



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103429614 B

(45)授权公告日 2017.05.24

(21)申请号 201180062599.6  
 (22)申请日 2011.12.22  
 (65)同一申请的已公布的文献号  
 申请公布号 CN 103429614 A  
 (43)申请公布日 2013.12.04  
 (30)优先权数据  
 590143 2010.12.22 NZ  
 (85)PCT国际申请进入国家阶段日  
 2013.06.24  
 (86)PCT国际申请的申请数据  
 PCT/NZ2011/000271 2011.12.22  
 (87)PCT国际申请的公布数据  
 W02012/087160 EN 2012.06.28  
 (73)专利权人 曼努卡米德有限公司  
 地址 新西兰马斯德统市  
 (72)发明人 阿嫫达·比恩 彼得·莫蓝  
 雷·库森斯 理查·威尔金斯  
 (74)专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司 11243  
 代理人 钟晶 於毓桢  
 (51)Int.Cl.  
 C07K 14/76(2006.01)  
 A61K 38/38(2006.01)  
 G01N 33/68(2006.01)  
 G01N 33/533(2006.01)  
 A61P 29/00(2006.01)

(56)对比文件  
 CN 1980577 A,2007.06.13,  
 CN 1688209 A,2005.10.26,  
 Fontana,R. ET AL.major royal jelly protein 1 [Apis mellifera].《NCBI,Genbank accession number:NP\_001011579.1》.2007,  
 MAJTAN J ET AL.The immunostimulatory effect of the recombinant apalbumin 1-major honeybee royal jelly protein-on TNF  $\alpha$  release.《INTERNATIONAL IMMUNOPHARMACOLOGY》.2006,第6卷(第2期),  
 X FAN ET AL.Methylglyoxal-bovine serum albumin stimulates tumor necrosis factor alpha secretion in RAW 264.7 cells through activation of mitogen-activating protein kinase, nuclear factor [kappa]B and intracellular reactive oxygen species formation.《ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS》.2003,第409卷(第2期),  
 X FAN ET AL.Methylglyoxal-bovine serum albumin stimulates tumor necrosis factor alpha secretion in RAW 264.7 cells through activation of mitogen-activating protein kinase, nuclear factor [kappa]B and intracellular reactive oxygen species formation.《ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS》.2003,第409卷(第2期),

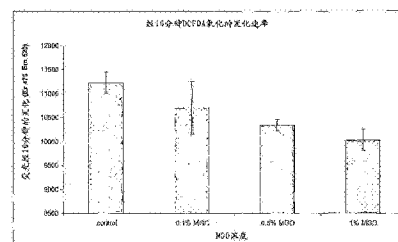
审查员 李煦颖

权利要求书2页 说明书21页  
序列表11页 附图13页

(54)发明名称  
抗发炎蛋白与制备及使用其的方法

(57)摘要  
本案的揭示是关于抗发炎蛋白、其用途、制备方法及其侦测方法。特定而言,本发明是关于来自麦卢卡蜂蜜的经甲基乙二醛修饰的主要蜂王浆蛋白及其片段。

CN 103429614 B



1. 一种分离的王浆主蛋白 (apalbumin) 蛋白质, 其已经化学修饰以包含至少17个经甲基乙二醛 (MGO) 修饰的氨基酸残基, 其具有抗发炎能力, 且所述王浆主蛋白蛋白质的氨基酸序列为SEQ ID NO 1。

2. 如权利要求1的分离的蛋白质, 其是自麦卢卡蜂蜜 (manuka honey) 分离。

3. 如权利要求1或2的分离的蛋白质, 其具有17个至32个经MGO修饰的氨基酸残基。

4. 如权利要求1或2的分离的蛋白质, 其具有约32个经MGO修饰的氨基酸残基。

5. 如权利要求4的分离的蛋白质, 其中该等经修饰的氨基酸残基为赖氨酸或精氨酸。

6. 如权利要求4的分离的蛋白质, 其中该等经修饰的氨基酸残基为赖氨酸。

7. 一种组成物, 其包含权利要求1至6中任一项的分离的蛋白质。

8. 一种产生抗发炎分子的方法, 其中该抗发炎分子为王浆主蛋白蛋白质, 其已经化学修饰以包含至少17个经MGO修饰的氨基酸残基, 且所述王浆主蛋白蛋白质的氨基酸序列为SEQ ID NO 1, 其中该方法包括修饰蜂王浆, 该方法包括使蜂王浆与至少0.5%MGO反应的步骤。

9. 如权利要求8的方法, 其包括在反应的步骤期间加热的步骤。

10. 如权利要求8的方法, 其包括使蜂王浆与至少1.0%MGO反应的步骤。

11. 如权利要求8至10中任一项的方法, 其中该方法进一步包括自该蜂王浆分离经MGO修饰的王浆主蛋白蛋白质的步骤。

12. 一种减轻蜂巢组织中的炎症的方法, 其包含使权利要求7的组成物与该蜂巢组织接触的步骤, 其中该方法在活体外操作。

13. 一种降低免疫系统细胞的吞噬率的方法, 其包含授予该免疫系统细胞权利要求7的组成物的步骤, 其中该方法在活体外操作。

14. 一种抑制免疫系统细胞上用于吞噬的受体的方法, 其包含授予该免疫系统细胞权利要求7的组成物的步骤, 其中该方法在活体外操作。

15. 一种减少发炎细胞的呼吸爆发及活性氧物质释放的方法, 其包含授予该等发炎细胞权利要求7的组成物的步骤, 其中该方法在活体外操作。

16. 一种权利要求7的组成物的用途, 其是用于制备用于减轻个体蜂巢组织中的炎症的医药品。

17. 一种权利要求7的组成物的用途, 其是用于制备用于降低个体免疫系统细胞的吞噬率的医药品。

18. 一种权利要求7的组成物的用途, 其是用于制备用于抑制个体免疫系统细胞上用于吞噬的受体的医药品。

19. 一种权利要求7的组成物的用途, 其是用于制备用于减少个体发炎细胞的呼吸爆发及活性氧物质释放的医药品。

20. 一种识别蜂蜜样本的 (i) 抗发炎能力及 (ii) 经MGO修饰的王浆主蛋白浓度的方法, 该王浆主蛋白已经化学修饰以包含至少17个经MGO修饰的氨基酸残基, 且所述王浆主蛋白的氨基酸序列为SEQ ID NO 1, 其中该方法包含以下步骤:

a) 分析该蜂蜜样本的荧光, 及

b) 藉由将一蜂蜜样本的荧光量测值以及一或多种蜂蜜样本的抗发炎能力与先前已经量测的抑制吞噬作用能力比较, 来使该蜂蜜样本的荧光量测值与该蜂蜜样本的抗发炎能力

具相关性。

21. 如权利要求20的方法,其中该方法是用于使得养蜂人能够确定自蜂房收集蜂蜜以获得含有所需抗炎能力或经MGO修饰的王浆主蛋白蛋白质含量的蜂蜜样本的恰当时机。

22. 如权利要求20的方法,其中该方法是用于使得蜂蜜生产者能够确定储存蜂蜜以获得具有所需抗炎能力及经MGO修饰的王浆主蛋白蛋白质含量的蜂蜜样本的所需持续时间。

23. 一种增强王浆主蛋白蛋白质的抗炎能力的方法,其是藉由用至少0.5%MGO或至少1%戊二醛化学处理来达成,该王浆主蛋白蛋白质的氨基酸序列为SEQ 1D NO 1,且用于MGO处理的该一或多种王浆主蛋白含有至少17个可藉由MGO修饰的氨基酸残基。

24. 一种提高蜂蜜样本的抗炎能力及经MGO修饰的王浆主蛋白蛋白质含量的方法,其包含以至少0.5%MGO或MGO前驱分子培育蜂蜜样本的步骤,使得该王浆主蛋白已经化学修饰以包含至少17个经MGO修饰的氨基酸残基,该王浆主蛋白的氨基酸序列为SEQ 1D NO 1。

25. 如权利要求23或24的方法,其中该王浆主蛋白蛋白质为经MGO修饰的王浆主蛋白1蛋白质。

## 抗发炎蛋白与制备及使用其的方法

### 技术领域

[0001] 本发明是关于抗发炎蛋白、其用途及其侦测方法。

### 背景技术

[0002] 蜂蜜因其多种健康益处而已在世界各地藉由培养使用数个世纪。蜂蜜的两个最重要的健康益处为其抗细菌及抗发炎性质。由蜜蜂自松红梅(*Leptospermum scoparium*) (一种新西兰及南澳大利亚原生的植物)收集花蜜产生的麦卢卡蜂蜜(Manuka honey)已被识别为一种尤其展现有效抗细菌及抗发炎性质的蜂蜜品种。

[0003] 最近,已发现化学物质甲基乙二醛(MGO/2-氧代丙醛)为麦卢卡蜂蜜的抗细菌活性的主要组分。含有较高浓度的MGO的麦卢卡蜂蜜样本相较于MGO浓度较低的蜂蜜样本具有较高水平的抗细菌活性。咸信MGO赋予蜂蜜以抗细菌性质,这是因为MGO为具高度化学反应性的化合物,且MGO可容易地与细胞分子反应。MGO与细菌中的细胞分子的化学反应损伤对于细菌活力而言重要的分子,且从而MGO充当抗细菌剂。

[0004] 蜂蜜中存在高含量的MGO为区分麦卢卡蜂蜜与其他品种的蜂蜜的特征。大部分蜂蜜品种展现某种程度的抗细菌活性,大部分蜂蜜品种的抗细菌活性主要为蜂蜜中存在过氧化氢的结果。相较而言,麦卢卡蜂蜜主要因蜂蜜中存在MGO而展现抗细菌活性。

[0005] 在2004年Kohnno等人在细胞激素层面上研究蜂王浆的抗发炎效应或作用。研究结果表明蜂王浆具有抗发炎作用,该抗发炎作用由抑制活化的巨噬细胞产生促发炎细胞激素(诸如TNF- $\alpha$ 、1L-6及1L-1)所致。该研究进一步表明蜂王浆中的活性部分或组分的分子量介于5kDa与30kDa之间。此研究大概阐明大部分蜂蜜具有弱抗发炎效应是因为在蜂蜜中存在蜂王浆蛋白。

[0006] 虽然已了解麦卢卡蜂蜜的抗细菌活性的多重作用机制,但麦卢卡蜂蜜充当抗发炎剂的机制仍然未知。需要研发基于蜂蜜的抗发炎剂,这是因为许多当前可用的抗发炎剂在其使用方面具有较多缺点。举例而言,COX-2抑制剂(一种非类固醇抗发炎药(NSAID)形式)会提高患者的心脏病发作及中风的风险,且阿司匹林(aspirin)可能提高胃肠出血的风险。另外,皮质类固醇经报导会抑制上皮细胞生长且NSAID经报导具细胞毒性,因此此两个类别的抗发炎剂不适用于伤口护理。源自蜂蜜的抗发炎剂相较于当前可用的药物在一或多个领域中可具有较少毒性副作用,且相较于当前可用的抗发炎药物亦可提供可能的不同用途。

[0007] 除需要研发基于蜂蜜的抗发炎药物之外,亦需要研发一种测试蜂蜜样本的抗发炎特性的简便方法。本发明旨在满足该两种需要及其他未满足的需要。

[0008] 本发明人已识别出来自麦卢卡蜂蜜的约55kDa至75kDa的经修饰王浆主蛋白(apalbumin),其是得自麦卢卡蜂蜜中发现的高含量的甲基乙二醛。本发明人已认识到,经修饰的王浆主蛋白相较于未经修饰的王浆主蛋白具有显著较强的抗发炎性质。

### 发明内容

[0009] 本文描述一种经甲基乙二醛(MGO)化学修饰且在蜂蜜中识别出的王浆主蛋白

质,其展现显著提高的抗发炎效应。在一个方式中,提供一种分离的王浆主蛋白蛋白质或其片段,其已经甲基乙二醛(MGO)化学修饰。在另一具体实施例中,该蛋白为经修饰的王浆主蛋白1(Apa1/MRJP)蛋白或其片段。在另一具体实施例中,经修饰的王浆主蛋白蛋白质或其片段是自麦卢卡蜂蜜中分离。

[0010] 在另一具体实施例中,蛋白或其片段具有至少17个经MGO修饰的氨基酸残基,或17至32个经MGO修饰的氨基酸残基或约32个经MGO修饰的氨基酸残基。在另一具体实施例中,经修饰的氨基酸残基为一或多个赖氨酸或精氨酸残基。

[0011] 在另一方式中,提供一种组成物,其包含分离的经MGO修饰的王浆主蛋白蛋白质或其片段。

[0012] 在另一方式中,提供一种分离的经MGO修饰的王浆主蛋白蛋白质或其片段,其具有「抗发炎能力」且包含与SEQ ID NO1中所述的氨基酸序列具有至少75%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的氨基酸序列。在一个具体实施例中,分离的经MGO修饰的王浆主蛋白蛋白质或其片段是自麦卢卡蜂蜜中分离。

[0013] 在另一方式中,提供一种减轻蜂巢组织中的炎症的方法,其包含使包括如上文所定义的分开的经MGO修饰的王浆主蛋白蛋白质的组成物与蜂巢组织接触的步骤。

[0014] 在另一方式中,提供一种(i)降低免疫系统细胞的吞噬率的方法,或(ii)抑制免疫系统细胞上的用于吞噬的受体的方法,其包含授予免疫系统细胞含如上文所定义的分开的经MGO修饰的王浆主蛋白蛋白质的组成物的步骤。

[0015] 在另一具体实施例中,提供一种藉由修饰蜂王浆产生抗发炎分子的方法,该方法包括使蜂王浆与至少0.01%MGO或0.5%MGO或1.0%MGO反应的步骤。该方法可进一步包括自蜂王浆产物中分离经MGO修饰的王浆主蛋白(MRJP1)蛋白质的步骤。

[0016] 在另一方式中,提供一种识别蜂蜜样本的(i)抗发炎能力或(ii)经MGO修饰的王浆主蛋白浓度的方法,其包含以下步骤:

[0017] a)分析蜂蜜样本的荧光,及

[0018] b)藉由将一蜂蜜样本的荧光量测值以及一或多种蜂蜜样本的抗发炎能力与先前已经量测的抑制吞噬作用能力比较,来使蜂蜜样本的荧光量测值与蜂蜜样本的抗发炎能力具相关性。

[0019] 在一个具体实施例中,经MGO修饰的王浆主蛋白为经修饰的王浆主蛋白1蛋白质。

[0020] 在一个具体实施例中,该方法用于使得养蜂人能够确定自蜂房收集蜂蜜以获得含有所需抗发炎能力或经MGO修饰的王浆主蛋白含量的蜂蜜样本的恰当时机。

[0021] 在另一具体实施例中,该方法用于使得蜂蜜生产者能够确定储存蜂蜜以获得具有所需抗发炎能力及经MGO修饰的王浆主蛋白含量的蜂蜜样本的所需持续时间。

[0022] 一种增强一或多种王浆主蛋白/(MRJP)蛋白质的抗发炎及荧光特性的方法,该方法是藉由用MGO化学处理来达成。

[0023] 一种提高蜂蜜样本的抗发炎能力及经MGO修饰的王浆主蛋白蛋白质含量的方法,其包含将MGO或MGO前驱分子添加至蜂蜜样本中的步骤。

[0024] 在另一具体实施例中,提供一种增强一或多种王浆主蛋白蛋白质的抗发炎能力的方法,其是藉由用MGO、甲醛、乙二醛及/或戊二醛化学处理来达成。

[0025] 在另一具体实施例中,提供一种增强一或多种王浆主蛋白蛋白质的抗发炎能力的

方法,其是藉由用MGO、乙二醛及/或戊二醛化学处理来达成。

[0026] 上述概要大致描述本发明的某些具体实施例的特征及技术优势。其他技术优势将在随后的本发明的实施方式及实施例中描述。咸信为本发明特性的新颖特征在连同任何随附的附图及实施例一起考虑时将自本发明的实施方式更透彻地了解。然而,本文提供的附图及实施例意欲协助说明本发明或帮助建立对本发明的理解,而不意欲限制本发明的范围。

## 附图说明

[0027] 图1描绘(a)10%具有高荧光的麦卢卡蜂蜜溶液的荧光发射光谱,及(b)藉由将10mg/ml牛血清白蛋白水溶液与400 $\mu$ g/ml MGO一起培育所制备的经MGO修饰的牛血清白蛋白溶液的荧光发射光谱。

[0028] 图2描绘许多蜂蜜样本的吞噬抑制作用(P1A)对比荧光的图。

[0029] 图3展示麦卢卡蜂蜜的透析保留物在180ml G-50葡聚糖凝胶管柱上的层析洗提。洗提份量为1ml。

[0030] 图4展示自图3中所示的G-50葡聚糖凝胶层析获得的洗提份8、14及23的吞噬作用-抑制活性。结果展示相较于未经处理的对照组得到的吞噬作用降低%。误差杠展示至少三次分析的平均值 $\pm$ 1个SD。洗提份23因其几乎不含/不含蛋白质而纳入作为对照物。

[0031] 图5展示来自葡聚糖凝胶G-50层析的洗提份4至10在25ml Superose12FPLC管柱上层析的洗提特征。洗提份量为1ml。

[0032] 图6展示藉由胰蛋白酶消化以Superose12层析管柱分离的洗提份8所获的肽的质谱。

[0033] 图7展示藉由胰蛋白酶消化以Superose12层析管柱分离的洗提份14所获的肽的质谱。

[0034] 图8展示用来自Superose12层析管柱的洗提份进行银染色的SDS电泳凝胶操作的影像。

[0035] 图9展示未经处理的麦卢卡蜂蜜及苜蓿蜜在培育之前的银染色SDS电泳凝胶(一式两份)。

[0036] 图10展示蜜场蜂蜜在3个月培育后(泳道1)及在培育之前(泳道2)的银染色SDS电泳凝胶以及麦卢卡蜂蜜在3个月培育后(泳道3)及在培育之前(泳道4)的银染色SDS电泳凝胶。

[0037] 图11展示在不同浓度的MGO下MRJP1由MGO修饰所致的质量变化(以道尔顿计)。

[0038] 图12展示在不同浓度的MGO下MRJP1由MGO修饰所达成的DFCDA生物分析结果。

[0039] 图13展示使用10 $\mu$ L细胞进行DCFDA分析的动力学分析曲线图。

[0040] 图14展示藉由使用MGO、果糖、戊二醛及葡萄糖修饰MRJP1所达成的DFCDA生物分析结果。

[0041] 图15展示MRJP的Lys C消化的MS。

[0042] 图16展示经0.1%MGO修饰的MRJP的Lys C消化的MS。

[0043] 图17展示经0.5%MGO修饰的MRJP的Lys C消化的MS。

[0044] 图18展示经1.0%MGO修饰的MRJP的Lys C消化的MS。

- [0045] 图19展示图15至19中所示的Lys C消化的MS曲线的重迭图。
- [0046] 图20展示识别为源自未经MGO修饰的MRJP提取物的MRJP1-胰蛋白酶消化物的峰。
- [0047] 图21展示识别为源自经0.1%MGO修饰的MRJP提取物的MRJP1-胰蛋白酶消化物的峰。
- [0048] 图22展示识别为源自经0.5%MGO修饰的MRJP提取物的MRJP1-胰蛋白酶消化物的MS峰。
- [0049] 图23展示识别为源自经1%MGO修饰的MRJP提取物的MRJP1-胰蛋白酶消化物的MS峰。

### 具体实施方式

[0050] 以下描述阐述众多例示性组态、参数及其类似方面。然而,应了解该描述不欲对本发明范围进行限制,而实际上提供作为对例示性具体实施例的描述。

[0051] 定义

[0052] 王浆主蛋白蛋白质为糖蛋白。存在许多在蜂蜜及蜂王浆中发现的王浆主蛋白。蜂蜜中所发现的主要王浆主蛋白为王浆主蛋白1 (Apl), 亦称为主要蜂王浆蛋白1 (MRJP1)。虽然本说明书集中于蜂蜜中所发现的主要王浆主蛋白,但应了解蜂蜜中所发现的其他王浆主蛋白亦可展现类似的修饰潜能及类似的抗发炎能力,这是因为其皆为具有高度甘露糖型糖基化的糖蛋白,如在2000年由Kimura等人在Biosci. Biotechnol. Biochem中所报导。存在约9种主要蜂王浆蛋白且主要蜂王浆蛋白1至5的序列展示于下文中。

[0053] 如贯穿本说明书中关于蜂蜜或王浆主蛋白或主要蜂王浆蛋白所用的术语「荧光 (fluorescence)」为当藉由较低波长的光激发时实质上对应于主要处于440nm至560nm范围内的光的最大发射的波长。

[0054] 「蜂王浆 (royal jelly)」为蜜蜂分泌物,其分泌自工蜂咽下部的腺体。除了水以外,蛋白质是蜂王浆的主要组分。

[0055] 「发炎 (inflamed)」组织被定义为响应于组织损伤或感染而出现免疫反应的组织,且该组织具有以下一或多种症状:疼痛、肿胀、发热、敏感或发红。

[0056] 如本文所用的「抗发炎能力 (anti-inflammatory capacity)」被定义为临床上减轻蜂巢组织的炎症或炎症症状的能力。抗发炎能力可使用下文详细描述吞噬作用抑制分析法 (PIA) 或下文详细描述的DCFDA分析法来确定。

[0057] 应了解一级氨基酸序列的「修饰 (modification)」包括「缺失 (deletion)」(即,一或多个氨基酸残基不存在的多肽)、「添加 (addition)」(即,相较于所说明的多肽具有一或多个额外氨基酸残基的多肽)、「取代 (substitution)」(即,由置换一或多个氨基酸残基而产生的多肽),及「片段 (fragment)」(即,由与所说明多肽的一部分一级序列一致的一级氨基酸序列组成的多肽)。

[0058] 应了解「经修饰的王浆主蛋白 (modified apalbumin)」包括已藉由甲基乙二醛于氨基酸上的化学反应或甲基乙二醛于构成蛋白质的氨基侧链上的化学反应而经修饰的任何王浆主蛋白蛋白质或其片段。甲基乙二醛修饰有可能存在于王浆主蛋白内的赖氨酸、精氨酸及/或半胱氨酸氨基酸以及末端氨基酸的自由氨基上且该等MGO修饰可存在于蛋白质内约1至40个位点上。举例而言,经修饰的王浆主蛋白1意谓在其氨基酸序列上的一或多个

位点处经修饰以得到经MGO修饰的Apa1的Apa1。

[0059] 氨基酸「序列相似性(sequence similarity)」或「序列一致性(sequence identity)」是指两个或两个以上多肽在适当位置处的氨基酸与氨基酸的比较,其中氨基酸一致或具有相似的化学及/或物理性质,诸如电荷或疏水性。随后可基于该比较测定所比较的多肽序列之间的「一致性百分比(percent identity)」。

[0060] 序列的简要描述

[0061] SEQ ID NO:1:自<http://www.uniprot.org/uniprot/018330>获得的Apa1(亦称为主要蜂王浆蛋白1)的氨基酸序列。

```
[0062]          10          20          30          40          50          60
[0063] MTRLFMLVCL G1VCQGTTGN ILRGESLNKS LPILHEWKFF DYDFGSDERR QDAILSGEYD
[0064]          70          80          90          100         110         120
[0065] YKNNYPSD1D QWHDK1FVTM LRYNGVPSSL NV1SKKVG DG GPLLQPYPDW SFAKYDDCSG
[0066]          130         140         150         160         170         180
[0067] 1VSASKLA1D KCDRLWVLDS GLVNNTQPMC SPKLLTFDLT TSQLLKQVE1 PHDVAVNATT
[0068]          190         200         210         220         230         240
[0069] GKGRLSSLAV QSLDCNTNSD TMVY1ADEKG EGL1VYHNSD DSFHRLTSNT FDYDPKFTKM
[0070]          250         260         270         280         290         300
[0071] TIDGESYTAQ DG1SGMALSP MTNNLYYSPV ASTSLYYVNT EQFRTSDYQQ ND1HYEGVQN
[0072]          310         320         330         340         350         360
[0073] 1LDTQSSAKV VSKSGVLFPG LVGDSALGCW NEHRTLERN 1RTVAQSD ET LQM1ASMK1K
[0074]          370         380         390         400         410         420
[0075] EALPHVP1FD RY1NREY1LV LSNKMQKMN NDFNFDDVNF R1MNANVNEL 1LNTRCENPD
[0076]          430
[0077] NDRTPFK1S1 HL
```

[0078] 赖氨酸(K) 22个位点及精氨酸(R) 17个位点已经突出显示以识别可能由MGO糖基化的位点,藉以该糖基化产生经MGO修饰的王浆主蛋白。

[0079] SEQ ID NO:2:自<http://http://www.uniprot.org/uniprot/077061>获得的主要蜂王浆蛋白2的氨基酸序列是展示于序列表中。

[0080] SEQ ID NO:3:自<http://www.uniprot.org/uniprot/Q17060-1>获得的主要蜂王浆蛋白3的氨基酸序列是展示于序列表中。

[0081] SEQ ID NO:4:自<http://www.uniprot.org/uniprot/Q17060-1>获得的主要蜂王浆蛋白4的氨基酸序列是展示于序列表中。

[0082] SEQ ID NO:5:自<http://www.uniprot.org/uniprot/097432>获得的主要蜂王浆蛋白5的氨基酸序列是展示于序列表中。

[0083] 经MGO修饰的王浆主蛋白1

[0084] 王浆主蛋白1(亦称为Apa1或「主要蜂王浆蛋白1」(MRJP1))为以不同浓度见于各种蜜蜂产物中的蛋白质。Apa1为由蜜蜂分泌的48.9千道尔顿(kDa)蛋白质,且其见于蜂蜜、蜂王浆及其他蜜蜂产物中。所测试的所有蜂蜜品种皆已展示含有Apa1(J.Simuth等人,2004)。据估计Apa1构成蜂王浆中48%的蛋白质(B.Lerrer等人,2007)。

[0085] 甲基乙二醛或MGO为具有式 $C_3H_4O_2$ 的有高度化学反应性的化合物。MGO由活生物体内多重代谢路径形成。麦卢卡蜂蜜的称为「活性」麦卢卡蜂蜜的某些制剂相较于其他蜂蜜品种含有高得多浓度的MGO。活性麦卢卡蜂蜜已经测定含有为其他蜂蜜品种中的MGO浓度的高达1000倍的MGO浓度(E.Mavric等人,2008)。

[0086] MGO可参与活生物体内的多种化学反应,包括「晚期糖基化终产物」(AGE)的形成过程。糖基化为糖与蛋白质或脂质在不涉及酶作为反应催化剂的情况下的反应。MGO可藉由与氨基酸精氨酸、赖氨酸及/或半胱氨酸的自由氨基以及末端氨基反应而糖基化蛋白质,且从而可化学修饰含有精氨酸及/或赖氨酸的蛋白质。如自SEQ ID NO:1可见,Apa1含有总共约39个可经MGO化学修饰的精氨酸及赖氨酸残基。

[0087] 经MGO修饰的Apa1可藉由自活性麦卢卡蜂蜜中分离该分子而得到。经MGO修饰的Apa1可藉由生物化学技术自蜂蜜中分离出及/或由蜂蜜增浓。此等技术包括(但不限于)过滤、离心及层析,诸如离子交换层析、亲和层析、疏水性相互作用层析、尺寸排阻层析及逆相层析。经MGO修饰的Apa1亦可自各种来源纯化或藉由将MGO添加至蜂王浆中而化学合成。

[0088] 亦可藉由以下操作得到经MGO修饰的Apa1:获得编码氨基酸序列SEQ ID NO:1的基因,将该基因选殖至适当载体中,用该载体使细胞系转型,使多肽表现,纯化该多肽,将多肽与MGO混合以使MGO与多肽之间进行化学反应,及纯化经MGO修饰的多肽。

[0089] 表现系统可含有控制序列,诸如启动子、强化子及终止控制子,如此项技术中关于多种宿主所知(参见例如Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第2版,Cold Spring Harbor Press(1989),其以全文引用的方式并入本文中)。表现系统亦可含有有助于基因表现及/或蛋白质折迭的信号肽及原蛋白序列。

[0090] Apa1(SEQ ID NO:1)的氨基酸变异体的经MGO修饰形式亦可展现抗发炎能力。如一般技术者所了解,对SEQ ID NO:1的一级氨基酸序列的次要修饰会产生抗发炎活性相较于SEQ ID NO:1实质上相等或增强的多肽。当Apa1修饰包括一或多处取代时,较佳取代为保守取代,亦即其中残基经另一相同通用类型的残基置换。在对Apa1蛋白进行修饰时,可考虑氨基酸的亲水指数(参见例如Kyte.等人,J.Mol.Biol.157,105-132(1982),其以全文引用方式并入本文中)。在此项技术中已知某些氨基酸可经其他具有相似亲水指数或分数的氨基酸取代且仍产生具有相似生物活性的多肽。

[0091] 经MGO修饰的Apa1变异体较佳与非变异Apa1序列展现至少约75%序列一致性,较佳与本文所述的任何野生型或参考序列展现至少约80%一致性,更佳至少约85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性。甚至更佳,经MGO修饰的Apa1变异体展现实质上与经MGO修饰的非变异Apa1相当的抗发炎能力。

[0092] 可藉由以下操作刺激蜂蜜中经MGO修饰的Apa1的形成:(i)在环境温度下长期储存,或(ii)在高温(摄氏30度至40度)下培育蜂蜜,从而增强蜂蜜样本的抗发炎能力。将MGO或MGO前驱体(诸如二羟丙酮(DHA))添加至蜂蜜样本中,伴以足够时间及/或加热以使MGO前驱体转化成MGO亦可刺激该蜂蜜样本中经MGO修饰的Apa1的形成,且亦可藉由在蜂蜜样本中产生经MGO修饰的Apa1而增强蜂蜜样本的抗发炎能力。

[0093] 抗发炎性质增强的Apa1亦可在蜂蜜外形成。完全或部分纯化的Apa1已发现可用MGO处理以得到经MGO修饰的Apa1。经MGO修饰的Apa1在与未经修饰的Apa1相比较时展现增强的抗发炎性质。

[0094] 经MGO修饰的ApaI及其变体可以治疗有效量纳入医药组成物中。本发明的医药组成物可经特定调配而以固体或液体形式投予,包括适于以下的组成物:(1)经口投药,例如药液(水性或非水性溶液或悬浮液);锭剂,例如旨在经颊、舌下及全身吸收的锭剂;丸剂;散剂;颗粒;供涂覆于舌头的糊剂;(2)非经肠投药,例如以例如无菌溶液或悬浮液或持续释放调配物形式藉由皮下、肌肉内、静脉内或硬膜外注射投予;(3)局部施用,例如呈施用于皮肤的乳膏剂、软膏或控制释放贴片或喷雾剂形式;(4)阴道内或直肠内,例如呈子宫托、乳膏剂或泡沫剂形式;(5)舌下;(6)眼部;(7)经皮;(8)经肺;或(9)经鼻。当本发明化合物以药物形式投予人类及动物时,其本身可给与或以医药组成物形式给与,该医药组成物含有例如约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%的活性成分以及医药学上可接受的载剂。

[0095] 湿润剂、乳化剂及润滑剂(诸如月桂基硫酸钠及硬脂酸镁)以及着色剂、脱模剂、涂布剂、甜味剂、调味剂及香化剂、防腐剂及抗氧化剂亦可存在于本文所述的医药组成物中。此等组成物亦可含有佐剂,诸如防腐剂、湿润剂、乳化剂及分散剂。可藉由包括各种抗细菌剂及抗真菌剂(例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚山梨酸及其类似物)来确保防止微生物对本发明化合物的作用。在组成物中亦可能需要包括等张剂,诸如糖、氯化钠及其类似物。另外,可藉由包括延迟吸收剂(诸如单硬脂酸铝及明胶)来使得可注射药物形式的吸收延长。

[0096] 实施例1-自麦卢卡蜂蜜中分离经MGO修饰的王浆主蛋白蛋白质

[0097] 如下将自Honey Research Unit,University of Waikato,NZ获得且非过氧化物抗细菌活性等效于12%w/v苯酚(Allen,Molan等人,1991)的麦卢卡蜂蜜样本份化:

[0098] 1.1去除蜂蜜的低分子量组分

[0099] 将25公克麦卢卡蜂蜜悬浮于25ml蒸馏水中且在4℃下针对1公升自来水透析(Cellu Sep T1管,Membrane Filtration Products公司,Seguin,TX;EEUU,分子质量截留3500Da)48小时,在此期间更换1公升水四次。冻干透析保留物且接着储存于-20℃下直至分析为止。用0.3mol/l乙酸铵缓冲液将冻干样本复原至2ml。

[0100] 1.2葡聚糖凝胶G-50层析分离

[0101] 接着将复原的透析保留物(2ml)加载至葡聚糖凝胶G-50管柱(180ml)上且将物质于1ml洗提份中(流速:0.5毫升/分钟,在280nm下监测)洗提。冻干自图3中所示的2个峰获得的洗提份且用纯水复原至100μl以在吞噬作用分析法中进行初步评定。此分析法显示抑制活性在于首先洗提的峰中。进行进一步层析分离以产生大量的蛋白质。重复葡聚糖凝胶G-50管柱层析三次且将来自各次操作的洗提迹在线的第一峰的洗提份汇集于一起,旋转蒸发至200μl且接着在Superose12管柱上分离。

[0102] 1.3蛋白质经Superose12的快速蛋白质液相层析(FPLC)分离

[0103] 为进一步份化葡聚糖凝胶G-50洗提迹在线的第一峰,将100μl量的复原样本注射至Superose12FPLC管柱(25ml)上且用磷酸盐缓冲盐水(pH7.11)(流速:0.5毫升/分钟,0.5cm/ml,在280nm下监测)洗提成1ml洗提份。此等洗提份冷冻于-20℃下直至进一步使用为止。在吞噬作用分析法中分析所得两个明显分离的主峰(洗提份8及14)的抑制活性。使此等洗提份在10%SDS-PAGE凝胶上进行电泳且处理用于MALDI-TOF质谱识别。

[0104] 1.4活性洗提份的逆相

[0105] 在逆相管柱上对来自Superose12层析的发现具有吞噬作用抑制活性的洗提份(洗提份8)进行层析以进一步纯化蛋白质以供MALDI质谱识别之用。使用FPLC系统(Pharmacia-LKB,Uppsala,Sweden)上的管柱进行层析。将500 $\mu$ l量的洗提份8样本注射于管柱上且用移动相以100%水至100%乙腈的梯度(流速为1毫升/分钟,在260nm下监测)洗提。将所得包含两个主峰的洗提份(洗提份23及26)旋转蒸发至50 $\mu$ l。将洗提份(5 $\mu$ l)加载至10%SDS小型凝胶上以使其显现且处理用于如下文所述的MALDI-TOF质谱法。

[0106] 实施例2:使用THP-1细胞的吞噬作用抑制分析法(P1A)

[0107] 吞噬作用为吞没固体粒子的细胞反应或过程且在免疫系统中,其为用于移除病原体及细胞碎片的主要机制。细菌、死组织细胞及小矿物质粒子皆为可能由细胞吞噬或吞没的目标的实施例。吞噬作用在白血球发炎反应开始时出现以引发炎症。当细胞中吞噬作用激活时由细胞产生的反应性氧物质及细胞激素募集且使更多吞噬细胞活化作为为皆以吞噬开始的发炎反应的细胞事件的级联的一部分。因此,任何吞噬作用抑制剂可恰好在级联开始时有效地阻止发炎反应。

[0108] 量测广泛类型的新西兰蜂蜜的吞噬作用抑制活性。发现麦卢卡蜂蜜总体上比其他类型具有高得多的活性,如下表1所示,其展示不同类型的蜂蜜(0.5%)对LPS活化的THP-1细胞中乳胶粒子的吞噬作用的影响。在添加乳胶粒子后4小时进行分析。藉由用无菌RPM11640完全培养基稀释蜂蜜达成麦卢卡蜂蜜及人工蜂蜜的浓度。麦卢卡蜂蜜是自Honey Research Unit,University of Waikato,NZ获得且具有等效于12%w/v苯酚的非过氧化物抗细菌活性(Allen,Molan等人,1991)。藉由称取1.37g蜂蜜(每毫升蜂蜜密度)且在临用于无菌RPM11640中之前用19ml MilliQ水稀释此蜂蜜(5%V/V浓度)并过滤(50 $\mu$ m、8 $\mu$ m及3 $\mu$ m,Minisart Sartorius过滤器,Millipore公司)以移除花粉、蜜蜂组织等来稀释蜂蜜。在深色容器中将未稀释的蜂蜜保持于4 $^{\circ}$ C下以防止酶变性及降解。人工蜂蜜是用于提供蜂蜜中所见的天然糖的渗透效应的对照物。此人工蜂蜜的组成是如所公开(White1975)。

[0109] 熟知新西兰生产的一些类型的蜂蜜可能已具有一些麦卢卡花蜜,该麦卢卡花蜜亦包括于其中而由蜜蜂产生,这是因为麦卢卡在整个新西兰广泛地生长且为蜜蜂的有利花蜜来源。

[0110] 表1

[0111]

蜂蜜类型	吞噬作用之降低百分比
蜜场蜂蜜(Pasture honey)	13% $\pm$ 4%
苜蓿蜜	6% $\pm$ 4%
卡努卡蜂蜜(Kanuka honey)	15% $\pm$ 3%
麦卢卡蜂蜜	67% $\pm$ 10%
人工蜂蜜	0%

[0112] THP-1为充分特性化的人类单核细胞白血病细胞系。该等细胞就若干准则而言类似于单核细胞且可藉由用PMA、LPS或维生素D处理而分化成巨噬细胞样细胞(Auwerx J., 1991)。一旦活化,巨噬细胞可用于藉由将巨噬细胞与乳胶珠粒或其类似物一起培育且藉由在显微镜下观测细胞以记录吞噬性捕捉来研究吞噬作用。藉由使用荧光乳胶珠粒,该等珠粒在吞噬后在细胞内可见。可藉由比较在添加物质时吞噬的量与在未添加物质的情况下吞

噬的量来研究抑制吞噬作用的物质。

[0113] 对在用LPS、PMA及维生素D活化后暴露于蜂蜜的THP-1细胞的培养物评估细胞形态、吞噬作用、细胞分裂速率及所选表面标记的变化。选择LPS用于进一步研究,这是因为活化速率较短而使得分析能够在30小时内完成。LPS活化的细胞在24小时内变成巨噬细胞,而用PMA及维生素D则需花费至少72小时。THP-1细胞分化的准则为细胞贴壁、细胞形态的变化及与巨噬细胞表型有关的人类软骨群蛋白-39(human cartilage group protein-39, HCgp-39)及羧肽酶M(CPM)的细胞表面标记表现特征的变化,由对经LPS处理的细胞及未经处理的细胞的mRNA进行qRT-PCR所测定。

[0114] 在37℃、5%CO<sub>2</sub>及95%相对湿度(RH)下于含有10%胎牛血清及25mMHEPES及抗生素的不含内毒素的RPMI1640培养基中维持THP-1细胞。每3天继代培养细胞一次以维持细胞计数为约106个/毫升且在处理之前藉助于锥虫蓝排除法在血球计上评定活力。继代数目始终为40至55。

[0115] 藉由将1mg LPS溶解于无菌RPMI1640(Invitrogen)中来制备100μg/ml的LPS储备溶液。将储备溶液于-20℃下冷冻储存。在临用前,融化LPS储备溶液且将其添加至新鲜继代培养的细胞中达500ng/ml的最终浓度,其中106个/毫升THP-1细胞具有活力95%或95%以上。将细胞以每孔1ml涂于24孔培养盘(Cellstar, Greiner bio-one)中且用胶带密封培养盘以避免蒸发。将培养盘在37℃、5%CO<sub>2</sub>及95%相对湿度(RH)下培育24小时以活化。

[0116] 在吞噬作用分析之前,在倒置显微镜上检查各孔以观测指示成功转型的形态改变。对照THP-1细胞(无LPS)维持圆形且不聚集或黏附至培养盘表面,而用LPS处理的活化THP-1细胞聚集,变得扁平且呈具有明显伪足的变形虫状,且黏附至培养盘表面。

[0117] 用无菌RPMI培养基洗涤LPS活化的THP-1细胞单层两次,移除悬浮的细胞,且接着在500μl RPMI中与以下三种处理中的任一种处理一起培育30分钟;无蜂蜜、人工蜂蜜(0.25%)或蜂蜜(0.25%)。将无菌的1.0μm经涂布聚苯乙烯乳胶珠粒(Sigma L5405-1ml)以每个细胞约25个珠粒添加至单层中且在37℃、5%CO<sub>2</sub>及95%RH下培育培养盘。每次实验各处理组具有至少三个重复试样且在各别天重复至少两次。

[0118] 培育四小时后,移除悬浮的细胞且藉由用冰冷无菌磷酸盐缓冲盐水洗涤单层来停止吞噬。藉由在孔中平缓地上下抽吸100μl PBS使贴壁的细胞自培养盘脱壁。使用具有40×透镜的Axostar plus Zeiss荧光显微镜11相在血球计上对各样本的至少200个细胞进行计数。含有至少三个珠粒的细胞被视为吞噬作用阳性。在初步分析中观测到未活化的THP-1细胞(单核细胞)的吞噬率小于5%。在分析后使用锥虫蓝排除法检查活力以确保处理或蜂蜜未诱导细胞凋亡。

[0119] THP-1细胞吞噬乳胶珠粒的能力是以蜂蜜处理组/无蜂蜜对照组的百分比来定量。首先,藉由用吞噬细胞数目除以血球计上计数的细胞数获得活化率。培育四小时的可接受的活化率为70%或70%以上。亦以此方式计数蜂蜜处理组且接着根据下式计算吞噬作用的降低百分比。

[0120] 吞噬作用降低%=(蜂蜜处理组吞噬率/对照组)×100-100

[0121] 例示性计算如下:

[0122] 对照组,75%(75%的细胞吞噬至少3个珠粒)

[0123] 蜂蜜处理组1,25%(25%细胞吞噬至少3个珠粒)

[0124] 蜂蜜处理组1,吞噬作用抑制活性= $(25/75) \times 100 - 100 = 66.7\%$ 。

[0125] 此结果表明蜂蜜处理组1对吞噬性乳胶珠粒捕捉具有66.7%抑制作用。

[0126] 为筛选大量样本,可修改此分析法而在96孔培养盘上使用由(Wan, Park等人, 1993)阐明的修改方案进行。此分析法经修改而使用THP-1及其生长条件/培养基以及相同的乳胶珠粒。在与蜂蜜一起培育后在PBS中洗涤各孔以移除悬浮的细胞及自由乳胶珠粒,之后在培养盘读取器或LAS-1000上进行量测。已比较两个方法且得到相当类似的结果。

[0127] 实施例3:量测荧光强度

[0128] 在装备有智能型暗盒(intelligent darkbox)11(Alphatech)的Fujifilm LAS-100上量测蜂蜜的荧光强度。使用提供的软件影像读取器LAS-1000plus lite版本1.5及Image Gauge4.0分析数据。

[0129] 使蜂蜜达到室温且在双重蒸馏H<sub>2</sub>O中稀释至10%v/v(1ml蜂蜜=1.37gm)。接着经0.2 μm Minisart无菌一次性针筒过滤器(Sartoris)过滤5ml稀释的蜂蜜。将100 μl稀释的蜂蜜吸取至96孔黑色培养盘(nunc目录号:137101)的5个孔中。亦涂具有已知荧光的标准蜂蜜以及水空白及空孔用于背景读数。

[0130] 将培养盘置于暗盒(能阶4)内部且使用影像读取器LAS1000plus程序聚焦。进行预曝光以测定约30秒的所需曝光时间。一旦获取影像,即使用所提供的Image Gauge4.0获得结果。简言之,以任意单位(AU)量测孔的荧光且减去背景强度,得到处于40000AU至260000AU范围内的读数。求得样本的平均值,得到具有典型标准偏差 $\pm 1500$ AU的最终读数。在一些状况下,荧光强度过高而缩短曝光时间以避免过度曝光。使用标准蜂蜜AU导出此等蜂蜜的正确AU(但很少进行此操作,原因在于仅少数蜂蜜达成如此程度的荧光)。

[0131] 其在蜂蜜中具有1%的浓度。由于可自蜂蜜洗提份获得的蛋白质量较小,所以使用200 μl分析样本量。分析如上文所述获得的洗提份8及14的吞噬作用抑制活性。洗提份8具有强烈的吞噬作用抑制活性且洗提份14具有极小活性。藉由如下文所述的MALDI-TOF质谱法以显著命中(hit)识别出两个洗提份。具有大部分抗发炎活性的洗提份(洗提份8)为经修饰的王浆主蛋白1(MRJP-1)。洗提份14产生两个命中,一个命中为显著的,其为王浆主蛋白3(MRJP-3)。不显著的命中为很可能未经MGO修饰的王浆主蛋白1(MRJP-1)。

[0132] 实施例4:SDS小型凝胶上的电泳

[0133] 使藉由份化蜂蜜获得的蛋白质在SDS-PAGE凝胶上进行电泳以使其显现且得到分子量估计值。使用含10%及12%丙烯酰胺的解析凝胶分离不同范围的蛋白质。10%凝胶最佳用于分离14kD至205kD蛋白质而12%凝胶用于分离14kD至66kD蛋白质。在OWL分离系统凝胶灌胶模具(BioLab Scientific LTD)中使用组装的清洁玻璃板制成凝胶。首先使用注射器倾批注析凝胶,且用丁醇层覆盖使其凝固以确保平坦的凝胶表面。当凝胶凝固时,移除丁醇且倾注堆栈凝胶并插入凝胶梳状物以制成用于加载样本的孔。凝胶的组成为:

[0134] 10%解析凝胶

[0135] 6.8ml 37%丙烯酰胺

[0136] 2ml 1M Tris pH9.0

[0137] 5.9ml 水

[0138] 150 μl 10%十二烷基硫酸钠(SDS)

[0139] 15 μl N,N',N',N'-四亚甲基二胺(TEMED)

- [0140] 150 $\mu$ l10%过氧硫酸铵 (APS)
- [0141] 12%解析凝胶
- [0142] 8.2ml37%丙烯酰胺
- [0143] 2ml1M Tris pH9.0
- [0144] 4.5ml水
- [0145] 150 $\mu$ l10%SDS
- [0146] 15 $\mu$ l TEMED
- [0147] 150 $\mu$ l10%APS
- [0148] 5%堆栈凝胶
- [0149] 0.66ml37%丙烯酰胺
- [0150] 1.25ml0.5M Tris pH6.8
- [0151] 3.0ml水
- [0152] 50 $\mu$ l10%SDS
- [0153] 5 $\mu$ l TEMED
- [0154] 50 $\mu$ l10%APS

[0155] 当堆栈凝胶凝固时,将凝胶插入电泳腔室中且在顶部及底部腔室中添加电泳缓冲液(3.0g Tris、14.4g甘氨酸、1g SDS,于1L MilliQ水中)。移除梳状物且用电泳缓冲液洗涤样本孔。接着在10mA下跑胶10分钟以移除任何未聚合的丙烯酰胺。将欲加载至凝胶上的样本与2 $\times$ 三(羟甲基)甲基甘氨酸(Tricine)样本缓冲液(0.1mol/l Tris (pH6.8)、24%(w/v)甘油、8%(w/v)SDS、0.2mol/l二硫苏糖醇、0.02%(w/v)库马斯蓝(Coomassie Blue)G-250)1:1混合且在99 $^{\circ}$ C下加热5分钟,接着冷却。将样本离心(2000 $\times$ g,20秒)以使任何沉积物成为离心块且每个泳道加载10 $\mu$ l样本。使B10RAD Precision Plus Dual Colour蛋白质标准梯状条带(ladder)(目录号:161-0374)与样本并排进行电泳以得到样本的估计蛋白质大小。标准品含有大小为10kDa至250kDa的蛋白质:在凝胶的各端上加载6 $\mu$ l。在10mA下跑胶直至样本迁移穿过堆栈凝胶进入解析凝胶中为止。接着将电流增加至20mA。当样本中的染料跑出凝胶边缘时,关掉电流且移出凝胶并染色。使用两种方法使条带显现。使用银染色识别较淡的条带,这是因为银染色更灵敏。在MALDI-TOF质谱研究之前使用固蓝(fast blue)法,这是因为该染色剂比银更容易移除。固蓝为使用库马斯亮蓝的以较低亲和力结合至糖蛋白而使其对于具有大比例糖蛋白的蜂蜜而言理想的染色剂。此允许在蛋白质MALDI质谱研究之前较佳地移除染色剂,因为残留的染色剂可能干扰定量(Deutscher1990)。在进行染色之前5分钟新鲜制备所有试剂且保持在4 $^{\circ}$ C下直至需要为止。首先在50%乙醇/12%乙酸中固定凝胶30分钟,接着在30%乙醇中浸泡15分钟。随后,添加100ml0.02%硫代硫酸钠且留置1至2分钟。在100ml0.1%硝酸银+100 $\mu$ l甲醛中浸泡凝胶10分钟。接着将其在水中洗涤10秒且添加100ml显影剂(100ml MilliQ水中的3g碳酸钠、100 $\mu$ l甲醛、40 $\mu$ l1%硫代硫酸钠)。在条带变得可见后用10%乙酸停止显影。将显影的凝胶储存于MilliQ水中直至需要为止。固蓝是自Fisher Biotec(目录号FS-100)获得。在使用之前稀释固蓝(8ml牢性染色剂(Fast Stain)浓缩液、32ml MilliQ水、10ml45%甲醇(含10%乙酸))。首先在含10%乙酸的40%甲醇中洗涤凝胶10至20分钟,继而在MilliQ水中冲洗。接着,添加100ml稀释的固蓝且在该溶液中平缓地涡旋凝胶20分钟。用10%乙酸将凝胶去染10分钟,接着储存于MilliQ水中直至需要为止。

[0156] 由SDS凝胶估计的洗提份8(Apa1/MRJP-1)的分子量为60kDa,其比所预期的分子量大10kDa(因为Swiss-prot传回仅48.9kDa的蛋白质大小)。大小差异可由糖基化及/或交联来解释。MRJP-1上三个预测的N连接的糖基化位点已经报导(Srisuparbh,Klinbunga等人,2003)。此等位点的糖基化将增加分子量。由于洗提份8处于空体积中(意谓足够大以由管柱珠粒排除的巨分子首先自管柱洗提(Superose12管柱的空体积为11ml)),所以此可能指示Apa1/MRJP-1经高度糖基化及/或交联,原因在于在48.9kDa(Apa1/MRJP-1的分子量)下,单体蛋白质应容易地进入管柱中。

[0157] 实施例5:活性蜂蜜蛋白质的MALDI-TOF质谱识别

[0158] 在Waikato Mass Spectrometry Facility,University of Waikato处完成下文所述的MALDI-TOF研究。

[0159] 5.1制备蛋白质

[0160] 使用清洁刮刀切下条带,接着用30%乙醇藉由在60℃下培育15分钟或直至凝胶块看似无色为止将其去染以移除固蓝染料。在30%乙醇中洗涤条带两次且接着用100%乙腈使其收缩10分钟。藉由抽吸移除乙腈且在Speed Vac中藉由真空干燥凝胶块30分钟以移除残留水分。藉由用胰蛋白酶消化凝胶块中的蛋白质使凝胶块中的蛋白质裂解成肽以用于藉由MALDI-TOF质谱法进行分析。所用方法是改编自由Jo McKenzie,University of Waikato提供的细节。向各凝胶块中添加10 $\mu$ l 25mmol/l碳酸氢铵,继而添加10 $\mu$ l定序级胰蛋白酶溶液(49 $\mu$ l于10%乙腈中的25mmol/l碳酸氢铵、1 $\mu$ l定序胰蛋白酶(1mg/ml,Promega目录号V5111))。接着在37℃下留置管隔夜。向各管中添加14 $\mu$ l含0.3%三氟乙酸的50%乙腈且涡旋管并音波处理10分钟。弃去凝胶块且冷冻溶液直至使用为止。

[0161] 5.2制备基质

[0162] 所用方法是自Waikato Mass Spectrometry Facility,University of Waikato获得。将5mg $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA)添加至500 $\mu$ l含1%三氟乙酸的65%乙腈中。涡旋溶液2分钟,音波处理10分钟,再涡旋2分钟,接着以12,000rpm离心5分钟。合并制备的蛋白质消化溶液与基质(2:1)且将1 $\mu$ l点样于MALDI Anchor芯片目标板上。空气干燥斑点且接着藉由在干燥的基质斑点上来回抽吸5 $\mu$ l 1%三氟乙酸来洗涤并干燥。

[0163] 5.3Autoflex操作程序

[0164] 在分析之前用Bruker Daltonics肽标准品206195进行外部校正。以 $\pm 0.1\%$ 的变焦使用单同位素肽校正。在收集到良好的清楚的图谱后,自动再校正质谱仪。若误差不大于 $\pm 10$ ppm,则拟合结果可接受。若存在由胰蛋白酶自溶产生的产物,则可进行内部校正。此等产物在842及2211处产生峰。在flex分析程序中将该等峰指定为内部校正物。使用Bruker Autoflex 11 TOF/TOF质谱仪分析肽消化物。每种样本获取平均30个截图(shot)以建构肽质量指纹图谱。将质量范围选择器设定在低范围且将侦测器增益电压偏移设定在1400v。侦测配置设定在480Da至3540Da范围内。使用flex控制软件手动操作仪器。保留适合图谱且输出至flex分析中。

[0165] 5.4分析MALDI图谱

[0166] 可使用Biotools软件针对多种蛋白质数据库搜索所收集的图谱。较佳使用的数据库为SWIS Prot及NCBI nr。在SWIS Prot中搜索真核生物蛋白质的参数为 $\pm 200$ ppm的肽容许误差及1个缺失的裂解。对于Swis Prot而言,大于64分的蛋白质评分为显著的。在NCBI nr中

搜索真核生物蛋白质的参数为1个缺失的裂解及 $\pm 200$ ppm的肽容许误差。在NCBI nr中显著命中所需的蛋白质评分为78分。此等参数为正确的至少直至2009年5月为止。可在分子/肽的总分子质量的0.01%精确度以内量测分子质量。此足以使得较小质量变化得以侦测,例如一个氨基酸取代为另一氨基酸或转译后修饰。

[0167] 质量分析器的主要功能在于根据在质谱仪的电离源中形成的离子的质荷比将其分离或解析。由胰蛋白酶消化产生的肽是因其质量而藉由电离来分离且此质量可计算出。侦测器监测离子电流,将其放大且接着将信号传送至数据系统,在数据系统中将其以质谱形式记录。绘制离子的质荷比值针对其强度的曲线以展示样本中的组分数目、各组分的分子质量以及样本中各种组分的相对丰度。当使用MALDI-TOF识别蛋白质时,产生的离子须形成具有强峰清楚质谱,表明在自SDS电泳凝胶切割的条带中仅存在一种蛋白质(至少大量存在)。当样本中存在一种以上蛋白质时,典型地不存在与大量相同肽有关的清楚的峰。

#### [0168] 5.5活性蛋白质的MALDI-TOF质谱识别

[0169] 对自如上文所述的SDS电泳凝胶中切下的条带回收的蛋白质、来自Superose12层析分离的洗提份8及14进行胰蛋白酶消化以供MALDI-TOF质谱分析来用于识别。使用上文所述的Autoflex操作程序获得自Superose12层析管柱分离的洗提份14的肽质量指纹图谱。如图7所示的由MALDI-TOF质谱法产生的质谱提供各肽的分子量且将此输入SWIS Prot文库中并搜索匹配。获得SWIS Prot文库中胰蛋白酶肽的分子量的两个命中/匹配。最显著的命中/匹配为蛋白质王浆主蛋白3(MRJP-3)。第二命中王浆主蛋白1(MRJP-1)本身不为显著的匹配,但由于对应于此匹配的质谱峰不同于促成MRJP-3匹配的峰,所以其极可能存在于样本中。

[0170] 对自Superose12层析管柱分离的洗提份8亦进行相同程序。如图6所示的洗提份8中的肽的MALDI质谱提供质谱的一个显著命中,即针对MRJP-1的匹配。

#### [0171] 实施例6:在MGO存在下培育蜂蜜

[0172] 培育麦卢卡蜂蜜及非麦卢卡蜂蜜。基于麦卢卡蜂蜜的初始高MGO含量及低荧光值来选择其用于培育。基于非麦卢卡蜂蜜的低荧光值及缺乏MGO来选择其。培育蜂蜜三个月,期间追踪荧光读数。经培育的各蜂蜜亦具有经冷冻以维持原始质量的样本。分析经培育的蜂蜜及冷冻蜂蜜对吞噬作用的抑制且对其进行小型凝胶SDS电泳以测定因培育所致的任何蛋白质大小改变。亦对具有高荧光值的麦卢卡蜂蜜及具有低荧光值的麦卢卡蜂蜜进行SDS电泳以比较经培育的蜂蜜与未经培育的蜂蜜。将整个苜蓿蜜及蜜场蜂蜜与MGO一起或不与MGO一起在37°C下培育三个月以确定MGO的存在是否随时间推移在无荧光蜂蜜中产生荧光且增强吞噬作用抑制活性。先前已分析蜂蜜的吞噬作用抑制活性且其具有低活性。使蜂蜜在SDS小型凝胶上进行电泳以确定因培育所致的任何蛋白质大小改变。在吞噬作用分析法中分析经MGO处理的蜂蜜以确定培育对吞噬作用抑制活性有何种影响。甲基乙二醛(40%)是购自Sigma-Aldrich(目录号M0252)且以与15的非过氧化物抗细菌活性有关的最终浓度使用(每公克蜂蜜约400 $\mu$ g或每公斤蜂蜜1ml140%MGO)。

#### [0173] 6.1蜂蜜培育

[0174] 在37°C下培育整个麦卢卡蜂蜜(20g MSB20, NPA20+)、蜜场蜂蜜(20g)及苜蓿蜜(20g)三个月。亦在37°C下培育用400 $\mu$ g/g MGO(混合入苜蓿蜜中)处理的苜蓿蜜(20g)三个月。冷冻所有蜂蜜(20g)的对照样本该持续时间。在添加MGO后立即量测蜂蜜的荧光,且在添

加至蜂蜜中的浓度下,未发现因添加的MGO而使荧光增强。培育蜂蜜六周及三个月后,量测荧光。

[0175] 6.2经培育蜂蜜的SDS凝胶电泳

[0176] 使上文所述的蜂蜜样本在12%SDS小型凝胶(如上文所述制备及操作)上进行电泳。为比较,亦包括具有高荧光值的麦卢卡蜂蜜及具有低荧光值的麦卢卡蜂蜜。将蜂蜜稀释至10%。将欲加载至凝胶上的样本与2×三(羟甲基)甲基甘胺酸样本缓冲液1:1混合且在99℃下加热5分钟,接着冷却,之后加载。在染色之前,在UV凝胶照明器上使凝胶成像以观测蛋白质条带的荧光(此荧光在染色后不可见)。SDS小型凝胶经银染色。

[0177] 下表2展示所选蜂蜜在37℃下与天然MGO含量(麦卢卡蜂蜜)或添加的400mg/kg MGO(蜜场蜂蜜及苜蓿蜜)一起培育三个月之前、期间及之后的荧光量测结果。在对照(在4℃下保持三个月的麦卢卡蜂蜜(具有高天然MGO含量))及在4℃下与400mg/kg MGO一起保持三个月的蜜场蜂蜜及苜蓿蜜,或在4℃下在未添加MGO下保持三个月的蜂蜜(蜜场蜂蜜及苜蓿蜜)中,不存在荧光增强(结果未示)。

[0178] 表2

蜂蜜	MGO mg/kg	培育之前的荧光值	培育6周之后的 荧光值	培育3个月之后的 荧光值
麦卢卡蜂蜜	576	88	149	170
蜜场蜂蜜	10	35	47	57
蜜场蜂蜜	410	35	64	89
苜蓿蜜	0	41	52	60
苜蓿蜜	400	41	66	82

[0179] 表2.蜂蜜与所示含量的天然或添加的MGO一起在37℃下培育之前、培育6周之后及培育3个月之后的荧光量测结果(以任意单位 $\times 10^3$ )。麦卢卡蜂蜜具有天然的MGO含量,而蜜场蜂蜜及苜蓿蜜中添加有MGO。

[0181] 6.3经培育的蜂蜜的SDS电泳凝胶影像

[0182] 与MGO一起培育的蜂蜜的电泳结果展示于图9及10中。图9展示苜蓿蜜与麦卢卡蜂蜜之间主要蛋白质(60kDa至65kDa)的大小差异。图10展示将蜂蜜与MGO一起培育可增加两种蜂蜜类型中的主要蛋白质的大小(增加约5kDa至10kDa)。

[0183] 如上文所详细描述,使用活性导引(activity-led)份化来分离麦卢卡蜂蜜样本的组分。本发明人发现麦卢卡蜂蜜中具有吞噬作用抑制活性的分离组分具荧光。在将蜂蜜分离成洗提份的各阶段,藉由在约490nm下量测组分的荧光来测试各洗提份以量测其中存在吞噬作用抑制活性的程度。如自图1a可见,发射波长介于450nm与550nm之间。在透析麦卢卡蜂蜜之后发现活性存在于透析保留物中,该透析保留物为含有分子量大于3.5kDa的组分的洗提份,活性而非存在于透析渗出液中,该透析渗出液为含有分子量小于3.5kDa的组分的洗提份。主要在视作洗提迹在线的第一峰的洗提份(洗提份8)中发现吞噬作用抑制活性,该洗提份以大于管柱空体积的体积洗提。在视作洗提迹在线的第二峰的洗提份中发现少量活性。接着使自Superose12管柱洗提的第一及第二峰中的麦卢卡蜂蜜洗提份经SDS-PAGE(存在有十二烷基硫酸钠的聚丙烯酰胺凝胶电泳)进行电泳。银染色展示存在一个条带。自凝胶

的未染色部分切下凝胶的相应部分且用胰蛋白酶消化蛋白质且经MALDI-TOF MS(基质辅助雷射脱附飞行时间式质谱)操作由此获得的肽。将肽的质量与Swiss-Prot数据库中的数据相比较且发现来自Superose12层析的第一峰中的蛋白质与主要蜂王浆蛋白-1(亦称为王浆主蛋白-1)相匹配,且来自Superose12层析的第一峰中的蛋白质与主要蜂王浆蛋白-3(亦称为王浆主蛋白-3)相匹配。

[0184] 在已藉由活性导引份化发现Apa1或MRJP-1蛋白质为负责抗发炎活性的组分,且已知其他蜂蜜存在主要蜂王浆蛋白的情况下,进行进一步研究以确定麦卢卡蜂蜜中高含量的MGO的存在是否修饰Apa1/MJRP蛋白质。发现麦卢卡蜂蜜具有高荧光,在其他蜂蜜类型中未见到相同程度的荧光且此荧光是归因于蜂蜜中修饰蛋白质的MGO。在不希望受任何特定理论限制的情况下,作为麦卢卡蜂蜜的独特特征的高含量的MGO被认为可引起Apa1/MRJP蛋白质糖基化形成晚期糖基化终产物(AGE),该等晚期糖基化终产物具荧光,如Schmitt等人, *Analytical Biochemistry*, 2005所报导。本发明人发现将蜂蜜与MGO一起培育会使得发射波长与当将牛血清白蛋白与MGO一起培育时牛血清白蛋白中所产生的荧光相同的荧光增强。进一步分析展示抗发炎活性亦因此处理而增强。在蜂蜜样本的荧光与抗发炎活性之间发现相关性,如图2所示。用MGO处理亦可增加Apa1/MRJP蛋白质的分子量(经SDS电泳),增加的分子量的条带具荧光,如图8及10所示。

[0185] 经MGO修饰的王浆主蛋白的使用方法

[0186] 组织中的炎症可藉由投予发炎组织一或多种纯化的经MGO修饰的王浆主蛋白多肽或含经MGO修饰的王浆主蛋白的组成物来减轻。

[0187] 经MGO修饰的王浆主蛋白藉由降低免疫细胞的吞噬率,且藉由阻断免疫细胞上引起吞噬作用的甘露糖受体来减轻组织中的炎症。免疫细胞包括巨噬细胞、单核细胞、树突状细胞及粒细胞。

[0188] 经MGO修饰的王浆主蛋白可以各种不同形式投予发炎组织,包括已自其他组分纯化的经MGO修饰的王浆主蛋白,及处于含有一或多种其他类型化合物(诸如医药学上可接受的载剂、佐剂或治疗性分子)的组成物中的经MGO修饰的王浆主蛋白。经MGO修饰的王浆主蛋白可自活性麦卢卡蜂蜜中纯化,或自己添加有MGO或MGO前驱体来修饰王浆主蛋白的麦卢卡蜂蜜或任何其他类型的蜂蜜中纯化,或其可自蜂王浆或重组表现王浆主蛋白且接着将其用MGO处理的系统中纯化。

[0189] 含有一或多种其他类型化合物的组成物中的经MGO修饰的王浆主蛋白包括经MGO修饰的王浆主蛋白已增浓的蜂蜜或蜂蜜提取物中的经MGO修饰的王浆主蛋白、与王浆主蛋白重组产生及用MGO化学修饰王浆主蛋白有关的提取物中的经MGO修饰的王浆主蛋白。

[0190] 纯化的经MGO修饰的王浆主蛋白或含有经MGO修饰的王浆主蛋白1的组成物可以各种不同形式投予发炎组织,包括(但不限于):乳膏剂、洗剂、液体溶液或泥罨剂。经MGO修饰的王浆主蛋白亦可藉由将经MGO修饰的王浆主蛋白纳入可食用产品中来投予发炎组织。该等产品包括(但不限于):饮料、糖果、糖浆、口含锭、药丸及食物。

[0191] 侦测经MGO修饰的王浆主蛋白及特性化蜂蜜的性质的方法

[0192] 蜂蜜样本的抗发炎能力可经由侦测经MGO修饰的王浆主蛋白来确定。Apa1经MGO的化学修饰产生经MGO修饰的Apa1,其所展现的荧光大于未经MGO修饰的Apa1。由于Apa1存在于蜂蜜中,所以藉由量测蜂蜜样本的荧光,可获得蜂蜜样本中经MGO修饰的Apa1的相对浓度

的量测结果。蜂蜜样本中经MGO修饰的Apa1浓度的量测结果直接与蜂蜜样本的抗发炎能力有关。图2描绘荧光及由此所得的经MGO修饰的Apa1含量与吞噬细胞抑制能力之间的相关性。

[0193] 藉由量测具有已知低浓度的经MGO修饰的王浆主蛋白(诸如Apa1)的蜂蜜样本的荧光以及具有已知高浓度的经MGO修饰的Apa1的蜂蜜样本的荧光,可产生标准尺度,该标准尺度使蜂蜜样本的荧光与该蜂蜜样本中的经MGO修饰的Apa1浓度具相关性。为获得可用于荧光测试及标准尺度生成的含有已知的经MGO修饰的Apa1浓度的蜂蜜样本,可藉由标准分析化学技术(诸如质谱分析)测定蜂蜜样本的经MGO修饰的Apa1浓度。

[0194] 在产生使蜂蜜样本的荧光与蜂蜜样本中的经MGO修饰的Apa1浓度具相关性的标准尺度后,可使用该标准尺度以及对蜂蜜样本的荧光测试来产生适用于蜂蜜制备及分析的各种类型的信息。

[0195] 举例而言,可量测经MGO修饰的Apa1浓度未知的蜂蜜样本的荧光,且基于荧光量测结果及标准尺度,可确定测试蜂蜜样本中经MGO修饰的Apa1的浓度。测定蜂蜜样本中经MGO修饰的Apa1的浓度的荧光法相较于其他分析化学技术(诸如质谱分析)成本低得多且快得多。藉由以此方式量测蜂蜜样本中经MGO修饰的Apa1的浓度,亦快速测定蜂蜜样本的抗发炎能力。

[0196] 由于高MGO浓度为麦卢卡蜂蜜在所有蜂蜜品种中所独有的特征,所以蜂蜜生产者可藉由将MGO添加至天然不含所需浓度的MGO的蜂蜜样本中来试图仿真活性麦卢卡蜂蜜。消费者相较于经处理的蜂蜜而更喜欢天然产生的蜂蜜。纯化的活性MGO可轻易自商业化学物质生产商(例如Sigma-Aldrich, St. Louis, MO出售约40%甲基乙二醛的水溶液)获得,且蜂蜜生产者可将MGO添加至天然不含所需浓度的MGO的蜂蜜样本中以提高蜂蜜样本中的MGO浓度达所需水平。「与天然蜂蜜形成无关的制程」包括不由蜜蜂进行的任何活动,且其因此包括诸如将纯化的MGO添加至蜂蜜样本中的活动。「与天然蜂蜜形成无关的制程」不包括诸如蜜蜂收集含有高含量的MGO或MGO前驱分子的花蜜、花粉或其他植物产物的活动。

[0197] 蜂蜜的荧光亦可用于确定自蜂房收集蜂蜜或储存所收集的蜂蜜以获得具有所需抗发炎性质的蜂蜜的适当时机。由于蜂蜜中王浆主蛋白经MGO的修饰可能在一定时段内进行,所以蜂蜜生产者可选择将蜂蜜保持于蜂房中直至其含有所需抗发炎能力及所需浓度的经MGO修饰的王浆主蛋白为止。藉由以不同时间间隔量测来自蜂房的蜂蜜样本的荧光,蜂蜜生产者可使用蜂蜜荧光的量测法作为确定自蜂房收集蜂蜜以获得在蜂蜜中具有所需抗发炎性质的蜂蜜的最佳时机的方法。同样,蜂蜜生产者亦可量测储存在蜂房外的蜂蜜的荧光,以确定该蜂蜜样本是否具有所需水平的抗发炎性质。藉由量测蜂蜜样本的荧光,设法获得含有所需抗发炎能力的蜂蜜样本的蜂蜜生产者可储存蜂蜜直至其因形成经MGO修饰的王浆主蛋白而产生所需水平的抗发炎能力为止。

[0198] 用MGO修饰蜂王浆及评估所得分子量变化

[0199] 获取蜂王浆且藉由MALDI-TOF使用芥子酸作为基质且以正离子模式进行分析。在约52.4kDa的m/z处识别出一个显著峰。此峰符合自先前识别为主要蜂王浆蛋白的逆相分离的洗提份获得的52.4kDa的m/z。

[0200] 分析型RP HPLC方案是在具有Phenomenex SecurityGuard C-18保护管柱的Phenomenex Proteo90管柱(3 $\mu$ , 90 Å, C18, 250 $\times$ 4.06mm)上进行。用缓冲液A:0.1%TFA的奈

米纯水溶液(流速1毫升/分钟)平衡管柱。如下施加缓冲液B(含有0.1%TFA的100%乙腈)的梯度且在214nm下监测吸亮度(表1)。

[0201] 接着使蜂王浆与0.1%、0.5%及1.0%的甲基乙二醛反应。藉由以10mg/mL的浓度将部分解冻的制剂溶解于PBS中来制备蜂王浆蛋白质溶液。藉由用PBS稀释储备溶液(Sigma, 40%)以达成0.1%、0.5%及1.0%范围内的最终浓度来制备MGO溶液。向900 $\mu$ L蛋白质溶液中添加100 $\mu$ L具有所需浓度的MGO溶液且在60 $^{\circ}$ C下培育混合物隔夜。亦藉由MALDI TOF MS研究所得反应产物。使用MALDI TOF MS,在0.5%及1.0%MGO反应产物中仅观测到一个显著峰,其为约55.1kDa的经修饰的MRJP1主要蛋白质。在0.1%MGO反应中,自MALDI-TOF图谱中清楚的是,不仅存在未衍生化的蛋白质且亦存在经修饰的MRJP-1主要蛋白质。此表明该MGO含量不足以与MRJP-1完成反应。 $m/z$ 自52.4kDa移位至55.1kDa可被认为是基于在Arg上添加造成72.07Da加合物的单个MGO而产生衍生自甲基乙二醛的二羟基咪唑啉(MGDH),及衍生自甲基乙二醛的氢化咪唑啉(MGHI)的70.05的质量移位。与赖氨酸反应形成CEL,其中CEL引起72.07的质量移位( $N\epsilon$ -(羧甲基)赖氨酸),且形成MOLD(甲基乙二醛赖氨酸二聚体),MOLD引起180.25Da的增加。其他精氨酸修饰及其质量改变为己酸2-铵基-6-([2-[4-铵基-5-氧离子基-5-氧代戊基]氨基]-4-甲基-4,5-二氢-1H-咪唑-5-亚基]氨基)(MODIC)(增加166.23Da)、四氢嘧啶(THP)(使质量改变160.18Da)及精氨酸嘧啶(质量改变80.09)。参见Brock等人, Detection and identification of arginine modifications on methylglyoxal-modified ribonuclease by mass spectrometric analysis, J. Mass Spectrom. 2007; 42: 89-100, 在Wiley InterScience中于2006年12月4日在线发表。

[0202] 表3:与MGO修饰有关的分子量变化

MGO 修饰	质量变化
MGDH	72.07
MGHI	70.05
CEL	72.07
MOLD	180.25
MODIC	166.23
THP	160.18
精氨酸嘧啶	80.09

[0204] 由于可能有多种加合物且各自形成的可能性不同,所以使用82的平均数来确定MRJP1上MGO修饰的相对程度。在产生部分反应的MRJP1蛋白质的0.1%MGO的状况下,相较于未反应的MRJP1,质量单位的差异为1422.0Da,其为MRJP1上形成的约17个MGO加合物所致。在0.5%及1.0%MGO反应产物的状况下,质量单位的差异可见于下表4中。0.5%及1.0%MGO皆产生形成于MRJP1上的约31至32个MGO加合物。亦值得注意的是,MRJP1上存在最多39个可由MGO形成加合物的位点(不包括Cys残基)。存在22个精氨酸位点及17个赖氨酸位点。结果提示约82%的可能的MGO加合物形成位点经MGO修饰。由于0.5%及1.0%MGO实质上等效地与MRJP1反应,如图11中所示,所以有可能得出结论,即反应完成。此外,值得注意的是麦卢卡蜂蜜中MGO的天然含的趋于积聚至约0.4%至0.5%。接着藉由DCFDA分析法(下文详述)进一步确定,0.5%及1%MGO反应产物的生物活性相较于对照组具统计显著性,而0.1%MGO反应产物不具统计显著性-参见图12。此表明为了观测到经修饰的MRJP1反应产物的活性,需要存在至少17个MGO位点修饰。

[0205] 表4:

	MRJPI 单独	MRJPI 及 0.1% MGO	MRJPI 及 0.5% MGO	MRJPI 及 1.0% MGO
[0206] 因 MGO 修饰所致的分子量差异 (质量单位)	0	1422.0	2589.8	2605.1
基于添加 82 道尔顿加合物的 MGO 修饰数目	0	17.3	31.6	31.8

[0207] DCFDA ROS活性分析法

[0208] 细胞在需氧代谢期间常常产生反应性氧物质 (ROS)。ROS 产生在免疫系统中发挥重要保护及功能作用。细胞具有有效的抗氧化防御系统以对抗 ROS 过度产生。当 ROS 产生压制细胞天然抗氧化防御时细胞出现氧化性应激。认为 ROS 及氧化性损伤在许多人类疾病中起重要作用,包括癌症、动脉粥样硬化、其他神经退化性疾病及糖尿病。因此,确定其准确作用需要能够准确地量测 ROS 及其引起的氧化性损伤。存在许多量测细胞中自由基产生的方法。ROS 产生主要引起发炎反应。最直接的技术使用细胞渗透性荧光及化学发光探针。二乙酸 2'-7'-二氯二氢荧光素 (DCFDA) 氧化为一种最广泛用于直接量测细胞的氧化还原状态的技术。其与所研发的其他技术相比具有若干优点。其极易于使用,对细胞氧化还原状态的改变极灵敏,成本低且可用于追踪 ROS 随时间推移的变化。反应性氧物质 ROS 产生的 DCFDA 分析法为细胞中的发炎反应的指示性量度,其被研发作为上文所述的吞噬作用测试的替代生物活性测试。藉由将 90 $\mu$ L 磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 及 10 $\mu$ L 细胞连同相关样本一起一式三份置于 96 孔培养盘中,继而添加 50 $\mu$ L DCFDA 溶液来准备分析。藉由将 3mg DCFDA 溶解于 1mL DMSO 中来制备 DCFDA。接着将 100 $\mu$ L DMSO 溶液与 10mL PBS 混合。使用荧光在 SpectraMax M4 培养盘读取器中使用 Ex473nm 及 Em520nm 监测 DCFDA 向荧光素的氧化。在第 0 分钟、第 2 分钟、第 5 分钟及第 10 分钟监测分析。使用动力学分析进行初始分析,其中在细胞存在及不存在下每 10 秒量测一次并持续 5 分钟。使用初始培养盘确定需要多少细胞及欲使用的样本体积。整个 96 孔培养盘范围内的平均标准误差仅为 5%。藉由使用多注式吸液管,吾人能够确保在 10 分钟内处理整个分析培养盘。此快速处理为分析产生的样本及对样本进行分析导引型份化以试图识别相关蛋白质及肽所必需。使用 10 $\mu$ L 细胞的 DCFDA 分析法的动力学分析展示于图 13 中。

[0209] 用 LPS 及 1 $\mu$ m 球体活化羊脾细胞看似并非必要的,这是因为样本在不使用无菌技术下制备且直接使用。如图 1 所示,DCFDA 的线性氧化仅在细胞存在下获得且 DCFDA 看似对所用条件具稳定性。

[0210] 制备用于 DCFDA ROS 活性分析的细胞

[0211] 自当地屠宰场 (Taylor Preston Wellington) 获得整个新鲜脾脏。典型地在获取 1 小时内获得细胞,但在 4 $^{\circ}$ C 下储存 24 小时之后亦处理脾细胞。纵向地将脾脏切片,切口之间存在 1cm 间隙,且接着使用凝胶刮刀自脾中刮下红细胞团块。将细胞与 200mL PBS 混合且接着用手动掺合器短暂均质化以将细胞团块驱散成个别细胞。接着将混合物倾注穿过 4 层细布。随后在 4 $^{\circ}$ C 下储存细胞直至使用为止。

[0212] 赖氨酸残基的意义

[0213] 乙酰化选择性阻断赖氨酸残基。将 1.2814g 解冻的 RJP 混合物溶解于 50mL 含有 6M 尿素的 Tris/HCl (0.1M, pH8.5) 中。在冰水浴槽上冷却溶液。经 2 小时时段每 20 分钟以 0.5ml 等

分试样添加乙酸酐一次。在每次添加之前测定溶液的pH值且使用Tris/HCl缓冲液(1M, pH8.5)调节至高于7.5的pH值。接着,将样本转移至透析管(分子量截留10kDa)中且针对1.6公升水透析隔夜,其中更换渗析液三次。冷冻透析管的内含物且冷冻干燥。回收239.9mg白色微黏物质。在MGO处理之后在DCFDA分析中发现乙酰化样本不再具有活性。此表明赖氨酸残基的MGO修饰对由经修饰MRJP表现的功能活性而言必不可少。

[0214] Lys C消化:使用下列方案水解蜂王浆样本。将4 $\mu$ g Lys C溶解于100 $\mu$ L碳酸铵(pH8.4)中。将10 $\mu$ L Lys C储备溶液直接添加至100 $\mu$ g MRJP提取物(100 $\mu$ L)中。在室温下进行反应72小时。接着将样本与芥子酸溶液1:1混合且将1 $\mu$ L一式两份点样于MALDI TOF384孔培养盘上。使用Applied Biosystems Voyager5800分析肽以测定质量及MSMS图谱。藉由质谱分析研究来自使用0.1%、0.5%及1.0%MGO修饰的Lys C提取物且MS曲线图展示于图15至19中。在MGO修饰MRJP1后自Lys C提取物识别出较大峰及较多峰。亦应观测到,MGO浓度愈高,所观测到的较大峰的数目愈大。此等Lys C结果表明在MRJP1上的各个Lys残基上存在多处修饰。

[0215] MRJP1及经MGO修饰的MRJP1的胰蛋白酶离心管柱水解:使用Sigma胰蛋白酶离心管柱(TT0010)使用制造商说明书对蜂王浆样本(10mg/mL)进行胰蛋白酶水解。在室温下进行水解30分钟,其中使MRJP(100 $\mu$ g)通过碳酸氢铵缓冲液两次。亦在60 $^{\circ}$ C下使MRJP与0.1%、0.5%及1.0%浓度的MGO反应隔夜。亦在与对于原生酶所述的相同条件下对经MGO修饰的MRJP进行胰蛋白酶水解。亦测试经MGO修饰的MRJP样本降低DCFDA氧化速率的能力。两个较高浓度经展示具高度活性。在经0.1%MGO处理的样本中观测到较低量的活性。

[0216] 藉由质谱分析研究经MGO(0.1%、0.5%及1.0%)修饰的胰蛋白酶消化物且MS曲线图展示于图21至23中。未经修饰的胰蛋白酶消化物的MS曲线图展示于图20中。MRJP1的序列覆盖广泛且当在其天然状态下水解蛋白质时侦测到许多小片段。然而,当MGO修饰存在于MRJP1上各个Lys及Arg残基上时,可形成多达六种不同加合物且基于加合物的定位位置产生的组合数目可产生更多肽。修饰亦阻断胰蛋白酶的裂解位点,因此此减少产生的肽的可能数目。观测到较大数目的较大肽由于某些位点因Lys及Arg残基的修饰而不能被裂解。对于经MGO处理的MRJP1观测到较大数目的肽。此符合Lys及Arg残基的预期随机活性及不同位置上提供相关活性物质的多个加合物产生的可能性。

[0217] 用各种酶(包括胰蛋白酶)对MRJP提取物进行水解且对消化物进行MGO修饰。发现所得水解提取物在DCFDA分析法中具有良好活性(结果未示)。

[0218] 用替代试剂修饰未经处理的RJP

[0219] 亦研究与蛋白质交联的多种其他化合物(包括乙二醛及戊二醛)以确定使用此等试剂是否可产生相似程度的抗吞噬作用活性。

[0220] 用已知与肽及蛋白质交联的其他试剂处理未经处理的MRJP。此等试剂包括乙二醛、戊二醛及甲醛。使用PBS配制乙二醛溶液达10mg/mL的最终浓度。使用PBS分别2.5倍及3.7倍稀释戊二醛(25%)及甲醛(37%)的储备溶液,得到10%的最终浓度。将500 $\mu$ l的此等试剂溶液添加至4.5ml RJP溶液(10mg/mL)中且在60 $^{\circ}$ C下培育隔夜。

[0221] 亦如下使RJP与葡萄糖及果糖反应。向4.5ml于PBS中的蛋白质溶液(10mg/mL)中添加500 $\mu$ L于PBS中的各别碳水化合物溶液(10mg/mL)且在60 $^{\circ}$ C下培育混合物隔夜。在PBS中以10mg/mL制备MRJP且在60 $^{\circ}$ C下用下列试剂修饰隔夜:1)乙二醛;2)葡萄糖(10%,2mL,10mg/

mL, 19.7+1.97); 3) 果糖 (10%, 2mL, 10mg/mL, 24.1+2.41); 4) 戊二醛 (25%, 稀释 $2.5 \times 2\text{mL}$ , 800 微升+12mL PBS); 5) MGO (40%, 稀释 $4 \times 2\text{mL}$ , 500 微升+1.5mL PBS); 及未经处理的空白。在 DCFDA 分析法中针对 ROS 产生测试样本且结果展示于图 14 中。当用 MGO 或戊二醛修饰 MRJP 时观测到统计显著性结果。当使用葡萄糖或果糖作为交联剂时未观测到活性。此表明抗吞噬作用活性直接与交联剂形成共价键的能力有关。在 1:1000 稀释样本以抵消初始样本中可能存在的任何自由 MGO 的情况下, 观测到此活性。

[0222] 此部分中所述的 MALDI-TOF 研究在 University of Victoria Mass Spectrometry Facility, Wellington, New Zealand 处完成。

[0223] 已详细描述本发明及其具体实施例。然而, 本发明范围不欲受限于本说明书中所述的任何制程、制造、物质组成物、化合物、构件、方法及/或步骤的特定具体实施例。可对所揭示的物质进行各种修改、替换及变化而不背离本发明的精神及/或基本特征。因此, 一般技术者将容易地自本发明了解到与本文所述的具体实施例发挥实质上相同功能或达成实质上相同结果的稍后的修改、替换及/或变化可根据本发明的该等相关具体实施例加以利用。因此, 以下申请专利范围意欲在其范围内涵盖对本文揭示的制程、制造、物质组成物、化合物、构件、方法及/或步骤的修改、替换及变化。

[0224] 参考文献

[0225] K.Kohno, I.Okamoto, O.Sano, N.Arai, K.Iwaki, M.Ikeda 及 M.Kurimoto, [Royal Jelly Inhibits the Production of Proinflammatory Cytokines by Activated Macrophages], Biosci.Biotechnol.Biochem., 68 (1), 2004, 第 138-145 页。

[0226] Kimura Y, Miyagi C, Kimura M, Nitoda T, Kawai N, Sugimoto H. [Structural features of N-glycans linked to royal jelly glycoproteins: structures of high-mannose type, hybrid type, and biantennary type glycans.] Biosci.Biotechnol.Biochem., 64 (10) (2000), 第 2109-20 页。

[0227] J.Simuth, K.Bilikova, E.Kovacova, Z.Kuzmova 及 W.Schroder, [Immunochemical approach to detection of adulteration in honey: physiologically active Royal Jelly protein stimulating TNF-alpha release is a regular component of honey]; Journal of Agriculture and Food Chemistry, 52 (8), 2004; 第 2154-8 页。

[0228] B.Lerrer, K.Zinger-Yosovich, B.Avrahami 及 N.Gilboa-Garber, [Honey and royal jelly, like human milk, abrogate lectin-dependent infection-preceding Pseudomonas aeruginosa adhesion]; ISME Journal, 1, 2007; 第 149-155 页。

[0229] E.Mavric, S.Wittmann, G.Barth 及 T.Henle [Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (Leptospermum scoparium) honeys from New Zealand]; Mol.Nutr.Food Res. 52, 2008。

[0230] Auwerx J. (1991). [The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation.] Experientia. 47: 22-31。

[0231] Wan, C.P., C.S.Park 等人, (1993). [A rapid and simple microfluorometry phagocytosis assay.] Journal of Immunological Methods 162 (1): 1-7。

[0232] Allen, K.L., P.C. Molan 等人, (1991). [A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys.] *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 43 (12): 817-22.

[0233] White, J. (1975). *Honey: a comprehensive survey*. London, Heinemann.

[0234] Schmitt, A., J. Schmitt 等人, (2005). [Characterization of advanced glycation end products for biochemical studies: side chain modifications and fluorescence characteristics.] *Analytical Biochemistry* 338: 201-215.

[0235] Jonathan W.C. Brock, 1 William E. Cotham, 1 Suzanne R. Thorpe, 1 John W. Baynes 1 及 Jennifer M. Ames 2. (2007). Detection and identification of arginine modifications on methylglyoxal-modified ribonuclease by mass spectrometric analysis. *J. Mass Spectrom.* 2007; 42: 89-100.

序列表

- <110> 曼努卡米德有限公司  
阿嫫达 比恩
- <120> 抗炎蛋白与制备及使用其的方法
- <130> 251 WO1
- <150> NZ 590143
- <151> 2010-12-22
- <160> 5
- <170> PatentIn 3.5 版
- <210> 1
- <211> 432
- <212> PNT
- <213> 西方蜜蜂

- <220>
- <221> 主要蜂王浆蛋白1
- <222> (1)..(432)
- <400> 1

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

[0001] 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

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

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

[0002] 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

<210> 2  
 <211> 452  
 <212> PRT  
 <213> 西方蜜蜂

<220>  
 <221> 主要蜂王浆蛋白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

[0003] 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

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  
 [0004] 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  
 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> 西方蜜蜂  
 <220>

<221> 主要蜂王浆蛋白3  
<222> (1)..(544)

<220>  
<221> 主要蜂王浆蛋白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

[0005] 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

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

[0006] 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> 西方蜜蜂

<221>  
<222> 主要蜂王浆蛋白4  
<222> (1)..(464)

<400> 4

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

[0007] 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  
115 120 125

Ala His Lys Ile Ala Ile Asp Glu Tyr Glu Arg Leu Trp Val Leu Asp  
130 135 140

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

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

His Asp Val Ala Thr Thr Gly Lys Gly Glu Leu Val Ser Leu Thr Val  
180 185 190

Gln Ala Met Asp Ser Thr Asn Thr Met Val Tyr Met Val Asp Asn Lys  
 195 200 205

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

Ser Ser His Thr Leu Asn His Asn Ser Asp Lys Met Ser Asp Gln Gln  
 225 230 235 240

Glu Asn Leu Thr Leu Lys Glu Val Asp Asn Lys Val Tyr Gly Met Ala  
 245 250 255

Leu Ser Pro Val Thr His Asn Leu Tyr Tyr Asn Ser Pro Ser Ser Glu  
 260 265 270

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

Gly Asn Asp Val Gln Tyr Glu Arg Val Gln Asp Val Phe Asp Ser Gln  
 290 295 300

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

[0008] Ala Asn Asn Thr Leu Ser Cys Trp Asn Glu His Gln Ser Leu Asp Arg  
 325 330 335

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

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

```

<210> 5
<211> 598
<212> PRT
<213> 西方蜜蜂

<220> 主要蜂王浆蛋白5
<221>
<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
[0009] 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
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

[0010] 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

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 Asn Arg Met Asn Arg Gln Met Asn Glu Tyr  
 530 535 540

[0011] Met Met Ala Leu Ser Met Lys Leu Gln Lys Phe Ile Asn Asn Asp Tyr  
 545 550 555 560

Asn Phe Asn Glu Val Asn Phe Arg Ile Leu Gly Ala Asn Val Asn Asp  
 565 570 575

Leu Ile Met Asn Thr Arg Cys Ala Asn Ser Asp Asn Gln Asn Asn Asn  
 580 585 590

Gln Asn Lys His Asn Asn  
 595

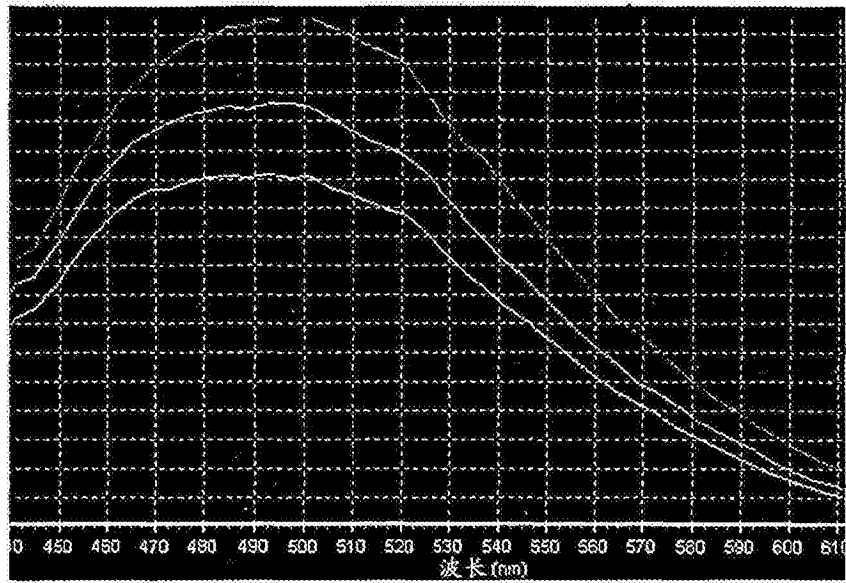


图1 (a)

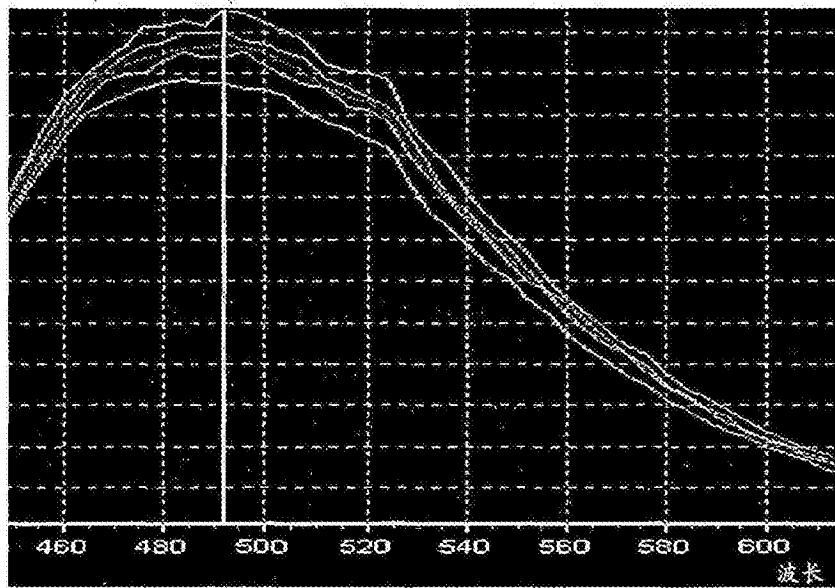


图1 (b)

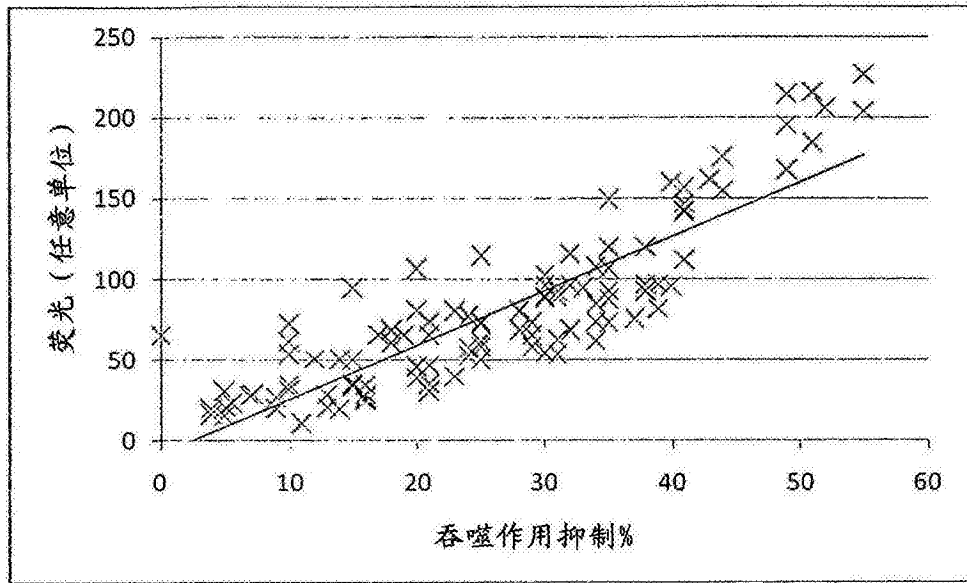


图2

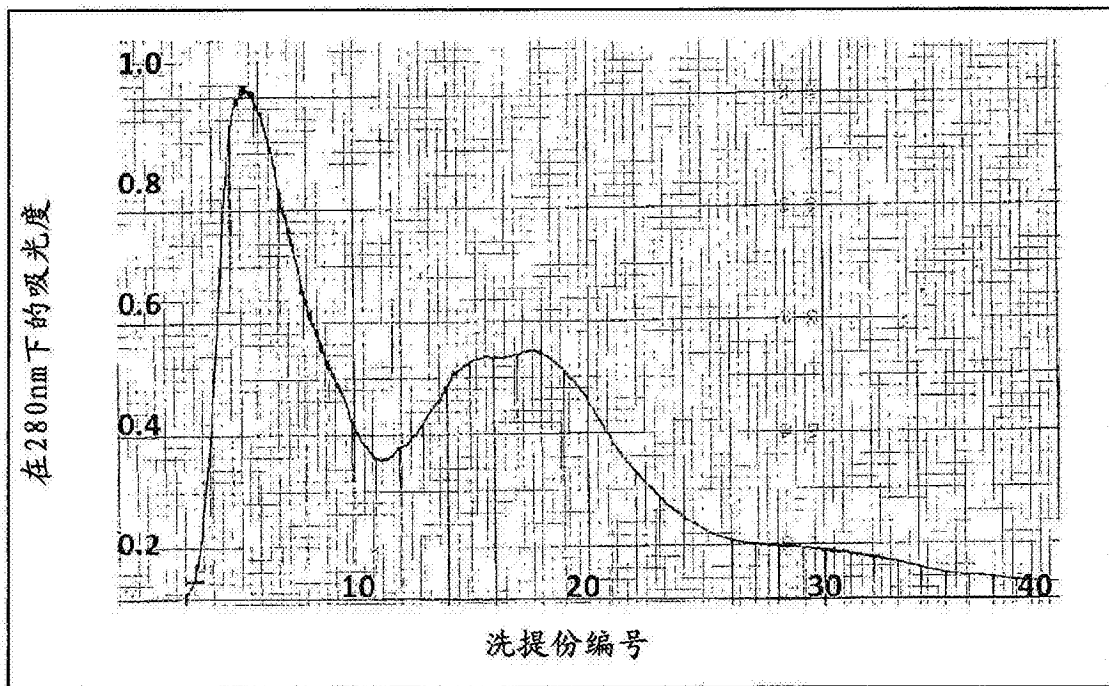


图3

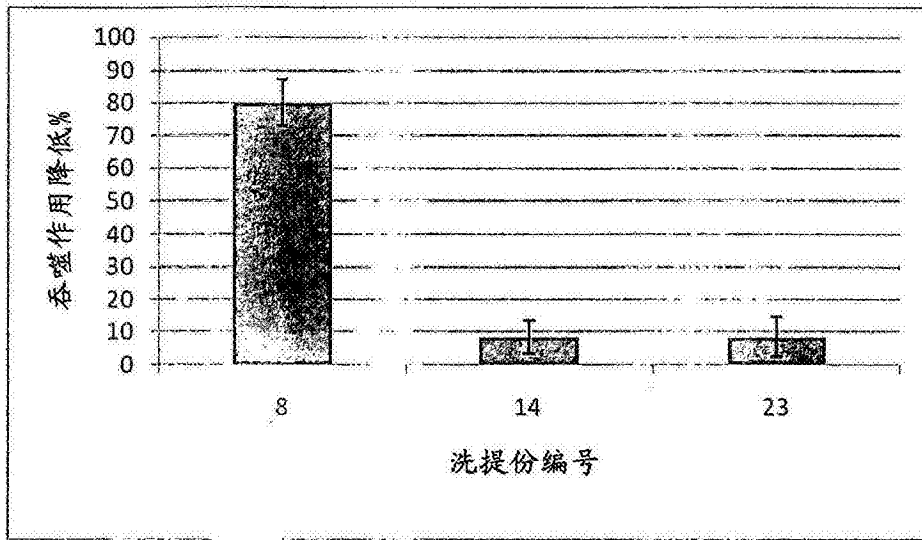


图4

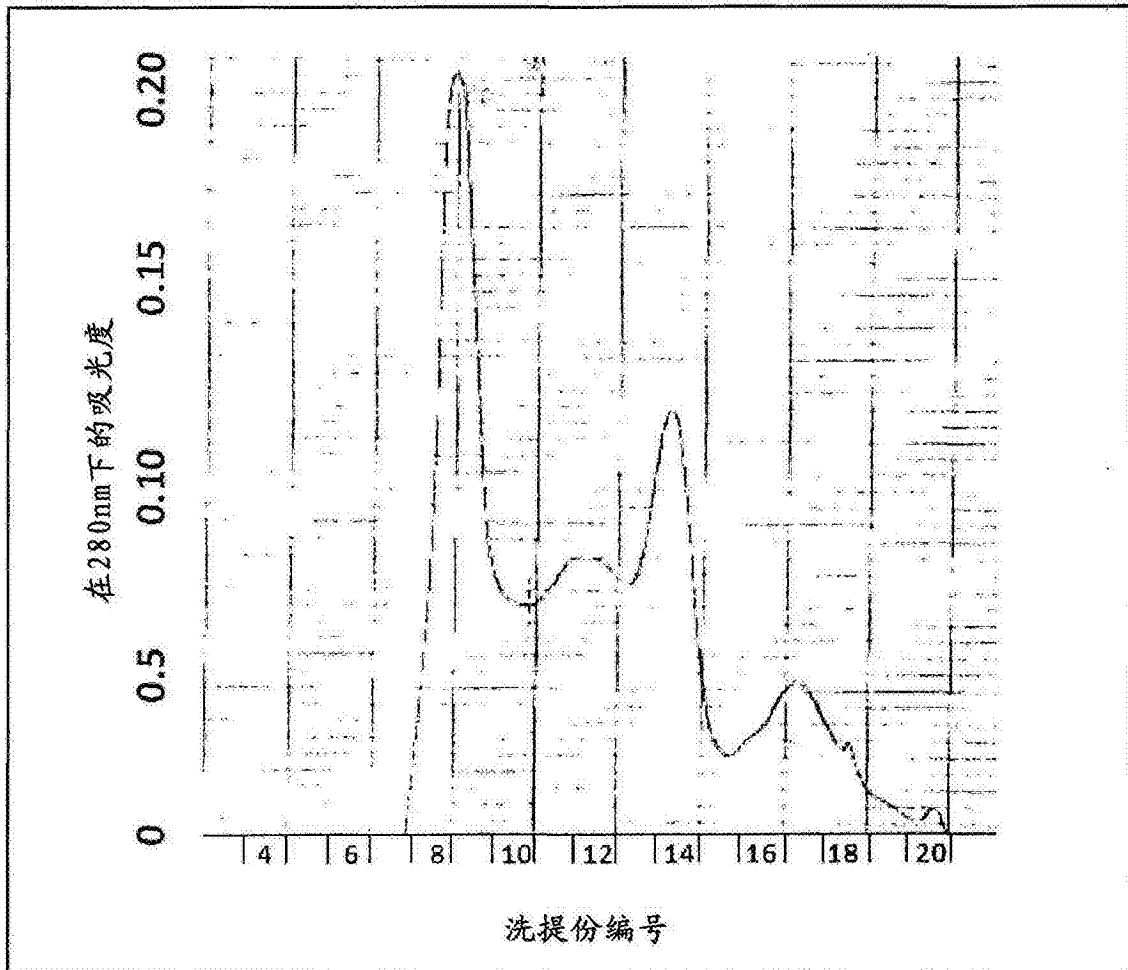


图5

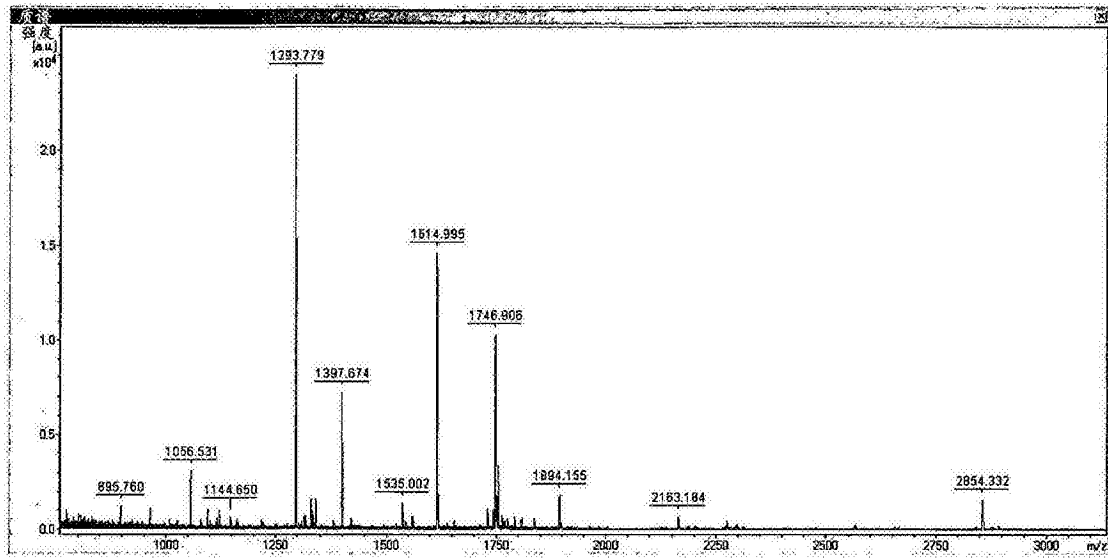


图6

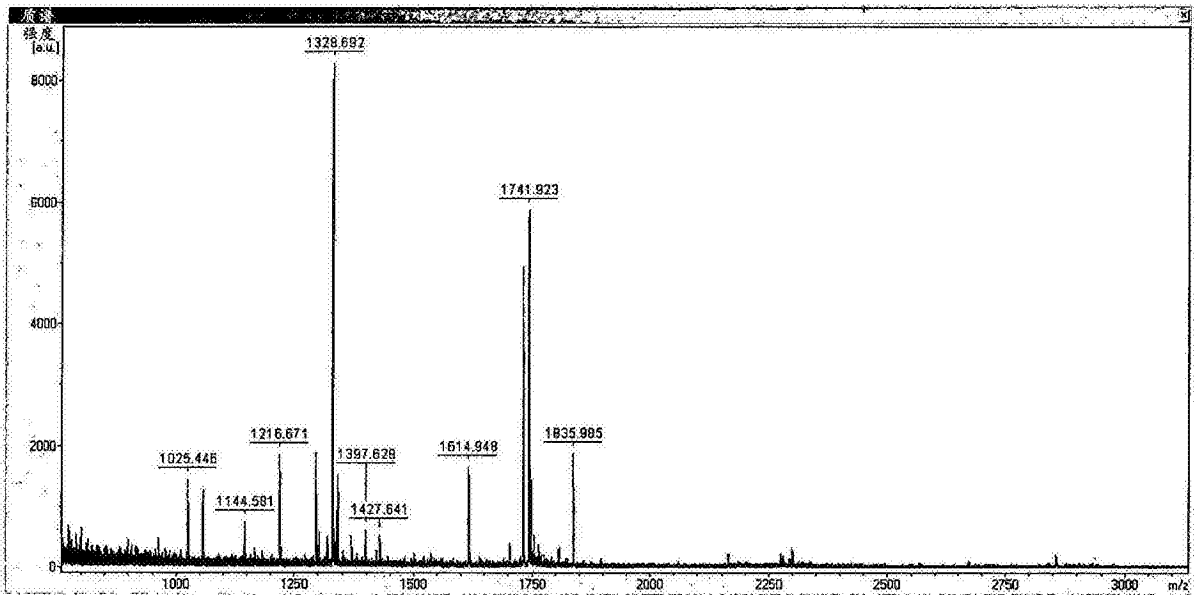


图7

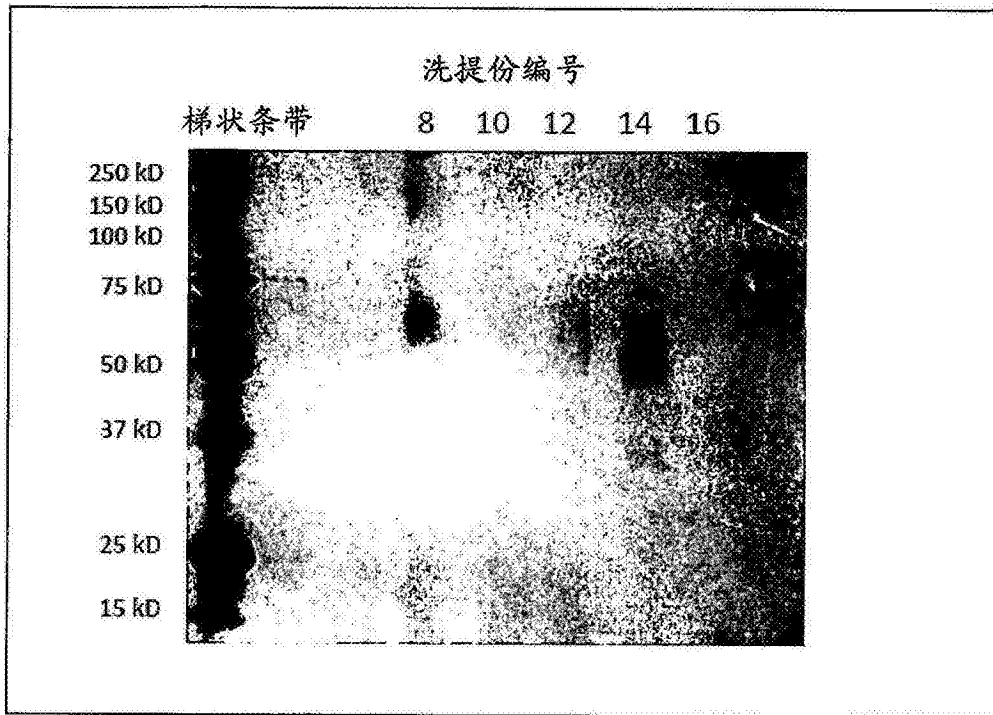


图8

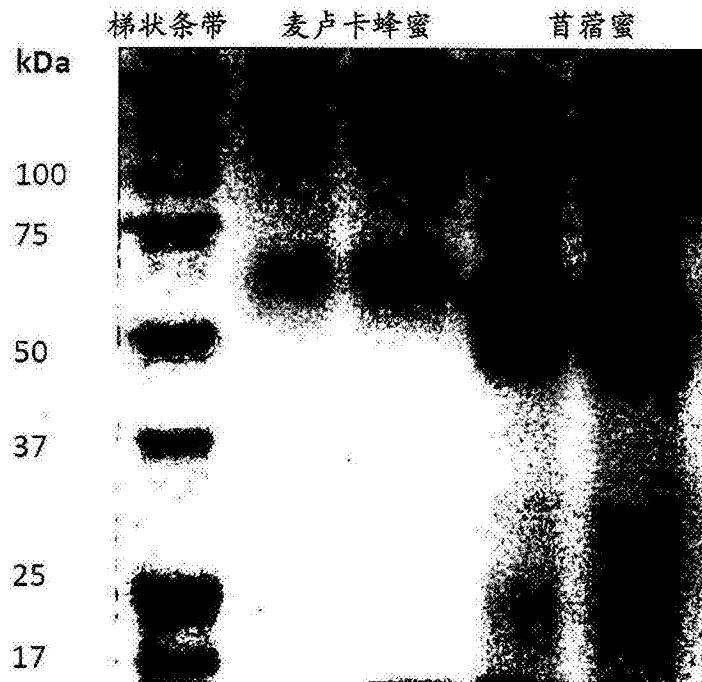


图9

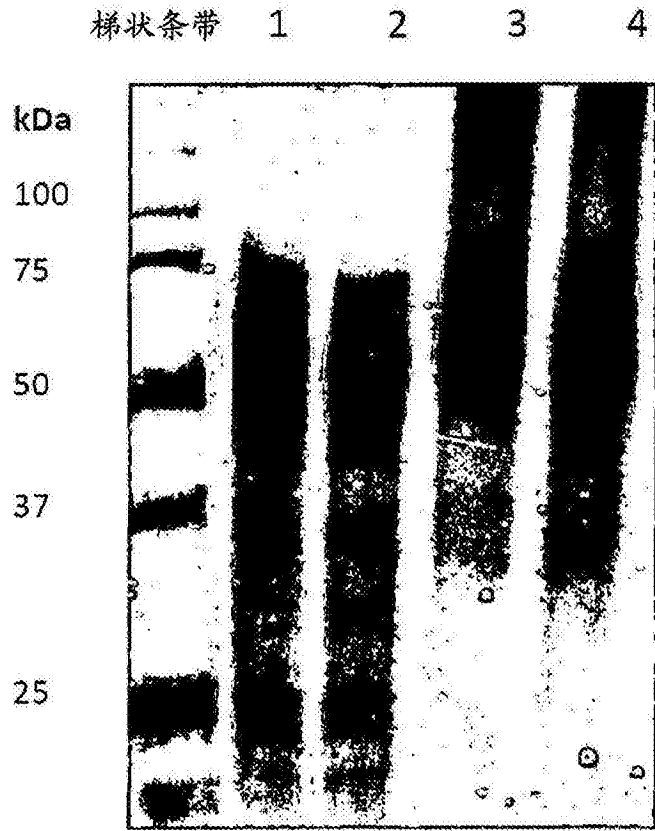


图10

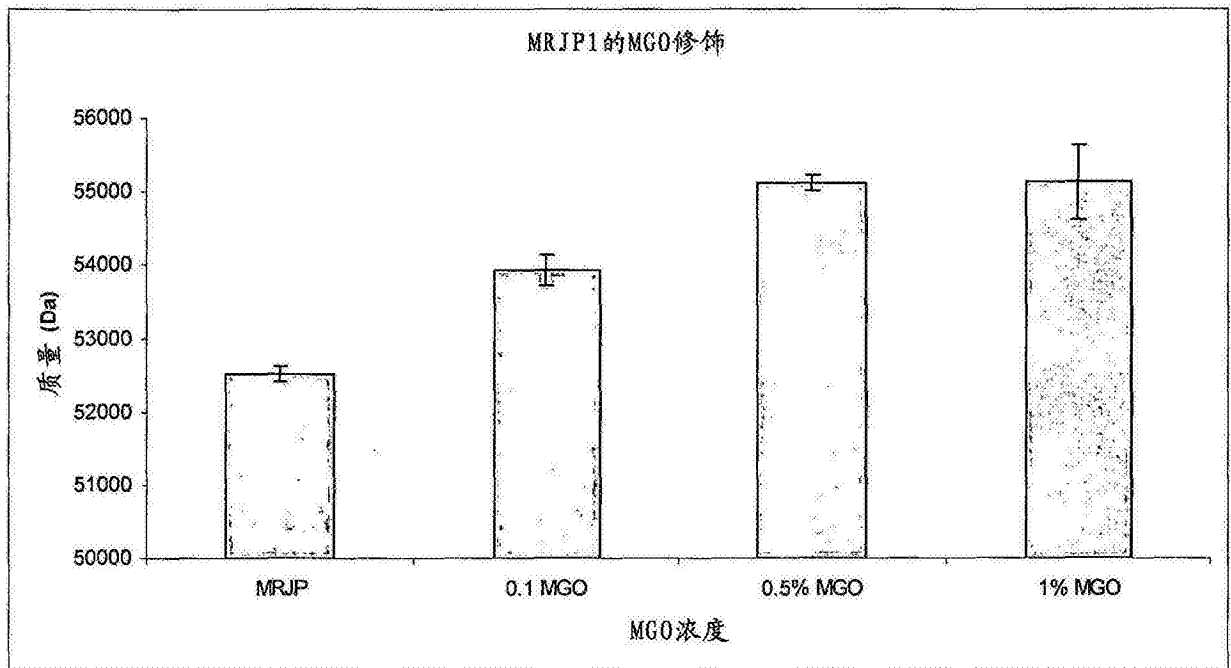


图11

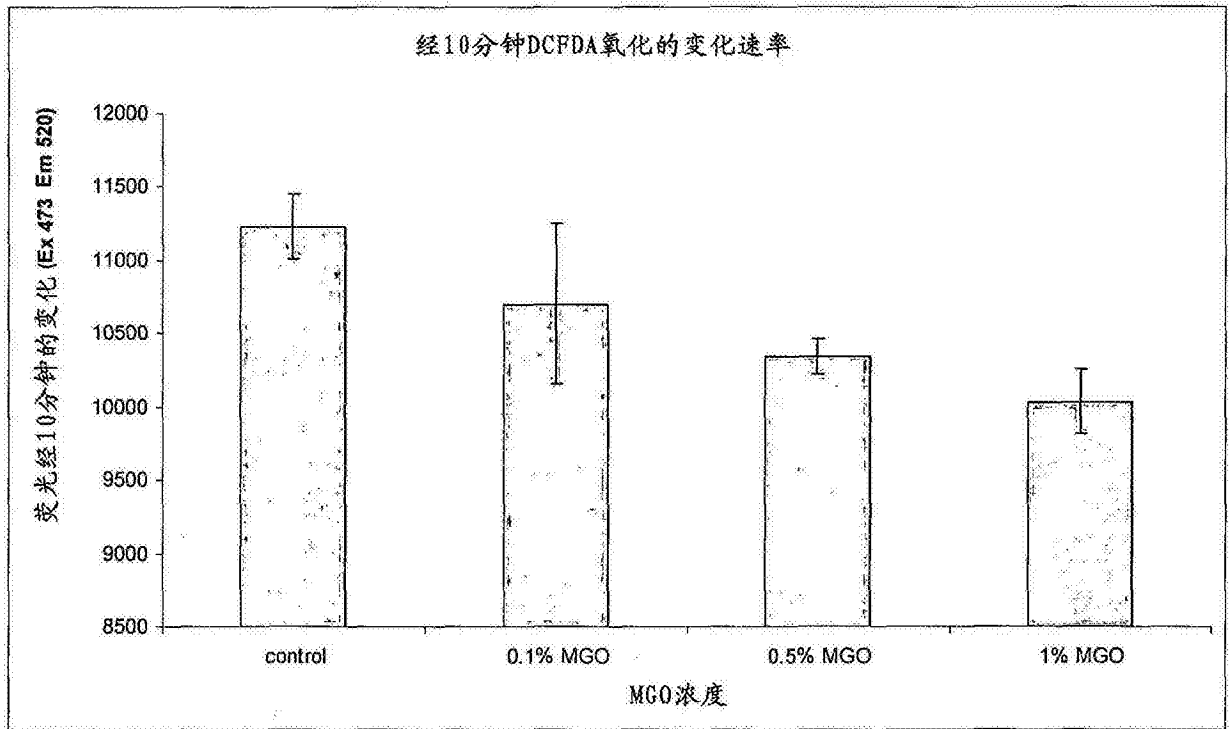


图12

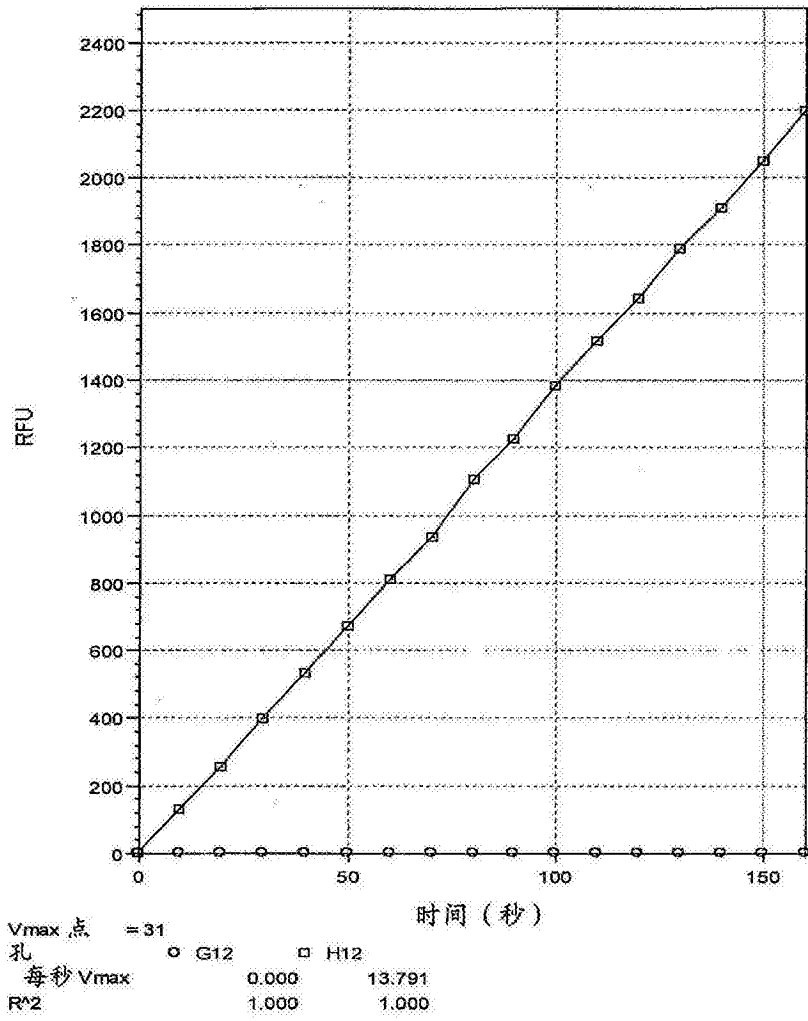


图13

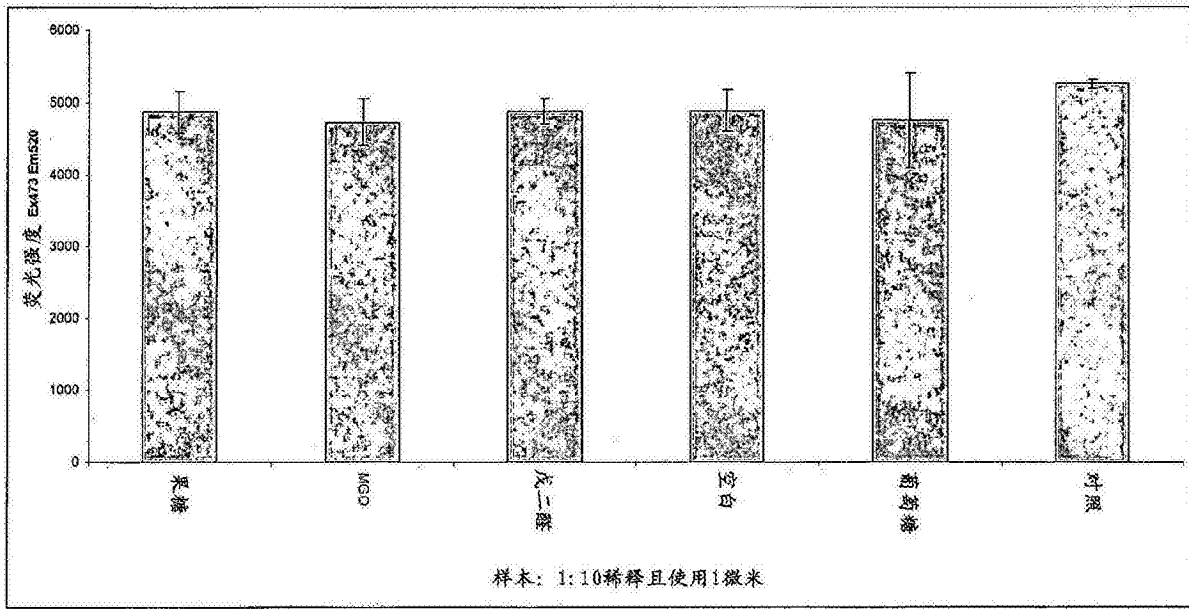


图14

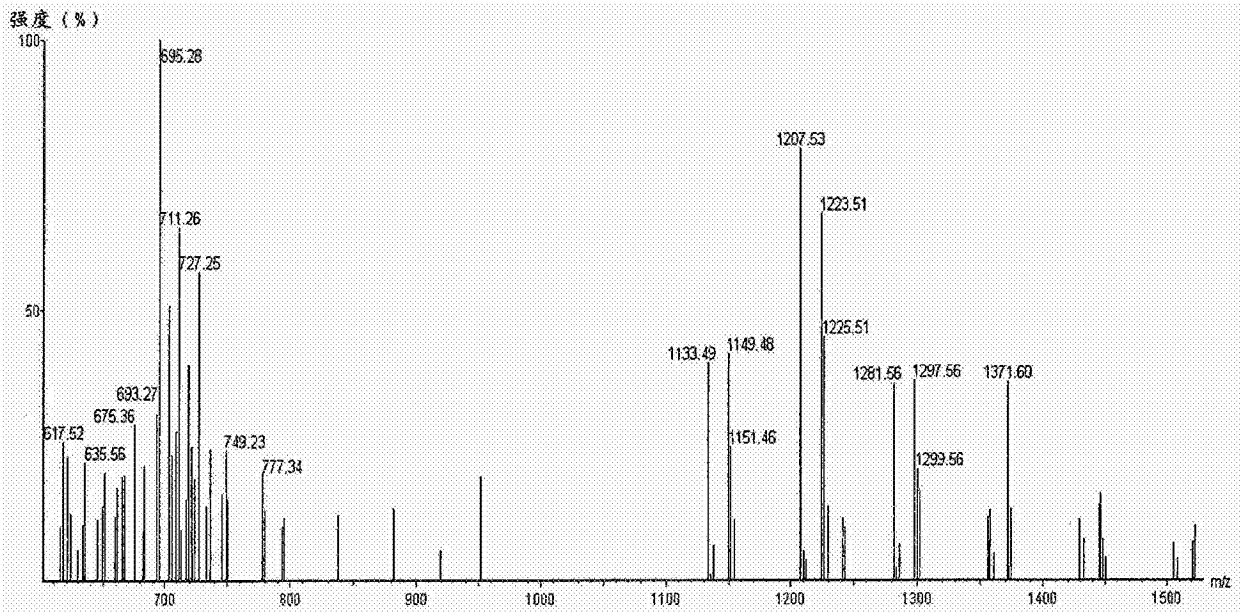


图15

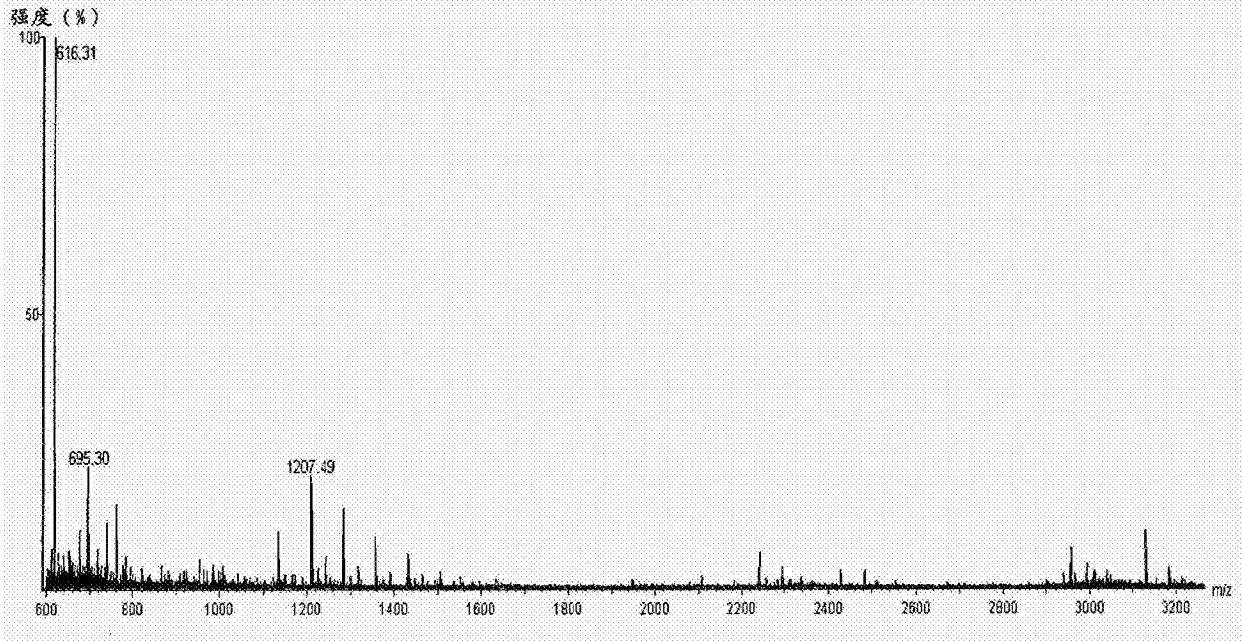


图16

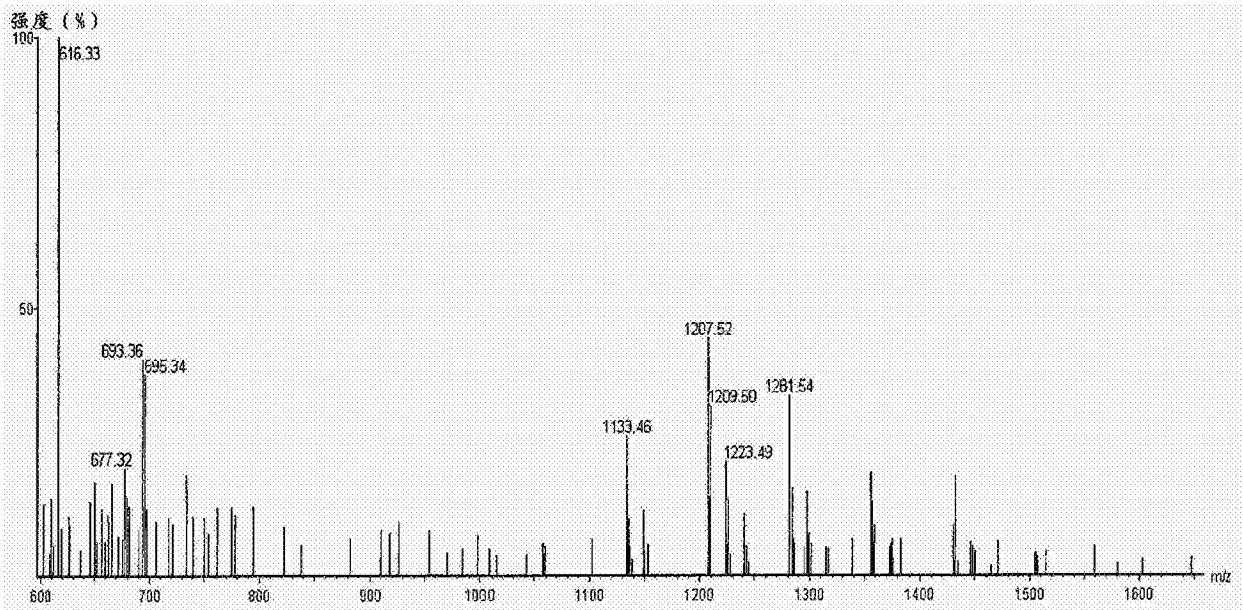


图17

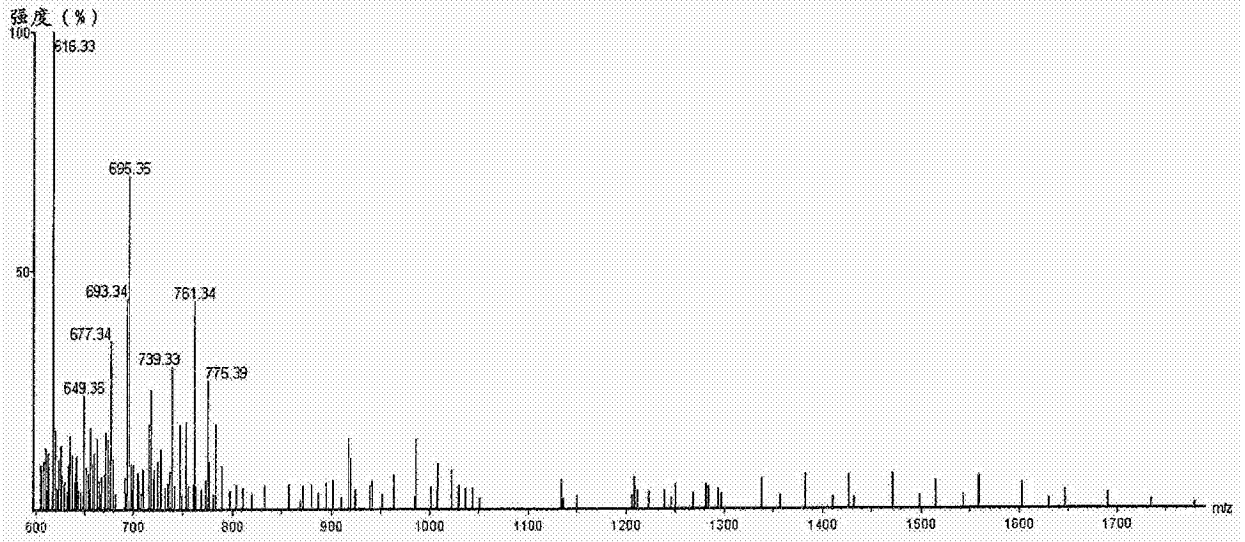


图18

所识别出的MRJPI的LysC消化物的峰

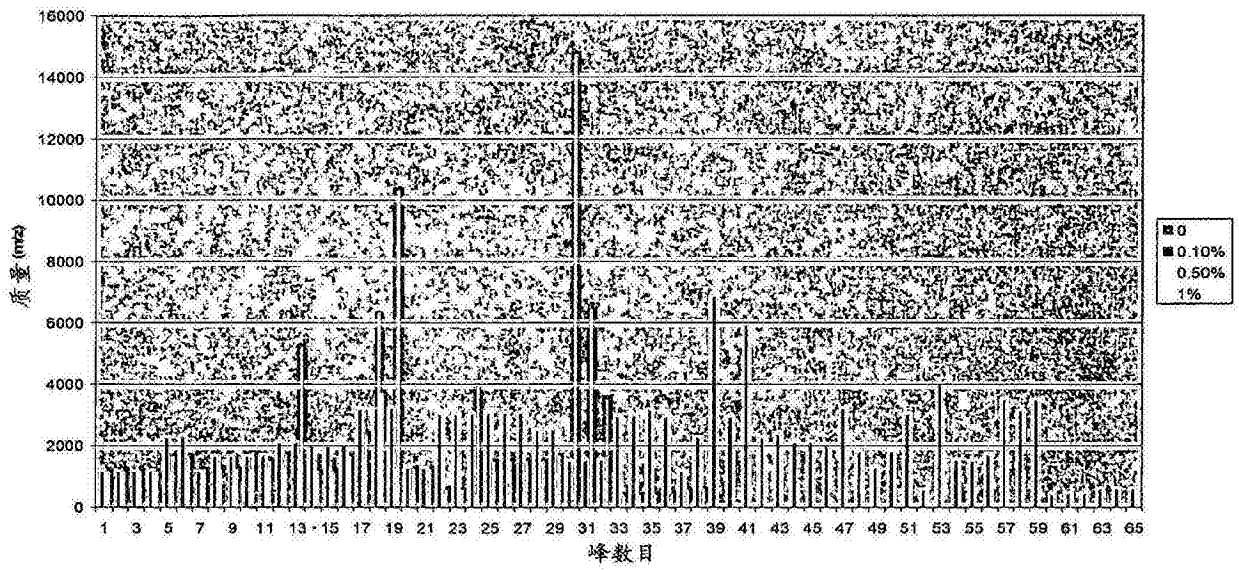


图19

经MGO修饰的MRJPI的胰蛋白酶消化物的MS分析

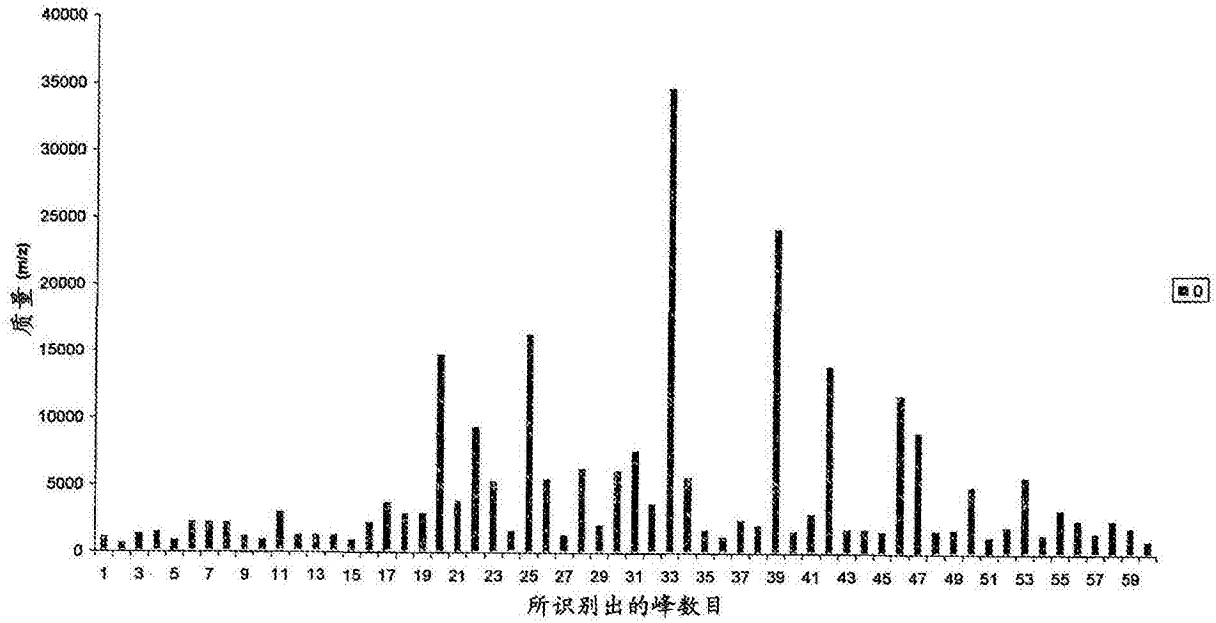


图20

经MGO修饰的MRJPI的胰蛋白酶消化物的MS分析

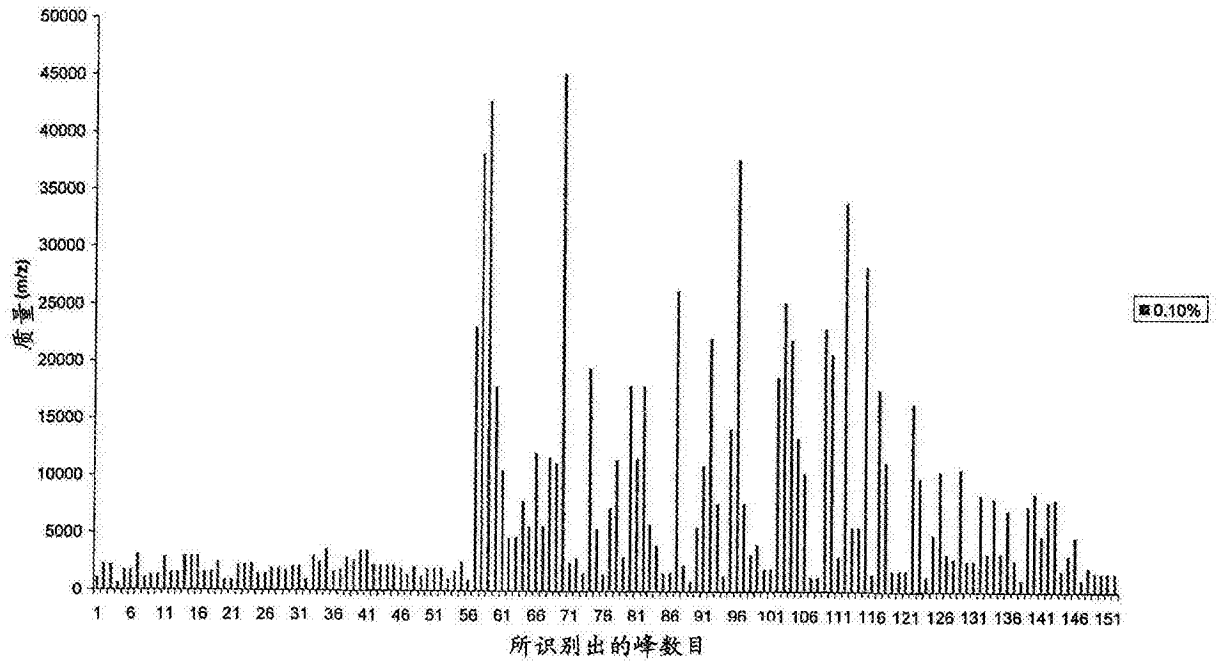


图21

经MGO修饰的MRJP1的胰蛋白酶消化物的MS分析

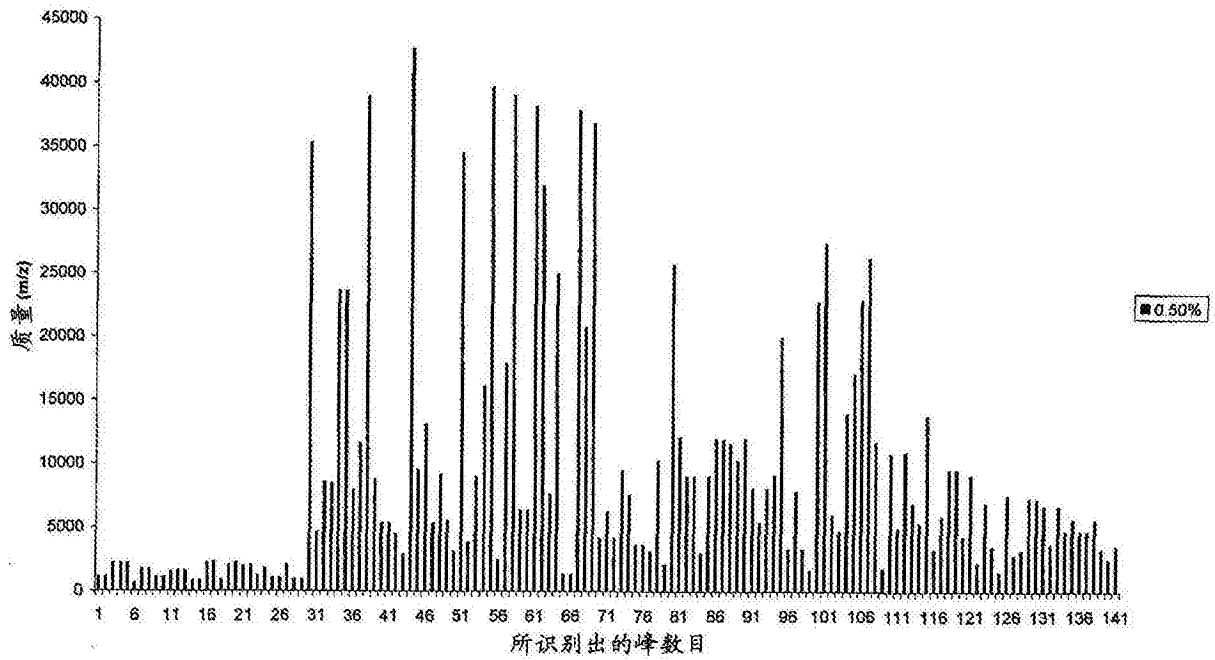


图22

经MGO修饰的MRJP1的胰蛋白酶消化物的MS分析

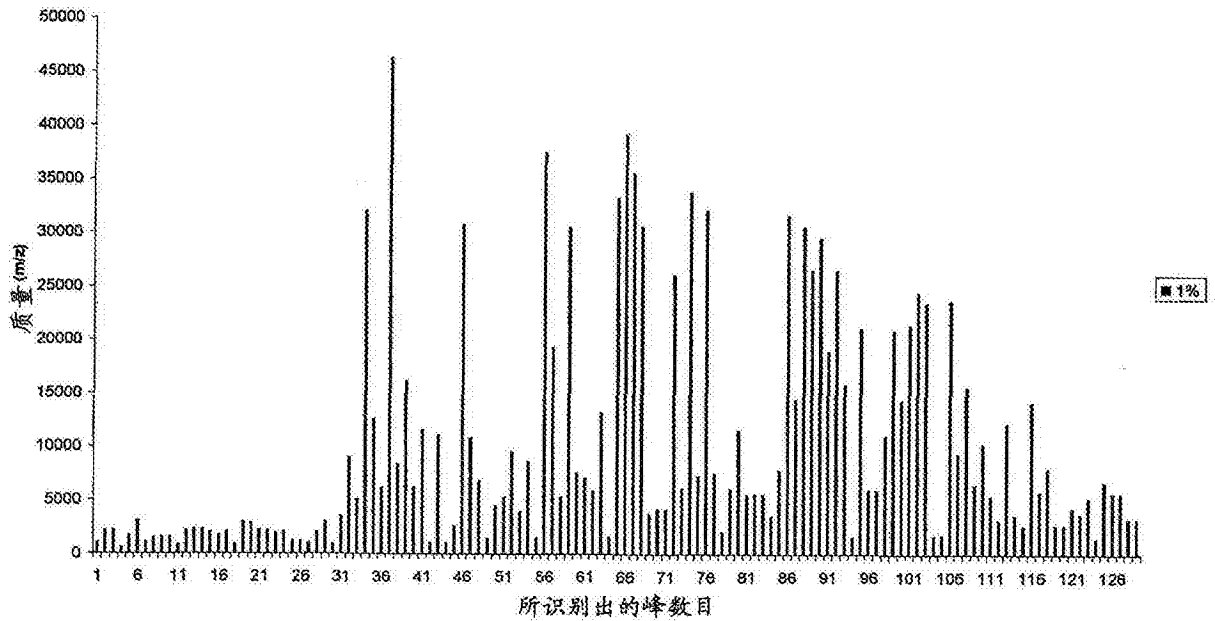


图23

专利名称(译)	抗发炎蛋白与制备及使用其的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103429614B</a>	公开(公告)日	2017-05-24
申请号	CN201180062599.6	申请日	2011-12-22
[标]申请(专利权)人(译)	曼努卡米德有限公司		
申请(专利权)人(译)	曼努卡米德有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	曼努卡米德有限公司		
[标]发明人	阿嫫达比恩 彼得莫蓝 雷库森斯 理查威尔金斯		
发明人	阿嫫达·比恩 彼得·莫蓝 雷·库森斯 理查·威尔金斯		
IPC分类号	C07K14/76 A61K38/38 G01N33/68 G01N33/533 A61P29/00 A23L21/20		
CPC分类号	A61K38/00 A61K38/1767 A61P29/00 A61K47/54 C07K14/43572 G01N33/68 G01N2333/43565 A61K35/644 G01N21/64 G01N33/15		
代理人(译)	钟晶		
优先权	590143 2010-12-22 NZ		
其他公开文献	CN103429614A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本案的揭示是关于抗发炎蛋白、其用途、制备方法及其侦测方法。特定而言，本发明是关于来自麦卢卡蜂蜜的经甲基乙二醛修饰的主要蜂王浆蛋白及其片段。

