



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I568746 B

(45)公告日：中華民國 106 (2017) 年 02 月 01 日

(21)申請案號：105121435

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 07 月 06 日

(51)Int. Cl. : C07K5/093 (2006.01)

A61K38/06 (2006.01)

A61K31/277 (2006.01)

G01N21/3504(2014.01)

(71)申請人：高雄醫學大學(中華民國) KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY (TW)

高雄市三民區十全一路 100 號

(72)發明人：呂濟宇 LU, CHI YU (TW)

(74)代理人：黃耀霆

(56)參考文獻：

CN 101434645B

EP 1117686B1

2011 年 10 月 27 日, Reversible hydrogen transfer reactions of cysteine thiyl radicals in peptides: the conversion of cysteine into dehydroalanine and alanine, and of alanine into dehydroalanine, J Phys Chem B. 2011 October 27; 115(42): 12287-12305.

2011 年 10 月, Cysteine residues as catalysts for covalent peptide and protein modification: a role for thiyl radicals?, Biochem Soc Trans. 2011 October ; 39(5): 1254-1259.

2016 年 03 月 29 日, Protein oxidation and peroxidation, Michael J., Biochem. J. (2016) 473, 805-825

審查人員：林桂滿

申請專利範圍項數：4 項 圖式數：6 共 22 頁

(54)名稱

用以評估自由基產生能力的寡肽及方法

AN OLIGOPEPTIDE FOR ESTIMATING FREE RADICAL-PRODUCING ABILITY AND A METHOD THEREOF

(57)摘要

一種用以評估自由基產生能力的寡肽，其包含如 SEQ ID NO：3 所示之胺基酸序列；本發明另關於使用該寡肽以評估自由基產生能力的方法。

An oligopeptide for estimating free radical-producing ability is disclosed. The oligopeptide comprises an amino acid sequence set forth as SEQ ID NO: 3. A method for estimating free radical-producing ability using the oligopeptide is also disclosed.

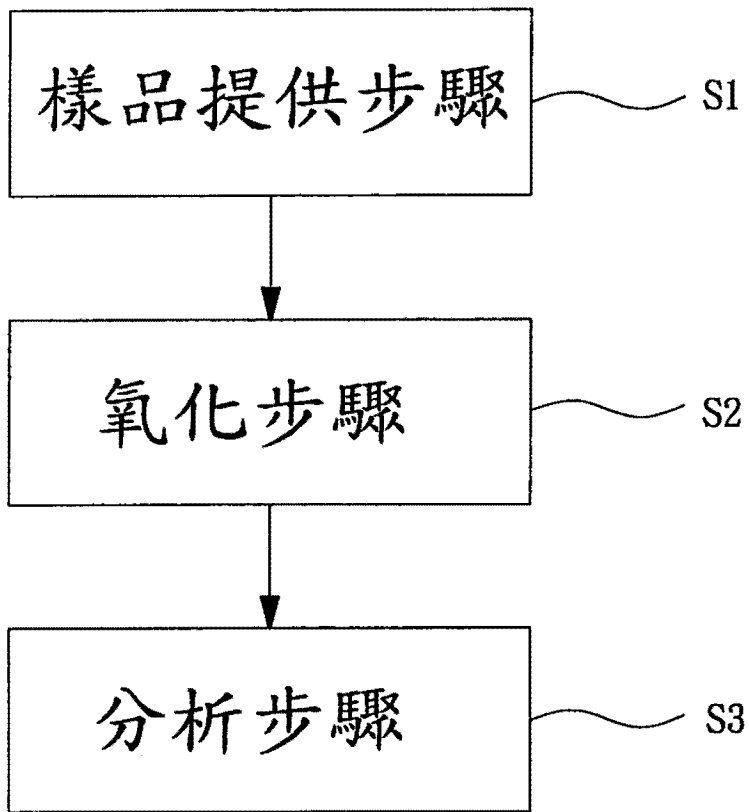
指定代表圖：

符號簡單說明：

S1 . . . 樣品提供步驟

S2 . . . 氧化步驟

S3 . . . 分析步驟



第 1 圖

公告本

發明摘要

※ 申請案號：105121435

※ 申請日：105. 7. 06

 ※IPC 分類：C07K 5/03 (2006.01)
 A61K 31/06 (2006.01)
 G01N 21/04 (2014.01)

【發明名稱】(中文/英文)

用以評估自由基產生能力的寡肽及方法 / An Oligopeptide for Estimating Free Radical-Producing Ability and a Method thereof

【中文】

一種用以評估自由基產生能力的寡肽，其包含如 SEQ ID NO: 3 所示之胺基酸序列；本發明另關於使用該寡肽以評估自由基產生能力的方法。

【英文】

An oligopeptide for estimating free radical-producing ability is disclosed. The oligopeptide comprises an amino acid sequence set forth as SEQ ID NO: 3. A method for estimating free radical-producing ability using the oligopeptide is also disclosed.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

- S1 樣品提供步驟
- S2 氧化步驟
- S3 分析步驟

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

（無）

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

用以評估自由基產生能力的寡肽及方法 / An oligopeptide for Estimating Free Radical-Producing Ability and a Method thereof

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種寡肽，特別是一種用以評估自由基產生能力的寡肽。本發明另關於一種利用該寡肽以評估自由基產生能力的方法。

【先前技術】

【0002】 在藥物的代謝過程中，如果發生共價鍵均裂 (homolysis) 而形成具有不成對電子 (unpaired valence electron) 的自由基 (free radical)，即可能會由於自由基的高化學活性，反而對生物體的組織和細胞造成損害。

【0003】 為了防止藥物的服用對生物體造成傷害，一般會在藥物研發過程中，以細胞實驗進行第一階段的篩選，去除會促使細胞產生自由基的候選藥物 (drug candidate)，然而，當候選藥物的數量龐大時，細胞實驗的進行將會耗費大量的時間及金錢，有鑑於此，確實有必要提供一種能夠評估候選藥物之自由基產生能力的方法。

【發明內容】

【0004】 為解決上述問題，本發明提供一種用以評估自由基產生能力的寡肽，其包含如 SEQ ID NO: 3 所示之胺基酸序列。

【0005】 據此，本發明之用以評估自由基產生能力的寡肽，藉由其容易被氧化，且可以被氧化為不同氧化態的特性，可以應用於評估一待測樣品的自由基產生能力，為本發明之功效。

【0006】 基於相同的技術概念下，本發明另提供一種用以評估自由基

產生能力的方法，係包含：提供一待測樣品；混合該待測樣品及如上述之寡肽，以獲得一混合物；及使該混合物與一基質形成一結晶狀固態物，以一雷射光束離子化該混合物中的寡肽，使該寡肽形成一氣相離子，並以一質荷比分析器檢測該氣相離子，以獲得一寡肽強度值及至少一氧化寡肽強度值。

【0007】 據此，本發明之用以評估自由基產生能力的方法，可以使該待測樣品及該寡肽的短暫接觸，使該待測樣品所產生的自由基部分氧化該寡肽，藉由已被氧化之寡肽與未被氧化之寡肽之間的比例，評估該待測樣品的自由基產生能力，為本發明之功效。

【0008】 本發明之用以評估自由基產生能力的方法中，係於使該混合物與該基質形成該結晶狀固態物之前，以 UV 照射該混合物 10 分鐘；藉由 UV 照射可以促使共價鍵均裂的發生，使該待測樣品加速產生自由基，縮短該寡肽被氧化的時間，可以達成加速反應、縮短時程等功效。

【圖式簡單說明】

【0009】

第 1 圖：本實施例之用以評估自由基產生能力的方法之流程圖。

第 2 圖：不同胺基酸序列之寡肽的測試長條圖。

第 3 圖：本實施例之用以評估自由基產生能力的方法之測試圖譜。

第 4a 圖：本實施例之用以評估自由基產生能力的方法之 UV 照射前不同濃度之維他命 K3 的測試長條圖。

第 4b 圖：本實施例之用以評估自由基產生能力的方法之 UV 照射後不同濃度之維他命 K3 的測試長條圖。

第 5a 圖：本實施例之用以評估自由基產生能力的方法之 UV 照射前不同種類之非類固醇抗發炎藥物的測試長條圖。

第 5b 圖：本實施例之用以評估自由基產生能力的方法之 UV 照射後

不同種類之非類固醇抗發炎藥物的測試長條圖。

第 6 圖：本實施例之用以評估自由基產生能力的方法之經不同種類的對羥基苯甲酸酯處理之細胞的測試長條圖。

【實施方式】

【0010】 為讓本發明之上述及其他目的、特徵及優點能更明顯易懂，下文特舉本發明之較佳實施例，並配合所附圖式，作詳細說明如下：

【0011】 請參照第 1 圖所示，本發明之一實施例的用以評估自由基產生能力的方法，係包含：一樣品提供步驟 S1、一氧化步驟 S2 及一分析步驟 S3。

【0012】 詳而言之，於該樣品提供步驟 S1 中，該待測樣品可以為任何需要評估其自由基產生能力者，例如需要評量其生體使用安全性的食品或藥品，惟此僅為本發明所屬技術領域中具有通常知識者可以瞭解，於此不加以限制。

【0013】 於該氧化步驟 S2 中，該待測樣品係可以混合用以評估自由基產生能力的寡肽，以獲得一混合物，該寡肽係包含如 SEQ ID NO：3 所示之胺基酸序列。值得注意的是，該寡肽具有容易被氧化之半胱胺酸（Cysteine）殘基，因此在該待測樣品與該寡肽共同形成該混合物時，該待測樣品所產生的自由基即可以氧化該半胱胺酸殘基，並且由於該半胱胺酸殘基可以被氧化接上一個氧、二個氧或三個氧，該寡肽在被氧化之後即可以具有不同的氧化態。

【0014】 於該氧化步驟 S2 中，更能夠以 UV 照射該混合物 10 分鐘，可以促使共價鍵均裂的發生，使該待測樣品加速產生自由基，縮短該寡肽被氧化的時間，可以達成加速反應、縮短時程等功效。

【0015】 於該分析步驟 S3 中，係可以選擇以基質輔助雷射脫附離子化-飛行時間質譜儀（matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight

mass spectrometer, 簡稱 MALDI-TOF MS) 進行分析, 但不以此為限。詳而言之, 該混合物係可以置於該基質輔助雷射脫附離子化-飛行時間質譜儀之一樣品托盤 (target plate), 覆蓋上一基質 (matrix), 使該基質與該混合物形成一結晶狀固態物, 該基質係可以吸收波長為 330~360 nm 之雷射光束。於本實施例中, 該基質可以為 α -氰基-4-羥基桂皮酸 (α -cyanol-4-hydroxy-cinnamic acid, 簡稱 CHCA)。

【0016】 接著, 以波長為 330~360 nm 之一雷射光束照射該結晶狀固態物, 使該結晶狀固態物可以被激發, 以形成一氣相離子, 該氣相離子經由電場加速後, 可以進入一質荷比分析器, 以偵測該氣相離子之質荷比 (mass-to-charge ratio, 簡稱 m/z), 以獲得一寡肽強度值及至少一氧化寡肽強度值。該質荷比分析器係可以選自飛行式時間質荷比分析器 (time-of-flight analyzer, 簡稱 TOF analyzer)、四極棒質荷比分析器 (quadrupole analyzer)、離子阱質荷比分析器 (ion trap analyzer, 簡稱 IT analyzer) 及傅立葉轉換質荷比分析器 (Fourier transform-ion cyclotron resonance, 簡稱 FT-ICR)。於本實施例中, 該質荷比分析器係選擇為飛行式時間質荷比分析器 (time-of-flight analyzer, 簡稱 TOF analyzer), 其分析速度快, 結合基質輔助雷射脫附游離法, 係可以有效節省樣品分析之時間。

【0017】 據此, 藉由比較該寡肽強度值與該至少一氧化寡肽強度值, 即可以評估該待測樣品之自由基產生能力。

【0018】 為證實本實施例之用以評估自由基產生能力的方法係能夠用以評估該待測樣品的自由基產生能力, 遂進行下列試驗:

【0019】 (A) 寡肽的胺基酸序列選擇

【0020】 於本試驗中, 係以該分析步驟 S3 分析如第 1 表所示之胜肽, 藉此選擇其中最為合適之寡肽, 其結果如第 2 圖所示。

【0021】 第 1 表、本試驗各組之胜肽的胺基酸序列

組別	胺基酸序列
A1	SEQ ID NO : 1
A2	SEQ ID NO : 2
A3	SEQ ID NO : 3
A4	SEQ ID NO : 4
A5	SEQ ID NO : 5

【0022】 請參照第 2 圖所示，A1~A5 組之寡肽中，係以第 A3 組之寡肽具有最強的訊號，因而選用第 A3 組之寡肽進行後續試驗。

【0023】 (B) 寡肽強度值及氧化寡肽強度值的計算

【0024】 於本試驗中，係取已知會產生自由基之維他命 K3(作為該待測樣品，混合該待測樣品(濃度為 10~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)及該寡肽(50~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)以形成該混合物(等體積混合，總體積為 2 μL)後，以 UV 照射該混合物 10 分鐘，接著以 MALDI-TOF MS 進行分析，其結果如第 2 圖所示，除了未經氧化之寡肽於 775 位置形成一波峰($m/z \cdot [M+H]^+ = 775$)外，經維他命 K3 作用而具有不同氧化態的寡肽則分別於 791、807、823 位置形成一波峰；如此，經由計算於 775 位置所形成之波峰的面積即可以獲得該寡肽強度值，而於 791、807、823 位置所形成之波峰的面積則為該氧化寡肽強度值(為便於後續說明，前述三個位置所形成之波峰的面積以下分別稱為“一氧寡肽強度值”、“二氧寡肽強度值”及“三氧寡肽強度值”)。

【0025】 (C) 維他命 K3 的自由基產生能力

【0026】 於本試驗中，係以如前述之方法評估第 2 表所示之各組待測樣品，並於未照射 UV 及照射 UV 的狀況下分別進行該氧化步驟 S2，並以下列公式計算比例：

比例 = 一氧(二氧或三氧)寡肽強度值/寡肽強度值

【0027】 第 2 表、本試驗各組之待測樣品

組別	待測樣品
C0	無
C1	維他命 K3 (1 µg/mL)
C2	維他命 K3 (10 µg/mL)
C3	維他命 K3 (100 µg/mL)
C4	過氧化氫 (H ₂ O ₂)

【0028】 請參照第 4a 圖所示，在未以 UV 照射該混合物的狀況下，僅能夠偵測到高濃度之維他命 K3 (第 C3 組) 具有自由基產生能力，另請參照第 4b 圖所示，以 UV 照射該混合物的情況下，第 C1~C3 組之不同濃度的維他命 K3 均可以偵測到具有自由基產生能力。

【0029】 (D) 非類固醇抗發炎藥物的自由基產生能力

【0030】 於本試驗中，係以如前述之方法評估第 3 表所示之各組待測樣品，並於未照射 UV 及照射 UV 的狀況下分別進行該氧化步驟 S2，其結果分別如第 5a、5b 圖所示。

【0031】 第 3 表、本試驗各組之待測樣品

組別	待測樣品
D0	無
D1	酮洛芬 (100 µg/mL)
D2	布洛芬 (100 µg/mL)
D3	過氧化氫 (H ₂ O ₂)

【0032】 請參照第 5a 圖所示，在未以 UV 照射該混合物的狀況下，僅能夠偵測到布洛芬 (第 D2 組) 具有自由基產生能力，另請參照第 5b 圖所示，以 UV 照射該混合物的情況下，第 D1 組之酮洛芬 (ketoprofen) 及第 D2 組之布洛芬 (ibuprofen) 均可以偵測到具有自由基產生能力。

【0033】 (E) 對羥基苯甲酸酯促使細胞產生自由基的能力

【0034】 於本試驗中，係將第 4 表所示之對羥基苯甲酸酯 (100 μM) 加入人類皮膚角質細胞中 (HaCaT cell)，於 24 小時後，收取各組之細胞培養液，以 3 kDa 過濾器過濾細胞培養液，取過濾後之細胞培養液再加入該寡肽 (各 1 μL) 於 37°C 下反應 10 分鐘，最終以 MALDI-TOF MS 進行分析，其結果如第 6 圖所示。

【0035】 第 4 表、本試驗各組之對羥基苯甲酸酯

組別	對羥基苯甲酸酯
E0	無 (DMSO)
E1	對羥基苯甲酸丙酯
E2	對羥基苯甲酸丁酯

【0036】 請參照第 6 圖所示，證實本實施例之方法亦可以應用於評估該待測樣品促使細胞產生自由基的能力。

【0037】 綜上所述，本發明之用以評估自由基產生能力的方法，可以使該待測樣品及該寡肽的短暫接觸，使該待測樣品所產生的自由基部分氧化該寡肽，藉由已被氧化之寡肽與未被氧化之寡肽之間的比例，評估該待測樣品的自由基產生能力，為本發明之功效。

【0038】 再者，本發明之用以評估自由基產生能力的寡肽，藉由其容易被氧化，且可以被氧化為不同氧化態的特性，可以應用於評估一待測樣品的自由基產生能力，為本發明之功效。

【0039】 雖然本發明已利用上述較佳實施例揭示，然其並非用以限定本發明，任何熟習此技藝者在不脫離本發明之精神和範圍之內，相對上述實施例進行各種更動與修改仍屬本發明所保護之技術範疇，因此本發明之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。

【符號說明】

【0040】

S1 樣品提供步驟

S2 氧化步驟

S3 分析步驟

【生物材料寄存】

國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】

(無)

國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

(無)



【序列表】：

<110> 高雄醫學大學

<120> 用以評估自由基產生能力的寡肽及方法

<130> PK14482

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡肽

<400> 1

Glu Cys Gly

1

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

INNOVUE
新穎數位

<220>

<223> 寡肽

<400> 2

Ala Ala Ala Ala Cys Ala Ala Ala Ala

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡肽

<400> 3

Ala Ala Ala Ala Cys Ala Ala Ala Arg

1 5

<210> 4

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列



<223> 寡肽

<400> 4

Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe

1 5 10 15

Glu Asp His Val Lys

20

<210> 5

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡肽

<400> 5

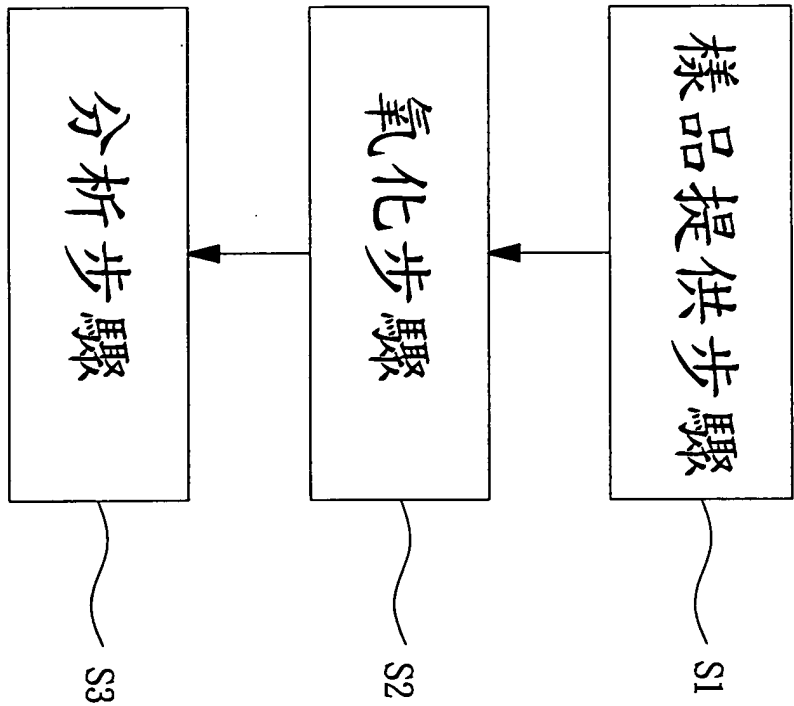
Leu Glu Glu Leu Glu Glu Glu Leu Glu Gly Cys Glu

1 5 10

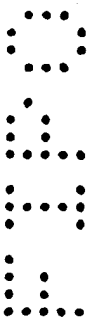
申請專利範圍

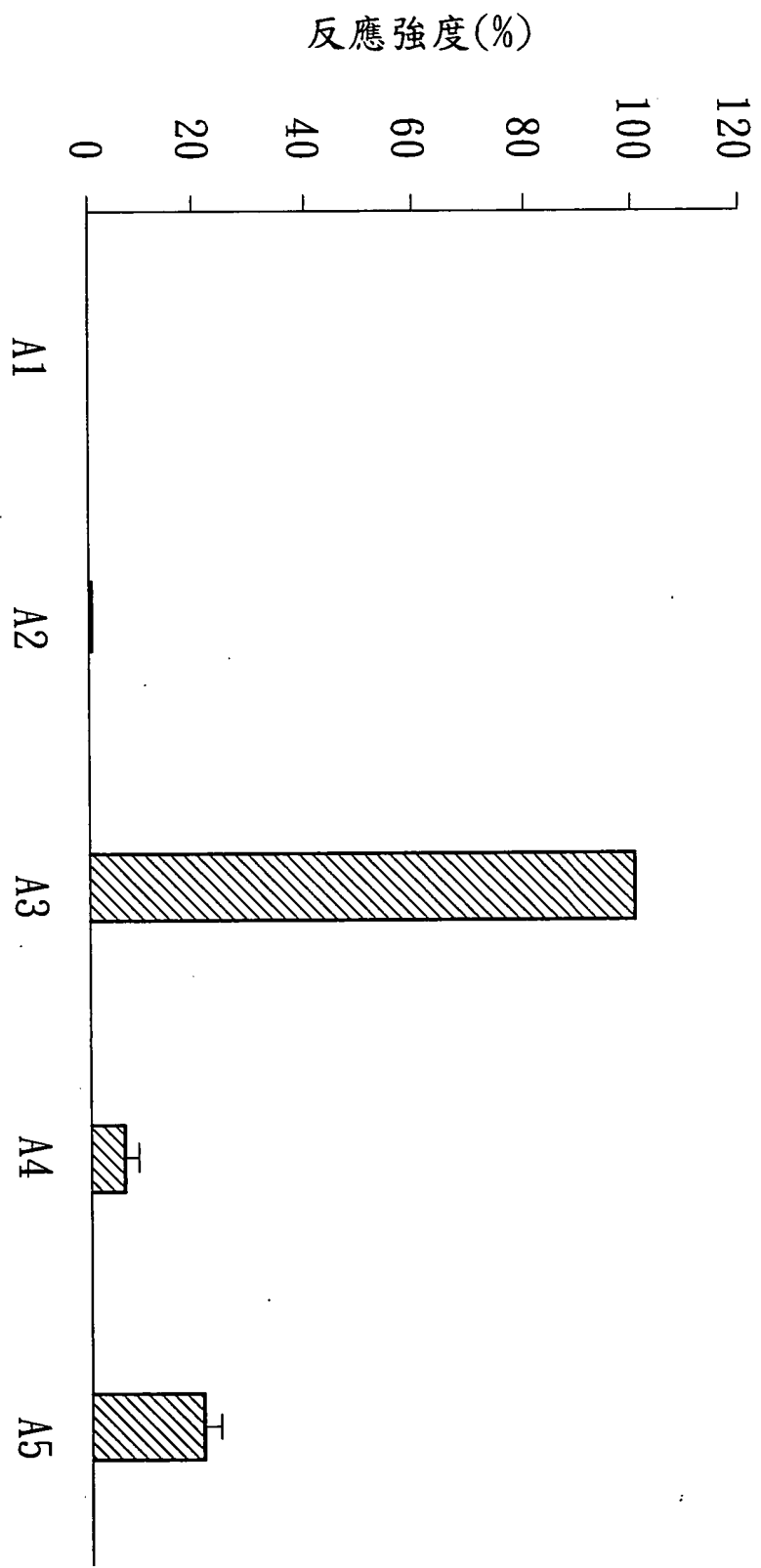
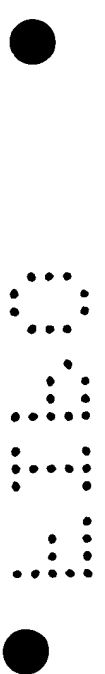
1. 一種用以評估自由基產生能力的寡肽，其包含如 SEQ ID NO：3 所示之胺基酸序列。
2. 一種用以評估自由基產生能力的方法，係包含：
提供一待測樣品；
混合該待測樣品及如申請專利範圍第 1 項所述之寡肽，以獲得一混合物；及
使該混合物與一基質形成一結晶狀固態物，以一雷射光束離子化該混合物中的寡肽，使該寡肽形成一氣相離子，並以一質荷比分析器檢測該氣相離子，以獲得一寡肽強度值、一單氧強度值、一雙氧強度值及一三氧強度值。
3. 如申請專利範圍第 2 項所述之用以評估自由基產生能力的方法，其中，該基質為 α -氰基-4-羥基桂皮酸。
4. 如申請專利範圍第 2 項所述之用以評估自由基產生能力的方法，其中，係於使該混合物與該基質形成該結晶狀固態物之前，以 UV 照射該混合物 10 分鐘。

圖式



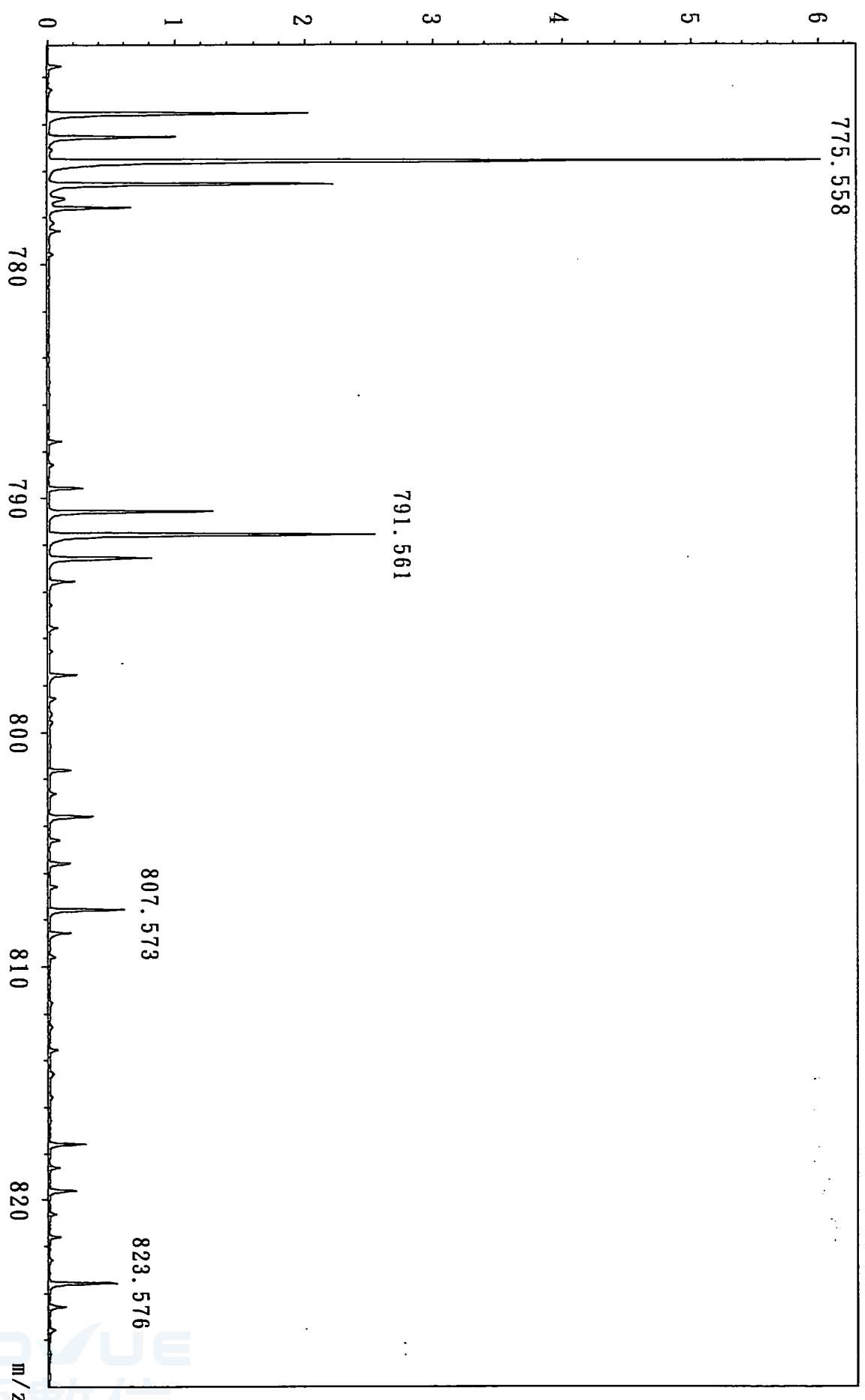
第 1 圖



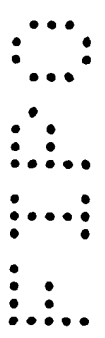


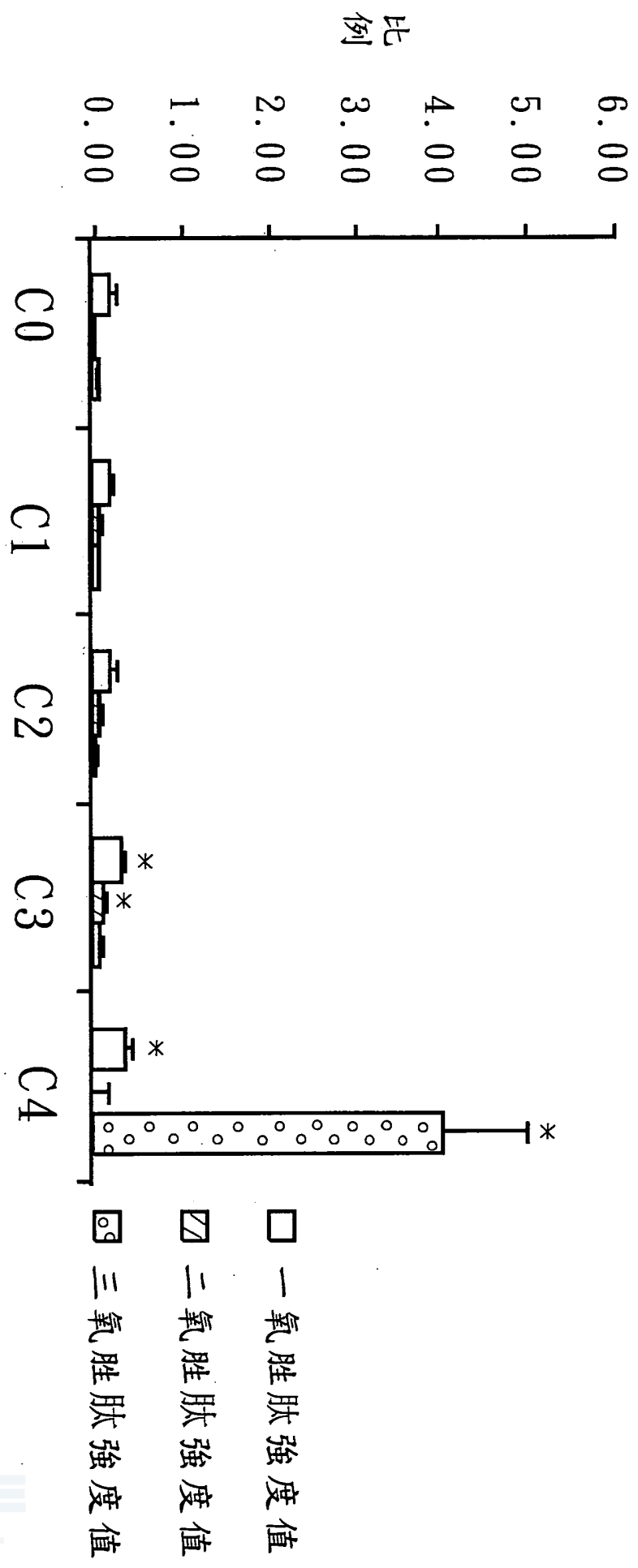
第 2 圖

強度 $\times 10^4$ (a. u.)

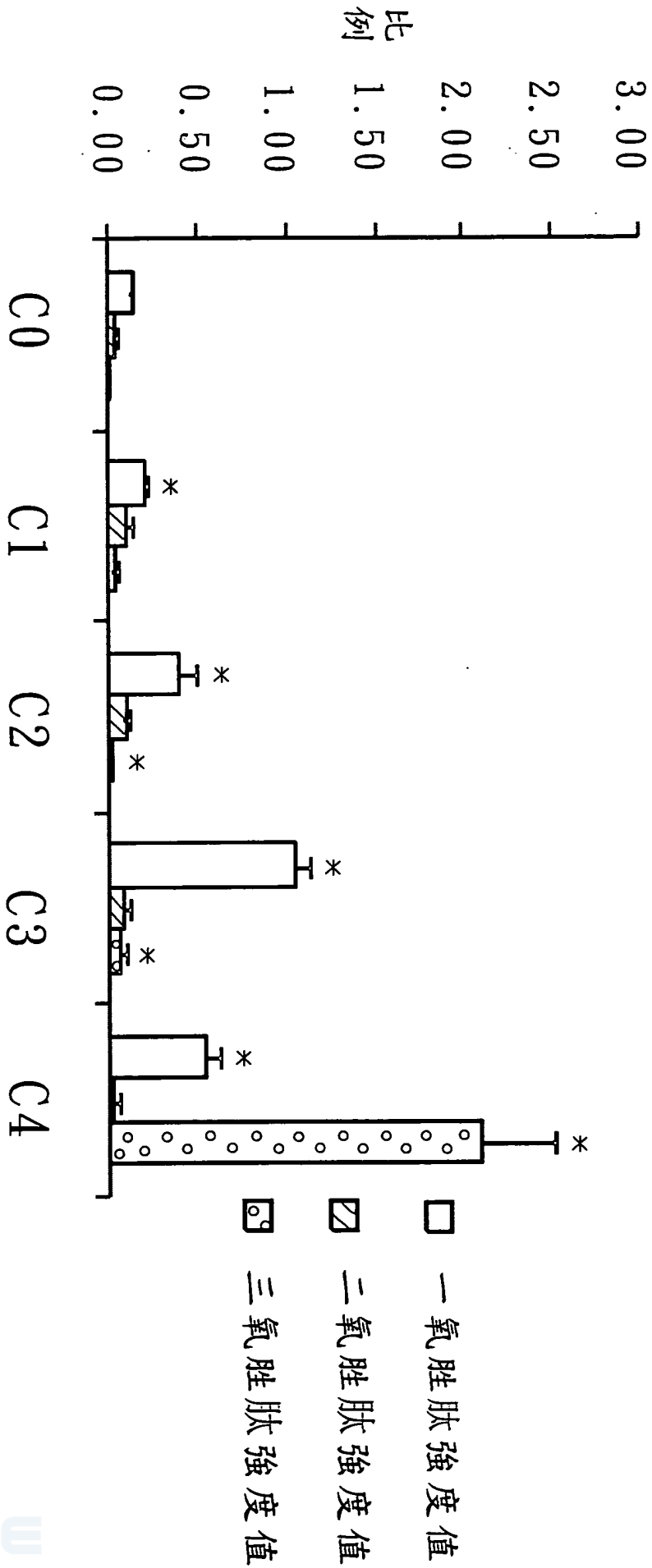


第 3 圖

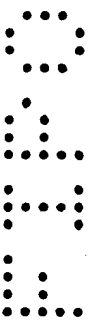


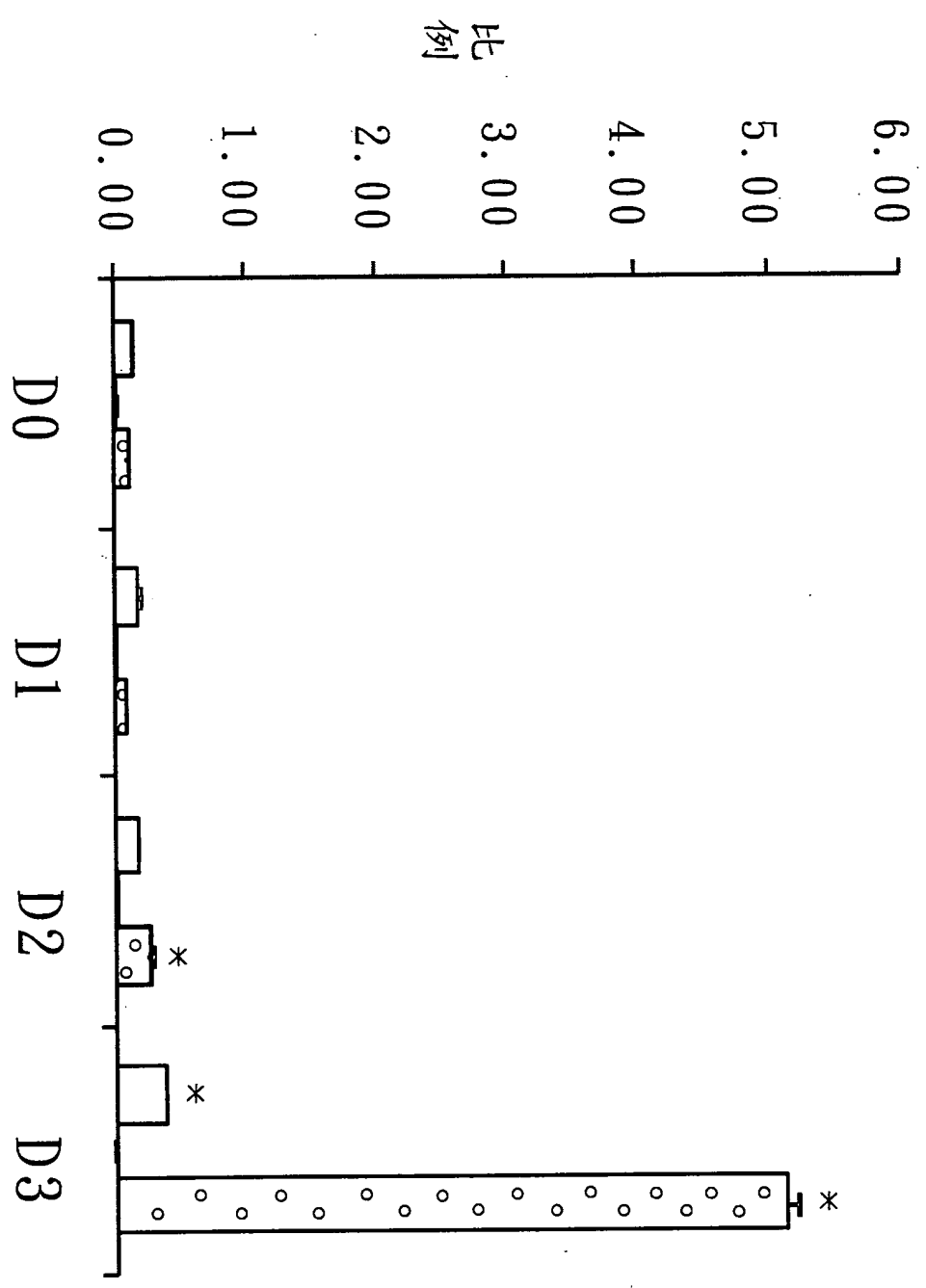
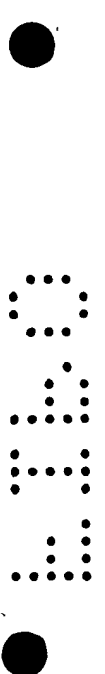


第 4a 圖



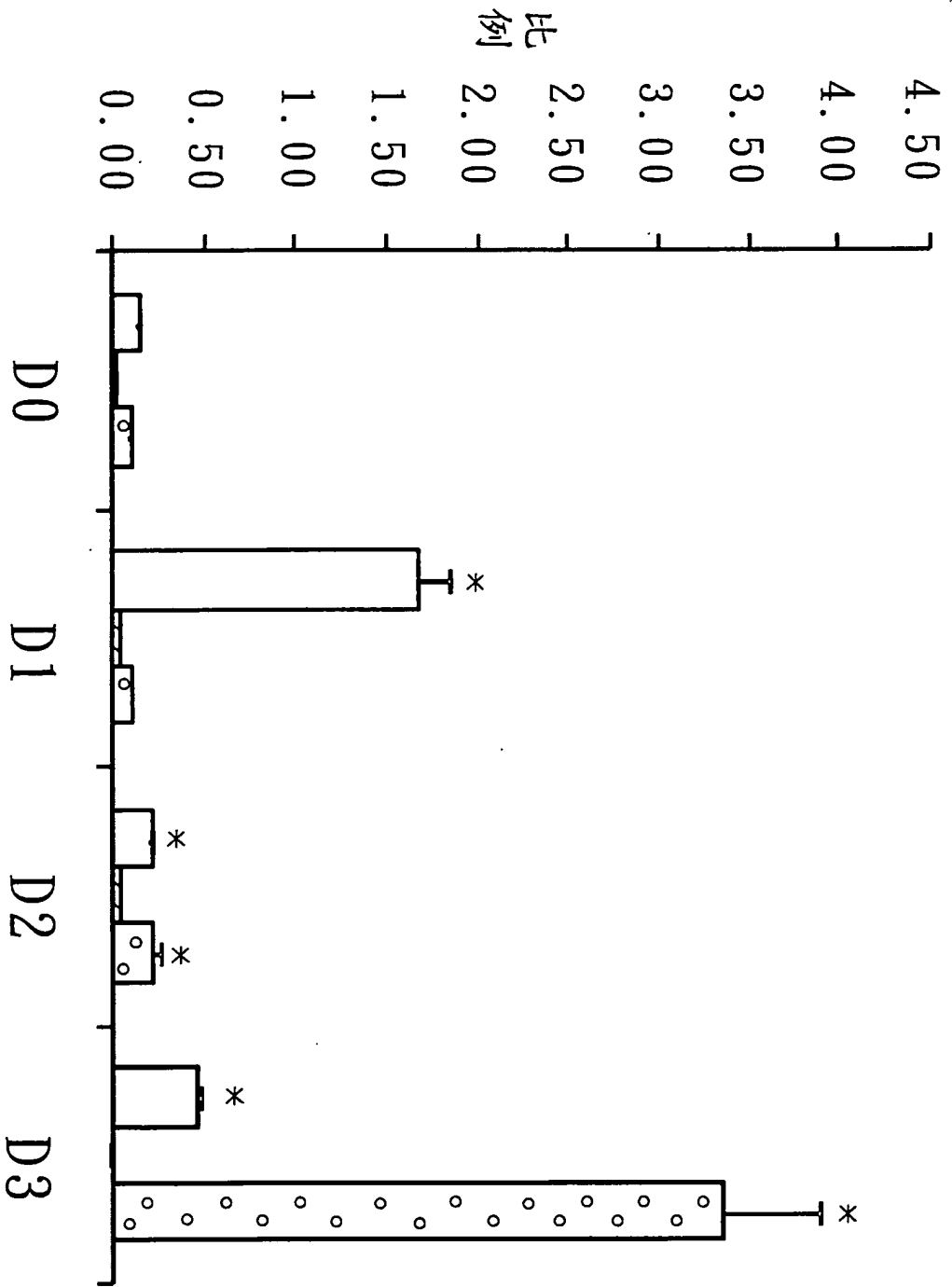
第 4b 圖





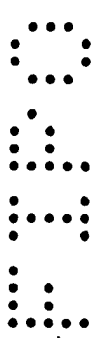
- 一氧胜肽强度值
- ▨ 二氧胜肽强度值
- ▣ 三氧胜肽强度值

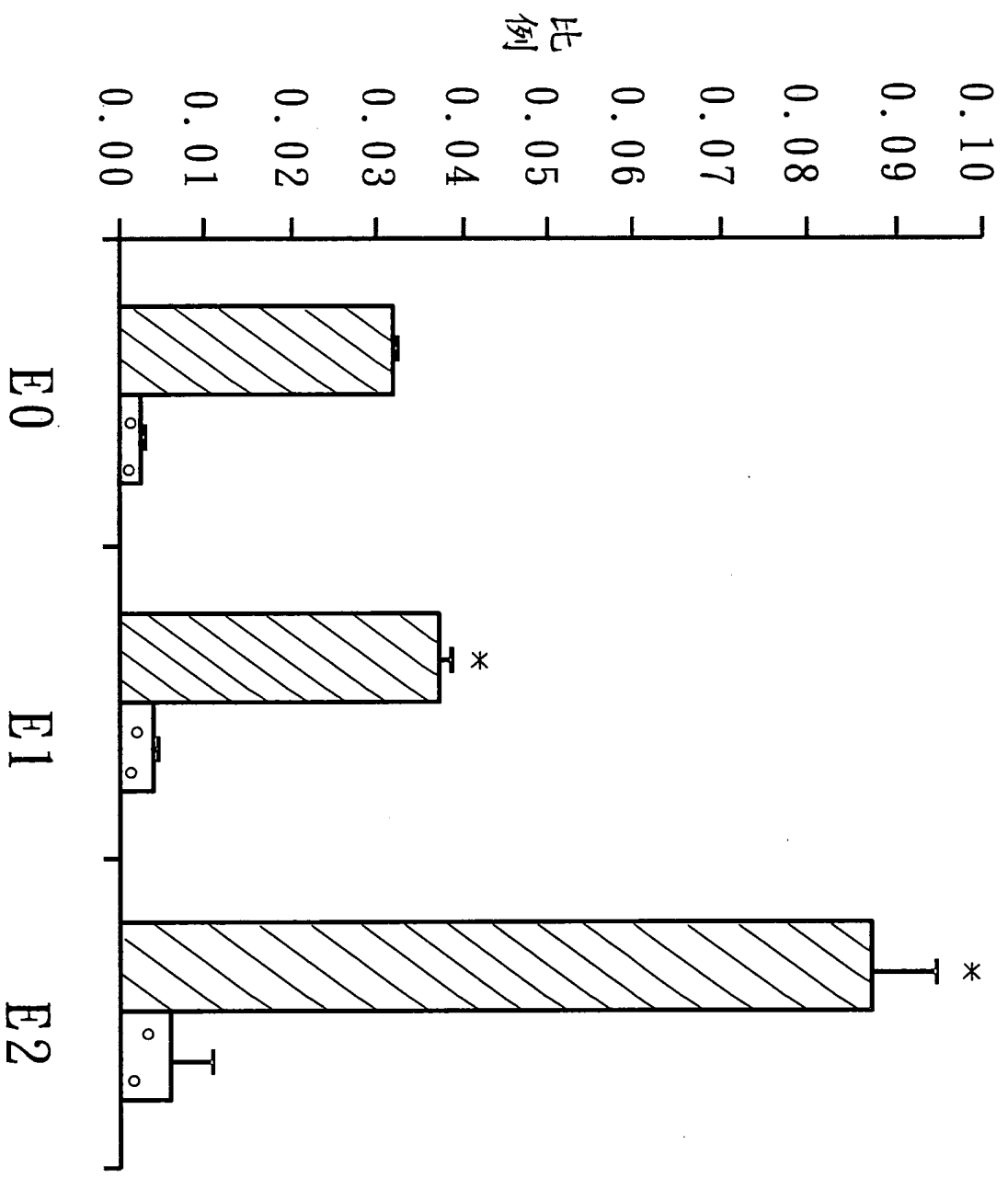
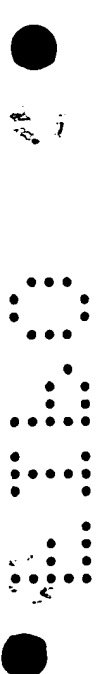
第 5a 圖



- 一氧胜肽强度值
- ▨ 二氧胜肽强度值
- ◻ 三氧胜肽强度值

第 5b 圖





▨ 二氧胜肽强度值
 □ 三氧胜肽强度值

第 6 圖