



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201300539 A1

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 01 月 01 日

(21)申請案號：100140109

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 11 月 03 日

(51)Int. Cl.：

C12N9/36 (2006.01)

C12N15/62 (2006.01)

A61K38/47 (2006.01)

A61P31/04 (2006.01)

A23L3/3571 (2006.01)

A61L12/14 (2006.01)

A61L101/54 (2006.01)

(30)優先權：2010/11/03

英國

1018518.9

(71)申請人：魯汶天主教大學研發處 (比利時) KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN, K. U. LEUVEN R&D (BE)

比利時

米尼奧大學 (葡萄牙) UNIVERSITY OF MINHO (PT)

葡萄牙

(72)發明人：羅帝格斯 艾茲瑞德 西西里亞 范倫德 喬安那 RODRIGUES AZEREDO, JOANA CECILIA VALENTE (PT)；布蘭卡 鐸斯 山多斯 羅柏特 西奧米奧 BRANCO DOS SANTOS, SILVIO ROBERTO (PT)；可洛肯斯 多羅西雅 李奧那德斯 KLUSKENS, LEONARDUS DOROTHEA (NL)；拉維涅 羅布 LAVIGNE, ROB (BE)；外瑪 馬汀 WALMAGH, MAARTEN (BE)

(74)代理人：洪澄文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：19 項 圖式數：6 共 63 頁

(54)名稱

新型內溶素

NOVEL ENDOLYSIN

(57)摘要

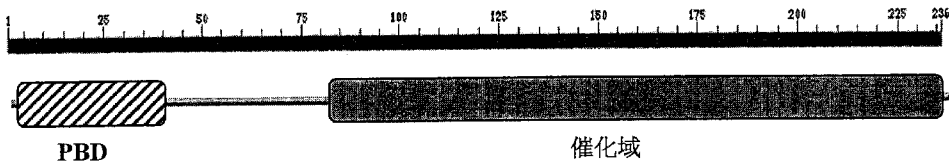
本發明有關包含序列識別號 1 所示的氨基酸序列的具有內溶素活性的多肽及其片段或衍生物，或其衍生的融合蛋白。此外，本發明有關編碼所述多肽或融合蛋白的核酸分子、包含所述核酸分子的載體和包含所述核酸分子或所述載體中任一的宿主細胞。另外，本發明有關作為藥物(特別是用於治療或預防革蘭氏陰性細菌感染)、作為診斷手段、作為化妝用物質或作為消毒劑使用的所述多肽、片段、衍生物或融合蛋白。本發明還有關所述多肽、片段、衍生物或融合蛋白用於處理或預防食品、食物加工設備、食物加工廠、與食品接觸的表面、醫學裝置、醫院和診所的表面的革蘭氏陰性細菌污染的用途。此外，本發明有關包含所述多肽、片段、衍生物或融合蛋白的藥物組合物。

> PVPSE1的wt ORF146的DNA序列(711bp)

ATGAATGCTGCAATTGCGGAGATTACGCGTATGCTGATCGAAGGTGGGTTTAGCGTCG
 GCAAGTCTGGTGCTGATGGATTGTACGGACCCGCTACAAAAGCCGCACTGCAAAAAGTG
 CATTGCACAGGCTACCACTGGAAACAATAAAGGAGGTACTTTGAACTCACCCAAGCAC
 AACTGGACAAAATCTTCCCCGTTGGTGCAAGTTCTGGGAGGAATGCAAAATTCCTGAAG
 CCGCTCAATGAOCTGTTTGAAAAGACAGAGATTAAATACGGTAAATGGGGTTGCAGGATT
 CCTGTCTCAGATTGGTGTTGGAGTGGGCGGAGTTCCGGTATGTACGTGAAGTCCGGTAAC
 GATGCCCTACTTTGACAAGTAAGACACTGGTCTTATTGCAGAAAGACTTGGAAACACACC
 CCAGAAACATGGGGGATGGTGCCAAAGTACAAGGGGGACAGGTCTGATTCAAGGTGACCGGA
 CTCGCAAACTACAAGGCTTGGCGSTAAAGCACTGGGTCTTGAACTCGTTAACCACCTGA
 GTTGGCTGAACAGGCTGAGTATGCAGTTGCCAGCGCTGGTTGGTATTGGGACACGAGA
 AACATCAACGCCGCTTGGCATGCTGATGATATCGTGAAAATTACCAAGCTGGTAAACGG
 TGGTACAAATCAGCTTGGCCGAGGGCACAGCCATTACAAAAGGCCAAAATCTGTTCTAA
 CCTCGTAA

> wt PVPSE1gpORF146的蛋白質序列(236個氨基酸)

MNAAIAEIQRMLIEGGFSVGKSGADGLYGPATKAALQKCIQAATSGNNKGGTLKLTAQLDK
 IFPVGASSGRNAKLKPLNDLFEKTEINTVNRVAGFLSQIGVESAEFRYVRELNDAYFDKYDI
 GPIAERLGNTPQKDDGAKYKGRGLIQVTGLANYKACGKALGLDLVNHPELLEQPEYAVAS
 AGWYWDTRNINAAODADDIVKITKLVNGGTNHLAERTAYYKKAQSVLTS





(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201300539 A1

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 01 月 01 日

(21)申請案號：100140109

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 11 月 03 日

(51)Int. Cl.：

C12N9/36 (2006.01)

C12N15/62 (2006.01)

A61K38/47 (2006.01)

A61P31/04 (2006.01)

A23L3/3571 (2006.01)

A61L12/14 (2006.01)

A61L101/54 (2006.01)

(30)優先權：2010/11/03

英國

1018518.9

(71)申請人：魯汶天主教大學研發處 (比利時) KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN, K. U. LEUVEN R&D (BE)

比利時

米尼奧大學 (葡萄牙) UNIVERSITY OF MINHO (PT)

葡萄牙

(72)發明人：羅帝格斯 艾茲瑞德 西西里亞 范倫德 喬安那 RODRIGUES AZEREDO, JOANA CECILIA VALENTE (PT)；布蘭卡 鐸斯 山多斯 羅柏特 西奧米奧 BRANCO DOS SANTOS, SILVIO ROBERTO (PT)；可洛肯斯 多羅西雅 李奧那德斯 KLUSKENS, LEONARDUS DOROTHEA (NL)；拉維涅 羅布 LAVIGNE, ROB (BE)；外瑪 馬汀 WALMAGH, MAARTEN (BE)

(74)代理人：洪澄文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：19 項 圖式數：6 共 63 頁

(54)名稱

新型內溶素

NOVEL ENDOLYSIN

(57)摘要

本發明有關包含序列識別號 1 所示的氨基酸序列的具有內溶素活性的多肽及其片段或衍生物，或其衍生的融合蛋白。此外，本發明有關編碼所述多肽或融合蛋白的核酸分子、包含所述核酸分子的載體和包含所述核酸分子或所述載體中任一的宿主細胞。另外，本發明有關作為藥物(特別是用於治療或預防革蘭氏陰性細菌感染)、作為診斷手段、作為化妝用物質或作為消毒劑使用的所述多肽、片段、衍生物或融合蛋白。本發明還有關所述多肽、片段、衍生物或融合蛋白用於處理或預防食品、食物加工設備、食物加工廠、與食品接觸的表面、醫學裝置、醫院和診所的表面的革蘭氏陰性細菌污染的用途。此外，本發明有關包含所述多肽、片段、衍生物或融合蛋白的藥物組合物。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號： 100/40109

※申請日： 100.11.3

※IPC 分類：

C12N 9/36 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

A61K 38/47 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A23L 3/3571 (2006.01)

A61L 12/14 (2006.01)

A61L 101/54 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

新型內容素 / NOVEL ENDOLYSIN

二、中文發明摘要：

本發明有關包含序列識別號 1 所示的氨基酸序列的具有內容素活性的多肽及其片段或衍生物，或其衍生的融合蛋白。此外，本發明有關編碼所述多肽或融合蛋白的核酸分子、包含所述核酸分子的載體和包含所述核酸分子或所述載體中任一的宿主細胞。另外，本發明有關作為藥物(特別是用於治療或預防革蘭氏陰性細菌感染)、作為診斷手段、作為化妝用物質或作為消毒劑使用的所述多肽、片段、衍生物或融合蛋白。本發明還有關所述多肽、片段、衍生物或融合蛋白用於處理或預防食品、食物加工設備、食物加工廠、與食品接觸的表面、醫學裝置、醫院和診所的表面的革蘭氏陰性細菌污染的用途。此外，本發明有關包含所述多肽、片段、衍生物或融合蛋白的藥物組合物。

三、英文發明摘要：

The present invention relates to a polypeptide with endolysin activity comprising an amino acid

sequence according to SEQ ID No. 1 and fragments or derivatives thereof, or fusion proteins derived thereof. Moreover, the present invention relates to nucleic acid molecules encoding said polypeptide or fusion protein, vectors comprising said nucleic acid molecules and host cells comprising either said nucleic acid molecules or said vectors. In addition, the present invention relates to said polypeptide, fragment, derivative or fusion protein for use as a medicament, in particular for the treatment or prevention of Gram-negative bacterial infections, as diagnostic means, as cosmetic substance or as sanitizing agent. The present invention also relates to the use of said polypeptide, fragment, derivative or fusion protein for the treatment or prevention of Gram-negative bacterial contamination of foodstuff, of food processing equipment, of food processing plants, of surfaces coming into contact with foodstuff, of medical devices, of surfaces in hospitals and surgeries. Furthermore, the present invention relates to a pharmaceutical composition comprising said polypeptide, fragment, derivative or fusion protein.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：無。

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無。

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明有關具有如序列識別號 1 所示的氨基酸序列的具有內容素活性的多肽及其片段或衍生物。此外，本發明有關編碼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載體和包含所述核酸分子或所述載體中任一的宿主細胞。另外，本發明有關作為藥物(特別是用於治療或預防革蘭氏陰性細菌感染)、作為診斷手段、作為化妝用物質或作為消毒劑使用的所述多肽、其片段或衍生物。本發明還有關所述多肽、其片段或衍生物用於處理或預防食品、食物加工設備、食物加工廠、與食品接觸的表面、醫學裝置、醫院和診所的表面的細菌污染，特別是革蘭氏陰性污染的用途。此外，本發明有關包含所述多肽、其片段或衍生物的藥物組合物。

【先前技術】

革蘭氏陰性細菌具有以其特徵性不對稱雙層為標誌的

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：無。

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無。

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明有關具有如序列識別號 1 所示的氨基酸序列的具有內溶素活性的多肽及其片段或衍生物。此外，本發明有關編碼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載體和包含所述核酸分子或所述載體中任一的宿主細胞。另外，本發明有關作為藥物(特別是用於治療或預防革蘭氏陰性細菌感染)、作為診斷手段、作為化妝用物質或作為消毒劑使用的所述多肽、其片段或衍生物。本發明還有關所述多肽、其片段或衍生物用於處理或預防食品、食物加工設備、食物加工廠、與食品接觸的表面、醫學裝置、醫院和診所的表面的細菌污染，特別是革蘭氏陰性污染的用途。此外，本發明有關包含所述多肽、其片段或衍生物的藥物組合物。

【先前技術】

革蘭氏陰性細菌具有以其特徵性不對稱雙層為標誌的

外膜。所述外膜雙層由含有磷脂(主要為磷脂酰乙醇胺)的內部單層和主要由單糖脂、脂多糖(LPS)構成的外部單層組成。細菌界中的 LPS 結構存在巨大的多樣性，並且 LPS 結構可以回應於主流環境條件而得到修飾。LPS 層的穩定性和不同 LPS 分子之間的相互作用主要通過二價離子(Mg^{2+} 、 Ca^{2+})與 LPS 分子陰離子成分(磷脂 A 和內核中的磷酸基團以及 KDO 的羧基基團)的靜電相互作用實現。此外，脂質 A 的疏水性模組的密集且有序的包裝，其由於缺乏不飽和脂肪酸而得到促進，形成具有高粘度的剛性結構。這使其對親脂性分子可透過性較低，而且對外膜(OM)賦予額外的穩定性。

具有殺菌或抑菌活性的各種類型的藥劑是已知的，例如抗生素、內溶素、抗微生物肽和防衛素。然而，微生物對抗生素逐漸增加的抗性在治療越來越多由細菌引起的感染方面造成了困難。特定的困難伴隨由革蘭氏陰性細菌如腸桿菌科 (*Enterobacteriaceae*)，諸如沙門氏菌 (*Salmonella* sp.) 和銅綠假單胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 引起的感染出現。

內溶素是由噬菌體(或細菌病毒)編碼的肽聚糖水解酶。它們在噬菌體繁殖的裂解週期中在晚期基因表達過程中合成，而且經由降解細菌肽聚糖來介導後代病毒體自受感染細胞的釋放。它們是 β -(1,4)-糖基化酶(溶菌酶)、轉糖基酶、酰胺酶或內肽酶。Gasson (GB2243611) 在 1991 年已經提示了內溶素的抗微生物應用。儘管內溶素的殺滅

能力久為人知，由於抗生素的成功和主宰地位，這些酶作為抗細菌劑的用途一直受忽略。僅在多重抗生素耐藥性細菌出現後，用內容素對抗人類病原體這一簡單概念方才受到注意。出現了開發完全新穎類型的抗細菌劑的令人矚目的需求，且用作“酶抗生素(enzybiotics)”（“酶”和“抗生素”的組合術語）的內容素完美地符合該需求。在2001年，Fischetti及其同事首次闡明了細菌噬菌體 C1 內容素對 A 組鏈球菌的治療潛力(Nelson 等，2001)。從此，多份文獻確立了內容素作為控制細菌感染，特別是革蘭氏陽性細菌的細菌感染的有吸引力和補充的替代手段。接著，針對其他革蘭氏陽性病原體如肺炎鏈球菌(*Streptococcus pneumoniae*) (Loeffler 等，2001)、炭疽芽孢桿菌(*Bacillus anthracis*) (Schuch 等，2002)、無乳鏈球菌(*Streptococcus agalactiae*) (Cheng 等，2005) 和金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) (Rashel 等，2007) 的不同的內容素證明了其作為酶抗生素的效力。現在，內容素療法的最重要的考驗在於革蘭氏陰性細菌對內容素的外源作用的不敏感性，因為外膜遮罩內容素接近肽聚糖。這目前阻止有效內容素的範圍擴展至重要的革蘭氏陰性病原體。

抗微生物肽(AMP)代表廣泛範圍的短的、陽離子性或兩親性(amphipatic)、由基因編碼的肽抗生素，其可見於幾乎所有生物。不同的 AMP 顯示不同的特性，且該類型中的許多肽不僅作為抗生素，還作為細胞穿透肽的範本正經受

徹底的研究。儘管分享一些共同特徵(例如，陽離子性，兩親性和小尺寸)，AMP 序列變化極大，且已提出至少四種結構組(α -螺旋， β -片層，延伸型(extended)和環狀(looped))引起觀察到的 AMP 構象的多樣性。同樣，已提出了幾種其作為抗生素的作用模式，且顯示例如許多這些肽的主要靶是細胞膜，而對於其他肽，主要靶是細胞質侵襲和核心代謝功能的擾亂。儘管缺乏特異性靶結合，AMP 可變得足夠集中(concentrated)以顯示協作活性(cooperative activity)，例如，通過在膜上形成孔，如對於大部分 AMP 的情況下。然而，該現象僅在模式磷脂雙分子層中觀察到，且在一些情況下，需要在膜中 AMP 的濃度高至每六個磷脂分子一個肽分子來使這些事件發生。所述濃度接近甚至可達到全膜飽和。因為對於 AMP 最低抑制濃度(MIC)通常在低微摩爾範圍，可理解地，對於這些閾值的相關性及其在體內的重要性產生了懷疑(Melo 等, Nature reviews, Microbiology, 2009, 245)。

防衛素是一大家族的小的、陽離子性、富含半胱氨酸和精氨酸的抗微生物肽，見於脊椎動物和無脊椎動物兩者。防衛素根據半胱氨酸的間隔樣式(spacing pattern)分為五個組：植物、無脊椎動物、 α -、 β -和 θ -防衛素。後三種主要見於哺乳動物。 α -防衛素為見於嗜中性粒細胞和腸上皮細胞的蛋白質。 β -防衛素為最廣泛分佈的，並由白細胞和許多類型的上皮細胞所分泌。 θ -防衛素目前很少見，例如見於獼猴(rhesus macaques)的白細胞。防衛素對

細菌、真菌和許多有包膜和無包膜病毒有活性。然而，有效殺滅細菌所需的濃度多數情況下較高，即在微摩爾範圍。許多肽的活性在生理鹽條件、二價陽離子和血清的存在下受限。取決於疏水氨基酸殘基的含量，防衛素亦顯示溶血活性。

如此，需要新的針對革蘭氏陰性細菌的抗微生物劑。

【發明內容】

本發明有關自腸炎沙門氏菌 (*Salmonella enteritis*) 噬菌體 PVPSE1 分離的且可用於製備針對革蘭氏陰性細菌的新型抗細菌劑的具有內溶素活性的新型多肽。

本發明的第一目的提供了一種包含如序列識別號 1 所示的氨基酸序列的具有內溶素活性的多肽或其片段或衍生物。

較佳地，包含如序列識別號 1 所示的氨基酸序列的多肽是由如序列識別號 2 所示的核苷酸序列編碼的。

在一個較佳的實施方案中，所述片段包含如序列識別號 3 和 / 或 5 所示的氨基酸序列，其較佳地分別由序列識別號 4 和 / 或序列識別號 6 所示的核苷酸序列編碼。

在又一個較佳的實施方案中，所述衍生物在如序列識別號 1、3、和 / 或 5 所示的氨基酸序列中具有刪除、添加、插入和 / 或替代。

在又一個較佳的實施方案中，如本發明的所述多肽或其片段或衍生物在 N 端或 C 端與具有膜或 LPS 破壞活性的

肽段，特別是陽離子或聚陽離子肽融合。

所述多肽、其片段或衍生物或融合蛋白可以另外包含標籤，較佳地為 His6-標籤。

在本發明的一個較佳的實施方案中，所述多肽包含如序列識別號 7 所示的氨基酸序列。

本發明的又一個目的有關包含如上述任一項的多肽和在 N 端或 C 端與所述多肽融合的肽段的融合蛋白，其中所述肽段是陽離子肽、聚陽離子肽、兩親肽、壽司(sushi)肽、防衛素、疏水性肽和/或抗微生物肽。

在本發明的一個較佳的實施方案中，所述肽段包含約 5 至約 100 個氨基酸殘基，特別地約 5 至 50 個氨基酸殘基，特別地約 5 至 30 個氨基酸殘基。

在本發明的又一個較佳的實施方案中，所述陽離子和/或聚陽離子肽段包含至少一個選自下組的氨基酸殘基：精氨酸、組氨酸和賴氨酸殘基，特別地其中所述肽段中包含的至少 70%的氨基酸殘基是精氨酸、組氨酸和/或賴氨酸殘基，特別地精氨酸和/或賴氨酸殘基。

在本發明的一個較佳的實施方案中，所述兩親肽包含與至少一個疏水性氨基酸殘基組合的至少一個選自下組的帶正電荷的氨基酸殘基：賴氨酸、精氨酸和組氨酸殘基，所述疏水性氨基酸殘基選自下組：纈氨酸、異亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、半胱氨酸、丙氨酸、酪氨酸、組氨酸、蘇氨酸、絲氨酸、脯氨酸和甘氨酸殘基，特別地其中所述兩親肽中的至少約 70%的所述氨基酸殘基

是精氨酸或賴氨酸殘基，且所述兩親肽中的至少約 30%的所述氨基酸殘基是纈氨酸、異亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、半胱氨酸、丙氨酸、酪氨酸、組氨酸、蘇氨酸、絲氨酸、脯氨酸或甘氨酸殘基。

在本發明的又一個較佳的實施方案中，所述肽段包含如序列識別號 14-19 所示的氨基酸序列。

在本發明的一個具體的較佳實施方案中，所述融合蛋白包含如序列識別號 13 所示的氨基酸序列。

本發明的又一個目的有關包含如申請專利範圍第 13 項的核酸分子的載體。

本發明的又一個目的提供了一種分離的核酸分子，其編碼如本發明的多肽、其片段或衍生物或融合蛋白。

本發明的又一個目的有關包含如本發明的核酸分子的載體。

本發明的又一個目的有關包含如本發明的核酸分子或如本發明的載體的宿主細胞。

本發明的又一個目的有關如本發明的多肽、片段或衍生物或如本發明的融合蛋白，其用作人用醫藥物質、獸用醫藥物質或診斷物質、用作食物中或化妝品上的抗微生物劑、用作消毒劑或者用於環境領域中。

在一個較佳的實施方案中，如本發明的所述多肽、片段或衍生物或融合蛋白在生產用於治療或預防革蘭氏陰性細菌感染的藥物中使用。

另一個較佳的實施方案有關如本發明的所述多肽、片

段或衍生物或融合蛋白用於處理或預防食品、食物加工設備、食物加工廠、與食品接觸的表面、醫學裝置、醫院和診所的表面的革蘭氏陰性細菌污染的用途。

本發明的又一個較佳的實施方案有關包含本發明的多肽或本發明的融合蛋白的藥物組合物。

【實施方式】

定義：

如在本文中出現，則下列術語應當具有下文所列出的定義。

如本文中使用的術語“蛋白質”與術語“多肽”所指相同。本文中使用的術語“蛋白質”指氨基酸殘基通過肽鍵以特定序列連接的直鏈聚合物。蛋白的氨基酸殘基可通過例如共價附著多種基團如糖和磷酸來修飾。其他的物質如血紅素或脂質可更鬆散的與多肽鏈相聯繫，得到綴合的蛋白質，其也包含于本文中使用的術語“蛋白質”中。有多種方式闡明多肽鏈的折疊，特別是針對 α 螺旋和 β 折疊片層的存在。如本文中使用的術語“蛋白質”指所有四種類型的蛋白質，即全 α 、全 β 、 α/β 和 α 加上 β 。

如本文中所使用的，術語“融合蛋白”指源自兩種核酸序列融合的表達產物。此類蛋白質可以例如在重組 DNA 表達系統中生成。此外，如本文中所使用的，術語“融合蛋白”指第一氨基酸序列，如例如內溶素與第二或別的氨基酸序列的融合物。較佳地，所述第二或別的氨基酸序列

是肽段，特別是陽離子肽或聚陽離子肽。較佳地，所述第二和/或別的氨基酸序列對於第一氨基酸序列的任何域而言是外來的，而且與第一氨基酸序列的任何域基本上不是同源的。

如本文中所使用的，術語“肽段”指與諸如內溶素等蛋白質連接的任何種類的肽。然而，本發明意義上的肽段不指 His₆ 標籤、Strep 標籤、Avi 標籤、Myc 標籤、Gst 標籤、JS 標籤、半胱氨酸標籤、FLAG 標籤或本領域中已知的其他標籤、硫氧還蛋白或麥芽糖結合蛋白(MBP)。如本文中所使用的，與術語“肽段”形成對比，術語“標籤”指可用於促進多肽表達和/或親和純化、將多肽固定化於表面或者充當標誌物或標記模組以供例如通過不同 ELISA 測定法形式中的抗體結合來檢測多肽的肽，只要使標籤可用于上文所列輔助作用之一的所述功能不是由所述肽的正電荷引起的。然而，根據各自的 pH，His₆ 標籤也可以是帶正電荷的，但是由於它結合固定化的二價陽離子而作為親和純化工具使用，而不作為如本發明的肽段使用。

如本文中所使用的，術語“肽”指由約 2 至約 100 個氨基酸殘基、更較佳地約 4 至約 50 個氨基酸殘基、更較佳地約 5 至約 30 個氨基酸殘基組成的短的多肽，其中一個氨基酸殘基的氨基基團與另一個氨基酸殘基的羧基基團通過肽鍵連接。肽可以具有特定功能。肽可以是天然存在的肽或合成設計並生成的肽。肽可以例如通過酶促或化學切割自天然蛋白質衍生或取出，或者可以使用常規的肽合成技

術(例如固相合成)或分子生物學技術(參見 Sambrook, J. 等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)) 來製備。

如本文中所使用的,術語“內容素”指適合於水解細菌細胞壁的酶。“內容素”包含至少一個“酶活性域”(EAD),其具有至少一項下列活性:內肽酶、N-乙酰基-胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶(酰胺酶)、N-乙酰基-溶菌酶(muramidase)、N-乙酰基-氨基葡萄糖苷酶(溶菌酶)或轉糖基酶。另外,內容素還可以含有無酶活性,並且結合宿主細菌細胞壁的區域,即所謂的 CBD(細胞壁結合域)。內容素可以含有兩個或更多個 CBD。然而,如本文中所使用的,術語“內容素”還指具有至少一個 EAD 但無 CBD 的酶。一般而言,細胞壁結合域能夠結合細菌表面上的不同成分。較佳地,細胞壁結合域是肽聚糖結合域,而且結合細菌的肽聚糖結構。內容素的不同域可以通過域接頭連接。

如本文中所使用的,術語“域接頭”指發揮使單一蛋白質域彼此連接的功能的氨基酸序列。通常,域接頭不形成或僅形成很少的規則二級結構,如 α -螺旋或 β -片層,並且在各種結構背景的情況中可以佔有不同構象。檢測域接頭和接頭序列特性的方法是本領域公知的,例如記載於 Bae 等, 2005, Bioinformatics, 21, 2264-2270 或 George 和 Heringa, 2003, Protein Engineering, 15, 871-879 的。

如本文中所使用的，術語“野生型”或“wt”指如序列識別號 1 中所描述的內溶素 PVPSE1gp146 的氨基酸序列。編碼野生型內溶素 PVPSE1gp146 的核酸序列在序列識別號 2 中描述。

如本文中所描述的，術語“刪除”指自各自的起始序列除去 1、2、3、4、5 或更多個氨基酸或核酸殘基。

如本文中所使用的，術語“插入”或“添加”指向各自的起始序列插入或添加 1、2、3、4、5 或更多個氨基酸或核酸殘基。

如本文中所使用的，術語“替代”指將位於某個位置的氨基酸殘基交換為不同的氨基酸殘基。

如本文中所使用的，術語“細胞壁”指形成革蘭氏陰性細菌的細胞外殼，並且如此保證其完整性的所有組分。具體地，如本文中所使用的，術語“細胞壁”指肽聚糖、具有脂多糖的革蘭氏陰性細菌的外膜、細菌細胞膜，但是還指別的沉積於肽聚糖上作為例如莢膜、蛋白質外層或粘液的層。

如本文中所使用的，術語“EAD”指內溶素的酶活性域。EAD 負責水解細菌肽聚糖。它展現出內溶素的至少一種酶活性。EAD 也可以由超過一種酶活性模組構成。術語“EAD”在本文中與術語“催化域”同義使用。

本發明有關自腸炎沙門氏菌噬菌體 PVPSE1 分離的新型模組內溶素，其可用於製備針對革蘭氏陰性細菌的新型抗細菌劑。特別地，本發明有關包含如序列識別號 1 的氨

基 酸 序 列 的 多 肽 或 其 片 段 或 衍 生 物 。 較 佳 地 ， 包 含 如 序 列 識 別 號 1 的 氨 基 酸 序 列 的 多 肽 是 由 如 序 列 識 別 號 2 的 核 苷 酸 序 列 編 碼 的 。

具 有 如 序 列 識 別 號 1 的 氨 基 酸 序 列 的 內 溶 素 PVPSE1gp146 具 有 236 個 氨 基 酸 的 長 度 。 它 包 含 N 端 細 胞 壁 結 合 域 (CBD) 和 C 端 酶 活 性 域 (EAD)。N 端 CBD 是 具 有 如 SEQ ID No. 3 的 氨 基 酸 序 列 和 如 SEQ ID No. 4 的 核 苷 酸 序 列 的 肽 聚 糖 結 合 域 (PGB, aa 3 至 39)。C 端 EAD 是 遵 照 溶 菌 酶 樣 超 家 族 的 催 化 域 且 具 有 如 SEQ ID No. 5 的 氨 基 酸 序 列 及 如 SEQ ID No. 6 的 核 苷 酸 序 列 的 催 化 域 (aa 81 至 234)。內 溶 素 PVPSE1gp146 的 PGB 和 催 化 域 通 過 域 接 頭 連 接 。

如 此 ， 如 本 發 明 的 多 肽 的 較 佳 的 片 段 是 包 含 如 序 列 識 別 號 3 和 / 或 如 序 列 識 別 號 5 的 氨 基 酸 序 列 的 多 肽 。

如 本 發 明 的 衍 生 物 是 包 含 如 序 列 識 別 號 1、3、和 / 或 5 的 氨 基 酸 序 列 ， 但 是 具 有 額 外 的 修 飾 和 / 或 變 化 的 多 肽 。

在 一 個 實 施 方 案 中 ， 如 本 發 明 的 內 溶 素 的 所 述 衍 生 物 的 所 述 修 飾 和 / 或 變 化 可 以 是 突 變 ， 特 別 是 刪 除 、 插 入 、 添 加 、 替 代 或 其 任 何 組 合 和 / 或 氨 基 酸 殘 基 的 化 學 變 化 ， 例 如 生 物 素 化 、 乙 酰 化 、 PEG 化 、 氨 基 - 、 SH- 或 羧 基 - 基 團 的 化 學 變 化 。 如 本 發 明 的 所 述 衍 生 物 展 現 出 PVPSE1gp146 (序 列 識 別 號 1) 的 裂 解 活 性 和 / 或 如 本 發 明 的 片 段 的 活 性 。 所 述 活 性 可 以 是 PVPSE1gp146 的 活 性 和 / 或 如 本 發 明 的 片 段 的 活 性 的 約 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100,

110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 或約 200%。可以通過本領域技術人員在本領域公知的測定法，如例如平板裂解測定法或液體裂解測定法（其記載於例如（Briers et al., J. Biochem. Biophys Methods 70: 531-533, (2007)））來測量活性。

在本發明的一個較佳的實施方案中，如本發明的多肽、片段和/或衍生物在 N 端或在 C 端另外包含標籤諸如 His6-標籤、Strep-標籤、Avi-標籤、Myc-標籤、Gst-標籤、JS-標籤、半胱氨酸-標籤、FLAG-標籤或本領域中已知的其他標籤。在本發明的一個較佳的實施方案中，所述標籤在 C 端與如本發明的多肽、片段和/或衍生物連接。所述標籤可以通過其他氨基酸殘基與所述多肽、片段和/或衍生物連接。所述其他氨基酸殘基可以由至少 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 或 10 個額外的氨基酸殘基組成。在本發明的一個較佳的實施方案中，標籤通過額外的氨基酸殘基 Leu-Glu 或 Lys-Gly 與如本發明的多肽、片段和/或衍生物連接。在一個較佳的實施方案中，本發明有關包含如 SEQ ID No. 7 的氨基酸序列的多肽。與具有如 SEQ ID No.1 的氨基酸序列的多肽相比，具有如 SEQ ID No. 7 的氨基酸序列的多肽分別包含通過額外的氨基酸殘基賴氨酸和甘氨酸(Lys-Gly)與所述具有如 SEQ ID No.1 的氨基酸序列的多肽的 C 端連接的額外的 C 端 His6-標籤。另外，在第 2 位和第 3 位導入 BamHI 限制性位點。較佳地，包含如 SEQ ID No. 7 的氨基酸序列的多肽是由如 SEQ ID No. 8 的核苷酸序列編碼的。

本發明的又一方面是融合蛋白，其由如本發明的多肽、片段和/或衍生物和在 N 端或 C 端與如本發明的多肽、片段和/或衍生物融合以增強所述內容素針對革蘭氏陰性細菌的活性的具有膜破壞或 LPS 破壞活性的肽段構成。較佳地，所述肽段是如 W02010023207 的陽離子肽和/或聚陽離子肽，通過提及而將其完整收入本文。

較佳地，如本發明的融合蛋白的肽段與如本發明的多肽、片段和/或衍生物共價結合。較佳地，所述肽段由至少 5，更較佳地至少 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 個或至少 100 個氨基酸殘基組成。特別較佳的是包含約 5 至約 100 個氨基酸殘基、約 5 至約 50 或約 5 至約 30 個氨基酸殘基的肽段。更較佳的是包含約 6 至約 42 個氨基酸殘基、約 6 至約 39 個氨基酸殘基、約 6 至約 38 個氨基酸殘基、約 6 至約 31 個氨基酸殘基、約 6 至約 25 個氨基酸殘基、約 6 至約 24 個氨基酸殘基、約 6 至約 22 個氨基酸殘基、約 6 至約 21 個氨基酸殘基、約 6 至約 20 個氨基酸殘基、約 6 至約 19 個氨基酸殘基、約 6 至約 16 個氨基酸殘基、約 6 至約 14 個氨基酸殘基、

約 6 至約 12 個氨基酸殘基、約 6 至約 10 個氨基酸殘基或約 6 至約 9 個氨基酸殘基的肽段。較佳地，肽段沒有標籤諸如 His6-標籤、Strep-標籤、Avi-標籤、Myc-標籤、Gst 標籤、JS-標籤、半胱氨酸標籤、FLAG-標籤或本領域中已知的其他標籤，而且沒有硫氧還蛋白或麥芽糖結合蛋白(MBP)。然而，肽段可以另外包含一種或多種此類標籤等，其用於純化或定位蛋白質。

本發明進一步有關編碼如本發明的多肽、片段、衍生物和/或融合蛋白的分離的核酸分子。特別較佳的如本發明的分離的核酸分子包含如序列識別號 2、4、6 或 8 的核酸序列。本發明進一步有關包含如本發明的核酸分子的載體。所述載體可以提供如本發明的所述多肽、片段、衍生物和/或融合蛋白的組成型或誘導型表達。本發明還有關於自表達所述多肽、片段、衍生物和/或融合蛋白的微生物，諸如經遺傳修飾的合適的宿主細胞獲得所述多肽、片段、衍生物和/或融合蛋白的方法。所述宿主細胞可以是微生物，諸如細菌或酵母或動物細胞，如例如哺乳動物細胞，特別是人細胞。在本發明的一個實施方案中，宿主細胞是大腸桿菌(*Escherichia coli*)細胞。宿主可以僅由於生物技術原因，例如產量、溶解度、成本等而選擇，而且也可以從醫學觀點而選擇，例如非病理性細菌或酵母或人細胞。本發明的另一方面有關用於遺傳轉化合適的宿主細胞以獲得如本發明的多肽、片段、衍生物和/或融合蛋白的表達的方法，其中通過將編碼所述多肽、片段、衍生物和/

或融合蛋白的遺傳材料導入宿主細胞中，並且通過本領域技術人員公知的遺傳工程方法獲得其翻譯和表達來遺傳修飾宿主細胞。

在又一方面，本發明有關包含如本發明的多肽、片段、衍生物和/或融合蛋白和/或用包含編碼如本發明的多肽、片段、衍生物和/或融合蛋白的核苷酸序列的核酸分子或載體轉化的宿主的組合物，較佳地藥物組合物。

在本發明的一個較佳的實施方案中，組合物另外包含使革蘭氏陰性細菌的外膜透化的試劑，諸如金屬螯合劑例如 EDTA、TRIS、乳酸、乳鐵蛋白、多粘菌素、檸檬酸和/或其他物質，如例如由 Vaara (Agents that increase the permeability of the outer membrane. Vaara M. Microbiol Rev. 1992 年 9 月;56(3):395-441) 所描述的。還較佳的是包含上文所提及的透化劑的組合的組合物。特別較佳的是包含約 10 μ M 至約 100mM EDTA，更較佳地約 50 μ M 至約 10mM EDTA，更較佳地約 0.5mM 至約 10mM EDTA，更較佳地約 0.5mM 至約 2mM EDTA，更較佳地約 0.5mM 至 1mM EDTA 的組合物。還較佳的是包含約 0.5mM 至約 2mM EDTA，更較佳地約 1mM EDTA 和另外約 10 至約 100mM TRIS 的組合物。

本發明還有關作為藥物使用的如本發明的多肽、片段、衍生物和/或融合蛋白和/或用包含編碼如本發明的多肽、片段、衍生物和/或融合蛋白的核苷酸序列的核酸轉化的宿主。在又一方面，本發明有關如本發明的多肽、片段、衍生物和/或融合蛋白和/或用包含含有編碼如本發明的多

肽、片段、衍生物和/或融合蛋白的核苷酸序列的核酸分子的載體轉化的宿主在製造用於治療和/或預防與革蘭氏陰性細菌有關的病症、疾病或狀況的藥物中的用途。特別地，所述要治療和/或預防的病症、疾病或狀況可以由包括人或動物的病原性菌株的細菌群(bacterial group)、科、屬或種的革蘭氏陰性細菌引起，所述革蘭氏陰性細菌如腸桿菌科(*Enterobacteriaceae*) (埃希氏菌屬(*Escherichia*) 特別是大腸桿菌(*E. coli*)、沙門氏菌屬(*Salmonella*)、志賀氏菌屬(*Shigella*)、檸檬酸桿菌屬(*Citrobacter*)、愛德華氏菌屬(*Edwardsiella*)、腸桿菌屬(*Enterobacter*)、哈夫尼菌屬(*Hafnia*)、克雷伯氏菌屬(*Klebsiella*) 特別是肺炎克雷伯氏菌(*K. pneumoniae*)、摩根氏菌屬(*Morganella*)、變形菌屬(*Proteus*)、普羅威登斯菌屬(*Providencia*)、沙雷氏菌屬(*Serratia*)、耶爾森氏菌屬(*Yersinia*))、假單胞菌科(*Pseudomonadaceae*) (假單胞菌屬(*Pseudomonas*) 特別是銅綠假單胞菌、伯克霍爾德氏菌屬(*Burkholderia*)、寡養單胞菌屬(*Stenotrophomonas*)、希瓦氏菌屬(*Shewanella*)、鞘氨醇單胞菌屬(*Sphingomonas*)、叢毛單胞菌屬(*Comamonas*))、奈瑟氏球菌屬(*Neisseria*)、莫拉氏菌屬(*Moraxella*)、弧菌屬(*Vibrio*)、氣單胞菌屬(*Aeromonas*)、布魯氏菌屬(*Brucella*)、弗朗西絲氏菌屬(*Francisella*)、博多特氏菌屬(*Bordetella*)、軍團菌屬(*Legionella*)、巴爾通氏體屬(*Bartonella*)、考克斯氏體屬(*Coxiella*)、嗜血菌屬(*Haemophilus*)、巴斯德氏菌屬

(*Pasteurella*)、曼海姆氏菌屬(*Mannheimia*)、放線桿菌屬(*Actinobacillus*)、加德納氏菌屬(*Gardnerella*)、螺旋體科(*Spirochaetaceae*) (密螺旋體屬(*Treponema*)和疏螺旋體屬(*Borrelia*))、鉤端螺旋體科(*Leptospiraceae*)、彎曲桿菌屬(*Campylobacter*)、螺桿菌屬(*Helicobacter*)、螺菌屬(*Spirillum*)、鏈桿菌屬(*Streptobacillus*)、擬桿菌科(*Bacteroidaceae*) (擬桿菌屬(*Bacteroides*)、梭桿菌屬(*Fusobacterium*)、普雷沃氏菌屬(*Prevotella*)、卟啉單胞菌屬(*Porphyromonas*))、不動桿菌屬(*Acinetobacter*)特別是鮑氏不動桿菌(*A. baumannii*)。特別地，所述要治療和/或預防的病症、疾病或狀況可以是由銅綠假單胞菌、惡臭假單胞菌(*Pseudomonas putida*)、類鼻疽伯克霍爾德氏菌(*Burkholderia pseudomallei*)、大腸桿菌和/或鼠傷寒沙門氏菌(*Salmonella typhimurium*)引起的。

本發明進一步有關包含如本發明的多肽、片段、衍生物和/或融合蛋白和/或用包含編碼如本發明的多肽、片段、衍生物和/或融合蛋白的核苷酸序列的核酸轉化的宿主的藥物。

在又一方面，本發明有關在需要治療和/或預防的受試者中治療病症、疾病或狀況的方法，該方法包括對所述受試者施用有效量的如本發明的多肽、片段、衍生物和/或融合蛋白和/或有效量的經下述核酸轉化的宿主或如本發明的組合物，所述核酸包含編碼如本發明的多肽、片段、衍生物和/或融合蛋白的核苷酸序列。受試者可以是人或動

物。特別地，所述治療方法可以用於治療和/或預防由革蘭氏陰性細菌，特別是如上文所列的革蘭氏陰性細菌引起的皮膚、軟組織、呼吸系統、肺、消化道、眼、耳、牙、鼻咽、口、骨、陰道、菌血症傷口的感染和/或心內膜炎。

在如本發明的治療(或預防)方法中使用的施用劑量和路徑取決於要治療的特定疾病/感染部位。施用路徑可以是例如口服、局部(topical)、鼻咽、胃腸外、靜脈內、直腸、或任何其他施用路徑。對於將如本發明的多肽、片段、衍生物和/或融合蛋白和/或有效量的經下述核酸轉化的宿主或如本發明的組合物應用於感染部位(或有感染危險的部位)，可以使用保護活性化合物免于環境影響諸如蛋白酶、氧化、免疫應答等，直至它達到感染部位的配製劑，所述核酸包含編碼如本發明的多肽、片段、衍生物和/或融合蛋白的核苷酸序列。因此，配製劑可以是膠囊、糖衣片、丸劑、栓劑、可注射溶液或任何其他醫學合理的蓋倫配製劑。較佳地，蓋倫配製劑可以包含合適的載體、穩定劑、調味劑、緩衝劑或其他合適的試劑。例如，對於局部應用，配製劑可以是洗劑或硬膏劑，對於鼻咽應用，配製劑可以是要經由噴霧向鼻應用的鹽水溶液。

較佳地，若要治療(或預防)的感染是由多抗性細菌菌株，特別是由對下列一種或多種抗生素有抗性的菌株引起的：鏈黴素、四環素、頭孢噻吩(cephalothin)、慶大黴素(gentamicin)、頭孢噻肟(cefotaxime)、頭孢菌素(cephalosporin)、頭孢他啶(ceftazidime)或亞胺培南

(imipenem)，則使用如本發明的多肽、片段、衍生物和/或融合蛋白進行醫學處理。此外，如本發明的多肽、片段、衍生物和/或融合蛋白可以在治療方法中使用，其通過將其與常規的抗細菌劑，諸如抗生素、硫醚抗生素(lantibiotics)、細菌素或內溶素等聯合施用來進行。

本發明還有關包含一個或多個隔室的藥物包，其中至少一個隔室包含一種或多種如本發明的多肽、片段、衍生物和/或融合蛋白和/或一種或多種經下述核酸轉化的宿主或如本發明的組合物，所述核酸包含編碼如本發明的多肽、片段、衍生物和/或融合蛋白的核苷酸序列。

在另一方面，本發明有關製備藥物組合物的方法，所述方法包括混合一種或多種如本發明的多肽、片段、衍生物和/或融合蛋白和/或一種或多種經下述核酸轉化的宿主與藥學可接受稀釋劑、賦形劑或載體，所述核酸包含編碼如本發明的多肽、片段、衍生物和/或融合蛋白的核苷酸序列。

在甚至又一方面，如本發明的組合物是化妝用組合物。數種細菌物種可以在患者身體的環境暴露表面諸如皮膚上引起刺激。為了預防此類刺激或者為了消除所述細菌病原體的次要病候(minor manifestation)，可以採用特殊的化妝用製品，其包含足夠量的如本發明的多肽、片段、衍生物和/或融合蛋白以降解已經存在的或新近沉降的病原性革蘭氏陰性細菌。

在又一方面，本發明有關在醫學、食物或飼料或環境

診斷學中作為診斷手段，特別是作為用於診斷細菌感染特別是由革蘭氏陰性細菌引起的細菌感染的診斷手段使用的如本發明的多肽、片段、衍生物和/或融合蛋白。在此方面，可以使用如本發明的多肽、片段、衍生物和/或融合蛋白作為特異性降解病原性細菌，特別是革蘭氏陰性病原性細菌的工具。可以通過添加去污劑如 Triton X-100 或削弱細菌細胞包膜的其他添加劑如多粘菌素 B 來支持如本發明的多肽、片段、衍生物和/或融合蛋白對細菌細胞的降解。需要特定的細胞降解作為初始步驟，以隨後特異性檢測細菌，其使用基於核酸的方法如 PCR、核酸雜交或 NASBA（基於核酸序列的擴增）、免疫學方法如 IMS、免疫螢光或 ELISA 技術、或其他依賴於細菌細胞的細胞內容物的方法如使用對獨特的細菌群或物種特異性的蛋白質（例如對於腸細菌為 β -半乳糖苷酶，對於凝固酶陽性菌株為凝固酶）的酶測定法進行。在又一方面，本發明有關如本發明的多肽、片段、衍生物和/或融合蛋白用於處理或預防食品、食物加工設備、食物加工廠、與食品接觸的表面諸如架子和食物保存區和所有其他情況（其中病原性、偶發病原性（facultative pathogenic）或其他不想要的細菌能潛在地侵染食物材料的情況）、醫學裝置和醫院和診所的所有種類表面的革蘭氏陰性細菌污染的用途。

特別地，本發明的多肽、片段、衍生物和/或融合蛋白可以作為消毒劑預防性使用。所述消毒劑可以在手術前或後，或者例如在血液透析過程中使用。此外，可以用如本

發明的融合蛋白處理早產嬰兒和免疫受損個人，或那些需要假體裝置的受試者。所述處理可以是預防性的或在急性感染期間。在相同背景中，醫院內感染(特別是由抗生素抗性菌株如銅綠假單胞菌(FQRP)、不動桿菌屬物種和腸桿菌科諸如大腸桿菌、沙門氏菌屬、志賀氏菌屬、檸檬酸桿菌屬、愛德華氏菌屬、腸桿菌屬、哈夫尼菌屬、克雷伯氏菌屬、摩根氏菌屬、變形菌屬、普羅威登斯菌屬、沙雷氏菌屬和耶爾森氏菌屬物種引起的)可以用本發明的多肽、片段、衍生物和/或融合蛋白預防性地或在急性階段期間處理。因此，還可以與其他可用於消毒溶液的成分如去污劑、Tensids、溶劑、抗生素、硫醚抗生素、或細菌素組合使用如本發明的多肽、片段、衍生物和/或融合蛋白作為消毒劑。

以下實施例解釋本發明，但不認為是對公開內容或所附申請專利範圍的限制性。除非不同地指明，使用分子生物學標準方法，如例如由 Sambrock 等，1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 所描述的。

實施例 1：PVP-SE1gp146 及其 N 端 PK 融合的變體 PK-PVP-SE1gp146

腸炎沙門氏菌噬菌體 PVPSE1 的模組內溶素 PVP-SE1gp146 及 N 端 PK 融合的變體 PK-PVP-SE1gp146 的克隆、表達和純化

PVP-SE1gp146 (長 236 個氨基酸，MW = 25325Da)是源

自腸炎沙門氏菌噬菌體 PVPSE1 的模組內溶素，其預測為擁有 N 端肽聚糖結合域(氨基酸 3 至 39)和溶菌酶樣超家族 C 端催化殼多糖酶域(氨基酸 81 至 234) (參見圖 1)。

使用噬菌體 PVPSE1 (獲自 S. Santos 博士, Universidade do Minho, Braga, Portugal)的純化的基因組 DNA 作為範本以在用 *Pfu* 聚合酶(Fermentas, Ontario, Canada)的標準 PCR 反應中擴增編碼內溶素 PVP-SE1gp146 的可讀框(ORF146)。使用以下 PCR 參數：

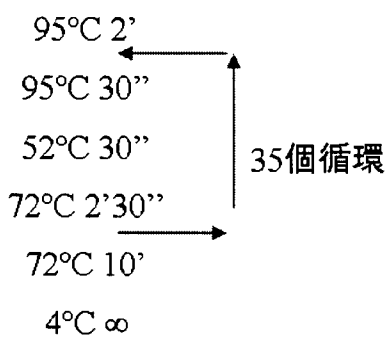


表 1 中顯示了此 PCR 的正向(引子 1)和反向(引子 2)引子。

表 1：ORF146 的標準 PCR 擴增期間及對 ORF146 添加 N 端 PK 標籤的尾部 PCR 期間使用的引子

# 引子名稱	引子序列
1. ORF146 正向引子	ATGGGATCCAATGCTGCAATTGCGGAGA 序列識別號 9
2. ORF146 反向引子	CGAGGTTAGAACAGATTTTGCCT 序列識別號 10
3. 延伸的 ORF146 正向引子	ATGGGATCCAAACGCAAGAAACGTAAGAAACGCAAAAATGCTGCAATTGCGGAGA 序列識別號 11

為了延伸具有編碼聚陽離子 9 聚體肽 *Lys-Arg-Lys-Lys-Arg-Lys-Lys-Arg-Lys-* 的基因片段的 ORF146 5' 端，用延伸的 5' 引子(引子 3，序列識別號 11，表 1)和標準的 3' 引子(引子 2，序列識別號 10，表 1)進

行尾部 PCR (遵循與上述標準 PCR 相同的參數)。然後，遵循由製造商提供的 TA 克隆方案在商品化 pEXP5CT/TOPO[®] 表達載體 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 中連接這兩種獲得的 PCR 片段，這引起內溶素 ORF/蛋白質的 3' /C 端一側與純化必需的 6x 組氨酸標籤的融合。獲得的重組 PVP-SE1gp146 和 PK-PVP-SE1gp146 內溶素的 DNA 和氨基酸序列顯示於序列識別號 7 (重組 PVPSE1gp146 的氨基酸序列)、序列識別號 8 (重組 PVPSE1gp146 的核苷酸序列)、序列識別號 12 (重組 PK-PVPSE1gp146 的 DNA 序列) 和序列識別號 13 (重組 PK-PVPSE1gp146 的氨基酸序列)。

用 1mM IPTG (異丙基硫代半乳糖苷) 於 16°C 誘導過夜後在指數生長的大腸桿菌 BL21 (λ DE3) pLysS 細胞中實施 PVP-SE1gp146/PK-PVP-SE1gp146 的重組表達。然後，使用由 pEXP5CT/TOPO[®] 表達載體編碼的 C 端 6xHis 標籤通過 Ni²⁺ 親和層析 (Akta FPLC, GE Healthcare) 來純化內溶素。Ni²⁺ 親和層析在隨後的 4 步中實施，均為室溫：

1. 以 0.5ml/分鐘的流速用 10 個柱體積的清洗緩衝液 (70mM 咪唑、0.5mM NaCl 和 20mM NaH₂PO₄-NaOH, pH 7.4) 平衡 Histrap HP 1ml 柱 (GE Healthcare)。

2. 以 0.5ml/分鐘的流速將總溶胞物 (具有期望的內溶素) 在 Histrap HP 1ml 柱上載入。

3. 以 1ml/分鐘的流速用 15 個柱體積的清洗緩衝液清洗柱。

4. 以 0.5ml/分鐘的流速用 10 個柱體積的洗脫緩衝液

· (500mM 咪唑、5mM NaCl 和 20mM NaH₂PO₄-NaOH，pH 7.4)自該柱洗脫結合的內容素。

表 2 中顯示了重組 PVP-SE1gp146/PK-PVP-SE1gp146 的純化收率。以 280nm 的波長用分光光度法測定蛋白質濃度。洗脫緩衝液(20mM NaH₂PO₄-NaOH pH7.4; 0.5M NaCl; 500mM 咪唑)中的這兩種蛋白質的純化的儲備溶液是超過 90%純的，如在 SDS-PAGE 凝膠上通過視覺測定的(圖 2)。

表 2：每升大腸桿菌表達培養物的純化的重組 PVP-SE1gp146/PK-PVP-SE1gp146 內容素的收率，如通過以 280nm 的分光光度測量測定的。經 PK 修飾的變體的收率幾乎高達未修飾的 PVP-SE1gp146 的兩倍，揭示了 PK 標籤對蛋白質表達的穩定化作用。

內容素	表達收率
PVP-SE1gp146	38.18mg/L
PK-PVP-SE1gp146	65.15mg/L

實施例 2：腸炎沙門氏菌噬菌體內容素 PVPSE1gp146 的生物化學胞壁質水解活性的表徵和測定

對於量化胞壁質水解活性，使用對內容素活性致敏的外膜透化的銅綠假單胞菌 PA01_{krylov} (獲自國家工業微生物遺傳學研究所(State Institute for Genetics of Industrial Microorganisms), 1st Dorozhnii proezd 1, 113545 Moscow, Russia 的 V. Krylov 教授的 PA01_{krylov})細胞底物。在存在過量的此底物的情況中，創建洗脫緩衝液中的 PVPSE1gp146 的酶活性的飽和曲線，以不同內容素濃度(以 nM 表示)範圍的函數顯示肽聚糖降解活性(表示為每

分鐘的 OD_{655nm} 降低) (圖 3)。用具有 pH 7.3 和 80mM 離子強度的對於酶活性最佳的 KH_2PO_4/K_2HPO_4 緩衝液中溶解的底物一式三份完成測量。

使用此飽和曲線的線性部分的最好的線性回歸的斜率來測定胞壁質水解活性數值，其如 Cheng 等 (2004) 及 Briers 等 (2007) 的酶活性定義的改編型式進行：

$$\text{活性(以單位/mM計)} = \frac{(\text{斜率}(\Delta OD_{655nm}/\text{分鐘}))/mM}{0.001}$$

使用上面的公式，PVPSE1gp146 在溶解於洗脫緩衝液中時擁有 15,005,330 個單位/mM 的胞壁質水解活性數值。

實施例 3：與腸炎沙門氏菌噬菌體 PVP-SE1 的內容素的 N 端抗細菌肽融合物

1. 抗細菌標籤融合的 PVP-SE1gp146 構建體的克隆、表達和純化

將 PVP-SE1gp146 與一組天然的抗細菌肽標籤 (在表 3 中顯示) 在 N 端融合以提高其抗革蘭氏陰性活性並加寬其細菌宿主範圍。這些標籤是基於其兩親性、疏水性或聚陽離子特性和較短的長度進行選擇或開發的。此列表含有文獻中選擇的許多已知的抗細菌肽 (其源自昆蟲、兩栖類或魚，而且證明為對革蘭氏陰性菌株有效地起作用)；和三種設計的抗細菌標籤。圖 4 顯示了經修飾的標籤-PVP-SE1gp146 變體的可能的二維模組結構。

表 3：與 PVP-SE1gp146 融合的抗細菌肽標籤的列表

標籤	描述+大小	氨基酸序列	參考文獻
T4溶菌酶的 α 4螺旋	兩親性螺旋 (13個aa)	PNRAKRVTTFRT (序列識別號14)	Matthews*
五肽 (設計的)	疏水性 (5個aa)	FFVAP (序列識別號15)	Briers等, 2008
Artilysin 1 (設計的)	疏水性 (18個aa)	GFFIPAVILPSIAFLIVP (序列識別號16)	Walmagh
Artilysin 2 (設計的)	兩親性螺旋 (25個aa)	GKPGWLIKALVFKKLIRRPLKRLA (序列識別號17)	Walmagh
Parasin 1	α -螺旋肽 (19個aa)	KGRGKQGKVRAKAKTRSS (序列識別號18)	Park, Y等, 1998
Lycotoxin 1	兩親性螺旋 (25個aa)	IWLTALKFLGKHAACKLAKQQLSKL (序列識別號19)	Yan和Adams, 1988

除了五肽(PP)標籤外，使用不依賴於連接的克隆(LIC)技術 (Berrow 等 , 2007, A versatile ligation-independent cloning method suitable for high-throughput expression screening applications)的改編型式來將所有抗細菌肽標籤與編碼 PVP-SE1gp146 的 ORF 融合。因此，在噬菌體 OBP 的純的基因組 DNA 上用特異性設計的 5' 正向引子 (GGAATGGGGAGCTCCTCCAATGCTGCAATTGCGGAGAT; 序列識別號 30)和標準的 PVP-SE1gp146 反向引子(CGAGGTTAGAACAGATTTTGCCT, 序列識別號 10)通過尾部 PCR 在 PVP-SE1gp146 編碼基因前面插入獨特的 Ecl136II 限制性位點。然後，通過遵循製造商的 TA 克隆方案在 pEXP5CT/TOPO®表達載體(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)中連接此延伸的片段。以 Ecl136II 限制性消化對純的質粒進行一次切割，並在沒有必需的連接步驟的情況中將雜交的肽盒(通過引子對(參見表 4)雜交創建)插入經切割的質粒中。對於 N 端五肽標籤融合物，對純化的 pEXP5-CT/PK-OBPg pLys 質粒 DNA 施以用編碼此五肽的延伸

的 5' 引子(ATGGGATCCTTCTTCGTAGCACCGGGCTCCTCCAATGCTGCAAT, 序列識別號 31; 五肽加下劃線)的尾部 PCR。在將該構建體導入合適的大腸桿菌 BL21(DE3)pLysS 表達菌株中前通過測序分析來確認表達載體中的片段的正確插入。

表 4：與 PVP-SE1gp146 融合前的抗細菌肽標籤雜交所使用的引子

標籤	正向引子	反向引子
T4-溶菌酶的 α 4-螺旋	TTGGAATGGGGAGCCCGAACCGTGCA AAACGTGTAATCA (序列識別號 20)	CATTGGAGGAGCCCGGTACGGAAGGTG GTGATTACACGTT (序列識別號 21)
Artilysin 1 (設計的)	TTATGGGCTTCTTCATCCCGGCAGTA ATCCTGCCCTCCA (序列識別號 22)	CATTGGAGGAGCCCGGTACGATCAGG AATGCGATGGAGGGCAGGAT (序列 識別號23)
Artilysin 2 (設計的)	TTATGGGCAAACCGGGCTGGCTGATC AAAAGGCACTGGTATTCAAGA (序列 識別號24)	CATTGGAGGAGCCTGCCAGTCTCTTC AGCGGACGACGGATCAGTTTCTTGAA TACCA (序列識別號25)
Parasin 1	TTGGAATGGGGAGCAAAGGCCGTGGC AAGCAGGGAGGCAAAGTACGTG (序 列識別號26)	CATTGGAGGAGCCTGAGGAACGGGTC TTTGCTTTTGCACGTA CTTTGC (序 列識別號27)
Lycotoxin 1	GGAATGGGGAGCATCTGGCTGACCGC ACTGAAATTCCTCGGCAAACACGCCG CAA (序列識別號28)	CATTGGAGGAGCCCAGTTTGGATAAT TGCTGTTTTGCCAGTTTCTTTGCGGC GTGTT (序列識別號29)

在溶原性肉湯(Lysogeny Broth, LB)中在用 1mM 異丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷誘導的指數生長細胞(OD_{600nm} = 0.6)中實施標準的表達。表達參數，如溫度、時間和表達菌株按蛋白質特定的基礎(on a protein specific basis)變化以優化經修飾的內溶素的可溶性表達水平(參見表 5)。對於純化，將來自表達培養物(500-600 ml)的細胞收穫(4500rpm, 30 分鐘, 4℃)，並在 1/25 個體積的裂解緩衝液(10mM 咪唑、20mM NaH_2PO_4 、0.5M NaCl, pH 7.4)中重懸。將此懸浮液冷凍/融化三次，之後進行聲處理(8 x 30

秒，Vibra Cell™, Sonics, Danduray, CT, USA 上的振幅 40%)，並過濾通過 0.45 和 0.22 μ m Durapore 膜濾器 (Millipore, Billerica, MA, USA)。通過採用 Ni^{2+} 親和層析 (HisTrap HP 1ml 柱, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) 如製造商的指令的一步方案實施加有 His 標籤的融合蛋白的純化。 Ni^{2+} 親和層析在隨後的 4 步中實施，均在室溫：

1. 以 0.5ml/分鐘的流速用 10 個柱體積的清洗緩衝液 (蛋白質依賴性用量的咪唑 (60-70mM)、0.5mM NaCl 和 20mM NaH_2PO_4 -NaOH, pH 7.4) 平衡 HisTrap HP 1ml 柱 (GE Healthcare)。

2. 以 0.5ml/分鐘的流速將總溶胞物 (具有想要的內容素) 在 HisTrap HP 1ml 柱上載入。

3. 以 1ml/分鐘的流速用 15 個柱體積的清洗緩衝液清洗柱。

4. 以 0.5ml/分鐘的流速用 10 個柱體積的洗脫緩衝液 (500mM 咪唑、5mM NaCl 和 20mM NaH_2PO_4 -NaOH, pH 7.4) 自該柱洗脫結合的內容素。

清洗緩衝液包含低咪唑濃度，其以特定蛋白質為基礎變化以確保較高的蛋白質純度 (參見表 5)。表 5 中還顯示了每升大腸桿菌表達培養物的重組蛋白的總收率。通過以 280nm 的波長用分光光度法測量蛋白質濃度和純化的儲備溶液的總體積來測定數值。純化的儲備溶液是至少 90% 純的，如在 SDS-PAGE 凝膠上通過視覺測定的 (資料未顯示)。

表 5：表達參數和每升 N 端融合的 PVP-SE1gp146 構建體的

表達培養物獲得的蛋白質收率。ON = 過夜；* =大腸桿菌 Codon Plus RIL, Agilent Technologies 產品目錄編號 230245, 基因型=大腸桿菌 B F- *ompT* hsdS(*r_B⁻* *m_B⁻*) *dcm*⁺ Tet^r gal λ (DE3) *endA* Hte [*argU* *ileY* *leuW* Cam^r]

經修飾的內容素	溫度/時間	[咪唑] (以mM計)	菌株	蛋白質收率 (以mg/l計)
α 4-PVP-SE1gp146	16°C/ON	60	大腸桿菌Codon Plus RIL*	1.5
PP-PVP-SE1gp146	16°C/ON	70	大腸桿菌Codon Plus RIL*	4.3
Artilysin1-PVP-SE1gp146	16°C/ON	65	大腸桿菌Codon Plus RIL*	5.1
Artilysin2- PVP-SE1gp146	16°C/ON	70	大腸桿菌Codon Plus RIL*	3.2
Parasin1- PVP-SE1gp146	16°C/ON	60	大腸桿菌Codon Plus RIL*	2.4
Lycotoxin1-PVP-SE1gp146	16°C/ON	60	大腸桿菌Codon Plus RIL*	1.7

2. N端標籤融合的 PVP-SE1gp146 變體的體外抗細菌活性

為了測定抗細菌標籤融合物對 PVP-SE1gp146 的體外抗細菌活性是否具有正面影響，在 2 種不同革蘭氏陰性細菌：對大腸桿菌 XL1 blue 和食物病原體鼠傷寒沙門氏菌 LT2 上測試了一些 N 端標籤融合的 PVP-SE1gp146 變體 Artilyns2-PVPSE1gp146 和 Lycotox1-PVPSE1gp146。為了優化其抗細菌特性，添加少量的外膜透化劑乙二胺四乙酸二鈉(EDTA-Na₂)。

將指數生長的革蘭氏陰性細菌細胞(OD_{600nm} = 0.6)稀釋 100 倍至終濃度約 10⁶個細胞/ml，並於室溫在不搖動的情況中與具有和沒有 0.5mM EDTA-Na₂ 的經不同修飾的 PVP-SE1gp146 變體一起溫育 30 分鐘。溫育後，將細胞懸浮液稀釋三倍，以 10⁶個細胞/ml 開始至 10⁵個細胞/ml，然後至濃度 10⁴個細胞/ml，最終至濃度 10³細胞/ml，並將 100μl 每種稀釋物在 LB 培養基上鋪板。在於 37°C 過夜溫育

後對殘留的菌落計數。基於計數的細胞數目，計算作為以對數單位($\log_{10}(N_0/N_i)$ ，其中 N_0 =未處理細胞的數目，而 N_i =經處理的細胞的數目，這兩者在溫育後計數)計的相對滅活的抗細菌活性(表 6)。

表 6：與未修飾的 PVP-SE1gp146 相比沒有(A)和具有(B) 0.5mM EDTA- Na_2 的 5 μM N 端標籤融合的 PVP-SE1gp146 變體對革蘭氏陰性細菌的體外抗細菌活性。抗細菌活性作為以對數單位($\log_{10}(N_0/N_i)$ ，其中 N_0 =未處理細胞的數目，而 N_i =溫育後計數的經處理的細胞的數目)計的相對滅活量化。將所有樣品重複三次。顯示了平均值 $\pm$ 標準偏差。觀察到的最大降低依賴於 10 個細胞/ml 的檢測水平和初始細胞密度。

A)

		鼠傷寒沙門氏菌		大腸桿菌	
Artilyls2-PVPSE1gp146		0.12	0.12	0.10	0.09
PVPSE1gp146		0.19	0.10	0.10	0.09

B)

		鼠傷寒沙門氏菌		大腸桿菌	
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

在沒有外膜透化劑 EDTA 的情況中，在鼠傷寒沙門氏菌和大腸桿菌中僅可檢出低抗細菌活性。在包含 EDTA 的樣品中，可以觀察到更強的抗細菌活性。具有修飾 Artilysin 2 的融合蛋白擁有良好的針對鼠傷寒沙門氏菌的抗細菌活性。然而，活性在未修飾的變體 PVPSE1gp146 的範圍中。

針對鼠傷寒沙門氏菌的抗細菌活性在具有 Lycotoxin 1 修飾的融合蛋白的情況中甚至得到改善。就大腸桿菌而言，Lycotoxin 融合蛋白及 Artilysin 2 融合蛋白也施展抗細菌活性，由此與針對鼠傷寒沙門氏菌的抗細菌活性相比，活性處於降低的水平。

實施例 4：重組 PVP-SE1gp146 及其 PK 融合的變體 PK-PVP-SE1gp146 的熱穩定性

溫度在 PVP-SE1gp146/PK-PVP-SE1gp146 的穩定性中發揮主要的作用，並且如此在其酶活性或胞壁質水解活性中發揮主要的作用。提高溫度可以容易地打破蛋白質三維結構內部的氫鍵和非極性疏水性相互作用，引起蛋白質變性及其酶功能的部分喪失。為了調查 PVP-SE1gp146 和 PK-PVP-SE1gp146 的熱穩定性，在 Biometra T3000 熱迴圈儀(Göttingen, Germany)中於不同溫度(42, 50, 60, 70, 80, 90 和 100°C)將這兩種重組內溶素溫育不同時間間隔(於 42 和 50°C 的 1, 2, 3, 4, 8 和 24 小時；在 1 小時期間對於 50 至 100°C 各為 10 分鐘)。在熱溫育後，將 30 μ l 每個溫育的樣品添加至 270 μ l 外膜透化的銅綠假單胞菌 PA01 (獲自國家工業微生物遺傳學研究所(State Institute for Genetics of Industrial Microorganisms), 1st Dorozhnii proezd 1, 113545 Moscow, Russia 的 V. Krylov 教授的 PA01_{Krylov})細胞底物(Lavigne 等, 2004**), 並且以時間的函數追蹤光密度(OD_{655nm})。將每個樣品一式三份溫育並測試。如 Briers 等(2007)***文章基於 OD_{655nm}/時

間曲線量化每個樣品的酶或胞壁質水解活性，並以相對於時間 0 時的未加熱參照樣品的活性(= 100 %活性)的百分比表示。在圖 5 中，顯示了 24 小時的時間間隔期間於 42°C 和 50°C 溫育的結果。選擇 42°C 的數值，因為它模擬發熱體溫條件，而 50°C 是熱不穩定性蛋白質開始變性的重要溫度。

PVP-SE1gp146 和 PK-PVP-SE1gp146 兩者於 42°C 甚至在溫育 24 小時後是熱穩定的(圖 5A)。甚至於 50°C (圖 5B)，PVP-SE1gp146 的胞壁質水解活性在一段 24 小時的期間裏不顯著改變。相反，PK-PVP-SE1gp146 在 8 和 24 小時的時間點間喪失 30%的初始活性，這可能是由於 PK 標籤的存在。于 42°C 溫育 2 小時及于 50°C 溫育 3 小時後，PK-PVP-SE1gp146 的胞壁質水解活性甚至顯著升高。可能地，較高的溫度最初抑制由 PK 修飾引起的活性降低；即一種隨增加的溫育時間而降低的效應。

因為 PVP-SE1gp146 在 24 小時後於 50°C 仍顯示完全的活性，所以還分別在 1 小時和 40 分鐘的溫育時間期間於 50-100 °C 的較高溫育測定了 PVP-SE1gp146/PK-PVP-SE1gp146 的熱穩定性(圖 6)。對 PVP-SE1gp146 在時間點 0、20、40 和 60 分鐘時(圖 6A)及對 PK-PVP-SE1gp146 在 0、20、30 和 40 分鐘時(圖 6B)測量活性。

圖 6A 顯示了 PVP-SE1gp146 在於 80°C 溫育 1 小時後仍保持其最大活性，但是於 100°C，20 分鐘的短溫育足以降低其活性超過 80%。如上述圖 5 中所描述的，在高於 50°C 的溫度，PK-PVP-SE1gp146 的活性逐漸地降低。在於 80°C

的 30 分鐘溫育後，內容素已經幾乎喪失其全部活性。

這些結果強調未修飾的 PVP-SE1gp146 的強熱穩定性，使其成為一種在食物防腐的障礙性方法(hurdle approach)中使用的感興趣的候選物。可以使用與 PVP-SE1gp146 組合的溫和熱處理來有效減少食物病原體，而不喪失食物產品的質量。

引用的參考文獻

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.

Briers Y., Lavigne R., Volckaert, G.和 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.

從本文中所公開的本發明的說明書和實踐考慮，本發明的其他實施方案對於本領域技術人員會是顯而易見的。意圖認為說明書和實施例僅為例示性的，本發明的真正的範圍和精神由所附申請專利範圍指明。

【圖式簡單說明】

以下的圖用來例示本發明。

圖 1 顯示了使用 BLASTp 和 Pfam 分析系統對野生型模

組腸炎沙門氏菌內溶素 PVPSE1gp146 的功能分析。如它們在野生型噬菌體中出現的氨基酸序列和 DNA 及氨基酸序列分別為 SEQ ID No. 1 和 SEQ ID No. 2。預測的 N 端肽聚糖結合域(PBD, 氨基酸 3-39, 序列識別號 3, 加下劃線)和溶菌酶樣超家族 C 端催化域(氨基酸 81-234, 序列識別號 5, 以灰色突出顯示)都在圖解和序列中顯示。

圖 2：對 PVPSE1gp146 (左側)和 PK-PVPSE1gp147 (右側)的重組表達和純化的 SDS-PAGE 分析。SDS-PAGE 分析顯示了相對於 LMW 參照標誌物的洗脫蛋白質級分及流過物(FT)和廢物級分(W)。26.4kDa (代表 PVPSE1gp146)和 27.7kDa (代表 PK-PVPSE1gp146)左右的厚條帶標示這兩種重組蛋白的高收率。分別伴隨 52.8kDa 和 55.4kDa 左右的蛋白質的二聚化可見一些少量次級條帶(蛋白質降解)。

圖 3：洗脫緩衝液中的腸炎沙門氏菌噬菌體內溶素 PVPSE1gp146 對外膜透化的銅綠假單胞菌 PA01 的胞壁質水解活性(muralytic activity)的飽和曲線。對增加濃度的 PVPSE1gp146 (以 nM 計, X-軸)顯示活性(以 ΔOD_{655nm} /分鐘計, Y-軸)。此外, 線性曲線部分的最好的線性回歸標示為趨勢線及相應的最佳 R 方值。重複三次對結果的測定。將 PA01_{Krylov} 底物在最佳的 KH_2PO_4/KH_2PO_4 緩衝液中溶解。

圖 4 顯示了經修飾的標籤-PVP-SE1gp146 變體的可能二維模組結構。PVP-SE1gp146 的推定的 N 端肽聚糖結合域(PBD)和溶菌酶樣超家族 C 端催化殼多糖酶域與 N 端融合的抗細菌肽標籤(APT)的取向一起顯現。

圖 5 顯示了在 24 小時中的不同時間點在於 42℃ (A) 和 50℃ (B) 溫育後 PVP-SE1gp146 (藍色柱形) 和 PK-PVP-SE1gp146 (紅色柱形) 對外膜透化的 PA01 細胞底物的熱穩定性。與時間 0 時的未加熱樣品相對地比較胞壁質水解活性，並以百分比表示。顯示了三次獨立實驗的平均值和標準偏差。

圖 6 顯示了對於 PVP-SE1gp146 在 0 (藍色)、20 (紅色)、40 (綠色) 和 60 (紫色) 分鐘時；及對於 PK-PVP-SE1gp146 在 0 (藍色)、20 (紅色)、30 (綠色) 和 40 (紫色) 分鐘時在 50-100℃ 的溫育後 PVP-SE1gp146 (A) 和 PK-PVP-SE1gp146 (B) 對外膜透化的 PA01 細胞底物的熱穩定性。與時間 0 時的未加熱樣品相對地比較胞壁質水解活性，並以百分比表示。顯示了三次獨立實驗的平均值和標準偏差。

【主要元件符號說明】

無。

序列表

<110> 魯文天主教大學研發處
米尼奧大學

<120> 新型內溶素

<130> 5122-12004-P

<150> GB 1018518.9

<151> 2010-11-03

<160> 31

<170> PatentIn version 3.5

<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

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> PVPSE1 的 wt ORF146

<400> 2
atgaatgctg caattgcgga gattcagcgt atgctgatcg aaggtggggt tagcgtcggc 60
aagtctggtg ctgatggatt gtacggaccc gctacaaaag ccgcactgca aaagtgcatt 120
gcacaggcta ccagtggaaa caataaagga ggtactttga aactcaccca agcacaactg 180
gacaaaatct tccccgttgg tgcaagttct gggaggaatg caaaattcct gaagccgctc 240
aatgacctgt ttgaaaagac agagattaat acggtaaadc gggttgcagg attcctgtct 300
cagattggtg tggagtcggc ggagttccgg tatgtacgtg aactcggtaa cgatgcctac 360
tttgacaagt acgacactgg tcctattgca gaaagacttg gaaacacacc ccagaaagat 420
ggggatggtg ccaagtacaa ggggagaggt ctgattcagg tgaccggact cgcaaactac 480
aaggcttgcg gtaaagcact cggctcttgac ctcggttaacc accctgagtt gcttgaacag 540
cctgagtatg cagttgccag cgctgggttg tattggggaca cgagaaacat caacgccgct 600
tgcgatgctg atgatatcgt gaaaattacc aagctggtaa acggtgtgtac aaatcacctt 660
gccgagcgca cagcctatta caaaaaggca aaatctgttc taacctcgta a 711

<210> 3
<211> 37
<212> PRT
<213> 人工序列



<220>
<223> PVPSE1 的肽聚糖結合域

<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 的肽聚糖結合域
<400> 4
gctgcaattg cggagattca gcgtatgctg atcgaagggtg ggtttagcgt cggcaagtct 60
ggtgctgatg gattgtacgg acccgctaca aaagccgcac tgcaaaagtg c 111

<210> 5
<211> 153
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PVPSE1 的催化域
<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 的催化域

<400> 6
gacctgtttg aaaagacaga gattaatacgt gtaaatacggg ttgcaggatt cctgtctcag 60
attgggtgtgg agtcggcgga gttccggtat gtacgtgaac tcggtaacga tgcctacttt 120
gacaagtacg aacttggtcc tattgcagaa agacttggaa acacacccca gaaagatggg 180
gatggtgcca agtacaaggg gagaggtctg attcaggtga ccggactcgc aaactacaag 240
gcttgcggtg aagcactcgg tcttgacctc gttaaccacc ctgagttgct tgaacagcct 300
gagtatgcag ttgccagcgc tggttggtat tgggacacga gaaacatcaa cgccgcttgc 360
gatgctgatg atatcgtgaa aattaccaag ctggtaaaac gtggtacaaa tcaccttgcc 420
gagcgcacag cctattacaa aaaggcaaaa tctgttcta 459

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

<220>
<223> 重组 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 PVPSE1gp146

<400> 8
atgggatcca atgctgcaat tgcggagatt cagcgtatgc tgatcgaagg tgggttttagc 60
gtcggcaagt ctggtgctga tggattgtac ggacccgcta caaaagccgc actgcaaaag 120
tgcatcgac aggctaccag tggaaacaat aaaggaggta ctttgaaact cacccaagca 180
caactggaca aaatcttccc cgttggtgca agttctggga ggaatgcaaa attcctgaag 240
ccgctcaatg acctgtttga aaagacagag attaatacgg taaatcgggt tgcaggattc 300
ctgtctcaga ttggtgtgga gtcggcggag ttccggtatg tacgtgaact cggtaacgat 360
gcctactttg acaagtacga cactggtcct attgcagaaa gacttggaac cacaccccag 420
aaagatgggg atggtgccaa gtacaagggg agaggtctga ttcaggtgac cggactcgca 480
aactacaagg cttgcggtaa agcactcggg cttgacctcg ttaaccaccc tgagttgctt 540
gaacagcctg agtatgcagt tgccagcgct ggttgggtatt gggacacgag aaacatcaac 600

gccgcttgcg atgctgatga tatcgtgaaa attaccaagc tggtaaacgg tggtaacaaat 660
caccttgccg agcgcacagc ctattacaaa aaggcaaaat ctgttctaac ctogaagggt 720
catcatcacc atcaccattg a 741

<210> 9
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> ORF146 正向引子

<400> 9
atgggatcca atgctgcaat tgcggaga 28

<210> 10
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> ORF146 反向引子

<400> 10
cgaggttaga acagattttg cct 23

<210> 11
<211> 55
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 延伸的 ORF146 正向引子

<400> 11

atgggatcca aacgcaagaa 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 aacgcaagaa acgtaagaaa cgcaaaaatg ctgcaattgc ggagattcag 60
cgtatgctga tcgaaggtgg gtttagcgtc ggcaagtctg gtgctgatgg attgtacgga 120
cccgctacaa aagccgcact gcaaaagtgc attgcacagg ctaccagtgg aaacaataaa 180
ggagggtactt tgaaactcac ccaagcacia ctggacaaaa tcttccccgt tgggtgcaagt 240
tctgggagga atgcaaaaatt cctgaagccg ctcaatgacc tgtttgaaaa gacagagatt 300
aatacggtaa atcggggttgc aggattcctg tctcagattg gtgtggagtc ggcggagttc 360
cggtatgtac gtgaactcgg taacgatgcc tactttgaca agtacgacac tggctctatt 420
gcagaaaagac ttggaaacac accccagaaa gatgggggatg gtgccaaagta caaggggaga 480
ggtctgattc aggtgaccgg actcgcaaac tacaaggctt gcggtaaagc actcggctctt 540
gacctcgta accaccctga gttgcttgaa cagcctgagt atgcagttgc cagcgtcgtt 600
tggtattggg acacgagaaa catcaacgcc gcttgcgatg ctgatgatat cgtgaaaatt 660
accaagctgg taaacggtgg taaaaatcac cttgccgagc gcacagccta ttacaaaaag 720
gcaaaatctg ttctaacctc gaagggtcat catcaccatc accattga 768

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

<220>
<223> 重组 PK-PVPSE1gp146 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
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α4-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

<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α4-螺旋的正向引子

<400> 20
ttggaatggg gagcccgaac cgtgcaaaac gtgtaatca 39

<210> 21
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> T4-溶菌酶的α4-螺旋的反向引子

<400> 21
cattggagga gccggtacgg aaggtggtga ttacacgtt 39

<210> 22
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Artilysin 1 的正向引子

<400> 22
ttatgggctt cttcatcccg gcagtaatcc tgccctcca 39

<210> 23
<211> 46

<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Artilysin 1 的反向引子	
<400>	23	
	cattggagga gcccgggtacg atcaggaatg cgatggaggg caggat	46
<210>	24	
<211>	47	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Artilysin 2 的正向引子	
<400>	24	
	ttatgggcaa accgggctgg ctgatcaaaa ggcactggta ttcaaga	47
<210>	25	
<211>	57	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Artilysin 2 的反向引子	
<400>	25	
	cattggagga gcctggcagt ctcttcagcg gacgacggat cagtttcttg aatacca	57
<210>	26	
<211>	48	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Parasin 1 的正向引子	
<400>	26	
	ttggaatggg gagcaaaggc cgtggcaagc agggaggcaa agtacgtg	48
<210>	27	
<211>	48	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Parasin 1 的反向引子	
<400>	27	
	cattggagga gcctgaggaa cgggtctttg cttttgcacg tacttttc	48
<210>	28	
<211>	55	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

<220>		
<223>	Lycotoxin 1 的正向引子	
<400>	28	
	ggaatgggga gcatctggct gaccgcaactg aaattcctcg gcaaacacgc cgcaa	55
<210>	29	
<211>	57	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Lycotoxin 1 的反向引子	
<400>	29	
	cattggagga gccagtttg gataattgct gttttgccag tttctttgcg gcgtggt	57
<210>	30	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	尾部 PCR 的 5' 正向引子	
<400>	30	
	ggaatgggga gctcctccaa tgctgcaatt gcggagat	38
<210>	31	
<211>	44	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	五肽的延伸的 5' 正向引子	
<400>	31	
	atgggatacct tcttcgtagc accgggctcc tccaatgctg caat	44



七、申請專利範圍：

1. 一種具有內溶素活性的多肽或其片段或衍生物，包含如序列識別號 1 所示的氨基酸序列。

2. 如申請專利範圍第 1 項所述之多肽，其中所述片段包含如序列識別號 3 和 / 或 5 所示的氨基酸序列。

3. 如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之多肽，其中該衍生物在如序列識別號 1、3、和 / 或 5 所示的氨基酸序列中具有刪除、添加、插入和 / 或替代。

4. 如申請專利範圍第 1 至 3 項任一項所述之多肽，其中該多肽在 N 端或 C 端與具有膜或 LPS 破壞活性的肽段融合。

5. 如上述申請專利範圍任一項所述之多肽，其另外包含標籤，較佳地 His6-標籤。

6. 如申請專利範圍第 5 項所述之多肽，其中該多肽包含如序列識別號 7 所示的氨基酸序列。

7. 一種融合蛋白，包含如上述申請專利範圍任一項所述之多肽和在 N 端或 C 端與該多肽融合的肽段，其中該肽段是陽離子肽、聚陽離子肽、兩親肽、壽司肽、防衛素、疏水性肽和 / 或抗微生物肽。

8. 如申請專利範圍第 7 項所述之融合蛋白，其中該肽段包含約 5 至約 100 個氨基酸殘基，特別地約 5 至 50 個氨基酸殘基，特別地約 5 至 30 個氨基酸殘基。

9. 如申請專利範圍第 7 或 8 項所述之融合蛋白，其中該陽離子和 / 或聚陽離子肽段包含至少一個選自下組的氨

基酸殘基：精氨酸、組氨酸和賴氨酸殘基，特別地其中該肽段中包含的至少 70% 的氨基酸殘基是精氨酸、組氨酸和 / 或賴氨酸殘基，特別地精氨酸和 / 或賴氨酸殘基。

10. 如申請專利範圍第 7 項所述之融合蛋白，其中該兩親肽包含與至少一個疏水性氨基酸殘基組合的至少一個選自下組的帶正電荷的氨基酸殘基：賴氨酸、精氨酸和組氨酸殘基，該疏水性氨基酸殘基選自下組：纈氨酸、異亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、半胱氨酸、丙氨酸、酪氨酸、組氨酸、蘇氨酸、絲氨酸、脯氨酸和甘氨酸殘基，特別地其中該兩親肽中的至少約 70% 的該氨基酸殘基是精氨酸或賴氨酸殘基，且該兩親肽中的至少約 30% 的該氨基酸殘基是纈氨酸、異亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、半胱氨酸、丙氨酸、酪氨酸、組氨酸、蘇氨酸、絲氨酸、脯氨酸或甘氨酸殘基。

11. 如申請專利範圍第 7 項所述之融合蛋白，其中該肽段包含如序列識別號 14-19 所示的氨基酸序列。

12. 如申請專利範圍第 7 項所述之融合蛋白，其中該融合蛋白包含如序列識別號 13 的氨基酸序列。

13. 一種分離的核酸分子，其編碼如申請專利範圍第 1 至 6 項任一項所述之多肽或如申請專利範圍第 7 至 12 項任一項所述之融合蛋白。

14. 一種載體，其包含如申請專利範圍第 13 項所述之核酸分子。

15. 一種宿主細胞，其包含如申請專利範圍第 13 項所

述之核酸分子或如申請專利範圍第 14 項所述之載體。

16. 如申請專利範圍第 1 至 6 項任一項所述之多肽或如申請專利範圍第 7 至 12 項任一項所述之融合蛋白，其用作人用醫藥物質、獸用醫藥物質或診斷物質、用作食物中或化妝品上的抗微生物劑、用作消毒劑或者用於環境領域中。

17. 如申請專利範圍第 1 至 6 項任一項所述之多肽或如申請專利範圍第 7 至 12 項任一項所述之融合蛋白，其作為藥物用於治療或預防革蘭氏陰性細菌感染。

18. 一種如申請專利範圍第 1 至 6 項任一項所述之多肽或如申請專利範圍第 7 至 12 項任一項所述之融合蛋白的用途，其用於處理或預防食品、食物加工設備、食物加工廠、與食品接觸的表面、醫學裝置、醫院和診所的表面的革蘭氏陰性細菌污染。

19. 一種藥物組合物，其包含如申請專利範圍第 1 至 6 項任一項所述之多肽或如申請專利範圍第 7 至 12 項任一項所述之融合蛋白。

八、圖式：如後所示。

> PVPSE1的wt ORF146的DNA序列(711bp)

ATGAATGCTGCAATTGCGGAGATTCAGCGTATGCTGATCGAAGGTGGGTTTAGCGTCCG
GCAAGTCTGGTGCTGATGGATTGTACGGACCCGCTACAAAAGCCGCACTGCAAAAGTG
CATTGCACAGGCTACCAGTGGAAACAATAAAGGAGGTACTTTGAAACTCACCCAAGCAC
AACTGGACAAAATCTTCCCCGTTGGTGCAAGTTCTGGGAGGAATGCAAAATTCCTGAAG
CCGCTCAATGACCTGTTTGAAAAGACAGAGATTAATACGGTAAATCGGGTTGCAGGATT
CCTGTCTCAGATTGGTGTGGAGTCGGCGGAGTTCCGGTATGTACGTGAACTCGGTAAC
GATGCCTACTTTGACAAGTACGACACTGGTCCTATTGCAGAAAGACTTGGAACACACC
CCAGAAAGATGGGGATGGTGCCAAGTACAAGGGGAGAGGTCTGATTCAGGTGACCGGA
CTCGCAAACTACAAGGCTTGCGGTAAAGCACTCGGTCTTGACCTCGTTAACCACCCTGA
GTTGCTTGAACAGCCTGAGTATGCAGTTGCCAGCGCTGGTTGGTATTGGGACACGAGA
AACATCAACGCCGCTTGCGATGCTGATGATATCGTGAAAATTACCAAGCTGGTAAACGG
TGGTACAAATCACCTTGCCGAGCGCACAGCCTATTACAAAAGGCCAAAATCTGTTCTAA
CCTCGTAA

> wt PVPSE1gpORF146的蛋白質序列(236個氨基酸)

MNAAIAEIQRMLIEGGFSVGKSGADGLYGPATKAALQKCIAQATSGNNKGGTLKLTQAQLDK
IFPVGASSGRNAKLKPLNDLFEKTEINTVNRVAGFLSQIGVESAEFRYVRELGNDAYFDKYDT
GPIAERLGNTLPQKDGDAKYKGRGLIQVTGLANYKACGKALGLDLVNHPELLEQPEYAVAS
AGWYWDTRNINAACDADDIVKITKLVNGGTNHLAERTAYYKKAKSVLTS

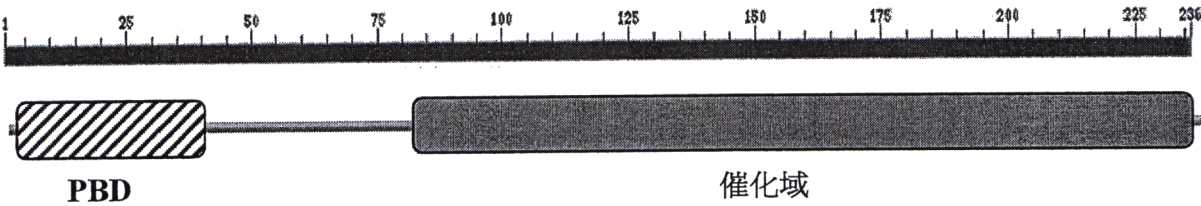


圖 1

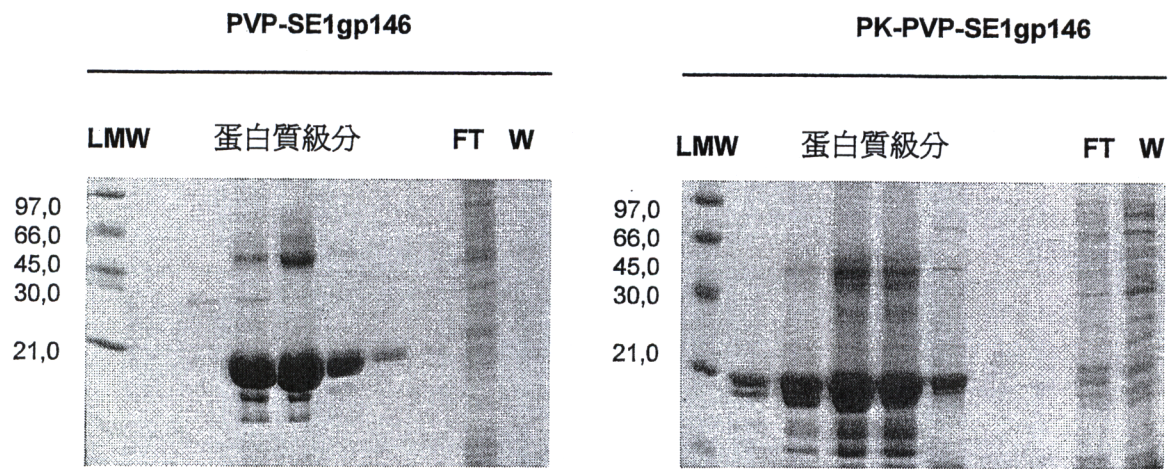


圖2

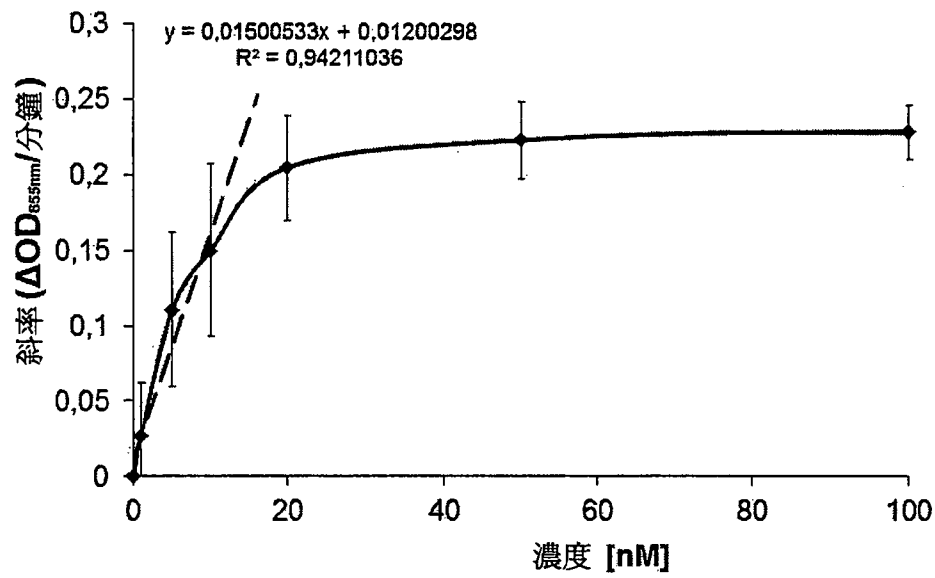
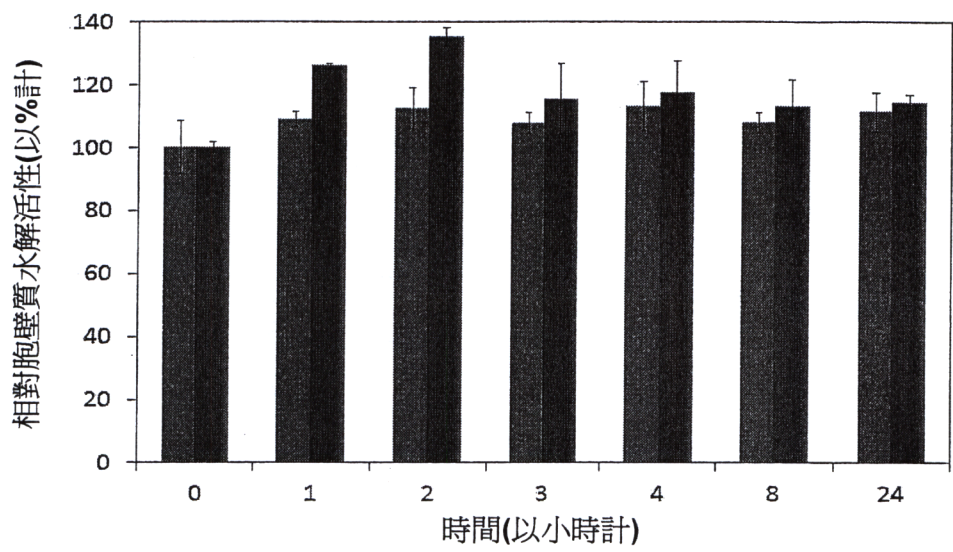


圖3



圖 4

A



B

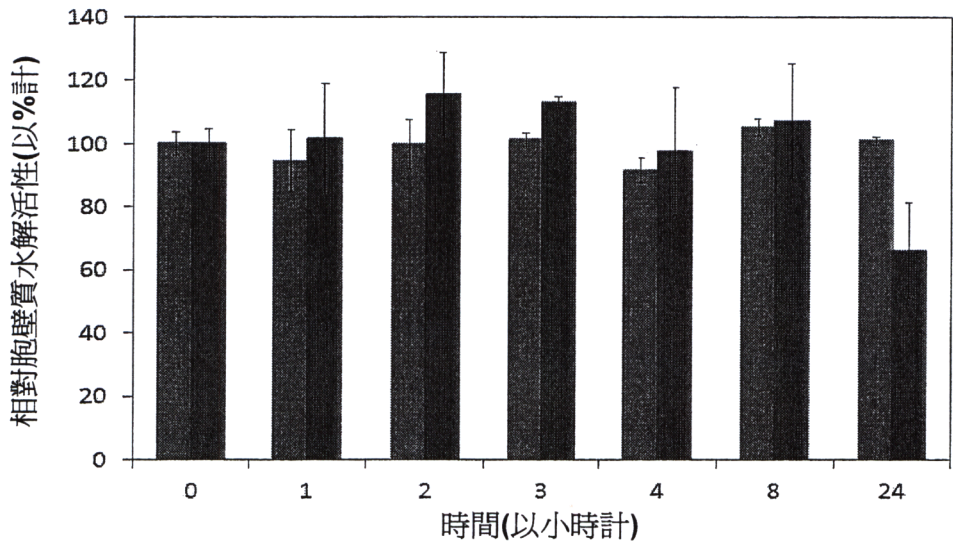
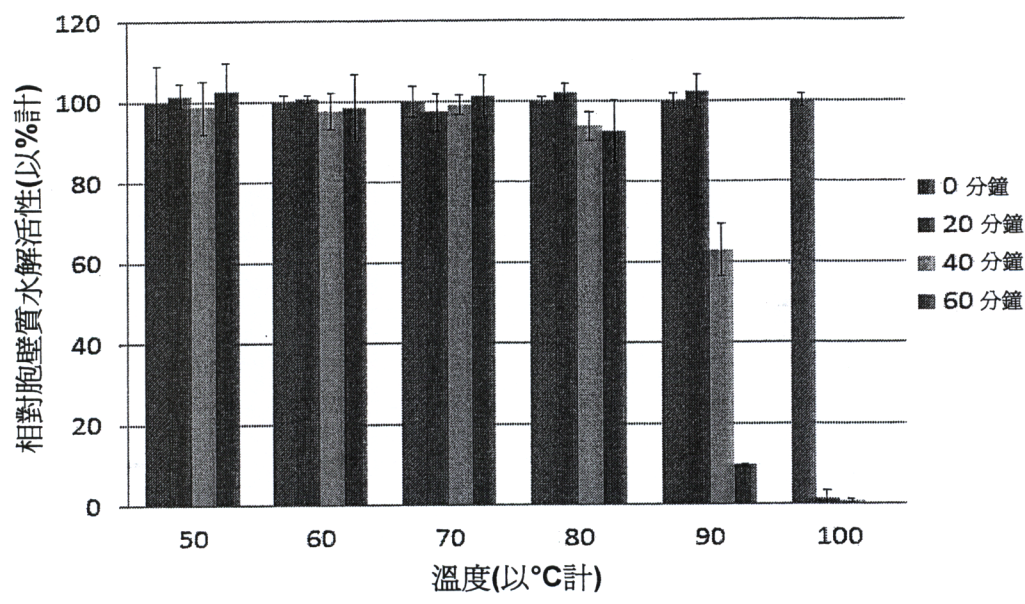


圖5

A



B

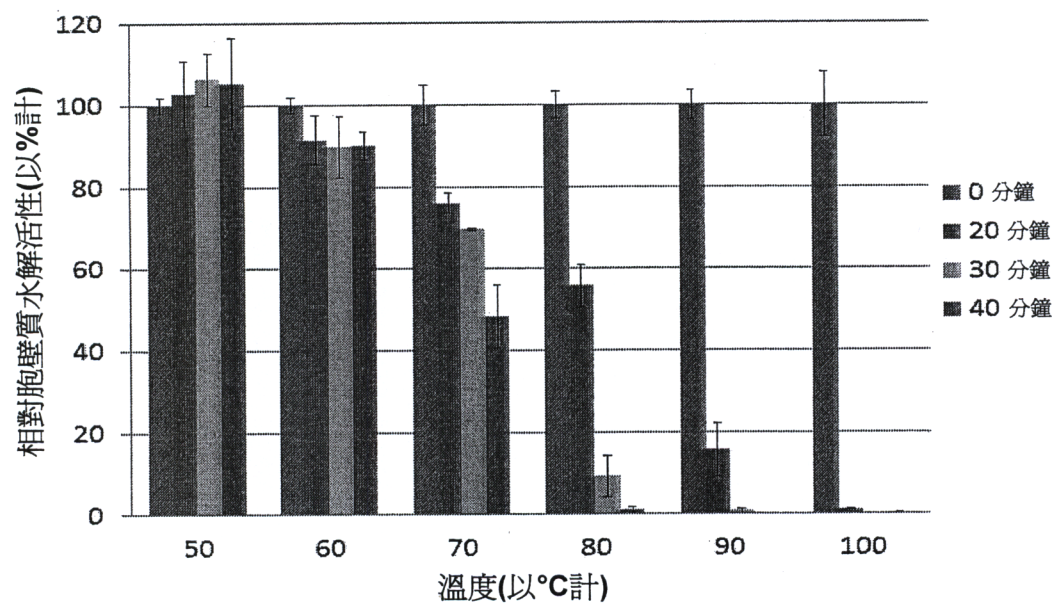


圖6