



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105504010 A

(43) 申请公布日 2016. 04. 20

(21) 申请号 201410498361. 3

(22) 申请日 2014. 09. 24

(71) 申请人 中国科学院大连化学物理研究所
地址 116023 辽宁省大连市中山路 457 号

(72) 发明人 邹汉法 靳艳 晏嘉泽

(74) 专利代理机构 沈阳科苑专利商标代理有限公司 21002

代理人 马驰

(51) Int. Cl.

C07K 7/06(2006. 01)

A61K 38/08(2006. 01)

A61P 3/10(2006. 01)

A61P 3/04(2006. 01)

A61P 13/12(2006. 01)

A61P 37/02(2006. 01)

A61P 9/00(2006. 01)

权利要求书1页 说明书3页
序列表1页

(54) 发明名称

一种具有 DPP-IV 抑制活性的多肽及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一种源于鹿蛋白的 DPP-IV 抑制肽 GPGSPGGPL, 其氨基酸序列为 Gly-Pro-Gly-Ser-Pro-Gly-Gly-Pro-Leu。多肽 GPGSPGGPL 具有 DPP-IV 抑制活性及降血糖活性, 作为糖尿病、心脏病、心血管病、肥胖症、肾病、免疫紊乱等疾病的保健品和药物先导化合物具有良好的应用前景。

1. 具有 DPP-IV 抑制活性的多肽,其特征在于:所述多肽为 GPGSPGGPL,具有序列表 SEQ ID NO:1 中氨基酸序列;该多肽的氨基酸序列具体为, Gly-Pro-Gly-Ser-Pro-Gly-Gly-Pro-Leu。
2. 一种权利要求 1 所述多肽在制备 DPP-IV 抑制剂或降血糖药物中的应用。
3. 按照权利要求 2 所述的应用,其特征在于:所述 DPP-IV 抑制剂及降血糖药物是以多肽 GPGSPGGPL 为活性成份,其中可添加药物学上可接受的载体或辅料。
4. 按照权利要求 2 所述的应用,其特征在于:所述多肽在制备预防和 / 或治疗糖尿病、心脏病、心血管病、肥胖症、肾病、免疫紊乱中的一种或二种以上疾病药物和 / 或保健品中的应用。

一种具有 DPP-IV 抑制活性的多肽及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及多肽 GPGSPGGPL 在制备抑制二肽基肽酶—IV (DPP-IV) 及降血糖中的应用。

背景技术

[0002] 二肽基肽酶—IV (dipeptidyl peptidase-IV, DPP-IV) (EC3.4.14.5) 是一种丝氨酸蛋白酶, 广泛分布于人体内。DPP-IV 通过对多肽的剪切使其失活, 从而达到调节生理功能的作用。DPP-IV 优先水解 N- 末端第二位上具有脯氨酸 (Pro) 或丙氨酸 (Ala) 的蛋白质。其作用底物包括: 胰高血糖素样肽 -1 (GLP217-36)、抑胃肽 (GIP1-42)、神经肽 (NPY)、YY 肽 (PYY) 以及胰多肽家族 (PP-family) 等。这些物质的共同特点就是 N- 末端第二位的氨基酸残基或者是脯氨酸或者是丙氨酸残基。DPP-IV 通过作用于以上多肽底物而在糖尿病、葡萄糖耐量、肥胖、食欲调节、高血脂症、骨质疏松、神经肽新陈代谢和 T- 细胞激活等相关疾病中起着重要的作用。因此, 体内给予 DPP-IV 抑制剂可预防相关底物肽的 N- 末端降解, 从而保障人体机能正常运行。

[0003] DPP-IV 将完整的 GLP-1 和 GIP 反应切断 N- 末端 2 个氨基酸残基后, 使其失活从而影响 GLP-1 和 GIP 相关的血糖调节等生理反应。体内给予 DPP-IV 抑制剂可预防 GLP-1 和 GIP 的 N- 末端降解, 使胰岛素分泌物增加从而改善葡萄糖耐量。鉴于 DPP-IV 抑制剂与血糖代谢的密切关系, DPP-IV 抑制剂已成为新型 2 型糖尿病药物的研究热点。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供多肽 GPGSPGGPL 在抑制 DPP-IV 活性和降血糖中的应用; 多肽 GPGSPGGPL 具有 DPP-IV 抑制活性及降血糖活性, 作为糖尿病、心脏病、心血管病、肥胖症、肾病、免疫紊乱等疾病的保健品和药物先导化合物具有良好的应用前景。

[0005] 为实现上述目的, 本发明以所述多肽 GPGSPGGPL 为抑制 DPP-IV 活性和降血糖的有效成份。

[0006] 其具有序列 SEQ ID NO: 1 中氨基酸序列; 多肽 GPGSPGGPL 为 DPP-IV 抑制剂及降血糖药物的活性成份, 其中可添加药物学上可接受的载体或辅料。

[0007] 具有抑制 DPP-IV 活性和降血糖活性的多肽化合物 GPGSPGGPL 的氨基酸序列为 Gly-Pro-Gly-Ser-Pro-Gly-Gly-Pro-Leu。单链线性结构, 分子量为 738.8Da, 白色粉末状, 易溶于水, 对 DPP-IV 活性具有很强的抑制作用, IC_{50} 为 1.64mM。

[0008] 多肽 GPGSPGGPL 具备 DPP-IV 抑制剂所要求的特征: DPP-IV 优先水解 N- 末端第二位上具有脯氨酸 (Pro) 或丙氨酸 (Ala) 的蛋白质或肽, GPGSPGGPL 的 N- 末端第二位上是脯氨酸 (Pro)。

[0009] 本发明与现有技术相比, 具有如下有益效果:

[0010] 本发明首次从鹿蛋白中获得并确定了活性化合物的结构, 化合物具有较好的抑制 DPP-IV 的活性, 因此作为糖尿病、心脏病、心血管病、肥胖症、肾病、免疫紊乱等疾病的保健

品和药物先导化合物具有良好的应用前景。

具体实施方式

[0011] 实施例 1 多肽 GPGSPGGPL 的制备

[0012] 100g 新鲜的马鹿鹿皮,用质量浓度 10% NaOH 于 50℃煮 30 分钟进行脱脂处理后,纯水清洗干净,剪为 2~3 平方厘米的碎片。鹿皮碎片按照 1:100(原料:缓冲液质量比)加入 0.01M 醋酸缓冲液,再按 1:100(酶:原料)质量比加入胃蛋白酶,于 40℃搅拌反应 2 小时。将上述反应液的 pH 用 1MNaOH 调至 7,加入复合酶(糜蛋白酶,中性蛋白酶,质量混合比例 1:1)进行酶解,加酶量为反应物质量的 0.1%,于 40℃搅拌反应 2 小时,反应结束后 90℃灭活 20min。将上述反应液 5000rpm 离心 5min,收集上清,上述酶解产物经制备色谱分离,色谱柱为 C18(20X250mm,10 μm),所用的流动相 A 为质量浓度 0.1% 甲酸/水溶液,流动相 B 为质量浓度 0.1% 的甲酸/乙腈溶液,流速为 2mL/min,洗脱过程如下:5% B—35% B(V/V)—80% B(V/V)。将在 280nm 下所检测到的色谱峰分别收集得到不同组分冷冻干燥,为乳白色粉末状样品。

[0013] 所得样品分别经反相液相色谱-串联质谱系统(RPLC-MS/MS)分析:将冷冻干燥后的酶解样品用体积浓度 0.1% 甲酸溶液配制为 0.4 μg/μL,进样 20 μL 进行 LTQ 线性离子阱质谱(配置纳升级电喷雾源)分析。利用 Xcalibur 软件(Thermo)进行系统控制和数据收集。实验得到的质谱数据结果分别在 honeybee, Brassica campestris L. 蛋白质数据库(<http://www.uniprot.org/>)中进行检索,技术重复 3 次,数据库检索软件为 SEQUEST。获得序列为 Gly-Pro-Gly-Ser-Pro-Gly-Gly-Pro-Leu。

[0014] 实施例 2 多肽 GPGSPGGPL 的 DPP-IV 抑制活性检测

[0015] (1) 原理

[0016] 采用以甘氨酸脯氨酸对硝基苯胺(Gly-Pro-PNA)为底物的发色底物法筛选 DPP-IV 抑制剂,该方法的检测原理为在碱性条件下 DPP-IV 催化底物 Gly-Pro-p-nitroanilide 水解,生成黄色的对硝基苯胺,后者在波长 405nm 处有特征性吸收峰,通过酶标仪在 405nm 处测得的吸光度大小反映酶活性高低。

[0017] (2) 方法

[0018] 样品:将样品溶解于 100mM 的 Tris-HCl 缓冲液(pH = 8.0),配成 40mg/mL 储备液,再将储备液稀释成不同的浓度,作为样品溶液。

[0019] 底物:Gly-pro-p-nitroanilide 溶液,用 100mM 的 Tris-HCl 缓冲液(pH = 8.0)将 Gly-pro-p-nitroanilide 配置成 1.59mM 的 Gly-pro-p-nitroanilide 溶液。

[0020] 酶:DPP-IV 溶液,用 100mM 的 Tris-HCl 缓冲液(pH = 8.0)配置成 0.01U/mL 的 DPP-IV 溶液。

[0021] 终止溶液:1M 的醋酸-醋酸钠缓冲液(pH = 4.0)。

[0022] 实验在 96 孔板中进行,利用酶标仪在 405nm 检测吸光度。首先将酶、缓冲液及药物在 37℃温度下分别水浴 30min,然后将样品(或缓冲液)、底物依次加入 96 孔板内 37℃孵育 10 分钟,再加入 DPP-IV 酶溶液,混匀后于 37℃温育 60 分钟,加入 100 μL 1M 的醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 4.0)使反应终止。用酶标仪测定 405nm 吸光度(OD)。反应总体积为 100 μL。实验分为 4 组,每组设 3 个复孔。各组分别为:

[0023] 样品组 (S 组) : 样品 + 酶 + 底物。

[0024] 样品空白组 (SB 组) : 样品 + 底物。

[0025] 阴性对照组 (C 组) : 酶 + 底物。

[0026] 空白组 (B 组) : 底物。

[0027] 具体各组加样品见表 1。

[0028] 表 1 DPP-IV 抑制活性实验分组及加样量

[0029]

分组	底物	抑制剂	酶	终止剂
样品组 (S 组)	25	25	50	100
样品空白组 (SB 组)	25	25	-	100
阴性对照组 (C 组)	25	-	50	100
空白组 (B 组)	25	-	-	100

[0030] 注 : (1) 表中数字的单位均为 μl 。

[0031] (2) 反应总体积为 $100\mu\text{l}$, 各组按照表中所列加入反应物后用缓冲液将最终体积补至 $100\mu\text{l}$ 。

[0032] (3) 抑制率的计算

[0033]

$$\text{S 组抑制率} = (1 - \frac{OD_S - OD_{SB}}{OD_C - OD_B}) \times 100\%$$

[0034] (4) 检测结果

[0035] 分别用 $12.5\mu\text{g/ml}$, $25\mu\text{g/ml}$, $50\mu\text{g/ml}$, $100\mu\text{g/ml}$, $250\mu\text{g/ml}$, $500\mu\text{g/ml}$ 的多肽浓度, 按上述方法进行 DPP-IV 抑制活性检测。结果如下表 :

[0036]

样品浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	DPP-IV 抑制率 (%)
12.5	3.51

[0037]

25	3.02
50	4.07
100	14.82
250	25.74
500	42.88

[0038] 经 IC_{50} 计算器计算该序列的 IC_{50} 为 1.21mg/mL , 即 1.64mM 。

[0001]

SEQUENCE LISTING

<110> 中国科学院大连化学物理研究所

<120> 一种具有GFP-IV抑制活性的多肽及其应用

<130>

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 9

<212> PNT

<213> 马廐

<220>

<221> prt

<222> (1).. (9)

<223>

<400> 1

Gly Pro Gly Ser Pro Gly Gly Pro Leu
1 5