

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01128235.5

[51] Int. Cl.

C07K 14/435 (2006.01)

C07K 1/36 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 7 月 11 日

[11] 授权公告号 CN 1325514C

[22] 申请日 2001.9.30 [21] 申请号 01128235.5

[73] 专利权人 沈阳药科大学

地址 110015 辽宁省沈阳市文化路 103 号
药大科研处

[72] 发明人 张景海 马润林 王思玲 吴春福

[56] 参考文献

CN1271735A 2000.11.1

审查员 王亦然

[74] 专利代理机构 沈阳杰克知识产权代理有限公司

代理人 李宇彤

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 2 页

[54] 发明名称

蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽及获得方法

[57] 摘要

本发明是一种蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽及其制法，蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽来源于蝎或蝎毒；蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽及其部分片段、衍生物、类似物的基因可由蝎或通过化学合成获得；蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽或其部分片段或其衍生物、类似物可通过化学合成生产制备；蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽或其部分片段或其衍生物、类似物可通过基因工程技术生产制备；蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽或其部分片段或其衍生物、类似物能作为镇痛、抗肿瘤的藥物。

1、蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽，其特征在于：从蝎毒或全蝎抽提、分离、纯化获得如下蝎毒氨基酸序列

VRDGYIADDKNCA YFCGRNAYCDDECKKNGAESGYCQWAGVY
GNACWCYKLPDKVPIRVPGKCNGG,

MVRDGYIADDKNCA YFCGRNAYCDDECKKNGAESGYCQWAGVY
GNACWCYKLPDKVPIRVPGKCNGGLEHHHHHH,

MGSSHHHHHHSSGLVPGSHMVRDGYIADDKNCA YFCGRNAYCDD
EC
KKNGAESGYCQWAGVYGNACWCYKLPDKVPIRVPGKCNGG。

2、如权利要求1所述的蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽的生产方法，其特征在于：它包括：（1）蝎毒分别用蒸馏水、酸性溶液、碱性溶液溶解抽提，离心除去杂质，（2）抽提液经疏水层析柱分离得镇痛抗肿瘤活性组分，（3）将所得镇痛抗肿瘤活性组分经超滤，以除去盐和杂蛋白，同时进行浓缩，通过阳离子交换层析柱纯化得到镇痛抗肿瘤活性组分，（4）经疏水层析柱进一步纯化得到镇痛抗肿瘤活性组分，（5）通过超滤，除去盐和浓缩，经凝胶过滤层析柱得电泳纯蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽，（6）经反相层析柱进一步纯化，得蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽。

蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽及获得方法

技术领域：本发明涉及生物医学技术领域。具体地说是一种蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽及获得方法。

技术背景：蝎又称全虫、全蝎，在“诗经”、“开宝本草”、“本草纲目”等古代医学名著中对其药用性进行了详细描述，具有祛风镇惊，通络止痛，攻毒散解等功能。用于小儿惊风，抽搐痉挛，中风口喎，半身不遂，风湿顽痹，偏、正头痛，神经痛，躯身锐痛，疮疡瘰癧，各类恶性肿瘤等。但全蝎中究竟哪一种成分在发挥通络止痛，攻毒散解的功能，一直不很清楚。

发明内容：本发明是利用生物技术，从蝎毒中筛选、分离、纯化发现并得到一种镇痛抗肿瘤缬精甘肽。该镇痛抗肿瘤活性肽不仅可从全蝎或蝎毒中分离纯化制备；也可通过重组 DNA 技术即基因工程方法表达获得；也可通过化学合成获得。该活性肽具有显著的镇痛和抗肿瘤生物活性。

本发明是通过以下技术方案来实现：

利用全蝎或蝎毒中蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽的分子量、等电点、分子表面的疏水性与其它蛋白质、多肽、酶的差异，单独或综合借助这些差异，通过超滤；胶过滤、离子交换、疏水、反相层析方法，从全蝎或蝎毒中抽提、分离、纯化，获得蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽，该活性肽的结构见说明书附图 1、根据该活性肽的结构，利用化学合成方法获得该蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽或该蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽的部分片段或该蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽的衍生物、类似物。根据该活性肽的结构，利用化学合成方法或生物技术获得该蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽或该蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽的部分片段或该蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽的衍生物、类似物的基因，通过重组 DNA 技术即基因工程方法，克隆至基因工程表达载体中，经表达、纯化获得蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽或该蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽的部分片段或该蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽的衍生物、类似物。本发明蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽及获得方法包括：

(1) 蝎毒分别用蒸馏水、酸性溶液、碱性溶液溶解抽提，离心除去杂质，(2) 抽提液经疏水层析柱分得镇痛抗肿瘤活性组分，(3) 将所得镇痛抗肿瘤活性组分经超滤，以除去盐和杂蛋白，同时进行浓缩，通过阳离子交换层析柱纯化得到镇痛抗肿瘤活性组分，(4) 经疏水层析柱进一步纯化得到镇痛抗肿瘤活性组分，(5) 通过超滤，除去盐和浓缩，经凝胶过滤层析柱独得电泳纯蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽，(6) 经反相层析柱可进一步纯化；

a、蝎毒用蒸馏水溶解抽提，抽提液在 pH 值大于等于 2 的酸性溶液、pH 值小于等于 12 的碱性溶液中沉淀杂质，蝎毒溶液 pH 值在 2~12 范围内，蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽可溶且不失活；

b、蝎镇痛抗肿瘤活性组分经两次疏水层析分离纯化，层析介质是苯基-或正辛烷-或丁基-疏水层析填料，磷酸钠洗脱液 pH 值在生理条件下，其磷酸根浓度在 5mM~100nM， $(\text{HN}_3)_2\text{SO}_4$ 或 Na_2SO_4 的浓度梯度在 2.0M~0.0M；

c、蝎镇痛抗肿瘤活性组分或活性肽进行超滤除去盐、杂蛋白和浓缩，超滤膜的截留分子量为 30kDa 或 1kDa；

d、蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽进行凝胶过滤层析，介质是 Sephacryl S-100HR 或 Superose 6 prep grade 或 Superose 12 prep grade 或 Superdex 30 prep grade 或 Superdex 75 prep grade 层析填料，洗脱液的 pH 值在 2~12 范围内；

e、蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽进行反相层析，介质是 SOURCE 15RPC 或 SOURCE 30RPC 层析填料，洗脱液为 0.1%三氟醋酸-乙腈水溶液，乙腈浓度梯度洗脱为 20%至 95%；

f、蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽的抽提、分离、纯化操作在 10℃~30℃ 半无菌或无菌室进行。

本发明还包括：(1) 全蝎首先在蒸馏水中进行匀浆抽提活性组分，抽提液分别在酸性溶液、碱性溶液沉淀杂质，离心除去杂质，(2) 抽提液经疏水层析柱分得镇痛抗肿瘤活性组分，(3) 将所得镇痛抗肿瘤活性组分经超滤，以除去盐和杂蛋白，同时进行浓缩，通过阳离子交换层析柱纯化得到镇痛抗肿瘤活性组分，(4) 经疏水层析柱进一步纯化得到镇痛抗肿瘤活性组分，(5) 通过超滤，除去盐和浓缩，经凝胶过滤层析柱得电泳纯蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽，(6) 经反相层析柱可进一步纯化；

a、全蝎在蒸馏水中匀浆抽提，抽提液分别在酸性溶液、碱性溶液中沉淀杂质，溶液 pH 值分别大于等于 2、小于等于 12，溶液 pH 值在 2~12 范围内，蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽可溶且不失活；

b、蝎镇痛、抗肿瘤活性组分经两次疏水层析分离纯化，层析介质是苯基-或正辛烷-或丁基-疏水层析填料，磷酸钠洗脱液的磷酸根浓度在 5mM~100nM， $(\text{HN}_3)_2\text{SO}_4$ 或 Na_2SO_4 的浓度梯度在 2.0M~0.0M；

c、蝎镇痛抗肿瘤活性组分或活性肽进行超滤除去盐、杂蛋白和浓缩，超滤膜的截留分子量为 30kDa 或 1kDa；

d、蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽进行凝胶过滤层析，介质是 Sephacryl S-100HR 或 Superose 6 prep grade 或 Superose 12 prep grade 或

Superdex 30 prep grade 或 Superdex 75 prep grade 层析添料, 洗脱液的 pH 值在 2~12 范围内;

e、蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽进行反相层析, 介质是 SOURCE 15RPC 或 SOURCE 30RPC 层析添料, 洗脱液为 0.1%三氟醋酸-乙腈水溶液, 乙腈浓度梯度洗脱为 20%至 95%。

本发明所述的蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽或该蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽的部分片段或该蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽的衍生物、类似物不仅可作为治疗各种疼痛和肿瘤疾病的药物, 也可作为研究工具, 用于镇痛、抗肿瘤的新化合物的筛选。蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽的抽提、分离、纯化操作在 10℃~30℃半无菌或无菌室进行。本发明所述的蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽或该蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽的部分片段或该蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽的衍生物、类似物的获得方法常规、简单、产量高, 对研制开发蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽类药物具有重要的指导意义和实用价值, 为工业化生产和实用化奠定了基础。

附图说明:

图 1 为蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽氨基酸序列及基因序列。

图 2 为蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽类似物氨基酸序列。

图 3 为蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽衍生物氨基酸序列。

图 1 基因序列中 N 代表 A 或 T 或 C 或 G 碱基, P 代表 A 或 G 碱基, M 代表 C 或 T 碱基。

具体实施方式:

实施例 1: 蝎毒 2.0 克溶于 20 毫升蒸馏水后, 15000 转/分离心 15 分钟, 取上清液用 0.01M 盐酸或磷酸溶液调 PH 为 2, 15000 转/分离心 15 分钟, 取上清液用磷酸钠溶液调 pH 为 12, 15000 转/分离心 15 分钟。取上清液用盐酸或磷酸水溶液调 pH 在生理条件下, 加 $(\text{HN}_3)_2\text{SO}_4$ 或 Na_2SO_4 至 2M 浓度, 上样于预先用 2M $(\text{HN}_3)_2\text{SO}_4$ 或 Na_2SO_4 溶液平衡的疏水层析柱 (2.6cm×30cm), 如苯基-或正辛烷-疏水层析, 分别用 1.5M、1.0M、0.5M $(\text{HN}_3)_2\text{SO}_4$ 或 Na_2SO_4 缓冲液洗脱, 最后用 50mM 磷酸钠缓冲液 (pH 在生理条件下) 洗脱, 将具有镇痛抗肿瘤活性组份的洗脱液合并, 分别用截留分子量为 30kDa、1kDa (千道尔顿) 范围的超滤膜进行上述合并超滤, 以除去该洗脱液中盐和杂蛋白, 最后用 10mM pH4.0 柠檬酸-磷酸钠缓冲液平衡, 将平衡好的 30kDa、1kDa (千道尔顿) 范围的超滤样品液上样于预先用 10mM pH4.0 柠檬酸-磷酸钠缓冲液平衡好的阳离子交换层析柱 (2.6cm×50cm), 如 CM-、SP-等阳离子交换层析添料, 先用 10mM pH4.0 柠檬酸-磷酸钠缓冲液充分洗涤, 以 10mM pH4.0 柠檬酸-磷酸钠缓冲液为基础液, 进行 NaCl 浓度梯度 (0.0M~1.0M) 洗脱,

合并具有镇痛抗肿瘤活性组份的洗脱液，用氢氧化钠或盐酸或磷酸水溶液调 pH 在。。生理条件下，加 $(\text{HN}_3)_2\text{SO}_4$ 或 Na_2SO_4 至 2.0M 浓度，上样于预先用 2M $(\text{HN}_3)_2\text{SO}_4$ 或 Na_2SO_4 溶液平衡的疏水层析柱(2.6cm×30cm)，如至丁基-或至辛烷-疏水层析填料，以 50mM 磷酸钠缓冲液 (pH 在生理条件下) 为基础液，进行中性盐浓度梯度 (2.0M~0.0M) 洗脱，合并收集两个洗脱峰的第二个峰，用截留分子量为 1kDa (千道尔顿) 的超滤膜进行超滤浓缩，样品液上样于预先用 20mM 磷酸钠缓冲液 (pH 在生理条件下，含 150mM NaCl) 平衡好的凝胶过滤层析柱 (1.6cm×60cm)，如 Sephacryl S-100HR 或 Superose6、12prep grade 或 Superdex30、75prep grade 层析填料，合并收集洗脱峰面积最大的洗脱峰组分，该组分在 SDS-PAGE 为单一银染色区带，将凝胶过滤所得的活性组分，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 (1.0cm×15cm)，如 SURCE 15RPC、30PRC 层析填料，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，该组分洗脱峰面积占整个反相层析洗脱峰面积的 95% 以上。

实施例 2: 1000 克全蝎加 2.5 升蒸馏水匀浆后，4500 转/分离心 20 分钟，收集上清液，沉淀加 1.5 升蒸馏水匀浆后，4500 转/分离心 20 分钟，收集上清液，沉淀加 1.0 升蒸馏水匀浆后，，4500 转/分离心 20 分钟，收集上清液，合并上述三次抽提液，用 0.01M 盐酸或磷酸溶液调 pH 为 2，5000 转/分离心 15 分钟，取上清液用磷酸钠溶液调 pH 为 12，5000 转/分离心 15 分钟。其他操作同实施例 1。

实施例 3: 按蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽的结构 (氨基酸序列见说明书附图 1)，合成核苷酸片段，通过杂交筛选从蝎 cDNA 池 (pool) 或 cDNA 库或 DNA 库中筛选获蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽全长基因 (基因序列见说明书附 1) 或其衍生物、类似物基因片段或者它们部分片段基因。如从人工饲养的蝎获得蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽全长基因为说明书附图 1 的基因序列，从野生的蝎获得蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽全长基因序列，除编码第 24 位、第 29 位氨基酸的密码子为 GAC、AAT 外，其它的与人工饲养的基因序列一致。

实施例 4: 以蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽的 N 端、C 端氨基酸序列设计 PC 简并引物，如引物 1: 5'GGAATTCCATGGTACGCGATGGTTATAT3' (GTA CGC GAT GGT TAT 编码蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽第 1~5 位氨基酸)，引物 2: 5'TTGCTCGAGACCG CCATTGCATTTTGG3' (ACC GCC ATT GCA TTT TGG 为编码蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽第 61~66 位氨基酸的互补链

序列)(获得重组蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽类似物氨基酸序列见说明书附图2)。引物3: 5'CAAGCATATGGTACGATGGTTATAT3'(GTACGC GAT GGT TAT 编码蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽第1~5位氨基酸), 引物4: 5'ATAGGATCCTATTAACCGCCATTGCATTTTGG3'(ACC GCC ATT GCA TTT TGG 编码蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽第61~66位氨基酸的互补链序列)(获得重组蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽衍生物氨基酸序列见说明书附图3)。经PCR反应可从cDNA池(pool)或cDNA库或DNA库中筛选获得蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽全长基因或其衍生物、类似物基因片段或者它们的部分片段基因。

实施例5: 按说明书附图1、附图2、附图3所示蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽或其衍生物、类似物的结构(氨基酸序列), 人工合成蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽全长基因或其衍生物、类似物基因片段或者它们的部分片段基因。

实施例6: 将从实施例3、4、5获得的基因, 经限制性内切酶消解, 克隆的在各种基因工程表达载体中, 如将从实施例4中获得的PCR产物, 经限制性内切酶Nco I、Xho I消解或Nde I、BamH I消解, 克隆在大肠杆菌表达载体pET28a中, 经表达、后处理、分离和纯化获得重组蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽及其延长的或缩短的衍生物、类似物(氨基酸序列见说明书附图2、3)。

实施例7: 从实施例1、2、6获得的蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽或该蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽的部分片段或该蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽的衍生物、类似物, 在小鼠醋酸扭体模型, 静脉注射给予上述样品, 剂量在0.1mg/kg体重至16.0mg/kg体重, 小鼠扭体反应抑制率在0.0%至100%, 如从实施例1获得的SDS-PAGE单一区带的蝎镇痛抗抗肿瘤缬精甘肽的ED₅₀(半数有效量)为0.47mg/kg体重, 静脉注射给予阳性对照药-吗啡的ED₅₀(半数有效量)为1.2mg/kg体重; 灌胃给予上述样品, 剂量在0.1mg/kg体重至16.0mg/kg体重, 小鼠扭体反应抑制率在0.0%至100%, 如从实施例2获得的SDS-PAGE单一区带的蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽的ED₅₀(半数有效量)为2.86mg/kg体重。在小鼠热板法模型, 静脉注射给予上述样品, 剂量在0.1mg/kg体重至16.0mg/kg体重, 小鼠痛阈值(在55℃±5℃热板上舔后足所需时间)为正常值(10秒至30秒)至60秒(如果痛阈值超过60秒, 小鼠仍不舔后足, 则取出小鼠), 如从实施例1、2获得的SDS-PAGE单一区带的蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽, 静脉注射给予0.6mg/kg体重, 在5分钟、15分钟、25分钟、35分钟、45分钟、60分钟、90分钟的痛阈提高率分别为16.5%、145.7%、219.1%、219.1%、177.6%、32.4%、14.9%, 而静脉注射给予10.0mg/kg体重吗啡的痛阈提高率

则分别为 0.6 %、27.0 %、112.6 %、177.9 %、125.8 %、50.9 %、-3.7 %。

实施例 8: 在小鼠实验性肿瘤模型(如艾氏腹水癌、S₁₈₀ 实体瘤), 从实施例 1、2、6 获得的蝎镇痛抗捉瘤缬精甘肽或该蝎镇痛抗捉瘤缬精甘肽的部分片段或该蝎镇痛抗捉瘤缬精甘肽的衍生物、类似物, 皮下注射给予 0.1mg/kg 体重至 16.0mg/kg 体重, 连续给样七天, 对 S₁₈₀ 肉瘤实体型肿瘤的瘤重抑制率 $[(C-T)/C]$;C:对照组平均瘤重, T:样品组平均瘤重]为 0 %至 62 %, 如从实施例 1 获得的 SDS-PAGE 单一区带的蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽, 剂量为 0.639mg/kg 体重, 对瘤重抑制率为 30.9 %; 而阳性对照药环磷酰胺, 剂量为 60.0mg/kg 体重, 对瘤重抑制率为 50.5 %。灌胃给予 0.1mg/kg 体重至 16.0mg/kg 体重的从实施例 1、2、6 获得的蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽或该蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽的部分片段或该蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽的衍生物、类似物, 连续给样十天, 对艾氏腹水癌小鼠的生命延长率为 0 %至 46 %, 如从实施例 2 获得的 SDS-PAGE 单一区带的蝎镇痛抗肿瘤缬精甘肽, 剂量为 0.213mg/kg 体重、0.639mg/kg 体重, 其生命延长率分别为 16.8 %、31.5 %; 而阳性对照药环磷酰胺, 剂量为 60.0mg/kg 体重(皮下注射给予), 其生命延长率为 15.6 %。

V R D G Y I A D D K N C A Y F C G R N A
GTA CGC GAT GGT TAT ATT GCC GAC GAT AAA AAT TGC GCA TAT TTT TGT GGT AGA AAT GCG
Y C D D E C K K N G A E S G Y C Q W A G
TAT TGC GAT GAT GAA TGT AAG AAG AAC GGT GCT GAG AGT GGC TAT TGC CAA TGG GCA GGT
V Y G N A C W C Y K L P D K V P I R V P
GTA TAC GGA AAC GCC TGC TGG TGC TAT AAA TTG CCC GAT AAA GTA CCT ATT AGA GTA CCA
G K C N G G
GGA AAA TGC AAT GGC GGT

图 1

MVRDGYIADDKNCAYFCGRNAYCDDECKKNGAESGYCQWAGVY
GNACWCYKLPDKVPIRVPGKCNGGLEHHHHHH

图 2

MGSSHHHHHSSGLVPGSHMVRDGYIADDKNCAYFCGRNAYCDDEC
KKNGAESGYCQWAGVYGNACWCYKLPDKVPIRVPGKCNGG

图3