

[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 92111829.5

[51]Int.Cl⁵

A61K 37/48

[43]公开日 1994年7月6日

[22]申请日 92.12.30

[71]申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100012北京市朝阳区大屯路15号

[72]发明人 韩玉琨

[74]专利代理机构 中国科学院专利事务所
代理人 高存秀

C12P 21/02 C12N 15/09
// (A61K37/48,37:02)

说明书页数:

附图页数:

[54]发明名称 重组水蛭素及其复合物用于制备预防和治疗血栓病药物

[57]摘要

本发明涉及一种药物和制备方法，特别是涉及一种以基因的人工合成方法制备重组水蛭素及其水蛭素与复合物的用于预防凝血和治疗血栓病的药物。

本发明为了提高提供一种重组水蛭素与复合物按1:20—1:2重量比例配成用于抗凝血和治疗血栓病的药物，及其制备本发明的药物方法。该方法简单，易于掌握合成，而且大大地提高了制备的药物的药效。

权 利 要 求 书

1、一种重组水蛭素与蚓激酶按1：20—1：2重量比组成的抗凝血和治疗血栓病的药物。

2、一种按权利要求1制备用于抗凝血和治疗血栓病的药物方法，其特征在于：

(1) 将人工合成的水蛭素NV₂的基因置于酵母 α -因子基因的启动子及导肽之后，构造成表达载体；

(2) 将步骤(1)中的表达载体转化酵母菌株，并经诱变得得到含水蛭素基因的突变菌株；

(3) 在完全培养基中培养步骤(2)中的突变酵母菌株，并从培养液中得到水蛭素HV₂；

(4) 步骤(3)中得到的水蛭素，经过反复纯化可得到纯度为95%的水蛭素产品；

(5) 将步骤(4)得到的水蛭素产品与蚓激酶以1：20—1：2重量比配成抗凝血和治疗血栓病药物。

重组水蛭素及其复合物用于制备预防和治疗血栓病药物

本发明涉及一种药物和制备方法，特别是涉及一种以基因的人工合成方法制备重组水蛭素及其水蛭素与复合物的用于预防凝血和治疗血栓病的药物。

水蛭素是水蛭的唾液腺分泌的一种酸性多肽，具有强的抗凝血作用。Markwardt⁽¹⁾ 于1955年首次从欧洲医蛭中分离纯化了水蛭素。天然水蛭素具有多种异构体，由65个或66个氨基酸组成，彼此结构十分相似。水蛭素能够与凝血酶形成稳定的非共价结合的复合物，对凝血酶具有特异的抑制作用。水蛭素是目前已知的最强有力的凝血酶的天然抑制剂⁽²⁾。

目前临床常用的治疗血栓的药物，诸如尿激酶，血纤维蛋白溶酶原激活剂(tPA)，蛇毒，蚓激酶等，都是在血栓形成后进行溶栓治疗，而水蛭素的功能是抗凝血，防止血栓的形成，且副作用小，所以水蛭素将成为预防和治理血栓疾病的新药物。国外也在从事水蛭素临床方面的研究，但尚未在临床广泛应用。另外人们还在合成制造水蛭素的衍生物，复合物等用于血栓疾病的治疗和预防。

水蛭素的医疗价值得到人们的普遍重视，但由于水蛭素天然来源有限，使其研究和应用受到限制。近年来，基因工程技术的建立，使人们制造水蛭素成为可能。自1986年以来，国外几个实验室先后报道了在大肠杆菌及酵母细胞中表达水蛭素的结果。如：中国专利申请91101687.2号，“含水蛭素衍生物的分泌物”，所记载的，这

种含水蛭素衍生物的分泌物是以编码水蛭素衍生物的基因直接定位于编码细菌信号肽的DNA片段下游的方式构建重组载体，然后转化大肠杆菌分泌型突变株，在培养基中培养转化后的细菌，并从培养基中获得水蛭素衍生物的方法，其水蛭素衍生物为：

N-末端氨基酸序列A-Thr-Yyr-Thr-Asp,

其中A代表Ala,

又如：中国专利申请89100165.4号“水蛭素衍生物”所描述的。他们或是用大肠杆菌或是用酵母做宿主，在用大肠杆菌做宿主时，由于大肠杆菌对人体有害，与酵母相比做为制备药物时酵母更安全，另外上述几种制备水蛭素衍生物的方法较复杂，而这些方法所得到的是一种单纯的水蛭素或它们的衍生物，没有一种做成用于治疗 and 预防血栓病的复合药物。

本发明的目的在于克服已有技术的缺点和不足，为了提高现有溶血栓药物治疗效果和扩大水蛭素本身的应用范围，从而提供一种重组水蛭素或重组水蛭素与其复合物以1：20-1：2比例配成抗凝血和预防治疗血栓的药物及其制备本发明药物的方法。

该方法包括以下步骤：

- 1、将人工合成的水蛭素HV₂的基因置于酵母 α -因子基因的启动子及导肽之后，构造成表达载体。
- 2、将步骤(1)中的表达载体转化酵母菌株，并经诱变得到含水蛭素基因的突变菌株。
- 3、在完全培养基中培养步骤(2)中的突变酵母菌株，并从培养

液中得到水蛭素HV₂。

4、步骤(3)中得到的水蛭素，经过反复纯化可得到纯度为95%的水蛭素产品，将其用于临床实验。

5、水蛭素与蚓激酶以1：20-1：2范围内配位，组成抗凝血，溶血栓的复合药物。

本发明涉及到水蛭素基因在酵母突变菌株中的分泌表达，并得到用于抗凝血抗血栓形成的药物重组水蛭素。其内容包括水蛭素基因的人工合成，分泌型表达载体的构建，表达水蛭素的酵母菌株的诱变，基因的表达，表达产物的分离纯化，水蛭素较大规模的生产，水蛭素临床前药理毒理研究，临床应用，水蛭素复合物的配制，药物的剂型种类等。本发明有其明显的特点：图1是水蛭素基因的合成，如图1所示，本发明的水蛭素的氨基酸的顺序与天然的水蛭素HV₂相同，并采用酵母基因常用编码设计水蛭素基因的核苷酸顺序。在构建水蛭素酵母表达载体时，利用酵母 α -因子表达系统即利用质粒PYA2C，水蛭素基因在 α -因子基因启动及引导肽的参与下得到分泌表达。并用细胞色素C-基因的3'-端终止顺序来终止水蛭素基因的表达。同时在人工合成的水蛭素基因的5'端设计了与天然酵母 α -因子肽C端编码相似的引导肽末端顺序，以及酵母胞内蛋白酶YSCF作用位点顺序的编码(见图3)

图2是水蛭素酵母表达载体的构建图，以便使表达的水蛭素在细胞内被正确无误地加工，除第6位酪氨酸未被硫酸酯化外，得到的重组水蛭素与天然的相同。酵母表达系统中的一个主要问题是质

粒的稳定性问题，营养缺陷型的酵母菌株常因发生回复突变而导致质粒上外源基因表达产物的产量下降。我们通过反复的常规诱变结合5Fu压力下的选择，有效地封锁了酵母菌株ura途径的回复突变，大大提高了含表达质粒pjy-H1的突变菌株BJ-1995-SC-HF的稳定性，确保水蛭素的高效表达。在水蛭素的纯化过程中，利用阴离子—纤维素处理酵母培养液的上清液，既起到浓缩作用又有一较好的分离效果。

本发明提供的重组水蛭素或重组水蛭素与复合物组成制备用于预防凝血和治疗溶血栓药物其组成如下：

单纯水蛭素

水蛭素与蚓激酶按1：20—1：2重量比例配成复合药物。

图3是合成水蛭素基因5'端的引导肽末端顺序与酵母x因子肽顺序比较，下面结合实施例和附图对本发明进行详细描述。

实施例1，水蛭素基因的人工合成。

本发明所涉及的水蛭素HV₂，其基因是按图1所示的核苷酸顺序，采用固相亚磷酰胺法合成的。全基因共239bp，14个寡核苷酸合成，各片段混合退火拼接，将所得全长基因插到PUC18质粒中，测序鉴定其正确性。

实施例2 分泌型酵母表达载体的构建

图2显示出水蛭素酵母表达载体构建的程序，以实施例1中合成的水蛭素全基因取代质粒PYA2C中的细胞色素C编码基因顺序，即构成α-因子表达顺序(5'调控区，启动子和引导肽编码)—水蛭素基

因一细胞色素C3'端终止顺序串连而成的水蛭素表达单元。将此表达单元用BamH1切出放入大肠杆菌-酵母穿梭质粒PJH158中，即构成水蛭素基因的表达载体PJH-H1。

实施例3 表达水蛭素的酵母菌株的诱变和表达

将实施例2中所述的水蛭素表达质粒PJY-H1依Ito等人的方法转化酵母BJ-1995-SC株，得到的转化系在ura⁻不完全培养基上传代纯化，经紫外诱变25W紫外灭菌灯管4分钟及亚硝基胍诱变处理，(0.5mg/ml 30℃ 20分钟)，并在5Fu(10mmol/L)-不完全培养基上反复筛选，最后选到能在丰富培养基上稳定的保存质粒，水蛭素分泌量高(20ATu/ml)的酵母菌株BJ-1995-SC-HF。将此菌株接种到完全培养基上，30℃摇床培养36-48小时，用ChromozymTH 生色底物测上清液(含水蛭素)的抑制凝血酶活力，用凝血酶滴定法测上清液的抗凝血活力。

实施例4 水蛭素的纯化和较大规模生产

实施例3中得到的上清液，经纤维素吸附，凝胶过滤，离子交换，高压液相层析等纯化步骤，可得到纯度95%的，氨基酸N末端单一的重组水蛭素。5-10升的酵母培养液的上清液调PH7.0以上，用阴离子纤维素吸附浓缩；浓缩后的含水蛭素的上清液经SephadexG-50过滤，除去大部分杂蛋白；水蛭素部分吸附到DEAE-Celulose 柱上，经NaCl分步洗脱，收集合并水蛭素部分，透析后冻干，再作一次凝胶过滤；然后用半制备量的高压液相(HPLC)C18反相柱层析分离，用10-60%的乙腈洗脱，可得纯度为95%的水蛭素。

实施例5 药理毒理研究及临床应用

用实施例4中得到的水蛭素作主要药效学和一般药理学研究，急性毒性、长期毒性、特殊毒性实验及药代动力学研究。就其主要药效学即水蛭素的抗凝血抗血栓形成作用来看，无论是体外实验（如全血凝血时间，复钙时间，凝血酶时间等），或是体内急性实验的结果，都显示出水蛭素对抗凝血和抗血栓形成有显著效果。用水蛭素的粗、精制品做成不同制剂，用于临床实验。以每公斤体重病人用药0.1-0.5mg的剂量，对弥散型血管内凝血有明显的治疗和预防作用，对冠状动脉血栓，静脉血栓，脑血栓和血栓静脉炎也都有预防和治疗作用。外科静脉栓塞手术后直接用水蛭素即防止了静脉血管的再次栓塞。

实施例6 水蛭素与蚓激酶组成抗血栓溶血栓复合药物

蚓激酶是一种新的溶血栓药，经卫生部批准现已试生产。而水蛭素的主要特性是抗凝血，抗血栓形成，这两者的结合是一种预防和治疗血栓及血栓引起的疾病的理想药物。蚓激酶与水蛭素以20：1和2：1的比率配成复合药物，用此药对血栓病患者进行治疗，70公斤体重的病人，每天用药20—100mg，收到明显的疗效。用tPA溶栓治疗后再栓塞的病人，单独使用水蛭素可使病情在1—3周内得到好转。

6、药品的剂型

制备了注射用针剂，采用皮下或肌肉注射，而作为胶囊为口服药。还制成冷冻干燥品用于灌注治疗，外用水蛭素用于外科手术后防止再栓塞。

说明书附图

```

<----- H1 ----->
A GCT TTA AAA CCA GGT CAA CCA ATG TAC AAG AGA
  AAT TTT GGT CCA GTT GGT TAC ATG TTC TCT
<----- h1 ----->
HindIII

><----- H2 ----->
ATC ACT TAT ACT GAC TGC ACT GAA TCT GGC CAA AAC TTG TGT TTG
TAG TGA ATA TGA CTG ACG TGA CTT AGA CCG GTT TTG AAC ACA AAC
-----><----- h2 ----->
          SalI
ile thr tyr thr asp cys thr glu ser gly gln asn leu cys leu

----- H3 -----><----- H4 ----->
TGT GAA GGT TCT AAC GTT TGT GGT AAG GGT AAC AAG TGT ATC TTG
ACA CTT CCA AGA TTG CAA ACA CCA TTC CCA TTG TTC ACA TAG AAC
----- h3 -----><----- h4 ----->
cys glu gly ser asn val cys gly lys gly asn lys cys ile leu

-----><----- H5 ----->
GGT TCT AAC GGT AAG GGT AAC CAA TGT GTC ACT GGT GAA GGC ACT
CCA AGA TTG CCA TTC CCA TTG GTT ACA CAG TGA CCA CTT CCG TGA
-----><----- h5 ----->
gly ser asn gly lys gly asn gln cys val thr gly glu gly thr

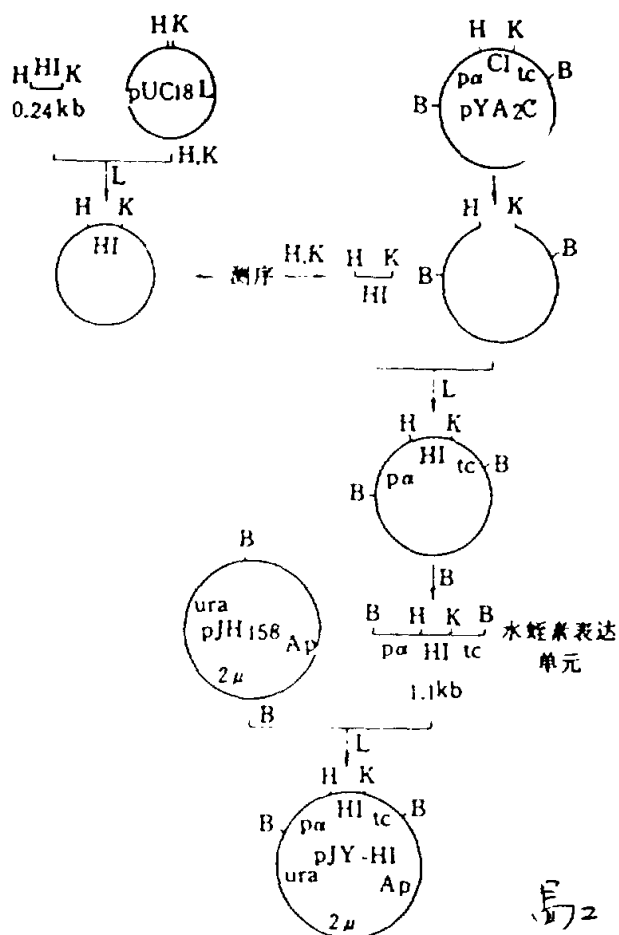
----- H6 -----><----->
CCA AAC CCA GAG TCT CAC AAC AAC GGT GAC TTC GAA GAA ATT CCA
GGT TTG GGT CTC AGA GTG TTG TTG CCA CTG AAG CTT CTT TAA GGT
-----><----- h6 ----->
pro asn pro glu ser his asn asn gly asp phe glu glu ile pro

----- H7 ----->
GAA GAA TAC TTG CAA TAA GTC GAC GGT AC
CTT CTT ATG AAC GTT ATT CAG CTG C
----- h7 ----->
          SalI   KpnI
glu glu tyr leu gln stop

```

图 1

说明书附图



TGG CAT TGG TTG CAA CTA AAA CCT GGC CAA CCA ATG TAC AAG AGA
 trp his trp leu gln leu lys pro gly gln pro met tyr lys arg
* **

A GCT TTA AAA CCA GGT CAA CCA ATG TAC AAG AGA
 ala leu lys pro gly gln pro met tyr lys arg
* **