

(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



(10) 国际公布号

WO 2020/228218 A1

(43) 国际公布日

2020 年 11 月 19 日 (19.11.2020)

(51) 国际专利分类号:

C07K 7/08 (2006.01)

A61K 38/10 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

(21) 国际申请号:

PCT/CN2019/107585

(22) 国际申请日:

2019 年 9 月 24 日 (24.09.2019)

(25) 申请语言:

中文

(26) 公布语言:

中文

(30) 优先权:

201910394108.6 2019年5月13日 (13.05.2019) CN

(71) 申请人: 山东大学 (SHANDONG UNIVERSITY)

[CN/CN]; 中国山东省威海市文化西路 180 号, Shandong 264209 (CN)。

(72) 发明人: 吉爱国 (JI, Aiguo); 中国山东省威海市

文化西路 180 号, Shandong 264209 (CN)。 宋淑

亮 (SONG, Shuliang); 中国山东省威海市文化西路 180 号, Shandong 264209 (CN)。

(74) 代理人: 济南圣达知识产权代理有限公司 (JINAN

SHENGDA INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY

CO., LTD.); 中国山东省济南市经十路 17703 号华

特广场 B308 室, Shandong 250061 (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, 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。

(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,

(54) Title: HIRUDIN AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 一种水蛭肽及其应用

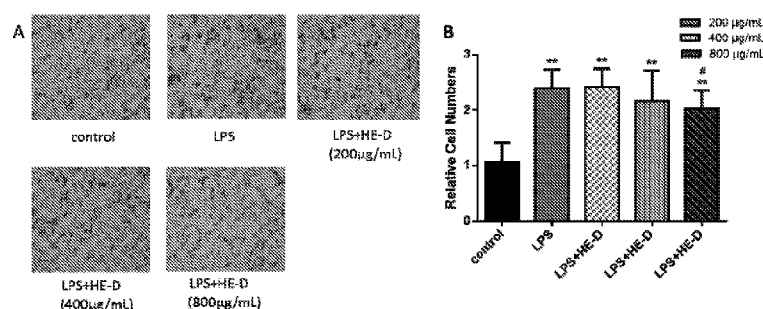


图 10

(57) Abstract: Provided in the present invention are hirudin and an application thereof. Specifically disclosed is synthetic hirudin provided with the activity of inhibiting the migration of macrophages in vitro, which may be applied to the prevention and development of atherosclerosis. The present invention firstly prepares a hirudin hydrolysate HE from *Whitmania pigra*. By means of further analysis and sequencing, the amino acid sequence of hirudin HE4-1 is finally obtained and artificially synthesized. By means of tests, it is verified that the artificially synthesized hirudin also has the activity of inhibiting the migration of macrophages, and thus has good, practical application value.

(57) 摘要: 本发明提供一种水蛭肽及其应用, 具体的, 本发明公开了一种具有体外抑制巨噬细胞迁移活性的合成水蛭肽, 其可应用于动脉粥样硬化的预防和发展。本发明首先从宽体金线蛭中制备得到水蛭酶解物 HE, 经进一步分析、测序, 最终获得水蛭肽 HE4-1 的氨基酸序列并进行人工合成, 经试验验证, 人工合成的水蛭肽同样具有抑制巨噬细胞迁移活性, 因此具有良好的实际应用之价值。

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))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

一种水蛭肽及其应用

技术领域

本发明属于生物制药技术领域，具体涉及一种水蛭肽及其应用。

背景技术

公开该背景技术部分的信息仅仅旨在增加对本发明的总体背景的理解，而不必然被视为承认或以任何形式暗示该信息构成已经成为本领域一般技术人员所公知的现有技术。

心脑血管疾病是全球范围内发病率、致死率和致残率第一位的疾病，严重威胁人类的生存和生活质量。WHO 数据显示，全球每年约有 1750 万人死于心血管疾病。我国血管病中心发布的《中国心血管病报告 2018》指出我国约有 2.9 亿心血管病患者，心血管病占疾病死亡构成的 40% 以上，是我国居民的首位死因，已成为我国重大公共卫生问题。动脉粥样硬化（Atherosclerosis AS）是心脑血管疾病发生发展的重要病理基础。AS 发展可经历数十年，由其引发的心血管疾病在出现症状时一般已进入后期。实际上 AS 早期阶段脂质条纹的形成可见于儿童期，虽不造成临床症状，但由此可见该病的发生是一个缓慢发展的长期过程，而 AS 的早期防治也就变的尤为重要。

AS 作为一种慢性疾病，其病因复杂，几十年的实验室及临床研究已对 AS 病理进程有了初步的了解。1980 年 Russell Ross 提出的“炎症-损伤-反应”学说得到广泛支持和认可，与“脂质渗透学说”相辅相成，较完整的阐释了 AS 发生、发展的全过程。目前认为，在 AS 早期，多种危险因素，如高脂血症、高血压、高血糖、吸烟等，引起血管内皮细胞和单核细胞损伤，从而使两者细胞表面表达大量细胞粘附分子，血管内皮细胞上 E 选择素、P 选择素及单核细胞上 L 选择素结合其配体介导单核细胞在血管内皮细胞上最初的滚动性粘附。血管内皮细胞释放趋化因子如单核细胞趋化蛋白 1

(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1), 使其细胞膜上血管细胞粘附分子 1(vascular cell adherent molecule-1, VCAM-1)、细胞间粘附分子 1 (intercellular adherent molecule-1, ICAM-1) 活化, 分别与白细胞表面的整合素结合, 如极迟抗原 4(very late antigen-4, VLA-4) 和淋巴细胞功能相关抗原 1(lymphocyte function associated anti-gen-1, LFA-1) , 引发牢固性粘附。一旦完成牢固性粘附, 单核细胞便跨过血管内皮迁移入血管内膜。渗入内膜的单核细胞在巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor, MCSF) 作用下分化为巨噬细胞。巨噬细胞通过清道夫受体, 如 CD36, 大量吞噬脂质, 继而转化为巨噬细胞源性泡沫细胞。同时, 巨噬细胞也释放趋化因子, 诱导中膜平滑肌细胞迁移入内膜, 后者也可吞噬脂质, 转化为平滑肌细胞源性泡沫细胞。泡沫细胞聚集于内膜, 形成 AS 早期病变脂纹(fatty streak) 。随着 AS 继续发展, T 细胞表达 γ 干扰素(IFN- γ) 、CD40 活化巨噬细胞, 活化的巨噬细胞进一步分泌细胞因子、生长因子促进平滑肌细胞的迁移和增殖。后者大量合成和分泌胶原纤维, 覆盖在斑块表面, 形成 AS 纤维斑块期。随着炎症持续存在, 巨噬细胞释放基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP) 降解胶原, 另一方面释放 NO, 诱导泡沫细胞凋亡, 从而促使 AS 进展为粥样斑块期。由于粥样斑块不稳定, 易引起许多继发性病变, 如血栓、斑块破裂、斑块内出血、动脉瘤等, 导致心肌梗死、脑出血、脑梗死等严重心血管疾病发生。因此单核/巨噬细胞不仅是首先进入 AS 部位的免疫细胞, 而且对 AS 斑块的形成、发展及转归均起着关键作用。

AS 的发生是多因素共同作用的结果, 目前已发现的 AS 危险性因素也很多, 但是目前针对性的治疗及控制效果均不理想, 降脂和抗炎治疗是目前最主要的治疗措施。越来越多的证据显示免疫反应(其中首先为巨噬细胞) 参与 AS 发展的各个环节。免疫缺陷小鼠与正常小鼠相比, AS 的严重程度减轻约 70%; 而血清胆固醇水平没有改变。因此炎症免疫调节机制成为目前

AS 研究的热点，对该机制的研究将为 AS 的治疗开辟新的道路。但是完全抑制免疫系统不良反应又太多，而从 AS 的发生发展的过程中我们可以看出单核/巨噬细胞是免疫系统参与 AS 的首要细胞，AS 斑块的消退也同时伴随着斑块中巨噬细胞的减少，反之，AS 斑块的进展伴随着巨噬细胞的增多。因此如果能抑制巨噬细胞向 AS 部位的迁移，就有可能在对免疫系统影响较小的情况下延缓 AS 的发展，这对于预防 AS 的发生具有重要的现实意义。

水蛭（*Whitmaniapigra* Whitman）作为临床常用中药之一，在古代医书中就用其治疗多种疾病，在《神农本草经》中谓其“主逐恶血、瘀血、月闭、破血消积聚……”。水蛭药理作用广泛，包括抗凝、抗血栓、抗肿瘤、抗炎以及抗纤维化等。近年来关于水蛭在心脑血管疾病中的研究也不断深入，其在心脑血管疾病中的应用也越来越多。临床上水蛭已广泛应用于冠心病、心绞痛、急性心肌梗塞、缺血性脑中风、脑出血、动脉粥样硬化及周围血管病等疾病的治疗。目前除了具有凝血酶抑制作用的水蛭素及其衍生制剂外，其他制剂大都是以水蛭全体入药，没有进行系统的分离纯化。中药水蛭在临床中应用广泛，但是发明人发现，由于水蛭成分复杂，不易控制药材质量，不良反应较多，其中最大的不良反应就是容易引发出血，因此长期服用水蛭制剂的患者需要定期监测血凝。

发明内容

基于上述现有技术的不足，本发明提供一种具有体外抑制巨噬细胞迁移活性的水蛭肽，其可应用于动脉粥样硬化的预防和发展。本发明首先从宽体金线蛭中制备得到水蛭酶解物 HE，经进一步分析、测序，最终获得水蛭肽 HE4-1 的氨基酸序列并进行人工合成，经试验验证，人工合成的水蛭肽同样具有抑制巨噬细胞迁移的活性，因此具有良好的实际应用之价值。

本发明的一个方面，提供一种水蛭多肽，组成水蛭多肽的氨基酸序列为

EAGSAKELEGDPVAG (SEQ ID NO.1)。该水蛭多肽具有抑制巨噬细胞迁移活性的作用，可采用固相多肽合成法合成。

本发明的第二个方面，提供一种水蛭多肽片段，其氨基酸主序列具有与上述水蛭多肽氨基酸主序列 $\geq 70\%$ 的相同性， $\geq 90\%$ 的相似性，片段为把所述的15个氨基酸的序列从任意位置截取成3个或4个或5个氨基酸组成的与所述水蛭多肽具有同样生物活性的水蛭多肽。

本发明的第三个方面，提供一种抑制巨噬细胞迁移的水蛭多肽类似物，其具有与上述水蛭多肽相同的生物活性，所述水蛭多肽类似物是指在用所述水蛭多肽和另一种化合物融合或者用所述水蛭多肽的氨基酸序列融合另外的多肽或者蛋白质而形成具有生物活性的多肽序列或蛋白质。

本发明的第四个方面，提供一种抑制巨噬细胞迁移的水蛭多肽衍生物，其氨基酸序列具有与水蛭多肽氨基酸主序列 $\geq 70\%$ 的相同性， $\geq 90\%$ 的相似性，该衍生物是指把所述氨基酸的序列中的氨基酸的一个或者几个氨基酸的某个基团用另外的基团取代后与所述水蛭多肽具有同样生物活性的水蛭多肽。

本发明的第五个方面，提供一种抑制巨噬细胞迁移的水蛭多肽变体，其氨基酸序列具有与水蛭多肽氨基酸主序列 $\geq 70\%$ 的相同性， $\geq 90\%$ 的相似性，该变体是指一种具有一个或几个氨基酸或核苷酸改变的氨基酸序列或编码它的核苷酸序列，所述改变包括在氨基酸序列或核苷酸序列中，在序列中间的任一位置缺失、插入或替换氨基酸或核苷酸，或在序列两端添加氨基酸或核苷酸。

本发明的第六个方面，提供编码所述水蛭多肽、水蛭多肽片段、水蛭多

肽类似物、水蛭多肽衍生物或水蛭多肽变体的核苷酸，其包含下组中的任一种：

(a)编码具有所述氨基酸序列的多肽或其片段、类似物、衍生物或其变体的核苷酸；

(b)与(a)所述核苷酸互补的核苷酸；

(c)与(a)或(b)中所述核苷酸有 $\geq 75\%$ 相同性的核苷酸。

所述核苷酸采用人工合成方法制备。

本发明的第七个方面，提供上述水蛭多肽、水蛭多肽片段、水蛭多肽类似物、水蛭多肽衍生物和水蛭多肽变体用于制备具有由于巨噬细胞迁移引发的一切相关疾病、诊断与检测相关疾病的发生以及相关疾病发生的恶性程度药物的应用。

优选的，所述疾病包括动脉粥样硬化。

本发明的有益技术效果：

本发明从宽体金线蛭中制备得到水蛭酶解物 HE，经进一步分析、测序，最终获得水蛭肽 HE4-1 的氨基酸序列并进行人工合成，经试验验证，人工合成的水蛭肽同样具有抑制巨噬细胞迁移活性，从而具有预防和/或治疗动脉粥样硬化及其相关疾病的潜在价值，具有良好的实际应用之前景。

附图说明

构成本发明的一部分的说明书附图用来提供对本发明的进一步理解，本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明，并不构成对本发明的不当限定。

图 1 是本发明实施例 1 中 HE 经 Q Sepharose FF 强碱性阴离子柱层析洗脱曲线图。

图 2 是本发明实施例 1 中 HE1-HE6 对巨噬细胞 RAW264.7 迁移活性的影响图；其中，图 2 (A) 巨噬细胞 RAW264.7 迁移结果图 (100×)；图 2 (B) 小室下层细胞数量统计结果图。 $**p<0.01$ VS 对照组， $\#p<0.05$ VS LPS 组， $##p<0.01$ VS LPS 组。

图 3 是本发明实施例 1 中 HE4 经 Superdex30 凝胶过滤层析洗脱曲线图。

图 4 是本发明实施例 1 中 HE1-HE6 对巨噬细胞 RAW264.7 存活率的影响图；图 4 (A) 为 HE4-1 处理后巨噬细胞 RAW264.7 迁移结果图 (100×)；图 4 (B) 为 HE4-1 处理后小室下层细胞数量统计结果图；图 4 (C) 为 HE4-2 处理后巨噬细胞 RAW264.7 迁移结果图 (100×)；图 4 (D) 为 HE4-2 处理后小室下层细胞数量统计结果图。 $*p<0.05$ VS 对照组， $**p<0.01$ VS 对照组， $\#p<0.05$ VS LPS 组。

图 5 是本发明实施例 1 中 HE4-1 经 Superdexpeptide 凝胶过滤层析洗脱曲线图；

图 6 是本发明实施例 1 中 HE4-1 经 G10 凝胶过滤层析洗脱曲线图；

图 7 是本发明实施例 1 中 HE4-1 对巨噬细胞 RAW264.7 迁移活性的影响图；其中，图 7 (A) 巨噬细胞 RAW264.7 迁移结果图 (100×)；图 7 (B) 是小室下层细胞数量统计结果图。 $**p<0.01$ VS 对照组， $\#p<0.05$ VS LPS 组。

图 8 是本发明实施例 2 中 HE4-1 的 MALDI-TOF 质谱图；

图 9 是本发明实施例 2 中 HE4-1 的 LC-MS/MS 质谱图；

图 10 是本发明实施例 4 中 HE-D 对巨噬细胞 RAW264.7 迁移活性的影响图；其中，图 10 (A) 为基于 Transwell 小室 HE-D 对巨噬细胞 RAW264.7 迁移活性照片；图 10 (B) 为数据统计柱状图。

图 11 是本发明实施例 5 中 HE-D 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 JNK、p38 信号通路的影响；图 11 (A) 为 JNK、p38 信号通路 Western blot 结果图；图 11 (B) 为 Image J 数据处理结果图。 $*p<0.05$ VS LPS 组。

图 12 是本发明实施例 6 中 HE-D 对 RAW264.7 细胞吞噬能力及溶菌酶分泌能力的影响图，其中，图 12 (A) 为 HE-D 对巨噬细胞吞噬能力无显著影响图；图 12 (B) 为 HE-D 对巨噬细胞溶菌酶分泌能力无显著影响图。*** $p < 0.001$ VS 对照组。

图 13 是本发明实施例 6 中 HE-D 对 RAW264.7 细胞分泌 IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α 的影响图；其中，图 13 (A) 为 HE-D 对巨噬细胞 IL-1 的分泌能力无显著影响图；图 13 (B) HE-D 对巨噬细胞 IL-6 的分泌能力无显著影响图；图 13 (C) 为 HE-D 对巨噬细胞 IL-12 的分泌能力无显著影响图；图 13 (D) 表明 400, 800 μ g/mL 的 HE-D 可促进 TNF- α 的分泌图。 $*p < 0.05$ VS 对照组，*** $p < 0.001$ VS 对照组。

具体实施方式

应该指出，以下详细说明都是示例性的，旨在对本发明提供进一步的说明。除非另有指明，本发明使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属技术领域的普通技术人员通常理解的含义。

需要注意的是，这里所使用的术语仅是为了描述具体实施方式，而非意图限制根据本发明申请的示例性实施方式。如在这里所使用的，除非上下文另外明确指出，否则单数形式也意图包括复数形式，此外，还应当理解的是，当在本说明书中使用术语“包含”和/或“包括”时，其指明存在特征、步骤、操作、器件、组件和/或它们的组合。

如前所述，由于水蛭成分复杂，不易控制药材质量，不良反应较多，其中最大的不良反应就是容易引发出血，因此长期服用水蛭制剂的患者需要定期监测血凝。

有鉴于此，本发明的一个典型实施方式中，提供一种水蛭多肽，组成水

蛭多肽的氨基酸主序列为 EAGSAKELEGDPVAG。该水蛭多肽具有抑制巨噬细胞迁移活性的作用。

本发明所述的合成水蛭肽（代号为 HE-D）的序列缩写为：EAGSAKELEGDPVAG，分子量为：1429.294 Da，序列为：Glu-Ala-Gly-Ser-Ala-Lys-Glu-Leu-Glu-Gly-Asp-Pro-Val-Ala-Gly。其中，

Glu 表示英文名称为 glutamic acid，中文名称为谷氨酸的氨基酸的相应残基；

Ala 表示英文名称为 alanine，中文名称为丙氨酸的氨基酸的相应残基；

Gly 表示英文名称为 glycine，中文名称为甘氨酸的氨基酸的相应残基；

Ser 表示英文名称为 serine，中文名称为丝氨酸的氨基酸的相应残基；

Lys 表示英文名称为 lysine，中文名称为赖氨酸的氨基酸的相应残基；

Leu 表示英文名称为 leucine，中文名称为亮氨酸的氨基酸的相应残基；

Asp 表示英文名称为 aspartic acid，中文名称为天冬氨酸的氨基酸的相应残基；

Pro 表示英文名称为 proline，中文名称为脯氨酸的氨基酸的相应残基；

Val 表示英文名称为 valine，中文名称为缬氨酸的氨基酸的相应残基。

本发明上述多肽可采用多肽固相合成法人工合成，具体的，所述的氨基酸序列采用标准 Fmoc 方案，通过树脂筛选，合理的多肽合成方法。将目标多肽的 C-端羧基以共价键形式与一个不溶性的高分子树脂相连，然后以这个氨基酸的氨基作为起点，与另一分子氨基酸的羧基作用形成肽键。不断重复这一过程，即可以得到目标多肽产物。合成反应完成后，去除保护基，将肽链与树脂分离，即得到目标产物。多肽合成是一个重复添加氨基酸的过程，

固相合成顺序从 C 端向 N 端合成。

经试验证明, 本发明提供的水蛭多肽 HE-D 可以通过调节 JNK 和 p38 磷酸化水平发挥抑制巨噬细胞迁移作用。HE-D 在抑制巨噬细胞迁移的同时, 对巨噬细胞的生物学功能基本没有影响, 可以有效减少 HE-D 的不良反应。因此, 合成水蛭肽 HE-D 可用于动脉粥样硬化的早期预防, 并具有阻止 AS 进一步发展的潜在作用。

本发明的又一具体实施方式中, 所述水蛭多肽片段, 其氨基酸主序列具有与该水蛭多肽氨基酸主序列 $\geq 70\%$ 的相同性, $\geq 90\%$ 的相似性, 片段为把所述的 15 个氨基酸的序列从任意位置截取成 3 个或 4 个或 5 个氨基酸组成的与所述水蛭多肽具有同样生物活性的水蛭多肽。

本发明的又一具体实施方式中, 提供一种抑制巨噬细胞迁移的水蛭多肽类似物, 其具有与所述水蛭多肽相同的生物活性, 所述类似物是指在用所述水蛭多肽和另一种化合物融合或者用所述水蛭多肽的氨基酸序列融合另外的多肽或者蛋白质而形成具有生物活性的多肽序列或蛋白质。

本发明的又一具体实施方式中, 提供一种抑制巨噬细胞迁移的水蛭多肽衍生物, 其氨基酸序列具有与水蛭多肽氨基酸主序列 $\geq 70\%$ 的相同性, $\geq 90\%$ 的相似性, 该衍生物是指把所述氨基酸的序列中的氨基酸的一个或者几个氨基酸的某个基团用另外的基团取代后与所述水蛭多肽具有同样生物活性的水蛭多肽。

本发明的又一具体实施方式中, 提供一种抑制巨噬细胞迁移的水蛭多肽变体, 其氨基酸序列具有与水蛭多肽氨基酸主序列 $\geq 70\%$ 的相同性, $\geq 90\%$ 的相似性, 该变体是指一种具有一个或几个氨基酸或核苷酸改变的氨基酸序列

或编码它的核苷酸序列，所述改变包括在氨基酸序列或核苷酸序列中，在序列中间的任一位置缺失、插入或替换氨基酸或核苷酸，或在序列两端添加氨基酸或核苷酸。

本发明的又一具体实施方式中，提供编码所述水蛭多肽、水蛭多肽片段、水蛭多肽类似物、水蛭多肽衍生物或水蛭多肽变体的核苷酸，其包含下组中的任一种：

(a)编码具有所述氨基酸序列的多肽或其片段、类似物、衍生物或其变体的核苷酸；

(b)与(a)所述核苷酸互补的核苷酸；

(c)与(a)或(b)中所述核苷酸有 $\geq 75\%$ 相同性的核苷酸。

所述核苷酸采用人工合成方法制备。

本发明的又一具体实施方式中，提供上述水蛭多肽、水蛭多肽片段、水蛭多肽类似物、水蛭多肽衍生物和水蛭多肽变体用于制备具有预防和/治疗动脉粥样硬化等由于巨噬细胞迁移引发的一切相关疾病、诊断与检测相关疾病的发生以及相关疾病发生的恶性程度药物的应用。所述疾病包括动脉粥样硬化。

本发明的又一具体实施方式中，水蛭多肽用于制备具有作为蛋白酶抑制剂或者促进剂或者亲和试剂的药物或者检测试剂的应用。

以下通过实施例对本发明做进一步解释说明，但不构成对本发明的限制。应理解这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。

实施例 1 水蛭肽的分离纯化

本实施例采用酶解法从宽体金线蛭中制备得到水蛭酶解物 HE。在建立 LPS 诱导巨噬细胞 RAW264.7 迁移模型后,通过 Transwell 小室检测发现 HE 可以浓度依赖性抑制巨噬细胞迁移。接着使用 QSepharoseFF 强碱性阴离子交换柱层析、Superdex30、Superdexpeptide 和 G10 凝胶柱层析对 HE 进行分离纯化,并结合 Transwell 实验进行活性追踪,最终分离得到具有抑制巨噬细胞 RAW264.7 迁移活性的水蛭肽 HE4-1。

使用 QSepharoseFF 强碱性阴离子柱对 HE 进行第一次分离,如图 1 所示,HE 共分离得到 6 个峰,收集各洗脱峰产物,醇沉脱盐后冻干得到 HE1-HE6。

使用 Transwell 小室检测 HE1-HE6 抑制巨噬细胞迁移活性,结果如图 2 所示,LPS 诱导后,巨噬细胞迁移活性显著增大。在加入六种洗脱产物处理后,HE3 和 HE4 可以显著抑制 LPS 诱导的巨噬细胞 RAW264.7 迁移。考虑 HE3 洗脱物产率较低,且只有高浓度下才具有抑制迁移活性,因此接下来主要对 HE4 进行下一步分离纯化。

使用 Superdex30 凝胶柱对 HE4 进行分离,如图 3 所示,HE4 共分离得到 2 个峰,收集各洗脱峰产物,醇沉脱盐冻干后得到洗脱产物 HE4-1 和 HE4-2。

使用 Transwell 小室检测 HE4-1 和 HE4-2 抑制巨噬细胞迁移活性,结果如图 4 所示,800 μ g/mL 的 HE4-1 可显著抑制 LPS 诱导的巨噬细胞 RAW264.7 迁移,其抑制率可达到 15.2 %。

将 HE4-1 过 Superdexpeptide 凝胶过滤层析,结果如图 5 所示,只洗脱出唯一单峰,即 HE4-1。再将 HE4-1 过 SephadexG10 凝胶柱进行脱盐处理(图 6),并收集盐峰前的 HE4-1 峰作为最终分离纯化产物。

使用 Transwell 小室检测最终洗脱产物 HE4-1 抑制巨噬细胞 RAW264.7 迁移活性, 结果如图 7 所示, 1 μ g/mL LPS 可显著促进巨噬细胞的迁移, 而 800 μ g/mL 的 HE4-1 可抑制由 LPS 诱导的巨噬细胞 RAW264.7 的迁移, 其抑制率可达 15.2 %。

实施例 2 水蛭肽的测序

将水蛭肽 HE4-1 送至北京华大蛋白, 通过 LC-ESI-QUAD-TOF-MS/MS 检测氨基酸序列。色谱柱: Trap 柱: AcclaimPePmap100 (75 μ m $\times$ 2cm, 3 μ m, 100A, Thermoscientific); 分析柱: 华大蛋白自制喷针一体柱, 填料为: Venusil $\times$ BPC, C18 (L), 5 μ m, 150A (AgelaTechnologies)。色谱条件为: 流动相 A 为 0.1%甲酸水溶液, 流动相 B 为 0.1%甲酸乙腈, 梯度洗脱条件: 0-48min, A:95%-20%, B:5%-80%; 48-56minA:20%-20%, B:80%-80%; 流速为 0.4 μ L/min。

经高分辨质谱检测, 水蛭肽 HE4-1 分子量为 1429.294Da (见图 8), 氨基酸序列为 EAGSAKELEGDPVAG (见图 9)。

实施例 3 水蛭肽 HE-D 的全合成

将测得的氨基酸序列:
Glu-Ala-Gly-Ser-Ala-Lys-Glu-Leu-Glu-Gly-Asp-Pro-Val-Ala-Gly 送至生工生物工程(上海)进行多肽合成, 将合成肽命名为 HE-D, 纯度经 HPLC 检测为 95%以上, 并经 ESI-MS 鉴定结构。

实施例 4 合成水蛭肽 HE-D 抑制巨噬细胞迁移的活性

使用 Transwell 小室检测 HE-D 抑制巨噬细胞 RAW264.7 迁移活性, 实验分共为五组, 包括空白对照组, LPS 造模组和 HE-D200, 400, 800 μ g/mL 组。结果如图 10 所示, 1 μ g/mL LPS 可显著促进巨噬细胞的迁移, 而 800 μ g/mL 的 HE-D 可抑制由 LPS 诱导的巨噬细胞 RAW264.7 的迁移, 其抑制率可达 14.9 %。

实施例 5 合成水蛭肽 HE-D 抑制巨噬细胞迁移的信号通路研究

通过 Westernblot 实验检测 HE-D 发挥抑制巨噬细胞 RAW264.7 作用的机制, 结果如图 11 所示, HE-D 对 JNK 与 p38 总蛋白的表达量无显著影响, 但 800 μ g/mL 的 HE-D 可以显著抑制由 LPS 诱导的 JNK 和 p38 磷酸化蛋白表达量的升高, 这表明 HE-D 可以通过调节 JNK 和 p38 磷酸化水平发挥抑制巨噬细胞迁移作用。

实施例 6 合成水蛭肽 HE-D 对巨噬细胞生物学功能的影响

通过中性红吞噬实验和溶菌酶活性测定实验分别检测 HE-D 对巨噬细胞 RAW264.7 吞噬能力及溶菌酶活性的影响, 结果如图 12 所示, 1 μ g/mL LPS 可显著增加巨噬细胞吞噬能力和溶菌酶活性, 而 0-800 μ g/mL 的 HE-D 对巨噬细胞 RAW264.7 吞噬能力及溶菌酶活性的影响均无显著性影响。

使用 ELISA 法检测 HE-D 对巨噬细胞 RAW264.7 分泌炎症相关因子 IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α 的影响, 结果如图 13 所示, 1 μ g/mL LPS 可显著促进四种炎症因子的释放, 而 0-800 μ g/mL 的 HE-D 对巨噬细胞 IL-1, IL-6,

IL-12 三种促炎因子的分泌能力无显著影响, 400, 800 μ g/mL 的 HE-D 可促进 TNF- α 的分泌, 但影响较小, 最高可提升 11.4 %。

综上, HE-D 对 JNK 与 p38 总蛋白的表达量无显著影响, 但 800 μ g/mL 的 HE-D 可以显著抑制由 LPS 诱导的 JNK 和 p38 磷酸化蛋白表达量的升高, 这表明 HE-D 可以通过调节 JNK 和 p38 磷酸化水平发挥抑制巨噬细胞迁移作用。HE-D 在抑制巨噬细胞迁移的同时, 对巨噬细胞的生物学功能基本没有影响, 可以有效减少 HE-D 的不良反应。因此, 合成水蛭肽 HE-D 可用于动脉粥样硬化的早期预防, 并具有阻止 AS 进一步发展的潜在作用。

最后应该说明的是, 以上所述仅为本发明的优选实施例而已, 并不用于限制本发明, 尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明, 对于本领域的技术人员来说, 其依然可以对前述实施例所记载的技术方案进行修改, 或者对其中部分进行等同替换。凡在本发明的精神和原则之内, 所作的任何修改、等同替换、改进等, 均应包含在本发明的保护范围之内。上述虽然对本发明的具体实施方式进行了描述, 但并非对本发明保护范围的限制, 所属领域技术人员应该明白, 在本发明的技术方案的基础上, 本领域技术人员不需要付出创造性劳动即可做出的各种修改或变形仍在本发明的保护范围以内。

SEQUENCE LISTING

<110> 山东大学

<120> 一种水蛭肽及其应用

<130>

<160> 1

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> 水蛭多肽

<400> 1

Glu Ala Gly Ser Ala Lys Glu Leu Glu Gly Asp Pro Val Ala Gly

1

5

10

15

1、一种水蛭多肽，其特征在于，组成水蛭多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示。

2、一种水蛭多肽片段，其特征在于，其氨基酸主序列具有如权利要求 1 所述水蛭多肽氨基酸序列 $\geq 70\%$ 的相同性， $\geq 90\%$ 的相似性，片段为把所述的 15 个氨基酸的序列从任意位置截取成 3 个或 4 个或 5 个氨基酸组成的与所述水蛭多肽具有同样生物活性的水蛭多肽。

3、一种水蛭多肽类似物，其特征在于，其具有与权利要求 1 所述水蛭多肽相同的生物活性，所述类似物是指在用所述水蛭多肽和另一种化合物融合或者用所述水蛭多肽的氨基酸序列融合另外的多肽或者蛋白质而形成具有生物活性的多肽序列或蛋白质。

4、一种水蛭多肽衍生物，其特征在于，其氨基酸序列具有与权利要求 1 所述水蛭多肽氨基酸主序列 $\geq 70\%$ 的相同性， $\geq 90\%$ 的相似性，该衍生物是指把所述氨基酸的序列中的氨基酸的一个或者几个氨基酸的某个基团用另外的基团取代后与所述水蛭多肽具有同样生物活性的水蛭多肽。

5、一种水蛭多肽变体，其特征在于，其氨基酸序列具有与权利要求 1 所述水蛭多肽氨基酸主序列 $\geq 70\%$ 的相同性， $\geq 90\%$ 的相似性，该变体是指一种具有一个或几个氨基酸或核苷酸改变的氨基酸序列或编码它的核苷酸序列，所述改变包括在氨基酸序列或核苷酸序列中，在序列中间的任一位置缺失、插入或替换氨基酸或核苷酸，或在序列两端添加氨基酸或核苷酸。

6、编码权利要求 1 所述水蛭多肽、权利要求 2 所述水蛭多肽片段、权利要求 3 所述水蛭多肽类似物、权利要求 4 所述水蛭多肽衍生物或权利要求 5 所述水蛭多肽变体的核苷酸，优选的，所述核苷酸包含下组中的任一种：

(a)编码具有所述氨基酸序列的多肽或其片段、类似物、衍生物或其变体的核苷酸；

(b)与(a)所述核苷酸互补的核苷酸；

(c)与(a)或(b)中所述核苷酸有 $\geq 75\%$ 相同性的核苷酸；所述核苷酸采用人工合成方法制备。

7、如权利要求 1 所述的水蛭多肽，其特征在于，所述多肽采用多肽固相合成法制备。

8、权利要求 1 所述水蛭多肽、权利要求 2 所述水蛭多肽片段、权利要求 3 所述水蛭多肽类似物、权利要求 4 所述水蛭多肽衍生物或权利要求 5 所述水蛭多肽变体用于制备由于巨噬细胞迁移引发的一切相关疾病、诊断与检测相关疾病的发生以及相关疾病发生的恶性程度药物的应用。

9、如权利要求 8 所述应用，其特征在于，所述疾病为动脉粥样硬化。

10、权利要求 1 所述水蛭多肽、权利要求 2 所述水蛭多肽片段、权利要求 3 所述水蛭多肽类似物、权利要求 4 所述水蛭多肽衍生物或权利要求 5 所述水蛭多肽变体用于制备具有作为蛋白酶抑制剂或者促进剂或者亲和试剂的药物或者检测试剂的应用。

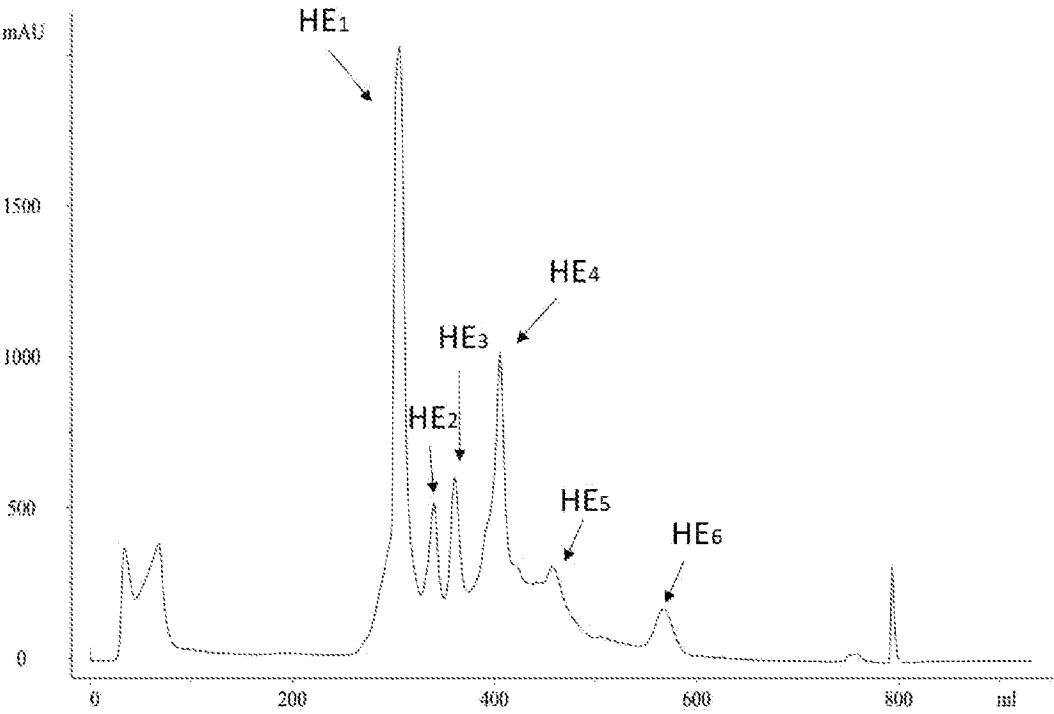


图 1

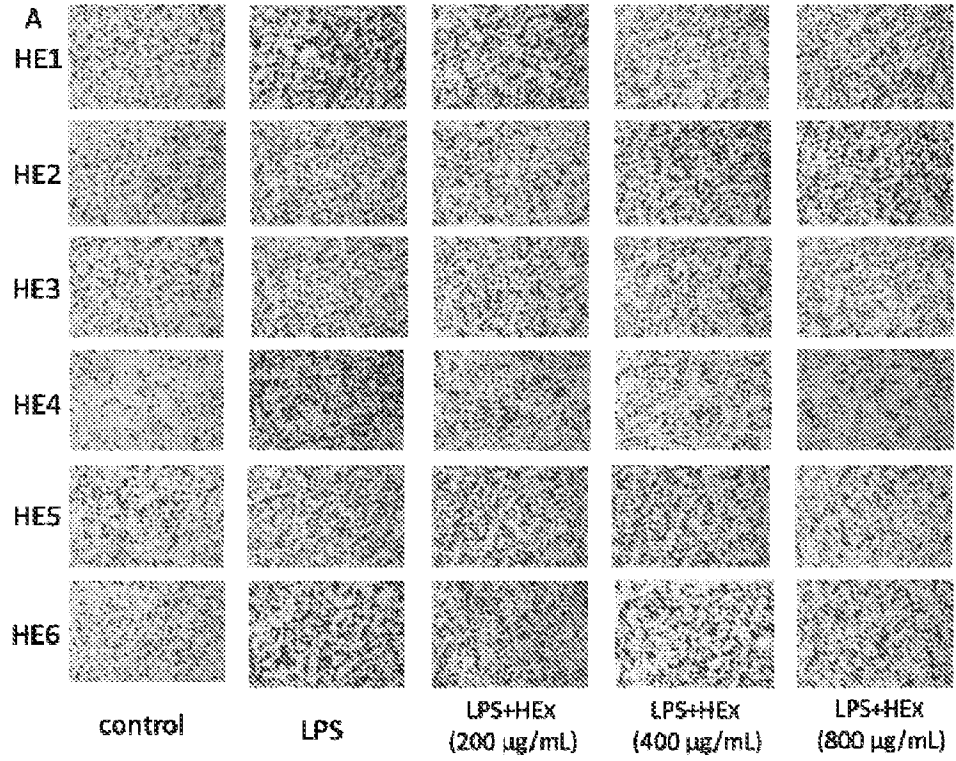


图 2

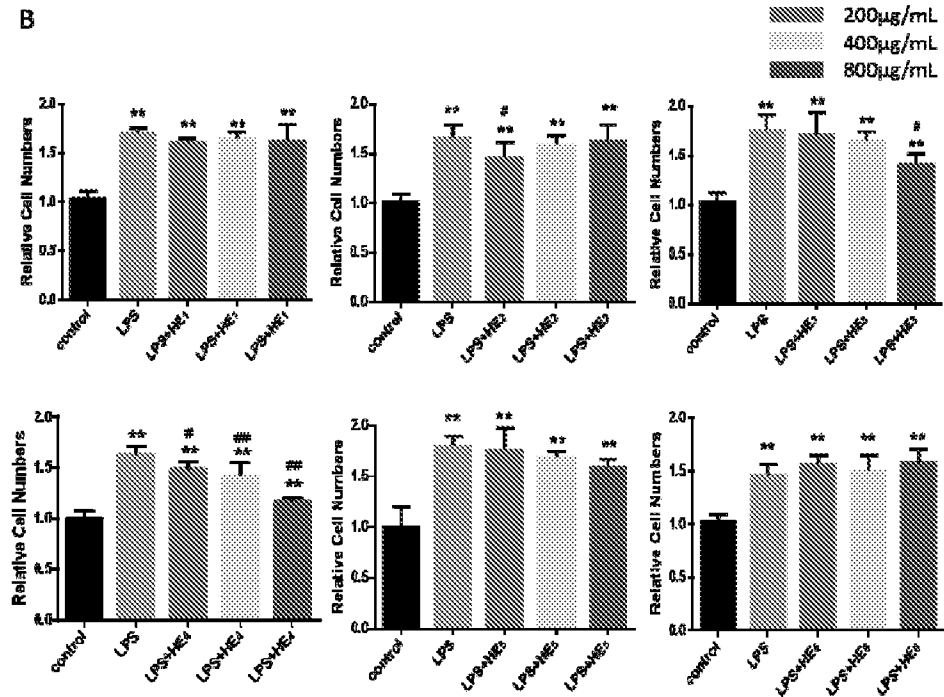


图 2

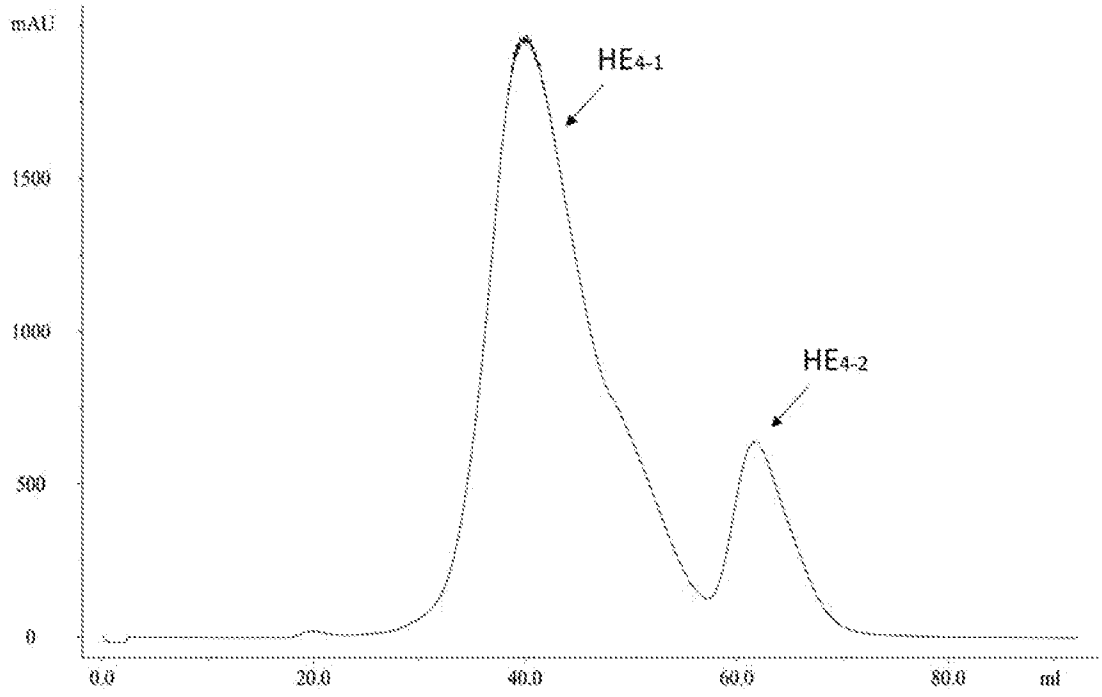


图 3

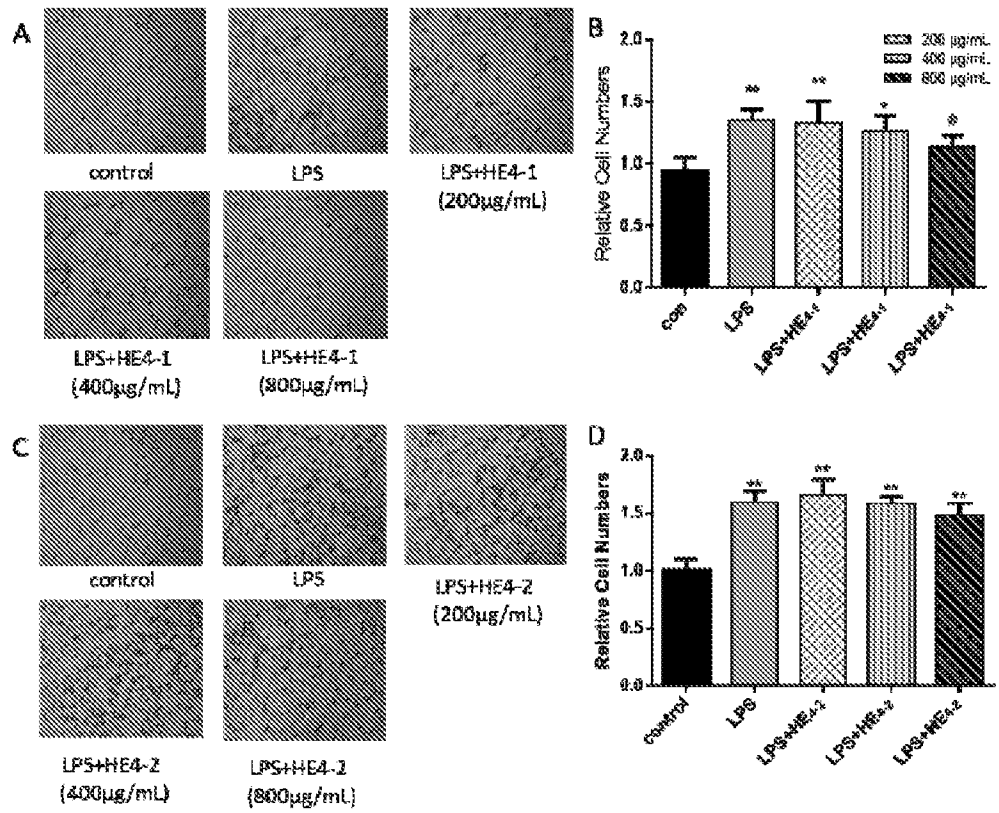


图 4

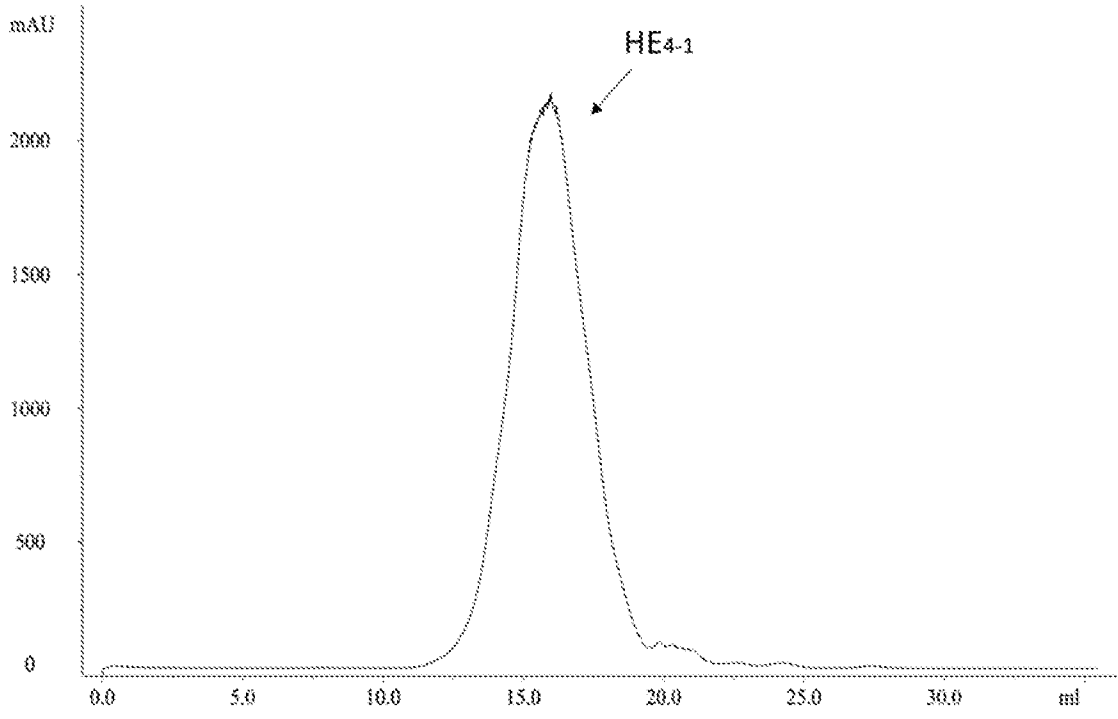


图 5

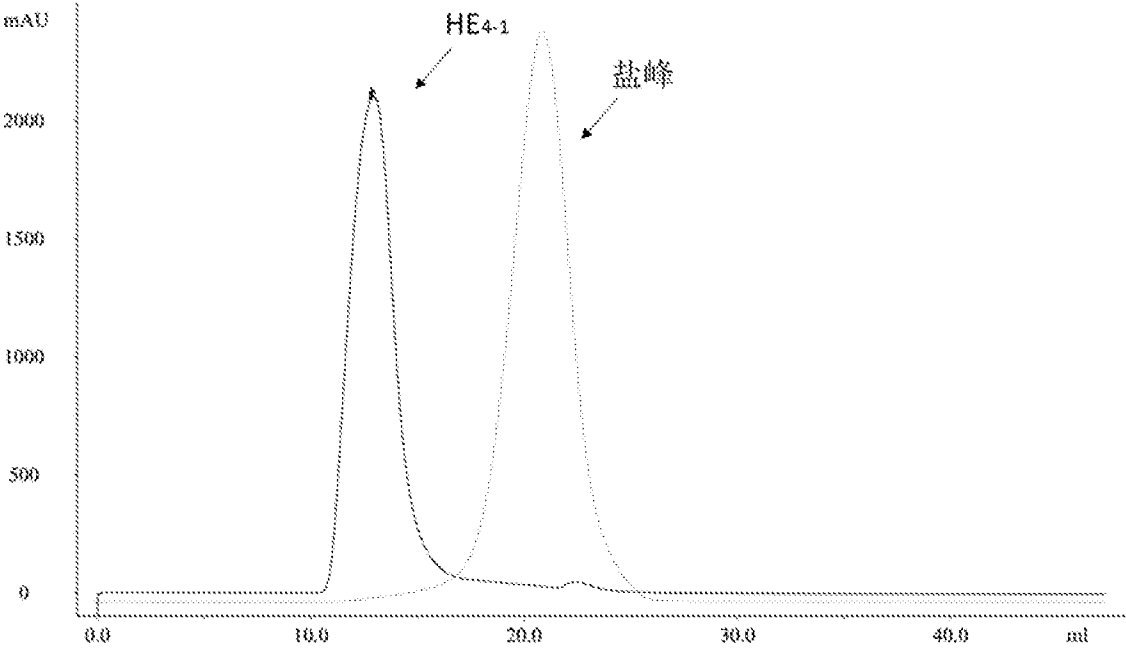


图 6

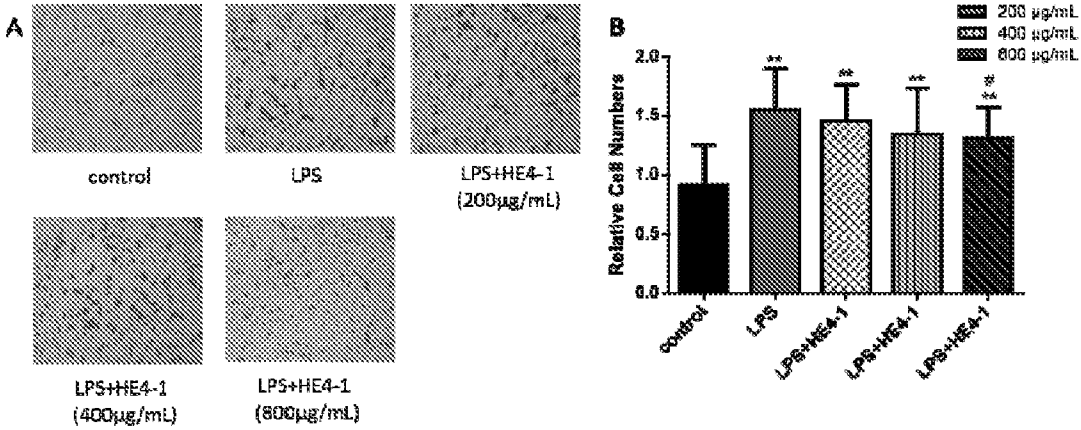


图 7

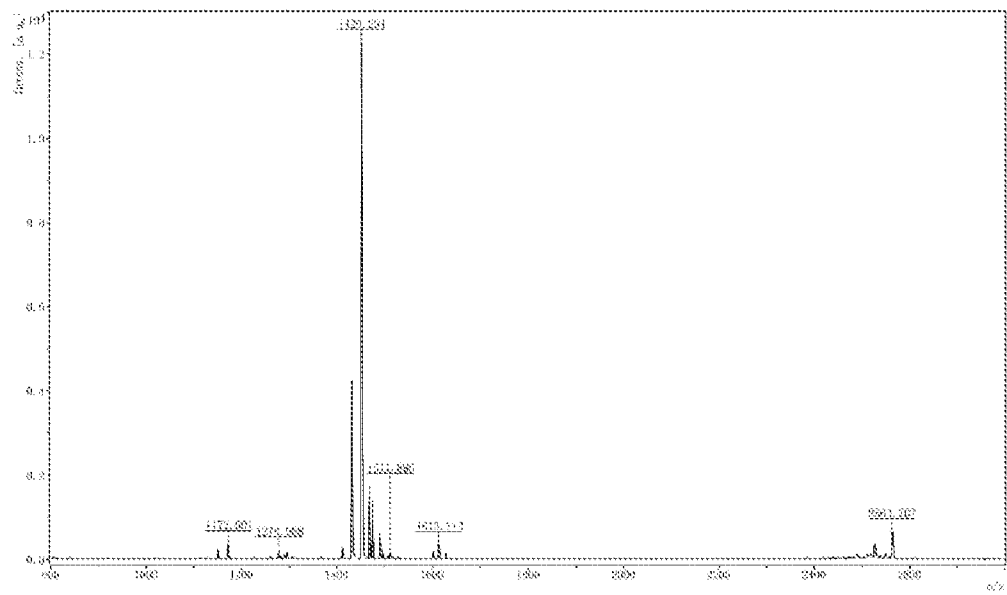


图 8

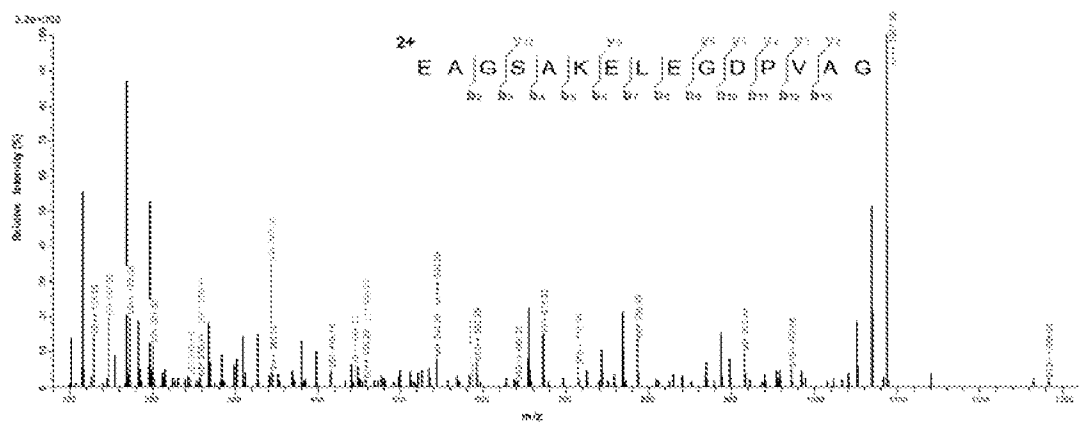


图 9

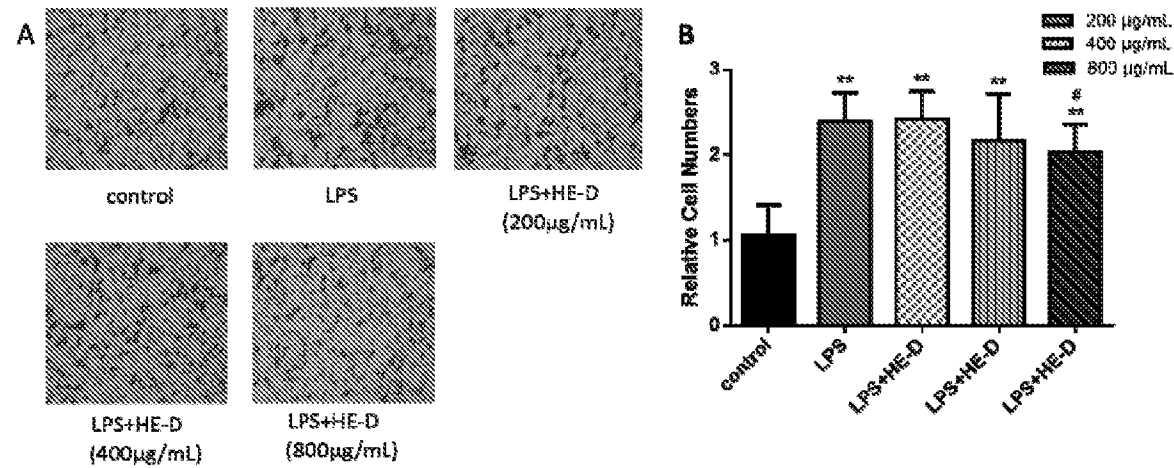


图 10

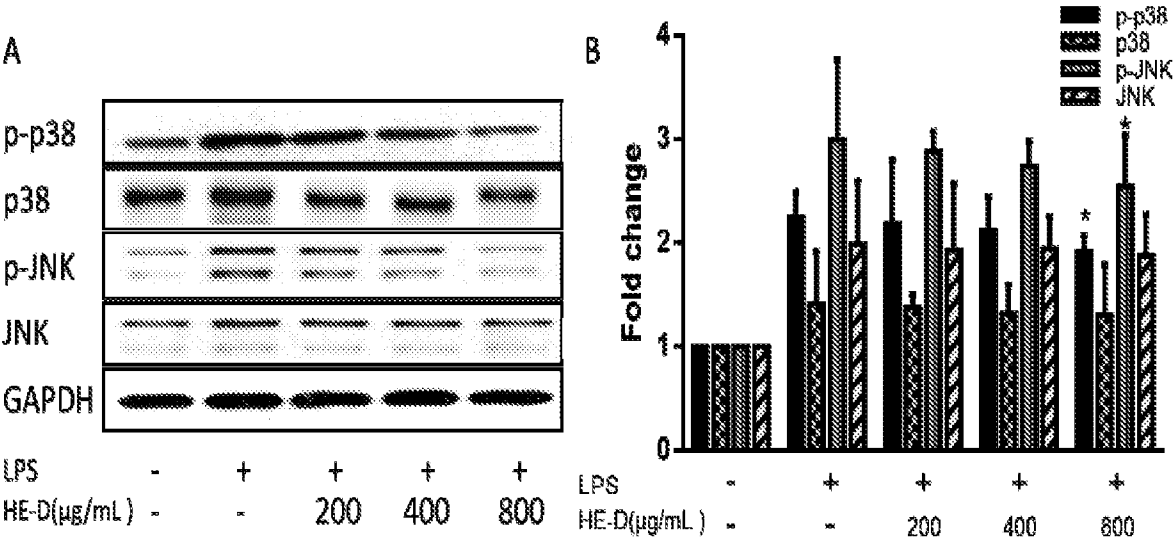


图 11

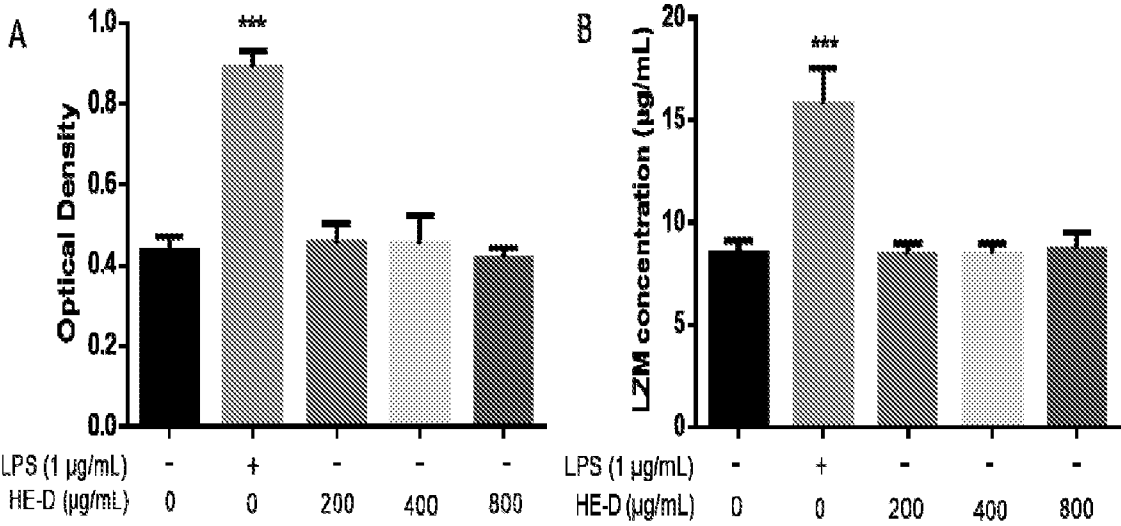


图 12

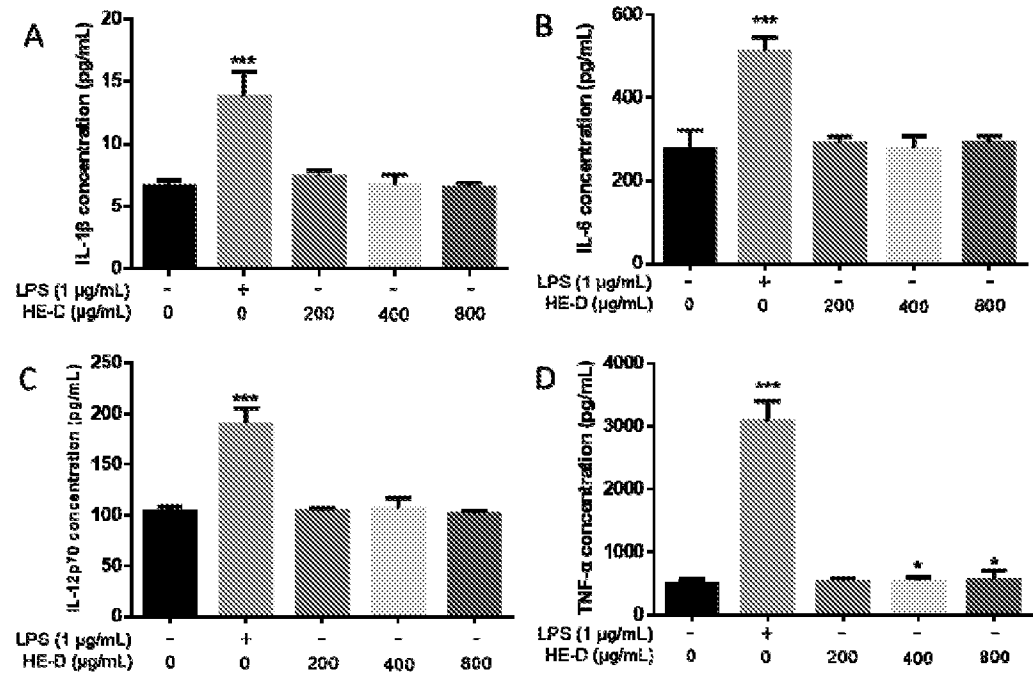


图 13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/107585

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 7/08(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; A61K 38/10(2006.01)i; A61P 9/10(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)

C07K; C12N; A61K; A61P

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)

CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, CPEA, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, ELSEVIER, EMBASE, ISI web of science; and search terms: 水蛭, 肽, 巨噬细胞, 迁移, whitmaniapigra whitman, peptide, hirudo, hirudin, hirudinoid, macrophage, migration, etc.; GENBANK, EMBL, 中国专利生物序列检索系统和检索的序列: SEQ ID NO: 1, China Patent Biological Sequence Search System and search sequence: SEQ ID NO: 1.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	李颖 (LI, Ying). "水蛭肽的分离纯化及其抑制巨噬细胞迁移的机制研究 (Study on Isolation, Purification and Mechanism of Hirudin Peptide with Activity of Inhibiting Macrophage Migration)" 中国优秀硕士学位论文全文数据库, 医药卫生科技辑 (Medicine and Health Science, Chinese Master's Theses Full-text Database), No. no. 9, 15 September 2017 (2017-09-15), ISSN: 1674-0246, Abstract, and Chapter II, Preparation for hirudin peptide (HP)	1, 3, 7 (all), 6, 8-10 (in part)
A	CN 101514231 A (CHONGQING UNIVERSITY) 26 August 2009 (2009-08-26) abstract, and claims 1-10	1, 3, 7 (all), 6, 8-10 (in part)
A	CN 107287269 A (SHANDONG UNIVERSITY) 24 October 2017 (2017-10-24) abstract, and claims 1-10	1, 3, 7 (all), 6, 8-10 (in part)
PX	CN 110066318 A (SHANDONG UNIVERSITY) 30 July 2019 (2019-07-30) claims 1-10	1, 3, 7 (all), 6, 8-10 (in part)



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

22 January 2020

Date of mailing of the international search report

18 February 2020

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration
 No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
 100088
 China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/107585

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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: **2、4、5** (全部) 和**6、8-10** (部分)
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:
 - [1] Claims 2, 4 and 5 respectively set forth a fragment, derivative and variant of a hirudin polypeptide, and define a large number of different polypeptides by using sequence identity and similarity, capturing three or four or five amino acid fragments, substitution, deletion, insertion or replacement; and an experiment is necessary to verify whether these polypeptides inhibit the migration of macrophages. Therefore, claims 2, 4 and 5 are not supported by the description, and do not comply with PCT Article 6, and the extend of not complying with the requirements causes that no meaningful search can be carried out.
 - [2] By the same reasoning, when referring to claims 2, 4 and 5, claims 6 and 8-10 are also not supported by the description, and do not comply with PCT Article 6, and the extend of not complying with the requirements causes that no meaningful search can be carried out.

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/CN2019/107585

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)	
CN	101514231	A	26 August 2009	CN	101514231	B	27 April 2011
CN	107287269	A	24 October 2017	None			
CN	110066318	A	30 July 2019	None			

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/107585

A. 主题的分类

C07K 7/08(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; A61K 38/10(2006.01)i; A61P 9/10(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)

C07K; C12N; A61K; A61P

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))

CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, CPEA, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, ELSEVIER, EMBASE, ISI web of science和
检索词: 水蛭, 肽, 巨噬细胞, 迁移, whitmaniapigra whitman, peptide, hirudo, hirudin, hirudinoid, macro-
phage, migration, 等; GENBANK, EMBL, 中国专利生物序列检索系统和检索的序列: SEQ ID NO: 1。

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
A	李颖. “水蛭肽的分离纯化及其抑制巨噬细胞迁移的机制研究” 中国优秀硕士学位论文全文数据库(医药卫生科技辑), 第9期, 2017年 9月 15日(2017-09-15), ISSN: 1674-0246, 摘要, 第二章水蛭肽HP的制备	1、3、7(全部) 和6、8-10(部分)
A	CN 101514231 A(重庆大学) 2009年 8月 26日(2009-08-26) 摘要, 权利要求1-10	1、3、7(全部) 和6、8-10(部分)
A	CN 107287269 A(山东大学) 2017年 10月 24日(2017-10-24) 摘要, 权利要求1-10	1、3、7(全部) 和6、8-10(部分)
PX	CN 110066318 A(山东大学) 2019年 7月 30日(2019-07-30) 权利要求1-10	1、3、7(全部) 和6、8-10(部分)

☐ 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

2020年 1月 22日

国际检索报告邮寄日期

2020年 2月 18日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(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

李晨

电话号码 86-10-62411100

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：
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
2. ☒ 权利要求： 2、4、5（全部）和6、8-10（部分）
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：
[1] 权利要求2、4、5分别请求保护一种水蛭多肽的片段、衍生物和变体，是使用序列相同性、相似性、截取3个或4个或5个氨基酸的片段、取代、缺失、插入或替换等限定了大量不同的多肽，这些多肽是否具有抑制巨噬细胞迁移需要实验的验证。因此，权利要求2、4、5得不到说明书的支持，不符合PCT条约第6条的规定，其不符合程度导致不能进行任何有意义的检索。
[2] 同理，当权利要求6、8-10引用权利要求2、4、5时，同样得不到说明书的支持，不符合PCT条约第6条的规定，其不符合程度导致不能进行任何有意义的检索。
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/CN2019/107585

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	101514231	A	2009年 8月 26日	CN 101514231 B	2011年 4月 27日
CN	107287269	A	2017年 10月 24日	无	
CN	110066318	A	2019年 7月 30日	无	