

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2023 年 5 月 11 日 (11.05.2023)



(10) 国际公布号
WO 2023/077413 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 14/475 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
C07K 1/22 (2006.01) *A61K 38/18* (2006.01)
C07K 1/16 (2006.01) *A61K 47/64* (2017.01)
C12N 15/12 (2006.01) *A61K 45/06* (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01) *A61P 7/02* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

(71) 申请人: 南京大学 (NANJING UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省南京市栖霞区仙林大道163号刘颖, Jiangsu 210023 (CN)。 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心 (CENTER FOR EXCELLENCE IN MOLECULAR CELL SCIENCE) [CN/CN]; 中国上海市徐汇区岳阳路320号刘颖, Shanghai 200031 (CN)。 华中农业大学 (HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国湖北省武汉市洪山区狮子山街1号刘颖, Hubei 430070 (CN)。

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/128944

(22) 国际申请日: 2021 年 11 月 5 日 (05.11.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权: 202111290823.9 2021年11月2日 (02.11.2021) CN

(72) 发明人: 董咸池 (DONG, Xianchi); 中国江苏省南京市栖霞区仙林大道163号刘颖, Jiangsu 210023 (CN)。 刘雯 (LIU, Wen); 中国江苏省南京市栖霞区仙林大道163号刘颖, Jiangsu

(54) Title: USE OF PROTEIN SEQUENCE CAPABLE OF BINDING TO SUBSTRATE IN PREPARATION OF PRODUCT FOR INHIBITING FIBRIN ASSEMBLY

(54) 发明名称: 可与底物结合的蛋白序列在制备抑制纤维蛋白组装的产品中的应用

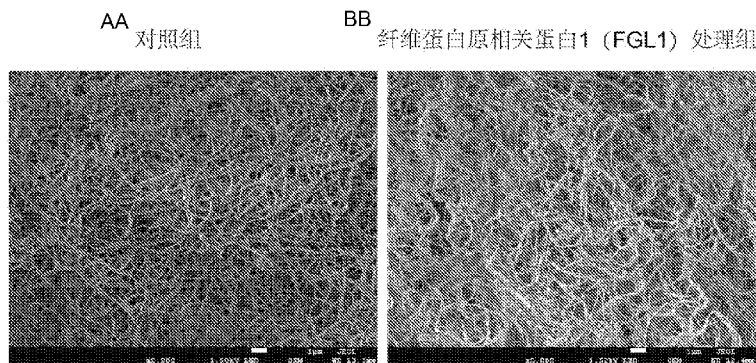


图 11

AA Control group
BB Fibrinogen-like protein 1 (FGL1) treatment group

(57) Abstract: Provided are a protein containing an amino acid sequence capable of binding to a peptide fragment of a substrate GPRP, a fibrinogen-like protein 1 (FGL1) containing the amino acid sequence, and a fibrinogen domain (FD) of the FGL1, wherein a single FD protein also has a function the same as or similar to that of the FGL1. The FGL1 and FD, which have different action mechanisms from existing drugs, can inhibit fibrin assembly in the process of thrombogenesis by means of competing for fibrin substrate binding pockets. The FGL1 and FD can have a stronger affinity to the substrate by means of mutation, thereby effectively enhancing a usage effect of drugs for treating thrombus.

(57) 摘要: 提供了一种含有可与底物GPRP肽段结合的氨基酸序列的蛋白、含有此氨基酸序列的纤维蛋白原相关蛋白1(FGL1)以及其纤维原蛋白结构域(FD), 并且单独的FD结构域蛋白也具有与FGL1相同或类似的功能。FGL1和FD, 与现有的药物具有不同的作用机制, 可以通过竞争纤维蛋白底物结合口袋, 从而抑制血栓形成过程中纤维蛋白的组装, 通过突变, 可以使其具有更强的底物亲和力, 能够有效增强血栓治疗药物的使用效果。

210023 (CN)。 丁建平(DING, Jianping); 中国上海市徐汇区岳阳路320号刘颖, Shanghai 200031 (CN)。 石雨(SHI, Yu); 中国上海市徐汇区岳阳路320号刘颖, Shanghai 200031 (CN)。 徐曙彤(XU, Shutong); 中国湖北省武汉市洪山区狮子山街1号刘颖, Hubei 430070 (CN)。 徐建波(XU, Jianbo); 中国湖北省武汉市洪山区狮子山街1号刘颖, Hubei 430070 (CN)。

(74) 代理人: 北京智丞瀚方知识产权代理有限公司 (BEIJING ZHI CHENG HAN FANG IP AGENCY CO., LTD.); 中国北京市西城区西直门外大街1号院2号楼11C8-02刘颖, Beijing 100044 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

可与底物结合的蛋白序列在制备抑制纤维蛋白组装的产品中的应用

技术领域

- 5 本发明涉及可与底物结合的蛋白序列、包含有此蛋白序列的纤维蛋白原相关蛋白 1 及其活性结构域在制备抑制纤维蛋白组装的产品中的应用。

背景技术

- 血栓是血流在心血管系统血管内面剥落处或修补处的表面所形成的小块。在可变的流体依赖型(variable flow dependent patterns)中，血栓由不溶性纤维蛋白，沉积的血小板，积聚的白细胞和陷入的红细胞组成。血栓形成是由一组遗传和环境因素相互作用、相互影响的多因素变化过程。临床常见的血栓患者，最主要的特点有家族遗传性，反复发作性，症状严重性，血栓形成部位异常性，以及发病时间年轻化。抗血栓疗法是运用溶栓药物，抗血小板药物和抗凝剂来抑制血栓的形成或分解已形成的血栓。

抗血栓药可分为抗凝血药、抗血小板聚集药和溶血栓药三大类：

- 15 A、抗凝血药(anticoagulants)是一类干扰凝血因子，阻止血液凝固的药物，主要用于血栓栓塞性疾病的预防与治疗。

B、抗血小板聚集药分为三代：阿司匹林为第一代，噻氯匹啶为第二代，血小板糖蛋白 II b/IIIa 受体拮抗剂为第三代。其中，血小板糖蛋白 II b/IIIa 受体拮抗剂的问世是抗血小板治疗中的一个重要里程碑。

- 20 C、凝血中形成的纤维蛋白，可经纤溶酶作用从精氨酸-赖氨酸键上分解成可溶性产物，使血栓溶解。纤维蛋白溶解药(fibrinolytic drugs)激活纤溶酶而促进纤溶，也称溶栓药(thrombolytic drugs)，用于治疗急性血栓栓塞性疾病。第一代的溶栓药链激酶(SK)和尿激酶(UK)至今仍然是国内外使用最广泛的品种，随着尿激酶原(Pro-UK)等新一代溶栓药的问世，这类药物正在临床逐渐推广应用。

- 25 纤维蛋白原(Fibrinogen，又称为血纤维蛋白原)是由肝细胞合成和分泌的一种糖蛋白($\alpha 2\beta 2\gamma 2$)，是参与凝血和止血过程中的重要蛋白纤维蛋白。是在凝血过程中，凝血酶切除血纤维蛋白原中的血纤肽 A 和 B 而生成的单体蛋白质。高纤维蛋白原是各种血栓性疾病重要危险因素，在临床中被认为是疾病状态的标志物。

发明内容

- 30 本发明的目的是提供了一种含有可与底物 GPRP 肽段结合的氨基酸序列的蛋白、含有此氨基酸序列的纤维蛋白原相关蛋白 1 (fibrinogen like protein 1，简称 FGL1) 以及其纤维原蛋白结构域 (fibrinogen domain of FGL1，简称 FD)，其与现有的药物具有不同的作用机制，可以通过竞争纤维蛋白 γ 亚基与血纤肽 A 结合，从而抑制血栓形成过程中纤维蛋白组装。

本发明的上述目的可采用下列技术方案来实现：

本发明的第一个发明点是提供了一种蛋白，所述蛋白含有可与底物 GPRP 肽段结合的氨基酸序列，氨基酸序列的结构为：色氨酸—AA_{n1}—酪氨酸—AA_{n2}—半胱氨酸—AA_{n3}—谷氨酸—天冬氨酸—AA_{n4}—半胱氨酸—组氨酸—AA_{n5}—天冬氨酸—AA_{n6}—酪氨酸—AA_{n7}—色氨酸，其中，AA 为氨基酸，n1-n7 为氨基酸数量，n1=16-18 个，n2=2-4 个，n3=1-3 个，n4=7-9 个，n5=16-18 个，n6=4-6 个，n7=3-5 个。

上述的蛋白，所述氨基酸数量 n1=17 个，n2=3 个，n3=2 个，n4=8 个，n5=17 个，n6=5 个，n7=4 个。

也即是，氨基酸序列的结构为：色氨酸—17 个氨基酸—酪氨酸—3 个氨基酸—半胱氨酸—2 个氨基酸—谷氨酸—天冬氨酸—8 个氨基酸—半胱氨酸—组氨酸—17 个氨基酸—天冬氨酸—5 个氨基酸—酪氨酸—4 个氨基酸—色氨酸。

表明了色氨酸与酪氨酸之间连接有任意的 17 个氨基酸，酪氨酸与半胱氨酸之间连接有任意的 3 个氨基酸，半胱氨酸与谷氨酸之间连接有任意的 2 个氨基酸，谷氨酸与天冬氨酸之间直接连接，天冬氨酸与另一半胱氨酸之间连接有任意的 8 个氨基酸，另一半胱氨酸与组氨酸之间直接相连，组氨酸与另一天冬氨酸之间连接有任意的 17 个氨基酸，另一天冬氨酸与另一酪氨酸之间连接有任意的 5 个氨基酸，另一酪氨酸与另一色氨酸之间连接有任意的 4 个氨基酸。

此蛋白所包含的可与底物 GPRP 肽段结合的氨基酸序列，在保证此氨基酸序列关键位点存在以及结构相同或 80% 相同的情况下，氨基酸序列中的 AA 可以为任意的功能性氨基酸，采用不同功能的 AA，也将会给所述蛋白带来不同的复合功效；同时，对此蛋白氨基酸序列中的某些关键位点进行突变，也有可能实现增强其抑制血栓形成功能的效果，如 204 位和/或 269 位色氨酸突变为丙氨酸的情形下，突变体对聚集的纤维蛋白的裂解相比于不突变形态下，明显有所增强（如图 27 所示）。

具体到本发明所提供的纤维蛋白原相关蛋白 1 中，氨基酸序列即为 204 位色氨酸，222 位酪氨酸，226 位半胱氨酸，229 位谷氨酸，230 位天冬氨酸，239 位半胱氨酸，240 位组氨酸，258 位天冬氨酸，264 位酪氨酸，269 位色氨酸。

上述的氨基酸序列中所列出的氨基酸位点，为可与底物 GPRP (Gly-Pro-Arg-Pro) 肽段相结合的关键性氨基酸位点，氨基酸序列能够通过这些关键氨基酸位点以疏水键、氢键或盐键特异性、竞争性的与底物 GPRP 相结合，如图 26 所示，其竞争性的占据了可与血纤肽 A 结合的结合位点，从而通过抑制纤维蛋白的组装、抑制了纤维蛋白的活性，实现了抑制血栓形成或减缓血栓形成进度的效果。

本发明的第二个发明点是提供了纤维蛋白原相关蛋白 1，为如下任意一项所示的蛋白质并包含有前述的氨基酸序列：

(a1) 氨基酸序列如 SEQ ID No.1 (即 SEQ ID No.1) 或 SEQ ID No.1 的第 48-290 位 (即 SEQ ID No.3) 所示的蛋白质；

(a2)将 SEQ ID No.1 或 SEQ ID No.1 的第 48-290 位所示的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加且具有相同功能的蛋白质;

(a3) 与 (a1) - (a2) 中任一所限定的氨基酸序列具有 99%以上、95%以上、90%以上、85%以上或者 80%以上同源性且具有相同功能的蛋白质;

5 (a4) 在 (a1) - (a3) 中任一所限定的蛋白质的 N 端和/或 C 端连接标签后得到的融合蛋白。

纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 包含纤维蛋白结构域蛋白 (FD), 并且单独 FD 结构域蛋白也具有与 FGL1 相同的或类似的功能; 其中, FGL1 的氨基酸序列如序列表 SEQ ID No.1 所示, 单独 FD 结构域蛋白的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID No.1
10 的第 48-290 位所示。

纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 的氨基酸序列如下所示, SEQ ID No.1:

LEDCAQEQMRLRAQVRLLETRVKQQQVKIKQLLQENEVQFLDKGDENTVID
LGSKRQYADCSEIFNDGYKLSGFYKIKPLQSPAEF SVYCDMSDGGGWTVIQRRSDG
SENFNRGWKDYENGFGNFVQKHGEYWLGNKNLHFLT TQEDYTLKIDLADFEKNS
15 RYAQYKNFKVGDEKNFYELNIGEYSGTAGDSL AGNFHPEVQWWASHQRMKFSTW
DRDHDNYEGNCAEEDQSGW WFN RCHSANLNGVYYSGPYTAKTDNGIVWYTW H
GWWYSLKSVMKIRPND FIPNVI。

纤维蛋白结构域蛋白 (FD) 的氨基酸序列如下所示, SEQ ID No.3:

TVIDLGSKRQYADCSEIFNDGYKLSGFYKIKPLQSPAEF SVYCDMSDGGGWTV
20 IQRRSDGSENFNRGWKDYENGFGNFVQKHGEYWLGNKNLHFLT TQEDYTLKIDL
ADFEKNSRYAQYKNFKVGDEKNFYELNIGEYSGTAGDSL AGNFHPEVQWWASHQ
RMKFSTWDRDHDNYEGNCAEEDQSGW WFN RCHSANLNGVYYSGPYTAKTDNGI
VWYTW HGWYSLKSVMKIRPND FIPNVI。

本发明的第三个发明点是提供了编码上述纤维蛋白原相关蛋白 1 的核酸分子。

25 进一步的, 所述核酸分子为基因; 所述基因是如下任意一项所述的 DNA 分子:
(b1)SEQ ID No.2(即 SEQ ID No.2)或 SEQ ID No.2 的第 142-870 位(即 SEQ ID No.4)
所示的 DNA 分子;

(b2) 在严格条件下与 (b1) 限定的 DNA 分子杂交且编码所述蛋白质的 DNA 分子;

(b3) 与 (b1) - (b2) 限定的 DNA 序列具有 99%以上、95%以上、90%以上、85%
30 以上或者 80%以上同源性且编码所述蛋白质的 DNA 分子。

(b4) 编码 (a3) 中所述蛋白质的 DNA 分子。

纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 的核酸序列如下所示, SEQ ID No.2:

ctcgaggactgtgccaggagcagatgcggctcagagcccaggtgcgcctgctgagacccgggtcaaacagcaacag
gtcaagatcaagcagcttttcaggagaatgaagtcagttccttgataaaggagatgagaatactgtcattgatcttggaagcaag
35 aggcagtatgcagattgttcagagattttcaatgatgggtataagctcagtggtatttacaaaatcaaacctctccagagcccagcag
aattttctgtttattgtgacatgtccgatggaggaggatggactgtaattcagagacgatctgatggcagtgaaaactttaacagagga
tggaagactatgaaaatggctttggaaattttgtccaaaacatgggtgaatattggctgggcaataaaaatcttcacttctgaccact

caagaagactacactttaaaatcgaccttgacagattttgaaaaaatagccgttatgcacaatataagaatttcaaagttggagatga
aaagaattttacgagttgaatattgggaatattctggaacagctggagattcccttgccgggaattttcatcctgaggtgcagtggt
gggctagtcaccaaagaatgaaattcagcacgtgggacagagatcatgacaactatgaaggggaactgcgcagaagaagatcagt
ctggctggtggtttaacaggtgtcactctgcaaacctgaatggtgtatactacagcgccctacacggctaaaacagacaatggg
5 attgtctggtacacctggcatgggtggtgtattctctgaaatctgtggttatgaaaattaggccaaatgattttattccaaatgtaatt。

纤维原蛋白结构域蛋白（FD）的核酸序列如下所示，SEQ ID No.4:

actgtcattgatcttgaagcaagaggcagtatgcagattgttcagagattttcaatgatgggtataagctcagttggattttaca
aatcaaacctctccagagcccagcagaattttctgtttattgtgacatgtccgatggaggaggatggactgtaattcagagacgatc
tgatggcagtgaaaactttaacagaggatggaaagactatgaaaatggctttggaaattttgtccaaaaacatggtgaatattggctg
10 ggcaataaaaaatcttcaactcttgaccactcaagaagactacactttaaaatcgaccttgacagattttgaaaaaatagccgttatgc
acaatataagaatttcaaagttggagatgaaaagaatttctacgagttgaatattgggaatattctggaacagctggagattcccttg
cggggaattttcatcctgaggtgcagtggtgggctagtcaccaaagaatgaaattcagcacgtgggacagagatcatgacaactat
gaaggggaactgcgcagaagaagatcagctggctggtggtttaacaggtgtcactctgcaaacctgaatggtgtatactacagcgg
cccctacacggctaaaacagacaatgggattgtctggtacacctggcatgggtggtgtattctctgaaatctgtggttatgaaaatt
15 aggccaaatgattttattccaaatgtaatt。

本发明的第四个发明点是提供了上述核酸分子的表达盒、重组载体、重组菌或转基因细胞系。

本发明的第五个发明点是提供了上述纤维蛋白原相关蛋白 1（FGL1）或上述核酸分子或上述重组载体、重组菌或转基因细胞系的应用，所述应用至少为如下所述的任意一种：

- (c1) 制备用于抑制血栓发生的产品；
- (c2) 制备用于抑制血栓程度的产品；
- (c3) 制备用于抑制血浆中纤维蛋白活性的产品；
- (c4) 制备用于抑制血浆中纤维蛋白原组装的产品；
- 25 (c5) 制备用于增强溶纤能力的产品；
- (c6) 制备用于延长血浆的活化部分凝血酶时间和/或凝血酶原时间和/或凝血酶时间的产品。

本发明的研究表明纤维蛋白原相关蛋白 1（FGL1）或纤维原蛋白结构域蛋白（FD）抑制血栓形成过程中纤维蛋白组装，可用于制备治疗血栓相关疾病的药物。

30 其中，所述治疗血栓相关疾病的药物，是以纤维蛋白原相关蛋白 1（FGL1）或纤维原蛋白结构域蛋白（FD）为活性成分的药物。所述治疗血栓相关疾病的药物可用于治疗多种原因引起的血栓疾病，也可以用于预防血栓疾病的发生，同时，还可以用于预防和治疗多种与纤维蛋白活性增高、溶纤能力降低以及血浆的活化部分凝血酶时间和/或凝血酶原时间和/或凝血酶时间缩短相关的疾病。

35 纤维蛋白原相关蛋白 1（FGL1）包含纤维原蛋白结构域蛋白（FD），其作用机理为：可通过竞争纤维蛋白 γ 亚基与血纤肽 A 结合，从而抑制血栓形成过程中纤维蛋

白组装。

也可对纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 进行突变, 以期增加其与血纤肽 A 的亲合力, 从而达到提高药效的目的。

进一步的, 上述的应用, 所述蛋白质的制备方法为: 将所述蛋白质的编码基因克隆入真核表达载体, 以无血清培养基培养真核细胞表达所述蛋白质, 采用 Ni-NTA 亲和力柱进行纯化, 再使用 Superdex 200 10/300 GL 色谱柱通过凝胶过滤进一步纯化蛋白质, 得到高纯度纯化蛋白质。

进一步的, 上述的应用, 所述产品为药物产品, 所述药物产品包括疫苗产品。

进一步的, 上述的应用, 所述药物产品类型包括 DNA 药物、mRNA 药物、蛋白质或腺病毒药物。所述的用于预防或治疗血栓类疾病的药物产品, 包括但不限于上述的类型产品, 其可采用多种载体形式进行给药, 如质粒包裹、微球包裹、外泌体携带等, 亦可采用多种形式的载蛋白给药方式, 如蛋白与化合物结合给药、蛋白质与肽结合给药、蛋白质与小分子结合给药等, 其最终目的是为了保证本发明所述纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 或纤维蛋白结构域蛋白 (FD) 的生物活性, 通过不同的给药方式将活性成分摄入, 以抑制纤维蛋白的组装。

进一步的, 上述的应用, 所述产品中还修饰有用于穿过血脑屏障的结构。

进一步的, 上述的应用, 所述修饰的穿过血脑屏障的结构为大脑靶向配体。

进一步的, 上述的应用, 所述大脑靶向配体, 包括但不限于 RVG 肽、硬脂酸-转铁蛋白、载体蛋白 E。

基于上述记载, 本发明所述的用于预防或治疗血栓类疾病的药物产品, 在保证纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 或纤维蛋白结构域蛋白 (FD) 生物活性的前提下, 还可以将其与多种靶向配体结合, 比较突出的靶向配体修饰是将蛋白或结构域蛋白与大脑靶向配体结合, 以利于其突破血脑屏障 (BBB), 从而实现脑部血栓的机体供药治疗, 但本发明的作用并不仅限于此, 其同样可与其它结构或形式的靶向配体结合, 从而实现针对不同病灶的靶向治疗。

进一步的, 上述的应用, 所述药物中还包括有可联合使用的治疗用药。

进一步的, 上述的应用, 所述可联合使用的治疗用药分别为尿激酶、链激酶、阿替普酶、瑞替普酶或组织性纤维酶原激活剂。

纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 及其突变体可以有效协同现有抗血栓药物 (尿激酶和组织型纤维酶原激活剂等), 并降低现有抗血栓药物的使用剂量, 缓解其毒副作用。

本发明的第六个发明点是提供了一种生物材料, 所述生物材料为能够表达上述纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 的核酸分子或含有所述核酸分子的表达盒、重组载体、重组菌或转基因细胞系。

目前已有的抗血栓药, 根据作用机制不同可分为三类, 分别为:

1) 抗凝药物: 机制为抑制凝血过程, 副作用为容易造成组织出血;
2) 抗血小板药物: 机制为抑制血小板聚集, 副作用为造成组织出血;
3) 纤溶药物: 机制为通过诱导纤维蛋白降解, 使已经形成的血栓溶解, 副作用同样为出血并发症。

5 本发明的特点及优点是: 本发明提供了含有可与底物 GPRP 肽段结合的氨基酸序列的蛋白、含有此氨基酸序列的纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 及其活性结构域 (FD), 以及上述蛋白在制备抑制纤维蛋白组装的产品中的应用, 所述的含有可与底物 GPRP 肽段结合的氨基酸序列的蛋白、纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1)、其纤维原蛋白结构域 (FD) 及其突变体, 与现有的药物具有不同的作用机制, 可以通过竞争
10 纤维蛋白底物结合口袋, 从而抑制血栓形成过程中纤维蛋白的组装, 通过突变, 可以使其具有更强的底物亲和力, 能够有效增强血栓治疗药物的使用效果。FGL1 和 FD 的作用机理是破坏了纤维蛋白的组装过程, 故其与现有溶栓药物相比, 溶栓效果优异, 但溶栓过程更为缓和, 基本不会产生出血等副作用。也即是说, 本发明是作用于纤维蛋白, 而非纤维蛋白原, 也就避免了现有血栓治疗药物在使用过程中由于作用于
15 纤维蛋白原, 而导致极易引发药物副作用大出血的技术难题; 也正是由于此种作用机理, 将本发明提供的 FGL1 和 FD 与多种现有血栓治疗药物 (如阿替普酶等) 联合使用时, 能够协同治疗血栓类疾病, 同时也能够大幅降低现有抗血栓药物普遍性出血副作用的发生几率, 为血栓类疾病的治疗拓展了新的途径。

附图说明

20 为了更清楚地说明本发明实施例中的技术方案, 下面将对实施例描述中所需要使用的附图作简单地介绍, 显而易见地, 下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例, 对于本领域普通技术人员来讲, 在不付出创造性劳动的前提下, 还可以根据这些附图获得其他的附图。

图 1 显示为纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) Ni-NTA 亲和力柱纯化后的 SDS-PAGE
25 图。

图 2 显示为纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 经过 Superdex 200 10/300 GL 色谱柱纯化图; 其中, 图中纵坐标为 A280 蛋白吸收值, 横坐标为体积数。

图 3 显示为纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 经过 Superdex 200 10/300 GL 色谱柱纯化后的 SDS-PAGE 图; 其中, 泳道 1-12 分别显示为: 1-蛋白标准品, 2-收集管 1,
30 3-收集管 2, 4-收集管 3, 5-收集管 4, 6-收集管 5, 7-收集管 6, 8-收集管 7, 9-收集管 8, 10-收集管 9, 11-收集管 10, 12-蛋白标准品。

图 4 显示为纤维蛋白原结构域 (FD) Ni-NTA 亲和力柱纯化后的 SDS-PAGE 图。

图 5 显示为纤维蛋白原结构域 (FD) 经过 Superdex 200 10/300 GL 色谱柱纯化图, 其中, 图中纵坐标为 A280 蛋白吸收值, 横坐标为体积数。

35 图 6 显示为纤维蛋白原结构域 (FD) 经过 Superdex 200 10/300 GL 色谱柱纯化后

SDS-PAGE 图；其中，泳道 19-29 分别显示为：19-收集管 19，20-收集管 20，21-收集管 21，22-收集管 22，23-收集管 23，24-收集管 24，25-收集管 25，26-收集管 26，27-收集管 27，28-收集管 28，29-蛋白标准品。

图 7 显示为纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 在无氯化钙的作用下对纤维蛋白聚集的影响。

图 8 显示为纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 在有氯化钙的作用下对纤维蛋白聚集的影响。

图 9 显示为纤维蛋白原结构域 (FD) 在无氯化钙的作用下对纤维蛋白聚集的影响。

图 10 显示为纤维蛋白原结构域 (FD) 在有氯化钙的作用下对纤维蛋白聚集的影响。

图 11 显示为扫描电镜观察纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 对纤维蛋白聚集的影响对比图。

图 12 显示为扫描电镜观察纤维蛋白原结构域 (FD) 对纤维蛋白聚集的影响对比图；其中可以明显看出，在纤维蛋白原结构域 (FD) 的处理下纤维蛋白聚集形成的栓变细，结构变松散。

图 13 显示为扫描电镜观察纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 对小鼠血栓形态的影响对比图。

图 14 显示为扫描电镜观察纤维蛋白原结构域 (FD) 对小鼠血栓形态的影响对比图，其中可以明显看出，在纤维蛋白原结构域 (FD) 的处理下血栓变细，结构变松散。

图 15 显示为纤维蛋白原结构域 (FD) 对聚集的纤维蛋白裂解作用的对照图。

图 16 显示为纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 对聚集的纤维蛋白裂解作用的对照图。

图 17 显示为纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 与组织型纤溶酶原激活剂 tPA 协同溶解纤维蛋白聚集的对比图。

图 18 显示为纤维蛋白原结构域 (FD) 与组织型纤溶酶原激活剂 tPA 协同溶解纤维蛋白聚集的对比图。

图 19 显示为纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 与尿激酶 uPA 协同溶解纤维蛋白聚集的对比图。

图 20 显示为纤维蛋白原结构域 (FD) 与尿激酶 uPA 协同溶解纤维蛋白聚集的对比图。

图 21 显示为纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 质粒注射小鼠过表达改善凝血酶诱导的血栓模型数据统计图；其中，(A) 为 ELISA 验证纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 质粒注射过表达的对比图；(B) 为纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 过表达显著提高

小鼠存活率的对比图。

图 22 显示为纤维蛋白原结构域 (FD) 质粒注射小鼠过表达改善凝血酶诱导的血栓模型数据统计图；其中，(A) 为 ELISA 验证纤维蛋白原结构域 (FD) 质粒注射过表达的对比图；(B) 为纤维蛋白原结构域 (FD) 过表达显著提高小鼠存活率的对比图。

图 23 显示为使用 RVG 肽和 Cy5.5 荧光修饰纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 的操作流程。

图 24 显示为 RVG 肽修饰促进纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 在小鼠脑组织中的分布检测结果图。

图 25 显示为纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 及纤维蛋白原结构域 (FD) 对纤维蛋白原的损失 (A) 和流血时间 (B) 无明显影响 (无毒副作用)。

图 26 显示为纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) (绿色) 和底物 GPRP 肽段结合 (橙色) 结构图；其中，标记显示的氨基酸为底物结合的关键位点，分别为 204 位色氨酸，222 位酪氨酸，226 位半胱氨酸，229 位谷氨酸，230 位天冬氨酸，239 位半胱氨酸，240 位组氨酸，258 位天冬氨酸，264 位酪氨酸，269 位色氨酸；图 26B 为图 26A 沿 Y 轴旋转 70° 得到的。

图 27 显示为纤维蛋白原结构域 (FD) 突变体对聚集的纤维蛋白的裂解作用对比图；其中，突变位点为 204 位和 269 位的色氨酸，突变为丙氨酸，突变后的纤维蛋白原结构域 (FD) 突变体裂解效果明显增强。

具体实施方式

下面将结合本发明实施例中的附图，对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。

实施例 1:

一种蛋白，含有可与底物 GPRP 肽段结合的氨基酸序列，氨基酸序列的结构为：色氨酸—AA_{n1}—酪氨酸—AA_{n2}—半胱氨酸—AA_{n3}—谷氨酸—天冬氨酸—AA_{n4}—半胱氨酸—组氨酸—AA_{n5}—天冬氨酸—AA_{n6}—酪氨酸—AA_{n7}—色氨酸，其中，AA 为氨基酸，n1-n7 为氨基酸数量，n1=16-18 个，n2=2-4 个，n3=1-3 个，n4=7-9 个，n5=16-18 个，n6=4-6 个，n7=3-5 个。

优选为，氨基酸数量 n1=17 个，n2=3 个，n3=2 个，n4=8 个，n5=17 个，n6=5 个，n7=4 个。

也即是，氨基酸序列的结构为：色氨酸—17 个氨基酸—酪氨酸—3 个氨基酸—半胱氨酸—2 个氨基酸—谷氨酸—天冬氨酸—8 个氨基酸—半胱氨酸—组氨酸—17 个氨基酸—天冬氨酸—5 个氨基酸—酪氨酸—4 个氨基酸—色氨酸。

表明了色氨酸与酪氨酸之间连接有任意的 17 个氨基酸，酪氨酸与半胱氨酸之间连接有任意的 3 个氨基酸，半胱氨酸与谷氨酸之间连接有任意的 2 个氨基酸，谷氨酸与天冬氨酸之间直接连接，天冬氨酸与另一半胱氨酸之间连接有任意的 8 个氨基酸，另一半胱氨酸与组氨酸之间直接相连，组氨酸与另一天冬氨酸之间连接有任意的 17 个氨基酸，另一天冬氨酸与另一酪氨酸之间连接有任意的 5 个氨基酸，另一酪氨酸与另一色氨酸之间连接有任意的 4 个氨基酸。

实施例 2:

纤维蛋白原相关蛋白 1，为如下任意一项所示的含有实施例 1 所述的氨基酸序列的蛋白质：

- 10 (a1) 氨基酸序列如 SEQ ID No.1 或 SEQ ID No.1 的第 48-290 位所示的蛋白质；
- (a2) 将 SEQ ID No.1 或 SEQ ID No.1 的第 48-290 位所示的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加且具有相同功能的蛋白质；
- (a3) 与 (a1) - (a2) 中任一所限定的氨基酸序列具有 99% 以上、95% 以上、90% 以上、85% 以上或者 80% 以上同源性且具有相同功能的蛋白质；
- 15 (a4) 在 (a1) - (a3) 中任一所限定的蛋白质的 N 端和/或 C 端连接标签后得到的融合蛋白。

纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 包含纤维蛋白结构域蛋白 (FD)，并且单独 FD 结构域蛋白也具有与纤维蛋白原 FGL1 相同的或类似的功能；其中，纤维蛋白原 FGL1 的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID No.1 所示，单独 FD 结构域蛋白的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID No.1 的第 40-272 位所示。

纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 的氨基酸序列如下所示：

LEDCAQEQMRLRAQVRLLETRVKQQQVKIKQLLQENEVQFLDKGDENTVID
LGSKRQYADCSEIFNDGYKLSGFYKIKPLQSPAEF SVYCDMSDGGGWTVIQRRSDG
SENFNRGWKDYENGFGNFVQKHGEYWLGNKNLHFLT TQEDYTLKIDLADFEKNS
25 RYAQYKNFKVGDEKNFYELNIGEYSGTAGDSL AGNFHPEVQWWASHQRMKFSTW
DRDHDNYEGNCAEEDQSGWGFNRCHSANLNGVYYSGPYTAKTDNGIVWYTW H
GWWYSLKSVVMKIRPNDFIPNVI。

纤维蛋白结构域蛋白 (FD) 的氨基酸序列如下所示：

TVIDLGSKRQYADCSEIFNDGYKLSGFYKIKPLQSPAEF SVYCDMSDGGGWTV
30 IQRRSDGSENFNRGWKDYENGFGNFVQKHGEYWLGNKNLHFLT TQEDYTLKIDL
ADFEKNSRYAQYKNFKVGDEKNFYELNIGEYSGTAGDSL AGNFHPEVQWWASHQ
RMKFSTWDRDHDNYEGNCAEEDQSGWGFNRCHSANLNGVYYSGPYTAKTDNGI
VWYTW HGWYSLKSVVMKIRPNDFIPNVI。

具体到本发明所提供的纤维蛋白原相关蛋白 1 中，氨基酸序列即为 204 位色氨酸，
35 222 位酪氨酸，226 位半胱氨酸，229 位谷氨酸，230 位天冬氨酸，239 位半胱氨酸，
240 位组氨酸，258 位天冬氨酸，264 位酪氨酸，269 位色氨酸。

上述的氨基酸序列中所列出的氨基酸位点,为可与底物 GPRP(Gly-Pro-Arg-Pro)肽段相结合的关键性氨基酸位点,氨基酸序列能够通过这些关键氨基酸位点特异性、竞争性的与底物 GPRP 相结合,如图 26 所示,其竞争性的占据了可与血纤肽 A 结合的结合位点,从而通过抑制纤维蛋白的组装、抑制了纤维蛋白的活性,实现了抑制血

5 栓形成或减缓血栓形成进度的效果。

实施例 3:

本发明还提供了编码上述纤维蛋白原相关蛋白 1 的核酸分子,核酸分子为基因;所述基因是如下任意一项所述的 DNA 分子:

(b1) SEQ ID No.2 或 SEQ ID No.2 的第 142-870 位所示的 DNA 分子;

10 (b2) 在严格条件下与 (b1) 限定的 DNA 分子杂交且编码所述蛋白质的 DNA 分子;

(b3) 与 (b1) - (b2) 限定的 DNA 序列具有 99%以上、95%以上、90%以上、85%以上或者 80%以上同源性且编码所述蛋白质的 DNA 分子。

纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 的核酸序列如下所示:

ctcgaggactgtgcccaggagcagatgcggctcagagcccagggtgcgctgcttgagacccgggtcaaacagcaacag
15 gtcaagatcaagcagcttttgcaggagaatgaagtcagttccttgataaaggagatgagaatactgtcattgatcttgaagcaag
aggcagtatgcagattgttcagagattttcaatgatgggtataagctcagtggtattttacaaatcaaacctctccagagcccagcag
aattttctgtttattgtgacatgtccgatggaggaggatggactgtaattcagagacgatctgatggcagtgaaaactttaacagagga
tggaagactatgaaatggctttggaaattttgtccaaaacatgggtgaatattggctgggcaataaaatcttcacttctgaccact
caagaagactacactttaaaaatcgaccttcagattttgaaaaaatagccgttatgcacaatataagaatttcaaagttggagatga
20 aaagaatttctacgagtgaatattgggaatattctggaacagctggagattcccttgccggggaattttcatcctgaggtgcagtggt
gggctagtccacaaagaatgaaattcagcacgtgggacagagatcatgacaactatgaagggaactgcgcagaagaagatcagt
ctggctggtgtttaaaggtgtcactctgcaaacctgaatgggtgtatactacagcgccctacacggctaaaacagacaatggg
attgtctggtacacctggcatgggtgggtgtattctctgaaatctgtggttatgaaaattaggccaaatgattttattccaaatgtaatt。

纤维原蛋白结构域蛋白 (FD) 的核酸序列如下所示:

25 actgtcattgatcttgaagcaagaggcagtatgcagattgttcagagattttcaatgatgggtataagctcagtggtatttaca
aatcaaacctctccagagcccagcagaattttctgtttattgtgacatgtccgatggaggaggatggactgtaattcagagacgatc
tgatggcagtgaaaactttaacagaggatggaaagactatgaaaatggctttggaaattttgtccaaaacatgggtgaatattggctg
ggcaataaaaatcttcacttctgaccactcaagaagactacactttaaaaatcgaccttcagattttgaaaaaatagccgttatgc
acaatataagaatttcaaagttggagatgaaaagaatttctacgagtgaatattggggaatattctggaacagctggagattcccttg
30 cggggaattttcatcctgaggtgcagtggtgggctagtccacaaagaatgaaattcagcacgtgggacagagatcatgacaactat
gaagggaactgcgcagaagaagatcagctctggctggtgtttaaaggtgtcactctgcaaacctgaatgggtgtatactacagcgg
cccctacacggctaaaacagacaatgggattgtctggtacacctggcatgggtgggtgtattctctgaaatctgtggttatgaaaatt
aggccaaatgattttattccaaatgtaatt。

本发明同时还提供了上述核酸分子的表达盒、重组载体、重组菌或转基因细胞系。

35 实施例 4:

上述纤维蛋白原相关蛋白 1 或上述核酸分子或上述重组载体、重组菌或转基因细胞系的应用,所述应用至少为如下所述的任意一种:

- (c1) 制备用于抑制血栓发生的产品;
- (c2) 制备用于抑制血栓程度的产品;
- (c3) 制备用于抑制血浆中纤维蛋白活性的产品;
- (c4) 制备用于抑制血浆中纤维蛋白原组装的产品;
- 5 (c5) 制备用于增强溶纤能力的产品;
- (c6) 制备用于延长血浆的活化部分凝血酶时间和/或凝血酶原时间和/或凝血酶时间的产品。

研究表明纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 或纤维原蛋白结构域蛋白 (FD) 抑制血栓形成过程中纤维蛋白组装, 可用于制备治疗血栓相关疾病的药物。

- 10 其中, 所述治疗血栓相关疾病的药物, 是以纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 或纤维原蛋白结构域蛋白 (FD) 为活性成分的药物。所述治疗血栓相关疾病的药物可用于治疗多种原因引起的血栓疾病, 也可以用于预防血栓疾病的发生, 同时, 还可以用于预防和治疗多种与纤维蛋白活性增高、溶纤能力降低以及血浆的活化部分凝血酶时间和/或凝血酶原时间和/或凝血酶时间缩短相关的疾病。

- 15 纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 包含纤维原蛋白结构域蛋白 (FD), 其作用机理为: 可通过竞争纤维蛋白 γ 亚基与血纤肽 A 结合, 从而抑制血栓形成过程中纤维蛋白组装。

也可对纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 进行突变, 以期增加其与血纤肽 A 的亲合力, 从而达到提高药效的目的。

- 20 所述蛋白质的制备方法为: 将所述蛋白质的编码基因克隆入真核表达载体, 以无血清培养基培养真核细胞表达所述蛋白质, 采用 Ni-NTA 亲和力柱进行纯化, 再使用 Superdex 200 10/300GL 色谱柱通过凝胶过滤进一步纯化蛋白质, 得到高纯度纯化蛋白质。

所述产品为药物产品, 所述药物产品包括疫苗产品。

- 25 所述药物产品类型包括 DNA 药物、mRNA 药物、蛋白药物或腺病毒药物。所述的用于预防或治疗血栓类疾病的药物产品, 包括但不只限于上述的类型产品, 其可采用多种载体形式进行给药, 如质粒包裹、微球包裹、外泌体携带等, 亦可采用多种形式的载蛋白给药方式, 如蛋白与化合物结合给药、蛋白质与肽结合给药、蛋白质与小分子结合给药等, 其最终目的是为了保证本发明所述纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 或纤维原蛋白结构域蛋白 (FD) 的生物活性, 通过不同的给药方式将活性成分摄入,
- 30 以抑制纤维蛋白的组装。

所述产品中还修饰有用于穿过血脑屏障的结构。

所述修饰的穿过血脑屏障的结构为大脑靶向配体。

所述大脑靶向配体, 包括但不限于 RVG 肽、硬脂酸-转铁蛋白、载体蛋白 E。

- 35 基于上述记载, 本发明所述的用于预防或治疗血栓类疾病的药物产品, 在保证纤

纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 或纤维蛋白结构域蛋白 (FD) 生物活性的前提下，还可以将其与多种靶向配体结合，比较突出的靶向配体修饰是将蛋白或结构域蛋白与大脑靶向配体结合，以利于其突破血脑屏障 (BBB)，从而实现脑部血栓的机体供药治疗，但本发明的作用并不仅限于此，其同样可与其它结构或形式的靶向配体结合，

5 从而实现针对不同病灶的靶向治疗。

所述药物中还包括有可联合使用的治疗用药。

所述可联合使用的治疗用药分别为尿激酶、链激酶、阿替普酶、瑞替普酶或组织性纤维酶原激活剂。

纤维原样蛋白 1 及其突变体可以有效协同现有抗血栓药物 (尿激酶和组织型纤维酶原激活剂等)，并降低现有抗血栓药物的使用剂量，缓解其毒副作用。

10

本发明同时还提供了一种生物材料，所述生物材料为能够表达上述蛋白的核酸分子或含有所述核酸分子的表达盒、重组载体、重组菌或转基因细胞系。

实施例 5:

纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 和纤维蛋白原结构域 (FD) 抑制纤维蛋白聚集：

15 a、纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 的制备：

将纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 蛋白质的编码基因克隆入真核表达载体，以无血清培养基培养真核细胞表达所述蛋白质，采用 Ni-NTA 亲和力柱进行纯化，再使用 Superdex 200 10/300 GL 色谱柱通过凝胶过滤进一步纯化蛋白质，得到高纯度纯化的蛋白质，SDS-PAGE 验证其纯度。

20 纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) Ni-NTA 亲和力柱纯化后的 SDS-PAGE 如图 1 所示；

纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 分子筛如图 2 所示；

纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 分子筛后的 SDS-PAGE 如图 3 所示。

b、纤维蛋白原结构域蛋白 (FD) 按照如下方法获得：

25 纤维蛋白原结构域蛋白 (FD) 表达与纯化：以纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 蛋白质的编码基因为模版，使用 PCR 及同源重组法获得表达载体。以无血清培养基培养真核细胞表达所述蛋白质，采用 Ni-NTA 亲和力柱进行纯化，再使用 Superdex 200 10/300 GL 色谱柱通过凝胶过滤进一步纯化蛋白质，得到高纯度纯化蛋白质，SDS-PAGE 验证其纯度。

30 纤维蛋白原结构域 (FD) Ni-NTA 亲和力柱纯化后的 SDS-PAGE 如图 4 所示；

图 5 显示为纤维蛋白原结构域 (FD) 分子筛如图 5 所示；

图 6 显示为纤维蛋白原结构域 (FD) 分子筛后 SDS-PAGE 如图 6 所示。

c、纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 抑制纤维蛋白聚集：

纤维蛋白原也叫做凝血因子 I，由 $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ 三个亚基组成的六聚体复合物，是血栓的重要组成部分。纤维蛋白聚集主要由凝血酶 Thrombin 和凝血因子 13 介导。凝血因

35

子 13 催化 α 或者 γ 亚基 C 端结构域的氨基酸共价连接。凝血酶 Thrombin 将纤维原蛋白的 α 和 β 亚基切割, 暴露出血纤肽 A (Knob A) 和血纤肽 B (Knob B)。暴露出的血纤肽 A (Knob A) 和血纤肽 B (Knob B) 分别插入另一个纤维蛋白分子的 γ 和 β 亚基的 C 端结构域, 从而促进纤维蛋白聚集。组织型纤溶酶原激活剂 tPA 虽然可以
5 直接靶向降解纤维蛋白, 但由于一些抑制因子的作用, 使其在临床上用量极大, 造成的副作用主要为神经毒性及出血。研究表明, 松散结构的纤维蛋白有助于增强组织型纤溶酶原激活剂 tPA 降解效果。纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 可以通过靶向纤维蛋白抑制纤维蛋白聚集。

实验方法如下:

10 多功能酶标仪 M200PRO 检测光散射过程, 调节仪器激发光为 350 nm, 发射光为 350 nm。对照组为 3.3 μ M 的纤维原蛋白, 模型组为 3.3 μ M 的纤维原蛋白+2.5 U/ml 凝血酶 Thrombin, 给药组为 3.3 μ M 的纤维原蛋白+2.5 U/ml 凝血酶 Thrombin+各剂量的纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1)。以上体系均在 20 mM Tris-HCl, pH7.4, 150 mM NaCl $\pm$ 5 mM CaCl₂ 溶液中, 体积为 100 微升/孔 (96 孔板)。25 $^{\circ}$ C, 每分钟检测一
15 次, 测量动力学曲线。

纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 在无氯化钙的作用下对纤维蛋白聚集的影响如图 7 所示。

纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 在有氯化钙的作用下对纤维蛋白聚集的影响如图 8 所示。

20 扫描电镜观察纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 对纤维蛋白聚集的影响对比如图 11 所示。

d、纤维蛋白原结构域 (FD) 抑制纤维蛋白聚集:

同理纤维蛋白原结构域 (FD) 可以通过靶向纤维蛋白抑制纤维蛋白聚集。

实验方法如下:

25 多功能酶标仪 M200PRO 检测光散射过程, 调节仪器激发光为 350 nm, 发射光为 350 nm。对照组为 3.3 μ M 的纤维原蛋白, 模型组为 3.3 μ M 的纤维原蛋白+2.5 U/ml 凝血酶 Thrombin, 给药组为 3.3 μ M 的纤维原蛋白+2.5 U/ml 凝血酶 Thrombin+各剂量的纤维蛋白原结构域 (FD)。以上体系均在 20 mM Tris-HCl, pH7.4, 150 mM NaCl $\pm$ 5 mM CaCl₂ 溶液中。25 $^{\circ}$ C, 每分钟检测一次 A350 吸光值, 测量动力学曲线。

30 纤维蛋白原结构域 (FD) 在无氯化钙的作用下对纤维蛋白聚集的影响如图 9 所示。

纤维蛋白原结构域 (FD) 在有氯化钙的作用下对纤维蛋白聚集的影响如图 10 所示。

扫描电镜观察纤维蛋白原结构域 (FD) 对纤维蛋白聚集的影响对比如图 12 所示;
35 其中可以明显看出, 在纤维蛋白原结构域 (FD) 的处理下纤维蛋白聚集形成的栓变

细，结构变松散。

实施例 6:

纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 和纤维蛋白原结构域 (FD) 质粒注射小鼠过表达对凝血酶诱导的血栓模型的保护作用:

- 5 1、纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 质粒注射小鼠过表达对凝血酶诱导的血栓模型的保护作用:

a. 小鼠的分组:

雌性八周龄 BALB/c 小鼠 (18-22 g) 只, 随机分为 3 组, 即正常对照组、模型组、纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 质粒注射组;

- 10 b. 纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 质粒注射及过表达体系的验证:

构建 pcDNA3.1 载体的 FGL1 表达质粒, 小鼠尾静脉注射质粒, 100 μ g/2 ml PBS/只小鼠, 18 小时后取小鼠血浆, ELISA 检测血浆中过表达的 FGL1 含量;

c. 纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 对凝血酶诱导的血栓模型的保护作用:

- 15 凝血酶 Thrombin 15 U/200 μ l PBS/只小鼠尾静脉注射造模, 记录注射后 1 小时内每组小鼠死亡只数, 计算纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 过表达的保护率。

扫描电镜观察纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 对小鼠血栓形态的影响对比如图 13 所示。

纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 对聚集的纤维蛋白裂解作用的对照如图 16 所示。

- 20 纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 质粒注射小鼠过表达改善凝血酶诱导的血栓模型数据统计如图 21 所示。

- 2、纤维蛋白原结构域 (FD) 质粒注射小鼠过表达对凝血酶诱导的血栓模型的保护作用:

具体操作方法与前述 FGL1 相同。

- 25 扫描电镜观察纤维蛋白原结构域 (FD) 对小鼠血栓形态的影响对比如图 14 所示, 其中可以明显看出, 在纤维蛋白原结构域 (FD) 的处理下血栓变细, 结构变松散。

纤维蛋白原结构域 (FD) 对聚集的纤维蛋白裂解作用的对照如图 15 所示。

纤维蛋白原结构域 (FD) 质粒注射小鼠过表达改善凝血酶诱导的血栓模型数据统计如图 22 所示。

30 实施例 7:

RVG 肽修饰促进纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 进入小鼠血脑屏障:

a. 试验材料:

- RVG29-Cys (YTWMPENPRPGTPCDIFTNSRGKRASNGGGGGGC) 多肽由南京金斯瑞合成, a-maleimide-u-N-hydroxy-succinimide ester polyethylene glycol (MAL-PEG-NHS, 分子量 2.1 kDa) 由美国 Creative PEGWorks 公司购买, NHS-cy5.5
- 35

染料由赛默飞公司购买；

b. MAL-PEG 修饰的纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) (MAL-PEG-FGL1) 制备：

MAL-PEG-NHS 和纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 以摩尔比 1:2 的比例，在 PBS (pH 8.0, 0.3 mL) 中室温反应 3 小时；10 kDa 的浓缩管浓缩并置换出未反应的

5 MAL-PEG-NHS；

c. RVG29-Cys-PEG 修饰的纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) (RVG29-Cys-PEG-FGL1) 制备：

RVG29-Cys 肽和 MAL-PEG-FGL1 以摩尔比 5:1 的比例，在 PBS (pH 7.0, 0.3 mL) 中室温反应 24 小时；10 kDa 的浓缩管浓缩并置换出未反应的 RVG29-Cys 肽；

10 d. NHS-cy5.5 标记的 RVG29-Cys-PEG-FGL1 蛋白制备：

10 μ g 的 NHS-cy5.5 和 10 mg RVG29-Cys-PEG-FGL1，在 PBS (pH 8.0, 0.3 mL) 中室温反应 1 小时，10 kDa 的浓缩管浓缩并置换出未反应的 NHS-cy5.5；

e. 观察 NHS-cy5.5 标记的 RVG29-Cys-PEG-FGL1 蛋白脑组织中荧光含量：

雌性八周龄 BALB/c 小鼠 (18-22 g) 只，随机分为 3 组，即正常对照组、NHS-cy5.5 15 标记的 FGL1 组和 NHS-cy5.5 标记的 RVG29-Cys-PEG-FGL1 组；小鼠尾静脉注射 10 mg/kg 蛋白，1 小时、2 小时、6 小时后使用小动物成像仪 (IVIS Lumina XR) 观察蛋白在小鼠器官中的分布。

使用 RVG 肽和 Cy5.5 荧光修饰纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 的操作流程如图 23 所示。

20 RVG 肽修饰促进纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 在小鼠脑组织中的分布检测结果如图 24 所示。

实施例 8：

纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 与组织型纤溶酶原激活剂 tPA 的协同使用：

a. 纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 与组织型纤溶酶原激活剂 tPA 的协同使用促进纤 25 维蛋白的聚集：

实验方法如下：

多功能酶标仪 M200PRO 检测光散射过程，调节仪器激发光为 350 nm，发射光为 350 nm。对照组为 3.3 μ M 的纤维原蛋白，模型组为 3.3 μ M 的纤维原蛋白+2.5 U/ml 凝血酶 Thrombin。上体系均在 20 mM Tris-HCl, pH7.4, 150 mM NaCl $\pm$ 10 mM CaCl₂ 30 溶液中，体积为 100 微升/孔 (96 孔板)。在凝胶状的纤维蛋白形成 1 小时后，加入 100 微升，2 nM 组织型纤溶酶原激活剂 tPA + 各剂量的纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1)。25°C，每分钟检测一次 A350 吸光值，测量动力学曲线。

b. 纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 与组织型纤溶酶原激活剂 tPA 的协同使用促进血 栓的溶解：

35 方法如下：

1) 血栓的制备:

首先在 96 孔板中沿着孔壁底部加入 5 微升促血栓滴液 (Innovin + CaCl_2), 其次在孔壁底部加入 25 微升新鲜小鼠血液。37°C 孵育 30 分钟, 即可得新鲜制备的血栓样本。

5 2) 血栓的溶解:

对照组为试剂对照, 给药组为 2 nM 组织型纤溶酶原激活剂 tPA, 各剂量的纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 的单用以及联用组。在 37°C, 使用多功能酶标仪 M200PRO 检测 510 nm 激发光的吸收值, 每分钟检测一次, 测量动力学曲线。

纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 与组织型纤溶酶原激活剂 tPA 协同溶解纤维蛋白聚集的对比如图 17 所示。

10 实施例 9:

纤维蛋白原结构域 (FD) 与组织型纤溶酶原激活剂 tPA 的协同使用:

a. 纤维蛋白原结构域 (FD) 与组织型纤溶酶原激活剂 tPA 的协同使用促进纤维蛋白的聚集:

15 实验方法如下:

多功能酶标仪 M200PRO 检测光散射过程, 调节仪器激发光为 350 nm, 发射光为 350 nm。对照组为 3.3 μM 的纤维原蛋白, 模型组为 3.3 μM 的纤维原蛋白+2.5 U/ml 凝血酶 Thrombin。上体系均在 20 mM Tris-HCl, pH7.4, 150 mM NaCl $\pm$ 10 mM CaCl_2 溶液中, 体积为 100 微升/孔 (96 孔板)。在凝胶状的纤维蛋白形成 1 小时后, 加入 100 微升, 2 nM 组织型纤溶酶原激活剂 tPA + 各剂量的纤维蛋白原结构域 (FD)。25°C, 每分钟检测一次 A350 吸光值, 测量动力学曲线。

b. 纤维蛋白原结构域 (FD) 与组织型纤溶酶原激活剂 tPA 的协同使用促进血栓的溶解:

方法如下:

25 1) 血栓的制备:

首先在 96 孔板中沿着孔壁底部加入 5 微升促血栓滴液 (Innovin + CaCl_2), 其次在孔壁底部加入 25 微升新鲜小鼠血液。37°C 孵育 30 分钟, 即可得新鲜制备的血栓样本。

2) 血栓的溶解:

30 对照组为试剂对照, 给药组为 2 nM 组织型纤溶酶原激活剂 tPA, 各剂量的纤维蛋白原结构域 (FD) 的单用以及联用组。在 37°C, 使用多功能酶标仪 M200PRO 检测 510 nm 激发光的吸收值, 每分钟检测一次, 测量动力学曲线。

纤维蛋白原结构域 (FD) 与组织型纤溶酶原激活剂 tPA 协同溶解纤维蛋白聚集的对比如图 18 所示。

35 实施例 10:

纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 与尿激酶 uPA 的协同使用:

- a. 纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 与尿激酶 uPA 的协同使用促进纤维蛋白的聚集:

实验方法如下:

多功能酶标仪 M200PRO 检测光散射过程, 调节仪器激发光为 350 nm, 发射光为 350 nm。对照组为 3.3 μ M 的纤维原蛋白, 模型组为 3.3 μ M 的纤维原蛋白+2.5 U/ml 凝血酶 Thrombin。上体系均在 20 mM Tris-HCl, pH7.4, 150 mM NaCl $\pm$ 10 mM CaCl₂ 溶液中, 体积为 100 微升/孔(96 孔板)。在凝胶状的纤维蛋白形成 1 小时后, 加入 100 微升, 800 U/ml 尿激酶 uPA+各剂量的纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1)。25°C, 每分钟检测一次 A350 吸光值, 测量动力学曲线。

- 10 b. 纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 与尿激酶 uPA 的协同使用促进血栓的溶解:

方法如下:

- 1) 血栓的制备:

首先在 96 孔板中沿着孔壁底部加入 5 微升促血栓滴液 (Innovin + CaCl₂), 其次在孔壁底部加入 25 微升新鲜小鼠血液。37°C 孵育 30 分钟, 即可得新鲜制备的血栓样本。

- 2) 血栓的溶解:

对照组为试剂对照, 给药组为 800 U/ml 尿激酶 uPA, 各剂量的纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 的单用以及联用组。在 37°C, 使用多功能酶标仪 M200PRO 检测 510 nm 激发光的吸收值, 每分钟检测一次, 测量动力学曲线。

- 20 纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1) 与尿激酶 uPA 协同溶解纤维蛋白聚集的对比如图 19 所示。

实施例 11:**纤维蛋白原结构域 (FD) 与尿激酶 uPA 的协同使用:**

- a. 纤维蛋白原结构域 (FD) 与尿激酶 uPA 的协同使用促进纤维蛋白的聚集:

25 实验方法如下:

多功能酶标仪 M200PRO 检测光散射过程, 调节仪器激发光为 350 nm, 发射光为 350 nm。对照组为 3.3 μ M 的纤维原蛋白, 模型组为 3.3 μ M 的纤维原蛋白+2.5 U/ml 凝血酶 Thrombin。上体系均在 20 mM Tris-HCl, pH7.4, 150 mM NaCl $\pm$ 10 mM CaCl₂ 溶液中, 体积为 100 微升/孔(96 孔板)。在凝胶状的纤维蛋白形成 1 小时后, 加入 100 微升, 2800 U/ml 尿激酶 uPA + 各剂量的纤维蛋白原结构域 (FD)。25°C, 每分钟检测一次 A350 吸光值, 测量动力学曲线。

- b. 纤维蛋白原结构域 (FD) 与尿激酶 uPA 的协同使用促进血栓的溶解

方法如下:

- 1) 血栓的制备:

35 首先在 96 孔板中沿着孔壁底部加入 5 微升促血栓滴液 (Innovin + CaCl₂), 其次

在孔壁底部加入 25 微升新鲜小鼠血液。37°C 孵育 30 分钟，即可得新鲜制备的血栓样本。

2) 血栓的溶解：

对照组为试剂对照，给药组为 800 U/ml 尿激酶 uPA，各剂量的纤维蛋白原结构域（FD）的单用以及联用组。在 37°C，使用多功能酶标仪 M200PRO 检测 510 nm 激

5 发光的吸收值，每分钟检测一次，测量动力学曲线。

纤维蛋白原结构域（FD）与尿激酶 uPA 协同溶解纤维蛋白聚集的对比如图 20 所示。

实施例 12：

10 纤维蛋白原相关蛋白 1（FGL1）和纤维蛋白原结构域（FD）具有较低的毒副作用：

雌性八周龄 BALB/c 小鼠（18-22 g）60 只，随机分为 5 组，即正常对照组、纤维蛋白原相关蛋白 1（FGL1）100 mg/kg，纤维蛋白原相关蛋白 1（FGL1）30 mg/kg，纤维蛋白原结构域（FD）100 mg/kg，纤维蛋白原结构域（FD）30 mg/kg，阿替普酶

15 10 mg/kg，尾静脉给药给药 1 小时，戊巴比妥钠麻醉小鼠并进行流血时间测定。在距小鼠尾尖 5 mm 处断尾，同时用秒表开始计时。每隔 10 s 用干净的滤纸片拭其断尾处，直至无血迹印到滤纸片上，停止计时，记录下所用时间。该时间即为小鼠尾出血时间。2 小时后，取小鼠血浆，测定血浆中纤维蛋白原的含量。

纤维蛋白原相关蛋白 1（FGL1）及纤维蛋白原结构域（FD）对纤维蛋白原的损失

20 （A）和流血时间（B）无明显影响（无毒副作用），结果如图 25 所示。

实施例 13：

此蛋白氨基酸序列中的某些关键位点进行突变，也能够实现增强其抑制血栓形成功能的效果，本实施例中对 204 位和 269 位关键位点的色氨酸突进行了突变处理，突变为丙氨酸，再采用实施例 6 的方法对突变后的纤维蛋白原结构域（FD）进行处理，

25 得到的纤维蛋白原结构域（FD）突变体对聚集的纤维蛋白裂解作用的对照如图 27 所示；从图 27 对比结果可以看出，突变体对聚集的纤维蛋白的裂解相比于不突变形态下，明显有所增强。

最后应说明的是：以上各实施例仅用以说明本发明的技术方案，而非对其限制；尽管参照前述各实施例对本发明进行了详细的说明，本领域的普通技术人员应当理解：

30 其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改，或者对其中部分或者全部技术特征进行等同替换；而这些修改或者替换，并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的范围。

权 利 要 求 书

1. 一种蛋白，其特征在于，所述蛋白含有可与底物 GPRP 肽段结合的氨基酸序列，氨基酸序列的结构为：色氨酸—AA_{n1}—酪氨酸—AA_{n2}—半胱氨酸—AA_{n3}—谷氨酸—天冬氨酸—AA_{n4}—半胱氨酸—组氨酸—AA_{n5}—天冬氨酸—AA_{n6}—酪氨酸—AA_{n7}—色氨酸，其中，AA 为氨基酸，n1-n7 为氨基酸数量，n1=16-18 个，n2=2-4 个，n3=1-3 个，n4=7-9 个，n5=16-18 个，n6=4-6 个，n7=3-5 个；优选地，所述氨基酸数量 n1=17 个，n2=3 个，n3=2 个，n4=8 个，n5=17 个，n6=5 个，n7=4 个。
2. 纤维蛋白原相关蛋白 1，其特征在于，所述纤维蛋白原相关蛋白 1 为如下任意一项所示的蛋白质并包含有权利要求 1 所述的氨基酸序列：
 - (a1) 氨基酸序列如 SEQ ID No.1 或 SEQ ID No.1 的第 48-290 位所示的蛋白质；
 - 10 (a2) 将 SEQ ID No.1 或 SEQ ID No.1 的第 48-290 位所示的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加且具有相同功能的蛋白质；
 - (a3) 与 (a1) - (a2) 中任一所限定的氨基酸序列具有 99% 以上、95% 以上、90% 以上、85% 以上或者 80% 以上同源性且具有相同功能的蛋白质；
 - (a4) 在 (a1) - (a3) 中任一所限定的蛋白质的 N 端和/或 C 端连接标签后得到的融合蛋白。
- 15 3. 编码权利要求 2 所述纤维蛋白原相关蛋白 1 的核酸分子，其特征在于：所述核酸分子为基因；所述基因是如下任意一项所述的 DNA 分子：
 - (b1) SEQ ID No.2 或 SEQ ID No.2 的第 142-870 位所示的 DNA 分子；
 - (b2) 在严格条件下与 (b1) 限定的 DNA 分子杂交且编码所述蛋白质的 DNA 分子；
 - (b3) 与 (b1) - (b2) 限定的 DNA 序列具有 99% 以上、95% 以上、90% 以上、85% 以上或
 - 20 者 80% 以上同源性且编码所述蛋白质的 DNA 分子；
 - (b4) 编码 (a3) 中所述蛋白质的 DNA 分子。
4. 含有权利要求 3 所述核酸分子的表达盒、重组载体、重组菌或转基因细胞系。
5. 权利要求 1 所述的蛋白、权利要求 2 所述纤维蛋白原相关蛋白 1 或权利要求 3 所述的核酸分子或权利要求 4 所述的重组载体、重组菌或转基因细胞系的应用，其特征在于，所述应用至少为如下所述的任意一种：
 - (c1) 制备用于抑制血栓发生的产品；
 - (c2) 制备用于抑制血栓程度的产品；
 - (c3) 制备用于抑制血浆中纤维蛋白活性的产品；
 - (c4) 制备用于抑制血浆中纤维蛋白原组装的产品；
 - 25 (c5) 制备用于增强溶纤能力的产品；
- 30

(c6) 制备用于延长血浆的活化部分凝血酶时间和/或凝血酶原时间和/或凝血酶时间的产品。

6. 根据权利要求 5 所述的应用，其特征在于，所述蛋白质的制备方法为：将所述蛋白质的编码基因克隆入真核表达载体，以无血清培养基培养真核细胞表达所述蛋白质，采用 Ni-NTA 亲和力柱进行纯化，再使用 Superdex 200 10/300 GL 色谱柱通过凝胶过滤进一步
5 纯化蛋白，得到高纯度纯化蛋白。
7. 根据权利要求 5 或 6 所述的应用，其特征在于，所述产品为药物产品，所述药物产品包括疫苗产品；优选地，所述药物产品类型包括 mRNA 药物、DNA 药物、蛋白药物或腺病毒药物。
8. 根据权利要求 5 或 6 所述的应用，其特征在于，所述产品中还修饰有用于穿过血脑屏障
10 的结构；优选地，所述修饰的穿过血脑屏障的结构为大脑靶向配体；优选地，所述大脑靶向配体，包括但不限于 RVG 肽、硬脂酸-转铁蛋白、载体蛋白 E。
9. 根据权利要求 8 所述的应用，其特征在于，所述药物中还包括有可联合使用的治疗用药；
优选地，所述可联合使用的治疗用药分别为尿激酶、链激酶、阿替普酶、瑞替普酶或组织性纤维酶原激活剂。
- 15 10. 一种生物材料，其特征在于，所述生物材料为能够表达权利要求 1 所述蛋白的核酸分子或权利要求 2 所述纤维蛋白原相关蛋白 1 的核酸分子或含有所述核酸分子的表达盒、重组载体、重组菌或转基因细胞系。

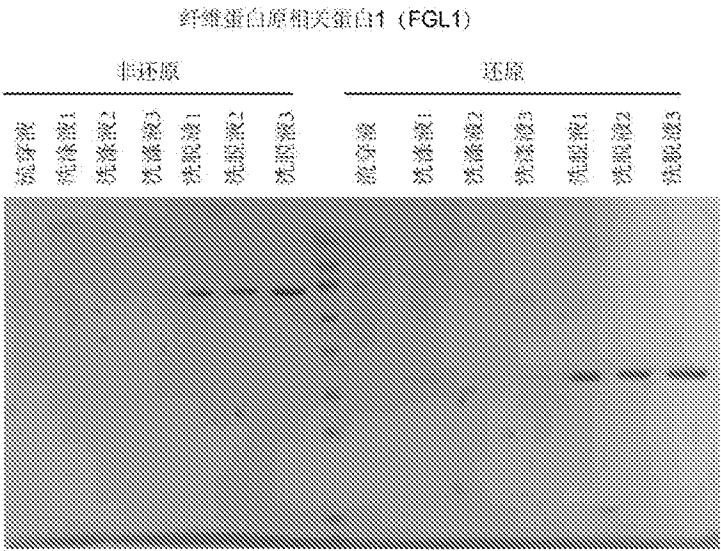


图 1

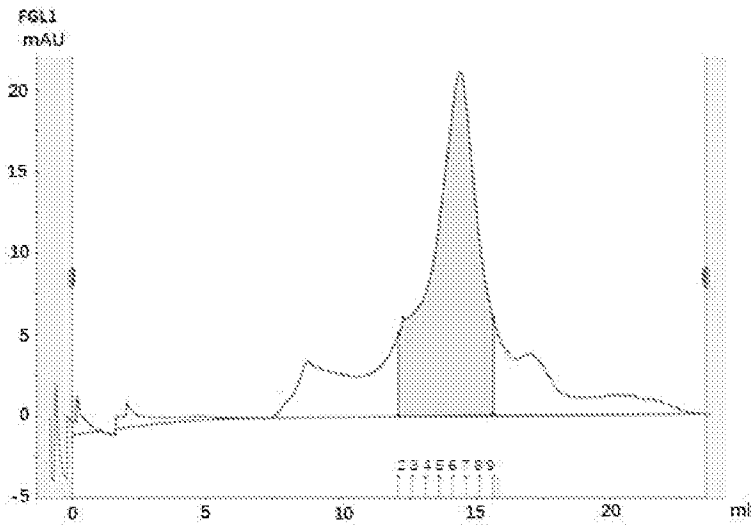


图 2

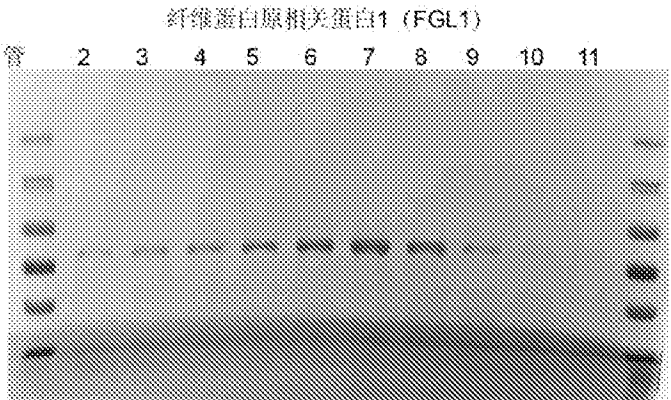


图 3

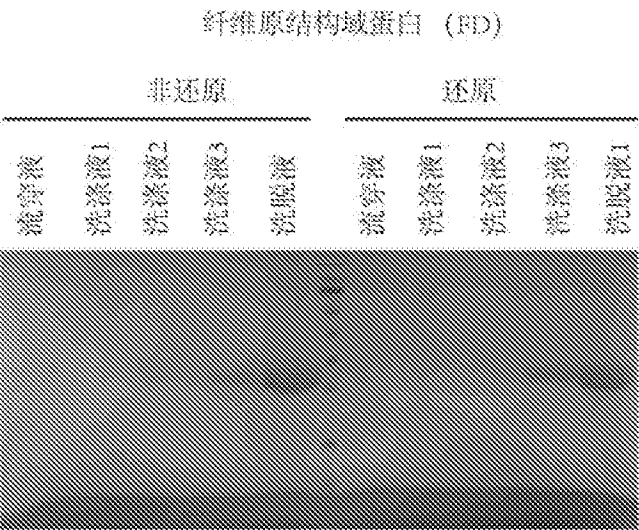


图 4

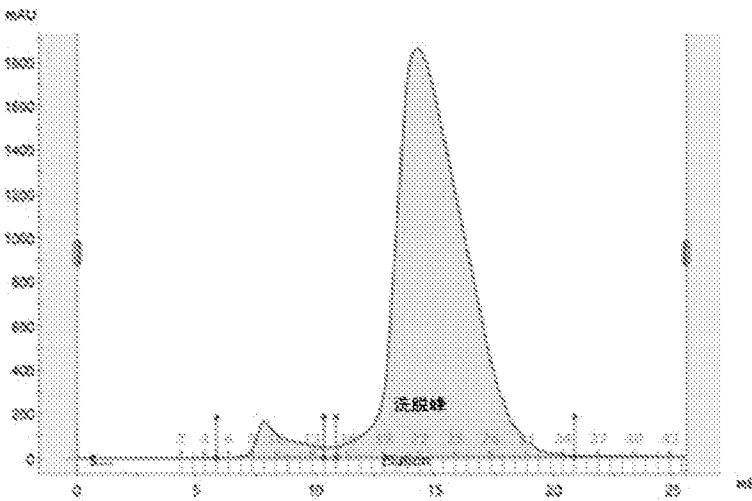


图 5

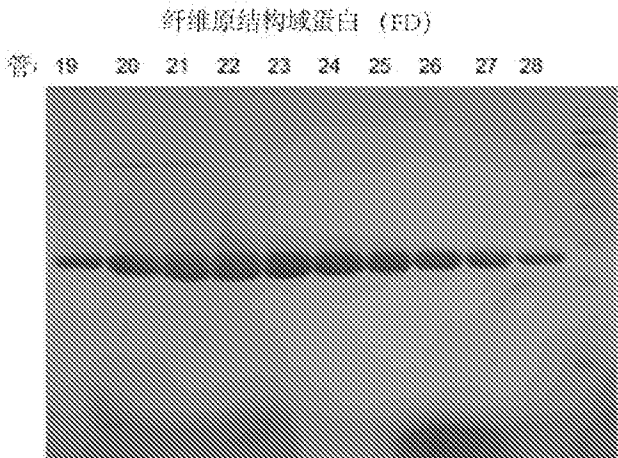


图 6

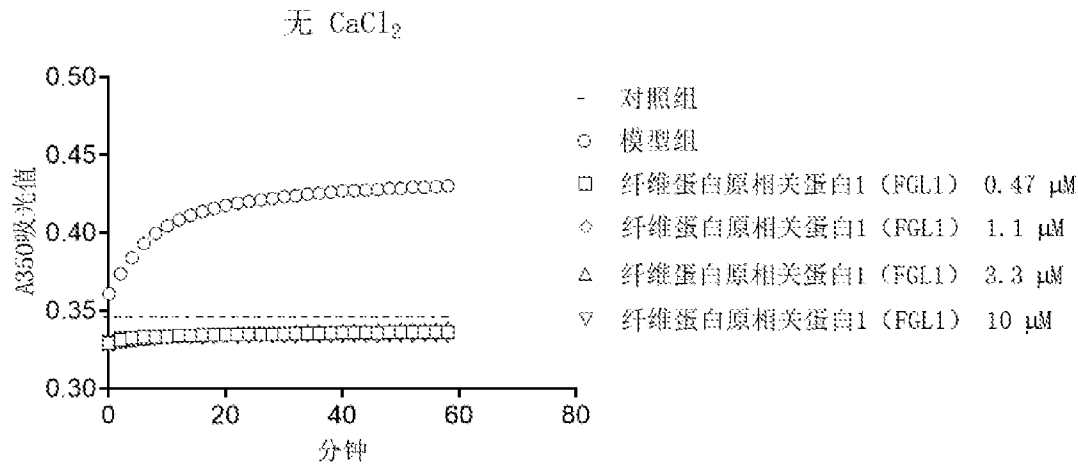


图 7

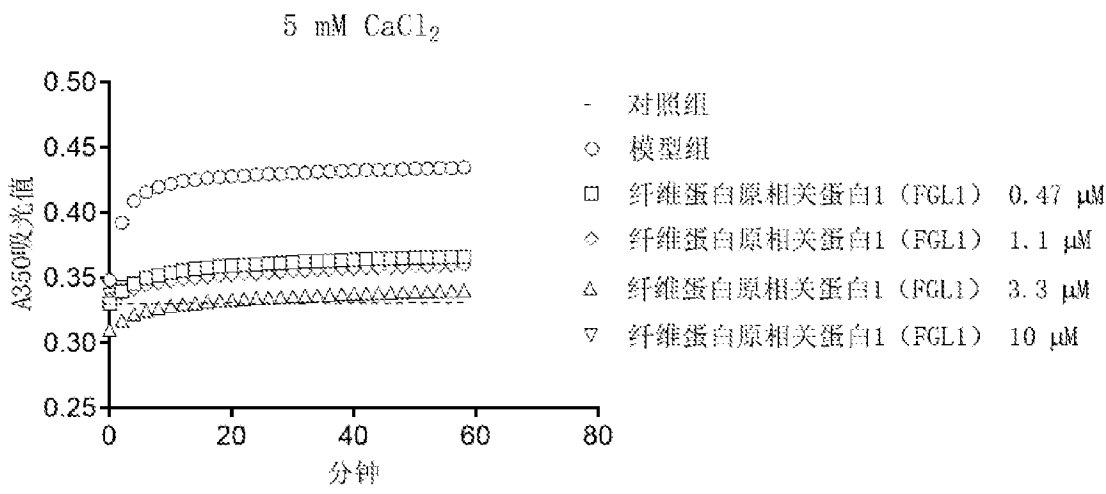


图 8

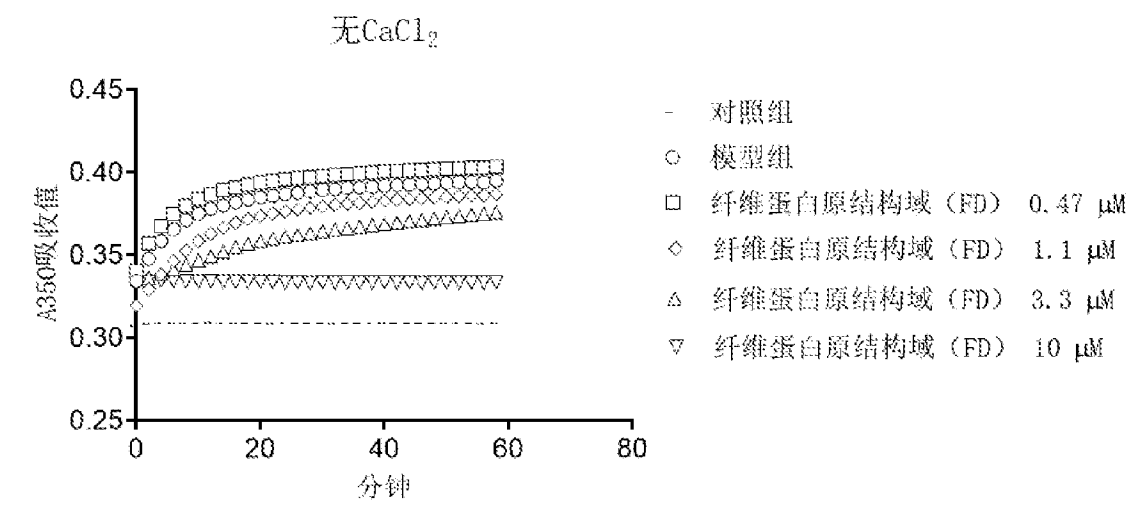


图 9

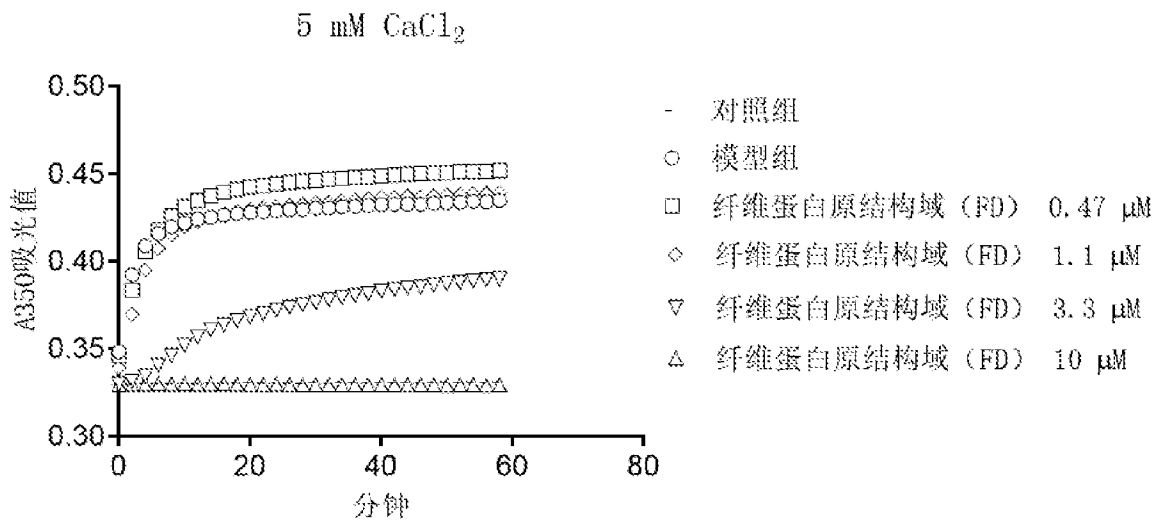


图 10

对照组

纤维蛋白原相关蛋白1 (FGL1) 处理组

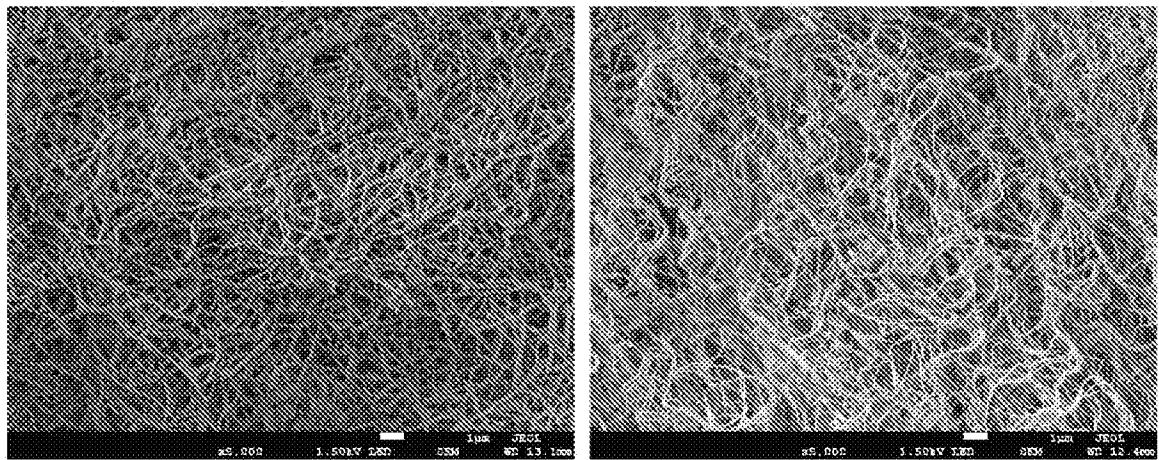


图 11

纤维原蛋白+凝血酶

纤维原蛋白+凝血酶
+1 μM 纤维原结构域蛋白 (FD)

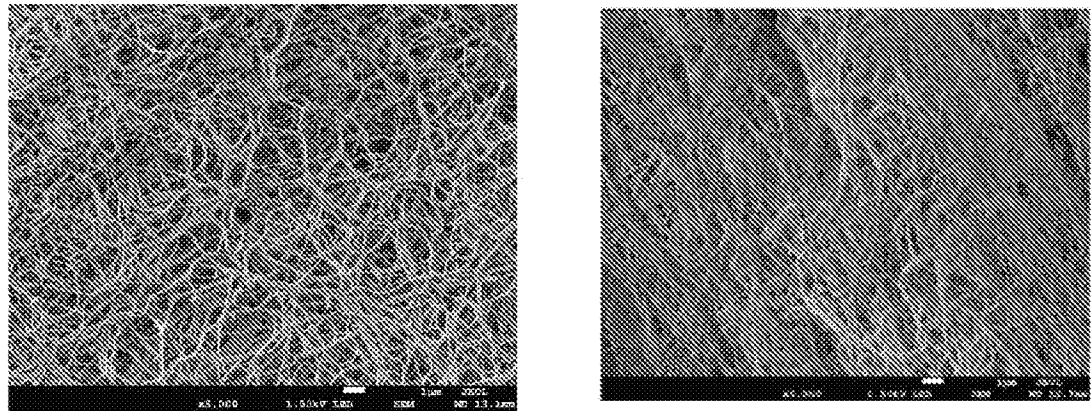


图 12

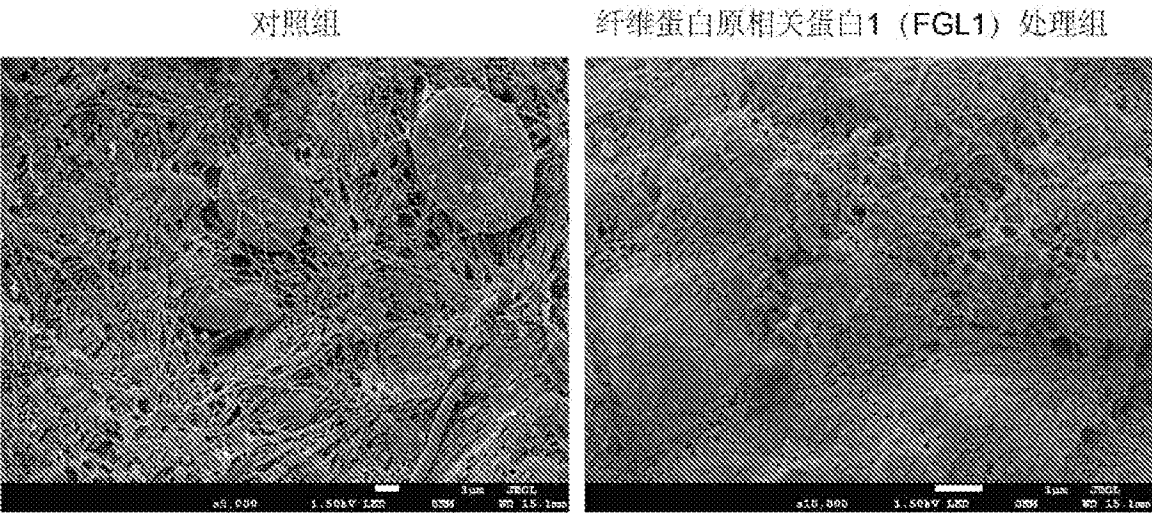


图 13

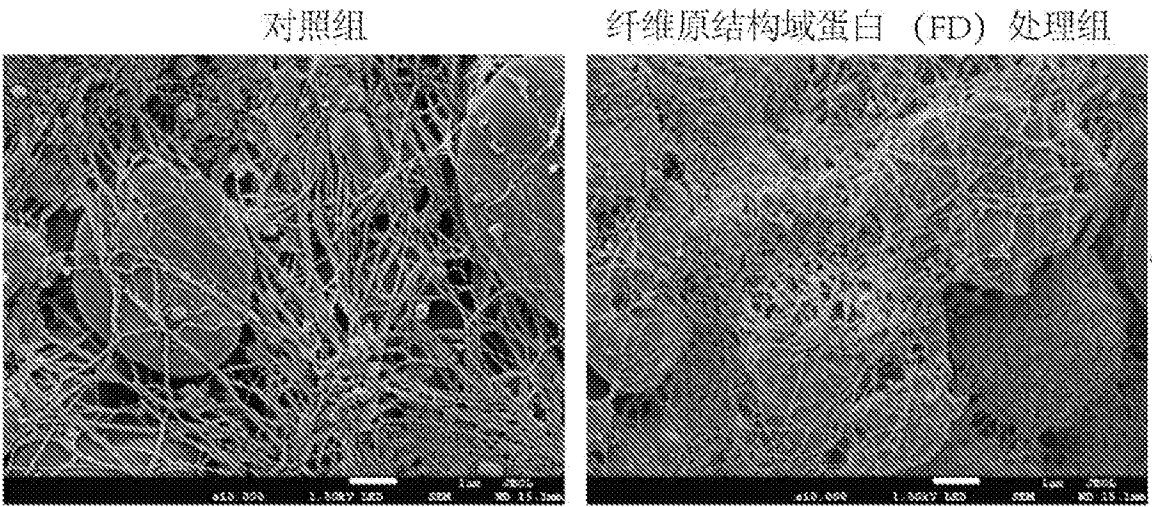


图 14

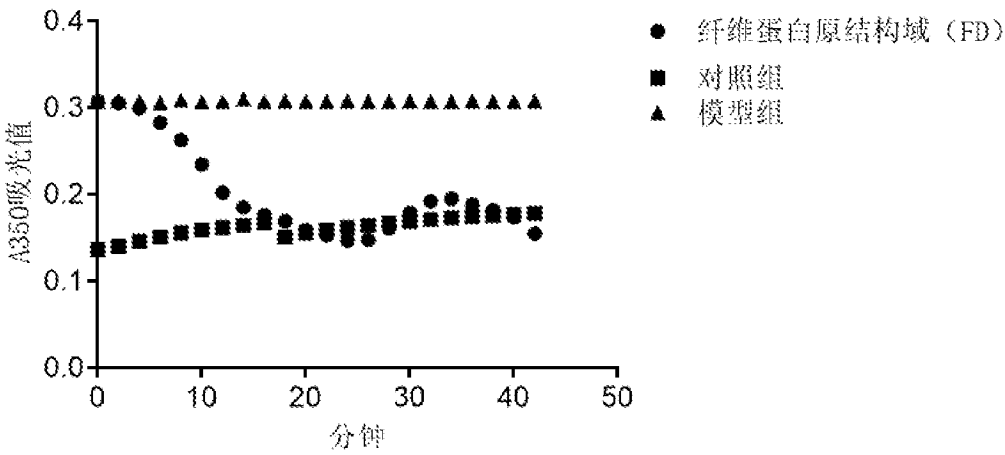


图 15

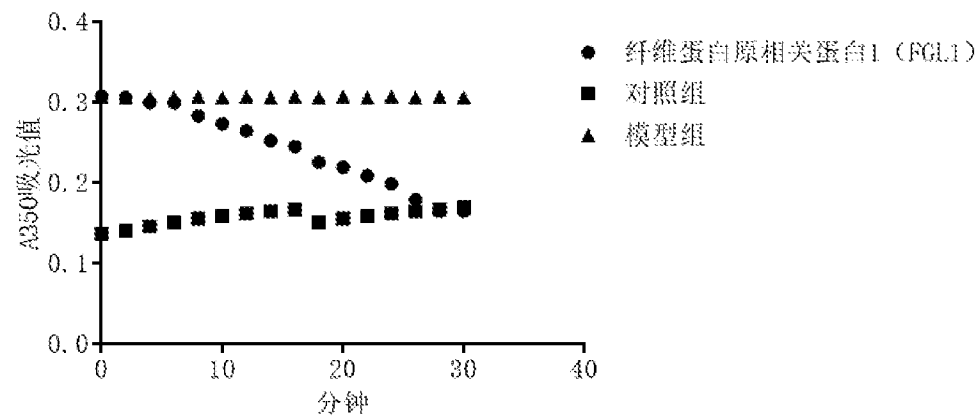


图 16

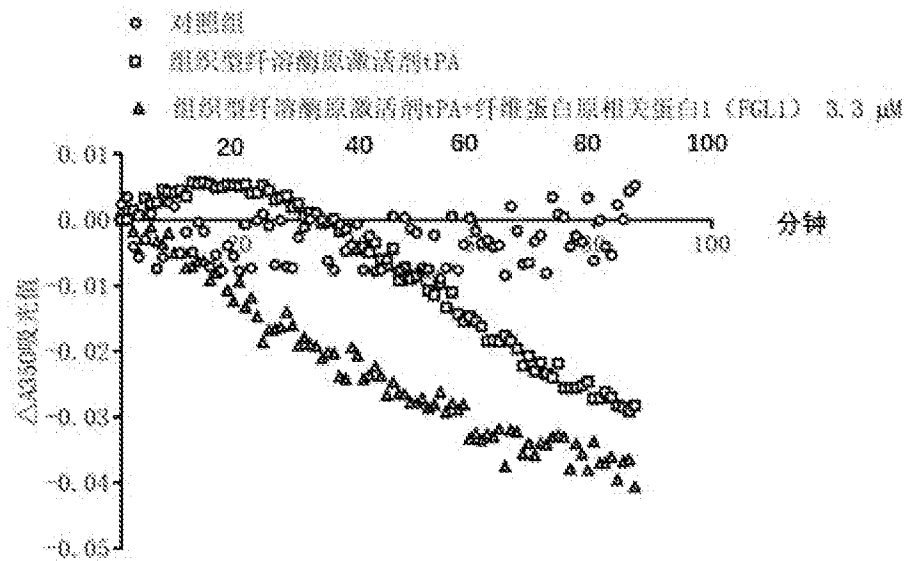


图 17

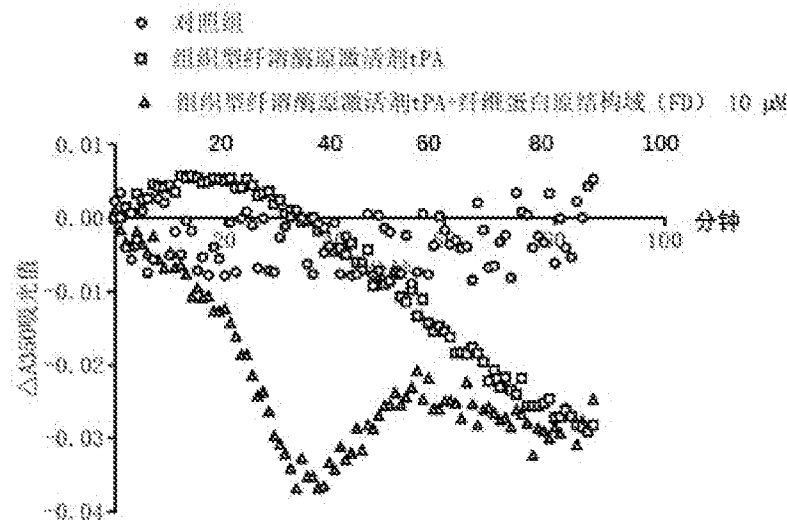


图 18

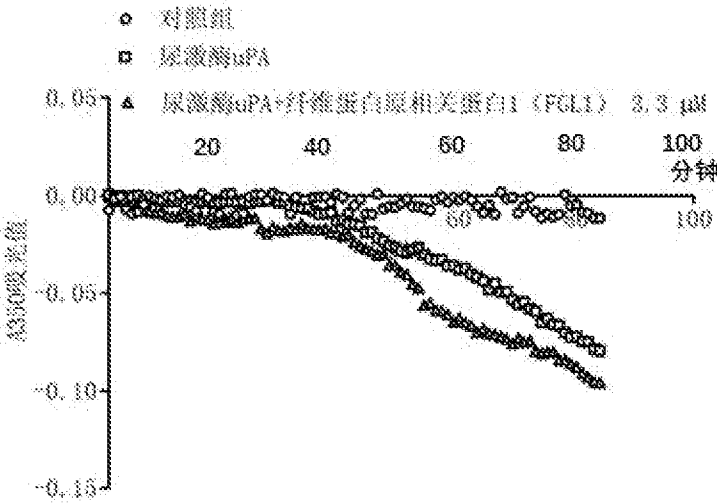


图 19

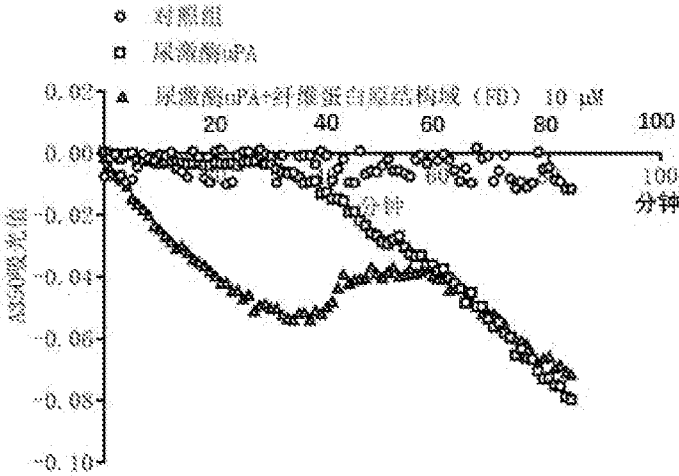


图 20

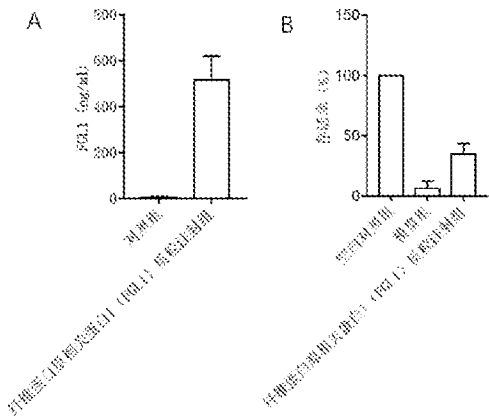


图 21

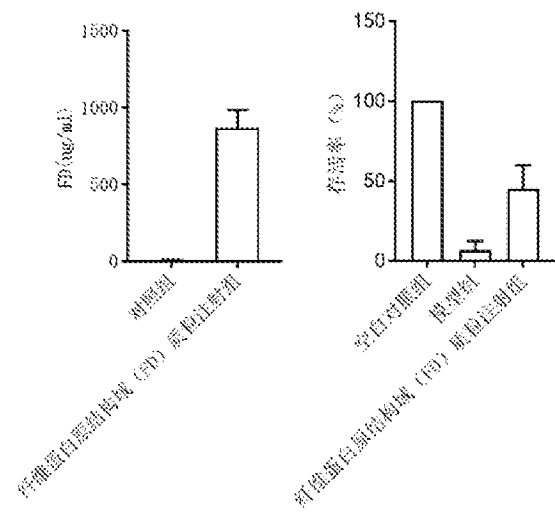


图 22

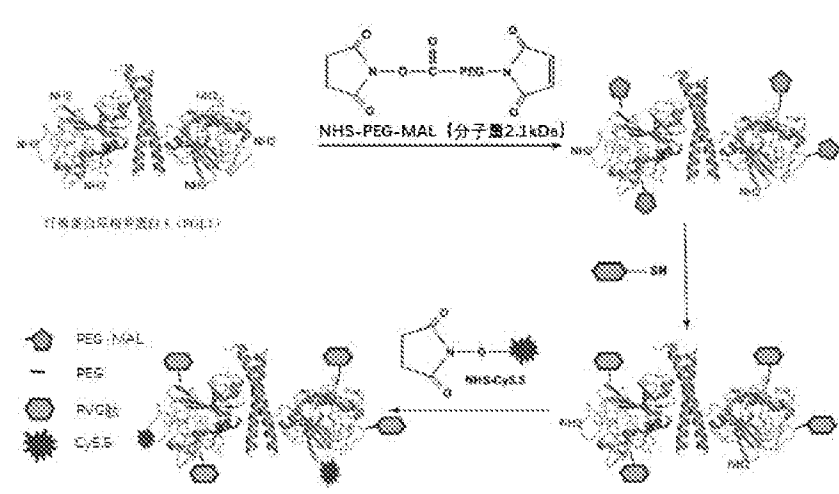


图 23

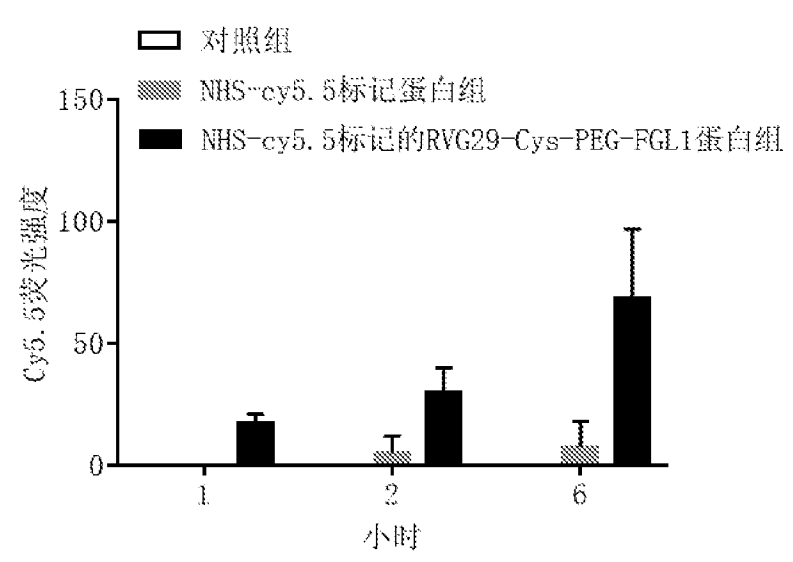


图 24

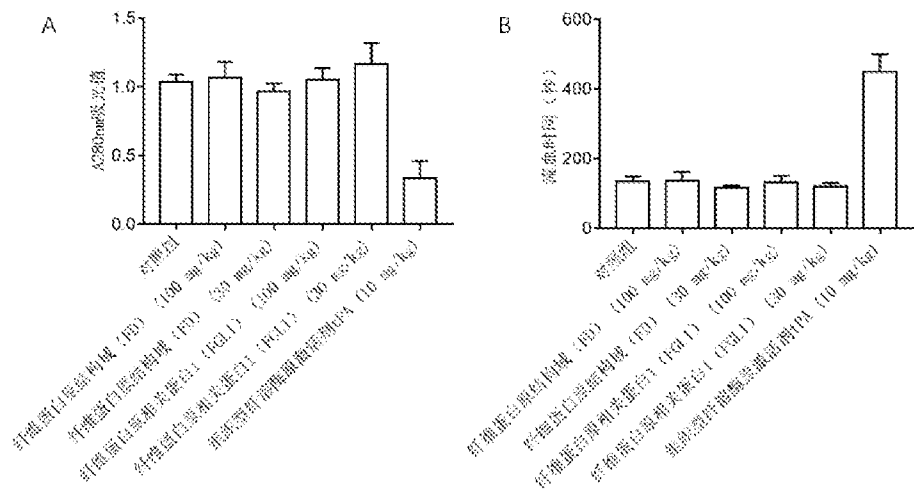


图 25

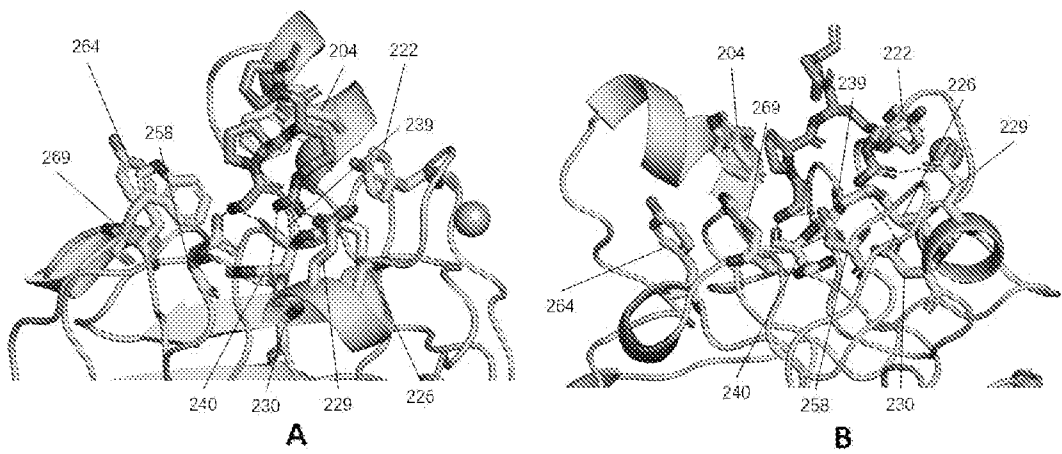


图 26

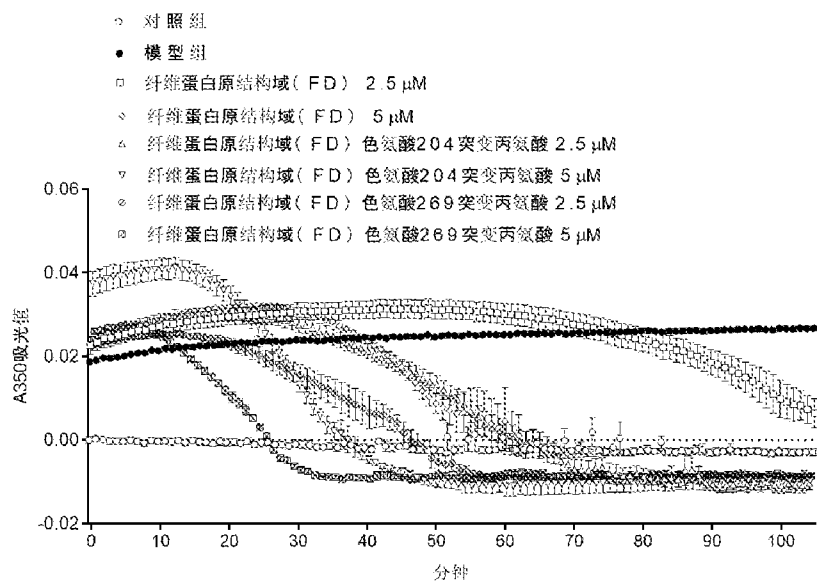


图 27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/128944

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/475(2006.01)i; C07K 1/22(2006.01)i; C07K 1/16(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; C12N 15/85(2006.01)i;
A61K 48/00(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i; A61K 38/18(2006.01)i; A61K 47/64(2017.01)i; A61K 45/06(2006.01)i;
A61P 7/02(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K C12N A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, SIPOABS, DWPI, CNKI, baidu, patents, NCBI: 南京大学, 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心, 华中农业大学, 董咸池, 刘雯, 丁建平, 石雨, 徐曙彤, 徐建波, GPRP结合, 色氨酸-AAAn1-酪氨酸-AAAn2-半胱氨酸-AAAn3-谷氨酸-天冬氨酸-AAAn4-半胱氨酸-组氨酸-AAAn5-天冬氨酸-AAAn6-酪氨酸-AAAn7-色氨酸, 血栓, 血栓程度, 纤维蛋白活性, 纤维蛋白原, 溶纤能力, 活化部分凝血酶时间, 凝血酶原时间, 凝血酶时间, 血脑屏障, 大脑靶向配体, RVG肽, 硬脂酸-转铁蛋白, 载体蛋白E, 尿激酶, 链激酶, 阿替普酶, 瑞替普酶, 组织性纤维酶原激活剂, 截短, N端缺失, Fibrinogen domain, Fibrinogen like, FGL1, FD, GPRP, truncated, shortened, mutate, mutation, deletion, SEQ ID No.1-4.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	周景艺 (ZHOU, Jingyi). "遗传性异常纤维蛋白原血症的临床和分子发病机制研究 (Clinical and Molecular Pathological Study of Congenital Dysfibrinogenemia)" 中国知网CNKI数据库, 上海交通大学附属医学院瑞金医院博士学位论文 (CNKI, Doctoral Dissertation of Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine), 15 March 2020 (2020-03-15), abstract	1-10
A	徐修才等 (XU, Xiucan et al.). "β链基因突变导致遗传性无纤维蛋白原血症一例报告 (Fibrinogen β Chain Gene Mutation Contributes to one Congenital Afibrinogenemia)" 中华血液学杂志 (Chinese Journal of Hematology), Vol. 26, No. 3, 31 December 2005 (2005-12-31), pages 137-139	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 February 2022

Date of mailing of the international search report

29 July 2022

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088, China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SUN, X. L. et al. "Homo sapiens fibrinogen like 1 (FGL1), transcript variant 1, mRNA, NCBI Reference Sequence: NM_004467.4, 1237 bp mRNA linear." <i>NCBI GenBank.</i> , 17 October 2021 (2021-10-17), pages 1-4	1-10
A	黄丹丹等 (HUANG, Dandan et al.). "1例遗传性异常纤维蛋白原血症的鉴定及分子发病机制研究 (Identification and Molecular Pathogenesis Study of a Case of Inherited Dysfibrinogenemia)" <i>临床检验杂志 (Chinese Journal of Clinical Laboratory Science)</i> , Vol. 37, No. 9, 30 September 2019 (2019-09-30), pages 675-679	1-10
A	谢燕燕 (XIE, Yanyan). "一个遗传性无纤维蛋白原血症家系的基因缺陷分析 (Genetic Defect Analysis of a Chinese Family with Congenital Afibrinogenemia)" <i>中国知网CNKI数据库, 华北理工大学硕士学位论文 (CNKI, Master's thesis of North China University of Science and Technology)</i> , 15 February 2017 (2017-02-15), abstract	1-10
A	李丹丹 (LI, Dandan). "两例遗传性异常纤维蛋白原血症的临床和分子发病机制研究 (Study of Clinical and Molecular Pathogenesis in Two Patients with Congenital Dysfibrinogenemia)" <i>中国知网CNKI数据库, 河北医科大学硕士学位论文 (CNKI, Master's thesis of Hebei Medical University)</i> , 15 January 2020 (2020-01-15), abstract	1-10
A	DIB, N. et al. "Fibrinogen angers with a new deletion (c GVYYQ 346-350) causes hypofibrinogenemia with hepatic storage." <i>Journal of Thrombosis and Haemostasis.</i> , Vol. 5, 31 December 2007 (2007-12-31), pages 1999-2005	1-10
A	VU, D. et al. "Molecular mechanisms accounting for fibrinogen deficiency:from large deletions to intracellular retention of misfolded proteins." <i>Journal of Thrombosis and Haemostasis.</i> , Vol. 5, No. supplement 1, 31 December 2007 (2007-12-31), pages 125-131	1-10
A	OKUMURA, N. et al. "A novel variant fibrinogen, deletion of Bh111Ser in coiled-coil region, affecting fibrin lateral aggregation." <i>Clinica Chimica Acta.</i> , Vol. 365, 17 October 2005 (2005-10-17), pages 160-167	1-10
A	CN 108404119 A (HARBIN BOAO BIOLOGICAL MEDICAL TECHNOLOGY DEVELOPMENT CO., LTD.) 17 August 2018 (2018-08-17) entire document	1-10
A	CN 1800382 A (RADIOLOGY INSTITUTE OF PLA MILITARY MEDICAL ACADEMY OF SCIENCES et al.) 12 July 2006 (2006-07-12) entire document	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/128944

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2021/128944

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	108404119	A	17 August 2018	None	
CN	1800382	A	12 July 2006	None	

A. 主题的分类 C07K 14/475(2006.01)i; C07K 1/22(2006.01)i; C07K 1/16(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; C12N 15/85(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i; A61K 38/18(2006.01)i; A61K 47/64(2017.01)i; A61K 45/06(2006.01)i; A61P 7/02(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类														
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C07K C12N A61K A61P 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS, SIPOABS, DWPI, CNKI, baidu, patentics, NCBI, 南京大学, 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心, 华中农业大学, 董咸池, 刘雯, 丁建平, 石雨, 徐曙彤, 徐建波, GPRP结合, 色氨酸—AAn1—酪氨酸—AAn2—半胱氨酸—AAn3—谷氨酸—天冬氨酸—AAn4—半胱氨酸—组氨酸—AAn5—天冬氨酸—AAn6—酪氨酸—AAn7—色氨酸, 血栓, 血栓程度, 纤维蛋白活性, 纤维蛋白原, 溶纤能力, 活化部分凝血酶时间, 凝血酶原时间, 凝血酶时间, 血脑屏障, 大脑靶向配体, RVG肽, 硬脂酸-转铁蛋白, 载体蛋白E, 尿激酶, 链激酶, 阿替普酶, 瑞替普酶, 组织性纤维酶原激活剂, 截短, N端缺失, Fibrinogen domain, Fibrinogen like, FGL1, FD, GPRP, truncated, shortened, mutate, mutation, deletion, SEQ ID No.1-4。														
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>周景艺. “遗传性异常纤维蛋白原血症的临床和分子发病机制研究.” 中国知网CNKI数据库, 上海交通大学附属医学院瑞金医院博士学位论文., 2020年3月15日 (2020 - 03 - 15), 摘要</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>徐修才等. “β 链基因突变导致遗传性无纤维蛋白原血症一例报告.” 中华血液学杂志., 第26卷, 第3期, 2005年12月31日 (2005 - 12 - 31), 第137-139页</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>SUN, X.L. 等. “Homo sapiens fibrinogen like 1 (FGL1), transcript variant 1, mRNA, NCBI Reference Sequence: NM_004467.4, 1237 bp mRNA linear.” NCBI genbank., 2021年10月17日 (2021 - 10 - 17), 第1-4页</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	周景艺. “遗传性异常纤维蛋白原血症的临床和分子发病机制研究.” 中国知网CNKI数据库, 上海交通大学附属医学院瑞金医院博士学位论文., 2020年3月15日 (2020 - 03 - 15), 摘要	1-10	A	徐修才等. “β 链基因突变导致遗传性无纤维蛋白原血症一例报告.” 中华血液学杂志., 第26卷, 第3期, 2005年12月31日 (2005 - 12 - 31), 第137-139页	1-10	A	SUN, X.L. 等. “Homo sapiens fibrinogen like 1 (FGL1), transcript variant 1, mRNA, NCBI Reference Sequence: NM_004467.4, 1237 bp mRNA linear.” NCBI genbank., 2021年10月17日 (2021 - 10 - 17), 第1-4页	1-10
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求												
A	周景艺. “遗传性异常纤维蛋白原血症的临床和分子发病机制研究.” 中国知网CNKI数据库, 上海交通大学附属医学院瑞金医院博士学位论文., 2020年3月15日 (2020 - 03 - 15), 摘要	1-10												
A	徐修才等. “β 链基因突变导致遗传性无纤维蛋白原血症一例报告.” 中华血液学杂志., 第26卷, 第3期, 2005年12月31日 (2005 - 12 - 31), 第137-139页	1-10												
A	SUN, X.L. 等. “Homo sapiens fibrinogen like 1 (FGL1), transcript variant 1, mRNA, NCBI Reference Sequence: NM_004467.4, 1237 bp mRNA linear.” NCBI genbank., 2021年10月17日 (2021 - 10 - 17), 第1-4页	1-10												
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。														
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件														
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期												
2022年2月10日		2022年7月29日												
ISA/CN的名称和邮寄地址		授权官员												
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		朱宁 电话号码 86-(10)-53961956												

C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	黄丹丹等. "1例遗传性异常纤维蛋白原血症的鉴定及分子发病机制研究." 临床检验杂志., 第37卷, 第9期, 2019年9月30日 (2019 - 09 - 30), 第675-679页	1-10
A	谢燕燕. "一个遗传性无纤维蛋白原血症家系的基因缺陷分析." 中国知网CNKI数据库, 华北理工大学硕士学位论文., 2017年2月15日 (2017 - 02 - 15), 摘要	1-10
A	李丹丹. "两例遗传性异常纤维蛋白原血症的临床和分子发病机制研究." 中国知网CNKI数据库, 河北医科大学硕士学位论文., 2020年1月15日 (2020 - 01 - 15), 摘要	1-10
A	DIB, N. 等. "Fibrinogen angers with a new deletion (c GVYYQ 346-350) causes hypofibrinogenemia with hepatic storage." Journal of Thrombosis and Haemostasis., 第5卷, 2007年12月31日 (2007 - 12 - 31), 第1999-2005页	1-10
A	VU, D. 等. "Molecular mechanisms accounting for fibrinogen deficiency:from large deletions to intracellular retention of misfolded proteins ." Journal of Thrombosis and Haemostasis., 第5卷, 第增刊1期, 2007年12月31日 (2007 - 12 - 31), 第125-131页	1-10
A	OKUMURA, N. 等. "A novel variant fibrinogen, deletion of Bh111Ser in coiled-coil region, affecting fibrin lateral aggregation." Clinica Chimica Acta., 第365卷, 2005年10月17日 (2005 - 10 - 17), 第160-167页	1-10
A	CN 108404119 A (哈尔滨博翱生物医药技术开发有限公司) 2018年8月17日 (2018 - 08 - 17) 全文	1-10
A	CN 1800382 A (中国人民解放军军事医学科学院放射医学研究所等) 2006年7月12日 (2006 - 07 - 12) 全文	1-10

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/128944

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	108404119	A	2018年8月17日	无	
CN	1800382	A	2006年7月12日	无	