



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103254278 B

(45) 授权公告日 2015. 07. 22

(21) 申请号 201310023562. 3

A61P 9/12(2006. 01)

(22) 申请日 2006. 06. 08

A61P 39/06(2006. 01)

C12P 21/06(2006. 01)

(30) 优先权数据

P200501373 2005. 06. 08 ES

(56) 对比文件

W0 03018606 A2, 2003. 03. 06, 全文.

(62) 分案原申请数据

200680029333. 0 2006. 06. 08

Hernandez-ledesma, B 等. Angiotensin converting enzyme inhibitory activity in commercial fermented products. Formation of peptides under simulated gastrointestinal digestion. 《Journal of Agricultural and food chemistry》. 2004, 第 52 卷 (第 6 期), 第 1504-1510 页.

(73) 专利权人 康斯乔最高科学研究公司

地址 西班牙马德里

Bakalkin, G. Ya 等. Relationship between primary structure and activity in exorphins and endogenous opioid peptides. 《FEBS LETTERS》. 1992, 第 310 卷 (第 1 期), 第 13-16 页.

(72) 发明人 I. 雷西奥桑彻茨

A. 奎罗斯德尔博斯奎

B. 赫南德茨勒德斯马

J. A. 戈梅茨鲁茨

M. 米古尔卡斯特罗

M. L. 阿米戈加里多

I. 洛佩茨埃克斯波西托

M. M. 拉莫斯冈扎勒茨

A. 阿莱克桑德里德阿蒂纳诺

M. 康特雷拉斯戈梅茨

审查员 夏颖

(74) 专利代理机构 中国专利代理 (香港) 有限公

司 72001

代理人 刘辛 梁谋

(51) Int. Cl.

C07K 7/06(2006. 01)

权利要求书1页 说明书19页

序列表7页 附图10页

(54) 发明名称

奶酪蛋白的酶水解产物中鉴定的生物活性肽及其生产方法

(57) 摘要

本发明涉及源自奶蛋白的生物活性制品的生产, 该奶蛋白用于生产源自奶蛋白, 特别是酪蛋白的生物活性奶制品。可以通过化学, 生化或通过酶处理从含有其的蛋白质获得本发明的 16 个肽并产生具有抗微生物活性, 体外血管紧张素转化酶抑制剂活性和 / 或抗高血压活性和 / 或抗氧化活性的肽。所述营养药物产品适用于食品和制药工业中, 以水解产物或生物活性肽的形式。

1. 生物活性肽,其特征在于:
 - a. 具有体外血管紧张素转化酶-抑制活性和/或体内抗高血压活性和/或抗氧化活性,
 - b. 存在于胃蛋白酶水解的奶酪蛋白酶水解产物中,和
 - c. 为 SEQ. ID No. 13。
2. 根据以上权利要求 1 的生物活性肽,其特征在于源自 α_{s2} -酪蛋白。
3. 根据以上权利要求 2 的生物活性肽,其特征在于模拟胃肠消化后获得。
4. 根据以上权利要求 1 的生物活性肽,其特征在于源自 α_{s1} -酪蛋白。
5. 根据以上权利要求 1 的生物活性肽,其特征在于呈现出体外血管紧张素转化酶-抑制活性。
6. 根据以上权利要求 1 的生物活性肽,其特征在于呈现出抗高血压活性。
7. 根据以上权利要求 1 的生物活性肽,其特征在于通过氧自由基螯合呈现出抗氧化活性。
8. 根据以上权利要求 1 的生物活性肽,其特征在于通过化学合成方法、酶水解方法或通过重组方法获得。
9. 根据以上权利要求 8 的生物活性肽,其特征在于通过酶水解 α_{s1} -酪蛋白或 α_{s2} -酪蛋白的方法获得。
10. 生产根据以上权利要求 1 的生物活性肽的方法,其特征在于:
 - a. 将奶酪蛋白以合适的浓度溶解或分散于水或缓冲溶液中,以获得混合物,
 - b. 在适于蛋白水解酶胃蛋白酶作用的 pH 下调节该混合物,
 - c. 向该混合物加入所述胃蛋白酶,裂解奶酪蛋白,和
 - d. 使蛋白水解酶胃蛋白酶与蛋白反应 10 分钟至 24 小时,以获得如权利要求 1-9 中任一项所述的生物活性肽。
11. 根据权利要求 10 的方法,其特征在于:

以酶-底物 w/w 比例 3.7/100 并在 37°C、pH3.0 下加入胃蛋白酶;和

反应时间为 30 分钟至 3 小时。
12. 生物活性制品,其特征在于其包含酶水解产物、其级分或其纯化物,所述酶水解产物、其级分或其纯化物含有由以上权利要求 1 至 9 中任一项所述生物活性肽组成的肽。

奶酪蛋白的酶水解产物中鉴定的生物活性肽及其生产方法

[0001] 本申请是 2006 年 6 月 8 日提交的题为“奶酪蛋白的酶水解产物中鉴定的生物活性肽及其生产方法”的国家申请号为 200680029333.0 (PCT/ES2006/070079) 的发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明包括源自奶蛋白的生物活性制品的生产。这些蛋白在酶处理后产生具有抗微生物活性和 / 或体外血管紧张素转化剂抑制剂活性 (ACE- 抑制活性) 和 / 或抗高血压活性和 / 或抗氧化活性的肽, 其适用于食品和药物工业中。

背景技术

[0003] 奶在人营养中的作用从出生开始就是必需的并且是高营养和功能价值的食物。新的生物分离技术的最新发展使得可以分级奶的不同成分来用于新的食品和非食品目的, 新的应用有助于提高由此引起的消费。因此, 致力于从奶级分生产分离蛋白的不同的公司关注提高和多样化一些成分的用途, 如酪蛋白和乳清蛋白。这是涉及乳铁蛋白生产的工业的情况, 乳铁蛋白用作抗微生物剂并且已经用于婴儿食品, 酸奶, 食物补充剂, 特殊配方以及牙齿和皮肤产品中。乳铁蛋白还因为其抗微生物活性用作鲜奶中的添加剂来延长其保质期。

[0004] 近几年来, 由于消费者关于饮食和健康之间存在关系的提高意识, 功能食品已经闯入食品工业中。将功能性配料定义为将其掺入食品中时发挥特定生物活性的那些成分, 该活性超出起码的营养作用, 那些中由于它们的多样性和多功能性处于突出位置的一种是生物活性肽。这些肽在前体蛋白质内是无活性片段, 但是在通过体内和 / 或体外水解过程释放后, 其在体内发挥出不同的生理功能。因为在 1979 发现了它们, 已经描述了源自食物蛋白的具有不同生物活性的肽, 这些活性为: 抗微生物, 抗高血压, 免疫调节, 抗血栓形成, 阿片类 (opioid), 抗氧化剂等。这些肽在食品和 / 或药品中具有潜在的用途并可以通过不同的策略释放出来, 目前最常使用的是酶水解和微生物发酵。

[0005] 一些值得特别注意的生物活性肽是发挥抗微生物特性的那些 (R. Floris, I. Recio, B. Berkhout 和 S. Visser, Antibacterial and antiviral effects of milk proteins and derivatives thereof, (奶蛋白及其衍生物的抗细菌和抗病毒效果), Current Pharmaceutical Design, 2003, 9:1257-1275)。已经研究奶的抗微生物活性很长时间了, 并通常归因于该食品中存在的具有抗微生物活性的不同蛋白质 (免疫球蛋白, 乳铁蛋白, 乳过氧化物酶, 溶菌酶等)。然而, 最近也已经证实了源自奶蛋白的肽的抗微生物活性。尽管迄今为止不存在对源自奶蛋白的抗微生物肽的作用机理的结论性研究, 但主要的发现已经描述了这些生物活性序列中的一些影响和光滑细菌膜的能力 (D. Chapple, D. J. Mason, C. L. Joannou, E. W. Odell, V. Grant, R. W. Evans, Structure-function relationship of antibacterial synthetic peptides homologous to a helical surface region on human lactoferrin against Escherichia coli serotype 0111 (抗

大肠杆菌血清型 0111 的人乳铁蛋白上螺旋表面片段同源的抗细胞合成肽的结构-功能相关性), *Infection and Immunity*, 1998, 66, 2434-2440)。已经描述了从牛来源的酪蛋白酶水解产物获得的具有抗微生物活性的肽, 如 α_{s2} -酪蛋白 (EP 1114060, Process for producing cationic peptides from biological fluids(从生物流体生产阳离子肽的方法) 以及 β -酪蛋白和 κ -酪蛋白 (W099/26971, Antimicrobial peptides(抗微生物肽))。通过相似的水解过程, 已经分离并鉴定了源自乳清蛋白的具有抗微生物特性的肽, 如乳铁蛋白 (W02004/089986, Antimicrobial peptide from transferrin family(来自转铁蛋白家族的抗微生物肽))。

[0006] 已知发达国家中与高血压相关的冠心病的高发病率, 另一组很重要的生物活性肽是具有抗高血压活性的肽。这些肽中的许多通过抑制血管紧张素转化酶 (ACE) 调节肾素-血管紧张素系统来起作用 (T. Takano, Milk derived peptides and hypertension reduction(奶产生的肽和高血压降低), *Intrnational Dairy Journal*, 1998, 8 :375-381), 尽管没有排除它们的效果可能是通过其他机理。已经发现了从酪蛋白 (US6514941, Method of preparing a casein hydrolyzate enriched in antihypertensive peptides(制备富含抗高血压肽的酪蛋白水解产物的方法) 和乳清蛋白 (W001/85984, Enzymatic treatment of whey proteins for the production of antihypertensive peptides, the resulting products and treatment of hypertension in mammals(用于生产抗高血压肽的乳清蛋白的酶处理, 所得到的产物以及哺乳动物中高血压的治疗)) 的酶水解产物获得的不同的肽具有 ACE-抑制活性 (AECIa)。对具有抗高血压活性的肽的结构-活性相关性的研究揭示了特定的疏水性氨基酸在实现该活性中的基础作用 (H.-S. Cheung, F.-L. Wang, M. A. Ondetti, E. F. Sabo 和 D. W. Cushman. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme(肽底物和血管紧张素转化酶抑制剂的结合)。Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence(COOH-末端二肽序列的重要性)。 *Journal of Biological Chemistry* 1980, 255 :401-407)。还认为这些氨基酸中一些的存在对于发挥抗氧化活性是必需的, 并且这种活性在近几年中呈现出主要的重要性 (H. M. Chen, K. Muramoto, F. Yamauchi, K. Fujimoto 和 K. Nokihara, Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein(从大豆蛋白消化液中发现的肽片段设计的含组氨酸肽的抗氧化特性), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, 46 :49-53)。不同的退化性疾病, 如癌症, 阿尔茨海默氏病, 白内障或自身老化与细胞成分, 脂质, 蛋白质或 DNA 的氧化相关。这些疾病可以作为氧化剂和生物体的抗氧化系统之间不平衡的结果而产生, 出于该原因, 膳食中抗氧化化合物的摄入在防止这类疾病中是有用的。此外, 食物中存在的这些抗氧化化合物延迟了脂肪氧化过程, 认为是脂肪氧化过程引起了腐败, 并由于这些食物呈现出令人不愉快的气味和口味。最近的研究已经揭示不同奶蛋白及其衍生物通过不同的作用机理发挥抗氧化活性的能力。因此, 已经描述了来自水解的酪蛋白 (K. Suetsuna, H. Ukeda 和 H. Ochi, Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein(源自酪蛋白的自由基清除活性肽的分离和表征), *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2000, 11 :128-131; EP1188767, Isolated antioxidant peptides from casein and methods for preparing,

isolating and identifying antioxidant peptides(从酪蛋白分离的抗氧化肽以及制备,分离和鉴定抗氧化肽的方法)和乳清蛋白(B. Hernández-Ledesma, A. Davalos, B. Bartolomé 和 L. Amigo, Preparation of antioxidant enzymatic hydrolyzates from α -lactalbumin and β -lactoglobulin(从 α -乳清蛋白和 β -乳球蛋白制备抗氧化酶水解产物)。Identification of active peptides by HPLC-MS/MS(通过 HPLC-MS/MS 鉴定活性肽), Journal of Agricultural and Food chemistry 2005, 53, 588-593) 的具有螯合自由基能力的肽。此外,酪蛋白已经成为具有酶催化脂肪氧化过程抑制活性的蛋白质的主要来源(S. G. Rival, S. Formaroli, C. G. Boeriu 和 H. J. Wichers, Caseins and casein hydrolyzates. I. Lipooxygenase inhibitory properties(酪蛋白和酪蛋白水解产物。I. 脂氧化酶抑制特性), Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49 : 287-294)。

[0007] 迄今为止进行的大部分研究围绕源自牛酪蛋白的肽的生物活性。然而,对通过其他类型酪蛋白如绵羊和山羊酪蛋白的肽发挥的生物活性存在很少的公开数据。J. A. Gomez-Ruiz, I. Recio 和 A. Pihlanto(Antimicrobial activity of ovine casein hydrolyzates(绵羊酪蛋白水解产物的抗微生物活性)。A preliminary study : Milchwissenschaft-Milk Science International 2005, 60 : 41-45) 描述了通过 β -酪蛋白水解产物发挥的对大肠杆菌 JM103 代谢活性有效的剂量依赖性抑制效果。然而,在该研究中没有进行鉴定引起该作用的肽。相反,实际上已经鉴定了在 Manchego 干酪制备特征性的发酵和老化过程中从绵羊酪蛋白释放的几个序列,其中一些已经呈现出 ACE-抑制活性(J. A. Gomez-Ruiz, M. Ramos 和 I. Recio, Identification and formation of angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheese by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry(通过高效液相色谱串联质谱鉴定和形成 Manchego 干酪中血管紧张素转化酶抑制肽), Journal of Chromatography A, 2004, 1054 : 269 : 277)。这些序列的 IC_{50} 值(抑制 50% 酶活性的浓度)为 24.1 至 1275.4 μ M。在该研究中,呈现出最高 ACE-抑制活性的肽是 VRYL 序列(SEQ ID No. 11)的 α_{s1} -酪蛋白片段 f(205-208), 其显示出 24.1 μ M 的 IC_{50} 值(J. A. Gómez-Ruiz, M. Ramos 和 I. Recio, Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity of peptides isolated from Manchego cheese. Stability under simulated gastrointestinal digestion(从 Manchego 干酪分离的肽的血管紧张素转化酶抑制活性。模拟胃肠消化下的稳定性)。Int. Dairy Journal 2004, 1075-1080)。然而,对这些肽穿过肠屏障的能力和在体内发挥抗高血压效果的能力不存在公开的数据。必须强调的是许多在体外呈现出 ACE 抑制活性的肽通常在体内测试时失去全部或部分活性,或甚至在体外没有呈现任何显著 ACE-抑制活性的肽由于消化酶的作用在体内呈现出这种活性(M. Maeno, N. Yamamoto 和 T. takano, Identification of an anti-hypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from Lactobacillus helveticus CP790(通过来自瑞士乳杆菌(Lactobacillus helveticus)CP790 的蛋白酶产生的酪蛋白水解产物的抗高血压肽的鉴定), Journal of Dairy Science, 1996, 79 : 1316-1321)。关于从不同类型的酪蛋白释放的肽发挥多种生物活性如抗高血压,抗微生物和/或抗氧化活性的多功能能力不存在任何公开的研究。

[0008] 在食物蛋白的序列内存在特定的区域,其一旦通过水解释放,可以呈现出生物活性。这些片段,称为生物活性肽,可以在体内通过胃肠酶的作用在蛋白水解过程中产生,或在体外通过特定酶的作用或在制备特定食品的过程中产生。已知奶蛋白的高生物品质,主要的兴趣是从这些蛋白质获得生物活性肽,其用作膳食的一部分时,除了发挥它们基础的营养功能,能够产生用于维持健康和防止疾病的代谢或生理效果。从奶蛋白生产生物活性肽使得可以发现该食物超出常规营养价值的新用途,包括产生药物和营养药物产品。这将有助于健康,安全,高质量食品的研发,有助于最佳利用奶制品所给予的并且使它们成为更高价值的。

发明内容

[0009] - 发明简述

[0010] 本发明包括通过酪蛋白部分的酶水解生产源自奶蛋白的产品,该产品含有具有抗微生物和 / 或体外 ACE- 抑制活性和 / 或抗高血压活性和 / 或抗氧化活性的生物活性肽。

[0011] 通过一种或多种含有所述生物活性肽氨基酸序列的蛋白,其肽或片段的水解来生产生物活性肽,使用蛋白水解酶(优选胃蛋白酶,以及在合适的情况下,还可以使用 Corolase PP[®])以及使蛋白质链在用于其释放的合适位置分裂的水解条件。在使用两种酶模拟胃肠消化道情况中,获得耐胃肠吸收并通过血流的最小功能肽单位。该特征开辟了将这些肽应用于口服给药以外的其它给药形式或提高它们的吸收率。还可以通过化学合成或通过重组等方法来生产。可以按原样或从未加工的水解产物,低分子量浓缩物,或通过基于大小的分离方法或色谱方法获得的其他活性子部分摄入这些肽。

[0012] 这些水解产物,其级分或肽可以形成食品的一部分,用作食品防腐剂,以及在摄入时,支持身体的天然防御,除此之外,还可以用于制备治疗疾病的药品,特别是能够有助于血压和 / 或细菌感染的控制。本发明通过最佳利用所有奶蛋白所给予的并且使它们成为更高价值的而扩大了奶蛋白的应用。

[0013] - 发明详述

[0014] 本发明提供了从奶酪蛋白生产生物活性肽的方法。这些生物活性肽是 SEQ. ID No. 1, SEQ. ID No. 2, SEQ. ID No. 3, SEQ. ID No. 4, SEQ. ID No. 5, SEQ. ID No. 6, SEQ. ID No. 7, SEQ. ID No. 8, SEQ. ID No. 9, SEQ. ID No. 10, SEQ. ID No. 12, SEQ. ID No. 13, SEQ. ID No. 14, SEQ. ID No. 15, SEQ. ID No. 16, SEQ. ID No. 17, (表 1) 中所示氨基酸序列标识的那些,其中一些发挥抗微生物和 / 或体外 ACE- 抑制活性和 / 或抗高血压和 / 或抗氧化活性。

[0015] 本发明的起始原料可以是任何合适的物质,其包括一种或多种动物或植物来源的蛋白质或肽,或其可以来自微生物,其含有目标生物活性肽的氨基酸序列。显然可以使用属于 α_{s2} -酪蛋白序列的那些, (SEQ. ID No. 1, SEQ. ID No. 2, SEQ. ID No. 3, SEQ. ID No. 4, SEQ. ID No. 5, SEQ. ID No. 6, SEQ. ID No. 7, SEQ. ID No. 8, SEQ. ID No. 9, SEQ. ID No. 10, 表 1), 含有不同类型 α_{s2} -酪蛋白,其一部分或肽或其任何大小片段的任何制剂,单独或结合其他蛋白质。显然还可以使用属于 α_{s1} -酪蛋白 (SEQ. ID No. 12, SEQ. ID No. 13) 的那些,含有不同类型 α_{s1} -酪蛋白,其一部分或其肽或其所需大小片段的任何制剂,单独或结合其他蛋白。显然还可以使用属于 β -酪蛋白 (SEQ. ID No. 14, SEQ. ID No. 16 和 SEQ. ID No. 17) 的那些,含有不同类型 β -酪蛋白,其一部分,或其肽或其所需大小片段的任何制剂,单独或结合其他

蛋白。因此,根据所需要的肽,可以使用纯 α_{s1} -酪蛋白,纯 α_{s2} -酪蛋白,纯 β -酪蛋白,完整酪蛋白,酪蛋白酸盐,和不同呈现形式的奶,发酵的奶制品,奶蛋白水解产物,奶子产品,用于动物饲料的奶衍生物等。

[0016] 将所述起始原料以合适的浓度溶解或分散于水中或缓冲溶液中,在适于蛋白水解酶作用的 pH。可以使用任何能够分裂起始原料中存在的蛋白质并提供目标肽的蛋白水解酶,但是优选在 pH2.0-3.0 的胃蛋白酶。还可以使用能够实现底物发酵和蛋白质水解的蛋白水解微生物。

[0017] 为了选择最有活性水解产物的目的,最佳化水解条件:pH,温度,酶-底物比例,反应中断等。在一个特定的实施方案中,通过在 pH3.0 使用胃蛋白酶,以 3.7/100(w/w) 的酶-底物比例,以及在 37℃ 进行水解,时间段为 10 分钟至 24 小时,但是优选少于 30 分钟的时间段,来生产生物活性肽。

[0018] SEQ. ID No. 15, SEQ. ID No. 17(表 1) 所标识的生物活性肽,其具有体外 ACE-抑制活性和/或抗高血压活性,由于它们的结构和对胃肠酶的抗性,在胃肠消化后,将是最小的功能肽单位,其将是耐胃肠吸收的并通过血流。起始原料将是任何合适的底物,其包括一种或多种动物或植物来源的蛋白质或肽或其来自微生物,其含有目标生物活性肽氨基酸序列(SEQ. ID No. 15, SEQ. ID No. 17(表 1)),优选 α_{s2} -酪蛋白和 β -酪蛋白。显然可以使用含有不同类型的 α_{s2} -酪蛋白或 β -酪蛋白或其肽或其任何大小片段的任何制剂。例如:纯 α_{s2} -酪蛋白,纯 β -酪蛋白,完整酪蛋白,酪蛋白酸盐,和不同呈现形式的奶,发酵的奶制品,奶蛋白水解产物,奶子产品,用于动物饲料的奶衍生物等。

[0019] 为了选择最有活性水解产物的目的,最佳化水解条件:pH,温度,酶-底物比例,反应中断等。在一个特定的实施方案中,通过使用 Corolase PP[®] 水解胃蛋白酶水解的酪蛋白或其小于 3000Da 的部分或含有(PVYRYL SEQ. ID No. 7, HLPLPLL SEQ. ID No. 14)的合成肽来实现这,在 pH7-8,以 1:25 的酶-底物 w/w 比例,在 37℃ 持续大约 2.5 小时。通过在 95℃ 水浴中加热 10 分钟来中断反应。Corolase PP[®] 是蛋白水解猪胰腺酶的制剂,除了胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶,其含有氨基和羧基肽酶。

[0020] 接着,理想的是浓缩生物活性肽,并且已知具有抗微生物活性的肽本质上是阳离子,可以通过阳离子交换色谱(FPLC)进行含有生物活性肽的级分的分离。可以通过使用阳离子交换色谱,疏水性色谱等,或优选反相高效液相色谱(RP-HPLC)来进一步搜索,将活性子部分从更高阳离子级分中分离出来。或者,可以通过如超滤,透析,具有合适膜孔的电透析,凝胶过滤色谱等方法从水解产物浓缩生物活性肽。

[0021] 除了完整的水解产物及其一部分,表 1 中所示的标记为 SEQ. ID No. 1, SEQ. ID No. 2, SEQ. ID No. 3, SEQ. ID No. 4, SEQ. ID No. 5, SEQ. ID No. 6, SEQ. ID No. 7, SEQ. ID No. 8, SEQ. ID No. 9, SEQ. ID No. 10, SEQ. ID No. 12, SEQ. ID No. 13, SEQ. ID No. 14 的肽呈现出生物活性特征,主要是抗微生物活性和/或 ACE-抑制活性和/或抗高血压活性和/或抗氧化活性,并且这也是本发明的一个目的。特别地,用序列 SEQ. ID No. 1, SEQ. ID No. 2, SEQ. ID No. 3, SEQ. ID No. 4, SEQ. ID No. 5, SEQ. ID No. 6, SEQ. ID No. 7, SEQ. ID No. 8, SEQ. ID No. 9, SEQ. ID No. 10 标示的肽呈现出革兰氏阳性细菌的抗微生物活性,和至少序列 SEQ. ID No. 3 另外发挥出抗大肠杆菌的有效抗微生物作用。除此之外,序列 SEQ. ID No. 1 和 SEQ. ID No. 7 标识的肽呈现出有效的体外 ACE-抑制活性,并且在口服给药于这些动物时,序列 SEQ. ID

No. 7 在自发性高血压大鼠 (SHR) 中呈现出抗高血压活性。除此之外,至少 SEQ. ID No. 7 标识的肽通过氧自由基螯合机理具有理想的抗氧化活性。相似地,来自 β -酪蛋白的基于修改证明标识为 SEQ. ID. No. 14 的肽,也呈现出高的 ACE-抑制活性。除了胃蛋白酶水解的酪蛋白和 Corolase PP[®],表 1 中所示并标记为 SEQ. ID. No. 15 和 SEQ. ID No. 17 的肽在自发高血压大鼠 (SHR) 中具有抗高血压活性,并且也是本发明的一个目的。必须特别注意的事实是这些是来自各种食用产品的天然肽,可以预期其副作用少并且耐受性良好。

[0022] 相似地,胃蛋白酶水解产物中鉴定的生物活性肽 (SEQ. ID No. 1, SEQ. ID No. 2, SEQ. ID No. 3, SEQ. ID No. 4, SEQ. ID No. 5, SEQ. ID No. 6, SEQ. ID No. 7, SEQ. ID No. 8, SEQ. ID No. 9, SEQ. ID No. 10, SEQ. ID No. 12, SEQ. ID No. 13, SEQ. ID No. 14),以及另外的,使用 Corolase PP[®]的 (SEQ. ID No. 15, SEQ. ID No. 16, SEQ. ID No. 17, 表 1),一旦知道其序列,目前可用的技术可以通过化学和 / 或酶肽合成或通过重组方法获得这些。

[0023] 表 1. 鉴定的生物活性肽的序列

[0024]

LKKISQ	SEQ. ID. No.1
VDQHQKAMKPWTQPKTNAIPYVRYL	SEQ. ID. No.2
LKKISQYYQKFAWPQYL	SEQ. ID. No.3
LKKISQYYQKFAWPQY	SEQ. ID. No.4
TVDQHQKAMKPWTQPKTNAIPYVPYL	SEQ. ID. No.5
LKTVDQHQKAMKPWTQPKTNAIPYVRYL	SEQ. ID. No.6
PYVRYL	SEQ. ID. No.7
KTVDQHQKAMKPWTQPKTNAIPYVRYL	SEQ. ID. No.8
LKKISQYYQKFAWPQYLKT	SEQ. ID. No.9
YQKFAWPQYLKTVDQHQKAMKPWTQPKTNAIPYVRYL	SEQ. ID. No.10
RYLGY	SEQ. ID. No.12
AYFYPEL	SEQ. ID. No.13
HLPLPLL	SEQ. ID. No.14

[0025]

PYV	SEQ. ID. No.15
HLPLPL	SEQ. ID. No.16
HLPLP	SEQ. ID. No.17

[0026] 之前没有描述过从胃蛋白酶-水解的绵羊 α_{s2} -酪蛋白生产生物活性肽, 尽管源自这种牛来源蛋白的抗微生物肽实际上已经得到了描述 (EP 1114060, Process for producing cationic peptides from biological fluid(从生物流体生产阳离子肽的方法))。之前还鉴定了源自 α_{s2} -酪蛋白的一些肽和 Manchego 干酪中具有 ACE-抑制活性的其他绵羊酪蛋白 (J. A. Gomez-Ruiz, M. Ramos 和 I. Recio, Identification and formation of angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheese by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry(通过高效液相色谱串联质谱鉴定和形成 Manchego 干酪中血管紧张素转化酶抑制肽), Journal of Chromatography A, 2004, 1054 :269 :277), 尽管没有进行它们的体内抗高血压活性研究。之前鉴定的具有 ACE-抑制活性的肽之一是绵羊 α_{s2} -酪蛋白的 205-208 片段序列 VRYL (SEQ. ID. No. 11) (IC_{50} 24.1 μ M)。然而, 本发明的序列 SEQ. ID. No. 7, PYVRYL (IC_{50} , 1.94) 具有高于之前所述那种 12 倍功效的 ACE-抑制活性, 其证明了需要本发明中发现的完整序列, 以便发挥理想的抗高血压和 / 或抗氧化和 / 或抗微生物活性。为了发挥抗高血压和 / 或抗氧化和 / 或抗微生物活性, 也需要完整的 SEQ. ID. No. 7 序列。此外, 还显示出, 本发明的序列 SEQ. ID. No. 7 在胃肠模拟后, 最小活性片段是序列 PYV SEQ. ID. No. 15。

[0027] 另一方面, 本发明使得可以通过使用酶制剂和模拟胃肠消化的条件来获得生物活性肽 (SEQ. ID. No. 15, SEQ. ID No. 16, SEQ. ID No. 17, 表 1)。因此, 可能的是获得的片段将是水解的终产物, 能够在胃肠道中吸收并且是直接引起抗高血压作用的那些。然而, 不能排除通过血浆肽酶的进一步水解。活性小片段的产生是有利的, 因为这些片段更易于通过不同途径来给药, 并且当口服给药时, 将快速起效。

[0028] 这些奶制品: 全奶, 奶级分, 酪蛋白, 酪蛋白酸盐等, 是便宜的, 即可获得的物质, 用于生产生物活性肽, 其可以用作具有抗微生物活性和 / 或 ACE-抑制活性和 / 或抗高血压和 / 或抗氧化活性的治疗物质。这些奶制品可以经热处理, 如巴氏杀菌, 或者经干燥或冷冻干燥处理等, 以使用作功能食品, 添加剂或食品配料, 或药品, 用于治疗 and / 或预防感染和 / 或所有形式的动脉高血压, 主要是在人类中, 尽管也可以在动物中。水解产物, 低分子量级分, 肽, 其衍生物或药物学上可接受的盐及其组合的含量, 以及它们用于治疗任何疾病的剂量, 将根据各种因素而改变, 如年龄, 疾病或障碍的严重程度, 给药途径和给药频率。

这些化合物可以以任何给药形式呈现,固体或液体,并且通过任何合适的给药途径给药,口服,呼吸道,直肠或局部,尽管将它们特别设计成用于以固体或液体形式口服给药。

[0029] 通常,可以最佳化生产这些制品:完全水解产物,其级分及其构成肽,的方法,通过聚焦于最大可能量的生物活性肽的生产或控制苦味至可能的程度,通常由高浓度培养基或低分子量疏水性肽引起的。

[0030] 分析方法

[0031] 抗微生物活性的测量

[0032] 根据 A. Pellegrini, C. Deltting, U. Thomas, P. Hunziker 的方法测定抗微生物活性 (Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine β -lactoglobulin(牛 β -乳球蛋白中四个杀菌结构域的分离和表征) *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, 1526 :131-140), 使用微生物大肠杆菌 (*Escherichia coli*) [美国典型微生物培养中心 (ATCC), Rockville, MD, USA] ATCC 25922, 无害李斯特氏菌 (*Listeria innocua*) [Coleccion Espanola de Cultivos Tipo (CECT) Valencia, Spain] CECT 910T, 表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) CECT231, 粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) CECT 795, 粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*) CECT 854 和肉葡萄球菌 (*Staphylococcus carnosus*) CECT 4491T。

[0033] 对于大肠杆菌,粘质沙雷氏菌和葡萄球菌属的菌株,以 1% 将细菌悬浮液接种于胰蛋白大豆培养液 (TSB) 中,或对于粪肠球菌和无害李斯特氏菌,接种于脑心浸液 (BHI) 培养液中。在 37°C 进行培养,除了粘质沙雷菌的情况中,其在 30°C 进行培养。

[0034] 在 37°C 或 30°C 将生长于 10mL TSB 或 BHI 中 TSB-琼脂或 BHI-琼脂中的菌落培养过夜后,获得开始工作的细菌接种物。用相应的培养基将细菌悬浮液 (1mL) 稀释 1/50, 在对于每个菌株合适的温度下培养直至获得每 mL $1-4 \times 10^8$ 菌落形成单位 (CFU) 的种群密度。将培养物在 2000xg 离心 10 分钟,用 15mL 磷酸盐缓冲液 (pH7.4) 将沉淀的细菌洗涤两次并将种群调节至 10^6 CFU/mL。在无菌多孔平板 (Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Germany) 上,将 50 μ L 细菌悬浮液, 50 μ L 待测试的物质和 100 μ L 磷酸盐缓冲液与每种情况中 2% 合适的培养基混合,然后将混合物在 37°C 或 30°C 培养 2 小时。该时间后,将混合物稀释至 10^{-5} ,将每一种 100 μ L 的稀释液加入 TSB-琼脂或 BHI-琼脂平板中并将平板培养 24 小时,该时间后进行菌落计数。

[0035] 将以下等式用于计算抗微生物活性:

[0036]

$$\text{抗微生物活性} = \log \frac{N_0}{N_f},$$

[0037] 其中 N_0 是开始的 CFU/mL 数量

[0038] N_f 是最后的 CFU/mL 数量

[0039] 血管紧张素转化酶抑制活性 (ACEIa) 的测量

[0040] 通过 D. W. Cushman 和 H. S. Cheung 的方法在体外测量 ACE-抑制活性 (Spectrophotometric assay and properties of angiotensin-converting enzyme in rabbit lung(兔子肺中血管紧张素转化酶的光谱测试和特性)。 *Biochemical Pharmacology*, 1971, 20 :1637-1648), 之后由 Y. K. Kim, S. Yoon, D. Y. Yu, B. Lonnerdal

和 B. H. Chung 改进 (Novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from recombinant human α_{s1} -casein expressed in Escherichiacoli. (源自大肠杆菌中表达的重组人 α_{s1} -酪蛋白的新血管紧张素-I-转化酶抑制肽)。Journal of Dairy Research 1999,66,431-439)。

[0041] 将底物,马尿酸-组氨酸 (hipuril histidil) 亮氨酸 (HHL, Sigma, Chemical Co, St. Louis, MO, USA), 溶解于含有 0.3M NaCl 的 0.1M 硼酸盐缓冲剂中, pH8.3, 来获得 5mM 的终浓度。将每种 40 μ L 待测定 ACE- 抑制活性的样品加入 100 μ L 底物中。加入 ACE 酶 (CE 3.4.5.1, Sigma), 溶解于 50% 甘油中并在进行测试的时间点以 1/10 稀释于重蒸水中。将反应在 37°C 的水浴中进行 30 分钟。通过用 150 μ L 1N HCl 降低 pH 来使酶灭活。用 1000 μ L 乙酸乙酯提取所形成的马尿酸 (hipuric acid)。涡旋搅拌 20 秒后, 在室温 3000xg 离心 10 分钟, 从 95°C 热蒸发 10 分钟的有机相中取出 750 μ L。将马尿酸残余物再溶解于 800 μ L 重蒸水中, 并在搅拌 20 秒钟后, 在来自 Beckman Instruments, Inc., Fullerton, USA 的 Dur-70 光谱仪中测量 228nm 处的吸光值。

[0042] 使用以下等式计算 ACE- 抑制活性的百分比:

[0043] $\% \text{ ACE- 抑制活性} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100$

[0044] 空白用于校正背景吸光值。该空白含有底物, 酶和 20 μ L 替代样品的重蒸水, 并在时间零时停止反应。对照需要抑制剂不存在时对底物的 100% 酶反应并含有 20 μ L 替代样品的水并培养与样品相同长的时间。

[0045] 将结果显示为 IC_{50} (μ M) 或 50% 酶活性得到抑制的浓度。通过双辛丁酸 (bicinchoninic acid) 测试测定蛋白质浓度 (Pierce-Rockord, IL, USA), 使用牛血清白蛋白作为模式。

[0046] 抗氧化活性的测量

[0047] 通过 B. X. Ou. M. Hampsh-Woodill, RL. Prior 产生的方法 (Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe (使用荧光素作为荧光探针的改进氧自由基吸收能力测试的研发和证实), 2001, 49:4619-4626) 测定氧自由基吸收能力 (ORAC)。该方法是基于荧光素通过在 $\lambda_{\text{exo}} = 493\text{nm}$ 和 $\lambda_{\text{cm}} = 515\text{nm}$ 热分解 2,2' 偶氮-双 2-脒基丙烷二盐酸盐原位产生的过氧自由基的氧化。抗氧化剂的存在防止或延迟了荧光素的分解。

[0048] 每日从 75nM 磷酸盐缓冲液 (pH7.5) 中的 100 μ M 荧光素母液制备 60nM 浓度的荧光素工作溶液。作为对照抗氧化剂, 使用 6-羟基-2,5,7,8-四甲基色满-2-羧酸 (Trolox), 将其在磷酸盐缓冲液中制备成 20nM 浓度 (母液) 并存储于 -20°C。通过分析从母液制备的浓度 12.5, 25, 40, 50 和 100 μ M 的模式溶液来作出 Trolox 标准曲线。将 AAPH 溶解于磷酸盐缓冲液中至 143mM 的终浓度, 保持在低温来防止其分解。

[0049] 为了进行该测试, 将 375 μ L 样品与 375 μ L AAPH 和 2.225mL 荧光素混合, 将该混合物在 37°C 培养。每 5 分钟, 在 RF-1501 荧光计 (Shimadzu) 中 ($\lambda_{\text{exo}} = 493\text{nm}$ 和 $\lambda_{\text{cm}} = 515\text{nm}$) 测量荧光。对测试进行对照, 包括含有荧光素和磷酸盐缓冲液的空白, 用于检测来确保实验过程中荧光的稳定性, 和含有荧光素, AAPH 和磷酸盐缓冲液的阳性最大氧化对照。作为最大抗氧化活性的对照, 待分析的每套样品中包括 40 μ M trolox 溶液。所有样品重复三份分析。

[0050] 通过曲线下荧光素荧光的“曲线下面积”(AUC)测量的来定量抗氧化活性并在 Trolox 等式 (ORAC 曲线) 中给出。使用以下等式计算 AUC:

$$[0051] \quad AUC = (0.5 + f_5/f_0 + f_{10}/f_0 + f_{15}/f_0 + \dots + f_{30}/f_0)$$

[0052] 其中 f_0 是时间零时的荧光, 且 f_i 是时间“i”时的荧光。

[0053] 使用以下等式测定肽的相对 ORAC 值:

$$[0054] \quad ORAC = [(AUC_{\text{样品}} - AUC_{\text{空白}}) / (AUC_{\text{trolox}} - AUC_{\text{空白}})] \times [(trolox \text{ 体积摩尔浓度} / \text{样品体积摩尔浓度})]$$

[0055] 通过离子交换色谱 (FPLC) 分离肽级分

[0056] 通过带有一些改进的 I. Recio, S. Visser 的方法进行阳离子型肽级分的分离 (Identification of two distinct antibacterial domains within the sequence of bovine α_{s2} -casein (牛 α_{s2} -酪蛋白序列内两个截然不同的抗菌结构域的鉴定), 在 FPLC 系统内, 使用 HiLoad™ 26/10SP Sepharose Fast Flow 阳离子交换柱 (Pharmacia, Uppsala, Sweden)。A 和 B 相各自包括 10mM NH_4HCO_3 (用 HCOOH 调节至 pH7.0), 和 1.5M NH_3 。将样品溶解于制备成浓度 5mg/mL 的 A 相中, 通过 50mL 的 Superloop™ (Pharmacia) 加样 5mL 体积。以 5mL/min 的流速洗脱水解产物。用 100% 溶剂 A 20 分钟后, 在 60 分钟内使用 A 中 0% 至 50% 溶剂 B 梯度, 接着 20 分钟使用 50% 溶剂 B。在 214nm 进行吸光率的检测。柱子和移动相的温度是 9°C。几次色谱分析后收集级分。

[0057] 通过半制备规模的反相高效液相色谱 (RF-HPLC) 分离肽级分

[0058] 使用包括两个可编程的泵模型 Waters Delta 600 的系统, Mod. 966 二极管阵列检测仪, Mod. 717 加自动加样器和自动级分收集器 (Water Corp., Milford, MA, USA)。使用 C_{18} Prep NovaPack® HR 柱, 7.8×300mm 和 6 μm 孔大小 (Waters), C_{18} 药筒 (Waters) 作为保护柱。在 30°C 进行分析, 并在 214 和 280nm 检测。用 Millennium Software 版本 3.2 (Waters) 进行数据获取。将 α_{s2} -酪蛋白样品制成 2.5mg/mL 的浓度, 并且在加样之前, 在 16000×g 离心 10 分钟。为了样品的洗脱, 各自使用含有 0.1% 和 0.08% 三氟醋酸的二相 MilliQ® 水梯度 (相 A) 和乙腈 (相 B), 流速为 4mL/min。相 B 梯度在 50 分钟内从 0% 至 40%, 并从 40% 至 70% 持续 5 分钟, 用 70% B 洗涤柱子 5 分钟并将柱子恢复至起始条件 25 分钟。加样的样品体积是 300 μL 。制备浓度为 100mg/mL 总酪蛋白样品, 并在加样之前, 通过具有 0.45 μm 孔径的滤器。为了样品的洗脱, 各自使用含有 0.1% 和 0.08% 三氟醋酸的二相 MilliQ® 水梯度 (相 A) 和乙腈 (相 B), 流速为 4mL/min。相 B 梯度在 70 分钟内从 0% 至 35% 并从 35% 至 70% 持续 5 分钟, 用 70% B 洗涤柱子 5 分钟并将柱子恢复至起始条件 20 分钟。加样样品的体积是 50 μL 。

[0059] 通过串联质谱的分析 (离线)

[0060] 使用 Esquire 3000 离子捕获系统 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany)。将样品在含有 0.01% 甲酸 (v/v) 的 50% (v/v) 水: 乙腈溶液中制成 2mg/mL 的浓度。使用模型 22 加样泵 (Havard Apparatus, South Natick, MA, USA) 将样品以 4 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速加样至电喷雾器中。系统使用氮作为喷雾和干燥气体并在 5×10^{-3} 巴氮压下工作。以 13000Da/秒的速率以 100–2000m/z 的间隔获取质谱。使用 Biotoools 2.1 程序 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) 进行用于鉴定肽序列的串联质谱的判读。

[0061] 通过在线连接串联质谱的 RP-HPLC(RP-HPLC-MS/MS) 的分析

[0062] 使用 Esquire-LC 系统 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany)。HPLC(1100 系列) 由四联泵, 自动加样器, 洗脱液脱气系统和可变波长紫外线检测仪构成。(Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) 在线连接 Esquire 3000 离子捕获光谱仪 (Bruker Daltonik)。柱子是 Hi-Pore C18 柱 (250x4.6mm i.d., 5 μ m 粒径) (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA)。溶剂 A 是水和三氟醋酸的混合物 (1000 : 0.37), 溶剂 B 是乙腈和三氟醋酸的混合物 (1000 : 0.27)。加样制成 4.5mg/ml 浓度的 50 μ L 样品。使用 0.8ml/min 的流速, 60 分钟内 A 中 0% 至 50% 溶剂 B 的线性梯度。在上述的相同条件下通过质谱在 214nm 处监控洗脱液, 除了通过喷雾器的样品的加样流速为 275 μ L/min。

[0063] 自发高血压大鼠 (SHR) 中抗高血压活性的研究

[0064] 研究了所鉴定的肽对自发高血压大鼠 (SHR) 血压的几个作用。为了该研究, 化学合成肽。

[0065] 用来自 Charles River Laboratories Espana S. A 的 17-20 周大称重 300 至 350 的雄性大鼠进行研究。将大鼠饲养在笼子中, 每只笼子五只, 维持 25°C 的温度, 使用 12- 小时亮 - 暗循环, 自由饮水和进食。获得收缩压 (SBP) 和舒张压 (DBP) 测量值, 为了该目的, 使用 tail cuff 方法 (R. D. Bunag, Validation in awake rats of tail-cuff method for measuring systolic pressure (清醒大鼠中测量收缩压的 tail-cuff 方法的确定), J. Appl. Physiol., 1973, 34 : 279-282)。使用的设备 (Le5001, Letica) 自动提供了远端 SBP 和 DBP 值。该设备记录并且还促进动物的心率。将 tail-cuff 和转换器置于大鼠尾巴上之前, 将大鼠暴露于接近 37°C 的温度, 使得促进尾动脉的舒张。此外, 为了确保测量的可靠性, 在进行所述测试之前使动物适应程序 2 周。通过取 3 个连续的测量值来测定 SBP 和 DBP 值并对于这两个变量中的每一个来计算这三个值的平均值。

[0066] 用于研究的自发高血压大鼠 (SHR) 具有 190mm Hg 至 220mm Hg 的 SBP 值, 130mm Hg 至 180mm Hg 的 DBP 值。

[0067] 在 9a. m. 至 10a. m. 的时间跨度内通过胃内导管给药待测试的产品, 并溶解于 1ml 蒸馏水中来给药测试的剂量。在给药之前获得 SBP 和 DBP 读数, 并且在给药后每 2 小时还进行了这些变量的定期测量, 直至给药后 8 小时。此外, 还在给药所述产品后 24 小时获得 SBP 和 DBP 测量值。作为阴性对照 (用于建立插管大鼠中 SBP 和 DBP 的昼夜节律变化), 使用通过胃内导管给药 1ml 水的大鼠, 在相似的测试中获得 SBP 和 Dap 测量值。作为阳性对照, 使用已经给药 50mg/kg 卡托普利 (captopril) (原型 ACE- 抑制药物) 的大鼠, 在相似的测试中获得 SBP 和 DBP 测量值。将该卡托普利药物溶解于 1ml 蒸馏水中来给药于每只大鼠。

[0068] 集合结果并计算最小 6 个同样测试的测量值的 $\pm$ 标准误差平均 (SEM)。为了比较, 使用方差的 one-way 分析, 接着 Bonferroni 测试。认为 $p < 0.05$ 的值差异是显著的。

[0069] 附图简述

[0070] 图 1 : 使用阳离子交换色谱 (FPLC) 获得胃蛋白酶水解 30 分钟的绵羊 α_{s2} - 酪蛋白的色层谱, 其中选择了 5 个级分 (FA-FE), 将其人工收集。将以分钟给出的时间绘制于 X- 轴上。

[0071] 图 2A : 使用反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 获取半制备规模的 FC 级分的色层谱, FC 级分是从胃蛋白酶水解 30 分钟的绵羊 α_{s2} - 酪蛋白收集的。选择了四 (4) 个人工收集的子

部分 (FC1-FC4)。将以分钟给出的时间绘制在 X- 轴上。

[0072] 图 2B :使用反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 获取半制备规模的 FD 级分的色层谱,FD 级分是从胃蛋白酶水解 30 分钟的绵羊 α_{s2} - 酪蛋白收集的。选择了两 (2) 个人工收集的子部分 (FD1-FD2)。将以分钟给出的时间绘制在 X- 轴上。

[0073] 图 3 :通过半制备规模的 RP-HPLC 从 FC 和 FD 级分获得的不同子部分的抗微生物活性。

[0074] 图 4 :通过胃内导管给药 1ml 水 (○), 50mg/kg 卡托普利 (□), 3mg/kg PYVRYL (▲) 和 3mg/kg LKKISQ (◆) 后,在自发高血压大鼠中发现了收缩压 (SBP) 降低和舒张压 (DBP) 降低。T(h) 表示从给药开始流逝的时间长度,以小时给出。数据显示出最少 6 只动物的 $\pm$ 平均 SEM。^aP < 0.05vs 水 ;^bP < 0.05vs 卡托普利 ;^cP < 0.05vs PYVRYL。

[0075] 图 5 :通过胃内导管给药 1ml 水 (○), 50mg/kg 卡托普利 (□), 400mg/kg 酪蛋白 (▲), 400mg/kg 酪蛋白水解产物 (◆) 和 200mg/kg F < 3000Da 的酪蛋白水解产物 (■) 后,在自发高血压大鼠中发现了收缩压 (SBP) 降低和舒张压 (DBP) 降低。T(h) 表示从给药开始流逝的时间长度,以小时给出。数据显示出最少 4 只动物的 $\pm$ 平均 SEM。^aP < 0.05vs 水 ;^bP < 0.05vs 卡托普利 ;^cP < 0.05vs 400mg/kg 酪蛋白。

[0076] 图 6A :使用反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 获取半制备规模的 3000Da 次要部分的色层谱,该次要部分是从胃蛋白酶水解 3 小时的绵羊 α_{s2} - 酪蛋白获得的。将 214nm 处的吸光值绘制在 Y- 轴上,将以分钟计的时间绘制在 x- 轴上。图 6B 对应于通过 RP-HPLC 获得的色谱级分的血管紧张素酶抑制活性 (ACEIa)。由于其有效的 ACE- 抑制活性,选择了人工收集的 3 个级分 (F3, F5 和 F6)。

[0077] 图 7 :在用胃蛋白酶和 Corolase PP[®] 按次序水解之前和之后,使用合成肽 PYVRYL SEQ. ID. NO. 7 的反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 获取色层谱。将 214nm 处的吸光值绘制在 Y- 轴上,将以分钟计的时间绘制在 X- 轴上。

[0078] 图 8 :通过胃内导管给药 1ml 水 (○), 50mg/kg 卡托普利 (□), 3mg/kg PYVRYL (◆) 和 2mg/kg PYV (■) 后,在自发高血压大鼠中发现了收缩压 (SBP) 降低和舒张压 (DBP) 降低。T(h) 表示从给药开始流逝的时间长度,以小时给出。数据显示出最少 4 只动物的 $\pm$ 平均 SEM。^aP < 0.05vs 水 ;^bP < 0.05vs 卡托普利 ;^cP < 0.05vs 3mg/kg PYVRYL。

[0079] 图 9 :在用胃蛋白酶和 Corolase PP[®] 按次序水解之前和之后,使用合成肽 HLPLPLL SEQ. ID. No. 14 的反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 获取色层谱。将 214nm 处的吸光值绘制在 Y- 轴上,将以分钟计的时间绘制在 X- 轴上。

[0080] 图 10 :通过胃内导管给药 1ml 水 (○), 50mg/kg 卡托普利 (□), 7mg/kg HLPLP (●) 后,在自发高血压大鼠中获得了收缩压 (SBP) 降低和舒张压 (DBP) 降低。T(h) 表示从给药开始流逝的时间长度,以小时给出。数据显示出最少 4 只动物的 $\pm$ 平均 SEM。^aP < 0.05vs 水 ;^bP < 0.05vs 卡托普利。

具体实施方案

[0081] 以下实施例说明了本发明,尽管必须不能将它们认为是限制其范围。

[0082] 实施例 1. 从胃蛋白酶水解的绵羊 α_{s2} - 酪蛋白生产具有抗微生物, ACE- 抑制, 抗高血压和抗氧化活性的生物活性肽。

[0083] 通过使用绵羊 α_{s2} -酪蛋白作为底物来获得水解产物,底物通过 H. J. Vreeman, J. A. M. van Riel 的方法分离剩余酪蛋白后获得 (The large-scale isolation of α_{s2} -casein from bovine casein (从牛酪蛋白大规模分离 α_{s2} -酪蛋白)。Netherlands Milk and Dairy Journal, 1990, 44: 43-48)。作为酶,使用来自猪胃的猪胃蛋白酶 (E. C. 3. 4. 23. 1. 570U/mg 蛋白质) (Sigma Chemical, St. Louis, USA)。制备 0.5% 的 α_{s2} -酪蛋白水溶液,并用 1M HCl 将 pH 调节至 3.0。加入胃蛋白酶 (酶-底物比例 3.7/100, w/w)。在 37°C 进行水解 30 分钟。通过在 80°C 加热 15 分钟来获得胃蛋白酶的失活,然后用 1M NaOH 将 pH 调节至 7.0。将水解产物在 16000g 5°C 离心 15 分钟后收集上清液,通过 HPLC 来分析 (图 1),已经分离五个级分 (FA-FE),将其人工收集,然后冻干。

[0084] 在 2.5mg/mL 的浓度测量这五个级分的抗微生物活性,使用 5.9×10^3 CFU/mL 大肠杆菌作为对照。结果表明 FC 和 FD 级分具有抗微生物活性,各自将微生物的数量降低了 2.54 和 0.6 个数量级。

[0085] 为了鉴定负责抗微生物活性的肽的目的,通过半制备规模的 RP-HPLC 分析 FC 和 FD 级分。图 2 显示了 FC 级分 (图 2A) 和 FD 级分 (图 2B) 的色谱特征。从 FC 部分中分离出四个子部分 (FC1-FC4),从 FD 级分中分离出两个子部分 (FD1-FD2)。收集这些子部分中的每一个,并在乙腈蒸发后,将其冻干。在 2.5mg/mL 浓度测量这些子部分对抗大肠杆菌 (6.2×10^6 CFU/mL) 的抗微生物活性。图 3 显示出这些子部分对抗大肠杆菌的抗微生物活性。在所有这些子部分中,必须特意提及 FC1,其是呈现出较大抗微生物活性之一,已知其在测试的浓度具有杀菌效果 ($\log N_f/N_0$ 大于 6)。FC4, FD1 和 FD2 子部分呈现中中等的抗微生物活性,各自具有 1.24, 1.31 和 1.64 数量级的微生物降低值。

[0086] 按照之前所述的方法,使用离子捕获分析仪,通过质谱分析 FC1, FC4, FD1 和 FD2 子部分。表 1 中显示了鉴定的肽。

[0087] 表 2. 从胃蛋白酶水解 30 分钟的绵羊 α_{s2} -酪蛋白获得的子部分 FC1, FC4, FD1 和 FD2 中鉴定的肽。

[0088]

子部分 No.	预期质 量	理论质 量	蛋白质	蛋白质	氨基酸	序列 No.	
FC1	715.4	715.4	α_{s2} -酪蛋白	165-170	LKKISQ	SEQ	ID No.1
FC4	3011.8	3011.5	α_{s2} -酪蛋白	184-208	VDQHQKAMKPWTQPKTNA IPYVRYL	SEQ	ID No.2
FC4	2203.2	2203.1	α_{s2} -酪蛋白	165-181	LKKISQYYQKFAWPQYL	SEQ	ID No.3
FC4	2089.8	2090.1	α_{s2} -酪蛋白	165-180	LKKISQYYQKFAWPQY	SEQ	ID No.4
FC4	3111.3	3112.6	α_{s2} -酪蛋白	183-208	TVDQHQKAMKPWTQPKTN AIPYVRYL	SEQ	ID No.5
FD1	3354.3	3353.8	α_{s2} -酪蛋白	181-208	LKTVDQHQKAMKPWTQPK TNAIPYVRYL	SEQ	ID No.6
FD1	809.4	809.4	α_{s2} -酪蛋白	203-208	PYVRYL	SEQ	ID No.7
FD1	3240.3	3240.7	α_{s2} -酪蛋白	182-208	KTVDQHQKAMKPWTQPKT NAIPYVRYL	SEQ	ID No.8
FD1	2433.0	2432.3	α_{s2} -酪蛋白	165-183	LKKISQYYQKFAWPQYLKT	SEQ	ID No.9
FD2	4566.8	4565.3	α_{s2} -酪蛋白	172-208	YQKFAWPQYLKTVDQHQK AMKPWTQPKTNAIPYVRYL	SEQ	ID No.10

[0089] 实施例 2. 化学上合成的肽具有抗微生物活性。

[0090] 化学合成大部分存在于从胃蛋白酶水解绵羊 α_{s2} -酪蛋白 30 分钟获得的子部分中的肽 (SEQ. ID. No. 1, SEQ. ID. No. 2, SEQ. ID. No. 3 和 SEQ. ID. No. 7)。通过 Fmoc 固相方法合成这些肽,并通过 RP-HPLC-MS/MS 证实它们的纯度。

[0091] 测量 .05mM 浓度的合成肽对抗大肠杆菌,粘质沙雷氏菌,肉葡萄球菌,表皮葡萄球菌,粪肠球菌和无害李斯特氏菌的抗微生物活性。活性结果显示于表 2 中。

[0092] 表 3. 从胃蛋白酶水解绵羊 α_{s2} -酪蛋白 30 分钟获得的子部分 FC1,FC4 和 FD1 种鉴定的合成肽的抗微生物活性。

[0093]

SEQ ID	氨基酸	大 肠 杆菌	粘 质 沙 雷 氏 菌	肉 葡 萄 球 菌	表 皮 葡 萄 球 菌	粪 肠 球 菌	无 害 李 斯 特 氏 菌
No.1	LKKISQ	0.33	0	>6	3.6	0	1.11
No.2	VDQHQQAMKPWTQPKTNAIPYVRYL	0.07	0	>6	0.61	0	1.71
No.3	LKKISQYYQKFAWPQYL	4.63	0.38	>6	>6	3.32	>6
No.7	PYVRYL	0.27	0	2.23	2.06	0	1.13

[0094] 这些肽呈现出抗革兰氏阳性细菌的高度抗微生物活性,尤其是抗葡萄球菌属的测试菌株。这些肽中的三个 SEQ. ID. No. 1, SEQ. ID. No. 2 和 SEQ. ID. No. 3 呈现出抗肉葡萄球菌的杀菌活性。然而,革兰氏阴性细菌(大肠杆菌和粘质沙雷氏菌)对所有这些肽的作用是高度抗性的,尽管必须提及 SEQ. ID. No. 3 标识的肽呈现出抗大肠杆菌的高度抗微生物活性的事实。

[0095] 实施例 3. 化学上合成的肽具有 ACE- 抑制和抗高血压活性。

[0096] 测量了实施例 1 中提及的两种化学上合成肽的 ACE- 抑制活性,特别是序列 SEQ. ID. No. 1 和 SEQ. ID. No. 7。作为 IC₅₀ 或抑制 50% 酶活性需要的蛋白质浓度给出的活性结果显示于表 3 中。这两种肽呈现出有效的 ACE- 抑制活性。

[0097] 表 4. 从胃蛋白酶水解 30 分钟的 α_{s2} - 酪蛋白获得的 FC1 和 FD1 子部分中鉴定的合成肽的 ACE- 抑制活性。

[0098]

序列 No.	氨基酸	IC ₅₀
SEQ. ID. No.1	LKKISQ	2.10
SEQ. ID. No.7	PYVRYL	1.94

[0099] 测试了 SEQ. ID. No. 1 和 SEQ. ID. No. 7 肽的抗高血压活性,为了该目的,将这些肽(3mg/kg)给药于自发高血压大鼠(SHR)。将肽溶解于蒸馏水中,并在 1ml 体积中将相应剂量给药于每只大鼠。

[0100] 图 4 显示了在给药 3mg/kg SEQ. ID. No. 1 和 SEQ. ID. No. 7 肽后不同时间点的自发高血压大鼠(SHR)中 SBP 和 DBP 的降低程度。可以看到 SEQ. ID. No. 7 肽的给药引起这些动物中 SBP 和 DBP 的显著降低。这些变量的降低在给药这种肽后 4 小时达到峰值。该降低还呈现出与给药卡托普利引起的 SBP 和 DBP 降低相似的时间过程,这证明了其是具有抗高血压活性的化合物。这些结果表明基于急性基础口服给药时,SEQ. ID. No. 7 标识的肽具有清楚而显著的抗高血压效果。

[0101] 实施例 4. 具有抗氧化活性的化学合成肽。

[0102] 测量了实施例 1 中提及的 SEQ. ID. No. 7 的抗氧化活性。以下显示了过氧自由基螯合活性:

[0103] $ORAC_{PYVRYL} = 1.82 \mu\text{mol Trolox 等价物} / \mu\text{mol 肽}$

[0104] 因此结果显示 PYVRYL (SEQ. ID. No. 7) 具有比 $1 \mu\text{mol Trolox}$ 高 1.82 倍的抗氧化活性。

[0105] 实施例 5. 用胃蛋白酶从牛酪蛋白生产具有 ACE- 抑制活性的生物活性肽。

[0106] 通过从未加工的牛奶等电点沉淀来获得牛酪蛋白底物, 使用该底物来进行水解。将来自猪胃的猪肽用作酶 (E. C. 3. 4. 23. 1. 570U/mg 蛋白质) (Sigma Chemical, St. Louis, USA)。制备 0.5% 的牛酪蛋白水溶液并用 1M HCl 将 pH 调节至 2.0。加入胃蛋白酶 (酶-底物 w/w 比例 3.7/100)。在 37℃ 进行水解 3 小时。通过在 80℃ 加热 20 分钟使胃蛋白酶灭活, 然后用 1M NaOH 调节 pH 至 7.0。将水解产物在 $16000 \times g$ 5℃ 离心 15 分钟后收集上清液, 然后将上清液通过具有 3000Da 孔径的疏水性膜 (Centriprep, Amicon Inc, Beverly, MA, USA) 超滤。在 SHR 中测定总水解产物和透过物 (分子量小于 3000Da 的水解产物部分) 的 ACE- 抑制和抗高血压活性 (根据之前分析方法中所述的)。表 4 显示出以 IC_{50} 或抑制 50% 酶活性需要的蛋白质浓度给出的 ACE- 抑制活性值, 并通过凯氏法测定蛋白质含量。图 5 显示出给药酪蛋白水解产物后和给药具有低于 3000Da 分子量的酪蛋白水解产物级分后不同时间的自发高血压大鼠 (SHR) 中发现的 SBP 和 DBP 降低。如表中所示的, 酪蛋白水解产物的给药引起这些动物中 SBP 和 DBP 的显著降低。分子量小于 3000Da 的酪蛋白水解产物级分的给药引起自发高血压大鼠中 SBP 和 DBP 降低至与给药酪蛋白水解产物后观察到那些相似的程度。这些变量的降低在给药这些产物后 2 小时达到峰值。未水解酪蛋白的给药没有显著改变自发高血压大鼠 (SHR) 的 SBP 并且比之前的化合物将这些动物中的 DBP 降低至更低的程度。这些结果表明基于急性基础口服给药时, 酪蛋白水解产物和分子量小于 300Da 的酪蛋白水解产物级分具有明显的抗高血压效果。

[0107] 表 5: 胃蛋白酶水解的牛酪蛋白以及超滤处理后获得的透过物 ($< 300\text{Da}$ 的部分) 和截留物 ($F > 3000\text{Da}$) 的 ACE- 抑制活性

[0108]

	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	%蛋白质 (w/w) (凯氏法)
酪蛋白水解产物	52.8	0.45
透过物 ($F < 3000\text{Da}$)	5.5	0.03
截留物 ($F > 3000\text{Da}$)	242.0	3.29

[0109] 为了鉴定负责 ACE- 抑制和抗高血压活性的肽的目的, 超滤后, 将透过物接受半制备规模 RP-HPLC 的分离处理, 其中收集了 8 个级分。乙腈蒸发后, 将这些色谱级分冻干, 并通过二辛可宁酸方法测定蛋白质含量。图 6 显示了色谱特征和所获得的级分, 以及对于每一种色谱级分以 IC_{50} 给出的 ACE- 抑制活性值。图 6 中称为 F3, F5 和 F6 的级分是呈现出更高 ACE- 抑制活性的那些, 换句话说, 更低的 IC_{50} 值。使用之前所述的方法通过在线连接串联质谱的 RP-HPLC (RP-HPLC-MS/MS) 分析这些级分。表 5 中显示了所鉴定的主要的肽。

[0110] 表 6: 从胃蛋白酶水解 3 小时的牛酪蛋白的透过物获得的级分 F3, F5 和 F6 中鉴定的主要活性肽

[0111]

子部分 No.	预期质量	理论质量	蛋白质	蛋白质	氨基酸	序列 No.
FC3	670.5	670.35	α_{s1} -酪蛋白	90-94	RYLGY	SEQ ID No.12
FC5	901.5	901.43	α_{s1} -酪蛋白	143-149	AYFYPEL	SEQ ID No.13
FC6	801.6	801.52	α_{s1} -酪蛋白	134-140	HLPLPLL	SEQ ID No.14

[0112] 通过固相 Fmoc 方法化学合成这些色谱级分中获得的主要肽,并通过 RP-HPLC-MS/MS 证实其纯度。测定了化学合成肽的 ACE- 抑制活性,尤其是序列 SEQ. ID. No. 12, SEQ. ID. No. 13 和 SEQ. ID. No. 3。表 6 中显示了以 IC_{50} 或抑制 50% ACE 活性需要的蛋白质浓度给出的活性结果。鉴定的三种主要肽中的至少两种呈现出有效的 ACE- 抑制活性。

[0113] 表 7 :级分中鉴定的合成肽的 ACE- 抑制活性

[0114]

序列 No.	氨基酸	IC_{50}
SEQ. ID. No.12	RYLGY	Nd
SEQ. ID. No.13	AYFYPEL	7.5
SEQ. ID. No.14	HLPLPLL	34.2

[0115] 实施例 6 :水解 α_{s2} - 酪蛋白获得的片段 SEQ. ID. No. 7 的模拟胃肠消化后肽的 ACE- 抑制和抗高血压活性。

[0116] 之前已经在 α_{s2} - 酪蛋白水解产物中鉴定了 PVYRYL SEQ. ID. No. 7 肽并化学合成,接受模拟胃肠消化的两级水解过程 (Alting, A. C., Meijer, R. J. G. M., Van Berestijn, E. C. H. Incomplete elimination of the ABBOS epitope of bovine serum albumin under simulated gastrointestinal conditions of infants. (模拟婴儿胃肠条件下牛血清白蛋白的 ABBOS 抗原决定部位的不完全消除) Diabetes Care, 1997, 20 :875-880)。为了该目的,首先用胃蛋白酶 (E. C. 3. 4. 4. 1, 570U/mg 蛋白) (Sigma) (酶-底物比例, 1 : 50, w/w) 在 pH2.0 和 37℃ 水解合成肽的水溶液 (10mg/ml) 90 分钟,此后用 Corolase **PP**[®] (酶-底物比例 1 : 25, w/w) (**Röhm**, Darmstadt, Germany) 在 pH7-8 和 37℃ 水解 2.5 小时。通过在 95℃ 水浴中加热 10 分钟来中断反应。

[0117] 图 7 显示了用胃蛋白和 Corolase **PP**[®] 孵育后, PVYRYL 肽 SEQ. ID. No. 7 完全水解。通过 RP-HPLC-MS/MS 鉴定的主要获得片段是三肽 PVY SEQ. ID. No. 15。化学合成这种肽并测定其 ACE- 抑制活性,获得 741.3 μ M 的 IC_{50} 值,换句话说, ACE- 抑制活性比初始的肽低 370 倍。通过给药于 SHR 来测定该三肽 PVY SEQ. ID. No. 15 的抗高血压活性。将肽溶解于蒸馏水中并将 1ml 体积中相应的剂量给药于每只大鼠。图 8 显示出给药 2mg/kg 剂量 PVY SEQ. ID. No. 15 和 3mg/kg 剂量 PVYRYL 肽 SEQ. ID. No. 7 后不同时间点 SHR 大鼠中发现的 SBP 和 DBP 降低,其中显示出这两种肽的给药引起这些动物中 SBP 和 DBP 的显著降低。同时在给药后 2 小时产生 PVY SEQ. ID. No. 15 对 SBP 的峰值效果,直至给药后 4 小时也没有产生 PVYRYL 肽 SEQ. ID. No. 7 的峰值效果。在 SEQ. ID. No. 15 的情况中,抗高血压效果的较快发作可能是

由于给药该序列时,消除了对于其在体内引起的必须发生的酶消化过程。这些结果证明了尽管在原理上 SEQ. ID. No. 15 的抗高血压活性,但这不能归因于 ACE- 抑制活性。重要的是强调迄今为止至今还没有描述过 PYV 肽 SEQ. ID. No. 15 的有效抗高血压活性。

[0118] 实施例 7 :通过水解完整酪蛋白 HLPLPLL SEQ. ID. No. 14 获得的片段的模拟胃肠消化后肽的 ACE- 抑制和抗高血压活性。

[0119] 之前已经在具有低于 3000Da 分子量总酪蛋白水解产物部分中鉴定了 HLPLPLL 肽 SEQ. ID. No. 14 并化学合成,将其接受模拟胃肠消化的两级水解过程 (Alting, A. C., Meijer, R. J. G. M., Van Berestijn, E. C. H. Incomplete elimination of the ABB0 S epitope of bovine serum albumin under simulated gastrointestinal conditions of infants. (模拟婴儿胃肠条件下牛血清白蛋白的 ABBOS 抗原决定部位的不完全消除) Diabetes Care, 1997, 20 :875-880)。为了该目的,首先用胃蛋白酶 (E. C. 3. 4. 4. 1, 570U/mg 蛋白) (Sigma) (酶-底物比例, 1 : 50, w/w) 在 pH2.0 和 37℃ 水解合成肽的水溶液 (10mg/ml) 90 分钟,此后用 Corolase PP[®] (酶-底物比例 1 : 25, w/w) (Röhm, Darmstadt, Germany) 在 pH7-8 和 37℃ 水解 2.5 小时。通过在 95℃ 水浴中加热 10 分钟来中断反应。

[0120] 图 9 显示出通过 RP-HPLC-MS/MS 鉴定 HLPLPLL 肽 SEQ. ID. No. 14 水解后获得的肽,其对应于 HLPLPL 六肽 SEQ. ID. No. 16 和 HLPLP 五肽 SEQ. ID. No. 17。HLPLPL SEQ. ID. No. 16 是中间片段,而五肽 HLPLP SEQ. ID. No. 17 是对胃肠酶的作用抗性的并可能是 HLPKPLL 肽 SEQ. ID. No. 14 的最终蛋白水解产物。测定 HLPLP 五肽 SEQ. ID. No. 17 的 ACE- 抑制活性并发现 21 μ M 的 IC₅₀ 值。相似地,以 7mg/kg 剂量给药时,测定了水解 HLPLP SEQ. ID. No. 17 获得的最后的肽在 SHR 大鼠中的抗高血压活性。图 10 中显示了 SBP 和 DBP 的降低。在这些动物中发现了 SBP 和 DBP 的显著降低,但是在这种情况下,实际上抗高血压效果至少部分可以归因于 ACE- 抑制活性。

[0001]

CPCH1360055D, 分案申请序列表, txt

序列表

<110> SPANISH COUNCIL FOR SCIENTIFIC RESEARCH

<120> 奶酪蛋白的酶水解产物中鉴定的生物活性肽及其生产方法

<130> 1. 2007.0527/MAD

<140> 200680029333.0

<141> 2007-07-12

<150> PCT/ES2006/070079

<151> 2006-08-06

<150> SPAIN P200501373

<151> 2005-08-06

<160> 17

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 源自酪蛋白

<220>

<221> 肽

<222> (1).. (6)

<400> 1

Leu Lys Lys Ile Ser Gln
1 5

<210> 2

<211> 25

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 源自酪蛋白

<220>

<221> 肽

<222> (20).. (25)

<223> SEQ. ID. NO. : 7 限定的肽

[0002]

<400> 2

Val Asp Gln His Gln Lys Ala Met Lys Pro Trp Thr Gln Pro Lys Thr
1 5 10 15

Asn Ala Ile Pro Tyr Val Arg Tyr Leu
20 25

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 源自酪蛋白

<220>

<221> 肽

<222> (1)..(6)

<223> SEQ. ID. NO. : 1 限定的肽

<400> 3

Leu Lys Lys Ile Ser Gln Tyr Tyr Gln Lys Phe Ala Trp Pro Gln Tyr
1 5 10 15

Leu

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 源自酪蛋白

<220>

<221> 肽

<222> (1)..(6)

<223> SEQ. ID. NO. : 1 限定的肽

<400> 4

Leu Lys Lys Ile Ser Gln Tyr Tyr Gln Lys Phe Ala Trp Pro Gln Tyr
1 5 10 15

<210> 5

<211> 26

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 源自酪蛋白

[0003]

<220>
<221> 肽
<222> (21).. (26)
<223> SEQ. ID. NO. : 7 限定的肽

<400> 5
Thr Val Asp Gln His Gln Lys Ala Met Lys Pro Trp Thr Gln Pro Lys
1 5 10 15
Thr Asn Ala Ile Pro Tyr Val Arg Tyr Leu
20 25

<210> 6
<211> 28
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 源自酪蛋白

<220>
<221> 肽
<222> (23).. (28)
<223> SEQ. ID. NO. : 7 限定的肽

<400> 6
Leu Lys Thr Val Asp Gln His Gln Lys Ala Met Lys Pro Trp Thr Gln
1 5 10 15
Pro Lys Thr Asn Ala Ile Pro Tyr Val Arg Tyr Leu
20 25

<210> 7
<211> 6
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 源自酪蛋白

<220>
<221> 肽
<222> (1).. (3)
<223> SEQ. ID. NO. : 15 限定的肽

<400> 7
Pro Tyr Val Arg Tyr Leu
1 5

<210> 8
<211> 27
<212> PRT
<213> 人造序列

[0004]

<220>

<223> 源自酪蛋白

<220>

<221> 肽

<222> (22)..(27)

<223> SEQ. ID. NO. : 7 限定的肽

<400> 8

Lys Thr Val Asp Gln His Gln Lys Ala Met Lys Pro Trp Thr Gln Pro
1 5 10 15

Lys Thr Asn Ala Ile Pro Tyr Val Arg Tyr Leu
20 25

<210> 9

<211> 19

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 源自酪蛋白

<220>

<221> 肽

<222> (1)..(6)

<223> SEQ. ID. NO. : 1 限定的肽

<400> 9

Leu Lys Lys Ile Ser Gln Tyr Tyr Gln Lys Phe Ala Trp Pro Gln Tyr
1 5 10 15

Leu Lys Thr

<210> 10

<211> 37

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 源自酪蛋白

<220>

<221> 肽

<222> (32)..(37)

<223> SEQ. ID. NO. : 7 限定的肽

<400> 10

Tyr Gln Lys Phe Ala Trp Pro Gln Tyr Leu Lys Thr Val Asp Gln His
1 5 10 15

Gln Lys Ala Met Lys Pro Trp Thr Gln Pro Lys Thr Asn Ala Ile Pro

[0005]

	20	25	30
	Tyr Val Arg Tyr Leu 35		
<210>	11		
<211>	4		
<212>	PRT		
<213>	人造序列		
<220>			
<223>	源自绵羊酪蛋白		
<220>			
<221>	肽		
<222>	(1).. (4)		
<400>	11		
	Val Arg Tyr Leu 1		
<210>	12		
<211>	5		
<212>	PRT		
<213>	人造序列		
<220>			
<223>	源自酪蛋白		
<220>			
<221>	肽		
<222>	(1).. (5)		
<400>	12		
	Arg Tyr Leu Gly Tyr 1 5		
<210>	13		
<211>	7		
<212>	PRT		
<213>	人造序列		
<220>			
<223>	源自绵羊酪蛋白		
<220>			
<221>	肽		
<222>	(1).. (7)		
<400>	13		
	Ala Tyr Phe Tyr Pro Glu Leu 1 5		

[0006]

<210> 14
<211> 7
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 源自酪蛋白

<220>
<221> 肽
<222> (1).. (5)
<223> SEQ. ID. NO. : 17 限定的肽

<400> 14
His Leu Pro Leu Pro Leu Leu
1 5

<210> 15
<211> 3
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 源自酪蛋白

<220>
<221> 肽
<222> (1).. (3)

<400> 15
Pro Tyr Val
1

<210> 16
<211> 6
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 源自酪蛋白

<220>
<221> 肽
<222> (1).. (5)
<223> SEQ. ID. NO. : 17 限定的肽

<400> 16
His Leu Pro Leu Pro Leu
1 5

<210> 17
<211> 5

[0007]

<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 源自酪蛋白

<220>
<221> 肽
<222> (1).. (5)

<400> 17
His Leu Pro Leu Pro
1 5

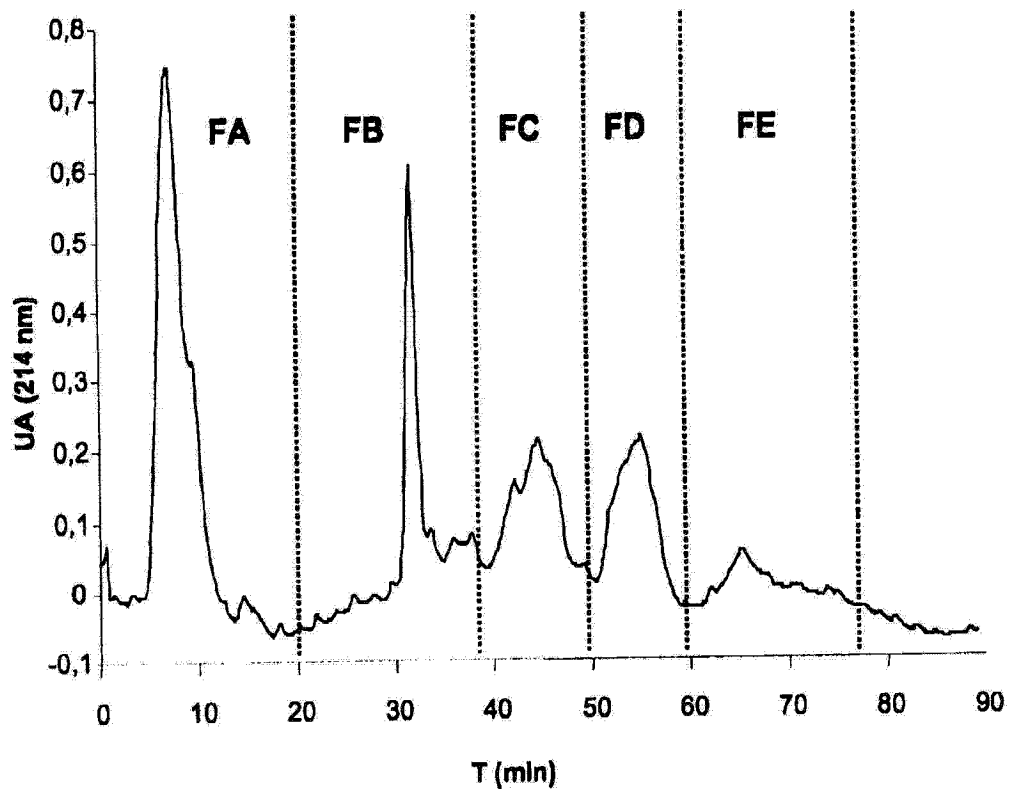


图 1

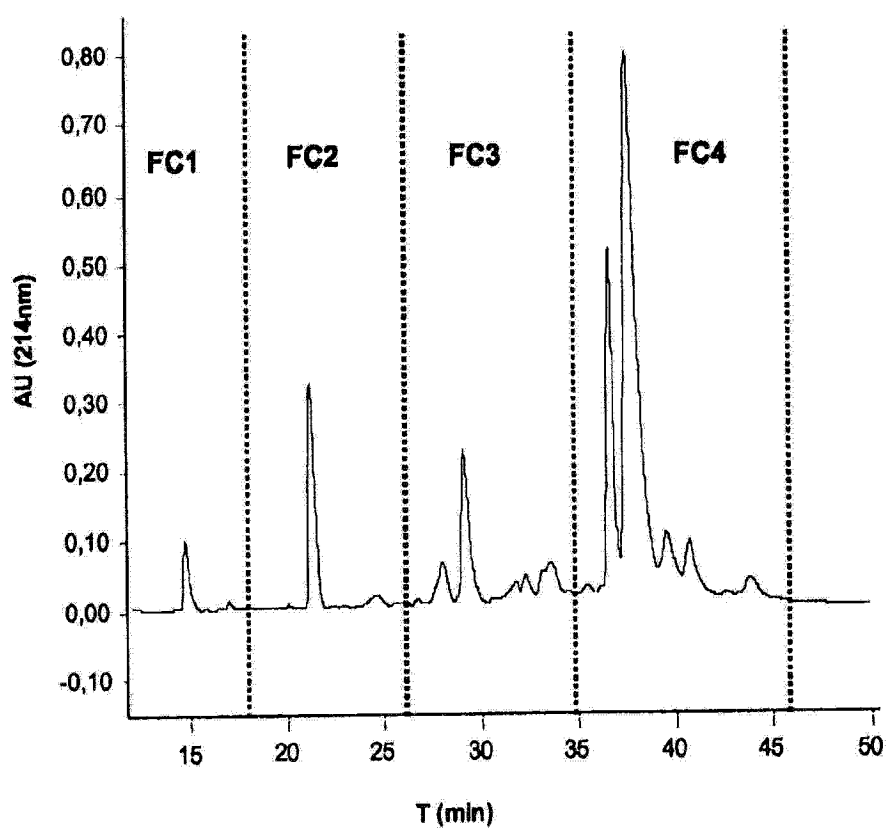


图 2A

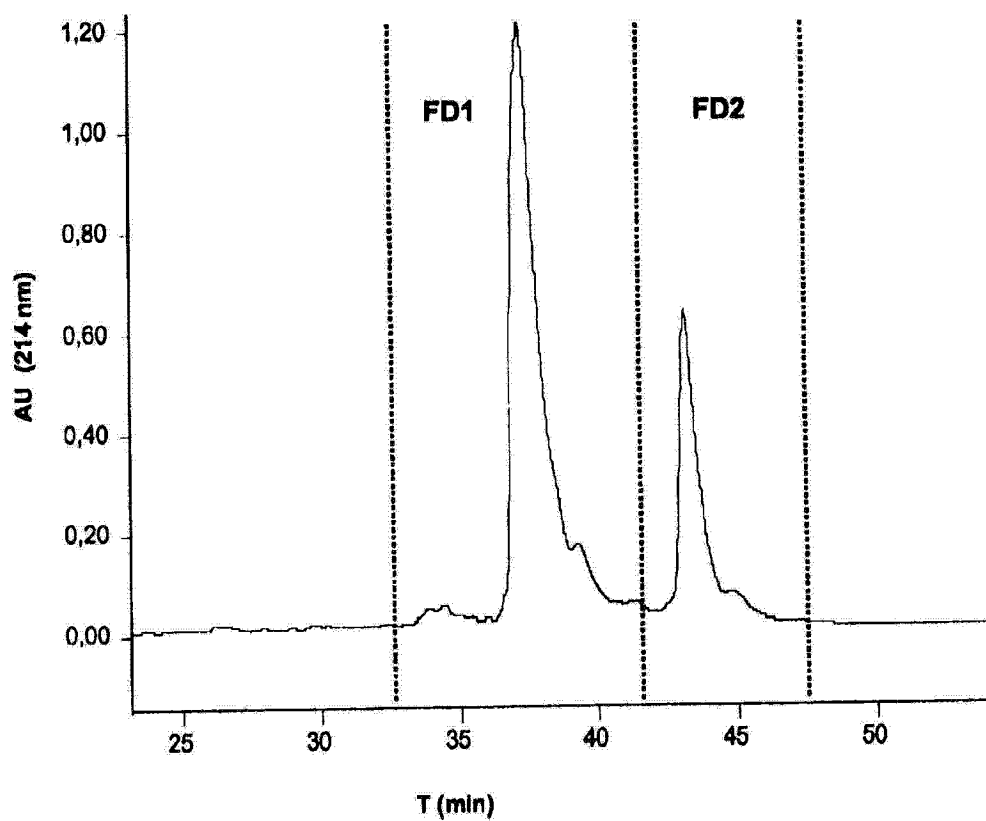


图 2B

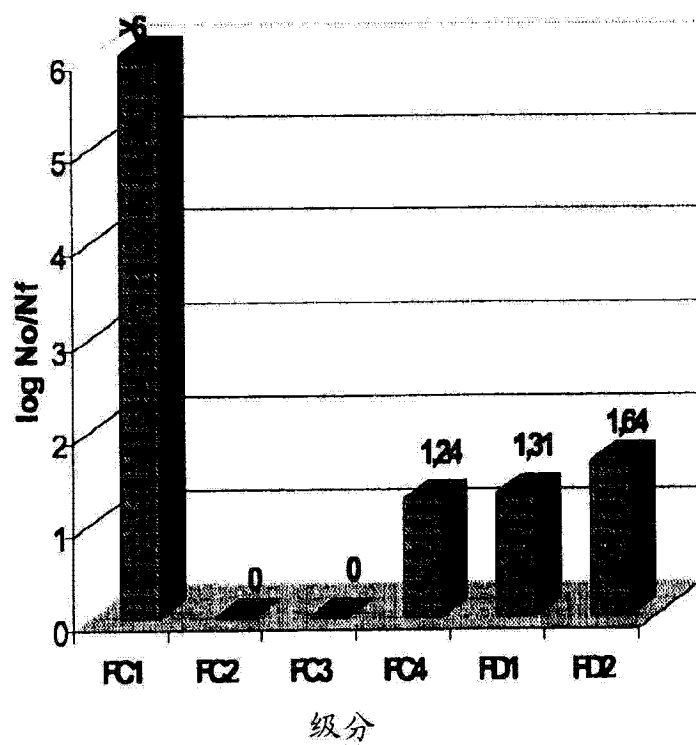


图 3

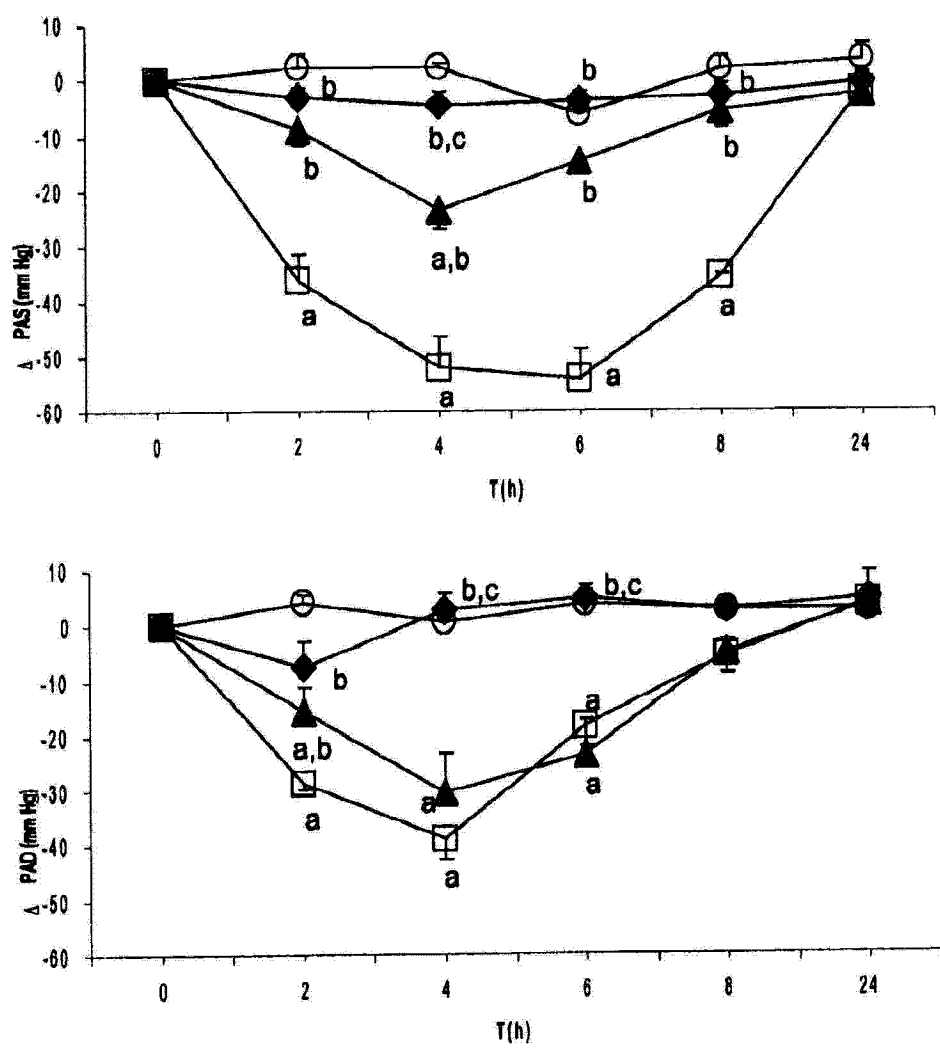


图 4

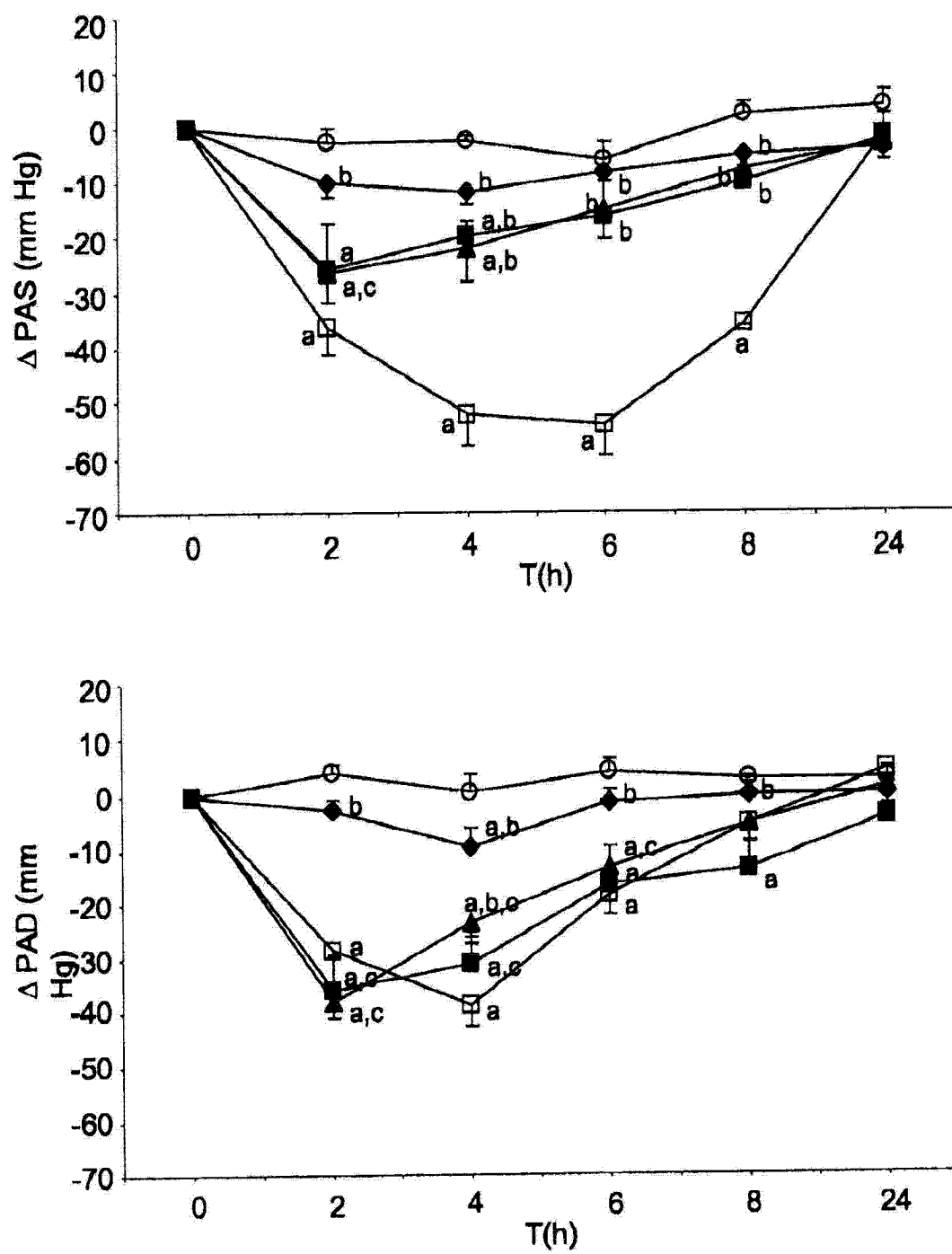


图 5

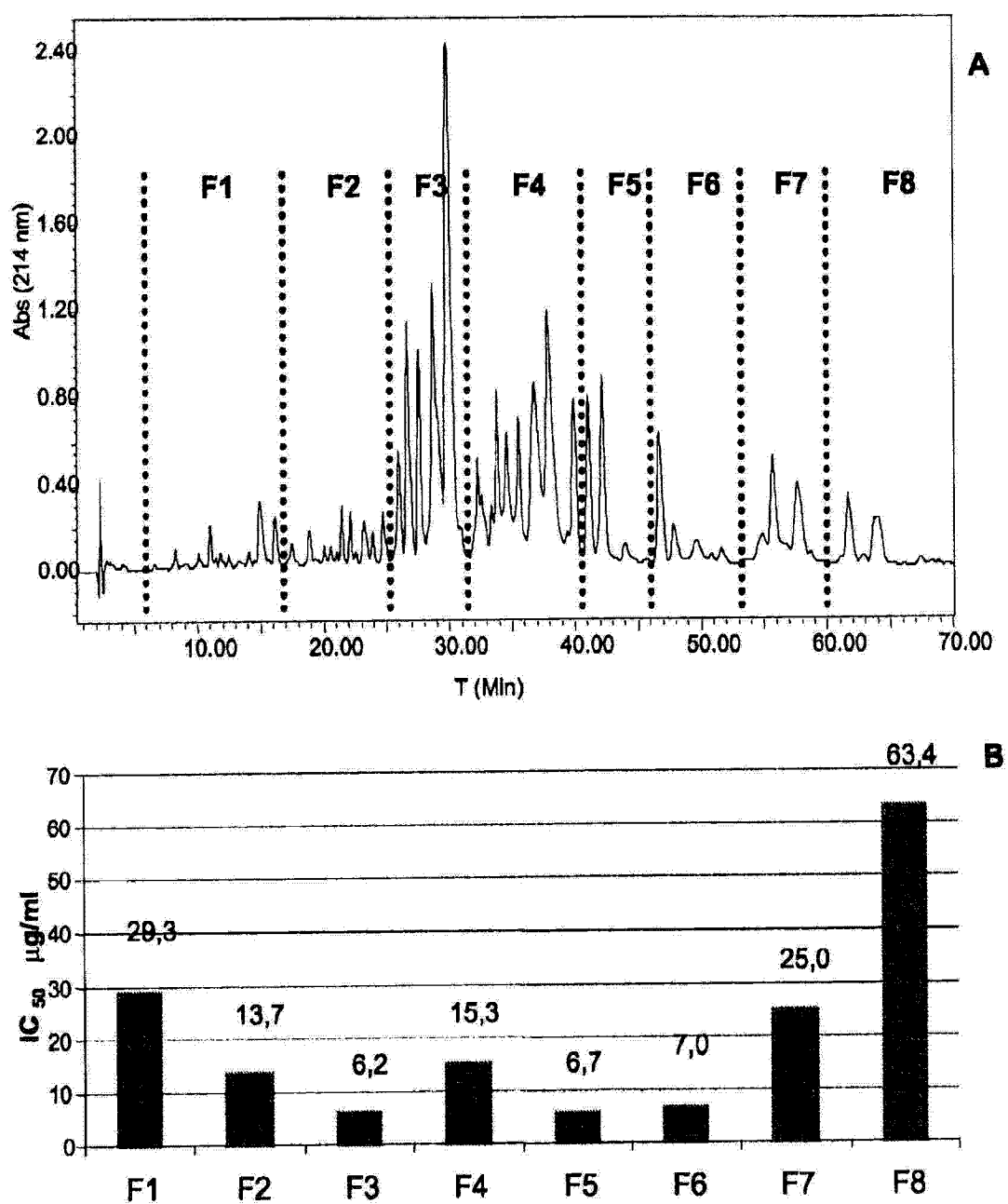


图 6

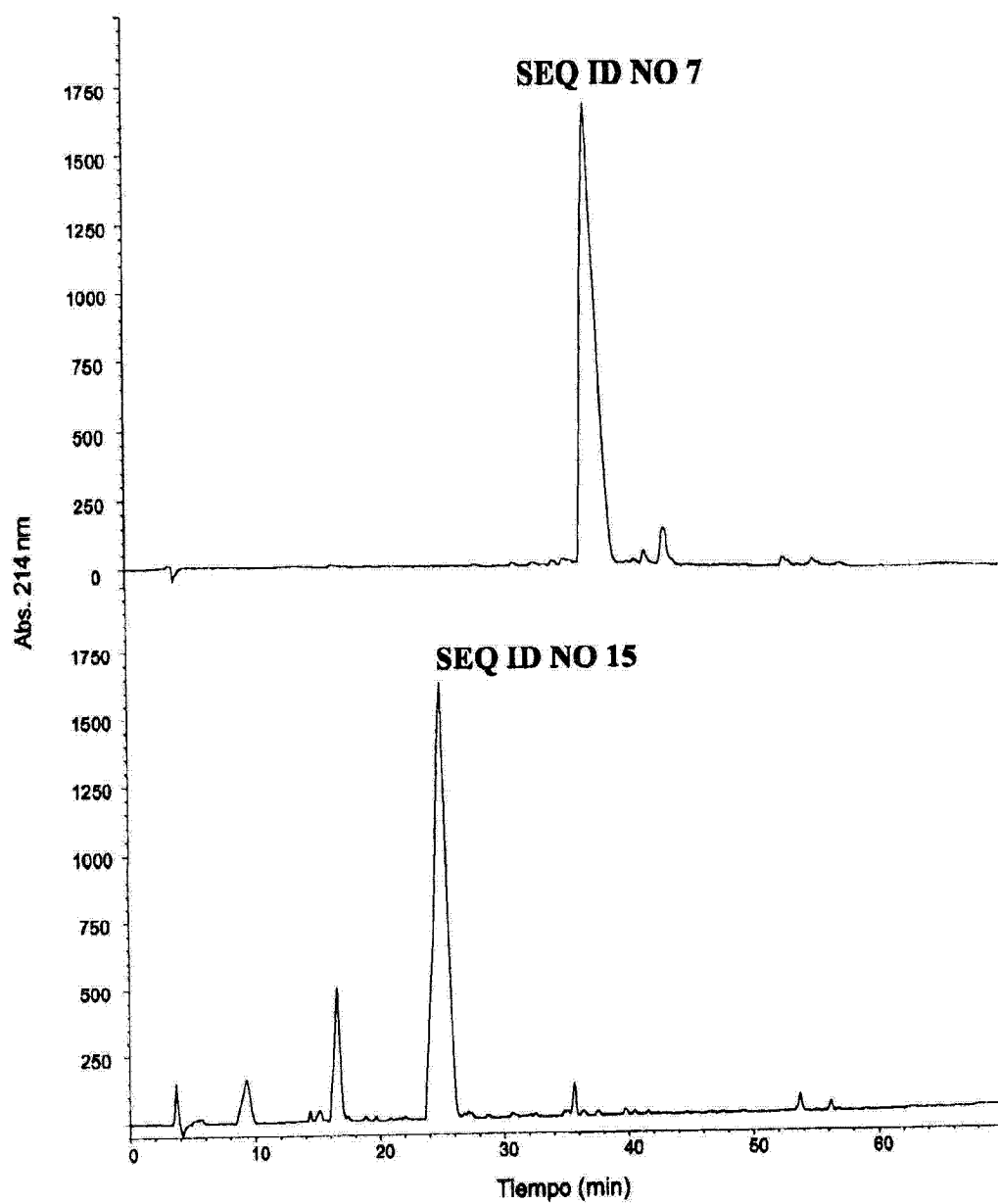


图 7

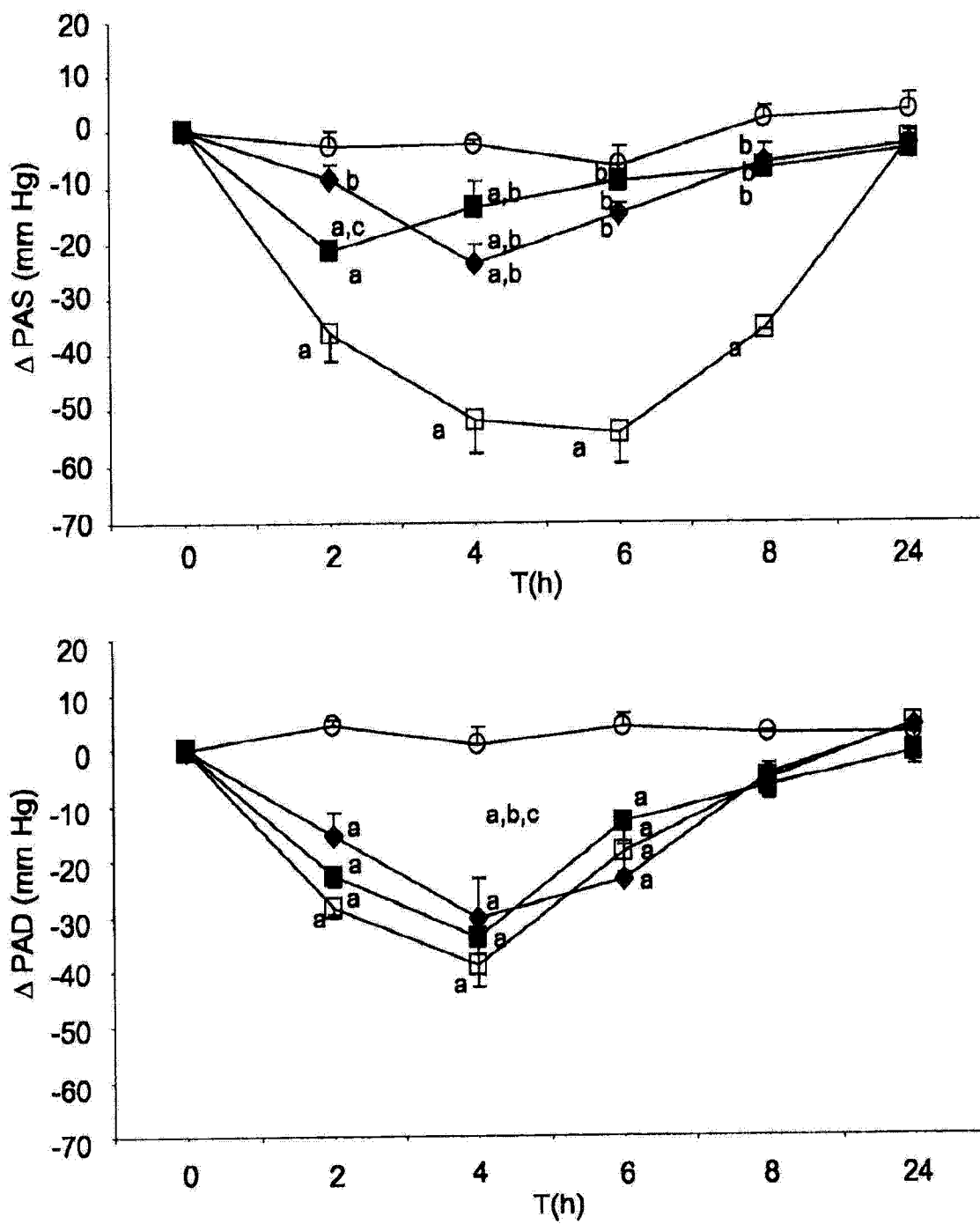


图 8

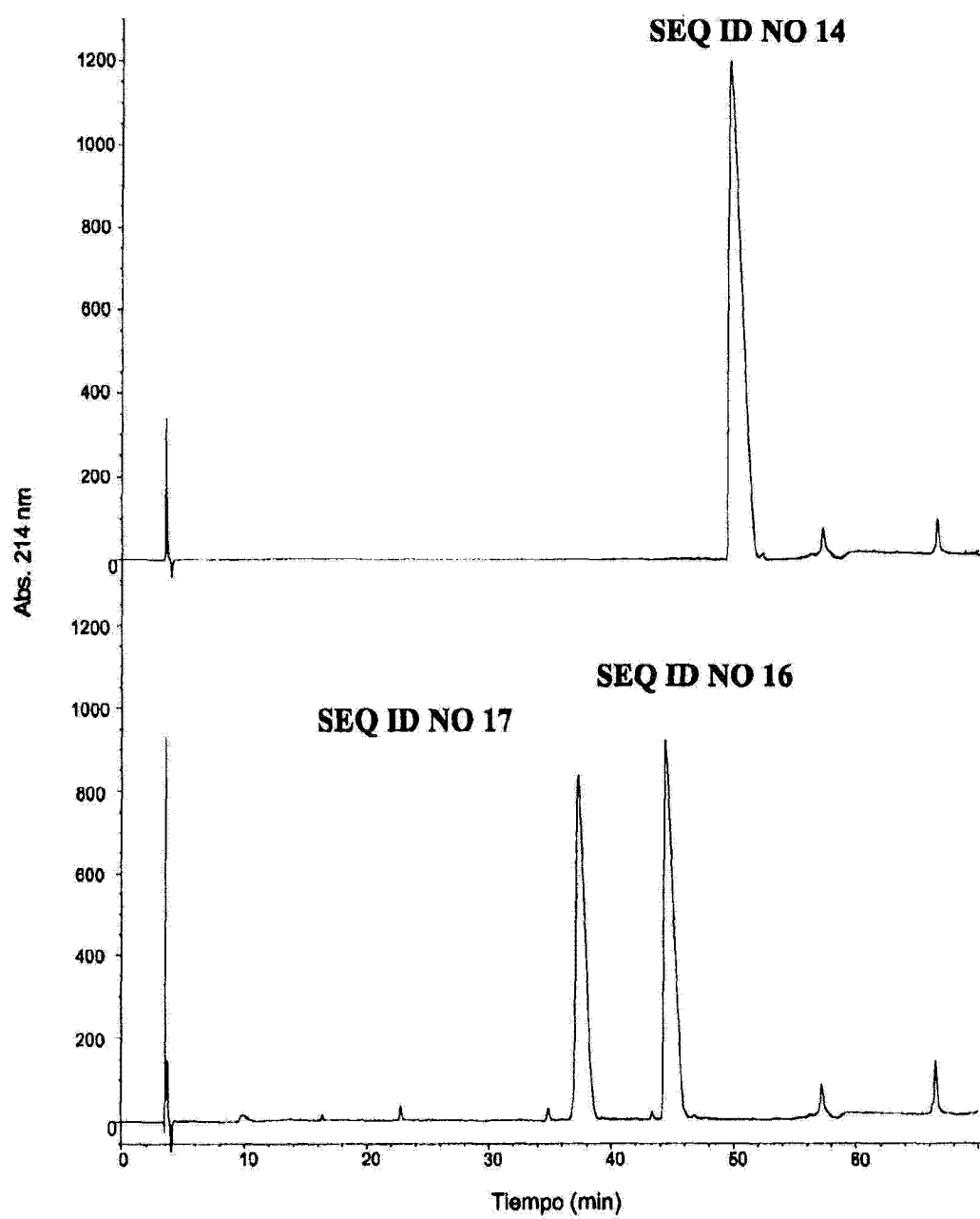


图 9

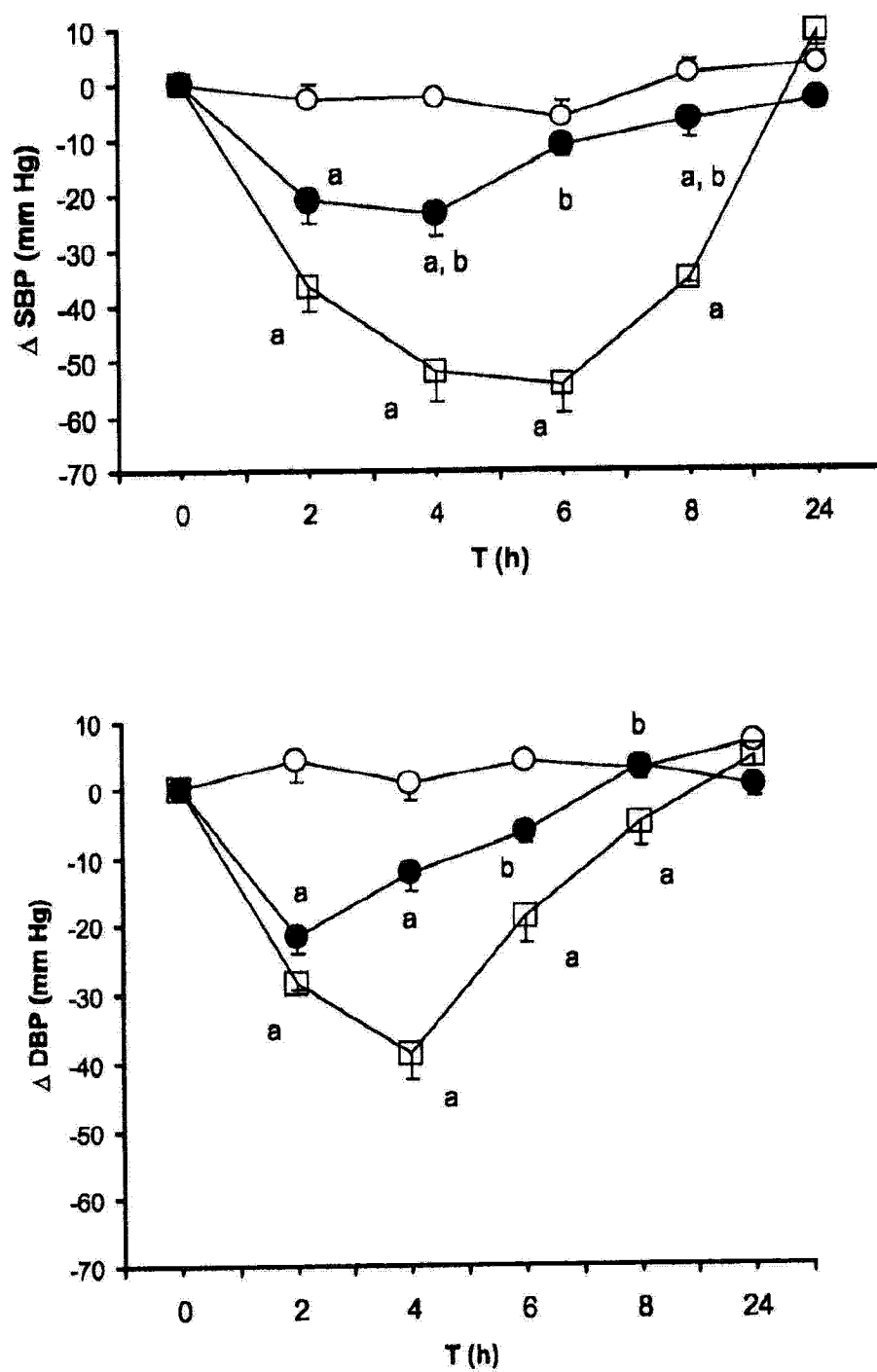


图 10