



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108715599 B

(45) 授权公告日 2021.11.23

(21) 申请号 201810511559.9

(22) 申请日 2018.05.24

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108715599 A

(43) 申请公布日 2018.10.30

(73) 专利权人 华南理工大学

地址 510640 广东省广州市南沙区环市大道南路25号华工大广州产研院

(72) 发明人 任娇艳 李宇娟

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

代理人 何淑珍 江裕强

(51) Int. Cl.

C07K 5/097 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

A61K 38/06 (2006.01)

A61P 19/06 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 106317178 A, 2017.01.11

CN 1341630 A, 2002.03.27

JP 2007197434 A, 2007.08.09

王守源等. 氨基酸分类与蛋白质二级结构相关性.《内蒙古大学学报(自然科学版)》.2002, 第33卷(第4期),

王守源等. 氨基酸分类与蛋白质二级结构相关性.《内蒙古大学学报(自然科学版)》.2002, 第33卷(第4期),

Yujuan Li等. Anti-hyperuricemic peptides derived from bonito hydrolysates based on invivo hyperuricemic model and in vitro xanthine oxidase inhibitory activity.《Peptides》.2018, 第107卷

审查员 梁艳莉

权利要求书1页 说明书6页

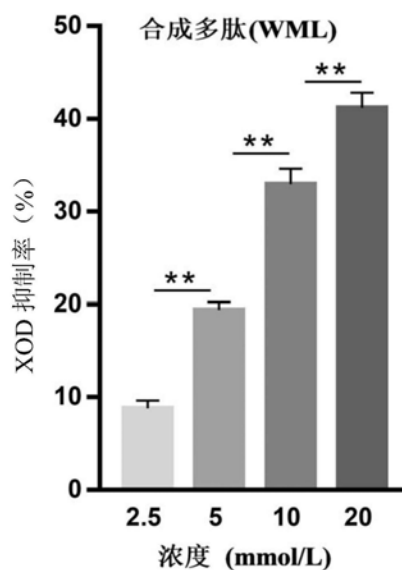
序列表1页 附图2页

(54) 发明名称

一种具有降尿酸功效的合成多肽及其制备方法与应用和编码该多肽的基因

(57) 摘要

本发明属于生物制药领域,公开一种具有降尿酸功效的合成多肽及其制备方法与应用和编码该多肽的基因。本发明所述合成多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。本发明提供一种固相合成方法合成新型降尿酸三肽,经体外降尿酸实验证明,具有显著降尿酸功效。本发明所述作用机制通过计算机分子对接模拟技术分析,结果表明疏水相互作用是本发明发挥降尿酸作用的关键。本发明可用于制备抗高尿酸血症及痛风疾病相关的药品及保健食品领域,应用范围广且安全性高,具有良好的社会经济效益。



1. 一种具有降尿酸功效的合成多肽在制备抗高尿酸血症药物中的应用, 其特征在于, 所述合成多肽的氨基酸序列为Trp-Met-Leu, 如序列表 SEQ ID No:1所示, 具有体外降尿酸活性。

2. 根据权利要求1所述的一种具有降尿酸功效的合成多肽在制备抗高尿酸血症药物中的应用, 其特征在于, 所述合成多肽的制备包括: 通过固相合成方法, 按照SEQ ID NO:1所示合成多肽的氨基酸序列, 以苄氧羰基Fmoc作为氨基酸的保护基, 从C端到N端通过逐一偶联氨基酸的方式合成, 脱除Fmoc保护基同时偶联固体树脂形成多肽树脂, 在裂解剂作用下使得外层树脂裂解, 并采用侧链保护基脱除剂去除Fmoc保护基后, 即能得到所述合成多肽。

3. 根据权利要求2所述的一种具有降尿酸功效的合成多肽在制备抗高尿酸血症药物中的应用, 其特征在于, 所述固体树脂为4-(羟甲基) 苯氧甲基聚苯乙烯树脂以共价键的形式与氨基酸的C端相连, 同时在多肽合成过程中, 可作为逐个延伸偶联接肽反应的载体。

4. 根据权利要求3所述的一种具有降尿酸功效的合成多肽在制备抗高尿酸血症药物中的应用, 其特征在于, 所述逐个延伸偶联采用的偶联剂为HOBt/HBTU混合偶联剂。

5. 根据权利要求3所述的一种具有降尿酸功效的合成多肽在制备抗高尿酸血症药物中的应用, 其特征在于, 所述裂解剂是质量浓度为20%的哌啶N, N-二甲基甲酰胺DMF溶液。

6. 根据权利要求3所述的一种具有降尿酸功效的合成多肽在制备抗高尿酸血症药物中的应用, 其特征在于, 所述侧链保护基脱除剂为三氟乙酸、酒石酸乙二胺、蒸馏水、TIS的混合溶液。

7. 根据权利要求3所述的一种具有降尿酸功效的合成多肽在制备抗高尿酸血症药物中的应用, 其特征在于, 所述合成多肽的体外降尿酸活性通过检测黄嘌呤氧化酶催化生成尿酸速率的相对抑制率进行确定。

一种具有降尿酸功效的合成多肽及其制备方法与应用和编码 该多肽的基因

技术领域

[0001] 本发明属于生物制药领域,具体涉及一种具有降尿酸功效的多肽合成方法、应用及其作用机制。

背景技术

[0002] 高尿酸血症是一种血清尿酸浓度过高导致的嘌呤代谢疾病。人体中尿酸主要以尿酸盐的形式存在,在生理条件下,女性正常血尿酸浓度为 $178.4-297.4\mu\text{mol/L}$ ($3-5\text{mg/dL}$),男性正常血尿酸浓度为 $237.9-356.9\mu\text{mol/L}$ ($4-6\text{mg/dL}$)。男性血尿酸浓度明显高于女性血尿酸浓度,当女性血清尿酸浓度高于 $360\mu\text{mol/L}$ (6mg/dL),男性血清尿酸浓度高于 $420\mu\text{mol/L}$ (7mg/dL)时为高尿酸血症。当血清尿酸浓度过高时,尿酸盐沉积在关节处,导致痛风石的形成,进而引发痛风,同时可能伴随糖尿病、高血压、心脑血管疾病、冠心病、肾脏病变等多种代谢综合症。尿酸具有抗氧化性,能直接清除体内的氧自由基、单线态氧及过氧化物,能保护人体血液中的抗坏血酸使其免于被氧化。因此,人体血清尿酸水平应维持在正常范围内。

[0003] 人体中尿酸主要由肝脏产生,在嘌呤代谢的最后一步,由黄嘌呤氧化酶(XOD)催化黄嘌呤或次黄嘌呤最终生成尿酸。尿酸产生有两种途径:一是通过嘌呤类食物的代谢(外源性),占人体内尿酸总量的20%;二是通过体内核酸类物质分解代谢产生(内源性),占总量的80%。机体合成的尿酸有2/3通过肾脏排泄,其余1/3由肠道排泄。因此,通过减少尿酸的生成和促进尿酸的分解代谢可以缓解高尿酸血症及痛风等疾病。降低尿酸生成的药物主要包括别嘌呤醇(Allopurinol)、非布司他(Febuxostat)和托匹司他(Topiroxostat)等,主要通过抑制黄嘌呤氧化酶(XOD)活性减少尿酸的生成。促进尿酸排泄的药物有丙磺舒(Probenecid)、苯溴马隆(Benzbromarone)、RDEA594等。促进尿酸分解的药物有拉布立酶(Rasburicase)、聚乙二醇尿酸酶(PEG-uricase)、培戈洛酶(Pegloticase)等。这些药物都能够降低血清尿酸水平,但同时对人体脏器官具有一定的毒副作用,易引起严重的过敏及炎症反应。因此,天然产物降尿酸物质由于毒副作用小逐渐受到研究工作者的关注。

[0004] 生物活性肽具有抗肿瘤、降血压、降血糖、抗炎症、抗氧化、抗衰老等生理功能,较蛋白质和氨基酸更易被人体吸收,且无毒副作用。但目前,有关降尿酸生物活性肽的报道相对较少,这些食物来源的活性肽具有体外黄嘌呤氧化酶抑制活性和降低高尿酸血症小鼠血清尿酸水平的功效。

[0005] 海洋鱼类酶解可得生物活性肽,刘洋等以海洋鱼蛋白为原料,响应面分析法优化酶解工艺后制得活性较好的抗痛风肽,具有显著的体外XOD抑制活性。进一步研究其作用机理发现,海洋鱼蛋白肽能够有效抑制高尿酸血症大鼠的XOD活性,并降低其肝脏中ADA和XOD mRNA的表达水平,同时具有良好的肾脏保护功效。此外,酶解液经纯化鉴定后,合成的多肽序列也具有体外黄嘌呤氧化酶抑制活性和降低高尿酸血症小鼠血清尿酸水平的作用。据报道,鲨鱼软骨水提取物中鉴定合成的18条多肽,每条多肽都含有Tyr、Trp、Phe等芳香性氨基

酸。通过高尿酸血症动物模型评价合成多肽的活性,结果表明Tyr-Leu-Asp-Asn-Tyr (YLDNY) 和Ser-Pro-Pro-Tyr-Trp-Pro-Tyr (SPPYWPY) 以静脉注射方式处理高尿酸血症大鼠后,能够显著降低其血尿酸含量,YLDNY以口服方式处理也能降低其血尿酸含量。进一步研究发现,来源于YLDNY的某些二肽或三肽,其中Asp-Asn片段具有较好的XOD抑制活性,说明YLDNY在体内可能以二肽或三肽的方式被吸收后,通过抑制XOD活性降低大鼠血清尿酸。因此,多肽作为降尿酸保健品及药物的研制具有广阔的市场前景。

发明内容

[0006] 有鉴于此,本发明提供了一种合成多肽的制备方法与应用,并通过分子对接技术分析其降尿酸的作用机制。

[0007] 为实现本发明的目的,本发明采用如下技术方案。

[0008] 一种具有降尿酸功效的合成多肽,其氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。其氨基酸序列为Trp-Met-Leu,具有体外降尿酸活性。

[0009] 其中,Trp表示英文名称为Tryptophan,中文名称为色氨酸的氨基酸相应残基;

[0010] Met表示英文名称为methionine,中文名称为甲硫氨酸的氨基酸相应残基;

[0011] Leu表示英文名称为Leucine,中文名称为亮氨酸的氨基酸相应残基。

[0012] 编码权利要求1所述合成多肽的基因,其基因序列tggatgctg,如序列表SEQ ID No:2所示。本发明提供了编码合成多肽的DNA分子。由于密码子的简并性,可能存在多种核苷酸序列。本发明所述多肽的DNA分子编码,通过选择构成所述氨基酸序列氨基酸残基的密码子,从而确定和提供所述多肽氨基酸序列的DNA分子,均为本领域技术人员利用现有方法便可制备合成的。

[0013] 制备所述一种具有降尿酸功效的合成多肽的方法,其通过固相合成方法,按照SEQ ID NO:1所示合成多肽的氨基酸序列,以苄氧羰基(Fmoc)作为氨基酸的保护基,从C端到N端通过逐一偶联氨基酸的方式合成,脱除Fmoc保护基同时偶联固体树脂形成多肽树脂,在裂解剂和侧链保护基脱除剂的作用下使得外层树脂裂解,并脱去侧链的Fmoc保护基后,即能得到所述合成多肽。

[0014] 所述多肽的固相合成方法,按照所述合成多肽氨基酸序列从C端到N端进行逐一偶联氨基酸的方式合成。

[0015] 进一步的,所述固体载体树脂为4-(羟甲基)苯氧甲基聚苯乙烯树脂(Wang树脂),以共价键的形式与氨基酸的C端相连,同时,在多肽合成过程中作为逐个延伸偶联接肽反应的载体。

[0016] 进一步的,所述逐个延伸偶联采用的偶联剂为HOBT/HBTU混合偶联剂。

[0017] 进一步的,所述裂解剂是质量浓度为20%的哌啶N,N-二甲基甲酰胺DMF溶液。

[0018] 进一步的,所述侧链保护基脱除剂为三氟乙酸、酒石酸乙二胺、蒸馏水、TIS的混合溶液。

[0019] 本发明提供的所述合成多肽能在制备抗高尿酸血症药物中的应用。

[0020] 前述应用中,体外降尿酸活性通过检测黄嘌呤氧化酶催化生成尿酸速率的相对抑制率进行确定。所述合成多肽对黄嘌呤氧化酶的抑制作用机理,采用分子对接技术来评价。

[0021] 在本发明具体实施方式中,按照SEQ ID NO:1所示序列,采用Fmoc保护基保护氨基

酸的氨基,氨基酸原料为Fmoc-Trp-OH、Fmoc-Met (trt) -OH、Fmoc-Leu (boc) -OH,以及Wang树脂进行偶联,具体地按照C端到N端的氨基酸顺序,将保护氨基酸原料和树脂进行逐一偶联,然后裂解液脱除树脂和侧链保护基,获得多肽粗品,经分离纯化后获得目标多肽。

[0022] 其中,本发明所述逐一偶联的偶联剂采用HOBt/HBTU混合偶联剂,偶联效果更优于单一偶联剂,且所述偶联剂用量优选为过量。

[0023] 本发明所述多肽制备方法中偶联方式,偶联前需对Fmoc保护的氨基酸进行脱除Fmoc处理。具体实施例中,所述脱除Fmoc的试剂为20%哌啶N,N-二甲基甲酰胺(DMF)溶液,搅拌反应时间30min,即可除去Fmoc保护基。

[0024] 作为优选,本发明所述裂解Wang树脂的裂解脱除剂优选为三氟乙酸、酒石酸乙二胺、蒸馏水和TIS的混合溶液,具体地为三氟乙酸:酒石酸乙二胺:蒸馏水:TIS=94.5:2.5:2:1的混合体系,反应时间为2h。

[0025] 此外,本发明采用体外黄嘌呤氧化酶催化反应方法检测了合成多肽的降尿酸活性,结果发现合成多肽可通过疏水相互作用和氢键相互作用与黄嘌呤氧化酶相结合,进而抑制黄嘌呤氧化酶的催化活性,具有显著降尿酸作用。

[0026] 基于上述优异的实验结果,本发明提供了所述合成多肽在制备抗高尿酸血症药物中的应用。

[0027] 在所述应用中,本发明提供了一种药物,本发明所述合成多肽与医药中可接受的各种常用辅料,如填充剂、崩解剂、润滑剂、粘合剂等混合,具体地填充剂如淀粉,乳糖,葡萄糖,甘露醇和硅酸;崩解剂如琼脂,碳酸钙,土豆淀粉或木薯淀粉,海藻酸,某些硅酸盐和碳酸钠,低取代羟丙基纤维素;润滑剂如滑石粉,硬脂酸钙,硬脂酸镁,固体聚乙二醇,月桂硫酸钠;粘合剂如羧甲基纤维素,藻酸盐,明胶,聚乙烯吡咯酮,蔗糖和阿拉伯胶。

[0028] 本发明所述多肽降尿酸药物可制备成不同剂型的药物。作为优选,本发明药物形式可制成片剂、胶囊剂、口服液、颗粒剂、丸剂、散剂等。但药物的剂型并非限于于此,本领域技术人员认为可行的剂型均在本发明的保护范围之内。

[0029] 由上述技术方案可知,本发明提供了一种具有降尿酸功效的多肽合成方法及其应用。本发明所述合成多肽其氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示,本发明所述多肽,采用Fmoc固相合成法制备。

[0030] 与现有技术相比,本发明具有如下优点和有益效果:本发明提供一种固相合成方法合成新型降尿酸三肽,经体外降尿酸实验证明,具有显著降尿酸功效。本发明所述作用机制通过计算机分子对接模拟技术分析,结果表明疏水相互作用是本发明发挥降尿酸作用的关键。本发明可用于制备抗高尿酸血症及痛风疾病相关的药品及保健食品领域,应用范围广且安全性高,具有良好的社会效益。本发明所述多肽具有很好的黄嘌呤氧化酶抑制活性,可以用于制备抗高尿酸血症及痛风等的药物,安全性高且应用范围广,具有良好的社会效益。

附图说明

[0031] 图1合成多肽的高效液相(HPLC)色谱图。

[0032] 图2合成多肽的高分辨质谱(ESI-MS)图谱。

[0033] 图3多肽的体外黄嘌呤氧化酶(XOD)抑制活性。

具体实施方式

[0034] 本发明公开了一种具有降尿酸功效多肽的制备方法、应用及其作用机制。本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及产品已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0035] 为了进一步理解本发明,下面将结合本发明实施例,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述。显然,所描述的实施例仅是本发明的部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0036] 如无特殊说明,本发明实施例中所涉及的试剂均为市售产品,均可以通过商业渠道购买获得。实验所采用的体外降尿酸实验评价方法及分子对接分析技术,均可广泛用于评价潜在药物及保健食品的降尿酸活性,为抗高尿酸血症的预防与治疗寻求更有效安全的药物提供研究方法。

[0037] 以下就本发明所提供的一种合成多肽及其合成方法和应用做进一步说明。

[0038] 实施例1:合成多肽的固相合成:

[0039] 采用Fmoc固相合成策略,以Fmoc保护的氨基酸为原料,按照氨基酸序列Trp-Met-Leu的序列特征,选用Wang树脂作为载体,HOBt/HBTU/DIEA混合偶联剂,使肽链从C端逐个向N端延伸,具体操作方案如下:

[0040] (1) 在多肽合成管中,各氨基酸的用量为0.1mol,加入0.3mol Fmoc保护氨基酸和0.0125mmol, Wang树脂,搅拌30min,使树脂充分溶胀。

[0041] (2) 在固相合成管中加入2mmol Fmoc保护的氨基酸Fmoc-Trp-OH,加入含12mmol DIEA的DMF溶液,并用20mL DMF溶液洗涤三次,即可得到Fmoc-Trp-CTC树脂。

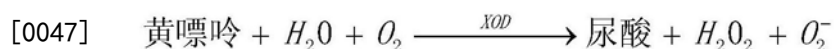
[0042] (3) 在固相合成管中加入20%哌啶DMF溶液(15mL/g),搅拌30min,使多肽树脂中的Fmoc保护基脱除。再向其中加入偶联剂HOBt 0.259g, HBTU 0.728g和DMF10mL,搅拌并活化20min反应4h后,即可得到偶联多肽树脂。

[0043] (5) 在固相合成管中加入裂解脱除剂三氟乙酸(94.5%)、酒石酸乙二胺(2.5%)、蒸馏水(2%)和TIS(1%) (体积分数)的混合液及上述所得多肽链,混合均匀后反应2h,并用DMF洗脱三次,每次1min,抽滤干燥后即获得可脱去树脂及侧链保护基的多肽粗品。

[0044] 上述操作过程均在SYMPHONY型12通道多肽合成仪中完成,反应合成的粗多肽经RP-HPLC反相高效液相色谱仪纯化后如图1所示。合成多肽最后经高分辨质谱鉴定,结果显示其纯度达到99%以上,如图2为ESI-MS质谱鉴定图谱。

[0045] 实施例2:合成多肽的体外降尿酸活性测定:

[0046] 黄嘌呤氧化酶(XOD)是尿酸合成的关键酶,抑制黄嘌呤氧化酶的活性,从而减少尿酸的生成,因此体外黄嘌呤氧化酶抑制活性可作为评价样品降尿酸活性的有效方法。在嘌呤代谢过程中,黄嘌呤氧化酶可将黄嘌呤和次黄嘌呤氧化成尿酸,其反应原理如下:



[0048] 采用96酶标仪检测板作为检测酶-底物反应体系的载体,分别将50μL待测样品,50μL 0.05U/mL的黄嘌呤氧化酶加入96酶标仪检测板中,37℃孵育10min,加入150μL

0.4mmol/L黄嘌呤溶液后,酶促反应被启动,同时记录2min内反应体系在290nm处吸光值的动力学变化,以pH 7.5PBS缓冲液做参比,酶促反应体系的初始反应速率记为 V_0 ,样品存在时酶促反应体系的初始速率记为 V_s ,按照以下公式计算样品对黄嘌呤氧化酶活性的抑制率:

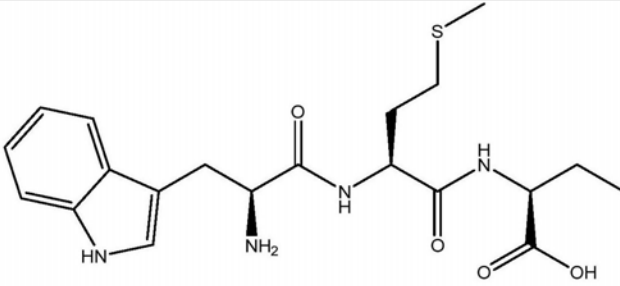
[0049] XOD抑制活性(XOD inhibitory activity,%) = $(V_0 - V_s) / V_0$

[0050] 如图3为多肽的体外黄嘌呤氧化酶(XOD)抑制活性。合成多肽的体外降尿酸实验,在黄嘌呤氧化酶-黄嘌呤反应体系中,加入不同浓度的多肽溶液,检测黄嘌呤氧化酶催化生成尿酸速率的相对抑制率。采用单因素ANOVA来评价不同浓度合成多肽对黄嘌呤氧化酶活性的影响,所有数据均采用平均值±方差表示,其中**表示 $P < 0.01$ 。合成多肽WML对黄嘌呤氧化酶的抑制活性表现出显著的剂量依赖效应,说明WML能够通过与黄嘌呤氧化酶相互作用并结合,从而抑制其催化黄嘌呤生成尿酸。

[0051] 实施例3:合成多肽对黄嘌呤氧化酶的抑制作用机理

[0052] 分子对接技术是配体与受体分子之间通过空间匹配和能量匹配而相互识别形成分子复合物的计算机模拟方法,能整体评价配体与受体之间相互作用所需能力及结合效果。分子对接模拟首先需要从蛋白质数据库(Protein data bank)中下载黄嘌呤氧化酶晶体结构,分子对接实验进行之前先去除蛋白结构中的水分子及无关配体,并通过MGL Tools加氢、加电荷得到其完整结构。配体合成多肽的3D结构下载于Mololol网站,用PyMOL软件对黄嘌呤氧化酶与配体之间的对接结果进行可视化分析,最后通过AutoDock对合成多肽与黄嘌呤氧化酶的进行计算机模拟二者相互作用,并分析其相互作用能力及类型结果。黄嘌呤氧化酶含有两个FAD、2个钼原子和8个铁原子。其中,酶中的钼原子以钼蝶呤辅因子的形式存在,是酶的活性位点,并且钼蝶呤中心的氨基酸残基形成疏水空腔。钼蝶呤中心疏水空腔内主要是由一些氨基酸残基:Phe649,Phe914,Phe1009,Asn768,Val1011,Glu802,Ser876,Lys771,Leu873,Leu1014,Arg880,Thr1010和Glu1261等包围形成。XOD抑制剂通过与这些残基结合进入疏水腔进而抑制XOD活性的发挥。为了确定多肽WML对XOD活性的抑制机制,利用分子对接研究合成多肽残基与钼蝶呤残基的结合及鉴定多肽分子是否进入活性疏水区域并发挥作用。合成多肽WML的Leu残基与黄嘌呤氧化酶Asn768残基间形成氢键为2.036 Å,且其结合能为-7.34kcal/mol,基本接近于临床黄嘌呤氧化酶抑制剂别嘌呤醇。合成多肽WML含有三个疏水氨基酸:Trp、Met、Leu,虽然其与黄嘌呤氧化酶直接只形成一个氢键,却表现出很好的亲和力,说明促使WML进入黄嘌呤氧化酶活性疏水区域的作用力除氢键相互作用力,其中主要发挥作用的为疏水相互作用力。

[0053] 表1

	合 成		分	L
	多肽	分子结构式	子量	og P
[0054]	WML		448 .21	0 .57

[0055] 表1为合成多肽的分子结构式及LogP值,由表1可知,LogP(>0为亲水性;<0为疏水性)值为负值,WML为疏水性多肽,说明在WML与黄嘌呤氧化酶之间存在疏水相互作用和氢键相互作用。WML与黄嘌呤氧化酶的结合能为-7.34kcal/mol,所需结合能较临床上常用黄嘌呤氧化酶抑制剂别嘌呤醇与酶相结合所需能量还低,说明WML具有很强的黄嘌呤氧化酶抑制活性,但只形成一个氢键,说明疏水相互作用成为多肽分子进入疏水空腔的主要推动力。

-
- [0001] 序列表
- [0002] <110> 华南理工大学
- [0003] <120> 一种具有降尿酸功效的合成多肽及其制备方法与应用和编码该多肽的基因
- [0004] <160> 2
- [0005] <170> SIP0SequenceListing 1.0
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 3
- [0008] <212> PRT
- [0009] <213> 人工合成(人工序列)
- [0010] <400> 1
- [0011] Trp Met Leu
- [0012] 1
- [0013] <210> 2
- [0014] <211> 9
- [0015] <212> DNA
- [0016] <213> 人工合成(人工序列)
- [0017] <400> 2
- [0018] tggatgctg 9

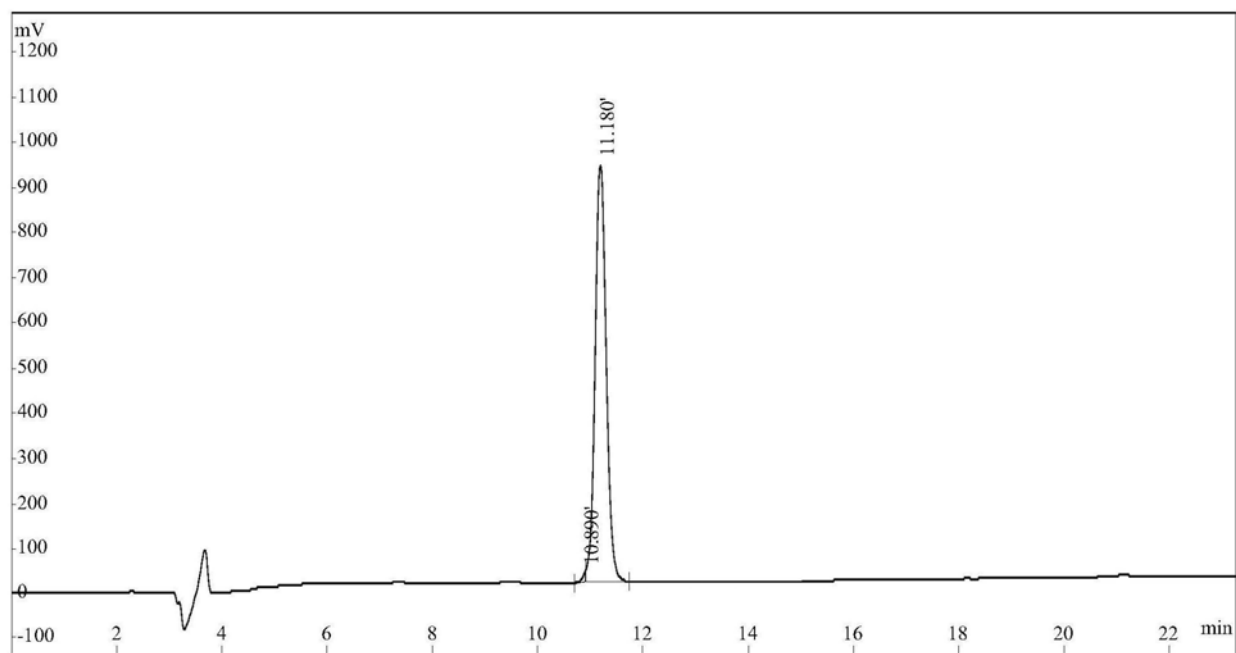


图1

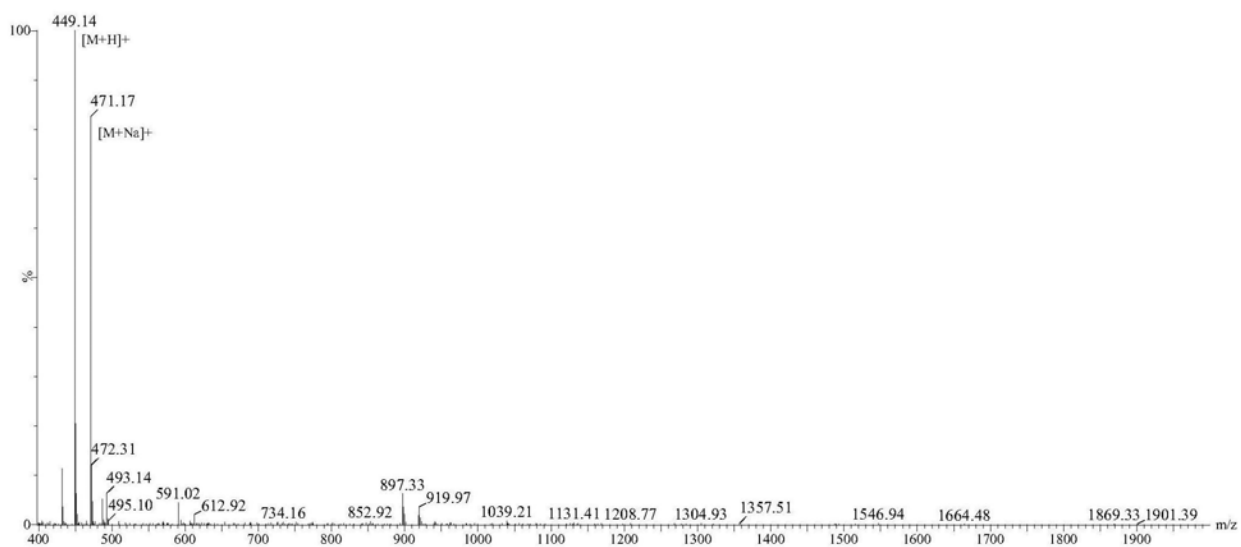


图2

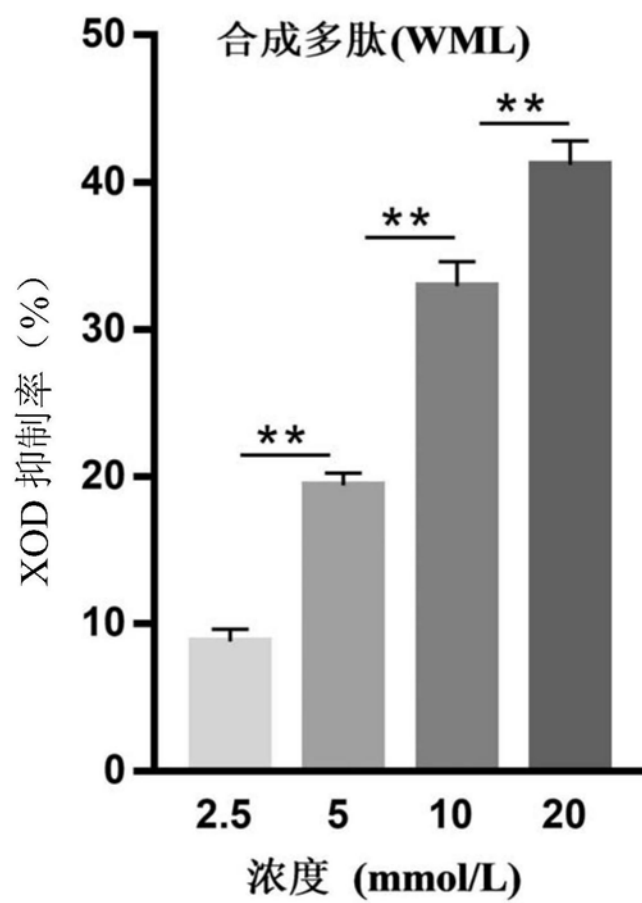


图3