



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110051830 A

(43)申请公布日 2019.07.26

(21)申请号 201910194270.3

(22)申请日 2019.03.14

(71)申请人 苏州新凝生物医药科技有限公司
地址 215400 江苏省苏州市太仓市科教新城健雄路20号大学科技园11号楼LA14

(72)发明人 许晓倩

(74)专利代理机构 上海泰能知识产权代理事务所 31233

代理人 黄志达 魏峯

(51) Int. Cl.

A61K 38/55(2006.01)

A61K 47/55(2017.01)

A61K 47/64(2017.01)

A61P 7/04(2006.01)

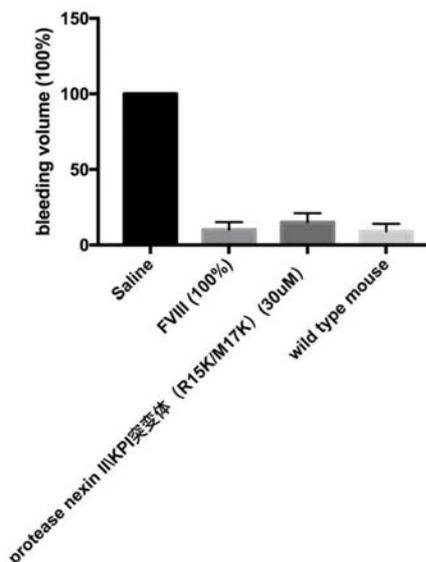
权利要求书1页 说明书4页
序列表1页 附图2页

(54)发明名称

一种protease nexin II\KPI蛋白突变体的应用

(57)摘要

本发明涉及一种protease nexin II\KPI蛋白突变体及衍生物、类似物或其组成片段的应用,用于制备治疗与获得性血友病和有抑制物产生的血友病相关疾病或病症的药物。本发明可应用于出血性疾病药物的制备,特别是有抑制物的血友病的相关药物,具有很好的应用前景。



1. 一种protease nexin II\KPI突变体、衍生物、类似物或其组成片段的应用,其特征
在于:用于制备治疗与获得性血友病和有抑制物产生的血友病相关疾病或病症的药物。

2. 根据权利要求1所述的应用,其特征
在于:所述相关疾病或病症为缺乏伴有凝血因子抗体或抑制物。

3. 根据权利要求1所述的应用,其特征
在于:所述protease nexin II\KPI突变体的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。

4. 根据权利要求1所述的应用,其特征
在于:所述protease nexin II\KPI突变体与其他融合蛋白融合形成protease nexin II\KPI突变体融合蛋白。

5. 根据权利要求3所述的应用,其特征
在于:所述融合蛋白为人白蛋白、免疫球蛋白Fc、转铁蛋白或alpha 1抗胰蛋白酶。

一种protease nexin II\KPI蛋白突变体的应用

技术领域

[0001] 本发明属于出血病治疗领域,特别涉及一种protease nexin II\KPI蛋白突变体及其衍生物、类似物或其组成片段的应用。

背景技术

[0002] 血友病A和B是由于凝血因子VIII (FVIII) 或IX (FIX) 缺陷所致遗传性出血性疾病,男性人群中发病率为1/5000和1/2000,患者临床上表现为凝血功能障碍,可出现自发性肌肉血肿和关节腔出血等。FVIII/FIX替代治疗是目前唯一有效的治疗手段。随着生物技术的发展,基因重组的FVIII/FIX,逐渐取代了血浆或者血浆来源的FVIII/FIX成为替代治疗的主要制剂。FVIII体内半衰期仅有不到12小时, FIX也仅有24小时左右,为了维持足够的血浆浓度以预防出血,患者每周需要注射2~3次,费用昂贵,据统计2011年美国等西方国家每年的FVIII制剂销售额超过52亿美元,预计2016年会超过70亿美元。虽然替代治疗可以有效预防和治疗FVIII/FIX缺陷所导致的出血,但是有30%的血友病患者会在治疗过程中产生抗FVIII抗体,少部分血友病B患者也会产生FIX抗体,导致替代治疗失效,不得不采用高剂量FVIII免疫诱导耐受治疗或应用包括活化的凝血因子VII (FVIIa) 等在内的药物控制出血,治疗费用更加昂贵。欧美国家医疗保险部门每年需额外花费超过16亿美元以治疗产生FVIII/FIX抑制物的血友病患者。FVIII抗体的产生与FVIII制剂替代治疗中的剂量直接相关,儿童血友病患者首次替代治疗是因为手术、外伤等出血紧急状况下所进行的高剂量FVIII止血治疗时,FVIII抑制物产生的几率显著增加,剂量越高,治疗时程越长,FVIII抑制物越容易产生,当剂量高于35IU/Kg时抑制物产生的几率是小于35IU/Kg治疗组的2.4倍。血友病出血表现与血浆中的FVIII或FIX活性相关,然而,凝血因子活性水平相近的患者的出血严重程度仍然不同。有研究发现提出,促血栓形成的遗传危险因素与血友病共存可能会改善血友病患者的出血严重程度。凝血强度有凝血反应所产生的凝血酶的数量有关,凝血酶除了具有促凝功能外,还可以在内皮细胞上的血栓调节蛋白辅助下,将蛋白C转化为其活化形式的aPC。后者以蛋白质S为辅因子,催化裂解并灭活FVa和FVIIIa,限制凝血反应的范围和强度。除遗传性PC缺乏外,凝血因子V (FV) Leiden突变因为其对aPC的裂解所具有抵抗作用,都是血栓形成倾向的遗传危险因素。血友病患者同时存在FV Leiden或PC缺陷,出血表现较其他患者轻微。

[0003] protease nexin II\KPI是一种分子两位6,500Da的多肽分子,是protease nexin II蛋白的组成成分,表达于人体的多种组织中,例如神经细胞、血小板等。protease nexin II\KPI多肽链由57个氨基酸残基组成。protease nexin II\KPI蛋白的生理功能为特异性的活化的凝血因子XI的抑制物。protease nexin II\KPI与同为丝氨酸蛋白酶抑制剂的抑肽酶在结构上同源。抑肽酶通过其对纤溶酶($K_i \sim 1\text{nM}$)和激肽释放酶($K_i \sim 30 \sim 36\text{nM}$)的高度特异性抑制活性来抑制纤维蛋白降解,同时抑肽酶也以相对较低的活性抑制其他蛋白酶,其对FXIa ($1.1\mu\text{M}$)和活化蛋白C ($K_i \sim 1.1 \sim 2.6\mu\text{M}$)具有中等抑制活性但对FVIIa/TF复合物 ($K_i > 10\mu\text{M}$),FXa ($K_i > 10\mu\text{M}$)或凝血酶 ($K_i \sim 27 \sim 61\mu\text{M}$)几乎没有影响。抑肽酶在心脏手术中

可显著降低出血量,减少此类手术中的输血需要。但是抑肽酶来源于动物组织(主要是牛肺脏),可能产生过敏等不良反应,通过同源蛋白改造,将人体中protease nexin II\KPI中的氨基酸替换,使其酶抑制性改变,从而具有抑肽酶类似的促凝作用。protease nexin II\KPI突变体R15K/M17K和R15K/M17R对其生理抑制对象凝血因子XI的亲和力显著下降,由2nM升高为3081和707nM,但对纤溶酶的抑制活性由200nM降低至8nM左右,提示了其抗纤溶作用增强。同时,其对aPC的抑制作用也得以增强。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题是提供一种protease nexin II\KPI突变体(R15K/M17K)及其衍生物、类似物或其组成片段的应用,该R15K/M17K突变体具有抗活化蛋白C的活性和抑制纤维溶解的特性,可以通过减弱机体抗凝作用,增强不依赖于凝血因子IX(FIX)/凝血因子VIII(FVIII)的凝血反应,提升机体整体凝血功能,从而纠正凝血因子缺乏导致的凝血功能缺陷,可应用于出血性疾病药物的制备。

[0005] 本发明提供了一种protease nexin II\KPI突变体(R15K/M17K)及衍生物、类似物或其组成片段的应用,用于制备治疗与获得性血友病和有抑制物产生的血友病相关疾病或病症的药物。

[0006] 所述相关疾病或病症为凝血因子缺乏,并可能同时伴有凝血因子抗体或抑制物产生。

[0007] 所述protease nexin II\KPI突变体(R15K/M17K)氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。

[0008] 所述protease nexin II\KPI突变体(R15K/M17K)与其他融合蛋白融合形成protease nexin II\KPI突变体(R15K/M17K)融合蛋白。

[0009] 所述融合蛋白为人白蛋白、免疫球蛋白Fc、转铁蛋白或alpha 1抗胰蛋白酶。

[0010] 本发明还提供了一种protease nexin II\KPI突变体(R15K/M17K)蛋白的制备方法,包括如下步骤:

[0011] (1) 将protease nexin II\KPI突变体(R15K/M17K)基因连入载体中,得到重组载体;

[0012] (2) 将上述重组载体转化宿主细胞,得到表达重组细胞克隆,细胞可以是哺乳动物细胞,昆虫细胞,真菌或细菌;

[0013] (3) 于无血清培养基中连续灌流培养上述重组细胞克隆,或真菌细菌发酵,诱导重组抑肽酶的表达;

[0014] (4) 分离纯化、过滤,最后灌装、冻干,得到所表达的protease nexin II\KPI突变体(R15K/M17K)蛋白。

[0015] 所述步骤(4)中的纯化包括初纯和精纯。

[0016] 本发明提供包含protease nexin II\KPI突变体(R15K/M17K)(重组或者动物组织提纯)的药物,用于诊断,预防和/或治疗疾病,其中所述疾病主要包括出血性疾病或各种原因导致的出血;其中,最可能的出血性疾病是血友病A和B,即由于遗传性凝血因子VIII或IX缺乏导致的出血性疾病,并包括其中有抑制性抗体产生的血友病A和B,或者后天因抑制物产生所导致的获得性凝血因子VIII或IX缺乏;及其它使用旁路制剂的出血性疾病,例如新

生儿凝血障碍;严重的肝脏疾病;高风险手术;创伤性失血;骨髓移植;血小板减少症和血小板功能障碍;口服抗凝的紧急逆转;先天性凝血因子V,VII,X和XI的缺陷;血管性血友病,及血管性血友病因子抑制物导致的获得性血管性血友病,与大量损伤有关的失血,大脑出血,血小板功能障碍。

[0017] 有益效果

[0018] 本发明中的protease nexin II\KPI突变体(R15K/M17K)具有抗活化蛋白C的活性和抑制纤维溶解的特性,通过抑制机体抗凝活性,纠正因凝血因子缺乏导致的凝血缺陷和出血表现,因此通过不依赖于凝血因子IX(FIX)/凝血因子VIII(FVIII)的机制促进血液凝集,提升机体整体凝血功能,发挥止血作用,因此可应用于出血性疾病药物的制备,特别对有抑制物的血友病治疗的相关药物的制备,由于其为人体固有蛋白的改造而来,较动物型蛋白免疫性小,安全性高,具有很好的治疗应用前景。

附图说明

[0019] 图1为protease nexin II\KPI突变体(R15K/M17K)抑制活化蛋白C效果示意图;

[0020] 图2A和B为protease nexin II\KPI突变体(R15K/M17K)纠正血友病A及有抑制物存在的血友病A血浆中凝血生成缺陷的示意图;

[0021] 图3为protease nexin II\KPI突变体(R15K/M17K)纠正血友病A小鼠断尾出血量示意图;

[0022] 图4为protease nexin II\KPI突变体(R15K/M17K)促进血友病A血液在血管微损伤中的血液凝固示意图。

具体实施方式

[0023] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。此外应理解,在阅读了本发明讲授的内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0024] 实施例1

[0025] protease nexin II\KPI突变体(R15K/M17K)对蛋白C的抑制作用

[0026] 在纯化蛋白体系中,将不同浓度的protease nexin II\KPI突变体(R15K/M17K)与活化蛋白C共同反应,并通过aPC特异性发光底物检测由protease nexin II\KPI突变体(R15K/M17K)抑制后残留的aPC的活性,结果显示,随着protease nexin II\KPI突变体(R15K/M17K)浓度升高,aPC的活性逐渐降低,protease nexin II\KPI突变体(R15K/M17K)对aPC的具有中度的抑制活性(IC₅₀~1uM)(图1)。

[0027] 实施例2

[0028] protease nexin II\KPI突变体(R15K/M17K)纠正血友病A,B患者血浆及有抑制物的血友病A患者血浆中凝血酶生成缺陷

[0029] 凝血酶生成试验(thrombin generation test,TGT):可用于评估血浆中凝血酶生成能力,是一种模拟体内凝血条件的整体凝血功能试验,反应了凝血和抗凝系统的总和效应。血浆凝血反应在加入激活剂(含组织因子及磷脂)后即获启动,凝血酶生成由特异性的

荧光底物检测,通过FLUOROSKAN荧光读数仪动态监测荧光强度改变,并采用特定凝血酶生成实验软件将荧光信号转换数字信号,绘制凝血酶生成曲线。从生成曲线的几个参数可以评价凝血酶生成能力:(1)延迟时间(lag time),即从反应开始到凝血酶开始生成所需时间;(2)峰值(peak),即生成的凝血酶最大量;(3)达峰时间(time to peak,ttpeak),即从反应开始到凝血酶达峰时间所需时间;(4)凝血酶生成潜力(endogenous thrombin potential,ETP),即凝血酶生成曲线下面积,反应凝血酶生成总量。当凝血反应中加入可溶性的血栓调节素(TM)后,蛋白C活化,抑制凝血酶生成,可以反应抗凝系统对整体凝血的影响。

[0030] 在含有/不含有抑制物的血友病血浆中加入protease nexin II\KPI突变体(R15K/M17K)(30uM),在加入TF启动凝血反应,血浆中有一定量凝血酶产生,但是当加入TM活化蛋白C后,抗凝系统发挥作用,几乎无进行凝血酶生成。当protease nexin II\KPI突变体(R15K/M17K)加入反应体系后,可以部分逆转蛋白C对凝血酶生成的抑制作用,保留了血浆中凝血酶生成的能力。与无抑制物的血友病血浆中的作用相比(图2A),protease nexin II\KPI突变体(R15K/M17K)这种抗蛋白C促进凝血酶生成的能力不受抑制物的影响(图2B)。

[0031] 实施例3

[0032] protease nexin II\KPI突变体(R15K/M17K)改善血友病小鼠断尾出血表型

[0033] 将protease nexin II\KPI突变体(R15K/M17K)经鼠尾静脉注射入4-8周的血友病小鼠模型中使血浆中protease nexin II\KPI突变体(R15K/M17K)峰浓度达到30uM。同时注射生理盐水作为阴性对照,凝血因子VIII(峰浓度为正常的100%)为阳性对照。小鼠麻醉后,在鼠尾端直径为2mm处断尾,并将尾巴垂悬置于室温PBS缓冲液中,计时10min,检测试管中血红蛋白的浓度,根据血红蛋白量测算断尾的出血量,以盐水处理的血友病小鼠出血量为对照(100%)(图3)。protease nexin II\KPI突变体(R15K/M17K)显著减少血友病A小鼠的出血表型,对凝血因子VIII缺乏所导致的凝血缺陷具有改善作用,在峰浓度为30uM时所起到的止血作用可以与100%凝血因子VIII的止血效果相似,与正常小鼠的出血量类似。

[0034] 实施例4

[0035] protease nexin II\KPI突变体(R15K/M17K)促进血友病A血液在血管微损伤中的血液凝固

[0036] 通过尾静脉注射荧光标记血小板后,显微镜下分离血友病小鼠肠系膜微血管,激光损伤局部血管,观察血小板聚集。protease nexin II\KPI突变体(R15K/M17K)峰浓度达到30uM时血液凝固的能力与凝血因子VIII(峰浓度为正常的100%)类似,显示很强的非凝血因子VIII依赖的促凝能力(图4)。

SEQUENCE LISTING

<110> 苏州新凝生物医药科技有限公司
<120> 一种protease nexin II KPI蛋白突变体的应用
<130> 1
<160> 1
<170> PatentIn version 3.3
<210> 1
<211> 57
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 1

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

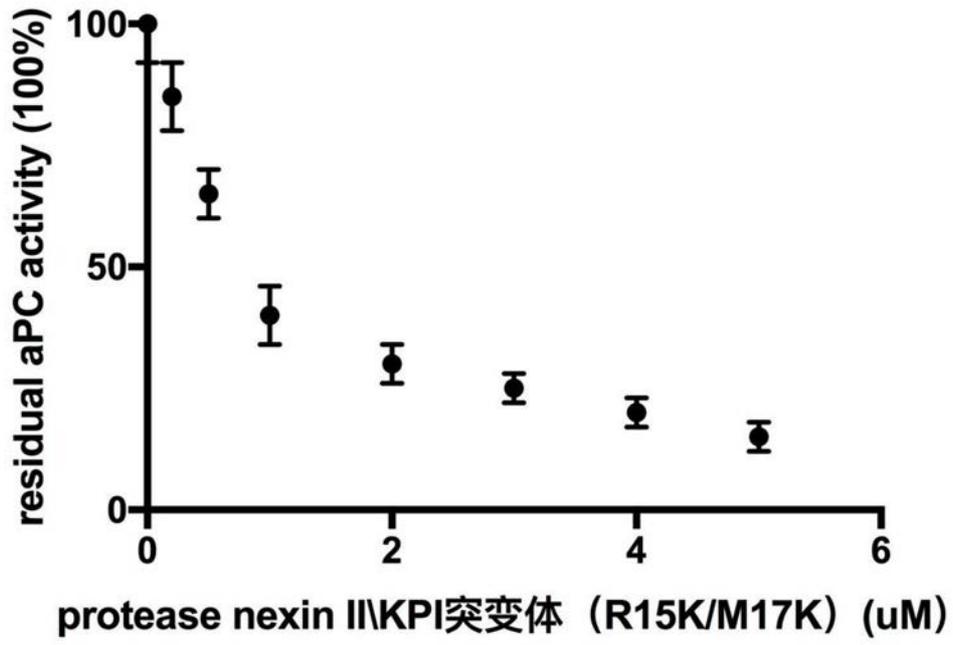


图1

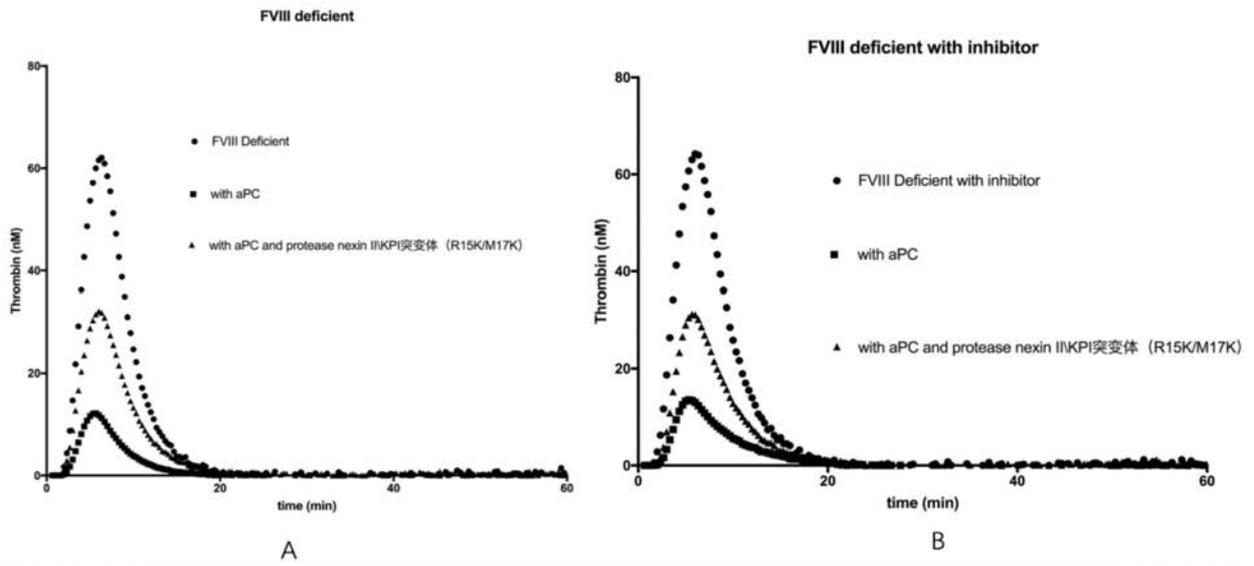


图2

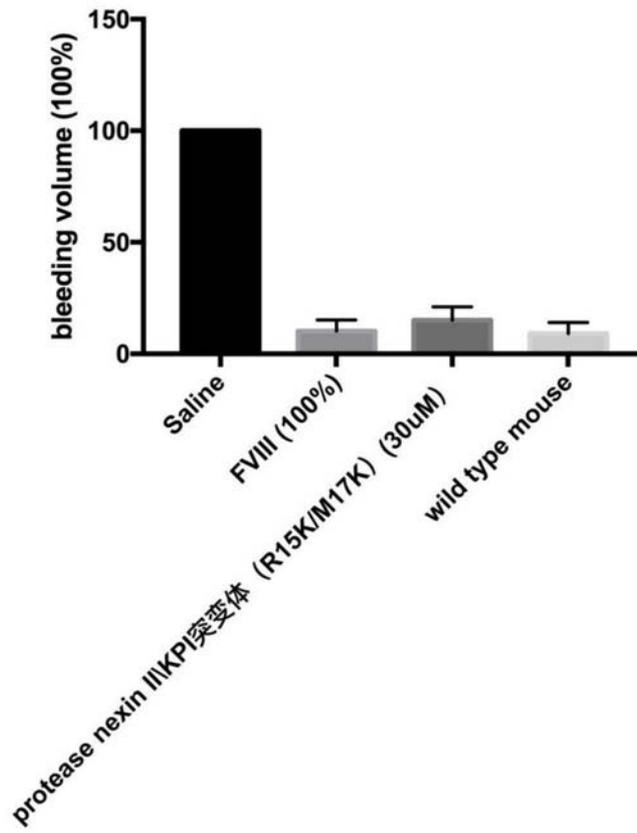


图3

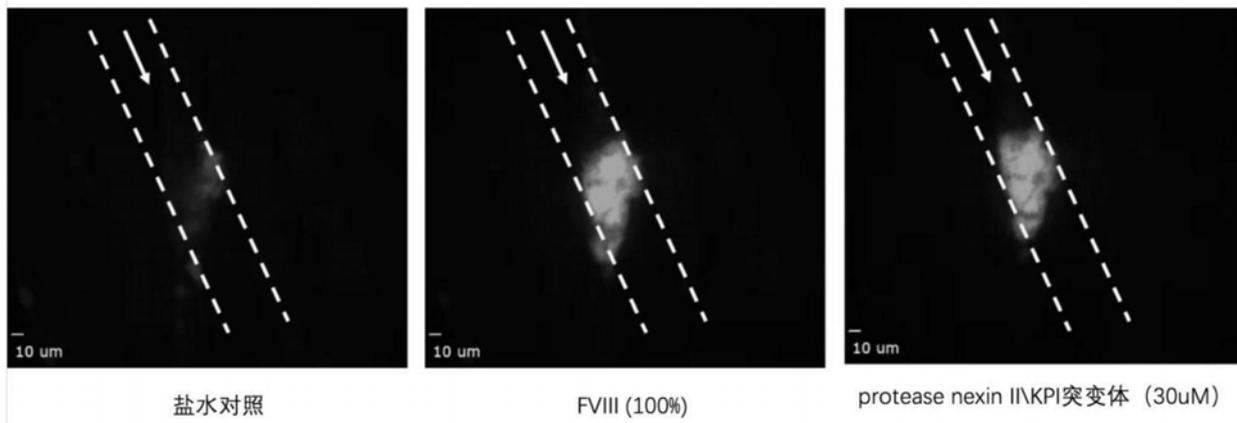


图4