

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200480019203. X

[51] Int. Cl.

C07K 14/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年6月10日

[11] 授权公告号 CN 100497375C

[51] Int. Cl. (续)

A23K 1/17 (2006.01)

C11D 3/00 (2006.01)

[22] 申请日 2004.6.10

[21] 申请号 200480019203. X

[30] 优先权

[32] 2003.6.11 [33] DK [31] PA200300865

[86] 国际申请 PCT/DK2004/000400 2004.6.10

[87] 国际公布 WO2004/108752 英 2004.12.16

[85] 进入国家阶段日期 2006.1.5

[73] 专利权人 诺维信公司

地址 丹麦鲍斯韦

[72] 发明人 D·R·塞古拉 P·H·米京德

H·H·K·赫根豪格 A·托西

[56] 参考文献

WO0112668A 2001.2.22

WO9609332A 1996.3.28

AMPHIPATHIC, ALPHA - HELICAL ANTI-MICROBIAL PEPTIDES. TOSSI 等. BIOPOLYMERS, Vol. 55 No. 1. 2000

DESIGN OF SYNTHETIC ANTIMICROBIAL PEPTIDES BASED ON SEQUENCE ANALOGY AND AMPHIPATHICITY. TOSSI A 等. EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, Vol. 250 No. 2. 1997

审查员 韩世炜

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 封新琴

权利要求书 3 页 说明书 91 页

[54] 发明名称

抗微生物多肽

[57] 摘要

本发明涉及具有抗微生物活性的多肽及具有编码所述多肽的核苷酸序列的多核苷酸。本发明还涉及核酸构建体、载体及包含所述核酸构建体的宿主细胞以及产生和使用所述多肽的方法。

1. 具有抗微生物活性的多肽,其包含 SEQ ID NO: 2 列出的氨基酸序列,所述 SEQ ID NO: 2 为 G-X₁-X₂-X₃-R-X₄-X₅-X₆-K-I-X₇-X₈-K-X₉-K-K-X₁₀-G-X₁₁-X₁₂-I-K-X₁₃-X₁₄-X₁₅-X₁₆-L-V-P;

其中

X₁ = L 或 R; X₂ = L、V、I 或 F; X₃ = R 或 K;
X₄ = L、V、I 或 F; X₅ = R、W 或 G; X₆ = K、R、G、M、N 或 E;
X₇ = G、R、K 或 E; X₈ = G、R、K 或 E; X₉ = L 或 F;
X₁₀ = I、F、C 或 Y; X₁₁ = Q、L 或 P; X₁₂ = K、I、M、L 或 V;
X₁₃ = P、A、H、N 或 D; X₁₄ = I 或 L; X₁₅ = R、H、Q 或 P;
X₁₆ = I 或 K。

2. 多核苷酸,其具有编码权利要求 1 定义的多肽的核苷酸序列。

3. 核酸构建体,其包含权利要求 2 中定义的核苷酸序列,所述核苷酸序列与在适宜宿主中指导所述多肽产生的一种或多种控制序列有效连接。

4. 重组表达载体,其包含权利要求 3 中定义的核酸构建体。

5. 重组宿主细胞,其包含权利要求 3 中定义的核酸构建体。

6. 用于产生如权利要求 1 定义的多肽的方法，所述方法包括：

(a) 在有益于产生所述多肽的条件下，培养如权利要求 5 中定义的重组宿主细胞；和

(b) 回收所述多肽。

7. 组合物，其包含如权利要求 1 定义的抗微生物多肽。

8. 权利要求 7 的组合物，其还包含额外的杀生物剂。

9. 体外杀灭微生物细胞或抑制微生物细胞生长的方法，其包括将所述微生物细胞与如权利要求 1 定义的抗微生物多肽接触。

10. 洗涤剂组合物，其包含表面活性剂和如权利要求 1 定义的抗微生物多肽。

11. 如权利要求 1 定义的抗微生物多肽，其用作药物。

12. 如权利要求 1 定义的抗微生物多肽，其用作兽医用的或者用于人的抗微生物治疗或预防剂。

13. 如权利要求 1 定义的抗微生物多肽的用途，其用于制备兽医用或者用于人的治疗剂，所述治疗剂用于治疗微生物感染或用于预防用途。

14. 如权利要求 1 定义的抗微生物多肽的用途，用于体外杀灭微生物细胞或抑制微生物细胞生长。

15. 如权利要求 1 定义的至少一种抗微生物多肽的用途，用于动物饲料中。

16. 如权利要求 1 定义的至少一种抗微生物多肽的用途，用于制备用于动物饲料中的组合物。

17. 动物饲料组合物，其具有 50 至 800 g/kg 的粗蛋白质含量并且包含至少一种如权利要求 1 定义的抗微生物多肽。

抗微生物多肽

背景

近年来，抗微生物剂的种类大量增加，然而抗性病原性微生物也平行增加。现在认识到抗性针对所有可临床用抗微生物剂。医学界对抗微生物抗性的反应是应用以前没有应用的针对抗性细菌的新的或备选抗生素。此方法需要持续研发新抗生素，作为可抑制或避开细菌抗性机制的现有化合物的修饰或作为化合物组合。

本发明的目的是提供具有改善抗微生物活性的新多肽及编码所述多肽的多核苷酸。

概述

本发明第一方面涉及具有抗微生物活性的多肽，其包含如下氨基酸序列或其具有抗微生物活性的至少 19 个氨基酸的片段：

G-X₁-X₂-X₃-R-X₄-X₅-X₆-K-I-X₇-X₈-K-X₉-X₁₀-K-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄-I-K-X₁₅-X₁₆-X₁₇-X₁₈-L-V-P;

其中

X₁ = L 或 R; X₂ = L、V、I 或 F; X₃ = R 或 K;
 X₄ = L、V、I 或 F; X₅ = R、K、W 或 G; X₆ = K、R、G、M、N 或 E;
 X₇ = G、R、K 或 E; X₈ = G、R、K 或 E; X₉ = L 或 F;
 X₁₀ = K 或 R; X₁₁ = I、L、F、C 或 Y; X₁₂ = G、A 或 T;
 X₁₃ = Q、R、L 或 P; X₁₄ = K、I、M、L 或 V; X₁₅ = P、A、H、N 或 D;
 X₁₆ = I 或 L; X₁₇ = R、H、Q 或 P; X₁₈ = I 或 K。

本发明另一方面涉及具有抗微生物活性的多肽，其包含与以下氨基酸

序列至多有两个氨基酸不同的氨基酸序列:

$G-X_1-X_2-X_3-R-X_4-X_5-X_6-K-I-X_7-X_8-K-X_9-X_{10}-K-X_{11}-X_{12}-Z$

其中

$X_1 = L$ 或 R ; $X_2 = L, V, I$ 或 F ; $X_3 = R$ 或 K ;

$X_4 = L, V, I$ 或 F ; $X_5 = R, K, W$ 或 G ; $X_6 = K, R, G, M, N$ 或 E ;

$X_7 = G, R, K$ 或 E ; $X_8 = G, R, K$ 或 E ; $X_9 = L$ 或 F ;

$X_{10} = K$ 或 R ; $X_{11} = I, L, F, C$ 或 Y ; $X_{12} = G, A$ 或 T ;

$Z = R$ 或 $X_{13}-X_{14}-I-K-X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}-L-V-P$;

其中

$X_{13} = Q, L$ 或 P ; $X_{14} = K, I, M, L$ 或 V ; $X_{15} = P, A, H, N$ 或 D ;

$X_{16} = I$ 或 L ; $X_{17} = R, H, Q$ 或 P ; $X_{18} = I$ 或 K 。

本发明第二方面涉及具有编码本发明的多肽的核苷酸序列的多核苷酸。

本发明第三方面涉及包含核苷酸序列的核酸构建体, 所述核苷酸序列编码本发明的多肽, 所述核苷酸序列有效连接指导在合适宿主中产生所述多肽的一种或多种控制序列有效连接。

本发明第四方面涉及包含本发明的核酸构建体的重组表达载体。

本发明第五方面涉及包含本发明的核酸构建体的重组宿主细胞。

本发明第六方面涉及用于产生本发明的多肽的方法, 该方法包含:

- (a) 在有益于产生所述多肽的条件下培养本发明的重组宿主细胞; 和
- (b) 回收所述多肽。

本发明的其它方面将从以下描述及所附的权利要求书中是显然的。

定义

在进一步详细讨论本发明之前, 首先对以下术语及惯用语进行定义:

抗微生物活性: 术语“抗微生物活性”文中定义为能杀死或抑制微生物

物细胞生长的活性。在本发明的上下文中，术语“抗微生物”欲表示杀细菌和/或制细菌作用和/或杀真菌和/或制真菌作用和/或杀病毒作用，其中术语“杀细菌”理解为能杀死细菌细胞。术语“制细菌”理解为能抑制细菌生长，即抑制生长的细菌细胞。术语“杀真菌”理解为能杀死真菌细胞。术语“制真菌”理解为能抑制真菌生长，即抑制生长的真菌细胞。术语“杀病毒”理解为能灭活病毒。术语“微生物细胞”表示细菌或真菌细胞（包括酵母）。

在本发明上下文中，术语“抑制微生物细胞生长”欲表示细胞处于非生长状态，即它们不能增殖。

对于本发明，抗微生物活性可根据 Lehrer 等人，*Journal of Immunological Methods*，第 137 (2)卷，第 167-174 页（1991）中描述的方法确定。

在具有抗微生物活性多肽的 25% (w/w) 的水溶液中，优选 10% (w/w) 的水溶液中；更优选 5% (w/w) 的水溶液中；甚至更优选 1% (w/w) 的水溶液中；最优选 0.5% (w/w) 的水溶液中；且特别是 0.1% (w/w) 的水溶液中于 20℃ 孵育 8 小时后（优选 4 小时后，更优选 2 小时后，最优选 1 小时后，且特别是 30 分钟后，），具有抗微生物活性多肽可能将大肠杆菌 (*Escherichia coli*) (DSM 1576) 活细胞数降低至 1/100。

在微生物生长培养基中，加入 1000 ppm 浓度时，优选加入 500 ppm 浓度时，更优选加入 250 ppm 浓度时，甚至更优选加入 100 ppm 浓度时；最优选加入 50 ppm 浓度时，特别是当加入 25 ppm 浓度时，具有抗微生物活性多肽于 25℃ 孵育 24 小时也能够抑制大肠杆菌 (DSM 1576) 的生长。

在具有抗微生物活性多肽的 25% (w/w) 的水溶液中，优选 10% (w/w) 的水溶液中；更优选 5% (w/w) 的水溶液中；甚至更优选 1% (w/w) 的水溶液中；最优选 0.5% (w/w) 的水溶液中；且特别是 0.1% (w/w) 的水溶液中，于 20℃ 孵育 8 小时后（优选 4 小时后，更优选 2 小时后，最优选 1 小时后，且特别是 30 分钟后，），能够将枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) (ATCC 6633) 的活细胞数降低至 1/100。

在微生物生长培养基中，加入 1000 ppm 浓度时，优选加入 500 ppm 浓度时，更优选加入 250 ppm 浓度时，甚至更优选加入 100 ppm 浓度时；最优选加入 50 ppm 浓度时，且特别是当加入 25 ppm 浓度时，具有抗微生物活性多肽于 25℃ 孵育 24 小时也能够抑制枯草芽孢杆菌（ATCC 6633）的生长晕。

本发明的多肽优选具有由 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 57 中任意一项 1 至 29 位氨基酸或 SEQ ID NO: 58 至 SEQ ID NO: 69 中任意一项 1 至 19 位氨基酸显示的氨基酸序列组成的多肽的至少 20% 抗微生物活性。在特别优选的实施方案中，所述多肽具有由 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 57 中任意一项 1 至 29 位氨基酸或 SEQ ID NO: 58 至 SEQ ID NO: 69 中任意一项 1 至 19 位氨基酸显示的氨基酸序列组成的多肽的抗微生物活性的至少 40%，如至少 50%，优选至少 60%，如至少 70%，更优选至少 80%，如至少 90%，最优选至少 95%，如约或至少 100%。

片段：文中应用时，氨基酸序列：G-X₁-X₂-X₃-R-X₄-X₅-X₆-K-I-X₇-X₈-K-X₉-X₁₀-K-X₁₁-X₁₂-Z；其中 X₁ = L 或 R；X₂ = L、V、I 或 F；X₃ = R 或 K；X₄ = L、V、I 或 F；X₅ = R、K、W 或 G；X₆ = K、R、G、M、N 或 E；X₇ = G、R、K 或 E；X₈ = G、R、K 或 E；X₉ = L 或 F；X₁₀ = K 或 R；X₁₁ = I、L、F、C 或 Y；X₁₂ = G、A 或 T；Z = R 或 X₁₃-X₁₄-I-K-X₁₅-X₁₆-X₁₇-X₁₈-L-V-P；其中 X₁₃ = Q、L 或 P；X₁₄ = K、I、M、L 或 V；X₁₅ = P、A、H、N 或 D；X₁₆ = I 或 L；X₁₇ = R、H、Q 或 P；X₁₈ = I 或 K；或 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 57 的任意一项或 SEQ ID NO: 58 至 SEQ ID NO: 69 的任意一项的“片段”为所述多肽的子序列，其中一个或多个氨基酸自氨基端和/或羧基端缺失。优选一个或多个氨基酸自羧基端缺失。片段可由至少 19 个氨基酸，如 19、20、21、22、23、24、25、26、27、28 或 29 个氨基酸组成。优选片段自多肽的氨基端计数由至少 19 个氨基酸组成。

等位变体：在本上下文中，术语“等位变体”表示占据相同染色体基因座基因的任意两个或多个备选形式。等位变异通过突变天然发生，且可

在群内导致多态性。基因突变可为沉默的（在所编码多肽中无变化）或可编码具有经改变氨基酸序列的多肽。多肽的等位变体为通过基因的等位变体编码的多肽。

基本上纯的多核苷酸：文中应用的术语“基本上纯的多核苷酸”是指多核苷酸制备物，其中多核苷酸自它的天然遗传环境中去除，并因此没有其它外来或不需要的编码序列且为在遗传工程蛋白质产生系统中适合应用的形式。因此，基本上纯的多核苷酸含有占与它天然相关的其它多核苷酸材料按重量计算至多 10%（优选其它多核苷酸材料的较低百分比，例如按重量计算至多 8%，按重量计算至多 6%，按重量计算至多 5%，按重量计算至多 4%，按重量计算至多 3%，按重量计算至多 2%，按重量计算至多 1% 且按重量计算至多 1/2%）。然而，基本上纯的多核苷酸可包括天然存在 5' 及 3' 非翻译区，如启动子和终止子。优选基本上纯的多核苷酸至少 92% 纯，即多核苷酸组成至少占制备物中存在总多核苷酸材料的按重量计算 92%，且优选较高百分率如至少 94% 纯，至少 95% 纯，至少 96% 纯，至少 97% 纯，至少 98% 纯，至少 99% 纯且至多 99.5% 纯是优选的。文中公开的多核苷酸优选基本上纯的形式。特别地，文中公开的多核苷酸为“基本上纯的形式”即多核苷酸制备物基本上无与它天然相关的其它多核苷酸材料是优选的。文中，术语“基本上纯的多核苷酸”与术语“经分离多核苷酸”及“经分离形式的多核苷酸”是同义的。

修饰：本发明上下文中术语“修饰”欲表示由氨基酸序列 G-X₁-X₂-X₃-R-X₄-X₅-X₆-K-I-X₇-X₈-K-X₉-X₁₀-K-X₁₁-X₁₂-Z；其中 X₁=L 或 R；X₂=L、V、I 或 F；X₃=R 或 K；X₄=L、V、I 或 F；X₅=R、K、W 或 G；X₆=K、R、G、M、N 或 E；X₇=G、R、K 或 E；X₈=G、R、K 或 E；X₉=L 或 F；X₁₀=K 或 R；X₁₁=I、L、F、C 或 Y；X₁₂=G、A 或 T；Z=R 或 X₁₃-X₁₄-I-K-X₁₅-X₁₆-X₁₇-X₁₈-L-V-P；其中 X₁₃=Q、L 或 P；X₁₄=K、I、M、L 或 V；X₁₅=P、A、H、N 或 D；X₁₆=I 或 L；X₁₇=R、H、Q 或 P；X₁₈=I 或 K；或如 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 57 中任意一项 1 至 29 位氨基酸或 SEQ ID NO: 58 至 SEQ ID NO: 69 中任意一项 1

至 19 位氨基酸显示的氨基酸序列组成的多肽的任意化学修饰以及编码所述多肽的 DNA 的遗传操作。修饰可为氨基酸侧链的取代，在目的氨基酸中或目的氨基酸的替代、缺失和/或插入；或在氨基酸序列中应用具有相似特征的非天然氨基酸。特别地，修饰可为酰胺化，如 C 端的酰胺化。

cDNA: 术语“cDNA”在本上下文中应用时，欲覆盖可通过自来源于真核细胞的成熟的、已剪接 mRNA 分子通过反转录制备的 DNA 分子。cDNA 缺乏一般在对应基因组 DNA 中存在的内含子序列。最初的初级 RNA 转录物为 mRNA 前体且经过一系列加工作用成为成熟的已剪接 mRNA。此类作用包括通过称为剪接的过程去除内含子序列。由于 cDNA 来自 mRNA，因此它缺乏内含子序列。

核酸构建体: 文中应用时，术语“核酸构建体”表示分离自天然存在基因或以在自然界不存在的方式进行修饰以含有核酸节段的单链或双链核酸分子。当核酸构建体含有用于表达本发明的编码序列所需控制序列时，术语核酸构建体与术语“表达盒”是同义的。

控制序列: 文中定义的术语“控制序列”包括对本发明的多肽的表达是必需的或有益的所有组分。每个控制序列对编码多肽的核苷酸序列可为天然的或外来的。此类控制序列包括但不限于前导序列、多腺苷酸化序列、前肽序列、启动子、信号肽序列及转录终止子。控制序列最少包括启动子、转录及翻译终止信号。控制序列可与接头一起提供用于导入有助于控制序列与编码多肽的核苷酸序列的编码区连接的特异限制性位点。

有效连接: 术语“有效连接”文中定义为构造，所述构造中将控制序列适当置于与 DNA 序列的编码序列相关位置使控制序列指导多肽的表达。

编码序列: 文中应用时，术语“编码序列”欲覆盖核苷酸序列，其直接规定它的蛋白质产物的氨基酸序列。编码序列的边界一般通过通常以 ATG 起始密码子开始的阅读框确定。编码序列一般包括 DNA、cDNA 及重组核苷酸序列。

表达: 在本上下文中，术语“表达”包括多肽产生相关的任意步骤，包括但不限于转录、转录后修饰、翻译及翻译后修饰。优选表达也包含多

肽的分泌。

表达载体：在本上下文中，术语“表达载体”覆盖线性或环状 DNA 分子，其包含编码本发明的多肽的节段且所述节段与提供它转录的额外节段有效连接。

宿主细胞：如文中应用的，术语“宿主细胞”包括用核酸构建体易于转化的任意细胞类型。

术语“多核苷酸探针”、“杂交”以及多种严格条件在标题为“具有抗微生物活性多肽”的节中进行定义。

详述

具有抗微生物活性多肽

第一方面，本发明涉及具有抗微生物活性的多肽且其中所述多肽包含，优选由氨基酸序列 $G-X_1-X_2-X_3-R-X_4-X_5-X_6-K-I-X_7-X_8-K-X_9-X_{10}-K-X_{11}-X_{12}-Z$ ；其中 $X_1 = L$ 或 R ； $X_2 = L, V, I$ 或 F ； $X_3 = R$ 或 K ； $X_4 = L, V, I$ 或 F ； $X_5 = R, K, W$ 或 G ； $X_6 = K, R, G, M, N$ 或 E ； $X_7 = G, R, K$ 或 E ； $X_8 = G, R, K$ 或 E ； $X_9 = L$ 或 F ； $X_{10} = K$ 或 R ； $X_{11} = I, L, F, C$ 或 Y ； $X_{12} = G, A$ 或 T ； $Z = R$ 或 $X_{13}-X_{14}-I-K-X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}-L-V-P$ ；其中 $X_{13} = Q, L$ 或 P ； $X_{14} = K, I, M, L$ 或 V ； $X_{15} = P, A, H, N$ 或 D ； $X_{16} = I$ 或 L ； $X_{17} = R, H, Q$ 或 P ； $X_{18} = I$ 或 K ；或 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 57 中任意一项的 1 至 29 位氨基酸或 SEQ ID NO: 58 至 SEQ ID NO: 69 中任意一项的 1 至 19 位氨基酸组成。在一个令人感兴趣的实施方案中，所述氨基酸序列与氨基酸序列： $G-X_1-X_2-X_3-R-X_4-X_5-X_6-K-I-X_7-X_8-K-X_9-X_{10}-K-X_{11}-X_{12}-Z$ ；其中 $X_1 = L$ 或 R ； $X_2 = L, V, I$ 或 F ； $X_3 = R$ 或 K ； $X_4 = L, V, I$ 或 F ； $X_5 = R, K, W$ 或 G ； $X_6 = K, R, G, M, N$ 或 E ； $X_7 = G, R, K$ 或 E ； $X_8 = G, R, K$ 或 E ； $X_9 = L$ 或 F ； $X_{10} = K$ 或 R ； $X_{11} = I, L, F, C$ 或 Y ； $X_{12} = G, A$ 或 T ； $Z = R$ 或 $X_{13}-X_{14}-I-K-X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}-L-V-P$ ；其中 $X_{13} = Q, L$ 或 P ； $X_{14} = K, I, M, L$ 或 V ； $X_{15} = P, A, H, N$ 或 D ； $X_{16} = I$ 或 L ； $X_{17} = R, H, Q$ 或 P ；

$X_{18} = I$ 或 K ; 或 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 57 中任意一项的 1 至 29 位氨基酸或 SEQ ID NO: 58 至 SEQ ID NO: 69 的任意一项的 1 至 19 位氨基酸的至多五个氨基酸 (例如五个氨基酸), 如至多四个氨基酸 (例如四个氨基酸), 例如至多三个氨基酸 (例如三个氨基酸), 特别是至多两个氨基酸 (例如两个氨基酸), 如一个氨基酸不同。

术语“SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 57 中的任意一项”欲表示 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 44、SEQ ID NO: 45、SEQ ID NO: 46、SEQ ID NO: 47、SEQ ID NO: 48、SEQ ID NO: 49、SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 52、SEQ ID NO: 53、SEQ ID NO: 54、SEQ ID NO: 55、SEQ ID NO: 56 或 SEQ ID NO: 57。

术语“SEQ ID NO: 58 至 SEQ ID NO: 69 中任意一项”欲表示 SEQ ID NO: 58、SEQ ID NO: 59、SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 61、SEQ ID NO: 62、SEQ ID NO: 63、SEQ ID NO: 64、SEQ ID NO: 65、SEQ ID NO: 66、SEQ ID NO: 67、SEQ ID NO: 68 或 SEQ ID NO: 69。

优选地, 本发明的多肽包含 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 57 中任意一项的氨基酸序列或 SEQ ID NO: 58 至 SEQ ID NO: 69 中任意一项的氨基酸序列; 或其具有抗微生物活性的片段。在另一优选实施方案中, 本发明的多肽包含 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 57 中任意一项的 1 至 29 位氨基酸或 SEQ ID NO: 58 至 SEQ ID NO: 69 中任意一项的 1 至 19 位氨基酸。

在更优选的实施方案中，所述多肽由 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 57 中任意一项的 1 至 29 位氨基酸或 SEQ ID NO: 58 至 SEQ ID NO: 69 中任意一项的 1 至 19 位氨基酸组成。

组成本发明的多肽的氨基酸可独立地选自 D 型或 L 型。

本发明的多肽可为人工变体，与氨基酸序列：G-X₁-X₂-X₃-R-X₄-X₅-X₆-K-I-X₇-X₈-K-X₉-X₁₀-K-X₁₁-X₁₂-Z；其中 X₁=L 或 R；X₂=L、V、I 或 F；X₃=R 或 K；X₄=L、V、I 或 F；X₅=R、K、W 或 G；X₆=K、R、G、M、N 或 E；X₇=G、R、K 或 E；X₈=G、R、K 或 E；X₉=L 或 F；X₁₀=K 或 R；X₁₁=I、L、F、C 或 Y；X₁₂=G、A 或 T；Z=R 或 X₁₃-X₁₄-I-K-X₁₅-X₁₆-X₁₇-X₁₈-L-V-P；其中 X₁₃=Q、L 或 P；X₁₄=K、I、M、L 或 V；X₁₅=P、A、H、N 或 D；X₁₆=I 或 L；X₁₇=R、H、Q 或 P；X₁₈=I 或 K；或 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 57 中任意一项的 1 至 29 位氨基酸或 SEQ ID NO: 58 至 SEQ ID NO: 69 中任意一项的 1 至 19 位氨基酸相比，所述人工变体包含，优选由具有至多三个，例如至多两个，如至多一个氨基酸替代、缺失和/或插入的氨基酸序列组成。此类人工变体可通过本领域已知的标准技术构建，如通过定点/随机诱变包含氨基酸序列：G-X₁-X₂-X₃-R-X₄-X₅-X₆-K-I-X₇-X₈-K-X₉-X₁₀-K-X₁₁-X₁₂-Z；其中 X₁=L 或 R；X₂=L、V、I 或 F；X₃=R 或 K；X₄=L、V、I 或 F；X₅=R、K、W 或 G；X₆=K、R、G、M、N 或 E；X₇=G、R、K 或 E；X₈=G、R、K 或 E；X₉=L 或 F；X₁₀=K 或 R；X₁₁=I、L、F、C 或 Y；X₁₂=G、A 或 T；Z=R 或 X₁₃-X₁₄-I-K-X₁₅-X₁₆-X₁₇-X₁₈-L-V-P；其中 X₁₃=Q、L 或 P；X₁₄=K、I、M、L 或 V；X₁₅=P、A、H、N 或 D；X₁₆=I 或 L；X₁₇=R、H、Q 或 P；X₁₈=I 或 K；或 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 57 的任意一项中 1 至 29 位氨基酸或 SEQ ID NO: 58 至 SEQ ID NO: 69 中任意一项的 1 至 19 位氨基酸显示的氨基酸序列的多肽来构建。在本发明的一个实施方案中，氨基酸变化较小，即为不显著影响蛋白质折叠和/或活性的保守性氨基酸替代；一般为一个至约 5 个氨基酸的小缺失；小氨基或羧基端延伸，如氨基端甲硫氨酸残基；多达约 10-25 个残基的小连接肽；或通过改变净

电荷或另一功能如多组氨酸道 (tract)、抗原表位或结合结构域有助于纯化的小延伸。

保守性替代的实例在碱性氨基酸 (精氨酸、赖氨酸及组氨酸)、酸性氨基酸 (谷氨酸及天冬氨酸)、极性氨基酸 (谷氨酰胺及天冬酰胺)、疏水性氨基酸 (亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸及甲硫氨酸)、芳香族氨基酸 (苯丙氨酸、色氨酸及酪氨酸) 及小氨基酸 (甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸及苏氨酸) 中。一般不改变比活的氨基酸替代是本领域已知的且例如通过 H. Neurath 和 R. L. Hill, 1979, 在 *The Proteins*, Academic Press, 纽约一书中描述。最通常发生的交换为 Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Tyr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu 及 Asp/Gly 以及这些颠倒过来。

在本发明的一个令人感兴趣的实施方案中, 氨基酸的改变为多肽理化性质改变的性质。例如可进行改善多肽热稳定性、改变底物特异性、改变最适 pH 等等的氨基酸改变。

N 端延伸

本发明的多肽的 N 端延伸可合适的由 1 至 50 个氨基酸, 优选 2-20 个氨基酸, 特别是 3-15 个氨基酸组成。在一个实施方案中 N 端肽延伸不含有 Arg (R)。在另一实施方案中 N 端延伸包含如以下进一步定义的 kex2 或 kex2 样切割位点。在优选的实施方案中 N 端延伸为包含至少两个 Glu (E) 和/或 Asp (D) 氨基酸残基的肽, 如包含以下序列: EAE、EE、DE 及 DD 之一的 N 端延伸。

Kex 2 位点

Kex2 位点 (参见, 例如, D. Goeddel 编辑的 *Methods in Enzymology* 第 185 卷, Academic Press Inc. (1990), San Diego, CA, "Gene Expression Technology" 一书) 及 Kex2 样位点为一些蛋白质的前肽编码区及成熟区之间发现的双碱性识别位点 (即, 切割位点)。

在某些情况中显示插入 kex2 位点或 kex2 样位点改善在前肽切割位点的正确内肽酶加工, 导致蛋白质分泌水平增加。

在本发明上下文中，插入 kex2 或 kex2 样位点导致 N 端延伸某位置获得切割的可能性，导致与氨基酸序列：G-X₁-X₂-X₃-R-X₄-X₅-X₆-K-I-X₇-X₈-K-X₉-X₁₀-K-X₁₁-X₁₂-Z；其中 X₁ = L 或 R；X₂ = L、V、I 或 F；X₃ = R 或 K；X₄ = L、V、I 或 F；X₅ = R、K、W 或 G；X₆ = K、R、G、M、N 或 E；X₇ = G、R、K 或 E；X₈ = G、R、K 或 E；X₉ = L 或 F；X₁₀ = K 或 R；X₁₁ = I、L、F、C 或 Y；X₁₂ = G、A 或 T；Z = R 或 X₁₃-X₁₄-I-K-X₁₅-X₁₆-X₁₇-X₁₈-L-V-P；其中 X₁₃ = Q、L 或 P；X₁₄ = K、I、M、L 或 V；X₁₅ = P、A、H、N 或 D；X₁₆ = I 或 L；X₁₇ = R、H、Q 或 P；X₁₈ = I 或 K；或 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 57 中任意一项的 1 至 29 位氨基酸或 SEQ ID NO: 58 至 SEQ ID NO: 69 中任意一项的 1 至 19 位氨基酸显示的成熟多肽相比延伸的抗微生物多肽。

融合多肽

本发明的多肽也包括融合多肽或可切割融合多肽，所述融合多肽或可切割融合多肽中另一多肽与本发明的多肽或其片段的 N 端或 C 端融合。融合多肽通过编码另一多肽的核苷酸序列（或其部分）与本发明的核苷酸序列（或其部分）融合产生。用于产生融合多肽的技术是本领域已知的，且包括连接编码多肽的编码序列以使它们在框内且融合多肽的表达处于相同启动子及终止子的控制下。

多核苷酸及核苷酸序列

本发明还涉及具有编码本发明的多肽的核苷酸序列的多核苷酸。特别地，本发明涉及由编码本发明的多肽核苷酸序列组成的多核苷酸。由于遗传密码的简并性，本领域技术人员易于认识到可以制备编码本发明的每种多肽的一些核苷酸序列。本领域公知哪些核苷酸组成编码本发明的多肽的氨基酸的密码子。

本发明还涉及编码具有抗微生物活性的氨基酸序列：G-X₁-X₂-X₃-R-X₄-X₅-X₆-K-I-X₇-X₈-K-X₉-X₁₀-K-X₁₁-X₁₂-Z；其中 X₁ = L 或 R；X₂ = L、V、I 或 F；X₃ = R 或 K；X₄ = L、V、I 或 F；X₅ = R、K、W 或 G；X₆ = K、R、G、M、N 或 E；X₇ = G、R、K 或 E；X₈ = G、R、K

或 E; $X_9 = L$ 或 F; $X_{10} = K$ 或 R; $X_{11} = I, L, F, C$ 或 Y; $X_{12} = G, A$ 或 T; $Z = R$ 或 $X_{13}-X_{14}-I-K-X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}-L-V-P$; 其中 $X_{13} = Q, L$ 或 P; $X_{14} = K, I, M, L$ 或 V; $X_{15} = P, A, H, N$ 或 D; $X_{16} = I$ 或 L; $X_{17} = R, H, Q$ 或 P; $X_{18} = I$ 或 K; 或 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 57 中任意一项或 SEQ ID NO: 58 至 SEQ ID NO: 69 中任意一项的片段的多核苷酸。多核苷酸的子序列为其中自 5'和/或 3'端缺失一个或多个核苷酸的核苷酸序列。

核苷酸序列可通过遗传工程中应用的标准克隆方法获得以将核苷酸序列自一个位置至一个不同位点重新定位, 所述核苷酸序列在所述不同位点复制。克隆方法可包含切割及分离包含编码所述多肽的核苷酸序列的目的片段, 将该片段插入载体分子及将重组载体整合到宿主细胞, 在宿主细胞中所述核苷酸序列的多个拷贝或克隆将进行复制。核苷酸序列可为基因组的、半合成、合成来源的或其任意组合。

编码本发明的多肽的核苷酸序列的修饰对于包含氨基酸序列的多肽合成可能是必需的, 所述氨基酸序列与氨基酸序列: $G-X_1-X_2-X_3-R-X_4-X_5-X_6-K-I-X_7-X_8-K-X_9-X_{10}-K-X_{11}-X_{12}-Z$; 其中 $X_1 = L$ 或 R; $X_2 = L, V, I$ 或 F; $X_3 = R$ 或 K; $X_4 = L, V, I$ 或 F; $X_5 = R, K, W$ 或 G; $X_6 = K, R, G, M, N$ 或 E; $X_7 = G, R, K$ 或 E; $X_8 = G, R, K$ 或 E; $X_9 = L$ 或 F; $X_{10} = K$ 或 R; $X_{11} = I, L, F, C$ 或 Y; $X_{12} = G, A$ 或 T; $Z = R$ 或 $X_{13}-X_{14}-I-K-X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}-L-V-P$; 其中 $X_{13} = Q, L$ 或 P; $X_{14} = K, I, M, L$ 或 V; $X_{15} = P, A, H, N$ 或 D; $X_{16} = I$ 或 L; $X_{17} = R, H, Q$ 或 P; $X_{18} = I$ 或 K; 或 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 57 中任意一项的 1 至 29 为氨基酸或 SEQ ID NO: 58 至 SEQ ID NO: 69 中任意一项的 1 至 19 位氨基酸相比, 具有至少一个替代、缺失和/或插入。这些人工变体与分离自天然来源的多肽在一些工程方法上不同, 例如在比活、热稳定性、最适 pH 等等中不同的变体。

此类修饰可在对分子功能关键的区域外产生且仍然产生活性多肽对本领域技术人员是显然的。本发明的核苷酸序列编码多肽的活性必需并因此

优选不进行修饰，如替代的氨基酸残基可根据本领域已知方法如定点诱变或丙氨酸扫描诱变(参见，例如，Cunningham 和 Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085) 进行鉴定。在丙氨酸扫描诱变技术中，在分子的每个正电荷残基上导入突变，对产生的突变分子进行抗微生物活性检测以鉴定对分子活性重要的氨基酸残基。如通过技术如核磁共振分析、晶体学或光亲和标记法(参见，例如，de Vos 等人, 1992, *Science* 255: 306-312; Smith 等人, 1992, *Journal of Molecular Biology* 224: 899-904; Wlodaver 等人, 1992, *FEBS Letters* 309: 59-64) 确定的三维结构的分析也可确定底物-酶相互作用位点。

此外，编码本发明的多肽的核苷酸序列可通过导入核苷酸替代进行修饰，所述核苷酸替代不产生核苷酸序列编码的多肽的另一氨基酸序列，但与欲用于产生所述酶的宿主生物体的密码子选择对应。

将突变导入核苷酸序列以将核苷酸改变为另一核苷酸可通过定点诱变完成，使用本领域已知方法中的任意一种。特别有用的为利用具有目的插入片段的超螺旋、双链 DNA 载体及含有目的突变的两种合成引物的方法。每种与载体的相反链互补的寡核苷酸引物通过 Pfu DNA 聚合酶在温度循环期间延伸。整合引物后，产生含有交错切口的经突变质粒。温度循环后，将产物用对甲基化及半甲基化 DNA 特异的 DpnI 处理以消化亲代 DNA 模板并选择包含突变的经合成 DNA。也可用本领域已知的其它方法。对核苷酸替代的一般性描述，参见例如 Ford 等人, 1991, *Protein Expression and Purification* 2: 95-107 一书。

核酸构建体

本发明还涉及包含本发明的核苷酸序列的核酸构建体，所述核苷酸序列有效连接一种或多种控制序列，所述控制序列在合适宿主细胞中在与控制序列相容条件下指导编码序列的表达。

对编码本发明多肽的核苷酸序列可以多种方式进行操作以提供多肽的表达。取决于表达载体，插入载体前对核苷酸序列的操作可以是所希望的或必需的。用重组 DNA 方法修饰核苷酸序列的技术是本领域公知的。

控制序列可为适当的启动子序列，所述启动子序列为通过宿主细胞识别用于核苷酸序列的表达的核苷酸序列。启动子序列含有介导多肽表达的转录控制序列。启动子可为在选择的宿主细胞中显示转录活性的任意核苷酸序列，包括突变、截短及杂合启动子，且可自与宿主细胞同源或异源的编码细胞外或细胞内多肽的基因获得。

用于指导本发明的核酸构建体转录，特别是在细菌宿主细胞中转录的合适启动子的实例为获自大肠杆菌 *lac* 操纵子、天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) 琼脂糖酶基因 (*dagA*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 果聚糖蔗糖酶基因 (*sacB*)、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) α 淀粉酶基因 (*amyL*)、嗜热脂肪芽孢杆菌麦芽糖淀粉酶基因 (*amyM*)、解淀粉芽孢杆菌 α -淀粉酶基因 (*amyQ*)、地衣芽孢杆菌青霉素酶基因 (*penP*)、枯草芽孢杆菌 *xylA* 和 *xylB* 基因和原核 β -内酰胺酶基因 (Villa-Kamaroff 等人, 1978, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 75: 3727-3731) 的启动子，以及 *tac* 启动子 (DeBoer 等人, 1983, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 80: 21-25) 的启动子。更多启动子在 “Useful proteins from recombinant bacteria” in *Scientific American*, 1980, 242: 74-94 一书中以及在 Sambrook 等人, 1989, 同上一书中描述。

用于指导在丝状真菌宿主细胞中本发明的核酸构建体的转录的适宜的启动子的实例为得自以下的启动子：米曲霉 TAKA 淀粉酶、*Rhizomucor miehei* 天冬氨酸蛋白酶、黑曲霉中性 α -淀粉酶、黑曲霉酸稳定 α -淀粉酶、黑曲霉或泡盛曲霉葡糖淀粉酶 (*glaA*)、*Rhizomucor miehei* 脂肪酶、米曲霉碱性蛋白酶、米曲霉丙糖磷酸异构酶、构巢曲霉乙酰胺酶和尖孢镰孢胰蛋白酶样蛋白酶 (WO 96/00787)，以及 Na_2 -*tpi* 启动子 (来自黑曲霉中性 α -淀粉酶和米曲霉丙糖磷酸异构酶基因的启动子的杂合体) 和它们的突变体、截短和杂合启动子。

在酵母宿主中，有用启动子得自以下来源的基因：酿酒酵母烯醇化酶 (*ENO-1*)、酿酒酵母半乳糖激酶 (*GAL1*)、酿酒酵母醇脱氢酶/甘油醛-3-

磷酸脱氢酶(ADH2/GAP)和酿酒酵母 3-磷酸甘油酸激酶。其它酵母宿主细胞的有用启动子如 Romanos 等人, 1992, 酵母 (Yeast) 8 : 423-488 所述。

所述控制序列还可以是一种适宜的转录终止子序列, 其为由宿主细胞识别用于终止转录的序列。终止子序列有效连接到编码所述多肽的核苷酸序列的 3' 末端。任何在所选择的宿主细胞中发挥功能的终止子可以用于本发明。

优选的用于丝状真菌宿主细胞的终止子得自以下来源的基因: 米曲霉 TAKA 淀粉酶、黑曲霉葡糖淀粉酶、构巢曲霉氨基苯甲酸合酶、黑曲霉 α -葡糖苷酶和尖孢镰孢胰蛋白酶样蛋白酶。

优选的酵母宿主细胞终止子得自以下来源的基因: 酿酒酵母烯醇化酶、酿酒酵母细胞色素 C(CYC1)和酿酒酵母甘油醛-3-磷酸脱氢酶。Romanos 等人, 1992, 上文, 描述了其它有用的酵母宿主细胞的终止子。

所述控制序列还可以是适宜的先导序列, 为对宿主细胞翻译重要的 mRNA 非翻译区。所述先导序列有效连接到编码多肽的核苷酸序列的 5' 末端。任何在所选择的宿主细胞内发挥功能的先导序列可以用于本发明。

优选的用于丝状真菌宿主细胞的先导序列得自以下来源的基因: 米曲霉 TAKA 淀粉酶和构巢曲霉丙糖磷酸异构酶。

适宜的酵母宿主细胞先导序列得自以下来源的基因: 酿酒酵母烯醇化酶(ENO-1)、酿酒酵母 3-磷酸甘油酸激酶、酿酒酵母 α -因子和酿酒酵母醇脱氢酶/甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (ADH2/GAP)。

所述控制序列还可以是聚腺苷酸化序列, 该序列有效连接到核苷酸序列的 3' 末端且在转录时被宿主细胞识别为一种将聚腺苷残基加至被转录的 mRNA 的信号的序列。任何在所选择的宿主细胞中发挥功能的聚腺苷酸化序列可以用于本发明。

优选的用于丝状真菌宿主细胞的聚腺苷酸化序列得自以下来源的基因: 米曲霉 TAKA 淀粉酶、黑曲霉葡糖淀粉酶、构巢曲霉氨基苯甲

酸合酶、尖孢镰孢胰蛋白酶样蛋白酶和黑曲霉 α -葡糖苷酶。

酵母宿主细胞的有用的聚腺苷酸化序列如由 Guo 和 Sherman, 1995, 分子细胞生物学 (Molecular Cellular Biology) 15 : 5983-5990 所描述。

所述的控制序列还可以是信号肽编码区, 其编码连接到多肽的氨基末端的氨基酸序列并指导所编码的多肽进入细胞分泌途径。所述核苷酸序列的编码序列的 5'端本身可以包含一个天然连接在具有编码所分泌的多肽的编码区节段的翻译读框上的信号肽编码区。可选择地, 所述编码序列的 5'端可以包含此编码序列的外源信号肽编码区。当所述的编码序列并不天然包含一个信号肽编码区时, 可能需要外源信号肽编码区。可选择地, 所述的天然信号肽编码区可用外源信号肽编码区简单替换以促进多肽的分泌。但任何可指导所表达的多肽进入所选择的宿主细胞的分泌途径的信号肽编码区均可用于本发明。

细菌宿主细胞的有效信号肽编码区是得自以下来源的基因的信号肽编码区: 芽孢杆菌属 NCIB 11837 麦芽糖淀粉酶、嗜热脂肪芽孢杆菌 α -淀粉酶、地衣芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶、地衣芽孢杆菌 β -内酰胺酶、嗜热脂肪芽孢杆菌中性蛋白酶(nprT、nprS、nprM)和枯草芽孢杆菌 prsA。其它信号肽如在以下文献中所述: Simonen 和 Palva, 1993, 微生物学评论 (Microbiological Reviews) 57 : 109-137。

丝状真菌宿主细胞的有效信号肽编码区是得自以下基因的信号肽编码区: 米曲霉 TAKA 淀粉酶、黑曲霉中性淀粉酶、黑曲霉葡糖淀粉酶、米赫根毛霉(Rhizomucor miehei)天冬氨酸蛋白酶、Humicola insolens 纤维素酶和 Humicola lanuginosa 脂肪酶。

酵母宿主细胞的有用信号肽得自以下来源的基因: 酿酒酵母 α -因子和酿酒酵母转化酶。Romanos 等人, 1992, 上文, 描述了其它有用的信号肽编码区。

所述控制序列还可以是编码位于多肽氨基末端的氨基酸序列的前肽编码区。所得的多肽已知是一种酶原或前多肽(或在某些情况下为酶原)。前多肽一般没有活性, 并可以通过催化切割或自身催化切割来自前

多肽的前肽而转化为成熟的活性多肽。所述的前肽编码区可以得自以下来源的基因：枯草芽孢杆菌碱性蛋白酶 (aprE)、枯草芽孢杆菌中性蛋白酶 (nprT)、酿酒酵母 α -因子、米赫根毛霉天冬氨酸蛋白酶和嗜热毁丝霉漆酶(WO 95/33836)。

当在多肽的氨基末端存在信号肽和前肽区两者时，所述的前肽区与多肽的氨基末端相邻，所述的信号肽区与所述前肽区的氨基末端相邻。

加入对与宿主细胞生长相关的多肽的表达进行调节的控制序列也是有利的。那些调控系统的实例是其对化学或物理刺激物（包括存在的调节化合物）的应答可以使得基因的表达被开启或关闭的系统。原核系统中的调控系统包括 lac、tac 和 trp 操纵子系统。在酵母中，可以使用 ADH2 系统或 GAL1 系统。在丝状真菌中，TAKA α -淀粉酶启动子、黑曲霉葡萄糖淀粉酶启动子和米曲霉葡萄糖淀粉酶启动子可以用作控制序列。控制序列的其它实例为允许基因扩增的控制序列。在真核系统中，它们包括在甲氨蝶呤存在下扩增的二氢叶酸还原酶基因和用重金属扩增的金属硫蛋白基因。在这些情况下，编码多肽的核苷酸序列与控制序列有效连接。

表达载体

本发明还涉及包含本发明的核酸构建体的重组表达载体。以上描述的多种核苷酸及控制序列可连在一起以产生重组表达载体，所述重组表达载体可包括一个或多个方便的限制性位点以允许编码所述多肽的核苷酸序列在这些位点的插入或替代。备选地，本发明的核苷酸序列可通过将核苷酸序列或包含该序列的核酸构建体插入到用于表达的适当载体进行表达。在产生表达载体时，将编码序列置于载体中以使编码序列与适当控制序列有效连接用于表达。

重组表达载体可为任意载体（例如，质粒或病毒），所述任意载体可方便进行重组 DNA 方法且可以引起核苷酸序列的表达。载体的选择一般取决于载体与将导入载体的宿主细胞的相容性。载体可为线性或闭合环状质粒。

载体可为自主复制载体，即作为染色体外实体存在的载体，其复制不依赖于染色体复制，例如，质粒、染色体外元件、微型染色体或人工染色体。

载体可包含用于确保自身复制的任意方式。备选地，载体可为这种载体，当其导入到宿主细胞时，与基因组整合且与其整合的染色体一起复制。此外，可应用一种载体或质粒或一起含有欲导入到宿主细胞基因组中总DNA的两种或多种载体或质粒或转座子。

本发明的载体优选含有一个或多个允许易于选择经转化细胞的选择标记。选择标记为基因，其产物提供杀生物或病毒抗性、重金属抗性、营养缺陷体原养型等等。

细菌选择标记的实例为来自枯草芽孢杆菌或地衣芽孢杆菌的 *dal* 基因，或赋予抗生素抗性如氨基青霉素、卡那霉素、氯霉素或四环素抗性的标记。用于酵母宿主细胞的合适标记为 *ADE2*、*HIS3*、*LEU2*、*LYS2*、*MET3*、*TRP1* 及 *URA3*。用于在丝状真菌宿主细胞中应用的选择标记包括但不限于 *amdS*（乙酰胺酶）、*argB*（鸟氨酸氨甲酰转移酶）、*bar*（磷丝菌素乙酰转移酶）、*hygB*（潮霉素磷酸转移酶）、*niaD*（硝酸还原酶）、*pyrG*（乳清酸核苷-5'-磷酸脱羧酶）、*sC*（硫酸腺苷酰转移酶）、*trpC*（邻氨基苯甲酸合酶）以及其等同物。

优选在曲霉细胞中应用的为构巢曲霉或米曲霉的 *amdS* 及 *pyrG* 基因及吸水链霉菌（*Streptomyces hygroscopicus*）的 *bar* 基因。

本发明的载体优选含有允许将载体稳定整合到宿主细胞基因组中或不依赖于基因组在细胞的载体中自主复制的元件。

对于整合到宿主细胞基因组中，载体可依赖于编码多肽的核苷酸序列或载体任意其它元件用于通过同源或非同源重组将载体稳定整合到基因组中。备选地，载体可含有额外核苷酸序列用于通过同源重组指导整合到宿主细胞基因组中。额外核苷酸能使载体整合到宿主细胞基因组中染色体中的精确位置。为了增加在精确位置整合的可能性，整合元件优选含有足够数量的核苷酸，如 100 至 1,500 个碱基对，优选 400 至 1,500 个碱基对，且

最优选 800 至 1,500 个碱基对, 所述碱基对与对应的靶序列高度同源以增强同源重组的可能性。整合元件可为与宿主细胞基因组中靶序列同源的任意序列。此外, 整合元件可为非编码或编码核苷酸序列。另一方面, 载体可通过非同源重组整合到宿主细胞基因组中。

对于自主复制, 载体可进一步包含能使载体在所述宿主细胞中自主复制的复制起点。细菌复制起点的实例为允许在大肠杆菌中复制的质粒 pBR322、pUC19、pACYC177 及 pACYC184 及允许在芽孢杆菌中复制的 pUB110、pE194、pTA1060 及 pAMB1 的复制起点。用于在酵母宿主细胞中应用的复制起点实例为 2 微米复制起点、ARS1、ARS4, ARS1 与 CEN3 的组合以及 ARS4 与 CEN6 的组合。复制起点可为具有突变的复制起点, 所述突变使得所述复制起点宿主细胞中具有功能性温度敏感(参见, 例如, Ehrlich, 1978, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 75: 1433)。

可将一个以上拷贝的本发明核苷酸序列插入到宿主细胞以增加基因产物的产生。核苷酸序列拷贝数的增加可通过将至少一个额外拷贝的序列整合到宿主细胞基因组获得, 或者通过所述核苷酸序列包括可扩增的选择标记基因, 其中细胞含有选择标记基因的经扩增的拷贝, 因此通过在存在适当选择试剂时培养细胞以选择核苷酸序列的额外拷贝可以获得核苷酸序列拷贝数的增加。

用于连接以上的描述元件以构建本发明的重组表达载体的方法对本领域技术人员是公知的(参见, 例如, Sambrook 等人, 1989, 同上)。

宿主细胞

本发明还涉及包含本发明的核酸构建体的重组宿主细胞, 所述核酸构建体有益地在多肽重组产生中应用。将包含本发明的核苷酸序列的载体导入到宿主细胞中使载体作为染色体整合体或作为如以前描述的自身复制染色体外载体保持。

宿主细胞可为单细胞微生物例如, 原核细胞或非单细胞微生物, 例如真核细胞。

有用的单细胞细胞为细菌细胞如革兰氏阳性细菌，包括但不限于芽孢杆菌细胞，例如，嗜碱芽孢杆菌 (*Bacillus alkalophilus*)、短芽孢杆菌 (*Bacillus brevis*)、环状芽孢杆菌 (*Bacillus circulans*)、克劳氏芽孢杆菌 (*Bacillus clausii*)、凝结芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans*)、灿烂芽孢杆菌 (*Bacillus lautus*)、迟缓芽孢杆菌 (*Bacillus lentus*)、地衣芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)、嗜热脂肪芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌及苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*)；或链霉菌细胞，例如，变铅青链霉菌 (*Streptomyces lividans*) 或鼠灰链霉菌 (*Streptomyces murinus*)，或革兰氏阴性细菌如大肠杆菌及假单胞菌种。在优选的实施方案中，细菌宿主细胞为迟缓芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌或枯草芽孢杆菌细胞。在另一优选的实施方案中，芽孢杆菌细胞为嗜碱芽孢杆菌。

将载体导入细菌宿主细胞中可通过例如，原生质体转化 (参见，例如，Chang 和 Cohen, 1979, *Molecular General Genetics* 168: 111-115)、用感受态细胞 (参见，例如，Young 和 Spizizin, 1961, *Journal of Bacteriology* 81: 823-829，或 Dubnau 和 Davidoff-Abelson, 1971, *Journal of Molecular Biology* 56: 209-221)、电穿孔 (参见，例如，Shigekawa 和 Dower, 1988, *Biotechniques* 6: 742-751) 或接合 (参见，例如，Koehler 和 Thorne, 1987, *Journal of Bacteriology* 169: 5771-5278) 进行。

宿主细胞可为真核细胞，如哺乳动物、昆虫、植物或真菌细胞。

在优选的实施方案中，宿主细胞为真菌细胞。如文中应用的“真菌”包括子囊菌门 (*Ascomycota*)、担子菌门 (*Basidiomycota*)、壶菌门 (*Chytridiomycota*) 及接合菌门 (*Zygomycota*) (如通过 Hawksworth 等人，在 Ainswoffh and Bisby's *Dictionary of The Fungi*, 第 8 版, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, 英国一书中定义的) 以及卵菌门 (*Oomycota*) (如在 Hawksworth 等人, 1995, 同上, 第 171 页一书中引用的) 及所有有丝分裂孢子真菌 (Hawksworth 等人, 1995, 同上)。

在更优选的实施方案中，真菌宿主细胞是酵母细胞。文中所用“酵母”

包括产子囊孢子酵母(内孢霉目)、产担孢子酵母和属于半知菌的酵母(芽孢纲)。因为酵母的分类在将来可以改变,所以对于本发明,酵母将如 *Biology and Activities of Yeast* (Skinner, F. A., Passmore, S. M., 和 Davenport, R. R., 编者, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series No. 9, 1980) 所描述的定义。

在优选实施方案中,酵母宿主细胞是假丝酵母属(*Candida*)、汉逊酵母属(*Hansenula*)、克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)、毕赤酵母属(*Pichia*)、酵母属(*Saccharomyces*)、裂殖酵母属(*Schizosaccharomyces*)或 *Yarrowia* 细胞。

在最优选的实施方案中,酵母宿主细胞是卡氏酵母(*Saccharomyces carlsbergensis*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、糖化酵母(*Saccharomyces diastaticus*)、*Saccharomyces douglasii*、可鲁弗酵母(*Saccharomyces kluyveri*)、诺地酵母(*Saccharomyces norbensis*)或卵形糖酵母(*Saccharomyces oviformis*)细胞。在另一最优选的实施方案中,酵母宿主细胞是乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)细胞。在另一最优选的实施方案中,酵母宿主细胞是 *Yarrowia lipolytica* 细胞。

在另一优选实施方案中,真菌宿主细胞是丝状真菌细胞。“丝状真菌”包括真菌门和卵菌门亚门的所有丝状形式(如 Hawksworth 等人, 1995, 上文定义)。丝状真菌特征是由菌丝体壁,其由壳多糖、纤维素、葡聚糖、壳聚糖、甘露聚糖和其他复杂多糖组成。营养体生长是通过菌丝延长,碳代谢是专性需氧的。相比,酵母,如酿酒酵母的营养体生长是通过单细胞菌体的出芽,碳代谢是发酵的。

在甚至更优选的实施方案中,丝状真菌宿主细胞是但不限于,枝顶孢霉属(*Acremonium*)、曲霉属(*Aspergillus*)、镰孢属(*Fusarium*)、腐质霉属(*Humicola*)、毛霉(*Mucor*)、毁丝霉属(*Myceliophthora*)、链孢霉属(*Neurospora*)、青霉属(*Penicillium*)、草根霉菌属(*Thielavia*)、*Tolyocladium* 或木霉属(*Trichoderma*)的细胞。

在最优选的实施方案中,丝状真菌宿主细胞是泡盛曲霉(*Aspergillus*

awamori)、臭曲霉 (*Aspergillus foetidus*)、日本曲霉 (*Aspergillus japonicus*)、构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 或米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 细胞。在另一最优化的实施方案中, 丝状真菌宿主细胞是杆孢状镰孢 (*Fusarium bactridioides*)、*Fusarium cerealis*、*Fusarium crookwellense*、大刀镰孢 (*Fusarium culmorum*)、禾谷镰孢 (*Fusarium graminearum*)、禾赤镰孢 (*Fusarium graminum*)、异孢镰孢 (*Fusarium heterosporium*)、合欢木镰孢 (*Fusarium negundi*)、尖孢镰孢 (*Fusarium oxysporum*)、多枝镰孢 (*Fusarium reticulatum*)、玫瑰色镰孢 (*Fusarium roseum*)、接骨木镰孢 (*Fusarium sambucinum*)、肤色镰孢 (*Fusarium sarcochroum*)、拟分枝孢镰孢 (*Fusarium sporotrichioides*)、硫色镰孢 (*Fusarium sulphureum*)、*Fusarium torulosum*、*Fusarium trichothecioides* 或 *Fusarium venenatum* 细胞。在甚至最优化的实施方案中, 丝状真菌亲本细胞是 *Fusarium venenatum* (Nirenberg sp. nov.)。在另一最优化的实施方案中, 丝状真菌宿主细胞是 *Humicola insolens*、*Humicola lanuginosa*、米赫毛霉 (*Mucor miehei*)、嗜热毁丝霉 (*Myceliophthora thermophila*)、粗糙链孢霉 (*Neurospora crassa*)、产紫青霉 (*Penicillium purpurogenum*)、*Thielavia terrestris*、*Trichoderma harzianum*、康宁木霉 (*Trichoderma koningii*)、*Trichoderma longibrachiatum*、*Trichoderma reesei* 或绿色木霉 (*Trichoderma viride*) 细胞。

通过一种本身已知方法可以转化真菌细胞, 所述方法包括原生质体形成、转化原生质体和再生细胞壁。用于转化曲霉属宿主细胞的适宜的方法在 EP 238 023 和 Yelton 等人 1984, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 81: 1470-1474 中描述。用于转化镰孢属的适宜方法由 Malardier 等人, 1989, *Gene* 78: 147-156 和 WO 96/00787 描述。使用 Becker 和 Guarente, Abelson, J. N. 和 Simon, M. I., 编者, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology*, 卷 194, 182-187 页, Academic Press Inc., New York; Ito 等人, 1983, *Journal of Bacteriology* 153: 163; 和 Hinnen 等人, 1978, *Proceedings of the National*

Academy of Sciences USA 75: 1920 所描述的方法转化酵母。

产生方法

本发明还涉及用于产生本发明的多肽的方法，所述方法包含 (a) 在有益于产生所述多肽的条件下培养宿主细胞；及 (b) 回收所述多肽。

在本发明产生方法中，用本领域已知方法在适合于产生所述多肽的营养培养基中培养所述细胞。例如，可通过摇瓶培养、在实验室或工业发酵罐中小规模互大规模发酵（包括连续、分批、补料分批或固态发酵）在合适培养基中并在允许所述多肽表达和/或分离的条件下培养所述细胞。使用本领域已知方法，在包含碳源、氮源及无机盐的合适营养培养基中进行培养。合适培养基可以获自供应商或可根据已公开的组分（例如，在美国典型培养物保藏中心的目录中）制备。如果多肽分泌到营养培养基中，那么可直接自培养基中回收多肽。如果所述多肽不分泌，那么可自细胞裂解物中回收所述多肽。

可用对所述多肽特异的本领域已知方法检测所述多肽。这些检测方法可包括应用特异抗体、酶产物的形成或酶底物的消失。例如，酶测定法可用于确定如文中描述的多肽的活性。

所得多肽可通过本领域已知方法进行回收。例如，可通过常规方法自营养培养基中回收所述多肽，所述常规方法包括但不限于，离心、过滤、提取、喷雾干燥、蒸发或沉淀。

可通过本领域已知的多种方法纯化本发明的多肽，所述方法包括但不限于层析（例如，离子交换、亲和、疏水、层析聚焦及大小排阻）、电泳方法（例如，制备等电聚焦）、差别溶解性（例如，硫酸铵沉淀）、SDS-PAGE 或提取（参见，例如，Protein Purification, J.-C. Janson 和 Lars Ryden 编辑，VCH Publishers, 纽约，1989）。

植物

本发明还涉及转基因植物、植物部分或植物细胞，所述转基因植物、植物部分或植物细胞用编码具有本发明的抗微生物活性多肽的核苷酸序列转化以表达及产生可回收量的多肽。可自植物或植物部分回收所述多肽。

备选地，含有重组多肽的植物或植物部分可这样使用用于提高食品或饲料品质，例如提高营养价值、适口性、流变学性质或破坏抗营养因子。经回收多肽、植物或植物部分可用于改善或改变动物及家畜中的消化菌群。

转基因植物可为双子叶（双子叶植物）或单子叶（单子叶植物）。单子叶植物的实例为禾本科植物，如牧草（blue grass, *Poa*），饲料草如羊茅属（*Festuca*）、黑麦草属（*Lolium*），温带草如剪股颖属（*Agrostis*）及谷类，例如小麦、燕麦、黑麦、大麦、稻、高粱及玉米（玉蜀黍）。

双子叶植物的实例为烟草、马铃薯、甜菜，豆类如羽扇豆、豌豆、豆和大豆及十字花科植物（十字花科）如花椰菜、油菜籽及密切相关的模式生物拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）。

植物部分的实例为茎、愈伤组织、叶、根、果实、种子及块茎。特定植物组织如叶绿体、质外体、线粒体、液泡、过氧化物酶体及细胞质也被考虑为植物部分。此外，任意植物细胞无论任意组织来源都被考虑为植物部分。

此类植物、植物部分及植物细胞的子代也包括在本发明范围内。

表达本发明的多肽的转基因植物或植物细胞可根据本领域已知方法进行构建。简而言之，通过将编码本发明的多肽的一个或多个表达构建体整合到植物宿主基因组并将产生的经修饰植物或植物细胞增殖成转基因植物或植物细胞构建植物或植物细胞。

方便地，表达构建体为核酸构建体，所述核酸构建体包含编码本发明多肽的核苷酸序列，其与在所选植物或植物部分中表达所述核苷酸序列所需的适当调节序列有效连接。此外，表达构建体可包含用于鉴定表达构建体已经整合的宿主细胞的选择标记及用于将构建体导入所述植物中必需的DNA序列（所述DNA序列取决于应用的DNA导入方法）。

调节序列如启动子及终止序列及任选的信号或转运序列的选择例如在希望多肽何时、在哪里及怎样进行表达的基础上进行鉴定。例如，编码本发明多肽的基因的表达可为组成型或诱导型，或可为发育、阶段或组织特异的，且基因产物可靶向特定组织或植物部分如种子或叶。例如 Tague 等

人, 1988, *Plant Physiology* 86: 506 描述了调节序列。

对于组成型表达, 可应用 35S-CaMV 启动子 (Franck 等人, 1980, *Cell* 21: 285-294)。器官特异启动子可为, 例如来自储存库 (sink) 组织如种子、马铃薯块茎及果实 (Edwards 和 Coruzzi, 1990, *Ann. Rev. Genet.* 24: 275-303) 或来自代谢库组织如分生组织 (Ito 等人, 1994, *Plant Mol. Biol.* 24: 863-878) 的启动子, 种子特异启动子如来自稻的谷蛋白、谷醇溶蛋白、球蛋白或白蛋白启动子 (Wu 等人, 1998, *Plant and Cell Physiology* 39: 885-889)、来自蚕豆的豆球蛋白 B4 及未知种子蛋白质基因的蚕豆 (*Vicia faba*) 启动子 (Conrad 等人, 1998, *Journal of Plant Physiology* 152: 708-711)、来自种子油体蛋白质的启动子 (Chen 等人, 1998, *Plant and Cell Physiology* 39: 935-941)、来自欧洲油菜 (*Brassica napus*) 储藏蛋白质的 napA 启动子或本领域已知的任意其它特异启动子, 例如在 WO91/14772 中描述。此外, 启动子可为叶特异启动子, 如来自稻或番茄的 *rbcS* 启动子 (Kyojuka 等人, 1993, *Plant Physiology* 102: 991-1000)、小球藻病毒腺嘌呤甲基转移酶基因启动子 (Mitra 和 Higgins, 1994, *Plant Molecular Biology* 26: 85-93) 或来自稻的 *aldP* 基因启动子 (Kagaya 等人, 1995, *Molecular and General Genetics* 248: 668-674) 或创伤诱导型启动子, 如马铃薯 *pin2* 启动子 (Xu 等人, 1993, *Plant Molecular Biology* 22: 573-588)。

也可应用启动子增强子元件以获得在植物中所述酶的较高表达。例如, 启动子增强子元件可为置于启动子和编码本发明多肽的核苷酸序列之间的内含子。例如, Xu 等人, 1993, 同上公开了应用稻肌动蛋白 1 基因的第一个内含子以增强表达。

选择标记基因及表达构建体的任意其它部分可自本领域可获得的选择标记基因及表达构建体中选择。

根据本领域已知的常规技术, 将核酸构建体整合到植物基因组中, 所述技术包括农杆菌介导的转化、病毒介导的转化、显微注射、粒子轰击、生物射弹转化及电穿孔 (Gasser 等人, 1990, *Science* 244: 1993; Potrykus, 1990, *Bio/Technology* 8: 535; Shimamoto 等人, 1989, *Nature* 338: 274)。

当前，根癌农杆菌介导的基因转移是用于产生转基因双子叶植物的所选方法（对于综述，参见 Hooykas 和 Schilperoort, 1992, *Plant Molecular Biology* 19: 15-38）。然而它也可用于转化单子叶植物，尽管对于这些植物一般优选其它转化方法。当前，用于产生转基因单子叶植物的所选方法为离子轰击（用转化 DNA 包裹的显微金或钨颗粒）胚胎胼胝体或正发育的胚胎（Christou, 1992, *Plant Journal* 2 : 275-281; Shimamoto, 1994, *Current Opinion Biotechnology* 5: 158-162; Vasil 等人, 1992, *Bio/Technology* 10: 667-674）。用于转化单子叶植物的备选方法基于如 Omirulleh 等人, 1993, *Plant Molecular Biology* 21: 415-428 描述的原生质体转化。

转化后，根据本领域公知方法对其中整合表达构建体的转化体进行选择并再生成完整植物。

本发明还涉及用于产生本发明的多肽的方法，所述方法包含（a）在有益于产生所述多肽的条件下，培养包含编码具有本发明的抗微生物活性的多肽的核苷酸序列的转基因植物或植物细胞；和（b）回收所述多肽。

组合物

在又一方面，本发明涉及包含本发明的抗微生物多肽的组合物，如药物组合物。

组合物可包含本发明的多肽作为主要多肽组分，例如单组分组合物。备选地，组合物可包含多种酶活性，如氨基酸酶、淀粉酶、糖酶、羧肽酶、过氧化氢酶、纤维素酶、壳多糖酶、角化酶（cutinase）、环糊精糖基转移酶、脱氧核糖核酸酶、酯酶、 α -半乳糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、 α -葡糖苷酶、 β -葡糖苷酶、卤过氧化物酶（haloperoxidase）、转化酶、漆酶、脂肪酶、甘露糖苷酶、氧化酶、果胶分解酶、肽谷氨酰胺酶、过氧化物酶、植酸酶、多酚氧化酶、蛋白水解酶、核糖核酸酶、转谷氨酰胺酶或木聚糖酶。

所述组合物可还包含另一种药理学活性剂，如额外的杀生物剂，如以上定义显示抗微生物活性的另一抗微生物多肽。如本领域已知的，杀生物剂

可为抗生素。抗生素类型包括青霉素，例如青霉素 G、青霉素 V、二甲氧基苯青霉素、苯唑青霉素、羧苄青霉素、乙氧萘青霉素、氨苄青霉素等；青霉素与 β -内酰胺酶抑制剂的组合，头孢菌素，例如，头孢克洛、头孢唑啉、头孢氨苄、拉氧头孢等；碳青霉烯类 (carbapenems)；单环内酰胺；氨基糖苷类；四环素类；大环内酯类；林可霉素类；多粘菌素类；磺胺类；喹诺酮类 (quinolones)；氯霉素；甲硝唑；壮观霉素、甲氧苄啶、万古霉素等。杀生物剂也可为抗真菌剂，包括多烯，例如两性霉素 B、制霉菌素；5-flucosyn 及吡咯类，例如咪康唑、酮康唑、伊曲康唑及氟康唑。

在一个实施方案中，杀生物剂为非酶化学剂。在另一实施方案中杀生物剂为非多肽化学剂。

在杀生物剂的 25% (w/w) 水溶液中，优选在 10% (w/w) 水溶液中；更优选在 5% (w/w) 水溶液中；甚至更优选在 1% (w/w) 水溶液中；最优选在 0.5% (w/w) 水溶液中；且特别是在 0.1% (w/w) 水溶液中于 20 °C 孵育 8 小时后 (优选 4 小时后，更优选 2 小时后，最优选 1 小时后，且特别是 30 分钟后)，杀生物剂能够降低大肠杆菌 (DSM 1576) 活细胞数至 1/100。

在微生物生长培养基中，当加入 1000 ppm 浓度；优选加入 500 ppm 浓度；更优选加入 250 ppm 浓度；甚至更优选当加入 100 ppm 浓度；最优选加入 50 ppm 浓度；且特别是加入 25 ppm 浓度杀生物剂时，于 25 °C 作用 24 小时，所述杀生物剂也能够抑制大肠杆菌 (DSM 1576) 生长。

在杀生物剂的 25% (w/w) 水溶液中，优选在 10% (w/w) 水溶液中；更优选在 5% (w/w) 水溶液中；甚至更优选在 1% (w/w) 水溶液中；最优选在 0.5% (w/w) 水溶液中；且特别是在 0.1% (w/w) 水溶液中于 20 °C 孵育 8 小时后 (优选 4 小时后，更优选 2 小时后，最优选 1 小时后，且特别是 30 分钟后)，杀生物剂能够降低枯草芽孢杆菌 (ATCC 6633) 活细胞数至 1/100。

在微生物生长培养基中，当加入 1000 ppm 浓度；优选加入 500 ppm 浓度；更优选加入 250 ppm 浓度；甚至更优选加入 100 ppm 浓度；最优选

加入 50 ppm 浓度；且特别是加入 25 ppm 浓度杀生物剂时，于 25℃ 作用 24 小时，所述杀生物剂也能够抑制枯草芽孢杆菌（ATCC 6633）生长。

组合物可包含合适的载体材料。当组合物用作药物时，组合物也可包含能将本发明的抗微生物多肽递送到目的部位的合适递送载体。

组合物可根据本领域已知方法进行制备且可为液态或干燥组合物形式。例如，多肽组合物可为颗粒或微颗粒形式。组合物中包括的多肽可根据本领域已知方法进行稳定。

以下给出了本发明的多肽组合物优选用途的实例。本发明的多肽组合物的剂量及组合物应用的其它条件可基于本领域已知方法确定。

方法及用途

本发明还包含本发明的抗微生物多肽的多种用途。抗微生物多肽一般用于受细菌、真菌、酵母或藻类污染的任意部位。一般地，所述部位为水系统，如冷却水系统、洗衣冲洗水，油系统如切削油、润滑油、油田等等，需要杀死所述部位的微生物或控制它们的生长。然而，本发明也可用于已知抗微生物组合物有用的所有应用中，如木材、乳胶、粘合剂、胶水、纸、纸板、纺织品、皮革、塑料、堵塞材料及饲料的保护。

其它用途包括食品、饮料、化妆品如洗液、面霜、凝胶、油膏、肥皂、洗发剂、调节剂、止汗剂、除臭剂、漱口水、隐形眼镜制品、酶制剂或食品成分的保存。

因此，本发明的抗微生物多肽可作为消毒剂用于例如治疗痤疮、眼或口中的感染、皮肤感染；止汗剂或防臭剂；足浴盐；用于隐形镜片、坚硬表面、牙齿（口腔护理）、创伤、擦伤等等的清洁及消毒。

大体上，可以考虑本发明的抗微生物多肽用于任意坚硬表面的清洁、消毒或抑制微生物生长。可与本发明的抗微生物多肽有益接触的表面的实例为，所用加工设备的表面，所述加工设备为例如乳制品、化学品或药物加工车间、水卫生系统、油加工车间、纸浆加工车间、水处理车间及冷却塔。本发明的抗微生物多肽应以对所述表面清洁、消毒或抑制微生物生长有效的量应用。

此外，设想本发明的抗微生物多肽可有益地在就地清洗（C. I. P.）系统中应用用于清洁任意种类加工设备。

本发明的抗微生物多肽又可用于在食品加工车间清洁表面及烹任用具以及准备或提供食品的任意区域，如医院、疗养院、饭店，特别是快餐店、熟食店等等。在食品制品中它也可作为抗微生物剂应用且特别用于奶酪、水果及蔬菜以及色拉棒上食品的表面抗微生物剂。

所述多肽也可在基于水的油漆中用作防腐剂或消毒剂。

本发明的抗微生物多肽也用于水位线的微生物控制，和用于水的消毒，特别用于工业水的消毒。

本发明还涉及本发明的抗微生物多肽或组合物作为药物的用途。此外，本发明的抗微生物多肽或组合物也可用于制造药物用于控制或抗击微生物，如真菌生物或细菌，优选革兰氏阳性细菌。

本发明的组合物及抗微生物多肽可用作兽医用或者用于人的抗微生物治疗剂或预防剂。因此，本发明的组合物及抗微生物多肽可用于制备兽医用的或者用于人的治疗剂或预防剂用以治疗微生物感染，如细菌或真菌感染，优选革兰氏阳性细菌感染。特别地微生物感染可与肺病相关，所述肺病包括但不限于肺结核、肺炎及囊性纤维化以及治疗性传播疾病，包括但不限于淋病及衣原体。

本发明的组合物包含有效量的本发明的抗微生物多肽。

术语“有效量”在文中应用时欲表示包含足可抑制所述微生物生长的所述抗微生物多肽或其片段或变体的量，所述多肽包含氨基酸序列： $G-X_1-X_2-X_3-R-X_4-X_5-X_6-K-I-X_7-X_8-K-X_9-X_{10}-K-X_{11}-X_{12}-Z$ ；其中 $X_1 = L$ 或 R ； $X_2 = L, V, I$ 或 F ； $X_3 = R$ 或 K ； $X_4 = L, V, I$ 或 F ； $X_5 = R, K, W$ 或 G ； $X_6 = K, R, G, M, N$ 或 E ； $X_7 = G, R, K$ 或 E ； $X_8 = G, R, K$ 或 E ； $X_9 = L$ 或 F ； $X_{10} = K$ 或 R ； $X_{11} = I, L, F, C$ 或 Y ； $X_{12} = G, A$ 或 T ； $Z = R$ 或 $X_{13}-X_{14}-I-K-X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}-L-V-P$ ；其中 $X_{13} = Q, L$ 或 P ； $X_{14} = K, I, M, L$ 或 V ； $X_{15} = P, A, H, N$ 或 D ； $X_{16} = I$ 或 L ； $X_{17} = R, H, Q$ 或 P ； $X_{18} = I$ 或 K 或如 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 57 中任意一

项 1 至 29 位氨基酸序列或 SEQ ID NO: 58 至 SEQ ID NO: 69 中任意一项 1 至 19 位氨基酸显示的氨基酸序列。

本发明还涉及创伤愈合组合物或产物如绷带、医疗器具例如导管，还涉及抗头皮屑产品如洗发剂。

对遭受或易患微生物感染的宿主施用本发明的抗微生物多肽的制剂。取决于特异微生物，施用可为体表 (topical)、局部(localized)或全身的，优选局部施用。大体上本发明的抗微生物多肽的剂量足可降低微生物群体到至少约 50%，一般至少 1/10，且可杀死至 1/100 或者以下。本发明的化合物以降低微生物群体而将任意副作用降到最小的剂量施用。设想得到并在医师的指导下体内使用所述组合物。本发明的抗微生物多肽特别用于杀死革兰氏阴性细菌，包括绿脓假单胞杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 和沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*)；及革兰氏阳性细菌，包括多种葡萄球菌 (*staphylococci*) 及链球菌 (*streptococci*)。

本发明的抗微生物多肽也用于体外制剂以杀死微生物，特别是当不希望导入常规抗生素量时。例如，本发明的抗微生物多肽可加入到动物和/或人食物制品中；或它们可作为用于体外细胞培养的添加剂以防止组织培养中微生物的过度生长。

如在实验部分中详细说明的，特定微生物对用本发明的抗微生物多肽杀死的敏感性可通过体外检测确定。一般地微生物的培养物与抗微生物多肽以多种浓度组合作用足可使蛋白质作用一段时间，一般为约一小时到一天。然后对有活力微生物进行计数并确定杀死水平。

目的微生物包括但不限于，革兰氏阴性细菌，例如：柠檬酸细菌属 (*Citrobacter sp.*)；肠杆菌属 (*Enterobacter sp.*)；埃希杆菌属 (*Escherichia sp.*)，例如大肠杆菌；克雷伯杆菌属 (*Klebsiella sp.*)；摩根菌属 (*Morganella sp.*)；变形菌属 (*Proteus sp.*)；普罗威登斯菌属 (*Providencia sp.*)；沙门氏菌属 (*Salmonella sp.*)，例如伤寒沙门氏菌 (*S. typhi*)、鼠伤寒沙门氏菌 (*S. typhimurium*)；沙雷氏菌属 (*Serratia sp.*)；志贺菌属 (*Shigella sp.*)；假单胞菌属 (*Pseudomonas sp.*)，例如铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*)；

耶尔森菌属 (*Yersinia* sp.), 例如鼠疫耶尔森菌 (*Y. pestis*)、假结核耶尔森菌 (*Y. pseudotuberculosis*)、结肠耶尔森菌 (*Y. enterocolitica*); 弗朗西丝菌属 (*Franciscella* sp.); 巴斯德氏菌属 (*Pasturella* sp.); 弧菌属 (*Vibrio* sp.), 例如霍乱弧菌 (*V. cholera*)、副溶血弧菌 (*V. parahemolyticus*); 弯曲杆菌属 (*Campylobacter* sp.), 例如空肠弯曲菌 (*C. jejuni*); 嗜血杆菌属 (*Haemophilus* sp.), 例如流感嗜血杆菌 (*H. influenzae*)、杜克雷嗜血杆菌 (*H. ducreyi*); 博德特氏菌属 (*Bordetella* sp.), 例如, 百日咳博德特氏菌 (*B. pertussis*)、支气管炎博德特氏菌 (*B. bronchiseptica*)、副百日咳博德特氏菌 (*B. parapertussis*); 布鲁氏菌属 (*Brucella* sp.); 奈瑟氏球菌属 (*Neisseria* sp.), 例如淋病 (*gonorrhoeae*)、脑膜炎奈瑟氏球菌 (*N. meningitidis*) 等。其它目的细菌包括军团杆菌属 (*Legionella* sp.), 例如嗜肺性军团杆菌 (*L. pneumophila*); 利斯特氏菌属 (*Listeria* sp.), 例如产单核细胞利斯特氏菌 (*L. monocytogenes*); 支原体属 (*Mycoplasma* sp.), 例如人支原体 (*M. hominis*)、肺炎支原体 (*M. pneumoniae*); 分支杆菌属 (*Mycobacterium* sp.), 例如结核分支杆菌 (*M. tuberculosis*)、麻风分支杆菌 (*M. lepra*); 密螺旋体属 (*Treponema* sp.), 例如苍白密螺旋体 (*T. pallidum*); 疏螺旋体属 (*Borrelia* sp.), 例如伯氏疏螺旋体 (*B. burgdorferi*); 细螺旋体属 (*Leptospirae* sp.); 立克次体属 (*Rickettsia* sp.), 例如立克次体 (*R. rickettsii*)、地方性斑疹伤寒立克次体 (*R. typhi*); 衣原体属 (*Chlamydia* sp.), 例如沙眼衣原体、肺炎衣原体 (*C. pneumoniae*)、鹦鹉热衣原体 (*C. psittaci*); 螺旋杆菌属 (*Helicobacter* sp.), 例如幽门螺旋杆菌 (*H. pylori*) 等。

目的非细菌病原体包括真菌及原生动物病原体, 例如疟原虫属 (*Plasmodia* sp.), 例如恶性疟原虫 (*P. falciparum*); 锥虫属 (*Trypanosoma* sp.), 例如布氏锥虫 (*T. brucei*); shistosomes; 内阿米巴属 (*Entamoeba* sp.); 隐球菌属 (*Cryptococcus* sp.); 念珠菌属 (*Candida* sp.), 例如白色念珠菌 (*C. albicans*); 等等。

可应用多种施用方法。多肽制剂可经口、或静脉内注射、皮下注射、腹膜内注射，通过气溶胶、经眼、膀胱内施用、局部施用等。例如，通过吸入施用的方法是本领域公知的。取决于施用的特定抗微生物多肽、疾病性质、施用频率、施用方式、活性剂自宿主的清除等等，治疗制剂的剂量有很大程度变化。初始剂量可较大，接着是较小的维持剂量。剂量可不经常地每周或每两周进行施用，或分为较小剂量并每天、每半周等施用一次或几次以维持有效剂量水平。在许多情况下，经口施用比静脉内施用需要更高剂量。对于经口施用，可对酰胺键以及氨基及羧基端进行修饰以得到更大稳定性。例如，可对羧基端进行酰胺化。

剂型

本发明的化合物可掺入到多种剂型用于治疗性施用。更特别地，本发明的化合物可通过与适当可药用载体或稀释剂组合制成药物组合物，且可制成固体、半固体、液体或气体形式的制剂，如片剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂、软膏剂、乳膏、泡沫剂、溶液剂、栓剂、注射剂、吸入剂、凝胶剂、微球、洗剂及气雾剂。如此，化合物的施用可以多种方式完成，包括经口、含服、经直肠、肠胃外、腹膜内、皮内、经皮、气管内等。本发明的抗微生物多肽在施用后可达到全身或可通过应用在植入部位保持活性剂量的植入物或其它剂型局部化。

在一个实施方案中，用于局部应用的剂型包含降低二价阳离子，特别是钙离子及镁离子有效浓度的螯合剂。例如，可包括试剂如柠檬酸盐、EGTA 或 EDTA，优选柠檬酸盐。柠檬酸盐的浓度一般自约 1 至 10 mM。

本发明的化合物可单独施用、互相组合施用，或它们可与其它已知化合物（例如，穿孔蛋白、消炎剂、抗生素等）组合应用。在药物剂型中，化合物可以它们可药用盐的形式施用。以下方法及赋型剂仅仅为示例性的并且绝非限制。

对于经口制剂，化合物可单独应用或与适当添加剂组合以制备片剂、粉剂、颗粒剂或胶囊剂，例如，与常规添加剂如乳糖、甘露醇、玉米淀粉或马铃薯淀粉；与粘合剂如晶体纤维素、纤维素衍生物、阿拉伯胶、玉米

淀粉或明胶；与崩解剂如玉米淀粉、马铃薯淀粉或羧甲基纤维素钠；与润滑剂如滑石或硬脂酸镁；且根据需要，与稀释剂、缓冲剂、湿润剂、防腐剂及芳香剂组合应用。

通过将化合物在水性溶剂或非水溶剂如植物油或其它相似油，合成脂族酸甘油酯、高等脂族酸酯或丙二醇中溶解、悬浮或乳化，并且如果需要，使用常规添加剂如增溶剂、等渗剂、悬浮剂、乳化剂、稳定剂和防腐剂将所述化合物制成注射用制剂。

化合物可以以气雾剂剂型通过吸入施用进行应用。本发明的化合物可配制到可加压推进剂，如二氯二氟甲烷、丙烷、氮等等中。

化合物可通过与常规添加剂如增溶剂、等渗剂、悬浮剂、乳化剂、稳定剂及防腐剂制备作为例如以防止烧伤感染的洗剂应用。

此外，化合物可通过与多种基质如乳化基质或水溶性基质混合制成栓剂。本发明的化合物可通过栓剂经直肠施用。栓剂可包括在体温溶解，但在室温固化的载体如可可脂、碳蜡及聚乙二醇。

可提供用于经口或经直肠施用的单位剂型如糖浆剂、酏剂及混悬剂，其中每种剂量单位，例如一茶匙、一汤匙、片剂或栓剂含有预定量的组合物，其含有本发明的一种或多种化合物。相似地，用于注射或静脉内施用的单位剂型可包含组合物中的本发明化合物，所述组合物作为无菌水、生理盐水或另一可药用载体中的溶液剂。

用于持续释放剂型的植入物是本领域公知的。植入物与可生物降解或不可生物降解聚合物配制成微球体、厚片(slab)等。例如，乳酸和/或乙醇酸的聚合物形成宿主良好耐受的易蚀聚合物。将含有本发明的抗微生物多肽的植入物置于感染位置附近，使活性剂的局部浓度相对于身体的其余部位增加。

如文中应用的术语“单位剂型”是指适合用于人及动物受试者的单一剂量的物理上离散的单位，每个单位含有经计算与可药用稀释剂、载体或运载体(vehicle)联合足可产生目的作用的量的预定量的本发明化合物。用于本发明的单位剂型的说明书取决于应用的具体化合物及欲达到的效果

和在宿主中与所述化合物相关的药物动力学。

可药用赋形剂如运载体、佐剂、载体或稀释剂对公众是易于获得的。此外，可药用辅助物质，如 pH 调节及缓冲剂、张力调节剂、稳定剂、湿润剂等等对公众是易于获得的。

用于全身施用的一般剂量为每次施用 0.1 pg 至 100 微克/kg 受试者体重。一般剂量可为每天服用两至六次，每次一粒片剂或每天服用一次一粒定时释放胶囊剂或一粒片剂且包含较高比例含量的活性成分。定时释放作用可通过在不同 pH 值溶解的胶囊剂材料、通过渗透压缓慢释放的胶囊剂或通过任意其它控制释放的已知方法获得。

本领域技术人员易于理解剂量水平可随特定化合物、症状的严重程度及受试者对副作用的易感性而变化。一些特定化合物比其它化合物更强效。本领域技术人员通过多种方法易于确定给定化合物的优选剂量。优选方法为测定给定化合物的生理效能。

应用脂质体作为递送载体是一个令人感兴趣的方法。脂质体与靶位点的细胞融合并将腔内容物递送到细胞内。使用保持接触的多种方法，如分离、结合剂等等使脂质体保持接触细胞足够时间用于融合。在本发明一方面，将脂质体设计为气溶胶化用于肺部施用。可用介导膜融合的经纯化蛋白质或肽，如仙台病毒或流感病毒等制备脂质体。脂类可为已知形成脂质体的脂类，包括阳离子或两性离子脂类，如磷脂酰胆碱的任意有用组合。剩余脂类通常为中性或酸性脂类，如胆固醇、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰甘油等等。

对于脂质体的制备，可应用 Kato 等人, (1991) *J. Biol. Chem.* 266: 3361 描述的方法。简而言之，脂类及含有肽的腔组合物在适当水性介质中组合，所述水性介质方便地为盐水介质，其中总固体为约 1-10 重量百分比。短时间强烈搅拌约 5-60 秒后，将试管置于约 25-40℃ 的温水浴中并将此循环重复约 5-10 次。然后将组合物进行超声处理一段方便时间，一般约 1-10 秒，并可进一步通过涡旋搅拌。然后通过加入水性介质将体积扩大，大体上增加体积约 1-2 倍，接着进行摇动及冷却。此方法使高分子量分子掺入到腔

中。

与其它活性剂的剂型

对于用于主题方法中，本发明的抗微生物多肽可与其它药学活性剂，特别是其他抗微生物剂配制。如本领域已知的，其它目的活性剂包括多种抗生素。抗生素类型包括青霉素，例如，青霉素 G、青霉素 V、二甲氧基苯青霉素、苯唑青霉素、羧苄青霉素、乙氧萘青霉素、氨苄青霉素等；青霉素与 β -内酰胺酶抑制剂的组合，头孢菌素，例如，头孢克洛、头孢唑啉、头孢氨苄、拉氧头孢等；碳青霉烯类；单菌霉素；氨基糖苷类；四环素类；大环内酯类；林可霉素类；多粘菌素类；磺胺类；喹诺酮类；氯霉素；甲硝唑；壮观霉素、甲氧苄啶；万古霉素；等。

抗真菌剂也是有用的，包括多烯，例如两性霉素 B、制霉菌素；5-flucosyn 及吡咯类，例如咪康唑、酮康唑、伊曲康唑及氟康唑。抗结核病药包括异烟肼、乙胺丁醇、链霉素及利福平。细胞因子也可以包括在本发明的抗微生物多肽剂型中，所述细胞因子为例如 γ 干扰素、肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 12 等。

体外合成

用如本领域已知的常规方法，可通过体外合成制备本发明的抗微生物多肽。多种商品化合成分装置例如通过 Applied Biosystems Inc., Beckman 的自动合成仪等是可获得的。通过用合成仪，可用非天然氨基酸，特别是 D-异构体（或 D-型）例如，D-丙氨酸及 D-异亮氨酸、非对映异构体、具有不同长度或功能性的侧链等等替代天然存在氨基酸。特定序列及制备方式可由方便性、经济、所需纯度等等决定。

可为包含方便官能度的多种肽或蛋白质提供化学连接用于形成键，如氨基用于酰胺或取代胺形成，例如还原性胺化，巯基用于硫醚或二硫化物形成，羧基用于酰胺形成等等。

如果希望，在合成期间或表达期间，可将允许与其它分子或与表面连接的多种基团导入到肽中。因此，可用半胱氨酸制备硫醚、组氨酸用于连接金属离子络合物、羧基用于形成酰胺或酯、氨基用于形成酰胺等等。

也可根据重组合成的常规方法对多肽进行分离及纯化。可制备表达宿主的裂解物且用 HPLC、排阻层析、凝胶电泳、亲和层析或其它纯化技术对裂解物进行纯化。对于大部分，相对于与产物制备方法及它的纯化相关的污染物，应用的组分占目的产物至少 20%重量，更一般占至少约 75%重量，优选至少约 95%重量，并且对于治疗目的，一般占至少约 99.5%重量。一般地，百分率基于总蛋白质。

动物饲料

本发明还涉及在动物饲料中使用具有抗微生物活性多肽的方法，还涉及包含本发明的抗微生物多肽的饲料组合物及饲料添加剂。

术语动物包括所有动物，包括人。动物的实例为非反刍动物及反刍动物，如牛、绵羊及马。在特定实施方案中，动物为非反刍动物。非反刍动物包括单胃动物，例如猪（包括但不限于小猪、成长猪及母猪）；家禽如火鸡及鸡（包括但不限于适于烘烤小鸡、产蛋鸡）；小牛；及鱼（包括但不限于鲑鱼）。

术语饲料或饲料组合物表示动物适合或欲用于动物摄取的任意化合物、制备物、混合物或组合物。

在根据本发明的用途中，抗微生物多肽可在膳食之前、之后或同时进行喂食，与膳食同时喂食是优选的。

在特定实施方案中，对加入到饲料中，或包括在饲料添加剂中的形式的抗微生物多肽进行了明确定义。明确定义表示抗微生物多肽制剂为至少 50%纯，这可以如通过大小排阻层析（参见 WO01/58275 实施例 12）确定。在另一特定实施方案中，如通过这个方法确定的，抗微生物多肽制剂至少 60、70、80、85、88、90、92、94 或至少 95%纯。

明确定义的抗微生物多肽制剂是有益的。例如，向饲料中正确添加基本上不干扰或污染其它抗微生物多肽的抗微生物多肽是较容易的。术语正确添加特别是指获得一致及恒定结果的目的，和基于预期效果优化剂量的能力。

然后，对于在动物饲料中应用，抗微生物多肽不必那么纯；例如它可

包括其它酶，在这种情况下它可称为抗微生物多肽制剂。

抗微生物多肽制剂可 (a) 直接加入到饲料中 (或在植物蛋白质的处理过程中直接应用)，或 (b) 它可在产生一种或多种中间组合物如饲料添加剂或预混物中应用，所述中间组合物随后加入到饲料中 (或在处理过程中应用)。无论是根据以上 (a) 或 (b) 应用，以上描述的纯度是指初始抗微生物多肽制剂的纯度。

具有这个数量级纯度的抗微生物多肽制剂用重组产生方法是特别易获得的，而通过传统发酵方法产生抗微生物多肽时，它们不易获得且批与批之间差异也较大。

此类抗微生物多肽制剂当然可与其它酶混合。

如文中应用的术语植物蛋白质是指包括来自或起始自植物的至少一种蛋白质的任意化合物、组合物、制剂或混合物，包括经修饰蛋白质及蛋白质衍生物。在特定实施方案中，植物蛋白质的蛋白质含量为至少 10、20、30、40、50 或 60% (w/w)。

植物蛋白质可来自植物蛋白质源，如豆类及谷类，例如来自豆科 (Fabaceae (Leguminosae))、十字花科、藜科 (Chenopodiaceae) 及禾本科 (Poaceae) 植物的物质，如大豆膳食、羽扇豆膳食及油菜籽膳食。

在特定实施方案中，植物蛋白质源为来自豆科的一种或多种植物的材料，例如大豆、羽扇豆、豌豆或豆。

在另一实施方案中，植物蛋白质源为来自藜科的一种或多种植物的材料，例如甜菜 (beet)、甜菜 (sugar beet)、菠菜或昆诺阿藜 (quinoa)。

植物蛋白质源的其它实例为油菜籽及卷心菜。

大豆为优选的植物蛋白质源。

植物蛋白质源的其它实例为谷类如大麦、小麦、黑麦、燕麦、玉米 (玉蜀黍)、稻及高粱。

抗微生物多肽可以任意形式加入到饲料中，所述任意形式可以是相对纯的抗微生物多肽或与欲用于加入到动物饲料的其它组分混合，即以动物饲料添加剂的形式，如所称作的动物饲料的预混物。

又一方面本发明涉及在动物饲料中应用的组合物，如动物饲料及动物饲料添加剂，例如预混物。

除了本发明的抗微生物多肽外，本发明的动物饲料添加剂含有至少一种脂溶性维生素和/或至少一种水溶性维生素和/或至少一种微量矿物质、和/或至少一种大量矿物质。

此外，任选地，饲料添加剂成分为着色剂、芳香化合物、稳定剂和/或至少一种选自植酸酶 EC 3.1.3.8 或 3.1.3.26；木聚糖酶 EC 3.2.1.8；半乳聚糖酶 EC 3.2.1.89；和/或 β -葡聚糖酶 EC 3.2.1.4 中的其它酶。

在特定实施方案中，这些其它酶是明确定义的（如以上对于抗微生物多肽制剂定义的）。

其它抗微生物肽(AMP's)的实例为 CAP18、Leucocin A、Tritrpticin、Protegrin-1、Thanatin、防卫素、Ovispirin 如 Novispirin (Robert Lehrer, 2000)及其保持抗微生物活性的变体或片段。

其他抗真菌多肽 (AFP's) 的实例为如在 WO 94/01459 及 PCT/DK02/00289 [一旦公开用 WO 号替换]中公开的巨大曲霉(*Aspergillus giganteus*)及黑曲霉肽，其以及保持抗真菌活性的变体及片段。

通常脂溶性及水溶性维生素，以及微量矿物质形成部分所称作的预混物以用于加入到饲料中，而大量矿物质通常单独加到饲料中。这些组合物类型当富含本发明的抗微生物多肽，为本发明的动物饲料添加剂。

在特定实施方案中，在动物膳食或饲料中欲包括（或规定应当包括）0.01 至 10.0%水平；更特别是 0.05 至 5.0%；或 0.2 至 1.0%（%表示每 100 g 饲料 g 添加剂）的本发明的动物饲料添加剂。这对于预混物尤其如此。

以下为这些组分实例的非排他性列表：

脂溶性维生素的实例为维生素 A、维生素 D3、维生素 E 及维生素 K，例如维生素 K3。

水溶性维生素的实例为维生素 B12、生物素及胆碱、维生素 B1、维生素 B2、维生素 B6、烟酸、叶酸及泛酸盐，例如 Ca-D-泛酸盐。

微量矿物质的实例为锰、锌、铁、铜、碘、硒及钴。

大量矿物质的实例为钙、磷及钠。

这些组分的营养需要量(用家禽及小猪/猪示例)在 WO 01/58275 表 A 中列出。营养需要量表示这些组分在膳食中以标明的浓度提供。

备选地,本发明的动物饲料添加剂包含在 WO 01/58275 表 A 中详细说明的至少一种单独组分。至少一种表示一种或多种,一种、或两种、或三种、或四种等等直到所有十三种、或直到所有十五种单独组分。更特别地,这至少一种单独组分以提供表 A 中第四列或第五列或第六列中标明范围内的饲料浓度量包括在本发明的添加剂中。

本发明还涉及动物饲料组合物。动物饲料组合物或膳食具有相对高含量的蛋白质。家禽及猪的膳食可如 WO 01/58275 表 B 的第 2-3 列中标明的表征。鱼膳食可如这个表 B 第 4 列中标明的表征。此外此类鱼膳食通常具有 200-310 g/kg 的粗脂肪含量。

根据本发明的动物饲料组合物具有 50-800 g/kg 的粗蛋白质含量,且此外包含如文中要求保护的至少一种抗微生物多肽。

此外,或备选地(对于以上标明的粗蛋白质含量),本发明的动物饲料组合物具有 10-30 MJ/kg 可代谢能量含量;和/或 0.1-200 g/kg 的钙含量;和/或 0.1-200 g/kg 的有效磷含量;和/或 0.1-100 g/kg 甲硫氨酸含量;和/或 0.1-150 g/kg 甲硫氨酸加半胱氨酸含量;和/或 0.5-50 g/kg 赖氨酸含量。

在特定实施方案中,可代谢能量、粗蛋白质、钙、磷、甲硫氨酸、甲硫氨酸加半胱氨酸和/或赖氨酸含量在 WO 01/58275 (R. 2-5) 表 B 中的 2、3、4 或 5 行中的任意一行中。

粗蛋白质通过氮(N)乘以因子 6.25 计算,即粗蛋白质(g/kg)=N(g/kg) x 6.25。氮含量通过凯氏定氮法(A.O.A.C., 1984, Official Methods of Analysis 第 14 版, Association of Official Analytical Chemists, 华盛顿)确定。

可基于 NRC 出版物 Nutrient requirements in swine, 第九次修订版, 1988, subcommittee on swine nutrition, committee on animal nutrition, board of agriculture, national research council. National Academy Press,

华盛顿, 第 2-6 页一书中, 以及 European Table of Energy Values for Poultry Feed-stuffs, Spelderholt centre for poultry research and extension, 7361 DA Beekbergen, 荷兰一书中, Grafisch bedrijf Ponsen & looijen bv, Wageningen. ISBN 90-71463-12-5 计算可代谢能量。

完全动物膳食中钙、有效磷及氨基酸膳食含量通过在饲料表如 Veevoedertabel 1997, gegevens over chemische samenstelling, verteerbaarheid en voederwaarde van voedermiddelen, Central Veevoederbureau, Runderweg 6,8219 pk Lelystad. ISBN 90-72839-13-7 一书饲料表基础上进行计算。

在特定实施方案中, 本发明的动物饲料组合物含有至少一种以上定义的植物蛋白质或蛋白质源。

在又一特定实施方案中, 本发明的动物饲料组合物含有 0-80% 玉米; 和/或 0-80% 高粱; 和/或 0-70% 小麦; 和/或 0-70% 大麦; 和/或 0-30% 燕麦; 和/或 0-40% 大豆粉; 和/或 0-10% 鱼粉; 和/或 0-20% 乳清。动物膳食可例如作为碎饲料(非颗粒)或颗粒饲料进行制备。一般地, 将磨碎饲料进行混合并根据用于相关物种的说明书加入足量必需维生素及矿物质。酶可作为固体或液体酶剂型加入。例如固体酶剂型一般在混合步骤之前或期间加入; 液体制剂一般在造粒步骤之后加入。酶也可掺合到饲料添加剂或预混物中。

膳食中的最终酶浓度在每 kg 膳食 0.01-200 mg 酶蛋白质范围内, 例如在每 kg 动物膳食中 5-30 mg 酶蛋白质的范围。

抗微生物多肽可以以下量(剂量范围)的一种或多种进行施用: 0.01-200; 或 0.01-100; 或 0.05-100; 或 0.05-50; 或 0.10-10, 所有这些范围为 mg 抗微生物多肽蛋白质/kg 饲料(ppm)。

为确定每 kg 饲料中所含 mg 抗微生物多肽蛋白质, 将抗微生物多肽自饲料组合物中纯化, 且经纯化抗微生物多肽的比活用相关测定法(参见以下抗微生物活性、底物及测定法)测定。如此类的饲料组合物中抗微生物活性也可用相同测定法测定, 且在这两个测定基础上, 计算以每 kg 饲料所

含 mg 抗微生物多肽蛋白质表示的剂量。

相同原理用于测定饲料添加剂中 mg 抗微生物多肽蛋白质。当然，如果用于制备饲料添加剂或饲料的抗微生物多肽的样品是可获得的，那么自这个样品确定比活（不需要自饲料组合物或添加剂中纯化抗微生物多肽）。

洗涤剂组合物

可向洗涤剂组合物中加入本发明的抗微生物多肽并且其因此成为洗涤剂组合物的组分。

本发明的洗涤剂组合物可例如作为手工或机器洗衣洗涤剂组合物制备，所述手工或机器洗衣洗涤剂组合物包括适合用于预处理经染色织物的洗衣添加组合物及漂洗添加织物软化剂组合物，或可作为用于一般家庭硬表面清洗操作的洗涤剂组合物制备，或用于手工或机器洗盘操作制备。

在特定方面中，本发明提供了包含本发明的抗微生物多肽及表面活性剂的洗涤添加剂。洗涤添加剂以及洗涤剂组合物可包含一种或多种其它酶，如蛋白酶、脂肪酶、角化酶、淀粉酶、糖酶、纤维素酶、果胶酶、甘露聚糖酶、阿拉伯糖酶、半乳聚糖酶、木聚糖酶、氧化酶（如漆酶）和/或过氧化物酶（如卤过氧化物酶）。

通常，所选酶的性质应与所选洗涤剂相容（即最适 pH、与其它酶和非酶成分等的相容性），且酶应以有效量存在。

蛋白酶：合适的蛋白酶包括来自动物、植物、微生物的蛋白酶。来源于微生物的蛋白酶是优选的。也包括经化学修饰或蛋白工程化的突变体。所述的蛋白酶可以是丝氨酸蛋白酶或金属蛋白酶，优选碱性微生物蛋白酶或胰蛋白酶样蛋白酶。碱性蛋白酶的实例为枯草杆菌蛋白酶，特别是来自芽孢杆菌的枯草杆菌蛋白酶，例如，枯草杆菌蛋白酶 Novo、枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg、枯草杆菌蛋白酶 309、枯草杆菌蛋白酶 147 和枯草杆菌蛋白酶 168 (WO 89/06279 中描述)。胰蛋白酶样蛋白酶的实例为胰蛋白酶（例如来自猪或牛的）和如 WO 89/06270 和 WO 94/25583 中所公开的镰孢霉属的蛋白酶。

有用的蛋白酶的实例是如 WO 92/19729，WO 98/20115，WO

98/20116 和 WO 98/34946 所描述的变体,特别是在一个或多个下述位置发生替换的变体: 27, 36, 57, 76, 87, 97, 101, 104, 120, 123, 167, 170, 194, 206, 218, 222, 224, 235 和 274。

脂肪酶: 合适的脂肪酶包括那些来源于细菌或真菌的脂肪酶。也包括经化学修饰或蛋白工程化的突变体。有用的脂肪酶的实例包括如 EP 258 068 和 EP 305 216 中所公开的来自腐质霉属 (*Thermomyces* 与之同物异名), 例如来自 *H. lanuginosa* (*T. lanuginosus*) 的脂肪酶或如 WO 96/13580 中所公开的来自 *H. Insolens* 的脂肪酶, 假单胞菌脂肪酶, 例如来自产碱假单胞菌 (*P. Alcaligenes*) 或类产碱假单胞菌 (*P. Pseudoalcaligenes*) (EP 218 272), 洋葱假单胞菌 (*P. Cepacia*) (EP 331 376), 施氏假单胞菌 (*P. stutzeri*) (GB 1,372,034), 荧光假单胞菌 (*P. Fluorescens*), 假单胞菌菌株 SD 705 (WO 95/06720 和 WO 96/27002), *P. wisconsinensis* (WO 96/12012), 芽孢杆菌脂肪酶, 例如来自枯草芽孢杆菌 (Dartois 等人(1993), 生物化学与生物物理学学报 (*Biochemica et Biophysica Acta*), 1131, 253-360), 嗜热脂肪芽孢杆菌 (JP 64/744992) 或短小芽孢杆菌 (*B. Pumilus*) (WO 91/16422)。

其它的实例为如 WO 92/05249, WO 94/01541, EP 407 225, EP 260 105, WO 95/35381, WO 96/00292, WO 95/30744, WO 94/25578, WO 95/14783, WO 95/22615, WO 97/04079 和 WO 97/07202 中所公开的脂肪酶变体。

淀粉酶: 合适的淀粉酶(α 和/或 β) 包括那些来源于细菌或真菌的淀粉酶。也包括经化学修饰或蛋白工程化的突变体。淀粉酶包括例如来源于芽孢杆菌的 α -淀粉酶, 例如来自地衣芽孢杆菌的特定菌株, 详细内容参见 GB 1,296,839。

有用的淀粉酶的实例是如 WO 94/02597, WO 94/18314, WO 96/23873 和 WO 97/43424 中所描述的变体,尤其是那些在一个或多个下列位置发生替换的变体: 15, 23, 105, 106, 124, 128, 133, 154, 156, 181, 188, 190, 197, 202, 208, 209, 243, 264, 304, 305, 391, 408

和 444。

纤维素酶：合适的纤维素酶包括来源于细菌或真菌的纤维素酶。也包括其经化学修饰或蛋白工程突变体。合适的纤维素酶包括来自芽孢杆菌属、假单胞菌属、腐质霉属、镰孢霉属、草根霉属、枝顶孢霉属的纤维素酶，例如可由在 US 4,435,307, US 5,648,263, US 5,691,178, US 5,776,757 和 WO 89/09259 中公开的 *Humicola insolens*、嗜热毁丝霉和尖孢镰孢产生的所述真菌纤维素酶。

特别合适的纤维素酶是具有颜色保护优势的碱性或中性纤维素酶。这样的纤维素酶的实例为如 EP 0 495 257, EP 0 531 372, WO 96/11262, WO 96/29397, WO 98/08940 中所公开的纤维素酶。其它的实例为如那些在 WO 94/07998, EP 0 531 315, US 5,457,046, US 5,686,593, US 5,763,254, WO 95/24471, WO 98/12307 和 PCT/DK98/00299 中所公开的纤维素酶变体。

过氧化物酶/氧化酶：合适的过氧化物酶/氧化酶包括那些来源于植物、细菌或真菌的过氧化物酶/氧化酶。也包括化学修饰或蛋白工程化的突变体。有用的过氧化物酶的实例包括如 WO 93/24618, WO 95/10602 和 WO 98/15257 所述的来自鬼伞属(*Coprinus*) (例如来自灰盖鬼伞(*C. cinereus*)) 和其变体的过氧化物酶。

所述的洗涤剂酶可以通过添加含一种或多种酶的独立添加剂，或通过添加含所有这些酶的组合添加剂而被包含于洗涤剂组合物中。本发明的洗涤剂添加剂，也就是独立添加剂或组合添加剂可以制成例如颗粒状、液体、浆状等等。优选的洗涤剂添加剂形式为颗粒状（特别是非粉末化颗粒）、液体（特别是稳定的液体）或浆。

非粉末化颗粒可依照例如 US 4,106,991 和 4,661,452 所述进行生产并可任选地用已知的方法包被。蜡状包被材料的实例是平均分子量为 1000 到 20000 的聚(环氧乙烷)产物(聚乙二醇, PEG); 含有 16 到 50 个环氧乙烷单位的乙氧基化的壬基酚; 乙氧基脂肪醇, 其中, 醇含 12 到 20 个碳原子且其中存在 15 到 80 个环氧乙烷单位; 脂肪醇; 脂肪酸;

和脂肪酸的单-、二-和三酸甘油酯。GB 1483591 中给出了适合于通过流化床技术应用的成膜包被材料的实例。液体酶制剂可以依照现成的方法通过例如添加多元醇如丙二醇、糖或糖醇、乳酸或硼酸得以稳定。受保护的酶可依照 EP 238,216 中所公开的方法进行制备。

本发明的洗涤剂组合物可以是任何方便的形式，例如棒状、片状、粉末、颗粒、粘团或液体。液体洗涤剂可以是含水的，一般含高达 70% 的水和 0-30% 的有机溶剂，或不含水的。

所述的洗涤剂组合物一般包含一种或多种表面活性剂，它们可以是非离子表面活性剂，包括半极性的和/或阴离子和/或阳离子和/或两性离子表面活性剂。所述的表面活性剂一般占到 0.1% 到 60% 的重量。当包含在所述洗涤剂中时，通常包含约 1% 到约 40% 的阴离子表面活性剂，如直链烷基苯磺酸酯、 α -烯属磺酸酯、硫酸烷基酯(硫酸脂肪醇酯)、乙氧基硫酸醇酯、仲链烷磺酸酯、 α -磺基脂肪酸甲酯、烷基-或链烯基琥珀酸或皂。

当包含在所述洗涤剂中时，通常含有约 0.2% 到约 40% 的非离子表面活性剂例如乙氧基化脂肪醇、乙氧基化壬基酚、烷基多苷、烷基二甲胺氧化物、乙氧基化脂肪酸单乙醇酰胺、脂肪酸单乙醇酰胺、多羟基烷基脂肪酸酰胺或葡糖胺的 N-酰基 N-烷基衍生物(“葡糖酰胺”)。

所述的洗涤剂可以包含 0-65% 的洗涤剂增洁剂或络合剂例如沸石、二磷酸盐、三磷酸盐、磷酸盐、碳酸盐、柠檬酸盐、次氨基三乙酸、乙二胺四乙酸、二亚乙基三胺五乙酸、烷基-或链烯基琥珀酸、可溶性硅酸盐或层叠式硅酸盐(例如购自 Hoechst 的 SKS-6)。

所述的洗涤剂还可以包含一种或多种聚合物。实例为羧甲基纤维素、聚(乙烯吡咯烷酮)、聚(乙二醇)、聚(乙烯醇)、聚(乙烯基吡啶-N-氧化物)、聚(乙烯基咪唑)、聚羧酸酯如聚丙烯酸酯、马来酸/丙烯酸共聚物和甲基丙烯酸月桂醇酯/丙烯酸共聚物。

所述的洗涤剂还可以含有可能包含 H_2O_2 来源的漂白体系，如可以与形成过酸的漂白活化剂如四乙酰基乙二胺或壬酰氧基苯磺酸盐结合

的过硼酸盐或过碳酸盐。可选择地,所述的漂白体系可以包含例如酰胺、二酰亚胺或矾类的过氧酸。

本发明的洗涤剂组合物中的酶可以通过诸如以下的常规稳定剂稳定:多元醇如丙二醇或丙三醇、糖或糖醇、乳酸、硼酸或硼酸衍生物如芳香硼酸酯或苯基硼酸衍生物如4-甲酰基苯基硼酸,且所述的组合物也可制备为如WO 92/19709和WO 92/19708中所述的组合物。

所述的洗涤剂还可以包含其它的常规洗涤剂成分例如纤维调节剂包括黏土、增泡剂、泡沫抑制剂、抗腐蚀剂、污物悬浮剂、抗污物再沉淀剂、染料、杀菌剂、光学增白剂、助溶剂、失泽抑制剂或香料。

目前认为在本发明的洗涤剂组合物中,任意酶及本发明的抗微生物多肽可以以相当于每升洗涤液中具有0.01-100mg酶蛋白质,优选每升洗涤液0.05-10mg酶蛋白质,更优选每升洗涤液中0.1-5mg酶蛋白质,特别优选每升洗涤液中具有0.1-1mg酶蛋白质的量加入。

本发明的抗微生物多肽可额外掺入到如WO 97/07202所公开的洗涤剂制剂中,该文献引入本文作为参考。

本发明通过以下实例进一步描述,所述实例不应理解为限制本发明范围。

实施例

用作缓冲剂及底物的化学试剂为至少试剂级的商品。

实施例 1

抗微生物多肽 (Cat1) 的克隆、表达及活性评估

编码 Cat1 的合成基因的克隆

为了产生抗微生物多肽 Cat1 (SEQ ID NO: 3) 用于抗微生物活性测定,制备合成基因 (见下文) 并将其插入到表达载体 pET31b+ (Novagen Inc.)。合成基因由特别设计的寡核苷酸 (引物 1 及引物 2) 构成。

编码 Cat1 的合成基因 (SEQ ID NO: 70):

GGC CTG CTG CGC CGT CTG CGC AAG AAG ATT GGC AAA AAG CTG AAG AAA
G L L R R L R K K I G K K L K K

ATT GGC CAG AAG ATT AAA CCG ATT CGC ATT CTG GTG CCG TAG
I G Q K I K P I R I L V P *

引物 1 (SEQ ID NO: 72) :

ATTATTCAGA TGCTGGATCC GCGGAAGGC CTGCTGCGCC GTCTGCGCAA GAAGATTGGC
AAAAAGCTGA AGAAAATTGG CCAGAAGATT AAACCGATTC GCATTCTGGT GCCGTAGCTC
GAGATTATT

引物 2 (SEQ ID NO: 73) :

AATAATCTCG AGCTACGGCA CCAGAAATGCG AATCGGTTTA ATCTTCTGGC CAATTTTCTT
CAGCTTTTGT CCAATCTTCT TGCGCAGACG GCGCAGCAGG CCTTCCGCCG GATCCAGCAT
CTGAATAAT

侧翼限制性内切酶位点 (AlwNI/AvaI) 的酶消化使我们能克隆在 pET31b+ 中作为融合构建体的这个合成基因 (如通过生产商 New England Biolabs Inc. 描述的标准方法)。所有标准方法在别处已经描述 (Sambrook, Fritsch 和 Maniatis, 1989)。

Cat1 在大肠杆菌中的转化及表达

如通过生产商 (Novagen) 描述的, 将重组 pET31b+ 转化到大肠杆菌 Novablue 中。通过 QIAprep 小柱 (QIAGEN Inc.) 制备质粒且用质粒特异引物 (引物 3 及引物 4) 通过自动测序对质粒测序。

引物 3 (SEQ ID NO: 74) :

TGCTA GTTAT TGCTC AGCGG

引物 4 (SEQ ID NO: 75) :

ACCGT AGTTG CGCCC ATCG

根据生产商 (Novagen) 将质粒转化到大肠杆菌 BLR-DE3 中。将细菌在 LB 培养基中培养至 OD₆₀₀~0.8 且通过 1 mM IPTG (异丙基 β-D-硫代半乳糖吡喃糖苷) 起始重组蛋白质合成。经过 3 小时诱导作用, 收获细菌, 在 1/10 体积的缓冲液 A (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 8) 中重悬浮并通过压力破裂 (1500 mBar) 裂解。产生的沉淀物在缓

冲液 B (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 100 mM NaCl, pH 8) 中洗两次。所有标准方案在别处已经描述 (Sambrook, Fritsch 和 Maniatis, 1989)。

自大肠杆菌内含体中纯化 Cat1

自以上纯化得到的沉淀物包含经纯化内含体。为了自 KSI 融合配偶体中释放肽, 在经改造的导入编码 Cat1 的基因的 N-端的 Asp-Pro 位点进行酸性水解。将内含体在 100 mM 磷酸钠 (pH 2.3) 中重悬浮并于 85 摄氏度孵育过夜。得到的上清液包含肽 (PAE-Cat1)。样品通过加入 100 mM 磷酸钠 (pH 12.3) 中和。为了使肽成熟, 将肽用谷氨酰内肽酶 I (来自地衣芽孢杆菌) 进行处理。经成熟肽通过质谱分析法证实并进一步通过标准层析方法纯化。

通过全国临床标准实验委员会 (NCCLS) 微稀释培养基测定 (MIC 和 MBC) 抗微生物活性

根据 NCCLS 用于新抗微生物化合物敏感性试验的指南 (Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard 第五版, NCCLS document M7-A5 (ISBN 1-56238-394-9)), 我们发现 Cat1 的广谱活性。以下细菌菌株对 Cat1 敏感 (MIC < 64 µg/ml): 枯草芽孢杆菌 (ATCC6633)、藤黄微球菌 (Micrococcus luteus) (ATCC9341)、表皮葡萄球菌 (Staphylococcus epidermidis) (DSM1798)、粪肠球菌 (Enterococcus faecalis) (DSM2570)、产气假单胞菌 (Pseudomonas aeruginosa) (ATCC27853)、支气管败血性博德特氏菌 (Bordetella bronchiseptica) (ATCC4617)、大肠杆菌 (ATCC10536)、肺炎克雷伯菌 (Klebsiella pneumoniae) (ATCC10031)、猪霍乱沙门菌 (Salmonella choleraesuis) (DSM9220) 及奇异变形杆菌 (Proteus mirabilis) (ATCC7002)。最低杀菌浓度 (MBC) 在相似范围内, 表明 Cat1 活性是杀细菌的。

在另一研究中, 对多种与创伤感染相关微生物菌株测定 Cat1 的特定 MIC。如在以上谈及的 NCCLS 方案中推荐的, 将菌株在经阳离子调节的

Muller-Hinton 培养基中生长。检测的最高浓度为 32 $\mu\text{g/ml}$ 。表 1 中的结果表明 Cat1 为对许多不同革兰氏阴性及革兰氏阳性细菌具有强效活性的广谱抗生素。

表 1

微生物菌株	ATCC-号	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
产气假单胞菌	27853	2
金黄色葡萄球菌 (MSSA)	25923	32
金黄色葡萄球菌 GISA	700699	32
表皮葡萄球菌	12228	4
肺炎葡萄球菌	10015	8
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	12714	1
大肠杆菌	25922	1.5
<i>Streptococcus pyogenes</i>	4543	1.5
支气管败血性博德特氏菌	14064	0.5
肺炎克雷伯氏菌	29995	8
<i>Acinetobacter baumannii</i>	49137	8
弗氏枸橼酸菌 (<i>Citrobacter freundii</i>)	11811	1.5
摩氏摩根菌 (<i>Morganella morganii</i>)	21116	1.5
藤黄微球菌	9341	0.5
无乳链球菌 (<i>Streptococcus agalactiae</i>)	624	16
绿色气球菌 (<i>Aerococcus viridans</i>)	700406	0.5
艰难梭菌 (<i>Clostridium difficile</i>)	43594	32

在不同试验条件下的 MIC 值

还在微肉汤 (microbroth) 稀释测定中用经阳离子调节的 Mueller hinton 培养基 (MHB) 测定 Cat1 的最低抑制浓度, 其中如以下表 2 描述的, 以不同修饰应用 MHB。所选受试生物为产气假单胞菌 (ATCC 27853)。

表 2

试验条件	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
MHB	4
MHB + 1.5 mM Ca^{2+}	11
MHB + 1.5 mM Mg^{2+}	6
MHB + 150mM NaCl	6
MHB + 1% 人血清	6
MHB + 1% 经裂解的人红细胞	9
将MHB 调节至 pH 6.5	6
将MHB 调节至 pH 5.5	6

杀灭动力学

用产气假单胞菌 (ATCC 27853) 作为受试生物在 MHB 中测定 Cat1 的杀灭率。将细菌与 Cat1 (在 4 x MIC 浓度) 孵育。在不同时间点, 将制剂的几种稀释液涂平板并确定活细胞的估计 (CFU/ml)。表 3 中的结果表明 Cat1 快速杀死细菌, 在 30 分钟内将 CFU 降低至约 1/1000。

表 3

时间	CFU/ml	
	对照	Cat1
0 小时	100,000	100,000
0.5 小时	100,000	175
1.5 小时	300,000	<20
24 小时	>1,000,000	<20

通过辐射扩散测定法 (MEC) 测定抗微生物活性

在抗微生物活性检测中应用以前发表方案的经修饰形式 (Lehrer 等人, (1991) Ultra sensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides J Immunol Methods 137: 167-173)。将靶细菌 (10^6 个菌落形成单位 (CFU)) 加入到 10 ml 底层琼脂糖 (1% 低电渗琼脂糖, 0.03% 胰酪胨豆胨培养液, 10 mM 磷酸钠 pH 7.4, 37 摄氏度) 中。悬浮液在 INTEGRID 培养皿 (Becton

Dickinson Labware) 上固化。用 3 mm 凝胶打孔器在底层琼脂糖上打孔 (Amersham Pharmacia Biotech, 瑞典)。将样品加入孔中并于 37 摄氏度孵育 3 小时。在上面铺上一层琼脂糖并将平板孵育过夜 (LB 培养基, 7.5% 琼脂)。通过观察孔周围细菌清除区确定抗微生物活性。通过加入 10ml 0.2 mM MTT (3-(4, 5-二甲基噻唑-2-基)-2, 5-二苯基四唑鎓溴化物噻唑蓝) 对活细胞进行复染。

这个测定法显示如通过 NCCLS 方案 (上面段落) 确定的相似活性谱及浓度。发现以下细菌种是敏感的 (最低有效浓度 (MEC) < 64 µg/ml): 枯草芽孢杆菌 (ATCC6633)、希氏肠球菌 (Enterococcus hirae) (ATCC10541)、藤黄微球菌 (ATCC9341)、金黄色葡萄球菌 (ATCC29737)、表皮葡萄球菌 (DSM1798)、粪肠球菌 (DSM2570)、产气假单胞菌 (ATCC27853)、支气管败血性博德特氏菌 (ATCC4617)、大肠杆菌 (ATCC10536)、肺炎克雷伯菌 (ATCC10031)、猪霍乱沙门菌 (DSM9220) 及奇异变形杆菌 (ATCC7002)。

实施例 2

抗微生物活性的评估

如在国际专利申请 WO 00/73433 实施例 1 中公开的 (有较小变更), 用阿拉伯糖作为诱导物, 在大肠杆菌 TOP10 (Invitrogen) 中表达一系列合成的抗微生物多肽。本发明的抗微生物多肽的表达使宿主细胞的生长受到抑制。

简而言之, 在微量滴定板中, 将含有 0.2% 葡萄糖及氨苄青霉素 (100µg/ml) 的 RM 培养基中生长的新鲜过夜培养物稀释 300 倍至含有 0.2% 甘油及氨苄青霉素 (100µg/ml) 以及不同浓度阿拉伯糖 (0、0.01% 或 0.1%) 的 150 微升 RM 的并于 37 摄氏度剧烈摇动下孵育。通过用 Bioscreen C 微生物读出器 (Thermo Electron Corporation) 以 30 分钟间隔测定 OD₄₅₀ (关于缓冲剂及培养基组合物参见 Invitrogen 方案的 pBAD/gIII A、B 及 C 载体目录号 V450-01) 14 小时对生长曲线进行监测。

通过每个样品的终点 OD 测量值除以获自含有对照载体的细胞的终点

OD 测量值并乘以 100 计算生长抑制百分率。公式如下：

$$\left(1 - \frac{\text{样品 OD} - \text{空白 OD}}{\text{对照载体 OD} - \text{空白 OD}}\right) \times 100$$

其中“空白 OD”对应于空孔的 OD。

Cat1 的氨基酸序列及经选择的改进合成变体在表 4、5 及 6 中列出。

表 4

氨基酸序列	SEQ ID NO:	使用 0.01% 阿拉伯糖的生长抑制 (%)	使用 0.1% 阿拉伯糖的生长抑制 (%)
GLLRRLRKKIGKKLKKIGQKIKPIRILVP	3	63	64
GLLRRLRGKIGKKLKKIGQKIKAIRKLVP	4	89	100
GLLRRFRKKIGGKLKKYGQIKHLRILVP	5	94	100
GLLRRLRRKIGGKLKKFGQKIKPLRKLVP	6	92	100
GLLRRLRKKIGKKLKKFGQKIKHIRILVP	7	93	100
GLLKRLGRKIGKKLKKFGQKIKAIRKLVP	8	97	100
GRFKRFWKKIGRKFKKIGQMLKPIRILVP	9	96	100
GLLKRLRKKIGKKLKKIGPKIKHIRKLVP	10	93	100
GLLRRFWMKIGGKLKKFGQMIKHLRKLVP	11	92	99
GRLRRLRRKIGEKLKKFGQVIKALRILVP	12	94	99
GLLRRLWRKIGRKLKKYGQKIKALRKLVP	13	96	100
GRFRFRKKIGKKLKKIGLVIKHIRILVP	14	94	100
GLLRRLRRKIGKKLKKFGQKIKHIRILVP	15	96	100
GLLRRLRNKIRKKLKKFGQKIKAIRILVP	16	96	100
GRLRRLWRKIGRKLKKYGQVIKHLRILVP	17	94	100

表 5

氨基酸序列	SEQ ID NO:	使用 0.1% 阿拉伯糖的生长抑制 (%)
GLLRRLRKKIGKKLKKIGQKIKPIRILVP	3	53
GLFKRLRKKIGKKLKKFGQKIKPLRKLVP	18	94
GLLRRFGRKIGKKFKKFGPKIKHLRKLVP	19	91

GLFRRFRKIGKKLKKFGQKIKPLRKLVP	20	97
GLLRRFRKIGRKLKKYGLMIKPLRKLVP	21	94
GLLKRFRGKIGKKLKKYGQLIKAIRILVP	22	90
GLFRRLRKKIGKKLKKIGQLIKAIRILVP	23	97
GLLRRFGKKIGKKFKKYGQKIKNLRILVP	24	92
GLLKRLRKKIGKKLKKIGQKIKPIRKLVP	25	94
GLLRRFGRKIGKKFKKFGPKIKHLRKLVP	26	92
GRLRRLRKKIRKKLKKYGQKIKAIRKLVP	27	96
GRFRRFRKIGGKLKKIGQVIKDIRILVP	28	95
GRFRRFRKIGKKFKKFGQMIKALRILVP	29	95
GRLRFRKIGKKLKKIGQMIKHIRILVP	30	95
GLVRRFRKIGKKLKKIGQIIKAIRKLVP	31	96
GLLRRLRKKIGKKFKKIGQVIKHLRKLVP	32	97
GLFRRLRGKIGKKLKKIGQKIKAIRILVP	33	91
GLFRRLGKKIGKKLKKFGQVIKHIRILVP	34	92
GLLRLGKKIGKKFKKFGQVIKALRILVP	35	95
GLFRRLGRKIGKKLKKIGQVIKHIRILVP	36	95
GLLRLRKKIEKKLKKYGPKIKALRKLVP	37	94
GRIKRVGEKIGKKLKKIGQVIKHLRILVP	38	96
GLFRRFGKKIGKKLKKIGQVIKALRILVP	39	95
GRLRRFGKKIGKKLKKFGQLIKALRILVP	40	95
GLLRRFWKIGKKLKKFGQKIKPLPKLVP	41	96
GRFRRLGRKIGEKLKKFGQVIKAIRILVP	42	95
GLFRRFGKKIGKKLKKIGQKIKPIHKLVP	43	76
GLLKRLRKKIGKKLKKIGQMIKHIRILVP	44	93
GLLRRFREKIGKKLKKYGQKIKHLRKLVP	45	79
GLFRRLRKKIGKKFKKFGQKIKPLRKLVP	46	96
GLFRRFWKIGRKLKKIGQKIKPLQILVP	47	79
GLLRLWKKIGRKFKYGQVIKHIRKLVP	48	97
GLLRLGRKIGKKLKKIGQKIKAIRILVP	49	96
GLLRRFRNKIGKKLKKIGQKIKPIRKLVP	50	92
GRFKRLRKKIGKKFKKIGQKIKDIRKLVP	51	97
GLFRRIIRKIGKKFKKFGQVIKPLRKLVP	52	95

GRLRRLGKKIGEKLLKKFGQMIKHIRILVP	53	84
GLLRRLGKKIGKFKKCGQVIKAIRILVP	54	89
GLLRRFRKKIGEKFKKFGQKIKNIRILVP	55	79
GLLRRLRKKIGKLLKKIGQKIKPIRKLVP	56	94
GLLRRFRKKIGKLLKKGQKIKHLRILVP	57	95

表 6

氨基酸序列	SEQ ID NO:	使用 0.01% 阿拉伯糖的生长抑制 (%)	使用 0.1% 阿拉伯糖的生长抑制 (%)
GLLRRLRKKIGKLLKKIGQKIKPIRILVP	3	65	68
GLLRRLRKKIGKLLKKIAR	59	93	100
GLFRRLKRKIGRKFKKIAR	60	85	99
GLLKRLGRKIGKFKKIAR	61	89	98
GLLRRFRKKIGKLLKKIAR	62	94	98
GLLRRLRKKIGKLLKKITR	63	95	99
GLFRRLRKKIGKLLKKIAR	64	92	99
GLFRRLKRKIGKLLKKIAR	65	91	99
GLLKRLGRKIGKLLKKIAR	66	92	100
GLLRRFRKKIGKLLKKITR	67	90	100
GLLRRLRKKIGRKFKKIAR	68	91	100
GLFRRLRKKIGKFKKIAR	69	86	99

表 4、5 及 6 中显示的结果令人信服地表明所有检测的抗微生物多肽都显示强抗微生物活性。

实施例 3

针对细菌菌株的抗微生物活性 (MIC 和 MEC)

用 Mueller Hinton 培养基 (MHB), 使用微稀释培养基测定 (参见实施例 1) 分析本发明多肽的抗微生物活性。在这个方案中对四种不同细菌菌株进行检测: 藤黄微球菌 (ATCC 9341)、产气假单胞菌 (ATCC 27853)、大肠杆菌 (ATCC 10536) 及肺炎克雷伯菌 (DSM681)。多肽的氨基酸序

列及获得的最低抑制浓度 (MIC, 微克/毫升) 在以下表 7 中显示。

表 7

氨基酸序列	MIC (µg/ml)			
	藤黄微球菌 (ATCC 9341)	产气 假单胞菌 (ATCC 27853)	大肠杆菌 (ATCC10536)	肺炎 克雷伯氏菌 (DSM681)
GLLRRLRKKIGKKLKKIGQKIKPIRILVP	16	4	8	32-64
GLLRRFWKKIGKKLKKFGQKIKPLPKLVP	32	16	32	32
GLLRRLWRKIGRKLKQYQKIKALRKLVP	32	32	64	32
GLLRRLRKKIGKKLKKIAR	32	8	16	32
GLLKRLGRKIGKKLKKIAR	64	64	8	未检测
GLLRRFRKKIGKKLKKIAR	64	64	16	32-64

还用最低条件在辐射扩散测定法 (参见实施例 1) 中分析本发明多肽的抗微生物活性。在这个方案中对两种细菌菌株进行检测; 肉葡萄球菌 (*Staphylococcus carnosus*) 及大肠杆菌 Top10。多肽的氨基酸序列及获得的最低有效浓度 (MEC, 微克/毫升) 在以下表 8 显示。

表 8

氨基酸序列	MEC (µg/ml)	
	肉葡萄球菌	大肠杆菌 Top10
GLLRRLRKKIGKKLKKIGQKIKPIRILVP	2.5	8.5
GRIKRVGEKIGKKLKKIGQVIKHLRILVP	8	8.5
GLLRRFWKKIGKKLKKFGQKIKPLPKLVP	3.8	16.6
GLLRRLWRKIGRKLKQYQKIKALRKLVP	4.4	27.0
GLLRRLRKKIGKKLKKIAR	1.8	18.3
GLLKRLGRKIGKKLKKIAR	2	13.5
GLLRRFRKKIGKKLKKIAR	1.1	28.0

序列表

<110> 诺和酶股份有限公司

<120> 抗微生物多肽

<130> 10328.204-W0

<160> 75

<170> PatentIn 版本 3.1

<210> 1

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的抗微生物肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = 亮氨酸或精氨酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa = 亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸或苯丙氨酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa = 精氨酸或赖氨酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa = 亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸或苯丙氨酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7).. (7)

<223> Xaa = 精氨酸、色氨酸或甘氨酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (8).. (8)

<223> Xaa = 赖氨酸、精氨酸、甘氨酸、甲硫氨酸、天冬酰胺或谷氨酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (11).. (11)

<223> Xaa = 甘氨酸、赖氨酸、精氨酸或谷氨酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (12).. (12)

<223> Xaa = 赖氨酸、精氨酸、甘氨酸或谷氨酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (14).. (14)

<223> Xaa = 亮氨酸或苯丙氨酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (15).. (15)

<223> Xaa = 赖氨酸或精氨酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (17).. (17)

<223> Xaa = 亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、半胱氨酸或酪氨酸

<220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (18)..(18)
 <223> Xaa = 甘氨酸、丙氨酸或苏氨酸

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (19)..(19)
 <223> Xaa = 谷氨酰胺、精氨酸、亮氨酸或脯氨酸

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa = 赖氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸或缬氨酸

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (23)..(23)
 <223> Xaa = 脯氨酸、丙氨酸、组氨酸、天冬酰胺或天冬氨酸

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (24)..(24)
 <223> Xaa = 异亮氨酸或亮氨酸

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (25)..(25)
 <223> Xaa = 精氨酸、组氨酸、谷氨酰胺或脯氨酸

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (26)..(26)
 <223> Xaa = 异亮氨酸或赖氨酸

<400> 1

Gly Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Lys Ile Xaa Xaa Lys Xaa Xaa Lys

1

5

10

15

Xaa Xaa Xaa Xaa Ile Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Val Pro
 20 25

<210> 2

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的抗微生物肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2).. (2)

<223> Xaa = 亮氨酸或精氨酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (20).. (20)

<223> Xaa = 赖氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸或缬氨酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (23).. (23)

<223> Xaa = 脯氨酸、丙氨酸、组氨酸、天冬酰胺或天冬氨酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (24).. (24)

<223> Xaa = 异亮氨酸或亮氨酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (25).. (25)

<223> Xaa = 精氨酸、组氨酸、谷氨酰胺或脯氨酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (26).. (26)

<223> Xaa = 异亮氨酸或赖氨酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3).. (3)

<223> Xaa = 亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸或苯丙氨酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4).. (4)

<223> Xaa = 精氨酸或赖氨酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6).. (6)

<223> Xaa = 亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸或苯丙氨酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7).. (7)

<223> Xaa = 精氨酸、色氨酸或甘氨酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (8).. (8)

<223> Xaa = 赖氨酸、精氨酸、甘氨酸、甲硫氨酸、天冬酰胺或谷氨酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (11).. (11)

<223> Xaa = 甘氨酸、赖氨酸、精氨酸或谷氨酸

<220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa = 赖氨酸、精氨酸、甘氨酸或谷氨酸

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa = 亮氨酸或苯丙氨酸

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa = 异亮氨酸、苯丙氨酸、半胱氨酸或酪氨酸

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (19)..(19)
 <223> Xaa = 谷氨酰胺、亮氨酸或脯氨酸

<400> 2

Gly Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Lys Ile Xaa Xaa Lys Xaa Lys Lys
 1 5 10 15

Xaa Gly Xaa Xaa Ile Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Val Pro
 20 25

<210> 3
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成的抗微生物肽 (Cat1)

<400> 3

Gly Leu Leu Arg Arg Leu Arg Lys Lys Ile Gly Lys Lys Leu Lys Lys

1 5 10 15

Ile Gly Gln Lys Ile Lys Pro Ile Arg Ile Leu Val Pro
 20 25

<210> 4
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的抗微生物肽

<400> 4

Gly Leu Leu Arg Arg Leu Arg Gly Lys Ile Gly Lys Lys Leu Lys Lys
1 5 10 15

Ile Gly Gln Lys Ile Lys Ala Ile Arg Lys Leu Val Pro
 20 25

<210> 5
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的抗微生物肽

<400> 5

Gly Leu Leu Arg Arg Phe Arg Lys Lys Ile Gly Gly Lys Leu Lys Lys
1 5 10 15

Tyr Gly Gln Ile Ile Lys His Leu Arg Ile Leu Val Pro
 20 25

<210> 6

<211> 29
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成的抗微生物肽

<400> 6

Gly Leu Leu Arg Arg Leu Arg Arg Lys Ile Gly Gly Lys Leu Lys Lys
 1 5 10 15

Phe Gly Gln Lys Ile Lys Pro Leu Arg Lys Leu Val Pro
 20 25

<210> 7
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成的抗微生物肽

<400> 7

Gly Leu Leu Arg Arg Leu Arg Lys Lys Ile Gly Lys Lys Leu Lys Lys
 1 5 10 15

Phe Gly Gln Lys Ile Lys His Ile Arg Ile Leu Val Pro
 20 25

<210> 8
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成的抗微生物肽

<400> 8

Gly Leu Leu Lys Arg Leu Gly Arg Lys Ile Gly Lys Lys Leu Lys Lys
 1 5 10 15

Phe Gly Gln Lys Ile Lys Ala Ile Arg Lys Leu Val Pro
 20 25

<210> 9
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成的抗微生物肽

<400> 9

Gly Arg Phe Lys Arg Phe Trp Lys Lys Ile Gly Arg Lys Phe Lys Lys
 1 5 10 15

Ile Gly Gln Met Leu Lys Pro Ile Arg Ile Leu Val Pro
 20 25

<210> 10
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成的抗微生物肽

<400> 10

Gly Leu Leu Lys Arg Leu Arg Lys Lys Ile Gly Lys Lys Leu Lys Lys
 1 5 10 15

Ile Gly Pro Lys Ile Lys His Ile Arg Lys Leu Val Pro
 20 25

<210> 11
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成的抗微生物肽

<400> 11

Gly Leu Leu Arg Arg Phe Trp Met Lys Ile Gly Gly Lys Leu Lys Lys
 1 5 10 15

Phe Gly Gln Met Ile Lys His Leu Arg Lys Leu Val Pro
 20 25

<210> 12
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成的抗微生物肽

<400> 12

Gly Arg Leu Arg Arg Leu Arg Arg Lys Ile Gly Glu Lys Leu Lys Lys
 1 5 10 15

Phe Gly Gln Val Ile Lys Ala Leu Arg Ile Leu Val Pro
 20 25

<210> 13
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成的抗微生物肽

<400> 13

Gly Leu Leu Arg Arg Leu Trp Arg Lys Ile Gly Arg Lys Leu Lys Lys
 1 5 10 15

Tyr Gly Gln Lys Ile Lys Ala Leu Arg Lys Leu Val Pro
 20 25

<210> 14

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的抗微生物肽

<400> 14

Gly Arg Phe Arg Arg Phe Arg Lys Lys Ile Gly Lys Lys Leu Lys Lys
 1 5 10 15

Ile Gly Leu Val Ile Lys His Ile Arg Ile Leu Val Pro
 20 25

<210> 15

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的抗微生物肽

<400> 15

Gly Leu Leu Arg Arg Leu Arg Arg Lys Ile Gly Lys Lys Leu Lys Lys
 1 5 10 15

Phe Gly Gln Lys Ile Lys His Ile Arg Ile Leu Val Pro

20

25

<210> 16
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成的抗微生物肽

<400> 16

Gly Leu Leu Arg Arg Leu Arg Asn Lys Ile Arg Lys Lys Leu Lys Lys
 1 5 10 15

Phe Gly Gln Lys Ile Lys Ala Ile Arg Ile Leu Val Pro
 20 25

<210> 17
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成的抗微生物肽

<400> 17

Gly Arg Leu Arg Arg Leu Trp Arg Lys Ile Gly Arg Lys Leu Lys Lys
 1 5 10 15

Tyr Gly Gln Val Ile Lys His Leu Arg Ile Leu Val Pro
 20 25

<210> 18
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>

<223> 合成的抗微生物肽

<400> 18

Gly Leu Phe Lys Arg Leu Arg Lys Lys Ile Gly Lys Lys Leu Lys Lys
1 5 10 15

Phe Gly Gln Lys Ile Lys Pro Leu Arg Lys Leu Val Pro
 20 25

<210> 19

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的抗微生物肽

<400> 19

Gly Leu Leu Arg Arg Phe Gly Arg Lys Ile Gly Lys Lys Phe Lys Lys
1 5 10 15

Phe Gly Pro Lys Ile Lys His Leu Arg Lys Leu Val Pro
 20 25

<210> 20

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的抗微生物肽

<400> 20

Gly Leu Phe Arg Arg Phe Arg Arg Lys Ile Gly Lys Lys Leu Lys Lys
1 5 10 15

Phe Gly Gln Lys Ile Lys Pro Leu Arg Lys Leu Val Pro
 20 25

<210> 21

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的抗微生物肽

<400> 21

Gly Leu Leu Arg Arg Phe Arg Arg Lys Ile Gly Arg Lys Leu Lys Lys
 1 5 10 15

Tyr Gly Leu Met Ile Lys Pro Leu Arg Lys Leu Val Pro
 20 25

<210> 22

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的抗微生物肽

<400> 22

Gly Leu Leu Lys Arg Phe Arg Gly Lys Ile Gly Lys Lys Leu Lys Lys
 1 5 10 15

Tyr Gly Gln Leu Ile Lys Ala Ile Arg Ile Leu Val Pro
 20 25

<210> 23

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的抗微生物肽

<400> 23

Gly Leu Phe Arg Arg Leu Arg Lys Lys Ile Gly Lys Lys Leu Lys Lys
1 5 10 15

Ile Gly Gln Leu Ile Lys Ala Ile Arg Ile Leu Val Pro
 20 25

<210> 24

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的抗微生物肽

<400> 24

Gly Leu Leu Arg Arg Phe Gly Lys Lys Ile Gly Lys Lys Phe Lys Lys
1 5 10 15

Tyr Gly Gln Lys Ile Lys Asn Leu Arg Ile Leu Val Pro
 20 25

<210> 25

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的抗微生物肽

<400> 25

Gly Leu Leu Lys Arg Leu Arg Lys Lys Ile Gly Lys Lys Leu Lys Lys

<211> 29
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成的抗微生物肽

<400> 28

Gly Arg Phe Arg Arg Phe Arg Lys Lys Ile Gly Gly Lys Leu Lys Lys
 1 5 10 15

Ile Gly Gln Val Ile Lys Asp Ile Arg Ile Leu Val Pro
 20 25

<210> 29
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成的抗微生物肽

<400> 29

Gly Arg Phe Arg Arg Phe Arg Lys Lys Ile Gly Lys Lys Phe Lys Lys
 1 5 10 15

Phe Gly Gln Met Ile Lys Ala Leu Arg Ile Leu Val Pro
 20 25

<210> 30
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成的抗微生物肽

<400> 30

<210> 33
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成的抗微生物肽

<400> 33

Gly Leu Phe Arg Arg Leu Arg Gly Lys Ile Gly Lys Lys Leu Lys Lys
 1 5 10 15

Ile Gly Gln Lys Ile Lys Ala Ile Arg Ile Leu Val Pro
 20 25

<210> 34
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成的抗微生物肽

<400> 34

Gly Leu Phe Arg Arg Leu Gly Lys Lys Ile Gly Lys Lys Leu Lys Lys
 1 5 10 15

Phe Gly Gln Val Ile Lys His Ile Arg Ile Leu Val Pro
 20 25

<210> 35
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成的抗微生物肽

<400> 35

Gly Leu Leu Arg Arg Leu Gly Lys Lys Ile Gly Lys Lys Phe Lys Lys
 1 5 10 15

Phe Gly Gln Val Ile Lys Ala Leu Arg Ile Leu Val Pro
 20 25

<210> 36

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的抗微生物肽

<400> 36

Gly Leu Phe Arg Arg Leu Gly Arg Lys Ile Gly Lys Lys Leu Lys Lys
 1 5 10 15

Ile Gly Gln Val Ile Lys His Ile Arg Ile Leu Val Pro
 20 25

<210> 37

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的抗微生物肽

<400> 37

Gly Leu Leu Arg Arg Leu Arg Lys Lys Ile Glu Lys Lys Leu Lys Lys
 1 5 10 15

Tyr Gly Pro Lys Ile Lys Ala Leu Arg Lys Leu Val Pro

20

25

<210> 38
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成的抗微生物肽

<400> 38

Gly Arg Ile Lys Arg Val Gly Glu Lys Ile Gly Lys Lys Leu Lys Lys
 1 5 10 15

Ile Gly Gln Val Ile Lys His Leu Arg Ile Leu Val Pro
 20 25

<210> 39
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成的抗微生物肽

<400> 39

Gly Leu Phe Arg Arg Phe Gly Lys Lys Ile Gly Lys Lys Leu Lys Lys
 1 5 10 15

Ile Gly Gln Val Ile Lys Ala Leu Arg Ile Leu Val Pro
 20 25

<210> 40
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>

<223> 合成的抗微生物肽

<400> 40

Gly Arg Leu Arg Arg Phe Gly Lys Lys Ile Gly Lys Lys Leu Lys Lys
1 5 10 15

Phe Gly Gln Leu Ile Lys Ala Leu Arg Ile Leu Val Pro
 20 25

<210> 41

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的抗微生物肽

<400> 41

Gly Leu Leu Arg Arg Phe Trp Lys Lys Ile Gly Lys Lys Leu Lys Lys
1 5 10 15

Phe Gly Gln Lys Ile Lys Pro Leu Pro Lys Leu Val Pro
 20 25

<210> 42

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的抗微生物肽

<400> 42

Gly Arg Phe Arg Arg Leu Gly Arg Lys Ile Gly Glu Lys Leu Lys Lys
1 5 10 15

Phe Gly Gln Val Ile Lys Ala Ile Arg Ile Leu Val Pro
 20 25

<210> 43
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成的抗微生物肽

<400> 43

Gly Leu Phe Arg Arg Phe Gly Lys Lys Ile Gly Lys Lys Leu Lys Lys
 1 5 10 15

Ile Gly Gln Lys Ile Lys Pro Ile His Lys Leu Val Pro
 20 25

<210> 44
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成的抗微生物肽

<400> 44

Gly Leu Leu Lys Arg Leu Arg Lys Lys Ile Gly Lys Lys Leu Lys Lys
 1 5 10 15

Ile Gly Gln Met Ile Lys His Ile Arg Ile Leu Val Pro
 20 25

<210> 45
 <211> 29
 <212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的抗微生物肽

<400> 45

Gly Leu Leu Arg Arg Phe Arg Glu Lys Ile Gly Lys Lys Leu Lys Lys
1 5 10 15

Tyr Gly Gln Lys Ile Lys His Leu Arg Lys Leu Val Pro
 20 25

<210> 46

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的抗微生物肽

<400> 46

Gly Leu Phe Arg Arg Leu Arg Arg Lys Ile Gly Lys Lys Phe Lys Lys
1 5 10 15

Phe Gly Gln Lys Ile Lys Pro Leu Arg Lys Leu Val Pro
 20 25

<210> 47

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的抗微生物肽

<400> 47

Gly Leu Phe Arg Arg Phe Trp Lys Lys Ile Gly Arg Lys Leu Lys Lys

<211> 29
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成的抗微生物肽

<400> 50

Gly Leu Leu Arg Arg Phe Arg Asn Lys Ile Gly Lys Lys Leu Lys Lys
 1 5 10 15

Ile Gly Gln Lys Ile Lys Pro Ile Arg Lys Leu Val Pro
 20 25

<210> 51
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成的抗微生物肽

<400> 51

Gly Arg Phe Lys Arg Leu Arg Lys Lys Ile Gly Lys Lys Phe Lys Lys
 1 5 10 15

Ile Gly Gln Lys Ile Lys Asp Ile Arg Lys Leu Val Pro
 20 25

<210> 52
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成的抗微生物肽

<400> 52

<210> 55
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的抗微生物肽

<400> 55

Gly Leu Leu Arg Arg Phe Arg Lys Lys Ile Gly Glu Lys Phe Lys Lys
1 5 10 15

Phe Gly Gln Lys Ile Lys Asn Ile Arg Ile Leu Val Pro
 20 25

<210> 56
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的抗微生物肽

<400> 56

Gly Leu Leu Arg Arg Leu Arg Lys Lys Ile Gly Lys Lys Leu Lys Lys
1 5 10 15

Ile Gly Gln Lys Ile Lys Pro Ile Arg Lys Leu Val Pro
 20 25

<210> 57
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的抗微生物肽

<400> 57

Gly Leu Leu Arg Arg Phe Arg Lys Lys Ile Gly Lys Lys Leu Lys Lys
 1 5 10 15

Tyr Gly Gln Lys Ile Lys His Leu Arg Ile Leu Val Pro
 20 25

<210> 58

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的抗微生物肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = 亮氨酸或精氨酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa = 亮氨酸或苯丙氨酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa = 精氨酸或赖氨酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa = 亮氨酸或苯丙氨酸

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (7).. (7)
<223> Xaa =精氨酸、赖氨酸或甘氨酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8).. (8)
<223> Xaa =精氨酸、赖氨酸或谷氨酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11).. (11)
<223> Xaa = 甘氨酸或赖氨酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12).. (12)
<223> Xaa = 赖氨酸、精氨酸或谷氨酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14).. (14)
<223> Xaa = 亮氨酸或苯丙氨酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (18).. (18)
<223> Xaa = 丙氨酸或苏氨酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15).. (15)
<223> Xaa = 赖氨酸或精氨酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17).. (17)

<223> Xaa = 异亮氨酸或亮氨酸

<400> 58

Gly Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Lys Ile Xaa Xaa Lys Xaa Xaa Lys
1 5 10 15

Xaa Xaa Arg

<210> 59

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的抗微生物肽

<400> 59

Gly Leu Leu Arg Arg Leu Arg Lys Lys Ile Gly Lys Lys Leu Lys Lys
1 5 10 15

Ile Ala Arg

<210> 60

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的抗微生物肽

<400> 60

Gly Leu Phe Arg Arg Leu Lys Arg Lys Ile Gly Arg Lys Phe Lys Lys
1 5 10 15

Ile Ala Arg

<210> 61

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的抗微生物肽

<400> 61

Gly Leu Leu Lys Arg Leu Gly Arg Lys Ile Gly Lys Lys Phe Lys Lys
 1 5 10 15

Ile Ala Arg

<210> 62

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的抗微生物肽

<400> 62

Gly Leu Leu Arg Arg Phe Arg Lys Lys Ile Gly Lys Lys Leu Lys Lys
 1 5 10 15

Ile Ala Arg

<210> 63

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的抗微生物肽

<400> 63

Gly Leu Leu Arg Arg Leu Arg Lys Lys Ile Gly Lys Lys Leu Lys Lys
1 5 10 15

Ile Thr Arg

<210> 64

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的抗微生物肽

<400> 64

Gly Leu Phe Arg Arg Leu Arg Lys Lys Ile Gly Lys Lys Leu Lys Lys
1 5 10 15

Ile Ala Arg

<210> 65

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的抗微生物肽

<400> 65

Gly Leu Phe Arg Arg Leu Lys Arg Lys Ile Gly Lys Lys Leu Lys Lys

<211> 19
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的抗微生物肽

<400> 68

Gly Leu Leu Arg Arg Leu Arg Lys Lys Ile Gly Arg Lys Phe Lys Lys
1 5 10 15

Ile Ala Arg

<210> 69
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的抗微生物肽

<400> 69

Gly Leu Phe Arg Arg Leu Arg Lys Lys Ile Gly Lys Lys Phe Lys Lys
1 5 10 15

Ile Ala Arg

<210> 70
<211> 90
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的 Cat1 基因

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(90)

<223>

<400> 70

ggc ctg ctg cgc cgt ctg cgc aag aag att ggc aaa aag ctg aag aaa 48
Gly Leu Leu Arg Arg Leu Arg Lys Lys Ile Gly Lys Lys Leu Lys Lys
1 5 10 15

att ggc cag aag att aaa ccg att cgc att ctg gtg ccg tag 90
Ile Gly Gln Lys Ile Lys Pro Ile Arg Ile Leu Val Pro
20 25

<210> 71

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 Cat1 基因

<400> 71

Gly Leu Leu Arg Arg Leu Arg Lys Lys Ile Gly Lys Lys Leu Lys Lys
1 5 10 15

Ile Gly Gln Lys Ile Lys Pro Ile Arg Ile Leu Val Pro
20 25

<210> 72

<211> 129

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引物 1 序列

<400> 72

attattcaga tgctggatcc ggcggaaggc ctgctgcgcc gtctgcgcaa gaagattggc 60

aaaaagctga agaaaattgg ccagaagatt aaaccgattc gcattctggt gccgtagctc 120

gagattatt 129

<210> 73

<211> 129

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引物 2 序列

<400> 73

aataatctcg agctacggca ccagaatgcg aatcggttta atcttctggc caatcttctt 60

cagctttttg ccaatcttct tgcgcagacg ggcgagcagg ccttccgccg gatccagcat 120

ctgaataat 129

<210> 74

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引物 3 序列

<400> 74

tgctagttat tgctcagcgg 20

<210> 75

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引物 4 序列

<400> 75

accgtagttg cgcccatcg 19