



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109232746 A

(43)申请公布日 2019.01.18

(21)申请号 201811086080.1

(22)申请日 2018.09.18

(71)申请人 北京大学深圳研究生院
地址 518000 广东省深圳市南山区西丽大
学城北大湾区,丽水路2199号

(72)发明人 李书鹏 周强

(74)专利代理机构 深圳市君之泉知识产权代理
有限公司 44366

代理人 张丕阳

(51) Int. Cl.

C07K 19/00(2006.01)

A61K 38/17(2006.01)

A61K 47/42(2017.01)

A61P 29/00(2006.01)

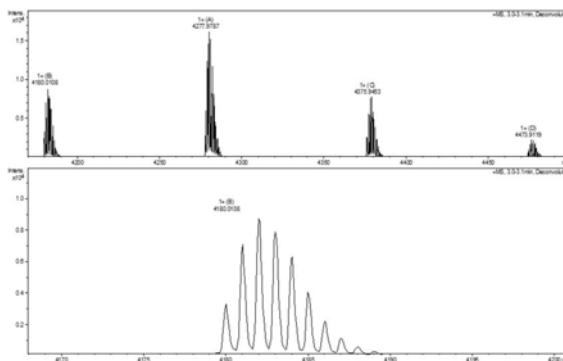
权利要求书1页 说明书11页
序列表2页 附图11页

(54)发明名称

一种齐考诺肽和TAT肽的融合多肽

(57)摘要

本发明提供一种齐考诺肽和TAT肽的融合多肽。本发明以齐考诺肽的C端与细胞膜穿透肽的N端进行连接,获得的融合肽,克服了不能肌肉注射等不足。该融合多肽能够通过血脑屏障,适用于静脉、腹腔或鼻腔给药方式,操作方便,临床风险小,通过静脉、腹腔或鼻腔施用,其在体内的药效作用时间长,镇痛效果优良,肽副作用小,适用于大规模的临床应用。本发明的融合多肽制备简单,制备工艺和制备过程中质量可控,适用于大规模产业化生产。



1. 一种融合多肽,其特征在于,所述多肽包含齐考诺肽与TAT肽。
2. 权利要求1所述的融合多肽,其特征在于,所述多肽由齐考诺肽通过C端与TAT肽连接组成,优选的,所述齐考诺肽的C端通过连接子与TAT肽的N端连接。
3. 权利要求2任意一项所述的融合多肽,其特征在于,所述齐考诺肽的氨基酸如SEQ ID NO.1所示,或所述齐考诺肽为SEQ ID NO.1所示氨基酸少于10个的缺失、突变或插入的氨基酸的变体。
4. 权利要求1-3任意一项所述融合多肽,其特征在于,所述TAT肽的氨基酸如SEQ ID NO.2所示,或所述TAT肽为SEQ ID NO.2所示氨基酸少于10个的缺失、突变或插入的氨基酸的变体,或其拟肽。
5. 权利要求1-4任意一项所述的融合多肽,其特征在,所述融合多肽为SEQ ID NO.4所示氨基酸少于10个的缺失、突变或插入的氨基酸的变体,或其拟肽。
6. 权利要求1-4任意一项所述的融合多肽,其特征在,所述融合多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.4所示。
7. 一种药物组合物,其特征在于,所述药物组合物包含权利要求1-6的多肽和可接受载体。
8. 权利要求7所述的药物组合物,其特征在于,所述药物组合物用于静脉、腹腔或鼻腔给药,药物组合物剂型为静脉、腹腔或鼻腔给药剂型。
9. 一种制剂,其特征在于,所述制剂包含权利要求1-6的多肽,优选的,制剂为静脉、腹腔或鼻腔给药制剂。
10. 一种权利要求1-6所述多肽的制备方法,其特征在于,所述多肽采用合成的方式制备而成。

一种齐考诺肽和TAT肽的融合多肽

技术领域

[0001] 本发明属于多肽药物技术领域,特别涉及一种齐考诺肽的融合多肽。

背景技术

[0002] 齐考诺肽(商品名Prialt™,Elan Pharmaceuticals)是美国食药局(FDA)2004年批准的首例芋螺毒素类药物。其靶向作用位点是N型电压门控钙离子通道,是蛛网膜下腔(鞘内)复合镇痛的一线药物。齐考诺肽是太平洋食鱼螺——鸡心螺——体内毒液肽中亲水性多肽 ω -MVIIA的人工合成物,是首个应用于临床的新型非吗啡类镇痛剂,其分子式为 $C_{102}H_{172}N_{36}O_{32}S_7$,结构式:H-Cys-Lys-Gly-Lys-Gly-Ala-Lys-Cys-Ser-Arg-Leu-Met-Tyr-Asp-Cys-Cys-Thr-Gly-Ser-Cys-Arg-Ser-Gly-Lys-Cys-NH₂。

[0003] 齐考诺肽临床可以治疗带状疱疹后遗神经痛,幻肢痛,艾滋病相关神经病理性疼痛,难治性癌痛,手术后疼痛,不能耐受或拒绝其他治疗方法如全身性镇痛药、辅助治疗、缓解鞘内注射阿片类药物无效的疼痛等。与水杨酸盐,NSAIDs和局部麻醉剂主要通过外周神经/伤害感受器,阿片类药物和全身麻醉药主要作用于大脑水平以消除疼痛和意识不同,齐考诺肽的治疗作用机制是通过其结合N型钙通道受体的能力。N型钙离子通道受体位于脊髓后部表面Rexed's I和II层内的主要伤害性A- δ 和C-慢纤维疼痛纤维(伤害感受器)上,可缓解其他治疗手段包括鞘内注射吗啡无效的疼痛,且长时间使用该药物不会产生耐受性和成瘾性,应用指征为治疗与创伤、肿瘤和神经痛等相关的慢性疼痛,尤其在治疗对阿片类药物不敏感的难治性疼痛或对阿片类不能耐受的病人方面有独到的优势。然而,齐考诺肽不能穿过血脑屏障,目前仅使用鞘内插管给药途径输注,插管与输注泵埋藏于皮下,需要手术完成,临床使用不方便。目前仅用于对已有止痛药物抵抗型、慢性疼痛的长期、永久性治疗。这种给药方式极大限制了该药固有优点的临床应用。

[0004] 血脑屏障(BBB)是存在于脑组织和血液之间的一个复杂细胞系统,能控制血脑两侧的物质转运,从而保证中枢神经组织内环境的稳定血液中的有用物质通过微血管内皮细胞膜上各种各样的受体相互作用,并按机体的需要转运进入大脑,从而发挥作用;而一些有毒有害物质则被该屏障屏蔽于脑组织外,以防对大脑产生损害。血脑屏障(BBB)这种特殊的保护作用,导致了大部分药物难以进入大脑,这个中枢神经类疾病的治疗和给药造成困扰。

[0005] 细胞穿透肽(cell penetrating peptides, CPP)是一类能够通过生物膜进入细胞的短肽(一般少于35个氨基酸残基)。其发现源于1988年,有学者发现HIV-1的反式激活蛋白Tat能跨膜转导至胞内,接着又有人发现果蝇转录蛋白也具有类似特性。此后,其他许多CPP陆续被发现, CPP在相对分子质量、氨基酸组成、氨基酸排列序列上表现出多样性,所含氨基酸数量和种类不同,极性和带电荷量亦不同,但是它们具有一些共同的特点,比如:在较低的浓度条件下,可以穿过细胞膜进入细胞并且不会对膜造成明显破坏和损伤;本身具有穿透膜能力,并且还能介导各种物质包括小分子、核酸、蛋白多肽以及纳米粒子等入胞;高效、低毒。近年来,研究发现,采用细胞穿透肽与药物分子连接,可以达到穿过血脑屏障效果,这给中枢神经给药带来了新的方向。

[0006] 目前,现有技术中存在利用细胞穿透肽辅助芋螺毒素穿过血脑屏障的技术方法,例如,将齐考诺肽包装于病毒颗粒中,并在病毒颗粒表面连接TAT多肽,该病毒颗粒可以递送齐考诺肽通过血脑屏障,但是,这样的方法制备的工艺流程复杂,病毒的包装过程,无法进行很好的质量控制,难以在产业上大规模应用。又如,将TAT肽与芋螺毒素的N端通过两个GG作为连接单元,制备获得融合多肽,该融合多肽可以通过血脑屏障,适用于静脉注射给药,但是,N端连接的融合多肽通过静脉注射给药,在体内的镇痛效果和存在时间都无法达到临床应用的要求,无法进行大规模的推广。因此,获得一种能够通过血脑屏障,克服鞘内插管给药的缺点,且能在临床上大规模使用的改进型齐考诺肽是目前急需解决的问题。

发明内容

[0007] 本发明目的之一是提供一种融合多肽。本发明人通过长期研究发现,通过齐考诺肽的C端与细胞膜穿透肽的N端连接,获得的改进型齐考诺肽的融合肽,可以克服现有技术的缺陷,适用于静脉、腹腔或鼻腔给药,且在体内的镇痛效果良好和药效时间较长,能够在临床上大规模使用。

[0008] 具体的,实现上述目的的技术方案如下所示。

[0009] 一种融合多肽,由齐考诺肽与细胞膜穿透肽组成。优选的,所述融合多肽由齐考诺肽通过C端与细胞膜穿透肽连接组成,或者齐考诺肽的C端与细胞膜穿透肽的N端连接。

[0010] 进一步,齐考诺肽的氨基酸为CKGKGAKCSRLMYDCCTGSCRSKGC(如SEQ ID NO.1所示),或者,融合多肽中齐考诺肽也可以是CKGKGAKCSRLMYDCCTGSCRSKGC(如SEQ ID NO.1所示)通过少于10个、少于8个,少于6个,少于4个,2个或1个的氨基酸进行缺失、突变或插入的氨基酸的变体。

[0011] 进一步,所述细胞膜穿透肽可以Penetratin、TAT肽、Pep-1肽、S4₁₃-PV、Magainin 2或Buforin 2。

[0012] 其中,TAT肽来源HIV-1的反式激活蛋白Tat,其能跨膜转导至胞内。TAT肽的氨基酸为YGRKKRRQRRR(如SEQ ID NO.2所示),或者,融合多肽中TAT肽也可以是YGRKKRRQRRR(如SEQ ID NO.2所示)通过少于10个、少于8个,少于6个,少于4个,2个或1个的氨基酸进行缺失、突变或插入的氨基酸的变体,或其拟肽。

[0013] 优选的,前述多肽或融合多肽或改进型齐考诺肽的氨基酸序列为CKGKGAKCSRLMYDCCTGSCRSKGCYGRKKRRQRRR(如SEQ ID NO.4所示)或者,通过少于10个、少于8个,少于6个,少于4个,2个或1个的氨基酸进行缺失、突变或插入的氨基酸的变体,或其拟肽。

[0014] 所述拟肽,指具有与由天然氨基酸组成的肽基本上相同的结构和/或功能特征的合成化学化合物。拟肽可以完全地包含氨基酸的合成的非天然类似物,或是部分天然氨基酸和部分非天然氨基酸类似物的嵌合分子。拟肽还可以掺入任何数量的天然氨基酸保守替换位点,只要此种替换基本上不改变模拟物的结构和/或抑制活性或结合活性。多肽模拟成分可以含有非天然结构组分的任何组合,所述非天然结构组分一般来自3个结构组:a)非天然酰胺键(“肽键”)连接的残基连接基团;b)代替天然存在的氨基酸残基的非天然残基;或c)诱导二级结构模拟,即诱导或稳定二级结构例如β转角、γ转角、β折叠、α螺旋构象等的残基。

[0015] 本发明的第二个目的是提供一种药物组合物或制剂,优选为药物制剂,进一步,所

述药物组合物或制剂/药物制剂包含本发明的多肽和/或可接受载体。

[0016] 所述药物组合物或制剂/药物制剂可以包含以下所示的任意剂量的单位剂量形式(即,用于单次施用的剂量)提供药物组合物。可以利用常规的混合、溶解、制粒、制备糖锭剂、磨细、乳化、包囊、包埋或冻干方法制备。可以使用一种或多种便于将活性剂加工为可药用制剂的生理学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂或辅料,以常规方式配制所述药物组合物或制剂/药物制剂。适合的制剂取决于所选择的给药途径。

[0017] 施用方式可以是胃肠外、静脉内、口服、皮下、动脉内、颅内、鞘内、腹膜内、局部、鼻内或肌内施用。优选静脉内施用或腹腔注射。用于肠胃外施用的所述药物组合物或制剂/药物制剂优选是无菌和基本上等渗的。对于注射,可将活性剂配制在水溶液,优选生理上相容的缓冲液例如汉克氏溶液、林格溶液或生理盐水或乙酸盐缓冲液中(以减少注射部位的不适)。该溶液可以含有配制剂,诸如助悬剂、稳定剂和/或分散剂。

[0018] 本发明的第三个目的是提供一种融合多肽的用途。所述用途为:用于制备药物,优选的,用于制备镇痛药物,优选的,所述镇痛药物作用于钙通道。

[0019] 进一步,所述药物可以用于治疗疼痛、疼痛相关的疾病,例如,可导致慢性疼痛的疾病包括糖尿病、关节炎(例如,骨关节炎、类风湿关节炎和青少年慢性关节炎)、癌症或化疗的毒性作用、纤维肌痛、带状疱疹、肠易激综合征、血管问题或镰状细胞病。

[0020] 与偶发的一般疼痛相关的疾病包括风湿性多肌痛、臆想病、抑郁症、糖尿病、恶性贫血、镰状细胞病和梅毒。与神经性疼痛相关的疾病包括神经痛(例如,三叉神经痛、不典型面痛以及由带状疱疹或疱疹引起的带状疱疹神经痛)、外周的神经病、Charcot-Marie-Tooth病、弗里德赖希共济失调、糖尿病(例如,糖尿病性神经病变)、饮食缺陷(尤其维生素B-12)、过度的酒精使用(酒精性神经病变)、尿毒症(来自肾衰竭)、癌、艾滋病、肝炎、科罗拉多蜱传热、白喉、格-巴二氏综合征、没有发展为艾滋病的HIV感染、麻风病、莱姆病、多发性结节性动脉炎、类风湿关节炎、结节病、舍格伦综合征、梅毒、系统性红斑狼疮,以及暴露于有毒化合物。

[0021] 与炎性疼痛相关的疾病包括:(A)关节炎疾病,例如类风湿关节炎;青少年慢性关节炎;系统性红斑狼疮(SLE);痛风性关节炎;硬皮病;骨关节炎;银屑病关节炎;强直性脊柱炎;莱特尔氏综合征(反应性关节炎);成年斯蒂尔病;来自病毒感染的关节炎;来自细菌感染的关节炎,例如,淋病性关节炎和非淋病性细菌性关节炎(脓毒性关节炎);三级莱姆病;结核性关节炎;以及来自真菌感染的关节炎,诸如酵母病;(B)自身免疫疾病,例如格-巴二氏综合征、桥本甲状腺炎、恶性贫血、艾迪生病、I型糖尿病、系统性红斑狼疮、皮炎、舍格伦综合征、红斑狼疮、多发性硬化、重症肌无力、莱特尔氏综合征和格雷夫斯病。(C)结缔组织病,例如脊椎关节炎、皮炎和纤维肌痛;(D)损伤引起的炎症;(E)感染,例如结核病或间质性角膜炎;以及(G)关节炎,例如滑囊炎或肌腱炎。头疼的类型包括肌肉的/肌源性头痛、血管性头痛、牵引性或炎症性头痛、丛集性头痛、激素性头痛、反跳性头痛或慢性鼻窦炎头痛。

[0022] 躯体疼痛可与以下相关:过度的肌肉收缩、反复运动疾病、诸如多肌炎的肌肉疾病、皮炎、狼疮、纤维肌痛、风湿性多肌痛,以及横纹肌溶解、肌痛、感染诸如肌肉脓肿、旋毛虫病、流行性感、莱姆病、疟疾、落矶山斑疹热、禽流感、普通感冒、社会获得性肺炎、脑膜炎、猴痘、严重急性呼吸综合征、中毒性休克综合征、旋毛虫病、伤寒,以及上呼吸道感染。

内脏痛可与诸如以下的疾病相关:肠易激综合征、慢性功能性腹痛(CFAP)、功能性便秘、功能性消化不良、非心脏胸痛(NCCP)和慢性腹痛、慢性胃肠炎,例如胃炎、炎性肠病,例如克罗恩病、溃疡性结肠炎、微观结肠炎、憩室炎和肠胃炎;间质性膀胱炎;肠局部缺血;胆囊炎;阑尾炎;胃食管反流;溃疡、肾结石、尿路感染、胰腺炎和疝。

[0023] 本发明的第四个目的是提供一种本发明多肽的制备方法,优选的,可以采用化学合成的方式制备本发明的多肽。进一步优选的,采用固相合成法或重组表达法进行制备,进一步,采用F-moc全自动固相合成法制备本发明的多肽。

[0024] 与现有技术相比,本发明有益效果为:通过将齐考诺肽的C端与细胞膜穿透肽连接获得一种改进型齐考诺肽,克服了齐考诺肽不能通过血脑屏障,不能肌肉注射,主要通过脑室和椎管给药所带来的外科手术风险高、感染风险高等不足。本发明的融合多肽能够通过血脑屏障,适用于静脉、腹腔或鼻腔给药方式,操作方便,临床风险小,通静脉、腹腔或鼻腔施用,其在体内的药效作用时间长,镇痛效果优良,而且本发明的融合多肽副作用小,适用于大规模的临床应用。另外,本发明的融合多肽制备简单,制备工艺和制备过程中质量可控,适用于大规模产业化生产。

附图说明

[0025] 图1: MVIIA和MVIIA-a, b, c, d一步氧化折叠HPLC分析图谱;

[0026] 图2: MVIIA和MVIIA-a, b, c, d的圆二色谱图,多肽的终浓度是 $35\mu\text{mol/L}$,分别溶解在磷酸盐缓冲液(10mM , $\text{pH}=7.2$);

[0027] 图3: MVIIA和MVIIA-a, b, c, d对 $\text{CaV}2.2$ 通道电流的抑制作用, MVIIA的剂量效应曲线如图3A所示, MVIIA变体的剂量效应曲线如图3B-3E所示。半抑制浓度和坡度值的数据均显示在图上,数据以平均值 \pm 标准误表示,每组5只小鼠。如F图所示,在 $10\mu\text{M}$ L-MVIIA(蓝色)和 $2\mu\text{M}$ MVIIA(红色)时,由从 -80mV 到 10mV 的电压步长所激发的全细胞钙通道电流痕迹的叠加;G图是MVIIA及其变体的半抑制浓度的汇总表格;

[0028] 图4: MVIIA和MVIIA-c热板疼痛比较结果,侧脑室给药MVIIA(图4A),尾静脉给药MVIIA(图4B)和MVIIA-c(图4C)后的体内镇痛效果。镇痛效果以百分比表示最大可能的影响(%MPE)。数据以平均值 \pm 标准误表示,每组6-8只小鼠。 $*p<0.05$, $**p<0.01$ 和 $***p<0.001$ 表示与生理盐水组进行比较(数据分析采用单因素方差分析和邓肯多重范围检验法);

[0029] 图5: MVIIA-a, b, d热板疼痛实验结果,图5A-图5C为尾静脉给MVIIA-a, b, d多肽后的体内镇痛效果。镇痛效果以百分比表示最大可能的影响(%MPE)。数据以平均值 \pm 标准误表示,每组8-10只小鼠。 $*p<0.05$, $**p<0.01$ 和 $***p<0.001$ 表示与生理盐水组进行比较;

[0030] 图6: 醋酸扭体实验中MVIIA和MVIIA-a, b, c, d的镇痛效果,腹腔注射1%醋酸后的5到20分钟内,记录小鼠的翻滚次数;如图A所示,侧脑室给药30分钟后,腹腔注射1%的醋酸的作用比较;如图B所示,尾静脉给药30分钟后,腹腔注射1%的醋酸的作用比较;。 $\#$,与生理盐水组(saline)组比较;*,与MVIIA组比较; &,与MVIIA-C组比较;*, $\#$, &, $p<0.05$;***,###,&&&, $p<0.001$ 。数据以平均值 \pm 标准误表示,每组9-11只小鼠;

[0031] 图7: MVIIA和MVIIA-a, b, c, d对小鼠震颤时间的影响,侧脑室给予 $6\mu\text{L}$ 的多肽(0.9nmol/kg)和生理盐水。给药后30分钟和120分钟,记录5分钟内小鼠的累计震颤时间。数据以平均值 \pm 标准误($n=12$)表示;

- [0032] 图8: MVIIA的质谱图;
- [0033] 图9: MVIIA-a的质谱图;
- [0034] 图10: MVIIA-b的质谱图;
- [0035] 图11: MVIIA-c的质谱图;
- [0036] 图12: MVIIA-d的质谱图;
- [0037] 图13: MVIIA和不同剂量MVIIA-c鼻腔给药后的镇痛能力;
- [0038] 图14: MVIIA-a, b, d鼻腔给药时在热板疼痛实验中的镇痛能力。

具体实施方式

[0039] 为了克服现有技术中齐考诺肽的不足, 本发明人通过长期研究发现, 通过齐考诺肽的C端与细胞膜穿透肽的N端连接, 获得的改进型齐考诺肽的融合肽, 适用于静脉或腹腔给药。为了进一步研究不同类型的改进型齐考诺肽的镇痛效果, 本发明设计合成了多种不同类型和结构的融合多肽, 包括, 不使用连接子, 通过齐考诺肽的C端与细胞膜穿透肽的N端直接连接的融合多肽; 使用一个或多个甘氨酸作为连接子构建的融合多肽。进一步, 对上述不同类型的融合多肽进行结构表征, 细胞实验、体内实验以及副作用验证实验, 用以说明不同类型的改进型齐考诺肽的效果

[0040] 为了更好的理解本发明的技术方案, 下面结合实施例进行详细说明。

[0041] 实施例1不同类型的齐考诺肽融合肽的制备

[0042] 制备4种不同类型的融合肽, 分别命名为受保护的多肽MVIIA-a、MVIIA-b、MVIIA-c、MVIIA-d。同时制备齐考诺肽, 命名为MVIIA, 作为对照。本实验是采用F-moc全自动固相合成法, 具体步骤如下:

[0043] 多肽的合成: 使用433A自动合成器 (ABI, Foster City, CA) 的模型在树脂上组装受保护的多肽及其衍生物。室温下, 肽树脂在悬浮液中孵育2.5小时, 脱保护基。悬浮液体系是由10毫升TFA、0.75克苯酚、0.25毫升的1,2-乙二硫醇、0.5毫升的苯甲硫醚和0.5毫升的水组成的。(苄氧羰基 (Fmoc), 一种常见的烷氧羰基类氨基保护基)。通过过滤, 从多肽去保护基混合物中分离树脂。粗多肽在150ml预冷的乙醚溶液中沉淀, 并以10%冰醋酸作为洗脱剂在葡聚糖凝胶G-25柱中进行层析纯化。随后, 含有多肽的组分被汇集并冻干, 并使用高效液相色谱法测得粗多肽的纯度为80%左右。

[0044] 多肽折叠: MVIIA包含六个半胱氨酸残基, 维持其三个二硫键结构, 在氧化条件下的折叠可产生多种异构体。在经过氧化还原系统、缓冲液、盐、浓度和温度的筛选以后, 选取了两个MVIIA的高效折叠条件: (a) 0.5M NH₄Ac缓冲液 (pH 7.9), 其中包含1mM GSH, 0.1mM GSSG, 1mM EDTA, 和0.2mg/mL MVIIA; (b) 0.5M NH₄Ac缓冲液, 其中包含1mM cysteine, 1mM EDTA, 和0.2mg/mL MVIIA。4°C时, 直线型多肽MVIIA在a条件下48-72小时和在b条件24-48h下被折叠。

[0045] 多肽纯化和表征: MVIIA被氧化后, 先用醋酸对反应混合物进行酸化 (pH<4.5) 处理, 随后过滤。滤液直接上样至Zorbax 21.2×250mm的C18液相色谱柱, 其中使用的是制备高效液相色谱泵 (Waters 2000series, Milford, MA)。C18柱先使用缓冲液A (0.1% TFA的水溶液) 预清洗柱, 随后采用10-40%缓冲液B (0.1% TFA的乙腈溶液), 以8mL/min的速度进行40分钟线性梯度洗脱。得到的馏分是含90%的MVIIA的浓缩液, 随后我们采用装上9.4×

250mm ZorbaxC18液相色谱柱的半制备的反相高效液相色谱进行进一步纯化。最后,我们在葡聚糖凝胶G-25层析柱中以20%乙酸溶液为洗脱液,将终产物从TFA盐溶液中转换至乙酸盐溶液中。多肽的纯度是由分析型的反相高效液相色谱进行评估的,评估时是在1ml每分钟的流速下,使用Zorbax C18液相色谱柱(4.6×250mm),以8-40%缓冲液B(0.1%TFA的乙腈溶液)进行25分钟线性梯度洗脱。最终,我们得到的终产物-多肽的纯度为98%。

[0046] 实施例2:不同类型的齐考诺肽融合肽的化学特性和结构表征

[0047] 1.MVIIA及其变体的化学特性

[0048] 4℃时,缓冲液处理线性多肽24-48小时,随后使用高效液相色谱进行分析,发现线性多肽的折叠导致了一个主要的高峰和几个小峰的出现。缓冲液体系包括1mM谷胱甘肽,0.1mM氧化型谷胱甘肽,1mM EDTA,和0.2mg/mL线性多肽,溶液的pH为7.9。主要的产物经过提纯,并通过分析反相高效液相色谱进行评估,同时多肽的纯度被确定为大于98%。用Ultraflex III TOF/TOF质谱仪进行确定(Bruker)。制备获得的多肽序列如表1所示,其一步氧化折叠HPLC分析图谱如图1所示。

[0049] 表1:制备获得的多肽序列

[0050]

名称	序列
MVIIA (SEQ ID NO.1)	CKGKGAKCSRLMYDCCTGSCRSKGK

[0051]

MVIIA-a (SEQ ID NO.4)	CKGKGAKCSRLMYDCCTGSCRSKGKCYGRKKRRQRRR
MVIIA-b (SEQ ID NO.5)	CKGKGAKCSRLMYDCCTGSCRSKGKCGYGRKKRRQRRR
MVIIA-c (SEQ ID NO.3)	CKGKGAKCSRLMYDCCTGSCRSKGKCGGYGRKKRRQRRR
MVIIA-d (SEQ ID NO.6)	CKGKGAKCSRLMYDCCTGSCRSKGKCGGGYGRKKRRQRRR

[0052] 2.圆二色谱

[0053] 多肽在PBS(10mM,pH=7.2)溶液中溶解,终浓度为35μM。室温下,检测190nm到260nm波长范围内的圆二色谱,使用的是Chirascan Plus spectropolarimeter (Applied Photophysics Ltd.,Leatherhead,Surrey,UK)仪器。设置的检测指数如下所示:step resolution 1.0nm;speed 20nm/min,和cell path length of 1.0mm。

[0054] 如图2所示,MVIIA在195nm-205nm处呈现了明显的β折叠结构。我们发现TAT变体有相似的随机线圈结构,并在200nm左右,有明显的减弱波段出现。这些结果表明,MVIIA和TAT间的连接序列的长度扩大时,多肽的二级结构并没有发生改变。当连接序列扩增时,TAT变体的摩尔椭圆度随之加深,表明MVIIA和TAT间连接序列的扩增有助于形成随机线圈结构。采用质谱(采用Voyager MALDI-TOF光谱仪)的方法鉴定产物多肽准确的分子量,如表2所示,MVIIA和MVIIA-a,b,c,d的质谱图如图8-图12所示。二硫键的桥接模式是由于部分减少半胱氨酸耦合和氨基酸沉默的方法进行分配的。合成的多肽与MVIIA标准品的高效液相色谱图和圆二色谱图结果是一致的。

[0055] 表2.MVIIA及其变体的分子量

[0056]

样品	理论MW	实测m/z	理论值与实测的差值
MVIIA	2645.54	2639.0198	6.5202
MVIIA-a	4186.0784	4180.0108	6.0676
MVIIA-b	4243.0978	4237.0300	6.0678
MVIIA-c	4299.1353	4292.0362	7.0991
MVIIA-d	4356.1568	4351.0842	5.0726

[0057] 实施例3:不同类型的齐考诺肽融合肽的电生理学实验

[0058] 为了进一步研究不同类型改进型齐考诺肽电生理学效果和对钙离子 (CaV2.2) 通道的抑制作用,进行如下实验:

[0059] HEK293T细胞(能表达SV40大T抗原)培养在含10%胎牛血清,1%的青霉素、链霉素的DMEM高糖培养基(Gibco)中。培养箱环境为37℃,5%CO₂。Dr.Diane Lipscombe提供了大鼠CaV2.2通道的 α_{1B} 拼接变体e37a,辅助亚单位 $\alpha_2\delta_1$ 和 β_3 质粒(Addgene plasmid#26569,#26575,#26574)。随后三种质粒(3 μ g)、0.4 μ g增强型绿色荧光蛋白基因和脂质体一起瞬转染至HEK293T细胞中。转染24小时后,细胞接种在玻璃载玻片上,在培养箱(37℃,5%CO₂)培养至少6小时,随后进行电生理记录。

[0060] 本研究是按照之前已发表的研究文献中细胞电压钳位记录的方法进行记录的(F.Wang et al.,2016)。简单来说,记录电极有大约3M Ω 的电阻,被内部溶液所充满。内部溶液包含135mM CsCl,10mM NaCl,10mM HEPES,和5mM EGTA,并用CsOH调节溶液pH为7.2。细胞外记录溶液包含135mM N-Methyl-D-glucamine,10mM BaCl₂·2H₂O,2mM MgCl₂·6H₂O和10mM HEPES,溶液最终pH为7.4。室温下(~22℃),采用MultiClamp 700B放大器(Molecular Devices,Sunnyvale,CA)和Clampex 10.3/Digidata1440A数据采集系统和数模转换器记录采集的电流。膜电流在2kHz过滤后,在10kHz取样。所有的数据采用数据分析系统clampfit 10.3进行分析(Molecular Devices),且以平均值 \pm 标准误表示。阻断N型Ca离子电流的毒素的剂量-效应曲线用GraphPad Prism(GraphPad Software,San Diego,CA)软件绘制的,将电流幅度抑制曲线作为药物浓度的函数,使用希尔方程拟合。

[0061] MVIIA及其变体MVIIA-a,b,c,d的主要氨基酸序列及其电生理活性如表3所示。

[0062] 表3.MVIIA及其变体的主要氨基酸序列及其电生理活性

Peptides	Primary amino acid sequences	IC ₅₀ (μM)
MVIIA	CKGKGAKCSRLMYDCCGTGSCRSKGK	0.0436
L-MVIIA	GGGGS-CKGKGAKCSRLMYDCCGTGSCRSKGK	> 10
MVIIA-a	CKGKGAKCSRLMYDCCGTGSCRSKGK-YGRKKRRQRRR	0.4127
MVIIA-b	CKGKGAKCSRLMYDCCGTGSCRSKGK-G-YGRKKRRQRRR	0.3788
MVIIA-c	CKGKGAKCSRLMYDCCGTGSCRSKGK-GG-YGRKKRRQRRR	0.2367
MVIIA-d	CKGKGAKCSRLMYDCCGTGSCRSKGK-GGG-YGRKKRRQRRR	0.3446

[0064] MVIIA及其变体对钙离子 (CaV2.2) 通道的抑制作用

[0065] 众所周知, MVIIA是一种选择性CaV2.2通道阻滞剂。浓度为2μM MVIIA能90%以上的阻断Cav2.2通路。(F.Wang.2016, and other articles) 在本研究中, 我们在293T细胞中记录了CaV2.2通道(α_{1B}, α_{2δ1} and β₃)的Ca²⁺峰值电流(ICa)。所有的电流被100ms从-80mv到10mv的电压步长所激发。1μM浓度的MVIIA、MVIIA-a、MVIIA-b、MVIIA-c和MVIIA-d处理可以降低Ca²⁺峰值电流, 其降低值分别为98.24±0.708%, 89.45±0.752%, 91.70±1.477%, 98.81±0.427%和84.26±3.127%。我们发现, MVIIA-c与MVIIA有相似的阻断Cav2.2通道的能力。L-MVIIA阻断Cav2.2通道的能力显著降低, 且在10μM的浓度下仅能降低23.28±3.347%的Ca²⁺峰值电流。MVIIA的浓度和抑制Cav2.2通道的响应关系的半抑制浓度是0.0436μM, 与TAT变体相比, 几乎大了5-10倍。TAT变体(MVIIA-a, MVIIA-b, MVIIA-c and MVIIA-d)的半抑制浓度分别为0.413, 0.379, 0.237和0.345μM, 如图3所示。这些结果表明, MVIIA-a, MVIIA-b, MVIIA-c和MVIIA-d对Cav2.2通道的具有一定的抑制效果, 且MVIIA和TAT变体间连接序列的长度能够影响Cav2.2通道的结合能力。

[0066] 实施例4: 不同类型的齐考诺肽融合肽的体内镇痛效果实验

[0067] 1. 热板疼痛实验

[0068] 1.1 实验方法

[0069] 本实验中, 一共九组小鼠, 每组小鼠6-8只, 分别采用侧脑室给药MVIIA (0.11, 0.33 or 1.00 nmol/kg), 尾静脉给药MVIIA和MVIIA-a, MVIIA-b, MVIIA-c和MVIIA-d (0.33, 1.00 or 3.00 μmol/kg)。两种途径给药时, 生理盐水组均作为空白对照组。动物被放在一个温度恒定为55±0.5℃的电烫斗上, 延迟时间是记录从将小鼠放置在电烫斗的表面到第一次舔后腿的爪子或者第一次跳起来的时间作为疼痛指数的阈值(Eddy and Leimbach, 1953)。以60s的时间为界限, 若超过60s则将小鼠取出, 避免小鼠组织受到损伤。在给药前, 延迟时间被提前测量作为基线值; 随后, 记录给药MVIIA、MVIIA-c和Saline (侧脑室给药或者尾静脉给药) 后的0.5、1、2、3、4、6、8、10和12h时的延迟时间。与延迟基线时间相比, 延迟时间少于5s或者多于20s的小鼠均被认为是不敏感的和超敏感的小鼠, 随后被剔除。

[0070] 镇痛效果是以百分比表示最大可能的影响(%MPE), 最后使用下面的方程进行计算: %MPE = (T₁-T₀) × 100 / (T₂-T₀)

[0071] 其中, T₀和T₁分别表示给药前后的延迟时间, T₂是每次测试的界限时间。

[0072] 1.2镇痛能力比较

[0073] 如图4所示,侧脑室给药MVIIA (0.11,0.33和1.00nmol/kg) 1小时后,MVIIA的药效达到最高值;到4小时时,MVIIA的药效基本消失(图4A)。然而,尾静脉注射时,多剂量的MVIIA均未产生药效(图4B)。MVIIA-c是MVIIA的TAT变体中有最强抑制CaV2.2通道电流作用的变体。如图4C所示,MVIIA-c在给药3小时时展现出最强的药效,且其的最强药效持续4小时左右,药效持续时间为12小时。

[0074] 如图5所示,尾静脉注射不同剂量的MVIIA-a,b,d (0.11 μ mol/kg,0.33 μ mol/kg和1.00 μ mol/kg) 1小时后,均呈现出镇痛效果,并在给药2-3小时时展现出最强的药效,药效持续4小时左右,随时间逐步降低,在给药12小时后给药组与盐水组仍有显著差别,药效持续时间为12小时。

[0075] 2.醋酸扭体实验(Koster et al.,1959)

[0076] 2.1实验方法

[0077] 三种剂量的MVIIA-a,b,c,d多肽组(0.6,1.8和5.4nmol/kg,图中低,中,高剂量),盐水对照组(saline),三种剂量的阳性参考药物组MVIIA(0.11,0.33和1.00nmol/kg,图中低,中,高剂量)处理动物。扭体实验时,在腹腔注射1%醋酸前30分钟分别给药MVIIA(侧脑室)or MVIIA-a,b,c,d(侧脑室),随后测量MVIIA和MVIIA-MVIIA-a,b,c,d的体内镇痛效果。为了检测MVIIAand MVIIA-a,b,c,d通过血脑屏障的能力,在腹腔注射1%醋酸前3小时,通过尾静脉给药的方式分别给药MVIIA和MVIIA-a,b,c,d。生理盐水组均作为空白对照组(侧脑室给药或者尾静脉给药)。记录醋酸注射后5分钟到20分钟内小鼠的翻滚次数(Galeotti et al.,2008)。扭转运动的次数是以腹部肌肉的收缩并伴随着后肢的拉伸和身体的伸长为特点进行记录的。

[0078] 2.2镇痛能力比较

[0079] 在醋酸扭体实验中,三种剂量的MVIIA-a,b,c,d多肽组(0.6,1.8和5.4nmol/kg,图6中低,中,高剂量),盐水对照组(saline),三种剂量的阳性参考药物组MVIIA(0.11,0.33和1.00nmol/kg,图6中低,中,高剂量)处理动物,对比各组在三种不同剂量,静脉给药和侧脑室给药条件下的翻滚次数。发现MVIIA-a,b,c,d多肽组与阳性参考药物组MVIIA均减少醋酸诱导的翻滚次数,且呈剂量依赖性。在侧脑室给药条件下,MVIIA,MVIIA-a,b,c,d分别使得小鼠的翻滚次数降低为(相对于盐水组):MVIIA8.97%,53.37%,76.88%;MVIIA-A,2.94%,13.36%,48.35%;MVIIA-B,10.82%,42.79%,77.60%;MVIIA-C,14.75%,39.53%,81.77%;MVIIA-D,12.08%,23.95%,56.54%。在静脉给药条件下,阳性参考药物MVIIA无降低小鼠的翻滚次数的作用,MVIIA-a,b,c,d分别使小鼠的翻滚次数降低为(相对于盐水组):MVIIA-a,10.47%,27.82%,30.03%;MVIIA-b,17.08%,45.94%,51.79%;MVIIA-c,19.81%,49.30%,62.95%;MVIIA-d,6.33%,35.86%,47.57%,如图6所示。

[0080] 结论:从上述的实验结果可以看出,相比于MVIIA,MVIIA-a,b,c,d多肽能在静脉注射的情形,起到镇痛的效果且呈剂量依赖性,特别是,在中,高剂量的情况下,MVIIA-a,b,c,d多肽通过静脉注射,能够达到良好的镇痛效果,满足临床使用需求。进一步,相比于MVIIA,通过静脉注射给药MVIIA-a,b,c,d药效长达12小时,在体内有良好的缓释效果。

[0081] 前述镇痛实验采用单因素方差分析(one-way ANOVA),重复测量的双因素方差分析(two-way ANOVAwith repeated measures),组间用邓肯或纽曼-柯尔测验法的方法进

行分析。所有的数据均用平均值±标准差或标准误或95%的置信区间。当p值的差异小于0.05时,认为数据具有统计学意义。

[0082] 实施例5:不同类型的齐考诺肽融合肽的副作用实验

[0083] 为了进一步研究不同类型改进型齐考诺肽在体内的副作用,进行如下实验:

[0084] 1. 实验方法

[0085] 震颤时间被认为是齐考诺肽一类典型的副作用。震颤时间是记录一段时间内小鼠四肢、头部和躯干有节奏的震动的总时间。小鼠随机分组: MVIIA (0.9nmol/kg) 组, MVIIA-a, b, c, d (0.9nmol/kg) 组和正常对照组 (6μL, 侧脑室给药; n=12, 雌雄各半)。给药30分钟和120分钟后,用数码相机录制5分钟内小鼠的动态视频,并由一位对实验不了解的人统计每只小鼠5分钟内的累计震颤时间。

[0086] 毒理学实验采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 和纽曼-柯尔测验法的方法进行分析。所有的数据均用平均值±标准差或标准误或95%的置信区间。当p值的差异小于0.05时,认为数据具有统计学意义。

[0087] 2.1 副作用比较

[0088] 如图7所示,给药30分钟时, MVIIA造成了更明显的震颤症状和更长的震颤时间;给药120分钟时,各组多肽与MVIIA相比,造成的震颤症状和更长的震颤时间没有明显差异。从上述结果中可以看出, MVIIA于MVIIA-a, b, c, d多肽在副作用上无明显差异,甚至于,在给药开始阶段, MVIIA-a, b, c, d的副作用还要低于MVIIA,可见,本申请的MVIIA-a, b, c, d多肽毒副作用较小。

[0089] 实施例6: MVII-A脑室给药与MVIIA-a, b, c, d滴鼻镇痛实验比较

[0090] 1.1 热板疼痛实验方法

[0091] 热板疼痛实验方法如前所述。小鼠本实验中,一共九组小鼠,每组小鼠10只,脑室内给予MVIIA (1.00nmol/kg, 5μl/10g) 作为阳性对照组 (实验中发现MVIIA鼻内给药无效), 鼻腔分别给予生理盐水 (saline, 2μl/10g), MVIIA-C (3.3, 6.6 or 9.9nmol/kg, 2μl/10g)。生理盐水组作为空白对照组。记录脑室内给药MVIIA、鼻腔给药MVIIA-c和Saline后的0.5、1、2、3、4、6、8、10h时的延迟时间。与延迟基线时间相比,延迟时间少于5s或者多于20s的小鼠均被认为是不敏感的和超敏感的小鼠,随后被踢除。

[0092] 镇痛效果是以百分比表示最大可能的影响 (%MPE), 最后使用下面的方程进行计算: $\%MPE = (T_1 - T_0) \times 100 / (T_2 - T_0)$

[0093] 其中, T_0 和 T_1 分别表示给药前后的延迟时间, T_2 是每次测试的界限时间。

[0094] 1.2 实验结果

[0095] MVIIA和不同剂量MVIIA-c鼻腔给药后的镇痛能力如图13所示。图13展示了MVIIA脑室和MVIIA-c鼻腔给药时在热板疼痛实验中的镇痛效果。脑室给药MVIIA (1.00nmol/kg) 后,药效持续4小时。MVIIA-C (3.3, 6.6, 9.9nmol/kg) 鼻腔给药后迅速起效,高剂量的MVIIA-C药效持续时间长,在8小时仍与生理盐水组有显著差异,在给药10小时后药效消失。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 和*** $p < 0.001$ 表示与生理盐水组进行比较。

[0096] 1.3 MVIIA-a, b, d滴鼻镇痛实验

[0097] 如图14所示, MVIIA-a, b, d鼻腔给药时在热板疼痛实验中的镇痛效果。与MVIIA-C类似, MVIIA-a, b, d (9.9nmol/kg) 鼻腔给药后迅速起效, MVII-b在8小时仍与生理盐水组有

显著差异,在给药10小时后药效消失。 $*p<0.05$, $***p<0.001$ 表示与生理盐水组进行比较。

[0098] 上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

序列表

<110> 北京大学深圳研究生院

<120> 一种齐考诺肽和TAT肽的融合多肽

<141> 2018-09-11

<160> 6

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 1

Cys Leu Gly Leu Gly Ala Leu Cys Ser Ala Leu Met Thr Ala Cys Cys

1 5 10 15

Thr Gly Ser Cys Ala Ser Gly Leu Cys

 20 25

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 2

Thr Gly Ala Leu Leu Ala Ala Gly Ala Ala Ala

1 5 10

<210> 3

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 3

Cys Leu Gly Leu Gly Ala Leu Cys Ser Ala Leu Met Thr Ala Cys Cys

1 5 10 15

Thr Gly Ser Cys Ala Ser Gly Leu Cys Gly Gly Thr Gly Ala Leu Leu

 20 25 30

Ala Ala Gly Ala Ala Ala

 35

<210> 4

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 4

Cys Leu Gly Leu Gly Ala Leu Cys Ser Ala Leu Met Thr Ala Cys Cys
 1 5 10 15
 Thr Gly Ser Cys Ala Ser Gly Leu Cys Thr Gly Ala Leu Leu Ala Ala
 20 25 30
 Gly Ala Ala Ala
 35

<210> 5

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 5

Cys Leu Gly Leu Gly Ala Leu Cys Ser Ala Leu Met Thr Ala Cys Cys
 1 5 10 15
 Thr Gly Ser Cys Ala Ser Gly Leu Cys Gly Thr Gly Ala Leu Leu Ala
 20 25 30
 Ala Gly Ala Ala Ala
 35

<210> 6

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 6

Cys Leu Gly Leu Gly Ala Leu Cys Ser Ala Leu Met Thr Ala Cys Cys
 1 5 10 15
 Thr Gly Ser Cys Ala Ser Gly Leu Cys Gly Gly Gly Thr Gly Ala Leu
 20 25 30
 Leu Ala Ala Gly Ala Ala Ala
 35

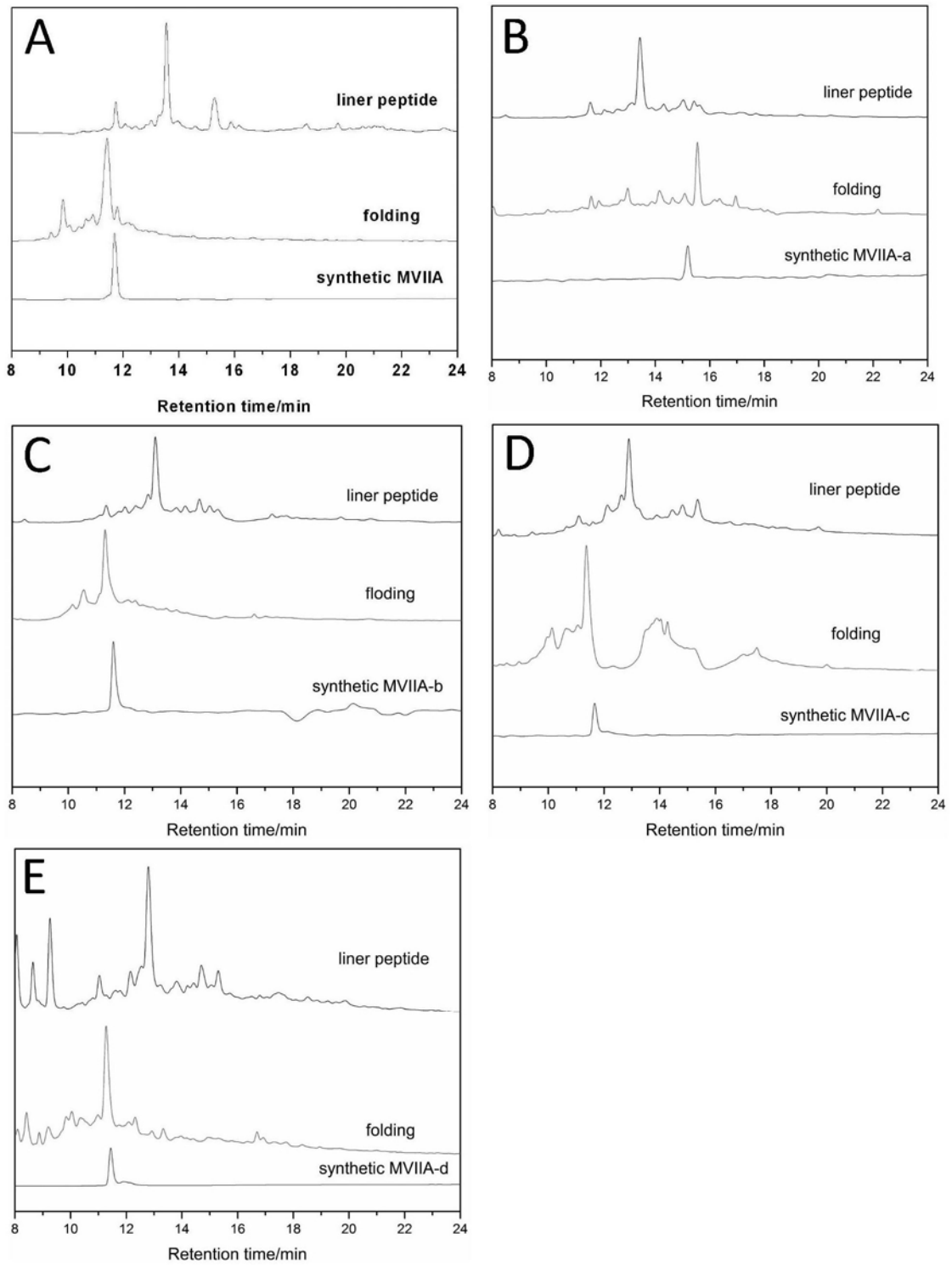


图1

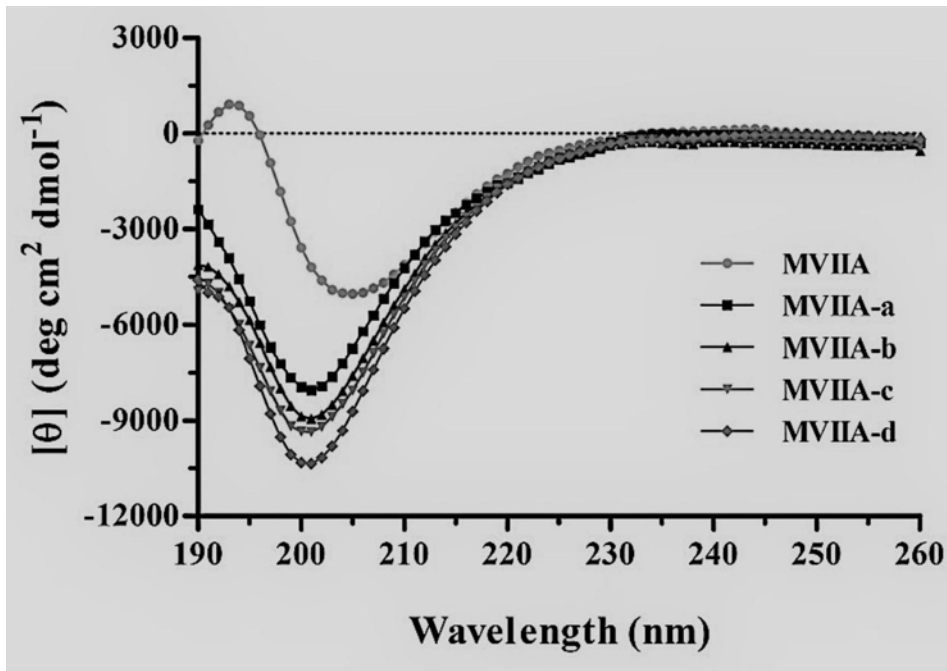


图2

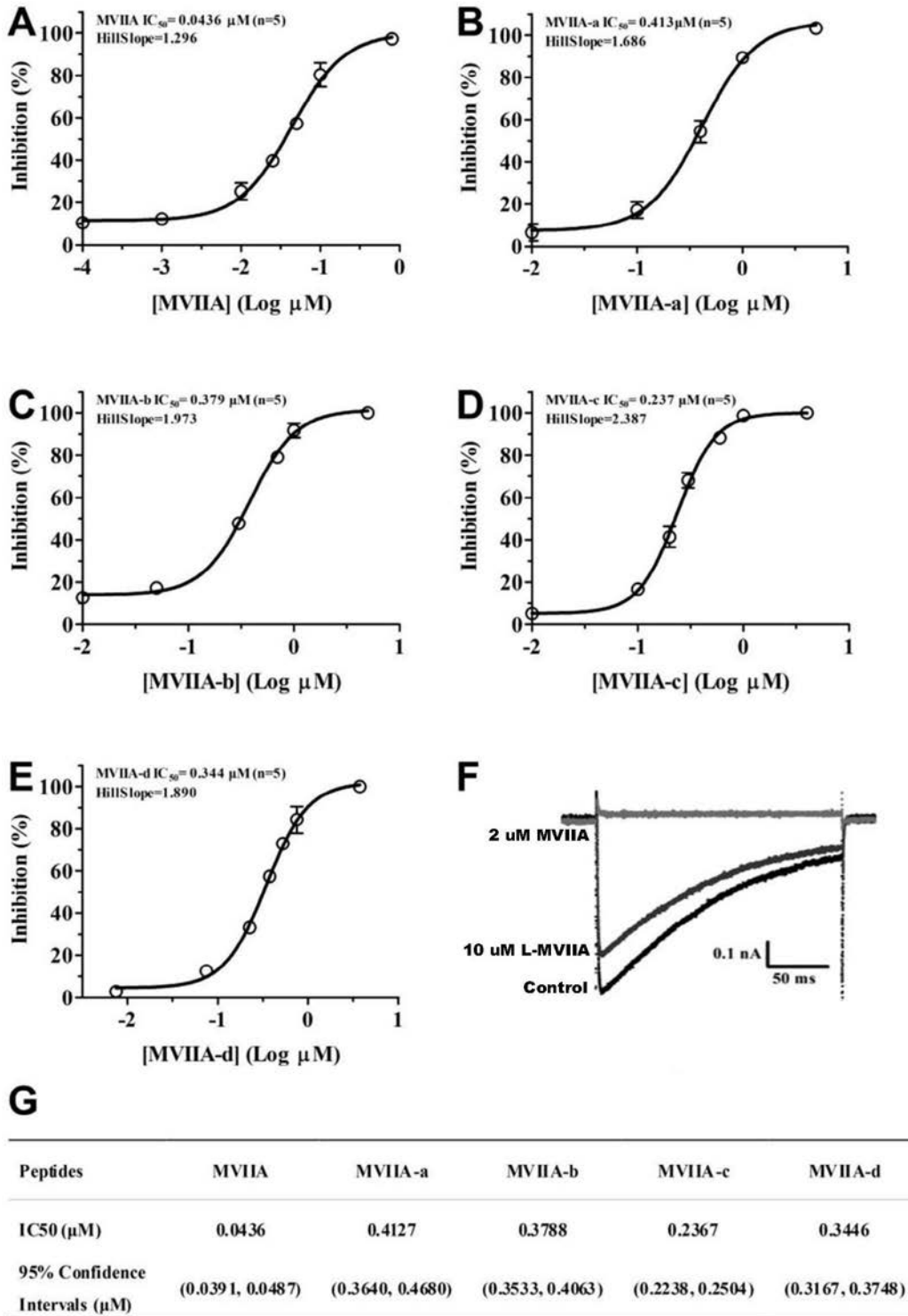


图3

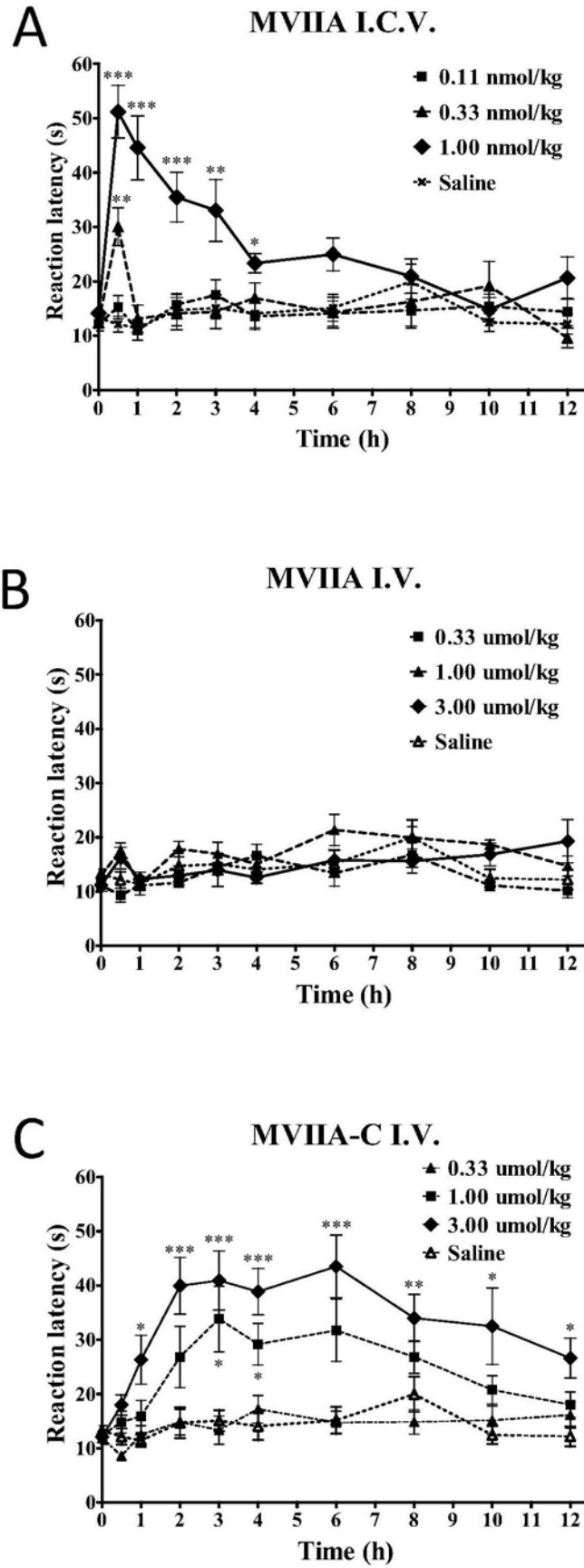


图4

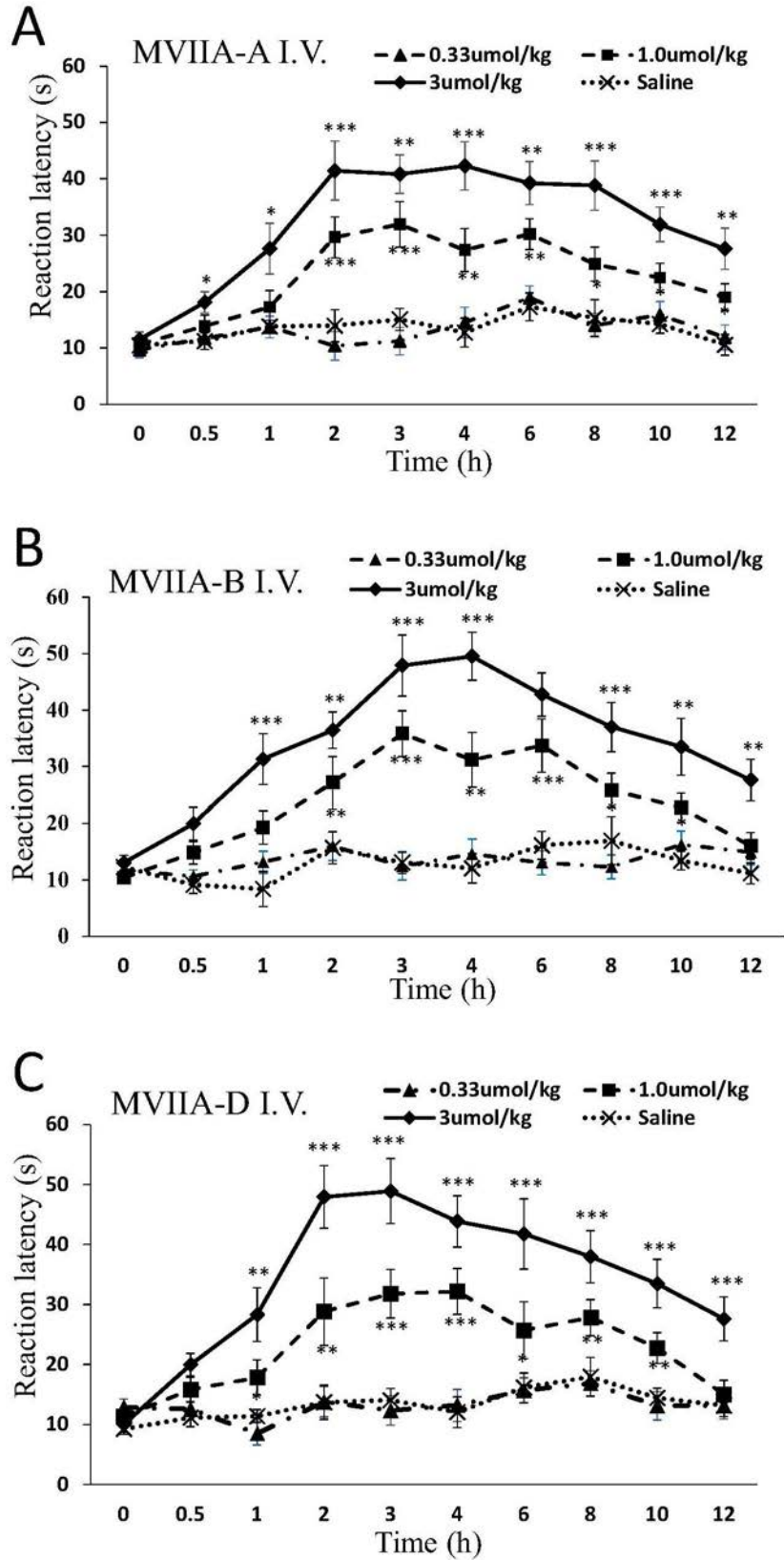
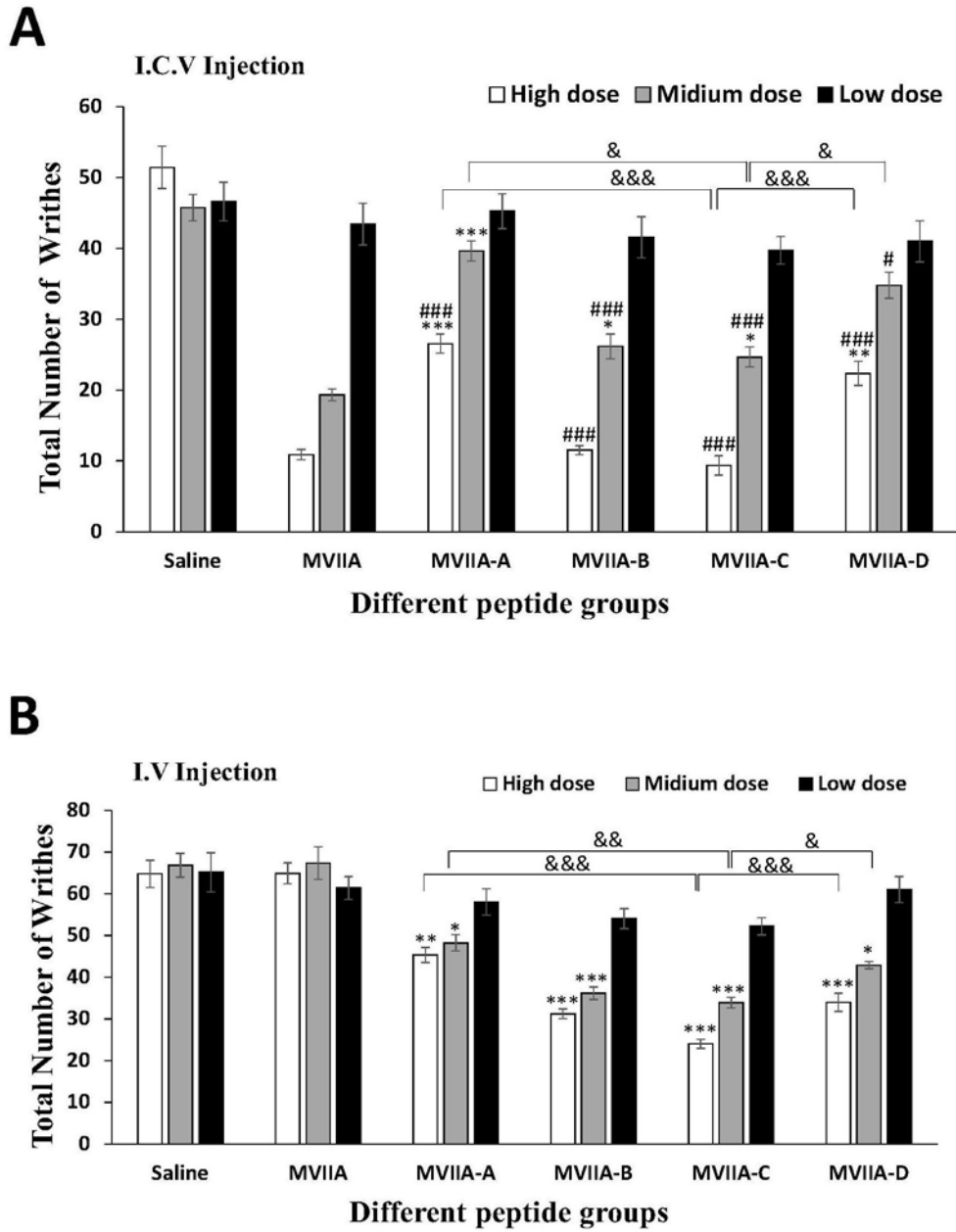


图5



#, 与生理盐水组(saline)组比较
 *, 与MVIIA组比较
 &, 与MVIIA-C组

图6

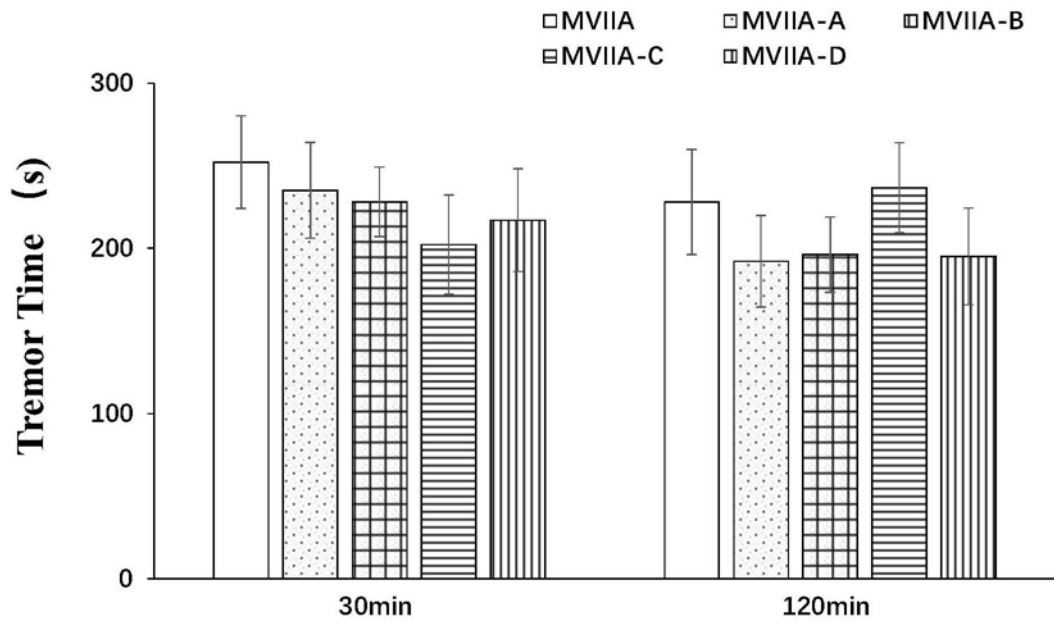


图7

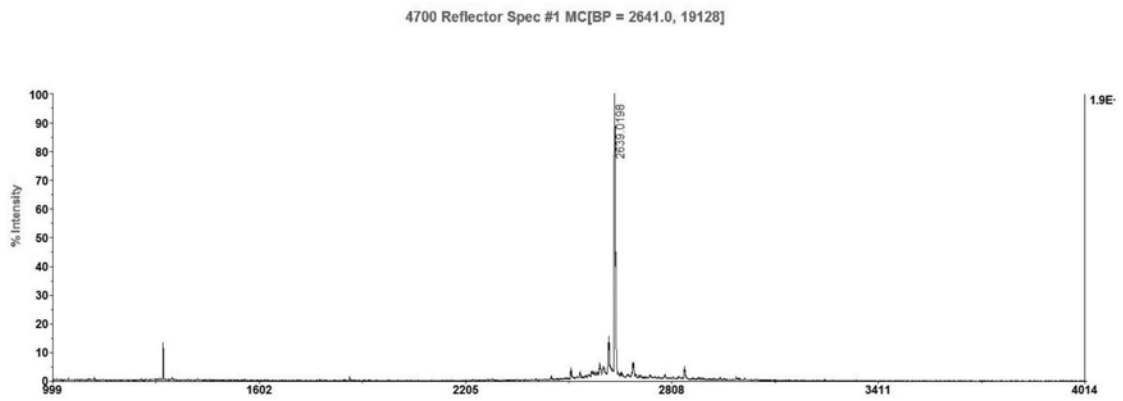


图8

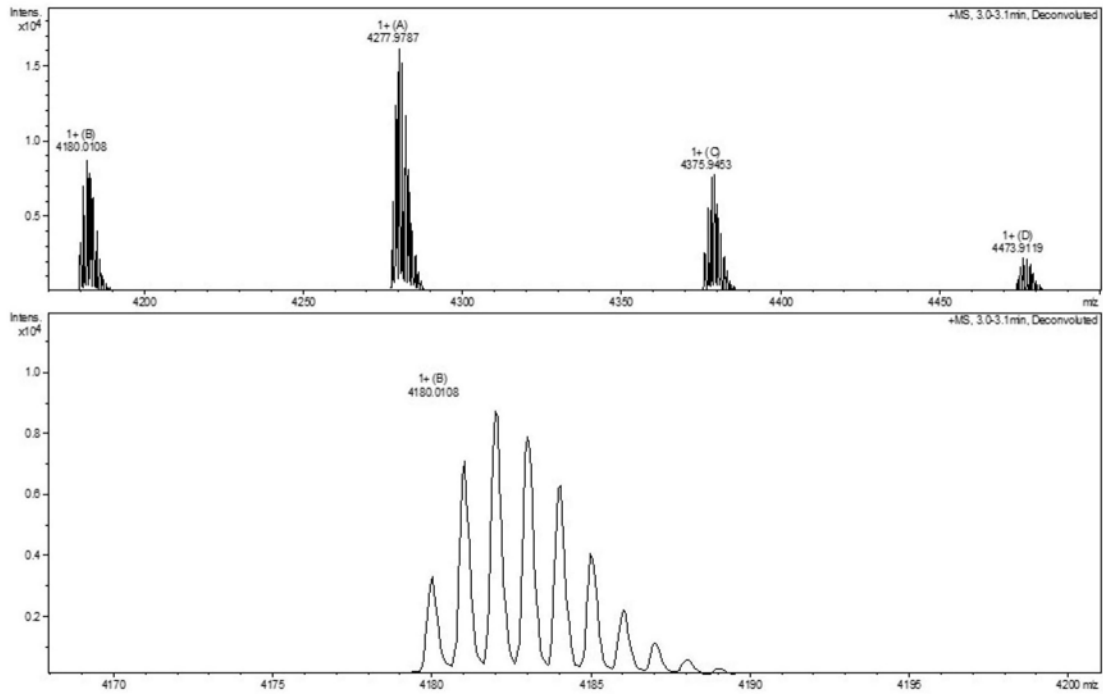


图9

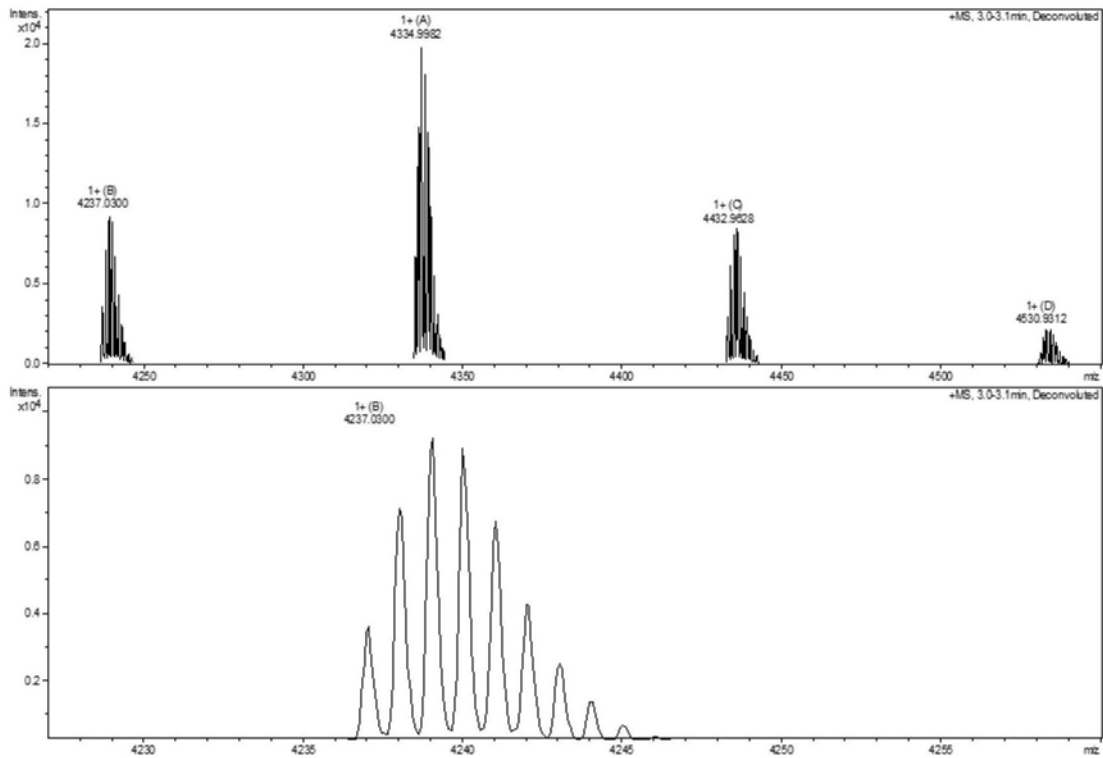


图10

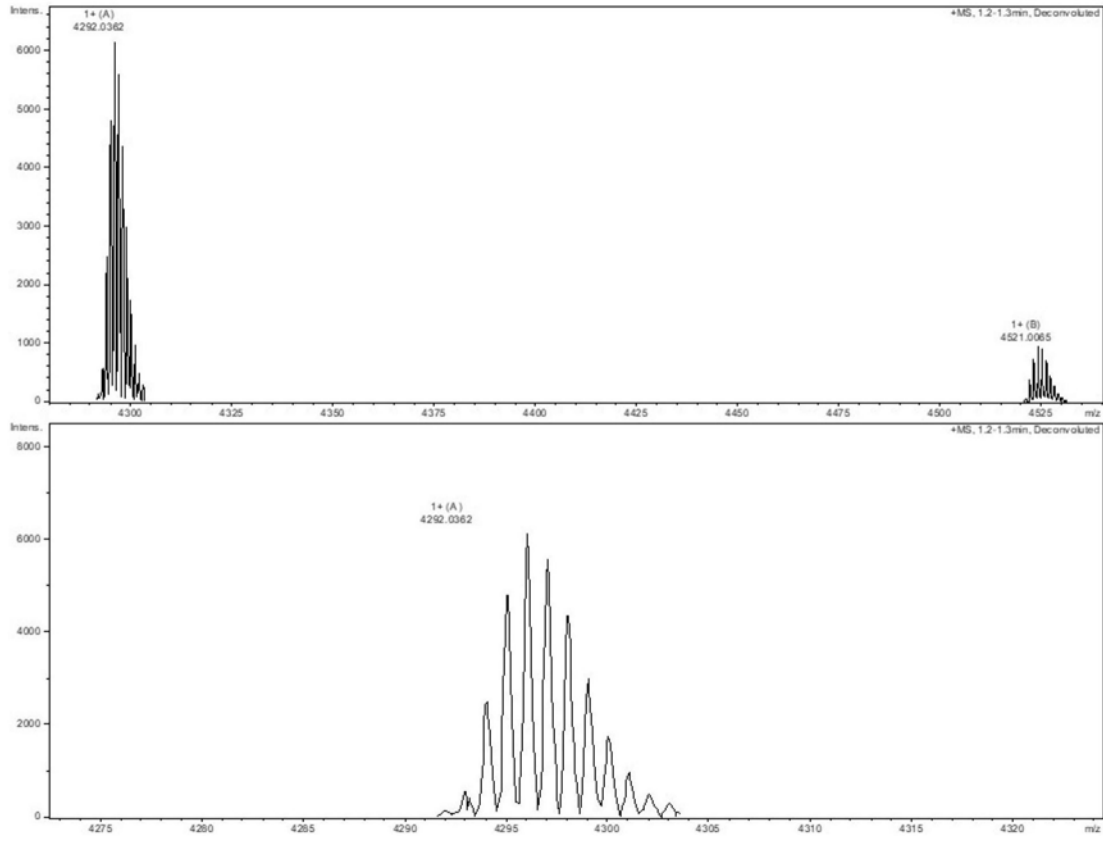


图11

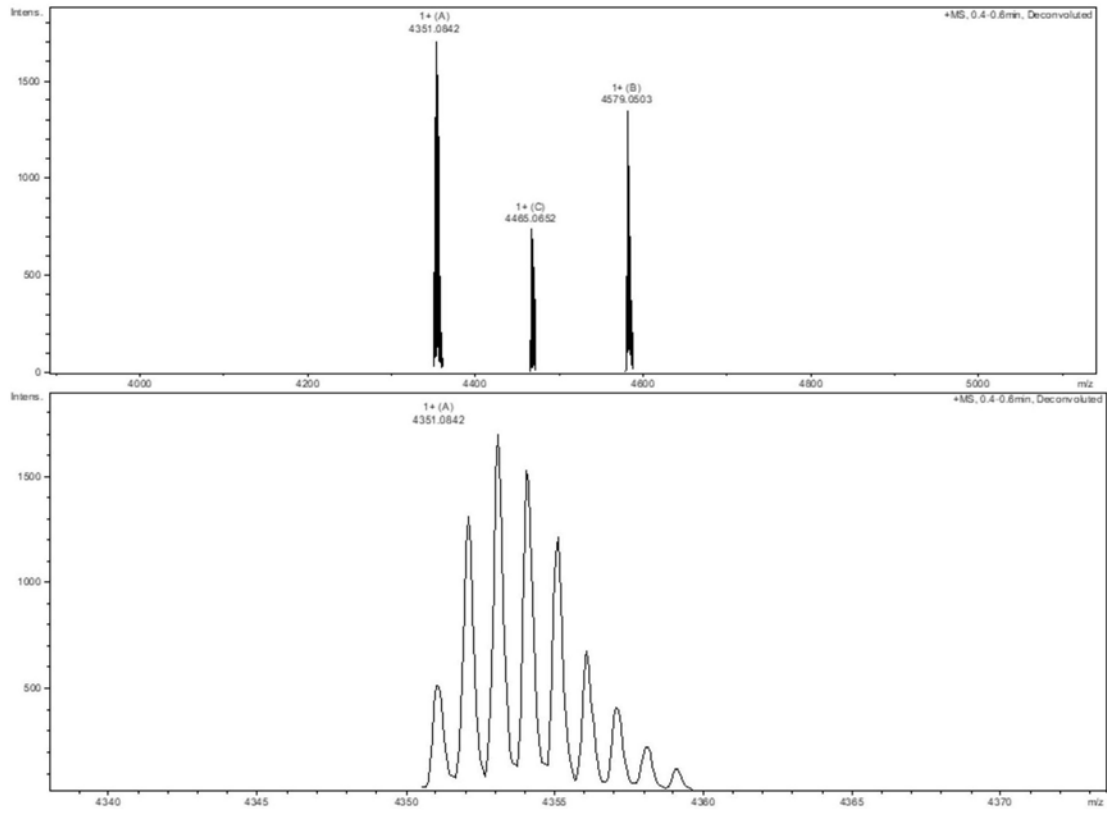


图12

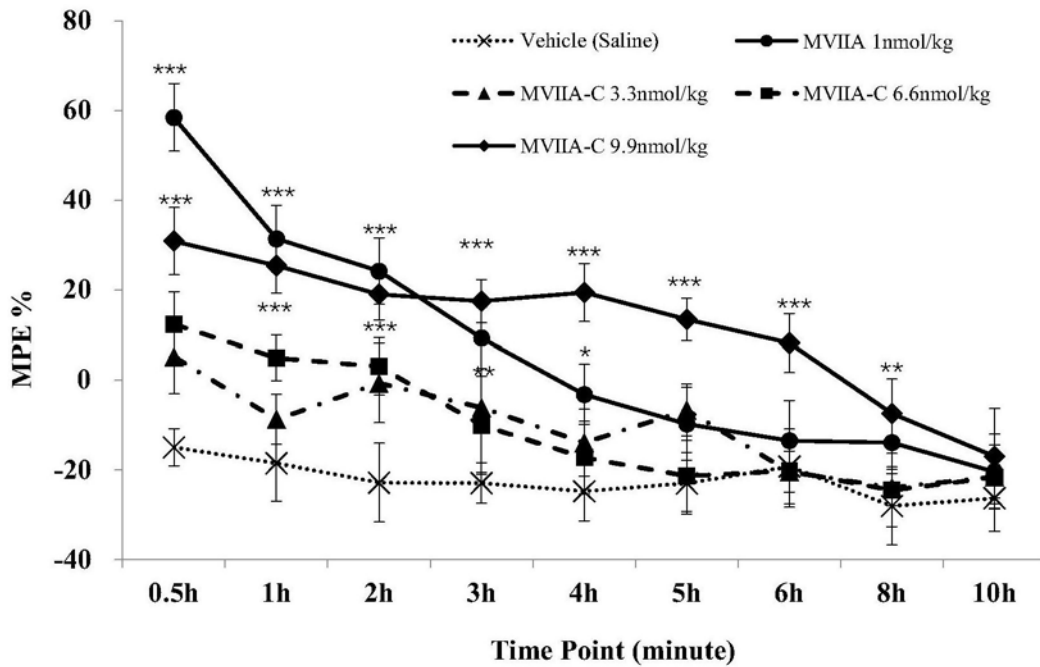


图13

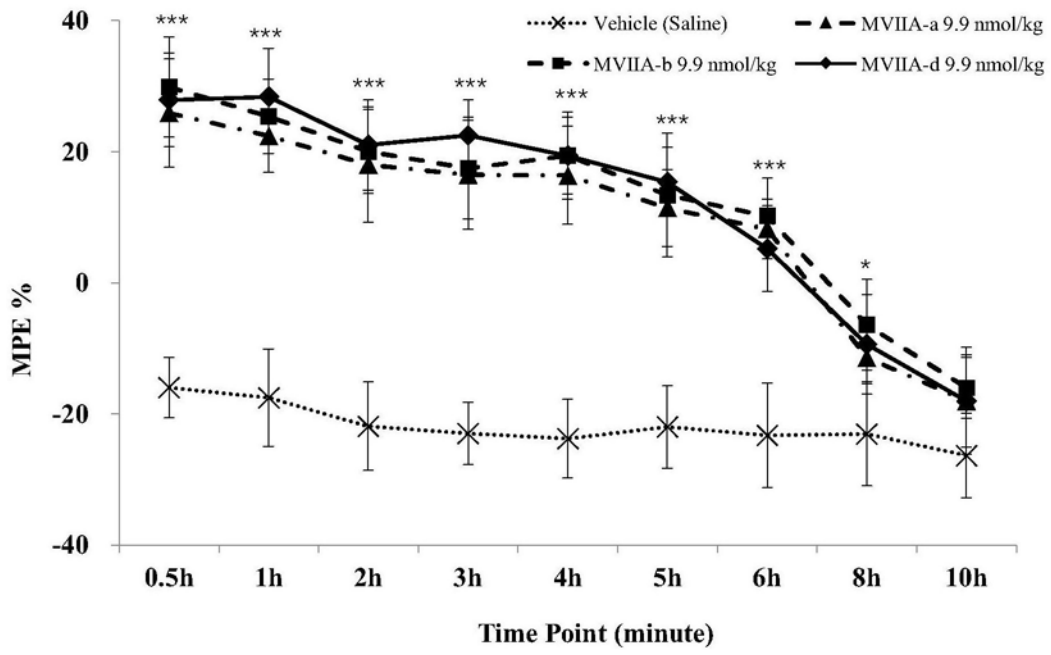


图14