



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101918548 B

(45) 授权公告日 2013. 10. 16

(21) 申请号 200880123270. 4

(22) 申请日 2008. 11. 25

(30) 优先权数据

60/991, 148 2007. 11. 29 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 06. 28

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/084645 2008. 11. 25

(87) PCT申请的公布数据

W02009/073471 EN 2009. 06. 11

(73) 专利权人 泰勒克里斯生物治疗学公司

地址 美国北卡罗来纳州

(72) 发明人 V·诺沃克哈特尼

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

(51) Int. Cl.

C12N 9/68 (2006. 01)

C12N 15/09 (2006. 01)

(56) 对比文件

W0 2007047874 A1, 2007. 04. 26, 说明书全文.

宋钢. 人纤溶酶原结构和功能研究进展.《国外医学分子生物学分册》. 1999, 第 21 卷 (第 1 期), 39 - 42.

审查员 李美宣

权利要求书1页 说明书19页

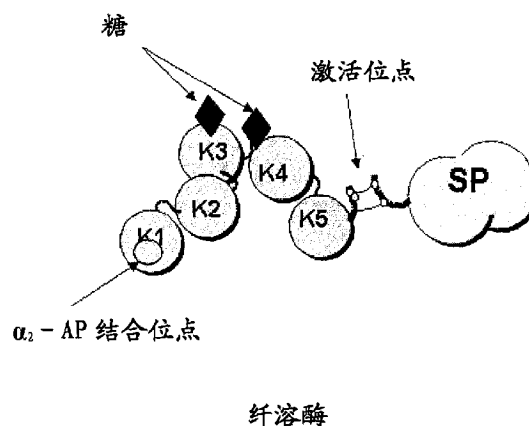
序列表36页 附图6页

(54) 发明名称

重组修饰的纤溶酶

(57) 摘要

本发明提供了涉及重组修饰的纤溶酶(原)分子的多聚核苷酸和多肽。纤溶酶(原)分子具有位于天然人纤溶酶原分子中的激活位点 N-末端的单个三环域,其如此组合使得不存在外来序列,并显示赖氨酸-结合以及与天然酶相关的显著的酶特征。



1. 多聚核苷酸,其包含编码如下多肽的核苷酸序列,该多肽具有
 - a) 与天然人纤溶酶原的三环域1结构域同源的单个N-末端三环域,其中三环域内最后四个氨基酸残基与SEQ ID No. 2的位置91-94上的残基相同;和
 - b) 与天然人纤溶酶原中对应结构域同源的C-末端结构域激活位点和丝氨酸蛋白酶结构域;其中所编码的多肽结合于固定化的赖氨酸并且可以被纤溶酶原激活子所激活;以及其中编码的多肽与SEQ ID No. 2所示序列具有至少95%同一性。
2. 权利要求1的多聚核苷酸,其中编码的多肽与SEQ ID No. 2所示序列具有至少98%同一性。
3. 权利要求1的多聚核苷酸,其中编码的多肽是SEQ ID NO:2所示序列。
4. 权利要求1的多聚核苷酸,其中多聚核苷酸的核苷酸序列是SEQ ID NO:1所示序列或编码SEQ ID No. 2所示多肽序列的简并变体。
5. 由权利要求1-4中任一项的多聚核苷酸编码的多肽。
6. 权利要求5的多肽,其中激活的多肽显示出纤维蛋白溶解活性,其被 α_2 -抗纤溶酶抑制,抑制速率是至少5倍快于 α_2 -抗纤溶酶对小-纤溶酶抑制纤维蛋白溶解活性的抑制速率。
7. 权利要求5的多肽,其中多肽具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列及其保守取代物。
8. 权利要求5的多肽,其中多肽在SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的位置85的相对位置上有精氨酸残基。
9. 表达载体,其包含权利要求1-4中任一项的多聚核苷酸。
10. 培养的细胞,其包含权利要求9的表达载体。
11. 产生多肽的方法,其包括在权利要求10的细胞中表达其所包含所述表达载体的所述多聚核苷酸。
12. 用于制备一种或多种具有不同N-末端的重组纤溶酶多肽的方法,所述方法包括:
 - a) 提供权利要求5的多肽;和
 - b) 将步骤a)中提供的多肽在足以切割一个或多个肽键的条件下与蛋白酶接触,从而形成一种或多种具有不同N-末端的重组纤溶酶多肽。
13. 权利要求12的方法,其中多肽具有SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。
14. 权利要求12的方法,其中步骤a)中的提供包括在大肠杆菌中表达SEQ ID NO:1所示的DNA序列或编码SEQ ID No. 2所示多肽序列的简并变体。

重组修饰的纤溶酶

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据 35 USC § 119 要求在 2007 年 11 月 29 日提交的美国临时申请 60/991,148 的优先权,通过引用将其并入本文。

[0003] 发明背景

[0004] 人纤溶酶原是单链蛋白质,含有 791 个氨基酸残基。酶原中 Arg561-Val1562 肽键的单一的切割引起纤溶酶原激活成为纤溶酶。产生的纤溶酶分子是具有胰蛋白酶样特异性(在 Lys 和 Arg 之后切割)的双链的二硫键连接的丝氨酸蛋白酶。

[0005] 纤溶酶的氨基-末端重链(残基 1-561, ~ 60kDa)由五个三环域(Kringle domain)组成,每个都含有大约 80 个氨基酸残基。三环域负责纤溶酶原的调控特性,如与激活抑制子(例如,Cl⁻离子)的相互作用;与激活刺激子(例如 ϵ -氨基酸)的相互作用;与哺乳动物和细菌细胞的相互作用;以及与其他蛋白质(如纤溶酶生理底物纤维蛋白和纤溶酶抑制子 α 2-抗纤溶酶的相互作用)。所有五个三环中,三环 1 是最具多功能性的一个:已经显示其赖氨酸结合活性负责纤溶酶与 α 2-抗纤溶酶和纤维蛋白的相互作用。见 Wiman, B., 等人, *Biochim. Biophys. Acta* 579:142-154(1979);及 Lucas, M. A., 等人, *J. Biol. Chem.* 258:4249-4256(1983)。

[0006] 纤溶酶的 C-末端轻链(残基 562-791, ~ 25kDa)是典型的丝氨酸蛋白酶,与胰蛋白酶同源,并含有经典的丝氨酸蛋白酶催化三联体:His603、Asp646 和 Ser741。纤溶酶原含有 24 个二硫键桥及位于 Asn289 和 Thr346 的 2 个糖基化位点。

[0007] 已显示纤溶酶原被弹性蛋白酶有限蛋白水解产生三个主要片段(Sottrup-Jensen, L., 等人, *Prog. Chem. Fibrinol. Thrombol.*, 3:191-209(1978))。第一个片段 K1-3 包括前三个三环,可以分离为两种形式, Tyr80-Val1338 和 Tyr80-Val1354。第二个片段 K4 对应于第四个三环,包括残基 Val1355-Ala440。最后一个, C-末端片段(所谓的小-纤溶酶原)包括残基 Val443-Asn791,并由第五个三环及丝氨酸蛋白酶结构域构成。小-纤溶酶原能以与纤溶酶原相同的方式被激活,形成小-纤溶酶。

[0008] 由于全长纤溶酶原分子的复杂结构,不能证明细菌表达系统可用于重组纤溶酶原的生产。纤溶酶原以不溶性包涵体形式生产,不能从该状态重折叠。进一步地,纤溶酶原在哺乳动物细胞中的表达由于细胞内纤溶酶原激活为纤溶酶并产生细胞毒性而变得复杂。使用昆虫细胞进行完全活性纤溶酶原的生产是可能的,然而,由于产量低该系统不适合于大规模生产。进一步地,与任何重组蛋白的方案相同,接受治疗性重组蛋白质的受试者中存在遇到免疫原性问题的可能。

[0009] 免疫原性是有效和/或高效利用特定重组蛋白质治疗方案的障碍。免疫原性是对被认为是外来的物质(例如,蛋白质的化学结构,包括氨基酸序列)的一系列复杂反应,并且可能包括产生中和及非中和抗体、免疫复合体形成、补体激活、肥大细胞激活、炎症及过敏反应。免疫原性可以多重方式限制蛋白质治疗剂的效力和安全性。效力可直接通过形成中和抗体的形成被减少。效力还可以间接减少:如结合于中和或非中和抗体一般导致其从血清中被迅速清除。当引发免疫反应时会发生严重的副作用甚至死亡。当中和抗体与

内源蛋白质交叉反应并阻断其功能时,产生一类特殊的副作用。

[0010] 因此,需要经修饰的重组蛋白质,其具有纤溶酶/纤溶酶原的理想特征(例如,具有天然样的化学结构的区域)而同时缺少特定负面特征,且能够在重组蛋白质表达系统(包括细菌细胞)中大量产生。

[0011] 发明概述

[0012] 在一方面,本发明提供包含编码多肽的核苷酸序列的多聚核苷酸,所述多肽具有

[0013] a) 与天然人纤溶酶原的三环域同源的单个 N-末端三环域,其中三环域内最后四个氨基酸残基为 V、P、Q 和 C;和

[0014] b) 与人纤溶酶原中对应结构域同源的 C-末端结构域激活位点和丝氨酸蛋白酶结构域;其中多肽结合于固定化的赖氨酸。

[0015] 在另一方面,本发明提供多肽,其包含:

[0016] a) 与天然人纤溶酶原的三环域同源的单个 N-末端三环域,其中三环域内最后四个氨基酸残基为 V、P、Q 和 C;和

[0017] b) 与人纤溶酶原中对应结构域同源的 C-末端结构域激活位点和丝氨酸蛋白酶结构域;其中多肽结合于固定化的赖氨酸。

[0018] 在另一方面,本发明提供包含本发明多聚核苷酸的表达载体。在一个实施方式中,多聚核苷酸包含如 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列。

[0019] 在一些方面,本发明提供培养的细胞,其包含具有本发明的多聚核苷酸的表达载体。在一个实施方式中,所述多聚核苷酸包含如 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列。在另一个实施方式中,培养的细胞为原核生物。在一个实施方式中,原核生物为大肠杆菌(E. coli)。

[0020] 在一方面,本发明提供用于制备一种或多种重组纤溶酶多肽的方法。该方法包括:

[0021] a) 提供多肽,其具有与天然人纤溶酶原的三环域同源的单个 N-末端三环域,其中三环域内最后四个氨基酸残基为 V、P、Q 和 C;以及与人纤溶酶原中对应结构域同源的 C-末端结构域激活位点和丝氨酸蛋白酶结构域;其中多肽结合于固定化的赖氨酸;和

[0022] b) 将步骤 a) 中提供的多肽在足以切割一个或多个肽键的条件下与蛋白酶接触,从而形成一种或多种重组纤溶酶多肽。在一个实施方式中,提供包括在合适宿主中表达具有对应于如 SEQ ID NO:1 所示序列的序列的开放阅读框,或其简并变体。在另一个实施方式中,多肽具有如 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列。

[0023] 图像简述

[0024] 图 1 为天然纤溶酶被蛋白水解切割而激活后的示意图。K1-K5 为三环区域 1-5;SP 为丝氨酸蛋白酶结构域。“ α 2-AP”为三环 1 上的 α_2 -抗纤溶酶结合位点。

[0025] 图 2 为本发明的纤溶酶原缺失突变体的示意图,使用了与图 1 相同的命名,显示了 K2-5 的缺失。

[0026] 图 3 显示了人纤溶酶原的氨基酸序列,显示了 19-残基的先导序列,编号为 -19 至 -1,纤溶酶原序列显示为残基 1-791(见 SEQ ID NO:3,人纤溶酶原的 cDNA 序列;及 SEQ ID NO:4,所编码的氨基酸序列,如图 3 所示)。显示了许多特征,包括以下:(TAL6003)-纤溶酶原序列(阴影部分)的一个实施方式;三环域 1-5(双下划线);糖基化位点 Ash289 和 Thr346(加粗);Arg-Val 激活位点(R⁵⁶¹V⁵⁶²,加粗);及三环 1 中的赖氨酸结合位点(下划线

并具有特异性位置编号)。

[0027] 图 4 显示天然人纤溶酶(原)的五个三环域(1-5)之间的多肽序列比较(即,缺口比对)。与三环 1 中同一个相对位置上的相同的氨基酸残基以下划线显示。

[0028] 图 5 显示血浆衍生的纤溶酶制备物(泳道 1 = 非还原(NR);泳道 2 = 还原(R))及(TAL6003)-纤溶酶(泳道 3 = 非还原(NR);泳道 4 = 还原(R))制备物的 8-25% 梯度 SDS-PAGE。链激酶分别将血浆衍生纤溶酶原和(TAL6003)-纤溶酶原激活为天然纤溶酶和重组(TAL6003)-纤溶酶,使得形成对应于三环和丝氨酸蛋白酶结构域的两条带。这样,在电泳前与还原性试剂二硫苏糖醇(DTT)一起温育后,血浆衍生纤溶酶和(TAL6003)-纤溶酶(其在非还原胶上是单个条带)被还原成在同一个非还原胶上对应于三环 1(下方条带)和丝氨酸蛋白酶结构域(上方条带)的两条带。

[0029] 图 6 为链激酶激活(TAL6003)-纤溶酶原的示意图。

[0030] 图 7 为色谱图,显示了(TAL6003)-纤溶酶原结合于赖氨酸-SEPHAROSE 4B: 将 0.5mg 纯化的(TAL6003)-纤溶酶原应用到用 pH7.4 的 Tris 缓冲盐水平衡的赖氨酸-SEPHAROSE 4B 柱子(1x3cm)上。用 0-20mM 梯度的 ϵ -氨基己酸(ϵ -ACA)将结合的蛋白质从柱子上洗脱,作为单一的峰。280nm 处的吸光度与 ϵ -ACA 浓度作为洗脱剂体积的函数显示于图像中。

[0031] 图 8 显示(TAL6003)-纤溶酶原与纤维蛋白的结合,通过其随后被 tPA 激活的情况及所得的凝块溶解进行评估。

[0032] 图 9 显示(TAL6003)-纤溶酶与血浆衍生纤溶酶的溶解血栓效力的体外比较。

[0033] 图 10 示例显示了(TAL6003)-纤溶酶(SEQ ID NO:2)的二硫键模式。在图中,(X)代表氨基酸序列 RDVVLFEK。

[0034] 发明详述

[0035] 本发明人已经发现新型重组纤溶酶原多肽或其变体,本文称为(TAL6003)-纤溶酶原,其具有天然纤溶酶原样特征,虽然从其结构中删除了 4 个三环。这些(TAL6003)-纤溶酶原或其变体为能够在激活事件(至少涉及位于酶原的三环域和丝氨酸蛋白酶结构域之间的 Arg-Val 肽键的蛋白水解切割)之后被激活成为功能性纤溶酶酶类(本文称为(TAL6003)-纤溶酶)的酶原。

[0036] 本发明的(TAL6003)-纤溶酶原或其变体具有纤维蛋白全长天然人纤溶酶原的结合纤维蛋白、结合抗纤溶酶,以及激活属性。此外,(TAL6003)-纤溶酶原具有许多新型的和理想的特征,包括在重组生产中高水平表达以及与天然发生的人血浆衍生纤溶酶原相同的或非常类似的特定的蛋白质化学结构。

[0037] 根据本发明的(TAL6003)-纤溶酶(原)能够至少依据以下几点定性:

[0038] i) (TAL6003)-纤溶酶原激活后产生的(TAL6003)-纤溶酶分子量较低(例如,在一个实施方式中为大约 36,911- 大约 37,039Da),由此引起特异性活性(每 mg 蛋白质)的增加;

[0039] ii) 缺少至少两个在天然蛋白质中发现的糖基化位点(见图 3,即, N²⁸⁹ 和 T³⁴⁶),这与相对低的分子量一起促进了使用相对廉价的细菌和酵母表达系统进行此蛋白的重组生产;

[0040] iii) (TAL6003)-纤溶酶原能够被纤溶酶原激活子 tPA、尿激酶和链激酶激活;

[0041] iv) 与天然人纤溶酶的原三环域同源的单个 N- 末端三环域的存在保留了纤溶酶与纤维蛋白结合的属性,这对于溶解血栓效力是重要的;

[0042] v) 与天然人纤溶酶的原三环域同源的单个 N- 末端三环域中 α_2 - 抗纤溶酶- 结合位点的存在使得 (TAL6003)- 纤溶酶被此纤溶酶生理学抑制子迅速抑制 (能够阻止流血的一个特征);

[0043] vi) (TAL6003)- 纤溶酶较小的大小能够促进其被 α_2 - 巨球蛋白抑制,相对于天然纤溶酶进一步减少发生流血并发症的机会。在具体实施方式中,三环 5 的缺乏 (保留了完整的、未消化的纤维蛋白 (原) 的主要结合位点) 使得能够利用具有减少的循环纤维蛋白原缺失的 (TAL6003)- 纤溶酶;

[0044] vii) 与天然人纤溶酶的原三环域同源的单个 N- 末端三环域 (其中三环域内最后四个氨基酸为 V、P、Q 和 C) 的存在提供了与丝氨酸蛋白酶结构域的天然样连接 (即,与人纤溶酶原三环 5 结构域和丝氨酸蛋白酶结构域之间天然发生的结构域连接处类似的连接); 及

[0045] viii) 表达重组 (TAL6003)- 纤溶酶原后,其 N- 末端可向后切割 (即,在激活过程中向后切割) 以提供天然样 N- 末端。

[0046] 通常,本发明提供重组 (TAL6003)- 纤溶酶 (原) 多肽,其具有激活位点 N- 末端的单个三环区域和丝氨酸蛋白酶结构域,相比小- 纤溶酶 (原) 有特定优势。尽管本发明的 (TAL6003)- 纤溶酶原只有一个例如激活位点 N- 末端的三环域,一些实施方式包括激活位点 N- 末端的其他序列。其它 N- 末端序列可以衍生自纤溶酶原的天然三环区域的序列。

[0047] 本发明 N- 末端三环域包括天然纤溶酶 (原) 三环 1 和 4 的三环域序列及其功能等价物。具体而言,见以下讨论,其中提供了关于多肽变体中功能保留的指导,包括参与或影响赖氨酸- 结合的残基的保留。

[0048] 进一步地,本发明多肽的具体实施方式由于天然样结构所以能够显示出减少的免疫原性。例如,在一些实施方式中,本发明的重组纤溶酶原具有与天然发生的人血浆衍生纤溶酶原形式之一相同的 N- 末端,其在被链激酶激活后产生包含天然样 N- 末端的纤溶酶多肽。此外,本发明的新型多肽在三环和丝氨酸蛋白酶结构域之间具有一个序列,其类似于天然发生人纤溶酶三环 5 和 SP 结构域之间的连接点。

[0049] 定义

[0050] 如本文使用的,术语多肽的“结构域”和“区域”一般是同义的,除非另外指出是相反的情况。当与公认的结构或功能名称如“三环”或“丝氨酸蛋白酶”等一同提到时,这些术语介绍的是多肽特征,其与至少一些通常认可并理解为与对应于这些名称的多肽结构相关的特性是相关的。

[0051] 如本文使用的,“培养的宿主细胞”指的是含有已经通过任何方式引入细胞的异源 DNA 的原核或真核细胞,所述方式例如,电穿孔、磷酸钙沉淀、显微注射、转化、病毒感染等等。

[0052] 如本文使用的,“异源的”意思是“不同于天然来源的”或代表非天然状态。例如,如果培养的宿主细胞用衍生自另一种生物 (特别是来自另一个物种) 的 DNA 或基因转化,该基因对于所培养的宿主细胞以及对于携带此基因的培养的宿主细胞的后代是异源的。类似地,“异源的”指衍生自并插入到相同天然、原始细胞类型的核苷酸序列,但其以非天然状

态存在,例如,有不同拷贝数或受到不同调节元件的控制。进一步地,当用于核酸或氨基酸序列的情况时,术语“异源的”还可以指此序列上的与同一序列的另一区域具有不同天然来源的任意区域。例如,如果重组蛋白质包含衍生自载脂蛋白(a)的三环域及衍生自纤溶酶原的丝氨酸蛋白酶结构域,此三环域和丝氨酸蛋白酶结构域相对彼此为“异源的”,尤其是当每个结构域衍生自不同物种或生物时。

[0053] “载体”分子是其中可以插入异源核酸的核酸分子,其然后能引入恰当的培养的宿主细胞中。载体优选地具有一个或多个复制起点以及一个或多个其中可以插入重组 DNA 的位点。载体经常有方便的方法将具有载体的细胞从那些不具有载体的细胞中挑选出来,例如,其编码药物抗性基因。常见载体包括质粒、病毒基因组和(主要在酵母和细菌中)“人工染色体”。

[0054] 如本文使用的,术语“转录控制序列”指的是这样的核酸序列,如起始子序列、增强子序列和启动子序列,其诱导、抑制或控制可操作地连接于其上的编码蛋白质的核酸序列的转录。

[0055] 术语“多肽”在本文与术语“肽”和“蛋白质”交换使用。

[0056] 术语“多聚核苷酸”和“核酸”在本文交换使用,可以指任何含有上下文指出的目的所需信息的核酸。即,核酸可以是 DNA 或 RNA,单链或双链的,或其他核酸,只要多聚体能够代表恰当的信息,例如,关于编码的肽,且包括互补序列,例如,核酸多聚体的正义链和反义链。

[0057] 术语多肽的“变体”指的是一个或多个氨基酸发生改变的氨基酸序列。变体可以有“保守”变化,其中被取代的氨基酸具有类似结构或化学属性,例如,以异亮氨酸代替亮氨酸。备选地,变体可以具有“非保守”变化,例如,以色氨酸代替甘氨酸。类似的微小变化还可以包括氨基酸缺失或插入,或二者。“变体”多肽的特定形式是“功能上等价的”多肽,即,显示出与本发明多肽的实例基本类似的体内或体外活性的多肽,如下文更详细描述。可以使用本领域熟知的计算机程序找到关于确定哪些氨基酸残基能够被取代、插入或缺失而不消除生物学或免疫学活性的指导,例如 DNASTAR 软件(DNASTAR, Inc., Madison, WI)。进一步地,下面提供了具体指导,包括引用的参考文献中提供的指导,其全部通过引用并入本文。

[0058] 术语“N-末端”和“C-末端”用在本文以指应用这些术语的任何氨基酸序列或多肽结构域或结构的相对位置。相对定位将从上下文变得清楚。也就是,“N-末端”特征比相同上下文讨论的另一特征(其他特征可能被称作相对于第一个特征位于“C-末端”)将位于距离多肽分子 N-末端至少更近的地方。类似地,术语“5'-”和“3'-”可以用于本文以指多聚核苷酸特征的相对位置。

[0059] 本文所指的具有“与天然人纤溶酶原的三环域同源的”N-末端结构域的多肽显示出类似于天然纤溶酶原三环域的结构和功能特征。进一步地,本文所指的具有“与三环 1 同源的”的 N-末端结构域的多肽显示出类似于天然三环 1 的特征,类似的程度至少达到多肽能够比三环 5 具有更高的对于 ω -氨基酸(及功能同源物如反式-4-氨基甲基环己烷-1-羧酸,一种环酸)的亲和力。对于比较分离的三环域多肽结合 5-氨基戊酸(5-APnA);6-氨基己酸(6-AHxA),也称为 ϵ -氨基己酸(ϵ ACA);7-氨基庚酸(7-AHpA);和反式-4-氨基甲基环己烷-1-羧酸(t-AMCHA)的条件和操作流程:参见,例如,Chang, Y.,等

人, *Biochemistry* 37 :3258-3271 (1998), 通过引用并入本文。

[0060] “与三环 4 同源的”三环域的提法的定义类似于上文关于“与三环 1 同源的”词语。也就是, 其显示出类似于上文讨论的天然人纤溶酶原的三环 4 的功能特征。如上文所述, 这些多肽也与固定化赖氨酸结合。

[0061] 本发明的多肽与固定化的赖氨酸结合。如本文使用的, 词语“与固定化的赖氨酸结合”指当使用赖氨酸-SEPHAROSE 作为色谱媒介进行柱色谱时, 如此表征的多肽相对于小-纤溶酶原前进较为迟滞。一般地, 可以使用含有特定配体(例如 ϵ -ACA, 作为洗脱剂)的溶液将本发明的多肽从这种色谱媒介(赖氨酸亲和树脂)上洗脱下来。

[0062] 进一步地, 除了 Chang 等人, 见上文, 本领域技术人员还可以参考其他文献以确定何种残基可以通过保守或非保守取代、缺失或添加而变化以产生本发明范围内的缺失突变体。例如, 以下参考文献提供了关于对于结合 ω -氨基酸可能具有重要意义的天然三环域上特定残基的信息: Ji 等人的美国专利 6,538,103; Suzuki 的美国专利 6,218,517; Douglas, J. T., 等人, *Biochemistry* 41(10):3302-10(2002); Zajicek, J., 等人, *J. Mol. Biol.*, 301(2):333-47(2000); Lee, H., 等人, *Arch Biochem Biophys.*, 375(2):359-63(2000); Castellino, F. and S. McCance, *Ciba Found Symp.* 212:46-60(1997); McCance, S., 等人, *J. Biol. Chem.*, 269:32405-32410(1994); Rejante, M. R. and M. Llinas, *Eur. J. Biochem.*, 221(3):939-49(1994); Wu, T. P., 等人, *Blood Coagul. Fibrinolysis*, 5(2):157-66(1994); Hoover, C. J., 等人, *Biochemistry*, 32(41):10936-43(1993); Menhart, N., 等人, *Biochemistry*, 32:8799-8806(1993); Thewes, T., 等人, *J. Biol. Chem.*, 265(7):3906-3915(1990); Novokhatny, V., 等人, *Thromb Res.*, 53(3):243-52(1989); Motta, A., 等人, *Biochemistry*, 26(13):3827-36(1987); Novokhatny, V., 等人, *J. Mol. Biol.*, 179:215-232(1984); Lerch, P. G., 等人, *Eur. J. Biochem.*, 107(1):7-13(1980); Sottrup-Jensen, L., 等人, *Prog. Chem. Fibrinol. Thrombol.*, 3:191-209(1978); 及 Wiman, B. 和 D. Collen, *Nature* 272,549-545(1978), 皆通过引用全文并入本文。

[0063] 因为本发明人已经认识到可以制备一种有价值的、简单化的纤溶酶(原)分子, 其具有单个具有有益的功能性特征(可以通过测试与固定化赖氨酸的结合而进行部分评估, 如本文所述)的 N-末端三环域, 所以本发明能包括其他激活位点 N-末端的纤维蛋白-结合结构域或区域。例如, 本发明可以包括这样的多肽: 其中纤溶酶的丝氨酸蛋白酶结构域连接于纤维蛋白结合三环域, 所述三环域选自一组, 包括但不限于人纤溶酶原的三环 4、tPA 的三环 2 或载脂蛋白(a)的三环。此外, 本发明可以包括这样的多肽: 其中纤溶酶的丝氨酸蛋白酶结构域连接于任何其他已知的纤维蛋白结合分子, 如 tPA 或纤连蛋白“指状”结构域或纤维蛋白特异性 IgG 的 FAB 片段。

[0064] 在一些方面, 本发明的多肽具有与在人血浆衍生纤溶酶(原)的天然发生的形式中发现的化学结构相同的蛋白质化学结构(例如, 天然样 N-末端, 三环与丝氨酸蛋白酶结构域之间的天然样连接)。不被具体的理论所限, 人们相信蛋白质的特定特征(包括但不限于氨基酸序列)可以对免疫原性产生作用。因此, 本发明提供了基于重组(TAL6003)-纤溶酶原的有效的蛋白质治疗剂, 通过引入与天然人纤溶酶原序列相似的氨基酸序列而预先减少(TAL6003)-纤溶酶原潜在的免疫原性。

[0065] 在一个方面, 本发明的重组(TAL6003)-纤溶酶原多肽包含 a) 与天然人纤溶酶原

的三环域同源的单个 N- 末端三环域,其中三环域内最后四个氨基酸残基为 V、P、Q 和 C;和 b) 与人纤溶酶原中对应结构域同源的 C- 末端结构域激活位点和丝氨酸蛋白酶结构域;其中多肽结合于固定化的赖氨酸。在一个实施方式中,单个 N- 末端三环域与天然人纤溶酶原的三环 1 或三环 4 同源。在一些实施方式中,固定化的赖氨酸是结合于固体支持基质,所述基质选自赖氨酸-琼脂糖、赖氨酸水凝胶、赖氨酸-交联琼脂糖。在另一个实施方式中,固定化的赖氨酸为赖氨酸-交联琼脂糖。

[0066] 本发明的重组 (TAL6003)- 纤溶酶原多肽可以被本领域普通技术人员激活以提供 (TAL6003)- 纤溶酶多肽。在一个实施方式中, (TAL6003)- 纤溶酶多肽显示出纤维蛋白溶解活性,其被 α_2 - 抗纤溶酶抑制,抑制速率是至少 5 倍快于 α_2 - 抗纤溶酶对小- 纤溶酶的纤维蛋白溶解活性的速率抑制。在另一个实施方式中,抑制速率是至少大约 10- 倍、20- 倍、30- 倍或 40- 倍快于小- 纤溶酶的抑制速率。

[0067] 在一个实施方式中,重组 (TAL6003)- 纤溶酶原多肽与 SEQ ID NO :2 所示的序列有至少 90% 或 95%, 或 98% 的同一性。在另一个实施方式中,单个 N- 末端三环域与天然人纤溶酶原的三环 1 或三环 4 结构域具有至少 90% 的同一性;且 C- 末端结构域与人纤溶酶原的激活位点和丝氨酸蛋白酶结构域具有至少 90% 的同一性。在一些实施方式中,多肽具有如 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列及其保守取代物。在其他实施方式中,多肽在类似于 SEQ ID NO :2 所示氨基酸序列位置 85 的相对位置上有精氨酸残基。

[0068] 在进一步的实施方式中,单个 N- 末端三环域与天然人纤溶酶原的三环 1 或三环 4 的氨基酸序列同一性,相对于与天然人纤溶酶原的三环 5 的序列同一性至少多一个残基,就与三环 5 作同一性比较目的而言,单个 N- 末端三环域相对于人纤溶酶原的三环 1 和三环 4 的天然序列的保守取代不被认为与所述天然序列不同。

[0069] 例如,本发明描述的 (TAL6003)- 纤溶酶原利用了连接单个三环域和丝氨酸蛋白酶的连接区域的氨基酸残基修饰。这样,两个结构域之间的该连接更相近地类似于人纤溶酶原的三环 5 结构域和丝氨酸蛋白酶结构域之间的天然发生的接合。

[0070] 在另一个实施方式中,本发明描述的 (TAL6003)- 纤溶酶原进一步包含天然样 N- 末端序列。重组生产的 (TAL6003)- 纤溶酶原可以在激活时被切割以提供同样具有天然样 N- 末端的重组 (TAL6003)- 纤溶酶多肽。

[0071] 在特定实施方式中, (TAL6003)- 纤溶酶原的单个 N- 末端三环域特定位置上的残基相对于天然人纤溶酶原三环 1 是保守的。这些可以是与二硫桥和赖氨酸结合相关的位置上的残基,分别包括 Cys84、Cys105、Cys133、Cys145、Cys157 和 Cys162 以及 Pro136-Pro140、Pro143-Tyr146 和 Arg153-Tyr156 (位置按照如图 3 所示进行编号)。此外,本发明具体的实施方式可以相对于具有类似结构域成分 (即,三环域-丝氨酸蛋白酶 (K-SP) 的小-纤溶酶 (原) 进行化学上的定性 (参见 Sottrup-Jensen, L., 等人, Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis, Vol. 3, (Eds: J.F. Davidson, 等人) Raven 出版社, New York (1978)), 但是,尤其在类似于 SEQ ID NO :2 所示氨基酸序列的位置 85 的相对位置上缺少精氨酸 (Arg)。在一些实施方式中,本发明的 (TAL6003)- 纤溶酶原包含单个 N- 末端结构域,其在类似于 SEQ ID NO :2 所示氨基酸序列的位置 85 的相对位置上有 Arg。类似于 SEQ ID NO :2 所示氨基酸序列的位置 85 的相对位置的非限制性例子包括 SEQ ID NO :4 所示氨基酸序列的 Arg (153)、Arg (234)、Arg (324) 和 Arg (426) 位置。

[0072] 在其他实施方式中,指定残基的特定位置可以稍微变化,但仍存在于多肽的结构和功能类似位置上(即相对于N-末端结构域的三环域结构;见Chang, Y.,等人,如上文讨论的)。在一些实施方式中,(TAL6003)-纤溶酶(原)多肽的单个N-末端三环域与天然人纤溶酶原的三环1或三环4天然的同源性百分比,比与天然人纤溶酶原三环5的同源性百分比至少多一个残基。

[0073] 进一步地,本发明具体实施方式可以相对于小-纤溶酶(原)进行功能上的定性。在优选的实施方式中,本发明的(TAL6003)-纤溶酶显示出增加的被 α_2 -抗纤溶酶抑制的速率,例如,比小-纤溶酶的抑制速率快大约一个或两个数量级。进一步地,在具体实施方式中,(TAL6003)-纤溶酶结合固定化的赖氨酸(例如,赖氨酸-SEPHAROSE)。

[0074] 将(TAL6003)-纤溶酶原的单个N-末端三环域描述为“N-末端”仅仅是指该结构域存在于激活位点的N-末端,不意味着不存在此结构域本身N-末端的其他氨基酸残基。进一步地,纤溶酶原的单个N-末端三环域的多数C-末端半胱氨酸残基(即,图4所示的多数C-末端Cys残基)和激活位点之间放置的残基数量和同源性可以变化,而不脱离本发明的范围。基于本文公开以及本文引用的用作关于三环1功能和结构的指导的参考文献,本领域技术人员无需过量实验即可以确定达到本发明益处的这些变化(ω 氨基酸的三环1样结合,缺失突变体大小没有实质增加,也没有引入潜在引起问题的糖基化位点)。

[0075] 因此,本发明涉及多聚核苷酸、多肽、用于生产所述多肽的重组方法、含有所述多聚核苷酸的载体、用于生产所述多肽的表达系统以及包含这些表达系统的培养的宿主细胞。

[0076] 如指出的,在一个方面,本发明涉及编码本文公开的多肽的多聚核苷酸或具有其保守氨基酸取代物的多肽。关于选择“保守”氨基酸取代的指导在下文更详细提供。在一个实施方式中,多聚核苷酸是DNA。

[0077] 在另一方面,本发明涉及制备载体的方法,包括将本发明的多聚核苷酸插入载体。在另一方面,本发明涉及由本发明的方法生产的载体。

[0078] 在另一方面,本发明涉及制备培养的宿主细胞的方法,包括将本发明载体引入培养的宿主细胞。在另一方面,本发明涉及由本发明的方法生产的培养的宿主细胞。

[0079] 在另一方面,本发明涉及本发明分离的多肽,其通过包括下列步骤的方法生产:(a) 将包含编码所述多肽的多聚核苷酸的载体引入培养的宿主细胞;(b) 培养宿主细胞;以及(c) 回收多肽。在另一方面,本发明涉及用于生产多肽的方法,其包括:(a) 在表达载体的条件下培养本发明的宿主细胞;及(b) 回收多肽。

[0080] 在另一个方面,本发明涉及含有至少一种本发明的多聚核苷酸的细胞。

[0081] 在一个实施方式中,多聚核苷酸包含如SEQ ID NO:1所示核苷酸序列。在另一个实施方式中,多聚核苷酸包含如SEQ ID NO:1所示核苷酸序列的核苷酸4-1032。在其他实施方式中,多肽包含如SEQ ID NO:2所示氨基酸序列。

[0082] 多聚核苷酸

[0083] 本发明的多聚核苷酸包括具有取代、缺失和/或添加(可以涉及一种或多种核苷酸)的变体。变体可以在编码区域、非编码区域或二者中有改变。编码区域的改变能够产生保守或非保守的氨基酸取代、缺失或添加。这些之中尤其优选的是沉默的取代、添加和缺失,其不改变(TAL6003)-纤溶酶(原)蛋白质或其部分的属性和活性。就此而言尤其优选

的还有保守取代（见下文）。

[0084] 本发明的进一步实施方式包括核酸分子，其包含与以下序列具有至少 90% 同一性，更优选至少 95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的核苷酸序列的多聚核苷酸：(a) 编码具有 SEQ ID NO:2 的完整氨基酸序列的多肽的核苷酸序列；(b) 编码具有 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的多肽的核苷酸序列；和 (c) 与上文 (a) 或 (b) 中任何核苷酸序列互补的核苷酸序列。

[0085] 在一个实施方式中，本发明的核酸分子包括多聚核苷酸，其具有编码具有 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的多肽的核苷酸序列。在其他实施方式中，核酸分子包括多聚核苷酸，其具有 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列或其简并变体。

[0086] 在说到具有与编码 (TAL6003)- 纤溶酶原的参考核苷酸序列具有例如至少 95% 的“同一性”的核苷酸序列的多聚核苷酸，其表示所述多聚核苷酸的核苷酸序列与所述参考序列是相同的，只不过所述多聚核苷酸序列在编码 (TAL6003)- 纤溶酶原多肽的参考核苷酸序列的每 100 个核苷酸中可以包括多至 5 个点突变。换句话说，为了获得具有与参考核苷酸序列至少 95% 同一性的核苷酸序列的多聚核苷酸，参考序列中多至 5% 的核苷酸可以缺失或被其他核苷酸取代，或可以将数目多至参考序列总核苷酸 5% 的核苷酸插入所述参考序列。参考序列的这些突变可以发生在参考核苷酸序列的 5' 或 3' 末端位置，或位于两个末端位置之间的任何位置，单独分散在参考序列的核苷酸之中或者在参考序列内的一个或多个连续的组中。

[0087] 如上文所指出的，可以通过确定它们的百分比同一性来比较两个或更多个多聚核苷酸序列。同样可以通过确定它们的百分比同一性比较两个或更多个氨基酸序列。无论是核酸还是肽序列，两个序列的百分比同一性一般被描述为两个比对序列之间完全匹配的数目除以较短序列的长度并乘以 100。核酸序列的近似比对是通过 Smith 和 Waterman 的局部同源性算法提供的，见 *Advances in Applied Mathematics* 2:482-489(1981)。该算法可以扩展到用于肽序列，采用由 Dayhoff 开发的评分矩阵，见 *Atlas of Protein Sequences and Structure*, M. O. Dayhoff ed., 5 suppl. 3:353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, D. C., USA, 并且通过 Gribskov *Nucl. Acids Res.* 14(6):6745-6763(1986) 进行标准化。这种算法对于核酸和肽序列的实施是由 Genetics Computer Group (Madison, Wis.) 在他们的 BESTFIT 应用程序中提供的。该方法的缺省参数在以下文献中描述：*Wisconsin Sequence Analysis Package Program Manual, Version 8(1995)*（可以从 Genetics Computer Group, Madison, Wis. 获得）。

[0088] 例如，由于遗传密码的简并性，本领域普通技术人员将直接意识到与 SEQ ID NO:1 所示核酸序列具有至少 90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的大量核酸分子将编码 (TAL6003)- 纤溶酶原多肽。实际上，由于这些核苷酸序列的简并变体都编码相同的多肽，所以这对于本领域技术人员来说是显而易见的，不需要进行本文描述的任何功能分析或测定。本领域进一步认识到，对于不是简并变体的这类核酸分子来说，其中也会有合理数量的核酸分子编码具有 (TAL6003)- 纤溶酶原多肽活性的多肽。这是因为技术人员完全了解那些不太可能或不可能显著影响蛋白功能的氨基酸取代（例如，将一种脂肪族氨基酸取代为另一种脂肪族氨基酸）。

[0089] 最近，在较长的多聚核苷酸序列的合成生产方面的进展已经能够合成生产编码显

著更长的多肽的核酸,而不使用传统克隆技术。这些服务的商业提供者包括 Blue Heron, Inc., Bothell, WA (<http://www.blueheronbio.com>)。由 Blue Heron, Inc. 所采用的技术披露于美国专利号 6,664,112 ;6,623,928 ;6,613,508 ;6,444,422 ;6,312,893 ;4,652,639 ;公开的美国专利申请号 20020119456A1 ;20020077471A1 ;和公开的国际专利申请(公开号)W00305423A3 ;W00194366A1 ;W09727331A2 ;和 W09905322A1 中,所有文献皆通过引用并入本文。

[0090] 当然,分子生物学,微生物学和重组核酸的传统技术也可用于生产本发明的多聚核苷酸。这些技术是众所周知的,并且披露于以下文献中,例如,Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel, ed., Vols. I, II and III (1997) ; Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) ; DNA Cloning: A Practical Approach, D.N. Glover, ed., Vols. I and II (1985) ; Oligonucleotide Synthesis, M.L. Gait, ed. (1984) ; Nucleic Acid Hybridization, Hames 和 Higgins, eds. (1985) ; Transcription and Translation, Hames 和 Higgins, eds. (1984) ; Animal Cell Culture, R.I. Freshney, ed. (1986) ; Immobilized Cells and Enzymes, IRL Press (1986) ; Perbal, " A Practical Guide to Molecular Cloning " ; the series, Methods in Enzymology, Academic Press, Inc. (1984) ; Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells, J.H. Miller 和 M.P. Calos, eds., Cold Spring Harbor Laboratory (1987) ; 和 Methods in Enzymology, Wu 和 Grossman 和 Wu, eds., 分别见 Vols. 154 和 155, 以上文献皆通过引用并入本文。

[0091] 载体和培养的宿主细胞

[0092] 本发明还涉及包括本发明分离的核酸分子的载体,使用重组载体进行遗传工程改造的培养的宿主细胞,以及通过重组技术生产(TAL6003)-纤溶酶(原)多肽。

[0093] 可以使用公知技术(例如感染、转导、转染、转位、电穿孔和转化)将重组构建体导入培养的宿主细胞。载体可以是例如噬菌体、质粒、病毒或逆转录病毒载体。逆转录病毒载体可以是能复制的或复制缺陷型的。在后一种情况下,病毒繁殖通常只能在补偿性培养的宿主细胞中发生。

[0094] 所述多聚核苷酸可以与含有选择标记的载体连接,以便在培养的宿主中繁殖。一般地,将质粒载体导入沉淀物,如磷酸钙沉淀物,或导入具有带电荷的脂质的复合物。如果载体是病毒的话,可以使用合适的包装细胞系进行体外包装,然后转导进入培养的宿主细胞。

[0095] 优选的是包含对感兴趣的多聚核苷酸的顺式作用控制区的载体。合适的反式作用因子可以由培养的宿主提供,由互补载体提供或在导入培养的宿主后由载体本身提供。

[0096] 在这一方面的特定实施方案中,所述载体提供了特异性表达,它可以是可诱导和/或细胞类型特异性的。在这种载体中特别优选的是可以通过便于操纵的环境因素(如温度和营养添加剂)诱导的载体。

[0097] 可用于本发明的表达载体包括染色体-、附加体-和病毒-衍生的载体,例如,衍生自细菌质粒、噬菌体、酵母附加体、酵母染色体元件、病毒(如杆状病毒、乳多泡病毒、痘病毒、腺病毒、禽痘病毒、伪狂犬病毒和逆转录病毒)的载体,以及衍生自它们的组合的载体,

如粘粒和噬菌粒。

[0098] DNA 插入物应当可操作地连接到合适的启动子,如噬菌体 λ PL 启动子,大肠杆菌 lac、trp 和 tac 启动子,SV40 早期和晚期启动子和逆转录病毒 LTR 的启动子(仅举几个例子)。其他合适的启动子为本领域技术人员所公知。表达构建体还包含转录起始位点、终止位点,并且在转录区中还包含用于翻译的核糖体结合位点。由所述构建体表达的成熟转录物的编码部分可以包括位于开始部分的翻译起始和适当地位于要翻译的多肽的末端的终止密码子(UAA、UGA 或 UAG)。

[0099] 正如所指出的,表达载体优选包括至少一种可选择的标记,这类标记包括二氢叶酸还原酶或新霉素抗性,用于真核细胞培养物;以及四环素或氨苄青霉素抗性基因,用于在大肠杆菌(*E. coli*)和其他细菌中培养。合适的培养的宿主的代表性例子包括但不限于细菌细胞,如大肠杆菌、链霉菌属(*Streptomyces*)和鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonellatyphimurium*)细胞;真菌细胞,如酵母细胞;昆虫细胞,如果蝇(*Drosophila*) S2 和草地夜蛾(*Spodoptera*) Sf9 细胞;动物细胞,如 CHO、COS 和 Bowes 黑素瘤细胞;以及植物细胞。用于上述培养的宿主细胞的合适的培养基和条件为本领域所公知。

[0100] 优选用于细菌的载体包括例如 pET24b 或 pET22b(可获自 Novagen, Madison), WI(pET-24b(+)) 和 pET-22b(+)) 分别 = pETExpression System 24b(Cat.No.69750) 和 22b(Cat.No.70765), EMD Biosciences Inc., Novagen Brand, Madison, WI, 见 <http://www.emdbiosciences.com> 关于 pET-24b 和 pET-22b 的产品信息部分获得关于载体的详细资料), pQE70、pQE60 和 pQE-9(可以从 Qiagen Inc., Valencia, CA 获得);pBS 载体、PHAGESCRIPT 载体、BLUESCRIPT 载体、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A(可以从 Stratagene, LaJolla, CA 获得);和 ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5(可以从 Pharmacia(现在是 Pfizer, Inc., New York, NY) 获得)。优选的真核载体有 pWLNE0、pSV2CAT、pOG44、pXT1 和 pSG(可以从 Stratagene 获得);以及 pSVK3、pBPV、pMSG 和 pSVL(可以从 Pharmacia 获得)。其他合适的载体对本领域技术人员来说是显而易见的。

[0101] 适用于本发明的细菌启动子包括大肠杆菌 lacI 和 lacZ 启动子、T3 和 T7 启动子、gpt 启动子、 λ PR 和 PL 启动子和 trp 启动子。合适的真核启动子包括 CMV 立即早期启动子、HSV 胸苷激酶启动子、早期和晚期 SV40 启动子、逆转录病毒 LTR 的启动子(如劳氏肉瘤病毒(RSV)的启动子)和金属硫蛋白启动子(如小鼠金属硫蛋白-I 启动子)。

[0102] 将载体构建体导入培养的宿主细胞可以通过磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、阳离子型脂类介导的转染、电穿孔、转导、感染或其他方法实现。这样的方法在很多标准实验室手册中有描述,如 Davis et al., Basic Methods In Molecular Biology, 2nd Edition(1995)。

[0103] 可以通过将增强子序列插入载体来增强高等真核生物对于编码本发明多肽的 DNA 的转录。增强子是 DNA 的顺式作用元件,通常约 10-300bp,它在给定类型的培养的宿主细胞中提高启动子的转录活性。增强子的例子包括 SV40 增强子(位于复制起点后侧(late side)100-270bp 处);巨细胞病毒早期启动子增强子;位于复制起点后侧的多瘤病毒增强子;以及腺病毒增强子。

[0104] 为了使翻译的蛋白分泌进入内质网腔,进入壁膜间隙或进入细胞外环境,可以将合适的分泌信号并入到所表达的多肽中。所述信号对多肽来说可以是内源的,或者它们可

以是外源信号。

[0105] 多肽能够以修饰的形式表达,如融合蛋白,并且不仅可以包括分泌信号,而且还包括其他异源功能区。例如,可以将额外的氨基酸区域(特别是带电荷的氨基酸)添加至多肽的例如 N- 末端,以在纯化期间或后续的处理和保存中改善在培养的宿主细胞中的稳定性和持久性。另外,还可以将肽部分添加到多肽上以促进纯化。可以在最终的多肽制备之前将这些区域移除。向多肽上添加肽部分以引起分泌或排泄以便提高稳定性并促进纯化等等,这些是本领域熟知的和常规技术。优选的融合蛋白包含来自免疫球蛋白的异源区,其可用于溶解蛋白。例如,EP 0 464 533 A1(加拿大的对应申请为 2,045,869)公开了包含免疫球蛋白分子的恒定区的不同部分与另一种人类蛋白或其部分的融合蛋白。在许多情况下,融合蛋白中的 Fc 部分对于治疗和诊断用途十分有益,并因此带来例如改善了的药物动力学特性。另一方面,对某些用途来说,需要在以所描述的有益方式表达、检测和纯化融合蛋白质之后能够删除 Fc 部分。当 Fc 部分被证实妨碍了治疗和诊断上的应用时,是这种情况,例如,当融合蛋白将被用作免疫接种的抗原时。例如,在药物发现方面,已经将人类蛋白与 Fc 部分融合,用于进行高通量筛选测定的目的(如 hIL5- 受体,以鉴定 hIL-5 的拮抗剂)。参见 Bennett, D., et al., J. Molecular Recognition, 8 :52-58(1995) 和 Johanson, K. et al., J. Biol. Chem., 270(16) :9459-9471(1995)。

[0106] 可以通过熟知的方法(包括在本文的实施例中具体描述的那些)从重组细胞培养物中回收和纯化(TAL6003)- 纤溶酶原。本发明的多肽包括天然纯化的产物、化学合成程序的产物、以及通过重组技术从原核或真核培养宿主生产的产物,所述宿主包括例如细菌、酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞。另外,本发明的多肽还可以包括原始的经修饰的甲硫氨酸残基,在某些情况下是宿主介导的过程的结果。

[0107] 多肽

[0108] 本发明的多聚核苷酸包括编码本发明多肽的变体和具体例子的那些。例如,取代在 Bowie, J. U. 等人,“Deciphering the Message in Protein Sequences:Tolerance to Amino Acid Substitutions,” Science 247 :1306-1310(1990) 中提供了有关如何制备表型沉默氨基酸取代的指导,其中作者指出,蛋白惊人地耐受氨基酸取代。尽管本发明范围内的任何数量的取代都可以通过应用这种一般原则获得,但是对于有关取代的具体指导,本领域技术人员可以参考本文所引用的关于三环 1 结构域的结构和功能的参考文献。

[0109] 可进一步理解的是,根据所采用的标准,(TAL6003)- 纤溶酶原的三环、激活位点,和丝氨酸蛋白酶结构域的确切“位置”或序列在本发明范围内的具体变体中可略有不同。例如,相对于激活位点,三环域的确切定位可略微变化和 / 或三环域结构域的 N- 末端的序列的长度可以改变。因此,本发明包括(TAL6003)- 纤溶酶原多肽的这样的变体,其表现出本文所公开的(TAL6003)- 纤溶酶原多肽活性。这样的变体包括缺失、插入、倒位、重复和取代。如上文所指出的,关于哪些氨基酸变化可能是表型沉默的指导可以参见以下文献: Bowie, J. U., et al., “Deciphering the Message in Protein Sequences:Tolerance to Amino Acid Substitutions”, Science 247 :1306-1310(1990) 中找到。

[0110] 因此,SEQ ID NO :2 的多肽的衍生物或类似物可以是(i) 这样的物质,其中一个或多个氨基酸残基(例如,3、5、8、10、15 或 20 个残基)被保守的或非保守的氨基酸残基(优选为保守的氨基酸残基)取代。这样的经取代的氨基酸残基可以是或者不是由遗传密码编

码的,或(ii)这样的物质,其中一个或多个氨基酸残基包括取代基团(例如,3、5、8、10、15或20),或(iii)这样的物质,其中成熟的多肽与另一种化合物融合,如能延长多肽半衰期的化合物(例如,聚乙二醇),或(iv)这样的物质,其中附加的氨基酸与成熟的多肽融合,如IgG Fc融合区肽或前导或分泌序列或用于纯化成熟的多肽或前蛋白序列的序列。这样的片段、衍生物和类似物被视为在本领域技术人员通过阅读本说明书可以了解的范围内。

[0111] 如所指出的,改变优选是微小性质的,如不会显著影响蛋白折叠或活性的保守性氨基酸取代。当然,技术人员可以进行的氨基酸取代的数目取决于很多因素,包括上面所描述的因素。一般来说,对任何给定的(TAL6003)-纤溶酶原多肽的取代数目将不超过50、40、30、25、20、15、10、5或3个。

[0112] 本发明的(TAL6003)-纤溶酶原中对功能必需的氨基酸可以通过本领域公知的方法确定,如定点诱变或丙氨酸-扫描诱变(Cunningham和Wells, Science 244:1081-1085(1989))。后一种程序在分子的每个残基上导入单个的丙氨酸突变。然后测试所得到的突变型分子的生物学活性,例如,如在本文提供的实施例中显示的。对配体结合有关键意义的位点还可以通过结构分析确定,如结晶、核磁共振或光亲和标记(Smith, et al., J. Mol. Biol. 224:399-904(1992)和de Vos, et al. Science 255:306-312(1992))。即使从蛋白的N-末端删除一个或多个氨基酸导致了蛋白的一种或多种生物学功能的改变或丧失,其他生物学活性仍然可以得以保留。

[0113] 还可以预期的是,可以通过固相合成方法生产可用于生产本发明的“分离的多肽”的多肽。参见Houghten, R. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:5131-5135(1985);和Houghten等人的美国专利号4,631,211(1986)。

[0114] 本发明的多肽可以以分离的形式提供。“分离的多肽”意指从其天然环境中取出的多肽。因此,对于本发明的目的而言,在重组培养的宿主细胞中生产和/或包含的多肽被认为是分离的。“分离的多肽”还指已经从重组培养的宿主中部分或实质上纯化的多肽。

[0115] 可以使用一些方法(包括计算机辅助的方法,如上文关于多聚核苷酸中指出的)来确定具有与(TAL6003)-纤溶酶原多肽的参考氨基酸序列具有所标明的百分比同一性的氨基酸序列的多肽按照上文关于核苷酸序列的讨论进行多肽氨基酸序列的检查和比较。本领域技术人员将认识到,这样的概念(如对多聚核苷酸所讨论的分子端点)在考虑这样的方法和程序用于多肽分析的相应用途时将具有直接的类似物。例如,有关多聚核苷酸讨论的人工校正指的是核酸的5'和3'端点,不过,将认识到相同的讨论适用于多肽的N-末端和C-末端。

[0116] 本发明包括(TAL6003)-纤溶酶原多肽,其在翻译期间或之后被差异性修饰,例如,糖基化、乙酰化、磷酸化、酰胺化、通过已知的保护/封闭基团衍生化、蛋白酶切割、连接至抗体分子或其他细胞配体等。多种化学修饰中的任何修饰都可以通过已知技术完成,包括但不限于通过溴化氰、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、木瓜蛋白酶、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)V8蛋白酶、NaBH₄进行的特异性化学切割;乙酰化、甲酰化、氧化、还原;在存在衣霉素的条件下进行代谢合成;等。

[0117] 本发明包括的其他翻译后修饰包括,例如,N-连接的或O-连接的糖链、N-末端或C-末端的加工、将化学部分连接至氨基酸骨架、N-连接的或O-连接的糖链的化学修饰,以及为了改造载体和构建体以便在原核培养宿主细胞中表达(TAL6003)-纤溶酶原多肽而添

加的 N-末端甲硫氨酸残基。多肽还可以通过可检测的标记（如酶、荧光、同位素或亲和标记）修饰，以便可以检测和分离蛋白质。

[0118] 药用组合物和治疗方法

[0119] 可以根据以下文献中描述的方法和组合物配制 (TAL6003)- 纤溶酶 (原) 用于治疗用途: 美国专利申请号 10/143,112; 和 Novokhatny, V., et al., J. Thromb. Haemost. 1(5):1034-41 (2003), 二者通过引用并入本文。例如, 可以将低 pH (大约 2.5- 大约 4), 低缓冲力的缓冲液用于配制 (TAL6003)- 纤溶酶。另外, 本领域技术人员所公知的其他方法和制剂 (如对于纤溶酶、小- 纤溶酶、和 / 或微- 纤溶酶的实践) 可用于配制本发明的 (TAL6003)- 纤溶酶以用于治疗性施用。

[0120] (TAL6003)-纤溶酶(原)可用于治疗多种血栓形成性疾病或病况,例如,根据以下文献中描述的方法进行:美国专利号 6,355,243、6,964,764 和 6,969,515,皆通过引用并入本文。同样,正如可应用于 (TAL6003)-纤溶酶的可能的药物制剂, (TAL6003)-纤溶酶也可以通过本领域公知的方法进行治疗性施用,例如,目前以纤溶酶、小-纤溶酶、和/或微-纤溶酶实施的方法。

[0121] 实施例

[0122] 表达载体的设计

[0123] (TAL6003)-纤溶酶原的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。具有编码(TAL6003)-纤溶酶原的核苷酸序列的多聚核苷酸针对大肠杆菌表达和mRNA稳定性进行密码子优化,以产生如SEQ ID NO:1所示的DNA序列。将此多聚核苷酸克隆进入大肠杆菌表达载体pET24b(+)(Novagen;Madison,WI)的NdeI和BamHI位点,以便生产细胞溶质的蛋白质。

[0124] 如表 1 中阐述的, 细菌 (例如大肠杆菌) 中的表达提供了重组 (TAL6003)- 纤溶酶原, 其具有 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列 (即, 重组 (TAL6003)- 纤溶酶原有 N- 末端甲硫氨酸 (即, M¹), 紧接着位于对应于 SEQ ID NO :4 所示的天然人纤溶酶原氨基酸序列的位置 70 精氨酸 (即, R⁷⁰) 的精氨酸氨基酸残基 (即, R²) 之前 (另见, 例如, 图 3)。这样的重组产物对进一步切割敏感, 产生具有不同 N- 末端的其他蛋白质, 包括具有 N- 末端赖氨酸 (即, K¹⁰) 或缬氨酸 (即, V¹¹) (分别对应于天然人纤溶酶原位置 78 的赖氨酸 (即, K⁷⁸) 或位置 79 的缬氨酸 (即, V⁷⁹)) 的蛋白质。

[0125] 表 1 :天然纤溶酶原 (例如,基于 SEQ ID NO :4) 和 (TAL6003)- 纤溶酶 (原) (例如,基于 SEQ ID NO :2,或其变体) 的 N- 末端

[0126]

包含 19 个氨基酸的先导序列的天然纤溶酶原（例如，基于 SEQ ID NO :4）：
↓ ↓ ↓ ↓
M ¹⁹ EHKE ... E ⁰¹ PLDDY ... M ⁶⁹ R ⁷⁰ DVVLFEKK ⁷⁸ V ⁷⁹ YLSEC
天然“Lys- 纤溶酶原”（即，切割掉先导序列）：
↓ ↓ ↓
E ⁰¹ PLDDY ... M ⁶⁹ R ⁷⁰ DVVLFEKK ⁷⁸ V ⁷⁹ YLSEC
(SEQ ID NO :5)

基于 Lys- 纤溶酶原切割（如果有）的天然纤溶酶种类：	
(SFQ ID NO :6)	M ⁶⁹ R ⁷⁰ DVVLFEKK ⁷⁸ V ⁷⁹ YLSEC
(SEQ ID NO :7)	K ⁷⁸ V ⁷⁹ YLSEC
(SEQ ID NO :8)	V ⁷⁹ YLSEC
本发明的重组 (TAL6003)- 纤溶酶原多肽：	
↓ ↓	
(例如, 基于 SEQ ID NO :2)	M ⁰¹ R ⁰² DVVLFEKK ¹⁰ V ¹¹ YLSEC
基于 (TAL6003)- 纤溶酶原进一步切割的其他蛋白质：	
	(SEQ ID NO :9)K ¹⁰ V ¹¹ YLSEC
	(SEQ ID NO :10)V ¹¹ YLSEC

[0127] ↓ 指示潜在的切割位点

[0128] (TAL6003)- 纤溶酶原的表达及纯化

[0129] 将包含编码 (TAL6003)- 纤溶酶原的 DNA 的表达载体转化进入多种细胞, 包括 BL21(DE3)RIL(Stratagene, La Jolla, CA)、BL21(DE3) (基因型:F⁻ompT hsdS_B(rB⁻mB⁻)gal dcm(DE3)) (EMB Biosciences, Inc., San Diego, CA) 及 BLR(DE3) (基因型:F⁻ompT hsdS_B(rB⁻mB⁻)gal dcm(DE3) Δ (srl-recA)306 :Tn10(Tet^R)) 并且通过 SDS-PAGE 分析使用 1mM IPTG (异丙基-β-D-硫代半乳糖苷) 诱导之后蛋白质的过表达。摇瓶中的表达估计为至少大约 250mg/L 细胞培养物。

[0130] 细胞类型 BL21(DE3)RIL 经过工程改造成表达编码 Arg、Ile 和 Leu 的罕见的大肠杆菌 tRNA。进一步地, BL21(DE3) 和 BLR(DE3) 二者都为大肠杆菌 B 菌株, 基于毒力及定居因子的缺少, 其被分类为对人和动物是非致病性的。BLR(DE3) 细胞缺少用于 DNA 重组的 recA 基因, 还没有报道用这些细胞进行 λ 噬菌体的诱导。在 Charles River 实验室 (Malvern, PA) 产生了 BLR(DE3) 细胞中 (TAL6003)- 纤溶酶原构建体的研究细胞库, 并测试其纯度、同一性以及噬菌体的诱导。测试证实了研究细胞库的同一性和纯度, 这些细胞通过了噬菌体诱导测试, 没有观察到噬菌体 (数据未显示)。

[0131] (TAL6003)- 纤溶酶原 (即, 基于 SEQ ID NO :2) 的生产在更大规模的表达中得到证实, 其中细胞被裂解, 可溶性蛋白质和纯化的包涵体均使用 SDS-PAGE 检查。

[0132] 以下典型的操作流程用于 (TAL6003)- 纤溶酶原的表达：

[0133] 将包含 (TAL6003)- 纤溶酶原载体的大肠杆菌细胞 (例如, BL21(DE3)RIL、BL21(DE3) 或 BLR(DE3) 的单菌落用于接种 5ml 的 LB/ 卡那霉素 (30 μg/ml), 并且在 37°C 在摇床上培养 8 小时。此后, 从培养的细菌悬浮液中取出 50 μl 的等份样品, 用于在新鲜培养基中进一步生长。16 小时之后重复以上操作, 使用 6ml 的细菌培养物和 250ml 的培养基。培养物在 37°C 摇动生长, 达到 OD_{600nm} 为 ~ 1.0, 加入 IPTG 至 1mM 的最终浓度。让培养物再生长 5 小时。通过以 5,000x g 离心收获细胞, 并且将细胞沉淀物溶解在含有 20mM EDTA 的 20mM Tris pH 8.0 中, 并且在 -80°C 冷冻。

[0134] 为了纯化 (TAL6003)- 纤溶酶原, 将细胞沉淀物解冻, 并且添加缓冲液, 直到溶液体积约为原始细胞培养物体积的 1/20。此后, 添加溶菌酶至最终浓度为 0.5mg/ml, 并且在 4°C 快速搅拌细胞 10-15 分钟。然后, 添加 Triton x-100 至 1% 的最终浓度, 并且再继续搅

拌 10 分钟。添加 DNase I (0.05mg/ml) 和 $MgCl_2$ (2.5mM), 并且在 4℃ 继续搅拌 30 分钟, 或直到溶液不再黏稠。最终的溶液在 4℃ 以 15,000x g 离心 30 分钟, 并且丢弃上清液。

[0135] 用洗涤液 (50mM Tris-HCl, pH 7.4, 含有 10mM EDTA、1% Triton-X-100 和 0.5M 尿素) 洗涤细胞沉淀物 3 次, 并且将最终的沉淀物溶解在 40ml 的提取缓冲液 (PBS, pH 7.4, 含有 10mM EDTA、20mM DTT 和 6M 盐酸胍) 中, 并且在 4℃ 保存过夜。16 小时之后, 以 15,000x g 将该溶液离心 30 分钟以除去固体, 并且将上清液缓慢添加到再折叠溶液 (50mM Tris-HCl, pH 8.3, 3.5M 盐酸胍, 0.5M 精氨酸 HCl, 10mM EDTA, 3mM GSH, 0.3mM GSSG) 中, 同时在 4℃ 搅拌。再折叠过程是在大约 0.29g/L 的蛋白质浓度下进行的。

[0136] 将再折叠溶液在 4℃ 保持 2 天不受干扰, 然后针对 8 倍体积的含有 10mM EDTA、0.15M NaCl、0.15M 精氨酸-HCl 的 0.1M Tris-HCl pH 8.0 透析 8-10 小时, 经常更换缓冲溶液。

[0137] 然后从透析中取出蛋白质溶液, 并且使用 AMICON 滤膜 (膜截留分子量为 10kDa) 浓缩至大约 10-20ml, 并且针对 100 倍体积的含有 10mM EDTA、0.15M NaCl 的 0.1M Tris pH 8.0 透析过夜。离心该材料以除去颗粒物, 然后通过赖氨酸亲和树脂 (赖氨酸-SEPHAROSE 4B; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)。使用含有 0.2M ϵ -氨基己酸 (ϵ -ACA) 的 Tris-缓冲盐水, pH 8.0 从树脂上洗脱 (TAL6003)-纤溶酶原。

[0138] 通常, 从 1 升细胞培养物中可以分离出 80mg 的包涵体, 并且在赖氨酸-SEPHAROSE 层析步骤中可以洗脱 40mg。

[0139] (TAL6003)-纤溶酶原的特性

[0140] 通过对还原的 (二硫苏糖醇-处理的) 和非还原的蛋白进行 SDS-PAGE 分析发现, 纯化的 (TAL6003)-纤溶酶原表现为在 35-40kDa 区域中的条带。通过 MALDI 质谱法测定的它的分子量为 38,140Da, 接近预期值。

[0141] 为了测定 (TAL6003)-纤溶酶原被链激酶激活的速率, 将 1mg/ml 重组 (TAL6003)-纤溶酶原与链激酶以 1:100 (TAL6003)-纤溶酶原比链激酶的比率混合并在室温 pH 7 温育。在多个时间点取出样品并以 SDS-Page 缓冲液淬灭, 在还原型 SDS-PAGE 上分析, 随后用密度计量学方法确定单链 (TAL6003)-纤溶酶原分子向双链 (TAL6003)-纤溶酶分子的转换。根据 SDS-PAGE 确定全长的 (TAL6003)-纤溶酶原随着时间的消失, 以此作为链激酶激活 (TAL6003)-纤溶酶原的百分率, 结果显示于图 6。

[0142] 为了证实三环 1 的功能性, 我们测定了 TAL6003-纤溶酶原与赖氨酸-SEPHAROSE 4B 的结合。如图 7 所示, (TAL6003)-纤溶酶原结合于赖氨酸-SEPHAROSE 并可以使用 0-20mM ϵ -ACA 梯度从柱子上将其洗脱: 在大约 4mM 时为单峰。重折叠的 (TAL6003)-纤溶酶原结合赖氨酸-SEPHAROSE 的能力表示分子的三环域被恰当折叠且赖氨酸-结合位点完全有活性。

[0143] 为了进一步证实三环 1 的功能, 通过监测蛋白荧光的相关变化测定 ϵ -ACA 与 (TAL6003)-纤溶酶原的结合, 如 Matsuka 等人, Eur. J. Biochem. 190:93-97 (1990) 和 Douglas 等人 J. Biochemistry 41:3302-3310 (2002) 所述 (皆通过引用并入本文)。 ϵ -ACA 与 (TAL6003)-纤溶酶原的三环 1 的结合导致荧光的减弱, 这可能是由于色氨酸残基 (其是赖氨酸-结合位点的一部分) 的淬灭。

[0144] 为了监测这一过程, 将 4 μ l 至 16 μ l 的 ϵ -ACA 浓缩溶液的等份样品添加到 2ml

的溶解在含有 20mM NaCl 的 50mM Tris 缓冲液中的 $5\mu\text{M}$ (TAL6003)-纤溶酶原中 (pH 8.0, 25°C)。在 298nm 的激发波长和 340nm 的发射波长下以 FLUOROMAX 荧光分光光度计 (JobinYvon, Inc., Edison, NJ) 监测荧光;在每次添加 ϵ ACA 之后,让溶液平衡直至观察不到荧光的进一步变化。

[0145] 将所得到的荧光值根据稀释度进行校正,并且对于 ϵ ACA 的浓度 (范围是 $0-50\mu\text{M}$ ϵ ACA) 作图。通过非线性回归拟合数据,获得大约 $19\mu\text{M}$ 的 K_d 。

[0146] 纤溶酶的一个特性是它结合纤维蛋白的能力。为了确定 (TAL6003)-纤溶酶原是否保留了与纤维蛋白相互作用的能力,通过微量滴定板测定测试了它的纤维蛋白结合特性,其中, (TAL6003)-纤溶酶原与纤维蛋白的结合是通过随后 tPA 对它的激活和所形成的凝块溶解来评估的。为此目的,在微量滴定板的每一个孔中使用凝血酶将 $100\mu\text{l}$ 的 5mg/ml 纤维蛋白原聚合化。将各种浓度的 (TAL6003)-纤溶酶原添加到纤维蛋白凝块的顶部,并且在 37°C 温育 1 小时。用 PBS 充分洗涤平板,同时纤维蛋白凝块仍然保持完整并且附着于孔。在洗涤之后,将 0.1mg/ml tPA 溶液添加到每一个孔中,并且在 37°C 温育平板 2 小时。结果是,某些凝块被完全溶解,某些被部分溶解,同时具有极少量 (TAL6003)-纤溶酶原的孔和对照孔几乎保持完整。将原始凝块的残余物在 1M NaOH 中重构并在 280nm 测定其吸光度,以此来监测纤维蛋白溶解的程度。将吸光度值作为 (TAL6003)-纤溶酶原浓度的函数形式作图。如图 8 所示, (TAL6003)-纤溶酶原与纤维蛋白的结合遵循典型的 S 形结合曲线。通过这种测定,发现 (TAL6003)-纤溶酶原和纤维蛋白结合的亲和力与全长纤溶酶原的亲和力相当,并且该相互作用的 C_{50} ($\sim 0.3\mu\text{M}$) 与全长纤溶酶原和纤维蛋白结合的 K_d 相当。

[0147] 这些实验表明 (TAL6003)-纤溶酶原能够结合纤维蛋白。进一步地,至少 (TAL6003)-纤溶酶原与赖氨酸-Sepharose 的相互作用,其以预期的 K_d 与 ϵ ACA 结合的能力,其结合纤维蛋白的能力,以及其能被纤溶酶原激活剂激活的能力均表明该分子在大肠杆菌系统中是以完全功能性的形式生产的。

[0148] (TAL6003)-纤溶酶的纯化和制剂

[0149] 将 SK 添加到纯化的 (TAL6003)-纤溶酶原溶液中实现了 (TAL6003)-纤溶酶原向 (TAL6003)-纤溶酶的转化。蛋白质被浓缩到 2mg/ml 并以 50% 甘油 1 : 1 稀释以产生 25% 甘油中 1mg/ml 的溶液。将溶液置于室温,并以 SK : (TAL6003)-纤溶酶原为 1 : 100 的摩尔比添加链激酶。反应在室温温育 4.5 小时,不搅拌。然后通过添加 NaCl 至 0.5M 终浓度而减慢反应。通过 SDS-PAGE 对激活进行分析表明激活蛋白有 90% 的产率。

[0150] 通过苯甲脒亲和色谱纯化激活的 (TAL6003)-纤溶酶。苯甲脒亲和色谱纯化的目的是分离未激活 (TAL6003)-纤溶酶原与杂质,包括来自活性 (TAL6003)-纤溶酶的 (TAL6003)-纤溶酶降解产物。将 SK 激活溶液应用于经平衡的苯甲脒-SEPHAROSE 4 Fast Flow 柱。截短的和完整的 (TAL6003)-纤溶酶均被亲和树脂捕获,而之前提到的杂质流过柱子。用平衡缓冲液洗涤柱子直至 280nm 处的吸光度达到基线。然后使用低 pH 的 ϵ ACA 步骤洗脱结合的 (TAL6003)-纤溶酶以从柱子上除去所有残余蛋白质。一般产率为 75%,其中蛋白质有 95% 是活性的,如显色纤溶酶效力测定所测。

[0151] 因为 (TAL6003)-纤溶酶与全长纤溶酶类似,易于在生理 pH 下自发降解,所以选择 pH 3.6 用于最终制剂 (以醋酸盐水进行酸化)。如 Novokhatny 等人, J Thromb Haemost., 1(5) :1034-41 (2003) (其通过引用并入本文) 之前针对纤溶酶指出的,以及 (TAL6003)-纤

溶酶的实验证实的,这种低缓冲能力、低 pH 的制剂不仅使活性纤溶酶能够安全储存延长的时间段,还与这些直接溶解血栓剂的非肠道施用是相容的。当与血浆或中性 pH 缓冲液混合时,(TAL6003)-纤溶酶被迅速重新激活。

[0152] (TAL6003)-纤溶酶的酶特性

[0153] 利用纤溶酶底物 D-Val-Leu-Lys-对硝基苯胺 (S-2251) (DiaPharma, West Chester, OH) 检验 (TAL6003)-纤溶酶的酰胺裂解活性。

[0154] 对于 (TAL6003)-纤溶酶,在 pH 7.4, 25°C 在 PBS 缓冲液中,发现其对于 S-2251 的 Michaelis-Menten 常数 (K_m) 也为 $141 \mu M$ (表 3)。发现制备物的 k_{cat} 为大约 725min^{-1} 。通过 4-硝基苯基 4-胍基苯甲酸酯盐酸盐 (pNPGb) 滴定 (Chase, T. 和 E. Shaw, Methods Enzymol. 197:20-27 (1970)), 发现功能性活性位点的百分比为 67%。针对百分比活性位点校正 k_{cat} , 确定 k_{cat} 为大约 725min^{-1} 。该值非常接近用相同方法测定的全长纤溶酶的值, $820 \pm 23 \text{min}^{-1}$, 和微-纤溶酶 (缺少所有五个三环) 的值, $795 \pm 24 \text{min}^{-1}$ 。这些数据表明, 三环的存在或缺乏不会影响丝氨酸蛋白酶结构域的催化活性。

[0155] 表 3: 在 25°C pH 7.4 的 PBS 缓冲液中, 多种纤溶酶种类与底物 S-2251 的稳态动力学参数

[0156]

	K_m	K_{CAT}
纤溶酶	$220 \pm 9 \mu M$	$820 \pm 23 \text{min}^{-1}$
小-纤溶酶	$160 \pm 30 \mu M$	$770 \pm 70 \text{min}^{-1}$
微-纤溶酶	$145 \pm 13 \mu M$	$795 \pm 24 \text{min}^{-1}$
(TAL6003)-纤溶酶	$141 \pm 9 \mu M$	725min^{-1}

[0157] 使用 Wiman 和 Collen 的方法 (Wiman, B. 和 D. Collen, Eur. J. Biochem. 84: 573-578 (1978)) 测定 α_2 -抗纤溶酶对 (TAL6003)-纤溶酶的抑制速率为 $1.8 \pm 0.06 \times 10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, 其中将纤溶酶和 α_2 -抗纤溶酶混合, 然后在特定时间点分析 S-2251 活性 (表 4)。该值与所报道的纤溶酶的值 $2.5 \times 10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ (来自 Anonick 等, Thrombosis Res. 59:449 (1990)) 相当。

[0158] 表 4 在 22°C pH 7.4 的 PBS 缓冲液中测定各种纤溶酶种类和抑制剂的抑制速率。

[0159]

	α_2 -抗纤溶酶
纤溶酶	$2.5 \pm 0.5 \times 10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1} (\text{lit.})$
小-纤溶酶	$2.4 \pm 0.5 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
微-纤溶酶	$1.8 \pm 0.2 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
(TAL6003)-纤溶酶	$1.8 \pm 0.06 \times 10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$

[0160] 对微-纤溶酶进行的相同的实验显示 α_2 -抗纤溶酶在两个单独的实验中抑制速率为 $1.8 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 和 $3.1 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 。 α_2 -抗纤溶酶抑制小-纤溶酶（小-纤溶酶结构域成分，K5-SP）的速率确定为 $2.4 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 。这些数据与微-和小-纤溶酶的文献值具有合理的一致性，且显示（TAL6003）-纤溶酶被 α_2 -抗纤溶酶抑制的速率比微-纤溶酶或小-纤溶酶的抑制速率快 40 倍。因此，这些数据表明（TAL6003）-纤溶酶应当是由于其结构中存在三环 1 而被 α_2 -抗纤溶酶迅速抑制。总体上，本部分的数据显示（TAL6003）-纤溶酶的酶特性及抑制特性与全长纤溶酶是类似的。

[0161] 文献值取自 Anonick 等人，Thrombosis Res. 59:449 (1990)。所有速率均根据 Anonick 等人发表的方法测量。

[0162] 体外纤维蛋白溶解效力

[0163] 使用以下实验操作流程，在凝块裂解测定的体外模型上测试了（TAL6003）-纤溶酶的纤维蛋白溶解效力。

[0164] 将（TAL6003）-纤溶酶与血浆衍生的纤溶酶的血栓溶解效力进行体外比较。将等摩尔量的血浆衍生纤溶酶（0.25mg/ml）与（TAL6003）-纤溶酶（0.11mg/ml）在试管中与血凝块混合，通过凝块中释放的材料的 A_{280} 吸光度监测凝块裂解的程度。

[0165] 在纤维蛋白和起始血块裂解存在时克服血浆抑制剂所需的纤溶酶或（TAL6003）-纤溶酶浓度显示于图 9。

[0001]

序列表

<110> Talecris Biotherapeutics, Inc.
Novokhatny, Valery

<120> 重组修饰的纤溶酶

<130> T126 1190.PCT

<150> US 60/991,148

<151> 2007-11-29

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1032

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码具有与天然人纤溶酶原的三环域同源的单个 N 末端三环域的多肽的核苷酸序列

<400> 1

atgcgtgatg tcgtcttatt cgagaagaaa gtctatttat ctgaatgtaa aacaggcaat 60

ggtaaaaact atcgcggtac catgtccaaa acaaaaaacg gtatcacttg tcaaaaatgg 120

tctagcactt caccatcg tctcgtttc tcccctgcga cccatccctc tgaaggcctc 180

gaagaaaact actgccgcaa ccccgataat gatcctcaag gcccatgggtg ttatactacc 240

gatcctgaaa aacgttatga ctattgcgat gtcccacaat gcgcagcccc ttcttttgat 300

tgcggcaaac cacaagttga acccaagaaa tgtccaggtc gtgttgctcg cggttggtt 360

gcgcaccccc acagttggcc gtggcaggtc tcattacgta cccggtttgg aatgcacttt 420

tgtggcggca ctctcatctc gcccgatgg gttcttacag ctgcacactg ttggaaaaa 480

agccccgctc cttcttctta taaagttatc ctcggcgcac atcaagaagt caatttagaa 540

cctcatgtac aagaaatcga agtatctcgt ttattcctgg aaccgactcg caaagacatc 600

[0002]

gcattactta aactgtcctc ccccgctgtg atcacccgata aagtaattcc cgcgtgttta 660
ccttctccta attatgttgt tgcagatcgt acagaatgct ttattaccgg ctgggggtgaa 720
actcaaggta cttttggtgc gggactcctg aaagaagcac agttaccagt catcgaaaac 780
aaagtatgta atcgctacga attcttaaac ggtcgtgttc aatccacaga attgtgcgca 840
ggtcatttag caggtggcac tgatagctgt caagtgatt caggtgggcc tctcgtatgt 900
ttcgaaaaag ataaatatat tctgcaaggc gtcacctctt ggggtttagg ttgtgctcgt 960
cccaataaac ctggtgtata tgtacgtgta agtcgttttg ttacctggat tgaaggtgtt 1020
atgcggaaca ac 1032

<210> 2

<211> 344

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有与天然人纤溶酶原的三环域同源的单个 N 末端三环域的多肽

<400> 2

Met Arg Asp Val Val Leu Phe Glu Lys Lys Val Tyr Leu Ser Glu Cys
1 5 10 15

Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg Gly Thr Met Ser Lys Thr Lys
20 25 30

Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser Ser Thr Ser Pro His Arg Pro
35 40 45

Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser Glu Gly Leu Glu Glu Asn Tyr
50 55 60

[0003]

Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Pro Gln Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr
65 70 75 80

Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys Asp Val Pro Gln Cys Ala Ala
85 90 95

Pro Ser Phe Asp Cys Gly Lys Pro Gln Val Glu Pro Lys Lys Cys Pro
100 105 110

Gly Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala His Pro His Ser Trp Pro Trp
115 120 125

Gln Val Ser Leu Arg Thr Arg Phe Gly Met His Phe Cys Gly Gly Thr
130 135 140

Leu Ile Ser Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Glu Lys
145 150 155 160

Ser Pro Arg Pro Ser Ser Tyr Lys Val Ile Leu Gly Ala His Gln Glu
165 170 175

Val Asn Leu Glu Pro His Val Gln Glu Ile Glu Val Ser Arg Leu Phe
180 185 190

Leu Glu Pro Thr Arg Lys Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Ala Val Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala Cys Leu Pro Ser Pro Asn
210 215 220

Tyr Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys Phe Ile Thr Gly Trp Gly Glu
225 230 235 240

[0004]

Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu Leu Lys Glu Ala Gln Leu Pro
245 250 255

Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Tyr Glu Phe Leu Asn Gly Arg
260 265 270

Val Gln Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly His Leu Ala Gly Gly Thr Asp
275 280 285

Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Phe Glu Lys Asp
290 295 300

Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu Gly Cys Ala Arg
305 310 315 320

Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg Val Ser Arg Phe Val Thr Trp
325 330 335

Ile Glu Gly Val Met Arg Asn Asn
340

<210> 3

<211> 2430

<212> DNA

<213> 人

<400> 3

atggaacata aggaagtgg tcttctactt cttttatttc tgaaatcagg tcaaggagag 60

cctctggatg actatgtgaa tacccagggg gcttcactgt tcagtgtcac taagaagcag 120

ctgggagcag gaagtataga agaattgtgca gcaaaatgtg aggaggacga agaattcacc 180

tgcaggcat tccaatatca cagtaaagag caacaatgtg tgataatggc tgaaaacagg 240

aagtcctcca taatcattag gatgagagat gtagttttat ttgaaaagaa agtgtatctc 300

[0005]

tcagagtgca agactgggaa tggaaagaac tacagaggga cgatgtccaa aacaaaaaat	360
ggcatcacct gtcaaaaatg gagttccact tctccccaca gacctagatt ctcacctgct	420
acacaccctt cagagggact ggaggagaac tactgcagga atccagacaa cgatccgcag	480
gggccctggt gctatactac tgatccagaa aagagatatg actactgca cattcttgag	540
tgtgaagagg aatgtatgca ttgcagtga gaaaactatg acggcaaat ttccaagacc	600
atgtctggac tggaatgcca ggctgggac tctcagagcc cacacgtca tggatacatt	660
ccttccaaat ttccaaacaa gaacctgaag aagaattact gtcgtaacc cgatagggag	720
ctgeggctt ggtgtttcac caccgacccc aacaagcgt gggaactttg cgacatcccc	780
cgtgcacaa cacctccacc atcttctggt ccacctacc agtgtctgaa gggaacaggt	840
gaaaactatc gcgggaatgt ggctgttacc gtttcgggc acacctgtca gcactggagt	900
gcacagacc ctcacacaca taacaggaca ccagaaaact tcccctgcaa aaatttgat	960
gaaaactact gccgcaatcc tgacggaaaa agggcccat ggtgccatac aaccaacagc	1020
caagtgcggt gggagtactg taagataccg tctgtgact cctccccagt atccacggaa	1080
caattggctc ccacagcacc acctgagcta acccctgtgg tccaggactg ctaccatggt	1140
gatggacaga gctaccgagg cacatcctcc accaccacca caggaaagaa gtgtcagtct	1200
tggtcatcta tgacaccaca ccggcaccag aagacccag aaaactacc aaatgctggc	1260
ctgacaatga actactgcag gaatccagat gccgataaag gcccctggtg ttttaccaca	1320
gacccagcg tcagggtgga gtactgcaac ctgaaaaaat gtcaggaac agaagcgagt	1380
gtttagcac ctccgctgt tgtcctgctt ccagatgtag agactccttc cgaagaagac	1440
tgtatgtttg ggaatgggaa aggataccga ggcaagagg cgaccactgt tactgggacg	1500
ccatgccagg actgggctgc ccaggagccc catagacaca gcattttcac tccagagaca	1560
aatccacggg cgggtctgga aaaaaattac tgccgtaacc ctgatggtga tgtaggtggt	1620

[0006]

ccctgggtgct acacgacaaa tccaagaaaa ctttacgact actgtgatgt ccctcagtgt	1680
gcggccccctt catttgattg tgggaagcct caagtggagc cgaagaaatg tcctggaagg	1740
gttgtggggg ggtgtgtggc ccaccacat tcctggcctt ggcaagtcag tcttagaaca	1800
aggtttggaa tgcacttctg tggaggcacc ttgatatccc cagagtgggt gttgactgct	1860
gcccaactgct tggagaagtc cccaaggcct tcatcctaca aggtcatcct ggggtgcacac	1920
caagaagtga atctcgaacc gcatgttcag gaaatagaag tgtctaggct gttcttggag	1980
cccacacgaa aagatattgc cttgctaaag ctaagcagtc ctgccgtcat cactgacaaa	2040
gtaatcccag cttgtctgcc atccccaaat tatgtggctg ctgaccggac cgaatgtttc	2100
atcactggct ggggagaaac ccaaggtact tttggagctg gcctttctaa ggaagcccag	2160
ctccctgtga ttgagaataa agtgtgcaat cgctatgagt ttctgaatgg aagagtccaa	2220
tccaccgaac tctgtctggg gcatttggcc ggaggcactg acagttgcca gggtgacagt	2280
ggaggtcctc tggtttgctt cgagaaggac aaatacattt tacaaggagt cacttcttgg	2340
ggtcttggct gtgcacgccc caataagcct ggtgtctatg ttcgtgtttc aaggtttgtt	2400
acttggattg agggagtgat gagaaataat	2430

<210> 4

<211> 810

<212> PRT

<213> 人

<400> 4

Met	Glu	His	Lys	Glu	Val	Val	Leu	Leu	Leu	Leu	Phe	Leu	Lys	Ser
1				5				10					15	

Gly	Gln	Gly	Glu	Pro	Leu	Asp	Asp	Tyr	Val	Asn	Thr	Gln	Gly	Ala	Ser
			20					25					30		

[0007]

Leu Phe Ser Val Thr Lys Lys Gln Leu Gly Ala Gly Ser Ile Glu Glu
35 40 45

Cys Ala Ala Lys Cys Glu Glu Asp Glu Glu Phe Thr Cys Arg Ala Phe
50 55 60

Gln Tyr His Ser Lys Glu Gln Gln Cys Val Ile Met Ala Glu Asn Arg
65 70 75 80

Lys Ser Ser Ile Ile Ile Arg Met Arg Asp Val Val Leu Phe Glu Lys
85 90 95

Lys Val Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg
100 105 110

Gly Thr Met Ser Lys Thr Lys Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser
115 120 125

Ser Thr Ser Pro His Arg Pro Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser
130 135 140

Glu Gly Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Pro Gln
145 150 155 160

Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys
165 170 175

Asp Ile Leu Glu Cys Glu Glu Glu Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn
180 185 190

Tyr Asp Gly Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala
195 200 205

[0008]

Trp Asp Ser Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe
210 215 220

Pro Asn Lys Asn Leu Lys Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Glu
225 230 235 240

Leu Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu
245 250 255

Cys Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Thr
260 265 270

Tyr Gln Cys Leu Lys Gly Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asn Val Ala
275 280 285

Val Thr Val Ser Gly His Thr Cys Gln His Trp Ser Ala Gln Thr Pro
290 295 300

His Thr His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp
305 310 315 320

Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Lys Arg Ala Pro Trp Cys His
325 330 335

Thr Thr Asn Ser Gln Val Arg Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys
340 345 350

Asp Ser Ser Pro Val Ser Thr Glu Gln Leu Ala Pro Thr Ala Pro Pro
355 360 365

Glu Leu Thr Pro Val Val Gln Asp Cys Tyr His Gly Asp Gly Gln Ser
370 375 380

[0009]

Tyr	Arg	Gly	Thr	Ser	Ser	Thr	Thr	Thr	Thr	Gly	Lys	Lys	Cys	Gln	Ser
385					390					395					400

Trp	Ser	Ser	Met	Thr	Pro	His	Arg	His	Gln	Lys	Thr	Pro	Glu	Asn	Tyr
			405						410					415	

Pro	Asn	Ala	Gly	Leu	Thr	Met	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Ala	Asp
			420					425					430		

Lys	Gly	Pro	Trp	Cys	Phe	Thr	Thr	Asp	Pro	Ser	Val	Arg	Trp	Glu	Tyr
		435					440					445			

Cys	Asn	Leu	Lys	Lys	Cys	Ser	Gly	Thr	Glu	Ala	Ser	Val	Val	Ala	Pro
	450					455						460			

Pro	Pro	Val	Val	Leu	Leu	Pro	Asp	Val	Glu	Thr	Pro	Ser	Glu	Glu	Asp
465					470					475					480

Cys	Met	Phe	Gly	Asn	Gly	Lys	Gly	Tyr	Arg	Gly	Lys	Arg	Ala	Thr	Thr
				485					490					495	

Val	Thr	Gly	Thr	Pro	Cys	Gln	Asp	Trp	Ala	Ala	Gln	Glu	Pro	His	Arg
			500					505					510		

His	Ser	Ile	Phe	Thr	Pro	Glu	Thr	Asn	Pro	Arg	Ala	Gly	Leu	Glu	Lys
		515					520					525			

Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Asp	Val	Gly	Gly	Pro	Trp	Cys	Tyr
	530					535					540				

Thr	Thr	Asn	Pro	Arg	Lys	Leu	Tyr	Asp	Tyr	Cys	Asp	Val	Pro	Gln	Cys
545					550					555					560

[0010]

Ala Ala Pro Ser Phe Asp Cys Gly Lys Pro Gln Val Glu Pro Lys Lys
565 570 575

Cys Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala His Pro His Ser Trp
580 585 590

Pro Trp Gln Val Ser Leu Arg Thr Arg Phe Gly Met His Phe Cys Gly
595 600 605

Gly Thr Leu Ile Ser Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu
610 615 620

Glu Lys Ser Pro Arg Pro Ser Ser Tyr Lys Val Ile Leu Gly Ala His
625 630 635 640

Gln Glu Val Asn Leu Glu Pro His Val Gln Glu Ile Glu Val Ser Arg
645 650 655

Leu Phe Leu Glu Pro Thr Arg Lys Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu Ser
660 665 670

Ser Pro Ala Val Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala Cys Leu Pro Ser
675 680 685

Pro Asn Tyr Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys Phe Ile Thr Gly Trp
690 695 700

Gly Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu Leu Lys Glu Ala Gln
705 710 715 720

Leu Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Tyr Glu Phe Leu Asn
725 730 735

[0011]

Gly Arg Val Gln Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly His Leu Ala Gly Gly
740 745 750

Thr Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Phe Glu
755 760 765

Lys Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu Gly Cys
770 775 780

Ala Arg Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg Val Ser Arg Phe Val
785 790 795 800

Thr Trp Ile Glu Gly Val Met Arg Asn Asn
805 810

<210> 5
<211> 791
<212> PRT
<213> 人

<400> 5

Glu Pro Leu Asp Asp Tyr Val Asn Thr Gln Gly Ala Ser Leu Phe Ser
1 5 10 15

Val Thr Lys Lys Gln Leu Gly Ala Gly Ser Ile Glu Glu Cys Ala Ala
20 25 30

Lys Cys Glu Glu Asp Glu Glu Phe Thr Cys Arg Ala Phe Gln Tyr His
35 40 45

Ser Lys Glu Gln Gln Cys Val Ile Met Ala Glu Asn Arg Lys Ser Ser
50 55 60

Ile Ile Ile Arg Met Arg Asp Val Val Leu Phe Glu Lys Lys Val Tyr

[0012]

65	70	75	80
Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg Gly Thr Met			
	85	90	95
Ser Lys Thr Lys Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser Ser Thr Ser			
	100	105	110
Pro His Arg Pro Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser Glu Gly Leu			
	115	120	125
Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Pro Gln Gly Pro Trp			
	130	135	140
Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys Asp Ile Leu			
	145	150	155
Glu Cys Glu Glu Glu Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn Tyr Asp Gly			
	165	170	175
Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala Trp Asp Ser			
	180	185	190
Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe Pro Asn Lys			
	195	200	205
Asn Leu Lys Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Glu Leu Arg Pro			
	210	215	220
Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu Cys Asp Ile			
	225	230	235
Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Thr Tyr Gln Cys			

[0013]

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

[0014]

	420	425	430
Lys Lys Cys Ser Gly Thr Glu Ala Ser Val Val Ala Pro Pro Pro Val			
435	440	445	
Val Leu Leu Pro Asp Val Glu Thr Pro Ser Glu Glu Asp Cys Met Phe			
450	455	460	
Gly Asn Gly Lys Gly Tyr Arg Gly Lys Arg Ala Thr Thr Val Thr Gly			
465	470	475	480
Thr Pro Cys Gln Asp Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Arg His Ser Ile			
485	490	495	
Phe Thr Pro Glu Thr Asn Pro Arg Ala Gly Leu Glu Lys Asn Tyr Cys			
500	505	510	
Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Gly Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asn			
515	520	525	
Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Tyr Cys Asp Val Pro Gln Cys Ala Ala Pro			
530	535	540	
Ser Phe Asp Cys Gly Lys Pro Gln Val Glu Pro Lys Lys Cys Pro Gly			
545	550	555	560
Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala His Pro His Ser Trp Pro Trp Gln			
565	570	575	
Val Ser Leu Arg Thr Arg Phe Gly Met His Phe Cys Gly Gly Thr Leu			
580	585	590	
Ile Ser Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Glu Lys Ser			

[0015]

595	600	605
Pro Arg Pro Ser Ser Tyr Lys Val Ile Leu Gly Ala His Gln Glu Val		
610	615	620
Asn Leu Glu Pro His Val Gln Glu Ile Glu Val Ser Arg Leu Phe Leu		
625	630	635 640
Glu Pro Thr Arg Lys Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu Ser Ser Pro Ala		
	645	650 655
Val Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala Cys Leu Pro Ser Pro Asn Tyr		
	660	665 670
Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys Phe Ile Thr Gly Trp Gly Glu Thr		
	675	680 685
Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu Leu Lys Glu Ala Gln Leu Pro Val		
690	695	700
Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Tyr Glu Phe Leu Asn Gly Arg Val		
705	710	715 720
Gln Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly His Leu Ala Gly Gly Thr Asp Ser		
	725	730 735
Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Phe Glu Lys Asp Lys		
	740	745 750
Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu Gly Cys Ala Arg Pro		
	755	760 765
Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg Val Ser Arg Phe Val Thr Trp Ile		

[0016]

770	775	780
Glu Gly Val Met Arg Asn Asn		
785	790	
<210> 6		
<211> 723		
<212> PRT		
<213> 人		
<400> 6		
Met Arg Asp Val Val Leu Phe Glu Lys Lys Val Tyr Leu Ser Glu Cys		
1	5	10 15
Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg Gly Thr Met Ser Lys Thr Lys		
	20	25 30
Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser Ser Thr Ser Pro His Arg Pro		
	35	40 45
Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser Glu Gly Leu Glu Glu Asn Tyr		
	50	55 60
Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Pro Gln Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr		
65	70	75 80
Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys Asp Ile Leu Glu Cys Glu Glu		
	85	90 95
Glu Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn Tyr Asp Gly Lys Ile Ser Lys		
	100	105 110
Thr Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala Trp Asp Ser Gln Ser Pro His		
	115	120 125

[0017]

Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe Pro Asn Lys Asn Leu Lys Lys
130 135 140

Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Glu Leu Arg Pro Trp Cys Phe Thr
145 150 155 160

Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu Cys Asp Ile Pro Arg Cys Thr
165 170 175

Thr Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Thr Tyr Gln Cys Leu Lys Gly Thr
180 185 190

Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asn Val Ala Val Thr Val Ser Gly His Thr
195 200 205

Cys Gln His Trp Ser Ala Gln Thr Pro His Thr His Asn Arg Thr Pro
210 215 220

Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro
225 230 235 240

Asp Gly Lys Arg Ala Pro Trp Cys His Thr Thr Asn Ser Gln Val Arg
245 250 255

Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys Asp Ser Ser Pro Val Ser Thr
260 265 270

Glu Gln Leu Ala Pro Thr Ala Pro Pro Glu Leu Thr Pro Val Val Gln
275 280 285

Asp Cys Tyr His Gly Asp Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr
290 295 300

[0018]

Thr Thr Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser Trp Ser Ser Met Thr Pro His
305 310 315 320

Arg His Gln Lys Thr Pro Glu Asn Tyr Pro Asn Ala Gly Leu Thr Met
325 330 335

Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp Lys Gly Pro Trp Cys Phe Thr
340 345 350

Thr Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Lys Lys Cys Ser
355 360 365

Gly Thr Glu Ala Ser Val Val Ala Pro Pro Pro Val Val Leu Leu Pro
370 375 380

Asp Val Glu Thr Pro Ser Glu Glu Asp Cys Met Phe Gly Asn Gly Lys
385 390 395 400

Gly Tyr Arg Gly Lys Arg Ala Thr Thr Val Thr Gly Thr Pro Cys Gln
405 410 415

Asp Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Arg His Ser Ile Phe Thr Pro Glu
420 425 430

Thr Asn Pro Arg Ala Gly Leu Glu Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp
435 440 445

Gly Asp Val Gly Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asn Pro Arg Lys Leu
450 455 460

Tyr Asp Tyr Cys Asp Val Pro Gln Cys Ala Ala Pro Ser Phe Asp Cys
465 470 475 480

[0019]

Gly Lys Pro Gln Val Glu Pro Lys Lys Cys Pro Gly Arg Val Val Gly
485 490 495

Gly Cys Val Ala His Pro His Ser Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Arg
500 505 510

Thr Arg Phe Gly Met His Phe Cys Gly Gly Thr Leu Ile Ser Pro Glu
515 520 525

Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Glu Lys Ser Pro Arg Pro Ser
530 535 540

Ser Tyr Lys Val Ile Leu Gly Ala His Gln Glu Val Asn Leu Glu Pro
545 550 555 560

His Val Gln Glu Ile Glu Val Ser Arg Leu Phe Leu Glu Pro Thr Arg
565 570 575

Lys Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu Ser Ser Pro Ala Val Ile Thr Asp
580 585 590

Lys Val Ile Pro Ala Cys Leu Pro Ser Pro Asn Tyr Val Val Ala Asp
595 600 605

Arg Thr Glu Cys Phe Ile Thr Gly Trp Gly Glu Thr Gln Gly Thr Phe
610 615 620

Gly Ala Gly Leu Leu Lys Glu Ala Gln Leu Pro Val Ile Glu Asn Lys
625 630 635 640

Val Cys Asn Arg Tyr Glu Phe Leu Asn Gly Arg Val Gln Ser Thr Glu
645 650 655

[0020]

Leu Cys Ala Gly His Leu Ala Gly Gly Thr Asp Ser Cys Gln Gly Asp
660 665 670

Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Phe Glu Lys Asp Lys Tyr Ile Leu Gln
675 680 685

Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu Gly Cys Ala Arg Pro Asn Lys Pro Gly
690 695 700

Val Tyr Val Arg Val Ser Arg Phe Val Thr Trp Ile Glu Gly Val Met
705 710 715 720

Arg Asn Asn

<210> 7
<211> 714
<212> PRT
<213> 人

<400> 7

Lys Val Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg
1 5 10 15

Gly Thr Met Ser Lys Thr Lys Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser
20 25 30

Ser Thr Ser Pro His Arg Pro Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser
35 40 45

Glu Gly Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Pro Gln
50 55 60

[0021]

Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys
65 70 75 80

Asp Ile Leu Glu Cys Glu Glu Glu Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn
85 90 95

Tyr Asp Gly Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala
100 105 110

Trp Asp Ser Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe
115 120 125

Pro Asn Lys Asn Leu Lys Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Glu
130 135 140

Leu Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu
145 150 155 160

Cys Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Thr
165 170 175

Tyr Gln Cys Leu Lys Gly Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asn Val Ala
180 185 190

Val Thr Val Ser Gly His Thr Cys Gln His Trp Ser Ala Gln Thr Pro
195 200 205

His Thr His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp
210 215 220

Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Lys Arg Ala Pro Trp Cys His
225 230 235 240

[0022]

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

[0023]

His Ser Ile Phe Thr Pro Glu Thr Asn Pro Arg Ala Gly Leu Glu Lys
420 425 430

Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Gly Gly Pro Trp Cys Tyr
435 440 445

Thr Thr Asn Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Tyr Cys Asp Val Pro Gln Cys
450 455 460

Ala Ala Pro Ser Phe Asp Cys Gly Lys Pro Gln Val Glu Pro Lys Lys
465 470 475 480

Cys Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala His Pro His Ser Trp
485 490 495

Pro Trp Gln Val Ser Leu Arg Thr Arg Phe Gly Met His Phe Cys Gly
500 505 510

Gly Thr Leu Ile Ser Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu
515 520 525

Glu Lys Ser Pro Arg Pro Ser Ser Tyr Lys Val Ile Leu Gly Ala His
530 535 540

Gln Glu Val Asn Leu Glu Pro His Val Gln Glu Ile Glu Val Ser Arg
545 550 555 560

Leu Phe Leu Glu Pro Thr Arg Lys Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu Ser
565 570 575

Ser Pro Ala Val Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala Cys Leu Pro Ser
580 585 590

[0024]

Pro Asn Tyr Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys Phe Ile Thr Gly Trp
595 600 605

Gly Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu Leu Lys Glu Ala Gln
610 615 620

Leu Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Tyr Glu Phe Leu Asn
625 630 635 640

Gly Arg Val Gln Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly His Leu Ala Gly Gly
645 650 655

Thr Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Phe Glu
660 665 670

Lys Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu Gly Cys
675 680 685

Ala Arg Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg Val Ser Arg Phe Val
690 695 700

Thr Trp Ile Glu Gly Val Met Arg Asn Asn
705 710

<210> 8

<211> 713

<212> PRT

<213> 人

<400> 8

Val Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg Gly
1 5 10 15

[0025]

Thr Met Ser Lys Thr Lys Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser Ser
20 25 30

Thr Ser Pro His Arg Pro Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser Glu
35 40 45

Gly Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Pro Gln Gly
50 55 60

Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys Asp
65 70 75 80

Ile Leu Glu Cys Glu Glu Glu Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn Tyr
85 90 95

Asp Gly Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala Trp
100 105 110

Asp Ser Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe Pro
115 120 125

Asn Lys Asn Leu Lys Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Glu Leu
130 135 140

Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu Cys
145 150 155 160

Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Thr Tyr
165 170 175

Gln Cys Leu Lys Gly Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asn Val Ala Val
180 185 190

[0026]

Thr Val Ser Gly His Thr Cys Gln His Trp Ser Ala Gln Thr Pro His
195 200 205

Thr His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp Glu
210 215 220

Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Lys Arg Ala Pro Trp Cys His Thr
225 230 235 240

Thr Asn Ser Gln Val Arg Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys Asp
245 250 255

Ser Ser Pro Val Ser Thr Glu Gln Leu Ala Pro Thr Ala Pro Pro Glu
260 265 270

Leu Thr Pro Val Val Gln Asp Cys Tyr His Gly Asp Gly Gln Ser Tyr
275 280 285

Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Thr Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser Trp
290 295 300

Ser Ser Met Thr Pro His Arg His Gln Lys Thr Pro Glu Asn Tyr Pro
305 310 315 320

Asn Ala Gly Leu Thr Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp Lys
325 330 335

Gly Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr Cys
340 345 350

Asn Leu Lys Lys Cys Ser Gly Thr Glu Ala Ser Val Val Ala Pro Pro
355 360 365

[0027]

Pro Val Val Leu Leu Pro Asp Val Glu Thr Pro Ser Glu Glu Asp Cys
370 375 380

Met Phe Gly Asn Gly Lys Gly Tyr Arg Gly Lys Arg Ala Thr Thr Val
385 390 395 400

Thr Gly Thr Pro Cys Gln Asp Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Arg His
405 410 415

Ser Ile Phe Thr Pro Glu Thr Asn Pro Arg Ala Gly Leu Glu Lys Asn
420 425 430

Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Gly Gly Pro Trp Cys Tyr Thr
435 440 445

Thr Asn Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Tyr Cys Asp Val Pro Gln Cys Ala
450 455 460

Ala Pro Ser Phe Asp Cys Gly Lys Pro Gln Val Glu Pro Lys Lys Cys
465 470 475 480

Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala His Pro His Ser Trp Pro
485 490 495

Trp Gln Val Ser Leu Arg Thr Arg Phe Gly Met His Phe Cys Gly Gly
500 505 510

Thr Leu Ile Ser Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Glu
515 520 525

Lys Ser Pro Arg Pro Ser Ser Tyr Lys Val Ile Leu Gly Ala His Gln
530 535 540

[0028]

Glu Val Asn Leu Glu Pro His Val Gln Glu Ile Glu Val Ser Arg Leu
545 550 555 560

Phe Leu Glu Pro Thr Arg Lys Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu Ser Ser
565 570 575

Pro Ala Val Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala Cys Leu Pro Ser Pro
580 585 590

Asn Tyr Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys Phe Ile Thr Gly Trp Gly
595 600 605

Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu Leu Lys Glu Ala Gln Leu
610 615 620

Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Tyr Glu Phe Leu Asn Gly
625 630 635 640

Arg Val Gln Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly His Leu Ala Gly Gly Thr
645 650 655

Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Phe Glu Lys
660 665 670

Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu Gly Cys Ala
675 680 685

Arg Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg Val Ser Arg Phe Val Thr
690 695 700

Trp Ile Glu Gly Val Met Arg Asn Asn
705 710

[0029]

<210> 9
<211> 335
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有与天然人纤溶酶原的三环域同源的单个 N 末端三环域的多肽

<400> 9

Lys Val Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg
1 5 10 15

Gly Thr Met Ser Lys Thr Lys Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser
20 25 30

Ser Thr Ser Pro His Arg Pro Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser
35 40 45

Glu Gly Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Pro Gln
50 55 60

Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys
65 70 75 80

Asp Val Pro Gln Cys Ala Ala Pro Ser Phe Asp Cys Gly Lys Pro Gln
85 90 95

Val Glu Pro Lys Lys Cys Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala
100 105 110

His Pro His Ser Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Arg Thr Arg Phe Gly
115 120 125

Met His Phe Cys Gly Gly Thr Leu Ile Ser Pro Glu Trp Val Leu Thr
130 135 140

[0030]

Ala Ala His Cys Leu Glu Lys Ser Pro Arg Pro Ser Ser Tyr Lys Val
145 150 155 160

Ile Leu Gly Ala His Gln Glu Val Asn Leu Glu Pro His Val Gln Glu
165 170 175

Ile Glu Val Ser Arg Leu Phe Leu Glu Pro Thr Arg Lys Asp Ile Ala
180 185 190

Leu Leu Lys Leu Ser Ser Pro Ala Val Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro
195 200 205

Ala Cys Leu Pro Ser Pro Asn Tyr Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys
210 215 220

Phe Ile Thr Gly Trp Gly Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu
225 230 235 240

Leu Lys Glu Ala Gln Leu Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg
245 250 255

Tyr Glu Phe Leu Asn Gly Arg Val Gln Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly
260 265 270

His Leu Ala Gly Gly Thr Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
275 280 285

Leu Val Cys Phe Glu Lys Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser
290 295 300

Trp Gly Leu Gly Cys Ala Arg Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg
305 310 315 320

[0031]

Val Ser Arg Phe Val Thr Trp Ile Glu Gly Val Met Arg Asn Asn
 325 330 335

<210> 10
 <211> 334
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 具有与天然人纤溶酶原的三环域同源的单个 N 末端三环域的多肽

<400> 10

Val Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg Gly
 1 5 10 15

Thr Met Ser Lys Thr Lys Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser Ser
 20 25 30

Thr Ser Pro His Arg Pro Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser Glu
 35 40 45

Gly Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Pro Gln Gly
 50 55 60

Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys Asp
 65 70 75 80

Val Pro Gln Cys Ala Ala Pro Ser Phe Asp Cys Gly Lys Pro Gln Val
 85 90 95

Glu Pro Lys Lys Cys Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala His
 100 105 110

[0032]

Pro His Ser Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Arg Thr Arg Phe Gly Met
115 120 125

His Phe Cys Gly Gly Thr Leu Ile Ser Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala
130 135 140

Ala His Cys Leu Glu Lys Ser Pro Arg Pro Ser Ser Tyr Lys Val Ile
145 150 155 160

Leu Gly Ala His Gln Glu Val Asn Leu Glu Pro His Val Gln Glu Ile
165 170 175

Glu Val Ser Arg Leu Phe Leu Glu Pro Thr Arg Lys Asp Ile Ala Leu
180 185 190

Leu Lys Leu Ser Ser Pro Ala Val Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala
195 200 205

Cys Leu Pro Ser Pro Asn Tyr Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys Phe
210 215 220

Ile Thr Gly Trp Gly Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu Leu
225 230 235 240

Lys Glu Ala Gln Leu Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Tyr
245 250 255

Glu Phe Leu Asn Gly Arg Val Gln Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly His
260 265 270

Leu Ala Gly Gly Thr Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu
275 280 285

[0033]

Val Cys Phe Glu Lys Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp
290 295 300

Gly Leu Gly Cys Ala Arg Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg Val
305 310 315 320

Ser Arg Phe Val Thr Trp Ile Glu Gly Val Met Arg Asn Asn
325 330

<210> 11
<211> 79
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> 环 1
<222> (1).. (79)

<400> 11

Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg Gly Thr Met Ser Lys Thr
1 5 10 15

Lys Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser Ser Thr Ser Pro His Arg
20 25 30

Pro Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser Glu Gly Leu Glu Glu Asn
35 40 45

Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Pro Gln Gly Pro Trp Cys Tyr Thr
50 55 60

Thr Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys Asp Ile Leu Glu Cys
65 70 75

[0034]

<210> 12
<211> 78
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> 环 2
<222> (1).. (78)

<400> 12

Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn Tyr Asp Gly Lys Ile Ser Lys Thr
1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala Trp Asp Ser Gln Ser Pro His Ala
 20 25 30

His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe Pro Asn Lys Asn Leu Lys Lys Asn
 35 40 45

Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Glu Leu Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr
 50 55 60

Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu Cys Asp Ile Pro Arg Cys
65 70 75

<210> 13
<211> 78
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> 环 3
<222> (1).. (78)

<400> 13

[0035]

Cys Leu Lys Gly Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asn Val Ala Val Thr
1 5 10 15

Val Ser Gly His Thr Cys Gln His Trp Ser Ala Gln Thr Pro His Thr
20 25 30

His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp Glu Asn
35 40 45

Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Lys Arg Ala Pro Trp Cys His Thr Thr
50 55 60

Asn Ser Gln Val Arg Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys
65 70 75

<210> 14

<211> 78

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> 环 4

<222> (1).. (78)

<400> 14

Cys Tyr His Gly Asp Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr
1 5 10 15

Thr Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser Trp Ser Ser Met Thr Pro His Arg
20 25 30

His Gln Lys Thr Pro Glu Asn Tyr Pro Asn Ala Gly Leu Thr Met Asn
35 40 45

[0036]

Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp Lys Gly Pro Trp Cys Phe Thr Thr
50 55 60

Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Lys Lys Cys
65 70 75

<210> 15
<211> 80
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> 环 5
<222> (1).. (80)

<400> 15

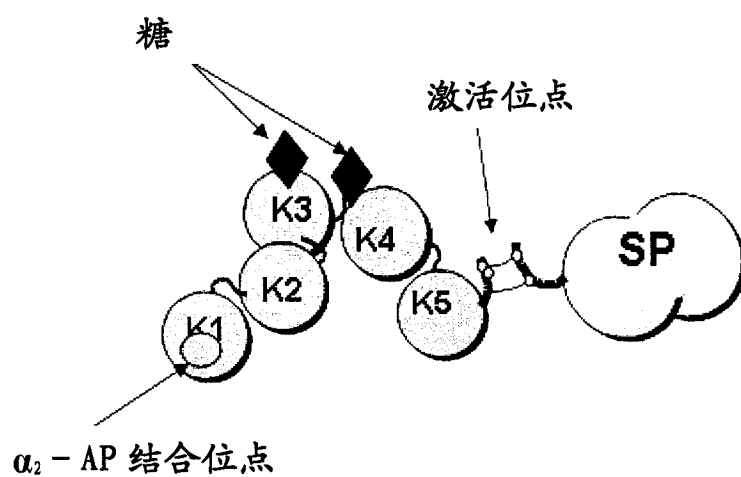
Cys Met Phe Gly Asn Gly Lys Gly Tyr Arg Gly Lys Arg Ala Thr Thr
1 5 10 15

Val Thr Gly Thr Pro Cys Gln Asp Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Arg
20 25 30

His Ser Ile Phe Thr Pro Glu Thr Asn Pro Arg Ala Gly Leu Glu Lys
35 40 45

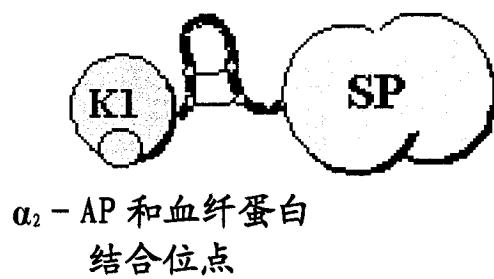
Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Gly Gly Pro Trp Cys Tyr
50 55 60

Thr Thr Asn Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Tyr Cys Asp Val Pro Gln Cys
65 70 75 80



纤溶酶

图 1



(TAL6003) - 纤溶酶原

图 2

-19 1
MEHKEVVLLLLLFLKSGQGEPLDDYVNTQGASLFSVTKKQLGAGSIEECAAKCEEDEEFTCRAFQ

78
YHSKEQQCVIMAENRKSSIIIRMRDVVLFEKKVYLSECKTGNGKNYRGTMSTKNGITCQKWSST

136 143 153 162
SPHRPRFSPATHPSEGLEENYCRNPNDPQGPGWCYT~~TDPEKRYDY~~CDILECEEECMHCSGENYDG
三环 1

234
KISKMSGLECAWDSQSPHAHGYPKSKFPNKNLKKKNYCRNPDELRPWCFTTDPNKRWELCDIP
三环 2

RCTTPPPSSGPTYQCLKGTGENYRGNVAVTVSGHTCQHWSAQTPH~~THN~~RTPENFPCKNLDENYCR
三环 3

324
NPDGKRAPWCHTTNSQVRWEYCKIPSCDSSPVSTEQLAP~~T~~APPELTPVVQDCYHGDGQSYRGTS

426
TTTTGKKCQSWSSMTPHRHQKTPENYPNAGLTMNYCRNPADKGPWCFTTDP~~SVRWEYCNLKKCS~~
三环 4

GTEASVVAPPPVLLPDVETPSEEDCMFGNGKGYRGKRATTVTGT~~PCQDWA~~AQEPHRHSIFTPET
三环 5

532 542 561
NPRAGLEKNYCRNP~~GDVG~~GPWCYT~~TNPR~~KLYDYCDVPQCAAPSFDCGK~~PQVEPKKCPGR~~VVGGC

VAHPHSWPWQVSLRTRFGMHFCGGTLISPEWVLTA~~AH~~CLEKSPRPSSYKVILGAHQEVNLEPHVQ

EIEVSRLFLEPTRKDIALKLSSPAVITDKVIPACLPSPNYV~~VADR~~TECFITGWGETQGTFGAGL

LKEAQLPVIENKVCNRYEFLNGRVQSTELCAGHLAGGTDSCQGD~~SGG~~PLVCFEKDKYILQGVTSW

791
GLGCARP~~NKPG~~VYVRVSRFVTWIEGVMRNN (SEQ ID NO:4)

图 3

HK1	<u>CKTGNGKNYR</u>	<u>GTMSKTKNGI</u>	<u>TCQKWSSTSP</u>	<u>HR-PRFSPAT</u>	<u>HPSEGLEENY</u>
HK2	<u>CMHCSGENYD</u>	<u>GKISKTMISGL</u>	<u>ECQAWDSQSP</u>	<u>HA-HGYIPSK</u>	<u>FPNKNLKKNY</u>
HK3	<u>CLKGTGENYR</u>	<u>GNVAVTVSGH</u>	<u>TCQHWSAQTP</u>	<u>HT-HNRTPEN</u>	<u>FPCKNLDENY</u>
HK4	<u>CYHGDGQSYR</u>	<u>GTSSTTTTGK</u>	<u>KCQSWSSMTP</u>	<u>HR-HQKTPEN</u>	<u>YPNAGLTMNY</u>
HK5	<u>CMFGNGKGYR</u>	<u>GKRATTVTGT</u>	<u>PCQDWAAQEP</u>	<u>HRHSIFTPET</u>	<u>NPRAGLEKNY</u>

(con't)

HK1	<u>CRNPDNDPQG</u>	<u>PWCYTDDPEK</u>	<u>RYDYCDILEC</u>	(SEQ ID NO:11)
HK2	<u>CRNPDRE-LR</u>	<u>PWCFTTDPNK</u>	<u>RWELCDIPRC</u>	(SEQ ID NO:12)
HK3	<u>CRNPDGK-RA</u>	<u>PWCHTTNSQV</u>	<u>RWEYCKIPSC</u>	(SEQ ID NO:13)
HK4	<u>CRNPDAD-KG</u>	<u>PWCFTTDPSP</u>	<u>RWEYCNLKKC</u>	(SEQ ID NO:14)
HK5	<u>CRNPDGDVGG</u>	<u>PWCYTNNPRK</u>	<u>LYDYCDVPQC</u>	(SEQ ID NO:15)

图 4

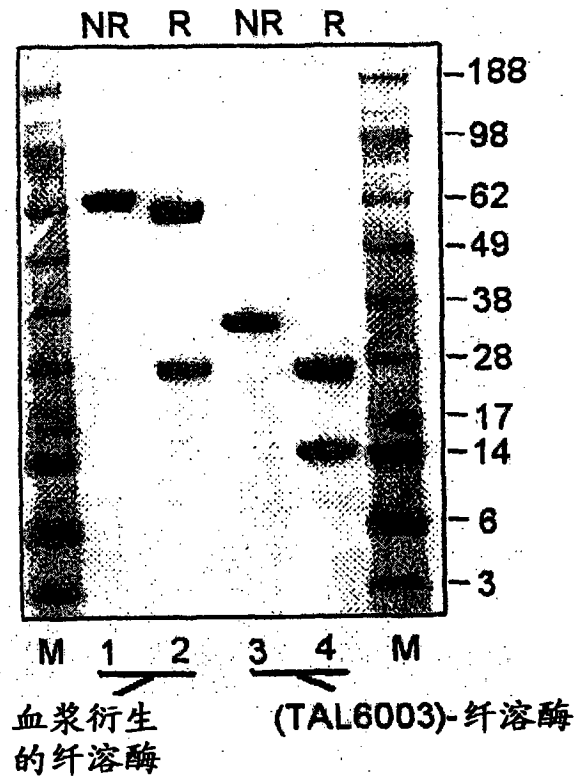


图 5

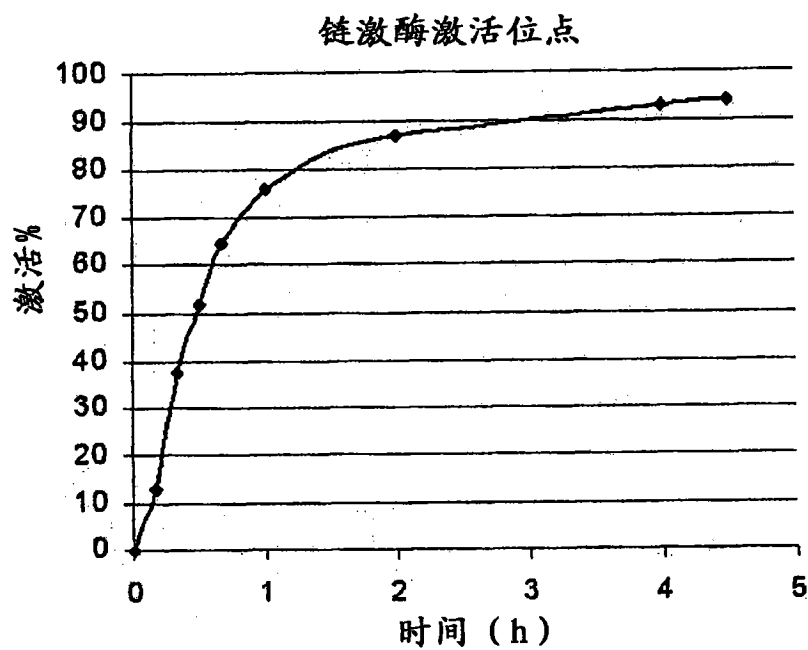


图 6

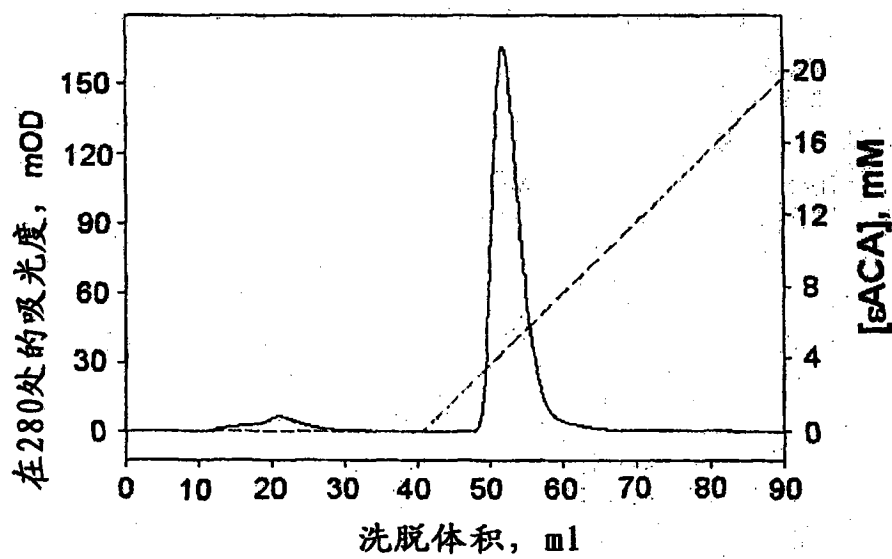


图 7

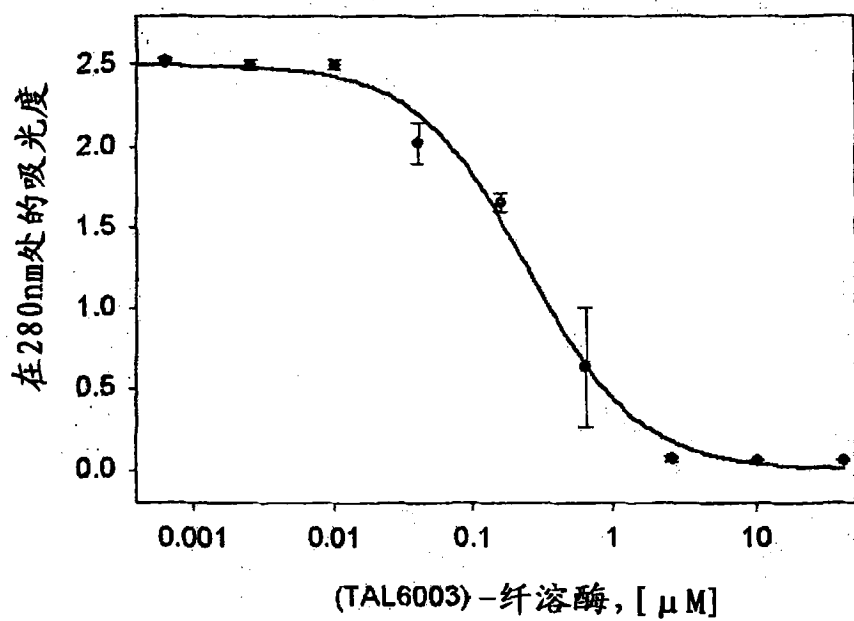


图 8

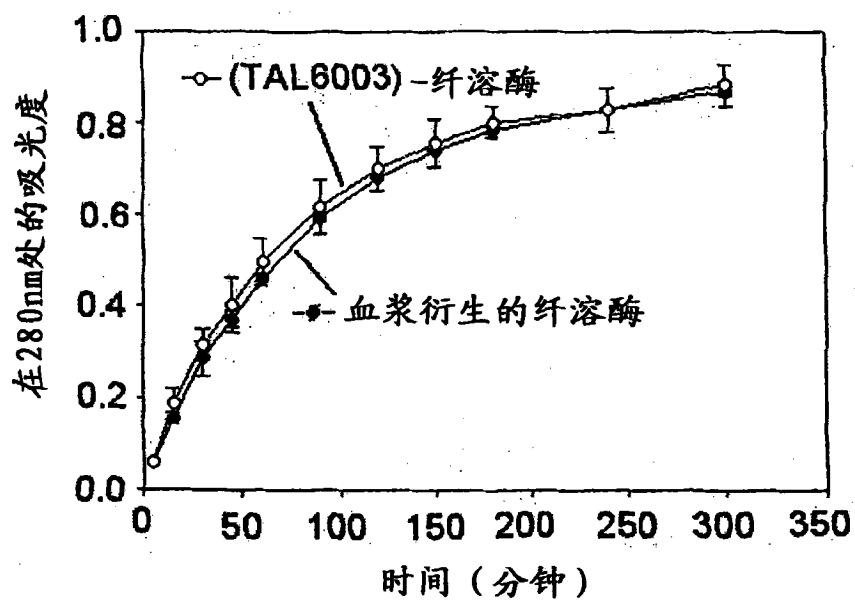
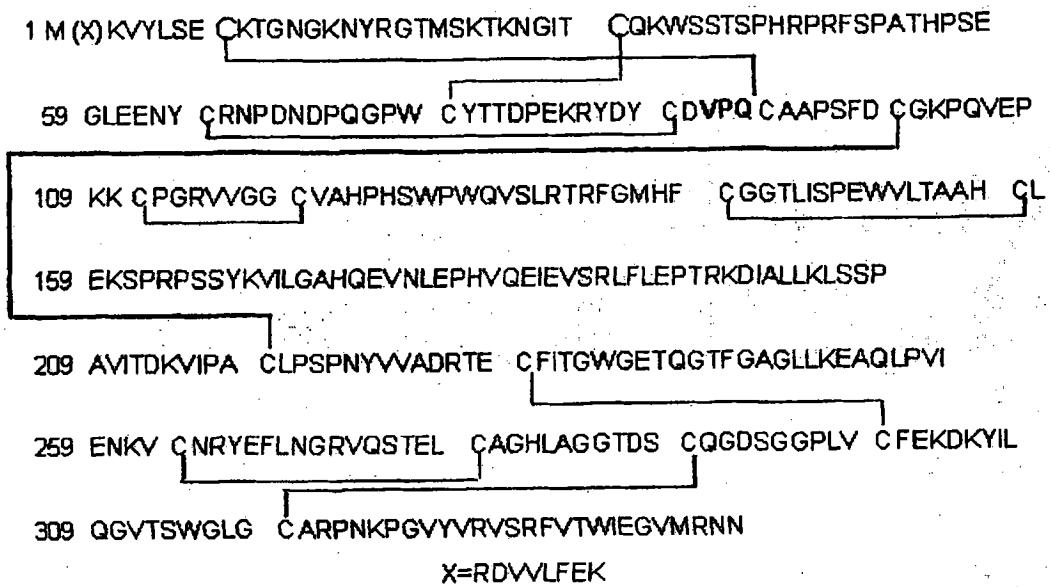


图 9



(SEQ ID NO:2)

图 10