

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 47/48 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680034875.7

[43] 公开日 2008年9月17日

[11] 公开号 CN 101267843A

[22] 申请日 2006.8.4

[21] 申请号 200680034875.7

[30] 优先权

[32] 2005.8.4 [33] GB [31] 0516091.6

[86] 国际申请 PCT/GB2006/002934 2006.8.4

[87] 国际公布 WO2007/015107 英 2007.2.8

[85] 进入国家阶段日期 2008.3.21

[71] 申请人 哈莫斯塔蒂斯有限公司

地址 英国诺丁汉

[72] 发明人 A·H·古多尔 S·M·泰勒

G·F·沃克

[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 李 瑛

权利要求书4页 说明书25页 附图11页

[54] 发明名称

人造血小板

[57] 摘要

描述了适合于用作人造血小板的治疗剂。所述的活性剂包含与不溶性载体结合的血纤蛋白原结合前体，其中血纤蛋白原结合前体可以被伤口部位特异性活性剂，诸如凝血酶转化成与载体结合的血纤蛋白原结合成分。血纤蛋白原结合成分与血纤蛋白原结合前体相比具有增加的结合血纤蛋白原的能力。所述的活性剂可以用于治疗其自身血小板缺乏，诸如具有血小板数(血小板减少症)或功能(血小板功能不全)遗传性或后天性缺陷的患者。

1. 包含与不溶性载体结合的血纤蛋白原结合前体的活性剂，其中血纤蛋白原结合前体可以被伤口部位特异性活性剂转化成与载体结合的血纤蛋白原结合成分，血纤蛋白原结合成分与血纤蛋白原结合前体相比具有增加的结合血纤蛋白原的能力，并且血纤蛋白原结合前体不是血纤蛋白原。

2. 权利要求 1 的活性剂，其中血纤蛋白原结合成分是肽。

3. 权利要求 2 的活性剂，其中血纤蛋白原结合肽在其氨基末端包含氨基酸序列 $\text{NH}_2\text{-GPRP-}$ (SEQ ID NO: 17)。

4. 任何上述权利要求的活性剂，其中血纤蛋白原结合前体可以被伤口部位特异性活性剂切割以便暴露结合载体的血纤蛋白原结合成分。

5. 权利要求 4 的活性剂，其中血纤蛋白原结合前体包含在其氨基末端与阻断或抑制血纤蛋白原与血纤蛋白原结合肽结合的阻断成分连接的血纤蛋白原结合肽，以便伤口部位特异性活性剂切割血纤蛋白原结合前体暴露血纤蛋白原结合肽而使血纤蛋白原与血纤蛋白原结合肽的结合增加。

6. 权利要求 4 或 5 的活性剂，其中伤口部位特异性活性剂为凝血酶，并且血纤蛋白原结合前体包括凝血酶切割位点。

7. 权利要求 6 的活性剂，其中血纤蛋白原结合前体包含肽，所述肽在其氨基末端包含氨基酸序列 $\text{NH}_2\text{-ZYXR/GPRP}$ (SEQ ID NO: 18)，其中“/”表示凝血酶切割位点，且 X 为任何氨基酸，但优选为脯氨酸，Y 为任何氨基酸，但优选为天冬氨酸，且 Z 为至少一种优选为亮氨酸或脯氨酸的氨基酸。

8. 权利要求 7 的活性剂，其中肽在其氨基末端上包含下列氨基酸序列之一： $\text{NH}_2\text{-LVPR/GPRP}$ (SEQ ID NO: 19)； $\text{NH}_2\text{-ADPR/GPRP}$ (SEQ ID NO: 20)； $\text{NH}_2\text{-LDPR/GPRP}$ (SEQ ID NO: 21)；或 $\text{NH}_2\text{-LVPR/GPRV}$ (SEQ ID NO: 22)，其中“/”表示凝血酶切割位点。

9. 权利要求 6-8 中任一项的活性剂，其进一步包含凝血酶结合

位点。

10. 权利要求 9 的活性剂，其中血纤蛋白原结合前体和凝血酶结合位点分别与不溶性载体结合。

11. 权利要求 9 的活性剂，其中凝血酶结合位点为血纤蛋白原结合前体组成部分的肽序列。

12. 权利要求 11 的活性剂，其中肽序列为可以结合凝血酶的序列，优选凝血酶 exosite I 或 II 结构域可以结合的序列。

13. 权利要求 11 或 12 的活性剂，其中肽序列对应于 PAR-1 受体（诸如 WEDEEKNES (SEQ ID NO: 24)），血纤蛋白原（诸如 VRPEHPAETDYDSLYPEDDL (SEQ ID NO: 25)）或因子 VIII（诸如 EEEDWD (SEQ ID NO: 26) 或 EDSYED (SEQ ID NO: 27)）的肽序列，其可以与凝血酶 exosite I 或 II 结构域结合，或对应于凝血酶结合肽水蛭素。

14. 任何上述权利要求的活性剂，其中血纤蛋白原结合前体包含具有与不溶性载体共价结合的羧基末端残基或修饰的羧基末端残基的肽。

15. 权利要求 14 的活性剂，其中羧基末端残基为半胱氨酸残基，或其中修饰的羧基末端残基为马来酰亚胺修饰的赖氨酸残基。

16. 权利要求 14 或 15 的活性剂，其中血纤蛋白原结合前体包含在羧基末端残基或修饰的羧基末端残基与血纤蛋白原结合成分之间的间隔序列。

17. 权利要求 16 的活性剂，其中间隔序列为 GGGGG (SEQ ID NO: 29) 或 GGGGG (SEQ ID NO: 30)。

18. 任何上述权利要求的活性剂，其进一步包含伤口部位靶向成分。

19. 权利要求 18 的活性剂，其中伤口部位靶向成分固定化于不溶性载体上。

20. 权利要求 18 的活性剂，其中伤口部位靶向成分为血纤蛋白原结合前体的组成部分。

21. 权利要求 20 的活性剂，其中血纤蛋白原结合前体为包含血纤蛋白原结合肽的肽，并且伤口部位靶向成分结合血纤蛋白原结合肽的氨

基末端，以便伤口部位特异性活性剂切割血纤蛋白原结合前体释放伤口部位靶向成分以暴露血纤蛋白原结合肽。

22. 权利要求 18 - 21 中任一项的活性剂，其中伤口部位靶向成分能够结合细胞表面蛋白组织因子。

23. 权利要求 22 的活性剂，其中伤口部位靶向成分包含能够结合细胞表面蛋白组织因子的因子 VII 或其片段或衍生物，或能够结合细胞表面蛋白组织因子的因子 VIIa 或其片段或衍生物。

24. 药物组合物，包含如权利要求 1 - 23 中任一项所述的活性剂和药学上可接受的载体，赋形剂或稀释剂。

25. 如权利要求 1 - 23 中任一项所述的活性剂，用作药物。

26. 如权利要求 1 - 23 中任一项所述的活性剂在制备用于预防、治疗或改善血小板减少症或血小板功能不全的药物中的应用。

27. 预防、治疗或改善血小板减少症或血小板功能不全的方法，包括对有这类预防、治疗或改善需要的受试者给予如权利要求 1 - 23 中任一项所述的活性剂。

28. 用作权利要求 1 的活性剂的组成部分的血纤蛋白原结合前体肽，其中血纤蛋白原结合前体肽可以被伤口部位特异性活性剂转化成血纤蛋白原结合肽，血纤蛋白原结合肽与血纤蛋白原结合前体肽相比具有增加的结合血纤蛋白原的能力，并且血纤蛋白原结合前体肽不是血纤蛋白原。

29. 权利要求 28 的肽，其包含 SEQ ID NOs: 32-35, 或 38-41 中任一项的氨基酸序列。

30. 鉴定用作权利要求 1 的活性剂的组成部分的血纤蛋白原结合前体的方法，包括：

i) 将伤口部位特异性活性剂与结合不溶性载体的标记的候选血纤蛋白原结合前体一起孵育，其条件为允许伤口部位特异性活性剂将已知的血纤蛋白原结合前体转化成血纤蛋白原结合成分；

ii) 在与伤口部位特异性活性剂一起孵育之前和之后确定不溶性载体上的标记的量；和

iii) 将候选血纤蛋白原结合前体鉴定为血纤蛋白原结合前体，只要在与伤口部位特异性活性剂一起孵育后不溶性载体上标记的量低于在与伤口部位特异性活性剂一起孵育前不溶性载体上标记的量。

31. 权利要求 30 的方法，其进一步包括在与伤口部位特异性活性剂一起孵育之前和之后确定血纤蛋白原与不溶性载体的结合，并且在步骤(iii)中，将候选血纤蛋白原结合前体鉴定为血纤蛋白原结合前体，只要在与伤口部位特异性活性剂一起孵育后不溶性载体上标记的量低于在与伤口部位特异性活性剂一起孵育前不溶性载体上标记的量，并且在与伤口部位特异性活性剂一起孵育后血纤蛋白原与不溶性载体的结合增加。

32. 鉴定用作权利要求 1 的活性剂的组成部分的血纤蛋白原结合前体的方法，包括：

i) 使伤口部位特异性活性剂接触结合不溶性载体的候选血纤蛋白原结合前体，其条件为允许伤口部位特异性活性剂将血纤蛋白原结合前体转化成血纤蛋白原结合成分；

ii) 确定候选血纤蛋白原结合前体在接触伤口部位特异性活性剂后是否促进血块形成，血小板聚集或不溶性载体聚集；和

iii) 将候选血纤蛋白原结合前体鉴定为血纤蛋白原结合前体，只要血块形成得以促进。

人造血小板

本发明涉及适合于用作人造血小板的活性剂。这些活性剂可以用于治疗其自身血小板存在缺乏，诸如血小板数(血小板减少症)或功能(血小板功能不全)遗传性或后天性缺陷的患者。

血小板输注是目前针对急性出血唯一有效的疗法并且预防存在血小板产生和/或功能障碍的患者。然而，用于输注的血小板浓缩物的贮存期限仅有5天。还存在与血小板输注相关的感染的风险以及患者可能对血小板浓缩物存在过敏反应的风险。

鉴于与血小板浓缩物和血小板输注相关的问题，已经进行了研发人造血小板的尝试。重要的是人造血小板彼此间并且与其中血小板活化的血管聚集部位上的内源性血小板聚集，而最少的聚集发生在别处。当血小板活化时，血小板膜糖蛋白 GPIIb-IIIa 的构象变化使得它结合血浆血纤蛋白原并且将更多的血小板补充到生长的血栓中。

WO 2005/035002 中描述了两种人造血小板制品的生产方法。产品 1 为通过末端半胱氨酸与人清蛋白微球交联的序列 NH₂-GPRPGGGGGC (SEQ ID NO: 1) 的肽。血纤蛋白原与肽结合。产品 2 与产品 1 相同，但血纤蛋白原不与肽结合。当给予时，产品 2 通过肽结合内源性血纤蛋白原。所述的肽能够结合血纤蛋白原，以便维持血纤蛋白原的天然构象或使血纤蛋白原接近其天然构象。这使得优先与 GPIIb-IIIa 受体的活化形式发生相互作用。结合的血纤蛋白原还可以与切割血纤蛋白原的凝血酶发生相互作用，从而使得微球通过血纤蛋白-血纤蛋白桥交联微球。

认为产品 2 与产品 1 相比具有增强的安全特性，因为产品 2 与患者的内源性血纤蛋白原结合。这就降低了在给予产品 2 时感染和过敏反应的风险。

需要提供进一步改进的人造血小板。特别地，需要提供人造血小

板,其中进一步将远离血管损害部位的血栓形成的风险降至最低限度。

本发明提供了用作人造血小板的活性剂,该活性剂包含与不溶性载体结合的血纤蛋白原结合前体,其中血纤蛋白原结合前体可以被伤口部位特异性活性剂转化成与载体结合的血纤蛋白原结合成分,血纤蛋白原结合成分与血纤蛋白原结合前体相比具有增加的结合血纤蛋白原的能力,并且血纤蛋白原结合前体不是血纤蛋白原。

一旦在伤口部位血纤蛋白原结合前体被转化成血纤蛋白原结合成分,血纤蛋白原结合成分就能够结合血纤蛋白原使得结合的血纤蛋白原可以与血小板结合,由此导致血小板聚集。因为需要伤口部位特异性活性剂转化血纤蛋白原结合前体,所以使远离伤口部位的血小板聚集降至最低。认为本发明的活性剂与已知的人造血小板相比,其远离伤口的血栓形成性降低,由此提高了安全性。

本发明活性剂的另一个优点在于血纤蛋白原结合成分以这样的方式与血纤蛋白原结合维持血纤蛋白原的天然构象或使血纤蛋白原接近其天然构象,以便结合的血纤蛋白原优先与活化的血小板发生相互作用并非必需的。这是因为这些活性剂仅在伤口部位上活化。因此,血纤蛋白原结合成分的选择并不象 WO 2005/035002 中所述的产品 1 和 2 那么关键。但是,优选的是血纤蛋白原结合成分与血纤蛋白原结合,使得结合的血纤蛋白原优先与活化的血小板发生相互作用。这进一步降低了活性剂会导致远离伤口部位的血栓形成的风险。

一旦血纤蛋白原与血纤蛋白原结合成分结合,它就应能够被凝血酶切割而使得不溶性载体通过血纤蛋白-血纤蛋白桥交联。

优选的是,血纤蛋白原结合成分与具有 10^{-9} - 10^{-6} M 的解离常数 (K_D) 的血纤蛋白原结合。

可以在平衡时测定解离常数。例如,可以将已知浓度的放射性标记的血纤蛋白原与已经交联血纤蛋白原结合成分的微球一起孵育。一般而言, $5\mu\text{M}$ 肽与 1g 微球交联或 15-40 μmoles 肽与 1g 微球交联。将肽连接的微球稀释至 0.5 mg/ml,并且在 20°C 下在 pH 7.4 的等渗缓冲液(例如包含 0.15M NaCl 的 0.01M HEPES 缓冲液)中与 0.05 - 0.5mg/ml

浓度的放射性标记的血纤蛋白原一起孵育长达1小时。可以通过离心从游离血纤蛋白原中分离与微球上的血纤蛋白原结合成分结合的血纤蛋白原并且测定游离的和结合的血纤蛋白原的量。然后根据Scatchard分析,通过将结合的血纤蛋白原浓度对结合:游离血纤蛋白原浓度比绘图计算解离常数,其中曲线斜率表示为 K_D 。

可以理解血纤蛋白原结合前体(和不溶性载体)对血纤蛋白原的亲合力越低则越好。这会将本发明活性剂导致血小板聚集的风险降至最低,否则在伤口部位被伤口部位特异性活性剂转化。

将本发明的活性剂给予患者不应在远离伤口部位产生医学上不可接受水平的血液凝固。医学上不可接受水平的血液凝固包括深静脉血栓形成(DVT)、肺栓塞(PE)、暂时性脑或心血管局部缺血或中风。

优选血纤蛋白原结合前体对血纤蛋白原的解离常数大于 $1 \times 10^{-6} M$ 。

血纤蛋白原结合前体可以为肽或肽类似物,但优选肽。

在本发明优选的实施方案中,血纤蛋白原结合前体包含在其氨基末端上与阻断或抑制(即减少)血纤蛋白原与血纤蛋白原结合肽结合的阻断成分(优选肽)连接的血纤蛋白原结合肽(即血纤蛋白原结合成分)。伤口部位特异性活性剂切割血纤蛋白原结合前体暴露了与不溶性载体结合的血纤蛋白原结合肽。在这类实施方案中,阻断成分阻断或抑制血纤蛋白原结合肽结合血纤蛋白原的能力,直到切割发生为止。优选阻断成分为1-30个氨基酸残基长度的肽。

可以使用任何合适的血纤蛋白原结合肽。例如,肽能够与天然或通过血小板膜糖蛋白GPIIb-IIIa结合血纤蛋白的血纤蛋白原区结合。与血纤蛋白原结合的血纤蛋白在Mosesson等2001, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 936, 11-30中有讨论。GPIIb-IIIa与血纤蛋白原结合在Bennett, 2001, *Annals of NY Acad. Sci.*, 936, 340-354中有讨论。

肽能够与血纤蛋白 α -链的羧基和/或氨基末端结构域结合。特别地,肽可能能够与这些结构域之一或两者中包含RGD的基元(诸如95-98位氨基酸上的RGDF(SEQ ID NO: 2)或572-575位氨基酸上的RGDS(SEQ ID NO: 3))结合。肽可能能够与血纤蛋白原 γ -链的羧基末端

结构域, 优选与该结构域的最后 12 个氨基酸(序列 HHLGGAKQAGDV (SEQ ID NO: 4)) 结合。肽可能能够与血纤蛋白原 γ -链的 D-结构域, 诸如 D-结构域的 β -链区段结合。

血纤蛋白原结合肽可以包含来源于 GPIIb 或 GPIIIa 的血纤蛋白原结合区的序列。例如肽可以包含序列 AVTDVNGDGRHDLLVGAPLYM (SEQ ID NO: 5), 它对应于 GPIIb 的 294-314 位氨基酸残基的序列或其保持血纤蛋白原结合活性的片段或衍生物。已知保持血纤蛋白原结合活性的片段为 TDVNGDGRHDL (296-306) (SEQ ID NO: 6), GDGRHDLLVGAPL (300-312) (SEQ ID NO: 7) 和 GAPL (SEQ ID NO: 8)。TDVNGDGRHDL 的合适的衍生物包括: T (D, E) VNG (D, E) GRH (D, E) L (SEQ ID NO: 9); TD (V, L) NGDGRHDL (SEQ ID NO: 10); TDV (N, Q) GDGRHDL (SEQ ID NO: 11); TDVNGDG (R, K) HDL (SEQ ID NO: 12)。

血纤蛋白原结合肽可以包含 GPIIIa 的 95-223 位残基的序列或其保持血纤蛋白原结合活性的片段或衍生物。例如, 认为包含序列 SVSRNRDAPEGG (SEQ ID NO: 13) 的 211-222 位残基为 GPIIIa 中重要的血纤蛋白原结合结构域。GPIIIa 的其它合适的区包括 109-171 和 164-202 位残基。

血纤蛋白原结合肽可以包含残基的序列, 所述的残基通过凝血酶作用暴露在血纤蛋白原上, 并且作为聚合反应中的第一步结合血纤蛋白原以便产生血纤蛋白。凝血酶从血纤蛋白原 α 和 β 链的 N 末端切割肽(释放血纤蛋白肽 A 和 B), 以便分别暴露序列 NH₂-GPR- (SEQ ID NO: 14) 和 NH₂-GHR- (SEQ ID NO: 15)。血纤蛋白原结合肽的优选实例由此在其氨基末端上包含氨基酸序列 NH₂-G (P, H) RX- (SEQ ID NO: 16), 其中 X 为任何氨基酸, 且 (P, H) 意指脯氨酸或组氨酸存在于该位置上。优选肽在其氨基末端上包含序列 NH₂-GPRP- (SEQ ID NO: 17)。

优选血纤蛋白原结合肽为 4-30 个, 更优选 4-10 个氨基酸残基长度。

伤口部位特异性活性剂优选为在伤口部位产生的天然存在的酶, 它能够切割血纤蛋白原结合前体。在这类实施方案中, 血纤蛋白原结

合前体应包含切割位点，它被伤口部位特异性活性剂特异性识别并且位于血纤蛋白原结合肽与阻断成分之间。凝血酶为优选的伤口部位特异性活性剂。然而，其它丝氨酸蛋白酶，诸如因子 Xa 或 FIXa 可以在伤口部位产生并且可以用于切割血纤蛋白原结合前体。已知凝血酶切割羧基末端与精氨酸残基，且通常量精氨酸与甘氨酸之间的肽键。

在本发明优选的实施方案中，血纤蛋白原结合前体为肽，它包含位于其氨基末端的氨基酸序列 $\text{NH}_2\text{-ZYXR/GPRP-}$ (SEQ ID NO: 18)，其中“/”表示凝血酶切割位点，且 X 为任何氨基酸，但优选为脯氨酸，Y 为任何氨基酸，但优选为天冬氨酸或丙氨酸，且 Z 为至少一种氨基酸，其优选为亮氨酸或脯氨酸。实例为： $\text{NH}_2\text{-LVPR/GPRP-}$ (SEQ ID NO: 19)； $\text{NH}_2\text{-ADPR/GPRP-}$ (SEQ ID NO: 20)； $\text{NH}_2\text{-LDPR/GPRP-}$ (SEQ ID NO: 21)；或 $\text{NH}_2\text{-LVPR/GPRV-}$ (SEQ ID NO: 22)。

在优选的实施方案中，本发明的活性剂进一步包含伤口部位特异性活性剂的结合位点。预计这可强化在伤口部位血纤蛋白原结合前体转化成血纤蛋白原结合成分。结合位点可以在与血纤蛋白原结合前体或血纤蛋白原结合前体组成部分结合的不溶性载体上。在优选的实施方案中，结合位点与血纤蛋白原结合成分结合，使得伤口部位特异性活性剂切割血纤蛋白原结合前体而释放结合位点，以便暴露血纤蛋白原结合成分。例如，血纤蛋白原结合前体可以为肽，它在羧基末端到氨基末端的方向上包含固定化于不溶性载体上的血纤蛋白原结合肽，伤口部位特异性活性剂的切割位点和包含伤口部位特异性活性剂的结合位点的肽。一般而言，结合位点肽的羧基末端将需要由序列与血纤蛋白原结合肽的氨基末端隔离，所述的序列当伤口部位特异性活性剂在切割位点上切割血纤蛋白原结合前体肽时被该活性剂所识别。例如，如果伤口部位特异性活性剂为凝血酶且血纤蛋白原结合肽的氨基末端残基为 G，那么序列可以如上所述为 RXYZ (在羧基到氨基方向上) (SEQ ID NO: 23)。任选地间隔区还可以存在于由伤口部位特异性活性剂所识别的切割序列与结合位点肽之间。该间隔区应足够长以使伤口部位特异性活性剂能够在与所述的结合位点肽结合时切割血纤蛋白原结合

前体。优选该间隔区为具有 1-20 个氨基酸残基长度的肽。

如果伤口部位特异性活性剂为凝血酶，优选本发明的活性剂进一步包含凝血酶结合位点。凝血酶结合位点优选由凝血酶可结合的肽提供，优选具有 $Kd. 10^{-9} - 10^{-6}$ 的亲合力。优选肽包含凝血酶的 exosite I 或 II 结合结构域可以结合的序列。凝血酶结合肽的合适的实例为来源于 PAR-1 受体(诸如 WEDEEKNES (SEQ ID NO: 24))，血纤蛋白原(诸如 VRPEHPAETDYDSLYPEDDL (SEQ ID NO: 25)) 或因子 VIII(诸如 EEEDWD (SEQ ID NO: 26) 或 EDSYED (SEQ ID NO: 27)) 的 exosite 结合位点的序列。或者，凝血酶结合位点可以来源于凝血酶结合肽水蛭素(例如 NGDFEEIPEEYL (SEQ ID NO: 28))。凝血酶结合肽可以作为单独的肽(通过合适的接头，肽或非肽)与不溶性载体交联。或者，凝血酶结合肽可以为血纤蛋白原结合前体肽的组成部分。

在优选的实施方案中，本发明的活性剂进一步包含伤口部位靶向成分以便促进该活性剂定位于伤口部位。伤口部位靶向成分应选择性地与伤口部位结合(优选具有 $Kd 10^{-9} - 10^{-6}$ 的亲合力)。优选伤口部位靶向成分能够与细胞表面蛋白组织因子结合。当细胞表面蛋白组织因子在血管损伤后暴露于血液时引起凝血。一旦暴露，细胞表面组织因子便以极高亲和力和特异性结合丝氨酸蛋白酶因子 VII 或酶促活性形式 VIIa 的惰性前体。因此，伤口部位靶向成分可以包含因子 VII 或其能够结合细胞表面蛋白组织因子的片段或衍生物或因子 VIIa 或其能够结合细胞表面蛋白组织因子的片段或衍生物。

伤口部位靶向成分可以被固定化于与血纤蛋白原结合前体或血纤蛋白原结合前体组成部分结合的不溶性载体上。在一个实施方案中，伤口部位靶向成分和血纤蛋白原结合前体分别与不溶性载体交联。在另一个实施方案中，伤口部位靶向成分与血纤蛋白原结合成分结合，以便伤口部位特异性活性剂切割血纤蛋白原结合前体而释放伤口部位靶向成分，以便暴露血纤蛋白原结合成分。例如血纤蛋白原结合前体可以为肽，它在羧基末端到氨基末端的方向上包含被固定化于不溶性载体上的血纤蛋白原结合肽，伤口部位特异性活性剂的切割位点和伤

口部位靶向成分。一般而言，伤口部位靶向成分的羧基末端需要由序列与血纤蛋白原结合肽的氨基末端隔离，所述的序列当伤口部位特异性活性剂在切割位点上切割血纤蛋白原结合前体肽时被该活性剂所识别。例如，如果伤口部位特异性活性剂为凝血酶且血纤蛋白原结合肽的氨基末端残基为G，那么序列可以如上所述为RXYZ(在羧基到氨基方向上)。任选地间隔区还可以存在于由伤口部位特异性活性剂所识别的切割序列与伤口部位靶向成分之间。该间隔区应足够长以使伤口部位靶向成分能够选择性地与伤口部位结合。优选该间隔区为具有1-20个氨基酸残基长度的肽。

不溶性载体应为惰性的，生物相容性的并且当给予活性剂时不应引起任何医学上不可接受水平的凝血。不溶性载体应足够小以便通过肺毛细血管床输送活性剂。可以使用Perkins等1997, *The British Journal of Radiology*, 70, 603的方法测定通过肺毛细血管床输送活性剂的能力。

不溶性载体可以具有最大尺寸，以便少部分，例如，在数目上少于约2%的群体超过作为最大尺寸的6 μm ，正如通过颗粒计数器，诸如Coulter Multizer II测量的。作为最大尺寸的2-4 μm 大小可能是合适的，其与人血小板的大小相差无几。

不溶性载体可以为微粒(包括实心，空心或多孔微粒)，优选基本上为球形的微粒。微粒可以由任何合适的物质，例如交联蛋白构成。合适的蛋白质为清蛋白(血清衍生的或重组的，人或非人的)。适合于用作本发明中的不溶性载体的微粒可以通过使用众所周知的喷雾干燥技术，例如，如WO 92/18164中所述喷雾干燥人血清清蛋白来形成。

微粒作为载体的应用的可替代选择包括脂质体，合成聚合物颗粒(诸如聚乳酸、聚乙醇酸和聚(乳/乙醇)酸)或细胞膜碎片。

血纤蛋白原结合前体可以通过任何合适的方式与不溶性载体结合，但一般为共价结合。优选的共价键的实例为二硫键，硫醚键或酰胺键。合适的共价键可以在血纤蛋白原结合前体为包含半胱氨酸的肽且载体包含巯基反应基时形成。这使得肽通过连接半胱氨酸的-SH基

团与载体上的巯基反应基与载体结合。优选将末端半胱氨酸引入血纤蛋白原结合前体肽中以便使与载体上的巯基反应基交联。或者，共价键可以在血纤蛋白原结合前体为包含马来酰亚胺基的肽(优选在羧基末端上，例如与肽的羧基末端赖氨酸连接)且载体包含巯基时形成。然后通过使肽的马来酰亚胺基与载体的巯基反应而使肽与载体结合。

一般而言，在血纤蛋白原结合成分与不溶性载体之间将需要间隔区以确保血纤蛋白原结合成分的血纤蛋白原结合活性不受不溶性载体的不利影响。例如，不溶性载体的表面可以对血纤蛋白原与血纤蛋白原结合成分结合产生位阻作用，否则这是距不溶性载体的表面足够的距离。

如果血纤蛋白原结合前体为包含血纤蛋白原结合肽的肽且该前体通过末端氨基酸残基与不溶性载体结合，那么间隔序列优选存在于末端氨基酸残基与该前体的血纤蛋白原结合肽之间。间隔序列可以为，例如1-20个，优选5-20个氨基酸残基长度。优选间隔序列GGGGG(SEQ ID NO: 29)或GGGGG(SEQ ID NO: 30)。

任何数量的血纤蛋白原结合前体可以与不溶性载体结合。血小板一般具有50,000-100,000个GPIIb-IIIa表面蛋白。相似数量的与不溶性载体结合的血纤蛋白原结合前体可能是合适的，不过，优选约1,000-10,000个。

本发明还提供了药物组合物，其包含本发明的活性剂与药学上可接受的载体，赋形剂或稀释剂。

可以将所述的活性剂配制在生理pH下的等渗缓冲液中的混悬液。可以使用包含甘露糖醇、葡萄糖、人清蛋白或海藻糖(trahalose)的缓冲液。可以将活性剂冻干以便产生可以在使用前即刻重构的冻干剂型。

一般可以以无菌方式生产活性剂。优选对活性剂另外进行最终的灭菌处理。合适的处理的实例为在合适的温度，例如60℃下将液体混悬液加热10小时或在121℃下的高压灭菌器中蒸汽灭菌15分钟。或

者，首先将活性剂冻干且然后加热至例如 160°C 下至少 2 小时或 80°C 下 72 小时。或者，可以用 γ 射线照射，例如通过使用钴 ⁶⁰ 源暴露于 25-35kGy 替代热处理。

本发明还提供了用作药物的本发明活性剂。

本发明进一步提供了本发明活性剂在制备用于预防、治疗或改善血小板减少症或血小板功能不全的药物中的应用。

本发明进一步提供了用于预防、治疗或改善血小板减少症或血小板功能不全的方法，包括对有这类治疗需要的受试者给予本发明的活性剂。

血小板减少症通过对血细胞进行计数来诊断。正常的血小板计数为 $150-400 \times 10^9/l$ 。低于该范围，主要的止血受损并且出血时间延长。然而，自发威胁生命的出现通常仅在细胞计数降至 $10 \times 10^9/l$ 以下时出现。可以使用本发明的方法，其中受试者具有的血小板计数低于 $400 \times 10^9/l$ ，优选低于 $150 \times 10^9/l$ ，更优选低于 $10 \times 10^9/l$ 。

血小板减少症的最常见原因在于从骨髓中的血小板产生能力衰竭，诸如血癌中或细胞毒性化疗或放疗后的血小板产生能力衰竭。

血小板减少症可以由导致血小板破坏增加的疾患引起。它们包括免疫性血小板减少性紫癜、弥漫性血管内凝血、肝素诱发的血小板减少症、其它药物诱发的血小板减少症、系统性红斑狼疮、HIV-1 相关血小板减少症、血栓性血小板减少性紫癜/溶血性-尿毒症综合征、普通可变量免疫缺陷和输血后引起的紫癜。

血小板减少症可以由导致血小板产生减少的疾患引起。它们包括具有桡骨缺失的血小板减少症 (TAR) 综合征、血栓性血小板减少症、巨大血小板综合征 (诸如伯-索综合征、梅-海二氏异常、Fechtner 综合征、Sebastian 综合征、爱泼斯坦综合征蒙特里尔血小板综合征) 和维-奥综合征。

血小板减少症可以由导致隔绝 (例如脾功能亢进或 Nasabach-Merritt 综合征) 或血小板破坏增加和血液稀释 (诸如体外灌注) 的疾患引起。

血小板功能不全(获得性血小板功能缺陷)可以因如下情况导致:尿毒症;骨髓增殖性疾病(诸如原发性血小板增多症、真性红细胞增多症、慢性髓细胞样白血病和特发性骨髓化生);急性白血病和骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndromes);血内蛋白异常;体外灌注;获得性 vonwillebrand 病;获得性贮池缺如;抗血小板抗体;肝病。

血小板功能不全(遗传性血小板功能缺陷)可以因如下情况导致:血小板粘附疾患(诸如伯-索综合征);激动剂受体疾患(诸如整联蛋白 $\alpha 2\beta 1$ (胶原蛋白受体)缺乏、 $P2Y_{12}$ (ADP 摄入)缺乏或血栓烷 A_2 受体缺乏);信号传导途径疾患(诸如 $G\alpha_q$ 缺乏、磷脂酶 C- $\beta 2$ 缺乏、环加氧酶缺乏、血栓烷合成酶缺乏、脂氧合酶缺乏或钙动员缺陷);分泌疾患(诸如钙动员、海-普二氏综合征、切-东二氏综合征、灰色血小板综合征、Quebec 综合征和维-奥综合征);聚集疾患(诸如 Glanzmann 血小板机能不全或先天性无血纤蛋白原血症 (congenital afibrinogenemia))和血小板-促凝蛋白相互作用疾患(诸如 Scott 综合征)。

本发明的方法可以用于预防, 治疗或改善上述疾患中的任何一种。

本发明的方法还可以用于治疗其血小板存在持续性技协损害的患者, 诸如在冠状动脉旁路手术和/或血液透析中体外循环过程中出现的血小板存在持续性技协损害的患者。

预计所述活性剂的合适的总剂量在 0.1-5g 蛋白质或 0.1-5g 基于蛋白质的载体的蛋白质等效物的范围。

本发明还提供了用作本发明活性剂组成部分的血纤蛋白原结合前体, 其中血纤蛋白原结合前体可以被伤口部位特异性活性剂转化成血纤蛋白原结合成分, 血纤蛋白原结合成分与血纤蛋白原结合前体相比具有增加的结合血纤蛋白原的能力, 并且血纤蛋白原结合前体不为血纤蛋白原。优选血纤蛋白原结合前体为肽。在一个特别优选的实施方案中, 血纤蛋白原结合前体肽包含 SEQ ID NOs: 32-35 或 38-41 中任一种的氨基酸序列。

本发明还提供了鉴定用作本发明活性剂组成部分的血纤蛋白原结合前体的方法，包括：

i) 孵育伤口部位特异性活性剂与标记的结合不溶性载体的候选血纤蛋白原结合前体，其孵育条件为允许伤口部位特异性活性剂将已知的血纤蛋白原结合前体转化成血纤蛋白原结合成分；

ii) 测定与伤口部位特异性活性剂孵育之前和之后不溶性载体上标记的量；和

iii) 鉴定作为血纤蛋白原结合前体的候选血纤蛋白原结合前体，只要在与伤口部位特异性活性剂孵育后的不溶性载体上标记的量低于与伤口部位特异性活性剂孵育之前不溶性载体上标记的量。

这类方法的一个实例描述在下文的实施例 11 中。

所述的方法可以进一步包含：测定与伤口部位特异性活性剂孵育之前和之后血纤蛋白原与不溶性载体的结合；并且在步骤 (iii) 中，鉴定作为血纤蛋白原结合前体的候选血纤蛋白原结合前体，只要在与伤口部位特异性活性剂孵育后的不溶性载体上标记的量低于与伤口部位特异性活性剂孵育之前不溶性载体上标记的量；并且血纤蛋白原与不溶性载体的结合在与伤口部位特异性活性剂孵育之后增加。

本发明进一步提供了鉴定用作本发明活性剂组成部分的血纤蛋白原结合前体的方法，包括：

i) 使伤口部位特异性活性剂接触候选血纤蛋白原结合前体结合不溶性载体，其接触条件为允许伤口部位特异性活性剂将血纤蛋白原结合前体转化成血纤蛋白原结合成分；

ii) 测定候选血纤蛋白原结合前体在接触伤口部位特异性活性剂后是否促进血块形成，血小板聚集或不溶性载体聚集；和

iii) 鉴定作为血纤蛋白原结合前体的候选血纤蛋白原结合前体，只要血块形成得以促进。

下文实施例 7-10 中描述了用于测定在与伤口部位特异性活性剂凝血酶接触后候选血纤蛋白原结合前体释放促进血块形成，血小板聚集或不溶性载体聚集的方法。

应理解一般重要的是本发明的活性剂一旦给予(除外它阿伤口部位上被伤口部位特异性活性剂转化)就不会降解(或仅缓慢降解)。优选本发明活性剂一旦对不具有任何可导致活性剂转化的伤口部位的受试者给予,则在血液中的循环时间大于1小时。用于测定本发明活性剂在体内的稳定性的合适的方法描述在下文的实施例12中。本发明的活性剂在实施例12中所述试验条件下应稳定至少1小时。

WO 2005/035002的实施例1-4描述了生产肽连接的微球的方法,测定血纤蛋白原结合肽连接的微球的方法,改进的聚集试验,体外活性测定法和体内评价模型。应理解相应的方法可以用于鉴定,生产和测试本发明的活性剂。

现在仅通过实施例,参照附图描述本发明优选的实施方案,其中:

图1图示了本发明活性剂的第一种优选的实施方案;

图2图示了本发明活性剂的第二种优选的实施方案;

图3a图示了本发明活性剂的第三种优选的实施方案;图3b图示了本发明活性剂的第四种优选的实施方案;

图4表示如下文实施例3中所述的血纤蛋白原结合肽连接的微球的测定结果;

图5表示与不同浓度凝血酶与孵育后血纤蛋白原结合的微球的百分比。未进行肽修饰的0.7 mg/ml的微球(▲)和使用肽C修饰的0.7(●), 5(■)和10 mg/ml(▼)的微球;

图6表示分别在没有(1和2)或有0.032 U/ml凝血酶(3和4)存在下空白或具有血纤蛋白原的肽C修饰的微球的聚集分布型;

图7表示具有血浆的肽C修饰的微球的聚集分布型,所述的血浆未接触凝血酶(1)并且已经与凝血酶一起预孵育且加入到2分钟后加入凝血酶的血浆中(2);

图8表示空白或具有血浆的肽C修饰的微粒的聚集分布型。无凝血酶的肽C(1)和空白(2);2分钟时添加凝血酶的空白(3)和肽C(4)微球;且

图9表示使用血小板集合度测定,应用和不应用预先接触凝血酶

的微粒的通过腺苷二磷酸 (ADP) 活化的血小板减少的血液中的血小板聚集。

本发明活性剂的第一个优选的实施方案图示在图 1(a) 中。该活性剂包含结合人血清清蛋白 (HSA) 微球的血纤蛋白原结合前体肽。血纤蛋白原结合前体肽包含 (从其羧基末端到其氨基末端): 与 HSA 微球交联的羧基末端半胱氨酸残基; 第一间隔序列 (间隔区 1); 血纤蛋白原结合肽; 凝血酶切割序列 (图中方框标记的“凝血酶切割序列”表示为连接在凝血酶能够切割血纤蛋白原结合前体肽的位点, 即凝血酶切割位点的氨基末端的序列); 第二间隔序列 (间隔区 2); 和凝血酶结合肽。

位于血纤蛋白原结合肽氨基末端侧上的血纤蛋白原结合前体肽的部分 (即凝血酶切割序列-间隔区 2-凝血酶结合肽部分) 形成阻断成分。该阻断成分阻断或抑制血纤蛋白原与血纤蛋白原结合肽结合。在伤口部位上产生的凝血酶能够结合凝血酶结合肽并且在血纤蛋白原结合肽的氨基末端上切割血纤蛋白原结合前体肽 (如图 1(b) 中所示)。切割血纤蛋白原结合前体肽从血纤蛋白原结合肽中释放阻断成分, 由此暴露血纤蛋白原结合肽并且允许血纤蛋白原与血纤蛋白原结合肽结合 (图 1(c))。

第一间隔区与 HSA 微球间隔血纤蛋白原结合肽, 使得一旦暴露, 微球不干扰血纤蛋白原与血纤蛋白原结合肽结合。第二间隔区允许凝血酶最佳定向以便在结合凝血酶结合肽时切割凝血酶切割位点。

本发明活性剂的第二个优选的实施方案图示在图 2(a) 中。该活性剂包含与 HSA 微球交联的两种单独的肽: 血纤蛋白原结合前体肽和凝血酶结合肽。血纤蛋白原结合前体肽包含 (从其羧基末端到其氨基末端): 与 HSA 微球交联的羧基末端半胱氨酸残基; 第一间隔序列 (间隔区 1); 血纤蛋白原结合肽; 和凝血酶切割序列 (图中方框标记的“凝血酶切割序列”表示为与凝血酶能够切割血纤蛋白原结合前体肽的位点, 即凝血酶切割位点连接的氨基末端的序列)。位于血纤蛋白原结合肽氨基末端侧上的血纤蛋白原结合前体肽的部分 (即凝血酶切割序列) 形成阻断成分。该阻断成分阻断或抑制血纤蛋白原与血纤蛋白原结合

肽结合。

凝血酶结合肽在其羧基末端上与第二间隔序列(间隔区 2)连接。第二间隔区序列的羧基末端与交联 HSA 微球的半胱氨酸残基连接。

在伤口部位上产生的凝血酶与凝血酶结合肽结合并且在凝血酶切割位点上切割血纤蛋白原结合前体肽。切割血纤蛋白原结合前体肽从血纤蛋白原结合肽中释放阻断成分,由此暴露血纤蛋白原结合肽并且允许血纤蛋白原与血纤蛋白原结合肽结合(图 2(b))。

本发明活性剂的第三个优选的实施方案图示在图 3a 中。该活性剂包含与 HSA 微球交联的三种单独的肽:血纤蛋白原结合前体肽;凝血酶结合肽;和伤口部位靶向肽。血纤蛋白原结合前体肽和凝血酶结合肽如上述对第二个优选实施方案所述。伤口部位靶向肽在其羧基末端上与第三间隔序列(间隔区 3)连接。第三间隔序列的羧基末端与交联 HSA 微球的半胱氨酸残基连接。伤口部位靶向肽能够选择性结合伤口部位(例如结合细胞表面蛋白组织因子)。

伤口部位靶向肽促进活性剂在伤口部位的定位。在伤口部位上产生的凝血酶与凝血酶结合肽结合并且在凝血酶切割位点上切割血纤蛋白原结合前体肽。切割血纤蛋白原结合前体肽从血纤蛋白原结合肽中释放阻断成分,由此暴露血纤蛋白原结合肽并且允许血纤蛋白原与血纤蛋白原结合肽结合(图 3a)。

第三间隔序列与 HSA 微球间隔伤口部位靶向肽,使得微球不干扰伤口部位靶向肽与伤口部位结合。

本发明活性剂的第四个优选的实施方案图示在图 3b 中。该活性剂包含结合人血清清蛋白(HSA)微球的血纤蛋白原结合前体肽。血纤蛋白原结合前体肽包含(从其羧基末端到其氨基末端):与 HSA 微球交联的羧基末端半胱氨酸残基;第一间隔序列(间隔区 1);血纤蛋白原结合肽;和凝血酶切割序列(图中方框标记的“凝血酶切割序列”表示为连接在凝血酶能够切割血纤蛋白原结合前体肽的位点,即凝血酶切割位点的氨基末端的序列)。

位于血纤蛋白原结合肽的氨基末端侧上的血纤蛋白原结合前体肽

的部分(即凝血酶切割序列)形成阻断成分。该阻断成分阻断或抑制血纤蛋白原与血纤蛋白原结合肽结合。在伤口部位上产生的凝血酶能够在血纤蛋白原结合肽的氨基末端上切割血纤蛋白原结合前体肽(如图3b中所示)。切割血纤蛋白原结合前体肽从血纤蛋白原结合肽释放阻断成分,由此暴露血纤蛋白原结合肽并且允许血纤蛋白原与血纤蛋白原结合肽结合(如图3b的下部分中所示)。

上述和图1-3中所示本发明活性剂的四种优选实施方案的合适肽序列的实例为:

间隔区 1: $\text{NH}_2\text{-GGGGGG-COOH}$ (SEQ ID NO: 29);

血纤蛋白原结合肽: $\text{NH}_2\text{-GPRP-COOH}$ (SEQ ID NO: 17);

凝血酶切割序列: $\text{NH}_2\text{-LVPR-COOH}$ (SEQ ID NO: 31);

间隔区 2: 允许在结合凝血酶结合肽时凝血酶最佳定向以切割凝血酶切割位点的肽序列;

凝血酶结合肽: 来源于能够结合凝血酶的分子上凝血酶 exosite 1 结合位点的肽序列, 诸如 PAR-1 (即 WEDEEKNES (SEQ ID NO: 24));

伤口部位靶向肽: 因子 VII 或片段或其衍生物 (诸如重组因子 VIIa);

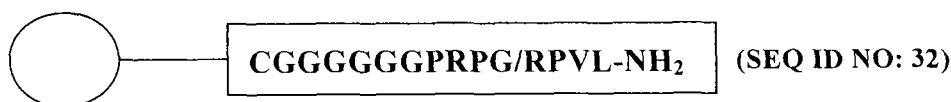
间隔区 3: $\text{NH}_2\text{-GGGGGG-COOH}$ (SEQ ID NO: 29)。

在上述优选的实施方案中, 肽包含与 HSA 微球交联的羧基末端半胱氨酸残基。可以理解可以使用连接微球的任何合适的共价键, 例如连接肽的马来酰亚胺基与微球的巯基反应得到的共价键。

上述优选实施方案 (和下文实施例中所描述的某些实施方案) 包含微球。可以理解可以使用其它微粒或合适的非微球载体。

实施例 1

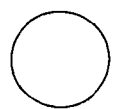
本发明活性剂的实施例:





其中:

“/” 表示凝血酶切割位点;



表示清蛋白微球; 且



表示肽序列的末端半胱氨酸与清蛋白微球之间的共价键。

在本实施例中, 已经用二硫代-双-(2-硝基苯甲酸) (DTNB) 修饰清蛋白微球的表面以便提供载体上的巯基反应基, 以用于与肽的羧基末端半胱氨酸残基的-SH 基反应(参见下文的实施例 2)。

实施例 2

血纤蛋白原结合前体肽(肽 A)和结合微球的血纤蛋白原结合肽(肽 B)的制备

如下各自合成 $H_2N-LVPRGPRPG^6C$ (肽 A)(SEQ ID NO: 36) 和 $H_2N-GPRPG^6C$ (肽 B)(SEQ ID NO: 37) 并且分别与由人清蛋白组成的微球交联:

将由人清蛋白组成的 25mg 微球以 10mg/ml 的终浓度悬浮于 0.02M Tris pH 7.5 中;

将以 4mg/ml 浓度溶于 pH 8.0 的 0.2M 磷酸钠缓冲液的 75 μ l 二硫代-双-(2-硝基苯甲酸)(DTNB)加入到微球中并且用 Dynal 混合器混合 2 小时;

在混合以改善洗涤后, 再将 2.5ml 0.02M Tris pH 7.5 加入到试管中并且通过倒置简单混合;

通过以 1800g 离心 15 分钟从上清液中分离微球;

将微球悬浮于 2.5ml pH 7.5 的 0.02M Tris 中;

将肽 A 或肽 B 以 10mg/ml 浓度溶于 pH 7.5 的 0.02M Tris。将 100 μ l 10mg/ml 肽加入到微球中并且在室温下用 Dynal 混合器混合 6 小时;

加入 2.5ml pH 7.5 的 0.02M Tris 并且通过倒置简单混合;

通过以 1800g 离心 15 分钟从上清液中分离微球;

再用 5.0ml pH 7.5 的 0.02M Tris 洗涤微球并且通过如所述的离心分离;

将微球重新悬浮于包含 5%人血清清蛋白的 2.5ml 0.02M Tris;

将微球填充成 200 μ l 等分部分并且储存在-70 $^{\circ}$ C 下。

实施例 3

在没有(i)和有(ii)凝血酶存在下血纤蛋白原与血纤蛋白原结合前体(肽 A)和血纤蛋白原结合肽(肽 B)连接的微球(M/S)结合的测定

如实施例 2 中所述制备肽 A 连接的微球和肽 B 连接的微球并且如下表中所示与缓冲液或凝血酶混合 30 分钟:

肽	A	A	B	B
M/S (10mg/ml)	50. μ l	50. μ l	50 μ l	50 μ l
凝血酶 (3.2 u/ml)	0	5 μ l	0	5 μ l
0.02M Tris	50 μ l	45 μ l	50 μ l	45 μ l
最终凝血酶浓度	0	0.16 U/ml	0	0.16U/ml

然后通过以 1800g 离心 10 分钟回收微球。将微球重新悬浮于 100 μ l Tris 而得到 5mg/ml 的终浓度。加入 10 μ l 100U/ml 水蛭素以便抑制残留的凝血酶。

将浓度为 0.1mg/ml 的 180 μ l 血纤蛋白原加入到 20 μ l 肽 A 或肽 B 连接的微球中并且混合 1 小时。

如下测定血纤蛋白原结合。将 5 μ l 微球加入到 pH 7.5 的 50 μ l HEPES 缓冲液中。加入 1 μ l FITC 标记的针对人血纤蛋白原的标记的抗体并且混合 20 分钟。通过添加 0.2% 甲酰盐水终止反应。使用 Beckman Coulter XL MCL 流式细胞仪测定结合的荧光。

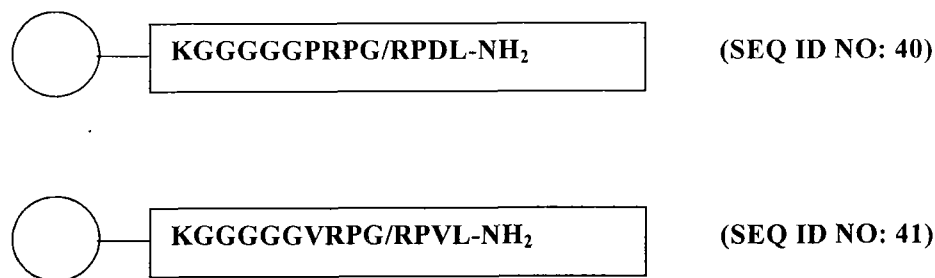
结果如图 4 中所示。当将肽 A 微球与血纤蛋白原混合时，预先未与凝血酶孵育的那些微球仅结合少量的血纤蛋白原 (6%)。当首先将肽 A 连接的微球与凝血酶孵育且然后与血纤蛋白原混合时，86% 结合血纤蛋白原。

为不具有阻断序列的血纤蛋白原结合肽的肽 B 在有和没有凝血酶下均结合血纤蛋白原。

实施例 4


本发明活性剂的其它实施例:





其中:

“/” 表示凝血酶切割位点;

 表示带有表面巯基基团的清蛋白微粒; 且

— 表示通过肽序列的末端马来酰亚胺与清蛋白微粒的巯基反应形成的共价硫醚键。

实施例 5

使用马来酰亚胺连接化学连接血纤蛋白原结合前体肽 (肽 C) 与微球

如下使用 C-末端 H₂N-LVPRGPRPG^SK-MAL (肽 C) (SEQ ID NO: 42) 上的马来酰亚胺 (MAL) 部分合成下列肽并且与由人清蛋白组成的微粒交联:

在与肽结合前, 如下通过改进的 Ellmans 测定法测定微粒的巯基含量: 将二硫代-双-(2-硝基苯甲酸) (DTNB) 以 4mg/ml 的浓度溶于含有 2 mM EDTA 的 pH 8 的 0.1 M 磷酸 Na 缓冲液。将制备的 20 mg/ml (0.2 ml) 微粒与含有 2 mM EDTA 的 pH 8 的 0.79 ml 0.1 M 磷酸 Na 缓冲液混合并且将 10 μL DTNB 储备溶液加入到反应体系中。使用不含微粒的 0.2 ml 缓冲液制备对照组空白。将反应体系在转盘上混合 20 分钟, 然后离心 (1800 g, 15 分钟) 并且通过注射器收集上清液且然后通过 0.22 μm 注射器式过滤器过滤。使用分光光度计在 412 nm 处分析滤液并且使用 13600 的摩尔消光系数测定巯基的量。巯基含量一般在 0.6

- 0.3 摩尔巯基/摩尔清蛋白。

为了使马来酰亚胺修饰的肽与微粒结合；通过在转盘上混合 10 分钟，随后声处理 10 分钟将 62.5 mg 人血清清蛋白微粒分散于包含 2 mM EDTA 的 pH 7 的 2.4 ml 0.1 M Tris/HCl 中。

将肽 C 以 10 mg/ml 溶于 pH 6.5 的 10 mM 磷酸 Na 缓冲液。将肽储备溶液 (100 μ l) 加入到微粒中并且在室温下用 Dynal 混合器混合 1 小时。用等体积的 pH 7.5 的 0.02M Tris 稀释该反应体系并且通过倒置简单混合。通过以 1800g 离心 15 分钟从上清液中分离微粒。再用 pH 7.5 的 5.0 ml 0.02M Tris/HCl 洗涤微粒并且通过如所述的离心分离；将微粒重新悬浮于包含 2 %甘露糖醇的 pH 7.5 的 2.5ml 0.02M Tris 中。将微粒填充成 200 μ l 等分部分并且储存在 70 $^{\circ}$ C 下。

实施例 6

在与或不与凝血酶孵育后血纤蛋白原与微粒结合的测定

如实施例 5 所述用肽 C 修饰微粒。将微粒与接触凝血酶后的血纤蛋白原溶液混合以便证实血纤蛋白原结合序列接触凝血酶。

在 37 $^{\circ}$ C 下将 0.7, 5 或 10 mg/ml 的微粒与 0-0.64 U/mL 凝血酶一起孵育, 2 分钟后, 通过添加终浓度为 10 U/mL 的水蛭素 (Sigma) 抑制凝血酶。以 9300 g 将微粒离心 5 分钟并且重新悬浮于 HBS 而得到 14 mg/mL。用 0.1mg/mL 人血纤蛋白原 (Scottish National Blood Transfusion Service: SNBTS) 将微粒稀释 10-倍并且在室温下孵育 1 小时。通过流式细胞计量术与多克隆抗体兔-抗-人血纤蛋白原-FITC (Dako Cytomation) 测定结合的血纤蛋白原的量。这些在图 5 中所示的结果表明使用肽 C 修饰, 但不使用凝血酶的微粒不结合血纤蛋白原, 但随凝血酶浓度的增加, 在所有三种微粒测试浓度下, 血纤蛋白原结合微粒的量均增加。未使用肽 C 修饰的微粒在接触或不接触凝血酶时均不会结合血纤蛋白原。

实施例 7

作为对凝血酶反应的血纤蛋白原的血块形成

如下通过使用 Platelet Aggregation Profiler® PAP-4 (BioData Corporation, PA), 根据浊度的降低测定血块形成;

如实施例 5 中所述制备肽 C 连接的微粒, 储备溶液的浓度为在 HEPES 缓冲盐水 (HBS) 中 2.5 mg/ml。使用在 HBS 中 3 mg/ml 的血纤蛋白原 (SNBTS) 溶液设定基线光密度。将血纤蛋白原溶液 (205 μ l) 预温热至 37°C 下 1 分钟, 此后添加微粒 (25 μ l), 同时将搅拌速率设定在 900 rpm。在 2 分钟后, 加入 20 μ L 人凝血酶 (Sigma) 储备溶液而得到 0.032U/ml 终浓度。典型的聚集分布型如图 6 中所示。在没有凝血酶存在下, 空白和用肽 C 修饰的微粒均不会形成凝块。在 2 分钟时添加凝血酶后, 溶液的浊度就包含肽 C 修饰的微粒的溶液而言下降得比对照组未修饰的微粒更为快速, 表明血块形成。

实施例 8

肽 C 修饰的微粒与凝血酶预孵育后作为对凝血酶反应的血浆中的血块形成

如在含有肽 C 修饰的微粒的血浆中监测血块形成, 所示的微粒已经预先在缓冲液中接触了凝血酶。如上所述使用 Platelet Aggregation Profiler® PAP-4 (BioData Corporation, PA) 通过比浊方法测定微粒血块形成。

如实施例 5 中所述制备肽 C 修饰的微粒, 储备溶液的浓度为在 HBS 中 2.5 mg/ml。将肽 C 修饰的微粒预先与 0.6 U/ml 凝血酶一起孵育 1 小时且然后加入水蛭素 (10 U/ml) 以便抑制凝血酶活性。将反应体系以 9300 g 离心 5 分钟, 然后以 2.5 mg/ml 重新悬浮于 HBS 中。使用由柠檬酸盐血制备的血浆设定基线光密度。将血浆样品 (205 μ l) 预温热至 37°C 下 1 分钟, 此后添加微粒 (25 μ l), 同时将搅拌速率设定在 900 rpm。在 2 分钟后, 加入 20 μ L 凝血酶储备溶液至反应体系中而得到 0.25U/ml 的凝血酶终浓度。典型的聚集分布型如图 7 中所示。该图表示当肽 C 微粒在与血浆孵育之前和过程中暴露于凝血酶时发生血块形

成。不暴露于凝血酶的肽 C 修饰的微粒在 20 分钟期限内不会导致血块形成。

实施例 9

作为对凝血酶反应的血浆中的血块形成

如上所述使用 Platelet Aggregation Profiler® PAP-4 (BioData Corporation, PA) 通过比浊方法测定血浆中微粒血块形成。

如实施例 5 中所述制备肽 C 修饰的微粒, 储备溶液的浓度为在 HBS 中 2.5 mg/ml。使用由柠檬酸盐血制备的血浆设定基线光密度。将血浆样品 (205 μ l) 预温热至 37°C 下 1 分钟, 此后添加微粒 (25 μ l), 同时将搅棒速率设定在 900 rpm。在 2 分钟后, 加入 20 μ L 人凝血酶 (Sigma) 储备溶液而得到 0.25U/ml 终浓度。典型的聚集分布型如图 8 中所示。这些结果表明在不添加凝血酶的血浆中, 未修饰的和肽 C 修饰的微粒不会形成凝块。在 2 分钟时间点时添加凝血酶, 使用肽 C 修饰的微粒表现出比未修饰的对照组空白微粒在血浆中血块加速形成。

实施例 10

在有肽 C 修饰的微粒存在下的血小板聚集

使用多血小板阻抗凝集计 (Multiplate® Dynabyte medical, Munich) 测定在有肽 C 修饰的微粒存在下的血小板聚集。

如实施例 5 中所述制备肽 C 修饰的微粒, 储备溶液的浓度为在 HBS 中 2.5 mg/ml。将微粒 (0.75 mg) 与 1 U/ml 人凝血酶 (Sigma) 在 HBS (总体积 0.3 ml) 中预孵育 1 小时。为了抑制凝血酶活性, 加入终浓度为 5 U/ml 的水蛭素 (Sigma)。将该反应体系以 9300 g 离心 5 分钟并且弃去上清液。将微粒重新悬浮于 HBS 中至终浓度为 2.5 mg/ml。

如下由柠檬酸盐血制备血小板减少的血液:

通过以 163g 将全血离心 20 分钟并且弃去富含血小板的上层除去血小板。用在以 1800g 将全血离心 30 分钟后作为上清液分离的血浆替代富含血小板的上层。

为了对每一电极孔监测电阻抗，将 0.3 ml 血液与微粒 (0.15 mg) 和盐水在 37°C 下孵育至得到最终体积为 0.6 ml。在添加 30 μ l 活化剂腺苷二磷酸溶液 (0.1 mM) 后即刻记录聚集。将聚集剂量 6 分钟；将图 9 中的结果表示为最终聚集的任何单位。这些结果表明在有肽 C 修饰的微粒存在下活化的 TCB 中的电阻抗大于在无微粒或空白颗粒的 TCB 中的电阻抗 (即大于最终聚集)。

实施例 11

测定候选血纤蛋白原结合前体肽水解

使用放射性标记，分色或荧光分子在肽的 N-末端上合成候选肽。使用实施例 2 或 5 中所述的方法使肽与不溶性载体连接。将肽修饰的载体与纯的蛋白酶在缓冲液中孵育。修饰的载体上保留的标记的量能够测定肽的水解速率。

例如 5,6-羧基荧光素标记肽 5,6-FAM-LVPRGPRPGGGG-Cys (SEQ ID NO: 43)。使用实施例 2 中所述的方法，应用 DNTB 使标记的肽与清蛋白微粒结合以便有利于肽连接。使用流式细胞仪，根据保留在微粒上的结合的荧光的量测定肽水解速率。

将结合了标记的肽的微粒与不同浓度的人凝血酶 (Sigma) 在 pH 7.4 下混合并且在 37°C 下孵育不同期限。然后通过添加凝血酶单位 5 倍过量的水蛭素终止反应并且适当稀释反应体系以便通过流式细胞计量术分析。该操作步骤能够鉴定在与清蛋白微粒结合时可以被凝血酶水解的肽。可以理解等同的操作步骤可以用于鉴定在结合微粒时可以被其它蛋白酶水解的肽。

实施例 12

血纤蛋白原结合前体肽稳定性的测定

使用 N-末端标记合成候选血纤蛋白原结合前体肽并且如实施例 11 中所述结合不溶性载体。在生物样品，诸如全血，血浆或组织匀化物中孵育标记的肽连接的微粒。肽的稳定性反映出微粒上完整荧光肽

的量。为了鉴定涉及的蛋白酶，孵育物中包括特异性蛋白酶抑制剂。

例如，将柠檬酸盐血与凝血酶抑制剂水蛭素 (5 U/ml) 混合并且用 20 mmol/mL 重新使血液钙化。然后将使用标记的肽修饰的微粒以 2.5 mg/ml 的终浓度加入到血液中。混合该反应体系，同时维持在 37°C，在不同时间点取反应样品，适当稀释并且上流式细胞仪，以便测定完整结合的肽的量。

实施例 13

体内剂量相关止血活性的评价

1. 血小板减少的兔模型中剂量相关的止血活性

2.5-4.0kg 雄性新西兰白兔获自有声望的供应商。在本研究前，分别使用两次剂量的细胞毒类药物白消安给予达 6 只兔的组 12 和 9 天至血小板减少。根据血小板减少症的严重性改变所需的白消安剂量，例如，20mg/kg 的两次剂量一般将血小板计数降至 $10-20 \times 10^9/l$ ，而两次剂量的 25mg/kg 将血小板计数降至低于 $10 \times 10^9/l$ 。除血小板计数下降外，白消安给药还与白细胞消耗有关，但在血细胞比容方面仅有最低的减少并且无明显毒性。在本操作步骤无中需麻醉。

将人血小板浓缩物用作这些研究的阳性对照。仅要求每组动物使用一种血小板浓缩物。已经证实人血小板浓缩物在兔体内仅循环约分钟，这是因网状内皮系统吸收所致。因此，在这些实验中，巨噬细胞功能因在本研究的当天前 24 小时给予兔棕榈酸乙酯而受到抑制。为了一致性，可以将使用棕榈酸乙酯处理用于所有组的动物。

在本研究的当天，将测试活性剂通过静脉内输注入耳静脉。通过测定出血时间评价功效，所述出血时间的测定使用在耳中标准切口进行。

通过确保动物安静和均匀的温度尽可能控制出血时间的变异性 (Roskam, 1993, Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie, 114, 166-169)，并且将血样的数量减至最少。Blajchman & Lee, 1997, Transfusion Medical Reviews, 11, 99-105。在给予测试剂量前和给药后达 24 小时的时间点即刻测定出血时间。通过给伤

口施压终止超过 20 分钟的出血时间。在本研究完成时处死动物。

根据与人血小板活性相比的出血时间减少确定基于剂量/kg 的本发明活性剂的剂量相关活性。将相同大小，但不含偶联的肽的 HAS 微粒用作阴性对照。可以对本研究 24 小时期限内的作用期限进行比较。

在血小板减少的兔中，约 20 分钟的出血时间是典型的。本发明的活性剂一般应能够在 6 只兔组中的最少 3 只，且优选所有 6 只试验兔中将出血时间减少至 10 分钟以下。

2. 兔 Wessler 模型中血栓形成性的评价

基本上如 Wessler 等在 1959, *Journal of Applied Physiology*, 14, 943-946 中所述在 Wessler 模型中评价本发明活性剂潜在的血栓形成性。

2.5-4.0kg 雄性新西兰白兔获自批准的供应商并且麻醉达 6 只兔的组。暴露左和右侧颈静脉段并且与周围组织中分离。通过耳静脉给予测试制品并且在 3 分钟循环期后，扎紧颈静脉段并且在原位再保持 10 分钟。谨慎切开所述的段并且暴露内腔。检验血管中存在的发生的血栓，通过目测评分。

本发明的活性剂在高于与出血时间最佳减少相关的剂量 5 倍，优选 10 倍的剂量下不应产生血栓。

本发明活性剂的合适的剂量可以为 $1 \times 10^8 - 2 \times 10^{10}$ 产品颗粒/kg 患者体重。例如剂量(在表示为产品颗粒数/kg 体重时)可以约为 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} 或 2×10^{10} 。

还可以将合适的剂量表示为毫克总蛋白/kg 患者体重。基于此，合适的剂量可以为 5-200 mg/kg。例如该剂量可以约为 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 150 或 200 mg/kg。

理想的剂量具有至少 2 倍，优选约 10 倍的安全限度。换句话说，理想剂量是有效的，但甚至当增加 2 倍或约 10 倍时仍然保持安全。使用如上所述的 Wessler 试验，安全剂量不会形成凝块。

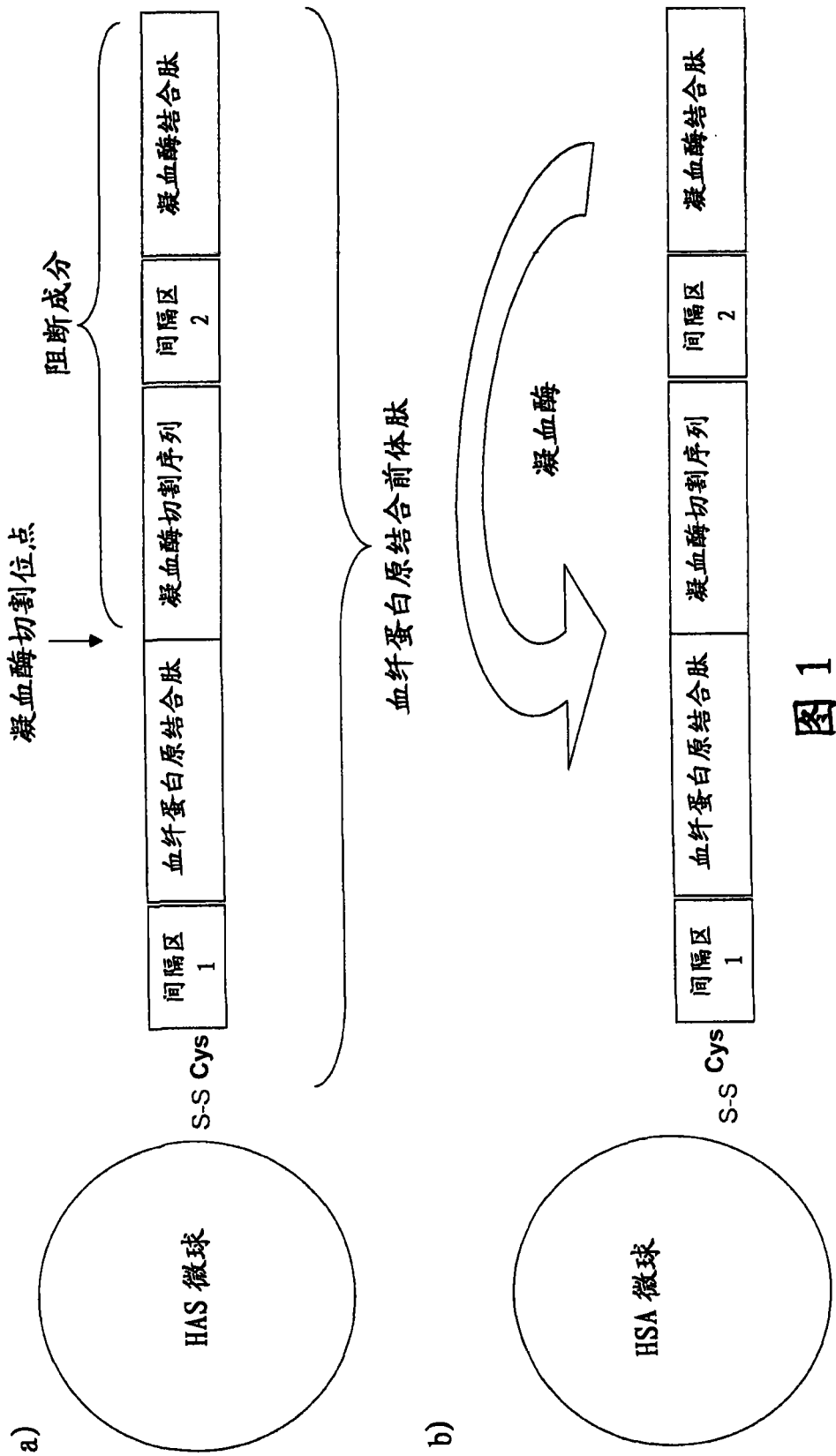


图 1

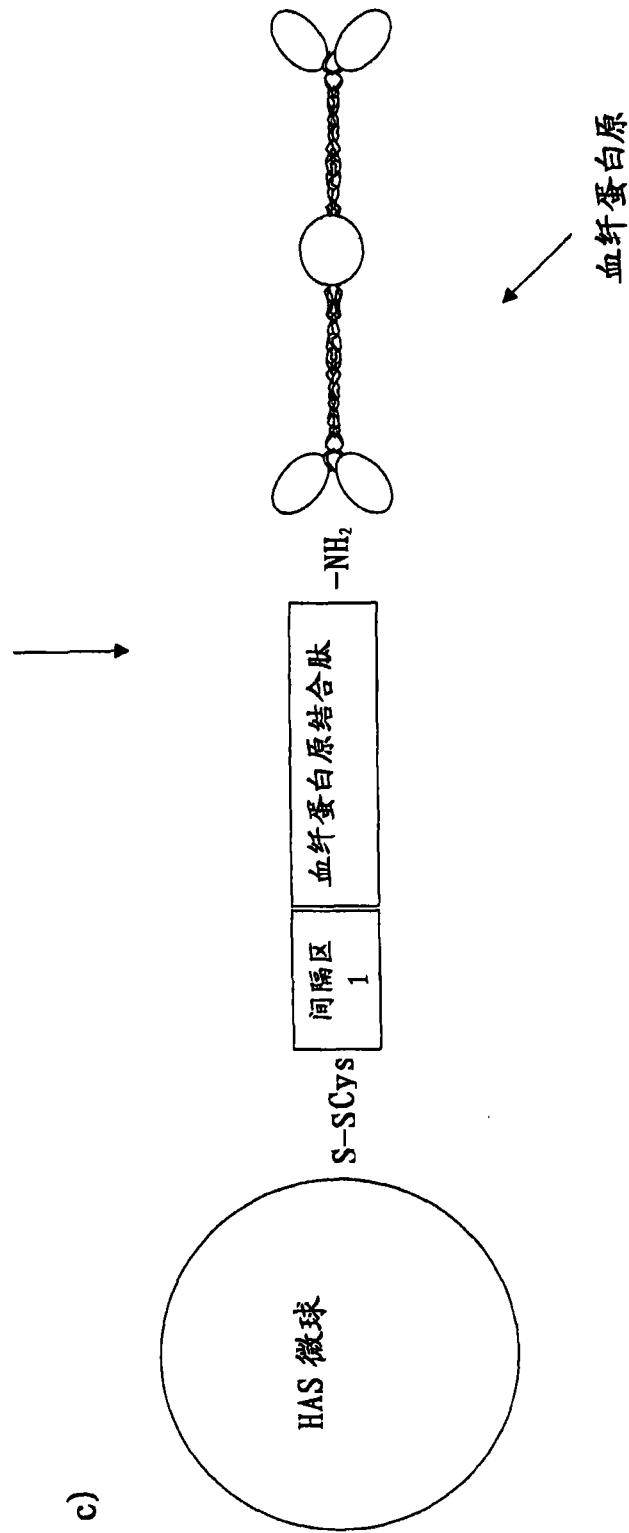


图 1 (续)

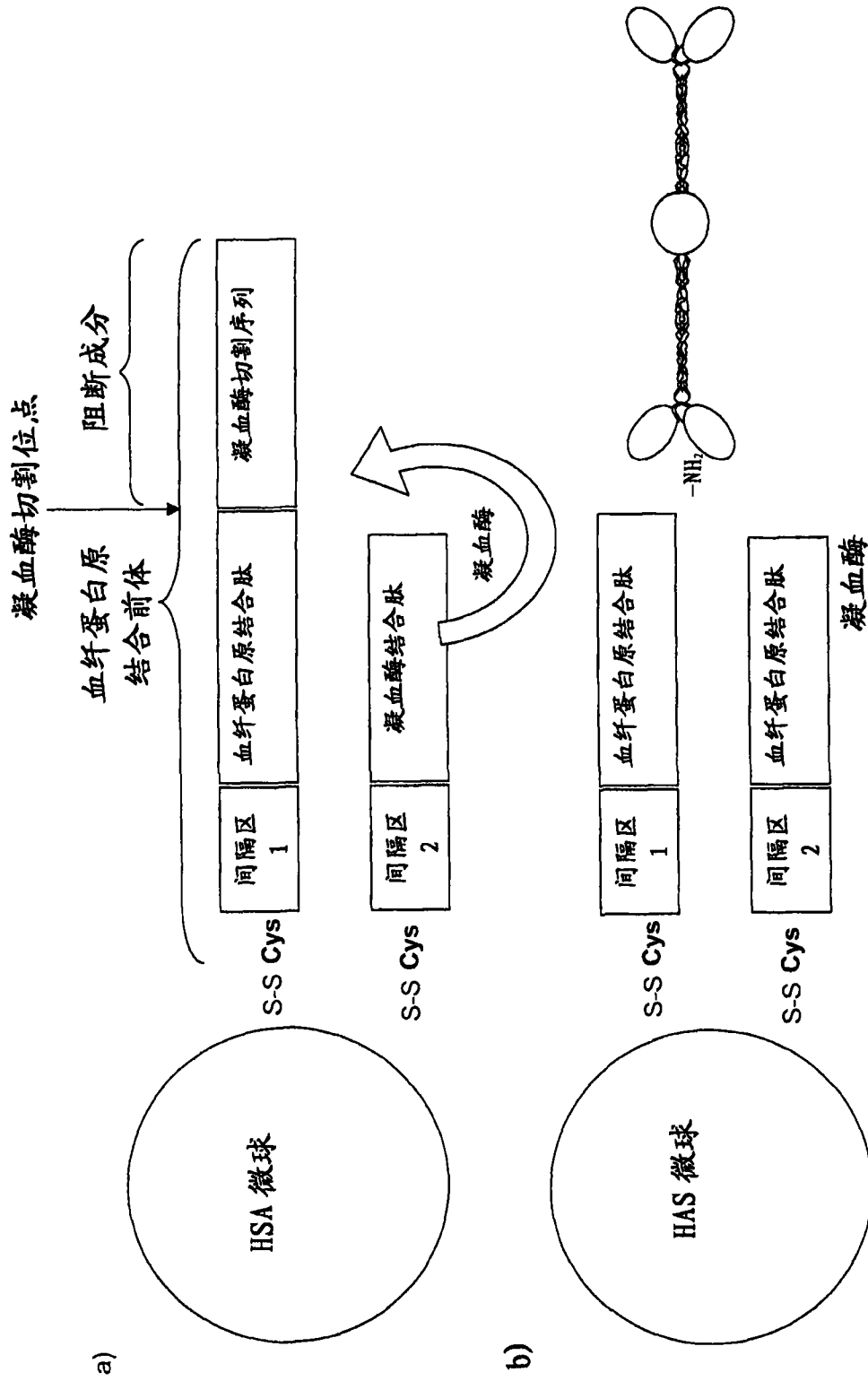


图 2

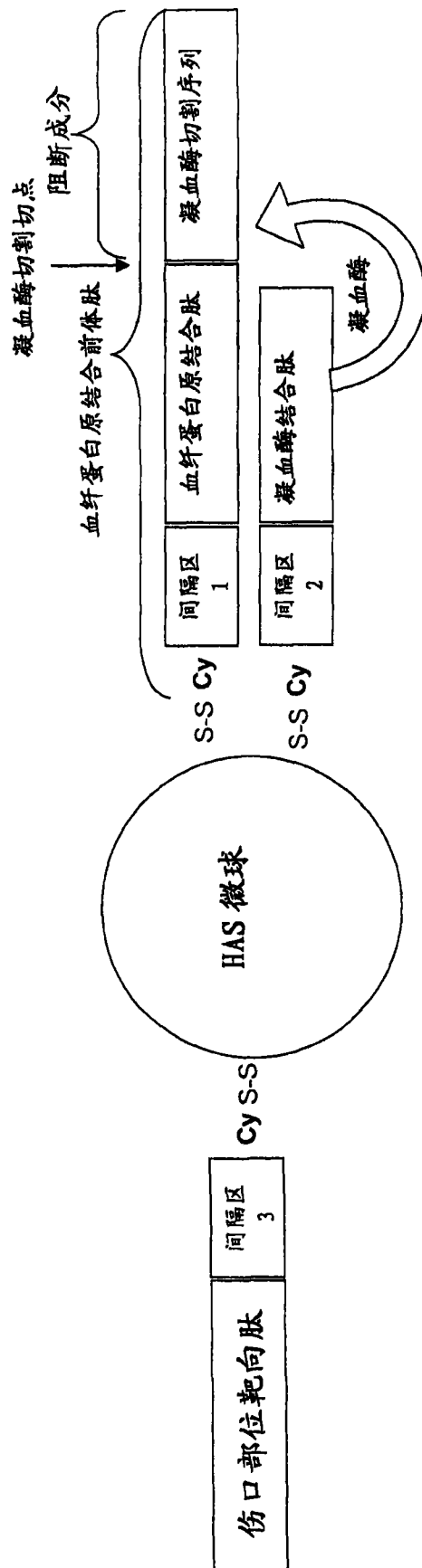


图 3a

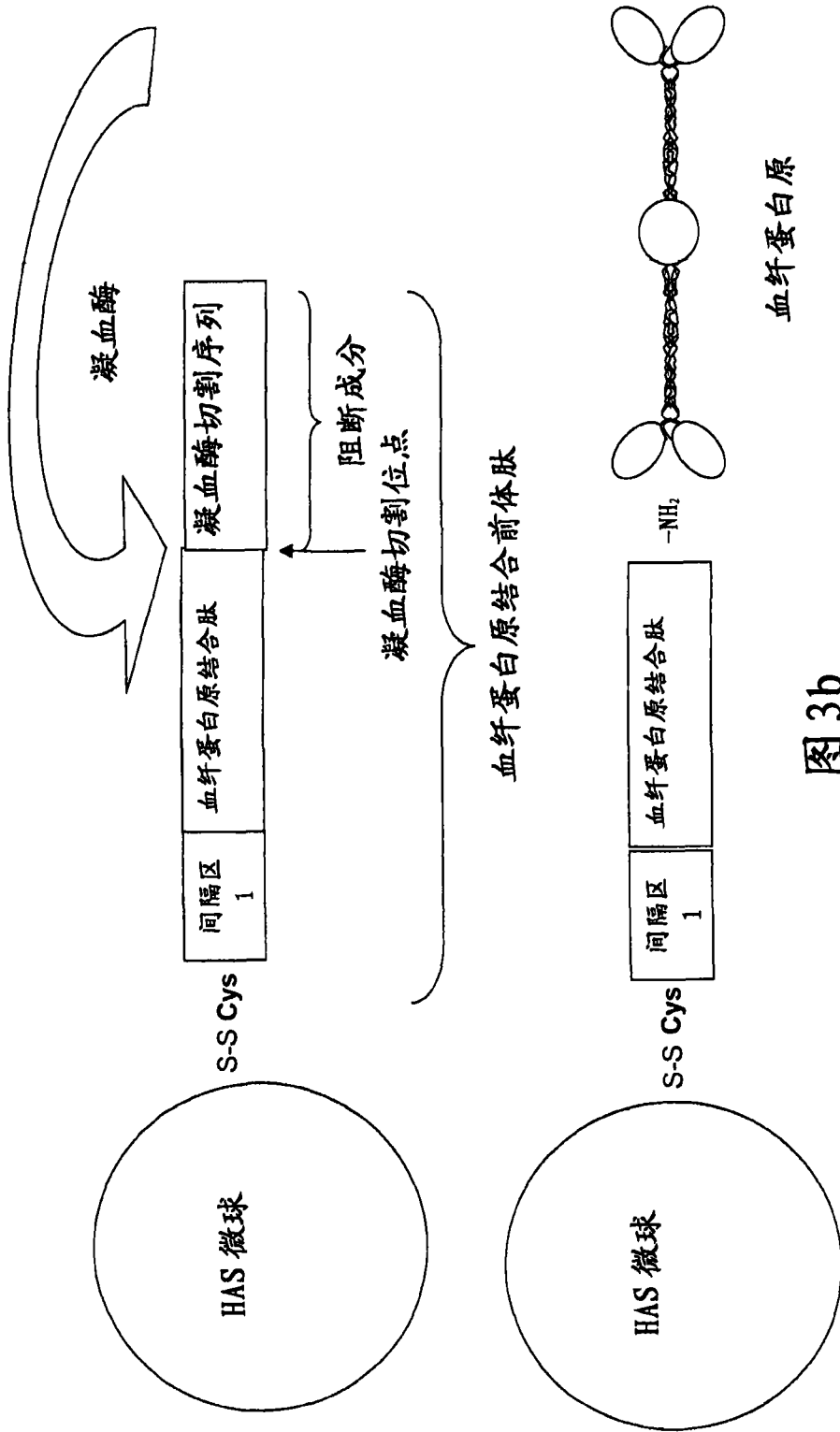


图 3b

在先与凝血酶一起孵育对固定化肽A
摄取血纤蛋白原的作用

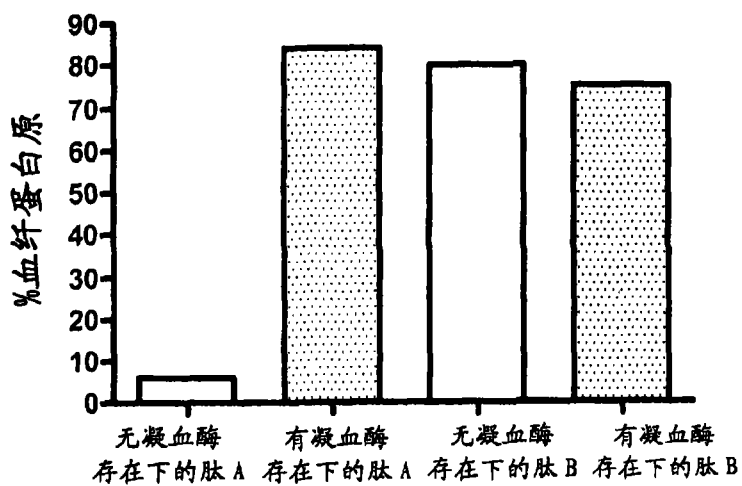


图 4

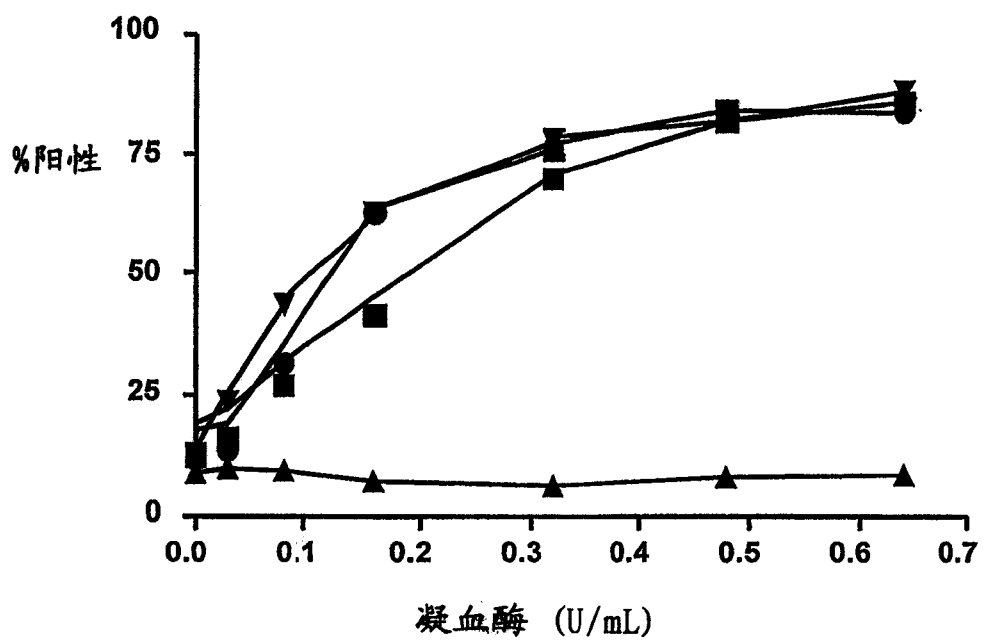


图 5

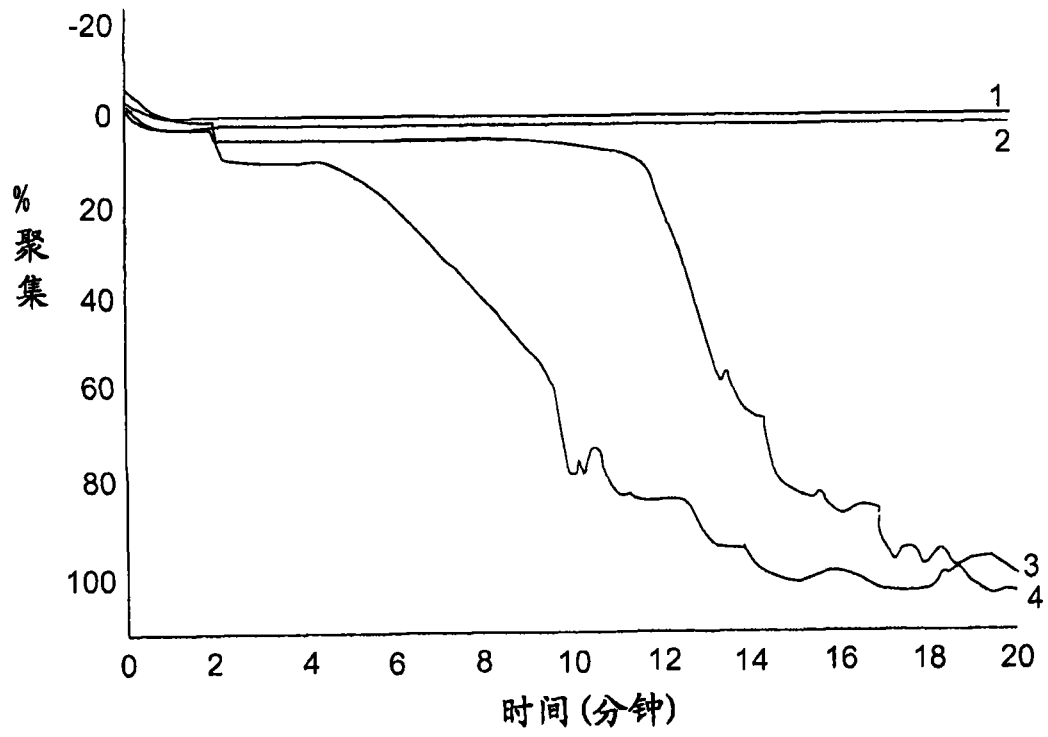


图6

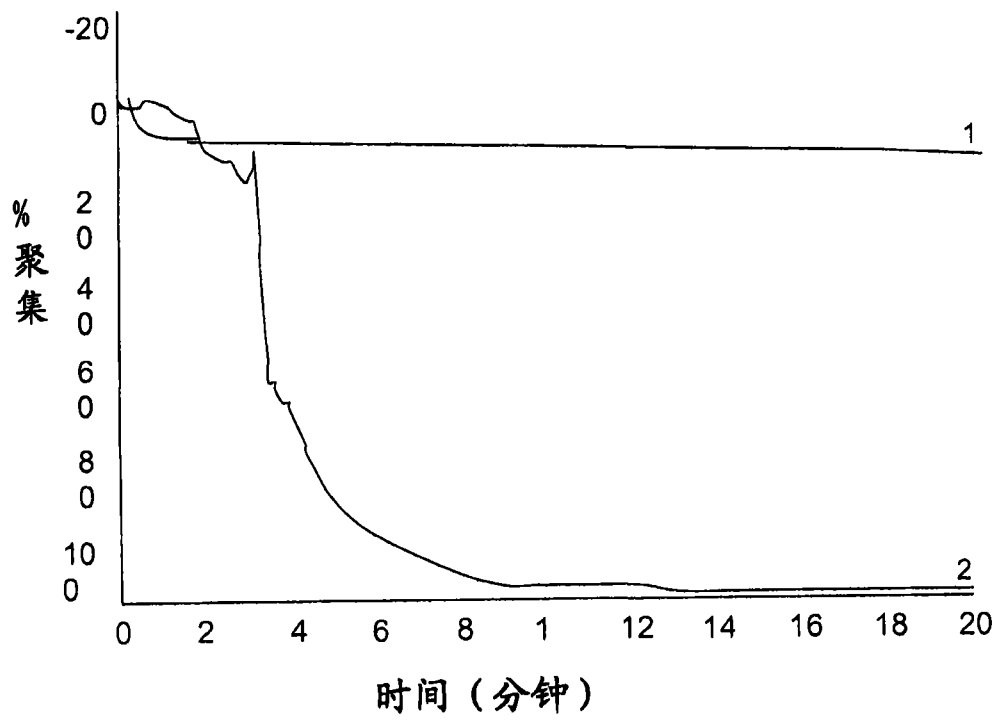


图 7

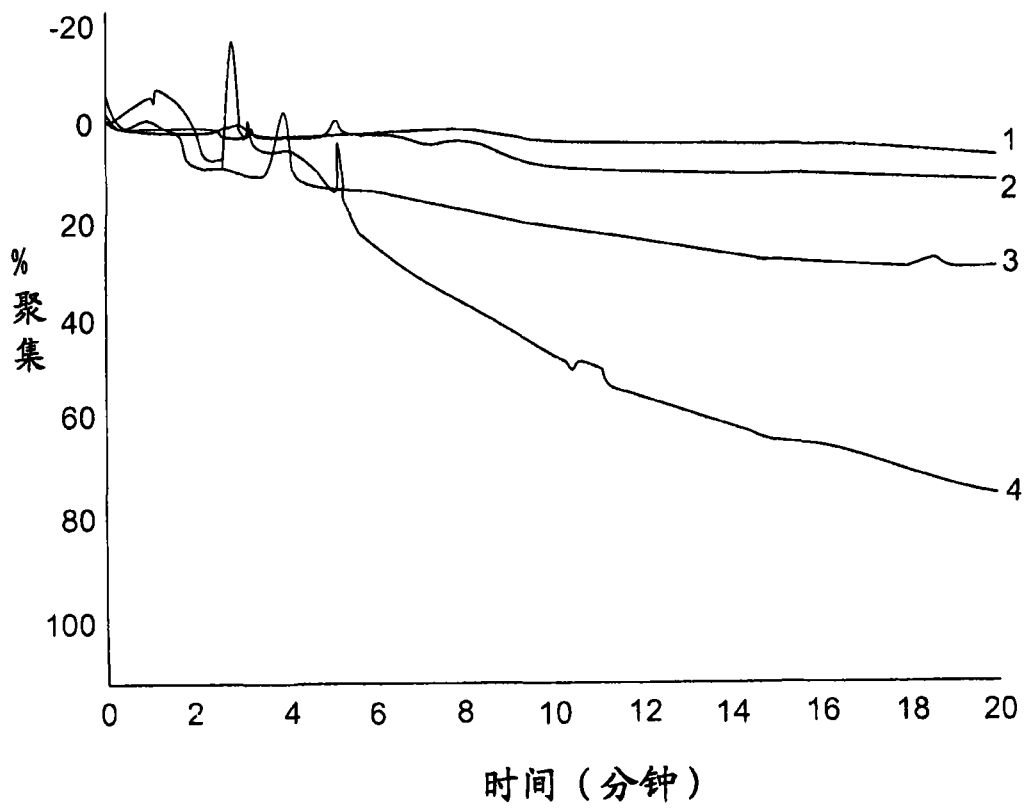


图 8

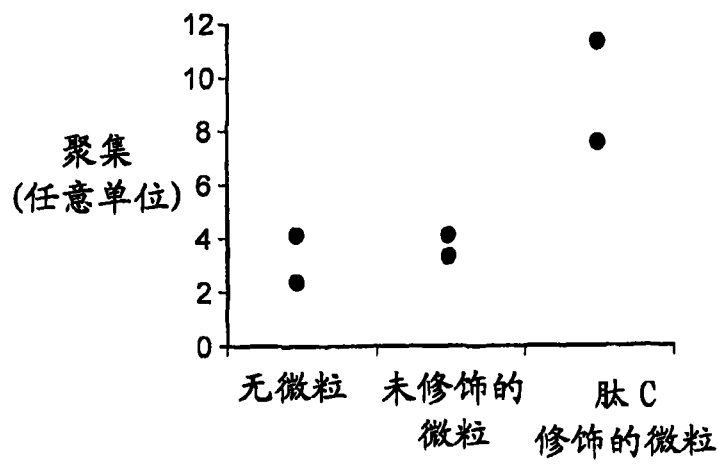


图9