

类肉毒多肽的合成与祛皱效果*

丁文锋, 吕庆琴, 张继勇, 赖燕敏, 陈言荣

(深圳市维琪医药研发有限公司, 深圳 518102)

摘要 目的 寻找一种具有显著类肉毒作用而淡化皱纹抗衰老的多肽, 用于医疗美容领域和皮肤科药物领域。
方法 采用多肽合成技术, 通过对已经上市 SYN-AKE 化合物的结构式进行改造, 合成一系列新的化合物。采用人肌细胞和来自小鼠胚胎脊髓神经元共培养模型模拟肌肉收缩, 进行效果测试。**结果** 优选 6 种新合成多肽, H-(β -Ala)-Hyp-Dab-NH-苄基($C_{19}H_{30}N_5O_4$) 在 1 min 肌肉收缩次数变化率低于 SYN-AKE ($P < 0.05$)。**结论** H-(β -Ala)-Hyp-Dab-NH-苄基有望成为抗皱抗衰老领域医疗美容新原料及皮肤科药物。

关键词 活性多肽; 类肉毒作用; 抗皱作用; 抗衰作用; 肌肉收缩

中图分类号 R986; R962

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2017)10-1112-04

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2017.10.006

Synthesis and Anti-wrinkle Efficacy of Botox-like Polypeptide

DING Wenfeng, LYU Qingqin, ZHANG Jiyong, LAI Yanmin, CHEN Yanrong (Shenzhen Winkey Pharmaceutical Research and Development Co., Ltd, Shenzhen 518102, China)

ABSTRACT Objective To develop a new botox-like polypeptide with anti-wrinkle and anti-aging functions, which will be used in the field of cosmetics and dermatology. **Methods** A series of new peptide compounds were synthesized via modifying the structure of SYN-AKE by peptide synthesis technology. Simulating muscle contraction by using co-culture model of human muscle cells and mouse embryonic spinal cord neurons to test the effects. **Results** Six new synthetic peptides were selected. The results showed that the muscle contraction frequency was lowered by adding $C_{19}H_{30}N_5O_4$ compound than adding SYN-AKE in 1 min ($P < 0.05$). **Conclusion** $C_{19}H_{30}N_5O_4$ is expected to become a new cosmetic peptide raw material and dermatology drug in the field of anti-wrinkle and anti-aging.

KEY WORDS Active polypeptide; Botox-like; Anti-wrinkle; Anti-aging; Muscle contraction

皱纹是皮肤衰老的结果。皮肤衰老不仅直接影响着皮肤组织的正常结构和生理机能, 而且间接影响机体内环境环境的稳定, 导致新陈代谢不同程度的失衡, 可能促进和加快机体的衰老, 甚至死亡。正常情况下肌肉收缩过程是: 神经冲动-乙酰胆碱(Ach)-终板电位-肌肉动作电位-肌肉收缩。皱纹是由于表情肌连年累月长期反复收缩而形成^[1]。研究显示, 阻断信号传递是改善皱纹产生的方法之一。A 型肉毒毒素(botox)特异作用于周围胆碱能运动神经元的突触前膜, 抑制钙离子介导的乙酰胆碱释放, 从而降低肌张力, 缓解肌肉收缩。1989 年, 美国食品药品监督管理局(FDA)正式批准 A 型肉毒毒素作为新药, 用于治疗斜视、眼睑痉挛、四肢肌肉痉挛、痉挛性脑瘫等^[2-3]。在 20 世纪 90 年代后, 随着对其研究深入, 发现注射 A 型肉毒毒素可减轻患者头面部皱纹^[4], 因此 A 型肉毒毒素被广泛应用于整形美容外科^[2]。然而注射 A 型肉毒毒素不当引

起面瘫、肌肉僵硬、疼痛等副作用已众所周知。近年来, 国外科学家发现并证实与皮肤组织细胞相关多肽在皮肤抗衰老中作用, 多肽逐渐成为抗衰祛皱的新原料并被大众接受。一种新的合成多肽——乙酰六肽-8 (也名阿基瑞林)作用类似 A 型肉毒毒素, 具有抗皱作用^[5], 安全性高, 但效果不明显。2006 年, 帝斯曼(DSM)全资子公司彭特法姆(pentapharm)从天然蛇毒里提取出一种三胜肽蛋白, 比 A 型肉毒毒素更安全有效, 之后研发的产品以 Syn-ake 命名上市^[6-7]。笔者以具有类肉毒作用的多肽为研究对象, 通过对其结构进行修饰改造并探索祛皱效果, 报道如下。

1 材料

1.1 药物与试剂 2-Cl-Trt 树脂(天津南开合成科技有限公司, 批号: G55Q0411, 规格 SUB = 1.1 mmol · g⁻¹); Fmoc-Dab (Boc)-OH (批号: GLS150701-22114, 含量: 98.67%)、Fmoc-Hyp-OH (批号: GLS140846-30401, 含量: 98.89%)、Boc- β -Ala-OH (批号: GLS140703-30103, 含量: 98.33%), 均购自吉尔生化(上海)有限公司, HOBT · H₂O (购自贵州吴帆生物科技有限公司, 批号: 20150401, 含量: 99.9%); DIPEA 为化学纯, 购自淄博天堂山化工有限公司, 批号: 20150718; 二氯甲烷(dichloromethane, DCM) (化学纯, 广州朗艺化工有限公司, 批号: 20150420); N-N-二甲

收稿日期 2016-05-23 修回日期 2016-10-08

基金项目 * 深圳市科技计划项目 (CYZZ2014040-3161538626); 深圳市宝安区科技计划项目 (B2015131)

作者简介 丁文锋 (1976-), 男, 江西人, 副主任药师, 博士, 研究方向: 多肽药物、美容多肽的研究以及应用。电话: 0755-86635014, E-mail: dingwenfeng@winkey-china.com。

基酰胺(*N,N*-dimethylformamide, DMF)(化学纯,广州朗艺化工有限公司,批号:150423);苄胺(分析纯,国药集团化学试剂有限公司,批号:8001612720141216);*N*-甲基吗啉(分析纯,国药集团化学试剂有限公司,批号:8008442720150309);乙酸乙酯(分析纯,广州朗艺化工有限公司,批号:GB20150425);甲醇(分析纯,上海星可试剂有限公司,批号:021450301);碳酸氢钠、氯化钠、硫酸氢钾为分析纯,购自广州西陇化工有限公司;第三次传代正常人肌细胞(成肌细胞);具有“背根神经节”出生 10 d 小鼠胚胎的脊髓外植体;Syn-ake (INCI 名称: dipeptide diamino butyryl benzylamide diacetate, 彭特法姆股份公司)。

1.2 仪器 高效液相色谱仪(日本岛津,型号: LC2030);固相合成柱(北京欣维尔玻璃仪器有限公司);高分辨电喷雾四级杆-飞行时间质谱仪(德国 BURKER 公司);磁共振波谱仪(德国 BURKER 公司);傅里叶红外分光光度计(英国 PE 公司);红外分光光度计(日本 SHIMADZU 公司);磁力搅拌器(IKA);电感耦合等离子体质谱(美国 PE 公司);离子阱多级质谱仪(德国 BURKER 公司)。

2 方法与结果

2.1 多肽的合成 参考文献[8],设计多肽结构式,然后分析所设计的多肽结构,确定合成工艺。从合成的多肽中,优选几种进行功效测试。

2.1.1 Fmoc-Dab(Boc)-2-Cl-Trt 树脂的制备 称取 2-Cl-Trt 树脂 80 g(88 mmol)和 Fmoc-Dab(Boc)-OH 38.75 g(88 mmol),加入磨口圆底烧瓶中,加入 *N,N*-二异丙基乙胺(ethyl-diisopropylamine, DIPEA) 157 mL(88 mmol)和 DCM 800 mL,摇匀,密封后在摇床上震荡反应 17 h。用 DMF 洗涤树脂,加入 DCM 850 mL,甲醇 100 mL,DIPEA 50 mL,混合液封闭 20 min。封闭结束后用 DMF 600 mL 洗涤树脂 4 次,DCM 600 mL 洗涤树脂 2 次。抽滤溶剂。给予甲醇 600,300,300 mL 收缩树脂 3 次。真空抽干。称定质量为 91.75 g。干燥后低温保存,制得化合物。

2.1.2 Fmoc-Hyp-Dab(Boc)-2-Cl-Trt 树脂的制备 精密称取干燥 Fmoc-Dab(Boc)-2-Cl-Trt 树脂 91.75 g(40 mmol),置于固相反应合成柱中。DCM 800 mL 溶胀树脂 20 min,抽滤。DMF 400 mL 洗涤树脂 3 次。用 20% piperidine/DMF 400 mL 脱 Fmoc 2 次。先后用 DMF 400 mL 洗涤树脂 4 次,DCM 400 mL 洗涤树脂 2 次。抽走溶剂。称取 Fmoc-Hyp-OH、HOBT·H₂O 置于干燥 500 mL 广口三角瓶中。加适量 DMF 溶剂溶解。置于冰水浴中冷却。加 DIC 活化 3 min,避免水汽。将活化

后氨基酸加入上一步树脂中反应 2 h。抽走反应液。用适量 DMF 洗涤树脂,每次 2 min,洗涤 3 次。

2.1.3 Boc-β-Ala-Hyp-Dab(Boc)-2-Cl-Trt 树脂的制备 Fmoc-Hyp-Dab(Boc)-2-Cl-Trt 树脂用 20% piperidine/DMF 400 mL 脱 Fmoc 二次。DMF 400 mL 洗涤树脂 4 次,DCM 400 mL 洗涤树脂 2 次。抽走溶剂。称取 Boc-β-Ala-OH、HOBT·H₂O 置于干燥 500 mL 广口三角瓶中。加适量 DMF 溶剂溶解。置于冰水浴中冷却。加 DIC 活化 3 min,避免水汽。将活化后氨基酸加入上一步树脂中反应 2 h。抽走反应液。用适量 DMF 洗涤树脂,每次 2 min,3 次。

2.1.4 Boc-β-Ala-Hyp-Dab(Boc)-OH 的制备 称取干燥至恒重的 Boc-β-Ala-Hyp-Dab(Boc)-2-Cl-Trt 树脂肽树脂,加适当三氟乙醇裂解液(0.1 g·mL⁻¹)切割反应 45 min。反应结束后,用砂芯漏斗滤过,分离树脂。将滤液旋干,得到全保护粗肽。置于真空干燥器干燥至恒重。

2.1.5 Boc-β-Ala-Hyp-Dab(Boc)-NH-Bzl 的制备 Boc-β-Ala-Hyp-Dab(Boc)-OH,HOBT 用无水四氢呋喃 250 mL 溶解,冷至 0℃,缓慢加入 DCC,0℃搅拌 5 min,然后加入苄胺及 *N*-甲基吗啉。0℃搅拌 2 h,用 *N*-甲基吗啉维持 pH 值 8~9,室温搅拌 12 h,薄层色谱(TLC,三氯甲烷:甲醇:乙酸=20:1:0.4)显示原料点消失。反应混合物滤过,滤液减压浓缩,残留物用石油醚反复研磨,得到固体,加乙酸乙酯 1 500 mL 溶解,分别用饱和碳酸氢钠溶液(75 mL×3),饱和氯化钠溶液(75 mL×1),5%硫酸氢钾溶液(75 mL×3),饱和氯化钠溶液(15 mL×3)洗涤,有机层用无水硫酸钠干燥,滤过,滤液减压旋干得到粗品(产率 98%)。

2.1.6 HCl·H-β-Ala-Hyp-Dab-NH-Bzl 的制备 Boc-β-Ala-Hyp-Dab(Boc)-NH-Bzl, 0℃下缓慢加入 4 mol·L⁻¹盐酸/乙酸乙酯 250 mL,于 0℃搅拌 1.5 h,反应液出现大量沉淀,薄层色谱(TLC,三氯甲烷:甲醇=10:1)显示原料点消失,滤过,沉淀用乙酸乙酯(50 mL×3)和无水乙醚(50 mL×3)反复洗涤至无盐酸,得目标化合物粗品(85%)。

2.2 精制 采用 C₁₈ 反相柱纯化脱盐。粗品预处理:60 g HCl·H-β-Ala-Hyp-Dab-NH-Bzl 分成 5 份,分别用纯化水 5 mL 溶解,滤过。填料:C₁₈,柱长 800 mm,内径 50 mm。洗脱条件:梯度洗脱,流速 2 mL·min⁻¹,先用 2%乙腈-1%乙酸水溶液洗脱,硝酸银溶液检测氯离子,接收液无氯后换为 10%乙腈-1%乙酸水溶液,1 h 后再转换为 15%乙腈-1%乙酸水溶液。收集样品:采用薄层色谱(TLC)茚三酮显色方法检测样品流出情

况,并根据高效液相色谱(HPLC)法检测数据收集主成分,合并洗脱液,冷冻干燥24 h后,再次加入纯化水溶解,冻干48 h,得终产品白色冻干粉末(产率68%,含量99.8%)37 g。

2.3 合成结果 根据以上方法制备一系列多肽化合物,优选化合物见表1。

表1 优选的多肽化合物			
Tab.1 Optimized poly peptide compounds			
化合物	结构式	分子式	分子量
化合物1	H-(β-Ala)-Hyp-Arg-NH-苄基	C ₂₂ H ₃₆ N ₇ O	462.57
化合物2	H-(β-Ala)-Hyp-Gln-NH-苄基	C ₂₁ H ₃₂ N ₅ O ₅	434.51
化合物3	H-(β-Ala)-Hyp-Dab-NH-苄基	C ₁₉ H ₃₀ N ₅ O ₄	392.47
化合物4	H-(β-Ala)-Hyp-Glu-NH-苄基	C ₂₁ H ₃₁ N ₄ O ₆	435.49
化合物5	H-(β-Ala)-Hyp-Ser-NH-苄基	C ₁₉ H ₂₉ N ₄ O ₅	393.46
化合物6	H-(β-Ala)-Hyp-Lys-NH-苄基	C ₂₂ H ₃₆ N ₅ O ₄	434.55

2.4 抗皱作用评价

2.4.1 建立培养模型 将正常成肌细胞置于含2/3MEM和1/3M199、2 mmol·L⁻¹L-谷氨酰胺、50 U·mL⁻¹青霉素、50 μg·mL⁻¹链霉素、5%胎牛血清培养基中,于37℃、5%二氧化碳,且明胶包被的平板中培养,直到形成单层肌原纤维。然后将具有背根神经节出生10 d的小鼠胚胎的脊髓外植体置于所述肌细胞单层上,共培养48 h后,观察到从外植体生长出的神经突与肌细胞接触,100 h后开始发生收缩。共培养4周,神经和肌肉已经充分连接,形成具有完全成熟的神经肌肉接头(相当于具有运动终板)充分分化的横纹肌纤维模型,在这一阶段,肌原纤维可以进行规律的收缩。

2.4.2 测试方法 加入化合物前,先用显微镜观察培养模型肌肉收缩频率30 s,观察5次,计数,取平均值。接着将待测试多肽和Syn-ake在培养基中稀释成不同浓度后,分别加入培养模型中。另外再设空白对照组。在1 min、2 h和48 h时观察肌肉收缩频率各30 s,并计数,记录结果^[8]。见表2。

2.4.3 多肽效果测试结果 化合物加入后1 min、2 h和48 h肌肉收缩次数变化百分数,结果见表2。对化合物3和Syn-ake在1 min的肌肉收缩次数变化百分数进行均值t检验分析,两者在相同浓度下比较差异有统计学意义(P<0.05),证明化合物3具有更强的活性及更好的祛皱效果。

2.5 结构确证 利用磁共振谱图、质谱、红外谱图等对化合物3进行结构确证,确定化合物的结构式及分子式。初步确定其分子式为C₁₉H₃₀N₅O₄。见图1,2,3,4。

表2 不同浓度化合物在不同时间诱导肌肉收缩的次数
Tab.2 Times of muscle contraction induced by different concentration of peptide compound at different time point

产品编号	浓度/ (mmol·L ⁻¹)	1 min	2 h	48 h
对照组	—	107	103	97
Syn-ake	1.0	37	6	0
	0.5	86	7	5
	0.1	83	26	10
化合物1	1.0	40	7	0
	0.5	58	15	1
	0.1	91	21	8
化合物2	1.0	95	78	67
	0.5	109	93	72
	0.1	105	105	98
化合物3	1.0	5	0	0
	0.5	13	0	0
	0.1	34	8	3
化合物4	1.0	92	68	36
	0.5	85	65	25
	0.1	99	77	45
化合物5	1.0	56	30	5
	0.5	77	16	17
	0.1	90	33	26
化合物6	1.0	45	12	5
	0.5	67	26	6
	0.1	88	19	13

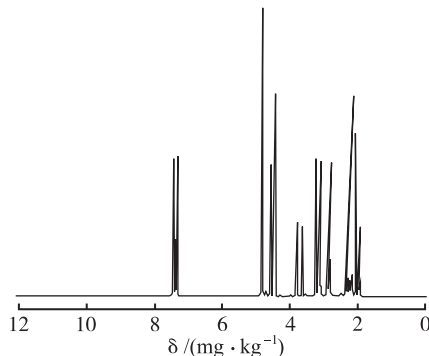


图1 化合物3磁共振谱图(H谱)
Fig.1 Nuclear magnetic resonance spectrum of NO.3 peptide compound(H spectrum)

3 讨论

具有类肉毒作用化合物已经被广泛应用于抗皱抗衰老领域,较知名的药物有A型肉毒毒素和小分子多肽,如阿基瑞林、Syn-ake。A型肉毒毒素通过专一阻断乙酰胆碱在神经-肌肉接头处的释放引起肌肉放松而达到祛皱的目的。毒素结合到神经元细胞膜,通过细胞钙和pH值依赖易位过程进入细胞,以温度和锌离子依赖方式阻断SNARE位点。但A型肉毒毒素治

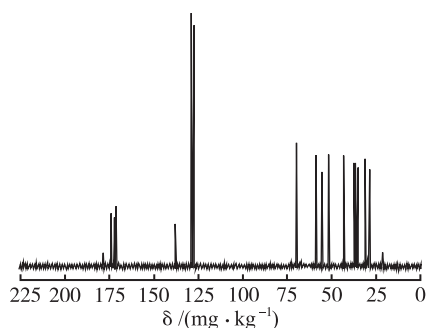


图 2 化合物 3 磁共振谱图(C 谱)

Fig.2 Nuclear magnetic resonance spectrum of NO.3 peptide compound(C spectrum)

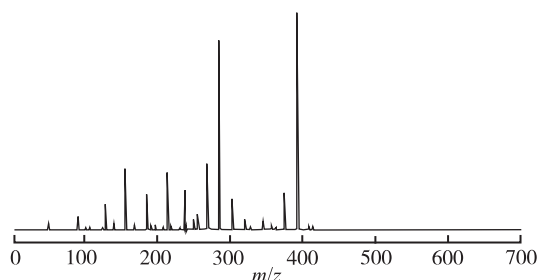


图 3 化合物 3 质谱图

Fig.3 Mass spectrogram of NO.3 peptide compound

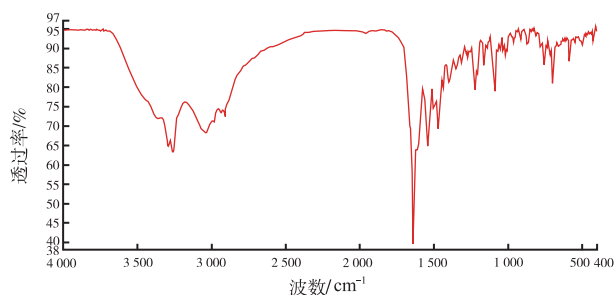


图 4 化合物 3 红外光谱图

Fig.4 Infrared spectrum of NO.3 peptide compound

疗必须在严密观察下进行,因为这种毒素是迄今为止发现毒性最强的毒素,且需要持续注射才能不断保持祛皱效果(临床作用一般维持 3~6 个月)^[2]。为了突破毒性限制,通过小分子肽模拟 A 型肉毒毒素引起人们很大兴趣。从这一点出发,合成肽效仿 SNAP-25 氨基酸序列显示出专一抑制神经分泌活动。阿基瑞林,即乙酰六肽-8 具有良好祛皱作用^[5],由 SNAP-25 N 末端区域衍生而来,干扰 SNARE 三元复合体的组合,且抑制钙依赖的铬细胞儿茶酚胺释放^[6],可祛皱效果较弱。SYN-AKE 来自 Wagler 毒蛇的 Waglerin-1 毒液^[7,9],

是一个 22-氨基酸肽选择性结合 Ach 受体(nAChPs),作用于突触后膜,是可逆性 nAChR 拮抗剂,通过结合到 nAChP 的小亚单位达到阻止 Ach 与受体结合,从而抑制肌肉收缩^[6-7],可减少肌肉收缩频率达 82%^[9]。

笔者借鉴上述研究成果,利用多肽合成技术,对上市的 Syn-ake 化合物结构式进行改造,合成一系列模拟蛇毒毒素 WaglerinI 活性的小分子多肽,通过抑制肌肉收缩而减少皱纹的产生,具有显著类肉毒作用。体外培养正常的人肌细胞(成肌细胞)与背根神经节模拟肌肉收缩试验显示,化合物 3 收缩频率低于 Syn-ake,说明化合物 3 祛皱效果优于 Syn-ake。对化合物 3 进行进一步的化学结构确证,从磁共振谱图、质谱、红外谱图确定其结构式,其 INCI 命名 beta-alanyl hydroxypropyl diaminobutyroyl benzylamide 已经通过国际化妆品原料委员会审批。后期将对其作用机制、毒理药理、皮肤刺激性等进行进一步的研究。

参考文献

- [1] 虞瑞尧.肉毒毒素注射上面部除皱的解剖学基础[J].中华医学美容杂志,2007,13(6):379-380.
- [2] 谭蔚锋,唐昊,邢新,等.A 型肉毒毒素在整形美容外科中的应用进展[J].中华医学美容杂志,2003,9(3):187-189.
- [3] 王雅洁,韩仰同.A 型肉毒毒素治疗痉挛型脑性瘫痪[J].国外医学(儿科学分册),2001,28(9):265-267.
- [4] 程喜平.A 型肉毒毒素除去老年人皱纹临床疗效观察[J].临床皮肤科杂志,2003,32(5):290-291.
- [5] RUIZ M A, CLARES B, MORALES M E, et al. Evaluation of the anti-wrinkle efficacy of cosmetic formulations with an anti-aging peptide (Argireline®) [J]. Ars Pharm, 2010, 50(4):168-176.
- [6] ZHANG L J, FALLA T J. Cosmeceuticals and peptides [J]. Clin Dermatol, 2009, 27(5):485-494.
- [7] BALAEV A N, OKHMANOVICH K A, OSIPOV V N. A shortened, protecting group free, synthesis of the anti-wrinkle venom analogue Syn-Ake exploiting an optimized Hofmann-type rearrangement [J]. Tetrahedron Lett, 2014, 55: 5745-5747.
- [8] 彭特法姆股份公司.新型可局部施用的抗表情皱纹和与年龄相关的皱纹的活性物质:CN101061134A[P].2007-10-24.
- [9] GOROUHI F, MAIBACH H I. Topical peptides and proteins for aging skin [M]. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010:1089-1117.