[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
C12N 15/57
C12N 9/74 C12N 5/10
A61K 38/48 A61P 9/00

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 94194668.1

[43] 授权公告日 2003 年 3 月 26 日

[11] 授权公告号 CN 1103815C

[22] 申请日 1994.11.14 [21] 申请号 94194668.1

[30] 优先权

[32] 1993.11.12 [33] US [31] 08/152,657

[32] 1994. 6.10 [33] US [31] 08/258,038

[86] 国际申请 PCT/US94/13104 1994.11.14

[87] 国际公布 WO95/13385 英 1995.5.18

[85] 进入国家阶段日期 1996.6.27

[71] 专利权人 吉里德科学公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 C. S. 吉布斯

L. L. K. 陆恩格 M. 特西安格

[56] 参考文献

EMBO J. 8/11 1989 - 01 - 01 W. Bode et al.

J. BIOL. CHEM. 268/24 1993 - 08 - 25 k. Padmanabhan et al.

PNAS,88 1991 - 01 - 01 Q. WU et al.

审查员 曾繁辉

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所

代理人 杜京英

权利要求书 6 页 说明书 71 页 附图 8 页

[54] 发明名称 凝血酶突变体

[57] 摘要

提供了具有蛋白 C 激活能力而无显著纤维蛋白原凝集活性或与之相反的凝血酶突变体(TS)。 相对于纤维蛋白原凝集其蛋白 C 活化特性提高的 TS 很有用，尤其作为抗凝剂及用于筛选拮抗或激活该特性的物质，以及在确定病人活性蛋白 C 介导的抗凝途径状态的诊断步骤中。 促凝 TS 可用于实体瘤治疗促进凝结，作为绷带浸渍剂或用于诊断检测。在重组细胞培养中或用体外方法制备这些 TS。

ISSN1008-4274

知识产权出版社出版

1.一种分离的多肽，其(1)与参考序列凝血酶具有至少约 80%的氨基酸序列同源性和(2)具有参考序列凝血酶的至少一个免疫表位，其中至少一个氨基酸残基已取代了至少一个下列凝血酶氨基酸残基，或至少一个下列凝血酶氨基酸残基已缺失，或一种氨基酸已紧邻地插入在至少一个下列凝血酶氨基酸残基:

R20, S22, Q24, E25, D35, W50, D51, N53, F54, T55, N57, D58, K65, H66, Y71, N74, E82, K83, R93, E94, R98, D113, D122, R123, E124, S128, Q131, K145, N151, K154, S158, E169, K174, D175, S176, T177, D183, D193, K196, A200, N216, N217, E229, R233, D234, G235, K236, Y237, F239, Q251, W249, D255 或 Q256，但条件是，该多肽不是凝血酶 K154A，凝血酶 K174E，凝血酶 E25K，凝血酶 N151D，K154E，凝血酶 desP48P49W50，在凝血酶激活位点中至少一个氨基酸残基已被取代或缺失，或有相邻插入到该氨基酸残基的残基的凝血酶，或者其中 F19－E25 环被来自组织纤溶酶原激活物的相当的环所替代的凝血酶。

2. 权利要求 1 的多肽，其具有的蛋白 C 激活活性与纤维蛋白原凝集活性的比值小于参考序列凝血酶的约一半，或大于其约 2 倍。

3. 权利要求 1 的多肽，其中多肽选自其中一个或多个残基 W50、K65、H66, Y71、S176、T177、E229、R233、K196、D234、K236、Y237 或 F239 被取代、缺失或相邻插入另一残基的凝血酶。

4. 权利要求 3 的多肽，其中 W50 被缺失或者用选自下组的另一残基取代或紧靠其位点插入：G、A、V、I、L、S、T、D、N、E、Q、C、K、M、F、Y、P、R 和 H。

5. 权利要求 3 的多肽，其中 K65 或 K196 被缺失或者用选自下组的另一残基取代它或紧邻其位点插入:G、A、V、I、L、S、T、D、N、E、Q、C、M、F、Y、P、W、R和H。

6. 权利要求 3 的多肽，其中 D234 被缺失或者用选自下组的另一残基取代或紧邻其位点插入：G、A、V、I、L、S、T、N、E、Q、C、K、M、F、Y、P、W、R和H。

7. 权利要求3的多肽，其中残基E229和W50、或R233和E229被取代或缺失。

8. 权利要求 3 的多肽，其中 H66 被缺失或者用选自下组的另一残基取代或紧邻其位点插入：G、A、V、I、L、S、T、D、N、E、Q、C、K、M、F、Y、P、W和R。

9. 权利要求 3 的多肽，其中 Y71 被缺失或者用选自下组的另一残基取代或紧邻其位点插入：G、A、V、I、L、S、T、D、N、E、Q、C、K、M、F、P、W、R和H。

10. 权利要求 3 的多肽，其中 Y237 被缺失或者用选自下组的另一残基取代或紧邻其位点插入：G、A、V、I、L、S、T、D、E、Q、C、K、M、N、F、P、W、R和H。

11. 权利要求 3 的多肽，其中 E229 被缺失或者用选自下组的另一残基取代或紧邻其位点插入：G、A、V、I、L、S、T、D、N、Q、C、K、M、F、Y、P、W、R和H。

12. 权利要求3的多肽，其中取代、缺失或插入仅发生在A链或B链上。

13. 权利要求 3 的多肽，其中 R233 被缺失或被选自下述一组的另一残基取代或紧邻其位点插入：G、A、V、I、L、S、T、D、N、E、Q、C、K、M、F、Y、P、W和H。

14. 权利要求3的多肽，其中残基被取代，且用丙氨酸取代。

15. 权利要求 3 的多肽，其中 2 或 3 个残基被取代。

16. 权利要求 3 的多肽，其含有 B 链而无 A 链。

17. 权利要求 3 的多肽，其含有 A 链和 B 链。

18. 权利要求 2 的多肽，当在肝素依赖性的 AT－Ⅲ抑制下通过 S－2238 的水解作用测量时，其残余蛋白水解活性大于参考凝血酶的约 2 倍。

19. 权利要求 3 的多肽，其中肝素结合位点残基被取代。

20. 权利要求 3 的多肽，其是 E229D 多肽、E229F 多肽、E229S 多肽、E229W 多肽、E229Y 多肽、R233N 多肽、R233D 多肽、R233F 多肽、W50C 多肽、W50E 多肽或 W50K 多肽。

21. 权利要求 2 的多肽，其中凝血酶在 Q24、或 R98 残基被取代，一个或多个这样的残基被缺失或者紧邻着一个或多个这样的残基插入另一个残基。

22. 权利要求 3 的多肽，其中残基为 E229 或 R233。

23. 权利要求 1 的多肽，其中的 E229 已被选自 G, A, V, I, L, S, T, D, N, Q, C, K, M, F, Y, P, W, R 和 H 的残基取代。

24. 权利要求 1 的多肽，包括 E229K, E229D, E229A, E229W 或 E229Y。

25. 权利要求 24 的多肽，包括 E229K 或 E229W。

26. 权利要求 1 的多肽，其中选自下列 6 组之一的两个残基被另一氨基酸取代：E229, R233；E229, D234；W50, E229；和 D58, E229。

27. 权利要求 1 的多肽，其中的残基是 S176, T177, A200, E229, R233, D234, K236, Y237 或 F239。

28. 权利要求 27 的多肽，其中的残基是 S176, T177, K236, Y237 或 F239。

29. 权利要求1的多肽，其中的W50被G，A，V，L，I，S，T，D，E，Q，C，M，F，P，N，K，R或H取代。

30. 权利要求1的多肽，其中除了至少一个定义的凝血酶残基的取代，插入或缺失外，是参考序列凝血酶或其等位基因变异。

31. 权利要求1的多肽，其中1－5个列举的残基被取代。

32. 权利要求1的多肽，其中W50是缺失的，在其相邻位点插入一种氨基酸，或W50被A，C，E，G，I，K，L，M，N，P，Q，R，S，T，V或Y取代。

33. 权利要求32的多肽，其中的W50被A，C,E,G,K,L,M,N,Q,R,S,T,V或Y取代。

34. 权利要求1的多肽，其中取代入凝血酶的氨基酸残基是羟脯氨酸，β－羟基天冬氨酸，γ－羧基谷氨酸，羟基赖氨酸或正亮氨酸。

35. 权利要求1的多肽，其中的多肽还包括desE146T147W148。

36. 权利要求1的多肽，其中的参考序列是SEQ ID NO:2。

37. 一种与参考序列凝血酶的氨基酸序列有至少约80%同源性的分离的多肽，其改进包括：取代或缺失至少一个下列凝血酶氨基酸残基，或紧邻至少一个下列凝血酶氨基酸残基插入至少一个氨基酸残基：

R20,S22,Q24,E25,D35,W50,D51,K52,N53,F54,T55,N57,D58,K65,H66,Y71,N74,E82,K83,R93,E94,R98,D113,D122,R123,E124,S128,Q131,K145,N151,K154,S158,E169,K174,D175,S176,T177,D183,D193,K196,A200,N216,N217,E229,R233,D234,G235,K236,Y237,G238,F239,Q251,K248,W249,D255或Q256，

但条件是，该多肽不是凝血酶K52E，凝血酶K154A，凝血酶K174E，凝血酶E25K，凝血酶N151D，K154E，凝血酶desP48P49W50，在凝

血酶激活位点中至少一个氨基酸残基已被取代或缺失，或有相邻插入到该氨基酸残基的残基的凝血酶，或者其中 F19－E25 环被来自组织纤溶酶原激活物的相当的环所替代的凝血酶。

38. 一种与参考序列至少有约 80%的氨基酸序列同源性的分离的多肽，其中丙氨酸，丝氨酸，苏氨酸，甘氨酸，脯氨酸或半胱氨酸氨基酸残基取代了至少一种下列凝血酶氨基酸残基，或至少一个下列凝血酶氨基酸残基缺失，或一种氨基酸残基紧邻插入至少一种下列凝血酶残基:

R20,K21,S22,Q24,E25,D35,W50,D51,K52,N53,F54,T55,N57,D58,K65,H66,R68,T69,R70,Y71,R73,N74,K77,E82,K83,R93,E94,R98,D113,D122,R123,E124,S128,Q131,K145,N151,K154,S158,E169，K174,D175,S176,T177,D183,D193,K196,A200,E202,N216,N217,E229,R233,D234,G235,K236,Y237,G238,F239,Q251,K248,W249,D255 或 Q256,

但条件是，该多肽不是凝血酶 K52E，凝血酶 K154A，凝血酶 K174E，凝血酶 E25K，凝血酶 N151D，K154E，凝血酶 desP48P49W50，在凝血酶激活位点中至少一个氨基酸残基已被取代或缺失，或有相邻插入到该氨基酸残基的残基的凝血酶，或者其中 F19－E25 环被来自组织纤溶酶原激活物的相当的环所替代的凝血酶。

39. 权利要求 38 的多肽，其中丙氨酸，丝氨酸或苏氨酸残基取代一个列举的凝血酶残基。

40. 一种分离的多肽，其(1)与参考序列凝血酶至少有约 80%的氨基酸序列同源性，和(2)具有至少一个参考序列凝血酶的免疫表位，其中 K52 缺失，或紧邻 K52 插入一种氨基酸残基，或 K52 被 V,L,I,M,F,Y,W,A,S,T,G,P,C,Q 或 N 取代。

41. 权利要求 40 的多肽，其中残基 K52 被取代或缺失。

42. 权利要求 40 的多肽，其中 K52 被 G,A,V,L,I,S,T,N,Q,C,M,F,Y,P,W,R 或 H 取代。

43. 权利要求 40 的多肽，其中 K52 缺失，相邻其插入一种氨基酸残基，或 K52 被 A,S,T,G,P 或 C 取代。

44. 权利要求 40 的多肽，其中 K52 被 V,L,I,M,F,Y,W,C,S 或 T 取代。

45. 一种编码权利要求 1,37,38 或 40 中任一项的多肽的核酸。

46. 一种含有权利要求 45 的核酸的可复制的载体。

47. 一种含有权利要求 46 的载体的重组细胞。

48. 一种包括培养权利要求 47 的细胞和从细胞培养物中收集多肽的方法。

49. 权利要求 48 的方法，其中多肽在细胞培养中以可溶性多肽形式表达。

50. 权利要求 48 的方法，其中多肽在细胞培养中以单独 B 链形式表达。

51. 权利要求 48 的方法，其中编码 A 和 B 链序列的核酸各自独立地与编码信号序列的核酸连接，而且它们在同一宿主细胞中共同表达。

52. 权利要求 1－44 中任一项的多肽在制备用于治疗血栓形成疾病或状况的药物中的用途。

53. 权利要求 52 的用途，其中血栓形成疾病或状况是心旁路外科、冠状血栓溶解和血管形成术、肺部栓塞、暂时性局部缺血发作、中风、不稳定性心绞痛、心肌梗塞和深部静脉血栓。

凝血酶突变体

凝血酶(止血中一种关键酶)根据其底物特异性不同,具有促凝血和抗凝血两种特性。它由肝脏以一种无活性的酶原,即凝血酶原形式分泌出来,凝血酶原在凝血因子 Va 和 Xa 的作用下形成成熟的 α-凝血酶。在体外用诸如 Echis carinatus(龙状蝰蛇)蛇毒等几种蛇毒来酶解凝血酶原就可模拟上述过程。

凝血酶通过酶解纤维蛋白原,最终导致形成一种不可溶的纤维蛋白凝块而起促凝剂作用。它会激活凝血因子 V 和 VIII 变成 FVa 和 FVIIIa,酶解 XI 因子形成活化的 XIa 因子(导致进一步激活 IX 因子和 X 因子并延长凝血作用),酶解血小板凝血酶受体导致血小板激活。另一方面,当凝血酶与血栓调节素(TM)(血管内皮细胞上的一种组成型膜蛋白)结合时,它会发生构型变化以致失去促凝血活性,取而代之是获得了能把称为 C 蛋白(PC)的血浆蛋白转变为活性 C 蛋白(aPC)的能力。aPC 是一种丝氨酸蛋白酶,它通过灭活在凝血一连串反应中起重要作用的两个因子 FV(FVa)和 FVIII(FVIIIa)而起抗凝剂作用。aPC 还能灭活血浆蛋白酶原活化抑制因子 1(PAI-1),它是组织血浆蛋白酶原活化因子(tPA)的主要生理抑制因子,即能加强正常纤维蛋白溶解作用。这一机制能保证血液凝集局限在伤口处。完全缺乏 PC 的婴儿基本上难以存活,由于称为新生儿暴发性紫癜的血栓形成疾病;某些部分缺乏 PC 的病人会复发血栓形成。此外,许多现行的输注 aPC 的动物模型显示,外源性 aPC 是一

种抗血栓形成和抗炎症的分子。

人凝血酶是由一个大约有579个成熟氨基酸(有潜在的等位基因变异或N-末端的微小异质性)和一个约43残基的前导序列(Degen等,"Bio-chemistry"22:2087〔1993〕)的前体多肽即凝血酶原产生出来的。这前导序列在细胞表达和分泌凝血酶原过程中被蛋白水解而去掉。凝血酶原是一种酶原或无活性的蛋白酶,它通过蛋白水解而活化。至少有3个基本酶解位点。在体内,凝血酶原可被Xa因子在有Va因子、磷脂和钙离子存在下,在残基R271和T272(残基编号按Degen等人的方法)之间酶解生成前凝血酶2和片段1.2。凝血酶原还可被同一系统在R320和I321之间酶解,生成凝血酶meizothrombin,它再在R155和S156之间自我酶解成片段1(1-155)和meizothrombin des1(一种二硫键连接的从156残基延伸到凝血酶原羧基端的二肽,在R323处酶解)。最后,前凝血酶2在R320和I321之间酶解,或由meizothrombin des1在R271和T272之间酶解生成凝血酶。然后凝血酶自身在T284和T285之间酶解,得到成熟的A-链N-末端。本发明中,把凝血酶A链的成熟N-末端残基(Degen系统中为T285)称为"T1a",然后连续编号到R36a位的精氨酸残基。B链是从它的N-末端残基I1数起(Degen系统为I321)直到E259。这两条凝血酶多肽通过C9a和C119之间的一个二硫键共价连接在一起。

对于凝血酶,除了用Degen等人基于DNA的系统外,还使用了两种不同的编码方法。一种是基于与胰凝乳蛋白酶原的线性排列(Bode等"EMBOJ"8:3467(1989)。第二种是华盛顿大学的Sadle和同事推荐的方法。本专利说明书中使用的就是Sadle的编码方法。

按这种方法，凝血酶的 B 链从 I1 开始，延伸到 E259 为止，而 A 链正象上述那样，注个“a”字，即从 T1a 到 R36a。这种凝血酶被称为“参考序列凝血酶”它的全部序列显示在图 1 中，如 Wu 等人[PNAS USA 88： 6775 （ 1991 ）]公布的几种根据 Sadle 方法所编码的凝血酶突变体。Wu 等人的突变体和相应的胰凝乳蛋白酶原编码及 Degen 残基编码分别依次表示如下： H43 （ 57， 363 ）、 K52 （ 605， 372 ）、 N53 （ 60g， 373 ）、 R62 （ 67， 382 ）、 R68 （ 73， 388 ）、 R70 （ 75、 390 ）、 D99 （ 102、 419 ）和 S205 （ 195， 525 ）。

众所周知，凝血酶对纤维蛋白原和蛋白 C 活化作用的结合位点是重叠的，但不是一致的。这是基于少数凝血酶突变体得来的（ Wu 等， op cit ）。 Wu 等人报道过：有凝血酶序列但在 52 位有谷氨酸取代的（ K52E ）一种多肽在产生活化的 PC 上活性大约要比野生型凝血酶高出 2.5 倍，并只有野生型凝血酶的正常纤维蛋白原凝集活性的 17 %。相反，也报道过：有凝血酶序列但在 70 位有谷氨酸取代（ R70E ）的一种多肽有野生型凝血酶的纤维蛋白原的凝集活性，但只有大约 7 %的野生型凝血酶的 PC 活化能力。根据 Wu 等人， R68E 蛋白基本上丧失了这两种功能。

其他与凝血酶有序列同源性的多肽见

Le Bonniec et al., “JBC” 268(25):19055(1993); Le Bonniec et al., “JBC” 266(21):13796(1991); Le Bonniec et al., “PNAS USA” 88:7371(1991); Sheehan et al., “JBC” 268(5):3639(1993); Horrevoet et al., “JBC” 268(2):779(1993); Suzuki et al., “JBC” 266(28):18498(1991); Sheehan et al., “Thrombosis and Haemostasis” 69: Abstract 1784(1993); Gan et al., “Thrombosis and Haemostasis” 69:Abstract 1783(1993); Gan et al., “Thrombosis and Haemostasis” 69: Abstract 1787(1993), and Naray-Szabo et al., “Theochem” 59:401(1989).

凝血酶在凝血中的关键作用使这种蛋白成为研制治疗血栓形成药剂时的一个靶子。绝大部分尝试都集中在直接抑制凝血酶的蛋白水解活性上，事实上，许多凝血酶促凝血活性的抑制剂都有抗凝作用(Hirsh, 1991；Hirsh, 1991a)。但是，这些抑制剂的作用能力可能会受伴随的对凝血酶抗凝活性的抑制所限制。相反，抗凝作用可通过增加或刺激凝血酶的抗凝途径而实现，如通过服用可溶性 TM(Gomi 等，"Blood"75:1396－1399, 1990 和 Light, D; WO93/15755)或活化的 PC("aPC")(Dreyfus 等，1991, Gruber 等，1990, Gruber 等，1991, Taylor 等 1987)。这种方法不能封闭由先前激活的凝血酶所引起的正在发生的凝血作用。

研制一些提高了理化和生物学活性的新型多肽是本发明一个目的。

本发明还有一个目的是研制一种新型多肽，其凝血酶的促凝血和抗凝血活性基本上是分开的，并且还选择性地抵抗肝素介导的抗凝血酶Ⅲ(AT－Ⅲ)抑制作用。

还有一个目的是获得能在重组细胞培养中高效表达的多肽。

本发明还有一个目的是提供对蛋白 C 活性或纤维蛋白原有底物特异性但基本不酶解正常情况下不是凝血酶底物之底物的新型多肽。

本发明的另一个目的是提供在筛选凝血酶的促凝血或抗凝血活性的激动剂或拮抗物质时有用的新型共价修饰的多肽。

另一个目的是提供能活化蛋白 C 但基本上不能或降低了对任何一种或几种纤维蛋白原、凝血酶血小板受体和/或 XIII、V、XI 或

VIII 因子的蛋白酶解活性的新型多肽。

还有另外一个目的就是获得新型的在从细胞培养或天然来源纯化如 TM 或 aPC 一类的与凝血酶作用的多肽时有用的多肽。

另外一个目的是要鉴定能保留凝血酶至少一定程度的所希望的蛋白酶解活性的新型多肽，这包括凝血酶对所希望底物的 Kcat 和 Km。

在另一个目的中，新提供的新型多肽要表现出与野生型凝血酶相比增强的 PAI－1 灭活活性。

另一个目的是提供在凝血机制异常的病人中鉴定血栓调节素功能缺陷的方法。

对其他的目的，提供的新型多肽可用于治疗血栓形成，特别是与败血病休克有关的血栓形成，用于实质性肿瘤的治疗，用于改进创伤敷料的制备以及依赖于凝血酶特性的治疗和诊断方面的应用。

另一目的是鉴定凝血酶的新型同系物，它们提高或降低了刺激细胞增殖的能力(Ben－Sharit 等，“PNAS USA”83:976－980 1986)。

本发明这些目的和其他目的在将本专利说明书作为一个整体考虑将是明显的。

本发明涉及一些新型多肽(以下简称“NP”)，其中凝血酶特性是分离的，即这些多肽不具有凝血酶一个或几个不希望的特性，但仍保留一个或几个凝血酶所希望的特性。此外，本发明还涉及在凝血酶靶位残基有突变的那些 NP。

凝血酶的已知氨基酸序列变体不包括在本发明 NP 之内，特别是凝血酶 R70E，凝血酶 R68E，凝血酶 K154A，凝血酶 K252E，凝血酶 K174E，凝血酶 R180E，凝血酶 D99A，凝血酶 D99N，凝血酶

E202Q，凝血酶 E25K，凝血酶 R245E，凝血酶 S205A，凝血酶 R197E，凝血酶 D199E，凝血酶 N151D，凝血酶 K154E，凝血酶 desP48，P49，W50，凝血酶 desE146，T147，W148，凝血酶 desT147－S158，WO93/13208 中的凝血酶；其中在凝血酶活化位点内至少有一个氨基酸残基突变了和其中 F19－E25 环被来自组织凝血酶原激活因子的相应环所取代。但是，凝血酶 K52E 的排除仅以现有技术能生产为限。活化位点变异的凝血酶的排除仅限于 W093/13208 中所定义和公开的活化位点。已知的凝血酶与非凝血酶多肽或前凝血酶原或凝血酶原多肽的融合物也被排除在本发明的新型多肽之外。然而，那些已知凝血酶中有额外氨基酸取代、插入或缺失的凝血酶未被排除在本发明的 NP 之外。

天然存生的凝血酶也排除在本发明的新型多肽之外，不管它是来自人的还是动物的(包括天然产生的等位基因突变)，它没有从血液或其他机体组织中分离或纯化出来，即为天然产物。但应理解：本发明的 NP 包括除在本发明中考虑的突变外还有那些不同于参考序列凝血酶的等位基因突变。

在本发明一些具体实施方案中，我们提供新的具有蛋白水解活性的、蛋白 C 活性与纤维蛋白原凝结之比不同于野生型凝血酶的多肽。具体讲，我们提供两大类新型多肽。第一类叫做蛋白 C 激活因子或“PCA”，我们提供的多肽其抗凝活性与促凝活性之比大于 2。PCA 多肽能激活蛋白 C 但基本上不能酶解纤维蛋白原。令人惊异的是，我们在动物中的实验研究证实：PCA 中促凝活性残余水平都有较好的耐变性，不会导致播散性血管内凝血或其他临床不良促凝反应。而且，我们意外地能够鉴定这样的 PCA，它们缺乏在我们的

试验中可测到的任何促凝活性，但仍有蛋白 C 活化能力。因此，本发明的一个具体实施方案包括给予需要抗凝治疗的受者治疗有效剂量的 PCA。

作为上述实施方案的延伸，制备并服用一种 PCA，此 PCA 的抗凝活性基本上对抗预定的凝血酶抑制剂如肝素和 AT－Ⅲ等的抑制作用。在一个实施方案中，体内把 PCA 与肝素结合起来给药。肝素抑制了内源性凝血酶的促凝血活性而不影响 PCA 的抗凝血活性，从而导致提高了抗凝血作用。本发明这一实施方案的另一优点在于预计服用的 PCA 会对体内清除 AT－III—肝素有抗性，从而延长生物半衰期。

在另外一些实施方案中，提供的 PCA 降低了对血小板凝血酶受体的蛋白水解活性，因此在治疗剂量下不激活血小板。提供的 PCA 其刺激血小板凝集的 EC50 都大于 10nM，常规大于 20nM。以能激活蛋白 C 的剂量使用 PCA 时，EC50 比野生型凝血酶大的 PCA 会降低或消除可测到的血小板凝集。

本发明第二类新型多肽叫“纤维蛋白原凝集蛋白”或“FCP”。这些多肽抗凝活性与促凝活性之比小于 0.5。这些 NP 在凝血酶 PC 激活结构域中有突变，降低突变后的多肽抗凝活性使其不足野生型凝血酶的一半，但仍保留凝聚纤维蛋白原的能力。这些多肽如在诊断、制备方法和手术止血中是有用的。本发明另一实施方案包括给需要促凝治疗的受治者以治疗有效剂量的 FCP。

若在现有文献中出现 FCA 或 PCA 的公开达到可实施程度，这种已知多肽可用于上述的本发明治疗方法中。

在一个实施方案中，我们提供了 PCA 多肽，其中邻近一个或多

个凝血酶残基 W50、K52、D58、K65、H66、Y71、N74、K106、K107、S176、T177、W227、D193、K196、E202、E229、R233、D232、D234、K236、Y237 或 F239 已取代或缺失一个凝血酶多肽的氨基酸残基，或插入一个残基。

在另一实施方案中，我们提供了 FCP 多肽，其中邻近一个或多个凝血酶残基 K21、Q24、R70、R98 或 K77 已取代或缺失一个凝血酶多肽的氨基酸残基，或插入一个残基。

本发明另一个实施方案有助于对各种自发性血栓形成疾病进行特异性诊断。这一实施方案是一种方法，包括用诊断有效剂量的 PCA 与受检者血液和血管组织接触，然后测定受检者血液的止血参数而确定受检者 aPC 途经是否有缺陷。

图 1(SEQ.ID.NO:1 和 SEQ.ID.NO:2)描绘的是编码参考序列凝血酶(也称为野生型凝血酶)DNA 的核苷酸序列，它的互补序列以及参考序列凝血酶的推定氨基酸序列。

图 2A 和 2B 是比较重组野生型人凝血酶(2A)和 K52A PCA (2B)在兔子中的活性。这一研究显示：与人野生型凝血酶相比，新型多肽对循环纤维蛋白原没有造成明显降低，但它能诱发抗凝作用，如用活化 PTT 试验所测定的结果。

图 3 显示 K52A PCA 在体内有明显长的半衰期，服用后使抗凝作用活性持续达约 150 分钟。

图 4 是比较两个剂量的本发明新型多肽(PCA－2, E229A PCA)在食蟹猴中的抗凝活性。

图 5 是比较本发明两种 PCA(K52A 和 E229A)在食蟹猴中的抗凝活性。

图 6 证实本发明的两种 NP(K52A 和 E229A)持续的血栓调节素依赖关系。

图 7 表示本发明的两种 NP 的血小板激活效力与野生型凝血酶相比大大降低。

本发明的新型多肽其氨基酸序列与参考凝血酶序列至少有 80%的同源性(常规至少 90%,优选至少 95%),但它们具有参考序列凝血酶所不具有的某些质或量的显著特性,正如本发明在别处所描述过的那样。

"同源性"定义为把两个序列线性排列,必要时留出空隙使同源性百分比达到最大后,与参考序列凝血酶中的残基一致的候选氨基酸序列中的残基百分比。线性排列的方法和其计算机程序是本领域中熟知的。对于决定一个候选序列是否符合这一定义而可以使用或采用的一个计算机程序是 Genentech, Inc, 提出的"Align2",它已于 1991 年 12 月 10 日以用户文件(user documentation)在美国版权局(Washington.DC 20559)登记。

在计算氨基酸序列同源性时,把候选氨基酸和参考序列以能产生线性对准残基数最大的方法线性排列出来,在线性排列的序列中以缺口表示残基的插入和缺失。例如一个含 100 个残基的参考凝血酶序列片段,在它的 N—末端融合上 20 个异源性残基(细菌信号序列),但在凝血酶片段序列中只有 1 个残基取代的 120 个残基的多肽,计算得出其与参考序列凝血酶的同源性为 99%,因为这一片段的序列除有 1 个残基取代和 N－末端融合的 20 个残基外,其余同排成线性的参考凝血酶序列都精确的一致。即假如候选的和参考序列作最大线性排列比较时表现出有 1 个或几个氨基酸残基插入(或缺

失),那么这些残基在作同源性计算时可被忽略。

在另一实例中,本文所用"E202A NP"意味着这样指称的多肽包括在凝血酶B链(包括以下任何一条B链)202位上的丙氨酸取代:成熟人凝血酶B链(无A链)、含有A、B链的人凝血酶原、与人B链凝血酶融合的细菌多肽或含有202位点的人B链凝血酶片段,只要每个这样的衍生物保留激活蛋白C或酶切纤维蛋白原而产生血凝块的能力或经加工后能这样就行。也包括凝血酶A或B链片段,特别是B链的,同样要求多肽作为一个整体至少能激活蛋白C或酶切纤维蛋白原产生血凝块。凝血酶片段大小有约10、20、30、50、100或更多个残基。一般来说,在凝血酶序列中有一个以上残基取代的NP也将包括插入的凝血酶序列。

同源性分析都是基于从用于表达NP的核酸序列推衍出来的任何一个或几个序列、作为体外第一个产生的产品的序列或任何经翻译后修饰的序列。因此,假如参考的和候选的序列表达时是一致的,而后来谷胺酰胺残基被脱氨成为谷氨酸,则第一个候选序列是100%同源的,但脱氨的序列不是。

本发明把"促凝活性"定义为由实例2.3中纤维蛋白原凝集试验所测定的活性,用NP浓度和相应的野生型凝血酶浓度标准化进行校正。

本发明把"抗凝活性"定义为由实施例2.4中蛋白C活化试验所测定的活性,用NP浓度和相应的野生型凝血酶浓度标准化进行校正。

用任何适宜的试验都能测出NP和凝血酶的浓度。下文表la报告了结果,其中NP和凝血酶蛋白浓度都是由酰氨分解活性推断出

来的。然而，用一种免疫试验法也可满足该目的。例如，可以用固定化的 PPAK 去捕获 NP 和凝血酶，并用标记的抗凝血酶抗体检测结合上去的蛋白。假如 NP 或凝血酶基本上是均匀的话，那么就可用诸如已知的 Lowry 法等大量蛋白测定法来确定试验样品中的 NP 或凝血酶的浓度。

"相应"野生型凝血酶是指一种蛋白，它基本是按制备分析物 NP 相同方法制备的，并与 NP 有相同的序列，只是在 NP 中出现的突变又恢复到参考序列凝血酶中所出现的残基。

在一些实施方案中，新型多肽具有(a)至少一个能与针对参考序列凝血酶抗体起交叉反应的免疫表位，(b)同参考序列凝血酶 A、B 链有同源性的被一个二硫键连在一起的两条链；(c)凝血酶活性位点残基 S205、H43 和 D99；(d)对纤维蛋白原或蛋白 C 的 Kcat 依情况而定，为参考序列的至少 20%，优选至少 75%，最优选大于或等于参考序列的 Kcat，(e)对纤维蛋白原或蛋白 C 的 Km 为参考序列 Km 的(依情况)：最多约为 150%，优选最多约为 100%，最好最多约为 50%，优选至少约为 75%，(f)与参考序列凝血酶相比，用 S－2238 水解作用所测定的蛋白水解活性大于约 50%，优选大于约 75%，最优选大于约 90%，和/或(g)其底物特异性其基本上不宽于参考序列凝血酶，例如，它可以在体内酶解不同于天然凝血酶底物的人类蛋白，其裂解速率为参考序列的至多 150%，优选至多 120%。

本发明中典型的 PCA 具有(a)促凝活性等于或小于参考序列凝血酶的百分之 50、25、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1，(b)当与参考序列凝血酶比较时，其抗凝活性与促凝活性之比大于 2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、25 或 50，(c)抗凝活性与参考序列凝血酶的抗凝活性相等或

大于它的百分之5、10、15、25、50、75或100。

本发明中典型的FCP具有(a)抗凝活性等于或小于参考序列凝血酶的百分之50,25、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1,(b)当与参考序列凝血酶比较时,其抗凝活性与促凝活性之比小于约0.5、0.25、0.15、0.10、0.09、0.08,(c)促凝活性等于或大于参考序列凝血酶的促凝活性的约百分之5、10、15、25、50、75或100。

本发明新型多肽包括在邻近下表1或1b中所示任何参考序列氨基酸残基位点处取代、缺失或插入任何氨基酸残基。表1描述的是其中凝血酶残基用丙氨酸取代的研究结果。取代的NP是那些在参考序列中至少有一个氨基酸被去掉而在相同位置上插入一个不同的氨基酸。这种取代可以是单一的,在多肽分子中只有一个氨基酸被取代,它们也可以是多位点的,即在凝血酶2个或多个位点上有2个或多个氨基酸被取代。表1从左至右竖行分别描述我们采用的编码编号、取代的残基、两行S-2238水解的数据(凝血酶水解活性的测量和取代带来构型破坏的标记)、纤维蛋白原凝集活性(促凝活性的测量)、蛋白C激活作用(抗凝活性的测量)、蛋白C激活作用与纤维蛋白原凝集活性之比。以及依赖肝素的AT-Ⅲ抑制作用(在有肝素存在下,NP耐受AT-Ⅲ灭活作用的能力的测量)。在我们的系统中NP Mt3和Mt37c的表达没能测到。

表 1

NPs 单位 野生型	用丙氨酸取代的残基	凝乳蛋白酶编号	So 酰胺分解 Ac Slot Blot 野生型的%	So 酰胺分解 Ac Western Blot 野生型的%	纤维蛋白原凝集 (FC) 野生型的%	蛋白C活化 (PA) 野生型的%	PA/FC	肝素依赖性 ATIII 抑制 残余活性 (%)
			99.09	100.00	100.00	100.00	1.00	18.15
Mt1	S4a, E6a, D8a	1E, 1C, 1A	281.58	58.32	165.45	93.07	0.56	
Mt2	K17a, K18a, S19a	9, 10, 11	104.78	99.27	84.78	96.94	1.14	
Mt3	K23a, R26a, E27a	14A, 14D, 14E	—	—	—	—	—	
Mt3a	K23a	14A	111.94	91.46	110.54	87.39	0.79	
Mt3b	R26a	14D	96.42	79.02	92.48	99.36	1.07	
Mt3c	E27a	14E	61.87	70.23	46.34	59.74	1.29	
Mt4	E30a, D34a	14H, 14L	96.97	93.86	80.08	102.71	1.28	
Mt5	E3, D6	18, 21	101.61	93.44	85.57	97.23	1.14	
Mt6	R20	35	136.11	92.16	79.95	67.73	0.85	
Mt7	K21	36	92.13	90.77	30.91	14.24	0.46	
Mt8	S22, Q24, E25	37, 38, 39	129.96	90.30	158.49	11.85	0.07	
Mt8a	S22	37	109.65	69.36	74.82	47.90	0.64	
Mt8b	Q24	38	122.15	70.13	135.51	12.54	0.09	
Mt8c	E25	39	101.06	81.87	119.98	104.42	0.87	
Mt9	D35	49	233.65	92.52	133.46	112.81	0.85	
Mt10	W50, D51	60D, 60E	43.73	76.57	12.68	24.98	1.97	
Mt10a	W50	60D	49.37	71.40	5.15	35.56	6.90	
Mt10b	D51	60E	110.80	75.17	96.50	69.08	0.72	
Mt11	K52	60F	122.22	85.22	38.17	134.70	3.53	
Mt12	N53, T55	60G, 60I	76.22	70.51	42.60	99.58	2.34	
Mt13	N57, D58	62, 63	83.94	90.14	47.90	71.77	1.50	
Mt13a	N57	62	96.64	92.93	75.17	100.14	1.33	
Mt13b	D58	63	93.34	71.98	58.11	87.75	1.51	
Mt14	K65	70	110.97	100.76	1.85	5.64	3.04	
Mt14.5	H66	71	55.45	103.45	2.00	12.30	6.14	
Mt15	R68	73	99.53	78.01	20.25	34.12	1.68	
Mt16	T69	74	120.84	107.33	77.04	58.26	0.76	
Mt17	R70A	75	108.39	93.34	77.51	14.01	0.18	
Mt17a	R70E	75	105.69	95.31	76.86	63.29	0.82	
Mt17b	R68, R70	73, 75	109.32	69.25	6.70	13.31	1.99	
Mt18	Y71	76	87.95	102.03	0.31	5.28	17.11	
Mt19	R73	77A	91.74	99.34	16.65	26.38	1.58	
Mt20	N74, K77	78, 81	127.70	124.90	10.59	12.92	1.22	
Mt20a	N74	78	94.97	86.47	59.33	82.47	1.39	
Mt20b	K77	81	80.46	82.47	27.05	12.71	0.47	
Mt21	E82, K83	86, 87	124.83	139.61	71.83	62.45	0.87	
Mt22	R89, R93, E94	93, 97, 97A	142.67	95.11	54.92	61.10	1.11	59.24
Mt22.5	R98	101	186.13	46.67	124.06	62.50	0.50	
Mt23	K106, K107	109, 110	107.35	102.01	13.15	31.42	2.39	
Mt23a	K106	109	86.92	93.24	50.25	72.35	1.44	
Mt23b	K107	110	106.96	92.38	46.93	44.92	0.96	
Mt24	D113	116	122.36	90.97	80.15	88.41	1.10	
Mt25	D122, R123, E124	125, 126, 127	92.57	71.47	84.21	84.44	1.00	
Mt26	S128, Q131	129B, 131	75.74	109.30	85.40	89.80	1.05	
Mt27	K145, T147, W148	145, 147, 148	111.11	98.07	65.81	84.40	1.28	
Mt28	T149, N151	149, 149B	81.88	98.90	74.36	76.63	1.03	
Mt29	K154	149E	88.57	87.07	118.76	95.47	0.80	
Mt30	S158	153	86.86	92.30	97.96	97.50	1.00	
Mt31	E169, K174, D175	164, 169, 170	111.22	205.21	43.97	69.56	1.58	32.86
Mt32	R178, R180, D183	173, 175, 178	61.62	58.44	90.35	102.37	1.13	56.52
Mt33	D193, K196	186A, 186D	99.65	108.75	28.87	60.27	2.09	
Mt34	E202	192	40.33	25.40	37.22	93.81	2.52	
Mt35	N216, N217	204B, 205	177.29	92.87	41.64	77.56	1.86	
Mt36	E229, R233, D234	217, 221, 222			0.75	0.00	0.00	
Mt36a	E229	217	42.70	23.73	0.58	13.22	22.91	
Mt36b	R233	221	75.90	83.93	2.31	25.16	10.87	
Mt36c	D234	222	51.82	75.33	27.37	59.64	2.18	
Mt37	R245, K248, Q251	233, 236, 239			0.73	0.00	0.00	
Mt37a	R245	233	135.96	26.22	72.57	70.39	0.97	
Mt37b	K248	236	143.41	73.41	76.89	76.86	1.00	
Mt37c	W249	237	—	—	—	—	—	
Mt37d	Q251	239	105.24	96.55	60.45	68.79	1.14	
Mt38	K252, D255, Q256	240, 243, 244	92.80	94.98	65.07	63.74	0.98	

表1中最重要的参数是PA/FC比值。这个比值与1.0差别越大，则在突变体中促凝活性和PC激活特性分离越大。算术值最大的那些特别有利于PC激活，而最小的那些有利于促凝功能。但是，在表1列出的位点有丙氨酸以外任何一种氨基酸残基取代也都在本发明的范围之内，如在下面公开的20种天然的氨基酸残基之一。对于最适宜的抗凝治疗应用，尽管考虑PA/FC比值，NP的PC激活能力至少应是参考序列凝血酶的5%，常规是10～30%，以便能保证这种酶将有足够的活性以在生理和诊断上起作用。此外，PCA绝对的纤维蛋白凝集活性理想地应小于参考序列凝血酶的10%，一般要小于5%，常规小于3%，优选小于野生型的1%，以助于保证临床安全性。不必使NP保留与参考序列凝血酶有相同水平的PC激活活性，因为较低的活性在治疗中很容易通过服用更多的这种酶加以克服。对这一方面，E229和R233 PCA特别令人注目。

除了在表1中显示的丙氨酸取代外，其他氨基酸取代参考序列凝血酶也在本发明的范围之内。通常，插入的残基都是天然的氨基酸，常见的有G、A、Y、V、L、I、S、T、D、E、Q、C、M、N、F、P、W、K、R或H(用惯用的单字符，EP323149)。适宜插入的残基还包括羟脯氨酸，β－羟基天冬氨酸，γ－羟基谷氨酸，羟基赖氨酸或正亮氨酸，作为同名物的替代物使用。

这些取代可能是保守的，其取代的残基具有被取代残基类似的结构或功能。其他的取代将是较少保守的，具有不同结构或功能的残基之间产生交换。对于本发明，这些残基类别包括：1.正电性R、K、H；2.负电性P、E；3.脂肪族的：V、L、I、M；4.芳香族的：F、Y、W；

5.小的A、S、T、G、P、C;6.带电的:R、K、D、E、H;7.极性的:S、T、Q、N、Y、H、W;8.小而亲水的:C、S、T。跨类的取代通常对蛋白功能的影响比保守性(类内)的取代要大。因此,本发明的范围还特别包括把保守性取代引入表1或1b的位点中去,假如结果不理想,则把非保守的取代引入到这比位点上。然而,典型的脯氨酸、甘氨酸和半胱氨酸取代或插入到上述序列中是不优选的。

本发明的一个目的是获得对人无免疫原性或很小免疫原性的NP。就这方面,取代或插入K或R残基到本序列中是不优选的。

优选的取代位点是其中丙氨酸取代导致PA/FC比值大于2.0或小于0.5的表1中位点(W50,K52、D58、K65、H66、Y71、N74、E202、E229、R233、D234、K21、Q24、K70、R98和K77)。选出其中4个位点发生饱和突变(E229、R233、W50、K52)。此外,将不同的双重和三重突变引进到位点W50、K52、R233、E229、E202、K106、K107、D193和K196中。按表1突变体的同样方式制备并在重组细胞培养中表达这些NP,然后检测其表达水平、酰胺分解活性、aPC和纤维蛋白原凝集活性。结果显示在表1a中("INF"=接近无穷大,空白表示NP直到目前还未鉴定)。

表 1a

NPs 单位	表达水平 野生型的%%	Sp酰胺分解Ac Western Blot 野生型的%	蛋白C激活 (PA) 野生型的%	纤维蛋白 原凝集(FC) 野生型的%	PA/FC 比
S205A	83.50	0.26	0.01	0.00	
WT	100.00	100.00	100.00	100.00	1.00
W50A/K52A	24.50	94.90	77.57	6.87	11.28
W50A/E229A	55.50	7.28	1.45	0.00	INF
W50A/R233A	3.90	267.50	-0.13	0.00	0.00
K52A/E202A					
K52A/E229A	4.30	41.87	6.79		
K52A/R233A	14.40	94.29	18.50	0.00	INF
K52A/K106A/K107A	2.20	171.02	15.92		
K52A/D193A/K196A					
E229A/R233A	45.00	10.90	0.57	0.00	INF
E229A	62.50	33.44	5.25	0.33	15.81
E229C	0.00				
E229D	45.00	185.00	10.21	0.00	INF
E229F	11.00	40.57	2.89	0.00	INF
E229G	100.00	3.48	-2.97	0.00	0.00
E229H					
E229I					
E229K	16.00	23.29	3.95		
E229L	22.50	79.20	44.62	20.98	2.13
E229M					
E229N	61.00	101.83	12.19		
E229P	113.00	6.26	1.84	0.00	INF
E229Q					
E229R					
E229S	30.00	52.91	25.83	0.53	48.75
E229T	16.00	56.36	14.37	5.32	2.70
E229V	16.00	58.25	9.16	12.62	0.73
E229W	20.00	34.57	29.05	0.00	INF
E229Y	8.50	38.17	33.43	0.00	INF
R233A	81.00	113.71	55.04	3.04	18.11
R233C	52.00	58.06	6.38	0.00	INF
R233D	75.00	84.93	15.20	0.00	INF
R233E	52.00	229.46	67.61	1.04	65.10
R233F	100.00	59.91	9.24	0.00	INF
R233G	50.00	110.77	10.25	0.87	11.76
R233H	96.00	94.96	25.15	4.59	5.48
R233I	77.50	73.22	31.36	6.27	5.00
R233K					
R233L	96.00	79.47	10.82	7.15	1.51
R233M	200.00	46.78	10.04	1.15	8.69
R233N	52.00	242.15	80.61	1.06	76.12
R233P	50.00	5.49	-0.74	0.00	0.00
R233Q	96.00	91.05	14.90	4.96	3.00
R233S	80.00	94.86	12.87	0.90	14.33
R233T	80.00	98.91	6.95	1.46	4.76
R233V	50.00	122.85	28.02	23.15	1.21
R233W	0.00				
R233Y	106.00	27.46	-0.83	0.00	0.00
W50A	53.60	123.04	50.84	5.17	9.83
W50C	25.00	48.63	20.38	0.00	INF
W50D	32.46	220.03	9.99	7.64	1.30

表 1a（续）

NPs 单位	表达水平 野生型的% 	Sp酰胺分解Ac Western Blot 野生型的%	蛋白C激活 (PA) 野生型的%	纤维蛋白原凝集 (FC) 野生型的%	PA/FC比
W50E	36.36	185.62	9.30	0.00	INF
W50F	22.08	112.74	91.55	49.44	1.85
W50G	50.00	160.05	55.51	6.08	9.13
W50H	8.05	222.75	16.47	39.28	0.42
W50I					
W50K	82.72	65.39	61.38	3.27	18.77
W50L	60.00	172.05	103.19	10.97	9.41
W50M	50.00	149.44	81.72	14.06	5.81
W50N	3.90	1078.41	27.48	3.46	7.94
W50P	0.00				
W50Q	120.00	134.58	52.80	24.93	2.12
W50R	40.00	107.57	201.34	23.75	8.48
W50S	16.88	255.68	36.81	9.12	4.04
W50T	60.00	139.15	48.19	14.65	3.29
W50V	9.09	229.78	18.06	2.33	7.75
W50Y	40.00	184.77	195.64	65.05	3.01
K52A	41.50	125.60	151.70	48.77	3.11
K52C	40.00	8.92	5.17	0.00	INF
K52D	0.00				
K52E	0.00				
K52F	12.98	313.25	86.15	20.41	4.22
K52G	0.00				
K52H	155.00	64.46	153.40	31.27	4.91
K52I	4.00	483.02	225.74	144.68	1.56
K52L	26.40	134.75	216.98	170.79	1.27
K52M	50.00	51.07	70.05	65.38	1.07
K52N	32.00	47.56	72.77	28.69	2.54
K52P	0.00				
K52Q	93.50	74.21	85.14	64.08	1.33
K52R	480.00	41.54	22.31	9.47	2.36
K52S	48.00	71.61	167.01	48.06	3.48
K52T	86.00	66.63	140.99	70.48	2.00
K52V	70.00	72.06	210.17	87.30	2.41
K52W	41.00	124.20	30.24	6.46	4.68
K52Y	26.40	51.60	73.37	36.08	2.03

表 1a 中的数据按表 1 提供的方法得到，活性(蛋白 C 激活作用和纤维蛋白原凝集作用)都用酰胺分解活性标准化，除表 1a 中 NP 特异性酸胺分解活性低于相应的野生型凝血酶的活性 25% 时例外，对于 PC 激活作用和纤维蛋白原的凝集作用的 NP 活性值通过乘以相应的 NP 特异性酰胺分解活性而校正(以野生型的百分比表示)。可以注意到，在表 1 和 1a 中用数字表示的 PA 和 FC 活性，对出现在两表中的 NP 是不同的。这是由两个因素造成的，第一，表 1a 的结果一般都代表仅 1 次或 2 次重复试验的结果，而表 1 的结果至少是 4 次重复的结果。因为 PA 和 FC 试验的变异系数约在 10～20%，所以可以想象到表 1a 的结果，对相同的 NP 来说会不同于表 1 的结果。第二，如上所述，当酰胺分解活性小于野生型凝血酶活性的 75% 时，表 1a 的结果根据 Western 印迹对于蛋白浓度进行了校正。这就可以对表 1a 中各种 NP 作更有意义的比较，因为那些结果都是对按 Western 印迹方法测定出来的相同蛋白浓度校正的。表 1 的 NP 不需要作大量校正，因为对绝大多数情况来说，丙氨酸突变保留参考序列凝血酶的大部分蛋白水解活性。

表 1a 中鉴定了特别显著的 PCA，数据表明至少保留了一些 aPC 活性，但基本完全消除了在我们的试验中可检测到的 FC 活性(600 秒未出现凝集)。这些是双突变体 W50A、E229A 和 E229A、R233A，单突变体 E229D(显然与野生型酶只有一个亚甲基的差别)、E229F、E229S、E229W、E229Y、R233E、R233G、R233M、R233N、R233S、W50E、W50K、W50C 和 K52C。

表 1 和 1a 中 PCA 只是 NP 的代表，其中凝血酶残基突变以便产

生特别安全和有效的 PCA 。其他这类 PCA 用本发明介绍的方法或对本领域技术人员显而易见的其他方法很容易鉴定。例如用额外的活性来选择多位点突变，和让以丙氨酸筛选鉴定出来的其他有希望的位点发生饱和突变，以便选择最适宜的修饰。因为很显然，其他具有理想的促凝和抗凝作用的 NP 都能成功地鉴定出来，这将仅仅是鉴定和分离他们的常规试验问题。

从表 1 和 1a 中显显可以看出 E229 和 R233 是 PCA 的关键残基。以范德华力接触 E229 或 R233 、靠近 E229 或 R233 的残基以及与含有 R233 结构域及含有 E229 的环接触的残基而进行的凝血酶残基修饰，可能类似于直接取代 E229 或 R233 而影响纤维蛋白原凝集和蛋白 C 激活，这是通过引起 E229 或 R233 的方向或位置的改变或通过破坏正常情况下与 E229 或 R233 有关的分子内部相互作用而引起的。为了鉴定其取代可以模拟 E229 取代的那些残基，找出了凝血酶三维结构中最接近 E229 的残基。把那些 C_α 在 E229 C_α 10 埃范围内的残基列在下表 1b 中：

表 1b

残基	C_α 与 C_α E229 的距离（埃）	表 1 中的突变	PA/FC
E146	10.06	—	
S176	9.93	—	
T177	8.28	—	
R178	10.31	Mt 32	1.13
I179	10.03	—	
D199	10.91	—	
A200	10.90	—	
C201	9.74	—	
E202	10.06	Mt 34	2.52
W227	7.27	—	
G228	3.82	—	
G230	3.73	—	
C231	6.69	—	
D232	8.88	—	
R233	7.94	Mt 36b	10.87
D234	10.64	Mt 36c	2.18
G235	10.41	—	
K236	6.96	—	
Y237	7.75	—	
G238	7.88	—	
F239	9.32	—	

用这种分析方法独立鉴定出来的位点之一是 R233，通过表 1a 中报道的结果证实这一点在 PCA 特异性上起重要的作用。表 1 报道的最初筛选中还鉴定出另外 3 个位点，这三个位点 PA/FC 比值都大于 1，还证实这一结构域在分离凝血酶 aPC 活性的底物特异性上起关键作用。因此，制备那些表 1b 中列出的任一个或几个残基被取代或缺失或紧靠基插入残基的 NP 是在本发明的范围内。特别是位于 E229Cα 或 R233Cα 10Å 以内的残基都是特别有意义的，在 8Å 以内的那些残基更是如此。但是，C201 和 C231 不是优选位点，因为它们配对在天然凝血酶中形成一个二硫键。G228、G230、G235 和 G238 也不是优选的残基。因此，优选取代、插入或缺失的表 1b 中的残基是 S176、T177、W227、D232、K236、T237 和 G239。对表 1b 中的残基用于取代优于缺失或插入，这种取代用不同于天然残基所属类群的成员来进行，或这种取代用天然残基类群中的成员来进行。但是，一般来说，半胱氨酸、脯氨酸、甘氨酸不应用于表 1b 中任一残基的取代。R233 10Å 的残基将与许多最靠近 E229 的残基重叠，不重叠的额外残基用 Bode(op cit)三维结构很容易鉴别出来。

PCA 多肽一般都是对相应参考序列残基在下列凝血酶 1 个或几个位点上有残基取代的多肽，它们是 K52、K65、Y71、N74、W50、D58、H66、E202、E229、D234 和 R233。残基 K52、K106、K107、K196 和/或 K65 独立优选地用天然氨基酸残基，如 G、A、V、L、I、S、T、D、N、E、Q、C、M、F、Y、P、W、R 或 H 取代。K52 一般用半胱氨酸、甘氨酸、丙氨酸、谷氨酸、天冬酰胺或谷氨酰胺取代，在某些情况下，用谷氨酸以外的任何天然氨基酸残基取代，或在其他一些实施方案中，用

谷氨酸或天冬氨酸以外的残基取代；而 K65、K106、K107 和/或 K196 典型地用丙氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、精氨酸或组氨酸取代。

Y71 优选用天然氨基酸残基如：G、A、V、L、I、S、T、D、E、Q、C、M、N、F、P、W、K、R 或 H 取代，典型地是苯丙氨酸、苏氨酸、丝氨酸、异亮氨酸或色氨酸取代。

N74 优选用天然氨基酸残基如 G、A、V、L、I、S、T、D、E、Q、C、M、F、P、W、K、R 或 H 取代，典型地是用丙氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸或天冬氨酸取代。

W50 优选用天然氨基酸残基如：G、A、V、L、I、S、T、D、E、Q、C、M、F、P、N、K、R、Y 或 H 取代，典型地是用半胱氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、精氨酸或组氨酸取代。

D58、D193 和/或 D234 独立地优选用天然氨基酸残基如 G、A、V、L、I、S、T、W、E、Q、C、M、F、P、N、K、R、Y 或 H 取代，典型地是用丙氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、酪氨酸、苏氨酸或丝氨酸取代。

H66 优选用天然氨基酸残基如：G、A、V、L、I、S、T、W、D、Q、C、M、F、P、N、K、Y、E 或 R 取代，典型地是用丙氨酸、赖氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、组氨酸或丝氨酸取代。

E202 和/或 E229 独立地优选用天然氨基酸残基如 G、A、V、L、I、S、T、W、D、Q、C、M、F、P、N、K、R、Y 或 H 取代，典型地是用丙氨酸、天冬氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、天冬氨酸、酪氨酸或丝氨酸取代。

R233 优选用天然氨基酸残基如：G、A、V、L、I、S、T、W、D、Q、C、M、F、P、N、K、E、Y 或 H 取代，典型地是用丙氨酸、赖氨酸、天冬酰

胺、谷氨酰胺、谷氨酸、苏氨酸、组氨酸或丝氨酸取代。

代表上述突变结合NP都属本发明范围内。把上述2个、3个、4个、5个或更多个取代引入本文所定义的凝血酶中。单个氨基酸取代的结果一般都是加成性的，除非这些残基相互间直接或间接发生作用。我们指望从上述11个关键残基结合的多重取代中得到另外一些PCA(W50、K52、D58、K65、H66、Y71、N74、K106、K107、D193、K196、E202、E229、R233、D234)。它们很容易按下面介绍的相同方法筛选出来，以便鉴定那些性质有所改进，特别是促凝活性同抗凝活性之比明显降低的那些。例如它们包括E229、R233、D234；E229、R233；

E229,D234; R233,D234; E229,K52; R233,K52; D234,K52; E229,R233,K52; E229,D234,K52; R233,D234,K52; E229,R233,D234,K52; W50,D58; W50,K52; W50,E229; W50,R233; W50,D234; W50,E229,R233,D234; W50,E229,R233; W50,E229,D234; W50,R233,D234; W50,E229,K52; W50,R233,K52; W50,D234,K52; W50,E229,R233,K52; W50,E229,D234,K52; W50,R233,D234,K52; W50,E229,R233,D234,K52; E202,E229,R233,D234; E202,E229,R233; E202,E229,D234; E202,R233,D234; E202,E229,K52; E202,E233,K52; E202,D234,K52; E202,E229,R233,K52; E202,E229,D234,K52; E202,R233,D234,K52; E202,E229,R233,D234,K52; E202,W50,K52; E202,W50,E229; E202,W50,R233; E202,W50,D234; E202,W50,R233,D234; E202,W50,E229,R233; E202,W50,E229,D234; E202,W50,R233,D234; E202,W50,K52; E202,W50,E229; E202,W50,R233; E202,W50,D234; W50,E202; E202,K52; E202,E229; E202,R233; E202,D234; D58,K52; D58,E229; D58,R233; D58,D234; D58,W50; D58,E202; D58,K52,E229; D58,K52,R233; D58,K52,D234; D58,K52,W50; D58,K52,E202; D58,E229,R233; D58,E229,D234; D58,E229,W50; D58,E229,E202; D58,R233,D234; D58,R233,W50; D58,R233,E202; D58,D234,W50; D58,R233,E202; D58,W50,E202; D58,W50,R233; and D58,W50,D234.

多重取代的NP 实施方案举例 如下：(用上述分类号指示取代的类别，如W50.3表示W50用V、L、I或M任一个取代)：W50.1,.2,.3,.5,.6,.7或.8,K52.2,.3,.4,.5,.6,.7或.8; W50.1,.2,.3,.5,.6,.7或.8,D58.1,.3,.4,.5,.6,.7或.8; W50.1,.2,.3,.5,.6,.7或.8,H66.2,.3,.4,.5,.6,.7或.8; W50.1,.2,.3,.5,.6,.7或.8,Y71.1,.2,.3,.5,.6,.7或.8; W50.1,.2,.3,.5,.6,.7或.8,E229.1,.3,.4,.5,.6,.7或.8; K52.2,.3,.4,.5,.6,.7或.8,D58.1,.3,.4,.5,.6,.7或.8; K52.2,.3,.4,.5,.6,.7或.8,H66.2,.3,.4,.5,.6,.7或.8; K52.2,.3,.4,.5,.6,.7或.8,Y71.1,.2,.3,.5,.6,.7或.8; K52.2,.3,.4,.5,.6,.7或.8,R233.2,.3,.4,.5,.6,.7或.8; D58.1,.3,.4,.5,.6,.7或.8,H66.2,.3,.4,.5,.6,.7或.8; D58.1,.3,.4,.5,.6,.7或.8,Y71.1,.2,.3,.5,.6,.7或.8; D58.1,.3,.4,.5,.6,.7或.8,E202.1,.3,.4,.5,.6,.7或.8; D58.1,.3,.4,.5,.6,.7或.8,R233.2,.3,.4,.5,.6,.7或.8; H66.2,.3,.4,.5,.6,.7或.8,Y71.1,.2,.3,.5,.6,.7或.8; H66.2,.3,.4,.5,.6,.7或.8,E229.1,.3,.4,.5,.6,.7或.8; H66.2,.3,.4,.5,.6,.7或.8,R233.2,.3,.4,.5,.6,.7或.8; Y71.1,.2,.3,.5,.6,.7或.8,E229.1,.3,.4,.5,.6,.7或.8; 和Y71.1,.2,.3,.5,.6,.7或.8,R233.2,.3,.4,.5,.6,.7或.8.

多重取代的NP 特别有 W50F,Y或H,D58E,N或Q; W50F,Y或H,H66F,Y或W; W50F,Y或H,Y71F,H或W; W50F,Y或H,E229D,N或Q; W50F,Y或H,R233K或H; D58E,N或Q,H66F,Y或H; D58E,N或Q,Y71F,H或W; D58E,N或Q,E229D,N或Q; D58E,N或Q,R233K或H; H66F,Y或W,Y71F,H或W; H66F,Y或W,E229D,N或Q; H66F,Y或W,R233K或H; Y71F,H或W,E229D,N或Q; Y71F,H或W,R233K或H; E229D,N或Q,R233K或H; W50A,K52A; W50A,E229A; W50A,R233A; K52A,K106A,K107A; K52A,D193A,K196A; K52A,E202A; K52A,E229A; K52A,K233A; E229L,R233E; E229L,R233N; E229L,W50K; E229L,K52W; E229A,W50L; E229L,W50M; R233E,W50G; R233E,W50K; R233E,W50K; R233E,W50L; R233E,W50M; R233E,W50R; R233E,W50T; R233E,K52W; W50L,K52A; W50L,K52W; G230C,C231G; C231D,D232C; E202C,C201E; C201A,A200C; 和E229A,R233A.

多重取代NP的进一步示例选自以下：

K52G,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, C, Q, M, F, Y, P, W, R, K 或 H; K52A,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, C, Q, M, F, Y, P, W, R, K 或 H; K52V,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, C, Q, M, F, Y, P, W, R, K 或 H; K52L,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, C, Q, M, F, Y, P, W, R, K 或 H; K52I,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, C, Q, M, F, Y, P, W, R, K 或 H; K52S,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, C, Q, M, F, Y, P, W, R, K 或 H; K52T,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, C, Q, M, F, Y, P, W, R, K 或 H; K52D,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, C, Q, M, F, Y, P, W, R, K 或 H; K52N,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, C, Q, M, F, Y, P, W, R, K 或 H; K52E,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, C, Q, M, F, Y, P, W, R, K 或 H; K52Q,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, C, Q, M, F, Y, P, W, R, K 或 H; K52M,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, C, Q, M, F, Y, P, W, R, K 或 H; K52F,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, C, Q, M, F, Y, P, W, R, K 或 H; K52Y,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, C, Q, M, F, Y, P, W, R, K 或 H; K52P,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, C, Q, M, F, Y, P, W, R, K 或 H; K52W,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, C, Q, M, F, Y, P, W, R, K 或 H; K52R,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, C, Q, M, F, Y, P, W, R, K 或 H; K52H,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, C, Q, M, F, Y, P, W, R, K 或 H; W50G,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, Q, C, M, F, Y, P, W, R, K 或 H; W50A,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, Q, C, M, F, Y, P, W, R, K 或 H; W50V,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, Q, C, M, F, Y, P, W, R, K 或 H; W50L,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, Q, C, M, F, Y, P, W, R, K 或 H; W50I,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, Q, C, M, F, Y, P, W, R, K 或 H; W50S,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, Q, C, M, F, Y, P, W, R, K 或 H; W50T,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, Q, C, M, F, Y, P, W, R, K 或 H; W50D,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, Q, C, M, F, Y, P, W, R, K 或 H; W50N,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, Q, C, M, F, Y, P, W, R, K 或 H; W50E,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, Q, C, M, F, Y, P, W, R, K 或 H; W50Q,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, Q, C, M, F, Y, P, W, R, K 或 H; W50M,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, Q, C, M, F, Y, P, W, R, K 或 H; W50F,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, Q, C, M, F, Y, P, W, R, K 或 H; W50Y,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, Q, C, M, F, Y, P, W, R, K 或 H; W50P,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, Q, C, M, F, Y, P, W, R, K 或 H; W50K,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, Q, C,

M, F, Y, P, W, R, K 或 H; W50R,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, Q, C, M, F, Y, P, W, R, K 或 H; W50H,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, Q, C, M, F, Y, P, W, R, K 或 H; W50G,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E 或 H; W50A,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E 或 H; W50V,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E 或 H; W50L,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E 或 H; W50I,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E 或 H; W50S,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E 或 H; W50T,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E 或 H; W50D,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E 或 H; W50N,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E 或 H; W50E,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E 或 H; W50Q,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E 或 H; W50M,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E 或 H; W50F,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E 或 H; W50Y,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E 或 H; W50P,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E 或 H; W50K,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E 或 H; W50R,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E 或 H; W50H,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E 或 H; E229G,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E 或 H; E229A,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E 或 H; E229V,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E 或 H; E229L,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E 或 H; E229I,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E 或 H; E229S,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E 或 H; E229T,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E 或 H; E229D,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E 或 H; E229N,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E 或 H; E229Q,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E 或 H; E229M,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E 或 H; E229F,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E 或 H; E229Y,R233G,

A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E 或 H; E229P,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E 或 H; E229K,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E 或 H; E229R,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E 或 H; E229H,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E 或 H; 和 E229W,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E 或 H.

在紧邻表 1, 1a 或 1b 中指定的参考序列中任一个位置的凝血酶氨基酸处插入一个或多个氨基酸的 NP 包括在本发明范围内。插入性 NP 一般都有含 $NH_2-PP-A-(X)_{n1}-B-PP-COOH$ 的多肽结构，基中 X 是插入的残基(可以是相同的或不同的)，n1 是整数，A 或 B 是指定要插入的位点，PP 代表 NP 其余部分或 NP N 端或 C 端的一个键。这样的实例包括 K52AA、R233RA、K52KA、K52AK、E229AE、E229EW、E229WE、E229EY、E229YE、G228GE、G228GA、G228GS、G228GAA、G228GAE、G228GSE、G230GA、G230GS、G230GAA 和 E229EA(从 N 端向 C 端读起)。典型的插入见于 E229 10Å范围内，并紧靠表 1b 中任一个残基。插入部分包括从 1 到约 1000 或更多个残基的凝血酶或非凝血酶多肽，虽然这些残基典型地是从 NP A 和/或 B 链的 N 端或 C 端引入。这些多肽包括凝血酶原序列或或其段(无论是人的还是动物的)、为了从细胞培养物中免疫亲和纯化 NP 产物的抗原序列、信号序列以及象下面将要详细介绍的序列。

本发明范围内的 NP 还包括把糖基化位点引入参考序列中或从参考序列中去掉的 NP，无论是通过取代、插入还是缺失一个或几个氨基酸残基。这种变化将导致 NXS 或 NXT 序列的建立或去除，其

中 X 可以是任一残基。因此，可用天冬酰胺取代位于距丝氨酸或苏氨酸 2 个残基的 N－末端方向的任何残基，以引入一个糖基化位点。或者用任何一个残基取代 N53、缺失 F54、用丝氨酸外的任何残基取代 T55，或在 N53 和 T55 之间至少插入一个残基来消除野生型凝血酶 N53 位上的单一糖基化位点。

缺失性 NP 也包括在本发明范围之内，即：其中有一个或几个参考序列中的氨基酸残基在指定的位置上被除去，侧翼的残基按一般方式以肽键连接。表 1 或 1b 中阐述的任何一个位点都适于缺失，虽然一般不优选缺失 P、C 或 G 残基。此外，在有些 NP 实施方案中凝血酶 A 链作为一个整体被选择性地缺失。在本发明实施方案中，缺失在 E229 约 10Å 的范围内进行，包括表 1b 中任何一个残基，优选 A200、E202、Y237、I179、R178、E146、以及 S226。

缺失或插入，典型的都是相对小的，如 1 到 10 个残基，一般不多于 2 个残基，尽管缺失或插入可以是相当大的，即如果根据具体情况，它们不在对促凝或抗凝活性所必须的参考序列部分，或在翻译后或回收后加工过程中把额外的序列去掉。部分缺失或插入的残基数目将取决于它们是否构成象螺旋或折叠的二级结构中的成分(此时，仅有 1 个或优选 2 个残基插入或缺失)，或结构上很少限制的结构域如环状，其中较大数目的残基可以缺失或插入而不会过分扰乱凝血酶的结构。

有缺失、插入和/或取代的结合形式的 NP 也包括在本发明的范围之内。典型情况有，单一残基的缺失将伴随一个在缺失位点上 1 到 3 个残基的插入；较大结构域的缺失可根据具体情况对于促凝活性或 aPC 活性不一定必须伴有一个插入。凝血酶 A 链可选择性从

NP 中缺失，此时 B 链中常规与 A 链形成二硫键的半胱氨酸(C119)被取代或从 B 链中缺失。在 C119 处典型的取代是 R、G、A、V、I、L、S、T、W、D、Q、M、F、Y、P、N、K、E 或 H 中的任一个，但通常是 S、M 或 A。为了有利于表达或回收 NP，所用的大部分插入都应自然伴有在参考序列中的其他修饰，这种修饰对 NP 提供理想的特征，如抗凝或促凝作用。

本发明的 NP 可以进行翻译后共价修饰，如，天冬酰胺或谷氨酰胺的脱氨作用，或半胱氨酸的氧化作用，以及根据用于表达突变体的宿主细胞在 N53 上缺失或变异糖基化作用。含有这种修饰的 NP 都包括在本发明的范围内。假如 N53 是糖基化的，优选用哺乳细胞特征性糖来糖基化，尽管它也可能具有真菌(如酵母)的糖基化模式。由成纤细胞、肾细胞、肺细胞、皮肤细胞、神经细胞、肝细胞或骨髓细胞或细胞系，或任何哺乳细胞系如 CHO 或胚肾细胞表达的 NP 糖基化特性都是可接受的。

凝血酶体内清除的一个主要机制是形成凝血酶－AT－Ⅲ复合物，这主要依赖细胞表面的肝素样分子。我们预期突变凝血酶的肝素结合位点将阻止肝素结合，从而延长这种蛋白的血浆半衰期。临床上，这种降低达到抗血栓形成效果所需的蛋白量。在这一实施方案中，使肝素结合位点突变，以使 NP 不再能够显著结合肝素。这通过至少在已知肝素结合结构域上的一个或几个残基的缺失、取代或插入而完成(包括 R89、R180、R245、K248 和 K252)。有抗性的 NP 包括能导致把新 O－或 N－连接的糖基化位点(NXS/T)引进结合区的取代或插入(如 R180N)。

表 1 显示两个涉及三重丙氨酸取代的突变体对由肝素介导的

AT－Ⅲ抑制有抵抗作用，显示在肝素存在下纤维蛋白原凝集活性大于50%，而野生型凝血酶为18%。其中一个这样的突变体同时有R178、R180和D183取代，显示出促凝活性或抗凝活性没有降低。最佳的突变体是通过筛选对肝素介导的抑制的最大抗性（特别是在抗凝血酶Ⅲ存在下）而鉴定出来的。此类变体可选择性地与上述介绍的各种变异结合，如：那些表现出促凝活性与抗凝活性相比有所降低的突变。这样的NP和肝素结合服用会取得强抗凝效果，其中抗凝途径由NP所激活，内源性凝血酶的促凝活性被肝素介素的AT－Ⅲ抑制。

新型多肽的制备和筛选

理想的NP显示调节的纤维蛋白原凝集或aPC活性、降低的肝素抑制作用、改变的酶解血小板凝血酶受体的能力和其他理想特性，这些NP可通过用本发明中介绍的体外相关试验筛选候选物而鉴别出来，然后必要时在动物中检测再确定在血栓形成或出血试验中的有效性。外源aPC可用作阳性对照。然后任选在已证明aPC灌注有效的动物模型如兔、豚鼠、狒狒败血病休克或动脉血栓形成模型中直接检测选出的NP。此外这种NP的抗凝效力可在心肺分流术模型中测定。这些试验是常规的，并在本领域内已广为人知。不需要做过多的试验来制备和检测那些本发明具体公开以外的NP。

本发明NP很容易用本领域已知的方法制备。通常，编码NP的核酸通过PCR、体外合成、克隆、结合前三者而制备，若有必要还包括编码凝血酶核酸的定点突变。在体外系统或重组宿主细胞中表达。表达方法之一是用特定tRNA进行基于核糖体的合成（Benner，"TIBTECB"12：158－163（1994）和Robetson等，"J. Am. chem.

Soc." 113:2722－2729(1991)),但通常是:编码 NP 的核酸(常为 DNA)被插入到适当的表达载体中,用此重组载体转染宿主细胞,并在适当培养基中培养此细胞,通过层析或其他纯化方法从重组细胞培养物中回收具有所需氨基酸序列的 NP。本发明也包括在重组细胞培养中或通过体外方法部分合成 NP,然后用多肽连接酶进行多肽片段的连接(逆蛋白水解合成)。

表达 NP 的核酸典型地编码含有所需突变的前凝血酶原,因为这有利于表达和用现有的用于凝血酶的方法加工。此外,"无 gla 区"凝血酶原的重组表达的已知方法很适于制备本发明的 NP。本发明也包括表达编码下述任何 NP 类似物的核酸,(a)前凝血酶－2(α－凝血酶)或前凝血酶－1,(b)"meizothrombin des 1"的双链序列(可表达一条从 S156(Degen et al)一直延伸到编码 B 链的核酸的 3'末端的单链,或共表达分别编码 S156 片段和凝血酶 B 链的核酸),(c)凝血酶(表达编码 A 链和 B 链的一条单链,或在相同细胞中共表达分别编码 A、B 链的核酸),或(d)无 A 链的凝血酶 B 链。"分别编码"这里指编码 A 链和 B 链的核酸至少被一个终止密码子所分离,若必要,下游核酸(通常为 B 链)从一个起始密码子开始。然而应注意的是,细菌多顺反子表达盒可不需要下游编码序列的起始密码子。独立地表达两链的合适的载体和宿主细胞在美国专利 4,923,805 描述过。这种异双体的表达系统通常是哺乳动物。

多顺反子表达系统用于包括上述凝血酶两条链序列的单一细胞共表达。这些系统本身是已知的,尤其用于在细胞培养中独立合成 PN 的 A、B 链,从而不需要翻译后的加工。在这种情形下,通常两条链在相同表达调控序列指导下表达(链与表达调解序列可在相同或

不同的载体上)。然而,编码每条链的核酸需要含有自身起始密码子,更可取的是,每个核酸都编码它自身的信号序列。

任选地 NP 作为 α-凝血酶前蛋白或分离的 A 链 B 链被表达,从而 NP 作为前体表达并加工成成熟 NP,并且从宿主细胞中分泌出来。在此所用的前序列或信号序列包括与凝血酶基因来源相关的天然的前序列,例如:前凝血酶原的人前序列;或含有与该凝血酶原信号的序列或来源不同的氨基酸序列的前序列。合适的前序列包括:(a) 微生物蛋白酶的,如枯草杆菌蛋白酶,(b) 哺乳动物蛋白酶的,例如胰蛋白酶、糜蛋白酶、纤溶酶包括尿激酶或 tPA,还有凝血因子如因子 V、X、IX、VⅡ、VⅢ或纤维蛋白原,(c)细胞因子的,例如:γ-干扰素或白细胞介素,(d) 生长因子的,如生长激素或 TGF-α,(e)多肽或具有与人凝血酶 A、B 链同源的 N 末端成熟序列的蛋白的,(f)免疫球蛋白的,(g) 受体的,(h) 其他分泌的或细胞膜结合蛋白的前序列,或(i) 用于指导无 gla 区凝血酶原分泌的已知的前序列(WO 93/13208 的第 11 页 30 行到第 12 页 21 行)。任意选择的信号序列来自宿主细胞,或至少宿主细胞所属种系分支或与之同源。例如,人们常在酵母表达系统中使用酵母蛋白的前序列,比如交配因子,或在细菌表达系统中用细菌的前序列,比如 ST-Ⅱ或 β-内酰胺酶。从有与成熟凝血酶 A、B 链相同的成熟 N-末端残基的异源多肽中选择信号,并且使用那些带有 N 末端同源凝血酶链的信号是很理想的。多种多样的合适的信号序列已为人知,并且可用在本发明提到的 NP 的制备方法中。

编码分泌型 NP 的核酸结构通常可编码凝血酶 A 或 B 链,A、B 链的 N 末端与相同或不同信号序列的正常 C 末端熔合。按本领域

普遍已知的那样，它们在表达调控序列如启动子、操纵子、增强子多聚苷酸序列的调节下被拼接入表达载体。构建合适的表达载体用来分泌性或在胞质中表达本发明 NP 对本领域技术人员是常规操作，可用常规的分子生物学工具来完成，包括体外核酸的合成、PCR、接头、连接酶、限制性内切酶、表达和穿梭质粒、转染工具等，所有这些都是公众可得到的(大部分有商品供应)。

用于给定重组宿主细胞表达 NP 的合适启动子、增强子、终止序列和其他功能子是人们已熟知的，适于用编码所需 NP 的核酸转染的宿主细胞也是已知的。有一些已在上述提到，另一些则在 WO93/13208 第 12 页 21 行到第 19 页 5 行和 EP319,312B1 第 16 页 10—18 行和表Ⅱ中有述。使用能使 NP 糖基化的宿主细胞是很理想的，典型的这些细胞包括哺乳动物细胞，如人胚肾 293 细胞，COS 细胞，CHO，BHK—21 细胞等等。另外，以前已用来在重组细胞培养中表达蛋白水解酶或酶原的宿主细胞，或已知在非重组培养中高水平表达这种酶或酶原的宿主细胞都是适合的。后一种情形下，如果内源性酶或酶原很难与 NP 分离开，那么内源性基因应通过同源重组而被去除，或其表达通过编码反义序列的核酸共转染宿主细胞而受抑制，这里的反义序列是编码不需要的多肽的 RNA 的互补序列。此时最好用高水平表达内源性基因的表达调控序列(如启动子、增强子等等)对 NP 的表达进行调控。

应选择宿主载体系统以生成基本一致的 NP，这样就避免了从其他同种异型 NP 中纯化单分子种的需求。如果细胞能够糖基化，那么基本上所有的 NP 分子都应被糖基化。此外，最好选择(在相关细胞室中)没有能　链内裂解凝血酶 A、B 链的蛋白分解活性的宿主

细胞。选择的细胞不含有蛋白酶，例如在胞质中这种蛋白酶将在凝血酶BR62、R123、R73或K154后裂解，已知所有上述位点都是B链降解的位点。例如，已知大肠杆菌和其他微生物株就很少或不含细胞外或胞质的蛋白分解活性(除信号多肽酶外)。这样的细胞最好用于以下表达系统中，其中A链和B链与相同或不同信号序列融合、在同一宿主细胞中表达。A链、B链被共同分泌进胞质或细胞外基质，它们在那里形成二硫键。有害蛋白酶的缺乏有助于确保产物不受作用于NP的宿主内源性蛋白酶的影响而对链长产生微小异质性，但是A、B链的独立分泌不依赖这些细胞。此外，或替代地，A或B链的碱性残基也就是蛋白酶解的位点被一些K或R以外的残基所取代。例如，据报导K154是在γ－凝血酶转化中酶解的位点之一(Colman etal.,"Hemostasis and Thrombosis",P.154(1987))。上表1表明K154被A取代而活性没有明显的变化。因此K154可被R以外的其他残基所取代以提供对蛋白水解降解的耐性(还有其他任何需要的变异)。这也可延长NP的体内寿命。

重组细胞在常规条件下，用以前已用于目的细胞的常规培养基进行培养。这些条件和培养基已广为人知。新转染的细胞只可以短暂地表达NP，而稳定的转化子很容易按传统的操作获到：用一个选择基因如DHIR或谷胺酰胺合成酶共转化，并且在选择剂存在下连续培养，选择剂例如分别为氨甲喋呤或甲硫氨酸Sulfoximine。在取代基和插入特性的微小差异，NP的产率就可有显著差别。在这种情形下，对筛选产生的凝血酶量至少为参考凝血酶在相同表达系统中所得量的75%的表达系统是有利的。有时这体系可用来在低于常规37℃，常在约10℃～30℃，最佳在15℃～27℃下培养细胞。微

生物或哺乳动物细胞就是如此。

优选NP作为一适当组装的、二硫键连结的凝血酶A和B链类似物或作为单独B链类似物被表达。NP通常是水溶性的。它在细菌中以折射体的形式表达,这种情形下回收不溶的NP,并用已知的方法重新折叠,例如通过溶解在盐酸胍中,然后渐渐移去变性剂。本发明直接表达的NP可有一额外的N末端蛋氨酸或封闭的蛋氨酸残基,尽管可使用能裂解这样的外源N末端蛋氨酸残基的宿主细胞。

如果A、B链融合起来,例如当NP作为α—凝血酶类似物被表达时,那么为激活前体酶原成为蛋白水解活性的NP,需要翻译后的蛋白水解加工过程。这样的前体类似于天然凝血酶原,或者可以是一条或两条与凝血酶异源性多肽融合的NP链,如信号序列的情形。宿主细胞培养自身就可完成蛋白水解活化和/或加工,也可在NP前体回收(有或无NP前体的纯化)以后完成。翻译后的蛋白水解加工(或在宿主细胞培养中,或在NP前体初步回收以后)用来除去一些凝血酶原(或凝血酶原异源性)序列,这些序列的N末端与NP A或B链融合,或插入在NP前体的其他地方(例如:利于纯化的抗原标记)。NP前体可被一种酶或多种酶水解,这些酶能够在NP A、B链内正确裂解,没有过多的或不需要的水解作用。通常,用来除去前序列、激活天然凝血酶原的合适的酶见于龙状蝰蛇毒液中。因子Xa也用于活化NP前体。NP成熟B链或共表达的成熟个体A、B链不需要蛋白水解活化。

用不同蛋白酶或凝血酶自身识别并酶解的另一序列来取代凝血酶活化区(因子Xa裂解位点)有利于NP前体的蛋白水解活化。用于本发明NP的适当取代的活化位点在WO93/13208,第9页21行

到第 10 页 17 行中有述。在 WO93/13208 中注意到，因为酵母能表达 KEX2 并且可在活化位点处内源性裂解凝血酶前体，因此，用酵母 KEX2 位点取代凝血酶原中凝血酶活化位点是值得注意的。能适当取代凝血酶活化区域的其他序列公开在 EP319,312 B1 的表 1 中。作为 NP 或其前体细胞培养加工的一部分，这些序列被细胞膜结合的蛋白酶所裂解。

在 NP 或其前体表达或纯化中注意时间都可进行蛋白水解活化，尤其在 NP 前体从细胞或细胞培养上清纯化后进行。注意，含有一新的二元位点(由 R 或 K 残基插入或取代进入凝血酶序列而产生的)的 NP 可能对不会裂解天然凝血酶的酶的水解作用敏感，从而降低了表达或活化中的产率。此时需要选择一表达系统和/或一个有不同底物特异性的激活酶以减少偶发的裂解。

从重组宿主细胞培养产生的 NP 量根据许多因素变化，包括培养条件和 NP 本身性质。理想的是，培养产生的 NP 按重量计应大于参考凝血酶的一半(优选大于 75%)。

不需进一步纯化，在诊断上使用重组细胞的含 NP 的、活化的、浓缩的条件培养液是可能的。然而，想要治疗用的 NP 应用以前用于凝血酶或其他蛋白质的方法进行分离纯化，例如：天然或还原性/SDS 电泳，等电聚焦，固定 PH 梯度电泳，盐析，溶剂抽提(用乙醇等)和层析，如凝胶过滤，离子交换(阳离子或阴离子)，配体亲和层析(cibacron 蓝 F3GA 或对氨基苄脒)、免疫亲和层析，色谱聚焦，反相或疏水作用层析。适当的方法公开在 Colman 等，“Hlemostasis and Thrombosis”，P.148(1987)中，和其中引用的参考文献中，WO93/13208 第 19 页 33 行到 21 页 25 行及其他常规来源。活化酶(如果有

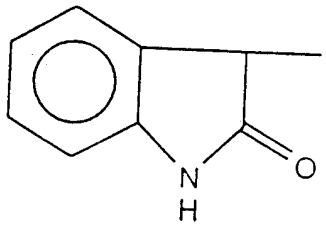
的话)在随后的纯化步骤中被固定或除去。一般分离 NP 使纯度按蛋白重量计大于 95%,优选大于 99%。

NP 或其片段也可在体外制备,尤其当它们较小时,如约 30 个残基或更少时。但更大些的完整 NP 也可在体外过程中制备。例如,较小的 NP 用 Merrifield "J. Am. Chem. Soc."85:2149(1963)描述的标准固相肽合成操作进行合成而制备。然后用多肽连接酶连在一起(逆蛋白水解)。蛋白合成的体外方法也可用于制备 NP,而不需要重组细胞培养。这些方法对小规模制备有用,有利于降低宿主细胞蛋白酶对产率的可能影响。体外 NP 蛋白合成还有另一重要优点是可在特异性位点向 NP 中引进非天然氨基酸残基(Benner, 和 Robertson etal.,如上所引用)。因此本文使用"氨基酸残基"一词(有关取代或插入对凝血酶的修饰,尤其是单个氨基酸取代或插入)时,应认识到该氨基酸不限于与天然 tRNA 结合的天然残基。Robertson 等所述氨基酰基 tRNA 可用多种非天然氨基酸残基有效制备("非天然"指不在蛋白质中天然存在的,尽管在生物系统本身可以发现该氨基酸)。因为该 tRNA 被选择结合一个不被蛋白合成中任何普通 tRNA 识别的密码子,选择的非天然氨基酸残基只结合在 NP 序列中该独特密码子选定的特殊位点。这样,NP 被在所需的独特插入或取代位点含一无义密码子(如 UAG)的核酸编码。被适当结合的非天然氨基酸例如描述在 Greenstein 等"Chemistry of the Amino Acids"Vols. 1-3, 1986 中。通常,人们可以用药学上无毒的,天然存在但通常不被结合进蛋白质的 L-氨基酸。这样的氨基酸结构上与在给定位点产生所需效果的天然残基有关,用于进一步分离和完善所需的 NP 特性。

本发明的NP也包括被一非肽部分取代的凝血酶，或者其目的是开始制备NP时使用，或对如本文别处描述的那样通过氨基酸取代、插入或缺失制备的NP作随后的修饰。凝血酶或其组成链或亚片段的共价修饰可制备NP本身。既然我们已经确定了凝血酶促凝与抗凝功能中涉及的主要残基，本发明也包括在这样的位点引入共价修饰，以达到用天然残基产生相应的定点突变所达到的相同目的。例如：含有羧基的残基如E229侧链通过与碳二亚胺(R′－N＝C－R′，R和R′是不同的烷基)反应而衍生化，或通过与氨或取代的胺反应而被酰胺化。

如R233和K52的碱性侧链也可被衍生化。如，R233D和E是很好的PCA，其中正电侧链已被负电侧链所取代。相似的电荷逆转通过用氯乙酸取代凝血酶R233或K52而完成。赖氨酸残基用乙酸酐进行乙酰化。

凝血酶中色氨酸是一个很稀有的氨基酸。因此，W50是翻译后共价修饰的优选位点，因为预期在具有更普通残基的其他位点的取代成功的可能性较小。W50与氧化剂如卤素供体如溴反应，将产生如下侧链结构。此反应应在水性溶剂中和低卤素浓度下进行。



为得到本发明的NP，NP或凝血酶的其他共价修饰对本领域技

术人员来说是显而易见的。不需要起反应的侧链通过用抗体直接对抗含有残基的表位而被保护。为完成这样的修饰所用试剂已为人知并广泛应用于诊断和制备领域。见 T. Creighton, Proteins: Structure and Moleculer Properties, 1983。

共价修饰也可用于达到制备具有分离的底物特性之外的目标。例如将 NP 与水不溶性基质交联使其不溶。这通过 NP 和基质与形成共价交联的双功能试剂反应来完成。合适的试剂例如有：1,1－双(重氮基乙酰)－α－苯乙烷，戊二醛、N－羟基琥珀酰亚胺酯，如与 4－叠氮基水杨酸的酯，均双功能性酰亚胺酯，包括二琥珀酰亚胺酯如 3,3′一二硫代二(琥珀酰亚胺基丙酸酯)，和双官能马来酰亚胺如二—N－马来酰亚氨基－1,8－辛烷。衍生化试剂如 3－[(对叠氮苯基)二硫代]丙酰亚氨酸甲酯产生光敏中间体，该中间体在光存在下能形成交联。或者将 NP 固定在反应活性水不溶性基质中，如溴化氰活化的碳水化合物和 US 3,969,287;3691016;4195128,4247642,4229537 和 4330440 中描述的反应性底物。

也可通过将 NP 与各种非蛋白聚合物相连而共价修饰，例如：聚乙二醇，聚丙二醇或聚氧亚烷基，按 U. S 4640835, 4496689, 4301144,4670417,4791192,4179337 中所阐述方法进行。

体内 NP 的循环半衰期可以通过把 NP 连在能提供延长的半衰期的聚合物上而被延长，例如聚乙二醇(PEG)。PEG 是一个非免疫原性的、线性的，不带电荷的聚合物，每个氧化乙烯单位含 3 个水分子。(Maxfield, et al., "Polymer" 16: 505 - 509 (1975); Bailey, F. E et. al., "Nonionic Surfactants", Schick, M. J. ed, pp. 794 - 821 (1967))。一些治疗性酶已被偶联到 PEG 上以提高他们的体内半衰

期(Abuchowski, A. et al., "J. Biol. Chem":252:3582－3586(1977); Abuchowshi, A. et al., "Cancer Biochem. Biophys." 7: 175 － 186 (1984)). 一个 IL－2－PEG 偶合物已被报导增加了循环时间和效力 (Katre, N. V. et al. "Proc. Natl. Acad. Sci." 84: 1487 － 1491(1987); Goodson. R. et al., "Biol/Technology" 8: 343 － 346(1990))。另见 Abuchowski, A. et al., "J. Biol. Chem" 252:3578－3581(1977)。这些文献中所用的 PEG 偶联方法中任一种方法对本发明的 NP 都适用。

最后,在诊断学应用中通过与以前用于诊断学检测的可检测基团交联而对 NP 共价修饰,详述见下文。

本发明 NP 的应用

本发明的 NP 用于治疗、诊断和预防方法。其用途依赖于其具有的特性,这对本领域普通技术人员是显而易见的。大部分情形下,所有的 NP 将保留凝血酶的免疫表位,因此在凝血酶的免疫检测中 NP 可用来代替凝血酶,无论它们是否落在本文所用的 PCA 或 FCP 的定义中,也无论他们是否具有蛋白水解活性。另外,PCA 与 FCP 具有专门的治疗应用。

抗凝剂 NP,特别是 PCA,用来改善或阻止不良的凝块。它们有效地活化内源性蛋白 C 途径,作为一种强抗凝剂通过产生外源 aPC 使 FVa、FVⅢa 失活,并且通过使 PAI－1 失活增强了 tPA 介导的纤维蛋白溶解作用。这种 NP,尤其是 PCA 的临床适应症,包括血栓性疾病或另一些情况,如败血症休克、冠状溶栓和血管成形术的辅助治疗,肺栓塞、短暂的局部缺血和中风,不稳定心绞痛,心肌梗塞,深静脉血栓和各种动、静脉血栓。在败血性休克治疗方法中,抗凝剂 NP 给深度败血症者服用(革兰氏阳性、阴性菌、真菌的感染),例如病人

表现体征是高热，低压，DIC，肾功能不全和/或 ARDS。抗凝剂 NP 尤其是 PCA，用于到以前 aPC 的任何应用中。这可见 EP191606B1 中 P13L52－P15L32。为治疗应用，将抗凝剂 NP 尤其是 PCA 给予哺乳动物，尤其是人，以药物可接受剂型及治疗有效剂量进行给药。抗凝剂 NP 可作为一个浓缩药团静脉内给药或一段时间的连续输注，或肌内、皮下、动脉内、滑膜内、鞘内、表皮、吸入途径等。抗凝 NP 也适于导管给药主要起局部抗凝作用。

抗凝剂 NP 也用在凝血疾病的诊断上。在病人中发现的大部分高凝状态并不能归因于特异的分子缺陷。许多有血栓发作倾向的病人是由于出生先天的蛋白 C 激活途径组分的缺陷，这样的病人目前很难诊断。PCA 特别用在缺陷的活化蛋白 C 途径和途径某一成分缺乏的诊断。在此实施方案中，这些病人并不急需抗凝治疗，但可以被了解已有未知起因的过度血栓形成倾向。给病人服用抗凝剂 NP，如 PCA，病人血液抗凝状态在 PCA 有时间起作用后测定。PCA 的剂量基本上与在一般病人诱导可检测的抗凝作用有效的 PCA 量相同。基本上在与一般病人体内诱导可检测的抗凝作用相同的时间检测病人的抗凝状态。血液凝固的任何检测方法都适合，如 aPTT 等等。如果 PCA 不能成功地诱导病人血液可检测抗凝作用，那么可能病人有血栓调节素—蛋白 C 抗凝途径的缺陷。在另一实施方案中，将可溶的 TM 与 PCA 共同给药，确定哪一蛋白能克服缺陷并产生缺陷部位的信息。如果 TM 与 NP 诱导抗凝，而蛋白 C 与 NP 不能，则可作出结论受试者的 TM 是缺陷的。

促凝血的 NP 作为促凝剂用于任何目的的治疗。例如，它们被渗透进敷料、绷带等中，或用于表皮给药的其他剂型中。FCP 在大

块实质性肿瘤的血栓形成性治疗中作为血栓形成促进剂也是有效的。如U.S专利5,147,638中描述,FCP可用来取代C4b结合蛋白、或抗aPC抗体,最理想的是与细胞因子结合,例如TNF－α、TNF－β、γ－IFN,IL－1,IL－2和/或GM/CSF。FCP的剂量将被调节到可诱导肿瘤内凝血,但在其他地方不产生临床上明显的凝血。依赖于内源激活的NP原型也可用于此方法中。

NP的剂型是那些其他蛋白治疗所用的常规剂型。NP应是无菌的,最好是放在无菌的容器中(如,用橡胶塞子密封的小瓶),并含有无毒的药用载体,包括盐和溶剂。这种载体的例子包括离子交换剂,氧化铝,硬脂酸铝,卵磷脂,血清蛋白如人血白蛋白,缓冲液如磷酸盐,甘氨酸、精氨酸、赖氨酚、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的部分甘油酯混合物、水、碱金属盐,或电解质如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐、硅胶、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素类物质和聚乙二醇。NP的凝胶形成或表皮给药剂型的载体包括:多糖如羧甲基纤维素钠或甲基纤维素,PVP,聚丙烯酸盐,聚氧乙烯—聚氧丙烯嵌段聚合物,FEG和木蜡醇。可使用常规的储存形式,例如包括微胶束、纳胶束、脂质体、膏药、吸入剂型、鼻喷雾剂、舌下片剂。在这类载体中一般将NP配制成浓度约1～150μmol或1～200mg/ml。特别当(一般情况如此)NP含有连接A、B链的二硫键或在B链内存在二硫键时,最好还包含抗氧化剂如抗坏血酸。应选择适当的制剂pH值使脱酰氨作用和自身水解作用达到最低限度,通常pH值约为5～8。另外制剂最好是冻干的,但也可以水溶液的形式制备和贮存。

预防或治疗血栓形成的抗凝NP的合适剂量取决于残余促凝活

性的量(如果有的话)、血栓形成的部位及性质或待治疗的预期血栓形成、凝血疾病的严重程度和病程、抗凝 NP 用于预防还是治疗、以前治疗的特点和进程、NP 在循环中的半衰期、其它治疗方法或抗凝剂的应用、NP 给药部位(局部剂量低于全身剂量)、患者对 NP 的应答、NP 是否依赖内源性凝血酶原激活途径(即提供的凝血酶 NP 是相应的凝血酶原或其非活化的片段)或其它主治大夫用于判断的考虑因素。因为 PCA 是一种活性酶,抗凝血作用所需的量是很小的,在 5－10nM 范围内(血浆终浓度),实际上我们用兔子做实验得出的结果是 K52A PCA 在血浆水平 3—9nM 范围内产生抗凝治疗作用,E229A PCA 试验结果相似。与其它抗凝血大分子如水蛭素(100—800nM)或 GS－522〔一种凝血酶结合性 DNA aptamer(2000—4000nM;PCT US 92/01367)〕相比,该结果非常有利。我们初步的猴子试验证实,灵长类 PCA 剂量约为 0.05U/kg/min 到 20U/kg/min,主要取决于残留血纤维蛋白原降解活性(尤其在低剂量时,这将对防止纤维蛋白原的消耗和血小板激活起作用)和 aPC 活性的效力(PCA 保留了大部分野生型 aPC 活性并将在低剂量范围内使用)。1U 等于对 S－2238 酰胺分解活性为 1 NIH 单位(凝血活性)野生型凝血酶时的量(见实施例 4)。

本发明中的 NP 并不期望具有免疫原性,因为在本申请的具体实施方案中只有少数关键残基被修饰(少于 5 个)或被糖基化覆盖。高度保守的单一取代(例如 E229D)尤其如此。有些 NP 的半衰期可能非常短,这就需要将它们连续地输注(野生型凝血酶的血浆半衰期可能极短,为几秒)。然而,在有些情形下,这可能具有临床上的优点,因为这就免除了当患者出现出血现象时对凝血酶抑制剂的需要。

PCA在比人类低级的灵长类动物或其它动物中，适当剂量给药后90—180分钟内具有抗凝血效应。因此PCA通过一次注射或短时间(如10分钟)输注给药是可行的。但是连续输液仍在本发明范围内。

促凝或抗凝NP适于给患者一次或进行系列治疗。根据条件，可几天或更长时间内重复给药，一直到取得满意抗凝或促凝血效果为止。

根据本发明的另一个具体实施方案，本发明的化合物作为促凝或抗凝剂的效力可通过将此化合物与另一种药或对相关目的有效的医疗措施顺序或同时给药而得以提高。PCA可与其它已知抗凝剂如肝素、第十因子(Factor X)抑制剂、血小板凝集抑制剂等联合使用，还可与其它溶栓治疗药联合应用，如tPA、脲激酶或链蛋白激酶或气球血管成形术或其它促血块溶解的方法、动脉粥样硬化症斑治疗或血管内壁的操作或接触。

本发明NP可用来鉴别与凝血酶靶位结合的物质(凝血酶结合的配体，即TBP)。特别有意义的是那些与凝血酶PC激活区结合而不与促凝区结合或与之正好相反的物质。在一优选实施方案中，它们与凝血酶结合并显著抑制凝血酶的促凝血活性，而不相当地抑制它的PC激活功能。但这并不意味着TBP必须保持凝血酶PC激活功能完全不受抑制。此时所需要的只是PC激活被抑制的程度必须低于促凝血功能。典型的TBP将抑制靶凝血酶的蛋白分解活性，使PC活化与促凝血活性的比率小于0.5或大于2.0。TBP通常为二种类型的聚合物：多肽或寡核苷酸，但基本上不受限制地含有分子量小于1500的任何物质。TBP具有诊断学价值，可间接标记凝血酶

或从试验样品中将凝血酶与其它物质分离。TBP 与凝血酶结合的能力还可用于从污染的混合物如重组凝血酶表达细胞的细胞培养上清(其中包括凝血酶氨基酸序列 NP)中回收凝血酶。典型地,在凝血酶免疫分析中,如果 NP 具有被所述凝血酶免疫分析中所用抗体识别的至少一个凝血酶表位,NP 可用来替换凝血酶标准品,而 TBP 替换抗凝血酶抗体。NP 还可用于特定单个凝血酶特性的功能分析,例如它的促凝血活性,只要 NP 保留有促凝血活性。

典型的多肽类 TBP 能特异结合 FCP 而不能结合 PCA 的多肽或蛋白质。因此它们是凝血酶的 aPC 功能或促凝血功能的高度特异性抑制剂。

肽类 TBP 是通过应用体外直接演化方法获得的,如应用丝状噬菌体显示候选序列(或称作噬菌体显示法)以及依赖系统发生和筛选肽活性的本身已知的相似方法。这些通常都是很小的分子,大约含 5 到 20 个残基。本发明的 FCP 和 PCA 多肽,以用于筛选寡核苷酸类 TBP 的同样的总体方法,也可用于筛选这样的肽类 TBP。

抗体类 TBP 为免疫球蛋白,通常是单克隆抗体,能特异地抑制凝血酶的促凝或 aPC 功能。这些抗体是用含有参考序列凝血酶的一种蛋白组合物诱导的。为了得到一种抗凝剂抗体,以 PCA 吸附抗体混合物,不与 PCA 有效结合的抗体(但显示凝集抑制功能)便被获得。这些抗体必然针对纤维蛋白原裂解表位。促凝剂抗体的制备也采用相似的方法。

这里所讲的"单克隆抗体"是指从大量均一抗体群中获得的抗体,即抗体群中的单个抗体具有基本同一的特异性和亲和性。单克隆抗体包括杂合和重组抗体(如"人源化抗体"),而不管其来源或免

疫球蛋白种类或亚类归属，以及抗体片段（如 Fab、$F(ab')_2$ 和 F_V）。因此，“单克隆”抗体可用产生大量均一群体的特定方法生产。例如，单克隆抗体可用参考文献中描述的方法制备：Kohler 和 Milstein，“Nature”256：495（1975），Goding，Monoclonal Antibodies：Principles and Practice pp. 53 - 103（1986），Kozbor，“J Immunol.”133：3001（1984），或 Bradeur 等，Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications pp. 51—63（1987），或者可用重组 DNA 方法制备。Cabilly 等 U.S.Pat.NO.4,816,567。

在本发明一种优选实施方案中，单克隆抗体对参考序列凝血酶的亲和力至少为 10^9 摩尔/升，例如采用 Munson & Pollard，“Anal. Bichem.”107：220（1980）的 Scatchard 分析方法测定。另外，单克隆抗体对凝血酶的促凝或抗凝活性的抑制率至少为 50%，优选大于 80%，最优选大于 90%，例如，采用本文透露的 PC 激活分析或凝血酶时间测定法测定。

编码单克隆抗体的 DNA 易于采用常规方法分离并测定序列（如，应用能与编码鼠抗体重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针）。上述 DNA 优选来自杂交瘤细胞。分离出的 DNA 可插入到表达载体中，再将重组载体转染到猴 COS 细胞、中国仓鼠卵巢（CHO）细胞或不另外产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞等宿主细胞中，以便在重组宿主细胞中合成单克隆抗体。

对 DNA 进行选择性修饰，以便改变其表达产物——免疫球蛋白的特征。例如，将鼠抗体可变区的互补决定区（CDR）改变成人抗体的相应区从而产生“人源”形式的鼠抗体。在一些方案中，选定的鼠抗体框架区（framework region（FR））的氨基酸残基也被相应的人

抗体中的氨基酸残基所取代。鼠抗体的"人源"形式也可以通过以人抗体重链和轻链稳定区编码序列取代鼠抗体的同源序列而产生，见Morrison 等，"PNAS"81:6651(1984)。

结合靶蛋白的寡核苷酸的演化选择方法是众所周知的，WO92/14843;Ellington 等，"Nature"355:850(1992);Bock 等，"Nature"355:564(1992);Ellington 等，"Nature"346:818(1990);Tuerk 等;"Science"249:505(1990)。这些寡核苷酸通常称作 aptamers，一般含有常见的 A、T、G、C 或 U 碱基或其衍生物，具有与靶蛋白预定位点结合的序列。此时，FCP 与 PCA 在阴性(不结合)和阳性(结合)选择方法中用来产生 TBP，如特异性抑制凝集或 aPC 活性的 aptamer。一种抑制凝血酶促凝功能(但基本不干扰其抗凝剂活性)的 TBP 选择方法，包括(a)制备候选混合物(寡核苷酸、肽、提取物、蛋白质等);(b)将候选物与具促凝血活性(一般为参考序列凝血酶)的凝血酶接触;(c)将能结合凝血酶的候选物与凝血酶分离;(d)将步骤(c)中得到的候选物与因突变而基本失去凝血酶促凝血功能的 NP 如 PCA 接触;(e)回收那些不与 PCA 结合的候选物。这样可以保证选择出的所有候选物都能结合到与 PCA 多肽不同的氨基酸位点，即对凝血酶的促凝血功能关键的残基。或者，富含潜在抗凝剂 TBP 的一种候选物或混合物可以这样选择:(a)制备结合配体的候选物混合物(如上);(b)将候选物与具有促凝血活性的凝血酶接触(典型的为参考序列凝血酶);(c)将与凝血酶结合的候选物与凝血酶分离;(d)将步骤(c)中的候选物与因突变而基本失去 PC 激活功能的凝血酶 NP，如 FCP 接触;(e)回收那些与 FCP 结合的候选物。这样，所得到的候选物混合物富含或选出了不与在 PC 激活位点有突变残基的凝血酶结

合的候选物。这些候选物混合物再进行抗凝剂活性选择，例如，通过进一步选择不与 PCA 结合的 TBP。最后，这将富集或者选择出与 PC 激活位点不结合但与凝血酶的促凝残基结合的候选 TBP。步骤(c)和(d)在两种方法中可选择性地倒置。

抑制凝血酶蛋白 C 激活功能的 TBP，通过一个类似上述富集具有抑制促凝血功能的 TBP 的方法选择，如选择结合凝血酶而不结合 FCP 的 TBP。

结合步骤大部分情况采用固定化 NP 进行，典型地按众所周知的方法将 NP 通过其糖基取代基或其 N－末端或 C－末端吸附到不溶性载体上(例如，伴刀豆蛋白 A 琼脂糖固定法，再用 α－甲基甘露糖苷洗脱，Bock 等，op cit)。

当候选物是可进行复制的物质时，如丝状显示噬菌体或寡核苷酸，可以选择性地在步骤(c)和(d)之间插入一步或多个步骤对选择的或分离的候选物混合进行扩增。而通常在这些步骤中间，候选物并不进行扩增。另外，重复(a)至(e)步骤是需要的，而且多数情况下，在步骤(e)和(a)之间插入一个扩增步骤。扩增(寡核苷酸类候选物通常以 PCR 方法扩增)对于富集其所选择功能的混合物是有用的。

FCP 和 PCA 在制备 TBP 中是非常有用的中间体。

在诊断应用方面，TBP 或本发明中的 NP 可选择性地用可检测的物质进行标记。可检测的物质可以是直接或间接产生可检测信号的任何取代基。例如，可检测的物质可以是放射性同位素，如^{3}H、^{14}C、^{32}P、^{35}S 和^{125}I；荧光或化学发光化合物，如异硫氰酸荧光素、若丹明或荧光素；放射性同位素标记物，如^{125}I、^{32}P、^{14}C 或^{3}H、；或酶，如碱

性磷酸酶、β－半乳糖苷酶或辣根过氧化物酶。

本领域中本身已知的各种方法均适用于用可检测物质标记TBP或NP，参阅以下文献所述方法：以上文献以及Hunter等，"Nature"144：945(1962)；David等，"Biochemistry"13：1014(1974)；Pain等，"J. Immunol. Meth."40：219(1981)；和Nygren, J. "Histochem. and Cytochem."30：407(1982)。寡核苷酸类TBP采用以前用于诊断探针领域中的常规方式进行标记。

标记的NP应用于例如结合凝血酶的蛋白如抗体的检测。另外，非标记NP与抗分析物抗体连接(共价结合或免疫吸附)或与分析物结合受体连接，由于它们能降解那些易用荧光或比色方法测定的已标记的肽，这使它们自身就可用作标记物。未标记NP与其连接的典型受体包括细胞表面大分子，如LFA－1、VLA－4、mac－1、I－CAM1、I－CAM2、I－CAM3或V－CAM1。未标记NP与其连接的典型抗体包括针对参与凝血连锁反应的蛋白以及内皮细胞抗原、肿瘤抗原或其他细胞表面大分子的抗体。已知有适宜的结合蛋白或标记蛋白的方法，并方便地用来结合或标记NP。例如把NP B链N－末端融合到免疫球蛋白重链C－末端或细胞表面受体的细胞外结构域的C－末端上。

任选本发明的TBP或NP用于已知的免疫检测技术中，如竞争性结合试验、直接或间接夹心试验及免疫沉淀试验。Zola, Monoclonal Antibodies:A Manual of Techniques. pp. 147－158(1987)。

竞争结合试验依赖标记的标准物质(它可以是凝血酶，或它的一个免疫反应性部分如本发明的标记NP)与试验样品凝血酶竞争结合有限量TBP的能力。试验样品中凝血酶量与标准品与TBP结合

的量成反比。为了有利于检测结合的标准物的数量，一般在竞争前或后把 TBP 固相化(不可溶解)，这样同 TBP 结合的标准物和分析物就很方便地与仍未结合的标准物及分析物分离。

夹心试验涉及二种 TBP 的使用，每种能同凝血酶的不同靶位或表位结合。在一种夹心试验中，试验样品中的分析物通过已固定在固相支持物上的第一种 TBP 结合，然后，第二种 TBP 再同这种分析物结合，即形成一种不溶性的三组分复合物。David 和 Greene. U. S.Pat. No. 4,376,110 。第二抗体本身可以是用可检测物标记的(在直接夹心试验中)或可以用抗－TBP 抗体来测定，这种抗－TBP 抗体是用可检测物标记的(在间接夹心试验中)。例如，一种类型的夹心试验就是 ELISA 试验，其中可检测物是一种酶。

本发明的 TBP 和 NP 在体内影像中也是有用的，其中，把用可检测物标记的一种 TBP 或 NP 给予宿主，优选血流中，并检测宿主中有无标记的 TBP 或 NP 及定位。

以下实施例只是说明性质的，无意以任何方式限制本发明。本发明所引用的所用专利和参考文献都明确地并入本文作为参考。

实施例 1

1.1 产生重组人凝血酶原表达载体的构建

编码人凝血酶原的全部 1869 个碱基对的序列加上 5′非翻译区 12 个碱基对序列以及 3′端非翻译区的 97 个碱基序列是从一个人凝血酶原 cDNA 克隆 BS(KS)－hF Ⅱ(从 Ross T. A. MacGillivray, Dept.of Biochemisty, Univ of British Columbia, Vancouver Canada 得到)的 SmaI 到 XbaI 片段上分离出来的。这一片段被克隆到真核表达载体pRc/CMV中(Invitrogen Corp, San Diego, CA)。pRc/CMV 用

Hind Ⅲ酶切，3′凹陷末端用 E.coli DNA 聚合酶Ⅰ的 Klenow 片段补平。此载体用 Xba1 进一步酶切，并与编码凝血酶原序列的 Sma Ⅰ到 Xba Ⅰ片段连接。得到的重组子 pRc/CMV－hPT 含有编码凝血酶原的序列，侧翼连有在哺乳类细胞中高效转录所需要的序列：人巨细胞病毒立即早期基因启动子和转录终止子序列及牛生长激素基因的多腺苷化信号。这个克隆还含有提供氨苄青霉素抗性的β－内酰胺酶基因和为在大肠杆菌中繁殖、保存的 ColE1 复制起点。还有丝状噬菌体的复制起点 f1，以使用缺陷辅助噬菌体 M13KO7 感染的大肠杆菌中产生单链 DNA(Vieira 和 Messing，1987)。这种载体可用于在暂时性转染的哺乳动物细胞中表达人凝血酶原，然而，具有新霉素磷酸转移酶基因意味着能大规模表达的持久性转染细胞系可通过对抗生素 G418 有抗性而筛选出来。

1.2 鉴定凝血酶表面上功能性残基的诱变策略

我们设计的诱变策略是系统性地对人α－凝血酶表面进行扫描以鉴定对纤维蛋白原凝集作用、依赖于血栓调节素的蛋白 C 激活作用、由肝素/抗凝血酶Ⅲ引起的凝集抑制作用以及凝血酶 aptamer 起重要作用的残基。设计这种策略以便有最大的机会鉴定功能性残基，而对蛋白构型非特异性破坏机会最小。带电荷和有极性(R、K、D、E、H、S、T、Q、N、Y、W)氨基酸对于突变特别有意义，因为这些残基能参与形成氢键和静电作用，看来这些对结合带电的配体是非常重要的。第二，只有α－凝血酶表面上与溶剂高度接触的带电荷和极性残基被选来进行突变。溶剂易接近的残基作为靶位，因为这些残基都可用于与配体相作用，对序列变异更有耐受性(Bowie 等，1990)。对人α－凝血酶与抑制剂水蛭素复合物(Rydel 等，1990)的

2.3Å晶体结构中每个凝血酶残基，测定了对半径1.4Å溶剂探针的分部易接近度(Rose 等 1985)，选出了70个分部易接近度大于35%的带电荷极性残基用于突变。只有1个残基R36a除外。R36a是位于α－凝血酶A链和B链之间连接处，是加工凝血酶原为成熟的双链α－凝血酶所必需的。然而，对此要增加几个残基，包括位于推测的纤维蛋白原外侧结合位点(exosite)上的5个残基(R20.K65、H66、R68、K77)和2个在推定的肝素结合位点上的残基(R98、W249)。即总共76个残基通过寡核苷酸定向诱变用丙氨酸代替。丙氨酸被用于所有的取代，因为丙氨酸与α－及β—二级结构是相容的(Klapper, 1977)，在蛋白深埋的和外露的位点都可被接受(Klapper, 1977; Rose 等, 1985)，而且它的侧链无极性而且小，保证了用丙氨酸取代而破坏蛋白质α构型的可能性小。当有2个或3个作为靶位点的残基串连在一起时，同时可进行多重取代。如果这种多重突变显示出有功能性遗传表型，那么再单独进行单个残基取代。丙氨酸替代的突变体全部列在表1中。人α－凝血酶中残基的编号系统就是以前所用的系统(Wu 等, 1991)，其中B链的残基是连续编号的(1－259)。A链的残基也是连续编号的(1a－36a)，但用小写a作下标，表明为A链残基。

1.3 用寡核苷酸指导的诱变构建人凝血酶原中丙氨酸的取代

在单链DNA模板上，通过寡核苷酸指导的诱变把丙氨酸取代引进人凝血酶原基因中(Zoller 和 Smith, 1982)。含尿密啶的单链DNA模板由大肠杆菌dut—ung—株产生(CJ236)(Kunkel, 等, 1987)，延伸和连接诱变寡苷酸引物后，能够在大肠杆菌 ung^+ 株中针对非突变模板链进行筛选。编码丙氨酸取代物的合成寡核苷酸引

物,侧翼拼接 12 个同凝血酶原编码链互补的核苷酸,在 Applied Biosystems Inc. 固相合成仪上用磷酸酰胺(phosphoamidite)化学法合成。磷酸化引物与 pRc/CMV－hPT 模板杂交,用 T7 DNA 聚合酶延伸,并用 T4 DNA 连接酶连接到新合成的链上。把这异源双链 DNA 用于转化 dut^+ ung^+ 大肠杆菌菌株 XL1－Blue,针对含尿嘧啶的亲代链筛选。用双脱氧末端终止法和测序酶 2.0(United States Biochemical)对单个转化子进行单链 DNA 测序,以证实每个突变的一致性。对每个 pRc/CMV－hPT 突变体,取 500ml XL1－Blue 培养物,提取其质粒 DNA,用于转染培养的 COS－7 细胞。用 QIAGEN Maxi 质粒制备药盒分离出大约 1mg 的闭合环状质粒 DNA。以相同的方法,用适宜的模板制备编码本发明所述其他 NP 的 DNA。

实施例 2

2.1 重组凝血酶原在暂时表达试验中的表达和激活

把含有未修饰的凝血酶原 cDNA(对野生型凝血酶)、在 S205A 位突变的凝血酶(作为阴性对照)和各种突变体的各种重组凝血酶原重组子(10～20μg),用 DEAE－葡聚糖转染法(Adams 和 Rose, 1985),分别转进到 10^6 个生长在 35mm 孔中的 COS－7 细胞中。转染后 2 天,用 PBS 洗单层细胞两次,向单层细胞加入 1ml 无血清 DME 培养液,37℃培养 24 小时(当 37℃培养表达测不出或表达较差时偶尔在 30℃以下培养可能有利,特别是 27℃,即 Mt11、12、13、34、35、14.5、和 37c)。然后收集这种条件培养液,离心去掉任何细胞碎片,并用 Centricon－30 通过超滤浓缩 20 倍。50μl 这种浓缩的培养液用 1.5μg Echis Carinatus 蛇毒在 37℃激活 45 分钟。把 25μl

蛇毒激活前后的条件培养液用抗人凝血酶多克隆或单克隆抗体，通过 Western 印迹进行分析。凝血酶表达水平为每 10^6 细胞有 0.12 到 2.0μg 凝血酶不等，这是根据 Western 分析和酰胺分解检测估算。

2.1 在条件细胞培养液中培养的重组凝血酶原用 Slot Blot 法定量。

用 Schleicher 和 Schuell Minifold Ⅱ 真空 Slot－bolt 装置，通过定量 Western 印迹方法检测凝血酶蛋白浓度。按上述方法激活浓缩 20 倍条件培养液中的凝血酶原和纯化的凝血酶原标准品(American Diagnostica)。样本和标准品都用 PBS 稀释，并把它调整到与模拟转染细胞条件培养液有相同浓度。把含有大约 50ng 激活凝血酶原的双份 100μl 和双份纯化的激活凝血酶原标准品(1－200ng)通过 Slot－blot 装置上的 0.45μm 硝酸纤维素滤膜抽干。对每个 Slot 都用 200μl PBS 洗 2 次。滤膜用 PBS 洗 2 次，并用 PBS 配制的 5% 无脂脱脂奶(Carnation)封闭。膜上的印迹与用 5% 脱脂奶配制的 11μg/ml 的兔抗人凝血酶原多克隆免疫球蛋白(Dako)一起孵育。用含有 0.05% Tween－20 的 PBS 洗涤印迹并与 1μCi/ml ^{35}S－标记的驴抗兔免疫球蛋白 $F(ab')_2$(Amersham)片段一起孵育。用含 0.05% Tween－20 的 PBS 洗涤印迹，用 Ambis 4000 放射分析影像检测仪扫描测出每个印迹的放射活性。每份样本中凝血酶的浓度由标准曲线测出，这个标准曲线在 1－200ng 凝血酶原范围内为线性。

2.2 酰胺分解试验

按以前所述方法进行凝血酶显色底物 S－2238 的水解(Wu 等，1991)。用血浆凝血酶构建标准曲线，其中 1μg 凝血酶水解速度为 300μl 100μM 的 S—2238 中 1220.5mOD/分钟。为了测定水解

300μl 100μM S—2238 的速度，使用了 20μl 1/3 稀释的蛇毒激活的条件培养液。

2.3.纤维蛋白原凝集作用

在纤维蛋白原凝集试验中使用在实施例2.2酰胺分解试验中产生 335mOD/分钟水解速度的蛇毒激活条件培养基的量(相当于 0.27μg 血浆凝血酶)。反应混合物含有 20μl 条件培养基和 182μl 含 20mM Tris－醋酸 pH7.5、140mM NaCl、5mM KCl、lmM $MgCl_2$、1mM $CaCl_2$ 的选择缓冲液。通过加入 50μl 由 10mg/ml 的无钙离子 PBS 储存母液用选择缓冲液新配制的 2mg/ml 的人纤维蛋白原来起始反应。用纤维蛋白仪(fibrometer)测量从加入纤维蛋白原到出现血凝块的时间(秒数)。用血浆凝血酶标准凝集曲线将凝集时间转换为相当于每 ml 多少 mg 血浆凝血酶。结果以野生型活性的百分比表示。

2.4 蛋白 C 激活作用

按以前介结的方法(Tsiang 等，1990)从以 504 ± 34fmol/10^6 细胞水平表达重组人血栓调节素的 TMnc 细胞制备细胞裂解液(Tsiang 等:1992)。把大约 8×10^6 细裂解在 800μl 中，得到裂解液中血栓调节素浓度为～5nM。对照裂解物由未转染的亲代 CV—1 细胞系(不表达 TM)以类似方法制备。市场上购得的人血浆蛋白 C，每 pmole 含有～0.005－0.02pmoles 的污染凝血酶原。为了克服这个问题，先把 444pmoles 的蛋白 C 用 10μg Echis Carina-tus 蛇毒在 37℃处理 30 分钟，使污染的凝血酶原转化为凝血酶，然后再用凝血酶抑制剂 PPACK(D－Phe－Pro－Arg－氯甲基酮)滴定灭活它。这种蛇毒处理过的、PPACK 滴定过的蛋白 C 再用于蛋白 C 激活试验

中(Tsiang 等,1990)。试验混合液含有相当于 S－2238 酰胺分解活性标准量(8.5mOD/分钟)蛇毒激活的条件培养液,20μlTMnc 细胞裂解液和 887nM 的蛋白 C,总体积为 50μl。将这种混合液 37℃孵育 1 小时,加入抗凝血酶Ⅲ和肝素终止反应。对于血栓调节素非依赖性蛋白 C 激活作用,在试验混合液中省略 TMnc 裂解液,并用 5mM Na_2EDTA 代替 2mM$CaCl_2$。得到的活化蛋白 C 用对产色底物 S－2366 的水解来来测定。表 1a 中粗线条表示按实施例 2.3 中有同方法作了修正。蛋白 C 激活活性以野生型活性的百分比表示。

2.5.肝素依赖性抗凝血酶Ⅲ对凝集的抑制作用

每个试验中使用相当于水解 S－2238 底物每分钟产生 370mOD 的蛇毒激活培养液。样本体积用模拟转染 20 倍浓缩的培养液调整到 15μl,与 135μl 的选择缓冲液混合并在 37℃预热。在同时把 50μl 2mg/ml 纤维蛋白原和 50μl 650nM AT－Ⅲ(带 0.1U/ml 肝素或不带 0.1U/ml 肝素的)加到样本混合液后,立即测定凝集时间。AT－Ⅲ抑制凝集对肝素的敏感性以有肝素存在时残留的凝集活性与无肝素对照的百分比表示。

实施例 3

3.1 重组凝血酶的稳定表达

把实施例 1 中的线性化重组凝血酶原重组子(10μg)用磷酸钙转染法,转入到 BHK－21 细胞里(Graham 和 Van del Eb., 1973;Parker 和 Stark,1979)。在含有 G418 抗生素的培养液中挑选克隆,用酰胺分解活性和 Western 印迹来检测表达水平。

3.2 用于蛋白纯化的条件培养基的制备:

把每个表达重组凝血酶原的理想克隆接种到 850cm^2 的滚筒发

酵瓶中，在含有10%FCS的完全DMEM中培养(每瓶200ml 5×10^6 细胞)。2天后，细胞达到融合成片后，加入微载体珠(Cytodex 2)(Pharmacia LKB, Piscatawasy, NJ)以包被细胞单层。3天后，小珠被长在它上面的细胞盖住后，细胞用PBS洗涤，再把无血清的含有5μg/ml胰岛素、5μg/ml转铁蛋白、5μg/ml脂球蛋白和10μg/ml维他命K的DMEM加入到细胞上使其分泌凝血酶原。3天以后集条件培养基，之后6天收集一次。

另外一种方法是不用微载体小珠扩展生长表面积，即把每个理想的BHK－21克隆接种到1700cm^2的扩大表面积滚筒发磷瓶中，以上述相同培养基培养(每瓶200ml，5×10^6 细胞)。4天后，细胞达到融合后，用PBS洗细胞2次(不是3次)，把同样无血清培养基(150ml)加入到细胞上使其表达凝血酶原。收集条件培养夜3次，4天后一次(150ml)，8天后第2次(150ml)，11天后第3次(100ml)。用布氏漏斗让条件培养液滤过Whatwan N°1滤低，以除去细胞碎片，和第一种方法中的小珠。

3.3 培养液浓缩和透析

用切线流过滤系统(Pellicon®, Millipore, Bedlford, MA)对含有凝血酶原的无血清条件培养夜进行浓缩。按厂家说明书来预平衡切线流滤器(PLGC型，5平分英尺，MWCO.10000)的低分子量蛋白结合纤维素滤膜。浓缩期间，进样一侧加压20－25psi，收样侧压力用3～4psi。渗透流速为150～200ml/分钟。当培养液(收集的样品)浓缩到500～600ml时，用同样滤器让它对1000～1200ml透析缓冲液(0.1M磷酸钾，PH7.5)透析7—8次。简而言之，就是在这一过滤系统中把透析缓冲液以循环混合液形式轻轻混合，约2～3分钟内加入

到浓缩培养液中(渗出)。然后把混合液浓缩到500～600ml。重复上述透析7—8次后,用透析缓冲液取代99.9%以上的培养液。

3.4 凝血酶原的纯化

把最终的透析液(600～800ml)通过一个无菌的一次性0.45μm滤膜(Nalgene, Rochester, NY),并上样到一个2.6×7cm的DEAE—葡聚糖快速流阴离子交换层析柱上(Pharmacia, Piscataway, NJ)。用0.1～0.7M磷酸钾梯度在0.35～0.45M之间洗脱出凝血酶原峰。再用可溶性Echis carinatus蛇毒(Sigma St. Louis, MO)活化后的酰胺分解测定及SDS—PAGE电泳两种方法来测定含有凝血酶原的部分。合并有活性的部分,并对0.02M HEPES、0.1M NaCl、PH8.0于4℃透析过夜。透析后的混合凝血酶原部分,通过一个PM30滤膜、用一个摇动池(Amicon, Beverly, MA)浓缩到10—15ml。

3.5 NP的纯化

浓缩物中的凝血酶原NP通过Echis carinatus蛇毒加工成NP,蛇毒预先吸附在Amberlite CG50上(ICN Biomedicals, Irvine, CA)并任意固定到Affi－Gel10小珠上(Bio Rad, Richmond, CA)。蛇毒活化凝血酶原NP是在37℃轻轻旋转50分钟来进行的。通过离心再通过0.45μm滤膜过滤来去除蛇毒结合的小珠。滤液立即上样到2.6×7cm的Amberlite CG50(200－400目)阳离子交换柱上。用0.1～1.0M NaCl梯度在0.4M洗出NP单一峰。根据酰胺分解活性和SDS—PAGE电泳(染色胶和Westernblot)结果,把含有NP的流份合并。然后再用一个带有PM30膜的搅拌池把合并的NP流份浓缩到8～10ml,并对0.1M NaCl,0.02M HEPES, PH8.0透析。对纯化的NP进行酰胺分解活性、血浆凝固时间、蛋白C激活作用和血小板

聚集作用方面的鉴定。也测定了它的纯度和特异活性。最后 NP 制品用灭菌的聚丙烯试管 0.5ml 一份保存在 -80℃。

3.6 NP 在体内的抗凝作用

试验的配制品详细说明如下：

配制品	项目	说明
A	对照	无菌等渗盐水,USP.
B	试验	含有大约 0.25mg/ml 凝血酶的野生型人凝血酶无菌等渗水溶液(Hematologic Technologies 人凝血酶,来自人血浆,凝血酶原酶活化)
C	对照	用 NP 试验中相同的方法以 Echis 蛇毒激活的重组参考序列凝血酶原(图 2A)
D	试验	含有约 0.25mg/ml NP 的重组 NP K 52A 的无菌等渗水溶液(图 2B)
E	对照	兔脑促凝血酶原激酶无菌等渗溶液(含组织因子)

每种配制品通过插入中央静脉的插管从静脉按每小时大约 13ml 流速输入新西兰大白兔中(对野生型为每分钟每公斤体重 14.3U,对 K52A 是 11.7U)。因为试验的配方中可能有潜在的血栓形成能力,所以考虑从外周静脉输入(如耳缘静脉)可能全引起局部血栓形成和由于试验物局部高浓度而造成的局部缺血。通过接近中央循环(如通过颈静脉的 SVC)这种并发症就可由于输入的化合物在血管内快速流走并迅速分布而降列最低限度。这种方法以前在狒狒中以人凝血酶应用过(J.Clin.Invest.,92:2003—12,1993)。

通过耳缘静脉作为给药途经输入配制品已显示是安全有效的。

结果显示在图 2A、2B 和图 3 中。每个图都代表一只兔子的结果。图 2A 显示，野生型凝血酶引起显著的纤维蛋白原消耗和过量的抗凝活性。相反，图 2B 证实，K52A PCA 具有正常范围内抗凝活性(图中阴影部分)，并在保持活性方面具有临床价值，而且不引起纤维蛋白原消耗。图 3 描绘了消除半衰期和可逆性。

3.7 在无或有 TM 的情况下 PCA 对蛋白 C 的激活作用

蛋白 C 激活试验在实施例 2.4 中有述。不同于同于实施例 2.4 的是不需要用蛇毒和 PPACK 预先处理蛋白 C 母液，因为在纯化的重组凝血酶中无蛇毒所要激活的蛋白 C 母液中污染的凝血酶原。凝血酶、血栓调节素和蛋白 C 都按图 6 中指明的浓度使用。反应物在 37℃孵育 1 小时，用生色底物 S—2366 来检测 aPC 活性。这一试验证实：PCA K32A 和 E229A 仍依赖血栓调节素。

实施例 4

在食蟹猴中(Cynomolgus monkeys)用蛋白 C 激活剂 2(PCA2)(E229A)和 K52A PCA 证实可逆的抗凝作用

按实施例 3.4 和 3.5 中描述的方法制备 PCA2，用无菌等渗水溶液配制，总体积为 10ml。按每小时 60ml 的速度，把 10ml PCA2 溶液从外周静脉输入到成年雄性食蟹猴静脉内，连续输注 10 分钟。用输液泵控制输注速度。输注两个浓度：(1)1.5μg/公斤体重/分钟(2U/公斤体重/分钟)(2)4.5μl/公斤体重/公钟(6U/公斤体重/分钟)。(1U 如上文所定义)。

在下列时间针刺外周静脉采集血液标本：输注开始时立即采血(t=0)，输注开始后在间隔 t=5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150 分钟时采血。血标本体积约 2ml，收集在枸橼酸盐中。10 分钟内从全血

中得到血浆。在纤维蛋白测定仪中通过测量 aPTT 来监视抗凝作用。用纤维蛋白原缺乏血浆从凝集试验中来确定纤维蛋白原水平。

图 4 表示用 2 个剂量的 PCA2 输注各个猴子的结果.两个剂量都导致凝固时间延长超出预期的治疗范围（阴影部分），而没有消耗纤维蛋白原，表明 PCA2 在体内缺乏可测出的促凝活性。这种作用是可逆的，输注结束后大约 170 分钟 aPTT 达到正常。这种作用的可逆性启示：输注期间不消耗凝集因子。另外表明： PCA2 在体内无可测出的促凝活性。逆转作用的动力学分析启示消除半衰期为大约 50 分钟。相信持续这么长时间在临床上是有好处的。

在另一研究中，按每公斤体重每分钟输注 2U 的 K52A PCA,按上述方法准备并输注 10 分钟,并与上述实施例中 2U/kg/分钟 E229A PCA 输注进行比较。结果表示在图 5 中。虽然按 2U/kg/分钟输注 K52A PCA 的纤维蛋白原水平没有变化， K52A PCA 是在基本相同的条件下输注的，但按 12U/kg/分钟输注导致 aPTT 大于 10 倍对照,纤维蛋白原降到小于 10%。 12U/kg/分钟对猴子来说是过量了,尽管这种量对兔子是能耐受的(见上文)。即在猴子中的剂量 一般要低于在兔子中的剂量。

表 2

	E229A(2U/kg/min)			E229A(6U/kg/min)			K52A(2U/kg/min)	
时间 (输注后,分)	0	60	150	0	60	180	0	120
血小板	245		352	400		341	458	471
出血时间(分)	2	2		2	2			

这些数据证实保留了血小板功能，且出血时间未变，这与用 gp/IIb/IIIa 抑制因子或凝血酶抑制因子所作试验的结果不同。

实施例 5

5.1 单独 B－链 NP 的表达和应用

鉴于我们的观察结果，凝血酶 A 链中的取代对 S－2238 的水解 FC 或 PA 几乎没有什么影响，单独用 PCA B－链作为抗凝剂或单独用 FCP B－链作促凝剂都将是有好处的。FCP 或 PCA B－链是通过还原连接的二硫键并重新卷曲从两个母链得到（Hageman 等，Arch. Biochem. Biophys. 171：327－336[1975]）。但是，优选的 B－链是通过单独表达编码 NP B－链核酸而得到的。B－链 PCA 或 FCA 的表达载体是由构建表达凝血酶原、前凝血酶 1、前凝血酶 2（单链 α－凝血酶）的载体衍化而来的，是通过把编码凝血酶 B 链氨基末端残基(I1)和信号肽羧基末端密码子之间的间隔序列缺失而构建出来的。用寡核苷酸指导的诱变达到缺失，其中使用化学合成的寡核苷酸，这种核苷酸作为单链 DNA 模板上的引物编码这种缺失，正如上文所述构建丙氨酸取代 NP 的情形。任选诱变 C44 密码子编码 A 或 S。

5.2. 在大肠杆菌中，前凝血酶 1 和前凝血酶 2 以 GST 融合蛋白形式表达。

前凝血酶－1（氨基末端残基为 S156，Degen 等的残基编号系统）和前凝血酶－2（氨基末端残基为 T272，Degen 等的残基编号系统）在大肠杆菌细胞浆中以与谷胱甘肽 S－转移酶(GST)可溶性融合蛋白形式表达。所用的表达载体是 pGEX－5X－1（Pharmacia

LKB Biotechnology)，它含有在大肠杆菌中繁殖所需的 pBR322 复制起点，编码抗氨苄青霉素的 β－内酰胺酶基因以便保持这一质粒的存在，以及编码 Lac 阻遏物蛋白 LacIq 基因以阻抑融合蛋白的基础表达。表达是通过 tac 启动子启动的，它可被 IPTG 诱导，靠近核糖体结合位点和 GST 基因的翻译起始密码子。在编码 GST 221 个氨基酸序列后面是一个编码 Xa 因子或 Echis carinatus 蛇毒的酶切位点的序列(IEGR)(用它可以从融合蛋白中酶切出 GST 部分)，以及含有多个单一限制酶位点可把要融合到 GST 编码序列上的编码序列插入的多接头序列。

对于前凝血酶－1，设计 PCR 引物以扩增从编码前凝血酶－1 S 156 (Degen 等的编号系统)到凝血酶 B－链的羧基端的核苷酸序列。修饰这个编码前凝血酶－1 序列的 5′端，加入一个编码 6 个连续组氨酸残基的序列，可被用作在 Ni^{2+} 螯合基质中纯化融合蛋白的亲和标记；和加入一个编码 EcoRl 限制性内切酶位点的序列。3′端引物是在终止密码子 3′上插入一个编码 XhoI 限制性内切酶位点的序列加以修饰。对于前凝血酶－2，使用相同的 PCR 3′引物，而设计 5′ PCR 引物以将起始于 T272 残基(Degen 等的残基编号系统)的前凝血酶－2 序列与 6 个组氨酸亲和标记和 EcoR1 限制性内切酶位点上融合。以凝血酶原 cDNA 克隆，BS(KS)－hFII 作模板用 PCR 引物扩增已修饰过的编码前凝血酶－1 和前凝血酶－2 的序列。把扩增的片段克隆到 pGEX－5X－1 的 EcoR1 和 XhoI 位点上，GST 编码序列读框内。用所得到的重组子转化大肠杆菌 JM105 株(ATCC 47016)。

把含有 GST－前凝血酶－1 和 GST－前凝血酶－2 的 JM105

菌稳定期培养物，于 37℃ 在 25ml 含有 200μg/ml 氨苄青霉素的 Luria－Bertani 培养基(LB)中。250rpm 振荡培养过夜。200ml 培养液按种 4ml 稳定期培养物于 37°下 250rpm 振荡培养直到细胞达到对数期生长($O.D_{600nm}=0.6\sim1.2$)。培养温度降到 17℃，1 小时后加入 IPTG 使终浓度达到 1mM，继续培养 24 小时。5000g 离心收集细菌细胞，用 50mM TrisCl，150mM NaCl，PH 7.5 洗涤，把细胞悬浮到 20ml 50mM TirsCl，150μM NaCl，pH7.5 缓冲液中，通过超声 3－4 (50% duty cycle)分钟破碎细胞，加入 Triton X－100 至终浓度为 1%。提取物在 4℃ 80rpm 混匀 60 分钟。通过 10000g 离心去除不溶性物质。GST－前凝血酶－1 和 GST－前凝血酶－2 以可溶成分表达出来，通过抗人 α－凝血酶的单抗(EXT－1) Western 印迹法检测，测得每毫升培养液中含 5mg。GST－前凝血酶－1 和 GST－前凝血酶－2 融合蛋白通过与 30μg/ml 的 Echis carinatus 蛇毒在 50mM TrisCl，150mMNaCl，pH7.5 中 37℃ 培养 30 分钟或更长些时间加工成成熟 α－凝血酶。融合蛋白加工成与人 α 凝血酶的 A 和 B 链大小相同的片段，通过在还原条件下 SDS－PAGE 电泳后的 Western 印迹法观测到。加工后，把 200ng 加工过 GST－前凝血酶－1 或 GST－前凝血酶－2 融合蛋白与 100μM S－2238 在 50mM TrisCl、150mM NaCl，pH 7.5 中于 37℃ 孵育 10 分钟来检试对凝血酶特异性生色多肽底物(S－2238)的酰胺分解活性。酰胺分解活性只有在用 Echis carinatus 蛇毒处现后的样品中测到。

在谷胱甘肽一葡聚糖 4B(Pharmacia)柱上用亲和层析方法纯化 GST－前凝血酶－1 和 GST－前凝血酶－2 融合蛋白。把菌体提取物上样到一个 1ml 的谷胱甘肽－葡聚糖 4B 柱上，封闭柱子，并混匀

40 分钟。柱子流干后用 50mM TrisCl, 150mM NaCl, pH 7.5 加 1% Triton X－100 洗涤，用 50mM TrisCl, 150mM NaCl, pH 7.5 洗涤，再用 1ml 等份含 10mM 谷胱甘肽的缓冲液洗脱。用 10mM 谷胱甘肽洗脱下来的 GST－前凝血酶－1 和 GST－前凝血酶－2 融合蛋白，用 SDS－PAGE 电泳、考马斯亮兰染色测定，纯度为约 50%。

按本例中前凝血酶－1 或前凝血酶 2 相同方法制备本发明的 NP，并按本发明介绍的方法加工成成熟的有活性的 NP，只是在 JM105 菌株中表达前诱变构建物以向这一表达载体中引入所需的序列变化。

实施例 6

PCA2 (E229A) 和野生型凝血酶的血小板凝集作用。

虽然已经证明 PCA2 在纤维蛋白原凝集过程中无效，但凝血酶另外一个重要的促凝功能是刺激血小板凝集，这是对血小板表面上跨膜受体的酶切结果。为了证实 PCA2 在凝血酶这一促凝功能中也是缺乏的，对不同浓度的 PCA2 和野生型凝血酶进行了血小板凝集作用的比较试验。

用 Chrono－Log 双道凝集测量仪(model 560－VS、Chrono－Log Corp. Havertown PA)，以富含血小板的枸橼酸化人血浆(PRP)进行野生型和 PCA－2 凝血酶的血小板凝集比较试验。在无菌 Vacutainner 试管(Becton Dickenson, Rutherford, NJ)中收集人新鲜全血(4.5ml)，此试管里含有 0.5ml129mM 枸橼酸钠。通过离心从枸橼酸化血液中分离出 PRP。根据厂家仪器说明操作凝集测量仪。把重组人 α－凝血酶加到预温(37℃ 2 分钟)的 PRP 中，终浓度对于野生型凝血酶为 0.12nM～0.49nM，对 PCA－2 为 0.74nM－71.

89nM。凝血酶加到PRP后刺激血小板凝集作用通过在记录仪上记录光传导5分钟内的增加来监控。血小板凝集程度用测量加入凝血酶后追踪1.5分钟的曲线下面积来定量。血小板凝集的程度（cm^2）对凝血酶浓度作图（图7）。

从本图中计算出野生型凝血酶和PCA2刺激血小板凝集作用的EC50（达到最大刺激一半时所需要的浓度）。PCA 2（EC50＝30.8nM）在刺激血小板凝集作用上比野生型凝血的效果（EC50＝3.9nM）差8倍，即PCA2在此促凝活性及纤维蛋白原凝集方面都是缺乏的。

参考文献

Adams, G. A. et al., Mol. Cell. Biol. 5, 1442-1448, 1985.

Bowie J. U. et al., Science. 247, 1306-1310, 1990.

Dreyfus, M., et al., N. Eng. J. Med. 325, 1565-1568, 1991.

Graham, F.L.,和 Vand der Eb, A., J. Virology. 52, 456-567, 1973.

Gruber, A., et al., Circulation. 82, 578-585, 1991.

Gruber, A., et al., Circulation. 84, 2454-2462, 1991a.

Hirsh, J., N. Eng. J. Med. 324, 1865-1875, 1991.

Hirsh, J., N. Eng. J. Med. 324, 1565-1574, 1991a.

Klapper, M. H., Biochem. Biophys. Res. Comm. 78, 1018-1024, 1977.

Kunkel T. A. et al., Meth. Enzymol. 154, 367-382, 1987.

LaVallie, E. R., et al., Biotechnology, 11, 187-193, 1993.

Maggi, A., et al., Haemostasis. 17,329-335, 1987.

Parker, B.A.和 Stark, G.R., J. Virol. 31,360-369, 1979.

Rescador, R., et al., Thrombosis Res. 53, 197-201, 1989.

Rose G. D. et al., Science. 229, 834-838, 1985.

Rydel T. J. et al., Science. 249, 277-280, 1990.

Smith, D. B. et al., Gene, 67, 31-40, 1988.

Stader, J. A. et al., Meth. Enzymol. 185, 166-187, 1990.

Studier, F. W. et al., Meth. Enzymol. 185, 60-89, 1990.

Tabor, S.和 Richardson, C.C., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84, 4767-4771, 1987.

Taylor et al., J. Clin. Invest. 79, 918-925, 1987.

Tsiang, M., et al., Biochemistry 29, 10602-10612, 1990.

Tsiang, M., Lentz, S. R.,和 Sadler, J. E. J. Biol. Chem. 267, 6164-6170, 1992.

Vieira, J.和 Messing, J., Meth. Enzymol. 153, 3-11, 1987.

Wells, J. A. Biochemistry, 29, 8509-8517, 1990.

Wu, Q., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 6775-6879, 1991.

Zoller, M. J.和 Smith, M., Nucleic Acids Res. 10, 6487-6493, 1982.

序列表

(1)一般信息:

(i)申请人:GILEAD SCIENCES, INC

(ii)发明名称:新型多肽和凝血治疗

(iii)序列数:2

(iv)通信地址:

(A)收信人:GILEAD SCIENCES, INC.

(B)街道:353 LAKESIDE DRIVE

(C)城市:FOSTER CITY

(D)州:CALIFORNIA

(E)国家:美国

(F)ZIP:94404

(v)计算机可读形式:

(A)媒体类型:软盘

(B)计算机:IBM PC 兼容机

(C)操作系统:PC—DOS/MS—DOS

(D)软件:PatenIn Release #1.0, Version #1.25

(Vi)本申请资料:

(A)申请号:PCT/US94/13104

(B)申请日:14—NOV—1994

(C)分类:

(vii)优先申请资料:

(A)申请号:US08/338 368

(B)申请日:14—NOV—1994

(Viii)律师/代理人信息:

(A)姓名:HENSLEY, MAX D.

(B)登记号:27043

(C)卷号:190.2F

(iX)通迅资料:

(A)电话:415—574—3000

(B)传真:415—578—9264

(C)SEQ ID NO:1 的信息

(i)序列特征:

(A)长度:885 碱基对

(B)类型:核酸

(C)链型:单链

(D)拓扑结构:线性

(iX)特征:

(A)名称/关键词:CDS

(B)位置:1..885

(Xi)序列描述:SEQ ID NO:1

```
ACC TTT GGC TCG GGA GAG GCA GAC TGT GGG CTG CGA CCT CTG TTC GAG          48
Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu
 1               5                  10                  15

AAG AAG TCG CTG GAG GAC AAA ACC GAA AGA GAG CTC CTG GAA TCC TAC          96
Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr
            20                  25                  30

ATC GAC GGG CGC ATT GTG GAG GGC TCG GAT GCA GAG ATC GGC ATG TCA         144
Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser
        35                  40                  45
```

```
CCT TGG CAG GTG ATG CTT TTC CGG AAG AGT CCC CAG GAG CTG CTG TGT        192
Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys
     50                  55                  60

GGG GCC AGC CTC ATC AGT GAC CGC TGG GTC CTC ACC GCC GCC CAC TGC        240
Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys
 65                  70                  75                  80

CTC CTG TAC CCG CCC TGG GAC AAG AAC TTC ACC GAG AAT GAC CTT CTG        288
Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu
                 85                  90                  95

GTG CGC ATT GGC AAG CAC TCC CGC ACC AGG TAC GAG CGA AAC ATT GAA        336
Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu
            100                 105                 110

AAG ATA TCC ATG TTG GAA AAG ATC TAC ATC CAC CCC AGG TAC AAC TGG        384
Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp
        115                 120                 125

CGG GAG AAC CTG GAC CGG GAC ATT GCC CTG ATG AAG CTG AAG AAG CCT        432
Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro
    130                 135                 140

GTT GCC TTC AGT GAC TAC ATT CAC CCT GTG TGT CTG CCC GAC AGG GAG        480
Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu
145                 150                 155                 160

ACG GCA GCC AGC TTG CTC CAG GCT GGA TAC AAG GGG CGG GTG ACA GGC        528
Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly
                165                 170                 175

TGG GGC AAC CTG AAG GAG ACG TGG ACA GCC AAC GTT GGT AAG GGG CAG        576
Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln
            180                 185                 190

CCC AGT GTC CTG CAG GTG GTG AAC CTG CCC ATT GTG GAG CGG CCG GTC        624
Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val
        195                 200                 205

TGC AAG GAC TCC ACC CGG ATC CGC ATC ACT GAC AAC ATG TTC TGT GCT        672
Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg Ile Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala
    210                 215                 220

GGT TAC AAG CCT GAT GAA GGG AAA CGA GGG GAT GCC TGT GAA GGT GAC        720
Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp
225                 230                 235                 240

AGT GGG GGA CCC TTT GTC ATG AAG AGC CCC TTT AAC AAC CGC TGG TAT        768
Ser Gly Gly Pro Phe Val Met Lys Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr
                245                 250                 255

CAA ATG GGC ATC GTC TCA TGG GGT GAA GGC TGT GAC CGG GAT GGG AAA        816
Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys
            260                 265                 270

TAT GGC TTC TAC ACA CAT GTG TTC CGC CTG AAG AAG TGG ATA CAG AAG        864
Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys
        275                 280                 285

GTC ATT GAT CAG TTT GGA GAG                                            885
Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
    290                 295
```

(2)SEQ ID NO:2 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度:295 个氨基酸

(B)类型:氨基酸

(C)拓扑结构:线性

(ii)分子类型:蛋白质

(Xi)序列描述:SEQ ID NO:2:

```
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 Met 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
```

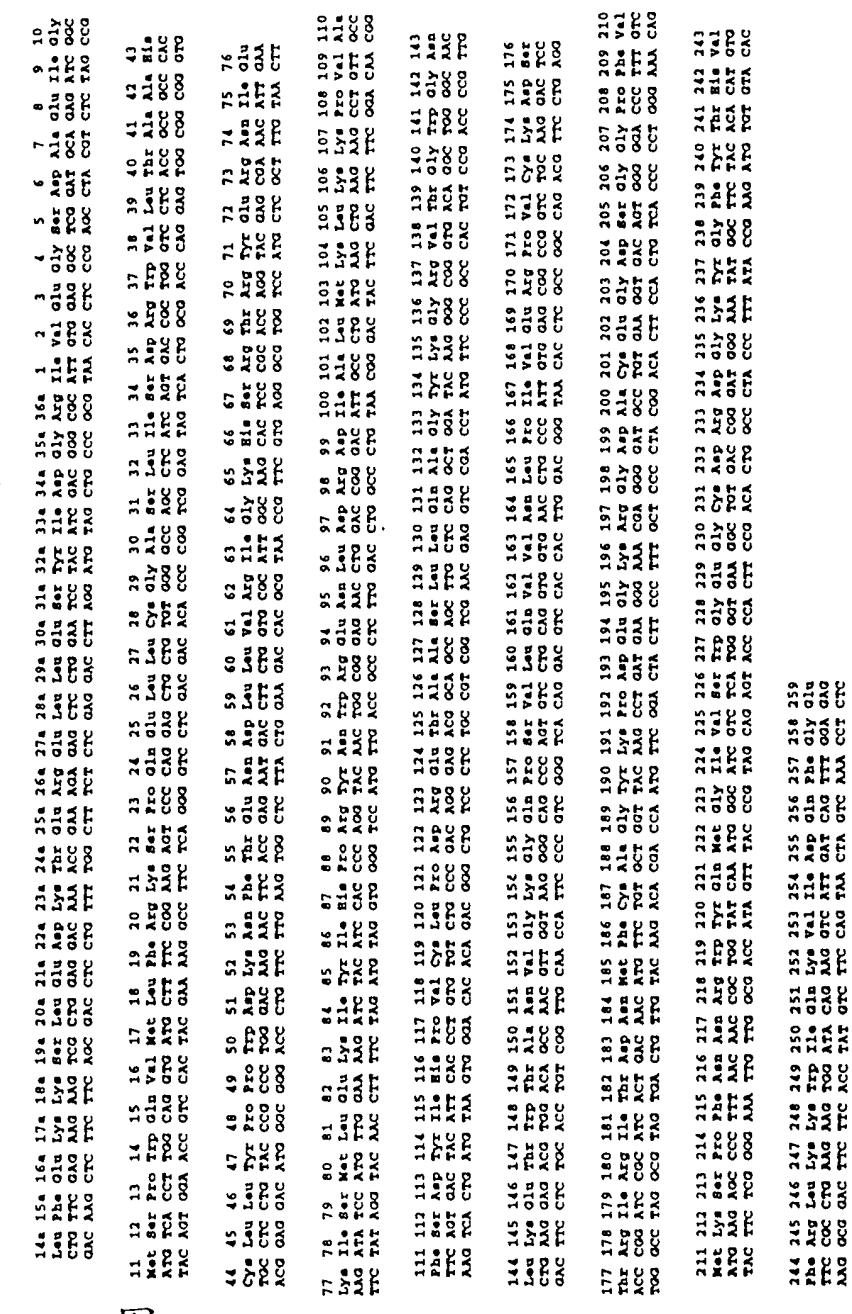


图 1

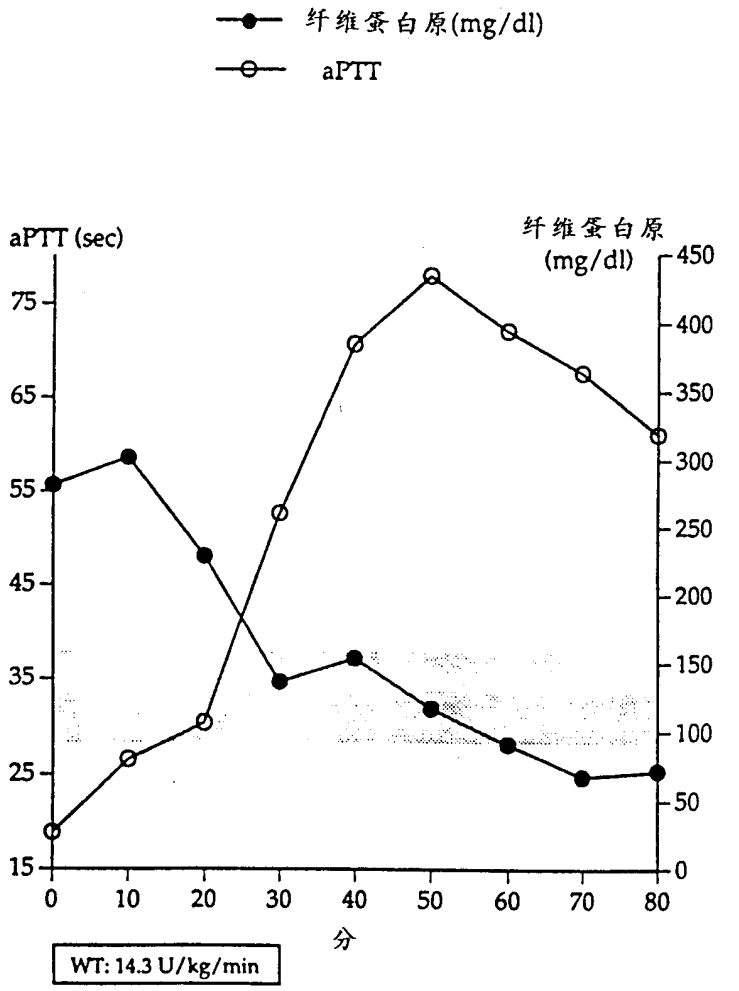

纤维蛋白原(mg/dl)
aPTT
aPTT (sec)
纤维蛋白原
(mg/dl)
75
65
55
45
35
25
15
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
分
WT: 14.3 U/kg/min

图 2

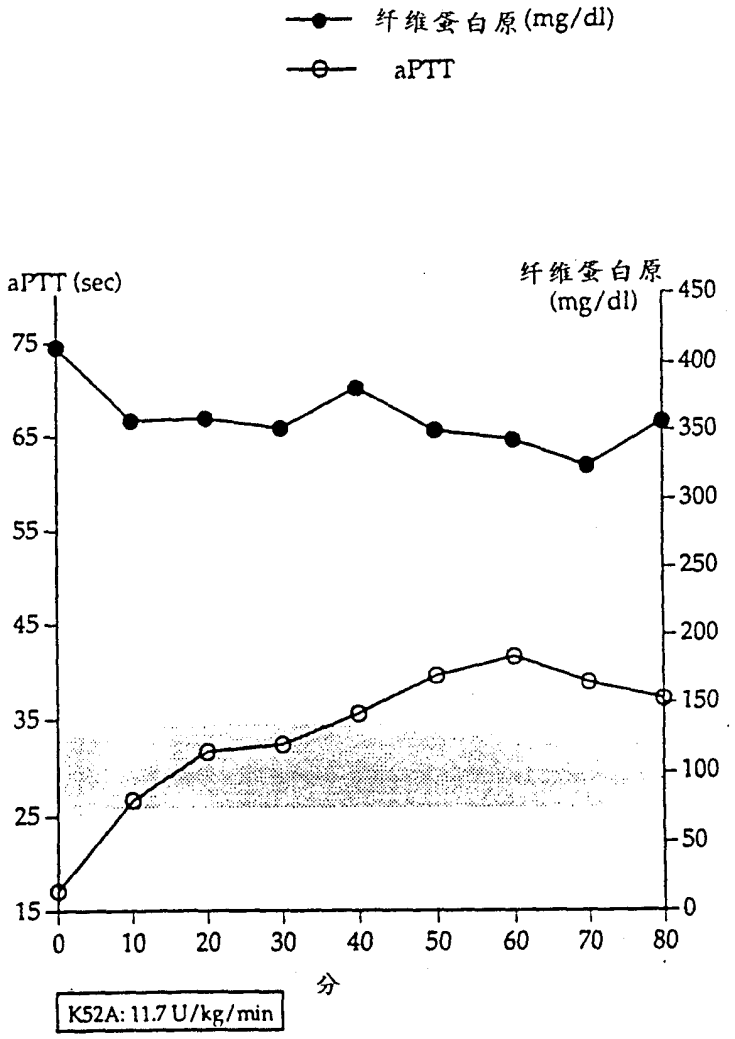

纤维蛋白原(mg/dl)
aPTT
aPTT (sec)
纤维蛋白原
(mg/dl)
75
65
55
45
35
25
15
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
分
K52A: 11.7 U/kg/min

图 3

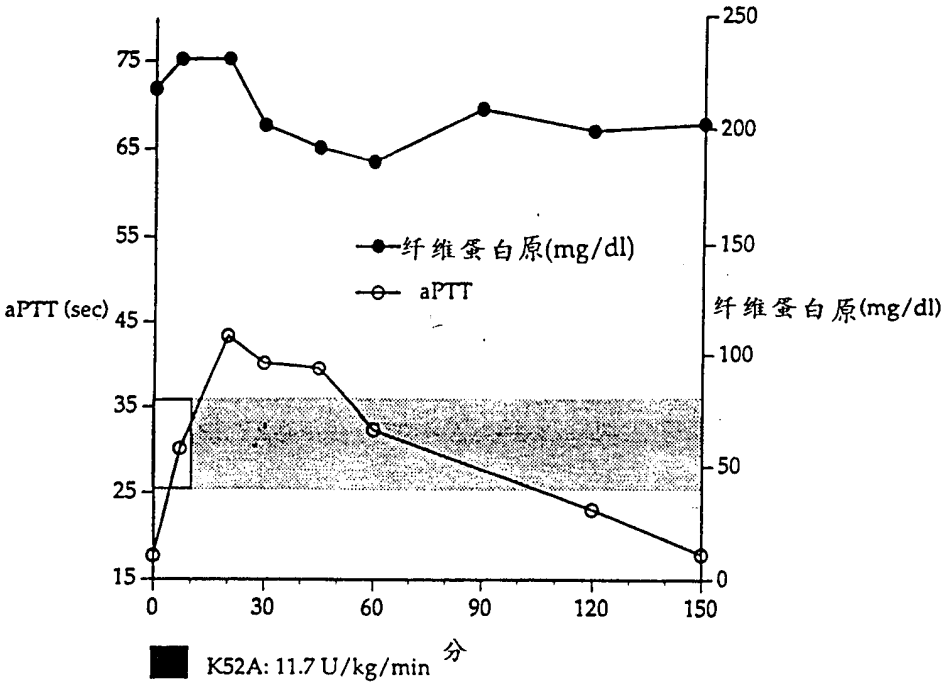

250
75
200
65
55
纤维蛋白原(mg/dl)
150
aPTT
aPTT (sec)
45
纤维蛋白原(mg/dl)
100
35
50
25
15
0
0
30
60
90
120
150
分
K52A: 11.7 U/kg/min

图4

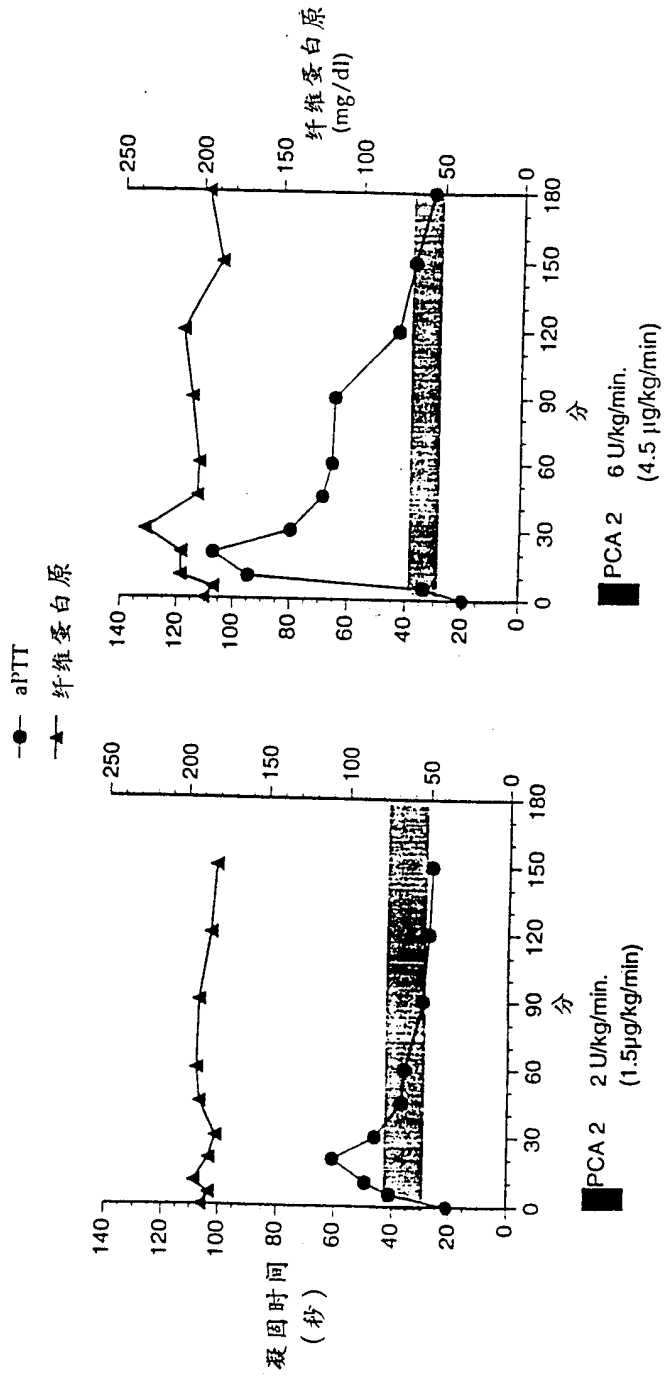

aPTT
纤维蛋白原
凝固时间（秒）
纤维蛋白原 (mg/dl)
分
PCA 2 2 U/kg/min. (1.5μg/kg/min)
PCA 2 6 U/kg/min. (4.5 μg/kg/min)

图 5a

图 5b

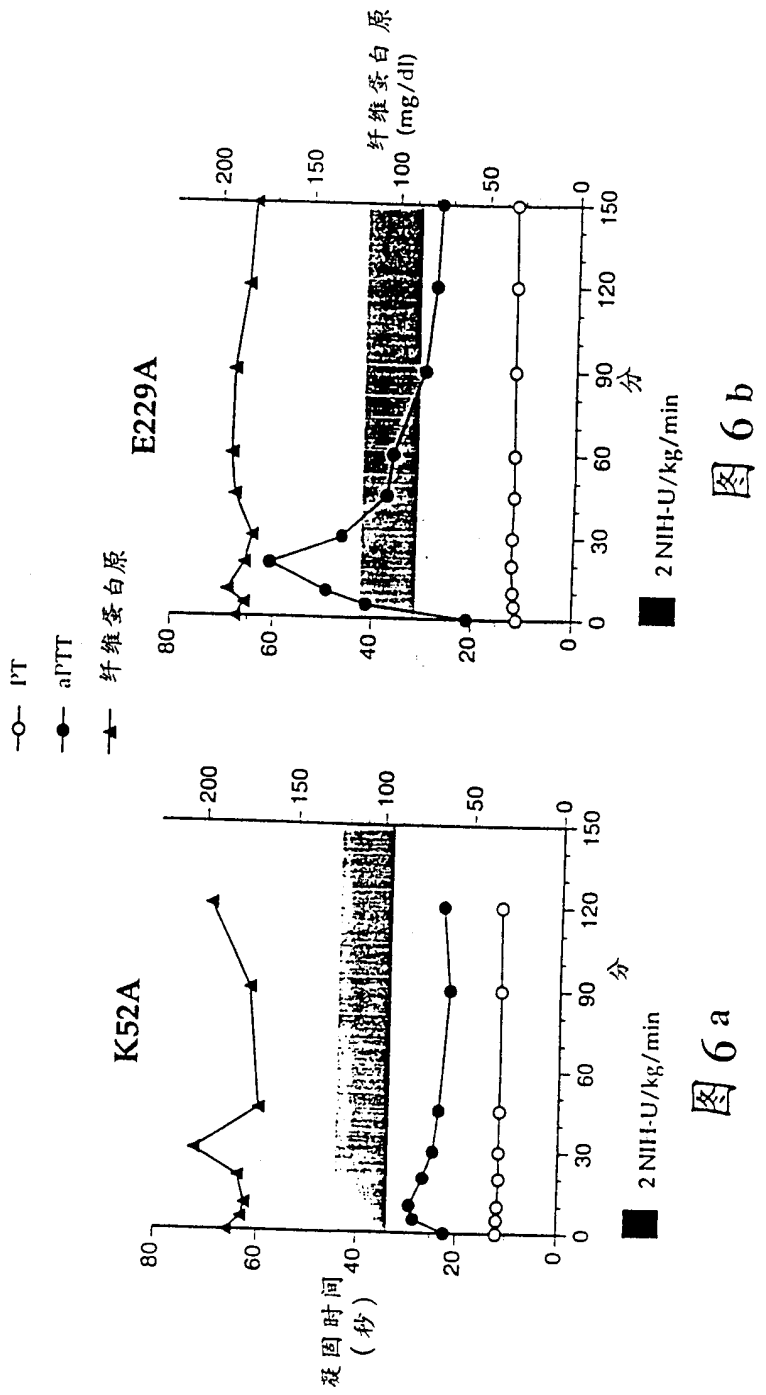

PT
aPTT
纤维蛋白原
K52A
凝固时间（秒）
80
60
40
20
0
200
150
100
50
0
150
120
90
60
30
0
分
2 NIH-U/kg/min
E229A
纤维蛋白原 (mg/dl)
80
60
40
20
0
200
150
100
50
0
150
120
90
60
30
0
分
2 NIH-U/kg/min

图 6 a

图 6 b

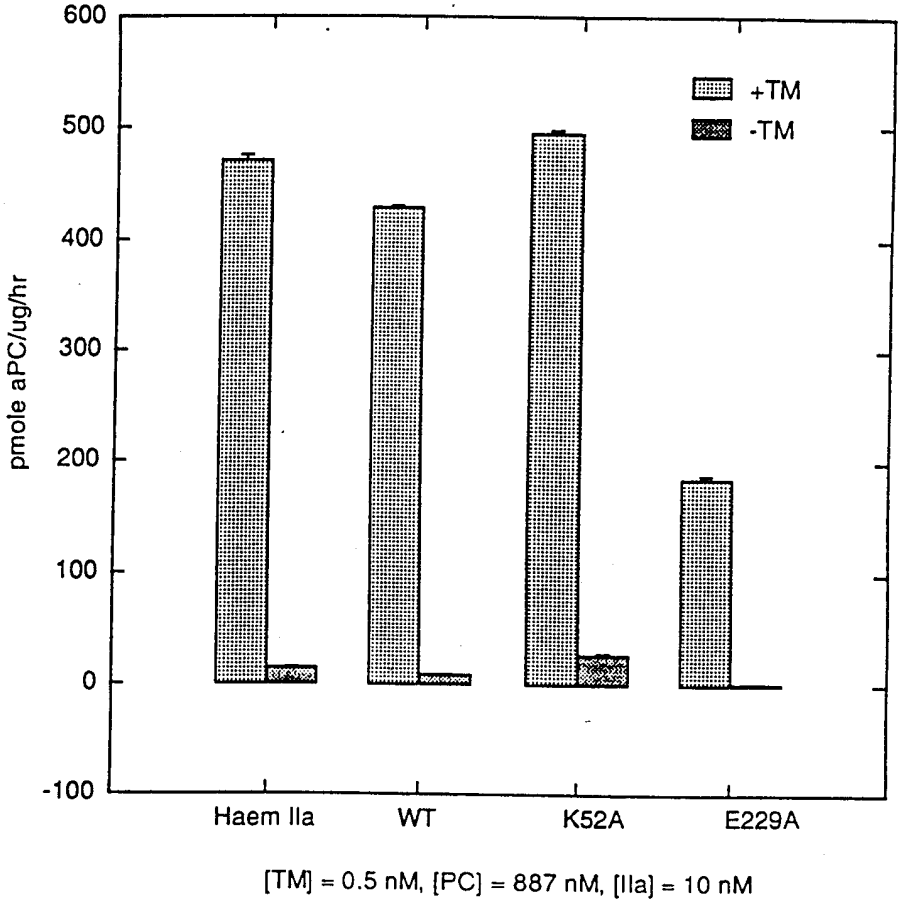

600
500
400
300
200
100
0
-100
pmole aPC/ug/hr
+TM
-TM
Haem IIa
WT
K52A
E229A
[TM] = 0.5 nM, [PC] = 887 nM, [IIa] = 10 nM

图 7

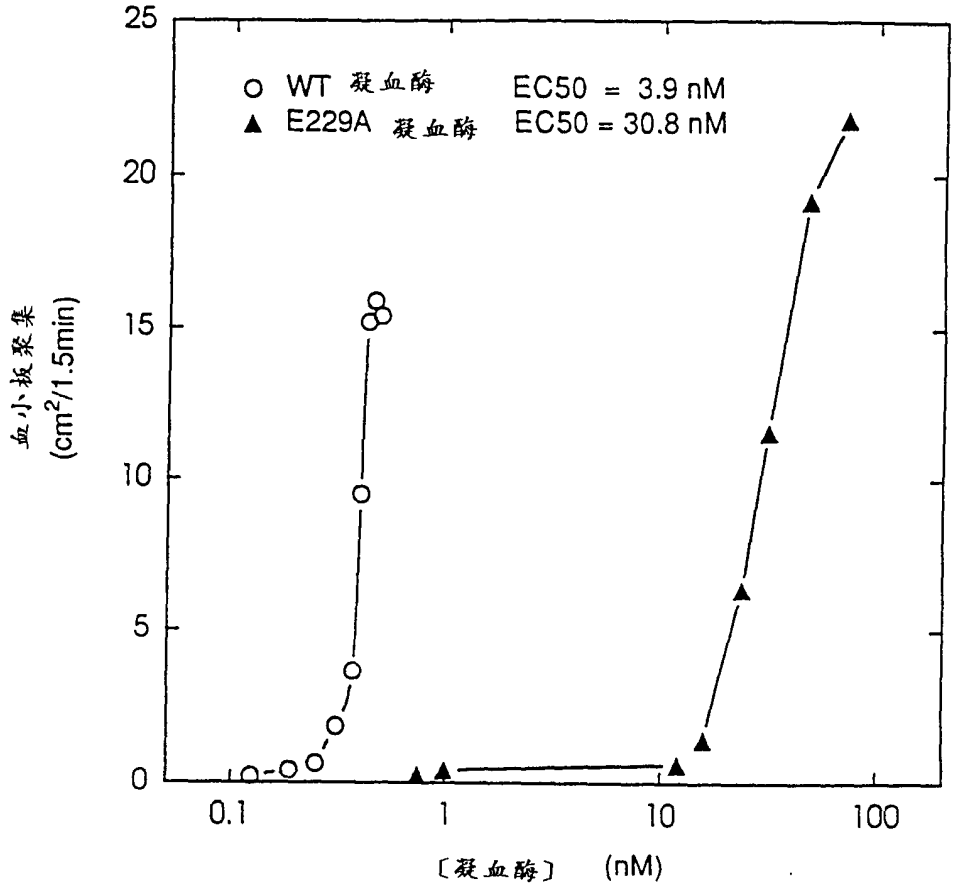

25
20
15
10
5
0
WT 凝血酶 EC50 = 3.9 nM
E229A 凝血酶 EC50 = 30.8 nM
血小板聚集
(cm²/1.5min)
0.1
1
10
100
〔凝血酶〕 (nM)

图 8