



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106456778 A

(43)申请公布日 2017.02.22

(21)申请号 201580032338.8

S·霍普-克雷默

(22)申请日 2015.06.18

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038

(30)优先权数据

代理人 刘晓东

14172910.3 2014.06.18 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

(51)Int.Cl.

2016.12.16

A61K 45/06(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

A61K 38/57(2006.01)

PCT/EP2015/063760 2015.06.18

A61K 39/395(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

A61P 25/00(2006.01)

W02015/193457 EN 2015.12.23

A61K 31/573(2006.01)

(71)申请人 德国杰特贝林生物制品有限公司

地址 德国马尔堡

(72)发明人 C·克莱因施尼茨 M·诺尔特

A-L·西伦

权利要求书2页 说明书28页

C·阿尔贝特-魏森贝格尔

序列表9页 附图26页

(54)发明名称

在神经创伤性病患中使用因子XII抑制剂进行治疗

(57)摘要

本发明涉及直接因子XII(FXII)抑制剂在神经创伤性病患的治疗中的用途,其中所述的神经创伤性病患是由脑(外伤性脑损伤,TBI)或脊髓(脊髓损伤,SCI)的外伤性损伤导致的。

1. 一种在治疗神经创伤性病患中使用的因子XII (FXII) 的直接抑制剂, 其中所述的神

经创伤性病患是由脑(外伤性脑损伤)或脊髓(脊髓损伤)的外伤性损伤引起的, 其中所述的

FXII抑制剂并非C1酯酶抑制剂。

2. 一种根据权利要求1所使用的FXII抑制剂, 其中所述的FXII抑制剂包含:

(i) 野生型Infestin-4多肽序列 (SEQ ID NO:1), 或包含以下的多肽序列:

(a) SEQ ID NO:1经修饰而在SEQ ID NO:1的N-末端氨基酸位置2-13的外侧包含1-5个

氨基酸突变; 和/或

(b) 与SEQ ID NO:1具有至少70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%或99%的同源性, 并且

保留SEQ ID NO:1中的6个保守的半胱氨酸残基;

(ii) 野生型SPINK-1多肽序列 (SEQ ID NO:2), 或包含以下的多肽序列:

(a) SEQ ID NO:2经突变, 从而使用SEQ ID NO:1的N-末端氨基酸2-13替代其N-末端氨

基酸位置2-13; 并且可任选地进一步修饰从而包含1-5个其他的氨基酸突变, 这些突变增加了

所述的多肽序列与SEQ ID NO:1序列的同源性; 和/或

(b) 与SEQ ID NO:2具有至少70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%或99%的同源性, 并且

保留SEQ ID NO:2中的6个保守的半胱氨酸残基;

(iii) SPINK-1突变体K1, K2或K3 (SEQ ID NO:3, 4或5) 之一; 和/或

(iv) 抗FXII抗体。

3. 一种根据权利要求2所使用的FXII抑制剂, 其中所述的抗FXII抗体包含:

(i) (a) VH区, 其包含在SEQ ID NO:8中列出的重链CDR1, 在SEQ ID NO:10中列出的重链

CDR2, 和在SEQ ID NO:12中列出的重链CDR3; 和/或

(b) VL区, 其包含在SEQ ID NO:13中列出的轻链CDR1, 在SEQ ID NO:14中列出的轻链

CDR2, 和在SEQ ID NO:16中列出的轻链CDR3;

或者

(ii) (a) VH区, 其包含在SEQ ID NO:8中列出的重链CDR1, 在SEQ ID NO:9中列出的重链

CDR2, 和在SEQ ID NO:11中列出的重链CDR3; 和/或

(b) VL区, 其包含在SEQ ID NO:13中列出的轻链CDR1, 在SEQ ID NO:14中列出的轻链

CDR2, 和在SEQ ID NO:15中列出的轻链CDR3;

或者

(iii) 包含SEQ ID NO:6的VH区和包含SEQ ID NO:7的VL区。

4. 根据权利要求2-3中任意一项所述的FXII抑制剂, 其中所述的抗FXII抗体为IgG抗

体。

5. 根据权利要求1-4中任意一项所使用的FXII抑制剂, 其中所述的至少一种FXII抑制

剂与包含PEG或延长半衰期的多肽的融合伴侣连接, 其中所述的延长半衰期的多肽选自白

蛋白, 甲清蛋白, 甲胎蛋白, 维生素D结合蛋白质, 人类白蛋白, 免疫球蛋白, 以及IgG的Fc。

6. 根据权利要求5所述的所使用的FXII抑制剂, 其中所述的延长半衰期的多肽通过连

接子与所述的FXII抑制剂连接。

7. 根据权利要求5-6的任意一项所述的所使用的FXII抑制剂, 其中所述的FXII抑制剂

为融合蛋白质, 其包含通过连接子肽与FXII抑制剂连接的人类白蛋白。

8. 根据权利要求1-7的任意一项所述的所使用的FXII抑制剂, 其中所述的FXII抑制剂

通过静脉内、皮下或鞘内施用。

9. 根据权利要求1-8的任意一项所述的所使用的FXII抑制剂,其中所述的FXII抑制剂以以下方式施用:(i) 作为注射或输注液以单一剂量;(ii) 多个剂量,均作为注射或输注液;或(iii) 作为连续输注液或应用。

10. 根据权利要求1-9的任意一项所述的所使用的FXII抑制剂,其中所述的FXII抑制剂以大约0.01至大约1000mg/kg体重、或者优选为大约1至大约500mg/kg的浓度施用。

11. 根据权利要求1-10的任意一项所述的所使用的FXII抑制剂,其中所述的FXII抑制剂在所述的外伤性损伤后施用。

12. 根据权利要求11所述的所使用的FXII抑制剂,其中在所述的外伤损伤后立即进行所述的FXII抑制剂的第一次施用,或者在所述的外伤损伤后至多24小时、优选为至多12小时、更优选为至多6小时进行所述的FXII抑制剂的第一次施用。

13. 根据权利要求1-12的任意一项所述的所使用的FXII抑制剂,其中所述的FXII抑制剂施用至少1次、至少2次、至少3次、至少4次或至少5次。

14. 一种用于治疗神经创伤性病患的试剂盒,其中所述的神经创伤性病患选自脊髓损伤和外伤性脑损伤,所述的试剂盒包含:

(a) 至少一种直接FXII抑制剂;

(b) 在神经创伤性病患的治疗中使用所述的试剂盒的说明书,其中所述的神经创伤性病患是由脑(外伤性脑损伤)或脊髓(脊髓损伤)的外伤性损伤导致的;以及

(c) 可任选地,至少一种其他的治疗活性化合物或药品;

其中所述的FXII抑制剂和所述的其他的的治疗活性化合物或药品均不是C1酯酶抑制剂。

15. 根据权利要求14所述的试剂盒,其中所述的其他的的治疗活性化合物或药品为类固醇,特别是可的松。

在神经创伤性病患中使用因子XII抑制剂进行治疗

[0001] 本申请涉及直接因子II (FXII) 抑制剂在治疗神经创伤性病患中的用途,其中所述的神经创伤性病患选自脊髓损伤(SCI) 和外伤性脑损伤(TBI)。

[0002] 对于凝血,存在两条会聚的凝血途径,它们是由血管系统的“外部”(血管壁)或“内部”(血源性)成分引发的。在与高分子量的激肽原和血浆激肽释放酶有关的反应中,当因子XII (FIXX,接触因子)与带负电荷的表面接触时,引发“固有的”或接触的激活途径。因子XII为丝氨酸蛋白酶,并且其一旦被激活(FXIIa),便在正反馈反应中进一步激活循环FXII(直接或者通过激肽释放酶原的激活)。FXIIa还激活因子XI,并且在与其他因子激活有关的反应级联中,在凝血酶生成结束时通过有限的蛋白质水解进行凝血,这将血浆纤维蛋白原转变成纤维蛋白,并激活血小板。

[0003] 血管舒缓素-激肽系统(KKS)也由凝血因子XII (FXII,接触因子)引发,并且在血管渗透性和水肿形成的调节中起着重要作用(Leeb-Lundberg et al. (2005) Pharmacol.Rev.;571:27-77)。近来,在中风患者中也证明了KKS的激活(Wagner et al. (2002) J.Neurol.Sci.;202:75-76)。激肽(例如缓激肽,胰激肽)构成了KKS的最终产物。激肽是高度活性的促炎肽激素,其在多种组织损伤(包括脑缺血)中通过激肽释放酶由它们的前体(激肽原)释放。激肽的细胞作用是由两种不同的缓激肽受体B1R和B2R介导的。在靶器官中,这些受体的激活引发了炎症过程(例如促炎细胞因子的释放或免疫细胞的吸引)以及增加的血管渗透性。

[0004] 外伤性脑损伤(TBI)是毁灭性的神经性状况,可以被定义为颅骨内脑的快速移动或者由于外伤性事件对脑和/或神经根造成的直接损伤而导致的脑损伤,从而造成脑组织/神经根的直接机械损伤和延迟的病理学事件。这是一种异质性病患,在脑损伤、脑损伤的分布和损伤的机制方面都存在变化。外伤性事件通常由交通或运动事故造成,其是青少年和年轻男性中死亡和残疾的主要原因(Tagliaferri et al.,2006,Acta Neurochir(Wien),148(3):255-68)。TBI占有所有创伤的大约20%,疾病相关的花费极高(在2000年,在美国为\$600亿)。此外,TBI的治疗选择极其有限(Faul et al.,2007,Journal of Trauma-Injury Infection&Critical Care,63(6),1271-8;Steudel et al.,2005,Acta Neurochir(Wien),147(3):231-42);目前,治疗严重的TBI的唯一有效的方法是防止其发生。尽管多个II期临床试验已经显示治疗化合物的有利作用(Narayan et al.,2002,J Neurotrauma,19(5):503-57),但是不幸地,所有的化合物在III期试验中都不能清楚地显示效力(Doppenberg et al.,2004,Neurosurg Anesthesiol.,16(1):87-94)。尽管许多临床试验都尝试找到安全有效的神经保护剂,但是均以失败告终(Kabadi et al.,2014,International journal of molecular sciences 15:1216-1236;Menon et al.,2015, Nature reviews Neurology 11:71-72)。

[0005] 由于外力引起的原发性脑损伤导致脑组织的不可逆的机械破坏。结果,继发性损伤过程促进了外伤性脑损伤的恶化。原发性脑组织损伤可以是弥漫或集中的,而损伤的环境决定了弥漫性和集中性创伤发展的相对程度。尽管集中的创伤与脑组织挫伤、血管损伤和大出血(伴有缺血)有关,但是弥漫性脑损伤的特征在于弥散性轴索损伤。造成这种脑损

伤的主要成因是炎症,代谢紊乱和脑血管功能障碍,其进一步放大了损伤诱导的组织缺血和由于血脑屏障(BBB)破坏而导致的脑水肿(Schlosberg et al.(2010) Nat Rev Neurol.; 6:393-403;Donkin and Vink(2010) Curr.Opinion in Neurol.;23:293-299)。

[0006] 除了良好表征的损伤过程(例如兴奋性中毒、炎症和血脑屏障损伤)以外,脑微循环中血栓的形式可能通过引起挫伤周围缺血和减少局部脑血流量而促成继发性脑损伤(Schwarzmaier et al.,2010,J Neurotrauma 27:121-130)。在临床TBI中,脑内血管闭塞及随后的缺血使结果恶化(Stein et al.,2002,J Neurosurg 97:1373-1377;Stein et al.,2004,Neurosurgery 54:687-691;Harhangi et al.,2008,Acta Neurochir(Wien) 150:165-175;Maegele,2013,Transfusion 53 Suppl 1:28S-37S)。然而,在TBI患者中传统抗凝血剂的潜在应用存在争议。一些研究支持在TBI后进行抗凝治疗能够通过降低血栓栓塞事件的风险(Dudley et al.,2010,J Neurotrauma 27:2165-2172;Albrecht et al.,2014,JAMA internal medicine 174:1244-1251)并改善结果参数(Stutzmann et al.,2002,CNS Drug Rev 8:1-30;Kim et al.,2014,J Emerg Trauma Shock 7:141-148)而获得净的有利的效果,而其他的研究则报告,抗凝作用会导致通常在TBI后还发生的颅内出血的风险增加,因而是有害的(Peck et al.,2014,The journal of trauma and acute care surgery 76:431-436)。

[0007] 血管舒缓素-激肽系统(KKS)涉及多种病理学状态(Leeb-Lundberg et al.(2005) Pharmacol.Rev.;571:27-77),并且在TBI中代表了引人注意的治疗靶标。由激肽释放肽释放的激肽为促炎肽,其通过激活两种G蛋白偶联受体(GPCR,激肽受体B1(B1R)和B2(B2R))而介导它们的作用(Leeb-Lundberg et al.,2005,Pharmacol.Rev.;571:27-77;(Albert-Weissenberger et al.(2013)Progr.Neurobiol.;101-102:65-82)。在损伤后,激肽在调节不同器官中血管渗透性、水肿形成、跨内皮细胞迁移和炎症中起重要作用(Leeb-Lundberg et al.,2005,Pharmacol.Rev.;571:27-77)。此外,KKS通过因子XII(FXII,接触因子)与血浆凝血级联相联系。已经鉴定了啮齿动物和人脑中KKS的所有构成成分(Albert-Weissenberger et al.(2013)Progr.Neurobiol.;101-102:65-82),它们的表达在脑损伤后被上调(Ongali et al.(2006)J.Neurotrauma 23,696-707;Raslan et al.,(2010)J.Cereb.Blood Flow Metab.30,1477-1486;Trabold et al.(2010),J.Cereb.Blood Flow Metab.30,130-139。最近报导,在小鼠中,阻断B1R,但不阻断B2R在局部脑缺血(Austinat et al.(2009)Stroke;40:285-293)和外伤性脑损伤(Albert-Weissenberger et al.(2012)J.Cereb.Blood Flow Metab.;32:1747-56;Raslan et al.(2010)J.Cereb.Blood Flow Metab.;30:1477-1486)的试验模型中减少了血脑屏障损伤和水肿形成,表明在缺血性脑卒中和外伤性脑损伤的急性阶段KKS对脑水肿形成的功能相关性(Albert-Weissenberger et al.(2013)Progr.Neurobiol.;101-102:65-82)。

[0008] 在通过抑制FXII(其在与带负电表面接触时被生理激活(接触激活))来防止KKS激活的研究中,研究了在急性试验性中风后的神经病理学结果(Hagedorn et al.(2010)Circulation;121:1510-1517;Kleinschnitz et al.(2006)JEM;203(3):513)。

[0009] WO 2006/066878首次一般性公开了FXII抑制剂在治疗或预防静脉或动脉血栓症中的用途,其与异常出血无关(止血)。

[0010] Hagedorn et al.((2010)Circulation;121:1510-1517)公开了通过重组人类白

蛋白Infestin-4(一种FXII抑制剂)治疗和预防动脉阻塞性血栓形成,同时使止血完全完整。此外,rHA-Infestin-4在缺血性中风的鼠模型中是保护性的。

[0011] EP 2 623 110 A1公开了利用FXII抑制剂治疗神经学炎症病患。尽管“神经学炎症病患”是指脑或脊髓的一个或多个区域的炎症的状况,该病患与外伤性脑损伤或脊髓损伤无关。

[0012] WO 2014/135694(于2014年9月12日公开)公开了利用选自C1酯酶抑制剂、激肽释放酶抑制剂和FXII抑制剂的接触激活系统治疗和/或预防远端缺血-再灌注损伤(IRI)。尽管此类远端IRI可能包括血脑屏障的破坏,但是所提及的疾病和作用(脑水肿、中风、颅内压增高和神经组织炎症)、以及远端IRI本身并非明确地与外伤性脑损伤或脊髓损伤有关。

[0013] WO 2011/069090公开了通过施用磷脂酰丝氨酸结合剂(即,FXII激活剂的抑制剂)治疗与FXII激活有关的疾病或状况。其中提到FXII激活的抑制可以用于例如预防和治疗由例如脊髓外伤引起的(神经性)休克。尽管WO 2011/069090还简短地提及磷脂酰丝氨酸结合剂可以与抗FXII抗体结合,但是直接FXII抑制剂(单独或组合)在脊髓外伤或外伤性脑损伤中的效力未被证实。

[0014] 综上,尽管本领域公开了FXII抑制剂在特定的血栓形成指征、炎症疾病或神经状况中的应用,但是,这些文件均不涉及具有与神经创伤性病患有关的病理机制的疾病。此外,现有技术中还没有外伤性脑损伤的具体的治疗干预方法,特别是考虑到抗凝治疗在TBI患者中存有争议,迫切需要鉴定出创新性的基于病理机制的概念,以用于有效治疗。

[0015] 因此,在外伤性脑损伤中,显而易见的是仍需要用于治疗外伤性脑损伤的改善的药剂。因此,本发明的目的是满足这种需要。因此,本发明的技术问题是提供成功地靶向外伤性脑损伤的备选的和/或改善的手段和方法,其构成了基础,或者可以允许研发用于治疗外伤性脑损伤的更令人满意的治疗方法。

[0016] 该技术问题的解决方法由权利要求中表征的实施方案提供。

[0017] 因此,本发明公开了治疗方法,其包括至少一种直接因子XII抑制剂(FXII抑制剂)在治疗神经创伤性病患中的用途。所述的神经创伤性病患是由中枢神经系统的外伤性损伤导致的,可以选自脊髓损伤和外伤性脑损伤,治疗方法可以包括施用有效量的至少一种FXII抑制剂(例如rHA-Infestin-4或抗FXII抗体)。

[0018] 换言之,本发明人发现,在中枢神经系统的最初的外伤性损伤后发生的外伤性脑损伤或脊髓损伤(特别是外伤性水肿)可以通过施用直接FXII抑制剂来治疗和/或预防。因此,本发明总体涉及在受试对象中治疗外伤性损伤和/或治疗或预防中枢神经系统(CNS)的原发性水肿的形成和/或减少原发性水肿的大小的方法中使用直接FXII抑制剂,其中所述的受试对象(优选为人类受试对象)患有或者已经患有选自外伤性脑损伤和脊髓损伤中的至少一种病患。

[0019] 本发明人发现,使用直接FXII抑制剂对FXII的药理学抑制会减少外伤性脑损伤后外伤诱导的微血管血栓形成,并改善功能结果(例如更好的运动功能、减小的脑损伤体积和降低的神经退行性疾病),而不会增加异常脑内出血的风险。

[0020] 在一些实施方案中,所述的至少一种FXII抑制剂可以包含野生型Infestin-4多肽序列(SEQ ID NO:1),或者Infestin-4序列,该序列具有位于SEQ ID NO:1的N-末端氨基酸位置2-13外侧的1-5个氨基酸突变,和/或与SEQ ID NO:1具有至少70%,80%,85%,90%,

95%, 98%或99%的同源性,并保留SEQ ID NO:1的6个保守的半胱氨酸残基。在一些实施方案中,所述至少一种FXII抑制剂可以包含野生型SPINK-1多肽序列(SEQ ID NO:2),或者这样的野生型SPINK-1多肽序列,其中N-末端氨基酸位置2-13被SEQ ID NO:1的N-末端氨基酸替换;并且所述的序列可任选地进一步修饰成包含增加多肽序列与序列SEQ ID NO:1的同源性的1-5个其他的氨基酸突变,和/或与SEQ ID NO:2具有至少70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%或99%的同源性,并保持SEQ ID NO:2的6个保守的半胱氨酸残基。在某些实施方案中,所述的至少一种FXII抑制剂可以包含抗FXII抗体。在一些实施方案中,所述的至少一种FXII抑制剂可以直接或通过连接子与融合伴侣(例如延长半衰期的多肽)连接。在一些实施方案中,所述的FXII抑制剂对FXII、FXIIa和/或FXII的激活具有特异性。

[0021] 在多个实施方案中,在患者的神经损伤后或者在患者发展了神经创伤性病患后立即施用所述的FXII抑制剂,或者预防性地施用FXII抑制剂。FXII抑制剂可以单次施用或多次施用(例如作为重复的预防性治疗,或者作为在导致神经创伤性病患的外伤性损伤过程中或之后的重复治疗)。

[0022] 在一些实施方案中,提供了一种试剂盒,其包含至少一种FXII抑制剂,在神经创伤性病患的治疗中使用所述试剂盒的说明书,以及可任选地至少一种其他的治疗活性化合物或药品,其中所述的其他的的治疗活性化合物并非C1抑制剂。

[0023] 附图简述

[0024] 图1示出分别与NaCl处理的或WT对照相比,在外伤诱导后24h,在rHA-Infestin-4处理的野生型(WT)小鼠或FXII^{-/-}小鼠中减小的损伤大小。针对它们的损伤体积来分析由雄鼠和雌鼠获得的脑切片的TTC染色。FXII缺陷或抑制会减小外伤性诱导后24h的损伤大小。

[0025] 图2示出与WT对照相比,在FXII^{-/-}小鼠中,外伤诱导后24h时血脑屏障(BBB)完整性的保留。在损伤的大脑半球中通过光度测定法测定Evans Blue渗出的程度、以及作为损伤的大脑半球中脑水肿量度的脑水含量来分析BBB的完整性。

[0026] 图3示出与NaCl处理的对照相比,在rHA-Infestin-4处理的小鼠中,在外伤诱导后24h时血脑屏障(BBB)完整性的保留。在损伤的大脑半球中通过光度测定法测定的Evans Blue渗出的程度和BBB结构蛋白质封闭蛋白的相对蛋白质表达来分析BBB的完整性。脑水含量为损伤的大脑半球中脑水肿的量度。

[0027] 图4示出在外伤诱导后24h,血栓形成和受到抑制的血栓形成过程的减少。通过Western印迹来分析纤维蛋白/纤维蛋白原的相对蛋白质表达,显示与WT对照相比,表达在FXII^{-/-}小鼠中减少。通过对脑组织进行H&E染色,组织学分析在损伤的大脑半球中阻塞的血管与开放的血管的比例,发现与NaCl处理的对照相比,在rHA-Infestin-4处理的小鼠中,阻塞的血管与开放的血管的比例减少。

[0028] 图5示出FXII^{-/-}小鼠中在外伤诱导后24h时免于炎症过程的保护。使用免疫组织化学染色来分析渗透至损伤的大脑半球中的巨噬细胞的定量;与WT对照和假手术的小鼠相比,测量FXII^{-/-}小鼠中促炎细胞因子TNF α 和白细胞介素-1 β 的相对基因表达。

[0029] 图6示出在外伤诱导后24h,经rHA-Infestin-4处理的动物中炎症过程受到抑制。测量与经NaCl处理的和假手术的小鼠相比,经rHA-Infestin-4处理的小鼠中促炎细胞因子TNF α 和白细胞介素-1 β 的相对基因表达。

[0030] 图7示出在外伤诱导后3d,与WT对照相比,FXII^{-/-}小鼠中损伤大小的减小。测量TTC

染色的脑切片中损伤体积,显示在雄性和雌性FXII^{-/-}小鼠中均有免于组织损伤的保护。

[0031] 图8示出与WT对照相比,在FXII^{-/-}小鼠中外伤诱导后3d血脑屏障(BBB)损伤的减少。由损伤的大脑半球中通过光度测定法测定的Evans Blue渗出程度来分析BBB的完整性。

[0032] 图9示出作为外伤性脑损伤的病理特征的脑内血小板聚集和血栓症(在重物坠落损伤和低温损伤后)。

[0033] 图10示出在FXII^{-/-}小鼠中在重物坠落损伤后第7天的脑内血小板聚集的减少。

[0034] 图11示出在低温损伤FXII^{-/-}小鼠后第1天和第3天的脑内血小板聚集的减少。

[0035] 图12示出FXII缺陷在重物坠落损伤后的结果中的改善作用,其中在弥漫性脑外伤后的第3天和第7天,与野生型小鼠和使用人类FXII再构建的FXII^{-/-}小鼠相比,FXII^{-/-}小鼠显示显著更低的神经严重性得分。

[0036] 图13示出FXII缺陷在低温损伤后的结果中的改善作用,其中所述的FXII^{-/-}小鼠显示比WT小鼠明显更少的损伤体积,并且与WT对照相比,FXII^{-/-}小鼠中凋亡神经元的数量显著减少。

[0037] 图14示出在重物坠落脑外伤后,通过rHA-Infestin-4对FXII的药理学抑制,脑内血小板聚集的减少和结果的改善。

[0038] 图15示出通过rHA-Infestin-4对FXII的药理学抑制,脑内血小板聚集的减少和免于局灶性脑外伤的保护。

[0039] 图16示出FXII的遗传缺乏和药理学抑制在低温损伤后不会导致出血。

[0040] 图17示出在损伤诱导后24小时和3天时免疫细胞浸润的减少。某些实施方案的详细描述

[0041] 本申请的实施方案涉及多种方法,包括向患者施用直接因子XII (FXII) 抑制剂以治疗选自脊髓损伤和外伤性脑损伤中的神经创伤性病患。在一些实施方案中,该治疗方法可以与构成治疗疾病(例如血栓炎症,细胞毒性和血管源性脑水肿,由于血管痉挛和微血栓形成而导致的微血管灌注不足,对微血管内皮和血脑屏障成分的损伤)的病理生理学基础的多种途径相互影响,从而潜在地为更广泛的患者群体提供比现有技术的治疗方法更有效的治疗。

[0042] 定义

[0043] 在本申请中,除非另外特意陈述,否则单数的使用(例如“a”或“the”)包括复数含义。此外在本申请中,除非另外陈述,否则“或”的使用是指“和/或”。此外,术语“包含”以及其他形式(例如“包括”和“具有”)的使用没有限定。本文所述的任何范围都应该理解为包括端值和端值之间的所有值。

[0044] 各部分的标题仅是为了组织,不应该解释为限定所述的主题。就任何目的而言,本申请中所引用的所有文件或文件的一部分(包括但不限于专利、专利申请、文章、书籍和论文)均以引用方式全文明确地并入本文。如果以引用方式并入的出版物以及专利或专利申请与本说明书中包含的本发明相矛盾,则以本说明书为准。

[0045] 如本文所用,“FXII抑制剂”是指因子XII(在激活前,即其酶原)和/或激活的因子XII (FXIIa)、以及FXII激活过程的抑制剂。FXII抑制剂涵盖野生型抑制剂的功能变体和片段。功能变体或片段为保留野生型分子抑制FXII、FXIIa或FXII激活的能力的至少50%(例如50,60,70,80,90,95,99,100%或它们之间的任何百分数)的分子。

[0046] 如本文所用,术语“直接FXII抑制剂”是指通过与FXII(或FXIIa)接触(例如结合)而起作用的抑制剂,即FXII抑制剂与FXII和/或FXIIa结合,并抑制其活性和/或激活。相反,间接抑制剂可以在不与FXII(FXIIa)蛋白质接触的条件下起作用。例如反义RNA可以用于降低FXII基因的表达,或者小分子可以通过与下游FXIIa反应伴侣(例如因子XI)相互作用而抑制FXIIa的作用;它们均不与FXII蛋白质直接相互作用。因此,与直接抑制剂相反,间接抑制剂在FXII蛋白质的上游或下游起作用。直接抑制剂的一些实例在下文中示出。在一些实施方案中,FXII抑制剂为非内源性的抑制剂;即它们不是在人类或动物体中天然发生的抑制剂。在一些实施方案中,FXII抑制剂特异于FXII或FXIIa,特别是特异于人类FXII或FXIIa,如下文所讨论的。

[0047] 如本文所用,“神经创伤性病患”是指中枢神经系统(CNS)的外伤性损伤,选自脊髓损伤和外伤性脑损伤。优选地,神经创伤性病患为原发性外伤性脑水肿,其为在初始损害过程中或者在损害后短时间内或立即(即在几分钟内)发生的水肿。因此,神经创伤性病患或CNS水肿是指任何直接的脑或脊髓肿胀,即在初始损伤后立即发生的肿胀。其最初为在损伤的血脑屏障上水扩散增加而导致的血管性水肿,但是后来还包括损伤的脑细胞的异常水吸收而导致的细胞毒性水肿。神经创伤性病患进一步涉及直接神经损伤(凋亡,轴突损伤),由微血管损伤引起的局部脑组织能量缺陷,以及在损害后立即发生、持续几天至几个月的血栓炎症过程。

[0048] 优选地,根据本发明的神经学病患最初在初始损伤(即,在外力损伤CNS时)后的几个小时内发生,并且可以持续几周。在一些实施方案中,CNS的神经学病患是在初始损害后的30分钟内或者在1,2,3,4,5,6,12或24h内出现,或者在它们之间的任何时间出现。

[0049] 优选地,根据本发明的神经外伤性病患最初在初始损伤(即,在外力损伤CNS时)后的几个小时内发生,并且可以持续几周。在一些实施方案中,CNS的神经外伤性病患是在初始损害后的30分钟内或者在1,2,3,4,5,6,12或24h内出现,或者在它们之间的任何时间出现。

[0050] 术语“外伤性脑损伤”(“TBI”)是指由于外伤性事件由脑在颅骨内的快速移动而导致的脑损伤,从而引起脑组织的立即机械破坏和延迟的致病事件。这是一种异质性病患,在脑损伤的类型、脑损伤的分布和损伤的机制方面可以改变。TBI的一个经常出现的症状为外伤性脑水肿。外伤性事件通常是由交通或运动事故导致的。

[0051] 如本文所用,术语“脊髓损伤”(SCI)是指由外伤而不是疾病所导致的脊髓的任何损伤。根据脊髓和神经根受损伤的位置,症状可以由疼痛、到瘫痪、再到失禁而广泛改变。脊髓损伤在多个“不完整”的水平下进行了描述,其可以由对患者无作用至“完全”损伤之间变化,后者意味着神经/器官功能的全部丧失。通常,脊髓损伤与脊髓水肿有关。脊髓损伤具有多种原因,但是通常与由例如汽车事故、跌倒、运动损伤和暴力导致的主要外伤有关。

[0052] 术语“外伤性脑水肿”或“脑水肿”是指脑的任何受伤后肿胀,即,在CNS的初始损伤后短时间内发生的肿胀。术语“外伤性脊髓水肿”或“脊髓水肿”是指脊髓的任何损伤后肿胀,即在初始受伤后短时间内发生的肿胀。

[0053] 如本文所用,“治疗”涵盖预防、抑制、消除、延迟发作、减缓、减轻、降低严重性或改善病患或疾病的至少一种迹象、症状或方面。治疗不需要症状的完全消除,因为其涵盖但是不等同于“治愈”。在一些实施方案中,可以治疗患者以预防病患,其是指向已知处于发展成

神经创伤性病患(选自脊髓损伤和外伤性脑损伤)风险之下的受试对象实施治疗方法。在一些实施方案中,“治疗”还可以包括改善病患或疾病的作用。术语“改善”和“改善作用”是指改良会产生一种或多种患者功能损伤的病患或疾病的一些方面。例如治疗外伤性脑损伤可以包括预防外伤性脑损伤,改善外伤性脑损伤的作用,或者降低外伤性脑损伤的严重性(例如通过神经功能或脑成像来测量)。

[0054] 如本文所用,“患者”为患有、已经患有、或者有可能发展成神经创伤性病患(选自脊髓损伤和外伤性脑损伤),并且受益于FXII抑制剂的施用的任何人类或动物。FXII抑制剂的施用可以为将药物或治疗剂传递给患者的任何已知的方法,包括但不限于肠胃外施用(例如硬膜下、皮下、静脉内、动脉内、肌肉内、鞘内、鼻内、气管内、吸入和/或腹膜内注射),口服和/或直肠施用,以及通过灌注、喷雾施加和/或输注技术施用。在某些实施方案中,所述的施用可以静脉内、皮下或鞘内施用。

[0055] 如本文所用,“抗体”包括包含功能性抗原结合位点的任何多肽,包括免疫球蛋白和其抗原结合部分或片段。功能性抗原结合部分或片段为保留完整抗体结合和抑制抗原能力的至少50%(例如50,60,70,80,90,95,99,100%或者它们之间的任何百分率)的分子。术语抗体包括但不限于多克隆、单克隆、单特异性、多特异性、非特异性、人源化、完整人类、骆驼化、单链、嵌合、合成、重组、杂合、突变的、回复突变的和CDR接枝的抗体。所述的术语还包括抗体片段,例如Fab,F(ab')₂,Fv,scFv,Fd,dAb,VHH(也称为纳米抗体);以及保留抗原结合功能的其他抗体片段或变体,包括双特异性或多特异性抗体。抗体可以为任何同型的抗体,包括IgA,IgD,IgE,IgG和IgM。如本文所用,“抗原”为能够被抗体结合的靶分子。如本文所用,术语“抗原结合位点”是指能够结合抗原的一部分或全部或与或者与其互补的抗体分子的部分。

[0056] I. 神经创伤性病患

[0057] 在一些实施方案中,公开了FXII抑制剂,其可以用于治疗由中枢神经系统的外伤性损伤导致的神经创伤性病患(选自脊髓损伤和外伤性脑损伤)的方法中。所述的方法可以包括向有此需要的受试对象施用至少一种FXII抑制剂。因此,本发明还提供了一种或多种用于治疗由中枢神经系统的外伤性损伤导致的神经创伤性病患(选自脊髓损伤和外伤性脑损伤)的药物组合物,其在药物可接受的赋形剂或载体中包含至少一种FXII抑制剂。类似地,本发明还提供了一种或多种包含至少一种FXII抑制剂的组合物在制备用于治疗神经创伤性病患(选自脊髓损伤和外伤性脑损伤)的药剂中的用途。所述的至少一种FXII抑制剂可以单独使用,或者还可以施用其他的治疗化合物。

[0058] 使用本文公开的方法和组合物治疗的神经创伤性病患可以包括脊髓损伤(SCI)或外伤性脑损伤(TBI)。优选地,使用本文公开的方法和组合物治疗的神经创伤性病患为TBI。

[0059] 在外力创伤性地损伤脑时发生根据本发明的外伤性脑损伤(TBI)(也称为颅脑损伤)。可以根据严重性、机制(闭合性或穿透性头损伤)或其他特征(例如在特定的位置或者在广泛的区域上发生)将TBI分类,并且可以导致许多物理、认知、社交、感情和行为作用,而且结果可以为完全恢复至永久残疾或死亡。外伤性脑损伤可以定义为由机械外力导致的脑损伤,例如急加速或减速、冲击、冲击波或抛射物的穿透。脑功能短暂地或永久地受损,并且使用目前的技术可能检测到或检测不到结构损伤。

[0060] TBI的最普通的原因包括暴力、交通事故、建筑和运动事故。摩托车事故是主要原

因,因此越来越重要。在2至4岁的儿童中,跌倒是TBI的最常见的原因,而在更大的儿童中,交通事故赢得跌倒,成为TBI的最常见原因。TBI是虐待儿童所导致的第三个最普通的损伤。虐待占小儿脑外伤病例的19%,并且在这些病例中,死亡率更高。

[0061] 力的类型、方向、强度和持续时间均促成了TBI的特征和严重性。可以造成TBI的力包括角向力、旋转力、剪切力和平移力。即使缺乏冲击,头的明显的加速或减速也可以造成TBI;但是在大多数情况下原因很可能是冲击和加速的结合。涉及头部击打或头部被某物击打(称为接触或冲击载荷)的力是大多数局灶性损伤的原因,并且脑在颅内的移动(称为非接触或惯性载荷)通常导致弥漫性损伤。损伤可以直接发生在冲击位点之下,或者可以发生在冲击相对的一侧上。根据本发明的TBI可以由弥漫性损伤和/或局灶性损伤导致。

[0062] 可以预防性地实施使用至少一种FXII抑制剂的治疗,从而预防选自脊髓损伤和外伤性脑损伤中的神经创伤性病患。在大多数的情况下,治疗是在外伤性损伤后进行的,即在导致神经创伤性病患(选自脊髓损伤和外伤性脑损伤)的中枢神经系统外伤性损伤发生后立即或在某时间点时施用治疗。例如治疗可以在外力损伤中枢神经系统后首次直接施用治疗,或者至多大约1小时、或至多大约2小时、或甚至至多24小时、或甚至多达3天时施用治疗。

[0063] 在优选的实施方案中,治疗在神经创伤性病患初始发生后立即、或者初始发生后少于大约12小时开始。在一些实施方案中,至多大约30分钟、或至多大约1小时、至多大约2小时或者甚至至多大约24小时开始治疗。在一些实施方案中,在外力发生后立即,或者大约5,10,20,30,40或50分钟,或者1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23或24小时(或者它们之间的任何时间点)后施用,其中所述的外力创伤性地损伤脑或脊髓。在一些实施方案中,在初始损伤发生后尽可能早地施用治疗,优选地在损伤后少于1小时、少于6小时或者少于24小时进行。在一些实施方案中,治疗在初始损伤后不迟于大约24小时进行,或者在损伤后不迟于大约6小时,或者在损伤后不迟于大约1小时进行。

[0064] 在一些实施方案中,可以预防性地施用至少一种FXII抑制剂,从而预防处于神经创伤性病患风险之下的患者的初始损伤。预防性治疗可以单次剂量进行或重复剂量进行。可以在一组持续时间内施用周期性的剂量,例如在治疗过程的持续时间内。

[0065] 在一些实施方案中,可以重复性地施用至少一种FXII抑制剂,从而例如治疗处于神经创伤性病患风险之下的患者,或者以更有效的方式治疗患者。此类治疗可以多个剂量进行,例如以重复的方式以2、3、4、5或更多的剂量,例如每1小时一剂,每2小时一剂,每4小时一剂,每6小时一剂,每12小时一剂,或者它们之间的任何时间周期。

[0066] 至少一种FXII抑制剂的施用(例如向需要治疗的受试对象施用)可以以单一剂量或以重复施用的方式,以多种生理学可接受的盐形式和/或可接受的药物载体和/或作为药物组合物一部分的添加剂的形式中的任意一种进行。因此,在某些实施方案中,按照以下方式施用所述的至少一种FXII抑制剂:(i)一次,均作为分开的注射或输注,或者在单一的组合注射或输注中;(ii)多剂,例如以2、3、4、5或更多剂,各作为注射或输注;或者(iii)作为输注或应用。输注/应用可以在一段时间内施用,优选在1分钟至24小时的时间内,或10分钟至12小时,或10分钟至6小时,或10分钟至5小时,或10分钟至4小时,或10分钟至3小时,或10分钟至2小时,或10分钟至1小时(或者它们之间的任意的时间段)。所述的施用可以在损伤后直至神经创伤性损伤的症状消失后以重复方式进行,即,至少一种FXII抑制剂的施用可

以重复施用的方式进行几天至几个月(例如1天、2天、3天、4天、5天、6天、1周、2周、4周、2个月)。

[0067] 可以施用患者治疗有效量的包含至少一种FXII抑制剂的组合物。通常,治疗有效量可以根据受试对象的年龄、一般状况和性别、以及受试对象的医疗状况的严重性而改变。所述的剂量可以由医生确定,并且根据需要调节以适合所观察到的治疗的效果。

[0068] 所述至少一种FXII抑制剂的的治疗有效剂量可以取决于许多因素,例如确切的适应症、配方或施用方式,并且对于各个适应症,可以在临床前和临床试验中确定。例如在一个实施方案中,FXII抑制剂的剂量为大约0.01,0.1,1,50,100,200,500或1000mg/kg体重,或者它们之间的任何剂量;或者大约0.01-1000mg/kg,大约0.1-1000mg/kg,大约1-1000mg/kg,大约1-500mg/kg,大约10-200mg/kg,大约10-100mg/kg,大约50-500mg/kg,大约50-200mg/kg,大约100-200mg/kg,或者它们之间的任何剂量。在某些实施方案中,FXII抑制剂为rHA-Infestin-4。在一些实施方案中,当使用rHA-Infestin-4时,剂量可以为大约0.01至1000mg/kg体重,或者大约1至1000mg/kg,或者大约1至500mg/kg,或者大约50至500mg/kg(或者它们之间的任何剂量)。

[0069] 在一些实施方案中,FXII抑制剂可以为抗FXII抗体。在涉及抗FXII抗体的治疗有效剂量的那些实施方案中,治疗有效剂量为在需要治疗的患者或受试对象中产生大约积极治疗效果的剂量。治疗有效剂量可以为大约0.001至100mg/kg体重,大约0.01至100mg/kg,大约0.01至50mg/kg,大约0.1至30mg/kg,大约0.1至10mg/kg,大约0.1至5mg/kg,大约0.1至2mg/kg,大约0.1至1mg/kg,或它们之间的任何剂量范围。例如治疗有效剂量可以为将受试对象中的FXIIa活性抑制至少大约50%,或者至少60%,70%,80%,90%,95%,99%或100%(或它们之间的任何百分率)的剂量。

[0070] FXII抑制剂的确切的治疗有效剂量可以由本领域的技术人员通过常规试验确定,并且不涉及任何惊人的步骤。

[0071] 在某些实施方案中,所述的至少一种FXII抑制剂以使得神经创伤性病患的至少一种症状减轻的浓度施用。

[0072] 施用的药物组合物可以包含至少一种FXII抑制剂作为唯一的活性化合物,或者可以与一种或多种其他的化合物、组合物或生物材料组合传递。其他化合物的实例包括类固醇,特别是可的松。

[0073] 在一些实施方案中,使用至少一种FXII抑制剂对神经创伤性病患的治疗效果可以通过测量组织损伤和/或水肿的程度来监测。用于测量组织损伤程度的方法可以包括例如组织学、生物化学、比色法和免疫测试(Evans Blue渗出、TTC染色、Western印迹、炎症介物的RT-PCR)、神经功能的测量或脑成像(MRT,CT,PET)。在一些实施方案中,组织损伤导致神经功能丧失,这可以使用神经功能评估来测量(Neuroscore)。

[0074] 在所公开的方法的某些实施方案中,应该根据患者临床表现的已建立护理标准来治疗患者。

[0075] II. 因子XII抑制剂

[0076] 如上文所讨论的那样,术语“因子XII”和“FXII”均是指因子XII(例如肽的酶原或前体形式)和/或激活的因子XII(FXIIa)。因此,“FXII抑制剂”可以包括FXII和/或FXIIa(也称为 α FXIIa)以及FXII激活的抑制剂,包括FXIIa切割产物FXIIa α 和FXIIa β (也称为FXII β)。

此外,抗FXII抗体包括与FXII和/或FXIIa结合并抑制FXII和/或FXIIa的抗体。术语“FXII抑制剂”还指包括与延长半衰期的多肽连接的FXII抑制剂,其中所述的多肽在一些实施方案中包括连接子。可以使用的FXII抑制剂的实例包括rHA-Infestin-4, SPINK-1, 抗FXII抗体, 包括保留抑制FXII激活的能力的这些蛋白质的改性形式/片段。在一个实施方案中,FXII抑制剂为SPINK-1或改性的SPINK-1。在一个实施方案中,FXII抑制剂为Infestin-4、改性Infestin-4或抗FXII抗体。

[0077] FXII抑制剂是FXII的直接抑制剂。术语“直接”抑制剂是指通过接触(例如结合)与FXII(或FXIIa)相作用的抑制剂,即,FXII抑制剂与FXII和/或FXIIa结合,并抑制其活性和/或激活。相反,间接抑制剂可以不接触FXII(或FXIIa)蛋白质而起作用。例如反义RNA可以用于降低FXII基因的表达,或者小分子可以通过与下游FXIIa反应伴侣例如因子XI相互作用而抑制FXIIa的作用;它们不与FXII蛋白质直接相互作用。因此,与直接抑制剂相反,间接抑制剂在FXII蛋白质的上游或下游起作用。直接抑制剂的一些实例在下文中列出。在一些实施方案中,FXII抑制剂为非内源抑制剂;换言之,它们并非是在相应人类或动物体中天然形成的(内源的)抑制剂。在一些实施方案中,FXII抑制剂并非为象例如C1抑制剂的FXII抑制剂。

[0078] 在一个实施方案中,FXII抑制剂为特异性FXII抑制剂,优选为特异性FXIIa抑制剂。

[0079] 特异性FXII抑制剂是指如果以1:1的摩尔比使用时,对除FXII和/或FXIIa以外的血浆丝氨酸蛋白酶或其他内源蛋白质的抑制低于或等于25%的抑制剂。换言之,当特异性FXII/FXIIa抑制剂与并非FXII和/或FXIIa的血浆丝氨酸蛋白酶以1:1的摩尔比使用时,该特异性抑制剂抑制所述血浆丝氨酸蛋白酶的水平低于或等于25%。优选地,当所述FXII抑制剂以1:1的摩尔比使用时,该抑制剂抑制所述并非FXII和/或FXIIa的血浆丝氨酸蛋白酶水平低于或等于20%,优选为低于或等于15%,优选为低于或等于10%,优选为低于或等于5%,优选为低于或等于1%。例如特异性FXII mAb抑制所述血浆丝氨酸蛋白酶FXIIa仅5%,其中FXIIa与所述的mAb的摩尔比为1:1,而同一FXII mAb抑制FXIIa达到至少80%,优选为至少90%。

[0080] 在本发明的一个实施方案中,如果另一种血浆丝氨酸蛋白酶与所述的抑制剂以1:1的摩尔比使用时,所述血浆丝氨酸蛋白酶被抑制超过50%。

[0081] 在本发明的另一个实施方案中,如果两种另外的血浆丝氨酸蛋白酶与所述的抑制剂以1:1的摩尔比使用时,所述两种另外的血浆丝氨酸蛋白酶被抑制超过50%。

[0082] 在另一个实施方案中,FXII抑制剂为人类FXII抑制剂,包括人源化的单克隆抗体,优选为完全人单克隆抗体。

[0083] 如本文所用,“同源性”是指一致的或者构成保守性取代的氨基酸的百分数量。同源性可以使用序列比较程序测定,例如GAP (Deveraux et al., 1984, Nucleic Acids Research 12, 387-395), 该文献以引用方式并入本文。按照这种方式,与本文所述的那些序列相似的或大体上不同长度的序列可以通过将缺口插入至比对中来进行比较,所述的缺口可例如通过GAP使用的比较算法来测定。

[0084] 在一个实施方案中,施用的药物组合物包含FXII抑制剂作为唯一的活性物质,即,FXII抑制剂不与另一种活性剂组合使用。优选地,FXII抑制剂不与磷脂酰丝氨酸结合剂组

合使用,例如改性的膜联蛋白V组合物。

[0085] A.Infestin-4

[0086] 在一个实施方案中,本申请提供了包含infestin结构域4(称为“Infestin-4”)的FXII抑制剂。Infestin是一类由食血昆虫骚扰锥蝱(*Triatoma infestans*)的中肠(为寄生虫克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*)的主要载体,已知会导致美洲锥虫病)来源的丝氨酸蛋白酶抑制剂(Campos ITN et al.32 Insect Biochem.Mol.Bio.991-997,2002;Campos ITN et al.577 FEBS Lett.512-516,2004;WO 2008/098720)。该昆虫使用这些抑制剂来防止摄入血液发生凝血。Infestin基因编码4个结构域,得到在凝血途径中可以抑制不同因子的蛋白质。具体而言,结构域4编码FXIIa的强抑制剂的蛋白质(Infestin-4)。已经在小鼠中施用Infestin-4,未产生出血性并发症(WO 2008/098720;Hagedorn et al.,Circulation 2010;121:1510-17)。

[0087] 在多个实施方案中,FXII抑制剂包括Infestin-4。如本文所用,术语“Infestin-4”涵盖了野生型肽的保留抑制FXII能力的变体或片段。在一些实施方案中,因Infestin-4抑制FXIIa的能力而选用它。在某些实施方案中,Infestin-4包括Infestin-4的变体,其中所述的变体包含Infestin结构域4,并且可任选地,包含Infestin结构域1、2和/或3。在一个实施方案中,Infestin-4为(His)₆-标记的Infestin-4构建体。在另一个实施方案中,Infestin-4为融合蛋白质,其包含与Infestin-4结合的融合伴侣,例如延长半衰期的多肽(例如白蛋白,IgG的Fc结构域或PEG)。在一些实施方案中,连接子将融合伴侣与Infestin-4连接。在多个实施方案中,Infestin-4为Hagedorn et al.(Circulation 2010;117:1153-60)中所述的rHA-Infestin-4蛋白质。在一个实施方案中,组合物包含通过柔性连接子与Hagedorn et al.(Circulation 2010;117:1153-60)中所述的rHA-Infestin-4蛋白质结合的白蛋白。在某些实施方案中,使用FXII的其他Infestin-4抑制剂,其实例在WO 2008/098720和Hagedorn et al.(Circulation 2010;117:1153-60)中有所描述,这两份文件均以引用方式全文并入本文。

[0088] 野生型 Inf e s t i n - 4 序 列 的 实 例 在 S E Q I D N O : 1 : EVRNPCACFRNYVPVCGSDGKTYGNPCMLNCAAQTKVPGLKLVHEGRC中提供。

[0089] 如本文所用,术语Infestin-4的“变体”是指具有一个或多个氨基酸突变的多肽,其中“突变”被定义为取代、缺失或添加至野生型Infestin-4序列(SEQ ID NO:1)中。术语“Infestin-4”涵盖这些Infestin-4变体。术语Infestin-4的“变体”还包括野生型或突变的Infestin-4序列的变体。在多个实施方案中,野生型Infestin-4序列的一个或多个突变基本上不改变所述多肽抑制FXII的功能性能力。在一些实施方案中,所述一个或多个突变不会完全或大幅除去所述多肽抑制FXII的能力(例如所述的变体保留野生型Infestin-4抑制能力的至少大约20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%,95%,98%,99%或更高)。此类变体的其他实例在下文中提供。

[0090] 在一个实施方案中,Infestin-4变体包含得自野生型Infestin-4序列的氨基末端的氨基酸序列VRNPCACFRNYV(SEQ ID NO:20,其为SEQ ID NO:1的残基2-13)。在某些实施方案中,所述的变体包含SEQ ID NO:1的残基2-13,并且与野生型Infestin-4序列(SEQ ID NO:1的外侧残基2-13)相比,包含至少1个、任选地至多5个氨基酸突变。在一些实施方案中,变体保留了野生型Infestin-4序列的6个保守的半胱氨酸残基,和/或与野生型Infestin-4序列

的同源性为至少70%，至少75%，至少80%，至少85%，至少90%，至少95%，至少98%，或至少99%。在一些实施方案中，Infestin-4的变体包含野生型Infestin-4序列的保守的N-末端区域氨基酸2-13，以及这些保守的N-末端氨基酸外侧的至少1个、任选地至多5个氨基酸突变，从而与野生型Infestin-4序列具有差异。如本文所用，术语Infestin变体的“N-末端氨基酸外侧”是指沿着变体的多肽链，除包含SEQ ID NO:20序列：VRNPCACFRNYV的氨基酸毗邻段（即SEQ ID NO:1的氨基酸2-13）外的任何氨基酸。

[0091] 在另一个实施方案中，Infestin-4变体包含6个保守的半胱氨酸残基，和/或与野生型Infestin-4序列的同源性为至少70%，至少75%，至少80%，至少85%，至少90%，至少95%，至少98%，或至少99%。在一个实施方案中，这6个保守的半胱氨酸残基为野生型Infestin-4序列SEQ ID NO:1的位置6,8,16,27,31和48处的氨基酸。在一个实施方案中，变体包含位置48处的最后一个保守半胱氨酸。在其他的实施方案中，由于Infestin-4变体中的插入或缺失，半胱氨酸残基的确切位置和彼此的相对位置可能不同于野生型Infestin-4序列的位置6,8,16,27,31和48。然而，在这些实施方案中，Infestin-4变体均包含所有6个半胱氨酸和/或可以与野生型Infestin-4序列共有70%，75%，85%，90%，91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%或99%或者它们之间任意百分率的同源性。在一些实施方案中，Infestin-4变体保留SEQ ID NO:1的氨基酸2-13，以及所有6个半胱氨酸残基，并且可以与野生型Infestin-4序列共有70%，75%，85%，90%，91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%或99%或者它们之间任意百分率的同源性。

[0092] 在一些实施方案中，Infestin-4变体包含SEQ ID NO:21:DSLGREVRNPICA。在一些实施方案中，该序列被添加在片段或全长野生型Infestin-4序列的N-末端处或附近，所述的序列衍生自人类蛋白质SPINK-1。

[0093] 在一些实施方案中，Infestin-4变体包含野生型Infestin-4或变体Infestin-4与人类白蛋白之间的融合构建体（称为“HA”）。在一些实施方案中，HA为重组蛋白质（称为“rHA”）。在某些实施方案中，Infestin-4和HA蛋白质是直接连接的，或通过连接子多肽连接。

[0094] 在一个实施方案中，FXII抑制剂包含野生型Infestin-4多肽序列的变体，其中所述的变体包含SEQ ID NO:1的N-末端氨基酸2-13；位于所述N-末端氨基酸外侧的至少1个、任选地至多5个氨基酸突变；6个保守的半胱氨酸残基；和/或与野生型Infestin-4序列的同源性为至少70%，至少75%，至少80%，至少85%，至少90%，至少95%，至少98%，或至少99%。

[0095] 在多个实施方案中，提供了保留抑制FXII的能力的Infestin-4变体。这种功能性抑制活性可以例如通过体外和/或体内表征来评估，包括检验FXII酶活性的抑制的直接测试，延长的凝血时间（例如活化部分凝血活酶时间，aPTT），针对凝血内源性途径的临床凝集检验，或评价凝血的体内方法。

[0096] Infestin-4变体的其他实例为SPINK-1突变体，其在下文中描述。

[0097] B.SPINK-1突变体

[0098] 在多个实施方案中，所述至少一种FXII抑制剂可以包含与Infestin-4具有高度相似性的人类蛋白质。与Infestin-4具有高度相似性的人类蛋白质的一个实例为SPINK-1，其为在胰腺中表达的Kazal型丝氨酸蛋白酶抑制剂（也称为胰腺分泌型胰蛋白酶抑制剂，

PSTI)。Kazal型丝氨酸蛋白酶抑制剂家族是已知的丝氨酸蛋白酶抑制剂大家族的一员。已经描述了得自不同物种的许多相似的蛋白质(Laskowski M and Kato I, 49 Ann.Rev.Biochem.593-626, 1980)。

[0099] 野生型SPINK-1序列的实例在SEQ ID NO: 2DSLGREAKCYNELNGCTKIYDPVCGTDGNTYPNECVLCFENRKRQTSILIQKSGPC中提供。

[0100] 在多种实施方案中,野生型SPINK-1序列(例如SEQ ID NO:2)被用作FXII抑制剂。术语“SPINK-1”还涵盖SPINK-1的功能变体和片段,其基本保留了抑制FXII的能力,在一些实施方案中,这些SPINK-1变体被用作FXII抑制剂。例如可以生成这些野生型序列的不同变体从而增加SPINK-1序列与Infestin-4的同源性。在一个实施方案中,Infestin-4被突变成包含SEQ ID NO:1的N-末端氨基酸2-13。

[0101] 在一个实施方案中,变体SPINK-1包含野生型Infestin-4序列的N-末端部分(例如SEQ ID NO:1的氨基酸2-13),以及可任选地在N-末端氨基酸外侧、增加变体与野生型Infestin-4序列的同源性的至少1、2、3、4或5个其他的氨基酸突变。在另一个实施方案中,变体SPINK-1包含6个保守的半胱氨酸残基,并且与野生型SPINK-1序列具有至少70%,至少75%,至少80%,至少85%,至少90%,至少95%,至少98%,或至少99%的同源性,并且任选地被突变而增加所述的变体与野生型Infestin-4序列的同源性。在一些实施方案中,SPINK-1变体还包含野生型Infestin-4序列的N-末端部分(例如SEQ ID NO:1的氨基酸2-13)。突变可以包含取代、缺失和/或添加。“位于N-末端氨基酸的外侧”的突变是指沿着变体的多肽链,除包含SEQ ID NO:20序列:VRNPCACFRNYV的氨基酸毗邻段(即SEQ ID NO:1的氨基酸2-13)外的任何氨基酸。术语“变体”包含SPINK-1或突变的SPINK-1序列的片段。

[0102] 在一些实施方案中,SPINK-1的6个保守的半胱氨酸残基可以为野生型SPINK-1序列(例如SEQ ID NO:2)的位置9,16,24,35,38和56处的氨基酸。在一个实施方案中,所述的变体包含野生型SPINK-1序列的最后一个半胱氨酸(即,在SEQ ID NO:2的位置56处的半胱氨酸)。在一些实施方案中,这6个半胱氨酸未突变,但是由于在SPINK-1变体中其他处的插入和/或缺失,这些半胱氨酸的确切位置和彼此的相对位置可能不同于野生型SPINK-1序列的位置9,16,24,35,38和56。但是,在这些实施方案中,SPINK-1变体包含所有6个半胱氨酸。

[0103] 在一些实施方案中,SPINK-1的6个半胱氨酸未被突变,但是SPINK-1被突变成包含野生型Infestin-4序列的N-末端部分(例如SEQ ID NO:1的氨基酸2-13),和/或与野生型SPINK-1序列具有至少70%,至少75%,至少80%,至少85%,至少90%,至少95%,至少98%或至少99%的同源性,和/或包含在SPINK-1序列中、位于所述N-末端氨基酸外侧的1、2、3、4或5个突变。例如SPINK-1变体可以包含SEQ ID NO:1的N-末端氨基酸2-13;位于所述N-末端氨基酸外侧、增加变体与野生型Infestin-4序列的同源性的至少1个且至多5个氨基酸突变;来自野生型SPINK-1序列的6个保守的半胱氨酸残基;和/或与野生型SPINK-1序列具有至少70%,至少75%,至少80%,至少85%,至少90%,至少95%,至少98%或至少99%的同源性。

[0104] 在一些实施方案中,SPINK-1的变体基本保留了它们抑制FXII的能力(例如所述的变体保留野生型SPINK-1的抑制活性的至少大约20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%,95%,98%,99%或更高)。

[0105] 可用于本发明公开的方法中的SPINK-1变体的实例包括:

[0106] K1:DSLGREVRNPCACFRNYVPVCGTDGNTYPNECVLCFENRKRQTSILIQKSGPC;

[0107] K2:DSLGREVRNPCACFRNYVPVCGTDGNTYGNECMLCAENRKRQTSILIQKEGPC;以及

[0108] K3:DSLGREVRNPCACFRNYVPVCGTDGNTYGNECMLNCAENRKRQTSILIQKEGPC (分别为SEQ ID NOS:3,4和5)。

[0109] 在一些实施方案中,可以在N-末端的外侧相对于K1进行进一步的氨基酸取代,从而增加与Infestin-4的同源性。在SPINK-1变体K3的情况下,5个氨基酸取代增加了与Infestin-4的同源性。在某些实施方案中,SPINK-1变体可以与野生型SPINK-1序列共有70%,75%,80%,85%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99% (或者它们之间的任何百分率)的同源性。

[0110] C.FXII抗体

[0111] 在多个实施方案中,FXII抑制剂为与FXII和/或与FXIIa结合,并且抑制或降低FXII激活和/或活性的抗FXII抗体。术语“抗因子XII抗体”涵盖全长抗体及其功能片段(例如抗原结合片段,例如Fab,F(ab)₂,Fv和scFv)。所述的术语还涵盖多克隆和单克隆抗体,以及任何同型的抗体(例如IgM,IgD,IgA,IgG和IgE)及其任何亚类(例如IgG₁)。所述的抗体可以得自哺乳动物物种,例如人类、小鼠、大鼠、兔、山羊、仓鼠或猴。在一些实施方案中,所述的抗体可以是人源化的或CDR接枝的。在一些实施方案中,所述的抗体可以被突变或改性,从而改变免疫原性、半衰期,和/或赋予与治疗性抗体有关的其他有利的性质。在一个实施方案中,所述的抗体为与FXII重链或轻链上的表位(例如中和性表位)结合的抗FXII抗体。在一些实施方案中,所述的抗体可以与多肽、核酸或小分子缀合。“抗FXII抗体”还包括结合和/或抑制FXII的酶原和/或激活的蛋白质(FXIIa)、包括FXIIa α 和FXIIa β 切割片段的抗体。在一些实施方案中,所述的抗体特异性地结合FXIIa或者FXIIa的 α 或 β 链片段。

[0112] 在一些实施方案中,抗FXII抗体可以结合并抑制FXIIa激活和/或活性。例如在W0 2006/066878和Ravon et al.,Blood 86:4134-43 (1995)中已经描述了抗FXII抗体,其公开内容以引用方式全文并入本文。人类因子FXII的其他单克隆抗体(mAb)包括Pixley et al. (J Biol Chem 1987;262,10140-45)所述的B7C9 mAb;Small et al. (Blood 1985,65:202-10)所述的mAb;Nuijens et al. (J.Biol.Chem.1989;264:12941-49)所述的单克隆抗体F1和F3;在W089/11865中所述的针对FXII轻链的B6F5,C6B7和D2E10单克隆抗体;在W090/08835中所述的超过FXII而选择性地结合FXIIa- β 的单克隆抗体;以及在W091/17258中所述的抗FXII抗体OT-2,这些文献的公开内容以引用方式全文并入本文。

[0113] 其他的抗因子XII单克隆抗体在W0 2013/014092中有所描述,该文献以引用方式全文并入本文。在一些实施方案中,所述的抗体对人类因子XIIa- β 的结合亲和性可能是对非激活的人类FXII的结合亲合性的2倍以上,并且可能能够抑制人类因子XIIa的酰胺水解活性。

[0114] 表1.

[0115]

区域	氨基酸序列
VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYIMQWVRQAPGKGLEWVSGIR PSGGTTVYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARALPRSG YLISPHYYYYALDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 6)
VL	QSELTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGRNYVYVYQQVPGTAPKLLIYSN NQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLVISGLRSEDEADYYCAAWDASLRGVFGGGT KLTVLG (SEQ ID NO: 7)
HCDR 1 (Kabat 31-35)	KYIMQ (SEQ ID NO: 8)
HCDR 2 (Kabat 50-65)	GIRPSGGTTVYADSVKG (SEQ ID NO: 9)
HCDR 3 (Kabat 95-102)	ALPRSGYLISPHYYYYALDV (SEQ ID NO: 11)
LCDR 1 (Kabat 24-34)	SGSSSNIGRNYVY (SEQ ID NO: 13)
LCDR 2 (Kabat 50-56)	SNNQRPS (SEQ ID NO: 14)
LCDR 3 (Kabat 89-97)	AAWDASLRGV (SEQ ID NO: 15)

[0116] 在某些实施方案中,抗FXII抗体包含表1中提供的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)序列。在一些实施方案中,抗FXII抗体包含HCDR1,HCDR2和HCDR3,和/或包含表1所示的VCDR1,VCDR2和VCDR3。WO 2013/014092 A1中所述的抗体3F7为此类抗体的实例。

[0117] 在一些实施方案中,所述的抗体具有以下特征中的一个或多个:(a)结合人类FXII;(b)包含与SEQ ID NO:6序列超过85%相同,例如超过90%,95%,98%或99%相同的重链可变区(VH);(c)包含与SEQ ID NO:7序列超过85%相同,例如超过90%,95%,98%或99%相同的轻链可变区(VL)的;(d)包含与SEQ ID NO:8序列至少80%(例如超过85%,90%,95%,98%或99%)相同的重链CDR1,和/或与SEQ ID NO:9至少60%(例如超过70%,80%,85%,90%,95%,98%或99%)相同的重链CDR2,和/或与SEQ ID NO:11序列至少80%(例如超过85%,90%,95%,98%或99%)相同的重链CDR3;(e)包含与SEQ ID NO:13至少50%(例如超过60%,70%,80%,85%,90%,95%,98%或99%)相同的轻链CDR1,和/或与SEQ ID NO:14的轻链CDR2至少50%(例如超过60%,70%,80%,85%,90%,95%,98%或99%)相同的轻链CDR2,和/或与A-X₁-W-X₂-X₃-X₄-X₅-R-X₆-X₇(SEQ ID NO:16)(其中X₁可以为

A或S, X₅可以为L或V, 并且其他的X_n可以为任何氨基酸) 至少50% (例如超过60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%或99%) 相同的轻链CDR3; (f) 以K_d超过10⁻⁸M结合人类因子XIIa-β; (g) 与Infestin-4竞争结合人类因子XIIa-β; 或(h) 为人类IgG或其功能变体, 优选为人类IgG4或其功能变体。

[0118] 在某些实施方案中, 所述抗FXII抗体为结合人类FXII/FXIIa的IgG抗体, 并且包含: (a) 包含SEQ ID NO:8中列出的重链CDR1、SEQ ID NO:10中列出的重链CDR2和SEQ ID NO:12中列出的重链CDR3的VH区; 和/或(b) 包含SEQ ID NO:13中列出的轻链CDR1、SEQ ID NO:14中列出的轻链CDR2和SEQ ID NO:16中列出的轻链CDR3的VL区。重链CDR2可以包含序列GIX₁X₂X₃X₄X₅X₆TVYADSVKG (SEQ ID NO:10), 其中X₁为R、N或D; X₂为P, V, I或M; X₃为S, P或A; X₄为G, L, V或T; X₅可以为任何氨基酸, 优选地X₅为G, Y, Q, K, R, N或M; 并且X₆为T, G或S。重链CDR3可以包含序列ALPRSGYLX₁X₂X₃X₄YYYALDV (SEQ ID NO:12), 其中X₁为I, M或V; X₂为S或K; X₃为P, K, T或H; 以及X₄为H, N, G或Q。轻链CDR3可以包含序列AX₁WX₂X₃X₄X₅RX₆X₇ (SEQ ID NO:16), 其中X₁为A或S; X₂为D, Y, E, T, W, E或S; X₃为A, N, I, L, V, P, Q或E; X₄为S, D, P, E, Q或R; X₅为L或V; X₆为G, L或K; 以及X₇为V, A, D, T, M或G。

[0119] 在其他的实施方案中, 抗FXII抗体为结合人类FXII/FXIIa的IgG抗体的片段, 并且包含: (a) 包含SEQ ID NO:8中列出的重链CDR1、SEQ ID NO:9中列出的重链CDR2和SEQ ID NO:11中列出的重链CDR3的VH区; 和/或(b) 包含SEQ ID NO:13中列出的轻链CDR1、SEQ ID NO:14中列出的轻链CDR2和SEQ ID NO:15中列出的轻链CDR3的VL区。

[0120] 在多个实施方案中, 抗FXII抗体为亲和力成熟的、嵌合的、CDR接枝的或人源化的抗体, 或者其功能性抗原结合片段。在一些实施方案中, 抗FXII抗体选自亲和力成熟的(相对于3F3) 抗体VR115, VR112, VR24, VR110和VR119 (这些抗体的HCDR 1-3和LCDR1-3的SEQ ID NO示于下表2中)。

[0121] 表2.

[0122]

mAb	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
3F7	8	9	11	13	14	15
VR119	8	10	11	13	14	15
VR112	8	10	11	13	14	15
VR115	8	10	11	13	14	15
VR24	8	9	11	17	14	15
VR110	8	10	11	13	14	15

[0123] 如上文所注释, SEQ ID NO:10为简并序列。VR119包含SEQ ID NO:10, 其中X₁为N, X₂为V, X₃为P; X₄为L, X₅Y; 以及X₆为G。VR112包含SEQ ID NO:10, 其中X₁为N, X₂为V, X₃为P, X₄为V, X₅为Q, 以及X₆为G。VR115包含SEQ ID NO:10, 其中X₁为D, X₂为I, X₃为P, X₄为T, X₅为K, 以及X₆为G。VR110包含SEQ ID NO:10, 其中X₁为D, X₂为M, X₃为P, X₄为T, X₅为K, 以及X₆为G。VR24包含独特的LCDR1:SGSSEMTVHHYVY (SEQ ID NO:17)。

[0124] 在涉及抗体CDR的实施方案中, 根据KABAT编号系统来定义CDR (Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5th ed. U.S. Department of Health and Human services, NIH, Bethesda, MD. (1991))。

[0125] 在一些实施方案中,所述的抗体为抗FXII单克隆抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段在FXIIa- α 与抗体以1:0.2的摩尔比使用时,能够将人类FXIIa- α (例如在体外FXIIa酰胺水解活性测试(WO 2013/014092)中)抑制超过40%、超过50%或者超过60%。在一些实施方案中,所述的抗体或其抗原结合片段在FXIIa- α 与抗体以1:0.5的摩尔比使用时,能够将人类因子XIIa- α 抑制超过80%、超过85%或者超过90%。在一个实施方案中,所述的抗体在以1:0.5的摩尔比使用时,能够实现对人类FXIIa- α 的完全或接近完全的抑制(例如95%,96%,97%,98%,99%或更高)。在一个实施方案中,所述的抗体或其抗原结合片段对人类FXIIa的亲合性与抗体3F7的亲合性至少大致相当。

[0126] D.与HLEP连接的FXII抑制剂

[0127] 本申请的另一个方面提供了与融合伴侣连接的FXII抑制剂,例如延长半衰期的多肽(HLEP)或分子,例如PEG。在一个实施方案中,FXII抑制剂为小的蛋白质。因此,可以预计快速的肾清除率(如针对其他小的蛋白质所观察的那样)(Werle M and Bernkop-Schnurch A, *Amino Acids* 2006;30:351-367)。解决多肽化合物的血浆半衰期短的一种方式重复地注射或者通过连续的输注。另一种方法是增加多肽本身的固有血浆半衰期。例如在一个实施方案中,FXII抑制剂与延长半衰期的蛋白质连接。

[0128] “延长半衰期的多肽”为可以增加FXII抑制剂在患者或动物体内的半衰期的多肽融合伴侣。其实例包括白蛋白、免疫球蛋白和它们的片段,例如Fc结构域,或衍生物,其可以与FXII抑制剂直接融合,或通过可切割的或不可切割的连接子融合。Ballance et al. (WO 2001/79271)描述了融合多肽,其包含与人类血清白蛋白融合的多个不同治疗性多肽。

[0129] 术语“白蛋白”和“血清白蛋白”涵盖人类白蛋白(HA)及其变体(其完整的成熟形式在本发明中公开(SEQ ID NO:19)),以及得自其他物种的白蛋白及其变体。如本文所用,“白蛋白”是指具有白蛋白的一种或多种功能活性(例如生物学活性)的白蛋白多肽或氨基酸序列、或白蛋白变体。在某些实施方案中,白蛋白用于稳定或延长FXII抑制剂的治疗活性。白蛋白可以衍生自任何脊椎动物,特别是任何哺乳动物,例如人类、猴、牛、绵羊或猪。还可以使用非哺乳动物的白蛋白,包括但不限于得自鸡和鲑鱼的白蛋白。白蛋白连接的多肽的白蛋白部分可以得自不同于治疗多肽部分的不同动物。例如参见WO 2008/098720的白蛋白融合蛋白质,所述的文献以引用方式全文并入本文。

[0130] 在一个实施方案中,白蛋白变体为至少10,20,40,50,60或至少70个氨基酸长(或者它们之间的任何长度),或者可以包含得自人类白蛋白(HA)序列(例如SEQ ID NO:19)的15,20,25,30,50或更长的连续氨基酸(或者它们之间的任何长度),或者可以包含HA的部分或所有的特定结构域。白蛋白变体可以包含氨基酸取代、缺失或添加,保守的或非保守的取代,其中此类改变基本上不改变赋予半衰期延长多肽的治疗活性的活性位点或活性结构域。这些变体可以共有70%,75%,80%,85%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%(或它们之间的任何百分率)的同源性。

[0131] 在一些实施方案中,白蛋白变体为片段,并且可以包含白蛋白的至少一个完整的结构域,和/或这些结构域的片段,例如结构域1(SEQ ID NO:19的氨基酸1-194),2(SEQ ID NO:19的氨基酸195-387),3(SEQ ID NO:19的氨基酸388-585),1+2(SEQ ID NO:19的1-387),2+3(SEQ ID NO:19的195-585)或1+3(SEQ ID NO:19的氨基酸1-194+氨基酸388-585)。各个结构域本身均由2个同源的亚结构域构成,即SEQ ID NO:19的残基1-105,120-

194,195-291,316-387,388-491和512-585,以及包含残基Lys106至Glu119,Glu292至Val315,以及Glu492至Ala511的柔性亚结构域间连接子区域。因此,在一些实施方案中,白蛋白变体包含白蛋白的至少一个完整的亚结构域。

[0132] 在某些实施方案中,与白蛋白在结构上或进化上相关的其他蛋白质(“白蛋白家族蛋白质”)可以用作HELP,包括但不限于甲胎蛋白(WO 2005/024044;Beattie and Dugaicznyk,20 Gene 415-422,1982),甲清蛋白(Lichenstein et al.269(27) J.Biol.Chem.18149-18154,1994),和维生素D结合蛋白质(Cooke and David,76J.Clin.Invest.2420-2424,1985)。编码这些蛋白质的基因代表了在人类、小鼠和大鼠中在作图到相同染色体区域的具有结构和功能相似性的多基因簇。白蛋白家族成员的结构相似性表明它们可以用作HELP。例如声称甲胎蛋白在体内能够延长所附着的治疗多肽的半衰期(WO 2005/024044)。因此,在一些实施方案中,能够稳定或延长治疗活性的这些蛋白质或其变体可以用作与FXII或FXIIa连接的HELP,并且可以衍生自任何脊椎动物,特别是任何哺乳动物,例如人类、猴、牛、绵羊或猪;或者非哺乳动物,包括但不限于母鸡或鲑鱼。在一些实施方案中,变体的长度可以包含10个或更多的氨基酸,或者可以包含其所来源的相应蛋白质序列的大约15,20,25,30,50或更多个连续的氨基酸,或者可以包含相应蛋白质的部分或所有的特定结构域。白蛋白家族成员融合蛋白质可以包含天然形成的多态性变体。

[0133] 在某些实施方案中,单-或多-(例如2-4)聚乙二醇(PEG)部分可以用作融合伴侣,并且可以延长体内半衰期。可以通过任何可利用的聚乙二醇化反应进行聚乙二醇化。用于制备聚乙二醇化蛋白质产物的示例性方法通常可以包括:(a)在一定的条件下,使多肽与聚乙二醇(例如PEG的反应性酯或醛衍生物)反应,由此所述的蛋白质附着在一个或多个PEG基团上;以及(b)获得反应产物。具有许多种PEG附着方法。例如参见EP 0 401 384;Malik et al.,Exp.Hematol.,20:1028-1035(1992);Francis,Focus on Growth Factors,3(2):4-10(1992);EP 0 154 316;EP 0 401 384;WO 92/16221;WO 95/34326;美国专利No.5,252,714,这些文献以引用方式全文并入本文。

[0134] 在一些实施方案中,免疫球蛋白(Ig)可以用作HELP。术语“免疫球蛋白”涵盖了功能片段及其变体,例如Fc区域或者一个或多个Ig恒定结构域。在一些实施方案中,Ig包含Fc区域或免疫球蛋白恒定结构域的部分。恒定区可以为IgM,IgG,IgD,IgA或IgE免疫球蛋白的恒定区。在一些实施方案中,治疗性多肽部分通过抗体的铰链区或肽连接子(其可以是可被切割的)与Ig连接。多个专利和专利申请描述了治疗蛋白质与免疫球蛋白恒定区的融合,从而延长治疗蛋白质的体内半衰期(US 2004/0087778,WO 2005/001025,WO 2005/063808,WO 2003/076567,WO 2005/000892,WO 2004/101740,US 6,403,077),其中所述的文献以引用方式并入本文。因此,在一些实施方案中,免疫球蛋白区域(例如Fc结构域,免疫球蛋白的Fc片段及其变体)被用作HELP。在一些实施方案中,FXII的抑制剂可以与作为HELP的Fc结构域或免疫球蛋白恒定区的部分融合。在一些实施方案中,这些融合蛋白质作为在原核或真核宿主细胞(例如细菌、酵母菌、植物、动物(包括昆虫)或人类细胞系)或在转基因动物中表达的重组分子来制备(WO 2008/098720,以引用方式并入本文)。

[0135] SPINK突变体-Fc融合蛋白质的一个实例,SPINK-K2-Fc融合蛋白质,在WO 2008/098720中有描述。

[0136] E.连接子

[0137] 在多个实施方案中,可以在治疗多肽和HLEP之间引入间插性肽连接子。在一个实施方案中,引入可切割的连接子,特别是如果HLEP具有通过(例如)空间位阻而干扰治疗性多肽的特定活性时更是如此。在某些实施方案中,连接子可以通过与凝血有关的酶切割,例如固有的、外在的或共同的凝血途径的凝血蛋白酶。固有途径的凝血蛋白酶包括接触激活途径中的蛋白酶,例如FXIIa、FXIa或FIXa。在一个实施方案中,连接子可以被FXIIa切割。外在途径的蛋白酶包括组织因子途径中的蛋白酶,例如FVIIa。共同途径的蛋白酶包括与纤维蛋白原转化为纤维蛋白中所涉及的蛋白酶,例如FXa、FIIa和FXIIIa。

[0138] III. 药物组合物

[0139] 在本发明的多个方面的任意一个方面中,FXII抑制剂的纯度可以高于80%,或者高于95%,96%,97%,98%或99%。在一个实施方案中,FXII抑制剂的药物纯度状态可以为相对于污染高分子(例如其他蛋白质和核酸)而言超过99.9%的纯度,并且可能不含感染因子和热原试剂。

[0140] 在某些实施方案中,药物组合物可以包含至少一种添加剂,例如填料、膨胀剂、缓冲剂、稳定剂或赋形剂。一些示例性的药物配制技术在例如the 2005 Physicians' Desk Reference, Thomson Healthcare: Montvale, NJ, 2004; Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th ed., Gennaro et al., Eds. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2000; Kibbe et al. Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd ed., Pharmaceutical Press, 2000中描述。药物添加剂包括例如甘露醇, 淀粉, 葡萄糖, 乳糖, 蔗糖, 凝胶, 麦芽, 大米, 面粉, 白垩, 硅胶, 硬脂酸钠, 单硬脂酸甘油酯, 滑石, 氯化钠, 脱脂奶粉, 甘油, 丙烯, 二醇类, 水, 乙醇等。在某些实施方案中, 药物组合物还可以包含pH缓冲剂和润湿或乳化剂。在其他的实施方案中, 所述的组合物可以包含防腐剂和/或稳定剂。药物组合物可以配制成冻干的或稳定可溶的形式。多肽可以通过本领域已知的多种操作冻干。

[0141] 在某些实施方案中, 制备包含至少一种FXII抑制剂的药物组合物以用于治疗选自脊髓损伤和外伤性脑损伤的神经创伤性病患。例如, 如果提供粉末或冻干形式的FXII抑制剂(例如通过冷冻干燥), 并且需要水性药物, 则可以通过将粉末与药物配制物的水性成分混合并使用合适的技术(例如涡流或温和的摇动)搅拌来溶解所述的粉末。备选地, 如果需要水性药物并且FXII抑制剂已经为水性形式, 则所述的成分可以在施用之前直接合并。在某些实施方案中, 提供冻干形式的FXII抑制剂, 并将其在施用之前与水性药物成分合并(例如其他的活性成分或非活性成分, 例如填料、稳定剂、溶剂或载体)。

[0142] 药物组合物的配方可以根据预期的施用方式和其他参数而改变(例如参见Rowe et al., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 4th ed., APhA Publications, 2003)。在一些实施方案中, 药物组合物可以是冻干团块或粉末。冻干的组合物可以重建以用于通过静脉注射施用, 例如采用注射用无菌水, USP。在其他的实施方案中, 所述的组合物可以是无菌的无热原溶液。在其他的实施方案中, 所述的组合物以粉末形式、药丸或片剂形式给药。

[0143] FXII抑制剂的配制物可以通过任何药物合适的施用手段施用于患者。例如所述的组合物可以系统施用, 例如肠道外或鞘内。根据已知的操作, 肠道外配制物可以以团注形式或输注形式在静脉内或皮下施用。用于肠胃外用途的公知的优选液体载体包括无菌水、盐

水、水性右旋糖、糖溶液、乙二醇、二醇类和油。对于系统用途而言,治疗蛋白质可以配制用于静脉管线或动脉管线。所述的配制物可以通过输注或团注的方式连续施用。

[0144] 用于口服或直肠施用的片剂和胶囊可以包含常规的赋形剂,例如粘合剂、填料、润滑剂或润湿剂等。口服或直肠液体制备物可以为水性或油性悬液、溶液、乳液、糖浆、酞剂等,或者可以作为干燥产物提供,以便在使用前使用水或其他合适的媒介物进行重溶。此类液体制备物可包含常规添加剂,例如悬浮剂、乳化剂、非水性媒介物和防腐剂。一些配制物涵盖了缓释系统,例如贴剂。

[0145] 此外,公开了用于治疗选自脊髓损伤和外伤性脑损伤的神经创伤性病患的试剂盒。在某些实施方案中,所述的试剂盒包含:(a)至少一种FXII抑制剂;(b)用于治疗选自脊髓损伤和外伤性脑损伤的神经创伤性病患的说明书;以及可任选地(c)至少一种其他的治疗活性组分,其中所述的其他的治疗活性组分并非C1抑制剂。

[0146] 所述的试剂盒的成分可以包含在一个或不同的容器中,例如一个或多个小瓶。所述的至少一种FXII抑制剂可以为液体或固体形式(例如在冻干后)。如果为液体形式,则所述的至少一种FXII抑制剂可以包含添加剂(例如稳定剂)和/或防腐剂(例如脯氨酸、甘氨酸、蔗糖或其他添加剂)。

[0147] 在某些实施方案中,所述的试剂盒可以包含其他的化合物,例如在施用所述至少一种FXII抑制剂之前、同时或之后施用的治疗活性化合物或药品,其中所述其他的治疗活性组分并非C1抑制剂。此类化合物的实例包括维生素、抗生素、抗病毒剂等。在其他的实施方案中,类固醇,特别是可的松,可以包含在试剂盒中。

[0148] 在多个实施方案中,试剂盒的使用说明书可以包括使用试剂盒成分来治疗选自脊髓损伤和外伤性脑损伤的神经创伤性病患的指示。所述的说明书可以进一步包含关于如何制备(例如在冷冻干燥蛋白质的情况下,稀释或重溶)所述至少一种FXII抑制剂的信息。所述的说明书可以进一步包含关于施用剂量和/或频率的指导。

附图说明

[0149] 图1显示在外伤诱导后24h,分别与经NaCl处理的或野生型(B1/6)对照相比,经rHA-Infestin-4处理的或FXII^{-/-}小鼠中损伤大小的减小情况。对由雄性小鼠和雌性小鼠获得的脑切片的TTC染色分析损伤体积。在外伤诱导后24h,FXII缺陷或抑制会减小损伤大小。(A)雄性野生型和FXII^{-/-}小鼠中(n=19);(B)雌性小鼠中(对于B1/6而言,n=4;对于FXII^{-/-}而言,n=5);以及(C)在经rHA-Infestin-4处理的动物和对照中(对于rHA-Infestin-4而言,n=14;对于对照而言,n=13)的损伤体积。***P<0.001,**P<0.01,未配对的双尾Student's t-检验,平均值+SEM。

[0150] 图2显示在外伤诱导后24h,与野生型对照(B1/6)相比,在FXII^{-/-}小鼠中,血脑屏障(BBB)完整性的保护。(A)通过光度测定法测定损伤的大脑半球中Evans Blue渗出的程度(对于FXII^{-/-}而言,n=6;对于B1/6而言,n=8);(B)在损伤的大脑半球中,作为脑水肿量度的脑水含量(对于FXII^{-/-}而言,n=8;对于B1/6而言,n=9)。^{*}P<0.05,未配对的双尾Student's t-检验,平均值+SEM。

[0151] 图3显示在外伤诱导后24h,与经NaCl处理的对照相比,在经rHA-Infestin-4处理的小鼠中,血脑屏障(BBB)完整性的保护。通过(A)由光度测定法测定的损伤大脑半球中(n

=5) Evans Blue (EB) 渗出的程度以及 (B) 损伤的大脑半球中作为脑水肿量度的脑水含量来分析 BBB 的完整性 (对于 rHA-Infestin-4 而言, $n=8$; 对于对照而言, $n=9$)。 (C) 紧密连接的蛋白质封闭蛋白的相对蛋白质表达 ($n=5$)。 $**P<0.01$, $**P<0.05$, 未配对的双尾 Student's *t*-检验, 平均值+SEM。

[0152] 图4显示在外伤诱导后24h, 血栓形成和受到抑制的血栓形成过程的减少。 (A) 通过 Western 印迹来分析纤维蛋白/纤维蛋白原的相对蛋白质表达, 显示与野生型对照 (B1/6; $n=3$) 相比, 表达在 FXII^{-/-} 小鼠中减少。 (B) 在 H&E 染色的脑切片中测定在损伤的大脑半球中阻塞的血管与开放的血管的比例 ($n=5$, 5个切片/只动物)。 阻塞血管 (箭头) 与开放血管 (星号) 的代表性染色 (下图)。 与 NaCl 处理的对照相比, 在经 rHA-Infestin-4 处理的小鼠中发现所述的比例改善。 $**P<0.01$, $**P<0.05$, 未配对的双尾 Student's *t*-检验, 平均值+SEM。

[0153] 图5显示在外伤诱导后24h, 在 FXII^{-/-} 小鼠中免于炎症过程的保护。 (A) 在第1天, 使用免疫组织化学染色针对 CD11b+ 巨噬细胞/小神经胶质细胞来分析巨噬细胞向损伤的大脑半球中浸润的定量, 并与野生型对照 (B1/6; $n=4$) 比较。 在外伤诱导后 ($n=5$), 在 FXII^{-/-} 小鼠中, 与野生型对照 (B1/6) 和假手术的小鼠相比, 在同侧皮质 (ipsi) 中测量促炎细胞因子 TNF α (B) 和白细胞介素-1 β (C) 的相对基因表达。 与 B1/6 相比, $***P<0.001$, $**P<0.01$, $*P<0.05$; 与假手术的小鼠相比, $^{##}P<0.01$, $^{#}P<0.05$, 未配对的双尾 Student's *t*-检验 (A), 单因素 ANOVA, 然后 Bonferroni post-hoc 检验, 平均值+SEM。

[0154] 图6显示与经 NaCl 处理的和假手术的小鼠相比, 在经 rHA-Infestin-4 处理的小鼠中的促炎细胞因子。 在外伤诱导后24h, 在经 rHA-Infestin-4 处理的动物中, 炎症过程受到抑制。 显示了在同侧皮质 (ipsi; $n=3$) 中促炎细胞因子 TNF α (A) 和白细胞介素-1 β (B) 的相对基因表达。 与假手术的动物相比, $^{#}P<0.05$, 单因素 ANOVA, 然后 Bonferroni post-hoc 检验, 平均值+SEM。

[0155] 图7显示在外伤诱导后3d, 与野生型对照 (B1/6) 相比, 在 FXII^{-/-} 小鼠中损伤大小的减小。 在第3天, FXII 缺陷型小鼠受到保护而免于组织损伤。 在雄性 (对于 FXII^{-/-} 而言, $n=9$; 对于 B1/6 而言, $n=14$) 和雌性小鼠 ($n=3$) 中, 在 TTC 染色的脑切片中测量损伤体积。 $**P<0.01$, 未配对的双尾 Student's *t* 检验, 平均值+SEM。

[0156] 图8显示在外伤诱导后3d, 在 FXII^{-/-} 小鼠中, 与野生型对照 (B1/6) 相比, 血脑屏障 (BBB) 损伤的减少。 在外伤诱导后的第3天, 在 FXII^{-/-} 小鼠中 BBB 完整性得到保护。 通过光度测定法来测定损伤的大脑半球中 Evans Blue 渗出的程度 (对于 B1/6 而言, $n=4$; 对于 FXII^{-/-} 而言, $n=5$)。 $***P<0.001$, 未配对的双尾 Student's *t* 检验, 平均值+SEM。

[0157] 图9显示脑内血小板累积和血栓是外伤性脑损伤的病理学特征。 (A) 针对人类外伤性脑组织的血小板标志物糖蛋白 Ib (GPIb) 的代表性免疫组织染色显示了显著的血管内血小板沉积 (箭头; 未阻塞的血管通过星号表示; 比例尺表示 100 μ m)。 (B) 在重物坠落损伤后的第7天, 损伤的大脑半球的小鼠脑切片的代表性苏木精和伊红染色显示阻塞的血管 (箭头; 比例尺表示 100 μ m)。 (C) 在右顶叶 (冲击区域) 上脑血流量在7天内显著减少。 (E) 在低温损伤后的第1天, 损伤的大脑半球的小鼠脑切片的代表性苏木精和伊红染色显示阻塞的血管 (箭头; 比例尺表示 100 μ m)。

[0158] 图10显示在因子 XII 缺陷型 (FXII^{-/-}) 小鼠中, 在重物坠落损伤后第7天的脑内血小板累积减少。 (A) 由使用苏木精和伊红染色的脑切片计算血栓指数显示, 当与野生型 (WT) 小

鼠和使用人类FXII再构建的FXII^{-/-}小鼠 (FXII^{-/-}/hFXII) 相比时,FXII^{-/-}小鼠中阻塞血管减少 (n=5只/组,***P<0.001,**P<0.01)。(B) 使用糖蛋白Ib (GPIb) 和CD31抗体的免疫荧光染色分析表明,与WT小鼠和FXII^{-/-}/hFXII小鼠相比,FXII^{-/-}小鼠在损伤诱导后第7天血管内血小板沉积显著减少 (n=4只/组,***P<0.001)。(C) 使用GPIb抗体的Western印迹分析证明了与WT对照或假手术的小鼠相比,FXII^{-/-}小鼠中血小板累积程度更小。通过密度计量学相对于β-肌动蛋白对照对条带定量。下方图显示了各组的2个代表性印迹 (n=5只/组,***P<0.001,**P<0.01;AU=任意单位)。

[0159] 图11显示在因子XII缺陷型 (FXII^{-/-}) 小鼠中,在低温损伤减轻后第1天 (d1) 和第3天 (d3) 脑内血小板累积。(A) 在由使用苏木精和伊红染色的脑切片得到的血栓指数的计算显示,与野生型 (WT) 小鼠和使用人类FXII再构建的FXII^{-/-}小鼠 (FXII^{-/-}/hFXII) 相比,FXII^{-/-}小鼠中阻塞血管减少 (n=5只/组,***P<0.001,**P<0.01)。(B) 使用糖蛋白Ib (GPIb) 抗体的Western印迹分析证明了与WT对照或假手术的小鼠 (Sham) 相比,FXII^{-/-}小鼠中血小板累积程度更小。通过密度计量学相对于β-肌动蛋白对照对条带定量 (n=5只/组,*P<0.05)。(C) 使用GPIb和CD31抗体的免疫荧光染色分析表明,与WT小鼠和FXII^{-/-}/hFXII小鼠相比,FXII^{-/-}小鼠中血管内血小板沉积显著减少。

[0160] 图12显示在重物坠落损伤后,因子XII (FXII) 缺陷会改善结果。在弥漫性脑外伤后第3天和第7天,与野生型 (WT) 小鼠和使用人类FXII再构建的FXII^{-/-}小鼠 (FXII^{-/-}/hFXII) 相比,FXII缺陷型 (FXII^{-/-}) 小鼠的神经功能缺损严重程度得分 (NSS) 显著较低。在外伤后的第1个小时 (第0天) 和第1天,动物显示相似的神经缺陷 (n=10-13只/组,*P<0.05)。

[0161] 图13显示在低温损伤后,因子XII (FXII) 缺陷会改善结果。(A) 在局灶性脑外伤后的第1天 (d1) 和第3天 (d3),雄性野生型 (WT) 小鼠,FXII缺陷型 (FXII^{-/-}) 小鼠,使用人类FXII再构建的FXII^{-/-}小鼠 (FXII^{-/-}+hFXII),雌性野生型 (WT雌性) 小鼠和雌性 (FXII^{-/-}雌性) 小鼠的脑切片在2,3,5-三苯基氯化四氮唑 (TTC) 染色后实施损伤体积测定。雄性和雌性FXII^{-/-}小鼠显示,与WT小鼠相比,显著减小了损伤体积。通过施加人类FXII (hFXII) 可以逆转FXII缺陷型的有利作用 (n=7只/组,**P<0.01,*P<0.05)。(B) 在WT小鼠和FXII^{-/-}小鼠中在外伤诱导后的第1天和第7天 (d7),连续冠状T2加权梯度回波MR图像显示高信号损伤。表明脑出血的低信号区域在两组中均是缺乏的。下方图显示每组2个代表性的脑切片和时间点。基于MRI的损伤体积测定 (上方图) 证明了在FXII^{-/-}小鼠中发展的损伤较小 (n=8-9只/组,*P<0.05)。(C) 在FXII^{-/-}小鼠中神经元凋亡减少。小图显示了在d1和d3天损伤的大脑半球中每个脑切片的TUNEL阳性神经元的数量。与WT对照比较,FXII^{-/-}小鼠中凋亡神经元的数量显著减少 (n=4只/组,***P<0.001,*P<0.05,比例尺表示50μm)。

[0162] 图14显示在重物坠落脑外伤后,使用rHA-Infestin-4对因子XII (FXII) 的药理学抑制会减小脑内血小板累积,并改善结果。(A) 与使用rHA-Infestin-4处理的小鼠相比,在媒介物处理的小鼠中阻塞的血管更多。该发现通过计算在第7天时由使用苏木精和伊红染色的脑切片的血栓指数得到证实,表明在使用rHA-Infestin-4处理的小鼠中阻塞血管非常显著地减少 (n=5只/组,***P<0.001)。(B) 使用糖蛋白Ib (GPIb) 和CD31抗体的免疫荧光染色分析表明,在损伤诱导后的第7天,使用rHA-Infestin-4处理的小鼠中血管内血小板沉积显著减少 (n=4只/组,***P<0.001)。(C) 在脑外伤后的第3天和第7天,使用rHA-Infestin-4处理的小鼠的神经功能缺损严重程度得分 (NSS) 比媒介物处理的小鼠 (媒介物) 明显较低。

在脑外伤后1小时(第0天)和1天,动物展示相似的神经缺陷($n=13$ 只/组, $*P<0.05$)。

[0163] 图15显示使用rHA-Infestin-4对因子XII的药理学抑制会减小脑内血小板累积,并提供保护免于局灶性脑外伤。(A)如通过计算在损伤诱导后第1天(d1)和第3天(d3)的血栓指数所测定的,与经rHA-Infestin-4处理的小鼠相比,在媒介物处理的动物中阻塞血管更加丰富,表明在媒介物处理的动物中阻塞血管非常显著地增多($n=4$ 只/组, $***P<0.001$, $**P<0.01$,比例尺表示 $100\mu\text{m}$)中。(B)使用糖蛋白Ib(GPIb)和CD31抗体的免疫荧光染色分析表明,使用rHA-Infestin-4处理的小鼠中损伤诱导后d1和d3的血管内血小板积聚显著减少($n=4$ 只/组, $***P<0.001$)。(C)在局灶性脑外伤后的d1和d3,媒介物处理的小鼠和使用rHA-Infestin-4处理的小鼠的脑切片在2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)染色后实施损伤体积测定。使用rHA-Infestin-4处理的小鼠基本被保护而免于脑外伤($n=7$ 只/组, $**P<0.01$, $*P<0.05$)。(D)在针对神经元标志物NeuN进行免疫标记后评估每个脑切片的TUNEL阳性神经元数量,经过TUNEL测试以检测凋亡情况。在d1和d3,与媒介物处理的对照相比,在rHA-Infestin-4处理的小鼠中凋亡神经元的数量显著减少($n=4$ 只/组, $**P<0.01$, $*P<0.05$)。

[0164] 图16显示因子XII的遗传缺陷和药理学抑制在低温损伤后不会导致出血。上方图显示假手术小鼠、FXII缺陷型小鼠、rHA-Infestin-4处理的小鼠和FXI缺陷型小鼠在使用2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)染色后的代表性脑切片。下方图显示在外伤诱导后1天,在假手术的小鼠(Sham)、野生型(WT)小鼠、FXII缺陷型(FXII^{-/-})小鼠、媒介物处理的(媒介物)小鼠、使用rHA-Infestin-4处理的小鼠和FXI缺陷型(FXI^{-/-})小鼠的损伤的大脑半球中血红蛋白的量。在FXII被抑制的组中血红蛋白浓度保持在假手术的动物的水平,FXI^{-/-}小鼠显示血红蛋白的量非常显著地升高($n=4-5$ 只/组, ns =不显著, $***P<0.001$)。

[0165] 图17显示在外伤诱导后24小时和3天,免疫细胞浸润减少。分别与WT或NaCl处理的对照相比,采用免疫组织化学来测定在FXII^{-/-}小鼠和rHA-Infestin-4处理的小鼠中Ly.6B.2阳性嗜中性粒细胞的量。

[0166] 所述的实施例举例说明了本发明。所述的实施例意图举例说明而绝不限定本发明公开。由本发明公开的组合物和方法的说明和实践来考虑,所公开的组合物和方法的其他实施方案对于本领域那些技术人员而言是显而易见的。

实施例

[0167] 实施例1:

[0168] 方法:

[0169] 使用皮质低温损伤模型,6周龄的C57B1/6野生型小鼠(B1/6)和FXII缺陷型小鼠(FXII^{-/-})进行试验性局灶性TBI。就激活的FXII的药理学抑制而言,在外伤诱导后1h,使用rHA-Infestin-4(200mg/kg i.v.)处理野生型小鼠。通过体积测定法,由使用2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)染色的脑切片来测定损伤大小。为了评估血脑屏障(BBB)损伤,通过光度测定法来测量脑内Evans Blue(EB)渗出,并计算湿干重比以用于测量脑水含量(=水肿)。实施Western印迹(WB)分析和免疫组织化学(IHC)染色,以评估紧密连接蛋白和纤维蛋白/纤维蛋白原的蛋白质表达。通过PCR和组织学来分析TBI后的局灶性炎症应答。

[0170] 结果:

[0171] 在外伤诱导后24h,与对照相比较,在FXII^{-/-}小鼠以及经rHA-Infestin-4处理的野生型小鼠中观察到损伤大小显著减小。脑血管中较少的血栓形成以及受到保护的BBB完整性可以被鉴定为潜在的机制。此外,FXII抑制会抑制TBI后的局灶性炎症应答。此外,在外伤诱导后3天,与对照比较,在FXII^{-/-}小鼠中观察到损伤大小减小和BBB完整性的保护。

[0172] 结论:

[0173] FXII的封闭通过减少“血栓-炎症”而免于TBI。因此,FXII的抑制是对抗TBI和其他神经病患(优选神经创伤性病患)的有前途的策略。

[0174] 实施例2:

[0175] 材料和方法

[0176] 动物:

[0177] 在本研究中使用总计124只(110只雄性和14只雌性)C57Bl/6N(野生型)小鼠,55只(41只雄性和14只雌性)FXII缺陷型(FXII^{-/-})小鼠(Pauer et al.,2004,Thromb Haemost 92:503-508),和5只雄性FXI缺陷型(FXI^{-/-})小鼠(Gailani et al.,1997,Blood Coagul Fibrinolysis 8:134-144)。在随意获得食物和水、并且在12小时光/12小时暗循环下将小鼠分成5至9只动物的组进行饲养。在本研究中,所有试验都得到机构和监管当局批准,并且根据EU Directive 2010/63/EU和ARRIVE标准(Kilkenny et al.,2012,Osteoarthritis Cartilage 20:256-260)实施。

[0178] 皮质低温损伤模型:

[0179] 如之前所述诱导皮质低温损伤(Albert-Weissenberger et al.,2014,Frontiers in cellular neuroscience 8:269)。简言之,腹膜内注射克他命(0.1mg/g)和甲苯噻嗪(0.005mg/g)来麻醉6周龄的小鼠。在将小鼠头部限制在立体定向框架(TSE系统)之后,通过颅骨切开术暴露颅骨,在右顶叶皮层进行手术。使用液氮(-196℃)填充尖端直径为2.5mm的铜质圆柱体,并将其在右顶叶皮层(距前卤的坐标:1.5mm尾部,1.5mm侧向)上放置90s。在铜质圆柱体未冷却的情况下,对假手术的动物进行相同的手术过程。

[0180] 重物坠落模型:

[0181] 如之前所述实施试验性闭合性头部损伤(Albert-Weissenberger et al.,2012,J Cereb Blood Flow Metab 32:1747-1756;Albert-Weissenberger et al.,2012,Exp Transl Stroke Med 4:1)。简言之,在异氟烷麻醉诱导后,将自主呼吸的10至16周龄的小鼠放置在立体定向框架中,通过中线纵向颅骨切开术暴露颅骨。在鉴定冲击区域后,坠下具有硅树脂覆盖的钝性尖端的重物,最终冲击为0.01J。假手术包括麻醉和暴露颅骨,但是未进行重物下坠损伤。通过神经功能缺损严重程度得分(NSS)(其为一种复合得分,包括运动功能的任务、警觉和生理行为)来评估小鼠的神经行为状态,较低的得分表明较少的缺陷。在重物下坠损伤后1小时、1天、3天和7天评价小鼠。进行功能测试的个人对于试验组而言都是盲态的。

[0182] 药理学处理:

[0183] 在局灶性冷冻损伤或弥漫性重物下坠损伤后1小时,野生型小鼠接受剂量为200mg/kg体重的单次静脉注射特异性FXII抑制剂rHA-Infestin-4(CSL Behring,Marburg, Germany)。对照动物接受等体积的0.9%氯化钠(媒介物)。在损伤诱导后1h静脉注射2μg/g体重的人类FXII(hFXII)(Sekisui Diagnostics,ADG412H),每72h连续注射,得到FXII^{-/-}小

鼠的再构建。

[0184] 在皮质低温损伤后损伤大小的测定:

[0185] 在低温损伤后24小时或3天,处死小鼠;快速取出脑,并使用小鼠脑切片基质(Harvard Apparatus)切出5个1mm厚的皮质冠状面。使用处于BPS中的2%2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC;Sigma-Aldrich)在37℃下将脑切片染色20min,以观察损伤。以盲态方式通过体积测定法(ImageJ software,National Institutes of Health,USA)来计算损伤体积。

[0186] 磁共振成像:

[0187] 在使用克他命(0.1mg/g)和甲苯噻嗪(0.005mg/g)麻醉下,以3Tesla单位(Vision;Siemens),在低温损伤后1天和7天重复实施MRI。所述的方案包括冠状T2加权序列(脑片厚度2mm)和血液敏感型冠状T2加权梯度回波CISS序列(Constructed Interference in Steady State;脑片厚度1mm)。在高分辨率CISS图像上,通过高信号区域的侧面法来计算损伤体积。还对CISS图像进行检查以发现可能的脑内出血。

[0188] 激光多普勒血流仪:

[0189] 激光多普勒血流仪(Moor Instruments)用于监测右顶叶(冲击区域)上的局部脑血流量。在损伤诱导后1小时、3和7天,在基线(在损伤诱导之前)处连续地测量脑血流量。

[0190] 组织学和免疫组织化学:

[0191] 使用低温保持器(Leica),将冷冻包埋的小鼠脑切成10-μm厚或15-μm厚的脑切片(分别为皮质低温损伤模型和重物下坠模型)。为了进行血栓指数的评估,根据标准的操作来实施苏木精和伊红的染色。以盲态方式检查染色情况,并且在20倍放大下在每十分之一脑片中计数损伤的大脑半球内阻塞血管(N_{occ})和未阻塞血管(N_{open})的数量。使用以下公式来计算血栓指数: $(N_{\text{occ}} / (N_{\text{open}} + N_{\text{occ}})) \times 100$ 。为了评估人脑中血管内的血小板聚集,根据制造商提供的说明书针对糖蛋白Ib(GPIb;abcam,ab102647)对石蜡包埋的切片染色,然后使用苏木精进行负染,从而观察所有的核。就免疫荧光染色而言,施加以下初级抗体:抗GPIb(1:100,Prof.Nieswandt惠赠,Rudolf-Virchow-Zentrum,Würzburg),抗CD31(Bio-Rad Laboratories,MCA2388GA,1:100),抗NeuN(Millipore,MAB377,1:1000)。作为二级抗体,使用Cy2抗大鼠(Dianova,122-225-167,1:100),Cy3抗大鼠(Dianova,712-165-150,1:100)和DyLight 488抗小鼠(abcam,ab96871,1:100)。使用TUNEL(末端脱氧核糖核酸转移酶dUTP缺口末端标记)in situ Cell Death Detection Kit(Roche,Basel,Switzerland),根据制造商提供的说明书来评估神经元凋亡。在装配有DS-U3DS照相机控制单元和NIS-Elements软件(Nikon,Düsseldorf,Germany)的Nikon显微镜Eclipse 50i下,在放大40倍下,由2个脑切片的损伤大脑半球的3个视野测定凋亡神经元的数量。为了评估血小板聚集体,定量每只动物的2个脑切片。为了定量分析,我们使用得自近乎相同的脑区的切片用于各组之间更好的比较。

[0192] Western印迹分析:

[0193] 按照之前所述,通过Western印迹分析来检测损伤皮质中针对GPIb(抗GPIb,1:500,Prof.Nieswandt惠赠,Rudolf-Virchow-Zentrum,Würzburg)的免疫反应性(Langhauser et al.,2012,Blood,120(19):4082-92)。使用ImageJ软件(National Institutes of health,USA),以盲态方式实施GPIb的光密度分析,并且使用β-肌动蛋白

(Dianova, A5441, 1:500000) 作为加载对照用于对所检测的GPIIb水平标准化。

[0194] 脑出血的定量:

[0195] 分光光度法测定与出血程度有关的脑实质内血红蛋白浓度(Choudhri et al., 1997, Stroke 28:2296-2302)。在外伤后24小时,处死动物并取出脑部。将损伤的大脑半球在1.5ml冰冷的水中超声处理60s,此后在4℃下离心30min。将1mlDrabkin溶液加入至250μl上清液中,并在室温下温育15min。在540nm下测量吸光度(MultiskanEX, Thermo Scientific, Waltham, MA)。

[0196] 试验设计:

[0197] 按照以下假设($\alpha=0.05$, $\beta=0.2$, 平均值和标准偏差(G*Power 3.0.10)),通过先验样品大小计算来测定检测皮质低温损伤后第1天损伤体积 ≥ 0.2 、或者在重物下坠损伤后第1天的NSS ≥ 0.2 的标准化效果所需的动物的数量。将小鼠随机分配至处理组(在低温损伤后区组随机化,为了取得平衡组,在重物下坠损伤后分层随机化)。为了避免偏差,实施多个试验并以盲态方式进行分析。

[0198] 统计方法:

[0199] 所有结果均表示成平均值 $\pm$ SEM,但NSS量度除外,后者描绘为散点图,包括中值以及在文中括号内给出的25%百分点和75%百分点。就统计分析而言,使用PrismGraph 5.0软件包(GraphPad Software)。使用Kolmogorov Smirnov检验,并且在测量通过双因素ANOVA(具有用于多变量分析的post hoc Bonferroni校正)同时分析的2个因素的作用的情况下,或者在非参数数据(NSS)Kruskal Wallis检验(具有post hoc Dunns校正)下,检验数据的Gaussian分布。在测量1个因素的作用的情况下,使用具有post hoc Bonferroni校正的单因素ANOVA。如果仅比较2个组,则实施未配对双尾Student's t检验。P值 <0.05 被认为具有统计学意义。

[0200] 结果

[0201] 外伤性脑损伤中微血管血栓是共同的病理学特征:

[0202] 首先,我们分析从一个TBI致命性病例获得的人类脑样品,显示血小板在外伤后的脑的微血管中累积(图9A)。因此,我们在小鼠中使用重物下坠模型来严密地模仿人类TBI,导致显著的弥漫性脑外伤。由野生型小鼠得到的受损伤脑组织的苏木精和伊红染色显示血管腔的大量阻塞(图9B)。因此,我们发现了血小板的血管内累积。有趣的是,冲击区域的脑血流随时间稍微减少,在重物下坠损伤后第7天脑血流量显著减少(图9C)。当通过皮质低温损伤诱导局灶性脑外伤时,在损伤诱导后的第1天和第3天在皮质脑组织中发现大量的阻塞血管和GPIIb阳性血小板的血管内累积(图1D)。这些结果强烈地支持了微血管血栓是TBI中的共同病理特征的假说。

[0203] 在外伤性脑损伤中因子XII有助于微血管血栓:

[0204] 为了评估FXII对TBI后脑内血栓形成的影响,我们首先与野生型小鼠或通过静脉注射hFXII再构建的FXII缺陷型小鼠(FXII^{-/-}/hFXII)相比较来分析FXII缺陷型小鼠的挫伤脑组织。在重物下坠损伤后的第7天,与野生型或小鼠FXII^{-/-}/hFXII比较,苏木精和伊红染色的脑切片的组织学分析证明在FXII^{-/-}小鼠中阻塞的脑微血管较少(图10A)。我们同样在FXII缺陷型小鼠的脑中检测到较少的血管内GPIIb阳性血小板累积(图10B)。此外,Western印迹分析证明在FXII缺陷型小鼠的脑组织中,血小板的量显著减少(图10C)。与重物下坠损

伤相似,与野生型小鼠相比,在FXII^{-/-}小鼠中,在局灶性低温损伤后1天和3天,检测到血栓阻塞脑血管更少(图11A)、脑脉管系统中血小板累积更少(图11C)、以及脑组织中血小板量更少(图11B)。

[0205] 综上,我们观察到,在通过施用hFXII再构建的FXII缺陷型小鼠中,可以再现损伤诱导的微血管血栓和脑损伤。这首次证明了FXII对固有凝血途径的激活在外伤后脑血栓的形成中起作用。因此,我们推断FXII会促进微血管血栓,而与TBI的本性无关。

[0206] 因子XII缺陷导致外伤性脑损伤后的结果更好

[0207] 为了评价减少的脑内血栓在FXII缺陷型小鼠中的病理学意义,我们接着测定FXII缺陷对重物下坠损伤后功能结果的影响。在早期阶段(在损伤诱导后的1h和1天),外伤的严重性在所有组中是相当的,在重物下坠损伤后3天,FXII^{-/-}小鼠的恢复明显好于野生型或FXII^{-/-}/hFXII小鼠(中值NSS[25百分位,75百分位]:在野生型小鼠中为4.0[3.0,4.0],在FXII^{-/-}/hFXII小鼠中为3.5[3.0,4.0],而在FXII^{-/-}小鼠中为2.0[1.0,3.0], $P<0.05$;图12)。重要的是,直到第7天,在FXII^{-/-}小鼠中的较好神经结果依然持续(中值NSS[25百分位,75百分位]:在野生型小鼠中为3.0[2.0,3.0],在FXII^{-/-}/hFXII小鼠中为2.5[2.0,3.0],在FXII^{-/-}小鼠中为1.0[1.0,2.5.0], $P<0.05$;图12)。

[0208] 我们接着评价在低温损伤后的第1天和第3天,FXII缺陷对皮质损伤体积和神经退行性病变的影响。在雄性小鼠中,FXII缺陷导致第1天和第3天的损伤体积显著减小,这可以通过脑切片的TTC染色来评估(图13A)。由于性别对TBI后的临床结果具有显著的影响(Wright et al.,2014),我们将雌性小鼠进行低温损伤。与野生型小鼠相比,雌性小鼠中FXII缺陷也使得第1天和第3天的脑损伤显著减小(图13A)。这些观察结果得到了脑MRI研究的证实,显示FXII缺陷使得局灶性脑损伤后的损伤大小持续减小(图13B)。与对照小鼠相比,在低温损伤后第1天,在FXII缺陷型小鼠中,损伤体积的减小伴有神经元凋亡的显著减少(图13C)。在低温损伤后的第3天,观察到凋亡细胞的量有甚至更明显的差异(图13C)。

[0209] 因子XII的药理学抑制导致外伤性脑损伤后的微血管血栓减少和结果更好:

[0210] 为了检验药理学FXII抑制用于治疗TBI中病理学血栓的效力,我们以200mg/kg体重静脉内施用激活的FXII的选择性抑制剂rHA-Infestin-4,并监测经过重物下坠损伤或低温损伤的小鼠中的微血管血栓、功能结果和损伤体积。显现血小板和内皮细胞的苏木精和伊红染色脑切片和免疫组织化学的详细分析显示,在两种TBI模型中,与经媒介物处理的小鼠相比,在经rHA-Infestin-4处理的小鼠中血栓阻塞的脑微血管更少(图14A、14B、15A和15B)。

[0211] 经rHA-Infestin-4处理的小鼠中血栓形成减小与较好的神经结果相关。尽管在重物下坠损伤后,神经缺陷的初始严重性(1h和第1天)在处理组之间是相当的($P>0.05$),但是在外伤后第3天和第7天,经rHA-Infestin-4处理的小鼠比经媒介物处理的小鼠明显恢复的更好(第3天,中值NSS[25百分位,75百分位]:在经rHA-Infestin-4处理的小鼠中为2.0[2.0,3.0],在经媒介物处理的小鼠中为3.0[3.0,3.0], $P<0.05$;第7天,中值NSS[25百分位,75百分位]:在经rHA-Infestin-4处理的小鼠中为2.0[1.5,2.5],在经媒介物处理的小鼠中为3.0[2.0,5.0], $P<0.05$;图14C)。在低温损伤后,与经媒介物处理的小鼠相比,在经rHA-Infestin-4处理的小鼠中,第1天和第3天的损伤体积和神经退行性病变减轻。对于两种结果而言,rHA-Infestin-4的保护作用在低温损伤后的第3天甚至比第1天更显著(图7C和

7D)。

[0212] 与FXII缺陷类似,使用rHA-Infestin-4对小鼠的急性治疗在两种TBI模型中均可以预防脑微循环中病理学血栓的形成。血栓形成的减少分别与重物下坠损伤和低温损伤后脑外伤后晚期阶段(第3天,第7天)保持的更好的神经结果、较少的脑损伤以及较少的神经退行性病变有关。因此,脑外伤后单一施用rHA-Infestin-4似乎足以用于保护而免于损伤恶化。综上,FXII的药理学抑制导致试验性TBI后微血管血栓减少和结果更好。

[0213] FXII缺陷或抑制不会增加脑出血的风险:

[0214] 为了证明脑外伤后FXII抑制在异常脑出血方面的安全性,我们测定了在FXII^{-/-}小鼠、rHA-Infestin处理的小鼠和它们各自的对照的受损伤大脑半球中的出血程度。在低温损伤后,FXII缺陷型小鼠和使用rHA-Infestin-4处理的小鼠均未显示出血水平升高(图16)。为了证实该结果,我们还测定了FXI^{-/-}小鼠中的出血程度,这是因为FXI缺陷与人类中外伤后出血增加有关(Rosenthal et al.,1955,Blood 10:120-131)。在这些小鼠中,我们在受损伤大脑半球中观察到出血增加,这也可以肉眼看到(图16)。此外,FXII缺陷型小鼠和野生型对照的MRI扫描也显示无出血迹象。

序列表

<110> CSL Behring GmbH

Justus-Maximilians-Universitaet Wuerzburg

<120> 在神经创伤性病患中使用因子XII抑制剂进行治疗

<130> 2014_M001_A232

<150> EP 14172910.3

<151> 2014-06-18

<160> 20

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 48

<212> PRT

<213> 骚扰锥蝱 (Triatoma infestans)

<400> 1

Glu Val Arg Asn Pro Cys Ala Cys Phe Arg Asn Tyr Val Pro Val Cys

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

<210> 2

<211> 56

<212> PRT

<213> 人 (Homo Sapiens)

<400> 2

Asp Ser Leu Gly Arg Glu Ala Lys Cys Tyr Asn Glu Leu Asn Gly Cys

1 5 10 15

Thr Lys Ile Tyr Asp Pro Val Cys Gly Thr Asp Gly Asn Thr Tyr Pro

20 25 30

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

35 40 45

Leu Ile Gln Lys Ser Gly Pro Cys

50 55

<210> 3

<211> 53

<212> PRT

<213> 人

<400> 3

Asp Ser Leu Gly Arg Glu Val Arg Asn Pro Cys Ala Cys Phe Arg Asn
1 5 10 15
Tyr Val Pro Val Cys Gly Thr Asp Gly Asn Thr Tyr Pro Asn Glu Cys
 20 25 30
Val Leu Cys Phe Glu Asn Arg Lys Arg Gln Thr Ser Ile Leu Ile Gln
 35 40 45
Lys Ser Gly Pro Cys
 50

<210> 4

<211> 53

<212> PRT

<213> 人

<400> 4

Asp Ser Leu Gly Arg Glu Val Arg Asn Pro Cys Ala Cys Phe Arg Asn
1 5 10 15
Tyr Val Pro Val Cys Gly Thr Asp Gly Asn Thr Tyr Gly Asn Glu Cys
 20 25 30
Met Leu Cys Ala Glu Asn Arg Lys Arg Gln Thr Ser Ile Leu Ile Gln
 35 40 45
Lys Glu Gly Pro Cys
 50

<210> 5

<211> 54

<212> PRT

<213> 人

<400> 5

Asp Ser Leu Gly Arg Glu Val Arg Asn Pro Cys Ala Cys Phe Arg Asn
1 5 10 15
Tyr Val Pro Val Cys Gly Thr Asp Gly Asn Thr Tyr Gly Asn Glu Cys
 20 25 30
Met Leu Asn Cys Ala Glu Asn Arg Lys Arg Gln Thr Ser Ile Leu Ile
 35 40 45
Gln Lys Glu Gly Pro Cys
 50

<210> 6

<211> 129

<212> PRT

<213> 人

<400> 6

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Lys Tyr
 20 25 30
 Ile Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Arg Pro Ser Gly Gly Thr Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ala Leu Pro Arg Ser Gly Tyr Leu Ile Ser Pro His Tyr Tyr
 100 105 110
 Tyr Tyr Ala Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 115 120 125

Ser

<210> 7

<211> 110

<212> PRT

<213> 人

<400> 7

Gln Ser Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Arg Asn
 20 25 30
 Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Val Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Val Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80
 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Ala Ser Leu
 85 90 95
 Arg Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> 人

<400> 8

Lys Tyr Ile Met Gln

1 5

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 9

Gly Ile Arg Pro Ser Gly Gly Thr Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 显示改变的重链CDR2

<220>

<221> 变体

<222> (3) .. (3)

<223> Xaa选自Arg, Asn,和Asp

<220>

<221> 变体

<222> (4) .. (4)

<223> Xaa选自Pro, Val, Ile和Met

<220>

<221> 变体

<222> (5) .. (5)

<223> Xaa选自Ser, Pro和Ala

<220>

<221> 变体

<222> (6) .. (6)

<223> Xaa选自Gly, Leu, Val和Thr

<220>

<221> 变体

<222> (7) .. (7)

<223> Xaa选自Gly, Tyr, Gln, Lys, Arg, Asn和Met

<220>

<221> 变体

<222> (8) .. (8)

<223> Xaa选自Thr, Gly和Ser

<400> 10

Gly Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 11

<211> 20

<212> PRT

<213> 人

<400> 11

Ala Leu Pro Arg Ser Gly Tyr Leu Ile Ser Pro His Tyr Tyr Tyr Tyr

1 5 10 15

Ala Leu Asp Val

20

<210> 12

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 显示改变的重链CDR3

<220>

<221> 变体

<222> (9) .. (9)

<223> Xaa选自Ala, Met和Val

<220>

<221> 变体

<222> (10) .. (10)

<223> Xaa选自Ser和Lys

<220>

<221> 变体

<222> (11) .. (11)

<223> Xaa选自Pro, Lys, Thr和His

<220>

<221> 变体

<222> (12) .. (12)

<223> Xaa选自His, Asn, Gly和Gln

<400> 12

Ala Leu Pro Arg Ser Gly Tyr Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Tyr Tyr

1

5

10

15

Ala Leu Asp Val

20

<210> 13

<211> 13

<212> PRT

<213> 人

<400> 13

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Arg Asn Tyr Val Tyr

1

5

10

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 14

Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser

1

5

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 15

Ala Ala Trp Asp Ala Ser Leu Arg Gly Val

1

5

10

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 显示改变的轻链CDR3

<220>

<221> 变体

<222> (2) .. (2)

<223> Xaa选自Ala和Ser

<220>

<221> 变体

<222> (4) .. (6)

<223> Xaa 可以是任何氨基酸

<220>

<221> 变体

<222> (7) .. (7)

<223> Xaa选自Leu和Val

<220>

<221> 变体

<222> (9) .. (10)

<223> Xaa可以是任何氨基酸

<400> 16

Ala Xaa Trp Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Xaa

1 5 10

<210> 17

<211> 13

<212> PRT

<213> 人

<400> 17

Ser Gly Ser Ser Glu Met Thr Val His His Tyr Val Tyr

1 5 10

<210> 18

<211> 12

<212> PRT

<213> 骚扰锥蝽

<400> 18

Val Arg Asn Pro Cys Ala Cys Phe Arg Asn Tyr Val

1 5 10

<210> 19

<211> 12

<212> PRT

<213> 骚扰锥蝽

<400> 19

Asp Ser Leu Gly Arg Glu Val Arg Asn Pro Cys Ala

1 5 10

<210> 20

<211> 585

<212> PRT

<213> 人

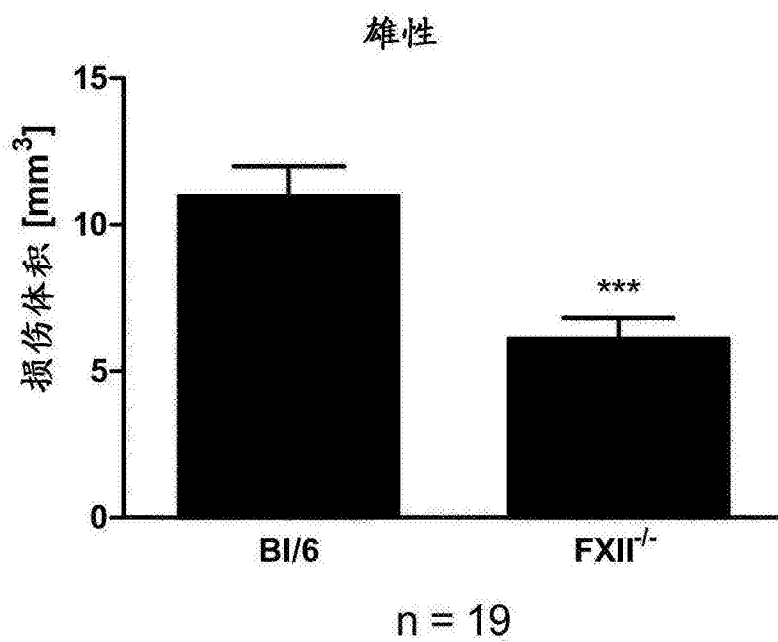
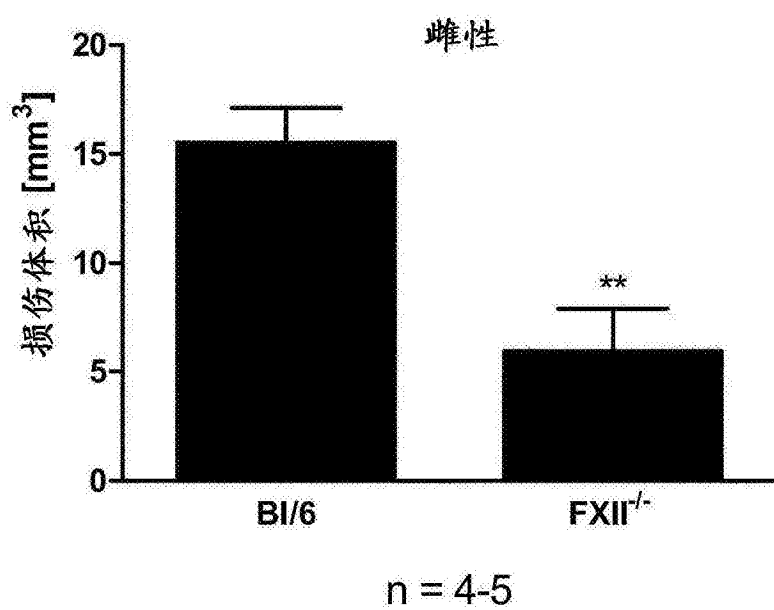
<400> 20

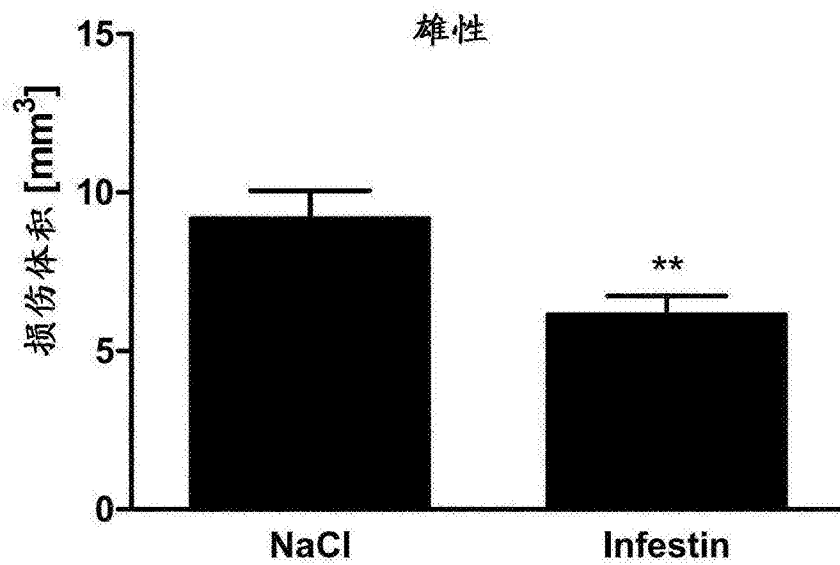
Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu

1 5 10 15

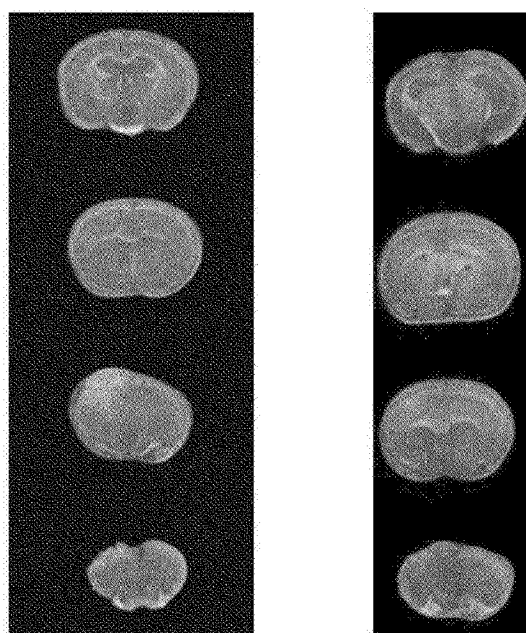
Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln			
20	25	30	
Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu			
35	40	45	
Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys			
50	55	60	
Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu			
65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

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

A**B**

C

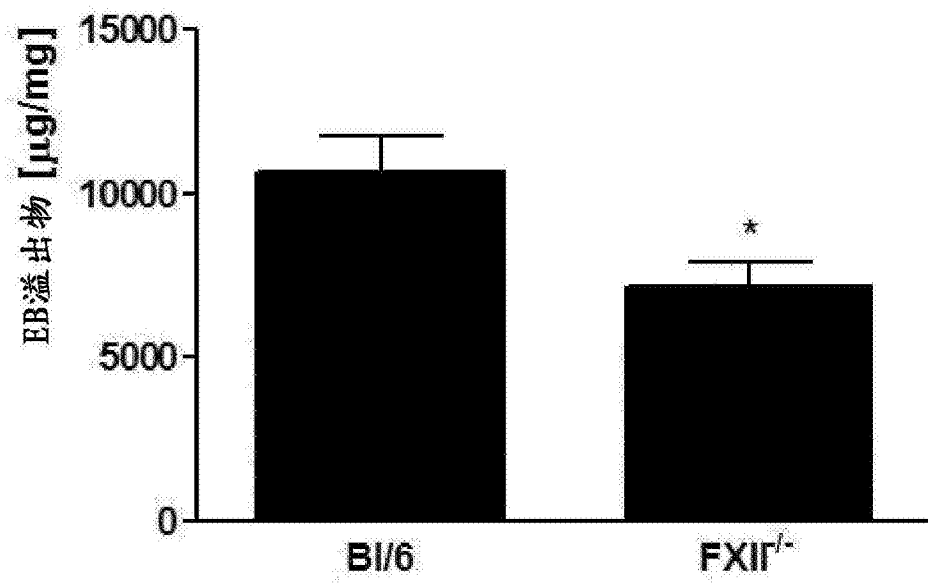
n = 13-14



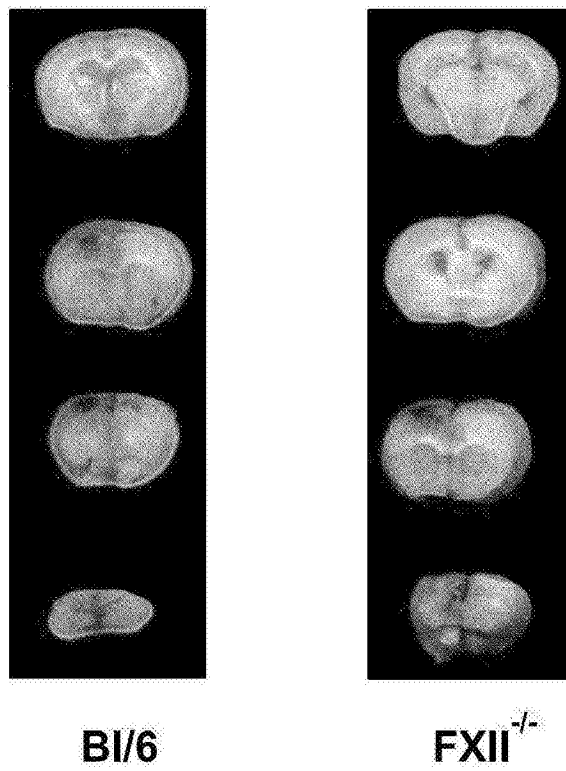
NaCl

Infestin

图1

A

n = 6-8



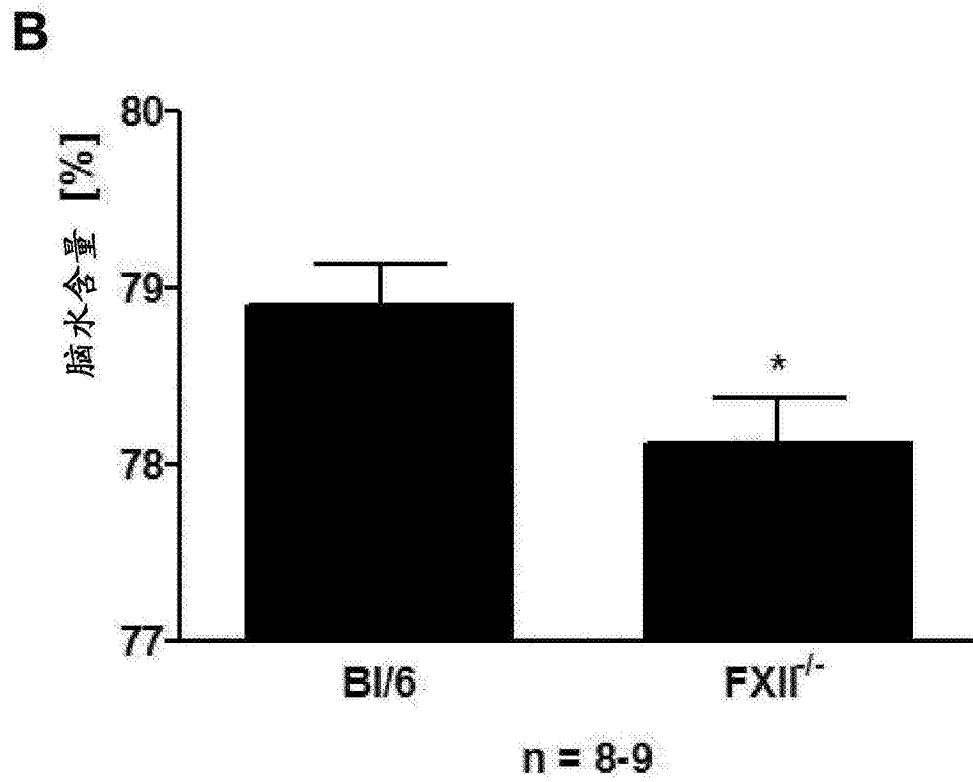
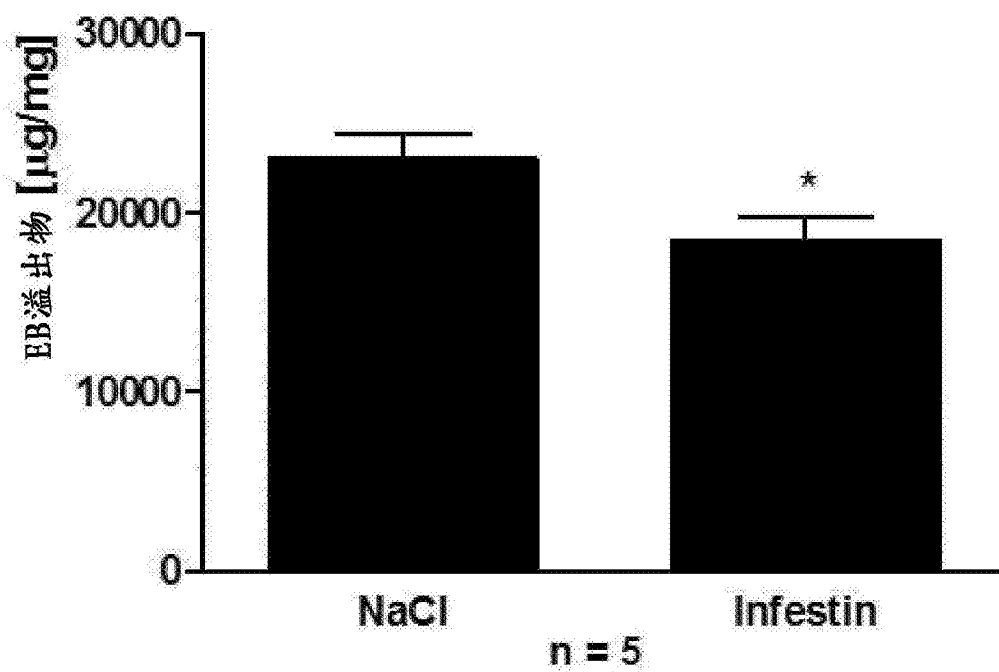
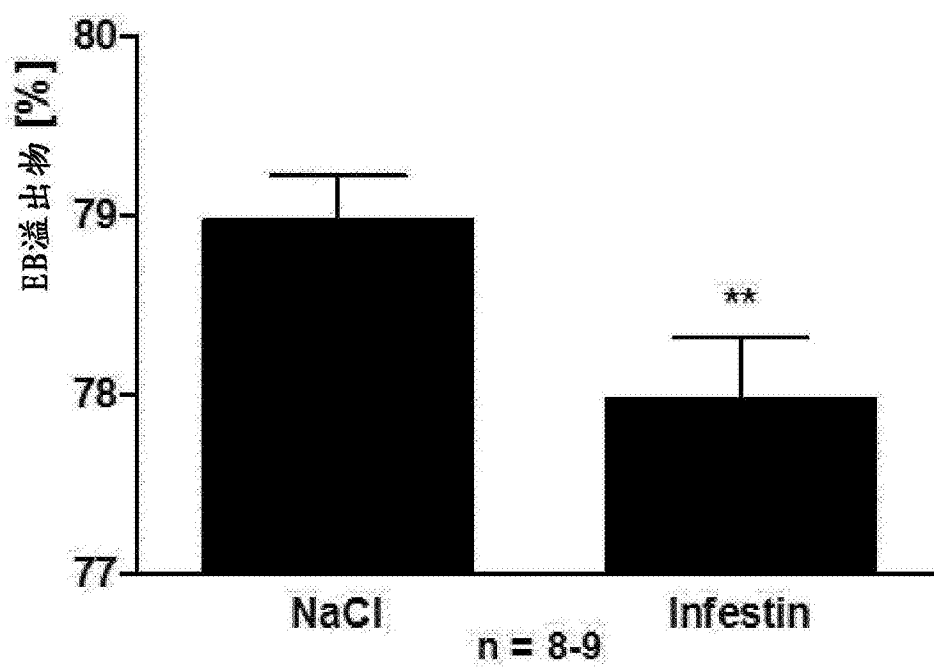


图2

A**B**

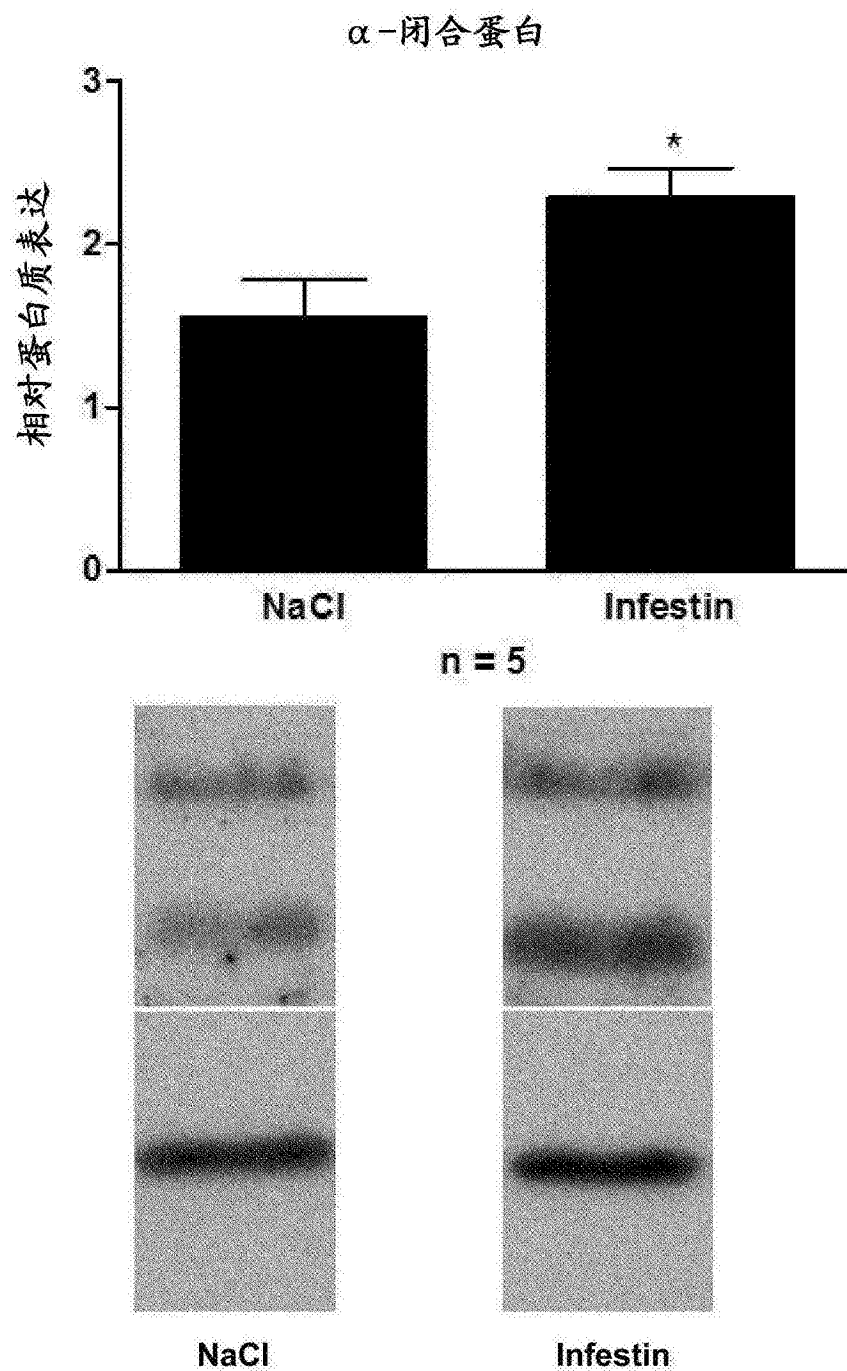
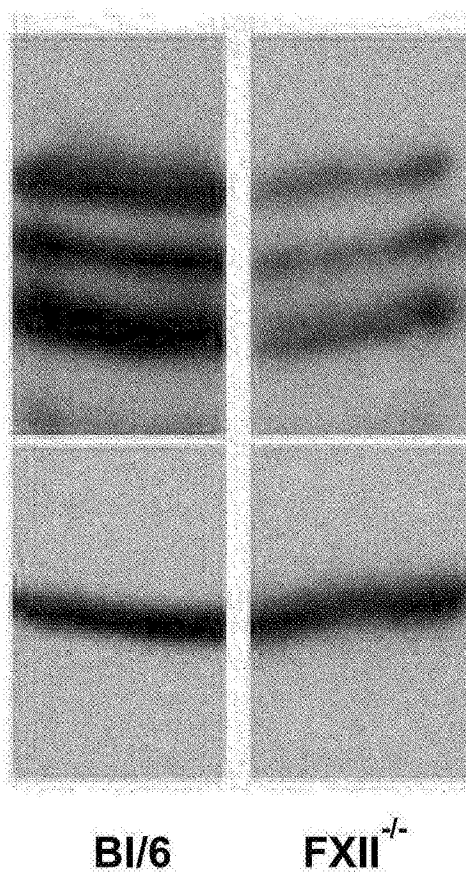
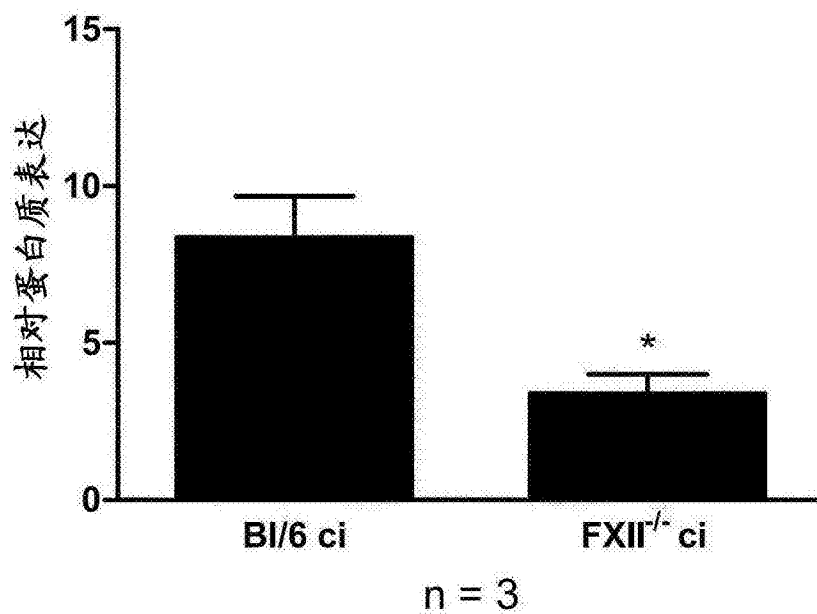
C

图3

A α -纤维蛋白(原)

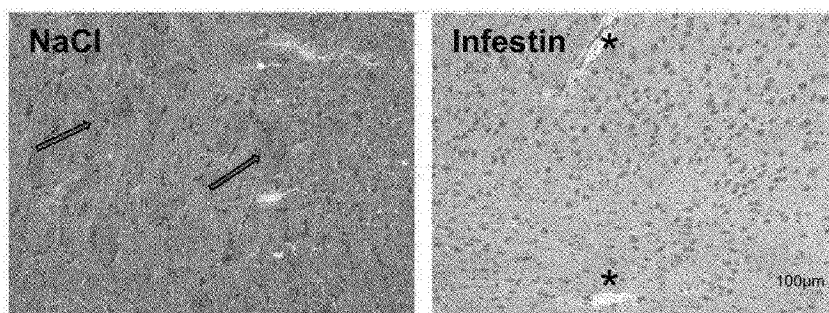
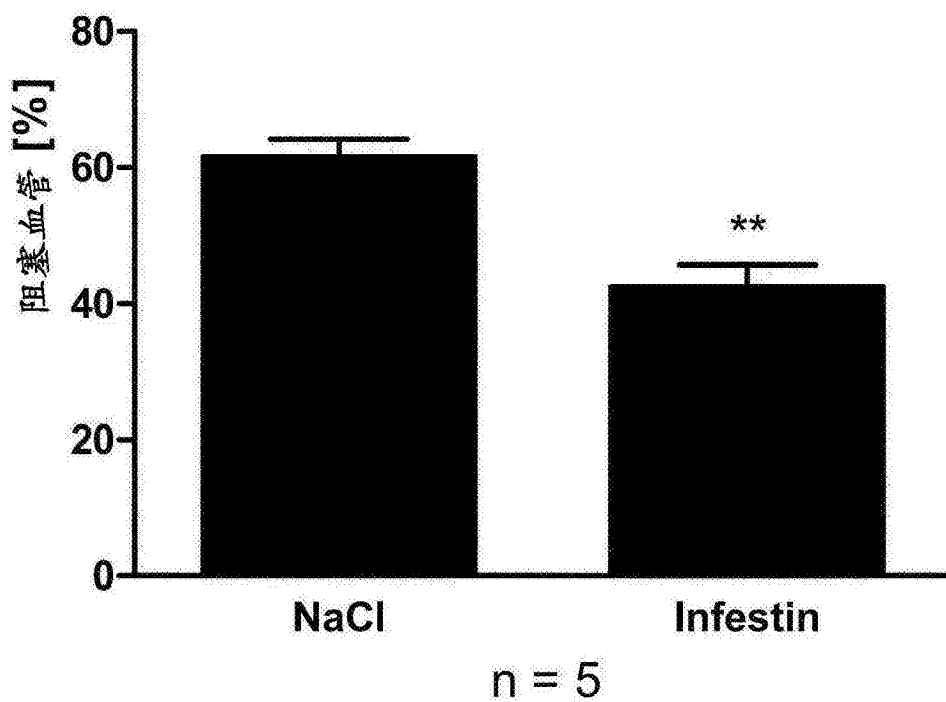
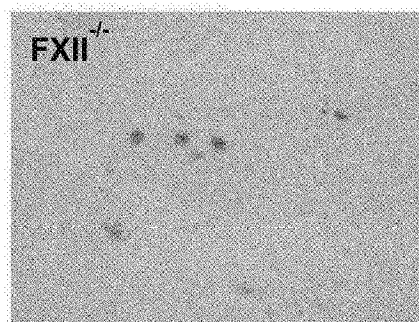
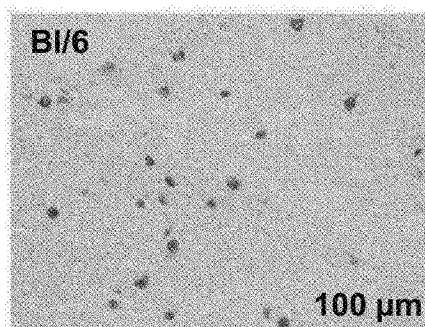
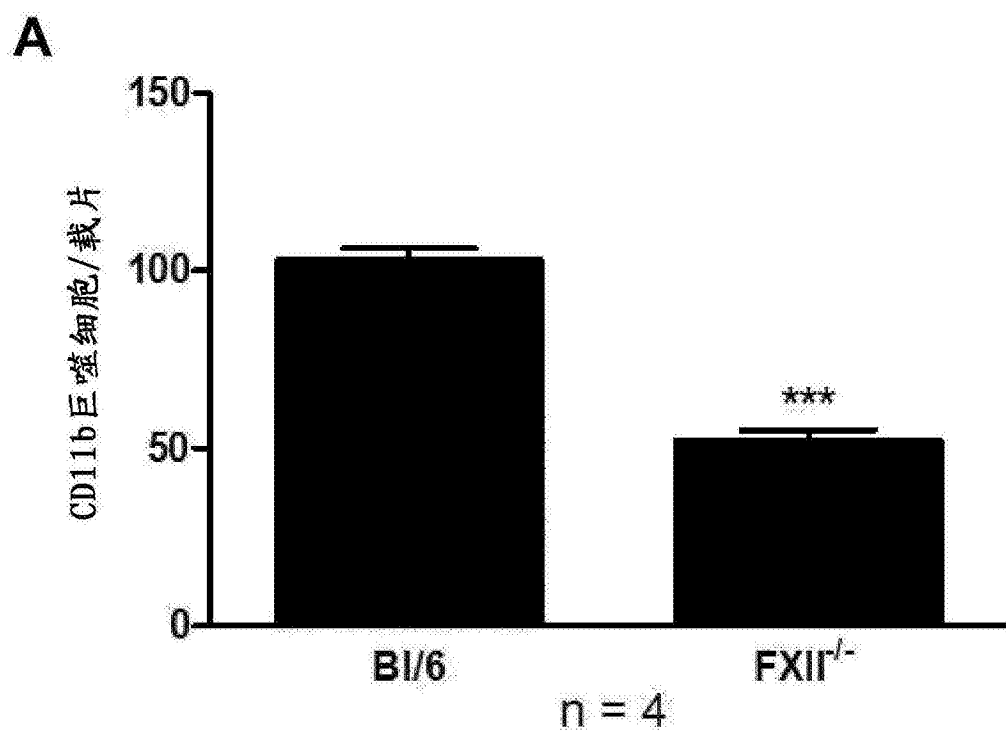
B

图4



CD11b⁺ - 染色

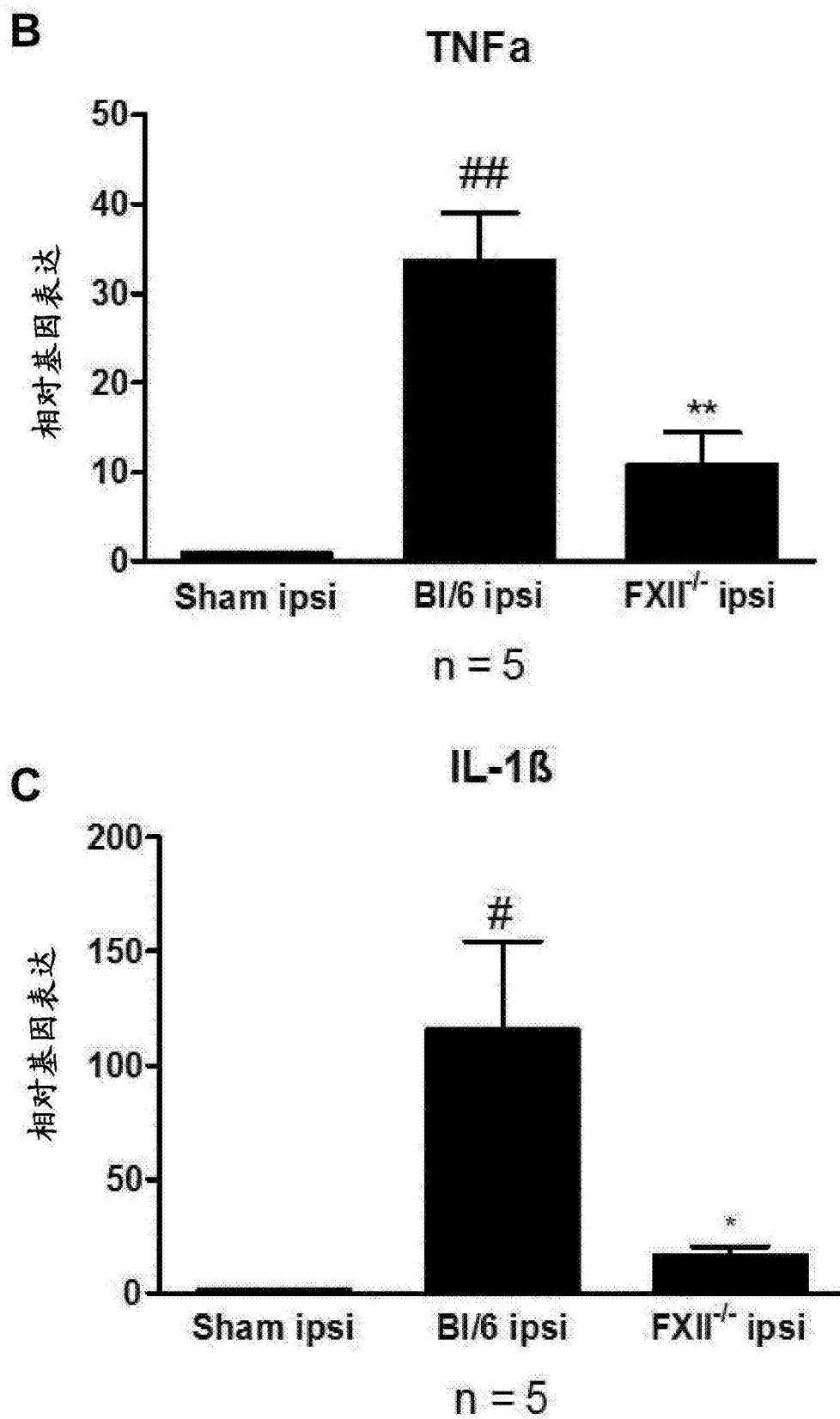


图5

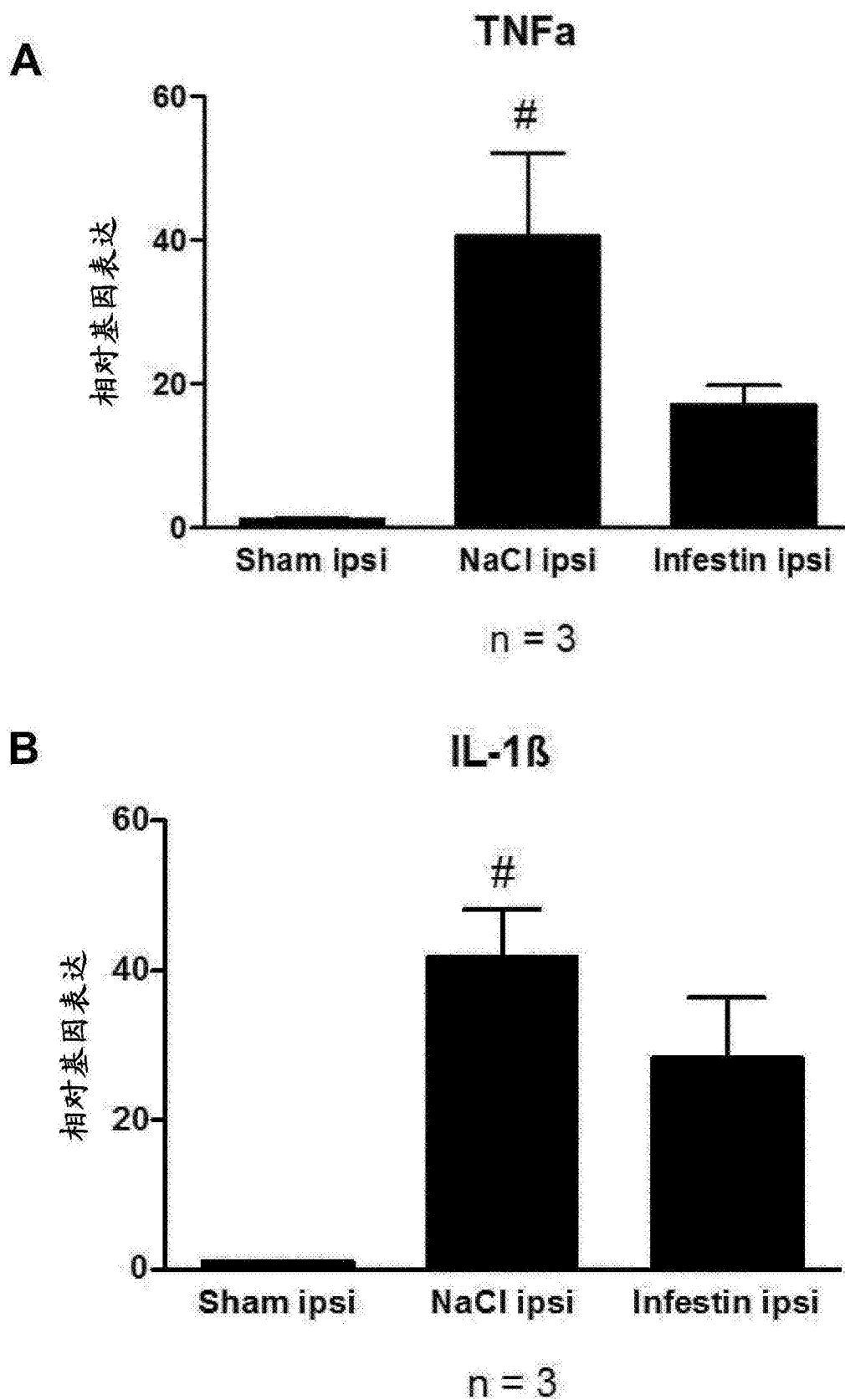


图6

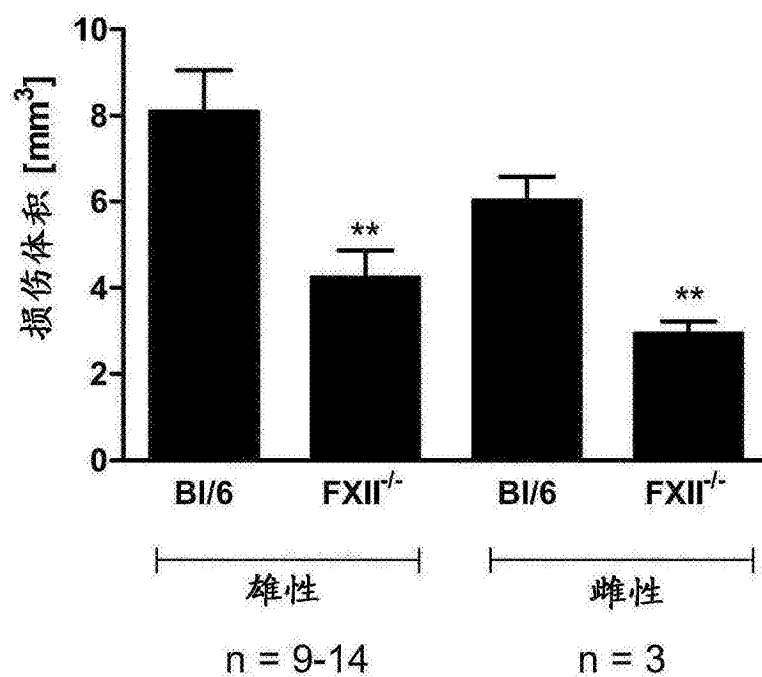


图7

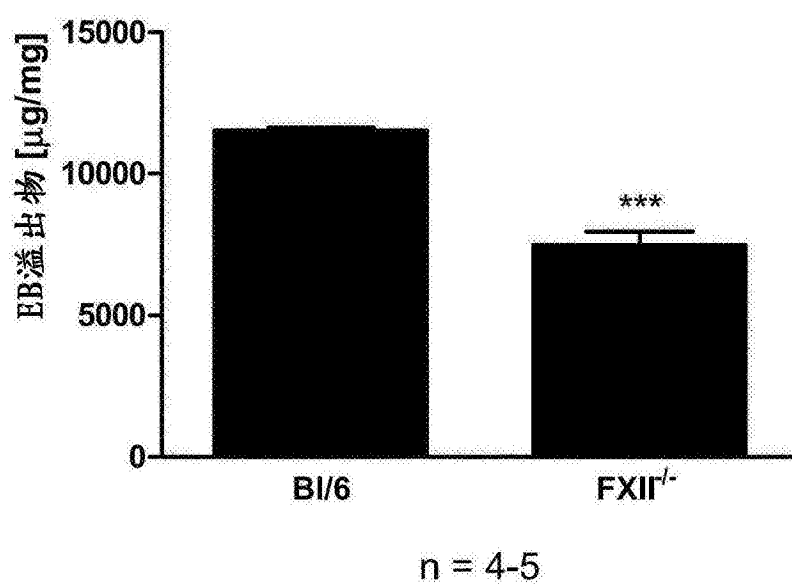
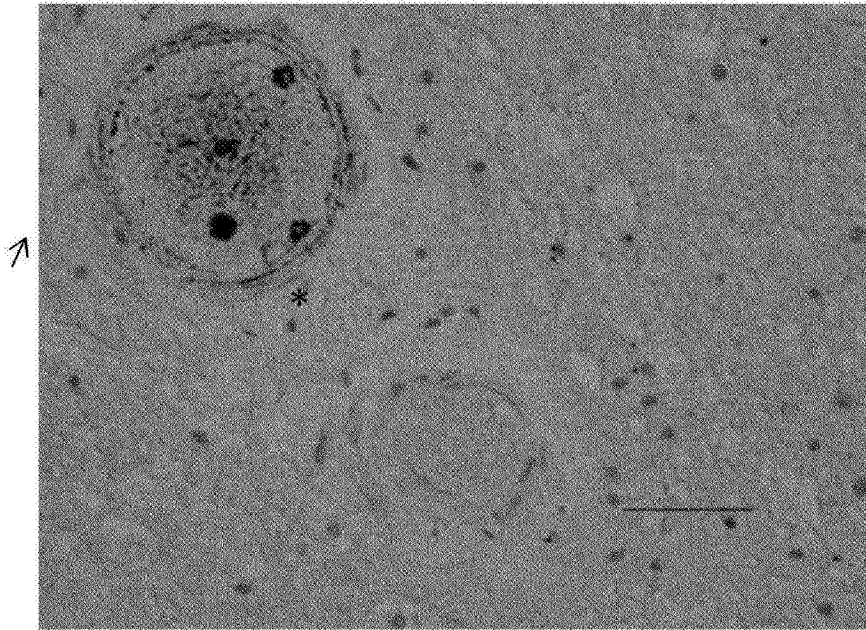
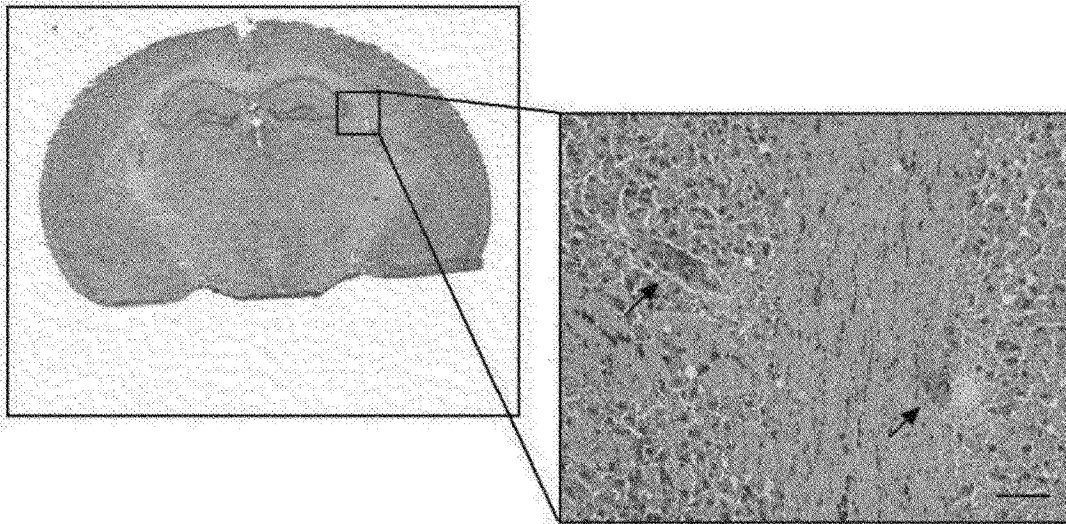


图8

A**B**

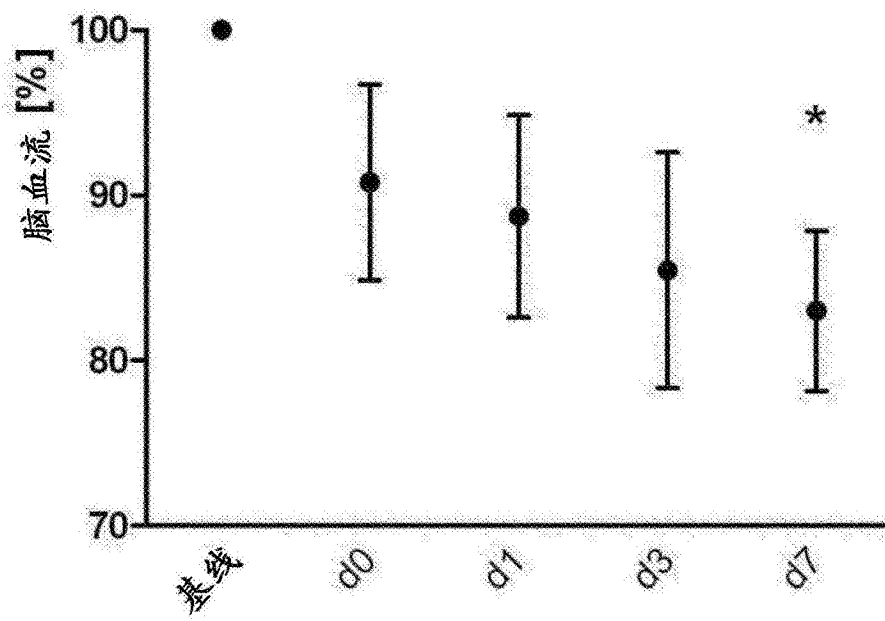
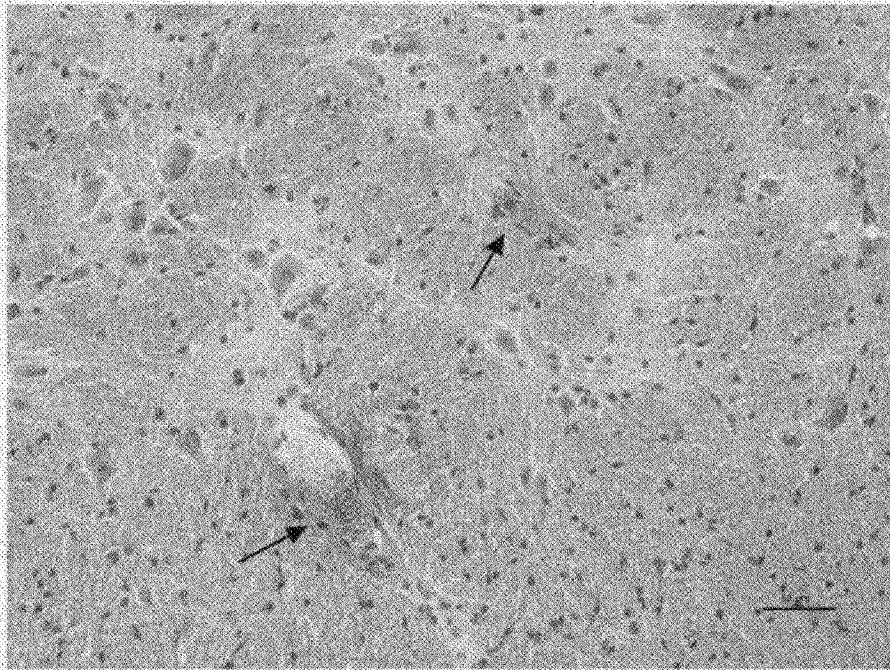
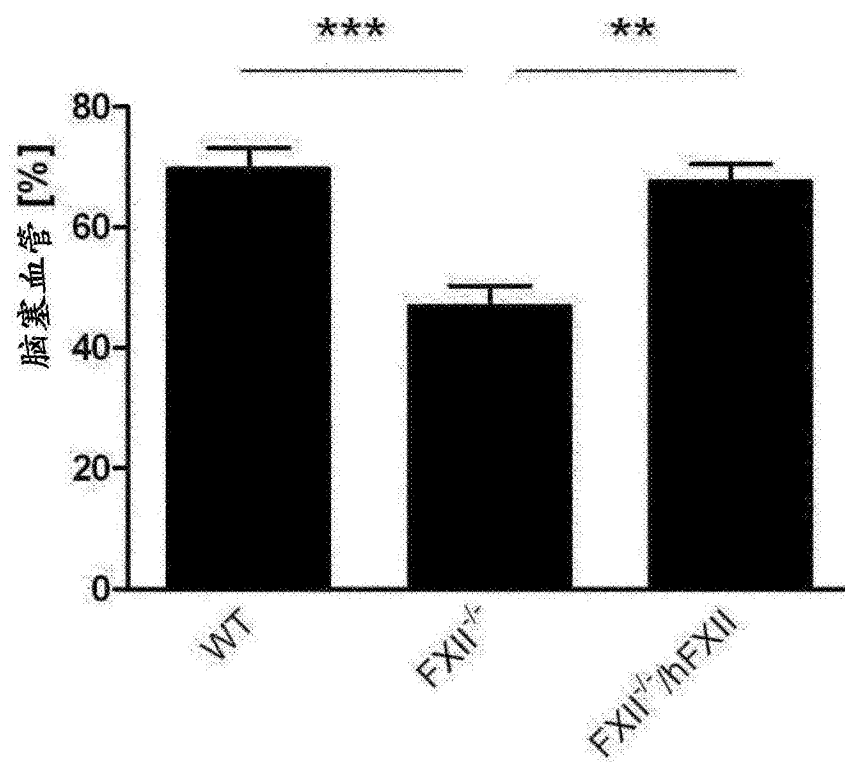
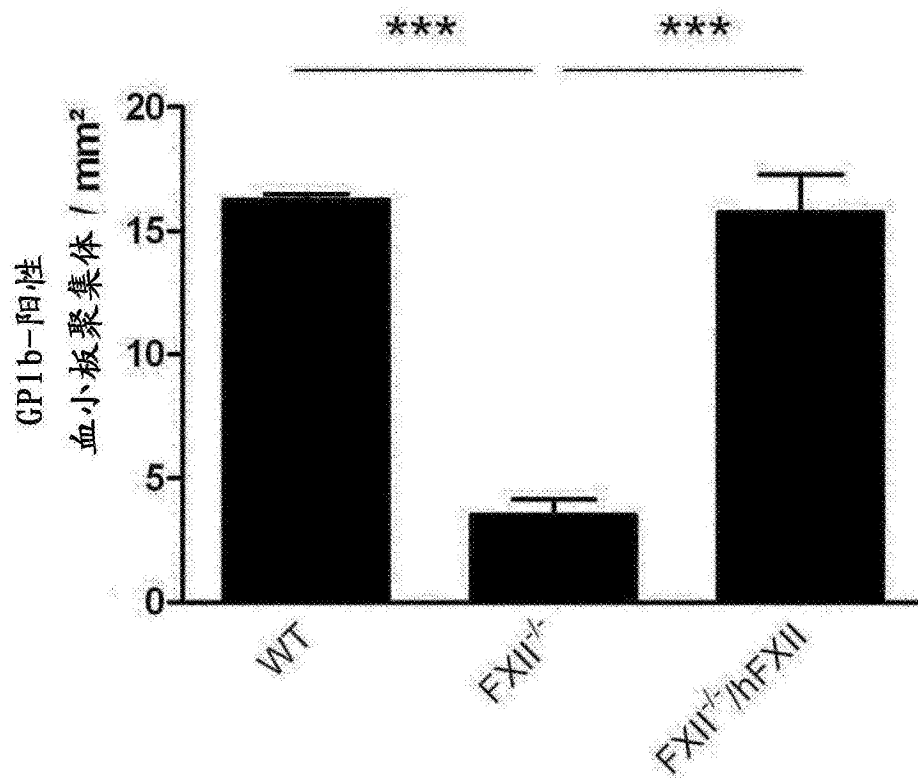
C**D**

图9

A**B**

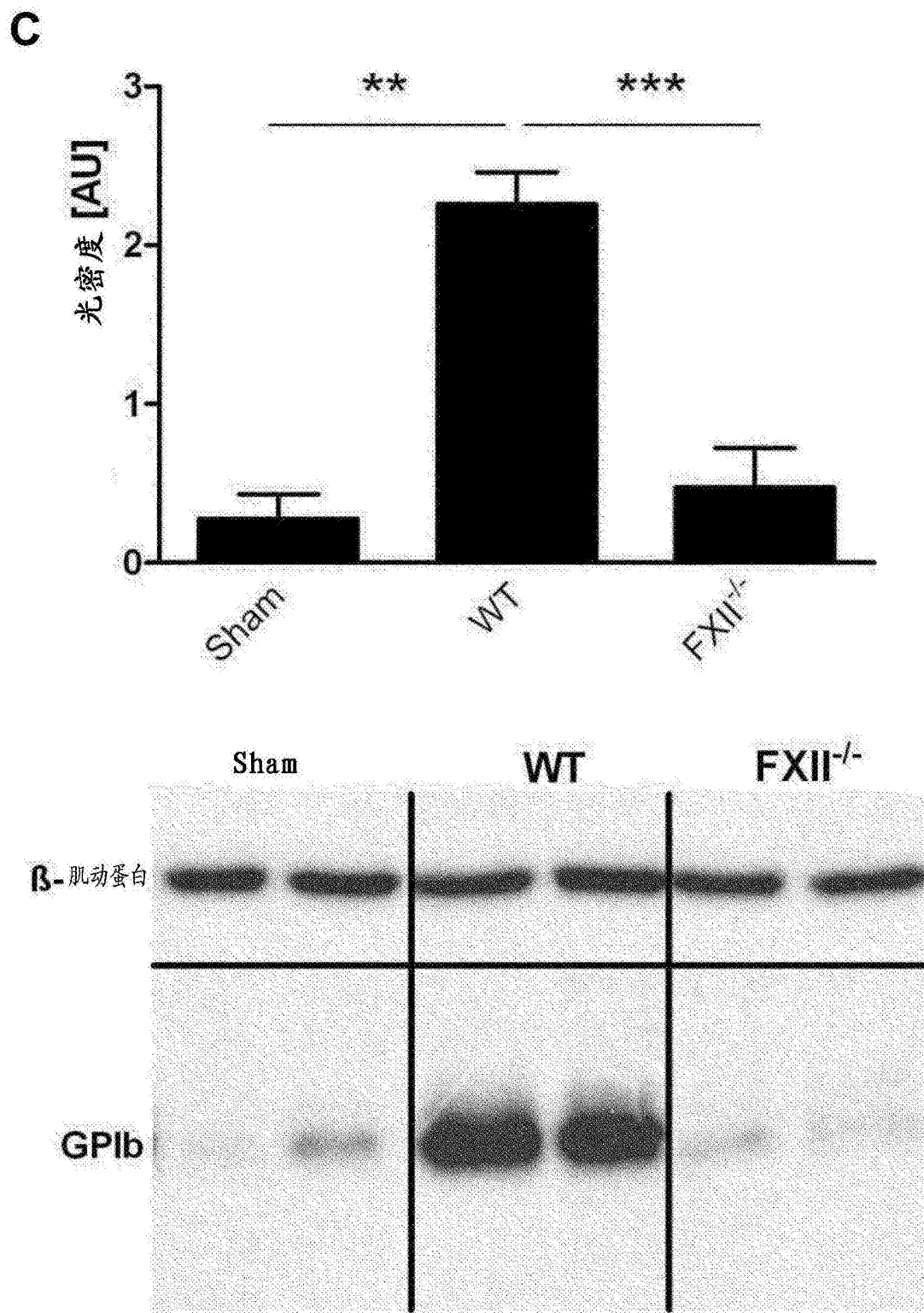
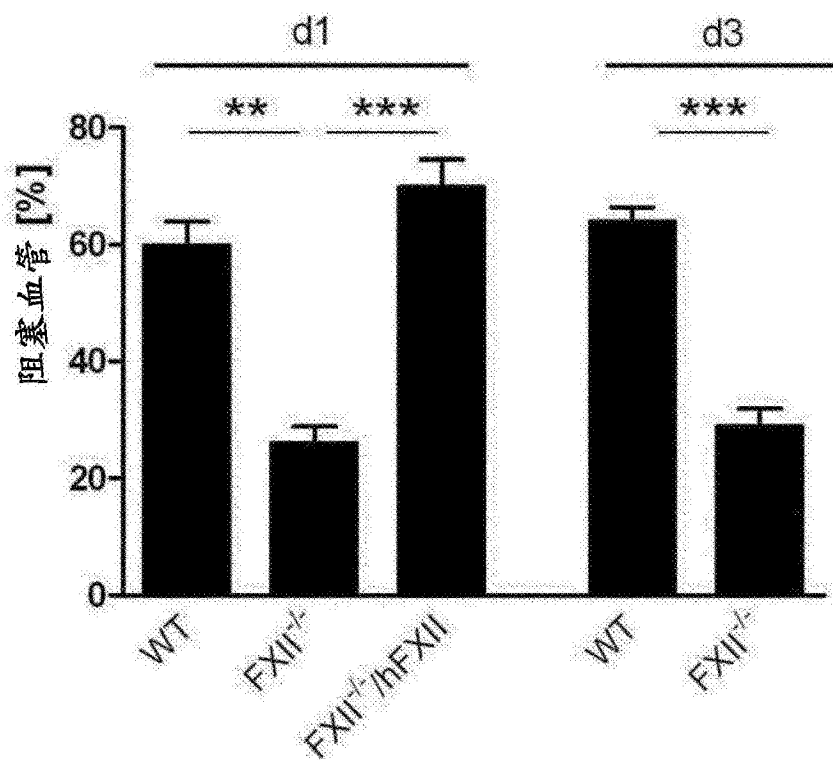
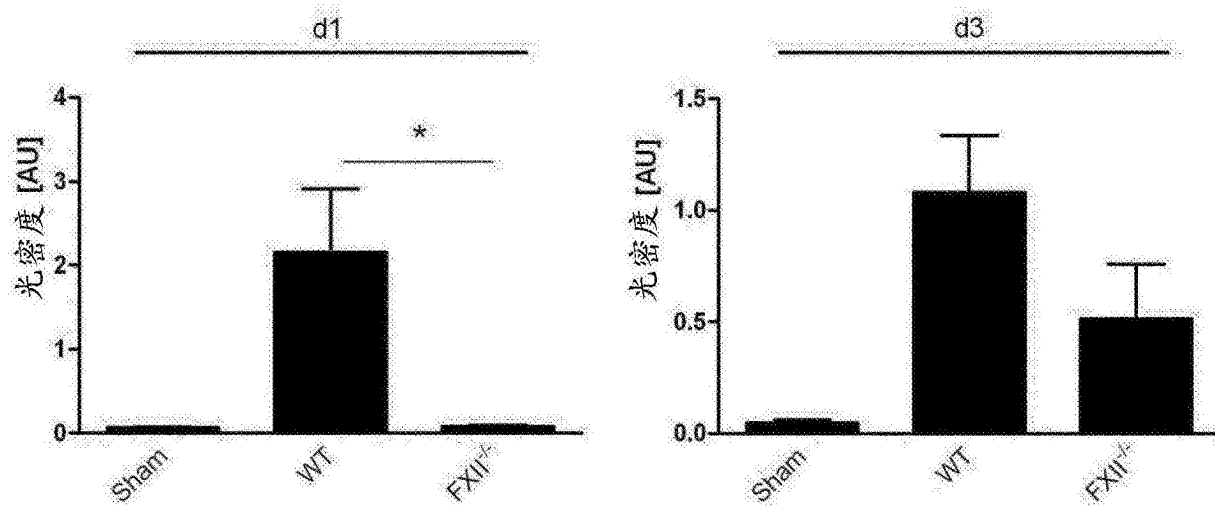


图10

A**B**

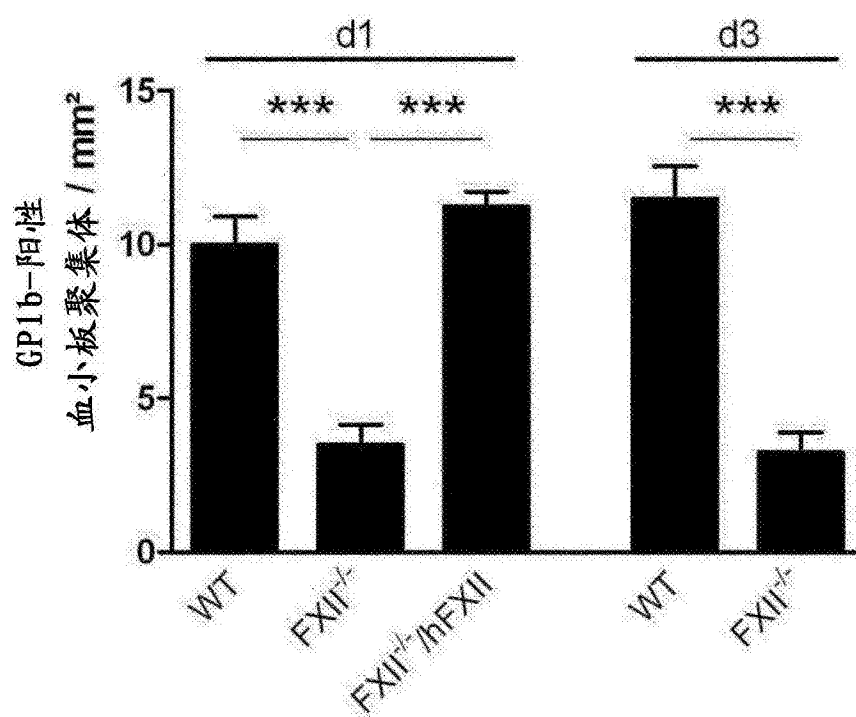
C

图11

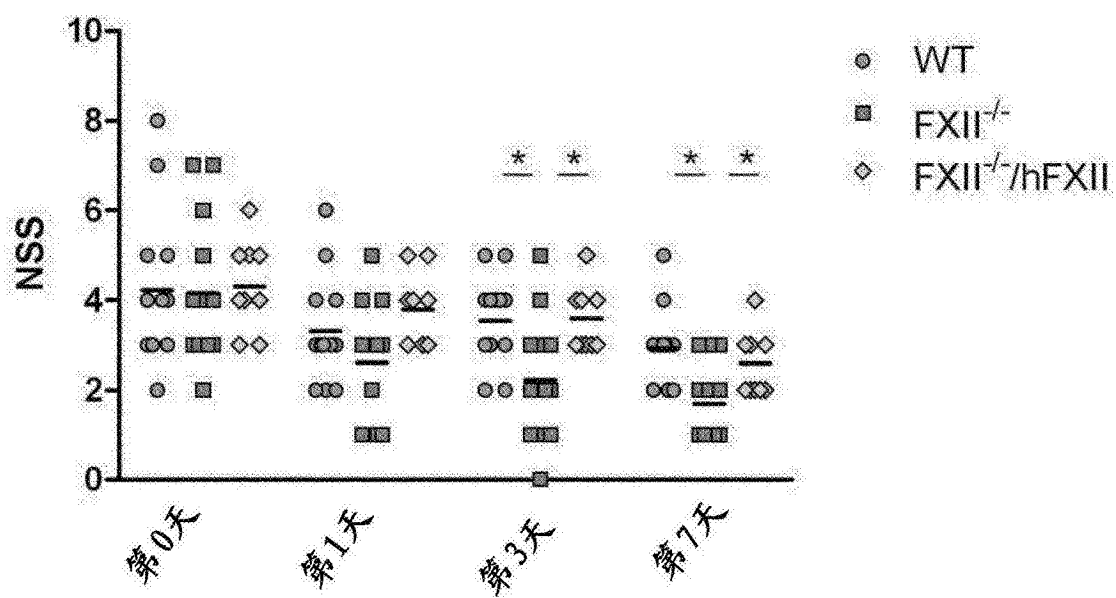
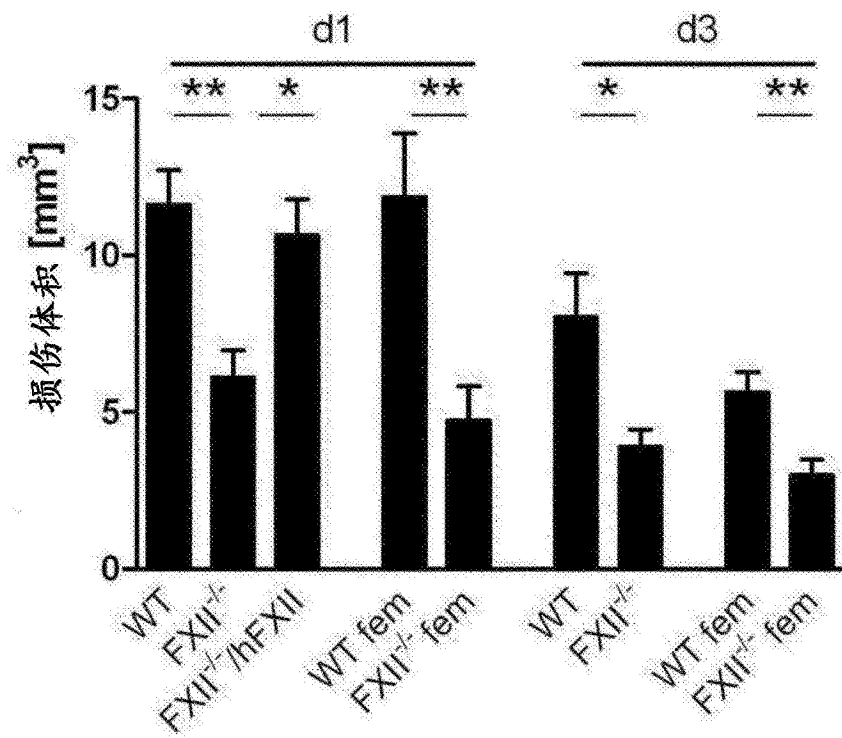
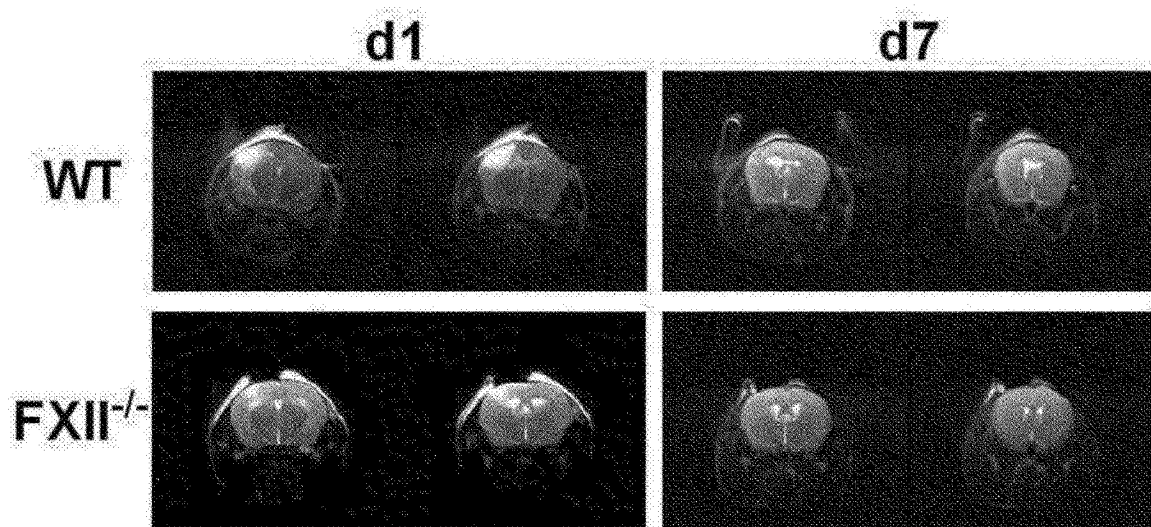
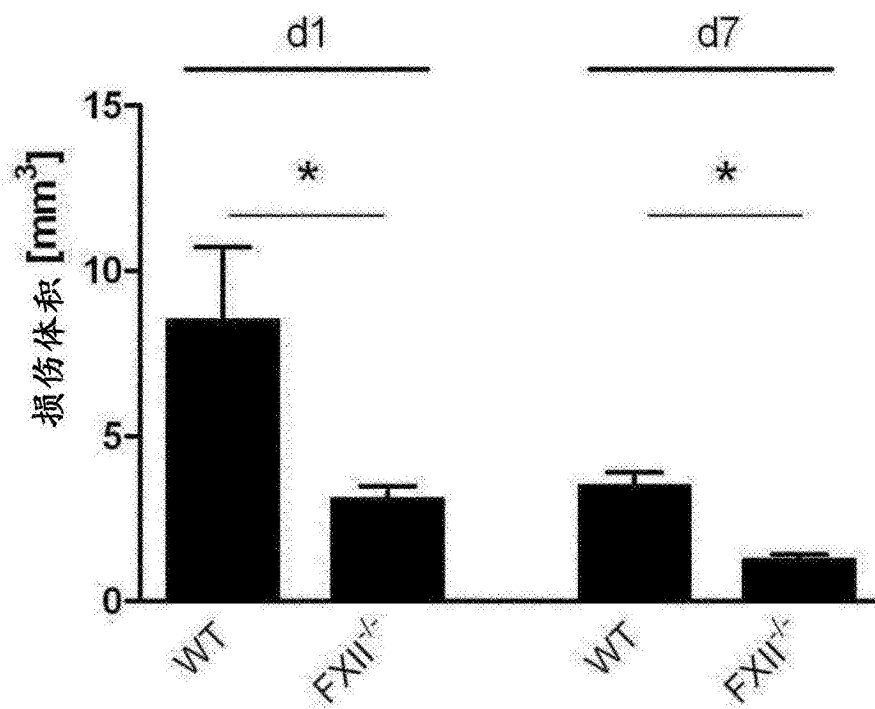


图12

A

B

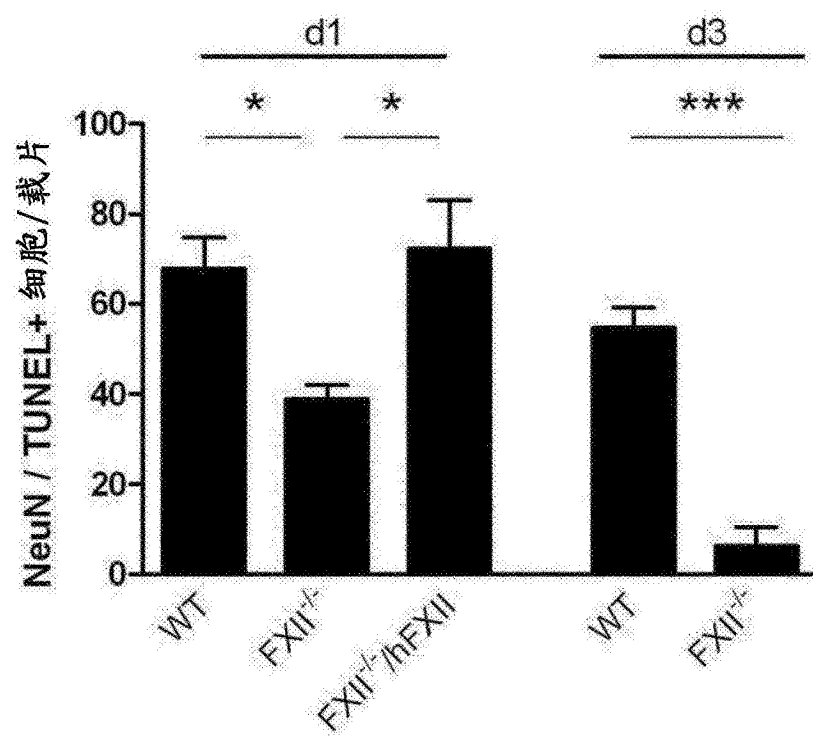
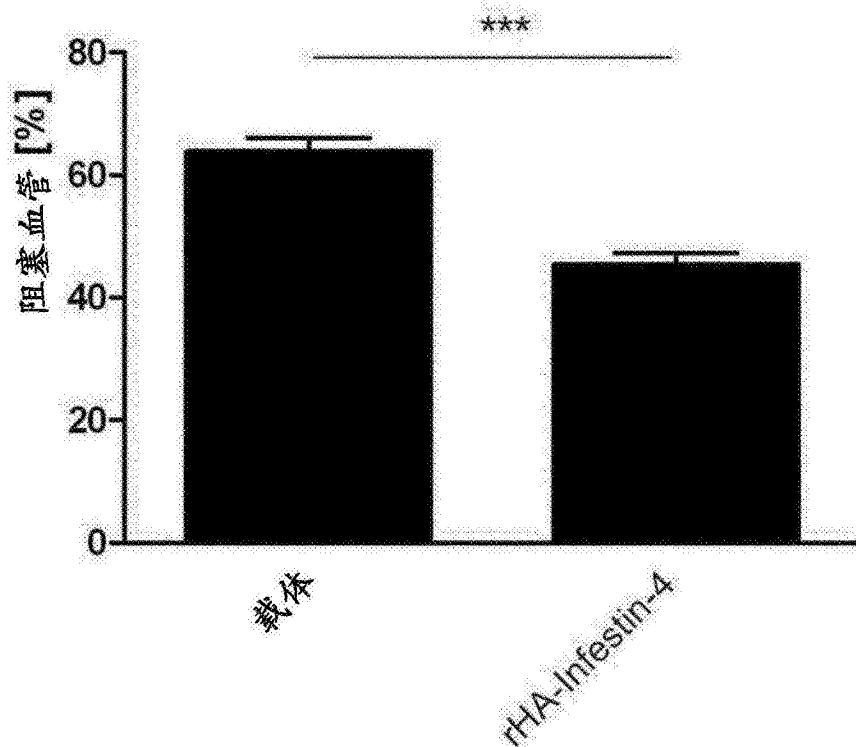
C

图13

A

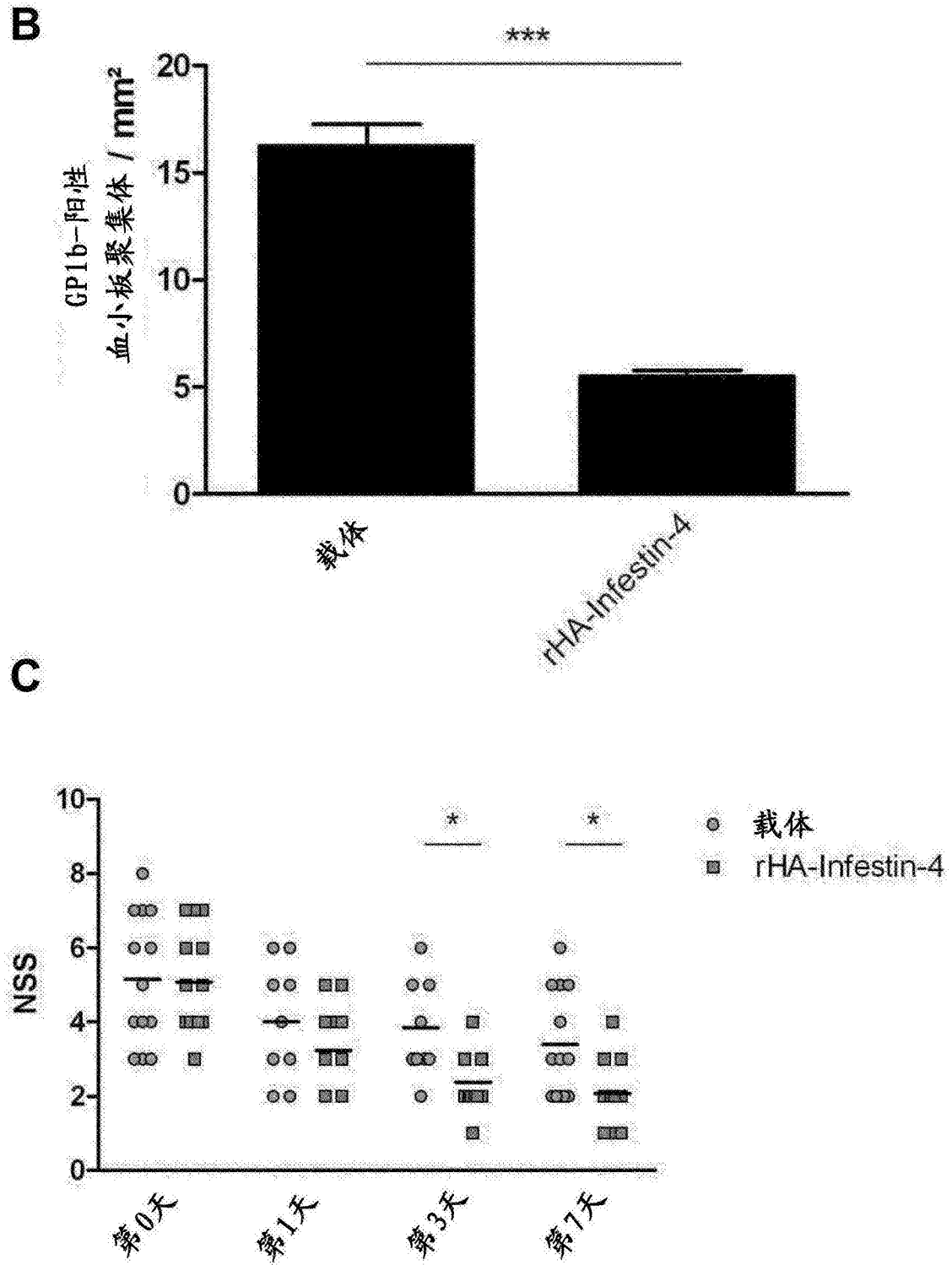
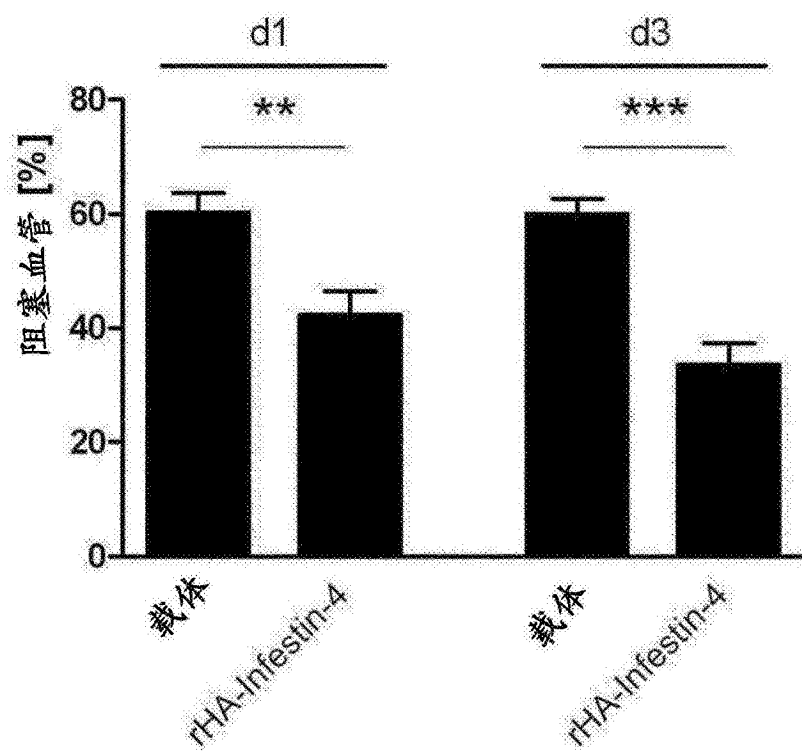
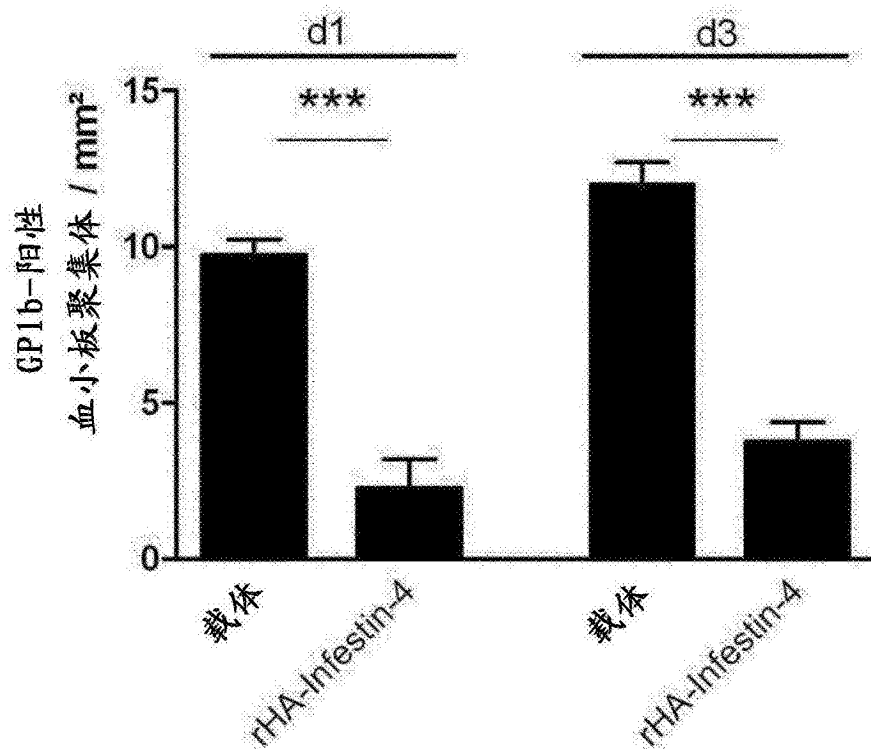


图14

A**B**

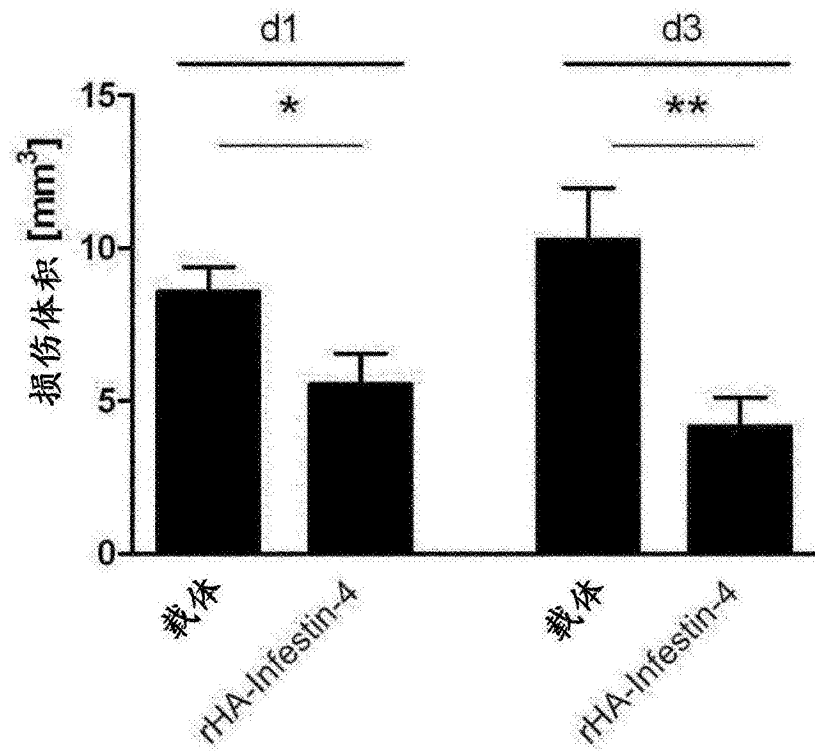
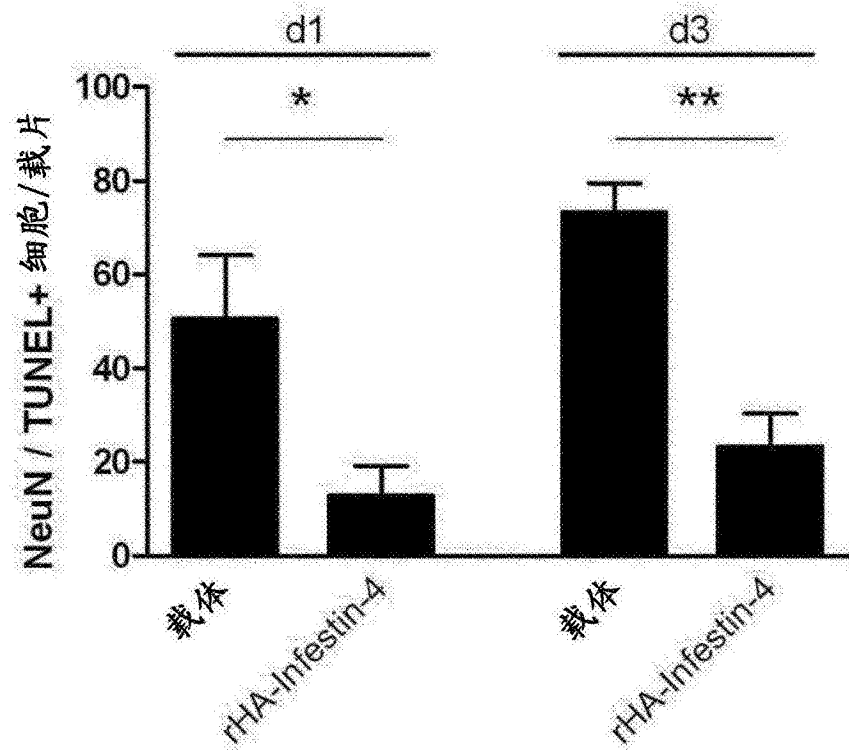
C**D**

图15

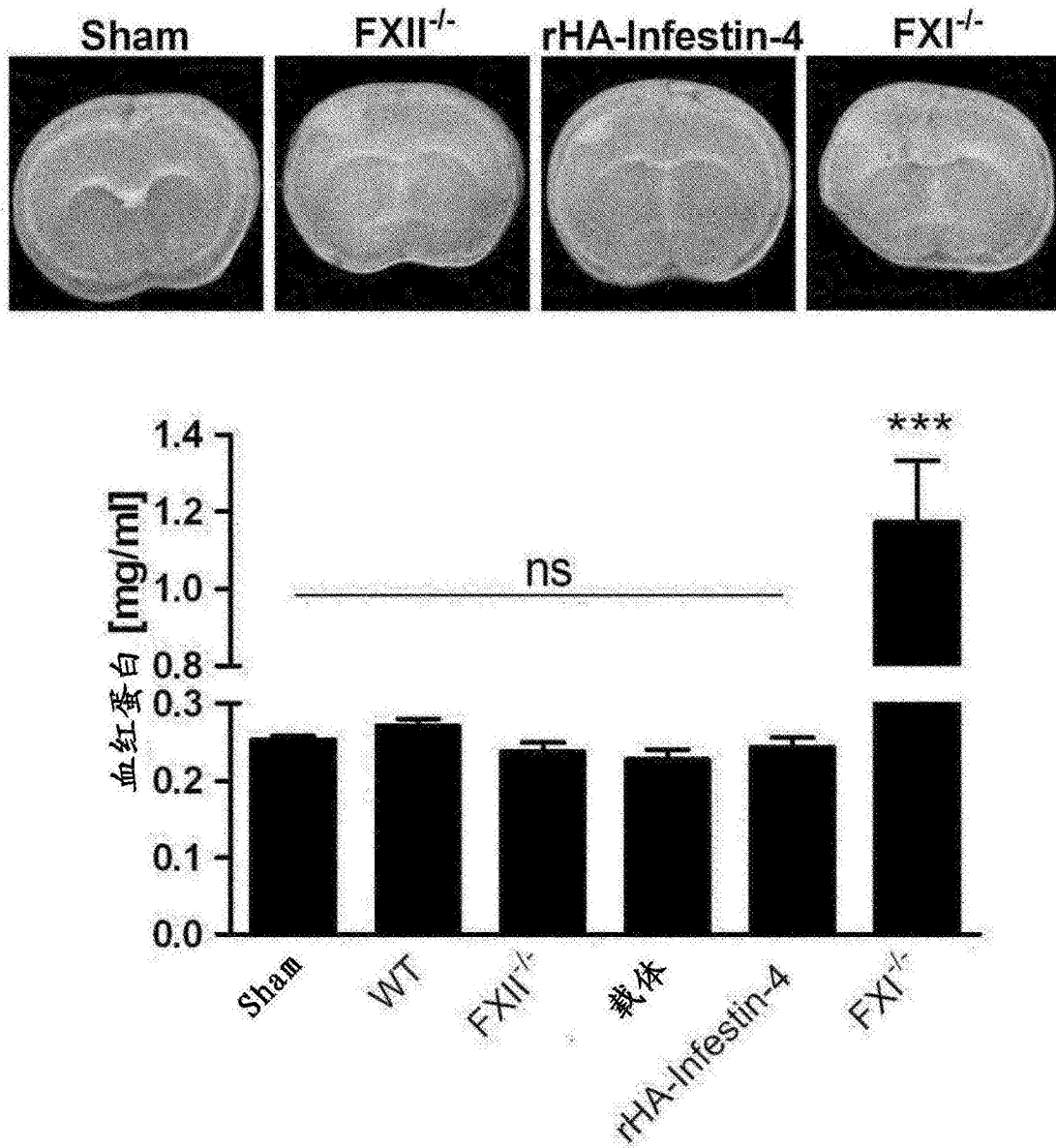


图16

