[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580046575.6

[51] Int. Cl.
A61P 7/02 (2006.01)
C07K 16/36 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 14/81 (2006.01)
A61K 38/56 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 1 月 9 日

[11] 公开号 CN 101102819A

[22] 申请日 2005.12.20
[21] 申请号 200580046575.6
[30] 优先权
[32] 2004.12.23 [33] EP [31] 04030593.0
[86] 国际申请 PCT/EP2005/013714 2005.12.20
[87] 国际公布 WO2006/066878 英 2006.6.29
[85] 进入国家阶段日期 2007.7.13
[71] 申请人 CSL 百灵有限公司
地址 德国马尔堡
[72] 发明人 B·涅斯万德特 T·瑞恩尼
[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所
代理人 胡国群

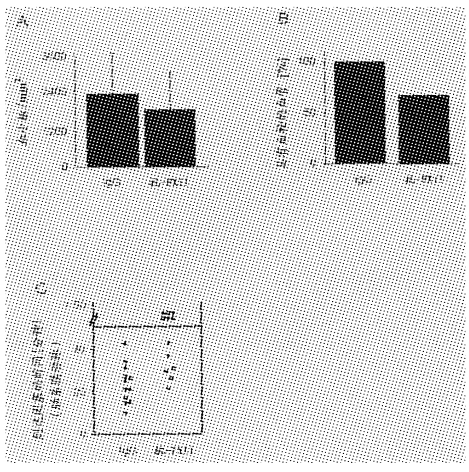
权利要求书 2 页 说明书 25 页 附图 7 页

[54] 发明名称

血栓的形成和/或稳定化的预防

[57] 摘要

本发明涉及至少一种抗体和/或一种抑制剂用于抑制凝血因子 XII 和防止三维血栓的形成和/或稳定化的用途。 本发明还涉及药物制剂以及凝血因子 XII 作为抗血栓形成的靶标的用途。



1. 至少一种抗体和/或一种抑制剂用于抑制凝血因子 XII 以及防止血栓的形成和/或稳定化从而防止三维腔内血栓生长的用途。

2. 根据权利要求 1 的用途，其中所述抗体是抗-FXII 抗体。

3. 根据权利要求 1 的用途，其中所述抗体抑制 FXII 激活。

4. 根据权利要求 1 的用途，其中所述抑制剂是蛋白酶抑制剂。

5. 根据权利要求 1 的用途，其中所述抑制剂是丝氨酸蛋白酶抑制剂。

6. 根据权利要求 3 的用途，其中所述蛋白酶抑制剂选自 AT III 抑制剂、血管紧张肽转变酶抑制剂、C1 抑制剂、抑酶肽、α-1 蛋白酶抑制剂、抗蛋白酶（[(S)-1-羧基-2-苯乙基]-氨基甲酰基-L-Arg-L-Val-Arginal）、Z-Pro-Pro-醛-二甲基乙酸盐、DX88、亮抑蛋白酶肽、脯氨酰寡肽酶的抑制剂例如 Fmoc-Ala-Pyr-CN、玉米胰蛋白酶抑制剂、牛胰腺胰蛋白酶抑制剂的突变体、大肠杆菌素、YAP（刺黄盖鲽抗凝蛋白）以及笋瓜胰蛋白酶抑制剂-V 和笋瓜同效抑制剂。

7. 根据权利要求 1 至 4 中任一项的抗体和/或抑制剂在医学中的用途。

8. 根据权利要求 1 至 4 中任一项的抗体和/或抑制剂在制备药物中的用途。

9. 根据权利要求 1 至 4 中任一项的抗体和/或抑制剂在治疗或预防与静脉或动脉血栓的形成相关的状况或病症特别是中风或心肌梗死、炎症、补体激活、纤维蛋白溶解、血管发生和/或与 FXII 诱导的激肽形成有关的疾病如遗传性血管性水肿、肺的细菌感染、锥虫感染、低血压性休克、胰腺炎、恰加斯病或关节痛风中的用途。

10. 包含至少一种抗体和/或一种抑制剂的药物制剂，其适于抑制凝血因子 XII，并且防止病理学血栓的形成和/或稳定化。

11. 根据权利要求 8 的制剂，其中所述抗体是抗-FXII 抗体。

12. 根据权利要求 8 的制剂，其中所述抗体抑制 FXII 激活。

13. 根据权利要求 8 的制剂，其中所述抑制剂是蛋白酶抑制剂。

14. 根据权利要求 8 的制剂，其中所述抑制剂是丝氨酸蛋白酶抑制剂。

15. 根据权利要求 10 的制剂，其中所述蛋白酶抑制剂选自 AT III 抑制剂、血管紧张肽转变酶抑制剂、C1 抑制剂、抑酶肽、α-1 蛋白酶抑制剂、抗蛋白酶（[(S)-1-羧基-2-苯乙基]-氨基甲酰基-L-Arg-L-Val-Arginal）、Z-Pro-Pro-醛-二甲基乙酸盐、DX88、亮抑蛋白酶肽、脯氨酰寡肽酶的抑制剂例如 Fmoc-Ala-Pyr-CN、玉米胰蛋白酶抑制剂、牛胰腺胰蛋白酶抑制剂的突变体、大肠杆菌素、YAP（刺黄盖鲽抗凝蛋白）以及笋瓜胰蛋白酶抑制剂-V 和笋瓜同效抑制剂。

16. 凝血因子 XII 的用途，其通过由至少一种抗体和/或一种抑制剂抑制凝血因子 XII 并因而防止血栓的形成和/或稳定化或者血栓生长而用作抗血栓形成的靶标。

血栓的形成和/或稳定化的预防

在最一般的方面，本发明的主题是三维动脉或静脉血栓的形成和/或稳定化的预防。

具体地，本发明涉及至少一种抗体和/或一种抑制剂用于抑制凝血因子 XII 活性和防止血栓的形成和/或稳定化和血栓生长的用途。本发明还涉及药物制剂以及凝血因子 XII 作为抗血栓形成的靶标的用途。

血管壁损伤引发血小板的突然粘着和聚集，接着是血浆凝固系统的激活和含有血纤蛋白的血栓的形成，血栓使损伤部位闭塞。这些事件对于限制创伤后失血是关键的，但是也可以闭塞患病的血管，导致重要器官的局部缺血和梗死。以瀑布或级联的方式，血液凝固通过一系列反应进行，所述反应涉及通过有限蛋白水解来激活酶原，最终爆发式地产生凝血酶，其将血浆血纤蛋白原转化成血纤蛋白并有效地激活血小板。反过来，粘着胶原或血纤蛋白的血小板又通过在它们的外表面暴露促凝血的磷脂酰丝氨酸（PS）（其扩大凝血蛋白酶复合体的装配和活化）以及通过血小板受体和凝血因子之间的直接相互作用以几个数量级的程度促进凝血酶产生。

存在两种凝血的会聚途径，它们通过血管系统的外源性（血管壁）或者内源性（血源性的）组分引发。“外源性”途径由血浆凝血因子 VII（FVII）和膜内在蛋白质组织因子（TF）的复合体启动，TF 是在血管的腔表面不存在但是在内皮下层强烈表达的必需的凝血辅因子。在循环微泡中表达的 TF 也可以通过维持在活化的血小板的表面上的凝血酶产生而促进血栓扩大。

当凝血因子 XII（FXII，Hageman 因子）在涉及高分子量激肽原和血浆激肽释放酶的反应中接触带负电荷的表面时，启动了“内源性”或接触活化途径。FXII 可以被内皮下基质的大分子组分例如糖胺聚糖和胶原、硫苷脂、核苷酸和其他可溶的聚阴离子或者非生理材料例如

玻璃或聚合物活化。最有效的接触活化剂之一是高岭土，并且该反应物作为主要临床凝固试验((活化的)部分促凝血酶原激酶时间(PTT, aPTT))的机理基础。在由血小板所扩大的反应中，活化的FXII然后激活FXI，反过来，FXIa又激活凝血因子IX。尽管它高效诱导体外血液凝固，但是FXII引发的内源性凝血途径的(病理)生理重要性受到如下事实的质疑：FXII以及高分子量激肽原和血浆激肽释放酶的遗传缺陷与出血并发症无关。观察到缺少外源性途径组分如TF、FVII或凝血因子IX的人和小鼠患有严重的出血，与该观察一起导致了当前的假说：血纤蛋白形成在体内仅由外源性级联启动(Mackman, N. (2004). Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 24, 1015-1022)。

像所有生理机制一样，凝血级联可以变得不适当地被激活，并导致在血管内形成止血塞。从而，血管可以变成被闭塞，并且血液向远端器官的供应受到限制。该过程已知为血栓栓塞并且与高死亡率相关。此外，由于凝血级联的活化和假体表面的包被(这通常损害了它的功能)，与血液接触的假体装置的使用受到严重限制。此类假体装置的实例是血液透析器、心肺分流回路、血管支架和留置导管。对于使用此类装置的情况，用抗凝剂如肝素来防止血纤蛋白沉积在表面上。然而，一些患者不耐受肝素，其可以导致肝素诱导的血小板减少症(HIT)，导致血小板聚集和威胁生命的血栓形成。此外，临床中使用的所有抗凝剂的内在风险也与严重出血的风险增加有关。因此，存在对新型抗凝剂的需要，所述抗凝剂不与这样的并发症有关，并且可以用于受影响的患者或者作为预防血栓形成的优异的治疗概念而没有增加的出血倾向。

所以显然仍然需要用于治疗或预防血栓形成和类似病症的改良的药疗法。因此，本发明的一个目的是满足这种需求。50多年以来，已知凝血因子XII的缺陷不与自发或损伤相关的出血并发症增加有关联(Ratnoff, O.D. & Colopy, J.E. (1955) A familial hemorrhagic trait associated with a deficiency of a clot-promoting fraction

of plasma. J Clin Invest 34, 602-13）。实际上，尽管存在病理性 aPTT（专注于凝血的内源性途径的临床凝固试验），但是 FXII 缺陷的人甚至在大手术操作中并没有异常出血（Colman, R. W. Hemostasis and Thrombosis. Basic principles & clinical practice (eds. Colman R. W., Hirsch. J., Mader V. J., Clowes A. W., & George J.) 103-122 Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001）。相反地，FXII 的缺陷与静脉血栓形成的风险增加有关（Kuhli, C., Scharrer, I., Koch, F., Ohrloff, C. & Hattenbach, L.O. (2004) Factor XII deficiency: a thrombophilic risk factor for retinal vein occlusion. Am. J. Ophthalmol. 137, 459-464; Halbmayer, W.M., Mannhalter, C., Feichtinger, C., Rubi, K. & Fischer, M. (1993) Factor XII (Hageman factor) deficiency: a risk factor for development of thromboembolism. Incidence of factor XII deficiency in patients after recurrent venous or arterial thromboembolism and myocardial infarction. Wien. Med. Wochenschr. 143, 43-50）。支持该观点的研究和病例报告涉及 FXII 缺陷的指示病例：John Hageman 先生，它死于肺栓塞。FXII 缺陷与促血栓形成的风险增加有关这一假说受到几个病例报告的最近的重新评估的挑战，所述的重新评估将 FXII 缺陷与血栓形成联系起来（Girolami, A., Randi, M.L., Gavasso, S., Lombardi, A.M. & Spiezia, F. (2004) The Occasional Venous Thromboses Seen in Patients with Severe (Homozygous) FXII Deficiency are Probably Due to Associated Risk Factors: A Study of Prevalence in 21 Patients and Review of the Literature. J. Thromb. Thrombolysis 17, 139-143）。在大多数情况下，作者鉴定了与凝血因子 FXII 缺陷相组合的相伴的先天性或获得性促血栓形成风险因子，其甚至可以不依赖于 FXII 而造成血栓形成事件。使用经详细表征的患者（Koster, T., Rosendaal, F.R., Briet, E. & Vandenbroucke, J.P. (1994) John Hageman's factor and deep-vein thrombosis: Leiden

thrombophilia Study. Br. J. Haematol. 87, 422-424）和 FXII 缺陷型家族（Zeerleder, S. 等人 (1999) Reevaluation of the incidence of thromboembolic complications in congenital factor XII deficiency-a study on 73 subjects from 14 Swiss families. Thromb. Haemost. 82, 1240-1246）所进行的最大的流行病学研究表明，FXII 缺陷和任何促血栓形成或抗血栓形成的风险之间没有相关性。

令人惊奇地并且与本领域技术人员通常认为的相反，本申请人已经发现，凝血因子 XII 所驱动的内源性凝血途径对于体内动脉血栓形成是必要的，但是对于正常的组织特异性止血不是必需的。出乎意料地，这些结果改变了体内血液凝固仅仅由外源性途径介导这种长期存在的观念，并将凝血因子 XII 置于病理性血栓形成过程中的中心位置。

因此，本发明的第一个主题是至少一种抗体和/或至少一种抑制剂用于抑制凝血因子 XII 和防止三维动脉或静脉血栓的形成和/或稳定化的用途。因此，抗-FXII 抗体或者抑制剂可以以抑制 FXII 的激活和/或干扰关键性地参与 FXII 激活的 FXII 分子的其他部分而发挥功能。

与内源性途径不是止血所需这一事实一起，这将凝血因子 XII 确立为有效的抗血栓形成治疗的有希望的新靶标。此外，这些结果对于开发抗-FXII 试剂以控制其他与接触系统相连的（病理）机制如炎症、补体激活、纤维蛋白溶解、血管发生和激肽形成也是重要的。

因此，本发明还提供了此类抗体和/或抑制剂在治疗或者预防与动脉的血栓形成相关的状况或病症即中风或心肌梗死、炎症、补体激活、纤维蛋白溶解、血管发生和/或与病理性激肽形成有关的疾病如低渗休克、水肿（包括遗传性血管性水肿）、细菌感染、关节炎、胰腺炎或关节痛风中的用途。

具体地，根据本发明，提供了至少一种抗-FXII 抗体（例如，像 F1 抗体(MoAb F1, Ravon 等人, Blood. 1995 Dec 1; 86(11): 4134-43)）和/或至少一种蛋白酶抑制剂用于抑制 FXII-驱动的血栓形成的用途。

特别优选的是例如选自下列的蛋白酶抑制剂：AT III 抑制剂、血

管紧张肽转变酶抑制剂、C1抑制剂、抑酶肽、α-1蛋白酶抑制剂、抗蛋白酶（[(S)-1-羧基-2-苯乙基]-氨基甲酰基-L-Arg-L-Val-Arginal）、Z-Pro-Pro-醛-二甲基乙酸盐（Z-Pro-Pro-aldehyde-dimethyl acetate）、DX88（Dyax Inc., 300 Technology Square, Cambridge, MA 02139, USA; 在Williams A. and Baird LG., Transfus Apheresis Sci. 2003 Dec: 29 (3):255-8中所引用）、亮抑蛋白酶肽、脯氨酰寡肽酶的抑制剂例如Fmoc-Ala-Pyr-CN、玉米胰蛋白酶抑制剂、牛胰腺胰蛋白酶抑制剂的突变体、大肠杆菌素、YAP（刺黄盖鲽（yellowfin sole）抗凝蛋白）和笋瓜（*Cucurbita maxima*）胰蛋白酶抑制剂-V（包括笋瓜同效抑制剂）。

因此，本发明提供了本文描述的此类抗体和/或抑制剂在医学中的用途；和此类抗体和/或抑制剂在制备药物中的用途。

因此，根据本发明的另一方面，提供了包含至少一种抗体和/或一种抑制剂的药物制剂，其适于抑制凝血因子XII，并且防止三维动脉或静脉血栓的形成和/或稳定化。

具体地，用于所述药物制剂的所述抗体是抗-FXII抗体（例如，像F1抗体（MoAb F1, Ravon等人, Blood. 1995 Dec 1; 86(11): 4134-43）），并且所述抑制剂是蛋白酶抑制剂，例如但不限于AT III抑制剂、血管紧张肽转变酶抑制剂、C1抑制剂、抑酶肽、α-1蛋白酶抑制剂、抗蛋白酶（[(S)-1-羧基-2-苯乙基]-氨基甲酰基-L-Arg-L-Val-Arginal）、Z-Pro-Pro-醛-二甲基乙酸盐、DX88（Dyax Inc., 300 Technology Square, Cambridge, MA 02139, USA; 在Williams A. and Baird LG., Transfus Apheresis Sci. 2003 Dec: 29 (3):255-8中所引用）、亮抑蛋白酶肽、脯氨酰寡肽酶的抑制剂例如Fmoc-Ala-Pyr-CN、玉米胰蛋白酶抑制剂、牛胰腺胰蛋白酶抑制剂的突变体、大肠杆菌素、YAP（刺黄盖鲽抗凝蛋白）和笋瓜胰蛋白酶抑制剂-V（包括笋瓜同效抑制剂）。

所述抗体还可以是保留了抑制活性的抗体片段或模拟物，例如，在美国专利6,613,890（特别是第4到8栏）中公开的淀粉状蛋白前

体蛋白的 Kunitz 蛋白酶抑制剂结构域的类似物。其他合适的抑制剂可以是 Harahiko Isawa 等人在 The Journal of Biological Chemistry, Vol. 277, No. 31 (August 2, pp. 27651-27658, 2002)中公开的 Hamadarin。合适的玉米胰蛋白酶抑制剂及其制备方法公开于 Zhi-Yuan Chen 等人, Applied and Environmental Microbiology, March 1999, p. 1320-1324 和其中所引用的参考文献 19 中。所有引用的参考文献都将其完整内容引入本申请中作为参考。最后但同样重要的是,例如通过使用 FXII 或 FXIIa 抑制作为进行选择的基础的测定法而分离的小分子以及在上文或下文中描述它们的各自用途都是本发明的一部分。可以基于 FXII 的晶体结构来设计这些小分子 FXIIa 抑制剂。因此,一些 FXII 结构域或者轻链可以在表达系统如大肠杆菌(*E. coli*)、酵母或者哺乳动物细胞中重组表达。然后使用对于 FXII 底物 FXI 所描述的标准方法(Jin L,等人 (2005) Crystal structures of the FXIa catalytic domain in complex with ecotin mutants reveal substrate-like interactions. J Biol Chem. 280(6):4704-12)来纯化和结晶该蛋白质。备选地,可以包括小分子丝氨酸蛋白酶抑制剂以稳 FXII 结构。包含蛋白质靶的小分子抑制剂(其可以例如在这些靶蛋白质的晶体的指导下进行设计)的此类制剂是本领域公知的,并且包括可以例如全身地如肠胃外或口服或者局部地施用于患者的药物制剂。

如本文使用的,术语“肠胃外的”包括皮下、静脉内、肌内、动脉内和气管内注射,滴注,喷雾施用,和输注技术。肠胃外制剂优选地根据已知的程序以快速浓注的形式或恒量输注的形式静脉内施用,或者皮下施用。公知用于肠胃外使用的优选的液体载体包括无菌水、盐水、葡萄糖水溶液、糖溶液、乙醇、二醇和油。

用于口服施用的片剂和胶囊剂可以含有常规赋形剂,例如粘合剂、填充剂、润滑剂和湿润剂等等。口服液体制剂可以为水性或油性的混悬剂、溶液剂、乳剂、糖浆剂、酏剂等等的形式,并且可以作为在用时用水或其他合适的载体重构的干燥产品存在。此类液体制剂可以含

有常规的添加剂，例如悬浮剂、乳化剂、非水性载体和防腐剂。

适于局部应用的制剂可以为水性或油性的混悬剂、溶液剂、乳剂、凝胶剂或者优选地乳浊型软膏剂（emulsion ointment）的形式。用于喷雾应用的制剂可以为可喷雾的液体或者干燥粉剂的形式。

根据本发明的第三方面，通过由至少一种抗体和/或一种抑制剂抑制凝血因子 XII 并因而防止血管中三维血栓的形成和/或稳定化，提供了凝血因子 XII 作为抗血栓形成的靶标的用途。

当结合下述附图进行阅读时，从下面的所进行的实验和它们的结果的详细描述，本发明的性质、益处和其他特征会变得显而易见。

用凝血因子 XII 缺陷型小鼠来分析内源性凝血级联在止血和血栓形成中的功能。活体荧光显微术和超声波流量测量揭示了在血管系统的不同的动脉分枝中三维血栓的形成和稳定化之中的严重缺陷。用人凝血因子 XII 重构突变型小鼠，在体外恢复了内源性凝血途径和在体内恢复了动脉血栓形成。在机制上，内源性途径的促凝血活性关键性地由活化的血小板促进。这些结果将 FXII 诱导的内源性血液凝固级联置于动脉血栓形成过程中的中心位置，其连接血浆凝固与血小板聚集。

图 1 描述了 FXII 缺陷型小鼠的凝血分析：（A）野生型（n=12）和 FXII-/-（n=11）小鼠的尾部出血时间。每个符号代表一个个体。（B）FXII-/-和 wt 小鼠的外周血细胞计数（千/μl）和总体凝血参数。缩写为白细胞计数（WBC）、活化的部分促凝血酶原激酶时间（aPTT）和凝血酶原时间（PT）。值以每种基因型的 10 只小鼠的平均值 ± SD 给出。(C)使用特异抗体通过 Western 印迹法在 0.3 μl 的 wt 和 FXII-/-血浆中探测的接触系统蛋白 FXII、血浆激肽释放酶（PK）和高分子量激肽原（HK）。在左边给出分子量标准。（D）在用高岭土（深色柱）或者胶原（浅色柱）激活后，在来自 C57BL/6 和 129sv wt、FXII-/-、FcRγ-/-和整联蛋白 α2 缺陷型小鼠的无血小板（上图）和富含血小板（下图）的血浆中测定的再钙化凝血时间。在补充有 50 μg/ml 抗体的 C57BL/6 血浆中分析 JON/A 的影响。给出了来自 6 次实验的平均值 ± STD。

图 2。(A)在静脉内注射胶原(0.8 mg/kg)和肾上腺素(60 μg/kg)后观察到血栓栓塞性死亡。所有野生型小鼠在 5 分钟内死亡。在攻击后 30 分钟仍活着的动物被认为是存活者。(B)在输注胶原/肾上腺素后 2 分钟，在对照(n = 19)、FXII-/- (n = 14)和 FcR γ-/- (n = 5)小鼠中的血小板计数。(C)用胶原(10 μg/ml)或 ADP(5 μM)刺激来自野生型和 FXII-/-小鼠的肝素化的富含血小板的血浆，并用标准 aggregometer 记录光透射。显示的结果是每组 6 只小鼠的代表。(D)在胶原/肾上腺素注射后 2 分钟，来自所示小鼠肺的苏木精/伊红染色的切片。以 20 倍放大率计数每个视野的血栓。柱代表来自 100 个视野的平均值 ± SDT。

图 3 描述了在缺少凝血因子 XII 的小鼠体内缺陷的血栓形成。在用 20% $FeCl_3$ 诱导损伤的情况下，监视肠系膜小动脉上的体内血栓形成。(A)在所有小鼠品系中于损伤后 5 分钟检测单个血小板粘附，在野生型小鼠中于损伤后 7 到 8 分钟观察到第一个血栓，而在 FXII-/-中于损伤后 14 到 35 分钟出现第一个血栓，和在 FXI-/-中于损伤后 5 到 35 分钟出现第一个血栓。(B)在野生型小鼠中在 100%的肠系膜动脉中观察到血栓形成，但是仅在 50%的 FXII-/-小鼠和 44.4%的 FXI-/-小鼠中观察到血栓形成。(C)在野生型小鼠中形成的血栓在损伤后平均 25 分钟的时间闭塞了血管，而在 FXII 和 FXI 缺陷型小鼠中形成的血栓不导致闭塞。每个符号代表单个所监视的小动脉。(D)一个实验的代表性照片。

图 4。在动脉闭塞模型中分析野生型(n= 10)、FXII-/- (n= 10)和 FXI-/- (n= 11)。通过用镊子进行一次用力的压迫在主动脉中诱导血栓形成。用血管周围超声波流量探测器监视血液流量直到完全闭塞。在 40 分钟后停止实验。每个符号代表一个个体。(B)通过结扎来诱导颈动脉中的机械性损伤。在取出丝状血栓后，以 μm^2 测量野生型(n= 10)和 FXII-/- (n= 10)中的面积。(C)显微照片显示损伤后 2 分钟的代表性图像。

图 5 描述了 FXII 缺陷型动物中血栓形成的缺陷，其通过人 FXII

而得到恢复。（A）在野生型小鼠以及注射了人 FXII 的 FXII-/-小鼠中，在 100％的肠系膜动脉中观察到当进行 $FeCl_3$ 诱导的损伤时的血栓形成。（B）在野生型小鼠中，在损伤后平均 25 分钟内，所形成的血栓闭塞了血管，和在注射了人 FXII 的 FXII-/-小鼠中，在损伤后 22.7 分钟内，所形成的血栓闭塞了血管。每个符号代表一个个体。（C）显示了代表性照片。（D）FXII-/-小鼠接受 2 mg/kg hFXII-/-，并通过用镊子进行一次用力的压迫在主动脉中诱导血栓形成。用血管周围超声波流量探测器监视血液流量直到完全闭塞。在 40 分钟后停止实验。每个符号代表一个个体。

图 6 描述了抗-FXII 抗体在小鼠体内抑制血栓形成。野生型小鼠经静脉内接受 2 mg/kg 抗-FXII 抗体或者非免疫 IgG。15 分钟后，在用 20% $FeCl_3$ 诱导损伤的情况下，监视肠系膜小动脉上的体内血栓形成。（A）在两个组中于损伤后 5 分钟检测单个血小板粘附。7 到 8 分钟后，在经对照 IgG 处理的小鼠中观察到第一个血栓，而在经抗-FXII 处理的小鼠中，在损伤后 12 到 32 分钟出现第一个血栓。（B）在对照小鼠中在 100％的肠系膜动脉中观察到血栓形成，但是仅在 60％的经抗-FXII 处理的小鼠中观察到血栓形成。（C）显示了到达完全闭塞的时间。每个符号代表一个个体。

图 7 描述了动脉血栓形成的经修正的模型。最初，在血管损伤部位，血栓形成主要是由于在内皮下基质中的组织因子（TF）的暴露。与 FVII 复合的 TF 起始外源性凝血途径。在损伤部位，经 FXI 驱动内源性途径的 FXII 对于凝血酶（FII）产生的贡献是微小的，并且对于正常的止血可以忽略不计。因此，具有 FXII 缺陷的个体不遭受出血。所产生的凝血酶通过形成血纤蛋白和激活血小板来起始血块形成。血栓生长的扩大：在正在生长的血栓中暴露的表面上，由 FXII 诱导的内源性途径关键性地促进凝血酶产生。活化的 FXII 通过 FXI 产生另外的血纤蛋白。因此，FXII 以及 FXI 缺陷严重地损害血栓形成。

在本发明中，使用缺少凝血因子 XII 的小鼠，通过基于活体显微镜术和流量测量的动脉血栓形成模型评估了凝血的内源性途径对体内

病理性血栓形成的潜在贡献。尽管在突变型动物中，损伤部位处血小板的最初粘附没有改变，但是随后的三维血栓的形成和稳定化有严重缺陷。该缺陷在脉管系统的不同分枝中观察到，并且可以通过外源的人凝血因子 XII 而完全恢复。这些发现在经修正的血栓形成模型中将由凝血因子 XII 驱动的内源性凝血途径确立为初级和次级止血之间的主要连接。

为了分析 FXII 对于体内凝血的功能，产生了 FXII 缺陷型小鼠。FXII-/-小鼠是健康的，在表型上与它们的野生型同窝小鼠不可区分，并且是能繁殖的。详细的组织学和止血学（hemostasiological）分析没有显示出对于在 FXII-/-小鼠中增加的血栓形成或者出血的联系，尽管在眶后采集的血浆中具有延长的 aPTT（68 ± 17 秒）和再钙化时间（412 ± 78 秒）（wt: 23 ± 4 和 210 ± 31 秒）（Pauer, H.U. 等人 (2004). Targeted deletion of murine coagulation factor XII gene-a model for contact phase activation in vivo. Thromb. Haemost. 92, 503-508）。类似于 FXII 缺陷的人，FXII-/-小鼠没有增加的出血倾向，如通过尾部出血时间与在野生型动物中发现的尾部出血时间相似所表明的（分别为 369.5 ± 201.7 和 355.9 ± 176.1 秒，每组 n=12，图 1A）。突变型小鼠的外周血细胞计数与野生型对照没有不同。值得注意的是，FXII-/-小鼠的凝血酶原时间（PT）类似于野生型（8.9 ± 1.3 对 9.1 ± 1.3 秒），表明 FXII 缺陷不影响通过外源性凝血系统的血纤蛋白形成（图 1B）。为了评估人和小鼠之间 FXII 促凝血活性中的可能差异，用鼠类野生型血浆重构了 FXII 缺陷的人（FXII < 1%）或者反之亦然，并测定了混合物的 PTT。在任一情况中，血块形成都变得正常，这支持了在人和小鼠中 FXII 对于凝血的功能是相当的这一观点。

在人中，类似于 FXII 缺陷，接触系统蛋白质血浆激肽释放酶（PK）和高分子量激肽原（HK）的缺陷不导致出血风险增加，尽管 aPTT 延长。为了证实在 FXII-/-小鼠中 aPTT 延长不是由于接触相蛋白的额外缺陷引起的，我们分析了 FXII-/-和 wt 血浆中的 PK 和 HK。Western 印迹表明，在突变型和野生型小鼠中 HK 和 PK 水平是相等的（图 1C）。在

功能上，在暴露于胶原或高岭土的 FXII-/-血浆中，HK 加工和凝血酶形成与野生型相比受到严重损害。

血液凝固和血小板激活是互补的并且相互依赖的过程。血小板与几种凝血因子相互作用并促进这些凝血因子的激活，中心凝血产物凝血酶是有效的血小板激活剂。因此，接着更详细地检查了血小板和 FXII 对血块形成的贡献。为此，我们使用高岭土或胶原诱导凝血，高岭土通常激活 FXII 但是对于血小板没有直接影响，胶原激活 FXII 和血小板，其中它与许多受体，最重要地α2β1 整联蛋白和 GPVI 相互作用。在血小板存在而不是不存在时，对于野生型血浆中的血块形成，胶原优于高岭土（图 1D）。相反地，在含有激活缺陷型 FcRγ-/-血小板的血浆中，高岭土和胶原的相对效力类似于 PFP，并且用来自整联蛋白α2-/-小鼠的 PRP 看到相似的效果。在正在凝固的血浆中也有效地引发了血小板促凝血活性，并且血纤蛋白(原)受体αIIbβ3 已经显示出在该过程中起关键作用，尽管潜在的机制还没有完全理解。与这些报导相一致，阻断抗体 JON/A 的αIIbβ3 功能极大地抑制了凝血时间的依赖血小板的缩短（图 1D）。这些结果一起证明，促凝血状态下的血小板可以促进 FXII 诱导的血块形成。

为了测试胶原诱导的 FXII 激活是否在体内具有功能后果，将野生型和 FXII-/-小鼠进行致死性肺血栓栓塞模型测试，该模型通过输注胶原（0.8 mg/kg 体重）和肾上腺素（60 μg/kg 体重）的混合物而诱导。所有对照小鼠（19/19）在 5 分钟内死于广泛的肺血栓形成和心脏停搏，其伴随着攻击后 2 分钟时循环的血小板计数减少>95% （图 2A,B）。在这些实验条件下，35.7%（5/14）的 FXII-/-小鼠存活下来，虽然它们的外周血小板计数与在野生型对照中类似地减少，这提示所观察到的保护不是基于血小板激活缺陷。通过体外研究证实了该假设，所述研究表明 FXII-/-血小板表达正常水平的主要表面糖蛋白，包括胶原受体，并且表明通过典型的激动剂如凝血酶、腺苷二磷酸（ADP），或者 GPVI-特异性激动剂，胶原相关的肽可正常地激活细胞（如通过整联蛋白αIIbβ3 和 P-选择蛋白表达的激活而测量的）。与此相一致，

FXII-/-血小板显示出对胶原、ADP（图 2C）、PMA 或凝血酶的未改变的聚集应答。

在一组平行的实验中，用胶原/肾上腺素攻击 FcRγ-/-小鼠。这些小鼠受到完全保护而免于死亡，并且攻击后 2 分钟血小板计数仅适度地减少，这证实在该模型中致死性严格地需要血小板激活。这些数据进一步得到来自不同组的小鼠的肺切片的组织学分析的支持。尽管在野生型小鼠中大多数血管被闭塞，但是这在 FXII-/-小鼠（存活者和非存活者）中显著减少。与以前的报导一致，在来自 FcRγ-/-小鼠的肺中几乎没有发现血栓（图 2D）。这些结果提示，在体内胶原引发了血小板激活和依赖 FXII 的内源性凝血途径，其在该模型中起协同作用以形成闭塞性肺血栓。

病理性血栓形成通常由脉管系统的动脉分枝中粥样硬化斑块的龟裂或者突然破裂而起始，所述粥样硬化斑块的龟裂或者突然破裂在内皮下层的表面上导致非生理强烈的血小板激活和促凝血活性。为了测试 FXII 在这些过程中的作用，使用不同的动脉损伤模型，在野生型和 FXII-/-小鼠中研究了血栓形成。在第一种模型中，在肠系膜小动脉（直径 60－100 μm）中诱导了氧化损伤，并通过体内荧光显微术检查了血栓形成。野生型和 FXII-/-小鼠接受相同基因型的经荧光标记的血小板（1×10^8），并通过局部施加用 20％氯化铁（$FeCl_3$）饱和的滤纸 1 分钟来诱导损伤，氯化铁引起自由基的形成，从而导致内皮的破坏。血小板与受损的血管壁的相互作用快速开始，并且在损伤后 5 分钟，在两个组的小鼠中牢固粘附的血小板的数目是相似的（图 3A）。然而，尽管在野生型小鼠中，粘附的血小板不断从循环系统中募集额外的血小板，导致形成聚集体，但是该过程在突变型小鼠中是严重缺陷的。在 100％的对照血管（17/17）中，在损伤后 10 分钟已经形成了直径 >20 μm 的稳定的血栓，其随着时间不断生长并最后在 40 分钟的观察期内在 94.1％（16/17）的血管中导致完全闭塞（平均闭塞时间：25.6±8.9 分钟）（图 3）。形成鲜明对比的是，在突变型小鼠中，在 50％（7/14）的血管中完全不存在所出现的微聚集体或血栓的形成。在其

余的 50%（7/14）的血管中，形成了血栓，然而其始终是不稳定的并且从血管壁上迅速脱落。没有一个血管中直径>20 μm 的血栓在损伤部位保持附着超过 1 分钟。因此，在观察期（40 分钟）内，FXII-/-小鼠中没有血管闭塞。该出乎意料的结果证明 FXII 是 $FeCl_3$-损伤的小动脉中富含血小板的血栓的产生和稳定化所需的，并且提示 FXII 诱导的凝血途径实质上有助于所观察到的血栓形成应答。当在相同的模型中分析 FXI 缺陷型小鼠时，证实了该假设。因为 FXI 是在“内源性”级联中 FXII 的主要的底物，所以在那些小鼠中肯定会预期出现血栓形成的类似缺陷。实际上，非常类似于 FXII-/-小鼠，在损伤后前 3 分钟内可以检测到损伤部位处几乎正常的血小板粘附，而在 55.6%（5/9）的血管中血栓的形成被完全抑制。在其余的血管中，形成的微聚集体和血栓是不稳定的，并且连续地被栓塞（图 3）。结果，在观察期（40 分钟）内没有血管被闭塞。该数据显示，在 $FeCl_3$-诱导的颈动脉闭塞模型中，FXI 缺陷型小鼠受到保护。

已知 $FeCl_3$-诱导的动脉血栓形成依赖于血小板和凝血酶产生，但是还不清楚该类型的损伤如何地类似于在患病血管(例如，当动脉粥样硬化斑块破裂时)中产生的血栓生成环境。因此，为了排除大量 $FeCl_3$-诱导的氧化损伤产生可以人工有利于 FXII 依赖性接触相激活的非生理条件这种可能性，在另一种成熟的动脉血栓形成模型中评估了 FXII 的功能，在所述另一种成熟的动脉血栓形成模型中在主动脉中机械性地诱导损伤并用超声波流量探测器监视血液流量。在血液流量于损伤后立即暂时增加后，在所有经测试的小鼠中，血流量在几分钟内不断减小。在所有经测试的野生型小鼠（10/10）中，这种减小在损伤后 1.6 到 11.1 分钟内导致血管的完全和不可逆的闭塞(平均闭塞时间 5.3 ± 3.0 分钟，图 4A）。在 FXII-/-小鼠中发现了不同的图像，其中稳定的血栓形成是严重缺陷的。尽管在所有动物中，在损伤后前几分钟内观察到血液流量的逐渐减少，但是仅在 10 只小鼠的 4 只中发生闭塞。此外，那些小鼠中的闭塞性血栓在所有情况下都是不稳定的并且快速栓塞，从而在闭塞后 10 秒到 115 秒内再次建立血流。再次打开的血管

没有再次闭塞。因此，所有 FXII-/-小鼠在观察期（40 分钟）结束时都显示出通过受损血管的基本上正常的流速。用 FXI-/-小鼠得到了非常相似的结果，其中 11 只中的 9 只不能在观察期（30 分钟）内建立闭塞性血栓（图 5A）。

在第三种独立的模型中证实了在 FXII-/-小鼠中动脉血栓形成中的严重缺陷，在所述模型中通过体内荧光显微术来研究在受损的颈动脉中的血小板募集。从供体小鼠纯化血小板，进行荧光标记，并注射到相同基因型的受体小鼠中。通过颈动脉的用力结扎来导致血管损伤，所述结扎总是导致内皮层的破坏和内弹性膜的经常破裂，随后是在损伤部位的快速的由胶原引发的血小板粘附和血栓形成（Gruner 等人，Blood 102: 7/4/2007 2003）。尽管野生型动物快速形成大的稳定的血栓（血栓面积：102.821 ± 39.344 μm^2；t = 5 分钟），其不栓塞，但是在突变型小鼠中仅仅形成小的和中等大小的聚集体，其经常从损伤部位上脱落（图 4B，C）。因此，在突变型小鼠中血栓面积显著减小（8.120 ± 13.900 μm^2；t = 5 分钟），尽管血管壁上初始的血小板粘附似乎没有缺陷。

为了测试在 FXII-/-小鼠中血栓形成中的严重缺陷是由于缺少血浆 FXII 或血小板 FXII，还是可能由于 FXII 缺陷的次级的未鉴定的影响例如脉管系统中的改变而引起，在施用人 FXII（2 μg/g 体重）后在 FXII-/-小鼠中研究了动脉血栓形成。该处理使 PTT 正常化（27 ± 6 秒），并且完全恢复了动脉血栓形成。在 100%的经 $FeCl_3$ 损伤的肠系膜小动脉中，在损伤后 10 分钟内就已经形成了>20 μm 的血栓，并且在观察期内所有血管都被完全闭塞（图 5A-C）。与未处理的野生型对照小鼠相比，在重构的 FXII-/-小鼠中可检测到甚至倾向于更快闭塞（平均闭塞时间：22.7 ± 8.2 分钟对 25.6 ± 8.9 分钟）。当在主动脉中机械性地诱导损伤时，得到类似的结果。在所有测试的血管中，在损伤后 10 分钟内发生完全和不可逆的闭塞（图 5D），这证实血浆 FXII 的缺乏造成在 FXII-/-小鼠中观察到的血栓形成缺陷。

上述研究证明，FXII 对于动脉血栓形成是关键的，并且因此可以

用作抗血栓形成的靶标。

为了直接对此进行评估，将小鼠用 2 mg/kg 体重的多克隆兔抗小鼠 FXII 抗体或非免疫兔抗体处理，并评估在经 $FeCl_3$-诱导的损伤后肠系膜动脉中的血小板募集和血栓形成。如图 6A 中所示，在损伤部位的血小板粘附在两组小鼠中相当。然而，尽管在 100％的对照血管中，在损伤后 10 分钟内已经形成了>20 μm 的血栓，并且在观察期内所有血管被完全闭塞（图 6B，C），但是在用抗 FXII 抗体处理的动物中，仅在 67％的血管中观察到>20 μm 的血栓并且仅在 50％的血管中发生闭塞。

备选地，为了测试小分子 FXII 抑制剂的影响，在颈动脉中的 $FeCl_3$-诱导的损伤前 5 分钟，将野生型小鼠用 FXII 抑制剂玉米胰蛋白酶抑制剂（CTI，50 μg/g 体重）进行输注（Wang 等人 (2005) J. Thromb. Heamost. 3: 695-702）。抑制剂处理延长了 aPTT（62 ± 11 秒，n=4），但是在手术步骤期间没有影响出血。在测试的动物中，没有一只（0/4）在施加 $FeCl_3$ 后 30 分钟内产生闭塞血管的血栓。

这些结果证明，抗-FXII 治疗剂像抗-FXII 抗体或者小分子 FXII 抑制剂一样，提供了对动脉血栓形成的显著保护。

尽管 50 多年来 FXII 的接触激活已经被认为是内源性凝血级联的起点，但是该途径被认为与血液凝固是不相关的。在本发明中，使用三种不同的体内模型通过原位视频显微术和超声波流量测量来分析在 FXII 缺陷型小鼠中动脉损伤部位处的血小板募集和血栓形成，并且表明明显不能形成稳定的三维血栓。该缺陷是基于血浆但不是其他区室中的 FXII 缺乏，因为它通过静脉内注射外源的人 FXII 而被完全逆转（图 6），从而也排除了 FXII 缺陷的次级效果有助于所观察到的表型这种可能。

这些结果是出乎意料的，因为基于一些报导，认为 FXII 是抗血栓形成的而不是促血栓形成的酶，所述报导表明 FXII 缺陷与静脉血栓形成的发生率增加相关（Kuhli, C., Scharrer, I., Koch, F., Ohrloff, C. 和 Hattenbach, L. O. (2004). Factor XII deficiency: a

thrombophilic risk factor for retinal vein occlusion. Am. J. Ophthalmol. 137, 459-464; Halbmayer,W.M., Mannhalter,C., Feichtinger,C., Rubi,K. 和 Fischer,M. (1993). [Factor XII (Hageman factor) deficiency: a risk factor for development of thromboembolism. Incidence of factor XII deficiency in patients after recurrent venous or arterial thromboembolism and myocardial infarction]. Wien. Med. Wochenschr. 143, 43-50）。

FXII 缺陷型小鼠展示出正常的出血时间（图 1A），并且不显示出自发或者增加的创伤后（手术中）出血的征兆，这证实 FXII 对于正常的止血来说是可有可无的。最初看来，这些结果似乎与止血的中心法则相矛盾，所述中心法则为仅仅其缺陷与出血或血栓形成有关的那些因子与血液凝固相关。然而，仔细考虑起来，这些数据并不挑战该法则而是引起了有趣的可能性：止血和动脉血栓形成可能通过不同的机制而发生。

尽管上面讨论的持续凝血酶产生机制可以足以产生止血塞，但是数据表明，至少在小鼠中，稳定的动脉血栓的形成需要内源性凝血途径的额外激活。对于在 FXII 的功能或者酶的底物中存在物种特异性差异这一可能性没有证据。突变型小鼠的所有凝血参数和止血表型都与人 FXII 缺陷相一致，并且在动物中所观察到的所有改变都通过用人 FXII 重构而正常化（图 5）。此外，排除了血栓形成缺陷局限于特定的实验模型，因为血栓形成缺陷在血管系统的不同动脉分枝中发现并且不依赖于损伤的类型。可能难以确定哪种类型的损伤最好地反映了由动脉粥样硬化斑块的破裂产生的血管损伤，动脉粥样硬化斑块被认为是急性心血管综合征的主要引发物。动脉粥样硬化损伤富含生成血栓的组分，最重要的是 TF 和纤维胶原。在动脉粥样化形成过程中，已经表明内膜平滑肌细胞和成纤维细胞的胶原合成增强显著促进腔的狭窄。斑块的破裂或龟裂导致胶原原纤维暴露于流动的血液，这引发血小板粘附和聚集。此外，它们诱导 FXII 激活，如本文对于 I 型纤维胶原所示，I 型纤维胶原是在血管壁中发现的主要胶原类型。但是胶原可能

不是在损伤部位处 FXII 的唯一的（病理）生理性激活剂。其他候选者可以是从分解细胞释放的或者暴露于 ECM 的物质，包括 HSP90 或者可溶性和不溶性的聚阴离子，例如核小体或糖胺聚糖。

在这些 FXII 激活剂中，胶原是最能形成血栓的，因为它们也有效地激活血小板。在损伤部位，通过血小板 GPIb-V-IX 与结合有胶原的 vWf（其减小细胞的速度，从而允许其他受体的结合）的可逆相互作用，血小板束缚至 ECM。在这些之中，胶原受体 GPVI 是最重要的，因为它激活整联蛋白 α2β1 和 αIIbβ3，它们然后介导稳定的粘附和促进细胞激活。此外，通过 GPVI/FcRγ-链复合物的血小板激活诱导了细胞的促凝血状态，其特征是磷脂酰丝氨酸（PS）的暴露以及（PS 暴露性）膜泡和微泡的产生。整联蛋白 α2β1 通过“由外向内（outside-in）”信号而直接促进该过程并且通过增强 GPVI-胶原相互作用而间接促进该过程。已确定含有 PS 的膜强烈加速凝血过程的两个中心反应：tenase 和凝血酶原酶反应。本发明表明，促凝血的血小板通过涉及 GPVI/FcRγ-链复合物以及 α2β1 的机制在体外促进 FXII 依赖性凝血（图 2）。这可以至少部分解释，为什么尽管在动脉损伤部位血小板粘附未改变，但是 α2β1 缺陷型小鼠显示出在闭塞性血栓形成中的部分缺陷。除了胶原外，正在凝固的血浆也通过整联蛋白 αIIbβ3-依赖性机制有效地刺激血小板促凝血活性。在本实验中，αIIbβ3 的阻断几乎完全抑制了在 FXII 依赖性凝血中的血小板沉淀，这表明 αIIbβ3 拮抗剂的公知的抗凝血活性可能部分基于由 FXII 驱动的内源性凝血途径的抑制。总之，本发明表明由 FXII 驱动的接触系统和血小板激活可能是相互依赖的过程，它们在病理性血栓形成中共同发挥作用。

基于实验结果，提出了在图 7 中示意性描绘的病理性血栓形成的模型。在血管损伤部位，第一层血小板与胶原在额外富含 TF 和血纤蛋白的环境中接触。因此，并不令人惊奇的是，在 FXII-/-小鼠中血小板向着受损的血管壁的粘附没有受到损害，并且这些细胞非常可能被完全激活并且处于促凝血状态。然而，在正在生长的血栓中，不存在胶原，并且由微泡提供的 TF 浓度与血管壁相比可能更低并且通过从活

化的血小板大量释放的 TFPI 而降低了它们的活性。在这些条件下，需要另外的机制来保持时间空间上的（spatio-temporal）凝血酶产生以激活新近募集的血小板，并且通过形成血纤蛋白而引起它们的凝血活性。FXII-/-小鼠严重不能建立稳定的血栓明确地表明，由 FXII 驱动的内源性凝血途径是该过程中的必需参与者。与低 TF 的小鼠也展示出受损害的动脉血栓形成这一观察一起，这些结果提示，外源性和内源性的途径必须是有效运作的并且协同来促进三维的和最终闭塞性的血栓的形成。相反地，在 FXII-/-小鼠中缺少出血表明，在第三维中的血栓生长可能不是封闭血管壁中的孔所必需的。这可以解释为什么产生第一薄层的血纤蛋白和激活的血小板的外源性途径足够介导正常的止血。我们的结果产生了如下有趣的可能性：三维血栓的形成发挥不同于止血的功能。这些功能可以包括停止在组织创伤处的某些区域中的血液流动以便防止入侵的病原体或毒素随着血流的分布。

实验程序

动物

所有实验和照料都得到当地动物照料和使用委员会(Animal Care & Use Committee)的批准。如所述的,产生缺少凝血因子 XI(FXI-/-)、凝血因子 XII(FXII-/-)、α2 整联蛋白(α2-/-)的典型的小鼠突变体(Gailani,D., Lasky,N.M.和 Broze,G.J., Jr. (1997). A murine model of factor XI deficiency. Blood Coagul. Fibrinolysis 8, 134-144; Pauer,H.U., Renne,T., Hemmerlein,B., Legler,T., Fritzlar,S., Adham,I., Muller-Esterl,W., Emons,G., Sancken,U., Engel,W.和 Burfeind,P. (2004). Targeted deletion of murine coagulation factor XII gene-a model for contact phase activation in vivo. Thromb. Haemost. 92, 503-508; Holtkotter,O., Nieswandt,B., Smyth,N., Muller,W., Hafner,M., Schulte,V., Krieg,T.和 Eckes,B. (2002). Integrin alpha 2-deficient mice develop normally, are fertile, but display partially defective platelet interaction with collagen. J Biol Chem JID - 2985121R 277, 10789-10794)。使用 C57B/6J 小鼠(FXI-/-)或 Sv129(FXII-/-)作为对照。缺乏 FcRγ链的小鼠(Takai,T., Li,M., Sylvestre,D., Clynes,R.和 Ravetch,J.V. (1994). FcR gamma chain deletion results in pleiotrophic effector cell defects. Cell 76, 519-529)来自(Taconics, Germantown)。

抗-FXII 抗体的产生

从 129sv wt 小鼠的肝脏分离总细胞 RNA,并用来自 Qiagen 的"一步 RT-PCR 试剂盒"根据生产商的使用说明进行 FXII-cDNA 合成。使用各 25 pmol 的分别引入 BamH I 和 EcoR I 限制性位点的 5-和 3-引物(ttggatccccaccatggaaagactccaag 和 ttgaattcgcgcatgaacgaggacag),按照下面的方案扩增凝血因子 FXII 重链(第 61-1062 位,对应

于残基 21-354)：在热循环仪（Biometra, Göttingen, Germany）上 95℃ 30 秒，58℃ 60 秒和 72℃ 1 分钟，共 30 个循环。将 PCR 产物克隆到 pGEX-2T 表达载体（Pharmacia）的 BamH I 和 EcoR I 位点中。随后，在大肠杆菌菌株 BL21 中表达待测序的蛋白质。用 0.5 mM 异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷刺激指数生长的细菌 1 小时，收获，重悬浮在含有 1 mM EDTA、200 mM NaCl、10 μg/ml 盐酸苄脒、10 μg/ml 苯基甲基磺酰氟的 10 mM Tris-HCl（pH 7.4）中，并以每次 15 秒的脉冲进行超声波处理 3 分钟。在 4℃下以 15,000×g 离心 20 分钟后，移出上清液并转移到 GST-sepharose 柱（Pharmacia）上以进行纯化。如从考马斯染色的 SDS-PAGE 推断的，洗脱出的蛋白质纯度>95%。按照标准程序，在兔中产生针对 GST-重链 FXII 的多克隆抗体。使用具有融合至麦芽糖结合蛋白（MBP）的 FXII 重链的柱子从超免疫血清中选择抗体。与对于 GST-融合构建体所描述的类似地，使用 pMAL-c2 表达系统和直链淀粉树脂柱来表达和纯化这些融合蛋白。

血小板制备

将小鼠在乙醚麻醉状态下从眶后血管丛采集血液。将血液收集在含有 20 U/mL 肝素的管中，并通过在室温（RT）下以 300 g 离心 10 分钟而得到富含血小板的血浆（prp）。为了得到经洗涤的血小板，将 prp 以 1000 g 离心 8 分钟，并将沉淀物在前列环素（0.1 μg/ml）和腺苷三磷酸双磷酸酶（0.02 U/mL）存在下在经修饰的 Tyrodes-Hepes 缓冲液（134 mM NaCl, 0.34 mM Na_2HPO_4, 2.9 mM KCl, 12 mM $NaHCO_3$, 20 mM Hepes, 5 mM 葡萄糖, 0.35%牛血清白蛋白, pH 6.6）中重悬浮两次。然后将血小板重悬浮在相同的缓冲液（pH 7.0, 0.02 U/mL 腺苷三磷酸双磷酸酶）中，并在 37℃下温育至少 30 分钟后进行分析。

流式细胞术

将肝素化的全血用含有 5 mM 葡萄糖、0.35%牛血清白蛋白（BSA）和 1 mM $CaCl_2$ 的经修饰的 Tyrode-HEPES 缓冲液（134 mM NaCl, 0.34

mM Na_2HPO_4, 2.9 mM KCl, 12 mM $NaHCO_3$, 20 mM HEPES [N-2-羟乙基哌嗪-N′-2-乙磺酸], pH 7.0）作1:20稀释。样品和经荧光团标记的抗体在室温下温育15分钟，并在FACScalibur（Becton Dickinson, Heidelberg, Germany）上直接进行分析（Nieswandt, B., Schulte, V. 和 Bergmeier, W. (2004). Flow-cytometric analysis of mouse platelet function. Methods Mol. Biol. 272, 255-268）。

聚集度测定术（Aggregometry）

为了测定血小板聚集，使用prp（200 μL，具有 0.5×10^6个血小板/μL）测量光透射。用 Fibrintimer 4 通道聚集度计（APACT Laborgeräte und Analysensysteme, Hamburg, Germany）在10分钟内记录透射，并表示为任意单位，用血浆调节出 100%透射。通过加入胶原（10 μg/mL）和ADP（5 μM）来诱导血小板聚集。

出血时间实验

通过腹膜内注射三溴乙醇（Aldrich）（0.15 ml/10 g 体重）来麻醉小鼠，并用解剖刀切下尾尖的3 mm节段。通过用滤纸轻轻吸收血珠而不接触伤口部位来监视尾部出血。当在15秒间隔后在纸上没有观察到血液时，确定出血停止。必要时，在20分钟后手工停止出血。按照所指出的，用100 μg/小鼠的hFXII处理小鼠。

制备用于活体显微镜检查的血小板

将小鼠血液(1体积)收集在0.5体积的含有20 U/mL肝素的Hepes缓冲液中。将血液以250 g离心10分钟，并将富含血小板的血浆小心地转移到新管中。血小板用 5-羧基荧光素二乙酸琥珀酰亚氨基酯（5-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, DCF）标记，并调节到 200×10^6个血小板/250 μl 的终浓度（Massberg, S., Sausbier, M., Klatt, P., Bauer, M., Pfeifer, A., Siess, W., Fassler, R., Ruth, P., Krombach, F. 和 Hofmann, F. (1999).

Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3′,5′-monophosphate kinase I. J Exp Med 189, 1255-1264）。

《》

具有 $FeCl_3$-诱导的损伤的体内血栓形成模型

通过腹膜内注射 2,2,2-三溴乙醇和 2-甲基-2-丁醇（Sigma）（2.5%溶液，0.15 ml/10g 体重）来麻醉 4－5 周龄的雄性和雌性小鼠。静脉内注射经荧光标记的血小板。通过中线腹部切口小心地取出肠系膜。用装备有 100-W HBO 荧光灯源和连接到 S-VHS 录像机（AG-7355, Panasonic, Matsushita Electric, Japan）的 CCD 照像机（CV-M300）的 Zeiss Axiovert 200 倒置显微镜（x10）显现小动脉（35-50 μm 直径）。局部施加诱导血管损伤和内皮剥脱的 $FeCl_3$（20%）后，监视小动脉 40 分钟直到发生完全的闭塞（血流停止的持续时间>1 分钟）。将牢固的血小板粘附测定为直到损伤后 5 分钟沉积在血管壁上的荧光标记的血小板的数目，将血栓表征为直径大于 20 μm 的血小板聚集体，将血管的闭塞时间表征为达到血液停止流动至少 1 分钟所需的时间。在所有实验中，基于暴露的性质从每只小鼠选择最多两个小动脉。研究了总共 17 个 wt、14 个 FXII-/-和 9 个 FXI-/-小动脉。

活体显微镜检查－颈动脉

基本上如所述的，进行受损的颈动脉的活体显微镜检查（Massberg,S., Gawaz,M., Gruner,S., Schulte,V., Konrad,I., Zohlnhofer,D., Heinzmann,U.和 Nieswandt,B. (2003). A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. J Exp Med JID - 2985109R 197, 41-49）。简言之，通过腹膜内注射氯胺酮/甲苯噻嗪（氯胺酮 100 mg/kg, Parke-Davis, Karlsruhe, Germany; 甲苯噻嗪 5 mg/kg, Bayer AG, Leverkusen, Germany）麻醉小鼠。将聚乙烯导管（Portex, Hythe, England）植入右侧颈静脉，经静脉内输注发荧光的血小板（200 x

106/250 μl）。通过有力的结扎来诱导用于内皮剥脱的颈动脉损伤。血管损伤之前和之后，使用具有用于落射式照明的 100 W HBO 汞灯的 Zeiss Axiotech 显微镜(20x 水浸物镜, W 20x/0.5, Zeiss, Göttingen, Germany)通过右颈总动脉的体内视频显微术来原位显现发荧光的血小板。诱导损伤后 5 分钟记录血小板粘附和血栓形成，并使用计算机辅助的图像分析程序（Visitron, Munich, Germany）来评估录像磁带影像。

肺血栓栓塞

通过腹膜内注射 2,2,2-三溴乙醇和 2-甲基-2-丁醇（Aldrich）（2.5%溶液，0.15 ml/10g 体重）来麻醉小鼠。麻醉的小鼠接受注射到颈静脉中的胶原（0.8 mg/kg）和肾上腺素（60 μg/kg）的混合物。将存活的小鼠的切口缝合，并让它们恢复。对于在 4％甲醛中固定的肺进行解剖和组织学研究，并用苏木精/伊红对石蜡切片进行染色。

血小板计数

通过在 FACScalibur（Becton Dickinson, Heidelberg, Germany）上的流式细胞术来确定血小板计数。结果表示为平均值±S.D，或者表示为对照的百分比（wt，n = 19；FXII-/-，n = 14；和 FcRγ-/-，n = 5）。

闭塞时间

将麻醉的小鼠的腹腔纵向打开，并准备好腹主动脉。在主动脉周围放置超声波流量探测器，并通过用镊子进行一次用力的压迫来诱导血栓形成。监视血液流动直到发生完全闭塞。45 分钟后手工停止实验。按照所指出的，在即将进行该实验前经静脉内替换人凝血因子 XII。

组织病理学分析

将小鼠处死，快速取出肺，并在 4℃下在经缓冲的 4％福尔马林(pH

7.4; Kebo)中固定 24 小时。将组织脱水并用石蜡(Histolab Products AB)包埋，切成 4 μm 切片，并装在载玻片上。除去石蜡后，将组织用 Mayers 苏木精(Histolab Products AB)和伊红(Surgipath Medical Industries, Inc.)染色。

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、Western 印迹法和免疫印迹法(immunoprinting)

在 1%(w/v) SDS (Laemmli, 1970)存在下通过 12.5%(w/v)聚丙烯酰胺凝胶电泳来分离血浆(0,3 μl/泳道)。在 100 mA 下将蛋白质转移到硝酸纤维素膜上 30 分钟。膜用含有 4% (w/v)奶粉和 0.05% (w/v) Tween-20 的 PBS (pH 7.4)封闭。用 0.5 μg/ml 抗 MBK3 的单克隆抗体 (Haaseman J. Immunology 1988)探测膜。用抗小鼠 IgG 的缀合有过氧化物酶的二抗(稀释度 1:5000)接着施行化学发光检测方法来检测结合的抗体。

凝血测定

为了确定再钙化凝血时间，将 100 μl 用柠檬酸盐作抗凝血处理的小鼠血浆(0.38%柠檬酸钠)与各 100 μl 的 Horm 型胶原(Nycomed, München, Germany)、鞣花酸、硫酸软骨素(都来自 Sigma)、高岭土或缓冲液(终浓度 30 μg/ml)在 KC10 "Kugelkoagulometer" (Amelung, Lemgo, Germany)中在 37℃下温育 120 秒。为了测试血小板激活对于 FXII 依赖性凝血的影响，将经洗涤的血小板重悬浮在包含 4 mM Ca^{2+}和 5 μM Ca^{2+}-离子载运体 A23187 (Sigma)的 Tyrode 缓冲液中 10 分钟，之后加入至无血小板的血浆中。通过用 100 μl 25 mM $CaCl_2$-溶液进行再钙化来起始血块形成，并使用凝血计时器 KC4 (Amelung)记录直到发生凝血的时间。

凝血分析

使用 Dade Behring 试剂，根据生产商对于人样品所详细描述的方

案，用自动化血液凝固系统（BCS, Dade Behring）来测定总体和单一凝血参数。BCS 测定方案的原理可以从 Dade Behring 包装说明书中获得，其可以在 Dade Behring 的网站（http://www.dadebehring.com）上找到。用来自 Asserachrom（Roche）的 ELISA 测量 D-二聚体。根据标准方案，在 Sysmex XE 2100 上测定外周血细胞计数。

凝血酶测量

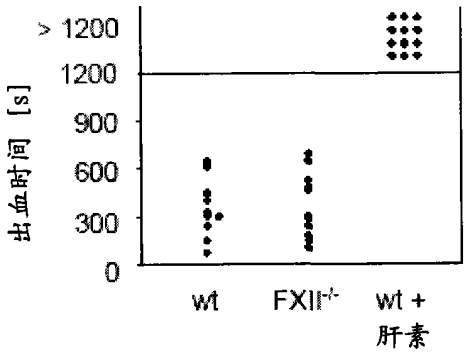
根据 Aronson 等人（Circulation, 1985）的方法并稍加修改来测量凝血酶产生。将富含血小板或者无血小板的血浆等分试样（0.5 ml）置于用 Horms 型胶原（100 μg/ml, 24 小时, 4℃）包被的圆底聚丙烯管中，并加入 20 μl 1 M Ca^{2+}以起始凝血。以 2.5-10 分钟的间隔在 60 分钟内向含有 90 μl 3.8%柠檬酸钠的微量滴定板的孔中加入样品（10 μl）。通过加入 50 L 在 1 mol/L Tris（pH 8.1）中的 2 mmol/L S-2238（H-D-Phe-Arg-NH-NO_2-HCl，凝血酶特异性底物; Chromogenix, Mölndal, Sweden）来显色 2 分钟。使用 Vmax 微量滴定板读取器（Easy Reader, EAR 340AT, SLT Lab Instruments GmbH, Vienna, Austria）在 405 nm 波长下通过分光光度测定法来测量所释放的有色产物的吸光度。在每个时间点一式三份地获得测量值。

统计学评价

使用不成对 Student's t 检验进行统计学分析。

尽管在本文中仅仅具体地举例说明和描述了优选的实施方案，但是将会认识到，按照上面的教导，本发明的许多修饰和变化都是可能的并且在所附权利要求的范围内而不背离本发明的精神和期望的范围。

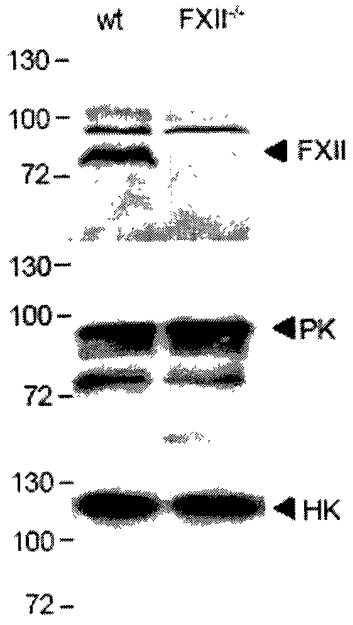
A



B

	FXII$^{-/-}$	wt
血小板	1176 ± 141	1142 ± 81
WBC	6.2 ± 1.6	7.2 ± 2.3
淋巴细胞	5.6 ± 2.1	6.5 ± 2.9
单核细胞	0.04 ± 0.02	0.05 ± 0.03
嗜中性粒细胞	0.57 ± 0.21	0.66 ± 0.24
红细胞	9.2 ± 0.7	9.3 ± 0.4
aPTT [秒]	71 ± 18	25 ± 5
PT [秒]	8.9 ± 1.3	9.1 ± 1.3
再钙化时间 [秒]	412 ± 78	210 ± 31

C



D

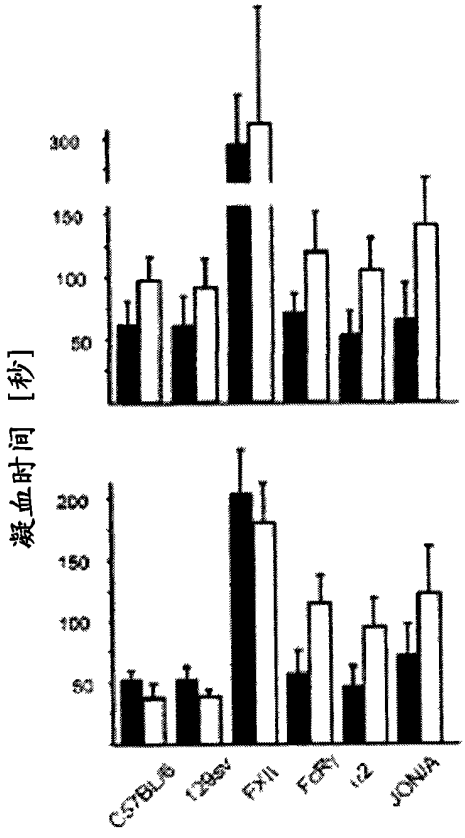


图 1

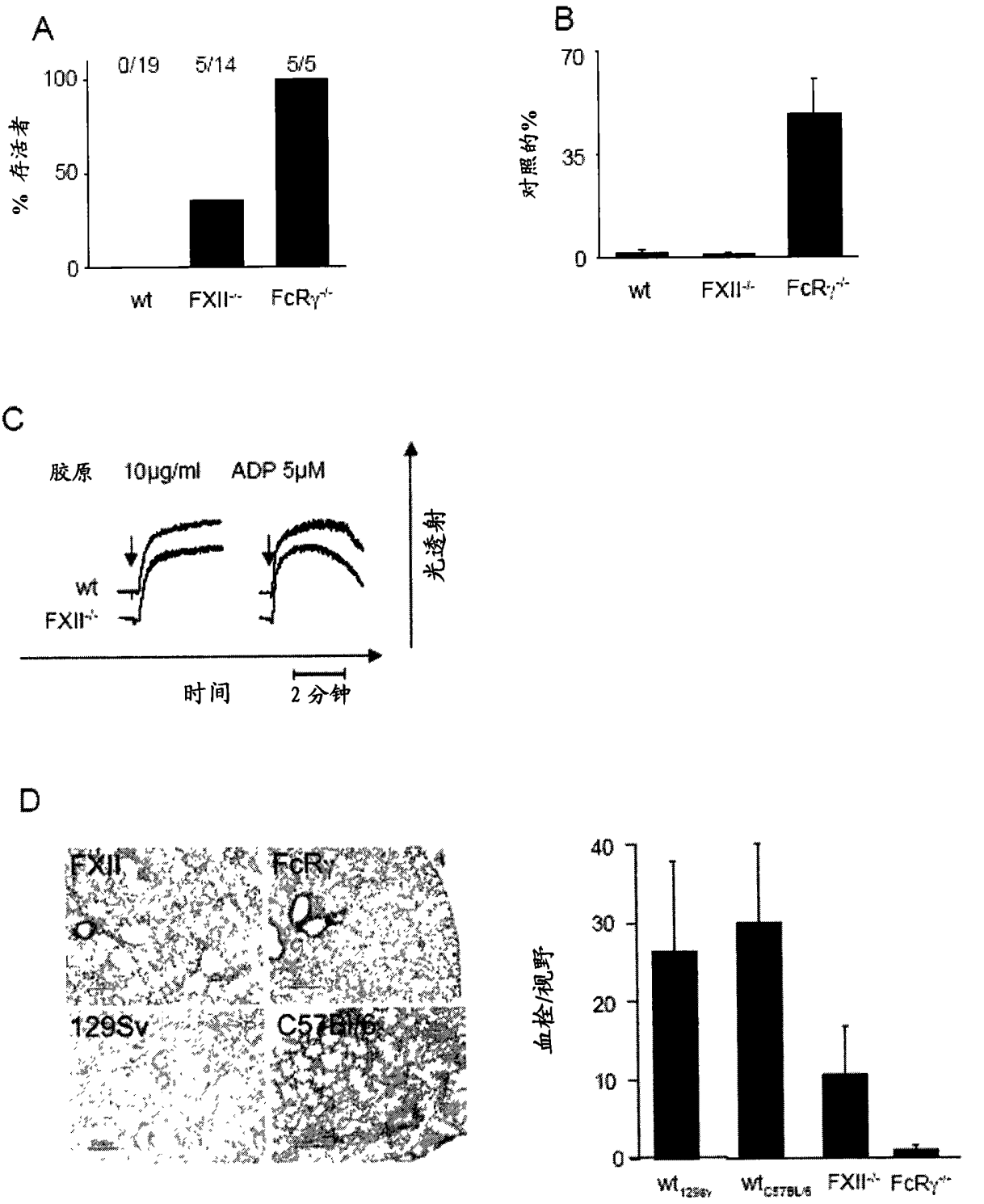

A
0/19
5/14
5/5
100
50
0
% 存活者
wt
FXII-/-
FcRγ-/-
B
70
35
0
对照的%
wt
FXII-/-
FcRγ-/-
C
胶原 10μg/ml ADP 5μM
wt
FXII-/-
光透射
时间
2 分钟
D
FXII
FcRγ
129Sv
C57Bl/6
40
30
20
10
0
血栓/视野
wt129Sv
wtC57BL/6
FXII-/-
FcRγ-/-

图 2

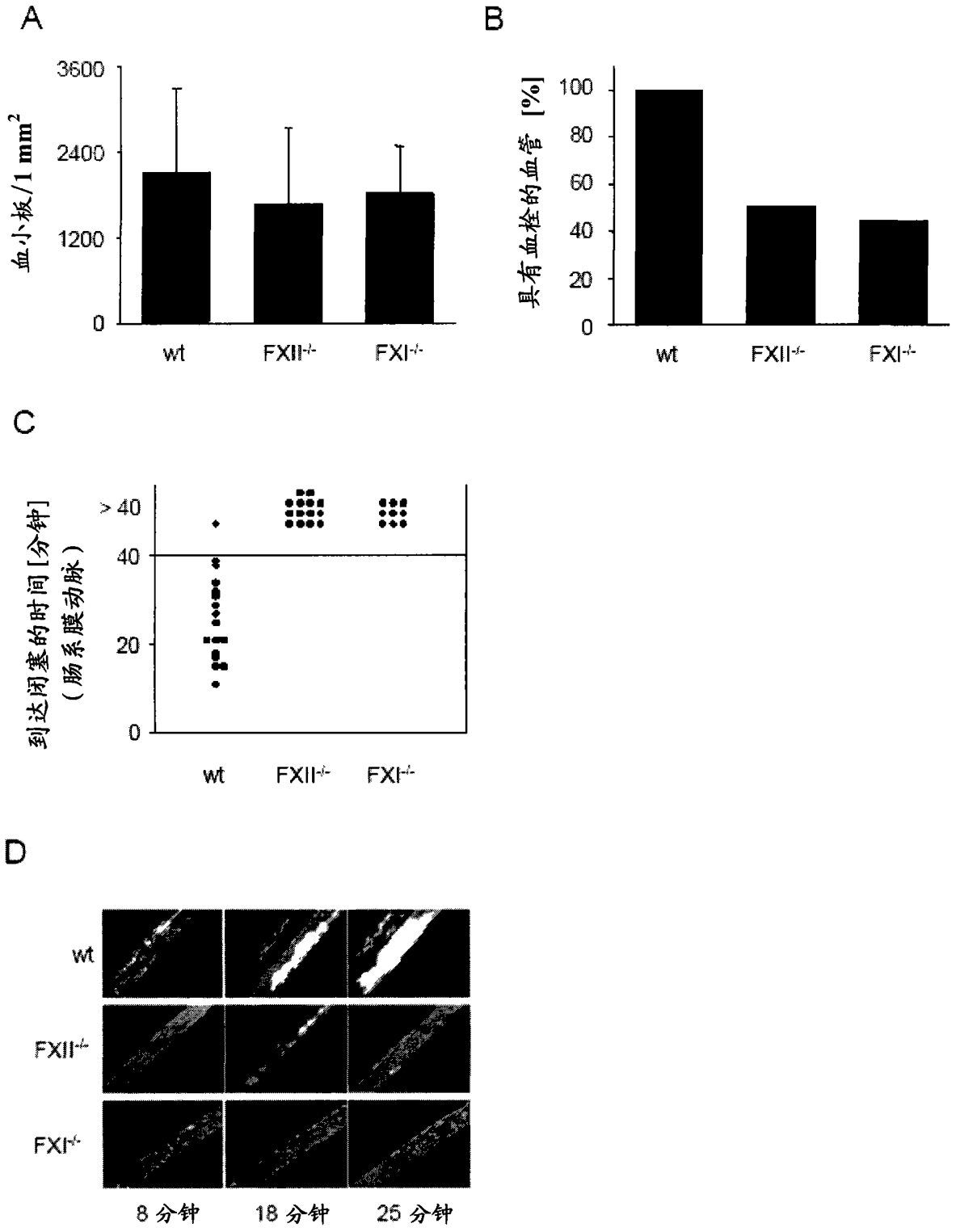

A
血小板/1 mm²
3600
2400
1200
0
wt
FXII-/-
FXI-/-
B
具有血栓的血管 [%]
100
80
60
40
20
0
wt
FXII-/-
FXI-/-
C
到达闭塞的时间 [分钟]
（肠系膜动脉）
> 40
40
20
0
wt
FXII-/-
FXI-/-
D
wt
FXII-/-
FXI-/-
8 分钟
18 分钟
25 分钟

图 3

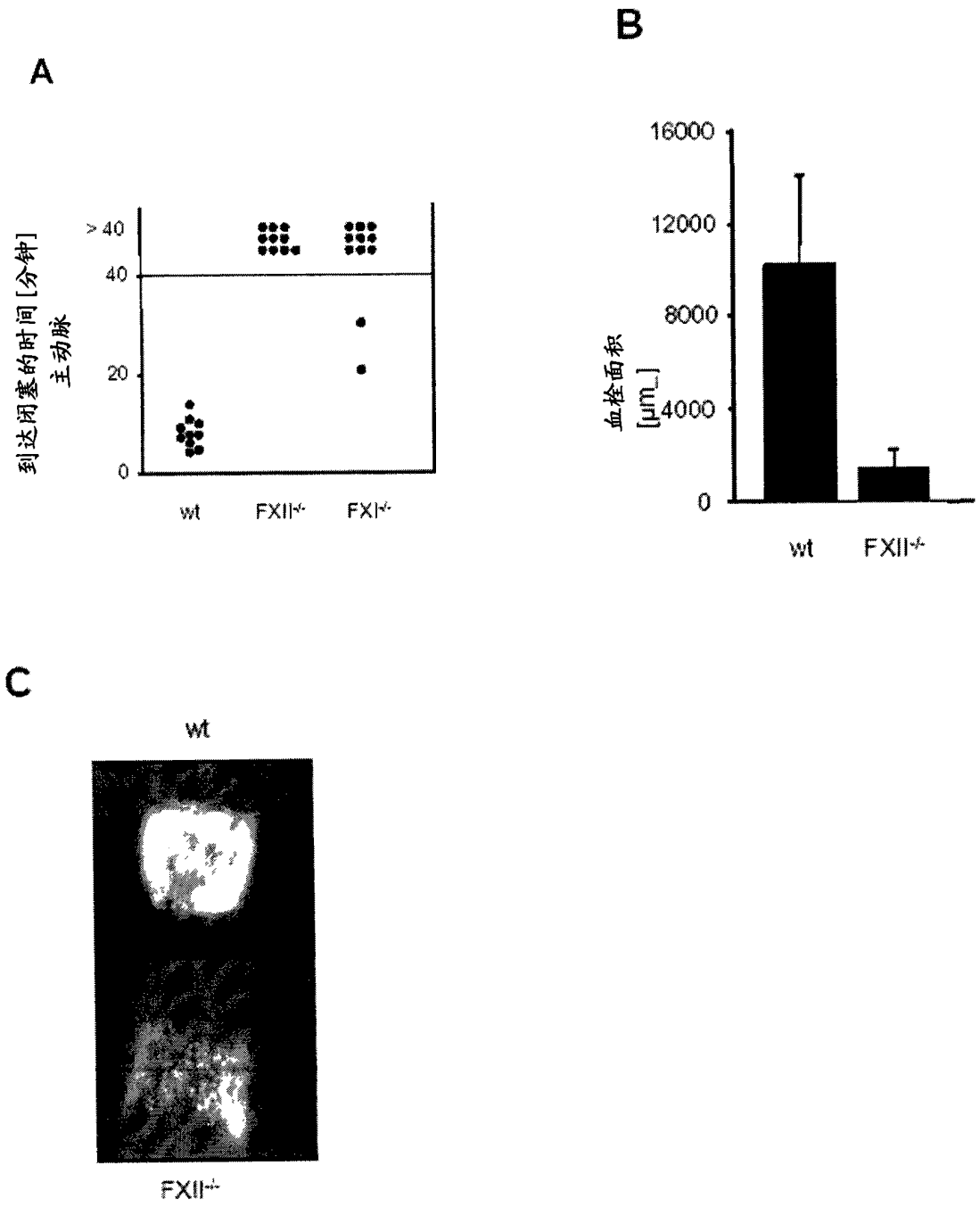

A
到达闭塞的时间[分钟]
主动脉
>40
40
20
0
wt
FXII-/-
FXI-/-
B
血栓面积
[μm_]
16000
12000
8000
4000
0
wt
FXII-/-
C
wt
FXII-/-

图 4

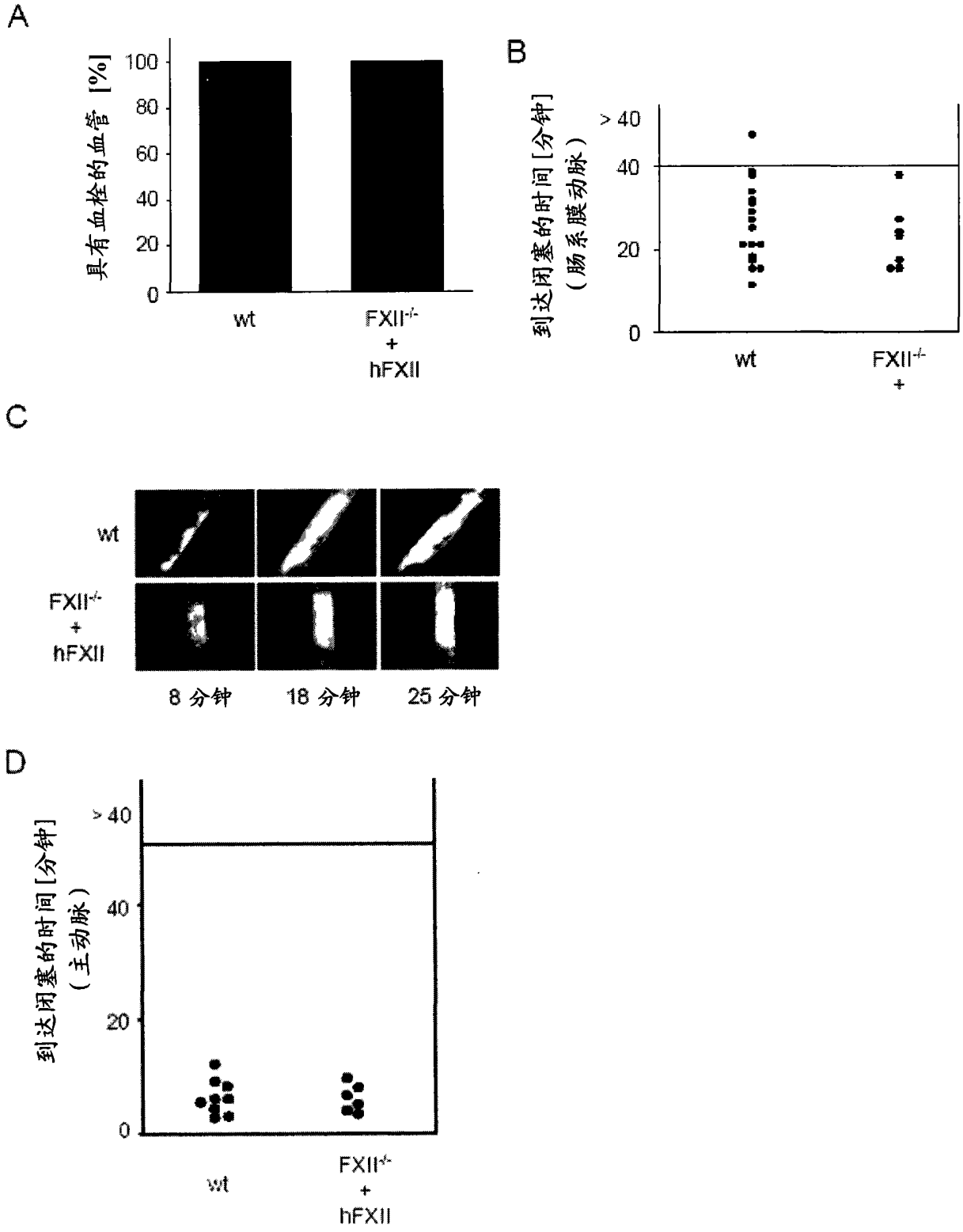

A
具有血栓的血管 [%]
100
80
60
40
20
0
wt
FXII-/-
+
hFXII
B
到达闭塞的时间 [分钟]
(肠系膜动脉)
> 40
40
20
0
wt
FXII-/-
+
C
wt
FXII-/-
+
hFXII
8 分钟
18 分钟
25 分钟
D
到达闭塞的时间 [分钟]
(主动脉)
> 40
40
20
0
wt
FXII-/-
+
hFXII

图 5

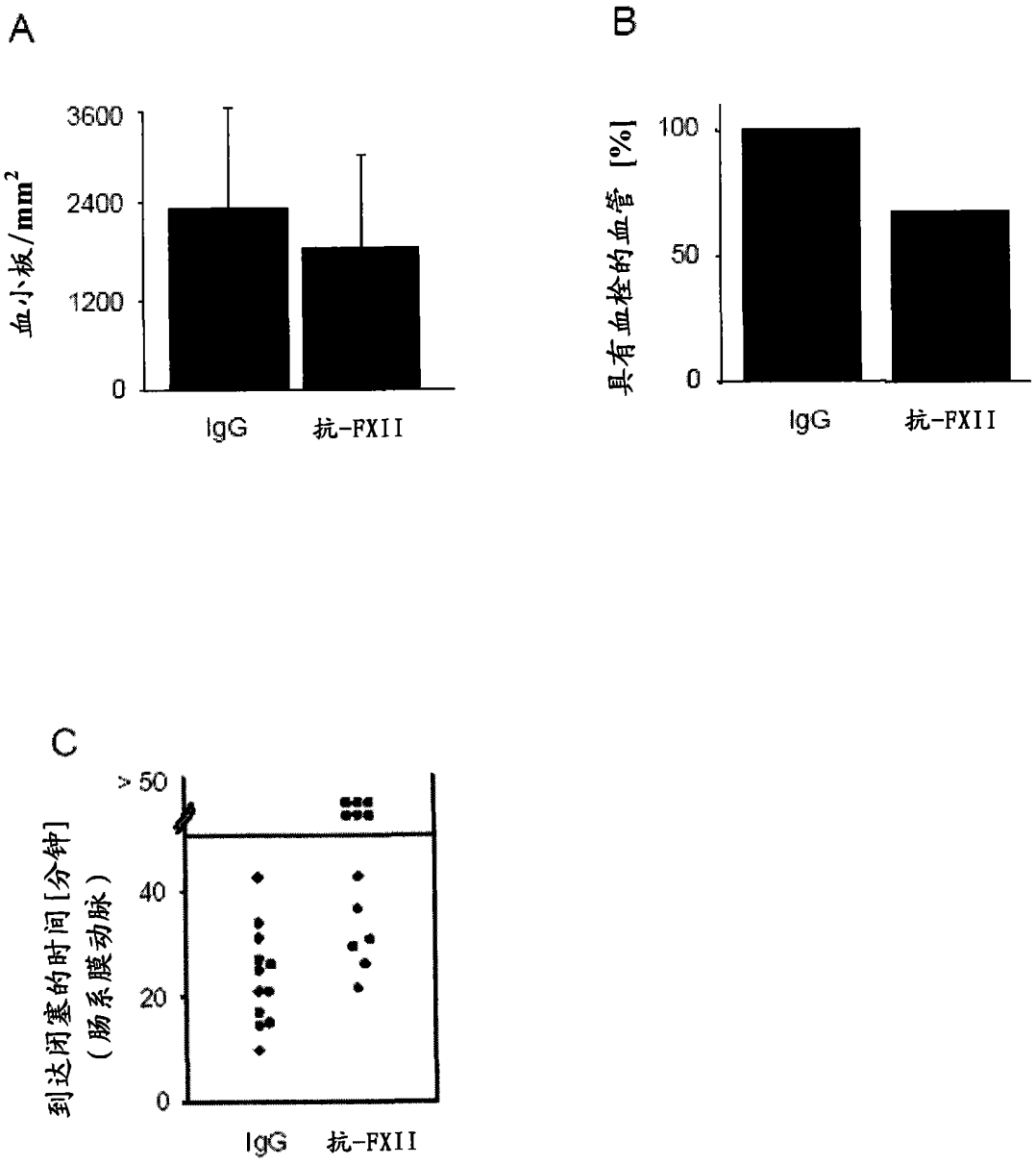
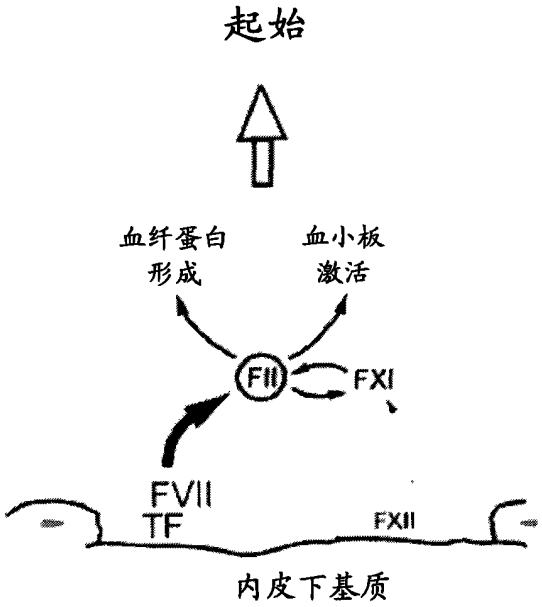

A
血小板/mm²
3600
2400
1200
0
IgG
抗-FXII
B
具有血栓的血管 [%]
100
50
0
IgG
抗-FXII
C
到达闭塞的时间[分钟]
(肠系膜动脉)
> 50
40
20
0
IgG
抗-FXII

图 6

A


起始
血纤蛋白
形成
血小板
激活
FII
FXI
FVII
TF
FXII
内皮下基质

B

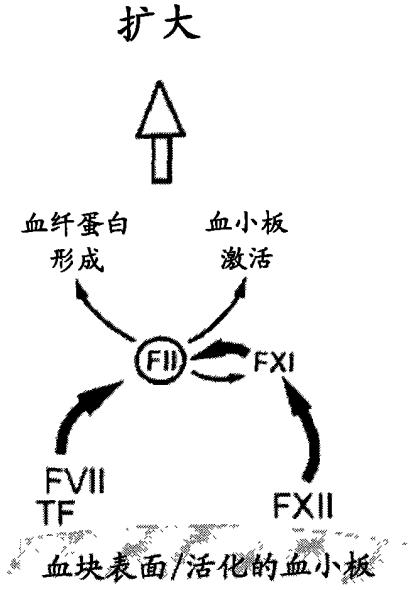

扩大
血纤蛋白
形成
血小板
激活
FII
FXI
FVII
TF
FXII
血块表面/活化的血小板

图 7