

國 籍：(中文/英文)

丹麥 / DENMARK

三、發明人：(共 4 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 多羅帝 拉文托斯 塞古拉 / SEGURA, DOROTEA RAVENTOS
2. 波 候塞 米俊德 / MYGIND, PER HOLSE
3. 漢斯亨利克 克利斯登森 霍根豪格 /
HOEGENHAUG, HANS-HENRIK KRISTENSEN
4. 亞利山朵羅 托西 / TOSSI, ALESSANDRO

國 籍：(中文/英文)

1. 西班牙 / SPAIN
2. 丹麥 / DENMARK
3. 丹麥 / DENMARK
4. 義大利 / Italian

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，
其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

丹麥；2003.6.11；PA 2003 00865

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域及先前技術】

發明背景

近年來，抗微生物劑的種類已實質上增加，伴隨著有抗性的病原微生物也同時增加。抗性目前被認為是不利於所有臨床上可利用的抗微生物劑。在醫界，對於抗微生物抗性的反應，已必須使用不同於先前使用對抗抗性細菌之新的或替代性的抗生素。這個方向已需要持續性的開發新的抗生素，無論是現在既存的化合物之修飾或是化合物的組合，而該等抗生素可抑制或繞過細菌抗性的機轉。

本發明之目的係提供新的具有改良的抗微生物活性之多肽，以及編碼該等多肽之多核苷酸。

【發明內容】

發明概述

本發明的第一種形態是有關於具有抗微生物活性的多肽，其包括具有抗微生物活性的至少 19 個胺基酸之胺基酸序列或其片段：

$$G-X_1-X_2-X_3-R-X_4-X_5-X_6-K-I-X_7-X_8-K-X_9-X_{10}-K-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-I-K-X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}-L-V-P;$$

其中

$X_1 = \text{L 或 R};$	$X_2 = \text{L、V、I 或 F};$	$X_3 = \text{R 或 K};$
$X_4 = \text{L、V、I 或 F};$	$X_5 = \text{R、K、W 或 G};$	$X_6 = \text{K、R、G、M、N 或 E};$
$X_7 = \text{G、R、K 或 E};$	$X_8 = \text{G、R、K 或 E};$	$X_9 = \text{L 或 F};$
$X_{10} = \text{K 或 R};$	$X_{11} = \text{I、L、F、C 或 Y};$	$X_{12} = \text{G、A 或 T};$
$X_{13} = \text{Q、R、L 或 P};$	$X_{14} = \text{K、I、M、L 或 V};$	$X_{15} = \text{P、A、H、N 或 D};$

$X_{16} = \text{I 或 L}; \quad X_{17} = \text{R、H、Q 或 P}; \quad X_{18} = \text{I 或 K}。$

本發明的另一形態是有關於具有抗微生物活性的多肽，其包括一胺基酸序列，其與下列胺基酸序列至多有兩個不同的胺基酸：

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

其中

$X_1 = \text{L 或 R}; \quad X_2 = \text{L、V、I 或 F}; \quad X_3 = \text{R 或 K};$
 $X_4 = \text{L、V、I 或 F}; \quad X_5 = \text{R、K、W 或 G}; \quad X_6 = \text{K、R、G、M、N 或 E};$
 $X_7 = \text{G、R、K 或 E}; \quad X_8 = \text{G、R、K 或 E}; \quad X_9 = \text{L 或 F};$
 $X_{10} = \text{K 或 R}; \quad X_{11} = \text{I、L、F、C 或 Y}; \quad X_{12} = \text{G、A 或 T};$

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

其中

$X_{13} = \text{Q、L 或 P}; \quad X_{14} = \text{K、I、M、L 或 V}; \quad X_{15} = \text{P、A、H、N 或 D};$
 $X_{16} = \text{I 或 L}; \quad X_{17} = \text{R、H、Q 或 P}; \quad X_{18} = \text{I 或 K}。$

本發明的第二形態是有關於多核苷酸，其具有編碼本發明的多肽之核苷酸序列。

本發明的第三形態是有關於核酸構築，其包括編碼本發明的多肽之核苷酸序列，可操作地連結到一種或多種可在適合宿主中引導多肽生產的控制序列。

本發明的第四形態是有關於重組表現載體，其包括本發明之核酸構築。

本發明的第五形態是有關於重組宿主細胞，其包括本發明之核酸構築。

本發明的第六形態是有關於製造本發明的多肽之方法，該方法包括：

(a) 在有益於多肽生產的條件下，培養本發明之重組宿主細胞；以及

(b) 回收多肽。

由以下的說明以及附屬的申請專利範圍，本發明的其他形態將是顯而易見的。

定義

在進一步詳細討論本發明之前，將首先定義以下名詞以及慣用語：

抗微生物活性：名詞“抗微生物活性”此處是定義為可殺死或抑制微生物細胞生長的活性。在本發明的內文中，名詞“抗微生物”希望是指有殺細菌及/或及/或抑制細菌及/或殺真菌及/或抑制真菌的效果及/或殺病毒的效果，其中名詞“殺細菌”應理解為可殺死細菌細胞。名詞“抑制細菌”應理解為可抑制細菌生長，也就是，抑制生長的細菌細胞。名詞“殺真菌”應理解為可殺死真菌細胞。名詞“抑制真菌”應理解為可抑制真菌生長，也就是，抑制生長的真菌細胞。名詞“殺病毒”應理解為可使病毒失活性。名詞“微生物細胞”代表細菌或真菌細胞（包括酵母菌）。

在本發明的內文中，名詞“抑制微生物細胞的生長”希望是指非生長期的細胞，也就是，它們不能夠增殖。

為了本發明之目的，抗微生物活性可根據 Lehrer 等人 *J. Immunol. Methods* 137(2): 167-174 (1991) 所說明的方法而測定。

於 25% (重量/重量) 具有抗微生物活性的多肽之水溶液，較佳於 10% (重量/重量) 水溶液，更佳於 5% (重量/重量) 水溶液，還要更佳於 1% (重量/重量) 水溶液，最佳於 0.5% (重量/重量) 水溶液，以及特別是於 0.1% (重量/重量) 水溶液，在 20°C 培養 8 小時之後 (較佳 4 小時之後，更佳 2 小時之後，最佳 1 小時之後，以及特別是 30 分鐘之後)，具有抗微生物活性的多肽可將大腸桿菌 (*E. coli*; DSM 1576) 的活細胞數減少至 1/100。

當以 1000 ppm 的濃度加入時，較佳當以 500 ppm 的濃度加入時，更佳當以 250 ppm 的濃度加入時，還要更佳當以 100 ppm 的濃度加入時，最佳當以當以 50 ppm 的濃度加入時，以及特別當以 25 ppm 的濃度加入時，在微生物的生長基質中，於 25°C 中，具有抗微生物活性的多肽也可抑制大腸桿菌 (DSM 1576) 的發展達 24 小時。

於 25% (重量/重量) 具有抗微生物活性的多肽之水溶液，較佳於 10% (重量/重量) 水溶液，更佳於 5% (重量/重量) 水溶液，還要更佳於 1% (重量/重量) 水溶液，最佳於 0.5% (重量/重量) 水溶液，以及特別是於 0.1% (重量/重量) 水溶液，在 20°C 培養 8 小時之後 (較佳 4 小時之後，更佳 2 小時之後，最佳 1 小時之後，以及特別是 30 分鐘之後)，具有抗微生物活性的多肽也可將枯草芽胞桿菌 (*Bacillus subtilis*; ATCC 6633) 的活細胞數減少至 1/100。

當以 1000 ppm 的濃度加入時，較佳當以 500 ppm 的濃

度加入時，更佳當以 250 ppm 的濃度加入時，還要更佳當以 100 ppm 的濃度加入時，最佳當以 50 ppm 的濃度加入時，以及特別當以 25 ppm 的濃度加入時，在微生物的生長基質中，於 25°C 中，具有抗微生物活性的多肽也可抑制枯草芽胞桿菌（ATCC 6633）的發展達 24 小時。

本發明之多肽較佳應具有至少 20% 多肽的抗微生物活性，而該多肽係由序列識別號 1 至序列識別號 57 的任一個之胺基酸 1 至 29、或序列識別號 58 至序列識別號 69 的任一個之胺基酸 1 至 19 所示的胺基酸序列所組成。在特定較佳具體實例中，多肽應具有至少 40%，例如至少 50%，較佳至少 60%，例如至少 70%，更佳至少 80%，例如至少 90%，最佳至少 95%，例如約或至少 100% 多肽的抗微生物活性，而該多肽係由序列識別號 1 至序列識別號 57 的任一個之胺基酸 1 至 29、或序列識別號 58 至序列識別號 69 的任一個之胺基酸 1 至 19 所示的胺基酸序列所組成。

片段：當於此處使用時，胺基酸序列的“片段”：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；或序列識別號 1 至序列識別號 57 的任一

個或序列識別號 58 至序列識別號 69 的任一個是多肽的次序列，其中一個或多個胺基酸已從胺基端及/或羧基端處刪除。較佳地，一個或多個胺基酸已從羧基端處刪除。片段係由至少 19 個胺基酸所組成，例如，19、20、21、22、23、24、25、26、27、28 或 29 個胺基酸。較佳地，片段係由多肽的胺基端處所計數的至少 19 個胺基酸所組成。

對偶基因變異體：在本發明的內文中，名詞“對偶基因變異體”代表位於相同染色體座的基因之任何兩種或多種替代形式。對偶基因變異體會經由突變而自然產生，並且可在族群間導致多形性。基因突變可以是無聲的（在編碼的多肽中沒有改變）或可編碼具有改變的胺基酸序列之多肽。多肽的對偶基因變異體是藉由基因的對偶基因變異體所編碼的多肽。

實質上純的多核苷酸：此處所使用的名詞“實質上純的多核苷酸”是指多核苷酸製備物，其中多核苷酸已從其天然基因的周圍環境中移出，並且因此不含其他無關或不想要的編碼序列，並且是以適合在遺傳工程的蛋白質生產系統內所使用的形式而存在。因此，實質上純的多核苷酸包含至多 10 重量% 與其天然相關的其他多核苷酸物質（較佳是更低百分比的其他多核苷酸物質，例如，至多 8 重量%、至多 6 重量%、至多 5 重量%、至多 4 重量%、至多 3 重量%、至多 2 重量%、至多 1 重量% 以及至多 重量%）。然而，實質上純的多核苷酸可包括天然存在的 5' 及 3' 未轉譯區域，例如，啟動子及終結子。較佳地，實質上純的多

核苷酸是至少 92% 純的，也就是，多核苷酸構成至少 92 重量% 在製備物中存在的總多核苷酸物質，較佳是更高的百分比，例如，至少 94% 純的、至少 95% 純的、至少 96 % 純的、至少 97% 純的、至少 98% 純的、至少 99% 純的以及至多 99.5% 純的。此處所揭露的多核苷酸較佳是以實質上純的形式而存在。特別地，此處所揭露的多核苷酸較佳是以“基本上純的形式”而存在，也就是，多核苷酸製備物基本上不含與其天然相關的其他多核苷酸物質。在此處，名詞“實質上純的多核苷酸”與名詞“分離的多核苷酸”及“分離形式的多核苷酸”是同義的。

修飾：在本發明的內文中，名詞“修飾”希望是指由以下胺基酸序列所組成的多肽之任何化學修飾： $G-X_1-X_2-X_3-R-X_4-X_5-X_6-K-I-X_7-X_8-K-X_9-X_{10}-K-X_{11}-X_{12}-Z$ ；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 ；或序列識別號 1 至序列識別號 57 的任一個之胺基酸 1 至 29、或序列識別號 58 至序列識別號 69 的任一個之胺基酸 1 至 19 所示的胺基酸序列，以及編碼多肽的 DNA 之基因操作物。修飾可以是胺基酸側鏈的置換、在有興趣的胺基酸內或胺基酸上之取代、刪除及/或插入；或在胺

基酸序列內使用具有相似特徵的非天然胺基酸。特別地，修飾可以是醃胺化，例如，羧基端的醃胺化。

互補 DNA (cDNA)：當用於本發明的內文中時，名詞“cDNA”希望涵蓋可從衍生自真核細胞的成熟、剪接的 mRNA 分子藉由反轉錄而製備的 DNA 分子。cDNA 缺少通常存在於對應基因體 DNA 中的內含子 (intron) 序列。一開始、初級的 RNA 轉錄物是 mRNA 的前驅物，且其在顯現為成熟剪接的 mRNA 之前，經歷過一系列的加工事件。這些事件包括藉由所謂的剪接而將內含子序列移除。因此，當 cDNA 是衍生自 mRNA 時，它就缺少了內含子序列。

核酸構築：當用於此處時，名詞“核酸構築”是指單股或雙股的核酸分子，其為分離自天然存在的基因，或以除此以外不會存在於自然界的的方式而已經修飾成包含核酸的片段。當核酸構築包含表現本發明的編碼序列所需之控制序列時，名詞核酸構築與名詞“表現卡匣”是同義的。

控制序列：名詞“控制序列”在此處是定義為包括對於本發明多肽的表現是必要或有利的所有成份。對於編碼多肽的核苷酸序列，每個控制序列都可以是天然的或外來的。這樣的控制序列包括，但並不限於，前導子、聚腺苷酸化序列、前肽序列、啟動子、訊號肽序列以及轉錄終結子。最少，控制序列包括啟動子、以及轉錄及轉譯終止訊號。可將控制序列裝配連接子，以用於引導專一性限切位置，促進控制序列與編碼多肽的核苷酸序列之編碼區域黏接之目的。

可操作地連結：名詞“可操作地連結”在此處是定義為一種結構，其中控制序列是適當地放置在相對於 DNA 序列的編碼序列位置，使得控制序列可引導多肽的表現。

編碼序列：當用於此處時，名詞“編碼序列”希望涵蓋可直接具體指定其蛋白質產物的胺基酸序列之核苷酸序列。編碼序列的邊界一般是由開放譯讀架構而決定，其通常開始於 ATG 起始密碼子。編碼序列通常包括 DNA、cDNA 以及重組核苷酸序列。

表現：在本發明的內文中，名詞“表現”包括涉及多肽生產的任何步驟，包括但並不限於，轉錄、轉錄後修飾、轉譯以及轉譯後修飾。較佳地，表現也可包括多肽的分泌。

表現載體：在本發明的內文中，名詞“表現載體”涵蓋線形或環狀的 DNA 分子，其包括編碼本發明多肽的片段，以及其可操作地連結到可提供轉錄的另外片段。

宿主細胞：此處所使用的名詞“宿主細胞”包括可容許以核酸構築而轉形的任何細胞類型。

名詞“多核苷酸探針”、“雜合”以及各種嚴格性條件，是在標題為“具有抗微生物活性的多肽”章節中定義。

發明詳述

具有抗微生物活性的多肽

本發明的第一種形態是有關於具有抗微生物活性的多肽，其中多肽包括，較佳係由以下的胺基酸序列所組成：
 $G-X_1-X_2-X_3-R-X_4-X_5-X_6-K-I-X_7-X_8-K-X_9-X_{10}-K-X_{11}-X_{12}-Z$ ；其

中 $X_1 = \text{L 或 R}$; $X_2 = \text{L、V、I 或 F}$; $X_3 = \text{R 或 K}$; $X_4 = \text{L、V、I 或 F}$; $X_5 = \text{R、K、W 或 G}$; $X_6 = \text{K、R、G、M、N 或 E}$; $X_7 = \text{G、R、K 或 E}$; $X_8 = \text{G、R、K 或 E}$; $X_9 = \text{L 或 F}$; $X_{10} = \text{K 或 R}$; $X_{11} = \text{I、L、F、C 或 Y}$; $X_{12} = \text{G、A 或 T}$; $Z = \text{R 或 } X_{13}-X_{14}-\text{I-K-}X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}-\text{L-V-P}$; 其中 $X_{13} = \text{Q、L 或 P}$; $X_{14} = \text{K、I、M、L 或 V}$; $X_{15} = \text{P、A、H、N 或 D}$; $X_{16} = \text{I 或 L}$; $X_{17} = \text{R、H、Q 或 P}$; $X_{18} = \text{I 或 K}$; 或序列識別號 1 至序列識別號 57 的任一個之胺基酸 1 至 29、或序列識別號 58 至序列識別號 69 的任一個之胺基酸 1 至 19。在一有趣的具體實例中，胺基酸序列至多有 5 個胺基酸（例如，5 個胺基酸），例如，至多 4 個胺基酸（例如，4 個胺基酸），例如，至多 3 個胺基酸（例如，3 個胺基酸），特別是至多 2 個胺基酸（例如，2 個胺基酸），例如，1 個胺基酸，是與下列胺基酸序列不同： $\text{G-X}_1-\text{X}_2-\text{X}_3-\text{R-X}_4-\text{X}_5-\text{X}_6-\text{K-I-X}_7-\text{X}_8-\text{K-X}_9-\text{X}_{10}-\text{K-X}_{11}-\text{X}_{12}-\text{Z}$; 其中 $X_1 = \text{L 或 R}$; $X_2 = \text{L、V、I 或 F}$; $X_3 = \text{R 或 K}$; $X_4 = \text{L、V、I 或 F}$; $X_5 = \text{R、K、W 或 G}$; $X_6 = \text{K、R、G、M、N 或 E}$; $X_7 = \text{G、R、K 或 E}$; $X_8 = \text{G、R、K 或 E}$; $X_9 = \text{L 或 F}$; $X_{10} = \text{K 或 R}$; $X_{11} = \text{I、L、F、C 或 Y}$; $X_{12} = \text{G、A 或 T}$; $Z = \text{R 或 } X_{13}-X_{14}-\text{I-K-}X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}-\text{L-V-P}$; 其中 $X_{13} = \text{Q、L 或 P}$; $X_{14} = \text{K、I、M、L 或 V}$; $X_{15} = \text{P、A、H、N 或 D}$; $X_{16} = \text{I 或 L}$; $X_{17} = \text{R、H、Q 或 P}$; $X_{18} = \text{I 或 K}$; 或序列識別號 1 至序列識別號 57 的任一個之胺基酸 1 至 29、或序列識別號 58 至序列識別號 69 的任一個之胺基酸 1 至 19。

名詞“序列識別號 1 至序列識別號 57 的任一個”希望

是指序列識別號 1、序列識別號 2、序列識別號 3、序列識別號 4、序列識別號 5、序列識別號 6、序列識別號 7、序列識別號 8、序列識別號 9、序列識別號 10、序列識別號 11、序列識別號 12、序列識別號 13、序列識別號 14、序列識別號 15、序列識別號 16、序列識別號 17、序列識別號 18、序列識別號 19、序列識別號 20、序列識別號 21、序列識別號 22、序列識別號 23、序列識別號 24、序列識別號 25、序列識別號 26、序列識別號 27、序列識別號 28、序列識別號 29、序列識別號 30、序列識別號 31、序列識別號 32、序列識別號 33、序列識別號 34、序列識別號 35、序列識別號 36、序列識別號 37、序列識別號 38、序列識別號 39、序列識別號 40、序列識別號 41、序列識別號 42、序列識別號 43、序列識別號 44、序列識別號 45、序列識別號 46、序列識別號 47、序列識別號 48、序列識別號 49、序列識別號 50、序列識別號 51、序列識別號 52、序列識別號 53、序列識別號 54、序列識別號 55、序列識別號 56 或序列識別號 57。

名詞“序列識別號 58 至序列識別號 69 的任一個”希望是指序列識別號 58、序列識別號 59、序列識別號 60、序列識別號 61、序列識別號 62、序列識別號 63、序列識別號 64、序列識別號 65、序列識別號 66、序列識別號 67、序列識別號 68 或序列識別號 69。

較佳地，本發明的多肽包括序列識別號 1 至序列識別號 57 的任一個之胺基酸序列或序列識別號 58 至序列識別

號 69 的任一個之胺基酸序列、或其具有抗微生物活性的片段。在另一較佳具體實例中，本發明的多肽包括序列識別號 1 至序列識別號 57 的任一個之胺基酸 1 至 29 或序列識別號 58 至序列識別號 69 的任一個之胺基酸 1 至 19。在又一較佳具體實例中，多肽是由序列識別號 1 至序列識別號 57 的任一個之胺基酸 1 至 29 或序列識別號 58 至序列識別號 69 的任一個之胺基酸 1 至 19 所組成。

構成本發明多肽的胺基酸可獨立地選自 D 或 L 形式。

本發明的多肽可以是人工變異體，其包括，較佳係由以下所組成：即相較於以下胺基酸序列，具有至多 3 個，例如至多 2 個，例如至多 1 個胺基酸的取代、刪除及/或插入之胺基酸序列：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；或序列識別號 1 至序列識別號 57 的任一個之胺基酸 1 至 29、或序列識別號 58 至序列識別號 69 的任一個之胺基酸 1 至 19。這樣的人工變異體可藉由在此技藝中所熟知的標準技術而構築，例如，藉由多肽的定點/隨機致突變，該多肽包括如以下胺基酸序列所示的胺基酸序列：G-X₁-X₂-X₃-R-X₄-X₅-X₆-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 ；或序列識別號 1 至序列識別號 57 的任一個之胺基酸 1 至 29、或序列識別號 58 至序列識別號 69 的任一個之胺基酸 1 至 19。在本發明的具體實例中，胺基酸的改變具有不重要的特性，亦即不會明顯影響蛋白質折疊及/或活性的保守性胺基酸取代；小的刪除，通常是 1 個至約 5 個胺基酸的刪除；小的胺基端或羧基端延伸，例如，胺基端的甲硫胺酸殘基；至多約 10-25 個殘基的小連結肽；或可藉由改變淨電荷或其他功能而促進純化的小延伸，例如，聚組胺酸束、抗原性抗原決定部位或結合功能部位。

保守性取代的例子是在鹼性胺基酸（精胺酸、離胺酸及組胺酸）、酸性胺基酸（麩胺酸及天冬胺酸）、極性胺基酸（麩醯胺酸及天冬醯胺酸）、厭水性胺基酸（白胺酸、異白胺酸、纈胺酸及甲硫胺酸）、芳香族胺基酸（苯丙胺酸、色胺酸及酪胺酸）以及小胺基酸（甘胺酸、丙胺酸、絲胺酸及蘇胺酸）的族群內。一般不會改變特定活性的胺基酸取代是在此技藝中已知的，並且例如 H. Neurath 及 R. L. Hill (1979) 於“蛋白質”（大學出版，紐約）中的說明。

最常發生的交換是丙胺酸/絲胺酸、纈胺酸/異白胺酸、天冬胺酸/麩胺酸、蘇胺酸/絲胺酸、丙胺酸/甘胺酸、丙胺酸/蘇胺酸、絲胺酸/天冬醯胺酸、丙胺酸/纈胺酸、絲胺酸/甘胺酸、酪胺酸/苯丙胺酸、丙胺酸/脯胺酸、離胺酸/精胺酸、天冬胺酸/天冬醯胺酸、白胺酸/異白胺酸、白胺酸/纈胺酸、丙胺酸/麩胺酸及天冬胺酸/甘胺酸，以及這些的相反。

在本發明有趣的具體實例中，胺基酸的改變具有多肽的物化性質被改變之特性。例如，胺基酸的改變可表現出改善多肽的熱穩定性、改變基質專一性、改變 pH 最適性以及類似特性。

胺基端延伸

本發明多肽的胺基端延伸可適當地由 1 至 50 個胺基酸所組成，較佳是 2-20 個胺基酸，特別是 3-15 個胺基酸。在一具體實例中，胺基端的肽延伸並不包含精胺酸 (R)。在另一具體實例中，胺基端的延伸包括 kex2 或類似 kex2 的切割位置，將在以下進一步定義。在較佳具體實例中，胺基端的延伸係包括至少 2 個麩胺酸 (E) 及/或天冬胺酸 (D) 胺基酸殘基的肽，例如，胺基端的延伸包括以下序列之一：EAE、EE、DE 及 DD。

kex2 位置

kex2 位置 (例如，參見酵素學方法，185 卷，D. Goeddel 編輯，大學出版公司 (1990)，聖地牙哥，加州，“基因表現技術”) 及類似 kex2 位置是二鹼價的辨識位置 (也就

是切割位置)，係在編碼區域的前肽及部份蛋白質的成熟區域之間被發現。

在特定例子中，插入 *kex2* 位置或類似 *kex2* 位置已顯示肽內切酶於前肽切割位置的正確處理，導致增加的蛋白質分泌水平。

在本發明的內文中，插入 *kex2* 或類似 *kex2* 位置會導致在胺基端延伸的特定位置獲得切割的可能性，相較於以下胺基酸序列所示的成熟肽，其，導致抗微生物肽被延伸：
 $G-X_1-X_2-X_3-R-X_4-X_5-X_6-K-I-X_7-X_8-K-X_9-X_{10}-K-X_{11}-X_{12}-Z$ ；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 ；或序列識別號 1 至序列識別號 57 的任一個之胺基酸 1 至 29、或序列識別號 58 至序列識別號 69 的任一個之胺基酸 1 至 19。

融合的多肽

本發明的多肽也包括融合的多肽或可切割的融合多肽，其中另一個多肽是在本發明多肽或其片段的胺基端或羧基端處融合。融合的多肽是藉由將編碼另一個多肽的核苷酸序列（或其部份），融合至本發明的核苷酸序列（或其部份）而製造。製造融合多肽的技術是在此技藝中已知

的，並且包括黏接編碼該多肽的編碼序列，使得它們是在架構內，以及融合多肽的表現是在相同啟動子及終結子的控制下。

多核苷酸及核苷酸序列

本發明也有關於具有可編碼本發明多肽的核苷酸序列之多核苷酸。特別地，本發明是有關於由可編碼本發明多肽的核苷酸序列所組成之多核苷酸。由於遺傳密碼的簡併性，因此，在此技藝中之人士將易於認識到，可製備編碼每一個本發明多肽的數個核苷酸序列。在此技藝中之人士熟知的是，何種核苷酸會構成編碼本發明多肽的胺基酸之密碼子。

本發明也有關於可編碼以下胺基酸序列的片段之多核苷酸：
 $G-X_1-X_2-X_3-R-X_4-X_5-X_6-K-I-X_7-X_8-K-X_9-X_{10}-K-X_{11}-X_{12}-Z$ ；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 ；或具有抗微生物活性的序列識別號 1 至序列識別號 57 的任一個或序列識別號 58 至序列識別號 69 的任一個。多核苷酸的次序列是一種核苷酸序列，其中 5' 及 / 或 3' 端的一個或多個核苷酸已被刪除。

核苷酸序列可藉由在遺傳工程中所使用的標準選殖方

法而獲得，以將核苷酸序列從一處重新放置於它將被重製的不同位置。選殖方法可能涉及切除及分離包括編碼多肽的核苷酸序列之所要片段、將片段插入至載體分子、以及將重組載體併入到宿主細胞，在宿主細胞中，多次複製或選殖的核苷酸序列將被複製。核苷酸序列可以是基因體、cDNA、RNA、半合成、合成的來源或其任何組合。

編碼本發明多肽的核苷酸序列之修飾，對於多肽的合成可能是必要的，相較於以下的胺基酸序列，其包括具有至少一個取代、刪除及/或插入的胺基酸序列：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；或序列識別號 1 至序列識別號 57 的任一個之胺基酸 1 至 29、或序列識別號 58 至序列識別號 69 的任一個之胺基酸 1 至 19。這些人工的變異體可能以部分工程的方式，而不同於從其天然來源所分離的多肽，例如，比活性、熱穩定性、pH 最適性或類似特性的變異體。

對於熟悉於此技藝者將顯而易見的是，這樣的修飾可在對於分子的功能是關鍵性的區域外部而進行，並且仍可產生活性的多肽。對於本發明核苷酸序列所編碼的多肽之

活性是必要的胺基酸殘基，並且因此較佳是不進行修飾（例如取代）的胺基酸殘基，可根據在此技藝中已知的方法而鑑定，例如，定點致突變或丙胺酸掃描致突變（例如，參見 Cunningham 及 Wells(1989), *Science* 244:1081-1085）。在後者的技術中，突變是在分子中每個帶正電的殘基中被導入，並將所得的突變分子測試抗微生物活性，以鑑定對於分子的活性是關鍵性的胺基酸殘基。基質-酵素交互作用的位置，也可藉由三維結構的分析而決定，如同藉由核磁共振分析、結晶或光親合力標示的技術而測定（例如，參見 de Vos 等人（1992），*Science* 255: 306-312；Smith 等人（1992），*J. Mol. Biol.* 224: 899-904；Wlodaver 等人（1992），*FEBS Ltr.* 309: 59-64）。

此外，編碼本發明多肽的核苷酸序列也可藉由導入核苷酸取代而修飾，其不會引起核苷酸序列所編碼的多肽之另一胺基酸序列，但可對應於希望產生酵素的宿主生物體之密碼子的利用。

將突變導入至核苷酸序列以將一個核苷酸與另一核苷酸交換，可藉由定點致突變，利用任何在此技藝中所熟知的方法而完成。特別有用的是利用具有插入有興趣物及包含所要突變的兩個合成引子之超螺旋、雙股 DNA 載體的方法。寡核苷酸引子，每一個都與載體的相反股互補，可在溫度循環期間，藉由 *Pfu* DNA 聚合酶而延伸。在併入引子之後，就產生包含交錯缺口的突變質體。在溫度循環之後，將產物以對於甲基化及半甲基化 DNA 具有專一性的 *DpnI* 處

理，以消化親代 DNA 模板，並且篩選包含突變的合成 DNA。也可使用在此技藝中已知的其他方法。對於核苷酸取代的一般說明，例如，參見 Ford 等人 (1991)，*Protein Express. and Purif.* 2: 95-107。

核酸構築

本發明也有關於核酸構築，其包括本發明的核苷酸序列，可操作地連結到一個或多個控制序列，其可在適合的宿主細胞中，在與控制序列相容的條件下引導編碼序列的表現。

編碼本發明多肽的核苷酸序列可以各種方式操作，以提供多肽的表現。在其插入到載體之前，核苷酸序列的操作可能是希望的或必要的，取決於表現載體而定。利用重組 DNA 方法而修飾核苷酸序列的技術，是在此技藝中所熟知的。

控制序列可以是適合的啟動子序列，其為受宿主細胞所辨識的核苷酸序列，以用於核苷酸序列的表現。啟動子序列包含轉錄控制序列，其可調節多肽的表現。啟動子可以是任何的核苷酸序列，在選擇的宿主細胞中顯示轉錄活性，包括突變的、截短的以及雜合的啟動子，並且可從編碼細胞外或細胞內對宿主細胞是同源性或異源性的多肽之基因而獲得。

用於引導本發明核酸構築（特別是在細菌宿主細胞中）的轉錄之適合啟動子的例子，是得自大腸桿菌乳糖操縱子、天藍色鏈黴菌 (*Streptomyces coelicolor*) 瓊脂糖酶

基因 (*dagA*)、枯草芽胞桿菌果聚糖蔗糖酶基因 (*sacB*)、
 蘚樣芽胞桿菌 (*B. licheniformis*) α -澱粉酶基因 (*amyL*)、
 嗜熱脂肪芽胞桿菌 (*B. stearothermophilus*) 麥芽糖澱粉
 酶基因 (*amyM*)、解澱粉芽胞桿菌 (*B. amyloliquefaciens*)
 α -澱粉酶基因 (*amyQ*)、蘚樣芽胞桿菌青黴素酶基因
 (*penP*)、枯草芽胞桿菌 *xylA* 及 *xylB* 基因、以及原核生
 物的 β -內醯胺酶基因 (Villa-Kamaroff 等人 (1978), *Proc.*
Natl. Acad. Sci. USA 75: 3727-3731) 的啟動子，以及 *tac*
 啟動子 (DeBoer 等人 (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*
 80: 21-25)。其他的啟動子是說明於“重組細菌中之有用
 的蛋白質”，於 *Sci. American* (1980) 242: 74-94；以
 及 Sambrook 等人 (1989)，上述文獻。

用於引導本發明核酸構築在絲狀真菌宿主細胞中的轉
 錄之適合啟動子的例子，是得自米麴菌 (*Aspergillus*
oryzae) TAKA 澱粉酶、毛黴菌 (*Rhizomucor miehei*) 天
 冬胺酸蛋白酶、黑麴菌 (*A. niger*) 中性 α -澱粉酶、黑麴
 菌酸性穩定的 α -澱粉酶、黑麴菌或盛泡麴菌 (*A. awamori*)
 葡萄糖澱粉酶 (*glaA*)、毛黴菌脂肪酶、米麴菌鹼性蛋白
 酶、米麴菌磷酸三碳糖異構酶、構巢麴菌 (*A. nidulans*)
 乙醯胺酶及尖孢鐮刀菌 (*Fusarium oxysporum*) 類似胰蛋
 白酶 (WO 96/00787) 的啟動子，以及 NA2-tpi 啟動子 (黑
 麴菌中性 α -澱粉酶及米麴菌磷酸三碳糖異構酶的基因啟
 動子之雜合體)，以及其突變的、截短的以及雜合的啟動
 子。

在酵母菌宿主中，有用的啟動子是得自釀酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 烯醇化酶 (ENO-1)、釀酒酵母半乳糖激酶 (GAL1)、釀酒酵母乙醇脫氫酶/3-磷酸甘油醛脫氫酶 (ADH2/GAP) 及釀酒酵母 3-磷酸甘油酸激酶的基因。其他有用於酵母菌宿主細胞的啟動子是說明於 Romanos 等人 (1992)，*Yeast* 8: 423-488。

控制序列也可以是適合的轉錄終結子序列，其為受宿主細胞所辨識的序列，以用於終結轉錄作用。終結子序列可操作地連結到編碼多肽的核苷酸序列之 3'端。可在所選擇的宿主細胞中發揮功能的任何終結子，都可用於本發明中。

對於絲狀真菌宿主細胞，較佳的終結子是得自米麴菌 TAKA 澱粉酶、黑麴菌葡萄糖澱粉酶、構巢麴菌鄰氨基苯甲酸合成酶、黑麴菌 α -糖苷酶及尖孢鐮刀菌類似胰蛋白酶基因。

對於酵母菌宿主細胞，較佳的終結子是得自釀酒酵母 烯醇化酶、釀酒酵母細胞色素 C (CYC1) 及釀酒酵母 3-磷酸甘油醛脫氫酶的基因。其他有用於酵母菌宿主細胞的終結子是說明於 Romanos 等人 (1992)，上述文獻。

控制序列也可以是適合的前導子序列，其為對於宿主細胞轉譯作用是重要的 mRNA 之非轉譯區域。前導子序列可操作地連結到編碼多肽的核苷酸序列之 5'端。可在所選擇的宿主細胞中發揮功能的任何前導子，都可用於本發明中。

對於絲狀真菌宿主細胞，較佳的前導子是得自米麴菌 TAKA 澱粉酶及構巢麴菌磷酸三碳糖異構酶的基因。

對於酵母菌宿主細胞，適合的前導子是得自釀酒酵母烯醇化酶（ENO-1）、釀酒酵母 3-磷酸甘油酸激酶、釀酒酵母 α -因子及釀酒酵母乙醇脫氫酶/3-磷酸甘油醛脫氫酶（ADH2/GAP）的基因。

控制序列也可以是聚腺苷酸化序列，一種可操作地連結到核苷酸序列的 3'端之序列，當轉錄時，其受宿主細胞辨識為訊號，以將聚腺苷酸殘基加到轉錄的 mRNA。可在所選擇的宿主細胞中發揮功能的任何聚腺苷酸化序列，都可用於本發明中。

對於絲狀真菌宿主細胞，較佳的聚腺苷酸化序列是得自米麴菌 TAKA 澱粉酶、黑麴菌葡萄糖澱粉酶、構巢麴菌鄰胺基苯甲酸合成酶、尖孢鐮刀菌類似胰蛋白酶及黑麴菌 α -糖苷酶的基因。

對於酵母菌宿主細胞，有用的聚腺苷酸化序列是說明於 Guo 及 Sherman (1995)，*Mol. Cell. Biol.* 15: 5983-5990。

控制序列也可以是訊號肽編碼區域，其編碼連結到多肽的胺基端之胺基酸序列，並且引導所編碼的多肽進入細胞的分泌途徑內。核苷酸序列的編碼序列之 5'端，可固有地包含訊號肽編碼區域，其天然地在轉譯譯讀架構中與可編碼分泌的多肽之編碼區域片段連結。可選擇地，編碼序列的 5'端可包含對編碼序列而言是外源性的訊號肽編碼區

域。當編碼序列不天然地包含訊號肽編碼區域的時候，外源性的訊號肽編碼區域可能是需要的。可選擇地，外源性的訊號肽編碼區域可簡單地取代天然的訊號肽編碼區域，以增強多肽的分泌。然而，可將表現的多肽引導至所選擇的宿主細胞的分泌途徑內之任何訊號肽編碼區域，都可用於本發明中。

對於細菌宿主細胞，有效的訊號肽編碼區域是得自芽胞桿菌 NCIB 11837 麥芽糖澱粉酶、嗜熱脂肪芽胞桿菌 α -澱粉酶、蘇樣芽胞桿菌枯草桿菌蛋白酶、蘇樣芽胞桿菌 β -內酰胺酶、嗜熱脂肪芽胞桿菌中性蛋白酶 (*nprT*、*nprS*、*nprM*) 及枯草芽胞桿菌 *prsa* 的基因之訊號肽編碼區域。其他的訊號肽是說明於 Simonen 及 Palva(1993), *Microbiol. Rev.* 57: 109-137。

對於絲狀真菌宿主細胞，有效的訊號肽編碼區域是得自米麴菌 TAKA 澱粉酶、黑麴菌中性 α -澱粉酶、黑麴菌葡萄糖澱粉酶、毛黴菌天冬胺酸蛋白酶、腐植黴土生菌 (*Humicola insolens*) 纖維素酶及棉毛土生菌 (*H. lanuginosa*) 脂肪酶的基因之訊號肽編碼區域。

對於酵母菌宿主細胞，有效的訊號肽是得自釀酒酵母 α -因子及釀酒酵母轉化酶的基因。其他有用的訊號肽編碼區域是說明於 Romanos 等人 (1992)，上述文獻。

控制序列也可以是前肽編碼區域，其編碼位於多肽胺基端處的胺基酸序列。所得到的多肽已知為前酵素或前多肽（或在部份例子中是酶原）。前多肽一般是不活化的，

並且可藉由前肽從前多肽的催化或自體催化切割，而轉換成為成熟的活性多肽。前肽編碼區域可得自枯草芽胞桿菌鹼性蛋白酶（*aprE*）、枯草芽胞桿菌中性蛋白酶（*nprT*）、釀酒酵母 α -因子、毛黴菌天冬胺酸蛋白酶及嗜溫蝕絲黴菌（*Myceliophthora thermophila*）漆酶（WO 95/33836）的基因。

當訊號肽及前肽區域是存在於多肽的胺基端時，前肽區域是位於緊臨多肽的胺基端處，以及訊號肽區域是位於緊臨前肽區域的胺基端處。

加入調控序列也可能是令人滿意的，其可相對於宿主細胞的生長而調控多肽的表現。調控系統的例子係對於化學或物理刺激反應時（包括調控化合物的存在），可使基因表現開啟或關閉的調控序系統。在原核系統中的調控系統包括 *lac*、*tac* 及 *trp* 操縱子系統。在酵母菌中，可使用 ADH2 系統或 GAL1 系統。在絲狀真菌中，可使用 TAKA α -澱粉酶啟動子、黑麴菌葡萄糖澱粉酶啟動子及米黴菌葡萄糖澱粉酶啟動子作為調控序列。其他調控序列的例子是可使基因增殖的調控序列。在真核系統中，它們包括在胺甲碟呤存在下增殖的二氫葉酸還原酶基因，以及與重金屬一同增殖的金屬硫肽基因。在這些例子中，編碼多肽的核苷酸序列將可操作地與調控序列連結。

表現載體

本發明也有關於包含本發明的核酸構築之重組表現載體。上述的各種核苷酸及控制序列都可連結在一起，以產

生重組表現載體，其可包括一個或多個方便的限切位置，以提供編碼多肽的核苷酸序列在該等位置的插入或取代。可選擇地，本發明的核苷酸序列，可藉由將核苷酸序列或包括序列的核酸構築插入至適當的表現載體而表現。在產生表現載體中，編碼序列是位於載體中，使得編碼序列可操作地連結用於表現的適當控制序列。

重組表現載體可以是任何的載體(例如，質體或病毒)，其可方便地進行重組 DNA 程序，並可引起核苷酸序列的表現。載體的選擇通常將取決於載體與載體要被導入的宿主細胞之相容性。載體可以是線形或封閉的圓形質體。

載體可以是自發性複製的載體，也就是，以染色體外的實體而存在的載體，其複製是獨立於染色體的複製，例如，質體、染色體外的元素、小染色體或人工染色體。

載體可包含可確保自我複製的工具。可選擇地，當導入至宿主細胞時，載體可以是嵌入基因體內並且與已被嵌入的染色體一起複製的載體。此外，也可使用單一的載體或質體或兩個或多個的載體或質體，其一起包含要導入至宿主細胞基因體內的全部 DNA，或可使用轉移子(transposon)。

本發明的載體較佳包含一個或多個可篩選的標記，其可容許易於篩選轉形的細胞。可篩選的標記是一種基因，其產物可提供殺生物性或病毒抗性、重金屬抗性、原質營養型到營養缺陷型、以及類似性質。

細菌可篩選的標記的例子是枯草芽胞桿菌或蘚樣芽胞

桿菌的 *dal* 基因，或是可賦予抗生素抗性的標記，例如，氯苄青黴素、康那黴素、氯黴素或四環黴素抗性。對於酵母菌宿主細胞，適合的標記是 ADE2、HIS3、LEU2、LYS2、MET3、TRP1 及 URA3。用於絲狀真菌宿主細胞之可篩選的標記包括，但並不限於，*amdS*（乙醯胺酶）、*argB*（鳥胺酸氨基甲醯轉移酶）、*bar*（磷絲菌素乙醯轉移酶）、*hygB*（潮黴素磷酸轉移酶）、*niaD*（硝酸還原酶）、*pyrG*（乳清酸核苷-5'-磷酸去羧基酶）、*sC*（硫酸腺苷酸轉移酶）、*trpC*（鄰胺基苯甲酸合成酶）及其同等物。

較佳用於麴菌細胞的是構巢麴菌或米麴菌的 *amdS* 及 *pyrG* 基因，以及吸水鏈黴菌（*S. hygroscopicus*）的 *bar* 基因。

本發明的載體較佳包含可將載體穩定嵌入至宿主細胞基因體的元素，或是可使載體在細胞內獨立於基因體而自發性複製的元素。

對於嵌入至宿主細胞基因體，載體可依賴編碼多肽的核苷酸序列或載體的任何其他元素，以藉由同源或非同源重組作用而將載體穩定嵌入至基因體內。可選擇地，載體可包含另外的核苷酸序列，以藉由同源重組作用而引導嵌入至宿主細胞的基因體內。另外的核苷酸序列可使載體在染色體的正確位置上被嵌入至宿主細胞基因體內。為了增加在正確位置嵌入的可能性，嵌入的元素較佳應包含足夠數目的核苷酸，例如，100 至 1,500 鹼基對，較佳是 400 至 1,500 鹼基對，最佳是 800 至 1,500 鹼基對，其與對應

標的序列具有高度同源性，以增強同源重組作用的機率。嵌入的元素可以是與宿主細胞的基因體中之標的序列同源的任何序列。此外，嵌入的元素也可以是非編碼或編碼的核苷酸序列。另一方面，載體也可藉由非同源重組作用而嵌入至宿主細胞的基因體內。

對於自發性的複製，載體更可包括一複製起源，其可使載體在所討論的宿主細胞中自發性的複製。細菌的複製起源的例子是：容許在大腸桿菌中複製的質體 pBR322、pUC19、pACYC177 及 pACYC184 之複製起源，以及容許在芽胞桿菌屬中複製的 pUB110、pE194、pTA1060 及 pAM β 1 之複製起源。用於酵母菌宿主細胞的複製起源的例子是 2 微米的複製起源、ARS1、ARS4、ARS1 及 CEN3 的組合、以及 ARS4 及 CEN6 的組合。複製起源可具有突變，使它在宿主細胞中發揮功能是溫度敏感性的（例如，參見 Ehrlich (1978)，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 1433）。

可將超過一個複製的本發明之核苷酸序列插入至宿主細胞，以增加基因產物的生產。增加核苷酸序列的複製數目，可藉由將至少一個另外複製的序列嵌入至宿主細胞基因體，或藉由將可增殖可篩選的標記基因與核苷酸序列納入而獲得，其中細胞包含可增殖複製之可篩選的標記基因，藉此，另外複製的核苷酸序列可藉由將細胞在適當篩選作用劑的存在下培養而篩選。

用於黏接上述元素以構築本發明重組表現載體的方法，是熟悉於此技藝者所熟知的（例如，參見 Sambrook 等

人 (1989) , 上述文獻) 。

宿主細胞

本發明也有關於包括本發明核酸構築的重組宿主細胞，其可有利地用於多肽的重組生產。將包括本發明核苷酸序列的載體導入至宿主細胞，使得載體被維持成染色體嵌合體，或如上述之自我複製的染色體外之載體。

宿主細胞可以是單細胞的微生物（例如，原核生物）或非單細胞的微生物（例如，真核生物）。

有用的單細胞微生物是細菌細胞，例如，革蘭氏陽性細菌，包括但並不限於芽胞桿菌細胞，例如，嗜鹼芽胞桿菌 (*B. alkalophilus*)、解澱粉芽胞桿菌、短芽胞桿菌 (*B. brevis*)、環狀芽胞桿菌 (*B. circulans*)、幽靜芽胞桿菌 (*B. clausii*)、凝結芽胞桿菌 (*B. coagulans*)、典雅芽胞桿菌 (*B. lautus*)、豆形桿菌 (*B. lentus*)、蘚樣芽胞桿菌、巨大芽胞桿菌 (*B. megaterium*)、嗜熱脂肪芽胞桿菌、枯草芽胞桿菌及蘇力菌 (*B. thuringiensis*)；或鏈黴菌細胞，例如，青紫鏈黴菌 (*S. lividans*) 及綠鏈黴菌 (*S. murinus*)；或革蘭氏陰性細菌，例如，大腸桿菌及假單胞菌屬。在一較佳具體實例中，細菌宿主細胞是豆形桿菌、蘚樣芽胞桿菌、嗜熱脂肪芽胞桿菌或枯草芽胞桿菌細胞。在另一較佳具體實例中，芽胞桿菌細胞是嗜鹼芽胞桿菌。

將載體導入至細菌宿主細胞，可例如藉由原生質體轉形（例如，參見 Chang 及 Cohen(1979), *Mol. Gener. Genet.*

168:111-115)、利用勝任細胞(例如,參見 Young 及 Spizizin (1961), *J. Bacteriol.* 81: 823-829, 或 Dubnau 及 Davidoff-Abelson (1971), *J. Mol. Biol.* 56: 209-221)、電穿孔(例如,參見 Shigekawa 及 Dower (1988), *Biotechniques* 6: 742-751)或結合作用(例如,參見 Koehler 及 Thorne (1987), *J. Bacteriol.* 169: 5771-5278)而達成。

宿主細胞可以是真核細胞,例如,哺乳動物、昆蟲、植物或真菌細胞。

在一較佳具體實例中,宿主細胞是真菌細胞。此處所使用的“真菌”包括子囊菌門、擔子菌門、壺菌門及接合菌門(如 Hawksworth 等人,於 Ainsworth 及 Bisby 氏真菌字典,第八版(1995),CAB 國際,環球出版(劍橋,英國)之定義)以及卵菌門(如 Hawksworth 等人(1995),上述文獻,第 171 頁之引述)。

在更佳具體實例中,真菌宿主細胞是酵母菌細胞。此處所使用的“酵母菌”包括子囊孢子酵母菌(內孢黴目)、擔孢子酵母菌以及屬於不完全菌的酵母菌(芽孢綱)。由於酵母菌的分類在未來可能改變,因此,為了本發明之目的,酵母菌應定義為如“酵母菌之生物學及活性”中之說明(Skinner F.A.、Passmore S.M.及 Davenport R.R 編輯之“應用細菌學會研討會系列”,第 9 期(1980))。

在還要更佳的具體實例中,酵母菌宿主細胞是念珠菌屬(*Candida*)、漢遜酵母菌屬(*Hansenula*)、克魯維酵

母菌屬 (*Kluyveromyces*)、畢赤酵母菌屬 (*Pichia*)、釀母菌屬 (*Saccharomyces*)、裂殖釀母菌屬 (*Schizosaccharomyces*) 或亞若維酵母菌屬 (*Yarrowia*) 細胞。

在最佳具體實例中，酵母菌宿主細胞是卡爾斯伯酵母 (*S. carlsbergensis*)、釀酒酵母、酒精酵母 (*S. diastaticus*)、道格拉氏酵母 (*S. douglasii*)、克魯維酵母 (*S. kluyveri*)、諾邊酵母 (*S. norbensis*) 或卵形酵母 (*S. oviformis*) 細胞。在另一最佳具體實例中，酵母菌宿主細胞是乳酸克魯維酵母 (*K. lactis*) 細胞。在另一最佳具體實例中，酵母菌宿主細胞是解脂亞若維酵母 (*Y. lipolytica*) 細胞。

在另一更佳具體實例中，真菌宿主細胞是絲狀真菌細胞。“絲狀真菌”包括所有絲狀形式的真菌門及卵菌門亞型（如 Hawksworth 等人（1995），上述文獻之定義）。絲狀真菌的特徵在於由幾丁質、纖維素、葡聚糖、脫乙酰殼多糖、甘露聚糖及其他複雜的多醣類所組成的菌絲壁。營養生長是藉由菌絲延長，以及碳的分解代謝是必要須氧的。相反地，酵母菌（例如釀酒酵母）的營養生長是藉由單細胞菌體的出芽，以及碳的分解代謝可以是發酵型的。

在還要更佳的具體實例中，絲狀真菌宿主細胞是，但並不限於，枝頂孢菌屬 (*Acremonium*)、麴菌屬 (*Aspergillus*)、鐮刀菌屬 (*Fusarium*)、腐植黴屬 (*Humicola*)、白黴屬 (*Mucor*)、蝕絲黴屬

(*Myceliophthora*)、鏈孢黴屬(*Neurospora*)、青黴菌屬(*Penicillium*)、果腐黴屬(*Thielavia*)、彎頸黴屬(*Tolypocladium*)或木黴屬(*Trichoderma*)種類的細胞。

在最佳具體實例中，絲狀真菌宿主細胞是盛泡麴菌、惡臭麴菌(*A. foetidus*)、日本麴菌(*A. japonicus*)、構巢麴菌、黑麴菌或米麴菌細胞。在另一最佳具體實例中，絲狀真菌宿主細胞是膠孢鐮刀菌(*F. batrudioides*)、穀鐮刀菌(*F. cerealis*)、庫威鐮刀菌(*F. crookwellense*)、大刀鐮刀菌(*F. culmorum*)、禾本鐮刀菌(*F. graminearum*)、麥鐮刀菌(*F. graminum*)、異孢鐮刀菌(*F. heterosporum*)、尼根地鐮刀菌(*F. negundi*)、尖鐮刀菌(*F. oxysporum*)、網鐮刀菌(*F. reticulatum*)、康乃馨鐮刀菌(*F. roseum*)、接骨木鐮刀菌(*F. sambucinum*)、肉色鐮刀菌(*F. sarcochroum*)、擬分枝孢鐮刀菌(*F. sporotrichioides*)、硫色鐮刀菌(*F. sulphureum*)、圓鐮刀菌(*F. torulosum*)、擬絲孢鐮刀菌(*F. trichothecioides*)或鑲片鐮刀菌(*F. venenatum*)。在還要最佳的具體實例中，絲狀真菌母細胞是鑲片鐮刀菌(尼倫伯格種)細胞。在另一最佳具體實例中，絲狀真菌宿主細胞是腐植黴土生菌(*H. insolens*)、棉毛土生菌(*H. lanuginosa*)、毛白黴菌(*M. miehei*)、嗜熱蝕絲黴菌(*M. thermophila*)、粗糙鏈孢黴菌(*N. crassa*)、產紫青黴菌(*P. purpurogenum*)、陸生果腐黴菌(*T. terrestris*)、哈茨木黴菌(*T. harzianum*)、康氏木黴菌(*T. koningii*)、長枝木黴菌(*T.*

longibrachiatum)、裡氏木黴菌 (*T. reesei*) 或綠色木黴菌 (*T. viride*) 細胞。

真菌細胞可藉由涉及原生質體形成、原生質體轉形及細胞壁再生的方法，以其本身已知的方式而轉形。適合於麴菌宿主細胞轉形的方法，是說明於歐洲專利 238 023 以及 Yelton 等人 (1984)，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1470-1474。適合於鐮刀菌轉形的方法，是說明於 Malardier 等人 (1989)，*Gene* 78: 147-156 及 WO 96/00787。酵母菌可利用以下所說明的方法而轉形：Becker 及 Guarente，於 Abelson J.N. 及 Simon M.I. 編輯之“酵母菌遺傳學及分子生物學指南：酵素學方法”第 194 卷，第 182-187 頁 (大學出版公司，紐約)；Ito 等人 (1983)，*J. Bacteriol.* 153: 163；以及 Hinnen 等人 (1978)，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 1920。

製造方法

本發明也有關於製造本發明多肽的方法，其包括 (a) 在有益於多肽生產的條件下培養宿主細胞；以及 (b) 回收多肽。

在本發明的製造方法中，細胞是利用在此技藝中已知的方法，而培養在適合於製造多肽的營養培養基中。例如，細胞可藉由搖晃錐形瓶培養法、小規模或大規模的發酵 (包括連續式、批次式、饋料-批次式或固相發酵)，於實驗室級或工業級發酵槽中，在適合的培養基及在使多肽表現及/或分離的條件下進行而培養。培養是利用在此技藝中

已知的方法，在適合的營養培養基中進行（其包括碳及氮源以及無機鹽）。適合的培養基可從商業供應商處獲得，或可根據公開的組成物而製備（例如，美國標準菌種中心的目錄）。如果多肽分泌到營養培養基中，則多肽可直接從培養基中回收。如果多肽沒有分泌，則可從細胞溶胞產物中回收。

多肽可利用在此技藝中已知對多肽專一性的方法而偵測。這些偵測方法可包括使用專一性抗體、形成酵素產物或酵素基質的消失。例如，酵素分析可用於測定如此處所說明的多肽之活性。

得到的多肽可藉由在此技藝中已知的方法而回收。例如，多肽可從營養培養基中，藉由傳統的方法而回收，包括但並不限於，離心、過濾、萃取、噴霧乾燥、蒸發或沉澱。

本發明的多肽可藉由在此技藝中已知的各種方法而純化，包括但並不限於，層析法（例如，離子交換、親和力、厭水性、色層聚焦及大小區別層析）、電泳方法（例如，製備級等電點聚焦）、差異性溶解度（例如，硫酸銨沉澱）、硫酸十二酯鈉-聚丙烯醯胺膠體電泳（SDS-PAGE）或萃取（例如，參見“蛋白質純化”，J.C. Janson 及 Lars Ryden 編輯，VCH 出版公司，紐約（1989））。

植物

本發明也有關於轉殖植物、植物部分或植物細胞，其已以編碼具有本發明抗微生物活性的多肽之核苷酸序列而

轉形，以便以可回收的量而表現並製造多肽。多肽可從植物或植物部分回收。可選擇地，包含重組多肽的植物或植物部分，就其本身而論，可用於改善食物或飼料的品質，例如，改善營養值、美味性以及流變學性質，或破壞抗營養的因子。回收的多肽、植物或植物部分，也可用於改善或改變動物及家畜中的消化性菌叢。

轉殖植物可以是雙子葉植物（雙子葉）或單子葉植物（單子葉）。單子葉植物的例子是禾本科植物，例如，草坪草（藍草、早熟禾屬（*Poa*））、飼草（例如，羊茅屬（*Festuca*）、黑麥草屬（*Lolium*））、溫帶草（例如，翦股穎（*Agrostis*））以及穀類（例如，小麥、燕麥、黑麥、大麥、稻米、高粱及玉蜀黍（玉米））。

雙子葉植物的例子是菸草、馬鈴薯、甜菜、豆類（例如，羽扇豆、豌豆及黃豆）以及十字花科植物（十字花科）（例如，花椰菜、油菜籽）以及緊密關聯的模型生物體阿拉伯芥（*Arabidopsis thaliana*）。

植物部份的例子是莖、癒合組織、葉、根、果實、種子及塊莖。此外，特定的植物組織，例如，葉綠素、質外體（apoplast）、粒線體、液泡、過氧化體及細胞質，也視為是植物部份。此外，凡是組織來源的任何植物細胞，也視為是植物部份。

也包括在本發明範疇內的是該等植物、植物部份及植物細胞的子代。

表現本發明多肽的轉殖植物或植物細胞，可根據在此

技藝中已知的方法而構築。簡言之，植物或植物細胞是藉由將一種或多種編碼本發明多肽的表現構築併入到植物宿主的基因體中，並且將所得到修飾的植物或植物細胞繁殖成轉殖植物或植物細胞。

方便地，表現構築是一種核酸構築，其包括編碼本發明多肽的核苷酸序列，可操作地連結在所選擇的植物或植物部份中表現核苷酸序列所需之適當的調控序列。此外，表現構築也可包括可篩選的標記，其有效於鑑定表現構築已嵌入至宿主細胞內，以及將構築導入至所討論的植物中之所需的 DNA 序列（後者取決於要使用的 DNA 導入方法而定）。

調控序列（例如啟動子及終結子序列，以及視需要訊號或運送序列）的選擇，是在例如多肽希望何時、何地及如何被表現的基礎上而決定。例如，編碼本發明多肽的基因之表現，可以是組成性或可誘發性的，或可以是發展性、階段性或組織專一性的，以及可將基因產物標定至特定組織或植物部份，例如，種子或葉子。調控序列是例如 Tague 等人（1988），*Plant Physiol.* 86：506 之說明。

對於組成性的表現，可使用 35S-CaMV 啟動子（Franck 等人（1980），*Cell* 21：285-294）。器官專一性的啟動子可以是例如，儲存的沈入組織（例如，種子、馬鈴薯塊莖及果實）之啟動子（Edwards 及 Coruzzi（1990），*Ann. Rev. Genet.* 24：275-303）或代謝的沈入組織（例如，分生組織）之啟動子（Ito 等人（1994），*Plant Mol. Biol.* 24：

863-878)、種子專一性的啟動子(例如, 稻米的鹼溶性蛋白質、醇溶性蛋白質、球蛋白或白蛋白啟動子)(Wu 等人(1998), *Plant Cell Physiol.* 39: 885-889)、鹽溶性蛋白 B4 及蠶豆未知的種子蛋白質基因之蠶豆(*Vicia faba*)的啟動子(Conrad 等人(1998), *J. Plant Physiol.* 152: 708-711)、種子油狀體蛋白質的啟動子(Chen 等人(1998), *Plant Cell Physiol.* 39: 935-941)、油菜(*Brassica napus*)的儲存蛋白質 nap 啟動子, 或任何在此技藝中已知的其他種子專一性啟動子, 例如, 如 WO 91/14772 之說明。此外, 啟動子也可以是葉子專一性的啟動子, 例如, 稻米或番茄的 *rbcS* 啟動子(Kyozuka 等人(1993), *Plant Physiol.* 102: 991-1000)、綠藻病毒腺嘌呤甲基轉移酶基因啟動子(Mitra 及 Higgins (1994), *Plant Molec. Biol.* 26: 85-93)或稻米的 *aldP* 基因啟動子(Kagaya 等人(1995), *Molec. General Genet.* 248: 668-674)或創傷誘發的啟動子(例如, 馬鈴薯的 *pin2* 啟動子)(Xu 等人(1993), *Plant Molec. Biol.* 22: 573-588)。

啟動子增強子元素也可在植物中用於達成酵素的較高表現。例如, 啟動子增強子元素可以是內含子, 其位置在啟動子及碼本發明多肽的核苷酸序列之間。例如, Xu 等人(1993), 上述文獻, 揭露了使用稻米肌動蛋白 1 基因的第一內含子以增強表現。

可篩選的標記基因以及表現構築的任何其他部份, 可選自於在此技藝中可獲得者。

根據在此技藝中已知的傳統技術，而將核酸構築併入到植物基因體內，其包括農桿菌 (*Agrobacterium*) 調節的轉形作用、病毒調節的轉形作用、微注射、粒子轟擊、生物彈轉形作用以及電穿孔 (Gasser 等人 (1990), *Science* 244: 1293; Potrykus (1990), *Bio/Tech.* 8: 535; Shimamoto 等人 (1989), *Nature* 338: 274)。

目前，根癌農桿菌 (*A. tumefaciens*) 調節的基因轉移，是產生轉殖雙子葉植物所選擇的方法 (回顧請參見 Hooykas 及 Schilperoort (1992), *Plant Molec. Biol.* 19: 15-38)。然而，它也可用於轉形單子葉植物，但其他的轉形方法對於這些植物一般是較佳的。目前，產生轉殖單子葉植物所選擇的方法是胚癒合組織或發展中的胚之粒子轟擊 (以轉形的 DNA 包覆微小的金或鎢粒子) (Christou (1992), *Plant J.* 2: 275-281; Shimamoto (1994), *Curr. Opin. Biotech.* 5: 158-162; Vasil 等人 (1992), *Bio/Tech.* 10: 667-674)。單子葉植物轉形的另一種方法是根據原生質體轉形作用，如 Omirulleh 等人 (1993), *Plant Molec. Biol.* 21: 415-428 之說明。

在轉形作用之後，根據在此技藝中熟知的方法而篩選具有將表現構築併入其中的轉形株，並且繁殖成整個植物。

本發明也有關於製造本發明多肽的方法，其包括 (a) 在有益於多肽生產的條件下，培養包括編碼具有本發明抗微生物活性的多肽之核苷酸序列的轉殖植物或植物細胞；

以及 (b) 回收多肽。

組成物

本發明的另一形態是有關於組成物 (例如醫藥組成物)，其包括本發明的抗微生物多肽。

組成物可包括本發明的多肽作為主要的多肽成份，例如，單一成份的組成物。可選擇地，組成物可包括多種的酵素活性，例如，胺基肽酶、澱粉酶、碳水化合物酶、羧基肽酶、過氧化氫酶、纖維素酶、幾丁質酶、角質素分解酶、環糊精糖基轉移酶、去氧核糖核酸酶、酯酶、 α -半乳糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、葡萄糖澱粉酶、 α -糖苷酶、 β -糖苷酶、鹵過氧化酶、轉化酶、漆酶、脂肪酶、甘露糖苷酶、氧化酶、果膠分解酵素、肽羧基胺酸酶、過氧化酶、植酸酶、多酚氧化酶、蛋白分解酵素、核糖核酸酶、轉羧基胺酸酶或木聚糖酶。

組成物更可包括另一醫藥上的活性作用劑，例如，額外的殺生物劑，例如，顯示以上定義的抗微生物活性之另一抗微生物多肽。殺生物劑可以是在此技藝中已知的抗生素。抗生素的種類包括青黴素，例如，青黴素 G、青黴素 V、甲氧苯青黴素、苯唑青黴素、羧苄青黴素、乙氧萘青黴素、氯苄青黴素等；青黴素併用 β -內酰胺酶抑制劑、頭孢菌素，例如，頭孢克洛 (cefaclor)、頭孢唑啉 (cefazolin)、頭孢呋辛 (cefuroxime)、拉氧頭孢 (moxalactam) 等；碳青黴烯 (carbapenem)；單巴坦 (monobactam)；胺基糖苷；四環素；大環類酯；林肯黴

素；多黏菌素；磺胺；喹諾酮（quinolone）；氯黴素；甲硝唑；大觀黴素；甲氧苄啶（trimethoprim）；萬古黴素等。殺生物劑也可以是抗細胞分裂作用劑，包括多烯類，例如，兩性黴素 B、制黴菌素；5-氟可新（flucosyn）；及唑類，例如，咪康唑、酮康唑、伊曲康唑及氟康唑。

在一具體實例中，殺生物劑是非酵素類的化學作用劑。在另一具體實例中，殺生物劑是非多肽類的化學作用劑。

於 25%（重量/重量）殺生物劑之水溶液，較佳於 10%（重量/重量）水溶液，更佳於 5%（重量/重量）水溶液，還要更佳於 1%（重量/重量）水溶液，最佳於 0.5%（重量/重量）水溶液，以及特別是於 0.1%（重量/重量）水溶液，在 20°C 培養 8 小時之後（較佳 4 小時之後，更佳 2 小時之後，最佳 1 小時之後，以及特別是 30 分鐘之後），殺生物劑可將大腸桿菌（DSM 1576）的活細胞數減少至 1/100。

當以 1000 ppm 的濃度加入時，較佳當以 500 ppm 的濃度加入時，更佳當以 250 ppm 的濃度加入時，還要更佳當以 100 ppm 的濃度加入時，最佳當以當以 50 ppm 的濃度加入時，以及特別當以 25 ppm 的濃度加入時，在微生物的生長基質中，於 25°C 中，殺生物劑也可抑制大腸桿菌（DSM 1576）的發展達 24 小時。

於 25%（重量/重量）殺生物劑之水溶液，較佳於 10%（重量/重量）水溶液，更佳於 5%（重量/重量）水溶液，還要更佳於 1%（重量/重量）水溶液，最佳於 0.5%

(重量/重量) 水溶液，以及特別是於 0.1% (重量/重量) 水溶液，在 20°C 培養 8 小時之後 (較佳 4 小時之後，更佳 2 小時之後，最佳 1 小時之後，以及特別是 30 分鐘之後)，殺生物劑也可將枯草芽胞桿菌 (ATCC 6633) 的活細胞數減少至 1/100。

當以 1000 ppm 的濃度加入時，較佳當以 500 ppm 的濃度加入時，更佳當以 250 ppm 的濃度加入時，還要更佳當以 100 ppm 的濃度加入時，最佳當以 50 ppm 的濃度加入時，以及特別當以 25 ppm 的濃度加入時，在微生物的生長基質中，於 25°C 中，殺生物劑也可抑制枯草芽胞桿菌 (ATCC 6633) 的發展達 24 小時。

組成物可包括適合的載劑物質。組成物也可包括適合的傳遞載劑，當組成物使用作為藥劑時，其可將本發明的抗微生物多肽傳遞至所要的部位。

組成物可根據在此技藝中已知的方法而製備，並且可以是液體或乾燥組成物的形式。例如，多肽組成物可以是顆粒或微顆粒的形式。納入到組成物中的多肽，可根據在此技藝中已知的方法而穩定。

以下提供本發明多肽組成物的較佳用途之實例。本發明多肽組成物的劑量以及組成物所使用的其他條件，可根據在此技藝中已知的方法而決定。

方法及用途

本發明也包括本發明的抗微生物多肽之各種用途。在細菌、真菌、酵母菌或藻類污染被導入的任何部位，抗微

生物多肽通常是有效的。通常，部位是在水溶性的系統中（例如，冷卻水系統、洗衣店沖洗水）；油系統（例如，切削油、潤滑油、油田）以及類似部位，在該處，需要殺死微生物或需要控制它們的生長。然而，本發明也可用於已知抗微生物組成物是有效處的所有應用，例如，保護木頭、乳膠、膠黏劑、膠水、紙、硬紙板、織品、皮革、塑膠、隙縫以及飼料。

其他的用途包括保存食物、飲料、化妝品（例如，化妝水、乳霜、凝膠、油膏、香皂、洗髮精、潤髮乳）、止汗藥、防臭劑、漱口水、隱形眼鏡產品、酵素調配物或食物成份。

因此，本發明的抗微生物多肽可有效於作為消毒劑，例如，治療瘡瘍、眼或口的感染、皮膚感染；止汗藥或防臭劑；足浴鹽；隱形眼鏡、硬表面、牙齒（口腔保健）、創傷、擦傷以及類似的清潔及消毒。

一般而言，預期本發明的抗微生物多肽是有效於清潔、消毒或抑制在任何硬表面上的微生物生長。可有利地與本發明的抗微生物多肽接觸的表面之實例，是製程設備所使用的表面，例如，乳品業、化學或製藥加工廠、水衛生系統、油處理廠、紙漿處理廠、水處理廠以及冷卻水塔。本發明的抗微生物多肽應以有效於清潔、消毒或抑制在討論的表面上之微生物生長的量而使用。

此外，預期本發明的抗微生物多肽也可有利地用於在線清潔（C.I.P.）系統，以用於任何種類的製程設備。

本發明的抗微生物多肽可另外用於在食物加工廠以及任何製備或保存食物的地方清潔表面及烹調器皿，例如，醫院、療養院、餐廳（特別是速食餐廳）、熟食店以及類似地方。本發明的抗微生物多肽也可在食物產品中使用作為抗微生物劑，並且將特別有效的在乳酪、水果及蔬菜中以及在沙拉吧上的食物，作為抗微生物劑。

本發明的抗微生物多肽也可在水性塗料中使用作為防腐劑或消毒劑。

本發明的抗微生物多肽也有效於輸水管線的微生物控制，以及有效於水的消毒，特別是有效於工業用水的消毒。

本發明也有關於將本發明的抗微生物多肽使用作為藥劑。此外，本發明的抗微生物多肽或組成物也可用於控制或對抗微生物的藥劑之製造，例如，真菌生物體或細菌，較佳是革蘭氏陽性細菌。

本發明的組成物及抗微生物多肽可使用作為抗微生物的獸醫或人類治療或預防作用劑。因此，本發明的組成物及抗微生物多肽可用於製備獸醫或人類治療劑或預防劑，以治療微生物感染，例如，細菌或真菌感染，較佳是革蘭氏陽性細菌感染。特別地，微生物感染可能與肺部疾病有關，包括但並不限於，肺結核、肺炎及囊胞性纖維症；以及性傳播疾病，包括但並不限於，淋病及衣原體。

本發明的組成物包括有效量的本發明抗微生物多肽。

當使用於此處時，名詞“有效量”希望是指包括以下胺基酸序列之抗微生物多肽的量： $G-X_1-X_2-X_3-R-X_4-X_5-X_6-$

$K-I-X_7-X_8-K-X_9-X_{10}-K-X_{11}-X_{12}-Z$ ；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 ；或序列識別號 1 至序列識別號 57 的任一個之胺基酸 1 至 29、或序列識別號 58 至序列識別號 69 的任一個之胺基酸 1 至 19 所示的胺基酸序列，或其片段或變異體，其足以抑制所討論的微生物之生長。

本發明也有關於創傷癒合的組成物或產物，例如，繃帶、醫療裝置（例如導管），以及更有關於抗頭皮屑的毛髮產物，例如，洗髮精。

本發明抗微生物多肽的調配物是投予至患有或易受微生物感染的宿主。投予可以局部性、區域性或全身性，取決於特定微生物而定，較佳將是局部性的投予。一般而言，本發明抗微生物多肽的劑量將足以減少微生物族群至少約 50%，通常至少減少 1 個對數，並可能減少 2 或更多個對數的殺死。本發明的化合物是以可減少微生物族群同時將任何副作用減到最少的劑量而投予。預期組成物將可在醫師於活體內使用的指導下獲得並使用。本發明的抗微生物多肽特別是有效於殺死革蘭氏陰性細菌（包括綠膿假單胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）及砂眼披衣菌（*Chlamydia*

trachomatis)) 以及革蘭氏陽性細菌 (包括各種葡萄球菌屬及鏈球菌屬) 。

本發明的抗微生物多肽也有效於可殺死微生物的活體外調配物，特別是在不想要導入一定量的傳統抗生素時。例如，可將本發明的抗微生物多肽加到動物及/或人類的食物製品中；或可將它們納入為活體外細胞培養的添加物，以預防組織培養中微生物的過度生長。

以本發明的抗微生物多肽殺死的特定微生物之敏感性，可藉由活體外的測試而決定，如實驗章節中之詳細說明。通常，微生物的培養是與多樣濃度的抗微生物多肽，結合一段足以使蛋白質作用的時間，通常是在約 1 小時至 1 天之間。然後可計數活的微生物，並測定殺死的程度。

有興趣的微生物包括，但並不限於，革蘭氏陰性細菌，例如：檸檬酸菌屬 (*Citrobacter sp.*)；腸桿菌屬 (*Enterobacter sp.*)；埃希氏桿菌屬 (*Escherichia sp.*)，例如，大腸桿菌；克雷伯氏桿菌屬 (*Klebsiella sp.*)；摩根氏桿菌屬 (*Morganella sp.*)；變形桿菌屬 (*Proteus sp.*)；普羅威登菌屬 (*Providencia sp.*)；沙門桿菌屬 (*Salmonella sp.*)，例如，傷寒沙門桿菌 (*S. typhi*)、鼠傷寒沙門桿菌 (*S. typhimurium*)；沙雷氏菌屬 (*Serratia sp.*)；志賀氏桿菌屬 (*Shigella sp.*)；假單胞菌屬 (*Pseudomonas sp.*)，例如，綠膿假單胞菌；耶爾森氏菌屬 (*Yersinia sp.*)，例如，鼠疫耶爾森氏菌 (*Y. pestis*)、假結核耶爾森氏菌 (*Y. pseudotuberculosis*)、小腸結腸

耶爾森氏菌 (*Y. enterocolitica*) ; 弗朗西絲氏菌屬 (*Franciscella sp.*) ; 巴斯德桿菌屬 (*Pasturella sp.*) ; 弧菌屬 (*Vibrio sp.*) , 例如 , 霍亂弧菌 (*V. cholerae*) 、副溶血弧菌 (*V. parahemolyticus*) ; 彎曲菌屬 (*Campylobacter sp.*) , 例如 , 空腸彎曲菌 (*C. jejuni*) ; 嗜血桿菌屬 (*Haemophilus sp.*) , 例如 , 流感嗜血桿菌 (*H. influenzae*) 、杜雷克氏嗜血桿菌 (*H. ducreyi*) ; 博德特氏菌屬 (*Bordetella sp.*) , 例如 , 百日咳博德特氏菌 (*B. pertussis*) 、支氣管敗血性博德特氏菌 (*B. bronchiseptica*) 、副百日咳博德特氏菌 (*B. parapertussis*) ; 布魯氏菌屬 (*Brucella sp.*) ; 奈瑟氏菌屬 (*Neisseria sp.*) , 例如 , 淋病奈瑟氏菌 (*N. gonorrhoeae*) 、腦膜炎奈瑟氏菌 (*N. meningitidis*) 等。其他有興趣的細菌包括退伍軍人桿菌屬 (*Legionella sp.*) , 例如 , 嗜肺性退伍軍人桿菌 (*L. pneumophila*) ; 李斯特氏菌屬 (*Listeria sp.*) , 例如 , 產單核細胞李斯特氏菌 (*L. monocytogenes*) ; 黴漿菌屬 (*Mycoplasma sp.*) , 例如 , 人黴漿菌 (*M. hominis*) 、肺炎黴漿菌 (*M. pneumoniae*) ; 分枝桿菌屬 (*Mycobacterium*) , 例如 , 結核分枝桿菌 (*M. tuberculosis*) 、癩瘋分枝桿菌 (*M. leprae*) ; 螺旋體屬 (*Troponema sp.*) , 例如 , 梅毒螺旋體 (*T. pallidum*) ; 疏螺旋體屬 (*Borrelia sp.*) , 例如 , 伯氏疏螺旋體 (*B. burgdorferi*) ; 細螺旋體屬 (*Leptospirae sp.*) ; 立克次體屬 (*Rickettsia sp.*) , 例如 , 立克氏立

克次體 (*R. rickettsii*)、傷寒立克次體 (*R. typhi*)；披衣菌屬 (*Chlamydia sp.*)，例如，砂眼披衣菌 (*C. trachomatis*)、肺炎披衣菌 (*C. pneumoniae*)、鸚鵡熱披衣菌 (*C. psittaci*)；螺旋桿菌屬 (*Helicobacter sp.*)，例如，幽門螺旋桿菌 (*H. pylori*) 等。

有興趣的非細菌病原體包括真菌及原生動物病原體，例如，瘧原蟲屬 (*Plasmodia sp.*)，例如，惡性瘧原蟲 (*P. falciparum*)；錐蟲屬 (*Trypanosoma sp.*)，例如，布魯斯錐蟲 (*T. brucei*)；血吸蟲 (*Schistosoma*)；阿米巴蟲屬 (*Entamoeba sp.*)；隱球菌屬 (*Cryptococcus sp.*)；念珠菌屬 (*Candida sp.*)，例如，白色念珠菌 (*C. albicans*) 等。

許多的投予方法都可以使用。多肽調配物可口服給予，或可靜脈注射、皮下、腹膜、藉由氣溶膠、眼內、囊內、局部等。例如，藉由吸入的投予方法是在此技藝中熟知的。治療調配物的劑量，將根據投予的特定抗微生物多肽、疾病的特質、投予頻率、投予方式、藥劑從宿主中的清除以及類似因素而廣泛地改變。一開始的劑量可以是較大的，然後再較小的維持劑量。劑量可如每週或每兩週般稀少地投予，或分成較小的劑量，並且每日、每半週投予一次或數次等，以維持有效劑量的水平。在許多例子中，口服投予將需要比靜脈內投予更高的劑量。可修飾醯胺鍵以及胺基及羧基端，以在口服投予上有較大的穩定性。例如，可將羧基端醯胺化。

調配物

本發明的化合物可併入至許多用於治療投予的調配物中。更特別地，本發明的化合物可藉由與適當醫藥上可接受的載劑或稀釋劑結合而調配成醫藥組成物，或可調配成固體、半固體、液體或氣體形式的製劑，例如，錠劑、膠囊、粉末、顆粒、油膏、乳霜、泡沫、溶液、栓劑、注射劑、吸入劑、凝膠、微球、洗劑以及氣溶膠。就其本身而論，化合物的投予可以各種方式達成，包括口服、頰內、直腸、非腸胃道、腹膜內、皮內、經皮、胸腔內等投予。本發明的抗微生物多肽可全身性投予，或可藉由使用移植物或可在移植部位保留活性劑量的其他調配物而局部投予。

在一具體實例中，局部用途的調配物包括螯合劑，其可減少二價陽離子（特別是鈣及鎂）的有效濃度。例如，可納入檸檬酸鹽、EGTA 或 EDTA 的作用劑，其中較佳是檸檬酸鹽。檸檬酸鹽的濃度通常將從約 1 至 10 mM。

本發明的化合物可單獨投予、互相結合投予，或是它們可併用其他已知的化合物（例如，穿孔素（perforin）、抗發炎劑、抗生素等）。在醫藥劑型中，化合物可以它們醫藥上可接受的鹽之形式而投予。以下的方法及賦形劑僅是作為範例，而絕非用以限制。

對於口服製備物，化合物可單獨使用或併用適當的添加物，以製造錠劑、粉末、顆粒或膠囊，例如，併用傳統的添加物，例如，乳糖、甘露糖醇、玉米澱粉或馬鈴薯澱

粉；併用黏結劑，例如，結晶體纖維素、纖維素衍生物、阿拉伯膠、玉米澱粉或明膠；併用崩散劑，例如，玉米澱粉、馬鈴薯澱粉或羧甲基纖維素鈉；併用潤滑劑，例如，滑石或硬脂酸鎂；以及如果需要的話，併用稀釋劑、緩衝劑、溼潤劑、防腐劑及香味劑。

可將化合物調配成用於注射的製備物，係藉由將它們溶解、懸浮或乳化於水溶性或非水溶性的溶劑中，例如，植物油或其他類似的油、合成的脂肪酸甘油酯、高級脂肪酸酯或丙二醇；以及如果需要的話，併用傳統的添加物，例如，溶解劑、等滲壓劑、懸浮劑、乳化劑、穩定劑以及防腐劑。

可將化合物用於經由吸入投予的氣溶膠調配物中。可將本發明的化合物調配成加壓可接受的推進劑，例如，二氯二氟甲烷、丙烷、氮氣以及類似物。

可將化合物使用作為洗劑，例如，以避免燒燙傷的感染，其係藉由與傳統的添加物調配，例如，溶解劑、等滲壓劑、懸浮劑、乳化劑、穩定劑以及防腐劑。

此外，也可將化合物藉由與各種的基底混合而製成栓劑，例如，乳化基底或水溶性基底。本發明的化合物也可經由栓劑而直腸投予。栓劑可包括載劑，例如，可可油、碳蠟及聚乙二醇，其可在體溫時融化，但在室溫時是固化的。

可提供用於口服或直腸投予的單位劑型，例如，糖漿、萬能藥及懸浮劑，其中每個劑量單位（例如，一茶匙量、

一大湯匙量、錠劑或栓劑) 都包含預定量之含有一種或多種本發明化合物的組成物。同樣，用於注射或靜脈投予的單位劑型，可在組成物中包括本發明的化合物，如同溶液於無菌水、生理食鹽水或另外醫藥上可接受的載劑中。

用於持續釋放調配物的移植物是在此技藝中熟知的。將移植物與生物可分解或非生物可分解的聚合物調配成微球、平板等。例如，乳酸及/或甘醇酸的聚合物會形成對宿主具有相當耐受性之可侵蝕的聚合物。將包含本發明抗微生物多肽的移植物，置於接近感染的部位，使得活性作用劑的局部濃度相對於身體的其餘部份是增加的。

此處所使用的名詞“單位劑型”是指適合作為人類或動物個體單一劑量之物理上分離的單位，每個單位都包含預定量的本發明化合物，係以足夠產生所要效果的量而計算，並結合醫藥上可接受的稀釋劑、載體或載劑。本發明單位劑型的規格，係取決於所使用的特定化合物及要達到的效果，以及在宿主中與化合物有關的藥物動力學而定。

醫藥上可接受的賦形劑（例如，載劑、佐劑、載體或稀釋劑）可易於公開獲得。此外，醫藥上可接受的輔助物質，例如，pH 調整劑及緩衝劑、滲壓調整劑、穩定劑、溼潤劑以及類似物，也可易於公開獲得。

全身性投予的通常劑量，每次投予範圍從 0.1 皮克 (pg) 至 100 毫克/公斤重的個體。通常的劑量可以是每日 2 至 6 次服用一個錠劑，或每日一次服用一個時間釋放性的膠囊或錠劑，其包含比例上較高含量的活性成份。時間

釋放性的效果可藉由在不同 pH 值溶解的膠囊材料、藉由可隨滲透壓而緩慢釋放的膠囊、或藉由任何其他已知的控制釋放工具而獲得。

熟悉於此技藝者可易於理解，劑量水平可隨著特定化合物、症狀的嚴重性以及個體對副作用的敏感性之函數而改變。部份的特定化合物是比其他化合物更有效力。對於指定化合物的較佳劑量，可由熟悉於此技藝者藉由各種方法而易於決定。較佳的方法是測量指定化合物的生理效價。

使用微脂體作為傳遞載劑是一種有興趣的方法。微脂體可與標的部位之細胞融合，並且細胞內傳遞腔室的內容物。將微脂體維持與細胞接觸一段足夠融合的時間，利用各種方法以維持接觸，例如，分離、結合劑以及類似物。在本發明的一種形態中，將微脂體設計成氣溶膠化，以用於肺部投予。微脂體可與調節細胞膜融合之純化的蛋白質或肽一起製備，例如，仙台（Sendai）病毒或流感病毒等。脂質可以是已知形成脂質的微脂體之任何有效的組合，包括陽離子或兩性離子的脂質，例如，磷脂醯膽鹼。剩下的脂質通常將是中性或酸性的脂質，例如，膽固醇、磷脂醯絲胺酸、磷脂醯甘油以及類似物。

對於製備微脂體，可使用 Kato 等人（1991），*J. Biol. Chem.* 266：3361 所說明的方法。簡言之，包含肽的脂質及腔室組成物是在適當的水溶性培養液中結合，方便地是鹽溶液培養液，其中總固體將在約 1-10 重量%的範圍內。

在劇烈攪動一段短時間之後（約 5-60 秒），將試管置於溫水浴中（約 25-40℃），並且重複這個循環約 5-10 次。然後將組成物超音波震盪一段合宜的時間（一般約 1-10 秒），並可藉由旋轉而進一步攪動。接著藉由加入水溶性培養液而擴張體積，一般是增加體積約 1-2 倍，然後搖晃並且冷卻。這個方法可提供高分子量的分子併入至腔室中。

與其他活性作用劑之調配物

為了用於本發明的方法，可將本發明之抗微生物多肽與其他醫藥上的活性作用劑調配，特別是其他的抗微生物作用劑。其他有興趣的作用劑包括在此技藝中已知的各種抗生素。抗生素的種類包括青黴素，例如，青黴素 G、青黴素 V、甲氧苯青黴素、苯唑青黴素、羧苄青黴素、乙氧萘青黴素、氯苄青黴素等；青黴素併用 β -內醯胺酶抑制劑、頭孢菌素，例如，頭孢克洛、頭孢唑啉、頭孢呋辛、拉氧頭孢等；碳青黴烯；單巴坦；氨基糖苷；四環素；大環類酯；林肯黴素；多黏菌素；磺胺；喹諾酮；氯黴素；甲硝唑；大觀黴素；甲氧苄啶；萬古黴素等。

抗細胞分裂作用劑也是有效的，包括多烯類，例如，兩性黴素 B、制黴菌素；5-氟可新；及唑類，例如，咪康唑、酮康唑、伊曲康唑及氟康唑。抗結核病藥物包括異菸疊氮（isoniazid）、乙丁醇、鏈黴素及利福平。也可將細胞激素納入至本發明的抗微生物多肽之調配物中，例如，干擾素 γ 、腫瘤壞死因子 α 、介百素 12 等。

活體外合成

本發明的抗微生物肽可利用，在此技藝中已知的傳統方法，藉由活體外的合成而製備。可利用許多商用的合成裝置，例如，應用生物系統公司、貝克曼等的自動合成儀。藉由使用合成儀，可將天然存在的胺基酸以非天然的胺基酸取代，特別是 D-異構物（或 D-形式）（例如，D-丙胺酸及 D-異白胺酸）、非對映異構物、具有不同長度或官能性的側鏈以及類似物。特定的序列以及製備方式，將藉由方便性、經濟性、所需純度以及類似性質而決定。

可將化學連接提供給包括合宜官能性的各種肽或蛋白質以用於鍵結，例如，胺基用於醯胺或經取代的胺形成（例如，還原性胺化作用）；硫基用於硫醚或雙硫鍵形成；羧基用於醯胺形成；以及類似化學連接。

如果需要的話，可在合成期間或表現期間將各種基團導入至肽中，其可提供連接至其他的分子或表面。因此，半胱胺酸可用於製造硫醚；組胺酸用於連接至金屬離子錯合物；羧基用於形成醯胺或酯；胺基用於形成醯胺；以及類似連接。

多肽也可根據傳統的重組合成方法而分離及純化。溶胞產物可從表現宿主中製備，並利用高效能液相層析（HPLC）、排阻層析、膠體電泳、親和力層析或其他純化技術而純化。大部分而言，所使用的組成物將包括至少 20 重量%的所要產物，更常是至少約 75 重量%，較佳是至少約 95 重量%，以及為了治療目的，通常是至少約 99.5 重量%，與產物的製備方法及其純化之污染物有關。通常，

百分比將取決於總蛋白質而定。

動物飼料

本發明也有關於將具有抗微生物活性的多肽用於動物飼料之方法，以及包括本發明抗微生物多肽的飼料組成物及飼料添加物。

名詞“動物”包括所有的動物，其包括人類。動物的例子是非反芻動物以及反芻動物，例如，牛、羊及馬。在特定具體實例中，動物是非反芻動物。非反芻動物包括單胃動物，例如，豬（包括但並不限於小豬、生長豬及母豬）；家禽，例如火雞及雞（包括但並不限於適於烤焙的小雞、蛋雞）；小牛；以及魚（包括但並不限於鮭魚）。

名詞“飼料”或“飼料組成物”是指適合於或希望動物吸收的任何化合物、製備物、混合物或組成物。

在本發明的用途中，抗微生物多肽可在飲食前、後或同時餵給動物。較佳是後者。

在特定具體實例中，以添加至飼料的形式或當納入飼料添加物時，抗微生物多肽是定義明確的。“定義明確”是指抗微生物多肽製備物是至少 50% 的純度，係由大小區別層析而測定（例如，WO 01/58275 的實施例 12）。在其他特定具體實例中，抗微生物多肽製備物是至少 60、70、80、85、88、90、92、94 或至少 95% 由此方法測定的純度。

定義明確的抗微生物多肽製備物是有利的。例如，更容易將基本上不受其他抗微生物多肽干擾或污染的抗微生物多肽，正確地投藥至飼料中。名詞“正確地投藥”特別

是指獲得一致或固定結果的目標，以及根據所要效果的給予最適劑量之能力。

然而，對於使用於動物飼料，抗微生物多肽不需要是純的；例如，它可包括其他的酵素，在這樣的例子中，它可稱為抗微生物多肽製備物。

抗微生物多肽製備物可（a）直接加到飼料中（或直接用於植物性蛋白質的處理程序中），或（b）它可用於製造一種或多種的中間產物組成物，例如，後續加到飼料中的飼料添加物或預混物（或用於處理程序中）。上述純度的程度是指原始抗微生物多肽製備物的純度，無論是根據上述（a）或（b）所使用。

具有這種等級純度的抗微生物多肽製備物，是特別可利用重組的製造方法而獲得，然而當抗微生物多肽是藉由傳統發酵方法製造時，它們並非如此容易的獲得，並且也容易受到更高的批次與批次之變化而影響。

這樣的抗微生物多肽製備物當然可與其他的酵素混合。

此處所使用的名詞“植物性蛋白質”是指包括至少一種衍生自或源自植物的蛋白質（包括修飾的蛋白質及蛋白質衍生物）之任何化合物、組成物、製備物或混合物。在特定具體實例中，植物性蛋白質的蛋白質含量是至少 10、20、30、40、50 或 60%（重量/重量）。

植物性蛋白質可衍生自植物性蛋白質的來源，例如，豆類及穀類，例如，從蝶形花科（*Fabaceae*）（豆科

(*Leguminosae*))、十字花科 (*Cruciferae*)、藜科 (*Chenopodiaceae*) 及禾本科 (*Poaceae*) 的植物材料，例如，黃豆粕、羽扇豆粕及油菜籽粕。

在特定具體實例中，植物性蛋白質的來源是從一種或多種蝶形花科的植物材料，例如，黃豆、羽扇豆、豌豆或豆實。

在另一特定具體實例中，植物性蛋白質的來源是從一種或多種藜科的植物材料，例如，甜菜根、甜菜、菠菜或白藜。

植物性蛋白質來源的其他例子是油菜籽及甘藍菜。

黃豆是較佳的植物性蛋白質來源。

植物性蛋白質來源的其他例子是穀類，例如，大麥、小麥、黑麥、燕麥、玉蜀黍（玉米）、稻米及高粱。

可將抗微生物多肽以任何形式加到飼料中，作為相當純的抗微生物多肽或與其他希望加到動物飼料的化合物混合，也就是，以動物飼料添加物的形式，例如所稱用於動物飼料的預混物。

本發明的另一形態是有關用於動物飼料中的組成物（例如動物飼料），以及動物飼料添加物（例如預混物）。

除了本發明的抗微生物多肽之外，本發明的動物飼料添加物還包含至少一種脂溶性維生素，及/或至少一種水溶性維生素，及/或至少一種微量礦物質，及/或至少一種大量礦物質。

此外，視需要，飼料添加的成份是色劑、芳香化合物、

穩定劑及/或至少一種其他的酵素，係選自植酸酶 EC 3.1.3.8 或 3.1.3.26；木聚糖酶 EC 3.2.1.8；聚半乳糖酶 EC 3.2.1.89；及/或 β -葡聚糖酶 EC 3.2.1.4 之中。

在特定具體實例中，這些其他的酵素是定義明確的（如上述抗微生物多肽製備物的定義）。

其他抗微生物肽（AMP's）的例子是 CAP18、細菌素（Leucocin A）、野豬蛋白（Tritrpticin）、豬抗菌蛋白（Protegrin-1）、昆蟲抗真菌肽（Thanatin）、防禦素（Defensin）、抗菌多肽（Ovispirin）（例如抗菌肽（Novispirin）（Robert Lehrer, 2000）），及其可保留抗微生物活性的變異體或片段。

其他抗真菌多肽（AFP's）的例子是巨麴菌（*A. giganteus*）及黑麴菌肽，及其可保留抗真菌活性的變異體或片段，如同 WO 94/01459 及 PCT/DK02/00289 之揭露。

通常，脂溶性及水溶性維生素以及微量礦物質可形成所謂希望加到飼料的預混物之一部份，然而大量礦物質則通常是分別地加到飼料中。當富含本發明的抗微生物多肽時，這些組成物類型的任一種都是本發明的動物飼料添加物。

在特定具體實例中，本發明的動物飼料添加物希望被納入（或規定為必須納入）動物飲食中，或以 0.01 至 10.0 % 的水平而餵食；更特別是 0.05 至 5.0 %；或 0.2 至 1.0 %（% 是指克添加物/100 克飼料）。這特別是對於預混物而言。

以下是非排它性列舉這些成份的例子：

脂溶性維生素的例子是維生素 A、維生素 D3、維生素 E 及維生素 K（例如，維生素 K3）。

水溶性維生素的例子是維生素 B12、生物素及膽鹼、維生素 B1、維生素 B2、維生素 B6、菸鹼素、葉酸及泛酸（例如，Ca-D-泛酸）。

微量礦物質的例子是錳、鋅、鐵、銅、碘、硒及鈷。

大量礦物質的例子是鈣、磷及鈉。

這些化合物的營養需求（以家禽及小豬/豬為例）是列於 WO 01/58275 的表 A 中。營養需求是指這些成份應以所指的濃度而提供至飲食中。

在另一選擇中，本發明的動物飼料添加物包括至少一種在 WO 01/58275 的表 A 中所指明的個別成份。至少一種是指任一種、一種或多種、一種、或兩種、或三種、或四種等等至多達所有十三種、或多達所有十五種的個別成份。更特別地，這個至少一種的個別成份是以可提供飼料內濃度在表 A 的第四欄、或第五欄、或第六欄所指的範圍內的量，而納入至本發明的添加物中。

本發明也有關於動物飼料組成物。動物飼料組成物或飲食具有相當高含量的蛋白質。家禽及豬的飲食之特徵為 WO 01/58275 的表 B 第 2-3 欄所指。魚類的飲食之特徵為這個表 B 的第四欄所指。此外，這樣的魚類飲食通常具有 200-310 克/公斤的粗脂肪含量。

本發明的動物飼料組成物具有 50-800 克/公斤的粗蛋

白質含量，並且更包括至少一種如此處聲明之抗微生物多肽。

此外，或另一選擇（對於以上所指的粗蛋白質含量），本發明的動物飼料組成物具有 10-30 百萬焦耳/公斤之可代謝能量的含量；及/或 0.1-200 克/公斤的鈣含量；及/或 0.1-200 克/公斤的可利用磷含量；及/或 0.1-100 克/公斤的甲硫胺酸含量；及/或 0.1-150 克/公斤的甲硫胺酸加半胱胺酸含量；及/或 0.5-50 克/公斤的離胺酸含量。

在特定具體實例中，可代謝能量、粗蛋白質、鈣、磷、甲硫胺酸、甲硫胺酸加半胱胺酸、及/或離胺酸的含量，是在 WO 01/58275 的表 B 第 2、3、4 或 5 列（R. 2-5）之任一範圍內。

粗蛋白質是以氮（N）乘以係數 6.25 而計算，也就是，粗蛋白質（克/公斤）= N（克/公斤）× 6.25。氮的含量是藉由 Kjeldahl 方法而測量（A.O.A.C.（1984）公職分析方法，第 14 版，公職分析化學家協會，華盛頓特區）。

可代謝能量可在以下的基礎上計算：NRC 公告豬的營養需求，第 9 修正版（1988），豬營養小組委員會，動物營養委員會，農業部，國家研究委員會。美國科學院出版社，華盛頓特區，第 2-6 頁，以及歐洲家禽飼料原料之能量數值表，家禽研究及延伸之 Spelderholt 中心，7361 DA Beekbergen，荷蘭。Grafisch bedrijf Ponsen & looijen bv，Wageningen。ISBN 90-71463-12-5。

在完整的動物飲食中，鈣、可利用的磷及胺基酸之飲

食含量是在飼料表的基礎上計算，例如，Veevoedertabel (1997)，gegevens over chemische samenstelling，verteerbaarheid en voederwaarde van voedermiddelen Central Veevoederbureau，Runderweg 6，8219 pk Lelystad。ISBN 90-72839-13-7。

在特定具體實例中，本發明的動物飼料組成物包含至少一種如以上定義的植物性蛋白質或蛋白質來源。

在另一特定具體實例中，本發明的動物飼料組成物包含 0-80% 的玉米；及/或 0-80% 的高粱；及/或 0-70% 的小麥；及/或 0-70% 的大麥；及/或 0-30% 的燕麥；及/或 0-40% 的黃豆粕；及/或 0-10% 的魚肉粕；及/或 0-20% 的乳清。例如，可將動物的飲食製造成粉料飼料（非丸塊）或丸塊飼料。通常，將研磨的飼料原料混合，並將足夠量的必須維生素及礦物質根據所討論的種類之規格而加入。酵素可以固體或液體的酵素調配物而加入。例如，固體的酵素調配物通常是在混合步驟之前或期間加入；以及液體的酵素製備物通常是在製成丸塊的步驟後加入。也可將酵素併入到飼料添加物或預混物中。

在飲食中，最終的酵素濃度是在 0.01-200 毫克的酵素蛋白質/公斤飲食的範圍內，例如，在 5-30 毫克的酵素蛋白質/公斤動物飲食的範圍內。

抗微生物多肽可以一種或多種的下述量而投予（劑量範圍）：0.01-200；或 0.01-100；或 0.05-100；或 0.05-50；或 0.10-10，所有的這些範圍都是毫克抗微生物多肽蛋白

質/公斤飼料 (ppm)。

為了測定毫克抗微生物多肽蛋白質/公斤飼料，將抗微生物多肽從飼料組成物中純化出來，以及純化的抗微生物多肽之比活性是利用有關的分析而測定（參見以下的抗微生物活性、基質及分析）。飼料組成物的抗微生物活性本身也是利用相同的分析而測定，並且在這兩個測定的基礎上，以毫克抗微生物多肽蛋白質/公斤飼料而計算劑量。

相同的原理可應用於測定飼料添加物中的毫克抗微生物多肽蛋白質。當然，如果樣本可利用抗微生物多肽以製備飼料添加物或飼料，則比活性可從這個樣本中測定（無須從飼料組成物或添加物中純化抗微生物多肽）。

清潔劑組成物

可將本發明的抗微生物多肽加入，並且因此變成清潔劑組成物的成份。

本發明的清潔劑組成物可例如調配成手動或機器洗衣的清潔劑組成物，其包括適合於染色織布前處理的洗衣添加組成物，以及添加潤洗的織布柔軟劑組成物，或可調配成一般用於家庭硬表面清潔操作的清潔劑組成物，或可調配以用於手動或機器洗碗操作。

本發明的特定形態係提供一種清潔劑添加物，其包括本發明的抗微生物多肽以及界面活性劑。清潔劑添加物及清潔劑組成物可包括一種或多種的其他酵素，例如，蛋白酶、脂肪酶、角質素分解酶、澱粉酶、碳水化合物酶、纖維素酶、果膠分解酶、甘露聚糖酶、阿拉伯聚糖酶、聚半

乳糖酶、木聚糖酶、氧化酶（例如漆酶）及/或過氧化酶（例如鹵過氧化酶）。

一般而言，所選擇的酵素性質應與所選擇的清潔劑相容（也就是，pH 最適性、與其他酵素及非酵素成份的相容性等），並且酵素應以有效量而存在。

蛋白酶：適合的蛋白酶包括動物、植物或微生物來源的蛋白酶。較佳是微生物來源的蛋白酶。化學修飾的或蛋白質工程的突變物也包括在內。蛋白酶可以是絲胺酸蛋白酶或金屬蛋白酶，較佳是鹼性的微生物蛋白酶或類似胰蛋白酶的蛋白酶。鹼性蛋白酶的例子是枯草桿菌蛋白酶，特別是衍生自芽胞桿菌屬的枯草桿菌蛋白酶，例如，枯草桿菌蛋白酶 Novo、枯草桿菌蛋白酶 Carlsberg、枯草桿菌蛋白酶 309、枯草桿菌蛋白酶 147 及枯草桿菌蛋白酶 168（說明於 WO 89/06279）。類似胰蛋白酶的蛋白酶的例子是胰蛋白酶（例如，豬或牛來源的胰蛋白酶），以及說明於 WO 89/06270 及 WO 94/25583 的鐮刀菌屬蛋白酶。

有效的蛋白酶的例子是說明於 WO 92/19729、WO 98/20115、WO 98/20116 及 WO 98/34946 的變異體，特別是在以下一個或多個位置具有取代的變異體：27、36、57、76、87、97、101、104、120、123、167、170、194、206、218、222、224、235 及 274。

脂肪酶：適合的脂肪酶包括細菌或真菌來源的脂肪酶。化學修飾的或蛋白質工程的突變物也包括在內。有效的脂肪酶的例子包括腐植黴屬（同義字嗜熱黴屬

(*Thermomyces*) 的脂肪酶，例如，棉毛土生菌（如歐洲專利第 258 068 號及歐洲專利第 305 216 號之說明）或腐植黴土生菌（如 WO 96/13580 之說明）的脂肪酶；假單胞菌屬脂肪酶，例如，產鹼假單胞菌 (*P. alcaligenes*) 或假產鹼假單胞菌 (*P. pseudoalcaligenes*)（歐洲專利第 218 272 號）、西巴假單胞菌 (*P. cepacia*)（歐洲專利第 331 376 號）、史都哲假單胞菌 (*P. stutzeri*)（英國專利第 1,372,034 號）、螢光假單胞菌 (*P. fluorescens*)、假單胞菌屬品系 SD705（WO 95/06720 及 WO 96/27002）、威斯康辛假單胞菌 (*P. wisconsinensis*)（WO 96/12012）的脂肪酶；芽胞桿菌屬脂肪酶，例如，枯草芽胞桿菌 (Dartois 等人 (1993), *Biochem. Biophys. Acta* 1131: 253-360)、嗜熱脂肪芽胞桿菌（日本專利 64/744992）或短小芽胞桿菌（WO 91/16422）的脂肪酶。

其他的例子是脂肪酶變異體，例如，說明於 WO 92/05249、WO 94/01541、歐洲專利第 407 225 號、歐洲專利第 260 105 號、WO 95/35381、WO 96/00292、WO 95/30744、WO 94/25578、WO 95/14783、WO 95/22615、WO 97/04079 及 WO 97/07202 的脂肪酶變異體。

澱粉酶：適合的澱粉酶 (α 及 / 或 β) 包括細菌或真菌來源的澱粉酶。化學修飾的或蛋白質工程的突變物也包括在內。澱粉酶包括，例如，得自芽胞桿菌屬的 α -澱粉酶，例如，一種特別的品系蘚樣芽胞桿菌，更詳細地說明於英國專利第 1,296,839 號。

有效的澱粉酶的例子是說明於 WO 94/02597、WO 94/18314、WO 96/23873 及 WO 97/43424 的變異體，特別是在以下一個或多個位置具有取代的變異體：15、23、105、106、124、128、133、154、156、181、188、190、197、202、208、209、243、264、304、305、391、408 及 444。

纖維素酶：適合的纖維素酶包括細菌或真菌來源的纖維素酶。化學修飾的或蛋白質工程的突變物也包括在內。適合的纖維素酶包括得自芽胞桿菌屬、假單胞菌屬、腐植黴屬、鐮刀菌屬、果腐黴屬、枝頂孢菌屬的纖維素酶，例如，腐植黴土生菌、嗜熱蝕絲黴菌及尖孢鐮刀菌製造的真菌纖維素酶，其揭露於美國專利第 4,435,307、美國專利第 5,648,263、美國專利第 5,691,178、美國專利第 5,776,757 及 WO 89/09259。

特別適合的纖維素酶是具有護色優勢的鹼性或中性纖維素酶。這樣的纖維素酶的例子是說明於歐洲專利第 0 495 257 號、歐洲專利第 0 531 372 號、WO 96/11262、WO 96/29397、WO 98/08940 的纖維素酶。其他的例子是纖維素酶變異體，例如，說明於 WO 94/07998、歐洲專利第 0 531 315 號、美國專利第 5,457,046 號、美國專利第 5,686,593 號、美國專利第 5,763,254 號、WO 95/24471、WO 98/12307 及 PCT/DK98/00299 的纖維素酶變異體。

過氧化酶/氧化酶：適合的過氧化酶/氧化酶包括植物、細菌或真菌來源的過氧化酶/氧化酶。化學修飾的或蛋白質工程的突變物也包括在內。有效的過氧化酶的例子包括

得自鬼傘屬 (*Coprinus*)，例如灰蓋鬼傘 (*C. cinereus*) 的過氧化酶及其變異體，如 WO 93/24618、WO 95/10602 及 WO 98/15257 之說明者。

可將清潔劑酵素藉由加入包含一種或多種酵素的個別添加物，或藉由加入包括所有這些酵素的組合添加物，而納入至清潔劑組成物中。本發明的清潔劑添加物（也就是，個別添加物或組合添加物）可調配成，例如，顆粒物、液體、漿體等。較佳的清潔劑添加物調配物是顆粒物（特別是無塵的顆粒物）、液體（特別是穩定化的液體）或漿體。

無塵的顆粒物可如美國專利第 4,106,991 號及 4,661,452 號之揭露而製造，並可視需要藉由在此技藝中已知的方法而包覆。蠟質包覆材料的例子是具有平均分子量 1000 至 20000 的聚(環氧乙烷)產物(聚乙二醇；PEG)；具有 16 至 50 個環氧乙烷單位的乙氧基化壬酚；乙氧基化的脂肪醇，其中醇包含 12 至 20 個碳原子以及其中有 15 至 80 個環氧乙烷單位；脂肪醇；脂肪酸；以及脂肪酸的單-及二-及三甘油酯。適合於流體床技術應用之形成薄膜包覆材料的例子，是提供於英國專利第 1483591 號。液體的酵素製備物可例如藉由加入多元醇（例如丙二醇）、糖或糖醇、乳酸或硼酸，根據已建立的方法穩定。經保護的酵素可根據揭露於歐洲專利第 238,216 號之方法而製備。

本發明的清潔劑組成物可以是任何合宜的形式，例如，條狀、錠狀、粉末、顆粒狀、糊狀或液體。液體清潔劑可以是水溶性的（通常包含至多 70% 的水及 0-30% 的有機溶

劑) 或非水溶性的。

清潔劑組成物包括一種或多種的界面活性劑，其可以是非離子（包括半極性）及/或陰離子及/或陽離子及/或兩性離子的界面活性劑。界面活性劑通常是以 0.1 重量%至 60 重量%的量而存在。

當納入其中時，清潔劑通常將包含約 1%至約 4%的陰離子界面活性劑，例如，線形的烷基苯磺酸酯、 α -鏈烯磺酸酯、烷基硫酸酯（脂肪醇硫酸酯）、醇乙氧基硫酸酯、二級鏈烷磺酸酯、 α -硫基脂肪酸甲酯、烷基-或烯基-琥珀酸或肥皂。

當納入其中時，清潔劑通常將包含約 0.2%至約 40%的非離子界面活性劑，例如，乙氧基化醇、乙氧基化壬酚、烷基多糖苷、氧化烷基二甲胺基、乙氧基化的脂肪酸單乙醇醯胺、脂肪酸單乙醇醯胺、多羥基烷基脂肪酸醯胺或葡萄糖胺的 N-醯基 N-烷基衍生物（“葡萄糖醯基”）。

清潔劑可包含 0-65%的清潔劑促進劑或錯合劑，例如，沸石、二磷酸鹽、三磷酸鹽、膦酸鹽、碳酸鹽、檸檬酸鹽、次氮基三乙酸、乙二胺四乙酸、二乙三胺五乙酸、烷基-或烯基-琥珀酸、可溶性矽酸鹽或層狀矽酸鹽（例如，Hoechst 的 SKS-6）。

清潔劑可包括一種或多種的聚合物。例子是羧甲基纖維素、聚(乙烯吡咯烷酮)、聚(乙二醇)、聚(乙烯醇)、聚(乙烯吡啶-N-氧化物)、聚(乙烯咪唑)、聚羧酸鹽（例如聚丙烯酸鹽）、馬來酸/丙烯酸共聚物及甲基丙烯酸月桂基酯/

丙烯酸共聚物。

清潔劑可包含漂白系統，其可包括 H_2O_2 來源，例如，過硼酸或過碳酸，其可與形成過酸的漂白活化劑結合，例如，四乙醯乙二胺或壬醯氧基苯磺酸鹽。可選擇地，漂白系統可包括例如醯胺、醯亞胺或醯類型的過氧酸。

本發明清潔劑組成物的酵素可利用傳統的穩定劑而穩定，例如，丙二醇或甘油、糖或糖醇、乳酸、硼酸或硼酸衍生物（例如，芳香族硼酸酯）或苯基硼酸衍生物（例如，4-甲醯苯基硼酸），以及組成物可如同例如 WO 92/19709 及 WO 92/19708 之說明而調配。

清潔劑也可包含其他傳統的清潔劑成份，例如，織品調節劑，包括黏土、泡沫增進劑、肥皂抑制劑、抗腐蝕劑、土壤懸浮劑、抗土壤再沈積劑、染劑、殺菌劑、光學增光劑、向水劑、污點抑制劑或香水。

目前考量的是，在清潔劑組成物中，任何的酵素以及本發明的抗微生物多肽，都可以相當於 0.01-100 毫克的酵素蛋白質/公升清洗液的量而加入，較佳是 0.05-10 毫克的酵素蛋白質/公升清洗液，更佳是 0.1-5 毫克的酵素蛋白質/公升清洗液，以及最佳是 0.1-1 毫克的酵素蛋白質/公升清洗液。

本發明的抗微生物多肽可額外地併入到 WO 97/07202 揭露的清潔劑調配物中，其以引用方式納入本文中。

本發明將藉由以下實施例而進一步說明，這些實施例不應被解釋為限制本發明的範疇。

【實施方式】

實施例

使用作為緩衝液及基質的化學品，至少是試劑級的商用產品。

實施例 1：抗微生物多肽 (Cat1) 的選殖、表現及活性評估

編碼 Cat1 的合成基因之選殖

為了製造抗微生物多肽 Cat1 (序列識別號 3) 以用於抗微生物活性分析，因此製得合成的基因 (參見下述)，並且插入至表現載體 pET31b⁺ (Novagen 公司)。合成的基因是藉由特別設計的寡核苷酸 (引子 1 及引子 2) 而構築。編碼 Cat1 的合成基因 (序列識別號 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   *
```

引子 1 (序列識別號 72)：

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

引子 2 (序列識別號 73)：

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

兩側限制核酸內切酶位置 (AlwNI/AvaI) 的酵素消化，可使我們選殖這個合成基因作為在 pET31b⁺ 中的融合構築

(標準方法是如製造商之說明，新英格蘭生物實驗室公司)。所有的標準步驟都已在別處揭露 (Sambrook、Fritsch 及 Maniatis, 1989)。

Cat1 於大腸桿菌中的轉形及表現

將重組的 pET31b⁺轉形至大腸桿菌 Novablue，如製造商之說明 (Novagen)。質體是藉由 QIAprep 小管柱而製備 (QIAGEN 公司)，並利用質體專一性的引子 (引子 3 及引子 4)，藉由自動定序而定序。

引子 3 (序列識別號 74)：

TGCTA GTTAT TGCTC AGCGG

引子 4 (序列識別號 75)：

ACCGT AGTTG CGCCC ATCG

根據製造商之說明 (Novagen)，將質體轉形至大腸桿菌 BRL-DE3。將細菌在 LB 培養液中培養至 OD₆₀₀ 約 0.8，以及重組蛋白質合成是藉由 1 mM IPTG (異丙基硫代半乳糖苷) 而啟動。在誘發 3 小時之後，將細菌回收、再懸浮於 1/10 體積的緩衝液 A (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 8)，並藉由壓力破壞而溶解 (1500 毫巴)。將所得的小塊在緩衝液 B 中清洗兩次 (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 100 mM NaCl, pH 8)。所有的標準步驟都已在別處揭露 (Sambrook、Fritsch 及 Maniatis, 1989)。

從大腸桿菌包涵體中純化 Cat1

得自上述純化的小塊係包含純化的包涵體。為了從 KSI

融合夥伴中將肽釋出，因此，在工程化的天冬胺酸-脯胺酸位置上進行酸水解作用，將胺基端導入至編碼 Cat1 的基因。將包涵體再懸浮於 100 mM 的磷酸鈉 (pH 2.3)，並且在 85°C 培養隔夜。所得的上清液包含肽 (PAE-Cat1)。藉由加入 100 mM 的磷酸鈉 (pH 12.3) 而將樣本中和。為了使肽成熟，將肽以麩胺醯基肽內切酶 I (得自蘚樣芽胞桿菌) 而處理。成熟的肽是藉由質譜儀而確認，並且藉由標準的層析法而進一步純化。

藉由 NCCLS 微量稀釋肉湯分析之抗微生物活性 (MIC 及 MBC)

根據 NCCLS 對於新穎抗微生物化合物的敏感性測試之指導方針，我們發現到廣範圍的 Cat1 活性 (對於好氧生長細菌的稀釋抗微生物敏感性測試之方法；認可的標準，第五版。NCCLS 文件 M7-A5 (ISBN 1-56238-394-9))。以下的細菌品系是對 Cat1 敏感 (MIC < 64 微克/毫升)：枯草芽胞桿菌 (ATCC 6633)、藤黃色微球菌 (*Micrococcus luteus*) (ATCC 9341)、表皮葡萄球菌 (*S. epidermidis*) (DSM 1798)、糞腸球菌 (*Enterococcus faecalis*) (DSM 2570)、綠膿假單胞菌 (ATCC 27853)、支氣管敗血性博德特氏菌 (ATCC 4617)、大腸桿菌 (ATCC 10536)、肺炎克雷伯氏菌 (*K. pneumoniae*) (ATCC 10031)、豬霍亂沙門桿菌 (*S. choleraesuis*) (DSM 9220) 及奇異變形桿菌 (*P. mirabilis*) (ATCC 7002)。最小殺菌濃度 (MBC) 是在類似的範圍內，顯示 Cat1 的活性是能殺細菌的。

在另一活動中，Cat1 的特定 MICs 是對抗各種與創傷感染相關的微生物品系而測定。如同上述 NCCLS 方法之建議，使細菌品系生長在陽離子調整的 Muller-Hinton 肉湯中。所測試的最高濃度是 32 微克/毫升。表 1 的結果顯示 Cat1 是廣範圍的抗生物性，具有對抗許多不同革蘭氏陰性及革蘭氏陽性細菌的有效活性。

表 1

微生物品系	ATCC 編號	MIC (微克/毫升)
綠膿假單胞菌	27853	2
金黃色葡萄球菌 (MSSA)	25923	32
金黃色葡萄球菌 GISA	700699	32
表皮葡萄球菌	12228	4
肺炎鏈球菌	10015	8
嗜麥寡營養食單胞菌	12714	1
大腸桿菌	25922	1.5
化膿葡萄球菌	4543	1.5
支氣管敗血性博德特氏菌	14064	0.5
肺炎克雷伯氏菌	29995	8
鮑氏不動桿菌	49137	8
弗勞地氏檸檬酸桿菌	11811	1.5
摩氏摩根氏桿菌	21116	1.5
藤黃色微球菌	9341	0.5
無乳鏈球菌	624	16
綠氣球菌	700406	0.5
艱難梭菌	43594	32

在不同測試條件下的 MIC 值

Cat1 的最小抑制濃度也是利用陽離子調整的 Mueller-Hinton 肉湯 (MHB)，在微量肉湯稀釋分析中測定，其中 MHB 是以如以下表 2 所說明的不同修飾而使用。所選擇的測試生物體是綠膿假單胞菌 (ATCC 27853)。

表 2

測試條件	MIC (微克/毫升)
MHB	4
MHB + 1.5 mM Ca^{2+}	11
MHB + 1.5 mM Mg^{2+}	6
MHB + 150 mM NaCl	6
MHB + 1%人類血清	6
MHB + 1%溶解的人類紅血球細胞	9
調整至 pH 6.5 的 MHB	6
調整至 pH 5.5 的 MHB	6

殺死動力學

Cat1 的殺死率是在 MHB 中，利用綠膿假單胞菌 (ATCC 27853) 作為測試生物體而測定。將細菌以 Cat1 培養 (於 $4 \times \text{MIC}$ 濃度)。在不同的時間點，將製備物的數個稀釋予以塗佈，並且測定存活細胞的估計值 (菌落形成單位/毫升)。表 3 的結果顯示 Cat1 可快速地殺死細菌，在 30 分鐘內減少接近 3 個對數的菌落形成單位。

表 3

時間	菌落形成單位/毫升	
	對照組	Cat1
0 小時	100.000	100.000
0.5 小時	100.000	175
1.5 小時	300.000	<20
24 小時	>1.000.000	<20

放射狀擴散分析之抗微生物活性 (MEC)

一種先前發表的方法之修飾版本已應用於抗微生物活性的偵測中 (Lehrer 等人 (1991)，內源性抗微生物多肽的超靈敏分析，*J. Immunol. Methods* 137: 167-173)。

將標的細菌 (10^6 菌落形成單位) 加到 10 毫升的襯底瓊脂糖 (1% 低電內滲瓊脂糖, 0.03% 胰化酪蛋白大豆肉湯, 10 mM 磷酸鈉, pH 7.4, 37°C)。將懸浮液在 INTEGRID 培養皿上固化 (Becton Dickison Labware)。使用 3 公釐的凝膠打孔器以在襯底瓊脂糖產生孔洞 (Amersham Pharmacia 生技公司, 瑞典)。將樣本加到孔洞中, 並且在 37°C 培養 3 小時。將一層覆蓋物倒在上方, 並將培養盤培養隔夜 (LB 培養液, 7.5% 瓊脂糖)。在槽孔周圍觀察到細菌清除區的抗微生物活性。藉由加入 10 毫升 0.2 mM 的 MTT (3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑鎢溴噻唑基藍), 而將活細胞對比染色。

這個分析顯示相似於 NCCLS 方法所測定的活性範圍以及濃度 (上一段)。發現以下的細菌種類是敏感的 (最小有效濃度 (MEC) < 64 微克/毫升): 枯草芽胞桿菌 (ATCC 6633)、空腸腸球菌 (*E. hirae*) (ATCC 10541)、藤黃色微球菌 (ATCC 9341)、金黃色葡萄球菌 (ATCC 29737)、表皮葡萄球菌 (DSM 1798)、糞腸球菌 (DSM 2570)、綠膿假單胞菌 (ATCC 27853)、支氣管敗血性博德特氏菌 (ATCC 4617)、大腸桿菌 (ATCC 10536)、肺炎克雷伯氏菌 (ATCC 10031)、豬霍亂沙門桿菌 (DSM 9220) 及奇異變形桿菌 (ATCC 7002)。

實施例 2: 抗微生物活性的評估

將一系列合成的抗微生物多肽, 利用阿拉伯糖作為誘導子而在大腸桿菌 TOP10 中表現 (Invitrogen), 如國際

專利申請案 WO 00/73433 的實施例 1 所揭露（有小部份修飾）。本發明抗微生物多肽的表現，可導致宿主細胞的生長抑制。

簡言之，將生長於 RM 培養液（包含 0.2% 葡萄糖及氯吡青黴素（100 微克/毫升））中之新鮮隔夜培養物，在微量滴定盤中稀釋 300 倍至 150 微升的 RM 培養液（包含 0.2% 甘油及氯吡青黴素（100 微克/毫升），以及不同濃度的阿拉伯糖（0、0.01% 或 0.1%）），並且在 37°C 培養隔夜，同時劇烈搖晃。生長曲線是藉由使用 Bioscreen C 微生物判讀儀（Thermo Electron 公司），以 30 分鐘的間隔測量 OD₄₅₀ 共 14 小時而監測（參見 Invitrogen pBAD/gIII A、B 及 C 載體目錄編號 V450-01 對於緩衝液及培養液組成物的方法）。

生長抑制的百分比是以每個樣本的末端 OD 測量值，除以包含對照組載體的細胞所獲得的末端 OD 測量值，並乘以 100 而計算。公式如下：

$$\left(1 - \frac{\text{樣本 OD} - \text{空白 OD}}{\text{對照組載體 OD} - \text{空白 OD}}\right) \times 100$$

其中“空白 OD”是對應到空槽孔的 OD。

Cat1 以及所篩選改善的合成變異體之胺基酸序列，是列於表 4、5 及 6 中。

表 4

胺基酸序列	序列 識別 號：	利用 0.01%阿拉 伯糖的生長抑制 (%)	利用 0.1%阿拉伯 糖的生長抑制 (%)
GLLRRLRKKIGKKLKKIGQKIPRILVP	3	63	64
GLLRRLRGKIGKKLKKIGQKIKAIRKLVP	4	89	100
GLLRRFRKKIGGKLKKYGQIIKHLRILVP	5	94	100
GLLRRLRRKIGGKLKKFGQKIKPLRKLVP	6	92	100
GLLRRLRKKIGKKLKKFGQKIKHIRILVP	7	93	100
GLLKRLGRKIGKKLKKFGQKIKAIRKLVP	8	97	100
GRFKRFRKKIGRKFKKIGQMLKPIRILVP	9	96	100
GLLKRLRKKIGKKLKKIGPKIKHIRKLVP	10	93	100
GLLRRFWMKIGGKLKKFGQMIKHLRKLVP	11	92	99
GRLRRLRRKIGEKLLKKFGQVIKALRILVP	12	94	99
GLLRRLWRKIGRKLKKYGQKIKALRKLVP	13	96	100
GRFRRFRKKIGKKLKKIGLVIKHIRILVP	14	94	100
GLLRRLRRKIGKKLKKFGQKIKHIRILVP	15	96	100
GLLRRLRNKIRKKLKKFGQKIKAIRILVP	16	96	100
GRLRRLWRKIGRKLKKYGQVIKHLRILVP	17	94	100

表 5

胺基酸序列	序列 識別 號：	利用 0.1%阿拉伯 糖的生長抑制 (%)
GLLRRLRKKIGKKLKKIGQKIPRILVP	3	53
GLFKRLRKKIGKKLKKFGQKIKPLRKLVP	18	94
GLLRRFGRKIGKKFKKFGPKIKHLRKLVP	19	91
GLFRRFRKIGKKLKKFGQKIKPLRKLVP	20	97
GLLRRFRKIGRKLKKYGLMIKPLRKLVP	21	94
GLLKRFGRKIGKKLKKYGQLIKAIRILVP	22	90
GLFRRLRKKIGKKLKKIGQLIKAIRILVP	23	97
GLLRRFGKIGKKFKKYGQKIKNLRILVP	24	92
GLLKRLRKKIGKKLKKIGQKIPRKLVP	25	94
GLLRRFGRKIGKKFKKFGPKIKHLRKLVP	26	92

GRLRRLRRKIRKKLKKYGQKIKAIRKLVP	27	96
GRFRRFRKKIGGKLKKIGQVIKDIRILVP	28	95
GRFRRFRKKIGKKFKKFGQMIKALRILVP	29	95
GRLRRFRKKIGKKLKKIGQMIKHIRILVP	30	95
GLVRRFRRKIGKKLKKIGQIIKAIRKLVP	31	96
GLLRRRLRRKIGKKFKKIGQVIKHLRKLVP	32	97
GLFRRLRGKIGKKLKKIGQKIKAIRILVP	33	91
GLFRRLGKKIGKKLKKFGQVIKHIRILVP	34	92
GLLRRLGKKIGKKFKKFGQVIKALRILVP	35	95
GLFRRLGRKIGKKLKKIGQVIKHIRILVP	36	95
GLLRRRLRKKIEKKLKKYGPKIKALRKLVP	37	94
GRIKRVGEKIGKKLKKIGQVIKHLRILVP	38	96
GLFRRFGKKIGKKLKKIGQVIKALRILVP	39	95
GRLRRFGKKIGKKLKKFGQLIKALRILVP	40	95
GLLRRFWKKIGKKLKKFGQKIKPLPKLVP	41	96
GRFRRLGRKIGEKLLKKFGQVIKAIRILVP	42	95
GLFRRFGKKIGKKLKKIGQKIKPIHKLVP	43	76
GLLKRLRKKIGKKLKKIGQMIKHIRILVP	44	93
GLLRRFREKIGKKLKKYGQKIKHLRKLVP	45	79
GLFRRLRRKIGKKFKKFGQKIKPLRKLVP	46	96
GLFRRFWKKIGRKLKKIGQKIKPLQILVP	47	79
GLLRRLWKKIGRKFKKYQVIKHIRKLVP	48	97
GLLRRLGRKIGKKLKKIGQKIKAIRILVP	49	96
GLLRRFRNKIGKKLKKIGQKIKPIRKLVP	50	92
GRFKRLRKKIGKKFKKIGQKIKDIRKLVP	51	97
GLFRRIRRKIGKKFKKFGQVIKPLRKLVP	52	95
GRLRRLGKKIGEKLLKKFGQMIKHIRILVP	53	84
GLLRRLGKKIGKKFKKCGQVIKAIRILVP	54	89
GLLRRFRKKIGEFKKFGQKIKNIRILVP	55	79
GLLRRRLRKKIGKKLKKIGQKIKPIRKLVP	56	94
GLLRRFRKKIGKKLKKYGQKIKHLRILVP	57	95

表 6

胺基酸序列	序列 識別 號：	利用 0.01%阿拉 伯糖的生長抑制 (%)	利用 0.1%阿拉伯 糖的生長抑制 (%)
GLLRRLRKKIGKKLKKIGQKIKPIRILVP	3	65	68
GLLRRLRKKIGKKLKKIAR	59	93	100
GLFRRLKRKIGRKFKKIAR	60	85	99
GLLKRLGRKIGKKFKKIAR	61	89	98
GLLRRFRKKIGKKLKKIAR	62	94	98
GLLRRLRKKIGKKLKKITR	63	95	99
GLFRRLRKKIGKKLKKIAR	64	92	99
GLFRRLKRKIGKKLKKIAR	65	91	99
GLLKRLGRKIGKKLKKIAR	66	92	100
GLLRRFRKKIGKKLKKITR	67	90	100
GLLRRLRKKIGRKFKKIAR	68	91	100
GLFRRLRKKIGKKFKKIAR	69	86	99

在表 4、5 及 6 中所示的結果，有說服力地顯示所有測試的抗微生物多肽都具有強的抗微生物活性。

實施例 3：對抗細菌品系的抗微生物活性 (MIC 及 MEC)

本發明多肽的抗微生物活性是以 Mueller-Hinton 肉湯 (MHB) 培養液，利用微量稀釋肉湯分析而分析 (參見實施例 1)。將四種不同的細菌品系在這個方案中測試：藤黃色微球菌 (ATCC 9341)、綠膿假單胞菌 (ATCC 27853)、大腸桿菌 (ATCC 10536) 及肺炎克雷伯氏菌 (DSM 681)。多肽的胺基酸序列以及所得到的最小抑制濃度 (MIC；微克/毫升) 是呈現於以下的表 7。

表 7

胺基酸序列	MIC (微克/毫升)			
	藤黃色微球菌 (ATCC 9341)	綠膿假單胞菌 (ATCC 27853)	大腸桿菌 (ATCC 10536)	肺炎克雷伯氏菌 (DSM 681)
GLLRRLRKKIGKKLKKIGQKIKPIRILVP	16	4	8	32-64
GLLRRFWKKIGKKLKKFGQKIKPLPKLVP	32	16	32	32
GLLRRLWRKIGRKLKKYGQKIKALRKLVP	32	32	64	32
GLLRRLRKKIGKKLKKIAR	32	8	16	32
GLLKRLGRKIGKKLKKIAR	64	64	8	未測試
GLLRRFRKKIGKKLKKIAR	64	64	16	32-64

本發明多肽的抗微生物活性也利用最少條件，在放射狀擴散分析中分析（參見實施例 1）。將兩種不同的細菌品系在這個方案中測試：肉膜葡萄球菌（*S. carnosus*）及大腸桿菌 Top 10。多肽的胺基酸序列以及所得到的最小有效濃度（MEC；微克/毫升）是呈現於以下的表 8。

表 8

胺基酸序列	MEC (微克/毫升)	
	肉膜葡萄球菌	大腸桿菌 Top 10
GLLRRLRKKIGKKLKKIGQKIKPIRILVP	2.5	8.5
GRIKRVGEKIGKKLKKIGQVIKHLRILVP	8	8.5
GLLRRFWKKIGKKLKKFGQKIKPLPKLVP	3.8	16.6
GLLRRLWRKIGRKLKKYGQKIKALRKLVP	4.4	27.0
GLLRRLRKKIGKKLKKIAR	1.8	18.3
GLLKRLGRKIGKKLKKIAR	2	13.5
GLLRRFRKKIGKKLKKIAR	1.1	28.0

序列表

<110> Novozymes A/S

<120> 抗微生物的多肽

<130> 10328.204-WO

<160> 75

<170> PatentIn 3.1 版

<210> 1

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗微生物多肽

<220>

<221> 混合特徵

<222> (2)..(2)

<223> Xaa= 白胺酸或精胺酸

<220>

<221> 混合特徵

<222> (3)..(3)

<223> Xaa= 白胺酸、異白胺酸、纈胺酸或苯丙胺酸

<220>

<221> 混合特徵

<222> (4)..(4)

<223> Xaa= 精胺酸或離胺酸

<220>

<221> 混合特徵

<222> (6)..(6)

<223> Xaa= 白胺酸、異白胺酸、纈胺酸或苯丙胺酸

<220>

<221> 混合特徵

<222> (7)..(7)

<223> Xaa= 精胺酸、色胺酸或甘胺酸

<220>

<221> 混合特徵

<222> (8)..(8)

<223> Xaa= 離胺酸、精胺酸、甘胺酸、甲硫胺酸、天冬醯胺酸或麩胺酸

<220>

<221> 混合特徵

<222> (11)..(11)

<223> Xaa= 甘胺酸、離胺酸、精胺酸或麩胺酸

<220>

<221> 混合特徵

<222> (12)..(12)

<223> Xaa= 離胺酸、精胺酸、甘胺酸或麩胺酸

<220>

<221> 混合特徵

<222> (14)..(14)

<223> Xaa= 白胺酸或苯丙胺酸

<220>

<221> 混合特徵

<222> (15)..(15)

<223> Xaa= 離胺酸或精胺酸

<220>

<221> 混合特徵

<222> (17)..(17)

<223> Xaa= 白胺酸、異白胺酸、苯丙胺酸、半胱胺酸或酪胺酸

<220>
<221> 混合特徵
<222> (18)..(18)
<223> Xaa= 甘胺酸、丙胺酸或蘇胺酸

<220>
<221> 混合特徵
<222> (19)..(19)
<223> Xaa= 麩醯胺酸、精胺酸、白胺酸或脯胺酸

<220>
<221> 混合特徵
<222> (20)..(20)
<223> Xaa= 離胺酸、白胺酸、異白胺酸、甲硫胺酸或纈胺酸

<220>
<221> 混合特徵
<222> (23)..(23)
<223> Xaa= 脯胺酸、丙胺酸、組胺酸、天冬醯胺酸或天冬胺酸

<220>
<221> 混合特徵
<222> (24)..(24)
<223> Xaa= 異白胺酸或白胺酸

<220>
<221> 混合特徵
<222> (25)..(25)
<223> Xaa= 精胺酸、組胺酸、麩醯胺酸或脯胺酸

<220>
<221> 混合特徵
<222> (26)..(26)
<223> Xaa= 異白胺酸或離胺酸

<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> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗微生物多肽

<220>

<221> 混合特徵

<222> (2)..(2)

<223> Xaa= 白胺酸或精胺酸

<220>

<221> 混合特徵

<222> (20)..(20)

<223> Xaa= 離胺酸、白胺酸、異白胺酸、甲硫胺酸或纈胺酸

<220>

<221> 混合特徵

<222> (23)..(23)

<223> Xaa= 脯胺酸、丙胺酸、組胺酸、天冬醯胺酸或天冬胺酸

<220>

<221> 混合特徵

<222> (24)..(24)

<223> Xaa= 異白胺酸或白胺酸

<220>

<221> 混合特徵

<222> (25)..(25)

<223> Xaa= 精胺酸、組胺酸、麩醯胺酸或脯胺酸

<220>
<221> 混合特徵
<222> (26)..(26)
<223> Xaa= 異白胺酸或離胺酸

<220>
<221> 混合特徵
<222> (3)..(3)
<223> Xaa= 白胺酸、異白胺酸、纈胺酸或苯丙胺酸

<220>
<221> 混合特徵
<222> (4)..(4)
<223> Xaa= 精胺酸或離胺酸

<220>
<221> 混合特徵
<222> (6)..(6)
<223> Xaa= 白胺酸、異白胺酸、纈胺酸或苯丙胺酸

<220>
<221> 混合特徵
<222> (7)..(7)
<223> Xaa= 精胺酸、色胺酸或甘胺酸

<220>
<221> 混合特徵
<222> (8)..(8)
<223> Xaa= 離胺酸、精胺酸、甘胺酸、甲硫胺酸、天冬醯胺酸或麩胺酸

<220>
<221> 混合特徵
<222> (11)..(11)
<223> Xaa= 甘胺酸、離胺酸、精胺酸或麩胺酸

<220>
 <221> 混合特徵
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa= 離胺酸、精胺酸、甘胺酸或麩胺酸

<220>
 <221> 混合特徵
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa= 白胺酸或苯丙胺酸

<220>
 <221> 混合特徵
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa= 異白胺酸、苯丙胺酸、半胱胺酸或酪胺酸

<220>
 <221> 混合特徵
 <222> (19)..(19)
 <223> Xaa= 麩醯胺酸、白胺酸或脯胺酸

<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> 人工序列

<220>
 <223> 合成的抗微生物多肽 (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> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗微生物多肽

<400> 25

Gly Leu Leu Lys 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> 26

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗微生物多肽

<400> 26

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> 27

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗微生物多肽

<400> 27

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

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

<210> 28
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗微生物多肽

<400> 30

Gly Arg Leu Arg Arg Phe 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> 31

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗微生物多肽

<400> 31

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

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

<210> 32

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗微生物多肽

<400> 32

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

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

<210> 33
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗微生物多肽

<400> 47

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

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

<210> 48

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗微生物多肽

<400> 48

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

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

<210> 49

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗微生物多肽

<400> 49

Gly Leu Leu Arg Arg Leu Gly Arg 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> 50

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗微生物多肽

<400> 52

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

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

<210> 53

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗微生物多肽

<400> 53

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

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

<210> 54

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗微生物多肽

<400> 54

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

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

<210> 55

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗微生物多肽

<220>

<221> 混合特徵

<222> (2)..(2)

<223> Xaa= 白胺酸或精胺酸

<220>

<221> 混合特徵

<222> (3)..(3)

<223> Xaa= 白胺酸或苯丙胺酸

<220>

<221> 混合特徵

<222> (4)..(4)

<223> Xaa= 精胺酸或離胺酸

<220>

<221> 混合特徵

<222> (6)..(6)

<223> Xaa= 白胺酸或苯丙胺酸

<220>

<221> 混合特徵

<222> (7)..(7)

<223> Xaa= 精胺酸、離胺酸或甘胺酸

<220>

<221> 混合特徵

<222> (8)..(8)

<223> Xaa= 精胺酸、離胺酸或麩胺酸

<220>

<221> 混合特徵

<222> (11)..(11)

<223> Xaa= 甘胺酸或離胺酸

<220>

<221> 混合特徵

<222> (12)..(12)

<223> Xaa= 離胺酸、精胺酸或麩胺酸

<220>

<221> 混合特徵

<222> (14)..(14)

<223> Xaa= 白胺酸或苯丙胺酸

<220>

<221> 混合特徵

<222> (18)..(18)

<223> Xaa= 丙胺酸或蘇胺酸

<220>

<221> 混合特徵

<222> (15)..(15)

<223> Xaa= 離胺酸或精胺酸

<220>
 <221> 混合特徵
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa= 異白胺酸或白胺酸

<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> 人工序列

<220>
 <223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>
 <223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗微生物多肽

<400> 65

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

Ile Ala Arg

<210> 66

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗微生物多肽

<400> 66

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

Ile Ala Arg

<210> 67

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗微生物多肽

<400> 67

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

Ile Thr Arg

<210> 68
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<220>
 <223> 合成的抗微生物多肽

<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> 人工序列

<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 4
8

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 9
0

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

20

25

<210> 71

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<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> 人工序列

<220>

<223> 引子 1 序列

<400> 72

attattcaga tgctggatcc ggcggaaggc ctgctgcgcc gtctgcgcaa gaagattggc 6
0

aaaaagctga agaaaattgg ccagaagatt aaaccgattc gcattctggt gccgtagctc 12
0

gagattatt 12
9

<210> 73

<211> 129

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子 2 序列

<400> 73

aataatctcg agctacggca ccagaatgcg aatcggttta atcttctggc caattttctt 6
0

cagctttttg ccaatcttct tgcgcagacg gcgcagcagg ccttccgccg gatccagcat 12
0

ctgaataat 12
9

<210> 74

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子 3 序列

<400> 74

tgctagttat tgctcagcgg
0

2

<210> 75
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子 4 序列

<400> 75
accgtagttg cgcccatcg
9

1

五、中文發明摘要：

本發明是有關於具有抗微生物活性的多肽，以及具有編碼多肽的核苷酸序列之多核苷酸。本發明也有關於核酸構築、載體及包括核酸構築的宿主細胞，以及製造及利用多肽之方法。

六、英文發明摘要：

The present invention relates to polypeptides having antimicrobial activity and polymucleotides having a nucleotide sequence which encodes for the polypeptides. The invention also relates to nucleic acid constructs, vectors, and host cells comprising the nucleic acid aconstructs as well as methods for producing and using the polypeptides.

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (無) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

99.3.16 修正

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：93116812

※ 申請日期：93-06-11

※ IPC 分類：

C07K 14/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

C11D 3/00 (2006.01)

A23K 1/17 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

抗微生物的多肽 / ANTIMICROBIAL POLYPEPTIDES

二、申請人：(共 1 人)**姓名或名稱：**(中文/英文)

諾佛酵素生物科技公司 / Novozymes Adenium Biotech A/S

代表人：(中文/英文)

克里斯雀 莫瑟 / MERSE, Kristian

住居所或營業所地址：(中文/英文)

丹麥 2880，貝格史法爾德，克洛格史維耶 36 號

KROGSHOEJVEJ 36, DK-2880 BAGSVAERD, DENMARK

國 籍：(中文/英文)

丹麥 / DENMARK

三、發明人：(共 4 人)**姓 名：**(中文/英文)

1. 多羅帝 拉文托斯 塞古拉 / SEGURA, DOROTEA RAVENTOS

2. 波 候塞 米俊德 / MYGIND, PER HOLSE

3. 漢斯亨利克 克利斯登森 霍根豪格 /

HOEGENHAUG, HANS-HENRIK KRISTENSEN

4. 亞利山朵羅 托西 / TOSSI, ALESSANDRO

十、申請專利範圍：

1.一種具有抗微生物活性的多肽，其包括以下胺基酸序列：

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；

以及其中構成該多肽的胺基酸是獨立地選自 D 或 L 形式。

2.如申請專利範圍第 1 項之多肽，其包括如序列識別號 58 所提出的胺基酸序列，

G-X₁-X₂-X₃-R-X₄-X₅-X₆-K-I-X₇-X₈-K-X₉-X₁₀-K-X₁₁-X₁₂
-R；

其中

X₁= L 或 R； X₂= L 或 F； X₃= R 或 K；
X₄= L 或 F； X₅= R、K 或 G； X₆= K、R 或 E；
X₇= G 或 K； X₈= K、R 或 E； X₉= L 或 F；
X₁₀= K 或 R； X₁₁= I 或 L； X₁₂= A 或 T。

3.如申請專利範圍第 1 項之多肽，其包括如序列識別號 2 所提出的胺基酸序列，

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。

4.如申請專利範圍第 1 項之多肽，其係由序列識別號 2 的胺基酸 1 至 29 或序列識別號 58 的胺基酸 1 至 19 所組成。

5.一種如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項所定義的抗微生物多肽，係使用作為藥劑。

6.一種如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項所定義的抗微生物多肽，係使用作為抗微生物的獸醫或人類治療或預防作用劑。

7.一種多核苷酸，其具有編碼如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項所定義的多肽之核苷酸序列。

8.一種核酸構築，其包括如申請專利範圍第 7 項所定義的核苷酸序列，該核苷酸序列可操作地連結到一種或多種可在適合宿主中引導該多肽生產的控制序列。

9.一種重組表現載體，其包括如申請專利範圍第 8 項所

定義的核酸構築。

10.一種重組宿主細胞，其包括如申請專利範圍第 8 項所定義的核酸構築。

11.一種製造如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項所定義的多肽之方法，該方法包括：

(a) 在有益於該多肽之生產的條件下，培養如申請專利範圍第 10 項所定義的重組宿主細胞；以及

(b) 回收該多肽。

12.一種組成物，其包括如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項所定義的抗微生物多肽。

13.如申請專利範圍第 12 項之組成物，其更包括另外的殺生物作用劑。

14.一種殺死或抑制微生物細胞生長之方法，其非治療性處理人類或動物體之方法，其包括將該微生物細胞與如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項所定義的抗微生物多肽接觸。

15.一種清潔劑組成物，其包括界面活性劑以及如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項所定義的抗微生物多肽。

16.一種如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項所定義的抗微生物多肽之用途，其係用於製備用於治療微生物感染或用於預防用途的獸醫或人類的治療作用劑。

17.一種植物細胞，其已以編碼如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項所定義具有抗微生物活性的多肽之核苷酸序列轉形。

18.一種如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項所定義的至少一種抗微生物多肽之用途，其係用於動物飼料中。

19.一種如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項所定義的至少一種抗微生物多肽之用途，其係用於製備用於動物飼料中的組成物。

20.一種動物飼料添加物，其包括：

(a) 至少一種如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項所定義的抗微生物多肽；以及

(b) 至少一種脂溶性維生素；及/或

(c) 至少一種水溶性維生素；及/或

(d) 至少一種微量礦物質；及/或

(e) 至少一種大量礦物質。

21.如申請專利範圍第 20 項之動物飼料添加物，其更包括植酸酶、木聚糖酶、聚半乳糖酶及/或 β -葡聚糖酶。

22.一種動物飼料組成物，其具有 50 至 800 克/公斤的粗蛋白質含量，並且包括至少一種如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項所定義的抗微生物多肽。

十一、圖式：

無