



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102559644 B

(45) 授权公告日 2015. 03. 25

(21) 申请号 201110447251. 0

A61K 38/48(2006. 01)

(22) 申请日 2008. 09. 26

A61K 47/48(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 39/395(2006. 01)

60/976, 343 2007. 09. 28 US

A61P 7/04(2006. 01)

61/090, 574 2008. 08. 20 US

(56) 对比文件

(62) 分案原申请数据

CN 1390258 13, 2003. 01. 08,

200880107973. 8 2008. 09. 26

CN 1480466 A, 2004. 03. 10,

Maignan, S. 等. Chain A, Crystal

(73) 专利权人 普托拉制药有限公司

Structure Of Human Coagulation Factor Xa

地址 美国加利福尼亚州

Complexed With Rpr128515. 《NCBI 数据库, 登录

(72) 发明人 卢根民 戴维·R·菲利普斯

号 :PDB: 1EZQ_A》. 2000,

帕特里克·安德烈 乌马·辛哈

审查员 王瑶

(74) 专利代理机构 广州三环专利代理有限公司

44202

代理人 温旭 郝传鑫

(51) Int. Cl.

C12N 9/50(2006. 01)

C12N 15/57(2006. 01)

C12N 1/15(2006. 01)

C12N 1/19(2006. 01)

C12N 1/21(2006. 01)

C12N 5/10(2006. 01)

C07K 16/40(2006. 01)

权利要求书1页 说明书54页

序列表8页 附图12页

(54) 发明名称

用于因子 XA 抑制剂的解毒剂和其使用方法

(57) 摘要

本发明涉及靶向因子 Xa 的抗凝血剂的解毒剂。所述解毒剂是因子 Xa 蛋白质衍生物, 所述因子 Xa 蛋白质衍生物结合至因子 Xa 抑制剂, 由此实质上中和所述因子 Xa 抑制剂而不会组装成凝血酶原酶复合物。本文所述衍生物缺少固有凝血活性或具有降低的固有凝血活性。本文揭示了停止或阻止目前正利用因子 Xa 抑制剂进行抗凝血疗法的患者出血的方法。

1. 一种分离的多肽,所述分离的多肽的氨基酸序列为 SEQ ID NO. 15。
2. 权利要求 1 所述的多肽在制造用于阻止或减少利用因子 Xa 抑制剂进行抗凝血疗法的个体出血的药物中的应用,其中所述因子 Xa 抑制剂选自贝特沙班、利伐沙班、阿哌沙班、依诺肝素和其组合。
3. 一种医药组合物,所述医药组合物包含载体和权利要求 1 所述的多肽。
4. 一种肽偶联物,所述肽偶联物包含以共价方式或非共价方式连接至权利要求 1 所述的多肽的载体。
5. 根据权利要求 4 所述的肽偶联物,其中所述载体是医药上可接受的聚合物或医药上可接受的载体。
6. 根据权利要求 5 所述的肽偶联物,其中所述医药上可接受的聚合物或医药上可接受的载体是脂质体或胶束。
7. 一种多核苷酸,所述多核苷酸编码权利要求 1 所述的多肽。
8. 一种制备权利要求 1 所述的多肽的体外方法,所述方法包括在原核或真核宿主细胞中表达编码所述多肽的多核苷酸。
9. 根据权利要求 8 所述的方法,其中所述宿主细胞是中国仓鼠卵巢细胞。
10. 根据权利要求 8 或 9 所述的方法,所述方法进一步包含分离所述多肽。
11. 一种分离的原核或真核宿主细胞,所述细胞包含编码权利要求 1 所述的多肽的多核苷酸。
12. 一种组合物,所述组合物包含载体和根据权利要求 11 所述的原核或真核宿主细胞。
13. 一种根据权利要求 3 所述的组合物在制造用于阻止或降低利用因子 Xa 抑制剂进行抗凝血疗法的个体出血的药物中的应用,其中所述因子 Xa 抑制剂选自贝特沙班、利伐沙班、阿哌沙班、依诺肝素和其组合。
14. 一种根据权利要求 3 所述的组合物在制造用于选择性结合并抑制利用因子 Xa 抑制剂进行抗凝血疗法的个体中以外源方式投与的因子 Xa 抑制剂的药物中的应用,其中所述因子 Xa 抑制剂选自贝特沙班、利伐沙班、阿哌沙班、依诺肝素和其组合。

用于因子 Xa 抑制剂的解毒剂和其使用方法

[0001] 本申请为 2010 年 3 月 19 日进入中国国家阶段、申请号为 200880107973.8、申请日为 2008 年 9 月 26 日、发明名称为“用于因子 Xa 抑制剂的解毒剂和其使用方法”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请案交叉参考

[0003] 本申请案根据 35U. S. C. § 119(e) 主张 2007 年 9 月 28 日提出申请的美国临时申请案第 60/976,343 号和 2008 年 8 月 20 日提出申请的美国临时申请案第 61/090,574 号的权利,这两个临时申请案均以整体引用的方式并入本文中。

技术领域

[0004] 本发明涉及因子 Xa (fXa) 衍生物用途,所述因子 Xa (fXa) 衍生物具有降低的固有促凝血活性或没有固有促凝血活性,但能够结合和 / 或中和 fXa 抑制剂,由此作为靶向 fXa 的抗凝血剂的解毒剂。

背景技术

[0005] 市场上在治疗或预防在不活动时或正接受医疗手术时易于形成血凝块的患者(例如,那些患有凝血病症的患者)的不期望血栓形成时需要抗凝血剂。然而,抗凝血疗法的一个重要限制是与治疗有关的出血风险,且在服用过量或如果需要紧急手术的情况下限制了迅速逆转抗凝血活性的能力。因此,业内极为期望针对所有形式的抗凝血疗法的特定且有效解毒剂。出于安全考虑,同样有利的是在研发新的抗凝血剂药物中获得抗凝血剂-解毒剂对。

[0006] 目前对于过度抗凝血可用的抗凝血剂-解毒剂对是肝素-鱼精蛋白和華法林(warfarin)-维生素 K。新鲜的冷冻血浆和重组因子 VIIa (rfVIIa) 也已用作在低分子量肝素治疗中正经受严重创伤或严重失血的患者的非特异性解毒剂。(劳里岑(Lauritzen, B.) 等人,血液(Blood),2005,607A-608A。)还报导了鱼精蛋白片段(美国专利第 6,624,141 号)和小的合成肽(美国专利第 6,200,955 号)作为肝素或低分子量肝素解毒剂;和凝血酶突变蛋白质(美国专利第 6,060,300 号)作为凝血酶抑制剂的解毒剂。已报导将凝血酶原中间产物和衍生物作为水蛭素和合成凝血酶抑制剂的解毒剂(美国专利第 5,817,309 号和第 6,086,871 号)。

[0007] 抗凝血疗法的一种有希望的形式靶向因子 Xa (fXa),且实际上,目前在临床研发的不同阶段中有多种直接 fXa 抑制剂用于抗凝血疗法中。这些中的大多数是小分子。尽管这些新的 fXa 抑制剂展示有希望用于治疗,但仍需要特定且有效的解毒剂。在过度抗凝血或利用这些 fXa 抑制剂治疗的患者需要手术的情况下,可能需要一种试剂来实质上中和所投与的一种或多种 fXa 抑制剂并恢复正常止血。

[0008] 目前可用试剂(例如重组因子 VIIa (rfVIIa))是以机械方式进行限制且并非特定用于 fXa 抑制剂的逆转且因此临床医生极为期望经改良的方案。在人类研究中,已经使用 rfVIIa 来逆转间接抗凝血酶 III 依赖性 fXa 抑制剂(例如磺达肝素(fondaparinux)和伊达

肝素 (idraparinux) 的作用 (比斯特沃特 (Bijsterveld, NR) 等人, 循环 (Circulation), 2002, 106 :2550-2554 ;比斯特沃特 (Bijsterveld, NR) 等人, 英国血液病学杂志 (British J. of Haematology), 2004(124) :653-658)。因子 VIIa (fVIIa) 的作用机制是与组织因子一起作用将血液循环中存在的因子 X (fX) 转化成 fXa 来恢复患者的正常止血。必须说明的是, 这种作用模式可能达到以中和活性位点定向 fXa 抑制剂的 fXa 的最高可能浓度受 fX 的循环血浆浓度限制。因此, 使用 rfVIIa 来逆转直接 fXa 抑制剂的作用的潜力机械上受限。由于 fX 的循环血浆浓度为 150 毫微摩尔 (“nM”), 所以通过这种模式所产生的 fXa 的最大量将为 150nM。因此, 使用 rfVIIa 来逆转直接 fXa 抑制剂的作用的潜力机械上受限。小分子 fXa 抑制剂 (例如利伐沙班 (rivaroxaban)) 的报告治疗浓度 (大约 600nM, 库比察 (Kubitza D) 等人, 欧洲临床药理学杂志 (Eur. J. Clin. Pharmacol), 2005, 61 :873-880) 高于由 rfVIIa 所生成的 fXa 的可能量。因此, 使用 rfVIIa 来逆转由 fXa 抑制剂所产生的治疗或超治疗水平的抗凝作用将提供不充分的效能水平。如图 4 中所示, 在中和因子 Xa 抑制剂贝特沙班 (betrixaban) 的抗凝血活性中使用 rfVIIa 具有有限的作用 (如下文所阐述)。重组 fVIIa 展示 50nM 至 100nM 的剂量反应解毒活性, 但所述作用在 100nM 至 200nM 之间趋于稳定, 此表明其解毒作用受除其浓度以外的因素的限制。在所有所测试的 rfVIIa 浓度中, 贝特沙班在 250nM 的浓度下仍展示 fXa 的剂量反应抑制 (高达约 75% 抑制)。此观察结果与 fVIIa 的建议作用机制一致。此结果还被展示 rfVIIa 不能完全逆转磺达肝素对凝血酶生成和凝血酶原活化的参数的抑制作用的研究所支持。(吉诺提法斯 (Gerotiafas, GT) 等人, 血栓形成和止血 (Thrombosis & Haemostasis) 2204(91) :531-537)。

[0009] 外源活性 fXa 不能以类似于 rfVIIa 的方式直接投与个体。不像 rfVIIa 在缺少其辅因子组织因子的情况下具有极低促凝血活性那样, 天然 fXa 是强效酶且具有造成血栓形成的潜在风险。因此, 使用 rfVIIa 或活性 fXa 作为 fXa 抗凝血疗法的解毒剂具有许多缺点。

[0010] 因此, 需要经改良的解毒剂, 其不会造成不期望的血栓形成且在 fXa 抑制剂服用过量的情况下或在需要恢复正常止血以阻止或停止出血的情况下有效地实质上中和 fXa 抑制剂的抗凝血活性。

[0011] 本文所提及的任何及所有出版物、专利和专利申请案均以整体引用的方式并入本文中。

发明内容

[0012] 现在已发现, 投与 fXa 蛋白质的经修饰衍生物可用作靶向 fXa 的抗凝血剂的解毒剂。所述 fXa 蛋白质的经修饰衍生物并不与 fXa 竞争组装成凝血酶原酶复合物, 而是结合和 / 或实质上中和抗凝血剂 (例如 fXa 抑制剂)。可用作解毒剂的衍生物经修饰以降低或去除固有的促凝血和抗凝血活性, 同时保留结合至抑制剂的能力。预计本发明的衍生物可包括修饰活性位点、或改变 G1a 结构域或自 fXa 去除整个 G1a 结构域、或其各种组合。由于已知活性位点经修饰的全长 fXa 是抗凝血剂, 因此进一步预计修饰 G1a 结构域将降低或消除 fXa 衍生物对正常止血的抗凝血作用。

[0013] 进一步预计, 修饰 fXa 的 EGF 结构域 (通过 EGF1、EGF2、或 EGF1 和 EGF2 两个结构域的缺失或取代) 提供用于本发明方法的衍生物。EGF 结构域修饰可单独实施或连同 G1a 结构域修饰一起实施。

[0014] 在一个实施例中,衍生物保留结合靶向 fXa 的抗凝血剂(或 fXa 抑制剂)所需的结构特性。通过衍生物直接或间接结合抑制剂,抑制剂实质上被中和。

[0015] 在一个方面中,本发明提供阻止或降低正利用因子 Xa 抑制剂进行抗凝血疗法的个体出血的方法,其包含向所述个体投与有效量的因子 Xa 蛋白质衍生物,所述衍生物结合至因子 Xa 抑制剂但不会组装成凝血酶原酶复合物。在一个实施例中,衍生物具有一个或一个以上的以下性质:降低的促凝血活性或没有促凝血活性;经修饰或去除的 Gla 结构域;和经修饰的活性位点。本发明的衍生物选择性地结合并抑制以外源方式投与的因子 Xa 抑制剂,由此实质上中和 fXa 抑制剂的抗凝血活性。此方法涵盖活体外和活体内方法二者。本发明所涵盖的对因子 Xa 蛋白质的各种修饰可在整个具体实施方式中找到。

[0016] 应了解,本发明所涵盖的衍生物不是血浆源性因子 VIIa、重组因子 VIIa、新鲜冷冻血浆、凝血酶原复合物浓缩物、或全血。

[0017] 本发明的一个方面是使用因子 Xa 衍生物和含有其的组合物来治疗已接受或正利用因子 Xa 抑制剂接受过度抗凝血疗法的患者或之前已投与因子 Xa 抑制剂且然后需要止血的患者(例如非急需或急诊手术可能需要)。在一个方面中,经修饰 fXa 蛋白质不同于天然存在的 fXa,这是因为其具有降低的固有促凝血活性或消除固有促凝血活性且将不会妨碍在止血方面的生理 fXa 功能,同时仍能够结合并实质上中和 fXa 抑制剂。

[0018] 在另一方面中,经修饰的因子 Xa 蛋白质是与能够延长所述因子 Xa 衍生物的血浆半寿期(或循环半寿期)的试剂共同投与。在又一方面中,解毒剂与一个部分偶联以延长其血浆半寿期。

[0019] 还提供含有因子 Xa 衍生物的医药组合物,所述因子 Xa 衍生物结合(和/或实质上中和)因子 Xa 抑制剂,但不会组装成凝血酶原酶复合物。所述医药组合物任选地包含医药上可接受的载剂。

[0020] 在另一方面中,本发明提供试剂盒,其包含用于抗凝血用途的 fXa 抑制剂和当需要实质上中和 fXa 抑制剂的抗凝血活性时使用的 fXa 抑制剂解毒剂(或因子 Xa 衍生物)。

[0021] 本发明的一个实施例涉及分离的多肽,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO. 12 或与 SEQ ID NO. 12 具有至少 80%同源性的多肽。另一实施例涉及分离的双链多肽,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO. 13 或与 SEQ ID NO. 13 具有至少 80%同源性的多肽。再一实施例涉及分离的多肽,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO. 15 或与 SEQ ID NO. 15 具有至少 80%同源性的多肽。

[0022] 还提供包含载剂和刚刚所阐述多肽的医药组合物。

[0023] 还提供编码刚刚所阐述多肽的多核苷酸。

[0024] 本发明进一步提供肽偶联物,其包含以共价或非共价方式连接至刚刚所阐述多肽的载剂。载剂可为脂质体、胶束、医药上可接受的聚合物、或医药上可接受的载剂。

[0025] 本发明还涉及结合刚刚所阐述多肽的抗体。所述抗体是多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体或人源化抗体。还提供抗体的生物活性片段。所述抗体可以可检测方式标记。所述抗体(或抗体片段)还作为组合物的一部分提供,所述组合物进一步包含载剂。

[0026] 在一个实施例中提供抗体-肽复合物,其包含本发明的抗体和特异性结合至所述抗体的多肽。所述多肽是受到对抗可产生所述抗体的多肽。所述抗体可为多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体或人源化抗体。

[0027] 在另一实施例中提供制备本发明多肽的方法,其包含在原核或真核宿主细胞中表

达编码所述多肽的多核苷酸。在一个实施例中,所述宿主细胞是真核细胞且尤其是中国仓鼠卵巢细胞(Chinese hamster ovary cell)。在一个实施例中,重链(SEQ ID NO.15)表达于原核细胞(例如大肠杆菌(E.coli))中。在另一实施例中,多肽经分离。

[0028] 在再一实施例中提供分离的原核或真核宿主细胞,其包含编码本发明多肽的多核苷酸。在一个实施例中,所述宿主细胞在组合物中,所述组合物进一步包含载体。

[0029] 在又一实施例中提供阻止或降低正利用因子Xa抑制剂进行抗凝血疗法的个体出血的方法,其包含向所述个体投与有效量的组合物,所述组合物包含本发明的多肽和载体。进一步提供选择性结合并抑制正进行抗凝血疗法的个体中以外源方式投与的因子Xa抑制剂,其包含向所述个体投与有效量的刚刚所阐述的组合物。

附图说明

[0030] 图1示意性地展示表1中所示的人类因子X(SEQ ID NO.1)的结构域结构,如在李塔斯(Leytus)等人,生物化学(Biochem.),1986,25,5098-5102中所报告。SEQ ID NO.1是由表2中所示的人类fX的核苷酸序列(SEQ ID NO.2)编码的人类fX的氨基酸序列,如此项技术中所习知。例如,经翻译的氨基酸序列报告于李塔斯等人(Leytus),生物化学(Biochem.),1986,25,5098-5102中且可在<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=89142731>的基因库(GenBank)，“NM_000504”中找到。此序列中的氨基酸编号是基于fX序列。人类fX前体(SEQ ID NO.1)含有前导序列(SEQ ID NO.1的氨基酸1至40),随后是对应于fX轻链(LC)的序列(SEQ ID NO.1的氨基酸41至179)、在fX分泌期间去除的RKR三联体的序列(SEQ ID NO.1的氨基酸180至182)、和fX重链的序列(SEQ ID NO.1的氨基酸183至488),所述重链含有激活肽(AP)(SEQ ID NO.1的氨基酸183至234)和催化结构域(SEQ ID NO.1的氨基酸235至488)。

[0031] 图2(SEQ ID NO.3)展示成熟人类因子X的氨基酸序列。此图中氨基酸编号是基于成熟fX序列自fX轻链的N-末端开始。因子X在血浆中作为通过二硫键连接的双链分子循环。轻链(LC)具有139个氨基酸(SEQ ID NO.1的氨基酸41至179)残基且含有富含 γ -羧基谷氨酸(G1a)的结构域(SEQ ID NO.3的1-45)(包括短芳香族堆栈(AS)(SEQ ID NO.3的氨基酸40-45)),之后是两个表皮生长因子(EGF)样结构域(EGF1:SEQ ID NO.3的氨基酸46-84,EGF2:SEQ ID NO.3氨基酸85-128)。重链(HC)具有306个氨基酸且含有52个氨基酸激活肽(AP:SEQ ID NO.3的氨基酸143-194),然后是催化结构域(SEQ ID NO.3的氨基酸195-448)。糜蛋白酶编号中的H57-D102-S195的催化三元体等效物位于fX序列中的His236、Asp282、和Ser379处并加下划线(SEQ ID NO.3的氨基酸236、282和379)。

[0032] 图3示意性地展示图2中所示的成熟人类因子X的结构域结构。此图中的氨基酸编号是基于成熟fX序列。突出显示用于糜蛋白酶消化以去除含G1a-结构域的片段(SEQ ID NO.3的氨基酸1-44)和用于fX激活以去除激活肽的切割位点。糜蛋白酶消化fXa产生缺少1-44氨基酸残基的无G1a结构域fXa(SEQ ID NO.4)。

[0033] 图4展示在凝血酶生成(表示为相对荧光单位(RFU))分析中在组织因子的存在下各种浓度的rfVIIa对fXa抑制剂贝特沙班(如下文所述)的抗凝血活性的影响(如实施例2中所述)。数据显示,rfVIIa和组织因子的组合在高达200nM的浓度下不能完全中和fXa抑制剂贝特沙班的抗凝血活性。

[0034] 图 5 展示在含活性 fXa 和贝特沙班（空心圆）的纯化系统中 Gla⁻ 结构域完整的酞 -fXa 逆转贝特沙班的 fXa 抑制作用，而与活性 fXa 相比，仅酞 -fXa 的促凝血活性（空心三角）可忽略。将 fXa 发色活性标准化成在无任何抑制剂的情况下的活性 fXa（空心正方形）。此更充分地阐述于实例 2 中。数据表明，酞 -fXa 对于 fXa 底物无活性，但仍保留 fXa 抑制剂结合能力。

[0035] 图 6 展示在血浆凝血酶生成（表示为相对荧光单位 (RFU)）分析（如实例 2 中所述）中，图 5 中具有完整 Gla 结构域的酞 -fXa 是有效抑制剂。其在 115nM 约时几乎完全抑制凝血酶生成。数据表明，Gla⁻ 结构域未修饰的酞 -fXa 并不适于用作 fXa 抑制剂解毒剂。

[0036] 图 7 展示在 96 孔板格式中活性 fXa 的凝血活性在糜蛋白酶消化之前和在糜蛋白酶消化 15 分钟和 30 分钟之后的比较。如此图中所示，凝血时间 (OD405 的变化) 在 fXa 被糜蛋白酶消化 15 分钟之后明显延迟，且当 fXa 被消化 30 分钟时有长达 20 分钟的时间未观察到凝血。此结果还用于建立糜蛋白酶消化酞 -fXa 的条件，这是因为在消化期间可监测到酞 -fXa 没有活性。此更充分地阐述于实例 3 中。

[0037] 图 8 展示去 Gla 的酞 -fXa 对因子 Xa 抑制剂贝特沙班的结合亲和力，如实例 4 中所阐述。数据表明，通过糜蛋白酶消化酞 -fXa 所制备以去除含 Gla⁻ 结构域的片段（残基 1-44）的去 Gla 的酞 -fXa 能够以与天然 fXa 类似的亲和力结合贝特沙班 (fXa :K_i = 0.12nM, 去 Gla 的酞 -fXa :K_d = 0.32nM)。

[0038] 图 9 展示，在实例 2 的凝血酶生成分析中，通过添加浓度为 680nM 的解毒剂（去 Gla 的酞 -fXa）逆转不同浓度贝特沙班的抗凝血活性。在浓度为 680nM 时，去 Gla 的酞 -fXa 能够产生实质上完全的 fXa 活性恢复。

[0039] 图 10 展示，在凝血延长分析中使用 aPTT 试剂在 96 孔板格式（如实例 3 中所述），通过不同浓度的解毒剂（去 Gla 的酞 -fXa）逆转 250nM 贝特沙班的抗凝血活性。数据表明，当使用约 608nM 的解毒剂来中和 250nM 的 fXa 抑制剂贝特沙班时，凝血时间与对照贫血小板血浆的凝血时间相当。

[0040] 图 11 展示，在凝血延长分析中使用 aPTT 试剂在 96 孔板格式中，563nM 的解毒剂（去 Gla 的酞 -fXa）对依诺肝素 (enoxaparin) (0.3125-1.25U/mL) 的抗凝血活性的影响，其表示为标准化之后的倍数变化。分析方案阐述于实例 3 中。数据表明，添加 563nM 的解毒剂明显中和低分子量肝素依诺肝素的活性。

[0041] 图 12 展示在发色分析中解毒剂（去 Gla 的酞 -fXa）对凝血酶 (5nM) 活性的作用和 50nM 阿加曲班 (argatroban)（一种特异性凝血酶抑制剂）对其的抑制作用。正如所预期，fXa 抑制剂的解毒剂在高达 538nM 浓度下不会以可检测方式影响凝血酶活性或所述特异性抑制剂阿加曲班对其的抑制作用。此更充分地阐述于实例 14 中。

[0042] 图 13 展示，在 aPTT 分析中使用标准凝血计时器通过改变解毒剂去 Gla 的酞 -fXa 的浓度对 400nM 贝特沙班抗凝血活性的影响。分析方案阐述于实例 3 中。数据展示，fXa 抑制剂的解毒剂实质上 400nM 贝特沙班对 fXa 的抑制作用。据估计，在 400nM 贝特沙班的情况下，解毒剂的 EC₅₀ 为约 656nM。

[0043] 图 14 展示 CHO 细胞中用于表达 fXa 三重突变体 (SEQ ID NO. 12) 的 DNA 构建体的图。将质粒 DNA 线性化并转染至 CHO dhfr(-) 细胞中。使用四氢叶酸酯 (HT) 缺乏的培养基加甲氨蝶呤 (MTX) 来选择细胞。通过 ELISA 来针对高蛋白质表达筛选稳定克隆。在无血

清培养基中产生 fXa 三重突变体并通过离子交换与亲和柱的组合来纯化。图中的编号是基于编码人类 fX SEQ ID NO. 1 的多核苷酸序列进行。例如,活性位点 S419 (SEQ ID NO. 1) 处的丙氨酸突变等效于成熟人类 fX 的 S379 (SEQ ID NO. 3) 处的突变,如整个申请案且更具体地实例 7 所讨论。

[0044] 图 15 展示分别使用识别 fX 重链和轻链的单克隆抗体纯化的 r- 解毒剂的西方印迹 (Western blot)。当将连接轻链和重链的二硫键还原后,r- 解毒剂重链以类似于血浆源性 fXa 的预计分子量迁移。与正常 fXa 相比, fXa 突变体的 Gla- 结构域中缺失 6-39aa 使得 r- 解毒剂轻链的分子量带较低。

[0045] 图 16 展示经口单独投与贝特沙班 (15mg/kg)、或经口投与贝特沙班 (15mg/kg) 然后静脉注射 (300 μ g, IV) 根据实例 1 制得的血浆源性解毒剂 (pd- 解毒剂) 之后小鼠 (n = 7-10/ 组) 中的贝特沙班血浆水平。pd- 解毒剂是在 1.5 小时的时间点之前 5 分钟时投与,并在经口投与贝特沙班之后 1.5、2.0 和 4.0 小时时取小鼠血液样品 (0.5mL)。分析全血 INR、贝特沙班和解毒剂血浆水平。将小鼠血浆中的贝特沙班水平 (平均值 \pm SEM) 绘示为小鼠投与 15mg/kg (空心正方形) 和 15mg/kg 然后解毒剂注射 (空心圆) 之后随时间变化的曲线。在 1.5 小时时间点 (解毒剂注射后 5 分钟) 解毒剂治疗组的 PK-PD 相关性汇总于表 13 中。根据 INR 测量值,单次注射解毒剂使功能性贝特沙班减少 > 50%。此更充分地阐述于实例 8 中。

[0046] 图 17 展示利用经纯化 r- 解毒剂进行小鼠实验 (n = 4-10/ 组) 的结果。比较经口单独投与贝特沙班 (15mg/kg) 或经口投与贝特沙班 (15mg/kg) 然后静脉注射 (300 μ g) r- 解毒剂之后小鼠血浆中的贝特沙班水平 (图 17A) 和全血 INR (图 17B)。标明各治疗组的平均值。如表 14 中所汇总,单次静脉注射 r- 解毒剂使得离体全血 INR 有 > 50% 校正,此证明经由多次注射或其它方案解毒剂有效中和 fXa 抑制剂。这些结果表明,本发明的 fXa 变体具有用作普遍解毒剂来逆转在出血或其它医疗急诊的患者中 fXa 抑制剂的抗凝血作用的潜力。此更充分地阐述于实例 8 中。

[0047] 图 18 展示在 96 孔浊度变化凝血分析中 r- 解毒剂逆转依诺肝素的抑制作用。这些结果基本上类似于 pd- 解毒剂 (图 11),此表明两种 fXa 衍生物具有相当的功能性解毒剂活性。50nM r- 解毒剂实质上校正 (> 75%) 1.25U/mL 依诺肝素的抑制作用。分析方案呈现于实例 11 中。

[0048] 图 19 展示 r- 解毒剂逆转低分子量肝素 (LMWH) 的抑制作用,如在人类血浆凝血分析中所测试。图 18 和 19 二者均于实例 11 中讨论。

[0049] 图 20 展示 r- 解毒剂逆转利伐沙班的抗凝血作用。此更充分地讨论于实例 12 中。

[0050] 图 21 展示 r- 解毒剂的多核苷酸序列和经翻译多肽序列的排列。

[0051] 图 22 展示在单次静脉注射 (1 次注射) 或两次注射 (2 次注射) r- 解毒剂的情况下小鼠实验 (n = 5/ 组, 312 μ g/200 μ l r- 解毒剂) 的结果。对经口投与贝特沙班 (15mg/kg) 之后静脉注射媒剂或 r- 解毒剂之后的血浆中的贝特沙班水平进行比较 (图 22A) (参见实例 8 的详细阐述)。如图 22A 中所示,与媒剂对照 (对照 1) 相比,单次静脉注射 r- 解毒剂使血浆中的贝特沙班水平增加 8 倍以上,此表明解毒剂在活体内有效捕获贝特沙班的能力。与单次注射相比,第二次注射解毒剂又使贝特沙班水平增加不到 2 倍,此表明在小鼠血浆中贝特沙班的数量有限且其抗凝血作用可能被解毒剂逆转。图 22B 表明,单次和双次注

射解毒剂之后,所测量的 INR 随小鼠血浆中解毒剂 / 贝特沙班的比例的增加而降低。

具体实施方式

[0052] I. 定义

[0053] 除非另有说明,否则本发明的实践将使用组织培养、免疫学、分子生物学、微生物学、细胞生物学和重组 DNA 的常规技术,此在所属领域的技术人员的范围内。参见例如萨姆布鲁克 (Sambrook) 和罗塞尔 (Russell) 编辑 (2001) 分子克隆:实验室手册 (Molecular Cloning:A Laboratory Manual),第 3 版;奥苏贝尔 (Ausubel) 等人编辑 (2007) 最新分子生物学实验方法汇编 (Current Protocols in Molecular Biology) 系列;酶学方法 (Methods in Enzymology) 系列 (学术出版社公司 (Academic Press, Inc.), 纽约 (N. Y.)); 麦克弗森 (MacPherson) 等人 (1991) PCR 1:实用方法 (PCR 1:A Practical Approach) (牛津大学出版社 (Oxford University Press) 的 IRL Press); 麦克弗森 (MacPherson) 等人 (1995) PCR 2:实用方法 (PCR 2:A Practical Approach); 哈洛 (Harlow) 和莱恩 (Lane) 编辑 (1999) 抗体,实验室手册 (Antibodies, A Laboratory Manual); 富润氏尼 (Freshney) (2005) 动物细胞的培养:基本技术手册 (Culture of Animal Cells:A Manual of Basic Technique),第 5 版;盖特 (Gait) 编辑 (1984) 寡核苷酸的合成 (Oligonucleotide Synthesis); 美国专利第 4,683,195 号;黑姆斯 (Hames) 和希金斯 (Higgins) 编辑 (1984) 核酸杂交 (Nucleic Acid Hybridization); 安德森 (Anderson) (1999) 核酸杂交 (Nucleic Acid Hybridization); 黑姆斯 (Hames) 和希金斯 (Higgins) 编辑 (1984) 转录和翻译;固定化细胞和酶 (Transcription and Translation; Immobilized Cells and Enzymes) (IRL Press (1986)); 佩巴尔 (Perbal) (1984) 分子克隆实验指南 (A Practical Guide to Molecular Cloning); 米勒 (Miller) 和考斯 (Calos) 编辑 (1987) 哺乳动物细胞的基因转移载体 (Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells) (冷泉港实验室 (Cold Spring Harbor Laboratory)); 马克瑞德斯 (Makrides) 编辑 (2003) 哺乳动物细胞的基因转移和表达 (Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells); 迈耶 (Mayer) 和沃克 (Walker) 编辑 (1987) 细胞核分子生物学中的免疫化学方法 (Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology) (学术出版社 (Academic Press), 伦敦 (London)); 赫岑贝格 (Herzenberg) 等人编辑 (1996) 韦尔的实验免疫学手册 (Weir's Handbook of Experimental Immunology); 小鼠胚胎操作实验指南 (Manipulating the Mouse Embryo:A Laboratory Manual),第 3 版 (冷泉港实验室出版社 (Cold Spring Harbor Laboratory Press) (2002))。

[0054] 所有包括范围在内的数值指定 (例如, pH、温度、时间、浓度、和分子量) 都是近似值,其以 (+) 或 (-)0.1 的增量变化。应了解,但不一定明确陈述所有数值指定前面皆有术语“约”。还应该了解,但未必明确陈述本文所述的试剂仅是例示性的且这些试剂的等效物已为此项技术习知。

[0055] 除非上下文另有明确说明,否则说明书和权利要求书中使用的单数形式“一 (a, an)”和“所述的 (the)”包括复数意义。例如,术语“医药上可接受的载剂”包括多种医药上可接受的载剂 (包括其混合物)。

[0056] 本文所用术语“包含”意欲指组合物和方法包括所列举要素,但并不排除其它要

素。当使用“基本上由... 组成”定义组合物和方法时,将意味着出于所想要的用途不包括对所述组合有任何本质意义的其它要素。因此,基本上由本文所定义的要素组成的组合物不会将来自分离和纯化方法的痕量污染物和医药上可接受的载剂(例如磷酸盐缓冲的盐水、防腐剂、和诸如此类)排除在外。“由... 组成”将意味着排除超过其它成分的痕量元素和用于投与本发明组合物的大量方法步骤。通过这些过渡术语中的每一者定义的实施例均在本发明的范围内。

[0057] 诊断或治疗的“个体”是细胞或哺乳动物(包括人类)。诊断或治疗的非人类动物个体包括(例如)鼠科动物(例如大鼠、小鼠)、犬科动物(例如狗)、兔科动物(例如兔子)、家畜、运动动物和宠物。

[0058] 术语“蛋白质”和“多肽”可互换使用且在其最广泛意义上是指两个或两个以上的亚单位氨基酸、氨基酸类似物或拟肽的化合物。所述亚单位可通过肽键连接。在另一实施例中,所述亚单位可通过其它键(例如,酯、醚等)连接。蛋白质或肽必须含有至少两个氨基酸且对蛋白质或肽序列中可包含的氨基酸的最大数量并无限制。本文所用术语“氨基酸”涉及天然的和/或非天然的或合成的氨基酸,其包括甘氨酸和D与L光学异构体二者、氨基酸类似物和拟肽物质。天然存在的氨基酸的单个字母和三个字母缩写列示于下文中。如果肽链短,通常将三个或三个以上氨基酸的肽称为寡肽。如果肽链较长,则通常将所述肽称为多肽或蛋白质。

[0059]

1- 字母	3- 字母	氨基酸
Y	Tyr	L- 酪氨酸
G	Gly	L- 甘氨酸
F	Phe	L- 苯丙氨酸
M	Met	L- 甲硫氨酸
A	Ala	L- 丙氨酸
S	Ser	L- 丝氨酸
I	Ile	L- 异亮氨酸
L	Leu	L- 亮氨酸
T	Thr	L- 苏氨酸
V	Val	L- 缬氨酸
P	Pro	L- 脯氨酸
K	Lys	L- 赖氨酸

H	His	L- 组氨酸
Q	Gln	L- 谷氨酰胺
E	Glu	L- 谷氨酸
W	Trp	L- 色氨酸
R	Arg	L- 精氨酸
D	Asp	L- 天冬氨酸
N	Asn	L- 天冬酰胺
C	Cys	L- 半胱氨酸

[0060] “因子 Xa”或“fXa”或“fXa 蛋白质”是指血液凝血途径中的丝氨酸蛋白酶，其由非活性因子 X(fX) 产生。因子 Xa 是由因子 IXa 与其辅因子因子 VIIIa(其呈称为固有 Xase 的复合物形式)或因子 VIIa 与其辅因子(其呈非固有 Xase 的复合物形式)激活。fXa 与因子 Va 形成膜结合凝血酶原酶复合物且是催化凝血酶原至凝血酶的转化的凝血酶原酶复合物的活性组份。凝血酶是催化纤维蛋白原至纤维蛋白的转化的酶，此最终导致血凝块形成。因此，在本文中 fXa 的生物活性有时称为“促凝血活性”。

[0061] 编码人类因子 X(“fX”)的核苷酸序列可在 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=89142731>> 的基因库 (GenBank) “NM_000504”中找到，且列示于图 1b 和 SEQ ID No. 2。fX 的对应氨基酸序列和结构域结构阐述于李塔斯等人，生物化学 (Biochemistry), 1986, 25 :5098-5102 中。成熟 fX 的结构域结构也阐述于文缙斯沃路 (Venkateswarlu, D.) 等人，生物物理学杂志 (Biophysical Journal), 2002, 82 : 1190-1206 中。当重链的前 52 个残基 (SEQ ID NO. 3 的氨基酸 143 至 194) 催化切割时，fX 被活化成 fXa (SEQ ID NO. 6)。fXa 含有轻链 (SEQ ID NO. 8) 和重链 (SEQ ID NO. 9)。轻链的前 45 个氨基酸残基 (SEQ ID NO. 6 的残基 1-45) 称为 Gla 结构域，因为其含有 11 个翻译后修饰的 γ -羧基谷氨酸残基 (Gla)。其还含有一个短 (6 个氨基酸残基) 芳香族堆栈序 (SEQ ID NO. 6 的残基 40-45)。糜蛋白酶消化选择性去除 1-44 个残基，此获得无 Gla 结构域的 fXa (SEQ ID NO. 4)。fXa 的丝氨酸蛋白酶催化结构域位于 C-末端重链。fXa 的重链与其它丝氨酸蛋白酶 (例如凝血酶、胰蛋白酶和经活化蛋白质 C) 高度同源。

[0062] 成熟因子 X 的结构域结构可在文缙斯沃路 (Venkateswarlu D.) 等人，生物物理学杂志 (Biophysical J.), 2002, 82, 1190-1206 中找到，其整体内容以引用的方式并入本文中。此图中的氨基酸编号与图 3 中的编号相同。将轻链连接至激活肽的三肽 e is not shown 由于在循环血浆中缺少三肽 Arg140-Lys141-Arg142 (图 1 中所示的 RKR 三联体) 的形式占主导地位，所以并未展示所述三肽。个别结构域展示于方框中。此包括图 2 中的氨基酸 1-45 (SEQ ID NO. 3)。在功能上重要的催化残基上画圈，且“Y”代表 Gla (γ -羧基谷氨酸) 残基。

[0063] “天然 fXa”或“野生型 fXa”是指天然存在于血浆中或以其原始未经修饰形式分离

的 fXa, 所述 fXa 具有活化凝血酶原的生物活性, 且因此促进形成血凝块。所述术语包括从组织样品中分离的天然存在的多肽以及重组产生的 fXa。“活性 fXa”是指具有活化凝血酶原生物活性的 fXa。“活性 fXa”可为天然 fXa 或经修饰保留促凝血活性的 fXa。

[0064] “fXa 衍生物”或“经修饰的 fXa”或“因子 Xa 蛋白质的衍生物”是指已经修饰以便直接或间接结合至因子 Xa 抑制剂且不会组装成凝血酶原酶复合物的 fXa 蛋白质。结构上, 所述衍生物经修饰以不提供促凝血活性或提供降低的促凝血活性。“促凝血活性”在本文中是指试剂能够造成血液凝血或血凝块形成的能力。降低的促凝血活性意味着与野生型 fXa 相比, 促凝血活性降低至少约 50%、或超过约 90%、或超过约 95%。例如, 重组 fX-S395A 基本上不具有促凝血活性, 如通过活体外分析 (例如 fXa 活性分析) 所测量。

[0065] 衍生物具有经修饰的活性位点或经修饰的 Gla 结构域或二者。亦涵盖额外的修饰。预计所述修饰可以一种或一种以上的以下方式来实施: 序列缺失一个或一个以上的氨基酸、利用一个或一个以上的不同氨基酸残基取代一个或一个以上的氨基酸残基、和 / 或操纵一个或一个以上的氨基酸侧链或其“C”或“N”末端。

[0066] 术语“活性位点”是指酶或抗体出现化学反应的部分。“经修饰的活性位点”是结构上已经修饰的活性位点以为所述活性位点提供增加或减少的化学反应性或特异性。活性位点的实例包括 (但不限于) 人类因子 X 包含 235-488 氨基酸残基的催化结构域 (图 1)、和人类因子 Xa 包含 195-448 氨基酸残基 (图 2 和 3) 的催化结构域。经修饰的活性位点的实例包括 (但不限于) 人类因子 Xa 包含 195-448 氨基酸残基且在 SEQ ID NO. 10、11、12、13、或 15 中在位置 Arg306、Glu310、Arg347、Lys351、Lys414、或 Arg424 处具有至少一个氨基酸取代的催化结构域。

[0067] 如上所述, 本发明的衍生物可具有经修饰 Gla 结构域或整个 Gla 结构域已去除。适于在本发明方法中用作解毒剂的 fXa 衍生物的实例是无 Gla 结构域的 fXa (SEQ ID NO. 4 或 5)、Gla- 缺乏的 fXa (SEQ ID NO. 7, 具有本文所述修饰)、在催化位点处修饰的 fXa (SEQ ID NO. 10 或 11)、和在习知对于 fV/fVa 相互作用或 fVIII/fVIIIa 相互作用而言重要的位点处修饰的 fXa (SEQ ID NO. 4、5、7、10、或 11, 在位置 Arg306、Glu310、Arg347、Lys351、Lys414 或 Arg424 处具有至少一个氨基酸取代), 如本文详细阐述。本发明所涵盖 fXa 衍生物的其他实例提供于下文中。

[0068] “无 Gla 结构域的 fXa”或“去 Gla 的 fXa”是指不具有 Gla- 结构域的 fXa 且涵盖除去除 Gla- 结构域以外具有其它修饰的 fXa 衍生物。本发明中无 Gla 结构域的 fXa 的实例包括 (但不限于) 缺少 SEQ ID NO. 3 的 1-39 氨基酸残基的 fXa 衍生物; 缺少 SEQ ID NO. 3 的 6-39 氨基酸残基的 fXa 衍生物, 其对应于如下文更详细阐述表达于 CHO 细胞中的 fXa 突变体 (SEQ ID NO. 12, 表 12); 缺少 SEQ ID NO. 3 的 1-44 氨基酸残基的 fXa 衍生物, 其对应于糜蛋白酶消化人类 fXa 之后的去 Gla 的 fXa (SEQ ID NO. 4, 图 3); 和缺少 SEQ ID NO. 3 的整个 1-45Gla- 结构域残基的 fXa 衍生物 (如帕德马纳班 (Padmanabhan) 等人, 分子生物学杂志 (Journal Mol. Biol., 1993, 232 :947-966 中所述) (SEQ ID NO 5)。其它实例包括去 Gla 的酞 fXa (SEQ ID NO. 10, 表 10) 和去 Gla 的 fXa-S379A (SEQ ID NO. 11, 表 11)。

[0069] 在一些实施例中, 去 Gla 的 fXa 至少包含 SEQ ID NO. 3 的氨基酸残基 40 至 448 或其等效物。在一些实施例中, 去 Gla 的 fXa 至少包含 SEQ ID NO. 3 的氨基酸残基 45 至 488 (SEQ ID NO. 4) 或 46 至 488 (SEQ ID NO. 5) 或其等效物。

[0070] 在一些实施例中,去 Gla 的 fXa 至少包含 SEQ ID NO. 3 的氨基酸残基 40 至 139 和 195 至 448 或其等效物。在一些实施例中,去 Gla 的 fXa 至少包含 SEQ ID NO. 3 的氨基酸残基 45 至 139 和 195 至 448 或其等效物。在另一实施例中,去 Gla 的 fXa 至少包含 SEQ ID NO. 3 的氨基酸残基 46 至 139 和 195 至 448 或其等效物。

[0071] “Gla 缺乏的 fXa”是指在 Gla 结构域中游离侧链 γ -羧基数量降低的 fXa。如同无 Gla 结构域的 fXa 一样, Gla 缺乏的 fXa 也可具有其它修饰。Gla 缺乏的 fXa 包括未羧化、羧化不全和经脱羧的 fXa。“未羧化的 fXa”或“脱羧的 fXa”是指不具有 Gla 结构域的 γ -羧基谷氨酸残基的 γ -羧基的 fXa 衍生物,例如所有 Gla 结构域 γ -羧基谷氨酸均被不同氨基酸置换的 fXa、或所有侧链 γ -羧基均通过诸如胺化、酯化等方式去除或遮蔽的 fXa。对于重组表达的蛋白质,未羧化 fXa 有时也称为非羧化 fXa。“羧化不全 fXa”是指与野生型 fXa 相比 Gla 结构域中 γ -羧基的数量降低的 fXa 衍生物,例如一个或一个以上但并非其所有 Gla 结构域 γ -羧基谷氨酸由一个或一个以上的不同氨基酸置换的 fXa、或至少一个但并非其所有侧链 γ -羧基通过诸如胺化和酯化等方式去除或遮蔽的 fXa。

[0072] 人类无 Gla 结构域因子 Xa 的结构域结构可在帕德马纳班 (Padmanabhan) 等人,分子生物学杂志 (J. Mol. Biol.), 1993, 232, 947-966 中找到,其以整体内容引用的方式并入本文中。氨基酸的编号是基于与糜蛋白酶拓扑等价,其中例如,当使用人类成熟 fX 编号时, Ser195 对应于图 2 中的 Ser379。插入用字母表示,且缺失由 2 个连续编号表示。将 300 添加到轻链编号中以与重链编号相区别。 β 363 是 β -羟基天冬氨酸盐。斜线表示在结晶物质中观察到的蛋白水解切割。基于成熟 fX (SEQ ID NO. 3) 且缺少 1-45 氨基酸残基的无 Gla 结构域 fXa 的序列列示于 SEQ ID NO. 5 中。

[0073] 在一个实施例中, fXa 衍生物可缺少 fXa 的轻链,但仍含有重链中存在的丝氨酸蛋白酶催化结构域。此外,具有其它丝氨酸蛋白酶催化结构域的嵌合体可用于在重链中进行取代。

[0074] “pd- 解毒剂”或“血浆源性解毒剂”是指去 Gla 的酰 fXa 衍生物且具有氨基酸残基 SEQ ID NO. 10。

[0075] “r- 解毒剂”或“重组解毒剂”是指缺少 SEQ ID NO. 3 的 6-39 氨基酸残基的 fXa 衍生物,其对应于如下文更详细阐述表达于 CHO 细胞中的 fXa 突变体 (SEQ ID NO. 13, 表 12a)。

[0076] “抗凝血试剂”或“抗凝血剂”是抑制血凝块形成的试剂。抗凝血试剂的实例包括 (但不限于) 凝血酶的特定抑制剂、因子 IXa、因子 Xa、因子 XIa、因子 XIIa 或因子 VIIa、肝素和衍生物、维生素 K 拮抗剂、和抗组织因子抗体。凝血酶的特定抑制剂的实例包括水蛭素 (hirudin)、比伐卢定 (bivalirudin) (安高玛斯(Angiomax®))、阿加曲班和来匹卢定 (lepirudin) (瑞福丹(Refludan®))。肝素和衍生物的实例包括未经分级分离的肝素 (UFH)、低分子量肝素 (LMWH), 例如依诺肝素 (莱沃诺斯(Lovenox®))、达肝素 (dalteparin) (法安明(fragmin®))、和达那肝素 (danaparoid) (类肝素剂(Organon®)); 和合成戊多糖 (例如磺达肝素 (阿瑞斯塔(Arixtra®))。维生素 K 拮抗剂的实例包括华法林 (warfarin) (香豆定(Coumadin®))、苯硝香豆醇 (phenocoumarol)、醋硝香豆醇 (acenocoumarol) (斯托姆(Sintrom®))、氯茛二酮 (clorindione)、双香豆素 (dicumarol)、二苯茛酮 (diphenadione)、双香豆乙酯 (ethyl biscoumacetate)、苯丙香豆素 (phenprocoumon)、苯茛二酮 (phenindione)、和噻氯香豆素 (tiocloamarol)。在一个实施

例中,抗凝血剂是因子 Xa 的抑制剂。在一个实施例中,抗凝血剂是贝特沙班。

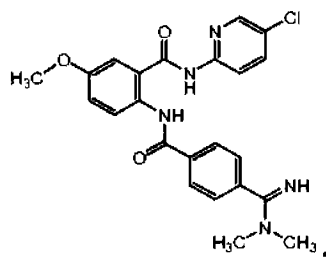
[0077] “抗凝血疗法”是指投与患者以防止不期望的血凝块或血栓形成的治疗方案。抗凝血疗法包含以适于治疗或防止患者中不期望血凝块或血栓形成的剂量和计划表投与一种抗凝血试剂或两种或两种以上的抗凝血试剂或其它试剂的组合。

[0078] 术语“因子 Xa 抑制剂”或“因子 Xa 的抑制剂”是指在活体外和 / 或活体内可直接或间接抑制凝血因子 Xa 的凝血酶原至凝血酶的催化转化活性的化合物。习知 fXa 抑制剂的实例包括 (但不限于) 磺达肝素、伊达肝素、生物素化的伊达肝素、依诺肝素、法安明、NAP-5、rNAPc2、组织因子途径抑制剂、DX-9065a (如例如赫伯特 (Herbert, J. M.) 等人,药理学与实验治疗学杂志 (J Pharmacol Exp Ther.) 1996276 (3) :1030-8 中所阐述)、YM-60828 (如例如谷内 (Taniuchi, Y.) 等人,血栓形成和止血 (Thromb Haemost.) 199879 (3) :543-8 中所阐述)、YM-150 (如例如埃里克森 (Eriksson, B. I.) 等人,血液 (Blood) 2005 ;106 (11), 摘要 1865 中所阐述)、阿哌沙班 (apixaban)、利伐沙班、PD-348292 (如例如调查报告:抗血栓剂-进入预防药市场 (Pipeline Insight:Antithrombotics-Reaching the Untreated Prophylaxis Market), 2007 中所阐述)、奥米沙班 (otamixaban)、雷扎沙班 (razaxaban) (DPC906)、BAY 59-7939 (如例如特佩 (Turpie, A. G.) 等人,血栓形成和止血杂志 (J. Thromb. Haemost.) 2005, 3 (11) :2479-86 中所阐述)、DU-176b (如例如海勒科 (Hylek EM), 研发中药物的新见 (Curr Opin Invest Drugs) 20078 (9) :778-783 中所阐述)、LY517717 (如例如阿涅利 (Agnelli, G.) 等人,血栓形成和止血杂志 (J. Thromb. Haemost.) , 2007 5 (4) :746-53 中所阐述)、GSK913893、贝特沙班 (如下文所述) 和其衍生物。也将低分子量肝素 (“LMWH”) 视为因子 Xa 抑制剂。

[0079] 在一个实施例中,因子 Xa 抑制剂选自贝特沙班、利伐沙班、LMWH、和其组合。

[0080] 术语“贝特沙班”是指化合物“[2-({4-[(二甲基氨基)亚氨基甲基]苯基}羰基氨基)-5-甲氧基苯基]-N-(5-氯(2-吡啶基))羧酰胺”或其医药上可接受的盐。“[2-({4-[(二甲基氨基)亚氨基甲基]苯基}羰基氨基)-5-甲氧基苯基]-N-(5-氯(2-吡啶基))羧酰胺”是指具有以下结构的化合物:

[0081]



[0082] 或其互变异构体或医药上可接受的盐。

[0083] 贝特沙班阐述于美国专利第 6, 376, 515 号和第 6, 835, 739 号及 2006 年 11 月 7 日提出申请的美国专利申请公开案第 2007/0112039 号中,其内容以引用的方式并入本文中。习知贝特沙班是因子 Xa 的特定抑制剂。

[0084] 本文所用术语“解毒剂”或“因子 Xa 抑制剂的解毒剂”是指可通过与活性 fXa 竞争以与可用 fXa 抑制剂结合来实质上中和或逆转 fXa 抑制剂的凝血抑制活性的分子 (例如 fXa 的衍生物)。本发明解毒剂的实例是具有降低的磷脂膜结合的 fXa 衍生物 (例如去 Gl1a 的 fXa 或 Gl1a 缺乏的 fXa)、和具有降低的催化活性的 fXa 衍生物 (例如活性位点经修饰的

fXa 衍生物)、和与 fV/Va、或 fVIII/fVIIIa 的相互作用降低的衍生物。本发明具有降低的磷脂膜结合和具有降低的催化活性的解毒剂包括(但不限于)通过糜蛋白酶消化酰-fXa 获得的去 Gla 的酰-fXa(如实例 1 中所述);通过诱变获得的去 Gla 的 fXa-S379A(糜蛋白酶编号中的 S195A)(如实例 6 中所述)。

[0085] 本发明解毒剂的其它实例包括含有丝氨酸蛋白酶催化结构域的蛋白质或多肽,所述丝氨酸蛋白酶催化结构域与 fXa 催化结构域具有足够的结构相似性且因此能够结合小分子 fXa 抑制剂。实例包括(但不限于)结合至 fXa 抑制剂 GSK913893 的凝血酶(杨(Young R.) 等人,生物有机药物化学快报(Bioorg. Med. Chem. Lett.) 2007, 17(10):2927-2930);结合至 fXa 抑制剂阿哌沙班的血浆激肽释放酶(露缇恩(Luettgen J.) 等人,血液(Blood), 2006, 108(11) 摘要 4130);和以亚纳摩尔亲和力($K_d = 500\text{pM}$) 结合 fXa 抑制剂 C921-78 的胰蛋白酶(或其细菌同系物枯草杆菌蛋白酶)(贝茨(Betz A) 等人,生物化学(Biochem.), 1999, 38(44):14582-14591)。

[0086] 在一个实施例中,本发明的衍生物直接或间接结合至因子 Xa 抑制剂。本文所用的术语“结合(binding, binds)”、或“识别(recognition, recognize)”是指包括可使用(例如)杂交分析检测的分子间相互作用。术语还指包括分子间的“结合”相互作用。相互作用可为(例如)自然界中的蛋白质-蛋白质、蛋白质-核酸、蛋白质-小分子或小分子-核酸。结合可为“直接”或“间接”。“直接”结合包含分子间的直接物理接触。分子间的“间接”结合包含同时直接物理接触一种或一种以上的中间产物的分子。例如,预计本发明的衍生物间接结合并实质上中和低分子量肝素和因子 Xa 的其它间接抑制剂。此结合可使得形成包含相互作用分子的“复合物”。“复合物”是指通过共价键或非共价键、相互作用或力将两种或两种以上的分子的结合保持在一起。

[0087] “中和”、“逆转”或“对抗”fXa 抑制剂的活性或类似词语是指抑制或阻断 fXa 抑制剂的因子 Xa 抑制或抗凝血功能。所述词语是指在活体外和/或活体内部分抑制或阻断所述功能、以及抑制或阻断大部分或所有 fXa 抑制活性。

[0088] 在某些实施例中,因子 Xa 抑制剂被实质上中和是指其直接或间接抑制因子 Xa 的能力降低至少约 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、或 100%。

[0089] 术语“磷脂膜结合”是指活性 fXa 在 Ca^{2+} 离子的存在下结合至带负电荷的磷脂膜或其它分子膜(例如血小板)的能力。此结合通过 fXa Gla 结构域中的 γ -羧基谷氨酸残基调介。

[0090] 术语“降低的相互作用”是指 fXa 衍生物与离子或通常与野生 fXa 结合或复合的其它辅因子结合或形成复合物的能力降低。所述相互作用的实例包括(但不限于)fXa 与 Ca^{2+} 离子和磷脂膜结合、与 fV/fVa 或 fVIII/f/VIIIa 等的相互作用。优选地, fXa 衍生物与离子或其它辅因子的相互作用降低至野生 fXa 相互作用的 50%。更优选地,相互作用降低至野生型 fXa 相互作用的 10%、1% 和 0.1%。这是指所述衍生物“组装成凝血酶原酶复合物”的能力。

[0091] “fXa 抑制剂结合活性”是指分子结合 fXa 的抑制剂的能力。本发明的解毒剂具有 fXa 抑制剂结合活性,无论是直接还是间接。

[0092] 术语“循环半寿期”或“血浆半寿期”是指单次投与之后在血浆中循环的解毒剂的

血浆浓度降低至其初始浓度的一半所需的时间。

[0093] 术语“偶联部分”是指可通过与 fXa 衍生物的残基形成共价键添加至所述 fXa 衍生物的部分。所述部分可直接键结至 fXa 衍生物的残基或可与连接体形成共价键,所述连接体进而与 fXa 衍生物的残基形成共价键。

[0094] 如本文所用,“抗体”包括整个抗体和其任何抗原结合片段或单链。因此术语“抗体”包括含有包含免疫球蛋白分子的至少一部分的分子的任何蛋白质或肽。所述实例包括(但不限于)重链或轻链的互补决定区(CDR)或其配体结合部分、重链或轻链可变区、重链或轻链恒定区、框架(FR)区、或其任一部分、或结合蛋白质的至少一部分。

[0095] 抗体可为多克隆或单克隆抗体且可自任何适宜生物源(例如,鼠科动物、大鼠、绵羊和犬科动物)分离。

[0096] “组合物”意欲指活性剂与另一种惰性(例如,可检测剂或标记)或活性(例如佐剂)的化合物或组合物的组合。

[0097] “医药组合物”意欲包括活性剂与惰性或活性载剂的组合,以使得所述组合物适于在活体外、活体内或离体诊断或治疗使用。

[0098] “有效量”是指衍生物足以诱导期望的生物和/或治疗结果的量。所述结果可为缓解疾病的体征、症状或病因,或生物系统的任何其它期望变化。在本发明中,所述结果通常应涉及一种或一种以上的以下结果:中和已投与患者的 fXa 抑制剂、逆转 fXa 抑制剂的抗凝血活性、自血浆中去除 fXa 抑制剂、恢复止血、和出血减少或终止。有效量将根据以下因素而变:所用特定解毒剂、投与个体的特定 fXa 抑制剂、fXa 抑制剂的服药方案、解毒剂的投与时间、个体和正治疗的疾病状况、个体的重量和年龄、疾病状况的严重程度、投与方式和诸如此类,所有这些都可由所属领域的技术人员容易地确定。

[0099] 如本文所用,本文中使用的术语“治疗(treating, treatment)”和诸如此类以指获得期望的药理学和/或生理学作用。此作用就完全或部分地预防病症或其体征或症状来说可为预防性的,和/或就部分或完全治愈病症和/或由所述病症造成的副作用来说是治疗性的。

[0100] “治疗”还涵盖哺乳动物病症的任何治疗,且包括:(a)防止可能易造成病症、但可能还未诊断出患有所述病症的个体出现所述病症,例如,防止抗凝血剂服药过量的患者出血;(b)抑制病症,即,终止其发展,例如,抑制出血;或(c)减缓或改善病症,例如,减少出血。

[0101] 如本文所用,“治疗”进一步包括全身性改善与病理学有关的症状和/或延迟症状的发作。“治疗”的临床和亚临床证据将随病理学、个体和治疗而变。

[0102] “投与”可在整个治疗过程中连续或间歇地以一次服药实施。确定最有效的投与方法和剂量的方法已为所属领域的技术人员所习知且应随用于治疗中的组合物、治疗的目的、所治疗的靶细胞和所治疗的个体而变化。可根据治疗医师所选择的剂量水平和模式实施单次或多次投与。适宜剂量调配物和投与试剂的方法已为此项技术习知。

[0103] 本发明的试剂和组合物可用于制造医药并通过根据常规程序投与(例如活性成分存于医药组合物中)来治疗人类和其它动物。

[0104] 本发明的试剂科通过任何适宜途径投与、特定地通过非经肠(包括皮下、肌内、静脉内和真皮内)投与用于治疗。还应了解,优选途径将随接受者的状况和年龄、和所治疗的

疾病而变。

[0105] 可以通过许多活体外分析（例如凝血酶生成分析）和临床凝血分析（例如 aPTT、PT 和 ACT）来确定能否达成所述方法（即，抑制或逆转因子 Xa 抑制剂）。

[0106] 本文针对核酸（例如 DNA 或 RNA）所用于的术语“经分离”是指分别从存在于巨分子天然源中的其它 DNA 或 RNA 分离出的分子。术语“分离的核酸”意欲包括并非天然作为片段存在且不可能以天然状态找到的核酸片段。术语“经分离”在本文中还用于指从其它细胞蛋白分离出的多肽和蛋白质且意欲涵盖经纯化多肽和重组多肽二者。在其它实施例中，术语“经分离”是指从构成部分、细胞及其它部分分离，其中细胞、组织、多核苷酸、肽、多肽、蛋白质、抗体或其片段在自然界中通常呈结合状态。例如，分离的细胞是从不同表型或基因型的组织或细胞分离出的细胞。所属领域的技术人员应了解，非天然存在的多核苷酸、肽、多肽、蛋白质、抗体或其片段不需要“分离”以将其与其天然存在的对应物相区别。

[0107] 当本文所用术语“其等效物”是指参考蛋白质、多肽或核酸时，其意指那些具有最小同源性同时仍保留期望功能性者。预计本文所提及的任何经修饰蛋白质也包括其等效物。例如，同源性可为至少 75% 同源性，且另一选择为至少 80%，或另一选择为至少 85%，或另一选择为至少 90%，或另一选择为至少 95%，或另一选择为 98% 同源性且展示实质上与参考多肽或蛋白质等效的生物活性。多核苷酸或多核苷酸区（或多肽或多肽区）与另一序列具有一定百分数（例如，80%、85%、90% 或 95%）的“序列一致性”意味着当进行比对时，将两个序列相比碱基（或氨基酸）的百分数相同。应注意，当仅使用的 fXa（或相关丝氨酸蛋白酶）的重链时，整体同源性可能低于 75%（例如，65% 或 50%），然而，仍保留期望功能性。此比对和 % 同源性或序列一致性可使用此项技术中已知的软件程序进行确定，例如那些在分子生物学实验手册（CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY）（奥苏贝尔（F. M. Ausubel）等人编辑，1987）增刊 30，第 7.7.18 节，表 7.7.1 中所阐述。优选地，使用默认参数进行比对。优选的比对程序是 BLAST，使用默认参数。具体来说，优选程序是 BLASTN 和 BLASTP，其使用以下默认参数：遗传密码 = 标准；筛选 = 无；链 = 两链；截止 = 60；预期 = 10；矩阵 = BLOSUM62；描述 = 50 序列；分类依据 = 高分；数据库 = 非重复，基因库 + EMBL + DDBJ + PDB + 基因库 CDS 翻译库 + 瑞士蛋白（SwissProtein）+ SPupdate + PIR。这些程序的细节可在以下互联网地址中找到：<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST>。

[0108] 术语“多核苷酸”和“寡核苷酸”可互换使用且是指任何长度的核苷酸（脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸或其类似物）的聚合形式。多核苷酸可具有任何三维结构且可执行已知或未知的任何功能。以下是多核苷酸的非限制实例：基因或基因片段（例如，探针、引物、EST 或 SAGE 标签）、外显子、内含子、信使 RNA（mRNA）、转移 RNA、核糖体 RNA、核酶、cDNA、重组多核苷酸、具支链多核苷酸、质粒、载体、任何序列的经分离 DNA、任何序列的经分离 RNA、核酸探针和引物。多核苷酸可包含经修饰的核苷酸，例如甲基化核苷酸和核苷酸类似物。若存在，对核苷酸结构的修饰可在多核苷酸组装之前或之后进行。核苷酸的序列可插入非核苷酸组份。多核苷酸可在聚合之后进一步修饰，例如通过与标记组份偶联。所述术语还指双链和单链分子二者。除非另外指明或需要，否则本发明为多核苷酸的任何实施例涵盖双链形式和两个已知或预计组成双链形式的互补单链形式中的任一者两种形式。

[0109] 多核苷酸是由 4 个核苷酸碱基的特定序列组成：腺嘌呤（A）；胞嘧啶（C）；鸟嘌呤（G）；胸腺嘧啶（T）；和尿嘧啶（U），当多核苷酸为 RNA 时其替代胸腺嘧啶。因此，术语“多核

核苷酸序列”是多核苷酸分子的字母表现形式。此字母表现形式可输入具有中央处理单元的电脑中的数据库中并用于生物信息学应用（例如功能基因组和同源性搜索）。

[0110] “同源性”或“一致性”或“相似性”是指两个肽之间或两个核酸分子之间的序列相似性。同源性可通过比较每一序列中的位置来测定，所述每一序列可为比较目的而进行比对。当所比较序列中的位置被相同碱基或氨基酸占据时，则分子在此位置处同源。序列间同源的程度随匹配或所述序列所共有的同源位置的数量而变。“无关”或“非同源”序列与本发明序列中的一者具有小于 40%一致性、或另一选择小于 25%一致性。

[0111] 多核苷酸或多核苷酸区（或多肽或多肽区）与另一序列具有某一百分数（例如，60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或 99%）的“序列一致性”意味着当进行比对时，两个序列相比碱基（或氨基酸）的百分数相同。此比对和%同源性或序列一致性可使用此项技术中已知的软件程序进行确定，例如那些在奥苏贝尔 (Ausubel) 等人编辑，(2007) 分子生物学实验手册 (Current Protocols in Molecular Biology) 中所阐述。优选地，使用默认参数进行比对。一种比对程序是 BLAST，使用默认参数。具体来说，程序是 BLASTN 和 BLASTP，利用以下默认参数：遗传密码=标准；筛选=无；链=两链；截止=60；预期=10；矩阵=BLOSUM62；描述=50 序列；分类依据=高分；数据库=非重复，基因库+EMBL+DDBJ+PDB+ 基因库 CDS 翻译库+瑞士蛋白+SPupdate+PIR。这些程序的细节可在以下互联网地址中找到：<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>，最后一次访问是在 2007 年 11 月 26 日。生物等效多核苷酸是那些具有特定%同源性并编码具有相同或类似生物活性的多肽的多核苷酸。

[0112] 术语“核酸的同系物”是指核苷酸序列与所述核酸或其补体的核苷酸序列具有某一同源性程度的核酸。双链核酸的同系物意欲包括具有与所述核酸或其补体有某一同源性程度的核苷酸序列的核酸。在一个方面中，核酸的同系物能够与核酸或其补体杂交。

[0113] “基因”是指含有至少一个开放读码框 (ORF) 在转录和翻译之后能够编码特定多肽或蛋白质的多核苷酸。本文所述的多核苷酸或多肽序列中的任一者可用于鉴别其所在基因的较大片段或全长编码序列。分离较大片段序列的方法已为所属领域的技术人员习知。

[0114] 术语“表达”是指基因产物的产生。

[0115] 如本文所用，“表达”是指将多核苷酸转录于 mRNA 中的过程和 / 或将所转录 mRNA 随后翻译成肽、多肽、或蛋白质的过程。如果多核苷酸是源自基因组 DNA，则表达可包括在真核细胞中拼接 mRNA。

[0116] 术语“编码”当应用于多核苷酸时是指被描述为“编码”处于天然状态的多肽的多核苷酸，或当通过所属领域的技术人员习知的方法操纵时，其可经转录和 / 或翻译以产生用于多肽和 / 或其片段的 mRNA。反义链是此一核酸的补体，且编码序列可由其推断出。

[0117] “肽偶联物”是指通过一个或一个以上的多肽与另一化学或生物化合物共价键结或非共价键结来缔合。在非限制实例中，出于其期望目的，多肽与化学化合物的偶联获得多肽的经改良稳定性或效能。在一个实施例中，肽偶联至载体，其中所述载体是脂质体、胶束、或医药上可接受的聚合物。

[0118] “脂质体”是由同心脂质双层构成的微小囊泡。结构上，脂质体的大小和形状在长管到球体的范围内，其中尺寸从数百埃到 1 毫米的几分之一。形成囊泡的脂质经选择以达到最终复合物的特定程度的流动性或刚性，来提供外层的脂质组合物。有天然（胆固醇）

或双极性脂质且包括磷脂（例如磷脂酰胆碱 (PC)、磷脂酰乙醇胺 (PE)、磷脂酰肌醇 (PI)、和鞘磷脂 (SM)）和其它类型的双极性脂质，其包括但不限于二油酰基磷脂酰乙醇胺 (DOPE)，其中烃链长度在 14-22 的范围内、且饱和或具有一个或一个以上的双 C = C 键。能够单独或与其它脂质组份组合产生稳定脂质体的脂质的实例是磷脂（例如氢化大豆磷脂酰胆碱 (HSPC)、卵磷脂、磷脂酰乙醇胺、溶血卵磷脂、溶血磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、鞘磷脂、脑磷脂、心磷脂、磷脂酸、脑苷脂类、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 (DSPE)、二油酰磷脂酰胆碱 (DOPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱 (DPPC)、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱 (POPC)、棕榈酰油酰磷脂酰乙醇胺 (POPE) 和二油酰基磷脂酰乙醇胺 4-(N-马来酰亚胺-甲基) 环己烷-1-羧酸酯 (DOPE-mal)。可纳入脂质体中的额外的不含磷的脂质包括硬脂胺、十二烷基胺、十六烷基胺、肉豆蔻酸异丙酯、三乙醇胺-月桂基硫酸盐、烷基芳基硫酸盐、乙酰棕榈酸酯、甘油蓖麻酸酯、硬脂酸十六烷基酯、两性丙烯酸聚合物、聚乙氧基化的脂肪酸酰胺、和以上提及的阳离子脂质 (DDAB、DODAC、DMRIE、DMTAP、DOGS、DOTAP (DOTMA)、DOSPA、DPTAP、DSTAP、DC-Chol)。带负电荷的脂质包括磷脂酸 (PA)、二棕榈酰基磷脂酰基甘油 (DPPG)、二油酰基磷脂酰基甘油 (DOPG) 和双十六烷基磷酸盐，这些能够形成囊泡。通常，根据脂质体的总尺寸和层状结构的性质可将其分为三类。如由纽约科学院科学会议 (New York Academy Sciences Meeting)，“脂质体和其在生物学或医药中的用途 (Liposomes and Their Use in Biology and Medicine)” 1977 年 12 月所阐述，这三类是多层囊泡 (MLV)、小单层囊泡 (SUV) 和大单层囊泡 (LUV)。

[0119] “胶束”是液体胶体中所分散的表面活性剂分子的聚集体。水溶液中的典型胶束与接触周围溶剂的亲水“头部”区形成聚集体，而掩蔽胶束中央的疏水尾部区。此类胶束称为正相胶束（水包油胶束）。反胶束具有在中央的头基以及延伸的尾部（油包水胶束）。胶束可用于附接多核苷酸、多肽、抗体或本文所述的组合物以促使有效递送至靶细胞或组织。

[0120] 词语“医药上可接受的聚合物”是指可偶联至一个或一个以上的本文所述多肽的化合物群组。预计聚合物偶联至多肽能够延长多肽在活体内和活体外的半寿期。非限制性实例包括聚乙二醇、聚乙烯基吡咯烷酮、聚乙烯醇、纤维素衍生物、聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯、糖、聚醇和其混合物。

[0121] “基因递送媒介”定义为可将所插入多核苷酸运载至宿主细胞中的任何分子。基因递送媒介的实例是脂质体；胶束；生物相容聚合物，其包括天然聚合物和合成聚合物；脂蛋白；多肽；多糖；脂多糖；人工病毒包膜；金属粒子；和细菌、或病毒，例如杆状病毒、腺病毒和逆转录病毒、噬菌体、粘粒、质粒、真菌载体和此项技术中通常所用且已阐述用于表达于各种真核和原核宿主中的其它重组媒介，且可用于基因疗法以及用于简单蛋白质表达。

[0122] 本发明的多核苷酸可使用基因递送媒介递送至细胞或组织中。如本文所用“基因递送”、“基因转移”、“转导”和诸如此类是指将外源性多核苷酸（有时称为“转基因”）引入宿主细胞中的术语，而不论用于引入的方法如何。所述方法包括各种习知技术，例如载体介导的基因转移（通过例如，病毒感染/转染、或各种其它基于蛋白质或基于脂质的基因递送复合物）以及有利于递送“裸”多核苷酸的各种技术（例如，电穿孔、“基因枪”递送和用于引入多核苷酸的各种其它技术）。所引入多核苷酸可稳定地或暂时地维持于宿主细胞中。稳定维持通常需要所引入多核苷酸含有与宿主细胞相容之复制起始点或整合于宿主细胞的复制子中，例如染色体外的复制子（例如，质粒）或核染色体或线粒体染色体。已知一些

载体能够介导基因至哺乳动物细胞的转移,如此项技术中已知和本文所阐述者。

[0123] “病毒载体”定义为重组产生的病毒或病毒粒子,其包含欲在活体内、离体或活体外递送至宿主细胞的多核苷酸。病毒载体的实例包括逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺伴随病毒载体、甲病毒载体和诸如此类。也已研发甲病毒载体(例如基于西门利克森林病毒的载体(Semliki Forest virus-based vector)和基于辛德毕斯病毒的载体(Sindbis virus-based vector))用于基因疗法和免疫疗法。参见施莱辛格(Schlesinger)和杜本斯基(Dubensky)(1999)生物技术新见(Curr. Opin. Biotechnol.)5:434-439和英(Ying)等人(1999)自然医学(Nat. Med.)5(7):823-827。在基因转移是通过逆转录病毒载体介导的各方面中,载体构建体是指包含所述逆转录病毒基因组或其一部分、和治疗基因的多核苷酸。如本文所用,“逆转录病毒介导的基因转移”或“逆转录病毒转导”具有相同含义且是指基因或核酸序列借助进入细胞的病毒稳定地转移到宿主细胞中并将其基因组整合至宿主细胞基因组的过程。病毒可经由其正常感染机制进入宿主细胞或可经修饰以便其结合至不同的宿主细胞表面受体或配体以进入所述细胞。如本文所用,逆转录病毒载体是指能够通过病毒或类病毒进入机制将外源性核酸引入细胞中的病毒粒子。

[0124] 逆转录病毒以RNA形式携带其遗传信息;然而,一旦病毒感染细胞,所述RNA将逆转录成DNA形式,DNA形式整合到所感染细胞的基因组DNA中。所整合DNA形式称为前病毒。

[0125] 在基因转移是由DNA病毒载体(例如腺病毒(Ad)或腺伴随病毒(AAV))介导的方面中,载体构建体是指包含所述病毒基因组或其一部分、和转基因的多核苷酸。腺病毒(Ad)是相对充分表征的、同质病毒群组,其包括超过50个的血清型。参见例如,国际PCT申请案第WO 95/27071号。Ad不需要整合于宿主细胞基因组中。还构建了重组Ad源性载体、尤其那些重组和生成野生型病毒的可能性降低的载体。参见国际PCT申请案第WO 95/00655号和第WO 95/11984号。野生型AAV具有高感染性和整合于宿主细胞的基因组中的特异性。参见和莫内特(Hermonat)和穆泽希卡(Muzyczka)(1984)美国国家科学院院刊(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)81:6466-6470和韦布科夫斯基(Lebkowski)等人(1988)分子与细胞生物学(Mol. Cell. Biol.)8:3988-3996。

[0126] 含有启动子和多核苷酸可操作地连接的克隆位点二者的载体已为此项技术习知。所述载体能够在活体外或活体内转录RNA,且可自诸如斯绰基恩(Stratagene)(加利福尼亚州拉由拉市(La Jolla, CA))和普罗米加生物技术(Promega Biotech)(威斯康辛州麦迪逊(Madison, WI))等源购得。为优化表达和/或活体外转录,可能需要去除、添加或改变克隆的5'和/或3'未翻译部分以消除额外的、潜在不适当的替代翻译起始密码子或可在转录或翻译层面上干扰或降低表达的其它序列。另一选择为,可将共有核糖体结合位点紧邻起译密码子的5'插入以增强表达。

[0127] 基因递送媒介还包括DNA/脂质体复合物、胶束和靶向病毒蛋白质-DNA复合物。还包含靶向抗体或其片段的脂质体可用于本发明方法中。为增强至细胞的递送,本发明的核酸或蛋白质可偶联至抗体或其结合细胞表面抗原(例如,在干细胞或心肌细胞上发现的细胞表面标志)的结合片段。除将多核苷酸递送至细胞或细胞群以外,将本文所述蛋白质直接引入细胞或细胞群可通过蛋白质转染的非限制技术来实施,可增强表达和/或促进本发明蛋白质活性的替代培养条件是其它非限制技术。

[0128] 词语“固体载体”是指诸如“培养板”、“基因芯片”或“微阵列”等非水性表面。所述基因芯片或微阵列可通过所属领域的技术人员习知的各种技术用于诊断和治疗目的。在一种技术中,将寡核苷酸排列于基因芯片上用于通过杂交途径测定 DNA 序列,例如美国专利第 6,025,136 号和第 6,018,041 号中所列举的。本发明的多核苷酸可修饰成探针,其进而可用于检测基因序列。所述技术已阐述于(例如)美国专利第 5,968,740 号和第 5,858,659 号中。探针也可附着至电极表面用于电化学检测核酸序列,如由凯姆(Kayem)等人在美国专利第 5,952,172 号和由凯利(Kelley)等人在(1999)核酸研究(Nucleic Acids Res.)27:4830-4837 中所阐述。

[0129] 各种“基因芯片”或“微阵列”和类似技术已为此项技术习知。该等的实例包括(但不限于)实验室卡片(LabCard)(克拉拉生物科学公司(ACLARA Bio Sciences Inc.));基因芯片(GeneChip)(昂飞公司(Affymetric, Inc.));实验室芯片(LabChip)(开立普科技公司(Caliper Technologies Corp.));具有电化学传感器的低密度阵列(临床微传感器(Clinical Micro Sensors));实验室碟片系统(LabCD System)(卡美拉生物科学公司(Gamera Bioscience Corp.));全能格栅(Omni Grid)(基因机器(Gene Machines));Q 阵列(针提科斯公司(Genetix Ltd.));高同量自动质谱系统连同液相表达技术(基因踪迹系统公司(Gene Trace Systems, Inc.));热喷射点样系统(惠普公司(Hewlett Packard Company));海森海芯片(Hyseq HyChip)(海森公司(Hyseq, Inc.));珠阵列(Bead Array)(依流纳公司(Illumina, Inc.));GEM(因赛特微阵列系统(Incyte Microarray Systems));可将 12 至 64 个斑点分配到多个载玻片上的高同量微阵列系统(智能生物仪器(Intelligent Bio-Instruments));分子生物学工作站和纳芯片(Molecular Biology Workstation and NanoChip)(纳米基因公司(Nanogen, Inc.));微流体玻璃芯片(microfluidic glass chip)(奥瑞驰生物科学公司(Orchid biosciences, Inc.));具有 4 个 PiezoTip 压电随选尖端(piezoelectric drop-on-demand tip)的生物芯片阵列仪(BioChip Arrayer)(帕卡德仪器公司(Packard Instruments, Inc.));弗莱捷(FlexJet)(罗塞塔印谱迈瑞公司(Rosetta Inpharmic, Inc.));MALDI-TOF 质谱仪(西克诺(Sequenome));芯片标志(ChipMaker)2 和芯片标志 3(特里克穆国际公司(TeleChem International, Inc.));和因感测器(GenoSensor)(威斯尔斯公司(Vysis, Inc.)),如在赫勒(Heller)(2002)生物医学工程年评(Annu. Rev. Biomed. Eng.)4:129-153 中所确定和阐述者。“基因芯片”或“微阵列”还阐述于美国专利公开案第 2007-0111322 号、第 2007-0099198 号、第 2007-0084997 号、第 2007-0059769 号和第 2007-0059765 号和美国专利第 7,138,506 号、第 7,070,740 号和第 6,989,267 号中。

[0130] 在一个方面中,制备含有与本文所述多核苷酸、多肽或抗体同源的探针或引物“基因芯片”或“微阵列”。从患者获得适宜样品,实施基因组 DNA、RNA、蛋白质或其任一组合的抽取并视需要扩增。使样品在适于所关注基因或基因产物杂交至基因芯片或微阵列所含探针或引物的条件下接触所述基因芯片或微阵列面板。探针或引物可以可检测方式标记,由此鉴别所关注基因。另一选择为,可添加化学或生物反应以鉴别与所关注基因的 DNA 或 RNA 杂交的探针或引物。然后,借助以上提及的装置和方法测定患者的基因型或表型。

[0131] 液相载剂的其它非限制实例包括玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、葡聚糖、尼龙、淀粉酶、天然和经修饰纤维素、聚丙烯酰胺、辉长岩、和磁铁矿。载剂的性质可为溶剂至一定

程度或不溶。载剂物质实际上可具有任何可能结构构造,只要偶合分子能够结合多核苷酸、多肽或抗体即可。因此,载剂构造可为球形(如呈珠粒形式)或圆柱形(如呈测试管的内部表面或棒的外部表面)。另一选择为,表面可平坦,例如薄片、测试条等,或另一选择为聚苯乙烯珠粒。所属领域的技术人员应知道用于结合抗体或抗原的许多其它适宜载剂将能够通过使用常规实验确定同样的事情。

[0132] “真核细胞”包含除原核生物以外的所有生命王国。其可容易地通过膜结合细胞核辨别。动物、植物、真菌和原生生物是真核生物或有机体,其细胞通过内部膜和细胞骨架组织成复合结构。最具特征的膜结合结构是细胞核。真核宿主包括(例如)酵母、高级植物、昆虫和哺乳动物细胞,或另一选择为原核细胞,如上所述。非限制性实例包括类人猿、牛科动物、猪、鼠科动物、大鼠、鸟类、爬行动物和人类。

[0133] “原核细胞”通常缺少细胞核或任何其它膜结合细胞器且分成两个领域,即细菌和古生菌。另外,这些细胞的遗传信息不具有染色体 DNA,而是在称为质粒的圆形环中。细菌细胞极小,大致为动物线粒体的大小(直径约 1-2 μm 且长为 10 μm)。原核细胞以以下三种主要形状为特征:棒形、球形和螺旋形。细菌细胞并不像真核生物那样实施精心复制过程,其通过二分分裂来分裂。实例包括(但不限于)芽孢杆菌(bacillus)细菌、大肠杆菌(E. coli)细菌和沙门氏菌(Salmonella)细菌。

[0134] 本文所用的术语“人类抗体”意欲包括具有源自人类种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。本发明的人类抗体可包括不是由人类种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过活体外随机诱变或定点诱变或通过活体内体细胞突变引入的突变)。然而,本文所用的术语“人类抗体”不欲包括其中源自另一哺乳动物物种(例如小鼠)种系的 CDR 序列已移植到人类框架序列上的抗体。因此,本文所用术语“人类抗体”是指其中实质上蛋白质的每一部分(例如,CDR、框架、 C_1 、 C_H 结构域(例如, C_{H1} 、 C_{H2} 、 C_{H3})、铰链、(VL、VH))实质上在人类中无免疫原性的抗体,其中仅有较小的序列变化或改变。同样,指定灵长目动物(猴子、狒狒、黑猩猩等)、啮齿类动物(小鼠、大鼠、兔子、天竺鼠、仓鼠和诸如此类)和其它哺乳动物的抗体指定所述种、亚属、属、亚科、科特异性抗体。此外,嵌合抗体包括以上抗体的任一组合。所述改变或变化相对于未经修饰的抗体任选且优选地保留或降低在人类或其它物种中的免疫原性。因此,人类抗体不同于嵌合或人源化抗体。应指出,人类抗体可由能够表达功能性重排的人类免疫球蛋白(例如,重链和/或轻链)基因的非人类动物或原核或真核细胞产生。此外,当人类抗体是单链抗体时,其可包含在天然人类抗体中未发现的连接体肽。例如,Fv 可包含连接重链的可变区和轻链的可变区的连接体肽,例如 2 至约 8 个甘氨酸或其它氨基酸残基。所述连接体肽视为是人类来源。

[0135] 如本文所用,如果人类抗体是使用人类免疫球蛋白序列(例如)通过对携带人类免疫球蛋白基因的转基因小鼠进行免疫或通过筛选人类免疫球蛋白基因文库自一个系统获得,则所述抗体是“源自”特定种系序列。“源自”人类种系免疫球蛋白序列的人类抗体可例如通过将人类抗体的氨基酸序列与人类种系免疫球蛋白的氨基酸序列进行比较来鉴别。所选人类抗体通常与人类种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列具有至少 90% 的氨基酸序列一致性,且含有当与其它物种(例如,鼠科动物种系序列)的种系免疫球蛋白氨基酸序列相比时将人类抗体鉴别为人类的氨基酸残基。在某些情况下,人类抗体与所述种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列具有至少 95%、或甚至至少 96%、97%、98% 或 99% 氨基酸

序列一致性。通常,源自特定人类种系序列的人类抗体通常将展示与由人类种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列的差异不超过 10 个氨基酸。在某些情况下,人类抗体可展示与由所述种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列的差异不超过 5、或甚至不超过 4、3、2、或 1 个氨基酸。

[0136] “人类单克隆抗体”是指具有源自人类种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的显示单一结合特异性的抗体。术语还意指重组人类抗体。用以制备这些抗体的方法阐述于本文中。

[0137] 本文所用术语“重组人类抗体”包括重组方式制备、产生或分离的所有人类抗体,例如从使用人类免疫球蛋白基因转基因或转染色体的动物(例如,小鼠)或自所述动物制备的杂交瘤分离的抗体、经转化以表达所述抗体的宿主细胞(例如,从转染瘤)分离的抗体、从重组、组合人类抗体文库分离的抗体、和通过涉及将人类免疫球蛋白基因序列拼接到其他 DNA 序列的任何其它方式制备、表达、产生或分离的抗体。所述重组人类抗体具有源自人类种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。然而,在某些实施例中,所述重组人类抗体可经受活体外诱变(或者,当使用人类 Ig 序列转基因动物时,经受活体内体细胞诱变),且因此重组抗体的 VH 和 VL 区的氨基酸序列尽管源自人类种系 VH 和 VL 序列并与其相关,但却是不可天然存在于人类活体内抗体种系谱中的序列。用以制备这些抗体的方法阐述于本文中。

[0138] 如本文所用,“同种型”是指由重链恒定区基因编码的抗体类型(例如, IgM 或 IgG1)。

[0139] 本文所用的术语“多克隆抗体”或“多克隆抗体组合物”是指源自不同 B 细胞系的抗体制剂。这些是经分泌对抗特定抗原的免疫球蛋白分子的混合物,每一者识别一种不同表位。

[0140] 本文所用的术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”是指具有单一氨基酸组成的抗体分子制剂。单克隆抗体组合物对于特定表位展示单一结合特异性和亲和力。

[0141] 本文所用术语“标记”意欲指直接或间接可检测化合物或组合物,其直接或间接偶联至欲检测组合物(例如,多核苷酸或蛋白质,例如抗体)以生成“经标记”组合物。所述术语还包括偶联至当表达所插入序列时将提供信号的多核苷酸(例如绿色荧光蛋白(GFP)和诸如此类)的序列。所述标记为自身可检测(例如,放射性同位素标记或荧光标记)或在酶标记情况下能催化可检测底物化合物或组合物的化学变化。所述标记可适用于小规模检测或更适用于高通量筛选。因此,适宜标记包括(但不限于)放射性同位素、荧光染料、化学发光化合物、染料、和蛋白质(包括酶)。标记可简单的检测或其可经量化。简单检测的反应通常包含仅仅证实其存在的反应,而经量化的反应通常包含具有可量化(例如,数值上可报告的)值(例如强度、极性和/或其它性质)。在发光或荧光分析中,可检测反应可直接使用与实际参与结合的分析组份缔合的发光基团或荧光基团、或间接地使用与另一(例如,报道分子或指示剂)组份缔合的发光基团或荧光基团来生成。

[0142] 产生信号的发光标记的实例包括(但不限于)生物发光和化学发光。可检测发光反应通常包含发光信号的改变或出现。用于发光标记分析组份的适宜方法和发光基团已为此项技术习知且阐述于(例如)豪格兰(Haugland)、理查德(Richard P.)(1996) 荧光探针和研究化学品手册(Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals)(第

6 版) 中。荧光探针的实例包括 (但不限于) 水母荧光素和萤光素酶。

[0143] 适宜荧光标记的实例包括 (但不限于) 萤光素、若丹明 (rhodamine)、四甲基若丹明、曙红 (eosin)、赤藓红 (erythrosin)、香豆素 (香豆素)、甲基香豆素、茈、孔雀绿 (Malacite green)、均二苯乙烯、荧光黄 (Lucifer Yellow)、瀑布蓝 (Cascade Blue)TM、和德克萨斯红 (Texas Red)。其它适宜光学染料阐述于豪格兰 (Haugland)、理查德 (Richard P.) (1996) 荧光探针和研究化学品手册 (Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals) (第 6 版) 中。

[0144] 在另一方面中, 荧光标记经官能化以促使共价衔接至细胞或组织表面中或其上存在的细胞组份 (例如细胞表面标志)。适宜官能团包括 (但不限于) 异硫氰酸酯基团、氨基、卤代乙酰基、马来酰亚胺、琥珀酰亚胺酯和磺酰卤化物, 所有这些都可用于将荧光标记衔接至第二分子。荧光标记的官能团的选择将取决于至连接体、试剂、标志或第二标记试剂的衔接位点。

[0145] II. 本发明方法

[0146] 本发明的一个方面涉及阻止或降低正经历抗凝血疗法的个体出血的方法, 所述方法通过向所述个体投与有效量的因子 Xa 蛋白质衍生物实施。在一个实施例中, 衍生物具有经修饰的活性位点和 / 或经修饰的 Gla- 结构域, 由此具有降低的促凝血活性或没有促凝血活性。衍生物起到解毒剂的作用且实质上中和抑制剂的抗凝血活性。在一个实施例中, 所述衍生物缺乏 Gla 或无 Gla 结构域。个体可为哺乳动物或更具体来说人类。

[0147] 在另一实施例中, 本发明涉及选择性结合并抑制个体中以外源方式投与的因子 Xa 抑制剂的方法。所述方法包含向患者投与有效量的因子 Xa 衍生物的衍生物, 如上文所述。个体可为细胞或哺乳动物 (例如人类)。

[0148] 适于此疗法的患者之前已经历抗凝血疗法, 例如, 其已经投与一种或一种以上的抗凝血剂 (例如因子 Xa 的抑制剂)。为因子 Xa 抑制剂的抗凝血剂实例包括 (但不限于) 磺达肝素、伊达肝素、生物素化的伊达肝素、依诺肝素、法安明 (fragmin)、NAP-5、rNAPc2、组织因子途径抑制剂、DX-9065a、YM-60828、YM-150、阿哌沙班、利伐沙班、PD-348292、奥米沙班、DU-176b、LY517717、GSK913893、低分子量肝素、和贝特沙班、或其任一组合。在整个说明书中可找到各种抗凝血剂的源。

[0149] 在一个方面中, 所述衍生物具有经修饰的活性位点和 / 或经修饰或去除的 Gla 结构域。在一个方面中, 所述因子 Xa 衍生物没有或不展示促凝血活性。在此方面中, 衍生物至少包含 SEQ ID NO. 3 的氨基酸残基 40 至 448、45 至 448、或 46 至 448 或其等效物。在另一方面中, 所述衍生物至少包含 SEQ ID NO. 3 的氨基酸残基 45 至 139 和 195 至 448 或 46 至 139 和 195-448 或其等效物。

[0150] 在本发明的另一方面中, fXa 衍生物保留 fXa 蛋白质活性位点的三维结构。关于去 Gla 的 fXa 的三维结构的信息可在布朗施泰特 (Brandstetter, H) 等人生物化学杂志 (J. Bio. Chem.), 1996, 271 :29988-29992 中找到。

[0151] 在本发明的另一方面中, fXa 衍生物可缺少 Gla 结构域以及两个 EGF 结构域中的任一者。在本发明的另一方面中, fXa 衍生物完全缺少轻链。重链的其它修饰可包含能够结合抑制剂的相关丝氨酸蛋白酶的催化结构域。相关丝氨酸蛋白酶所具有的催化结构域与 fXa 催化结构域具有足够结构相似性且因此能够结合小分子 fXa 抑制剂。相关丝氨酸蛋白

酶的实例包括（但不限于）哺乳动物蛋白酶（例如血浆激肽释放酶、凝血酶和胰蛋白酶）或细菌蛋白酶枯草杆菌蛋白酶。这些衍生物进一步包括在等效于本文所述活性位点丝氨酸（SER379）或天冬氨酸（ASP282）残基的氨基酸残基处进行修饰。

[0152] 在一些实施例中，具有降低的促凝血活性的因子 Xa 蛋白质包含经修饰轻链，其中所述修饰是取代、添加或缺失 Gla- 结构域以降低 fXa 的磷脂膜结合。在一些实施例中，fXa 的主要氨基酸序列并未改变，但某些氨基酸的侧链已经改变。降低 fXa 的磷脂膜结合的经修饰 Gla- 结构域的实例包含具有主要氨基酸序列 SEQ ID NO. 3 或其等效物的多肽或蛋白质，其中与野生型人类因子 Xa 蛋白质的 Gla- 结构域相比有至少一个氨基酸取代、添加或缺失。在一些实施例中，至少一个取代或缺失的氨基酸是 γ -羧基谷氨酸（Gla）。Gla 残基在 SEQ ID NO. 3 中展示于氨基酸位置 6、7、14、16、19、20、25、26、29、32、和 39 处。在一些实施例中，解毒剂的主要氨基酸序列与 SEQ ID NO. 3 或其等效物一致，但是一种未羧化、羧化不全或脱羧的因子 Xa 蛋白质。在一些实施例中，所述解毒剂是去 Gla 的酰 -fXa 或去 Gla 的 fX-S379A。在一些实施例中，具有降低的磷脂膜结合的因子 Xa 蛋白质进一步包含修饰或缺失 EGF1 和 / 或 EGF2（如图 3 中分别作为氨基酸 46 至 84 和 85 至 128 所展示）或其部分（即，所述 EGF1 和 / 或 EGF2 结构域的片段）。在一些实施例中，整个轻链或实质上整个轻链经修饰或去除。例如，具有降低的磷脂膜结合的经修饰 fXa 蛋白质可仅含重链或所述经修饰的 fXa 可含有重链和轻链含 Cys 132（与 SEQ ID NO. 3 中重链的 Cys302 形成单二硫键的氨基酸残基）的片段。在一些实施例中，所述衍生物包含氨基酸序列 SEQ ID NO. 12。在一些实施例中，所述衍生物是包含 SEQ ID NO. 13 的双链多肽。在其它实施例中，所述衍生物是 SEQ ID NO. 15 的多肽。

[0153] 在一些实施例中，所述因子 Xa 蛋白质衍生物包含含所述因子 Xa 蛋白质的催化结构域的经修饰重链。在一些实施例中，至少一个氨基酸取代存在于选自以下组成的群组的 fXa 的一个或一个以上的氨基酸位置处：SEQ ID NO. 3 和 7 中的 Glu216、Glu218、Arg332、Arg347、Lys351、和 Ser379（分别为糜蛋白酶编号中的 Glu37、Glu39、Arg150、Arg165、Lys169、和 Ser195）。在一些实施例中，所述解毒剂是活性位点丝氨酸（SEQ ID NO. 3 和 7 中的 Ser379，糜蛋白酶编号中的 Ser195）残基的因子 Xa 蛋白质，所述残基被修饰成脱氢丙氨酸或丙氨酸。可对野生型 fXa 蛋白质或对上述经修饰 fXa 蛋白质或片段中的任一者进行所述修饰。例如，活性位点丝氨酸残基被实例 1 中所述的脱氢丙氨酸替代的去 Gla 的酰 -fXa 已展示解毒活性。

[0154] 在其它实施例中，与野生型或天然存在的因子 Xa 相比，衍生物与 ATIII、辅因子 fV/fVa 和 fVIII/fVIIIa 的相互作用降低。在一些实施例中，在 SEQ ID NO. 3 和 7 中的氨基酸位置 Arg306、Glu310、Arg347、Lys351、Lys414 或 Arg424（分别为糜蛋白酶编号中的 Arg125、Glu129、Arg165、Lys169、Lys230 或 Arg240）处存在至少一个氨基酸取代。可对野生型 fXa 蛋白质或对上述经修饰 fXa 蛋白质或片段中的任一者进行所述修饰。

[0155] 在其它实施例中，所述解毒剂是包含可模拟 fXa 重链抑制剂结合能力的丝氨酸蛋白酶催化结构域的氨基酸序列的蛋白质。所述蛋白质可包括哺乳动物蛋白酶，例如血浆激肽释放酶、凝血酶、胰蛋白酶（或其细菌同系物枯草杆菌蛋白酶），所述蛋白酶已以重组方式经修饰而缺少能够裂解蛋白质底物的丝氨酸蛋白酶活性，但仍具有活性位点裂缝的结构特征。

[0156] 本发明还提供医药组合物,其含有一种或一种以上的经修饰因子 Xa 衍生物和医药上可接受的载体。将组合物以将提供期望益处(即出血减少或停止)的量投与需要的个体。所述组合物可与补充或增强因子 Xa 衍生物的活性的任何适宜试剂或疗法共同投与。所述实例是能够延长解毒剂的血浆半寿期的第二试剂。适宜第二试剂的实例包括(但不限于)识别 fXa 重链的外部位点的抗 fXa 抗体或 α -2-巨球蛋白结合 fXa 衍生物。fXa 衍生物与第二试剂(外部位点抗体或 α -2-巨球蛋白)之间形成复合物将阻断巨大分子相互作用,但保留活性位点依赖性抑制剂结合活性。适于共同投与的抗 fXa 抗体的实例包括(但不限于)那些阐述于杨(Yang Y.H.)等人,免疫学杂志(J. Immunol.)2006,1;177(11):8219-25、威尔肯斯(Wilkens, M)和克瑞斯内瓦米(Krishnaswamy, S.),生物化学杂志(J. Bio. Chem.),2002,277(11),9366-9374 和丘奇(Church WR)等人,血液(Blood),1988,72(6),1911-1921。

[0157] 在一些实施例中,因子 Xa 蛋白质是通过化学。酶活重组方式经修饰。。例如,活性位点 Ser379 可以化学方式修饰成脱氢丙氨酸,且 Glu 结构域可通过糜蛋白酶消化以酶方式去除,如实例 1 中所述。本文所述经修饰 fXa 也可通过重组方式通过修饰编码野生型 fX 的 cDNA 的序列(SEQ ID NO. 2)(更详细阐述于实例 7 中)来直接表达重组解毒剂(r-解毒剂)来产生,或另一选择为,具有期望修饰的 fX 蛋白质可通过重组方式、随后通过活化剂(例如蛇毒,例如罗塞尔(Russell)的蝰蛇毒,和 fVIIa/组织因子或 fIXa/fVIIIa 的复合物)活化经修饰 fXa 来产生。

[0158] 将受益于本文所述组合物的投与和伴随方法的个体包括那些正经历、或易患临床重大出血事件或临床明显非重大出血事件者。临床重大出血事件的实例选自由以下组成的群组:失血、重要器官出血、需要再次手术或新的治疗程序的出血、和出血指数 ≥ 2.0 且伴有明显出血。(特派爱(Turpie AGG)等人,新英格兰医学杂志(NEJM),2001,344:619-625。)另外,个体可正经历、或易患选自由以下组成的群组的非重大出血事件:持续性或复发性且大量或在无干预的情况下将不会停止的鼻出血、不会上升到需要治疗程序的水平或尿道出血、注射位点或其它地方自发性的或出现轻微创伤的大量血液流失、超过通常伴随不需要引流术的手术程序的大量血液流失、和需要非计划性输血的出血。

[0159] 在一些实施例中,解毒剂是在投与过剂量的 fXa 抑制剂之后或在可能将个体暴露于失血风险的手术之前投与。

[0160] 在本文所述的任一方法中,应了解,即使并未明确陈述,也是将有效量的衍生物投与个体。所述量可由治疗医师根据经验确定且将随个体的年龄、性别、重量和健康状况而变。治疗医师需要考虑的额外因素包括(但不限于)可能已经投与的因子 Xa 抑制剂的特性和/或数量、解毒剂将投与个体的方法或模式、解毒剂的调配物、和患者的治疗终点。利用这些考虑的变量,所属领域的技术人员将投与治疗有效量给欲治疗的个体。预计本文所述解毒剂足以抵消或实质上中和个体中的抗凝血剂的治疗有效量可含有约 0.01 毫克解毒剂/公斤个体体重至 1 克解毒剂/公斤个体体重的解毒剂。进一步预计,解毒剂可以约 10 毫微摩尔至约 100 微摩尔、或约 10 毫微摩尔至约 5 微摩尔、或约 100 毫微摩尔至约 2.5 微摩尔范围内的浓度提供给个体。

[0161] 组合物可以解毒剂有效选择性识别并直接或间接结合个体中的因子 Xa 抑制剂的量投与。其也可以实质上抑制或实质上中和个体中以外源方式投与的因子 Xa 抑制剂的量

投与。

[0162] 在再一方面中,本发明涉及用于逆转或中和投与个体的因子 Xa 抑制剂的抗凝血活性的医药组合物,其包含将有效量的解毒剂投与因子 Xa 抑制剂和医药上可接受的载剂中,前提条件是所述解毒剂不是血浆源性因子 VIIa、重组因子 VIIa、新鲜冷冻血浆、凝血酶原复合物浓缩物和全血。

[0163] 在一些实施例中,所述解毒剂是上述解毒剂中的任一者。在一些实施例中,所述解毒剂与能够延长解毒剂循环半寿期的部分偶联。在一些实施例中,所述部分选自自由聚乙二醇、酰基、脂质体、载剂蛋白、人工磷脂膜、和纳米粒子组成的群组。例如,本文所述 fXa 衍生物的非活性位点赖氨酸或半胱氨酸残基可以化学方式修饰以附接至聚乙二醇分子。提供于沃勒 (Werle, M.) 和伯恩考普 - 斯诺池 (Bernkop-Schnürch, A), 提高肽和蛋白质药物的血浆半寿期时间的方法 (Strategies to Improve Plasma Half Life Time of Peptide and Protein Drugs), 氨基酸 (Amino Acids) 2006, 30(4) :351-367 中的其它方法可用于延长本发明解毒剂的血浆半寿期。

[0164] 在本发明的其它实施例中, fXa 衍生物的半寿期是通过使解毒剂偶合至 Fc 载剂结构域来提高。在一个实施例中,解毒剂偶合至 Fc 片段,例如免疫球蛋白肽部分或 IgG1 片段。在一个实施例中,涵盖包含所述 fXa 衍生物和免疫球蛋白肽部分的嵌合蛋白质。在再一实施例中, fXa 衍生物和免疫球蛋白肽是通过化学反应偶合,例如具有人类 IgG 重链和 κ 轻链恒定区的二硫键。

[0165] 在一些实施例中,所述医药组合物进一步包含能够延长解毒剂的血浆半寿期的试剂。在另一方面中,所述医药组合物已与能够延长解毒剂的血浆半寿期的试剂共同投与。在一些实施例中,共同投与或共同调配的试剂是识别 fXa 的外部位点的抗 fXa 抗体或结合 fXa 衍生物的 α -2- 巨球蛋白。

[0166] III. 解毒剂

[0167] 因子 Xa 衍生物

[0168] 本发明的一个方面是 fXa 衍生物 (例如 Glu- 结构域缺乏的 fXa 或去 Glu 的 fXa) 作为安全且有效解毒剂以实质上中和凝血 fXa 的抑制剂的活性以阻止或停止出血的用途。预计本发明的解毒剂将用于逆转 fXa 抑制剂、尤其活性位点定向小分子抑制剂的抗凝血作用。

[0169] 预计 fXa 抑制剂的解毒剂具有降低的促凝血活性或没有促凝血活性但能够与 fXa 抑制剂结合。预计所述有限活性允许以高于循环野生型 fXa 的水平服用解毒剂。某些 fXa 衍生物 (例如去 Glu 的 fXa 和 Glu 缺乏的 fXa) 是本发明的适宜解毒剂。除具有降低或消除促凝血活性以外,本发明的解毒剂还应对个体实质上无免疫原性。解毒剂可含有两个或两个以上的突变和 / 或修饰的组合。此外,任一上述 fXa 衍生物可单独投与或彼此组合投与。

[0170] 因子 Xa 是血液凝血途径中使凝血酶原转化成凝血酶的丝氨酸蛋白酶。其从非活性因子 X 当通过固有 Xase (由因子 IXa 与其辅因子 (即因子 VIIIa) 形成的复合物) 或非固有 Xase (由因子 VIIa 与其辅因子 (即组织因子) 形成的复合物) 活化时产生。经活化 fX (fXa) 可在其重链的 C- 末端进一步进行自动催化切割,将 fXa α 转化成亚形式 fXa β (杰斯塔 (Jesty, J) 等人生物化学杂志 (J. Biol. Chem.) 1975, 250(12) :4497-4504)。fXa α 和

fXa β 二者均是本发明的适宜物质。fXa 自身以不足以帮助凝血的低速率转化凝血酶原。一旦 fXa 与辅因子 Ca²⁺、磷脂和因子 Va 形成凝血酶原酶复合物,其即可以快到足以帮助凝血的速率活化凝血酶原(斯库根(Skogen, W. F.) 等人,生物化学杂志(J. Biol. Chem.)1984, 259(4):2306-10)。复合物需要带负电荷的磷脂与 fXa 的 Gla 结构域中的 γ -羧基谷氨酸残基经由 Ca²⁺ 桥结合。

[0171] 因此,尽管 Gla 结构域不含 fXa 的活性位点,但其能够使 fXa 通过 γ -羧基谷氨酸残基形成凝血酶原酶复合物。此可由通过糜蛋白酶消化选择性去除 fXa Gla- 结构域来证实(参见图 7 和实例 1)。凝血分析是在通过糜蛋白酶消化切割 Gla 结构域的过程期间针对 fXa 来实施。已报告(斯库根(Skogen) 等人,生物化学杂志(J. Biol. Chem.)1984, 259(4):2306-10),由无 Gla 结构域的 fXa、fVa、磷脂和钙离子组成的重构凝血酶原酶复合物以相对降低的速率产生凝血酶(与含天然 fXa 的对照复合物相比,0.5%所生成产物)。如图 7 中所示,fXa 在血凝块形成中的活性在所述 fXa 被糜蛋白酶消化 15 分钟之后部分地降低且在消化 30 分钟之后活性完全丧失。因此,已发现缺少钙离子依赖性膜结合所需的适宜 γ -羧基谷氨酸残基的羧化不全或脱羧 fXa 不能够进行膜依赖性凝血复合物组装且不帮助凝血(马恩(Mann, KG) 等人,血液(Blood),1990, 76:1-16)。

[0172] 还已经建立, Gla- 结构域缺乏的 fXa 能够结合 fXa 的活性位点定向抑制剂。(布朗施泰特(Brandstetter, H) 等人,生物化学杂志(J. Bio. Chem.),1996, 271:29988-29992)。已报告结合至 des-Gla 人类 fXa 的小分子 fXa 抑制剂的结晶学,其提供活性位点裂缝的结构描述(布朗施泰特(Brandstetter),生物化学杂志(J. Bio. Chem.),1996, 271:29988-29992 和若持瑞恩(Roehrig),医药化学杂志(J. Med. Chem.),2005, 48(19):5900-8)。图 8 展示,去 Gla 的酞-fXa 与 fXa 抑制剂贝特沙班展示结合亲和力为 0.319nM,与天然 fXa 的结合亲和力相当。

[0173] 现在还发现,去 Gla 的 fXa 和具有降低的促凝血活性但能够结合 fXa 抑制剂的其它 fXa 衍生物可用作 fXa 抑制剂的解毒剂。如图 9 中所示,去 Gla 的酞-fXa 展示在 680nM 的浓度下完全逆转贝特沙班的抗凝血活性。如实例 2 中所详细阐述,凝血酶生成是通过添加含 TF 的试剂(因奴韦恩(Innovin)) 来起始且因此表明凝血因子在外因性凝血途径中的功能。在实例 9-13 中还证明,重组解毒剂可用于逆转宽范围内的抗凝血剂。

[0174] 利用活化部分促凝血酶原激酶时间(aPTT) 试剂(阿克停(Actin)FS) 实施的凝血延长分析来测定凝血因子在内因性凝血途径中的作用,其也表明去 Gla 的酞-fXa 具有解毒活性。图 10 展示去 Gla 的酞-fXa 对 250nM 贝特沙班的剂量反应解毒作用,其中在 600nM 下完全逆转。图 11 展示去 Gla 的酞-fXa 还能够逆转另一种 fXa 抑制剂依诺肝素的抗凝血活性。图 12 展示去 Gla 的酞-fXa 并未对直接凝血酶抑制剂阿加曲班明展示显解毒活性。因此,去 Gla 的酞-fXa 是 fXa 抑制剂的选择性解毒剂且能够恢复由外因性或内因性途径引发的 fXa 促凝血活性。

[0175] 此外,去 Gla 的酞-fXa 的解毒活性是通过利用传统凝血计时器所测量的 aPTT 延长分析来证明。如图 13 中所示,去 Gla 的酞-fXa 自身在所测试最高浓度(2576nM) 下对对照血浆的 aPTT 没有作用。400nM 的贝特沙班使 aPTT 延长超过 2 倍。贝特沙班的此抗凝血作用是通过去 Gla 的酞-fXa 以剂量反应方式来逆转,其中在解毒剂浓度高于 1610nM 时 aPTT 恢复至接近对照血浆的正常水平。

[0176] 预计进一步在 fXa 轻链处截断（例如，额外缺失 EGF1 结构域、EGF1 加 EGF2 结构域、或其片段）且在活性 fXa 中仅具有重链可为本发明有用的解毒剂。

[0177] Gla- 结构域缺乏的 fXa 在生理相关浓度下并不帮助凝血。然而，蛋白质在较高浓度下具有裂解许多底物并造成凝血的能力。例如，斯库根 (Skogen) 等人（斯库根 (Skogen, W. F.) 等人, 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.) 1984, 259(4) :2306-10) 展示牛科动物去 Gla 的 fXa 相对于野生型 fXa 具有约 0.5-1.0% 的凝血酶原酶复合物活性。因此，进一步降低或完全消除 fXa 衍生物的促凝血活性的修饰是本发明方法所预期的。所述修饰可在（例如）fXa 的催化结构域中。

[0178] 预计修饰 fXa 重链中的催化结构域以降低其促凝血活性的若干种途径。例如，fXa 的活性位点残基 S379（如 SEQ ID No. 7 中所示）可通过由脱氢丙氨酸（参见实例 1）或丙氨酸（参见实例 6）选择性替代来降低或消除促凝血活性。还知道，fXa 与靶向 fXa 的外部位点的试剂之间形成复合物可阻断 fXa 的巨分子结合能力，由此降低其促凝血活性同时保留活性位点的小分子结合能力。此外部位点靶向试剂包括（但不限于）靶向自活性位点去除的区的单克隆抗体（威尔肯斯 (Wilkins, M) 和克瑞斯内瓦米 (Krishnaswamy, S.)，生物化学杂志 (J. Bio. Chem.)，2002, 277(11), 9366-9374)、或 α -2-巨球蛋白。已知 α -2-巨球蛋白-丝氨酸蛋白酶复合物（例如与胰蛋白酶、凝血酶或 fXa）能够结合小分子底物（库若拉瓦 (Kurolwa, K.) 等人, 临床化学 (Clin. Chem.) 1989, 35(11), 2169-2172)。

[0179] 还知道，仅在重链中具有修饰而其轻链保持未变的活性 fXa 由于其干扰正常 fXa 的促凝血活性将作为凝血酶原酶的抑制剂（霍伦巴克 (Hollenbach, S.) 等人, 血栓形成和止血 (Thromb. Haemost.)，1994, 71(3), 357-62)，如图 6 中所示。因此，在一个实施例中，fXa 衍生物在轻链和重链二者中都具有修饰。已发现，这些修饰降低或消除促凝血活性和抗凝血活性二者，同时保留 fXa 衍生物的抑制剂结合活性。

[0180] 有若干方法可用于产生本文所述的 Gla- 结构域缺乏的 fXa 衍生物或其它 fXa 衍生物。例如，Gla- 结构域可通过糜蛋白酶切割完全去除，产生无 Gla 结构域的 fXa。另一选择为，无 Gla- 结构域的 fX 可通过糜蛋白酶切割天然 fX 来产生。然后，无 Gla 结构域的 fX 可通过 fX 活化剂转化成无 Gla 结构域的 fXa。fX 可自与欲治疗个体相同或不同的物种的血浆中分离。例如，牛科动物的 fX 已展示在人类血浆分析中起作用。fX 活化剂的实例包括（但不限于）蛇毒（例如罗塞尔 (Russell) 的蝰蛇毒）、和 fVIIa/组织因子或 fIXa/fVIIIa 的复合物。所述方法已为所属领域的技术人员所熟知。例如，鲁道夫 (Rudolph A. E.) 等人已报告从 Arg347 由谷氨酰胺单取代的重组因子 X (fX) (fXR347N) 产生的重组 fXa（生物化学 (Biochem.) 2000, 39(11) :2861-2867)。在一个实施例中，从非人类源产生的 fXa 衍生物是非免疫原性或实质上为非免疫原性。实例 7 还提供产生具有氨基酸序列 SEQ ID NO. 12 的重组解毒剂的方法。

[0181] 所述 fXa 衍生物也可从人类血浆经纯化，或可通过重组 DNA 方法产生，其中将 fXa 衍生物的适当基因表达于适宜宿主有机体中。重组 fXa 的表达和纯化已由许多群体报告，参见例如，拉森 (Larson, P. J.) 等人, 生物化学 (Biochem.)，1998, 37 :5029-5038 和卡米雷 (Camire, R. M.) 等人, 生物化学 (Biochem.)，2000, 39, 14322-14329 用于产生重组 fX；沃尔夫 (Wolf, D. L.) 等人, 生物化学杂志 (J. Bio. Chem.)，1991, 266(21) :3726-13730 用于产生重组 fXa。经修饰的 fXa 可根据这些程序使用具有编码期望 fXa 突变体的核苷酸序列的以

基因方式修饰的 cDNA 来制备。实例 6 给出具有作为解毒剂的功能活性的无 Gla 结构域的 fXa-S379 突变体的直接表达的更详细阐述。

[0182] 预计 Gla- 结构域缺乏的活性位点经突变或经修饰的 fXa (例如未羧化 fXa) 也可用作 fXa 抑制剂解毒剂。未羧化 fXa 可通过重组方式通过在蛋白质表达期间抑制维生素 K 衍生物 (微生物 K 衍生物是翻译后修饰以形成 Gla 残基所需的) 或通过在组织培养物中添加维生素 K 拮抗剂 (例如华法林) 来制备。脱羧 fXa 可通过加热 (巴贾吉 (Bajaj P.), 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.), 1982, 257(7) :3726-3731) 或通过糜蛋白酶的蛋白水解消化 (莫里塔 (Morita T.) 等人, 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.), 1986, 261(9) :4015-4023) 来制备。解毒剂也可在原核系统中随后活体外折叠或构造 fXa 抑制剂结合位点来生成。

[0183] 所述 Gla 残基也可以化学方式经修饰以去除造成钙离子依赖性膜结合的羧基。例如, Gla 残基上的羧基可在脱羧条件下选择性去除或可通过 (例如) 酯化或胺化遮蔽。期望所述酯化或胺化能抵抗活体内水解以便所述经修饰的 fXa 不易于转化成可造成血栓形成的活性 fXa。

[0184] fXa 的其它突变体或衍生物也可是本发明的有用解毒剂。在一个实施例中, 本发明涵盖彼得 (Peter J.)、拉森 (Larson) 等人, 生物化学 (Biochem.), 1998, 37 :5029-5038 中所阐述的突变体作为 fXa 抑制剂解毒剂的用途。

[0185] 在另一实施例中, 本发明涵盖催化非活性 fXa 突变体以制备 fXa 抑制剂解毒剂的用途。例如, 阐述于辛哈 (Sinha, U.) 等人, 蛋白质表达和纯化 (Protein Expression and Purif.), 1992, 3 :518-524 中的突变体 rXai、具有化学修饰的突变体 (例如脱氢丙氨酸 (酰 fXa)), 如野上 (Nogami) 等人, 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.) 1999, 274(43) :31000-7 中所阐述者。活性位点丝氨酸 (fX 编号中的 Ser379, 如 SEQ ID NO. 7 中所示, 且糜蛋白酶编号中的 Ser 195) 由丙氨酸 (fX 编号中的 fXa-S379A, 或糜蛋白酶编号中的 fXa-S195A) 替代的 fXa (其中促凝血活性被消除) 也可用作 fXa 抑制剂的解毒剂。本发明还设想活性位点丝氨酸残基不可逆地酰化但仍能够结合小分子抑制剂的 fXa 衍生物。活性位点丝氨酸可逆地酰化的 fXa 已由沃尔夫 (Wolf) 等人, 血液 (Blood), 1995, 86(11) :4153-7 报告。然而, 所述可逆的酰化能够时间依赖性的产生活性 fXa 且可导致活性 fXa 在一段时期内过量。去酰化速率可通过类似于那些在林 (Lin P.H.) 等人, 血栓研究 (Thrombosis Res), 1997, 88(4), 365-372 中所阐述的方法来降低。例如, Ser379 (糜蛋白酶编号中的 Ser 195) 由 4- 甲氧基苄基和 3- 溴 -4- 甲氧基苄基酰化的 fXa 分子当在 pH7.5 的缓冲液中于 37°C 下培养 4 小时时, 其初始活性恢复小于 50%。

[0186] 一个实施例涉及在习知对 fXa 与辅因子 fV/fVa 的相互作用很重要的 fXa 残基处突变的 fXa 衍生物的用途。所述残基包括 (但不限于) Arg306、Glu310、Arg347、Lys351、或 Lys414 (SEQ ID NO. 3 和 7, 这些氨基酸对应于糜蛋白酶编号中的 Arg125、Glu129、Arg165、Lys169、Lys230)。所述突变体的实例已报告于鲁道夫 (Rudolph, A.E.) 等人, 生物化学杂志 (J. Bio. Chem.), 2001, 276 :5123-5128 中。此外, 已知对 fVIII/fVIIIa 相互作用很重要的 fXa 残基 (例如 SEQ ID NO. 3 和 7 中的 Arg424 (糜蛋白酶编号中的 Arg240) 处的突变也可用作 fXa 抑制剂解毒剂。所述突变体的实例阐述于野上 (Nogami, K.) 等人, 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.), 2004, 279(32) :33104-33113 中。

[0187] fXa 的活性位点残基或已知对于丝氨酸蛋白酶相互作用重要的残基的其它修饰也

可获得本发明有用的解毒剂,例如,SEQ ID NO. 3 和 7 中的 Glu216、Glu218、和 Arg332(分别为糜蛋白酶编号中的 Glu37、Glu39、和 Arg150) 由其它氨基酸残基替代。

[0188] 在一个实施例中,如通过酰胺水解底物切割分析所评价,解毒剂的残余促凝血活性为人类血浆源性天然 fXa 的 < 1%、优选地 < 0.1%、更优选地 < 0.05%。例如,对于重组 fXa-S379A 当活性位点 Ser379(糜蛋白酶编号中的 S195) 由丙氨酸残基替代时有不可测量的促凝血活性,如通过凝血分析所测量。

[0189] 本发明进一步涉及用于上述 fXa 衍生物编码的核酸序列、具体来说 DNA 序列。这些序列可容易地通过根据遗传密码将多肽序列翻译回相应的 DNA 序列来确定。所用密码子优选为那些在所需宿主有机体中产生良好表达者。核酸序列可自天然 fXa 基因序列开始通过位点特异性诱变或者通过完整 DNA 合成来制备。

[0190] 本发明的多肽

[0191] 在某些方面中,本发明涉及包含氨基酸序列 SEQ ID NO. 12,13 或 15 的经分离多肽。本发明还涵盖与 SEQ ID NO. 12,13 或 15 具有至少 80%同源性的多肽。

[0192] 包含本发明氨基酸序列的多肽可通过在适当宿主细胞中表达编码多肽序列的多核苷酸来制备。此可通过所属领域的技术人员已知的重组 DNA 技术的方法来完成。因此,本发明还提供在真核或原核宿主细胞中以重组方式产生本发明多肽的方法。本发明的蛋白质和多肽还可通过化学合成使用市售自动肽合成器(例如由珀金埃尔默/应用生物系统公司(Perkin Elmer/Applied Biosystems, Inc.) 制造,430A 或 431A 型,美国加利福尼亚州福斯特城(Foster City, CA, USA)) 来获得。所合成蛋白质或多肽可经沉淀并(例如)通过高效液相色谱(HPLC)进一步纯化。因此,本发明还提供以化学方式合成本发明蛋白质的方法,其通过提供蛋白质的序列和试剂(例如氨基酸和酶)并将氨基酸以适当定向与线性序列连接在一起来实施。

[0193] 所属领域的技术人员已熟知,可对任何肽实施修饰以为其提供经改变的性质。本发明的多肽可经修饰以包括非天然氨基酸。因此,肽可包含 D-氨基酸、D-和 L-氨基酸的组合、和各种“设计者”氨基酸(例如,β-甲基氨基酸、C-α-甲基氨基酸和 N-α-甲基氨基酸等)以将特定性质传递给肽。此外,通过在特定偶合步骤中分配特定氨基酸,可生成具有 α-螺旋、β 转角、β 片层、α-转角的肽和环状肽。通常,据信 α-螺旋二级结构或随机二级结构是优选的。

[0194] 在另一实施例中,将选择赋予有用化学和结构性质的多肽亚单位。例如,包含 D-氨基酸的肽可对抗活体内的 L-氨基酸特异性蛋白酶。利用 D-氨基酸经修饰的化合物也可利用以相反顺序排列的氨基酸来合成以作为逆反肽产生本发明的 retro-inverso 肽。此外,本发明设想制备具有较好的经定义结构性质的肽、和模拟肽、和模拟肽键(例如酯键)用以制备具有新颖性质的肽的用途。在另一实施例中,可生成纳入经还原肽键(即, $R_1-CH_2NH-R_2$, 其中 R_1 和 R_2 为氨基酸残基或序列)的肽。经还原肽键可作为二肽亚单位引入。此一分子将抵抗肽键水解,例如,蛋白酶活性。所述分子将提供具有独特功能和活性的配体,例如由于抵抗代谢分解而延长的活体内半寿期、或蛋白酶活性。此外,已习知在某些系统中限制性肽(constrained peptide)展示增强的功能活性(赫鲁比(Hruby)(1982)生命科学(Life Sciences)31:189-199 和赫鲁比(Hruby)等人(1990)生物化学杂志(Biochem J.)268:249-262);本发明提供用以产生在所有其它位置处纳入随机序列的限制性肽的方

法。

[0195] 以下非典型氨基酸可纳入本发明的肽中以引入特定构象基序:1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸酯(卡则内斯科(Kazrnierski)等人(1991)美国化学会会志(J. Am. Chem. Soc.)113:2275-2283);(2S,3S)-甲基-苯基丙氨酸、(2S,3R)-甲基-苯基丙氨酸、(2R,3S)-甲基-苯基丙氨酸和(2R,3R)-甲基-苯基丙氨酸(卡则内斯科(Kazrnierski)和赫鲁比(Hruby)(1991)四面体通讯(Tetrahedron Lett.)32(41):5769-5772);2-氨基四氢萘-2-羧酸(兰迪斯(Landis)(1989)博士论文(Ph. D. Thesis),亚利桑那大学(University of Arizona));羟基-1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸酯(马亚科(Miyake)等人(1989)武田研究实验室杂志(J. Takeda Res. Labs.)43:53-76)组氨酸异喹啉羧酸(泽赫尔(Zechel)等人(1991)国际肽和蛋白质研究杂志(Int. J. Pep. Protein Res.)38(2):131-138);和HIC(组氨酸环脲)(达拉尼帕噶达(Dharanipragada)等人(1993)国际肽和蛋白质研究杂志(Int. J. Pep. Protein Res.)42(1):68-77)和(达拉尼帕噶达(Dharanipragada)等人(1992)结晶学报, C辑(Acta. Crystallogr. C.)48:1239-1241)。

[0196] 以下氨基酸类似物和模拟肽可纳入肽中以诱导或赋予特定二级结构:LL-Acp(LL-3-氨基-2-丙酮-6-羧酸)(LL-3-amino-2-propenidone-6-carboxylic acid): β -转角诱导二肽类似物(肯普(Kemp)等人(1985)有机化学杂志(J. Org. Chem.)50:5834-5838); β -片层诱导类似物(肯普(Kemp)等人(1988)四面体通讯(Tetrahedron Lett.)29:5081-5082); β -转角诱导类似物(肯普(Kemp)等人(1988)四面体通讯(Tetrahedron Lett.)29:5057-5060); α -螺旋诱导类似物(肯普(Kemp)等人(1988)四面体通讯(Tetrahedron Lett.)29:4935-4938); α -转角诱导类似物(肯普(Kemp)等人(1989)有机化学杂志(J. Org. Chem.)54:109:115);由以下参考文献提供的类似物:永井(Nagai)和佐藤(Sato)(1985)四面体通讯(Tetrahedron Lett.)26:647-650;和达门欧(DiMaio)等人.(1989)化学会志珀金翻译(J. Chem. Soc. Perkin Trans),第1687页;Gly-Ala 转角类似物(Kahn)等人(1989)四面体通讯(Tetrahedron Lett.)30:2317);酰胺键电子等排体(克劳斯(Clones)等人(1988)四面体通讯(Tetrahedron Lett.)29:3853-3856);四唑(泽波库克(Zabrocki)等人(1988)美国化学会会志(J. Am. Chem. Soc.)110:5875-5880);DTC(萨马宁(Samanen)等人(1990)国际蛋白质和肽研究杂志(Int. J. Protein Pep. Res.)35:501:509);和以下中教示的类似物:奥尔森(Olson)等人(1990)美国化学科学杂志(J. Am. Chem. Sci.)112:323-333和加维(Garvey)等人(1990)有机化学杂志(J. Org. Chem.)56:436。 β 转角和 β 凸起的构象限制模拟物、和其中所含有的肽阐述于1995年8月8日颁予卡恩(Kahn)的美国专利第5,440,013号中。

[0197] 所属领域的技术人员已习知,可通过将一个或一个以上的氨基酸用一个或一个以上的不会改变肽的生物功能的功能等效氨基酸取代来对任何肽进行修饰。在一个方面中,所述氨基酸经具有类似固有性质(包括但不限于疏水性、大小或电荷)的氨基酸取代。用于确定欲取代的适当氨基酸和用于取代的氨基酸的方法已为所属领域的技术人员习知。非限制性实例包括经验的取代模型,如由达霍夫(Dahoff)等人(1978)蛋白质序列和结构图册(In Atlas of Protein Sequence and Structure)第5卷,增补2(编辑达霍夫(M. O. Dayhoff)),第345-352页,国家生物医学研究基金会(National Biomedical Research Foundation),华盛顿特区(Washington DC)所阐述;包括达霍夫矩阵的PAM矩阵

(达霍夫 (Dahoff) 等人 (1978), 参考文献同上; 或 JTT 矩阵, 如由琼斯 (Jones) 等人 (1992) 生物科学计算机应用 (Comput. Appl. Biosci.) 8:275-282 和贡内特 (Gonnet) 等人 (1992) 科学 (Science) 256:1443-1145 所阐述; 由阿达池 (Adach) 和长谷川 (Hasegawa) (1996) 分子进化杂志 (J. Mol. Evol.) 42:459-468 所阐述的经验模型; 模块取代矩阵 (BLOSUM), 如由海内考夫 (Henikoff) 和海内考夫 (Henikoff) (1992) 美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 89:10915-10919 所阐述; 泊松模型 (Poisson model), 如由内 (Nei) (1987) 分子进化遗传 (Molecular Evolutionary Genetics.) 纽约哥伦比亚大学出版社 (Columbia University Press, New York) 所阐述; 和最大似然 (Maximum Likelihood) (ML) 方法, 如由穆勒 (Müller) 等人 (2002) 分子生物进化 (Mol. Biol. Evol.) 19:8-13 所阐述。

[0198] 多肽偶联物

[0199] 本发明的多肽和多肽复合物可用于各种调配物, 此刻根据期望用途而变。例如, 一种或一种以上可以共价或非共价方式连接 (复合) 至各种其它分子, 其性质可根据具体目的而有所变化。例如, 本发明的肽可以共价或非共价方式络合至巨分子载体, 所述巨分子载体包括 (但不限于) 天然和合成聚合物、蛋白质、多糖、多肽 (氨基酸)、聚乙烯醇、聚乙烯基吡咯烷酮和脂质。肽可偶联至脂肪酸用于引入脂质体中, 参见美国专利第 5, 837, 249 号。本发明的肽可以共价或非共价方式与固体载体复合, 各种固体载体已为此项技术习知并阐述于本文中。本发明的抗原肽表位可与抗原呈递基质 (例如 MHC 复合物) 在有或没有共刺激分子的情况下缔合。

[0200] 蛋白质载剂的实例包括 (但不限于) 超抗原、血清白蛋白、破伤风类毒素、卵清蛋白、甲状腺球蛋白、肌球蛋白、和免疫球蛋白。

[0201] 肽-蛋白质载体聚合物可使用传统的交联剂 (例如碳化二亚胺) 形成。碳化二亚胺的实例是 1-环己基-3-(2-吗啉基-(4-乙基) 碳化二亚胺 (CMC)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳化二亚胺 (EDC) 和 1-乙基-3-(4-氮鎓-44-二甲基戊基) 碳化二亚胺。

[0202] 其它适宜交联剂的实例是溴化氰、戊二醛和琥珀酸酐。通常, 可适于任何数量的双同官能团试剂, 其包括双同官能团醛、双同官能团环氧化物、双同官能团酰亚胺基酯、双同官能团 N-羟基琥珀酰亚胺酯、双同官能团马来酰亚胺、双同官能团烷基卤化物、双同官能团吡啶基二硫化物、双同官能团芳基卤化物、双同官能团肼、双同官能团二偶氮鎓衍生物和双同官能团光反应性化合物。还包括双异官能团化合物, 例如, 具有胺反应性基团和巯基反应性基团的化合物、具有胺反应性基团和光反应性基团的化合物和具有羰基反应性基团和巯基反应性基团的化合物。

[0203] 所述双同官能团交联剂的特定实例包括双官能 N-羟基琥珀酰亚胺酯, 二硫代双 (琥珀酰亚胺基丙酸酯)、二琥珀酰亚胺基辛二酸酯、和二琥珀酰亚胺基酒石酸酯; 双官能酰亚胺酯, 己二亚氨酸二甲酯、庚二亚氨酸二甲酯和辛二亚氨酸二甲酯; 双官能巯基反应性交联剂, 1,4-二-[3'-(2'-吡啶基二硫基) 丙酰胺基] 丁烷、双马来酰亚胺基己烷和双-N-马来酰亚胺基-1,8-辛烷; 双官能芳基卤化物, 1,5-二氟-2,4-二硝基苯和 4,4'-二氟-3,3'-二硝基苯基砒; 双官能光反应性试剂, 例如双-[b-(4-叠氮基水杨酰基酰胺基) 乙基] 二硫化物; 双官能醛, 甲醛、丙二醛、琥珀醛、戊二醛和己二醛; 双官能环氧化物, 例如 1,4-丁二醇二缩水甘油醚; 双官能肼, 己二酸二肼、碳酰肼和琥珀酸二肼; 双官能重氮盐, 邻邻甲苯胺、重氮化和双重氮化联苯胺; 双官能烷基卤化物, N1N' - 亚乙基 - 双

(碘乙酰胺)、N1N' - 六亚甲基 - 双(碘乙酰胺)、N1N' - 十一亚甲基 - 双(碘乙酰胺); 以及苄基卤化物和卤基氮芥, 分别如 1a' - 二碘 - 对 - 二甲苯磺酸和三(2-氯乙基)胺。

[0204] 可用于实施蛋白质至肽偶联的常用双异官能团交联剂的实例包括(但不限于) SMCC(琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯)、MBS(间-马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯)、SIAB(N-琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯)、SMPB(琥珀酰亚胺基-4-(对-马来酰亚胺基苯基)丁酸酯)、GMBS(N-(γ -马来酰亚胺基丁酰氧基)琥珀酰亚胺酯)、MPBH(4-(4-N-马来酰亚胺基苯基)丁酸肼)、M2C2H(4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧基-肼)、SMPT(琥珀酰亚胺基氧基羰基- α -甲基- α -(2-吡啶基二硫基)甲苯)、和 SPDP(N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯)。

[0205] 交联也可通过还原胺化将羰基偶合至胺基团至肼基团来完成。

[0206] 本发明的肽也可作为非共价连接的单体通过离子、吸附或生物特异性相互作用来调配。肽与高度带正电荷或带负电荷的分子的复合物可通过在低离子强度环境(例如于去离子水中)下形成盐桥来达成。大的复合物可使用诸如聚-(L-谷氨酸)或聚-(L-赖氨酸)(其分别含有许多负电荷和正电荷)等带电荷聚合物来形成。肽可吸附至表面(例如,微粒乳胶珠粒)或吸附至其它疏水聚合物,以形成有效模拟交联或化学聚合蛋白质的非共价连接的肽-超抗原复合物。最后,肽可通过使用其它分子间的生物特异性相互作用非共价连接。例如,利用生物素对蛋白质(例如抗生物素蛋白或链霉素或其衍生物)的强亲和力和卡用于形成肽复合物。这些生物素结合蛋白质含有四个结合位点,所述结合位点可与溶液中的生物素相互作用或共价附接至另一分子。(参见威尔柴可(Wilchek)(1988)生物化学年鉴(Anal. Biochem.) 171:1-32)。肽可使用常用生物素化试剂(例如D-生物素的N-羟基琥珀酰亚胺基酯(NHS-生物素),其与蛋白质上可用胺基团反应)进行修饰以具有生物素基团。然后,生物素化的肽可与抗生物素蛋白或链霉素一起培养以形成大的复合物。所述聚合物的分子质量可通过仔细控制生物素化的肽与抗生物素蛋白或链霉素的摩尔比例来调节。

[0207] 本申请案还提供本文所述偶联至标记(例如,荧光或生物发光标记)的肽和多肽用于诊断方法中。例如,以可检测方式标记的肽和多肽可结合至管柱并用于检测和纯化抗体。适宜荧光标记包括(但不限于)萤光素、若丹明(rhodamine)、四甲基若丹明、曙红、赤藓红、香豆素、甲基香豆素、花、孔雀绿、均二苯乙烯、荧光黄、瀑布蓝™、和德克萨斯红。其它适宜光学染料阐述于豪格兰(Haugland)、理查德(Richard P.)(1996)分子探针手册(Molecular Probes Handbook)中。

[0208] 本发明的多肽也可与不同液相载剂(例如无菌或水溶液、医药上可接受的载剂、悬浮液和乳液)组合。非水性溶剂的实例包括丙基乙二醇、聚乙二醇和植物油。当用于制备抗体时,载剂也可包括用于非特异性多大特定免疫反应的佐剂。所属领域的技术人员可容易地确定是否需要佐剂并选择一种佐剂。然而,仅出于阐释的目的,适宜佐剂包括(但不限于)弗罗因德氏(Freund)完全佐剂、弗罗因德氏不完全佐剂和无机盐。

[0209] 宿主细胞

[0210] 还提供包含本发明一种或一种以上的多肽的宿主细胞。在一个方面中,所述多肽经表达并呈递于细胞表面上(细胞外)。含有本发明多肽的适宜细胞包括原核和真核细胞,其包括(但不限于)细菌细胞、酵母细胞、昆虫细胞、动物细胞、哺乳动物细胞、鼠科

动物细胞、大鼠细胞、绵羊细胞、类人猿细胞和人类细胞。细菌细胞的实例包括大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、沙门氏菌 (*Salmonella enterica*) 和戈登链球菌 (*Streptococcus gordonii*)。所述细胞可自商业供应商购买,例如美国菌种保藏中心 (the American Type Culture Collection) (ATCC, 美国马里兰州洛克维尔 (Rockville Maryland), USA), 或使用此项技术已知的方法自分离物培养。适宜真核细胞的实例包括 (但不限于) 293THEK 细胞、以及仓鼠细胞系 CHO、BHK-21; 鼠科动物细胞系指定为 NIH3T3、NS0、C127、类人猿细胞系 COS、Vero; 和人类细胞系 HeLa、PER. C6 (自克鲁赛尔 (Cruce11) 购得) U-937 和 HepG2。昆虫细胞的非限制性实例包括草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*)。用于表达的酵母的实例包括 (但不限于) 酵母菌属 (*Saccharomyces*)、裂殖酵母属 (*Schizosaccharomyces*)、汉逊酵母属 (*Hansenula*)、假丝酵母属 (*Candida*)、球拟酵母属 (*Torulopsis*)、子囊菌酵母属 (*Yarrowia*)、或毕赤酵母属 (*Pichia*)。参见例如美国专利第 4,812,405 号;第 4,818,700 号;第 4,929,555 号;第 5,736,383 号;第 5,955,349 号;第 5,888,768 号和第 6,258,559 号。

[0211] 除物种特异性以外,细胞可为任何具体组织类型,例如神经元,或另一选择为成体或胚胎干细胞,例如可能或可能不分化成神经细胞的干细胞,例如,胚胎干细胞、脂肪干细胞、神经元干细胞和造血干细胞。所述干细胞可为人类或动物来源 (例如哺乳动物)。

[0212] 分离的多核苷酸和组合物

[0213] 本发明还提供以上所鉴别序列的互补多核苷酸或其补体。互补性可使用传统杂交在中等或高度严格的条件下确定。如本文所用,术语多核苷酸欲指 DNA 和 RNA 以及经修饰的核苷酸。例如,本发明还提供反义多核苷酸链,例如这些序列的反义 RNA 或其补体。

[0214] 还提供编码与本发明多肽和多肽复合物实质上同源且生物上等效的多肽的多核苷酸。实质上同源且生物上等效意指那些满足以下条件者:具有不同程度的同源性 (例如至少 65%、或另一选择至少 70%、或另一选择至少 75%、或另一选择至少 80%、或另一选择至少 85%、或另一选择至少 90%、或另一选择至少 95%、或另一选择至少 97% 同源,如上文所定义) 且编码对结合因子 Xa 抑制剂具有生物活性的多肽且不会组装成凝血酶原酶复合物 (如本文所述)。应了解,尽管未必明确陈述,但关于实质上同源多肽和多核苷酸的实施例意欲用于本发明的各个方面,例如,多肽、多核苷酸和抗体。

[0215] 本发明的多核苷酸可使用传统重组技术复制。另一选择为,多核苷酸可使用 PCR 技术复制。PCR 是美国专利第 4,683,195 号;第 4,800,159 号;第 4,754,065 号;和第 4,683,202 号的标的物且阐述于 PCR:聚合酶链反应 (PCR:The 聚合酶 Chain Reaction) (穆利斯 (Mullis) 等人编辑,伯克豪舍出版社 (Birkhauser Press), 波士顿 (Boston) (1994)) 和其中所引用参考文献中。再进一步,所属领域的技术人员可使用本文所提供的序列和市售 DNA 合成器来复制 DNA。因此,本发明还提供获得本发明多核苷酸的方法,其通过提供多核苷酸的线性序列、适宜引物分子、化学品 (例如酶) 和用于其复制的说明书并以化学方式复制或适当定向连接核苷酸以获得所述多核苷酸。在单独实施例中,这些多核苷酸进一步经分离。再进一步来说,所属领域的技术人员可将多核苷酸可操作地连接至调控序列用于其在宿主细胞中的表达。所述多核苷酸和调控序列插入宿主细胞 (原核或真核) 中用于复制和扩增。如此扩增的 DNA 可通过所属领域的技术人员习知的方法从细胞分离。本文进一步提供用于通过所述方法获得多核苷酸的方法以及如此获得的多核苷酸。

[0216] RNA 可通过首先将 DNA 多核苷酸插入适宜原核或真核宿主细胞中来获得。所述 DNA 可通过任何适当方法来插入,例如,通过使用适当基因递送媒介(例如,脂质体、质粒或载体)或通过电穿孔。当将细胞复制并将 DNA 转录成 RNA 时;然后可使用所属领域的技术人员习知的方法分离 RNA,例如,如阐述于萨姆布鲁克 (Sambrook) 和罗塞尔 (Russell) (2001) 参考文献同上中。例如,mRNA 可使用各种分解酶或化学溶液根据萨姆布鲁克 (Sambrook) 和罗塞尔 (Russell) (2001) 参考文献同上中所阐述的程序来分离或根据制造商提供的说明书通过核酸结合树脂来提取。

[0217] 在一个方面中, RNA 是短干扰 RNA, 其还称为 siRNA。制备和筛选 RNA 和针对阻断多核苷酸表达的能力进行选择的方法已为此项技术习知且其非限制性实例展示于下文中。本发明提供这些干扰 RNA。

[0218] siRNA 序列可通过以下来设计:获得靶 mRNA 序列并确定适当 siRNA 互补序列。本发明的 siRNA 经设计以与靶序列相互作用,此意味着其与所述序列充分杂交的靶序列互补。siRNA 与所述靶序列可 100% 一致。然而, siRNA 序列与靶序列的同源性可小于 100%, 只要 siRNA 可与靶序列杂交即可。因此,例如, siRNA 分子可与靶序列或靶序列的补体至少 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 一致。因此,也可使用相对于靶具有插入、缺失或单点突变的 siRNA 分子。建议对每个靶 mRNA 产生的许多不同 siRNA 序列针对最优靶序列进行筛选。应实施同源性搜索(例如 BLAST 搜索)以确保所述 siRNA 序列与任何已知哺乳动物基因不含有同源性。

[0219] 通常,优选地靶序列位于自靶 mRNA 的 AUG 起始密码子至少 100-200 个核苷酸处且距离终止密码子至少 50-100 个核苷酸(达克斯伯里 (Duxbury) (2004) 外科研究杂志 (J. Surgical Res.) 117:339-344)。

[0220] 研究者已确定,某些特征是选择性使其靶基因沉默的 siRNA 分子中所共有的(达克斯伯里 (Duxbury) (2004) 外科研究杂志 (J. Surgical Res.) 117:339-344; 牛耳地 (Ui-Tei) 等人 (2004) 核酸研究 (Nucl. Acids Res.) 32:936-48)。作为通用指南,在哺乳动物细胞基因沉默中包括一个或一个以上的以下条件的 siRNA 尤其有用:GC 比例在 45% 至 55% 之间,各段不超过 9 个 G/C 残基、G/C 在有义链的 5' 端;A/U 在反义链的 5' 端;和在反义链的 5' 末端的前 7 个碱基中有至少 5 个 A/U 残基。

[0221] 通常, siRNA 的长度为约 10 个至约 30 个核苷酸。例如, siRNA 可为 10-30 个核苷酸长、12-28 个核苷酸长、15-25 个核苷酸长、19-23 个核苷酸长、或 21-23 个核苷酸长。当 siRNA 含有两个不同长度的链时,较长的链指定所述 siRNA 的长度。在此情况下,较长链的未配对核苷酸将形成突出端。

[0222] 术语 siRNA 包括短发夹 RNA (shRNA)。shRNA 不含形成茎-环结构的单链 RNA,其中所述茎由互补链和构成双链 siRNA 的反义链组成,且所述环是不同大小的连接体。shRNA 的茎结构通常为约 10 个至约 30 个核苷酸长。例如,所述茎可为 10-30 个核苷酸长、12-28 个核苷酸长、15-25 个核苷酸长、19-23 个核苷酸长、或 21-23 个核苷酸长。

[0223] 用以帮助 siRNA 设计的工具可容易地公开获得。例如,基于计算机的 siRNA 设计可在因特网 www.dharmacon.com 处获得,最后一次登录是在 2007 年 11 月 26 日。

[0224] dsRNA 和 siRNA 的合成

[0225] dsRNA 和 siRNA 可以化学或酶方式在活体外合成,如米克若 (Micura) (2002) 应

用化学国际版 (Agnes Chem. Int. Ed. Emgl.) 41 :2265-2269 ;倍慈 (Betz) (2003) 普罗米加说明 (Promega Notes) 85 :15-18 ;和帕德森 (Paddison) 和汉农 (Hannon) (2002) 癌症细胞 (Cancer Cell). 2 :17-23 中所阐述。化学合成可通过手动或自动方法来实施,两种方法均为所属领域的技术人员所习知,如在米克若 (Micura) (2002), 参考文献同上中所阐述。siRNA 也可以 shRNA 形式内源性表达于细胞内部,如玉 (Yu) 等人 (2002) 美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 99 :6047-6052 ;麦克马纳斯 (McManus) 等人 (2002) RNA 8 :842-850 中所阐述。内源性表达已使用基于质粒的表达系统使用小核 RNA 启动子 (例如 RNA 聚合酶 III U6 或 H1、或 RNA 聚合酶 II U1) 来达成,如在布若莫坎普 (Brummelkamp) 等人 (2002) 科学 (Science) 296 :550-553 (2002) ;和诺瓦里诺 (Novarino) 等人 (2004) 神经科学杂志 (J. Neurosci.) 24 :5322-5330 中所述。

[0226] 活体外酶 dsRNA 和 siRNA 合成可使用 RNA 聚合酶介导的过程来实施以在递送至所选细胞之前产生活体外退火的个别正义链和反义链,如法耶 (Fire) 等人 (1998) 自然 (Nature) 391 :806-811 ;东泽 (Donze) 和皮卡德 (Picard) (2002) 核酸研究 (Nucl. Acids Res.) 30 (10) :e46 ;玉 (Yu) 等人 (2002) ;和施埃莫 (Shim) 等人 (2002) 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.) 277 :30413-30416 中所阐述。有许多制造商 (普罗米加 (Promega)、安彼讷 (Ambion), 新英格兰生物实验室 (New England Biolabs) 和斯隆珍 (Stragene)) 制造用于实施活体外合成的转录试剂盒。

[0227] siRNA 的活体外合成可 (例如) 通过使用一对在正义链和反义链 RNA 序列的上游含有 T7RNA 聚合酶启动子的短双工寡核苷酸作为 DNA 模板来实施。所述双工中的每一寡核苷酸是用于合成 siRNA 的一个链的单独模板。然后将所合成的单独短 RNA 链退火以形成 siRNA,如在方案和应用 (Protocols and Applications), 第 2 章 :RNA 干扰 (Chapter 2 :RNA interference), 普罗米加公司 (Promega Corporation), (2005) 中所阐述。

[0228] dsRNA 的活体外合成可通过 (例如) 使用在两个 DNA 靶序列链的 5' - 端的 T7RNA 聚合酶启动子来完成。此通过使用单独 DNA 模板来完成,每一个模板含有相对于 T7 启动子为不同定向的靶序列,其在两个单独反应中进行转录。将所得转录物混合并进行转录后退火。用于此反应中的 DNA 模板可通过使用两个线性化质粒模板来形成,每一模板在靶序列的不同端处含有 T7 聚合酶启动子。方案和应用 (Protocols and Applications), 第 2 章 :RNA 干扰 (Chapter 2 :RNA interference), 普罗米加公司 (Promega Corporation), (2005)。

[0229] 为表达本文所阐述的蛋白质,可通过若干种技术递送编码所关注基因的核酸序列的递送。所述技术包括病毒技术 (例如,逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺伴随病毒载体、甲病毒载体和诸如此类) 和非病毒技术 (例如, DNA/ 脂质体复合物、胶束和靶向病毒蛋白质-DNA 复合物), 如本文所述。一旦在所关注细胞的内部,则可在遍在启动子 (例如, EF-1 α) 或组织特异性启动子 (例如, 钙调蛋白激酶 2 (CaMKI) 启动子、NSE 启动子和人类 Thy-1 启动子) 的控制下进行转基因的表达。另一选择为,可通过使用诱导型启动子系统 (例如, Tet 启动 / 关闭启动子) 控制表达水平,如维泽诺威赤 (Wiznerowicz) 等人 (2005) 干细胞 (Stem Cells) 77 :8957-8961 中所述。

[0230] 启动子的非限制性实例包括 (但不限于) 巨细胞病毒 (CMV) 启动子 (坎普雷特 (Kaplitt) 等人 (1994) 自然遗传学 (Nat. Genet.) 8 :148-154)、CMV/ 人类 β 3- 球蛋白启动

子(曼德尔(Mandel)等人(1998)神经科学杂志(J.Neurosci.)18:4271-4284)、NCX1启动子、 α MHC启动子、MLC2v启动子、GFAP启动子(徐(Xu)等人(2001)基因理论(Gene Ther.), 8:1323-1332)、1.8-kb神经元特异性烯醇化酶(NSE)启动子(克莱因(Klein)等人(1998)实验神经学(Exp.Neurol.)150:183-194)、鸡 β 肌动蛋白(CBA)启动子(宫崎(Miyazaki)(1989)基因(Gene)79:269-277)和 β -葡糖苷酸酶(GUSB)启动子(西普利(Shiple)等人(1991)遗传学(Genetics)10:1009-1018)、人类血清白蛋白启动子、 α -1-抗胰蛋白酶启动子。为提高表达,可将其它调控元件额外可操作地连接至转基因,例如,土拨鼠肝炎病毒后调控元件(Woodchuck Hepatitis Virus Post-Regulatory Element)(WPRE)(戴鲁(Donello)等人(1998)病毒学杂志(J.Virol.)72:5085-5092)或牛科动物生长激素(BGH)多聚腺苷酸化位点。

[0231] 本文还提供多核苷酸探针或引物,其包含至少10个、或另一选择至少17个或另一选择至少20个、或另一选择至少50个、或另一选择至少75个编码SEQ ID NO:12至15或其补体的多核苷酸、或另一选择至少100个多核苷酸。适宜探针和引物阐述于同上参考文献中。此项技术中已知,特定杂交不需要“完全匹配的”探针。通过取代、缺失或插入少量碱基所达成的探针序列的微小改变并不影响杂交特异性。通常,可容许多达20%碱基对失配(当进行最佳比对时)。用于检测上述mRNA的探针与先前所鉴别序列(以上所鉴别)(其对应于先前所表征的本发明多核苷酸)中所含的相当大小的同源区具有至少约80%一致性。另一选择为,与同源区进行比对之后,探针与相应基因序列具有85%一致性;且再进一步,其展示90%一致性,或更进一步至少95%一致性。

[0232] 这些探针可用于放射性分析(例如,南方和北方印迹分析(Southern and Northern blot analysis))以检测或监测本发明多核苷酸或多肽的表达。探针也可附接至固体载体或阵列(例如芯片)用于高通量筛选分析来检测对应于本发明一种或一种以上的多核苷酸的基因的表达。

[0233] 本发明的多核苷酸和上述多核苷酸的片段也可作为引物用于检测表达于神经细胞中的基因或基因转录物以(例如)证实多核苷酸转导于宿主细胞中。在这方面,扩增是指使用能够以合理的保真度复制靶序列的引物依赖性聚合酶的任何方法。扩增可通过天然或重组DNA聚合酶(例如T7 DNA聚合酶)、大肠杆菌(E.coli)DNA聚合酶的克列诺(Klenow)片段、和逆转录酶进行。引物长度与以上针对探针所鉴定的长度一样。

[0234] 本发明进一步提供本发明可操作地连接至RNA转录的启动子、以及用于复制和/或暂时或稳定地表达DNA或RNA的其它调控序列的分离的多核苷酸。本文所用术语“可操作地连接”是指以启动子将直接转录RNA离开DNA分子的方式定位。所述启动子的实例是SP6、T4和T7。在某些实施例中,细胞特异性启动子用于细胞特异性表达所插入的多核苷酸。含有启动子或启动子/增强子、具有终止密码子和可选标志序列、以及可在其中将DNA的插入片段可操作地连接至所述启动子的克隆位点的载体已为此项技术习知且有市售。对于通用方法和克隆技术,参见基因表达技术(Gene Expression Technology)(高埃道(Goeddel)编辑,学术出版社公司(Academic Press, Inc.)(1991))和其中所引用的参考文献和载体:基本数据系列(Vectors:Essential Data Series)(加切沙(Gacasa)和拉姆吉(Ramji)编辑,威利父子(John Wiley & Sons),纽约(N.Y.)(1994)),其含有关于各种适宜载体的图谱、功能性质、商业供应商和GenEMBL登录号参考。优选的,这些载体能够在活体外或活体

内转录 RNA。

[0235] 使用含有这些核酸的表达载体用于以获得宿主载体系统来产生蛋白质和多肽。此暗示,这些表达载体必须在宿主有机体中作为附加体或作为染色体 DNA 的主要部分来复制。适宜表达载体包括质粒、病毒载体(包括腺病毒、腺伴随病毒、逆转录病毒、粘粒等)。腺病毒载体对于在活体内将基因引入组织中尤其有用,这是因为其在活体外和活体内二者中高表达水平和细胞的有效转化。当将核酸插入适宜宿主细胞(例如,原核或真核细胞)且宿主细胞进行复制时,可以重组方式产生蛋白质。适宜宿主细胞将取决于载体且可包括哺乳动物细胞、动物细胞、人类细胞、类人猿细胞、昆虫细胞、酵母细胞、和细菌细胞,如上文所述并使用习知方法构建。参见萨姆布鲁克(Sambrook)和罗塞尔(Russell)(2001),参考文献同上。除使用病毒载体用于将外源性核酸插入细胞中以外,可通过此项技术中习知的方法将核酸插入宿主细胞中,例如,对于细菌细胞进行转化;对于哺乳动物细胞,使用磷酸钙沉淀进行转染;DEAE-葡聚糖;电穿孔;或显微注射。对于此方法参见萨姆布鲁克(Sambrook)和罗塞尔(Russell)(2001),参考文献同上。

[0236] 本发明还提供适用于将本发明的多核苷酸递送至细胞中(无论是活体内、离体还是活体外)的递送媒介。本发明的多核苷酸可包含于基因递送媒介、克隆载体或表达载体中。这些载体(尤其表达载体)进而可经操纵以设想可(例如)促使递送至和/或进入细胞的许多形式中的任一者。

[0237] 这些含本发明的多核苷酸的经分离宿主细胞用于多核苷酸的重组复制且用于肽的重组产生且用于高通量筛选。

[0238] 本发明的多核苷酸可偶联至可检测标记或与诸如固体载剂或医药上可接受的载剂等载剂组合。适宜固体载剂阐述于上文中且同样也具有适宜标记。将标记附接至多核苷酸的方法已为所属领域的技术人员熟知。参见萨姆布鲁克(Sambrook)和罗塞尔(Russell)(2001),参考文献同上。

[0239] 治疗抗体组合物

[0240] 本发明还提供能够与本发明的蛋白质或多肽特异性形成复合物的抗体,其用于本发明的治疗方法中。术语“抗体”包括多克隆抗体和单克隆抗体、抗体片段、及其衍生物(上文中所阐述者)。所述抗体包括(但不限于)小鼠、大鼠和兔子或人类抗体。抗体可在细胞培养物、噬菌体、或各种动物中产生,其包括(但不限于)牛、兔子、山羊、小鼠、大鼠、仓鼠、天竺鼠、绵羊、狗、猫、猴子、黑猩猩、类人猿等。抗体还用于鉴别和纯化治疗多肽。

[0241] 本发明还提供包含上述抗体和特异性结合至所述抗体的多肽的抗体-肽复合物。在一个方面中,所述多肽是受到对抗可产生抗体的多肽。在一个方面中,抗体-肽复合物是分离的复合物。在再一方面中,所述复合物的抗体是(但不限于)多克隆抗体、单克隆抗体、人源化抗体或抗体衍生物,如本文所述。抗体-肽复合物的抗体和肽中的任一者或二者可以可检测方式标记。在一个方面中,本发明的抗体-肽复合物可在诊断或筛选分子中作为对照或参考样品。

[0242] 本发明的多克隆抗体可使用此项技术已熟知且文献中已充分阐述的传统技术来生成。存在许多用于产生多克隆抗体的方法。例如,多克隆抗体通常通过对适宜哺乳动物(例如但不限于鸡、山羊、天竺鼠、仓鼠、马、小鼠、大鼠和兔子)进行免疫来产生。将抗原注射于哺乳动物中,此诱使 B-淋巴细胞产生特异性针对所述抗原的 IgG 免疫球蛋白。纯化

来自哺乳动物血清的此 IgG。此方法的各种变化形式包括改变佐剂、投与途径和位点、每一位点的注射体积和每种动物位点的数量用于最优生产和动物的更人道对待。例如,通常使用佐剂以提高或增强对抗原的免疫反应。大多数佐剂提供注射位点抗原储积物,此允许抗原缓慢释放至引流淋巴结。其它佐剂包括提高蛋白质抗原分子在大表面积上的浓度的表面活性剂和免疫刺激分子。用于多克隆抗体生成的佐剂的非限制性实例包括弗罗因德氏(Freund)佐剂、瑞比(Ribi)佐剂系统和替特马斯(Titermax)。多克隆抗体可使用阐述于美国专利第 7,279,559 号;第 7,119,179 号;第 7,060,800 号;第 6,709,659 号;第 6,656,746 号;第 6,322,788 号;第 5,686,073 号;和第 5,670,153 号中的方法生成。

[0243] 本发明的单克隆抗体可使用此项技术已熟知且文献中已充分阐述的传统杂交瘤技术来生成。例如,杂交瘤是通过融合适宜永生细胞系(例如,骨髓瘤细胞系,例如但不限于 Sp2/0、Sp2/0-AG14、NS0、NS1、NS2、AE-1、L. 5、> 243、P3X63Ag8.653、Sp2 SA3、Sp2 MAI、Sp2 SS1、Sp2 SA5、U397、MLA 144、ACT IV、MOLT4、DA-1、JURKAT、WEHI、K-562、COS、RAJI、NIH 3T3、HL-60、MLA 144、NAMAIWA、NEURO 2A、CHO、PerC. 6、YB2/0)或诸如此类、或异源骨髓瘤、其融合产物、或源自其的任何细胞或融合细胞、或此项技术已熟知的任何其它适宜细胞系(参见例如, www.atcc.org、www.lifetech.com。(最后一次登录在 2007 年 11 月 26 日)、和诸如此类)与产生抗体的细胞(例如但不限于经分离或克隆的脾脏、外周血、淋巴、扁桃腺、或其它免疫或含 B 细胞的细胞)、或表达重链或轻链恒定区或可变区或框架或 CDR 序列(无论是作为内源性还是异源性核酸、是重组的还是内源性的、病毒、细菌、藻类、原核动物、两栖动物、昆虫、爬行动物、鱼类、哺乳动物、啮齿类动物、马科动物、羊、山羊、绵羊、灵长目动物、真核动物的单链、双链或三链、杂交基因组 DNA、cDNA、rDNA、线粒体 DNA 或 RNA、叶绿体 DNA 或 RNA、hnRNA、mRNA、tRNA、和诸如此类或其任何组合)的任何其它细胞而产生。产生抗体的细胞也可自己用所关注抗原免疫的人类或其它适宜动物的外周血、或优选地脾脏或淋巴节获得。任何其它适宜宿主细胞也可用于表达编码本发明抗体、其特定片段或变体的异源性或内源性核酸。经融合细胞(杂交瘤)或重组细胞可使用选择性培养条件或其它适宜已知方法来分离,并通过有限稀释或细胞分选或其它已知方法来克隆。

[0244] 在一个实施例中,本文所述的抗体可使用多抗原肽(MAP)系统来生成。所述 MAP 系统利用有三个或七个放射状支化赖氨酸残基的肽基核心,其上可使用标准固相化学建立所关注的抗原。所述赖氨酸核心产生具有约 4 至 8 个肽表位拷贝的 MAP,此取决于通常占总分子量的小于 10%的内部核心。所述 MAP 系统不需要载体蛋白用于偶联。MAP 中抗原表位多个拷贝的高摩尔比和致密堆积已展示产生强烈的免疫原性反应。此方法阐述于美国专利第 5,229,490 号中且此专利其整体以引用方式并入本文中。

[0245] 可使用产生或分离具有必需特异性的抗体的其它适宜方法,其包括(但不限于)使用此项技术中已知的方法自肽或蛋白质文库(例如但不限于噬菌体、核糖体、寡核苷酸、RNA、cDNA、或诸如此类)、展示文库(例如,自各个商业供应商购得者,例如剑桥抗体技术(Cambridge Antibody Technologies)(英国剑桥(Cambridgeshire, UK))、莫弗西斯(MorphoSys)(德尔马丁斯瑞德/普拉内格(Martinsreid/Planegg, De1))、巴尔威申(Biovation)(英国苏格兰阿伯丁(Aberdeen, Scotland, UK))、巴沃温特(BioInvent)(瑞士隆德(Lund, Sweden))选择重组抗体的方法。参见美国专利第 4,704,692 号;第 5,723,323 号;第 5,763,192 号;第 5,814,476 号;第 5,817,483 号;第 5,824,514 号;第

5, 976, 862 号。替代方法依赖于转基因动物的免疫（例如，SCID 小鼠，缪格曼 (Nguyen) 等人 (1977) 微生物免疫学 (Microbiol. Immunol.) 41 :901-907 (1997) ;格桑德 (Sandhu) 等人 (1996) 生物技术评论 (Crit. Rev. Biotechnol.) 16 :95-118 ;尔恩 (Eren) 等人 (1998) 免疫学 (Immunol.) 93 :154-161), 其能够产生人类抗体的谱型, 如此行技术所知和 / 或如本文所阐述。所述技术包括 (但不限于) 核糖体展示 (黑恩斯 (Hanes) 等人 (1997) 美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 94 :4937-4942 ;黑恩斯 (Hanes) 等人 (1998) 美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 95 :14130-14135) ;单细胞抗体产生技术 (例如, 选定淋巴细胞抗体方法 (“SLAM”) (美国专利第 5, 627, 052 号, 文 (Wen) 等人 (1987) 免疫学杂志 (J. Immunol.) 17 :887-892 ;巴博库 (Babcock) 等人, 美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) (1996) 93 :7843-7848) ;凝胶微滴和流动细胞术 (鲍威尔 (Powell) 等人 (1990) 生物技术 (Biotechnol.) 8 :333-337 ;一个细胞系统 (One Cell Systems) (马萨诸塞州剑桥 (Cambridge, Mass)) ;格雷 (Gray) 等人 (1995) J. Imm. Meth. 182 :155-163 ;和 Kenny 等人 (1995) 生物技术 (Bio. Technol.) 13 :787-790) ;B- 细胞选择 (思迪恩巴克 (Steenbakkers) 等人 (1994) 分子生物报告 (Molec. Biol. Reports) 19 :125-134。

[0246] 本发明的抗体衍生物可通过将编码本发明抗体的多核苷酸递送至适宜宿主 (例如, 用以提供在乳液中产生所述抗体的转基因动物或哺乳动物, 例如山羊、牛、马、绵羊和诸如此类) 来制备。这些方法已为此项技术习知且阐述于例如美国专利第 5, 827, 690 号 ;第 5, 849, 992 号 ;第 4, 873, 316 号 ;第 5, 849, 992 号 ;第 5, 994, 616 号 ;第 5, 565, 362 号 ;和第 5, 304, 489 号中。

[0247] 术语“抗体衍生物”包括对抗体或片段的线性多肽序列的翻译后修饰。例如, 美国专利第 6, 602, 684B1 号阐述生成抗体 (其包括整个抗体分子、抗体片段、或包括与免疫球蛋白的 Fc 区等效的区的融合蛋白质且具有经增强 Fc 介导的细胞毒性) 经修饰的二醇形式的方法和如此生成的糖蛋白。

[0248] 抗体衍生物也可通过递送本发明的多核苷酸以提供转基因植物和经培养植物细胞 (例如但不限于烟草、玉米和浮萍) 来制备, 在植物部分或自其培养的细胞中产生所述抗体、特定部分或变体。举例而言, 克雷默 (Cramer) 等人 (1999) 微生物学与免疫学的当前课题 (Curr. Top. Microbol. Immunol.) 240 :95-118 和其中所引用的参考文献阐述例如使用诱导型启动子产生表达大量重组蛋白质的转基因烟草叶。转基因玉米已用于在商业生产水平表达哺乳动物蛋白质, 其中生物活性等效于那些在其它重组系统所产生或自天然源纯化所得的生物活性。参见例如胡德 (Hood) 等人 (1999) 实验医学与生物学进展 (Adv. Exp. Med. Biol.) 464 :127-147 和其中所引用的参考文献。抗体衍生物也可自包括诸如单链抗体 (scFv) 等抗体片段的转基因植物种子 (包括烟草种子和洋芋) 大量产生。参见例如, 康拉德 (Conrad) 等人 (1998) 植物分子生物学 (Plant Mol. Biol.) 38 :101-109 和其中所引用的参考文献。因此, 本发明的抗体也可使用转基因植物根据已知方法来制备。

[0249] 抗体衍生物还可通过 (例如) 添加外源性序列以修饰免疫原性或降低、增强或修饰结合、亲和力 (affinity)、结合速率、解离速率、亲和性 (avidity)、特异性、半寿期或任何其它适宜特性。通常, 维持非人类或人类 CDR 序列的一部分或全部, 而可变区和恒定区的非人类序列由人类或其它氨基酸替代。

[0250] 通常, CDR 残基直接参与对抗原结合的影响且影响实质上最大。本发明抗体的人类

化或基因工程化可使用任何已知方法来实施,例如但不限于那些阐述于以下中者:美国专利第5,723,323号;第5,976,862号;第5,824,514号;第5,817,483号;第5,814,476号;第5,763,192号;第5,723,323号;第5,766,886号;第5,714,352号;第6,204,023号;第6,180,370号;第5,693,762号;第5,530,101号;第5,585,089号;第5,225,539号;和第4,816,567号。

[0251] 用于制备部分至完全人类抗体的技术已为此项技术习知且可使用任何所述技术。根据一个实施例,完全人类抗体序列是在已经基因工程化以表达人类重链和轻链抗体基因的转基因小鼠中制得。已经制得可产生不同类型抗体的所述转基因小鼠的多菌株。正产生合意抗体的转基因小鼠的B细胞可经融合以获得用于连续产生期望抗体的杂交瘤细胞系。(参见例如拉塞(Russel)等人,(2000)感染与免疫(Infection and Immunity)2000年4月:1820-1826;盖洛(Gallo)等人(2000)欧洲免疫学杂志(European J. of Immun.)30:534-540;格林(Green)(1999)免疫方法杂志(J. of Immun. Methods)231:11-23;杨(Yang)等人(1999A)白细胞生物学杂志(J. of Leukocyte Biology)66:401-410;杨(Yang)(1999B)癌症研究(Cancer Research)59(6):1236-1243;杰克保威茨(Jakobovits).(1998)先进药物输送评论(Advanced Drug Delivery Reviews)31:33-42;格林(Green)和杰克保威茨(Jakobovits)(1998)实验医学杂志(J. Exp. Med.)188(3):483-495;杰克保威茨(Jakobovits)(1998)研发中药物的实验评述(Exp. Opin. Invest. Drugs)7(4):607-614;津田(Tsuda)等人(1997)基因组学(Genomics)42:413-421;谢尔曼金-戈尔德(Sherman-Gold)(1997)基因工程新闻(Genetic Engineering News)17(14);门德斯(Mendez)等人(1997)自然遗传学(Nature Genetics)15:146-156;杰克保威茨(Jakobovits)(1996)威尔的实验免疫学手册,综合免疫系统(Weir's Handbook of Experimental Immunology, The Integrated Immune System)第IV卷,194.1-194.7;杰克保威茨(Jakobovits)(1995)生物技术近期评述(Current Opinion in Biotechnology)6:561-566;门德斯(Mendez)等人(1995)遗传学(Genomics)26:294-307;杰克保威茨(Jakobovits)(1994)现代生物学(Current Biology)4(8):761-763;阿保尼斯(Arbones)等人(1994)免疫(Immunity)1(4):247-260;杰克保威茨(Jakobovits)(1993)自然(Nature)362(6417):255-258;杰克保威茨(Jakobovits)等人(1993)美国国家科学院院刊(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)90(6):2551-2555;和美国专利第6,075,181号。)

[0252] 本发明的抗体也可经修饰以形成嵌合抗体。嵌合抗体是那些抗体的重链和轻链的各个结构域由来自超过一种的物种的DNA编码的抗体。参见例如美国专利第4,816,567号。

[0253] 另一选择为,本发明的抗体也可经修饰以形成覆盖抗体。覆盖抗体是那些其中一种物种的抗体的外部氨基酸残基慎重地由第二种物种抗体的外部氨基酸残基替代或“覆盖”的抗体以便所述第一物种的抗体在第二种物种中将不会有免疫原性,由此降低抗体的免疫原性。由于蛋白质的抗原性主要取决于其表面的性质,所以抗体的免疫原性将通过替代不同于在另一种哺乳动物物种抗体中所发现的残基的暴露残基而降低。外部残基的此慎重替代对内部结构域或对结构域间接触将具有较少或没有影响。因此,配体结合性质将由变化限于可变区框架残基而无影响。由于仅改变抗体的外表面或外皮而支撑残基保持未变,故此过程称为“覆盖”。

[0254] “覆盖”的程序利用人类抗体可变结构域的可用序列数据,所述序列数据由卡

巴特 (Kabat) 等人 (1987) 免疫学所关注蛋白质的序列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest), 第 4 版, 马里兰州贝塞斯达 (Bethesda, Md.), 美国国家卫生研究院 (National Institutes of Health) 编制, 更新到此数据库、和其它可访问的美国和其它国家的数据库 (核酸和蛋白质二者)。用于生成覆盖抗体的方法的非限制性实例包括 EP 519596; 美国专利第 6, 797, 492 号; 和帕德兰 (Padlan) 等人 (1991) 分子免疫学 (Mol. Immunol.) 28(4-5): 489-498)。

[0255] 术语“抗体衍生物”还包括具有 2 个抗原结合位点的小抗体片段的“双特异性抗体”, 其中片段包含在同一多肽链中与轻链可变结构域 (VL) 连接的重链可变结构域 (VH)。(参见例如 EP 404, 097; WO 93/11161; 和霍林格 (Hollinger) 等人 (1993) 美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 90: 6444-6448)。通过使用太短而无法使同一链上两个结构域配对的连接体, 所述结构域被迫与另一链上的互补结构域配对并形成两个抗原结合位点。(也参见颁予陈 (Chen) 等人的美国专利第 6, 632, 926 号, 所述专利揭示抗体变体, 其具有一个或一个以上的插入亲代抗体的超变区中的氨基酸且对靶抗原的结合亲和力比亲代抗体对抗原的结合亲和力强至少约 2 倍。)

[0256] 术语“抗体衍生物”进一步包括“线性抗体”。制作线性抗体的程序此项技术已熟知且阐述于泽帕德 (Zapata) 等人 (1995) 蛋白质工程 (Protein Eng.) 8(10): 1057-1062 中。简言之, 这些抗体包含一对串联 Fd 区段 ($V_H-C_H1-VH-C_H1$), 其形成一对抗原结合区。线性抗体可具有双特异性或单特异性。

[0257] 本发明的抗体可通过已知方法自重组细胞培养物回收并纯化, 其包括 (但不限于) 蛋白质 A 纯化、硫酸铵或乙醇沉淀、酸萃取、阴离子或阳离子交换色谱、磷酸纤维素色谱、疏水相互作用色谱、亲和色谱、羟基磷灰石色谱和凝集素色谱。高效液相色谱 (“HPLC”) 可也用于纯化。

[0258] 本发明的抗体包括天然纯化的产物、化学合成程序的产物和通过重组技术从真核宿主 (例如, 酵母、高级植物、昆虫和哺乳动物细胞) 或另一选择从原核细胞产生的产物, 如上文所述。

[0259] 若所测试单克隆抗体与蛋白质或多肽结合, 则所测试抗体与由本发明的杂交瘤所提供的抗体等效。还可在无需过多试验的情况下通过确定所测试抗体是否阻止本发明的单克隆抗体结合通常与单克隆抗体反应的蛋白质或多肽来确定抗体是否具有与本发明的单克隆抗体相同的特异性。如果所测试抗体与本发明的单克隆抗体竞争 (如通过本发明单克隆抗体的结合减少所展示), 则很可能两个抗体结合至相同或密切相关的表位。另一选择为, 本发明的单克隆抗体可与通常与其反应的蛋白质一起预先培育, 并确定所测试单克隆抗体其结合抗体的能力是否受到抑制。如果所测试单克隆抗体受到抑制, 则其很可能具有与本发明的单克隆抗体相同或密切相关的表位特异性。

[0260] 术语“抗体”还意欲包括抗体的所有同种型。单克隆抗体的特定同种型可直接通过自初始融合开始进行选择来制备, 或其次自分泌不同同种型的单克隆抗体的亲代杂交瘤开始通过血缘选择技术来制备以使用阐述于以下中的程序分离类型转换变体: 斯德普乐思科 (Steplewski) 等人 (1985) 美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 82: 8653; 或皮拉 (Spira) 等人 (1984) 免疫方法杂志 (J. Immunol. Methods) 74: 307。

[0261] 分泌具有本发明单克隆抗体的特异性的单克隆抗体的其它杂交瘤的分离也可由

所属领域的技术人员通过产生抗个体基因型抗体来完成。赫里恩 (Herlyn) 等人 (1986) 科学 (Science) 232:100。抗个体基因型抗体是一种识别由所关注杂交瘤产生的单克隆抗体上存在的独特决定子的抗体。

[0262] 两个杂交瘤的单克隆抗体之间的个体基因型一致性表明所述两个单克隆抗体就其相同抗原决定部位决定子的识别来说相同。因此,通过使用针对单克隆抗体上的抗原决定部位决定子的抗体,可能鉴别出表达具有相同抗原决定部位特异性的单克隆抗体的其它杂交瘤。

[0263] 还可使用抗个体基因型技术来产生模拟表位的单克隆抗体。例如,针对第一单克隆抗体所制得的抗个体基因型单克隆抗体将在超变区中具有结合结构域,所述结合结构域是通过第一单克隆抗体结合的表位的镜像。因此,在这种情况下,抗个体基因型单克隆抗体可用于免疫来产生这些抗体。

[0264] 在本发明的一些方面中,以可检测方式或治疗方式标记抗体将有用。适宜标记阐述于以上参考文献中。将抗体偶联至这些试剂的方法已为此项技术得知。仅出于阐释的目的,抗体可经可检测部分(例如放射性原子、发色团、荧光基团或诸如此类)标记。所述经标记抗体可在活体内或在经分离测试样品中用于诊断技术。

[0265] 将抗体偶合至低分子量半抗原可增加抗体在分析中的敏感性。然后,半抗原可通过第二反应特异性检测。例如,通常使用可与特异性抗半抗原抗体反应的半抗原,例如与抗生物素蛋白反应的生物素、或二硝基苯酚、吡哆醛和萤光素。参见哈洛 (Harlow) 和莱恩 (Lane) (1988) 参考文献同上。

[0266] 抗体可经可检测部分(例如放射性原子、发色团、荧光基团或诸如此类)标记。所述经标记抗体可在活体内或在经分离测试样品中用于诊断技术。抗体还可(例如)偶联至医药试剂(例如化学治疗药物或毒素)。其可连接至细胞因子、配体、另一抗体。适用于偶联至抗体以达成抗肿瘤作用的试剂包括细胞因子,例如白介素 2 (IL-2) 和肿瘤坏死因子 (TNF); 光敏剂,其用于光动力疗法,其包括四磺酸基酞菁铝 (III)、血卟啉、和酞菁;放射性核素,例如碘-131 (^{131}I)、钇-90 (^{90}Y)、铋-212 (^{212}Bi)、铋-213 (^{213}Bi)、锝-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)、铼-186 (^{186}Re)、和铼-188 (^{188}Re); 抗生素,例如多柔比星 (doxorubicin)、亚德里亚霉素 (adriamycin)、柔红霉素 (daunorubicin)、甲氨蝶呤、道诺霉素 (daunomycin)、新制癌菌素 (neocarzinostatin)、和卡铂 (carboplatin); 细菌、植物、和其它毒素,例如白喉毒素、假单胞菌外毒素 A、葡萄球菌肠毒素 A、相思豆毒蛋白-A 毒素、蓖麻毒素 A (去糖基化蓖麻毒素 A 和原生蓖麻毒素 A)、TGF- α 毒素、来自中华眼镜蛇 (Chinese cobra) (眼镜蛇 (naja naja atra)) 的细胞毒素、和白树毒素 (植物毒素); 来自植物、细菌和真菌的核糖体失活蛋白,例如局限曲菌素 (由局限曲霉 (*Aspergillus restrictus*) 产生的核糖体失活蛋白)、皂草素 (由石碱草 (*Saponaria officinalis*) 产生的核糖体失活蛋白)、和 RNase; 酪氨酸激酶抑制剂; 1y207702 (二氟化嘌呤核苷); 含有反囊性剂 (anti cystic agent) 的脂质体 (例如,反义寡核苷酸、编码毒素的质粒、甲氨蝶呤等); 和其它抗体或抗体片段,例如 F(ab)。

[0267] 本发明的抗体也可结合至许多不同载剂。因此,本发明还提供含所述抗体和另一种活性或惰性物质的组合物。习知载剂的实例包括玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、葡聚糖、尼龙、淀粉酶、天然和经修饰的纤维素、聚丙烯酰胺、琼脂糖和磁铁矿。载剂的性质出于本发明的目的可为溶解或不溶解。所属领域的技术人员应习知用于结合单克隆抗体的其它

适宜载剂,或应能够使用常规试验确定所述载剂。

[0268] IV. 疗法

[0269] 本发明涉及阻止或降低正经历抗凝血疗法的个体出血的治疗方法。预计本发明的解毒剂或衍生物可为在非急需或急诊情况中使用的短期药物,其可安全并特异性地中和 fXa 抑制剂的常规抗凝血性质而不会造成有害的血液动力学副作用或加重对损害的增殖血管反应。

[0270] 在一个实施例中,治疗有效量的解毒剂展示高治疗指数。治疗指数是毒性和治疗效果之间的剂量比,其可表示为 LD₅₀ 与 ED₅₀ 之间的比率。LD₅₀ 是对于 50% 的群体是致命的剂量且 ED₅₀ 是在 50% 群体中治疗有效的剂量。LD₅₀ 和 ED₅₀ 是通过标准制药程序在动物细胞培养物或实验动物中确定。本发明的解毒剂或衍生物可视需要投与一次或若干次以中和个体的血浆中所存在的 fXa 抑制剂的作用。优选地,本发明的解毒剂当以单剂量投与时即足够。

[0271] 预计本发明解毒剂的典型剂量将取决于实际临床环境和血浆中的抑制剂浓度。在活体外分析(例如凝血酶生成)、临床凝血分析(例如 aPTT、PT 和 ACT)中,期望治疗有效量的解毒剂以产生离体凝血活性的 10% 或更高的校正。活体外分析表明,解毒剂/抑制剂比 > 1.0 将展示逆转作用。预期解毒剂的最大血浆浓度在微摩尔范围内、优选地在 10 微摩尔或更低之间。

[0272] 在临床环境中,确定解毒剂有效性的一个准则是其产生出血的实际测量的任何变化。在临床实验中,重大出血的类别包括致命性失血、重要器官出血(颅内、眼内、腹膜后、脊柱、心包)、需要再次手术或新的治疗程序的任何出血(例如,手术膝盖的抽吸、针对胸腔积血的开胸管插入、内窥镜下电凝等)或出血指数 ≥ 2.0,如果其伴有明显出血。出血指数定义为所输入红细胞或全血体积的单位数量加上出血发作之前的血红蛋白值减去出血稳定之后的血红蛋白值(以克/分升计)。

[0273] 在临床环境中用于解毒剂效能的另一准则是其降低临床明显非重大出血。失血的类型包括非重大但超过平常且值得临床注意的出血,其持续性或复发性且大量或在无干预的情况下将不会停止的鼻出血;不会上升到需要治疗程序的水平的直肠或泌尿道出血(例如,新插入弗利氏导尿管(Foley catheter)或膀胱镜检查)、注射位点或其它地方自发性的或出现轻微创伤的大量血液流失;大量血液流失;需要非计划性输血的出血。如本文所用,“大量血液流失”是指血液流失的量超过通常与外科手术相关的量。大量血液流失会导致肿胀,但由于其达不到引流的要求,因而进行保守管控。

[0274] 在一个实施例中,本发明的衍生物具有足够血浆循环半寿期用于实质上中和血浆中存在的 fXa 抑制剂。活化 fXa 在人类中基本上没有循环半寿期,这是因为其有效被 ATIII、TFPI 和其它血浆抑制剂抑制(福克斯(Fuchs, H. E.)和皮佐(Pizzo, S. V.),临床研究杂志(J. Clin. Invest.), 1983, 72: 2041-2049)。非活性 fXa 已展示在人类中具有 2-3 个小时的循环半寿期。在狒狒模型中,活性位点被 DEGR([5-(二甲基氨基)-1-萘磺酰基]-谷氨酰基甘氨酸基精氨酸基氯甲基酮)阻断的 fXa 的半寿期为约 10 小时或 2 小时,如分别通过同位素或酶连接的免疫吸附分析所确定(泰勒(Taylor, F. B.)等人,血液(Blood), 1991, 78(2): 364-368)。

[0275] 其可期望的将解毒剂 fXa 衍生物的半寿期延长至 24-48 小时。预计偶联或添加一

个或一个以上的以下部分将增加解毒剂的血浆半寿期：

[0276] a) 聚乙二醇；

[0277] b) 酰基；

[0278] c) 脂质体和囊封剂；

[0279] d) 载剂蛋白；

[0280] e) 人工磷脂膜；

[0281] f) 免疫球蛋白；和

[0282] g) 纳米粒子。

[0283] 偶联位点可不限于特定链或残基，只要所述偶联不遮蔽解毒剂的抑制剂结合位点即可。本文所述的解毒剂可与以上所述的任一种或多于一种的化合物组合投与。

[0284] 通常，所投与抗体具有远比循环血液凝固蛋白长的半寿期。可使用由 Gla- 结构域缺乏的 fXa 和作为解毒剂结合至 fXa 的外部位点且具有延长的循环半寿期的抗体组成的复合物。fXa 与靶向外部位点的抗体之间形成复合物可降低 Gla- 结构域缺乏的 fXa 与巨分子底物和抑制剂（例如凝血酶原和抗凝血酶 III）的相互作用，同时保留未扰动的活性位点裂缝，以便复合物可作为解毒剂结合活性位点定向小分子抑制剂。形成的 α -2- 巨球蛋白-fXa 复合物也可有用的作为 fXa 小分子抑制剂的解毒剂。

[0285] 解毒剂在逆转 fXa 抑制剂的抗凝血活性的效能以及促凝血活性可通过活体外分析和动物模型由所属领域的技术人员确定。活体外分析的实例是凝血酶生成、临床凝血分析（例如 aPTT、PT 和 ACT）。本发明的解毒剂预期能够产生离体凝血活性的 10% 或更高的校正。可在（例如）啮齿类动物（例如小鼠、狗）和灵长目动物（例如猴子）中使用出血时间和 / 或血液流失的若干活体内动物模型来测量效能。

[0286] V. 医药组合物

[0287] 本发明进一步提供包含 fXa 衍生物和医药上可接受的载剂的组合物。

[0288] “医药上可接受的载剂”是指可用于本发明组合物中的任何稀释剂、赋形剂或载剂。医药上可接受的载剂包括离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白质（例如人类血清白蛋白）、缓冲物质（例如磷酸盐）、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的偏甘油酯混合物、水、盐或电解质（例如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐）、胶体二氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯基吡咯烷酮、基于纤维素的物质、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸酯、蜡、聚乙烯-聚氧丙烯-嵌段共聚物、聚乙二醇和羊毛脂。适宜医药载剂阐述于雷明顿的医药科学 (Remington's Pharmaceutical Sciences), 麦克出版公司 (Mack Publishing Company), 此领域的一本标准参考文本。其优选地针对所打算投与的形式（即，口服片剂、胶囊、酞剂、糖浆和诸如此类）、并与传统医药实践一致来选择。

[0289] 本发明的医药组合物可通过此项技术已习知的方法来制造，尤其如传统的造粒、混合、溶解、囊封、冷冻干燥或乳化过程。组合物可制成各种形式，其包括颗粒、微粒或粒子、粉末（包括冷冻干燥、旋转干燥或喷雾干燥的粉末、无定形粉末）、注射液、乳液、酞剂、悬浮液或溶液。调配物可任选地含有稳定剂、pH 调节剂、表面活性剂、生物可用性调节剂和这些的组合。

[0290] 医药调配物可使用无菌液体（例如油、水、醇和其组合）制成液体悬浮液或溶液。可添加医药上适宜的表面活性剂、悬浮剂或乳化剂用于经口或非经肠投与。悬浮液可包括

油,例如花生油、芝麻油、棉籽油、玉米油和橄榄油。悬浮液制剂还可含有脂肪酸的酯,例如油酸乙酯、肉豆蔻酸异丙酯、脂肪酸甘油酯和乙酰化脂肪酸甘油酯。悬浮液调配物可包括醇,例如乙醇、异丙醇、十六醇、甘油和丙二醇。悬浮液调配物中也可使用醚(例如聚(乙二醇)、石油烃(例如矿物油和石油)和水。

[0291] 本发明的组合物可经调配用于医药投与哺乳动物、优选地人类。本发明的所述医药组合物可以各种方式、优选地非经肠投与。

[0292] 为了在紧急情况中迅速逆转患者血浆中所存在 fXa 抑制剂的抗凝血活性,预计本发明的解毒剂可以或可能通过非经肠投与方式投与至体循环。本文所用术语“非经肠”包括皮下、静脉内、肌内、关节内、滑膜内、胸骨内、鞘内、肝内、病灶内、和颅内注射或输注技术。然而,在所中和的 fXa 抑制剂具有长血浆半寿期的情况下,可能需要连续输注或持续释放调配物以结合至 fXa 抑制剂且由此在 fXa 抑制剂自身体清除之前释放出活性 fXa。

[0293] 本发明组合物的无菌可注射形式可为水性或油性悬浮液。这些悬浮液可根据业内已知技术使用适宜分散剂或润湿剂和悬浮剂来调配。无菌可注射制剂也可为存于无毒非经肠可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液或悬浮液,例如,于 1,3-丁二醇中的溶液。可采用的可接受媒剂和溶剂包括水、林格氏(Ringer)溶液和等渗氯化钠溶液。此外,通常采用无菌不挥发油作为溶剂或悬浮介质。出于此目的,可采用任一温和不挥发油,包括合成的单-或二-甘油酯。脂肪酸(例如油酸和其甘油酯衍生物)可用于可注射制剂,例如天然的医药上可接受的油类,例如橄榄油或蓖麻油,尤其呈其聚氧乙烯化形式。这些油溶液或悬浮液也可含有长链醇稀释剂或分散剂,例如羧甲基纤维素或类似分散剂,其通常用于调配包括乳液和悬浮液在内的医药上可接受的剂型。也可将其它通常使用的表面活性剂用于调配目的,例如吐温(Tween)、司盘(Spans)和其它通常用于制造医药上可接受的固体、液体、或其它剂型的乳化剂或生物利用度增强剂。化合物可经调配用于通过注射(例如,浓注或连续输注)非经肠投与。用于注射的单位剂型可在安瓿或多剂量容器中。

[0294] 除以上所述剂型以外,医药上可接受的赋形剂和载剂和剂型通常已为所属领域的技术人员熟知且包括在本发明内。应理解,针对任一特定患者的具体剂量和治疗方案应根据多种因素而定,这些因素包括:所采用具体解毒剂的活性、患者的年龄、体重、总体健康状况、性别和饮食、肾和肝功能、和投与时间、排泄速度、药物组合、治疗医师或兽医的判断和所治疗特定疾病的严重性。

[0295] VI. 试剂盒

[0296] 本发明进一步提供试剂盒或包。在一些实施例中,本发明的试剂盒包含:(a) 第一容器,其含有定期投与用于治疗血栓形成的 fXa 抑制剂;和(b) 第二容器,其含有本发明的欲在当(a)中的 fXa 抑制剂服用过量或当需要恢复正常止血以停止或阻止出血时的情况下使用的解毒剂。在其它实施例中,试剂盒进一步包含解释(a)和(b)中的这两种试剂应何时使用的标记。

[0297] 所述第一和第二容器可为瓶子、罐、小瓶、细颈瓶、唧筒、试管、袋、或在制造、存储或分配医药茶品中所用的任何其它容器。包装说明书可为列举涉及试剂盒的医药组合物的信息的标记、标签、标志、或诸如此类。所列举的信息通常应由管理医药组合物销售领域的管理机构(例如美国食品和药物管理局(the United States Food and Drug Administration)确定。优选地,包装说明书特别地列举医药组合物已获得批准的标示。包

装说明书可由其中或其上所含有的信息可读取的任何材料制得。优选地,包装说明书为可印刷材料,例如纸、粘合剂背衬纸板、箔、或塑料、和诸如此类,其上已印刷或施加所想要的信息。

[0298] 实例

[0299] 通过参考一下实例可进一步理解本发明,但所述实例仅意欲纯粹解释本发明。本发明的围并不是例示性实例限制,所述例仅意欲作为本发明单个方面的陈述。功能上等效的任何方法都在本发明的范围内。除那些本文所阐述的以外,根据上文阐述和附图本发明的各种修改对于所属领域的技术人员将显而易见。所述修饰属于随附权利要求书的范围内。

[0300] 除非另有说明,否则所有温度皆以摄氏温度表示。而且,在这些实例及其它地方,缩写具有以下含义:

[0301]	aa	=氨基酸
[0302]	ab	=抗体
[0303]	ACT	=活化凝血时间
[0304]	aPTT	=活化部分促凝血酶原激酶时间
[0305]	CHO 细胞	=中国仓鼠卵巢细胞
[0306]	CHO dhfr(-) 细胞	=缺少 dhfr 基因的 CHO 细胞
[0307]	hr	=小时
[0308]	INR	=国际标准化比例
[0309]	IV	=静脉内
[0310]	kg	=公斤
[0311]	M	=摩尔
[0312]	mg	=毫克
[0313]	mg/kg	=毫克 / 公斤
[0314]	mg/mL	=毫克 / 毫升
[0315]	min	=分钟
[0316]	mL	=毫升
[0317]	mM	=毫摩尔
[0318]	nm	=纳米
[0319]	nM	=毫微摩尔
[0320]	PO	=经口
[0321]	PRP	=富血小板血浆
[0322]	PT	=凝血酶原时间
[0323]	RFU	=相对荧光单位
[0324]	s	=秒
[0325]	TF	=组织因子
[0326]	U/mL	=单位 / 毫升
[0327]	μ L 或 uL	=微升
[0328]	μ M	=微摩尔

[0329] μg = 微克

[0330] 实例 1. 通过糜蛋白酶消化制备去 Gla 的酰 -fXa

[0331] 根据莫里塔 (Morita, T.) 等人, 生物化学杂志 (J. Bio. Chem.), 1986, 261 (9) : 4015-4023 的程序通过将酰 -fXa (其中脱氢丙氨酸替代活性位点丝氨酸) 与糜蛋白酶于 0.05M Tris-HCl、0.1M NaCl 中于 pH 7.5 和 22°C 下一起培育 60 分钟来制备去 Gla 的酰 -fXa。在典型实验设定中, 将 0.5 毫克 / 毫升 (mg/mL) 酰 -fXa 与 5 单位 / 毫升 (U/mL) α -糜蛋白酶-琼脂糖珠粒一起在轻轻搅动下培育。反应结束时, 通过离心或过去去除 α -糜蛋白酶-琼脂糖珠粒。此随后与过量抑制剂 4-脘基-苯基-甲烷-磺酰氟 (APMSF)、甲苯磺酰基-L-赖氨酸氯甲基酮 (TLCK)、和甲苯磺酰基-L-苯基丙氨酸氯甲基酮 (TPCK) 一起培养以猝灭残余 fXa 活性或可能从珠粒浸出的糜蛋白酶的任何活性。通过阿米可 (Amicon) 超离心过滤装置 (YM10 膜) 或通过常规透析从最终产物去 Gla 的酰 -fXa 中去除 Gla- 结构域片段和抑制剂。视需要还同时实施浓缩或缓冲剂交换。含 Gla- 结构域的酰 -fXa 是根据野上 (Nogami) 等人, 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.) 1999, 274 (43) : 31000-7 中所报告的程序来制备。 α -糜蛋白酶-琼脂糖珠粒是自西格玛 (Sigma) 购得且比活性 (U/mL) 是根据所用特定批号的制造商数据。

[0332] 活性 fXa 的糜蛋白酶消化可根据以上程序在不适用 APMSF 的情况下实施。在糜蛋白酶消化之前、和糜蛋白酶消化 15、30 和 60 分钟之后根据以下实例 3 所阐述的程序确定活性 fXa 的凝血活性。图 7 展示糜蛋白酶消化 30 分钟之后完全丧失凝血活性。培育时间延长至 60 分钟以确保完全去除 Gla 结构域。

[0333] 实例 2. 贫血小板血浆 (PPP) 或富血小板血浆 (PRP) 中的凝血酶生成分析

[0334] 在此实例中, 人类贫血小板或富血小板血浆样品是从抽取到 0.32% 柠檬酸盐中的健康供者的血液制备。PRP 和 PPP 是通过在室温下将抗凝血血液分别以约 100X 重力或 1000X 重力旋转 20 分钟来制备。将 75-100 微升 (μL) 血浆与 CaCl_2 和 Z-Gly-Gly-Arg-氨基甲基香豆素 (Z-GGR-AMC, 凝血酶荧光底物) 混合。添加组织因子 (伊诺文 (Innovin), 德灵公司 (Dade Behring)) 来开始凝血酶的生成。对于典型实验来说, 反应混合物含有 15 毫摩尔 (mM) Ca^{2+} 、100 微摩尔 (μM) Z-GGR-AMC、和 0.1 毫微摩尔 (nM) 组织因子 (TF) (伊诺文 (Innovin))。在 37°C 下通过测量相对荧光单位 (RFU) 的荧光板读取器 (分子装置 (Molecular Devices)) 连续监测凝血酶形成。当存在时, 将抑制剂和解毒剂与血浆一起于室温下预培育 20 分钟, 然后开始凝血酶生成。

[0335] 使用此分析的各个实验的结果可在图 4、6 和 9 中找到。

[0336] 实例 3. 凝血延长分析

[0337] 使用两个凝血分析格式来测试因子 Xa 抑制剂和解毒剂对凝血延长的作用。在第一格式中, 使用 96 孔板来同时测量多个样品。在第二分析格式中, 利用常规凝血仪器 (麦拉伊莱克特拉 (MLA Electra) 800 自动凝血计时器) 测量 aPTT。

[0338] 在所述 96 孔板格式方法中, 以类似于实例 2 中的程序制备人类贫血小板血浆或富血小板血浆。将 75-100 μL 血浆利用 CaCl_2 再钙化, 于 37°C 下培育 3 分钟并通过添加组织因子 (伊诺文 (Innovin), 德灵公司 (Dade Behring)) 或 aPTT 试剂 (安克停 (Actin) FS, 德灵公司 (Dade Behring)) 开始血凝块形成。通过板读取器 (分子装置 (Molecular Devices)) 连续监测 OD405 的变化。凝血时间定义为当达到吸光度 (OD405nm) 变化的半最大值时的时

间(秒)。当存在时,将因子 Xa 抑制剂和解毒剂与血浆一起于室温下预培育 20 分钟,然后开始反应。

[0339] 当测试活性 fXa 的凝血活性时(如图 7 中所示),将 75-100 μ L fX 缺乏血浆(乔治国王生物医学公司(George King Bio-Medical, Inc.))利用 CaCl_2 再钙化,于 37 $^\circ\text{C}$ 下培育 3 分钟并将糜蛋白酶消化后的 fXa 产物添加于血浆中以开始血凝块形成。如上所述通过板读取器连续监测 OD405 的变化。

[0340] 在图 13 中,利用麦拉伊莱克特拉(MLA Electra)800 自动凝血计时器测量 400nM 贝特沙班对正常人类血浆的 aPTT 延长和贝特沙班抑制作用被解毒剂去 Gla 的酰-fXa 逆转的作用。将 100 μ L 混合人类血浆与 400nM 贝特沙班和不同浓度的解毒剂混合。根据制造商的凝血时间测量说明书添加 aPTT 试剂(安克停(Actin)FS,德灵公司(Dade Behring)和 CaCl_2 。

[0341] 使用此分析的额外实验的结果可在图 10 和 11 中找到。

[0342] 实例 4. 由去 Gla 的酰-fXa 逆转贝特沙班对 fXa 的抑制

[0343] 为测量贝特沙班对 fXa 活性的抑制和其抑制作用的逆转,将经纯化活性 fXa、不同浓度的贝特沙班和解毒剂去 Gla 的酰-fXa 添加到 20mM Tris、150mM NaCl、5mM Ca^{2+} 、和 0.1% 牛科动物血清白蛋白(BSA)。于室温下培育 20 分钟之后,将 100 μ M 斯柏克则米-fXa(Spectrozyme-fXa)(一种因子 Xa 发色底物,考汝莫詹尼斯(Chromogenix))添加到混合物中并通过板读取器在 405 纳米(nm)下连续 5 分钟监测底物切割速率。在图 5 中,将发色活性标准化成在不存在任何抑制剂情况下的活性 fXa。产物形成的初始速度随抑制剂和解毒剂浓度的变化是通过非线性回归以估计贝特沙班对解毒剂的亲和力来分析(图 8)。

[0344] 在有或没有阿加曲班(一种特异性小分子 IIa 抑制剂)的情况下使用发色底物 S2288(200 μ M)以类似于先前的方式测量解毒剂去 Gla 的酰-fXa 对凝血酶活性的作用。如所预计,解毒剂(538nM)并不影响 IIa(5nM)的酰胺水解活性或 50nM 阿加曲班的抑制作用。

[0345] 实例 5. 制备具有脱羧 γ -羧基谷氨酸残基的 fXa

[0346] 具有脱羧 γ -羧基谷氨酸残基的 fXa 衍生物可通过(例如)根据巴贾吉(Bajaj)等人生物化学杂志(J. Biol. Chem.), 1982, 257(7):3726-3731 中所报告的程序处理 fXa 蛋白质来制备。将存于 2mL 0.1 摩尔碳酸氢铵(pH 8.0)中的 2 至 5mg 纯化或重组 fXa 冻干。将所得粉末于小于 20 μ m 的真空下密封并在 110 $^\circ\text{C}$ 下加热不同时期以获得脱羧 fXa。

[0347] 实例 6. 重组去 Gla 的 fXa-S379A 的制备

[0348] fXa 衍生物可通过重组 DNA 方法利用以下基于表达 fX(SEQ ID NO. 1,3)或 fXa 衍生物(SEQ ID NO. 4,5,9,和 11)的 fX cDNA(SEQ ID NO. 2)的程序中的任一者在适宜宿主有机体中根据诱变和分子生物学中的一般程序来产生。

[0349] 重组 fX 和 fX 衍生物可基于拉森(Larson, P. J.)等人,生物化学(Biochem.), 1998, 37:5029-5038 和卡米雷(Camire, R. M.)等人,生物化学(Biochem.), 2000, 39, 14322-14329 中所阐述的程序表达于(例如)人类胚肾细胞 HEK293 中。重组 fX 可通过因子 X 活化剂罗塞尔(Russell)的蝥蛇毒(RVV)活化成 rfXa。rfXa 可根据实例 1 中所阐述的程序进一步处理成去 Gla 的酰-fXa。

[0350] 活性位点丝氨酸残基已由丙氨酸替代的重组 fX-S379A(糜蛋白酶编号中的 S195A)、且优选经活化 fXa 突变体 rfXa-S379A 可根据辛哈(Sinha)等人,蛋白质表达和纯

化 (Protein Expression and Purif.) 1992, 3 :518-524 ;沃尔夫 (Wolf, D. L.) 等人, 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.), 1991, 266 (21) :13726-13730 所阐述的程序表达于 (例如) 中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞中。

[0351] 去 Gla 的 fXa-S379A 可根据实例 1 中所阐述的程序通过糜蛋白酶消化 fXa-S379A 来制备。

[0352] 更优选地, 去 Gla 的 fXa-S379A 可直接根据先前程序来表达, 其中 Gla- 结构域片段的缺失是通过诱变程序。例如, 可使用重组蛋白质表达来表达: 去除 SEQ ID NO. 3 的 Gla- 结构域片段 1-39 之后的去 Gla(1-39)-fXa-S379A; 去 Gla(1-44)-fXa-S379A, 其等效于脱氢丙氨酸被丙氨酸替代的 SEQ ID NO. 10; 和整个 Gla- 结构域被去除的去 Gla(1-45)-fXa-S379A (SEQ ID NO. 11)。

[0353] 也可在 EGF1 或 EGF1 加 EGF2 结构域 (图 2) 处进一步截断以表达去 (1-84)-fXa-S379A 或去 (1-128)-fXa-S379A 衍生物。

[0354] 实例 7. 重组 fXa 突变体在 CHO 细胞中的表达

[0355] 此实例阐述直接表达无 Gla 结构域的 fXa-S379A (糜蛋白酶编号中的 S195A) 变体的重组蛋白质表达构建体和细胞系。重组解毒剂不需要产生 pd- 解毒剂所需的活化或化学修饰步骤且在本文所讨论的活体外分析对血浆源性蛋白质具有相当的亲和力。

[0356] 在此实例中, 将 fXa 突变体 (SEQ ID NO. 13、表 12a) 直接表达于 CHO 细胞中 (参见表达载体的图 14) 并如下文所述从条件培养基中纯化功能蛋白质。在活体外和动物模型中测试重组解毒剂 (r- 解毒剂) 功能活性 (实例 8)。

[0357] 使用 PCR 来使 fX (SEQ ID NO. 2) 的 cDNA 序列在三个区中突变。第一突变是 FX (SEQ ID NO. 3、图 3) 的 Gla- 结构域中缺失 6-39aa。第二突变是激活肽序列 143-194aa 由 -RKR- 替代。此产生连接轻链和重链的 -RKRRKR- 连接体。分泌时, 此连接体在 CHO 中去除而获得双链 fXa 分子。第三突变是活性位点残基 S379 突变成 A1a 残基。

[0358] 通常以上刚刚阐述的 cDNA (SEQ ID NO. 16) 所产生的多肽阐述于表 12 (SEQ ID NO. 12) 中。cDNA 与多肽的比对展示于表 20 中。分泌后所产生的双链 fXa 分子是表 12b (SEQ ID NO. 14) 中所阐述的轻链片段和表 12c (SEQ ID NO. 15) 中所阐述的重链片段。

[0359] fX 序列中的前 1-5aa 被保留并用于将 fXa 突变体的多肽连接至 fX 的前体肽 (SEQ ID NO. 1、图 1), 以确保 fXa 突变体中前体肽经适当处理。

[0360] 测定编码以上所述 fXa 突变体的多肽的 DNA 序列并插入图 14 中所示的表达载体。表达载体的多核苷酸展示于 SEQ ID NO. 18 中。将质粒 DNA 线性化并转染于 CHO dhfr(-) 细胞中。使用四氢叶酸酯 (HT) 缺乏的培养基加甲氨蝶呤 (MTX) 来选择细胞。使用 fX ELISA 试剂盒 (酶研究实验室 (Enzyme Research Laboratories), 目录编号 FX-EIA) 来针对高蛋白质表达筛选稳定克隆。将 FXa 突变体蛋白质表达于无血清培养基中并收获条件培养基并处理进行纯化。

[0361] 培养基中的靶蛋白质可通过离子交换色谱分离并随后通过单步骤亲和色谱 (例如偶合至矩阵的抗 fXa 抗体) 或通过若干色谱步骤的组合 (例如疏水矩阵) 来纯化。亲和纯化可包括选择性结合至 fXa 活性位点裂缝的色谱用物质, 例如苯甲脒-琼脂糖或大豆胰蛋白酶抑制剂-琼脂糖 (STI-琼脂糖)。

[0362] 图 15 展示亲和 (STI-琼脂糖, 西格玛 (Sigma) 目录编号 T0637) 纯化的 fXa

突变体使用分别识别 fX 重链和轻链的单克隆抗体（酶研究实验室 (Enzyme Research Laboratories), FX-EIA) 的西方印迹。当将连接轻链和重链的二硫键还原时, r- 解毒剂在西方印迹中展示类似于血浆源性 fXa 的预期重链带。与血浆源性 fXa 相比, fXa 突变体的 Gla- 结构域中 6-39aa 的缺失产生 r- 解毒剂的轻链较低分子量带。分子量标志也可在印迹上看到。

[0363] 实例 8. 活体内小鼠模型

[0364] 测试在雄性 C57B1/6 小鼠之内共在投与或未投与解毒剂的情况下贝特沙班的药物代谢动力学和药物效应动力学 (PK-PD) 曲线。对于对照组以 0、15、25、和 75mg/kg 单次经口投与贝特沙班。15mg/kg 用于解毒剂治疗组。解毒剂 (300ug/200 μ L) 或媒介 (生理盐水, 200 μ L) 的单次静脉内 (IV) 注射是在 1.5 小时时间点之前的 5 分钟投与。

[0365] 在经口投与贝特沙班后 1.5、2.0、和 4.0 小时, 将小鼠用氯胺酮鸡尾酒 (SC) 麻醉并通过心脏穿刺抽血。获得存于 50 μ L 柠檬酸三钠中的血液样品 (0.5mL)。全血 INR 是使用黑墨晁恩初级柱 (Hemochron Jr. cartridges) (国际泰克尼达恩公司 (International Technidyne Corporation)) 根据制造商的说明书来测量。通过离心制备小鼠贫血小板血浆用于贝特沙班和解毒剂 (ELISA) 血浆浓度确定。

[0366] 对于重组解毒剂 (r- 解毒剂) 实验, 对照组的小鼠以 0、15、25、和 75mg/kg 经口服用贝特沙班。15mg/kg 用于解毒剂 (300 μ g/200ML) 治疗组。经口投与贝特沙班后 1.5 小时 (解毒剂注射后 5 分钟) 取样品。

[0367] 如图 16 和 17 及表 13 和 14 中所示, 投与特沙班 (15mg/kg, PO) 后对小鼠单次注射 (300 μ g, IV) 血浆源性解毒剂 (pd- 解毒剂) 或重组 fXa 突变体 (r- 解毒剂) 有效捕获活体内的抑制剂。全血 INR 的 PK-PD 相关性和解毒剂血浆浓度 (表 13-14) 表明, 根据 INR 测量值功能性贝特沙班减少 > 50%, 且 fXa 抑制剂被解毒剂经由多次注射或其它方案合理有效的中和。预计这些结果证明, 本发明的 fXa 衍生物具有作为通用解毒剂以逆转出血或其它医疗急诊的患者中 fXa 抑制剂的抗凝血作用的可能。

[0368] 图 22 展示在经口投与贝特沙班 (15mg/kg) 之后单次静脉注射 (1 次注射) 或两次注射 (2 次注射) r- 解毒剂的小鼠实验 (n = 5/ 组, 312ug/200ul r- 解毒剂) 的结果。对于单次注射组, 在经口投与贝特沙班后 1 小时取小鼠血液样品。在 1 小时时间点前的 5 分钟投与媒介 (对照 1) 或 r- 解毒剂 (1 次注射)。对于双次注射组, 在经口投与贝特沙班后 55 分钟时注射媒介或 r- 解毒剂并在 115 分钟时再注射一次。对于媒介 (对照 2) 和 r- 解毒剂 (2 次注射) 治疗的小鼠在 2 小时时取小鼠血液样品。单次或双次注射解毒剂之后, 所测量 INR 随小鼠血浆中解毒剂 / 贝特沙班比例的变化展示于图 22B 中。

[0369] 实例 9. 由解毒剂活体外逆转利伐沙班和阿哌沙班

[0370] 如所预计, 本发明所涵盖的解毒剂也能够结合并中和和其它活性位点定向 fXa 抑制剂。表 15 和 16 展示 pd- 解毒剂和 r- 解毒剂对贝特沙班、利伐沙班和阿哌沙班的抑制作用的活体外校正。将经纯化 fXa (3.0nM)、抑制剂 (7.5nM)、和不同浓度的解毒剂在具有 20mM Tris、150mM NaCl、0.1% BSA 且 pH 7.4 的缓冲液中于 22°C 下培育 10 分钟。经分析 fXa 活性类似于实例 4 的活性。

[0371] 如表 15 中所示, 204nM pd- 解毒剂对所测试抑制剂的抑制作用产生至少 60% 校正, 而在表 16 中通过 r- 解毒剂 (186nM) 对于贝特沙班和利伐沙班达成 > 95% 的抑制作用

校正,且>70%的阿哌沙班逆转。

[0372] 实例 10. 通过 r- 解毒剂活体外逆转贝特沙班

[0373] 在表 17 中,在人类血浆凝血分析中测试重组解毒剂蛋白质对逆转贝特沙班的抗凝血的作用。通过麦拉伊莱克特拉 (MLA Electra)800 自动凝血计时器测量 300nM 和 400nM 贝特沙班对血浆的 aPTT 延长和抑制作用的逆转的作用。将 100 μ L 混合柠檬酸盐抗凝血人类血浆与 300nM 或 400nM 贝特沙班和不同浓度的解毒剂混合。根据制造商说明书添加 aPTT 试剂 (安克停 (Actin)FS,德灵公司 (Dade Behring)) 和 CaCl_2 。

[0374] 实例 11. r- 解毒剂活体外逆转低分子量肝素 (“LMWH “)

[0375] 在图 18 中,通过人类血浆的浊度变化测试 r- 解毒剂对逆转 LMWH 依诺肝素 (赛诺菲-安万特 (Sanofi-Aventis)) 的抑制作用的作用。将依诺肝素 (0-1.25U/mL) 于 22°C 下在有 508nM r- 解毒剂或没有 r- 解毒剂的情况下培育 20 分钟。根据实例 3 中所阐述的程序测量浊度变化。508nM r- 解毒剂实质上校正 (>75%)0.3125-1.25U/mL 依诺肝素的抑制作用。

[0376] 在图 19 中,在人类血浆凝血分析中测试 r- 解毒剂对逆转低分子量肝素 (LMWH 依诺肝素,赛诺菲-安万特 (Sanofi-Aventis)) 的抗凝血的作用。通过麦拉伊莱克特拉 (MLA Electra)800 自动凝血计时器测量 1 个抗 Xa 单位 /mL LMWH 对血浆的 aPTT 延长和逆转抑制作用的作用。将 100 μ L 混合柠檬酸盐抗凝血人类血浆与依诺肝素和不同浓度的解毒剂混合。测量凝血时间之间,根据制造商说明书添加 aPTT 试剂 (安克停 (Actin)FS,德灵公司 (Dade Behring)) 和 CaCl_2 。添加 1.14 μ M 重组解毒剂对 1 个单位 /mL 依诺肝素产生的抗凝血作用产生 52%校正。

[0377] 实例 12. r- 解毒剂的活体外逆转利伐沙班

[0378] 在图 20 中,在人类血浆凝血分析中测试重组解毒剂蛋白质对逆转小分子因子 Xa 抑制剂 (利伐沙班,贝 (Bay)59-7939) 的抗凝血的作用。如由佩尔茨博恩 (Perzborn) 等人,血栓形成和止血杂志 (J. Thromb. Haemost.) 3 :514-521,2005 所报告,凝血酶原时间测量是用于评价利伐沙班抗凝血作用的精确方法。通过麦拉伊莱克特拉 (MLA Electra)800 自动凝血计时器测量 1 μ M 利伐沙班对混合人类血浆的凝血酶原时间 (PT) 延长的作用和抑制作用的逆转。将 100 μ L 混合柠檬酸抗凝血人类血浆与利伐沙班和不同浓度的解毒剂混合。测量凝血时间之前,根据制造商说明书将兔脑促凝血酶原激酶 C 加试剂 (德灵公司 (Dade Behring)) 添加到血浆样品中。添加 1.9 μ M 重组解毒剂对 1 μ M 利伐沙班所产生的抗凝血作用产生 100%校正。

[0379] 实例 13. r- 解毒剂活体外逆转阿哌沙班

[0380] 在表 18 中,在人类血浆凝血分析中测试重组解毒剂蛋白质对逆转阿哌沙班的抗凝血的作用。如皮恩涛 (Pinto) 等人,医药化学杂志 (J. Med. Chem). 55(22) :5339-5356,2007 所报告;凝血酶原时间 (PT) 测量是用于评价阿哌沙班的离体抗凝血作用的精确方法。通过麦拉伊莱克特拉 (MLA Electra)800 自动凝血计时器测量 1 μ M 和 1.5 μ M 阿哌沙班对混合人类血浆的凝血酶原时间 (PT) 延长的作用和抑制作用的逆转。将 100 μ L 混合柠檬酸抗凝血人类血浆与阿哌沙班和不同浓度的解毒剂混合。测量凝血时间之前,根据制造商说明书将兔脑促凝血酶原激酶 C 加试剂 (德灵公司 (Dade Behring)) 添加到血浆样品中。添加 1.9 μ M 重组解毒剂对 1.5 μ M 阿哌沙班所产生的抗凝血作用产生 97%校正。

[0381] 实例 14. 去 Gla 的酰-fXa 活体外抑制阿加曲班

[0382] 为测量阿加曲班的凝血酶活性的抑制和其抑制作用的逆转, 将经纯化人类凝血酶 (5nM)、阿加曲班 (50nM) 和不同浓度的解毒剂去 Gla 的酰 fXa 添加至含 20mM Tris、0.15M NaCl、5mM 氯化钙、0.1% 牛科动物血清白蛋白的缓冲液 (pH 7.4) 中。于室温下培育 20 分钟之后, 将酰胺水解底物 S2288 (200uM) 添加于混合物中并通过 405nm 下的吸光度检测对-硝基苯胺底物的切割速率。结果呈现于图 12 中。

[0383] 应了解, 尽管已结合上述实施例阐述本发明, 但以上说明和实例意欲阐释而非限制本发明的范围。对于所属领域的技术人员在本发明范围内的其它方面、优点和修改将显而易见。

[0384] 表 13- 在经口投与 15mg/kg 贝特沙班后 1.5 小时 (解毒剂注射后 5 分钟) 时在 pd- 解毒剂治疗的小鼠中 PK-PD 相关性

[0385]

pd- 解毒剂治疗的动物	1	2	3	4	5	6	7	平均
贝特沙班 (ng/mL)	673	793	1170	415	217	664	879	687
预计 INR	4.2	4.5	5.2	3.3	2.3	4.1	4.7	4.0
测量 INR	2.3	2.3	3.3	0.8	0.8	1.5	2.0	1.9
%校正	63.9	66.6	52.3	100	100	83.1	74.4	77.2

[0386] 表 14- 在经口投与 15mg/kg 贝特沙班后 1.5 小时 (解毒剂注射后 5 分钟) 时在 r- 解毒剂治疗的小鼠中 PK-PD 相关性

[0387]

r- 解毒剂治疗的动物	1	2	3	4	平均
贝特沙班 (ng/mL)	434	262	335	494	381
预计 INR	3.2	2.5	2.8	3.5	3.0
测量 INR	2.0	0.9	1.2	0.9	1.3
%校正	50.0	94.1	80.0	93.6	77.3

[0388] 表 15-fXa 抑制剂的抑制作用的%校正

[0389]

pd- 解毒剂 (nM)	贝特沙班	利伐沙班	阿哌沙班
0	0	0	0

10.2	13.1	10.6	6.5
20.4	34.8	37.4	11.4
40.7	47.1	46.8	15.0
61.1	68.4	55.7	40.3
101.8	67.5	69.4	52.3
162.9	80.5	74.0	56.0
203.7	82.6	72.6	60.2

[0390] 表 16-fXa 抑制剂的抑制作用的%校正

[0391]

r- 解毒剂 (nM)	贝特沙班	利伐沙班	阿哌沙班
0	0	0	0
9.3	21.5	23.2	13.3
18.6	52.7	54.2	33.5
37.2	75.5	72.6	49.9
55.8	86.5	79.9	59.2
93.1	94.9	89.1	64.4
148.9	99.3	96.7	74.8
186.1	99.5	94.8	72.6

[0392] 表 17- 贝特沙班的抗凝血活性的 r- 解毒剂逆转

[0393]

	aPTT (sec)	倍数变化	抗凝血作用的%校正

[0394]

对照人类血浆	35.2	1.00	-
300nM 贝特沙班	61.8	1.76	-
300nM 贝特沙班 + 570nM r-解毒剂	38.3	1.09	88
300nM 贝特沙班 + 760nM r-解毒剂	38.2	1.09	88
300nM 贝特沙班 + 1140nM r-解毒剂	38.1	1.08	90
400nM 贝特沙班	66.3	1.88	-
400nM 贝特沙班 + 380nM r 解毒剂	47.1	1.34	61
400nM 贝特沙班 + 570nM r 解毒剂	39.9	1.13	85
400nM 贝特沙班 + 760nM r 解毒剂	39.9	1.13	85
400nM 贝特沙班 + 1140nM r 解毒剂	37.8	1.07	92
400nM 贝特沙班 + 1520nM r 解毒剂	39.4	1.12	86
1140nM r 解毒剂	38.9	1.11	-
1520nM r 解毒剂	38.8	1.10	-

[0395] 表 18- 阿哌沙班的抗凝血活性的 r- 解毒剂逆转

[0396]

	PT(sec)	倍数变化
对照人类血浆	14.1	-
1 μ M 阿哌沙班	16.4	1.16
1 μ M 阿哌沙班 + 380nM r 解毒剂	15.3	1.09
1 μ M 阿哌沙班 + 760nM r 解毒剂	14.9	1.06
1 μ M 阿哌沙班 + 1.14 μ M r 解毒剂	14.2	1.01
1 μ M 阿哌沙班 + 1.52 μ M _R 解毒剂	14.2	1.01
1.5 μ M 阿哌沙班	18.4	1.31
1.5 μ M 阿哌沙班 + 1.52 μ M r 解毒剂	14.6	1.04
1.5 μ M 阿哌沙班 + 1.90 μ M r 解毒剂	14.3	1.01
1.52 μ M r 解毒剂	14	-
1.90 μ M r 解毒剂	14.2	-

[0001]

序 列 表

表 1-序列识别号 1-人类因子 X 的多肽序列

1	MGRPLHLVLL	SASLAGLLL	GESLFIRREQ	ANNILARVTR	ANSFLEEMKK	GHLEECMEE
61	TCSYEEAREV	FEDSDKTNEF	WNKYKDGQDC	ETSPCQNQ GK	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN
121	CELFTRKLC S	LDNGDCDQFC	HEEQNSVVC S	CARGYTLADN	GKACIPTGPY	PCGKQTLERR
181	KRSVAQATSS	SGEAPDSITW	KPYDAADLDP	TENPFDLLDF	NQTQPERGDN	NLTRIVGQQE
241	CKDGECPWQA	LLINEBENEGF	CGGTILSEFY	ILTAAHCLYQ	AKRFKVRVGD	RNTEQEBEGGE
301	AVHEVEVVIK	HNRFPKETYD	FDIAVLR LKT	PITFRMNVAP	ACLPERDWAE	STLMTQKTGI
361	VSGFGRTHEK	GRQSTR LKML	EVPIVDRNSC	KLSSSPITIQ	NMFCAGYDTK	QEDACQGDSC
421	GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG	EGCARKGKYG	IYTKVTAFLK	WIDRSMKTRG	LPKAKSHAPE
481	VITSSPLK					

表 2-序列识别号 2-编码因子 X 的多核苷酸序列

1	gaatttgcctc	cagcagcctg	tcccagtgag	gacagggaca	cagtactcgg	ccacaccatg
61	ggggcccac	tgcacctcgt	cctgctcagt	gctccctgg	ctggcctcct	gctgctcggg
121	gaaagtctgt	tcacccgcag	ggagcagggc	acacacatcc	tggcgagggt	cagcagggcc
181	aattccctllc	ttgaagagat	gaagaaagga	cacctcgaaa	gagagtgcct	ggaagagacc
241	tgtccatcag	aagagggccc	cgaggtcttt	gaggacagcg	acaagacgaa	tgaattctgg
301	aataaataca	aagatggcga	ccagtgtag	accagtcctt	gccagaacca	gggcaaatgt
361	aaagacggcc	tgggggaata	cacctgcacc	tgtttagaag	gatttcgaag	caaaaactgt
421	gaattattca	cacggaaagt	ctgcagcctg	gacaacgggg	actgtgacca	gttctgcacc
481	gaggaacaga	actctgtggg	gtgctcctgc	gcccgggggt	acacctgggc	tgacaacggc
541	aaggcctgca	ttcccacagg	gcccacccc	tgtgggaaac	agacctggga	acgcagggaag
601	aggtccagtgg	cccaggccac	cagcagcagc	ggggaggccc	ctgacagcat	cacatgggaag
661	ccatcagatg	cagccgacct	ggaccccacc	gagaaccccc	tcgacctgct	tgacttcaac
721	cagacgcagc	ctgagagggg	cgacaacac	ctcaccagga	tcgtgggagg	ccaggaatgc
781	aaggacgggg	agtgctcctg	gcaggccctg	ctcatcaatg	aggaaaaaga	gggtlctgt
841	ggttgaaaca	ttctgagcga	gttctacatc	ctaaccggcag	cccactgctc	ctaccaagcc
901	aagagattca	aggtgagggg	aggggacctg	aacacgggagc	aggaggaggg	cggtgagggg
961	gtgcacgagg	tggagggtgg	cataaagcac	aaccgggtca	caaaggagac	ctatgacttc
1021	gacatcgccg	tgtctcgggt	caagaccccc	atcaccttcc	gcctgaaagt	ggcgcctgcc
1081	tgcctccctg	agcgtgactg	ggccgagctc	acgcctgatga	cgcagaagac	ggggatttgt
1141	agcggcttcc	ggcgcaccca	cgagaagggc	cgccagtcct	ccagggtcca	gatgctggag
1201	gtgcctcagc	tggaccgcaa	cagctgcag	ctgtccagca	gcttccatcat	caccagaac
1261	atgttctgtg	ccggtacga	caccaagcag	gaggatgctt	gccaggggga	cagcgggggc
1321	ccgcaagtca	cccgttcaa	ggacacctac	ttcgtgacag	gcacgtctag	ctggggagag
1381	ggtgtgtgccc	gtaaggggaa	gtacgggata	tacaccaagg	tcaccgctt	cctcaagtgg
1441	atcgacaggt	ccatgaaaa	caggggcttg	cccaaggcca	agagccatgc	cccggaggtc
1501	ataagctcct	ctccattaaa	gtgagatccc	actccaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa

表 3-序列识别号 3-成熟人类因子 X 的多肽序列

1	ANSFLEEMKK	GHLEECMEE	TCSYEEAREV	FEDSDKTNEF	WNKYKDGQDC	ETSPCQNQ GK
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	CELFTRKLC S	LDNGDCDQFC	HEEQNSVVC S	CARGYTLADN
121	GKACIPTGPY	PCGKQTLERR	KRSVAQATSS	SGEAPDSITW	KPYDAADLDP	TENPFDLLDF
181	NQTQPERGDN	NLTRIVGQQE	CKDGECPWQA	LLINEBENEGF	CGGTILSEFY	ILTAAHCLYQ
241	AKRFKVRVGD	RNTEQEBEGGE	AVHEVEVVIK	HNRFPKETYD	FDIAVLR LKT	PITFRMNVAP
301	ACLPERDWAE	STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK	GRQSTR LKML	EVPIVDRNSC	KLSSSPITIQ
361	NMFCAGYDTK	QEDACQGDSC	GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG	EGCARKGKYG	IYTKVTAFLK
421	WIDRSMKTRG	LPKAKSHAPE	VITSSPLK			

[0002]

表 7-序列识别号 7-谷氨酸翻译后修饰成 γ -羧基谷氨酸的活化人类因子 Xa 的多肽序列
(γ 代表 γ -羧基谷氨酸残基)

轻链	
1	ANSFLYWMKK GHLYRYCMYY TCSYVYARVY FYDSDKINVF WNKYKDCDQC ETSPCQNQCK
61	CKDGLGEYTC TCLEGFEGKN CELFTRKLCG LDNGDCDQFC HEEQNSVWCS CARGVTILADM
121	GKACIPTGPY PCGRQTLER
重链	
181	IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ
241	AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK INRFTKETYD FDIAVLRLKT PITFRMNVAP
301	ACLPERDVAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRLKML EVPYVDRNSC KLSSSPIITQ
361	NMFCAGYDTK QEDACQGDSS GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG ECCARKKGYG IYTKVTAFLK
421	WIDRSMKTRG LPKAKSHAPE VITSSPLK

表 8-序列识别号 8-谷氨酸翻译后修饰成 γ -羧基谷氨酸的活化人类因子 Xa 轻链的多肽序列

轻链	
1	ANSFLYWMKK GHLYRYCMYY TCSYVYARVY FYDSDKINVF WNKYKDCDQC ETSPCQNQCK
61	CKDGLGEYTC TCLEGFEGKN CELFTRKLCG LDNGDCDQFC HEEQNSVWCS CARGVTILADM
121	GKACIPTGPY PCGRQTLER

表 9-序列识别号 9-活化人类因子 Xa 重链的多肽序列

181	IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ
241	AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK INRFTKETYD FDIAVLRLKT PITFRMNVAP
301	ACLPERDVAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRLKML EVPYVDRNSC KLSSSPIITQ
361	NMFCAGYDTK QEDACQGDSS GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG ECCARKKGYG IYTKVTAFLK
421	WIDRSMKTRG LPKAKSHAPE VITSSPLK

[0004]

表 12-序列识别号 12-去除-RKRRKR-连接体之前人类因子 Xa 三重突变体的多肽序列

轻链	1 ANSFL	F WNKYKDGQDC	ETSPCQNOGK
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	CELFTRKLCG
121	GKACIPTGPFY	PCGKQTLER	
连接体	RKRRKR		
重链	181	IVGGQE	CKDGECPWQA
241	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEVVIK
301	ACLPERDWAE	STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK
361	NMFCAGYDTK	QEDACQGD	AG
421	WIDRSMKTRG	LPAKSHAPE	VITSSPLK

表 12a-序列识别号 13-去除-RKRRKR-连接体之后人类因子 Xa 三重突变体的多肽序列

轻链	1 ANSFL	F WNKYKDGQDC	ETSPCQNOGK
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	CELFTRKLCG
121	GKACIPTGPFY	PCGKQTLER	
重链	181	IVGGQE	CKDGECPWQA
241	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEVVIK
301	ACLPERDWAE	STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK
361	NMFCAGYDTK	QEDACQGD	AG
421	WIDRSMKTRG	LPAKSHAPE	VITSSPLK

表 12b-序列识别号 14-分泌之后人类因子 Xa 三重突变体的轻链片段的多肽序列

1	ANSFL	F WNKYKDGQDC	ETSPCQNOGK
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	CELFTRKLCG
121	GKACIPTGPFY	PCGKQTLER	

表 12c-序列识别号 15-分泌之后人类因子 Xa 三重突变体的重链片段的多肽序列

重链	181	IVGGQE	CKDGECPWQA
241	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEVVIK
301	ACLPERDWAE	STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK
361	NMFCAGYDTK	QEDACQGD	AG
421	WIDRSMKTRG	LPAKSHAPE	VITSSPLK

[0006]

表 19-序列识别号 16-编码 r-解毒剂 (因子 X 三重突变体) 的多核苷酸序列

```

1  ATGGGGGGGC  CACTGGCAGC  CGTCCCTGATC  AGTGCATCCG  TGGTCTGGCT  CCTGCTGCTC  GGGGAARGTC  TGTTCATCCG  CAGGGGGGAG  GCCACACACA
101  TCTTGGCCAG  GCTCACCAGG  GCCCAATTCCT  TCTTTTTCG  GAAATATATC  AATAGTGGCC  ACNRTGTGTA  GACCAGTCCCT  TCCCGAACC  AGGCCAATG
201  TAAAGACGCG  CTCGGGGAT  ACACCTGAC  CTGTTTGGAA  GGATTCGAG  GCAAAACTG  TBLATTTATC  ACRAGGRAG  TCTGCGACT  GGACRACGG
301  GACTGTGACC  AGTCTTCCCA  CGAGGACAG  AACTTCTCTG  TGTCTCTCTG  DELLCTGGG  TACACCCCTGG  CTBACRABGG  CAAGGCTTGC  ATTCTTACAG
401  GGGCCCTACC  CTGTGGGAAA  CAGACCTTGG  AAGGACAGAA  GAGGAGAGAG  AGGATCTTGG  GAGGCCAGGA  ATGCARGGAC  GGGGAGTGT  CCTGGCAGGC
501  CTTGCTCATC  AATGAGGAAA  ACGAGGATTC  CTGTGGTGG  ACCATCTGA  GCGATCTCA  GATCTTACG  GCAGCCCACT  GTCTCTACCA  AGCCRABAG
601  TTTAAGGTGA  GGGTAAAGGA  CCGGAACAG  GACCAAGAG  GAGGCGGTCA  GCGGTTCAC  GAGTTCGAG  TGGTCAACAA  GCACAACCG  TTTACAAAAC
701  AGACCTTUSA  CTTGGACATC  GCGGTCTCC  GCTTCAGAC  CCCCACAGC  TTTCCGATGA  ACGTGGGGCC  TGGCTGGCTC  CCGGAGCGTG  ACTGGGGGGA
801  GTCCACCTTG  ATGACCCGGA  AGATCGGAG  AGATCGGAG  ACCACTTCA  TCAATACCA  TCAATACCA  TCAATACCA  TCAATACCA  TCAATACCA
901  TACCTGGACC  GCAACACTTC  CAACTCTTC  CAACTCTTC  CAACTCTTC  CAACTCTTC  CAACTCTTC  CAACTCTTC  CAACTCTTC  CAACTCTTC
1001  GGGAGGCGAG  GGGCCCGCAC  GTCRCCCAT  TCRAGGAC  TCRAGGAC  TCRAGGAC  TCRAGGAC  TCRAGGAC  TCRAGGAC  TCRAGGAC
1101  GATCTACACC  AAGGTACCG  CCTTCCCTCA  CTGGATCGAC  AGGTCATGA  AACTCAGGG  CTTCGCCAAG  GGCARAGGC  ATGCCCCCGA  GGTCTATAAG
1201  TCCCTCCCAT  TAAGTGA

```

[0007]

表 20-序列识别号 18-r-解毒剂表达载体的多核苷酸序列

1 TCTACACACA GTACTGCGCC ACACCAATGCG CCGCGCACTG CAGCTGCTCC TGGTCAGTCC CTCCCTCCCT GCGCTCCCTG GCGCTCCCTG TCGTCCGATA AATACRABA TGGCGACCCAG AACTCTCTTC

101 ATCGGCAKGG AGCGGCGORA CAGCAATCTG GCGAGGCTCA GCGAGGCCAA GCGAGGCTCC TCTCTTCTT TCTGGRATA TCGCGACCCAG TGGCGACCCAG TGGCGACCCAG

201 GTCTCTTCCA GAACTCAGCC AANTWTMAG ACGCCCTGCG GCGATACACC TCGACTGCTT TCGAGTACTG TCGAGTACTG TCGAGTACTG TCGAGTACTG TCGAGTACTG

301 GAAGCTCTCC AGCTTGGACA ACGGGGACTG TCGGAGACTG TCGGAGACTG TCGGAGACTG TCGGAGACTG TCGGAGACTG TCGGAGACTG TCGGAGACTG TCGGAGACTG

401 AAGGCAAGG CCTGCAATTC CAGCGGCTTC TCGCGGCTTC GCGAGGACTG TCGGAGACTG TCGGAGACTG TCGGAGACTG TCGGAGACTG TCGGAGACTG TCGGAGACTG

501 AGGAGCGGGA GTGTCCCTGG CAGGCGCTGC TCAICAAATG GGAAGAGGAG GGTTCCTGTC GGTTCCTGTC GGTTCCTGTC GGTTCCTGTC GGTTCCTGTC GGTTCCTGTC

601 CCACTGTCTC CACCAAGCCA AAGATTTAA GGTAGGHTA GCGAGCGGA GCGAGCGGA GCGAGCGGA GCGAGCGGA GCGAGCGGA GCGAGCGGA GCGAGCGGA

701 ATCAGGCAEA ACCGGTTCAC AAGCGAAC CATTACTTC ACNTGCGCT ACNTGCGCT ACNTGCGCT ACNTGCGCT ACNTGCGCT ACNTGCGCT ACNTGCGCT

801 GCGTCCCGA GCGTGAATGG GCGGAGTCA GCGTGAATGG GCGGAGGAG GCGGAGGAG GCGGAGGAG GCGGAGGAG GCGGAGGAG GCGGAGGAG GCGGAGGAG

901 CAGGTCGAG ATGCTGCGAG TGCCTTACT TGCCTTACT TGCCTTACT TGCCTTACT TGCCTTACT TGCCTTACT TGCCTTACT TGCCTTACT TGCCTTACT

1001 ACCAAGCCAG ACGATGCTTC CCAAGCGGAC CCAAGCGGAC CCAAGCGGAC CCAAGCGGAC CCAAGCGGAC CCAAGCGGAC CCAAGCGGAC CCAAGCGGAC CCAAGCGGAC

1101 GCTGTGCGCG TAAGGGGAG TAAGGGGAG TAAGGGGAG TAAGGGGAG TAAGGGGAG TAAGGGGAG TAAGGGGAG TAAGGGGAG TAAGGGGAG TAAGGGGAG TAAGGGGAG

1201 GCGCCATCCC CCGGAGGTC TAAGGCTTC TAAGGCTTC TAAGGCTTC TAAGGCTTC TAAGGCTTC TAAGGCTTC TAAGGCTTC TAAGGCTTC TAAGGCTTC TAAGGCTTC

1301 GCGTGGACTG TGCCTTACT TGCCTTACT TGCCTTACT TGCCTTACT TGCCTTACT TGCCTTACT TGCCTTACT TGCCTTACT TGCCTTACT TGCCTTACT

1401 AAGATGAGG AATTTGCAATG CATTCTTGA GCGAGGCTCA TCTTCTTCC TCTTCTTCC TCTTCTTCC TCTTCTTCC TCTTCTTCC TCTTCTTCC TCTTCTTCC

1501 CAGGCAATGT GCGGATGCGG TCGGCAATGT TCGGCAATGT TCGGCAATGT TCGGCAATGT TCGGCAATGT TCGGCAATGT TCGGCAATGT TCGGCAATGT TCGGCAATGT

1601 TCGAATGTTT GTCAATGTTT GTCAATGTTT GTCAATGTTT GTCAATGTTT GTCAATGTTT GTCAATGTTT GTCAATGTTT GTCAATGTTT GTCAATGTTT GTCAATGTTT

1701 GCTTCCCGAG CTCTCCCGAG CTCTCCCGAG CTCTCCCGAG CTCTCCCGAG CTCTCCCGAG CTCTCCCGAG CTCTCCCGAG CTCTCCCGAG CTCTCCCGAG CTCTCCCGAG

1801 TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT

1901 TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT

2001 TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT

2101 TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT

2201 TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT

2301 TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT

2401 TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT

2501 TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT

2601 TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT

2701 TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT

2801 TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT

2901 TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT

3001 TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT

3101 TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT

3201 TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT

3301 TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT

3401 TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT

3501 TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT

3601 TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT

3701 TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT

3801 TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT TCGGCGCCAT

[0008]

1991 AAGATCCCTT GATCTTTCTT ACGGHTCTTG ACGHTCAGTG GAAAGAAAC TACGGTTAAG GGAATTTGGT CATGAGATTA TCAAAAGTA TCCTACACTA
 4001 GATCCCTTTA AATTAAMAAT GAAGTETDMA AATAAATAAG AATAAANCTTG AATAANCTCT TACCANCACT CTCCTACACTA GCCACCTATC
 4181 TTAGGAGACT GTCTACTTTC TTCACTCATA GTTTCATAC TCCGCTGCTG GTAGATAACT ACGGTACGGG AAGGCTTACC ATCTGGCCCC AGTGTCCAAA
 4281 TGTATACGHE AGACCCAGCC TCAADGGTCC CAGATTTAC AGAATAPAA CAGCTAGCCG GAAAGHCCGA GCTCAGAAGT GGTCTTGAHA CTTTATCCGC
 4381 CTCACATCCAG TCTATTAAT GTTCCCGGGA AGCTAGAGTA AGTASHTGG CAGTTAATAG TTTCGGCAC GTTGTTCOA TTGCTACAGG CATCGTGGTG
 4481 TTAGGCTGGT GGTTFGBDAD GGTTCATTC AGCTCCGCTT CCAAGAGAT CAGGCGAGT AAGCGAGT CCAAPGATCC CCAAGTTGEG CAAABAAGCG GTTAGCTCT
 4501 TCGTCTCC GATCCCTGTC AGAATAACT TCCGCTGCTT STTATCATTC AUCSTANCG CAGCACTCCA TAACTTCTTT ACTGTCAATCC CATCCCTAAG
 4681 AAGCTTTTCT GTGACTGGTG AGTACTCAAC CAGTCAATC TGGAGATAGT GTAATGCGGG ACCGAGTTGC CCGGAGTTGC TCTTGGCCCG GGTCAATACG GGATAATAC
 4781 GCGCCACATA CCAGAACTTT ABAATGCTC ATCAATGMA AAGHTTCTC GGGCCGMAA CTTCTAAGGA TCTTACCCTT GAGAAAGCAA AATCCGCCAA AATCCGTAAT
 4981 AAGGGCCACA CCGAATCTT GAATACTCAT ACTCTCTCTT TTGATATAT ATGAAAGCAT TATACAGGCT TATGTCTCA TGAGCGGATA CATATTTGAA
 5081 TSTATTAGA AAATAAACA AATAGGCTT CCGCGACTT TTCCCGMAA AATGCTACTT GCGAANTTCT AANCGTTAAT ATTTGTGTA AATTCGCTT
 5181 AAATTTTCT TAATCAGCT CATTTCTTAA CCAATFAGCC SAATGEGCA AATTCCTTA TAAATCAAAA GAATAGACCG AGATAGGGTT GAGTGTGPT
 5281 CCAATTCGA ACAGMGTTC ACTAATAAG AACTGACTT CCAAGCTMA AGGCGMAA ACGTCTATC AGGCGGATCG CCCACTACTG GAACCATCAC
 5381 CCVAVICAA TTTTTCGCG TCCAGCTCC CVAAGCACT AAATCCGAC COTAAAGGA GPTACGCTG CAGMTAACCA CACACCCGCG CCGGTTAAT
 5481 GCGAGAAAG GAGGGAAGA ARGHGAAG AGHGGCTTG CAGCTTAGC TTGGMAGG CAACTGCTCC CAGTACAGC GTGTAAAC GACGGCCAGT GAGCGGCGT AATACGACTC
 5581 GCGCCCTTAC ACGCCCTGTC CCAATGAGC TCCGAACTG TCCGAACTG GACTGTTAG GCAATGCTC GCAATGCTC GCTATTACG CAGCTGCGCA
 5681 AAGGGGATG TCGTGAAGG CAGTAACTT GGGTAAAGCC AAGHTTCTC CAGTACAGC GCAATGCTC GCAATGCTC GCAATGCTC GCAATGCTC GCAATGCTC
 5781 ACTATAGHC GAATGHAAT TARTGCTG GGTBAGCC CGRAGAA GACTCTTAG GCAATGCTC GCAATGCTC GCAATGCTC GCAATGCTC GCAATGCTC
 5881 GAGGCTGAT TGAAGGGGA AGTACACC CAACTCAAT ACACTCTG GAGCTAAGCC ACGAATGTA GAGGGAAGAT TCTGCACGTC COTVCCAGC
 5981 GCGCTCCCG TCAACACCA CCCCACCG CCGGACCG AGCTGAGAT AATTAACA AAGGACTCG CCGCTGCTT GGGGARTCC AAGGACCGTC
 6081 CTIAACTC CACTAACGTA GAACTCAG AUCCTGCTT TCCGCTCC CACTGAGG ATTTGCTA AGGCTGCG AGGCTGCG ATGCGTLAGG
 6181 CTCCGCTGC CGTCACTGG CAGAGGCGAC AUCGCGACA TCCGCGAGA AGTGGGAGG GTTGGGAGG AAGGCTAGAG GTGCTAGAG AAGGTTGCTT
 6281 GGGTAACT GGGAAATGA TGTCTGCTC TGGTCTGCTT TTTTDLGA GGTGGGGGA GAATGTATA TRAGTCAAT AGTCGCTC AGTCGCTC
 6381 TTCCAMCG GTTTCGCC CAAACLAGG TAACTGCTT GTTCTCTC CCGGCTTTC CCGGCTTTC CCGGCTTTC CCGGCTTTC CCGGCTTTC
 6481 TCCACGCC CTGGCTGAG TACGIGATC TTGATCCGA GCTTGGGTT GAGGTGGT GGGAGTTC CCGGCTTTC CCGGCTTTC CCGGCTTTC
 6581 TCGTCTGA GTTGAAGCTT GCTTGGGCT CCGGCTTTC TCGAAGGAG TCAAAATGA GAGGCGGCG CTCCGCGGAG CCGGCTTTC CCGGCTTTC
 6681 APTTAAATP TTTGATGAC TGTNGGAG CTTTTTCTT GGAAGATAG TCTTGAAT GGGGCGAAG APTTGAAC TGGTATTCG GTTPTTGGG
 6781 CCGCGGGG CAGCGGGCC CGTGGTCC AGGGACATG TTGGGAGG GGGGCTTC GAGTCCGCG ACGGAGATC ACGGAGGCT AGTCTEAG
 6881 TCGCGGCTC CCGGCTTTC TCGAAGGAG CCGGCTTTC TCGAAGGAG TCGAAGGAG TCGAAGGAG TCGAAGGAG TCGAAGGAG TCGAAGGAG
 6981 TCGCGGCTC CCGGCTTTC TCGAAGGAG CCGGCTTTC TCGAAGGAG TCGAAGGAG TCGAAGGAG TCGAAGGAG TCGAAGGAG TCGAAGGAG
 7081 CCGGCTTTC CCGGCTTTC TCGAAGGAG CCGGCTTTC TCGAAGGAG TCGAAGGAG TCGAAGGAG TCGAAGGAG TCGAAGGAG TCGAAGGAG
 7181 CCGGCTTTC CCGGCTTTC TCGAAGGAG CCGGCTTTC TCGAAGGAG TCGAAGGAG TCGAAGGAG TCGAAGGAG TCGAAGGAG TCGAAGGAG
 7281 CTTTTGAT TTGATCTG GTCATCTC AAGCTTCTT CAGTCTTCTT CAGTCTTCTT CAGTCTTCTT CAGTCTTCTT CAGTCTTCTT CAGTCTTCTT
 7381 AAT

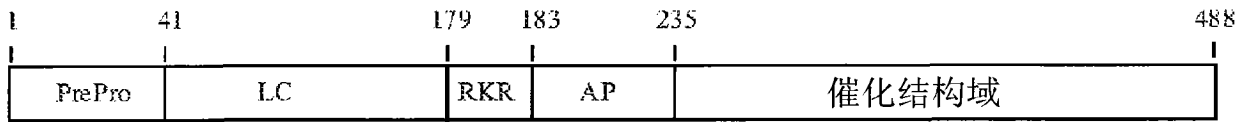


图 1

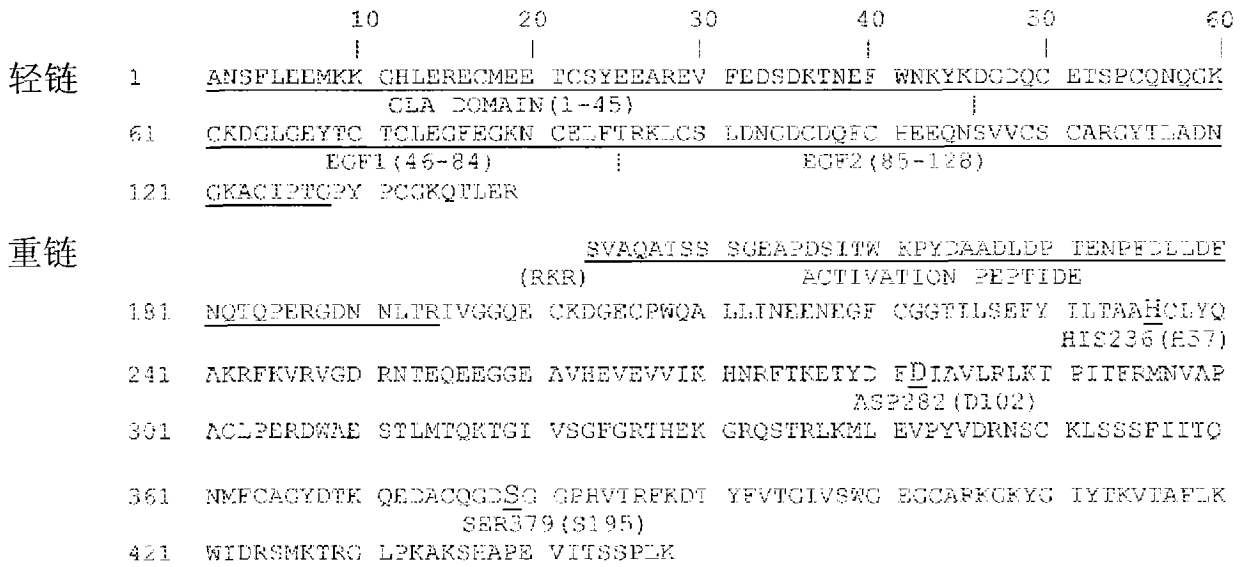


图 2

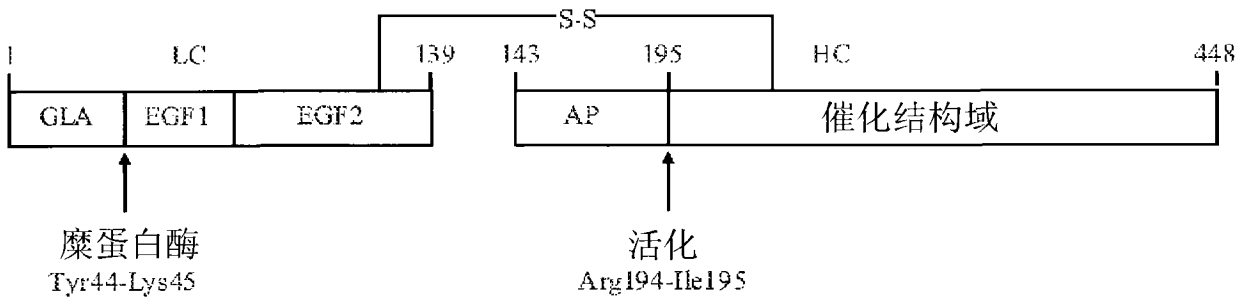


图 3

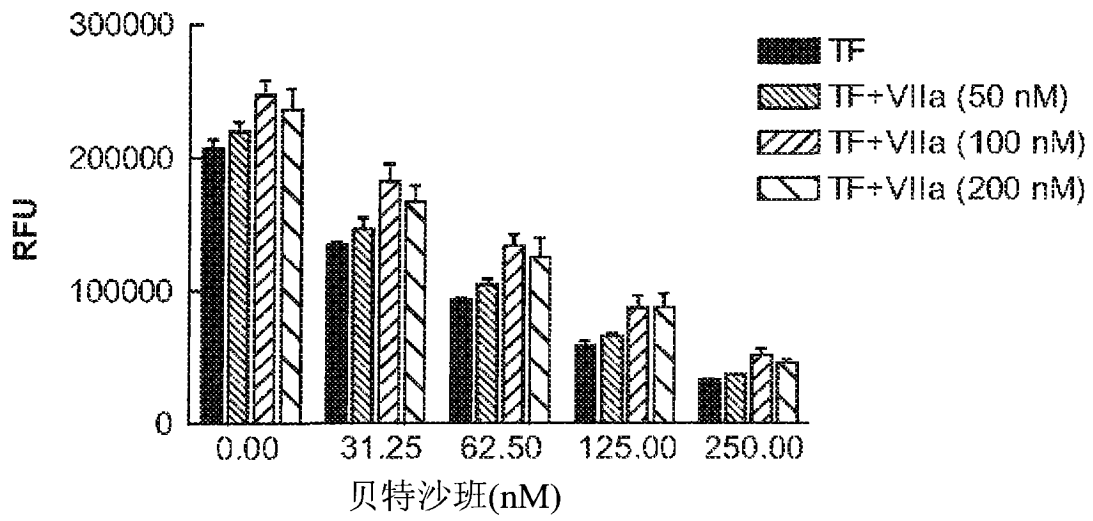


图 4

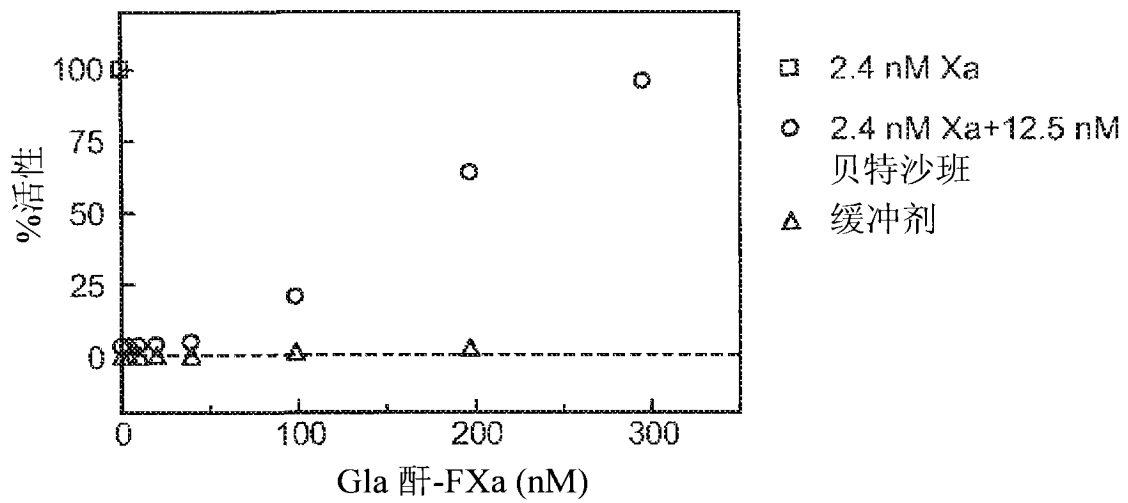


图 5

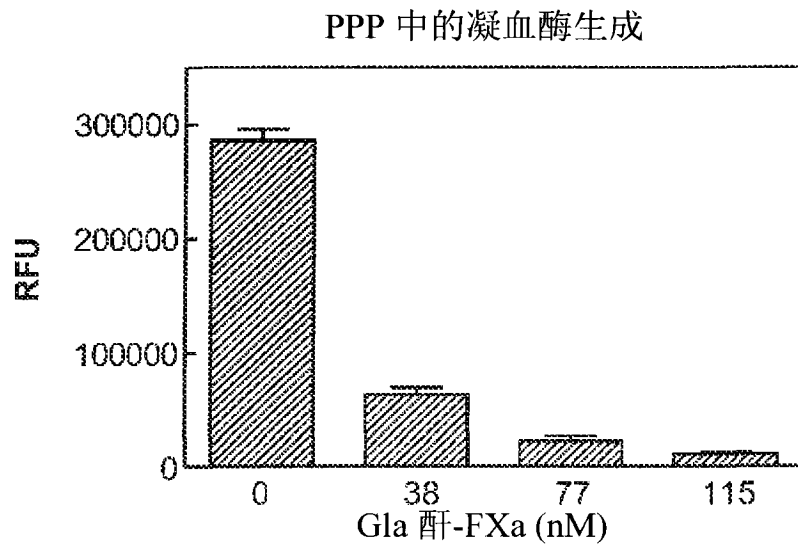


图 6

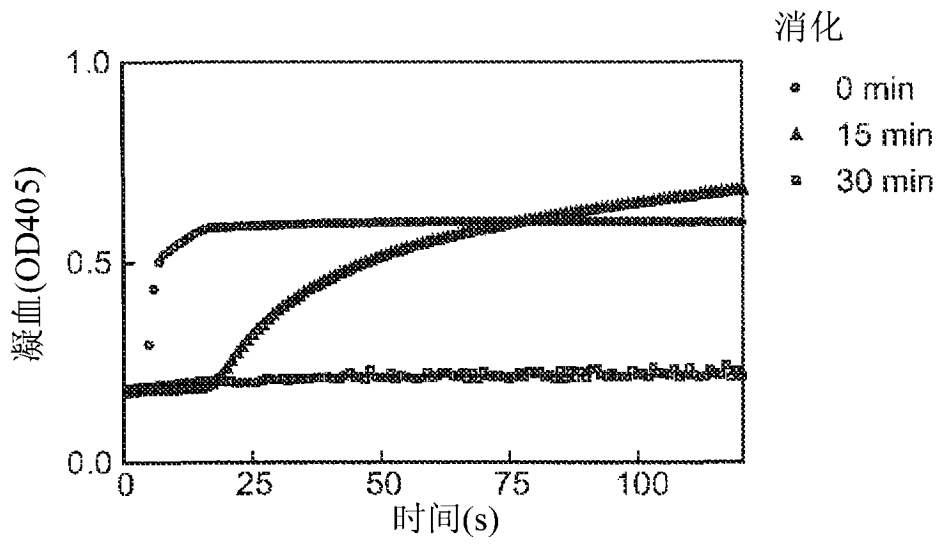


图 7

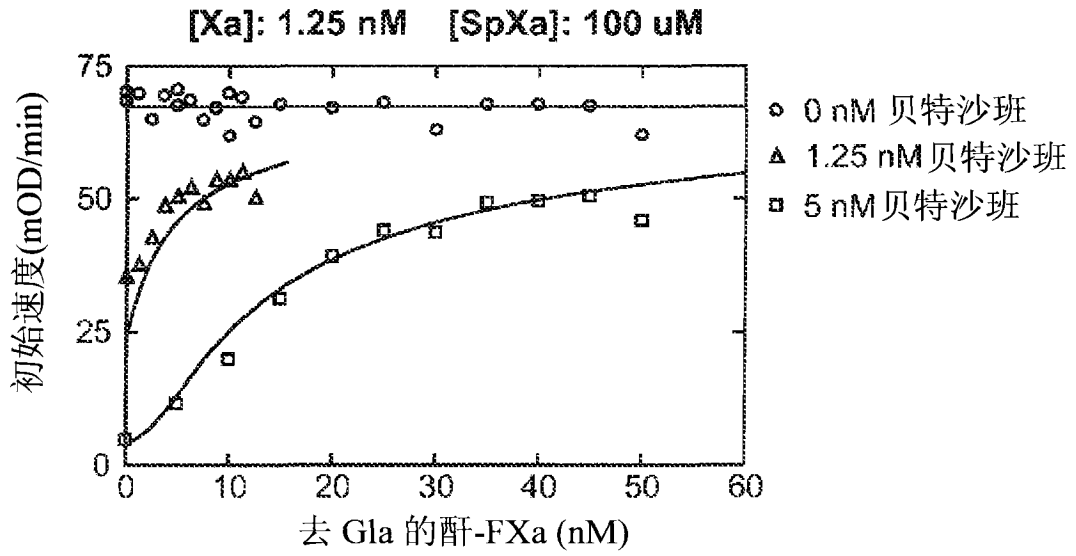


图 8

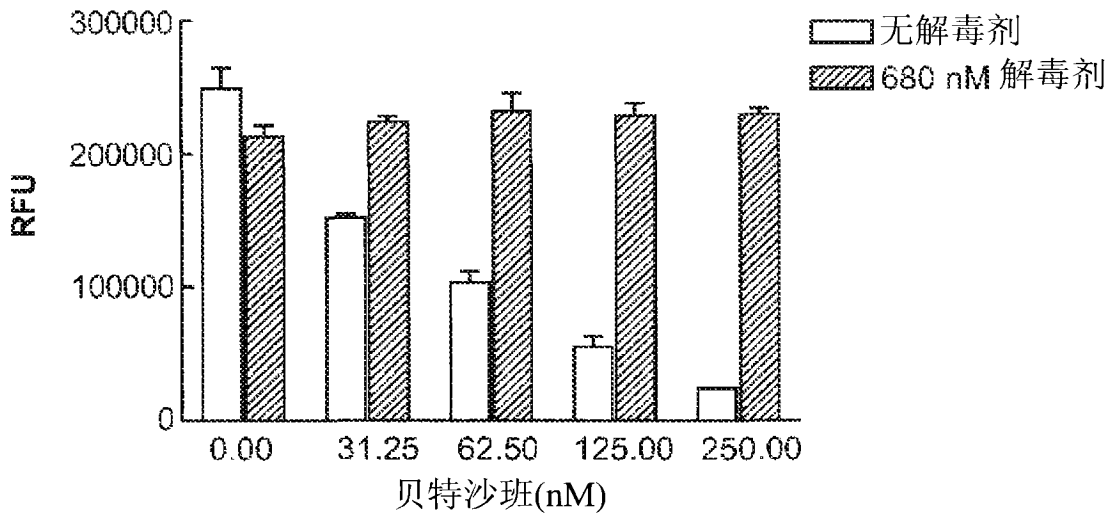


图 9

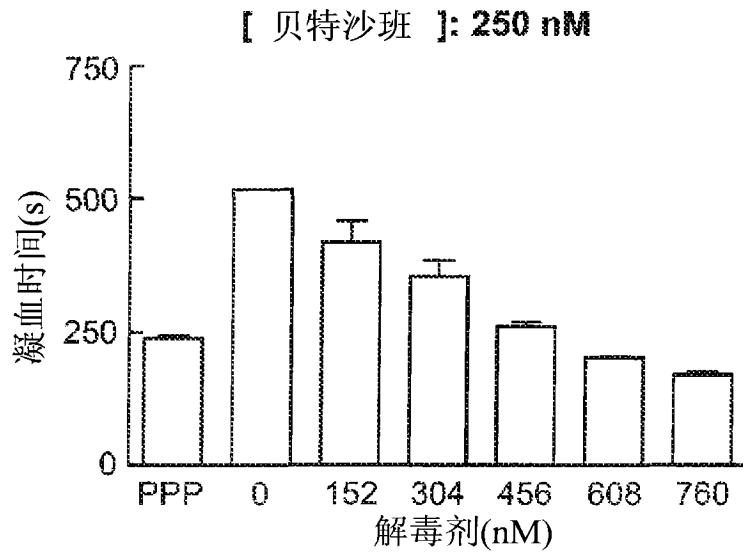


图 10

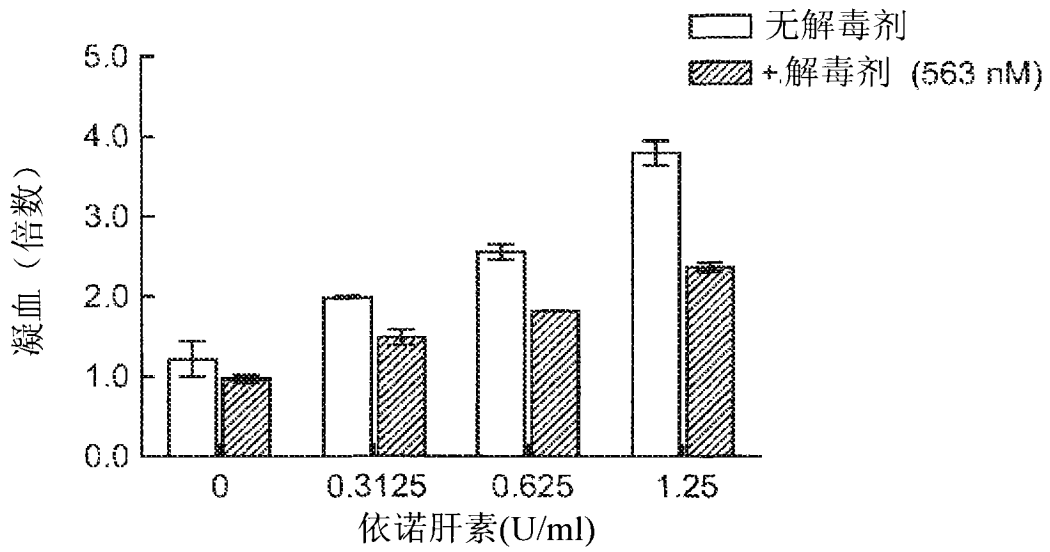


图 11

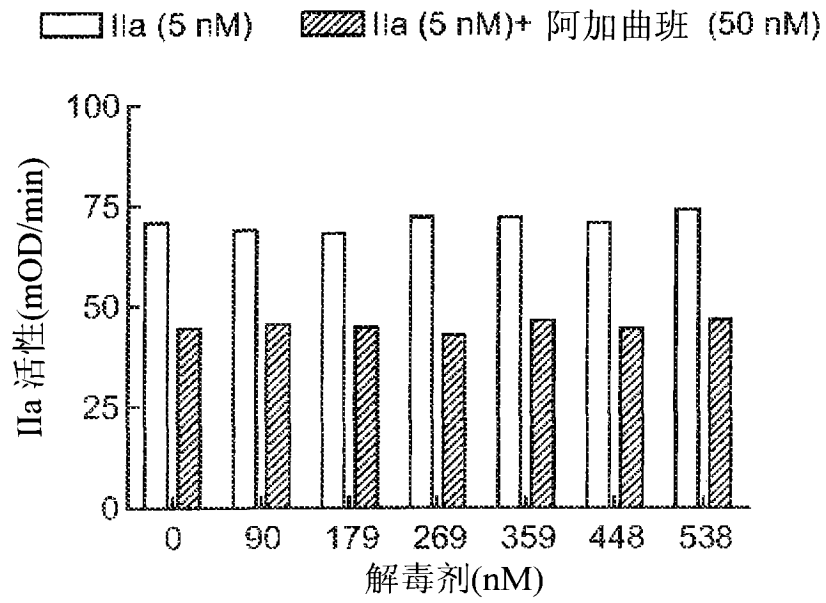


图 12

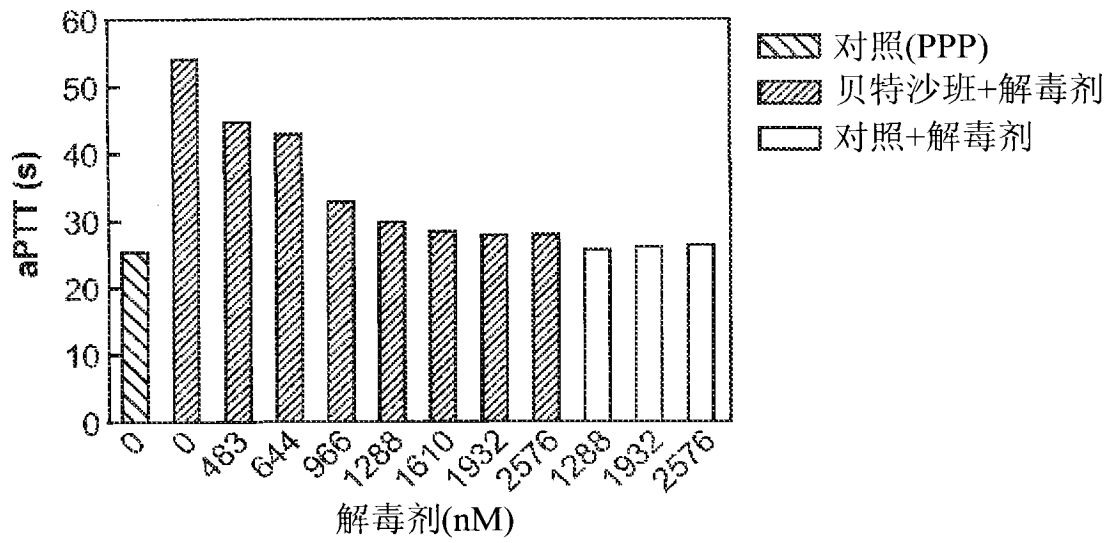


图 13

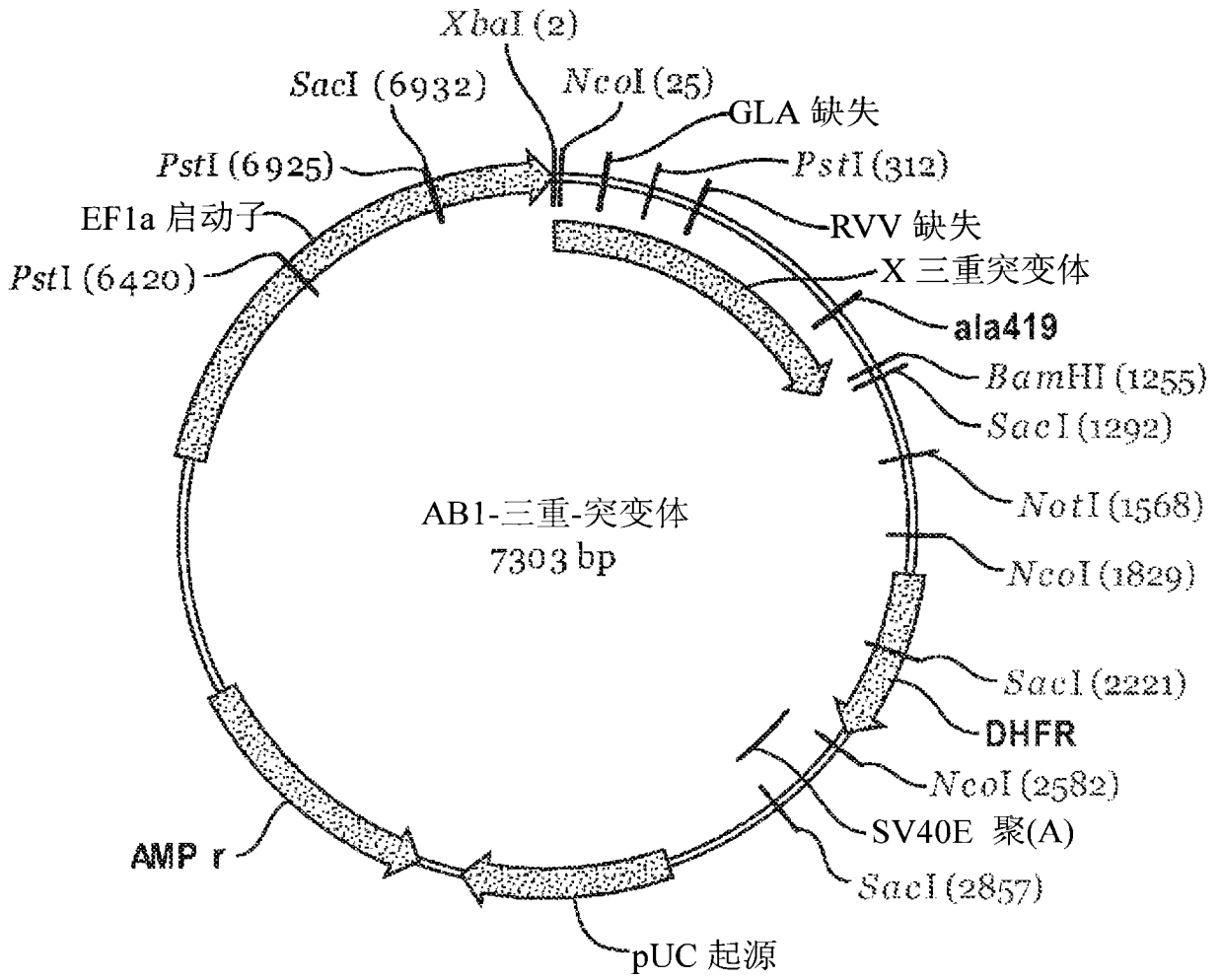


图 14

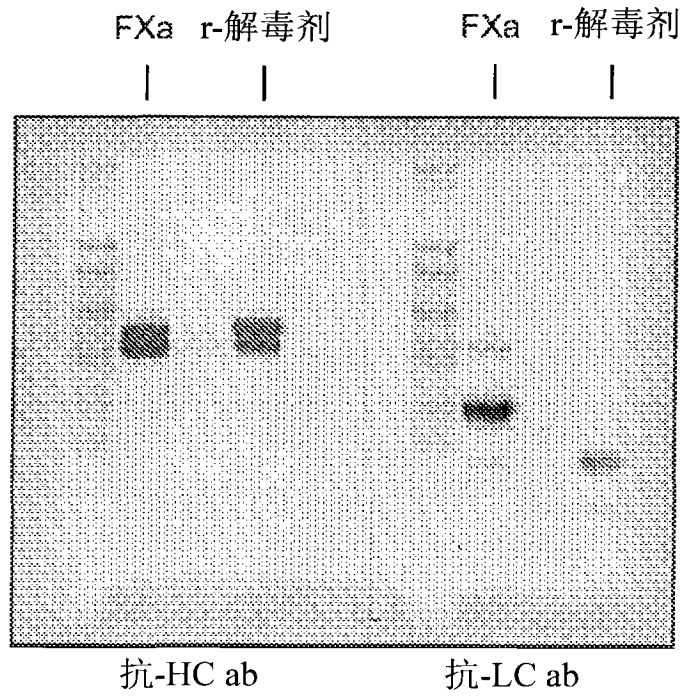


图 15

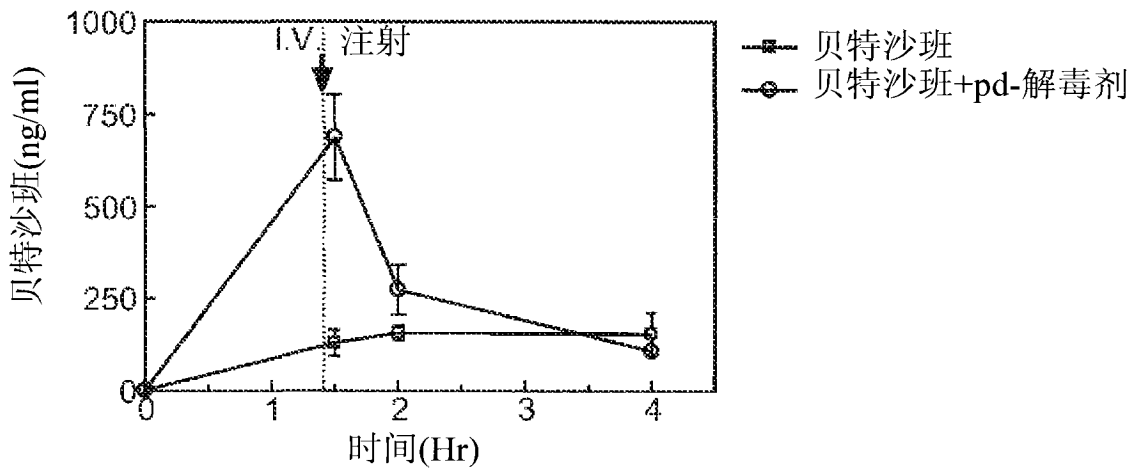


图 16

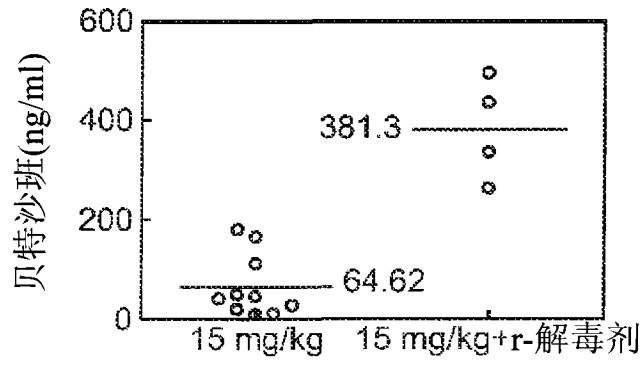


图 17A

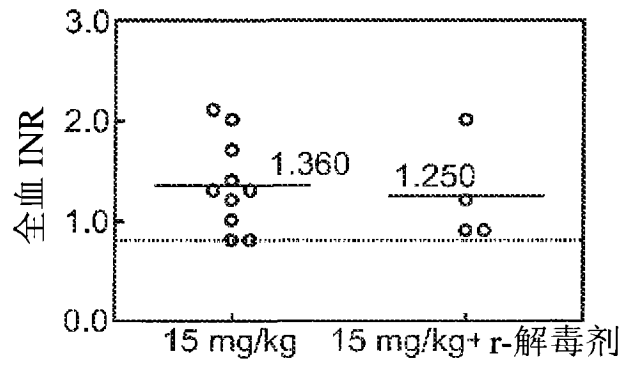


图 17B

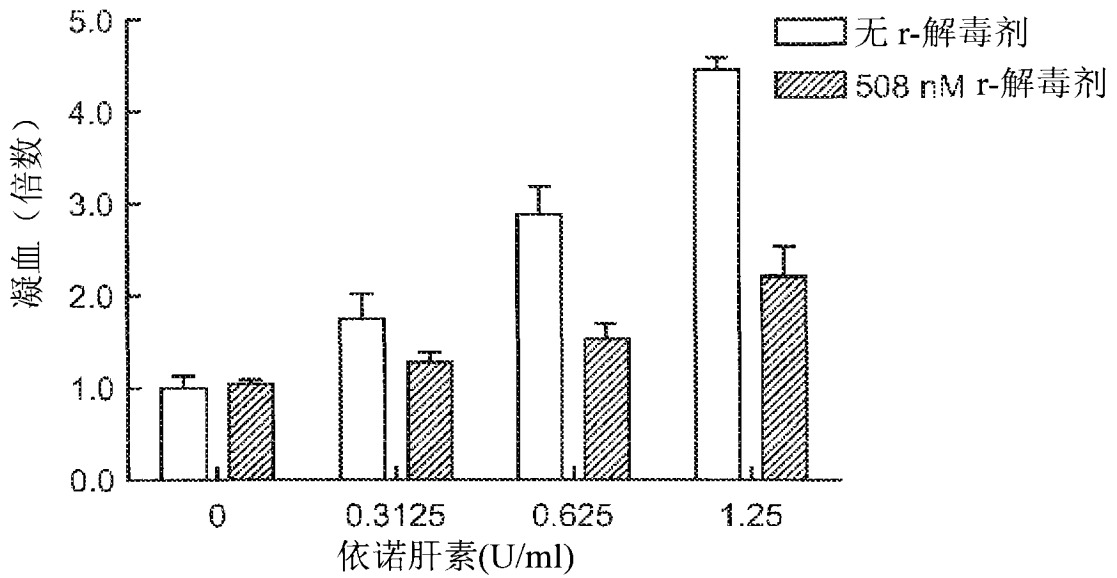


图 18

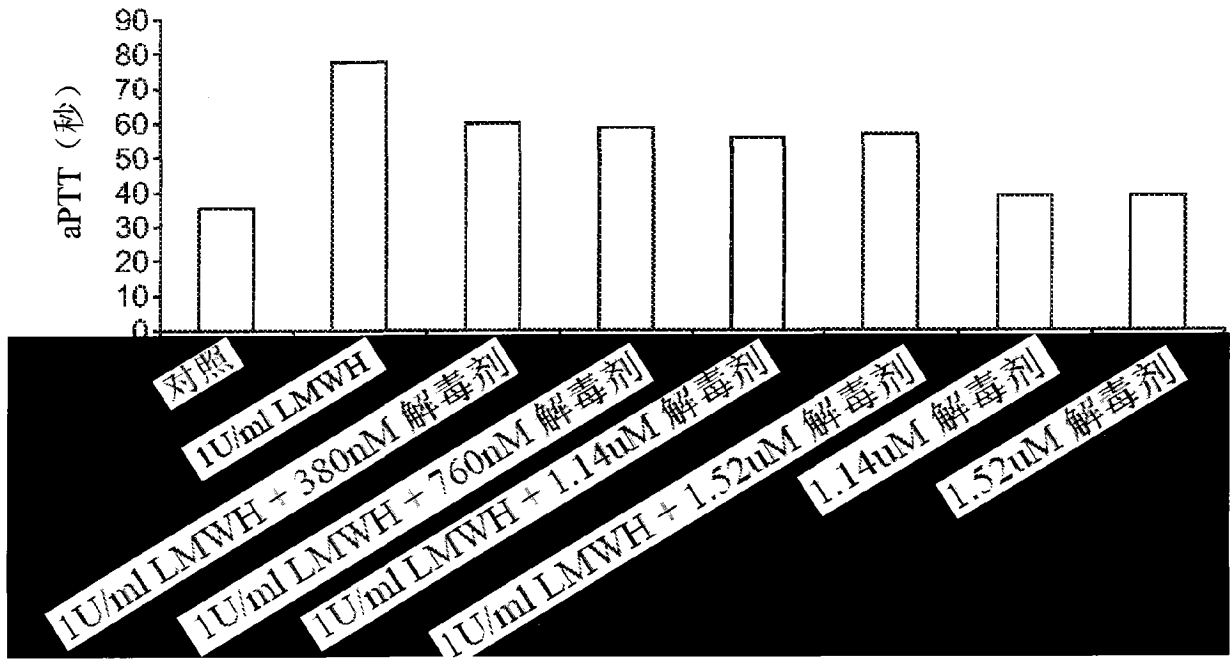


图 19

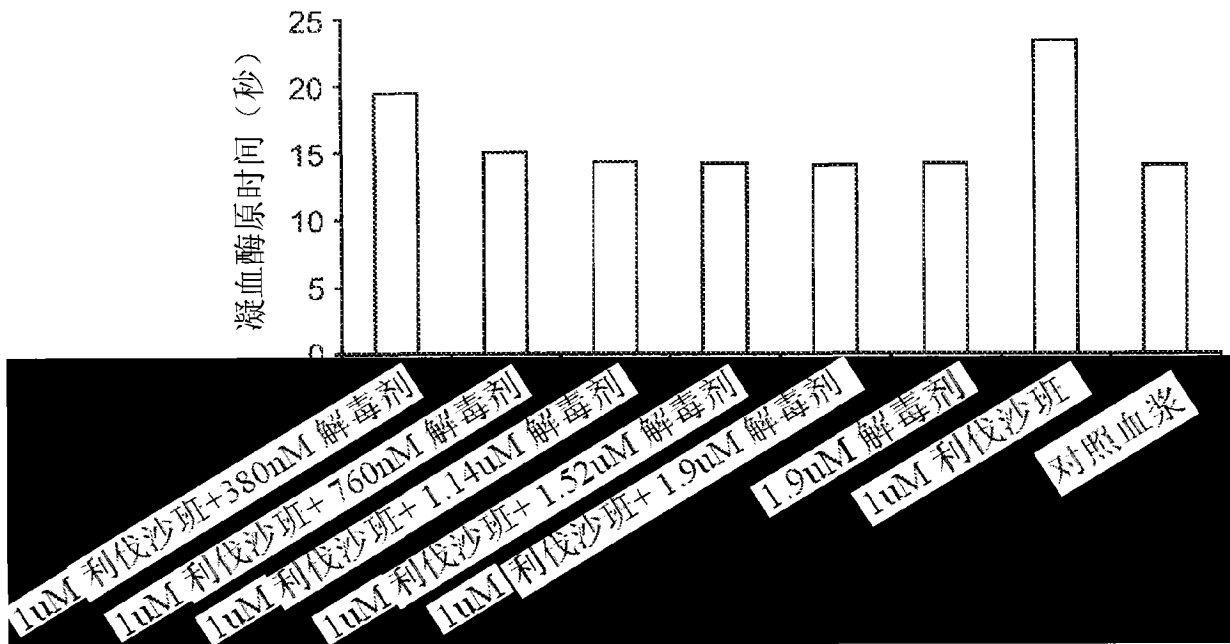


图 20

```

atggggggcccccaotgcacctcgtcctgctcagtgccctccctggctgggctcctgctgctc
M C R P L H L V L L S A S L A G L L L L
ggggaaagtctggtccatccgcaggaggcaggccaaacaacatccctggcgagggtcaccgagg
G E S L F I R R E Q A N N I L A R V T R
gccaattcctttcttttctggaataaatacaaaagatggcgaccagtgtagaccagtcct
A N S F L F W N K Y K D G D Q C E T S P
tgccagaaccaggggcaaatgtaaagaaggcctgggggaatacacctgcacctgttttagaa
C Q N Q G K C K D G L G E Y T C T C L E
ggattcgaaggcaaaaaactgtgaattattcacacggaagctctgcagcctggacaacggg
G F E G K N C E L F T R K L C S L D N G
gactgtgaccagttctgccacgagggaacagaactctgtgggtgctcctggcccggggg
D C D Q F C H E E Q N S V V C S C A R G
tacacccctggctgacaacggcaaggcctgcattcccacaggggccctaccctgtgggaaa
Y T L A D N G K A C I P T G P Y P C G K
cagaccctggaacgcaggaagaggaggaagaggatcgtgggagggcagggaatgcaaggac
Q T L E R R K R R K R I V G G Q E C K D
ggggagtgctccctggcaggccctgctcctcaatgaggaaaaacgagggtttctgtggtgga
G E C P W Q A L L I N E E N E C F C G G
accattctgagcgagttctacatcctaaacggcagcccaactgtctctaccaagccaagaga
T I L S E F Y I L T A A H C L Y Q A K R
ttcaaggtgagggttaggggaacgggaacacgggagcaggaggaggggcggtgaggcggtgca
F K V R V G D R N T E Q E E G G E A V H
gaggtggagggtgctcaagaacaaacgggttcacaaaggagacctatgacttogaatc
E V E V V I K H N R F T K E T Y D F D I
gctgtgctccggctcaagaaccccaacaccttcogtatgaaagtgggcgccctgctgctc
A V L R L K T F I T F R M N V A P A C L
cccgagcgtgactgggcccaggtccacgctgatgacgcagaagacggggattgtgagcggc
P E R D W A E S T L M T Q K T G I V S G
ttcggggcaccaccagagaagggccggcagtcaccaggctcaagatgctggaggtgccc
F G R T H E K G R Q S T R L K M L E V P
tacgtggaccgcaacagctgcaagctgtccagcagcttcacatcaccacagaacatgttc
Y V D R N S C K L S S S F I I T Q N M F
tgtgcccgttacgacaaccaagcaggaggatgctgcccagggggacgcaggggggcccgcac
C A G Y D T K Q E D A C Q G D A G G P H
gtcaccctcctcaaggacacctaacttcgtgacaggcatcgtcagctggggagagggtgt
V T R F K D T Y F V T C I V S W C E G C
gcccgttaaggggaagtaacgggatctacaccaaggtcacccgcttccctcaagtggtatgac
A R K G K Y G I Y T K V T A F L K W I D
aggtccatgaaaaccaggggcttgcccaaggccaagagccatgccccggaggtcataacg
R S M K T R C L P K A K S H A P E V I T
tctctcctattaaagtga
S S P L K -

```

图 21

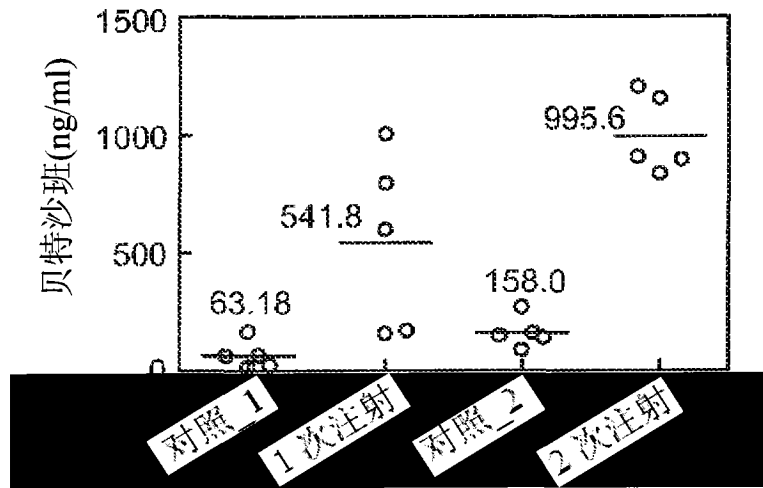


图 22A

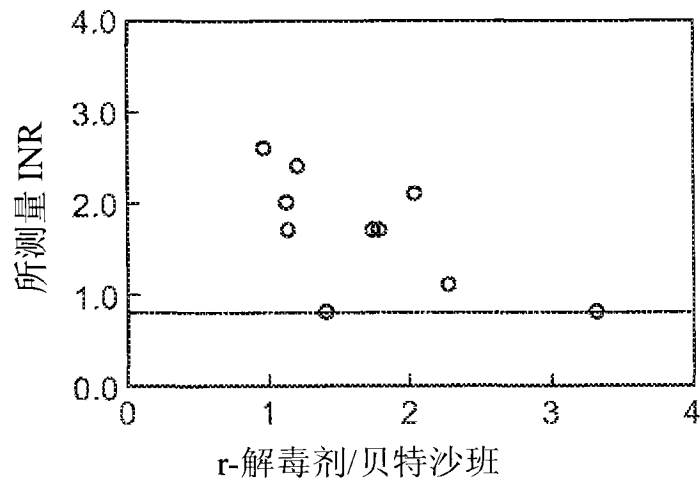


图 22B