



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106589135 B

(45)授权公告日 2018.08.28

(21)申请号 201611052825.3

C07K 1/04(2006.01)

(22)申请日 2016.11.25

C07K 1/06(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

A61K 47/64(2017.01)

申请公布号 CN 106589135 A

A61K 38/10(2006.01)

A61P 31/04(2006.01)

(43)申请公布日 2017.04.26

审查员 李有朝

(73)专利权人 东北农业大学

地址 150030 黑龙江省哈尔滨市香坊区木材街59号东北农业大学动物营养研究所

(72)发明人 单安山 徐林 丑淑丽 王家俊

(74)专利代理机构 哈尔滨市哈科专利事务所有

限责任公司 23101

代理人 吴振刚

(51)Int.Cl.

C07K 19/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

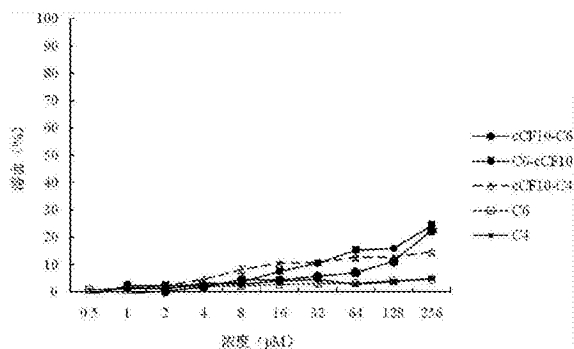
序列表1页 附图1页

(54)发明名称

一种靶向抗菌肽及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明公开一种靶向抗菌肽及其制备方法和应用,其靶向抗菌肽cCF10-C4的序列如序列表SEQ ID No.1所示。制备方法以粪肠球菌作为目标菌设计得到靶向抗菌肽cCF10-C4,通过杂合的方式构建了一系列对粪肠球菌具有选择性的多结构域抗菌肽分子。该系列抗菌肽的分子设计主要包含两个独立的功能区域,分别为杀菌区域和识别区域。该抗菌肽对目标菌具有靶向选择能力。靶向抗菌肽cCF10-C4有利于治疗后重建微生态平衡。



1. 一种靶向抗菌肽cCF10-C4, 其特征在于, 其序列如序列表SEQ ID No.1所示。
2. 一种靶向抗菌肽cCF10-C4的制备方法, 其特征在于, 方法如下:
 - (1) 以广谱抗菌肽C6作为母肽, 选用对粪肠球菌具有特异性识别作用的信息素cCF10作为识别区域, 以GGG作为连接体来连接这两个功能区域, 设计得到了对目标菌具有选择性的抗菌肽cCF10-C6;
 - (2) 用带负电荷E替换cCF10-C6活性中心第16位的K来降低净正电荷数, 设计得到对目标菌具有特异性的靶向抗菌肽cCF10-C4;
 - (3) 采用固相化学合成法通过多肽合成仪得到cCF10-C4肽树脂, 将得到的肽树脂经过TFA切割后, 得到一条多肽, 序列如序列表SEQ ID No.1所示;
 - (4) 经过反相高效液相色谱纯化和质谱鉴定后, 即完成多肽的制备。
3. 根据权利要求1所述一种靶向抗菌肽cCF10-C4在制备靶向抗粪肠球菌药物中的应用。

一种靶向抗菌肽及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种靶向抗菌肽及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 抗菌肽是存在于生物体天然免疫防御系统中的一类小分子多肽,参与机体的免疫防御功能,是机体抵御病原微生物侵袭的第一道屏障。抗菌肽通常由12-50个氨基酸残基组成,分子量小于10kDa,其共性特征是含有带正电荷的氨基酸和疏水性氨基酸,具有两亲性和阳离子性,对多种细菌、真菌、病毒、寄生虫甚至是癌细胞都有杀灭或抑制作用。

[0003] 但是抗菌肽与传统抗生素相同多为广谱抗菌药物,不仅对微生物耐药性突变产生了极大的选择性压力。更重要的是,广谱抗菌药物在杀灭病原菌的同时也杀死了有益的正常菌群,对微生态平衡造成严重的破坏,引发临床上常见的继发性感染等抗生素相关的并发症,导致了病情进一步恶化、延长治疗周期等严重的负面后果。因此,目前特别需要一类对病原菌具有选择性的“智能型”靶向抗菌药物,可以在杀灭致病菌的同时,对微生态环境造成最小地破坏,这将有利于重建微生态平衡,为机体提供长期保护。

发明内容

[0004] 基于以上不足之处,本发明的目的在于提供一种靶向抗菌肽cCF10-C4及其制备方法和应用,该抗菌肽对目标菌具有靶向选择能力。

[0005] 本发明的目的通过如下技术实现:一种靶向抗菌肽cCF10-C4,其序列如序列表SEQ ID No.1所示。

[0006] 本发明还具有如下技术特征:

[0007] 1、一种靶向抗菌肽cCF10-C4的制备方法如下:

[0008] (1)以广谱抗菌肽C6作为母肽,选用对粪肠球菌具有特异性识别作用的信息素cCF10作为识别区域,以GGG作为连接体来连接这两个功能区域,设计得到了对目标菌具有选择性的抗菌肽cCF10-C6;

[0009] (2)用带负电荷E替换cCF10-C6活性中心第16位的K来降低净正电荷数,设计得到对目标菌具有特异性的靶向抗菌肽cCF10-C4;

[0010] (3)采用固相化学合成法通过多肽合成仪得到cCF10-C4肽树脂,将得到的肽树脂经过TFA切割后,得到一条多肽;

[0011] (4)经过反相高效液相色谱纯化和质谱鉴定后,即完成多肽的制备。

[0012] 2、如上所述一种靶向抗菌肽cCF10-C4,在制备靶向抗菌药物中的应用。

[0013] 通过本方法制备的抗菌肽的实验技术简单,对得到的抗菌肽进行抗菌和溶血活性检测,发现cCF10-C4可特异性杀灭粪肠球菌,对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、大肠杆菌、鸡白痢沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌没有抑制作用,表现出精准的靶向特异性,而且具有很低的溶血活性。综上所述,cCF10-C4是一种具有较高应用价值的靶向抗菌肽,即证明该方法对于设计精准靶向抗菌肽效果显著。

附图说明

[0014] 图1是抗菌肽的溶血活性结果图。

具体实施方式

[0015] 下面结合实施例及附图对本发明作进一步详细的描述,但本发明的实施方式不限于此。

[0016] 实施例1

[0017] 本实施例结合信息素标记技术及优化正电荷数两种方法达到最优的对目标菌的特异性的效果,以粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) 作为目标菌设计得到抗菌肽cCF10-C4,通过杂合的方式构建了一系列对粪肠球菌具有选择性的多结构域抗菌肽分子。该系列抗菌肽的分子设计主要包含两个独立的功能区域,分别为杀菌区域和识别区域。

[0018] 抗菌肽的设计

[0019] 以广谱抗菌肽C6作为母肽,选用对粪肠球菌具有特异性识别作用的信息素cCF10作为识别区域,以GGG作为连接体来连接这两个功能区域,设计得到了对目标菌具有选择性的抗菌肽cCF10-C6,在此基础上用带负电荷E替换cCF10-C6活性中心第16位的K来降低净正电荷数,从而进一步提高靶向抗菌肽对目标菌的特异性,设计得到对目标菌具有特异性的靶向抗菌肽cCF10-C4。抗菌肽的氨基酸序列如表1所示。

[0020] 表1 抗菌肽的氨基酸序列

[0021]

肽	氨基酸序列	分子量	电荷数
cCF10-C4	LVTLVFGGGWKWKWENGKWKWKW-NH ₂	3019.59	+4

[0022] 实施例2

[0023] 固相化学合成法合成信息素标记抗菌肽

[0024] 1、抗菌肽的制备从C端到N端逐一进行,通过多肽合成仪来完成。首先将Fmoc-X (X是每个抗菌肽的C端第一个氨基酸) 接入到Wang树脂,然后脱去Fmoc基团后得到X-Wang树脂;再将Fmoc-Y-Trt-OH (9-苄氧羰基-三甲基-Y, Y为每个抗菌肽C端第二个氨基酸);按照这个程序依次从C端合成到N端,直至合成完毕,得到脱去Fmoc基团的侧链保护的树脂;

[0025] 2、在上述得到的肽树脂中,加入切割试剂,20℃避光下反应2h,过滤;沉淀TFA (三氟乙酸) 洗涤,将洗液与上述滤液混合,旋转蒸发仪浓缩,再加入10倍左右体积的预冷无水乙醚,-20℃沉淀3h,析出白色粉末物,以2500g离心10min,收集沉淀,再用无水乙醚洗涤沉淀,真空干燥,得到多肽,其中切割试剂由TFA、水和TIS (三异丙基氯硅烷) 按照质量比95:2.5:2.5混合而成;

[0026] 3、使用0.2mol/L硫酸钠 (磷酸调节至pH7.5) 进行柱平衡30min,用90%乙腈水溶液溶解多肽,过滤,C18反相常压柱,采用梯度洗脱 (洗脱剂为甲醇和硫酸钠水溶液按照体积比为30:70~70:30混合),流速为1mL/min,检测波为220nm,收集主峰,冻干;再利用反相C18柱进一步纯化,洗脱液A为0.1%TFA/水溶液;洗脱液B为0.1%TFA/乙腈溶液,洗脱浓度为25%

B~40%B,洗脱时间为12min,流速为1mL/min,再同上收集主峰,冻干;

[0027] 4、抗菌肽的鉴定:将上述得到的抗菌肽经过电喷雾质谱法分析,抗菌肽的纯度大于95%。

[0028] 实施例3

[0029] 抗菌肽活性的测定

[0030] 1、抗菌活性的测定:将抗菌肽配置成为一定储存液以备使用。利用微量肉汤稀释法测定几种抗菌肽的最小抑菌浓度。以0.01%乙酸(含0.2%BSA)作为稀释液,使用二倍稀释法依次配置系列梯度的抗菌肽溶液。取上述溶液100 μ L置于96孔细胞培养板中,然后分别添加等体积的待测菌液($\sim 10^5$ 个/mL)于各孔中。分别设置阳性对照(含有菌液而不含有抗菌肽)和阴性对照(既不含菌液也不含肽)。37 $^{\circ}$ C恒温培养20h,以肉眼未见孔底部有混浊现象的即为最小抑菌浓度。结果如表2所示。

[0031] 表2 抗菌肽的抑菌活性

[0032]

肽	最小抑菌浓度 (μ M)					
	革兰氏阳性菌			革兰氏阴性菌		
	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. Pullorum</i>	<i>E. coli</i>
	29212	29213	12228	7731	7913	25922
cCF10	>128	>128	>128	>128	>128	>128
C6	16	4	8	8	4	2
cCF10-C6	4	32	32	>128	16	4
C4	64	32	32	32	8	2
cCF10-C4	8	>128	>128	>128	>128	>128
random-C4	>128	>128	>128	>128	>128	>128

[0033] 通过表2可以看出,信息素cCF10没有抑菌活性,而抗菌肽C6具有广谱抗菌活性,连接cCF10可提高抗菌肽对粪肠球菌(*E. faecalis*)的抑菌活性,而对其他非靶标菌的抑菌活性均表现出明显降低;当正电荷数降低至4时(cCF10-C4),丧失了对所有非目标菌株的抑菌能力,但对*E. faecalis*的抑菌活性没有明显变化,表现出精准的靶向特异性。

[0034] 2、溶血活性的测定:采集人的新鲜血液1mL,肝素抗凝后溶解到2mLPBS溶液中,1000g离心5min,收集红细胞;用PBS洗涤3遍,再用10mL PBS重悬;取50 μ L红细胞悬液与50 μ L用PBS溶解的不同浓度的抗菌肽溶液混合均匀,在37 $^{\circ}$ C培养箱内恒温孵育1h;1 h后取出,4 $^{\circ}$ C、1000g离心5min;取出上清液用酶标仪在570nm处测光吸收值;每组取平均值,并比较分析。其中50 μ L红细胞加50 μ LPBS作为阴性对照;50 μ L红细胞加50 μ L0.1%Tritonx-100作为阳性对照。最小溶血浓度是抗菌肽引起10%溶血率时的抗菌肽浓度。结果如图1所示。如图可以看出,与母肽相比连接信息素cCF10后的抗菌肽溶血活性略有提高,但cCF10-C4在最大测定浓度256 μ M下引起的溶血率仍低于15%,说明该抗菌肽具有较低的细胞毒性。

[0035] 以上结果表明,本发明设计得到的靶向抗菌肽cCF10-C4可特异性杀灭粪肠球菌,对大肠杆菌、葡萄球菌等无作用。同时表现出较低的细胞毒性,具有开发成靶向抗粪肠球菌药物的潜力。

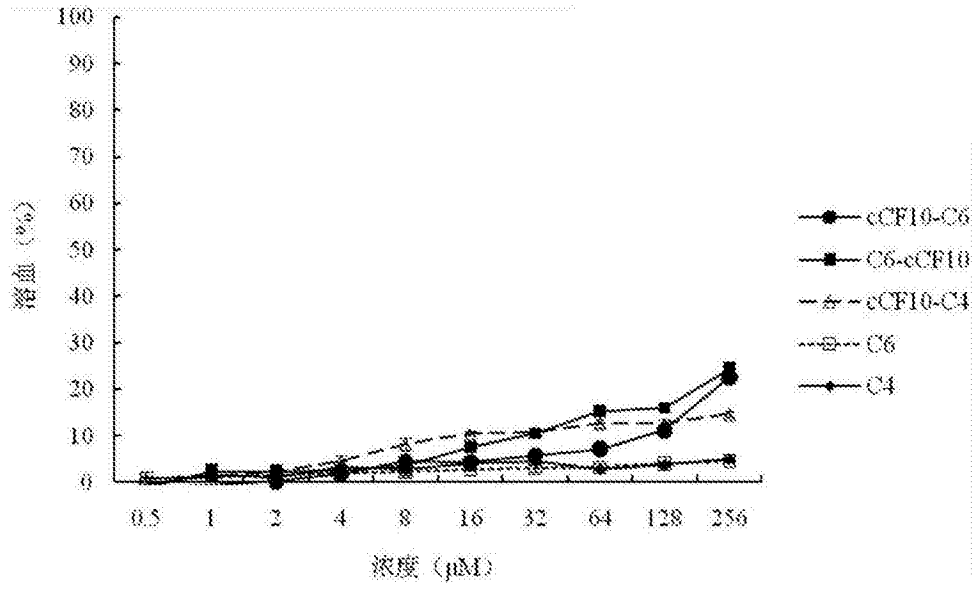


图1