



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103159844 A

(43) 申请公布日 2013.06.19

(21) 申请号 201110428037.0

(22) 申请日 2011.12.19

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 江涛 唐捷 童琼 周洪哲
孙含丽

(74) 专利代理机构 北京市汉信律师事务所
11373

代理人 王文生

(51) Int. Cl.

C07K 14/48 (2006.01)

C07K 1/18 (2006.01)

C07K 1/16 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书5页
序列表1页 附图2页

(54) 发明名称

减低蛇毒神经生长因子免疫毒性使之成为鼠源神经生长因子的药物替代品的的方法

(57) 摘要

本发明通过结构生物学和生物化学研究发现来自眼镜蛇的神经生长因子 (cNGF) 特异结合脂类小分子,是其免疫毒性的主要来源之一。因此,本发明涉及眼镜蛇毒神经生长因子 (cNGF) 的纯化方法和脱脂方法,利用有机溶剂采取特殊工艺对纯化的 cNGF 进行处理,成功地去除了脂类小分子,并通过细胞实验证实脱脂后的 cNGF 减少了对小鼠肥大细胞瘤细胞的免疫毒性,可作为鼠源神经生长因子的替代药物作为低副作用具有神经营养作用的药物。

1. 眼镜蛇毒神经生长因子 cNGF 的纯化方法,所述方法包括下述步骤:
 - (1) 将蛇毒粗品溶解于醋酸钠溶液,
 - (2) 将步骤 (1) 的溶液进行第一步离子交换层析,所用缓冲液 A 液 B 液均为磷酸钠缓冲液, B 液中洗脱盐为氯化钠,各洗脱组分经 SDS-PAGE 验证,将目的蛋白溶液浓缩;
 - (3) 将步骤 (2) 的浓缩蛋白溶液换至第二步离子交换层析缓冲液,进行第二步离子交换层析,所用缓冲液 A 液 B 液均为磷酸钠缓冲液, B 液中洗脱盐为氯化钠,各洗脱组分经 SDS-PAGE 验证,将目的蛋白溶液浓缩;和
 - (4) 将步骤 (3) 的浓缩蛋白溶液进行分子筛层析。
2. 根据权利要求 1 的方法,其中步骤 (2) 和 (3) 的离子交换层析为阳离子交换层析。
3. 根据权利要求 2 的方法,其中步骤 (2) 和 (3) 的离子交换层析使用 Resource S 阳离子交换柱进行,步骤 (4) 的分子筛层析使用 Superdex75 进行凝胶排阻层析。
4. 根据权利要求 1 的方法,其中步骤 (2) 所用缓冲液 A 为终浓度为 20mM 的磷酸钠缓冲液, pH 5.9, 缓冲液 B 为终浓度为 20mM 的磷酸钠缓冲液, pH 7.0, 1M NaCl。
5. 根据权利要求 1 的方法,其中步骤 (3) 所用缓冲液 A 为终浓度为 20mM 的磷酸钠缓冲液, pH 6.5, 缓冲液 B 为终浓度为 20mM 的磷酸钠缓冲液, pH 6.8, 1M NaCl。
6. 根据权利要求 1 的方法,其中步骤 (4) 所用缓冲液为终浓度为 20mM 的磷酸钠缓冲液, pH 6.5。
7. 眼镜蛇毒神经生长因子 cNGF 的脱脂方法,所述方法包括:将提取纯化的眼镜蛇毒神经生长因子 cNGF 与有机溶剂混合变性,离心取两相分界面的蛋白沉淀,重复 4-6 次,以达到充分脱脂。
8. 根据权利要求 7 的脱脂方法,其中所用的有机溶剂为氯仿。
9. 脱脂眼镜蛇毒神经生长因子 cNGF 用于制备神经营养药物的应用,其中所述脱脂眼镜蛇毒神经生长因子 cNGF 通过用权利要求 7 的脱脂方法对眼镜蛇毒神经生长因子脱脂获得。
10. 一种神经营养药物,其包含治疗有效量的用权利要求 7 的脱脂方法获得的脱脂眼镜蛇毒神经生长因子 cNGF。

减低蛇毒神经生长因子免疫毒性使之成为鼠源神经生长因子的药物替代品的的方法

发明领域：

[0001] 本发明通过结构生物学和生物化学研究发现来自眼镜蛇的神经生长因子 (cNGF) 特异结合脂类小分子, 这些脂类小分子是其免疫毒性的主要来源之一。因此, 本发明提供一种眼镜蛇毒神经生长因子 (cNGF) 的纯化方法和脱脂方法, 利用有机溶剂采取特殊工艺对纯化的 cNGF 进行脱脂处理, 成功地去除了脂类小分子, 并通过细胞实验证实脱脂后的 cNGF 减少了对小鼠肥大细胞瘤细胞的免疫毒性, 可作为鼠源神经生长因子的替代药物作为低副作用具有神经营养作用的药物。

背景技术：

[0002] 神经生长因子 (NGF) 在人体中广泛分布, 是一个有着复杂功能的生物活性蛋白。成熟的有生物活性的 NGF 以同源二聚体的形式存在于生物体中, 其单体是含有 120 个氨基酸的多肽, 分子量约为 13kD。两个单体的折叠片以广泛的疏水作用形成稳定非共价的活性双体形式。

[0003] NGF 在人体中广泛分布, 除了神经系统和结构性细胞中可以找到 NGF 的踪迹, 在免疫系统的炎症细胞中也能表达 NGF, 它们是: 肥大细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、巨噬细胞、B 细胞和 T 细胞等。NGF 可以在特定的部位和组织高丰度表达, 而这些部位和组织就是天然提取 NGF 的最佳来源。已知的有 (1) 雄性成年小鼠颌下腺; (2) 牛精浆; (3) 蛇毒; (4) 豚鼠前列腺。其中小鼠颌下腺和蛇毒中的含量最为丰富, 都以毫克级存在, 是两个最主要的来源。虽然蛇源和鼠源神经生长因子的神经营养作用相似, 但它们的免疫学行为却有很大差异。

[0004] NGF 具有神经元营养和促进突起生长双重生物学功能, 对种属和周围神经元的生长、发育、分化、正常状态的维持、凋亡、损伤后的保护和轴突的有效再生都有着重要作用。随着大量深入研究, 在神经细胞、炎症细胞和结构细胞中都可以表达 NGF 和 NGF 受体, 说明这些细胞不仅可以分泌 NGF 也是 NGF 的靶细胞, 受到 NGF 的调控, 并且暗示着 NGF 可能是这些细胞之间的枢纽。研究表明, NGF 在神经系统以外表现出非常活跃的生物学功能, 例如许多免疫细胞上都存在 NGF 受体, NGF 能增强特异性和非特异性免疫反应, 通过影响免疫细胞的活性, 进而调节免疫系统功能, 在免疫系统炎症疾病中扮演了非常重要的角色, 如哮喘、肺炎、关节炎。在临床上, NGF 已经应用于治疗多种疾病, 如外伤引起的神经损伤、视神经病变、角膜溃疡、耳聋耳鸣, 骨病中促进轴突定向再生、髓鞘生成, 帕金森病、阿尔兹海默症、多发性神经炎、带状疱疹和面部神经麻痹等等。

[0005] NGF 是神经系统中最重要生物活性分子之一。NGF 不仅对神经系统有作用, 而且对于免疫系统、造血系统也有一定的影响。目前我国已有鼠源和人源 NGF 新药用于临床, 是有效的治疗神经系统疾病和退行性神经病变的新型生物制剂, 适用于神经内科、神经外科和创伤等病症。由于小鼠 NGF 与人的 NGF 有很高的同源性 (89%), 并且材料的来源丰富, 因此, 目前药效较好的天然 NGF 多是以小鼠颌下腺为原料提取的。

[0006] 目前为止, NGF 的晶体结构有 6 个, 但是却没有一个是蛇源的 NGF 蛋白, 有 4 个是鼠源的, 另外 2 个则是人源的 NGF 在大肠杆菌中重组表达的。蛇源 cNGF 与鼠源 mNGF 的氨基酸序列比对表明, 两者的同源度约为 63%。小鼠颌下腺和蛇毒两种来源的 NGF 生物活性相似, 但蛇毒 NGF 具有耐酸、耐碱、耐蛋白酶水解和稳定性高的特点, 且来源丰富, 说明蛇毒 NGF 具有更广阔的应用前景。目前为止, 也已经有以舟山眼镜蛇毒 NGF 为原料的药品上市, 但是因为毒副作用比较大, 并且其副作用机理不清楚, 限制了其应用。

[0007] 人们研究神经生长因子 NGF 半个多世纪以来, 已经找到了它的两个膜上受体, 并且对于分别与这两个受体相关的信号通路的研究也比较透彻。在这些研究中经常可以注意到一些脂类分子的存在, 这些脂类分子或是与其受体偶联的信号通路相关, 或是与调节 NGF 的受体表达水平相关, 或是被 NGF 调节等等。长久以来, 科学家们都是在 NGF 周边间接地研究这些脂分子与 NGF 相关的生物功能, 也很少有学者直接的将 NGF 与脂分子联系起来。例如, 从蛇毒和大鼠颌下腺中提取的 NGF 与 lysoPS 共同作用可以诱导肥大细胞的脱颗粒反应, 释放出多种炎症介质: 如 5-羟色胺 (5-HT)、组胺 (histamine) 和白介素等, 但是其机理至今仍然不清楚。

[0008] 脂类是一类低溶于水却易溶于非极性溶剂的生物有机分子。脂类是富含能量的营养素, 是生物体中能量的一种储存形式, 脂类也是组成生物膜的重要组分, 为保持膜的完整性和流动性提供支持。脂类还做为一些物质的前体形式存在。近年来研究表明脂类也参与了细胞信号传导, 有一些非常重要的脂类被定义为第二信使, 发挥传递信号的中介功能, 调控生命活动。

发明内容:

[0009] 本发明利用结构生物学方法解析了眼镜蛇毒神经生长因子 cNGF (SEQ ID NO:1) 的晶体结构, 第一次在 NGF 双体的疏水通道中发现了脂类分子的存在。通过晶体结构分析, 结合提取 cNGF 中的脂类分子进行多级质谱分析, 我们大概确定这个脂分子的结构类似二酰基甘油分子, 分子量为 620Da, 由两条脂肪酸酯尾巴组成, 包含 40-44 个碳原子。

[0010] 利用 cNGF 及脱脂 cNGF 开展细胞实验, 小鼠肥大细胞瘤细胞组胺释放效应明显发生了变化。相比 cNGF, 脱脂 cNGF 组胺释放量明显降低, 将脱脂 cNGF 与 lysoPS 共同刺激肥大细胞时, 组胺释放量增多, 具有类似 mNGF 的效应。这说明小鼠肥大细胞瘤细胞组胺释放效应是由 NGF 与 lysoPS 脂分子共同调节的。

[0011] 在本发明中提供下列:

[0012] 1. 眼镜蛇毒神经生长因子 cNGF 的纯化方法, 所述方法包括下述步骤:

[0013] (1) 将蛇毒粗品溶解于醋酸钠溶液,

[0014] (2) 将步骤 (1) 的溶液进行第一步离子交换层析, 所用缓冲液 A 液 B 液均为磷酸钠缓冲液, B 液中洗脱盐为氯化钠, 各洗脱组分经 SDS-PAGE 验证, 将目的蛋白溶液浓缩;

[0015] (3) 将步骤 (2) 的浓缩蛋白溶液换至第二步离子交换层析缓冲液, 进行第二步离子交换层析, 所用缓冲液 A 液 B 液均为磷酸钠缓冲液, B 液中洗脱盐为氯化钠, 各洗脱组分经 SDS-PAGE 验证, 将目的蛋白溶液浓缩; 和

[0016] (4) 将步骤 (3) 的浓缩蛋白溶液进行分子筛层析。

[0017] 2. 根据第 1 项的方法, 其中步骤 (2) 和 (3) 的离子交换层析为阳离子交换层析。

[0018] 3. 根据权利要求 2 的方法,其中步骤 (2) 和 (3) 的离子交换层析使用 Resource S 阳离子交换柱进行,步骤 (4) 的分子筛层析使用 Superdex 75 进行凝胶排阻层析。

[0019] 4. 根据第 1 项的方法,其中步骤 (2) 所用缓冲液 A 为终浓度为 20mM 的磷酸钠缓冲液, pH 5.9, 缓冲液 B 为终浓度为 20mM 的磷酸钠缓冲液, pH 7.0, 1M NaCl。

[0020] 5. 根据第 1 项的方法,其中步骤 (3) 所用缓冲液 A 为终浓度为 20mM 的磷酸钠缓冲液, pH 6.5, 缓冲液 B 为终浓度为 20mM 的磷酸钠缓冲液, pH 6.8, 1M NaCl。

[0021] 6. 根据第 1 项的方法,其中步骤 (4) 所用缓冲液为终浓度为 20mM 的磷酸钠缓冲液, pH 6.5。

[0022] 7. 眼镜蛇毒神经生长因子 cNGF 的脱脂方法,所述方法包括:将提取纯化的眼镜蛇毒神经生长因子 cNGF 与有机溶剂混合变性,离心取两相分界面的蛋白沉淀,重复 4-6 次,以达到充分脱脂。

[0023] 8. 根据第 7 项的脱脂方法,其中所用的有机溶剂为氯仿。

[0024] 9. 脱脂眼镜蛇毒神经生长因子 cNGF 用于制备神经营养药物的应用,其中所述脱脂眼镜蛇毒神经生长因子 cNGF 通过用第 7 项的脱脂方法对眼镜蛇毒神经生长因子脱脂获得。

[0025] 10. 一种神经营养药物,其包含治疗有效量的用第 7 项的脱脂方法获得的脱脂眼镜蛇毒神经生长因子 cNGF。

[0026] 附图简述:

[0027] 图 1 是 cNGF 及脱脂 cNGF (cNGF-d1) 的小鼠肥大细胞瘤细胞组胺释放实验。相比 cNGF, 脱脂 cNGF 所引起的组胺释放效应明显降低;

[0028] 图 2 是 cNGF 的晶体结构。在双体结合面的疏水通道中发现了一个脂类小分子,这个脂类小分子由两条脂肪链尾巴组成,大概包含 40-44 个碳原子。

[0029] 图 3 是眼镜蛇毒神经生长因子 cNGF 的氨基酸序列 (SEQ ID NO :1)。

具体实施方式

[0030] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限制本发明。

[0031] 本领域技术人员应该理解,实施例中所用的试剂除特别说明外均为市售分析纯级别的试剂。

[0032] 实施例 1

[0033] 本发明提供蛇毒神经生长因子 cNGF (SEQ ID NO :1) 的纯化方法及脱脂方法。cNGF 及脱脂 cNGF 的小鼠肥大细胞瘤细胞组胺释放实验。

[0034] 1、中华眼镜蛇毒神经生长因子 NGF 蛋白的天然提取纯化。

[0035] 提纯方案为:第一步离子柱+第二步离子柱+分子筛

[0036] 我们是从广西医科大学蛇毒研究所购买的蛇毒粗品,来源于中华眼镜蛇 Chinese cobra (*N. naja atra*)。本领域技术人员应该理解,除中华眼镜蛇蛇毒粗品外,也可以使用其他市售来源的蛇毒粗品。本发明对蛇毒粗品的物种来源没有特别的限制。

[0037] 将粗品蛇毒溶解于 0.1M pH4.6 的醋酸钠溶液中,浓度为 100mg/ml。将充分溶解的蛇毒粗品高速离心后,去除沉淀,上清留用。

[0038] 第一步阳离子交换层析

[0039] 纯化条件：

[0040] 缓冲液：母液 0.2M Na₂HPO₄ 和 0.2M NaH₂PO₄

[0041] A Na₂HPO₄：NaH₂PO₄ 1：9 终浓度 20mM

[0042] B Na₂HPO₄：NaH₂PO₄ 6：4 终浓度 20mM+1 M NaCl

[0043] 纯化柱：阳离子交换柱，例如，包括但不限于，Resource S 6ml (GE)。本领域技术人员应该理解，当然还可以根据实际需要而使用其它柱体积的 Resource S 阳离子交换柱，甚至可以使用任何合适的其他阳离子交换柱，但是本实施例使用的是 6ml 的 Resource S 柱。

[0044] 第二步阳离子交换层析

[0045] 纯化条件：缓冲液 母液 0.2M Na₂HPO₄ 和 0.2M NaH₂PO₄

[0046] A Na₂HPO₄：NaH₂PO₄ 3：7 终浓度 20mM

[0047] B Na₂HPO₄：NaH₂PO₄ 5：5 终浓度 20mM+0.5MNaCl

[0048] 纯化柱：阳离子交换柱，例如，包括但不限于，Resource S 6ml (GE)。本领域技术人员应该理解，当然还可以根据实际需要而使用其它柱体积的 Resource S 阳离子交换柱，甚至可以使用任何合适的其他阳离子交换柱，但是本实施例使用的是 6ml 的 Resource S 柱。

[0049] 将第一步离子交换层析得到的蛋白超滤浓缩，换至第二步离子交换层析缓冲液，过 Resource S 6ml 柱，收集目标峰，浓缩至一定体积。

[0050] 第三步精细纯化凝胶排阻层析

[0051] 纯化条件：磷酸钠缓冲液

[0052] 溶液 母液 0.2M Na₂HPO₄ 和 0.2M NaH₂PO₄

[0053] 溶液：20mM Na₂HPO₄：NaH₂PO₄ 3：7 pH 6.5

[0054] 纯化柱：Superdex 75 (GE)。本领域技术人员应该理解，这一步主要是去除少量杂质，收集状态比较均一的目的蛋白，普通的分子筛都行，没有特别要求。

[0055] 将第二步得到的蛋白溶液过 Superdex 75 柱，收集主峰，浓缩至 10mg/ml 以内，液氮速冻，存 -80℃ 冰箱。

[0056] 2、cNGF 脱脂方法

[0057] 将天然提取纯化的 cNGF 与 10 倍体积以上的氯仿溶液剧烈震荡混匀，4℃，5000r.p.m 离心 30 分钟，形成两相分层，此时 cNGF 蛋白沉淀在两相界面处，脂类小分子溶于下层的氯仿有机相中。小心吸出下层有机相，保留上层溶液及沉淀，然后用 10 倍以上体积的氯仿重悬，重复前面的步骤 4-6 次，以达到充分脱脂。最后将上层溶液相及沉淀回收，高速离心，保留沉淀，用 PH 5.5, 50mM 的醋酸钠缓冲液重悬，液氮速冻，-80℃ 保存。

[0058] 3、cNGF 及脱脂 cNGF 的小鼠肥大细胞瘤细胞组胺释放实验。

[0059] 细胞实验内容：cNGF，脱脂 cNGF 工作浓度均为 200ng/ml，cNGF 与脂类小分子 lysoPS 共同孵育约十分钟，刺激时细胞培养液为 5% FBS (胎牛血清) DMEM。实验中 cNGF、脂类分子均用添加了 0.5mM CaCl₂ 的 50mMNa₂Ac 稀释。

[0060] 细胞实验结果：相比 cNGF，用脱脂 cNGF 刺激时，肥大细胞释放组胺的量明显减少，用脱脂 cNGF 与 lysoPS 共同孵育刺激肥大细胞时，组胺释放量又明显增加，类似于小鼠神经生长因子 (mNGF) 的作用模式。这说明小鼠肥大细胞瘤细胞组胺释放效应是由 NGF 与 lysoPS 脂分子共同调节的。

[0061] 应该理解，尽管参考其示例性的实施方案，已经对本发明进行具体地显示和描述，

但是本领域的普通技术人员应该理解,在不背离由后附的权利要求所定义的本发明的精神和范围的条件下,可以在其中进行各种形式和细节的变化,可以进行各种实施方案的任意组合。

[0001]

IB117674序列表

序列表

<110> 中国科学院生物物理所

<120> 减低蛇毒神经生长因子免疫毒性使之成为鼠源神经生长因子的药物替代品的的方法

<130> IB117674

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 116

<212> PRT

<213> 眼镜蛇毒神经生长因子cNGF的氨基酸序列

<400> 1

Glu Asp His Pro Val His Asn Leu Gly Glu His Ser Val Cys Asp Ser
 1 5 10 15

Val Ser Ala Trp Val Thr Lys Thr Thr Ala Thr Asp Ile Lys Gly Asn
 20 25 30

Thr Val Thr Val Met Glu Asn Val Asn Leu Asp Asn Lys Val Tyr Lys
 35 40 45

Glu Tyr Phe Phe Glu Thr Lys Cys Lys Asn Pro Asn Pro Glu Pro Ser
 50 55 60

Gly Cys Arg Gly Ile Asp Ser Ser His Trp Asn Ser Tyr Cys Thr Glu
 65 70 75 80

Thr Asp Thr Phe Ile Lys Ala Leu Thr Met Glu Gly Asn Gln Ala Ser
 85 90 95

Trp Arg Phe Ile Arg Ile Glu Thr Ala Cys Val Cys Val Ile Thr Lys
 100 105 110

Lys Lys Gly Asn
 115

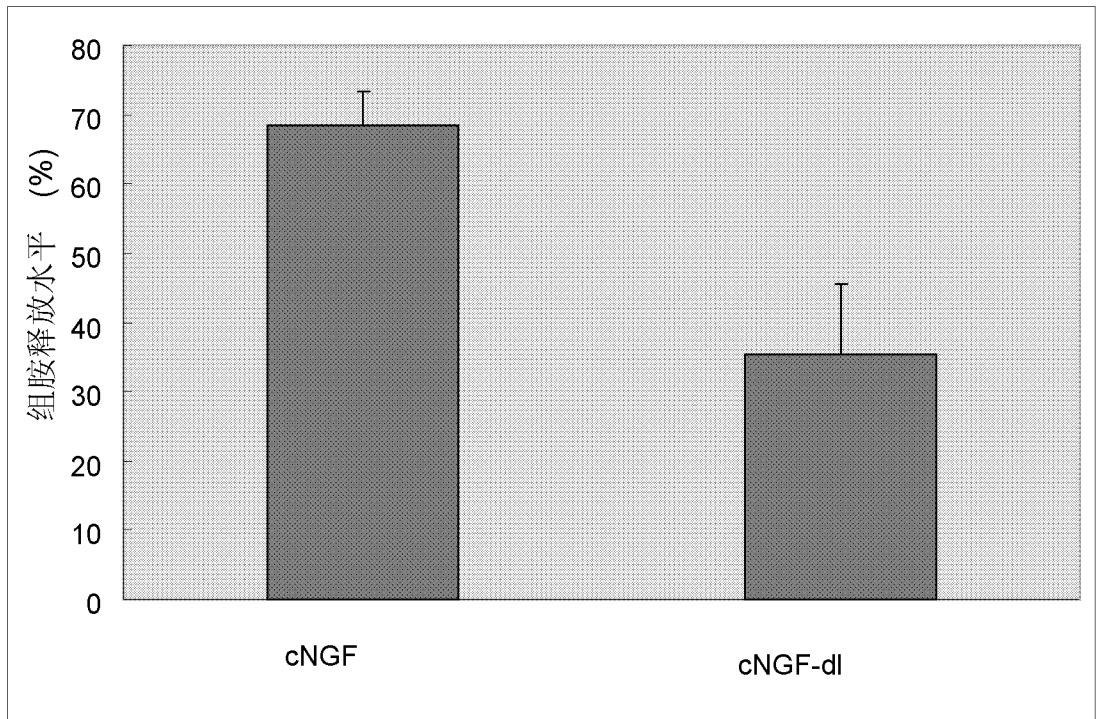


图 1

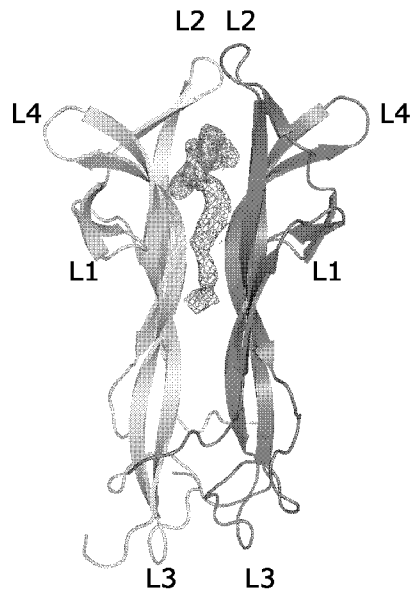


图 2

眼镜蛇毒神经生长因子 cNGF 的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 1):

EDHPVHNLGEHSVCDSVSAWVTKTATDIKGNTVTVMENVNLDNKVYKEYFFETKCKNPPEP
SGCRGIDSSHWNSYCTETDTFIKALTMEGNQASWRFIRIETACVCVITKKKGN

图 3