

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C07K 14/435
C12N 15/12 A61K 38/17
A61P 31/00



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 01112855.0

[45] 授权公告日 2004 年 7 月 21 日

[11] 授权公告号 CN 1158304C

[22] 申请日 2001.5.10 [21] 申请号 01112855.0
[71] 专利权人 上海华谊生物技术有限公司
地址 200233 上海市漕宝路 36 号
[72] 发明人 孙玉昆 伍登熙 朱志勇 余 刚
沈春娟 赵少凌 魏云静
审查员 颜 丛

[74] 专利代理机构 上海华工专利事务所
代理人 应云平

权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图 1 页

[54] 发明名称 蛙皮抗菌肽衍生物
[57] 摘要

本发明涉及一类有抗菌作用的蛙皮抗菌肽衍生物及其适用于药用的盐，其结构式如下：Gly - Ile - Gly - Lys - Phe - Leu - His - Ser - Ala - Lys - Lys - Phe - Gly - Lys - Ala - Phe - Val - Gly - Glu - Ile - X - Asn - Y - OH 其中：X 为选自 Met, Ile 或 Leu 的氨基酸残基，Y 为选自 Ser, Lys, Ile, Arg, Leu 的两个氨基酸残基的组合。该衍生物具有与天然蛙皮抗菌肽相同或更强的抗菌作用，且易于固相化学合成法制备，尤其易于用基因工程技术制备。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种如下结构的多肽或其适于药用的盐:

Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-His-Ser-Ala-Lys-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-Phe-Val-Gly-Glu-Ile-X-Asn-Y

其中: X为选自 Ile 或 Leu 的氨基酸, Y 为 Ser-Arg。

2. 根据权利要求1所述的多肽或其适于药用的盐, 其特征在于: 组成上述结构的多肽的氨基酸是 L 型或者 D 型异构体。

3. 根据权利要求1所述的多肽或其适于药用的盐, 其特征在于: 所述多肽结构式中的 X 为 Leu, Y 为 Ser-Arg。

4. 一种如下结构的多肽的制备方法:

Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-His-Ser-Ala-Lys-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-Phe-Val-Gly-Glu-Ile-X-Asn-Y

其中: X为选自 Ile 或 Leu 的氨基酸, Y 为选自 Ser-Arg;

该制备方法是基因工程方法, 其步骤包括: 按上述多肽的氨基酸序列合成基因片段, 基因片段连接, 质粒构建, 克隆, 发酵, 分离纯化及冻干得产品。

5. 一种如下结构的多肽或其适于药用的盐用作抗菌的药物:

Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-His-Ser-Ala-Lys-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-Phe-Val-Gly-Glu-Ile-X-Asn-Y

其中: X为选自 Ile 或 Leu 的氨基酸, Y 为选自 Ser-Arg;

该抗菌药物中含有上述多肽或其适于药用的盐, 或其组合物。

蛙皮抗菌肽衍生物

本发明涉及抗菌肽衍生物，具体地说涉及一类有抗菌作用的蛙皮抗菌肽衍生物。

许多生物，如昆虫、微生物、两栖类动物和人类都会产生保卫机体的抗菌肽物质。这些抗菌肽能将细胞膜脂质体穿孔使之失活，并且对原虫类、精子、甚至病毒也有作用，因而被称为超级抗生素。抗菌肽类物质都带有不同数量的正电荷，其抗菌作用的机制在于，它所带的正电荷与细菌细胞壁膜的磷脂质的负电荷相结合，在细胞膜上形成离子通道，扩大通透性，使细菌细胞溶解、死亡，因此其抗菌作用与特异受体的结合无关。

抗菌肽的抗菌范围很广，对革兰氏阳性、革兰氏阴性菌、好氧菌以及厌氧菌都有抑制作用，并且与抗菌素不同，不产生抗药性，即使对多种抗菌素产生抗药性的细菌也可被抑制。另外，抗菌肽也可以抑制原虫和病毒。抗菌肽的代谢产物为氨基酸，因此对宿主细胞的毒性低。综上所述抗菌肽是一类有广阔的抗菌药用前景的化合物。

蛙皮抗菌肽 Magainin 是一类天然的从蛙皮中提取的有抗菌作用而又得到广泛研究的抗菌肽。它具有易合成，成本低，溶血性低等特点。

美国专利 USP 5589364 公开了如何利用基因工程技术制备天然蛙皮抗菌肽 Magainin II（23 个氨基酸）的方法。蛙皮抗菌肽 Magainin II 是天然蛙皮抗菌肽 Magainin 的一种，其氨基酸序列如下：

Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-His-Ser-Ala-Lys-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-Phe-Val-Gly-Glu-Ile-Met-Asn-Ser-OH

式中的 Gly 为甘氨酸，Ile 为异亮氨酸，Lys 为赖氨酸，Phe 为苯丙氨酸，Leu 为亮氨酸，His 为组氨酸，Ser 为丝氨酸，Ala 为丙氨酸，Val 为缬氨酸，

Glu 为谷氨酸, Met 为甲硫氨酸, Asn 为天冬酰胺。

美国专利 USP 6183992 公开了利用基因工程技术制备蛙皮抗菌肽衍生物 MSI-78 (22 个氨基酸) 的方法, MSI-78 的氨基酸序列如下:

Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-Lys-Lys-Ala-Lys-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-Phe-Val-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys-NH₂

美国 Harriet M. Lamb 等人在《ADIS NEW DRUG PROFILE》杂志上报导: 蛙皮抗菌肽衍生物 MSI-78 应用在治疗外伤感染及糖尿病下肢溃疡等方面有明显疗效。

本发明的目的是提供一类蛙皮抗菌肽衍生物, 扩大了蛙皮抗菌肽衍生物的种类, 它们易于用固相化学制备, 尤其易于用基因工程技术制备, 从而为降低生产成本提供了可能。它们具有与天然蛙皮抗菌肽相同或者更强抗菌作用。

本发明的内容涉及一类如下结构的蛙皮抗菌肽衍生物及其适用于药用的盐:

Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-His-Ser-Ala-Lys-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-Phe-Val-Gly-Glu-Ile-X-Asn-Y-OH

其中: X 为选自 Ile 或 Leu 的氨基酸残基,

Y 为选自 Ser-Arg。

本发明中所述结构的蛙皮抗菌肽衍生物的氨基酸是 L 型或者 D 型异构体。

本发明中所述蛙皮抗菌肽衍生物结构中的 X 为亮氨酸 (Leu), Y 为丝氨酸-精氨酸 (Ser-Arg)。

本发明中所述的蛙皮抗菌肽衍生物结构中的 X 为异亮氨酸 (Ile), Y 为丝氨酸-精氨酸 (Ser-Arg)。

本发明中所述如下结构的蛙皮抗菌肽衍生物的制备方法，

Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-His-Ser-Ala-Lys-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-Phe-Val-Gly-Glu-Ile-X-Asn-Y-OH

其中：X为选自 Ile 或 Leu 的氨基酸残基，

Y 为 Ser-Arg。

该制备方法是基因工程方法，其步骤包括：按蛙皮抗菌肽衍生物的氨基酸序列合成基因片段，基因片段连接，质粒构建，克隆，发酵，分离纯化及冻干得产品。

本发明中所述如下结构的蛙皮抗菌肽衍生物的制备方法，

Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-His-Ser-Ala-Lys-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-Phe-Val-Gly-Glu-Ile-X-Asn-Y-OH

其中：X为选自 Ile 或 Leu 的氨基酸残基，

Y 为 Ser-Arg。

该制备方法是固相化学合成法，其步骤包括以 HMP 树脂为固相载体，氨基酸的 α -氨基用 9-苄基甲氧羰基 (Fmoc) 基团保护，用固相多肽合成仪合成，经分离提纯及冻干得产品。

本发明中所述如下结构的蛙皮抗菌肽及其适用于药用的盐用作抗菌的药物。

Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-His-Ser-Ala-Lys-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-Phe-Val-Gly-Glu-Ile-X-Asn-Y-OH

其中：X为选自 Ile 或 Leu 的氨基酸残基，

Y 为 Ser-Arg。

该抗菌药物中含有蛙皮抗菌肽及其适用于药用的盐，或其组合物。

本发明提供了一类蛙皮抗菌肽衍生物，扩大了蛙皮抗菌肽衍生物的种类，所提供的该类蛙皮抗菌肽易于用固相化学合成法制备，尤其易于用基因工程

技术制备,从而为降低生产成本提供了可能。它们具有与天然蛙皮抗菌肽相同或者更强抗菌作用。对本发明所述结构的蛙皮抗菌肽衍生物进行的杀菌效果和杀菌时间实验,以及溶血和急性毒性实验表明:本发明的蛙皮抗菌肽衍生物与天然蛙皮抗菌肽 Magainin II 对大肠杆菌的杀菌效果相当,对金黄色葡萄球菌亦有抑制作用。使用本发明蛙皮抗菌肽衍生物对 $50\ \mu\text{l}$ 的菌液 (10^6 菌/ml) 进行杀菌实验,用量为 $0.5\ \mu\text{g}$, 3 小时可杀死 90% 以上的细菌,用量为 $1\ \mu\text{g}$, 3 小时几乎杀死全部细菌。溶血实验表明本发明的蛙皮抗菌肽衍生物溶血 50% 有效浓度 (HC_{50}) 与抑制 50% 有效浓度 (IC_{50}) 比值约为 50, 而天然蛙皮抗菌肽 Magainin II 的 $\text{HC}_{50}/\text{IC}_{50}$ 约为 24, 这说明本发明的产品安全性优于天然蛙皮抗菌肽 Magainin II。急性毒性实验表明本发明的蛙皮抗菌肽衍生物的急性毒性较低。

现结合附图和实施例对本发明的内容作进一步说明。

附图 1 是本发明实施例 1 所得的蛙皮抗菌肽衍生物对大肠杆菌的杀菌时间图。

下面实施例是对本发明的进一步阐述而不是对本发明的限制。

实施例 1: 基因工程法制备本发明结构的蛙皮抗菌肽衍生物, 其中 X 为 Leu, Y 为 Ser-Arg。

(1) 按该蛙皮抗菌肽衍生物的氨基酸序列合成基因片段如下:

- (a) 5' AAT TCC ATG GGT ATC GGT AAA TTT CTG CAC AGC GCG AAA AAA
- (b) 5' TTT GGT AAA GCG TTT GTG GGT GAA ATC CTG AAC AGC CGT TAG A
- (c) 5' AG CTT CTA ACG GCT GTT CAG GAT TTC ACC CAC AAA CGC TTT
- (d) 5' ACC AAA TTT TTT CGC GCT GTG CAG AAA TTT ACC GAT ACC CAT GG

(2) DNA 片段的连接

取光密度为 0.1 ($A_{260\text{nm}}$) 的上述四个片段, 二个试管中分别加片段 a 与 d 和 b 与 c, 再加聚核苷酸激酶缓冲液 (Polynucleotide Kinase Buffer) 和聚核苷酸激酶 (Polynucleotide Kinase)。37℃ 保温 60 分钟后, 在 95

℃水浴中保温 10 分钟，随后徐徐自然冷却至室温，再加 T4 连接酶缓冲液（T4 Ligase Buffer）及三磷酸腺苷（ATP）溶液，最后加 T4 连接酶（T4 Ligase），于 15℃保温过夜，使片段完成连接。

（3）克隆

质粒含启动子为温控启动子 P_L （或乳糖启动子 Lac，色氨酸-乳糖混合启动子 Tac），用限制性内切酶 EcoR I 和 Hind III 双酶切之后，经过酚/氯仿抽提，再以氯仿洗涤 3 次，然后以异丙醇沉淀，经离心得质粒。将质粒与该蛙皮抗菌肽衍生物基因片段连接，即得含有该蛙皮抗菌肽衍生物基因片段的质粒。转化大肠杆菌 JM103 或 JM109，平板培养筛选菌落。

（4）验证

从单菌落中抽提含该蛙皮抗菌肽衍生物基因片段的质粒，经过 EcoR I +HindIII 双酶切之后，进行 1% 琼脂糖电泳，以溴化乙锭（Ethidium Bromide）染色，与标准样品对照检查克隆的基因片段，再经 DNA 序列分析、检测完成克隆。

（5）发酵

在 1L 含 300ml 组成为蛋白胨 10g、酵母抽提粉 5g、氯化钠 5g/L 的培养液（LB 培养液）摇瓶（10 瓶）中接种，37℃ 0.2mM 的异丙基硫代半乳糖苷（IPTG）诱导，振荡培养过夜，离心收集菌体。利用温控 P_L 启动子质粒时，于 30℃ 培养 8 小时，然后将培养液升温至 42℃，维持 4 小时使基因表达。

（6）经溶菌酶 37℃、1 小时破碎细胞壁后离心，将沉淀加 6M 盐酸胍抽提，离心透析，再离心，得蛋白质包涵体。将包涵体洗涤 3 次，洗涤溶液为 1% 氯化钠，0.1% 曲拉通 x-100（TrifoX-100），Tris-HCl 缓冲液（20mM，pH8），以十二烷基磺酸钠（SDS）-12% 聚丙烯酰胺凝胶（PAGE）电泳对融合蛋白进行鉴定。

(7) 将包涵体溶于 8M 尿素溶液中, 50mM HCl 条件下, 加溴化氰裂解, 避光通氮气条件下, 搅拌反应 2 小时。反应完毕, 用琼脂糖凝胶分子筛 G-25/快速蛋白分离系统 (FPLC) 分离, 得该蛙皮抗菌肽 衍生物粗品, 再经高效液相层析仪 (HPLC, C₁₈ 柱), 以乙腈/0.1% 三氟乙酸梯度洗脱。结果得该蛙皮抗菌肽衍生物产品, 该产品 HPLC 图谱与化学合成品完全一致。

实施例 2: 基因工程法制备本发明结构的蛙皮抗菌肽衍生物, 其中 X 为 Leu, Y 为 Ser-Lys。

(1) 按该蛙皮抗菌肽衍生物的氨基酸序列合成基因片段如下:

(a) 5' AAT TCC ATG GGT ATC GGT AAA TTT CTG CAC AGC GCG AAA AAA

(b) 5' TTT GGT AAA GCG TTT GTG GGT GAA ATC CTG AAC AGC AAG TAG A

(c) 5' AG CTT CTA CTT GCT GTT CAG GAT TTC ACC CAC AAA CGC TTT

(d) 5' ACC AAA TTT TTT CGC GCT GTG CAG AAA TTT ACC GAT ACC CAT GG

本实施例以下步骤 (2) ~ (7) 均同实施例 1。结果得该蛙皮抗菌肽衍生物产品, 该产品 HPLC 图谱与化学合成品完全一致。

实例 3: 固相化学合成法制备本发明结构的蛙皮抗菌肽衍生物, 其中 X 为 Leu, Y 为 Lys-Arg。

(1) 所采用的氨基酸单体:

Fmoc-L-Ala-OH	Fmoc-L-Lys (Boc)-OH
Fmoc-L-Asn (Trt)-OH	Fmoc-L-Met-OH
Fmoc-L-Asp (OtBu)-OH	Fmoc-L-Phe-OH
Fmoc-L-Gln (Trt)-OH	Fmoc-L-Pro-OH
Fmoc-L-Glu (OtBu)-OH	Fmoc-L-Ser (tBu)-OH
Fmoc-L-Gly-OH	Fmoc-L-Thr (tBu)-OH
Fmoc-L-His (Trt)-OH	Fmoc-L-Trp-OH
Fmoc-L-Ile-OH	Fmoc-L-Tyr (tBu)-OH
Fmoc-L-Leu-OH	Fmoc-L-Val-OH

上式中缩写表示:

Fmoc: 9-芴基甲氧羰基

BOC: 叔丁氧羰基 (tert-butyloxycarbonyl)

Trt: 三苯甲基 (trityl)

OtBu: 叔丁基酯

TBu: 叔丁基 (tert-butyl)

(2) 合成所采用的仪器设备及试剂:

仪器为: Applied Biosystem 多肽合成仪, 433A 型, 美国

试剂有: N-甲基吡咯烷酮, 二氯甲烷, 六氢吡啶, 甲醇, 二甲氨基吡啶

(Dimethylaminopyridine) / DMF, N,N-二异丙基乙胺 (N,N-diisopropylethylamine) / NMP, HBTU 100 mmole / 0.5 M HOBT in DMF, N,N-二环己基碳二亚胺 (N,N-Dicyclohexylcarbodiimide) / NMP

其中: DMF 为 N,N-二甲基甲酰胺 (N,N-Dimethylformamide)

NMP 为 N-甲基吡咯烷酮 (N-methylpyrrolidone)

HOBT 为 1-羟基苯并三唑 (1-Hydroxybenzotriazole)

HBTU 为 2-(1-氢-苯并三唑基)-四甲基脲六氟磷酸盐 (2-(1H-benzotriazole-yl-1,1,3,3-tetramethyl-Uronium hexafluorophosphate)

(3) 操作:

a、合成

以 0.25mmol 规模为例, 称取 HMP 树脂 0.25g, 置入多肽合成仪上的反应器中, 将各种带保护基氨基酸称取 1mmol 装瓶, 按该促胰岛素分泌肽衍生物的氨基酸序列从 C-端向 N-端排列在合成仪中, 于 25

℃室温条件下，由计算机程序控制自动进行脱 Fmoc 保护、活化、连结，然后再进行下一轮循环，如此完成合成。合成结束后，将得到的带侧链保护基的多肽树脂在多肽合成仪上吹干后称重即可。

b、 脱保护基及切断树脂：

将带保护基的该促胰岛素分泌肽衍生物多肽树脂置于具塞三角烧瓶，加入裂解试剂如下表：

试剂	用量
水	0.50 ml
苯甲醚	0.50 ml
苯酚	0.75 g
巯基乙醇	0.20 ml
三氟乙酸	10.0 ml

然后在恒温 30℃条件下，电磁搅拌反应 6 小时；过滤、收集滤液，树脂用少量三氟乙酸洗涤；合并收集液与洗涤液，加入乙醚产生沉淀，过滤，沉淀用少量乙醚洗涤后放入干燥器中干燥，得到粗品。

c、HPLC 分离纯化、冻干

将得到的粗品用制备型 HPLC 进行分离、提纯，最后经冷冻干燥后得到产品。经色质联用，该衍生物分子量实测值与理论值相符。

实施例 4：药效实验

以实施例 1 所得蛙皮抗菌肽衍生物与天然蛙皮抗菌肽 II 对照进行抑菌实验，具体操作如下：

待试菌大肠杆菌 E.coli JM103，金黄葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 分别培养，稀释至 1×10^6 菌/ml，加入灭菌的 Tris-HCl 缓冲液 20mM pH6.5，加入不同浓度的该衍生物和天然蛙皮抗菌肽 II，37℃保温不同时间，然后取 50 μ l 涂于琼脂糖凝胶培养皿中，37℃培养过夜，记录残存菌落数，计算杀菌百

分率。

(1) 杀菌效果表;

实施例 1 所得蛙皮抗菌肽衍生物与天然蛙皮抗菌肽 II 对大肠杆菌的杀菌效果对比表

品 名	浓度 $\mu\text{g/ml}$	残余菌落数			杀菌百分率%	
		0hr	3hr	4hr	3hr	4hr
实施例 1 所得蛙皮 抗菌肽衍 生物	0	407 228				
		317				
	10		109 73	160 195	71.3	44.2
			91	177		
	20		9 5	2 5	97.8	99.1
			7	3		
天然蛙皮 抗菌肽 II	10		99 57	52 44	75.4	84.9
			78	48		
	20		12 4	6 4	97.5	99.2
			8	5		

实施例 1 所得蛙皮抗菌肽衍生物对金黄葡萄球菌的杀菌效果表

浓度 $\mu\text{g/ml}$	残余菌落数			2hr 杀菌 百分率 %
	0hr	1hr	2hr	
0	267			
	225			
50	158	18	2	99
	185	18	2	99
	172	18	2	99

(2) 杀菌时间图: 实施例 1 所得蛙皮抗菌肽衍生物对大肠杆菌的抗菌时间

图见附图 1

(3) 溶血实验表;

分 组		剂量 ($\mu\text{g/ml}$)	溶血 %
实验组	天然蛙皮抗菌肽	100	0
		500	0
		1000	1.9
	实施例 1 所得蛙皮 抗菌肽衍生物	100	0
		500	0
		1000	2
对照组	曲拉通 x-100 (Tritonx-100)	0.1 %	100

(4) 急性毒性实验: 以二只昆明小鼠进行急性毒性实验, 腹腔注射实施例 1 所得蛙皮抗菌肽衍生物, 观察 1 小时后小鼠的存活情况。

腹腔注射量	存活率
100 μg	100 %
200 μg	100 %
1000 μg	100 %

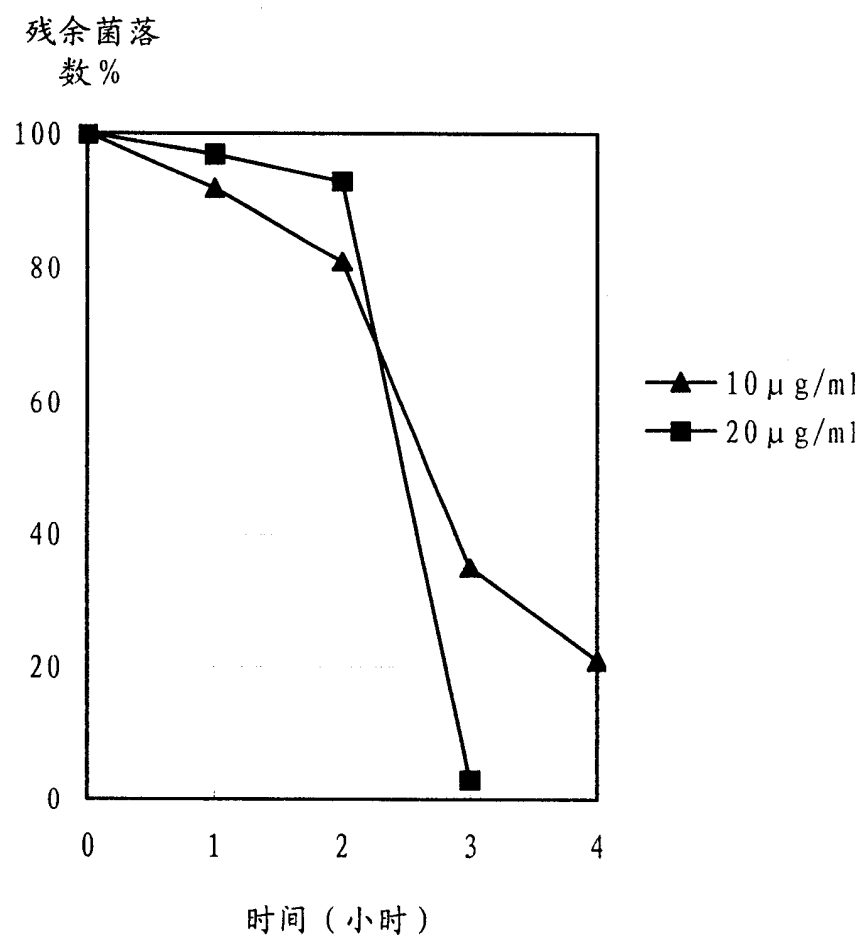


图 1