



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 117924424 B

(45) 授权公告日 2024.07.02

(21) 申请号 202311717868.9

A61K 38/10 (2006.01)

(22) 申请日 2023.12.14

A61P 31/04 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 117924424 A

(56) 对比文件

CN 117924423 A, 2024.04.26

(43) 申请公布日 2024.04.26

Changxuan Shao 等. "Novel design of simplified β -hairpin antimicrobial peptide as a potential food preservative based on Trp-pocket backbone". 《Food Chem》. 2024, 第448卷 doi: 10.1016/j.foodchem.2024.139128.

(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长江路600号东北农业大学

(72) 发明人 邵长轩 王袁梦雪 王梦成

付艳雪 张少华 单安山

审查员 蒲恒

(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

专利代理师 孟策

(51) Int. Cl.

C07K 7/08 (2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

序列表(电子公布) 附图2页

(54) 发明名称

基于D型氨基酸跨链交互作用的 β -发卡抗菌肽及制备方法和应用

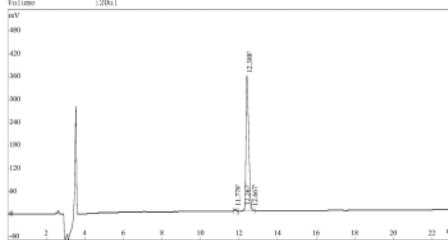
(57) 摘要

本发明公开一种基于D型氨基酸跨链交互作用的 β -发卡抗菌肽及制备方法和应用,属于生物工程领域。该抗菌肽序列如SEQ ID No.1所示。本发明基于 β -发卡抗菌肽的排布,利用D-色氨酸和D-异亮氨酸之间产生的跨链交互作用来辅助PG转角单元形成的 β -发卡抗菌肽的结构,设计得到抗菌肽命名为wiFRPG;并公开了该抗菌肽在制备治疗由革兰氏阴性菌或/和革兰氏阳性菌引起的感染性疾病的药物中应用。该抗菌肽对多种细菌具有极强的抑菌活性和可忽略不计的溶血,治疗指数达到269.47,此外,在多种生理环境和高浓度蛋白酶条件下具有较高的稳定性,该抗菌肽具有较强替代抗生素的潜力。

HPLC REPORT

Product Name : 11.FwR3RPGwR3F-NH2 FF-12-NH2
Lot No : SP230316-931062145
Column : Gemini-NX C18 110, 4.6*250mm
Solvent A : 0.1% Trifluoroacetic in 100% Acetonitrile
Solvent B : 0.1% Trifluoroacetic in 100% Water
Gradient : A B
0.0min 20% 80%
25min 45% 55%
35.0min 100% 0%
36min Stop

Flow rate : 1.0ml/min
Wavelength : 220nm
Volume : 20ul



Rank	Time	Conc.	Area	Height
1	11.778	0.7360	24772	3818
2	12.267	0.8252	27776	6463
3	12.388	96.7963	3258139	351592
4	12.687	1.6125	53285	4130
Total		100	3365972	366003

1. 一种基于D型氨基酸跨链交互作用的 β -发卡抗菌肽wiFRPG,其特征在于,氨基酸序列如SEQ ID No.1所示,含有PG转角单元,C端采用氨基酰胺化,序列中的色氨酸和异亮氨酸均为D型氨基酸。

2. 根据权利要求1所述的一种基于D型氨基酸跨链交互作用的 β -发卡抗菌肽wiFRPG的制备方法,其特征在于,方法如下:肽链采用PG转角单元,在肽链的两端各放置一个苯丙氨酸增加多肽的疏水性,基于 β -发卡两亲肽的排布,通过D型色氨酸和D型异亮氨酸之间的跨链交互作用来辅助PG转角单元形成稳定 β -发卡结构的力,同时还增加了抗酶解能力,得到该多肽的氨基酸序列如SEQ ID No.1所示,序列中的色氨酸和异亮氨酸均为D型氨基酸,然后采用固相化学合成法合成该多肽,再对多肽进行抑菌活性检测、细胞毒性检测、溶血活性检测、盐稳定性的测定以及蛋白酶对抗菌活性影响测定,最后命名为抗菌肽wiFRPG。

3. 根据权利要求1所述的一种基于D型氨基酸跨链交互作用的 β -发卡抗菌肽wiFRPG在制备治疗由革兰氏阴性菌或/和革兰氏阳性菌引起的感染性疾病的药物中应用。

4. 根据权利要求3所述的应用,所述的革兰氏阴性菌包括:大肠杆菌、绿脓杆菌和鼠伤寒沙门氏菌。

5. 根据权利要求3所述的应用,所述的革兰氏阳性菌包括:金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌和粪肠球菌。

基于D型氨基酸跨链交互作用的 β -发卡抗菌肽及制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种基于D型氨基酸跨链交互作用的 β -发卡抗菌肽及制备方法和应用。

背景技术

[0002] 由于人们长期大规模滥用抗生素,导致抗生素耐药性问题已经对人类健康、农业生产以及粮食安全产生了严重威胁,在此情况下,新型抗菌剂的开发日渐紧迫。抗菌肽(Antimicrobial peptides,AMPs)是天然免疫的重要组成成分,广泛分布于昆虫、哺乳动物、两栖动物、鱼类、植物和细菌中,并且根据其不同的靶向目标,AMPs可以分为抗病毒肽、抗细菌肽、抗真菌肽、抗寄生虫肽。与抗生素不同,AMPs主要与细菌细胞膜阴离子成分发生静电吸附作用并破坏细胞膜,使细胞质成分泄露,进而导致细胞死亡。这种作用方式使其难以产生耐药性,因此被视为最有潜力的抗生素替代物之一。

[0003] AMPs在临床开发中最关键的障碍之一是它们在血清和生理盐条件下的稳定性差以及对蛋白水解酶消化的敏感性。其中最后一种是特别关键的,因为它降低了AMPs的口服生物利用度。多年来,许多策略已经被用来增强AMPs的蛋白水解抗性,其中D-氨基酸的取代是一种常见的策略。由于D-氨基酸的商业可用性高,制造成本低,其已被广泛用于解决AMPs的抗蛋白酶降解问题。有D-氨基酸取代的AMPs一般都能表现出与亲本肽相差无几的抗菌活性和溶血活性,但比起亲本肽却具有更好的蛋白酶稳定性,如胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶。虽然用D-氨基酸取代多肽中的L-氨基酸可以有效地增强蛋白酶稳定性,但过度的取代也会带来潜在的风险,比如表现出过高的溶血活性。因此需要使用合适的修饰来提高体内稳定性,保持生物活性,并且保持较低的毒性,以期收获高效安全、稳定可靠、价格低廉的AMPs产品。

发明内容

[0004] 基于以上不足之处,本发明提供一种基于D型氨基酸跨链交互作用的 β -发卡抗菌肽wiFRPG,以解决抗菌肽蛋白酶稳定性差的问题。

[0005] 本发明所采用的技术方案如下:一种基于D型氨基酸跨链交互作用的 β -发卡抗菌肽wiFRPG,氨基酸序列如SEQ ID No.1所示,含有PG转角单元,C端采用氨基酰胺化,序列中的色氨酸和异亮氨酸均为D型氨基酸。

[0006] 本发明的目的是提供如上所述的一种基于D型氨基酸跨链交互作用的 β -发卡抗菌肽wiFRPG的制备方法,方法如下:肽链采用PG转角单元,在肽链的两端各放置一个苯丙氨酸增加多肽的疏水性,基于 β -发卡两亲肽的排布,通过D型色氨酸和D型异亮氨酸之间的跨链交互作用来辅助PG转角单元形成稳定 β -发卡结构的力,同时还增加了抗酶解能力,得到该多肽的氨基酸序列如SEQ ID No.1所示,然后采用固相化学合成法合成该多肽,再对多肽进行抑菌活性检测、细胞毒性检测、溶血活性检测、盐稳定性的测定以及蛋白酶对抗菌活性影响测定,最后命名为抗菌肽wiFRPG。

[0007] 本发明的另一目的在于提供如上所述一种基于D型氨基酸跨链交互作用 β -发卡抗菌肽wiFRPG在制备治疗由革兰氏阴性菌或/和革兰氏阳性菌引起的感染性疾病的药物中应用。

[0008] 进一步的,所述的革兰氏阴性菌包括:大肠杆菌、绿脓杆菌和鼠伤寒沙门氏菌。

[0009] 进一步的,所述的革兰氏阳性菌包括:金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌和粪肠球菌。

[0010] 本发明的有益效果及优点:本发明的抗菌肽wiFRPG的序列长度短,结构稳定,不易被蛋白酶降解。对合成的抗菌肽wiFRPG进行抗菌、溶血、酶稳定性及盐稳定性检测,发现抗菌肽wiFRPG对于大肠杆菌、绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌、表皮葡萄球菌、粪肠球菌等多种菌株均能表现出很好的抑制作用,包括对十种细菌的最小抑菌浓度的几何平均数达到了 $3.80\mu\text{M}$,并且具有很低的溶血活性,在高浓度蛋白酶条件下依旧能够保持优异稳定性。综上所述,抗菌肽wiFRPG是一种具有较高应用价值的抗菌肽。

附图说明

[0011] 图1为抗菌肽wiFRPG的高效液相色谱图;

[0012] 图2为抗菌肽wiFRPG的质谱图。

具体实施方式

[0013] 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。

[0014] 实施例1

[0015] 抗菌肽的设计

[0016] 在序列的N端和C端各放置一个苯丙氨酸增加抗菌肽的疏水性,基于 β -发卡两亲肽的排布,通过D-色氨酸和D-异亮氨酸之间的跨链交互作用来辅助PG转角单元形成的 β -发卡抗菌肽的结构,同时还增加了抗酶解能力,得到该抗菌肽的氨基酸序列如SEQ ID No.1所示,命名为抗菌肽wiFRPG,其氨基酸序列如表1所示。

[0017] 表1多肽wiFRPG的氨基酸序列

	肽	氨基酸序列	分子量 (Dalton)
[0018]	wiFRPG	Phe D-Trp Arg D-Ile Arg Pro Gly Arg D-Trp Arg D-Ile Phe -NH ₂	1689.02

[0019] 抗菌肽wiFRPG序列长度为12个氨基酸,转角单元为PG单元,通过D-Trp和D-Ile进行跨链交互稳定 β -发卡结构。以这种方法设计的抗菌肽在具有高效的抑菌活性和较低的溶血活性的同时还具有极好的蛋白酶稳定性。

[0020] 实施例2

[0021] 固相化学合成法合成抗菌肽wiFRPG

[0022] 1、AMPs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;

[0023] 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;

[0024] 3、使用0.2mol/L硫酸钠(磷酸调节至pH 7.4)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;

[0025] 4、抗菌肽的鉴定:将上述得到的AMPs经过电喷雾质谱法分析,质谱图中显示的分子量(如图2所示)与表1中的理论分子量基本一致,抗菌肽的纯度大于95%(如图1所示)。

[0026] 实施例3

[0027] 抗菌肽wiFRPG抗菌活性测定

[0028] 1、抗菌活性的测定:测定抗菌肽最小抑菌浓度所用方法是肉汤稀释法。将细菌放置在MHB培养基中,在37℃、220rpm摇床中恒定摇动孵育过夜,第二天转移至新的MHB后继续放入摇床孵育4小时直至生长对数期。用0.2%BSA(含0.01%乙酸)利用倍比稀释法稀释肽溶液,取上述溶液50μL置于96孔细胞培养板中,然后分别添加等体积的待测菌液(~10⁶CFU/mL)于各孔中。只含有菌液不含肽溶液的作为阳性对照,不含菌液也不含肽溶液的作为阴性对照。在37℃培养箱中孵育18h,然后用酶标仪观察并测量492nm的光密度,在视觉和分光光度法下均未观察到微生物生长的抗菌肽浓度为抗菌肽的最小抑菌浓度。检测结果如表2所示。

[0029] 表2抗菌肽wiFRPG的抑菌活性(μM)

[0030]

菌株	wiFRPG
----	--------

	革兰氏阳性菌	
	<i>S. aureus</i> 29213	2.0
	<i>S. aureus</i> 25923	4.0
	<i>S. aureus</i> 43300	2.0
	<i>E. faecalis</i> 29212	2.0
	<i>S. epidermidis</i> 12228	4.0
[0031]	革兰氏阴性菌	
	<i>E. coli</i> 25922	2.0
	<i>E. coli</i> UB 1005	4.0
	<i>P. aeruginosa</i> 27853	16.0
	<i>S. typhimurium</i> 14028	4.0
	<i>S. typhimurium</i> 7731	4.0

[0032] 通过表2可以看出,抗菌肽wiFRPG对于革兰氏阳性菌和阴性菌均表现出较高的抑菌活性。

[0033] 2、溶血活性的测定:抽取身体健康人血液1mL,3000~3500rpm、4°C离心10min,弃去上清液,收集下层红细胞,使用无菌PBS溶液(pH=7.4)清洗3遍后,用10倍体积的PBS溶液重悬红细胞,之后取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,放置37°C培养箱内恒温孵育1h。0.1% Triton X-100处理的红细胞悬浮液为阳性对照,未经处理的红细胞悬液为阴性对照。离心(3000~3500rpm、4°C)10min抽取上清液转移到新的无菌96孔板中,用酶标仪观察并测量570nm的光密度。溶血率计算公式如下:溶血率(%)=[(测量值-阴性对照值)/(阳性对照值-阴性对照值)] \times 100%。最小溶血浓度是抗菌肽引起10%溶血率时的抗菌肽浓度。检测结果如表3所示。

[0034] 表3抗菌肽wiFRPG溶血活性的测定

	wiFRPG
最小抑菌浓度的几何平均数	3.80
[0035] 最小溶血浓度(μM)	>512.00
治疗指数	269.47

[0036] 如表3所示,肽wiFRPG在检测范围内均未表现出溶血活性,使用最小溶血浓度和最小抑菌浓度的几何平均数的比值计算其治疗指数,治疗指数达到269.47。

[0037] 3、盐稳定性的测定:将每种浓度(150 \times 10⁻³M NaCl,4.5 \times 10⁻³M KCl,6 \times 10⁻⁶M NH₄Cl,1 \times 10⁻³M MgCl₂,2 \times 10⁻³M CaCl₂,8 \times 10⁻⁶M ZnCl₂,4 \times 10⁻⁶M FeCl₃)的盐溶于BSA溶液中,之后步骤与抗菌活性的测定方法一致。检测结果如表4所示。

[0038] 4、评估蛋白酶对抗菌活性的影响,将肽与不同蛋白酶溶液(8mg/mL)共同孵育4小时后测定抗菌活性。检测结果如表4所示。

[0039] 表4抗菌肽wiFRPG在生理盐浓度、蛋白酶条件下对大肠杆菌25922和金黄色葡萄球菌29213的抑菌活性(μM)

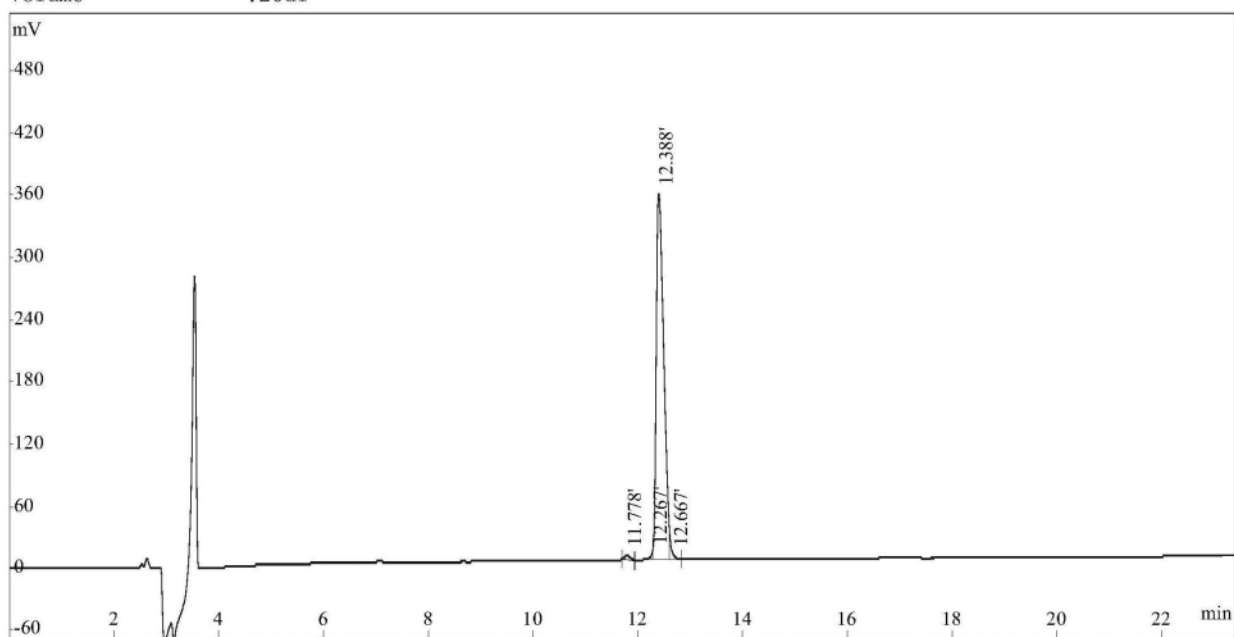
	菌株	<i>E. coli</i> ATCC25922	<i>S. aureus</i> 29213
	对照	3.3 \pm 2.4	3.0 \pm 1.0
	NaCl	6.0 \pm 2.1	14.7 \pm 3.3
	KCl	3.0 \pm 1.1	2.7 \pm 1.0
	NH ₄ Cl	2.0 \pm 0.0	3.7 \pm 0.8
	MgCl ₂	6.0 \pm 2.2	3.3 \pm 1.0
[0040]	CaCl ₂	10.7 \pm 4.1	4.0 \pm 0.0
	ZnCl ₂	2.0 \pm 0.0	3.3 \pm 1.0
	FeCl ₃	2.0 \pm 0.0	2.7 \pm 1.0
	8mg/mL 胃蛋白酶	2.6 \pm 1.0	3.3 \pm 1.0
	8mg/mL 胰蛋白酶	3.0 \pm 1.1	2.7 \pm 1.0
	8mg/mL 糜蛋白酶	2.3 \pm 0.8	2.7 \pm 1.0
	8mg/mL 蛋白酶 K	2.0 \pm 0.0	4.7 \pm 2.7

[0041] 根据表4结果可以看出,抗菌肽wiFRPG在生理浓度的盐离子水平下、8mg/mL胃、胰、糜、K蛋白酶条件下依旧保持良好的抑菌活性。

[0042] 综合以上所有结果,一种基于D型氨基酸跨链交互作用的 β -发卡抗菌肽wiFRPG具有较高的治疗指数和极强的稳定性,表明其具有较强的替代抗生素的潜力。

HPLC REPORT

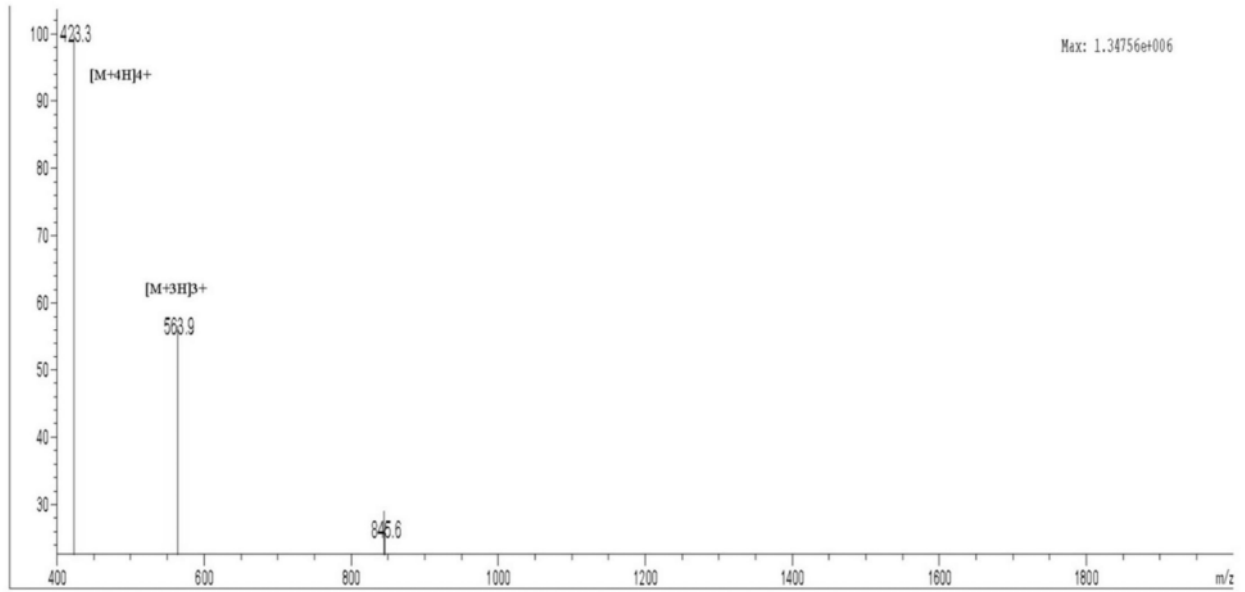
Product Name :11.FwRiRPGRwRiF-NH2 FF-12-NH2
 Lot No :P230316-SJ1062145
 Column :Gemini-NX 5 μ C18 110A, 4.6*250mm
 Solvent A :0.1%Trifluoroacetic in 100% Acetonitrile
 Solvent B :0.1%Trifluoroacetic in 100% Water
 Gradient : A B
 0.01min 20% 80%
 25min 45% 55%
 25.01min 100% 0%
 30min Stop
 Flow rate :1.0ml/min
 Wavelength :220nm
 Volume :20ul



Rank	Time	Conc.	Area	Height
1	11.778	0.7360	24772	3818
2	12.267	0.8252	27776	6463
3	12.388	96.7963	3258139	351592
4	12.667	1.6425	55285	4130
Total		100	3365972	366003

图1

MASS SPECTROMETRY REPORT



Sample Description	Instrument	Agilent-6125B		
Analyzed date: 2023-3-27	Probe:	ESI	Probe Bias:	+4.5kv
Analyst: YU	Nebulizer Gas Flow:	1.5L/min	Detector:	1.5kv
Sample: 11.FwRiRPGRwRiF-NH2 FF-12-NH2	CDL:	-20.0v	T. Flow:	0.2ml/min
M.W.: 1689.02	CDL Temp.:	250 °C	B. Conc.:	50%H2O/50%ACN
Lot. No.: P230316-SJ1062145	Block Temp.:	200 °C		

图2