



(43) 申请公布日 2013.07.10

序列表10页 附图4页

1. 具有细胞内容素活性的多肽,其包含依照SEQ ID NO:1的氨基酸序列,或其片段或衍生物。
2. 依照权利要求1的多肽,其中所述片段包含依照SEQ ID NO:3和/或5的氨基酸序列。
3. 依照SEQ ID NO:1或2的多肽,其中所述衍生物在依照SEQ ID NO:1、3和/或5的氨基酸序列中具有缺失、添加、插入和/或取代。
4. 依照权利要求1-3的多肽,其中所述多肽在N端或C端与具有破坏膜或LPS活性的肽段融合。
5. 依照前述任一项权利要求的多肽,其还包含标签,优选His6标签。
6. 依照权利要求5的多肽,其中所述多肽包含依照SEQ ID NO:7的氨基酸序列。
7. 一种融合蛋白,其包含依照前述任一项权利要求的多肽以及在N端或C端融合于所述多肽的肽段,其中所述肽段是阳离子性肽、多聚阳离子性肽、两亲肽、寿司肽、防卫素、疏水性肽和/或抗微生物肽。
8. 依照权利要求7的融合蛋白,其中所述肽段包含约5至约100个氨基酸残基,尤其是约5个至50个氨基酸残基,尤其是约5个至30个氨基酸残基。
9. 依照权利要求7或8的融合蛋白,其中所述阳离子性和/或多聚阳离子性肽段包含选自精氨酸、组氨酸和赖氨酸残基的至少一个氨基酸残基,尤其是其中所述肽段中包含的至少约70%的氨基酸残基是精氨酸、组氨酸和/或赖氨酸残基,尤其是精氨酸和/或赖氨酸残基。
10. 依照权利要求7的融合蛋白,其中所述两亲肽包含至少一个选自赖氨酸、精氨酸和组氨酸残基的荷正电的氨基酸残基,与至少一个选自缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、半胱氨酸、丙氨酸、酪氨酸、组氨酸、苏氨酸、丝氨酸、脯氨酸和甘氨酸残基的疏水性氨基酸残基组合,尤其是其中所述两亲肽中的至少约70%的所述氨基酸残基是精氨酸或赖氨酸残基,而所述两亲肽中的至少约30%的所述氨基酸残基为缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、半胱氨酸、丙氨酸、酪氨酸、组氨酸、苏氨酸、丝氨酸、脯氨酸或甘氨酸残基。
11. 依照权利要求7的融合蛋白,其中所述肽段包含依照SEQ ID NO:14-19的氨基酸序列。
12. 依照权利要求7的融合蛋白,其中所述融合蛋白包含依照SEQ ID NO:13的氨基酸序列。
13. 分离的核酸分子,其编码依照权利要求1-6中任一项的多肽或依照权利要求7-12中任一项的融合蛋白。
14. 包含依照权利要求13的核酸分子的载体。
15. 包含依照权利要求13的核酸分子或依照权利要求14的载体的宿主细胞。
16. 依照权利要求1-6中任一项的多肽或依照权利要求7-12中任一项的融合蛋白,用于人医学、动物医学或诊断物质,作为食物中或化妆品上的抗微生物剂,作为消毒剂或在环境领域中使用。
17. 依照权利要求1-6中任一项的多肽或依照权利要求7-12中任一项的融合蛋白,用于治疗或预防革兰氏阴性细菌感染的药物。

18. 依照权利要求 1-6 中任一项的多肽或依照权利要求 7-12 中任一项的融合蛋白用于处理或防止食品、食品加工设备、食品加工工厂、与食品接触的表面、医疗设备、医院及诊所中的表面的革兰氏阴性细菌污染的用途。

19. 药物组合物,其包含依照权利要求 1-6 中任一项的多肽或依照权利要求 7-12 中任一项的融合蛋白。

新的细胞内溶素

技术领域

[0001] 本发明涉及具有细胞内溶素活性的多肽,其具有依照 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列,以及所述多肽的片段或衍生物。此外,本发明涉及编码所述多肽或其片段或衍生物的核酸分子,包含所述核酸分子的载体,以及包含所述核酸分子或所述载体的宿主细胞。此外,本发明涉及所述多肽、或其片段或衍生物用作药物,尤其是用于治疗或预防革兰氏阴性细菌感染、作为诊断手段、作为化妆物质或作为消毒剂。本发明还涉及所述多肽或其片段或衍生物用来处理或防止食品、食品加工设备、食品加工工厂,与食品接触的表面、医疗设备、医院和诊所的表面的细菌污染,尤其是革兰氏阴性污染。此外,本发明涉及包含所述多肽或其片段或衍生物的药物组合物。

[0002] 发明背景

[0003] 革兰氏阴性细菌具有外膜,其特点为特征性的不对称双分子层。外膜的双分子层由含有磷脂(主要为磷脂酰乙醇胺)的内侧单分子层和主要由单一糖脂——脂多糖(LPS)构成的外侧单分子层组成。在细菌界,LPS 结构具有广阔的多样性,且 LPS 结构可响应主导的环境条件而受到修饰。LPS 层的稳定性以及不同 LPS 分子之间的相互作用主要通过二价离子(Mg^{2+} 、 Ca^{2+})与 LPS 分子的阴离子组分(脂质 A 中的磷酸基团和 KDO 的内核和羧基基团)的静电相互作用达成。此外,由于缺乏不饱和脂肪酸所致,脂质 A 疏水部分的密集而有序包装形成具有高粘性的刚性结构。这使其较不易被亲脂性分子渗透,并赋予外膜(OM)额外的稳定性。

[0004] 已知多种类型的具有杀菌或抑菌活性的试剂,例如抗生素、细胞内溶素、抗微生物肽和防卫素。然而,微生物对抗生素的增加的抗性对于治疗越来越多由细菌导致的感染造成困难。革兰氏阴性细菌如肠杆菌科,诸如沙门氏菌属(*Salmonella* sp.)和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)导致的感染产生了特别的困难。

[0005] 细胞内溶素为细菌噬菌体(或细菌的病毒)编码的肽聚糖水解酶。其在噬菌体复制的裂解周期中的晚期基因表达过程中合成,并通过降解细菌肽聚糖来介导后代病毒体从受感染的细胞的释放。其为 β (1,4)-糖基化酶(溶菌酶)、糖基转移酶、酰胺酶或内肽酶。细胞内溶素的抗微生物应用已经在 1991 年由 Gasson(GB2243611)提出。尽管细胞内溶素的杀灭能力久为人知,由于抗生素的成功和主宰地位,这些酶作为抗细菌剂的用途一直受忽略。仅在多重抗生素耐药性细菌出现后,用细胞内溶素对抗人类病原体这一简单概念方才受到注意。出现了开发完全新类型的抗细菌剂的令人瞩目的需求,且用作酶抗生素(enzybiotics)(“酶”和“抗生素”的糅合术语)的细胞内溶素完美地符合该需求。在 2001 年,Fischetti 及其同事首次阐明了细菌噬菌体 C1 细胞内溶素对 A 组链球菌的治疗潜力(Nelson 等,2001)。从此,许多文献确立了细胞内溶素作为控制细菌感染,特别是革兰氏阳性细菌的细菌感染的有吸引力和补充的替代手段。接着,针对其他革兰氏阳性病原体如肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)(Loeffler 等,2001)、炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)(Schuch 等,2002)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)(Cheng 等,2005)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)(Rashel 等,2007)的不同的细胞内溶素证明

了其作为酶抗生素的效力。目前,细胞内溶素疗法面临的最严重的挑战在于革兰氏阴性细菌对细胞内溶素的外源作用不敏感,这是由于外膜屏蔽了细胞内溶素接触肽聚糖。这一点目前阻碍了有效的内溶素范围扩展到重要的革兰氏阴性病原体。

[0006] 抗微生物肽 (AMP) 代表一大类短的、阳离子性或两亲性 (amphipatic)、由基因编码的肽抗生素,其可见于几乎所有生物。不同的 AMP 显示不同的特性,且该类型中的许多肽不仅作为抗生素,还作为细胞穿透肽的模板正经受彻底的研究。尽管分享一些共同特征 (例如,阳离子性,两亲性和小尺寸),AMP 序列变化极大,且已提出至少四种结构组 (α -螺旋, β -片层,延伸型 (extended) 和环状 (looped)) 引起观察到的 AMP 构象的多样性。同样,已提出了几种其作为抗生素的作用模式,且显示例如许多这些肽的主要靶是细胞膜,而对于其他肽,主要靶是细胞质侵袭和核心代谢功能的扰乱。尽管缺乏特异性靶结合,AMP 可变得足够集中 (concentrated) 以显示协作活性 (cooperative activity),例如,通过在膜上形成孔,如对于大部分 AMP 的情况下。然而,该现象仅在模式磷脂双分子层中观察到,且在一些情况下,需要在膜中 AMP 的浓度高至每六个磷脂分子一个肽分子来使这些事件发生。所述浓度接近甚至可达到全膜饱和。因为对于 AMP 最低抑制浓度 (MIC) 通常在低微摩尔范围,可理解地,对于这些阈值的相关性及其在体内的重要性产生了怀疑 (Melo 等, *Nature reviews, Microbiology*, 2009, 245)。

[0007] 防卫素是由小的、阳离子性、富含半胱氨酸和精氨酸的抗微生物肽构成的一个大家族,见于脊椎动物和无脊椎动物两者。防卫素根据半胱氨酸的间隔样式 (spacing pattern) 分为五个组:植物、无脊椎动物、 α -、 β -和 θ -防卫素。后三种主要见于哺乳动物。 α -防卫素为见于嗜中性粒细胞和肠上皮细胞的蛋白质。 β -防卫素为最广泛分布的,并由白细胞和许多类型的上皮细胞所分泌。 θ -防卫素目前很少见,例如见于猕猴 (rhesus macaques) 的白血病。防卫素对细菌、真菌和许多有包膜和无包膜病毒有活性。然而,多数情况下有效杀灭细菌所需的浓度较高,即在微摩尔范围。许多肽的活性在生理盐条件、二价阳离子和血清的存在下受限。取决于疏水氨基酸残基的含量,防卫素亦显示溶血活性。

[0008] 因此,存在对针对革兰氏阴性细菌的新型抗微生物剂的需要。

发明概要

[0009] 本发明涉及新的具有细胞内溶素活性的多肽,其从肠炎沙门氏菌 (*Salmonella enteritis*) 噬菌体 PVPSE1 分离而来,可用于制备针对革兰氏阴性细菌的新型抗菌剂。

[0010] 本发明的第一个目的提供涂有具有细胞内溶素活性的多肽,其包含依照 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列,或其片段或衍生物。

[0011] 包含依照 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的多肽优选由依照 SEQ ID NO:2 的核苷酸序列编码。

[0012] 在一个优选的实施方案中所述片段包含依照 SEQ ID NO:3 和 / 或 5 的氨基酸序列,优选分别由核苷酸序列 SEQ ID NO:4 和 / 或 SEQ ID NO:6 编码。

[0013] 在另一个优选的实施方案中所述衍生物在依照 SEQ ID NO:1、3 和 / 或 5 的氨基酸序列中具有缺失、添加、插入和 / 或取代。

[0014] 在另一个优选的实施方案中,所述依照本发明的多肽或其片段或衍生物在 N- 或 C- 段融合于具有破坏膜或 LPS 活性的肽段,尤其是阳离子性或多聚阳离子性肽。

[0015] 所述肽、片段或其衍生物或融合蛋白可以进一步包含标签, 优选 His6- 标签。

[0016] 在本发明的一个优选的实施方案中, 所述多肽包含依照 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列。

[0017] 本发明的另一个目的涉及这样的融合蛋白, 其包含依照前述任一项权利要求的多肽以及在 N 端或 C 端融合于所述多肽的肽段, 其中所述肽段是阳离子性肽、多聚阳离子性肽、两亲肽、寿司肽 (sushi peptide)、防卫素、疏水性肽和 / 或抗微生物肽。

[0018] 在本发明的一个优选的实施方案中, 所述肽段包含约 5 至约 100 个氨基酸残基, 尤其是约 5 个至 50 个氨基酸残基, 尤其是约 5 个至 30 个氨基酸残基。

[0019] 在本发明的另一个优选的实施方案中, 所述阳离子性和 / 或多聚阳离子性肽段包含选自下组的至少一个氨基酸残基: 精氨酸、组氨酸和赖氨酸残基, 尤其是其中所述肽段中包含的至少 70% 的氨基酸残基是精氨酸、组氨酸和 / 或赖氨酸残基, 尤其是精氨酸和 / 或赖氨酸残基。

[0020] 在本发明的一个优选的实施方案中, 所述两亲肽包含至少一个选自赖氨酸、精氨酸和组氨酸的荷正电的氨基酸残基, 与至少一个选自缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、半胱氨酸、丙氨酸、酪氨酸、组氨酸、苏氨酸、丝氨酸、脯氨酸和甘氨酸残基的疏水性氨基酸残基组合, 其中所述两亲肽中的至少 70% 的所述氨基酸残基是精氨酸或赖氨酸残基, 而所述两亲肽中的大约 30% 的所述氨基酸残基为缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、半胱氨酸、丙氨酸、酪氨酸、组氨酸、苏氨酸、丝氨酸、脯氨酸或甘氨酸残基。

[0021] 在本发明的另一个优选的实施方案中, 所述肽段包含依照 SEQ ID NO:14-19 的氨基酸序列。

[0022] 在本发明的一个特别优选的实施方案中, 所述融合蛋白包含依照 SEQ ID NO:13 的氨基酸序列。

[0023] 本发明的另一个目的涉及包含依照 SEQ ID NO:13 的核酸分子的载体。

[0024] 本发明的另一个目的提供编码依照本发明的多肽、其片段或衍生物、或融合蛋白的分离的核酸分子。

[0025] 本发明的另一个目的涉及包含依照本发明的核酸分子的载体。

[0026] 本发明的另一个目的涉及包含依照本发明的核酸分子或依照本发明的载体的宿主细胞。

[0027] 本发明的另一个目的涉及依照本发明的多肽、片段或衍生物或依照本发明的融合蛋白作为人医学、兽医医学或诊断物质, 作为食物中或化妆品上的抗微生物剂, 作为消毒剂或在环境领域中使用。

[0028] 在一个优选的实施方案中, 所述依照本发明的多肽、片段或衍生物或融合蛋白在制备用于治疗或预防革兰氏阴性细菌感染的药物中使用。

[0029] 另一个优选的实施方案涉及所述依照本发明的多肽、片段或衍生物或融合蛋白用于处理或防止食品、食品加工设备、食品加工工厂、与食品接触的表面、医疗设备、医院及诊所中的表面的革兰氏阴性细菌污染的用途。

[0030] 本发明的另一个优选的实施方案涉及包含本发明的多肽或本发明的融合蛋白的药物组合物。

[0031] 详细说明

附图说明

[0032] 下列附图用于例示本发明。

[0033] 附图 1 显示了使用 BLASTp 和 Pfam 分析系统对野生型模块性肠炎沙门氏菌细胞内容素 PVPSE1gp146 的功能性分析。氨基酸和 DNA 和氨基酸序列,如它们在野生型噬菌体中出现的,分别为 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2。预测的 N 端肽聚糖结合结构域 (PBD, 氨基酸 3-39, SEQ ID NO:3, 加下划线的) 和 C 端溶菌酶样超家族催化结构域 (氨基酸 81-234, SEQ ID NO:5, 加灰色高亮的) 在示意图和序列中均可可视化。

[0034] 图 2 - PVPSE1gp146 (左) 和 PK-PVPSE1gp147 (右) 的重组表达和纯化的 SDS-PAGE 分析。SDS-PAGE 分析显示洗脱蛋白级分,相对于 LMW 参照标志物,以及穿透级分 (FT) 和废液级分 (W)。26.4kDa (之于 PVPSE1gp146) 和 27.7kDa (之于 PK-PVPSE1gp146) 左右的粗条带显示了这两种重组蛋白的高产率。可见一些次要的次级条带 (蛋白降解) 以及分别位于 52.8kDa 和 55.4kDa 左右的蛋白二聚化。

[0035] 图 3- 肠炎沙门氏菌噬菌体细胞内容素 PVPSE1gp146 在洗脱缓冲液中对经外膜通透化的铜绿假单胞菌 PAO1 的溶胞壁活性的饱和曲线。显示了递增浓度的 PVPSE1gp146 (以 nM 计, X 轴) 的活性 (以 $\Delta OD_{655nm}/min$ 计, Y 轴)。此外,对线性曲线部分的最佳线性回归表示为趋势线,以及相应的最优 R 平方值。结果是一式三份测定的。PAO1_{Krylov} 底物溶于最优的 KH_2PO_4/KH_2PO_4 缓冲液中。

[0036] 图 4 显示的是修饰的标签 -PVP-SE1gp146 变体的可能的二维模块化结构。展示了 PVP-SE1gp146 的推定的 N 端肽聚糖结合结构域 (PBD) 和 C 端溶菌酶样超家族催化性壳聚糖酶结构域,以及 N 端融合的抗细菌肽标签 (APT) 的方向。

[0037] 图 5 显示 PVPSE1gp146 (蓝色条) 和 PK-PVP-SE1gp146 (红色条) 在 42°C (A) 和 50°C (B) 下温育后在 24h 中不同时间点内对外膜通透化后的 PAO1 细胞底物的热稳定性。将溶胞壁活性与时间点 0 的未加热样品相对比较,并以百分比表示。显示了三个独立实验的平均值和标准偏差。

[0038] 图 6 显示了 PVP-SE1gp146 (A) 和 PK-PVP-SE1gp146 (B) 在 50-100°C 温育 0 (蓝色)、20 (红色)、40 (绿色) 和 60 (紫色) 分钟时间 (对于 PVP-SE1gp146); 和 0 (蓝色)、20 (红色)、30 (绿色)、和 40 (紫色) 分钟时间 (对于 PK-PVP-SE1gp146) 之后对经过膜通透化的 PAO1 细胞底物的热稳定性。将溶胞壁活性与时间点 0 的未加热样品相对比较,并以百分比表示。显示了三个独立实验的平均值和标准偏差。

[0039] 说明

[0040] 定义

[0041] 下列术语若在本文中出现,则应具有下面的定义。

[0042] 如本文中使用的术语“蛋白质”与术语“多肽”所指相同。本文中使用的术语“蛋白质”指氨基酸残基通过肽键以特定序列连接的直链聚合物。蛋白的氨基酸残基可通过例如共价附着多种基团如糖和磷酸来修饰。其他的物质如血红素或脂质可更松散的与多肽链相联系,得到耦合的蛋白质,其也包含于本文中使用的术语“蛋白质”中。有多种方式阐明多肽链的折叠,特别是针对 α 螺旋和 β 折叠片层的存在。如本文中使用的术语“蛋白质”

指所有四种类型的蛋白质,即全 α 、全 β 、 α/β 和 α 加上 β 。

[0043] 如本文中使用的术语“融合蛋白”指由两个核酸序列融合所得的表达产物。上述蛋白可在例如重组 DNA 表达系统中产生。而且,如本文中使用的术语“融合蛋白”指第一氨基酸序列例如细胞内溶素,与第二或别的氨基酸序列的融合物。所述第二或别的氨基酸序列优选是肽段,特别是阳离子性肽或多聚阳离子性肽。优选地,所述第二和 / 或别的氨基酸序列对于第一氨基酸序列为外源的,并不与第一氨基酸序列的任何域实质上同源。

[0044] 如本文中使用的术语“肽段”指连接于蛋白质如细胞内溶素的任何类型的肽。然而,本发明的意义中的肽段不指 His6- 标签, Strep- 标签, Avi- 标签, Myc- 标签, Gst- 标签, JS- 标签, 半胱氨酸 (cystein)- 标签, FLAG- 标签或本领域中已知的其他标签, 硫氧还蛋白或麦芽糖结合蛋白 (MBP)。与如本文中使用的术语“肽段”相对, 术语“标签”指可用于帮助多肽的表达和 / 或亲和纯化, 将多肽固定于表面或者充当标志物或标记部分以供检测多肽 (例如通过在不同的 ELISA 测定形式中的抗体结合) 的肽, 只要使该标签可用于上述所列举之一的功能并非由所述肽所荷的正电荷所致即可。然而, His6 标签可能取决于相应的 pH, 亦可荷正电, 但却是因为其结合于固定化的二价阳离子而用作亲合纯化工具而并非用作根据本发明的肽段。

[0045] 如本文中使用的术语“肽”指由约 2 至约 100 个氨基酸残基, 更优选约 4 至约 50 个氨基酸残基, 更优选约 5 至 30 个氨基酸残基组成的短多肽, 其中一个氨基酸残基的氨基基团通过肽键连接于另一个氨基酸残基的羧基基团。肽可具有特定功能。肽可为天然出现的肽或合成设计和产生的肽。所述肽可例如通过酶法或化学剪切来源于天然蛋白或从天然蛋白移出, 或者可使用常规的肽合成技术 (例如固相合成) 或分子生物学技术 (参见 Sambrook, J. 等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989)) 来制备。

[0046] 本文中使用的术语“细胞内溶素”指适于水解细菌细胞壁的酶。“细胞内溶素”包含至少一个具有至少下述活性之一的“酶活性域 (EAD)”: 内肽酶、N- 乙酰基 - 胞壁酰 - L- 丙氨酸酰胺酶 (酰胺酶)、N- 乙酰基胞壁酰胺酶 (N-acetyl-muramidase)、N- 乙酰基 - 氨基葡萄糖苷酶 (溶菌酶) 或转糖基酶。此外, 所述细胞内溶素还可含有不具酶活性并结合于宿主细菌细胞壁的区域, 即所谓 CBD (细胞壁结合结构域)。所述细胞内溶素可含有两个或更多个 CBD。然而, 如本文中使用的术语“细胞内溶素”还指具有至少一个 EAD 但没有 CBD 的酶。一般而言, 细胞壁结合结构域能够结合细菌表面上不同的组分。优选地, 所述细胞壁结合结构域为肽聚糖结合结构域并结合于细菌的肽聚糖结构。细胞内溶素的不同结构域可通过结构域接头连接。

[0047] 如本发明所使用的术语“结构域接头”是指起着将单个蛋白结构域彼此相连的作用的氨基酸序列。作为规则, 结构域接头不形成或仅形成很少的规则二级结构, 如 α 螺旋或 β - 片层, 并且能够占据就结构背景而言的不同构象。检测结构域接头的方法以及接头序列的特征是本领域公知的, 例如描述于 Bae 等, 2005, Bioinformatics, 21, 2264-2270 或 George&Heringa, 2003, Protein Engineering, 15, 871-879 中。

[0048] 如本文所使用的术语“野生型”或“wt”是指如 SEQ ID NO:1 所示的细胞内溶素 PVPSE1gp146 的氨基酸序列。编码该野生型细胞内溶素 PVPSE1gp146 的核酸序列描述于 SEQ ID NO:2。

[0049] 如本文中使用的术语“缺失”指从对应的起始序列去除 1、2、3、4、5 或更多个氨基酸或核酸残基。

[0050] 如本文中使用的术语“插入”或“添加”指向对应的起始序列插入或添加 1、2、3、4、5 或更多个氨基酸或核酸残基。

[0051] 如本文中使用的术语“取代”指用不同的氨基酸残基替换位于特定位置的氨基酸残基。

[0052] 如本文中使用的术语“细胞壁”指所有构成革兰氏阴性细菌外细胞围绕物(enclosure) 并由此确保其完整性的组分。具体而言,如本文中使用的术语“细胞壁”指肽聚糖、革兰氏阴性细菌具有脂多糖的外膜、细菌细胞膜,但也指沉积于肽聚糖上的其他层例如荚膜(capsule)、外蛋白层或粘液(slime)。

[0053] 如本文中使用的术语“EAD”指细胞内容素的酶活性结构域。EAD 负责水解细菌肽聚糖。其呈现细胞内容素的至少一种酶活性。EAD 还可由超过一种酶活性模块构成。本文中使用的术语“EAD”与术语“催化结构域”同义。

[0054] 本发明涉及一种新的模块性(modular) 细胞内容素,其分离自肠炎沙门氏菌噬菌体 PVPSE1,可用于制备针对革兰氏阴性细菌的新型抗菌剂。尤其是,本发明涉及包含依照 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的多肽或其片段或衍生物。所述包含依照 SEQ ID NO:1 的多肽优选由依照 SEQ ID NO:2 的核苷酸序列编码。

[0055] 具有依照 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的细胞内容素 PVPSE1gp146 的长度为 236 个氨基酸。其包含一个 N 端细胞壁结合结构域(CBC) 和一个 C 端酶活性结构域(EAD)。该 N 端 CBD 是一个肽聚糖结合结构域(PGB, aa3 ~ 39),具有依照 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列以及依照 SEQ ID NO:4 的核苷酸序列。C 端 EAD 是一个催化结构域(aa81 ~ 234),与溶菌酶样超家族的催化结构域一致,且具有依照 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列及依照 SEQ ID NO:6 的核苷酸序列。细胞内容素 PVPSE1gp146 的 PGB 和催化结构域通过结构域接头连接。

[0056] 因此,依照本发明的肽的优选片段是包含依照 SEQ ID NO:3 和 / 或依照 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列的多肽。

[0057] 依照本发明的衍生物是包含依照 SEQ ID NO:1、3 和 / 或 5 的氨基酸序列但具有另外的修饰和 / 或改变的多肽。

[0058] 在一个实施方案中,依照本发明的细胞内容素的衍生物的所述修饰和 / 或改变可以是突变,尤其是缺失、插入、添加、取代或其任何组合,和 / 或氨基酸残基的化学改变,例如生物素化、乙酰化、PEG 化、氨基、SH 或羧基基团的化学变化。依照本发明的所述衍生物呈现 PVPSE1gp146(SEQ ID NO:1) 的溶解活性和 / 或依照本发明的所述片段活性。所述活性可为 PVPSE1gp146 活性和 / 或依照本发明的片段活性的约 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190 或约 200%。所述活性可由本领域技术人员通过本领域公知的测定法来测量,例如平板裂解(plate lysis) 测定法或液体裂解(liquid lysis) 测定法,其例如描述于(Briers 等, J. Biochem. Biophys. Methods 70:531-533, (2007))。

[0059] 在本发明优选的实施方案中,依照本发明的多肽、片段和 / 或衍生物还在 N 端或 C 端包含标签,诸如 His6 标签、Strep 标签、Avi 标签、Myc 标签、Gst 标签、JS 标签、半胱氨酸标签、FLAG 标签,或其他本领域公知的标签。在本发明优选的实施方案中,所述标签与依照

本发明的多肽、片段和 / 或衍生物在 C 端连接。所述标签可通过额外的氨基酸残基与所述多肽、片段和 / 或衍生物连接。所述额外的氨基酸残基可由至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个额外氨基酸残基组成。在本发明优选实施方案中,所述标签通过额外的氨基酸残基 Leu-Glu 或 Lys-Gly 连接于依照本发明的多肽、片段和 / 或衍生物。在优选的实施方案中,本发明涉及包含依照 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列的多肽。与具有依照 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的多肽相比,具有依照 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列的多肽分别包含额外的 C 端 His6- 标签,所述标签通过额外的氨基酸残基赖氨酸和甘氨酸 (Lys-Gly) 与具有依照 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的多肽的 C 端连接。此外,在第 2 和第 3 位导入了 BamHI 限制性位点。包含依照 SEQ ID NO:7 的氨基酸残基的多肽优选由依照 SEQ ID NO:8 的核苷酸序列编码。

[0060] 本发明的另一个方面是这样的融合蛋白,其由依照本发明的多肽、片段和 / 或衍生物,以及与该依照本发明的多肽、片段和 / 或衍生物多肽在 N 端或 C 段融合以增强该细胞内容素针对革兰氏阴性细菌的活性的、具有膜破坏活性或 LPS 破坏活性的肽段构成。优选地,所述肽段是根据 W02010023207 的阳离子性肽和 / 或多聚阳离子性肽,通过提述将该文件完整并入本文。

[0061] 依照本发明的融合蛋白的肽段优选与依照本发明的多肽、片段和 / 或衍生物共价连接。优选地,所述肽段由至少 5 个、更优选至少 6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 或至少 100 个氨基酸残基组成。特别优选的肽段包含约 5 至约 100 个氨基酸残基、约 5 至约 50 个或约 5 至 30 个氨基酸残基。更优选的肽段包含约 6 至约 42 个氨基酸残基、约 6 至约 39 个氨基酸残基、约 6 至约 38 个氨基酸残基、约 6 至约 31 个氨基酸残基、约 6 至约 25 个氨基酸残基、约 6 至约 24 个氨基酸残基、约 6 至约 22 个氨基酸残基、约 6 至约 21 个氨基酸残基、约 6 至约 20 个氨基酸残基、约 6 至约 19 个氨基酸残基、约 6 至约 16 个氨基酸残基、约 6 至约 14 个氨基酸残基、约 6 至约 12 个氨基酸残基、约 6 至约 10 个氨基酸残基或约 6 至约 9 个氨基酸残基。优选地,所述肽段不是诸如 His6 标签、Strep 标签、Avi 标签、Myc 标签、Gst 标签、JS 标签、半胱氨酸标签、FLAG 标签、或其他本领域公知标签的标签,也不是硫氧还蛋白或麦芽糖结合蛋白 (MBP)。然而,该肽段可额外的包含此类标签或多个标签等,其用于纯化或定位蛋白。

[0062] 本发明还涉及编码根据本发明的多肽、片段、衍生物和 / 或融合蛋白的分离的核酸分子。根据本发明的特别优选的核酸分子包含根据 SEQ ID NO:2、6 或 18 的核酸序列。本发明还涉及包含根据本发明的核酸分子的载体。所述载体可提供根据本发明的所述多肽、片段、衍生物和 / 或融合蛋白的组成型或诱导型表达。本发明还涉及用于从微生物获得所述多肽、片段、衍生物和 / 或融合蛋白的方法,如经遗传修饰的合适的宿主细胞,其表达所述多肽、片段、衍生物和 / 或融合蛋白。所述宿主细胞可为微生物如细菌或酵母,或者动物细胞例如哺乳动物细胞特别是人细胞。在本发明的一个实施方案中,所述宿主细胞是大肠杆菌细胞。宿主可仅由于生物技术上的原因选取,例如产量、溶解度、成本等,但也可从医药的观点来选取,例如,非病理性细菌或酵母或人细胞。本发明的另一个方面涉及用于遗传转化合适的宿主细胞以获得本发明的多肽、片段、衍生物和 / 或融合蛋白的表达的方法,其中

所述宿主细胞是通过将编码所述多肽、片段、衍生物和 / 或融合蛋白的遗传物质引入所述宿主细胞,并通过本领域技术人员众所公知的遗传工程方法获得其翻译和表达来遗传修饰的。

[0063] 在另一个方面本发明涉及组合物,优选药物组合物,其包含依照本发明的多肽、片段、衍生物和 / 或融合蛋白和 / 或经下述核酸分子或载体转化的宿主,所述核酸分子或载体包含编码根据本发明的多肽、片段、衍生物和 / 或融合蛋白的核苷酸序列。

[0064] 在本发明优选实施方案中,所述组合物包含其他的试剂,其渗透革兰氏阴性细菌的外膜,如金属螯合剂例如 EDTA、TRIS、乳酸、乳铁蛋白、多粘菌素、柠檬酸和 / 或其他如 Vaara (Agents that increase the permeability of the outer membrane. Vaara M. Microbiol Rev. 1992 Sep; 56 (3): 395-441) 所述的物质。还优选的是包含上述提及的渗透剂的组合的组合物。特别优选的是包含约 10 μ M 至约 100mM EDTA、更优选约 50 μ M 至约 10mM EDTA、更优选约 0.5mM 至约 10mM EDTA、更优选约 0.5mM 至约 2mM EDTA、更优选约 0.5mM 至约 1mM EDTA 的组合物。还优选包含约 0.5mM 至约 2mM EDTA,更优选约 1mM EDTA 以及另外约 10 至约 100mM TRIS 的组合物。

[0065] 本发明还涉及用作药物的根据本发明的多肽、片段、衍生物和 / 或融合蛋白和 / 或经包含编码根据本发明的多肽、片段、衍生物和 / 或融合蛋白的核苷酸序列的核酸转化的宿主。在其他方面,本发明涉及根据本发明的多肽、片段、衍生物和 / 或融合蛋白和 / 或经包含下述核酸分子的载体转化的宿主在制备用于治疗 and / 或预防与病原性革兰氏阴性细菌相关的病症、疾病或病状中的用途,所述核酸分子包含编码根据本发明的多肽、片段、衍生物和 / 或融合蛋白的核苷酸序列。具体而言,待治疗和 / 或预防的病症、疾病或病状可以由下述包含人或动物的病原性菌株的细菌组、科、属或种的革兰氏阴性细菌引起,如肠杆菌科 (埃希氏菌属 (*Escherichia*) 特别是大肠杆菌、沙门氏菌属 (*Salmonella*)、志贺氏菌属 (*Shigella*)、柠檬酸杆菌属 (*Citrobacter*)、爱德华氏菌属 (*Edwardsiella*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、哈夫尼菌属 (*Hafnia*)、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*) 特别是肺炎克雷伯氏菌 (*K. pneumoniae*)、摩根氏菌属 (*Morganella*)、变形杆菌属 (*Proteus*)、普罗维登斯菌属 (*Providencia*)、沙雷氏菌属 (*Serratia*)、耶尔森氏菌属 (*Yersinia*)、假单胞菌科 (*Pseudomonadaceae*) (假单胞菌属特别是铜绿假单胞菌、伯克霍尔德氏菌属 (*Burkholderia*)、寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas*)、希瓦氏菌属 (*Shewanella*)、鞘胺醇单胞菌属 (*Sphingomonas*)、丛毛单胞菌属 (*Comamonas*)、奈瑟氏菌属 (*Neisseria*)、莫拉氏菌属 (*Moraxella*)、弧菌属 (*Vibrio*)、气单胞菌属 (*Aeromonas*)、布鲁氏菌属 (*Brucella*)、弗朗西斯氏菌属 (*Francisella*)、博德特氏菌属 (*Bordetella*)、军团菌属 (*Legionella*)、巴尔通氏体属 (*Bartonella*)、考克斯氏体属 (*Coxiella*)、嗜血杆菌属 (*Haemophilus*)、巴斯德氏菌属 (*Pasteurella*)、曼氏菌属 (*Mannheimia*)、放线杆菌属 (*Actinobacillus*)、加德纳氏菌属 (*Gardnerella*)、螺旋体科 (*Spirochaetaceae*) (密螺旋体属 (*Treponema*) 和疏螺旋体属 (*Borrelia*))、钩端螺旋体科 (*Leptospiraceae*)、弯曲杆菌属 (*Campylobacter*)、螺杆菌属 (*Helicobacter*)、螺菌属 (*Spirillum*)、链杆菌属 (*Streptobacillus*)、类杆菌科 (*Bacteroidaceae*) (类杆菌属 (*Bacteroides*)、梭杆菌属 (*Fusobacterium*)、普雷沃氏菌属 (*Prevotella*)、卟啉单胞菌 (*Porphyromonas*))、不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、特别是鲍氏不动杆菌 (*A. baumannii*)。特别的,待治疗和 / 或预防的病症、疾病或病状可由铜绿假单胞

菌、恶臭假单胞菌、类鼻疽伯克霍尔德氏菌、大肠杆菌和 / 或鼠伤寒沙门氏菌造成。

[0066] 本发明还涉及包含根据本发明的多肽、片段、衍生物和 / 或融合蛋白和 / 或经下述核酸转化的宿主的药物,所述核酸包含编码根据本发明的多肽、片段、衍生物和 / 或融合蛋白的核苷酸序列。

[0067] 在其他方面,本发明涉及在需要治疗和 / 或预防的受试者中治疗病症、疾病或病状的方法,所述方法包括施与所述受试者有效量的根据本发明的多肽、片段、衍生物和 / 或融合蛋白和 / 或有效量的经下述核酸转化的宿主或根据本发明的组合物,所述核酸包含编码根据本发明的多肽、片段、衍生物和 / 或融合蛋白的核苷酸序列。所述受试者可为人或动物。

[0068] 具体而言,所述治疗方法可用于治疗和 / 或预防由革兰氏阴性细菌特别是上述列举的革兰氏阴性细菌造成的皮肤,软组织,呼吸系统,肺,消化道,眼,耳,牙齿,鼻咽,口,骨,阴道,菌血症 (bacteraemia) 伤口和 / 或心内膜炎的感染。

[0069] 用于本发明的治疗 (或预防) 方法中的施用剂量和途径取决于待治疗的具体疾病 / 感染位置。施用途径可例如为经口、局部、鼻咽、肠胃外、静脉内、直肠或任何其他施用途径。对于将根据本发明的多肽、片段、衍生物和 / 或融合蛋白和 / 或有效量的经核酸 (所述核酸包含编码根据本发明的多肽、片段、衍生物和 / 或融合蛋白的核苷酸序列) 转化的宿主或根据本发明的组合物施用于感染位置 (或有受感染危险的位置),可使用下述制剂,所述制剂保护活性化合物免受环境影响如蛋白酶、氧化、免疫应答等,直至其抵达感染位置。因此,所述制剂可为胶囊、锭剂、丸剂、栓剂、可注射溶液或任何其他医药上合理的盖仑 (galenic) 制剂。优选地,所述盖仑制剂可包含合适的载体、稳定剂、调味剂、缓冲剂或其他合适的试剂。例如,对于局部施用,所述制剂可为洗液或硬膏 (plaster),对于鼻咽施用所述试剂可为通过喷雾施与鼻部的盐水溶液。

[0070] 优选地,如果待治疗 (或预防) 的感染是由多重抗性的细菌菌株,特别是针对一种或多种下述抗生素具有抗性的菌株造成时,将根据本发明的多肽、片段、衍生物和 / 或融合蛋白用于医疗,所述抗生素为:链霉素、四环素、头孢噻吩、庆大霉素、头孢噻肟、头孢菌素、头孢他啶或亚胺培南。此外,根据本发明的多肽、片段、衍生物和 / 或融合蛋白可通过将其与常规的抗细菌剂如抗生素、硫醚抗生素、细菌素或细胞内容素等组合给药而用于治疗方法。

[0071] 本发明还涉及包含一个或多个隔室的药物包 (pharmaceutical pack),其中至少一个隔室包含一种或多种根据本发明的多肽、片段、衍生物和 / 或融合蛋白和 / 或一种或多种经下述核酸转化的宿主或根据本发明的组合物,所述核酸包含编码根据本发明的多肽、片段、衍生物和 / 或融合蛋白的核苷酸序列。

[0072] 在另一个方面本发明涉及制备药物组合物的方法,所述方法包括将可药用的稀释剂、赋形剂或载体与一种或多种根据本发明的多肽、片段、衍生物和 / 或融合蛋白和 / 或一种或多种经下述核酸转化的宿主混合,所述核酸包含编码根据本发明的多肽、片段、衍生物和 / 或融合蛋白的核苷酸序列。

[0073] 在甚至其他方面,本发明的组合物是化妆组合物。几种细菌菌种可导致患者的身体暴露于环境的表面如皮肤的刺激。为了预防此类刺激或者为了消除所述细菌病原体的次要病候 (minor manifestation),可使用特定的化妆制备物,其包含足够量的根据本发明的

多肽、片段、衍生物和 / 或融合蛋白以降解已经存在或新沉降的病原性革兰氏阴性细菌。

[0074] 在其他方面,本发明涉及根据本发明的多肽、片段、衍生物和 / 或融合蛋白作为诊断手段用于医药、食品或饲料或环境诊断,特别是作为诊断手段用于诊断细菌感染,特别是由革兰氏阴性细菌造成的细菌感染。在此方面,根据本发明的多肽、片段、衍生物和 / 或融合蛋白可用作工具以特异性降解病原性细菌,特别是革兰氏阴性病原性细菌。通过根据本发明的多肽、片段、衍生物和 / 或融合蛋白使得细菌细胞降解可通过添加去污剂如 Triton X-100 或其他减弱细菌细胞包膜 (envelope) 的添加剂如多粘菌素 B 来支持。需要特定细胞降解作为后续对细菌进行特异性检测的起始步骤,所述检测使用基于核酸的方法如 PCR、核酸杂交或 NASBA (基于核酸序列的扩增),免疫方法如 IMS、免疫荧光或 ELISA 技术,或其他依赖于细菌细胞的细胞成分的方法如使用对独特细菌组或种具有特异性的酶测定法 (例如, β -半乳糖苷酶之于肠细菌,凝固酶之于凝固酶阳性菌株)。在其他方面,本发明涉及根据本发明的多肽、片段、衍生物和 / 或融合蛋白用于处理或防止革兰氏阴性细菌污染食品、食品加工设备、食品加工厂、与食品接触的表面如架子和食品储藏区域以及在所有其他病原性、偶发病原性 (facultative pathogenic) 或其他不受欢迎的细菌可潜在地感染食品材料情况下,医疗设备和医院和诊所中所有类型的表面时。

[0075] 具体而言,本发明的多肽、片段、衍生物和 / 或融合蛋白可预防性地用作消毒剂。所述消毒剂可在手术之前或之后使用,或者例如在血液透析过程中使用。而且,早产婴儿和免疫妥协的个体,或有假体装置需要的那些受试者,可用根据本发明的融合蛋白治疗。所述治疗可为预防性的,或在急性感染过程中进行。在相同背景下,医院内感染,特别是由抗生素抗性菌株如铜绿假单胞菌 (FQRP),不动杆菌属菌种和肠杆菌科如大肠杆菌、沙门氏菌属、志贺氏菌属、柠檬酸杆菌属、爱德华氏菌属、肠杆菌属、哈夫尼菌属、克雷伯氏菌属、摩根氏菌属、变形杆菌属、普罗维登斯菌属、沙雷氏菌属和耶尔森氏菌属菌种造成的感染可预防性地或在急性期中用根据本发明的多肽、片段、衍生物和 / 或融合蛋白来治疗。因此,根据本发明的多肽、片段、衍生物和 / 或融合蛋白还可用作与其他可用于消毒溶液的成分如去污剂、tensid、溶剂、抗生素、硫醚抗生素或细菌素组合使用的消毒剂。

[0076] 下述实施例解释本发明,但并不视为限定性的。除非另行指出,使用如 Sambrock 等,1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 所述的分子生物学标准方法。

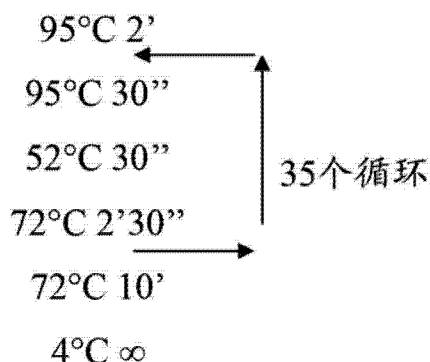
[0077] 实施例 1: PVP-SE1gp146 及其 N 端 PK 融合的变体 PK-PVP-SE1gp146

[0078] 肠炎沙门氏菌噬菌体 PVPSE1 的模块性细胞内溶素及其 N 端 PK 融合变体 PK-PVP-SE1gp146 的克隆、表达和纯化

[0079] PVP-SE1gp146 (236 个氨基酸长, MW=25325Da) 是来源于肠炎沙门氏菌噬菌体 PVPSE1 的模块性细胞内溶素, 预测为具有一个 N 端肽聚糖结合结构域 (从氨基酸 3 至 39), 和一个属于溶菌酶样家族的 C 端催化性壳聚糖酶结构域 (从氨基酸 81 至 234) (见图 1)。

[0080] 用纯化噬菌体 PVPSE1 基因组 DNA (获自 S. Santos 博士, Universidade do Minho, Braga, Portugal) 作为模板, 使用 Pfu 聚合酶 (Fermentas, Ontario, Canada) 进行标准 PCR 反应来扩增编码细胞内溶素 PVP-SE1gp146 的可读框 (ORF146)。使用了下述 PCR 参数:

[0081]



[0082] 该 PCR 的正向引物（引物 1）和反向引物（引物 2）显示于表 1。

[0083] 表 1- 在 ORF146 的标准 PCR 扩增以及在用于对 ORF146 添加 N 端 PK 标签的巢式 PCR 中使用的引物

[0084]

#引物名称	引物序列
1. ORF146正向引物	ATGGGATCCAATGCTGCAATTGCGGAGA SEQ ID NO:9
2. ORF146反向引物	CGAGGTTAGAACAGATTTTCCT SEQ ID NO:10
3.延长的ORF146正向引物	ATGGGATCCAAACGCAAGAAACGTAAGAAACGCAAAAATGCTGCAATTGCGGAGA SEQ ID NO:11

[0085]

[0086] 为了使 ORF146 的 5' 端延伸编码多聚阳离子性 9 聚肽 Lys-Arg-Lys-Lys-Arg-Lys-Lys-Arg-Lys- 的基因片段,用延伸的 5' 引物（引物 3, SEQ ID NO:11,表 1）和标准 3' 引物（引物 2, SEQ ID NO:10,表 1）进行巢式 PCR（按照与上述 PCR 相同的参数）。然后遵循制造商提供的 TA 克隆规程将获得的两个 PCR 片段连接到可商购的 **pEXP5CT/TOPO®** 表达载体（Invitrogen, Carlsbad, CA, USA）中,使得细胞内溶素 ORF/ 蛋白质的 3' /C 端侧与纯化所需的 6x 组氨酸标签融合。所得的重组 PVP-SE1gp146 和 PK-PVP-SE1gp146 细胞内溶素的 DNA 的氨基酸序列分别示于 SEQ ID NO:7（重组 PVPSE1gp146 的氨基酸序列）,SEQ ID NO:8（重组 PVPSE1gp146 的核苷酸序列）,SEQ ID NO:12（重组 PK-PVPSE1gp146 的 DNA 序列）,和 SEQ ID NO:13（重组 PK-PVPSE1gp146 的氨基酸序列）。

[0087] 在指数生长中的大肠杆菌 BL21（λ DE3）pLysS 细胞中用 1mM IPTG（异丙基硫代半乳糖苷）16℃ 诱导过夜之后进行 PVP-SE1gp146/PK-PVP-SE1gp146 的重组表达。然后利用 **pEXP5CT/TOPO®** 表达载体所表达的 C 端 6xHis- 标签,通过 Ni²⁺ 亲和色谱（Akta FPLC, GE Healthcare）纯化该细胞内溶素。

[0088] Ni²⁺ 亲和层析以下述四个步骤进行,均为室温：

[0089] 1. 用 10 个柱体积的洗涤缓冲液（70mM 咪唑,0.5mM NaCl 和 20mM NaH₂PO₄-NaOH, pH7.4）以 0.5ml/ 分钟的流速平衡 Histrap HP1ml 柱（GE Healthcare）。

[0090] 2. 将总裂解物（连同所需的细胞内溶素）以 0.5ml/ 分钟的流速上样于 Histrap

HP1ml 柱。

[0091] 3. 用 15 个柱体积的洗涤缓冲液以 1ml/ 分钟的流速洗涤柱。

[0092] 4. 用 10 个柱体积的洗脱缓冲液 (500mM 咪唑, 5mM NaCl 和 20mM NaH₂PO₄-NaOH, pH7.4) 以 0.5ml/ 分钟的流速从柱洗脱结合的细胞内溶素

[0093] 重组 PVP-SE1gp146/PK-PVP-SE1gp146 纯化的产率如表 2 所示。蛋白浓度是通过在 280nm 波长的分光光度法确定的。两种蛋白在洗脱缓冲液 (20mM NaH₂PO₄-NaOH pH7.4; 0.5M NaCl; 500mM 咪唑) 中的纯化储液在 SDS-PAGE 凝胶上目测确定为至少为 90% 纯 (图 2)。

[0094] 表 2-280nm 分光光度测量确定的每升大肠杆菌表达培养物的纯化重组 PVP-SE1gp146/PK-PVP-SE1gp146 细胞内溶素的产率。PK 修饰变体的产率几乎是未修饰的 PVP-SE1gp146 的 2 倍高, 这揭示了 PK 标签对蛋白质表达的稳定化作用。

[0095]

细胞内溶素	表达产率
PVP-SE1gp146	38.18 mg/L
PK-PVP-SE1gp146	65.15 mg/L

[0096] 实施例 2: 肠炎沙门氏菌噬菌体内溶素 PVPSE1gp146 的生化溶胞壁活性的表征和确定

[0097] 为了定量溶胞壁活性, 使用了经过对细胞内溶素活性敏感化的、外膜通透化铜绿假单胞菌 PA01_{Krylov} (从 State Institute for Genetics of Industrial Microorganisms, 1st Dorozhnii proezd1, 113545 Moscow, Russia PA01_{Krylov} 的 V. Krylov 教授处获得的 PA01_{Krylov}) 细胞底物。在有该底物存在的条件下, 创建了 PVPSE1gp146 在洗脱缓冲液中的酶活性的饱和曲线, 显示肽聚糖降解活性 (表示为每分钟 OD_{655nm} 下降) 作为一定范围的不同细胞内溶素浓度 (以 nM 表示) 的函数 (图 3)。测量一式三份地进行, 底物溶解在对酶活性而言最优的 KH₂PO₄/K₂HPO₄ 缓冲液中, 其 pH7.3, 离子强度为 80mM。

[0098] 根据 Cheng 等人 (2004) 及 Briers 等人 (2007) 对酶活性的定义经过调适后的版本, 利用对该饱和曲线的线性部分的最佳线性回归的斜率来确定溶胞壁活性值:

[0099]

$$(\text{斜率 } (\Delta\text{OD}_{655\text{nm}}/\text{min})) / \text{mM}$$

$$\text{活性 (以单位/mM计)} = \frac{\quad}{\quad}$$

$$0.001$$

[0100] 利用上式, PVPSE1gp146 当溶于洗脱缓冲液中时具有 15,005,330 单位 /mM 的溶胞壁活性值。

[0101] 实施例 3: 与肠炎沙门氏菌噬菌体 PVP-SE1 的内溶素的 N 端抗细菌肽融合物

[0102] 1. 抗细菌标签融合的 PVP-SE1gp146 构建体的克隆、表达和纯化

[0103] 将 PVP-SE1gp146N 端融合于一组天然抗菌肽标签（见表 3）以提高其抗革兰氏阴性活性并拓宽其细菌宿主范围。这些标签是基于它们的两亲性、疏水性或多聚阳离子性质以及短的长度被选择和开发出来的。该表包含文献中选出的若干已知的抗菌肽，它们来源于昆虫、两栖动物或鱼类，并已证明对革兰氏阴性菌株高效率地作用；还有三种设计的抗菌肽标签。图 4 例示了修饰的标签 -PVP-SE1gp146 变体的一种可能的二维模块性结构。

[0104] 表 3- 与 PVP-SE1gp146 融合的抗菌肽标签的列表

[0105]

标签	描述+大小	氨基酸序列	参考文献
T4-溶菌酶的 α 4-螺旋	两亲性螺旋 (13 aa)	PNRAKRVITTFRT (SEQ ID NO:14)	Matthews*
五肽(设计的)	疏水性 (5 aa)	FFVAP (SEQ ID NO:15)	Briers <i>et al.</i> , 2008
Artilysin 1 (设计的)	疏水性 (18 aa)	GFFIPAVILPSIAFLIVP (SEQ ID NO:16)	Walmagh
Artilysin 2 (设计的)	两亲性螺旋 (25 aa)	GKPGWLIKKALVFKKLIRRPLKRLA (SEQ ID NO:17)	Walmagh
Parasin 1	α -螺旋肽 (19 aa)	KGRGKQGGKVRAKAKTRSS (SEQ ID NO:18)	Park, Y <i>et al.</i> , 1998
Lycotoxin I	两亲性螺旋(25 aa)	IWLTALKFLGKHAACKLAKQQLSKL (SEQ ID NO:19)	Yan & Adams, 1988

[0106] 除了五肽 (PP) 标签之外，使用不依赖连接的克隆 (LIC) 技术 (Berrow *et al.*, 2007, A versatile ligation-independent cloning method suitable for high-throughput expression screening applications) 的经改造的版本将所有抗菌肽融合于编码 PVP-SE1gp146 的 ORF。因此，利用特别设计的 5' 正向引物 (GGAATG GGGAGCTCCTCCAATGCTGCAATTGCGGAGAT; SEQ ID NO:30) 和标准的 PVP-SE1gp146 反相引物 (CGAGGTTAGAACAGATTTTGCCT, SEQ ID NO:10) 对噬菌体 OBP 的纯的基因组 DNA 进行巢式 PCR，将唯一的 *Ecl*136II 限制性位点插入在 PVP-SE1gp146 编码基因的前方。然后按照生产商的 TA 克隆操作规程，将该延伸的片段连接到 pEXP5CT/TOPO® 表达载体

(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 中。将纯质粒在 *Ecl*136II 限制性消化中切割一次,并向经切割的质粒中插入杂合的肽盒(通过引物对的杂合生成,见表 4),而没有必要的连接步骤。为了 N 端五肽标签融合,对纯化的 pEXP5-CT/PK-OBPgpLys 质粒 DNA 用编码该五肽的延伸的 5' 引物(ATGGGATCCTTCTTCGTAGCACCGGGCTCCTCCAATGCTGCAAT, SEQ ID NO:31; 加下划线的是该五肽)进行巢式 PCR。通过测序分析验证表达载体中片段的正确插入,然后将构建体导入合适的大肠杆菌 BL21 (DE3) pLysS 表达系统中。

[0107] 表 4- 用于在与 PVP-SE1gp146 融合前杂合抗细菌肽标签的引物

[0108]

Tag	正向引物	反向引物
T4-溶菌酶的 α 3-螺旋	TTGGAATGGGGAGCCCGAACCGT GCAAAACGTGTAATCA (SEQ ID NO:20)	CATTGGAGGAGCCGGTACGGAAGGTGGTG ATTACACGTT (SEQ ID NO:21)
Artilysin 1 (设 计的)	TTATGGGCTTCTTCATCCCGGCA GTAATCCTGCCCTCCA (SEQ ID NO:22)	CATTGGAGGAGCCCGGTACGATCAGGAAT GCGATGGAGGGCAGGAT (SEQ ID NO:23)
Artilysin 2 (设 计的)	TTATGGGCAAACCGGGCTGGCTG ATCAAAAGGCACTGGTATTCAAG A (SEQ ID NO:24)	CATTGGAGGAGCCTGCCAGTCTCTTCAGC GGACGACGGATCAGTTTCTTGAATACCA (SEQ ID NO:25)
Parasin 1	TTGGAATGGGGAGCAAAGGCCG TGGCAAGCAGGGAGGCAAAGTA CGTG (SEQ ID NO:26)	CATTGGAGGAGCCTGAGGAACGGGTCTTT GCTTTTGACGTACTTTGC (SEQ ID NO:27)
Lycotoxin 1	GGAATGGGGAGCATCTGGCTGA CCGCACTGAAATTCCTCGGCAAA CACGCCGCAA (SEQ ID NO:28)	CATTGGAGGAGCCCAGTTTGGATAATTGC TGTTTTGCCAGTTTCTTTGCGGCGTGTT (SEQ ID NO:29)

[0109] 在溶原性培养液 (LB) 中的指数生长的细胞 ($OD_{600nm}=0.6$) 中用 1mM 异丙基- β -D-硫代半乳吡喃糖苷诱导来进行标准表达。表达参数如温度、时间和表达菌株等根据具体蛋白质而异,以便使得修饰的细胞内容物的可溶性表达水平最优(见表 5)。为了纯化,收集来自表达培养物 (500-600ml) 的细胞 (4500rpm, 30min, 4°C), 并在 1/25 体积的裂解缓冲液 (10mM 咪唑、20mM NaH_2PO_4 , 0.5M NaCl, pH7.4) 中重悬。将该悬液冷冻/融解 3 次,然后超声处理 (8x30s, 变幅 (amplitude) 40%, 在 Vibra CellTM, Sonics, Dandurly, CT, USA 上进行), 并通过 0.45 和 0.22 μm Durapore 膜滤器 (Millipore, Billerica, MA, USA) 过滤。根据生产商的说明,应用 Ni^{2+} 亲和层析 (HisTrap HP1ml 柱, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), 通过一步法规程完成带 His- 标签的融合蛋白的纯化。 Ni^{2+} 亲和层析以后述四个步骤进行,均为室温:

[0110] 1. 用 10 个柱体积的洗涤缓冲液（视蛋白质而定的咪唑量（60–70mM），0.5mM NaCl 和 20mM NaH_2PO_4 -NaOH, pH7.4）以 0.5ml/ 分钟的流速平衡 Histrap HP1ml 柱（GE Healthcare）。

[0111] 2. 将总裂解物（连同所需的细胞内溶素）以 0.5ml/ 分钟的流速上样于 Histrap HP1ml 柱。

[0112] 3. 用 15 个柱体积的洗涤缓冲液以 1ml/ 分钟的流速洗涤柱。

[0113] 4. 用 10 个柱体积的洗脱缓冲液（500mM 咪唑，5mM NaCl 和 20mM NaH_2PO_4 -NaOH, pH7.4）以 0.5ml/ 分钟的流速从柱洗脱结合的细胞内溶素。

[0114] 洗涤缓冲液包含低的咪唑浓度，其根据具体蛋白质而异，以确保更高的蛋白质纯度（参见表 5）。每升大肠杆菌表达培养物的重组蛋白质总产率也显示于表 5 当中。数值是通过在 280nm 波长分光光度法测量的蛋白质浓度和纯化的储液的总体积来确定的。如 SDS-PAGE 凝胶上目测确定的那样，纯化的储液至少为 90% 纯的（数据未显示）。

[0115] 表 5-N 端融合的 PVP-SE1gp146 构建体的表达参数和每升表达培养物获得的蛋白质产率。ON= 过夜；* = 大肠杆菌 Codon Plus RIL, Agilent Technologies Catalog nr. 230245, 基因型 = 大肠杆菌 B F-ompT hsdS(rB⁻mB⁻)dcm+Tet^r gal λ (DE3) endA Hte[argU⁺ileY⁺leuW⁺Cam^r]

[0116]

修饰的细胞内溶素	温度/时间	[咪唑] (以mM计)	菌株	蛋白质产率 (以mg/l计)
α4-PVP-SE1gp146	16°C/ON	60	大肠杆菌	1.5
PP-PVP-SE1gp146	16°C/ON	70	大肠杆菌	4.3
Artilysin1-PVP-SE1gp146	16°C/ON	65	大肠杆菌	5.1
Artilysin2- PVP-SE1gp146	16°C/ON	70	大肠杆菌	3.2
Parasin1- PVP-SE1gp146	16°C/ON	60	大肠杆菌	2.4
Lycotoxin1-PVP-SE1gp146	16°C/ON	60	大肠杆菌	1.7

[0117] 1. N 端标签融合的 PVP-SE1gp146 变体的体外抗细菌活性

[0118] 为了确定抗细菌标签融合物是否对 PVP-SE1gp146 的体外抗细菌活性有正面影响，用 2 种不同的革兰氏阴性细菌：大肠杆菌 XL1Blue 和食物病原体伤寒沙门氏菌 LT2 测试了某些 N 端标签融合的 PVP-SE1gp146 变体（对于 Artilysin2-PVPSE1gp146 和 Lycotoxin1-PVPSE1gp146）。为了最优化它们的抗细菌性质，加入少量外膜通透化剂乙二胺四乙酸二钠（EDTA- Na_2 ）。

[0119] 将指数生长的革兰氏阴性细菌细胞 ($OD_{600nm}=0.6$) 稀释 100 倍至最终密度为大约 10^6 个细胞 /ml, 并在室温不震荡的条件下与 $5 \mu M$ 的不同的修饰 PVP-SE1gp146 变体、以及有和没有 $0.5mM$ EDTA- Na_2 一起温育 30 分钟。在温育之后, 将细胞悬浮液稀释三次, 从 10^6 细胞 /ml 开始到 10^5 细胞 /ml, 然后再到 10^4 细胞 /ml, 最后到 10^3 细胞 /ml 的浓度, 然后将每个稀释液 $100 \mu l$ 在 LB 培养基上铺板。37°C 过夜温育之后计数残余的菌落。基于计数得到的细胞数, 计算以对数单位计的相对失活化作为抗细菌活性 ($\log_{10}(N_0/N_i)$, 其中 N_0 = 未处理的细胞数, N_i = 经处理的细胞数, 均在温育之后计数) (图 6)。

[0120] 表 6- $5 \mu M$ N 端标签融合的 PVP-SE1gp146 变体在无 (A) 和有 (B) $0.5mM$ EDTA- Na_2 条件下对革兰氏阴性细菌的体外抗细菌活性, 与未修饰的 PVP-SE1gp146 比较。抗细菌活性作为以对数单位计 ($\log_{10}(N_0/N_i)$, 其中 N_0 = 未处理的细胞数, N_i = 经处理的细胞数, 在温育之后计数) 的相对失活化来定量。所有样品三次重复。显示了平均值 $\pm$ 标准偏差。观察到的最大减少依赖于 10 细胞 /ml 的检测水平和初始细胞密度。

[0121] A)

[0122]

		鼠伤寒沙门氏菌		大肠杆菌	
Artilyls2-PVPSE1gp146		0.12	0.12	0.10	0.09
PVPSE1gp146		0.19	0.10	0.10	0.09

[0123] B)

[0124]

		鼠伤寒沙门氏菌		大肠杆菌	
Artilyls2-PVPSE1gp146	EDTA	0.41	0.25	0.16	0.10
Lycotox1-PVPSE1gp146	EDTA	0.87	0.28	0.34	0.15
PVPSE1gp146	EDTA	0.44	0.11	0.11	0.06

[0125] 在没有外膜通透化剂 EDTA 时, 在鼠伤寒沙门氏菌和大肠杆菌中仅能检测到低水平的抗细菌活性。在包含 EDTA 的样品中可以观察到更强的抗细菌活性。具有 Artilysin2 修饰的融合蛋白具有针对鼠伤寒沙门氏菌的良好抗细菌活性。然而, 该活性在未修饰的变体 PVP-SE1gp146 的范围之内。具有 Lycotoxin1 修饰的融合蛋白的针对鼠伤寒沙门氏菌的抗细菌活性进一步提高。该 Lycotoxin 融合蛋白和 Artilysin2 融合蛋白对大肠杆菌也具有抗细菌活性, 其中该活性与针对鼠伤寒沙门氏菌的抗细菌活性相比在更低的水平。

[0126] **实施例 4:** 重组 PVP-SE1gp146 及其 PK 融合变体 PK-PVP-SE1gp146 的热稳定性

[0127] 温度在 PVP-SE1gp146/PK-PVP-SE1gp146 的稳定性中起主要作用, 因此在它们的酶活性或溶胞壁活性中也起主要作用。升高温度可容易地打断蛋白质的三维结构中的氢键和非极性疏水相互作用, 导致蛋白质变性及其酶功能的部分丧失。为了考察 PVP-SE1gp146 和 PK-PVP-SE1gp146 的热稳定性, 将这两种细胞内溶素在 Biometra T3000 热循环仪 (Göttingen, Germany) 中不同温度下 ($42, 50, 60, 70, 80, 90$ 和 $100^\circ C$) 温育不同的时间间

隔 (42 和 50℃ 为 1、2、3、4、8 和 24 小时, 从 50 至 100℃ 为 1 小时内每 10 分钟 (each 10 minutes during 1 hours)。在热温育之后, 将 30 μ l 的每个经温育的样品加入 270 μ l 经过外膜通透化的铜绿假单胞菌 PA01 (PA01_{Krylov}, 获自 V. Krylov 教授, State Institute for Genetics of Industrial Microorganisms, 1st Dorozhnii proezd 1, 113545 Moscow, Russia) 细胞底物 (Lavigne et al., 2004**), 追踪作为时间函数的光密度 (OD_{655nm})。将每个样品一式三份地温育和测试。根据 Briers 等人 (2007)** 的文章, 基于 OD_{655nm}/ 时间曲线来定量每个样品的酶活性或溶胞壁活性, 并表示为相对于未加热的参比样品在时间 0 的活性 (=100% 活性) 的百分比。图 5 中显示了在 42℃ 和 50℃ 下在 24 小时的时间间隔内温育的结果。选择 42℃ 的值是因为其模拟发热的体温条件, 而 50℃ 是热不稳定蛋白质变性的临界温度。

[0128] PVP-SE1gp146 和 PK-PVP-SE1gp146 在 42℃ 都是热稳定的 (图 5A), 即使在 24h 温育后亦然。甚至在 50℃ (图 5B), PVP-SE1gp146 的溶胞壁活性经过 24h 的时间段也没有显著改变。相反, PK-PVP-SE1gp146 在 8 和 24h 时间点之间丧失了其初始活性的 30%, 这可能是由于 PK 标签的存在所致。在 42℃ 温育 2h 以及 50℃ 温育 3h 之后, PK-PVP-SE1gp146 的溶胞壁活性甚至显著上升。可能的是, 更高的温度最初可抑制因 PK 修饰导致的活性减少; 该效应随着温育时间增加而减小。

[0129] 由于 PVP-SE1gp146 在 50℃ 24h 之后仍然显示完全的活性, 还测定了 PVP-SE1gp146/PK-PVP-SE1gp146 在 50-100℃ 的更高温度下, 分别在 1h 和 40min 的温育时间内的热稳定性 (图 6)。在 0、20、40 和 60 分钟的时间点测量了 PVP-SE1gp146 的活性 (图 6A), 在 0、20、30 和 40 分钟的时间点测量了 PK-PVP-SE1gp146 的活性 (图 6B)。

[0130] 图 6A 显示 PVP-SE1gp146 在 80℃ 温育 1h 后仍然保持其最大活性, 但在 100℃, 20 分钟的短时间温育即足以将其活性降低超过 80%。如上述图 5 所描述的, 在高于 50℃ 的各温度, PK-PVP-SE1gp146 的活性逐渐降低。在 80℃ 温育 30 分钟后该细胞内溶素已经几乎丧失其全部活性。

[0131] 这些结果突出了未修饰的 PVP-SE1gp146 的强热稳定性, 使得它成为用于食品保鲜“围栏法” (hurdle approach) 的引人注目的候选者。温和热处理与 PVP-SE1gp146 的组合可以用来高效率地减少食品病原体而不损失食品产品的质量。

[0132] 引用的参考文献

[0133] Cheng, X., Zhang, X., Pflugrath, J. W. and Studier, F. W. (1994) The structure of bacteriophage T7 Lysozyme, a zinc amidase and an inhibitor of T7 RNA polymerase. Proc Natl Acad Sci U S A 91, 4034 - 4038.

[0134] Briers Y., Lavigne R., Volckaert, G. and Hertveldt, K. (2007a) A standardized approach for accurate quantification of murein hydrolase activity in high-throughput assays. Journal of Biochemical and Biophysical Methods 70, 531-533.

[0135] 本领域技术人员通过考虑本说明书和实施本说明书公开的发明, 将容易想到本发明的其他实施方案。本说明书和实施例应被视为仅是例示性的, 本发明的真实范围和精髓由下述权利要求来示明。

[0001]

序列表

<110> 勒芬天主教大学, K.U. 勒芬 R&D (Katholieke Universiteit Leuven K. U. Leuven R&D)
米尼奥大学 (University of Minho)

<120> 新的细胞内容素

<130> LYS-014 PCT

<140> 未知

<141> 2011-11-03

<150> GB 1018518.9

<151> 2010-11-03

<160> 31

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 235

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> wt PVPSE1gp146

<400> 1

Met Asn Ala Ala Ile Ala Glu Ile Gln Arg Met Leu Ile Glu Gly Gly
1 5 10 15

Phe Ser Val Gly Lys Ser Gly Ala Asp Gly Leu Tyr Gly Pro Ala Thr
20 25 30

Lys Ala Ala Leu Gln Lys Cys Ile Ala Gln Ala Thr Ser Gly Asn Asn
35 40 45

Lys Gly Gly Thr Leu Lys Leu Thr Gln Ala Gln Leu Asp Lys Ile Phe
50 55 60

Pro Val Gly Ala Ser Ser Gly Arg Asn Ala Lys Leu Lys Pro Leu Asn
65 70 75 80

Asp Leu Phe Glu Lys Thr Glu Ile Asn Thr Val Asn Arg Val Ala Gly
85 90 95

Phe Leu Ser Gln Ile Gly Val Glu Ser Ala Glu Phe Arg Tyr Val Arg
100 105 110

Glu Leu Gly Asn Asp Ala Tyr Phe Asp Lys Tyr Asp Thr Gly Pro Ile
115 120 125

Ala Glu Arg Leu Gly Asn Thr Pro Gln Lys Asp Gly Asp Gly Ala Lys
130 135 140

Tyr Lys Gly Arg Gly Leu Ile Gln Val Thr Gly Leu Ala Asn Tyr Lys
145 150 155 160

Ala Cys Gly Lys Ala Leu Gly Leu Asp Leu Val Asn His Pro Glu Leu
165 170 175

Leu Glu Gln Pro Glu Tyr Ala Val Ala Ser Ala Gly Trp Tyr Trp Asp
180 185 190

Thr Arg Asn Ile Asn Ala Ala Cys Asp Ala Asp Asp Ile Val Lys Ile
195 200 205

[0002]

Thr Lys Leu Val Asn Gly Gly Thr Asn His Leu Ala Glu Arg Thr Ala
210 215 220

Tyr Tyr Lys Lys Ala Lys Ser Val Leu Thr Ser
225 230 235

<210> 2
<211> 711
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> wt ORF146 of PVPSE1

<400> 2
atgaatgctg caatigcga gattcagcgt atgctgatcg aaggtagggt tagcgtcggc 60
aagctcggig ctgatggatt gtacggaccg gctacaaaag ccgcacigca aaagtgcatt 120
gcacaggcta ccagtggaag caataaagga ggtacttga aactaccca agcacacig 180
gacaaaatct tcccgctgg tgaagtctt gggaggaaag caaaaticct gaagccgctc 240
aatgacctgt ttgaaagac agagattaat acggtaaatc gggttcagg attcctgtct 300
cagattggig tggagtgcgc ggagttccgg taatgacgtg aactcggtaa cgtgcctac 360
ttgacaagt acgacatgg tcttatigca gaaagacttg gaaacacacc ccagaaagat 420
gggatggig ccaagtacaa ggggagaggt ctgaltcagg tgaccggact cgcaaacac 480
aaggcttgcg gtaagcaat cggcttgac ctgitaacc accctgagti gcttgaacag 540
ctgagtagt cagttgccag cgtcgttgg taatgggaca cgagaacat caacgccgt 600
tgcgatgtg atgatatgt gaaaattacc aagctggtaa acggtgtgac aaatcacctt 660
gccgagcgca cagcctatta caaaaaggca aaatcgttc taacctcgt a 711

<210> 3
<211> 37
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PVPSE1 的肽聚糖结合区域(peptidoglycan binding domain of PVPSE1)

<400> 3

Ala Ala Ile Ala Glu Ile Gln Arg Met Leu Ile Glu Gly Gly Phe Ser
1 5 10 15

Val Gly Lys Ser Gly Ala Asp Gly Leu Tyr Gly Pro Ala Thr Lys Ala
20 25 30

Ala Leu Gln Lys Cys
35

<210> 4
<211> 111
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PVPSE1 的肽聚糖结合区域(peptidoglycan binding domain of PVPSE1)

<400> 4
gctgcaatig cggagattca gcgtatgctg atcgaagggt gggttagcgt cggcaagtct 60
ggtagctgat gatgtacgg acccgctaca aaagccgcac tgcaaaagt c 111

<210> 5

[0003]

<211> 153
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PVPSE1 的催化区 (catalytic domain of PVPSE1)

<400> 5

Asp Leu Phe Glu Lys Thr Glu Ile Asn Thr Val Asn Arg Val Ala Gly
 1 5 10 15

Phe Leu Ser Gln Ile Gly Val Glu Ser Ala Glu Phe Arg Tyr Val Arg
 20 25 30

Glu Leu Gly Asn Asp Ala Tyr Phe Asp Lys Tyr Asp Thr Gly Pro Ile
 35 40 45

Ala Glu Arg Leu Gly Asn Thr Pro Gln Lys Asp Gly Asp Gly Ala Lys
 50 55 60

Tyr Lys Gly Arg Gly Leu Ile Gln Val Thr Gly Leu Ala Asn Tyr Lys
 65 70 75 80

Ala Cys Gly Lys Ala Leu Gly Leu Asp Leu Val Asn His Pro Glu Leu
 85 90 95

Leu Glu Gln Pro Glu Tyr Ala Val Ala Ser Ala Gly Trp Tyr Trp Asp
 100 105 110

Thr Arg Asn Ile Asn Ala Ala Cys Asp Ala Asp Asp Ile Val Lys Ile
 115 120 125

Thr Lys Leu Val Asn Gly Gly Thr Asn His Leu Ala Glu Arg Thr Ala
 130 135 140

Tyr Tyr Lys Lys Ala Lys Ser Val Leu
 145 150

<210> 6
 <211> 459
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PVPSE1 的催化区 (catalytic domain of PVPSE1)

<400> 6

gacctgtttg aaaagacaga gattaatacg gtaaatcggg ttgcaggatt cctgtotcag 60
 attggtgtgg agtcggcgga gticcgggat gtacgtgaac tcggtacga tgcctacttt 120
 gacaagtaag acactggicc tatgcagaa agacttggaa acacacccca gaaagatggg 180
 gatgggtcca agtacaaggg gagaggcttg aticaggta cgggactcgc aaactacaag 240
 gcttgcggta aagcactcgg tcttgacctc gtaaccacc ctgagttgct tgaacagcct 300
 gagtatgcag ttgccagcgc tggttggtat tgggacacga gaaacatcaa cgccgottgc 360
 gatgctgatg atatcgtgaa aattaccaag ctggtaaacg gtggtacasa tcaccttgcc 420
 gagcgacag cctattacaa aaaggcaaaa tctgttcta 459

<210> 7
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0004]

<220>
 <223> 重组体 PVPSE1gp146
 <400> 7
 Met Gly Ser Asn Ala Ala Ile Ala Glu Ile Gln Arg Met Leu Ile Glu
 1 5 10 15
 Gly Gly Phe Ser Val Gly Lys Ser Gly Ala Asp Gly Leu Tyr Gly Pro
 20 25 30
 Ala Thr Lys Ala Ala Leu Gln Lys Cys Ile Ala Gln Ala Thr Ser Gly
 35 40 45
 Asn Asn Lys Gly Gly Thr Leu Lys Leu Thr Gln Ala Gln Leu Asp Lys
 50 55 60
 Ile Phe Pro Val Gly Ala Ser Ser Gly Arg Asn Ala Lys Leu Lys Pro
 65 70 75 80
 Leu Asn Asp Leu Phe Glu Lys Thr Glu Ile Asn Thr Val Asn Arg Val
 85 90 95
 Ala Gly Phe Leu Ser Gln Ile Gly Val Glu Ser Ala Glu Phe Arg Tyr
 100 105 110
 Val Arg Glu Leu Gly Asn Asp Ala Tyr Phe Asp Lys Tyr Asp Thr Gly
 115 120 125
 Pro Ile Ala Glu Arg Leu Gly Asn Thr Pro Gln Lys Asp Gly Asp Gly
 130 135 140
 Ala Lys Tyr Lys Gly Arg Gly Leu Ile Gln Val Thr Gly Leu Ala Asn
 145 150 155 160
 Tyr Lys Ala Cys Gly Lys Ala Leu Gly Leu Asp Leu Val Asn His Pro
 165 170 175
 Glu Leu Leu Glu Gln Pro Glu Tyr Ala Val Ala Ser Ala Gly Trp Tyr
 180 185 190
 Trp Asp Thr Arg Asn Ile Asn Ala Ala Cys Asp Ala Asp Asp Ile Val
 195 200 205
 Lys Ile Thr Lys Leu Val Asn Gly Gly Thr Asn His Leu Ala Glu Arg
 210 215 220
 Thr Ala Tyr Tyr Lys Lys Ala Lys Ser Val Leu Thr Ser Lys Gly His
 225 230 235 240
 His His His His His
 245

<210> 8
 <211> 741
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 重组体 PVPSE1gp146
 <400> 8
 atgggatcca atgctgcaat tgcggagatt cagcgtatgc tgatcgaagg tgggttttagc 60

[0005]

gtcggcaagt ctggtgctga tggatigtac ggacccgcta caaaagccgc actgcaaaag	120
tgcattgcac aggtaccag tggaaacaat aaaggaggta ctltgaaact caccaagca	180
caactggaca aaatcttccc cgttggtgca agttctggga ggaatgcaaa attcctgaag	240
ccgcicaaig accigtitga aaagacagag attaatacgg taaatcgggi tgcaggattc	300
ctgtctcaga ttggttgga gtccggcgag ttccggtag tacgtgaact cggtaacgat	360
gcctacttfg acaagtacga cactggicci attgcagaaa gacttggaaa cacacccag	420
aaagatgggg atggtgcca gtacaagggg agaggctga ttccaggtag cggactegca	480
aactacaagg ctgcggtaa agcactcgtt ctgacctcg ttaaccacc tgagttgctt	540
gaacagccig agtatgcagt tggcagcgt ggttggattt gggacacgag aaacatcaac	600
gccgcttgcg atgctgaiga tatcgtgaaa attaccaagc tggtaaacgg tggtaacaa	660
caccttgcg agcgacagc ctattacaaa aaggcaaat ctgttctaac ctogaagggt	720
catcatcacc atcaccattg a	741
<210> 9 <211> 28 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> ORF146 正向引物	
<400> 9 atgggatcca atgctgcaat tgcggaga	28
<210> 10 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> ORF146 反向引物	
<400> 10 cgaggataga acagattttg cct	23
<210> 11 <211> 55 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 延长的 ORF146 正向引物	
<400> 11 atgggatcca aacgaagaa acgtaagaaa cgcaaaaatg ctgcaattgc ggaga	55
<210> 12 <211> 768 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 重组 PK-PVPSE1gp146 的 DNA 序列	
<400> 12 atgggatcca aacgaagaa acgtaagaaa cgcaaaaatg ctgcaattgc ggagattcag	60
cgtaigtga tcgaaggtag gttagcgtc ggcaagtcgt gtgcgatgg attgtacgga	120
cccgtacaa angecgact gcaaaagtc attgcacagg ctaccagtag aaacaataaa	180
ggaggtactt tgaactcac ccaagcaca cttgacaaaa tcttccccgt tggigcaagt	240
tciggaggga atgcaaaatt ccgaagccg ctcaatgacc tgittgaaaa gacagagatt	300

[0006]

```

aatcaggtaa atcgggttgc aggatcccg tctcagattg gttgggagtc ggcggagttc 360
cggtaigtac gtgaactcgg taacgatgcc tacttggaca agtacgacac tggtcctatt 420
gcagaaagac ttggaacac accccagaaa gatggggaig gtccaagta caaggggaga 480
ggtcigtatt aggtgaccgg actcgcaaac tacaaggcct gcggtaaagc actcggctct 540
gaccicgtta accaccctga gtgccttga cagcccgagt atgcagtggc cagcgttggt 600
tggtaittggg acacgagaaa catcaacgcc gcttgcgatg ctgatgatat cgtgaaaatt 660
accaagctgg taaacggigg tacaatcac ctggccgagc gcacagccta ttacaaaaag 720
gcaaaatcig tctaacctc gaagggtcat catcacatc accattga 768

```

<210> 13
 <211> 254
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 重组 PK-PVPSEIgp146 的氨基酸序列

<400> 13

```

Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Asn Ala Ala Ile
1           5           10          15

```

```

Ala Glu Ile Gln Arg Met Leu Ile Glu Gly Gly Phe Ser Val Gly Lys
20          25          30

```

```

Ser Gly Ala Asp Gly Leu Tyr Gly Pro Ala Thr Lys Ala Ala Leu Gln
35          40          45

```

```

Lys Cys Ile Ala Gln Ala Thr Ser Gly Asn Asn Lys Gly Gly Thr Leu
50          55          60

```

```

Lys Leu Thr Gln Ala Gln Leu Asp Lys Ile Phe Pro Val Gly Ala Ser
65          70          75          80

```

```

Ser Gly Arg Asn Ala Lys Leu Lys Pro Leu Asn Asp Leu Phe Glu Lys
85          90          95

```

```

Thr Glu Ile Asn Thr Val Asn Arg Val Ala Gly Phe Leu Ser Gln Ile
100         105         110

```

```

Gly Val Glu Ser Ala Glu Phe Arg Tyr Val Arg Glu Leu Gly Asn Asp
115         120         125

```

```

Ala Tyr Phe Asp Lys Tyr Asp Thr Gly Pro Ile Ala Glu Arg Leu Gly
130         135         140

```

```

Asn Thr Pro Gln Lys Asp Gly Asp Gly Ala Lys Tyr Lys Gly Arg Gly
145         150         155         160

```

```

Leu Ile Gln Val Thr Gly Leu Ala Asn Tyr Lys Ala Cys Gly Lys Ala
165         170         175

```

```

Leu Gly Leu Asp Leu Val Asn His Pro Glu Leu Leu Glu Gln Pro Glu
180         185         190

```

```

Tyr Ala Val Ala Ser Ala Gly Trp Tyr Trp Asp Thr Arg Asn Ile Asn
195         200         205

```

```

Ala Ala Cys Asp Ala Asp Asp Ile Val Lys Ile Thr Lys Leu Val Asn

```

[0007]

210	215	220
Gly Gly Thr Asn His Leu Ala Glu Arg Thr Ala Tyr Tyr Lys Lys Ala		
225	230	235 240
Lys Ser Val Leu Thr Ser Lys Gly His His His His His His		
	245	250
<210> 14		
<211> 13		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> T4-溶菌酶的 $\alpha 4$ -螺旋		
<400> 14		
Pro Asn Arg Ala Lys Arg Val Ile Thr Thr Phe Arg Thr		
1	5	10
<210> 15		
<211> 5		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 五肽		
<400> 15		
Phe Phe Val Ala Pro		
1	5	
<210> 16		
<211> 18		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> Artilysin 1		
<400> 16		
Gly Phe Phe Ile Pro Ala Val Ile Leu Pro Ser Ile Ala Phe Leu Ile		
1	5	10 15
Val Pro		
<210> 17		
<211> 25		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> Artilysin 2		
<400> 17		
Gly Lys Pro Gly Trp Leu Ile Lys Lys Ala Leu Val Phe Lys Lys Leu		
1	5	10 15
Ile Arg Arg Pro Leu Lys Arg Leu Ala		
	20	25
<210> 18		
<211> 19		
<212> PRT		
<213> 人工序列		

[0008]

<220>
 <223> Parasin 1
 <400> 18
 Lys Gly Arg Gly Lys Gln Gly Gly Lys Val Arg Ala Lys Ala Lys Thr
 1 5 10 15
 Arg Ser Ser
 <210> 19
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Lycotoxin 1
 <400> 19
 Ile Trp Leu Thr Ala Leu Lys Phe Leu Gly Lys His Ala Ala Lys Lys
 1 5 10 15
 Leu Ala Lys Gln Gln Leu Ser Lys Leu
 20 25
 <210> 20
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> T4-溶菌酶的 α 4-螺旋的正向引物
 <400> 20
 ttggaatggg gagcccgaaac cgigcaaaac gigtatca 39
 <210> 21
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> T4-溶菌酶的 α 4-螺旋的反向引物
 <400> 21
 catggagga gccggtacgg aagggtggga itacacgtt 39
 <210> 22
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Artilysin 1 的正向引物
 <400> 22
 ttatgggett cticaccccg gcagtaatcc igccotcca 39
 <210> 23
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Artilysin 1 的反向引物
 <400> 23
 catggagga gcccggiacg atcaggaatg cgaiggaggg caggat 46
 <210> 24

[0009]

```

<211> 47
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Artilysin 2 的正向引物

<400> 24
ttatgggcaa accgggcigg ctgatcaaaa ggcactggia ttcaaga 47

<210> 25
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Artilysin 2 的反向引物

<400> 25
cattggagga gcccgccagt ctcttcagcg gacgacggat cagtttcttg aatacca 57

<210> 26
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Parasin 1 的正向引物

<400> 26
ttggantggg gagcaaggc cgtggcagc agggaggcaa agtacgig 48

<210> 27
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Parasin 1 的反向引物

<400> 27
cattggagga gcccgaggaa cgggtctttg cttttgcacg tactttgc 48

<210> 28
<211> 55
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Lycotoxin 1 的正向引物

<400> 28
ggaatgggga gcatctggct gaccgcacig aaattcctcg gcaaacacgc cgcaa 55

<210> 29
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Lycotoxin 1 的反向引物

<400> 29
cattggagga gcccgatttg gataattgct gttttgccag ttcttttgcg gcgtgtt 57

<210> 30
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 巢式 PCR 的 5' 正向引物

<400> 30

```

[0010]

ggaatgggga gctcctccaa tgctgcaatt ggggagat	38
<210> 31	
<211> 44	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 五肽的扩增 5' 正向引物	
<400> 31	
atgggatcct tcttcgtagc accgggctcc tccaatgctg caat	44

> PVPSE1 的野生型 ORF146 的 DNA 序列 (711 bp)

ATGAATGCTGCAATTGCGGAGATTGAGCGTATGCTGATCGAAGGTGGGTTTAGCGTCG
GCAAGTCTGGTGCTGATGGATTGTACGGACCCGCTACAAAAGCCGCACTGCAAAAGTG
CATTGCACAGGCTACCAAGTGGAAACAATAAAGGAGGTACTTTGAAACTCACCCAAGCAC
AACTGGACAAAATCTTCCCCGTTGGTGCAAGTTCTGGGAGGAATGCAAAATTCCTGAAG
CCGCTCAATGACCTGTTTGAAAAGACAGAGATTAATACGGTAAATCGGGTTGCAGGATT
CCTGTCTCAGATTGGTGTGGAGTCGGCGGAGTTCCGGTATGTACGTGAACTCGGTAAAC
GATGCCTACTTTGACAAGTACGACACTGGTCCTATTGCAGAAAGACTTGGAACACACACC
CCAGAAAGATGGGGATGGTGCCAAGTACAAGGGGAGAGGTCTGATTCAGGTGACCGGA
CTCGCAAACCTACAAGGCTTGCGGTAAAGCACTCGGTCTTGACCTCGTTAACCAACCTGA
GTTGCTTGAACAGCCTGAGTATGCAGTTGCCAGCGCTGGTTGGTATTGGGACACGAGA
AACATCAACGCCGCTTGCGATGCTGATGATATCGTGAAAATTACCAAGCTGGTAAACGG
TGGTACAAATCACCTTGCCGAGCGCACAGCCTATTACAAAAGGCCAAAATCTGTTCTAA
CCTCGTAA

> 野生型 PVPSE1gp146 的蛋白质序列 (236 个氨基酸)

MNAIAIEIQRM¹LIEGGFSVGKSGADGLYGPATKAALQKCI²⁰AQATSGNNKGGTLKLTQAQLDK
IFPVGASSGRNAKLKPLNDLFEKTEINTVNRVAGFLSQIGVESAEFRYVRELGNDAFYDKYD
TGPIAERLGNT⁴⁰PQKDGDAKYKGRGLIQVTGLANYKACGKALGLDLVNHPELLEQPEYAVA
SAGWYWDTRNINAACDADDIVKITKL⁶⁰VNGGTNHLAERTAYYKKAKSVLTS

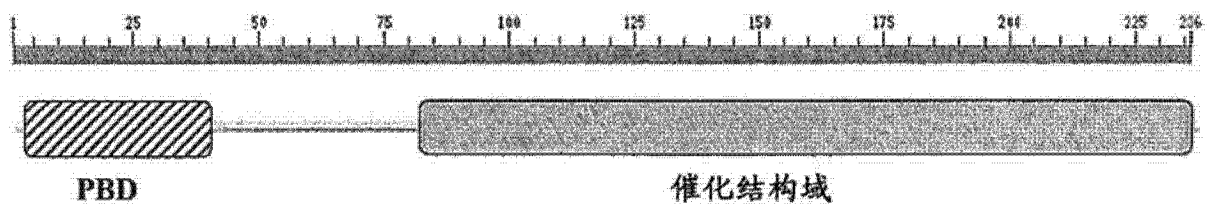


图 1

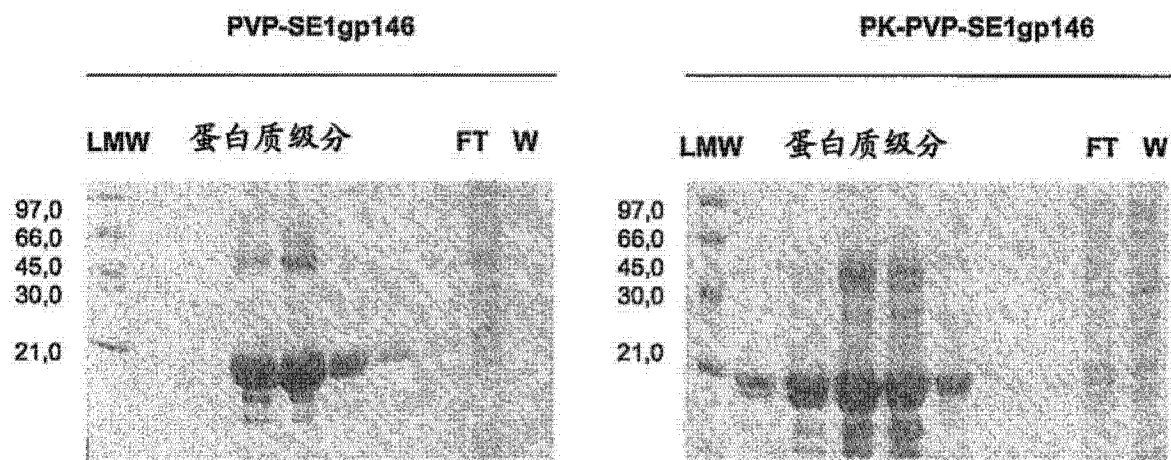


图 2

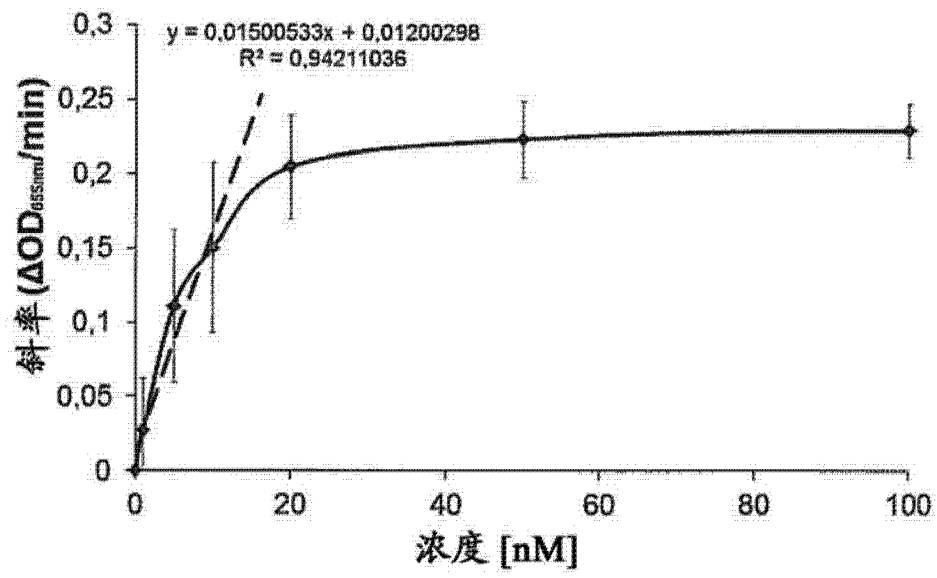


图 3



图 4

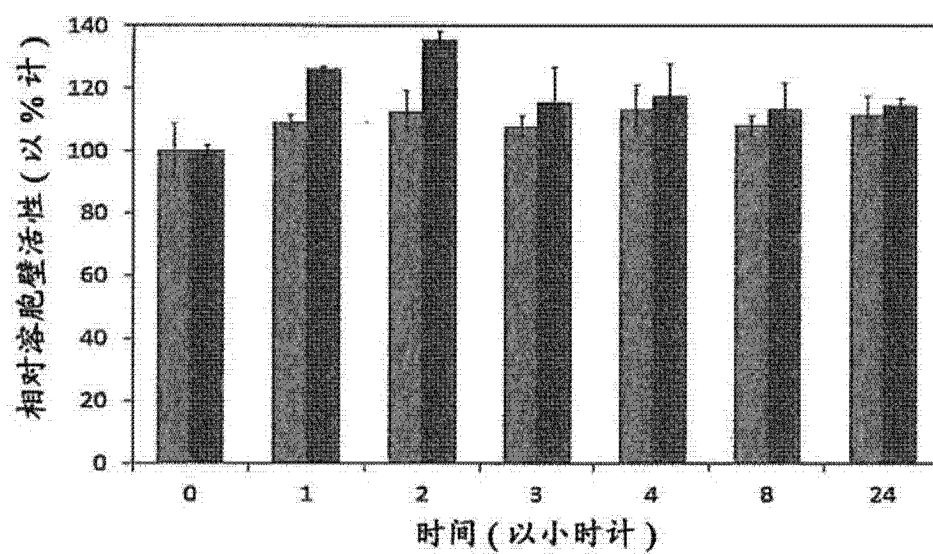
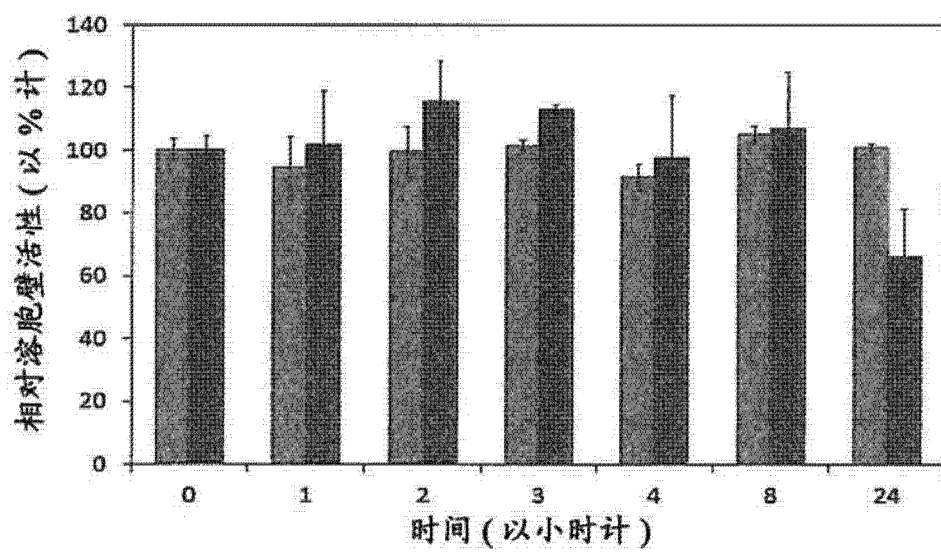
A**B**

图 5

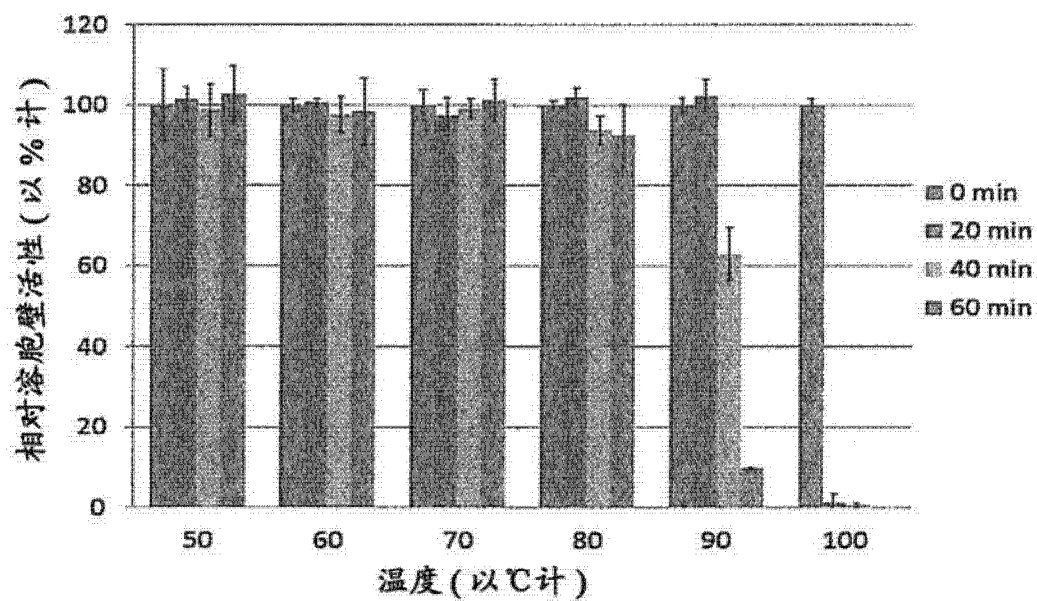
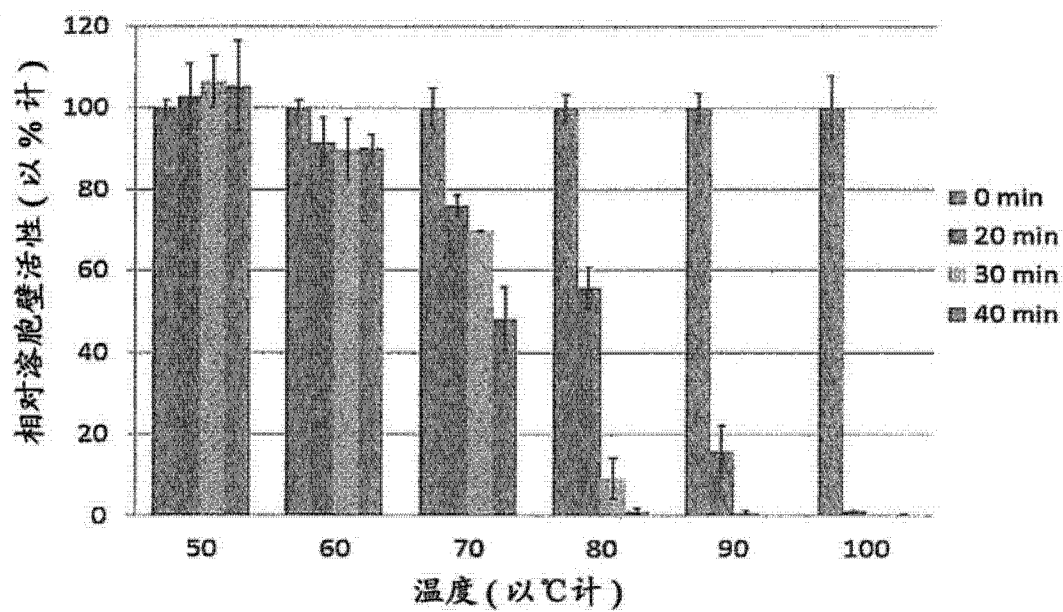
A**B**

图 6