

# (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局



(43) 国际公布日  
2019 年 2 月 21 日 (21.02.2019)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号  
WO 2019/033869 A1

## (51) 国际专利分类号:

A61K 38/08 (2006.01) C12P 19/26 (2006.01)

A61K 31/7016 (2006.01) C07K 7/06 (2006.01)

A61P 19/06 (2006.01) C07K 1/30 (2006.01)

LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/094613

(22) 国际申请日: 2018 年 7 月 5 日 (05.07.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

## (30) 优先权:

201710696668.8 2017 年 8 月 15 日 (15.08.2017) CN

(71) 申请人: 清华大学(TSINGHUA UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国北京市海淀区清华园 1 号, Beijing 100084 (CN)。

(72) 发明人: 邢新会(XING, Xinhui); 中国北京市清华大学化工系英士楼 607, Beijing 100084 (CN)。朱文明(ZHU, Wenming); 中国北京市清华大学化工系英士楼 607, Beijing 100084 (CN)。王怡(WANG, Yi); 中国北京市清华大学化工系英士楼 607, Beijing 100084 (CN)。何东(HE, Dong); 中国北京市清华大学化工系英士楼 607, Beijing 100084 (CN)。张翀(ZHANG, Chong); 中国北京市清华大学化工系英士楼 607, Beijing 100084 (CN)。苏楠(SU, Nan); 中国北京市清华大学化工系英士楼 607, Beijing 100084 (CN)。

(74) 代理人: 北京彩和律师事务所(BEIJING CAI HE LAW FIRM); 中国北京市海淀区大柳树路 17 号富海国际港 1902 室, Beijing 100081 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK,

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

## 本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

(54) Title: ANDRIAS DAVIDIANUS CARTILAGE PREPARATION

(54) 发明名称: 大鲵软骨制剂

(57) Abstract: Disclosed is an *Andrias davidianus* cartilage preparation. The *Andrias davidianus* cartilage enzymatic extract of the present invention is obtained by the following method, comprising obtaining cartilage from *Andrias davidianus*, proteolyzing the obtained cartilage, obtaining a supernatant after the proteolysis, and drying the supernatant. The *Andrias davidianus* cartilage enzymatic extract and an alcohol-soluble component thereof of the present invention comprises a cartilage polypeptide and have effects of lowering uric acid or treating hyperuricemia.

(57) 摘要: 公开了一种大鲵软骨制剂。本发明的大鲵软骨酶解提取物, 是通过如下方法获得的, 该方法包括: 从大鲵获取软骨, 对获取的软骨进行蛋白酶解, 以及获得蛋白酶解后的上清并对其干燥。本发明的大鲵软骨酶解提取物及其醇溶成分包括软骨多肽, 具有降低尿酸或治疗高尿酸血症的作用。



WO 2019/033869 A1

## 大鲵软骨制剂

### 5 技术领域

本发明涉及一种大鲵软骨制剂以及其用途。

### 背景技术

10 软骨中含有丰富的糖蛋白、多肽、小分子蛋白、多糖，研究发现某些动物来源的软骨提取物具有良好的抗肿瘤、抗血管生成、免疫调节、抗关节炎等活性。其中鲨鱼软骨制剂(Shark Cartilage Preparation, SCP)相关的研究尤其丰富，并作为营养补充剂在全球广为流行。然而随着鲨鱼软骨市场的发展，鲨鱼捕捞量增多，近几十年来自然界中鲨鱼种群数量剧烈下降，部分种类的鲨鱼已进入被列入了濒危物种目录。因此鲨鱼软骨的利用具有不可持续性。

15 目前市场上软骨制剂主要来源于鲨鱼软骨。随着鲨鱼软骨市场的发展，鲨鱼捕捞量增多，近几十年来自然界中鲨鱼种群数量剧烈下降，部分种类的鲨鱼已进入被列入了濒危物种目录。因此鲨鱼软骨的利用具有不可持续性。

### 发明内容

20 作为中国特有的珍稀动物，大鲵(*Andrias davidianus*)具有极高的食用、药用价值，具有极大的开发和利用潜力。野生大鲵是国家二类保护水生动物，但近二十年来大鲵人工驯养繁殖技术逐渐成熟，大鲵产业迅速发展，在陕西、湖南、河南、四川等多个省份和地区已经形成较大规模的养殖大鲵产业和市场，这为利用大鲵软骨提取有医用和保健价值的产品提供了可持续的生物资源，同时大鲵软骨制剂的开发也有利于大鲵产业向高值化方向发展。

25 具体来说，本发明涉及如下内容：

1. 一种大鲵软骨酶解提取物，其包括：

大鲵硫酸软骨素，以及

软骨多肽粗提物。

30 2. 如项 1 所述的大鲵软骨酶解提取物，其中，所述大鲵硫酸软骨素含有非硫酸化的二糖(CS-O)，C6 位硫酸化二糖(CS-C)，以及 C4 位硫酸化二糖

(CS-A)。

3. 如项 1 或 2 所述的大鲛软骨酶解提取物, 其中, 所述大鲛硫酸软骨素由非硫酸化的二糖(CS-O), C6 位硫酸化二糖(CS-C), 以及 C4 位硫酸化二糖(CS-A)组成。

5        4. 如项 1~3 中任一项所述的大鲛软骨酶解提取物, 其中, 所述大鲛硫酸软骨素的重均分子量(Mw)为 40kDa 以上, 优选为 45kDa 以上, 更优选为 48kDa 以上, 最优选为 49.2kDa。

10       5. 如项 1~4 中任一项所述的大鲛软骨酶解提取物, 其中, 所述软骨多肽粗提物包含 TGPLGPSPGP、HDLPLPLPE、DNLPLPK 和 VPSGPLGPEGPR 中的一种或多种。

6. 如项 1~5 中任一项所述的大鲛软骨酶解提取物, 其中, 所述大鲛硫酸软骨素占大鲛软骨酶解提取物总量的 15 质量%~30 质量%, 所述软骨多肽粗提物占大鲛软骨酶解提取物总量的 70 质量%~85 质量%。

15       7. 如项 1~6 任一项所述的大鲛软骨酶解提取物, 其是通过如下方法获得的, 该方法包括:

      从大鲛获取软骨,  
      对获取的软骨进行蛋白酶解, 以及  
      获得蛋白酶解后的上清并对其进行干燥。

20       8. 一种大鲛软骨酶解提取物的醇溶组分, 其为软骨多肽粗提物, 且包含 TGPLGPSPGP、HDLPLPLPE、DNLPLPK 和 VPSGPLGPEGPR 中的一种或多种。

25       9. 如项 8 所述的醇溶组分, 其是通过如下方法获得的, 该方法包括:  
      从大鲛获取软骨,  
      对获取的软骨进行蛋白酶解,  
      获得蛋白酶解后的上清并对其进行干燥,  
      对蛋白酶解后的上清或其干燥物进行醇沉, 以及  
      获得上清。

10. 如项 8 或 9 所述的醇溶组分, 其具有降尿酸活性。

30       11. 一种软骨多肽, 其特征在于, 该软骨多肽为 TGPLGPSPGP、HDLPLPLPE、DNLPLPK 和 VPSGPLGPEGPR 中的一种或多种。

12. 如项 11 所述的软骨多肽, 其有抑制 XOD 酶的活性。

13. 如项 11 所述的软骨多肽, 其具有降尿酸的活性。

14. 一种大鲈软骨酶解提取物的醇沉组分, 其包括大鲈硫酸软骨素, 该大鲈硫酸软骨素含有非硫酸化的二糖(CS-O), C6 位硫酸化二糖(CS-C), 以及 C4 位硫酸化二糖(CS-A)。

5 15. 如项 14 所述的大鲈软骨酶解提取物的醇沉组分, 其中, 所述大鲈硫酸软骨素由非硫酸化的二糖(CS-O), C6 位硫酸化二糖(CS-C), 以及 C4 位硫酸化二糖(CS-A)组成。

16. 如项 14 或 15 所述的大鲈软骨酶解提取物的醇沉组分, 其中, 所述大鲈硫酸软骨素的重均分子量(Mw)为 40kDa 以上, 优选为 45kDa 以上, 更  
10 优选为 48kDa 以上, 最优选为 49.2kDa。

17. 如项 14~16 中任一项所述的大鲈软骨酶解提取物的醇沉组分, 其是通过如下方法获得的, 该方法包括:

从大鲈获取软骨,

对获取的软骨进行蛋白酶解,

15 获得蛋白酶解后的上清并对其进行干燥,

对蛋白酶解后的上清或其干燥物进行醇沉, 以及

获得沉淀部分。

18. 如项 1~7 中任一项所述的大鲈软骨酶解提取物、如项 8~10 中任一项所述的大鲈软骨酶解提取物的醇溶组分或者如项 11~13 中任一项所述的  
20 软骨多肽用于制备降低尿酸或治疗高尿酸血症或痛风的药物的用途。

19. 如项 1~7 中任一项所述的大鲈软骨酶解提取物、如项 8~10 中任一项所述的大鲈软骨酶解提取物的醇溶组分或者如项 11~13 中任一项所述的软骨多肽用于降低尿酸或治疗高尿酸血症或痛风的用途。

20. 一种获取大鲈软骨酶解提取物的方法, 其包括:

25 从大鲈获取软骨,

对获取的软骨进行蛋白酶解, 以及

获得蛋白酶解后的上清并对其进行干燥。

21. 根据项 20 所述的方法, 其中, 所述蛋白酶是碱性蛋白酶, 在 pH 9~11 的条件下进行蛋白酶解。

30 22. 一种获取大鲈软骨酶解提取物的醇溶组分的方法, 其包括:

从大鲈获取软骨,

对获取的软骨进行蛋白酶解，  
获得蛋白酶解后的上清并对其进行干燥，  
对蛋白酶解后的上清或其干燥物进行醇沉，以及  
获得上清。

5        23. 根据项 22 所述的方法，其中，所述蛋白酶是碱性蛋白酶，在 pH 9~11 的条件下进行蛋白酶解。

24. 一种获取大鲛软骨酶解提取物的醇沉组分的方法，其包括：

从大鲛获取软骨，

对获取的软骨进行蛋白酶解，

10        获得蛋白酶解后的上清并对其进行干燥，

对蛋白酶解后的上清或其干燥物进行醇沉，以及

获得沉淀部分。

25. 根据项 24 所述的方法，其中，所述蛋白酶是碱性蛋白酶，在 pH 9~11 的条件下进行蛋白酶解。

15        26. 根据项 21、23 或 25 中任一项所述的方法，其中，所述碱性蛋白酶是 2709 蛋白酶。

27. 根据项 22~26 中任一项所述的方法，其中，醇沉操作中乙醇质量浓度为 50%-90%。

28. 根据项 27 所述的方法，其中，醇沉操作中乙醇质量浓度为 70%。

20        29. 一种降低尿酸或治疗高尿酸血症或痛风的方法，其包括：

向由此需要的受试者给药如项 1~7 中任一项所述的大鲛软骨酶解提取物、如项 8~10 中任一项所述的大鲛软骨酶解提取物的醇溶组分或者如项 11~13 中任一项所述的软骨多肽。

25        本发明涉及的大鲛软骨制剂是通过蛋白酶水解大鲛软骨等方法获得的多肽类物质或大鲛硫酸软骨素与多肽的组合物，具有抗肿瘤、抗血管生成、抗炎、抗氧化、增强免疫、抗骨质疏松、抗风湿、降尿酸、抗痛风等活性。

### **具体实施方式**

30        本发明涉及的大鲛软骨酶解提取物，其包括：大鲛硫酸软骨素，以及软骨多肽粗提物。

所述大鲛硫酸软骨素占大鲛软骨酶解提取物总量的 15 质量%~30 质

量%，优选为 18 质量%~26 质量%，所述软骨多肽粗提物占大鲛软骨酶解提取物总量的 70 质量%~85 质量%，优选为 74 质量%~82 质量%。

其中，大鲛硫酸软骨素含有非硫酸化的二糖(CS-O)，C6 位硫酸化二糖(CS-C)，以及 C4 位硫酸化二糖(CS-A)，优选由非硫酸化的二糖(CS-O)，C6 5 位硫酸化二糖(CS-C)，以及 C4 位硫酸化二糖(CS-A)组成。

本发明涉及的大鲛软骨制剂其制备过程如下：

从大鲛获取软骨。

蛋白酶解：使用一种或多种蛋白酶，例如可以为胶原蛋白酶、碱性蛋白酶、链蛋白酶、胰蛋白酶或木瓜蛋白酶等，优选为碱性蛋白酶，在适宜条件 10 下对大鲛软骨进行水解反应，一段时间后加热升温，将蛋白酶灭活。

分离：对反应后溶液静置沉淀(或离心、过滤等)后获取上清。

干燥：自然干燥(或冷冻干燥、旋蒸等)除去上清中的水分即得到所需的大鲛硫酸软骨素与软骨多肽的组合物，在本发明中也简称为 GSCP。

向在分离步骤中所得上清液或干燥步骤中所得组合物中加入乙醇或乙醇溶液进行醇沉(最终溶液中乙醇含量在 50%~90%之间)，获取上清并干燥， 15 得到所需的醇溶组分，组成以多肽为主，在本发明中也称为 GSCP2。

经过进一步分析发现，醇溶组分包括具有降尿酸活性的多肽 TGPLGPSPGP、HDLPLPLPE、DNLPLPK 和 VPSGPLGPEGPR。醇沉组分的组成以大鲛硫酸软骨素(ADCS)为主。

20 本发明涉及一种大鲛软骨酶解提取物，其特征在于，其是通过如下方法获得的，该方法包括：

从大鲛获取软骨，

对获取的软骨进行蛋白酶解，以及

获得蛋白酶解后的上清并对其进行干燥。

25 本发明还涉及一种大鲛软骨酶解提取物，其特征在于，其包括：

大鲛硫酸软骨素，以及

软骨多肽粗提物。

本发明的蛋白酶优选为碱性蛋白酶，进一步优选为 2709 蛋白酶。

30 本发明还涉及一种大鲛软骨酶解提取物，其特征在于，该大鲛硫酸软骨素的重均分子量(Mw)为 49.2kDa。

本发明还涉及一种大鲛软骨酶解提取物，其特征在于，该软骨多肽粗提

物包含 TGPLGPSPGP、HDLPLPLPE、DNLPLPK 和 VPSGPLGPEGPR 中的一种或多种。

本发明涉及一种制备大鲛软骨酶解提取物的方法，其特征在于，该方法包括：

- 5        从大鲛获取软骨，  
对获取的软骨进行蛋白酶解，以及  
获得蛋白酶解后的上清并对其进行干燥。

本发明涉及一种大鲛软骨酶解提取物的醇溶组分，其特征在于，其是通过如下方法获得的，该方法包括：

- 10       从大鲛获取软骨，  
对获取的软骨进行蛋白酶解，  
获得蛋白酶解后的上清并对其进行干燥，  
对蛋白酶解后的上清或其干燥物进行醇沉，以及  
获得上清。

- 15       本发明还涉及一种大鲛软骨酶解提取物的醇溶组分，其特征在于，其为软骨多肽粗提物。

本发明还涉及一种大鲛软骨酶解提取物的醇溶组分，其特征在于，其包含 TGPLGPSPGP、HDLPLPLPE、DNLPLPK 和 VPSGPLGPEGPR 中的一种或多种。

- 20       本发明涉及一种制备大鲛软骨酶解提取物的醇溶组分的方法，其特征在于，该方法包括：

- 从大鲛获取软骨，  
对获取的软骨进行蛋白酶解，  
获得蛋白酶解后的上清并对其进行干燥，  
25       对蛋白酶解后的上清或其干燥物进行醇沉，以及  
获得上清。

本发明涉及一种软骨多肽，其特征在于，该软骨多肽为 TGPLGPSPGP、HDLPLPLPE、DNLPLPK 和 VPSGPLGPEGPR 中的一种或多种。

- 即本发明的软骨多肽，可以是 TGPLGPSPGP，可以是 HDLPLPLPE，可  
30       以是 DNLPLPK，还可以是 VPSGPLGPEGPR，以及它们任意的混合物，例如 TGPLGPSPGP 和 HDLPLPLPE 的混合物，TGPLGPSPGP 和 DNLPLPK

的混合物, TGPLGPSPGP 和 VPSGPLGPEGPR 的混合物, HDLPLPLPE 和 DNLPLPK 的混合物, HDLPLPLPE 和 VPSGPLGPEGPR 的混合物, DNLPLPK 和 VPSGPLGPEGPR 的混合物, 可以是 TGPLGPSPGP, HDLPLPLPE 和 DNLPLPK 的混合物, 可以是 HDLPLPLPE, DNLPLPK 和 VPSGPLGPEGPR 的混合物, 可以是 TGPLGPSPGP, HDLPLPLPE 和 VPSGPLGPEGPR 的混合物, 可以是 HDLPLPLPE, DNLPLPK 和 VPSGPLGPEGPR 的混合物, 可以是 TGPLGPSPGP、HDLPLPLPE、DNLPLPK 和 VPSGPLGPEGPR 的混合物。

10 本发明还涉及一种软骨多肽, 其特征在于, 该软骨多肽具有抑制 XOD 酶的活性。

本发明还涉及一种软骨多肽, 其特征在于, 该软骨多肽具有降尿酸的活性。

本发明涉及一种大鲛软骨酶解提取物的醇沉组分, 其特征在于, 其是通过如下方法获得的, 该方法包括:

15 从大鲛获取软骨,  
对获取的软骨进行蛋白酶解,  
获得蛋白酶解后的上清并对其进行干燥,  
对蛋白酶解后的上清或其干燥物进行醇沉, 以及  
获得沉淀部分。

20 本发明还涉及一种大鲛软骨酶解提取物的醇沉组分, 其特征在于, 其包括大鲛硫酸软骨素。

本发明还涉及一种大鲛软骨酶解提取物的醇沉组分, 其特征在于, 该大鲛硫酸软骨素的重均分子量(Mw)为 49.2kDa。

25 本发明涉及一种制备大鲛软骨酶解提取物的醇沉组分的方法, 其特征在于, 该方法包括:

30 从大鲛获取软骨,  
对获取的软骨进行蛋白酶解,  
获得蛋白酶解后的上清并对其进行干燥,  
对蛋白酶解后的上清或其干燥物进行醇沉, 以及  
获得沉淀部分。

本发明涉及的大鲛软骨酶解提取物或大鲛软骨酶解提取物的醇溶组分

或软骨多肽诸如 TGPLGPSPGP、HDLPLPLPE、DNLPLPK 或 VPSGPLGPEGPR 具有抑制 XOD 酶的活性。

本发明还涉及大鲛软骨酶解提取物用于制备降低尿酸或治疗高尿酸血症的药物的用途。

5 本发明还涉及大鲛软骨酶解提取物用于降低尿酸或治疗高尿酸血症的用途。

本发明还涉及大鲛软骨酶解提取物用于制备治疗痛风的药物的用途。

本发明还涉及大鲛软骨酶解提取物用于治疗痛风的用途。

10 本发明还涉及大鲛软骨酶解提取物的醇溶组分用于制备降低尿酸或治疗高尿酸血症的药物的用途。

本发明还涉及大鲛软骨酶解提取物的醇溶组分用于降低尿酸或治疗高尿酸血症的用途。

本发明还涉及大鲛软骨酶解提取物的醇溶组分用于制备治疗痛风的药物的用途。

15 本发明还涉及大鲛软骨酶解提取物的醇溶组分用于治疗痛风的用途。

本发明还涉及软骨多肽诸如 TGPLGPSPGP、HDLPLPLPE、DNLPLPK 或 VPSGPLGPEGPR 用于制备降低尿酸或治疗高尿酸血症的药物的用途。

本发明还涉及软骨多肽诸如 TGPLGPSPGP、HDLPLPLPE、DNLPLPK 或 VPSGPLGPEGPR 用于降低尿酸或治疗高尿酸血症的用途。

20 本发明还涉及软骨多肽诸如 TGPLGPSPGP、HDLPLPLPE、DNLPLPK 或 VPSGPLGPEGPR 用于制备治疗痛风的药物的用途。

本发明还涉及软骨多肽诸如 TGPLGPSPGP、HDLPLPLPE、DNLPLPK 或 VPSGPLGPEGPR 用于治疗痛风的用途。

25 因此，本发明的大鲛软骨酶解提取物及其醇溶组分包括软骨多肽，其具有降低尿酸或治疗高尿酸血症或痛风的作用。

## 附图说明

图 1 显示的是 GSCP 组分的醋酸纤维素膜电泳(HA: 透明质酸; CS: 硫酸软骨素; HP: 肝素)。

30 图 2 显示的是 ADCS、鲨鱼硫酸软骨素(SCS)和牛硫酸软骨素(BCS)的 HPGPC 谱图。

图 3 显示的是 SAX-HPLC 图谱和二糖组成: (a) ADCS; (b) BCS; (c) SCS。

图 4 显示的是 ADCS 的  $^1\text{H}$ -NMR 谱图。

图 5 显示的是总离子流图。

5 图 6 显示的是 MALDI-TOF-MS 分析结果。

图 7 显示的是 XOD 酶活检测结果。

图 8 显示的是通过高效尿酸血症动物模型评价降尿酸效果: (a)血尿酸含量; (b)肝脏 XOD 酶活。

## 10 实施例

### 实施例 1 大鲵软骨制剂的制备

将分割的带有软骨的大鲵肉放入净水中, 加热沸腾 1h, 分离出大鲵软骨 20g; 将软骨放入 500ml 烧杯, 加入 200ml 水, 2g 2709 蛋白酶(北京东华强盛生物公司, 来源地衣芽胞杆菌), pH9.5, 50℃下水解 8h, 90℃加热 10 分钟使蛋白酶灭活; 10000rpm 离心 10min 取上清; 真空冷冻干燥 48h 得到固体粉末 10.6g, 即得到大鲵软骨酶解提取物(即 GSCP)。取 5g 大鲵软骨酶解提取物, 加入 20ml 75%乙醇并充分混合, 3000rpm 离心 5 分钟离心取上清, 置于 60℃烘箱 6h 除醇之后冷冻干燥 48h, 得到醇溶组分 3.5g(即 GSCP2)。沉淀部分干燥得到大鲵硫酸软骨素 1.2g(即 ADCS)。醇沉部分占质量分数 25.5%, 醇溶部分占质量分数 74.5%。

### 实施例 2 大鲵软骨制剂的制备

分离制备软骨的大鲵(3.2kg)经过清理洗净后得到湿重为 100g 的大鲵软骨, 将软骨切成小块后使用匀浆机匀浆, 将匀浆后的软骨悬浮在 500mL 含有 2%的醋酸钠的溶液中, 用 1M 的 NaOH 调节 pH 到 10.0±0.5 范围, 之后加入 6g 的 2709 碱性蛋白酶并加热搅拌, 每隔 30min 用 1M 的 NaOH 调节 pH 到 10.0±0.5 范围, 50℃反应约 6 h 直到软骨组织完全消化, 然后将反应液加热到 100℃保持 10min 使蛋白酶失活。反应液冷却至室温后 5,000 × g 离心 15min 获取上清, 得到大鲵软骨酶解提取物(GSCP)溶液。取上清加入 3 倍体积的无水乙醇, 4℃静置过夜, 5,000 × g 离心 15min 收集沉淀, 将沉淀溶于 100mL 的去离子水后再次重复醇沉操作获取沉淀, 之后将沉淀溶于

100mL 去离子水中并使用截留量为 7kDa 的透析袋进行透析 24h, 然后进行冷冻干燥得到 4.4g 纯化的大鲛硫酸软骨素。收集两次醇沉操作的上清液, 旋蒸浓缩后进行冷冻干燥, 得到 19.0g 主要组成为大鲛软骨多肽的醇溶组分。醇沉部分占质量分数 18.8%, 醇溶部分占质量分数 81.2%。

5

### 实施例 3 醋酸纤维素膜电泳分析实施例 1 获得的 GSCP 组分的糖胺聚糖组成

醋酸纤维薄膜(7cm\*9cm)在电极缓冲液(0.1 mol/L 吡啶, 0.47 mol/L 甲酸, pH3.0)中充分浸透 30 分钟, 取出吸除多余缓冲液, 使用加样器在醋酸纤维素薄膜一端加样(10mg/ml GSCP), 以 2mg/ml 透明质酸、硫酸软骨素、肝素样品为对照, 在 DYCP-38C 型卧式水平电泳仪上以恒定电流 6mA 电泳 30 分钟, 在染色液(0.5%阿利新蓝, 2%醋酸)中染色 30 分钟, 之后使用漂洗液(2%醋酸)重复漂洗 3~5 次, 每次 20 分钟, 将漂洗后的醋酸纤维素薄膜置于可见光下观察, 结果如图 1 所示。图 1 显示 GSCP 样品中有较多含量的硫酸软骨素。

15

### 实施例 4 大鲛硫酸软骨素的表征

如前所述, 从湿重为 3.2kg 养殖大鲛分离得到了湿重为 100g 的软骨, 根据其湿干比(W/D, 5.34), 得到 CS 提取得到的软骨干重为 18.7g。经过提取、分离、纯化并冷冻干燥, 实验获得了 4.4g 的 ADCS 样品。通过 HPGPC、SAX-HPLC 分析 ADCS 以及商品来源的 BCS、SCS 的纯度、分子量分布、二糖组成、电荷密度, 结果如表 1 所示。ADCS 的纯度为 98.7%, 从大鲛软骨中提取 ADCS 收率为 23.2%(干重/干重)。

20

25

表 1 CS 的化学性质(纯度、分子量分布、二糖组成、电荷密度)

| CS 样品 | 纯度 (%) | Mn (kDa) | Mw (kDa) | 分散系数(P) | 二糖组成 |      |      |      | 电荷密度 |
|-------|--------|----------|----------|---------|------|------|------|------|------|
|       |        |          |          |         | CS-O | CS-C | CS-A | CS-D |      |
| ADCS  | 98.7   | 43.5     | 49.2     | 1.13    | 0.15 | 0.61 | 0.24 | -    | 0.85 |
| BCS   | 99.0   | 30.6     | 34.4     | 1.13    | 0.05 | 0.36 | 0.59 | -    | 0.95 |
| SCS   | 98.2   | 51.9     | 75.8     | 1.46    | 0.02 | 0.49 | 0.30 | 0.19 | 1.17 |

通过 HPGPC 分析 CS 的分子量分布, 色谱图如图 2 所示, 三种 CS 样品的分散系数均小于 1.5, 分子量分布较为集中。ADCS 的重均分子量(Mw)为

49.2kDa, 低于水生动物鲨鱼来源的 SCS 的 75.8kDa, 高于陆地动物牛来源的 BCS 的 34.4kDa。

经 ChonABC 彻底降解后通过 SAX-HPLC 分析 CS 的二糖组成, 结果如图 3 所示。ADCS 中含有 14.6% 的非硫酸化的二糖 CS-O, 60.9% 的 C6 位硫酸化二糖 CS-C, 以及 24.5% 的 C4 位硫酸化二糖 CS-A, 不含双硫酸化的二糖 CS-D。同时从表 1 可以看出, ADCS 的二糖组成和 BCS、SCS 有明显的差异。因为鲨鱼来源的 CS 由于 CS-C 的含量较高, 通常称 SCS 为 CSC, 而我们的实验结果表明 ADCS 中 CS-C 的含量高达 60% 以上, 比鲨鱼来源的 SCS 更高。同时 ADCS 中非硫酸化的二糖单位 CS-O 的含量也比 BCS 和 SCS 中 CS-O 的含量高, 且和 SCS 相比, ADCS 中不含双硫酸化的二糖单位, 因此 ADCS 的电荷密度(0.85)也低于 BCS(0.95)和 SCS(1.17)。此外, 同样是从两栖动物软骨中提取的 CS, ADCS 的二糖组成也和已有文献报道(Mathews M B, Hinds L D. Acid mucopolysaccharides of frog cartilage in thyroxine-induced metamorphosis[J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 1963, 74(2): 198)的蛙来源的 CS(40% CS-O, 40% CS-A, 20% CS-C)有明显差异。

ADCS 的  $^1\text{H}$ -NMR 图谱分析结果如图 4 所示。结合 CS 核磁分析的文献报道(Mucci A, Schenetti L, Volpi N. H and  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance identification and characterization of components of chondroitin sulfates of various origin[J]. 2000, 41: 37–45)对核磁共振图谱进行分析, 在 1.9-2.1 ppm 的一组交叠的出峰归属于未硫酸化和硫酸化的 GalNAc 结构甲基中 H 原子的信号峰, 4.18ppm 和 4.70 ppm 的信号峰分别归属于 CS-C 中 GalNAc6S 的 C6 位 H 原子和 CS-A 中 GalNAc4S 的 C4 位 H 原子, 4.46 ppm 的信号峰归属于 GlcUA 和 GalNAc 中的 C1 位 H 原子, 3.32ppm、3.54ppm 和 3.69 ppm 的信号峰分别归属于 GlcUA 的 C2、C3 和 C4/C5 位的 H 原子。

可见, 经过分析发现, 通过对大鲵软骨酶解提取物进行醇沉操作和透析纯化得到纯度 98% 以上的 ADCS。通过 HPGPC 分析确定 ADCS 的分子量为 49.2kDa。经 ChonABC 酶彻底降解后通过 SAX-HPLC 分析 ADCS 二糖组成为 14.6% CS-O, 60.9% CS-C 和 24.5% CS-A, 和牛来源的 BCS 以及鲨鱼来源的 SCS 有显著差异。

## 实施例 5 大鲵软骨酶解提取物 GSCP 及醇溶组分 GSCP2 的氨基酸组

## 成、多肽分子量分布、蛋白测序

分析 1: GSCP 氨基酸组成分析委托北京农业生物检测中心进行。

### 一、样本信息

样本类型: 生物样本

5 储存条件: -20 度

样本数量: 7 个

检测内容: 50 种水解氨基酸含量检测

### 二、仪器试剂信息

采用技术: 质谱-同位素内标

10 使用仪器: 高效液相色谱-四级杆离子阱串联质谱仪 HPLC-MS/MS  
Q-TRAP

仪器型号: HPLC- MS/MS(Ultimate3000 - API 3200 Q TRAP)

氨基酸试剂盒: API 45AA 试剂盒; 甲醇、己腈均购自 fisher。

### 三、样本前处理

15 酸水解处理(固体样: 浸泡—匀浆—离心)

(1) 取 100ul 样, 加 400ul 水, 加 500ul 浓盐酸, 混匀冲氮气保护, 110 度密封, 高温消化 21 小时。

(2) 取出消化液, 离心取上清, 取 50ul 氮气吹干, 加 1ml 水复溶。

### 衍生化处理

20 (1) 取 40  $\mu$ L 复溶液, 置于试管内, 加 10  $\mu$ L 磺基水杨酸, 漩涡 30 秒, 13200 转, 离心 4 分钟。

(2) 取 10  $\mu$ L 上层液体置于另一试管。加入 40  $\mu$ L 标记缓冲液, 漩涡混匀, 旋转离心。

25 (3) 取 10  $\mu$ L 上层液体置于另一试管。每样品管中加入 5  $\mu$ L 稀释的 aTRAQ 试剂, 漩涡混匀, 旋转离心。

(4) 室温下孵化至少 30 分钟。管中加入 5  $\mu$ L 羟胺, 漩涡混匀, 旋转离心。

(5) 每支管中加入 32  $\mu$ L 内标, 漩涡混匀, 旋转离心。保存待检。

### 四、实验参数

30 (1) 液相条件:

色谱柱: MSLab HP-C18(150\*4.6mm 5um)

流动相: A:水+0.1%甲酸      B:乙腈+0.1%甲酸

流速: 0.8ml/min

柱温: 50℃

进样量: 3ul

5 液相分析梯度:

| 时间(min) | 流速  | A(%) | B(%) |
|---------|-----|------|------|
| 0       | 0.8 | 98   | 2    |
| 10      | 0.8 | 72   | 28   |
| 10.1    | 0.8 | 0    | 100  |
| 10      | 0.8 | 0    | 100  |
| 16.1    | 0.8 | 98   | 2    |
| 25      | 0.8 | 98   | 2    |

(2) 质谱条件:

离子源: +ESI 电喷雾离子源, 正离子方式

15 扫描方式: MRM 多反应监测

CUR:20(气帘气)

CAD: Medium(碰撞气)

IS: +5500V(喷雾电压)

TEM:500℃(雾化温度)

20 GS1:55 psi(雾化气)

GS2: 60 psi(辅助气)

DP: 35v(去簇电压)

EP:10 (射入电压)

CE:30 (碰撞能量)

25 CXP:5.0 (碰撞室射出电压)

五、实验数据

(1) 总离子流图

总离子流图如图 5 所示。

(2) 检测结果, 见表 2。

30

表 2 氨基酸组成检测结果

| 氨基酸  |         |      |                        | GSCP     | 软骨(干)   | 皮肤(干)    | 黏液(干)   | 肌肉(干)   | 肌肉(湿)   |
|------|---------|------|------------------------|----------|---------|----------|---------|---------|---------|
| 编号   | 中文名     | 缩写   | 英文名                    | 含量 mg/ml | 含量%     |          |         |         |         |
| AA01 | 丝氨酸     | Ser  | Serine                 | 1.6478   | 1.8332% | 2.3364%  | 3.3856% | 1.7648% | 0.3000% |
| AA02 | 甘氨酸     | Gly  | Glycine                | 19.5182  | 7.8406% | 14.6207% | 9.4998% | 2.7208% | 0.4625% |
| AA03 | 组氨酸     | His  | Histidine              | 0.1828   | 0.6163% | 0.4100%  | 1.3036% | 0.7772% | 0.1321% |
| AA04 | 苏氨酸     | Thr  | Threonine              | 1.5177   | 1.2442% | 1.0312%  | 5.3731% | 2.2176% | 0.3770% |
| AA05 | 谷氨酸     | Glu  | Glutamic acid          | 4.7376   | 3.8009% | 3.9883%  | 4.3229% | 5.2766% | 0.8970% |
| AA06 | 谷氨酰胺    | Gln  | Glutamine              | 0.0030   | 0.0069% | 0.0000%  | 0.0000% | 0.0000% | 0.0000% |
| AA07 | 天门冬氨酸   | Asp  | Aspartic acid          | 0.0000   | 0.0000% | 0.0000%  | 0.0000% | 0.0000% | 0.0000% |
| AA08 | 天门冬酰胺   | Asn  | Asparagine             | 0.0000   | 0.0000% | 0.0000%  | 0.0000% | 0.0000% | 0.0000% |
| AA09 | 丙氨酸     | Ala  | Alanine                | 0.1741   | 0.1223% | 0.1762%  | 0.1470% | 0.1190% | 0.0202% |
| AA10 | 精氨酸     | Arg  | Arginine               | 2.0381   | 2.6807% | 4.1268%  | 3.5693% | 3.7022% | 0.6294% |
| AA11 | 脯氨酸     | Pro  | Proline                | 4.4214   | 3.2495% | 4.0391%  | 2.9824% | 1.4879% | 0.2529% |
| AA12 | 半胱氨酸    | Cys  | Cysteine               | 0.0640   | 0.2040% | 0.0657%  | 0.4668% | 0.4207% | 0.0715% |
| AA13 | 赖氨酸     | Lys  | Lysine                 | 2.8566   | 2.2010% | 2.2178%  | 5.8212% | 5.1874% | 0.8819% |
| AA14 | 甲硫氨酸    | Met  | Methionine             | 0.7370   | 0.4468% | 0.5472%  | 0.9767% | 1.4552% | 0.2474% |
| AA15 | 缬氨酸     | Val  | Valine                 | 2.2751   | 1.2952% | 1.0274%  | 3.9402% | 2.2674% | 0.3855% |
| AA16 | 酪氨酸     | Tyr  | Tyrosine               | 1.0038   | 0.7761% | 0.4953%  | 4.5998% | 1.9872% | 0.3378% |
| AA17 | 异亮氨酸    | Ile  | Isoleucine             | 1.5847   | 1.0713% | 0.6753%  | 3.3978% | 2.0262% | 0.3445% |
| AA18 | 亮氨酸     | Leu  | Leucine                | 2.6496   | 1.4866% | 1.3027%  | 3.5666% | 3.3353% | 0.5670% |
| AA19 | 苯丙氨酸    | Phe  | Phenylalanine          | 1.9525   | 1.1655% | 1.1590%  | 4.0233% | 2.2412% | 0.3810% |
| AA20 | 色氨酸     | Trp  | Tryptophan             | 0.0000   | 0.0000% | 0.0000%  | 0.0076% | 0.0000% | 0.0000% |
| AA21 | 磷酸丝氨酸   | PSer | Phospho-serine         | 0.0000   | 0.0000% | 0.0000%  | 0.0000% | 0.0000% | 0.0000% |
| AA22 | 磷酸乙醇胺   | PEtN | Phosphorylethanolamine | 0.0006   | 0.0000% | 0.0000%  | 0.0000% | 0.0005% | 0.0001% |
| AA23 | 牛磺酸     | Tau  | Taurine                | 0.0077   | 0.0108% | 0.0057%  | 0.0024% | 0.0034% | 0.0006% |
| AA24 | 羟脯氨酸    | Hyp  | Hydroxy-proline        | 1.7335   | 0.8232% | 1.1231%  | 0.0291% | 0.0131% | 0.0022% |
| AA25 | 乙醇胺     | EtN  | Ethanolamine           | 0.0074   | 0.0092% | 0.0086%  | 0.0631% | 0.0554% | 0.0094% |
| AA26 | 瓜氨酸     | Cit  | Citrulline             | 0.0484   | 0.0000% | 0.0000%  | 0.0000% | 0.0000% | 0.0000% |
| AA27 | 同型瓜氨酸   | Hcit | Homocitrulline         | 0.0000   | 0.0000% | 0.0008%  | 0.0013% | 0.0000% | 0.0000% |
| AA28 | 鸟氨酸     | Orn  | Ornithine              | 0.8088   | 0.0000% | 0.0000%  | 0.0000% | 0.0000% | 0.0000% |
| AA29 | 精氨酸琥珀酸  | Asa  | argininosuccinic acid  | 0.0000   | 0.0000% | 0.0000%  | 0.0000% | 0.0000% | 0.0000% |
| AA30 | 肌氨酸     | Sar  | Sarcosine              | 0.0140   | 0.0000% | 0.0012%  | 0.0000% | 0.0091% | 0.0015% |
| AA31 | β-丙氨酸   | bAla | b-Alanine              | 0.1400   | 0.0098% | 0.0428%  | 0.0212% | 0.3888% | 0.0661% |
| AA32 | 肌肽      | Car  | Carnosine              | 0.0000   | 0.0000% | 0.0000%  | 0.0000% | 0.0000% | 0.0000% |
| AA33 | 鹅肌肽     | Ans  | Anserine               | 0.0000   | 0.0000% | 0.0000%  | 0.0000% | 0.0000% | 0.0000% |
| AA34 | α-氨基己二酸 | Aad  | α-Aminoadipic acid     | 0.0121   | 0.0064% | 0.0000%  | 0.0000% | 0.0002% | 0.0000% |
| AA35 | γ-氨基丁酸  | GABA | γ-Aminobutyric acid    | 0.0107   | 0.0014% | 0.0004%  | 0.0001% | 0.0020% | 0.0003% |
| AA36 | 3-氨基异丁酸 | 3Aib | 3-Aminoisobutyric acid | 0.0038   | 0.0001% | 0.0001%  | 0.0000% | 0.0009% | 0.0002% |
| AA37 | 2-氨基异丁酸 | 2Aib | 2-Aminoisobutyric acid | 0.0027   | 0.0000% | 0.0000%  | 0.0000% | 0.0000% | 0.0000% |
| AA38 | 2-氨基正丁酸 | Abu  | 2-Aminobutyric acid    | 0.0681   | 0.0000% | 0.0004%  | 0.0006% | 0.0015% | 0.0002% |
| AA39 | 5-羟基赖氨酸 | Hyl  | 5-Hydroxylysine        | 0.0000   | 0.0000% | 0.0000%  | 0.0013% | 0.0000% | 0.0000% |
| AA40 | 5-氨基戊酸  | 5Ava | 5-Aminovaleric acid    | 0.0143   | 0.0005% | 0.0003%  | 0.0005% | 0.0006% | 0.0001% |
| AA41 | 6-氨基己酸  | 6ACA | Aminocaproic Acid      | 0.0000   | 0.0000% | 0.0000%  | 0.0000% | 0.0000% | 0.0000% |
| AA42 | 同型半胱氨酸  | Hcy  | Homocysteine           | 0.0000   | 0.0000% | 0.0000%  | 0.0020% | 0.0000% | 0.0000% |
| AA43 | 胱硫醚     | Cth  | cystathionine          | 0.0000   | 0.0000% | 0.0000%  | 0.0000% | 0.0000% | 0.0000% |
| AA44 | 5-羟色胺   | 5HT  | 5-Hydroxy-Tryptamine   | 0.0000   | 0.0000% | 0.0000%  | 0.0000% | 0.0000% | 0.0000% |
| AA45 | 5-羟色氨酸  | 5HTP | 5-Hydroxy-tryptophan   | 0.0000   | 0.0000% | 0.0000%  | 0.0000% | 0.0000% | 0.0000% |
| AA46 | 犬尿氨酸    | Kyn  | kynurenine             | 0.0006   | 0.0009% | 0.0004%  | 0.0055% | 0.0007% | 0.0001% |
| AA47 | 3-甲基组氨酸 | 3MH  | 3-Methyl-histidine     | 0.0028   | 0.0000% | 0.0029%  | 0.0000% | 0.0343% | 0.0058% |

|      |       |      |                |        |         |         |         |          |         |
|------|-------|------|----------------|--------|---------|---------|---------|----------|---------|
|      | 酸     | is   | ne             |        |         |         |         |          |         |
| AA48 | 同型精氨酸 | Harg | Homoarginine   | 0.0000 | 0.0000% | 0.0000% | 0.0000% | 0.0000%  | 0.0000% |
| AA49 | 同型脯氨酸 | Hpro | Pipecolic acid | 0.1057 | 0.1313% | 0.0668% | 1.1634% | 0.8480%  | 0.1442% |
| AA50 | 同型丝氨酸 | Hser | Homoserine     | 0.0034 | 0.0028% | 0.0016% | 0.0018% | 0.0019%  | 0.0003% |
|      |       |      |                | 50.35  | 31.04%  | 39.47%  | 58.68%  | 38.3469% | 6.52%   |

说明：GSCP 送样为 100mg/ml 溶液，其他为固体样品

分析 2：醇溶部分 GSCP2 多肽分子量分布、蛋白测序

醇溶部分具有明显的降尿酸活性，通过凝胶尺寸排阻色谱和反相制备色  
5 谱对其进一步纯化，得到对 XOD 酶活具有明显抑制作用的组分，对其进行  
多肽分子量及序列分析，方法及结果如下：

多肽样品的分子量和序列分析委托清华大学生物医学测试中心进行，其  
中分子量的分析使用基质辅助激光解析飞行时间质谱仪 MALDI-TOF-TOF  
4800Plus(美国 ABI 公司)进行；多肽序列的分析使用 OrbiTrap Fusion LUMOS  
10 液质联用仪(美国 Thermo Fisher 公司)进行。

MALDI-TOF-MS 分析结果如图 6 所示。分析结果表明样品多肽质荷比  
(m/z)在 100-3000 范围，且两个样品均在 m/z 为 739 和 1162 的位置有较强的  
峰。

通过液相色谱-电喷雾串联质谱(LC-ESI-MS/MS)分析样品，并通过数据  
15 非依赖采集(DIA)的方案分析多肽的氨基酸序列，得到主要的四个多肽序列  
如表 3 所示，分别命名 S1、S2、S3、S4 并进行人工合成。

表 3 主要的四个多肽序列分析

| 多肽 | 氨基酸序列        | 氨基酸数目 | 相对分子量    |
|----|--------------|-------|----------|
| S1 | VPSGPLGPEGPR | 12    | 1161.614 |
| S2 | TGPLGPSPGP   | 10    | 878.4498 |
| S3 | HDLPLPLPE    | 9     | 1029.549 |
| S4 | DNLPLPLPK    | 8     | 892.5018 |

实施例 6 酶解提取物 GSCP 和醇溶组分 GSCP2 的降尿酸活性

分析 1:

XOD 催化黄嘌呤氧化生成尿酸和超氧阴离子，是活性氧主要来源之一，  
同时 XOD 也是核苷酸代谢的关键酶之一，主要分布于哺乳动物的心、肺、

肝脏等组织中；通过 XOD 酶活抑制模型可以对潜在的降尿酸药物进行筛选和评价。

试剂：XOD 酶(Sigma, 来源于牛奶), XOD 酶活检测试剂盒(购买自南京建成)。

5 黄嘌呤氧化酶(XOD)催化黄嘌呤氧化生成尿酸在 295nm 处有特异吸收, 通过分光光度法测定产物可表征酶活。按照 XOD 酶活检测试剂盒说明进行 XOD 酶活检测, 结果如图 7 所示。从图 7 的结果可以看出, GSCP 具有抑制 XOD 活性且有剂量依赖性, GSCP 的浓度为 40mg/ml 时的抑制活性最大, 而稀释到 1/2 或 1/5 浓度后的抑制活性相应地减小。

10 此外, 从图 7 中可以看出, 在 GSCP 中含量较大的 ADCS 不具有 XOD 抑制活性。推测具有抑制 XOD 酶活性的成分为 GSCP 中的多肽成分, 即 GSCP2 组分。

15 以无抑制剂存在时 XOD 酶活为 100%, 比较人工合成的降尿酸活性肽以及阳性药物别嘌醇的 XOD 酶活抑制效果, 结果如表 4 所示(表格中的浓度为样品在反应体系的终浓度)。

表 4 GSCP2、人工合成多肽及别嘌醇的 XOD 抑制活性

|              |      |      |      |
|--------------|------|------|------|
| GSCP2(mg/ml) | 2.5  | 5    | 10   |
| XOD 活性(%)    | 64.6 | 50.9 | 43.3 |
|              |      |      |      |
| S1(mg/ml)    | 2.5  | 5    | 10   |
| XOD 活性(%)    | 57.6 | 36.7 | 26.9 |
|              |      |      |      |
| S2(μg/ml)    | 50   | 100  | 200  |
| XOD 活性(%)    | 80.0 | 55.8 | 17.9 |
|              |      |      |      |
| S3(μg/ml)    | 20   | 40   | 80   |
| XOD 活性(%)    | 87.2 | 67.3 | 46.9 |
|              |      |      |      |
| S4(μg/ml)    | 20   | 40   | 80   |
| XOD 活性(%)    | 87.9 | 67.7 | 43.2 |

|                         |      |      |      |
|-------------------------|------|------|------|
|                         |      |      |      |
| 别嘌呤( $\mu\text{g/ml}$ ) | 0.2  | 0.4  | 0.8  |
| XOD 活性(%)               | 59.4 | 34.7 | 31.2 |

通过 XOD 酶活抑制实验计算半抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ )并比较, 如表 5 所示。

表 5 别嘌呤及人工合成多肽的半抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ )

| 样品  | 结构                                       | 分子量    | $\text{IC}_{50}(\mu\text{g/ml})$ | $\text{IC}_{50}(\text{M})$ |
|-----|------------------------------------------|--------|----------------------------------|----------------------------|
| 别嘌呤 | $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}$ | 136.11 | 0.26                             | $1.91 \times 10^{-6}$      |
| S1  | VPSGPLGPEGPR                             | 1162.2 | 3200                             | $2.75 \times 10^{-3}$      |
| S2  | TGPLGPSPGP                               | 879.2  | 110                              | $1.25 \times 10^{-4}$      |
| S3  | HDLPLPLPE                                | 1030.2 | 60                               | $5.82 \times 10^{-5}$      |
| S4  | DNLPLPK                                  | 893.5  | 60                               | $6.72 \times 10^{-5}$      |

合成多肽 S1、S2、S3、S4 分别在 3.2mg/mL、110  $\mu\text{g/mL}$ 、60  $\mu\text{g/mL}$ 、  
 5 60  $\mu\text{g/mL}$  时达到对 XOD 的半抑制浓度。而经过实验发现, 同样的反应体系  
 下 GSCP2 在 5.2mg/mL 时达到对 XOD 的半抑制浓度; 此外, 别嘌呤在 0.26  
 $\mu\text{g/mL}$  时达到对 XOD 的半抑制浓度, 但是浓度达到 30  $\mu\text{g/mL}$  时 XOD 仍  
 保留有约 10% 的酶活, 而 S2、S3、S4 浓度为半抑制浓度的三倍时 XOD 酶  
 活即被完全抑制, 推测人工合成的活性多肽具有和别嘌呤不同的 XOD 酶活  
 10 抑制机理。

## 分析 2:

急性高尿酸血症小鼠模型: 实验分正常组、模型组、阳性药物组(别嘌  
 醇, 百灵威, 2mg/ml)、ADCS 组(20mg/ml)、GSCP 组(40mg/ml), 每组 10  
 15 只小鼠, 连续 7 天灌胃(20ml/kg, 正常组和模型组给超纯水); 第 7 天灌胃后  
 1h 腹腔注射 15mg/ml 氧嗪酸钾(生工生物)和 10mg/ml 次黄嘌呤(sigma)悬液  
 0.5ml 造模; 造模后 1h 取血取肝脏, 测定血尿酸水平和肝脏黄嘌呤氧化酶活  
 性, 结果如图 8 所示。

次黄嘌呤是尿酸生成的前体物质, 氧嗪酸钾是尿酸酶的抑制剂。腹腔注  
 20 射氧嗪酸钾和次黄嘌呤后小鼠血尿酸水平显著升高, 表明高尿酸血症小鼠模  
 型建立成功。和模型组相比, 阳性药物别嘌呤组小鼠的血尿酸水平接近于 0,  
 GSCP 组血尿酸水平也处于较低水平, GSCP 经口给药表现出突出的降尿酸

活性。肝脏 XOD 酶活检测结果中别嘌醇组和 GSCP 组 XOD 活性低于模型组，表明 GSCP 能够通过抑制肝脏 XOD 活性发挥降尿酸作用。两组数据的结果表明 ADCS 中发挥降尿酸作用的有效成分不是硫酸软骨素，推测具有降尿酸活性的成分为 GSCP 中的多肽成分，即 GSCP2 组分。

- 5       前面仅仅示出了本发明的原理，应理解，本发明的范围不预期限制在本文所述的示例性方面，而应包括所有当前已知的和未来开发的等同物。另外，应当指出，在不脱离本发明技术原理的前提下，还可以作出若干改进和修改，这些改进和修改也应被视为本发明的范围。

## 权 利 要 求 书

1. 一种大鲛软骨酶解提取物，其包括：

5 大鲛硫酸软骨素，以及  
软骨多肽粗提物。

2. 如权利要求 1 所述的大鲛软骨酶解提取物，其中，所述大鲛硫酸软骨素含有非硫酸化的二糖(CS-O)，C6 位硫酸化二糖(CS-C)，以及 C4 位硫酸化二糖(CS-A)。

10 3. 如权利要求 1 或 2 所述的大鲛软骨酶解提取物，其中，所述大鲛硫酸软骨素由非硫酸化的二糖(CS-O)，C6 位硫酸化二糖(CS-C)，以及 C4 位硫酸化二糖(CS-A)组成。

4. 如权利要求 1~3 中任一项所述的大鲛软骨酶解提取物，其中，所述大鲛硫酸软骨素的重均分子量(Mw)为 40kDa 以上，优选为 45kDa 以上，更  
15 优选为 48kDa 以上，最优选为 49.2kDa。

5. 如权利要求 1~4 中任一项所述的大鲛软骨酶解提取物，其中，所述软骨多肽粗提物包含 TGPLGPSPGP、HDLPLPLPE、DNLPLPK 和 VPSGPLGPEGPR 中的一种或多种。

6. 如权利要求 1~5 中任一项所述的大鲛软骨酶解提取物，其中，所述  
20 大鲛硫酸软骨素占大鲛软骨酶解提取物总量的 15 质量%~30 质量%，所述软骨多肽粗提物占大鲛软骨酶解提取物总量的 70 质量%~85 质量%。

7. 如权利要求 1~6 任一项所述的大鲛软骨酶解提取物，其是通过如下方法获得的，该方法包括：

从大鲛获取软骨，

25 对获取的软骨进行蛋白酶解，以及  
获得蛋白酶解后的上清并对其进行干燥。

8. 一种大鲛软骨酶解提取物的醇溶组分，其为软骨多肽粗提物，且包含 TGPLGPSPGP、HDLPLPLPE、DNLPLPK 和 VPSGPLGPEGPR 中的一种或多种。

30 9. 如权利要求 8 所述的醇溶组分，其是通过如下方法获得的，该方法包括：

从大鲵获取软骨，  
对获取的软骨进行蛋白酶解，  
获得蛋白酶解后的上清并对其进行干燥，  
对蛋白酶解后的上清或其干燥物进行醇沉，以及  
5 获得上清。

10. 如权利要求 8 或 9 所述的醇溶组分，其具有降尿酸活性。

11. 一种软骨多肽，其特征在于，该软骨多肽为 TGPLGPSPGP、  
HDLPLPLPE、DNLPLPK 和 VPSGPLGPEGPR 中的一种或多种。

12. 如权利要求 11 所述的软骨多肽，其有抑制 XOD 酶的活性。

10 13. 如权利要求 11 所述的软骨多肽，其具有降尿酸的活性。

14. 一种大鲵软骨酶解提取物的醇沉组分，其包括大鲵硫酸软骨素，该  
大鲵硫酸软骨素含有非硫酸化的二糖(CS-O)，C6 位硫酸化二糖(CS-C)，以  
及 C4 位硫酸化二糖(CS-A)。

15 15. 如权利要求 14 所述的大鲵软骨酶解提取物的醇沉组分，其中，所  
述大鲵硫酸软骨素由非硫酸化的二糖(CS-O)，C6 位硫酸化二糖(CS-C)，以  
及 C4 位硫酸化二糖(CS-A)组成。

16. 如权利要求 14 或 15 所述的大鲵软骨酶解提取物的醇沉组分，其中，  
所述大鲵硫酸软骨素的重均分子量(Mw)为 40kDa 以上，优选为 45kDa 以上，  
更优选为 48kDa 以上，最优选为 49.2kDa。

20 17. 如权利要求 14~16 中任一项所述的大鲵软骨酶解提取物的醇沉组  
分，其是通过如下方法获得的，该方法包括：

从大鲵获取软骨，  
对获取的软骨进行蛋白酶解，  
获得蛋白酶解后的上清并对其进行干燥，  
25 对蛋白酶解后的上清或其干燥物进行醇沉，以及  
获得沉淀部分。

18. 如权利要求 1~7 中任一项所述的大鲵软骨酶解提取物、如权利要求  
8~10 中任一项所述的大鲵软骨酶解提取物的醇溶组分或者如权利要求  
11~13 中任一项所述的软骨多肽用于制备降低尿酸或治疗高尿酸血症或痛风的  
30 药物的用途。

19. 如权利要求 1~7 中任一项所述的大鲵软骨酶解提取物、如权利要求

8~10 中任一项所述的大鲵软骨酶解提取物的醇溶组分或者如权利要求 11~13 中任一项所述的软骨多肽用于降低尿酸或治疗高尿酸血症或痛风的用途。

20. 一种获取大鲵软骨酶解提取物的方法，其包括：

5 从大鲵获取软骨，  
对获取的软骨进行蛋白酶解，以及  
获得蛋白酶解后的上清并对其进行干燥。

21. 根据权利要求 20 所述的方法，其中，所述蛋白酶是碱性蛋白酶，  
在 pH 9~11 的条件下进行蛋白酶解。

10 22. 一种获取大鲵软骨酶解提取物的醇溶组分的方法，其包括：  
从大鲵获取软骨，  
对获取的软骨进行蛋白酶解，  
获得蛋白酶解后的上清并对其进行干燥，  
对蛋白酶解后的上清或其干燥物进行醇沉，以及  
15 获得上清。

23. 根据权利要求 22 所述的方法，其中，所述蛋白酶是碱性蛋白酶，  
在 pH 9~11 的条件下进行蛋白酶解。

24. 一种获取大鲵软骨酶解提取物的醇沉组分的方法，其包括：  
从大鲵获取软骨，  
20 对获取的软骨进行蛋白酶解，  
获得蛋白酶解后的上清并对其进行干燥，  
对蛋白酶解后的上清或其干燥物进行醇沉，以及  
获得沉淀部分。

25. 根据权利要求 24 所述的方法，其中，所述蛋白酶是碱性蛋白酶，  
25 在 pH 9~11 的条件下进行蛋白酶解。

26. 根据权利要求 21、23 或 25 中任一项所述的方法，其中，所述碱性  
蛋白酶是 2709 蛋白酶。

27. 根据权利要求 22~26 中任一项所述的方法，其中，醇沉操作中乙醇  
质量浓度为 50%-90%。

30 28. 根据权利要求 27 所述的方法，其中，醇沉操作中乙醇质量浓度为  
70%。

29. 一种降低尿酸或治疗高尿酸血症或痛风的方法，其包括：

向由此需要的受试者给药如权利要求 1~7 中任一项所述的大鲛软骨酶解提取物、如权利要求 8~10 中任一项所述的大鲛软骨酶解提取物的醇溶组分或者如权利要求 11~13 中任一项所述的软骨多肽。

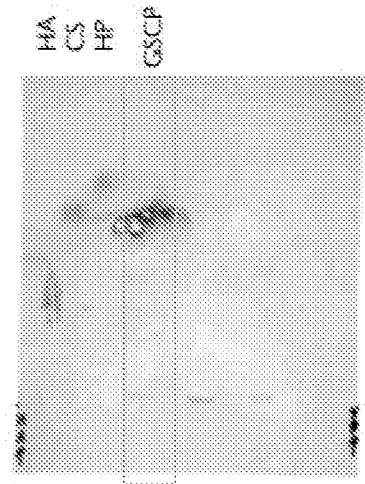


图 1

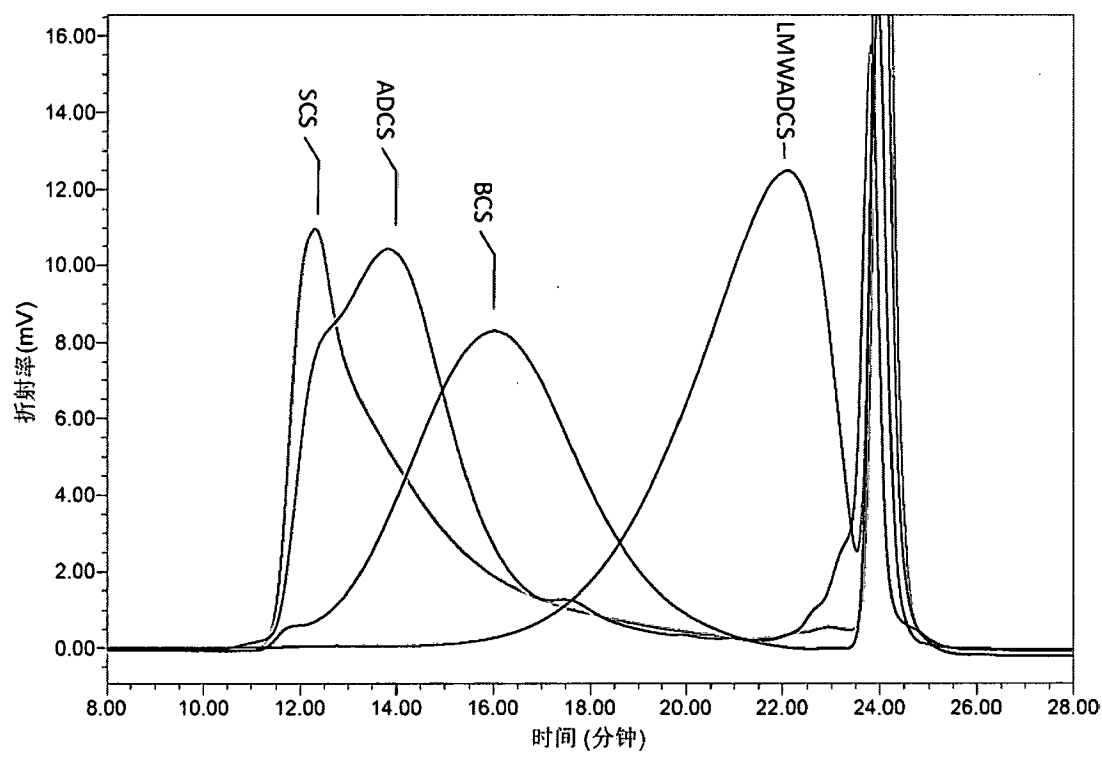


图 2

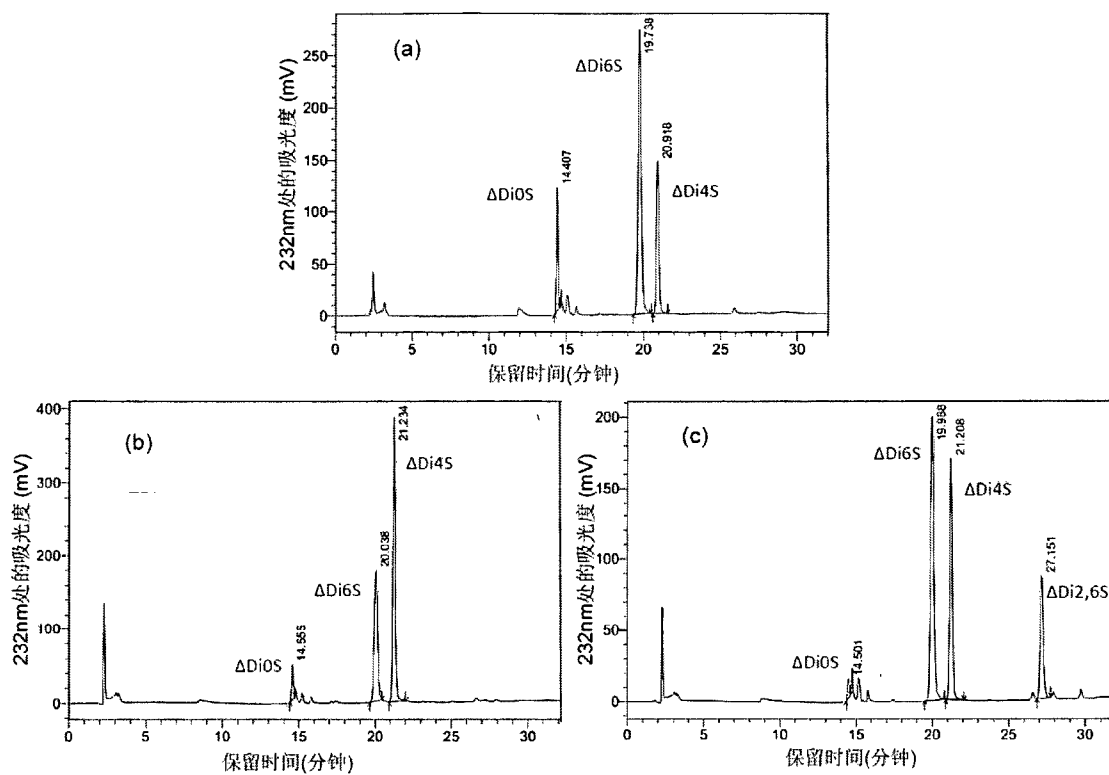


图 3

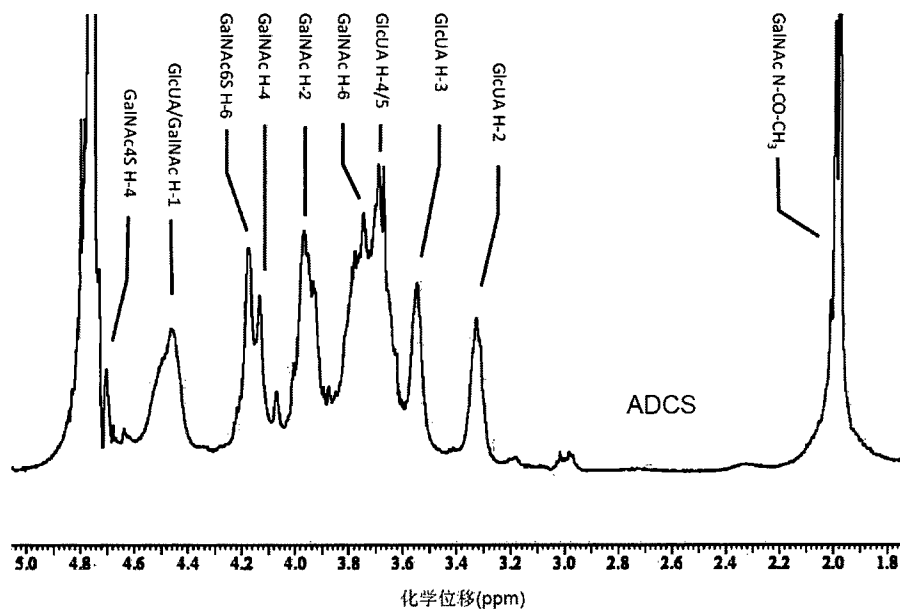


图 4

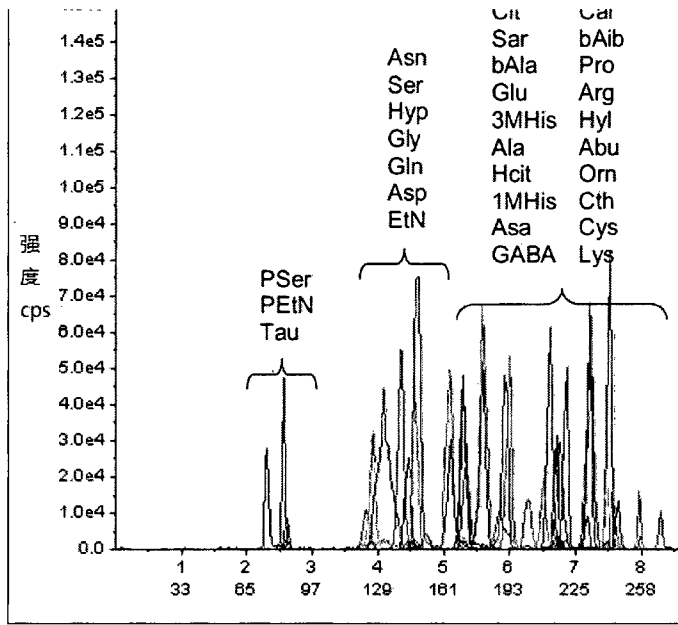


图 5

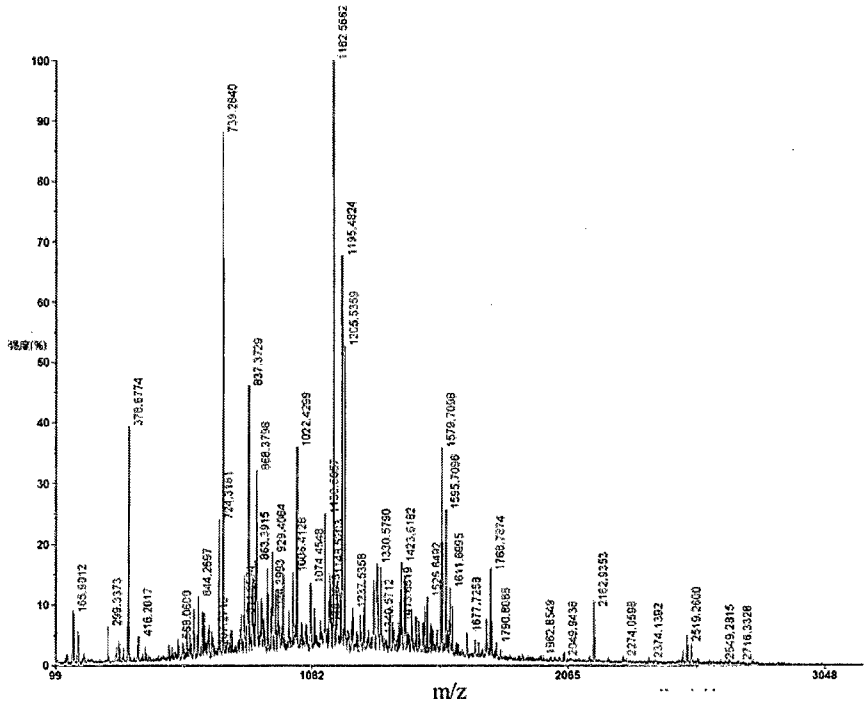


图 6

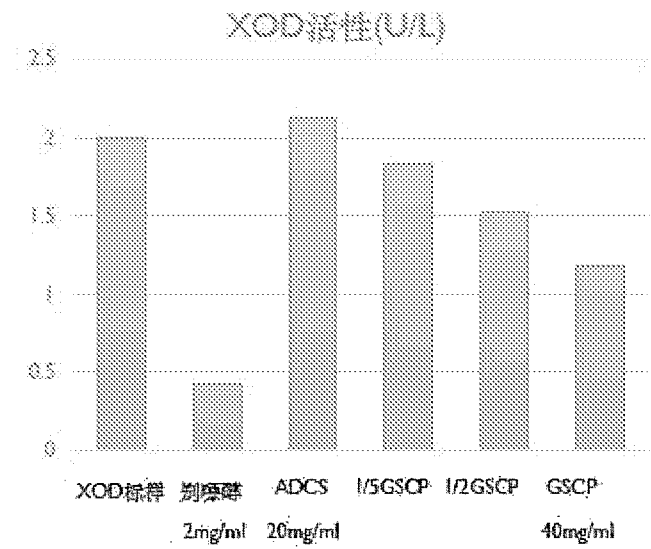


图 7

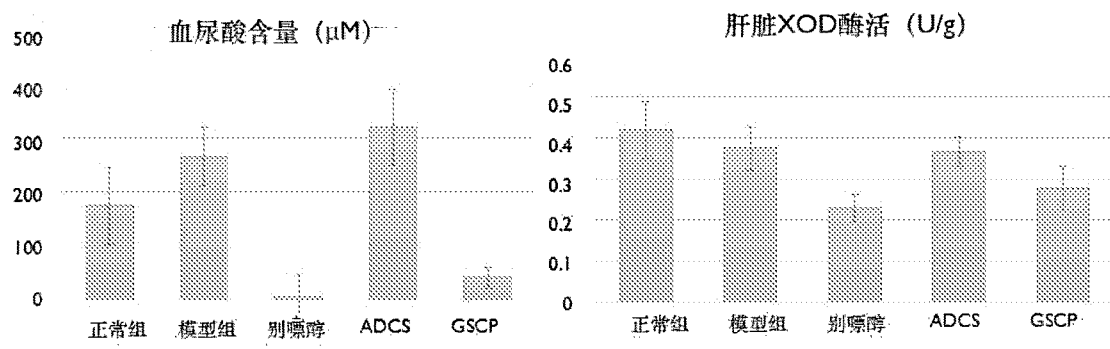


图 8

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/094613

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

A61K 38/08(2006.01)i; A61K 31/7016(2006.01)i; A61P 19/06(2006.01)i; C12P 19/26(2006.01)i; C07K 7/06(2006.01)i; C07K 1/30(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K,A61P,C12P,C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNMED, CPRSABS, CNABS, CPEA, DWPI, SIPOABS, AUABS, TWMED, ILABS, TWABS, HKABS, MOABS, SGABS, CNKI, NCBI, EMBL, GoogleScholar: 软骨素, 软骨多肽, 大鲵, giant, Chondroitin, sulfate, salamander

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                    | Relevant to claim No. |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| PX        | CN 107964055 A (TSINGHUA UNIVERSITY) 27 April 2018 (2018-04-27)<br>claims 1-12                                                        | 14-17                 |
| X         | CN 104448040 A (QINGDAO JIULONG BIOPHARMACEUTICAL CO., LTD.) 25 March 2015 (2015-03-25)<br>abstract                                   | 20-28                 |
| A         | CN 104448040 A (QINGDAO JIULONG BIOPHARMACEUTICAL CO., LTD.) 25 March 2015 (2015-03-25)<br>abstract                                   | 1-18                  |
| A         | CN 103613654 B (ZHANGJIAJIE (CHINA) GIANT SALAMANDER BIOLOGICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 06 January 2016 (2016-01-06)<br>entire document | 1-18                  |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 September 2018

Date of mailing of the international search report

08 October 2018

Name and mailing address of the ISA/CN

State Intellectual Property Office of the P. R. China  
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing  
100088  
China

Authorized officer

Facsimile No. (86-10)62019451

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CN2018/094613**

**Box No. II      Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **19,29**  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  - [1] The subject matter relating to the use of components such as cartilage peptide in the treatment of claims 19 and 29 falls within treatment methods for treating a human or animal body and falls within the cases set out in PCT Rule 39.1(iv) for which an international search is not required. Therefore, an international search has not been carried out.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2018/094613**

| Patent document<br>cited in search report |           |   | Publication date<br>(day/month/year) | Patent family member(s) |           |   | Publication date<br>(day/month/year) |
|-------------------------------------------|-----------|---|--------------------------------------|-------------------------|-----------|---|--------------------------------------|
| CN                                        | 107964055 | A | 27 April 2018                        | None                    |           |   |                                      |
| CN                                        | 104448040 | A | 25 March 2015                        | None                    |           |   |                                      |
| CN                                        | 103613654 | B | 06 January 2016                      | CN                      | 103613654 | A | 05 March 2014                        |

## 国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/094613

## A. 主题的分类

A61K 38/08(2006.01)i; A61K 31/7016(2006.01)i; A61P 19/06(2006.01)i; C12P 19/26(2006.01)i; C07K 7/06(2006.01)i; C07K 1/30(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

## B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

A61K, A61P, C12P, C07K

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNMED, CPRSABS, CNABS, CPEA, DWPI, SIPOABS, AUABS, TWMED, ILABS, TWABS, HKABS, MOABS, SGABS, CNKI, NCBI, EMBL, GoogleScholar:软骨素, 软骨多肽, 大鲵, giant, Chondroitin, sulfate, salamander

## C. 相关文件

| 类 型* | 引用文件, 必要时, 指明相关段落                                                     | 相关的权利要求 |
|------|-----------------------------------------------------------------------|---------|
| PX   | CN 107964055 A (清华大学) 2018年 4月 27日 (2018 - 04 - 27)<br>权利要求1-12       | 14-17   |
| X    | CN 104448040 A (青岛九龙生物医药有限公司) 2015年 3月 25日 (2015 - 03 - 25)<br>摘要     | 20-28   |
| A    | CN 104448040 A (青岛九龙生物医药有限公司) 2015年 3月 25日 (2015 - 03 - 25)<br>摘要     | 1-18    |
| A    | CN 103613654 B (张家界中国金驰大鲵生物科技有限公司) 2016年 1月 6日 (2016 - 01 - 06)<br>全文 | 1-18    |

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

\* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2018年 9月 15日

国际检索报告邮寄日期

2018年 10月 8日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)  
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

张艳霞

电话号码 62089438

## 第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 19, 29  
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：  
[1] 权利要求19、29涉及软骨多肽等组分用于治疗的主题，属于对人体或动物体进行治疗的方法范畴，属于PCT细则39.1(iv)中所列的无需进行国际检索的情形，因此未进行国际检索。
2. ☐ 权利要求：  
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3. ☐ 权利要求：  
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/094613

| 检索报告引用的专利文件 |           |   | 公布日<br>(年/月/日) | 同族专利         | 公布日<br>(年/月/日) |
|-------------|-----------|---|----------------|--------------|----------------|
| CN          | 107964055 | A | 2018年 4月 27日   | 无            |                |
| CN          | 104448040 | A | 2015年 3月 25日   | 无            |                |
| CN          | 103613654 | B | 2016年 1月 6日    | CN 103613654 | A 2014年 3月 5日  |

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)