(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2012 年 9 月 27 日 (27.09.2012)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2012/126150 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 14/435 (2006.01) *A61K 38/17* (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01) *A61P 25/04* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2011/001102

(22) 国际申请日: 2011 年 7 月 5 日 (05.07.2011)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201110069003.7 2011 年 3 月 22 日 (22.03.2011) CN

(71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): **沈阳药科大学 (SHENYANG PHARMACEUTICAL UNIVERSITY)** [CN/CN]; 中国辽宁省沈阳市沈河区文化路 103 号, Liaoning 110016 (CN)。

(72) 发明人; 及

(75) 发明人/申请人 (仅对美国): **张景海 (ZHANG, Jinghai)** [CN/CN]; 中国辽宁省沈阳市沈河区文化路 103 号, Liaoning 110016 (CN)。 **刘岩峰 (LIU, Yanfeng)** [CN/CN]; 中国辽宁省沈阳市沈河区文化路 103 号, Liaoning 110016 (CN)。 **王月秋 (WANG, Yueqiu)** [CN/CN]; 中国辽宁省沈阳市沈河区文化路 103 号, Liaoning 110016 (CN)。 **吴春福 (WU, Chunfu)** [CN/CN]; 中国辽宁省沈阳市沈河区文化路 103 号, Liaoning 110016 (CN)。

(74) 代理人: **沈阳杰克知识产权代理有限公司 (SHENYANG JACK INTELLECTUAL PROPERTY AGENT LTD.)**; 中国辽宁省沈阳市皇姑区黄河南大街 28 号甲 401 室, Liaoning 110031 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
— 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

(54) Title: PEPTIDE WITH ANALGESIC ACTIVITY AND PREPARATION METHOD THEREOF

(54) 发明名称 : 具有镇痛活性的肽及其制备方法

(57) Abstract: Provided is a kind of scorpion venom-derived peptide with analgesic activity and the preparation method thereof, and the amino acid sequence of the said peptide is shown as SEQ ID No:1. Also provided are derivatives and active fragments of the said peptide and the preparation methods thereof. The said peptide with analgesic activity can be mixed with pharmaceutically acceptable carriers to prepare injection, oral formulation, formulation for transdermal absorption, formulation for mucosal absorption and the like.

(57) 摘要:

本发明提供了一种源自蝎毒且具有镇痛活性的肽及其制备方法，所述肽的氨基酸序列如 SEQ ID No.: 1 所示。本发明还提供了所述肽的衍生物，活性片段以及它们的制备方法。所述具有镇痛活性的肽可以与药学上可接受的载体混合制备成注射剂、口服剂、透皮吸收剂、粘膜吸收剂等。

WO 2012/126150 A1

具有镇痛活性的肽及其制备方法

技术领域：

本发明涉及生物医药技术领域，涉及镇痛活性肽 VRD 的结构、功能以及制备方法与应用，具体地说，本发明涉及镇痛活性肽 VRD 及其衍生物、类似物、活性片段、第 54 位保守氨基酸残基的结构及其制备方法，以及作为镇痛药物在医药领域中的应用。

背景技术：

蝎作为中医珍贵药材又称全虫、全蝎，始载于《开宝本草》，《本草纲目》列于虫部40卷，距今已有2000多年的药用历史，具有熄风镇痉、攻毒散结、痛络止痛之功效。临床用于治疗偏头痛、面神经瘫痪、风湿痹痛及癌痛等症，疗效确切。蝎主要活性成分是尾腺分泌的毒素，其中蕴涵大量具有药学价值的活性组分，是一个富含有多种功能肽的天然活性肽库。

目前，从蝎获得具有镇痛活性的成分且结构清楚的已经有一些，如，蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽、蝎镇痛抗菌活性肽、镇痛活性肽VGG、镇痛活性肽DKK、镇痛活性肽GRR等。

发明内容：

本发明的目的是通过体内生物活性实验确证源于蝎的一种多肽具有镇痛活性（该活性肽命名为镇痛活性肽 VRD)。同时，也提供了镇痛活性肽 VRD 制备方法与应用范畴，具体是利用基因工程技术，从蝎 cDNA 克隆获得镇痛活性肽 VRD 基因并表达获得具有镇痛活性的该活性肽以及其衍生物、类似物、活性片段、突变体，镇痛活性肽 VRD 及其衍生物、类似物、活性片段、突变体的制备方法简单易行，可与任何载体混合制备医学上可接受的剂型。

本发明目的之二是针对镇痛活性肽 VRD 的镇痛活性，利用基因工程技术获得系列镇痛活性肽 VRD 的衍生物、类似物、活性片段、突变体，通过获得的系列表达产物的实验动物体内镇痛活性，以获得可以进一步开发镇痛类药物的镇痛活性肽 VRD 及其衍生物、类似物、活性片段、突变体。

本发明目的之三是针对镇痛活性肽 VRD 第 54 位氨基酸残基对其镇痛活性保守性进行研究，利用基因工程技术针对该位点氨基酸残基进行突变以获得系列突变体，通过获得的系列突变体表达产物的实验动物体内镇痛活性，确定对镇痛活性肽 VRD 的镇痛活性具有保守性。

本发明目的之四是针对镇痛活性肽 VRD 及其衍生物、类似物、活性片段、突变体的制备方法，利用基因工程技术或化学合成技术解决镇痛活性肽 VRD 及其衍生物、类似物、活性片段、突变体。镇痛活性肽 VRD 及其衍生物、类似物、活性片段、突变体的基因工程技术方法包括：

(1)将编码镇痛活性肽 VRD 或其衍生物或其类似物或其活性片段或其突变体的 DNA 重组至表达载体；

(2)将步骤(1)获得的重组表达载体转化适当的宿主细胞（原核或真核细胞）；

(3)在适合的诱导表达条件下，培养步骤(2)的被转化的宿主细胞；

(4)收获并纯化所得到的蛋白质。

本发明的另一个目的是提供上述镇痛活性肽 VRD 及其衍生物、类似物、活性片段、突变体的表达产物分离纯化方法。该方法可使用盐析沉淀、超滤、离子交换层析、疏水作用层析和凝胶过滤等方法,从细胞的溶胞产物及培养液中分离并纯化所需的表达产物。在表达产物的分离和纯化过程中，可使用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS-PAGE)、酶联免疫吸附法(ELISA)或蛋白免疫印迹法(WESTERN)检测表达产物的存在及相应分子大小。

本发明首次进行上述镇痛活性肽 VRD 及其衍生物、类似物、活性片段、突变体的小鼠体内镇痛生物学活性实验。

本发明还提供了上述镇痛活性肽 VRD 及其衍生物、类似物、活性片段、突变体在生物制药领域的应用，具体地说是其镇痛生物活性。

本发明的再一个目的是提供含有如上限定的蛋白质及一种或多种医药上可接受的载体或赋形剂的药物组合物。可按照制药工业领域已知的基本原则和方法制备适于胃肠道外途径给药的药物组合物(如参见 Remington's Pharmaceutical Science, 15th., Mack Publishing Company, 1980)。可通过各种给药途径，特别是静脉内、肌肉内、关节内、腹腔内、鼻内、皮内、皮下等胃肠道外途径投用本发明的药物组合物。

本发明的再一个目的是提供如上限定的蛋白质在生产镇痛药物中的应用。可使用本发明的蛋白或含有该蛋白质的药物组合物作为治疗剂，用于治疗特定类型人体的各种疼痛相关疾病。本发明的药物组合物的治疗有效剂量一般应根据疾病的性质、严重程度及对药物的敏感适应性，以及给药途径等诸多因素由临床医生按照个体化原则来确定。

在本发明中，术语“宿主细胞”包括原核细胞和真核细胞，常用的原核宿主细胞的例子包括大肠杆菌、枯草杆菌等。常用的真核宿主细胞包括酵母细胞、昆虫细胞和哺乳动物细胞等。

本发明所述的镇痛活性肽 VRD 及其衍生物、类似物、活性片段、突变体具有较好的镇痛活性，其获得方法常规、简单、产量高，不仅具有重要的指导意义和实用价值，也为工业化生产奠定了基础。

具体实施方式：

下面的实施例可以使本专业技术人员更全面地理解本发明，而不是以任何方式限制本发明特批权利要求的范围。

实施例 1：

镇痛活性肽 VRD 的获得

根据镇痛活性肽 VRD(VRDAYIAKPENCVYHCATNEGCNKLCTDNGAESGYCQWGGRYGNACWCIKLPDSVPIRVPGKCHR) 的 N 末端和 C 末端氨基酸序列以及其基因序列，分别设计相应寡核苷酸引物，同时在上述两个寡核苷酸引物的 5′ 端，分别加上限制性核酸内切酶 *Nde* I 和 *BamH* I 水解位点序列；以蝎 cDNA 为模板进行 PCR 扩增，琼脂糖凝胶电泳检测产物并进行核酸片段的凝胶回收；经过限制性核酸内切酶 *Nde* I 和 *BamH* I 双酶切后，与同样进行双酶切的质粒在 T4 DNA ligase 的作用下进行重组连接，热转化大肠杆菌感受态细胞 DH 5α，经过菌落 PCR 和限制性核酸内切酶酶切验证筛选获得阳性转化子后提交生物技术服务公司进行 DNA 序

列测定。结果表明，通过上述基因工程的方法构建获得镇痛活性肽 VRD 基因。

将阳性重组质粒热转化大肠杆菌 BL21(λDE3)，然后从该 LB 固体平板上挑取单菌落后接种至 3 ml LB (含卡那抗生素，50 μg/ml)，于 37 ℃，200 r/min 振荡过夜培养。按照 1%接种量将过夜培养物接种至 400 ml 含相应抗生素的新鲜 LB 培养基的三角瓶中，于 37 ℃，200 r/min 振荡培养至 OD600 为 0.6-0.8，加入终浓度为 0.166 mmol/L 的诱导物异丙基 β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)，培养 4 h。结束发酵，3000 g 离心力、4 ℃离心 20 min，收集菌体。用 40 ml 裂解缓冲液(0.1 M PBS, 0.15 M NaCl, 50 mM 咪唑)重悬菌体，进行超声破碎，超声结束后于 12,000g 离心力、4 ℃离心 20 min，得上清液，所得沉淀按照上述步骤重复破碎一次，合并两次上清液，直接上样于 0.1 M PBS (pH 8.0)预先平衡好的金属离子螯合层析柱，经过两个不同阶段的 pH 缓冲液分别充分洗涤 5 个柱床体积后，使用 0.5 M 咪唑 (pH 9.0)进行洗脱并收获该洗脱液。洗脱液中的表达产物结构特征为：MHHHHHHMVRDAYIAKPENCVYHCATNEGCNKLCTDNGAESGYCQWGGRYGNACWCIKLPDSVPIRVPGKCHR。利用化学法在 M 处断裂肽链，从而获得镇痛活性肽 VRD，结构特征为：VRDAYIAKPENCVYHCATNEGCNKLCTDNGAESGYCQWGGRYGNACWCIKLPDSVPIRVPGKCHR。

实施例 2：

镇痛活性肽 VRD 的分离纯化

在实施例 1 获得的表达产物或镇痛活性肽 VRD 的纯度没有达到预期纯度要求，可以利用疏水层析、离子交换层析、凝胶过滤层析、反相层析方法，分别单独或组合进行，以便进一步分离纯化至预期纯度要求。

疏水层析分离：

实施例 1 中的金属离子螯合层析柱获得的表达产物或化学法在 M 处断裂肽链获得的镇痛活性肽 VRD，用盐酸水溶液或磷酸水溶液或酸性溶液或碱性溶液调 pH 至要求条件范围下，加中性盐至 2M 浓度，上样于预先用 2M 中性盐-缓冲液溶液平衡的疏水层析柱，分别用 2.0M、1.5M、1.0M、0.5M 中性盐-缓冲液洗脱，最后用缓冲液洗脱，将含有目标物的洗脱液合并。疏水层析分离的特征：1. 疏水层析介质选择苯基-疏水层析添料或正辛烷-疏水层析添料-或己烷-疏水层析添料-或丁烷-疏水层析添料；2. 中性盐选择 $(HN_3)_2SO_4$ 或 Na_2SO_4 或 NaCl；3. 缓冲液的 pH 选择在 pH2-pH12，此条件既不影响镇痛活性成分的生物活性，又不影响活性成分的分离；4. 缓冲液的浓度选择在 1mM-100mM，此条件既不影响镇痛活性成分的生物活性，又不影响活性成分的分离。

超滤处理镇痛活性成分溶液

利用超滤处理的目的是除去镇痛活性成分溶液中的盐或杂蛋白或更换缓冲液，此外，对镇痛活性成分溶液进行浓缩。选择能够使镇痛活性肽 VRD 或及其衍生物、类似物、活性片段透过的超滤膜进行超滤处理，此时收集超滤透过液，而杂蛋白被截留实现分离的目的。选择能够截留镇痛活性肽 VRD 或及其衍生物、类似物、活性片段的超滤膜进行超滤处理，此时收集超滤浓缩液（镇痛活性肽 VRD 或及其衍生物、类似物、活性片段被截留），而盐、缓冲液的缓冲对、能透过超滤膜的杂蛋白、水被透过，实现去除盐、杂蛋白或更换缓冲液或浓缩的目的。超滤处理的特征：1. 透过超滤膜选择是分子量为 10kDa 或 20kDa 或 30kDa

或 40kDa 或 50kDa 的超滤膜，优选 30kDa 的超滤膜，大于或小于 30kDa 的超滤膜，其收率或超滤效率均受影响；2. 截留超滤膜选择是分子量为 1kDa 或 2kDa 或 3kDa 或 5kDa 的超滤膜，优选 1kDa 的超滤膜，大于或小于 1kDa 的超滤膜，其收率或超滤效率均受影响；3. 超滤处理的温度选择在 0℃-45℃，此条件既不破坏超滤膜的理化性质，又不影响目标物的活性。

离子交换层析分离

利用超滤处理的镇痛活性成分溶液，进一步用离子交换层析实验的缓冲液进行除盐、缓冲液更换和浓缩。待处理好的样品液上样于预先用缓冲液平衡好的离子交换层析柱，先用缓冲液充分洗涤去除不吸附的杂蛋白，分别用 0.05M、0.1M、0.15M、0.2M、0.25M、0.3M、0.4M、0.5M 盐溶液进行阶段洗脱，将含有镇痛活性的洗脱液合并。离子交换层析分离的特征：1. 层析介质选择阳离子交换层析添料，如 CM-离子交换层析添料或 SP-离子交换层析添料或 S-离子交换层析添料等阳离子交换层析添料，此时缓冲液酸碱度选择在 pH2-pH7；2. 层析介质选择阴离子交换层析添料，如 Q-离子交换层析添料或 DEAE-离子交换层析添料或 QAE-离子交换层析添料等离子交换层析添料，此时缓冲液酸碱度选择在 pH7-pH12；3. 缓冲液的浓度选择在 1mM-50mM，此条件既不影响镇痛活性成分的生物活性，又不影响活性成分的分离；4. 阶段洗脱的盐溶液选择是要求浓度的缓冲液或在 10mM 缓冲液中加中性盐到需要的浓度；5. 中性盐选择 $(HN_3)_2SO_4$ 或 Na_2SO_4 或 NaCl 或 KCl，优选 NaCl。

疏水层析纯化

镇痛活性成分按照疏水层析分离方法的基本框架进一步纯化。镇痛活性成分溶液加中性盐至 2M 浓度，上样于预先用 2M 中性盐-缓冲液溶液平衡的疏水层析柱，进行中性盐浓度梯度(2.0M～0.0M)洗脱，合并收集含有镇痛活性的洗脱峰，进行超滤去盐和浓缩处理。疏水层析纯化的特征：1. 疏水层析介质选择苯基-疏水层析添料或正辛烷-疏水层析添料-或己烷-疏水层析添料-或丁烷-疏水层析添料；2. 中性盐选择 $(HN_3)_2SO_4$ 或 Na_2SO_4 或 NaCl；3. 缓冲液的 pH 选择在 pH2-pH12；4. 缓冲液的浓度选择在 1mM-100mM。

离子交换层析纯化

镇痛活性成分按照离子交换层析分离方法的基本框架进一步分离。待处理好的样品液上样于预先用缓冲液平衡好的离子交换层析柱，先用缓冲液充分洗涤去除不吸附的杂蛋白，进行盐浓度梯度(0.0M～1.0M)洗脱，合并收集含有镇痛活性的洗脱峰。离子交换层析纯化的特征：1. 层析介质选择阳离子交换层析添料，如 CM-离子交换层析添料或 SP-离子交换层析添料或 S-离子交换层析添料等阳离子交换层析添料，此时缓冲液酸碱度选择在 pH2-pH7；2. 层析介质选择阴离子交换层析添料，如 Q-离子交换层析添料或 DEAE-离子交换层析添料或 QAE-离子交换层析添料等离子交换层析添料，此时缓冲液酸碱度选择在 pH7-pH12；3. 缓冲液的浓度选择在 1mM-50mM；4. 盐梯度洗脱的盐溶液选择是要求浓度的缓冲液或在 10mM 缓冲液中加中性盐到需要的浓度；5. 中性盐选择 $(HN_3)_2SO_4$ 或 Na_2SO_4 或 NaCl 或 KCl，优选 NaCl。

凝胶层析

将含有镇痛活性的溶液进行超滤浓缩，样品液上样于预先用洗脱液平衡好的凝胶过滤层析柱并进行纯化，收集含有镇痛活性的洗脱峰。凝胶层析的特征：1.层析介质可以选择 Sephacryl S-100 HR 或 Sephacryl S-200 HR 或 Sephadex G-50 或 Sephadex G-75 或 Sephadex G-100 或 Sephadex G-150 或 Superose 12 prep grade 或 Superose 6 prep grade 或 Superdex 30 prep grade 或 Superdex 75 prep grade 或 Superose 12 HR 或 Superose 6 HR 或 Superdex Peptide HR 或 Superdex75 HR 或 Superdex Peptide PE 等凝胶层析添料；2.洗脱液的 pH 选择在 pH2-pH12；3.洗脱液的浓度选择在离子浓度大于 0.15M 及以上。

反相层析

活性组分，上样于预先用 0.1%三氟醋酸-20%乙腈水溶液平衡好的反相层析柱，如 SOURCE 15RPC、30RPC 层析添料，先用 0.1%三氟醋酸-20%乙腈水溶液充分洗涤，而后进行乙腈浓度梯度(20%至 95%) 洗脱，合并收集洗脱峰面积最大的洗脱峰组分-镇痛活性肽目标物。

实施例 3：

镇痛活性肽 VRD 在酵母中的表达及其纯化

将编码镇痛活性肽基因的序列利用寡核苷酸引物进行扩增，PCR 反应所使用的 5′ 寡核苷酸引物序列含有 EcoR Ⅴ限制性内切酶的酶切位点和镇痛活性肽 VRD 的 N 末端区域氨基酸序列的编码序列，3′端引物序列含有 EcoR Ⅰ限制性内切酶的酶切位点、一个翻译终止密码子和镇痛活性肽 VRD 的 C 末端区域氨基酸序列的编码序列。

引物上的限制性内切酶的酶切位点对应于酵母表达载体 pPIC9K 上的限制性内切酶酶切位点（其中 EcoR Ⅴ和 SnaB Ⅰ的内切酶切口为平末端），该质粒载体编码抗生素抗性（Amp^r 和 Kan^r），一个来自 2μ 质粒的复制子，一个 AOX1 启动子，在毕赤酵母中可由甲醇诱导高效表达，一个 α-因子的信号肽序列，一个转录终止信号，一个 HIS4 选择性标记以及整合序列。

用 SnaB Ⅰ和 EcoR Ⅰ消化 pPIC9K 载体，用 EcoR Ⅴ和 EcoR Ⅰ消化 PCR 扩增的镇痛活性肽 VRD 基因，随后将其连入 pPIC9K 载体，连接产物热转化 E.coli DH 5α 菌株，在含有 Amp 的 LB 培养皿上筛选转化子，在含有 Amp（100μg/ml）的 LB 液体培养基中过夜培养含所需构建物的克隆。抽提质粒，测序验证插入片段正确插入。取质粒线性化后，电转化入酵母细胞，线性化的重组载体通过与宿主基因组的同源序列发生同源重组产生稳定的酵母转化体。利用 G418 筛选出高拷贝的整合转化子。将筛选得到的菌株接种于装有 25ml MGY、BMG 或 BMGY 培养基的 250ml 摇瓶中，于 28～30℃/250～300 转/分培养至 OD600 = 2～6 (16～18 h)；室温下 3000 转/分离心 5min，收集菌体，用 1/5 到 1/10 原培养体积的 MM、BMM 或 BMMY 重悬菌体（约 10～20ml)；将步骤 2 所得的菌液置于 100ml 的摇瓶中，用双层纱布或粗棉布封口，放置于 28～30℃/250～300 转/分的摇床上继续生长；每 24h 向培养基中添加 100%甲醇至终浓度为 0.5～1.0%。诱导工程菌表达的培养液中含有表达产物，该表达产物结构特征为：VRDAYIAKPENCVYHCATNEGCNKLCTDNGAESGYCQWGGRYGNACWCIKLPDSVPIRVPGKCHR。

针对诱导工程菌表达的培养液中表达产物，按照实施例 2 所提供的分离纯

化方法，将表达产物分离纯化至预期纯度。

实施例 4：

镇痛活性肽 VRD 的衍生物、类似物、活性片段获得

本实施例获得镇痛活性肽 VRD 的衍生物、类似物、活性片段的策略和基本方法，类同实施例 1、实施例 2 和实施例 3 的策略和基本方法。

具体是在镇痛活性肽 VRD 的 N 末端或 C 末端额外加上一个或多个氨基酸残基，获得的镇痛活性肽 VRD 衍生物、类似物、活性片段仍然具有镇痛生物活性。其结构特征为：

MVRDAYIAKPENCVYHCATNEGCNKLCTDNGAESGYCQWGGRYGNACWCIKLPDSVPIRVPGKCHR。

MVRDAYIAKPENCVYHCATNEGCNKLCTDNGAESGYCQWGGRYGNACWCIKLPDSVPIRVPGKCHR（SGGGG）n（n 可以是 1 或 2 或 3 或 4 或 5）。

M（SGGGG）n VRDAYIAKPENCVYHCATNEGCNKLCTDNGAESGYCQWGGRYGNACWCIKLPDSVPIRVPGKCHR（n 可以是 1 或 2 或 3 或 4 或 5）。

下面的解释可以使本专业技术人员更全面地理解上述镇痛活性肽 VRD 衍生物、类似物、活性片段的结构特征，而不是以任何方式限制本发明特批权利要求的范围。N 是 3 的镇痛活性肽 VRD 衍生物、类似物、活性片段的结构特征为：

MVRDAYIAKPENCVYHCATNEGCNKLCTDNGAESGYCQWGGRYGNACWCIKLPDSVPIRVPGKCHRSGGGGSGGGGSGGGG；

或

MSGGGGSGGGGSGGGGVRDAYIAKPENCVYHCATNEGCNKLCTDNGAESGYCQWGGRYGNACWCIKLPDSVPIRVPGKCHR。

实施例 5：

镇痛活性肽 VRD 第 54 位氨基酸残基的镇痛活性保守性

本实施例获得镇痛活性肽 VRD 第 54 位系列突变体的策略和基本方法，类同实施例 1、实施例 2、实施例 3 和实施例 4 的策略和基本方法。

具体是针对镇痛活性肽 VRD 的 54 位 S 残基，通过基因突变技术，将 54 位 S 残基分别突变成 A、Y、E、K、F、I、T、D、R 残基，通过基因工程表达获得相应的突变体，其结构特征为：

VRDAYIAKPENCVYHCATNEGCNKLCTDNGAESGYCQWGGRYGNACWCIKLPDAVPIRVPGKCHR。

VRDAYIAKPENCVYHCATNEGCNKLCTDNGAESGYCQWGGRYGNACWCIKLPDYVPIRVPGKCHR。

VRDAYIAKPENCVYHCATNEGCNKLCTDNGAESGYCQWGGRYGNACWCIKLPDEVPIRVPGKCHR。

VRDAYIAKPENCVYHCATNEGCNKLCTDNGAESGYCQWGGRYGNACWCIKLPDFVPIRVPGKCHR。

VRDAYIAKPENCVYHCATNEGCNKLCTDNGAESGYCQWGGRYGNACWCIKLPDIVPIRVPGKCHR。

VRDAYIAKPENCVYHCATNEGCNKLCTDNGAESGYCQWGGRYGNACWCIKLPDKVPIRVPGKCHR。

VRDAYIAKPENCVYHCATNEGCNKLCTDNGAESGYCQWGGRYGNACWCIKLPDTVPIRVPGKCHR。

VRDAYIAKPENCVYHCATNEGCNKLCTDNGAESGYCQWGGRYGNACWCIKLPDDVPIRVPGKCHR。

VRDAYIAKPENCVYHCATNEGCNKLCTDNGAESGYCQWGGRYGNACWCIKLPDRVPIRVPGKCHR。

针对镇痛活性肽 VRD 衍生物、类似物、活性片段的突变体，其结构特征为：

MVRDAYIAKPENCVYHCATNEGCNKLCTDNGAESGYCQWGGRYGNACWCIKLPD（A 或 Y 或 E 或 K 或 F 或 I 或 T 或 D 或 R）VPIRVPGKCHR。

MVRDAYIAKPENCVYHCATNEGCNKLCTDNGAESGYCQWGGRYGNACWCIKLPD（A或Y或E或K或F或I或T或D或R)VPIRVPGKCHR(SGGGG)n(n可以是1或2或3或4或5)。M（SGGGG）n VRDAYIAKPENCVYHCATNEGCNKLCTDNGAESGYCQWGGRYGNACWCIKLPD（A或Y或E或K或F或I或T或D或R）VPIRVPGKCHR（n可以是1或2或3或4或5）。

实施例6：

体内镇痛活性—小鼠醋酸扭体法

本实施例通过小鼠体内镇痛模型确定镇痛活性肽VRD及其衍生物、类似物、活性片段的体内生物活性-镇痛活性。此外,也旨在验证镇痛活性肽 VRD 及其衍生物、类似物、活性片段中保守氨基酸残基对镇痛活性的影响。蛋白浓度采用Lowry方法进行测定。

小鼠醋酸扭体法镇痛模型：将冰醋酸作为化学刺激物注入昆明种小鼠腹腔内，继而引起深部的、大面积而较持久的疼痛刺激，致使小鼠产生“扭体”反应(腹部内凹、躯干与后腿伸张、臀部高起)。

18-22 g昆明种小鼠，雌雄各半，随机分组，每组10只，尾静脉注射样品，20 min后按0.2 ml/20 g腹腔注射0.6% (v/v)醋酸引起内脏痛，5 min后记录小鼠10 min内的扭体次数。以吗啡为阳性对照，生理盐水为空白对照，按照下述公式计算各个给药组的扭体反应抑制率。

$$\text{抑制率} = \frac{\text{空白组扭体次数} - \text{给药组扭体次数}}{\text{空白组扭体次数}} \times 100\%$$

镇痛生物活性实验结果表明：

①生理盐水空白组实验动物扭体次数(Mean±SEM)为 41.75±2.98；阳性对照组（吗啡，1.00mg/kg）实验动物扭体次数(Mean±SEM)为23.67±1.95，扭体抑制率为43.30%。

②镇痛活性肽 VRD 样品组（0.5mg /kg）的实验动物扭体次数(Mean±SEM)为22.00±1.79，扭体抑制率为47.30%。

③镇痛活性肽VRD衍生物、类似物、活性片段各样品组（0.5mg /kg）的实验动物扭体抑制率均在45%以上。

④镇痛活性肽 VRD 第54位氨基酸残基突变体样品组（0.5mg /kg）的实验动物镇痛生物活性：

A.镇痛活性肽VRD第54位S分别突变为E或K或Y或T或D或R突变体及其相应衍生物、类似物、活性片段的扭体抑制率均在38%以上，相对突变前（镇痛活性肽VRD）的镇痛生物活性，两者之间的变化没有统计学意义；

B.镇痛活性肽VRD第54位S分别突变为A或F或I突变体及其相应衍生物、类似物、活性片段的扭体抑制率均在32%以下，相对突变前（镇痛活性肽VRD）的镇痛生物活性表现为降低，且该降低具有统计学意义；

上述结果表明：镇痛活性肽VRD第54位S或E或K或Y或T或D或R，是镇痛活性肽VRD及其衍生物、类似物、活性片段的镇痛活性保守性氨基酸残基。

权 利 要 求 书

1.镇痛活性肽 VRD，其特征在于，其结构特征为：

VRDAYIAKPENCVYHCATNEGCNKLCTDNGAESGYCQWGGRYGNACWCIKLPDSVPIRVPGKCHR。

2.根据权利要求 1 所述的镇痛活性肽 VRD，其特征在于，所述的镇痛活性肽 VRD 的第 54 位氨基酸残基为 S 或 E 或 K 或 Y 或 T 或 R 或 D。

3.镇痛活性肽 VRD 的衍生物或类似物或活性片段或突变体，其特征在于，它包含权利要求 1 或 2 中任何一项所述的氨基酸序列全序或片段。

4. 根据权利要求 1 或 2 或 3 所述的镇痛活性肽 VRD 的衍生物或类似物或活性片段或突变体，其特征在于，其包括如下几个镇痛活性肽 VRD 的衍生物或类似物或活性片段或突变体：

MHHHHHHMVRDAYIAKPENCVYHCATNEGCNKLCT

DNGAESGYCQWGGRYGNACWCIKLPDSVPIRVPGKCHR；

MVRDAYIAKPENCVYHCATNEGCNKLCT
DNGAESGYCQWGGRYGNACWCIKLPDSVPIRVPGKCHR；

MVRDAYIAKPENCVYHCATNEGCNKLCTDNGAESGYCQWGGRYG
NACWCIKLPDSVPIRVPGKCHR（SGGGG）n（n 可以是 1 或 2 或 3 或 4 或 5）；

M（SGGGG）n VRDAYIAKPENCVYHCATNEGCNKLCTDNGAESGYCQWGGRYG
NACWCIKLPDSVPIRVPGKCHR（n 可以是 1 或 2 或 3 或 4 或 5）；

MVRDAYIAKPENCVYHCATNEGCNKLCT
DNGAESGYCQWGGRYGNACWCIKLPDSVPIRVPGKCHRSGGGGSGGGGSGGGG；

MSGGGGSGGGGSGGGGVRDAYIAKPENCVYHCAT

NEGCNKLCTDNGAESGYCQWGGRYGNACWCIKLPDSVPIRVPGKCHR；

VRDAYIAKPENCVYHCATNEGCNKLCTDNGAESGYCQWGGRYGNACWCIKLPDAVPIRVPGKCHR；

VRDAYIAKPENCVYHCATNEGCNKLCTDNGAESGYCQWGGRYGNACWCIKLPDYVPIRVPGKCHR；

VRDAYIAKPENCVYHCATNEGCNKLCTDNGAESGYCQWGGRYGNACWCIKLPDEVPIRVPGKCHR；

VRDAYIAKPENCVYHCATNEGCNKLCTDNGAESGYCQWGGRYGNACWCIKLPDFVPIRVPGKCHR；

权 利 要 求 书

VRDAYIAKPENCVYHCATNEGCNKLCTDNGAESGYCQWGGRYGNACWCIKLPDIVPIRVPGKCHR;

VRDAYIAKPENCVYHCATNEGCNKLCTDNGAESGYCQWGGRYGNACWCIKLPDKVPIRVPGKCHR;

VRDAYIAKPENCVYHCATNEGCNKLCTDNGAESGYCQWGGRYGNACWCIKLPDTVPIRVPGKCHR;

VRDAYIAKPENCVYHCATNEGCNKLCTDNGAESGYCQWGGRYGNACWCIKLPDDVPIRVPGKCHR;

VRDAYIAKPENCVYHCATNEGCNKLCTDNGAESGYCQWGGRYGNACWCIKLPDRVPIRVPGKCHR;

MVRDAYIAKPENCVYHCATNEGCNKLCTDNGAES
GYCQWGGRYGNACWCIKLPD（A 或 Y 或 E 或 K 或 F 或 I 或 T 或 D 或 R）VPIRVPGKCHR;

MVRDAYIAKPENCVYHCATNEGCNKLCTDNGA
ESGYCQWGGRYGNACWCIKLPD（A 或 Y 或 E 或 K 或 F 或 I
或 T 或 D 或 R）VPIRVPGKCHR（SGGGG）n（n 可以是 1 或 2 或 3 或 4 或 5）;

M（SGGGG）n VRDAYIAKPENCVYHCATN
EGCNKLCTDNGAESGYCQWGGRYGNACWCIKLPD（A 或 Y 或 E 或 K
或 F 或 I 或 T 或 D 或 R）VPIRVPGKCHR（n 可以是 1 或 2 或 3 或 4 或 5）。

5.如权利要求 1 或 2 或 3 或 4 所述的镇痛活性肽 VRD 及其衍生物或类似物或活性片段或突变体的制备方法，可以利用基因工程技术进行表达获得，其特征在于，表达宿主细胞为原核细胞或真核细胞。

6.如权利要求 1 或 2 或 3 或 4 所述的镇痛活性肽 VRD 及其衍生物或类似物或活性片段或突变体，可以利用化学合成技术获得，其特征在于，化学合成为人工合成或合成仪合成。

7.权利要求 1 或 2 或 3 所述的镇痛活性肽 VRD 及其衍生物或类似物或活性片段或突变体在制备镇痛药物中的应用。

8. 权利要求 5 所述的镇痛活性肽 VRD 及其衍生物或类似物或活性片段或突变体的制备方法，其特征在于，基因工程表达后通过如下方法分离纯化，它包括（1）表达的基因工程菌体经破碎后，离心除去不溶物获得的上清液；或基因工程菌分泌表达后离心除去不溶物获得的上清液（2）上清液经疏水层析柱分离得到目标物活性组分，（3）得到活性组分经超滤以去除盐和杂蛋白，同时进行浓缩，通过离子交换层析柱分离得到目标物活性组分，（4）经疏水层析柱进一步分离得到活性组分，（5）经超滤以去除盐和浓缩，通过离子交换层析柱纯化得到目标物活性组分，（6）经凝胶过滤层析柱进一步纯化得到目标物活性组分，（7）经反向层析柱得到高纯度的目标物。

权 利 要 求 书

9.根据权利要求 7 所述的应用，其特征在于：所述的镇痛活性肽 VRD 及其衍生物或类似物或活性片段或突变体可以与药学上可接受的载体混合制备临床上可接受的注射剂、口服制剂、透皮吸收制剂、粘膜吸收制剂。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2011/001102

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

   a. (means)

   ☐ on paper

   ☒ in electronic form

   b. (time)

   ☐ in the international application as filed

   ☒ together with the international application in electronic form

   ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2011/001102

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC：C07K, C12N, A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See the extra sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Genbank Accession No. ABL62806.1， version，ABL62806.182353.1, 1 Oct. 2008 (01.10.2008), [searched on 19 Dec. 2011(19.12.2011)]. Searched from: Genbank database (www.ncbi.nlm.nih.gov). See the sequence.	1,5,6
	Cao, Zhijian. Molecular Cloning, Expression, Structure-function Relationship of K+Channel Scorpion Toxin from Buthus martensii Karsh, Chinese Doctoral Dissertations Full-text Database，Basic Sciences，15 Dec. 2004(15.12.2004).	
X	See fig. 6 on page 30，and 5.1.5 on page 50, and pages 73-74.	2-9
A		1
	CN101875691A(UYSH-N (UNIV SHENYANG PHARM) 03 Nov. 2010(03.11.2010).	
A	See claims and the abstract.	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
19 Dec. 2011(19.12.2011)	05 Jan. 2012 (05.01.2012)
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer CHANG, mao Telephone No. (86-10) **62411105**

Form PCT/ISA /210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2011/001102

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN101875691A	03.11.2010	NONE	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2011/001102

Continuation of ： CLASSIFICATIO OF SUBJECT MATTER

C07K 14/435 (2006.01)i
C12N 15/12 (2006.01)i
C12N 15/63 (2006.01)i
A61K 38/17 (2006.01)i
A61P 25/04 (2006.01)i

Continuationof : Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

STN Registry， GenBank, EBI-EMBL, DWPI, SIPOABS, CPRSABS, CNKI, PUBMED, Google Scholar and keywords: sequence listing， scorpion, neurotoxin， mesobuthus martensii， peptide, polypeptide etc..

专 利 合 作 条 约

PCT

国际检索报告

(PCT 第 18 条和细则 43 和 44)

申请人或代理人的档案号 **IP11070501**	**关于后续行为**	见 PCT/ISA/220 表和 适用时，见下面第 5 项
国际申请号 **PCT/CN2011/001102**	国际申请日 *(日/月/年)* **05.7 月 2011(05.07.2011)**	(最早的)优先权日 *(日/月/年)* **22.3 月 2011(22.03.2011)**
申请人 **沈阳药科大学 等**		

按照条约第 18 条，本国际检索报告由本国际检索单位做出并送交申请人。报告副本送交国际局。

本国际检索报告总计 6 页。

☐ 它还附有本报告所引用的各现有技术文件的副本。

1. **报告的基础**

a. 关于语言，进行国际检索基于：

☒ 国际申请提交时使用的语言。

☐ 该国际申请的_____语言译文，为了国际检索的目的提供该种语言的译文(细则 12.3(a)和 23.1(b))。

b. ☐ 本国际检索报告考虑了本单位许可或被通知的根据细则91所做出的明显错误更正。(细则43.6之二(a))。

c. ☒ 关于国际申请中公开的任何**核苷酸和/或氨基酸序列，见第 I 栏**。

2. ☐ **某些权利要求被认为是不能检索的**(见第II 栏)。

3. ☐ **缺乏发明的单一性**(见第III 栏)。

4. 关于**发明名称**，

☐ 同意申请人提出的发明名称。

☒ 发明名称由本单位确定如下：

具有镇痛活性的肽及其制备方法

5. 关于**摘要**，

☐ 同意申请人提出的摘要。

☒ 根据细则 38.2(b)，摘要由本单位制定，如第 IV 栏中所示。自本国际检索报告发文日起一个月内，申请人可以向本单位提出意见。

6. 关于**附图**，

a.随摘要一起公布的**附图**是：_____

☐ 按照申请人建议的。

☐ 由本单位选择的，因为申请人没有建议一幅图。

☐ 由本单位选择的，因为该图能更好地表示发明的特征。

b. ☒ 没有与摘要一起公布的附图

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2011/001102

第I栏　核苷酸和/或氨基酸序列(续第 1 页第 1.c 项)

1、关于国际申请中所公开的任何对要求保护的发明必要的**核苷酸和/或氨基酸序列**, 国际检索是在下列基础上进行的：

a. 序列表的提交或提供

☐ 纸件形式

☒ 电子形式

b. 提交或提供时间

☐ 包含在申请提交时的国际申请中

☒ 以电子形式与国际申请一起提交

☐ 为检索之用随后提交本单位

2、☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的申请中的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。

3. 补充意见

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2011/001102

A. 主题的分类

见附加页

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC：C07K, C12N, A61K, A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用）)

见附加页

C. 相关文件

类　型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	Genbank Accession No. ABL62806.1， 版本，ABL62806.182353.1， 1. 10 月 2008 (01.10.2008)， [检索于 19.12 月. 2011(19.12.2011)]. 检索自: Genbank 数据库 (www.ncbi.nlm.nih.gov). 参见序列	1, 5, 6
X	曹志贱，东亚钳蝎 K＋通道毒素的克隆、表达及其结构与功能关系研究，中国优秀博硕士论文全文数据库(博士)，基础科学辑，15.12 月 2004(15.12.2004). 参见 30 页图 6，50 页 5.1.5 节以及 73-74 页。	2-9
A	CN101875691A(沈阳药科大学) 03.11 月 2010(03.11.2010). 参见权利要求书以及摘要	1 1-9

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。　　☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
19.12 月 2011(19.12.2011)	**05.1 月 2012 (05.01.2012)**
ISA/CN 的名称和邮寄地址： 中华人民共和国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号： (86-10)62019451	受权官员 **常矛** 电话号码：(86-10) **62411105**

国际检索报告

关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2011/001102

检索报告中引用的专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN101875691A	03.11.2010	无	

续：主题的分类

C07K 14/435 (2006.01)i

C12N 15/12 (2006.01)i

C12N 15/63 (2006.01)i

A61K 38/17 (2006.01)i

A61P 25/04 (2006.01)i

续：在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词(如使用))

STN Registry，GenBank, EBI-EMBL, DWPI, SIPOABS, CPRSABS, CNKI, PUBMED, Google Scholar 以及关键词：序列表，蝎，蝎毒，肽，多肽， neurotoxin， mesobuthus martensii 等。