



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102516358 A

(43) 申请公布日 2012.06.27

(21) 申请号 201110404965.3

A23L 1/305(2006.01)

(22) 申请日 2011.12.08

A23C 19/00(2006.01)

(71) 申请人 鞍山嘉鲜农业发展有限公司

地址 114100 辽宁省鞍山市台安县农业高新技术园区

(72) 发明人 胡建恩 李敏镇 卢航 杨杰
张丽

(74) 专利代理机构 鞍山嘉讯科技专利事务所
21224

代理人 张群

(51) Int. Cl.

C07K 7/06(2006.01)

C07K 1/36(2006.01)

C07K 1/34(2006.01)

C07K 1/16(2006.01)

A61K 38/08(2006.01)

A61P 9/12(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54) 发明名称

源于鱼鳞胶原蛋白的血管紧张素 I 转换酶抑制剂及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一种源于鱼鳞胶原蛋白的血管紧张素 I 转换酶抑制剂及其应用,应用现代分子生物技术对鱼皮胶原蛋白进行酶解,对具有 ACE 抑制活性较强的部分进行分离纯化,对纯化得到的肽进行氨基酸序列分析,并研究了此肽在体内对 ACE 的抑制活性,结果表明此肽有明显的降血压效果。因此,可以将此活性肽及其衍生物或者其盐类作为高血压患者的长期治疗药物,或者作为食品添加剂制成保健食品。

1. 一种源于鱼鳞胶原蛋白的血管紧张素 I 转换酶抑制剂,其特征在于,该物质由对 ACE 有较强抑制作用的活性单肽组成,该活性单肽的氨基酸序列为 Gly-Ala-Aap-Gly-Ser-Val-Gly-Tyr。

2. 根据权利要求 1 所述的源于鱼鳞胶原蛋白的血管紧张素 I 转换酶抑制剂的制备方法,其特征在于,将鱼鳞胶原蛋白的酶解产物经超滤、凝胶过滤、C₁₈ 高效液相色谱分离纯化,分离过程中每一步用 ACE 活性抑制的测定方法跟踪测定分离样品的活性,取活性最大的成分进行进一步的分离,得到活性单肽。

3. 根据权利要求 2 所述的源于鱼鳞胶原蛋白的血管紧张素 I 转换酶抑制剂的制备方法,其特征在于,所述的凝胶过滤采用 Sephadex LH-20 凝胶过滤柱进行分离,流动相为体积百分比 30% 的甲醇水溶液,温度为室温,检测波长为 280nm,按时间收集。

4. 根据权利要求 2 所述的源于鱼鳞胶原蛋白的血管紧张素 I 转换酶抑制剂的制备方法,其特征在于,所述的高效液相色谱分离纯化采用 Hypersil C₁₈ 柱,流动相 A 液为 :0.1% TFA+0% 乙腈的水溶液,用前超声脱气;流动相 B 液为 :0.1% TFA+100% 乙腈的水溶液,检测波长 215nm,室温,进样体积 20 μ l,采用梯度洗脱,按时间收集;洗脱梯度 :0-60min :A 液 100% -50% 线性降低,B 液 0% -50% 线性升高;60-80min :A 液 0%,B 液 100%。

5. 一种权利要求 1 所述的源于鱼鳞胶原蛋白的血管紧张素 I 转换酶抑制剂的应用,其特征在于,所述的活性单肽用于治疗 and 预防高血压。

6. 根据权利要求 5 所述的源于鱼鳞胶原蛋白的血管紧张素 I 转换酶抑制剂的应用,其特征在于,所述的活性单肽按常规方法生成的盐类,可用于治疗和预防高血压。

7. 根据权利要求 5 或 6 所述的源于鱼鳞胶原蛋白的血管紧张素 I 转换酶抑制剂的应用,其特征在于,所述的活性单肽或活性单肽生成的盐类,可与充填剂形成各种形式的制剂:散剂,颗粒剂,片剂,胶囊,水溶液,悬浮液,乳化液,喷剂,或粉剂。

8. 根据权利要求 7 所述的源于鱼鳞胶原蛋白的血管紧张素 I 转换酶抑制剂的应用,其特征在于,所述的制剂,使用时可以采取经口腔和非经口腔的投入方法,非经口腔的投入可以采取皮下和静脉注射,或肛肠投入;注射液的制作可以任意选用生理盐水、葡萄糖、安定剂、防腐剂、悬浮剂或乳化剂。

9. 根据权利要求 7 所述的源于鱼鳞胶原蛋白的血管紧张素 I 转换酶抑制剂的应用,其特征在于,所述的制剂可以添加到各种食品当中,作为抑制血压的保健食品;食品的形态可以是液体的清凉饮料、乳酸饮料、调味品或汤类,也可以是固体的奶酪、火腿或点心。

10. 根据权利要求 1 所述的源于鱼鳞胶原蛋白的血管紧张素 I 转换酶抑制剂,其特征在于,所述的活性单肽由氨基酸璇光度不同而定义为 L 型氨基酸和 D 型氨基酸所形成的不同构型的八肽。

源于鱼鳞胶原蛋白的血管紧张素 I 转换酶抑制剂及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种源于鱼鳞胶原蛋白的血管紧张素 I 转换酶 (angiotensin I converting enzyme, 略称为 ACE) 抑制肽以及它的类似物, 或者其盐类中的一种所构成的 ACE 抑制剂及其应用。

背景技术

[0002] 高血压是最常见的心血管疾病之一, 它能造成大脑、心血管、肾脏的损害, 是引起脑卒中、心力衰竭和冠心病等的重要因素, 严重威胁着人类的健康。因此, 治疗和预防高血压对提高人类的健康水准, 延长寿命有着重要的意义。

[0003] 血管紧张素 I 转换酶在人体肾素 - 血管紧张素系统和激肽释放酶 - 激肽系统中, 对血压调节起着重要的作用。ACE 可以将血管紧张素 I 转换为血管紧张素 II, 使周围小动脉、血管平滑肌收缩, 同时刺激醛固酮分泌, 促进人体肾脏对 Na^+ 、 K^+ 的重吸收, 引起钠储量和血容量的增加, 使血压升高; 还可以使舒缓激肽失活, 引起血压升高。

[0004] 综上所述, ACE 一方面产生使血压上升的血管紧张素 II, 另一方面, 使具有血管舒张作用的舒缓激肽失活, 这都造成了血压的上升。所以, 如果抑制了 ACE 的活性, 就可以起到降压的作用。

[0005] 现有的作为治疗高血压的合成物卡普利就是 ACE 的抑制剂, 但它有很多副作用, 所以源于食品蛋白中的 ACE 抑制肽因其无毒副作用, 同时具有其它疗效而被广泛应用, 市场前景极好。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种来源于食品, 具有高安全性、廉价、可产业化实施的血管紧张素 I 转换酶抑制剂及制备方法及其应用。

[0007] 为实现上述目的, 本发明通过以下技术方案实现:

[0008] 一种源于鱼鳞胶原蛋白的血管紧张素 I 转换酶抑制剂, 该物质由对 ACE 有较强抑制作用的活性单肽组成, 该活性单肽的氨基酸序列为 Gly-Ala-Asp-Gly-Ser-Val-Gly-Tyr。

[0009] 所述血管紧张素 I 转换酶抑制剂的制备方法, 将鱼鳞胶原蛋白的酶解产物经超滤、凝胶过滤、 C_{18} 高效液相色谱分离纯化, 分离过程中每一步用 ACE 活性抑制的测定方法跟踪测定分离样品的活性, 取活性最大的成分进行进一步的分离, 得到活性单肽。高效毛细管电泳鉴定纯度大于 95%, 对 ACE 有较强的抑制作用, 由氨基酸旋光度不同而定义为 L 型氨基酸和 D 型氨基酸所形成的不同构型的八肽。

[0010] 所述的凝胶过滤采用 Sephadex LH-20 凝胶过滤柱进行分离, 流动相为体积百分比 30% 的甲醇水溶液, 温度为室温, 检测波长为 280nm, 按时间收集。

[0011] 所述的高效液相色谱分离纯化采用 Hypersil C_{18} 柱, 流动相 A 液为: 0.1% TFA+0% 乙腈的水溶液, 用前超声脱气; 流动相 B 液为: 0.1% TFA+100% 乙腈的水溶液, 检测波长 215nm, 室温, 进样体积 20 μl , 采用梯度洗脱, 按时间收集; 洗脱梯度: 0-60min : A 液

100% -50%线性降低, B液 0% -50%线性升高;60-80min :A液 0%, B液 100%。

[0012] 所述的活性单肽用于治疗 and 预防高血压。

[0013] 所述的活性单肽按常规方法生成的盐类,可用于治疗和预防高血压。所述的活性单肽与酸反应生成的盐,或与金属离子形成的盐类,或与氨基乙醇,三乙氨,或二环乙氨形成的胺类盐。公认的与酸反应产生的盐类,采用的酸如盐酸,硫酸,硝酸,磷酸等无机酸;蚁酸,乙酸,丙酸,甘氨酸,苹果酸,柠檬酸,酒石酸,琥珀酸等有机酸等形成的盐类;公认的与金属离子形成的盐类,包括钠盐,钾盐,钙盐,铵盐;以及氨基乙醇,三乙氨,二环乙氨等形成的胺类盐等没有特别的限制。

[0014] 所述的活性单肽或活性单肽生成的盐类,可与充填剂形成各种形式的制剂:散剂,颗粒剂,片剂,胶囊,水溶液,悬浮液,乳化液,喷剂,或粉剂。

[0015] 所述的制剂,使用时可以采取经口腔和非经口腔的投入方法,非经口腔的投入可以采取皮下和静脉注射,或肛肠投入;注射液的制作可以任意选用生理盐水、葡萄糖、安定剂、防腐剂、悬浮剂或乳化剂。

[0016] 所述的制剂可以添加到各种食品当中,作为抑制血压的保健食品;食品的形态可以是液体的清凉饮料、乳酸饮料、调味品或汤类,也可以是固体的奶酪、火腿或点心。

[0017] 本发明相关的 ACE 抑制剂,使用量没有特别的限制,具体根据高血压的程度,患者的年龄、体重、身体状况和给与的方法等因素,适当地确定。

[0018] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:

[0019] 1、原料来源于食品,无任何毒副作用;原料廉价,具有高安全性、可产业化实施;

[0020] 2、通过动物实验验证,本发明产品用于治疗 and 预防高血压,具有明显的效果。

附图说明

[0021] 图 1 是 Sephadex LH-20 对酶解液的分离相谱图;

[0022] 图 2 是治疗组 and 对照组进行灌肠实验的血压随时间变化曲线。

具体实施方式

[0023] 本发明应用现代分子生物技术对鱼鳞胶原蛋白进行酶解,对具有 ACE 抑制活性较强的部分进行分离纯化,对纯化得到的肽进行氨基酸序列分析,并研究了此肽在生物体内对 ACE 的抑制活性,结果表明此肽有明显的降血压效果。因此,可以将此活性肽及其衍生物或者其盐类作为高血压患者的长期治疗药物,或者作为食品添加剂制成保健食品。

[0024] 本发明通过对鱼鳞胶原蛋白酶解液进一步分离、纯化得到了其氨基酸序列为 Gly-Ala-Asp-Gly-Ser-Val-Gly-Tyr 的活性单肽,高效毛细管电泳鉴定纯度大于 95%,是有效的 ACE 抑制剂。该活性单肽及其盐类可有效治疗和预防高血压。

[0025] 本实施例所述的活性单肽是从可溶性鱼鳞胶原蛋白中分离、纯化得到的。具体步骤如下:

[0026] 1) 脱脂:将新鲜鱼鳞剪碎,加入体积百分比为 20%的正丙醇溶液,浸泡 24h,蒸馏水洗,沥干;

[0027] 2) 去除非胶原蛋白;在脱脂鱼鳞中加入 0.5mol/l 的 NaCl 溶液,浸泡 24h;

[0028] 3) 胶原蛋白的提取:在步骤 2) 处理后的溶液中再加入体积百分比为 1.5%的醋酸

溶液,处理 24h,在 6000r/min 条件下离心处理 10min,弃去沉淀后抽滤。再加入固体 NaCl 于滤液中盐析,静置 24h 抽滤得粗胶原蛋白沉淀,流水透析 24h,冷冻干燥得胶原蛋白;

[0029] 4) 胶原蛋白肽的制备:

[0030] ①胶原蛋白经胃蛋白酶酶解 24h 后,酶解产物经超滤处理,取分子量小于 10000 道尔顿的组分;

[0031] ②采用 Sephadex LH-20 凝胶过滤柱进行分离,流动相为体积百分比 30% 的甲醇溶液,柱温为室温,检测波长为 280nm,按时间收集,每 20 分钟接收一管;

[0032] ③采用高效液相色谱 Hypersil C₁₈ 柱进行进一步分离,流动相 A 液为:0.1% TFA+0% 乙腈的水溶液,用前超声脱气;流动相 B 液为:0.1% TFA+100% 乙腈的水溶液,检测波长 215nm,室温,进样体积 20 μ l,采用梯度洗脱,按时间收集;洗脱梯度:0-60min:A 液 100% -50% 线性降低,B 液 0% -50% 线性升高;60-80min:A 液 0%,B 液 100%。

[0033] ④A 组分具有很好的 ACE 抑制活性,测定此活性肽的分子量为:724.3,其氨基酸序列为 Gly-Ala-Asp-Gly-Ser-Val-Gly-Tyr。

[0034] 实施例 1

[0035] 可溶性鱼鳞胶原蛋白的制备

[0036] 将新鲜鱼鳞剪碎,加入体积百分比 20% 的正丙醇溶液,浸泡 24h,蒸馏水洗,沥干。加入 0.5mol/l 的 NaCl 溶液,浸泡 24h,加入体积百分比 1.5% 的醋酸溶液,处理时间 24h,在 6000r/min 下离心处理 10min,弃去沉淀后抽滤。加固体 NaCl 于滤液中盐析,静置 24h 抽滤得粗胶原蛋白沉淀,流水透析 24h,冷冻干燥得可溶性胶原蛋白。

[0037] 实施例 2

[0038] 可溶性鱼鳞胶原蛋白的酶解

[0039] 将上述制得的可溶性鱼鳞胶原蛋白溶于 0.05mol/L 的磷酸缓冲液中,用 1mol/L 的 HCl 溶液调 pH = 2.0,可溶性鱼鳞胶原蛋白与底物的比,蛋白浓度质量百分比为 2.5%。加入胃蛋白酶,胃蛋白酶与底物的质量比 1 : 50,在温度 37℃ 下酶解 24 小时。所得酶解液加热至 100℃,并保持 10 分钟,使胃蛋白酶失活。之后调节水解液 pH 为中性,离心 (5000×G, 室温) 25 分钟,经超滤膜 (MW 10000) 过滤,透过超滤膜的组分,得到可溶性鱼鳞胶原蛋白的酶解液,酶解液再进行真空冷冻干燥,得到鱼鳞胶原蛋白寡肽,零下 20℃ 保存。

[0040] 实施例 3

[0041] 酶解产物的分离

[0042] 1) 将可溶性鱼鳞胶原蛋白的酶解液 15ml 经 Sephadex Sephadex LH-20 凝胶过滤柱进行凝胶过滤,层析分离,如图 1 所示;用体积百分比 30% 的甲醇溶液洗脱,按管数收集,20 分钟 1 管,收集具有较强 ACE 抑制活性的组分。

[0043] 2) 将上述具有较强 ACE 抑制活性的组分继续在 RP-HPLC 上分离纯化。在 RP-HPLC 上用 Hypersil C₁₈ 柱,流动相 A 液为:0.1% TFA+0% 乙腈的水溶液,用前超声脱气;流动相 B 液为:0.1% TFA+100% 乙腈的水溶液,检测波长 215nm,室温,进样体积 20 μ l,采用梯度洗脱,按时间收集。洗脱梯度:0-60min:A 液 100% -50% 线性降低,B 液 0% -50% 线性升高;60-80min:A 液 0%,B 液 100%。

[0044] A 组分具有显著的 ACE 抑制活性,测定此活性肽的分子量为,724.3,其氨基酸序列为 Gly-Ala-Asp-Gly-Ser-Val-Gly-Tyr。A 组分即为活性单肽。高效毛细管电泳鉴定纯度

大于 95%，该活性单肽的分子量为 724.3。对 ACE 有较强的抑制作用，由氨基酸璇光度不同而定义为 L 型氨基酸和 D 型氨基酸所形成的不同构型的八肽。

[0045] 静脉注射动物实验

[0046] 选择 20 只自发性高血压大白鼠为实验模型，大白鼠饲养一周后，将其分成 2 组，每一组 10 只，每日按大白鼠体重 5-20mg/kg 剂量 Gly-Ala-Asp-Gly-Ser-Val-Gly-Tyr 进行静脉注射，结果表明，1 周后对照组大白鼠的血压持续升高，而治疗组自发性高血压大白鼠的血压明显下降，高血压大白鼠的平均收缩压从 195mmHg 下降到 162mmHg，说明此肽具有明显的降血压效果。

[0047] 灌胃动物实验

[0048] 选择 20 只自发性高血压大白鼠为实验模型，大白鼠饲养一周后，将其分组，每日按大白鼠体重 20-200mg/kg 剂量 Gly-Ala-Asp-Gly-Ser-Val-Gly-Tyr 进行灌胃投入，如图 2 所示，4 周后对照组大白鼠的血压持续升高，而治疗组自发性高血压大白鼠的血压明显下降，高血压大白鼠的平均收缩压从 185mmHg 下降到 160mmHg，说明此肽具有明显的降血压效果。

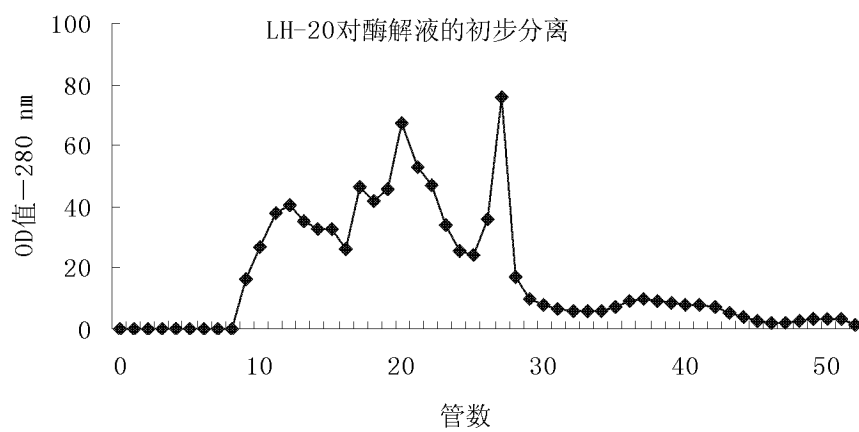


图 1

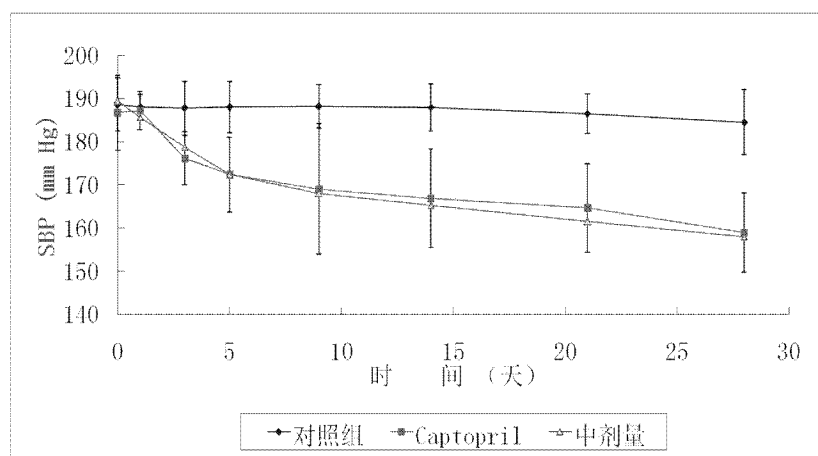


图 2