



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119183455 A

(43) 申请公布日 2024. 12. 24

(21) 申请号 202380040091.9

(22) 申请日 2023.05.16

(30) 优先权数据

10-2022-0059758 2022.05.16 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.11.12

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2023/006613 2023.05.16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/224357 K0 2023.11.23

(71) 申请人 高丽大学校产学协力团

地址 韩国

申请人 美迪引擎株式会社

(72) 发明人 申民丁 郑寅赫 朴灿

(74) 专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司 11243

专利代理师 许静 宋海花

(51) Int.Cl.

C07K 14/00 (2006.01)

A61K 47/42 (2017.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G12N 15/70 (2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

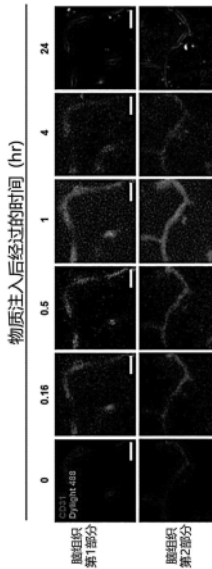
序列表(电子公布) 附图5页

(54) 发明名称

通过血脑屏障的多肽及其用途

(57) 摘要

本发明涉及穿过血脑屏障或脑血管屏障的多肽和上述多肽的物质传递用途,上述多肽能够将如蛋白质那样无法自然穿过血脑屏障的物质递送至脑组织中。



1. 一种血脑屏障穿透性肽,其包含序列号3或序列号5的氨基酸序列。
2. 根据权利要求1所述的血脑屏障穿透性肽,其中,包含序列号3的氨基酸序列的血脑屏障穿透性肽选自由序列号1至3组成的组。
3. 根据权利要求1所述的血脑屏障穿透性肽,其中,包含序列号5的氨基酸序列的血脑屏障穿透性肽由序列号4或序列号5的氨基酸序列构成。
4. 一种靶物质大脑递送用系统,其包含;权利要求1至3中任一项所述的血脑屏障穿透性肽;和与上述血脑屏障穿透性肽的一末端结合的靶物质。
5. 根据权利要求4所述的靶物质大脑递送用系统,其中,上述靶物质选自由化合物、蛋白质、糖蛋白、肽、核苷酸、核酸、碳水化合物、脂质、糖脂质、纳米粒子、脂质体、药物、脂质基制剂、病毒、量子点和荧光色素组成的组。
6. 根据权利要求4所述的靶物质大脑递送用系统,其中,上述血脑屏障穿透性肽与靶物质通过共价键连接。
7. 一种多核苷酸,其对权利要求1至3中任一项所述的血脑屏障穿透性肽进行编码。
8. 一种重组载体,其包含权利要求7所述的多核苷酸。
9. 一种大脑或中枢神经系统疾病的治疗或预防用药物组合物,其包含权利要求4至6中任一项所述的靶物质大脑递送用系统作为活性成分。
10. 一种大脑或中枢神经系统疾病的诊断用组合物,其包含权利要求4至6中任一项所述的靶物质大脑递送用系统作为活性成分。

通过血脑屏障的多肽及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及穿过血脑屏障或脑血管屏障的多肽和上述多肽的物质递送用途。

背景技术

[0002] 血脑屏障或脑血管屏障 (Blood-Brain Barrier, BBB) 是使脑脊液和血液分离的屏障。由于具有高选择通透性,因而起到将人体的主要调节中枢与如细菌等那样可通过血液输送的病原体以及血液中潜在的危险物质隔离的作用。

[0003] 血脑屏障起到使葡萄糖、必需氨基酸、电解质等通过内皮细胞被动穿过,但阻止血中的代谢产物、毒素、药物进入脑细胞的作用。但是,水、空气、二氧化碳之类的脂溶性物质可以自由穿过屏障,因此酒精、尼古丁、麻醉剂等会影响大脑。

[0004] 血脑屏障的这种选择通透性成为药物治疗阿尔茨海默病、帕金森氏病、细菌性和病毒性感染以及癌症之类的大脑和中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 疾病的主要障碍。这是因为用于治疗大脑和中枢神经系统 (CNS) 疾病和障碍的许多治疗剂是亲水性的,因此无法直接穿过血脑屏障。

发明内容

[0005] 技术课题

[0006] 针对如上所述的情况,本发明人等为了发掘出新型血脑屏障通透性肽而进行了研究,并且通过生物体内实验结果证实了5种新型肽与GST的融合蛋白可以穿过血脑屏障。

[0007] 因此,本发明的目的在于,提供一种新型血脑屏障通透性肽和上述肽的靶物质大脑递送用途。

[0008] 解决课题的方法

[0009] 为了实现上述目的,本发明的一个方式提供一种血脑屏障通透性肽,其包含序列号3或序列号5的氨基酸序列。

[0010] 根据本发明的一个具体例,包含序列号3的氨基酸序列的血脑屏障通透性肽可以选自由序列号1至3组成的组,包含序列号5的氨基酸序列的血脑屏障通透性肽可以由序列号4或序列号5的氨基酸序列构成。

[0011] 本发明中,包含序列号3的氨基酸序列的血脑屏障通透性肽可以包含与选自由序列号1至3组成的组中的氨基酸序列具有70%以上、优选具有80%以上、更优选具有90%以上、进一步优选具有95%以上、最优选具有98%以上的序列同源性的氨基酸序列。

[0012] 本发明中,包含序列号5的氨基酸序列的血脑屏障通透性肽可以包含与序列号5的氨基酸序列具有70%以上、优选具有80%以上、更优选具有90%以上、进一步优选具有95%以上、最优选具有98%以上的序列同源性的氨基酸序列。

[0013] 另外,上述血脑屏障通透性肽可以与其他细胞膜通透性肽融合使用,细胞膜通透性肽的例子有穿膜肽 (Penetratin)、TAT肽、Pep-1肽、S413-PV、Magainin2 (蛙皮素2) 或 Buforin 2 (蟾蜍抗菌肽)。

[0014] 本发明人等通过具体实验证实了所发掘的血脑屏障穿透性肽与GST的融合蛋白可以穿过小鼠的血脑屏障(图1至5)。

[0015] 因此,本发明的另一个方式提供一种靶物质大脑递送用系统,其包含血脑屏障穿透性肽以及与上述血脑屏障穿透性肽的一末端结合的靶物质。

[0016] 上述靶物质可以选自由化合物、蛋白质、糖蛋白、肽、核苷酸、核酸、碳水化合物、脂质、糖脂质、纳米粒子、脂质体、药物、脂质基制剂(lipid-based formulation)、病毒、量子点(quantum dots)和荧光色素(fluorochrome)组成的组。

[0017] 本发明中,上述血脑屏障穿透性蛋白与靶物质可以通过本领域公知的使蛋白质与靶物质结合的方法来连接,例如,可以通过共价键、化学键、肽键等来连接。

[0018] 如上所述,本发明人等证实了血脑屏障穿透性肽与GST的融合蛋白可以穿过血脑屏障,因此在使用蛋白质(靶蛋白)作为靶物质时,可以以血脑屏障穿透性蛋白与靶蛋白的融合蛋白形式引入至脑组织中。

[0019] 另外,如果使用大脑或中枢神经系统疾病的治疗剂或诊断剂作为靶物质,则靶物质大脑递送用系统可以用作大脑或中枢神经系统疾病的治疗或预防用药物组合物、大脑或中枢神经系统疾病的诊断用组合物。

[0020] 例如,本发明如果使通过与 α -突触核蛋白(alpha-synuclein)、淀粉样 β 蛋白(amyloid beta)、微管相关蛋白(tau)、超氧化物歧化酶1(Superoxide dismutase1, SOD1)、TDP-43等在退行性大脑疾病中聚集增加的各种靶物质选择性结合来抑制聚集的物质与血脑屏障穿透性肽连接后将其注入至体内,则能够通过PET对上述靶物质在脑实质内的分布进行早期造影或抑制聚集。

[0021] 上述大脑或中枢神经系统疾病包括通常所说的退行性神经疾病,并且包括阿尔茨海默病性痴呆、帕金森氏病、额颞叶痴呆、路易痴呆以及亨廷顿病等。

[0022] 上述大脑或中枢神经系统疾病的诊断用组合物可以以大脑或中枢神经系统疾病的风险预测或诊断用试剂盒的形式提供。该试剂盒中不仅包含能够检测血脑屏障穿透性肽的制剂,还可以包含适合于分析方法的一种以上的其他构成成分组合物、溶液或装置。

[0023] 上述大脑或中枢神经系统疾病的治疗或预防用药物组合物可以根据目标方法进行口服给药或非口服给药(例如,施用于静脉内、皮下、腹腔内或局部),在形成制剂的情况下,使用通常使用的填充剂、增量剂、结合剂、润湿剂、崩解剂、表面活性剂等稀释剂或赋形剂来制造。

[0024] 用于口服给药的固体制剂包括片剂、丸剂、散剂、颗粒剂、胶囊剂、锭剂等,这样的固体制剂通过将至少一种以上的赋形剂例如淀粉、碳酸钙、蔗糖(sucrose)、乳糖(lactose)或明胶等与活性成分混合来制造。此外,除了简单赋形剂之外,也使用硬脂酸镁滑石粉之类的润滑剂。作为用于口服给药的液体制剂,有混悬剂、口服溶液剂、乳剂或糖浆剂等,除了常用的作为简单稀释剂的水、液体石蜡之外,还可以包含各种赋形剂,例如润湿剂、甜味剂、香料、防腐剂等。

[0025] 用于非口服给药的制剂包括灭菌水溶液、非水性溶剂、混悬溶剂、乳剂、冻干制剂、栓剂等。作为非水性溶剂、混悬溶剂,可以使用丙二醇、聚乙二醇、橄榄油之类的植物性油、油酸乙酯之类的可注射酯等。作为栓剂的基剂,可以使用witepsol(半合成脂肪酸酯)、聚乙二醇(macrogol)、tween 61(吐温61)、可可脂(cacao butter)、月桂精脂(laurin butter)、

甘油、明胶等。

[0026] 本发明的药物组合物以药学上的有效量给药。本发明中，“药学上的有效量”是指以可施用于医学治疗的合理效益/风险比足以治疗疾病的量，有效剂量水平可以根据包括患者的疾病种类、严重程度、药物的活性、对于药物的敏感度、给药时间、给药途径和排泄比率、治疗持续时间、同时使用的药物在内的因素以及其他医学领域中熟知的因素来确定。例如，本发明的药物组合物可以以0.1mg/kg至200mg/kg、优选以1mg/kg至50mg/kg的剂量每天给药一次或每天分三次给药。关于上述给药量，任何方式都不会限定本发明的范围。但是，可以根据给药途径、肥胖的严重程度、性别、体重、年龄等而增加或减少，因此上述给药量不以任何方式限定本发明的范围。

[0027] 本发明的又一个方式提供对上述血脑屏障穿透性肽进行编码的多核苷酸。

[0028] 本说明书中使用的术语“多核苷酸(polynucleotide)”是以单链或双链形式存在的脱氧核糖核苷酸(deoxyribonucleotide)或核糖核苷酸(ribonucleotide)的聚合物。涵盖RNA基因组序列、DNA(gDNA和cDNA)以及由其转录的RNA序列，除非另行特别提及，否则包括天然多核苷酸的类似物。

[0029] 本发明中，上述多核苷酸不仅包含对细胞膜穿透性肽进行编码的核苷酸序列，还包含与该序列互补(complementary)的序列。上述互补的序列不仅包含完全互补的序列，还包含实质上互补的序列。此外，上述多核苷酸序列可以被修饰，修饰包括核苷酸的追加、缺失或非保守取代或保守取代。

[0030] 本发明的又一个方式提供包含对上述血脑屏障穿透性蛋白进行编码的多核苷酸序列的重组载体。

[0031] 本说明书中使用的术语“载体(vector)”是指用于在宿主细胞中使靶基因表达的工具。例如，可以包含质粒载体、粘粒载体以及噬菌体载体、腺病毒载体、逆转录病毒载体和腺伴随病毒载体之类的病毒载体，但不限于此。可用作上述重组载体的载体可以通过操作本领域常用的质粒(例如，pSC101、pGV1106、pACYC177、ColE1、pKT230、pME290、pBR322、pUC8/9、pUC6、pBD9、pHC79、pIJ61、pLAFR1、pHV14、pGEX系列、pET系列和pUC19等)、噬菌体(例如， λ gt4 λ B、 λ -Charon、 λ Δ z1和M13等)或病毒(例如，CMV、SV40等)来制作。

[0032] 上述重组载体可以包含上述多核苷酸序列和与多核苷酸序列可操作地连接(operatively linked)的启动子。

[0033] 本说明书中使用的术语“可操作地连接”是指核苷酸表达调控序列(例如，启动子序列)与其他核苷酸序列之间的功能性结合，由此上述调控序列调控上述其他核苷酸序列的转录和/或翻译。

[0034] 根据本发明的一个具体例，在使用蛋白质作为靶物质的情况下，可以将对血脑屏障穿透性蛋白和靶蛋白进行编码的多核苷酸序列一起引入至载体来以融合蛋白形式表达。

[0035] 因此，上述重组载体可以包含使融合蛋白易于纯化的标签(tag)序列，例如，连续组氨酸密码子、麦芽糖结合蛋白密码子以及Myc密码子等。此外，上述重组载体可以追加包含用于使融合蛋白的可溶性(solubility)提高的融合配偶体(partner)等。此外，可以包含在融合蛋白表达时被酶特异性切割以去除不需要的部分的序列、表达调控序列以及用于确认细胞内递送的标记(marker)或报告基因序列。

[0036] 发明效果

[0037] 如果使用本发明的血脑屏障穿透性多肽,则能够将无法自然穿过血脑屏障的物质有效递送至脑组织中。

附图说明

[0038] 图1是用荧光物质标记GST和序列号1的多肽融合而成的蛋白质并对小鼠给药后,确认脑组织中多肽在不同时间下的血脑屏障穿透度的结果(红色:血管,绿色:多肽)。

[0039] 图2是用荧光物质标记GST和序列号2的多肽融合而成的蛋白质并对小鼠给药后,确认脑组织中多肽在不同时间下的血脑屏障穿透度的结果(红色:血管,绿色:多肽)。

[0040] 图3是用荧光物质标记序列号3的多肽并对小鼠给药后,确认脑组织中多肽在不同时间下的血脑屏障穿透度的结果(红色:血管,绿色:多肽)。

[0041] 图4是用荧光物质标记序列号4的多肽并对小鼠给药后,确认脑组织中多肽在不同时间下的血脑屏障穿透度的结果(红色:血管,绿色:多肽)。

[0042] 图5是用荧光物质标记序列号5的多肽并对小鼠给药后,确认脑组织中多肽在不同时间下的血脑屏障穿透度的结果(红色:血管,绿色:多肽)。

具体实施方式

[0043] 以下,通过实施例来对一个以上的具体例进行更详细的说明。但是,这些实施例是为了例示性说明一个以上的具体例,本发明的范围不受这些实施例的限定。

[0044] 实施例1:肽准备

[0045] 如下准备肽,表1中记载了肽序列。

[0046] [表1]

序列号	肽序列
1	GSDQSENVDRGAGSIREAGGAFGKREQAEEERYFRAQSREQLAALKKHHEEEI VHHKKEIERLQKEIER HKQKIKMLKHDD
2	GSDQSENVDRGAGSIREAGGAFGKREQAEEERYFRAQSREQLAALKK
3	VDRGAGSIREAGGAFGKREQAEEERYFR
4	GSDQSENVDRG
5	GSDQSEN

[0048] 为了评价穿透性肽是否可以用作药物递送体,将无法自然穿透血脑屏障的GST与对应于序列号1或2的肽的N-末端偶联。

[0049] 具体地,将序列号1或2的肽序列和编码GST的核苷酸序列插入值pGEX载体系统来创建重组载体,并将该重组载体引入至大肠杆菌菌株BL21(DE3)。将上述菌株在LB培养基中以26℃培养3小时后,用1mM的异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, IPTG)进行处理,然后再次在18℃培养12小时。

[0050] 然后,回收培养液,通过离心分离回收细胞,并用对细胞进行超声波处理(sonication)。利用亲和层析来获得GST+肽的融合蛋白。对于所获得的融合蛋白,利用PBS(pH 7.4)缓冲液调整盐浓度2~3天来提高纯度。

[0051] 合成除序列号1、2之外的序列号3、4和5的肽,确认纯度为95%以上后用于后续实验。

[0052] 实施例2:肽的BBB穿透能力评价

[0053] 如下确认本发明的肽能否在生物体系统中穿透血脑屏障。

[0054] 为了在生物体内追踪肽,使表现出荧光信号的Dylight488与实施例1中制作的GST+肽的融合蛋白或序列号3至5的肽结合。将结合有荧光物质的各融合蛋白或肽试样注入至已知表现出与人体相似的代谢作用的小鼠(品系名称:C57BL/6N,8周龄)中,在脑组织和血管部位观察试样的存在与否。

[0055] 对小鼠进行呼吸麻醉(异氟烷(isoflurane))以限制运动并防止由此导致的不当的结果解释。为了区分脑组织和血管,通过抗-CD31和FSD fluor 647化合物对血管进行染色,为了进行组织成像,切开颅骨上的皮肤组织,并将颅窗(cranial window)贴在切口部位以获得固定的图像。然后,利用荧光显微镜(活体共焦双光子可转换显微镜,IVM-CM Confocal&Two-photon convertible microscopy)对注入试样前(0hr)的组织图像进行拍摄,并且通过静脉注射注入试样(10mg/kg)以观察随时间变化的荧光信号样子。

[0056] 结果,肽1和2在注入后0.16小时(10分钟)开始可以在脑组织内血管中观察到荧光信号,并且可知肽1在注入后1小时,肽2在注入后4小时时脑组织内荧光信号最强(图1和图2)。

[0057] 肽3至5全部在注入后0.5小时(30分钟)开始可以在脑组织内血管中观察到荧光信号,并且注入后1小时时荧光信号最强(图1至5)。

[0058] 通过图1至5的结果,证实本发明的肽能够穿透血脑屏障且能够将GST之类的大物质有效递送至脑组织中。

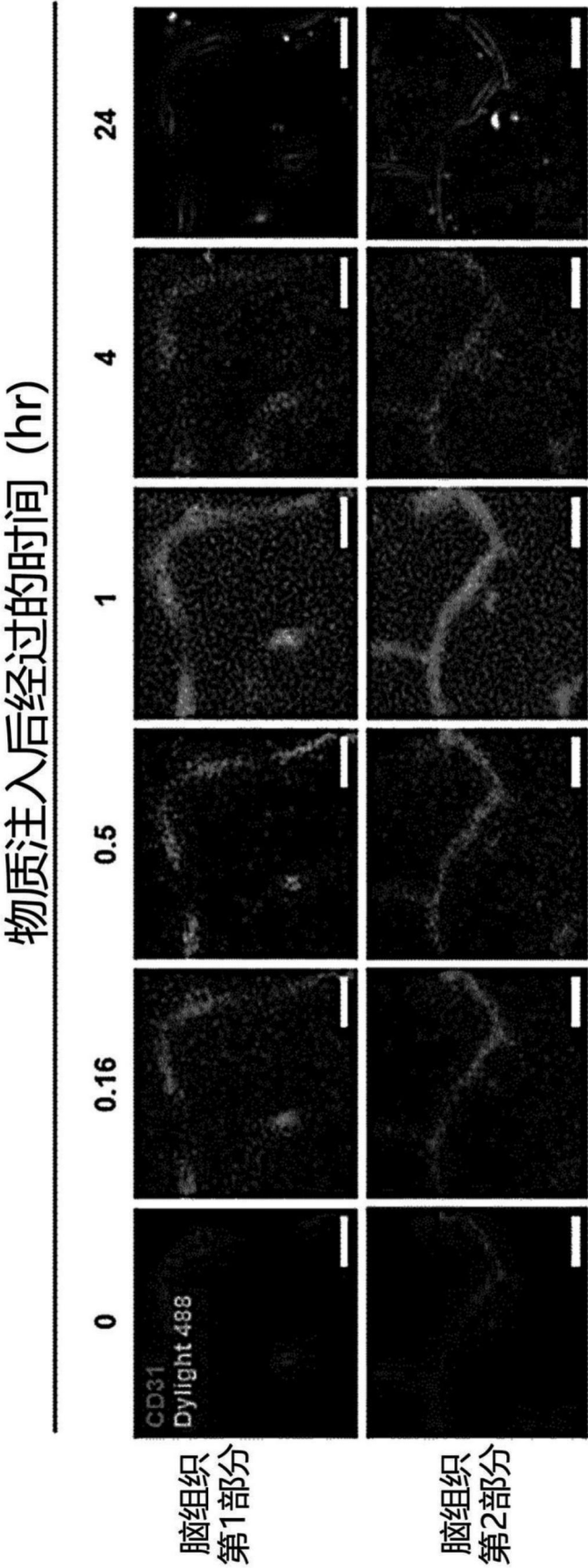


图1

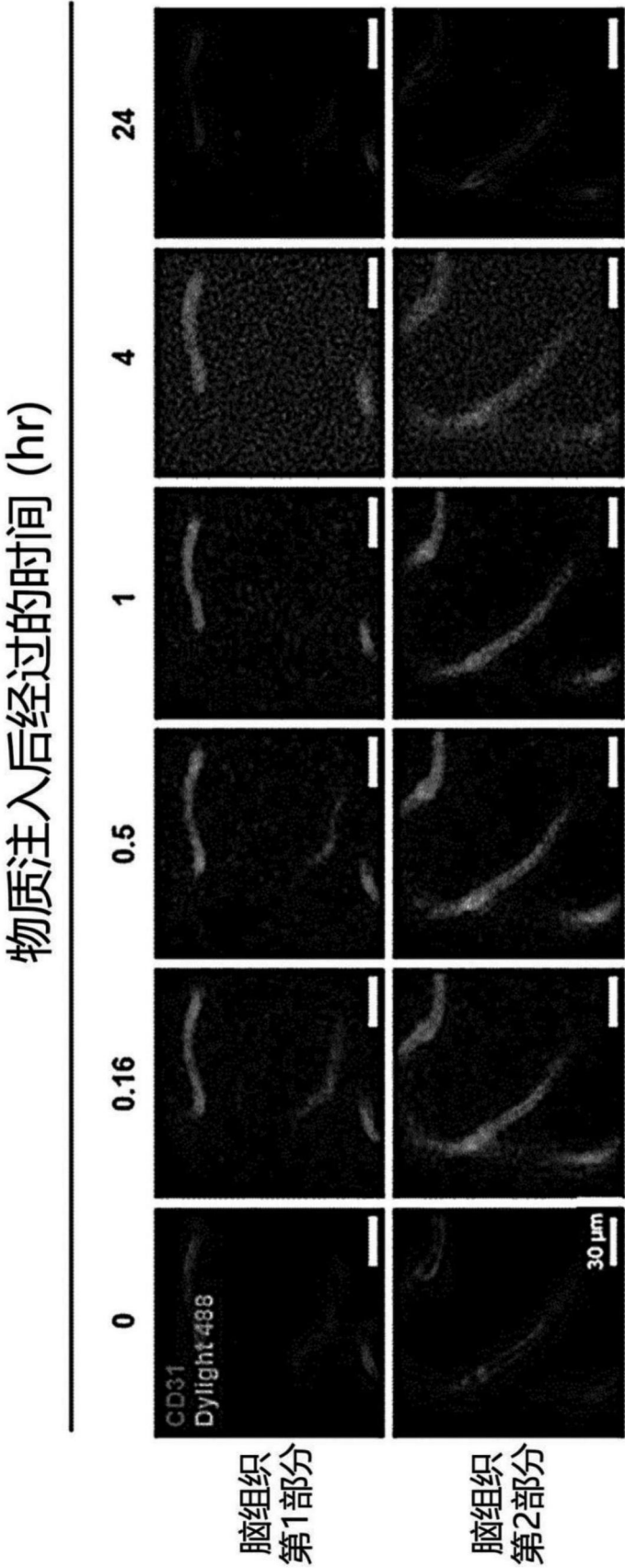


图2

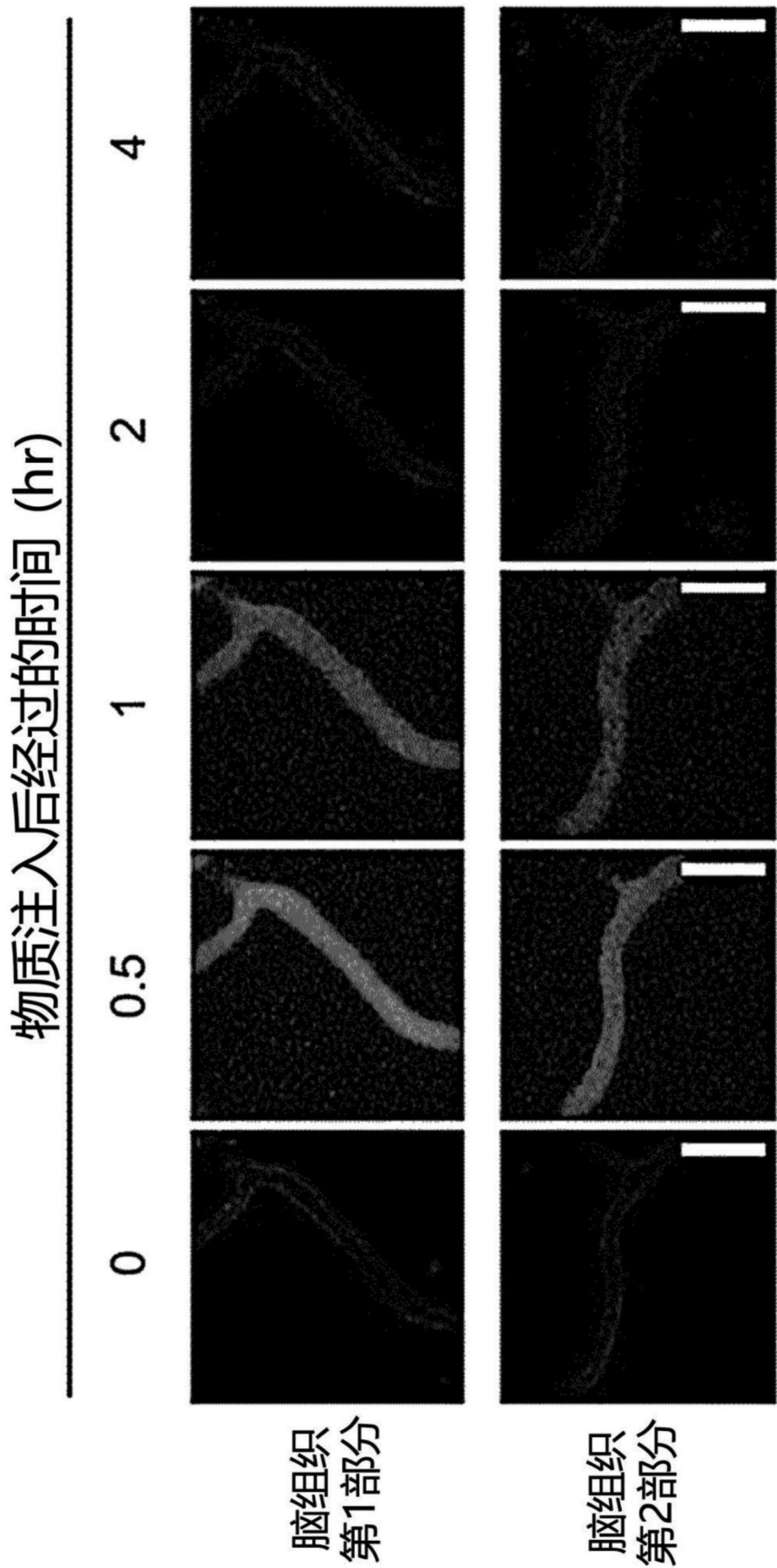


图3

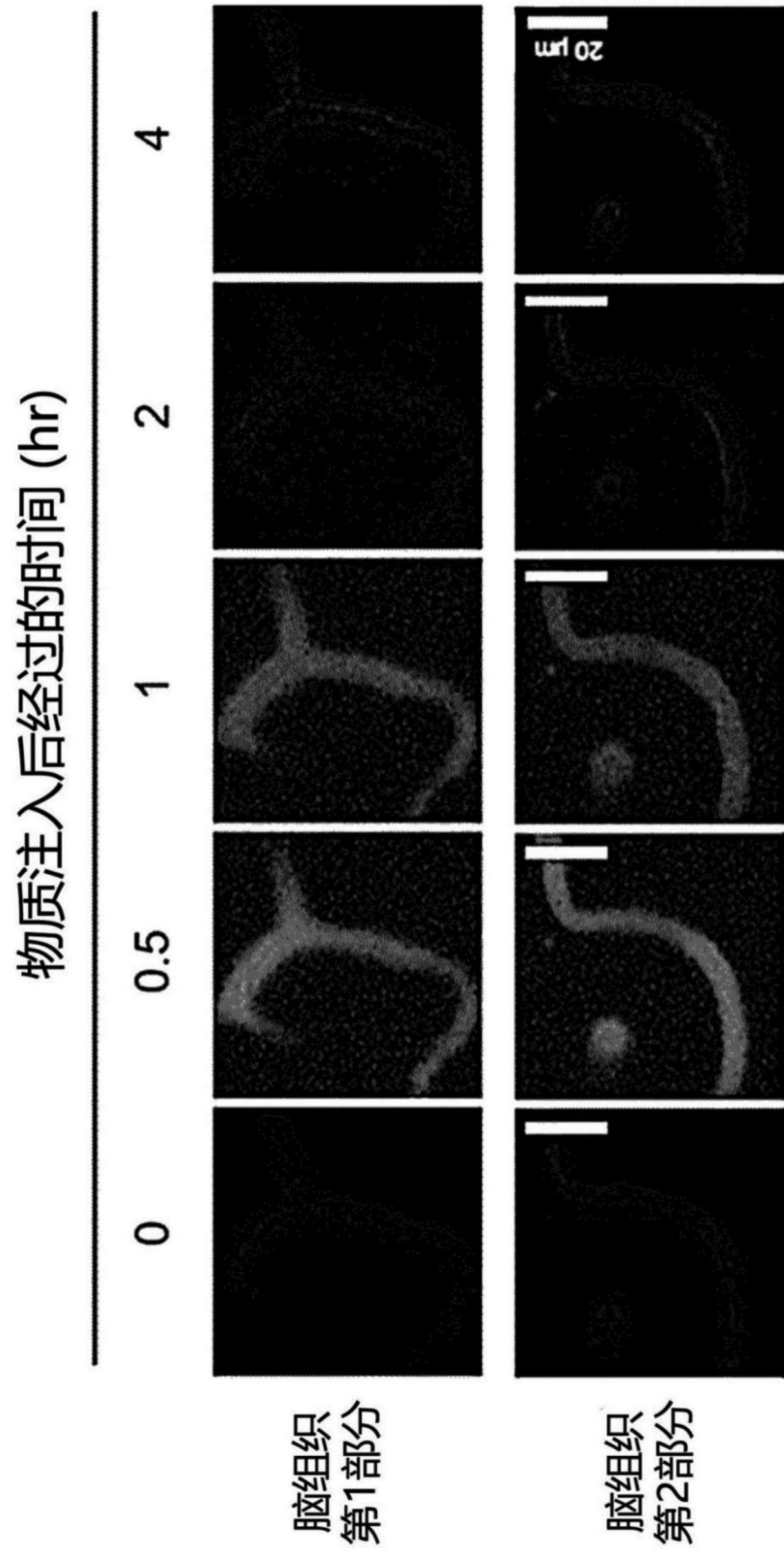


图4

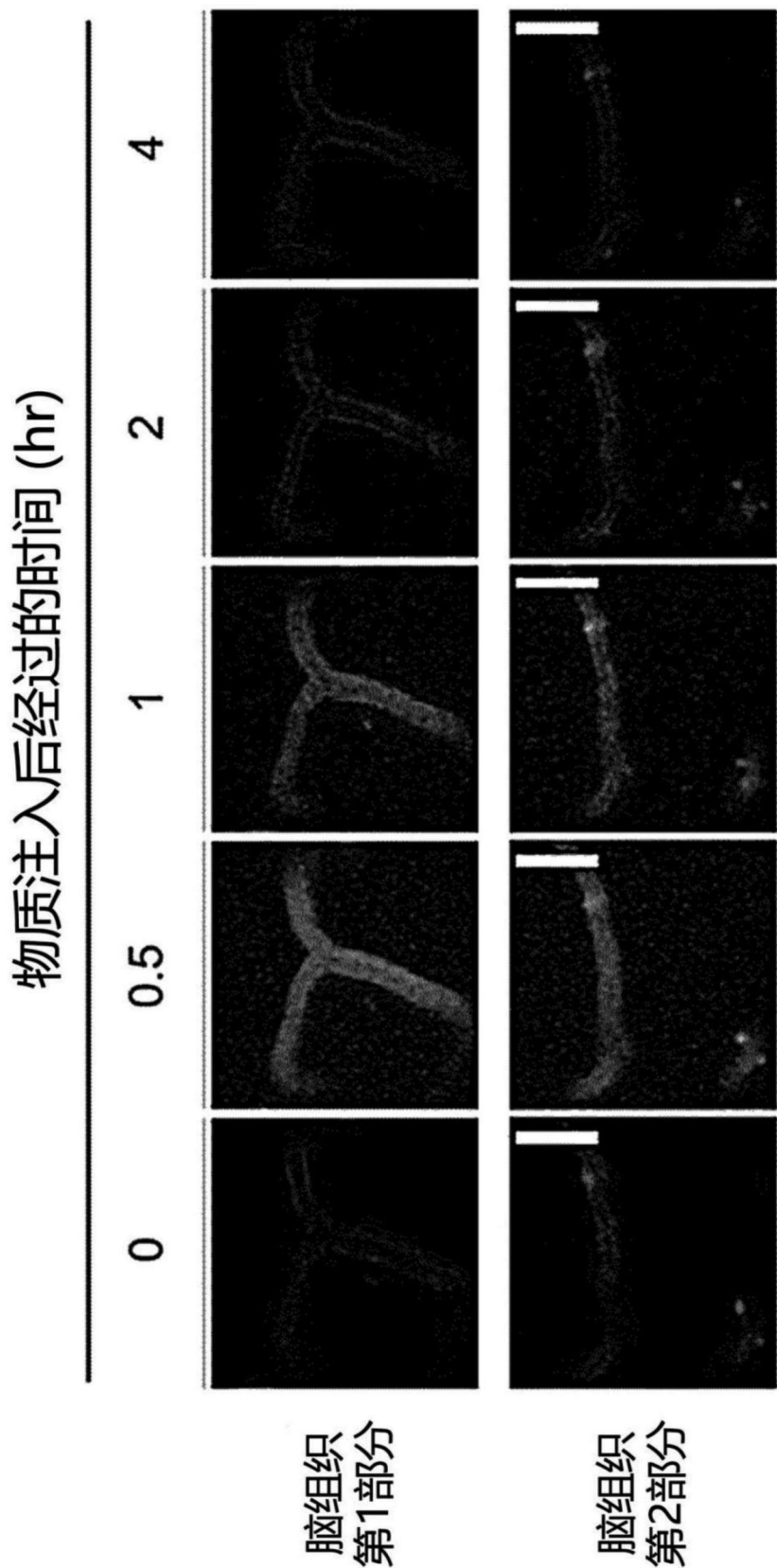


图5