(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104602701 B
(45)授权公告日 2019.04.16

(21)申请号 201380045758.0

(22)申请日 2013.07.02

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104602701 A

(43)申请公布日 2015.05.06

(30)优先权数据
61/668,172 2012.07.05 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.03.02

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IL2013/050559 2013.07.02

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2014/006613 EN 2014.01.09

(73)专利权人 哈达斯特医疗研究服务和开发有限公司
地址 以色列耶路撒冷

(72)发明人 阿卜得·希贾兹 努哈·希扎基

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
代理人 李平 郑霞

(51)Int.Cl.
A61K 38/48(2006.01)
A61K 38/36(2006.01)

(56)对比文件
US 2011008313 A1,2011.01.13,权利要求1-18、说明书第0009、0035段.
US 2011008313 A1,2011.01.13,权利要求1-18、说明书第0009、0035段.
US 5612029 A,1997.03.18,说明书第13栏第43-49行.
US 2010284998 A1,2010.11.11,0021、0064、0081-0095.

审查员 宋梦

权利要求书4页 说明书29页
序列表19页 附图17页

(54)发明名称

作为抗纤维蛋白溶解剂的纤维蛋白溶酶原活化剂的突变体

(57)摘要

本发明涉及抗纤维蛋白溶解组合物,包括携带取代tPA上的Ser为Ala的至少一个点突变的至少一种tPA突变体,所述突变体抑制tPA和uPA的至少一个的纤维蛋白溶解活性,所以可用于治疗与纤维蛋白溶解过程相关的紊乱,具体地凝血病、血小板减少症和出血。本发明还提供了方法以及本发明的突变体的应用。

CN 104602701 B

1.至少一种组织纤维蛋白溶酶原活化剂(tPA)突变体在制备用于在需要其的受试者中抑制tPA和尿激酶纤维蛋白溶酶原活化剂(uPA)的纤维蛋白溶解活性的抗纤维蛋白溶解组合物中的用途,所述tPA突变体携带在SEQ ID NO.7表示的野生型分子的位置481中取代Ser^{481}为Ala的点突变,所述tPA突变体抑制tPA和uPA的纤维蛋白溶解活性,其中所述受试者患有与纤维蛋白溶解相关的疾病、紊乱或状况,其中所述疾病、紊乱或状况不是脑损伤和神经损伤,并且其中所述tPA突变体为以下的任一种:

(a)称为$tPA^{Ser481Ala}$的由SEQ ID NO.1表示的氨基酸序列或SEQ ID NO.1的衍生物组成的tPA突变体,所述SEQ ID NO.1的衍生物由SEQ ID NO.12表示的氨基酸序列组成;和

(b)携带Ser481Ala和$KHRR^{299-302}$至AAAA的点突变并称为tPASer481Ala-DS的tPA突变体,所述tPA突变体由SEQ ID NO.2表示的氨基酸序列或SEQ ID NO.2的衍生物组成,所述SEQ ID NO.2的衍生物由SEQ ID NO.13表示的氨基酸序列组成。

2.根据权利要求1所述的用途,其中,所述tPA突变体称为$tPA^{Ser481Ala}$,并由SEQ ID NO.1表示的氨基酸序列或SEQ ID NO.1的衍生物组成,所述SEQ ID NO.1的衍生物由SEQ ID NO.12表示的氨基酸序列组成。

3.根据权利要求1所述的用途,其中,所述tPA突变体称为tPASer481Ala-DS,并由SEQ ID NO.2表示的氨基酸序列或SEQ ID NO.2的衍生物组成,所述SEQ ID NO.2的衍生物由SEQ ID NO.13表示的氨基酸序列组成。

4.根据权利要求1至3的任一项所述的用途,其中所述组合物用于与纤维蛋白溶解相关的疾病、紊乱或状况的治疗、改善、抑制或预防,所述疾病、紊乱或状况为凝血病。

5.根据权利要求1至3的任一项所述的用途,其中所述组合物用于与纤维蛋白溶解相关的疾病、紊乱或状况的治疗、改善、抑制或预防,所述疾病、紊乱或状况为血小板减少症。

6.根据权利要求1至3的任一项所述的用途,其中所述组合物用于与纤维蛋白溶解相关的疾病、紊乱或状况的治疗、改善、抑制或预防,所述疾病、紊乱或状况为出血。

7.根据权利要求1至3的任一项所述的用途,其中所述组合物用于与纤维蛋白溶解相关的疾病、紊乱或状况的治疗、改善、抑制或预防,所述疾病、紊乱或状况为不可压迫的出血。

8.根据权利要求1至3的任一项所述的用途,其中所述组合物用于与纤维蛋白溶解相关的疾病、紊乱或状况的治疗、改善、抑制或预防,所述疾病、紊乱或状况为外伤引起的出血。

9.根据权利要求1至3的任一项所述的用途,其中所述组合物用于与纤维蛋白溶解相关的疾病、紊乱或状况的治疗、改善、抑制或预防,所述疾病、紊乱或状况为妇科出血。

10.根据权利要求1至3的任一项所述的用途,其中所述组合物用于与纤维蛋白溶解相关的疾病、紊乱或状况的治疗、改善、抑制或预防,所述疾病、紊乱或状况为小手术或大手术出血。

11.根据权利要求1至3的任一项所述的用途,其中所述组合物用于与纤维蛋白溶解相关的疾病、紊乱或状况的治疗、改善、抑制或预防,所述疾病、紊乱或状况为先天凝血病。

12.根据权利要求1至3的任一项所述的用途,其中所述组合物用于与纤维蛋白溶解相关的疾病、紊乱或状况的治疗、改善、抑制或预防,所述疾病、紊乱或状况为弥散性血管内凝血(DIC)。

13.根据权利要求1至3的任一项所述的用途,其中所述组合物用于与纤维蛋白溶解相关的疾病、紊乱或状况的治疗、改善、抑制或预防,所述疾病、紊乱或状况为产后出血。

14.根据权利要求1至3的任一项所述的用途，其中所述组合物用于与纤维蛋白溶解相关的疾病、紊乱或状况的治疗、改善、抑制或预防，所述疾病、紊乱或状况为血友病。

15.根据权利要求1至3的任一项所述的用途，其中所述组合物用于与纤维蛋白溶解相关的疾病、紊乱或状况的治疗、改善、抑制或预防，所述疾病、紊乱或状况为出血损伤。

16.根据权利要求1至3的任一项所述的用途，其中所述组合物用于与纤维蛋白溶解相关的疾病、紊乱或状况的治疗、改善、抑制或预防，所述疾病、紊乱或状况为凝血相关的紊乱。

17.治疗有效量的至少一种tPA突变的分子在制备用于在需要其的受试者中治疗、改善、抑制或预防与纤维蛋白溶解相关的疾病、紊乱或状况的组合物中的用途，其中所述疾病、紊乱或状况不是脑损伤和神经损伤，且其中，所述tPA突变的分子携带在SEQ ID NO.7表示的野生型分子的位置481中取代Ser^{481}为Ala的点突变，所述tPA突变的分子为以下的任一种：

(a)称为$tPA^{Ser481Ala}$的由SEQ ID NO.1表示的氨基酸序列或SEQ ID NO.1的衍生物组成的tPA突变体，所述SEQ ID NO.1的衍生物由SEQ ID NO.12表示的氨基酸序列组成；和

(b)携带Ser481Ala和$KHRR^{299-302}$至AAAA的点突变并称为tPASer481Ala-DS的tPA突变体，所述tPA突变体由SEQ ID NO.2表示的氨基酸序列或SEQ ID NO.2的衍生物组成，所述SEQ ID NO.2的衍生物由SEQ ID NO.13表示的氨基酸序列组成。

18.根据权利要求17所述的用途，其中，所述tPA突变的分子称为$tPA^{Ser481Ala}$，并由SEQ ID NO.1表示的氨基酸序列或SEQ ID NO.1的衍生物组成，所述SEQ ID NO.1的衍生物由SEQ ID NO.12表示的氨基酸序列组成。

19.根据权利要求17所述的用途，其中，所述tPA突变的分子携带Ser481Ala和$KHRR^{299-302}$至AAAA的点突变，并称为$tPA^{Ser481Ala-DS}$，所述突变体由SEQ ID NO.2表示的氨基酸序列或SEQ ID NO.2的衍生物组成，所述SEQ ID NO.2的衍生物由SEQ ID NO.13表示的氨基酸序列组成。

20.根据权利要求17至19的任一项所述的用途，其中所述疾病、紊乱或状况为凝血病。

21.根据权利要求17至19的任一项所述的用途，其中所述疾病、紊乱或状况为血小板减少症。

22.根据权利要求17至19的任一项所述的用途，其中所述疾病、紊乱或状况为出血。

23.根据权利要求17至19的任一项所述的用途，其中所述疾病、紊乱或状况为不可压迫的出血。

24.根据权利要求17至19的任一项所述的用途，其中所述疾病、紊乱或状况为外伤引起的出血。

25.根据权利要求17至19的任一项所述的用途，其中所述疾病、紊乱或状况为妇科出血。

26.根据权利要求17至19的任一项所述的用途，其中所述疾病、紊乱或状况为小手术或大手术出血。

27.根据权利要求17至19的任一项所述的用途，其中所述疾病、紊乱或状况为先天凝血病。

28.根据权利要求17至19的任一项所述的用途，其中所述疾病、紊乱或状况为弥散性血

管内凝血(DIC)。

29.根据权利要求17至19的任一项所述的用途,其中所述疾病、紊乱或状况为产后出血。

30.根据权利要求17至19的任一项所述的用途,其中所述疾病、紊乱或状况为血友病。

31.根据权利要求17至19的任一项所述的用途,其中所述疾病、紊乱或状况为出血损伤。

32.根据权利要求17至19的任一项所述的用途,其中所述疾病、紊乱或状况为凝血相关的紊乱。

33.治疗有效量的至少一种tPA突变的分子在制备用于体外抑制tPA和uPA的纤维蛋白溶解活性的组合物中的用途,其中,所述tPA突变的分子携带在SEQ ID NO.7表示的野生型分子的位置481中取代Ser^{481}为Ala的点突变,其中所述tPA突变的分子为以下的任一种:

(a)称为$tPA^{Ser481Ala}$的由SEQ ID NO.1表示的氨基酸序列或SEQ ID NO.1的衍生物组成的tPA突变体,所述SEQ ID NO.1的衍生物由SEQ ID NO.12表示的氨基酸序列组成;和

(b)携带Ser481Ala和$KHRR^{299-302}$至AAAA的点突变并称为tPASer481Ala-DS的tPA突变体,所述tPA突变体由SEQ ID NO.2表示的氨基酸序列或SEQ ID NO.2的衍生物组成,所述SEQ ID NO.2的衍生物由SEQ ID NO.13表示的氨基酸序列组成。

34.根据权利要求33所述的用途,其中,所述tPA突变的分子称为$tPA^{Ser481Ala}$,并由SEQ ID NO.1表示的氨基酸序列或SEQ ID NO.1的衍生物组成,所述SEQ ID NO.1的衍生物由SEQ ID NO.12表示的氨基酸序列组成。

35.根据权利要求33所述的用途,其中,所述tPA突变的分子携带Ser481Ala以及$KHRR^{299-302}$至AAAA的点突变,并称为$tPA^{Ser481Ala-DS}$,所述突变体由SEQ ID NO.2表示的氨基酸序列或SEQ ID NO.2的衍生物组成,所述SEQ ID NO.2的衍生物由SEQ ID NO.13表示的氨基酸序列组成。

36.治疗有效量的至少一种tPA突变的分子在制备用于在需要其的受试者中抑制抗凝剂的抗凝活性的组合物中的用途,其中所述受试者是用抗凝剂治疗的受试者,且其中所述受试者患有不是脑损伤和神经损伤的疾病、紊乱或状况,且其中,所述tPA突变的分子携带在SEQ ID NO.7表示的野生型分子的位置481中取代Ser^{481}为Ala的点突变,所述tPA突变的分子为以下的任一种:

(a)称为$tPA^{Ser481Ala}$的由SEQ ID NO.1表示的氨基酸序列或SEQ ID NO.1的衍生物组成的tPA突变体,所述SEQ ID NO.1的衍生物由SEQ ID NO.12表示的氨基酸序列组成;和

(b)携带Ser481Ala和$KHRR^{299-302}$至AAAA的点突变并称为tPASer481Ala-DS的tPA突变体,所述tPA突变体由SEQ ID NO.2表示的氨基酸序列或SEQ ID NO.2的衍生物组成,所述SEQ ID NO.2的衍生物由SEQ ID NO.13表示的氨基酸序列组成。

37.根据权利要求36所述的用途,其中,所述tPA突变的分子称为$tPA^{Ser481Ala}$,并由SEQ ID NO.1表示的氨基酸序列或SEQ ID NO.1的衍生物组成,所述SEQ ID NO.1的衍生物由SEQ ID NO.12表示的氨基酸序列组成。

38.根据权利要求36所述的用途,其中,所述tPA突变的分子称为$tPA^{Ser481Ala-DS}$,并由SEQ ID NO.2表示的氨基酸序列或SEQ ID NO.2的衍生物组成,所述SEQ ID NO.2的衍生物由SEQ ID NO.13表示的氨基酸序列组成。

39.根据权利要求36所述的用途,其中,所述抗凝剂为香豆素或肝素样分子。

作为抗纤维蛋白溶解剂的纤维蛋白溶酶原活化剂的突变体

发明领域

[0001] 本发明涉及治疗具有提高的出血倾向的状况。更具体地，本发明涉及用在治疗纤维蛋白溶解相关紊乱的抑制tPA和uPA的纤维蛋白溶解活性的纤维蛋白溶酶原活化剂突变体及其抗纤维蛋白溶解组合物。

[0002] 发明背景

[0003] 本文中通过作者以及另外地通过专利申请号/专利号引用各种出版物。这些出版物、专利和专利申请的公开内容通过引用特此全文并入。

[0004] 损伤(injury)是全世界死亡的主要原因。交通事故每年引起超过百万例死亡，是全球排第九的死亡原因，并预期在2020年前变成排第三的导致死亡和残疾的原因。此外，每年约160万的人死于人际、集体或自主的暴力的故意行为。超过90％的外伤(trauma)死亡出现在相对贫穷的国家。促进医院死亡的另外的因素为出血，认为是约三分之一的住院外伤死亡的原因，并构成由于多器官衰竭的死亡的影响因素。

[0005] 止血系统有助于保持严重的血管损伤后的循环，无论是源自外伤或外科手术。大的外科手术和外伤引起相似的止血反应，并且在两种情况下，严重的失血呈现对凝血系统的极端挑战。对外科手术及外伤的非期望的响应的一部分为刺激凝块的分解(纤维蛋白溶解)，其在一些情况下变得有害(高纤维蛋白溶解)。

[0006] 抗纤维蛋白溶解剂减小了具有对外科手术的正常和扩大的纤维蛋白溶解反应的患者中的失血，没有明显的增加手术后并发症的风险。

[0007] 氨甲环酸为氨基酸赖氨酸的合成的衍生物，通过封闭纤维蛋白溶酶原上赖氨酸的结合位点而抑制纤维蛋白溶解。经选择性外科手术的患者中氨甲环酸的随机实验的系统回顾鉴定了包括3836名参与者的53个研究。氨甲环酸减小了对输血需要的三分之一(Ker K等，BMC Emerg Med.，2012，12:3)。

[0008] 早期给药短期的氨甲环酸在具有显著的出血或具有这样的事件的风险的外伤患者中减小死亡、血管闭塞的事件以及输血频率(Ker K.同上)。

[0009] 哺乳动物中的纤维蛋白溶解级联包括两种主要的组分，酶原纤维蛋白溶酶原和两个纤维蛋白溶酶原活化剂组织类型纤维蛋白溶酶原活化剂(tPA)和尿激酶纤维蛋白溶酶原活化剂(uPA)。内源纤维蛋白溶解以纤维蛋白溶酶原结合到血栓的主要组分纤维蛋白开始，然后被tPA或uPA活化成蛋白水解活性酶纤维蛋白溶酶。新产生的纤维蛋白溶酶裂解纤维蛋白凝块成通常被肝脏吸收的可溶的纤维蛋白降解产物(SFDP)。

[0010] tPA为由5个结构域组成的类胰蛋白酶的丝氨酸蛋白酶：纤连蛋白指结构域(finger domain)(F)、表皮生长因子结构域(EGF)、两个kringle结构域(K1和K2)和蛋白酶结构域(P)。除了结合到它的底物纤维蛋白溶酶原，tPA还结合纤维蛋白。tPA结合纤维蛋白主要由它的指结构域介导，并且K1的一些参与还介导其从循环快速清除(Stewart R等，J Biol Chem.(2000)，275:10112-10120)。

[0011] uPA表达为包括N末端片段(ATF，氨基酸1-135)和蛋白酶结构域(氨基酸136-411)的单链分子(scuPA)，还称为小分子量uPA(LMW-uPA)。氨基末端片段(ATF)自身包括2个独立

的结构域，已知结合uPA受体的氨基末端生长因子类结构域(GFD；氨基酸1-43)和单个kringle(K；氨基酸47-135)(Rabbani SA等，J Biol Chem.(1992)，267(20)：14151-6；Bdeir K等，Blood.(2003)，102(10)：3600-8)。scuPA当由纤维蛋白溶酶转变为2-链分子(tcuPA)时表达纤维蛋白溶酶原活化剂活性(Stump DC等，J Biol Chem.(1986)，261(36)：17120-6)，或者当结合到它的受体时作为单链分子(Higazi A等，J Biol Chem.(1995)，270(29)：17375-80)。虽然在纤维蛋白溶酶原活化的过程中，tPA和uPA裂解纤维蛋白溶酶原中氨基酸Arg560和Val561之间的相同单肽键，但是这些纤维蛋白溶解的活性的机制完全不同。

[0012] tPA的纤维蛋白溶解以tPA和纤维蛋白溶酶原共结合到纤维蛋白开始，导致两种物质在凝块表面非常高的局部浓度，以及然后比在纤维蛋白不存在下发生的提高由tPA活化纤维蛋白溶酶原的效率几个数量级(Hoylaerts M等，J Biol Chem.(1982)，257：2912-2919)。

[0013] 虽然纤维蛋白的存在还可提高uPA对纤维蛋白溶酶原的活化，但与tPA相反，uPA不结合到纤维蛋白(Collen D等，J Biol Chem.(1986)，261：1259-1266.)。已经显示，纤维蛋白溶酶原结合到纤维蛋白引起纤维蛋白溶酶原的构象变化，提高对uPA的亲和力(Lijnen HR等，J Biol Chem.(1986)，261(3)：1253-8；Collen D.等，Crit Rev Oncol Hematol.(1986)，4(3)：249-301；Collen D.等，J Biol Chem.(1978)，253：5395-5401)。

[0014] 纤维蛋白溶酶原活化剂的抑制剂可用于任何外伤后状况，无论其影响头、胸腹部或身体的其它部分。它们还可用在产后出血，或在可引起出血的任何手术期间。另外的使用可在出血性卒中、蛛网膜下出血或具有增加的出血倾向的其它的状况，例如血友病或弥散性血管内凝血(DIC)患者以及作为生物胶(biological glue)。

[0015] 发明概述

[0016] 根据第一方面，本发明涉及抗纤维蛋白溶解组合物，包括携带在如SEQ ID NO.7表示的野生型分子的位置481中取代Ser^{481}为Ala的点突变的至少一种tPA(组织纤维蛋白溶酶原活化剂)突变体。更具体地，用于本发明的组合物的突变体抑制tPA和uPA(尿激酶纤维蛋白溶酶原活化剂)的至少一种的纤维蛋白溶解活性。在某些实施方式中，本发明的组合物可包括本发明提供的tPA突变体，所述tPA突变体携带在如SEQ ID NO.7表示的野生型分子的位置481中取代Ser^{481}为Ala的点突变，以及可为下述的任一种的至少一个另外的突变：(a)SEQ ID NO.7表示的野生型分子的位置299-302中取代$KHRR^{299-302}$为AAAA的至少一个点突变；(b)SEQ ID NO.7表示的野生型分子的位置120和106中取代N^{120}为Q以及取代T^{106}为N的至少一个点突变；以及(c)指和K1结构域的至少一种的缺失，如由SEQ ID NO.4表示的。

[0017] 根据其一个方面，本发明提供了用于与纤维蛋白溶解相关的疾病、紊乱或状况的治疗、改善、抑制或预防的方法中的本发明描述的组合物。

[0018] 在另一个方面，本发明提供了分离的tPA突变的分子、或其任何片段或功能衍生物。更具体地，本发明提供的tPA突变体携带在如SEQ ID NO.7表示的野生型分子的位置481中取代Ser^{481}为Ala的点突变，以及可为下述的任一种的至少一个另外的突变：(a)SEQ ID NO.7表示的野生型分子的位置299-302中取代$KHRR^{299-302}$为AAAA的点突变；(b)SEQ ID NO.7表示的野生型分子的位置120和106中取代N^{120}为Q以及取代T^{106}为N的点突变；以及(c)指和K1结构域的至少一种的缺失，如由SEQ ID NO.4表示的。

[0019] 在另一个方面，本发明涉及用于在需要其的受试者中治疗、改善、抑制或预防与纤

维蛋白溶解相关的疾病、紊乱或状况的方法。更具体地，本发明的方法包括向所述受试者给药治疗有效量的本发明描述的至少一种tPA突变的分子的步骤。

[0020] 根据另外的方面，本发明还提供了生物胶，包括至少一种本发明的tPA突变的分子和至少一种凝血促进剂。

[0021] 本发明还提供了这些突变体作为抗纤维蛋白溶解剂的用途，以及用于治疗与纤维蛋白溶解相关的紊乱的药盒。

[0022] 通过下面的附图，本发明的这些和其它方面将变得明显。

[0023] 附图简述

[0024] 图1：tPA-S^{481}A与纤维蛋白以及纤维蛋白溶酶原的相互作用

[0025] 数据说明，tPA-S^{481}A仅在纤维蛋白的存在下结合到纤维蛋白溶酶原。与阳性对照(80nM人类tPA-S^{481}A)(泳道4)相比，在缺少(泳道2)或存在(泳道3)1μM uPA以及缺少纤维蛋白(泳道5)下用纤维蛋白溶酶原(每种100nM)以及纤维蛋白培养tPA-S^{481}A。如报道的，用抗纤维蛋白溶酶原免疫沉淀复合物，并用抗tPA抗体检测。结果证明，在缺少纤维蛋白时未形成复合物(泳道5)。tPA-S^{481}A仅在存在纤维蛋白时结合到纤维蛋白溶酶原，并形成稳定的复合物(泳道2)。uPA抑制tPA-S^{481}A的结合(泳道3)。

[0026] 图2A-2D：tPA^{S481A}对纤维蛋白溶酶原活化的抑制依赖于纤维蛋白溶酶原的构象

[0027] 图2A说明了血浆凝块的溶解。如以前报道地进行，tPA-S^{481}A(50nM)抑制了WT-tPA(20nM)和uPA(50nM)对人血浆来源的凝块的溶解。

[0028] 图2B说明了两个tPA突变体tPA-S^{481}A和tPA-S^{481}A-DS抑制了tPA与uPA介导的源自人类血浆的凝块的溶解，如图2A中进行的。在另一组实验中，瑞替普酶(20nM)代替WT tPA±tPA-S^{481}A或tPA-S^{481}A-DS(10nM)被加入。

[0029] 图2C说明了凝血弹性描记法(TEG)监测的凝块的溶解。tPA-S^{481}A抑制了通过TEG监测的源自新鲜的人全血的凝块的溶解。如所标示的，在无添加剂下(对照)、在WT tPA或uPA(每种10nM)±50或500nM tPA-S^{481}A或tPA-S^{481}A-DS(50nM)的存在下进行图B和图C中的实验。

[0030] 图2D显示了在不存在纤维蛋白的情况下tPA-S^{481}A对tPA和uPA的纤维蛋白溶酶原活化剂活性的影响。在缺少或存在tPA-S^{481}A或tPA-S^{481}A-DS(100nM)或氨甲环酸(TA)(200nM)和纤维蛋白溶酶显色底物(100μM)时，不使用(对照)或使用WT-tPA(50nM)或uPA(20nM)培养纤维蛋白溶酶原(500nM)。在接下来的20分钟连续地测量在405nm的OD。在另一组实验中，TA与tPA-S^{481}A(100nM)一起加入。数据表示为每分钟OD的变化。结果显示，tPA-S^{481}A在缺少纤维蛋白时对tPA或uPA的纤维蛋白溶酶原活化无影响，并且TA仅在uPA的情况下模拟纤维蛋白的效果。

[0031] 图3A-3F：小鼠中的CHI诱导时间依赖的脑内出血的扩张

[0032] 通过MRI以及通过测量血红蛋白(Hgb)的渗出而评价CHI引起的脑内出血。

[0033] 图3A显示了在未处理的WT小鼠(对照)、在CHI后立即(处理)或2个小时后(处理2个小时)给予tPA-S^{481}A或tPA-S^{481}A-DS(每个1mg/kg)的小鼠中CHI后24个小时的出血面积。在上图和下图显示了来自每个组(n＝6)的两只代表性小鼠。

[0034] 图3B显示了在损伤后立即给予盐水、以及WT或tPA-S^{481}A的WT和tPA$^{-/-}$小鼠中CHI后2或8个小时通过分光光度法定量的Hgb的渗出。结果显示了，Hgb的渗出为时间依赖的，在8

小时更严重，由WT tPA恶化，并被tPA-S^{481}A(每种1mg/kg)抑制。

[0035] 图3C显示了WT和$tPA^{-/-}$以及$uPA^{-/-}$小鼠中CHI后2或8个小时Hgb的渗出。实验如图3B中进行。

[0036] 图3D显示了在CHI前(前)或2个小时后(后)通过ELISA确定的WT小鼠的CSF中tPA和uPA的浓度。

[0037] 图3E显示了CHI后CSF的纤维蛋白溶解活性。上面的行显示在CHI后2个小时从未处理的小鼠获得的CSF(5或10μl)放在如图2A中的血浆来源的凝块的顶部。下面的行显示在CHI后2个小时从tPA-S^{481}A处理(1mg/kg)的小鼠获得的CSF。

[0038] 图3F显示了在CHI后从未处理或给予tPA-S^{481}A(1mg/kg)的小鼠获得的CSF的纤维蛋白溶解活性，如图2B中的量化。

[0039] 图4A-4B:tPA-S^{481}A对凝血病的影响：

[0040] 在CHI后立即静脉内(IV)给药盐水或包含tPA-S^{481}A(1mg/kg)、氨甲环酸(TA)(150mg/kg)、抑肽酶(1mg/kg)或TA+tPA-S^{481}A的盐水。2个小时后测量d-二聚体(DD)的血浆水平以及血小板计数。

[0041] 图4A显示了tPA-S^{481}A抑制d-二聚体的形成。

[0042] 图4B显示了tPA-S^{481}A抑制血小板减少的发展。

[0043] 图5:tPA-S^{481}A对CHI后神经恢复的影响。

[0044] 在CHI后立即IV给药盐水或包含tPA-S^{481}A或tPA-S^{481}A-DS(每种1mg/kg)、TA(150mg/kg)、抑肽酶(AP)(1mg/kg)或TA+tPA-S^{481}A的盐水。24个小时后确定神经功能缺损评分(neurological severity score,NSS)。

[0045] 图6A-6C:内源tPA、uPA和tPA-S^{481}A对CHI后脑内出血的发展、d-二聚体和血小板计数的作用。

[0046] 在WT、$tPA^{-/-}$和$uPA^{-/-}$小鼠中诱导CHI。在CHI后立即用tPA-S^{481}A(1mg/kg)、TA(10mg/kg)或AP(1mg/kg)IV处理小鼠。如图4中确定d-二聚体(DD)的血浆水平，并在2小时后测量血小板计数。

[0047] 图6A显示了上述处理对DD水平的影响。

[0048] 图6B显示了上述处理对血小板计数的影响。

[0049] 图6C显示了在用香豆素(华法林)处理的小鼠中tPA-S^{481}A对ICH扩大的抑制效果。在外伤时在用香豆素(WR)处理的WT、tPA-/-或uPA-/-小鼠中诱导CHI，INR为2.5。在TBI后立即给予tPA-S^{481}A(1mg/kg)，并且在损伤后，如表示的，2或8小时确定脑血红蛋白。结果显示，注射tPA-S^{481}A给用华法林抗凝的WT小鼠几乎完全抑制了外伤后的脑内出血。此外，数据进一步支持了uPA和tPA几乎同样地有助于外伤后出血的概念。

[0050] 发明详述

[0051] 应理解，本发明的应用不限于下面说明书中说明或附图中描述的细节。本发明能够有其它实施方式或以不同的方式实施。同样，应理解，本文中使用的措辞和术语用于说明的目的，而不应认为是限制。

[0052] 当组织首次受伤时，血液与胶原蛋白接触，引发血小板开始分泌炎症因子。血小板还在它们的细胞膜上表达糖蛋白，让它们彼此粘附并聚集，形成块。

[0053] 纤维蛋白和纤连蛋白交联到一起，形成捕获蛋白和颗粒的堵塞，并防止进一步的

血液损失。该纤维蛋白-纤连蛋白堵塞还是用于创伤(wound)的主要结构支撑物，直到胶原蛋白沉积。游走细胞使用该堵塞作为基质以穿过，并且血小板粘附到它并分泌因子。该凝块最终在称为纤维蛋白溶解的过程中裂解，并用肉芽组织取代，后来用胶原蛋白取代。

[0054] 纤维蛋白溶解为防止血液凝块生长并变成问题的过程。该过程具有两种类型：初级的纤维蛋白溶解和次级纤维蛋白溶解。初级类型为正常的身体过程，而次级纤维蛋白溶解为凝块由于药品、医学紊乱或者其它一些原因的分解。在纤维蛋白溶解中，凝血的产物纤维蛋白凝块分解。它的主要的酶纤维蛋白溶酶在各个位置切割纤维蛋白网络，导致循环片段的产生，即可溶的纤维蛋白降解产物(SFDP)，被其它蛋白酶或被肾脏和肝脏清除。

[0055] 纤维蛋白溶酶以无活性形式(酶原)纤维蛋白溶酶原在肝脏中产生。除了其它以外，组织纤维蛋白溶酶原活化剂(tPA)和尿激酶纤维蛋白溶酶原活化剂(uPA)为多功能丝氨酸蛋白酶(Nassar T等，JBC 2002,277:40499-40504;Nassar T等，Blood 2004,106:897-902)，裂解酶原纤维蛋白溶酶原中氨基酸残基Arg^{560}-Val^{561}之间的单肽键，从而产生有效的蛋白水解酶-纤维蛋白溶酶。纤维蛋白溶酶原的有效活化依赖于其结合到纤维蛋白，该结合继而显著地刺激纤维蛋白溶酶原的tPA和uPA活化。

[0056] 内源的纤维蛋白溶解。虽然uPA和tPA的内源纤维蛋白溶解各自被纤维蛋白显著地刺激，但是它们活性增强的机制不同。在tPA的情况下，纤维蛋白溶解通过在纤维蛋白的表面上tPA和酶原纤维蛋白溶酶原的结合和共定位开始，该结合和共定位提高了两种反应物的局部浓度。在纤维蛋白凝块的表面，tPA裂解纤维蛋白溶酶原中的Arg^{560}-Val^{561}键，以产生纤维蛋白溶酶，然后裂解纤维蛋白成不同的降解产物(SFDP)，活化/失活，并促进活化凝血因子的清除，并通过切除血小板表面上的某些糖蛋白而激活血小板活化作用。uPA也在纤维蛋白表面上裂解纤维蛋白溶酶原成纤维蛋白溶酶，但是不结合纤维蛋白。纤维蛋白溶酶原通过其见于kringle 1-3的赖氨酸结合位点(LBS)而结合到纤维蛋白上的N末端赖氨酸残基上。纤维蛋白溶酶原在通过其LBS结合到纤维蛋白后经历构象变化，使其成为uPA的更好的底物。已充分记载由纤维蛋白引起的纤维蛋白溶酶原构象的变化对其由tPA的活化无影响。

[0057] 基于tPA是循环中主要的纤维蛋白溶酶原活化剂的假设，例如氨甲环酸(TA)和ε-氨基己酸(EACA)的赖氨酸类似物已经广泛地用作抗纤维蛋白溶解物(anti-fibrinolytics)，以防止出血。然而，uPA补偿tPA的遗传缺失，并促进循环中的纤维蛋白溶解。氨甲环酸和ε-氨基己酸(EACA)结合到纤维蛋白溶酶原的LBS，从而防止其结合到纤维蛋白以及被tPA活化。另一方面，赖氨酸类似物结合到纤维蛋白溶酶原模拟了纤维蛋白的作用，并增强了其被uPA的活化。基于这些原理，将预期赖氨酸类似物可以独立于纤维蛋白的方式增强纤维蛋白溶酶产生。未形成在纤维蛋白上的纤维蛋白溶酶具有更大的作用于凝血因子和血小板的机会。此外，在赖氨酸类似物的存在下产生的纤维蛋白溶酶被保护不受其生理抑制剂α2-抗纤维蛋白溶酶失活，该失活还将增强将提高潜在的非期望效果的事实。

[0058] 我们的数据首次显示，纤维蛋白溶酶原结合到纤维蛋白或赖氨酸类似物增强了其与tPA-S^{481}A的相互作用，从而促进了其对tPA-或uPA-介导的纤维蛋白溶解的抑制。因此，理论上，预期tPA^{481}A是比氨甲环酸和ε-氨基己酸更有效的抑制剂，因为其直接作用于溶解步骤，而与机制无关。

[0059] 此外，纤维蛋白溶酶原对纤维蛋白的亲和性让其在凝块形成的过程中被包含到凝块中，从而使得需要时能够现场活化tPA以及uPA纤维蛋白溶解。tPA在体内通过血管受损的

内皮缓慢释放到血液中，使得在停止出血后，陷入凝块中的纤维蛋白溶酶原缓慢地被tPA和uPA活化，导致纤维蛋白网的裂解以及SFDP的产生。

[0060] 由于纤维蛋白溶解过程对于整个有机体的活力是根本的，所以其经受严密的调控以及反馈控制。纤维蛋白溶酶可进一步刺激纤维蛋白溶酶产生，因为其自身是更活化形态的tPA和uPA产生的催化剂。除了其它以外，纤维蛋白溶酶负责在Arg^{275}-Ile^{276}残基处裂解单多肽链形态的tPA，以及产生二硫化物连结的两条链形态的tPA。同样，纤维蛋白溶酶还负责还称为单链uPA(scuPA)的尿激酶原裂解和活化成完全活化的两条链uPA(tPA)。此外，纤维蛋白溶酶在Lys^{158}-Ile^{159}残基处裂解还称为高分子量(HMW)uPA的两条链uPA成低分子量的(LMW)的蛋白水解活性uPA，该蛋白水解活性uPA不结合uPA受体。

[0061] 相反，tPA和uPA被内源纤维蛋白溶酶原活化剂抑制剂1和2(PAI-1和PAI-2)抑制。PAI-1还由血管内皮以及其它组织类型诸如脂肪组织产生。PAI-2仅在妊娠期间以可检测的量存在于血液中，因为其由胎盘产生，这可解释妊娠期间血栓形成的增加的比率。

[0062] 在手术和外伤过程中纤维蛋白溶解活性的抑制或减小特别重要，以控制失血过多(即出血)。此外，其对于遗传的(即先天的)凝血病，例如血管性血友病(VWD)、血友病A和B的患者是必需的，以平衡减少的促凝血状态。为满足这些需要，已经开发了数种合成的纤维蛋白溶解抑制剂(还有抗纤维蛋白溶解物)，目前仅有的可用的产品为ε-氨基己酸(EACA)以及更有效的氨甲环酸(TA或AMCA)。然而，使用这两种产品与相当多的胃肠不良反应相关。此外，在鉴定大的不良反应，尤其在肾中的不良反应后，从市场上撤回了天然存在的抗纤维蛋白溶解剂抑肽酶。

[0063] 因此，本发明回答了对新的抗纤维蛋白溶解的产品的迫切需要，尤其由于天然血液产品例如新鲜或冷冻血浆的使用显著地被感染或过敏反应的风险危及。

[0064] 本发明基于意外和重要的发现：由特定一个或更多个点突变产生的某些无催化活性的tPA变体能够在纤维蛋白或赖氨酸类似物的存在下直接结合纤维蛋白溶酶原，并由此在体外和体内抑制tPA-和uPA介导的纤维蛋白溶酶原活化以及随后的纤维蛋白溶解。具体地，发明人发现，在tPA的催化位点由Ser^{481}残基至Ala的取代产生的无催化活性的tPA变体($tPA^{Ser481Ala}$;SEQ ID NO:1)在纤维蛋白的存在下在与纤维蛋白溶酶原的亲和性方面与野生型(WT)tPA和uPA竞争，从而妨碍tPA-和uPA介导的纤维蛋白溶解。此外，发明人进一步显示(图2B)，$tPA^{Ser481Ala}$抑制通过“瑞替普酶”诱导的纤维蛋白溶解，该tPA突变体具有与WT tPA相比减小的对纤维蛋白的结合；表明，$tPA^{Ser481Ala}$通过防止纤维蛋白溶酶原活化剂结合到纤维蛋白表面上存在的纤维蛋白溶酶而抑制纤维蛋白溶解。此外，图2D中的数据显示，$tPA^{Ser481Ala}$在缺少纤维蛋白但存在TA下抑制纤维蛋白溶酶原被tPA和uPA的活化，进一步支持我们的发现：$tPA^{Ser481Ala}$通过结合被纤维蛋白或赖氨酸类似物修饰的纤维蛋白溶酶原而发挥其抑制作用。更意外地，发现所述tPA变体以高度依赖于纤维蛋白的存在的特定的剂量依赖的方式与uPA和从而与uPA介导的纤维蛋白溶解竞争(参见实施例1)。这些实验数据导致发明人关于$tPA^{Ser481Ala}$变体和可能的某些其它tPA突变体可用于靶向tPA以及uPA纤维蛋白溶解的概念。

[0065] 已经在一系列的试验中证明该概念是正确的，显示在SEQ ID NO.7的tPA分子中包括Ser^{481}-Ala突变以及tPA kringle结构域中的$KHRR^{299-302}$至AAAA的另外的点突变的另一个tPA变体。应注意，此突变称为DS。在某些实施方式中，该突变体可包括还由SEQ ID NO:2表

示的氨基酸序列，所以缺少催化活性以及结合N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDA-R)的能力，对tPA和uPA纤维蛋白溶解具有相同的抑制作用，其严格地依赖于纤维蛋白的存在(实施例1)。应进一步注意，本发明进一步包括双突变的tPA，其携带^{S481A}以及KHRR$^{299-302}$至AAAA的突变，具有SEQ ID NO.13表示的氨基酸序列。应注意，该突变体在分子的N'末端进一步包括两个另外的氨基酸残基。仅为克隆的目的引入这两个残基Arg和Ser(RS)。应注意，本文中使用的299-302突变还指本领域称为tPA的位置296-299的KHRR至AAAA的突变。

[0066] 此外，当比较这些变体与合成的纤维蛋白溶解抑制剂TA的抗纤维蛋白溶解效果时，发明人发现，所述变体是比TA更有效的纤维蛋白溶解抑制剂，并且与TA不同，它们靶向tPA和uPA纤维蛋白溶解二者(实施例1)。总之，这些数据产生了发明概念的巩固，由此某些tPA突变体，在抑制纤维蛋白溶解以及其它数种与tPA以及uPA活性相关的生理过程中可具有潜在的治疗效果。

[0067] 在外伤性脑损伤(TBI)的小鼠模型的体内进一步实验显示了本发明的上述概念的潜在临床应用(实施例2)。发明人发现，在头外伤后立即或者两个小时后给药tPA变体导致出血的弱化和显著减轻(颅内出血，ICH)，与脑脊液(CSF)中纤维蛋白溶解活性的显著减小一致。更令人惊奇地，发现用tPA变体治疗逆转了TBI的次级症状，例如血小板减少症和神经症状，没有明显的副作用。

[0068] 因此，根据第一方面，本发明涉及抗纤维蛋白溶解组合物，包括携带在SEQ ID NO.7表示的野生型分子的位置481中取代Ser^{481}为Ala的点突变的至少一种tPA(组织纤维蛋白溶酶原活化剂)突变体。更具体地，用于本发明的组合物的突变体抑制了tPA和uPA(尿激酶纤维蛋白溶酶原活化剂)的至少一种的纤维蛋白溶解活性。

[0069] 在某些实施方式中，本发明的组合物可还包括至少一种另外的治疗剂。

[0070] 在另一个实施方式中，本发明的组合物可还包括至少一种可预期的载体和赋形剂。根据本发明的一个实施方式，本发明的组合物包括称为tPA^{Ser481Ala}的tPA变体，其包括SEQ ID NO.1表示的氨基酸序列，显示为tPA-和uPA介导的纤维蛋白溶酶原活化和纤维蛋白溶解活性的有效的和特异的抑制剂(实施例1)。应进一步理解，本发明的突变的tPA分子还可称为tPA-S^{481}A。还应注意，该突变体在分子的N'端进一步包括两个另外的氨基酸残基。仅为克隆的目的引入这两个残基Arg和Ser(RS)。因此，在某些实施方式中，本发明的tPA-S^{481}A突变体可包括SEQ ID NO.12表示的氨基酸序列。

[0071] 本发明公开了包括抑制tPA和uPA二者的纤维蛋白溶解活性的突变的tPA分子的组合物。应理解，本文中使用的术语tPA用于组织纤维蛋白溶酶原活化剂(也称为PLAT;酶条目EC 3.4.21.68)，涉及转变和活化酶原纤维蛋白溶酶原为有效的纤维蛋白溶解酶-纤维蛋白溶酶的分泌的丝氨酸蛋白酶。tPA在血管内皮细胞中以单多肽链合成，该单多肽链在位于精氨酸-异亮氨酸键的中心经纤维蛋白溶酶或胰蛋白酶的蛋白水解裂解，产生包括N末端衍生的重链和C末端轻链的2链二硫键形态。tPA基因(DNA acc.NT_167187.1，定位到染色体8p11.21)包含14个外显子，其编码包括两个kringle区域(K1和K2)的重链结构域以及与生长因子同源的区域，以及包括丝氨酸蛋白酶催化位点的轻链结构域。tPA基因的选择性剪切产生编码参与除了纤维蛋白溶解以外的多个生物过程例如细胞迁移和组织重构的不同的亚型的多个转录变体。提高的tPA活性引起高纤维蛋白溶解，表现为失血过多;减小的tPA活性导致可产生血栓形成或栓塞的低纤维蛋白溶解。与tPA联系的表型包括家族性高纤维蛋

白溶解(由于提高的tPA释放)以及家族性血栓形成(由于减小的tPA释放)(OMIM num.612348)。

[0072] 此外,本文中使用的用于尿纤维蛋白溶酶原活化剂(也称为PLAU;EC3.4.21.73)的术语uPA涉及转化纤维蛋白溶酶原成纤维蛋白溶酶的另一种酶。uPA可以单链形态(scuPA)或由纤维蛋白溶酶对单链形态的裂解产生的2-链衍生物(也称为HMW uPA)存在。HMW uPA可进一步加工成蛋白水解活性、但是不结合到uPA受体的LMW uPA。uPA基因(Gene acc.NT_030059.13,定位到染色体10q22.2)产生几种编码不同uPA亚型的可变剪切的转录本变体。uPA参与胞外基质的降解以及血管生成(angiogenesis),以及可能的肿瘤细胞迁移和增殖。该基因的特定的多态性可与迟发性的阿兹海默病(OMIM num.104300以及Quebec-血小板紊乱(OMIM num.601709)相关。

[0073] 如上述,本发明的突变体抑制了tPA和uPA的纤维蛋白溶解活性。本文中使用的有关本发明的术语纤维蛋白溶解表示其中血块溶解的生理过程。纤维蛋白溶解中的反应为活化酶原纤维蛋白溶酶原成纤维蛋白溶酶-负责纤维蛋白凝块降解的丝氨酸蛋白酶,以及许多其它生物蛋白。纤维蛋白溶酶原通过在kringle结构域的特定的赖氨酸结合位点(LBS)而结合纤维蛋白。纤维蛋白溶酶原的生理活化剂tPA还通过其指结构域结合纤维蛋白,并且通过第二kringle结构域至较小的程度。纤维蛋白溶酶原与tPA的这一共定位进一步促进了在纤维蛋白凝块位置的纤维蛋白溶解。纤维蛋白溶解对于保持体内平衡,以能够接近负责修复和再生(血管生成)受损的血管的生物因子是重要的。通过纤维蛋白溶解抑制剂抑制或减小纤维蛋白溶解在手术和外伤中是很重要的,以控制失血,对于具有出血性紊乱的患者甚至更强地表明。

[0074] 如本文中提及的术语“抑制/减小”涉及过程的阻滞、衰减、约束或减少。更具体地,理解本发明的tPA突变体抑制tPA和uPA纤维蛋白溶解的至少一种至少约1%至5%、约5%至10%、约10%至15%、约15%至20%、约20%至25%、约25%至30%、约30%至35%、约35%至40%、约40%至45%、约45%至50%、约50%至55%、约55%至60%、约60%至65%、约65%至70%、约75%至80%、约80%至85%、约85%至90%、约90%至95%、约95%至99%、或约99%至99.9%。

[0075] 这样,理解本发明的tPA突变体抑制了PA-以及uPA-依赖的纤维蛋白溶酶原活化的至少一种约1%至5%、约5%至10%、约10%至15%、约15%至20%、约20%至25%、约25%至30%、约30%至35%、约35%至40%、约40%至45%、约45%至50%、约50%至55%、约55%至60%、约60%至65%、约65%至70%、约75%至80%、约80%至85%、约85%至90%、约90%至95%、约95%至99%、或约99%至99.9%的任一个。

[0076] 应注意,本文中所指的术语“突变”涉及显示改变编码的蛋白产物的功能的诱导的遗传变异。所述突变可为点突变,即DNA分子中的单个核苷酸的取代、缺失或插入,或缺失/插入突变-DNA序列中核苷酸的数目的改变;或重复突变-与野生型相比DNA序列的异常重复。本领域中熟知点突变可为错义突变或无义突变或移框突变。在本发明具体的实施方式中,由于编码具体的氨基酸残基的密码子中的点突变,本发明的突变体携带用另一个取代或替换具体的氨基酸残基的至少一个点突变。

[0077] 除了其构成丝氨酸蛋白酶的催化结构域,tPA酶还包括纤连蛋白3型指结构域、表皮生长因子样结构域以及两个kingle结构域(K1和K2)。指结构域见于纤维蛋白和膜联蛋白

II(参与各种细胞过程,例如细胞基质相互作用、肌动蛋白细胞骨架相互作用、细胞运动、内吞作用以及离子通道的形成的蛋白质)。K1和K2结构域结合纤维蛋白,K2对于tPA的保护脑的活性是必要的。除了介导tPA的蛋白水解功能,催化结构域还结合到血管平滑肌细胞,并介导结合抑制剂,例如(PAI-1和PAI-2)。

[0078] 本发明特别地与在蛋白功能结构域引起的突变以及随之的其生物活性相关,特别是与tPA酶的kringle、指以及其它结构域相关。因此,应理解,本发明的突变的tPA分子可在分子的任何结构域携带任何另外的点突变。

[0079] 在另一实施方式中,本发明突变的tPA^{S481A}分子可另外在K结构域(K1或K2的至少一种)携带点突变。本文中所指的"kringle结构域"(K)涉及折叠成以三个二硫键连接所稳定的大的环的自主蛋白结构域。例如,已经在纤维蛋白溶酶原、tPA、肝细胞生长因子、凝血酶原以及载脂蛋白(a)中发现K结构域。K结构域在蛋白与蛋白相互作用中重要,最值得注意的是血液凝固因子。

[0080] 在一个实施方式中,本发明的突变的tPA^{S481A}分子可另外地在分子的F结构域携带点突变。本文中所述的术语"指结构域"(F)涉及以包括结合两个锌阳离子的$Cys_3HisCys_4$的氨基酸基序为特征的小的结构蛋白质结构域,所述两个锌阳离子稳定蛋白质特定的指状折叠。名称指结构域目前已经包括多种多样的不同的蛋白结构,包括纤连蛋白3型指结构域。许多包含F结构域的蛋白在泛素化路径中起关键的作用。

[0081] 上述特别与本发明的一些实施方式相关,其中,包括在本发明的组合物中的tPA Ser^{481}至Ala的突变体还包括至少一个位于残基Lys^{296}、His^{297}、Arg^{298}、Arg^{299}、Asp^{120}、Thr^{106}任一个位置的点突变,和/或tPA指和K1结构域的缺失(文中还称为双突变体)。本发明还提供了tPA突变体,除了其指结构域以及任选地其K1结构域外完全缺失。

[0082] 因此,在更具体和非限制的实施方式中,包括在本发明的组合物中的$tPA^{Ser481Ala}$变体可还包括以下的至少一种:(a)SEQ ID NO.7表示的野生型分子的位置299-302中取代$KHRR^{299-302}$为AAA的点突变A;(b)SEQ ID NO.7表示的野生型分子的位置120和106中取代N^{120}为Q以及取代T^{106}为N的点突变;以及(c)指和K1结构域的至少一种的缺失,如SEQ ID NO.4表示的。已经在体外对tPA-和uPA介导的纤维蛋白溶酶原活化以及纤维蛋白溶解的抑制效果(实施例1),以及在体内对病理性纤维蛋白溶解或高纤维蛋白溶解的抑制以及与神经外伤特别是头部外伤相关的谷氨酸介导的神经伤害(neural damage)或死亡的抑制方面(实施例2)证明了tPA双突变体的效力。应注意,本文中使用的299-302突变还指本领域中称为Tpa的位置296-299的KHRR至AAAA的突变,并且本领域中还称取代N^{120}至Q以及T^{106}至N的突变为取代N^{117}至Q以及T^{103}至N的突变。

[0083] 上述特别与本发明的具体实施方式相关,其中,组合物包括tPA双突变体,如tPA Ser^{481}至Ala和在tPA蛋白酶结构域中的点突变,例如AAAA取代$KHRR^{299-302}$的点突变。在某些实施方式中,该特定的突变体称为$tPA^{Ser481Ala-DS}$。应进一步注意,本发明的突变体还可称为$tPA-S^{481}A-DS$。

[0084] 这样的突变体的更具体的实施方式为包含氨基酸序列SEQ ID NO.2表示的氨基酸序列的突变体。发明人设想,该tPA突变体缺少催化活性以及结合NMDA-R的能力,而非结合纤维蛋白的能力。发明人还广泛地证明所述突变体在体外抑制tPA和uPA纤维蛋白溶解的功效(实施例1),以及头部外伤的体内模型中的有益效果(实施例2)。

[0085] NMDA-R支配一系列的生理状况，包括由神经损伤引起的神经紊乱、精神病和神经痛综合征。NMDA-R的过度活化(也称为NMDA-R介导的兴奋毒性)已经与急性的和慢性的神经退行性变的病理状态相联系。

[0086] 应注意，本发明的$tPA^{Ser481Ala-DS}$双突变体缺乏丝氨酸蛋白酶活性，因此不能活化NMDA-R。然而，由于tPA通过PAI-1停泊位点结合NMDA-R，所以该位点的破坏防止或抑制了tPA与NMDA-R的相互作用，该突变体不能与野生型tPA竞争，所以不能防止NMDA-R的活化。更具体地，Ser^{481}与Lys^{296}、His^{297}、Arg^{298}、Arg^{299}的至少一种，优选所有所述突变的组合产生了抑制或防止纤维蛋白溶解但不影响NMDA-R的tPA突变体。在治疗的紊乱或外伤不是脑或神经外伤并且期望治疗对神经系统无影响的情况下，或者需要甚至在神经系统特别是脑中的纤维蛋白溶解，但是期望不影响NMDA-R的情况下，这样的突变体可以是有益的。在一些具体的实施方式中，本发明的突变的tPA分子携带Ser^{481}至Ala的点突变和$KHRR^{299-302}$至AAAA的点突变，并包括SEQ ID NO.2的氨基酸序列。还应注意，该突变体在分子的N'末端还包括两个另外的氨基酸残基。仅为克隆的目的引入这两个残基Arg和Ser(RS)。因此，在某些实施方式中，本发明的$tPA\text{-}S^{481}A\text{-}DS$突变体可包括SEQ ID NO.13表示的氨基酸序列。

[0087] 如实施例显示，虽然该突变体不能防止NMDA的活化，但是当损伤后约2个小时给药时，在由出血而非NMDA-R引起的伤害中，$tPA^{Ser481Ala-DS}$突变体显示了呈现对头部损伤的有益的治疗效果，如降低的神经功能缺损评分(NSS)所反映的。

[0088] 如本文中表明，神经症状的这样的减轻或减少可为在需要其的受试者中NSS的约10％至95％，具体地，约10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％，以及甚至99％。此外，可通过给药本发明的tPA突变体，特别是tPA Ser^{481}至Ala以及tPA双突变体给患这样的损伤或例如损伤的危险的受试者，而防止或抑制头部外伤后的神经细胞死亡。头部外伤后神经细胞死亡的减少可为约10％至95％，具体地约10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％，甚至99％的所述受试者。具体地，可抑制或防止CA3海马区的细胞死亡。

[0089] 根据另一个实施方式，本发明的组合物可包括不同突变体的组合。更具体地，这样的组合物可包括$tPA^{Ser481Ala}$突变体以及其它的tPA突变体的至少一个，具体地，以下的任一种：(a)SEQ ID NO.7表示的野生型分子的位置299-302中取代$KHRR^{299-302}$为AAAA的点突变的tPA突变体。可由SEQ ID NO.15提供这样的突变体的具体的实施方式。(b)携带SEQ ID NO.7表示的野生型分子的位置120和106中取代N^{120}为Q并且取代T^{106}为N的点突变的突变体。可由SEQ ID NO.16提供这样的突变体的具体的实施方式。(c)携带指和K1结构域的至少一种的缺失的突变体，如SEQ ID NO.4表示的；以及(d)携带Ser^{356}至Ala的点突变的uPA/scuPA突变分子，如SEQ ID NO.5表示的。

[0090] 根据本发明，每个突变、缺失或者突变和/或缺失的组合改变了产生的tPA突变蛋白的活性或效力。因此，在本发明的上下文中，为了各种目的期望对纤维蛋白溶解有显著的影响但是对NMDA-R活化无影响的突变体。例如，发现，N^{120}至Q的突变通过上游的14个氨基酸移动了K1内的糖基化位点，并且T^{106}至N突变体呈现K1上另外的糖基化位点。两种突变导致与WT tPA相比显著更长的半衰期和提高的对纤维蛋白的亲和性。这些突变的组合以及Ser^{481}至Ala突变可导致更持久并更有效的纤维蛋白溶解抑制剂。在一些具体的实施方式

中，本发明的突变的tPA分子携带Ser^{481}至Ala的点突变和N^{120}至Q以及T^{106}至N的点突变，并且包括SEQ ID NO.3表示的氨基酸序列。还应注意，该突变体在分子的N'末端还包括两个另外的氨基酸残基。仅为克隆的目的引入这两个残基Arg和Ser(RS)。因此，在某些实施方式中，本发明的tPA-S^{481}A-N^{120}Q-T^{106}N三突变体可包括SEQ ID NO.14表示的氨基酸序列。

[0091] 此外，缺少指和K1结构域的突变体不能结合到纤维蛋白，但是仍可结合NMDA-R，并在循环中具有更长的寿命，因为K1提高了tPA的清除。这样的突变体将不结合纤维蛋白或影响纤维蛋白溶解，但是抑制NMDA-R活化。在一些具体的实施方式中，本发明的突变的tPA分子携带Ser^{481}至Ala的点突变，以及指和K1结构域的至少一种的缺失，并包括SEQ ID NO.4的氨基酸序列。

[0092] 此外，仅tPA的指结构域片段或其与K1结构域的组合可通过与tPA竞争结合到纤维蛋白并阻止tPA介导的纤维蛋白溶解而抑制了tPA介导的纤维蛋白溶解。

[0093] 本发明还预期相应的uPA突变体。例如，具有Ser^{356}-Ala单突变的uPA/scuPA(SEQ ID No.5)突变体缺少蛋白酶催化活性，因此防止/抑制了纤维蛋白溶酶原以及NMDA-R的活化。

[0094] 根据其一个方面，本发明提供了本发明描述的组合物用于用在治疗、改善、抑制或预防与纤维蛋白溶解相关的疾病、紊乱或状况的方法中。

[0095] 因此，本发明还提供了用在治疗、改善、抑制或预防疾病、紊乱或状况的方法中的组合物，所述疾病、紊乱或状况可包括凝血病、血小板减少、出血、不可压迫的出血(noncompressible hemorrhage)、外伤引起的出血、妇科出血、小手术或大手术出血、先天凝血病、血友病、弥散性血管内凝血(DIC)以及与血管生成相关的状况的任一种。

[0096] 应理解，本文中提及的凝血病(或者凝血或出血性紊乱)涉及其中身体凝血的能力被破坏的状况。更具体地，在该上下文中，凝血功能降低是由于凝血异常而对出血异常的敏感，即提高的出血素质。凝血病可由称为凝血因子的凝血蛋白的减小的水平或缺少而引起。凝血病的特定的组构成先天凝血病，其中，凝血因子缺少是遗传地决定的并遗传。凝血病还可由血小板的功能异常或减小的水平引起。凝血病可严重地使由于损伤、分娩、手术以及其中可出现出血的其它状况的失血复杂化。

[0097] 由于本发明特别地与先天的凝血病有关，所以应进一步理解，最常见的先天性凝血病包括：与血友病(血友病A或因子VIII缺乏症)，一种X连锁的紊乱，特征为自发肌肉骨骼出血；血友病B(或克雷司马斯病或因子XI缺乏症)具有相似的症状，但是较不常见，并高度依赖于维生素K；维勒布兰德氏病(vWD)为由于凝血因子缺乏以及受损的血小板功能的具有延长的出血时间的遗传紊乱；低凝血酶原血为另一类凝血因子的先天缺乏，可导致出血；其他紊乱包括因子XI缺乏症(血友病C)和因子VII缺乏症(还称为血清凝血酶原转变加速因子(SPCA)缺乏)。

[0098] 弥散性血管内凝血(DIC，还称为消耗性凝血病)为由病理的凝血酶产生引起的系统过程，可出乎意料地由于凝血的消耗产生出血。DIC病因学包括败血症、蛇咬伤、烧伤、羊水栓塞、外伤、急性白血病和其他恶性肿瘤。

[0099] 在某些实施方式中，本发明尤其涉及治疗及改善并可能预防为最常见的凝血紊乱的血小板减小症。血小板减少症定义为血小板计数小于正常范围(150,000至450,000/μl±2标准偏差之间)。最显著地，当血小板计数小于50,000/μl，自发的黏膜与皮肤的出血(牙龈

出血、鼻出血、月经过多、瘀点、瘀斑)以及威胁生命的自发地颅内出血或胃肠道出血的风险快速提高。除了血小板计数,用于血小板减小症的诊断标准包括D-二聚体(DD)检测中提高的值,以及在乙二胺四乙酸(EDTA)的存在下但是当使用柠檬酸钠血液时,在血小板的体外凝结中明显的人为的或“假性血小板减少”的排除。血小板减小症的病因包括:免疫性血小板减少性紫癜(ITP,也为特发性血小板减少性紫癜)-由存在抗血小板的抗体引起的自身免疫状况;血栓性血小板减少性紫癜或溶血性尿毒症综合征(TTP-HUS),由遗传或后天的状况引起的血小板减少症的相对罕见的威胁生命的形式;药物引起的血小板减少症相对常见,具体地,化学治疗引起的血小板减少症以及肝素引起的血小板减少症(HIT);败血症/感染引起的血小板减少症,具体地由细菌或病毒性感染引起(例如HIV、EBV或CMV);由于血液成分的隔离,DIC和脾机能亢进可引起血小板减少症;其它原因包括怀孕引起的血小板减少症以及骨髓移植、输血或转移癌引起的血小板减少症。

[0100] 此外,本发明特别地可应用于在渗血或出血的一般术语下本文中所述的状况的大的和普通的组。根据American College of Surgeons'advanced trauma life support (ATLS)分类,出血包括:I级-损失达到15%的血的体积,没有生命特征的变化;II级-15-30%损失,具有心跳过速的症状,末梢血管收缩以及苍白的皮肤;III级-30-40%的损失,具有血压的显著下降,心率的提高以及外周低灌注(休克);IV级->40%损失,达到身体补偿的限制,其中需要积极复苏以防止死亡。根据世界卫生组织(WHO),标准化评分量表以测量由以下组成的出血的严重性:级别0-无出血、级别1-点状出血、级别2-轻微失血(临床显著);级别3-需要输血的严重失血(严重)、级别4-包括大脑的使身体虚弱的失血,与死亡相关。

[0101] 出血的易发部位包括口(吐血、咳血)、鼻子(鼻出血)、肛门(便血)、泌尿道(血尿)、头上部(颅内、大脑和脑内出血)以及通常由一些病理非外伤过程例如颅内小动脉瘤的破裂或动静脉畸形(AVM)引起的在蛛网膜下腔的蛛网膜下出血(SAH);肺(肺出血);妇科(阴道出血、产后出血、突破出血和卵巢出血;内出血(到脾脏和肝脏中);以及胃肠(上消化道出血)。

[0102] 还可由外伤性损伤或其它医疗状况(例如由华法林/香豆素引起的内出血)或两者的组合引起出血。

[0103] 在外伤引起的出血中,具体相关的躯体(胸、腹、盆骨和背部)的不可压迫的出血,其中不能应用压迫,与更顺从于压迫以终止出血的肢体的创伤不同。尤其是对于不可压迫的出血,控制出血以及限制失血是避免大出血的唯一的途径。当静脉给药本发明的组合物时,提供了用于躯体出血的潜在治疗,躯体出血特别抵抗目前可得的治疗。

[0104] 与该内容具体地相关的是涉及脑内出血的出血性卒中,包括:如丘脑、基底核或小脑中的深的脑内出血;主要在大脑中的脑叶内出血;由脑动脉瘤引起的SAH;或由于高血压的高血压脑内出血。

[0105] 与本语境相关的为妇科出血,包括月经过多、妊娠出血或分娩和产科出血、产后出血。应注意,本发明的组合物以及方法、用途和药盒的任一种可用于本文中描述的任何紊乱。

[0106] 本发明还可涉及治疗或防止由小手术产生的出血,即不包括麻醉或辅助呼吸的手术过程,例如包皮环切、牙科手术;以及对于大手术,即患者必须经全身麻醉的任何手术,例如整形外科手术、泌尿外科手术。

[0107] 在出血的情况下,本发明可与另外的治疗剂结合给药。这样的另外的剂的具体的

实例可为至少一种凝血促进剂。这样的凝血促进剂可选自凝血酶、纤维蛋白原、血小板活化剂、血浆制品以及富含血小板的血浆制品和维生素K。此外，本发明可与通过收缩组织以密封损伤的血管来起作用的止血剂或者通过引起血管收缩或促进血小板聚集来起作用的其它局部作用剂一起给药。

[0108] 如本发明意外地显示的，本发明的突变的tPA分子还有效地抑制uPA的纤维蛋白溶解活性。最近已经显示uPA参与调节血管生成。更具体地，uPA牵涉在组织增殖和细胞粘着中，因为其调节细胞外基质的蛋白水解降解，释放生长因子以及基质金属蛋白酶。此外，已经显示内源的和血管内皮生长因子(VEGF)增强的血管生成都需要uPA。另一方面，已经显示uPA参与由纤维蛋白溶酶原生成血管抑制素。应注意，血管抑制素为血管生成的抑制剂。因此，本发明的突变体对uPA活性的抑制还可用于调节血管生成。应注意，调节是指增强或抑制血管生成。在一些具体的实施方式中，本发明的突变体还可用于增强需要其的受试者中的血管生成。如本文中使用，术语“增强”和“促进”涉及增加或扩大血管生成过程约1％至5％、约5％至10％、约10％至15％、约15％至20％、约20％至25％、约25％至30％、约30％至35％、约35％至40％、约40％至45％、约45％至50％、约50％至55％、约55％至60％、约60％至65％、约65％至70％、约75％至80％、约80％至85％、约85％至90％、约90％至95％、约95％至99％或约99％至99.9％的任一个。

[0109] 在其它具体的实施方式中，可在需要其的受试者中使用本发明的突变体以抑制血管生成。如文中使用，术语“抑制”和“减小”涉及消除、减小和减弱血管生成过程约1％至5％、约5％至10％、约10％至15％、约15％至20％、约20％至25％、约25％至30％、约30％至35％、约35％至40％、约40％至45％、约45％至50％、约50％至55％、约55％至60％、约60％至65％、约65％至70％、约75％至80％、约80％至85％、约85％至90％、约90％至95％、约95％至99％或约99％至99.9％的任一个。

[0110] 因此，根据一些实施方式，本发明还提供了本发明的组合物在调节血管生成的方法中的用途。

[0111] 本文中提及的血管生成涉及由已存在的血管生成新的血管的生理过程。这与血管发生(vasculogenesis)不同，血管发生为由中胚层细胞前体重新形成内皮细胞。血管生成是生长和发育以及创伤愈合和肉芽组织的形成中正常和重要的过程。它还是肿瘤由良性阶段至恶性阶段的过渡中的基本步骤，导致在癌症的治疗中使用血管生成抑制剂。具体地，与该内容相关的为与不充分的血管生成相关的状况，例如冠状动脉疾病、中风、慢性创伤以及手术中。

[0112] 已经显示，通过具有正调控活性和负调控活性的分子间的净平衡而控制血管生成。该发现导致了“血管生成开关”的概念，其中，由正调节物质的诱导和/或负调节物质的减少而确定内皮活化的状态。由于本发明影响纤维蛋白溶酶原和uPA的生物利用度之间的平衡，所以它可进一步提供与其它已知的因子例如血管内皮生长因子(VEGF)细胞因子和血管生成素一起调节血管生成的手段。

[0113] 相同地，本发明提供了用在促进并增强创伤愈合的方法中的本发明的组合物。

[0114] 应理解，本文中提及的创伤愈合(或瘢痕形成)涉及复杂的过程，其中皮肤或另一器官-组织在损伤后修复自身。在正常皮肤中，上皮(最外层)和真皮(内层或深层)以稳定状态平衡存在，形成抗外部环境的保护性屏障。一旦保护性屏障被破坏，立即开始创伤愈合的

正常(生理)过程。创伤愈合的经典模型分为三个或四个连续但重叠的阶段：(1)止血(一些作者不认为是一个阶段)，(2)炎症，(3)增殖以及(4)重塑。当皮肤损伤时，紧密地精密的级联(closely orchestrated cascade)地发生一组复杂的生化事件，以修复伤害。在损伤后数分钟内，血小板(凝血细胞)在损伤位点聚集以形成纤维蛋白凝块。该凝块作用以控制活动性出血(止血)。

[0115] 在炎症阶段，细菌和碎片被吞噬并去除，并且释放因子，所述因子引起增殖期中涉及的细胞的迁移和分裂。

[0116] 增殖期以血管生成、胶原沉积、肉芽组织形成、上皮形成以及创伤收缩为特征。在血管生成中，通过血管内皮细胞形成新的血管。在纤维组织形成和肉芽组织形成中，成纤维细胞生长并通过分泌胶原蛋白和纤连蛋白而形成新的临时的细胞外基质(ECM)。同时，发生上皮的表皮再生，其中，表皮细胞增殖，并且在创面顶上“爬行”，为新的组织提供覆盖。

[0117] 相反，通过肌成纤维细胞作用使得创伤更小，在创伤边缘形成柄(grip)，并使用与平滑肌细胞中相似的机制自身收缩。当细胞的功能接近于完成时，不需要的细胞经细胞凋亡。

[0118] 在成熟及重塑阶段，沿着张力线(tension line)重塑并重排胶原蛋白，并且通过细胞凋亡去除不再需要的细胞。

[0119] 如本文中使用，术语“增强”以及“促进”涉及与创伤愈合相关的过程或数量的增加或扩增约1％至5％、约5％至10％、约10％至15％、约15％至20％、约20％至25％、约25％至30％、约30％至35％、约35％至40％、约40％至45％、约45％至50％、约50％至55％、约55％至60％、约60％至65％、约65％至70％、约75％至80％、约80％至85％、约85％至90％、约90％至95％、约95％至99％、或约99％至99.9％的任一个。

[0120] 在另一些其它实施方式中，本发明提供了用作生物胶的如文中描述的各种组合物。

[0121] 如本文中使用，表述“生物胶”是指上述组合物，包括至少一种tPA突变的分子作为活性成分，可用于各种目的，例如，作为密封剂、递送剂和粘合化合物。更具体地，本发明的组合物可用作用于控制出血和用于密封血管、肺或皮肤切口以及在腔内损伤情况下的生物胶。例如，本发明的组合物可在损伤区域上通过压力用于密封或加强已经缝合或订住的创伤，或减小失血以及手术后出血。当用作生物胶时，优选在创伤瘢痕形成后，通过生物降解、吸收或通过以痂的形态简单地脱落而消除本发明的组合物。

[0122] 根据一些实施方式，本发明提供了本发明的组合物用在抑制tPA和uPA的至少一种的纤维蛋白溶解活性的方法中。应注意，如下面的实施例显示的，可体内或体外进行本发明的突变体的这样的抑制作用。

[0123] 应理解，本发明的药物组合物可包括游离形态的活性化合物，并且直接给药到待治疗的受试者。备选地，根据活性分子的大小，在给药前可期望将它共轭到药学上可接受的载体上。可以任何常规剂型给药治疗制剂。如上面限定的，制剂通常包括至少一种活性成分，以及一种或更多种从与其它成分相容并对患者无害的意义上说药学和生理学上可接受的载体。在一些具体实施方式中，本发明的药物组合物可适于注射。适于注射用途的药物形式包括无菌含水溶液或分散系，以及临时制备无菌可注射溶液或分散系的无菌粉末。在所有的情况下，该形式必须无菌，并且必须为流体到存在容易可注射性的程度。在制造和储存

条件下其必须稳定，并且必须被保存防止微生物例如细菌和真菌的污染作用。

[0124] 可通过各种抗菌和抗真菌制剂，例如对羟苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等产生对微生物的作用的抑制。在许多情况下，优选包含等渗剂，例如糖类或氯化钠。可通过在组合物中使用延长吸收剂例如单硬脂酸铝和明胶，产生可注射组合物的延长的吸收。

[0125] 通过在合适的溶剂中以需要的量掺入活性化合物与多种上述列举的其它成分，然后如需要无菌过滤，制备无菌的可注射溶液。通常，通过掺入各种灭菌的活性成分到包含所述基本分散介质的无菌媒介物以及来自从上述列举的这些的需要的其它成分，来制备分散剂。

[0126] 在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下，优选的制备方法为真空干燥和冻干技术，产生活性成分、以及来自其先前无菌滤过溶液的任何另外的期望的成分的粉末。

[0127] 本发明的药物组合物通常包括缓冲剂、调节其同渗容摩的剂，以及任选地一种或更多种药学上可接受的载体、赋形剂和/或本领域中已知的添加剂。补充的活性成分也可掺入到组合物中。载体可为溶剂或分散介质，包括例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇以及液体聚乙二醇等)、其合适的混合物，及植物油。可保持合适的流动性，例如通过使用涂层，例如卵磷脂，在分散剂的情况下通过保持期望的粒径，以及通过使用表面活性剂。

[0128] 本文中使用的“药学上可接受的载体”包括任何和所有溶剂、分散介质、涂层、抗菌剂和抗真菌剂等。本领域中熟知这样的介质和剂用于药物活性物质的用途。除了与活性成分不相容的任何常规介质或剂，预期其在治疗组合物中的用途。

[0129] 用于口服给药的组合物和制剂包括粉末或颗粒、水中或无水介质中的悬浮液或溶液、胶囊、袋或药片。还期望增稠剂、芳香剂、稀释剂、乳化剂、分散助剂或粘合剂。

[0130] 可根据药物工业中熟知的常规技术制备以通常以单位剂型呈现的本发明的药物组合物。这样的技术包括使活性成分与药物载体或赋形剂关联的步骤。通常通过使活性成分与液体载体或细粒固体载体均匀地且紧密地接触，然后如果必要成型成产品而制备制剂。

[0131] 本发明的组合物可配制成许多可能的剂型的任一种，例如但不限于药片、胶囊、液体糖浆、软凝胶、栓剂和灌肠剂。本发明的组合物还可配制为水中、无水或混合介质中的悬浮液。水性悬浮液可还包括提高悬浮液的粘度的物质，例如羧甲基纤维素钠、山梨醇和/或葡聚糖。悬浮液还可包括稳定剂。本发明的药物组合物还包括，例如但不限于乳剂和包含脂质体的制剂。

[0132] 制剂包括适于局部、口腔、直肠、鼻或非肠胃(包括皮下、肌肉内、腹膜内(IP)、静脉内(IV)和皮内)给药的那些。本领域中熟知所有此类化合物的性质、可用性及来源，以及给药，包括在受试者中产生期望效果的必需的有效量。药物组合物的制备是本领域普通技术人员熟知的，并在许多文献和教科书中描述，参见，例如Remington's Pharmaceutical Sciences,Gennaro A.R.ed.,Mack Publishing Co.,Easton,PA,1990，并且特别是文中pp.1521-1712。

[0133] 在一些具体的实施方式中，本发明的药物组合物可用于局部给药或经皮递送。这样的组合物和制剂可包括经皮贴剂、软膏、洗液、乳膏、凝胶、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体和粉末。常规的药物载体、含水的、粉末或油基、增稠剂等可以是必需或期望的。

[0134] 可以各种方式完成经皮递送。本文中“经皮”意思是通过皮肤穿过，并进入受试者

的血流，由此提供系统的效果。尽管术语包括跨粘膜，即通过粘膜组织，以包括舌下、口腔、阴道和直肠递送，通常通过受试者的皮肤实现经皮递送。由于这个原因，虽然将理解本文中描述经皮递送还可为跨粘膜，但是本文中通常仅为简单起见而提及向皮肤。

[0135] 根据一些实施方式，提供包括本发明的组合物的经皮递送系统。这样的组合物可以数种不同的方式存在，典型的描述为允许经皮递送的一种。例如，组合物可包含在设计贴到患者的皮肤的粘合剂贴剂中，或配制成为释放计算的剂量的tPA突变体制剂到其可擦到上面的皮肤上的易于破裂(例如，通过手指间的摩擦或挤压)的胶囊或袋。本领域技术人员已知其它制剂，例如局部涂覆的凝胶。典型地，本发明的组合物以粘合的经皮贴剂展现。包括本发明的组合物的此类贴剂构成用于经皮递送包含在它内部的本发明的组合物的递送系统。

[0136] 包括本发明的组合物的透皮贴剂包含一些量的将递送的tPA突变体，以及允许贴剂与皮肤接触的粘合剂，以在缺少外部压力的情况下被维持。典型地，贴剂包括接触皮肤的第一面以及贴剂相对所述第一面的第二面上的保护的背层，背层的一个面在使用中暴露于环境，并包括不渗透贴剂中存在的组分的材料。附着到透皮贴剂的第一面的通常为在其使用前保护贴剂的可释放的保护层，并且在附着贴剂到皮肤前，可从布置在贴剂的第一面上的粘合剂释放。

[0137] 本文中贴剂或粘合剂贴剂是指适于附着到受试者的皮肤或粘膜组织的材料。典型的，本文中的贴剂具有实质程度的刚性度，并且在使用中，包括暴露于环境的背层，并且本发明的组合物在背层下。然而，本发明的贴剂还可为非刚性性能。

[0138] 示例的经皮递送系统包括：(a)至少一种药库(drug reservoir)，包括至少一种tPA突变体或其任何盐、碱、酯或酰胺、或任何组合或混合物，以及任选地，以有效增强活性成分通过身体表面的流动而不引起对它的伤害的量的药学上可接受的无机碱或有机碱；(b)用于保持系统与身体表面的活性成分传递关系并形成身体表面-系统界面的装置(means)；以及(c)在使用过程中用作装置的外层的背层。在一个实施方式中，药库包括在药物递送过程中用于粘附系统到皮肤的药学上可接受的粘合剂材料的聚合基质；典型地，粘合剂材料为适于长期的皮肤接触的压敏粘合剂(PSA)，并且应与存在的活性成分、无机碱或有机碱以及任何载体、媒介物或其它添加剂物理和化学地相容。合适的粘合剂材料的实例包括但不限于如下：聚乙烯类；聚硅氧烷；聚异丁烯；聚丙烯酸酯；聚丙烯酰胺；聚氨酯；增塑的乙烯-醋酸乙烯酯共聚物；以及粘性橡胶，例如聚异丁烯、聚丁二烯、聚苯乙烯-异戊二烯共聚物、聚苯乙烯-丁二烯共聚物和氯丁橡胶(聚氯丁二烯)。优选地，粘合剂为聚异丁烯。

[0139] 可用在至少一种tPA突变体或其任何盐、碱、酯或酰胺，或其任何组合或混合物的经皮递送中的所述透皮贴剂包括背层、包含活性成分的层以及释放衬里。如果需要，可加入释放控制膜以控制活性成分或粘合剂层经皮吸收以粘附到皮肤上。此外，可采用容器型贴剂。在一些实施方式中，包含活性成分的层中为包含活性组分和粘合剂作为基础剂的基质类型的粘合剂层。通过提供作为基质类型贴剂的贴剂，可容易地设计贴剂而不需要另外的层例如粘合剂层，使得可减小制造贴剂的费用。

[0140] 根据具体的实施方式，在本发明的透皮贴剂的含药层中包含的粘合剂为无水粘合剂，并且包括橡胶粘合剂、丙烯酰聚合物以及硅酮聚合物。

[0141] 橡胶粘合剂包含一种或不少于两种选自苯乙烯-异戊二烯-苯乙烯嵌段共聚物、苯

乙烯-丁二烯-苯乙烯嵌段共聚物、苯乙烯-丁二烯橡胶、聚异丁烯、聚丁烯、丁基橡胶、天然橡胶和异戊二烯橡胶的剂，并可用在本发明中。

[0142] 丙烯酰聚合物包括但不限于，包含至少一种的(甲基)丙烯酸酯的聚合物或共聚物，所述(甲基)丙烯酸酯表示为作为单体单元的丙烯酸2-乙基己酯、丙烯酸甲酯、丙烯酸丁酯、丙烯酸2-羟乙酯、甲基丙烯酸2-羟己酯等，例如，可使用粘合剂聚合物，如丙烯酸-乙酸辛酯共聚物、2-乙基己基丙烯酸酯-N-乙烯基-2-吡咯烷酮-1,6-己烷乙醇酰基二甲基丙烯酸酯共聚物、2-乙基己基丙烯酸酯-醋酸乙烯酯共聚物、2-乙基己基丙烯酸酯-醋酸乙烯酯-丙烯酸共聚物、2-乙基己基丙烯酸酯-2-乙基己基甲基丙烯酸酯-十二烷基甲基丙烯酸酯共聚物、甲基丙烯酸甲酯-2-乙基己基丙烯酸酯共聚树脂乳剂、包含在丙烯基树脂烷醇胺溶液中的丙烯基聚合物，并且可商购DURO-TAK(注册商标)丙烯酸酯粘合剂系列(Henkle Japan Ltd.提供)、GELVA(注册商标)丙烯酸酯粘合剂系列(Monsanto Co.提供)、SK-DYNE MATRIDERM(Soken Chemical and Engineering Co.,Ltd提供)或EUDRAGIT(注册商标)系列(Higuchi Inc.提供)，并可用在本发明中。

[0143] 硅酮聚合物包括硅氧烷的衍生物(例如硅酮聚合物，如聚二甲硅氧烷和耐胺聚二甲硅氧烷(amine-resistant polydimethylsiloxane))。应注意，本文中与快速经口递送有关地描述的用于经皮递送系统的基质和膜也与经皮递送相关。

[0144] 在另一方面，本发明提供了分离的tPA突变的分子、或其任何片段或功能衍生物。更具体地，本发明提供的tPA突变体携带在SEQ ID NO.7表示的野生型分子的位置481中取代Ser^{481}为Ala的点突变以及可为下面任一种的至少一种另外的突变：(a)SEQ ID NO.7表示的野生型分子的位置299-302中取代$KHRR^{299-302}$为AAAA的点突变；(b)SEQ ID NO.7表示的野生型分子的位置120和106中取代N^{120}为Q并且取代T^{106}为N的点突变；以及(c)指和K1结构域的至少一种的缺失，如SEQ ID NO.4表示的。

[0145] 在其它实施方式中，本发明涉及分离的tPA突变的分子-携带Ser^{481}至Ala以及$KHRR^{299-302}$至AAAA的点突变。在更具体的实施方式中，这样的突变体称为$tPA^{Ser481Ala-DS}$，更具体地，这样的突变体可包括SEQ ID NO.2表示的氨基酸序列。在另一实施方式中，本发明的突变体可还包括N末端RS残基。这样的突变体可包括SEQ ID NO.13表示的氨基酸序列。

[0146] 在进一步的实施方式中，本发明涉及突变的tPA，其携带如SEQ ID NO.7表示的野生型分子的Ser^{481}至Ala的点突变以及位置120和106中取代N^{120}为Q以及取代T^{106}为N的点突变。在更具体的实施方式中，这样的突变体可包括SEQ ID NO.3的氨基酸序列。在另一个实施方式中，本发明的突变体可还包括N末端RS残基。这样的突变体可包括SEQ ID NO.14表示的序列。

[0147] 在进一步的实施方式中，本发明涉及突变的tPA分子，其携带Ser^{481}至Ala的点突变，以及指和K1结构域的至少一种的缺失。更具体地，这样的突变体可包括SEQ ID NO.5的氨基酸序列。

[0148] 在整个说明书中，应理解本文中可交换地使用术语“突变的tPA”、“tPA突变体”、“mtPA”或“tPA突变的分子”，并指任何突变的天然tPA和重组的突变tPA，以及缺少天然tPA的酶活性的tPA的修饰形态。例如，本发明的Ser^{481}-Ala tPA突变体基本缺乏蛋白酶或丝氨酸蛋白酶催化活性。因此，本发明的突变的tPA分子具有受损、减小或减少的活性。优选的突变的tPA分子缺少任何催化活性。根据本发明的一个实施方式，与WT(野生型)tPA活性相比，

本发明通过进行突变消除了至少约10-100％，更具体地约10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、99％以及甚至100％的tPA活性。应注意，可通过评价分子转化纤维蛋白溶酶原成纤维蛋白溶酶的能力而测量tPA的酶活性。

[0149] 本发明提供了如本文中上面描述的不同的tPA突变体，以及其任何变体或片段或肽。

[0150] “片段或肽”意思是所述突变的tPA分子的部分。分子例如本发明的任一种氨基酸序列的“片段”，意思是指突变的tPA分子的任何功能氨基酸子集。这还包括它的“变体”或“衍生物”。“肽”意思是指具有功能活性的特定的氨基酸子集。“功能的”意思是具有相同的生物功能，例如，具有与WT tPA竞争并抑制纤维蛋白溶酶原的活化的能力，或者具有与野生型tPA和uPA竞争的能力，或者抑制被两种酶纤维蛋白溶解的能力。这样的分子的“变体”意思是指与整个分子或其片段基本相似的天然存在的分子。如本文中使用术语“衍生物”意思是包括突变的tPA分子的氨基酸序列的分子，具有不干扰所述分子抑制tPA和uPA介导的纤维蛋白溶解的至少一种能力的任何插入、缺失、取代以及修饰。衍生物应保持与所述氨基酸序列的最小同源性，例如，甚至小于30％、优选90％至40％同源性，80％至50％或70％至60％。应理解，术语“插入”和“缺失”意思分别为本发明使用的突变的tPA肽的氨基酸残基的任何增加或减少1至50个氨基酸残基，优选1至20个氨基酸残基，最优选1至10个氨基酸残基。更具体地，插入或缺失分别可包括增加或减小1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸残基到本发明的突变的tPA分子。

[0151] 应注意到，本发明的突变体分离并纯化提供。当术语“分离”、“纯化”或“基本地纯化”用于肽、蛋白或核酸，例如本发明的突变体tPA分子的任一种时，表示肽、蛋白或核酸基本不含它在天然状态中与其关联的其它细胞成分。优选为均匀状态，虽然它可以为干燥或水溶液。通常使用分析化学技术例如高效液相色谱或聚丙烯酰胺凝胶电泳确定纯度和均匀性。为制品中存在的主要物质的蛋白、肽或核酸是充分地纯化的。

[0152] 对于氨基酸序列，例如本发明的任一个tPA突变体的氨基酸序列，本领域技术人员将认识到，在的编码的序列中改变、添加或缺失单个氨基酸或小的百分比的氨基酸的对核酸、肽、多肽或蛋白序列的单独取代、缺失或添加为“保守修饰的变体”，其中，所述改变导致化学相似氨基酸取代氨基酸。本领域中已知提供功能相似的氨基酸的保守取代表。这样的保守地修饰的变体为另外的，并且不排除本发明的多态的变体、种间同系物及等位基因。

[0153] 例如，可做出取代，其中，用组的另一成员取代脂肪族氨基酸(G、A、I、L或V)，或例如用一个极性残基取代另一个的取代，例如精氨酸取代赖氨酸，谷氨酸取代天冬氨酸，或谷氨酰胺取代天冬酰胺。下面8组的每个包含彼此为保守的取代的其它示例性氨基酸：

[0154] 1)丙氨酸(A)、甘氨酸(G)；

[0155] 2)天冬氨酸(D)、谷氨酸(E)；

[0156] 3)天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)；

[0157] 4)精氨酸(R)、赖氨酸(K)；

[0158] 5)异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V)；

[0159] 6)苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W)；

[0160] 7)丝氨酸(S)、苏氨酸(T)；和

[0161] 8)半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)。

[0162] 应注意,本文中使用的术语“氨基酸”是指所有天然存在的L氨基酸,例如并包括D氨基酸。通过熟知的单字母或三字母命名表示氨基酸。

[0163] 术语“衍生物”用于定义氨基酸序列的变体,以及本发明中做出的多肽的共价修饰,例如对具体的序列做出的多肽的共价修饰。本发明的任一种tPA突变体的功能衍生物,例如$tPA^{Ser481Ala}$ tPA或$tPA^{Ser481-Ala-DS}$(还称为$tPA-S^{481}A-DS$)突变体,并且其任选地还包括如本文中描述的其它突变体,优选与上面定义结构的tPA突变体的多肽的氨基酸序列具有至少约65%,更优选至少约75%,甚至更优选至少约85%,最优选至少约95%的总的序列同源性、同一性或相似性。

[0164] 本文中关于本发明的tPA突变体多肽和它们的功能衍生物的天然的任一种定义的“同源性”为在比对序列并且如果需要引入缺口以获得最大的同源性百分比后,候选序列中与相应的天然多肽的残基相同或相似的氨基酸残基的百分比,并且不考虑任何保守的取代作为序列同一性的一部分。N端和C端延长或插入或缺失不应解释为减小同一性或同源性。用于比对的方法及计算机程序是已知的。应理解,本文中使用的术语“插入”或“缺失”意思是对本发明的任一个tPA突变体的任何插入,或从本发明的任一个tPA突变缺失氨基酸残基,1至50个氨基酸残基、20至1个氨基酸残基以及具体地1至10个氨基酸残基。更具体地,插入或缺失可为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸的任一种。应认识到,插入或缺失可为从分子的N末端、C末端或分子内或其任何组合插入或缺失氨基酸残基。

[0165] 在两种或更多种核酸或多肽序列的情况下,术语“相同”、“基本的同一性”、“基本的同源性”或百分比“同一性”是指两条或更多条序列或子序列在具体的区域或整个分子上相同或具有相同(即约60%同一性,优选65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的同一性的特定百分比的氨基酸残基或核苷酸。

[0166] 在另一个方面,本发明涉及用于在需要其的受试者中治疗、改善、抑制或预防与纤维蛋白溶解相关的疾病、紊乱或状况的方法。更具体地,本发明的方法包括给药所述受试者治疗有效量的至少一种tPA突变的分子或包含其的任何组合物的步骤。在更具体的实施方式,tPA突变体携带在SEQ ID NO.7表示的野生型分子的位置481中取代Ser^{481}为Ala的点突变。

[0167] 本发明还提供了用于在需要其的受试者中治疗、改善、抑制或预防与纤维蛋白溶解相关的疾病、紊乱或状况的方法。更具体地,这样的方法可包括给药治疗有效量的至少一种tPA突变的分子给所述受试者的步骤,其中,所述tPA突变体携带Ser^{481}至Ala的点突变,并包括SEQ ID NO.1的氨基酸序列。进一步的实施方式涉及具有另外的RS残基的$tPA-S^{481}A$突变体,如SEQ ID NO.12表示的。

[0168] 在具体的实施方式中,本发明的方法涉及疾病、紊乱或状况的治疗、改善、防止或预防,所述疾病、紊乱或状况可为凝血病、血小板减少、出血损伤、非压迫出血、不可压迫的出血、凝血相关的紊乱、产后出血(postpartum bleeding)、产后出血(postpartum hemorrhage)、出血性卒中、蛛网膜下腔出血、血友病和弥散性血管内凝血(DIC)、外伤引起的出血、妇科出血、小手术或大手术出血、先天凝血病、血友病以及与血管生成相关的状况的任一种。

[0169] 在再一个实施方式中，本发明的方法包括tPA Ser481Ala突变的分子的使用，所述tPA Ser481Ala突变的分子还包括另外的突变/可为下述的至少一种：(a)SEQ ID NO.7表示的野生型分子的位置299-302中取代$KHRR^{299-302}$为AAAA的点突变；(b)SEQ ID NO.7表示的野生型分子的位置120和106中取代N^{120}为Q并且取代T^{106}为N的点突变；以及(c)指和K1结构域的至少一种的缺失，如SEQ ID NO.4表示的。

[0170] 在其它实施方式中，本发明的方法可使用tPA突变体，所述tPA突变体携带Ser481Ala和$KHRR^{299-302}$至AAAA的点突变，并称为tPA Ser481Ala-DS。更具体地，这样的突变体可包括SEQ ID NO.2表示的氨基酸序列。另外的实施方式涉及具有另外的RS残基的tPA-S^{481}A-DS突变体，如SEQ ID NO.13表示的。

[0171] 在其它实施方式中，除了给药$tPA^{Ser481Ala}$突变体，本发明的方法还可包括给药治疗有效量的下述至少一种的步骤：(a)携带SEQ ID NO.7表示的野生型分子的位置299-302中取代$KHRR^{299-302}$为AAAA的点突变的tPA突变体；(b)携带SEQ ID NO.7表示的野生型分子的位置120和106中取代N^{120}为Q并且取代T^{106}为N的点突变的tPA突变体；以及(c)携带指和K1结构域的至少一种的缺失的tPA突变体，如SEQ ID NO.4表示的；(d)携带Ser^{356}至Ala的点突变的uPA/scuPA突变分子，如SEQ ID NO.5表示的；以及(e)(a)至(d)的任何组合，以及包括它的任何组合物。

[0172] 如本文中使用，术语“治疗”是指改善紊乱、状况或疾病的非期望的表现的至少一种，其中，抑制病理性纤维蛋白溶解或高纤维蛋白溶解是有益的。如显示的，本发明可有益地抑制与头部外伤相关的纤维蛋白溶解，其中，除了抑制颅内出血，由于抑制NMDA-R介导的兴奋性毒性，还可抑制或防止神经元细胞坏死。本发明还预期为在紊乱、状况或疾病出现前的预防性治疗。

[0173] 本文中应用的术语“改善”涉及抑制或减小病理的纤维蛋白溶解或高纤维蛋白溶解的至少一种，以及抑制神经伤害，具体地与外伤相关的神经伤害。

[0174] 术语“预防”是指预防或减小生物或医疗事件出现的危险，所述生物或医疗事件是研究者、兽医、医师或其它临床医生寻求在组织、系统、动物或人中防止的。

[0175] 如本文中使用，术语“需要其的受试者”涉及哺乳动物受试者，例如人、牛、马、鼠、猫、犬或其它哺乳动物，其患如描述的病理的纤维蛋白溶解或高纤维蛋白溶解及神经外伤的至少一种，用本发明的治疗性tPA突变体的任一种、根据本发明的组合及其组合物治疗，将在症状的强度、强度发展的速度以及紊乱的时间范围方面改善或减小紊乱的严重性。

[0176] 术语“减小”或“减少”本文中是指涉及值、量或速率的减小。如本文中提及的减小或减少涉及量或过程减少或减轻约1％至5％、约5％至10％、约10％至15％、约15％至20％、约20％至25％、约25％至30％、约30％至35％、约35％至40％、约40％至45％、约45％至50％、约50％至55％、约55％至60％、约60％至65％、约65％至70％、约75％至80％、约80％至85％、约85％至90％、约90％至95％、约95％至99％、或约99％至99.9％的任一个。

[0177] 本发明的方法和组合物还包括治疗有效量的本文中描述突变体的使用。如本文中使用，术语“治疗有效量”意思是向需要它的受试者给药的、在疾病或紊乱的严重性方面实现有益改变或在所述受试者防止这样的疾病必需的化合物或组合物的量。该量还应在具体的药理学范围内，以避免过量的毒性作用。例如，在本发明中，用于治疗高纤维蛋白溶解的本发明的至少一种tPA突变体的治疗有效量将是向受试者给药的，将引起受试者中的有益

变化，缓解、改善或防止所述高纤维蛋白溶解的再发生，不引起有害副作用，或仅引起温和的副作用的这些蛋白的量。应理解，治疗有效量不是绝对的术语，并依赖于客观情况，例如受试者的年龄、健康以及各种其他统计，如在中描述的并在评估受试者的状况和需要后由巡诊医生具体地确定。

[0178] 应注意，本发明的突变体及本文中所述的其任何组合物可以每个剂量包含预定量的每种活性成分的单位剂型呈现。这样的单位可适于提供0.01-100mg/Kg体重的本发明的tPA突变体。具体地，0.1-10mg/Kg、5-15mg/Kg、10-30mg/Kg、25-50mg/Kg、40-80mg/Kg或60-100mg/Kg。更具体地，所述有效剂量为约0.01至约100mg/Kg的tPA突变体、约0.1至约90mg/Kg、约0.3至约80mg/Kg、约0.4至约70mg/Kg、约0.5至约60mg/Kg、约0.7至约50mg/Kg、约0.8至约40mg/Kg、约0.9至约30mg/Kg、约1至约20mg/Kg，具体地，约1至约10mg/Kg。可以单个剂量或数个分开的剂量提供这样的剂量。在给药单个剂量的情况下，剂量单位形式可包括可每天、每周或每月给药的约0.01mg至约1000mg的量。最终剂量当然将依赖于被治疗的状况、给药途径，以及患者的年龄、体重和状况，并且由医生判断。

[0179] 应进一步理解，对于本发明中提供的治疗和预防方法，所述治疗有效量或剂量依赖于将被治疗的疾病状态的严重性和响应性，疗程持续几天到几个月，或者直到实现治愈或获得疾病状态的减小。可从药物在患者体内蓄积的测量计算最优的给药方案。本领域的普通技术人员可容易地确定最优剂量、给药方法及重复速度。总之，剂量根据体重计算，并且可每天、每周、每月或每年一次或者甚至每2至20年一次给予。本领域的普通技术人员可容易地基于体液或组织中本发明使用的tPA突变体或本发明的任何组合物的测量的停留时间以及浓度估计重复速度。在成功治疗后，可期望患者经维持治疗以防止疾病状态的复发，其中以维持剂量给药本发明的组合的组合物。

[0180] 应理解，当在损伤发生后10’、20’、30’、45’、50’、60’、90’、150’、180’、4hr、5hr、6hr、7hr、8hr、9hr、10hr、11hr、12hr、13hr、14hr、15hr、16hr、17hr、18hr、19hr、20hr、21hr、22hr、23hr、24hr、2天、3天、4天、5天、6天，以及甚至7天或更久给药于损伤的受试者时，本发明的一种或更多种突变分子可有效。

[0181] 在一个方面，本发明的方法可用于在需要其的受试者中诱导并促进创伤愈合。在更具体的实施方式中，本发明包括应用治疗有效量的至少一种tPA突变的分子或包括其的抗纤维蛋白溶解组合物到创伤的步骤，其中，所述tPA突变体携带在SEQ ID NO.7表示的野生型分子的位置481中取代Ser^{481}为Ala的点突变。

[0182] 更进一步地，本发明提供了用于在需要它的受试者中调节血管生成的方法。本发明的方法包括应用治疗有效量的至少一种tPA突变的分子或包括它的组合物到创伤的步骤。在更具体的实施方式中，在这样的方法中有用的突变体可为tPA突变体，其携带在SEQ ID NO.7表示的野生型分子的位置481中取代Ser^{481}为Ala的点突变。

[0183] 本发明还提供了用于在需要它的受试者中抑制tPA和uPA的至少一种的纤维蛋白溶解活性的方法。更具体地，这样的方法包括给药于所述受试者治疗有效量的至少一种tPA突变的分子或包括它的组合物的步骤。应注意，在某些实施方式中，这样的tPA突变体携带在SEQ ID NO.7表示的野生型的位置481中取代Ser^{481}为Ala的点突变。

[0184] 在一些具体的实施方式中，上述方法可包括称为tPA Ser481Ala的tPA突变体，并包括如SEQ ID NO.1或12表示的氨基酸序列。

[0185] 在其它一些实施方式中，本发明的上述方法还可包括给药$tPA^{Ser481Ala}$，其中，这样的tPA突变的分子可还包括下述的至少一种：(a) SEQ ID NO.7表示的野生型分子的位置299-302中取代$KHRR^{299-302}$为AAAA的点突变；(b) SEQ ID NO.7表示的野生型分子的位置120和106中取代N^{120}为Q并且取代T^{106}为N的点突变；以及(c)指和K1结构域的至少一种的缺失，如SEQ ID NO.4表示的。

[0186] 在更具体的实施方式中，本发明提供的上述方法可包括给药tPA突变体，其携带Ser481Ala和$KHRR^{299-302}$至AAAA的点突变，并称为$tPA^{Ser481Ala-DS}$。在更具体的实施方式中，这样的突变体包括如SEQ ID NO.2或13表示的氨基酸序列。

[0187] 在进一步的实施方式中，上述方法可还包括给药治疗有效量的下述至少一种的步骤：(a)携带SEQ ID NO.7表示的野生型分子的位置299-302中取代$KHRR^{299-302}$为AAAA的点突变的tPA突变体；(b)携带SEQ ID NO.7表示的野生型分子的位置120和106中取代N^{120}为Q并且取代T^{106}为N的点突变的tPA突变体；以及(c)携带指和K1结构域的至少一种的缺失的tPA突变体，如SEQ ID NO.4表示的；(d)携带Ser^{356}至Ala的点突变的uPA/scuPA突变的分子，如SEQ ID NO.5表示的；以及(e) (a)至(d)的任何组合，以及包括它的任何组合物。

[0188] 本发明的另一个方面涉及治疗有效量的至少一种tPA突变体在制备用于治疗与纤维蛋白溶解相关的疾病、紊乱或状况的组合物中的用途，所述突变体携带在SEQ ID NO.7表示的野生型的位置481中取代Ser^{481}为Ala的点突变。

[0189] 应注意到，本文中以上对治疗方法描述的任何实施方式还可应用于本发明的用途方面。

[0190] 根据另外的方面，本发明还提供了生物胶，包括至少一种tPA突变的分子和至少一种凝血促进剂。在更具体的实施方式中，tPA突变体携带在SEQ ID NO.7表示的野生型分子的位置481中取代Ser^{481}为Ala的点突变。在本发明进一步具体的实施方式中，所述tPA突变的分子的每个和所述至少一种凝血促进剂的每个可任选地被包括在单独的区室内。

[0191] 根据更多具体的实施方式，本发明提供的生物胶包括tPA突变体，所述tPA突变体携带Ser^{481}至Ala的点突变，并包括SEQ ID NO.1或12的氨基酸序列。

[0192] 在本发明的生物胶组合物的具体的实施方式中，至少一种凝血促进剂可为凝血酶、纤维蛋白原、血小板活化剂、血浆制品和富含血小板的血浆制品的至少一种。

[0193] 在更具体的实施方式中，本发明的生物胶可包括作为凝血促进剂的凝血酶。如本文中提及的，凝血酶(也称为纤维蛋白原酶、凝血酶、thrombofort、topical、凝血酶-C、tropostasin、活化的血液凝血因子II、血液凝血因子IIa、因子IIa、E凝血酶、β凝血酶、γ凝血酶)涉及凝血级联中作用的丝氨酸蛋白酶。凝血酶由前体凝血酶原产生，当其被蛋白水解裂解成活性凝血酶时，催化可溶的纤维蛋白原转变为纤维蛋白的不溶解的链，以及许多其它凝血相关的反应，最终导致失血的减少。

[0194] 在其它具体的实施方式中，本发明的生物胶可包括作为凝血促进剂的纤维蛋白原。更具体地，纤维蛋白原(因子I)是在血块形成过程中由凝血酶转变为纤维蛋白的可溶的血浆糖蛋白。在正常的血凝固过程中，凝血级联通过转化它成丝氨酸蛋白酶凝血酶而活化凝血酶原。然后，凝血酶转化可溶的纤维蛋白原成不溶解的纤维蛋白链。然后，这些链被因子XIII交联以形成血块。如前面提到的，纤维蛋白在t-PA-和uPA-介导的纤维蛋白溶解的活化中提供负反馈。

[0195] 更进一步，在一些具体的实施方式中，本发明的生物胶可包括作为凝血促进剂的血浆制品。本文中提及的血浆制品涉及本领域中熟知的标准的血浆制品，通常用于取代凝血因子。富含血小板的血浆制品(PRP)是已经富集血小板的血浆的制品。具体地，美国食品和药物管理局(FDA)批准两种制备PRP的方法。

[0196] 在其它实施方式中，本发明的生物胶可包括$tPA^{Ser481Ala}$突变的分子，所述分子还包括下面的至少一种：(a)SEQ ID NO.7表示的野生型分子的位置299-302中取代$KHRR^{299-302}$为AAAA的点突变；(b)SEQ ID NO.12表示的野生型分子的位置120和106中取代N^{120}为Q并且取代T^{106}为N的点突变；以及(c)指和K1结构域的至少一种的缺失，如SEQ ID NO.4表示的。

[0197] 根据一些其它实施方式，本发明提供的生物胶除了携带Ser^{481}至Ala的点突变的tPA突变体，可包括可为下面的任一种的至少一种其它突变体：(a)如SEQ ID NO.7表示的野生型分子的位置299-302中取代$KHRR^{299-302}$为AAAA的点突变。可由包含SEQ ID NO.15表示的氨基酸序列的突变体提供这样的突变体的具体的实施方式。在另一个实施方式中，这样的另外的突变体可携带(b)在SEQ ID NO.7表示的野生型分子的位置120和106中取代N^{120}为Q并且取代T^{106}为N的点突变。由SEQ ID NO.16提供这样的突变体的具体的实施方式。在另一个实施方式中，这样的突变体可为具有以下的突变体：(c)指和K1结构域的至少一种的缺失，如SEQ ID NO.4表示的，具体的实施方式由具有如SEQ ID NO.17表示的氨基酸序列的突变体提供；和(d)携带Ser^{356}至Ala的点突变的uPA/scuPA突变的分子，如SEQ ID NO.5表示的。

[0198] 在另一个方面，本发明提供了用于治疗与纤维蛋白溶解相关的状况的药盒。本发明的药盒可包括：(i)生物胶，包括至少一种tPA突变的分子以及至少一种凝血促进剂。在某些实施方式中，所述tPA突变体携带在如SEQ ID NO.7表示的野生型分子的位置481中取代Ser^{481}为Ala的点突变。在具体实施方式中，所述tPA突变的分子以及所述至少一种凝血促进剂的每个可任选地被包括在所述单独的区室内。在某些实施方式中，本发明的药盒可任选地还包括(ii)用于应用所述生物胶组合物的说明书。

[0199] 在一些具体的实施方式中，包含在本发明的药盒中的生物胶可包括选自凝血酶、纤维蛋白原、血小板活化剂、血浆制品以及富含血小板的血浆制品的至少一种凝血促进剂。

[0200] 可以单一药物组合物形式给药药盒的生物胶，所述药物组合物包括一种或更多种tPA突变体和至少一种凝血促进剂的组合，以及药学可接受的载体或稀释剂。可选地，生物胶组合物可具有包含在药物组合物中的至少一种其组分储存在单独的区室内。在这样的情形下，药盒包含用于容纳两种单独的组合物的容器装置，例如分开的瓶或分开的箔包装。然而，单独的组合物还可包含在单独的未分开的包含几个区室的容器中。

[0201] 典型地，药盒包括用于给药单独的组分的说明书。当在不同的剂量间隔以不同的剂型给药单独的组分时，或者当处方医师期望滴定组合的单独组分时，药盒形式特别有益。

[0202] 根据具体的实施方式，本发明的药盒可适于用作密封剂、递送剂或黏合剂，并且可用于控制出血，用于紧紧地密封血管，密封肺或皮肤的切口，和用于治疗腔内损伤。例如，本发明的药盒可用于对损伤区域密封或贴补已经被缝合或钉住的创伤，或以减小血液损失以及手术后出血。

[0203] 应理解，当药盒的生物胶包括至少两种剂型时，例如，一种包括至少一种tPA突变的分子，并且另一种包括至少一种凝血促进剂时，可同时给药两种剂型。

[0204] 可选地，以任一顺序连续地给药所述第一剂型和所述第二剂型。

[0205] 如实施例5中显示，给药本发明的突变体清楚地逆转了抗凝剂例如香豆素(华法林)的抗凝活性和副作用。因此，联合给药本发明的突变体与抗凝剂例如香豆素或任何肝素样分子可用作用于由此引起的不受控制的出血的解毒剂。更具体地，给药肝素是对急性静脉血栓形成指示的标准抗血栓形成的治疗，用于在手术(特别是整形外科手术)后及不能活动的患者中血栓形成的预防，和用于静脉注射管线的冲洗以保持开放。然而，由于它们的效力，肝素和LMWH有缺点。由于动作的简单应力及伴随的与物理对象的接触或手术部位的不受控制的出血是主要的并发症。此外，用肝素治疗的大约5％(范围高达30％)的患者，以及接受未分馏的肝素(UFH)的约2％的患者发展了免疫介导的血小板减少(HIT)，可并发出血(作为减小的血小板计数的结果)或由于血管内血小板凝聚的动脉和静脉血栓形成。本方面的突变体可防止这些抗凝剂的这样的非期望的作用。

[0206] 因此，本发明还提供了用于在需要它的受试者中抑制抗凝剂或抗聚集剂的抗凝血活性的方法，包括给药于用抗凝剂治疗的受试者治疗有效量的至少一种tPA突变的分子或包括它的组合物的步骤，其中，所述tPA突变体携带在SEQ ID NO.7表示的野生型分子的位置481中取代Ser^{481}为Ala的点突变。

[0207] 在某些实施方式中，突变体可称为$tPA^{Ser481Ala}$，并包括SEQ ID NO.1表示的氨基酸序列。

[0208] 在另一个实施方式中，本发明的方法可使用称为$tPA^{Ser481Ala-DS}$的突变体，并包括SEQ ID NO.2表示的氨基酸序列。

[0209] 在另一实施方式中，所述抗凝剂可为香豆素或肝素样分子。

[0210] 应注意，本发明还涵盖肝素类似物质(heparinoids)或“肝素样分子”的抑制。本文中使用的术语肝素样分子是指具有与肝素充分地相似的抗凝血活性和化学结构的分子，使得认为所述分子为需要肝素的患者的可能的替代治疗。肝素样分子包括但不限于低分子量肝素、肝素类似物(heparin analogue)等。术语低分子肝素包括具有小于8,000道尔顿分子量的肝素分子。术语肝素类似物包括肝素类似物质，例如hepramine及其盐、软骨素及它们的盐等。本文中使用的术语肝素是指标准的可商购的肝素及其衍生物。术语标准肝素涵盖具有约8,000至约30,000道尔顿的平均分子量的未分馏的肝素分子或其任何子馏分的混合物。此外，预期本文中使用的术语肝素涵盖从哺乳动物来源分离的化学改性的生物活性肝素分子、或部分或完全重新合成的。术语肝素衍生物涵盖肝素的盐、肝素片段等。

[0211] 尽管公开和描述了，应理解，本发明不限于本文中公开的具体实例、方法步骤和材料，因为这样的方法步骤和材料可以稍微变化。还应理解，本文中使用的术语仅为了描述具体实施方式的目的，并且不旨在限制，因为本发明的范围将仅由所附的权利要求书及其等价形式所限定。

[0212] 必须注意，除非上下文另外地清楚地表明，如在该说明书和所附权利要求书中使用的，单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数的指代对象。

[0213] 遍及该说明书及下面的权利要求中，除非上下文另外需要，词语“包括(comprise)”以及变化形式例如“包括(comprises)”和“包括(comprising)”将理解为意味包括所述的整数或步骤、或整数或步骤的组，但是不排除其它任何整数或步骤，或整数或步骤的组。除非另外地表明，本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明相关的领域中

普通技术人员通常理解的相同的意义。为了本文中说明的本发明的目的，定义下面的术语。

[0214] 下面的实施例为发明人在实施本发明的各方面中使用的技术的代表。应理解，虽然这些技术为用于实施本发明的优选的实施方式的示例，鉴于本公开内容，本领域技术人员将认识到，可做出许多修改而不背离本发明的精神及预期的范围。

实施例

[0215] 实验步骤和试剂

[0216] 如以前在Higazi A等J Biol Chem.(1995),270(29):17375-80)中所报道的，纯化、表征单链尿激酶(uPA)。通过Deutsch和Mertz(Deutsch DG,Mertz ET.Science(1970),170(3962):1095-6)的方法由人血浆制备Glu-纤维蛋白溶酶原。从Sigma(St Louis,MO)获得人凝血酶。重组tPA来自Genentech(South San Francisco,CA)。抗体纤维蛋白溶酶原IgG购自Biotest(Kfar Saba Israel)，其中抗tPA抗体由American Diagnostica.ECL-Amersham ECL Plus Western Blotting Detection System提供。

[0217] 动物

[0218] 8至12周大的C57小鼠从Harlan,Israel获得。任意地给药小鼠标准的实验室食物和水，并保持在受控的温度和光条件。根据Hebrew University-Institutional Committee for Care and Use of Laboratory Animals的指南经委员会的批准进行动物实验。

[0219] 纤维蛋白溶酶原活化剂活性

[0220] 通过在37℃加入tPA(50nM)或uPA(20nM)到在磷酸盐缓冲液(PBS)中包含Glu-纤维蛋白溶酶原和纤维蛋白溶酶显色底物Spectrazyme PL(100μM)的反应混合物，并连续地测量随时间在405nm的光吸收，确定纤维蛋白溶酶原活化剂活性。从在A405nm随时间的变化，计算在不同的条件纤维蛋白溶酶产生的最初的速度。通过计算A405经不同时间间隔的速度的变化而获得在每个纤维蛋白溶酶原浓度的反应的最初速度，并且结果表示为每分钟光密度的变化(ΔOD)，其表示纤维蛋白溶酶原活化的最初速度的斜率(Higazi A等，J Biol Chem.(1995),270(29):17375-80)。

[0221] 在人血浆来源的血块中的纤维蛋白溶解检验

[0222] 通过在16-mm直径的组织培养孔中放入人血浆(200μL)，然后加入凝血酶(0.4U/mL终浓度)形成血块。如Higazi AA等在Blood(1998),92(6):2075-83)描述的测量纤维蛋白溶解。简略地，在37℃放10μL的tPA或uPA到血块上2个小时，拍照，并确定整体的直径。

[0223] 在源自新鲜的全人血的血块中的纤维蛋白溶解检验

[0224] 通过凝血弹性描记法(TEG®,Haemoscope)和旋转式血栓弹力测定法(ROTEM®,Pentapharm)评估血块粘弹性性质。两种系统都使用在包含WB样品的杯中的立销(vertical pin)。在TEG®中，杯振荡而销是静止的，而在ROTEM®中，杯是静止的而销振荡。由于血块在杯和销之间形成，检测到从杯到销的传输旋转的减小(TEG®)，或者对销振荡移动的阻抗(ROTEM®)，并产生痕迹。

[0225] 闭合性头部损伤(CHI)模型

[0226] 通过使用如以前描述的(Chen Y.等，(1996)J.Neurotrauma,13:557-568)修改的重锤装置(weight-drop device)引起头部外伤。简略地，在诱导乙醚麻醉后，做出纵向中线

切口，皮肤收缩并暴露头盖骨。识别左前额区，并且Teflon顶锥(2-mm的直径)放在中冠状面中的中线侧面1mm处。手动地保持头的位置，并且75-g重量从18cm的高度落到锥上，导致对左半球的局灶性损伤。外伤后，小鼠接受95％O_2的支撑充氧不超过2分钟，然后回到它们的笼中。在假手术对照中，仅进行麻醉和皮肤切口。

[0227] 通过共免疫沉淀的Ser^{481}-Ala tPA/纤维蛋白溶酶原蛋白相互作用检验

[0228] 在缺少或存在1μM uPA或纤维蛋白降解产物时，用针对纤维蛋白溶酶原的山羊多克隆抗体以及蛋白A琼脂糖培养各自在100nM终浓度的人Ser^{481}-Ala tPA和纤维蛋白溶酶原。通过离心分离蛋白A琼脂糖珠，洗涤并煮沸5分钟。通过离心沉淀珠，并且样品在NuPAGE 4-12％上运行。作为对照，将80ng的人Ser^{481}-Ala tPA加载到凝胶上。将来自凝胶的蛋白质转移到PVDF膜上。在牛奶/PBST中封闭膜，随后与针对tPA的小鼠单克隆抗体培养1个小时。然后洗涤它，用山羊抗小鼠IgG-HRP缀合物培养，再次洗涤，并用ECL检测。

[0229] tPA突变体的产生

[0230] Ser^{481}至Ala的tPA突变体的构建

[0231] 用设计分别引入5’侧翼Bgl II和3’侧翼Xho I限制性酶切位点的引物通过PCR扩增编码成熟的人tPA序列的cDNA片段，所述引物包含如SEQ ID NO 8和9表示的氨基酸序列。用Bgl II和Xho I限制性酶消化扩增的片段，并克隆到pMT/BiP/V5-HisA质粒(Invitrogen)上的相应位点。使用QuickChange Mutagenesis试剂盒(Stratagen)以包括如SEQ ID NO 10和11表示的核酸序列的一对反向平行引物通过PCR获得tPA序列中Ser^{481}至Ala突变。完全测序野生型和突变构建体的序列，以确认没有PCR引入的错误。由于引入Bgl II克隆位点到编码人tPA的原始cDNA序列，所以重组wt和S^{481}A突变体蛋白质序列都在N末端包含2个额外的氨基酸RS-。Ser^{481}至Ala-DS tPA突变体的构建

[0232] 如以前所述的合成tPA变体和表征(Nassar T,ET AL.,Am J Respir Cell Mol Biol 43:703-711,(2010))。克隆编码成熟的人tPA的cDNA到pMT/BiP/V5-HisA质粒中(Invitrogen,Carlsbad,CA)。为产生催化地失活的tPA(S481A)变体和PAI-1停泊位点(docking site,DS)变体(K296A/H297A/R298A/R299A)，使用QuickChange Mutagenesis试剂盒(Stratagene,La Jolla,CA)通过PCR在WT tPA中引入突变，并验证全序列。蛋白质在NH2末端包含由引入Bgl II克隆位点产生的两个额外氨基酸RS-。根据生产商方案在S2果蝇表达系统(Invitrogen)中表达蛋白质，并使用结合到CN-Br活化的Sepharose的抗tPA通过抗体亲和层析纯化。最终的产物在SDS-PAGE上以预期的大小作为单一条带迁移，并且使用纤维蛋白溶酶显色底物SpectrazymePL评估纤维蛋白溶酶原活化剂活性。使用前蛋白质储存在-70℃或冻干。

[0233] tPA突变体的表达和纯化

[0234] 在S2果蝇表达系统(Invitrogen)中表达重组人tPA及其无催化活性对应物(catalytically inactive counterpart)S^{481}A tPA。使用结合到CNBr活化的Sepharose 4Fast Flow(Amersham Biosciences)的针对tPA的American Diagnostica PAM-1MAb(产品#371，目前停产)亲和纯化蛋白质。用包含0.2M Arg的0.1M甘氨酸-HCl缓冲液，pH 2.8洗脱蛋白质。收集洗出液到PBS/0.2M Arg中，每ml的洗出液包含80微升的1M Tris-HCl，pH 8.0。在Amicon 30K过滤装置上进行对PBS/0.2M Arg的蛋白质浓缩/缓冲液更换。3-5微克的纯化的蛋白质作为预期大小的单个条带显现在SDS-PAGE上。蛋白质储存在-70℃或冻干。

[0235] 实施例1

[0236] 由tPA变体抑制血块的溶解

[0237] 为了检查tPA在纤维蛋白溶解中的作用，发明人首先检查了本发明的突变体对纤维蛋白原活化的抑制活性。图1说明了tPA-S^{481}A仅在存在纤维蛋白时结合纤维蛋白溶酶原(泳道2对比泳道5)，并且该tPA变体的结合被uPA抑制(泳道2对比泳道3)。

[0238] 该后一种发现表明，tPA-S^{481}A还可抑制在纤维蛋白的存在下纤维蛋白溶酶原被uPA的蛋白水解活化，纤维蛋白引起uPA的构象变化，从而加速纤维蛋白溶酶原活化。如预测的，tPA-S^{481}A抑制WT-uPA及WT-tPA对人血浆块的溶解，如通过肉眼(图2A和2B)，和通过使用TEG定量由新鲜的人血液形成的血块的溶解(图2C)评估的。

[0239] 用缺少催化活性和结合NMDA-R的能力二者的tPA-S^{481}A-DS观察到相同的抗纤维蛋白溶解活性(图2B和图2D)。在其最大抑制浓度，tPA-S^{481}A和tPA-S^{481}A-DS是比测试的TA更强的纤维蛋白溶解抑制剂(图2B)。

[0240] 如通过使用小肽代替纤维蛋白作为纤维蛋白溶酶底物的显色检验评价的，在缺少纤维蛋白时，tPA-S^{481}A和tPA-S^{481}A-DS都未抑制由tPA或uPA介导的纤维蛋白溶酶原活化(图2D)。与其抗纤维蛋白溶解活性不同，并如基于以前的研究预测的，TA在显色检验中显著地刺激了uPA(而非tPA)对纤维蛋白溶酶原的活化(图2D)。发明人解释这些结果是因为纤维蛋白溶酶原必须经历由纤维蛋白引起的构象变化，该构象变化使其更易于被uPA裂解，并结合tPA-S^{481}A或tPA-S^{481}A-DS，从而证明了tPA变体的抑制效果。为进一步检验该假设，在与TA一起加入的tPA-S^{481}A或tPA-S^{481}A-DS的存在下评估uPA的纤维蛋白溶酶原活化，这模拟了纤维蛋白对纤维蛋白溶酶原结构和活化的影响。在存在TA时，tPA-S^{481}A和tPA-S^{481}A-DS都抑制了uPA对纤维蛋白溶酶原的活化(图2D)。理论上，如果tPA变体在纤维蛋白或赖氨酸类似物的存在下结合到纤维蛋白溶酶原并从而抑制其被uPA活化，那么tPA-S^{481}A或tPA-S^{481}A-DS应能够通过相同的机制抑制tPA的纤维蛋白溶酶原活化，甚至在缺少纤维蛋白时。实际上，图2D显示了，在TA的存在下，两种tPA变体抑制tPA诱导的纤维蛋白溶酶原活化。这表明，TA模拟了纤维蛋白对tPA变体结合纤维蛋白溶酶原的刺激效应(参见图1)，从而使tPA-S^{481}A或tPA-S^{481}A-DS能够充当WT tPA和uPA的直接竞争性抑制剂。此外，在其中赖氨酸类似物刺激纤维蛋白溶酶原被uPA的活化或对其被tPA的活化无影响(缺少纤维蛋白)的情况下，tPA变体为抑制剂的事实，强烈地表明在体内病理条件下，它们可能更强并且具有更低的副作用。为支持上述假设，发明人检查了两种tPA变体抑制瑞替普酶对纤维蛋白溶酶原的活化的性能。图2B显示了tPA-S^{481}A和tPA-S^{481}A-DS抑制了瑞替普酶引起的血块溶解，支持了以下观念：两种tPA变体主要通过结合到纤维蛋白溶酶原并通过抑制纤维蛋白溶酶原活化剂tPA和uPA的结合，抑制了tPA和uPA对纤维蛋白溶酶原的活化。

[0241] 实施例2

[0242] TBI对内源纤维蛋白溶酶原活化剂活性的刺激导致脑内出血的扩大和凝血参数的继发性改变

[0243] TBI的闭合性头部损伤(CHI)模型引起在MRI上明显的广泛的和依赖于时间的脑内出血，并通过血红蛋白渗出到实质(图3A和3B)，随后是CHI后2个小时在CSF中tPA和uPA显著的提高(图3C)，伴随CSF纤维蛋白溶解活性的提高(图3D、3E和3F)。CHI之后立即或2个小时后静脉注射tPA-S^{481}A或tPA-S^{481}A-DS(每种2mg/kg)(图3A、3B和3C)抑制CSF纤维蛋白溶解活

性(图3D、3E和F)，显著地减弱脑内出血的扩大。相反地，在CHI后立即注射WT-tPA(5mg/kg)提高了WT小鼠中脑内出血的范围(图3B)，其转而可被注射等摩尔浓度的tPA-S^{481}A或tPA-S^{481}A-DS抑制(图3B)。两种TPA变体是比TA或抑肽酶的最优浓度更有效的脑内出血的抑制剂，其程度至它们的作用与由最优浓度TA与抑肽酶的组合诱导的抑制相当(图3B)。

[0244] 图4A和4B显示了CHI导致凝血参数的继发性改变，揭示了血浆d-二聚体的显著提高以及血小板计数的下降。在CHI后2个小时给药tPA-S^{481}A与tPA-S^{481}A-DS显著地减弱了d-二聚体的提高(图4A)，并防止了通常与TBI关联的血小板减少的发展(图4B)。

[0245] 实施例3

[0246] 阻断内源纤维蛋白溶酶原活化剂活性提供了TBI后的神经保护

[0247] 除了抑制内源的纤维蛋白溶解，tPA-S^{481}A还抑制了WT-tPA对NMDA-R的活化。为分开这两种路径对神经结果的贡献，发明人比较了两种变体tPA-S^{481}A和tPA-S^{481}A-DS的活性，两者都缺少催化活性，并具有防止其结合到NMDA-R的突变的停泊位点。tPA-S^{481}A-DS减小ICH至与tPA-S^{481}A相同的程度(图3B)，并对d-二聚体和TBI后血小板减少具有相同的影响(图4A和4B)。然而，尽管对脑内出血的程度具有相当的影响，在CHI后立即给予tPA-S^{481}A-DS比tPA-S^{481}A提供了较少的神经保护作用(图5)。神经保护作用程度的不同强烈地表明tPA-S^{481}A在该模型中通过两种途径发挥神经保护作用，即通过减小脑内出血的扩大以及通过防止由内源纤维蛋白溶酶原活化剂对NMDA-R的活化。为了支持该假设，当在CHI后2个小时给予每种时，已知此时NMDA-R相关的神经毒性已结束，由两种tPA变体提供的神经保护的差异消失(图5)，但是脑内出血持续扩大(图2)。

[0248] 实施例4

[0249] tPA和uPA对TBI后脑内和脑伤害的贡献

[0250] 由受控的皮层撞击和缺血性卒中引起的脑伤害模型以较小的或无脑内出血为特征。在这些模型中，具有tPA($tPA^{-/-}$)而非uPA($uPA^{-/-}$)遗传缺失的小鼠比WT小鼠显示较小的脑伤害。因此，这些模型表明内源tPA在引起脑伤害中的主要作用。相比之下，$tPA^{-/-}$和$uPA^{-/-}$小鼠都比WT小鼠显示更好的神经学结果(图5)，其中在此处研究的模型中脑内出血是基于两种TPA变体的不同神经保护效果的重要组分。该结果进一步表明，uPA在该环境下在TBI后脑内出血中起重要的作用。

[0251] 为验证该假设，发明人检查了TPA和uPA对ICH的发展的贡献。在WT、$tPA^{-/-}$和$uPA^{-/-}$小鼠中同时诱导CHI。$TPA^{-/-}$和$uPA^{-/-}$小鼠比经受相同损伤的WT小鼠发展显著地小的ICH(图6A)。通过注射外源WT-tPA或WT-uPA(每种5mg/kg)在两种类型的敲除小鼠中“救援”损伤表型，并且在两种情况下，注射等摩尔剂量的tPA-S^{481}A抑制了外伤后ICH的扩大(图6A)。汇总到一起，该组数据支持了关于uPA在TBI后ICH的发展中的作用的假设，并进一步支持了关于TPA变体抑制TPA和uPA引起的纤维蛋白溶解的能力的假设。

[0252] 实施例5

[0253] 由uPA增强的初级纤维蛋白溶解是TBI后ICH的主要原因

[0254] 图6A和6B提供的数据显示，$tPA^{-/-}$小鼠发展的血小板减少和d-二聚物的血浆水平的提高与在WT小鼠中观察到的相当，但是被大大地保护免受ICH(图6C)。总之，这些观察结果暗示提高的颅内纤维蛋白溶解活性，而非系统性凝血中CHI后扰动，是颅内以及其神经尖叫(squeal)的主要原因。为验证该可能性，发明人检查了在动物的单独群中CHI对纤维蛋白

原的血浆浓度及INR的影响。在所有的小鼠中CHI后的INR为<1.3，在$tPA^{-/-}$、$uPA^{-/-}$或WT小鼠间无差异。相同地，在三个群体中没有显著的纤维蛋白原的损耗，或者纤维蛋白原浓度的差异(数据未显示)。在独立的检测中，发明人检查了在CHI前华法林对小鼠的抗凝的效果。小鼠在外伤时具有2.5的平均INR。虽然华法林提高了WT小鼠中ICH的程度，它们在$tPA^{-/-}$或$uPA^{-/-}$小鼠中不具有这样的效果(图6C)。此外，注射$tPA\text{-}S^{481}A$到用华法林抗凝的WT小鼠几乎完全抑制外伤后脑内出血，(图6C)支持提高的纤维蛋白溶解而非系统的凝血病是CHI后脑内出血的主要原因的论点。

序列表

<110> 哈达斯特医疗研究服务和开发有限公司
<120> 作为抗纤维蛋白溶解剂的纤维蛋白溶酶原活化剂的突变体
<130> 2231127
<150> US 61/668,172
<151> 2012-07-05
<160> 17
<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 530
<212> PRT
<213> 人类
<400> 1

[0001]

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

Ser His Pro Trp Gln Ala Ala Ile Phe Ala Lys His Arg Arg Ser Pro
290 295 300
Gly Glu Arg Phe Leu Cys Gly Gly Ile Leu Ile Ser Ser Cys Trp Ile
305 310 315 320
Leu Ser Ala Ala His Cys Phe Gln Glu Arg Phe Pro Pro His His Leu
325 330 335
Thr Val Ile Leu Gly Arg Thr Tyr Arg Val Val Pro Gly Glu Glu Glu
340 345 350
Gln Lys Phe Glu Val Glu Lys Tyr Ile Val His Lys Glu Phe Asp Asp
355 360 365
Asp Thr Tyr Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu Gln Leu Lys Ser Asp Ser
370 375 380
Ser Arg Cys Ala Gln Glu Ser Ser Val Val Arg Thr Val Cys Leu Pro
385 390 395 400
Pro Ala Asp Leu Gln Leu Pro Asp Trp Thr Glu Cys Glu Leu Ser Gly
405 410 415
Tyr Gly Lys His Glu Ala Leu Ser Pro Phe Tyr Ser Glu Arg Leu Lys
420 425 430
Glu Ala His Val Arg Leu Tyr Pro Ser Ser Arg Cys Thr Ser Gln His
435 440 445
Leu Leu Asn Arg Thr Val Thr Asp Asn Met Leu Cys Ala Gly Asp Thr
450 455 460
Arg Ser Gly Gly Pro Gln Ala Asn Leu His Asp Ala Cys Gln Gly Asp
465 470 475 480
Ala Gly Gly Pro Leu Val Cys Leu Asn Asp Gly Arg Met Thr Leu Val
[0002] 485 490 495
Gly Ile Ile Ser Trp Gly Leu Gly Cys Gly Gln Lys Asp Val Pro Gly
500 505 510
Val Tyr Thr Lys Val Thr Asn Tyr Leu Asp Trp Ile Arg Asp Asn Met
515 520 525
Arg Pro
530

<210> 2
<211> 530
<212> PRT
<213> 人类
<400> 2
Gly Ala Arg Ser Tyr Gln Val Ile Cys Arg Asp Glu Lys Thr Gln Met
1 5 10 15
Ile Tyr Gln Gln His Gln Ser Trp Leu Arg Pro Val Leu Arg Ser Asn
20 25 30
Arg Val Glu Tyr Cys Trp Cys Asn Ser Gly Arg Ala Gln Cys His Ser
35 40 45
Val Pro Val Lys Ser Cys Ser Glu Pro Arg Cys Phe Asn Gly Gly Thr
50 55 60
Cys Gln Gln Ala Leu Tyr Phe Ser Asp Phe Val Cys Gln Cys Pro Glu
65 70 75 80
Gly Phe Ala Gly Lys Cys Cys Glu Ile Asp Thr Arg Ala Thr Cys Tyr
85 90 95
Glu Asp Gln Gly Ile Ser Tyr Arg Gly Thr Trp Ser Thr Ala Glu Ser

100 105 110
Gly Ala Glu Cys Thr Asn Trp Asn Ser Ser Ala Leu Ala Gln Lys Pro
115 120 125
Tyr Ser Gly Arg Arg Pro Asp Ala Ile Arg Leu Gly Leu Gly Asn His
130 135 140
Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Asp Ser Lys Pro Trp Cys Tyr Val
145 150 155 160
Phe Lys Ala Gly Lys Tyr Ser Ser Glu Phe Cys Ser Thr Pro Ala Cys
165 170 175
Ser Glu Gly Asn Ser Asp Cys Tyr Phe Gly Asn Gly Ser Ala Tyr Arg
180 185 190
Gly Thr His Ser Leu Thr Glu Ser Gly Ala Ser Cys Leu Pro Trp Asn
195 200 205
Ser Met Ile Leu Ile Gly Lys Val Tyr Thr Ala Gln Asn Pro Ser Ala
210 215 220
Gln Ala Leu Gly Leu Gly Lys His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly
225 230 235 240
Asp Ala Lys Pro Trp Cys His Val Leu Lys Asn Arg Arg Leu Thr Trp
245 250 255
Glu Tyr Cys Asp Val Pro Ser Cys Ser Thr Cys Gly Leu Arg Gln Tyr
260 265 270
Ser Gln Pro Gln Phe Arg Ile Lys Gly Gly Leu Phe Ala Asp Ile Ala
275 280 285
Ser His Pro Trp Gln Ala Ala Ile Phe Ala Ala Ala Ala Ala Ser Pro
290 295 300

[0003]
Gly Glu Arg Phe Leu Cys Gly Gly Ile Leu Ile Ser Ser Cys Trp Ile
305 310 315 320
Leu Ser Ala Ala His Cys Phe Gln Glu Arg Phe Pro Pro His His Leu
325 330 335
Thr Val Ile Leu Gly Arg Thr Tyr Arg Val Val Pro Gly Glu Glu Glu
340 345 350
Gln Lys Phe Glu Val Glu Lys Tyr Ile Val His Lys Glu Phe Asp Asp
355 360 365
Asp Thr Tyr Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu Gln Leu Lys Ser Asp Ser
370 375 380
Ser Arg Cys Ala Gln Glu Ser Ser Val Val Arg Thr Val Cys Leu Pro
385 390 395 400
Pro Ala Asp Leu Gln Leu Pro Asp Trp Thr Glu Cys Glu Leu Ser Gly
405 410 415
Tyr Gly Lys His Glu Ala Leu Ser Pro Phe Tyr Ser Glu Arg Leu Lys
420 425 430
Glu Ala His Val Arg Leu Tyr Pro Ser Ser Arg Cys Thr Ser Gln His
435 440 445
Leu Leu Asn Arg Thr Val Thr Asp Asn Met Leu Cys Ala Gly Asp Thr
450 455 460
Arg Ser Gly Gly Pro Gln Ala Asn Leu His Asp Ala Cys Gln Gly Asp
465 470 475 480
Ala Gly Gly Pro Leu Val Cys Leu Asn Asp Gly Arg Met Thr Leu Val
485 490 495
Gly Ile Ile Ser Trp Gly Leu Gly Cys Gly Gln Lys Asp Val Pro Gly
500 505 510

```
Val Tyr Thr Lys Val Thr Asn Tyr Leu Asp Trp Ile Arg Asp Asn Met
        515                 520                 525
Arg Pro
    530
```

<210> 3
<211> 530
<212> PRT
<213> 人类
<400> 3

```
Gly Ala Arg Ser Tyr Gln Val Ile Cys Arg Asp Glu Lys Thr Gln Met
1               5                  10                  15
Ile Tyr Gln Gln His Gln Ser Trp Leu Arg Pro Val Leu Arg Ser Asn
            20                  25                  30
Arg Val Glu Tyr Cys Trp Cys Asn Ser Gly Arg Ala Gln Cys His Ser
        35                  40                  45
Val Pro Val Lys Ser Cys Ser Glu Pro Arg Cys Phe Asn Gly Gly Thr
    50                  55                  60
Cys Gln Gln Ala Leu Tyr Phe Ser Asp Phe Val Cys Gln Cys Pro Glu
65                  70                  75                  80
Gly Phe Ala Gly Lys Cys Cys Glu Ile Asp Thr Arg Ala Thr Cys Tyr
                85                  90                  95
Glu Asp Gln Gly Ile Ser Tyr Arg Gly Asn Trp Ser Thr Ala Glu Ser
            100                 105                 110
Gly Ala Glu Cys Thr Asn Trp Gln Ser Ser Ala Leu Ala Gln Lys Pro
        115                 120                 125
Tyr Ser Gly Arg Arg Pro Asp Ala Ile Arg Leu Gly Leu Gly Asn His
    130                 135                 140
Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Asp Ser Lys Pro Trp Cys Tyr Val
145                 150                 155                 160
Phe Lys Ala Gly Lys Tyr Ser Ser Glu Phe Cys Ser Thr Pro Ala Cys
                165                 170                 175
Ser Glu Gly Asn Ser Asp Cys Tyr Phe Gly Asn Gly Ser Ala Tyr Arg
            180                 185                 190
Gly Thr His Ser Leu Thr Glu Ser Gly Ala Ser Cys Leu Pro Trp Asn
        195                 200                 205
Ser Met Ile Leu Ile Gly Lys Val Tyr Thr Ala Gln Asn Pro Ser Ala
    210                 215                 220
Gln Ala Leu Gly Leu Gly Lys His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly
225                 230                 235                 240
Asp Ala Lys Pro Trp Cys His Val Leu Lys Asn Arg Arg Leu Thr Trp
                245                 250                 255
Glu Tyr Cys Asp Val Pro Ser Cys Ser Thr Cys Gly Leu Arg Gln Tyr
            260                 265                 270
Ser Gln Pro Gln Phe Arg Ile Lys Gly Gly Leu Phe Ala Asp Ile Ala
        275                 280                 285
Ser His Pro Trp Gln Ala Ala Ile Phe Ala Lys His Arg Arg Ser Pro
    290                 295                 300
Gly Glu Arg Phe Leu Cys Gly Gly Ile Leu Ile Ser Ser Cys Trp Ile
305                 310                 315                 320
Leu Ser Ala Ala His Cys Phe Gln Glu Arg Phe Pro Pro His His Leu
```

[0004]

325 330 335
Thr Val Ile Leu Gly Arg Thr Tyr Arg Val Val Pro Gly Glu Glu Glu
340 345 350
Gln Lys Phe Glu Val Glu Lys Tyr Ile Val His Lys Glu Phe Asp Asp
355 360 365
Asp Thr Tyr Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu Gln Leu Lys Ser Asp Ser
370 375 380
Ser Arg Cys Ala Gln Glu Ser Ser Val Val Arg Thr Val Cys Leu Pro
385 390 395 400
Pro Ala Asp Leu Gln Leu Pro Asp Trp Thr Glu Cys Glu Leu Ser Gly
405 410 415
Tyr Gly Lys His Glu Ala Leu Ser Pro Phe Tyr Ser Glu Arg Leu Lys
420 425 430
Glu Ala His Val Arg Leu Tyr Pro Ser Ser Arg Cys Thr Ser Gln His
435 440 445
Leu Leu Asn Arg Thr Val Thr Asp Asn Met Leu Cys Ala Gly Asp Thr
450 455 460
Arg Ser Gly Gly Pro Gln Ala Asn Leu His Asp Ala Cys Gln Gly Asp
465 470 475 480
Ala Gly Gly Pro Leu Val Cys Leu Asn Asp Gly Arg Met Thr Leu Val
485 490 495
Gly Ile Ile Ser Trp Gly Leu Gly Cys Gly Gln Lys Asp Val Pro Gly
500 505 510
Val Tyr Thr Lys Val Thr Asn Tyr Leu Asp Trp Ile Arg Asp Asn Met
515 520 525

[0005] Arg Pro
530

<210> 4
<211> 355
<212> PRT
<213> 人类
<400> 4
Ser Tyr Gln Gly Asn Ser Asp Cys Tyr Phe Gly Asn Gly Ser Ala Tyr
1 5 10 15
Arg Gly Thr His Ser Leu Thr Glu Ser Gly Ala Ser Cys Leu Pro Trp
20 25 30
Asn Ser Met Ile Leu Ile Gly Lys Val Tyr Thr Ala Gln Asn Pro Ser
35 40 45
Ala Gln Ala Leu Gly Leu Gly Lys His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp
50 55 60
Gly Asp Ala Lys Pro Trp Cys His Val Leu Lys Asn Arg Arg Leu Thr
65 70 75 80
Trp Glu Tyr Cys Asp Val Pro Ser Cys Ser Thr Cys Gly Leu Arg Gln
85 90 95
Tyr Ser Gln Pro Gln Phe Arg Ile Lys Gly Gly Leu Phe Ala Asp Ile
100 105 110
Ala Ser His Pro Trp Gln Ala Ala Ile Phe Ala Lys His Arg Arg Ser
115 120 125
Pro Gly Glu Arg Phe Leu Cys Gly Gly Ile Leu Ile Ser Ser Cys Trp
130 135 140

Ile Leu Ser Ala Ala His Cys Phe Gln Glu Arg Phe Pro Pro His His
145 150 155 160
Leu Thr Val Ile Leu Gly Arg Thr Tyr Arg Val Val Pro Gly Glu Glu
165 170 175
Glu Gln Lys Phe Glu Val Glu Lys Tyr Ile Val His Lys Glu Phe Asp
180 185 190
Asp Asp Thr Tyr Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu Gln Leu Lys Ser Asp
195 200 205
Ser Ser Arg Cys Ala Gln Glu Ser Ser Val Val Arg Thr Val Cys Leu
210 215 220
Pro Pro Ala Asp Leu Gln Leu Pro Asp Trp Thr Glu Cys Glu Leu Ser
225 230 235 240
Gly Tyr Gly Lys His Glu Ala Leu Ser Pro Phe Tyr Ser Glu Arg Leu
245 250 255
Lys Glu Ala His Val Arg Leu Tyr Pro Ser Ser Arg Cys Thr Ser Gln
260 265 270
His Leu Leu Asn Arg Thr Val Thr Asp Asn Met Leu Cys Ala Gly Asp
275 280 285
Thr Arg Ser Gly Gly Pro Gln Ala Asn Leu His Asp Ala Cys Gln Gly
290 295 300
Asp Ala Gly Gly Pro Leu Val Cys Leu Asn Asp Gly Arg Met Thr Leu
305 310 315 320
Val Gly Ile Ile Ser Trp Gly Leu Gly Cys Gly Gln Lys Asp Val Pro
325 330 335
Gly Val Tyr Thr Lys Val Thr Asn Tyr Leu Asp Trp Ile Arg Asp Asn
[0006] 340 345 350
Met Arg Pro
355

<210> 5
<211> 411
<212> PRT
<213> 人类
<400> 5
Ser Asn Glu Leu His Gln Val Pro Ser Asn Cys Asp Cys Leu Asn Gly
1 5 10 15
Gly Thr Cys Val Ser Asn Lys Tyr Phe Ser Asn Ile His Trp Cys Asn
20 25 30
Cys Pro Lys Lys Phe Gly Gly Gln His Cys Glu Ile Asp Lys Ser Lys
35 40 45
Thr Cys Tyr Glu Gly Asn Gly His Phe Tyr Arg Gly Lys Ala Ser Thr
50 55 60
Asp Thr Met Gly Arg Pro Cys Leu Pro Trp Asn Ser Ala Thr Val Leu
65 70 75 80
Gln Gln Thr Tyr His Ala His Arg Ser Asp Ala Leu Gln Leu Gly Leu
85 90 95
Gly Lys His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Arg Arg Arg Pro Trp
100 105 110
Cys Tyr Val Gln Val Gly Leu Lys Pro Leu Val Gln Glu Cys Met Val
115 120 125
His Asp Cys Ala Asp Gly Lys Lys Pro Ser Ser Pro Pro Glu Glu Leu

```
     130                 135                 140
Lys Phe Gln Cys Gly Gln Lys Thr Leu Arg Pro Arg Phe Lys Ile Ile
145                 150                 155                 160
Gly Gly Glu Phe Thr Thr Ile Glu Asn Gln Pro Trp Phe Ala Ala Ile
                165                 170                 175
Tyr Arg Arg His Arg Gly Gly Ser Val Thr Tyr Val Cys Gly Gly Ser
            180                 185                 190
Leu Ile Ser Pro Cys Trp Val Ile Ser Ala Thr His Cys Phe Ile Asp
        195                 200                 205
Tyr Pro Lys Lys Glu Asp Tyr Ile Val Tyr Leu Gly Arg Ser Arg Leu
    210                 215                 220
Asn Ser Asn Thr Gln Gly Glu Met Lys Phe Glu Val Glu Asn Leu Ile
225                 230                 235                 240
Leu His Lys Asp Tyr Ser Ala Asp Thr Leu Ala His His Asn Asp Ile
                245                 250                 255
Ala Leu Leu Lys Ile Arg Ser Lys Glu Gly Arg Cys Ala Gln Pro Ser
            260                 265                 270
Arg Thr Ile Gln Thr Ile Cys Leu Pro Ser Met Tyr Asn Asp Pro Gln
        275                 280                 285
Phe Gly Thr Ser Cys Glu Ile Thr Gly Phe Gly Lys Glu Asn Ser Thr
    290                 295                 300
Asp Tyr Leu Tyr Pro Glu Gln Leu Lys Met Thr Val Val Lys Leu Ile
305                 310                 315                 320
Ser His Arg Glu Cys Gln Gln Pro His Tyr Tyr Gly Ser Glu Val Thr
                325                 330                 335
```

[0007]

```
Thr Lys Met Leu Cys Ala Ala Asp Pro Gln Trp Lys Thr Asp Ser Cys
            340                 345                 350
Gln Gly Asp Ala Gly Gly Pro Leu Val Cys Ser Leu Gln Gly Arg Met
        355                 360                 365
Thr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Arg Gly Cys Ala Leu Lys Asp
    370                 375                 380
Lys Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser His Phe Leu Pro Trp Ile Arg
385                 390                 395                 400
Ser His Thr Lys Glu Glu Asn Gly Leu Ala Leu
                405                 410
```

<210> 6
<211> 411
<212> PRT
<213> 人类
<400> 6

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

Gln Gln Thr Tyr His Ala His Arg Ser Asp Ala Leu Gln Leu Gly Leu
85 90 95
Gly Lys His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Arg Arg Arg Pro Trp
100 105 110
Cys Tyr Val Gln Val Gly Leu Lys Pro Leu Val Gln Glu Cys Met Val
115 120 125
His Asp Cys Ala Asp Gly Lys Lys Pro Ser Ser Pro Pro Glu Glu Leu
130 135 140
Lys Phe Gln Cys Gly Gln Lys Thr Leu Arg Pro Arg Phe Lys Ile Ile
145 150 155 160
Gly Gly Glu Phe Thr Thr Ile Glu Asn Gln Pro Trp Phe Ala Ala Ile
165 170 175
Tyr Arg Arg His Arg Gly Gly Ser Val Thr Tyr Val Cys Gly Gly Ser
180 185 190
Leu Ile Ser Pro Cys Trp Val Ile Ser Ala Thr His Cys Phe Ile Asp
195 200 205
Tyr Pro Lys Lys Glu Asp Tyr Ile Val Tyr Leu Gly Arg Ser Arg Leu
210 215 220
Asn Ser Asn Thr Gln Gly Glu Met Lys Phe Glu Val Glu Asn Leu Ile
225 230 235 240
Leu His Lys Asp Tyr Ser Ala Asp Thr Leu Ala His His Asn Asp Ile
245 250 255
Ala Leu Leu Lys Ile Arg Ser Lys Glu Gly Arg Cys Ala Gln Pro Ser
260 265 270
Arg Thr Ile Gln Thr Ile Cys Leu Pro Ser Met Tyr Asn Asp Pro Gln
[0008] 275 280 285
Phe Gly Thr Ser Cys Glu Ile Thr Gly Phe Gly Lys Glu Asn Ser Thr
290 295 300
Asp Tyr Leu Tyr Pro Glu Gln Leu Lys Met Thr Val Val Lys Leu Ile
305 310 315 320
Ser His Arg Glu Cys Gln Gln Pro His Tyr Tyr Gly Ser Glu Val Thr
325 330 335
Thr Lys Met Leu Cys Ala Ala Asp Pro Gln Trp Lys Thr Asp Ser Cys
340 345 350
Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Ser Leu Gln Gly Arg Met
355 360 365
Thr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Arg Gly Cys Ala Leu Lys Asp
370 375 380
Lys Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser His Phe Leu Pro Trp Ile Arg
385 390 395 400
Ser His Thr Lys Glu Glu Asn Gly Leu Ala Leu
405 410

<210> 7
<211> 530
<212> PRT
<213> 人类
<400> 7
Gly Ala Arg Ser Tyr Gln Val Ile Cys Arg Asp Glu Lys Thr Gln Met
1 5 10 15
Ile Tyr Gln Gln His Gln Ser Trp Leu Arg Pro Val Leu Arg Ser Asn

```
                20                  25                  30
Arg Val Glu Tyr Cys Trp Cys Asn Ser Gly Arg Ala Gln Cys His Ser
        35                  40                  45
Val Pro Val Lys Ser Cys Ser Glu Pro Arg Cys Phe Asn Gly Gly Thr
    50                  55                  60
Cys Gln Gln Ala Leu Tyr Phe Ser Asp Phe Val Cys Gln Cys Pro Glu
65                  70                  75                  80
Gly Phe Ala Gly Lys Cys Cys Glu Ile Asp Thr Arg Ala Thr Cys Tyr
                85                  90                  95
Glu Asp Gln Gly Ile Ser Tyr Arg Gly Thr Trp Ser Thr Ala Glu Ser
            100                 105                 110
Gly Ala Glu Cys Thr Asn Trp Asn Ser Ser Ala Leu Ala Gln Lys Pro
        115                 120                 125
Tyr Ser Gly Arg Arg Pro Asp Ala Ile Arg Leu Gly Leu Gly Asn His
    130                 135                 140
Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Asp Ser Lys Pro Trp Cys Tyr Val
145                 150                 155                 160
Phe Lys Ala Gly Lys Tyr Ser Ser Glu Phe Cys Ser Thr Pro Ala Cys
                165                 170                 175
Ser Glu Gly Asn Ser Asp Cys Tyr Phe Gly Asn Gly Ser Ala Tyr Arg
            180                 185                 190
Gly Thr His Ser Leu Thr Glu Ser Gly Ala Ser Cys Leu Pro Trp Asn
        195                 200                 205
Ser Met Ile Leu Ile Gly Lys Val Tyr Thr Ala Gln Asn Pro Ser Ala
    210                 215                 220
```

[0009]

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

Glu Ala His Val Arg Leu Tyr Pro Ser Ser Arg Cys Thr Ser Gln His
435 440 445
Leu Leu Asn Arg Thr Val Thr Asp Asn Met Leu Cys Ala Gly Asp Thr
450 455 460
Arg Ser Gly Gly Pro Gln Ala Asn Leu His Asp Ala Cys Gln Gly Asp
465 470 475 480
Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Leu Asn Asp Gly Arg Met Thr Leu Val
485 490 495
Gly Ile Ile Ser Trp Gly Leu Gly Cys Gly Gln Lys Asp Val Pro Gly
500 505 510
Val Tyr Thr Lys Val Thr Asn Tyr Leu Asp Trp Ile Arg Asp Asn Met
515 520 525
Arg Pro
530

<210> 8
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物 htPA-Bgl II
<400> 8
gcccgattca gatctggagc ccgcagctac caagtgatc 39

[0010]

<210> 9
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物 htPA-Xho I
<400> 9
ttttgaggac tcgagtgttc cttatcacgg tcgcatg 37

<210> 10
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 用于引入 S481A 突变的反向平行引物—S481A 引物
<400> 10
gcctgccagg gcgatgccgg aggccccctg gtg 33

<210> 11
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 用于引入 S481A 突变的反向平行引物—S481A 反向引物
<400> 11
caccaggggg cctccggcat cgccctggca ggc 33

〈210〉 12
〈211〉 532
〈212〉 PRT
〈213〉 人类
〈400〉 12

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

[0011]

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

```
Asp Asp Asp Thr Tyr Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu Gln Leu Lys Ser
    370                 375                 380
Asp Ser Ser Arg Cys Ala Gln Glu Ser Ser Val Val Arg Thr Val Cys
385                 390                 395                 400
Leu Pro Pro Ala Asp Leu Gln Leu Pro Asp Trp Thr Glu Cys Glu Leu
                405                 410                 415
Ser Gly Tyr Gly Lys His Glu Ala Leu Ser Pro Phe Tyr Ser Glu Arg
            420                 425                 430
Leu Lys Glu Ala His Val Arg Leu Tyr Pro Ser Ser Arg Cys Thr Ser
        435                 440                 445
Gln His Leu Leu Asn Arg Thr Val Thr Asp Asn Met Leu Cys Ala Gly
    450                 455                 460
Asp Thr Arg Ser Gly Gly Pro Gln Ala Asn Leu His Asp Ala Cys Gln
465                 470                 475                 480
Gly Asp Ala Gly Gly Pro Leu Val Cys Leu Asn Asp Gly Arg Met Thr
                485                 490                 495
Leu Val Gly Ile Ile Ser Trp Gly Leu Gly Cys Gly Gln Lys Asp Val
            500                 505                 510
Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Thr Asn Tyr Leu Asp Trp Ile Arg Asp
        515                 520                 525
Asn Met Arg Pro
    530
```

<210> 13
<211> 532
[0012] <212> PRT
<213> 人类
<400> 13

```
Arg Ser Gly Ala Arg Ser Tyr Gln Val Ile Cys Arg Asp Glu Lys Thr
1               5                   10                  15
Gln Met Ile Tyr Gln Gln His Gln Ser Trp Leu Arg Pro Val Leu Arg
            20                  25                  30
Ser Asn Arg Val Glu Tyr Cys Trp Cys Asn Ser Gly Arg Ala Gln Cys
        35                  40                  45
His Ser Val Pro Val Lys Ser Cys Ser Glu Pro Arg Cys Phe Asn Gly
    50                  55                  60
Gly Thr Cys Gln Gln Ala Leu Tyr Phe Ser Asp Phe Val Cys Gln Cys
65                  70                  75                  80
Pro Glu Gly Phe Ala Gly Lys Cys Cys Glu Ile Asp Thr Arg Ala Thr
                85                  90                  95
Cys Tyr Glu Asp Gln Gly Ile Ser Tyr Arg Gly Thr Trp Ser Thr Ala
            100                 105                 110
Glu Ser Gly Ala Glu Cys Thr Asn Trp Asn Ser Ser Ala Leu Ala Gln
        115                 120                 125
Lys Pro Tyr Ser Gly Arg Arg Pro Asp Ala Ile Arg Leu Gly Leu Gly
    130                 135                 140
Asn His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Asp Ser Lys Pro Trp Cys
145                 150                 155                 160
Tyr Val Phe Lys Ala Gly Lys Tyr Ser Ser Glu Phe Cys Ser Thr Pro
                165                 170                 175
Ala Cys Ser Glu Gly Asn Ser Asp Cys Tyr Phe Gly Asn Gly Ser Ala
```

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

[0013]

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

<210> 14
<211> 532
<212> PRT
<213> 人类
<400> 14

```
Arg Ser Gly Ala Arg Ser Tyr Gln Val Ile Cys Arg Asp Glu Lys Thr
1               5                  10                  15
Gln Met Ile Tyr Gln Gln His Gln Ser Trp Leu Arg Pro Val Leu Arg
            20                  25                  30
Ser Asn Arg Val Glu Tyr Cys Trp Cys Asn Ser Gly Arg Ala Gln Cys
        35                  40                  45
His Ser Val Pro Val Lys Ser Cys Ser Glu Pro Arg Cys Phe Asn Gly
    50                  55                  60
Gly Thr Cys Gln Gln Ala Leu Tyr Phe Ser Asp Phe Val Cys Gln Cys
65                  70                  75                  80
Pro Glu Gly Phe Ala Gly Lys Cys Cys Glu Ile Asp Thr Arg Ala Thr
                85                  90                  95
Cys Tyr Glu Asp Gln Gly Ile Ser Tyr Arg Gly Asn Trp Ser Thr Ala
            100                 105                 110
Glu Ser Gly Ala Glu Cys Thr Asn Trp Gln Ser Ser Ala Leu Ala Gln
        115                 120                 125
Lys Pro Tyr Ser Gly Arg Arg Pro Asp Ala Ile Arg Leu Gly Leu Gly
    130                 135                 140
Asn His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Asp Ser Lys Pro Trp Cys
145                 150                 155                 160
Tyr Val Phe Lys Ala Gly Lys Tyr Ser Ser Glu Phe Cys Ser Thr Pro
                165                 170                 175
Ala Cys Ser Glu Gly Asn Ser Asp Cys Tyr Phe Gly Asn Gly Ser Ala
            180                 185                 190
Tyr Arg Gly Thr His Ser Leu Thr Glu Ser Gly Ala Ser Cys Leu Pro
        195                 200                 205
Trp Asn Ser Met Ile Leu Ile Gly Lys Val Tyr Thr Ala Gln Asn Pro
    210                 215                 220
Ser Ala Gln Ala Leu Gly Leu Gly Lys His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro
225                 230                 235                 240
Asp Gly Asp Ala Lys Pro Trp Cys His Val Leu Lys Asn Arg Arg Leu
                245                 250                 255
Thr Trp Glu Tyr Cys Asp Val Pro Ser Cys Ser Thr Cys Gly Leu Arg
            260                 265                 270
Gln Tyr Ser Gln Pro Gln Phe Arg Ile Lys Gly Gly Leu Phe Ala Asp
        275                 280                 285
Ile Ala Ser His Pro Trp Gln Ala Ala Ile Phe Ala Lys His Arg Arg
    290                 295                 300
Ser Pro Gly Glu Arg Phe Leu Cys Gly Gly Ile Leu Ile Ser Ser Cys
305                 310                 315                 320
Trp Ile Leu Ser Ala Ala His Cys Phe Gln Glu Arg Phe Pro Pro His
                325                 330                 335
His Leu Thr Val Ile Leu Gly Arg Thr Tyr Arg Val Val Pro Gly Glu
            340                 345                 350
Glu Glu Gln Lys Phe Glu Val Glu Lys Tyr Ile Val His Lys Glu Phe
        355                 360                 365
Asp Asp Asp Thr Tyr Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu Gln Leu Lys Ser
    370                 375                 380
Asp Ser Ser Arg Cys Ala Gln Glu Ser Ser Val Val Arg Thr Val Cys
385                 390                 395                 400
Leu Pro Pro Ala Asp Leu Gln Leu Pro Asp Trp Thr Glu Cys Glu Leu
```

[0014]

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

<210> 15
<211> 530
<212> PRT
<213> 人类
<400> 15
Gly Ala Arg Ser Tyr Gln Val Ile Cys Arg Asp Glu Lys Thr Gln Met
1 5 10 15
[0015] Ile Tyr Gln Gln His Gln Ser Trp Leu Arg Pro Val Leu Arg Ser Asn
20 25 30
Arg Val Glu Tyr Cys Trp Cys Asn Ser Gly Arg Ala Gln Cys His Ser
35 40 45
Val Pro Val Lys Ser Cys Ser Glu Pro Arg Cys Phe Asn Gly Gly Thr
50 55 60
Cys Gln Gln Ala Leu Tyr Phe Ser Asp Phe Val Cys Gln Cys Pro Glu
65 70 75 80
Gly Phe Ala Gly Lys Cys Cys Glu Ile Asp Thr Arg Ala Thr Cys Tyr
85 90 95
Glu Asp Gln Gly Ile Ser Tyr Arg Gly Thr Trp Ser Thr Ala Glu Ser
100 105 110
Gly Ala Glu Cys Thr Asn Trp Asn Ser Ser Ala Leu Ala Gln Lys Pro
115 120 125
Tyr Ser Gly Arg Arg Pro Asp Ala Ile Arg Leu Gly Leu Gly Asn His
130 135 140
Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Asp Ser Lys Pro Trp Cys Tyr Val
145 150 155 160
Phe Lys Ala Gly Lys Tyr Ser Ser Glu Phe Cys Ser Thr Pro Ala Cys
165 170 175
Ser Glu Gly Asn Ser Asp Cys Tyr Phe Gly Asn Gly Ser Ala Tyr Arg
180 185 190
Gly Thr His Ser Leu Thr Glu Ser Gly Ala Ser Cys Leu Pro Trp Asn
195 200 205
Ser Met Ile Leu Ile Gly Lys Val Tyr Thr Ala Gln Asn Pro Ser Ala
210 215 220

Gln Ala Leu Gly Leu Gly Lys His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly
225 230 235 240
Asp Ala Lys Pro Trp Cys His Val Leu Lys Asn Arg Arg Leu Thr Trp
245 250 255
Glu Tyr Cys Asp Val Pro Ser Cys Ser Thr Cys Gly Leu Arg Gln Tyr
260 265 270
Ser Gln Pro Gln Phe Arg Ile Lys Gly Gly Leu Phe Ala Asp Ile Ala
275 280 285
Ser His Pro Trp Gln Ala Ala Ile Phe Ala Ala Ala Ala Ala Ser Pro
290 295 300
Gly Glu Arg Phe Leu Cys Gly Gly Ile Leu Ile Ser Ser Cys Trp Ile
305 310 315 320
Leu Ser Ala Ala His Cys Phe Gln Glu Arg Phe Pro Pro His His Leu
325 330 335
Thr Val Ile Leu Gly Arg Thr Tyr Arg Val Val Pro Gly Glu Glu Glu
340 345 350
Gln Lys Phe Glu Val Glu Lys Tyr Ile Val His Lys Glu Phe Asp Asp
355 360 365
Asp Thr Tyr Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu Gln Leu Lys Ser Asp Ser
370 375 380
Ser Arg Cys Ala Gln Glu Ser Ser Val Val Arg Thr Val Cys Leu Pro
385 390 395 400
Pro Ala Asp Leu Gln Leu Pro Asp Trp Thr Glu Cys Glu Leu Ser Gly
405 410 415
Tyr Gly Lys His Glu Ala Leu Ser Pro Phe Tyr Ser Glu Arg Leu Lys
[0016] 420 425 430
Glu Ala His Val Arg Leu Tyr Pro Ser Ser Arg Cys Thr Ser Gln His
435 440 445
Leu Leu Asn Arg Thr Val Thr Asp Asn Met Leu Cys Ala Gly Asp Thr
450 455 460
Arg Ser Gly Gly Pro Gln Ala Asn Leu His Asp Ala Cys Gln Gly Asp
465 470 475 480
Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Leu Asn Asp Gly Arg Met Thr Leu Val
485 490 495
Gly Ile Ile Ser Trp Gly Leu Gly Cys Gly Gln Lys Asp Val Pro Gly
500 505 510
Val Tyr Thr Lys Val Thr Asn Tyr Leu Asp Trp Ile Arg Asp Asn Met
515 520 525
Arg Pro
530

<210> 16
<211> 530
<212> PRT
<213> 人类
<400> 16
Gly Ala Arg Ser Tyr Gln Val Ile Cys Arg Asp Glu Lys Thr Gln Met
1 5 10 15
Ile Tyr Gln Gln His Gln Ser Trp Leu Arg Pro Val Leu Arg Ser Asn
20 25 30
Arg Val Glu Tyr Cys Trp Cys Asn Ser Gly Arg Ala Gln Cys His Ser

35 40 45

Val Pro Val Lys Ser Cys Ser Glu Pro Arg Cys Phe Asn Gly Gly Thr
50 55 60

Cys Gln Gln Ala Leu Tyr Phe Ser Asp Phe Val Cys Gln Cys Pro Glu
65 70 75 80

Gly Phe Ala Gly Lys Cys Cys Glu Ile Asp Thr Arg Ala Thr Cys Tyr
85 90 95

Glu Asp Gln Gly Ile Ser Tyr Arg Gly Asn Trp Ser Thr Ala Glu Ser
100 105 110

Gly Ala Glu Cys Thr Asn Trp Gln Ser Ser Ala Leu Ala Gln Lys Pro
115 120 125

Tyr Ser Gly Arg Arg Pro Asp Ala Ile Arg Leu Gly Leu Gly Asn His
130 135 140

Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Asp Ser Lys Pro Trp Cys Tyr Val
145 150 155 160

Phe Lys Ala Gly Lys Tyr Ser Ser Glu Phe Cys Ser Thr Pro Ala Cys
165 170 175

Ser Glu Gly Asn Ser Asp Cys Tyr Phe Gly Asn Gly Ser Ala Tyr Arg
180 185 190

Gly Thr His Ser Leu Thr Glu Ser Gly Ala Ser Cys Leu Pro Trp Asn
195 200 205

Ser Met Ile Leu Ile Gly Lys Val Tyr Thr Ala Gln Asn Pro Ser Ala
210 215 220

Gln Ala Leu Gly Leu Gly Lys His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly
225 230 235 240

[0017] Asp Ala Lys Pro Trp Cys His Val Leu Lys Asn Arg Arg Leu Thr Trp
245 250 255

Glu Tyr Cys Asp Val Pro Ser Cys Ser Thr Cys Gly Leu Arg Gln Tyr
260 265 270

Ser Gln Pro Gln Phe Arg Ile Lys Gly Gly Leu Phe Ala Asp Ile Ala
275 280 285

Ser His Pro Trp Gln Ala Ala Ile Phe Ala Lys His Arg Arg Ser Pro
290 295 300

Gly Glu Arg Phe Leu Cys Gly Gly Ile Leu Ile Ser Ser Cys Trp Ile
305 310 315 320

Leu Ser Ala Ala His Cys Phe Gln Glu Arg Phe Pro Pro His His Leu
325 330 335

Thr Val Ile Leu Gly Arg Thr Tyr Arg Val Val Pro Gly Glu Glu Glu
340 345 350

Gln Lys Phe Glu Val Glu Lys Tyr Ile Val His Lys Glu Phe Asp Asp
355 360 365

Asp Thr Tyr Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu Gln Leu Lys Ser Asp Ser
370 375 380

Ser Arg Cys Ala Gln Glu Ser Ser Val Val Arg Thr Val Cys Leu Pro
385 390 395 400

Pro Ala Asp Leu Gln Leu Pro Asp Trp Thr Glu Cys Glu Leu Ser Gly
405 410 415

Tyr Gly Lys His Glu Ala Leu Ser Pro Phe Tyr Ser Glu Arg Leu Lys
420 425 430

Glu Ala His Val Arg Leu Tyr Pro Ser Ser Arg Cys Thr Ser Gln His
435 440 445

Leu Leu Asn Arg Thr Val Thr Asp Asn Met Leu Cys Ala Gly Asp Thr
450 455 460
Arg Ser Gly Gly Pro Gln Ala Asn Leu His Asp Ala Cys Gln Gly Asp
465 470 475 480
Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Leu Asn Asp Gly Arg Met Thr Leu Val
485 490 495
Gly Ile Ile Ser Trp Gly Leu Gly Cys Gly Gln Lys Asp Val Pro Gly
500 505 510
Val Tyr Thr Lys Val Thr Asn Tyr Leu Asp Trp Ile Arg Asp Asn Met
515 520 525
Arg Pro
530

<210> 17
<211> 355
<212> PRT
<213> 人类
<400> 17
Ser Tyr Gln Gly Asn Ser Asp Cys Tyr Phe Gly Asn Gly Ser Ala Tyr
1 5 10 15
Arg Gly Thr His Ser Leu Thr Glu Ser Gly Ala Ser Cys Leu Pro Trp
20 25 30
Asn Ser Met Ile Leu Ile Gly Lys Val Tyr Thr Ala Gln Asn Pro Ser
35 40 45
Ala Gln Ala Leu Gly Leu Gly Lys His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp
[0018] 50 55 60
Gly Asp Ala Lys Pro Trp Cys His Val Leu Lys Asn Arg Arg Leu Thr
65 70 75 80
Trp Glu Tyr Cys Asp Val Pro Ser Cys Ser Thr Cys Gly Leu Arg Gln
85 90 95
Tyr Ser Gln Pro Gln Phe Arg Ile Lys Gly Gly Leu Phe Ala Asp Ile
100 105 110
Ala Ser His Pro Trp Gln Ala Ala Ile Phe Ala Lys His Arg Arg Ser
115 120 125
Pro Gly Glu Arg Phe Leu Cys Gly Gly Ile Leu Ile Ser Ser Cys Trp
130 135 140
Ile Leu Ser Ala Ala His Cys Phe Gln Glu Arg Phe Pro Pro His His
145 150 155 160
Leu Thr Val Ile Leu Gly Arg Thr Tyr Arg Val Val Pro Gly Glu Glu
165 170 175
Glu Gln Lys Phe Glu Val Glu Lys Tyr Ile Val His Lys Glu Phe Asp
180 185 190
Asp Asp Thr Tyr Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu Gln Leu Lys Ser Asp
195 200 205
Ser Ser Arg Cys Ala Gln Glu Ser Ser Val Val Arg Thr Val Cys Leu
210 215 220
Pro Pro Ala Asp Leu Gln Leu Pro Asp Trp Thr Glu Cys Glu Leu Ser
225 230 235 240
Gly Tyr Gly Lys His Glu Ala Leu Ser Pro Phe Tyr Ser Glu Arg Leu
245 250 255
Lys Glu Ala His Val Arg Leu Tyr Pro Ser Ser Arg Cys Thr Ser Gln

[0019]

```
                260                 265                 270
His Leu Leu Asn Arg Thr Val Thr Asp Asn Met Leu Cys Ala Gly Asp
        275                 280                 285
Thr Arg Ser Gly Gly Pro Gln Ala Asn Leu His Asp Ala Cys Gln Gly
    290                 295                 300
Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Leu Asn Asp Gly Arg Met Thr Leu
305                 310                 315                 320
Val Gly Ile Ile Ser Trp Gly Leu Gly Cys Gly Gln Lys Asp Val Pro
                325                 330                 335
Gly Val Tyr Thr Lys Val Thr Asn Tyr Leu Asp Trp Ile Arg Asp Asn
            340                 345                 350
Met Arg Pro
        355
```

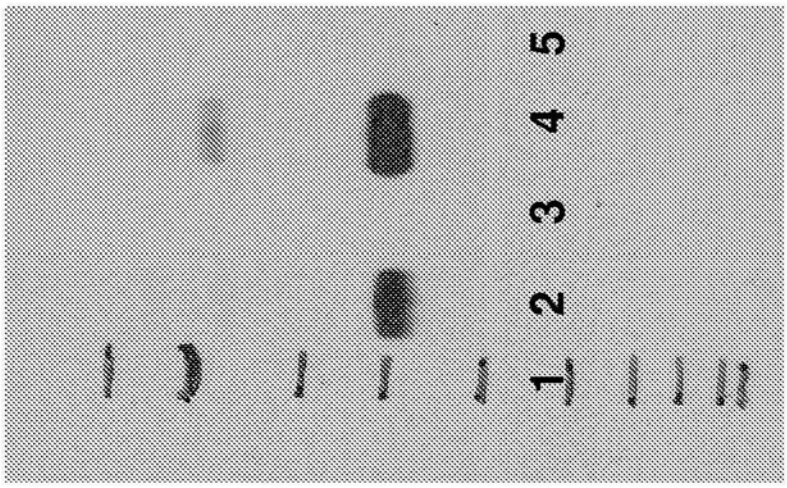

图1

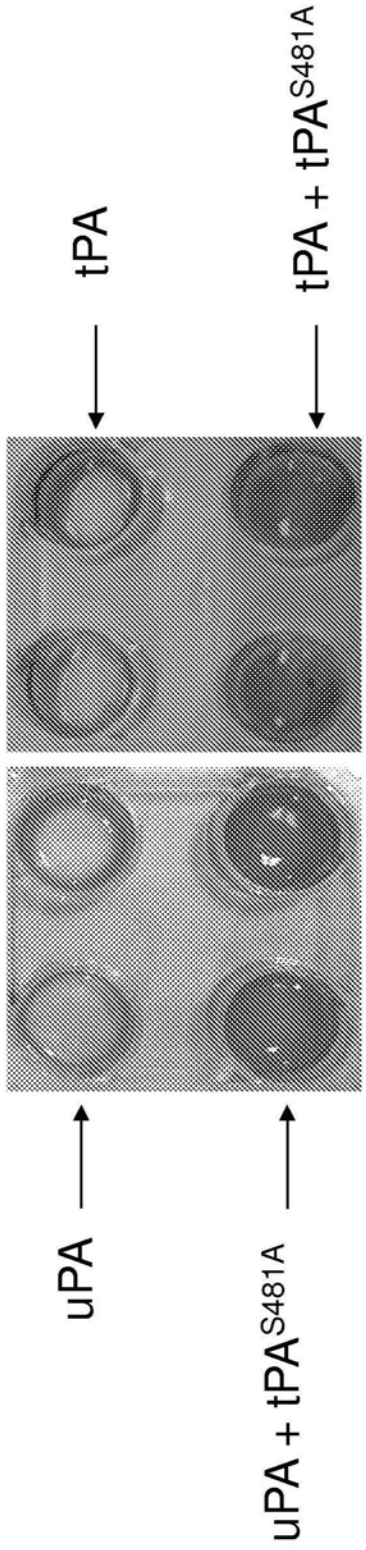

图2A

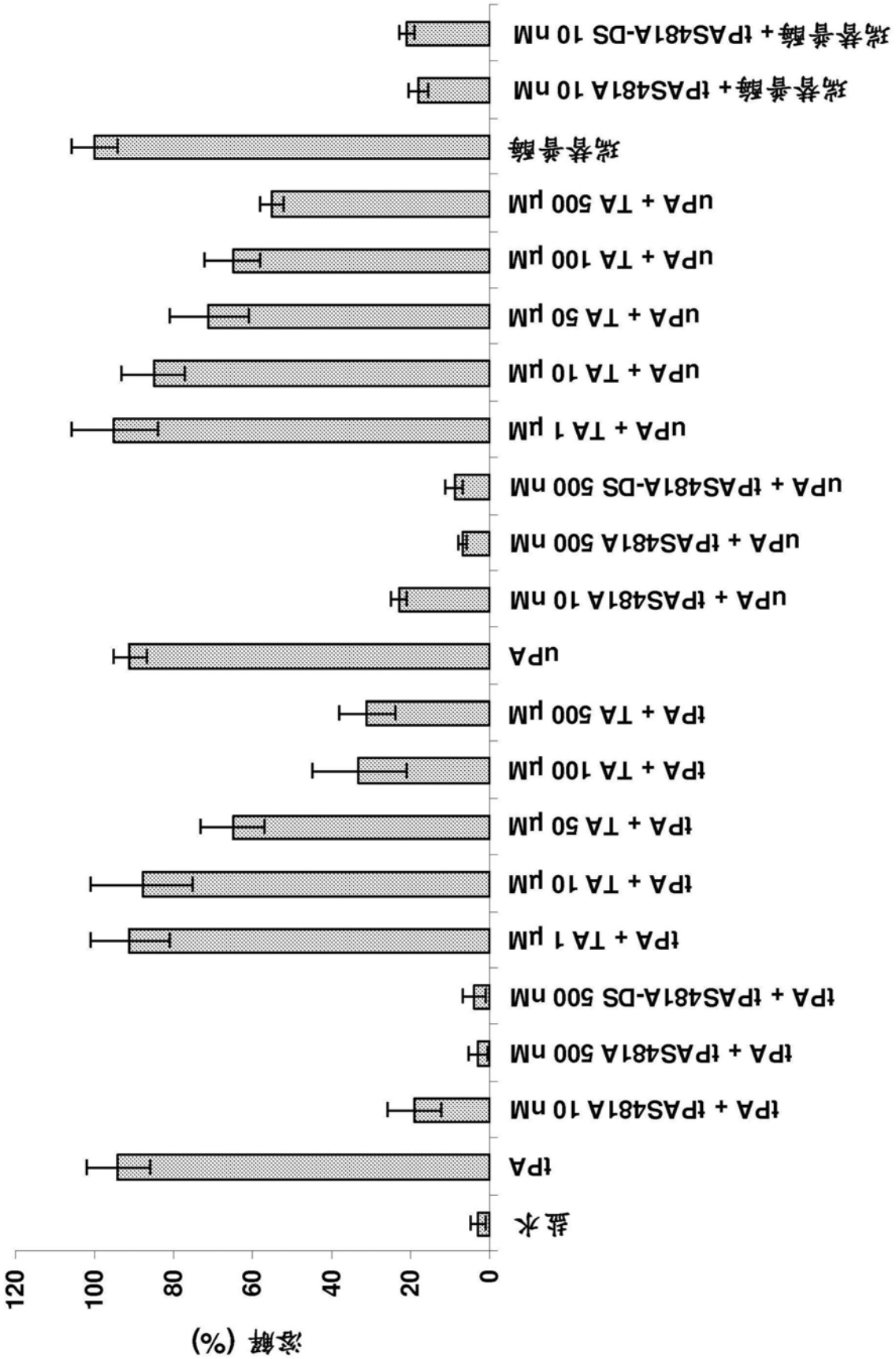
溶解 (%)
0
20
40
60
80
100
120
盐水
tPA
tPA + tPAS481A 10 nM
tPA + tPAS481A 500 nM
tPA + tPAS481A-DS 500 nM
tPA + TA 1 μM
tPA + TA 10 μM
tPA + TA 50 μM
tPA + TA 100 μM
tPA + TA 500 μM
uPA
uPA + tPAS481A 10 nM
uPA + tPAS481A 500 nM
uPA + tPAS481A-DS 500 nM
uPA + TA 1 μM
uPA + TA 10 μM
uPA + TA 50 μM
uPA + TA 100 μM
uPA + TA 500 μM
瑞替普酶
瑞替普酶 + tPAS481A 10 nM
瑞替普酶 + tPAS481A-DS 10 nM

图2B

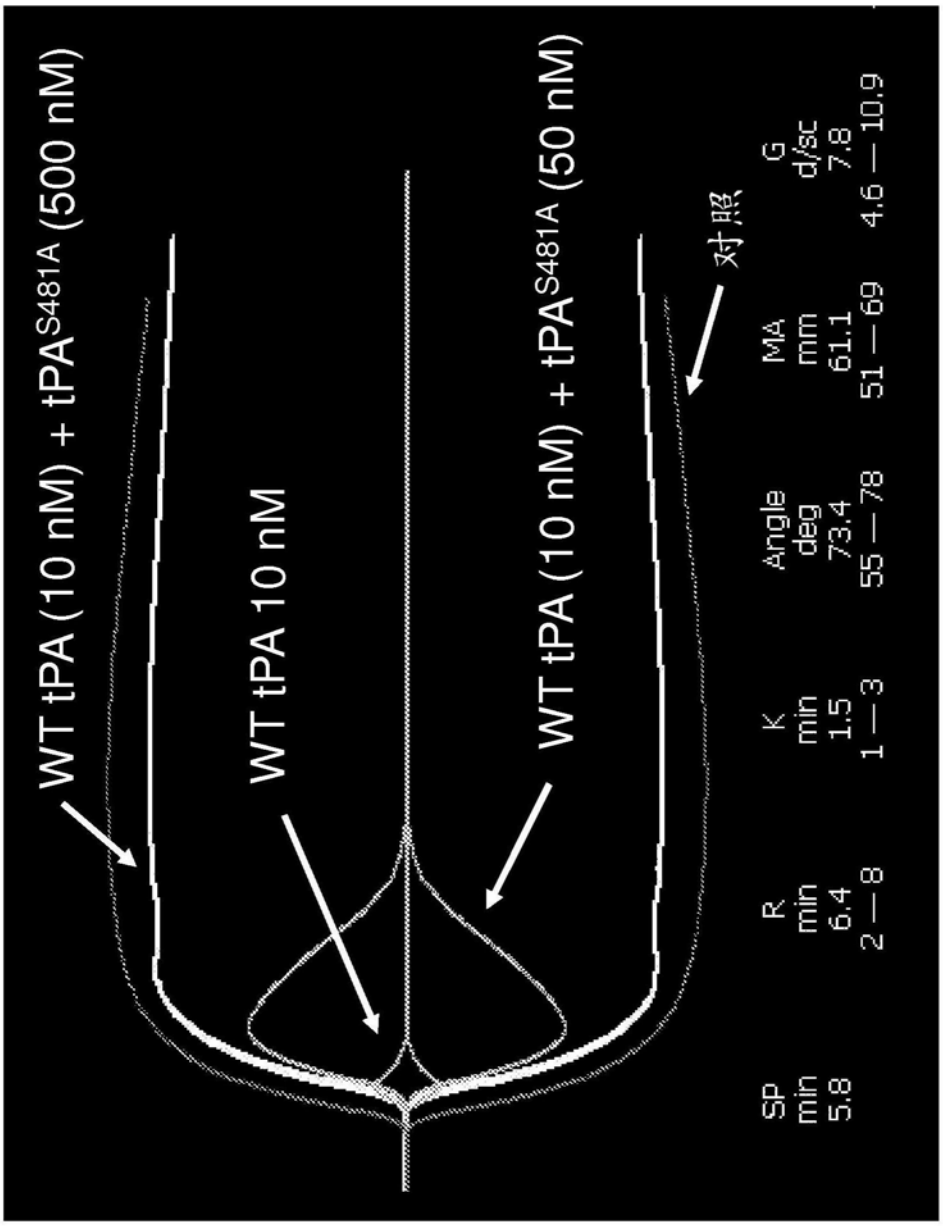
WT tPA (10 nM) + tPA^{S481A} (500 nM)
WT tPA 10 nM
WT tPA (10 nM) + tPA^{S481A} (50 nM)
对照
SP
min
5.8
R
min
6.4
2 — 8
K
min
1.5
1 — 3
Angle
deg
73.4
55 — 78
MA
mm
61.1
51 — 69
G
d/sc
7.8
4.6 — 10.9

图2C

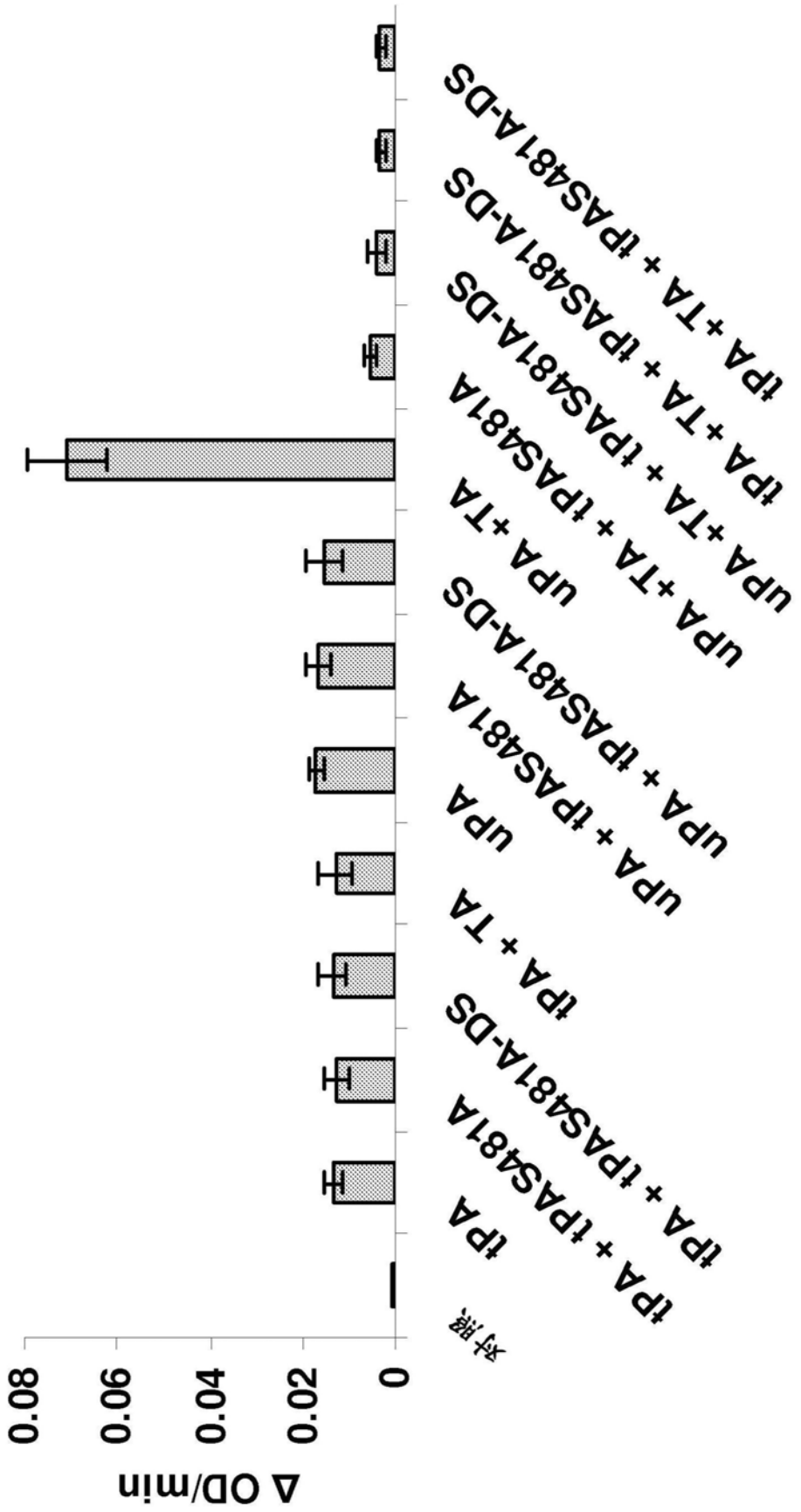
ΔOD/min
0.08
0.06
0.04
0.02
0
对照
tPA
tPA + tPAS481A
tPA + TA + tPAS481A-DS
tPA + TA + tPAS481A
uPA + tPAS481A-DS
uPA + tPAS481A
uPA
tPA + TA
uPA + TA + tPAS481A-DS
uPA + TA + tPAS481A
uPA + TA
tPA + TA + tPAS481A-DS
tPA + TA + tPAS481A
tPA + tPAS481A

图2D

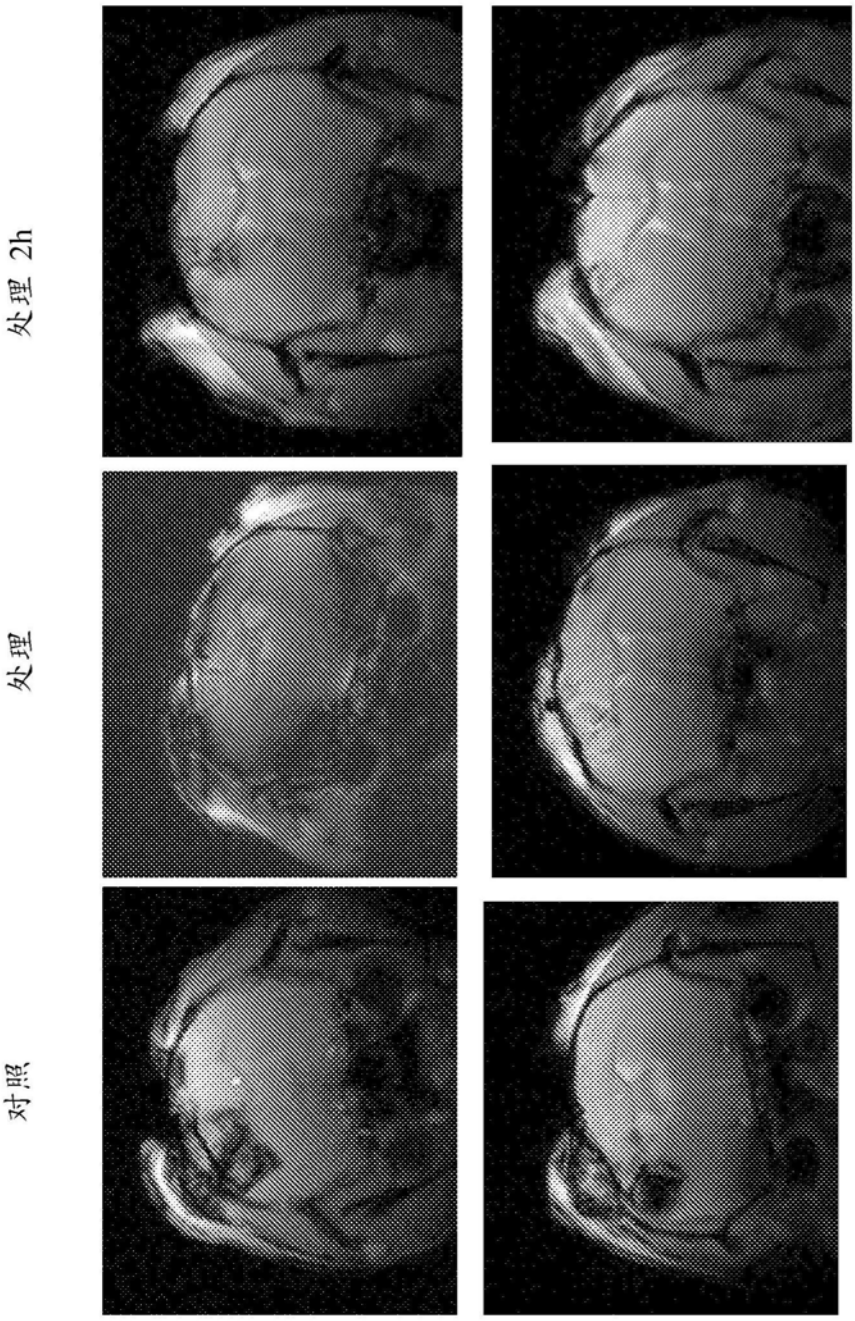

图3A

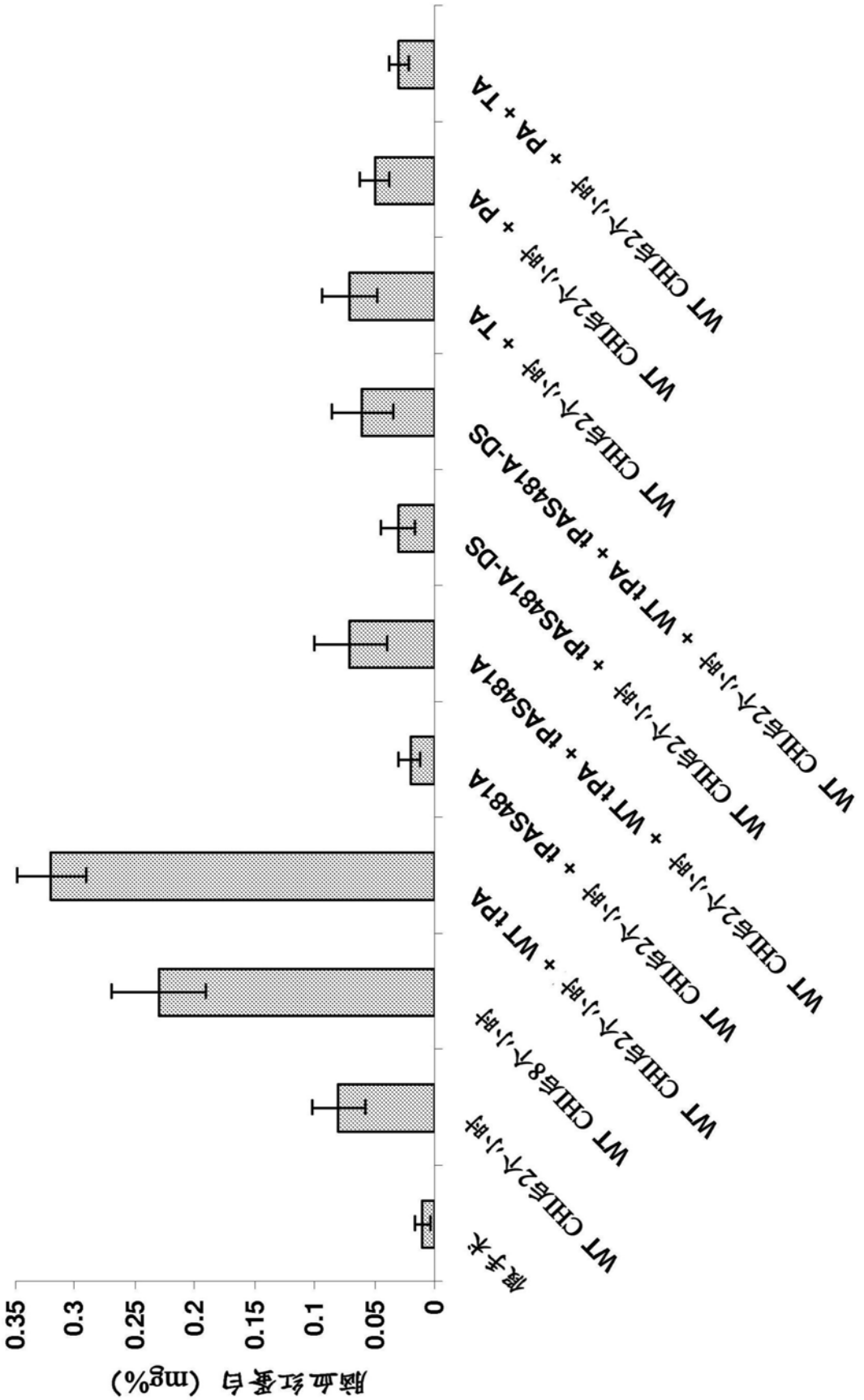
脑血红蛋白 (mg%)
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
载体
WT CHI后2小时
WT CHI后8小时
WT CHI后2小时 + WT tPA
WT CHI后2小时 + tPAS481A
WT CHI后2小时 + WT tPA + tPAS481A
WT CHI后2小时 + tPAS481A-DS
WT CHI后2小时 + WT tPA + tPAS481A-DS
WT CHI后2小时 + TA
WT CHI后2小时 + PA
WT CHI后2小时 + PA + TA

图3B

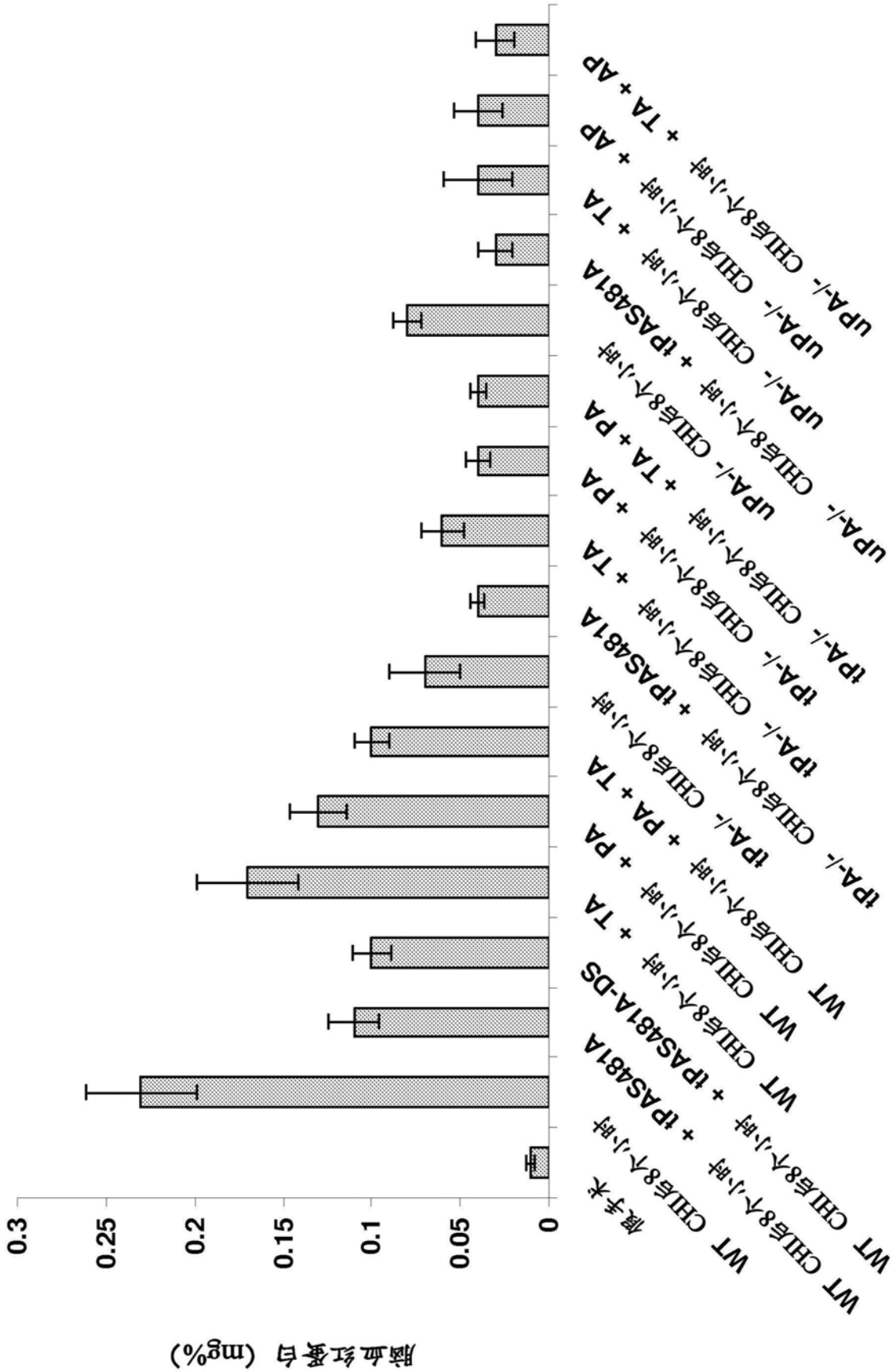
脑血红蛋白 (mg%)
0
0.05
0.1
0.15
0.2
0.25
0.3
极卡
WT CHI后8天,小时
WT CHI后8天,小时 + tPAS481A
WT CHI后8天,小时 + tPAS481A-DS
WT CHI后8天,小时 + TA
WT CHI后8天,小时 + PA
WT CHI后8天,小时 + PA + TA
tPA-/- CHI后8天,小时
tPA-/- CHI后8天,小时 + tPAS481A
tPA-/- CHI后8天,小时 + TA
tPA-/- CHI后8天,小时 + PA
tPA-/- CHI后8天,小时 + TA + PA
uPA-/- CHI后8天,小时
uPA-/- CHI后8天,小时 + tPAS481A
uPA-/- CHI后8天,小时 + TA
uPA-/- CHI后8天,小时 + AP
uPA-/- CHI后8天,小时 + TA + AP

图3C

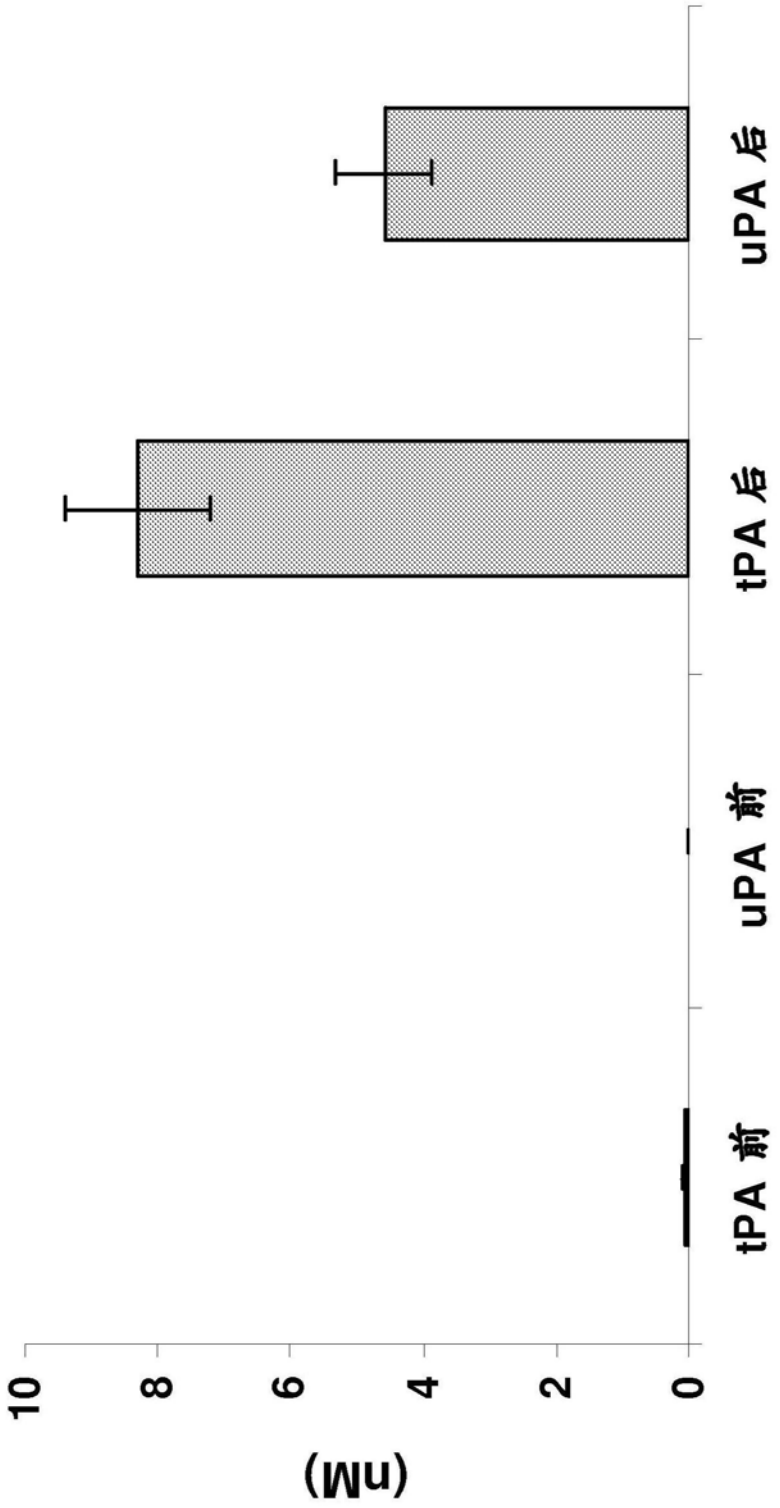

图3D

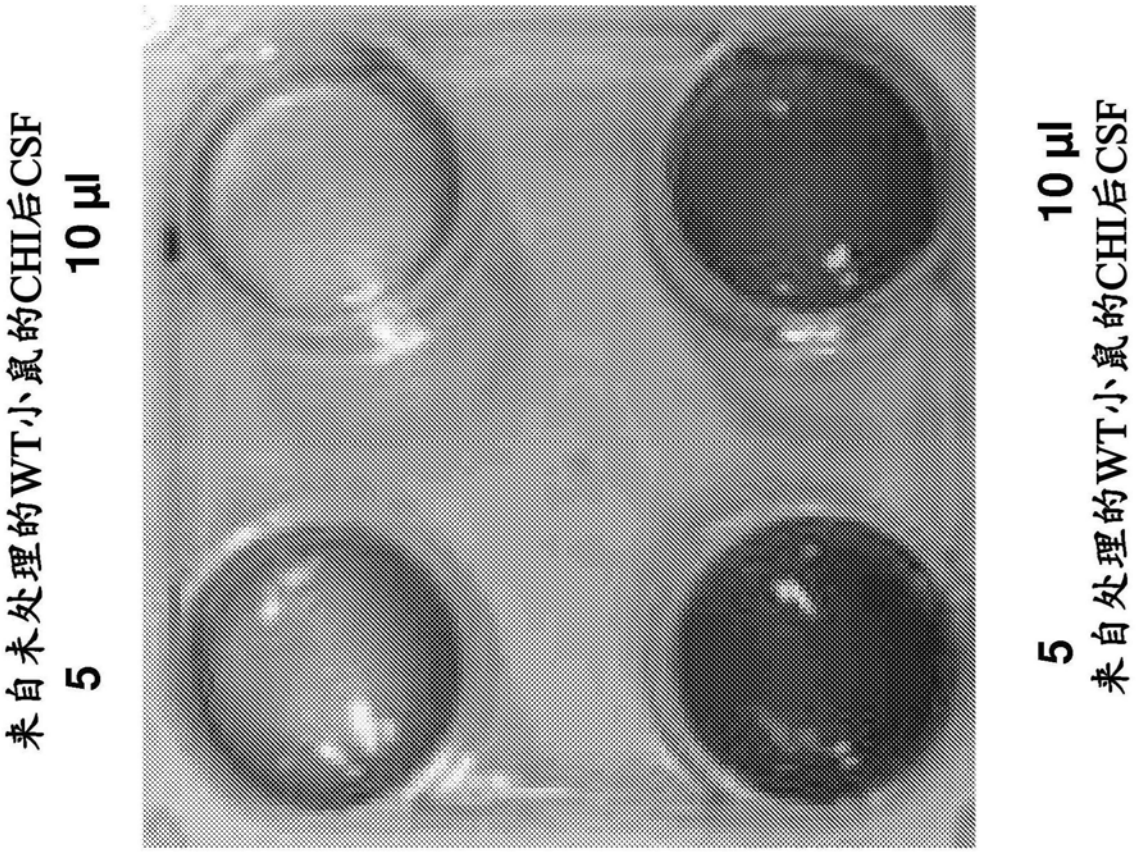

图3E

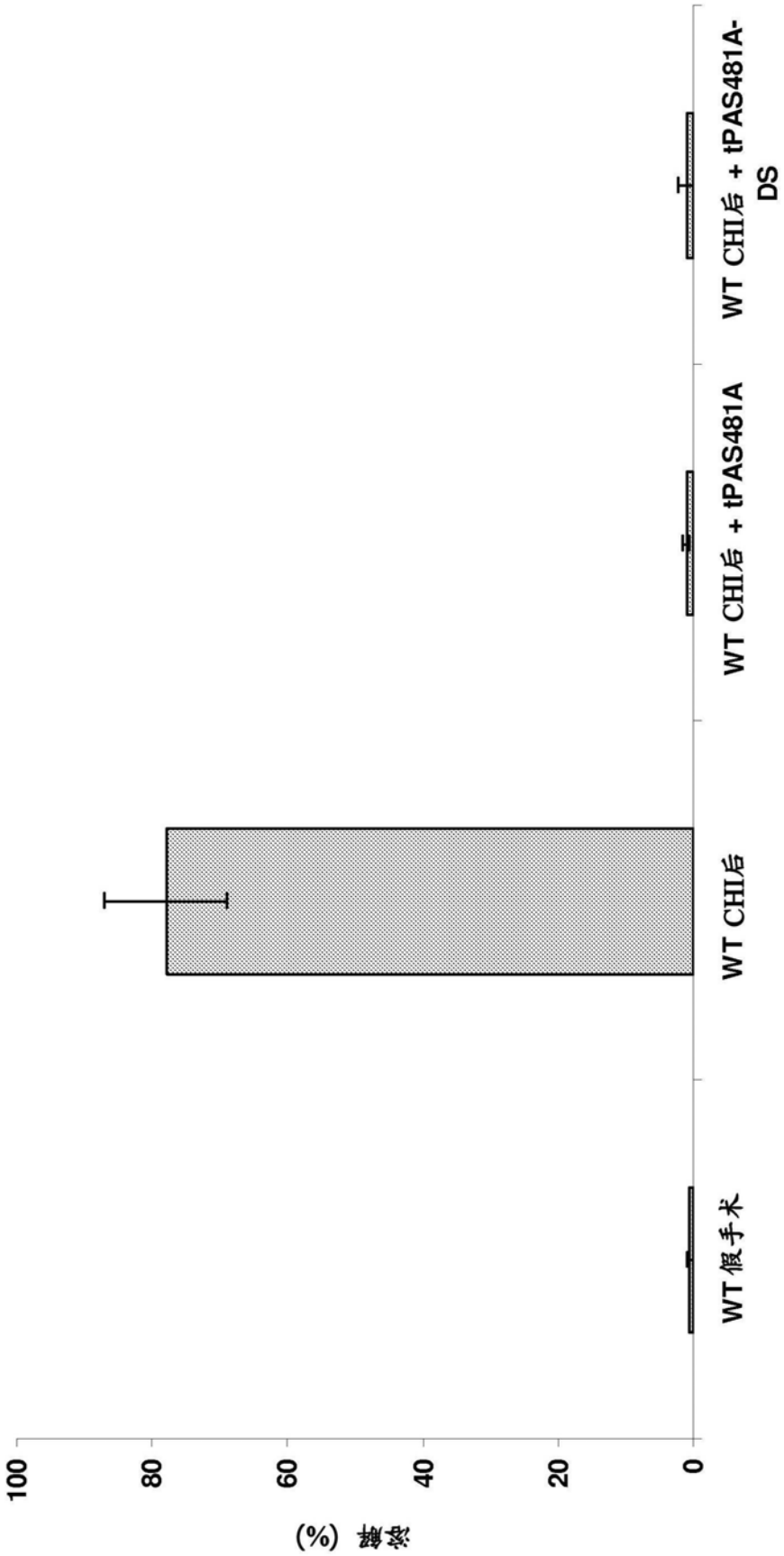
溶解 (%)
100
80
60
40
20
0
WT 假手术
WT CHI后
WT CHI后 + tPAS481A
WT CHI后 + tPAS481A-DS

图3F

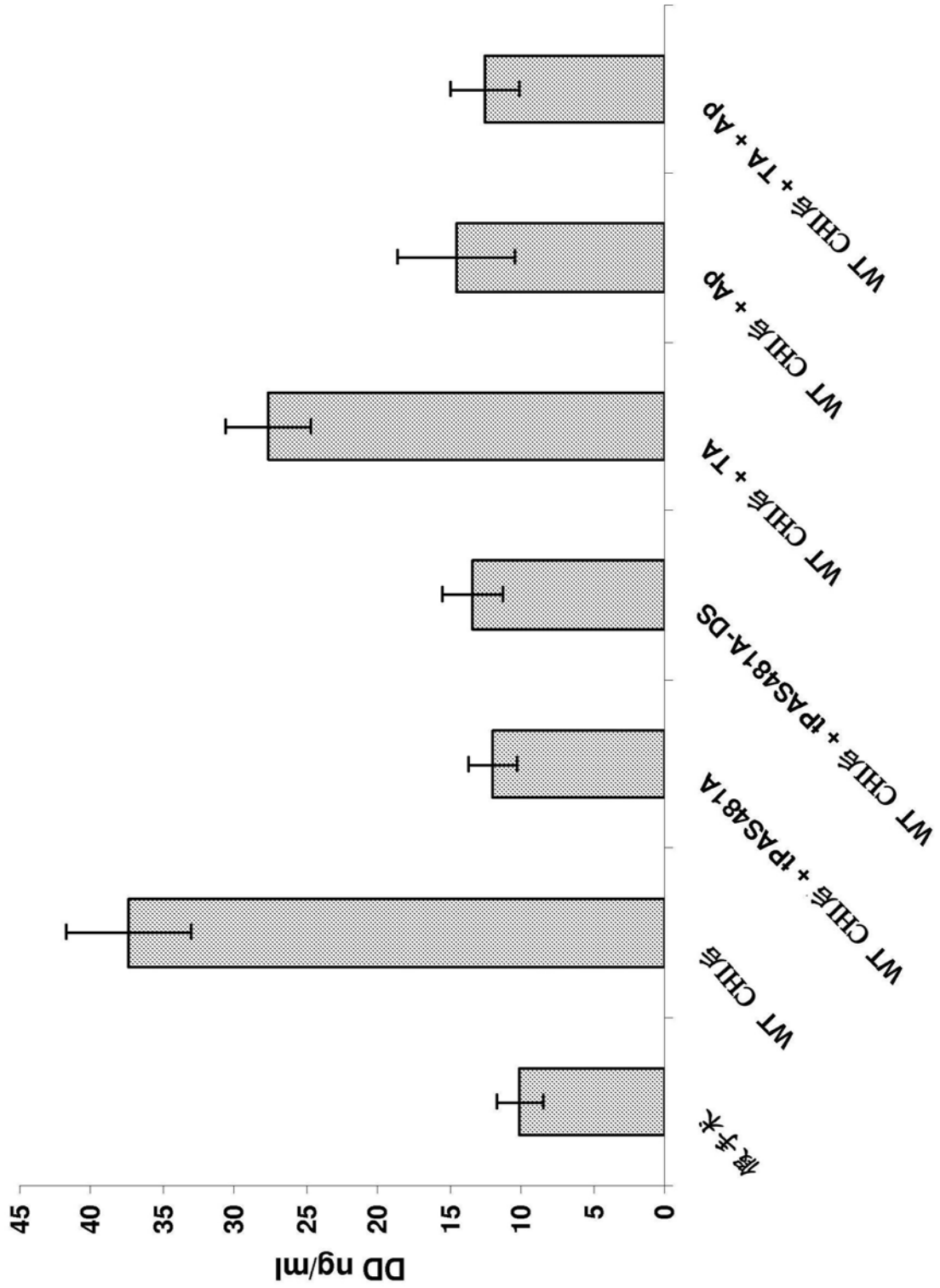
DD ng/ml
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
根尖米
WT CHI后
WT CHI后 + IPAS481A
WT CHI后 + IPAS481A-DS
WT CHI后 + TA
WT CHI后 + AP
WT CHI后 + TA + AP

图4A

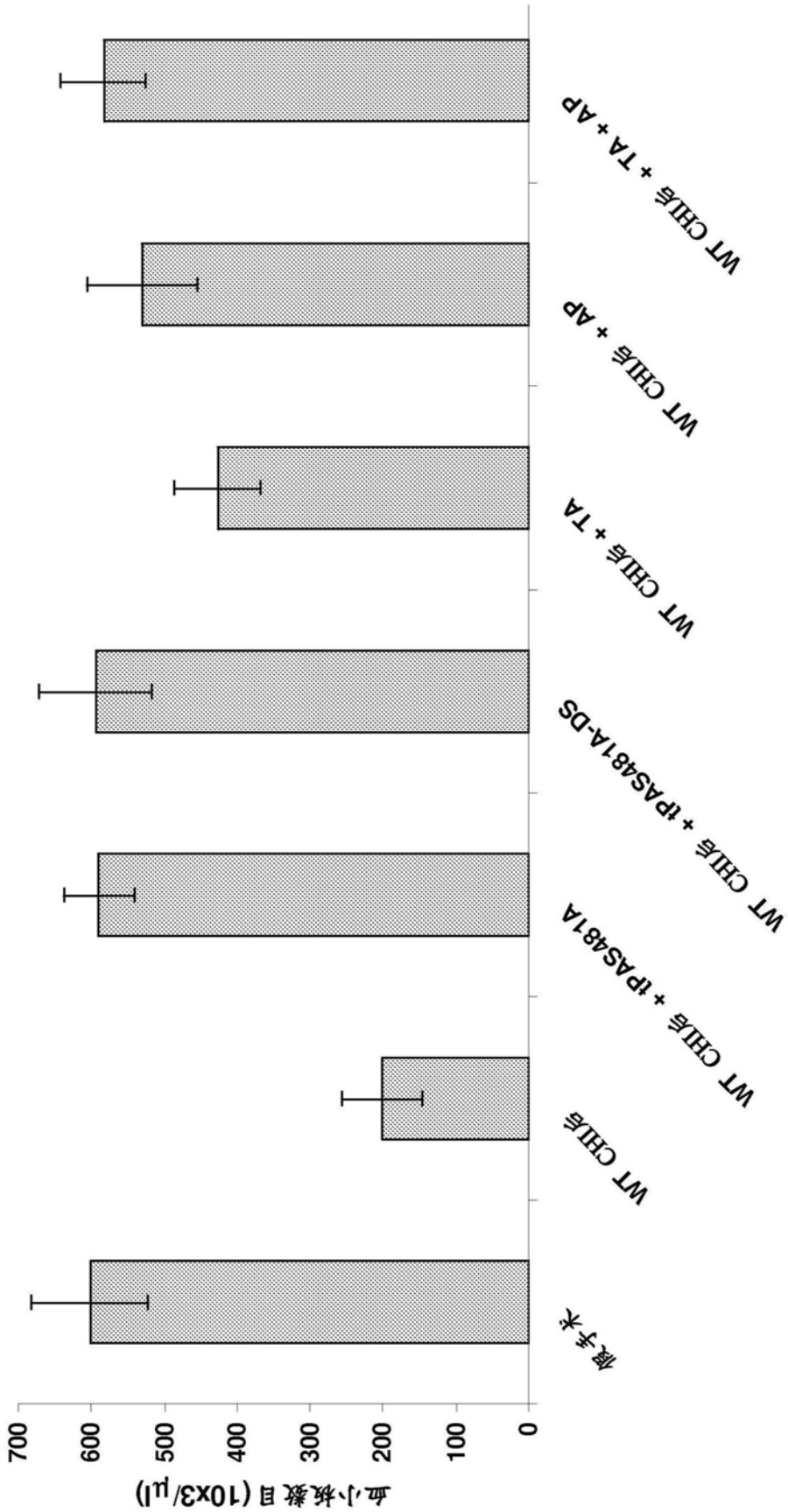
血小板数目 (10x3/μl)
0
100
200
300
400
500
600
700
假手术
WT CHI后
WT CHI后 + tPAS481A
WT CHI后 + tPAS481A-DS
WT CHI后 + TA
WT CHI后 + AP
WT CHI后 + TA + AP

图4B

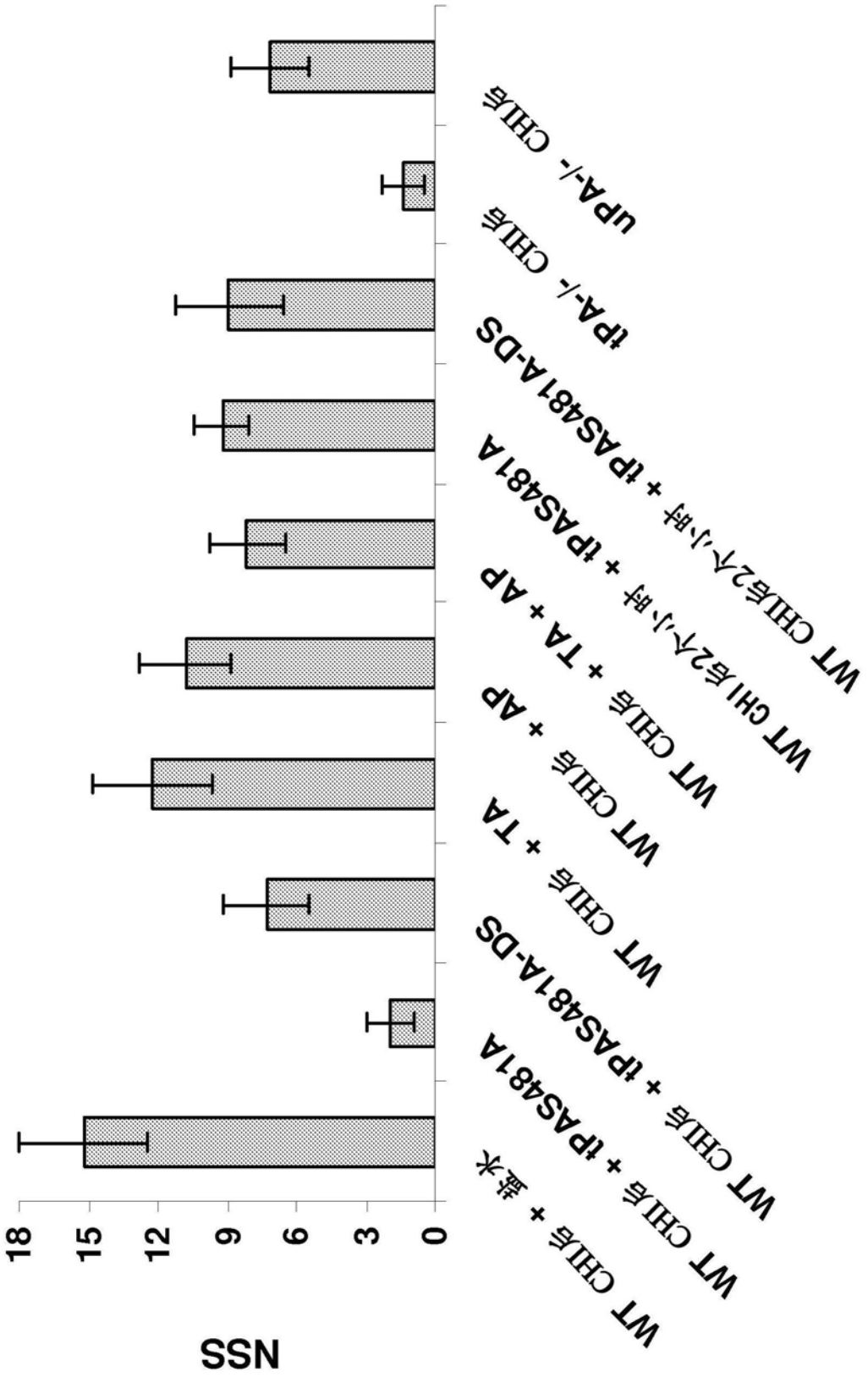
SSN
0
3
6
9
12
15
18
WT CHI后 + 盐水
WT CHI后 + tPAS481A
WT CHI后 + tPAS481A-DS
WT CHI后 + TA
WT CHI后 + AP
WT CHI后 + TA + AP
WT CHI后2小时 + tPAS481A
WT CHI后2小时 + tPAS481A-DS
tPA-/- CHI后
uPA-/- CHI后

图5

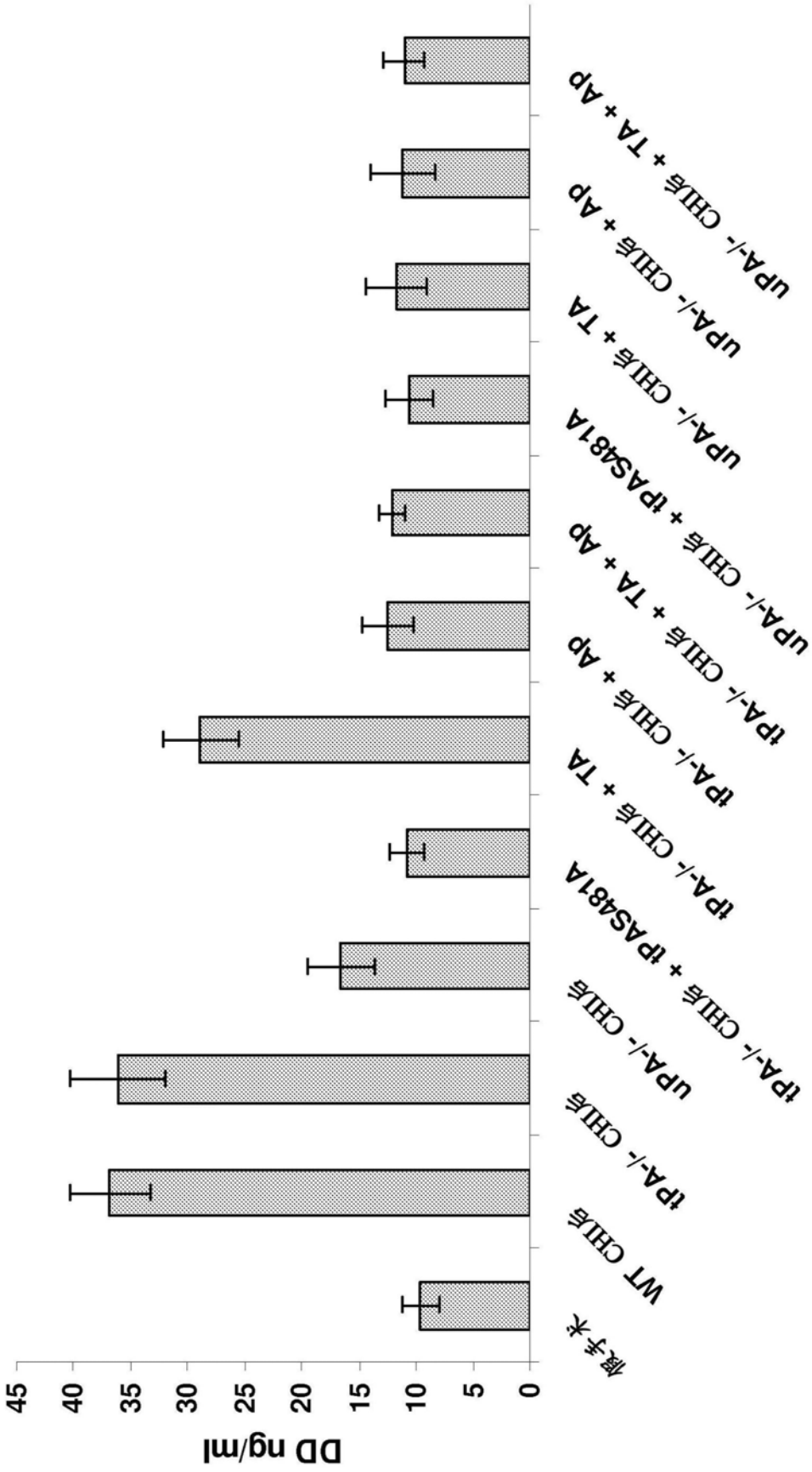
DD ng/ml
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
假手术
WT CHI后
tPA-/- CHI后
uPA-/- CHI后
tPA-/- CHI后 + tPAS481A
tPA-/- CHI后 + TA
tPA-/- CHI后 + AP
tPA-/- CHI后 + TA + AP
uPA-/- CHI后 + tPAS481A
uPA-/- CHI后 + TA
uPA-/- CHI后 + AP
uPA-/- CHI后 + TA + AP

图6A

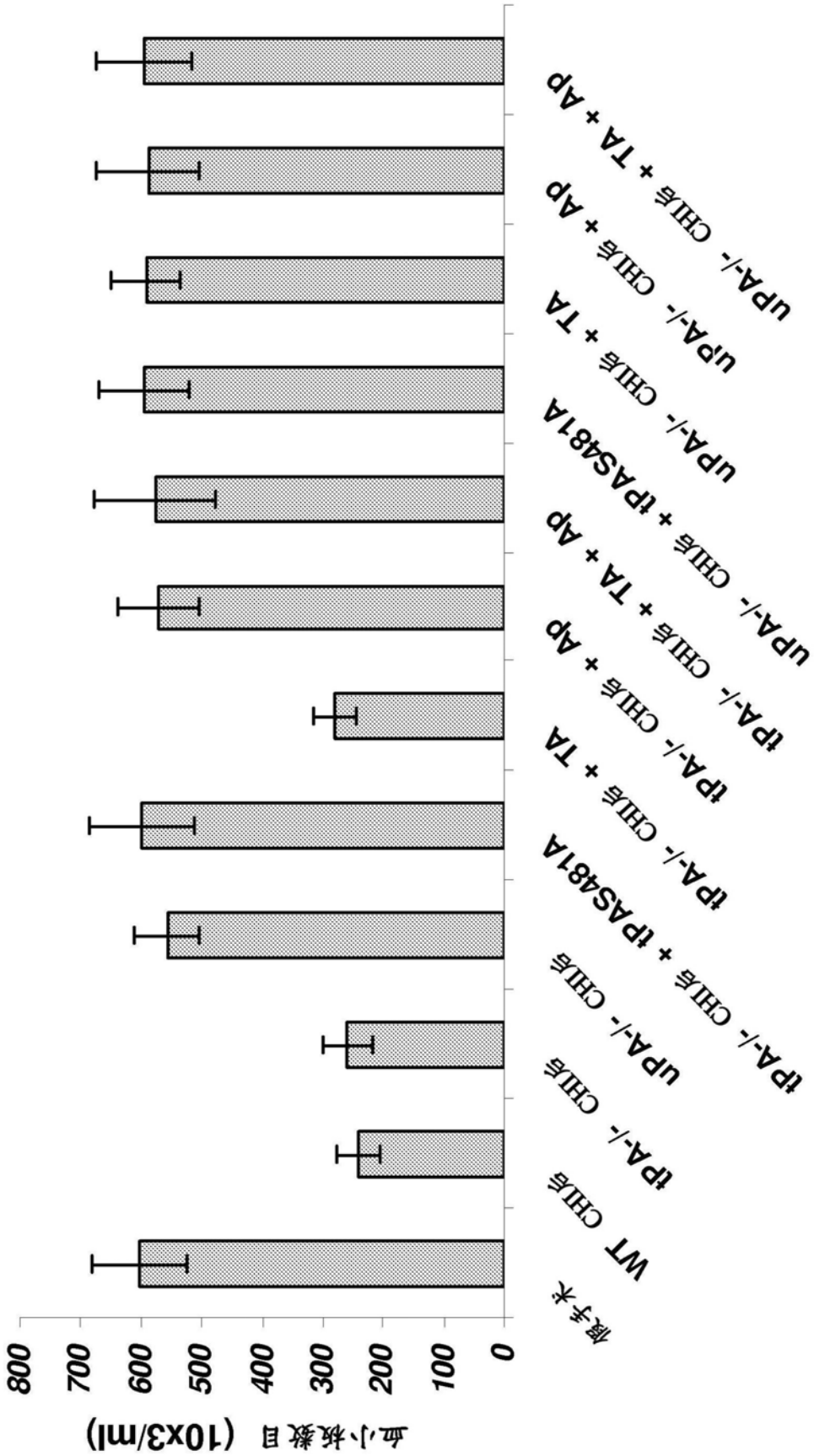
假手术
WT CHI后
tPA-/- CHI后
uPA-/- CHI后
tPA-/- CHI后 + tPAS481A
tPA-/- CHI后 + TA
tPA-/- CHI后 + AP
tPA-/- CHI后 + TA + AP
uPA-/- CHI后 + tPAS481A
uPA-/- CHI后 + TA
uPA-/- CHI后 + AP
uPA-/- CHI后 + TA + AP
0
100
200
300
400
500
600
700
800
血小板数目 (10x3/ml)

图6B

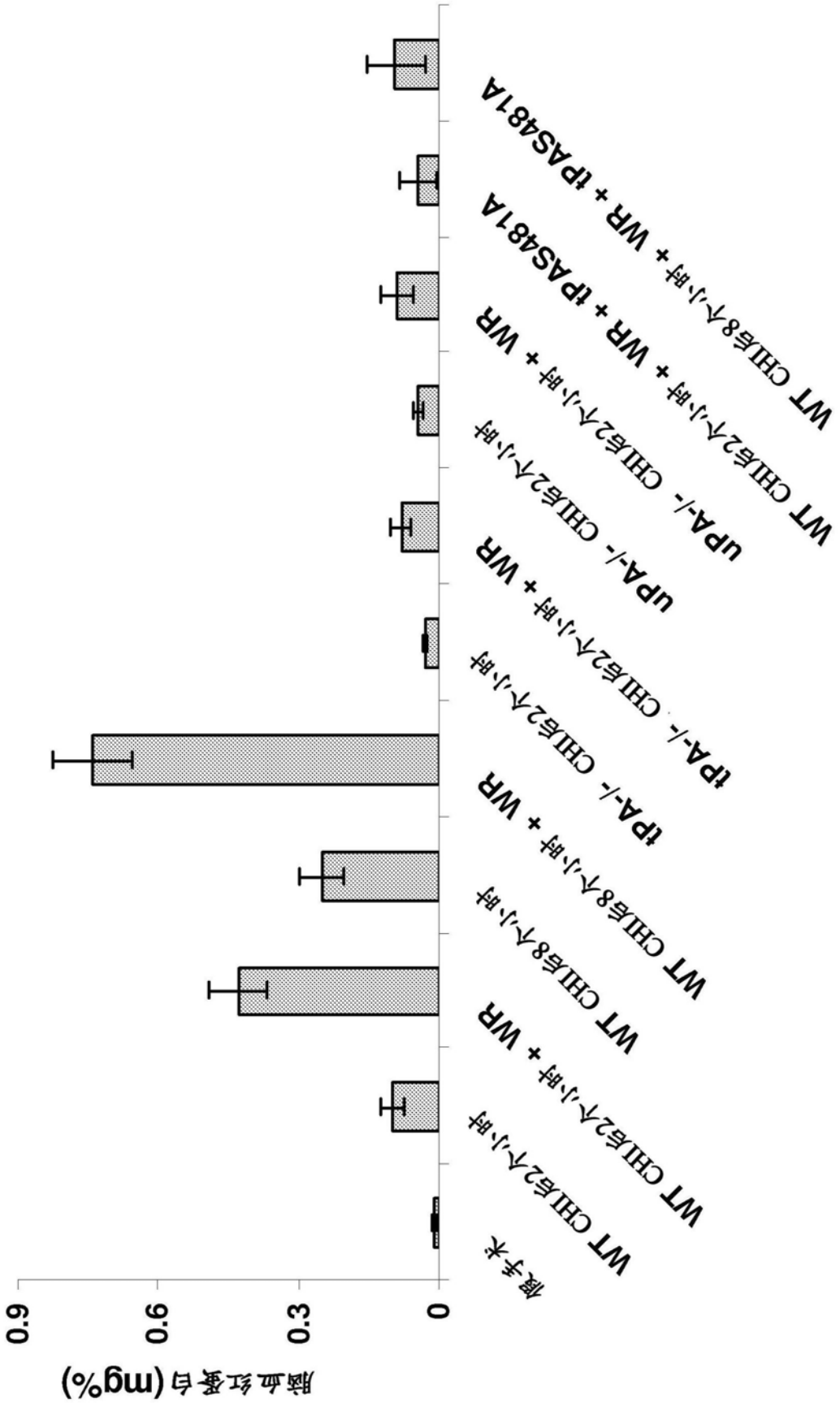
脑血红蛋白(mg%)
0
0.3
0.6
0.9
假手术
WT CHI后2小时
WT CHI后2小时 + WR
WT CHI后8小时
WT CHI后8小时 + WR
tPA-/- CHI后2小时
tPA-/- CHI后2小时 + WR
uPA-/- CHI后2小时
uPA-/- CHI后2小时 + WR
WT CHI后2小时 + WR + tPAS481A
WT CHI后8小时 + WR + tPAS481A

图6C