

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03109244.6

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

C07K 14/815 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006年3月15日

[11] 授权公告号 CN 1245509C

[22] 申请日 2003.4.7 [21] 申请号 03109244.6

[71] 专利权人 北京大学

地址 100871 北京市海淀区颐和园路5号北京大学

[72] 发明人 朱圣庚

审查员 卢 阳

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 关 畅

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

[54] 发明名称

水蛭素突变体 HV2 - Lys47 的生产方法及其专用表达载体与菌株

[57] 摘要

本发明公开了水蛭素突变体 HV2 - Lys47 的生产方法及其专用表达载体与菌株，本发明所提供的专用表达载体是图 1 所示的水蛭素突变体 HV2 - Lys47 的表达载体 pBH - 2，水蛭素突变体 HV2 - Lys47 基因连接有外膜蛋白信号肽编码序列；所述水蛭素突变体 HV2 - Lys47 基因为序列表中的 SEQ ID No: 1。本发明所提供的专用菌株是大肠埃希氏菌 (Escherichia coli) pBH2 CGMCC No0908。本发明生产水蛭素突变体 HV2 - Lys47 的方法，是在将培养温度自 25℃ - 32℃ 升高到 40℃ - 43℃ 的热诱导条件下，培养大肠埃希氏菌 (Escherichia coli) pBH2 CGMCC No0908，产生水蛭素突变体 HV2 - Lys47。本发明产率可高达 350mg/L，具有重要的实用价值。

1、图 1 所示的水蛭素突变体 HV2-Lys47 的表达载体 pBH-2，水蛭素突变体 HV2-Lys47 基因连接有外膜蛋白信号肽编码序列；所述水蛭素突变体 HV2-Lys47 基因为序列表中的 SEQ ID No: 1。

2、大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) pBH2 CGMCC No0908。

3、一种生产水蛭素突变体 HV2-Lys47 的方法，是在将培养温度自 25°C—32°C 升高到 40°C—43°C 的热诱导条件下，培养大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) pBH2 CGMCC No0908，产生水蛭素突变体 HV2-Lys47。

4、根据权利要求 3 所述的方法，其特征在于：所述热诱导条件为培养温度从 30°C 升高到 42°C。

水蛭素突变体 HV2-Lys47 的生产方法及其专用表达载体与菌株

技术领域

本发明涉及生物工程领域中一种高效表达水蛭素突变体 HV2-Lys47 的方法及其专用表达载体与菌株，特别是涉及一种利用大肠杆菌来高效表达水蛭素突变体 HV2-Lys47 的方法及其专用表达载体与菌株。

背景技术

在我国，水蛭是一种传统的中药，一千八百年前《神农本草经》中就有记载。中医认为它有破血、逐瘀、通经的疗效，主要用于治疗癥症、痞块、血瘀、闭经和跌打损伤。西方也常用水蛭吸血以治疗某些疾病。从水蛭及其唾液腺中已提取出多种活性成分，水蛭素（Hirudin）是其中活性最显著并且研究最多的一种。水蛭素是由 65-66 个氨基酸组成的小分子蛋白质（多肽），对凝血酶有极强的抑制作用，是迄今为止所发现的最强凝血酶天然特异抑制剂。动物试验与临床研究表明，水蛭素能高效抗凝血、抗血栓形成以及阻止凝血酶催化的凝血因子活化和血小板反应等进一步血瘀现象。此外，它还能抑制凝血酶诱导的成纤维细胞增殖和凝血酶对内皮细胞的刺激。与肝素相比，它不仅用量少，不会引起出血，也不依赖于内源性辅助因子，有较好的疗效。

水蛭素是一类很有前途的抗凝化瘀药物，可用于治疗各种血栓疾病，尤其是静脉血栓、弥漫性血管内凝血和脑血栓的治疗；也可用于外科手术后预防动脉血栓的形成，预防溶栓后或血管再造后血栓的形成，以及用于脑外伤的治疗；改善体外血液循环和血液透析过程。在显微外科手术中常因为吻合处血管栓塞而导致失败，采用水蛭素可促进伤口愈合。研究还表明，水蛭素在肿瘤治疗中也能发挥作用。它能阻止肿瘤细胞的转移，如纤维肉瘤、骨肉瘤、血管肉瘤、黑素瘤、淋巴瘤和白血病细胞等。水蛭素配合化学治疗和放射治疗，促进肿瘤中的血流，增强疗效。

动物试验和临床研究证明，静脉或皮下注射水蛭素均无明显毒副作用。无论急性、亚急性的毒性试验，血压、心率、血相、出血时间和血液化学成分均不受影响，呼吸系统也没有影响，无过敏反应，一般无特异抗体发现。半致死剂量 $LD_{50} > 50\text{mg/kg}$ ，远大于治疗所用的剂量（ 0.25mg/kg ）。尤其是，水蛭素可以口服，这给用药带来很大

方便。水蛭素比较稳定，加热、酸碱溶液、以及一定条件下胰蛋白酶和糜蛋白酶反应并不破坏其活性；而且水蛭素的某些水解片断仍有抑制凝血酶的作用。

水蛭素具有重要开发价值，但水蛭的来源有限，所以国内外医药界均着重研究通过基因工程获得重组水蛭素。1986年后，重组水蛭素已在大肠杆菌和酵母菌中分别表达成功。与天然水蛭素相比，重组水蛭素在第63位氨基酸（酪氨酸）上未硫酸酯化，活性略低，其余性质基本相同。在治疗的剂量下静脉注射无毒副作用。1999年底重组水蛭素首先在德国和英国上市，为粉针剂，商品名是脉管通（Revasc），其有效成分为酵母细胞制造的重组水蛭素（去硫酸水蛭素，Desirudin）。目前临床主要用于手术后防止血栓形成，以及对深静脉血栓、冠状动脉再狭窄、心肌梗塞、不稳定心绞痛等的治疗。

我国有许多抗栓中成药以水蛭为主要成分，如脑血康口服液、抗血栓片、活血通脉胶囊等。含水蛭素的新药也在不断研究和推出。利用基因工程生产重组水蛭素可以取代药源有限的水蛭，而且还能开发出更有效的药物。重组水蛭素类多肽药物的研制和生产有巨大的社会效益和经济效益。

当前，水蛭素突变体有数十种之多，研究表明，将水蛭素第47位天冬酰胺（Asn）改变成赖氨酸（Lys）的水蛭素突变体HV2-Lys47（序列表中的序列2，由65个氨基酸残基组成。）可以显著提高水蛭素抗凝血酶的活性，达到天然63位含硫酸酯水蛭素同样高的活性水平。目前，该种水蛭素突变体在酵母表达系统中生产，产率较低。

发明内容

本发明的目的是提供一种高效生产水蛭素突变体HV2-Lys47的方法及其专用的表达载体与菌株。

本发明所提供的高效表达水蛭素突变体HV2-Lys47的表达载体为pBH-2，它具有图1所示的物理图谱，水蛭素突变体HV2-Lys47基因连接有外膜蛋白信号肽编码序列；所述水蛭素突变体HV2-Lys47基因为序列表中的SEQ ID No: 1，SEQ ID No: 1由198个碱基组成，其编码框为自5'端第1位至第195位核苷酸。

该表达载体具有重要意义，可以使水蛭素突变体HV2-Lys47分泌至胞外。

利用上述表达载体，将突变体HV2-Lys47基因导入到大肠杆菌中，可以得到高效表达水蛭素突变体HV2-Lys47的菌株，本发明所提供的热诱导分泌型高效表达水蛭素

的菌株是大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) pBH2, 已于 2003 年 03 月 19 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (简称 CGMCC), 保藏号为 CGMCC No 0908。

大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) pBH2 CGMCC No0908 是通过将重组质粒 pBH-2 导入到大肠杆菌中得到的。大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) pBH2 CGMCC No0908 在 LB 平板培养基上呈光滑、湿润、全缘的菌落形态, 其最适生长温度为 30°C, 最适 pH 值是 7.0。

本发明所提供的生产水蛭素突变体 HV2-Lys47 的方法, 是在将培养温度自 25°C—32°C 升高到 40°C—43°C 的热诱导条件下, 培养大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) pBH2 CGMCC No0908, 产生水蛭素突变体 HV2-Lys47。

优选的热诱导条件为培养温度从 30°C 升高到 42°C。

得到的水蛭素需进行分离纯化。

水蛭素突变体 HV2-Lys47 基因是采用大肠杆菌偏爱密码子, 用递归 PCR 方法合成的。

大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) pBH2 热诱导分泌型表达水蛭素突变体产率可高达 350mg/L, 生产周期短、成本低; 水蛭素突变体在细胞内被正确加工, 并且全部分泌到培养基中, 大大简化了分离纯化的工艺。大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) pBH2 稳定, 易于操作, 要求的设备条件相对较低。

附图说明

图 1 为表达载体 pBH-2 的物理图谱。

具体实施方式

实施例 1、水蛭素的生产

培养大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) pBH2 CGMCC No0908 至菌体浓度为 OD₆₀₀ 达到 15 以上时, 将培养温度由 30°C 升高到 42°C, 水蛭素突变体 HV2-Lys47 即诱导产生, 培养 15 小时产量达到最高值, 水蛭素突变体 HV2-Lys47 被分泌到胞外; 收集培养液, 除去菌体, 水蛭素突变体 HV2-Lys47 存在于上清液中; 然后通过离子交换柱, 纯化水蛭素突变体 HV2-Lys47; 最后经超滤, 去盐和浓缩, 并冻干成粉末。产率为 350mg/L。

实施例 2、原药动物试验

1、鼠急毒试验：取小鼠 30 只，每只静脉注射实施例 1 得到的水蛭素突变体 HV2-Lys47 1300mg/kg，观察小鼠的反应，结果小鼠均未见异常，说明本发明的水蛭素突变体 HV2-Lys47 无毒副作用。

2、长期毒性试验：取大鼠 30 只，每只每天静脉注射实施例 1 得到的水蛭素突变体 HV2-Lys47 2mg/kg，连续给药二个月，观察大鼠的反应，结果大鼠均未见异常，说明本发明的水蛭素突变体 HV2-Lys47 无毒副作用。

序列表

<160>2

<210>1

<211>198

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>1

attacttaca ctgattgtac agaatcgggt caaaatttgt gcctctgcga gggaagcaat	60
gtttgcggtta aaggcaataa gtgcatattg ggttctaata gaaagggcaa ccaatgtgtc	120
actggcgaag gtacaccgaa gctgaaagc cataacaacg gcgatttcga agaaattcca	180
gaagaatatt tacaataa	
198	

<210>2

<211>65

<212>PRT

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>2

Ile Thr Tyr Thr Asp Cys Thr Glu Ser Gly Gln Asn Leu Cys Leu	
1 5 10 15	
Cys Glu Gly Ser Asn Val Cys Gly Lys Gly Asn Lys Cys Ile Leu	
20 25 30	
Gly Ser Asn Gly Lys Gly Asn Gln Cys Val Thr Gly Glu Gly Thr	
35 40 45	
Pro Lys Pro Glu Ser His Asn Asn Gly Asp Phe Glu Glu Ile Pro	
50 55 60	
Glu Glu Thr Leu Gln	
65	

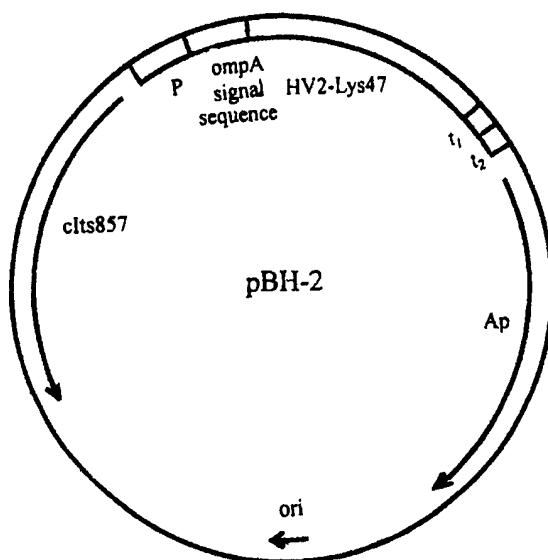


图 1