

# (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  
2010 年 4 月 1 日 (01.04.2010)

PCT

(10) 国际公布号  
WO 2010/034176 A1

## (51) 国际专利分类号:

C12N 9/64 (2006.01) A61K 9/12 (2006.01)

A61K 38/43 (2006.01) A61K 9/70 (2006.01)

A61K 9/19 (2006.01) A61P 7/04 (2006.01)

## (21) 国际申请号:

PCT/CN2009/000230

## (22) 国际申请日:

2009 年 3 月 4 日 (04.03.2009)

## (25) 申请语言:

中文

## (26) 公布语言:

中文

## (30) 优先权:

200810223433.8 2008 年 9 月 27 日 (27.09.2008) CN

(71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 康辰医药股份有限公司 (HEALTHSTAR PHARMACEUTICAL CO., LTD) [CN/CN]; 中国北京市海淀区上地三街 9 号嘉华大厦 A 座 7 层 712 号, Beijing 100085 (CN)。

## (72) 发明人; 及

(75) 发明人/申请人 (仅对美国): 孙狄 (SUN, Di) [CN/CN]; 中国北京市海淀区上地三街 9 号嘉华大厦 A 座 7 层 712 号, Beijing 100085 (CN)。王锡娟 (WANG, Xijuan) [CN/CN]; 中国北京市海淀区上地三街 9 号嘉华大厦 A 座 7 层 712 号, Beijing 100085 (CN)。

(74) 代理人: 北京路浩知识产权代理有限公司 (CN-KNOWHOW INTELLECTUAL PROPERTY

AGENT LIMITED); 中国北京市海淀区大柳树路 17 号富海国际港 707 室, Beijing 100081 (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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (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, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

## 本国际公布:

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

(54) Title: A THROBIN-LIKE ENZYME OF AGKISTRODON ACUTUS

(54) 发明名称: 来自尖吻蝮蛇的类凝血酶

(57) Abstract: A thrombin-like enzyme isolated from Agkistrodon acutus venom, comprising an alpha subunit having a defined sequence of SEQ ID NO.1 given in the description and a beta subunit having a defined sequence of SEQ ID NO. 2 given in the description, interconnected by seven disulfide linkages, is provided. The enzyme of present invention is a serine proteinase capable of hydrolyzing alpha chain of human fibrinogen, and has a molecular weight of 29.3~29.5kD and an isoelectric point of 5.5. Methods for purifying such enzyme, comprising removing insoluble substance of the venom by pretreatment, conducting twice of anion-exchange chromatography, collecting active eluting peak, dialysing, ultrafiltrating and desalinating, are also provided. The thrombin-like enzyme obtained from said methods has a specific activity of no less than 180u/mg protein, a HPLC purity of more than 95% and a yield of 0.7%-0.8% based on weight of venom raw material.

## (57) 摘要:

提供了一种从尖吻蝮蛇蛇毒中分离得到的类凝血酶, 该酶由  $\alpha$ 、 $\beta$  两个亚基构成, 亚基链间由二硫键连接, 其中  $\alpha$  亚基具有 SEQ ID NO.1 所示的氨基酸序列,  $\beta$  亚基具有 SEQ ID NO.2 所示的氨基酸序列。本发明尖吻蝮蛇血凝酶为丝氨酸蛋白酶, 分子量 29.3~29.5kD, 等电点 5.5, 能够水解人纤维蛋白原  $\alpha$  链。本发明还提供了纯化该酶的方法, 包括通过预处理除去不溶物, 再通过两次阴离子交换柱层析, 收集活性洗脱峰, 经透析、超滤浓缩及脱盐后获得蛇毒类凝血酶, 其比活力不低于 180u/mg 蛋白, HPLC 分析纯度可达 95% 以上, 以蛇毒原料重量记纯化收得率为 0.7%-0.8%。

WO 2010/034176 A1

## 来自尖吻蝮蛇的类凝血酶

### 技术领域

本发明涉及一种丝氨酸蛋白酶，具体地说是一种蛇毒血凝酶，本发明还涉及其分离纯化方法。

### 背景技术

据国内外文献的报导，在蝮亚科（*Crotalinae*）蛇毒中多存在一类与血液凝固相关的蛋白酶，通常称之为“类凝血酶”（thrombin-like enzyme，简称：TLC）。类凝血酶与凝血酶（thrombin）的作用相似，可以使血浆中纤维蛋白原转化为纤维蛋白而“凝固”。迄今已经发现现已在 30 多种蛇毒中含有类凝血酶成分，并有 20 余种得到分离纯化，其中有 10 余种类凝血酶的全部或部分氨基酸序列得到阐明。已发现的 TLC 分子量多在 29 ~ 45kD 之间，大多数为酸性糖蛋白。

在以往已经发现的蛇毒 TLC 中，蛋白质一级结构多为单链。其代表产品“立芷雪”（Reptilase）是由巴西矛头蝮蛇（*Bothrops atrox*）蛇毒中分离出的凝血酶，该酶前体由 255 个氨基酸构成，N 端有 24 个氨基酸形成的引导肽，活性酶含 231 氨基酸，相对分子量 39 ~ 43kD，为单链糖蛋白。

近 10 年来的研究发现在蝮亚科蛇毒 TLC 中也存在双链分子结构，链间由二硫键连接。Xin Cheng 等（中国科技大学）1999 年报导：从五步蛇（*Agkistrodon acutus*）中分离到一种“类凝血酶”，命名为“Agkisacutacin”。该蛋白由两条肽链构成， $\alpha$ -亚基分子量 15kD， $\beta$ -亚基分子量 14kD。Agkisacutacin 能够水解纤维蛋白原中的  $\alpha$  链。肖昌华（中科院昆明动物研究所）2004 年从五步蛇（*Agkistrodon acutus*）中分离到两种“类凝血酶”，均为双链分子结构。凝血酶 I 的 A 亚基含有 132 个氨基酸，分子量 16kD；B 亚基含有 123 个氨基酸，分子

量 14kD, 酶比活性为: 160u/mg。凝血酶 II 的 A 亚基含有 122 个氨基酸, 分子量 15kD; B 亚基含有 120 个氨基酸, 分子量 13kD, 酶比活性为: 70u/mg。该两种 TLC 经药理实验证明: 均具有止血功效。

我国具有丰富的蛇毒研究资源, 本发明人从我国的尖吻蝮蛇 (*Agkistrodon acutus*, 俗称五步蛇) 的蛇毒中分离得到一种高活性血凝酶。

## 发明内容

本发明的目的在于提供一种蛇毒血凝酶, 其是从尖吻蝮蛇蛇毒中分离得到的一种类凝血酶。

本发明的另一个目的在于提供一种分离纯化上述血凝酶的方法。

本发明血凝酶是从中国尖吻蝮蛇 (*Agkistrodon acutus*) 蛇毒中分离得到的高活性血凝酶。该酶具有如下特征: ①酶蛋白含 252 个氨基酸, 分子量为 29.3~29.5kD, 等电点 pI 为 5.5。②由  $\alpha$ 、 $\beta$  两个亚基构成, 亚基链间由七个二硫键连接。③ $\alpha$  亚基含 129 个氨基酸, 分子量为 15kD, 其氨基酸序列如 SEQ ID No.1 所示;  $\beta$  亚基含 123 个氨基酸, 分子量为 14.5kD, 其氨基酸序列如 SEQ ID No.2 所示。④酶活性可被苯甲基磺酰氟 (PMSF) 完全抑制, 表明其是一种丝氨酸蛋白酶。⑤能够水解人纤维蛋白原  $\alpha$  链。

本发明还提供上述血凝酶的纯化方法, 其包括如下步骤:

1)、蛇毒预处理;

2)、将预处理后的蛇毒溶液上经预平衡的 DEAE - Sephrose FF 阴离子交换层析柱, 用 0.01M pH7.0~7.5 的 PBS 洗柱, 再用含 0~1M NaCl 的 0.01M pH7.0~7.5 的 PBS 分段洗脱, 收集 0.06M NaCl 溶液的洗脱液;

3)、将上述洗脱液适当浓缩后透析或经多次稀释超滤去除 NaCl;

4)、将透析后的溶液再次上经预平衡的 DEAE - Sephrose FF 层析柱, 用 0.01M pH7.0~7.5 的 PBS 洗柱, 再用含 0~1M NaCl 的 0.01M

pH7.0 ~ 7.5 的 PBS 分段洗脱, 收集 0.06M NaCl 溶液洗脱液中的第二个洗脱峰;

5)、将上述洗脱液适当浓缩后用蒸馏水透析或采用 Sephadex-G25 柱脱盐。

其中, 步骤 1) 蛇毒预处理的方法是将蛇毒用适量预冷的 0.01M pH7.0 ~ 7.5 PBS 溶解, 离心取上清液进行透析(透析袋截留分子量为 7,000D~10,000D)或采用切向流超滤(超滤膜截留分子量为 5,000D ~ 10,000D)方法, 将离心上清液反复多次稀释、超滤浓缩。通过预处理可以去除不溶的杂质以及小分子多肽, 并降低溶液离子强度。

具体地说可通过如下步骤进行蛇毒的预处理: 称取蛇毒若干克, 用蛇毒重量 5~10 倍体积预冷的 0.01M pH7.0 ~ 7.5 的 PBS 于 4~8℃ 的层析柜中搅拌溶解 30~60 分钟, 于 4~8℃、5,000~10,000g 离心 10~20 分钟, 将离心上清液倾入透析袋中, 离心沉淀再次加入蛇毒重量 5~10 倍体积预冷的 PBS 搅拌悬浮, 再次离心。合并两次离心上清液于透析袋(截留分子量为 7,000D~10,000D)中, 在 4~8℃ 层析柜中对 0.01M pH7.0 ~ 7.5 的 PBS 透析 12~24 小时, 期间换液 2~4 次, 以去除小分子多肽和降低溶液离子强度。

如上所述, 各透析步骤均可采用切向流超滤(超滤膜截留分子量为 5,000~10000D)方法代替, 通过 PBS 稀释、超滤浓缩, 再稀释、再超滤浓缩的方式以去除小分子多肽和脱盐降低溶液离子强度。

其中, 步骤 2) 和步骤 4) 可采用 0.01M pH7.0 ~ 7.5 的 PBS 预平衡 DEAE - Sephrose FF 层析柱, 然后上样。

其中, 步骤 3) 和步骤 5) 的目的均是去除溶液中存在的 NaCl。洗脱液浓缩方式为超滤浓缩。小体积浓缩液可直接进行透析; 也可通过 PBS 稀释、超滤浓缩, 再稀释、再超滤浓缩的方式以浓缩蛋白, 脱去 NaCl。最终被纯化的酶浓缩液可直接采用 Sephadex-G25 柱脱盐。

除盐后的溶液直接冷冻干燥, 或加入冻干保护剂冷冻干燥。所述

冻干保护剂可以是低分子右旋糖酐、或甘露醇、蔗糖、甘油、明胶或人血白蛋白等等。冷冻保护剂的加入量为 1% - 5%(w/v)。

经本发明方法纯化的血凝酶比活力不低于 180u/mg 蛋白, 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 一条带, 还原 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (还原 SDS-PAGE) 两条带; HPLC 分析纯度 95% 以上。以蛇毒原料重量计, 本法纯化收得率为 0.7% - 0.8%。

本发明血凝酶具有良好的凝集活性, 可制成各种止血药物, 例如经适当稀释到规定酶活单位, 再添加冻干保护剂 (低分子右旋糖酐 20 或人血白蛋白等), 经病毒膜过滤, 冷冻干燥制成医用注射冻干粉针, 用于外科手术中止血, 以及各种临床出血症状。也可制成创伤外用止血贴剂、粉剂或液体喷雾剂。

## 附图说明

图 1 显示的是本发明血凝酶对人纤维蛋白原的水解作用, 4h、2h、1h、0.5h: 分别代表血凝酶水解人纤维蛋白原的时间; F: 人纤维蛋白原对照; M: 蛋白质分子量标准物。

## 具体实施方式

以下实施例进一步说明本发明的内容, 但不应理解为对本发明的限制。在不背离本发明精神和实质的情况下, 对本发明方法、步骤或条件所作的修改或替换, 均属于本发明的范围。

若未特别指明, 实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段。

本发明中涉及到的百分号 “%”, 若未特别说明, 是指质量百分比; 但溶液的百分比, 除另有规定外, 是指溶液 100ml 中含有溶质若干克; 液体之间的百分比, 是指在 20℃ 时容量的比例。本发明中类似 “用蛇毒重量 10 倍体积预冷的” 表述, 其中的重量和体积的单位分别是 g 和 ml。

### 实施例 1 蛇毒血凝酶的纯化

取 30g 尖吻蝮蛇蛇毒干粉（批号：20061001，广西蛇毒研究所），用蛇毒重量 10 倍体积预冷的 0.01M pH7.4 的 PBS 于 4℃ 的层析柜中搅拌溶解 30 分钟，于 4℃、10000g 离心 10 分钟，将离心上清液倾入透析袋中，离心沉淀再次加入蛇毒重量 10 倍体积预冷的 PBS 搅拌悬浮，再次离心。合并两次离心上清液于透析袋（截留分子量为 7000D）中，在 4℃ 层析柜中对 0.01M pH7.4 的 PBS 透析 24 小时，期间换液 3 次。将预处理后的蛇毒溶液上经 0.01M pH7.4 PBS 预平衡的 DEAE - Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析柱，用 0.01M pH7.4 PBS 洗柱，再分别用 0.02M、0.06M 和 1.0M NaCl 的 0.01M pH7.4 的 PBS 分段洗脱，收集 0.06M NaCl 溶液的洗脱峰；

经酶活测定（参照附录①或②方法）和电泳分析，目的物出现在 0.06M NaCl 溶液的洗脱峰中，合并洗脱收集液，共得 2220ml，采用 Millipore Pellicon 2 切向流超滤器（0.1M<sup>2</sup> cut off 5k 膜）超滤浓缩至 200ml，将该 200ml 超滤浓缩液倾入透析袋（7000D）中，用 5000ml 0.01M pH7.4 的 PBS 于 4℃ 透析 24 小时，期间更换溶液 3 次。将透析后的酶溶液上经预平衡的 DEAE - Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析柱，用 0.01M pH7.4 磷酸缓冲液洗柱，再分别用 0.02M、0.04M、0.06M 和 1.0M NaCl 的 0.01M pH7.4 的 PBS 分段洗脱，收集 0.06M NaCl 溶液洗脱液的第二个洗脱峰，得洗脱液 1050ml。经酶活测定确认，PAGE 检查为一条带，说明已经得到纯化。采用 Millipore Pellicon 2 切向流超滤器（0.1M<sup>2</sup> cut off 5k 膜）超滤浓缩至 135ml。将该 135ml 浓缩液装入透析袋中，对无离子水进行透析 24 小时，期间更换溶液 3 次，每次 5 升。透析后体积为 159ml，测定该溶液中总蛋白质含量为 240mg，测定酶比活力为 195u/mg 蛋白，最终收率 0.8%。HPLC 分析纯度 98.2%，还原 SDS - PAGE 为两条带，其分子量分别大致为 15kD 和 14.5kD。等电聚焦电泳测定该酶等电点 pI 为 5.5。

经 DENOVO 法氨基酸测序, 这两条带的氨基酸序列分别如 SEQ ID No.1 和 SEQ ID No.2 所示。 $\alpha$  亚基 (SEQ ID No.1) 含 129 个氨基酸, 仅按氨基酸计算分子量为 14660.7Dalton;  $\beta$  亚基 (SEQ ID No.2) 含 123 个氨基酸, 仅按氨基酸计算分子量为 14551.8Dalton。 $\alpha$  亚基和  $\beta$  亚基均各含有 7 个半胱氨酸残基。

## 实施例 2 蛇毒血凝酶的纯化

取 30g 尖吻蝮蛇蛇毒干粉 (批号: 20061001, 广西蛇毒研究所), 用 300ml 预冷的 0.01M pH7.4 的 PBS 于 4℃ 的层析柜中搅拌溶解 60 分钟, 于 4℃、10000g 离心 15 分钟, 将离心上清液倾入透析袋中, 离心沉淀再次加入 300ml 预冷的 PBS 搅拌悬浮, 再次离心。合并两次离心上清液于透析袋 (截留分子量为 10000D) 中, 在 4℃ 层析柜中对 0.01M pH7.4 的 PBS 透析 24 小时, 期间换液 3 次。

按与实施例 1 相同的方法, 将经预处理的蛇毒溶液进行第一次 DEAE-Sephrose FF 柱层析, 经酶活测定和电泳分析目的物出现在 0.06MNaCl 的洗脱峰中, 合并洗脱收集液, 共得 2262ml, 采用 Millipore Pellicon 2 切向流超滤器 (0.1M<sup>2</sup> cut off 5k 膜) 超滤浓缩至 200ml, 将该 200ml 超滤浓缩液倾入透析袋 (10,000D) 中, 用 5000ml 0.01M pH7.4PBS 于 4℃ 透析 24 小时, 期间更换溶液 3 次。透析后的酶液上样至 DEAE-Sephrose FF 柱中, 按适实例 1 相同的方法进行第二次层析。血凝酶出现在 0.06MnaCl 溶液洗脱液的第二个洗脱峰中, 收集该峰洗脱液得 956ml。经酶活测定确认, PAGE 检查为一条带, 说明已经得到纯化。采用 Millipore Pellicon 2 切向流超滤器 (0.1M<sup>2</sup> cut off 5k 膜) 超滤浓缩至 192ml。将该 192ml 浓缩液上样至 Sephdex-G25 柱上, 用无离子水洗柱脱盐, 收集洗脱峰 322ml, 该溶液直接冷冻干燥后收获总蛋白 235mg, 测定酶比活力为 200u/mg 蛋白, 最终收率 0.78%。HPLC 分析纯度 99%, 色谱图与实施例 1 相一致, 还原 SDS - PAGE 为两条带, 其分子量分别大致为 15kD 和 14.5kD。

### 实施例 3 蛇毒血凝酶的纯化

1、称取 100 克尖吻蝮蛇蛇毒干粉（批号 20061102），广西蛇毒研究所）用 2000ml 预冷的 0.01M pH7.4 的 PBS 于 4-8℃ 的层析柜中搅拌溶解 60 分钟，4℃ 10000g 离心 20 分钟，将离心上清液倾入一个 3000ml 烧杯中，采用 Millipore Pellicon 2 切向流超滤器（0.1M<sup>2</sup> cut off 8k 膜）超滤浓缩至 500ml，再加入预冷的 1500ml 0.01M pH7.4 的 PBS，再超滤至 500ml。该超滤浓缩过程循环 3 次。

2、向 500ml 超滤浓缩液中加入 1500ml 0.01M pH7.4 PBS，按 35-40ml/min 流速上样至 DEAE-Sephrose FF 柱。

3、上样后，依次分别用 0.02M、0.06M 和 1M NaCl 的 0.01M pH7.4 PBS 进行洗脱，洗脱速度 70-80ml/min。

4、目的蛋白出现在 0.06M NaCl 溶液洗脱液中，洗脱峰共收集 6750ml。

5、将收集液采用 Millipore Pellicon 2 切向流超滤器（0.1M<sup>2</sup> cut off 8k 膜）超滤浓缩至 500ml。

6、向 500ml 超滤浓缩液中加入 1500ml 0.01M pH7.4 的 PBS，再超滤至 500ml。该超滤浓缩过程循环 3 次。

7、向 500ml 超滤浓缩液中加入 1500ml 0.01M pH7.4 的 PBS，按 35-40ml/min 流速上样至 DEAE-Sephrose FF 柱。

8、上样后，依次分别用 0.02M、0.04M、0.06M 和 1M NaCl 的 0.01M pH7.4 PBS 各 10 升进行洗脱，洗脱速度 70-80ml/min。

9、经酶活测定确认目的蛋白出现在 0.06M NaCl 溶液洗脱液的第二个洗脱峰中，该洗脱峰共收集 3050ml。PAGE 检查为一条带，说明已经得到纯化。

10、将 3050ml 收集液采用 Millipore Pellicon 2 切向流超滤器（0.1M<sup>2</sup> cut off 8k 膜）进行超滤浓缩至 300ml。将该 300ml 浓缩液上样至 Sephadex-G25 柱上，用无离子水洗柱脱盐，收集洗脱峰 490ml。

测定该溶液中总蛋白为 752mg，比活力为 183u/mg 蛋白，最终收率为 0.75%。HPLC 纯度达 98.0%，色谱图与实施例 1 相一致。

11、按滤液体积加入 1%的低分子右旋糖苷 20 冻干保护剂后用 Millipore Viresolve NFP Filters OptiScale - 25 病毒膜过滤。

12、滤液直接分装后进行冷冻干燥。

13、冻干粉经 PAGE 检查为一条带，还原 SDS - PAGE 为两条带，其分子量分别大致为 15kD 和 14.5kD。

**实施例 4 尖吻蝮蛇血凝酶的丝氨酸蛋白属性实验**

将实施例 2 分离得到的血凝酶再经 HPLC 纯化制备，获得经三维 HPLC 测定蛋白纯度为 100 % 的尖吻蝮蛇血凝酶溶液，酶活性为 10u/ml。

用生理盐水配制 1 % 的牛纤维蛋白原（Sigma 公司）溶液。

用异丙醇溶解苯甲基磺酰氟（PMSF，Merck 公司），溶液浓度为 4mg/ml。

实验操作步骤如下：

- （1）取 1%牛纤维蛋白原溶液 2ml，37℃下恒温 5 分钟。
- （2）取三支小试管，分别标注 1#、2#、3#，每管加入 200μl 经蒸馏水稀释一倍的血凝酶溶液（5u/ml）。
- （3）分别向 1#试管加入 10μl 蒸馏水，2#试管加入 10μl 异丙醇，3#试管加入 10μl PMSF，于 37℃水浴保温 5 分钟。
- （4）按试管编号顺序分别单独进行凝集试验观察。向试管中加入恒温好的 1 % 牛纤维蛋白原溶液 200μl，立即计时，同时轻轻摇动混匀，于 37℃水浴中静置，观察试管中凝集反应的情况。以溶液呈现完全凝固状态时终止计时。

结果见表一

表一、 PMSF 对凝集时间的影响

| 试管号 | 1%纤维蛋白原 | 血凝酶溶液 |  | 凝集时间 |
|-----|---------|-------|--|------|
|-----|---------|-------|--|------|

|    | 溶液          | 5u/ml       |                 |          |
|----|-------------|-------------|-----------------|----------|
| 1# | 200 $\mu$ l | 200 $\mu$ l | 10 $\mu$ l 蒸馏水  | 50 秒     |
| 2# | 200 $\mu$ l | 200 $\mu$ l | 10 $\mu$ l 异丙醇  | 50 秒     |
| 3# | 200 $\mu$ l | 200 $\mu$ l | 10 $\mu$ l PMSF | 大于 600 秒 |

根据表一中的实验结果, 得出以下结论: ①100ppm 浓度的 PMSF 完全抑制了该血凝酶活性, 证明该尖吻蝾蛇血凝酶为丝氨酸蛋白酶。②微量异丙醇对本凝集反应无影响。

### 实施例 5 尖吻蝾蛇血凝酶水解人纤维蛋白原实验

用 50mM Tris-HCl(pH7.4)缓冲液配制 4mg/ml 的人纤维蛋白原溶液。分别向 5 支小试管中各加入 0.5ml 人纤维蛋白原溶液, 分别按 4 个不同水解保温时间顺序间隔向其中 4 管中加入经提取纯化的 1 个活性单位的血凝酶。37℃水浴保温 4、2、1 和 0.5 小时, 保温后立即进行 SDS-PAGE 电泳, 观察人纤维蛋白原的水解程度。另一支 0.5ml 纤维蛋白原对照管同时于 37℃水浴保温 4 小时。

如图 1 结果所示: 未经血凝酶水解的纤维蛋白原对照的电泳图呈现出三条带, 图中 F 列从上至下分别为  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  亚基。纤维蛋白原在血凝酶 (1 单位) 作用 0.5 小时和 1 小时后,  $\alpha$  亚基带逐渐变浅, 作用于 2 小时和 4 小时后,  $\alpha$  亚基带完全消失。该结果证实血凝酶有水解纤维蛋白原  $\alpha$  亚基的作用。

### 附录

#### 尖吻蝾蛇血凝酶单位定义及活性测定方法

①牛纤维蛋白原测定法 取生理盐水配制的 1.0% 牛纤维蛋白原 (Sigma 公司) 溶液 1ml 置小试管中, 37 $\pm$ 0.5℃水浴保温 3 分钟, 加入 37 $\pm$ 0.5℃预热的待测酶溶液 1ml, 立即计时, 纤维蛋白原溶液在 120 $\pm$ 30 秒内振摇出现白色絮团, 则该酶溶液为 1u/ml。

②标准人血浆测定法 取标准人血浆 1ml 置小试管中, 置 37℃ $\pm$ 0.5℃水浴中预热 3 分钟, 加入 37 $\pm$ 0.5℃预热的待测酶溶液 1ml, 立即计时, 人血浆在 60 $\pm$ 20 秒内

振摇出现白色絮团，则该酶溶液为 1u/ml。

注：测定未知高酶活性溶液时需用无离子水进行稀释，直至达到 1u/ml 用于测定；其稀释倍数即为每毫升原酶溶液中的酶活单位数。

## 权 利 要 求 书

---

1、尖吻蝮蛇血凝酶，该酶由  $\alpha$ 、 $\beta$  两个亚基构成，亚基链间由七个二硫键连接，其中  $\alpha$  亚基含 129 个氨基酸，具有 SEQ ID No.1 所示的氨基酸序列； $\beta$  亚基含 123 个氨基酸，具有 SEQ ID No.2 所示的氨基酸序列。

2、如权利要求 1 所述的尖吻蝮蛇血凝酶，其特征在于该酶是一种丝氨酸蛋白酶，能够水解人纤维蛋白原  $\alpha$  链。

3、含有权利要求 1 或 2 所述尖吻蝮蛇血凝酶的药物。

4、如权利要求 3 所述的药物，其为冻干粉、止血贴剂或液体喷雾剂。

5、权利要求 1 或 2 所述血凝酶的纯化方法，其包括如下步骤：

1)、蛇毒预处理；

2)、将预处理后的蛇毒溶液上经预平衡的 DEAE - Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析柱，用 0.01M pH7.0 ~ 7.5 PBS 洗柱，再用含 0~1M NaCl 的 0.01M pH7.0 ~ 7.5 的 PBS 分段洗脱，收集 0.06M NaCl 溶液的洗脱峰；

3)、将上述洗脱液适当浓缩后透析或经反复稀释超滤浓缩去除 NaCl；

4)、将透析后的溶液再次上经预平衡的 DEAE - Sepharose Fast Flow 层析柱，用 0.01M pH7.0 ~ 7.5 的 PBS 洗柱，再用含 0~1M NaCl 的 0.01M pH7.0 ~ 7.5 的 PBS 分段洗脱，收集 0.06M NaCl 溶液的第二洗脱峰；

5)、将上述收集洗脱液适当浓缩后用无离子水透析或经 Sephdex-G25 柱去除 NaCl。

6、如权利要求 5 所述的方法，其中，步骤 1) 蛇毒预处理的方法是将蛇毒用适量预冷的 0.01M pH7.0 ~ 7.5 的 PBS 溶解，离心取上清液进行透析或经反复稀释超滤浓缩。

7、如权利要求 6 所述的方法，其特征在于其中步骤 1) 蛇毒预处理的方法是：称取蛇毒若干克，用蛇毒重量 5~10 倍体积预冷的 0.01M pH7.0~7.5 的 PBS 于 4~8℃ 的层析柜中搅拌溶解 30~60 分钟，于 4~8℃、5,000~10,000g 离心 10~20 分钟，将离心上清液倾入透析袋，离心沉淀再用蛇毒重量 5~10 倍体积预冷的 PBS 搅拌悬浮，再次离心，合并两次离心上清液于透析袋中，在层析柜中 4~8℃ 对 0.01M pH7.0~7.5 的 PBS 透析 12~24 小时，期间更换溶液 2~4 次；或将蛇毒用 10~20 倍体积预冷的 0.01M pH7.0~7.5 的 PBS 溶解后，用分子截留值为 5,000~10,000D 的超滤膜经反复多次加入 PBS 进行稀释超滤浓缩。

8、如权利要求 5 所述的方法，其中，步骤 2) 和步骤 4) 采用 0.01M pH7.0~7.5 的 PBS 预平衡 DEAE - Sepharose Fast Flow 层析柱，然后上样。

9、如权利要求 5 所述的方法，其还包括将步骤 5) 除盐后的溶液直接冷冻干燥，或加入保护剂冷冻干燥。

10、如权利要求 5~9 任一项所述的方法，其特征在于采用分子截留值为 5,000~10,000D 超滤膜的超滤浓缩方式降低目的蛋白洗脱溶液体积，然后进行透析脱盐；或采用分子截留值为 5,000~10,000D 的超滤膜将洗脱液经反复稀释超滤脱盐并浓缩蛋白。

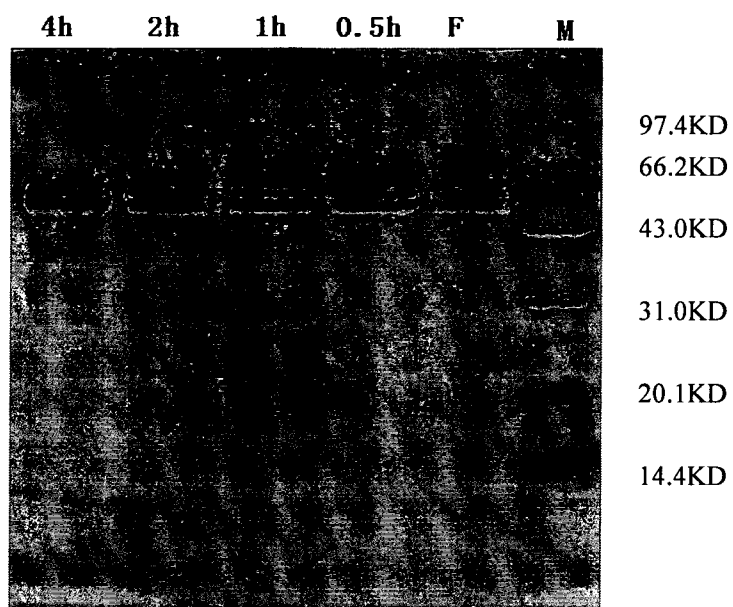


图 1

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2009/000230

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

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:C12N;A61K;A61P

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

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

Databases : EPODOC,WPI,PAJ,CNPAT,ISI WEB OF KNOWLEDGE (BIOSIS, EMBASE, MEDLINE),CNKI,GENBANK,EBI,DDBJ;

Search terms : agkistrodon acutus, thrombin-like enzyme, serine proteinase, purif+, sequence search on the sequences of SEQ ID NO:1-2

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages        | Relevant to claim No. |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| PX        | CN101358184A(KANGCHEN PHARM DEV CO LTD)4 FEB.2009(04.02.2009),see claims 1-9              | 1-10                  |
| A         | CN1332241A(CHINESE ACAD SCI KUNMING ZOOLOGY INST) 23 JAN.2002 (23.01.2002),see claims 1-7 | 1-10                  |
| A         | CN1332242A(CHINESE ACAD SCI KUNMING ZOOLOGY INST) 23 JAN.2002 (23.01.2002),see claims 1-7 | 1-10                  |
| A         | CN1502693A(TANG, Songshan) 9 JUN.2004(09.06.2004), see claims 1-8                         | 1-10                  |
| A         | WO2005017139A1(WU,Zhong) 24 FEB.2005(24.02.2005), see claims 1-5                          | 1-4                   |

☒ 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                                                                 | “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                                                                     |
| “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date                                                                                | “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 |
| “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) | “&”document member of the same patent family                                                                                                                                                                                                     |
| “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                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                  |

|                                                                                                                                                                                                           |                                                                                        |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| Date of the actual completion of the international search<br>6 JUN.2009 (06.06.2009)                                                                                                                      | Date of mailing of the international search report<br><b>25 Jun. 2009 (25.06.2009)</b> |
| Name and mailing address of the ISA/CN<br>The State Intellectual Property Office, the P.R.China<br>6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088<br>Facsimile No. 86-10-62019451 | Authorized officer<br><b>XING Yunlong</b><br>Telephone No. (86-10)62411094             |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/CN2009/000230

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                   | Relevant to claim No. |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | Tani,A.et al., "Characterization, primary structure and molecular evolution of anticoagulant protein from Agkistrodon actus venom" , Toxicon, 40:803-813, 31 DEC.2002(31.12.2002), see abstract and results, figure 1,2,5                                                            | 1-10                  |
| A         | Cheng,X.et al., "Purification, characterization, and cDNA cloning of a new fibrinogenlytic venom protein, Agkisacutacin, from Agkistrodon acutus venom" , Biochem. Biophys. Res. Commun., 265:530-535, 31 DEC.1999 (31.12.1999), see abstract, materials and methods, figure 1,2,3,5 | 1-10                  |
| A         | ZHANG, Yanyu et al., "Cloning and Bioinformatics Analysis of a Thrombin-like Enzyme Gene from Agkistrodon Acutus" , Journal of Experimental Hematology, Vol.13, No.4, pages 542-547, 31 DEC.2005(31.12.2005), see abstract and figure 3                                              | 1-10                  |
| A         | LIANG, Ningsheng et al., "Molecular Cloning of the New cDNA for the Thrombin-Like Enzyme form the Venom of Agkistrodon Acutus" , Journal of Guangxi Medical University, Vol.19,No.1, pages 27-30,28 FEB.2002(28.02.2002), see abstract and figure 3                                  | 1-10                  |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/CN2009/000230

| Patent Documents referred<br>in the Report | Publication Date | Patent Family   | Publication Date |
|--------------------------------------------|------------------|-----------------|------------------|
| CN101358184A                               | 04.02.2009       | none            |                  |
| CN1332241A                                 | 23.01.2002       | CN1159437C      | 28. 07.2004      |
| CN1332242A                                 | 23.01.2002       | CN1159438C      | 28. 07.2004      |
| CN1502693A                                 | 09.06.2004       | none            |                  |
| WO2005017139A1                             | 24.02.2005       | CN1488399A      | 14. 04.2004      |
|                                            |                  | AU2003292882 A1 | 07. 03.2005      |
|                                            |                  | CN1218747C      | 14. 09.2005      |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2009/000230

Continuation of Box A:

IPC:

C12N9/64 (2006.01) i

A61K38/43 (2006.01) i

A61K9/19 (2006.01) i

A61K9/12 (2006.01) i

A61K9/70 (2006.01) i

A61P7/04 (2006.01) i

# 国际检索报告

国际申请号  
**PCT/CN2009/000230**

## A. 主题的分类

见附加页

按照国际专利分类表(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)

IPC:C12N;A61K;A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

数据库: EPODOC,WPI,PAJ,CNPAT,ISI WEB OF KNOWLEDGE(BIOSIS, EMBASE, MEDLINE),CNKI,GENBANK,EBI, DDBJ;

检索词: 尖吻蝥蛇, 五步蛇, 蕲蛇, 类凝血酶, 类凝血酶, 丝氨酸蛋白酶, 分离, 纯化, agkistrodon acutus, thrombin-like enzyme, serine proteinase, purif+, SEQ ID NO.1,2

## 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 |
|------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| PX   | CN101358184A(康辰医药发展有限公司)4.2 月 2009(04.02.2009), 见权利要求 1-9                                                                                                                                        | 1-10    |
| A    | CN1332241A(中国科学院昆明动物研究所) 23. 1 月 2002(23.01.2002) , 见权利要求 1-7                                                                                                                                    | 1-10    |
| A    | CN1332242 A(中国科学院昆明动物研究所) 23. 1 月 2002(23.01.2002) , 见权利要求 1-7                                                                                                                                   | 1-10    |
| A    | CN1502693A(唐松山) 9. 6 月 2004(09.06.2004), 见权利要求 1-8                                                                                                                                               | 1-10    |
| A    | WO2005017139A1(吴忠) 24.2 月 2005(24.02.2005), 见权利要求 1-5                                                                                                                                            | 1-4     |
| A    | Tani,A 等, “Characterization, primary structure and molecular evolution of anticoagulant protein from Agkistrodon actus venom”, Toxicon, 40:803-813, 31.12 月 2002(31.12.2002), 见摘要, 结果部分, 图 1、2、5 | 1-10    |

☒ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

\* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

6. 6 月 2009 (06.06.2009)

国际检索报告邮寄日期

**25.6 月 2009 (25.06.2009)**

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员

**邢云龙**

电话号码: (86-10) **62411094**

## C(续). 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   | Cheng,X.等, “Purification, characterization, and cDNA cloning of a new fibrinogenolytic venom protein, Agkisacutacin, from Agkistrodon acutus venom”, Biochem. Biophys. Res. Commun., 265:530-535, 31.12 月 1999 (31.12.1999), 见摘要, 材料和方法部分, 图 1、2、3、5 | 1-10    |
| A   | 张艳宇等, “尖吻蝮蛇类凝血酶基因的克隆及生物信息学分析”, 中国实验血液学杂志, 第 13 卷第 4 期, 542-547 页, 31.12 月 2005(31.12.2005), 见摘要以及图 3                                                                                                                                                 | 1-10    |
| A   | 梁宁生等, “一种新的五步蛇蛇毒类凝血酶 cDNA 的克隆和序列分析”, 广西医科大学学报, 第 19 卷第 1 期, 27-30 页, 28. 2 月 2002(28.02.2002), 见摘要以及图 3                                                                                                                                              | 1-10    |

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号  
**PCT/CN2009/000230**

| 检索报告中引用的<br>专利文件 | 公布日期       | 同族专利            | 公布日期        |
|------------------|------------|-----------------|-------------|
| CN101358184A     | 04.02.2009 | 无               |             |
| CN1332241A       | 23.01.2002 | CN1159437C      | 28. 07.2004 |
| CN1332242A       | 23.01.2002 | CN1159438C      | 28. 07.2004 |
| CN1502693A       | 09.06.2004 | 无               |             |
| WO2005017139A1   | 24.02.2005 | CN1488399A      | 14. 04.2004 |
|                  |            | AU2003292882 A1 | 07. 03.2005 |
|                  |            | CN1218747C      | 14. 09.2005 |

A 栏的续页:

IPC:

C12N9/64 (2006.01) i

A61K38/43 (2006.01) i

A61K9/19 (2006.01) i

A61K9/12 (2006.01) i

A61K9/70 (2006.01) i

A61P7/04 (2006.01) i