

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2014 年 12 月 4 日 (04.12.2014)



(10) 国际公布号
WO 2014/190871 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07K 14/745 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)
A61K 38/36 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2014/078108
- (22) 国际申请日: 2014 年 5 月 22 日 (22.05.2014)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201310206823.5 2013 年 5 月 29 日 (29.05.2013) CN
- (71) 申请人: 四川大学 (SICHUAN UNIVERSITY)
[CN/CN]; 中国四川省成都市武侯区一环路南一段 24 号, Sichuan 610065 (CN)。
- (72) 发明人: 宋旭 (SONG, Xu); 中国四川省成都市武侯区一环路南一段 24 号, Sichuan 610065 (CN)。 李灵 (LI, Ling); 中国四川省成都市武侯区一环路南一段 24 号, Sichuan 610065 (CN)。 陈金武 (CHEN, Jinwu); 中国四川省成都市武侯区一环路南一段 24 号,

Sichuan 610065 (CN)。 廖东升 (LIAO, Dongsheng); 中国四川省成都市武侯区一环路南一段 24 号, Sichuan 610065 (CN)。 马登佼 (MA, Dengjiao); 中国四川省成都市武侯区一环路南一段 24 号, Sichuan 610065 (CN)。

(74) 代理人: 成都九鼎天元知识产权代理有限公司 (CHENGDU JIUDINGTIANYUAN INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY LTD.); 中国四川省成都市武侯区洗面桥街 33 号艺墅花乡商务楼 4 楼 405 室/冷亚君, Sichuan 610041 (CN)。

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

[见续页]

(54) Title: HUMAN COAGULATION FACTOR LIGHT-CHAIN PROTEIN AND APPLICATION OF SAME

(54) 发明名称: 人凝血因子轻链蛋白及其应用

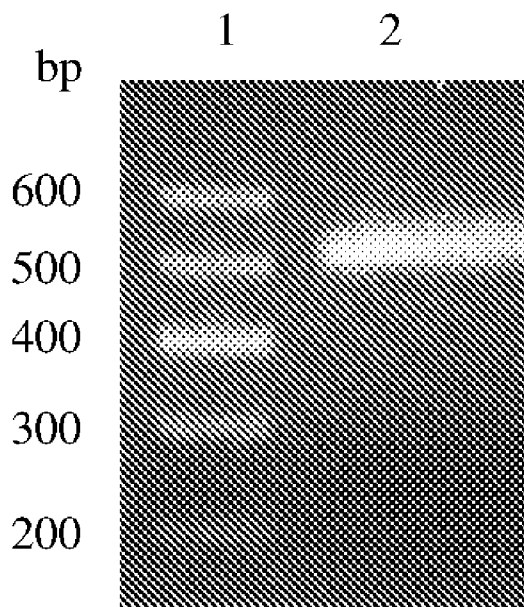


图 1 / FIG. 1

(57) Abstract: The present invention detects, through in vitro inhibitory activity, a minimum inhibitory concentration of a human coagulation factor light-chain protein for different gram-negative bacteria, detects, through in vivo inhibitory activity, an effect of inhibiting gram-negative bacteria by a human coagulation factor light-chain protein, and proves that a human coagulation factor light-chain protein has an obvious effect of inhibiting gram-negative bacteria, so as to facilitate the development of a type of novel drugs for treating gram-negative bacteria infection. It is proved through mass spectrometry and silver staining detection that a human coagulation factor light-chain protein has effects of hydrolyzing and eliminating endotoxins, so as to facilitate the development of a type of novel drugs for treating endotoxemia. The human coagulation factor light-chain protein is a human coagulation factor VII, IX, X light-chain protein, and a protein having a sequence similarity above 50% thereto.

(57) 摘要:

[见续页]

WO 2014/190871 A1



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

根据细则 4.17 的声明:

- 关于发明人身份(细则 4.17(i))
- 关于申请人有权申请并被授予专利(细则 4.17(ii))
- 关于申请人有权要求在先申请的优先权(细则 4.17(iii))

本国际公布:

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

本发明通过体外抑菌活性检测了人凝血因子轻链蛋白抗不同革兰氏阴性菌的最低抑菌浓度, 通过体内抑菌活性检测了人凝血因子轻链蛋白对革兰氏阴性菌的抑制作用, 证明了人凝血因子轻链蛋白对革兰氏阴性菌具有明显的抑制作用, 以便开发出一类治疗革兰氏阴性菌感染的新型药物。通过质谱及银染检测证明了人凝血因子轻链蛋白对内毒素的水解及清除作用, 以便开发出一类治疗内毒素血症的新型药物。所述人凝血因子轻链蛋白为人凝血因子 VII、IX、X 轻链蛋白, 以及与它们具有 50% 以上同源性的蛋白。

说明书

人凝血因子轻链蛋白及其应用

技术领域

本发明属于生物医药领域，特别涉及人凝血因子轻链蛋白及其在制药中的应用。

背景技术

革兰氏阴性菌泛指在革兰氏染色反应中呈现红色的细菌。由于细胞壁结构的不同，在革兰氏染色过程中，不同的染料造成了其与革兰氏阳性菌着色的不同（阳性菌为紫色）。革兰氏阴性菌以大肠杆菌为代表，还有变形杆菌、痢疾杆菌、肺炎杆菌、布氏杆菌、流感（嗜血）杆菌、副流感（嗜血）杆菌、卡他（摩拉）菌、不动杆菌属等等。该类细菌的致病能力往往与其细胞壁的特殊组分——脂多糖（又叫内毒素）相关。在人体当中，脂多糖会诱导机体产生大量细胞因子并激活免疫系统，最终形成有机体对病原菌的先天性免疫应答。例如红肿就是细胞因子大量产生并释放导致的。

在革兰氏阴性菌感染的治疗中，除了清除感染灶及用相应的支持对症治疗外，还需使用抗生素。目前主要采用的是氨基糖苷类、 β -内酰胺类等抗生素。这些抗生素对各种革兰氏阴性菌有强大杀菌作用，而且对于铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯氏菌、大肠埃希氏菌等常见革兰氏阴性杆菌都具有较长时间的抗生素后效应。除了抗生素以外，如前列腺素合成酶抑制剂、左旋咪唑、吞噬肽等也被用于革兰氏阴性菌感染的治疗。然而，随着抗生素的广泛应用，临床出现的抗生素滥用现象导致细菌的耐药性已经从单类耐药发展成为多重耐药，使大量原本能够有效替代的二线抗生素无效。其次，抗菌药物在杀/抑菌的同时会诱导内毒素的产生，增加了疾病的治疗难度，所以尽管不断有新的杀伤力强的抗生素问世及先进的支持疗法出现，革兰氏阴性菌感染所致的内毒素血症的处理仍是临床上棘手的问题，尤其是其 20~30% 的死亡率更是令人难以接受。据报道脂多糖是导致革兰氏阴性菌感染后发生的一系列毒性反应的主要病源物。虽然抗生素对清除细菌具有较好的效果，但对已游离于血液中的脂多糖以及由其持续刺激靶细胞产生的多种有害细胞因子无能为力，所以临床选用抗菌药物时应对药敏实验结果及其诱导内毒素释放的特性进行综合考虑。第三，因为脂多糖在革兰氏阴性菌的细胞壁表面，使得很多旧型抗生素不能有效抑制此类细菌。基于这些原因，近年来人们正在积极开拓治疗革兰氏阴性菌感染的新领域。

抗菌肽(antimicrobial peptides, AMPs) 是指具有抗菌活性的短肽，这类活性肽多数具有热稳定性、强碱性及广谱抗菌等特点。目前人们已经从不同的生物体中鉴定出约 2000 多个 AMPs，这些 AMPs 经诱导而合成，在机体抵抗病原体的入侵方面起着重要的作用，被认为是生物非特异性免疫功能的重要防御成分。因此寻找新型抗革兰氏阴性菌的 AMPs 成为研究的热点与难点。

人凝血因子 VII(human factor VII, hFVII) 是人体内天然存在的蛋白质，其分子量约为 50 kD。其分子包含四个结构域：N 末端膜结合的 γ 羧基谷氨酸结构域 (Gla 结构域)，两个表皮生长因子样结构域 (EGF1、EGF2) 和一个 C 端丝氨酸蛋白酶结构域。它在人体内还存在一些序列同源性较高的类似物，如人凝血因子 IX (human factor IX, hFIX)、人凝血因子 X (human factor

说明书

X, hFX) 等。迄今为止, 尚未见以人凝血因子VII、人凝血因子IX、人凝血因子X三者的轻链作为抑菌药物治疗细菌感染的相关报道及制备治疗革兰氏阴性菌所致的内毒素血症的药物的报道。

发明内容

本发明的目的之一是提供人工制备的人凝血因子轻链蛋白, 本发明的另一目的是证明所述人凝血因子轻链蛋白对革兰氏阴性菌具有抑制作用, 以便开发出一类治疗革兰氏阴性菌感染的新型药物及治疗革兰氏阴性菌所致的内毒素血症的药物。

本发明所述人凝血因子轻链基因所编码的蛋白, 其氨基酸序列为序列表中 SEQ ID NO: 1 所述, 或与 SEQ ID NO: 1 所述氨基酸序列具有 50% 以上的同源性的蛋白。与序列表中 SEQ ID NO: 1 所述的氨基酸序列具有 50% 以上同源性的蛋白的氨基酸序列为序列表中 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 3 所述。

或本发明所述人凝血因子轻链基因所编码的蛋白, 其氨基酸序列为序列表中 SEQ ID NO: 2 所述, 或与 SEQ ID NO: 2 所述氨基酸序列具有 50% 以上的同源性的蛋白。与序列表中 SEQ ID NO: 2 所述的氨基酸序列具有 50% 以上同源性的蛋白的氨基酸序列为序列表中 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 3 所述。

或本发明所述人凝血因子轻链基因所编码的蛋白, 其氨基酸序列为序列表中 SEQ ID NO: 3 所述, 或与 SEQ ID NO: 3 所述氨基酸序列具有 50% 以上的同源性的蛋白。与序列表中 SEQ ID NO: 3 所述的氨基酸序列具有 50% 以上同源性的蛋白的氨基酸序列为序列表中 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 2 所述。

氨基酸序列为序列表中 SEQ ID NO: 1 所述的人凝血因子轻链蛋白命名为 LhFVII, 氨基酸序列为序列表中 SEQ ID NO: 2 所述的人凝血因子轻链蛋白命名为 LhFIX, 氨基酸序列为序列表中 SEQ ID NO: 3 所述的人凝血因子轻链蛋白命名为 LhFX。

上述人凝血因子轻链基因所编码的蛋白, 由原核重组质粒表达而成, 或真核重组质粒表达而成, 或通过化学合成制备。

本发明所述人凝血因子轻链的原核重组质粒、真核重组质粒, 由序列表中 SEQ ID NO: 4 所述的核苷酸序列或与序列表中 SEQ ID NO: 4 所述的核苷酸序列具有 50% 以上同源性的基因分别与原核载体或真核载体构建而成。与序列表中 SEQ ID NO: 4 所述的核苷酸序列具有 50% 以上同源性的基因的核苷酸序列为序列表中 SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 6 所述。所述原核载体为 pET 质粒系统, 包括 pET-14b、pET-19b、pET-21a (+)、pET-28a (+)、pET-42a (+); 所述真核载体为 pcDNA3.1 (+)、pcDNA3.1 (-)。

本发明所述人凝血因子轻链的原核重组质粒、真核重组质粒, 由序列表中 SEQ ID NO: 5 所述的核苷酸序列或与序列表中 SEQ ID NO: 5 所述的核苷酸序列具有 50% 以上同源性的基因分别与原核载体或真核载体构建而成。与序列表中 SEQ ID NO: 5 所述的核苷酸序列具有 50% 以上同源性的基因的核苷酸序列为序列表中 SEQ ID NO: 4 或 SEQ ID NO: 6 所述。所述原核载体为 pET 质粒系统, 包括 pET-14b、pET-19b、pET-21a (+)、pET-28a (+)、pET-42a

说明书

(+); 所述真核载体为 pcDNA3.1 (+)、pcDNA3.1 (-)。

本发明所述人凝血因子轻链的原核重组质粒、真核重组质粒, 由序列表中 SEQ ID NO: 6 所述的核苷酸序列或与序列表中 SEQ ID NO: 6 所述的核苷酸序列具有 50% 以上同源性的基因分别与原核载体或真核载体构建而成。与序列表中 SEQ ID NO: 6 所述的核苷酸序列具有 50% 以上同源性的基因的核苷酸序列为序列表中 SEQ ID NO: 4 或 SEQ ID NO: 5 所述。所述原核载体为 pET 质粒系统, 包括 pET-14b、pET-19b、pET-21a (+)、pET-28a (+)、pET-42a (+); 所述真核载体为 pcDNA3.1 (+)、pcDNA3.1 (-)。

本发明所使用的方法:

(1) 通过 PCR 反应, 获取编码重组 LhFVII、LhFIX、LhFX 蛋白的基因或与它们具有 50% 以上同源性的基因;

(2) 将上述扩增的各基因片段分别插入到原核载体或真核载体构建原核重组质粒或真核重组质粒, 再将原核重组质粒或真核重组质粒转化至感受态细菌中进行培养, 然后筛选出含有正确插入片段的重组质粒测序;

(3) 将测序结果正确的原核重组质粒转化入工程菌中进行表达, 分离纯化表达的蛋白即获得重组 LhFVII 蛋白、LhFIX 蛋白、LhFX 蛋白或与它们具有 50% 以上同源性的蛋白; 或将真核重组质粒转染至哺乳动物细胞进行培养, 建立稳定细胞系进行真核表达, 然后分离纯化的蛋白即获得重组 LhFVII 蛋白、LhFIX 蛋白、LhFX 蛋白或与它们具有 50% 以上同源性的蛋白;

(4) 重组 LhFVII、LhFIX、LhFX 蛋白或与它们具有 50% 以上同源性的蛋白的体外抑菌活性检测;

(5) 重组 LhFVII、LhFIX、LhFX 蛋白或与它们具有 50% 以上同源性的蛋白的体内抑菌活性检测;

(6) 重组 LhFVII、LhFIX、LhFX 蛋白或与它们具有 50% 以上同源性的蛋白水解脂多糖的质谱检测;

(7) 重组 LhFVII、LhFIX、LhFX 蛋白或与它们具有 50% 以上同源性的蛋白水解脂多糖的银染检测;

所述原核载体为 pET 质粒系统, 所述 pET 质粒系统包括 pET-14b、pET-19b、pET-21a(+)、pET-28a(+)、pET-42a(+) 等原核表达质粒; 所述真核载体为 pcDNA3.1 (+)、pcDNA3.1 (-) 等。

人凝血因子轻链蛋白的化学合成通常委托专业公司。

本发明所述 LhFVII、LhFIX、LhFX 蛋白能够水解革兰氏阴性菌的脂多糖 (又称内毒素, 为革兰氏阴性菌外膜的主要成分), 破坏细胞结构的稳定性, 进而起到杀菌的作用。同时, 研究表明轻链蛋白与组织因子具有很强的结合作用。当有机体受到创伤时, 组织因子会大量暴露于伤口处, 使得轻链蛋白随之聚集在伤口处, 起到对伤口的靶向抑菌作用。体外抑制革兰氏阴性菌活性检测表明: LhFVII、LhFIX、LhFX 蛋白体对革兰氏阴性菌具有明显的抑制作用, 它们对大肠杆菌 DH5 α 、大肠杆菌 BL21、绿脓杆菌、肺炎克雷伯氏菌、阴沟肠杆菌、嗜水气单胞菌、异型枸橼酸杆菌、卡他莫拉菌、奇异变形杆菌、普通变形杆菌、粘质沙雷氏

说明书

杆菌的最低抑菌浓度（MIC）如下：

菌种	MIC (μg/mL)		
	LhFVII	LhFIX	LhFX
大肠杆菌 DH5α	25	25	25
大肠杆菌 BL21	50	50	50
绿脓杆菌	25	25	25
肺炎克雷伯氏菌	25	25	25
阴沟肠杆菌	25	50	50
嗜水气单胞菌	25	25	25
异型枸橼酸杆菌	50	50	25
卡他莫拉菌	25	25	25
奇异变形杆菌	25	25	25
普通变形杆菌	50	50	25
粘质沙雷氏杆菌	25	50	25

LhFVII、LhFIX、LhFX 蛋白在动物体内的抑菌活性检测表明：LhFVII、LhFIX、LhFX 蛋白对动物体内的革兰氏阴性菌具有明显的抑制作用，可以使受到致死剂量绿脓杆菌感染的小鼠在14天保持100%的存活率，并且未感染绿脓杆菌的小鼠在注射所述蛋白后，全部存活，说明本发明所述LhFVII、LhFIX、LhFX 蛋白本身免疫原性低，毒性小。

本发明所述 LhFVII、LhFIX、LhFX 蛋白能够水解革兰氏阴性菌的脂多糖（又称内毒素，见实施例 12、13），而脂多糖是导致内毒素血症的主要病源物，因而本发明所述 LhFVII、LhFIX、LhFX 蛋白可在制备治疗革兰氏阴性菌所致的内毒素血症的药物中应用。

本发明具有以下有益效果：

1、本发明提供的人工制备的人凝血因子轻链蛋白，能够水解革兰氏阴性菌的外膜、破坏其细胞结构的稳定性，对革兰氏阴性菌具有明显的抑制作用，因而为革兰氏阴性菌感染所致疾病提供了一类新型治疗药物。

2、本发明提供的人工制备的人凝血因子轻链蛋白，能够水解革兰氏阴性菌的脂多糖（又称内毒素），因而为革兰氏阴性菌所致的内毒素血症提供了一类新型治疗药物。

3、本发明提供的人工制备的人凝血因子轻链蛋白，能够通过与 TF 的结合靶向定位在有机体伤口部位，对伤口部位的革兰氏阴性菌具有良好的靶向杀菌效果，有望用于制备新型的靶向抗菌药物。

4、人凝血因子VII、IX、X 轻链蛋白是人体中固有的天然成分，本发明以其为抑菌结构域可以有效降低药物的免疫源性。

5、由于可以直接通过基因工程技术在大肠杆菌工程菌细胞内准确表达重组人凝血因子轻链蛋白，因而生产成本较低，有利于工业化生产。

附图说明

说明书

图1是实施例1所述编码重组蛋白LhFVII基因序列PCR扩增电泳图，图中，1泳道：DNA分子量标记（Marker1，购自天根公司）；2泳道：编码LhFVII的序列。

图2是实施例2所述编码重组蛋白LhFIX基因序列PCR扩增电泳图，图中，1泳道：DNA分子量标记（Marker1，购自天根公司）；2泳道：编码LhFIX的序列。

图3是实施例3所述编码重组蛋白LhFX基因序列PCR扩增电泳图，图中，1泳道：DNA分子量标记（Marker1，购自天根公司）；2泳道：编码LhFX的序列。

图4是实施例4所述原核重组质粒pET19blhfVII的示意图，其中，逆时针序列为正向基因片段，顺时针为反向基因片段。

图5是实施例4所述原核重组质粒pET19blhfIX的示意图，其中，逆时针序列为正向基因片段，顺时针为反向基因片段。

图6是实施例4所述原核重组质粒pET19blhfX的示意图，其中，逆时针序列为正向基因片段，顺时针为反向基因片段。

图7是实施例4中重组质粒pET19blhfVII的限制性内切酶酶切片段电泳鉴定图，其中，1泳道：DNA分子量标记（Marker1+1 kb Marker，购自天根公司）；2泳道：用限制性内切酶双酶切重组质粒pET19blhfVII后所得的pET19b载体片段和编码重组LhFVII蛋白的DNA片段。

图8是实施例4中重组质粒pET19blhfIX的限制性内切酶酶切片段电泳鉴定图，其中，1泳道：DNA分子量标记（1kb Marker，购自天根公司）；泳道2：DNA分子量标记（Marker 1，购自天根公司）；3泳道：用限制性内切酶双酶切重组质粒pET19blhfIX后所得的pET19b载体片段和编码重组LhFIX蛋白的DNA片段。

图9是实施例4中重组质粒pET19blhfX的限制性内切酶酶切片段电泳鉴定图，其中，1泳道：DNA分子量标记（Marker1，购自天根公司）；2泳道：DNA分子量标记（1Kb Marker，购自天根公司）；3泳道：用限制性内切酶双酶切重组质粒pET19blhfX后所得的pET19b载体片段和编码重组LhFX蛋白的DNA片段。

图10是实施例5中重组质粒pET19blhfVII在大肠杆菌中诱导表达重组LhFVII蛋白的SDS-PAGE分析图，其中，1泳道：蛋白质分子量标记（Unst.Protein Marker，购自Thermo Scientific）；2泳道：诱导之前未表达重组LhFVII蛋白的菌体总蛋白；3泳道：诱导表达重组LhFVII蛋白后的菌体总蛋白，箭头指示为表达出的重组LhFVII蛋白。

图11是实施例5中重组质粒pET19blhfIX在大肠杆菌中诱导表达重组LhFIX蛋白的SDS-PAGE分析图，其中，1泳道：蛋白质分子量标记（Unst.Protein Marker，购自Thermo Scientific）；2泳道：诱导之前未表达重组LhFIX蛋白的菌体总蛋白；3泳道：诱导表达重组LhFIX蛋白后的菌体总蛋白，箭头指示为表达出的重组LhFIX蛋白。

图12是实施例5中重组质粒pET19blhfX在大肠杆菌中诱导表达重组LhFX蛋白的SDS-PAGE分析图，其中，1泳道：蛋白质分子量标记（Unst.Protein Marker，购自Thermo Scientific）；2泳道：诱导之前未表达重组LhFX蛋白的菌体总蛋白；3泳道：诱导表达重组LhFX蛋白后的菌体总蛋白，箭头指示为表达出的重组LhFX蛋白。

说明书

图13是实施例5中诱导表达的重组LhFVII蛋白的western-blot鉴定分析图。

图14是实施例5中诱导表达的重组LhFIX蛋白的western-blot鉴定分析图。

图15是实施例5中诱导表达的重组LhF X蛋白的western-blot鉴定分析图。

图16是实施例6中经亲和层析法纯化的重组LhFVII蛋白的SDS-PAGE鉴定分析图,其中,1泳道:蛋白质分子量标记(Unst.Protein Marker,购自Thermo Scientific);2泳道:纯化后重组LhFVII蛋白。

图17是实施例6中经亲和层析法纯化的重组LhFIX蛋白的SDS-PAGE鉴定分析图,其中,1泳道:蛋白质分子量标记(Unst.Protein Marker,购自Thermo Scientific);2泳道:纯化后重组LhFIX蛋白。

图18是实施例6中经亲和层析法纯化的重组LhF X蛋白的SDS-PAGE鉴定分析图,其中,1泳道:蛋白质分子量标记(Unst.Protein Marker,购自Thermo Scientific);2泳道:纯化后重组LhF X蛋白。

图19是实施例7所述真核重组质粒pcDNA3.1-LhFVII的示意图,其中,逆时针序列为正向基因片段,顺时针为反向基因片段。

图20是实施例7所述真核重组质粒pcDNA3.1-LhFIX的示意图,其中,逆时针序列为正向基因片段,顺时针为反向基因片段。

图21是实施例7所述真核重组质粒pcDNA3.1-LhF X的示意图,其中,逆时针序列为正向基因片段,顺时针为反向基因片段。

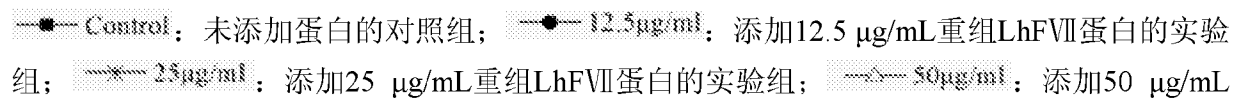
图22是实施例10所述重组LhF VII蛋白对大肠杆菌DH5 α 作用的生长曲线,其中,

 Control: 未添加蛋白的对照组;  12.5 μg/ml: 添加12.5 μg/mL重组LhFVII蛋白的实验组;  25 μg/ml: 添加25 μg/mL重组LhFVII蛋白的实验组;  50 μg/ml: 添加50 μg/mL重组LhFVII蛋白的实验组。

图23是实施例10所述重组LhF IX蛋白对大肠杆菌DH5 α 作用的生长曲线,其中,

 Control: 未添加蛋白的对照组;  12.5 μg/ml: 添加12.5 μg/mL重组LhFIX蛋白的实验组;  25 μg/ml: 添加25 μg/mL重组LhFIX蛋白的实验组;  50 μg/ml: 添加50 μg/mL重组LhFIX蛋白的实验组。

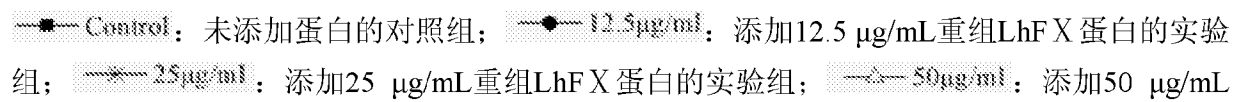
图24是实施例10所述重组LhF X蛋白对大肠杆菌DH5 α 作用的生长曲线,其中,

 Control: 未添加蛋白的对照组;  12.5 μg/ml: 添加12.5 μg/mL重组LhF X蛋白的实验组;  25 μg/ml: 添加25 μg/mL重组LhF X蛋白的实验组;  50 μg/ml: 添加50 μg/mL重组LhF X蛋白的实验组。

图25是实施例11所述重组LhFVII蛋白提高感染致死剂量绿脓杆菌小鼠存活率的曲线,其中,  Control: 未注射药物的感染小鼠;  美罗培南: 注射美罗培南的感染小鼠;  盘尼西林: 注射盘尼西林的感染小鼠;  LhFVII: 注射重组LhFVII蛋白的感染小鼠。

图26是实施例11所述重组LhFIX蛋白提高感染致死剂量绿脓杆菌小鼠存活率的曲线,其中,  Control: 未注射药物的感染小鼠;  盘尼西林: 注射盘尼西林的感染小鼠;

说明书

✕ 美罗培南：注射美罗培南的感染小鼠；✕ LhFIX：注射重组LhFIX蛋白的感染小鼠。

图27是实施例11所述重组LhF X蛋白提高感染致死剂量绿脓杆菌小鼠存活率的曲线，其中，✕ Control：未注射药物的感染小鼠；✕ 盘尼西林：注射盘尼西林的感染小鼠

✕ 美罗培南：注射美罗培南的感染小鼠；✕ LhFX：注射重组LhF X蛋白的感染小鼠。

图28是实施例12所述重组LhFVII蛋白水解LPS的质谱检测图谱，其中上层图谱为LhFVII蛋白质谱图；中层为未处理的LPS质谱图；下层为LhFVII蛋白处理LPS后的质谱图。

图29是实施例13所述重组LhFVII蛋白水解LPS的银染检测图谱，其中1泳道：蛋白预染marker；2泳道：重组LhFVII蛋白；3泳道：未经处理的*E. coli* K12 LPS；4泳道：LhFVII处理后的*E. coli* K12 LPS。

具体实施方式

以下结合实施例对本发明作进一步说明。下属实施例中，凡未注明具体实验条件的，均为按照本领域技术人员熟知的常规条件，例如 Sambrook 等著《分子克隆：实验室手册》(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)，实验动物常规手册(国家实验动物规范中心, 2004 年 11 月)；基本技术指南第五版 (John Wiley & Sons, Inc, 2005) 中所述的条件及实验步骤，或按照制造厂商所建议的条件及实验步骤。

实施例 1：获取重组 LhFVII 蛋白编码的基因

1、合成如下所示 PCR 扩增引物（由英俊生物技术有限公司合成）：

引物 1：

5'-TAACCATGGGCCATCATCATCATCACGCCAACGCGTTCCTGGAGGA-3'

Nco I

引物 2：

5'-TATCTCGAGTTA TCGGCCTTGGGGTTTGCTGGCATT-3'

Xho I

2、PCR 扩增体系

以含有人凝血因子 VII CDS 区的质粒（广州复能基因有限公司）为模板，用引物 1 和引物 2 进行 PCR 扩增。引物 1 序列中引入 Nco I 酶切位点以及 His×6 蛋白纯化标签，引物 2 序列中引入 Xho I 酶切位点。扩增后得到长 497bp、含有人凝血因子 VII 轻链编码序列的 DNA 片段。PCR 反应体系（50 μL）如下：

去离子水：	31.5 μL
5×反应buffer：	10 μL
dNTP Mix：	4 μL
引物1（10 mM）：	1 μL
引物2（10 mM）：	1 μL
含人凝血因子 VII CDS 区质粒（100 ng/μL）：	2 μL
PrimeStar DNA 聚合酶：	0.5 μL

说明书

3、PCR扩增反应条件

参照 PrimeStar DNA 聚合酶（购自 Takara 公司）的说明书设置 PCR 扩增反应条件：98℃预变性 2 min，98℃变性 10 sec、55℃复性 15 sec、72℃延伸 50 sec，30 个循环后 72℃延伸 4 min。

4、扩增产物经2%琼脂糖凝胶电泳分析（见图1），并按胶回收试剂盒（购自Omega公司）的说明回收片段。

实施例 2：获取重组 LhFIX 蛋白的编码基因

1、合成如下所示 PCR 扩增引物（由英俊生物技术有限公司合成）：

引物 1：

5'-ATACCATGGGCCATCATCATCATCATCATATTATAATTCAGGTAAATTGGAAG-3'

Nco I

引物 2：

5'-ATTCTCGAGTTAACGGGTGAGCTTAGAAGTTTGT-3'

Xho I

2、PCR扩增体系

以含有人凝血因子 IX CDS 区的质粒（广州复能基因有限公司）为模板，用引物1和引物2进行PCR扩增。引物1序列中引入Nco I酶切位点以及His×6蛋白纯化标签，引物2序列中引入Xho I酶切位点。扩增后得到长476bp、含有人凝血因子 IX 轻链编码序列的DNA片段。PCR反应体系（50 μL）如下：

去离子水：	31.5 μL
5×反应buffer：	10 μL
dNTP Mix：	4 μL
引物1（10 mM）：	1 μL
引物2（10 mM）：	1 μL
含人凝血因子 IX CDS 区的质粒（100 ng/μL）：	2 μL
PrimeStar DNA聚合酶：	0.5 μL

3、PCR扩增反应条件

参照 PrimeStar DNA 聚合酶的说明书设置 PCR 扩增反应条件：98℃预变性 2 min，98℃变性 10 sec、55℃复性 15 sec、72℃延伸 50 sec，30 个循环后 72℃延伸 4 min。

4、扩增产物经2%琼脂糖凝胶电泳分析（见图2），并按胶回收试剂盒（购自Omega公司）的说明回收片段。

实施例 3：获取重组 LhF X 蛋白的编码基因

1、合成如下所示 PCR 扩增引物，（由英俊生物技术有限公司合成）：

引物 1：

5'-ATACCATGGGCCATCATCATCATCATCATGCCAATTCCTTTCTTGAAGAG-3'

说明书

Nco I

引物 2:

5'-ATTCTCGAGTTAGCGTTCCAGGGTCTGTTTCC-3'

Xho I

2、PCR扩增体系

以含有人凝血因子X CDS区的质粒（广州复能基因有限公司）为模板，用引物1和引物2进行PCR扩增。引物1序列中引入Nco I酶切位点以及His×6蛋白纯化标签，引物2序列中引入Xho I酶切位点。扩增后得到长458bp、含有人凝血因子X轻链编码序列的DNA片段。PCR反应体系（50 μL）如下：

去离子水:	31.5 μL
5×反应buffer:	10 μL
dNTP Mix:	4 μL
引物1（10 mM）:	1 μL
引物2（10 mM）:	1 μL
含人凝血因子X CDS区的质粒（100 ng/μL）:	2 μL
PrimeStar DNA聚合酶:	0.5 μL

3、PCR扩增反应条件

参照 PrimeStar DNA 聚合酶说明书设置 PCR 扩增反应条件：98℃预变性 2 min，98℃变性 10 sec、55℃复性 15 sec、72℃延伸 50 sec，30 个循环后 72℃延伸 4 min。

4、扩增产物经2%琼脂糖凝胶电泳分析（见图3），并按胶回收试剂盒（购自Omega公司）的说明回收片段。

实施例4：表达重组LhFVII、LhFIX、LhFX蛋白的原核重组质粒的构建

1、基因片段与原核表达载体的预处理

用限制性内切酶 *Nco I* 及 *Xho I*（均购自 TaKaRaFermentas 公司）分别双酶切实施例 1 克隆的 LhFVII基因片段、实施例 2 克隆的 LhFIX基因片段、实施例 3 克隆的 LhFX基因片段以及原核表达载体 pET19b（Novagen 公司产品），37℃过夜，反应体系如下：

试 剂	<i>LhF VII</i> (μL)	<i>LhF IX</i> (μL)	<i>LhF X</i> (μL)	pET19b (μL)
DNA	20	20	20	20
<i>Nco I</i>	1	1	1	1
<i>Xho I</i>	1	1	1	1
10×缓冲液	6	6	6	6
双蒸水	2	2	2	2
总体积	30	30	30	30

双酶切结束后，反应产物经1%琼脂糖凝胶电泳，在凝胶成像系统的紫外灯下，按胶回收试剂盒（购自Omega公司）的说明回收片段。

说明书

2、*LhF VII*、*LhF IX*、*LhF X*基因与pET19b原核表达载体的连接与转化

(1) 将上述步骤中所获得的 *LhF VII*、*LhF IX*、*LhF X*基因片段及原核载体片段粗略定量后，按基因片段与原核载体的分子数比为 3:1 的连接反应原则进行连接实验，反应体系如下：

试 剂	体 积 (μL)
pET19b DNA	1.5
<i>LhF VII</i> 或 <i>LhF IX</i> 或 <i>LhF X</i> DNA	7
T4 连接酶	0.5
10 × 缓冲液	1
总体积	10

(2) 整个反应过程在 T4 DNA 连接酶（购自 Fermentas 公司）作用下在 16℃ 反应过夜。使上述扩增的 3 种基因片段分别插入到 pET19b 原核表达载体中，所构建的原核重组质粒结构图见图 4-图 6。

(3) 将连接产物分别转化大肠杆菌 Top10（购自 Invitrogen 公司）的感受态细胞（按《分子克隆操作指南》自制）。连接产物的转化方法主要步骤如下：

1) 取连接产物 5 μL 加入大肠杆菌 Top10 的感受态细胞 100 μL 置于 1.5 mL Ep 管中，阴性对照为大肠杆菌 Top10 的感受态细胞 100 μL 置于 1.5 mL Ep 管中；

2) 置于冰上 30 min；

3) 42℃ 循环金属浴 90s；

4) 快速将管转至冰浴中，冷却 2 min；

5) 加 900 μL SOC 培养基（蛋白胨 10 g，酵母浸出物 5 g，NaCl 0.5 g，KCl 0.186 g，MgCl₂ 0.95 g，用 ddH₂O 溶解后定容于 980 ml，高压灭菌，待冷却至室温后加入无菌 20%葡萄糖 20 mL），置于冰上；

6) 37℃，180 rpm 振荡培养 1 h；

7) 将菌液 4000 × g 离心 3 min，留 200 μL 上清，倒去多余培养基后，用余下的 200 μL 重悬细菌；

8) 将重悬的转化细菌均匀涂布于含 0.1 g/mL 氨苄青霉素的固体 LB 培养基上，置 37℃ 恒温培养箱培养过夜。

3、重组质粒的鉴定

挑取上述转化的大肠杆菌 Top 单克隆少量培养后用质粒提取试剂盒（购自 OMEGA）提取质粒，进行 Nco I/Xho I 双酶切鉴定。双酶切产物经凝胶电泳鉴定后，3 种重组质粒的限制性内切酶酶切片段电泳鉴定图如图 7-图 9 所示。酶切产物所形成的两条带，与预期产物大小相符，说明质粒构建成功。

将双酶切鉴定无误的质粒送北京华大基因研究中心对插入的融合基因片段进行测序，最后将测序结果正确的含 *LhF VII* 基因的原核重组质粒命名为 pET19bLhfVII，含 *LhF IX* 基因的原核重组质粒命名为 pET19bLhfIX，含 *LhF X* 基因的原核重组质粒命名为 pET19bLhfX。

说明书

实施例5：原核重组质粒在大肠杆菌中的表达

1、将实施例4构建的重组质粒pET19bLhFVII、pET19bLhFIX、pET19bLhFX分别转化大肠杆菌BL21(DE3)（购自Invitrogen），挑取单克隆于含0.1 g/mL 氨苄青霉素的LB培养基中，37℃ 185 rpm振荡培养至OD₆₀₀≈0.6，取1 mL菌液冻于-20℃。然后在剩余的菌液中加入终浓度0.8 mM的IPTG（异丙基-β-D-硫代半乳糖苷）继续培养6 h，取1 mL菌液冻于-20℃。

2、将上述IPTG诱导前、诱导后的样品在5%的浓缩胶和12%的分离胶中进行SDS-PAGE电泳检测，分析目的蛋白的表达情况，3种重组质粒在大肠杆菌中诱导表达重组蛋白的SDS-PAGE分析图分别见图10-图12。结果显示蛋白正常表达。

3、对目的蛋白进行Western-blot鉴定。将凝胶上的蛋白质电转移到硝酸纤维素滤膜（GE）上，电转移后的膜用封闭液（约5%的PBST脱脂奶粉）室温摇床震荡封闭处理2 h；再分别加入小鼠抗FVII、小鼠抗FIX、小鼠抗FX单克隆抗体（Santa公司产品）反应液，4℃过夜；充分洗涤后再加入酶标二抗（羊抗鼠IgG），室温摇床震荡作用2 h；充分洗涤后加ECL（Thermo）反应液反应5 min后，胶片曝光显色，诱导表达的3种重组蛋白的western-blot鉴定分析图分别如图13-图15所示。

结果显示IPTG诱导后融合蛋白有明显表达，将表达LhF VII的菌株命名为LhF VII-pET19bBL21-(DE3)，表达LhFIX的菌株命名为LhFIX-pET19bBL21-(DE3)，表达LhFX的菌株命名为LhFX-pET19bBL21-(DE3)。

实施例6：重组LhFVII、LhFIX、LhFX蛋白的亲和层析纯化

1、按照实施例5中的方法大规模培养LhF VII-pET19bBL21-(DE3)、LhF IX-pET19bBL21-(DE3)、LhF X-pET19bBL21-(DE3)细菌，并添加IPTG诱导，于18℃、175 rpm震荡培养过夜。

2、将上述菌液4000 × g 离心3 min收集菌体。用EW buffer（20 mM磷酸钠，500 mM NaCl，1mM DTT，0.1mM PMSF，pH7.4）重悬洗涤菌体沉淀。4000 × g离心3 min，弃上清。再用10 mL EW buffer重悬菌体。

3、超声波破碎菌体（功率：300 W；超声时间：10 s；间隔时间：10 s；总超声时间：3 min；冰浴中进行）。超声结束后，将菌液于4℃，48400 × g离心30 min，收集上清，置于冰上。

3、按Co²⁺纯化系统（Talon Metal Affinity Resin，Clontech公司产品）说明书预装层析柱，并上样。10ml EW洗涤柱子两次，并用10 mM咪唑溶液清洗杂蛋白。最后以100 mM咪唑洗脱蛋白，经亲和层析法纯化的3种重组蛋白的SDS-PAGE鉴定分析图分别见图16-图18。

4、将含有目的蛋白的洗脱液用Tris-Cl缓冲液（pH 7.4）进行超滤，置换buffer并浓缩。超滤后可得高浓度重组蛋白——重组LhFVII、LhFIX、LhFX蛋白。蛋白定量显示，每升表达菌液可得纯度在90%以上的目的蛋白约15 mg。

实施例7：表达重组LhFVII、LhFIX、LhFX蛋白的真核重组质粒的构建

1、合成如下所示PCR扩增引物，（由英俊生物技术有限公司合成）：

引物 1：TAAGGATCCTGCAGAGATTTTCATCATGGTCTCCCA

说明书

BamH I cozak

引物 2: TATCTCGAGTTAATGATGATGATGATGATGTCGGCCTTGG

Xho I 6×His

引物 3: TAAGGATCCTGCAGAGATTTTCATCATGCAGCGCGTGAAC

BamH I cozak

引物 4: TATCTCGAGTTAATGATGATGATGATGATGACGGGTGAGCT

Xho I 6×His

引物 5: TAAGGATCCTGCAGAGATTTTCATCATGGGGCGCCCA

BamH I cozak

引物 6: TATCTCGAGTTAATGATGATGATGATGATGGCGTTCCA

Xho I 6×His

2、PCR扩增体系

以含有人凝血因子VII CDS区的质粒（广州复能基因有限公司）为模板，用引物1和引物2进行PCR扩增。引物1序列中引入BamH I酶切位点、cozak序列，引物2序列中引入Xho I酶切位点以及His蛋白纯化标签。以含有人凝血因子IX CDS区的质粒（广州复能基因有限公司）为模板，用引物3和引物4进行PCR扩增。引物3序列中引入BamH I酶切位点、cozak序列以及信号肽，引物4序列中引入Xho I酶切位点以及His蛋白纯化标签。以含有人凝血因子X CDS区的质粒（广州复能基因有限公司）为模板，用引物5和引物6进行PCR扩增。引物5序列中引入BamH I酶切位点、cozak序列以及信号肽，引物6序列中引入Xho I酶切位点以及His蛋白纯化标签。

PCR反应参照实施例1进行。

3、真核表达重组LhFVII、LhFIX、LhFX蛋白的重组质粒的构建

用限制性内切酶 *BamH I* 及 *Xho I*（均购自 TaKaRaFermentas 公司）分别双酶切实施例7克隆的 LhFVII、LhFIX、LhFX 基因片段以及真核表达载体 pcDNA3.1 (+)（Novagen 公司产品），反应体系参照实施例4。基因与真核表达载体的连接与转化以及重组质粒的鉴定步骤参照实施例4。

最后将测序结果正确的含LhFVII基因的重组质粒命名为pcDNA3.1-LhFVII，含LhFIX基因的重组质粒命名为pcDNA3.1-LhFIX，含LhFX基因的重组质粒命名为pcDNA3.1-LhFX。质粒图谱见图19-图21。

实施例8：表达重组LhFVII、LhFIX、LhFX蛋白的稳定细胞系的构建

1、细胞准备

将 DG44 细胞（购自 ATCC）培养于添加了 10% FBS（胎牛血清，购自 Hiclony）的 α -MEM（含 L-谷氨酰胺，核糖核酸及脱氧核糖核酸）完全培养基（购自 Hiclony）中。转染前一天在六孔板中接种 DG44 细胞 4×10^5 个/mL，每孔 2mL。

2、细胞转染

说明书

采用脂质体法转染细胞，方法按照 Lipofectamine™2000 试剂（购自 Invitrogen）说明书进行。具体步骤如下：

1) 细胞培养基换成无血清 α -MEM 培养基，2mL/孔。

2) 将真核重组质粒 pcDNA3.1-LhFVII、pcDNA3.1-LhFIX、pcDNA3.1-LhFX 分别（总量为 4.0 μ g）与 250 μ L Opti-MEM 混合，同时将 10 μ L lipo2000 与 250 μ L Opti-MEM 混合，静置 5 min。

3) 将 2 种溶液充分混合，静置 20 min，将脂质体复合物加入细胞孔中，轻轻混匀，放入 37°C 培养箱培养。

4) 5h 后，将培养基更换为添加了 10% FBS 的 α -MEM 完全培养基；

3、阳性细胞克隆筛选及扩大

重组质粒转染 24 h 后，细胞以 1：2000 比例转入 100 mm 培养皿中培养，加入终浓度为 800 μ g/mL 的 G418（购自 Gibco）筛选，以转染空载体和未转染组作对照。15 天后挑取单克隆转入 24 孔板培养，待细胞长满后依次转入 6 孔板，100 mm 培养皿扩大培养，待细胞融合度达 90% 时 1：4 冻存于含 10% DMSO（购自 Gibco）的 FBS 中。

4、阳性细胞克隆鉴定

对挑取的阳性细胞克隆进行基因组 PCR 和 RT-PCR 技术检测，均可扩增出目的片段，说明融合基因已整合在细胞基因组并有功能性 mRNA 转录，将获得的稳定细胞系分别命名为 DG44-LhFVII、DG44-LhFIX、DG44-LhFX。

实施例9：真核重组质粒所表达的重组LhFVII、LhFIX、LhFX蛋白的收集

1、在添加有 400 μ g/mL G418 的含 10% FBS 的 α -MEM 完全培养基中分别培养 DG44-LhFVII、DG44-LhFIX、DG44-LhFX 细胞并传代至 10 板。

2、当每板细胞融合度均达 90% 以上时将 10% FBS 的 α -MEM 完全培养基换为 CHO 无血清培养基，并添加终浓度 1 μ g/mL Vitamin-K（Sigma）。

3、培养 3 天后，收集培养上清，离心弃去细胞沉淀，上清经 PEG20000（Merck）浓缩 5 倍后，采用钴离子亲和层析法进行纯化并通过 SDS-PAGE、Western Blot 进行鉴定，步骤参照实施例 6。

实施例10：重组LhFVII、LhFIX、LhFX蛋白的抑菌活性检测

1、以大肠杆菌 DH5 α 为例，将大肠杆菌 DH5 α 在 LB 固体培养基上划线培养后，挑取典型菌落接种于普通 LB 液体培养基中，37°C，185 rpm 振荡培养直至达到对数生长期（OD₆₀₀ ≈ 0.5）。4000 $\times$ g 离心 3 min，弃上清，用新鲜 LB 培养基重悬菌体。

2、将上述菌液稀释后接种在 96 孔板上，每孔总体积为 100 μ L，菌量约为 5×10^5 CFU/mL。

3、分别将重组 LhFVII、LhFIX、LhFX 蛋白添加至上述孔中，使最高浓度孔的蛋白终浓度为 50 μ g/mL。以此浓度为基础，2 倍梯度稀释，直至蛋白形成浓度为 50、25、12.5 μ g/mL 的浓度梯度。每个浓度梯度设 3 个平行孔。同时设无细菌空白孔以及无蛋白的细菌孔，每组 3 个平行孔。

说明书

4、将上述96孔板置于37℃，175 rpm摇床振荡培养，每30min取样，在紫外分光光度计下检测600nm波长处的吸光值，做出抑菌曲线。MIC判定：培养8 h后观察生长现象，肉眼观察或以紫外分光光度计在600 nm波长下进行判定，以无细菌生长的最小重组蛋白浓度为最小抑制浓度MIC。

重组LhFVII、LhFIX、LhF X蛋白对大肠杆菌DH5α作用的生长曲线见图22-图24，由图22-图24可知，重组LhFVII、LhFIX、LhF X蛋白对DH5α的生长具有明显的抑制作用，重组LhFVII、LhFIX、LhF X蛋白的MIC均为25 μg/mL。

5、以与大肠杆菌DH5α相同的方法检测重组LhFVII、LhFIX、LhF X蛋白对大肠杆菌BL21、绿脓杆菌、肺炎克雷伯氏菌、阴沟肠杆菌、嗜水气单胞菌、异型枸橼酸杆菌、卡他莫拉菌、奇异变形杆菌、普通变形杆菌、粘质沙雷氏杆菌等革兰氏阴性菌的生长情况的影响，MIC如下表：

菌种	MIC (μg/mL)		
	LhFVII	LhFIX	LhF X
大肠杆菌 BL21	50	50	50
绿脓杆菌	25	25	25
肺炎克雷伯氏菌	25	25	25
阴沟肠杆菌	25	50	50
嗜水气单胞菌	25	25	25
异型枸橼酸杆菌	50	50	25
卡他莫拉菌	25	25	25
奇异变形杆菌	25	25	25
普通变形杆菌	50	50	25
粘质沙雷氏杆菌	25	50	25

结论：从上述实验结果可知，本发明所述重组LhFVII、LhFIX、LhF X蛋白对多种革兰氏阴性菌均具有抑制作用。

实施例11：重组LhFVII、LhFIX、LhF X蛋白在动物体内的抑菌活性测定

1、实验动物为BAL B/C雄鼠（体重约为18-22g，来源于四川大学），分为11组，每组8只，其中实验组为3组，其余为各种对照组。

2、将绿脓杆菌（来源于四川大学）的菌液在LB固体培养基上划线培养后，挑取典型菌落接种于普通LB液体培养基中，经过37℃过夜振荡培养约12 h后4000 × g离心3 min，弃上清，生理盐水重悬菌体后待用。

3、将重组LhFVII、LhFIX、LhF X蛋白按照无菌操作法，用生理盐水配制成浓度分别为100 μg/mL的样品，冰上保存待用。

4、将青霉素、美罗培南分别用无菌生理盐水溶解，按照60 kg成人表面积换算成BAL B/C雄鼠的临床等效用药剂量。青霉素为9.1 mg/只，美罗培南为1.5 mg/只。

说明书

5、将致死剂量绿脓杆菌菌液按500 μL /只的剂量腹腔注射各实验组和三个对照组中的BAL B/C雄鼠。

6、三个实验组的BAL B/C雄鼠感染菌体30 min后，第一实验组尾静脉给药重组LhFVII蛋白（50 μg /只）、第二实验组尾静脉给药重组LhFIX蛋白(100 μg /只)、第三实验组尾静脉给药重组LhFX蛋白（100 μg /只）；三个对照组的BAL B/C雄鼠感染菌体30 min后，其中第一、第二对照组分别尾静脉给药青霉素（9.1 mg/只）、美罗培南（1.5 mg/只），第三对照组不给药。余下的第四、第五、第六、第七、第八对照组不注射绿脓杆菌菌液，只分别注射与第一、第二、第三实验组等剂量的重组LhFVII、LhFIX、LhFX蛋白，与第一、第二对照组等剂量的青霉素、美罗培南。

7、给药72 h后，对各实验组和对照组的BAL B/C雄鼠进行二次给药，给药类型和剂量与第一次给药相同。

8、BAL B/C雄鼠给药后每24 h观察一次，记录存活情况，第15天处死所有动物。

存活率=存活小鼠/8 $\times$ 100%

实验结果：本发明所述重组LhFVII、LhFIX、LhFX蛋白可以使受到致死剂量绿脓杆菌感染的小鼠在14天保持100%的存活。第二对照组（美罗培南组）小鼠在14后存活率为100%，而第一对照组（青霉素组）小鼠全部死亡，感染致死剂量绿脓杆菌小鼠存活率的情况如图25-图27所示。第四、第五、第六、第七、第八的小鼠全部存活。

实验结果表明，本发明所述重组LhFVII、LhFIX、LhFX蛋白在动物体内对革兰氏阴性菌具有抑菌活性，且毒性小，不会导致动物死亡。

实施例12：质谱检测重组LhFVII、LhFIX、LhFX蛋白对内毒素（LPS）的破坏作用

1、用实施例6获得的重组LhFVII、LhFIX、LhFX蛋白处理1 mg/mL的*E. coli* K12 LPS（Sigma），体系设置为：

实验组：	0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ LhFVII或LhFIX或LhFX	120 μL
	1 mg/mL LPS	250 μL
	生理盐水	30 μL
对照组1：	0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ LhFVII或LhFIX或LhFX	120 μL
	生理盐水	280 μL
对照组2：	TBS	120 μL
	1 mg/mL LPS	250 μL
	生理盐水	30 μL

2、按照上述体系将其放在37 $^{\circ}\text{C}$ 150 rpm条件下孵育过夜。孵育结束后，最大转速17000 g离心5分钟。离心结束后。收集上清。

3、将上清用100D的透析袋透析16小时，透析buffer为去离子水，透析结束以后用质谱MALDI-TOF分析处理后的样品；

4、首先取1 μL 的溶于33%乙醇中的10 mg/mL的2，5-二羟基基本甲酸（DHB）与1 μL 的样

说明书

品混匀；

5 将混合的了DHB的样品点在不锈钢MTP 384靶板上（Bruker Daltonics），接着通过热气将靶板上的样品烘干；

6 烘干后，用Autoflex TOF/TOF II 仪器（Bruker）氮气377 nm激光束，正离子模式条件下分析，通过FlexControl 2.2软件控制操作，整个质谱图通过使用反射器模式，加速电压19 kV，反射器电压20 kV，在阳离子模式下脉冲激发140 ns，扫描范围从质荷比600到7000，数据收集时间平均为500激光脉冲，其最低的激光能量必需能够获得足够的信噪比，质谱中产生的各峰是通过使用Bruker Flex分析软件（Version 3.0）获得；

7、后源衰变（PSD）质谱使用Bruker Daltonics LIFT系统记录，在18.96 kV先驱离子加速电压和碎片加速（LIFT电压4.37 kV）。反射器电压1和2分别设置为23.49 kV和9.69 kV；

实验图谱以LhFVII为例，结果见图28。未经处理的LPS（中）存在明显的m/z 2318.4峰，而LhFVII处理LPS后（下），质谱峰缺失m/z 2318.4，说明LPS被轻链蛋白水解。因此本发明所述LhFVII、LhFIX、LhF X具有水解LPS的作用，可用于治疗内毒素血症。

实施例13：银染检测重组LhFVII、LhFIX、LhF X蛋白水解的*E. coli* K12 LPS

1、用实施例6获得的LhFVII、LhFIX、LhF X分别处理LPS样品，对照组为TBS缓冲液作用LPS样品，孵育过夜，然后离心收集沉淀；

2、用LPS 1×loading buffer（0.05 M的Tris-HCl，含10 g/L SDS，100 g/L蔗糖，0.5% β-巯基乙醇，10 mg/L溴酚蓝，pH 6.8）与处理后处理后的沉淀样品混合，100℃金属浴上孵育5 min；

3、15%分离胶（含4 mol/L尿素，1.0mm厚Bio-Rad具体配置如下：去离子水 1.15 mL，30%丙烯酰胺 2.5 mL，1.5 mol/L Tris-HCl（PH8.8，含10%SDS）1.3 mL，10%过硫酸铵 50 μL，TEMED 4 μL）混匀，制胶，水封压平分离胶；

4、5%浓缩胶配制：去离子水 1.42 mL，30%丙烯酰胺 0.33 mL，1 mol/L Tris-HCl（PH6.8，含10%SDS）0.25 mL，10%过硫酸铵 20 μL，TEMED 2 μL）混匀，灌胶，迅速插上10孔梳子；

5、待胶制好后，点样，然后以120V的电压跑胶分离；跑胶结束后，开始银染，将胶剥下来到一个用去离子水洗净的盒子中，然后用去离子水将胶洗涤3次；

6、洗涤结束后，用50 mL固定液（30%乙醇、10%冰乙酸、7 g/L高碘酸）于室温固定氧化25 min。固定结束后，用去离子水洗涤凝胶3次，5 min/次；

7、洗涤结束后，于室温下，用100 mL 1 g/L的AgNO₃染色40 min。染色结束，用ddH₂O涮洗一次；

8、用50 mL在冰上预冷的30 g/L Na₂CO₃，当在显色时加入0.02%甲醛，显色，当出现条带时或条带开始变黑时加入6 mL的冰乙酸终止反应；待终止反应结束后，去掉终止液，用去离子水保存凝胶。

银染图谱以LhFVII为例，如图29。经过LhFVII处理后，LPS条带明显减少并变弱，说明轻链蛋白清除了大部分LPS。因此本发明所述LhFVII、LhFIX、LhF X具有水解LPS的作用，可用于治疗内毒素血症。

权利要求书

- 1、人凝血因子轻链基因所编码的蛋白，其氨基酸序列为序列表中 SEQ ID NO: 1 所述，或与 SEQ ID NO: 1 所述氨基酸序列具有 50%以上的同源性的蛋白。
- 2、根据权利要求 1 所述人凝血因子轻链基因所编码的蛋白，其特征在于与序列表中 SEQ ID NO: 1 所述的氨基酸序列具有 50%以上同源性的蛋白的氨基酸序列为序列表中 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 3 所述。
- 3、人凝血因子轻链基因所编码的蛋白，其氨基酸序列为序列表中 SEQ ID NO: 2 所述，或与 SEQ ID NO: 2 所述氨基酸序列具有 50%以上的同源性的蛋白。
- 4、根据权利要求 3 所述人凝血因子轻链基因所编码的蛋白，其特征在于与序列表中 SEQ ID NO: 2 所述的氨基酸序列具有 50%以上同源性的蛋白的氨基酸序列为序列表中 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 3 所述。
- 5、人凝血因子轻链基因所编码的蛋白，其氨基酸序列为序列表中 SEQ ID NO: 3 所述，或与 SEQ ID NO: 3 所述氨基酸序列具有 50%以上的同源性的蛋白。
- 6、根据权利要求 5 所述人凝血因子轻链基因所编码的蛋白，其特征在于与序列表中 SEQ ID NO: 3 所述的氨基酸序列具有 50%以上同源性的蛋白的氨基酸序列为序列表中 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 2 所述。
- 7、根据权利要求 1 至 6 中任一权利要求所述人凝血因子轻链基因所编码的蛋白，其特征在于由原核重组质粒表达而成，或真核重组质粒表达而成，或通过化学合成制备。
- 8、权利要求 1 至 7 所述人凝血因子轻链基因所编码的蛋白在治疗革兰氏阴性菌感染的药物中的应用。
- 9、权利要求 1 至 7 所述人凝血因子轻链基因所编码的蛋白在治疗革兰氏阴性菌所致的内毒素血症的药物中的应用。
- 10、权利要求 1 至 7 所述人凝血因子轻链基因所编码的蛋白在制备治疗革兰氏阴性菌感染的药物中的应用。
- 11、权利要求 1 至 7 所述人凝血因子轻链基因所编码的蛋白在制备治疗革兰氏阴性菌所致的内毒素血症的药物中的应用。
- 12、一种药物组合物，其特征在于，包括如权利要求 1-7 所述的人凝血因子轻链基因所编码的蛋白。
- 13、一种治疗革兰氏阴性菌感染的药物，其特征在于，包括如权利要求 1-7 所述的人凝血因子轻链基因所编码的蛋白。
- 14、一种治疗革兰氏阴性菌所致的内毒素血症的药物，其特征在于，包括如权利要求 1-7

权利要求书

所述的人凝血因子轻链基因所编码的蛋白。

说明书附图

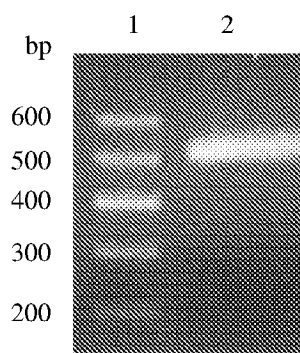


图 1

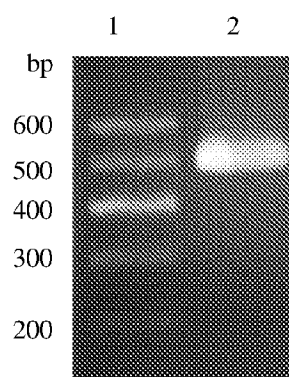


图 2

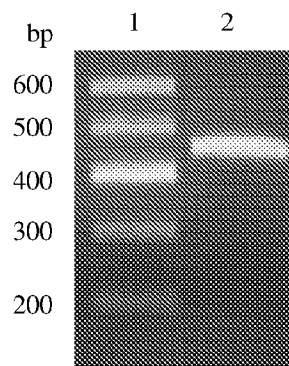


图 3

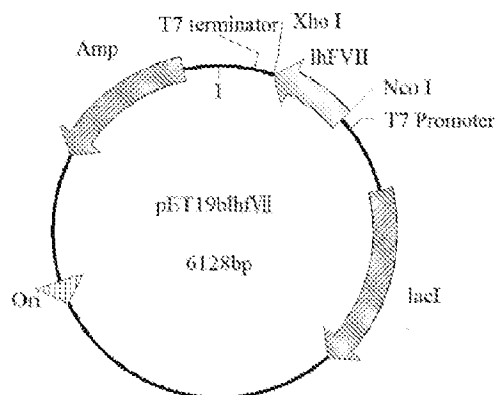


图 4

说明书附图

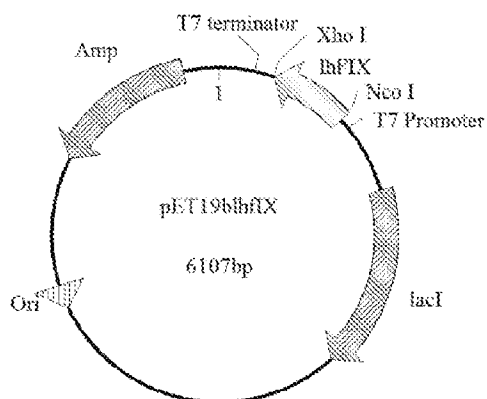


图 5

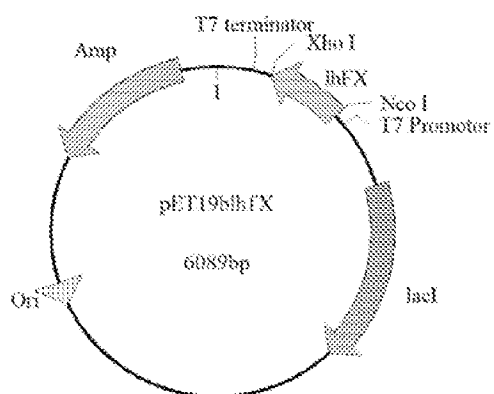


图 6

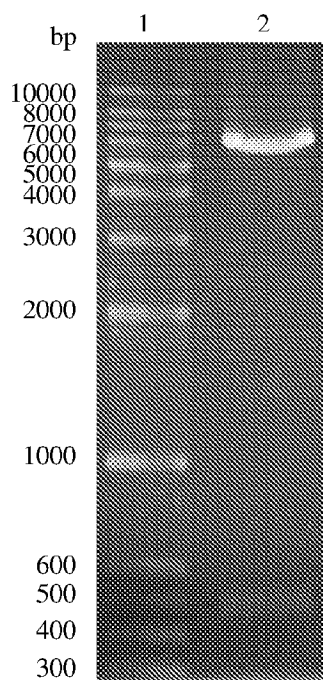


图 7

说明书附图

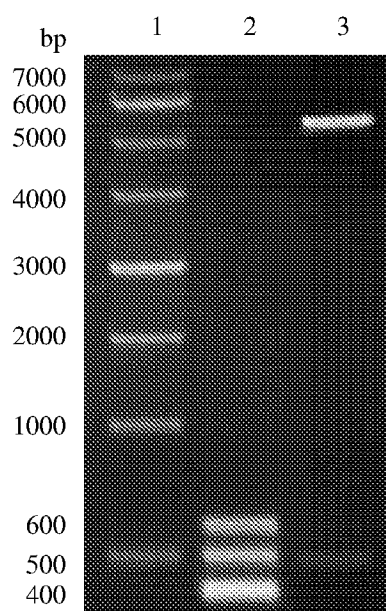


图 8

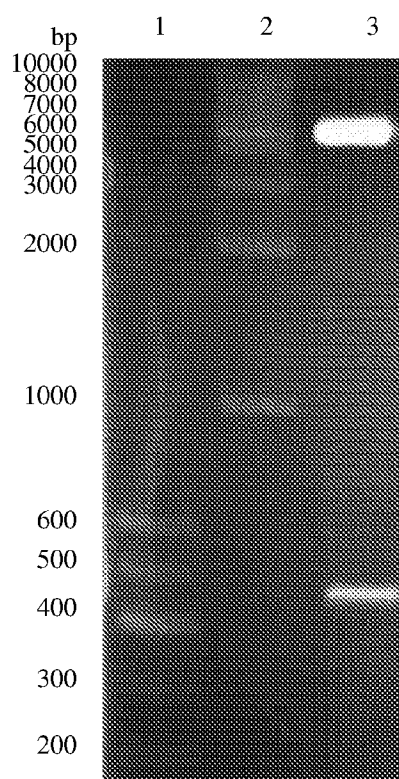


图 9

说明书附图

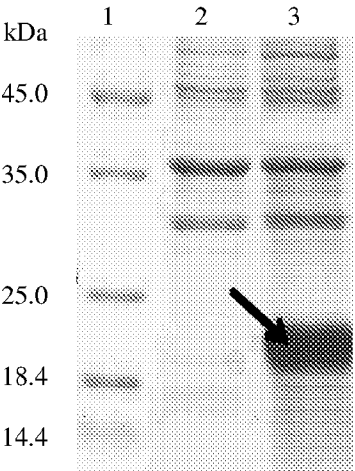


图 10

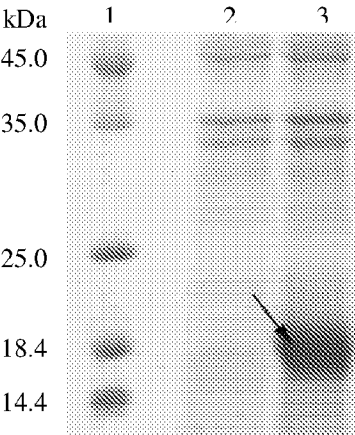


图 11

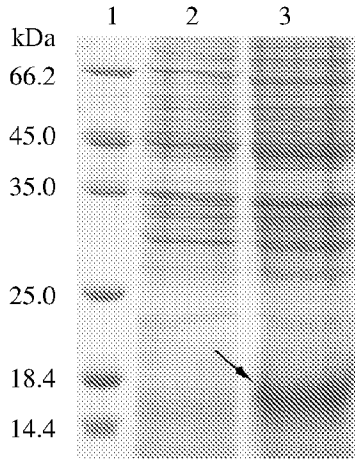


图 12

说明书附图

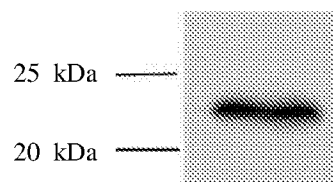


图 13

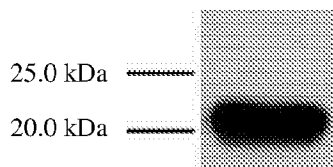


图 14

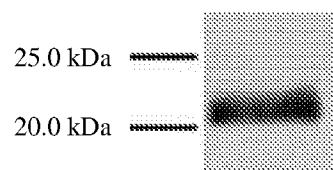


图 15

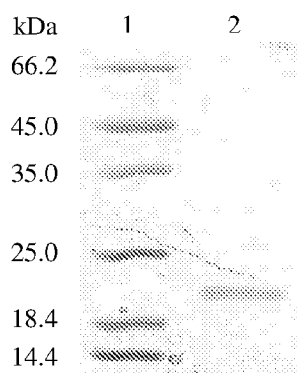


图 16

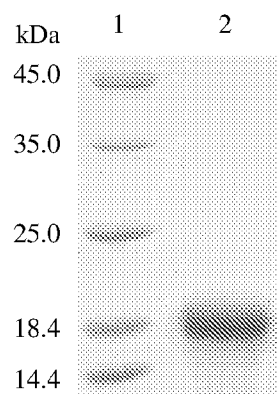


图 17

说明书附图

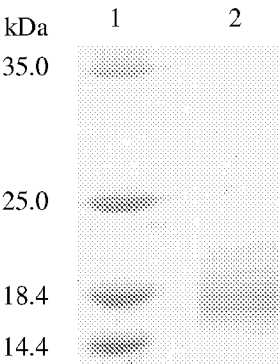


图 18

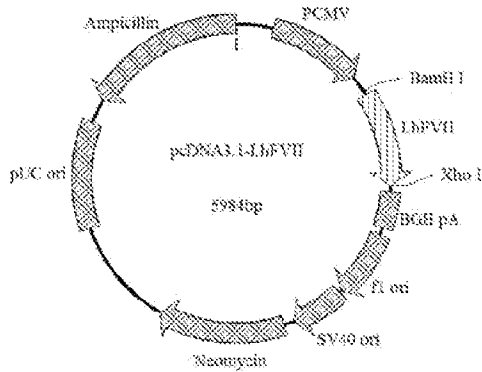


图 19

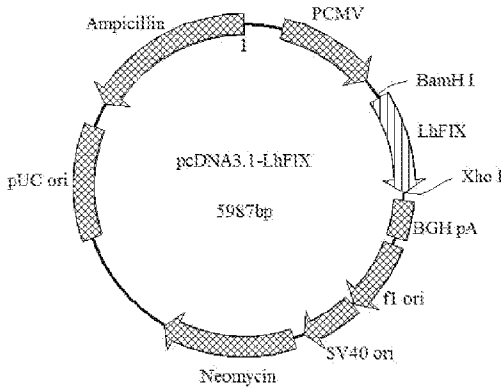


图 20

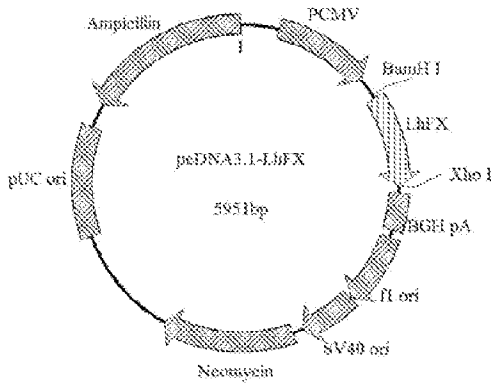


图 21

说明书附图

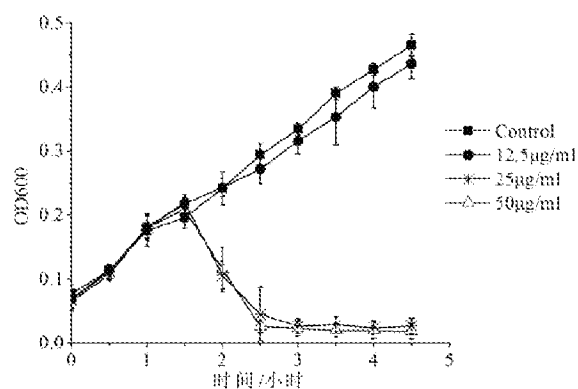


图 22

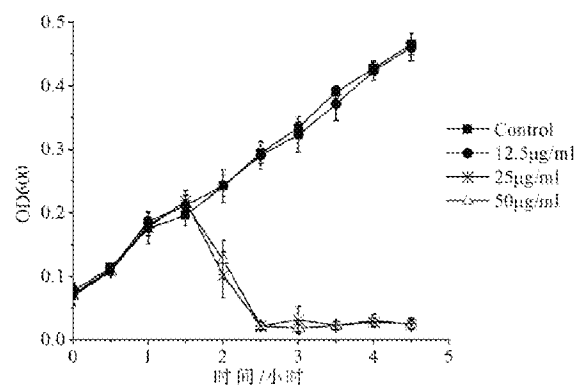


图 23

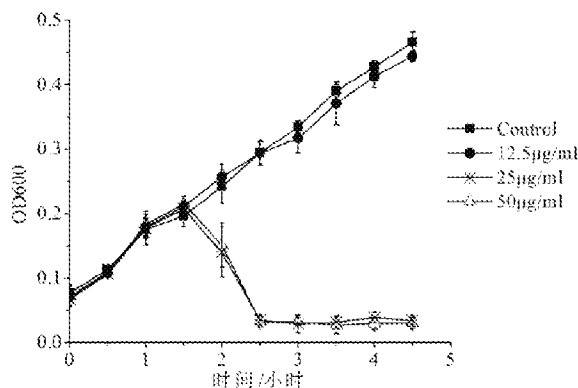


图 24

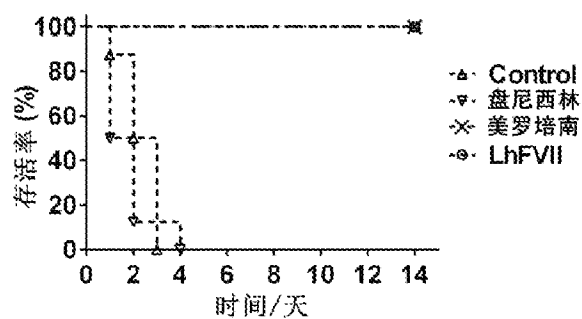


图 25

说明书附图

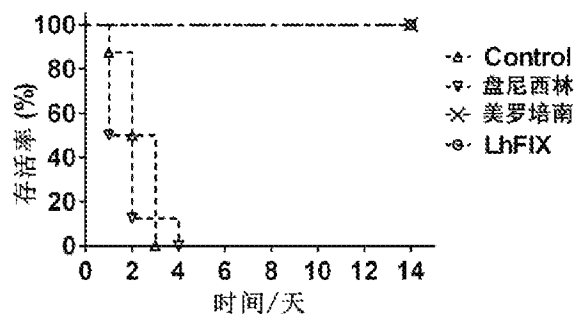


图 26

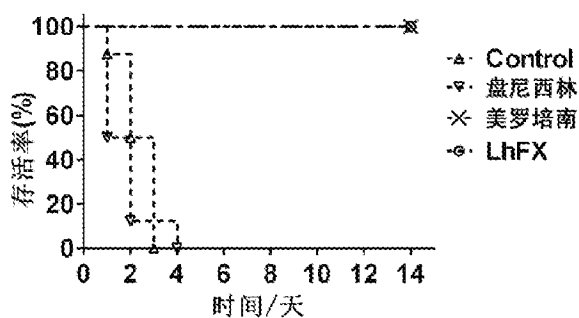


图 27

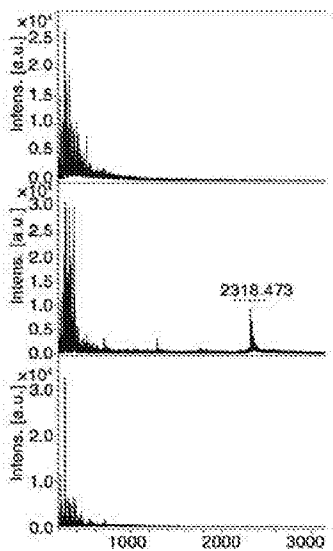


图 28

说明书附图

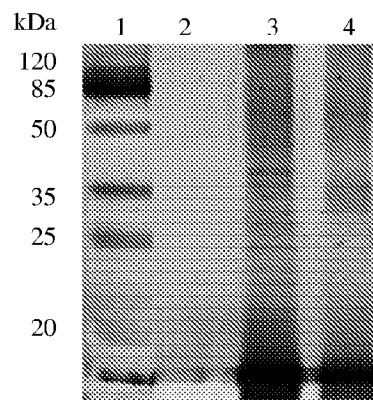


图 29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2014/078108

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/745 (2006.01) i; A61K 38/36 (2006.01) i; A61P 31/04 (2006.01) i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C07K; A61K; A61P

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

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

DWPI; ISI Web of knowledge; CNKI; CNABS: clotting factor, coagulation factor, thromboplastin, antihemophilic globulin, prothrombin, thrombinogen, antibiotics, antiseptic, antibacteria, inflammation, inflammatory, etc., EMBL; GenBank;

Chinese Patent Biological Sequence Database: SEQ ID NOs:1-3

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 103079588 A (CSL BEHRING GMBH, etc.) 01 May 2013 (01.05.2013) see the whole document	1-14
X	GenBank Accession No. 105D_L, Version 105D_L.1, 10 October 2012 (10.10.2012), [retrieved on 11 August 2014 (11.08.2014)], Retrieved from NCBI [online]: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/55669620 > see the amino acid sequence	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&"document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
12 August 2014

Date of mailing of the international search report
25 August 2014

Name and mailing address of the ISA
State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao
Haidian District, Beijing 100088, China
Facsimile No. (86-10) 62019451

Authorized officer
JIA, Tao
Telephone No. (86-10) 62411993

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/CN2014/078108

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GenBank Accession No. AAA51981, Version AAA51981.1, 01 November 1994 (01.11.1994), [retrieved on 11 August 2014 (11.08.2014)], Retrieved from NCBI [online]: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/180288 > see the amino acid sequence	1-7
X	GenBank Accession No. AAA52490, Version AAA52490.1, 08 November 1994 (08.11.1994), [retrieved on 11 August 2014 (11.08.2014)], Retrieved from NCBI [online]: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/182841 > see the amino acid sequence	1-7
A	Schoenmakers, S.H.H, et al., Blood coagulation factors as inflammatory mediators, Blood Cells, Molecules, and Diseases, Vol. 34, 28 October 2004 (28.10.2004) see the whole document of pages 30-37	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2014/078108

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 103079588 A	01 May 2013	US 2013177547 A1	11 July 2013
		JP 2013532649 A	19 August 2013
		CA 2806111 A1	26 January 2012
		KR 20140004620 A	13 January 2014
		AU 2011281599 A1	07 March 2013
		EP 2595649 A1	29 May 2013
		WO 2012010626 A1	26 January 2012

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2014/078108

A. 主题的分类

C07K 14/745(2006.01)i; A61K 38/36(2006.01)i; A61P 31/04(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K; A61K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

DWPI; ISI Web of knowledge和关键词: clotting factor, coagulation factor, thromboplastin, antihemophilic globulin, prothrombin, thrombinogen, antibiosis, antiseptic, antibacteria, inflammation, inflammatory等
CNKI; CNABS和关键词: 凝血因子, 促凝血酶原激酶, 抗血友病球蛋白, 自体凝血酶原, 抗菌, 炎症, 炎性等 EMBL; GenBank; 中国专利生物序列数据库: SEQ ID NO: 1-3

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 103079588 A (德国杰特贝林生物制品有限公司等) 2013年 5月 01日 (2013 - 05 - 01) 见全文	1-14
X	GenBank. "登录号105D_L" 版本105D_L.1, 2012年 10月 10日 (2012 - 10 - 10), [检索于11.8月2014 (11.08.2014)], 检索自NCBI [联机]: <URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/55669520>, 见氨基酸序列	1-7
X	GenBank. "登录号AAA51981" 版本AAA51981.1, 1994年 11月 01日 (1994 - 11 - 01), [检索于11.8月2014 (11.08.2014)], 检索自NCBI [联机]: <URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/180288>, 见氨基酸序列	1-7
X	GenBank. "登录号AAA52490" 版本AAA52490.1, 1994年 11月 08日 (1994 - 11 - 08), [检索于11.8月2014 (11.08.2014)], 检索自NCBI [联机]: <URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/182841>, 见氨基酸序列	1-7

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件	"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件
"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利	"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性
"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)	"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性
"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件	"&" 同族专利的文件
"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件	

国际检索实际完成的日期

2014年 8月 12日

国际检索报告邮寄日期

2014年 8月 25日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局 (ISA/CN)
北京市海淀区蓟门桥西土城路6号
100088 中国

传真号 (86-10)62019451

授权官员

贾涛

电话号码 (86-10)62411993

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	Schoenmakers, S.H.H等. "Blood coagulation factors as inflammatory mediators" Blood Cells, Molecules, and Diseases, 第第34卷卷, 2004年 10月 28日 (2004 - 10 - 28), 见第30-37页全文	1-14

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2014/078108

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	103079588	A	2013年 5月 01日	US	2013177547	A1	2013年 7月 11日
				JP	2013532649	A	2013年 8月 19日
				CA	2806111	A1	2012年 1月 26日
				KR	20140004620	A	2014年 1月 13日
				AU	2011281599	A1	2013年 3月 07日
				EP	2595649	A1	2013年 5月 29日
				WO	2012010626	A1	2012年 1月 26日