

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 19/00

C12N 9/48 A61P 7/02



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02129086.5

[43] 公开日 2004 年 3 月 10 日

[11] 公开号 CN 1480466A

[22] 申请日 2002.9.3 [21] 申请号 02129086.5

[71] 申请人 中国人民解放军军事医学科学院放射
医学研究所

地址 100850 北京市海淀区太平路 27 号

共同申请人 北京鲁银利华医药科技发展有限公司

[72] 发明人 石炳兴 吴祖泽 于爱平 董春娜

权利要求书 1 页 说明书 2 页

[54] 发明名称 一类溶栓抗凝双功能融合蛋白及应用

[57] 摘要

本发明涉及一种治疗血栓的重组融合蛋白的融合方法和所得到的融合蛋白，具体而言是抗凝血酶活性蛋白水蛭素与具有纤溶酶原激活作用的蛋白质分子通过凝血因子 Xa(FXa) 识别的氨基酸序列作为连接肽的连接方法和所得到的融合蛋白，特别涉及水蛭素与葡激酶(SAK)、组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)之间通过含有凝血因子 FXa 识别的氨基酸序列的连接肽的融合方法和所得到的融合蛋白；本发明还涉及采用上述融合方法所得到的融合蛋白的药学应用。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 通过含凝血因子 FXa 识别氨基酸序列的连接肽连接纤溶酶原激活剂和抗凝血酶蛋白两类活性蛋白的融合蛋白，蛋白融合具有靶向性，还具有溶栓抗凝双功能活性；在凝血过程中，人体血液无活性的凝血因子 FX 在凝血部位被活化成活性形式的凝血因子 FXa，因此，融合蛋白在进入血栓部位后，可被血栓部位的活性凝血因子 Xa (FXa) 水解成两个游离蛋白。
2. 权利要求 1 中所说的融合蛋白，是指葡激酶 (SAK) 通过含有 FXa 识别序列的肽与水蛭素连接构成的融合蛋白。
3. 权利要求 1 中所说的融合蛋白，是指组织型纤溶酶原活化剂 (tPA) 通过含有 FXa 识别序列的肽与水蛭素连接构成的融合蛋白。
4. 权利要求 2 中所说的 SAK 通过含有 FXa 识别序列的肽与水蛭素连接构成的融合蛋白，是指 SAK 在含有 FXa 识别序列的连接肽的 N 末端、水蛭素在含有 FXa 识别序列肽的 C 末端构成的融合蛋白；也指水蛭素在含有 FXa 识别序列的连接肽的 N 末端、SAK 在含有 FXa 识别序列肽的 C 末端构成的融合蛋白。
5. 权利要求 3 中所说的 tPA 通过含有 FXa 识别序列的肽与水蛭素连接构成的融合蛋白，是指 tPA 在含有 FXa 识别序列的连接肽的 N 末端、水蛭素在含有 FXa 识别序列肽的 C 末端构成的融合蛋白；也指水蛭素在含有 FXa 识别序列的连接肽的 N 末端、tPA 在含有 FXa 识别序列肽的 C 末端构成的融合蛋白。
6. 权利要求 1 中所说的融合蛋白的靶向性，其特征在于利用融合蛋白中水蛭素部分与凝血酶的强亲和力，促进融合蛋白与凝血部位的结合。
7. 权利要求 1 中所说的融合蛋白的溶栓抗凝双功能活性，溶栓活性是指融合蛋白具有的活化纤溶酶原为纤溶酶、纤溶酶降解纤维蛋白，从而表现为溶栓活性；抗凝活性是指融合蛋白具有的抗凝血酶活性。
8. 权利要求 1 中所说的融合蛋白的溶栓抗凝双功能活性，是指融合蛋白可以同时具有的活化纤溶酶原为纤溶酶、纤溶酶降解纤维蛋白，从而表现为溶栓活性，还具有抗凝血酶活性。
9. 权利要求 1 中所说的融合蛋白的溶栓抗凝双功能活性，是指融合蛋白在进入血栓部位后可被血液循环系统血栓部位活化的 FXa 所水解成两个游离蛋白，两个游离蛋白分别具有活化纤溶酶原而溶栓活性和抗凝活性。
10. 权利要求 9 中所说的融合蛋白，其特征在于融合蛋白在体外和体内未裂解之前可以是有活性的融合蛋白，也可以是无活性的融合蛋白。
11. 权利要求 1 中所说的融合蛋白，是指在大肠杆菌中、在毕赤酵母中、在酿酒酵母和在动物细胞中表达的具有权利要求 1 所说特征的融合蛋白。
12. 权利要求 1 所说的含凝血因子 FXa 识别氨基酸序列的连接肽，其特征在于连接肽中包含有凝血因子 FXa 特异识别的四个氨基酸 IEGR (-IleGluGlyArg-) 序列的肽，连接肽可以是比四个氨基酸 IEGR 序列更长的包含有凝血因子 FXa 特异识别的四个氨基酸 IEGR 序列的肽。

一类溶栓抗凝双功能融合蛋白及应用

技术领域 本发明涉及重组蛋白质药物领域，具体地说涉及血栓治疗蛋白的融合方法，特别涉及水蛭素与具有纤溶酶原激活作用的蛋白质分子通过含凝血因子 Xa (FXa) 识别的氨基酸序列作为连接肽的连接方法，特别涉及为使融合蛋白具有靶向性和融合蛋白在体内可分裂为两游离的原蛋白本身的方法，特别是水蛭素与葡激酶 (SAK) 和水蛭素与组织型纤溶酶原激活剂 (t-PA) 之间通过含有凝血因子 FXa 识别的氨基酸序列的肽链作为连接肽的连接方法。

背景技术 心血管疾病是人类近年面临的头号杀手。葡激酶 (Staphylokinase, SAK) 是新一代天然的纤溶酶原激活剂，降低其免疫原性对促进其临床广泛应用具有重要意义。水蛭素 (Hirudin, HV) 是来自水蛭的天然抗凝小分子蛋白药物，对凝血酶具有高的亲和性和选择性抑制作用。

SAK 来源于微生物，对人体具有免疫原性。为提高 SAK 的选择性，我们利用水蛭素对凝血酶的高度亲和性，采用融合蛋白的方法提高 SAK 对凝血部位的亲和力；通过减小临床 SAK 的用药剂量，从而减轻临床因 SAK 引起的免疫反应。

组织型纤溶酶原激活剂 (t-PA)、链激酶 (SK)、尿激酶 (UK)、尿激酶样纤溶酶原激活剂 (u-PA) 具有活化的纤溶酶原的作用，活化的纤溶酶在溶解血栓部位纤维蛋白的同时也引起了系统非血栓部位出血反应，提高药物的靶向性、减小药物的用量是有效的解决方法。

同时，被纤溶酶溶解的微小血块随血液循环进入循环系统引起新的血栓形成，因而临床上在实施溶栓处理的同时采用水蛭素、肝素等实施抗凝组合治疗。

国内外在水蛭素与 SAK、SK 的融合方法进行了研究，但水蛭素的抗凝血酶的活性均告丧失，仅保留了 SAK 的活性或部分活性。

在凝血过程中，人体血液中的无活性的凝血因子 FX 在凝血部位被活化成活性形式的凝血因子 FXa；活性 FXa 是凝血共同途径的必需因子。凝血因子 FXa 可特异识别氨基酸四肽 IEGR (-IleGluGlyArg-Xaa) 序列、并使蛋白在精氨酸残基羧基末端发生水解。FXa 识别序列被常用作蛋白标签或信号肽与目的蛋白的连接肽，以使实验分析过程中方便地得到游离的目的蛋白。

本发明的创新之处在于将所要融合的两个目的蛋白通过含 FXa 识别序列的连接肽相连，融合蛋白具有活化的纤溶酶原的活性、具有溶栓功能；融合蛋白在利用水蛭素的靶向性使融合蛋白到达血栓部位后，通过 FXa 的蛋白水解酶活性，释放出两个相应的游离蛋白，恢复各自的完全活性和发挥各自完整功能。

发明内容 本发明的内容第一方面涉及：凝血因子 FXa 识别氨基酸四肽 IEGR (-IleGluGlyArg-Xaa) 序列在溶栓、抗凝两种活性蛋白融合中的应用，其目的在于融合蛋白在进入血栓部位后可被系统自身 FXa 所水解成两个游离蛋白。

本发明的内容第二方面涉及：含有凝血因子 FXa 识别氨基酸四肽 IEGR (-IleGluGlyArg-Xaa) 序列连接溶栓、抗凝两种活性蛋白的融合蛋白在大肠杆菌和酵母中的表达。

本发明内容第三方面涉及：SAK 与水蛭素之间通过含有凝血因子 FXa 识别氨基酸四肽 IEGR 序列的氨基酸连接而成融合蛋白 SFH，融合蛋白 SFH 对血栓部位比游离 SAK 具有更好的靶向性和选择性，融合蛋白具有活化纤溶酶原成纤溶酶，从而具有溶栓功能。

本发明内容第四方面涉及：SAK 与水蛭素之间通过含有凝血因子 FXa 识别氨基酸四肽 IEGR 序列的肽连接而成融合蛋白 SFH，融合蛋白 SFH 进入血栓部位后，FXa 水解融合蛋白成 SAK 部分和游离水蛭素，SAK 部分具有活化纤溶酶原活性，释放出来的水蛭素具有抗凝血酶活性。

本发明内容第五方面涉及：tPA 与水蛭素之间通过含有凝血因子 FXa 识别氨基酸四肽 IEGR 序列的氨基酸连接而成融合蛋白 PAFH，融合蛋白 PAFH 对血栓部位比游离 tPA 具有更好的靶向性和选择性。

本发明内容第六方面涉及：tPA 与水蛭素之间通过含有凝血因子 FXa 识别氨基酸四肽 IEGR 序列的氨基酸连接而成融合蛋白 PAFH，融合蛋白 PAFH 进入血栓部位后，FXa 水解融合蛋白成 tPA 部分和游离水蛭素，tPA 部分具有活化纤溶酶原活性，释放出来的水蛭素具有抗凝血酶活性。

具体实施方式 (一) 在 SAK 基因两端分别加上 EcoR I 和 BamH I 酶切位点，构建不带终止密码子的葡激酶 SAK 基因到载体 pBV220，得 pBVS AK；用 PCR 方法在水蛭素基因前加上 BamH I 酶切位点和 FXa 识别氨基酸序列的编码碱基，BamH I 酶切位点和 FXa 识别氨基酸序列的编码碱基的加入方法采用引物合成方法合成到水蛭素基因上游 5'端之前，水蛭素下游引物合成带有 Pst I 酶切位点；用 BamH I 和 Pst I 双酶切带 FXa 识别序列的水蛭素基因，同时 BamH I 和 Pst I 双酶切上述 pBVS AK 载体，将酶切回收水蛭素基因片段连接到 pBVS AK 载体，得 pBV SFH 质粒。也可以是拼接重叠 PCR 方法连接上述两个基因片段。将 pBV SFH 质粒转化到大肠杆菌，温度诱导表达。融合目的蛋白含 SAK 氨基酸序列、FXa 识别序列、水蛭素氨基酸序列三个功能区。

具体实施方式 (二) 在 tPA 基因上下游分别加上 Xho I 和 Avr II 酶切位点，构建不带终止密码子的 tPA 基因到 pPIC9 载体；用 PCR 方法在水蛭素基因上游加上 Avr II 酶切位点和 FXa 识别氨基酸序列的编码碱基，Avr II 酶切位点和 FXa 识别氨基酸序列的编码碱基的加入方法采用引物合成方法合成到水蛭素基因上游 5'端之前，水蛭素下游引物合成带有 Not I 酶切位点；用 Avr II 和 Not I 双酶切带 FXa 识别序列的水蛭素基因并连接到上述构建的带 tPA 基因的 pPIC9 载体的 tPA 下游，构成融合基因 PAFH，得质粒 pPAFH。用 BamH I 和 Sal I 双酶切 pPAFH 和 pPIC9K 质粒，将 PAFH 基因构建到 pPIC9K，得 pPAFH-K 基因。线性化 pPAFH-K 质粒，电转化并重组到酵母基因组，甲醇诱导表达。融合目的蛋白含 tPA 氨基酸序列、FXa 识别序列、水蛭素氨基酸序列三个功能区。