



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 119241663 B

(45) 授权公告日 2025.06.24

(21) 申请号 202411571921.3

A61P 31/04 (2006.01)

(22) 申请日 2024.11.06

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 118373886 A, 2024.07.23

申请公布号 CN 119241663 A

US 2015126452 A1, 2015.05.07

(43) 申请公布日 2025.01.03

审查员 蒲恒

(73) 专利权人 东北农业大学

地址 150030 黑龙江省哈尔滨市香坊区长江路600号东北农业大学

(72) 发明人 董娜 朱允慧 薛雨桐 胡明阳

(74) 专利代理机构 哈尔滨市哈科专利事务有限责任公司 23101

专利代理师 孟策

(51) Int. Cl.

C07K 14/00 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

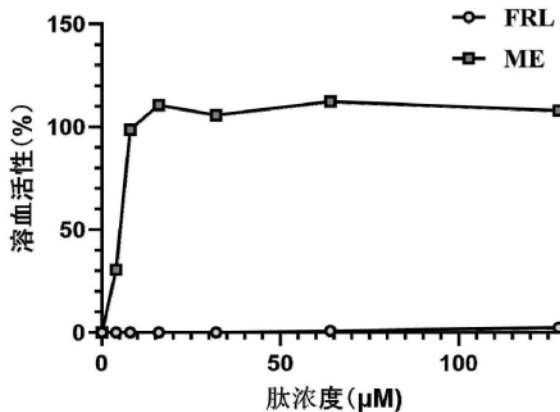
权利要求书1页 说明书5页  
序列表(电子公布) 附图4页

(54) 发明名称

一种抗酶解的抗菌肽FRL及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开一种抗酶解的抗菌肽FRL及其制备方法和应用,属于生物工程领域,该抗菌肽FRL的序列如SEQ ID No.1所示。该抗菌肽FRL表现出窄谱抑菌作用,可以有效抑制革兰氏阴性细菌,具有在治疗革兰氏阴性菌感染性疾病药物中应用的潜力。该抗菌肽具有很低的溶血活性和真核细胞毒性。该抗菌肽在128  $\mu\text{mol/L}$ 浓度下未能引起10%的红细胞溶血以及小鼠巨噬细胞RAW264.7的存活率达到80%以上。该抗菌肽在pH=5、37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下对胰蛋白酶、胃蛋白酶、糜蛋白酶、蛋白酶K(0.4mg/mL;0.5h)表现出较好的稳定性。综上所述,抗菌肽FRL具有成为抗生素替代物的发展潜力。



1. 一种抗酶解的抗菌肽FRL,其特征在于,其氨基酸序列如SEQ ID No.1所示。
2. 根据权利要求1所述的一种抗酶解的抗菌肽FRL的制备方法,其特征在于,方法如下:以柔性序列Resilin作为模板,通过将亲疏水交替抗菌片段两者相连接,抗菌片段的序列为:FFRLFFRLRRR,设计出的多肽序列如SEQ ID No.1所示;采用固相化学合成法得到多肽,再经过反相高效液相色谱纯化和质谱鉴定后,完成所述的多肽的制备;然后对所述的多肽进行抗菌活性的检测、溶血活性的检测和蛋白酶稳定性检测,最后命名为抗菌肽FRL。
3. 根据权利要求1所述的一种抗酶解的抗菌肽FRL在制备治疗革兰氏阴性菌感染性疾病药物中的应用,所述的革兰氏阴性菌为大肠杆菌、鸡白痢沙门氏菌、绿脓杆菌或鼠伤寒沙门氏菌。
4. 一种适用于治疗和/或预防革兰氏阴性菌感染的药物,其特征在于,所述药物含有如权利要求1所述的一种抗酶解的抗菌肽FRL。

## 一种抗酶解的抗菌肽FRL及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物工程领域,具体涉及一种抗酶解的抗菌肽FRL及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 抗菌肽是一种广泛存在于生物体内的具有抗菌作用的活性多肽,属于生物非特异性免疫防御的应答产物。抗菌肽具有广谱的抗病毒、抗真菌、抗寄生虫、抗肿瘤、免疫调节等生物活性。抗菌肽杀菌的主要机制为通过物理渗透作用破坏细菌细胞膜;而细菌等微生物很难改变其自身磷脂双分子层的胞膜结构;因此,抗菌肽成为有吸引力的解决病原微生物耐药性的候选方案。目前,抗菌肽已成为药物开发等领域的研究热点,具有极为广阔的市场应用前景。

[0003] 虽然,已经从各种动植物体中提取出来上千种抗菌肽,但可作为抗生素替代品用于医疗领域的抗菌肽却很少。限制天然抗菌肽成为抗生素替代物的主要原因有两个:一是天然抗菌肽对于红细胞的溶血作用;二是天然抗菌肽在体内的低稳定性。因此,寻找一种开发稳定又安全抗菌肽的方法势在必行。

### 发明内容

[0004] 基于以上需求,本发明公开一种抗酶解的抗菌肽FRL,该抗菌肽在胃肠道中具有较高的稳定性,同时具有很低的溶血活性。

[0005] 本发明所采用的技术方案如下:一种抗酶解的抗菌肽FRL的氨基酸序列如SEQ IDNo.1所示。

[0006] 本发明的另一目的是提供如上所述的一种抗酶解的抗菌肽FRL的制备方法,如下:以柔性序列Resilin作为模板,通过将亲疏水交替抗菌片段两者相连接,抗菌片段的序列为:FFRLFFRLRRR,设计出的多肽序列如SEQ ID No.1所示;采用固相化学合成法得到多肽,再经过反相高效液相色谱纯化和质谱鉴定后,完成所述的多肽的制备;然后对所述的多肽进行抗菌活性的检测、溶血活性的检测和蛋白酶稳定性检测,最后命名为抗菌肽FRL。

[0007] 本发明的另一目的是提供如上所述的一种抗酶解的抗菌肽FRL在制备治疗革兰氏阴性菌感染性疾病药物中的应用。

[0008] 进一步的如上所述的应用,所述的革兰氏阴性菌为大肠杆菌、鸡白痢沙门氏菌、绿脓杆菌或鼠伤寒沙门氏菌。

[0009] 本发明的另一目的是提供一种适用于治疗和/或预防革兰氏阴性菌感染的药物,所述药物含有如上所述的一种抗酶解的抗菌肽FRL。

[0010] 本发明的优点及有益效果:本发明的抗菌肽FRL对大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌等革兰氏阴性菌种有高效的抑制作用,但对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌的抑制作用较弱;具有窄谱抗菌作用。而且具有很低的溶血活性(最低溶血浓度 $>128\text{mM}$ )。吸光度检测发现,抗菌肽FRL在 $\text{pH}=5$ 时,表现出温度响应特征;随温度升高具有聚集的趋势,说明其具有稳定通过

胃肠道前段的特性。在口服情况下,具有有效保留抗菌活性至胃肠道末端的潜力。综上所述,抗菌肽FRL是一种具有较高应用价值的抗菌肽。

### 附图说明

- [0011] 图1为本发明的抗菌肽FRL的高效液相色谱图。  
 [0012] 图2为本发明的抗菌肽FRL的高效液相质谱图。  
 [0013] 图3为本发明的抗菌肽FRL与蜂毒素ME的溶血活性对比图。  
 [0014] 图4为本发明的抗菌肽FRL蜂毒素ME对小鼠巨噬细胞的细胞毒性影响对比图。  
 [0015] 图5为本发明的抗菌肽FRL在不同环境下OD<sub>350nm</sub>吸光度。  
 [0016] 图6为本发明抗菌肽FRL与不同蛋白酶孵育0.5小时后的高效液相色谱图。

### 具体实施方式

[0017] 下面结合说明书附图举例对本发明作进一步详细的说明,下列实施例中使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法,所使用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0018] 实施例1

[0019] 抗菌肽的设计

[0020] 抗菌肽FRL的氨基酸序列为:

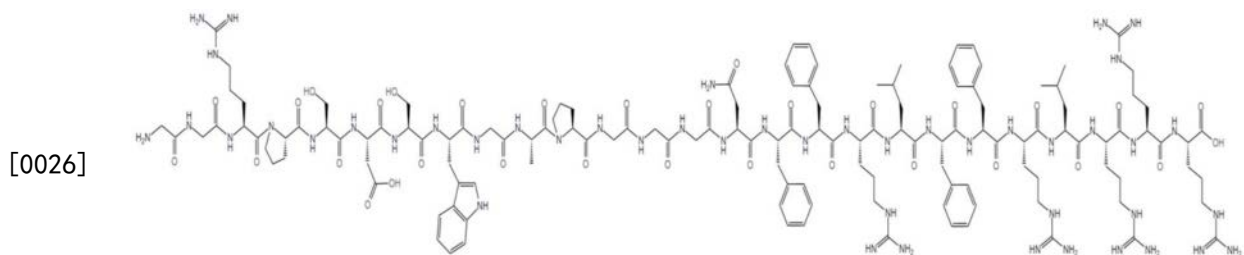
[0021] GGRPSDSWGAPGGGNFFRLFFRLRRR;

[0022] 以柔性序列Resilin作为模板,设计刺激响应抗菌肽,命名为FRL。抗菌肽的序列如表1所示。

[0023] 表1氨基酸序列

肽	氨基酸序列	分子量 (Dalton)
FRL	GGRPSDSWGAPGGGNFFRLFFRLRRR	2967.27

[0025] 其分子式如式(I)所示:



式 (I)

[0027] 抗菌肽FRL的电荷数为+5,通过将亲疏水交替抗菌片段与源自Resilin的序列模块连接,使其具有Resilin高生物相容性、低免疫原性、刺激相应的特征。

[0028] 实施例2

[0029] 固相化学合成法合成抗菌肽FRL

[0030] 1、抗菌肽的制备从C端到N端逐一进行,通过多肽合成仪来完成。首先将Fmoc-X(X是每个抗菌肽的C端第一个氨基酸)接入到Wang树脂,然后脱去Fmoc基团后得到X-Wang树

脂;再将Fmoc-Y-Trt-OH(9-芴甲氧羰基-三甲基-Y, Y为每个抗菌肽C端第二个氨基酸);按照这个程序依次从C端合成到N端,直至合成完毕,得到脱去Fmoc基团的侧链保护的树脂;

[0031] 2、在上述得到的肽树脂中,加入切割试剂,20°C避光下反应2h,过滤;沉淀TFA(三氟乙酸)洗涤,将洗液与上述滤液混合,旋转蒸发仪浓缩,再加入10倍左右体积的预冷无水乙醚,-20°C沉淀3h,析出白色粉末物,以2500g离心10min,收集沉淀,再用无水乙醚洗涤沉淀,真空干燥,得到多肽,其中切割试剂由TFA、水和TIS(三异丙基氯硅烷)按照质量比95:2.5:2.5混合而成;

[0032] 3、使用0.2mol/L硫酸钠(磷酸调节至pH=7.5)进行柱平衡30min,用90%乙腈水溶液溶解多肽,过滤,C18反相常压柱,采用梯度洗脱(洗脱剂为甲醇和硫酸钠水溶液按照体积比为30:70~70:30混合),流速为1mL/min,检测波为220nm,收集主峰,冻干;再利用反相C18柱进一步纯化,洗脱液A为0.1%TFA/水溶液;洗脱液B为0.1%TFA/乙腈溶液,洗脱浓度为25%B~40%B,洗脱时间为12min,流速为1mL/min,再同上收集主峰,冻干;

[0033] 4、抗菌肽的鉴定:将上述得到的抗菌肽经过电喷雾质谱法分析,质谱图中显示的分子量(如图1、2所示)与表1中的理论分子量基本一致,抗菌肽的纯度大于95%。

[0034] 实施例3:

[0035] 抗菌肽抗菌活性的测定

[0036] 1、抗菌活性的测定:利用微量肉汤稀释法测定几种抗菌肽的最小抑菌浓度。以0.01%乙酸(含0.2%BSA)作为稀释液,使用二倍稀释法依次配置系列梯度的抗菌肽溶液。取上述溶液100 $\mu$ L置于96孔细胞培养板中,然后分别添加等体积的待测菌液( $\sim 10^5$ 个/mL)于各孔中。分别设置阳性对照(含有菌液而不含有抗菌肽)和阴性对照(既不含菌液也不含肽)。37°C恒温培养14-18h,用酶标仪在492nm( $OD_{492nm}$ )处测定光吸收值,确定最小抑菌浓度。检测结果见表2。

[0037] 表2抗菌肽FRL的抑菌活性

菌株	最小抑菌浓度( $\mu$ M)	
	FRL	ME
<b>革兰氏阴性菌</b>		
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	2	2
<i>E. coli</i> K99	4	2
<i>E. coli</i> K88	4	2
<i>E. coli</i> 25922	2	2
<i>S. typhimurium</i> 14028	8	1
<i>S. pullorum</i> 7913	8	1
<b>革兰氏阳性菌</b>		
<i>S. aureus</i> 29213	>64	8
<i>S. epidermidis</i> 12228	32	0.5
<i>S. aureus</i> 43300	64	1

[0039] 通过表2可以看出,抗菌肽FRL对于革兰氏阴性菌表现出较高的抑菌活性。

[0040] 表3短肽的MHC( $\mu$ M)、GM( $\mu$ M)和SI值

肽	MHC <sup>a</sup>	GM <sup>b</sup>	
		革兰氏阴性菌	选择指数 (SI) <sup>c</sup>
[0041] FRL	>128	6	21.3
ME	0.25	2.25	0.11

[0042] 2、溶血活性的测定:采集人的新鲜血液1mL,肝素抗凝后溶解到2mLPBS溶液中,1000g离心5min,收集红细胞;用PBS洗涤3遍,再用10mL PBS重悬;取50μL红细胞悬液与50μL用PBS溶解的不同浓度的抗菌肽溶液混合均匀,在37°C培养箱内恒温孵育1h;1 h后取出,4°C、1000g离心5min;取出上清液用酶标仪在570nm处测光吸收值;每组取平均值,并比较分析。其中50μL红细胞加50μLPBS作为阴性对照;50μL红细胞加50μL0.1% Tritonx-100作为阳性对照。最小溶血浓度是抗菌肽引起10%溶血率时的抗菌肽浓度。检测结果见图3。通过图3可以看出,抗菌肽FRL在检测范围内未表现出溶血活性,于对照组蜂毒素呈显著性差异。

[0043] 真核细胞毒性的测定:采用MTT,并通过小鼠巨噬细胞RAW264.7进行细胞毒性检测。

[0044] (1) 培养基的制备及细胞的培养:将DMEM(培养基)与胎牛血清9:1混合配置完全培养基,并复苏液氮中的小鼠巨噬细胞RAW264.7,以细胞长满瓶底80%-90%为宜。

[0045] (2) 待用细胞的试验处理:无菌PBS清洗并重悬细胞3次,并用0.25%胰蛋白酶液对细胞消化处理,使其在瓶底脱落,用完全培养基冲洗,获得单个细胞悬液,同时在96孔板中填入终浓度约为 $2 \times 10^4$ 的50μL细胞悬液。

[0046] (3) 抗菌肽处理:另附96孔板第一孔内加10μL抗菌肽并倍比稀释后,取出50μL肽液加入原96孔板1-10孔,11孔加50μL完全培养基,12孔加100μL完全培养基。恒温培养4h;

[0047] (4) 毒性检测:取50μL 5mg/mL MTT溶液加入96孔板,再培养3-4h后,加150μLDMSO(二甲基亚砜),酶标仪OD<sub>570nm</sub>测定吸光度。吸光度值越高,证明毒性越弱,反之亦然。检测结果见图4。

[0048] 通过图4可以看出,抗菌肽FRL在检测范围内未表现出对小鼠巨噬细胞的毒性,于对照组蜂毒素呈显著性差异。

[0049] 实施例4:

[0050] 抗菌肽FRL的环境响应特征通过检测OD<sub>350nm</sub>下的吸光度来测定。将抗菌肽FRL溶于去离子水得到终浓度为64μM的肽溶液。用NaOH和HCl配置pH=9和pH=5的溶液。将pH=9、pH=5、去离子水与等体积的64μM肽溶液混合,得到终浓度为32μM的pH=9、pH=7、pH=5的抗菌肽FRL溶液。在透明96孔板中,加入上述溶液,每种溶液三个平行,每个平行100μL,读取不同温度下的吸光度。每个温度下读取三次;读取方式为由最低温度起依次升高,降低,再升高。检测结果见图5。

[0051] 通过图5可以看出,在pH=5时,抗菌肽FRL表现出温度响应的特征,随着温度升高展现出聚集的趋势。该特征使抗菌肽FRL具有胃肠道中稳定抗菌的潜力。

[0052] 多肽在胃肠道中的稳定性,通过检测pH=5环境下,多肽对于存在于胃肠道的蛋白酶的稳定性来测定。按上文所述,配置pH=5的0.2mg/mL肽溶液,与0.8mg/mL的蛋白酶溶液等体积混合,37°C孵育0.5小时。高效液相色谱检测多蛋白酶对多肽的降解。高效液相色谱

参数与实施例2(图1)相同。检测结果见图6。

[0053] 通过图6可以看出,在pH=5时,抗菌肽FRL在0.4mg/mL的糜蛋白酶、胃蛋白酶、蛋白酶K、胰蛋白酶存在的环境下,37°C孵育0.5小时后,结构依然相对完整,说明具有良好的稳定性。

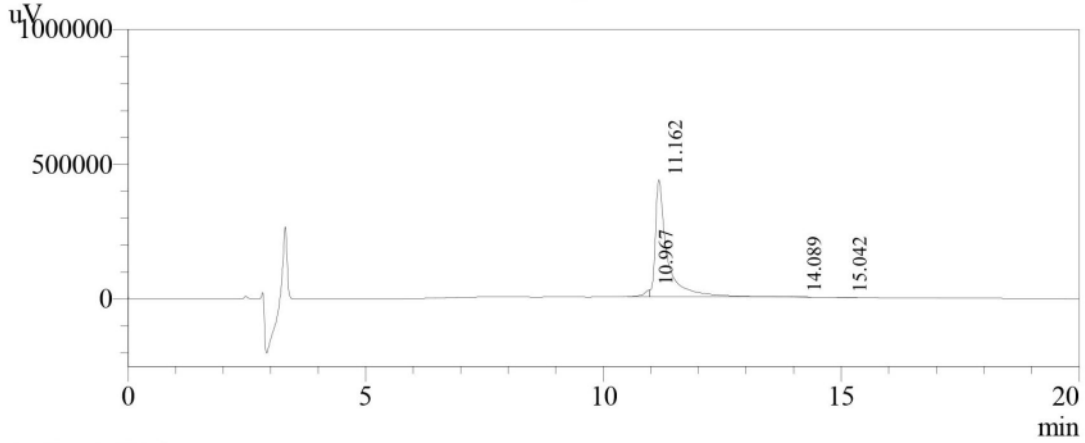
[0054] 由于人胃的pH为1.5-3.5、十二指肠pH为6、空肠到结肠的pH为6.8-9左右。单胃动物,如猪的胃pH为3-5、由十二指肠到结肠的pH由6增加到7-8。对肽活性影响较大的蛋白酶,如胃蛋白酶、胰蛋白酶、糜蛋白酶多分泌在胃肠道前端(pH较低段)。因此,抗菌肽FRL在低pH条件下具有聚集趋势,说明其具有稳定通过胃肠道前段的特性。在口服情况下,具有有效保留抗菌活性至胃肠道末端的潜力。综上所述,抗菌肽FRL是一种具有较高应用价值的抗菌肽。

Sample Information

Name : FRL  
 Sequence : GGRPSDSWGAPGGGNFFRLFFRLRRR  
 Modification : N/A  
 Lot.No : P32365-6-24032601  
 Pump A : 0.1%trifluoroacetic in 100%water  
 Pump B : 0.1%trifluoroacetic in 100%acetontrile  
 Total Flow : 1.0ml/min  
 Wavelength : 214nm  
 Analytical column type : SHIMADZU shim-pack GIST(4.6\*250MM\*5UM)  
 Dissolution method : 0.1mg sample dissolved to 0.5mL by 10%HCOOH 10%ACN and 80%H2O  
 Acquisition Time : 2024/04/10 13:08:27  
 Inj. Volume : 30ul

Time	Module	Action	Value
0.01	Pumps	B.Conc	29
20.00	Pumps	B.Conc	49

Chromatogram



1 Det.A Ch1 / 214nm

PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	10.967	215642	24698	2.774	5.336
2	11.162	7542338	436579	97.009	94.321
3	14.089	9710	798	0.125	0.172
4	15.042	7211	790	0.093	0.171
Total		7774901	462865	100.000	100.000

图1

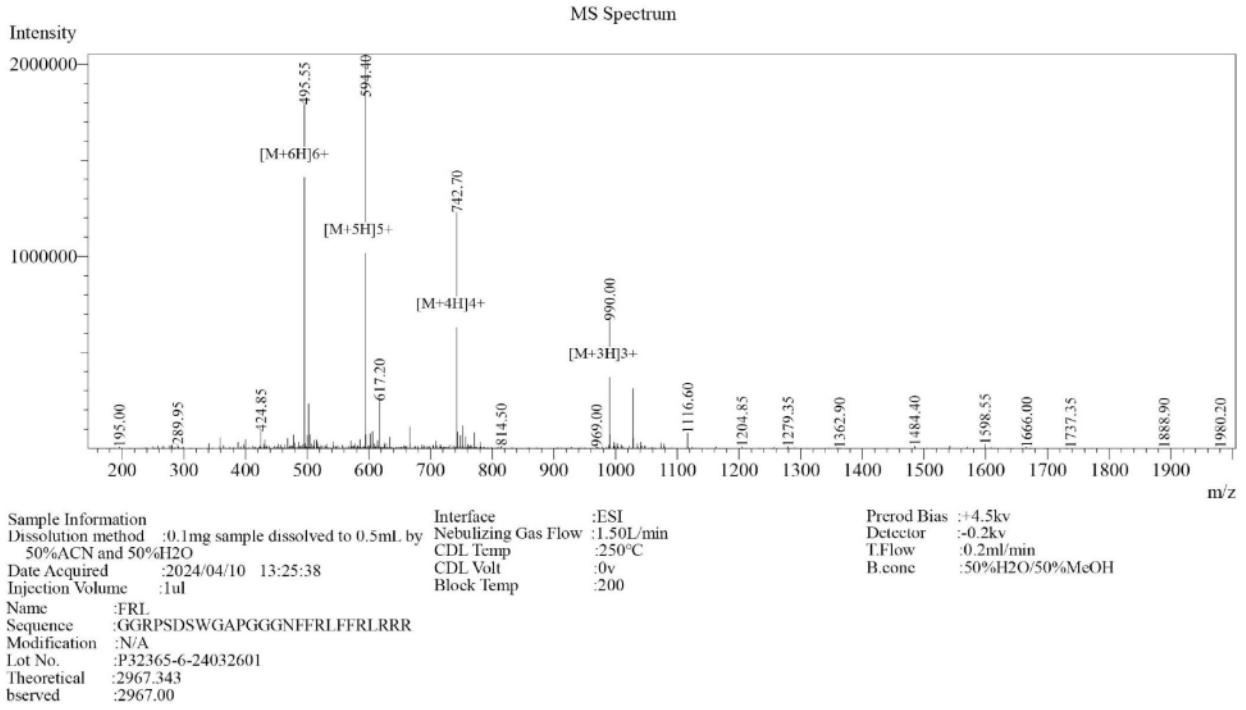


图2

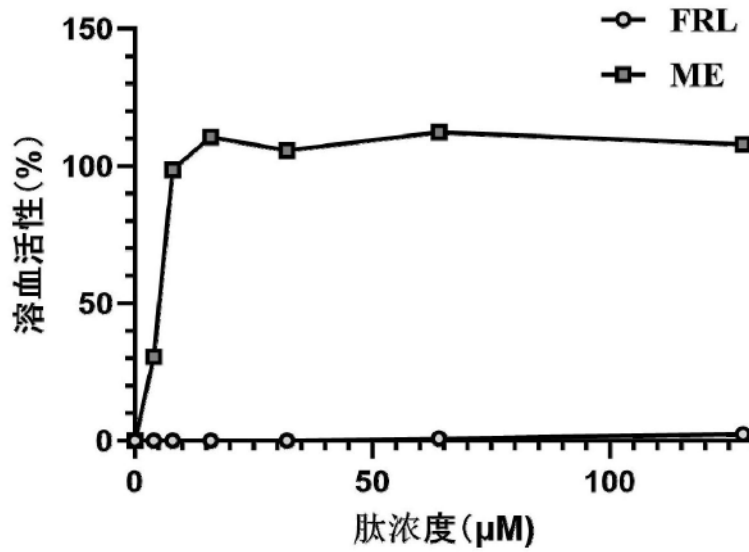


图3

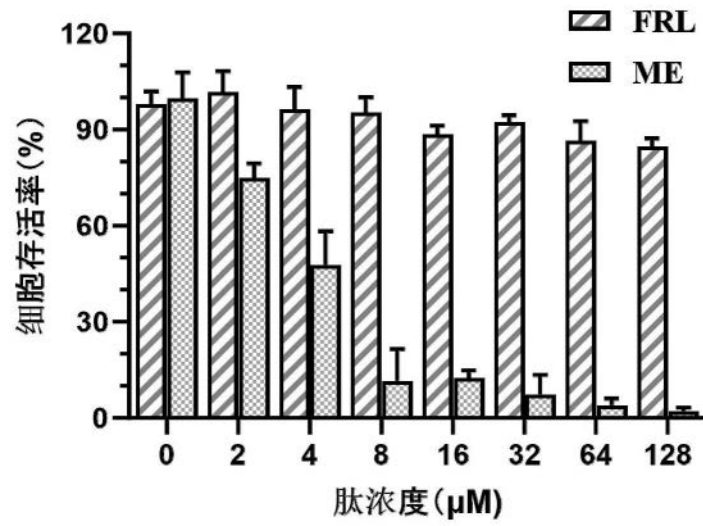


图4

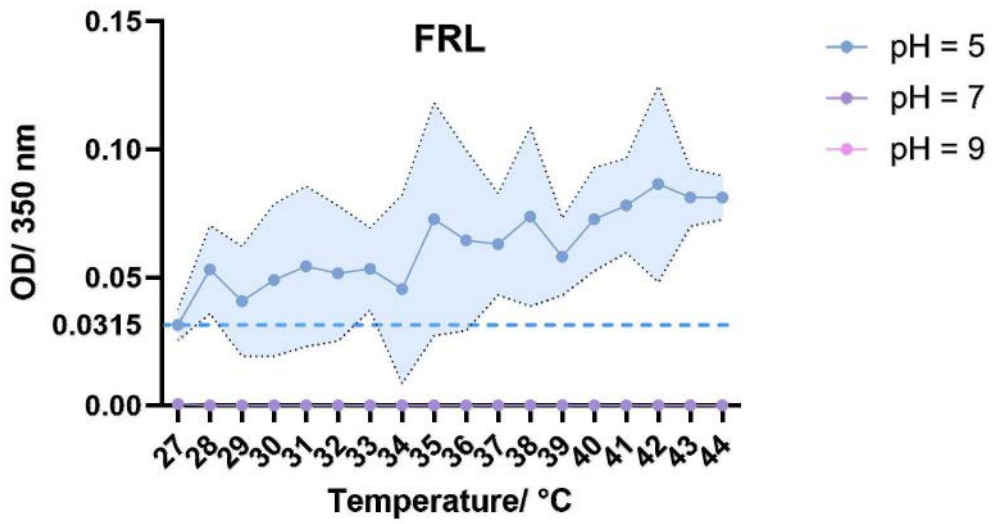


图5

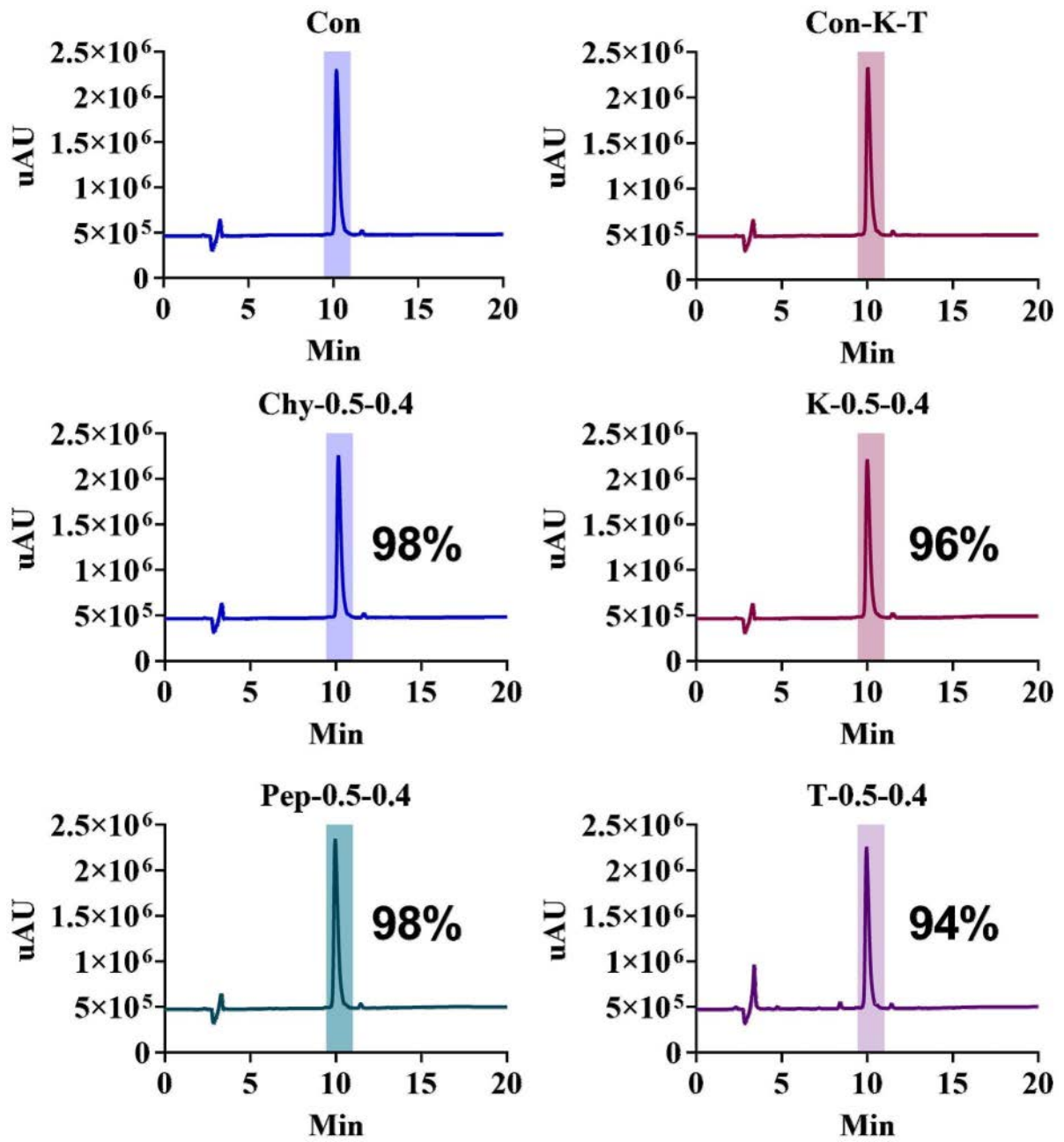


图6