



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104540516 B

(45)授权公告日 2019.12.06

(21)申请号 201380038465.X

(22)申请日 2013.06.24

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104540516 A

(43)申请公布日 2015.04.22

(30)优先权数据
600847 2012.06.22 NZ

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.01.19

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/NZ2013/000110 2013.06.24

(87)PCT国际申请的公布数据
W02013/191569 EN 2013.12.27

(73)专利权人 曼卡米德有限公司
地址 新西兰马斯特顿

(72)发明人 克润·詹森 辛西娅·孙
尤瑞克·赫布
扎根莫罕·比尔阿肯提

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理
有限责任公司 11204
代理人 王达佐 洪欣

(51)Int.Cl.

A61K 38/17(2006.01)
A61L 15/32(2006.01)
A61L 15/44(2006.01)
A61K 35/644(2015.01)
C07K 14/435(2006.01)
C07K 5/09(2006.01)
C07K 5/11(2006.01)
C07K 5/113(2006.01)
C07K 5/103(2006.01)
C07K 5/068(2006.01)
C07K 5/083(2006.01)
C07K 5/087(2006.01)
C07K 5/117(2006.01)
A61P 29/00(2006.01)

(56)对比文件

Shu-Chen Chu等.cathepsin B and
cystatin C play an inflammatory role in
gouty arthritis of the knee.《clinica
chimica acta》.2010,摘要、第1791页右栏第4
段.

审查员 罗洋

权利要求书2页 说明书25页
序列表69页 附图15页

(54)发明名称

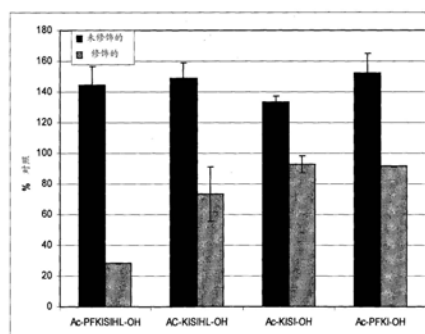
抗炎蛋白和肽以及它们的制备方法和用途

(57)摘要

本公开内容涉及抗炎蛋白/肽、它们的用途、
制备方法以及它们的检测方法。具体地,本发明
涉及来自薄子木属(*Leptospermum*)来源的蜂蜜
和蜂王浆的经甲基乙二醛修饰的蜂王浆主蛋白
及其片段。

PFKISHL (SEQ ID NO: 18)

Ac-PFKISHL-OH (SEQ ID NO: 19)
Ac-KISHL-OH (SEQ ID NO: 20)
Ac-KISI-OH (SEQ ID NO: 21)
Ac-PFKI-OH (SEQ ID NO: 22)



1. 功能片段在制备用于减少细胞组织炎症的药物中的用途;其中所述功能片段具有抗炎活性,且包含SEQ ID NO:1所示的蜂王浆主蛋白1(MRJP1)的C端的最后20个氨基酸的至多20个氨基酸;其中所述功能片段已被分离、富集、合成或重组制备;其中所述功能片段的赖氨酸或精氨酸残基已被甲基乙二醛(MGO)化学修饰;并且其中所述功能片段包含氨基酸序列KISIH(L)(SEQ ID NO:10),或所述功能片段包含肽类似物Ac-PFKISIH(L)-OH(SEQ ID NO:19)。

2. 如权利要求1所述的用途,其中所述药物降低免疫系统细胞的吞噬速率。

3. 如权利要求1所述的用途,其中所述药物抑制免疫系统细胞上的用于吞噬的受体。

4. 如权利要求1所述的用途,其中所述药物减少呼吸爆发和从炎性细胞释放活性氧物质。

5. 如权利要求1所述的用途,其中所述炎症与以下的一项或多项有关:炎性疾病、心血管疾病、神经障碍疾病、肺病、增殖性疾病、感染性疾病或相关综合症、过敏性疾病或免疫疾病。

6. 如权利要求1所述的用途,其中所述炎症与自身免疫性疾病有关。

7. 如权利要求1所述的用途,其中所述炎症与伤口有关。

8. 如权利要求5-7中任一项所述的用途,其中所述炎症与以下的一项或多项有关:类风湿性关节炎、多发性关节炎、阿尔兹海默病、进行性多灶性白质脑病(PML)、多发性硬化症、哮喘、支气管炎、成人呼吸窘迫综合征、韦格纳肉芽肿病、气肿、慢性阻塞性肺病(COPD)、黑色素瘤、生殖器疱疹、爱泼斯坦-巴尔二氏病毒(EBV)感染、脑炎、脉络膜视网膜炎、支气管肺炎、胃肠炎、葡萄膜炎、银屑病和皮炎。

9. 如权利要求5-7中任一项所述的用途,其中所述炎症与EBV相关脑炎和/或巨细胞病毒(CMV)相关的脉络膜视网膜炎有关。

10. 如权利要求7所述的用途,其中所述伤口是以下的一种或多种:糖尿病溃疡、蕁状伤口、刺伤、切伤、咬伤和手术伤口。

11. 包含功能片段的组合物在制备用于治疗患者的类风湿性关节炎的药物中的用途;其中所述功能片段具有抗炎活性,且包含SEQ ID NO:1所示的蜂王浆主蛋白1(MRJP1)的C端的最后20个氨基酸的至多20个氨基酸;其中所述功能片段已被分离、富集、合成或重组制备;并且其中所述功能片段的赖氨酸或精氨酸残基已被甲基乙二醛(MGO)化学修饰;并且其中所述功能片段包含氨基酸序列KISIH(L)(SEQ ID NO:10),或所述功能片段包含肽类似物Ac-PFKISIH(L)-OH(SEQ ID NO:19)。

12. 如权利要求11所述的用途,其中所述药物被制备用于经口给予、局部给予和肠胃外给予中的一种或多种。

13. 如权利要求11所述的用途,其中所述药物被制备用于静脉内给予、玻璃体内给予或肌肉内给予。

14. 分离的功能片段,其中所述功能片段具有抗炎活性,且包含SEQ ID NO:1所示的蜂王浆主蛋白1(MRJP1)的C端的最后20个氨基酸的至多20个氨基酸;其中所述功能片段已被分离、富集、合成或重组制备;其中所述功能片段包含氨基酸序列KISIH(L)(SEQ ID NO:10),或所述功能片段包含肽类似物Ac-PFKISIH(L)-OH(SEQ ID NO:19);并且其中所述功能片段的赖氨酸或精氨酸残基已被甲基乙二醛(MGO)化学修饰。

15.如权利要求14所述的分离的功能片段,其分离自麦卢卡树 (*Leptospermum scoparium*) 来源的麦卢卡蜂蜜。

16.如权利要求14所述的分离的功能片段,其是合成分子或重组分子。

17.抗炎组合物,其包含权利要求14至16中任一项所述的分离的功能片段。

18.伤口敷料,其包含功能片段;其中所述功能片段具有抗炎活性,且包含SEQ ID NO:1所示的蜂王浆主蛋白1 (MRJP1) 的C端的最后20个氨基酸的至多20个氨基酸;其中所述功能片段已被分离、富集、合成或重组制备;其中所述功能片段包含氨基酸序列KISIIHL (SEQ ID NO:10),或所述功能片段包含肽类似物Ac-PFKISIIHL-OH (SEQ ID NO:19);并且其中所述功能片段的赖氨酸或精氨酸残基已被甲基乙二醛 (MGO) 化学修饰。

19.抑制细胞组织中的组织蛋白酶B活性的方法,所述方法在体外实施,其包括使所述细胞组织与功能片段接触的步骤;其中所述功能片段具有抗炎活性,且包含SEQ ID NO:1所示的蜂王浆主蛋白1 (MRJP1) 的C端的最后20个氨基酸的至多20个氨基酸;其中所述功能片段已被分离、富集、合成或重组制备;其中所述功能片段的赖氨酸或精氨酸残基已被甲基乙二醛 (MGO) 化学修饰;并且其中所述功能片段包含氨基酸序列KISIIHL (SEQ ID NO:10),或所述功能片段包含肽类似物Ac-PFKISIIHL-OH (SEQ ID NO:19)。

抗炎蛋白和肽以及它们的制备方法和用途

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于2012年6月22日提交的新西兰临时申请NZ 600847的权益,通过引用将其整体并入本文。

技术领域

[0003] 本公开内容涉及抗炎蛋白和肽,它们的用途,以及它们的检测方法。

[0004] 发明背景

[0005] 由于其多种健康益处,蜂蜜已被世界文明使用了几个世纪。蜂蜜的两种最重要的健康益处是其抗菌性和抗炎性。麦卢卡蜂蜜由从新西兰和南澳洲的原生植物麦卢卡树(*Leptospermum scoparium*)采集花蜜的蜜蜂产生,其已被确定为表现出特别有效的抗菌性和抗炎性的多种蜂蜜。松红梅蜂蜜(Jelly Bush honey)由从澳洲的原生植物澳洲茶(*Leptospermum polygalifolium*)采集花蜜的蜜蜂产生,其已被确定为表现出特别有效的抗菌性和抗炎性的多种蜂蜜。

[0006] 最近,据发现,化学物质甲基乙二醛(MGO,也称为2-氧代丙醛和丙酮醛)是薄子木属(*Leptospermum*)来源的蜂蜜(如麦卢卡蜂蜜和松红梅蜂蜜)的抗菌活性的组要成分。麦卢卡蜂蜜和松红梅蜂蜜样品含有较高浓度的MGO,并且相比含具有较低浓度的MGO的蜂蜜样品具有更高量的抗菌活性。据信,MGO能赋予蜂蜜抗菌性,因为MGO是高化学反应性化合物,并且MGO可容易地与细胞分子反应。MGO与细菌中的细胞分子之间的化学反应破坏细菌的对于其生存力重要的分子。以此方式,MGO作为抗菌剂发挥功能。

[0007] 蜂蜜中存在高水平的MGO是区分麦卢卡蜂蜜及松红梅蜂蜜与其他多种蜂蜜的特征。虽然大多数种类的蜂蜜表现出一些抗菌活性,但是大多数种类的蜂蜜中的抗菌活性主要是由于蜂蜜中存在过氧化氢而导致的。与之不同的是,薄木子属来源的蜂蜜主要是由于蜂蜜中存在MGO而表现出抗菌活性。

[0008] 在2004年,Kohnoe等人在细胞因子水平检查了蜂王浆的抗炎效果或作用。结果显示,蜂王浆具有通过抑制活化的巨噬细胞的促炎性细胞因子(如TNF- α 、IL-6和IL-1)产生而得到的抗炎作用。该研究还显示,来自蜂王浆提取物的活性级份或组分的大小为5kDa至30kDa。因此,大多数蜂蜜由于蜂蜜中存在的蜂王浆蛋白而具有弱抗炎效果。

[0009] 虽然已经阐明了麦卢卡蜂蜜的抗菌活性的多种作用机制,但是麦卢卡蜂蜜作为抗炎剂发挥功能的机制仍然是未知的。由于现有的许多抗炎剂具有许多使用缺陷,需要开发基于蜂蜜的抗炎剂。例如,非甾体抗炎药(NSAID)形式的COX-2抑制剂可增加患者的心脏病和中风风险,并且阿司匹林可增加胃肠出血的风险。此外,据报道,皮质类固醇抑制上皮细胞的生长,并且据报道,NSAID具有细胞毒性,因此这两类抗炎剂都不适合用于伤口护理。与现有药物相比,由蜂蜜衍生的抗炎剂可在一个或多个区域具有更小的毒副作用,并且还可提供与现有抗炎药物不同的可能用途。

[0010] 共同待决申请PCT/NZ/2011/000271中描述了来自麦卢卡蜂蜜的约55kDa至75kDa的经修饰的王浆主蛋白(apalbumin),其产生自麦卢卡蜂蜜中发现的高水平的甲基乙二醛。

本发明人已鉴定,经修饰的王浆主蛋白或蜂王浆主蛋白比未经修饰的王浆主蛋白或蜂王浆主蛋白具有显著更高的抗炎性。

[0011] 发明概述

[0012] 本文描述了王浆主蛋白 (apalbumin, 也被称为蜂王浆主蛋白) 及其功能片段, 其具有经甲基乙二醛 (MGO) 化学修饰的至少一个赖氨酸或精氨酸并且表现出增强的抗炎效果王浆主蛋白。

[0013] 本发明的第一方面提供了减少细胞组织炎症的方法, 其包括使所述细胞组织与蜂王浆主蛋白 (MRJP) 的功能片段接触的步骤; 其中所述功能片段已被分离、富集、合成或重组制备; 其中所述功能片段包含所述蛋白C端最后20个氨基酸中的2-20个氨基酸; 并且其中所述功能片段的赖氨酸残基已被甲基乙二醛 (MGO) 化学修饰。在一个实施方案中, 所述蜂王浆主蛋白 (MRJP) 选自MRJP1 (SEQ ID NO:1)、MRJP2 (SEQ ID NO:2)、MRJP3 (SEQ ID NO:3)、MRJP4 (SEQ ID NO:4)、MRJP5 (SEQ ID NO:5)、MRJP6 (SEQ ID NO:6)、MRJP7 (SEQ ID NO:7)、MRJP8 (SEQ ID NO:8) 和MRJP9 (SEQ ID NO:9)。

[0014] 本发明的另一方面提供了减少细胞组织炎症的方法, 其包括使所述细胞组织与蜂王浆主蛋白 (MRJP) 的功能片段接触的步骤; 其中所述功能片段已被分离、富集、合成或重组制备; 其中所述功能片段包含选自以下的氨基酸序列: LVK (SEQ ID NO:84)、LIR (SEQ ID NO:86)、FDR (SEQ ID NO:127)、HNIR (SEQ ID NO:128)、FTK (SEQ ID NO:130) 和QNGNK (SEQ ID NO:137); 并且其中所述功能片段的赖氨酸或精氨酸残基已被甲基乙二醛 (MGO) 化学修饰。在一个实施方案中, 所述炎症与以下的一项或多项有关: 炎性疾病、心血管疾病、神经障碍疾病、肺病、增殖性疾病、感染性疾病或相关综合症、过敏性疾病、免疫疾病或自身免疫性疾病以及与伤口有关的炎症。

[0015] 在另外的方面, 提供了抑制细胞组织中的组织蛋白酶B活性的方法, 其包括使所述细胞组织与蜂王浆主蛋白 (MRJP) 的功能片段接触的步骤; 其中所述功能片段已被分离、富集、合成或重组制备; 其中所述功能片段包含选自以下的氨基酸序列: LVK (SEQ ID NO:84)、LIR (SEQ ID NO:86)、FDR (SEQ ID NO:127)、HNIR (SEQ ID NO:128)、FTK (SEQ ID NO:130) 和QNGNK (SEQ ID NO:137); 并且其中所述功能片段的赖氨酸或精氨酸残基已经被甲基乙二醛 (MGO) 化学修饰。

[0016] 在另外的方面, 提供了分离的蜂王浆主蛋白 (MRJP) 的功能片段, 其中所述功能片段包含选自以下的氨基酸序列:

[0017] i. KISHL (SEQ ID NO:10);

[0018] ii. KNNQNDN (SEQ ID NO:11);

[0019] iii. KLH (SEQ ID NO:12);

[0020] iv. KSNRHNND (SEQ ID NO:13);

[0021] v. KHNN (SEQ ID NO:14);

[0022] vi. KNQALD (SEQ ID NO:15);

[0023] vii. KNTRCISP (SEQ ID NO:16);

[0024] viii. KTNFFSIFL (SEQ ID NO:17); 并且

[0025] 其中所述功能片段的赖氨酸残基已被甲基乙二醛 (MGO) 化学修饰。

[0026] 本发明的另一个方面提供了分离的蜂王浆主蛋白 (MRJP) 的功能片段; 其中所述功

能片段包含选自以下的氨基酸序列:LVK (SEQ ID NO:84)、LIR (SEQ ID NO:86)、FDR (SEQ ID NO:127)、HNIR (SEQ ID NO:128)、FTK (SEQ ID NO:130) 和QNGNK (SEQ ID NO:137);并且其中所述功能片段的赖氨酸或精氨酸残基已被甲基乙二醛 (MGO) 化学修饰。

[0027] 在另一个方面,提供了通过修饰蜂王浆来制备抗炎分子的方法,所述抗炎分子为王浆主蛋白或其功能片段,所述方法包括将蜂王浆与至少0.1%的MGO在18摄氏度至37摄氏度下反应的步骤。

[0028] 在另一个方面,提供了富集包含薄子木属来源的MGO的蜂蜜中的抗炎分子的方法,其包括将所述蜂王浆主蛋白添加至所述蜂蜜中的步骤。

[0029] 在另外的方面,提供了鉴定蜂蜜样品的 (i) 抗炎能力或 (ii) MGO修饰的蜂王浆主蛋白浓度的方法,其包括以下步骤:分析所述蜂蜜样品的组织蛋白酶B抑制水平。

[0030] 在另一个方面,提供了抑制细胞组织中的组织蛋白酶B活性的方法,其包括使所述细胞组织与蜂王浆主蛋白 (MRJP) 的功能片段接触的步骤;其中所述功能片段已被分离、富集、合成或重组制备;其中所述功能片段包含所述蛋白C端最后20个氨基酸中的2至20个氨基酸;并且其中所述功能片段的赖氨酸残基已被甲基乙二醛 (MGO) 化学修饰。在一个实施方案中,所述蜂王浆主蛋白 (MRJP) 选自MRJP1 (SEQ ID NO:1)、MRJP2 (SEQ ID NO:2)、MRJP3 (SEQ ID NO:3)、MRJP4 (SEQ ID NO:4)、MRJP5 (SEQ ID NO:5)、MRJP6 (SEQ ID NO:6)、MRJP7 (SEQ ID NO:7)、MRJP8 (SEQ ID NO:8) 和MRJP9 (SEQ ID NO:9)。

[0031] 前面的简述概括地描述了本发明的某些实施方案的特征和技术优点。在随后的本发明的详述和实施例中将描述其他的技术优点。当联系任何附图和实例一起考虑时,通过本发明的详述,将能够更好地理解据信为本发明所特有的新的特征。但是,本文提供的附图和实施例仅旨在帮助举例说明本发明或协助对本发明的理解,而无意于限制本发明的范围。

附图说明

[0032] 图1A至1B:MRJP的SDS PAGE分析。图1A: Bolt® 4%至12%Bis-Tris Plus凝胶。泳道1:蛋白标记 (SeeBlue Plus2预染标样)。泳道2:粗制蜂王浆溶解于双蒸水中 (约5mg/mL粗制物的10μl上样量)。泳道3:粗制蜂王浆溶解于双蒸水中 (约2mg/mL粗制物的10μl上样量)。图1B: NuPAGE® Novex® 4%至12%Bis-Tris凝胶。泳道3:粗制蜂王浆溶解于双蒸水中 (可溶级份,pH 4)。泳道4:于不含PMSF的6M尿素中的5mL HiTrap™脱盐柱级份2,pH 4,于室温下48小时。泳道5:于含1mM PMSF的6M尿素中的5mL HiTrap™脱盐柱级份2,pH 4,于室温下48小时。泳道6:于不含PMSF的6M尿素中的5mL HiTrap™脱盐柱级份2,pH 8,于室温下48小时。泳道7:于含1mM PMSF的6M尿素中的5mL HiTrap™脱盐柱级份2,pH 8,于室温下48小时。泳道8:于不含PMSF的6M尿素中的5mL HiTrap™脱盐柱级份2,pH 8,于室温下168小时。泳道9:于含1mM PMSF的6M尿素中的5mL HiTrap™脱盐柱级份2,pH 8,于室温下168小时。泳道10:蛋白标记。

[0033] 图2:第1天和第2天的pH 4.0和7.0的MGO修饰的MRJP的Native PAGE™Novex® 4%至16%Bis-Tri凝胶。泳道1:蛋白标样包含20kDa至12,000kDa蛋白条带。泳道2:24小时后的于pH 7.4的PBS缓冲液中的仅MGO。泳道3:24小时后的于pH 4.0的0.2M乙酸钠缓冲液中

的仅MG0。泳道4:24小时后的于pH 7.4的PBS缓冲液中的MRJP。泳道5:24小时后的于pH 4.0的0.2M乙酸钠缓冲液中的MRJP。泳道6:24小时后的于pH 7.4的PBS缓冲液中的与MG0反应的MRJP。泳道7:24小时后的于pH 4.0的0.2M乙酸钠缓冲液中的与MG0反应的MRJP。泳道8:48小时后的于pH 7.4的PBS缓冲液中的仅MG0。泳道9:48小时后的于pH 4.0的0.2M乙酸钠缓冲液中的仅MG0。泳道10:48小时后的于pH 7.4的PBS缓冲液中的MRJP。泳道11:48小时后的于pH 4.0的0.2M乙酸钠缓冲液中的MRJP。泳道12:48小时后的于pH 7.4的PBS缓冲液中的与MG0反应的MRJP。泳道13:48小时后的于pH 4.0的0.2M乙酸钠缓冲液中的与MG0反应的MRJP。泳道14:BSA对照。泳道15:蛋白标记(与泳道1相同)。

[0034] 图3:第3天和第4天的pH 4.0和7.0的MG0修饰的MRJP的Native PAGE™ Novex® 4%至16%Bis-Tri凝胶。泳道1:蛋白标样包含20kDa至12,000kDa的蛋白条带。泳道2:72小时后的于pH 7.4的PBS缓冲液中的仅MG0。泳道3:72小时后的于pH 4.0的0.2M乙酸钠缓冲液中的仅MG0。泳道4:72小时后的于pH 7.4的PBS缓冲液中的MRJP。泳道5:72小时后的于pH 4.0的0.2M乙酸钠缓冲液中的MRJP。泳道6:72小时后的于pH 7.4的PBS缓冲液中的与MG0反应的MRJP。泳道7:72小时后的于pH 4.0的0.2M乙酸钠缓冲液中的与MG0反应的MRJP。泳道8:96小时后的于pH 7.4的PBS缓冲液中的仅MG0。泳道9:96小时后的于pH 4.0的0.2M乙酸钠缓冲液中的仅MG0。泳道10:96小时后的于pH 7.4的PBS缓冲液中的MRJP。泳道11:96小时后的于pH 4.0的0.2M乙酸钠缓冲液中的MRJP。泳道12:96小时后的于pH 7.4的PBS缓冲液中的与MG0反应的MRJP。泳道13:96小时后的于pH 4.0的0.2M乙酸钠缓冲液中的与MG0反应的MRJP。泳道14:BSA对照。泳道15:蛋白标记(与泳道1相同)。

[0035] 图4:第5天和第6天的pH 4.0和7.0的MG0修饰的MRJP的Native PAGE™ Novex® 4%至16%Bis-Tri凝胶。泳道1:蛋白标样包含20kDa至12,000kDa蛋白条带。泳道2:120小时后的于pH 7.4的PBS缓冲液中的仅MG0。泳道3:120小时后的于pH 4.0的0.2M乙酸钠缓冲液中的仅MG0。泳道4:120小时后的于pH 7.4的PBS缓冲液中的MRJP。泳道5:120小时后的于pH 4.0的0.2M乙酸钠缓冲液中的MRJP。泳道6:120小时后的于pH 7.4的PBS缓冲液中的与MG0反应的MRJP。泳道7:120小时后的于pH 4.0的0.2M乙酸钠缓冲液中的与MG0反应的MRJP。泳道8:144小时后的于pH 7.4的PBS缓冲液中的仅MG0。泳道9:144小时后的于pH 4.0的0.2M乙酸钠缓冲液中的仅MG0。泳道10:144小时后的于pH 7.4的PBS缓冲液中的MRJP。泳道11:144小时后的于pH 4.0的0.2M乙酸钠缓冲液中的MRJP。泳道12:144小时后的于pH 7.4的PBS缓冲液中的与MG0反应的MRJP。泳道13:144小时后的于pH 4.0的0.2M乙酸钠缓冲液中的与MG0反应的MRJP。泳道14:BSA对照。泳道15:麦卢卡蜂蜜(粗制物)。

[0036] 图5:第7天和第9天的pH 4.0和7.0的MG0修饰的MRJP的Native PAGE™ Novex® 4%至16%Bis-Tri凝胶。泳道1:蛋白标样包含20kDa至12,000kDa蛋白条带。泳道2:168小时后的于pH 7.4的PBS缓冲液中的仅MG0。泳道3:168小时后的于pH 4.0的0.2M乙酸钠缓冲液中的仅MG0。泳道4:168小时后的于pH 7.4的PBS缓冲液中的MRJP。泳道5:168小时后的于pH 4.0的0.2M乙酸钠缓冲液中的MRJP。泳道6:168小时后的于pH 7.4的PBS缓冲液中的与MG0反应的MRJP。泳道7:168小时后的于pH 4.0的0.2M乙酸钠缓冲液中的与MG0反应的MRJP。泳道8:216小时后的于pH 7.4的PBS缓冲液中的仅MG0。泳道9:216小时后的于pH 4.0的0.2M乙酸钠缓冲液中的仅MG0。泳道10:216小时后的于pH 7.4的PBS缓冲液中的MRJP。泳道11:

216小时后的于pH 4.0的0.2M乙酸钠缓冲液中的MRJP。泳道12:216小时后的于pH 7.4的PBS缓冲液中的与MG0反应的MRJP。泳道13:216小时后的于pH 4.0的0.2M乙酸钠缓冲液中的与MG0反应的MRJP。泳道14:此处未上样,但是存在从泳道13溢出的样品。泳道15:无样品(空的)。

[0037] 图6A:以pH 3.8的0.5%MG0孵育1天来抑制组织蛋白酶B。图6B:22℃(设置温度)或RT(环境室温)下用0.15%MG0和0.5%MG0修饰的MRJP抑制组织蛋白酶B。

[0038] 图7:乙酸酐(与ε-氨基反应)、N-乙基马来酰亚胺(NEM)(封闭半胱氨酸残基)和MG0(与Arg、Lys和Cys残基反应)修饰的MRJP示意图。

[0039] 图8:以NEM、乙酸酐和MG0处理MRJP后的组织蛋白酶B抑制。

[0040] 图9:MG0修饰的BSA和组织蛋白酶B水解的MG0修饰的MRJP的Native PAGE™ Novex® 4%至16%Bis-Tri凝胶。对pH 4.0或7.0下制备的MG0修饰的MRJP进行组织蛋白酶B水解。泳道1:蛋白标样包含20kDa至12,000kDa蛋白条带。泳道2:pH 7.4、37℃过夜的于PBS中的BSA对照。泳道3:PBS中的MG0修饰的BSA反应,pH 7.4,37℃过夜。泳道4:0.2M乙酸钠缓冲液中的MG0修饰的BSA反应,pH 4.0,37℃过夜。泳道5:PBS中的MG0修饰的BSA反应,pH 7.4,室温过夜。泳道6:0.2M乙酸钠缓冲液中的MG0修饰的BSA反应,pH 4.0,室温过夜。泳道7:未进行组织蛋白酶B消化的当天的pH 4/9的MG0修饰的MRJP的脱盐级份。泳道8:进行组织蛋白酶B消化当天的pH 4/9的MG0修饰的MRJP的脱盐级份。泳道9:未进行组织蛋白酶B消化的当天的pH 7.5/9的MG0修饰的MRJP的脱盐级份。泳道10:进行组织蛋白酶B消化的当天的pH 7.5/9的MG0修饰的MRJP的脱盐级份。泳道11至泳道15:与泳道2至泳道6相同,但是在上样至凝胶之前进行脱盐。

[0041] 图10:MRJP1的氨基酸序列,SEQ ID NO:1。

[0042] 图11A至11C:衍生自MRJP1的C端的肽的抑制活性。图11A:MRJP1的C端序列。MG0修饰的赖氨酸残基通过下划线指示。图11B:针对组织蛋白酶B抑制测试的合成肽。图11C:未修饰的肽和MG0修饰的肽的组织蛋白酶B抑制。

[0043] 图12A至12C:衍生自MRJP2的C端的肽的抑制活性。图12A:MRJP2的C端序列。MG0修饰的赖氨酸残基通过下划线指示。图12B:针对组织蛋白酶B抑制测试的合成肽。图12C:未修饰的肽和MG0修饰的肽的组织蛋白酶B抑制。

[0044] 图13A至13C:衍生自MRJP3的C端的肽的抑制活性。图13A:MRJP3的C端序列。MG0修饰的赖氨酸残基通过下划线指示。图13B:针对组织蛋白酶B抑制测试的合成肽。图13C:未修饰的肽和MG0修饰的肽的组织蛋白酶B抑制。

[0045] 图14A至14C:衍生自MRJP4的C端的肽的抑制活性。图14A:MRJP4的C端序列。MG0修饰的赖氨酸残基通过下划线指示。图14B:针对组织蛋白酶B抑制测试的合成肽。图14C:未修饰的肽和MG0修饰的肽的组织蛋白酶B抑制。

[0046] 图15A至15C:衍生自MRJP5的C端的肽的抑制活性。图15A:MRJP5的C端序列。MG0修饰的赖氨酸残基通过下划线指示。图15B:针对组织蛋白酶B抑制测试的合成肽。图15C:未修饰的肽和MG0修饰的肽的组织蛋白酶B抑制。

[0047] 图16A至16B:针对组织蛋白酶B抑制测试的其他的肽。图16A:合成肽序列。图16B:未修饰的肽和MG0修饰的肽的组织蛋白酶B抑制。

[0048] 发明详述

[0049] 以下描述记载了多个示例性配置、参数等。但是,应认识,这样的描述不意图限制本发明的范围,而是提供为示例性实施方案的描述。

[0050] 定义

[0051] 在本文中的各种情况下,在本发明的描述、实施方案以及实例中,术语“包含 (comprising)”、“包括 (including)”等应进行广泛无限制地解读。因此,除非上下文中明确地另有要求,否则在整个说明书和权利要求书中,词语“包含 (comprise/comprising)”等应解释为包括性意义而非排除性意义,即,意为“包括但不限于”。

[0052] “蜂王浆”是从工蜂下咽部中的腺体分泌的蜂蜜分泌物。除了水之外,蛋白质是蜂王浆的主要成分,并且包含蜂王浆主蛋白。

[0053] “王浆主蛋白 (apalbumin)”是在蜂蜜和蜂王浆中发现的糖蛋白。在蜂蜜中发现的主要王浆主蛋白是王浆主蛋白1 (Apa1),其也被称为蜂王浆主蛋白1 (MRJP1) 或王浆素 (royalactin)。虽然说明书聚焦于在蜂蜜中发现的主要王浆主蛋白,但是应理解,在蜂蜜中发现的其他王浆主蛋白也表现出类似的修饰潜能和类似的抗炎能力,因为它们都是具有高的甘露糖类型的糖基化的糖蛋白,如2000年Kimura等于Biosci.Biotechnol.Biochem.中所报道的。存在约九种蜂王浆主蛋白,并且在序列表中示出了蜂王浆主蛋白1至9的序列。

[0054] 应理解,为简单起见,使用术语“MRJP” (例如MRJP1至9中的任一个)、“肽” (例如衍生自MRJP1至9中任一个的肽) 和“SEQ ID NO:” (例如SEQ ID NO:1至145中任一个),以及其他这样的术语来指代本文所描述的分子,并且不用于提供它们的完全特征。因此,本文中,蛋白或肽可被表征为具有特定的氨基酸序列、特定的2维结构特征,但是应理解,所要求保护的分子具有其他的特征,包括3维结构、某些键周围的移动性以及该分子作为一个整体的其他性质。本公开内容涵盖了所述分子本身,及其作为一个整体的性质。

[0055] 一级氨基酸序列的“修饰”理解为包括“缺失” (即,缺失一个或多个氨基酸残基的多肽)、“插入” (即,相比所指定的多肽具有一个或多个额外的氨基酸残基的多肽)、“替换” (即,由一个或多个氨基酸残基的替换而得到的多肽),以及“片段” (即,与指定多肽的一级序列部分相同的一级氨基酸序列)。

[0056] “经修饰的王浆主蛋白”应理解为包括已通过氨基酸上的甲基乙二醛的化学反应或构成蛋白的氨基侧链上的甲基乙二醛的化学反应而修饰的任何王浆主蛋白或蜂王浆主蛋白或其片段。甲基乙二醛修饰发生于王浆主蛋白中的赖氨酸、精氨酸和/或半胱氨酸部分 (包括末端氨基酸) 的游离氨基上,并且这样的MGO修饰可发生于蛋白中的约1至40个位点上。例如,经修饰的王浆主蛋白1是指在其氨基酸序列上的一个或多个位点进行了修饰以提供MGO修饰的Apa1的Apa1。

[0057] 本文所述的MRJP“片段” (即,来源于一种或多种MRJP的片段) 将理解为包括从任何来源得到的肽,例如,分离的天然存在的肽、重组肽和合成肽。这些片段包括具有天然存在的序列以及经修饰的肽序列的肽。特别受关注的是MRJP的功能片段,即保留了起始蛋白质的一种或多种活性的片段,或其类似物。这样的活性在本文中有详细描述。因此,应理解,“片段”不限于直接从多肽得到的肽,例如通过用肽酶消化初始多肽而得到的肽。

[0058] 本文所用术语蛋白或肽的“类似物”是指包含本文所述的修饰的蛋白或肽,或者这样的肽或其片段,其包含一个或多个替换氨基酸的非氨基酸取代基,同时所述类似物仍然提供肽或肽片段的必要活性和各自的稳定性。本发明的类似物可包括乙酰化的N端 (Ac) 和/

或酰胺化的C端(NH₂),以及C端羟基残基(OH)。还可以是其他类似物,包括稳定组织蛋白酶B抑制所必需的结构域的那些。本发明特别地涵盖功能类似物,即,保留起始序列的一种或多种活性的类似物。应理解,在具体示出肽类似物的情况下(例如,Ac-Xaa-Xaa-Xaa-OH;5),氨基酸序列本身也视为被公开了(例如,Xaa-Xaa-Xaa)。类似的,在具体示出未经修饰的肽的情况下(例如,Xaa-Xaa-Xaa),类似物也视为被公开了(例如,Ac-Xaa-Xaa-Xaa-OH)。

[0059] “C端”或“C端区”应理解是为携带最末尾氨基酸的游离 α 羧基的氨基酸链的邻近末端的氨基酸区域。

[0060] “MG0修饰的赖氨酸”应理解为与MG0共价结合的赖氨酸。“MG0修饰的精氨酸”理解为与MG0共价结合的精氨酸。

[0061] 氨基酸“序列相似性”或“序列同一性”是指两条或更多条多肽在合适位置的氨基酸与氨基酸比较,其中氨基酸是相同的,或具有相似的化学性质和/或物理性质,如电荷或疏水性。通常通过在最高同源性的区域进行序列比对来确定序列相似性和同一性。序列比对算法是本领域公知并广泛使用的。基于序列比较,可确定比较的多肽序列之间的“百分比同一性”。

[0062] “发炎的”组织定义为其中发生了响应组织的损伤或感染的免疫反应,并且其中所述组织具有以下症状的一种或多种:疼痛、肿胀、热、敏感和发红。

[0063] 本文所用的“抗炎能力”定义为临床上减少细胞组织的炎症或发炎症状的能力。可使用PCT/NZ PCT/NZ/2011/000271中描述的吞噬抑制测定(PIA)或也在PCT/NZ/2011/000271中描述的DCFDA测定来确定抗炎能力,或者还可通过下文详细描述的组织蛋白酶B的抑制来确定抗炎能力。

[0064] 序列简述

[0065] SEQ ID NO:1-得自<http://www.uniprot.org/uniprot/018330>的Apa1(也称为蜂王浆主蛋白1)的氨基酸序列。参见图10。

[0066] SEQ ID NO:2-在序列表中示出了得自<http://www.uniprot.org/uniprot/077061>的蜂王浆主蛋白2的氨基酸序列。

[0067] SEQ ID NO:3-在序列表中示出了得自<http://www.uniprot.org/uniprot/Q17060>-1的蜂王浆主蛋白3的氨基酸序列。

[0068] SEQ ID NO:4-在序列表中示出了得自<http://www.uniprot.org/uniprot/Q17060>-1的蜂王浆主蛋白4的氨基酸序列。

[0069] SEQ ID NO:5-在序列表中示出了得自<http://www.uniprot.org/uniprot/097432>的蜂王浆主蛋白5的氨基酸序列。

[0070] SEQ ID NO:6-在序列表中示出了得自<http://www.uniprot.org/uniprot/Q6W3E3>的蜂王浆主蛋白6的氨基酸序列。

[0071] SEQ ID NO:7-在序列表中示出了得自<http://www.uniprot.org/uniprot/Q6IMJ9>的蜂王浆主蛋白7的氨基酸序列。

[0072] SEQ ID NO:8-在序列表中示出了得自<http://www.uniprot.org/uniprot/Q6TGR0>的蜂王浆主蛋白8的氨基酸序列。

[0073] SEQ ID NO:9-在序列表中示出了得自<http://www.uniprot.org/uniprot/Q4ZJX1>的蜂王浆主蛋白9的氨基酸序列。

[0074] 示例性的MRJP片段包括:SEQ ID NO:1的包含-Lys-Ile-Ser-Ile-His-Leu的片段(SEQ ID NO:10)或其类似物;SEQ ID NO:2的包含-Lys-Asn-Asn-Asn-Gln-Asn-Asp-Asn的片段(SEQ ID NO:11)或其类似物;SEQ ID NO:3的包含-Lys-Leu-His的片段(SEQ ID NO:12)或其类似物;SEQ ID NO:4的包含-Lys-Ser-Asn-Asn-Arg-His-Asn-Asn-Asn-Asp的片段(SEQ ID NO:13)或其类似物;SEQ ID NO:5的包含-Lys-His-Asn-Asn的片段(SEQ ID NO:14)或其类似物;SEQ ID NO:6的包含-Lys-Asn-Gln-Ala-His-Leu-Asp的片段(SEQ ID NO:15)或其类似物;SEQ ID NO:8的包含-Lys-Asn-Thr-Arg-Cys-Ile-Ser-Pro的片段(SEQ ID NO:16)或其类似物;SEQ ID NO:9的包含-Lys-Thr-Asn-Phe-Phe-Ser-Ile-Phe-Leu的片段(SEQ ID NO:17)或其类似物。在某些方面,这些片段的赖氨酸残基被MGO修饰。

[0075] 本文详细描述了其他片段,包括如SEQ ID NO:18至145所示的片段。将序列表以及其中包括的所有序列整体并入本文。

[0076] MGO修饰的蜂王浆主蛋白

[0077] 甲基乙二醛或MGO是高化学反应性化合物,其化学式为 $C_3H_4O_2$ 。在活生物体中MGO通过多种代谢通路形成。某些麦卢卡蜂蜜制备物被称为“活性”麦卢卡蜂蜜,其比其他种类的蜂蜜包含高得多的浓度的MGO。已经确定,活性麦卢卡蜂蜜包含高至其他种类的蜂蜜中的MGO浓度的1000倍的MGO浓度(E.Mavric等,2008)。

[0078] MGO可参与活生物体中的多种化学反应,包括晚期糖基化终产物(AGE)的形成过程。MGO可通过与精氨酸、赖氨酸和/或半胱氨酸的游离氨基以及末端氨基反应来修饰蛋白质,并因此可化学修饰包含精氨酸和/或赖氨酸的蛋白质。

[0079] 可通过从活性麦卢卡蜂蜜分离分子来衍生得到MGO修饰的蜂王浆主蛋白(MRJP)及其片段。所述经修饰的蛋白和片段可通过生化技术从蜂蜜分离和/或从蜂蜜富集。这些技术包括但不限于过滤、离心和色谱,如离子交换色谱、亲和色谱、疏水相互作用色谱、尺寸排阻色谱以及反相色谱。MGO修饰的MRJP和片段还可从多种来源纯化或通过将MGO添加至蜂王浆中进行化学合成。在另一种方法中,可将主要的蜂王浆添加至来源于薄子木属的蜂蜜(如麦卢卡蜂蜜和松红梅蜂蜜)中,以实现蜂蜜中的MGO修饰的MRJP和片段的富集。

[0080] MGO修饰的MRJP或其片段还可通过以下方法衍生得到:获得编码SEQ ID NO:1至145的氨基酸序列的序列,将所述编码序列克隆至合适的载体中,用所述载体转化细胞系,使所述多肽或肽表达,纯化所述多肽或肽,将所述多肽或肽与MGO混合以使MGO和所述多肽或肽发生化学反应,并纯化MGO修饰的多肽或肽。

[0081] 表达系统可包含控制序列,例如本领域已知的用于多种宿主的启动子、增强子和终止控制序列(参见例如Sambrook等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第二版,Cold Spring Harbor出版社(1988),通过引用将其整体并入本文)。所述表达系统还可包含有助于所述编码序列表达和/或有助于所述蛋白质折叠的信号肽和制备促进蛋白(prepro-protein)序列。

[0082] 可使用Goodman M.(编)“Synthesis of Peptides and Peptidomimetics”,Methods of organic chemistry(Houben-Weyl)(Workbench Edition,2004;Georg Thieme Verlag,Stuttgart,New York)描述的固相合成方法来进行肽的合成制备。该技术是清除理解的,并且是制备肽的常用方法。还可使用标准溶液肽合成方法来合成肽,其涉及使用形成酰胺键的化学方法或酶促方法来逐步或分块耦合氨基酸或肽片段。这些溶液合成方法是

本领域公知的。参见例如H.D.Jakubke, The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology, Academic出版社, New York, 1987, 第103-165页; J.D.Glass, *ibid.*, 第167-184页; 以及描述酶促肽合成法的EP 0324659 A2。还可使用市售的肽合成仪, 例如Applied Biosystems Model 430A。

[0083] MRJP的MG0修饰的氨基酸变体形式及其片段也可表现出抗炎能力。本领域技术人员将理解, 对SEQ ID NO:1的一级氨基酸序列的小修饰可产生相比SEQ ID NO:1具有基本相当的或增强的抗炎活性的多肽。还可修饰肽以提供与初始肽相比基本相当的或增强的抗炎活性。当修饰包括一个或多个替换时, 优选的替换是具有保守性质的替换, 即, 其中残基被相同的通用类型中的另一个替换。

[0084] 在对蛋白质或肽进行修饰的过程中, 可考虑氨基酸的疏水性指数(参见例如Kyte等, J.Mol.Biol.157, 105-132 (1982), 其通过引用整体并入本文)。本领域已知, 可用具有相似疏水性指数或分数的其他氨基酸来替换某些氨基酸, 并且仍然产生具有相似生物学活性的分子。

[0085] 在具体的方面, MG0修饰的MRJP变体或片段变体表现出与非变体序列至少约75%的序列同一性, 优选至少约80%的同一性, 更优选与任何野生型序列或本文描述的参考序列至少约85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。特别引人关注的是, MG0修饰的MRJP变体或片段变体表现出与非变体分子相比基本相当或增加的抗炎能力的情况。

[0086] 在某些方面, 所述MRJP片段衍生自所述蛋白质的C端序列。所述片段可衍生自所述蛋白质的C端序列的最后20个氨基酸、最后18个氨基酸、最后16个氨基酸、最后14个氨基酸、最后12个氨基酸、最后10个氨基酸、最后8个氨基酸、最后6个氨基酸、最后4个氨基酸或最后2个氨基酸。所述功能片段可包含该C端区域的2-20个氨基酸、2-18个氨基酸、2-16个氨基酸、2-14个氨基酸、2-12个氨基酸、2-10个氨基酸、2-8个氨基酸、2-6个氨基酸、2-4个氨基酸或2个氨基酸。因此, 所述MRJP片段可为20个氨基酸、18个氨基酸、16个氨基酸、14个氨基酸、12个氨基酸、10个氨基酸、8个氨基酸、6个氨基酸、4个氨基酸或2个氨基酸长。还可使用更长的片段。在具体的方面, MG0修饰的赖氨酸与C端相距至少三个残基, 或与所述蛋白质的C端相距不多于6个残基。

[0087] 特别引人关注的是本文中详细描述MRJP的C端功能片段。但是, 还可得到其他的MRJP片段, 例如, 与所述蛋白质的内部氨基酸序列对应的片段。在一些方面中, 片段可包含与一个或多个异源氨基酸序列融合(即, 相邻)的MRJP衍生的氨基酸序列。因此, MRJP片段可提供为作为较大的肽或多肽的一部分而被包含的蜂王浆主蛋白的一部分。这可提供更好的稳定性和/或表达能力, 或提供切割选择或标签选择。在某些方面, 所述MRJP片段可化学连接至其他分子, 例如一个或多个化学部分。虽然具体包括MG0修饰的片段, 但是其他化学修饰也是可能的。所述MRJP片段还可连接至基质, 例如珠子、导管、针、缝线、支架、可植入医疗装置、接触镜、根管填料、伤口敷料、烧伤敷料、组织培养板、纤维和纸。可根据已知方法将所述片段制备为肽缀合物。

[0088] 可通过(i) 延长在周围温度下的储存, 或(ii) 在升高的温度(30至40°C)下孵育, 来刺激蜂蜜中形成的MG0修饰的MRJP或其片段, 从而提高蜂蜜样品的抗炎能力。添加MG0或MG0前体(例如二羟基丙酮(DHA))至蜂蜜样品中, 连同足够的时间和/或加热转化MG0前体为

MGO,也可刺激该蜂蜜样品中形成MGO修饰的MRJP或其片段,并且也可通过在所述蜂蜜样品中生成MGO修饰的MRJP来提高所述蜂蜜样品的抗炎能力。

[0089] 还可在蜂蜜外面形成具有增强的抗炎性的MRJP1和MRJP3。已发现可用MGO处理经完全或部分纯化的MRJP从而得到MGO修饰的MRJP。与未经修饰的MRJP1和MRJP3相比,所述MGO修饰的MRJP1和MRJP3表现出增强的抗炎性。

[0090] 可在药物组合物中包含治疗有效量的MGO修饰的MRJP、其片段以及其变体。还应理解,可合成制备具有MGO修饰的赖氨酸和/或精氨酸的肽,以用于所述组合物。

[0091] 可将本公开内容的药物组合物特别配制用于以固体或液体形式给药,包括适于以下应用的那些:经口给药,例如灌服剂(drenches)(水性或非水性的溶液剂或混悬剂)、片剂(例如针对口腔、舌下和系统吸收的片剂)、大丸剂、粉剂、颗粒剂、用于施用至舌头的糊剂;肠胃外给药,例如作为无菌溶液剂或混悬剂或缓释制剂通过皮下、玻璃体内、肌肉内、静脉内或硬膜外注射。

[0092] 还可涵盖局部给药,例如,作为滴眼剂,或作为霜剂、软膏剂,或施用至皮肤的控释贴剂或喷雾剂;以及经阴道内或经直肠内给药,例如作为阴道栓剂、霜剂或泡沫剂;舌下给药;经眼给药;经皮给药;经肺给药或经鼻给药。

[0093] 当将本发明的化合物作为药物给予至人和动物时,可给予药物本身或将其作为药物组合物给药,所述药物组合物包含与药学上可接受的载剂或赋形剂组合的例如约0.1%至99%,或约1%至50%,或约10%至40%,或约10%至30%,或约10%至20%,或约10%至15%的活性成分。

[0094] 本文描述的药物组合物中还可存在湿润剂、乳化剂和润滑剂如十二烷基硫酸钠和硬脂酸镁,以及着色剂、脱模剂、涂层剂、甜味剂、风味剂和芳香剂、防腐剂和抗氧化剂。这些组合物还可包含佐剂,例如防腐剂、湿润剂、乳化剂和分散剂。

[0095] 可通过包含多种抗菌剂和抗真菌剂(例如,尼泊金、氯代丁醇、酚山梨酸等)来确保防止微生物作用于本发明的化合物。可取的还有,将等渗剂(例如糖、氯化钠等)添加至所述组合物中。此外,可通过包含延迟吸收的试剂如单硬脂酸铝和明胶来产生延长吸收的可注射药物形式。

[0096] MGO修饰的MRJP或其片段的使用方法

[0097] 在蛋白质的正常溶酶体降解和加工过程中涉及到半胱氨酸蛋白酶如组织蛋白酶B。半胱氨酸蛋白酶的增加的表达或增强的活化与一些医疗状态有关。因此,MGO修饰的MRJP或片段或包含MGO修饰的MRJP或片段的组合物可用于预防、延迟、延缓或治疗以下疾病。

[0098] 包括炎性疾病,例如类风湿性关节炎、多发性关节炎和其他炎性关节病(arthritidies)、炎性肠病以及炎性肠综合征、炎性腹膜炎、葡萄膜炎、败血症、全身炎症反应综合征、多发性器官衰竭;心血管疾病,如由移植和/或血管手术导致的缺血再灌注损伤、血管生成、新血管形成、急性心脏异体移植机能障碍、缺血性心脏损害、化疗诱导的心肌抑制;肌肉骨骼疾病,如骨关节炎、骨质疏松、肌营养不良、肌炎;神经性疾病,如多发性硬化症、中风、阿尔茨海默病、进行性多灶性白质脑病(PML)、朊粒相关疾病、共济失调毛细血管扩张、中枢神经系统损伤;肺病,如哮喘、支气管炎、慢性阻塞性肺病(COPD)、成人呼吸窘迫综合征、韦格纳肉芽肿和气肿。

[0099] 还包括增殖性疾病,包括涉及实体瘤、淋巴瘤、白血病和其他恶性肿瘤的那些,例

如,急性和慢性骨髓性白血病、神经元癌症、癌侵入和转移、肿瘤血管发生、B和T细胞淋巴瘤、急性和慢性淋巴细胞性白血病、化疗抵抗、癌症相关的凝血病(包括深静脉血栓形成、冠状动脉疾病、肺栓塞、弥散性血管内凝血)、霍奇金病、结肠癌、肝癌、肺癌、乳腺癌、肾癌、胃癌、胰腺癌、食管癌、口咽癌、肠癌、甲状腺癌、前列腺癌、膀胱癌、脑癌;骨肉瘤、软骨肉瘤和脂肪瘤;神经母细胞瘤;黑色素瘤;以及源自羊膜或绒毛膜的癌症)。

[0100] 此外,还包括感染性疾病及相关综合征,如败血性休克(包含革兰氏阴性败血症)、HIV感染和AIDS、生殖器疱疹、带状疱疹、水痘、传染性软疣、EBV感染、包括EBV相关脑炎在内的脑炎、脉络膜视网膜炎、巨细胞病毒(CMV)相关的脉络膜视网膜炎或脑炎、新生儿巨细胞病毒感染(包括相关的肺炎)、免疫功能受损个体(包括AIDS和移植患者)的机会性感染、痢疾、丙肝、甲肝、角膜结膜炎、支气管肺炎(包括免疫功能受损个体的肺炎)、胃肠炎、疟疾、鼻病毒、小儿麻痹症、肠病毒感染、普通感冒、无菌性脑膜炎、口蹄疫、克雷伯肺炎菌感染、大肠杆菌或表皮葡萄球菌、麻风菌血症、中耳炎、贾第虫病、非异位性鼻窦炎和爆发性肝炎。

[0101] 此外还包括过敏性疾病、免疫疾病和自身免疫性疾病,如屋尘螨过敏、移植排斥、移植物抗宿主病、1型糖尿病、自身免疫性甲状腺炎、银屑病、皮炎(例如接触性皮炎)、抗体介导的自身免疫性疾病、红斑狼疮、干燥综合征、自身免疫性脑脊髓炎;肾病,如多囊肾疾病、肾小球性肾炎;以及其他疾病,如牙周病、酒精性肝炎、前列腺肥大、伤口、皮肤肥大细胞增多症、辐射和HIV诱导的腹泻、恶病质(包括并发癌症和营养不良),以及伤口相关的炎症,例如刺伤、糖尿病性溃疡、蕁状伤口、切伤、咬伤和手术伤口。

[0102] 主要的适应症包括:类风湿性关节炎、多发性关节炎、阿尔兹海默病、多发性硬化症,尤其是复发-缓解型多发性硬化症、进行性多灶性白质脑病(PML)、哮喘、支气管炎、成人呼吸窘迫综合征、韦格纳肉芽肿病、气肿,以及COPD、黑色素瘤、生殖器疱疹、EBV感染、脑炎(包括EBV相关脑炎)、脉络膜视网膜炎(包括CMV脉络膜视网膜炎)、支气管肺炎、胃肠炎、葡萄膜炎、银屑病、皮炎和多种伤口。

[0103] 在具体的方面,MGO修饰的MRJP或其片段可被配制为伤口敷料。这包括可施用至病灶处的任何覆盖物。其涵盖感染性和非感染性的擦伤、切伤、咬伤、烧伤、伤口、溃疡、脓肿、手术伤口、蕁状肿瘤和压疮。病灶优选是外部的,例如皮肤破损或受伤所引起的。

[0104] MGO修饰的MRJP或片段,或者包含MGO修饰的MRJP或片段的组合物可位于基质如伤口敷料基质表面上。所述组合物可包含水以及任选地另外的溶剂。对于这样的组合物,可使水以及任选的溶剂蒸发。MGO修饰的MRJP或片段,或者包含MGO修饰的MRJP或片段的组合物可容纳于天然纤维或合成纤维中。例如,所述多肽或肽可容纳于用于布、合成敷料或纸质敷料的纤维上或容纳于其中。可使用纸作为临时伤口辅料的一部分。

[0105] 经处理的基质可包含天然材料或合成材料,以及可植入装置。可通过本领域已知的任何合适方法来评价所述基质的生物相容性,包括本领域技术人员已知的一种或多种生存力/细胞毒性测定。所述经处理的基质可与水性环境(例如水或患者内部)接触。可选地,所述经处理的基质可与空气接触,或者与外部环境或封闭的身体器官(例如肺)中的空气和/或空气传播的细菌接触。

[0106] 因此,可通过将一种或多种纯化的MGO修饰的MRJP或片段或者包含MGO修饰的MRJP或片段的组合物给予至发炎的组织来减少组织炎症。可治疗多种损伤、感染和医疗疾病造成的炎症。包括上文所述的急性和慢性炎性疾病。

[0107] 对于类风湿性关节炎,注意到,氨基酸序列Phe-Ala保持恒定但具有可变N端基团的肽基氟甲基酮类对体外抑制组织蛋白酶B活性有效,并且还抑制炎症的严重程度以及佐剂诱导的关节炎中的软骨和骨损伤的程度有效。参见Ahmed等,1992。本发明的MGO修饰的MRJP肽或片段或者包含MGO修饰的MRJP的组合物被认为可用于针对类风湿性关节炎的类似治疗中。

[0108] MGO修饰的MRJP或片段或者包含MGO修饰的MRJP或片段的组合物可通过降低免疫细胞的吞噬速率以及通过阻断免疫细胞上触发吞噬作用的甘露糖受体或其他受体来减少组织中的炎症。免疫细胞包括巨噬细胞、单核细胞、树突状细胞和粒细胞。

[0109] 吞噬作用是将免疫系统中的固体颗粒和细胞摄取物吞食的细胞应答或过程。这是用于去除病原体和细胞碎屑的主要机制。细菌、死组织细胞和小矿物颗粒都是可被细胞吞噬或吞食的目标的实例。在白细胞的炎性应答开始时发生吞噬作用从而引发炎症。细胞在吞噬后产生活性氧物质和细胞因子以招募和活化更多吞噬细胞,作为以吞噬作用起始的细胞级联事件的一部分。因此,抑制吞噬作用能够在开始级联时停止炎性应答。

[0110] 可将MGO修饰的MRJP或片段或包含MGO修饰的MRJP或片段的组合物给予至多种不同形式的发炎组织。可从其他组分中纯化MGO修饰的分子。为了给药,可取的是包含一种或多种其他类型的化合物,例如药学上可接受的载剂、佐剂或其他治疗分子。可使用其他抗炎剂与所述MGO修饰的MRJP或片段或者包含MGO修饰的MRJP或片段的组合物共给药。

[0111] 可从向其中添加了MGO或MGO前体以修饰王浆主蛋白的活性麦卢卡蜂蜜或麦卢卡蜂蜜或任何其他类型的蜂蜜中分离MGO修饰的MRJP或其功能片段,或者可从蜂王浆或其中王浆主蛋白得到重组表达王浆主蛋白并于随后以MGO处理的系统中将其纯化。

[0112] MGO修饰的MRJP或片段可容纳于包含一种或多种其他类型的化合物的组合物中。其包括容纳于蜂蜜或已针对MGO修饰的成分富集了的蜂蜜提取物中的MGO修饰的MRJP或片段,以及来自重组制备的王浆主蛋白或其肽和以MGO修饰的王浆主蛋白或其肽的提取物中的MGO修饰的MRJP或片段王浆主蛋白。

[0113] 可将MGO修饰的MRJP或片段或者包含MGO修饰的MRJP或片段的组合物以多种不同的形式给予至发炎组织,包括但不限于:霜剂、洗剂、液体溶液剂或泥敷剂。还可通过将MGO修饰的MRJP肽或片段容纳于可食用制品中来将MGO修饰的MRJP或片段给予至发炎组织。这样的制品包括但不限于饮料、糖果、糖浆剂、锭剂、丸剂和食物。

[0114] 检测MGO修饰的MRJP或MRJP片段以及定征蜂蜜的性质的方法

[0115] 可通过检测MGO修饰的MRJP或其片段来确定蜂蜜样品的抗炎能力。通过MGO化学修饰MRJP产生表现出组织蛋白酶B抑制活性的分子。因为蜂蜜中存在MRJP,所以可通过测量蜂蜜样品的组织蛋白酶B抑制活性来得到蜂蜜样品中的MGO修饰的MRJP或片段的相对浓度的测量值。蜂蜜样品中MGO修饰的MRJP或片段的浓度测量值直接与蜂蜜样品的抗炎能力相关。

[0116] 因为高MGO浓度是麦卢卡蜂蜜在所有蜂蜜种类中的独特特征,所以蜂蜜生产者可尝试通过将MGO添加至天然下不包含期望浓度MGO的蜂蜜样品中来刺激活性麦卢卡蜂蜜。相对于经处理的蜂蜜,客户偏爱天然存在的蜂蜜。可容易地从化学生产商(例如Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 出售~40%的甲基乙二醛水溶液)得到经纯化的活性MGO,并且蜂蜜生产者可将MGO添加至天然下不包含期望浓度的MGO的蜂蜜样品中,从而将蜂蜜样品中的MGO浓度提高至期望水平。

[0117] 在具体的方面,可通过一种或多种独立于天然蜂蜜形成的方法来得到所述MGO修饰的MRJP或其功能片段。独立于天然蜂蜜形成的方法包括不由蜜蜂进行的任何行为,并且因此,其包括例如将纯化的MGO添加至蜂蜜样品的行为。独立于天然蜂蜜形成的方法不包括例如蜜蜂采集花蜜、花粉或其他包含高水平MGO或MGO前体分子的植物制品的行为。

[0118] 蜂蜜的组织蛋白酶B抑制活性还可用于确定从蜂房采收蜂蜜或储存采收的蜂蜜以得到具有期望抗炎性的蜂蜜的合适时间。因为蜂蜜中MGO对MRJP的修饰可发生于一段时间内,所以蜂蜜生产者可选择将蜂蜜保持在蜂房中直至其包含期望的抗炎能力以及期望浓度的MGO修饰的MRJP。通过在不同的时间间隔测量来自蜂房的蜂蜜样品的组织蛋白酶B抑制活性,蜂蜜生产者可使用测量蜂蜜的组织蛋白酶B抑制活性作为确定从蜂房采收蜂蜜的最优时间,以得到在蜂蜜中具有期望的抗炎性的蜂蜜。

[0119] 类似地,蜂蜜生产者还可测量储存在蜂房外的蜂蜜的组织蛋白酶B抑制活性,以确定蜂蜜样品是否具有期望水平的抗炎性。通过测量蜂蜜样品的组织蛋白酶B抑制活性,寻求得到具有期望抗炎能力的蜂蜜样品的蜂蜜生产者可将蜂蜜储存至其通过形成MGO修饰的MRJP产生出期望水平的抗炎能力。

实施例

[0120] 提供本文描述的实施例是为了举例说明本发明的具体实施方案,而无意于以任何方式限制本发明。本领域技术人员可利用本文的公开内容和教导来产生其他实施方案和变型而无须进行过多的实验。所有这些实施方案和变型都被视为本发明的一部分。

[0121] 实施例1:MGO修饰的MRJP蛋白1和3的制备和分析

[0122] 将得自Watson&Son/ManukaMed的蜂王浆以50mg/mL溶解于pH 7.4的磷酸盐缓冲盐水中,或溶解于100mM pH 9.4的磷酸氢二钠中。当使用PBS时最终溶液的pH值是3.5至4.0,当使用pH 9.4的100mM磷酸氢二钠时,最终溶液的pH是7.4。

[0123] 将蛋白质溶液混合10分钟,然后于4℃下在SS34转子中以10,000rpm离心所述溶液。使上清通过0.45微米的过滤器,然后使用离子交换色谱和肝素Sephacrose™进一步分级分离以纯化MRJP。可选地,使用5mLHiTrap™脱盐柱(GE)对粗制混合物进行分级分离,或在Sephadex™ G75柱(GE)上使用尺寸排除色谱进行分离。

[0124] 还将所述粗制混合物与终浓度为0.05%、0.1%、0.15%、0.5%和1%的MGO在pH 7.4和3.5至4.0下以及pH 6.9和pH 5.0下反应。在室温、22℃、37℃、40℃和60℃下进行反应。关于MGO耦合的反应进行以下时间段:1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天和14天。

[0125] 使用以下分析进行MGO修饰蛋白质的分析:非变性(native)PAGE分析、SDS PAGE分析、280nm处的吸光度(蛋白质浓度)、330nm处的吸光度(Arg-MGO加合物形成)、Sephadex™ G75上的尺寸排除色谱(SEC)、HiTrap™脱盐柱以及和三硝基苯磺酸(TNBS)的反应、与赖氨酸残基的反应、由于精氨嘧啶(argpyrimidine)形成导致的330nm处的激发和410nm处(Arg-MGO加合物形成)的发射的荧光分析(Kim等,2010)。

[0126] 在Bolt® 4%至12%Bis-Tris Plus凝胶上进行SDS PAGE分析。按照制造商的方案使用10孔系统(BG04412BOX,Life technologies,NZ)对样品进行凝胶电泳分析。使用2-巯基乙醇(M3148,Sigma,NZ)替代DTT作为还原剂。蛋白标记是SeeBlue Plus2预染标准

(LC5925,Life,NZ)。此外,使用NuPAGE® Novex® 4%至12%Bis-Tris凝胶剂,1.0mm,10孔(NP0321BOX,Life technologies,NZ)进行SDS PAGE分析。按照制造商的方案对溶解于6M尿素中的样品进行凝胶电泳分析。如之前一样,用2-巯基乙醇(M3148,Sigma Aldrich,NZ)替代DTT用作还原剂,并且蛋白标记是SeeBlue Plus2预染标准(LC5925,Life,NZ)。本分析揭示了两种蜂王浆主蛋白MRJP1和MRJP3的存在(图1A和1B)。

[0127] 如上文详述,在不同pH条件下进行共9天的MG0修饰反应。每24小时收集样品,并按照手册中提供的指导在1.0mm的15孔4%至16%的Native PAGE™ Novex® Bis-Tris凝胶(BN1004BOX,Life Technologies,NZ)上进行分析。一般而言,将4μL NuPAGE™ LDS样品缓冲液(4X)(Invitrogen,Carlsbad USA Cat.No.NP0007)与11μL蛋白样品+1μL Native PAGE™ 5%G-250样品添加剂混合。然后,将12μL该样品混合物上样至非变性PAGE凝胶中。按照制造商的方案,将凝胶在150V下跑电泳120分钟。按照制造商的指导脱色2至4小时后可视化蛋白质带。使用UVITEC Cambridge,UK Gel-doc系统扫描凝胶。

[0128] 图2至5中示出了非变性PAGE结果。在pH 4.0下,MG0处理24小时后见到形成MRJP高分子量加合物(图2,泳道7),但在pH 7.0下未见到该现象。第9天,大多数300kDa六聚体明显是较高分子量加合物的可能来源(图5,泳道13)。

[0129] 较低分子量物质的变化不那么明显,但是可预期,在MRJP1的王浆素单体形式上也已发生了MG0修饰。由于从凝胶排除了较高分子量的加合物,这可能不容易变得明显。离心后在微量离心管的底部上观察到可见的沉淀。

[0130] 实施例2:在MG0存在下孵育蜂王浆主蛋白并产生抑制活性

[0131] 在部分融化后,将MRJP混合物以50mg/ml浓度溶解于PBS(pH 7.4)中。搅拌该混合物30分钟至60分钟。通过离心(10,000rpm,10分钟)使所得的浑浊溶液澄清。蛋白含量确定为 5.0 ± 0.5 mg/ml。溶液的pH为3.8。

[0132] 对于使用MG0的修饰,将900μL蛋白质溶液与100μL MG0水溶液(5%)混合。通过将125μL 40%的MG0添加至875μL水中来产生5%MG0储备溶液。为了得到0.15%反应物的最终MG0浓度,将30μL 5%的MG0添加至970μL蛋白溶液中,并在22℃(设置温度)下孵育,或在环境温度(RT)下静置1天至10天。使用水浴来维持22℃的设置温度。

[0133] 在每个孵育间隔后,在HiTrap™脱盐柱(5ml,GE healthcare)上去除未反应的MG0。用PBS缓冲液(25mM,pH 7.4)以2ml/分钟的流量洗脱蛋白质。通过214nm、280nm和330nm处的UV吸光度来检测洗脱化合物。可选地,在乙酸钠缓冲液(10mM,pH 4.0)中进行洗脱。在Äkta-900™系统(GE-healthcare)上,在UNICORN软件的控制下进行色谱分离。

[0134] 为了测试活性,通过使500μL反应混合物(MRJP+MG0)通过5mlHiTrap™脱盐柱来去除MG0。收集1ml级份,并在DCFDA氧化测定(参见Carter WO,Narayanan PK,Robinson JP.Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells.J Leukoc Biol.1994Feb;55(2):253-8)和组织蛋白酶B测定(参见下文)中进行测试以确定活性物质以及组织蛋白酶B抑制剂的存在。

[0135] 还使用TNBS和在280nm和330nm处测定的吸光度以及荧光特性分析了包含高分子量蛋白的脱盐级份1至3中游离胺的存在。将数值标准化为蛋白浓度,并确定了起始MRJP与MG0修饰的MRJP之间的差值,以鉴定组织蛋白酶B抑制相关活性所涉及的氨基酸。

[0136] 在以下条件下处理过夜后观察活性:0.5%MG0,在pH 3.8下用5mg/ml MRJP进行室温孵育(图6A)。这样的处理导致最快产生组织蛋白酶B抑制活性。使用0.15%MG0和0.5%MG0于室温下修饰,也发现了组织蛋白酶B的抑制。参见图6B。当使用0.15%的较低MG0浓度来进行MRJP修饰时,仅在更长的孵育时间后活性才明显。使用GE Healthcare脱盐柱来分离反应产物,并测试无MG0的高MW级份的组织蛋白酶B活性。在pH 7.5的PBS中或在pH 4.5的100mM乙酸钠缓冲液中进行凝胶过滤。在与用于在pH 7.5或pH 3.5下进行MG0修饰的条件所对应的条件下进行分级分离。这与较高MG0浓度相反。观察到pH的相似的趋势,借此,酸性pH相比pH 7.4以更快的速率产生抑制活性。参见图6B。

[0137] 实施例3:组织蛋白酶B活性的测定

[0138] 组织蛋白酶B得自Sigma(来自牛脾的C6286-25UN组织蛋白酶B)。通过将1mL pH 4.5的包含2mM EDTA和2mM 2-巯基乙醇的100mM乙酸钠添加至酶瓶中来制备所述酶。这激活了组织蛋白酶B。为了进行测定,用5mL测定缓冲液(pH 4.5的包含2mM EDTA和2mM 2-巯基乙醇的100mM乙酸钠)稀释50 μ l活化的组织蛋白酶B。于96孔板中每个孔使用50 μ l。

[0139] 以一式两份进行测定,并且对于活性物质以四个重复来进行重复。向96孔板的每个孔中添加100 μ l测定缓冲液,然后添加50 μ l样品和以1:100稀释至52.5 μ g/mL以用于测定的50 μ l组织蛋白酶B(具有12.5U/mg的5.25mg/mL的储备液)。测定中组织蛋白酶B的总量为2.625 μ g。将板于37 $^{\circ}$ C下孵育达10分钟。但是,常规分析进行2分钟至5分钟的孵育。

[0140] 添加基质用于起始反应,Na-CBZ-L-赖氨酸对硝基苯基酯(CLN)(Sigma C 3637)(Z-Lys-pNP)。进行与O'Neil等,1996所描述的相似的方案。将27mg基质溶解于1mL DMSO中,然后将50 μ l储备基质溶液与5mL测定缓冲液(pH 4.5的包含2mM EDTA和2mM 2-巯基乙醇的100mM乙酸钠)混合。将50 μ l基质添加至96孔板的每个孔中。在每次运行期间测定96孔板的一排八个孔。

[0141] 在于37 $^{\circ}$ C孵育的SpectraMax[®] M4板读取器中读取板。摇晃板10秒,并且在每次读取期间摇晃3秒。在2分钟期间(读取之间的间隔为10秒)读取330nm处吸光度的Vmax速率变化。使用30秒延迟来进行分析。使用曲线的线性部分来计算Vmax(毫单位/分钟)。进行两个重复读数的平均。再次测试活性级份来确认活性。

[0142] 实施例4:鉴定组织蛋白酶B抑制所涉及的氨基酸残基

[0143] 采用以下方法来证实哪些氨基酸残基对组织蛋白酶B抑制具有重要性。用MG0(产物77)、乙酸酐(封闭赖氨酸残基)(产物83)或N-乙基马来酰亚胺(NEM)(产物81)处理MRJP。然后用MG0进一步处理这最后两个样品(分别得到产物89和82)。采取乙酰化的MRJP样品(产物83),并进一步与NEM反应(得到产物84)。然后进一步用MG0处理该样品(得到产物85)。参见图7中的反应示意图。

[0144] 用MG0修饰MRJP混合物得到产物77

[0145] 在部分融化后,通过搅拌30分钟至60分钟将MRJP混合物以50mg/ml的浓度溶解于PBS(pH 7.4)中。通过离心(10,000rpm,10分钟)将所得的浑浊溶液澄清。蛋白含量确定为 5.0 ± 0.5 mg/ml。溶液的pH为3.8。

[0146] 对于使用MG0的修饰,将900 μ l蛋白溶液与100 μ l MG0水溶液(5%)混合,并在22 $^{\circ}$ C下孵育1天至10天。通过在水浴中孵育来维持温度。

[0147] 在每个孵育间隔后,在HiTrap[™]脱盐柱(5ml,GE healthcare)上去除未反应的MG0。

用PBS缓冲液(25mM, pH 7.4)以2ml/分钟的流量洗脱蛋白质。通过214nm、280nm和330nm处的UV吸光度检测洗脱化合物。可选地,在乙酸钠缓冲液(10mM, pH 4.0)中进行洗脱。在Äkta-900™系统(GE-healthcare)上,在UNICORN软件的控制下进行色谱。

[0148] 用NEM修饰MRJP混合物以得到产物81

[0149] 通过搅拌30分钟至60分钟将MRJP混合物以50mg/ml浓度溶解于磷酸钠缓冲液(pH 9.6)中。通过离心(10,000rpm, 10分钟)使所得的轻微浑浊的溶液澄清。蛋白含量确定为 5.0 ± 0.5 mg/ml。溶液的pH为7.5。

[0150] 向1ml蛋白质溶液中添加53μl NEM溶液(在PBS中, 200mM),并在室温下搅拌该混合物1小时。在HiTrap™脱盐柱(5ml, GE healthcare)上去除未反应的NEM。用乙酸钠缓冲液(10mM, pH 4.0)以2ml/分钟的流量洗脱蛋白质。通过214nm、280nm和330nm处的UV吸光度检测洗脱化合物。

[0151] 用MGO修饰经NEM处理的MRJP以得到产物82

[0152] 按上文所述,用MGO修饰来自脱盐柱的包含蛋白质的级份(级份2)。简言之,将900μl级份2与100μl MGO(5%)于22℃下反应过夜。在HiTrap™脱盐柱(5ml, GE healthcare)上去除未反应的MGO。用PBS缓冲液(25mM, pH 7.4)以2ml/分钟的流量洗脱蛋白质。通过214nm、280nm和330nm处的UV吸光度来检测洗脱化合物。可选地,在乙酸钠缓冲液((10mM, pH 4.0)中进行洗脱。

[0153] 乙酰化MRJP混合物以得到产物83

[0154] 将1.2814g解冻的RJP混合物溶解于50mL包含6M尿素的Tris/HCl(0.1M, pH 8.5)中。在冰水浴上冷却该溶液。每20分钟添加0.5ml份的乙酸酐,持续2小时时间。在每次添加之前测定溶液的pH,并使用Tris/HCl缓冲液(1M, pH 8.5)将pH调节至7.5以上。

[0155] 将样品转移至透析管(分子量阈值10kDa),并对1.6升水透析过夜,期间更换3次透析液。冷冻透析管的内容物,并冻干。回收239.9mg白色微粘物质。

[0156] 用NEM修饰乙酰化的MRJP以得到产物84

[0157] 用500μl PBS(25mM, pH 7.4)稀释浓缩的蛋白溶液(500μl),添加53μl NEM溶液(在PBS中, 200mM),并在室温下搅拌该混合物1小时。在HiTrap™脱盐柱(5ml, GE healthcare)上去除未反应的NEM。用乙酸钠缓冲液(10mM, pH 4.0)以2ml/分钟的流量洗脱蛋白质。通过214nm、280nm和330nm处的UV吸光度来检测洗脱化合物。

[0158] 用MGO修饰经NEM处理的乙酰化的MRJP以得到产物85

[0159] 按上文所述,用MGO修饰来自脱盐柱的包含蛋白质的级份(级份2)。简言之,使900μl级份2与100μl MGO(5%)于22℃下反应过夜。在HiTrap™脱盐柱(5ml, GE healthcare)上去除未反应的MGO。用PBS缓冲液(25mM, pH 7.4)以2ml/分钟的流量洗脱蛋白质。通过214nm、280nm和330nm处的UV吸光度检测洗脱化合物。可选地,在乙酸钠缓冲液(10mM, pH 4.0)中进行洗脱。

[0160] NEM修饰、乙酰化修饰和MGO修饰的结果

[0161] 用5mL HiTrap™脱盐柱对MGO处理后的样品进行脱盐,并分析包含高分子量蛋白的级份2的抑制组织蛋白酶B的能力。组织蛋白酶B活性的测定也在上文中进一步详述。

[0162] MGO处理的MRJP产生了抑制活性(图8)。在NEM+MGO处理的MRJP样品中也观察到抑制活性。然而,在乙酰化MRJP并用MGO处理后(产物89;参见图7中的示意图),所有抑制活性

都丢失,这证明MG0对精氨酸的修饰对组织蛋白酶B抑制活性具有重要性(图8)。对MRJP的赖氨酸残基进行乙酰化后,蛋白质似乎刺激而非抑制组织蛋白酶B活性(图8)。

[0163] 注意到NEM还是半胱氨酸蛋白酶抑制剂。我们的结果显示,NEM修饰接着进行MG0修饰产生对组织蛋白酶B的较强抑制。这归因于MG0修饰的蛋白样品中剩余的残留NEM,其使NEM与MG0修饰的蛋白质组合发挥作用,并进一步抑制组织蛋白酶B活性。

[0164] 因此,总之,MG0与MRJP的反应产生了组织蛋白酶B抑制剂。用NEM封闭巯基接着进行MG0处理也产生了组织蛋白酶B的活性抑制剂。乙酰化MRJP接着与MG0反应阻止组织蛋白酶B抑制活性的产生。乙酰化接着进行NEM处理以封闭MRJP上的赖氨酸残基和半胱氨酸残基接着进行MG0处理也未能产生活性组织蛋白酶B抑制剂。

[0165] PCT/NZ/2011/000271中示出,乙酰化选择性地封闭赖氨酸残基。如上文所述,发现乙酰化的MRJP样品在添加MG0后缺乏活性。这指示,关于蛋白表面上的MG0活性形式的形成,对赖氨酸的MG0修饰对经修饰的MRJP所示出的功能活性很重要。

[0166] 为了确认这些结果,测试了以相同方式制备的另一个样品抑制组织蛋白酶B的能力。来自蜂王浆的乙酰化的蛋白质不能抑制组织蛋白酶B,即使优化MG0处理(即,0.5%MG0,pH 3.5,于22℃下过夜)后亦如此。其可被完成的速度使得其优于图6B中概述的其他方法,这些方法生成相似水平的组织蛋白酶B抑制活性要花3至7天。结论是对赖氨酸的MG0修饰是组织蛋白酶B抑制活性的关键因素。

[0167] 实施例5:组织蛋白酶B对MG0修饰的MRJP的消化

[0168] 从于包含100mM乙酸钠、2mM EDTA和2.5mM 2-巯基乙醇,pH 5.0的缓冲液体系中的组织蛋白酶B储备溶液制备了组织蛋白酶B工作试剂溶液(1:50)。

[0169] 对选择的SEC级份样品进行组织蛋白酶消化。通常,将10μl组织蛋白酶B工作溶液与20μl蛋白样品混合,并于37℃消化过夜。水解后,准备消化物用于非变性PAGE分析。用Coomassie® G250对凝胶进行染色,如图9所示,参见泳道7至10。

[0170] 用于组织蛋白酶B消化的样品是:1)粗制MRJP蛋白;2)针对9天的样品的pH 4.0的MG0修饰的MRJP的脱盐级份(第一个大峰);3)针对9天的样品的于PBS(pH 7.5)中的MG0修饰的MRJP的脱盐级份(第一个大峰);4)pH 5.0级份的SEC级份;5)反应221的SEC级份。

[0171] 结果在图9中示出。泳道1示出了非变性PAGE分子量标记,泳道7示出了未经消化的pH 4.0的MG0修饰的MRJP,泳道8示出了组织蛋白酶B消化的pH 4.0的MG0修饰的MRJP,泳道9示出了未经消化的pH7.0的MG0修饰的MRJP,并且泳道10示出了组织蛋白酶B消化的pH 7.0的MG0修饰的MRJP。

[0172] 在pH 4.0(其为蜂蜜的预期pH)下,形成了MRJP的高分子量加合物(>480kDa)(参见图9,泳道7,以及图2,泳道5)。当在pH 7.0下进行MG0修饰时,这些条带不明显(参见图9,泳道9至10)。因此,组织蛋白酶B在pH 7.0下不能水解蛋白质,但是在pH 4.0下能够水解产生的较低分子量物质。pH 4.0下的较高分子量物质似乎比较低分子量物质对蛋白水解更具抗性。但是,pH 7.0下通过MG0修饰MRJP所产生的物质似乎也对水解具有抗性。

[0173] 不希望受到理论的限制,我们提出组织蛋白酶B不能水解MRJP是由于该酶受到抑制。我们参考图9。相反,原始的MRJP1六聚体形式和王浆素的单体形式容易被该酶降解(数据未示出)。

[0174] 显然,凝胶中上样的蛋白水平是不等的,其中对水解样品上样少25%的蛋白质。为

了进行水解,使用10 μ L组织蛋白酶B的1mg/mL溶液(10 μ g)。因此,采用了非常高水平的酶活性用于这些实验。此外,反应于37 $^{\circ}$ C下进行两天。在这些条件下,我们预期将见到MRJP蛋白的完全的或近乎完全的水解。

[0175] 由于组织蛋白酶B在pH 4.0下具有外肽酶活性,预期将通过水解生成二肽,其无法通过非变性PAGE分析来显示。我们观察到的不完全水解显示,发生了一些组织蛋白酶B抑制,和/或时间长度和组织蛋白酶B的浓度高于MG0修饰的MRJP蛋白的抑制活性。这可使58kDa蛋白(MRJP1)被部分水解,并且出现存在于242kDa附近的条带。

[0176] 通过比较,pH 4.0下,较大的交联复合物似乎不受组织蛋白酶B切割。蛋白质与MG0的交联发生于赖氨酸残基之间或赖氨酸与Arg残基之间。在pH 7.0下,水解的MRJP蛋白的寡聚复合物不被组织蛋白酶B水解。这是因为在该pH下,组织蛋白酶B的底物特异性局限于切割MRJP蛋白质内的Arg-Arg|Xaa序列,即,肽内切酶活性。

[0177] 但是,MRJP中的该位点似乎不可切割。用组织蛋白酶B进行实质(substantial)水解后在凝胶上观察到的蛋白水平基本与未添加组织蛋白酶B时观察到的相同。可能在这些条件下,组织蛋白酶B被完全抑制。还可能进行Arg残基的MG0修饰。这将阻止组织蛋白酶B在pH 7.0下对MRJP切割位点的识别。还可能非变性凝胶电泳未能充分分离蛋白片段。

[0178] 实施例6:提出的组织蛋白酶B抑制机制

[0179] 组织蛋白酶B是参与蛋白质的细胞内降解和周转的巯基蛋白酶。它是吞噬过程中的重要酶,并且其还涉及肿瘤侵入和转移。

[0180] 组织蛋白酶B的主要特异性是针对切割位点Arg-Arg-|Xaa(其中|表示切割点)的特异性。因为MRJP1-5中存在Arg-Arg肽序列,所以预测MRJP将是该酶合适底物。但是,我们的结果已经对该切割位点的重要性产生了质疑。具体地,MG0修饰的具有相同Arg-Arg肽序列的牛丝氨酸白蛋白未示出抗炎活性,这与MG0修饰的MRJP1和MRJP3蛋白相反(结果未示出)。结果显示,Arg-Arg切割可能仅在pH 7的最优条件下与质膜结合的组织蛋白酶B相关(数据未示出)。

[0181] 组织蛋白酶B还具有一些C端二肽酶活性(Brömme等,1987和Chapman等,1994)。不希望受理论约束,我们提出,MG0修饰的MRJP1和MG0修饰的MRJP3的C端肽区域抑制组织蛋白酶B的活性。我们提出,可能参与巯基赖氨酸交联的MG0修饰的赖氨酸很接近组织蛋白酶B的巯基活性位点。以此方式,赖氨酸上的MG0与组织蛋白酶B的巯基活性位点反应,并抑制其作用。

[0182] 显然,MRJP1具有赖氨酸(参见SEQ ID NO:1的427位),其为来自C末端的3个切割位点。MRJP3具有处于第542位的第一切割位点的赖氨酸残基(参见SEQ ID NO:3)。类似地,MRJP2具有处于第445位的第四切割位点的赖氨酸残基(参见SEQ ID NO:2),并且MRJP4具有处于第455位的第五切割位点的赖氨酸残基(参见SEQ ID NO:4)。MRJP5具有处于第595位的第二切割位点的赖氨酸残基(SEQ ID NO:5)。MRJP6具有处于第431位的第3切割位点的赖氨酸残基(参见SEQ ID NO:6)。MRJP8具有处于第409位的第四切割位点的赖氨酸残基(参见SEQ ID NO:8),并且MRJP9具有处于第415位的第四切割位点的赖氨酸残基(参见SEQ ID NO:9)。

[0183] 牛血清白蛋白的C端直至第五个组织蛋白酶B切割点没有赖氨酸。以此方式,MG0修饰的BSA中的赖氨酸残基可能太远而不能抑制组织蛋白酶B。此外,BSA中的第573位的赖氨酸

酸残基参与 α 螺旋结构,并且不容易被组织蛋白酶B切割所利用。因此假定MGO修饰的MRJP1和MRJP3的抑制活性的示出是由于赖氨酸距肽的C末端相对较近导致的。还预期,MGO修饰的MRJP2、MRJP4、MRJP5、MRJP6、MRJP8和MRJP9也将显示组织蛋白酶B抑制活性。

[0184] 还使用DCFDA氧化成荧光素来检测蛋白表面上活性MGO物质的存在(数据未示出)。过氧化氢与MGO的反应导致了所述水平的氧化的DCFDA的反应,并因此导致检测到的荧光水平降低(数据未示出)。使用凝胶过滤或HiTrap™脱盐分离高分子量蛋白质,造成鉴定出蛋白表面上的高反应性物质。通过DCFDA分析所显示的该物质与组织蛋白酶B抑制活性有关(数据未示出)。

[0185] 已知Arg-MGO加合物倾向于在较低的MGO浓度下形成,并且这产生了可用330nm处的吸光度或荧光Ex330nm和Em410nm检测的不可逆的加合物。与Cys残基的反应形成可逆并且不稳定而导致从蛋白表面释放MGO的半乙酰基(hemiacetyl)。与赖氨酸的反应可形成与MGO的可逆和不可逆的反应。

[0186] 缓慢地重排初始形成的加合物以形成附着至赖氨酸的 ϵ 氨基的稳定共价连接的MGO。可进行进一步重排,导致产生多种化学官能团,包括N(ϵ)-(羧基乙基)赖氨酸(CEL)酸基团、羟基、醛或酮官能团以及与其他蛋白质的不可逆反应以形成交联。

[0187] MGO修饰可产生与蛋白质结合的反应性物质如醛,并且醛可与组织蛋白酶B活性位点的巯基反应。由此,有可能,在具有醛官能团的经MGO修饰的赖氨酸残基之间可发生组织蛋白酶B的抑制。赖氨酸在组织蛋白酶B抑制中也是引人关注的,因为结合的MGO可经历坎尼扎罗重排,形成CEL和具有羧酸功能的羟基。两种醛反应,其中一种醛还原成相应的醇,而第二种醛氧化成羧酸。

[0188] 在pH 4.0下,组织蛋白酶B具有C端外二肽酶活性。我们假设,CEL中存在的酸官能团羧酸部分可被组织蛋白酶B识别为C端。这将使肽处于阻止切割的方向。可能由MGO在与赖氨酸反应后形成这两种结构。在不同的条件下可能倾向于不同的反应途径。

[0189] MGO在酸性条件下的化学反应性,如在麦卢卡蜂蜜中存在的,似乎能够形成高分子量交联。这似乎倾向于形成醛,所述醛进而继续反应形成蛋白交联。所述坎尼扎罗重排倾向于在碱性条件下进行,当MRJP蛋白在中性的pH 7.0下反应时,更可能发生所述重排。所述坎尼扎罗重排阻止蛋白质之间的进一步交联。交联中涉及的醛官能团被酸基团和羟基取代。所述羟基提供了在MGO修饰后对赖氨酸残基表面上的化学特性的进一步多样化,并且这可提供抑制选择性和亲和力的变化。

[0190] 如上所述,我们观察到用乙酸酐封闭赖氨酸残基接着进行MGO修饰阻止了组织蛋白酶B抑制。这凸显了赖氨酸在产生抑制活性中的重要性。赖氨酸 ϵ 氨基与乙酸酐的反应产生酰胺键。这去除了被组织蛋白酶B的C端外肽酶活性识别所需的特征。这进而消除了酶的相互作用和抑制。

[0191] 实施例7:合成肽的MGO修饰以及它们的抑制活性

[0192] 由Mimotopes Pty Ltd (Melbourne, Australia) 提供37种合成肽。所述结构基于MRJP 1至5中的肽序列。将特别的关注点放在这些蛋白质的C端上。

[0193] MGO修饰按如下进行。孵育混合物包含180 μ l肽溶液(5mM)和20 μ lMGO溶液(5%)。在室温下进行孵育过夜。使用C18SPE盒去除MGO。浓缩洗脱的肽,并使溶液接近初始浓度。

[0194] 用包含2mM未修饰的肽或根据前述方法修饰了的肽的溶液进行组织蛋白酶B活性

的抑制的测试。所述合成肽和结果在图11A至C、12A至C、13A至C、14A至C和15A至C,以及下面的表1至5中示出。表1:衍生自MRJP1的C端的合成肽

[0195]

肽	SEQ ID NO:	未修饰的	MGO修饰的
Ac-PFKI-OH	22	152.05±13.20	91.45±0.11
Ac-KISI-OH	21	133.11±4.29	92.82±5.44
Ac-KISIHl-OH	20	149.04±9.65	73.23±17.90
Ac-PFKISIHl-OH	19	144.22±12.20	28.11±0.06

[0196] 表2:衍生自MRJP2的C端的合成肽

[0197]

肽	SEQ ID NO:	未修饰的	MGO修饰的
Ac-KN-OH	28	149.55±4.42	111.84±6.21
Ac-NQKN-OH	27	282.39±19.66	102.36±6.36
Ac-NQKNNN-OH	26	146.89±14.87	87.48±4.31
Ac-NQKNNNQN-OH	25	290.25±12.34	171.38±9.10
Ac-NQKNNNQNDN-OH	24	254.04±22.31	123.18±12.85

[0198] 表3:衍生自MRJP3的C端的合成肽

[0199]

肽	SEQ ID NO:	未修饰的	MGO修饰的
Ac-HSSKLH-OH	30	121.50±2.05	102.36±6.36
Ac-SKLH-OH	31	146.35±2.91	67.57±1.73
Ac-SK-OH	32	137.62±9.65	115.94±1.24
Ac-HSSK-OH	33	164.77±3.87	134.68±1.13
Ac-SSKS-OH	34	118.71±9.09	107.49±4.29

[0201] 表4:衍生自MRJP4的C端的合成肽

肽	SEQ ID NO:	未修饰的	MGO 修饰的
Ac-KS-OH	41	135.26 ± 7.09	110.69 ± 0.89
Ac-SSKSNNRHNNND-OH	36	164.01 ± 8.57	109.55 ± 3.11
Ac-SSKSNN-OH	39	129.06 ± 6.31	107.043 ± 8.64
Ac-SSKSNNRH-OH	38	125.43 ± 9.56	101.92 ± 6.31
Ac-SSKSNNRHNN-OH	37	131.11 ± 6.491	104.11 ± 7.46

[0203] 表5:衍生自MRJP5的C端的合成肽

[0204]

肽	SEQ ID NO:	未修饰的	MGO修饰的
Ac-KH-OH	45	230.49±16.21	115.95±5.94

Ac-QNKHNN-OH	43	167.90±10.09	51.30±5.31
Ac-KHNN-OH	44	129.26±7.90	111.90±2.07
Ac-QNKH-OH	46	137.67±17.04	97.77±3.70

[0205] 从该分析中,目的合成肽包括:MRJP1:Ac-PFKISIHl-OH (SEQ ID NO:19);MRJP2:Ac-NQKNNNQNDN-OH (SEQ ID NO:24);Ac-NQKN-OH (SEQ ID NO:27);MRJP3:Ac-SKLH-OH (SEQ ID NO:31);以及MRJP5:Ac-QNKHNN-OH (SEQ ID NO:43);Ac-KH-OH (SEQ ID NO:45)。

[0206] 根据上述方法基于MRJP1、MRJP3和MRJP5的氨基酸序列制备了另外的合成肽。

[0207] 表6:MRJP1衍生的合成肽

[0208]

样品	SEQ ID NO:	未修饰的	MGO修饰的
H-FDR-OH	50	174.56±11.96	71.18±2.22
Ac-FDR-OH	53	85.57±3.51	44.78±1.54
H-HNIR-OH	54	151.51±0.62	103.38±3.65
Ac-HNIR-OH	59	171.58±11.29	106.82±3.02
H-YINR-OH	85	142.33±3.64	79.21±2.12
Ac-YINR-OH	87	93.14±2.42	99.05±7.78
H-FTK-OH	88	147.63±0.70	76.59±2.24
Ac-FTK-OH	91	148.84±16.13	105.35±5.73
H-IFVTMLR-OH	92	80.48±4.25	78.70±3.67
Ac-IFVTMLR-OH	93	88.31±12.62	92.63±2.00
H-MQK-OH	94	127.00±0.93	99.48±2.95
Ac-MQK-OH	95	121.24±3.57	69.15±4.87
H-CDR-OH	96	165.10±0.38	96.01±6.45
Ac-CDR-OH	97	120.52±8.17	78.51±2.51
H-MTR-OH	98	143.48±2.33	104.39±2.68
Ac-MTR-OH	99	126.30±8.12	118.90±5.62
TNBS-FAK-pNA	100	99.27±3.8	122.48±7.65

[0209] TNBS=用三硝基苯磺酸封闭的N端。pNA=对硝基苯胺。

[0210] 表7:MRJP3衍生的合成肽

[0211]

样品	SEQ ID NO:	未修饰的	MGO修饰的
H-QNDNK-OH	101	104.37±4.99	68.42±0.22
Ac-QNDNK-OH	102	167.26±7.64	122.35±3.05
H-QNDNR-OH	103	162.38±16.36	116.16±3.66
Ac-QNDNR-OH	104	161.75±9.25	132.44±4.77
H-QNGNK-OH	105	170.73±5.14	118.80±11.41
Ac-QNGNK-OH	106	187.34±9.14	89.21±10.96
H-QNGNR-OH	107	74.41±4.98	84.99±4.08
Ac-QNGNR-OH	108	101.30±6.00	88.67±4.38

[0212] 表8:MRJP5衍生的合成肽

[0213]

样品	SEQ ID NO:	未修饰的	MGO修饰的
H-TNR-OH	109	102.61±5.34	91.86±3.50
Ac-TNR-OH	110	96.48±2.03	91.72±0.84
H-MDK-OH	111	104.25±2.73	70.62±12.34
Ac-MDK-OH	112	109.67±3.13	99.38±1.63
H-MDR-OH	113	101.73±2.37	74.46±0.97
Ac-MDR-OH	114	107.34±1.46	88.56±2.14
H-TDK-OH	115	103.18±4.50	87.53±3.26
Ac-TDK-OH	116	100.51±10.69	92.75±2.41
H-IDR-OH	117	98.02±2.54	85.60±5.32
Ac-IDR-OH	118	93.46±12.24	81.75±3.26
H-VNR-OH	119	97.75±10.62	82.63±7.88
Ac-VNR-OH	120	99.83±3.40	68.49±8.73
H-MHR-OH	121	96.77±9.26	80.66±6.19
Ac-MHR-OH	122	101.26±4.59	90.13±17.28
H-MNR-OH	123	112.08±6.03	78.56±5.37
Ac-MNR-OH	124	100.83±2.26	86.94±3.01
H-LQK-OH	125	102.47±4.27	95.26±5.54
Ac-LQK-OH	126	102.05±10.32	90.15±1.52

[0214] 按本文所述测试了衍生自MRJP1至5的其他的合成肽。合成肽和结果在图16A和16B,以及下面的表9中示出。

[0215] 表9:针对抑制活性测试的其他的合成肽

[0216]

肽	衍生自 MRJP	SEQ ID NO:	未修饰的	MGO 修饰的
Ac-LVK-OH	MRJP3 (参见 Leu170)	48	143.92 ± 3.15	80.84 ± 3.07
Ac-LVK-NH ₂	MRJP3 (参见 Leu170)	49	92.71 ± 7.78	80.03 ± 0.10
Ac-LIR-OH	MRJP2, 4 (参见 Leu408)	51	128.28 ± 2.50	0.07 ± 3.96
Ac-LIR-NH ₂	MRJP2, 4 (参见 Leu408)	52	65.39 ± 2.75	72.56 ± 9.33
Ac-LLK-OH	MRJP1, 2, 4	56	141.56 ± 13.90	147.60 ± 5.98

[0217]

	(参见 Leu146; Leu104; Leu169)			
Ac-LLK-NH ₂	MRJP1, 2, 4 (参见 Leu146; Leu104; Leu169)	57	159.34 ± 2.34	136.90 ± 14.42
Ac-KI-OH	MRJP1-5 ⁺	58	108.98 ± 9.03	92.08 ± 5.79

[0218] +=MRJP1:Lys75,Lys358,Lys427;MRJP2:Lys121,Lys127,Lys356,Lys385;MRJP3:Lys132,Lys361,Lys390;MRJP4:Lys131,Lys356;MRJP5:Lys100,Lys130,Lys310,Lys518.

[0219] 另一种合成肽是FAK (Phe-Ala-Lys;例如,Ac-FAK-OH;SEQ ID NO:60),其包含发现于MRJP1、MRJP3和MRJP4中的序列。

[0220] 简述来自本实施例的氨基酸序列的表格提供如下。

[0221] 表10:针对抑制活性评估的氨基酸序列的简述

[0222]

序列	SEQ ID NO:	序列	SEQ ID NO:	序列	SEQ ID NO:
PFKI	61	HSSKLH	70	KH	80
KISI	62	SKLH	71	QNKHNN	1
KISIH	63	SK	72	KHNN	82
PFKISIH	64	HSSK	73	QNKH	83
KN	65	SSKS	74	LVK	84
NQKN	66	KS	75	LIR	86
NQKNNN	67	SSKSNNRHNNND	76	LLK	89
NQKNNNQN	68	SSKSNN	77	KI	90
NQKNNNQNDN	69	SSKSNNRH	78		
		SSKSNNRHNN	79		

[0223]

序列	SEQ ID NO:	序列	SEQ ID NO:	序列	SEQ ID NO:
FDR	127	MTR	134	TNR	139
HNIR	128	FAK	135	MDK	140
YINR	129	QNDNR	136	MDR	142
FTK	130	QNGNK	137	TDK	143

[0224]

IFVTMLR	131	QNGNR	138	IDR	144
MQK	132			VNR	145
CDR	133			MHR47	
				MNR141	
				LQK	55

[0225] 结果显示,C-末端和内部肽可在用MGO修饰赖氨酸后提供对组织蛋白酶B的抑制。肽类似物LIR (SEQ ID NO:51) 具有特别有效的活性。

[0226] 以前已经确定了蜂蜜中存在内源蛋白酶活性 (Larocca等,2012),并且我们证实该蛋白酶在尿素存在下导致MRJP蛋白的降解。因此,预期在对麦卢卡蜂蜜的延长的孵育期间,肽从MRJP蛋白的释放导致具有增强的组织蛋白酶B抑制的MGO修饰的肽的释放。

[0227] 在没有进行MGO处理的情况下,某些肽显示出刺激活性。在大多数情况下,该活化在用MGO处理后丧失。在一些情况下,较长的肽具有更高的活性。对于特定的肽,赖氨酸位于距C端氨基酸至少3个氨基酸并且距C端氨基酸不多于6个氨基酸处。对于抑制,通常存在游离的C-末端。这使其良好地与组织蛋白酶B相互作用,并潜在地增加抑制。

[0228] 对于所测定的肽,酸功能末端比酰胺化的末端更可能产生增加的活性。这与具有与胰酶相似的特异性的内部蛋白酶消化一致,即,切割C端至精氨酸和赖氨酸残基,只要下一个氨基酸不是脯氨酸即可。在组织蛋白酶B的结构以及其作用于C末端的外肽酶活性的情况下,对C端羧酸基团的偏好性是可以理解的。

[0229] 显然,组织蛋白酶B的闭合环包含被认为配位至肽的C端的两个组氨酸残基。参见例如,Musil,D.,Zucic,D.,Turk,D.,Engh,R.A.,Mayr,I.,Huber,R.,Popovic,T.,Turk,V.,Towatari,T.,Katunuma,N.,Bode,W.(1991)The refined 2.15Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B:the structural basis for its specificity.EMBO J.10:2321-2330。这使肽键位于肽的C端上游的第2与第3个氨基酸之间。此外,如果赖氨酸的伯胺或 ϵ 氨基已与MGO反应,则肽相对于组织蛋白酶B的方向可反转180°。如上所述,这可经历坎尼扎罗重排以产生CEL。这还可发生于赖氨酸的侧链 ϵ 氨基上。

[0230] 对于FAK肽类似物(SEQ ID NO:100),这显示了C端包含对硝基苯胺(pNA)的有限的抑制活性。我们假定,这可阻碍组织蛋白酶B识别肽。为了测试这点,在存在NaOH的碱性条件去除pNA基团。在MGO修饰前和修饰后重新评估肽的活性(数据未示出)。仍然观察不到抑制性活性,这说明肽序列中赖氨酸的位置可影响活性。从这点出发可推断,设定赖氨酸位置使得其位于组织蛋白酶B的活性位点较近位置可能是有益的。

[0231] 已经详细描述了本发明及其实施方案。但是,不旨在将本发明的范围限制于说明书中描述的任何过程、制备、物质组成、化合物、工具(means)、方法和/或步骤的具体实施方案。可对所公开的物质进行多种改造、替换和改变而不脱离本发明的范围和/或实质特征。

[0232] 因此,本领域技术人员将从本公开内容容易地理解,可根据本发明的这样的相关实施方案,随后采用进行与本文所述实施方案基本相同的功能或得到与本文所述实施方案基本相同的结果的改造、替换和/或改变。因此,本发明旨在将本文中公开的过程、制备、物质组成、化合物、工具、方法和/或步骤的改造、替换和改变涵盖在其范围内。

[0233] 参考文献

[0234] K.Kohno,I.Okamoto,O.Sano,N.Arai,K.Iwaki,M.Ikeda,and M.Kurimoto(2004)Royal jelly inhibits the production of proinflammatory cytokines by activated macrophages,Biosci.Biotechnol.Biochem.,68(1):138-145.

[0235] Kimura Y,Miyagi C,Kimura M,Nitoda T,Kawai N,Sugimoto H.(2000)Structural features of N-glycans linked to royal jelly glycoproteins: structures of high-mannose type,hybrid type,and biantennary type glycans.Bio sci.Biotechnol.Biochem.64(10):2109-20.

[0236] J.Simuth,K.Bilikova,E.Kovacova,Z.Kuzmova,and W.Schroder(2004)Immunochemical approach to detection of adulteration in honey:physiologically active Royal Jelly protein stimulating TNF- α release is a regular component of honey,Journal of Agriculture and Food Chemistry.52(8):2154-8.

[0237] B.Lerrer,K.Zinger-Yosovich,B.Avrahami,and N.Gilboa-Garber(2007)Honey and royal jelly,like human milk,abrogate lectin-dependent infection-preceding Pseudomonas aeruginosa adhesion.ISME Journal.1:149-155.

- [0238] E.Mavric,S.Wittmann,G.Barth,and T.Henle(2008) Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand.Mol.Nutr.Food Res.52.
- [0239] Auwerx J.(1991).The human leukemia cell line,THP-1:a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation.Experientia.47:22-31.
- [0240] Wan,C.P.,C.S.Park,et al.(1993).A rapid and simple microfluorometric phagocytosis assay.Journal of Immunological Methods162(1):1-7.
- [0241] Allen,K.L.,P.C.Molan,et al.(1991).A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys.Journal of Pharmacy and Pharmacology.43(12):817-22.
- [0242] White,J.(1975).Honey:a comprehensive survey.London,Heinemann.
- [0243] Schmitt,A.,J.Schmitt,et al.(2005).Characterization of advanced glycation end products for biochemical studies:side chain modifications and fluorescence characteristics.Analytical Biochemistry.338:201-215.
- [0244] Jonathan W.C.Brock,William E.Coatham,Suzanne R.Thorpe,John W Baynes1 andJennifer M.Ames.(2007).Detection and identification of arginine modifications on methylglyoxal-modified ribonuclease by mass spectrometric analysis.J.Mass Spectrom.42:89-100.
- [0245] Kim J,Kim NH,Sohn E,Kim CS,Kim JS.(2010).Methylglyoxal induces cellular damage by increasing argpyrimidine accumulation and oxidative DNA damage in human lens epithelial cells.Biochem Biophys Res Commun.391(1):346-51.Epub 2009 Nov 12.
- [0246] Brömme D,Steinert A,Fittkau S,Kirschke H.(1987).Action of rat liver cathepsin B on bradykinin and on the oxidized insulin A-chain.FEBS Lett.Jul27;219(2):441-4.
- [0247] Chapman HA Jr,Munger JS,Shi GP.(1994).The role of thiol proteases in tissue injury and remodeling.Am J Respir Crit Care Med.1994 Dec;150(6 Pt2):S155-9.
- [0248] June O'Neil,George Hoppe,Lawrence M.Sayre,and Henry F.Hoff(1997).Inactivation of cathepsin B by oxidised LDL involves complex formation induced by binding of putative reactive sites exposed at low pH to thiols on the enzyme.Free Radical Biology&Medicine.23(2):215-225.
- [0249] Ahmed NK,Martin LA,Watts LM,Palmer J,Thornburg L,Prior J,Esser RE.(1992)Peptidyl fluoromethyl ketones as inhibitors of cathepsin B.Implication for treatment of rheumatoid arthritis.Biochem Pharmacol.Sep 25;44(6):1201-7.
- [0250] Rossano R,Larocca M,Polito T,Perna AM,Padula MC,et al.(2012)What Are the Proteolytic Enzymes of Honey and What They Do Tell Us?A Fingerprint Analysis by 2-D Zymography of Unifloral Honeys.PLoS ONE 7(11):e49164.doi:10.1371/journal.pone1149164.

- <110> 曼卡米德有限公司
 <120> 抗炎蛋白和肽以及它们的制备方法和用途
 <130> 257 W01
 <140> PCT/NZ2013/000110
 <141> 2013-06-24
 <150> NZ 600847
 <151> 2012-06-22
 <160> 145
 <170> PatentIn版本3.5
 <210> 1
 <211> 432
 <212> PRT
 <213> 意大利蜜蜂 (*Apis mellifera*)
 <220>
 <221> 蜂王浆主蛋白1
 <222> (1)..(432)

[0001] <400> 1

```

Met Thr Arg Leu Phe Met Leu Val Cys Leu Gly Ile Val Cys Gln Gly
1          5          10          15

Thr Thr Gly Asn Ile Leu Arg Gly Glu Ser Leu Asn Lys Ser Leu Pro
          20          25          30

Ile Leu His Glu Trp Lys Phe Phe Asp Tyr Asp Phe Gly Ser Asp Glu
          35          40          45

Arg Arg Gln Asp Ala Ile Leu Ser Gly Glu Tyr Asp Tyr Lys Asn Asn
          50          55          60

Tyr Pro Ser Asp Ile Asp Gln Trp His Asp Lys Ile Phe Val Thr Met
65          70          75          80

Leu Arg Tyr Asn Gly Val Pro Ser Ser Leu Asn Val Ile Ser Lys Lys
          85          90          95

Val Gly Asp Gly Gly Pro Leu Leu Gln Pro Tyr Pro Asp Trp Ser Phe
          100          105          110
  
```

Ala Lys Tyr Asp Asp Cys Ser Gly Ile Val Ser Ala Ser Lys Leu Ala
115 120 125

Ile Asp Lys Cys Asp Arg Leu Trp Val Leu Asp Ser Gly Leu Val Asn
130 135 140

Asn Thr Gln Pro Met Cys Ser Pro Lys Leu Leu Thr Phe Asp Leu Thr
145 150 155 160

Thr Ser Gln Leu Leu Lys Gln Val Glu Ile Pro His Asp Val Ala Val
165 170 175

Asn Ala Thr Thr Gly Lys Gly Arg Leu Ser Ser Leu Ala Val Gln Ser
180 185 190

Leu Asp Cys Asn Thr Asn Ser Asp Thr Met Val Tyr Ile Ala Asp Glu
195 200 205

Lys Gly Glu Gly Leu Ile Val Tyr His Asn Ser Asp Asp Ser Phe His
210 215 220

[0002]

Arg Leu Thr Ser Asn Thr Phe Asp Tyr Asp Pro Lys Phe Thr Lys Met
225 230 235 240

Thr Ile Asp Gly Glu Ser Tyr Thr Ala Gln Asp Gly Ile Ser Gly Met
245 250 255

Ala Leu Ser Pro Met Thr Asn Asn Leu Tyr Tyr Ser Pro Val Ala Ser
260 265 270

Thr Ser Leu Tyr Tyr Val Asn Thr Glu Gln Phe Arg Thr Ser Asp Tyr
275 280 285

Gln Gln Asn Asp Ile His Tyr Glu Gly Val Gln Asn Ile Leu Asp Thr
290 295 300

Gln Ser Ser Ala Lys Val Val Ser Lys Ser Gly Val Leu Phe Phe Gly
305 310 315 320

Leu Val Gly Asp Ser Ala Leu Gly Cys Trp Asn Glu His Arg Thr Leu
325 330 335

Glu Arg His Asn Ile Arg Thr Val Ala Gln Ser Asp Glu Thr Leu Gln
340 345 350

Met Ile Ala Ser Met Lys Ile Lys Glu Ala Leu Pro His Val Pro Ile
355 360 365

Phe Asp Arg Tyr Ile Asn Arg Glu Tyr Ile Leu Val Leu Ser Asn Lys
370 375 380

Met Gln Lys Met Val Asn Asn Asp Phe Asn Phe Asp Asp Val Asn Phe
385 390 395 400

Arg Ile Met Asn Ala Asn Val Asn Glu Leu Ile Leu Asn Thr Arg Cys
405 410 415

Glu Asn Pro Asp Asn Asp Arg Thr Pro Phe Lys Ile Ser Ile His Leu
420 425 430

[0003] <210> 2
<211> 452
<212> PRT
<213> 意大利蜜蜂

<220>
<221> 蜂王浆主蛋白2
<222> (1)..(452)

<400> 2

Met Thr Arg Trp Leu Phe Met Val Ala Cys Leu Gly Ile Ala Cys Gln
1 5 10 15

Gly Ala Ile Val Arg Glu Asn Ser Pro Arg Asn Leu Glu Lys Ser Leu
20 25 30

Asn Val Ile His Glu Trp Lys Tyr Phe Asp Tyr Asp Phe Gly Ser Glu
35 40 45

Glu Arg Arg Gln Ala Ala Ile Gln Ser Gly Glu Tyr Asp His Thr Lys
50 55 60

Asn Tyr Pro Phe Asp Val Asp Gln Trp Arg Asp Lys Thr Phe Val Thr
65 70 75 80

	Ile	Leu	Arg	Tyr	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Thr	Leu	Asn	Val	Ile	Ser	Gly	
					85					90					95		
	Lys	Thr	Gly	Lys	Gly	Gly	Arg	Leu	Leu	Lys	Pro	Tyr	Pro	Asp	Trp	Ser	
				100					105					110			
	Phe	Ala	Glu	Phe	Lys	Asp	Cys	Ser	Lys	Ile	Val	Ser	Ala	Phe	Lys	Ile	
			115					120					125				
	Ala	Ile	Asp	Lys	Phe	Asp	Arg	Leu	Trp	Val	Leu	Asp	Ser	Gly	Leu	Val	
		130					135					140					
	Asn	Arg	Thr	Val	Pro	Val	Cys	Ala	Pro	Lys	Leu	His	Val	Phe	Asp	Leu	
	145					150					155					160	
	Lys	Thr	Ser	Asn	His	Leu	Lys	Gln	Ile	Glu	Ile	Pro	His	Asp	Ile	Ala	
				165						170					175		
	Val	Asn	Ala	Thr	Thr	Gly	Lys	Gly	Gly	Leu	Val	Ser	Leu	Ala	Val	Gln	
				180					185					190			
[0004]	Ala	Ile	Asp	Leu	Ala	Asn	Thr	Leu	Val	Tyr	Met	Ala	Asp	His	Lys	Gly	
			195					200					205				
	Asp	Ala	Leu	Ile	Val	Tyr	Gln	Asn	Ala	Asp	Asp	Ser	Phe	His	Arg	Leu	
	210						215					220					
	Thr	Ser	Asn	Thr	Phe	Asp	Tyr	Asp	Pro	Arg	Tyr	Ala	Lys	Met	Thr	Ile	
	225					230					235					240	
	Asp	Gly	Glu	Ser	Phe	Thr	Leu	Lys	Asn	Gly	Ile	Cys	Gly	Met	Ala	Leu	
					245					250					255		
	Ser	Pro	Val	Thr	Asn	Asn	Leu	Tyr	Tyr	Ser	Pro	Leu	Ala	Ser	His	Gly	
				260					265					270			
	Leu	Tyr	Tyr	Val	Asn	Thr	Ala	Pro	Phe	Met	Lys	Ser	Gln	Phe	Gly	Glu	
		275						280					285				
	Asn	Asn	Val	Gln	Tyr	Gln	Gly	Ser	Glu	Asp	Ile	Leu	Asn	Thr	Gln	Ser	
	290						295					300					
	Leu	Ala	Lys	Ala	Val	Ser	Lys	Asn	Gly	Val	Leu	Phe	Val	Gly	Leu	Val	

	305		310		315		320
	Gly Asn Ser Ala Val	Gly Cys Trp Asn Glu His Gln Ser Leu Gln Arg					
	325	330	335				
	Gln Asn Leu Glu Met Val Ala Gln Asn Asp Arg Thr Leu Gln Met Ile						
	340	345	350				
	Ala Gly Met Lys Ile Lys Glu Glu Leu Pro His Phe Val Gly Ser Asn						
	355	360	365				
	Lys Pro Val Lys Asp Glu Tyr Met Leu Val Leu Ser Asn Arg Met Gln						
	370	375	380				
	Lys Ile Val Asn Asp Asp Phe Asn Phe Asp Asp Val Asn Phe Arg Ile						
	385	390	395	400			
	Leu Gly Ala Asn Val Lys Glu Leu Ile Arg Asn Thr His Cys Val Asn						
	405	410	415				
[0005]	Asn Asn Gln Asn Asp Asn Ile Gln Asn Thr Asn Asn Gln Asn Asp Asn						
	420	425	430				
	Asn Gln Lys Asn Asn Lys Lys Asn Ala Asn Asn Gln Lys Asn Asn Asn						
	435	440	445				
	Gln Asn Asp Asn						
	450						
	<210> 3						
	<211> 544						
	<212> PRT						
	<213> 意大利蜜蜂						
	<220>						
	<221> 蜂王浆主蛋白3						
	<222> (1).. (544)						
	<400> 3						
	Met Thr Lys Trp Leu Leu Leu Val Val Cys Leu Gly Ile Ala Cys Gln						
	1	5	10	15			
	Asp Val Thr Ser Ala Ala Val Asn His Gln Arg Lys Ser Ala Asn Asn						
	20	25	30				

Leu Ala His Ser Met Lys Val Ile Tyr Glu Trp Lys His Ile Asp Phe
35 40 45

Asp Phe Gly Ser Asp Glu Arg Arg Asp Ala Ala Ile Lys Ser Gly Glu
50 55 60

Phe Asp His Thr Lys Asn Tyr Pro Phe Asp Val Asp Arg Trp Arg Asp
65 70 75 80

Lys Thr Phe Val Thr Ile Glu Arg Asn Asn Gly Val Pro Ser Ser Leu
85 90 95

Asn Val Val Thr Asn Lys Lys Gly Lys Gly Gly Pro Leu Leu Arg Pro
100 105 110

Tyr Pro Asp Trp Ser Phe Ala Lys Tyr Glu Asp Cys Ser Gly Ile Val
115 120 125

Ser Ala Phe Lys Ile Ala Val Asp Lys Phe Asp Arg Leu Trp Val Leu
130 135 140

[0006]

Asp Ser Gly Leu Val Asn Asn Asn Gln Pro Met Cys Ser Pro Lys Leu
145 150 155 160

Leu Thr Phe Asp Leu Lys Thr Ser Lys Leu Val Lys Gln Val Glu Ile
165 170 175

Pro His Asn Ile Ala Val Asn Ala Thr Thr Gly Met Gly Glu Leu Val
180 185 190

Ser Leu Ala Val Gln Ala Ile Asp Arg Thr Asn Thr Met Val Tyr Ile
195 200 205

Ala Asp Glu Lys Gly Glu Gly Leu Ile Met Tyr Gln Asn Ser Asp Asp
210 215 220

Ser Phe His Arg Leu Thr Ser Asn Thr Phe Asp Tyr Asp Pro Arg Tyr
225 230 235 240

Thr Lys Leu Thr Val Ala Gly Glu Ser Phe Thr Val Lys Asn Gly Ile
245 250 255

Tyr Gly Ile Ala Leu Ser Pro Val Thr Asn Asn Leu Tyr Tyr Ser Pro
260 265 270

Leu Leu Ser His Gly Leu Tyr Tyr Val Asp Thr Glu Gln Phe Ser Asn
275 280 285

Pro Gln Tyr Glu Glu Asn Asn Val Gln Tyr Glu Gly Ser Gln Asp Ile
290 295 300

Leu Asn Thr Gln Ser Phe Gly Lys Val Val Ser Lys Asn Gly Val Leu
305 310 315 320

Phe Leu Gly Leu Val Gly Asn Ser Gly Ile Ala Cys Val Asn Glu His
325 330 335

Gln Val Leu Gln Arg Glu Ser Phe Asp Val Val Ala Gln Asn Glu Glu
340 345 350

Thr Leu Gln Met Ile Val Ser Met Lys Ile Met Glu Asn Leu Pro Gln
355 360 365

[0007]

Ser Gly Arg Ile Asn Asp Pro Glu Gly Asn Glu Tyr Met Leu Ala Leu
370 375 380

Ser Asn Arg Met Gln Lys Ile Ile Asn Asn Asp Phe Asn Phe Asn Asp
385 390 395 400

Val Asn Phe Arg Ile Leu Gly Ala Asn Val Asp Asp Leu Met Arg Asn
405 410 415

Thr Arg Cys Gly Arg Tyr His Asn Gln Asn Ala Gly Asn Gln Asn Ala
420 425 430

Asp Asn Gln Asn Ala Asp Asn Gln Asn Ala Asn Asn Gln Asn Ala Asp
435 440 445

Asn Gln Asn Ala Asn Lys Gln Asn Gly Asn Arg Gln Asn Asp Asn Arg
450 455 460

Gln Asn Asp Asn Lys Gln Asn Gly Asn Arg Gln Asn Asp Asn Lys Gln
465 470 475 480

Asn Gly Asn Arg Gln Asn Asp Asn Lys Gln Asn Gly Asn Arg Gln Asn
485 490 495

Gly Asn Lys Gln Asn Asp Asn Lys Gln Asn Gly Asn Arg Gln Asn Asp
500 505 510

Asn Lys Arg Asn Gly Asn Arg Gln Asn Asp Asn Gln Asn Asn Gln Asn
515 520 525

Asp Asn Asn Arg Asn Asp Asn Gln Val His His Ser Ser Lys Leu His
530 535 540

<210> 4
<211> 464
<212> PRT
<213> 意大利蜜蜂

<220>
<221> 蜂王浆主蛋白4
<222> (1)..(464)

<400> 4

[0008] Met Thr Lys Trp Leu Leu Leu Met Val Cys Leu Gly Ile Ala Cys Gln
1 5 10 15

Asn Ile Arg Gly Gly Val Val Arg Glu Asn Ser Ser Gly Lys Asn Leu
20 25 30

Thr Asn Thr Leu Asn Val Ile His Lys Trp Lys Tyr Leu Asp Tyr Asp
35 40 45

Phe Asp Asn Asp Glu Arg Arg Gln Ala Ala Ile Gln Ser Gly Glu Tyr
50 55 60

Asp Arg Thr Lys Asn Tyr Pro Leu Asp Val Asp Gln Trp His Asn Lys
65 70 75 80

Thr Phe Leu Ala Val Ile Arg Tyr Asn Gly Val Pro Ser Ser Leu Asn
85 90 95

Val Val Ser Asp Lys Thr Gly Asn Gly Gly Arg Leu Leu Gln Pro Tyr
100 105 110

Pro Asp Trp Ser Phe Ala Lys Tyr Glu Asp Cys Ser Gly Ile Val Ser

[illegible]

Val Ser Met Lys Ile Lys Gln Asn Val Pro Gln Ser Gly Arg Val Asn
355 360 365

Asn Thr Gln Arg Asn Glu Tyr Leu Leu Ala Leu Ser Asp Arg Asn Gln
370 375 380

Asn Val Leu Asn Asn Asp Leu Asn Leu Glu His Val Asn Phe Gln Ile
385 390 395 400

Leu Gly Ala Asn Val Asn Asp Leu Ile Arg Asn Ser Arg Cys Ala Asn
405 410 415

Phe Asp Asn Gln Asp Asn Asn His Tyr Asn His Asn His Asn Gln Ala
420 425 430

Arg His Ser Ser Lys Ser Asp Asn Gln Asn Asn Asn Gln His Asn Asp
435 440 445

Gln Ala His His Ser Ser Lys Ser Asn Asn Arg His Asn Asn Asn Asp
450 455 460

[0010]

<210> 5
<211> 598
<212> PRT
<213> 意大利蜜蜂

<220>
<221> 蜂王浆主蛋白5
<222> (1).. (598)

<400> 5

Met Thr Thr Trp Leu Leu Leu Val Val Cys Leu Gly Ile Ala Cys Gln
1 5 10 15

Gly Ile Thr Ser Val Thr Val Arg Glu Asn Ser Pro Arg Lys Leu Ala
20 25 30

Asn Ser Met Asn Val Ile His Glu Trp Lys Tyr Leu Asp Tyr Asp Phe
35 40 45

Gly Ser Asp Glu Arg Arg Gln Ala Ala Met Gln Ser Gly Glu Tyr Asp
50 55 60

His Thr Lys Asn Tyr Pro Phe Asp Val Asp Gln Trp Arg Gly Met Thr
65 70 75 80

Phe Val Thr Val Pro Arg Tyr Lys Gly Val Pro Ser Ser Leu Asn Val
85 90 95

Ile Ser Glu Lys Ile Gly Asn Gly Gly Arg Leu Leu Gln Pro Tyr Pro
100 105 110

Asp Trp Ser Trp Ala Asn Tyr Lys Asp Cys Ser Gly Ile Val Ser Ala
115 120 125

Tyr Lys Ile Ala Ile Asp Lys Phe Asp Arg Leu Trp Ile Leu Asp Ser
130 135 140

Gly Ile Ile Asn Asn Thr Gln Pro Met Cys Ser Pro Lys Leu His Val
145 150 155 160

Phe Asp Leu Asn Thr Ser His Gln Leu Lys Gln Val Val Met Pro His
165 170 175

[0011]

Asp Ile Ala Val Asn Ala Ser Thr Gly Asn Gly Gly Leu Val Ser Leu
180 185 190

Val Val Gln Ala Met Asp Pro Val Asn Thr Ile Val Tyr Met Ala Asp
195 200 205

Asp Lys Gly Asp Ala Leu Ile Val Tyr Gln Asn Ser Asp Glu Ser Phe
210 215 220

His Arg Leu Thr Ser Asn Thr Phe Asp Tyr Asp Pro Lys Tyr Ile Lys
225 230 235 240

Met Met Asp Ala Gly Glu Ser Phe Thr Ala Gln Asp Gly Ile Phe Gly
245 250 255

Met Ala Leu Ser Pro Met Thr Asn Asn Leu Tyr Tyr Ser Pro Leu Ser
260 265 270

Ser Arg Ser Leu Tyr Tyr Val Asn Thr Lys Pro Phe Met Lys Ser Glu
275 280 285

	Tyr	Gly	Ala	Asn	Asn	Val	Gln	Tyr	Gln	Gly	Val	Gln	Asp	Ile	Phe	Asn
	290						295					300				
	Thr	Glu	Ser	Ile	Ala	Lys	Ile	Met	Ser	Lys	Asn	Gly	Val	Leu	Phe	Phe
	305					310					315					320
	Gly	Leu	Met	Asn	Asn	Ser	Ala	Ile	Gly	Cys	Trp	Asn	Glu	His	Gln	Pro
				325						330					335	
	Leu	Gln	Arg	Glu	Asn	Met	Asp	Met	Val	Ala	Gln	Asn	Glu	Glu	Thr	Leu
				340					345					350		
	Gln	Thr	Val	Val	Ala	Met	Lys	Met	Met	His	Leu	Pro	Gln	Ser	Asn	Lys
		355						360					365			
	Met	Asn	Arg	Met	His	Arg	Met	Asn	Arg	Val	Asn	Arg	Val	Asn	Arg	Met
	370						375					380				
	Asp	Arg	Met	Asp	Arg	Ile	Asp	Arg	Met	Asp	Arg	Met	Asp	Arg	Met	Asp
	385					390					395					400
[0012]	Thr	Met	Asp	Thr	Met	Asp	Arg	Ile	Asp	Arg	Met	Asp	Arg	Met	Asp	Arg
					405					410					415	
	Ile	Asp	Arg	Ile	Asp	Arg	Met	His	Thr	Met	Asp	Thr	Met	Asp	Thr	Met
				420					425					430		
	Asp	Arg	Thr	Asp	Lys	Met	Ser	Ser	Met	Asp	Arg	Met	Asp	Arg	Met	Asp
		435						440					445			
	Arg	Val	Asp	Arg	Met	Asp	Thr	Met	Asp	Arg	Thr	Asp	Lys	Met	Ser	Ser
	450						455					460				
	Met	Asp	Arg	Met	Asp	Arg	Met	Asp	Arg	Val	Asp	Thr	Met	Asp	Thr	Met
	465					470					475					480
	Asp	Thr	Met	Asp	Arg	Met	Asp	Arg	Met	Asp	Arg	Met	Asp	Arg	Met	Asp
				485						490					495	
	Arg	Met	Asp	Arg	Met	Asp	Thr	Met	Asp	Arg	Thr	Asp	Lys	Met	Ser	Arg
				500					505					510		
	Ile	Asp	Arg	Met	Asp	Lys	Ile	Asp	Arg	Met	Asp	Arg	Met	Asp	Arg	Thr

515	520	525
Asn Arg Met Asp Arg Met 530	Asn Arg Met Asn Arg 535	Gln Met Asn Glu Tyr 540
Met Met Ala Leu Ser 545	Met Lys Leu Gln Lys 550	Phe Ile Asn Asn Asp Tyr 555 560
Asn Phe Asn Glu Val 565	Asn Phe Arg Ile Leu Gly Ala 570	Asn Val Asn Asp 575
Leu Ile Met Asn Thr Arg Cys Ala 580	Asn Ser Asp Asn Gln 585	Asn Asn Asn 590
Gln Asn Lys His Asn Asn 595		

<210> 6
 <211> 437
 <212> PRT
 <213> 意大利蜜蜂

[0013]

<220>
 <221> 蜂王浆主蛋白6
 <222> (1)..(437)
 <400> 6

Met Thr Asn Trp Leu Leu Leu Ile Val Cys Leu Ser Ile Ala Cys Gln 1 5 10 15
Asp Val Thr Ser Ala Ile His Gln Arg Lys Ser Ser Lys Asn Leu Glu 20 25 30
His Ser Met Asn Val Ile His Glu Trp Lys Tyr Ile Asp Tyr Asp Phe 35 40 45
Gly Ser Asp Glu Lys Arg Gln Ala Ala Ile Gln Ser Gly Glu Tyr Asp 50 55 60
Tyr Thr Lys Asn Tyr Pro Phe Asp Val Asp Gln Trp His Asn Lys Thr 65 70 75 80
Phe Leu Ala Val Ile Arg Tyr Asp Gly Val Pro Ser Ser Leu Asn Val 85 90 95

Ile Ser Glu Lys Ile Gly Asn Gly Gly Cys Leu Leu Gln Pro Tyr Pro
100 105 110

Asp Trp Ser Trp Ala Asn Tyr Lys Asp Cys Ser Gly Ile Val Ser Ala
115 120 125

Tyr Lys Ile Ala Ile Asp Lys Phe Asp Arg Leu Trp Val Leu Asp Ser
130 135 140

Gly Leu Ile Asn Asn Ile Gln Leu Met Cys Ser Pro Lys Leu Leu Ala
145 150 155 160

Phe Asp Leu Asn Thr Ser Lys Leu Leu Lys Gln Ile Glu Ile Pro His
165 170 175

Asn Ile Ala Val Asn Ala Ser Thr Gly Met Gly Gly Pro Val Ser Leu
180 185 190

Val Val Gln Ala Met Asp Pro Met Asn Thr Thr Val Tyr Ile Ala Asp
195 200 205

[0014]

Asp Arg Gly Asp Ala Leu Ile Ile Tyr Gln Asn Ser Asp Asp Ser Phe
210 215 220

His Arg Leu Thr Ser Lys Thr Phe Asp Asn Asp Leu Arg Tyr Ser Glu
225 230 235 240

Leu Ala Val Ala Gly Glu Ser Phe Thr Val His Asp Gly Ile Phe Gly
245 250 255

Met Ala Leu Ser Pro Val Thr Asn Asn Leu Tyr Tyr Ser Pro Leu Thr
260 265 270

Ser His Ser Leu Tyr Tyr Val Asn Met Glu Pro Phe Met Lys Ser Gln
275 280 285

Tyr Glu Glu Asn Asn Ile Glu Tyr Glu Gly Ile Gln Asp Ile Phe Asn
290 295 300

Thr Gln Ser Ser Ala Lys Val Met Ser Lys Asn Gly Val Leu Phe Phe
305 310 315 320

Gly Leu Val Asn Asn Ser Ala Ile Gly Cys Trp Asn Glu His Gln Pro
325 330 335

Leu Gln Arg Gln Asn Met Asp Met Val Ala Gln Asn Glu Lys Thr Leu
340 345 350

Gln Met Ile Ile Ser Val Lys Ile Ile Gln Asn Leu Ala Tyr Ser Gly
355 360 365

Arg Met Asn Arg Ile His Lys Asn Glu Tyr Met Leu Ala Leu Ser Asn
370 375 380

Arg Met Gln Lys Ile Val Asn Asn Asp Phe Asn Phe Asp Glu Val Asn
385 390 395 400

Phe Arg Ile Leu Gly Ala Asn Val Asn Asn Leu Ile Lys Asn Thr Arg
405 410 415

Cys Ala Lys Ser Asn Asn Gln Asn Asn Asn Gln Asn Lys Tyr Lys Asn
420 425 430

[0015]

Gln Ala His Leu Asp
435

<210> 7
<211> 443
<212> PRT
<213> 意大利蜜蜂

<220>
<221> 蜂王浆主蛋白7
<222> (1).. (443)

<400> 7

Met Thr Arg Trp Leu Phe Met Val Ala Cys Leu Gly Ile Ala Cys Gln
1 5 10 15

Gly Ala Ile Leu Arg Glu Asn Ser Ala Arg Asn Leu Lys Asn Ser Leu
20 25 30

Lys Val Met His Glu Trp Lys Tyr Ile Asp Tyr Asp Phe Gly Ser Glu
35 40 45

	Glu	Lys	Arg	Gln	Ala	Ala	Ile	Gln	Ser	Asp	Glu	Tyr	Asp	His	Thr	Lys	
	50						55				60						
	Asn	Tyr	Pro	Phe	Asp	Val	Asp	Gln	Trp	Arg	Asp	Lys	Thr	Phe	Val	Thr	
	65					70					75					80	
	Val	Leu	Arg	Tyr	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Ser	Leu	Asn	Val	Ile	Ser	Glu	
					85					90					95		
	Lys	Thr	Gly	Asn	Gly	Gly	Arg	Leu	Leu	Gln	Pro	Tyr	Pro	Asp	Trp	Ser	
				100					105					110			
	Trp	Thr	Lys	Tyr	Lys	Asp	Cys	Ser	Gly	Ile	Val	Ser	Ala	Tyr	Ser	Ile	
			115					120					125				
	Ala	Ile	Asp	Lys	Phe	Asp	Arg	Leu	Trp	Val	Leu	Asp	Ser	Gly	Leu	Val	
		130					135					140					
	Asn	Asn	Thr	Gln	Pro	Met	Cys	Phe	Pro	Lys	Leu	Leu	Val	Phe	Asp	Leu	
	145					150					155					160	
[0016]	Asn	Ser	Ser	Gln	Leu	Ile	Lys	Gln	Val	Asp	Ile	Pro	His	Glu	Ile	Ala	
				165						170					175		
	Val	Asn	Thr	Thr	Thr	Glu	Gln	Gly	Arg	Leu	Lys	Ser	Leu	Ala	Val	Gln	
				180					185					190			
	Ala	Ile	Ser	Ser	Val	Asn	Thr	Leu	Val	Tyr	Ile	Ala	Asp	Asn	Lys	Gly	
		195						200					205				
	Asp	Gly	Leu	Ile	Val	Tyr	Gln	Asn	Ser	Asp	Asp	Ser	Phe	His	Arg	Leu	
	210						215					220					
	Thr	Ser	Asn	Thr	Phe	Asn	Tyr	Asp	Pro	Arg	Tyr	Thr	Lys	Met	Thr	Val	
	225					230					235					240	
	Glu	Gly	Glu	Ser	Phe	Thr	Val	Gln	Asp	Gly	Ile	Tyr	Gly	Met	Ala	Leu	
					245					250					255		
	Ser	Pro	Met	Thr	Asn	Asn	Leu	Tyr	Tyr	Ser	Pro	Leu	Ala	Ser	Arg	Asp	
				260					265					270			
	Leu	Tyr	Tyr	Val	Asn	Thr	Lys	Pro	Phe	Ile	Lys	Ser	Glu	Tyr	Gly	Glu	

	275	280	285
	Asn Lys Val Gln Tyr Asn Gly Val Gln Asp Val Phe Asn Thr Gln Thr 290 295 300		
	Thr Ala Lys Ala Val Ser Lys Asn Gly Ile Leu Phe Phe Gly Leu Val 305 310 315 320		
	Asn Asn Thr Ala Val Gly Cys Trp Asn Glu His Gln Thr Leu Gln Arg 325 330 335		
	Glu Asn Thr Asp Met Val Ala Gln Asn Glu Glu Thr Leu Gln Met Ile 340 345 350		
	Val Gly Met Lys Ile Lys Gln Leu Leu Pro His Ile Val Ile Ile Asp 355 360 365		
	Ile Asp Asn Ile Ile Asn Asp Glu Tyr Met Leu Val Leu Thr Asn Arg 370 375 380		
[0017]	Met Gln Lys Ile Leu Asn Asn Asp Leu Asn Phe Asn Asp Ile Asn Phe 385 390 395 400		
	Arg Ile Leu Ile Gly Gly Val Ser Asp Leu Leu Glu Asn Thr Arg Cys 405 410 415		
	Thr Asn Phe Asn Ile Gln Asn Asp Asp Ser Asp Glu Asn Asn Asp Asp 420 425 430		
	Ser Ile Arg Ile Thr Ile Asp Ala Ser Phe Asn 435 440		
	<210> 8 <211> 416 <212> PRT <213> 意大利蜜蜂		
	<220> <221> 蜂王浆主蛋白8 <222> (1)..(416)		
	<400> 8		
	Met Ile Arg Trp Leu Leu Leu Met Tyr Leu Gly Ile Thr Cys Gln Gly 1 5 10 15		

Val Thr Asp Ile His Ser Arg Asn Leu Thr Asn Ser Leu Lys Val Ile
20 25 30

Tyr Glu Trp Lys Tyr Ile Asp Tyr Asp Phe Gly Ser Asp Glu Lys Arg
35 40 45

Gln Ala Ala Ile Gln Ser Gly Asp Tyr Asn Tyr Thr Met Asn Tyr Leu
50 55 60

Leu Asp Thr Asp Gln Trp Gly Asp Lys Thr Phe Val Ile Ile Met Lys
65 70 75 80

Phe Asn Gly Val Pro Ser Ser Leu Asn Val Ile Thr Asn Lys Thr Gly
85 90 95

Asn Gly Gly Pro Leu Leu Ala Pro Tyr Pro Asp Trp Thr Trp Ala Lys
100 105 110

Asn Glu Asn Cys Ser Gly Ile Thr Ser Ala Tyr Lys Ile Glu Ile Asp
115 120 125

[0018]

Met Cys Asp Arg Leu Trp Val Leu Asp Ser Gly Leu Ile Asn Asn Val
130 135 140

Arg Ser Val Cys Pro Pro Gln Leu Leu Val Phe Asp Leu Asn Thr Ser
145 150 155 160

Gln Leu Leu Lys Gln Val Lys Ile Pro His Asp Ile Ala Val Asn Thr
165 170 175

Thr Thr Glu Lys Gly Ala Leu Val Thr Leu Ser Val Gln Leu Leu Ser
180 185 190

Cys Glu Val Asn Gly Ser Thr Leu Val Tyr Ile Gly Asp Asn Glu Gly
195 200 205

Phe Ala Leu Ile Ile Tyr Asn Asn Ser Asp Asn Ser Phe Gln Arg Leu
210 215 220

Thr Ser Ser Thr Phe Ala Ser Asp Pro Arg Tyr Thr Thr Phe Thr Ile
225 230 235 240

Asn Gly Glu Ser Phe Thr Leu Gln Ser Gly Ile Phe Gly Met Ala Leu
245 250 255

Ser Pro Leu Thr Gln Asn Leu Tyr Tyr Ser Ala Leu Ser Ser His Asn
260 265 270

Leu Asn Tyr Val Asn Thr Glu Gln Phe Val Lys Ser Gln Tyr Gln Ala
275 280 285

Asn Asn Val His Tyr Gln Gly Lys Glu Asn Ile Leu Trp Thr Gln Ala
290 295 300

Ser Ala Lys Gly Ile Ser Asp Asn Gly Val Leu Phe Phe Gly Leu Val
305 310 315 320

Gly Asp Thr Ser Leu Ala Cys Trp Asn Glu Asn Arg Leu Leu Asp Arg
325 330 335

Arg Asn Ile Glu Val Val Ala Lys Asn Lys Glu Thr Leu Gln Ala Ile
340 345 350

[0019]

Thr Gly Leu Lys Val Lys Arg Arg Ile Ser Phe Ile Leu Val His Gly
355 360 365

Phe Pro Leu Glu Tyr Glu Tyr Val Leu Ala Val Ser Asn Arg Ile Gln
370 375 380

Lys Val Ile Tyr Gly Phe Asp Phe Asn Asp Val Asn Phe Arg Ile Leu
385 390 395 400

Ile Ala Asn Val Asn Asp Leu Ile Lys Asn Thr Arg Cys Ile Ser Pro
405 410 415

<210> 9
<211> 423
<212> PRT
<213> 意大利蜜蜂

<220>
<221> 蜂王浆主蛋白9
<222> (1)..(423)

<400> 9

	Met	Ser	Phe	Asn	Ile	Trp	Trp	Leu	Ile	Leu	Tyr	Phe	Ser	Ile	Val	Cys
	1				5					10					15	
	Gln	Ala	Lys	Ala	His	Tyr	Ser	Leu	Arg	Asp	Phe	Lys	Ala	Asn	Ile	Phe
				20					25					30		
	Gln	Val	Lys	Tyr	Gln	Trp	Lys	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Asn	Phe	Gly	Ser	Asp
			35					40					45			
	Glu	Lys	Arg	Gln	Ala	Ala	Ile	Gln	Ser	Gly	Glu	Tyr	Asn	Tyr	Lys	Asn
		50					55					60				
	Asn	Val	Pro	Ile	Asp	Val	Asp	Arg	Trp	Asn	Gly	Lys	Thr	Phe	Val	Thr
	65					70					75					80
	Ile	Leu	Arg	Asn	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Ser	Leu	Asn	Val	Ile	Ser	Asn
					85					90					95	
	Lys	Ile	Gly	Asn	Gly	Gly	Pro	Leu	Leu	Glu	Pro	Tyr	Pro	Asn	Trp	Ser
				100					105					110		
[0020]	Trp	Ala	Lys	Asn	Gln	Asn	Cys	Ser	Gly	Ile	Thr	Ser	Val	Tyr	Arg	Ile
			115					120					125			
	Ala	Ile	Asp	Glu	Trp	Asp	Arg	Leu	Trp	Val	Leu	Asp	Asn	Gly	Ile	Ser
		130					135					140				
	Gly	Glu	Thr	Ser	Val	Cys	Pro	Ser	Gln	Ile	Val	Val	Phe	Asp	Leu	Lys
	145					150					155					160
	Asn	Ser	Lys	Leu	Leu	Lys	Gln	Val	Lys	Ile	Pro	His	Asp	Ile	Ala	Ile
					165					170					175	
	Asn	Ser	Thr	Thr	Gly	Lys	Arg	Asn	Val	Val	Thr	Pro	Ile	Val	Gln	Ser
				180					185					190		
	Phe	Asp	Tyr	Asn	Asn	Thr	Trp	Val	Tyr	Ile	Ala	Asp	Val	Glu	Gly	Tyr
		195						200					205			
	Ala	Leu	Ile	Ile	Tyr	Asn	Asn	Ala	Asp	Asp	Ser	Phe	Gln	Arg	Leu	Thr
		210					215					220				
	Ser	Ser	Thr	Phe	Val	Tyr	Asp	Pro	Arg	Tyr	Thr	Lys	Tyr	Thr	Ile	Asn

	225				230					235					240	
	Asp	Glu	Ser	Phe	Ser	Leu	Gln	Asp	Gly	Ile	Leu	Gly	Met	Ala	Leu	Ser
					245					250					255	
	His	Lys	Thr	Gln	Asn	Leu	Tyr	Tyr	Ser	Ala	Met	Ser	Ser	His	Asn	Leu
				260					265					270		
	Asn	Tyr	Val	Asn	Thr	Lys	Gln	Phe	Thr	Gln	Gly	Lys	Phe	Gln	Ala	Asn
			275					280					285			
	Asp	Ile	Gln	Tyr	Gln	Gly	Ala	Ser	Asp	Ile	Leu	Trp	Thr	Gln	Ala	Ser
		290					295					300				
	Ala	Lys	Ala	Ile	Ser	Glu	Thr	Gly	Ala	Leu	Phe	Phe	Gly	Leu	Val	Ser
	305					310					315					320
	Asp	Thr	Ala	Leu	Gly	Cys	Trp	Asn	Glu	Asn	Arg	Pro	Leu	Lys	Arg	Arg
				325						330					335	
[0021]	Asn	Ile	Glu	Ile	Val	Ala	Lys	Asn	Asn	Asp	Thr	Leu	Gln	Phe	Ile	Ser
			340						345					350		
	Gly	Ile	Lys	Ile	Ile	Lys	Gln	Ile	Ser	Ser	Asn	Ile	Tyr	Glu	Arg	Gln
			355					360					365			
	Asn	Asn	Glu	Tyr	Ile	Trp	Ile	Val	Ser	Asn	Lys	Tyr	Gln	Lys	Ile	Ala
		370					375					380				
	Asn	Gly	Asp	Leu	Asn	Phe	Asn	Glu	Val	Asn	Phe	Arg	Ile	Leu	Asn	Ala
	385					390					395					400
	Pro	Val	Asn	Gln	Leu	Ile	Arg	Tyr	Thr	Arg	Cys	Glu	Asn	Pro	Lys	Thr
				405						410					415	
	Asn	Phe	Phe	Ser	Ile	Phe	Leu									
			420													
	<210>	10														
	<211>	6														
	<212>	PRT														
	<213>	人工序列														
	<220>															

	<223>	蜂王浆主蛋白片段
	<400>	10
	Lys Ile Ser Ile His Leu	
	1	5
	<210>	11
	<211>	8
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	蜂王浆主蛋白片段
	<400>	11
	Lys Asn Asn Asn Gln Asn Asp Asn	
	1	5
	<210>	12
	<211>	3
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
[0022]	<220>	
	<223>	蜂王浆主蛋白片段
	<400>	12
	Lys Leu His	
	1	
	<210>	13
	<211>	10
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	蜂王浆主蛋白片段
	<400>	13
	Lys Ser Asn Asn Arg His Asn Asn Asn Asp	
	1	5 10
	<210>	14
	<211>	4
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	蜂王浆主蛋白片段

	<400>	14
	Lys His Asn Asn	
	1	
	<210>	15
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	蜂王浆主蛋白片段
	<400>	15
	Lys Asn Gln Ala His Leu Asp	
	1	5
	<210>	16
	<211>	8
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	蜂王浆主蛋白片段
[0023]	<400>	16
	Lys Asn Thr Arg Cys Ile Ser Pro	
	1	5
	<210>	17
	<211>	9
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	蜂王浆主蛋白片段
	<400>	17
	Lys Thr Asn Phe Phe Ser Ile Phe Leu	
	1	5
	<210>	18
	<211>	8
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	蜂王浆主蛋白片段

<400> 18

Pro Phe Lys Ile Ser Ile His Leu
1 5

<210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> 乙酰化

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> 羧基末端

<400> 19

[0024] Pro Phe Lys Ile Ser Ile His Leu
1 5

<210> 20

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> 乙酰化

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> 羧基末端

<400> 20

Lys Ile Ser Ile His Leu
1 5

<210> 21

	<211> 4
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 合成肽
	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (1)..(1)
	<223> 乙酰化
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (4)..(4)
	<223> 羧基末端
	<400> 21
	Lys Ile Ser Ile
	1
[0025]	<210> 22
	<211> 4
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 合成肽
	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (1)..(1)
	<223> 乙酰化
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (4)..(4)
	<223> 羧基末端
	<400> 22
	Pro Phe Lys Ile
	1
	<210> 23
	<211> 10
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 蜂王浆主蛋白片段

	<400>	23
	Asn Gln Lys Asn Asn Asn Gln Asn Asp Asn	
	1	5 10
	<210>	24
	<211>	10
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成肽
	<220>	
	<221>	MOD_RES
	<222>	(1)..(1)
	<223>	乙酰化
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(10)..(10)
	<223>	羧基末端
	<400>	24
[0026]	Asn Gln Lys Asn Asn Asn Gln Asn Asp Asn	
	1	5 10
	<210>	25
	<211>	8
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成肽
	<220>	
	<221>	MOD_RES
	<222>	(1)..(1)
	<223>	乙酰化
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(8)..(8)
	<223>	羧基末端
	<400>	25
	Asn Gln Lys Asn Asn Asn Gln Asn	
	1	5
	<210>	26

	<211>	6
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成肽
	<220>	
	<221>	MOD_RES
	<222>	(1)..(1)
	<223>	乙酰化
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(6)..(6)
	<223>	羧基末端
	<400>	26
	Asn Gln Lys Asn Asn Asn	
	1	5
	<210>	27
	<211>	4
	<212>	PRT
[0027]	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成肽
	<220>	
	<221>	MOD_RES
	<222>	(1)..(1)
	<223>	乙酰化
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(4)..(4)
	<223>	羧基末端
	<400>	27
	Asn Gln Lys Asn	
	1	
	<210>	28
	<211>	2
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 乙酰化

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> 羧基末端

<400> 28

Lys Asn
1

<210> 29
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 蜂王浆主蛋白片段

<400> 29

[0028] His His Ser Ser Lys Leu His
1 5

<210> 30
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 乙酰化

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> 羧基末端

<400> 30

His Ser Ser Lys Leu His
1 5

<210> 31

	<211> 4
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 合成肽
	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (1)..(1)
	<223> 乙酰化
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (4)..(4)
	<223> 羧基末端
	<400> 31
	Ser Lys Leu His
	1
[0029]	<210> 32
	<211> 2
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 合成肽
	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (1)..(1)
	<223> 乙酰化
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (2)..(3)
	<223> 羧基末端
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (2)..(2)
	<223> 羧基末端
	<400> 32
	Ser Lys
	1
	<210> 33
	<211> 4
	<212> PRT

	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成肽
	<220>	
	<221>	MOD_RES
	<222>	(1)..(1)
	<223>	乙酰化
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(4)..(4)
	<223>	羧基末端
	<400>	33
	His Ser Ser Lys	
	1	
	<210>	34
	<211>	4
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
[0030]	<220>	
	<223>	合成肽
	<220>	
	<221>	MOD_RES
	<222>	(1)..(1)
	<223>	乙酰化
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(4)..(4)
	<223>	羧基末端
	<400>	34
	Ser Ser Lys Ser	
	1	
	<210>	35
	<211>	13
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	蜂王浆主蛋白片段
	<400>	35

His Ser Ser Lys Ser Asn Asn Arg His Asn Asn Asn Asp
1 5 10

<210> 36
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 乙酰化

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> 羧基末端

<400> 36

Ser Ser Lys Ser Asn Asn Arg His Asn Asn Asn Asp
1 5 10

[0031]

<210> 37
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 乙酰化

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> 羧基末端

<400> 37

Ser Ser Lys Ser Asn Asn Arg His Asn Asn
1 5 10

<210> 38
<211> 8
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> 乙酰化

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> 羧基末端

<400> 38

Ser Ser Lys Ser Asn Asn Arg His
1 5

<210> 39

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

[0032]

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> 乙酰化

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> CARBOXYL TERMINUS

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> 羧基末端

<400> 39

Ser Ser Lys Ser Asn Asn
1 5

<210> 40

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 乙酰化

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> 羧基末端

<400> 40

Ser Ser Lys Ser
1

<210> 41
<211> 2
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

[0033]

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 乙酰化

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> 羧基末端

<400> 41

Lys Ser
1

<210> 42
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 蜂王浆主蛋白片段

<400> 42

Gln Asn Lys His Asn Asn
1 5

<210> 43
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 乙酰化

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> 羧基末端

<400> 43

Gln Asn Lys His Asn Asn
1 5

[0034]

<210> 44
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 乙酰化

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> 羧基末端

<400> 44

Lys His Asn Asn
1

<210> 45
<211> 2
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 乙酰化

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> 羧基末端

<400> 45

Lys His
1

<210> 46
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

[0035]

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 乙酰化

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> 羧基末端

<400> 46

Gln Asn Lys His
1

<210> 47
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 蜂王浆主蛋白片段

<400> 47

Met His Arg
1

<210> 48
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 乙酰化

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> 羧基末端

<400> 48

Leu Val Lys
1

[0036]

<210> 49
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 乙酰化

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> 氨酰化

<400> 49

Leu Val Lys
1

<210> 50
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> 氨基末端

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> 羧基末端

<400> 50

Phe Asp Arg
1

<210> 51
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

[0037]

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 乙酰化

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> 羧基末端

<400> 51

Leu Ile Arg
1

<210> 52
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)

	<223>	乙酰化
	<220>	
	<221>	MOD_RES
	<222>	(3)..(3)
	<223>	氨酰化
	<400>	52
	Leu Ile Arg	
	1	
	<210>	53
	<211>	3
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成肽
	<220>	
	<221>	MOD_RES
	<222>	(1)..(1)
	<223>	乙酰化
[0038]	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(3)..(3)
	<223>	羧基末端
	<400>	53
	Phe Asp Arg	
	1	
	<210>	54
	<211>	4
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成肽
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(1)..(1)
	<223>	氨基末端
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(4)..(4)
	<223>	羧基末端

<400> 54

His Asn Ile Arg
1

<210> 55

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 蜂王浆主蛋白片段

<400> 55

Leu Gln Lys
1

<210> 56

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

[0039]

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> 乙酰化

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> 羧基末端

<400> 56

Leu Leu Lys
1

<210> 57

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

	<223>	乙酰化
	<220>	
	<221>	MOD_RES
	<222>	(3)..(3)
	<223>	氨酰化
	<400>	57
	Leu Leu Lys	
	1	
	<210>	58
	<211>	2
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成肽
	<220>	
	<221>	MOD_RES
	<222>	(1)..(1)
	<223>	乙酰化
[0040]	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(2)..(2)
	<223>	羧基末端
	<400>	58
	Lys Ile	
	1	
	<210>	59
	<211>	4
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成肽
	<220>	
	<221>	MOD_RES
	<222>	(1)..(1)
	<223>	乙酰化
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(4)..(4)
	<223>	羧基末端

	<400> 59
	His Asn Ile Arg
	1
	<210> 60
	<211> 3
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 合成肽
	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (1)..(1)
	<223> 乙酰化
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (3)..(3)
	<223> 羧基末端
	<400> 60
[0041]	Phe Ala Lys
	1
	<210> 61
	<211> 4
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 蜂王浆主蛋白片段
	<400> 61
	Pro Phe Lys Ile
	1
	<210> 62
	<211> 4
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 蜂王浆主蛋白片段
	<400> 62
	Lys Ile Ser Ile
	1

<210> 63
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 蜂王浆主蛋白片段

<400> 63

Lys Ile Ser Ile His Leu
1 5

<210> 64
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 蜂王浆主蛋白片段

<400> 64

Pro Phe Lys Ile Ser Ile His Leu
1 5

[0042]

<210> 65
<211> 2
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 蜂王浆主蛋白片段

<400> 65

Lys Asn
1

<210> 66
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 蜂王浆主蛋白片段

<400> 66

Asn Gln Lys Asn
1

<210> 67
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 蜂王浆主蛋白片段

<400> 67

Asn Gln Lys Asn Asn Asn
1 5

<210> 68
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 蜂王浆主蛋白片段

<400> 68

Asn Gln Lys Asn Asn Asn Gln Asn
1 5

[0043]

<210> 69
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 蜂王浆主蛋白片段

<400> 69

Asn Gln Lys Asn Asn Asn Gln Asn Asp Asn
1 5 10

<210> 70
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 蜂王浆主蛋白片段

<400> 70

His Ser Ser Lys Leu His
1 5

	<210> 71
	<211> 4
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 蜂王浆主蛋白片段
	<400> 71
	Ser Lys Leu His
	1
	<210> 72
	<211> 2
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 蜂王浆主蛋白片段
	<400> 72
	Ser Lys
	1
[0044]	<210> 73
	<211> 4
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 蜂王浆主蛋白片段
	<400> 73
	His Ser Ser Lys
	1
	<210> 74
	<211> 4
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 蜂王浆主蛋白片段
	<400> 74
	Ser Ser Lys Ser
	1
	<210> 75

<211> 2
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 蜂王浆主蛋白片段

<400> 75

Lys Ser
1

<210> 76
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 蜂王浆主蛋白片段

<400> 76

Ser Ser Lys Ser Asn Asn Arg His Asn Asn Asn Asp
1 5 10

[0045]

<210> 77
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 蜂王浆主蛋白片段

<400> 77

Ser Ser Lys Ser Asn Asn
1 5

<210> 78
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 蜂王浆主蛋白片段

<400> 78

Ser Ser Lys Ser Asn Asn Arg His
1 5

<210> 79
<211> 10

	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 蜂王浆主蛋白片段
	<400> 79
	Ser Ser Lys Ser Asn Asn Arg His Asn Asn 1 5 10
	<210> 80
	<211> 2
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 蜂王浆主蛋白片段
	<400> 80
	Lys His 1
[0046]	<210> 81
	<211> 6
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 蜂王浆主蛋白片段
	<400> 81
	Gln Asn Lys His Asn Asn 1 5
	<210> 82
	<211> 4
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 蜂王浆主蛋白片段
	<400> 82
	Lys His Asn Asn 1
	<210> 83
	<211> 4
	<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 蜂王浆主蛋白片段

<400> 83

Gln Asn Lys His
1

<210> 84
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 蜂王浆主蛋白片段

<400> 84

Leu Val Lys
1

[0047] <210> 85
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> 氨基末端

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> 羧基末端

<400> 85

Tyr Ile Asn Arg
1

<210> 86
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 蜂王浆主蛋白片段

<400> 86

Leu Ile Arg
1

<210> 87

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> 乙酰化

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> 羧基末端

<400> 87

[0048]

Tyr Ile Asn Arg
1

<210> 88

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> 氨基末端

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> 羧基末端

<400> 88

Phe Thr Lys
1

<210> 89
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 蜂王浆主蛋白片段

<400> 89

Leu Leu Lys
1

<210> 90
<211> 2
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 蜂王浆主蛋白片段

<400> 90

Lys Ile
1

[0049] <210> 91
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 乙酰化

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> 羧基末端

<400> 91

Phe Thr Lys
1

<210> 92
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> 氨基末端

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> 羧基末端

<400> 92

Ile Phe Val Thr Met Leu Arg
1 5

<210> 93

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

[0050]

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> 乙酰化

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> 羧基末端

<400> 93

Ile Phe Val Thr Met Leu Arg
1 5

<210> 94

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)
<223> 氨基末端

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> 羧基末端

<400> 94

Met Gln Lys
1

<210> 95
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 乙酰化

[0051] <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> 羧基末端

<400> 95

Met Gln Lys
1

<210> 96
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> 氨基末端

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> 羧基末端

<400> 96

Cys Asp Arg
1

<210> 97

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> 乙酰化

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> 羧基末端

<400> 97

[0052]

Cys Asp Arg
1

<210> 98

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> 氨基末端

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> 羧基末端

<400> 98

Met Thr Arg
1

<210> 99
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 乙酰化

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> 羧基末端

<400> 99

Met Thr Arg
1

[0053] <210> 100
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 用三硝基苯磺酸封闭的末端氨基

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> 修饰成包含对硝基苯胺的末端羧基

<400> 100

Phe Ala Lys
1

<210> 101
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> 氨基末端

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> 羧基末端

<400> 101

Gln Asn Asp Asn Lys
1 5

<210> 102
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

[0054] <220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 乙酰化

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> 羧基末端

<400> 102

Gln Asn Asp Asn Lys
1 5

<210> 103
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> 氨基末端

	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (5)..(5)
	<223> 羧基末端
	<400> 103
	Gln Asn Asp Asn Arg
	1 5
	<210> 104
	<211> 5
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 合成肽
	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (1)..(1)
	<223> 乙酰化
[0055]	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (5)..(5)
	<223> 羧基末端
	<400> 104
	Gln Asn Asp Asn Arg
	1 5
	<210> 105
	<211> 5
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 合成肽
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (1)..(1)
	<223> 氨基末端
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (5)..(5)
	<223> 羧基末端
	<400> 105

Gln Asn Gly Asn Lys
1 5

<210> 106
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 乙酰化

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> 羧基末端

<400> 106

Gln Asn Gly Asn Lys
1 5

[0056]

<210> 107
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> 氨基末端

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> 羧基末端

<400> 107

Gln Asn Gly Asn Arg
1 5

<210> 108
<211> 5
<212> PRT

	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成肽
	<220>	
	<221>	MOD_RES
	<222>	(1)..(1)
	<223>	乙酰化
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(5)..(5)
	<223>	羧基末端
	<400>	108
	Gln Asn Gly Asn Arg	
	1	5
	<210>	109
	<211>	3
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
[0057]	<220>	
	<223>	合成肽
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(1)..(1)
	<223>	氨基末端
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(3)..(3)
	<223>	羧基末端
	<400>	109
	Thr Asn Arg	
	1	
	<210>	110
	<211>	3
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成肽
	<220>	

	<221> MOD_RES
	<222> (1)..(1)
	<223> 乙酰化
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (3)..(3)
	<223> 羧基末端
	<400> 110
	Thr Asn Arg
	1
	<210> 111
	<211> 3
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 合成肽
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (1)..(1)
	<223> 氨基末端
[0058]	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (3)..(3)
	<223> 羧基末端
	<400> 111
	Met Asp Lys
	1
	<210> 112
	<211> 3
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 合成肽
	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (1)..(1)
	<223> 乙酰化
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (3)..(3)

<223> 羧基末端
<400> 112
Met Asp Lys
1

<210> 113
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> 氨基末端

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> 羧基末端
[0059] <400> 113
Met Asp Arg
1

<210> 114
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 乙酰化

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> 羧基末端

<400> 114
Met Asp Arg
1

	<210>	115
	<211>	3
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成肽
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(1)..(1)
	<223>	氨基末端
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(3)..(3)
	<223>	羧基末端
	<400>	115
	Thr Asp Lys	
	1	
[0060]	<210>	116
	<211>	3
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成肽
	<220>	
	<221>	MOD_RES
	<222>	(1)..(1)
	<223>	乙酰化
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(3)..(3)
	<223>	羧基末端
	<400>	116
	Thr Asp Lys	
	1	
	<210>	117
	<211>	3
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> 氨基末端

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> 羧基末端

<400> 117

Ile Asp Arg

1

<210> 118

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

[0061]

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> 乙酰化

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> 羧基末端

<400> 118

Ile Asp Arg

1

<210> 119

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> 氨基末端

	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (3)..(3)
	<223> 羧基末端
	<400> 119
	Val Asn Arg
	1
	<210> 120
	<211> 3
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 合成肽
	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (1)..(1)
	<223> 乙酰化
[0062]	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (3)..(3)
	<223> 羧基末端
	<400> 120
	Val Asn Arg
	1
	<210> 121
	<211> 3
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 合成肽
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (1)..(1)
	<223> 氨基末端
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (3)..(3)
	<223> 羧基末端
	<400> 121

Met His Arg
1

<210> 122
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 乙酰化

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> 羧基末端

<400> 122

Met His Arg
1

[0063]

<210> 123
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> 氨基末端

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> 羧基末端

<400> 123

Met Asn Arg
1

<210> 124
<211> 3

	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成肽
	<220>	
	<221>	MOD_RES
	<222>	(1)..(1)
	<223>	乙酰化
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(3)..(3)
	<223>	羧基末端
	<400>	124
	Met Asn Arg	
	1	
	<210>	125
	<211>	3
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
[0064]	<220>	
	<223>	合成肽
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(1)..(1)
	<223>	氨基末端
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(3)..(3)
	<223>	羧基末端
	<400>	125
	Leu Gln Lys	
	1	
	<210>	126
	<211>	3
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 乙酰化

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> 羧基末端

<400> 126

Leu Gln Lys
1

<210> 127
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 蜂王浆主蛋白片段

<400> 127

[0065] Phe Asp Arg
1

<210> 128
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 蜂王浆主蛋白片段

<400> 128

His Asn Ile Arg
1

<210> 129
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 蜂王浆主蛋白片段

<400> 129

Tyr Ile Asn Arg
1

<210> 130
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 蜂王浆主蛋白片段

<400> 130

Phe Thr Lys
1

<210> 131
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 蜂王浆主蛋白片段

<400> 131

Ile Phe Val Thr Met Leu Arg
1 5

[0066]

<210> 132
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 蜂王浆主蛋白片段

<400> 132

Met Gln Lys
1

<210> 133
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 蜂王浆主蛋白片段

<400> 133

Cys Asp Arg
1

	<210>	134
	<211>	3
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	蜂王浆主蛋白片段
	<400>	134
	Met Thr Arg	
	1	
	<210>	135
	<211>	3
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	蜂王浆主蛋白片段
	<400>	135
	Phe Ala Lys	
	1	
[0067]	<210>	136
	<211>	5
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	蜂王浆主蛋白片段
	<400>	136
	Gln Asn Asp Asn Arg	
	1	5
	<210>	137
	<211>	5
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	蜂王浆主蛋白片段
	<400>	137
	Gln Asn Gly Asn Lys	
	1	5
	<210>	138

	<211> 5
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 蜂王浆主蛋白片段
	<400> 138
	Gln Asn Gly Asn Arg
	1 5
	<210> 139
	<211> 3
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 蜂王浆主蛋白片段
	<400> 139
	Thr Asn Arg
	1
[0068]	<210> 140
	<211> 3
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 蜂王浆主蛋白片段
	<400> 140
	Met Asp Lys
	1
	<210> 141
	<211> 3
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 蜂王浆主蛋白片段
	<400> 141
	Met Asn Arg
	1
	<210> 142
	<211> 3

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 蜂王浆主蛋白片段

<400> 142

Met Asp Arg
1

<210> 143
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 蜂王浆主蛋白片段

<400> 143

Thr Asp Lys
1

[0069]

<210> 144
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 蜂王浆主蛋白片段

<400> 144

Ile Asp Arg
1

<210> 145
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 蜂王浆主蛋白片段

<400> 145

Val Asn Arg
1

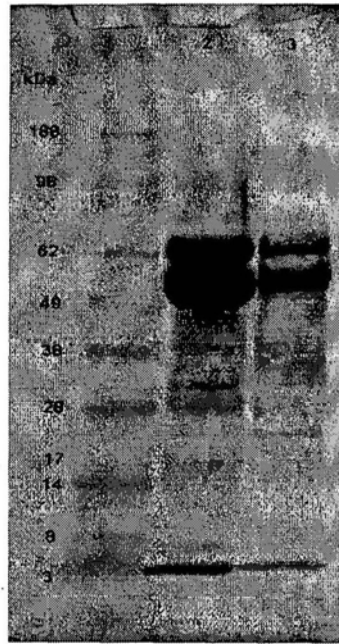


图1A

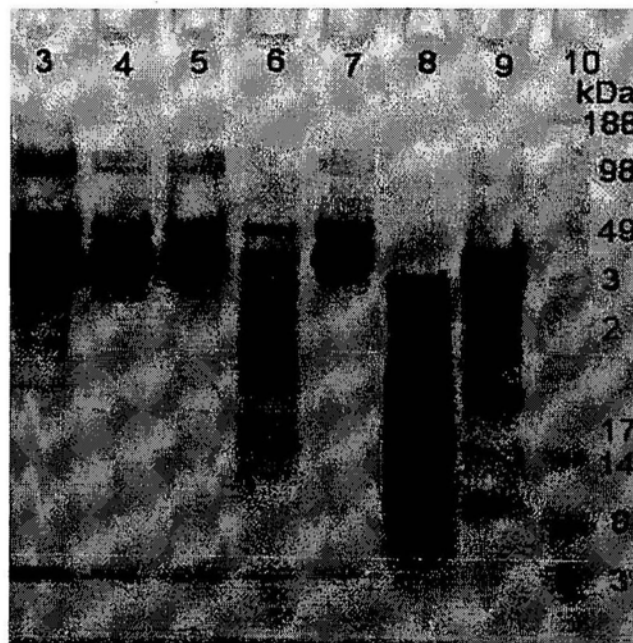


图1B

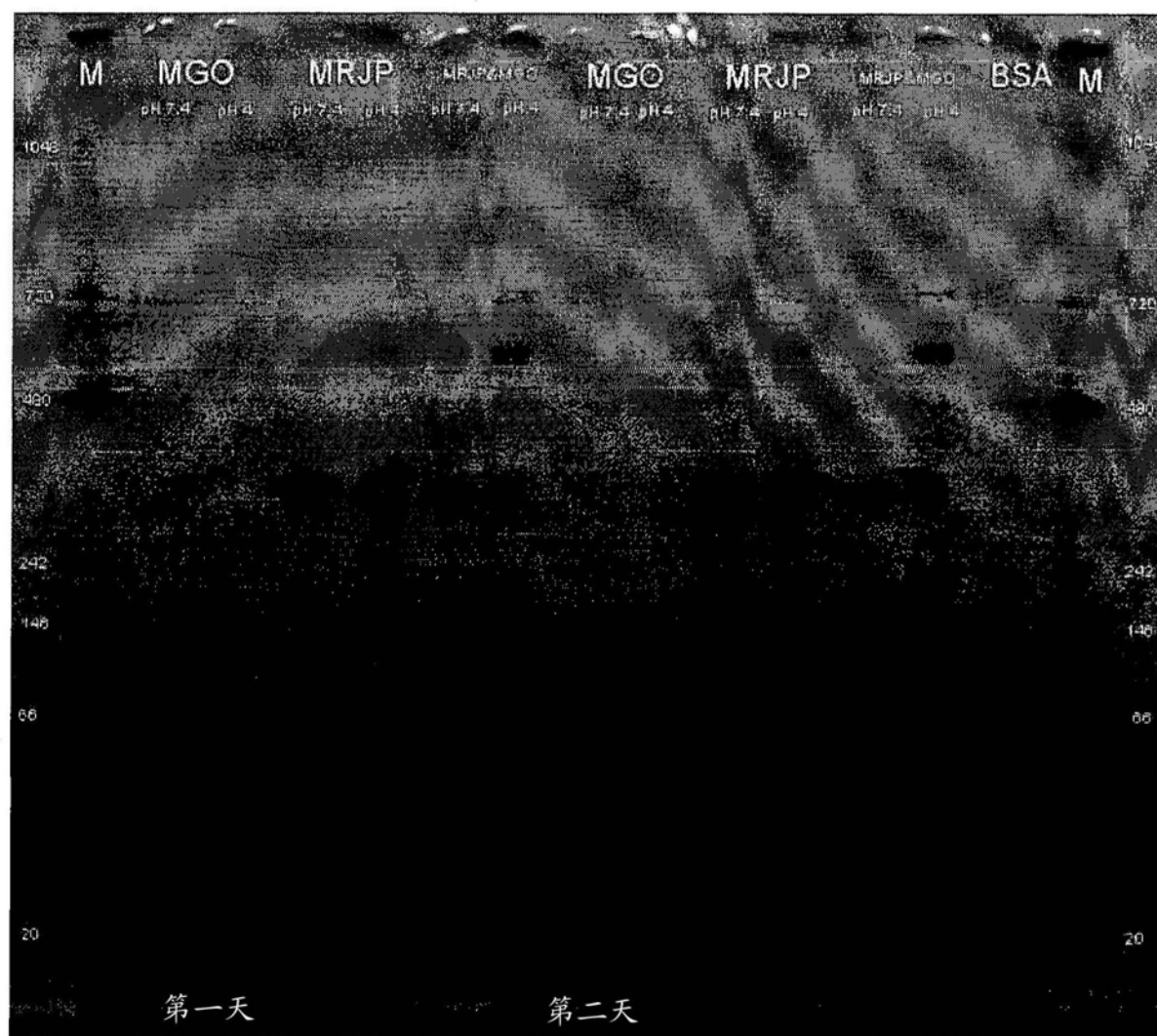


图2

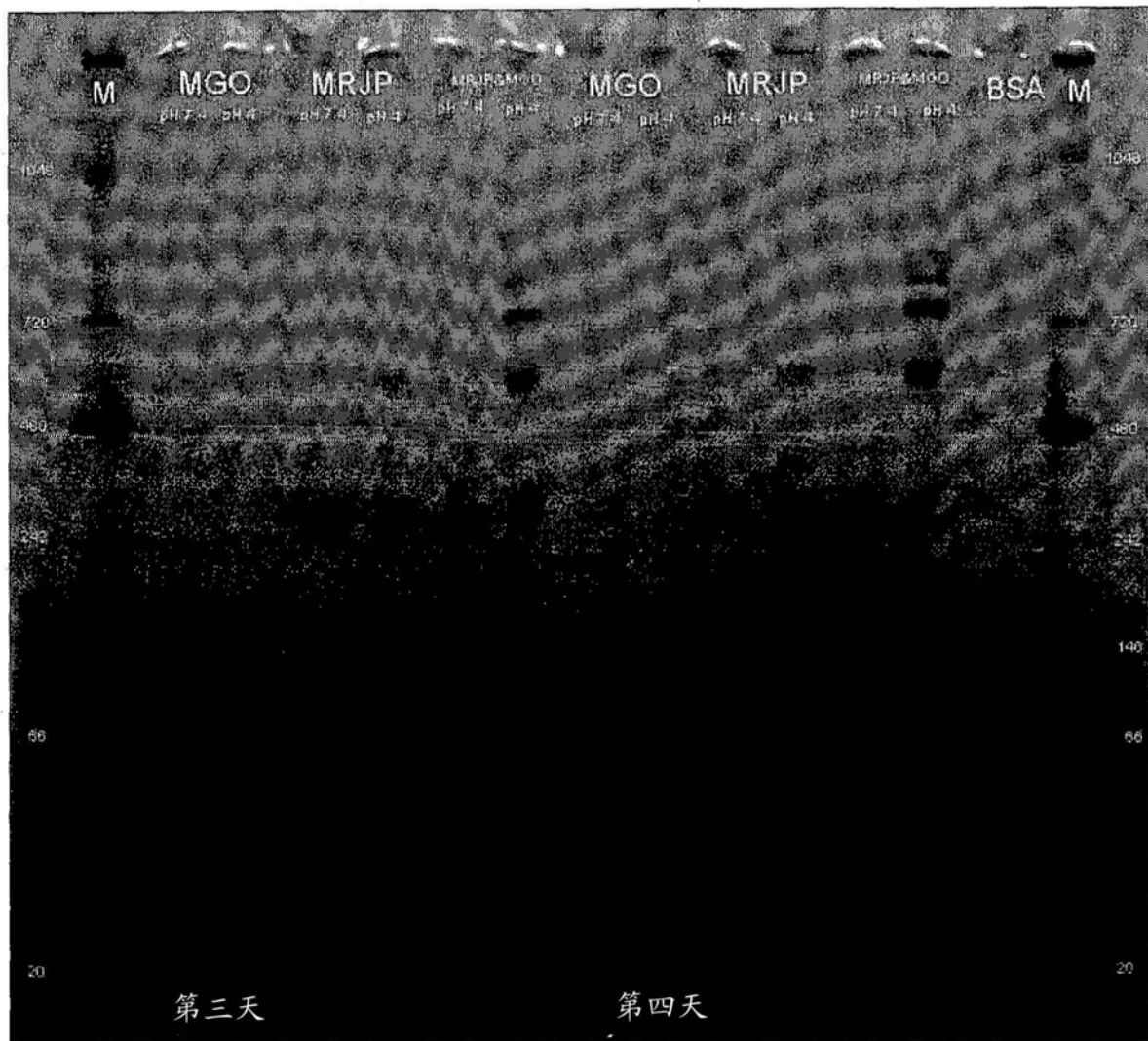


图3

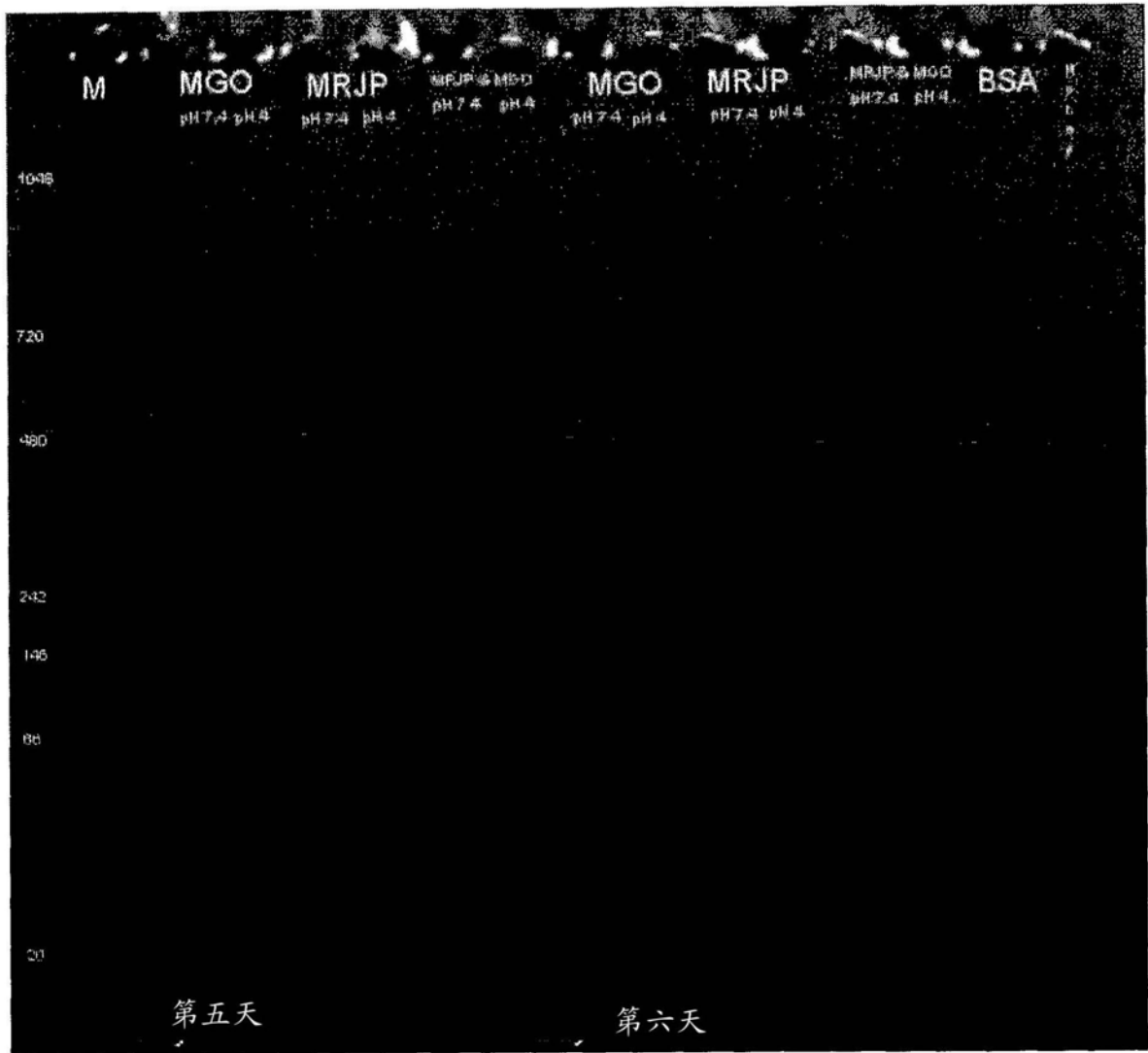


图4

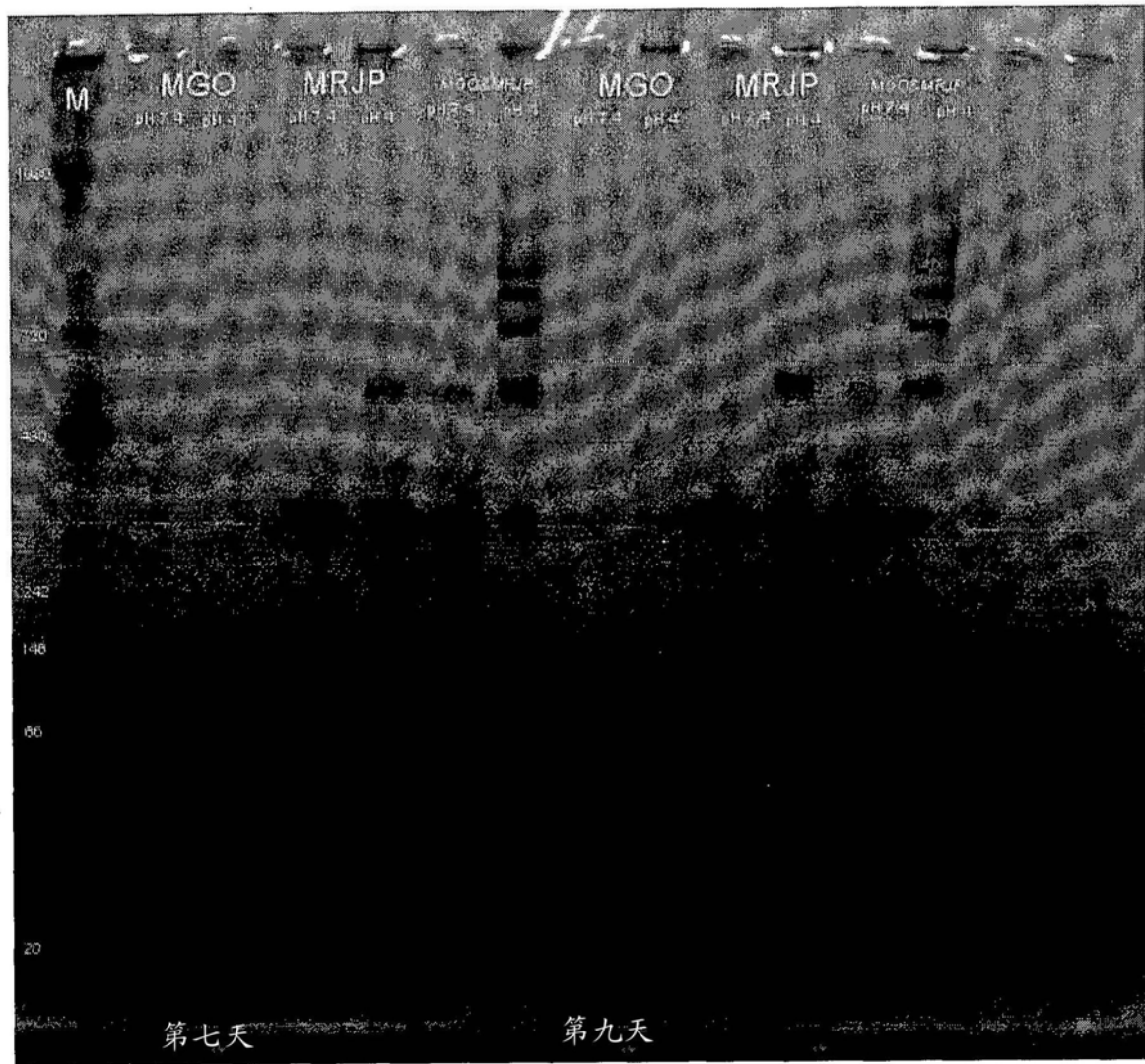


图5

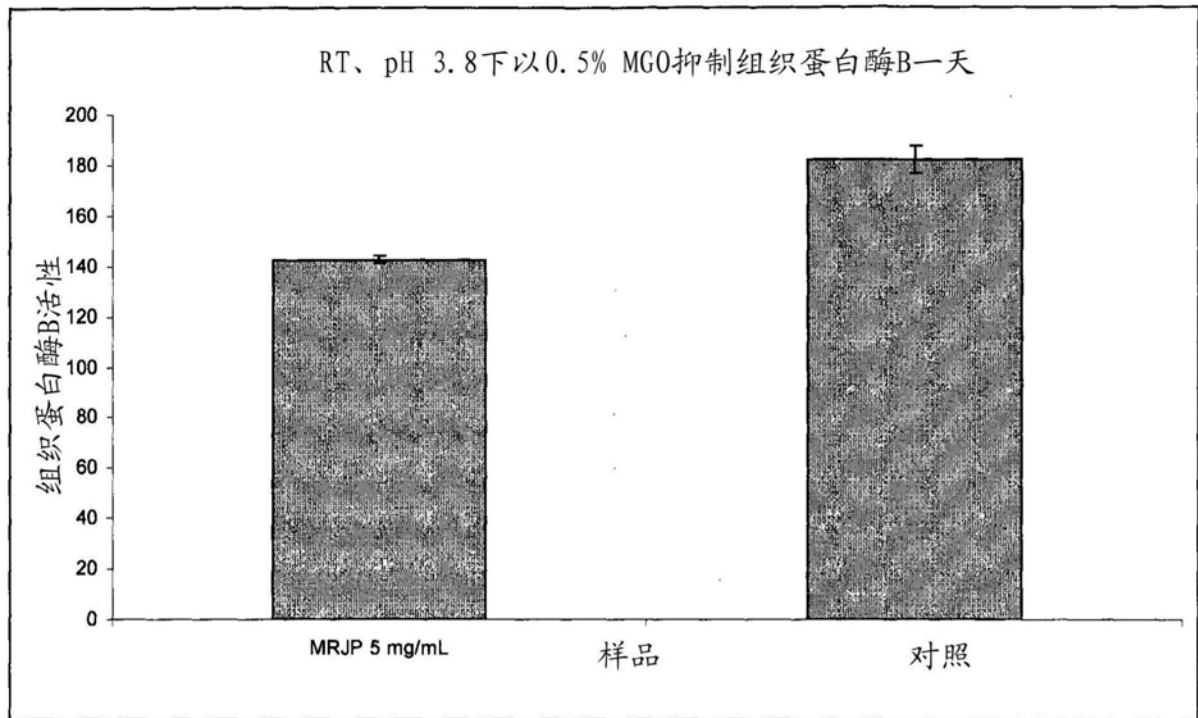


图6A

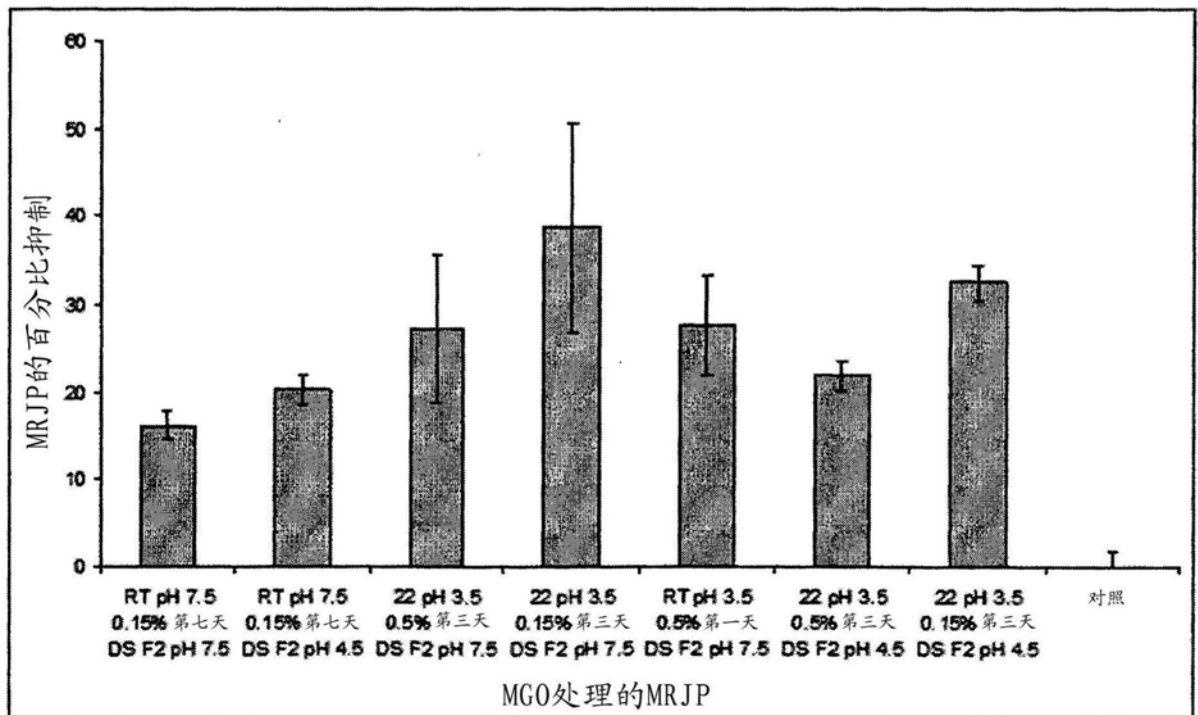


图6B

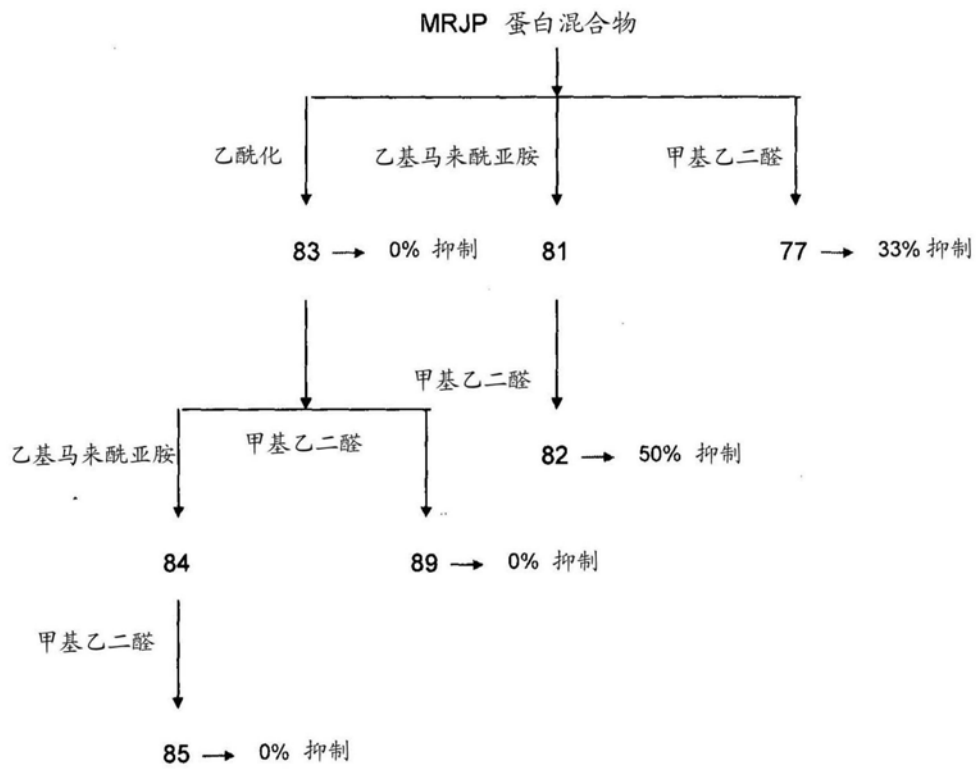


图7

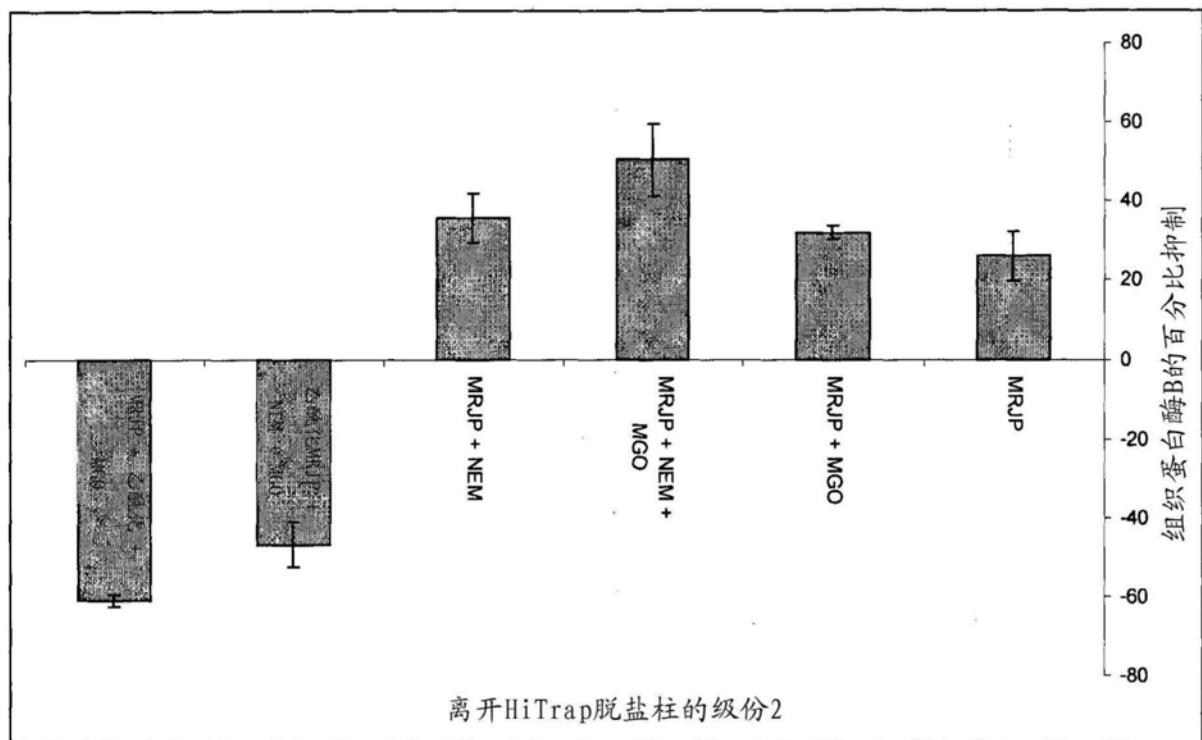


图8

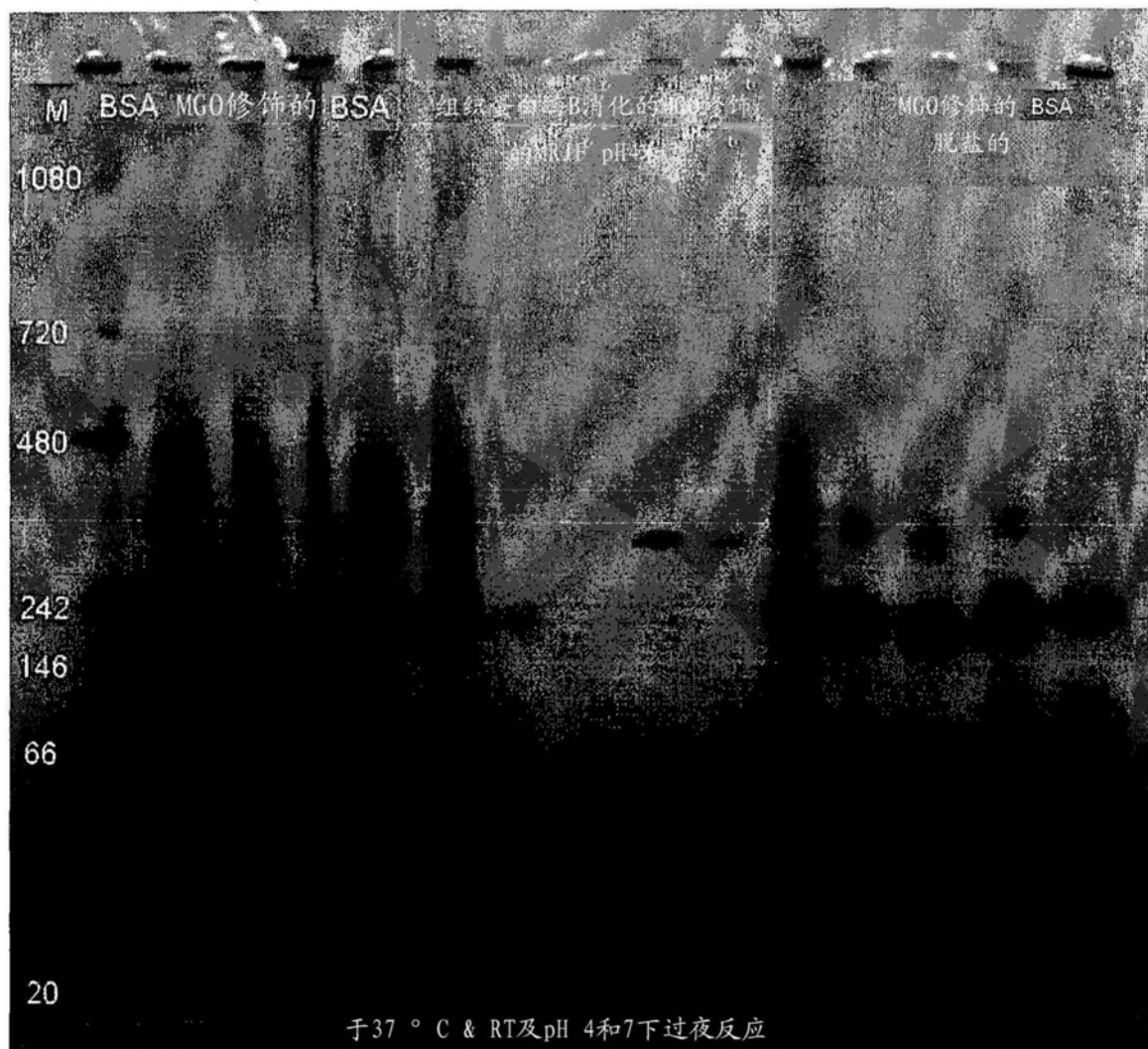


图9

10 20 30 40 50 60
MTRLFMLVCL GIVCQGTGN ILRGESLNKS LPILHEWKFF DYDFGSDERR QDAILSGEYD
70 80 90 100 110 120
YKNNYPSDID QWHDKIFVTM LRYNGVPSSL NVISKVGDG GPLLQYPDW SFAKYDDCSG
130 140 150 160 170 180
IVSASKLAID KCDRLWVLDS GLVNNTQPMC SPKLLTFDLT TSQLLKQVEI PHDVAVNATT
190 200 210 220 230 240
GKGRLLSLAV QSLDCNTNSD TMVYIADEKG EGLIVYHNSD DSFHRLTSNT FDYDPKFTKM
250 260 270 280 290 300
TIDGESYTAQ DGISGMALSP MTNNLYYSPV ASTSLYYVNT EQFRTSDYQQ NDIHYEGVQN
310 320 330 340 350 360
ILDTQSSAKV VSKSGVLFFG LVGDSALGCW NEHRTLERN IRTVAQSDET LQMIASMKIK
370 380 390 400 410 420
EALPHVPIFD RYINREYILV LSNKMQKMN NDFNFDDVNF RIMNANVNEL ILNTRCENPD
430
NDRTPFKISI HL SEQ ID NO: 1

图10

PFKIS₁HL (SEQ ID NO: 18)

图11A

Ac-PFKIS₁HL-OH (SEQ ID NO: 19)
Ac-KIS₁HL-OH (SEQ ID NO: 20)
Ac-KIS₁-OH (SEQ ID NO: 21)
Ac-PFKI-OH (SEQ ID NO: 22)

图11B

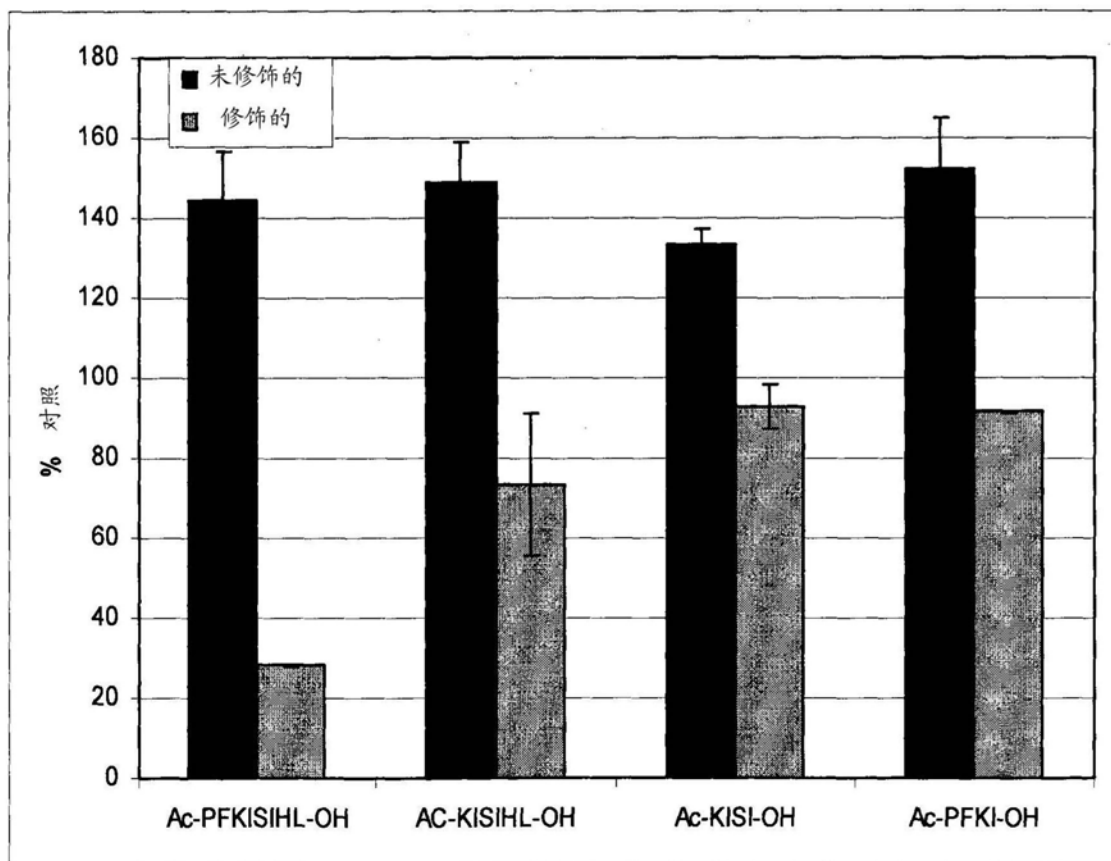


图11C

NQKNNNQNDN (SEQ ID NO: 23)

图12A

Ac-NQKNNNQNDN-OH (SEQ ID NO: 24)

Ac-NQKNNNQN-OH (SEQ ID NO: 25)

Ac-NQKNNN-OH (SEQ ID NO: 26)

Ac-NQKN-OH (SEQ ID NO: 27)

Ac-KN-OH (SEQ ID NO: 28)

图12B

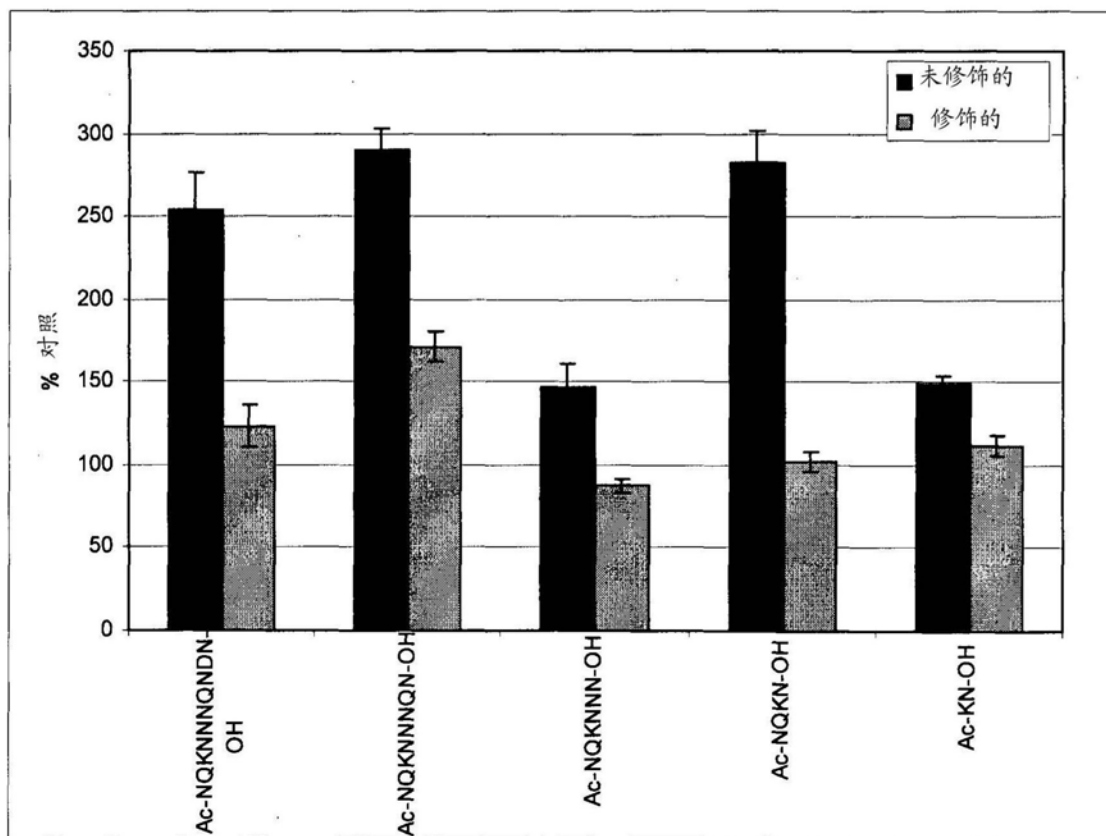


图12C

HHSSKLH (SEQ ID NO: 29)

图13A

Ac-HSSKLH-OH (SEQ ID NO: 30)
 Ac-SKLH-OH (SEQ ID NO: 31)
 Ac-SK-OH (SEQ ID NO: 32)
 Ac-HSSK-OH (SEQ ID NO: 33)
 Ac-SSKS-OH (SEQ ID NO: 34)

图13B

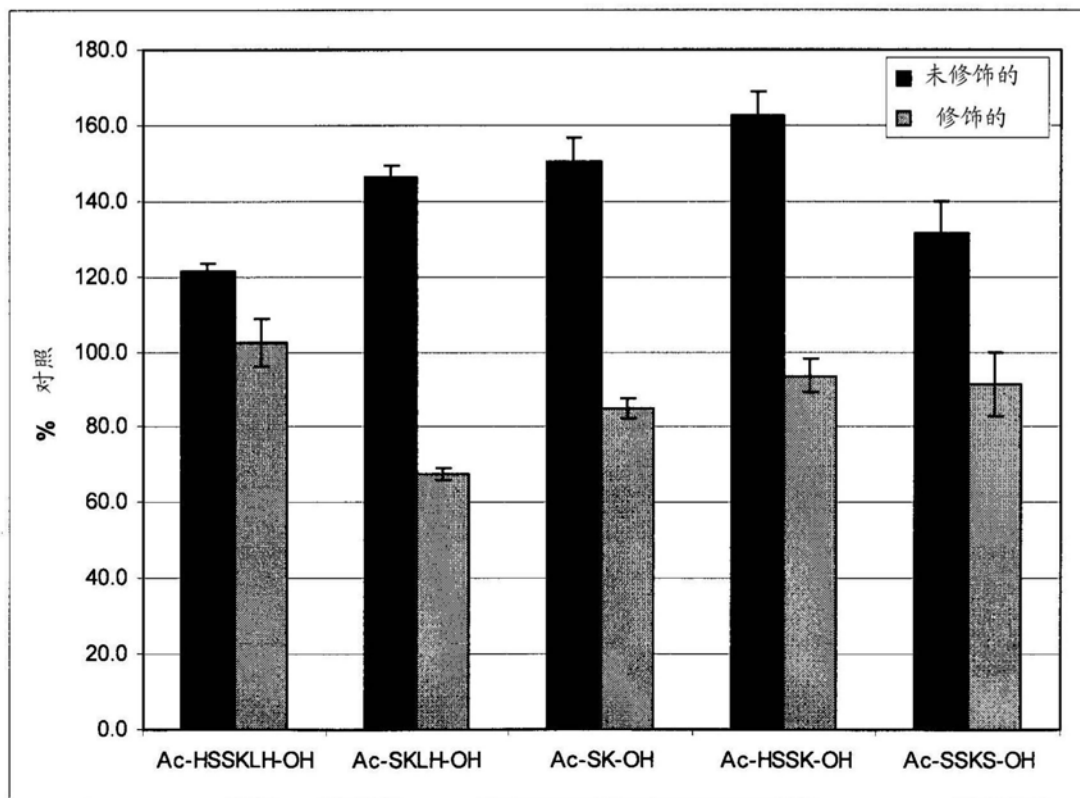


图13C

HSSKSNNRHNNND (SEQ ID NO: 35)

图14A

Ac-SSKSNNRHNNND-OH (SEQ ID NO: 36)
 Ac-SSKSNNRHNN-OH (SEQ ID NO: 37)
 Ac-SSKSNNRH-OH (SEQ ID NO: 38)
 Ac-SSKSNN-OH (SEQ ID NO: 39)
 Ac-SSKS-OH (SEQ ID NO: 40)
 Ac-KS-OH (SEQ ID NO: 41)

图14B

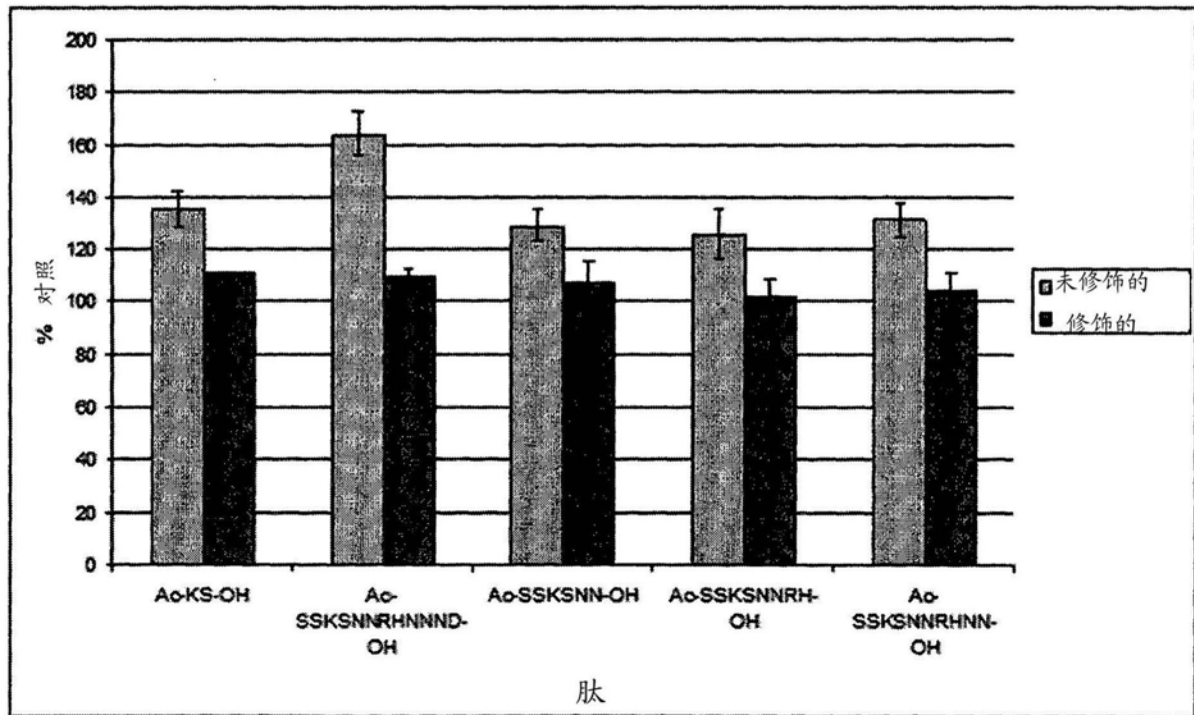


图14C

QNKHNN (SEQ ID NO: 42)

图15A

Ac-QNKHNN-OH (SEQ ID NO: 43)
 Ac-KHNN-OH (SEQ ID NO: 44)
 Ac-KH-OH (SEQ ID NO: 45)
 Ac-QNKH-OH (SEQ ID NO: 46)

图15B

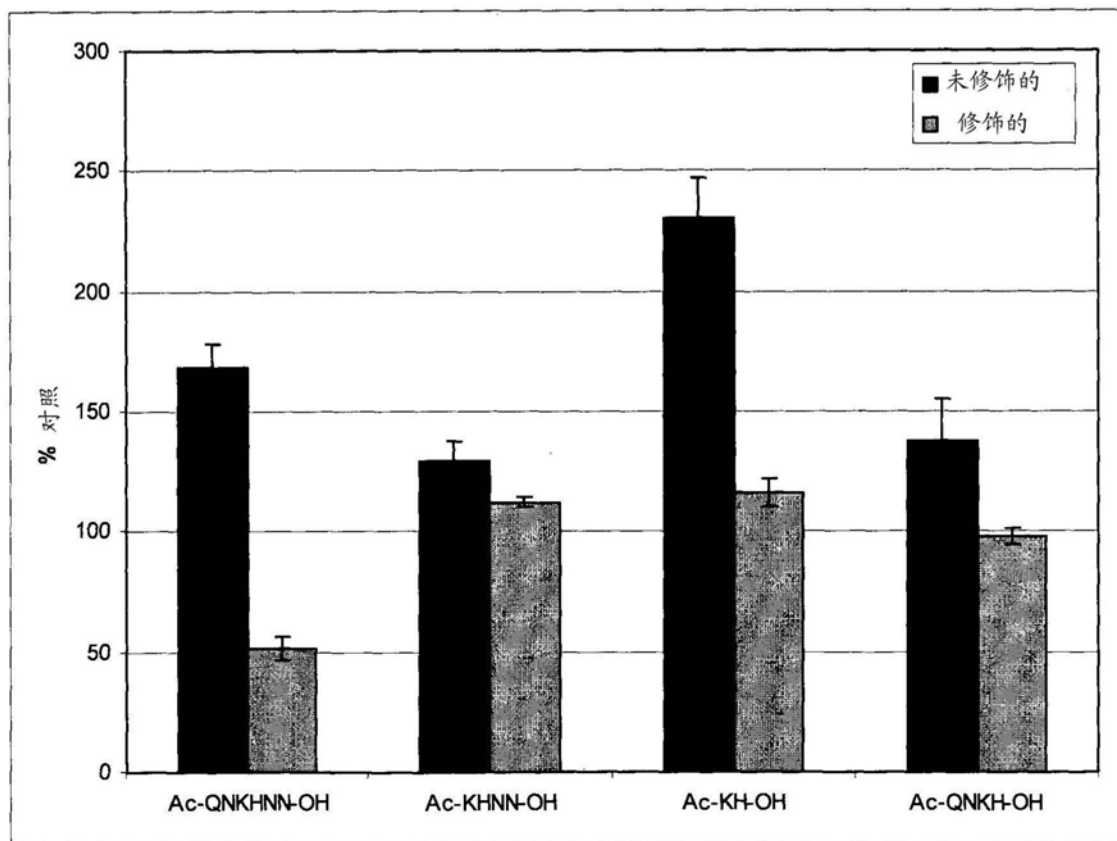


图15C

Ac-LVK-OH (SEQ ID NO: 48)
 Ac-LVK-NH₂ (SEQ ID NO: 49)
 Ac-LIR-OH (SEQ ID NO: 51)
 Ac-LIR-NH₂ (SEQ ID NO: 52)

Ac-LLK-OH (SEQ ID NO: 56)
 Ac-LLK-NH₂ (SEQ ID NO: 57)
 Ac-KI-OH (SEQ ID NO: 58)

图16A

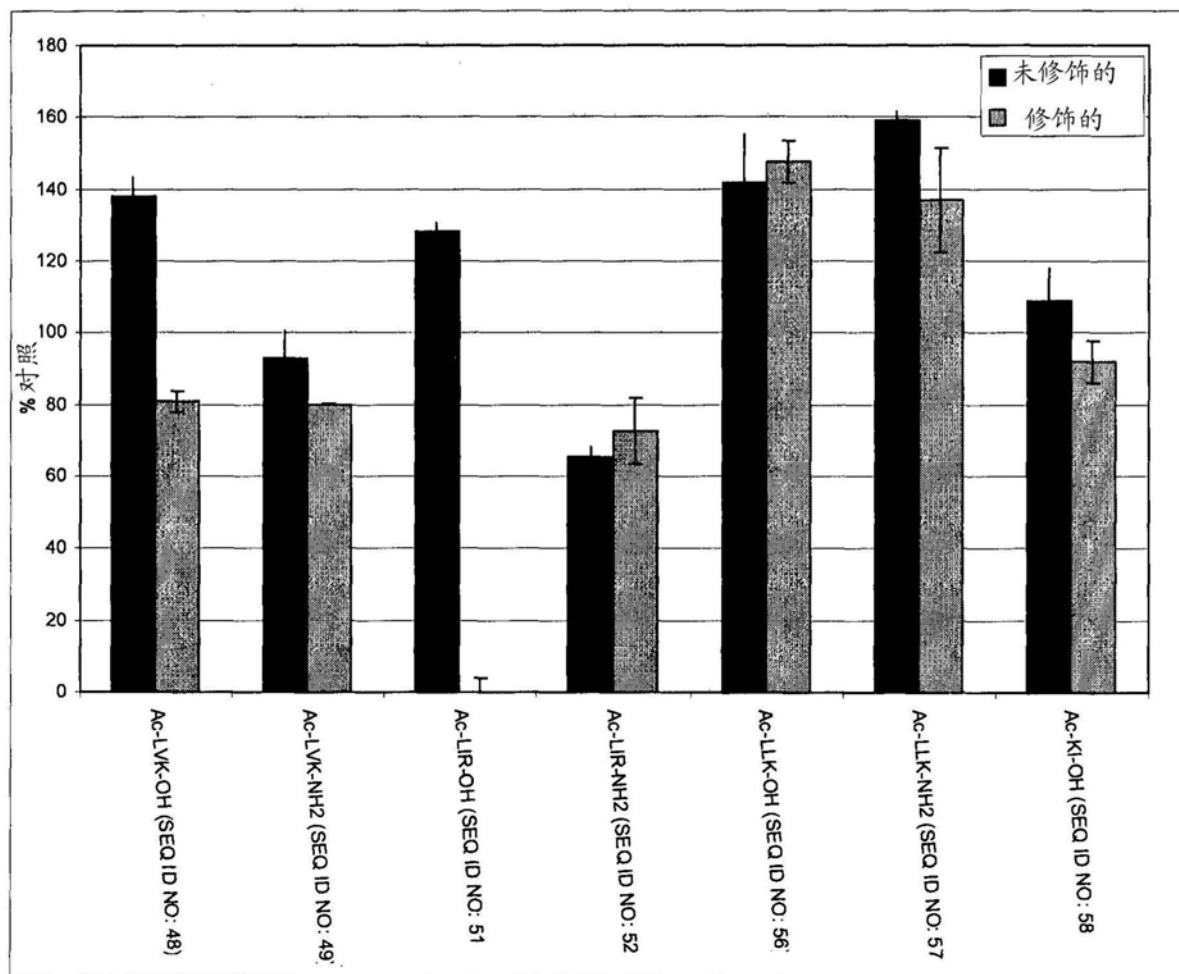


图16B