



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111356473 A

(43)申请公布日 2020.06.30

(21)申请号 201880062858.7

(22)申请日 2018.07.24

(30)优先权数据

102017000085409 2017.07.26 IT

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.03.26

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2018/055496 2018.07.24

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2019/021175 EN 2019.01.31

(71)申请人 生物与化学技术有限责任公司

地址 意大利洛迪

(72)发明人 西尔维亚·拉帕乔利

罗伯托·韦尔加 艾玛·马塞

斯特凡诺·祖基纳利

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 刘小立 郑霞

(51)Int.Cl.

A61K 38/40(2006.01)

A61P 31/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书11页

(54)发明名称

用于治疗感染的 lactoferricin 和 lactoferrampin

(57)摘要

公开了用于治疗由病原体(pathogenic agent)诸如细菌、真菌或酵母引起的感染的组合物。特别地,根据本发明的组合物包含协同联合的两种肽,即lactoferricin和lactoferrampin,所述组合物已经显示出针对这些病原体的显著活性。

1. 组合物,所述组合物包含lactoferricin和lactoferrampin,其中lactoferricin的量低于lactoferrampin的量。
2. 如权利要求1所述的组合物,其中lactoferricin和lactoferrampin的重量比为至少1:1.5。
3. 如权利要求1或2所述的组合物,其中lactoferricin和lactoferrampin的重量比不高于1:100。
4. 如权利要求3所述的组合物,其中lactoferricin和lactoferrampin的重量比为1:2至1:50。
5. 如权利要求1-4中任一项所述的组合物,所述组合物包含基于所述组合物重量的0.01wt%至1wt%的lactoferricin和0.02wt%至10wt%的lactoferrampin。
6. 如权利要求1-5中任一项所述的组合物,其中lactoferricin或lactoferrampin通过乳铁蛋白的酶促水解获得,所述酶促水解优选地通过固定化的酶进行。
7. 如权利要求1-6中任一项所述的组合物,所述组合物用于治疗由病原体引起的感染。
8. 如权利要求1-6中任一项所述的组合物,所述组合物用作用于人类或动物饲养的产品中的益生元剂。
9. 制剂,所述制剂包含如权利要求1-6中任一项所述的组合物和至少一种植物提取物。
10. 制剂,所述制剂包含如权利要求1-6中任一项所述的组合物和至少一种另外的天然抗微生物肽。

用于治疗感染的lactoferricin和lactoferrampin

发明领域

[0001] 本发明涉及用于治疗由病原体 (pathogenic agent) 诸如细菌、真菌或酵母引起的感染的组合物。特别地,根据本发明的组合物包含协同联合的两种肽,即lactoferricin和lactoferrampin,所述组合物已经显示出针对这些病原体的显著活性。

背景技术

[0002] 抗生素耐受性是现在公认的且在世界范围广泛分布的现象。

[0003] 耐药性的发展是正常的演化过程。通常,在对某种药物敏感的微生物群落中,存在一些天然耐受的微生物;这种现象被称为“原发性不敏感(primary insensitivity)”。当抗生素破坏敏感细菌时,对药物不敏感并且直到那一刻处于休眠状态的那些细菌开始繁殖。或者可能发生的是,由于细菌遗传物质的突变或赋予耐受性的基因在细菌之间交换之后而产生耐受性。

[0004] 虽然这种现象是自然的,但它通过抗生素药物的不正确使用被加速和加剧。促成耐受性的主要因素之一是在集约农场(intensive farm)的过度拥挤的环境中用低剂量抗生素处理农场动物以促进生长和预防疾病的实践。这种实践从2006年起已经在欧洲被禁止,但是现在在美国使用的约80%的抗生素被用于动物。

[0005] 被视为最有害的实践之一是使用抗生素治疗病毒感染的习惯,而抗生素对此毫无用处。甚至在服用抗生素时没有遵循说明书,例如以较低剂量或与所推荐的时间服用抗生素,也被认为有助于产生耐受性。最近已经受到谴责的另一种实践是在许多医院遇到的为了预防目的开处抗生素疗程的倾向。

[0006] 因此,本发明的一个目的是提供抗生素药物使用的替代解决方案,该方案允许有效治疗由细菌、真菌或酵母引起的感染,但不引起耐受性现象。

[0007] 发明概述

[0008] 所述目的已经通过权利要求1中陈述的包含lactoferricin和lactoferrampin的组合物实现。

[0009] 在另一方面,本发明涉及所述组合物用于治疗由病原体引起的感染的用途。

[0010] 在仍另一方面,本发明涉及所述组合物作为用于人类食品或动物饲料的产品中的益生元剂(prebiotic agent)的用途。

[0011] 在仍另一方面,本发明涉及包含所述组合物和至少一种植物提取物的制剂。

[0012] 在仍另一方面,本发明涉及包含所述组合物和至少一种其他天然抗微生物肽的制剂。

[0013] 本发明的特征和优点将从以下详述以及以非限制性实例的方式提供的实施方案变得明显。

[0014] 发明详述

[0015] 因此,本发明涉及一种组合物,所述组合物包含lactoferricin和lactoferrampin,其中lactoferricin的量低于lactoferrampin的量。

[0016] lactoferricin是可以由乳铁蛋白胃蛋白酶介导的消化生成的阳离子肽。完整的lactoferricin序列对应于乳铁蛋白的17-41片段(FKCRRWQWRM KKLGAPSITCVRRAF; LFB0084)。在人类中,lactoferricin对应于乳铁蛋白片段1-47,但由通过二硫桥(disulphide bridge)连接的两个亚基,即片段1-11和片段12-47组成。

[0017] lactoferrampin是一种阳离子肽,其以高度正电荷和疏水结构域,并且因此以两亲性特征为特征。lactoferrampin包含乳铁蛋白的残基268-284,并且位于乳铁蛋白的N1结构域中,靠近lactoferricin。

[0018] lactoferrampin和lactoferricin两者都具有两亲性和阳离子特征,然而它们具有不同的氨基酸组成,并且因此具有不同的结构,并且因此它们的抗微生物活性差异很大。

[0019] 术语“量低于(lower amount than)”是指lactoferricin的摩尔量低于lactoferrampin的摩尔量。“摩尔”是根据国际制度(IS)的物质的量的度量单位。1摩尔的化学物质包含 $6.02214076 \times 10^{23}$ 个组成粒子,所述粒子可以是原子、分子、离子、电子或其他物理粒子。

[0020] 已经令人惊讶地发现,在其中lactoferricin以低于lactoferrampin的量存在的组合物中,获得了明显的抗微生物协同作用,如将在下文提供的实例中可以观察到的。

[0021] 因此,在根据本发明的组合物中,lactoferricin和lactoferrampin的重量比为至少1:1.5。

[0022] 最优选地,lactoferricin和lactoferrampin的重量比不高于1:100。

[0023] 在优选的实施方案中,lactoferricin和lactoferrampin的重量比为1:2至1:50。

[0024] 在另外的实施方案中,lactoferricin和lactoferrampin的重量比为1:1.5至1:50,优选地为1:1.5至1:20,更优选地为1:1.5至1:10。

[0025] 在某些实施方案中,本发明的组合物包含基于组合物重量的0.0005wt%至15wt%的lactoferricin和lactoferrampin。优选地,根据本发明的组合物包含0.005wt%至5wt%的lactoferricin和lactoferrampin。更优选地,根据本发明的组合物包含0.01wt%至1wt%的lactoferricin和lactoferrampin。

[0026] 在特别优选的实施方案中,根据本发明的组合物包含0.01wt%至1wt%的lactoferricin和0.02wt%至10wt%的lactoferrampin。甚至更优选的是其中根据本发明的组合物包含0.03wt%至0.1wt%的lactoferricin和1wt%至8wt%的lactoferrampin的实施方案。

[0027] 在某些实施方案中,lactoferricin和lactoferrampin通过乳铁蛋白的酶促水解获得,所述酶促水解优选地通过使用固定化的酶进行,从而分别获得包含lactoferricin的乳铁蛋白水解物和包含lactoferrampin的乳铁蛋白水解物。

[0028] 合适的酶属于催化所讨论的蛋白(在此情况下是乳铁蛋白)的两个连续氨基酸之间的肽键断裂的水解酶类。这些酶对存在的不同氨基酸表现出不同的选择性,因此使蛋白完全降解为个体氨基酸组分不会发生,而是取决于被所用的水解酶识别的氨基酸的位置生成不同长度的肽片段。由于用于水解的酶可以代表产物中的杂质,该方法优选地基于所述酶通过共价键在惰性基质上的固定化进行;固定化使得能够在反应结束时通过使用物理方法(例如过滤)去除生物催化剂,并且因此防止pH变化和温度增加,所述pH变化和温度增加是使游离酶灭活所需的但对产物的活性具有负面影响。

[0029] 优选的酶是蛋白酶,特别是内切蛋白酶,优选地包括胃蛋白酶、梭菌蛋白酶、XVII型蛋白酶、ASP-N内肽酶、ARG-C蛋白酶、谷氨酰内肽酶、蛋白酶、胰蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、胰凝乳蛋白酶及其混合物。

[0030] 在优选的实施方案中,所述酶是猪胃蛋白酶、梭菌蛋白酶、XVII型蛋白酶、ASP-N内切蛋白酶、ARG-C内切蛋白酶或其混合物。

[0031] 优选地,进行酶促水解的pH不高于3,并且更优选地为约2。

[0032] 根据本发明的组合物还可以包含药学上可接受的赋形剂。术语“赋形剂”是指适于在用于治疗由细菌、真菌或酵母引起的感染的制剂中使用的化合物或其混合物。例如,用于在药物制剂中使用的赋形剂通常不应引起患者的不良反应,也不应显著抑制组合物的效力。

[0033] 合适的赋形剂包括酸化剂、酸度调节剂、防结块剂(anti-caking agent)、抗氧化剂、填充剂(bulking agent)、抗性剂(resistance agent)、胶凝剂、包衣剂、改性淀粉、螯合剂、增稠剂、甜味剂、稀释剂、解聚剂(disaggregating agent)、助流剂、着色剂、粘合剂、润滑剂、稳定剂、吸附剂、防腐剂、润湿剂(humectant)、调味剂、成膜剂、乳化剂、润湿剂(wetting agent)、释放阻滞剂(release retardant)及其混合物。

[0034] 赋形剂的添加可以通过使用本领域已知的方法进行。事实上,例如,可以将组分原样混合或与一种或更多种赋形剂混合,密封在软凝胶胶囊中,或呈固体形式,诸如片剂、小型片剂(mini-tablet)、微型片剂(micro-tablet)、颗粒剂、微粒剂、丸剂、多颗粒剂(multiparticulate)、微粉化颗粒、粉末,或呈溶液、乳剂、凝胶、小瓶、滴剂或喷雾剂的形式。

[0035] 根据本发明的组合物可以经由口服、经鼻、鼻内、舌下、含服、肌内、静脉内、经皮、皮下、外部局部、内部局部、直肠、或眼部途径来施用。

[0036] 在另一方面,本发明涉及上文描述的组合物用于治疗由病原体诸如细菌、真菌或酵母引起的感染的用途。

[0037] 术语“治疗”是指本发明的组合物的作用,其能够为罹患传染病的患者提供益处,例如,患者状况的改善或疾病进展的延迟。在本文件中,术语“感染”或其同义词“感染病理学(infectious pathology)”是指微生物在另一宿主生物体内或另一宿主生物体上的入侵、定殖和/或增殖。术语“感染”是指由病原体例如细菌、寄生虫、原生动物、病毒或真菌,包括酵母,引起的传染病。

[0038] 病原性细菌可以起源于以下细菌物种之一:葡萄球菌属的种(*Staphylococcus* spp.),例如金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) (例如金黄色葡萄球菌ATCC 25923或中间葡萄球菌(*S. intermedius*) ATCC 29663、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌);痤疮丙酸杆菌(*Propionibacterium acnes*);牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*);肠球菌属的种(*Enterococcus* spp.),例如粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*) ATCC 29212;假单胞菌属的种(*Pseudomonas* spp.),例如铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) ATCC 27853;分枝杆菌属的种(*Mycobacterium* spp.),例如结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*);肠杆菌属的种(*Enterobacter* spp.);弯曲杆菌属的种(*Campylobacter* spp.);沙门氏菌属的种(*Salmonella* spp.) (例如肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*) ATCC 13076);链球菌属的种(*Streptococcus* spp.),例如A族链球菌或B族链

球菌、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)；螺杆菌属的种 (*Helicobacter* spp.)，例如幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*)；奈瑟氏菌属的种 (*Neisseria* spp.)，例如淋病奈瑟氏菌 (*Neisseria gonorrhoea*)、脑膜炎奈瑟氏菌 (*Neisseria meningitidis*)；伯氏疏螺旋体 (*Borrelia burgdorferi*)，志贺氏菌属的种 (*Shigella* spp.)，例如福氏志贺氏菌 (*Shigella flexneri*)；大肠杆菌 (*Escherichia coli*) (ATCC 25922)；嗜血杆菌属的种 (*Haemophilus* spp.)，例如流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*)；土拉弗朗西斯菌 (*Francisella tularensis*)、芽孢杆菌属的种 (*Bacillus* spp.)，例如炭疽芽孢杆菌 (*Bacillus anthracis*)；梭菌属的种 (*Clostridium* spp.)，肉毒梭菌 (*Clostridium botulinum*)；耶尔森氏菌属的种 (*Yersinia* spp.)，例如鼠疫杆菌 (*Yersinia pestis*)；密螺旋体属的种 (*Treponema* spp.)；伯克霍尔德氏菌属的种 (*Burkholderia* spp.)，例如洋葱伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia cepacia*) ATCC 17759，鼻疽伯克霍尔德氏菌 (*B. mallei*) 和类鼻疽伯克霍尔德氏菌 (*B. pseudomallei*)；寡养单胞菌属的种 (*Stenotrophomonas* spp.)，例如嗜麦芽寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*) ATCC 13637。

[0039] 真菌病原体可以源自以下真菌物种 (包括酵母) 之一：念珠菌属的种 (*Candida* spp.) (例如白色念珠菌 (*C. albicans*))、表皮癣菌属的种 (*Epidermophyton* spp.)、外瓶霉属的种 (*Exophiala* spp.)、小孢子菌属的种 (*Microsporum* spp.)、毛癣菌属的种 (*Trichophyton* spp.) (例如红色毛癣菌 (*T. rubrum*) 和指间毛癣菌 (*T. interdigitale*))、癣属的种 (*Tinea* spp.)、曲霉属的种 (*Aspergillus* spp.)、芽生菌属的种 (*Blastomyces* spp.)、裂殖菌属的种 (*Blastoschizomyces* spp.)、球孢子菌属的种 (*Coccidioides* spp.)、隐球菌属的种 (*Cryptococcus* spp.) (例如新生隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*))、组织胞浆菌属的种 (*Histoplasma* spp.)、*Paracoccidiomyces* spp.、孢子丝菌属的种 (*Sporotrix* spp.)、犁头霉属的种 (*Absidia* spp.)、*Cladophialophora* spp.、着色霉属的种 (*Fonsecaea* spp.)、瓶霉属的种 (*Phialophora* spp.)、*Lacazia* spp.、*Arthrographis* spp.、枝顶孢属的种 (*Acremonium* spp.)、马杜拉放线菌属的种 (*Actinomadura* spp.)、鳞质霉属的种 (*Apophysomyces* spp.)、伊蒙菌属的种 (*Emmonsia* spp.)、蛙粪霉属的种 (*Basidiobolus* spp.)、白僵菌属的种 (*Beauveria* spp.)、金孢属的种 (*Chrysosporium* spp.)、耳霉属的种 (*Conidiobolus* spp.)、小克银汉霉属的种 (*Cunninghamella* spp.)、镰刀菌属的种 (*Fusarium* spp.)、地霉属的种 (*Geotrichum* spp.)、粘束孢菌属的种 (*Graphium* spp.)、小球腔菌属的种 (*Leptosphaeria* spp.)、马拉色菌属的种 (*Malassezia* spp.) (例如糠秕马拉色菌 (*Malassezia furfur*) 或厚皮马拉色菌 (*M. pachydermatis*) DSM 6172)、毛霉属的种 (*Mucor* spp.)、新龟甲属的种 (*Neotestudina* spp.)、诺卡氏菌属的种 (*Nocardia* spp.)、拟诺卡氏菌属 (*Nocardiosis* spp.)、拟青霉属的种 (*Paecilomyces* spp.)、茎点霉属的种 (*Phoma* spp.)、毛孢子菌属的种 (*Piedraia* spp.)、肺孢子菌属的种 (*Pneumocystis* spp.)、假霉样真菌属的种 (*Pseudallescheria* spp.)、棘壳孢属的种 (*Pyrenochaeta* spp.)、根毛霉属的种 (*Rhizomucor* spp.)、根霉属的种 (*Rhizopus* spp.)、红酵母属的种 (*Rhodotorula* spp.)、酵母菌属的种 (*Saccharomyces* spp.)、丝孢菌属的种 (*Scedosporium* spp.)、帚霉属的种 (*Scopulariopsis* spp.)、掷孢酵母属的种 (*Sporobolomyces* spp.)、共头霉属的种 (*Syncephalastrum* spp.)、木霉属的种 (*Trichoderma* spp.)、毛孢子菌属的种 (*Trichosporon* spp.)、单格孢属的种 (*Ulocladium* spp.)、黑粉菌属的种 (*Ustilago*

spp.)、轮枝菌属的种 (*Verticillium* spp.)、万吉拉菌属的种 (*Wangiella* spp.)。

[0040] 优选地,治疗是针对选自假单胞菌属的种、埃希氏菌属的种、葡萄球菌属的种、念珠菌属的种和马拉色菌属的种的病原体。

[0041] 如从以下实例中可以观察到的,由于如上文描述的 lactoferricin 和 lactoferrampin 的联合,根据本发明的组合物显示出针对所述病原体的令人惊讶的协同效力。

[0042] 在仍另一方面,本发明涉及所述组合物作为用于人类或动物饲养的产品中的益生元剂的用途。事实上,已经出乎意料地发现,根据本发明的组合物不仅针对上文陈述的病原体是协同有效的,而且具有比常用的益生元即FOS(低聚果糖)和GOS(低聚半乳糖)获得的益生元指数 (prebiotic index) 更高的益生元指数。事实上,该组合物导致有益益生菌(包括屎肠球菌 (*E. faecium*)、植物乳杆菌 (*L. plantarum*)、鼠李糖乳杆菌 (*L. rhamnosus*)) 的生长及其代谢活性,并且同时减少腐败微生物或潜在的病原性微生物,诸如上文陈述的那些微生物。

[0043] 益生元指数通过使用以下公式计算:

$$\frac{\text{对于益生元的益生菌生长 } \log \frac{\text{CFU}}{\text{mL}} (24 \text{ h}) - \text{对于益生元的益生菌生长 } \log \text{CFU/mL} (0 \text{ h})}{\text{对于葡萄糖的益生菌生长 } \log \frac{\text{CFU}}{\text{mL}} (24 \text{ h}) - \text{对于葡萄糖的益生菌生长 } \log \text{CFU/mL} (0 \text{ h})}$$

[0044]

$$\frac{\text{对于益生元的肠道菌生长 } \log \frac{\text{CFU}}{\text{mL}} (24 \text{ h}) - \text{对于益生元的肠道菌生长 } \log \text{CFU/mL} (0 \text{ h})}{\text{对于葡萄糖的肠道菌生长 } \log \frac{\text{CFU}}{\text{mL}} (24 \text{ h}) - \text{对于葡萄糖的肠道菌生长 } \log \text{CFU/mL} (0 \text{ h})}$$

[0045] 因此,指数越高,则所测试的化合物的益生元特征越大。

[0046] 在以下实例中,显示了根据本发明的组合物的益生元特征与FOS的益生元特征的比较。

[0047] 本发明涉及包含本文描述的组合物和合适的食品级成分的食品或饲料产品。

[0048] 在仍另一方面,本发明涉及包含所述组合物和至少一种植物提取物的制剂。

[0049] 优选的植物提取物是熊果、绿茶、蔓越莓、蓝莓、桉属植物 (*eucalyptus*)、金缕梅、大豆的提取物及其混合物。

[0050] 已经令人惊讶地观察到,当与至少一种植物提取物混合时,根据本发明的组合物显示出进一步的协同作用。

[0051] 在仍另一方面,本发明涉及包含所述组合物和至少一种其他天然抗微生物肽的制剂。

[0052] 所述天然抗微生物肽优选地为乳链菌肽、β防御素、LL-37、temporin A、temporin B、temporin L、indolicidin、蜂毒肽 (melittin)、protegrin-1、protegrin-2、protegrin-3、protegrin-4、protegrin-5、magainin 2、RTD-1、RTD-2、RTD-3、RTD-4、RTD-5、arenicin-1、arenicin-2、arenicin-3、皮离蛋白 (dermcidin)、cecropin、andropin、moricin、ceratotoxin、dermaseptin、bombinin,优选地为maximin H1、maximin H2、maximin H3、maximin H4或maximin H5、esculentin、ranalexin、buforin II、人类CAP18、baecin、apidaecin、profenin、bactenecin、brevinin-1、brevinin-2、tachiplesin、drosomycin及其混合物。

[0053] 在优选的实施方案中,所述天然抗微生物肽是乳链菌肽(nisin)。

[0054] 事实上,已经观察到,当与至少一种其他天然抗微生物肽混合时,根据本发明的组合物显示出进一步的协同作用。

[0055] 应当理解,如上文报道的组合物的组分的优选方面的所有可能组合都应被视为在本文公开。

[0056] 还应当理解,被鉴定为对于所述组合物及其组分是优选的和有利的的所有方面都应被视为对于其制备和用途也类似地是优选的和有利的。

[0057] 下文提供了本发明的工作实施例以用于说明性目的。

实施例

[0058] 实施例1.

[0059] 下文提供了酶固定化程序的实例,可以进行所述酶固定化程序以获得待被用于产生构成感兴趣的组合物的乳铁蛋白水解物的生物催化剂。

[0060] a) 酶固定化#1(盐酸)

[0061] 制备浓度为10mM的HCl的水性溶液。

[0062] 以25mg/mL的浓度添加粉末状的猪胃蛋白酶,并且使其处于搅拌下直至完全溶解。

[0063] 测量pH并使用盐酸或氢氧化钠的水性溶液调节至 2.00 ± 0.20 。

[0064] 以250mg/mL的浓度向酶悬浮液中添加环氧树脂并使其处于搅拌下持续4小时。

[0065] 通过用等体积的HCl 10mM+NaCl 1M溶液洗涤至少3次去除未结合的酶溶液。

[0066] 最后一次洗涤后,使用真空泵去除固定在树脂上的酶的液体部分,并且然后将树脂储存在4°C。

[0067] 通过用2% (w/v) 血红蛋白作为底物,使用标准方案滴定酶活性(Yoshida,F.(1956),Bull.Agri.Chem.Soc Japan 20,252-256)。

[0068] b) 酶固定化#2(磷酸)

[0069] 将85% (w/w) 磷酸制备为1.25% (v/v) 浓度的水性溶液。

[0070] 以25mg/mL的浓度添加粉末状的猪胃蛋白酶,并且使其处于搅拌下直至完全溶解。

[0071] 测量pH并用磷酸或氢氧化钾的水性溶液调节至 2.00 ± 0.20 。

[0072] 以250mg/mL的浓度向酶悬浮液中添加环氧树脂并使其处于搅拌下持续4小时。

[0073] 通过用等体积的1.25% (v/v) 磷酸+NaCl 1M的水性溶液洗涤至少3次去除未结合的酶溶液。

[0074] 最后一次洗涤后,使用真空泵去除固定在树脂上的酶的液体部分,并且然后将树脂储存在4°C。

[0075] 用2% (w/v) 血红蛋白作为底物,使用标准方案滴定酶活性(Yoshida,F.(1956),Bull.Agri.Chem.Soc Japan 20,252-256)。

[0076] 实施例2.

[0077] 通过使用固定化的酶的乳铁蛋白水解方法#1(HCl/甘氨酸)

[0078] 制备浓度为3g/L的甘氨酸的水性溶液。

[0079] 将溶液保持在搅拌下并缓慢添加乳铁蛋白粉末至浓度为130g/L并等待直至其完全溶解。

- [0080] 通过使用盐酸的水性溶液将悬浮液的pH调节至 2.1 ± 0.10 。
- [0081] 添加固定化的胃蛋白酶至浓度为32.5U/mL至65U/mL (通过对标准2% (w/w) 血红蛋白底物滴定测量的)。
- [0082] 在20°C-30°C的温度进行反应的2小时内,使用校准筛(calibrated sieve)去除固定化的酶,所述校准筛有效地将液体部分(乳铁蛋白的水解物)与固体部分(用过的(spent)固定化的酶)分离。
- [0083] 通过HPLC分析产物的水解概况并测量lactoferricin的存在。
- [0084] 实施例3.
- [0085] 通过使用固定化的酶的乳铁蛋白水解方法#2 (磷酸)
- [0086] 制备浓度为130g/L的乳铁蛋白的水性溶液,将溶液保持在搅拌下并等待直至其完全溶解。
- [0087] 使用85% (w/v) 磷酸的溶液将悬浮液的pH调节至 2.1 ± 0.10 。
- [0088] 添加固定化的胃蛋白酶至浓度为65U/mL至130U/mL (通过对标准2% (w/w) 血红蛋白底物滴定测量的)。
- [0089] 在20°C-30°C的温度进行反应的2小时内,使用校准筛去除固定化的酶,所述校准筛有效地将液体部分(乳铁蛋白的水解物)与固体部分(用过的固定化的酶)分离。
- [0090] 通过HPLC分析产物的水解概况并测量lactoferricin的存在。
- [0091] 实施例4.
- [0092] 通过使用固定化的酶的乳铁蛋白水解方法#3 (乳酸/磷酸)
- [0093] 将80% (w/w) 乳酸制备为2% (v/v) 浓度的水性溶液。
- [0094] 将溶液保持在搅拌下并缓慢添加乳铁蛋白粉末直至浓度为130g/L并等待直至其完全溶解。
- [0095] 通过使用85% (w/v) 磷酸的水性溶液将悬浮液的pH调节至 2.1 ± 0.10 。
- [0096] 添加固定化的胃蛋白酶至浓度为65U/mL至130U/mL (通过对标准2% (w/w) 血红蛋白底物滴定测量的)。
- [0097] 在20°C-30°C的温度进行反应的2小时内,使用经校准的筛去除固定化酶,经校准的筛有效地将液体部分(乳铁蛋白的水解物)与固体部分(用过的固定化酶)分离。
- [0098] 通过HPLC分析产物的水解概况并测量lactoferricin的存在。
- [0099] 实施例5.
- [0100] 通过使用固定化的酶的乳铁蛋白水解方法#4 (乳酸)
- [0101] 制备浓度为130g/L的乳铁蛋白的水性溶液,将溶液保持在搅拌下并等待直至其完全溶解。
- [0102] 添加80% (w/w) 乳酸至终浓度为2% (v/v)。
- [0103] 添加固定化的胃蛋白酶至浓度为32.5U/mL至65U/mL (通过对标准2% (w/w) 血红蛋白底物滴定测量的)。
- [0104] 在20°C-30°C的温度的2小时反应后,使用校准筛去除固定化的酶,所述校准筛有效地将液体部分(乳铁蛋白的水解物)与固体部分(用过的固定化的酶)分离。
- [0105] 通过HPLC分析产物的水解概况并测量lactoferricin的存在。
- [0106] 实施例6.

- [0107] 通过使用固定化的酶的乳铁蛋白水解方法#4(用于产生lactoferrampin)
- [0108] 制备浓度为130g/L的乳铁蛋白的水性溶液,将溶液保持在搅拌下并等待直至其完全溶解。
- [0109] 使用浓度为10mM至100mM的tris-Cl或碳酸氢铵缓冲液将溶液缓冲至7.0至9.0的pH。
- [0110] 添加浓度为0.01% (w/v) 至10% (w/v) 的以下游离酶或固定化的酶的对(pair):
- [0111] -梭菌蛋白酶和XVII型蛋白酶(内切蛋白酶GLU-C);
- [0112] -梭菌蛋白酶和内切蛋白酶ASP-N;
- [0113] -内切蛋白酶ARG-C和XVII型蛋白酶(内切蛋白酶GLU-C)
- [0114] -内切蛋白酶ARG-C和内切蛋白酶ASP-N。
- [0115] 使用前,梭菌蛋白酶需要在2.5mM DTT和1mM CaCl₂的存在下的4h活化阶段。
- [0116] 将反应物在25℃至37℃的温度孵育,通过HPLC监测lactoferrampin的产生。水解完成后,(在生物催化剂在固体基质上的情况下)通过去除固定化的酶或(在游离酶的情况下)通过3M HCl使pH降至4.00来抑制反应。
- [0117] 实施例7。
- [0118] 根据本发明的组合物的抗微生物活性已经通过使用抗微生物稀释法(CLSI方案-临床和实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute))的体外易感性测试,针对革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌以及真菌和酵母进行了评估,作为评估的结果,确定了针对所讨论的每种微生物的MIC(最小抑制浓度)。
- [0119] 对于所有进行的测试,抗微生物活性的阳性对照通过使用氟康唑(用于真菌和酵母)和头孢曲松(用于细菌菌株)来进行,并且在阴性对照(无化合物)中,对标准(correct)微生物生长进行评估。

- [0120] 首先,确定了两种肽(lactoferricin和lactoferrampin)的单独的抗微生物活性:
- [0121] -针对中间葡萄球菌(S.intermedius) ATCC 29663的活性(MIC)

| | lactoferricin(μg/mL) | lactoferrampin (μg/mL) |
|---------------|----------------------|------------------------|
| [0122] 中间葡萄球菌 | 6.25 | 200 |

- [0123] -针对厚皮马拉色菌DSM 6172的活性(MIC)

| | lactoferricin(μg/mL) | lactoferrampin (μg/mL) |
|---------------|----------------------|------------------------|
| [0124] 厚皮马拉色菌 | 6.25 | 200 |

- [0125] 然后确定了组合的(两种)肽的抗微生物活性:

| | FIC 指数(lactoferricin+lactoferrampin) |
|--------------|--------------------------------------|
| [0126] 中间链球菌 | 0.5 |
| 厚皮马拉色菌 | 0.5 |

- [0127] FIC指数由以下公式确定:

$$[0128] \text{FIC指数} = \frac{\text{与B组合的A的MIC}}{\text{单独的A的MIC}} + \frac{\text{与A组合的B的MIC}}{\text{单独的B的MIC}}$$

- [0129] 其中A是lactoferricin,且B是lactoferrampin

[0130] FIC指数<1=>显示出协同作用,即两种组分一起的活性大于它们单独测量时的活性的和。

[0131] FIC指数>1=>无协同作用

[0132] 根据获得的并在上表中示出的实验数据,组合的(两种)肽的协同作用是明确的。

[0133] 实施例8.

[0134] 通过将实施例2中获得的含有lactoferricin的乳铁蛋白水解物与实施例6中获得的含有lactoferrampin的乳铁蛋白水解物混合,制备了根据本发明的组合物,其中lactoferricin和lactoferrampin的重量比为1:1.5。

[0135] 实施例9.

[0136] (以不同浓度)使实施例8中的组合物和包含低聚果糖(FOS,来自菊苣的低聚果糖,由Sigma Aldrich销售)的产品与益生微生物或病原体接触。

[0137] 孵育24小时后,评估依据CFU/ml的细菌计数(在最佳琼脂培养基上铺板)以评价生长;将该参数与在葡萄糖存在下的生长进行比较。

[0138] 用于获得益生元指数的公式如下:

$$\frac{\text{对于益生元的益生菌生长 } \log \frac{\text{CFU}}{\text{mL}} (24 \text{ h}) - \text{对于益生元的益生菌生长 } \log \text{CFU/mL} (0 \text{ h})}{\text{对于葡萄糖的益生菌生长 } \log \frac{\text{CFU}}{\text{mL}} (24 \text{ h}) - \text{对于葡萄糖的益生菌生长 } \log \text{CFU/mL} (0 \text{ h})}$$

[0139]

$$\frac{\text{对于益生元的肠道菌生长 } \log \frac{\text{CFU}}{\text{mL}} (24 \text{ h}) - \text{对于益生元的肠道菌生长 } \log \text{CFU/mL} (0 \text{ h})}{\text{对于葡萄糖的肠道菌生长 } \log \frac{\text{CFU}}{\text{mL}} (24 \text{ h}) - \text{对于葡萄糖的肠道菌生长 } \log \text{CFU/mL} (0 \text{ h})}$$

[0140] 以下是特定浓度的FOS和实施例8中的组合物的益生元指数。

[0141] 如本说明书中所陈述的,指数越高,则所测试的化合物的益生元特征越大。

[0142] 屎肠球菌的生长(对比肠炎沙门氏菌)

| 浓度(mg/ml) | 益生元指数 | |
|-----------|-------|-------------|
| | FOS | 实施例 8 中的组合物 |
| 20 | 0.122 | 1.040 |
| 15 | 0.128 | 1.041 |
| 10 | 0.155 | 0.602 |
| 5 | 0.232 | 0.361 |
| 1 | 0.355 | 0.317 |
| 0.5 | 0.316 | 0.279 |
| 0.1 | 0.441 | 0.295 |

[0143]

[0144] 植物乳杆菌的生长(对比肠炎沙门氏菌)

| 浓度(mg/ml) | 益生元指数 | |
|-----------|-------|-------------|
| | FOS | 实施例 8 中的组合物 |
| 20 | 0.119 | 1.099 |
| 15 | 0.132 | 1.095 |
| 10 | 0.160 | 0.662 |
| 5 | 0.244 | 0.401 |
| 1 | 0.386 | 0.342 |

[0145]

| | | | |
|--------|-----|-------|-------|
| [0146] | 0.5 | 0.353 | 0.303 |
| | 0.1 | 0.478 | 0.314 |

[0147] 鼠李糖乳杆菌的生长(对比肠炎沙门氏菌)

| 浓度(mg/ml) | 益生元指数 | |
|-----------|-------|-------------|
| | FOS | 实施例 8 中的组合物 |
| 20 | 0.148 | 0.592 |
| 15 | 0.168 | 0.977 |
| [0148] 10 | 0.188 | 0.594 |
| 5 | 0.268 | 0.361 |
| 1 | 0.394 | 0.322 |
| 0.5 | 0.362 | 0.294 |
| 0.1 | 0.483 | 0.310 |

[0149] 以上数据清楚地显示出根据本发明的组合物的益生元特征。

[0150] 实施例10.

[0151] 在本实施例中,首先评估了单独的天然提取物的抗微生物活性,如下:

| MIC (mg/ml)熊果 | | | | |
|---------------------------|------------------------|--------------------|------------------------|-------|
| [0152] 金黄色葡萄球菌(S. aureus) | 表皮葡萄球菌(S. epidermidis) | 幼虫类芽孢杆菌(P. larvae) | 牙龈卟啉单胞菌(P. gingivalis) | 白色念珠菌 |
| 6.25 | 3.125 | 0.78 | 0.384 | 0.39 |

| MIC (mg/ml)蔓越莓 | | | |
|----------------|-------|-----------------------|-------|
| [0153] 金黄色葡萄球菌 | 大肠杆菌 | 铜绿假单胞菌(P. aeruginosa) | 白色念珠菌 |
| 0.78 | 3.125 | 0.78 | 1.56 |

| MIC (mg/ml)蓝莓 | | |
|---------------|--------|-------|
| [0154] 大肠杆菌 | 铜绿假单胞菌 | 白色念珠菌 |
| 1.56 | 12.5 | 6.25 |

| 微生物 - MIC (mg/ml) | |
|-------------------|--------------------------------|
| [0155] 绿茶 | 大肠杆菌 - 22.5 mg/ml |
| 桉属植物 | 白色念珠菌 3.125 mg/ml |
| 金缕梅 | 白色念珠菌 12.5 mg/ml |
| 大豆 | 痤疮丙酸杆菌(P. acnes) - 0.195 mg/ml |

[0156] 然后评估了与实施例8中的根据本发明的组合物联合的个体天然提取物的抗微生物活性:

| | 与实施例 8 混合的提取物 | FIC 指数 | |
|--------|---------------|--------|------|
| [0157] | 幼虫类芽孢杆菌 | 熊果 | 0.2 |
| | 大肠杆菌 | 绿茶 | 0.65 |
| | 表皮葡萄球菌 | 熊果 | 0.4 |
| | 白色念珠菌 | 熊果 | 0.2 |
| | 白色念珠菌 | 蔓越莓 | 0.3 |
| | 白色念珠菌 | 蓝莓 | 0.28 |
| | 白色念珠菌 | 桉属植物 | 0.15 |
| | 白色念珠菌 | 金缕梅 | 0.1 |
| | 金黄色葡萄球菌 | 熊果 | 0.5 |
| | 金黄色葡萄球菌 | 蔓越莓 | 0.75 |
| | 痤疮丙酸杆菌 | 大豆 | 0.75 |
| | 牙龈卟啉单胞菌 | 熊果 | 0.2 |

[0158] 同样,在这种情况下,观察到根据本发明的组合物与植物提取物之间的进一步的出乎意料的协同作用。

[0159] 实施例11.

[0160] 评估了实施例8中的组合物与其他天然抗微生物肽,诸如乳链菌肽的相互作用。

[0161] 获得的数据示出,两种化合物彼此之间建立了协同相互作用,如以下所陈述的:

| | 微生物 - MIC (UI/ml) | |
|--------|--------------------|--------------------|
| [0162] | 乳链菌肽 | 金黄色葡萄球菌 - 17 UI/ml |
| | 大肠杆菌 - 18750 UI/ml | |

[0163] 在确定了单独的乳链菌肽的抗微生物活性后,评估了与根据本发明的组合物联合的乳链菌肽的抗微生物活性:

| | FIC 指数(乳链菌肽+实施例 8) | |
|--------|--------------------|------|
| [0164] | 大肠杆菌 | 0.15 |
| | 金黄色葡萄球菌 | 0.37 |

[0165] 同样,在这种情况下,观察到根据本发明的组合物与天然抗微生物肽之间的进一步的出乎意料的协同作用。