(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106573035 B
(45)授权公告日 2020.08.28

(21)申请号 201480081162.0

(22)申请日 2014.08.11

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106573035 A

(43)申请公布日 2017.04.19

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2017.02.10

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2014/084089 2014.08.11

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2016/023150 ZH 2016.02.18

(73)专利权人 广州世优生物科技有限公司
地址 510663 广东省广州市高新技术产业开发区科学城揽月路3号广州国际企业孵化器G区G104房

(72)发明人 贺雄雷 朱威

(74)专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有限公司 44205
代理人 许飞

(51)Int.Cl.
A61K 38/05(2006.01)
A61K 38/55(2006.01)
A61P 9/12(2006.01)

(56)对比文件
EP 2161028 A1,2010.10.03
CN 102432670 A,2012.05.02
刘焕等.血管紧张素转化酶二肽抑制剂的哦古小关系.《计算机与应用化学》.2005,第22卷631-635.
Bhuyan J. Bhasker等.Effect of peptide-based captopril analogues on angiotensin converting enzyme activity and peroxynitrite-mediated tyrosine nitration.《Organic&Biomolecular Chemistry》.2011,第9卷5185-5188.

审查员 刘超

权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54)发明名称

二肽作为ACE酶活性抑制剂的应用

(57)摘要

一种二肽作为ACE酶活性抑制剂的应用。根据已经测定的ACE酶晶体结构,采用分子对接法,利用自研软件对400种二肽的ACE抑制作用进行虚拟筛选,并对虚拟筛选得到的二肽的ACE抑制活性进行实验验证,发现当二肽的N端为半胱氨酸时,二肽具有较好的ACE抑制活性。

CN 106573035 B

1.二肽作为体外ACE酶活性抑制剂的应用,其特征在于:所述二肽的N端为半胱氨酸,二肽中的氨基酸为L型或D型,二肽的C端氨基酸选自碱性氨基酸或脂肪族类氨基酸,所述碱性氨基酸选自H、K;所述脂肪族类氨基酸选自A、I。

2.二肽在制备降血压药物或保健品中的应用,其特征在于:所述二肽的N端为半胱氨酸,二肽中的氨基酸为L型或D型,二肽的C端氨基酸选自碱性氨基酸或脂肪族类氨基酸,所述碱性氨基酸选自H、K;所述脂肪族类氨基酸选自A、I。

二肽作为ACE酶活性抑制剂的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及二肽的新应用,特别涉及二肽作为ACE酶活性抑制剂的应用。

背景技术

[0002] 血管紧张素转化酶(Angiotensin converting enzyme,ACE)是一种锌金属蛋白酶,是羧基二肽酶,是肾素-血管紧张素系统中重要的蛋白酶之一。对人体血压调节有着重要的作用,通过作用于血管紧张素I的末端去掉His-Leu生成血管紧张素Ⅱ,它能够使动脉血管平滑肌收缩,迅速引起血压上升。抑制ACE活性是一种使血压下降的有效的方法。当前治疗高血压的药物大多是化学合成品,存在一些不良反应,如咳嗽、味觉功能紊乱及皮疹等副作用。食源性蛋白为原料制得的ACE抑制肽由于具有安全性高、毒副作用小等优点,是降压药物研发的重要方向。

[0003] 短肽易于制备,对人体基本无副作用。研究表明具有特定结构的短肽,如二肽、三肽、四肽等对ACE的活性有一定抑制作用,是一种非常具有开发前景的ACE酶抑制剂。

[0004] 刘焕,乐国伟,施用晖,等.血管紧张素转化酶二肽抑制剂的构效关系[J].计算机与应用化学,2006,22(8):631-635.中公开了从肽链的一级结构出发,以分子电边矢量(molecular electro-negativity edge vector,MEEV)为参数,36种血管紧张素转化酶二肽抑制剂为样本,构建了血管紧张素转化酶二肽抑制剂的构效关系模型。通过模型分析得出二肽肽键的“二、五、七”键抑制酶活的规律,即:(1)肽键的羧基和Zn形成二配体,而肽键的N原子和羧基氧形成H键以稳定这一基团;(2)与ACE酶中Arg(Arginine,精氨酸)正电荷盐键作用的羧酸根和第二氨基酸的氨基之间形成的五键结构单元对其降压效果起关键作用;(3)含芳香族氨基酸的二肽抑制剂中的肽键的氨基和苯环部分羟基端呈反式构型,它们相隔7个键位。

[0005] 刘静,彭剑秋,管骁.基于多元线性回归的血管紧张素转化酶抑制肽定量构效关系建模研究[J].分析科学学报,2012,28(001):16-22.公开了利用氨基酸结构描述符SVHEHS分别对血管紧张素转化酶(AngiotensinIconverting Enzyme,ACE)竞争性抑制二肽、三肽、四肽序列表征后,建立结构与活性的多元线性回归(MLR)模型.ACE抑制二肽模型的相关系数、交叉验证相关系数、均方根误差、外部验证相关系数分别为0.851、0.781、0.327、0.792;三肽模型分别为0.805、0.717、0.339、0.817;四肽模型分别为0.792、0.553、0.393、0.630.

[0006] 刘焕.大米ACE抑制肽的研究[D].江南大学,2005.以分子电边矢量(molecular electro-negativity edge vector,MEEV)为参数,36种血管紧张素转化酶二肽抑制剂为样本,构建了血管紧张素转化酶二肽抑制剂的构效关系模型。通过模型分析表明C末端的疏水性氨基酸如芳香族氨基酸和支链氨基酸是影响ACE抑制活性的关键因素。

[0007] 刘静,管骁,彭剑秋.基于氨基酸描述符SVHEHS的ACE抑制肽QSAR研究[J].化学学报,2012,70(1):83-91.公开的研究结论显示二肽C端氨基酸的疏水性(X15)、电性(X17)、立体特征(X24)和N端氨基酸的立体特征(X12)与肽活性相关性较大。

[0008] 彭剑秋.ACE抑制肽定量构效关系研究[D].上海理工大学,2012.公开的结果表明

二肽模型R^2＝0.851,RMSE＝0.327,Q^{2LOO}＝0.781,Q^{2ext}＝0.792,且C端氨基酸残基疏水性质及电荷性质和N端氨基酸残基立体特征对ACE抑制二肽的活性影响较大,特别是C端氨基酸残基强的疏水性和弱的电荷性质对其活性有积极作用;C端氨基酸残基的疏水性、电性特征、立体特征和N端氨基酸残基的立体特征与肽活性相关性较大。

[0009] 现有技术从多角度对短肽对ACE活性抑制进行了研究,试图确定短肽结构与ACE抑制活性之间关系,但是现有的研究结果都具有其局限性,预测结果的准确性不高,未能发现具有高ACE抑制活性的二肽。

[0010] 开发出具有高ACE抑制活性的二肽,具有非常实际的意义。

发明内容

[0011] 本发明的目的在于提供二肽作为ACE酶活性抑制剂的应用。

[0012] 本发明所采取的技术方案是:

[0013] 本发明根据已经测定的ACE酶晶体结构,采用分子对接法,利用自研软件对400种二肽的ACE抑制作用进行虚拟筛选,并对虚拟筛选得到的二肽的ACE抑制活性进行实验验证。发现当二肽的N端为半胱氨酸时,二肽具有较好的ACE抑制活性;当二肽的C端氨基酸选自碱性氨基酸或脂肪族类氨基酸时,二肽具有更好的ACE抑制活性,特别的,当碱性氨基酸选自H、K,脂肪族类氨基酸选自A、I时具有极好的ACE抑制活性。

[0014] 二肽中的氨基酸为L型或D型,二肽中的至少一个氨基酸上可选修饰有提高二肽在体内稳定性的基团。

[0015] 用于ACE酶活性抑制的二肽,二肽的N端为半胱氨酸,二肽中的氨基酸为L型或D型,二肽中的至少一个氨基酸上可选修饰有提高二肽在体内稳定性的基团。

[0016] 优选的,二肽的C端氨基酸选自碱性氨基酸或脂肪族类氨基酸。特别的,碱性氨基酸选自H、K,脂肪族类氨基酸选自A、I。

[0017] 本发明的有益效果是:

[0018] 本发明的二肽,可以很好地抑制ACE的活性,20μg/ml的浓度下,对ACE的抑制率达30％以上,抑制活性远超现有的二肽,具有极好地开发潜力。

附图说明

[0019] 图1是不同ACE酶量的动力曲线;

[0020] 图2是动力学曲线直线段斜率与酶活的关系曲线;

[0021] 图3是ACE的卡托普利抑制曲线。

具体实施方式

[0022] 下面结合实验,进一步说明本发明的技术方案。

[0023] ACE酶活检测

[0024] 不同ACE酶量的动力学曲线

[0025] 配置反应如下表:

[0026]

编号	1	2	3	4	5	6
FAPGG 试剂(μl)	200	200	200	200	200	200
115 u/L ACE(μl)	20	16	12	8	4	0
超纯水(μl)	20	34	28	32	36	40
备注: 酶活	115 u/L	92 u/L	69u/L	43u/L	23u/L	0u/L

[0027] 混匀,置于SpectraMax酶标仪上,于37℃下,以340nm为主波长,405nm为参比波长,检测吸光度值的变化,连续监测1小时。

[0028] 不同ACE酶量的动力学曲线如图1所示,动力学曲线直线段斜率与酶活的关系曲线如图2所示。结果显示动力学曲线直线段斜率与ACE酶活呈线性关系,回归方程$y=-7*10^{-6}x+5*10^{-5}$,$R^2=0.995$。

[0029] 不同卡托普利浓度对ACE的抑制效果

[0030] 用超纯水配置2mg/mL卡托普利,用超纯水进行10倍比稀释,至10^{-8}倍。

[0031] 配置如下表反应体系

[0032]

编号	1	2	3	4	5	6
FAPGG 试剂(μl)	200	200	200	200	200	200
115 u/L ACE(μl)	20	20	20	20	20	20
2 μg/L 卡托普利(μl)	20	16	12	8	4	0

[0033]

超纯水(μl)	0	4	8	12	16	20

[0034]

编号	1	2	3	4	5	6
FAPGG 试剂(μl)	200	200	200	200	200	200
115 u/L ACE(μl)	20	20	20	20	20	20
0.2 μg/L 卡托普利(μl)	20	16	12	8	4	0
超纯水(μl)	0	4	8	12	16	20

[0035] 混匀,置于SpectraMax酶标仪上,于37℃下,以340nm为主波长,405nm为参比波长,检测吸光度值的变化,连续监测1小时。

[0036] 卡托普利抑制曲线如图3所示。由图3可知,整体趋势看,随着卡托普利的浓度降低,抑制率下降。在实验中,采用的是线性浓度,故抑制率的变化幅度减小。

[0037] 二肽对ACE抑制效果

[0038] 用超纯水溶解合成的二肽样本,配置20mg/mL原液,然后稀释成20μg/mL浓度的样品作为试样。

[0039]

编号	1	2	3	4	5	6
FAPGG试剂(μl)	200	200	200	200	200	200
115u/L ACE(μl)	20	20	20	20	20	-
20μg/mL二肽(μl)	20	-	-	-	-	-
卡托普利(μl)	-	4	20	20	-	-
超纯水(μl)	0	16	0	0	20	40

[0040] 混匀,置于SpectraMax酶标仪上,于37℃下,以340nm为主波长,405nm为参比波长,检测吸光度值的变化,连续监测1小时。计算酶促动力学曲线中,直线段的斜率,根据式(1)计算样品的抑制率

[0041] $$抑制率\% = \frac{115 - E}{115} \times 100$$

[0042] 其中$$E = \frac{S_s - S_b}{S_p - S_b} \times 115$$

[0043] E—样品孔的ACE酶活U/L)

[0044] S_s—样品孔ACE动力学曲线直线段的斜率

[0045] S_p—未加抑制剂孔的ACE动力学曲线直线段的斜率

[0046] S_b—空白孔ACE动力学曲线直线段的斜率

[0047] 实验结果如下表所示:

[0048]

编号	二肽	抑制率（%）
3	FE	6.18
5	KW	16.42
9	IF	18.35
11	KY	11.54
13	AY	8.18
15	KP	7.88
19	WL	7.27
20	KA	6.45
22	AG	3.08
25	**CA**	**84.38**
28	**CH**	**70.79**
29	**CI**	**67.52**
30	**CK**	**38.39**
38	DE	15.16
47	EV	14.26
48	EW	9.91
49	FD	5.05
50	FH	10.06
51	FI	9.58
55	FQ	10.96
57	FT	1.92
58	FW	3.16
59	GC	0.12

[0049]

编号	二肽	抑制率（%）
64	GT	-3.20
65	HC	5.06
66	HD	10.98
67	HE	9.95
	Cap1	86.95
	Cap2	72.84
	Cap3	35.84

[0050] 由表可知，当二肽的N端为半胱氨酸时，二肽对ACE的抑制率显著高于其他二肽，特别的，当二肽为CA、CH、CI、CK时，其抑制率更高。

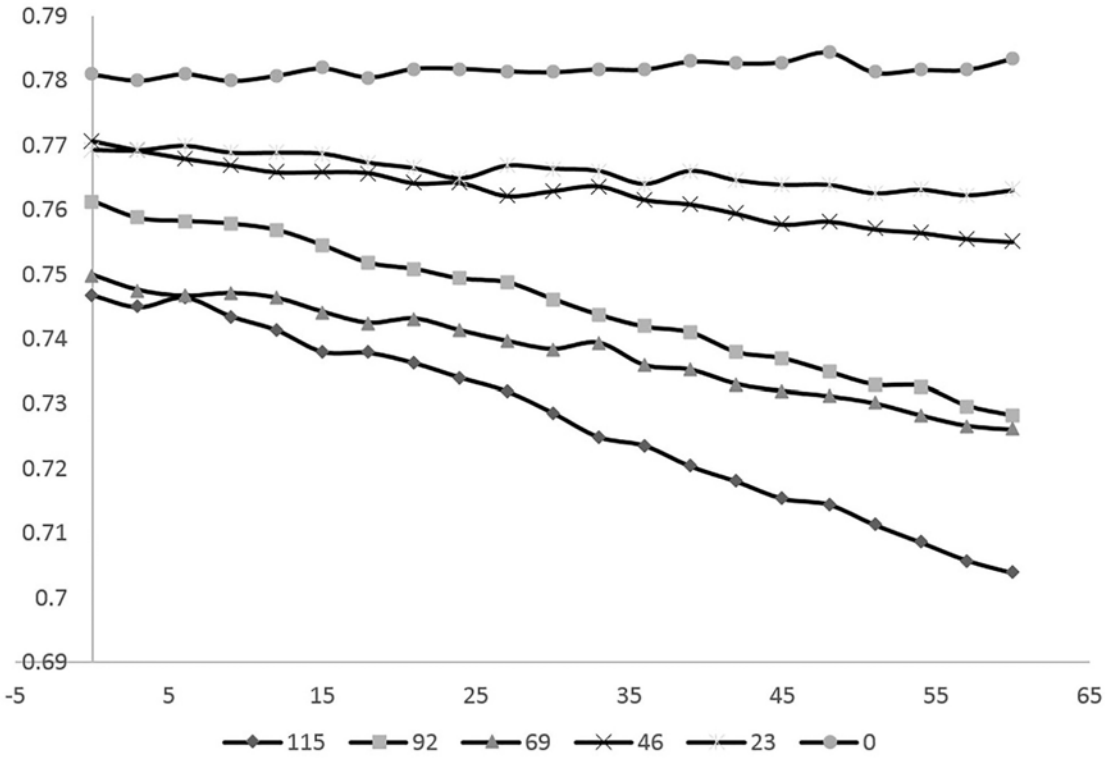
0.79
0.78
0.77
0.76
0.75
0.74
0.73
0.72
0.71
0.7
0.69
-5
5
15
25
35
45
55
65
115
92
69
46
23
0

图1

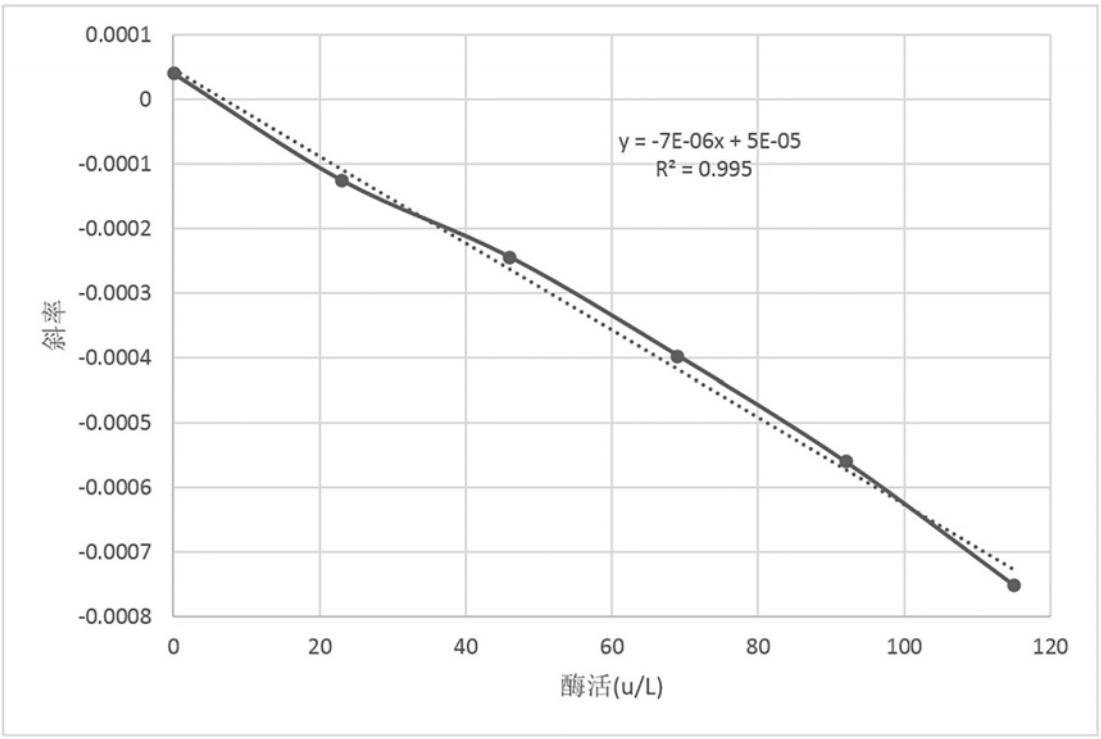
0.0001
0
-0.0001
-0.0002
-0.0003
-0.0004
-0.0005
-0.0006
-0.0007
-0.0008
斜率
y = -7E-06x + 5E-05
R² = 0.995
0
20
40
60
80
100
120
酶活(u/L)

图2

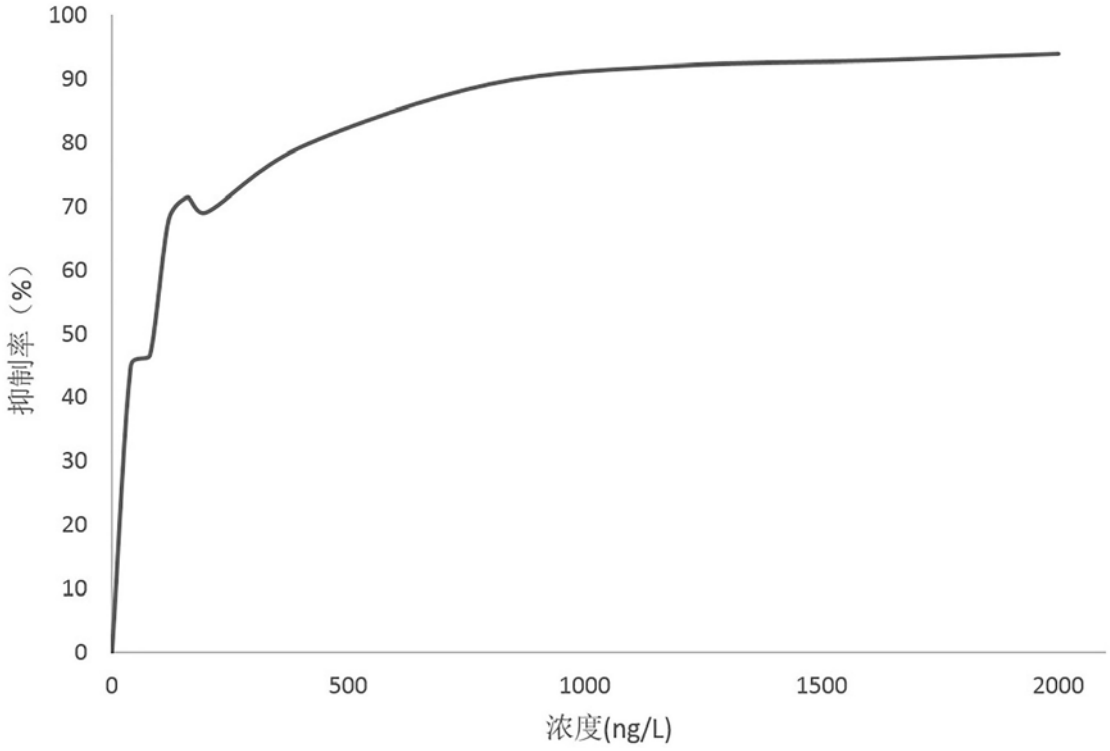

图3