

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日:

2003年2月27日(27.02.2003)

PCT

(10) 国际公布号:

WO 03/016339 A1

(51) 国际分类号⁷: C07K 14/435, C12N 15/12, A61K 38/17

(21) 国际申请号: PCT/CN02/00317

(22) 国际申请日: 2002年5月8日(08.05.2002)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
01112855.0 2001年5月10日(10.05.2001) CN

(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 上海华谊生物技术
有限公司(SHANGHAI HUAYI BIO LAB)
[CN/CN]; 中国上海市漕宝路36号, Shanghai 200233
(CN)。

(72) 发明人:及

(75) 发明人/申请人(仅对美国): 孙玉昆(SUN, Yukun)
[CN/CN]; 伍登熙(WU, Dengxi) [CN/CN]; 朱志勇
(ZHU, Zhiyong) [CN/CN]; 余刚(YU, Gang) [CN/CN];
沈春娟(SHEN, Chunjuan) [CN/CN]; 赵少凌(ZHAO,
Shaoling) [CN/CN]; 周加祥(ZHOU, Jiaxiang)
[CN/CN]; 中国上海市漕宝路36号, Shanghai 200233
(CN)。

(74) 代理人: 上海智信专利代理有限公司(SHANGHAI
ZHI XIN PATENT AGENT LTD.); 中国上海市肇嘉
浜路446号伊泰利大厦10楼, Shanghai 200031 (CN)。

(81) 指定国(国家): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CO, CR, CU, CZ, DE,

DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO,
RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(84) 指定国(地区): ARIPO专利(GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI专利(BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG)

根据细则4.17的声明:

- 关于申请人在国际申请日有权申请并被授予专利(细则4.17(ii))对除美国以外的所有指定国
- 关于申请人在国际申请日有权要求该在先申请的优先权(细则4.17(iii))对除美国以外的所有指定国
- 关于申请人在国际申请日有权要求该在先申请的优先权(细则4.17(iii))对下列指定国:美国
- 发明人资格(细则4.17(iv))仅对美国

本国际公布:

- 包括国际检索报告。

所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: A FROG SKIN ANTIBACTERIAL PEPTIDE DERIVATIVE

(54) 发明名称: 蛙皮抗菌肽衍生物

(57) Abstract: The present invention relates to a frog skin antibacterial peptide derivative having antibacterial function and to its salt which is suitable for medicamental use, which structural formula is: Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-His-Ser-Ala-Lys-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-Phe-Val-Gly-Glu-Ile-X-Asn-Y-OH Wherein the "X" is select from amino acid residue Met or Ile or Leu, the "Y" contain two residues which select from Ser, Lys, Ile, Arg and Leu. The antibacterial function of the said derivatives is same as or larger than it of nature frog skin antibacterial peptide, and easily to be produced by solid phase chemosynthesis method, especially by geneticengineering technology.

(57) 摘要

本发明涉及一类有抗菌作用的蛙皮抗菌肽衍生物及其适用于药用的盐,

其结构式如下:

Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-His-Ser-Ala-Lys-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-Phe-Val-

Gly-Glu-Ile-X-Asn-Y-OH

其中: X 为选自 Met, Ile 或 Leu 的氨基酸残基, Y 为选自 Ser, Lys, Ile, Arg,

Leu 的两个氨基酸残基的组合。该衍生物具有与天然蛙皮抗菌肽相同或更强

的抗菌作用, 且易于固相化学合成法制备, 尤其易于用基因工程技术制备。



WO 03/016339 A1

蛙皮抗菌肽衍生物

技术领域

本发明涉及抗菌肽衍生物，具体地说涉及一类有抗菌作用的蛙皮抗菌肽衍生物。

技术背景

许多生物，如昆虫、微生物、两栖类动物和人类都会产生保卫机体的抗菌肽物质。这些抗菌肽能将细胞膜脂质体穿孔使之失活，并且对原虫类、精子、甚至病毒也有作用，因而被称为超级抗生素。抗菌肽类物质都带有不同数量的正电荷，其抗菌作用的机制在于，它所带的正电荷与细菌细胞壁膜的磷脂质的负电荷相结合，在细胞膜上形成离子通道，扩大通透性，使细菌细胞溶解、死亡，因此其抗菌作用与特异受体的结合无关。

抗菌肽的抗菌范围很广，对革兰氏阳性、革兰氏阴性菌、好氧菌以及厌氧菌都有抑制作用，并且与抗菌素不同，不产生抗药性，即使对多种抗菌素产生抗药性的细菌也可被抑制。另外，抗菌肽也可以抑制原虫和病毒。抗菌肽的代谢产物为氨基酸，因此对宿主细胞的毒性低。综上所述抗菌肽是一类有广阔的抗菌药用前景的化合物。

蛙皮抗菌肽 Magainin 是一类天然的从蛙皮中提取的有抗菌作用而又得到广泛研究的抗菌肽。它具有易合成，成本低，溶血性低等特点。

美国专利 USP 5589364 公开了如何利用基因工程技术制备天然蛙皮抗菌肽 Magainin II（23 个氨基酸）的方法。蛙皮抗菌肽 Magainin II 是天然蛙皮抗菌肽 Magainin 的一种，其氨基酸序列如下：

Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-His-Ser-Ala-Lys-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-Phe-Val-Gly-Glu-Ile-Met-Asn-Ser-OH

式中的 Gly 为甘氨酸，Ile 为异亮氨酸，Lys 为赖氨酸，Phe 为苯丙氨酸，Leu 为亮氨酸，His 为组氨酸，Ser 为丝氨酸，Ala 为丙氨酸，Val 为缬氨酸，

Glu 为谷氨酸, Met 为甲硫氨酸, Asn 为天冬酰胺。

美国专利 USP 6183992 公开了利用基因工程技术制备蛙皮抗菌肽衍生物 MSI-78 (22 个氨基酸) 的方法, MSI-78 的氨基酸序列如下:

Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-Lys-Lys-Ala-Lys-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-Phe-Val-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys-NH₂

美国 Harriet M. Lamb 等人在《ADIS NEW DRUG PROFILE》杂志上报导: 蛙皮抗菌肽衍生物 MSI-78 应用在治疗外伤感染及糖尿病下肢溃疡等方面有明显疗效。

发明目的

本发明的目的是提供一类蛙皮抗菌肽衍生物, 扩大了蛙皮抗菌肽衍生物的种类, 它们易于用固相化学制备, 尤其易于用基因工程技术制备, 从而为降低生产成本提供了可能。它们具有与天然蛙皮抗菌肽相同或者更强的抗菌作用。

发明概要

本发明的内容涉及一类如下结构的蛙皮抗菌肽衍生物及其适用于药用的盐:

Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-His-Ser-Ala-Lys-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-Phe-Val-Gly-Glu-Ile-X-Asn-Y-OH

其中: X 为选自 Met, Ile 或 Leu 的氨基酸残基,

Y 为选自 Ser, Lys, Ile, Arg, Leu 的两个氨基酸残基的组合。

本发明的蛙皮抗菌肽衍生物的氨基酸序列如序列表中<210>1 所述。

本发明提供的蛙皮抗菌肽衍生物是两性化合物, 可与酸性或碱性物质反应形成盐。通常采用的形成酸加成盐的酸为: 盐酸, 氢溴酸, 氢碘酸, 硫酸, 磷酸, 对-甲苯磺酸, 甲磺酸, 草酸, 对溴苯基磺酸, 碳酸, 琥珀酸, 柠檬酸, 苯甲酸, 乙酸等。这类盐的例子包括硫酸盐, 焦硫酸盐, 硫酸氢盐, 亚硫酸盐, 亚硫酸氢盐, 磷酸盐, 磷酸氢盐, 磷酸二氢盐, 偏磷酸盐, 焦磷酸盐,

盐酸盐，溴化物，碘化物，乙酸盐，丙酸盐，癸酸盐，辛酸盐，丙烯酸盐，甲酸盐，异丁酸盐，己酸盐，庚酸盐，丙炔酸盐，草酸盐，丙二酸盐，丁二酸盐，辛二酸盐，癸二酸盐，富马酸盐，马来酸盐，丁炔-1,4-二酸盐，己炔-1,6-二酸盐，苯甲酸盐，氯苯甲酸盐，甲基苯甲酸盐，二硝基苯甲酸盐，羟基苯甲酸盐，甲氧基苯甲酸盐，苯乙酸盐，苯丙酸盐，苯丁酸盐，柠檬酸盐，乳酸盐， γ -羟基丁酸盐，甘醇酸盐，酒石酸盐，甲磺酸盐，丙磺酸盐，萘-1-磺酸盐，萘-2-磺酸盐，扁桃酸盐等，优选的酸加成盐是蛙皮抗菌肽衍生物与无机酸如盐酸，氢溴酸，尤其是盐酸形成的盐。

碱性物质也可以与蛙皮抗菌肽反应形成盐，这些碱性物质包括铵，碱金属或碱土金属的氢氧化物，以及碳酸盐，碳酸氢盐等。典型的有氢氧化钠，氢氧化钾，氢氧化铵，碳酸钾等。

本发明中所述的蛙皮抗菌肽衍生物的氨基酸是 L 型或者 D 型异构体。

本发明中所述的蛙皮抗菌肽衍生物的制备方法。

该制备方法是基因工程方法，其步骤包括：按蛙皮抗菌肽衍生物的氨基酸序列合成基因片段，基因片段连接，质粒构建，克隆，发酵，分离纯化及冻干得产品。

本发明中所述的蛙皮抗菌肽衍生物的制备方法。

该制备方法是固相化学合成法，其步骤包括以 HMP 树脂为固相载体，氨基酸的 α -氨基用 9-苄基甲氧羰基 (Fmoc) 基团保护，用固相多肽合成仪合成，经分离提纯及冻干得产品。

本发明还提供了该蛙皮抗菌肽衍生物及其适用于药用的盐在制备抗菌药物中的应用。

本发明提供了一类蛙皮抗菌肽衍生物，扩大了蛙皮抗菌肽衍生物的种类，所提供的该类蛙皮抗菌肽易于用固相化学合成法制备，尤其易于用基因工程技术制备，从而为降低生产成本提供了可能。它们具有与天然蛙皮抗菌肽相同或者更强抗菌作用。对本发明所述结构的蛙皮抗菌肽衍生物进行的杀菌效果和杀菌时间实验，以及溶血和急性毒性实验表明：本发明的蛙皮抗菌

肽衍生物与天然蛙皮抗菌肽 Magainin II 对大肠杆菌的杀菌效果相当，对金黄色葡萄球菌亦有抑制作用。使用本发明蛙皮抗菌肽衍生物对 50 μ l 的菌液（ 10^6 菌/ml）进行杀菌实验，用量为 0.5 μ g，3 小时可杀死 90%以上的细菌，用量为 1 μ g，3 小时几乎杀死全部细菌。溶血实验表明本发明的蛙皮抗菌肽衍生物溶血 50%有效浓度（HC₅₀）与抑制 50%有效浓度（IC₅₀）比值约为 50，而天然蛙皮抗菌肽 Magainin II 的 HC₅₀ /IC₅₀ 约为 24，这说明本发明的产品安全性优于天然蛙皮抗菌肽 Magainin II。急性毒性实验表明本发明的蛙皮抗菌肽衍生物的急性毒性较低。

附图说明

现结合附图和实施例对本发明的内容作进一步说明。

附图 1 是本发明实施例 1 所得的蛙皮抗菌肽衍生物对大肠杆菌的杀菌时间图。

发明内容

下面实施例是对本发明的进一步阐述而不是对本发明的限制。

实施例 1 基因工程法制备本发明结构的蛙皮抗菌肽衍生物，其中 X 为 Leu，Y 为 Ser-Arg。

(1) 按该蛙皮抗菌肽衍生物的氨基酸序列合成基因片段如下：

(a) 5' AAT TCC ATG GGT ATC GGT AAA TTT CTG CAC AGC GCG AAA AAA

(b) 5' TTT GGT AAA GCG TTT GTG GGT GAA ATC CTG AAC AGC CGT TAG A

(c) 5' AG CTT CTA ACG GCT GTT CAG GAT TTC ACC CAC AAA CGC TTT

(d) 5' ACC AAA TTT TTT CGC GCT GTG CAG AAA TTT ACC GAT ACC CAT GG

(2) DNA 片段的连接

取光密度为 0.1 (A_{260nm}) 的上述四个片段，二个试管中分别加片段 a 与 d 和 b 与 c，再加聚核苷酸激酶缓冲液 (Polynucleotide Kinase Buffer) 和聚核苷酸激酶 (Polynucleotide Kinase)。37℃保温 60 分钟后，在 95℃水浴中保温 10 分钟，随后徐徐自然冷却至室温，再加 T4 连接酶缓冲液 (T4 Ligase

Buffer) 及三磷酸腺苷 (ATP) 溶液, 最后加 T4 连接酶 (T4 Ligase), 于 15°C 保温过夜, 使片段完成连接。

(3) 克隆

质粒含启动子为温控启动子 P_L (或乳糖启动子 Lac, 色氨酸-乳糖混合启动子 Tac), 用限制性内切酶 EcoR I 和 Hind III 双酶切之后, 经过酚/氯仿抽提, 再以氯仿洗涤 3 次, 然后以异丙醇沉淀, 经离心得质粒。将质粒与该蛙皮抗菌肽衍生物基因片段连接, 即得含有该蛙皮抗菌肽衍生物基因片段的质粒。转化大肠杆菌 JM103 或 JM109, 平板培养筛选菌落。

(4) 验证

从单菌落中抽提含该蛙皮抗菌肽衍生物基因片段的质粒, 经过 EcoR I +HindIII 双酶切之后, 进行 1%琼脂糖电泳, 以溴化乙锭 (Ethidium Bromide) 染色, 与标准样品对照检查克隆的基因片段, 再经 DNA 序列分析、检测完成克隆。

(5) 发酵

在 1L 含 300ml 组成为蛋白胨 10g、酵母抽提粉 5g、氯化钠 5g/L 的培养液 (LB 培养液) 摇瓶 (10 瓶) 中接种, 37°C 0.2mM 的异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导, 振荡培养过夜, 离心收集菌体。利用温控 P_L 启动子质粒时, 于 30°C 培养 8 小时, 然后将培养液升温至 42°C, 维持 4 小时使基因表达。

(6) 经溶菌酶 37°C、1 小时破碎细胞壁后离心, 将沉淀加 6M 盐酸胍抽提, 离心透析, 再离心, 得蛋白质包涵体。将包涵体洗涤 3 次, 洗涤溶液为 1%氯化钠, 0.1%曲拉通 x-100 (TrifoX-100), Tris-HCl 缓冲液 (20mM, pH8), 以十二烷基磺酸钠 (SDS) -12% 聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE) 电泳对融合蛋白进行鉴定。

(7) 将包涵体溶于 8M 尿素溶液中, 50mM HCl 条件下, 加溴化氰裂解, 避光通氮气条件下, 搅拌反应 2 小时。反应完毕, 用琼脂糖凝胶分子筛 G-25/快速蛋白分离系统 (FPLC) 分离, 得该蛙皮抗菌肽 衍生物粗品, 再经高效液相层析仪 (HPLC, C_{18} 柱), 以乙腈/0.1% 三氟乙酸梯度洗脱。结果得该蛙皮抗菌肽衍生物产品, 该产品 HPLC 图谱与化学合成品完全一致。

实施例 2 基因工程法制备本发明结构的蛙皮抗菌肽衍生物，其中 X 为 Leu，Y 为 Ser-Lys。

(1) 按该蛙皮抗菌肽衍生物的氨基酸序列合成基因片段如下：

- (a) 5' AAT TCC ATG GGT ATC GGT AAA TTT CTG CAC AGC GCG AAA AAA
- (b) 5' TTT GGT AAA GCG TTT GTG GGT GAA ATC CTG AAC AGC AAG TAG A
- (c) 5' AG CTT CTA CTT GCT GTT CAG GAT TTC ACC CAC AAA CGC TTT
- (d) 5' ACC AAA TTT TTT CGC GCT GTG CAG AAA TTT ACC GAT ACC CAT GG

本实施例以下步骤（2）～（7）均同实施例 1。结果得该蛙皮抗菌肽衍生物产品，该产品 HPLC 图谱与化学合成品完全一致。

实例例 3 固相化学合成法制备本发明结构的蛙皮抗菌肽衍生物，其中 X 为 Leu，Y 为 Lys-Arg。

(1) 所采用的氨基酸单体：

Fmoc-L-Ala-OH	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH
Fmoc-L-Asn(Trt)-OH	Fmoc-L-Met-OH
Fmoc-L-Asp(OtBu)-OH	Fmoc-L-Phe-OH
Fmoc-L-Gln(Trt)-OH	Fmoc-L-Pro-OH
Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH	Fmoc-L-Ser(tBu)-OH
Fmoc-L-Gly-OH	Fmoc-L-Thr(tBu)-OH
Fmoc-L-His(Trt)-OH	Fmoc-L-Trp-OH
Fmoc-L-Ile-OH	Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH
Fmoc-L-Leu-OH	Fmoc-L-Val-OH

上式中缩写表示：

- Fmoc：9-芴基甲氧羰基
- BOC：叔丁氧羰基（tert-butyloxycarbonyl）
- Trt：三苯甲基（trityl）
- OtBu：叔丁基酯
- TBu：叔丁基（tert-butyl）

(2) 合成所采用的仪器设备及试剂：

- 仪器为：Applied Biosystem 多肽合成仪，433A 型，美国
- 试剂有：N-甲基吡咯烷酮，二氯甲烷，六氢吡啶，甲醇，二甲氨基吡啶

(Dimethylaminopyridine) / DMF N,N- 二 异 丙 基 乙 胺 (N,N-diisopropylethylamine) / NMP, HBTU 100 mmole / 0.5 M HOBT in DMF, N,N-二环己基碳二亚胺 (N,N-Dicyclohexylcarbodiimide) /NMP

其中：DMF 为 N,N-二甲基甲酰胺 (N,N-Dimethylformamide)

NMP 为 N-甲基吡咯烷酮 (N-methylpyrrolidone)

HOBT 为 1-羟基苯并三唑 (1-Hydroxybenzotriazole)

HBTU 为 2- (1 氢-苯并三唑基) -四甲基脲六氟磷酸盐 (2-(1H-benzotriazole-yl-1,1,3,3-tetramethyl-Uronium hexafluorophosphate)

(3) 操作：

a. 合成

以 0.25mmol 规模为例，称取 HMP 树脂 0.25g，置入多肽合成仪上的反应器中，将各种带保护基氨基酸称取 1mmol 装瓶，按该促胰岛素分泌肽衍生物的氨基酸序列从 C-端向 N-端排列在合成仪中，于 25℃ 室温条件下，由计算机程序控制自动进行脱 Fmoc 保护、活化、连结，然后再进行下一轮循环，如此完成合成。合成结束后，将得到的带侧链保护基的多肽树脂在多肽合成仪上吹干后称重即可。

b. 脱保护基及切断树脂：

将带保护基的该促胰岛素分泌肽衍生物多肽树脂置于具塞三角烧瓶，加入裂解试剂如下表：

试剂	用量
水	0.50 ml
苯甲醚	0.50 ml
苯酚	0.75 g
巯基乙醇	0.20 ml
三氟乙酸	10.0 ml

然后在恒温 30℃ 条件下，电磁搅拌反应 6 小时；过滤、收集滤液，树脂用少量三氟乙酸洗涤；合并收集液与洗涤液，加入乙醚产生沉淀，过滤，沉淀用少量乙醚洗涤后放入干燥器中干燥，得到粗品。

c. HPLC 分离纯化、冻干

将得到的粗品用制备型 HPLC 进行分离、提纯，最后经冷冻干燥后得到产品。经色质联用，该衍生物分子量实测值与理论值相符。

实施例 4 药效实验

以实施例 1 所得蛙皮抗菌肽衍生物与天然蛙皮抗菌肽 II 对照进行抑菌实验，具体操作如下：

待试菌大肠杆菌 E.coli JM103, 金黄葡萄球菌 *Staphylococcus Aureus* 分别培养，稀释至 1×10^6 菌/ml，加入灭菌的 Tris-HCl 缓冲液 20mM pH6.5，加入不同浓度的该衍生物和天然蛙皮抗菌肽 II，37℃保温不同时间，然后取 50μl 涂于琼脂糖凝胶培养皿中，37℃培养过夜，记录残存菌落数，计算杀菌百分率。

(1) 杀菌效果表；

实施例 1 所得蛙皮抗菌肽衍生物与天然蛙皮抗菌肽 II 对大肠杆菌的杀菌效果对比表

品 名	浓度 μg/ml	残余菌落数			杀菌百分率%	
		0hr	3hr	4hr	3hr	4hr
实施例 1 所得蛙皮 抗菌肽衍 生物	0	407 228				
		317				
	10		109 73	160 195	71.3	44.2
			91	177		
	20		9 5	2 5	97.8	99.1
			7	3		
天然蛙皮 抗菌肽 II	10		99 57	52 44	75.4	84.9
			78	48		
	20		12 4	6 4	97.5	99.2
			8	5		

实施例 1 所得蛙皮抗菌肽衍生物对金黄葡萄球菌的杀菌效果表

浓度 μg/ml	残余菌落数			2hr 杀菌 百分率%
	0hr	1hr	2hr	
0	267			
	225			
50	158	18	2	99
	185	18	2	99
	172	18	2	99

(2) 杀菌时间图：实施例 1 所得蛙皮抗菌肽衍生物对大肠杆菌的抗菌时间图见附图 1

(3) 溶血实验表：

分 组		剂量 (μg/ml)	溶血%
实验组	天然蛙皮抗菌肽	100	0
		500	0
		1000	1.9
	实施例 1 所得蛙皮抗菌肽衍生物	100	0
		500	0
		1000	2
对照组	曲拉通 x-100 (Tritonx-100)	0.1%	100

(4) 急性毒性实验：以二只昆明小鼠进行急性毒性实验，腹腔注射实施例 1 所得蛙皮抗菌肽衍生物，观察 1 小时后小鼠的存活情况。

腹腔注射量	存活率
100μg	100%
200μg	100%
1000μg	100%

权利要求

1. 一类蛙皮抗菌肽衍生物及其适用于药用的盐，该蛙皮抗菌肽衍生物的氨基酸序列如序列表中<210>1 所述。

2. 根据权利要求 1 所述的蛙皮抗菌肽衍生物的制备方法，该制备方法是基因工程方法，其步骤包括：按蛙皮抗菌肽衍生物的氨基酸序列合成基因片段，基因片段连接，质粒构建，克隆，发酵，分离纯化及冻干得产品。

3. 根据权利要求 1 所述的蛙皮抗菌肽衍生物的制备方法，该制备方法是固相化学合成法，其步骤包括以 HMP 树脂为固相载体，氨基酸的 α -氨基用 9-芴基甲氧羰基（Fmoc）基团保护，用固相多肽合成仪合成，经分离提纯及冻干得产品。

4. 根据权利要求 1 所述的蛙皮抗菌肽衍生物及其适用于药用的盐在制备抗菌药物中的应用。

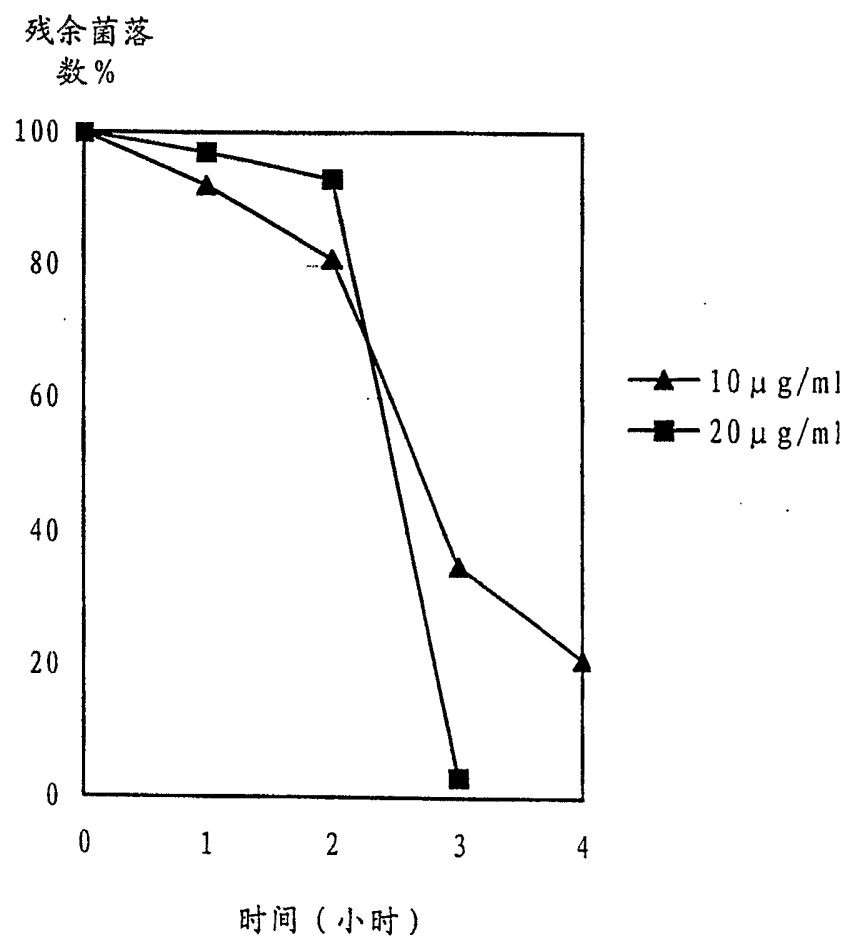


图1

SEQUENCE LISTING

<110> 上海华谊生物技术有限公司

<120> 蛙皮抗菌肽衍生物

<130> USP 6183992

<150> CN 01112855.0

<151> 2001-05-10

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 24

<212> PRT

<213> Magainin analogue

<220>

<221> VARIANT

<222> (21)..(21)

<223> Ile or Leu

<220>

<221> VARIANT

<222> (23)..(23)

<223> Lys or Ile or Arg or Leu

<220>

<221> VARIANT

<222> (24)..(24)

<223> Lys or Ile or Arg or Leu

<400> 1

Gly	Ile	Gly	Lys	Phe	Leu	His	Ser	Ala	Lys	Lys	Phe	Gly	Lys	Ala	Phe
1		5			10				15						

Val	Gly	Glu	Ile	Met	Asn	Ser	Ser
	20						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN02/00317

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC7 C07K14/435,C12N15/12,A61K38/17

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC7 C07K, C12N, A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GenBank, EMBL, DDBJ, PDB, PIR, WPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GenBank: AAA49930.1, GI: 214655, 1993/04/28, Terry, A.S., et al.	1 - 4
X	US5589364A, Magainin Pharmaceuticals Inc., 1996/12/31, See Claims	1 - 4

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
08.Aug.2002(08.08.02)

Date of mailing of the international search report
12 DEC 2002 (12.12.02)

Name and mailing address of the ISA/CN
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District,
100088 Beijing, China
Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer
Wang PengFei
Telephone No. 86-10-62093145

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inter:

il application No.

PCT/CN02/00317

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members	Publication date
US5589364 A	1996/12/31	WO9604373 A2 AU3321595 A WO9604373 A3	1996/02/15 1996/03/04 1996/03/21

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN02/00317

A. 主题的分类

IPC7 C07K14/435,C12N15/12,A61K38/17

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)

IPC7 C07K, C12N, A61K

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)

GenBank, EMBL,DDBJ,PDB, PIR,WPI

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求编号
X	GenBank 登录号: AAA49930.1, GI: 214655, 1993/04/28, Terry, A.S., et al.	1 - 4
X	US5589364A, Magainin Pharmaceuticals Inc., 1996/12/31, 见权利要求书	1 - 4

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的专用类型:

“A” 明确叙述了被认为不是特别相关的一般现有技术文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先的申请或专利

“L” 可能引起对优先权要求的怀疑的文件, 为确定另一篇
引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引
用的文件

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相
抵触, 但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理

“X” 特别相关的文件, 仅仅考虑该文件, 权利要求所记载的
发明就不能认为是新颖的或不能认为是有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件
结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时,
权利要求记载的发明不具有创造性

“&” 同族专利成员的文件

国际检索实际完成的日期

08.08 月.2002(08.08.02)

国际检索报告邮寄日期

1 2. 12月 2002 (1 2. 1 2. 02)

国际检索单位名称和邮寄地址:

中华人民共和国国家知识产权局专利局
中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088)

传真号: 86-10-62019451

受权官员:



电话号码: 86-10-62093145

国际检索报告
同族专利成员的情报

国际申请号

PCT/CN02/00317

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利成员	公布日期
US5589364 A	1996/12/31	WO9604373 A2 AU3321595 A WO9604373 A3	1996/02/15 1996/03/04 1996/03/21