

(21)申請案號：100135658

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 09 月 30 日

(51)Int. Cl. : A23J3/34 (2006.01)

A23L1/30 (2006.01)

(30)優先權：2010/10/01 歐洲專利局

10186222.5

(71)申請人：耐斯泰克公司 (瑞士) NESTEC S. A. (CH)

瑞士

(72)發明人：艾佛特 麥可 AFFOLTER, MICHAEL (CH)；布羅 法蘭茲 伊沙貝兒 BUREAU-FRANZ, ISABELLE (FR)；梅納德 法蘭崔斯 MAYNARD, FRANCOISE (FR)；摩塞尼爾 安尼克 MERCENIER, ANNICK (BE)；潘巧德 亞歷山德 PANCHAUD, ALEXANDRE (CH)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：22 項 圖式數：3 共 40 頁

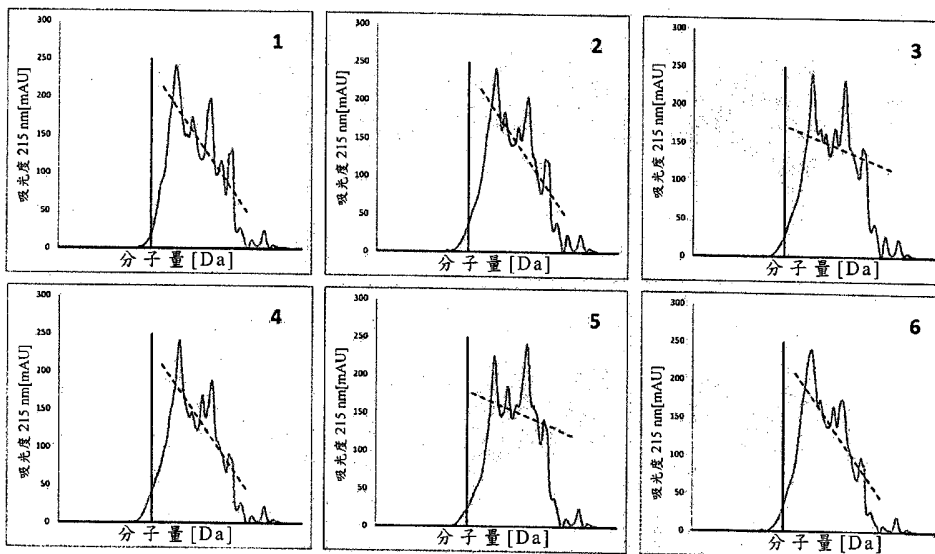
(54)名稱

基於牛奶之蛋白質水解物及由其製造之嬰兒配方及營養組合物

MILK-BASED PROTEIN HYDROLYSATES AND INFANT FORMULAE AND NUTRITIONAL COMPOSITIONS MADE THEREOF

(57)摘要

本發明係關於一種包含由牛奶獲得之蛋白質水解物的組合物，其係藉由使用源於微生物之酶處理而得到。本發明使用胰蛋白酶樣酶及胰凝乳蛋白酶樣酶。該組合物尤其意欲用於在嬰兒中誘導耐受性，其作用為調節今後生命中潛在發生之過敏。該組合物亦可用於患病成年患者。較佳地，該組合物為嬰兒配方、較大嬰兒配方(infant follow-up formula)、成長奶品或嬰孩食物或經腸式完全營養組合物。



| = 10 kDa 截斷值

- - - = 分子量趨勢線



(21)申請案號：100135658

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 09 月 30 日

(51)Int. Cl. : A23J3/34 (2006.01)

A23L1/30 (2006.01)

(30)優先權：2010/10/01 歐洲專利局

10186222.5

(71)申請人：耐斯泰克公司 (瑞士) NESTEC S. A. (CH)

瑞士

(72)發明人：艾佛特 麥可 AFFOLTER, MICHAEL (CH)；布羅 法蘭茲 伊沙貝兒 BUREAU-FRANZ, ISABELLE (FR)；梅納德 法蘭崔斯 MAYNARD, FRANCOISE (FR)；摩塞尼爾 安尼克 MERCENIER, ANNICK (BE)；潘巧德 亞歷山德 PANCHAUD, ALEXANDRE (CH)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：22 項 圖式數：3 共 40 頁

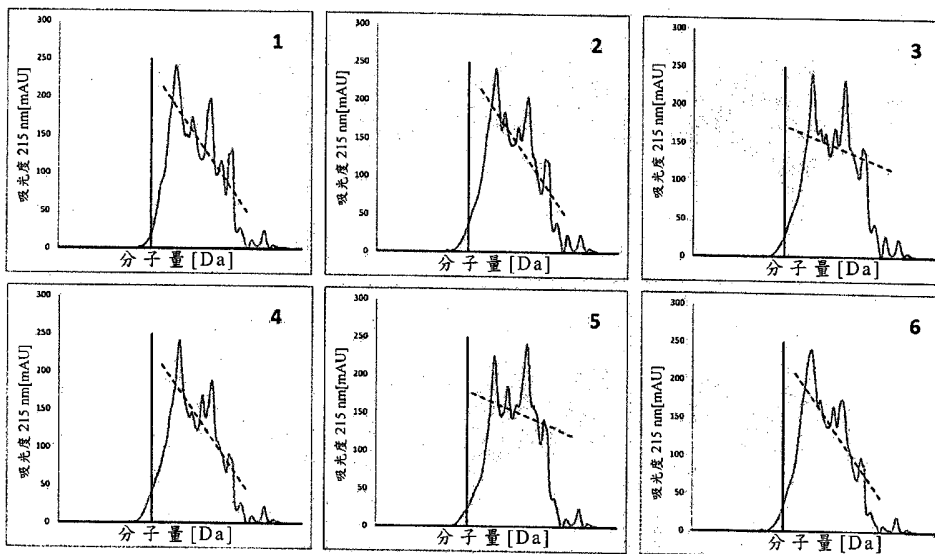
(54)名稱

基於牛奶之蛋白質水解物及由其製造之嬰兒配方及營養組合物

MILK-BASED PROTEIN HYDROLYSATES AND INFANT FORMULAE AND NUTRITIONAL COMPOSITIONS MADE THEREOF

(57)摘要

本發明係關於一種包含由牛奶獲得之蛋白質水解物的組合物，其係藉由使用源於微生物之酶處理而得到。本發明使用胰蛋白酶樣酶及胰凝乳蛋白酶樣酶。該組合物尤其意欲用於在嬰兒中誘導耐受性，其作用為調節今後生命中潛在發生之過敏。該組合物亦可用於患病成年患者。較佳地，該組合物為嬰兒配方、較大嬰兒配方(infant follow-up formula)、成長奶品或嬰孩食物或經腸式完全營養組合物。



| = 10 kDa 截斷值

--- = 分子量趨勢線

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於包含基於牛奶之蛋白質水解物的組合物，其可藉由用來自源於微生物之酶處理基於牛奶之蛋白質材料的溶液而獲得。該等組合物可併入嬰兒配方及成人食物補充劑中。本發明係關於兩種不同類型之蛋白質水解物，其旨在過敏預防及過敏治療。在第一種情況下，嬰兒為健康的，但其由於家族過敏史而有過敏風險。在第二種情況下，嬰兒或成人為過敏或有需要者，因此為患病者。

序列表之引用

本申請案含有電腦可讀形式之序列表。該電腦可讀形式係以引用的方式併入本文中。

【先前技術】

就嬰兒營養而言，人類母乳及母乳餵養代表著毫無異議的最高標準。作為人類母乳之替代品或補充劑的嬰兒配方應滿足嬰兒之營養需求，具有可接受之味道且當面向有過敏風險之嬰兒時，其為低過敏原的及致耐受性的(亦即能夠誘導口服耐受性)。已於EP0827697中描述對牛奶之口服耐受性的誘導。眾所周知，牛奶及含有牛奶蛋白質之嬰兒配方引起過敏係由於牛奶蛋白質不同於母乳蛋白質且其會構成人類過敏原的事實。公認之主要牛乳過敏原為 α 乳白蛋白(aLA)、 β 乳球蛋白(bLG)及牛血清白蛋白(BSA)。牛乳清蛋白及/或酪蛋白通常用作嬰兒配方中之乳蛋白源。為了降低過敏原性，用酶水解牛奶蛋白質並從而使其分解為

肽。由該等旨在預防過敏之牛奶蛋白質水解物組成的當前之低過敏原配方亦包含其他營養物，諸如動物油、植物油、澱粉、麥芽糊精、乳糖及蔗糖。該等蛋白質水解物亦可併入成人乳飲料或食物補充劑中。

必須小心監控用於產生該等水解物之水解過程以使得最終產物水解物保留其營養價值及所要物理性質，但為低過敏原性及致耐受性。

視水解反應進行之程度而定，水解物之特徵可為「部分型」或「充分型」。根據WAO(世界過敏組織，World Allergy Organization)有關牛奶蛋白質過敏(CMA)之準則，目前雖對充分水解產物(Extensively Hydrolyzed Product)沒有一致之法律上/臨床上的定義，但根據WAO一致認為水解配方已證明為有效及廣泛用於罹患CMA之嬰兒的蛋白質源。在本發明中，部分水解物為60%蛋白質/肽群之分子量小於1000道爾頓的水解物，而充分水解物為至少95%蛋白質/肽群之分子量小於1000道爾頓的水解物。該等定義目前用於行業中。認為部分水解物為低過敏原性(HA)，而認為充分水解物為非過敏原性。

許多團體已展開研究以優化水解過程。包括溫度及反應器體積、水解循環數、蛋白質受質、酶類型及濃度之選擇的水解反應條件為影響水解反應並因此影響最終產物之物理、化學及最終生物性質之諸多因素中的一些。在EP0353122中，使用胰蛋白酶/胰凝乳蛋白酶活性比率為0.33至0.66之胰蛋白酶與胰凝乳蛋白酶的混合物來製備低

過敏原的乳清蛋白質水解物。WO9304593 A1及US5039532A亦揭示使用胰蛋白酶與胰凝乳蛋白酶之水解過程，其包括兩步式水解反應及在兩步之間具有熱變性步驟，以確保最終水解物實質上無完整的過敏原蛋白質。該等方法中所用之胰蛋白酶及胰凝乳蛋白酶為藉由提取豬胰臟所製備之製劑。市場上存在有許多基於該等方法製備的含有蛋白質水解物之產物。例如，可由用自動物胰臟提取之胰蛋白酶及胰凝乳蛋白酶製得的水解物製備Nestlé HA®配方，且已充分研究並記載其低過敏原的特性。已發表三篇主要論文，其報導在德國進行之大型隨機化及雙盲干預研究的結果，其目的在於比較水解配方與標準牛奶配方有關預防有風險之嬰兒的過敏表現(尤其異位性濕疹)之作用。該出版物如下所列：在生命第一年中水解牛奶配方有關過敏預防之作用(The effect of hydrolyzed cow's milk formula for allergy prevention in the first year of life)：德國嬰兒營養干預研究(German Infant Nutritional Intervention Study)，一項隨機化雙盲實驗。von Berg A, Koletzko S, Grübl A, Filipiak-Pittroff B, Wichmann HE, Bauer CP, Reinhardt D, Berdel D; 德國嬰兒營養干預研究組(German Infant Nutritional Intervention Study Group). J Allergy Clin Immunol. 2003年3月；111:533-40。

某些水解配方降低異位性皮膚炎發生率，但不降低哮喘發生率：德國嬰兒營養干預研究之三年結果。von Berg A, Koletzko S, Filipiak-Pittroff B, Laubereau B, Grübl A,

Wichmann HE, Bauer CP, Reinhardt D, Berdel D; 德國嬰兒營養干預研究組 (German Infant Nutritional Intervention Study Group). *J Allergy Clin Immunol*. 2007 年 3 月 ; 119:718-25。

水解嬰兒配方之預防作用持續至6歲：來自德國嬰兒營養干預研究 (GINI Study) 之長期結果。 von Berg A, Filipiak-Pittroff B, Krämer U, Link E, Bollrath C, Brockow I, Koletzko S, Grübl A, Heinrich J, Wichmann HE, Bauer CP, Reinhardt D, Berdel D; GINIplus研究組, *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:1442-7。

後一項 GINI 研究結論為對高風險兒童使用 Nestlé H.A.(NAN HA®) 嬰兒配方進行早期營養干預時，對異位性皮膚炎具有直至6歲的長期預防作用，此表示疾病真正的減輕而非延緩疾病發作。

長期預防作用意謂預防作用持續時間遠遠超過Nan HA® 餵養時間，此顯示已誘導口服耐受性，不過GINI研究中未檢驗涉及該耐受性誘導之免疫機理。

除低過敏原性之外，若欲用作母乳補充劑或替代品的嬰兒配方能夠在嬰兒中誘導口服耐受性時，將極為有利。口服耐受性為藉由經口服途徑事先投與某一抗原，而特異性抑制針對該抗原之細胞及/或體液之免疫反應性。其為生命第一個月中免疫系統發育之重要部分，且允許嬰兒進食而無不良反應。口服耐受性建立之失敗會導致過敏。口服耐受性之演變與免疫系統訓練 (immune system education)

有關，其最終將降低對食物抗原之反應。咸信一些可明確存在於部分水解之嬰兒配方中的肽能夠與免疫系統相互作用且誘導口服耐受誘導性。咸信該等肽應具有特定性質，包括相當小的尺寸，以更能支持免疫系統訓練，但其本身不會成為過敏原。亦咸信特定肽之序列可具有重要作用。特定水解物肽型態可實際上為口服耐受性誘導之核心。

目前廣泛的趨勢為自使用來自動物之酶轉向使用來自微生物源之酶。在過去的20年中，利用遺傳工程，在酶製造領域已有許多進步。此使得可在相當短的時間期內，可再現性地製備大量高品質、高純度的酶。由於該等原因，將會希望能夠使用來自微生物源之酶來製造欲用於低過敏原的嬰兒配方之牛奶蛋白質水解物。此外，將會高度希望該等牛奶蛋白質水解物能夠在嬰兒中誘導口服耐受性。

因此，為了保留哺乳動物酶源性水解物之低過敏原性質，彼等用微生物酶製得之水解物必須具有類似的化學、物理及生物性質。此外，市場上任何新的嬰兒配方須遵從嚴格的管理準則，例如在歐洲指令2006/141/EC中適合。因此，希望任何新產品具有與已確認之用哺乳動物酶製成的產品十分類似之肽型態，以便保持過敏預防作用。此外，將會高度希望該等牛奶蛋白質水解物能夠在嬰兒中誘導口服耐受性。

類似地，希望特定言之藉由在完全營養組合物中提供特定蛋白質水解物來促使過敏或不良反應減少、增強蛋白質或胺基酸之吸收、有助於蛋白質或胺基酸之利用及/或調

節患病患者之炎症進程。

需要一種藉由非哺乳動物酶，較佳為微生物酶之作用而製備的由牛奶獲得之蛋白質水解物，其呈現低致敏性，同時呈現口服耐受誘導之能力。

需要該等者及水解物較佳包含於以有過敏風險之個體為目標的嬰兒配方及/或營養組合物中。

需要該等組合物在今後生命中降低過敏之風險或嚴重性且有助於調節過敏症狀之發生。

需要獲得基於細菌酶之水解物，其所具有之肽型態與由哺乳動物酶獲得之水解物部分相似，且甚至因此能夠再現後者的口服耐受性，且展示能預防過敏症狀。

需要使用與上述相同之酶來製備用於患病或虛弱患者之營養組合物。

除了製造「部分型」水解物以外，該等微生物酶亦可用於製造存在於治療配方中之「充分型」蛋白質水解物，諸如彼等意欲餵養對牛奶過敏之嬰兒及兒童的物質。在該種情況下，目標群體將會為已對牛奶蛋白質敏感之患病(過敏)嬰兒及兒童。

彼等微生物酶亦可用來製造任何類型之用於嬰兒、兒童或成人產品的蛋白質水解物，除了彼等與過敏相關者以外，該等產品亦以其他益處為目標，諸如有助於消化、增強胺基酸、肽及蛋白質之吸收與代謝、促進疾病恢復、優化氮源利用、促進組織建立及能量儲存。

為了解決該問題，本發明者已進行大範圍的研究項目，

且已比較許多作為用於進行水解反應之潛在候選者的微生物酶。其監測包括水解反應效能、酶特異性及肽分子量型態之參數且已確定許多特異性酶混合物可提供具有所要之物理、化學及生物性質的水解物。可有效地及可再現地製得本文所揭示之牛奶蛋白質水解物，其具有可接受之味道，具有所需之營養價值及為低過敏原的。此外，本發明之水解物可誘導口服耐受性。

【發明內容】

本發明係關於包含基於牛奶之蛋白質水解物的組合物，其可藉由用以下物質處理基於牛奶之蛋白質材料的溶液而獲得：

- a)至少一種由微生物產生之胰蛋白酶樣內肽酶，及
- b)至少一種由微生物產生之胰凝乳蛋白酶樣內肽酶。

如由肽分子量型態、肽序列型態(內肽酶特異性)及內肽酶水解效率所表徵，本發明之水解物具有與彼等由哺乳動物酶製得的基於牛奶之蛋白質水解物類似的性質。

本發明之水解物具有治療及預防作用，且尤其可用於在有需要之嬰兒或患者中誘導口服耐受性，或在有需要之嬰兒或患者中降低過敏風險，或在嬰兒期或在今後生命中降低過敏之嚴重性，尤其在有需要之嬰兒或患者中。

該等水解物可併入用於需要治療之個體的初生嬰兒配方(infant starter formula)、第二階段配方(follow-on formula)、嬰孩食物配方、嬰兒穀物配方或成長牛奶，或成人營養組合物或基於乳蛋白之成人飲品中，且該組合物

較佳為初生嬰兒配方。

在本發明之一態樣中，該至少一種胰蛋白酶樣內肽酶係由鐮刀菌屬 (*Fusarium*) 菌株、較佳為尖孢鐮刀菌 (*Fusarium oxysporum*) 獲得，或由庫茨涅爾氏菌屬 (*Kutzneria*) 菌株、較佳為白色庫茨涅爾氏菌 (*Kutzneria albida*) 獲得。

在本發明之另一態樣中，該至少一種胰凝乳蛋白酶樣內肽酶係由擬諾卡氏菌屬 (*Nocardiosis*) 菌株、較佳為擬諾卡氏菌 (*Nocardiosis Sp.*) 獲得，或由綠僵菌屬 (*Metarhizium*)、較佳為金龜子綠僵菌 (*Metarhizium anisopliae*) 獲得，或由小枝孢屬 (*Brachysporiella*)、較佳為小枝孢 (*Brachysporiella gayana*) 獲得。

在本發明之另一態樣中，胰蛋白酶樣內肽酶與胰凝乳蛋白酶樣內肽酶之比率以酶重量計在 5:1 至 35:1、較佳為 20:1 至 30:1 之範圍內，更佳為 27:1。

在本發明之另一態樣中，當胰蛋白酶樣內肽酶係由鐮刀菌屬菌株獲得且胰凝乳蛋白酶樣內肽酶係由擬諾卡氏菌屬菌株獲得時，胰蛋白酶樣內肽酶與胰凝乳蛋白酶樣內肽酶之比率以酶重量計為 9:1。

【實施方式】

本發明之基於牛奶的蛋白質水解物係藉由用來自微生物源之胰蛋白酶樣內肽酶及胰凝乳蛋白酶樣內肽酶處理基於牛奶之蛋白質材料的溶液而獲得。

基於牛奶之蛋白質材料

在本發明之組合物中，起始物質為基於牛奶之蛋白質材

料。其可為基於乳清之蛋白質材料、酪蛋白或基於乳清之蛋白質材料與酪蛋白之混合物。酪蛋白源可為酸酪蛋白或非脂乳固體(non-fat milk solid)。基於乳清之蛋白質材料可為來自乳酪製造之乳清，尤其為甜乳清(諸如由凝乳酶凝聚酪蛋白而產生之甜乳清)、由酸或酸化醱酵凝聚酪蛋白而產生之酸乳清，或者甚至為由酸及由凝乳酶凝聚而產生之混合乳清。該起始物質可為已藉由離子交換及/或藉由電透析而脫礦物質之乳清且被稱為脫礦物質乳清蛋白質(DWP)。在一個較佳實施例中，該基於乳清之蛋白質材料的來源為已完全或部分移除酪蛋白糖巨肽(CGMP)之甜乳清。其被稱為改質甜乳清(MSW)。自甜乳清移除CGMP產生蘇胺酸及色胺酸含量接近於人乳之蛋白質材料。EP 880902描述自甜乳清移除CGMP之方法。

起始物質可為DWP與MSW之混合物。其可為乳清蛋白質濃縮物35%至80%蛋白質(WPC)，或若乳清蛋白濃度高於95%蛋白質時可為分離物(WPI)。可列舉獲自Arla Foods, Denmark之WPC 87 Lacprodan®作為WPC之實例，且可列舉獲自Davigo Foods International(Minnesota USA)之Bipro®作為WPI之實例。

基於牛奶之蛋白質材料可為溶液或懸浮液，且以按重量計2%至30%、更佳為5%至20%、更佳為6%至10%蛋白質材料之濃度存在。

該起始物質甚至可為上述起始物質與乳糖之組合。乳糖可作為乳清蛋白質濃縮物之一部分而存在或可為添加的。

向起始物質中添加乳糖以進行水解之益處在於，乳糖中含有之任何殘餘蛋白質已水解。乳糖可以0.05% w/w至30% w/w、較佳為0.10% w/w至20% w/w之濃度存在，或在較低乳糖含量為較佳之情況下為0.10% w/w至1% w/w，較佳為0.10% w/w至0.20% w/w。在後者之情況下，最終產物可意欲用於具有低乳糖耐受性之嬰兒或成人。可將乳糖移除，例如，藉由超濾(產生UF乳清)，視情況接著進行透析來達成。

該起始物質可為真水溶液或膠狀水溶液形式，或為粉末形式。在後者之情況下，將粉末溶於較佳經脫礦物質之水中以形成水溶液。

由微生物產生之酶

本發明之胰蛋白酶樣內肽酶及胰凝乳蛋白酶樣內肽酶可由任何屬之微生物產生。在本文中提供「由.....產生」旨在意謂由既定生物體之細胞的發酵產生。後述之酶可由產生其之生物體天然產生，或可藉由插入編碼內肽酶之核苷酸序列而於宿主生物體中工程改造而得。

胰蛋白酶樣內肽酶

胰蛋白酶(EC 3.4.21.4)為一種絲胺酸蛋白酶，其可於許多脊椎動物之消化系統中發現，且於彼處水解蛋白質。其作為惰性酶原胰蛋白酶原產生於胰臟中。胰蛋白酶主要裂解胺基酸離胺酸或精胺酸羧基側處之肽鏈或連接，但離胺酸或精胺酸後為脯胺酸之情形除外。在本發明中，「胰蛋白酶樣內肽酶」意謂一種具有類似於哺乳動物胰蛋白酶

(例如自豬胰臟組織提取之胰蛋白酶)活性之活性的酶。「胰蛋白酶樣內肽酶」亦意謂一種優先裂解精胺酸及/或離胺酸，較佳為精胺酸及離胺酸之L異構體C端側處的肽或蛋白質之內肽酶。胰蛋白酶樣內肽酶可由以下菌株獲得：革蘭氏陽性細菌(gram-positive bacterial)菌株，諸如桿菌屬(*Bacillus*)菌株、梭菌屬(*Clostridium*)菌株、腸球菌屬(*Enterococcus*)菌株、芽孢桿菌屬(*Geobacillus*)菌株、庫茨涅爾氏菌屬菌株、乳桿菌屬(*Lactobacillus*)菌株、乳球菌屬(*Lactococcus*)菌株、海洋桿菌屬(*Oceanobacillus*)菌株、葡萄球菌屬(*Staphylococcus*)菌株、鏈球菌屬(*Streptococcus*)菌株或鏈黴菌屬(*Streptomyces*)菌株；或革蘭氏陰性細菌(gram negative bacterial)菌株，諸如曲狀桿菌屬(*Campylobacter*)菌株、大腸桿菌屬(*Escherichia*)菌株(較佳為大腸桿菌(*E. coli*))、黃桿菌屬(*Flavobacterium*)菌株、細梭菌屬(*Fusobacterium*)菌株、螺旋桿菌屬(*Helicobacter*)菌株、泥桿菌屬(*Ilyobacter*)菌株、奈瑟菌屬(*Neisseria*)菌株、假單胞菌屬(*Pseudomonas*)菌株、沙門氏菌屬(*Salmonella*)菌株或尿素原體(*Ureaplasma*)菌株；或真菌菌株，諸如酵母菌屬(*Saccharomyces*)菌株、克魯維酵母屬(*Kluyveromyces*)菌株、畢赤酵母屬(*Pichia*)菌株、念珠菌屬(*Candida*)菌株、麴菌屬(*Aspergillus*)菌株、青黴菌屬(*Penicillium*)菌株、鐮黴菌屬菌株及麥角菌屬(*Claviceps*)菌株。在一個較佳實施例中，胰蛋白酶樣內肽酶為真菌內肽酶，較佳由鐮刀菌屬菌株、更佳為具有已以名稱

SWISSPROT 編號 P35049 登記之序列的尖孢镰刀菌獲得。胰蛋白酶樣內肽酶與 SWISSPROT 編號 P35049 可具有至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 之序列一致性。已描述由後述序列編碼之酶 (US5,288,627 ; US5,693,520)。

在另一較佳實施例中，胰蛋白酶樣內肽酶係由革蘭氏陽性細菌、較佳為庫茨涅爾氏菌屬菌株、更佳為由白色庫茨涅爾氏菌獲得。在另一較佳實施例中，胰蛋白酶樣內肽酶與 SEQ ID NO:1 之成熟多肽具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 之序列一致性。

胰蛋白酶樣內肽酶之濃度可為每公克食物蛋白 100 至 500,000 USP 胰蛋白酶單位 (USP Trypsin Unit)，例如 250 至 250,000 或 500 至 100,000。一個 USP 胰蛋白酶單位為在 pH 7.6 及 25°C 下使用鹽酸 N-苯甲醯基-L-精胺酸乙酯 (BAEE) 作為受質，在 253 nm 下引起 0.003 之吸光度變化的活性。

其他以 >95% 純酶蛋白之毫克數/毫升表述者意謂胰蛋白酶樣內肽酶濃度可在每公克乳蛋白 0.5 毫克至 4 毫克、較佳為每公克乳蛋白 1 毫克至 3.5 毫克且更佳為每公克乳蛋白 1.5 毫克至 3 毫克之範圍內。此與胰凝乳蛋白酶樣內肽酶之存在無關。

酶類：胰凝乳蛋白酶樣內肽酶

胰凝乳蛋白酶 (EC 3.4.21.4) 為一種優先裂解醯胺鍵 (P₁ 位

置)羧基側為酪胺酸、色胺酸或苯丙胺酸之肽醯胺鍵的絲胺酸蛋白酶。胰凝乳蛋白酶亦以較慢速率水解肽中之其他醯胺鍵，尤其彼等在P₁位置含有白胺酸者。「胰凝乳蛋白酶樣內肽酶」意謂具有類似於哺乳動物胰凝乳蛋白酶(例如自豬胰臟組織提取之胰凝乳蛋白酶)活性之活性的酶。其亦意謂針對裂解酪胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、白胺酸、甲硫胺酸及組胺酸殘基各自之羧基端側比裂解精胺酸及賴胺酸兩者之羧基端側具有較高特異性的酶。

本發明之胰凝乳蛋白酶樣內肽酶可由以下菌株獲得：革蘭氏陽性細菌菌株，諸如桿菌屬菌株、梭菌屬菌株、腸球菌屬菌株、芽孢桿菌屬菌株、庫茨涅爾氏菌屬菌株、乳桿菌屬菌株、乳球菌屬菌株、海洋桿菌屬菌株、葡萄球菌屬菌株、鏈球菌屬菌株或鏈黴菌屬菌株；或革蘭氏陰性細菌菌株，諸如曲狀桿菌屬菌株、大腸桿菌屬菌株(較佳為大腸桿菌)、擬諾卡氏菌屬菌株、黃桿菌屬菌株、細梭菌屬菌株、螺旋桿菌屬菌株、泥桿菌屬菌株、奈瑟菌屬菌株、假單胞菌屬菌株、沙門氏菌屬菌株或尿素原體菌株；或真菌菌株，諸如酵母屬菌株、克魯維酵母屬菌株、畢赤酵母屬菌株、念珠菌屬菌株、麴菌屬菌株、青黴菌屬菌株、鐮刀菌屬菌株及麥角菌屬菌株。較佳地，本發明之胰凝乳蛋白酶樣內肽酶可由革蘭氏陽性細菌菌株或革蘭氏陰性細菌菌株獲得。在一個更佳實施例中，胰凝乳蛋白酶係由擬諾卡氏菌屬菌株、較佳為擬諾卡氏菌EMBL CDS CAI94179獲得(先前描述於例如WO 88/03947中)。在另一較佳實施例

中，胰凝乳蛋白酶樣內肽酶與多肽EMBL CDS CAI94179具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%之序列一致性。

在另一個更佳的實施例中，胰凝乳蛋白酶樣內肽酶係由綠僵菌屬 (*Metarhizium*)、較佳為金龜子綠僵菌 (*Metarhizium anisopliae*) 獲得，例如具有序列TREMBL:Q9Y843之成熟多肽的胺基酸序列者。在另一較佳實施例中，胰凝乳蛋白酶樣內肽酶與多肽TREMBL:Q9Y843具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%之序列一致性。在另一個更佳的實施例中，胰凝乳蛋白酶樣內肽酶係由小枝孢屬 (*Brachysporiella*)、較佳為小枝孢 (*Brachysporiella gayana*)(CGMCC 0865，即WO2004/072279中所揭示之胺基酸1至186)獲得。在另一較佳實施例中，胰凝乳蛋白酶樣內肽酶與後述參考多肽具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%之序列一致性。

胰凝乳蛋白酶樣內肽酶之濃度較佳為每公克基於牛奶之蛋白質100至100,000 USP胰凝乳蛋白酶單位 (USP Chymotrypsin Unit)，更佳為每公克基於牛奶之蛋白質500至50,000 USP胰凝乳蛋白酶單位，且最佳為每公克基於牛奶之蛋白質1,000至20,000 USP胰凝乳蛋白酶單位。一個

USP胰凝乳蛋白酶單位為在pH 7.0及25°C下，使用N-乙酰基-L-酪胺酸乙酯(ATEE)作為受質，在237 nm下引起0.0075之吸光度變化的活性。其他以>95%純酶蛋白之毫克數/毫升表述者意謂胰凝乳蛋白酶樣內肽酶濃度可在每公克乳蛋白0.05毫克至2毫克、較佳為每公克乳蛋白0.1毫克至1毫克且更佳為每公克乳蛋白0.15毫克至0.4毫克之範圍內。此與胰蛋白酶樣內肽酶之存在無關。

在水解過程期間，以混合物形式一起使用該等酶。例如，由白色庫茨涅爾氏菌獲得之胰蛋白酶樣內肽酶可與由擬諾卡氏菌或金龜子綠僵菌或小枝孢獲得之胰凝乳蛋白酶樣內肽酶結合。例如，由尖孢鐮刀菌獲得之胰蛋白酶樣內肽酶可與由擬諾卡氏菌或金龜子綠僵菌或小枝孢獲得之胰凝乳蛋白酶樣內肽酶結合。

本發明者已發現，以酶之重量計，胰蛋白酶樣內肽酶與胰凝乳蛋白酶樣內肽酶之比率(T/C比率)應在5:1至35:1、較佳為20:1至30:1之範圍內，更佳為27:1。此外，當胰蛋白酶樣內肽酶係由鐮刀菌屬菌株獲得且胰凝乳蛋白酶樣內肽酶係由擬諾卡氏菌屬菌株獲得時，T/C比率之較佳範圍為8:1至11:1，更佳為9:1。

尤為準確的是，由尖孢鐮刀菌獲得之胰蛋白酶樣內肽酶(T)與由擬諾卡氏菌獲得之胰凝乳蛋白酶樣內肽酶(C)以9:1之T/C比率組合，由白色庫茨涅爾氏菌獲得之胰蛋白酶樣內肽酶(T)與由擬諾卡氏菌獲得之胰凝乳蛋白酶樣內肽酶(C)以27:1之T/C比率組合，及由尖孢鐮刀菌獲得之胰蛋白

酶樣內肽酶(T)與由擬諾卡氏菌獲得之胰凝乳蛋白酶樣內肽酶(C)以27:1之T/C比率組合。

水解過程：

執行水解過程之典型條件已描述於先前技術中。溫度可在約40°C至60°C之範圍內變化，較佳為50°C，反應時間為1至6小時，較佳為4小時，且pH值可屬於6.5至8.5、較佳為7.0至8.0之範圍。可用已知試劑校準pH值，例如用Ca(OH)₂。在文獻US5039532或EP0631731A1中描述一種兩步式水解反應，在中間有一個熱變性步驟以確保最終的水解物實質上不含乳蛋白過敏原。該熱變性步驟較佳在95°C下持續進行5分鐘。

視情況而定，基於牛奶之蛋白質溶液或懸浮液可被預先加熱(例如預熱至80°C至100°C，持續5分鐘至30分鐘；或達到130°C，持續約30秒至60秒)以確保乳清蛋白(例如α乳白蛋白、β乳球蛋白及血清白蛋白(BSA))之變性。

不管水解如何進行，水解產物均經歷熱處理，其使執行水解之酶失活。該熱處理包含預熱該水解物至75°C以上之溫度，且將其於該溫度下(較佳在75°C至85°C下)保持約0.1分鐘至30分鐘以促進酶自消化，該處理宜後接藉由注射蒸汽或在熱交換器中進行之殺菌，較佳在超高溫下(例如在125°C至135°C下)持續30秒至3分鐘進行。

由此獲得之水解物可被淨化、過濾或超濾。亦可將其濃縮。接著可將其乾燥，例如針對不同應用可藉由低壓昇華乾燥法、噴霧乾燥或藉由冷凍乾燥來使其乾燥，或甚至可

經後續處理。在後者之情況下，可在後續處理期間使酶失活。

本發明之水解物可具有特徵為NPN/TN%之水解程度。NPN/TN%意謂(非蛋白質氮(Non-Protein Nitrogen)/總氮(Total Nitrogen)) $\times 100$ 。非蛋白質氮為能夠自由地與試劑(如三硝基苯磺酸(TNBS))反應之胺基氮。NPN/TN%可如Adler-Nissen J-, 1979, J. Agric. Food Chem., 27 (6), 1256-1262中詳述來測得。一般而言，充分水解物特徵為NPN/TN%大於95%，而部分水解的水解物特徵為NPN/TN%在75%至85%之範圍內。在一個較佳實施例中，本發明之水解物的NPN/TN%在70%至90%之範圍內，較佳在75%至85%之範圍內。後者之水解物為「部分」水解物。該等水解物之特徵亦可為60%至70%的其蛋白質/肽群之分子量為 <1000 道爾頓(Dalton)。

在「充分」水解物為所要者之另一較佳實施例中，本發明之水解物的NPN/TN%在大於95%之範圍內。該等水解物之特徵亦可為至少95%的其蛋白質/肽群之分子量為 <1000 道爾頓。

本發明之水解物可具有特徵為NPN/TN%之水解程度。非蛋白質氮/總氮廣泛用作由酶水解產生之可溶性肽之量度。用於量測NPN之分析方法相當於AOAC方法991.21。在100%基於乳清蛋白質之水解物中，NPN/TN含量通常在70%至90%之範圍內。在一個較佳實施例中，本發明之水解物的NPN/TN%在70%至90%之範圍內，較佳在75%至

85%之範圍內。在充分水解物為所要者之另一較佳實施例中，本發明之水解物的NPN/TN%在大於95%之範圍內。

所獲得之蛋白質水解物中肽之分子量分佈可例如藉由尺寸排阻層析法(SEC)來測定。在一個較佳實施例中，本發明之水解物為部分水解物且其包含肽，其中以重量計，小於1%之肽的分子量超過20,000 kDa。在一個更佳的實施例中，本發明之水解物的肽重量分佈與由哺乳動物酶(尤其豬酶，例如Novozyme(Denmark)之PTN 6.0S®(亦稱為PTN))獲得之分解物類似(參見實例1圖1)。該參照酶為自豬胰臟提取之胰蛋白酶，其含有主要成分胰蛋白酶及殘餘的胰凝乳蛋白酶。其胰蛋白酶活性為1350 USP胰蛋白酶/公克且胰凝乳蛋白酶活性為80活性USP胰凝乳蛋白酶/公克。此使得以活性計T/C比率為16。

可藉由對所得水解物中所包含之肽定序來評估水解期間所用之酶混合物的酶特異性。藉由LC-MS/MS鑑定肽序列。在一個更佳實施例中，本發明之水解物具有與由哺乳動物酶(特別為豬酶，例如上文描述之PTN 6.0S)獲得之水解物相接近之酶特異性(參見實例1圖2)。

可藉由量測水解期間之鹼(OH)消耗量來評估水解效率。在一個更佳實施例中，本發明之水解物具有與由哺乳動物酶(特別為豬酶，例如上文描述之PTN 6.0S)獲得之水解物相接近之水解效能(參見實例1圖3)。

可使用標準免疫檢定，如ELISA測試來評估水解物之殘餘抗原性。本發明之水解物較佳呈現<3毫克BLG當量/公

克蛋白質當量，更佳<2毫克BLG當量/公克蛋白質當量，最佳<1毫克BLG當量/公克蛋白質當量之殘餘β乳球蛋白(BLG)(參見實例1)。

本發明之水解物可併入嬰兒配方、第二階段配方、嬰孩食物、嬰兒穀類、成長牛奶、嬰兒或兒童食品補充劑或成人營養組合物，亦即所有以預防或治療過敏以及蛋白質水解物可向人類提供之任何其他益處為目標之製劑中，且該組合物較佳為初生嬰兒配方。

在本發明之一個實施例中，本發明之水解物與所選之益生菌組合使用，例如在嬰兒配方中。所選之益生菌可為習知用於嬰兒配方中之任何益生菌。益生菌較佳為彼等能夠對過敏及/或口服耐受誘導及/或炎症過程提供附加作用或協同作用的益生菌。

可用於本發明中之適合的益生菌微生物之實例包括：酵母，諸如酵母屬、德巴利酵母屬(*Debaromyces*)、念珠菌屬、畢赤酵母屬及球擬酵母屬(*Torulopsis*)；黴，諸如麴菌屬、酒麴菌屬(*Rhizopus*)、白黴菌屬(*Mucor*)及青黴菌屬及球擬酵母屬；及細菌，諸如雙叉桿菌屬(*Bifidobacterium*)、擬桿菌屬(*Bacteroides*)、梭菌屬、結梭菌屬、蜂球菌屬(*Melissococcus*)、丙酸桿菌屬(*Propionibacterium*)、鏈球菌屬、腸球菌屬、乳球菌屬、葡萄球菌屬、消化鏈球菌屬(*Peptostreptococcus*)、桿菌屬、小球菌屬(*Pediococcus*)、微球菌屬(*Micrococcus*)、明串珠菌屬(*Leuconostoc*)、魏斯氏菌屬(*Weissella*)、氣球菌

屬 (*Aerococcus*)、酒球菌屬 (*Oenococcus*) 及乳桿菌屬。適合之益生菌微生物的特定實例為：釀酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、凝結芽孢桿菌 (*Bacillus coagulans*)、地衣芽孢桿菌 (*Bacillus licheniformis*)、枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*)、雙歧雙叉桿菌 (*Bifidobacterium bifidum*)、嬰兒雙叉桿菌 (*Bifidobacterium infantis*)、龍根雙叉桿菌 (*Bifidobacterium longum*)、屎腸球菌 (*Enterococcus faecium*)、糞腸球菌 (*Enterococcus faecalis*)、嗜酸乳桿菌 (*Lactobacillus acidophilus*)、食品乳桿菌 (*Lactobacillus alimentarius*)、乾酪乳桿菌乾酪亞種 (*Lactobacillus casei subsp. casei*)、乾酪乳桿菌代田株 (*Lactobacillus casei Shirota*)、彎曲乳酸桿菌 (*Lactobacillus curvatus*)、德氏乳桿菌乳酸亞種 (*Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*)、香腸乳桿菌 (*Lactobacillus farciminus*)、加氏乳桿菌 (*Lactobacillus gasseri*)、瑞士乳桿菌 (*Lactobacillus helveticus*)、約氏乳桿菌 (*Lactobacillus johnsonii*)、洛德乳桿菌 (*Lactobacillus reuteri*)、鼠李糖乳桿菌 (*Lactobacillus rhamnosus*) (乳桿菌 GG (*Lactobacillus GG*))、清酒乳桿菌 (*Lactobacillus sake*)、乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*)、易變微球菌 (*Micrococcus varians*)、乳酸小球菌 (*Pediococcus acidilactici*)、戊糖小球菌 (*Pediococcus pentosaceus*)、乳酸小球菌 (*Pediococcus acidilactici*)、嗜鹽小球菌 (*Pediococcus halophilus*)、糞鏈球菌 (*Streptococcus faecalis*)、嗜熱鏈球菌 (*Streptococcus thermophilus*)、肉葡

萄球菌 (*Staphylococcus carnosus*) 及木糖葡萄球菌 (*Staphylococcus xylosus*)。

較佳益生菌細菌菌株包括可由芬蘭(Finland)之 Valio Oy 獲得的LGG牌鼠李糖乳桿菌 ATCC 53103、可由BioGaia AB 獲得之鼠李糖乳桿菌 CGMCC 1.3724、副乾酪乳桿菌 CNCM 1-2116、洛德乳桿菌 ATCC 55730及洛德乳桿菌 DSM 17938、尤其由丹麥之 Christian Hansen公司出售的Bb 12牌乳雙叉桿菌 CNCM 1-3446及由日本之 Morinaga Milk Industry Co. Ltd.出售的BB536牌龍根雙叉桿菌 ATCC BAA-999。

若存在於本發明之組合物中，則益生菌較佳以每公克組合物或每毫升組合物 10^3 至 10^{12} 個菌落形成單位，更佳以每公克組合物或每毫升組合物 10^6 至 10^{11} 個菌落形成單位，尤其更佳以每公克組合物或每毫升組合物 10^4 至 10^9 個菌落形成單位，最佳以每公克組合物或每毫升組合物 10^7 至 10^9 個菌落形成單位之量存在。

實例：

實例1.使用相同的牛奶蛋白質受質及一組6種酶溶液進行一系列水解反應，該6種酶溶液係由一種標準PTN溶液及如表1之胰蛋白酶樣內肽酶與胰凝乳蛋白酶樣內肽酶之5種不同混合物組成。起始物質為500 ml 8%受質牛奶蛋白質 MWP28/DWP28(基於蛋白質重量，比率為83/17)溶液。受質之最終組成為27.7%總固體、8%蛋白質及18.48%乳糖。

使蛋白質受質溶解成8%(w/v)水溶液。在反應中，使用500 ml之總體積。使溫度平衡至55°C。接著用10% Ca(OH)₂溶液調節pH值至pH 7.4。在酶添加(在第一步水解步驟中全部適用之酶的一半)之後，在4h內，在55°C下藉由使用自動滴定器DL50 Graphix(Mettler Toledo)添加0.25 M NaOH來保持pH值恆定於pH 7.4。在93°C下加熱水解物5分鐘。在使溫度平衡至55°C後，引入額外的酶(在第二步水解步驟中全部酶之一半)且如上所述保持pH值。在水解2小時後，藉由熱處理(在85°C下5分鐘)使酶失活來停止酶促反應。

表1顯示用各種比率之酶進行的一系列實驗。TL1與TL2分別表示由尖孢鐮刀菌與白色庫茨涅爾氏菌獲得之胰蛋白酶樣內肽酶。CTL2與CTL3分別表示由金龜子綠僵菌與擬諾卡氏菌獲得之胰凝乳蛋白酶樣內肽酶。

實驗	酶(毫克/公克蛋白)	T/C比率(w/w)
1號	PTN	16*
2號	TL1 + CTL3 (1.8 + 0.2)	9
3號	TL2 + CTL3 (1.8 + 0.3)	6
4號	TL2 + CTL3 (2.7 + 0.1)	27
5號	TL2 + CTL2 (1.8 + 0.6)	3
6號	TL1 + CTL3 (2.7 + 0.1)	27

16*比率係以酶活性計

使用3種不同的方法(肽尺寸排阻層析法、酶特異性分析及殘餘抗原性法)來分析所產生之6種水解物。藉由監測

OH-消耗量來分析6種反應之水解效率。結果分別顯示於圖1至圖3中。

抗原性：使用經設計用於定量食品中之天然及加工型殘餘β乳球蛋白的商用酶免疫檢定(RIDASCREEN β乳球蛋白(BLG)，r-Biopharm公司)來測試水解物之殘餘抗原性。用BLG標準物(BLG Standards)塗覆微量滴定孔，添加樣品溶液及抗-BLG抗體。游離的及固定的BLG競爭抗體結合位點。在洗滌後，添加用過氧化酶標記之二次抗體且使其與抗體-BLG-複合物結合。接著藉由洗滌步驟移除所有未結合的酶結合物。向各孔添加酶受質及色原體(chromogen)。結合酶結合物使無色色原體轉化成有色產物。用光度法進行量測且吸收值與樣品中之BLG濃度成反比。

實例1中所測試之6種水解物皆呈現小於0.85毫克BLG當量/公克蛋白質當量之殘餘β乳球蛋白(BLG)。此結果遠低於可根據2006年12月5日，JO 6.12.2006 L339/16關於嬰兒配方公開之歐洲指令2006/125/CE所指示而斷定嬰兒配方具低過敏原性時的含量。該指令要求免疫反應性蛋白質小於總含氮物質之1%。此相當於3毫克殘餘β乳球蛋白(BLG/公克蛋白質當量)。BLG大致佔乳清中之總免疫反應性物質的30%至50%。因此，BLG含量低於3毫克殘餘β乳球蛋白/公克蛋白質當量指示產物含有之免疫反應性蛋白質不超過1%。該含量與歐洲委員會指令(European Commission Directive)2006/125/CE之附件4(Annex IV)一致，其中該附件闡述關於據稱能降低過敏風險之嬰兒配方的一些條件。

結論：

已鑑定出許多由微生物源獲得之胰蛋白酶樣內肽酶與胰凝乳蛋白酶樣內肽酶的混合物適用於製造與由哺乳動物酶產生之牛奶水解物具有類似性質的牛奶蛋白質水解物。本發明者已進行一系列實驗來評估酶之最佳比率以提供具有所要物理、化學及生物性質之水解物。改變細菌源及胰蛋白酶樣內肽酶與胰凝乳蛋白酶樣內肽酶(基於酶之重量)之比率以及酶與蛋白質受質之比率及溫度。

發現由尖孢鐮刀菌或白色庫茨涅爾氏菌獲得之胰蛋白酶樣內肽酶與由擬諾卡氏菌或金龜子綠僵菌獲得之胰凝乳蛋白酶樣內肽酶組合的混合物為用於替代當前使用之哺乳動物酶的良好候選物。本發明之混合物，尤其當以特定比率使用胰蛋白酶樣內肽酶與胰凝乳蛋白酶樣內肽酶時，顯然顯示提供極其類似於彼等用哺乳動物酶製得者之肽型態。

尤為準確的是：由尖孢鐮刀菌獲得之胰蛋白酶樣內肽酶(T)與由擬諾卡氏菌獲得之胰凝乳蛋白酶樣內肽酶(C)以9:1之T/C比率(基於酶重量)組合，由白色庫茨涅爾氏菌獲得之胰蛋白酶樣內肽酶(T)與由擬諾卡氏菌獲得之胰凝乳蛋白酶樣內肽酶(C)以27:1之T/C比率組合，及由尖孢鐮刀菌獲得之胰蛋白酶樣內肽酶(T)與由擬諾卡氏菌獲得之胰凝乳蛋白酶樣內肽酶(C)以27:1之T/C比率組合。

如此產生之水解物呈現低過敏原性。其可在今後生命中降低過敏風險且可適合併入以有過敏風險之健康個體為目標之嬰兒配方及/或營養組合物中。其適合併入用於成人

或兒童或嬰兒之任何類型的食品補充劑中。其亦可具有誘導口服耐受性之能力。

除了過敏預防態樣以外，自微生物源獲得之胰蛋白酶與胰凝乳蛋白酶之混合物可用於製造治療產物，諸如意欲供給過敏個體之產物。其亦可用於製造以除預防/治療過敏外之其他益處為目標的任何類型之蛋白質水解物。

【圖式簡單說明】

圖1：實例1之水解物之肽尺寸排阻層析分離。肽係基於其分子量(MW)使用尺寸排阻層析柱(Superdex Peptide 10/300 GL，來自GE)而分離。利用UV於215 nm下監控肽之溶離。結果顯示，如由自高至低分子量之急劇降低所示，組合2、4及6之尺寸分佈十分接近於參照PTN(實驗1，參見正文)，而組合3及5反而觀察到一平台(參見趨勢線)。該等結果表明：相較於參照組，實驗2、4及6之酶促功效生成尺寸十分類似之肽群，而實驗3及5更多地富含較小的肽。

圖2：實例1之水解物之酶特異性分析。肽序列係藉由LC-MS/MS(LTQ-Orbitrap MS，配備Allegro HPLC泵，來自Thermo Scientific)鑑定。針對各鑑定之序列，抽取分裂位置(位置-1)前及後之5個胺基酸，且建立頻率圖(或序列保守性圖)。自最高(頂部)至最低(底部)頻率繪製胺基酸，且其垂直尺寸與其頻率成比例。結果顯示實驗4及6中所用之酶混合物具有與參照PTN(實驗1)相當的酶特異性。

圖3：在實驗1之水解反應期間OH⁻消耗的動力學(所消耗的μmole OH⁻/g蛋白質)。

序列表

<110> 瑞士商耐斯泰克公司

<120> 基於牛奶之蛋白質水解物及由其製造之嬰兒配方及營養組合物

<130> 11148

<140> 100135658

<141> 2011-09-30

<150> 10186222.5

<151> 2010-10-01

<160> 1

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 225

<212> PRT

<213> 白色庫茨涅爾氏菌

<400> 1

Ile Val Gly Gly Thr Lys Ala Ser Thr Ser Thr Tyr Pro Phe Val Val
 1 5 10 15

Phe Leu Thr Asp Ser Thr Gly Phe Gln Phe Cys Gly Gly Thr Leu Val
 20 25 30

Lys Pro Asn Lys Val Val Thr Ala Ala His Cys Thr Val Gly Glu Ser
 35 40 45

Ala Ala Asn Ile Arg Val Val Ala Gly Arg Asp Asp Lys Gln Ser Thr
 50 55 60

Ala Gly Thr Val Ser Lys Val Ser Lys Ile Trp Ile His Pro Ser Tyr
 65 70 75 80

Gln Asp Ala Thr Lys Gly Ser Asp Val Ser Val Leu Thr Leu Ser Thr
 85 90 95

Ser Leu Thr Gln Phe Thr Pro Leu Pro Leu Ala Ala Thr Thr Asp Thr
 100 105 110

Ala Leu Tyr Lys Glu Gly Thr Ala Ala Thr Ile Leu Gly Trp Gly Asp
 115 120 125

Thr Thr Glu Gly Gly Ser Ala Ser Arg Tyr Leu Leu Lys Ala Thr Val
 130 135 140

Pro Leu Thr Ser Asp Ala Thr Cys Lys Lys Ala Tyr Gly Glu Tyr Ser
 145 150 155 160

Ser Thr Ala Met Val Cys Ala Gly Tyr Pro Gln Gly Gly Thr Asp Thr
 165 170 175

Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Ala Gly Asn Lys Leu Ile
 180 185 190

201215332

gly ile Thr ser Trp gly Gln gly Cys Ala Glu Ala gly Tyr Pro Gly
195 200 205

val Tyr Thr Arg val Ala Thr Tyr ser ser Leu Ile Thr Gln Gln Leu
210 215 220

gly
225

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：100135658

※申請日：100.9.30

※IPC 分類：~~C12P~~

(2006.01)

A23J 3/34

(2006.01)

A23L 1/30

一、發明名稱：(中文/英文)

基於牛奶之蛋白質水解物及由其製造之嬰兒配方及營養組合物

MILK-BASED PROTEIN HYDROLYSATES AND INFANT

FORMULAE AND NUTRITIONAL COMPOSITIONS MADE THEREOF

二、中文發明摘要：

本發明係關於一種包含由牛奶獲得之蛋白質水解物的組合物，其係藉由使用源於微生物之酶處理而得到。本發明使用胰蛋白酶樣酶及胰凝乳蛋白酶樣酶。該組合物尤其意欲用於在嬰兒中誘導耐受性，其作用為調節今後生命中潛在發生之過敏。該組合物亦可用於患病成年患者。較佳地，該組合物為嬰兒配方、較大嬰兒配方(infant follow-up formula)、成長奶品或嬰孩食物或經腸式完全營養組合物。

三、英文發明摘要：

A composition comprising protein hydrolysates derived from milk is obtained by the treatment of enzymes derived from microorganisms. A trypsin-like enzyme and a chemotrypsin-like enzyme are used. The composition is in particular intended for inducing tolerance in infants with the effect of modulating the potential occurrence of allergies later in life. The composition can also be used in sick adult patients. Preferably the composition is an infant formula, infant follow-up formula, growing-up milk or baby food or an enteral complete nutritional composition.

七、申請專利範圍：

1. 一種包含基於牛奶之蛋白質水解物的組合物，其可藉由用以下物質處理基於牛奶之蛋白質材料的溶液而獲得：
 - a)至少一種由微生物獲得之胰蛋白酶樣內肽酶，及
 - b)至少一種由微生物獲得之胰凝乳蛋白酶樣內肽酶，該組合物係用作藥物或用作具有治療或預防作用之組合物。
2. 如請求項1之組合物，其係用於在有需要之嬰兒或患者中誘導口服耐受性，或用於在有需要之嬰兒或患者中降低過敏風險，或用於在嬰兒期或在今後生命中降低過敏嚴重性或頻率，尤其在有需要之嬰兒或患者中。
3. 如請求項1或2之組合物，其中該至少一種胰蛋白酶樣內肽酶係由鐮刀菌屬 (*Fusarium*) 菌株、較佳為尖孢鐮刀菌 (*Fusarium oxysporum*) 獲得，且其與由 SWISSPROT 編號 P35049 表示之序列具有至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 之序列一致性。
4. 如請求項1、2或3之組合物，其中該至少一種胰蛋白酶樣內肽酶係由庫茨涅爾氏菌屬 (*Kutzneria*) 菌株，較佳為白色庫茨涅爾氏菌 (*Kutzneria albida*) 獲得，且其與成熟多肽 SEQ ID NO:1 具有至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 之序列一致性。
5. 如請求項1至4中任一項之組合物，其中該至少一種胰凝

乳蛋白酶樣內肽酶係由擬諾卡氏菌屬 (*Nocardiopsis*) 菌株，較佳為擬諾卡氏菌 (*Nocardiopsis Sp.*) 獲得，或由綠僵菌屬 (*Metarhizium*)，較佳為金龜子綠僵菌 (*Metarhizium anisopliae*) 獲得，或由小枝孢屬 (*Brachysporiella*)，較佳為小枝孢 (*Brachysporiella gayana*) 獲得。

6. 如請求項1至5中任一項之組合物，其中該至少一種胰凝乳蛋白酶樣內肽酶與 EMBL CDS CAI94179 或 TREMBL:Q9Y843 或 CGMCC 0865(WO2004/072279 中所揭示之胺基酸1至186)之多肽序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%之序列一致性。
7. 如前述請求項中任一項之組合物，其中該胰蛋白酶樣內肽酶與該胰凝乳蛋白酶樣內肽酶之比率在5:1至35:1，較佳為20:1至30:1之範圍內，更佳為27:1，其中該比率係以酶之重量計。
8. 如請求項6之組合物，其中當該胰蛋白酶樣內肽酶係由鐮刀菌屬菌株獲得，且該胰凝乳蛋白酶樣內肽酶係由擬諾卡氏菌屬菌株獲得時，該胰蛋白酶樣內肽酶與該胰凝乳蛋白酶樣內肽酶之比率為9:1，其中該比率係以酶之重量計。
9. 如前述請求項中任一項之組合物，其中該基於牛奶之蛋白質材料為乳清蛋白、酪蛋白或兩者之混合物，較佳具有以重量計至少50/50、60/40或70/30之乳清/酪蛋白比

率，該基於牛奶之蛋白質材料最佳為乳清蛋白。

10. 如請求項9之組合物，其中該基於牛奶之蛋白質材料為甜乳清蛋白，較佳為已自其中完全或部分移除酪蛋白糖巨肽(caseino-glyco-macropeptide)之甜乳清蛋白，或為乳清蛋白分離物或該等蛋白質源之混合物。

11. 如請求項9或10之組合物，其中該基於牛奶之蛋白質材料為改質甜乳清與脫礦物質乳清蛋白之混合物。

12. 一種包含基於牛奶之蛋白質水解物的組合物，其可藉由用以下物質處理基於牛奶之蛋白質材料的溶液而獲得：

a)至少一種胰蛋白酶樣內肽酶，其係由鐮刀菌屬菌株，較佳為尖孢鐮刀菌獲得，且其較佳與序列SWISSPROT編號P35049具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%之序列一致性，

b)至少一種胰凝乳蛋白酶樣內肽酶，其係由擬諾卡氏菌屬菌株，較佳為擬諾卡氏菌獲得，且其較佳與序列EMBL CDS CAI94179具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%之序列一致性，

其中該胰蛋白酶樣內肽酶與該胰凝乳蛋白酶樣內肽酶之比率以酶之重量計為20:1至35:1，較佳為25:1至30:1，更佳為27:1。

13. 一種包含基於牛奶之蛋白質水解物的組合物，其可藉由用以下物質處理基於牛奶之蛋白質材料的溶液而獲得：

a)至少一種胰蛋白酶樣內肽酶，其係由庫茨涅爾氏菌屬菌株，較佳為白色庫茨涅爾氏菌獲得，且其與SEQ ID NO:1之成熟多肽序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%之序列一致性，及

b)至少一種由微生物獲得之胰凝乳蛋白酶樣內肽酶。

14. 如請求項13之組合物，其中該胰凝乳蛋白酶樣內肽酶係由擬諾卡氏菌屬菌株，較佳為擬諾卡氏菌獲得，或由綠僵菌屬，較佳為金龜子綠僵菌獲得，或由小枝孢屬，較佳為小枝孢獲得。
15. 如請求項13或14之組合物，其中胰蛋白酶樣內肽酶與胰凝乳蛋白酶樣內肽酶之比率以酶重量計在5:1至35:1，較佳為20:1至30:1之範圍內，最佳為27:1。
16. 如前述請求項中任一項之組合物，其中存在於該蛋白質水解物中之乳糖含量在0.05% w/w至30% w/w，較佳為0.10% w/w至20% w/w，更佳為0.10% w/w至0.20% w/w之範圍內。
17. 如前述請求項中任一項之組合物，其中該組合物為以預防或治療過敏為目標之嬰兒配方、第二階段配方、嬰孩食物配方、嬰兒穀類配方或成長牛奶、嬰兒或兒童食品補充劑或成人營養組合物，且該組合物較佳為初生嬰兒配方。
18. 一種包含基於牛奶之蛋白質水解物之組合物的用途，其係藉由用以下物質處理基於牛奶之蛋白質材料的溶液而

獲得：

- a)至少一種由微生物產生之胰蛋白酶樣內肽酶，及
- b)至少一種由微生物產生之胰凝乳蛋白酶樣內肽酶，

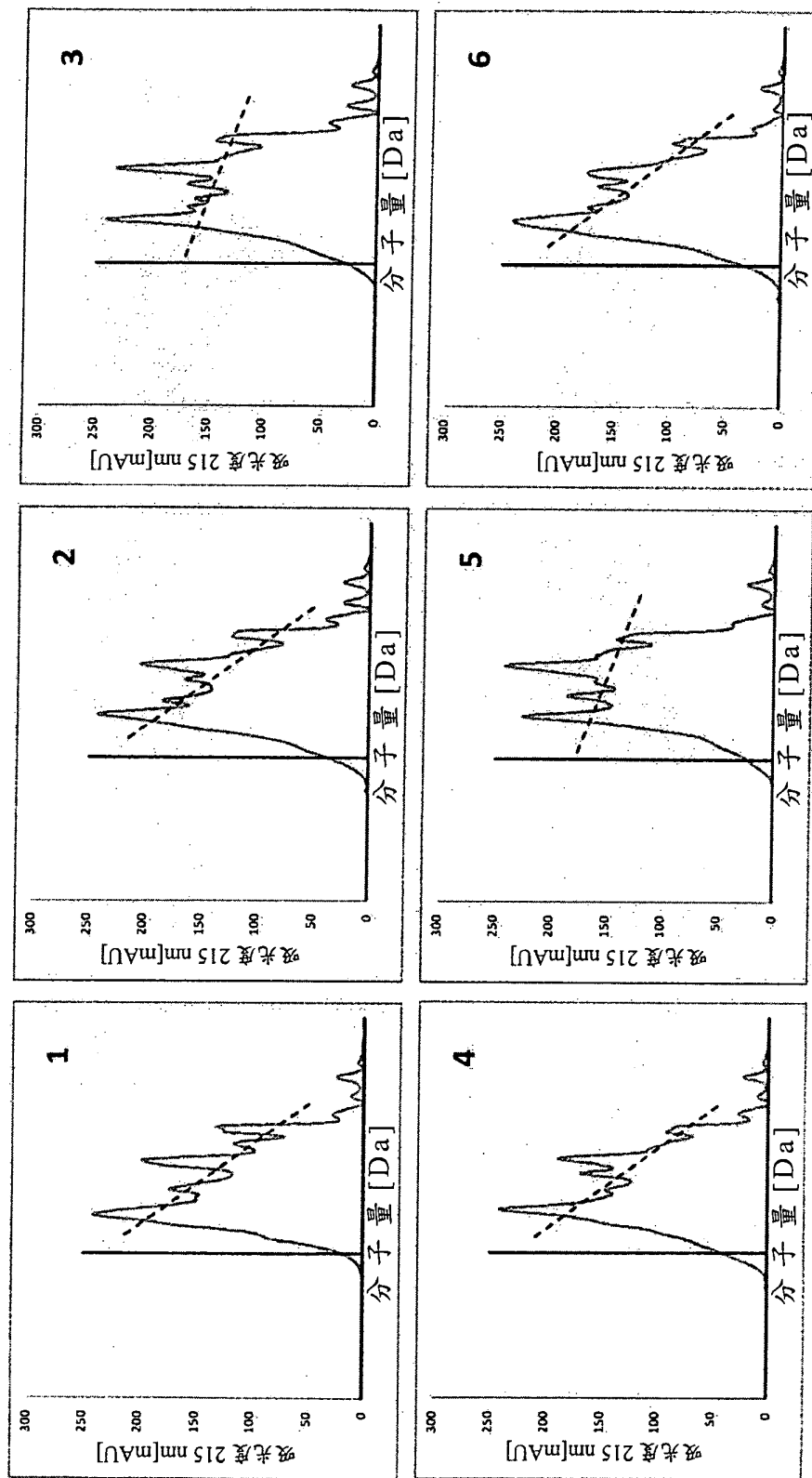
其係作為嬰兒配方或食品補充劑，用於在有需要之嬰兒或患者中誘導口服耐受性，或用於在有需要之嬰兒或患者中降低過敏風險，或用於在嬰兒期或在今後生命中降低過敏嚴重性，尤其在有需要之嬰兒或患者中。

19. 如請求項18之組合物的用途，其中該胰蛋白酶樣內肽酶係由鐮刀菌屬菌株，較佳為尖孢鐮刀菌獲得，且其與由SWISSPROT編號P35049表示之序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%之序列一致性；或係由庫茨涅爾氏菌屬菌株，較佳為白色庫茨涅爾氏菌獲得，且其與SEQ ID No:1之多肽具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%之序列一致性。
20. 如請求項18或19之組合物的用途，其中該胰凝乳蛋白酶樣內肽酶係由擬諾卡氏菌屬菌株，較佳為擬諾卡氏菌獲得，或由綠僵菌屬，較佳為金龜子綠僵菌獲得，或由小枝孢屬，較佳為小枝孢獲得。
21. 如請求項20之組合物的用途，其中該胰凝乳蛋白酶樣內肽酶與序列EMBL CDS CAI94179或TREMBL:Q9Y843或CGMCC 0865(WO2004/072279中所揭示之胺基酸1至186)具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少

95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 之序列一致性。

22. 如請求項 18、19、20 或 21 之組合物的用途，其中該組合物係用作以預防或治療過敏為目標之嬰兒配方、第二階段配方、嬰孩食物配方、嬰兒穀類配方或成長牛奶、嬰兒或兒童食品補充劑或成人營養組合物，或用於患病個體之成人乳飲料，且該組合物較佳為初生嬰兒配方。

八、圖式：



----- = 分子量趨勢線

| = 10 kDa 截斷值

圖 1

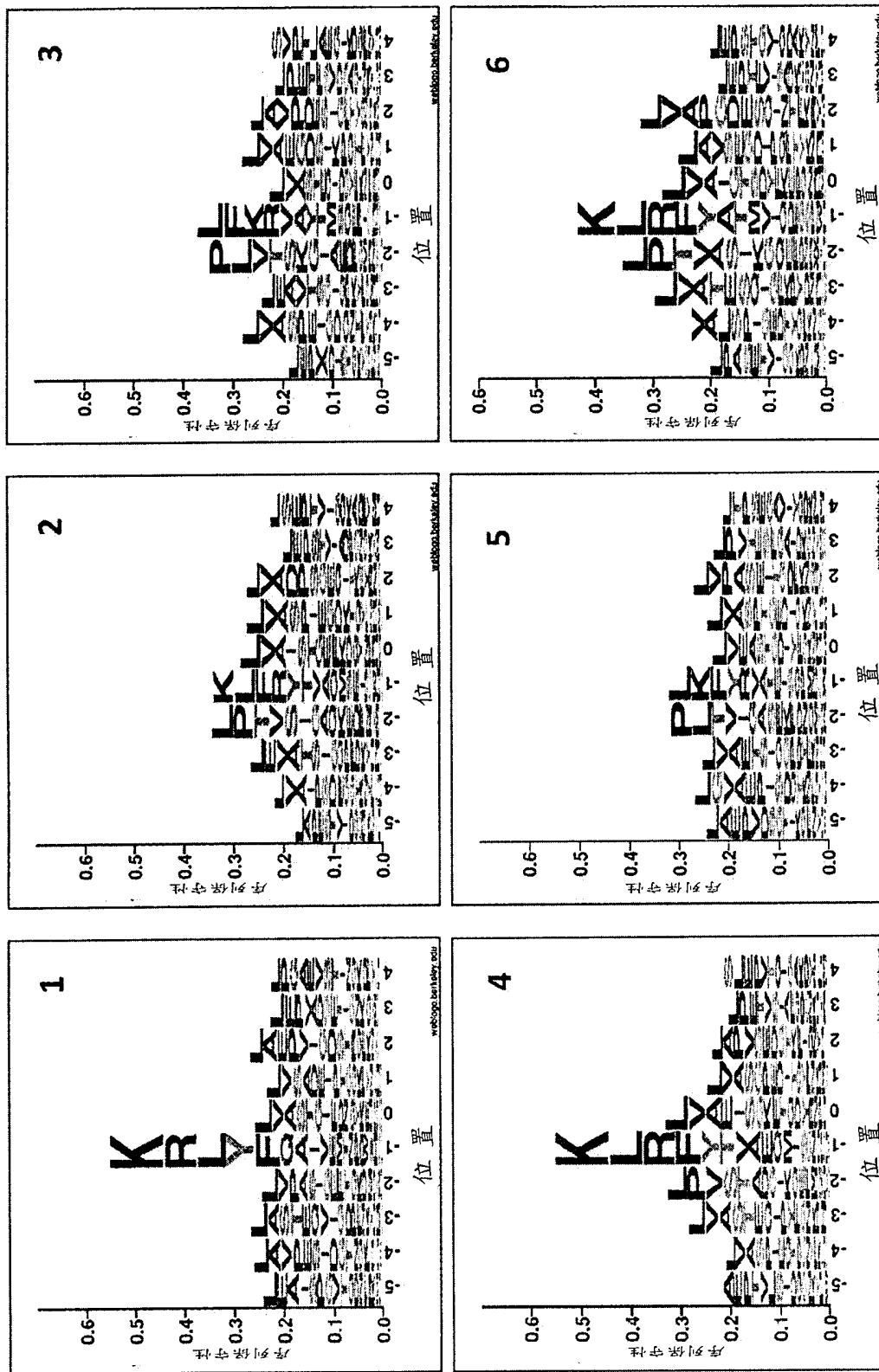


圖 2

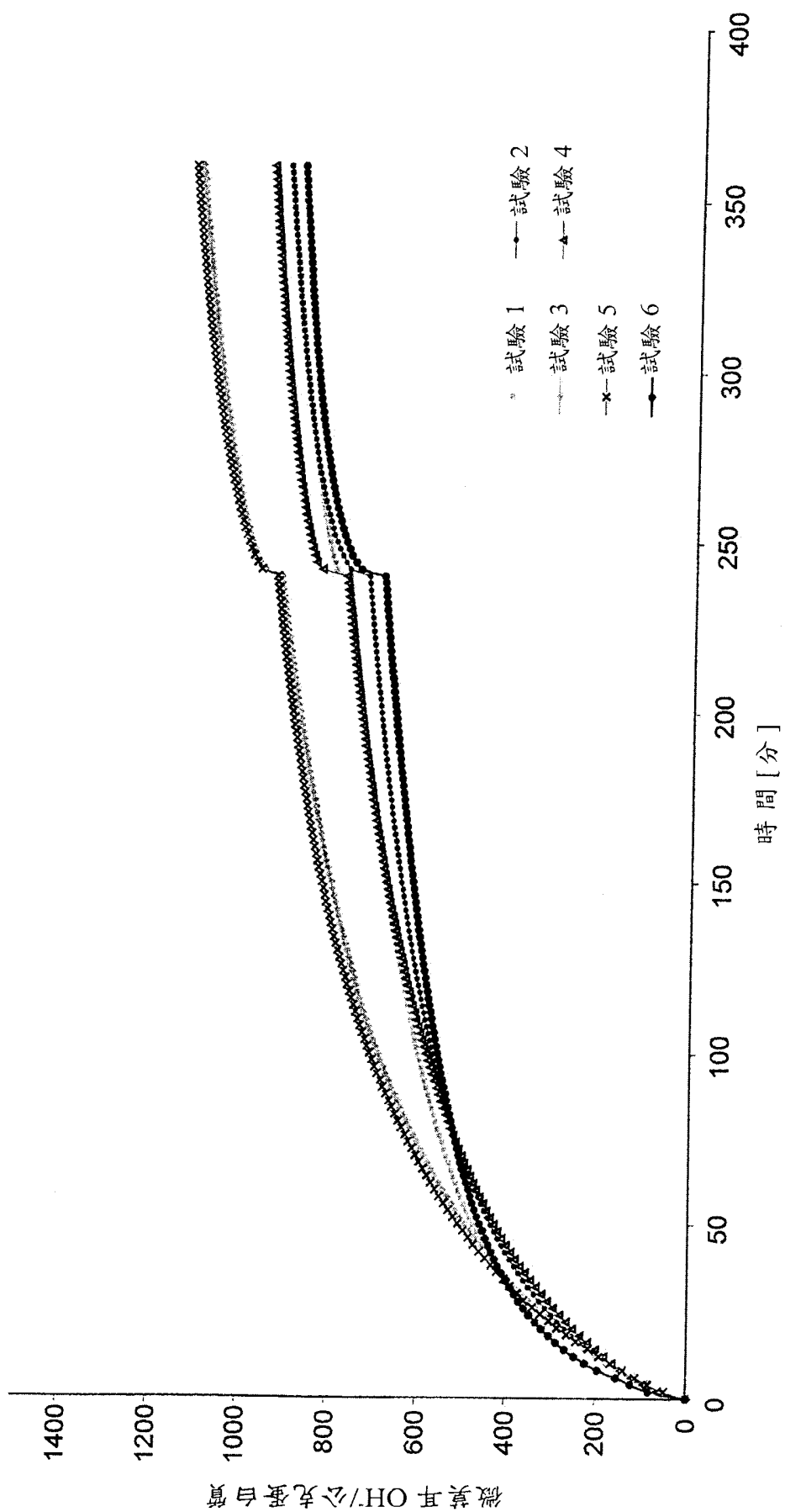


圖 3

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)