



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114149485 A

(43) 申请公布日 2022.03.08

(21) 申请号 202110591704.0

A61Q 19/00 (2006.01)

(22) 申请日 2021.05.28

A23L 33/18 (2016.01)

(71) 申请人 中国科学院大连化学物理研究所  
地址 116023 辽宁省大连市沙河口区中山  
路457-41号

申请人 舒倍登(杭州)科技有限公司

(72) 发明人 王方军 靳艳 杨建

(74) 专利代理机构 沈阳科苑专利商标代理有限  
公司 21002

代理人 马驰

(51) Int. Cl.

C07K 7/06 (2006.01)

A61K 38/08 (2019.01)

A61K 8/64 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

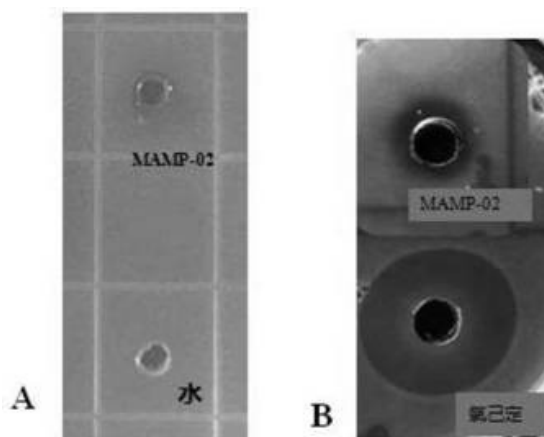
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

一种抗菌肽MAMP-02及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一种来自水解牛奶蛋白的具有微生物抑制活性的多肽化合物MAMP-02,其氨基酸序列为Leu-Asp-Ala-Gln-Ser-Asp-Pro-Leu-Arg (LDAQSAPLR)。多肽MAMP-02对大肠杆菌和变异链球菌具有抑制活性,包括大肠杆菌和变异链球菌等。具有原料天然安全和生产成本低的优点,可作为抑制微生物生长的活性成分应用于药物、食品、日用品中。



1. 一种抗菌肽MAMP-02,其特征在于:所述抗菌肽为多肽LDAQSAPLR,具有序列SEQ ID NO:1中氨基酸序列;该多肽的氨基酸序列具体为:Leu-Asp-Ala-Gln-Ser-Asp-Pro-Leu-Arg。

2. 按照权利要求1所述的抗菌肽,其特征在于:为来源于水解牛奶蛋白的抗菌肽,命名为MAMP-02。

3. 一种权利要求1或2所述抗菌肽在制备微生物生长抑制剂、抗感染药物、口腔用品或化妆品中的应用。

4. 按照权利要求3所述的应用,其特征在于:所述微生物生长抑制剂、抗感染药物、口腔用品或化妆品是以多肽MAMP-02为活性成份,其中可添加药理学、食品、口腔用品、化妆品中可接受的载体或辅料中的一种或两种以上。

5. 按照权利要求3或4所述的应用,其特征在于:所述感染为由大肠杆菌、变异链球菌中的一种或两种引起感染或菌群失衡。

6. 按照权利要求3或4所述的应用,其特征在于:

所述药物为预防和/或降低或治疗由大肠杆菌、变异链球菌中的一种或两种引起的口腔疾病的药品;

所述口腔用品为预防和/或降低或治疗由大肠杆菌、变异链球菌中的一种或两种引起的口腔疾病的口腔用品。

7. 按照权利要求3或4所述的应用,其特征在于:

所述药物为预防和/或降低或治疗由大肠杆菌、变异链球菌中的一种或两种引起的皮肤疾病的药品;

所述化妆品为预防和/或降低或治疗由大肠杆菌、变异链球菌中的一种或两种引起的皮肤疾病的化妆品。

## 一种抗菌肽MAMP-02及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种来源于水解牛奶蛋白的抗菌肽MAMP-02 (LDAQSAPLR) 及其应用。

### 背景技术

[0002] 抗生素是能抵抗致病微生物的药物,是抗菌消炎药中最大的一类。抗生素是由细菌、真菌或其他微生物在生活过程中所产生的物质,具有抑制或杀灭细菌、真菌等致病微生物的作用,因此作为抗感染药物广泛地应用于各种感染性疾病。抗生素在治疗感染中的显著效果也导致了细菌耐药性,使部分感染性疾病的治疗变得愈加困难。抗菌肽作为一种新型的抗生素,具有广谱的抗菌活性,不会轻易使微生物产生耐药性,具有广阔的应用前景。

[0003] 抗菌肽在自然界中广泛分布,作为被广泛关注的一种新型抗生素,越来越多的抗菌肽在微生物、动植物体内被发现。目前解析的抗菌肽构效关系中有两个较清晰的特征,分别是“带正电荷的阳离子”和“两亲性序列结构”。然而抗菌肽作为抗菌药物仍然面临许多待解决的问题:部分阳离子抗菌肽可以对哺乳动物的细胞产生较大的毒性作用;两亲性结构则要求氨基酸序列中有一定数量的碱性氨基酸,而碱性氨基酸易被蛋白酶水解的特性使得其作为药物进入人体后发挥效果大大受限。因此,开发安全、稳定、低细胞毒性的抗菌肽具有重要意义。

[0004] 牛奶作为优质的天然食物,是丰富的蛋白质和多肽资源,兼顾抗菌肽的优势及优质安全的蛋白来源两个特质。牛奶中蛋白含量丰富,在蛋白酶的水解作用下,形成稳定存在的抗菌肽,作为微生物生长抑制剂具有良好的潜质。因此,从水解牛奶蛋白肽出发进一步寻找具有抑菌活性的肽会为健康安全的微生物生长抑制剂的制备提供新的方向。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种来源于水解牛奶蛋白的抗菌肽MAMP-02,在制备预防和/或降低由微生物引起的肠道感染疾病、口腔疾病、皮肤疾病的药物、日用品或者微生物生长抑制剂中的应用。

[0006] 为实现上述目的,本发明以所述多肽MAMP-02为抑制微生物生长活性的有效成份。

[0007] 其具有序列SEQ ID NO:1中氨基酸序列;多肽MAMP-02为抗大肠杆菌和变异链球菌药物、食品、日用品的活性成份,其中可添加药学、食品、日用品上可接受的载体或辅料。

[0008] 具有对大肠杆菌和变异链球菌抑制活性的多肽化合物MAMP-02的氨基酸序列为LDAQSAPLR,Leu-Asp-Ala-Gln-Ser-Asp-Pro-Leu-Arg。分子量970.09Da,白色粉末状,易溶于水,对大肠杆菌和变异链球菌生长存在较强的抑制作用。

[0009] 本发明与现有技术相比,具有如下有益效果:

[0010] 本发明从水解牛奶蛋白中获得并确定了上述多肽的结构,首次验证了上述多肽具有较好的抑菌活性,因此作为预防和/或降低由大肠杆菌和变异链球菌引起的感染疾病的药物和/或保健品和/或日用品或者微生物生长抑制剂具有良好的应用前景。

## 附图说明

[0011] 图1本发明多肽对大肠杆菌和变异链球菌的抑菌结果,其中:图1A为多肽MAMP-02抑制大肠杆菌的实验结果;图1B为多肽MAMP-02抑制变异链球菌的实验结果。

## 具体实施方式

[0012] 实施例1

[0013] 水解牛奶蛋白肽的制备及鉴定。

[0014] (1) 样品制备

[0015] 取1g牛奶酪蛋白用10ml水溶解后加入20mg胰蛋白酶于37℃反应2小时,,酶解过程结束后在14000×g、4℃条件下离心20min,上清液为水解牛奶蛋白肽样品。

[0016] (2) LC-MS/MS分析

[0017] 水解牛奶蛋白肽溶液样品按如下步骤以C18柱(Waters Oasis HLB SPE柱,1cc/30mg,30um)除盐:C18柱用1.5mL甲醇活化后加入1.5mL 0.1% (V/V) TFA(三氟乙酸)-H<sub>2</sub>O溶液平衡,将样品以1ml 0.1% (V/V) TFA-H<sub>2</sub>O溶液复溶后加入C18柱中,以1.5mL 80% (V/V) ACN(乙腈)/0.1% (V/V) TFA-H<sub>2</sub>O溶液进行洗脱,收集洗脱液分装冻干于-80℃保存。脱盐后的样品以0.1% (V/V) FA(甲酸)-H<sub>2</sub>O溶解并制备成浓度为0.2g/L的溶液,上样量为8μL,加载到15cm毛细管分析柱(内径为180μm)进行质谱分析。LC-MS/MS系统由Agilent 1100HPLC系统和LTQ-Orbitrap Velos质谱仪组成。流动相A为含0.1% (V/V) 甲酸的水溶液,流动相B为含0.1%甲酸(V/V)和98%乙腈(V/V)的水溶液。梯度洗脱程序如下:0~80min,5~25%B(V/V,下同);80~95min,25%~35%B;95~97min,35%~90%B;97~107min,90%B;107~109min,90%~0%B;109~126min,0%B;流速70μL/min。在Orbitrap质量分析仪中以60000的分辨率获得了完整的质谱扫描图(m/z 400~2000)。对其中最强的15个离子进行离子碰撞解离(CID),再进行MS/MS扫描,扫描范围在m/z 400~2000。动态排除功能设置如下:重复2;持续时间30s;排除持续时间为60s。系统控制和数据收集由Xcalibur软件进行。每个样品进行三次质谱分析。

[0018] (3) 数据检索

[0019] Xcalibur采集的\*.RAW文件用MaxQuant软件在蛋白数据库(实验室在<http://www.uniprot.org/>下载蛋白质信息,建立牛奶蛋白数据库,蛋白质数目为7)中进行检索。搜库参数如下:不设置酶切、最大漏切数和固定修饰,可变修饰设置为甲硫氨酸的氧化(+15.9949Da),乙酰化修饰(+42.011Da),磷酸化修饰(+79.966Da)。母离子的质量容忍偏差为20ppm,碎片离子为0.8Da。导出肽段时控制假阳性率(FDR)<1%,对导出结果Score>20的肽段视为有效数据进行分析。

[0020] (4) LC-MS/MS得到目标肽段信息

[0021] 在水解牛奶蛋白肽样品中鉴定到五百条以上的肽段信息,其中约10%以上来源于β-乳球蛋白。其中多肽LDAQSAPLR蛋白质前体为牛β-乳球蛋白(f48-56),肽段等电点为5.84,分子质量为970.09Da,具有9个氨基酸,较短的序列及较低的相对分子质量,结合质谱鉴定结果表明该序列可以稳定存在不易继续被蛋白酶酶解。通过在线工具获取SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的生物学信息表示,该肽段的不稳定系数为100.51,脂肪族氨基酸指数和亲水性分别为108.89和-0.300,表现为疏水性,具有抗菌肽的特征。

[0022] SEQ ID No.1的信息

[0023] (a) 序列特征

[0024] \*长度:9氨基酸

[0025] \*类型:氨基酸

[0026] \*链型:单链

[0027] (b) 分子类型:蛋白

[0028] 序列描述:

[0029] SEQ ID No.1

[0030] LDAQSAPLR

[0031] 实施例2

[0032] 多肽的抗菌活性。

[0033] 于上海杰肽科技有限公司定制化学合成多肽MAMP-02,纯度为95.4%。以革兰氏阴性菌中的大肠杆菌和牙龈卟啉单胞菌、革兰氏阳性菌中的金黄色葡萄球菌和变异链球菌为靶标菌种,考察多肽MAMP-02的抗菌活性。

[0034] (1) 菌株及复苏

[0035] 大肠杆菌 (*Escherichia coli* K12)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*, P.g., ATCC33277) 和变异链球菌 (*Streptococcus mutans*, M.s., ATCC25175) 均购自中国菌种资源库保藏中心,以甘油保藏法保存于-80℃。实验前将大肠杆菌接种于LB肉汤培养基(北京索莱宝科技有限公司)中,将金黄色葡萄球菌接种于TSB肉汤培养基(北京索莱宝科技有限公司)中,将牙龈卟啉单胞菌和变异链球菌分别接种于BHI肉汤培养基(北京索莱宝科技有限公司)中,靶标菌种均以1%体积量接种。于37℃条件下培养12h,将菌液以1%体积量再次接种至新鲜培养基中培养复苏。重复接种复苏操作2次,使菌株恢复活力。

[0036] (2) 培养基

[0037] 实验使用边长为90mm的方形培养皿。大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌实验使用双层培养基,下层以20mL 2% (m/V, g/mL) 的琼脂水溶液做支撑,上层分别加入8mL含0.7% (m/V, g/mL) 琼脂、菌浓度为 $1 \times 10^5$  CFU/mL的LB培养基和TSB培养基,分别制成LB平板和TSB平板。将制备好的两种平板培养基密封后于4℃保存。牙龈卟啉单胞菌的抑菌实验使用哥伦比亚琼脂培养基(南京全隆生物技术有限公司),15mL的培养基制成平板,平板上加入200μL、菌浓度为 $1 \times 10^5$  CFU/mL的菌液,利用滚珠涂布均匀。变异链球菌的抑菌实验使用含1.5% (m/V, g/mL) 琼脂、菌浓度为 $1 \times 10^5$  CFU/mL的BHI培养基,每个培养皿中加入含菌的培养基15mL制成平板。

[0038] (3) 抗菌实验

[0039] 在LB平板和TSB平板上层制作出内径2mm的孔、BHI平板中制作内径8mm的孔、哥伦比亚琼脂平板中加入内径8mm牛津杯分别用于抗菌实验。

[0040] 将抗菌肽样品用无菌水溶解配制成100mg/ml的溶液,分别加到琼脂平板孔和牛津杯中20μL。大肠杆菌和金黄色葡萄球菌以无菌水作为阴性对照,牙龈卟啉单胞菌和变异链球菌以0.3mg/mL氯己定作阳性对照。阴性对照和阳性对照的加样体积与抗菌肽样品溶液相同。

[0041] 加样后的平板于4℃冰箱中静置3h,待孔中样液完全吸收扩散后取出,大肠杆菌和金黄色葡萄球菌在37℃恒温培养箱中倒置培养16h,牙龈卟啉单胞菌和变异链球菌在80%氮气(V/V)、10%氢气(V/V)、10%二氧化碳(V/V)的厌氧培养箱37℃条件下倒置培养16h。培养结束后观察是否有抑菌圈出现,测量抑菌圈大小并记录。

[0042] (4) 实验结果

[0043] 对两种菌的抑菌结果见表1,结果表明多肽MAMP-02对大肠杆菌和变异链球菌均有生长抑制活性,对金黄色葡萄球菌和牙龈卟啉单胞菌没有抑制活性。

[0044] 表1多肽MAMP-02对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌(抑菌圈,mm)

[0045]	样品	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>
[0046]	MAMP-02	4.2*4.2 <sup>1</sup>	—
	水(阴性对照)	—	—

[0047] 1,数字表示抑菌圈直径(mm),如4.2\*4.2表示抑菌圈直径4.2(mm);

[0048] 2、—表示没有抑菌活性。

[0049] 表2多肽MAMP-02对牙龈卟啉单胞菌和变异链球菌的抑菌结果(抑菌圈,mm)

[0050]	样品	牙龈卟啉单胞菌 <i>Porphyromonas gingivalis</i>	变异链球菌 <i>Streptococcus mutan</i>
	MAMP-02	—	14.0*14.0
	氯己定(阳性对照)	16.0*16.0	25.0*25.0

[0051] 1,数字表示抑菌圈直径(mm),如14.0\*14.0表示抑菌圈直径14.0(mm);

[0052] 2、—表示没有抑菌活性。

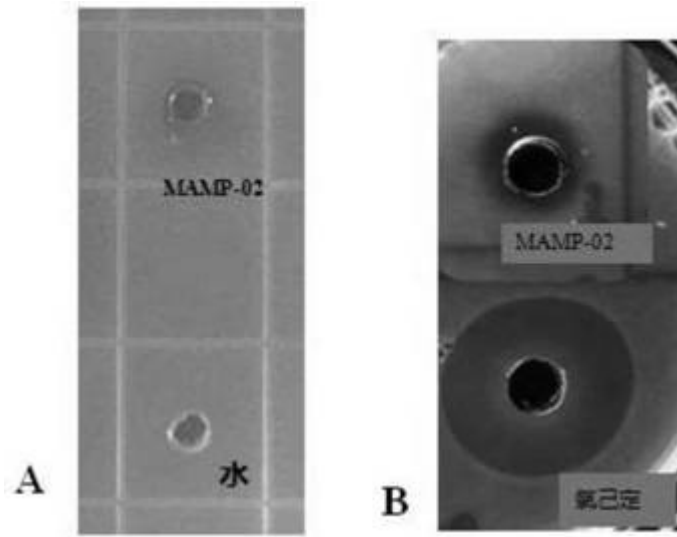


图1