



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101501216 B

(45) 授权公告日 2013. 10. 02

(21) 申请号 200780014337. 6

(22) 申请日 2007. 03. 06

(30) 优先权数据

60/779, 474 2006. 03. 06 US

60/843, 945 2006. 09. 12 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008. 10. 21

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2007/005845 2007. 03. 06

(87) PCT申请的公布数据

W02007/103447 EN 2007. 09. 13

(73) 专利权人 胡玛基因公司

地址 美国亚利桑纳

(72) 发明人 K·奥斯瑟

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1074438 A, 1993. 07. 21, 全文.

US 5476777 A, 1995. 12. 19, 第 2 栏第 21-30

行

第 6 栏第 50-54 段.

CN 1127509 A, 1996. 07. 24, 全文.

CN 1139455 A, 1997. 01. 01, 全文.

审查员 朱镜羲

权利要求书1页 说明书30页

序列表23页 附图15页

(54) 发明名称

制备重组人凝血酶的方法

(57) 摘要

本发明公开了制备重组人蛋白的新方法。具体而言,本发明涉及制备人重组凝血酶的新方法。

1. 一种制备含有如 SEQ ID NO:16 所示的 gla 结构域的重组人凝血酶原的方法,其包括在无血清条件下培养重组人宿主细胞,其中所述的重组人宿主细胞含有编码所述重组人凝血酶原的表达载体,SEQ ID NO:16 是 Ala Asn Thr Phe Leu Xaa Xaa Val Arg Lys Gly Asn Leu Xaa Arg Xaa Cys Val Xaa Xaa Thr Cys Ser Tyr Xaa Xaa Ala Phe Xaa Ala Leu Xaa Ser Ser Thr Ala Thr Asp Val,其中 Xaa 是谷氨酸或 γ -羧基谷氨酸。
2. 根据权利要求 1 的方法,其中所述人宿主细胞是人胚肾 (HEK) 细胞或 PER-C6 细胞。
3. 根据权利要求 2 的方法,其中所述 HEK 细胞选自:HEK 293、HE K 293T、HEK 293S 和 HEK 293 EBNA。
4. 根据权利要求 1-3 中任一项的方法,其中随后通过使用 ecarin 将所述重组人凝血酶原活化为重组人凝血酶。
5. 根据权利要求 4 的方法,其中所述重组人凝血酶比天然人凝血酶更有效地凝固纤维蛋白原。
6. 根据权利要求 1-3 中任一项的方法,其中所述人重组凝血酶原如 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4 所示。
7. 包含载体的分离的重组人宿主细胞,其中所述载体包含编码含有如 SEQ ID NO:16 所示的 gla 结构域的人凝血酶原的多核苷酸。
8. 根据权利要求 7 的分离的重组人宿主细胞,其是如权利要求 2 或 3 所定义的 HEK 细胞。

制备重组人凝血酶的方法

[0001] 本专利申请在此将按照 37C.F.R. § 1.77(b)(4) 提交给 USPTO 的光盘上所含资料的全部内容引入作为参考。包含所述资料的 CD 创建于 2007 年 3 月 6 日, 文件大小为 24.2KB, 和文件名为“070306 Sequencelisting_WorkFile.txt”。

发明领域

[0002] 本发明涉及制备重组人蛋白的组合物的新观念和方法, 每种组合物都以新的方法制备而成, 该方法制造出在人细胞、人细胞系、人干细胞或人前体细胞中产生的可靠或天然的人蛋白。具体而言, 本发明涉及制备人重组凝血酶和人重组纤维蛋白原的新方法。可以使用两条不同路线来制备人重组凝血酶, 一条始于含 gla 和 Kringle1 和 2 的点突变凝血酶原, 和在这个过程中保持这些结构域; 另一条始于凝血酶原(非突变的), 经由含 HPC4-Kringle2 结构域的前凝血酶(prethrombin) 和使这个前凝血酶遭受点突变。

技术背景

[0003] 凝血酶和纤维蛋白原是血纤蛋白凝固级联的一部分蛋白。凝血酶定义为双链、二硫键、糖基化的多肽, 其切割纤维蛋白原中的特异键以产生自我装配形成血纤蛋白凝块的血纤蛋白单体。

[0004] 当凝血酶和纤维蛋白原混合在一起, 或者添加牛抑肽酶时, 天然血纤蛋白凝固级联的末期发生了。除了提供止血外, 这种血纤蛋白密封剂还为成纤维细胞增殖以及其他间充质细胞增殖提供理想的环境。组织密封剂例如 Tisseel[®], 和纤维蛋白原、凝血酶和抑肽酶单独的量的改变决定凝块发生的速度和凝块密度。Mats Brittberg 等在他自 1994 的论文中测试了以使用 Tisseel 的方式组合的组织密封剂, 其中他表明在其研究中, 例如软骨细胞不渗透通过通过使用 Tisseel 获得的血纤蛋白凝块, 但是该细胞仅靠着凝块排齐, 这可能再次建立出现密封机制的理论, 其将捕获例如软骨缺陷中的软骨细胞, 但是不允许该细胞渗透过血纤蛋白凝块, 也称作血纤蛋白胶或组织密封剂。当给患者实施自体软骨细胞移植时, 当骨膜移植用作盖住所植入软骨细胞的遮盖罩或胶原 I/III(Chondro Gide[®]) 型膜作为遮盖罩时, Tisseel 被常规地用作组织密封剂。遮盖罩的边缘与环绕的健康软骨缝合, 和组织密封剂(也称作血纤蛋白胶), 例如 Tisseel, 添加到罩子的缝线中, 因此细胞可以注入罩子下面并密封缺陷内部。然而, Mats Brittberg 还发现动物软骨缺陷中血液自发凝结形成的自体血纤蛋白凝块似乎允许软骨细胞渗透, 和与 Tisseel 相反, 允许在血纤蛋白凝块中培养软骨细胞。近来已经描述了 Tisseel[®] 用于称作基质辅助软骨细胞移植(Matrix Assisted Chondrocyte Implantation) 的方法中(Marlovits S, et al. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. (2005) 13:451-7; Bartlett W, et al. J Bone Joint Surg Br. (2005) 87:640-5)。组织密封剂也已用于动物中以作为能够维护心肌壁的支架研究可能的心肌梗死的实施(Christman KL, et al. Tissue Eng. (2004) 10:403)。

[0005] 纤维蛋白原和凝血酶相组合的成分通常似乎更明显适于用作组织密封剂, 例如控制难以在器官例如肾脏中放置缝线的器官切口表面上的出血, 其中对于 Tisseel, 当其与

CoSeal (Baxter) (其由聚乙二醇成分组成) 相比时, 在形成凝块和与表面粘附方面显示出优异的优点, CoSeal 仿佛明显低劣。CoSeal 不能粘附或阻止切口表面血液的筛滤, 这使得其与纤维蛋白原-凝血酶组合的组织密封剂相比不可用 (Bernie JE, et al. J Endourol. (2005) 19 :1122-6)。FLOSEAL (Baxter), 其由胶原颗粒和凝血酶组成, 与纤维蛋白原和凝血酶组合的 Tisseel 在一起使用, 能够预防更广泛的出血区, 例如 L'Esparance 等在肾脏所测试的 (L'Esparance JO, et al. J Endourol. (2005) 19 :1114-21), 与单独使用 Tisseel 相比, 他联合使用两种类型的组织密封剂的密封。在很多其他外科手术中, 组织密封剂例如 Tisseel 被证明显著优于缝合或卡钉 (Langrehr JM, Rozhl Chir. (2005) 84 :399-402)。

[0006] 伤口愈合理想的基质, 止血剂, 必须能够粘附任何哺乳动物组织表面, 包括出血面, 以预防手术过程中的出血和保持患者自己的血容量, 或至少将给患者使用天然血液制品的必要性降至最低。

[0007] 同时, 具有上述能力的组织密封剂应当是安全的, 其将致病性微生物和致病性朊病毒的传播, 包括疯牛病的传播降至最低。当前市场上可买到的大规模使用的产品是组织密封剂例如 Tisseel® (BaxterImmuno) 和 Beriplast® (Aventis/Behring); 这两种组织密封剂和很多其他组织密封剂建立在使用天然人凝血酶和天然人纤维蛋白原上, - 和此外, 在 Tisseel- 以及 Beriplast 产品中, 使用牛抑肽酶; 市场上可使用的其他组织密封剂则更广泛地基于牛产品。

[0008] 大多数广泛使用的商业产品, 例如 Tisseel 血纤蛋白密封剂 (Baxter, Immuno) 等等的情况含有牛蛋白例如抑肽酶。

[0009] 猜测 Tisseel 基质提供成纤维细胞浸润和增殖的最佳环境, 以及如所猜测的还提供止血、组织合成和伤口愈合。Tisseel 和其他组织密封剂中使用的天然凝血酶已经在临床上使用多年以控制烧伤和某些创伤情况的手术过程中的出血 (Nakamura et al. The Amer. Surgeon(1991) 57 :226-230 ;Thompson et al. Ophthalmology(1986) 93 :279-282 ;Harris et al., J. Bone Joint Surg. Am. (1978) 60 :454-456 ;Craig and Asher, Spine(1997) 2 :313-317 ;Prasad et al., Burns(1991) 17 :70-71)。牛凝血酶也是一些商业组织密封剂 (也称作组织胶) 的组分, 例如 Costasis® (Angiotech Pharmaceuticals, Inc. Vancouver, BC, Canada), 其也含有牛胶原。

[0010] 商业凝血酶治疗剂是从人和动物混合血液制品纯化的并且同样存在污染病毒例如 HIV 和肝炎病毒的风险。三种商业凝血酶制剂比较起来, Suzuki 和 Sakuragawa (Suzuki and Sakuragawa, Thromb. Res. (1989) 53 :271-278) 发现该制剂含有污染蛋白, 和人制剂含有免疫球蛋白 G, 乙型肝炎表面抗原抗体和人免疫缺陷抗体。已经报道用牛凝血酶在对人凝血酶和人因子 V (因子 V 是牛凝血酶制剂中的污染物) 都产生自身反应抗体的患者中进行异种免疫 (Stricker et al., Blood(1988) 72 :1375-1380) ;Flaherty and Weiner, Blood(1989) 73 :1388) ;Flaherty et al., Ann Int. Med. (1989) 111 :631-634) ;Zehnder and Leung, Blood(1990) 76 :2011-2016) ;Lawson et al., Blood(1990) 76 :2249-2257) ;Stricker et al., Blood(1988) 72 :1375-1380) ;Berguer et al., J. Trauma(1991) 31 :408-411) 在用 Floseal (Baxter) 治疗的 139 名患者中, 139 名患者中的 25 名 (18%) 的牛凝血酶抗体滴度增加超过基线。而在对照组中, 由用含凝胶的牛凝血酶海绵状物处理的患者组成, 26/131 (20%) 的患者牛凝血酶滴度增加超过基线。对于 Floseal, 牛 Va 因子的相

应数字是 39/139 (28%) 和 43/131 (33%) (分别是 Baxter 和对照组)。2 组间显现牛凝血酶或牛 Va 因子抗体的频数差异统计上没有显著意义 (Winterbottom, N. et al., J. Applied Res. (2002) Vol. 2, Number1)。

[0011] Wai Y 等最近发表的结果 (Wai Y, Tsui V, Peng Z, Richardson R, Oreopoulos D, Tarlo SM, Clin. Exp. Allergy. (2003) 33 :1730) 表明在血液透析中用牛凝血酶对患者局部止血时,对牛凝血酶的敏感和临床过敏反应的可能性,并建议应该考虑其他止血方法。

[0012] 牛凝血酶在医疗和外科程序中用于辅助止血。至少 500,000 个美国人每年接触这种治疗剂,报道提示接触与自身反应性抗体的产生有关。为确定牛凝血酶是否可以诱发病理性自身免疫, Schoenecker 等使非自身免疫倾向的半乳糖- α 1-3-半乳糖缺陷小鼠接触当前批准在美国使用的两种牛凝血酶制剂,并发现,如同人接触牛凝血酶,小鼠产生抗治疗剂和异种碳水化合物半乳糖- α 1-3-半乳糖的免疫反应,和一些小鼠产生抗凝血因子的自身抗体。此外,出乎意料地,单次接触这种治疗剂也在小鼠中诱发自身免疫,特征是系统性红斑狼疮,包括抗核抗原、天然 DNA、双链 DNA 和心磷质的抗体。在所有评估的小鼠中,高水平的这些自身抗体与肾小球肾炎相关。第二次接触牛凝血酶后 15 周在小鼠中检测到这种自身免疫综合征,并发现雌性小鼠显现该综合征的频率明显高于雄性。因此,这些研究表明接触牛凝血酶制剂可以诱发具有狼疮样血清学的病理性全身性自身免疫综合征, (Schoenecker JG, Johnson RK, Leshner AP, Day JD, et al., American J. of Pathology, (2001) 159 :1957)。

[0013] 此外,近来对牛产品可能带来的病原体污染的关注也提高了,例如牛海绵状脑炎 (BSE) 物质,其用传统方法检测不到或不能活化治疗性人血液制品也遭到了病毒颗粒的污染,例如肝炎病毒和人类免疫缺陷性病毒。

[0014] 在其他表达系统,例如 DNA 序列被传送至其中的细菌 (例如大肠杆菌)、酵母系统中,或在被 DNA 序列转染的昆虫细胞、鸟细胞及其他动物细胞中,翻译后的很多人蛋白,尤其是如上所述的类型,例如纤维蛋白原、凝血酶、胶原及其他交联蛋白例如重组因子 XIII,事实上如美国专利 6,780,411 描述,在被传送酵母中制备-实际上是被酵母胞质表达 (从血液纯化的天然纤维蛋白原含有重组因子 XIII 作为稳定凝血过程的交联蛋白) 提及美国专利,主要在美国专利 6,780,411 中描述,其不如重组人蛋白 (例如在由转染的人胚肾细胞及其他细胞 (在无血清合成细胞培养基系统中维持并产生所述蛋白,例如 HEK 293、HEK293T、HEK 293S、HEK 293 EBNA) 组成的系统中产生的纤维蛋白原、凝血酶原、凝血酶原表达单元的构建和在哺乳动物细胞中表达、凝血酶、凝血因子 XIII、胶原) 一样完全类似于可靠的天然蛋白。

[0015] 如美国专利 6,780,411 所述,重组人纤维蛋白原,例如转基因绵羊的乳汁中产生的,看来是少唾液酸化的,当与本专利申请中描述的发明相比时,这成为显著差异,在本发明中,翻译后提供更可靠的天然蛋白,在人重组纤维蛋白原的情况下亦然,这是与例如克隆动物例如绵羊中产生的那些产品显著不同之处。首先,由于已知纤维蛋白原溶解度取决于足够的唾液酸化,和由于纤维蛋白原在任何事件中都是最小的可溶血浆蛋白质,因此实际上可能的情形是:当与使用本发明所述方法制备的纤维蛋白原相比,在该发明中不能获得足够的可溶纤维蛋白原以形成足够抗张强度的血纤蛋白凝胶。相反,在本发明中,纤维蛋白原将由编码 α 、 β 和 γ 链的纤维蛋白原人基因共表达。

[0016] 虽然可以在各种宿主中生产重组凝血酶,但是直到本发明之前最优选在 CHO 细胞中生产重组凝血酶,其实际上与本发明相反,需要胎牛血清的存在,因此首先将可能的不利因素添加到从像 CHO 细胞的来源制造的蛋白中,其次由于添加作为重要污染物的胎牛血清,因而添加非人蛋白和来源于疾病例如疯牛病的致病性朊病毒存在内在风险。

[0017] 与根据本发明生产的凝血酶原不同,通过重组方法已经制备了其他重组凝血酶原分子,其中大约 14% 的蛋白是异常羧化的。根据美国专利 5,502,034,在适当酵母载体中制备根据该发明制备的凝血酶原以用于该发明,这些载体包括 YRp7 (Struhl et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:1035-1039 (1978))、YEp13 (Broach et al., Gene 8:121-133 (1979))、POT 载体 (Kawasaki et al, 美国专利 4,931,373,其引入本文作为参考)、pJDB249 和 pJDB219 (Beggs, Nature 275:104-108 (1978)) 及其衍生物。酵母中制备的凝血酶原不会等同于可靠的天然人凝血酶。

[0018] 在美国专利 #6,037,457 中,在该发明优选实施方案的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞中产生了重组纤维蛋白原,该细胞用来生产重组纤维蛋白原。哺乳动物细胞可以在说明性条件下培养以表达纤维蛋白原,该条件如下:细胞生长在含贴壁微载体珠的摇瓶中,共 200ml 无血清培养基 (含 10 IU 青霉素 /ml、10mg 链霉素 /ml、10U 抑肽酶 /ml、和胰岛素、亚硒酸钠和运铁蛋白中每种 10.μg/ml 的 Dulbecco's Modified Eagle's Medium/F12 培养基) 37°C,生长三周之后开始每隔四至七天收集条件培养基。然而,该发明中包括的其他蛋白没有一种在相同细胞类型系统中制备,当然也没有在人细胞系统中制备,例如人肾细胞和人视网膜衍生 PER-C6 细胞或人胚肾细胞,乃至干细胞。以及前体细胞。上述发明事实上仅涉及单独的重组纤维蛋白原,因此没有解决有关无血清蛋白内容的完全纯的重组人翻译后系统的问题。

[0019] 发明概述

[0020] 本发明提供了重组人蛋白,特别是凝血酶原、前凝血酶、凝血酶和纤维蛋白原,用于制备这些蛋白的载体和人表达系统。此外,本发明实施方案中提供的重组人凝血酶包含突变 (M84A),或在根据本发明更确切和描述性方法中,以前称作 M84A 的凝血酶原类似物将是“凝血酶原类似物 M400A”,和以前也称作 M84A 的前凝血酶类似物将是“前凝血酶类似物 M256A”。本发明也涉及重组人蛋白在如本文对于相应非重组蛋白所述的药物中的用途。描述了获得凝血酶的两条不同路线,一条始于含 gla 和 Kringle1 和 2 结构域的点突变凝血酶原,和在整个过程中维持这些结构域;另一条始于凝血酶原 (非突变),经由含 HPC4-Kringle 2 结构域的前凝血酶,和使这个前凝血酶遭受点突变。

[0021] 本专利申请描述的发明生产人重组可靠蛋白的独特之处基于使用质粒 cDNA 转染的人细胞,能够分泌由转染的特定信息表达的蛋白。在本发明中,人细胞例如人肾细胞,更具体而言人胚肾 (HEK) 细胞系 (例如 HEK 293、HEK 293T、HEK 293S、HEK 293 EBNA),和人视网膜衍生 PER-C6 细胞,或其他细胞,例如干细胞或前体细胞系在无血清合成培养基中增殖,生产蛋白。

[0022] 在这个新人细胞培养系统中,其显著优点包括干细胞和 / 或前体细胞,更具体地说肾细胞系统,乃至更具体地说人胚细胞系及其他细胞系,称作 HEK 293、HEK 293T、HEK 293S、HEK 293 EBNA,和人肾细胞和人视网膜衍生 PER-C6 细胞系统,在独特无血清合成细胞培养基系统中生长、维持和能够从转染进这些细胞的 DNA 文库生产翻译后蛋白,上述的组

合,这是本发明的中心部分。

[0023] 由这些人重组蛋白组合制造的组织密封剂的效力可以与其他已知组织密封剂相比,例如 Tisseel® (Baxter Immuno, Vienna, Austria),但是目前市场上可利用的组织密封剂与本发明描述组织密封剂(称作 HUMA-SEALANT™ 和 HUMA-SEALANT™-C)之间的显著差异是下述事实:在目前市场上的组织密封剂中,所使用的一些蛋白是天然来源的和由人供体血液制备的,和/或一些蛋白由牛原料制备,使得这些产品与 HUMA-SEALANT™ 和 HUMA-SEALANT™-C 相比明显不安全,考虑到传递感染例如肝炎,围绕牛蛋白传递异常朊病毒或传递疯牛病给病人的问题;此外,牛(异种)蛋白将在患者中产生免疫,加深目前市场上可利用组织密封剂的可能副作用程度。相反,本发明尤其关心的 HUMA-SEALANT™ 组织密封剂系统,由在转染人细胞中翻译后获得可靠的天然蛋白的重组人蛋白组成,使得这个组织密封剂系统在关于传染性和免疫原性两方面考虑的安全性方面最佳。

[0024] 本专利申请要求保护的由人重组蛋白组合制备的组织密封剂的效力比得上或超过其他已知的由天然蛋白源制造的组织密封剂,这些蛋白源例如血纤蛋白胶或组织密封剂例如 Tisseel® (Baxter Immuno, Vienna, Austria) 中使用的来自人和动物例如牛物种的血液、血浆或其他体液。有意选择例如一种类型重组蛋白,即本专利申请描述的重组人凝血酶突变体的一个理由是以下观点:这些突变体看来显示最佳的切割纤维蛋白原和重组纤维蛋白原能力,同时显示切割蛋白 C 效力低,这明显不同于天然凝血酶。目前市场上可利用的组织密封剂与本发明描述的组织密封剂(命名为 HUMA-SEALANT™ 和 HUMA-SEALANT™-C)相比之间的显著差异是在目前市场上的组织密封剂中,所使用的真实蛋白是天然来源的和由人供体血液制备的,和/或一些蛋白由牛原料制备,使得这些产品与 HUMA-SEALANT™ 和 HUMA-SEALANT™-C 相比相当不安全,考虑到传递感染例如肝炎,围绕牛蛋白给患者传递异常朊病毒或传递引起疯牛病(BSE)的朊病毒的问题;此外,牛(异种)蛋白将在患者中产生免疫,加深目前市场上可利用组织密封剂的可能副作用程度。相反,本发明提供的 HUMA-SEALANT™ 组织密封剂系统,由在转染人细胞中翻译后获得可靠的天然蛋白的重组人蛋白组成,该蛋白具有最佳的活性和高程度逐批可重复性,其方法也使得这个组织密封剂系统在关于传染性和免疫原性两方面考虑的安全性方面最佳。因此,加工例如用于生产本发明描述的组织密封剂产品的人安全重组蛋白的新颖和独特方法与目前可获得的用于患者的组织密封剂相比显著不同,和此外,与可获得专利申请和可使用的专利中描述的其他组织密封剂相去甚远。

[0025] 伤口愈合理想的基质,密封剂、止血药等等必须能够粘附任何哺乳动物组织表面,包括出血面,以预防手术过程中出血和保持患者自己的血容量,或至少将给患者使用天然血液制品的必要性减到最低。同时,具有上述能力的组织密封剂应当是安全的,其将致病性微生物和致病性朊病毒的传播,包括疯牛病(或 BSE)的传播降至最低。当前市场上可买到的大规模使用的产品是组织密封剂例如 Tisseel® (Baxter Immuno) 和 Beriplast® (Aventis/Behring);这两种组织密封剂和很多其他组织密封剂建立在使用天然人凝血酶和天然人纤维蛋白原上,和此外,在 Tisseel- 以及 Beriplast 产品中,使用牛抑肽酶;市场上可使用的其他组织密封剂则更广泛地基于牛产品。

[0026] 因此,加工例如用于生产本发明描述的组织密封剂产品的安全重组蛋白的新颖和独特方法与目前可获得的用于患者的组织密封剂相比显著不同,和此外,与可获得专利申

请和可使用的专利中描述的其他组织密封剂相去甚远。

[0027] 尤其是,本发明关注于能够作为组织密封剂和止血药以及细胞载体和药物载体的模型。本发明应用蛋白信息学从人基因组确切鉴定蛋白和同工酶或同工型,鉴定基因或所讨论的基因,和使用新的载体系统将基因或所讨论的基因转染入明确定义的人细胞系、干细胞系、前体细胞系,或更具体地说,人肾细胞和人视网膜衍生 PER-C6 细胞和人视网膜衍生 PER-C6 细胞,并且甚至更具体地说转染入人肾细胞和人视网膜衍生 PER-C6 细胞或人胚肾细胞系及称作 HEK 293、HEK 293T、HEK293S、HEK 293 EBNA 的其他细胞系。本发明中,这个系统用于生产蛋白,例如重组人凝血酶,重组人纤维蛋白原和重组人胶原,或更具体地说大约 19-20 种人胶原型 I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI、XII、XIII、XIV、XV、XVI、XVII、XVIII 和 XIX 以及其他已知人胶原之一的重组人胶原。

[0028] 本发明一方面提供了使用重组方法在宿主细胞中生产凝血酶的方法,所述宿主细胞例如人细胞、人细胞系、人干细胞、人前体细胞,更具体地说人肾细胞和人视网膜衍生 PER-C6 细胞系,和甚至更具体地说人胚肾细胞系及其他细胞系(例如 HEK 293、HEK 293T、HEK 293S、HEK 293 EBNA)。

[0029] 发明详述

[0030] 本发明的一个目的尤其是提供生物学和很安全的组织密封剂,以新方法制备,其中,与其他组织密封剂的组合物相反,仅由各种在人细胞系中生产的所有相互作用蛋白组成,所述细胞系已被本发明要求保护的蛋白的 cDNA 拷贝转染,并通过在无血清培养基中处理含有 cDNA 拷贝的细胞而增殖,从而收获由无血清培养基中的所述细胞生产的特定蛋白,方法与在无血清培养基中从细胞中选择可靠的人蛋白相似。

[0031] 本发明涉及将确定的重组人凝血酶与纤维蛋白原以及同样地某些人重组纤维蛋白原组合以创造稳定产品的新观念和方法,所述稳定产品具有最佳的纤维蛋白原切割活性和对蛋白 C 活化具有较低影响。

[0032] 在本发明范围内包括哺乳动物细胞,和具体地说包括美国临时专利申请 60/779,474(其引入本文作为参考)中要求保护的细胞,所述细胞具有插入的 cDNA,旨在表达前凝血酶,细胞根据所有者的方法在含宿主细胞生长所需营养成分的无血清合成培养基中培养,同时分泌翻译后前凝血酶。

[0033] 可以使用描述过的使用人 DNA 文库的所有其他方法,cDNA 文库通过插入至由强启动子驱动的表达载体而从人 DNA 文库产生,在“表达载体的构建”中描述。稳定的人细胞接着将来自一个或多个细胞系的每种所述人重组蛋白,或一些重组蛋白的一定的单独的量生产所述蛋白,并将创造迅速运作的终产物,其由涉及可控制凝胶化或凝固作用的蛋白组成,和将无例如来源于任何形式使用的哺乳动物细胞的污染蛋白,如美国专利 6,780,411,5,476,777,5,502,034 和 5,572,692 所述,相反,其中描述了当使用转染方法时,例如产生无活性形式和活性形式的作为纯化方法一部分的重组人凝血酶。美国专利 5,476,777、5,502,034 和 5,572,692 中公开了这样生产 rh 凝血酶(rhThrombin)的方法,其教导引入此处作为参考。在所述的所有这些情况下,其中使用哺乳动物细胞或其他细胞以获得凝血酶原例如 gal 凝血酶原,其中一般认为细胞用于生产这些蛋白和实际上还有重组人蛋白,例如重组人纤维蛋白原,以及交联重组人蛋白例如重组人因子 XIII 或其他交联重组人蛋白例如胶原,和尤其是重组人胶原 I 型和 / 或重组人胶原 III 型。

[0034] 制造用于人用途的组织密封剂领域中使用的任何其他蛋白组合,用于产生最佳组合的蛋白,其具有不能与最高纯度、最小感染污染机会相比的最高纯度和最小污染风险的蛋白,迄今可利用或可使用产品所不能获得的所述蛋白的最高水平的相容性,因为这个事实:除了如本发明描述制备的人密封剂产品,即由转染的人细胞或尤其是人肾细胞和人视网膜衍生 PER-C6 细胞生产的产品之外,缺少通常被加到细胞培养、细胞生长或生产蛋白的细胞培养基中(通常由天然蛋白组成)的任何添加的蛋白,例如牛(例如胎牛血清)或人血清,不确定添加到细胞培养中的这些蛋白组合是否有帮助,因为可以从培养的人细胞释放并维持以及引起无血清合成培养基中产生蛋白的唯一蛋白。

[0035] 根据本发明在无血清合成细胞培养基中转染的人细胞中制备所有这些蛋白。于是这个方法将与在无血清合成细胞培养基中增殖的人细胞,和更具体地说人肾细胞和人视网膜衍生 PER-C6 细胞乃至更具体地说人胚肾细胞及其他细胞系(例如 HEK 293、HEK 293T、HEK 293S、HEK 293 EBNA)生产的蛋白相去甚远,为了具有高生物学活性或可靠的抗原性(对于抗体),该蛋白是需要可靠的翻译后修饰的蛋白。也可以使用干细胞或前体细胞。同时以这种方式生产的蛋白异质性降低,而是相反更加均质,在蛋白终产品中能够具有更好的一致性,更可逐批重复,功能上更活跃且由于糖分子的较少差异而具更低免疫原性,另外其可以在例如昆虫细胞或 CHO 细胞中获得。同时终产品也将无病毒。根据本发明要求保护的方法,我们能够产生稳定的细胞系和更容易制备适于无血清悬液的细胞。

[0036] 用这样的方式从无血清合成细胞培养基中的人细胞培养物,例如人肾细胞和人视网膜衍生 PER-C6 细胞培养物中纯化的蛋白将是新的和明显不同于来自任何转染细胞系的蛋白混合物,所述转染细胞系中添加了血清蛋白例如胎牛血清或其他天然蛋白、人或其他哺乳动物天然蛋白,并且这些蛋白将以更多或可能更少的量存在于收获的最终“纯化”蛋白中。例如不能排除添加到转染哺乳动物细胞培养物中的蛋白,血清(牛、人或其他物种蛋白)仍被认为从理论上和可能在实践中存在于最终产品中,其可能不排除微生物,例如病毒、病毒粒子、病理性朊病毒,举例来说那些微生物有时存在于可能接触或被“疯牛病”污染的动物中。

[0037] 本发明范围内包括哺乳动物细胞或更具体地说包括美国临时专利申请 60/779,474 要求保护的旨在表达含 gla- 结构域的凝血酶原时插入了 cDNA 的人细胞。人凝血酶原的 N- 末端 Gla 结构域是具有因子 Va 结合部位的功能单位。凝血酶原 Gla 结构域对于底物与凝血酶原酶复合物的相互作用很重要。根据所有权人的方法在含宿主细胞生长和同时分泌翻译后含 gla- 结构域的凝血酶原所需营养成分的无血清合成培养基中培养细胞,这是本发明所独有的且的确显著不同于缺少 gla- 结构域(gla-domainless)的凝血酶原或前凝血酶。

[0038] 本发明范围内也包括使用人重组胶原,例如重组人胶原 I 型和 / 或胶原 III 型或胶原 I 和 III 型的混合物,其在美国临时专利申请 60/722,366 中呈现,其中使用很少量凝血酶增强胶原和纤维蛋白原凝胶化产品,其提供了甚至更强和更好的粘附性组织密封剂。

[0039] 可以预料根据本发明的蛋白接近人天然可靠蛋白,因此它们在人类中不诱导免疫原性。

[0040] 本发明中公开的组织密封剂,例如由重组人凝血酶或具有前述的促凝作用(酶促切割纤维蛋白原或激活纤维蛋白原以形成血纤蛋白)的重组凝血酶突变体或类似物制

备的,其再次显示出对蛋白 C 的低酶促作用,和产品中可以包括差不多相同或几乎相同的信号转导 PAR1 作用,其被认为是在商品名 HUMA-SEALANT™ 下产生的,尤其是以和例如 Tisseel 相同的方式使用的很多作用和能力(例如有效的细胞友好产品),但是与 Tisseel 不同的是作为介质或细胞递送载体,其必须能够与靶组织很好地粘附数天乃至数周,使基质能够产生在上述所有能力中必须有效的作用,不是异种的、不引起过敏、无免疫原性,或不携带致病性微生物以及不显示任何明显的毒性。

[0041] HUMA-SEALANT™ 组织密封剂如同很多竞争性血纤蛋白密封剂,由至少两种活性组分组成,然而作为重组哺乳动物纤维蛋白原,和更具体地说作为重组人纤维蛋白原,本发明范围内的纤维蛋白原在细胞中制备,其中 cDNA 含有 A α 、B β 、 γ 纤维蛋白原表达,因此能够转录或产生重组人 A α 、B β 、 γ 纤维蛋白原。HUMA-SEALANT™ 的其他成分,重组凝血酶,或更具体地说重组人凝血酶,例如本发明描述的类型,也以天然蛋白存在于例如 Tisseel 中,当混合时将模拟自然凝固级联的末期,形成血纤蛋白凝块,或凝胶,并很可能也具有粘附作用,也被定义为生物基质(biomatrix),但是根据本发明是重组生物基质,乃至更具体地说重组哺乳动物生物基质。

[0042] 定义

[0043] 表达载体通常是 DNA 分子,其尤其是含有 DNA 序列,该 DNA 序列编码感兴趣蛋白,并具有启动子及其他序列,例如转录终止子和多聚腺苷酸化信号,它们促进蛋白的表达。

[0044] 表达载体含有遗传信息,该信息为在宿主细胞中复制准备,或自主复制或整合入宿主基因组。对本领域技术人员来说显然的是为表达载体在宿主细胞中自主复制准备的这种信息包括已知的酵母和细菌复制起点。

[0045] 转化通常应用于微生物。

[0046] 转染通常应用于多细胞生物的细胞。

[0047] 两个方法包括通过导入纯化的 DNA(部分选自 DNA 文库)稳定和可遗传地改变受体细胞基因型。

[0048] 培养细胞:能够在培养基中培养很多代的细胞。在来源于多细胞生物的细胞的情况下,培养的细胞是作为单细胞、组织、或来自组织的外植体从生物分离的细胞。

[0049] DNA 构建体是 DNA 分子,或它可以是这种分子的克隆,和可以是单或双链。这个分子将已经通过人为操纵以某种方式组合和并列的某些 DNA 片段而被修饰,其在天然情况下通常不存在。DNA 构建体可以含有可操作连接的元件,其指导编码感兴趣多肽的 DNA 序列的转录和翻译。这种元件包括启动子、增强子和转录终止子。如果这种 DNA 构建体包括感兴趣多肽的编码区,其含有分泌信号序列,那么该 DNA 构建体这种元件将被认为能够指导多肽的分泌。

[0050] 为了容易地区分例如被 zymogenetics 用于生产重组人凝血酶、前凝血酶和前凝血酶-1 的凝血酶原(gla- 结构域(含)凝血酶原、缺少 gla- 结构域的凝血酶原)各自的表达,图 1-4 提供了这些单独方面的概观。如图 4 所说明的,前凝血酶是无 gla 结构域和无 Kringle1 结构域的凝血酶原(缺少 Gla- 结构域的凝血酶原)。为促进切割和/或纯化,在 N 末端添加 HPC4 表位。图 4 的第一部分显示了包括 Gla 结构域和 Kringle1 和 Kringle2 的凝血酶原。

[0051] HPC4 定义为连接标记,对于其存在有单克隆抗体以在将凝血酶原切开变成前凝血

酶的过程中鉴定该分子。

[0052] 蛋白的前缀“h”意思是蛋白的人野生型变体。野生型通常前缀是 wt。

[0053] 蛋白前缀“r”意思是重组蛋白,其通过重组表达制备。

[0054] 蛋白的前缀“rh”意思是蛋白的人野生型变体,其通过重组表达制备。

[0055] 术语“序列同一性”,例如“核酸序列同一性”或“氨基酸序列同一性”意思是最佳比对的两个氨基酸序列之间或两个核酸序列之间同源程度的定量标准。两个序列必须比对以获得最佳可能的配对,允许插入缺口,或可供选择地,在多肽序列或核苷酸序列的末端允许截短。本文使用的序列同一性是相同的比对氨基酸的数量,除以所比较的两个序列中较短序列的氨基酸总数。

[0056] 对于重组人凝血酶引起的纤维蛋白原凝固与人天然凝血酶相比而言的术语“更有效”意思是提供与人天然凝血酶相似的反应需要更少量的重组人凝血酶。

[0057] 使用通过 MWC0 的过滤提供透析膜孔径大小,其特征是其分子量使 90% 溶质被该膜截留(防止透过)。溶质渗透性依赖于分子形状、它的水化度及其电荷。这些中每一个可能受溶剂性质、pH 和离子强度的影响。按一般规律,最好选择这样的 MWC0,其是被截留的溶质的分子量一半。为了有效分离,请参阅下列公式作为参考:

[0058]

$$\frac{\text{截留的MW}}{\text{通过的MW}} > 25$$

[0059] 这使样品回收率最大和使透析所需时间最短。

[0060] 蛋白质糖基化

[0061] 确保重组人蛋白正确糖基化是本发明的重要部分。重组蛋白的糖基化,尤其是指定可能施用给受试人的蛋白,通常比以前认为的更具关键意义。糖基化深刻影响生物活性、功能、从循环的清除和至关重要的抗原性 (Brooks, SA, Molecular Biotechnology, (2004) Vol 28, 241-256 (16)) Brooks 的这篇综述给出了人 N- 和 O- 连接的蛋白质糖基化的简短综述,总结了非人物种的细胞糖基化的潜力所知的内容,和提出了对于生物工程工业的含意。

[0062] 非人物种的细胞不会以如同人细胞一样的方式糖基化它们的蛋白在很多情况下,发现“人”糖基化和“动物”糖基化之间的差异很深奥总的说来,众所周知在进化方面距离越远,例如表达系统中最常使用的物种:细菌、酵母、真菌、昆虫和植物的糖基化特性与人类越不像,乃至来源于动物的细胞,例如啮齿类家族-仓鼠,和事实上直到最接近人的动物-猪,在糖基化方面存在显著差异,这可能也可以解释甚至蛋白的表观活性,例如生产性仓鼠细胞中产生的重组人凝血酶,显示更低的生物活性、不同的功能、清除率和仍然很关键的抗原性。因此,关于下列专利中描述的重组人凝血酶:在 5,527,692 中,其中描述 BHK 570 细胞和酵母被选择用于生产重组凝血酶;在专利 5,502,034 中,其中 BHK 570 细胞用于转染缺少 Gla- 结构域的凝血酶原,活化为重组凝血酶(野生型),声明其与纤维蛋白原反应,但不是特异性与重组人纤维蛋白原或重组人可靠的纤维蛋白原反应。因此,这些专利中描述所用的宿主细胞是动物来源或酵母来源的,因此认为糖基化不等同于或无论怎样不接近于待表达的人基因转染人细胞而达到的糖基化,所述人细胞例如本发明已经使用的人胚肾细胞 (HEK 293)。

[0063] 在 5,476,777 中,使用相同细胞系转染缺少 gla- 结构域的凝血酶原,和尤其是使

用 Sepharose 柱纯化和使用蛇毒活化。这个专利描述的终产品所得糖基化将不同于上述专利中已描述的 (5, 527, 692 和 5, 502, 034)。

[0064] 本发明范围内包括生产重组人可靠的凝血酶, 因为凝血酶原转染入合成培养基中的人胚肾细胞, 和本发明范围内还包括生产重组可靠的纤维蛋白原, 含 6 个多肽链, 由 2A α 、2B β 和 2 γ 链组成完整可靠的人纤维蛋白原, 其中在发明中我们也明显特意关注于最后得到为人用途而尽可能正确的糖基化, 意味着对于我们的两种产品, 我们避免使用动物细胞、昆虫细胞、酵母或细菌作为宿主, 两种产品是重组人凝血酶, 或更具体地说是具有 Chy84 从甲硫氨酸变为丙氨酸的位点突变的重组人凝血酶类似物, 我们认为其在人类中不会引起任何抗原性, 且这种糖基化将是正确的, 因为本发明要求保护的凝血酶是使用质粒转染人细胞, 例如人胚肾细胞而生产的。此外, 在无血清合成培养基中以悬浮培养物培养细胞, 看来得到比以前描述的可能达到的显著更高的产量。

[0065] 真核细胞中的很多蛋白是糖蛋白, 因为它们含有与某些氨基酸共价键连接的寡聚糖链。已知糖基化影响蛋白质折叠、定位和运输、蛋白溶解度、抗原性、生物活性和半衰期, 以及细胞-细胞间相互作用。

[0066] 蛋白质糖基化可以分为四个主要类型, 主要根据氨基酸和糖之间的键。这些是 N-糖基化、O-糖基化、C-甘露糖基化和 GPI 锚定连接。N-糖基化特征为糖添加至天冬酰胺的氨基。在 O-糖基化中, 糖与丝氨酸或苏氨酸残基的羟基连接。

[0067] 复合糖涉及多种生物学过程, 从蛋白质折叠、寡聚和稳定性, 到免疫反应和宿主-病原体相互作用 (Varki, 1993)。复合糖在进化过程中也起着重要作用, 如由异常糖基化引起的人类疾病的病理 (Freeze 和 Aebi, 2005) 和模型生物的遗传研究 (Haltiwanger 和 Lowe, 2004) 所揭示。

[0068] 不同物种间糖基化存在显著差异。人糖蛋白是糖基化的, 具有复合 N- 和 O- 连接的聚糖的极其多变的的不同种类阵列, 这是存在于细胞内质网和高尔基体的酶协调活性的产物。蛋白糖基化在分化、发育过程中, 在不同生理下-和细胞培养物来源的细胞培养物中受高度调节和存在变化, 意味着人细胞与动物细胞比较复合糖基化之间存在显著差异, 这当然将影响生物活性功能、生物中的清除, 和抗原性过程 (Brooks SA, Mol. Biotechnol. (2004), Vol 28, 241-255)。在很多情况下, 这种差异是深远的。总的说来, 在进化方面与人距离最远的物种, 例如细菌、酵母、真菌、昆虫和植物-表达系统中最常使用的物种, 糖基化性能与我们自己的最不像。

[0069] 此外, 根据 Apollo Cytokine Research (San Francisco, US) 重组人蛋白, 对于本发明重组人凝血酶和重组人纤维蛋白原, 当在转染人细胞 (例如 HEK293) 中表达时, 与例如在其他哺乳动物细胞, 如仓鼠细胞 (例如 CHO, 其被 Zymogenetics 用于生产重组人凝血酶) 中相比, 显示不同的糖基化模式 (<http://www.apollocytokineresearch.com/Scientific/posters.html>)。Apollo Cytokine Research 的数据表明在小鼠中, 仓鼠细胞 (CHO 细胞) 中表达的蛋白 TNF RII-Fc 比人细胞 (改良的 293) 中表达的更具免疫原性, 即引发产生抗体的免疫反应。

[0070] 蛋白的免疫原性由它们的氨基酸序列和它们的糖基化模式共同决定。

[0071] 凝血酶

[0072] 然后培养含本发明 DNA 构建体的宿主细胞以生产凝血酶原, 其在本发明纯化过程

将是由蛋白酶例如因子 Xa 活化的凝血酶。根据所有者的方法在含宿主细胞生长和同时分泌翻译后蛋白或多肽所需营养成分的无血清合成培养基中培养插入 cDNA 的细胞。

[0073] 凝血酶定义为双链、二硫键、糖基化的多肽，其切割纤维蛋白原中的特异键以产生自我装配形成血纤蛋白凝块的血纤蛋白单体。

[0074] 含本发明 DNA 构建体的宿主细胞是独特的，因为它与由 Zymogenetics 使用的和其他旨在生产凝血酶原的方法不同，在本发明中前凝血酶（不同于凝血酶原），将被活化为凝血酶。

[0075] 含本发明 DNA 构建体的宿主细胞是独特的，因为它与 Zymogenetics 使用的缺少 Gla- 结构域的凝血酶原方法和其他旨在生产缺少 Gla- 结构域的凝血酶原的方法不同，在本发明中 gla- 结构域凝血酶原（其完全且显著不同于缺少 Gla- 结构域的凝血酶原）将被活化为凝血酶。利用特异性识别蛋白例如含 gla- 结构域的凝血酶原中的 γ -羧基谷氨酰基 (Gla) 残基的单克隆抗体，通过使用如 Brown 等描述的包括 Gla 残基特异性单克隆抗体的方法可以证明 gla- 结构域的存在 (Brown MA, Stenberg LM, Persson U, Stenflo J, J. Biol. Chem. (2000), 275 :19795-19802)。

[0076] 重组人凝血酶突变体特别地证明是促凝凝血酶突变体（具有高促凝作用）和对细胞例如间充质细胞具有与野生型凝血酶相同的信号转导酶作用。促凝凝血酶突变体中，相比较时对细胞也具有 PAR1 信号酶作用，和低抗凝作用 - 与野生型凝血酶一样低或更低。那些重组凝血酶突变体当中，其例如是称作 W215P 的类型。

[0077] 也在本发明范围内的其他重组人凝血酶突变体是 M84A 型，也称作“凝血酶类似物 M400A（当由凝血酶原类似物 M400A 制备时）”，和“凝血酶类似物 M256A（当由前凝血酶类似物 M256A 制备时）”，其凝固纤维蛋白原的速度比野生型和缺乏自溶活性的 arg77A（或 R77aA）突变体更快。使用上述命名法，当由凝血酶原类似物 M400A 制备时命名为凝血酶类似物 M400A，和当由前凝血酶类似物 M256A 制备时命名为凝血酶类似物 M256A，人们总是可以通过所讨论的凝血酶类似物的制备方法容易地区分开来，而不是如一般命名法因两者都激活凝血酶而称为 M84A。在 R77aA 的情况下，凝血酶原类似物是“凝血酶原类似物 R393aA”，和来自前凝血酶的 R77aA 类似物将是“前凝血酶类似物 R249aA”。

[0078] 仍在本发明范围内，显示低等或无自溶作用的重组人凝血酶突变体，可以选自多种类型的重组凝血酶突变体，例如 arg77A（或 R77aA）。明确的目标是生产重组凝血酶突变体，其包括如上所述的至少一个或多个重组人凝血酶突变体，其可以是冷冻保存的且仍保留它们聚合纤维蛋白原，尤其是重组人纤维蛋白原（例如在哺乳动物细胞中制备的）的酶活性。

[0079] 本发明的一个目的是提供使用重组方法在宿主细胞中生产凝血酶的方法，以主要生产称作前凝血酶的凝血酶前体 - 例如人细胞、人细胞系、人干细胞、人前体细胞，更具体地说，人肾细胞和人视网膜衍生 PER-C6 细胞系，和甚至更具体地说人胚肾 (HEK) 细胞系（例如 HEK293、HEK 293T、HEK 293S、HEK 293 EBNA）。

[0080] 本发明一个目的是提供使用重组方法在宿主细胞中生产凝血酶的方法，以主要生产凝血酶前体（其被称作含 gla- 结构域的凝血酶原），- 例如人细胞、人细胞系、人干细胞、人前体细胞，更具体地说人肾细胞和人视网膜衍生 PER-C6 细胞系，和甚至更具体地说人胚肾 (HEK) 细胞系（例如 HEK 293、HEK 293T、HEK 293S、HEK 293 EBNA）。

[0081] 这些重组人凝血酶类型将与野生型人凝血酶相比较和将是重组人凝血酶类似物或突变体。

[0082] 作为本发明一部分的保留相当的纤维蛋白原切割活性但表达水平更高的凝血酶突变体可能具有以更低生产成本进行生产的优点。

[0083] 本发明范围内还包括凝血酶突变体保留相当的表达水平,但是显示出更高的纤维蛋白原切割活性,因此这些突变体可以降低治疗剂量。

[0084] 此外,本发明的范围内包括显示降低的自溶作用的凝血酶突变体,其是本发明的必要组成部分,可能有利于纯化过程和保存。

[0085] 如上所述本发明中进一步预想了缺乏蛋白 C 活化作用的突变体可能凝固活性提高。

[0086] 通过凝血酶家族成员之间的序列比较、合理的定点诱变或丙氨酸-扫描可以鉴定出突变。预想的基因可以通过插入、置换、缺失或结构域交换而被修饰。

[0087] 本发明范围内的方法基于生产重组哺乳动物凝血酶,或更具体地说重组人凝血酶,和甚至更具体的重组人凝血酶类似物,仍然更加具体的称作 M84A 的重组人凝血酶类似物;当以上全部重组人凝血酶或凝血酶类似物由“gla- 结构域凝血酶原”基因制备,意味着推导的重组人凝血酶原蛋白含有信号肽、前肽、Gla 结构域、两个 Kringle 结构域和(双链)蛋白酶结构域,M84A 类似物将称作“凝血酶类似物 M400A”。Gla 结构域示于图 5。

[0088] 在本发明的具体实施方案中,根据本发明表达的基因序列是显示出凝血酶活性的任何分子。

[0089] 初始纤维蛋白原聚合活性可以通过分光光度测定法测定。

[0090] 在本发明的具体实施方案中,根据本发明表达的基因序列是任何序列,其编码显示出凝血酶活性的分子。根据本发明表达的基因序列可以编码天然人凝血酶或其任何突变体。因此,在本发明的一个实施方案中,多核苷酸编码的凝血酶原具有与人凝血酶原序列 100% 相同的序列。

[0091] 纤维蛋白原

[0092] 这种重组人纤维蛋白原含有六条多肽链,2A α (蓝色),2B β 绿色和 2 γ 红色,三结节形状,中央 E 结节与两个末端的 D 结节相连,(参见图 12),其以新的方式逐一制备,所述方式制造出在哺乳动物细胞或人细胞,哺乳动物或人细胞系,哺乳动物或人干细胞或哺乳动物或人前体细胞中产生的可靠的或天然人蛋白。

[0093] 本发明包括的凝血酶(其包括重组人凝血酶或重组人凝血酶类似物催化纤维蛋白原转变,其通过在中央 E 结节与 FpA 位连接而具有三结节形状-连接纤维蛋白原分子的两个末端 D 结节与纤维蛋白单体。纤维蛋白单体相互作用形成双链初原纤维。初原纤维聚集成血纤蛋白纤维,和这些血纤蛋白纤维理论上可以通过因子 XIIIa 催化的交联形成而被稳定。纤维蛋白原的转变和在这种情况下重组人可靠的纤维蛋白原的转变还可以更简单解释为由凝血酶触发的纤维蛋白原转变为血纤蛋白,所述凝血酶从 α 和 β 链切割血纤肽 A 和 B,和因此暴露负责软凝块形成的 N- 末端聚合位置。

[0094] 在本发明的具体实施方案中,根据本发明表达的基因序列可以是任何序列,其编码纤维蛋白原类似物的分子,即通过丝氨酸蛋白酶例如凝血酶切割而活化并参与凝固级联的分子。根据本发明表达的基因序列可以编码天然人纤维蛋白原或其任何突变体。

[0095] 适当的表达系统

[0096] 实践本发明使用的宿主细胞主要可以包括定义明确的人细胞系, 已知其分泌蛋白或肽, 所分泌的蛋白或肽与该蛋白或肽的天然对应物十分类似。

[0097] 本发明应用蛋白信息学从人基因组确切地鉴定蛋白和同工酶或同工型, 鉴定基因或所讨论的基因, 和使用新的载体系统, 基因或所讨论的基因转染入明确定义的哺乳动物或人细胞系、干细胞系、前体细胞系, 或更具体地说, 人肾细胞和人视网膜衍生细胞, 和甚至更具体地说, 人肾细胞和人视网膜衍生 PER-C6 细胞或人胚肾细胞系 (HEK), 举例来说 HEK 293、HEK 293T、HEK 293S、HEK 293 EBNA。本发明中, 这个系统用于生产蛋白, 例如本发明描述的重组人凝血酶, 重组人纤维蛋白原和重组人胶原, 或更具体地说大约 19-20 种人胶原型 I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI、XII、XIII、XIV、XV、XVI、XVII、XVIII 和 XIX 以及其他已知人胶原之一的重组人胶原。

[0098] 表达载体的构建

[0099] 用于生产本发明要求保护的蛋白的哺乳动物表达载体将包括能够指导所克隆基因或 cDNA 转录的启动子。优选的启动子包括病毒启动子和细胞启动子。病毒启动子可以例如是立早巨细胞病毒启动子 (Boshart et al., Cell(1985)41:521-530) 或 SV40 启动子 (Subramani et al., Mol.Cell.Biol.(1981)1:854-864)。

[0100] 克隆的 DNA 序列可以使用各种方法导入培养的哺乳动物细胞, 例如几个作者描述的磷酸钙介导的转染是一个优选方法 (Wigler M, Pellicer A, Silverstein S, Axel R. Cell(1978), 14:725; Corsaro CM, Pearson ML., Somatic Cell Genetics(1981), 7:603; Graham FL, van der Eb AJ., Virology(1973)52:456)。电穿孔法是用于将克隆 DNA 序列导入如前所述的哺乳动物细胞的另一个技术 (Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH., EMBOJ. (1982)1:841-845)。

[0101] 来自 DNA 文库的克隆 DNA 序列可以通过例如磷酸钙介导的转染引入培养的哺乳动物细胞 (Graham FL and Van der Eb AJ, Virology(1973)52:456; Wigler M, Pellicer A, Silverstein S, Axel R., Cell(1978)14:725; Corsaro CM and Pearson ML, Somatic Cell Genetics(1981)7:603)。

[0102] 也可以使用 Neuman 等的利用电穿孔法将 DNA 序列导入哺乳动物细胞的技术 (Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH., EMBO J. (1982)1:841-845), 例如电脉冲 (8kV/cm, 5 微秒), 发现该技术在电场中通过电穿孔法大大增加 DNA 吸收入小鼠 1yoma 细胞。

[0103] 为指导本发明蛋白进入人细胞系的分泌途径, 所述人细胞系例如人肾细胞和人视网膜衍生 PER-C6 细胞, 人胚肾细胞 (例如 HEK 293、HEK 293T、HEK 293S、HEK 293 EBNA)、干细胞, 乃至前体细胞, 将至少一个信号序列与感兴趣的 DNA 序列连接。优选的信号可以尤其包括 α 因子信号序列 (pre-pro sequence; Kurjan and Herskowitz, Cell 30:933-943(1982); Kurjan 等的美国专利号 4,546,082; Brake 的美国专利号 4,870,008), 和 PH05 信号序列 (Beck et al., W086/00637) 和 BAR1 分泌信号序列 (MacKay 等的美国专利号 4,613,572; MacKay, W087/002670)。

[0104] 选择性标记通常用于鉴定具有感兴趣的基因或 cDNA 的细胞。用于培养的哺乳动物细胞的这种优选的选择性标记例如可以包括赋予抗药性的基因, 例如新霉素、潮霉素和

氨甲喋呤。选择性标记的选择在本领域普通技术人员水平内。选择性标记可以连同感兴趣的基因一起导入哺乳动物细胞,或导入、插入在同一质粒上。这个类型的构建体是本领域已知的(例如 Levinson and Simonsen,美国专利号 4,713,339)。

[0105] 转染的哺乳动物细胞允许生长一段时间,典型地是几天,以开始表达导入的 DNA 序列。然后应用药物选择法选择以稳定方式表达选择性标记的细胞的生长。对于已被可扩增选择性标记转染的细胞来说,为了增加克隆序列的拷贝数,从而增加表达水平,可以逐步增加药物浓度进行选择。

[0106] 本发明中不使用原认为可有效导入编码缺少 gla- 结构域的凝血酶原的表达载体的方法,因为本发明包括其中凝血酶在纯化过程中被蛋白酶例如因子 Xa 活化的方法。

[0107] 培养条件

[0108] 哺乳动物细胞通常在市场上可买到的含血清或无血清培养基中培养。适合于所使用的具体细胞系的培养基的选择在本领域普通技术人员水平内。

[0109] 各种市场上可买到的 HEK 293T 细胞系和它们适当的生长和表达培养基可以用来进一步提高蛋白生产产量。各种市场上可买到的表达载体,包括不同的启动子、分泌信号、转录增强子等等,也可以用来提高蛋白生产产量。

[0110] 本发明范围包括人细胞系的用途,例如永生人细胞乃至永生肾细胞系,例如人胚肾 (HEK) 293T 细胞系,或其变体,以及干细胞或前体细胞。

[0111] 任何培养的人细胞可以用作本发明内的宿主细胞。优选的可使用的培养哺乳动物细胞包括 COS-1 (ATCC CRL 1650)、BHK 和 293 (ATCC CRL 1573 ;Graham 等, J. Gen. Virol. 6 : 59-72 (1977)) 细胞系。优选的 BHK 细胞系是 BHK 570 细胞系 (保藏在 American Type Culture Collection, 保藏号 CRL10314)。然而,我们已发现选择的人细胞系看来分泌明显更好的结果,得到更可靠的人样蛋白和 / 或肽 ;其他人细胞系也许具有这些能力。

[0112] 制备重组人凝血酶的方法

[0113] 公开了用于生产凝血酶的方法。该蛋白是由用含有指导凝血酶前体表达所需信息的 DNA 构建体转化或转染的宿主细胞产生的。DNA 构建体通常包括下列可操作连接的元件 :转录启动子、编码凝血酶原的 DNA 序列和转录终止子,然而作为本发明必要部分,包括含 gla- 结构域的凝血酶原,确切地说,重组的含 gla- 结构域的人凝血酶原。由转化或转染的宿主细胞产生的凝血酶前体在体内或体外活化。因此本领域需要基本上无污染蛋白的生产凝血酶的方法。本发明满足这种需要并提供了其他相关优点。

[0114] 本发明范围内包括你可以从转染的单层培养的 HEK293 或 HEK293T 开始,但是在本发明范围内,首先特定蛋白的 cDNA,在这种情况下,含 gla- 结构域的凝血酶原转染入大肠杆菌,并且当人们已增加转染 HEK 293 或 HEK 293T 细胞所需的 DNA 的量时,使用这些细胞的单层培养物来进行,随后将这些细胞变为悬浮细胞培养 - 同时转移到合适的无血清培养基中,之后实施适当的克隆,然后使用无血清培养基培养细胞并优化。然后可以每 7-8 或左右天分批收获细胞培养物,当测定上清液时,待收获和纯化的蛋白显示出满意的含量,随后使用 HumanZyme (HumanZyme, Inc., Chicago) 开发的方法将含 gla- 结构域的凝血酶原适当激活为凝血酶。

[0115] 关于人肾细胞和人视网膜衍生 PER-C6 细胞,或更具体地说,人胚肾 (HEK) 293T 细胞系 - 含本发明的 DNA 构建体,所述构建体编码在纯化过程中被蛋白酶例如因子 Xa 活化的

凝血酶原。

[0116] 包括在本发明中的从人永生细胞系获得的所有类型的蛋白是重组凝血酶原的某些人变体的 cDNA 拷贝。

[0117] 最佳培养基的选择在本领域普通技术人员水平内。某些凝血酶前体优选可以通过添加肝素或凝血酶由这些转染子产生。将肝素添加至培养基可以增强含凝血酶切割位点替代野生型凝血酶活化位点 (Arg-Ile) 的凝血酶前体的活化。优选地,在这个方案中,将 0.5 和 5.0U/ml 之间的肝素添加至无血清培养基,更优选 1 和 5U/ml 之间和最优选根据一些作者,将 1U/ml 肝素添加至无血清培养基中。为活化由人细胞产生的蛋白,更具体地说人肾细胞和人视网膜衍生 PER-C6 细胞,或更具体地说人胚肾细胞及其他细胞系(例如 HEK 293、HEK293T、HEK 293S、HEK 293 EBNA)、干细胞、前体细胞等等,所述人细胞含编码凝血酶原或含 gla- 结构域的凝血酶原的本发明的 DNA 构建体,其中凝血酶将在纯化过程中被蛋白酶例如因子 Xa 或 Va 在凝血酶活化位点活化,当凝血酶被添加到无血清培养基时,在 0.5 和 5. μ g/ml 凝血酶之间时所述蛋白酶具有预期的活性,更优选在 1 和 2 μ g/ml 凝血酶之间具有预期的活性,特别优选将 1 μ g/ml 凝血酶添加到无血清培养基。

[0118] 凝血酶前体可以通过常规层析法纯化,然后可以通过例如蛇毒激活剂以相对于蛋白浓度的连续稀释浓度来激活凝血酶前体。可选择地,可以使用抗凝血酶抗体通过亲和层析来纯化凝血酶前体。例如美国专利号 4,965,203 中已经建议了纯化凝血酶的其他方法。根据本发明,重组人凝血酶将在纯化过程中被蛋白酶例如因子 Xa 激活。

[0119] 也可以使用凝血酶原的蛋白水解活化作用来激活纯化的凝血酶前体,如 Heldebrant 等和其他人所述 (Heldebrant CM, Butkowski RJ, Bajaj SP, Mann KG. J. Biol. Chem. (1973) 248 :7149-7163 ;Downing MR, Butkowski RJ, Clark MM, Mann KG, J. Biol. Chem. (1975), 250 :8897 ;Krishnaswamy S, Church WR, Nesheim ME, Mann KG. J. Biol. Chem. (1987) 262 :3291)。含有凝血酶活化位点的凝血酶前体可以通过添加凝血酶而被活化。然后可以使用具有盐梯度的柱层析法纯化激活的凝血酶。蛋白纯化方法是本领域熟知的,为了一般目的,参见 Scopes R. (Scopes, R., Protein Purification, Springer-Verlag, NY (1982) ;可以获得的纯度越高,凝血酶的确切切割反应就越多,因此 70% -90% 之间的纯度将可能是最理想的。

[0120] 在本发明中,使用获得最终产品凝血酶的新发明,通过在纯化过程中用蛋白酶例如因子 Xa 激活所述蛋白来生产重组人凝血酶,所述重组人凝血酶被用作凝血剂,用于稳定凝块例如连同纤维蛋白原,或用作移植或植入哺乳动物包括人的细胞的载体,以便在靶区域或靶器官中维持所移植的细胞,可选择地,连同纤维蛋白原和 / 或胶原,尤其是胶原 I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI、XII、XIII、XIV、XV、XVI、XVII、XVIII、XIX 型或胶原混合物,其再次作为化学制品或药物(例如诊断或医疗药物)。

[0121] 根据本发明的一个实施方案提供了如 SEQ ID NO :17 限定的编码重组人凝血酶前体分子的多核苷酸,该多核苷酸含有 i) 如 SEQ IDNO :16 限定的 Gla 结构域。在另一个实施方案中,本发明进一步包含 ii) Kringle2。在又一个实施方案中,本发明进一步包含本文所述的多核苷酸,其中该多核苷酸进一步包含 iii) HPC4(蛋白 C),且所编码的重组人凝血酶前体分子具有在 5' 末端连接的 HPC4 (SEQ IDNO :6)。

[0122] 在一个实施方案中,根据本发明的重组人凝血酶前体分子具有自溶活性。

[0123] 根据本发明的一个实施方案提供了包含如本发明所限定的多核苷酸的载体。在进一步的实施方案中,根据本发明的多核苷酸进一步可操作连接至被用所述载体转化的宿主细胞识别的控制序列。在本发明的又一实施方案中,根据本发明的载体是质粒载体的形式。

[0124] 根据本发明的一个实施方案提供了包含如本发明所限定的一种或多种载体的人宿主细胞。在进一步的实施方案中,人宿主细胞是人胚肾 (HEK) 细胞。在进一步的实施方案中,人宿主细胞选自:HEK 293、HEK 293T、HEK 293S 和 HEK 293 EBNA。

[0125] 根据本发明的一个实施方案提供了使用人表达系统制备重组人凝血酶原或凝血酶的方法。在进一步的实施方案中,人表达系统包含如本文限定的载体。在又进一步的实施方案中,人表达系统是如本文限定的人宿主细胞。在更进一步的实施方案中,人表达系统在无血清条件下培养。

[0126] 在根据本发明的实施方案中,根据本发明制备的重组人凝血酶原或凝血酶含有 gla 结构域 (SEQ ID NO:16)。

[0127] 根据本发明的一个实施方案提供了具有与天然人凝血酶原或凝血酶基因至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 核酸同源性的重组人凝血酶原或凝血酶。

[0128] 根据本发明的一个实施方案提供了具有与天然人凝血酶原或凝血酶至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 氨基酸同源性的重组人凝血酶原或凝血酶。

[0129] 根据本发明的一个实施方案提供了蛋白的至少 90%,例如至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 具有产生基本上与天然人凝血酶原或凝血酶相同的免疫原性反应的糖基化模式。

[0130] 根据本发明的一个实施方案中,重组人凝血酶以比天然人凝血酶更快的速度使纤维蛋白原凝固。

[0131] 在根据本发明的一个实施方案中,在 4-8°C 保存周后,重组人凝血酶保持至少 50%、例如至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90% 或 100% 的初始纤维蛋白原聚合活性。

[0132] 根据本发明的一个实施方案中,可以使用本领域技术人员已知的任何方法激活重组前凝血酶或凝血酶原。在根据本发明的优选实施方案中,利用 ecarin 将重组人前凝血酶或凝血酶原激活为重组人凝血酶。用 ecarin 活化具有另外的优点,即使得活化剂被固定成为可能;因此 ecarin 为重组人凝血酶的一步纯化法做准备。

[0133] 根据本发明的一个实施方案中,重组人凝血酶原具有比人天然凝血酶原显著降低的自溶活性。

[0134] 在根据本发明的实施方案中,人重组凝血酶原如 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4 限定。在进一步的实施方案中,如本文限定的人重组凝血酶原用在药物中。

[0135] 在根据本发明的实施方案中,人重组前凝血酶如 SEQ ID NO:7 或 SEQ ID NO:4 限定。在进一步的实施方案中,如本文限定的人重组凝血酶原用在药物中。

[0136] 在根据本发明的实施方案中,人重组凝血酶如 SEQ ID NO:17 限定。在进一步的实施方案中,如本文限定的人重组凝血酶用在药物中。

[0137] 制备重组人纤维蛋白原的方法

[0138] 关于生产人重组纤维蛋白原(其接近天然人纤维蛋白原的可靠性),人细胞或人

肾细胞和人视网膜衍生 PER-C6 细胞系,或更具体地说人胚肾 (HEK) 293T 细胞系可以是相同类型细胞,所述细胞已经用本发明要求保护的人纤维蛋白原的 cDNA 拷贝转染,该细胞在无血清培养基中繁殖并生产人纤维蛋白原以达到与来自细胞的可靠人纤维蛋白原的相似性,由于在肾细胞中掺入了编码 α 、 β 和 γ 链的人基因,所述肾细胞在无血清培养基中分泌更多同源纤维蛋白原,具有更好的功能性和更一致的逐批重复性。

[0139] 根据本发明的一个实施方案提供了在人细胞中体外表达的相应于 SEQ ID NO:10 的编码重组人 α 纤维蛋白原的多核苷酸(氨基酸序列在 SEQ ID NO:11 中)。

[0140] 根据本发明的一个实施方案提供了在人细胞中体外表达的相应于 SEQ ID NO:12 的编码重组人 β 纤维蛋白原的多核苷酸(氨基酸序列在 SEQ ID NO:13 中)。

[0141] 根据本发明的一个实施方案提供了在人细胞中体外表达的相应于 SEQ ID NO:14 的编码重组人 γ 纤维蛋白原的多核苷酸(氨基酸序列在 SEQ ID NO:15 中)。

[0142] 根据本发明的一个实施方案提供了包含如本文限定的一个或多个多核苷酸的载体。在进一步的实施方案中,该载体包含如本文限定的所有三个多核苷酸。在更进一步的实施方案中,根据本发明的载体包含多核苷酸,所述多核苷酸可操作连接至被用所述载体转化的宿主细胞识别的控制序列。在更进一步的实施方案中,根据本发明的载体是质粒载体的形式。

[0143] 根据本发明的一个实施方案提供了包含如本文限定的一种或多种载体的人宿主细胞。在进一步的实施方案中,人宿主细胞是人胚肾 (HEK) 细胞。在进一步的实施方案中,人宿主细胞选自:HEK 293、HEK293T、HEK 293S 和 HEK 293 EBNA。

[0144] 根据本发明的一个实施方案提供了使用人表达系统制备重组人纤维蛋白原的方法。在进一步的实施方案中,人表达系统包含如本文限定的载体。在又进一步的实施方案中,人表达系统是如本文限定的人宿主细胞。在更进一步的实施方案中,人表达系统在无血清条件下培养。

[0145] 根据本发明的一个实施方案提供了具有与天然人纤维蛋白原基因至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 核酸同源性的重组人纤维蛋白原。

[0146] 根据本发明的一个实施方案提供了具有与天然人纤维蛋白原至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 氨基酸同源性的重组人纤维蛋白原。

[0147] 根据本发明的一个实施方案提供了蛋白的至少 90%,例如至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 具有产生基本上与天然人纤维蛋白原相同的免疫原性反应的糖基化模式。

[0148] 根据本发明的一个实施方案提供了包含如 SEQ ID NO:11 限定的 α 链、如 SEQ ID NO:13 限定的 β 链和如 SEQ ID NO:15 限定的 γ 链并在人细胞中体外表达的人重组纤维蛋白原。在本发明进一步的实施方案中,根据权利要求 43 的人重组纤维蛋白原用在药物中。

[0149] 制备重组人胶原的方法

[0150] 预期本方法也可用于生产其他重组人蛋白例如重组人胶原。因此,在下文中给出这方面的简要说明。

[0151] 胶原将与脯氨酰 4-羟化酶共同表达,所述酶羟化胶原的特定脯氨酸残基,其已被

人胶原的 cDNA 拷贝转染,所述胶原例如 19-20 种任何已知人胶原,例如胶原 I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI、XII、XIII、XIV、XV、XVI、XVII、XVIII 和 XIX 型或任何这些已知胶原。在缺少果仁糖羟基化作用情况下,胶原的基本三螺旋构象在热力学上不稳定,例如在生理温度下。

[0152] 这些在细胞中增殖的人胶原型,或更具体地说下列任何胶原类型的胶原,例如 I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI、XII、XIII、XIV、XV、XVI、XVII、XVIII 和 XIX 型,达到类似于可靠人胶原和 / 或尤其是 III 型胶原,所述细胞在无血清培养基中增殖并在无血清培养基中产生人胶原。在本发明中,我们优选使用人细胞(在这些干细胞、前体细胞等等中)生产所有这些蛋白,和更具体地说,优选人肾细胞和人视网膜衍生 PER-C6 细胞系,并且甚至更具体地说,人胚肾 (HEK) 293T 细胞系(其是永生细胞系),由 P. Chen 等在 2002 年描述 (Chen, P., et al., Protein Expression and Purification (2002) 24 :481-488)。

[0153] 在人中可以发现下列胶原且理论上可以将这些胶原用于生产 CFM 或 CFM- 细胞:胶原 I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI、XII、XIII、XIV、XV、XVI、XVII、XVIII、XIX 型 - 全部这些已知胶原。然后有近来检测到的一些胶原,例如胶原 XX 型:最近的胶原亚家族;XXI 型:XXI 型胶原是血管壁的胞外基质组分,由平滑肌细胞分泌;XXIII:最近在转移性肿瘤中发现的胶原;XXIV:纤丝状脊椎动物胶原;XXVI:在卵巢和睾丸中发现的胶原新成员;XXVII:新的高度保守胶原(前(α)1(XXVII));XXIII 型:最近在转移性肿瘤中发现的胶原;XXIV:纤丝状脊椎动物胶原;XXVI:在卵巢和睾丸中发现的胶原新成员;XXVII:新的高度保守胶原(前(α)1(XXVII))。任何上述的胶原可以用来形成人胶原或人重组胶原,或人重组胶原的一部分,也称作“合成的人天然胶原”。可以添加本发明描述的人重组胶原类型来制造最佳的组织密封剂,例如胶原 I 型、胶原 II 和 / 或胶原 III 型,但不限于这三个类型。根据本发明在人细胞中制备的重组人胶原,和更具体地说人肾细胞和人视网膜衍生 PER-C6 细胞,乃至更具体地说称作 HEK 293、HEK 293T、HEK 293S 和 HEK 293 EBNA 的细胞系。干细胞或前体细胞也可以用在在这方面。所得分泌的胶原将在适当的试剂例如在能够分解胶原的培养基中制备(有 20 种以上的已知胶原,人衍生或人重组衍生胶原将是优选的);适当的培养基实例包括稀释盐酸(例如 10mM)或其他稀释的无机或有机酸或具有 7 或更小 pH 的水介质。

[0154] 根据本发明的人重组蛋白的应用

[0155] 包括在本发明中的基于名为 HUMA-SEALANT™-C 的基质的重组凝血酶和人重组胶原是生物学组织密封剂,其使得能够使用通过在特化的人细胞中过表达蛋白而生产的人重组凝血酶,或与通过在特化的人细胞中过表达蛋白而生产的人重组纤维蛋白原一起使用。此外,人重组胶原,例如任何大约 20 种已知的人胶原型。

[0156] 最佳的组织密封剂也可以通过使用人重组凝血酶和人重组纤维蛋白原得到,其甚至可以通过添加重组抑肽酶来对组织密封剂的凝胶化进行控制,甚至这个重组抑肽酶可以由人细胞,乃至人肾细胞和人视网膜衍生 PER-C6 细胞来生产。利用来自人脐带或人脐带血的多能细胞来获得细胞来源可能有优势,所述细胞来源可能甚至更适宜生产所述蛋白,获得坚固粘附,生产温和的和安全的产品作为生物学组织密封剂,以用于例如伤口愈合,减弱器官的出血,和用于任何密封目的,其中血纤蛋白胶或已知的组织密封剂通常含有天然人蛋白,或在很多情况下添加了牛(或其他动物衍生的)蛋白,其与人天然非重组蛋白相比,

可能能够传播微生物（包括病毒）生物；甚至除这种风险之外，由于例如异种蛋白（如组织密封剂产品例如 Tisseel®或 Beriplast®中看到的动物蛋白），可能产生免疫原性反应，其中该蛋白是天然人来源和非重组来源的。在组织密封剂例如 Tisseel 和 Beriplast 的情况下，抑肽酶来源于牛。上述组合或其一部分可以用作细胞移植过程中引导细胞的介质，和用作诊断或治疗药物的载体。

[0157] 本发明涉及制备人重组蛋白的一种或多种组合物的新观念和方法，所述组合物组合使用，例如重组人凝血酶和重组人凝血酶突变体，它们具有高促凝活性和低抗凝活性，细胞信号转导能力等于野生型人凝血酶的信号转导能力或大约与其相同，在某些条件下自溶程度低或几乎不存在自溶，致使这些能够至少保持它们的促凝酶活性（尤其是对人纤维蛋白原和重组人纤维蛋白原），即使当保持在冰箱温度（范围 3 至 17℃）时，使得这些相对稳定的重组凝血酶可用于止血试剂中，保持在冷冻温度持续长期的时间例如数周或数月。这些重组人凝血酶和人重组凝血酶突变体应该能够与重组人纤维蛋白原反应以产生至少大约等于或超过其他重组或天然凝血酶的止血作用、凝固作用、凝胶化作用和粘附作用，从而产生血纤蛋白。该重组人凝血酶和纤维蛋白原应该对哺乳动物细胞包括人细胞无毒，和能够与细胞或组织一起注射，和以那种方式能够作为细胞载体或能够对待注射或植入靶区域的所述细胞具有粘合作用，由此辅助细胞如同修复细胞或替代细胞（或当植入生物或尤其是器官或组织时）一样运作。通过重组凝血酶和重组纤维蛋白原，或这些成分中至少一种是重组的，而另一个是天然的（例如纤维蛋白原）来生产血纤蛋白。

[0158] 重组血纤蛋白将能够取代所有其它产品，其中使用对活细胞无毒的天然血纤蛋白，且具有仅由类似于可靠人蛋白的重组人蛋白及其突变体组成的优点，以特异性获得例如重组人凝血酶突变体尤其是能够很好切割重组哺乳动物中的纤维蛋白原（包括重组人纤维蛋白原），和同时能够显示 PAR1 信号转导活性，同时对蛋白 C 显示很小的活性或无活性的突变体。

[0159] 所述重组血纤蛋白将具有以下优点：不携带任何微生物或传染性物质，相反这些物质在天然血纤蛋白（来源于与天然纤维蛋白原或人或哺乳动物反应的天然（人或牛或来自任何其他物种）凝血酶）中相对经常发现。相对频繁地注意到，来自哺乳动物来源血液的天然凝血酶和天然纤维蛋白原可能携带使人或哺乳动物感染微生物（例如乙型肝炎、丙型肝炎、其他物种传播的病毒，例如牛等等），乃至致病性蛋白（例如来自人或哺乳动物的朊病毒，包括牛来源的朊病毒）的不必要风险。

[0160] 除了作为细胞载体（其是使用本发明范围内的重组蛋白所制备产品的次要地位），这种特别的组织密封剂（与组织密封剂例如 Tisseel 不同）在细胞移植手术过程中具有广泛领域的应用。

[0161] 本发明范围内还包括将重组胶原，或更具体地说如美国临时专利号 60/722,366 所描述的重组人胶原，例如胶原 I 型、和 / 或 2 型、和 / 或 3 型，与重组或天然纤维蛋白原组合，所述申请已经表明重组人胶原（例如 III 型）与纤维蛋白原一起形成凝胶化和粘附（凝固）作用。

[0162] 本发明范围内包括生产重组人纤维蛋白原，例如哺乳动物细胞中制备的纤维蛋白原，所述哺乳动物细胞含有 $A\alpha$ 、 $B\beta$ 和 γ 全部三个基因的 cDNA，这些基因被表达以产生蛋白。本发明范围内也包括重组纤维蛋白原和 / 或重组凝血酶可以与重组哺乳动物例如如上

所述的重组人胶原（例如重组胶原 I 或 III 型）组合。

[0163] 本发明范围内的另一个方法是使用哺乳动物细胞中产生的一个单一的重组人蛋白，例如某些重组人凝血酶类似物和 / 或重组凝血酶突变体，其意欲作为唯一产品无其他组合地单独用于局部止血，或用于生物的某些出血区，其中施加的重组人凝血酶可以与出血区存在的纤维蛋白原反应，并由此预防或终止出血。本发明范围内还包括生产重组人纤维蛋白原例如在哺乳动物细胞中制备的纤维蛋白原，所述细胞含有 A α 、B β 和 γ 全部三个基因，这些基因被表达以产生蛋白，其中这种产品可以作为单一制品来使用。HMW 大约 330,000 至 340,000 道尔顿的这种重组人纤维蛋白原用于治疗遗传性紊乱例如血纤蛋白原过少或血纤蛋白原异常紊乱，和尤其是作为治疗弥漫性血管内凝血 (DIC) 的一部分。重组人纤维蛋白原产品，当用作单独给药的生物剂时，它将以可以通过注射 / 输液施用给哺乳动物包括人的方式进行配制。

[0164] 尤其是，本发明范围还关注于制造可以模仿人活性蛋白的所述单独蛋白，所述蛋白参与修复出血紊乱，例如弥散性凝血障碍，或更内在的紊乱，其中患者可能缺乏蛋白或具有功能紊乱的蛋白，否则这些蛋白将参与适当的凝血，例如受损遗传性纤维蛋白原缺乏症的紊乱或制造完整纤维蛋白原蛋白的其他异常，例如血纤蛋白原异常、血纤蛋白原过少紊乱或特别是例如弥漫性血管内凝血 (DIC) 的紊乱。

[0165] 由相同类型人细胞系制备的独特重组组织密封剂，以获得可靠天然蛋白组成的组织密封剂

[0166] 为了获得独特的组织密封剂，生产重组人蛋白的步骤必须获得看来接近于可靠的天然人蛋白或实际上与其相同的蛋白。在其他发明中，CHO 细胞的使用已经被描述为重组凝血酶的生产者，但是我们声明人们在不使用下述技术的情况下，不会最佳地获得接近独特可靠蛋白的蛋白，所述技术利用转染入人细胞尤其是人肾细胞和人视网膜衍生 PER-C6 细胞，乃至更具体地说人胚肾 (HEK) 293T 细胞系的 cDNA 拷贝。

[0167] 在一个实施方案中，根据本发明的凝血酶浓度，例如重组人天然凝血酶或具有一个或多个点突变的重组人凝血酶，可以小于 20NIH 单位 /ml，如 1-20NIH 单位 /ml，例如小于 15NIH 单位 /ml，小于 10NIH 单位 /ml，小于 5NIH 单位 /ml，或小于 1NIH 单位 /ml。

[0168] 在一个实施方案中，根据本发明的纤维蛋白原浓度，例如重组人天然纤维蛋白原，可以小于大约 50mg/ml，如 1-50mg/ml，例如小于 40mg/ml，小于 30mg/ml，小于 20mg/ml，小于 10mg/ml，或小于 2mg/ml。

[0169] 此外如果获得的重组纤维蛋白原是使用使得组织密封试剂盒另一个组分不同的相当不同技术生产的，由于它是用可能与试剂盒中蛋白差距很大的另一种方法生产的，可能在其与人天然蛋白的可靠性方面达不到本发明所述的要求，因此该组织密封剂一点也不如本发明要求保护的组织密封剂试剂盒独特例如美国专利 #6,780,411 中，重组纤维蛋白原的组合，被描述作为重组纤维蛋白原产生，其是通过涉及在转基因哺乳动物体液中生产重组纤维蛋白原的方法制备的，所述转基因动物例如绵羊、猪、牛、山羊、兔子和骆驼。并入上述专利（美国专利 #6,780,411）的 WO-A-9523868 中描述了这种方法。这些发明的组织密封剂中涉及的另一个蛋白是重组凝血酶，其被描述为通过哺乳动物细胞例如 CHO 细胞产生。因此从我们描述的生产组成组织密封剂的蛋白的显著不同观念的观点看，从一个蛋白（凝血酶）由动物细胞（CHO 细胞）制备和另一个蛋白（纤维蛋白原）由转基因动物的体液

制备的观点看,这个组合显著不同于我们发明中要求保护的组织密封剂。

[0170] 重组人凝血酶具有广泛的用途,范围包括治疗人类凝血障碍以作为凝血的酶促引发剂发挥作用,治疗烧伤,植皮术治疗,在小手术和大手术中,作为单独产品或作为产品(例如组织密封剂)的一部分。

[0171] 美国专利号 4,427,650、4,442,655 和 4,655,211 中详细论述了各种创伤组织粘合剂的配制,每一篇引入本文作为参考。

[0172] 重组人凝血酶的有效剂量将根据使用凝血酶的方式发生相当大地变化,范围从 100 至 15,000 单位(凝血酶的比活性是每 μg 蛋白 3,000 单位)。

[0173] 根据本发明制备的重组人凝血酶可能量极其少,其通常不会启动明显的凝固,除非与任何类型的胶原一起使用,例如重组人胶原,例如 I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI、XII、XIII、XIV、XV、XVI、XVII、XVIII、XIX 型。因此,可以预料 - 与其他发明不同,包括使用凝血酶以产生凝胶化以及粘附化合物 - 其中在 100 单位至 15,000 单位的范围内使用凝血酶 - 根据本发明用于诱导凝胶化(凝固)和 / 或粘附物质的凝血酶的量,当与胶原和纤维蛋白原一起使用,或仅与胶原一起使用时,的确可以明显低于本领域经验丰富的技术人员所可能预期的,和因此认为是本发明独特的 - 即为了激活凝胶化(凝固)和 / 或粘附,使用添加的达到 90 单位凝血酶的痕量重组天然或重组凝血酶,可能的确足以达到所述凝胶化(凝固)。

[0174] 本发明完全不同的模式可以是使用本发明范围内的一些或一个蛋白,其可以方便地并入物质,其同样可以与被添加的物质反应以引起凝胶化、粘附或胶粘作用以及止血作用。

[0175] 可以用任何已知的药学可接受的赋形剂来配制根据本发明的重组人凝血酶原或凝血酶。

[0176] 可以用任何已知的药学可接受的赋形剂来配制根据本发明的重组人纤维蛋白原。

[0177] 本发明另外包括各种试剂盒,其含有实施和执行本文所描述的方法(包括用作组织密封剂和 / 或止血剂)所需的成份和仪器。在一个方面,这种试剂盒可以包括选自下列的一个或多个物质:如本文叙述的重组人凝血酶、如所述的人纤维蛋白原、胶原,例如胶原 I、II 和 III 型,和例如重组人胶原、蛋白酶,例如丝氨酸蛋白酶,例如抑肽酶,和用于药物中的一种或多种药学可接受的赋形剂。

[0178] 另外的组合物、试剂盒、成份组配包括在本发明范围内,用于与本文如下描述的方法结合。

[0179] 项目

[0180] 1. 组合物,其包括用含有 cDNA 的单独质粒构建体转染的人细胞系中表达的下列蛋白,该 cDNA 单独表达下列蛋白:

[0181] a. 重组人凝血酶原

[0182] b. 重组人凝血酶

[0183] b. 重组人纤维蛋白原

[0184] c. 重组人胶原

[0185] 2. 包括在项目 1c 中所述重组人胶原中的任何重组人胶原 I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI、XII、XIII、XIV、XV、XVI、XVII、XVIII、XIX 型。

[0186] 3. 项目 1 和 2 中描述的人重组蛋白的任一混合物的组合物,其构成形成凝胶的一致性。

[0187] 4. 非生理性的极少量重组人胶原和重组人凝血酶的混合物的组合物,例如很多单位凝血酶,从痕量凝血酶到 90 单位凝血酶,添加或不添加纤维蛋白原,其将产生形成凝胶的一致性。

[0188] 5. 项目 1-2 中定义的蛋白的任一混合物的组合物,当应用于表面时,其可以是生物学来源的,其在体外和体内粘附于所述表面。

[0189] 6. 1a-1c 中涉及的上述人重组蛋白的组合物,其包括人重组蛋白,使用 cDNA 转染人干细胞和 / 或进一步分化的人前体细胞,所述细胞分泌项目 1 中的一个或多个蛋白,当互相进行组合时,其将形成凝胶样物质。

[0190] 7. 1a-1c 中涉及的上述人重组蛋白的组合物,包括通过使用 cDNA 转染 HEK 293、HEK 293T、HEK 293S、HEK 293 EBNA 细胞系而制备的人重组蛋白,所述细胞系分泌项目 1 中的一个或多个蛋白,当互相进行组合时,其将形成凝胶样物质。

[0191] 8. 1a-1c 中涉及的上述人重组蛋白的组合物,包括通过使用 cDNA 转染 HEK 293、HEK 293T、HEK 293S、HEK 293 EBNA 细胞系而制备的人重组蛋白,所述细胞系分泌项目 1 中的一个或多个蛋白,当互相进行组合时,其将形成凝胶样物质,所述物质将在体外和体内粘附于表面,例如生物学表面。

[0192] 9. 根据项目 1 至 5 的任何组合物,其在所述条件下可以与活细胞混合并用作所述细胞的载体。

[0193] 10. 根据项目 1 至 5 的任何组合物,其在所述条件下可以与化合物混合,在体内用作所述化合物的载体以进行诊断和 / 或治疗应用。

[0194] 11. 根据前述项目任何一项的组合物,其用于携带医疗药物至靶组织或靶器官。

[0195] 12. 哺乳动物细胞中表达的重组哺乳动物凝血酶,其具有高促凝活性和低蛋白 C(抗凝)活化能力。

[0196] 13. 在具有表达六个多肽链 -2A α 、2B β 、2 γ 的 cDNA 的哺乳动物细胞中生产的重组哺乳动物纤维蛋白原,其能够起到哺乳动物血浆衍生的功能完全的哺乳动物纤维蛋白原的作用。

[0197] 14. 一种由试剂盒组成的产品,所述试剂盒含有项目 12 描述的重组哺乳动物或人凝血酶,其用于哺乳动物。

[0198] 15. 一种由试剂盒组成的产品,所述试剂盒含有项目 13 所述的重组哺乳动物或人纤维蛋白原,其用于哺乳动物。

[0199] 16. 一种由试剂盒组成的产品,所述试剂盒含有项目 12 所述的重组哺乳动物或人凝血酶和含有项目 13 所述重组人纤维蛋白原,其能够产生血纤蛋白。

[0200] 17. 一种由试剂盒组成的产品,所述试剂盒含有项目 13 所述重组哺乳动物纤维蛋白原和重组哺乳动物 I、II 和 / 或 III 型胶原,其用作密封剂和真皮填充产品。

[0201] 18. 项目 12 所述的重组哺乳动物凝血酶和重组哺乳动物 I、II 和 III 型胶原,其用作密封剂。

[0202] 19. 一种如本文限定的方法,其中细胞以悬浮培养法培养 5 至 20 天,并从上清中分离该细胞,所述上清含有蛋白。

[0203] 20. 一种如本文限定的方法,其中重组人纤维蛋白原是用选自下列的一个或多个方法纯化的:阴离子交换层析法、亲和层析法、使用鱼精蛋白-琼脂糖的亲和层析法、使用单克隆或多克隆抗体的免疫沉淀法、使用单克隆抗体的亲和层析法、使用硫酸铵的沉淀法。

[0204] 21. 根据一个或多个上述项目的方法,其中纤维蛋白原在至少一种蛋白酶抑制剂存在下纯化。

[0205] 下面表 1 示出了所附上的序列表的概述。

[0206] 表 1

[0207]

SEQ IDNO	说明
1	BC051332(人凝血酶原)-M400A的多核苷酸序列(碱基 #1198,1199,1200 ;ATG(gcc)
2	BC051332(人凝血酶原)-M400A的氨基酸序列(碱基 #1198,1199,1200 ;ATG(gcc)
3	BC051332(人凝血酶原)-wt的多核苷酸序列
4	BC051332(人凝血酶原)-wt的氨基酸序列
5	BC051332(人前凝血酶)-M256A的多核苷酸序列(碱基 #766,767,768 ;ATG(gcc)
6	含 HPC4 的 BC051332(人前凝血酶)-M256A 的多核苷酸序列(碱基 #766,767,768 ;ATG(gcc)
7	含 HPC4 的 BC051332(人前凝血酶)-M256A 的氨基酸序列(碱基 #766,767,768 ;ATG(gcc)
8	BC051332(人前凝血酶)-wt的多核苷酸序列
9	BC051332(人前凝血酶)-wt的氨基酸序列
10	纤维蛋白原 a(NM_021871)的多核苷酸序列
11	纤维蛋白原 a(NM_021871)的氨基酸序列
12	纤维蛋白原 b(BC106760)的多核苷酸序列
13	纤维蛋白原 b(BC106760)的氨基酸序列
14	纤维蛋白原 r(BC021674)的多核苷酸序列
15	纤维蛋白原 r(BC021674)的氨基酸序列
16	GLA 结构域(其中 X 定义为 γ-羧基谷氨酸(G1a))
17	来自 Seq.(由凝血酶原 Seq. no. 285 计算)的凝血酶类似物 M84A 的序列,其包含 α-凝血酶轻(A)链和重(B)链

附图说明

[0208] 图 1 显示了 Prepro 凝血酶原结构 (Degen & Davie(1987)Biochemistry 26 : 6165-6177)。

[0209] 图 2 是包括结构域 HPC4、Kringle2 和肽酶 S 的前凝血酶 M256A 的结构概观。此外,指示了点突变 M256A 的位置。

[0210] 图 3 是包括结构域 Gla、Kringle1、Kringle2 和肽酶 S 的凝血酶原 M400A 的结构概观。此外,指示了点突变 M256A 的位置。

[0211] 图 4. 为了容易地区分单独的表达,例如被 Zymogenetics 用于产生重组人凝血酶、前凝血酶和前凝血酶-1 的凝血酶原((含)gla-结构域的凝血酶缺少 gla-结构域的凝血酶原)的表达,图 4 提供了这些单独的项目的概观。如图 4 所说明的,前凝血酶=无 gla 结构域和无 kringleI 结构域的凝血酶原(缺少 Gla 结构域的凝血酶原)。为促进纯化,在 N 末端添加 HPC4 表位。因此,图 4 的第一部分显示了包括 Gla 结构域和 Kringle1 和 Kringle2 的凝血酶原。此外,图 4 阐明了从非突变凝血酶原开始的制备重组人前凝血酶的方法。

[0212] 图 5. 人凝血酶原的 Gla 结构域。GLA6 表示 γ -羧基谷氨酸残基,当被天冬氨酸取代时,其对凝血酶原功能影响很少;GLA7、GLA14、GLA19、GLA25 和 GLA32 表示对凝血酶原功能中等重要的残基,和 GLA16、GLA26 和 GLA29 表示对凝血酶原功能至关重要的那些残基。

[0213] 图 6. 第 1 道是分子标记,第 2 道是对照道,第 3 道是凝血酶原,第 4 道是前凝血酶(野生型),第 5 道是第 #4 道通过 MWC0 的滤液,第 6 道是前凝血酶-1 M84A(前凝血酶类似物 M256A),和第 7 道是第 #6 道通过 50kD MWC0 的滤液。

[0214] 图 7. 未转染的对照细胞,其消亡(前 6 个孔)。显示了 M84A(或前凝血酶类似物 M256A)转染的细胞在抗生素存在下持续生长。

[0215] 图 8. 显示了重组人凝血酶类似物[M84A(或凝血酶类似物 M256A)]。在左侧,含 10%血清的培养基的考马斯蓝染色。在右侧,用抗 HPC4 单克隆抗体(mAb-HPC4)反应的蛋白质印迹分析,其中 M84A(或类似物 M256A)显象为独特的强条带,表明 M84A(或类似物 M256A)浓度高。这表明当你载入量相对高的蛋白(如考马斯蓝染色所示)时,在从含血清的培养基纯化 M84A(类似物 M256A)的过程中不得不去除量相对高的污染蛋白。

[0216] 图 9. 无血清悬浮细胞(HEK293,改变为悬浮)培养物中,蛋白质印迹分析用抗 HPC4 单克隆抗体(mAb-HPC4)进行反应。

[0217] 图 10 显示了无血清蛋白产物的考马斯蓝染色,其比含 10%血清(左凝胶)样品明显更纯;左凝胶的箭头表示 M84A 位置(或类似物 M256A)蛋白质印迹分析(右凝胶)用抗 HPC4 的单克隆抗体(mAb-HPC4)进行反应,表示来自 M84A(或类似物 M256A)的信号强。人们观察到在左边第 2 和 3 道中,使用考马斯蓝,可以看到可获得蛋白的总量。观察到的蛋白量被评价为很小。含 M84A(或类似物 M256A)的克隆看来是蛋白的相对大的一部分(如使用 HPC4 的抗体检测所示)表明从如此相对少量的总蛋白中纯化活性蛋白将很容易。

[0218] 图 11 显示了重组人凝血酶类似物 M84A(或类似物 M256A)的纯化。第 1 道是分子标记。第 2 道是含 M84A 的粗蛋白,和第 3 道观察到完全纯化的 M84A 洗脱物。

[0219] 图 12. 含六个多肽链的重组人纤维蛋白原(六聚物)340kDa),分配如下:2A α (66kDa)、2B β (56-58kDa),和 2 γ (43-45kDa)。

[0220] 图 13. 凝胶用简单蓝染色法染色。第 1 道含分子标记,第 2 道纤维蛋白原,没有加热和没有 DTT,第 3 道纤维蛋白原,没有加热没有 DTT,第 4 道加热和具有 DTT 的纤维蛋白原,和第 5 道加热和具有 DTT 的纤维蛋白原,意味着第 3、4 和 5 道是在还原条件下。

[0221] 图 14. Western 泳道顺序:第 1 道:MW 标记,第 2 道:纤维蛋白原,没有加热没有

DTT,第3道:加热 &DTT 的纤维蛋白原,第4道:加热 &DTT 的纤维蛋白原,第5道:加热 &DTT 的纤维蛋白原,第3、4和5道在还原条件下,在所述条件下纤维蛋白原条带将消失。

[0222] 图15显示了考马斯蓝染色和用抗人凝血酶原 (Enzyme Research Laboratories) 对条件培养基的蛋白质印迹分析。M;标记,1. 对照培养基;2 凝血酶原 M84A (或凝血酶原类似物 M400A);3 凝血酶原 M84A (或凝血酶原类似物 M400A);4 凝血酶原 M84A (或凝血酶原类似物 M400A);5 凝血酶原 M84A (或凝血酶原类似物 M400A)。

[0223] 图16. 使用抗蛋白 C 的 mAb (Roche) 观察到前凝血酶 M84A (或类似物 M256A)。

[0224] 图17. 使用树脂:抗蛋白 C Affinity Matrix (Roche) 从来自无血清培养基的粗前凝血酶洗脱前凝血酶。

[0225] 图18. 前凝血酶 M84A (或前凝血酶类似物 M256A) 的纯化和活化为凝血酶 (α -凝血酶 M84A (或 α -凝血酶类似物 M256A))。

[0226] 图19. 肝素琼脂糖凝胶层析法纯化的 α -凝血酶。第1道显示了 Ecarin 活化的 α -凝血酶混合物 (或 α -凝血酶类似物 M256A) 载入 10mM Tris (pH7.4)/200mM 氯化胆碱预平衡过的肝素柱。第2道显示了获得的收集至基线的流出物。第3道显示了用 10mM Tris (pH7.4)/500mM 氯化胆碱洗涤的非特异性污染物。第4道显示了用 10mM Tris (pH7.4)/800mM 氯化胆碱洗脱的 α -凝血酶 M84A (或 α -凝血酶类似物 M256A)。

[0227] 图20. 无血清悬浮细胞 (悬浮培养物) 表达的纤维蛋白原。S道显示了 CHO 细胞中获得的人纤维蛋白原 (纯化的纤维蛋白原 (1.4 μ g)), 其与第1和2道相比,第1和2道是来自6天后的粗培养基, (15 μ l) 一式两份悬浮培养的 HEK293 (例如 HEK293T) 细胞的人纤维蛋白原。S'、1' 和 2' 道显示了加热和 DTT 处理后纤维蛋白原分解成 α 、 β 和 γ 。实施用兔抗人纤维蛋白原多抗 (American Diagnostica Inc. #313R) 反应的蛋白质印迹分析,显示 S 和 S' (加热和 DTT 处理前后从 CHO 细胞 (纯化的) 人纤维蛋白原), 与 2 和 2' 加热和 DTT 处理前后的重组人纤维蛋白原 (粗产物) 相比较。

[0228] 实施例

[0229] 实施例 1

[0230] 经由具有 HPC4 结构域的前凝血酶制备重组人前凝血酶的方法

[0231] 人凝血酶原基因购自 Gene Bank (GB 登录号 BC051332)。PCR 获得含 Gla- 结构域的凝血酶原区域和 HPC4 (蛋白 C) 表位添加至 DNA 5' 末端。蛋白 C 经历 Ca^{2+} 诱导的构象变化,这是被凝血酶-凝血调节蛋白复合物活化所需的。使用阻断蛋白 C 活化的 Ca^{2+} 依赖性单克隆抗体 (HPC4) 来研究蛋白 C 中接近活化位点的构象变化,如 Stearns 等所示 (Stearns DJ, Kurosawa S, Sims PJ, Esmon NL, Esmon CT, The interaction of a Ca^{2+} -dependent monoclonal antibody with the protein C activation peptide region. Evidence for obligatory Ca^{2+} binding to both antigen and antibody, J Biol Chem. (1988) 263(2): 826-32)。

[0232] 第84位的点突变是由甲硫氨酸变为丙氨酸 (ATG $\rightarrow$ GCC), 参见人 M84A 的序列 (SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:17), 其中 B116 上的序列 (SEQ) 编号相当于糜蛋白酶“84”或凝血酶原“400” (或凝血酶原类似物 M400A), 其被点突变,如本文所述,作为点突变。

[0233] 另一个生产重组人凝血酶的方法是将克隆的重组人前凝血酶-1 活化为这个凝血酶,例如将 M84A (或前凝血酶类似物 M256A) 插入 pHZsec 载体,所述载体是 Human Zyme Inc.

(HumanZyme Inc., Chicago, USA) 自己拥有的载体。然后在大肠杆菌中扩增 M84A 基因。接着根据 HumanZyme Inc. 开发的方法 (HumanZyme Inc., Chicago), 将扩增的基因转染入含血清培养基中的单层细胞培养的人胚肾细胞 (HEK293)。使用 mAb-HPC4 通过蛋白质印迹分析证实人重组凝血酶类似物 (M84A) 的表达。从图 6 可以观察到 HEK293 细胞已经成功表达野生型前凝血酶-1 和 M84A 前凝血酶-1。

[0234] 实施例 2

[0235] 在 HEK293 细胞中表达重组人凝血酶类似物 (M84A (或类似物 M256A))。从 6 个孔中选择十二 (12) 个克隆到更大的板上。使用抗 HPC4 的单克隆抗体 (mAb-HPC4) 根据蛋白质印迹分析最高的两个克隆。细胞改变为无血清培养基和作为悬浮培养物处理。使用指示大小的纯化方法纯化重组人前凝血酶-1M84A (或前凝血酶类似物 M256A)。每升无血清悬浮培养的重组 HU 凝血酶类似物 (M84A (或凝血酶类似物 M256A)) 的产量令人满意。未转染细胞 (对照) 消亡, 而 M84A (或类似物 M256A) 转染的细胞系在抗生素存在下显示持续生长, 参见图 7。

[0236] 图 8 显示了 12 个 HEK293 细胞克隆的筛选, 从中选择了克隆 2 和 11。图 9 显示了无血清悬浮细胞 (HEK293, 改变为悬浮) 培养物中, 用抗 HPC4 单克隆抗体 (mAb-HPC4) 反应的蛋白质印迹分析。图 10 显示了鉴定这两个克隆得到选自图 9 的蛋白质印迹分析的顶部结果。图 11 显示了重组人前凝血酶-1 的纯化结果, 纯化前 M84A 粗蛋白和洗脱的纯化的 M84A 蛋白示于图 10。图 11 显示了重组人凝血酶类似物 M84A 的纯化。第 1 道是分子标记。第 2 道是含 M84A (或前凝血酶类似物 M256A) 的粗蛋白, 和第 3 道观察到完全纯化的 M84A (或前凝血酶类似物 M256A) 洗脱物。

[0237] HumanZyme Inc. 进行 DNA 序列的插入和制备、转染、表达、纯化和活化 (HumanZyme Inc. Chicago, USA)。

[0238] 来自 Seq. (从凝血酶原 Seq no 285 计算) 的人凝血酶类似物 M84A 氨基酸序列是 SEQ ID NO 17。

[0239] 这表明当洗脱前粗蛋白与含血清 (例如 10% 血清) 细胞培养物中存在的蛋白的量相比仅含相对少的条带的蛋白时, 相对易于纯化重组人凝血酶类似物 M84A。

[0240] 实施例 3

[0241] 制备具有完整 Gla 结构域的凝血酶原的方法

[0242] 转染了重组人含 gla- 结构域的凝血酶原的稳定细胞系的选择, 所述凝血酶原可被活化为重组凝血酶, 重组人凝血酶之一的重组人凝血酶是重组人凝血酶类似物, M84A 乃至来源于含 gla- 结构域的凝血酶原活化的重组野生型凝血酶。在大肠杆菌中扩增完整含 Gla- 结构域的凝血酶原基因, 和扩增的含 Gla- 结构域的凝血酶原转染入 HEK293 (例如 HEK 293T) 细胞并在含血清培养基中单层培养生长。收获几个克隆并分离显示含 M84A (或类似物 M400A) 的克隆, 和这些克隆改变为无血清培养基中悬浮细胞培养。通过将细胞与上清分离, 从悬浮细胞培养物中收获 M84A gla- 结构域凝血酶原。然后沉淀和纯化 M84A (或类似物 M400A), 并使用蛋白酶通过一步法将其活化。

[0243] 来自 Seq. (由凝血酶原 Seq. no. 285 计算) 的人凝血酶类似物 M84A 的氨基酸序列是 SEQ ID NO :17。

[0244] 该方法中, 保留重组 Gla- 结构域凝血酶原, 含信号肽、前肽、Gla 结构域、两个

Kringle 结构域和蛋白酶结构域（例如胰蛋白酶）的凝血酶原。

[0245] 实施例 4

[0246] 制备纤维蛋白原的方法

[0247] 重组人纤维蛋白原, 和更具体地说在人胚肾细胞 (HEK293) 中克隆的重组人纤维蛋白原, 乃至更具体地说描述为重组人可靠的纤维蛋白原, 由于 6 个多肽-2A α 、2B β 和 2 γ 基因最可能已经克隆入任何适当的宿主细胞, 但是本发明中克隆入 HEK293 细胞。购买如 GB 登录号对于 Fb_A α 为 NM_021871、对于 Fb_B β 为 BC106760 和对于 Fb_ γ 为 BC021674 的人纤维蛋白原 α 、 β 和 γ 基因, 使用 PCR 检测纤维蛋白原 α 、 β 、 γ 基因。将每个基因克隆入 pHZsec 载体。在大肠杆菌中扩增这些基因。人 α (前体) 纤维蛋白原的多肽序列是 SEQ ID NO:10 和人 α (前体) 纤维蛋白原的氨基酸序列是 SEQ ID NO:11。人纤维蛋白原 β 链的核酸序列是 SEQ ID NO:12 和纤维蛋白原 β 链的氨基酸序列是 SEQ ID NO:13。人 γ 纤维蛋白原的多肽序列是 SEQ ID NO:14 和人 γ 纤维蛋白原的氨基酸序列是 SEQ ID NO:15。

[0248] 此后这三个基因转染入 HEK293 细胞系并在含血清条件下以单层培养生长。用兔抗人纤维蛋白原 IgG 多抗, 通过蛋白质印迹分析该条件培养基以证实其表达。当比较重组纤维蛋白原的结构时, 与图 12 所示的天然人纤维蛋白原相比, 其看来是可靠的, 这表明重组人纤维蛋白原含六个多肽链 (六聚物) (340kDa), 分配如下: 2A α (66kDa)、2B β (56-58kDa) 和 2 γ (43-45kDa)。

[0249] 图 13 显象了 HEK 293 细胞系统中重组 (可靠的) 人纤维蛋白原的表达, 其中凝胶是考马斯蓝染色的凝胶, 和图 14 中基于蛋白质印迹分析使用兔抗人纤维蛋白原 IgG 显象了重组 (可靠的) 人纤维蛋白原。

[0250] 给出最高产量的克隆是“抗生素”选择的, 和发现重组 (可靠的) 人纤维蛋白原的产量提供了令人满意的来自 HEK293 细胞的重组人可靠的纤维蛋白原的数量。

[0251] 实施例 5

[0252] 人凝血酶原基因购自 Gene Bank (GB 登录号 BC051332)。含 Gla- 结构域的凝血酶原区域 aa#44-622 (579aa) 通过 PCR 在第 84 位 (Chy) (或凝血酶原类似物 M400A) 进行点突变, 从 Met 变为 Ala (ATG $\rightarrow$ GCC)。

[0253] 在第 84 位氨基酸 (或在凝血酶原类似物 400 位) 上进行点突变, 从甲硫氨酸变为丙氨酸 (ATG $\rightarrow$ GCC) ;

[0254] o M84A-mF :5' -GAAAAGATATCCGCCTTGGAAGATC-3'

[0255] o M84a-mR :5' -GATCTTTTCCAAGGCGATATCTTTTC-3'

[0256] 然后将重组人凝血酶原 M84A (或人凝血酶原类似物 M400A) 插入 pHZsec 载体, 和在大肠杆菌中扩增 M84A (或类似物 M400A) 基因。然后将扩增的基因转染入含 10% 血清的培养基中单层的 HEK293 (例如 HEK293T) 细胞系。用抗人凝血酶原 (Enzyme Research Laboratories) 抗体通过蛋白质印迹分析条件培养基发现和证实表达。

[0257] 如图 15 可以看出, 单层中表达了 gla- 结构域凝血酶原 M84A (或凝血酶原类似物 M400A), 如对该细胞培养物的培养基上清进行的考马斯蓝和蛋白质印迹分析所证明的, 似乎各个孔中所有转染的 HEK293 细胞都表达了凝血酶原 M84A (或凝血酶原类似物 M400A)。

[0258] 实施例 6

[0259] 人凝血酶原基因购自 Gene Bank(GB 登录号 BC051332)。PCR 得到前凝血酶区域 aa#206-622(417aa) 并在 N 末端 (DNA 的 5' 末端) 添加 HPC4 表位 (18 个 aa)。Stearns 的关于 HPC4 的参考文献 (StearnsDJ, Kurosawa S, Sims PJ, Esmon NL, Esmon CT. J. Biol. Chem. (1988), 263 :826-832) 如下 :

[0260] gcagcaaagcttgaagaccaagtagatccgcggctcattgatgggaaggctcgacctgtca

[0261] A A K L E D Q V D P R L I D G K V D L S

[0262] 在第 84 位氨基酸 (或在类似物位置 M256A) 上进行点突变 M84A, 从 Met 突变为 Ala(ATG → GCC)

[0263] o M84A-mF :5' -GAAAAGATATCCGCCTTGAAAAGATC-3'

[0264] o M84a-mR :5' -GATCTTTTCCAAGGCGGATATCTTTTC-3'

[0265] 将克隆的重组人凝血酶 M84A (或凝血酶类似物 M256A) 插入 pHZsec 载体。然后在大肠杆菌中扩增克隆的基因。将该基因转染入单层培养的 HEK 293 (例如 HEK 293T) 细胞系。用 mAb-HPC4, 通过蛋白质印迹分析条件培养基证实表达 (参见图 8)。从 6 个孔中选择十二个克隆并将细胞转移至更大板。根据蛋白质印迹分析 (mAb-HPC4) 选择最高的两个克隆。这些细胞改变为无血清培养基。

[0266] 前凝血酶 M84A (或类似物 M256A) 的指示纯化

[0267] 如图 16 可以看出, 通过使用抗蛋白 C 的 mAb (Roche) 观察到前凝血酶 M84A (或类似物 M256A)。图 17 中可以观察到通过使用树脂 : 抗蛋白 C Affinity Matrix (Roche) 来自无血清培养基的粗前凝血酶洗脱了前凝血酶。

[0268] Ecarin 活化凝血酶 M84A

[0269] Ecarin 得自 Sigma (Sigma E0504), 和是锯鳞蝥毒液, 它不依赖于 Ca^{++} 、磷脂和血浆凝血因子。它可以用作可能的固定剂。

[0270] 活化反应条件如下, 将 50 μ l Ecarin (50EU/ml) 添加至含 5ml M84A 前凝血酶 (或前凝血酶类似物 M256A) (0.5mg/ml) 的粗培养基或 TBS 中 (通过 HPC4 柱纯化后)。用显色底物 (FPRpNA, 来自 MidwestBio-Tech# 710013) 在室温下通过凝血酶试验确定活化, 和随后进行 :

[0271] • 970 μ l 1×TBS (基于 Tris 的盐水, pH7.4)

[0272] • 25 μ l 1.7mM FPRpNA (终浓度 40 μ M)

[0273] • 每个时间段 5 μ l 反应混合物。

[0274] 前凝血酶 M84A (或前凝血酶类似物 M256A) 的纯化和活化为凝血酶 α -凝血酶 M84A) 示于图 18。

[0275] 来自肝素琼脂糖凝胶层析法的 A- 凝血酶纯化

[0276] 根据图 19, 第 1 道显示了将 Ecarin 活化的 α -凝血酶混合物载入用 10mM Tris (pH7.4)/200mM 氯化胆碱预平衡过的肝素柱。第 2 道显示了获得的收集至基线的流出物。第 3 道显示了用 10mM Tris (pH7.4)/500mM 氯化胆碱洗涤的非特异性污染物。第 4 道显示了用 10mM Tris (pH7.4)/800mM 氯化胆碱洗脱的 α -凝血酶 M84A (参见图 19)。

[0277] 实施例 7

[0278] 从 Gene Bank (GB 登录号对于 Fb_A α 为 NM_021871、对于 Fb_B β 为 BC106760 和对于 Fb_ γ 为 BC021674) 购买人纤维蛋白原 α 、 β 和 γ 基因。通过 PCR 克隆纤维蛋白原

α 、 β 和 γ 基因,将每个基因克隆入 pHZsec 载体,在大肠杆菌中扩增这些基因。将这三个基因转染入含 10%血清的单层培养的 HEK 293(例如 HEK 293T)细胞系。用兔抗人纤维蛋白原 IgG 多抗,通过蛋白质印迹分析该条件培养基证实表达。

[0279] 无血清悬浮细胞(悬浮培养物)的纤维蛋白原表达

[0280] 如图 20 所示, S 道显示了 CHO 细胞中获得的人纤维蛋白原(纯化的纤维蛋白原(1.4 μ g)),其与第 1 和第 2 道相比,第 1 和 2 道是来自 6 天后的粗培养基(15 μ l)的一式两份悬浮培养的 HEK 293(例如 HEK293T)细胞的人纤维蛋白原。S'、1' 和 2' 道显示了加热和 DTT 处理后纤维蛋白原分解成 α 、 β 和 γ 。实施用兔抗人纤维蛋白原多抗(American Diagnostica Inc. #313R)反应的蛋白质印迹分析,显示 S 和 S'(加热和 DTT 处理前后从 CHO 细胞(纯化的)人纤维蛋白原),与 2 和 2' 加热和 DTT 处理前后的重组人纤维蛋白原(粗产物)相比较。

序列表

<110>HumaGene Inc.

<120> 制备重组人凝血酶和纤维蛋白原的方法

<130>P12195 PC/P12195

<150>US 60/779, 474

<151>200603-06

<150>US 60/843, 945

<151>2006-09-12

<160>17

<170>PatentIn version 3.4

<210>1

<211>1743

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组人凝血酶前体分子

<400>1

gccaacacct tcttggagga ggtgcgcaag ggcaacctgg agcgagagtg cgtggaggag	60
acgtgcagct acgaggaggc cttcgaggct ctggagtcct ccacggctac ggatgtgttc	120
tgggccaagt acacagcttg tgagacagcg aggacgcctc gagataagct tgctgcatgt	180
ctggaaggta actgtgctga gggctctgggt acgaactacc gagggcatgt gaacatcacc	240
cggtcaggca ttgagtgcc gctatggagg agtcgctacc cacataagcc tgaaatcaac	300
tccactaccc atcctggggc cgacctacag gagaatttct gccgcaaccc cgacagcagc	360
accacgggac cctggtgcta cactacagac cccaccgtga ggaggcagga atgcagcatc	420
cctgtctgtg gccaggatca agtcactgta gcgatgactc cacgctccga aggtccaggt	480
gtgaatctgt cacctccatt ggagcagtgt gtccctgata gggggcagca gtaccagggg	540
cgcttgccgg tgaccacaca tgggctcccc tgccctggcct gggccagcgc acaggccaag	600
gccctgagca agcaccagga cttcaactca gctgtgcagc tgggtggagaa cttctgccgc	660
aaccagacg gggatgagga gggcgcgctgg tgctatgtgg ccgggaagcc tggcgacttt	720

```

gggtactgcg acctcaacta ttgtgaggag gccgtggagg aggagacagg agatgggctg      780
gatgaggact cagacagggc categaaggc cgtaccgcca ccagtgahta ccagactttc      840
ttcaatccga ggaccttttg ctcgggagag gcagactgtg ggctgcgacc tctgttcgag      900
aagaagtcgc tggaggacaa aaccgaaaga gagctcctgg aatcctacat cgacgggcgc      960
attgtggagg gctcggatgc agagatcggc atgtcacctt ggcaggatgat gcttttccgg    1020
aagagtcctc aggagctgct gtgtggggcc agcctcatca gtgaccgctg ggtcctcacc    1080
gccgccact gcctcctgta cccgccctgg gacaagaact tcaccgagaa tgaccttctg    1140
gtgcgcattg gcaagcactc ccgcaccagg tacgagcgaa acattgaaaa gatatccatg    1200
ttggaaaaga tctacatcca ccccaggtag aactggcggg agaacctgga ccgggacatt    1260
gccctgatga agctgaagaa gcctgttgcc ttcagtgaat acattcaccc tgtgtgtctg    1320
cccgacaggg agacggcagc cagcttgctc caggctggat acaaggggcg ggtgacaggc    1380
tggggcaacc tgaaggagac gtggacagcc aacgttggtg aggggcagcc cagtgtcctg    1440
cagggtggtg acctgccccat tgtggagcgg ccggtctgca aggactccac ccgatccgc    1500
atcactgaca acatgttctg tgctggttac aagcctgatg aagggaacg aggggatgcc    1560
tgtgaaggtg acagtggggg accctttgtc atgaagagcc cctttaacaa ccgctggtat    1620
caaatgggca tcgtctcatg gggatgaaggc tgtgaccggg atgggaaata tggcttctac    1680
acacatgtgt tccgcctgaa gaagtggata cagaaggta ttgatcagtt tggagagtag    1740
tga                                                                    1743

```

<210>2

<211>579

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组人凝血酶前体分子

<400>2

```

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

```

	85		90		95
Pro Glu Ile Asn Ser Thr Thr His	Pro Gly Ala Asp Leu Gln Glu Asn				
100	105	110			
Phe Cys Arg Asn Pro Asp Ser Ser Thr Thr Gly Pro Trp Cys Tyr Thr					
115	120	125			
Thr Asp Pro Thr Val Arg Arg Gln Glu Cys Ser Ile Pro Val Cys Gly					
130	135	140			
Gln Asp Gln Val Thr Val Ala Met Thr Pro Arg Ser Glu Gly Ser Ser					
145	150	155	160		
Val Asn Leu Ser Pro Pro Leu Glu Gln Cys Val Pro Asp Arg Gly Gln					
165	170	175			
Gln Tyr Gln Gly Arg Leu Ala Val Thr Thr His Gly Leu Pro Cys Leu					
180	185	190			
Ala Trp Ala Ser Ala Gln Ala Lys Ala Leu Ser Lys His Gln Asp Phe					
195	200	205			
Asn Ser Ala Val Gln Leu Val Glu Asn Phe Cys Arg Asn Pro Asp Gly					
210	215	220			
Asp Glu Glu Gly Ala Trp Cys Tyr Val Ala Gly Lys Pro Gly Asp Phe					
225	230	235	240		
Gly Tyr Cys Asp Leu Asn Tyr Cys Glu Glu Ala Val Glu Glu Glu Thr					
245	250	255			
Gly Asp Gly Leu Asp Glu Asp Ser Asp Arg Ala Ile Glu Gly Arg Thr					
260	265	270			
Ala Thr Ser Glu Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser					
275	280	285			
Gly Glu Ala Asp Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu					
290	295	300			
Glu Asp Lys Thr Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg					
305	310	315	320		
Ile Val Glu Gly Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val					
325	330	335			
Met Leu Phe Arg Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu					
340	345	350			
Ile Ser Asp Arg Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro					
355	360	365			
Pro Trp Asp Lys Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly					
370	375	380			
Lys His Ser Arg Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Ala					
385	390	395	400		

Leu Glu Lys Ile Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu	
405	410 415
Asp Arg Asp Ile Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser	
420	425 430
Asp Tyr Ile His Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser	
435	440 445
Leu Leu Gln Ala Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu	
450	455 460
Lys Glu Thr Trp Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu	
465	470 475 480
Gln Val Val Asn Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser	
485	490 495
Thr Arg Ile Arg Ile Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro	
500	505 510
Asp Glu Gly Lys Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ser Gly Gly Pro	
515	520 525
Phe Val Met Lys Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile	
530	535 540
Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr	
545	550 555 560
Thr His Val Phe Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln	
565	570 575
Phe Gly Glu	

<210>3

<211>1743

<212>DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>3

gccaacacct tcttggagga ggtgcgcaag ggcaacctgg agcgagagtg cgtggaggag	60
acgtgcagct acgaggaggc cttecgaggct ctggagtcct ccacggctac ggatgtgttc	120
tgggccaagt acacagcttg tgagacagcg aggacgcctc gagataagct tgctgcatgt	180
ctggaaggta actgtgctga gggctctgggt acgaactacc gagggcatgt gaacatcacc	240
cggtcaggca ttgagtgcc gctatggagg agtcgctacc cacataagcc tgaatcaac	300
tccactaccc atcctggggc cgacctacag gagaatttct gccgcaaccc cgacagcagc	360
accacgggac cctgggtgcta cactacagac cccaccgtga ggaggcagga atgcagcatc	420
cctgtctgtg gccaggatca agtcactgta gcgatgactc cacgctccga aggtccagt	480
gtgaatctgt cacctccatt ggagcagtggt gtccctgata gggggcagca gtaccagggg	540

```

cgcttggcgg tgaccacaca tgggctcccc tgcttggcct gggccagcgc acaggccaag      600
gccctgagca agcaccagga ctcaactca gctgtgcagc tggaggagaa cttctgccgc      660
aaccagacg gggatgagga gggcgcggtg tgctatgtgg ccgggaagcc tggcgacttt      720
gggtactgcg acctcaacta ttgtgaggag gccgtggagg aggagacagg agatgggctg      780
gatgaggact cagacagggc categaaggc cgtaccgcca ccagttagta ccagactttc      840
ttcaatccga ggaccttttg ctcgggagag gcagactgtg ggctgcgacc tctgttcgag      900
aagaagtgcg tggaggacaa aaccgaaaga gagctcctgg aatcctacat cgacgggcgc      960
attgtggagg gctcggatgc agagatcggc atgtcacctt ggcaggatgat gcttttccgg     1020
aagagtcccc aggagctgct gtgtggggcc agcctcatca gtgaccgctg ggtcctcacc     1080
gccgccact gcctcctgta cccgccctgg gacaagaact tcaccgagaa tgaccttctg     1140
gtgcgcattg gcaagcactc ccgcaccagg tacgagcgaa acattgaaaa gatatccatg     1200
ttggaaaaga tctacatcca cccaggtac aactggcggg agaacctgga ccgggacatt     1260
gccctgatga agctgaagaa gcctgttgcc ttcagtgact acattcacc cgtgtgtctg     1320
cccagacagg agacggcagc cagcttgctc caggctggat acaaggggcg ggtgacaggc     1380
tggggcaacc tgaaggagac gtggacagcc aacgttggtg aggggcagcc cagtgtcctg     1440
cagggtggtg acctgcccat tgtggagcgg ccggtctgca aggactccac ccgatccgc     1500
atcactgaca acatgttctg tgctggttac aagcctgatg aagggaacg aggggatgcc     1560
tgtgaaggtg acagtggggg accctttgtc atgaagagcc cctttaacaa ccgctggtat     1620
caaatgggca tcgtctcatg gggatgaaggc tgtgaccggg atgggaaata tggcttctac     1680
acacatgtgt tccgcctgaa gaagtggata cagaaggtea ttgatcagtt tggagagtag     1740
tga                                                                    1743

```

<210>4

<211>579

<212>PRT

<213> 智人

<400>4

```

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

```

Arg Ser Gly Ile Glu Cys Gln Leu Trp Arg Ser Arg Tyr Pro His Lys		
85	90	95
Pro Glu Ile Asn Ser Thr Thr His Pro Gly Ala Asp Leu Gln Glu Asn		
100	105	110
Phe Cys Arg Asn Pro Asp Ser Ser Thr Thr Gly Pro Trp Cys Tyr Thr		
115	120	125
Thr Asp Pro Thr Val Arg Arg Gln Glu Cys Ser Ile Pro Val Cys Gly		
130	135	140
Gln Asp Gln Val Thr Val Ala Met Thr Pro Arg Ser Glu Gly Ser Ser		
145	150	155
Val Asn Leu Ser Pro Pro Leu Glu Gln Cys Val Pro Asp Arg Gly Gln		
165	170	175
Gln Tyr Gln Gly Arg Leu Ala Val Thr Thr His Gly Leu Pro Cys Leu		
180	185	190
Ala Trp Ala Ser Ala Gln Ala Lys Ala Leu Ser Lys His Gln Asp Phe		
195	200	205
Asn Ser Ala Val Gln Leu Val Glu Asn Phe Cys Arg Asn Pro Asp Gly		
210	215	220
Asp Glu Glu Gly Ala Trp Cys Tyr Val Ala Gly Lys Pro Gly Asp Phe		
225	230	235
Gly Tyr Cys Asp Leu Asn Tyr Cys Glu Glu Ala Val Glu Glu Glu Thr		
245	250	255
Gly Asp Gly Leu Asp Glu Asp Ser Asp Arg Ala Ile Glu Gly Arg Thr		
260	265	270
Ala Thr Ser Glu Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser		
275	280	285
Gly Glu Ala Asp Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu		
290	295	300
Glu Asp Lys Thr Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg		
305	310	315
Ile Val Glu Gly Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val		
325	330	335
Met Leu Phe Arg Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu		
340	345	350
Ile Ser Asp Arg Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro		
355	360	365
Pro Trp Asp Lys Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly		
370	375	380
Lys His Ser Arg Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met		

385	390	395	400
Leu Glu Lys Ile Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu			
405	410	415	
Asp Arg Asp Ile Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser			
420	425	430	
Asp Tyr Ile His Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser			
435	440	445	
Leu Leu Gln Ala Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu			
450	455	460	
Lys Glu Thr Trp Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu			
465	470	475	480
Gln Val Val Asn Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser			
485	490	495	
Thr Arg Ile Arg Ile Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro			
500	505	510	
Asp Glu Gly Lys Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ser Gly Gly Pro			
515	520	525	
Phe Val Met Lys Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile			
530	535	540	
Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr			
545	550	555	560
Thr His Val Phe Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln			
565	570	575	
Phe Gly Glu			

<210>5

<211>1257

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组人凝血酶前体分子

<400>5

```

ctgtcacctc cattggagca gtgtgtccct gatcgggggc agcagtacca ggggcgcctg    60
gcggtgacca cacatgggct cccctgcctg gcctgggcca gcgcacaggc caagggcctg    120
agcaagcacc aggacttcaa ctcagctgtg cagctgggtg agaacttctg ccgcaaccca    180
gacggggatg aggagggcgc gtgggtctat gtggccggga agcctggcga ctttgggtac    240
tgcgacctca actattgtga ggaggccgtg gaggaggaga caggagatgg gctggatgag    300

```

gactcagaca	gggccatcga	agggcgtacc	gccaccagt	gtgaccagac	tttcttcaat	360
ccgaggacct	ttggctcggg	agaggcagac	tgtgggctgc	gacctctgtt	cgagaagaag	420
tcgctggagg	acaaaaccga	aagagagctc	ctggaatcct	acatcgacgg	gcgcattgtg	480
gagggctcgg	atgcagagat	cgccatgtca	ccttggcagg	tgatgctttt	ccggaagagt	540
ccccaggagc	tgtgtgtgtg	ggccagcctc	atcagtgacc	gctgggtcct	caccgccgcc	600
cactgcctcc	tgtacccgcc	ctgggacaag	aacttcaccg	agaatgacct	tctggtgcgc	660
attggcaagc	actcccgcac	caggtacgag	cgaaacattg	aaaagatatc	cgccttggaa	720
aagatctaca	tccaccccag	gtacaactgg	cgggagaacc	tggaccggga	cattgccctg	780
atgaagctga	agaagcctgt	tgccttcagt	gactacattc	accctgtgtg	tctgcccgc	840
agggagacgg	cagccagctt	gctccaggct	ggatacaagg	ggcgggtgac	aggctggggc	900
aacctgaagg	agacgtggac	agccaacgtt	ggtaaggggc	agcccagtg	cctgcaggtg	960
gtgaacctgc	ccattgtgga	gcggccggtc	tgcaaggact	ccacccggat	ccgcatcact	1020
gacaacatgt	tctgtgctgg	ttacaagcct	gatgaaggga	aacgagggga	tgcctgtgaa	1080
ggtgacagtg	ggggaccctt	tgtcatgaag	agccccctta	acaaccgctg	gtatcaaatg	1140
ggcatcgtct	catgggggtga	aggctgtgac	cgggatggga	aatatggctt	ctacacacat	1200
gtgttccgcc	tgaagaagtg	gatacagaag	gtcattgatc	agtttggaga	gtagtga	1257

<210>6

<211>1311

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组人凝血酶前体分子

<400>6

gcagcaaagc	ttgaagacca	agtagatccg	cggctcattg	atgggaaggt	cgacctgtca	60
cctccattgg	agcagtgtgt	ccctgatcgg	gggcagcagt	accaggggcg	cctggcgggtg	120
accacacatg	ggctcccctg	cctggccctg	gccagcgcac	aggccaaggc	cctgagcaag	180
caccaggact	tcaactcagc	tgtgcagctg	gtggagaact	tctgccgcaa	cccagacggg	240
gatgaggagg	gcgcgtgggtg	ctatgtggcc	gggaagcctg	gcgacttttg	gtactgcgac	300
ctcaactatt	gtgaggaggc	cgtggaggag	gagacaggag	atgggctgga	tgaggactca	360
gacagggcc	tcgaaggcg	taccgccacc	agttagtacc	agactttctt	caatccgagg	420
acctttggct	cgggagaggc	agactgtggg	ctgcgacctc	tggttcgagaa	gaagtcgctg	480
gaggacaaaa	ccgaaagaga	gtccttgga	tcctacatcg	acgggcgcat	tgtggagggc	540
tcggatgcag	agatcggcat	gtcaccttgg	caggtgatgc	ttttccggaa	gagtccccag	600
gagctgctgt	gtggggccag	cctcatcagt	gaccgctggg	tcctcaccgc	cgcccaactgc	660
ctcctgtacc	cgccctggga	caagaacttc	accgagaatg	accttctggg	gcgcattggc	720
aagcactccc	gcaccaggta	cgagcgaaac	attgaaaaga	tatccgcctt	ggaaaagatc	780
tacatccacc	ccaggtacaa	ctggcgggag	aacctggacc	gggacattgc	cctgatgaag	840

```

ctgaagaagc ctgttgccctt cagtgactac attcaccctg tgtgtctgcc cgacagggag    900
acggcagcca gcttgctcca ggctggatac aaggggcggg tgacaggctg gggcaacctg    960
aaggagacgt ggacagccaa cgttggtaag gggcagccca gtgtcctgca ggtgggtgaac   1020
ctgcccattg tggageggcc ggtctgcaag gactccaccc ggatccgcat cactgacaac   1080
atgttctgtg ctggttaciaa gcctgatgaa gggaaacgag gggatgcctg tgaaggtgac   1140
agtgggggac cctttgtcat gaagagcccc tttaacaacc gctgggtatca aatgggcatc   1200
gtctcatggg gtgaaggctg tgaccgggat gggaaatatg gcttctacac acatgtgttc   1260
cgcctgaaga agtggataca gaaggtcatt gatcagtttg gagagtagtg a           1311

```

<210>7

<211>435

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人重组前凝血酶

<400>7

```

Ala Ala Lys Leu Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly Lys
1           5           10           15
Val Asp Leu Ser Pro Pro Leu Glu Gln Cys Val Pro Asp Arg Gly Gln
20           25           30
Gln Tyr Gln Gly Arg Leu Ala Val Thr Thr His Gly Leu Pro Cys Leu
35           40           45
Ala Trp Ala Ser Ala Gln Ala Lys Ala Leu Ser Lys His Gln Asp Phe
50           55           60
Asn Ser Ala Val Gln Leu Val Glu Asn Phe Cys Arg Asn Pro Asp Gly
65           70           75           80
Asp Glu Glu Gly Ala Trp Cys Tyr Val Ala Gly Lys Pro Gly Asp Phe
85           90           95
Gly Tyr Cys Asp Leu Asn Tyr Cys Glu Glu Ala Val Glu Glu Glu Thr
100          105          110
Gly Asp Gly Leu Asp Glu Asp Ser Asp Arg Ala Ile Glu Gly Arg Thr
115          120          125
Ala Thr Ser Glu Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser
130          135          140
Gly Glu Ala Asp Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu
145          150          155          160
Glu Asp Lys Thr Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg

```

	165	170	175
Ile Val Glu Gly Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val			
	180	185	190
Met Leu Phe Arg Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu			
	195	200	205
Ile Ser Asp Arg Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro			
	210	215	220
Pro Trp Asp Lys Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly			
225	230	235	240
Lys His Ser Arg Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Ala			
	245	250	255
Leu Glu Lys Ile Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu			
	260	265	270
Asp Arg Asp Ile Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser			
	275	280	285
Asp Tyr Ile His Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser			
	290	295	300
Leu Leu Gln Ala Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu			
305	310	315	320
Lys Glu Thr Trp Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu			
	325	330	335
Gln Val Val Asn Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser			
	340	345	350
Thr Arg Ile Arg Ile Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro			
	355	360	365
Asp Glu Gly Lys Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ser Gly Gly Pro			
	370	375	380
Phe Val Met Lys Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile			
385	390	395	400
Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr			
	405	410	415
Thr His Val Phe Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln			
	420	425	430
Phe Gly Glu			
	435		

<210>8

<211>1311

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有 HPC4 蛋白的人前凝血酶野生型

<400>8

gcagcaaagc ttgaagacca agtagatccg cggtcattg atgggaaggt cgacctgtca	60
cctccattgg agcagtgtgt ccctgatcgg gggcagcagt accaggggcg cctggcgggtg	120
accacacatg ggctcccctg cctggcctgg gccagcgcac aggccaaggc cctgagcaag	180
caccaggact tcaactcagc tgtgcagctg gtggagaact tctgccgcaa cccagacggg	240
gatgaggagg gcgcgtggtg ctatgtggcc gggaagcctg gcgacttttg gtactgcgac	300
ctcaactatt gtgaggaggc cgtggaggag gagacaggag atgggctgga tgaggactca	360
gacagggcca tcgaaggcg taccgccacc agtgagtacc agactttctt caatccgagg	420
acctttggct cgggagaggc agactgtggg ctgcgacctc tgttcgagaa gaagtcgctg	480
gaggacaaaa ccgaaagaga gtcctggaa tcctacatcg acgggcgcat tgtggagggc	540
tcggatgcag agatcgcat gtcaccttg caggtgatgc ttttccggaa gagtccccag	600
gagctgctgt gtggggccag cctcatcagt gaccgctggg tcctcaccgc cgcccactgc	660
ctcctgtacc cgccctggga caagaacttc accgagaatg accttctggt gcgcattggc	720
aagcactccc gcaccaggta cgagcgaaac attgaaaaga tatccatggt ggaaaagatc	780
tacatccacc ccaggtacaa ctggcgggag aacctggacc gggacattgc cctgatgaag	840
ctgaagaagc ctgttgccctt cagtgactac attcacctg tgtgtctgcc cgacaggag	900
acggcagcca gcttgctcca ggctggatac aaggggcggg tgacaggctg gggcaacctg	960
aaggagacgt ggacagccaa cgttggtaag gggcagccca gtgtcctgca ggtggtgaac	1020
ctgcccattg tggagcggcc ggtctgcaag gactccacc ggatccgcat cactgacaac	1080
atgttctgtg ctggttacia gcctgatgaa gggaaacgag gggatgcctg tgaaggtagc	1140
agtgggggac cctttgtcat gaagagcccc tttacaacc gctggtatca aatgggcatc	1200
gtctcatggg gtgaaggctg tgaccgggat gggaaatatg gcttctacac acatgtgttc	1260
cgcctgaaga agtggataca gaaggtcatt gatcagtttg gagagtagtg a	1311

<210>9

<211>435

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有 HPC4 蛋白的人前凝血酶野生型

<400>9

Ala Ala Lys Leu Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly Lys

1

5

10

15

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

	325	330	335
Gln Val Val Asn Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser			
340	345	350	
Thr Arg Ile Arg Ile Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro			
355	360	365	
Asp Glu Gly Lys Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ser Gly Gly Pro			
370	375	380	
Phe Val Met Lys Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile			
385	390	395	400
Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr			
405	410	415	
Thr His Val Phe Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln			
420	425	430	
Phe Gly Glu			
435			

<210>10

<211>1911

<212>DNA

<213> 智人

<400>10

```

gtcctaagtg tgggtgggcac agcatggact gcagatagtg gtgaaggtga ctttctagct 60
gaaggaggag gcgtgcgtgg cccaagggtt gtggaaagac atcaatctgc ctgcaaagat 120
tcagactggc ctttctgctc tgatgaagac tggaactaca aatgcccttc tggctgcagg 180
atgaaagggt tgattgatga agtcaatcaa gattttacaa acagaataaa taagctcaaa 240
aattcactat ttgaatatca gaagaacaat aaggattctc attcgttgac cactaatata 300
atggaaattt tgagaggcga tttttcctca gccaaataacc gtgataatac ctacaaccga 360
gtgtcagagg atctgagaag cagaattgaa gtcctgaagc gcaaagtcac agaaaaagta 420
cagcatatcc agcttctgca aaaaaatgtt agagctcagt tggttgatat gaaacgactg 480
gaggttgaca ttgatattaa gatccgatct tgtcgagggt catgcagtag ggctttagct 540
cgtgaagtag atctgaagga ctatgaagat cagcagaagc aacttgaaca ggtcattgcc 600
aaagacttac ttccctctag agataggcaa cacttaccac tgatcaaaaat gaaaccagtt 660
ccagacttgg ttcccggaaa ttttaagagc cagcttcaga aggtaccccc agagtgggaag 720
gcattaacag acatgccgca gatgagaatg gagttagaga gacctggtgg aaatgagatt 780
actcgaggag gctccacttc ttatggaacc ggatcagaga cggaaagccc aaggaaccct 840
agcagtgctg gaagctggaa ctctgggagc tctggacctg gaagtactgg aaaccgaaac 900
cctgggagct ctgggactgg agggactgca acctggaaac ctggaagctc tggacctgga 960
agtactggaa gctggaactc tgggagctct ggaactggaa gtactggaaa ccaaaaccct 1020

```

```

gggagcccta gacctggtag taccggaacc tggaatcctg gcagctctga acgcggaagt 1080
gctggacact ggactttctga gagctctgta tctggtagta ctggacaatg gcactctgaa 1140
tctggaagtt ttaggccaga tagcccaggc tctgggaacg cgaggcctaa caaccagac 1200
tggggcacat ttgaagaggt gtcaggaaat gtaagtccag ggacaaggag agagtaccac 1260
acagaaaaac tggtcacttc taaaggagat aaagagctca ggactggtaa agagaaggtc 1320
acctctggta gcacaaccac cacgcgtcgt tcatgtctta aaaccgttac taagactgtt 1380
attggtcctg atggtcacia agaagttacc aaagaagtgg tgacctccga agatggttct 1440
gactgtcccc aggcaatgga ttaggcaca ttgtctggca taggcaccct ggatgggttc 1500
cgccataggc accctgatga agctgccttc ttcgacactg cctcaactgg aaaaacattc 1560
ccaggtttct tctcacctat gttaggagag tttgtcagtg agactgagtc taggggctca 1620
gaatctggca tcttcacaaa tacaaggaa tccagttctc atcaccctgg gatagctgaa 1680
ttcccttccc gtggtaaatc ttcaagttac agcaaacaat ttactagtag cacgagttac 1740
aacagaggag actccacatt tgaaagcaag agctataaaa tggcagatga ggccggaagt 1800
gaagccgata atgaaggaa acatagcacc aagagaggcc atgctaaatc tcgccctgtc 1860
agaggtatcc acacttctcc tttggggaag ccttcctgtg cccctagtg a 1911

```

<210>11

<211>625

<212>PRT

<213> 智人

<400>11

```

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

```

Lys Val Gln His Ile Gln Leu Leu Gln Lys Asn Val Arg Ala Gln Leu		
130	135	140
Val Asp Met Lys Arg Leu Glu Val Asp Ile Asp Ile Lys Ile Arg Ser		
145	150	155 160
Cys Arg Gly Ser Cys Ser Arg Ala Leu Ala Arg Glu Val Asp Leu Lys		
	165	170 175
Asp Tyr Glu Asp Gln Gln Lys Gln Leu Glu Gln Val Ile Ala Lys Asp		
	180	185 190
Leu Leu Pro Ser Arg Asp Arg Gln His Leu Pro Leu Ile Lys Met Lys		
	195	200 205
Pro Val Pro Asp Leu Val Pro Gly Asn Phe Lys Ser Gln Leu Gln Lys		
	210	215 220
Val Pro Pro Glu Trp Lys Ala Leu Thr Asp Met Pro Gln Met Arg Met		
225	230	235 240
Glu Leu Glu Arg Pro Gly Gly Asn Glu Ile Thr Arg Gly Gly Ser Thr		
	245	250 255
Ser Tyr Gly Thr Gly Ser Glu Thr Glu Ser Pro Arg Asn Pro Ser Ser		
	260	265 270
Ala Gly Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ser Gly Pro Gly Ser Thr Gly Asn		
	275	280 285
Arg Asn Pro Gly Ser Ser Gly Thr Gly Gly Thr Ala Thr Trp Lys Pro		
	290	295 300
Gly Ser Ser Gly Pro Gly Ser Thr Gly Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ser		
305	310	315 320
Gly Thr Gly Ser Thr Gly Asn Gln Asn Pro Gly Ser Pro Arg Pro Gly		
	325	330 335
Ser Thr Gly Thr Trp Asn Pro Gly Ser Ser Glu Arg Gly Ser Ala Gly		
	340	345 350
His Trp Thr Ser Glu Ser Ser Val Ser Gly Ser Thr Gly Gln Trp His		
	355	360 365
Ser Glu Ser Gly Ser Phe Arg Pro Asp Ser Pro Gly Ser Gly Asn Ala		
	370	375 380
Arg Pro Asn Asn Pro Asp Trp Gly Thr Phe Glu Glu Val Ser Gly Asn		
385	390	395 400
Val Ser Pro Gly Thr Arg Arg Glu Tyr His Thr Glu Lys Leu Val Thr		
	405	410 415
Ser Lys Gly Asp Lys Glu Leu Arg Thr Gly Lys Glu Lys Val Thr Ser		
	420	425 430
Gly Ser Thr Thr Thr Thr Arg Arg Ser Cys Ser Lys Thr Val Thr Lys		

435	440	445
Thr Val Ile Gly Pro Asp Gly His Lys Glu Val Thr Lys Glu Val Val		
450	455	460
Thr Ser Glu Asp Gly Ser Asp Cys Pro Glu Ala Met Asp Leu Gly Thr		
465	470	475
Leu Ser Gly Ile Gly Thr Leu Asp Gly Phe Arg His Arg His Pro Asp		
485	490	495
Glu Ala Ala Phe Phe Asp Thr Ala Ser Thr Gly Lys Thr Phe Pro Gly		
500	505	510
Phe Phe Ser Pro Met Leu Gly Glu Phe Val Ser Glu Thr Glu Ser Arg		
515	520	525
Gly Ser Glu Ser GlyIle Phe Thr Asn Thr Lys Glu Ser Ser Ser His		
530	535	540
His Pro Gly Ile Ala Glu Phe Pro Ser Arg Gly Lys Ser Ser Ser Tyr		
545	550	555
Ser Lys Gln Phe Thr Ser Ser Thr Ser Tyr Asn Arg Gly Asp Ser Thr		
565	570	575
Phe Glu Ser Lys Ser Tyr Lys Met Ala Asp Glu Ala Gly Ser Glu Ala		
580	585	590
Asp His Glu Gly Thr His Ser Thr Lys Arg Gly His Ala Lys Ser Arg		
595	600	605
Pro Val Arg Gly Ile His Thr Ser Pro Leu Gly Lys Pro Ser Leu Ser		
610	615	620
Pro		
625		

<210>12

<211>1389

<212>DNA

<213> 智人

<400>12

```

caaggtgtca acgacaatga ggagggtttc ttcagtgccc gtggatcatcg accccttgac 60
aagaagagag aagaggctcc cagcctgagg cctgccccac cgcccatcag tggagggtggc 120
tatcgggctc gtccagccaa agcagctgcc actcaaaaaga aagtagaaaag aaaagcccct 180
gatgctggag gctgtcttca cgctgaccca gacctggggg tgttgtgtcc tacaggatgt 240
cagttgcaag aggcttttgc acaacaggaa aggccaatca gaaatagtgt tgatgagtta 300
aataacaatg tggaagctgt ttcccagacc tcctcttctt cctttcagta catgtatttg 360
ctgaaagacc tgtggcaaaa gaggcagaag caagtaaaag ataatgaaaa tgtagtcaat 420

```

gagtactcct cagaactgga aaagcaccaa ttatatatag atgagactgt gaatagcaat 480
 atcccaacta accttcgtgt gcttcgttca atcctggaaa acctgagaag caaaatacaa 540
 aagttagaat ctgatgtctc agctcaaagt gaatattgtc gcaccccatg cactgtcagt 600
 tgcaatatte ctgtggtgtc tggcaaagaa tgtgaggaaa ttatcaggaa aggagggtgaa 660
 acatctgaaa tgtatctcat tcaacctgac agttctgtca aaccgtatag agtatactgt 720
 gacatgaata cagaaaatgg aggatggaca gtgattcaga accgtcaaga cggtagtggt 780
 gactttggca ggaaatggga tccatataaa cagggatttg gaaatgttgc aaccaacaca 840
 gatgggaaga attactgtgg cctaccaggt gaatattggc ttggaaatga taaaattagc 900
 cagcttacca ggatgggacc cacagaactt ttgatagaaa tggaggactg gaaaggagac 960
 aaagtaaagg ctactatgg aggattcact gtacagaatg aagccaacaa ataccagatc 1020
 tcagtgaaca aatacagagg aacagccggt aatgccctca tggatggagc atctcagctg 1080
 atgggagaaa acaggaccat gaccattcac aacggcatgt tcttcagcac gtatgacaga 1140
 gacaatgacg gctggttaac atcagatccc agaaaacagt gttctaaaga agacggtggt 1200
 ggatggtggt ataatagatg tcatgcagcc aatccaaacg gcagatacta ctggggtgga 1260
 cagtacacct gggacatggc aaagcatggc acagatgatg gtgtagtatg gatgaattgg 1320
 aaggggtcat ggtactcaat gaggaagatg agtatgaaga tcaggccctt cttcccacag 1380
 caatagtga 1389

<210>13

<211>461

<212>PRT

<213> 智人

<400>13

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

Ser Ser Phe Gln Tyr Met Tyr Leu Leu Lys Asp Leu Trp Gln Lys Arg		
115	120	125
Gln Lys Gln Val Lys Asp Asn Glu Asn Val Val Asn Glu Tyr Ser Ser		
130	135	140
Glu Leu Glu Lys His Gln Leu Tyr Ile Asp Glu Thr Val Asn Ser Asn		
145	150	155
Ile Pro Thr Asn Leu Arg Val Leu Arg Ser Ile Leu Glu Asn Leu Arg		
165	170	175
Ser Lys Ile Gln Lys Leu Glu Ser Asp Val Ser Ala Gln Met Glu Tyr		
180	185	190
Cys Arg Thr Pro Cys Thr Val Ser Cys Asn Ile Pro Val Val Ser Gly		
195	200	205
Lys Glu Cys Glu Glu Ile Ile Arg Lys Gly Gly Glu Thr Ser Glu Met		
210	215	220
Tyr Leu Ile Gln Pro Asp Ser Ser Val Lys Pro Tyr Arg Val Tyr Cys		
225	230	235
Asp Met Asn Thr Glu Asn Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln Asn Arg Gln		
245	250	255
Asp Gly Ser Val Asp Phe Gly Arg Lys Trp Asp Pro Tyr Lys Gln Gly		
260	265	270
Phe Gly Asn Val Ala Thr Asn Thr Asp Gly Lys Asn Tyr Cys Gly Leu		
275	280	285
Pro Gly Glu Tyr Trp Leu Gly Asn Asp Lys Ile Ser Gln Leu Thr Arg		
290	295	300
Met Gly Pro Thr Glu Leu Leu Ile Glu Met Glu Asp Trp Lys Gly Asp		
305	310	315
Lys Val Lys Ala His Tyr Gly Gly Phe Thr Val Gln Asn Glu Ala Asn		
325	330	335
Lys Tyr Gln Ile Ser Val Asn Lys Tyr Arg Gly Thr Ala Gly Asn Ala		
340	345	350
Leu Met Asp Gly Ala Ser Gln Leu Met Gly Glu Asn Arg Thr Met Thr		
355	360	365
Ile His Asn Gly Met Phe Phe Ser Thr Tyr Asp Arg Asp Asn Asp Gly		
370	375	380
Trp Leu Thr Ser Asp Pro Arg Lys Gln Cys Ser Lys Glu Asp Gly Gly		
385	390	395
Gly Trp Trp Tyr Asn Arg Cys His Ala Ala Asn Pro Asn Gly Arg Tyr		
405	410	415
Tyr Trp Gly Gly Gln Tyr Thr Trp Asp Met Ala Lys His Gly Thr Asp		

420	425	430
Asp Gly Val Val Trp Met Asn Trp Lys Gly Ser Trp Tyr Ser Met Arg		
435	440	445
Lys Met Ser Met Lys Ile Arg Pro Phe Phe Pro Gln Gln		
450	455	460

<210>14

<211>1272

<212>DNA

<213> 智人

<400>14

```

gctcttttat ttctctcttc aacatgtgta gcatatgttg ctaccagaga caactgctgc      60
atcttagatg aaagattcgg tagttattgt ccaactacct gtggcattgc agatttcctg      120
tctacttatac aaaccaaagt agacaaggat ctacagtctt tggaagacat cttacatcaa      180
gttgaaaaca aaacatcaga agtcaaacag ctgataaaaag caatccaact cacttataat      240
cctgatgaat catcaaaacc aaatatgata gacgctgcta ctttgaagtc caggaaaatg      300
ttagaagaaa ttatgaaata tgaagcatcg attttaacac atgactcaag tattcgatat      360
ttgcaggaaa tatataattc aaataatcaa aagattgtta acctgaaaga gaaggtagcc      420
cagcttgaag cacagtgcc aagacacggt tgcaaatacca tgatatcact      480
gggaaagatt gtcaagacat tgccaataag ggagctaaac agagcgggct ttactttatt      540
aaacctctga aagctaacca gcaattctta gtctactgtg aaatcgatgg gtctggaaat      600
ggatggactg tgtttcagaa gagacttgat ggcagtgtag atttcaagaa aaactggatt      660
caatataaag aaggatttgg acatctgtct cctactggca caacagaatt ttggctggga      720
aatgagaaga ttcatttgat aagcacacag tctgccatcc catatgcatt aagagtggaa      780
ctggaagact ggaatggcag aaccagtact gcagactatg ccatgttcaa ggtgggacct      840
gaagctgaca agtaccgcct aacatatgcc tacttcgctg gtggggatgc tggagatgcc      900
tttgatggct ttgattttgg cgatgatcct agtgacaagt ttttcacatc ccataatggc      960
atgcagttca gtacctggga caatgacaat gataagtttg aaggcaactg tgctgaacag     1020
gatggatctg gttggtggat gaacaagtgt cacgctggcc atctcaatgg agtttattac     1080
caaggtggca cttactcaaa agcatctact cctaattggt atgataatgg cattatttgg     1140
gccacttgga aaacccggtg gtattccatg aagaaaacca ctatgaagat aatcccattc     1200
aacagactca caattggaga aggacagcaa caccacctgg ggggagccaa acaggttgga     1260
gacgtttaat ga                                     1272

```

<210>15

<211>411

<212>PRT

<213> 智人

<400>15

Tyr Val Ala Thr Arg Asp Asn Cys Cys Ile Leu Asp Glu Arg Phe Gly
 1 5 10 15
 Ser Tyr Cys Pro Thr Thr Cys Gly Ile Ala Asp Phe Leu Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Gln Thr Lys Val Asp Lys Asp Leu Gln Ser Leu Glu Asp Ile Leu His
 35 40 45
 Gln Val Glu Asn Lys Thr Ser Glu Val Lys Gln Leu Ile Lys Ala Ile
 50 55 60
 Gln Leu Thr Tyr Asn Pro Asp Glu Ser Ser Lys Pro Asn Met Ile Asp
 65 70 75 80
 Ala Ala Thr Leu Lys Ser Arg Lys Met Leu Glu Glu Ile Met Lys Tyr
 85 90 95
 Glu Ala Ser Ile Leu Thr His Asp Ser Ser Ile Arg Tyr Leu Gln Glu
 100 105 110
 Ile Tyr Asn Ser Asn Asn Gln Lys Ile Val Asn Leu Lys Glu Lys Val
 115 120 125
 Ala Gln Leu Glu Ala Gln Cys Gln Glu Pro Cys Lys Asp Thr Val Gln
 130 135 140
 Ile His Asp Ile Thr Gly Lys Asp Cys Gln Asp Ile Ala Asn Lys Gly
 145 150 155 160
 Ala Lys Gln Ser Gly Leu Tyr Phe Ile Lys Pro Leu Lys Ala Asn Gln
 165 170 175
 Gln Phe Leu Val Tyr Cys Glu Ile Asp Gly Ser Gly Asn Gly Trp Thr
 180 185 190
 Val Phe Gln Lys Arg Leu Asp Gly Ser Val Asp Phe Lys Lys Asn Trp
 195 200 205
 Ile Gln Tyr Lys Glu Gly Phe Gly His Leu Ser Pro Thr Gly Thr Thr
 210 215 220
 Glu Phe Trp Leu Gly Asn Glu Lys Ile His Leu Ile Ser Thr Gln Ser
 225 230 235 240
 Ala Ile Pro Tyr Ala Leu Arg Val Glu Leu Glu Asp Trp Asn Gly Arg
 245 250 255
 Thr Ser Thr Ala Asp Tyr Ala Met Phe Lys Val Gly Pro Glu Ala Asp
 260 265 270
 Lys Tyr Arg Leu Thr Tyr Ala Tyr Phe Ala Gly Gly Asp Ala Gly Asp
 275 280 285

Ala Phe Asp Gly Phe Asp Phe Gly Asp Asp Pro Ser Asp Lys Phe Phe
290 295 300
Thr Ser His Asn Gly Met Gln Phe Ser Thr Trp Asp Asn Asp Asn Asp
305 310 315 320
Lys Phe Glu Gly Asn Cys Ala Glu Gln Asp Gly Ser Gly Trp Trp Met
325 330 335
Asn Lys Cys His Ala Gly His Leu Asn Gly Val Tyr Tyr Gln Gly Gly
340 345 350
Thr Tyr Ser Lys Ala Ser Thr Pro Asn Gly Tyr Asp Asn Gly Ile Ile
355 360 365
Trp Ala Thr Trp Lys Thr Arg Trp Tyr Ser Met Lys Lys Thr Thr Met
370 375 380
Lys Ile Ile Pro Phe Asn Arg Leu Thr Ile Gly Glu Gly Gln Gln His
385 390 395 400
His Leu Gly Gly Ala Lys Gln Ala Gly Asp Val
405 410

<210>16

(211)>39

<212>PRT

<213> 智人

<220>

<221>misc_feature

<222>(6).. (7)

<223>Xaa 可为任一天然存在的氨基酸

<220>

<221>misc_feature

<222>(14).. (14)

<223>Xaa 可为任一天然存在的氨基酸

<220>

<221>misc_feature

<222>(16).. (16)

<223>Xaa 可为任一天然存在的氨基酸

<220>

<221>misc_feature

<222>(19).. (20)

<223>Xaa 可为任一天然存在的氨基酸

<220>

<221>misc_feature

<222>(25).. (26)

<223>Xaa 可为任一天然存在的氨基酸

<220>

<221>misc_feature

<222>(29).. (29)

<223>Xaa 可为任一天然存在的氨基酸

<220>

<221>misc_feature

<222>(32).. (32)

<223>Xaa 可为任一天然存在的氨基酸

<400>16

Ala	Asn	Thr	Phe	Leu	Xaa	Xaa	Val	Arg	Lys	Gly	Asn	Leu	Xaa	Arg	Xaa
1				5					10					15	
Cys	Val	Xaa	Xaa	Thr	Cys	Ser	Tyr	Xaa	Xaa	Ala	Phe	Xaa	Ala	Leu	Xaa
				20				25						30	
Ser	Ser	Thr	Ala	Thr	Asp	Val									
				35											

<210>17

<211>295

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变的人 α 凝血酶 M84A

<400>17

Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Glu	Ala	Asp	Cys	Gly	Leu	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu
1				5					10					15	

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

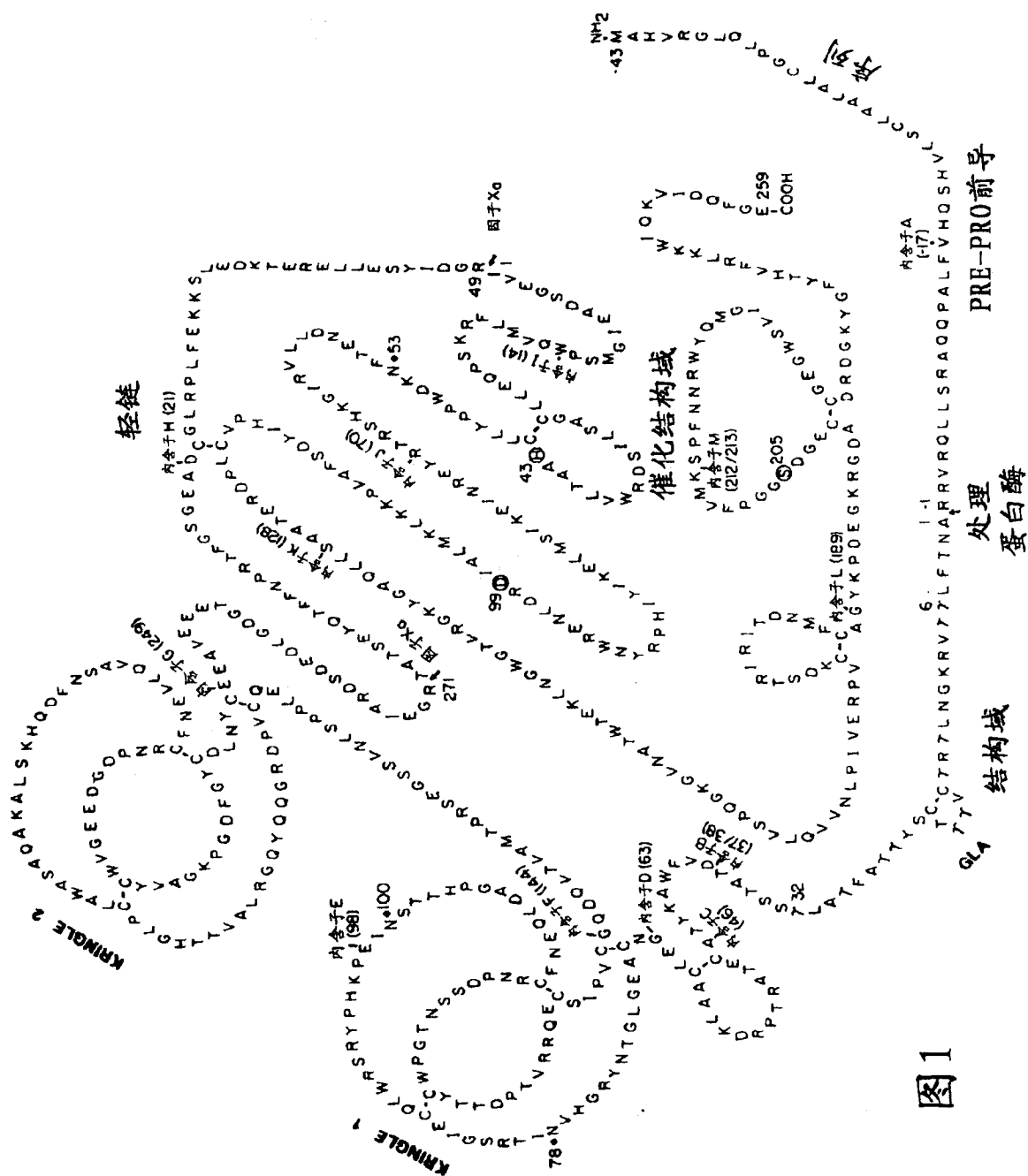


图1

前凝血酶M256A

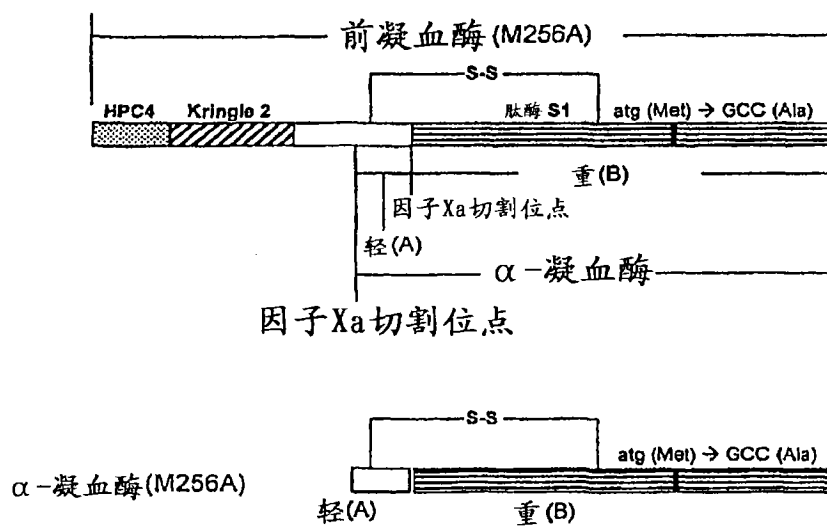


图 2

凝血酶原M400A

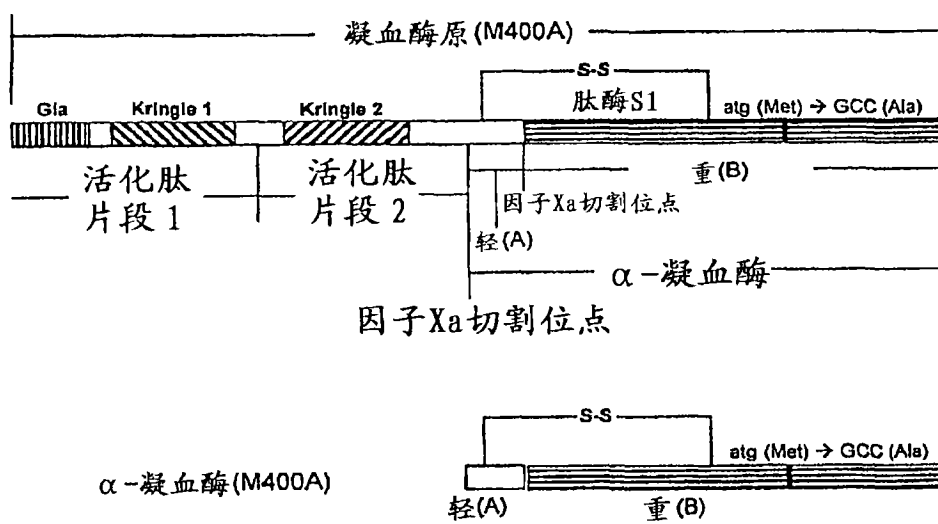


图 3

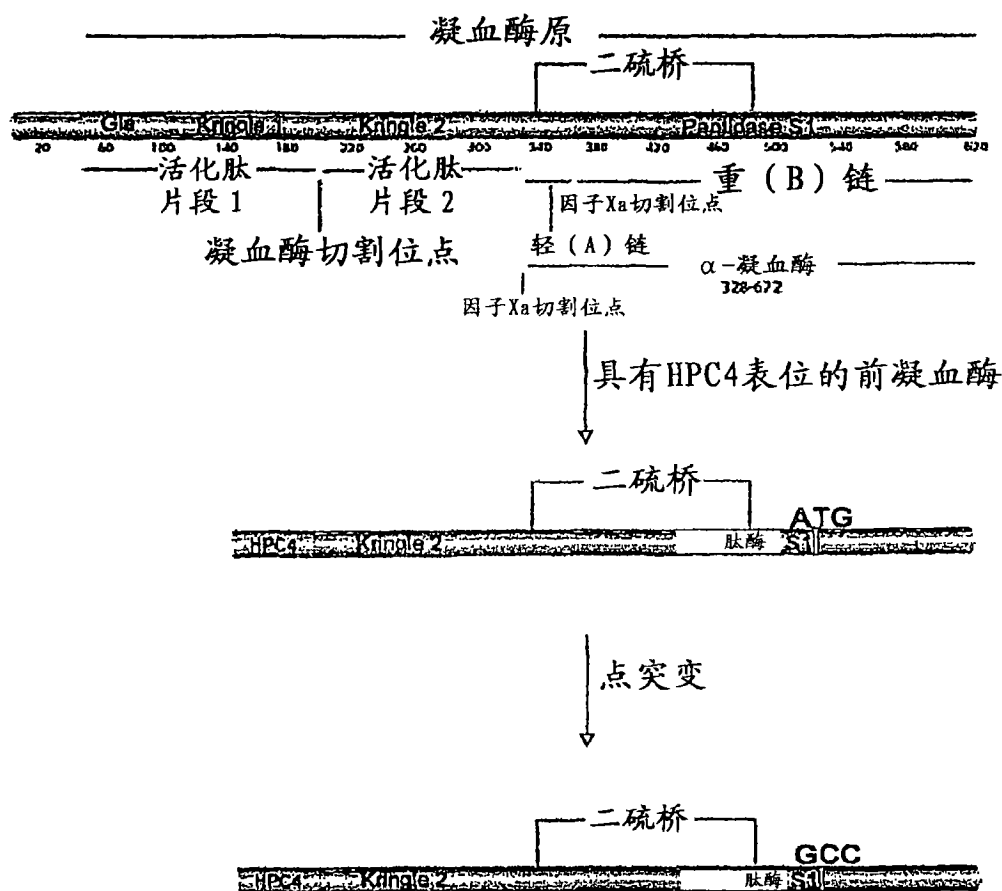


图 4

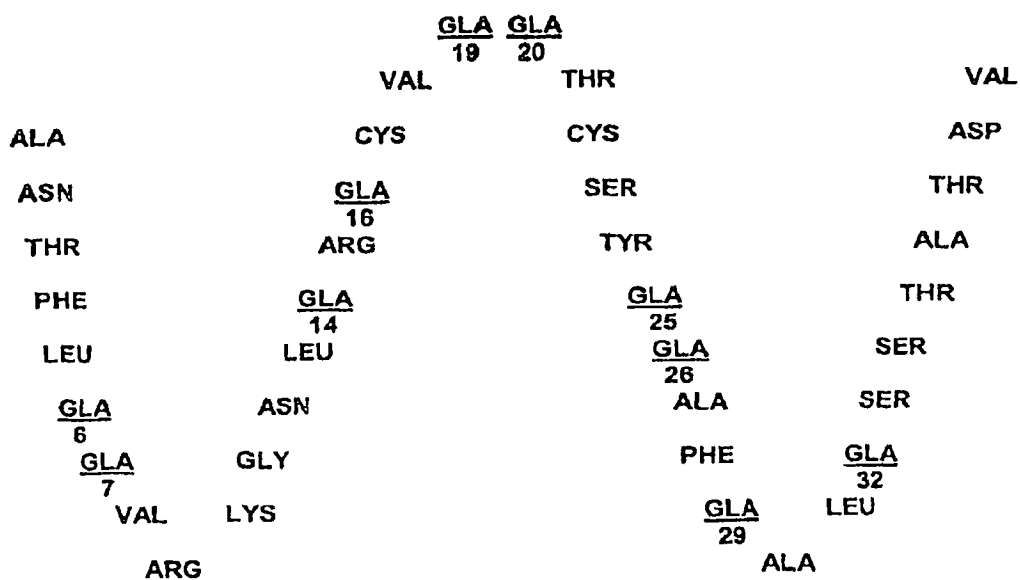


图 5

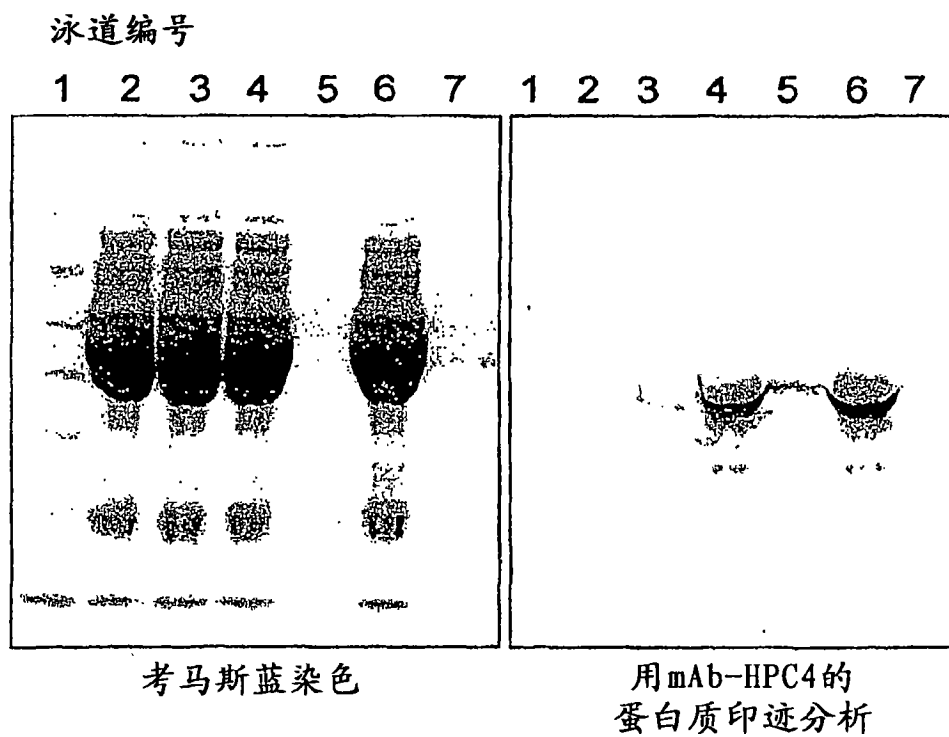


图 6

	抗生素存在下的 细胞生存力
未转染对照细胞	-
M84A转染细胞	+

图 7

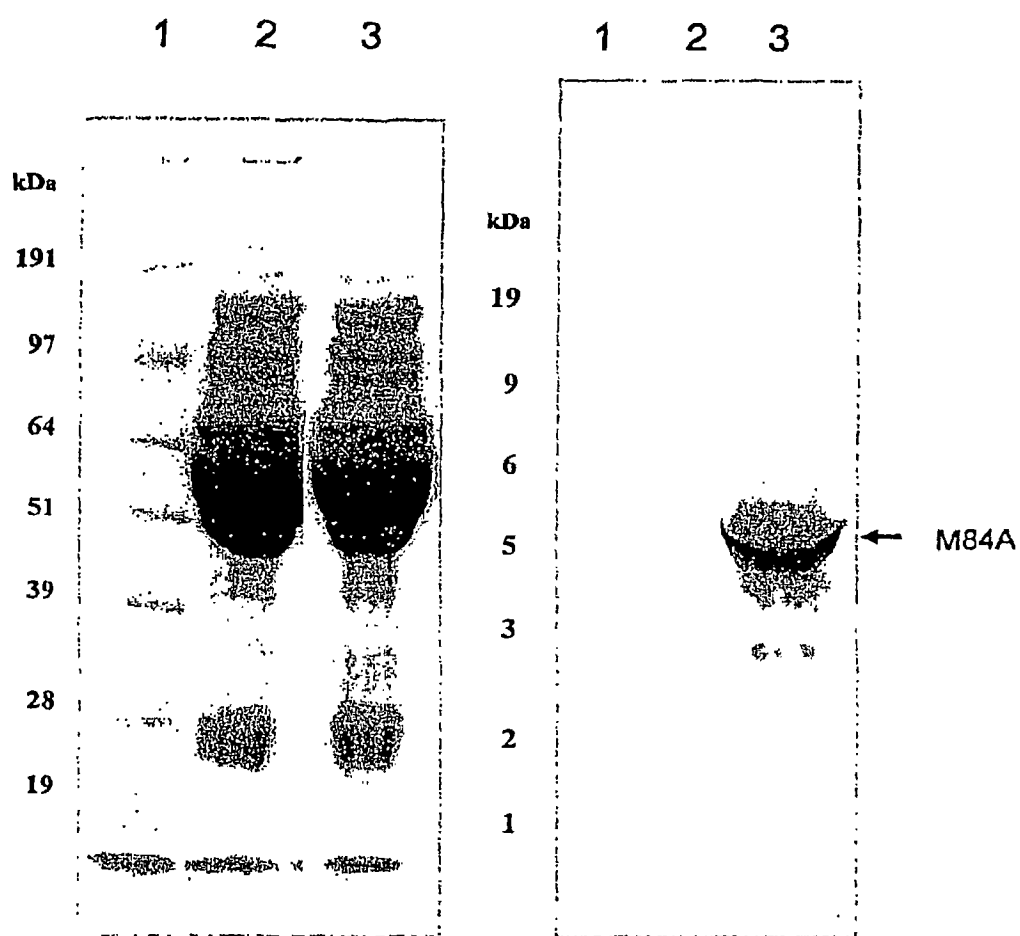


图 8

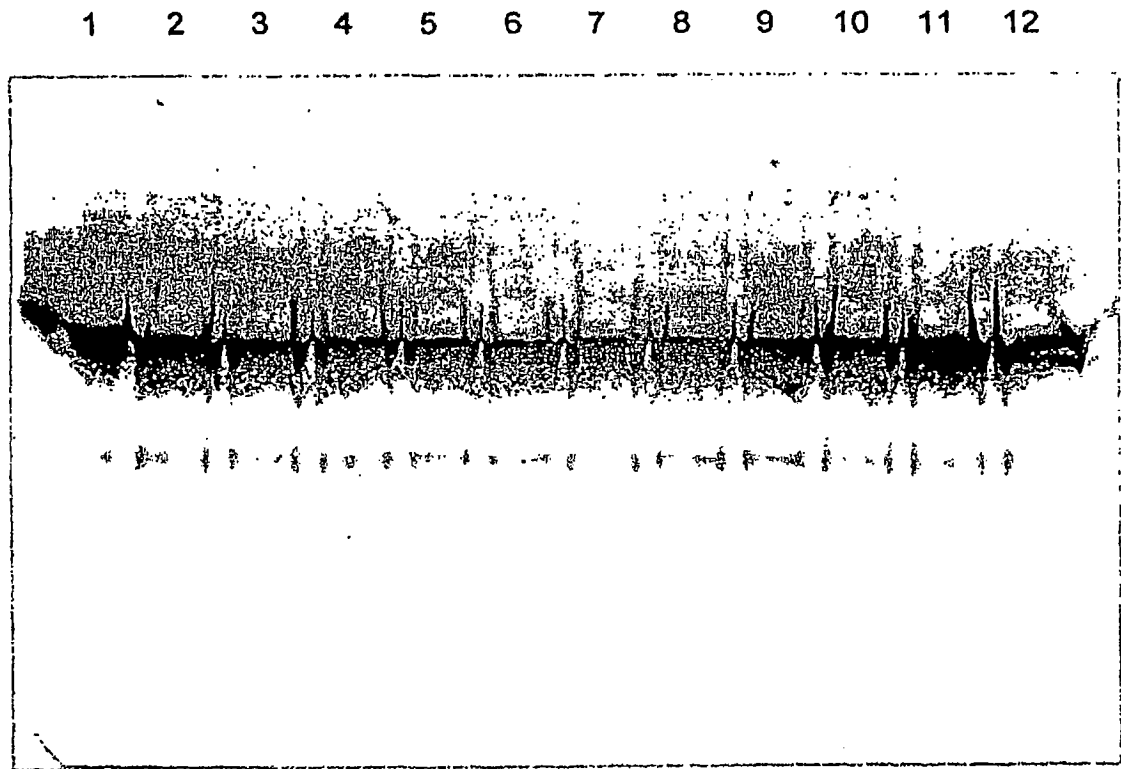


图 9

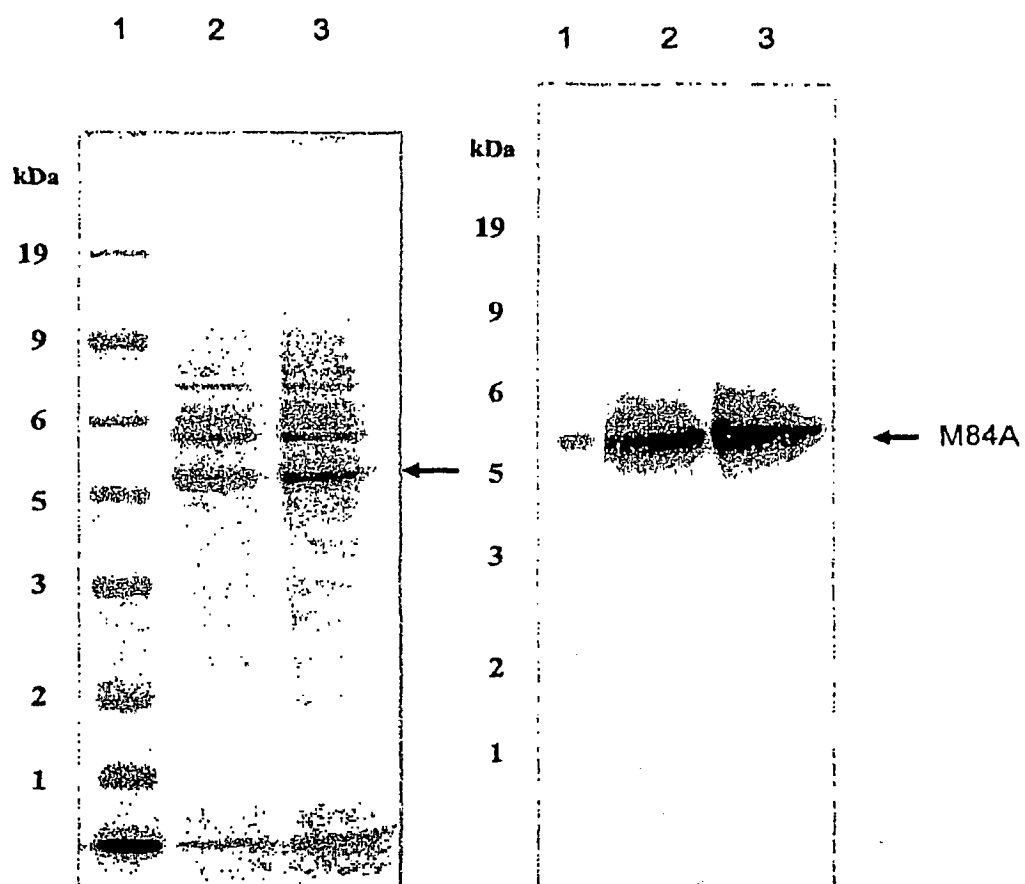


图 10

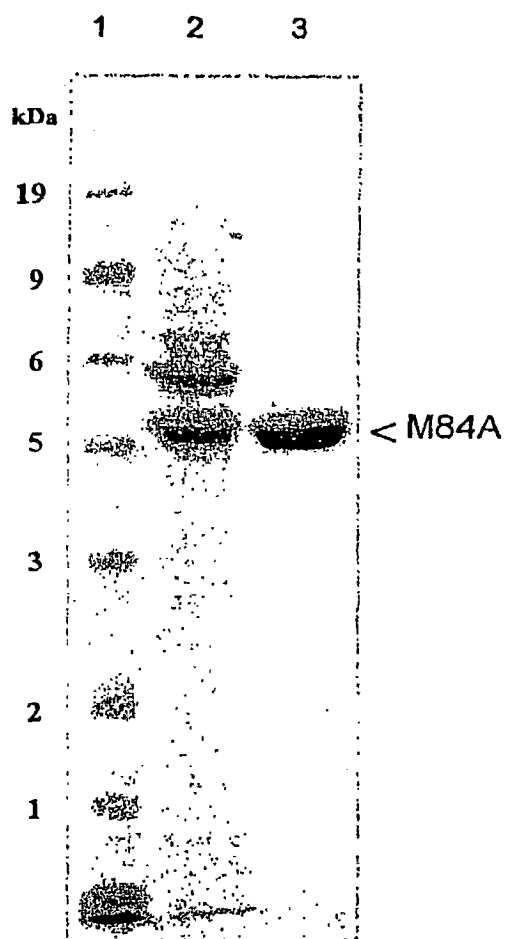


图 11

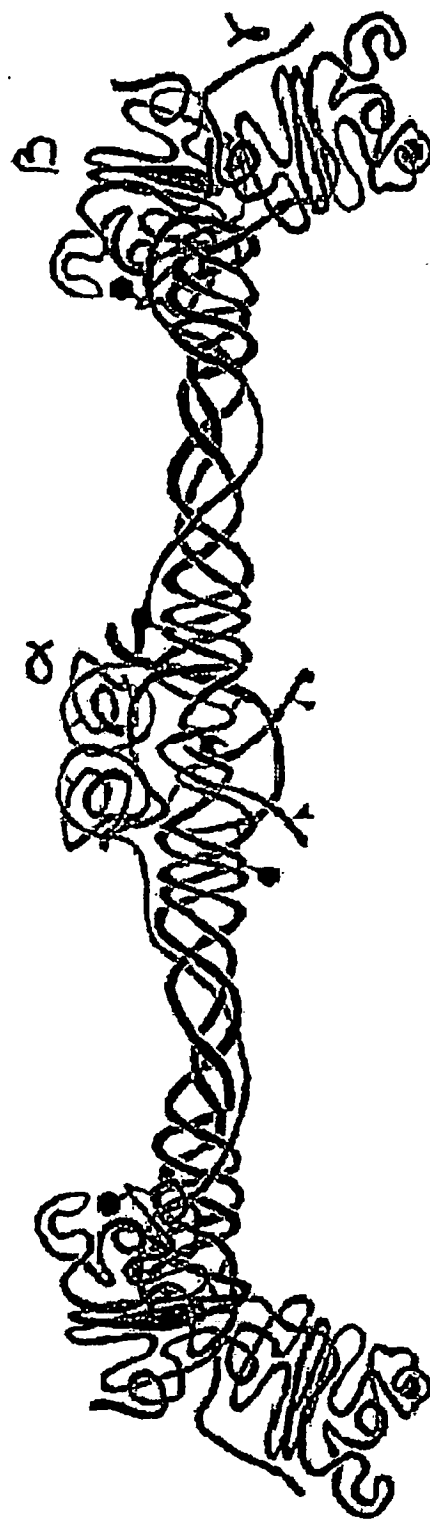
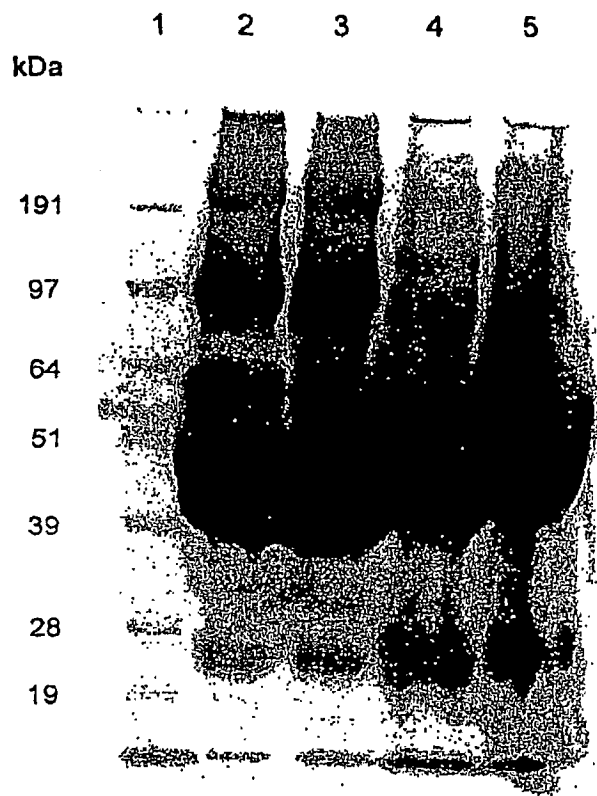
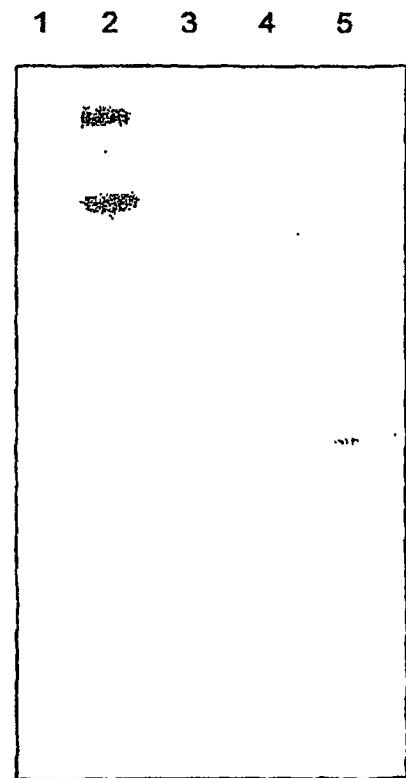


图 12



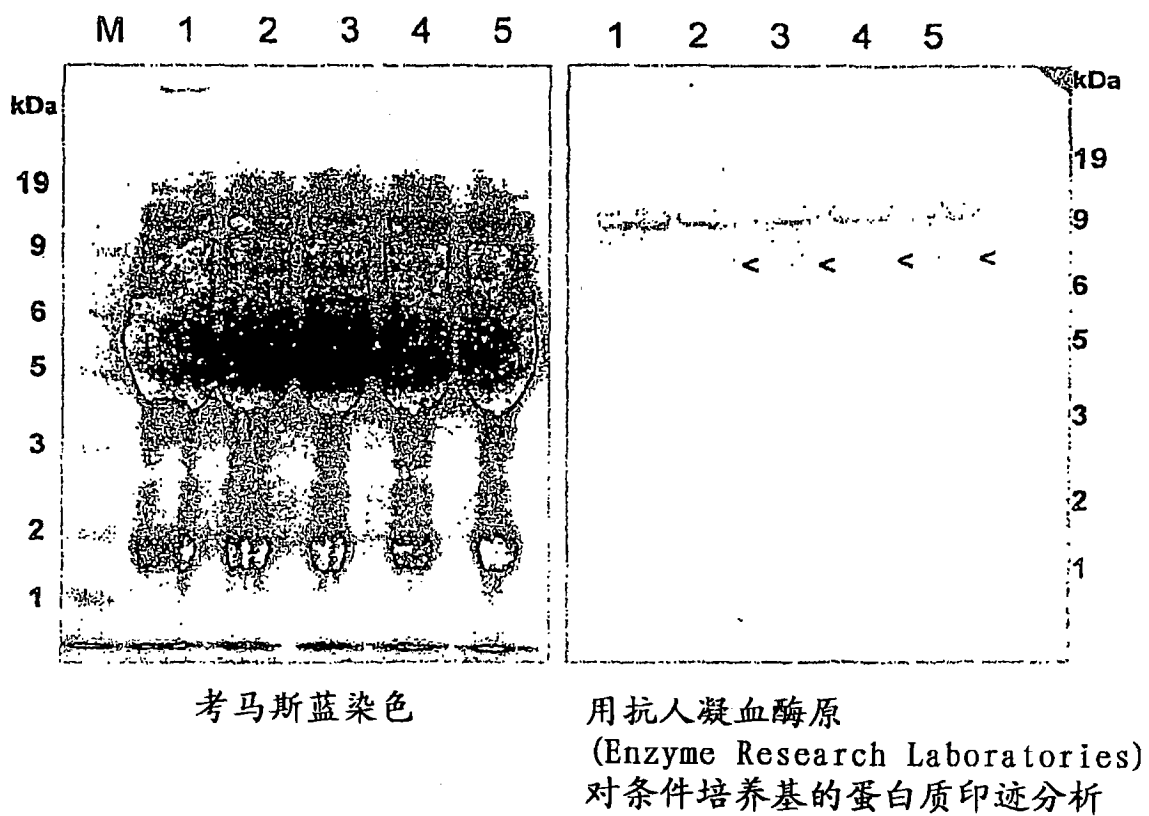
考马斯蓝凝胶

图 13



兔抗人纤维蛋白原IgG

图 14



M: 标记, 1. 对照培养基; 2凝血酶原; 3凝血酶原M84A;
4凝血酶原M84A; 5凝血酶原M84A

图 15

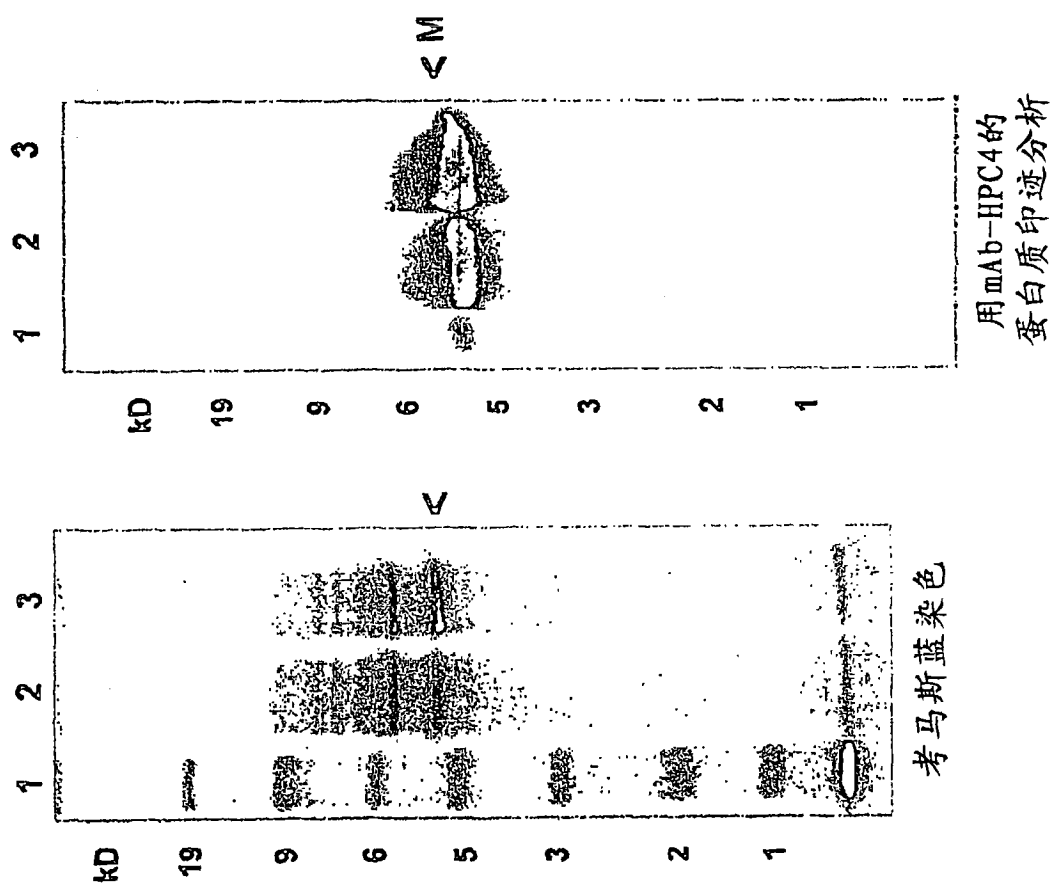


图16

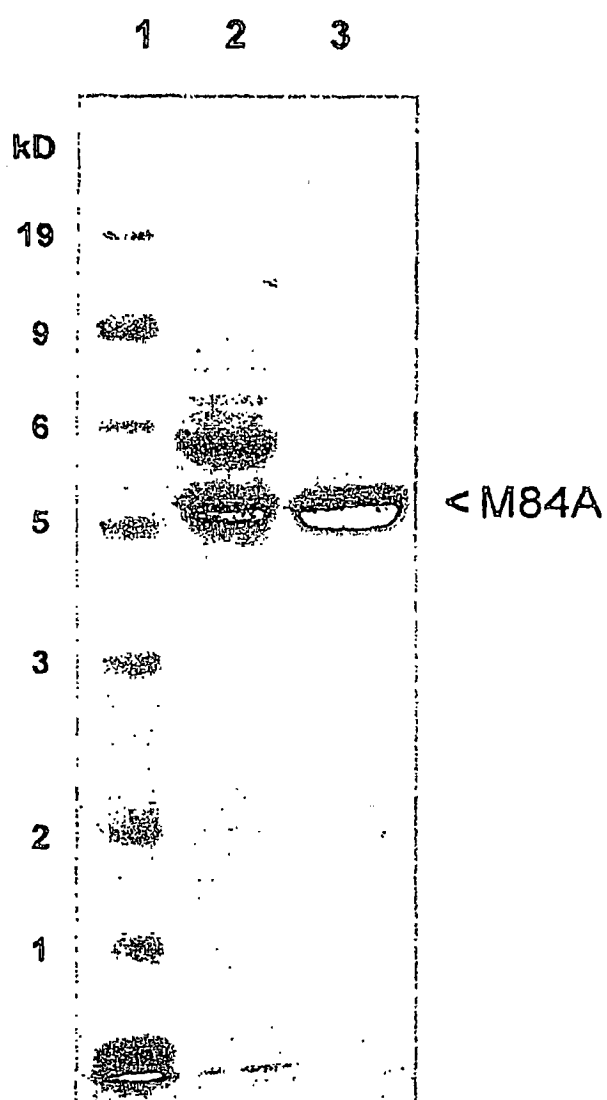
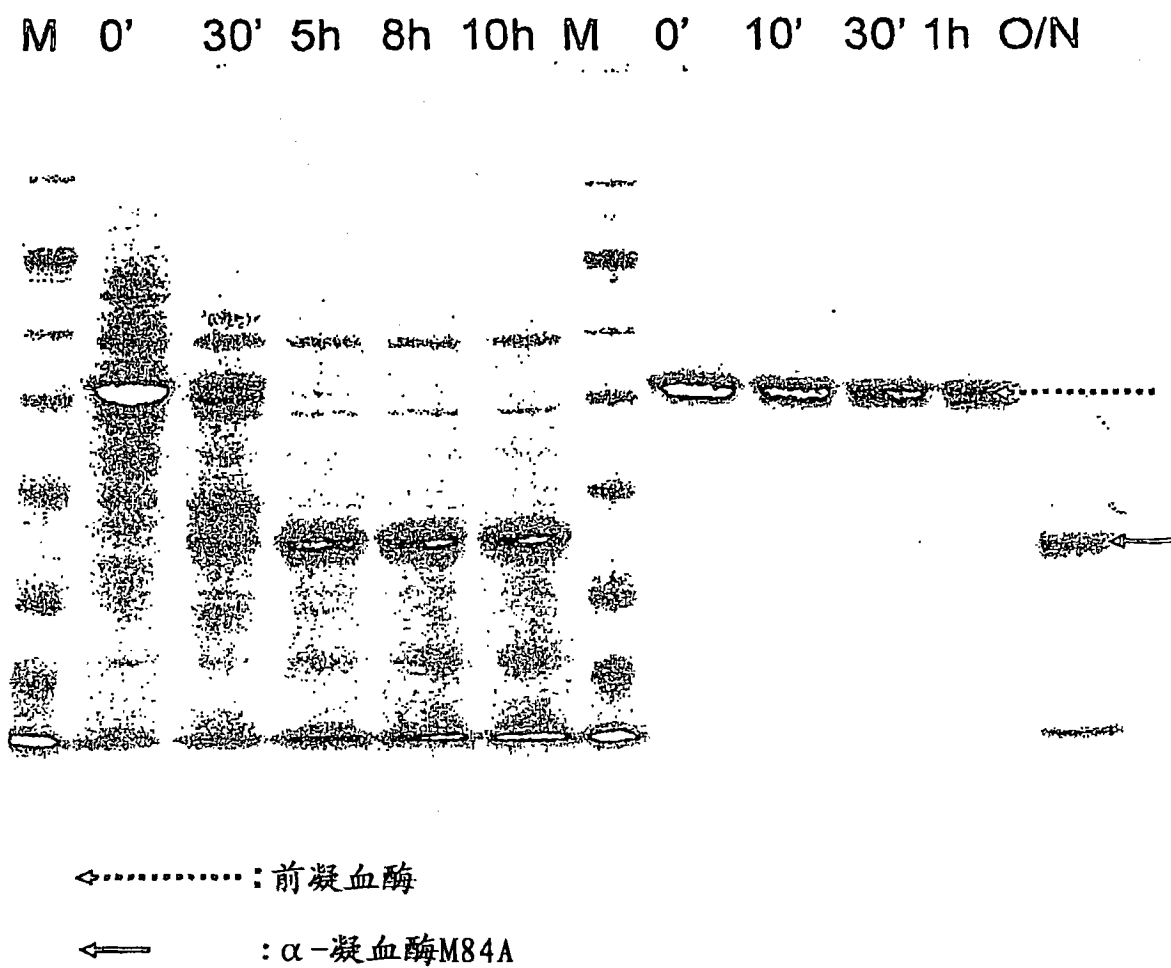


图 17



0'-10h; (左边凝胶): 前凝血酶M84A粗培养基

0'-1h O/N (右边凝胶): 从HPC4亲和柱纯化的前凝血酶M84A

图 18

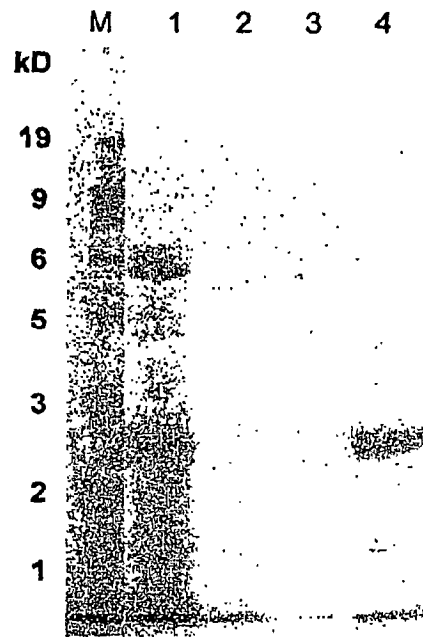


图 19

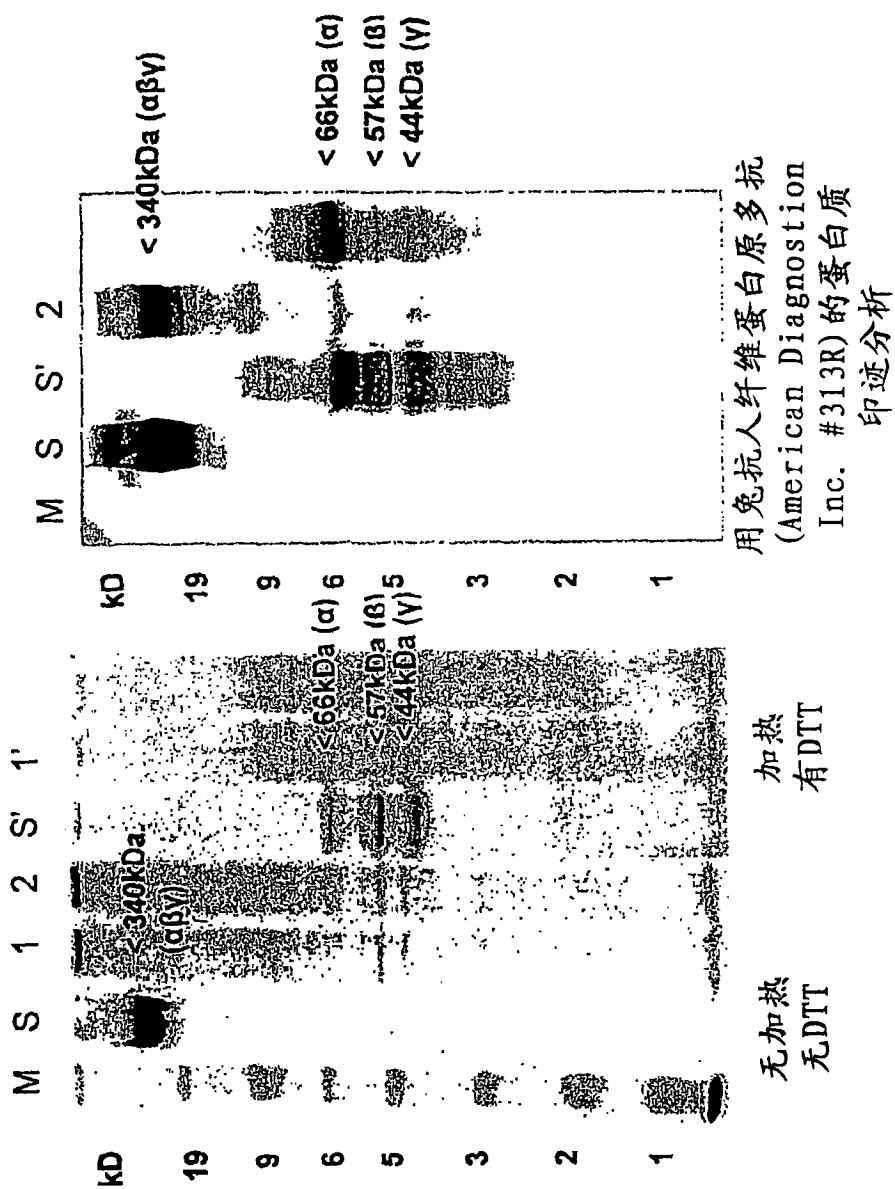


图 20