



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102171239 B

(45)授权公告日 2018.11.13

(21)申请号 200980138283.3

(22)申请日 2009.09.23

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 102171239 A

(43)申请公布日 2011.08.31

(30)优先权数据

61/136,673 2008.09.24 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2011.03.24

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2009/006926 2009.09.23

(87)PCT国际申请的公布数据

W02010/035107 EN 2010.04.01

(73)专利权人 特尔哈肖梅尔医学研究基础设施

和服务有限公司

地址 以色列特尔哈肖梅尔

(72)发明人 阿米尔·兹洛特金

亨·凯斯滕博伊姆

(74)专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限公司

责任公司 11287

代理人 章蕾

(51)Int.Cl.

C07K 7/06(2006.01)

C07K 7/08(2006.01)

C07K 14/415(2006.01)

C07K 14/435(2006.01)

C02F 1/00(2006.01)

C09D 5/16(2006.01)

A61L 31/16(2006.01)

C07K 14/46(2006.01)

(56)对比文件

US 2003103912 A1,2003.06.05,

CN 1356910 A,2002.07.03,

WO 2005121778 A2,2005.12.22,

审查员 杨佳倩

权利要求书1页 说明书27页

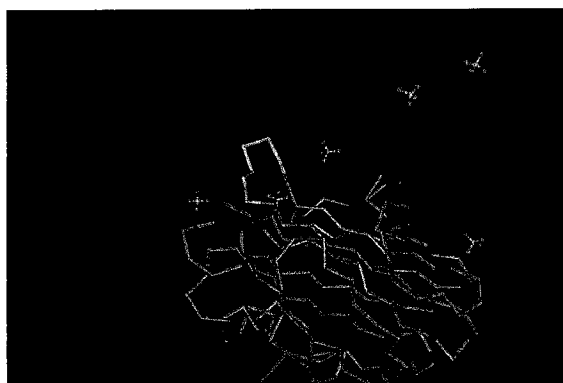
序列表24页 附图17页

(54)发明名称

用于防止细胞粘附的肽和组合物及其使用方法

(57)摘要

本发明提供包含经分离肽的组合物,所述肽可从诸如水生生物和藓类植物(moss)等生物提取,且例如任选包含选自以下组成的群组的序列:YDYNWY、YDYNLY、FDYNFY、FDYNLY、FDYNWY、YDWNLY、YDWHLY和WDYNLY,或本文中描述的任何其它序列;以及其使用方法,包括用于处理微生物生物膜或防止形成微生物生物膜以及防止细胞粘附于表面。



水溶性状态的成孔溶细胞素海藻细胞素II的1GWY A链的晶体结构

1. 一种肽,其选自由以下组成的群组:FDYNWY。
2. 一种防止单细胞生物粘附于表面的方法,所述表面选自由织物、纤维、泡沫材料(foam)、薄膜、混凝土、砖石建筑、玻璃、金属和塑料组成的群组,所述方法包含使所述单细胞生物与无细胞毒性或细胞抑制活性且包含肽的组合物接触,所述肽由一序列组成,所述序列选自SEQ ID NO:34的截短序列且包括序列FDYNWY,其中所述肽是环状且多达30个氨基酸长度,其中所述组合物防止或减少所述单细胞生物粘附于所述表面。
3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述表面包含在易于形成生物膜的装置中,所述装置选自如下构成的群组:容器外壳、汽车表面、飞机表面、膜、过滤器和工业设备。
4. 根据权利要求2所述的方法,其中所述肽是可从加勒比海海葵(*Stichodactyla helianthus*)中分离。
5. 根据权利要求2所述的方法,其中所述组合物耐冻干。
6. 根据权利要求2所述的方法,其中所述组合物抑制细胞集合。
7. 根据权利要求2所述的方法,其中所述单细胞生物是包含在生物膜中。
8. 根据权利要求2所述的方法,其中所述单细胞生物选自由细菌、真菌、原生动物和古生菌组成的群组。
9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述真菌包含酵母。
10. 根据权利要求2所述的方法,其中所述组合物呈选自由喷雾、凝胶和涂料组成的群组的形式。
11. 一种医疗装置,其包含无细胞毒性或细胞抑制活性且包含分离的肽的组合物,所述分离的肽由一序列组成,所述序列选自SEQ ID NO:34的截短序列且包括序列FDYNWY,其中所述肽是环状且多达30个氨基酸长度,其中所述组合物是涂覆于所述装置表面上,或并入所述医疗装置的聚合物基质中,且所述医疗装置是体内装置或体外装置。
12. 一种处理水以防止或减少生物膜形成或过滤器污损的方法,其包含用无细胞毒性或细胞抑制活性且包含分离的肽的组合物处理所述水,所述分离的肽由一序列组成,所述序列选自SEQ ID NO:34的截短序列且包括序列FDYNWY,其中所述肽是环状且多达30个氨基酸长度。
13. 根据权利要求12所述的方法,其进一步包括将所述经处理的水应用于反渗透过滤器。
14. 一种防止或减少非动物体来源的外部流体中生物膜形成的方法,所述方法包含用无细胞毒性或细胞抑制活性且包含分离的肽的组合物处理所述流体,所述分离的肽由一序列组成,所述序列选自SEQ ID NO:34的截短序列且包括序列FDYNWY,其中所述肽是环状且多达30个氨基酸长度。
15. 根据权利要求14所述的方法,其进一步包括将所述流体应用于反渗透过滤器。
16. 根据权利要求12或14所述的方法,其中所述生物膜是由选自由细菌、真菌、原生动物和古生菌组成的群组的单细胞生物形成。
17. 根据权利要求16所述的方法,其中所述真菌包含酵母。
18. 根据权利要求2所述的方法,其中所述肽选自由CMFSVPFDYNWYSNWWC, CFSVPFDYNWYSNWWC和CFDYNWYC组成的群组。

用于防止细胞粘附的肽和组合物及其使用方法

[0001] 相关专利申请案的交叉参考

[0002] 本申请案是2009年9月23日申请的PCT/IB2009/006926的美国国家阶段,所述PCT/IB2009/006926主张2008年9月24日申请的美国临时申请案第61/136,673号的优先权,所有这些申请案都以全文引用的方式并入本文中,包括说明书、图式、权利要求书和摘要。

技术领域

[0003] 本发明涉及经分离的天然肽和其用于防止细胞粘附的用途。

背景技术

[0004] 微生物可以单个细胞形式在环境中自由游动,生存和繁殖(如浮游生物),或者其可生长成高度有组织的多细胞群落,装入自产聚合物基质(self-produced polymeric matrix)中,与表面和界面紧密缔合。后一种微生物生活方式被称为生物膜。生物膜的形成代表着一种古老的受保护的生存模式,其允许微生物在不利环境中存活,并使微生物能分散和定植形成新的小生镜[霍尔-斯德雷(Hall-Stoodley)等人,自然微生物学综述(Nat Rev Microbiol.) (2004) 2 (2):95-108]。

[0005] 生物膜的组成相当复杂,且不同微生物物种的组成不同,而且甚至同一物种在不同环境条件下的组成也不相同。尽管如此,生物膜的形成仍代表着微生物在环境中的正常生活方式,并且所有微生物都能够产生生物膜。先前的研究揭露,细菌生物膜的形成经过多个蛋白质图谱不同的发展阶段[索尔(Sauer)等人,细菌学杂志(J Bacteriol.) (2002) 184 (4):1140-54],从附着于表面开始,随后迁移并分化形成小菌落,最终变成熟,涉及基质聚合物的表达。处于每一生物膜阶段内的细菌都展现与浮游生物生长的相同群组细菌明显不同的表型,并具有与之明显不同的特性[索尔(Sauer)等人,细菌学杂志(J Bacteriol.) (2004) 186 (21):7312-26]。

[0006] 生物膜是导致人类全身感染(例如医院感染)的主要原因。在体内,生物膜可与组织(例如内耳、牙齿、牙龈、肺、心脏瓣膜和泌尿生殖道)缔合。实际上,预计人体65%的细菌感染都由生物膜引起。此外,在形成生物膜后,微生物倾向于改变其特征,有时这种改变是彻底的,以致当生物为附着或聚集生物膜形式时,通常能杀死悬浮培养物中的生物的抗生素剂量对这些微生物完全无效(美国专利第7189351号)。

[0007] 引入体内的产品(例如隐形眼镜、中心静脉导管、机械心脏瓣膜和起搏器)或提供进入体内的路径的产品所带来的一个主要问题是微生物感染和必定会形成生物膜。由于这些感染难以用抗生素进行治疗,故常常需要取出装置,而这会对患者带来创伤,并增加医疗成本。因此,对于这些医疗设备,此项技术中长期以来一直寻求使这些医疗设备和装置抗微生物的手段和方法。

[0008] PCT申请案第W0 06/006172号揭示了抗淀粉样蛋白试剂(诸如芳香族化合物)的用途,其可用于抑制生物膜的形成,或使现有生物膜崩解。所述申请案揭示,防止阿尔茨海默氏症(Alzheimer)形成淀粉样纤维的化合物可防止生物膜中纤维的形成,并且得出结论,具

有芳香族臂的氨基酸可有效对抗生物膜。然而,这一分析仍局限于全长序列。

发明内容

[0009] 本发明提供广谱天然因子,其可干扰多种微生物中生物膜形成的初始阶段。从这些天然因子中,分离出具有高度保守序列的肽,并且呈现合成构象的这些肽在防止微生物粘附方面显示出较高活性。在数种海洋微生物(包括各种已知种类的海葵)、数种鱼类(包括斑马鱼(*Danio rerio*/zebra fish))和藓类植物小立碗藓亚种(*Physcomitrella patens* subsp. *Patens*.)中都发现了这一保守序列。

[0010] 上文提到的所有因子所显示的活性都仅仅针对防止细菌基质粘附和由此引起的生物膜形成。这些因子没有常常会观察到的由抗生素肽和次级代谢物所显示的致死性细菌活性,其通过强烈的微生物的“生物潜能”对快速自然选择提供较强的选择压力。另一方面,针对细菌定植的多种抑制作用将拮抗细菌存活的基础机制。因此,因其生命力而不太可能适应性改变所述机制。

[0011] 肖尔(Sher)等人(毒素(*Toxicon*) 45:865-879,2005)使用生物信息学方法鉴别出了水螅表达的假定的生物活性蛋白质和多肽,其可作为其引诱系统(allomonal system)的组分。经显示,水螅可表达刺胞动物磷脂酶A2毒素和属于actinoporin家族的溶细胞素的直系同源物,并且表达与毒蛇类磷脂酶、富含半胱氨酸的分泌蛋白(cysteine-rich secretory proetin,CRISP)、类前动力蛋白多肽和有毒脱氧核糖核酸酶类似的蛋白质。

[0012] 迄今为止,在从天然来源分离的肽中负责细胞毒性活性的特定序列尚未鉴别出来。

[0013] 除非另作定义,否则本文中使用的所有科技术语都具有与本发明所属领域技术人员通常所了解相同的含义。尽管与本文中所述方法和材料类似或等效的方法和材料都可用于实施或测试本发明,但下文将描述适合的方法和材料。在出现矛盾的情况下,以本专利说明书(包括定义)为主。此外,材料、方法和实例只是说明性的,且不打算作限制。

[0014] 本文中使用的术语“包含”和“包括”应理解为详细说明所述特征、整数、步骤或组分,但不排除添加其一个或一个以上其它特征、整数、步骤、组分或群组。本术语涵盖术语“由……组成”和“基本上由……组成”。

[0015] 短语“基本上由……组成”当用于本文中时,应理解为详细说明所述特征、整数、步骤或组分,但不排除添加其一个或一个以上其它特征、整数、步骤、组分或群组,而这只有当所述其它特征、整数、步骤、组分或群组不会显著改变所主张的组合物、装置或方法的基本和新颖特征时才能满足。

[0016] 术语“方法”是指用于实现指定任务的方式、手段、技术和程序,包括(但不限于)化学、生物和生物物理技术领域从业人员已知或易于由已知方式、手段、技术和程序开发的方式、手段、技术和程序。

[0017] 本文中使用的术语“约”是指 $\pm 10\%$ 。

[0018] 本发明的其它特征和优势将从以下实施方式和权利要求书显而易见。

附图说明

[0019] 本文中将参照所附图式以举例方式描述本发明。现将详细说明各图式,应注意,所

示细节是示范性的,并且只是出于说明性论述本发明的优选实施例的目的,旨在提供被认为最有用且最易于理解的对本发明原理和概念方面的描述。为此,没有试图以比从根本上理解本发明所需的更多细节显示本发明的结构细节,结合图式进行的描述将使所属领域技术人员了解如何在实践中具体实施本发明的数种形式。

[0020] 图中:

[0021] 图1显示水溶性状态的成孔溶细胞素海葵溶细胞素(sticholysin)Ii中1GWY A链的晶体结构,活性区以黄色标示;

[0022] 图2显示水溶性状态的成孔溶细胞素海葵溶细胞素Ii中1GWY B链的晶体结构,活性区以黄色标示;

[0023] 图3显示真核成孔溶细胞素等指海葵毒素(equinatoxin)Ii的1KD6 A链的结构,活性区以黄色标示;

[0024] 图4显示等指海葵毒素突变体的三维构造,活性区以黄色标示;

[0025] 图5是显示不同浓度的合成蛋白在24小时内对绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*) ATCC 27853生长的影响的柱形图;无杀细菌或细菌生长抑制作用;

[0026] 图6是显示不同浓度的合成蛋白在24小时内对绿脓杆菌ATCC 27853引起的生物膜形成的影响的柱形图;

[0027] 图7是显示不同浓度的合成蛋白在24小时内对鲍氏不动杆菌(*Acinetobacter Baumannii*)的临床分离株生长的影响的柱形图;无杀细菌或细菌生长抑制作用;

[0028] 图8是显示不同浓度的合成蛋白在24小时内对鲍氏不动杆菌的临床分离株引起的生物膜形成的影响的柱形图;

[0029] 图9是显示选自等指海葵(*Actinia equina*)的触手部分对鲍氏不动杆菌引起的生物膜形成的影响的柱形图,其中PBS作为阳性对照物;

[0030] 图10是显示部分13对各种革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌引起的生物膜形成的影响的柱形图;

[0031] 图11是显示来自迎风海葵属(*Anemonia*)、垃圾葵属(*Aiptasia*)和小立碗藓属(藓类植物)的蛋白质浓度为50 μ g/m³的粗提取物对绿脓杆菌的影响的柱形图;

[0032] 图12是显示五种合成肽和来自藓类植物小立碗藓的粗物质的影响的柱形图;

[0033] 图13显示通过在葡聚糖凝胶(Sephadex) G-10柱上分离美丽海葵(*Aiptasia pulchella*)的粗提取物所得到的部分;

[0034] 图14显示通过再色谱分离图13中的高分子量部分得到的峰;

[0035] 图15显示利用c-18柱反相高效液相色谱(RP-HPLC)分离图14中的低分子量部分得到的部分;

[0036] 图16A-B显示根据本发明原理的肽的具有乳化剂臂的环状头的基本结构;和

[0037] 图17是显示产生具有乳化臂的环状肽的流程图。

具体实施方式

[0038] 本发明是包含经分离肽的组合物,所述经分离肽具有一个或一个以上与防止细菌基质粘附和由此引起的生物膜形成,以及任选防止细胞间粘附有关的作用。另外或其它,也可任选提供其它作用。在非限制性实例中,所述肽可从诸如水生生物和藓类植物等生物提

取,并任选且优选包含选自以下组成的群组的序列:YDYNWY、YDYNLY、FDYNFY、FDYNLY、FDYNWY、YDWNLY、YDWHLY和WDYNLY;和其使用方法。其它序列如下文所述。

[0039] 在医学方面,一个重要问题是微生物生物膜的形成。对于人类来说,生物膜是引起全身感染(例如医院感染)的原因,并且当将产品引入体内(例如隐形眼镜、中心静脉导管、机械心脏瓣膜和起搏器)时会成为关注的重点。

[0040] 在许多工业中,包括食品业、制药业、涂料工业、水、船业工程业,生物膜也是一个问题,其会带来多种不利的影响,包括加速工业系统的腐蚀、油酸化和生物污损。举例来说,在海洋或淡水环境中,包括冷却或脱盐设施、灌溉站和发电站中的冷却塔、水管和过滤器,以及膜,诸如用于废水和脱盐系统中的膜,生物粘附于任何表面都可能引起生物污损。在养鱼场的水产养殖系统中,也会发生生物污损。

[0041] 此外,全世界的商业船队每年要消耗约三亿吨燃料。如果不采取抗污损措施,燃料消耗将增加多达40%,相当于每年额外消耗一亿两千万吨燃料。在2000年,预计这一经济成本为约七十五亿美元;近来的预计值达到三百亿美元。

[0042] 由于在生物膜内生长的微生物高度组织,并且能经受不利的环境,诸如高温和抗微生物剂(例如抗生素),使得很难去除生物膜。

[0043] 海洋和淡水植物和生物,包括软体水生无脊椎动物、鱼类和藓类植物,都被多种微生物所包围。由于这些植物和生物缺乏特异性免疫,故其会产生数种可防止微生物定植于其体表上的因子。

[0044] 最“敏感”的生物是属于刺胞动物门的无脊椎动物,包括海葵、珊瑚、水母、水螅虫、水母体和海扇。这些软体生物没有物理防护,诸如鳞或壳,使用蛋白质和次级代谢物来保护其免受周围微生物环境影响。

[0045] 先前曾报导过,海洋生物(例如海绵动物)产生的次级代谢物展现出抗细菌和抗真菌活性[阿曼德(Amade)等人,同上文]。此外,也已经显示海葵(例如等指海葵)可产生有毒的成孔肽(即等指海葵毒素),与其它小的抗微生物肽类似,能溶解和杀死真核细胞[安德鲁斯(Anderluh)等人,同上文]。

[0046] 尽管此项技术中已知,多种蛋白质的全长序列都与其细胞溶解功能有关,但先前尚未鉴别出负责细胞溶解作用的特定肽。

[0047] 本发明者已经证实,使用液相色谱分离法从海葵获得的数个活性部分能够高水平防止微生物粘附于无生命表面。海葵包括46个科,可见于世界各地的水源。大部分海葵都是固着动物,具有专门的足用来将其锚定于软基质中,或使其附着于岩石和珊瑚上。属于不同属:等指海葵(*Actinia equine*)、垃圾葵属和迎风海葵属的数种海葵显示出抗粘附活性。经显示,海葵细胞毒素的N末端区与细胞毒性作用有关[参见:科瑞斯坦(Kristan K),博得思科(Podlasek Z),霍尼克(Hojnik V),古提雷兹-艾格雷(Gutierrez-Aguirre I),格尼卡(Gunčar G),特克(Turk D),刚撒雷兹-玛纳斯(Gonzalez-Manas JM),雷克(Lakey JH),马斯克(Maček P),安德鲁斯(Anderluh G) (2004):等指海葵毒素(一种真核成孔毒素)形成孔需要柔性N末端区和稳定的 β 夹层(Pore formation by equinatoxin, an eukaryotic pore-forming toxin, requires a flexible N-terminal region and a stable beta sandwich). 生物化学杂志(J Biol Chem.) 279 (45):46509-46517]。本发明者也已经从鱼类中鉴别出与海葵细胞毒素C末端区(不涉及细胞毒性的区域)具有某种类似之处的蛋白质。

这一蛋白质具有高度保守的区域,功能尚不了解,这一区域也是一个富含Trp的结构域,并且对于蛋白质结合脂质膜极为重要。本发明者还在藓类植物小立碗藓中发现这一区域。

[0048] 因此,本发明者假定,这一区域提供了一种对于防止生物膜形成特别有效的肽,而这种肽没有细胞毒性活性。本发明者已经表征和分离出一种具有高度有效的抗生物膜特性的天然肽,其包含选自由以下组成的群组的序列:YDYNWY、YDYNLY、FDYNFY、FDYNLY、WDYNLY、FDYNWY、YDWNLY和YDWHLY。

[0049] 根据一些实施例,所述肽包含由约30、约40或约50个氨基酸构成的一部分序列。

[0050] 根据一些实施例,所述肽选自由以下组成的群组:LFSVPYDYNWYSNWW、FSPVPYDYNLYSNWWMFSPVPFDYNFYSNWWMFSPVPFDYNLYSNWWMFSPVPFDYNLYTNWWMFSPVPFDYNLYSNWWMFSPVPFDYNLYKWNFMFSPVPFDYNLYKNWLMFSPVPFDYNWYSNWWLFSVPFDYNLYSNWWLFSVPYDYNWYSNWWMASIPYDWNLYQSWAMASIPYDWNLYSAWAMASIPYDWHLYNAWA。如下文和以下实例部分中所示,本发明者已经使用串联质谱(MS/MS)分析鉴别出从美丽海葵提取的活性部分。

[0051] 本发明者使用clustalW程序鉴别出数种海葵细胞毒素蛋白的具有生物意义的多重序列比对,并鉴别出适用于聚合酶链反应(PCR)的海葵细胞毒素通用引物。分别扩增来自两种不同海葵即垃圾葵和蛇发海葵(anemonia viridansm)的250bp细胞毒素蛋白质区的序列Eqt-F:GTR TCG ACA ACG AGT CRG G,和Eqt-R252:TGA CAT YCC ACC AGT TGC TG。将这些区域翻译成肽,并使用BlastX与基因库(genebank)相比较,显示这些区域是海葵细胞毒素的保守结构域的一部分。如下文实例部分中较为详细地论述以及图5到8中所示,本发明者比较了来自海葵和藓类植物的多种合成肽的活性,并且发现这些肽可防止生物膜形成[图6和8到12],但不能杀死或抑制细菌生长[图5和7]。

[0052] 对数种细菌物种展现抗粘附作用(图10),使得本发明者得出结论,活性物质不具有物种特异性,而是对多种微生物物种都具有活性。

[0053] 举例来说,已经在以下天然蛋白质中鉴别出保守肽区:

[0054]	LFSVPYDYNWYSNWW	EqT-IV
	FSPVPYDYNLYSNWW	Actinoporin Or-A
	MFSVPFDYNFYSNWW	来自公主海葵(Heteractis magnifica)的 HMg III
	MFSVPFDYNLYSNWW	Avt-I RTX-A
[0055]	MFSVPFDYNLYTNWW	Pstx20
	MWSVPFDYNLYSNWW	小立碗藓
	MFSVPWDYNLYKNWF	斑马鱼
	MFSVPFDYNLYKNWL	黑青斑河豚(Tetraodon nigroviridis)

[0056] 本发明的肽任选且优选包含序列CMFSVPFDYNWYSNWWC。本发明的肽任选且优选包含在具有约100到约300个氨基酸的蛋白质中。

[0057] 不希望受单一假定的限制,根据两种海葵细胞毒素(等指海葵毒素和海葵溶细胞素)的三维结构,如图1到4中所示,活性区是面向外的。

[0058] 图1和2分别显示了溶细胞素海葵溶细胞素Ii的1GWY的A链和B链的晶体结构。图3显示了真核成孔溶细胞素等指海葵毒素Ii的1KD6的A链的结构。

[0059] 图4描述了等指海葵毒素突变体的三维构造,其在8、18和69位引入了三个半胱氨酸(1TZQ的A链)。先前已经显示,这一突变体不具有溶血活性(科瑞斯坦(Kristan K),博得

思科(Podlesek Z),霍尼克(Hojnik V),古提雷兹-艾格雷(Gutierrez-Aguirre I),格尼卡(Gunčar G),特克(TurkD),刚撒雷兹-玛纳斯(Gonzalez-Manas JM),雷克(Lakey JH),马斯克(Maček P),安德鲁斯(Anderluh G)(2004):等指海葵毒素(一种真核成孔毒素)形成孔需要柔性N末端区和稳定的 β 夹层(Pore formation by equinatoxin,an eukaryotic pore-forming toxin,requires a flexible N-terminal region and a stable beta sandwich).生物化学杂志(J Biol Chem.) 279(45):46509-46517)。因此,这种蛋白质丧失其细胞毒性,但仍具有抗细胞粘附的活性。

[0060] 参照图式和随附描述可更好地理解本发明的原理和操作。

[0061] 在详细解释本发明的至少一个实施例之前,应了解,本发明的应用不局限于以下描述中所阐述或各实例中所示范的细节。本发明能够以各种方式实施或进行其它实施例。还应了解,本文中使用的措辞和术语都是出于描述的目的,并不应将其视为限制。

[0062] 根据本发明的一个方面,提供一种包含分离的天然肽的组合物,所述肽包含选自以下组成的群组的序列:YDYNWY、YDYNLY、FDYNFY、FDYNLY、WDYNLY、FDYNWY、YDWNLY和YDWHLY。

[0063] 根据本发明另一方面,提供一种防止单细胞生物粘附于表面的方法,所述方法包含使细胞与包含分离的天然肽的组合物接触,由此防止细胞粘附于表面,所述天然肽包含选自以下组成的群组的序列:YDYNWY、YDYNLY、FDYNFY、FDYNLY、WDYNLY、FDYNWY、YDWNLY和YDWHLY。

[0064] 根据本发明一些实施例,优选提供一种结构域,其包含至少一种上述肽且有效防止细胞粘附于表面。更优选所包括的结构域是蛋白质的一部分。任选且最优选这一结构域展现抗粘附特性,例如以便防止生物膜形成和/或处理生物膜,但不展现细胞毒性特性。

[0065] 示范性结构域的非限制性选择提供于下表中。

[0066]

结构域序列	物种
LFSVPYDYNWYSNWW	EqT-IV
FSVPYDYNLYSNWW	Actinoporin Or-A
MFSVPFDYNFYSNWW	来自公主海葵的HMg III
MFSVPFDYNLYSNWW	Avt-I RTX-A
MFSVPFDYNLYTNWW	Pstx20
MWSVPFDYNLYSNWW	小立碗藓
MFSVPWDYNLYKNWF	斑马鱼
MFSVPFDYNLYKNWL	黑青斑河豚

[0067] 本文中描述的其它示范性序列涉及以下序列:

[0068] MSRLIIIVFIVVTMICSATALPSKKIIDEDEEDEKRSADVAGAVIDGASLSFDILKTV
LEALGNVKKRIAVGVDNESGKTWTALNTYFRSGTSDIVLPHKVPHGKALLYNGQKDR
GPVATGAVGVLAYLMSDGNTLAVLFSVPYDYNWYSNWWNVRIYKGKRRADQRMYE
ELYYNLSPFRGDNGWHTRNLGYGLKSRGFMNSSGHAILEIHVSKA

[0069] 此序列的基因库寄存标识符为:

[0070] >gi|48428895|sp|P61914.1|ACTP2_ACTEQ等指海葵毒素-2前体(等指海葵毒素

II) (EqTII) (EqTII) 红海葵, 且为214个氨基酸长。此序列也任选为根据本发明的示范性序列。所述序列的38到213位对应于注释的结构域pfam06369, Anemone_cytotox, 即海葵细胞毒性蛋白; 因此, 上述序列中的这一部分也任选为根据本发明的示范性序列。

[0071] 在一些实施例中, 本发明也包括上述序列的任何相关序列。所述相关序列可任选通过运行任何类型的序列比较软件 (包括但不限于) BLASTP 来发现。下文将提供来自所选 taxa 的代表性片段以及其与EqTII (上述序列) 的比对结果。

[0072] 1. 海葵-

[0073] 1a. 加勒比海海葵 (Stichodactyla helianthus)

[0074] >gi|2815496|sp|P07845.2|ACTP2_STOHE海葵溶细胞素-2 (海葵溶细胞素II) (StnII) (溶细胞素StII) (溶细胞素III) (细胞毒素)

[0075] ALAGTIIAGASLTFQVLDKVLEELGKVSRIKIAVGIDNESGGTWTALNAYFRSGTTDIVLP

[0076] EFVPNTKALLYSGRKDTGPVATGAVAAAFAYYMSSGNTLGVMFSVPFDYNWYSNWW

[0077] VKIYSGKRRADQGMEDLYYGNPY

[0078] RGDNGWHEKNLGYGLRMKGIMTSAGEAKMQIKISR

[0079] 比对:

[0080] >sp|P07845.2|ACTP2_STOHE海葵溶细胞素-2 (海葵溶细胞素II) (StnII) (溶细胞素St II) (溶细胞素III) (细胞毒素)

[0081] 长度=175

[0082] 分值=253比特 (646), E值 (Expect) = 8e-66, 方法: 基于组成的统计学方法 (Composition-based stats)。

[0083] 一致性 (Identities) = 118/176 (67%), 正选择 (Positives) = 144/176 (81%), 空位 (Gaps) = 1/176 (0%)

[0084]

```
Query 38 DVAGAVIDGASLSFDILKTVLEALGNVKKIAVGVDNESGKTWTALNTYFRSGTSDIVLP 97
          +AG +I GASL+F +L VLE LG V RKIAVG+DNESG TWTALN YFRSGT+D++LP
```

```
Sbjct 1 ALAGTIIAGASLTFQVLDKVLEELGKVSRIKIAVGIDNESGGTWTALNAYFRSGTTDIVLP 60
```

```
Query 98 HKVPHGKALLYNGQKDRGPVATGAVGVLAYLMSDGNLAVLFVSPYDYNWYSNWWNVRIY 157
          VP+ KALLY+G+KD GPVATGAV AY MS GNTL V+FSVP+DYNWYSNWW+V+IY
```

```
Sbjct 61 EFVPNTKALLYSGRKDTGPVATGAVAAAFAYYMSSGNTLGVMFSVPFDYNWYSNWWVDVKIY 120
```

```
Query 158 KGKRRADQRMYYEELYYNLSPFRGDNGWHTRNLGYGLKSRGFMNSSGHAILEIHVSK 213
          GKRRADQ MYE+LYY +P+RGDNGWH +NLGYGL+ +G M S+G A ++I +S+
```

```
Sbjct 121 SGKRRADQGMEDLYYG-NPYRGDNGWHEKNLGYGLRMKGIMTSAGEAKMQIKISR 175
```

[0085] 2. 硬骨鱼

[0086] 2a. 斑马鱼

[0087] >gi|125821212|ref|XP_001342650.1|PREDICTED:假定蛋白[斑马鱼]

[0088] MTESAEAVAANVSSRRHATVEITNLNNYCFLNPKVYLENGETSNPPQPTVRPLKTEVCTFSKSAAHAT
G

[0089] SVGVLTYDLFERRRNDYTETLAIMFSVPWDYNLYKNWFAVG IYPKGKECDQALYKEMYYQKNQHGFVRE

E

[0090] ANGSGINFEGKNLDIRATMCPMGRAIVKVEVWDKLLSPMAQMDC

[0091] 比对:

[0092] >ref|XP_001342650.1|UniGene infoGene info PREDICTED:假定蛋白[斑马鱼]

[0093] 长度=184

[0094] 基因编号:100002992apn1|类actinoporin蛋白[斑马鱼]

[0095] 分值=199比特(505),E值=1e-49,方法:基于组成的统计学方法。

[0096] 一致性=49/167(29%),正选择=73/167(43%),空位=12/167(7%)

[0097]

```
Query 58 LEALGNVKKRIAVGVDNESG-KTWTALNTYFRSGTSDIVLPHKVPHGKALLYNGQKDRGP 116
      + A + +R V + N + + Y +G + V K + K
Sbjct 8 VAANVSSRRHATVEITNLTNNYCFLNPKVYLENGETSNPPQPTVRPLKTEVCTFSKSAAH 67
```

```
Query 117 VATGAVGVLAYLMSD-----GNTLAVLFSPYDYNWYSNWWNVRIYKGKRRADQRMYYE 170
      ATG+VGVL Y + + TLA++FSVP+DYN Y NW+ V IY + DQ +Y+E
Sbjct 68 -ATGSVGVLTLDLFERRRNDYTETLAIMFSVPWDYNLYKNWFAVGIYPKGKECDQALYKE 126
```

```
Query 171 LYYNLSPF---RGDNGWHTRNLGYGLKSRGFMNSSGHAILEIHVSK 213
      +YY + NG G L R M G AI+++ V
Sbjct 127 MYYQKNQHG FVREEANGSGINFEGKNLDIRATMCPMGRAIVKVEVWD 173
```

[0098] 2b.黑青斑河豚

[0099] >gi|47218822|emb|CAG02807.1|未命名的蛋白质产物[黑青斑河豚]

[0100] MESAEAVAADVSRSRSVTIEISNLTKNYCLINPRVYLESGETYNPPQPTVRPLMTEVCTFSKSSGIPTG
S

[0101] VGVLT YELLERRSTMLPETLAIMFSVPYDYSFYNNWFAVG IYETG TKCNEGLYKQMYNEKKQAEHGFVR

E

[0102] KANGSGIN YVGGNLDIRATMNPLGKAIMKVEVWD A FPFSE

[0103] 比对:

[0104] >emb|CAG02807.1|未命名的蛋白质产物[黑青斑河豚]

[0105] 长度=181

[0106] 分值=192比特(489),E值=1e-47,方法:基于组成的统计学方法。

[0107] 一致性=46/170(27%),正选择=76/170(44%),空位=14/170(8%)

[0108]

Query 58 LEALGNVKKRIAVGVNDNES-GKTWTALNTYFRSGTSDIVLPHKVPHGKALLYNGQKDRGP 116
+ A + R + + + N + Y SG + V + K G

Sbjct 7 VAADVSRSRSVTIEISNLTKNYCLINPRVYLESGETYNPPQPTVRPLMTEVCTFSKSSG- 65

Query 117 VATGAVGVLAYLMSD-----GNTLAVLFSVPYDYNWYSNWWNVRIYKGRRADQORMYEE 170
+ TG+VGVL Y + + TLA++FSVPYDY++Y+NW+ V IY+ + ++ +Y++

Sbjct 66 IPTGSVGVLTLYELLERRSTMLPETLAIMFSVPYDYSFYNNWFAVGIIYETGTCNEGLYKQ 125

Query 171 LYYNLSPF-----RGDNGWHTRNLGYGLKSRGFMNSSGHAILEIHVSKA 214
+Y NG +G L R MN G AI+++ V A

Sbjct 126 MYNEKKQAEHGFVREKANGSGINYPVGGNLDIRATMNPLGKAIMKVEVWDA 175

[0109] 3. 藓类植物

[0110] 3a. 小立碗藓

[0111] >gi|168060237|ref|XP001782104.1|预测的蛋白质[小立碗藓亚种]

[0112] MVVHLIAMGLRYSETIMKTARMAEAIIPAAELSIKTLQNIPEGITGVDRKIAIGFKNLTDYTLENLGVY
F

[0113] NSGSSDRSIAYKINAQEALLFSARKSDHTARGETVGTFSYIIQDEDKTVHVMWSVPFDYNLYSNWWNI
AV

[0114] DGRQPPDSNVHDNLYNGSGGMPYPNKPQYINNEQKGFHLFGSMTNNGQATIEVELKKA

[0115] >ref|XP_001782104.1|基因信息预测的蛋白质 (Gene info predicted protein)
[小立碗藓亚种]gb|EDQ53098.1|基因信息预测的蛋白质[小立碗藓亚种]

[0116] 长度=199

[0117] 基因编号:5945292PHYPADRAFT_61094|假定蛋白[小立碗藓亚种]

[0118] 分值=230比特 (58), E值=7e-59, 方法:基于组成的统计学方法。

[0119] 一致性=63/183 (3%), 正选择=101/183 (55%), 空位=4/183 (2%)

[0120]

Query 35 RSADVAGAVIDGASLSFDILKTVLEALGNVKKRIAVGVNDNESGKTWTALNTYFRSGTSDI 94
++A +A A+I A LS L+ ++E + V RKIA+G N + T L YF SG+SD

Sbjct 18 KTARMAEAIIPAAELSIKTLQNIPEGITGVDRKIAIGFKNLTDYTLENLGVYFNSGSSDR 77

Query 95 VLP HKVPHGKALLYNGQKDRGPVATGAVGVLAYLMSD-GNTLAVLFSVPYDYNWYSNWWN 153
+ +K+ +ALL++ +K A G VG +Y + D T+ V++SVP+DYN YSNWWN

Sbjct 78 SIAYKINAQEALLFSARKSDH-TARGETVGTFSYIIQDEDKTVHVMWSVPFDYNLYSNWWN 136

Query 154 VRIYKGRRADQORMYEELYYNL--SPFRGDNGWHTRNLGYGLKSRGFMNSSGHAILEIHV 211
+ + G++ D +++ LY P+ + N G G M ++G A +E+ +

Sbjct 137 IAVVDGRQPPDSNVHDNLYNGSGGMPYPNKPQYINNEQKGFHLFGSMTNNGQATIEVEL 196

Query 212 SKA 214
KA

Sbjct 197 KKA 199

[0121] 4. 鸟类

[0122] 4a. 原鸡 (*Gallus gallus*)

[0123] >gi|118129726|ref|XP_001231839.1|PREDICTED:假定蛋白同工型1[原鸡]

[0124] MPPKEKKENDKPCNDNCQPKPQGGKGVESLMKNIDVCRSVGLEIINRTRTVTLTDFRSYCFSGKIVTTLP
F

[0125] EIGPDSKGICIFAKTPYSLRGSVGTVVCKADTFFLAITFSNPYDYILYKIEFALEIFTEPNHLGNLGDV
F

[0126] SKMMKSKPYCGSSLFQRAVLESEHETLEVSKGSIRVQAKMSNNRKAILKVQVEDMDPPPYSKGM

[0127] >ref|XP_001231839.1|UniGene infoGene info PREDICTED:假定蛋白同工型1
[原鸡]

[0128] 长度=204

[0129] 基因编号:769729LOC769729|假定蛋白LOC769729[原鸡]

[0130] 分值=150比特 (378), E值=9e-35, 方法:基于组成的统计学方法。

[0131] 一致性=33/172 (19%), 正选择=63/172 (36%), 空位=22/172 (12%)

[0132]

Query 58 LEALGNVKKRIAVGVDNES-GKTWTALNTYFRSGTSDIVLPHKVPHGKALLYNGQKDRGP 116

L +V R + + + N + T T +Y SG LP ++ + K

Sbjct 29 LMKNIDVCRSVGLEIINRTRTVTLTDFRSYCFSGKIVTTLPFEIGPDSKGICIFAKTP-Y 87

Query 117 VATGAVGVLAYLMSDGNTLAVLFSPYDYNWYSNWWNVRIYKGRADQ-----RMYEEL 171

G+VG + +D LA+ FS PYDY Y + + I+ + ++ ++

Sbjct 88 SLRGSVGTVVCK-ADTFFLAITFSNPYDYILYKIEFALEIF---TEPNHLGNLGDVFSKM 143

Query 172 YYNLSPPFRG-----DNGWHTRNLGYGLKSRGFMNSSGHAILEIHVSK 213

P+ G

++ + M+++ AIL++ V

Sbjct 144 MK-SKPYCGSSLFQRAVLESEHETLEVSKGSIRVQAKMSNNRKAILKVQVED 194

[0133] 5. 鸭嘴兽

[0134] 5a. 鸭嘴兽 (*Ornithorhynchus anatinus*)

[0135] >gi|149491241|ref|XP_001516906.1|PREDICTED:假定蛋白[鸭嘴兽]

[0136] MAQTIEHLVHEVEAGRCVGIEITNTTNMTFRSPRTFCFSGHTLTPPTPIIHPNNAAGFCIFVKKFSLRG
S

[0137] VGLLVYEIEDQTLAIMFSNPFIDYNFFKVEFAVALSGYKEETQDLKAFFELLYHEKQKGWLKMAKEKLCE
C

[0138] QCPVSLENNGIRVTATMSNNAKAIKLSPPDAKPPEGDVADVQPTTVRRPNPPFPSPRPRIGSDLTGD
Q

[0139] LATLDFESGK

[0140] >ref|XP_001516906.1|Gene info PREDICTED:假定蛋白[鸭嘴兽]

[0141] 长度=220

[0142] 基因编号:100086848LOC100086848|假定蛋白LOC100086848[鸭嘴兽]

[0143] 分值=168比特(426),E值=2e-40,方法:基于组成的统计学方法。

[0144] 一致性=36/167(21%),正选择=69/167(41%),空位=12/167(7%)

[0145]

```
Query 58 LEALGNVKKRIAVGVNDNESGKTWTALNTYFRSGTSDIVLPHKVPHGKALLYNGQKDRGPV 117
          L      R + + + N + T+ + T+ SG +      + A      K R
```

```
Sbjct 8 LVHEVEAGRCVGIETNTNTNMTFRSPRTFCFSGHTLTPPTPIIHPNNAGFCIFVK-RKFS 66
```

```
Query 118 ATGAVGVLAYLMSDGNTLAVLFSVPYDYNWYSNWWNVRI--YKGKRRADQRMYEELYYNL 175
          G+VG+L Y + D TLA++FS P+DYN++ + V + YK + + + +E LY+
```

```
Sbjct 67 LRGSVGLLVYEIED-QLTAIMFSNPFDDYNFFKVEFAVALSGYKEETQDLKAFFELLYHEK 125
```

```
Query 176 -----SPFRGDNGWHTRNLYGLKSRGFMNSSGHAILEIHVSKA 214
          +      G++ M+++ AI+++ A
```

```
Sbjct 126 QKGWLKMAKEKLCECQCPVSLNNGIRVTATMSNNAKAIKLSPPDA 172
```

[0146] 本文中使用的术语“分离的”是指组合物已经从其活体内位置(例如水生生物或藓类植物)移出。优选本发明的分离的组合物实质上不含存在于其活体内位置的其它物质(例如,其它不包含抗粘附作用的蛋白质)(即,经纯化或半纯化)。

[0147] 本文中使用的短语“水生生物”是指生活于含水环境(海洋或淡水)中的生物,诸如鱼类或固着水生生物。

[0148] 本文中使用的短语“固着水生生物”是指生命周期的至少某一部分不能自由移动的水生生物。固着水生生物通常因身体锚定于某种固体基质(诸如岩石或船身)或出于任何其它原因(例如石头鱼)而持久地附着于基质。

[0149] 示范性固着生物包括(但不限于)固着型刺胞动物,诸如珊瑚、海葵(例如红海葵和美丽海葵)、海鳃、水生固着型幼虫(例如水母幼虫)、千手海葵(tube dwelling anemone)和水螅虫(例如绿水螅(*Chlorohydra viridissima*)和普通水螅(*Hydra vulgaris*))。

[0150] 可用于本发明实施例中的示范性鱼类优选为栖息于浅水中的鱼类,或潜藏在海洋底层,有时潜藏在孔穴或洞穴中的鱼类。所述鱼包括鳗鱼和鲶鱼。

[0151] 本文中使用的词语“藓类植物”是指苔藓植物门(bryophyta division)的非维管植物,包括藻苔纲(takakiposida)、泥炭藓纲(sphagnopsida)、黑藓纲(andreaeopsida)、黑真藓纲(andreaebryopsida)、polytirchopsida或真藓植物纲(bryopsisa)。

[0152] 藓类植物包含例如小立碗藓、葫芦藓(*Funaria hygrometrica*);真核生物(Eukaryota);绿色植物(Viridiplantae);链形植物(Streptophyta);胚生植物(Embryophyta);苔藓植物(Bryophyta);藓类植物总纲V(Moss Superclass V);真藓植物纲;葫芦藓亚纲(Funariaceae);葫芦藓目(Funariaceae);或小立碗藓属。

[0153] 本发明组合物也可使用遗传工程改造技术(例如使用转基因水生固着生物)在活体内表达。

[0154] 根据本发明一些实施例,本发明组合物无细胞毒性或细胞抑制活性,例如其不具有杀细菌或细菌生长抑制活性。

[0155] 根据本发明一些实施例,本发明组合物耐冻干,例如其在冷冻干燥后仍保留活性。

[0156] 本文中使用的短语“单细胞生物”是指单细胞的生物,也称为微生物。本发明的单

细胞生物可以是真核单细胞生物(例如原生生物,或真菌,例如酵母)或原核单细胞生物(例如细菌或古生菌)。本发明的单细胞生物可以处于任何细胞环境中,诸如在生物膜中、呈分离的细胞或呈细胞悬浮液形式。

[0157] 本文中使用的术语“生物膜”是指使微生物分散和/或形成集落的细胞外基质。生物膜通常是由多糖和其它高分子构成。

[0158] 可根据本发明方法防止粘附的示范性细菌细胞包括革兰氏阳性(gram positive)细菌和革兰氏阴性(gram negative)细菌。

[0159] 本文中使用的术语“革兰氏阳性细菌”是指以具有肽聚糖以及多糖和/或磷壁酸作为细胞壁结构的一部分为特征且以在革兰氏染色程序中出现蓝紫色反应为特征的细菌。代表性革兰氏阳性细菌包括:放线杆菌属(*Actinomyces* spp.)、炭疽杆菌(*Bacillus anthracis*)、双歧杆菌属(*Bifidobacterium* spp.)、肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*)、产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)、梭菌属(*Clostridium* spp.)、破伤风梭菌(*Clostridium tetani*)、白喉杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*)、杰氏棒杆菌(*Corynebacterium jeikeium*)、粪肠菌(*Enterococcus faecalis*)、屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)、红斑丹毒丝菌(*Erysipelothrix rhusiopathiae*)、真杆菌属(*Eubacterium* spp.)、阴道加德纳氏菌(*Gardnerella vaginalis*)、麻疹孪生球菌(*Gemella morbillorum*)、明串珠菌属(*Leuconostoc* spp.)、脓肿分枝杆菌(*Mycobacterium abscessus*)、鸟分枝杆菌复合菌组(*Mycobacterium avium* complex)、龟分枝杆菌(*Mycobacterium chelonae*)、偶然分枝杆菌(*Mycobacterium fortuitum*)、嗜血流感杆菌(*Mycobacterium haemophilum*)、堪萨斯分枝杆菌(*Mycobacterium kansasii*)、麻风分枝杆菌(*Mycobacterium leprae*)、海洋分枝杆菌(*Mycobacterium marinum*)、瘰癧分枝杆菌(*Mycobacterium scrofulaceum*)、耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)、土地分支桿菌(*Mycobacterium terrae*)、结核杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、溃疡分枝杆菌(*Mycobacterium ulcerans*)、诺卡氏菌属(*Nocardia* spp.)、黑色消化球菌(*Peptococcus niger*)、消化链球菌属(*Peptostreptococcus* spp.)、丙酸杆菌属(*Propionibacterium* spp.)、藤黄八叠球菌(*Sarcina lutea*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、耳葡萄球菌(*Staphylococcus auricularis*)、头状葡萄球菌(*Staphylococcus capitis*)、科氏葡萄球菌(*Staphylococcus cohnii*)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、溶血葡萄球菌(*Staphylococcus haemolyticus*)、人葡萄球菌(*Staphylococcus hominis*)、路邓葡萄球菌(*Staphylococcus lugdanensis*)、解糖葡萄球菌(*Staphylococcus saccharolyticus*)、腐生葡萄球菌(*Staphylococcus saprophyticus*)、施氏葡萄球菌(*Staphylococcus schleiferi*)、模仿葡萄球菌(*Staphylococcus similans*)、沃氏葡萄球菌(*Staphylococcus warneri*)、木糖葡萄球菌(*Staphylococcus xylosus*)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*) (B型链球菌)、咽峡炎链球菌(*Streptococcus anginosus*)、牛链球菌(*Streptococcus bovis*)、狗链球菌(*Streptococcus canis*)、马链球菌(*Streptococcus equi*)、米氏链球菌(*Streptococcus milleri*)、轻型链球菌(*Streptococcus mitior*)、变性链球菌(*Streptococcus mutans*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*) (A型链球菌)、唾液链球菌(*Streptococcus salivarius*)、血链球菌(*Streptococcus sanguis*)。

[0160] 本文中使用的术语“革兰氏阴性细菌”是指以在各细菌细胞周围存在双层膜为特征的细菌。代表性革兰氏阴性细菌包括醋酸钙不动杆菌 (*Acinetobacter calcoaceticus*)、鲍氏不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*)、伴放线菌放线杆菌 (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*)、嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)、木糖氧化产碱菌 (*Alcaligenes xylosoxidans*)、类杆菌属 (*Bacteroides*)、脆弱类杆菌 (*Bacteroides fragilis*)、杆菌状巴尔通氏体 (*Bartonella bacilliformis*)、博德特氏菌属 (*Bordetella* spp.)、包柔氏螺旋体菌 (*Borrelia burgdorferi*)、卡他布兰汉氏菌 (*Branhamella catarrhalis*)、布鲁氏菌属 (*Brucella* spp.)、弧菌属 (*Campylobacter* spp.)、肺炎披衣菌 (*Chlamydia pneumoniae*)、鹦鹉热披衣菌 (*Chlamydia psittaci*)、沙眼披衣菌 (*Chlamydia trachomatis*)、紫色色杆菌 (*Chromobacterium violaceum*)、柠檬酸杆菌属 (*Citrobacter* spp.)、侵蚀艾肯菌 (*Eikenella corrodens*)、产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、脑膜炎败血黄杆菌 (*Flavobacterium meningosepticum*)、梭杆菌属 (*Fusobacterium* spp.)、流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*)、嗜血菌属 (*Haemophilus* spp.)、幽门螺旋菌 (*Helicobacter pylori*)、肺炎克氏杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella* spp.)、退伍军人杆菌属 (*Legionella* spp.)、钩端螺旋体属 (*Leptospira* spp.)、卡他莫拉菌 (*Moraxella catarrhalis*)、摩根氏菌 (*Morganella morganii*)、肺炎霉浆菌 (*Mycoplasma pneumoniae*)、淋病奈瑟氏菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎奈瑟氏菌 (*Neisseria meningitidis*)、多杀巴斯德杆菌 (*Pasteurella multocida*)、类志贺邻单胞菌 (*Plesiomonas shigelloides*)、普雷沃氏菌属 (*Prevotella* spp.)、变形杆菌属 (*Proteus* spp.)、雷氏普罗威登斯菌 (*Providencia rettgeri*)、绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas* spp.)、普氏立克次氏体 (*Rickettsia prowazekii*)、立氏立克次氏体 (*Rickettsia rickettsii*)、罗卡利马氏体菌属 (*Rochalimaea* spp.)、沙门氏菌属 (*Salmonella* spp.)、伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhi*)、粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*)、志贺氏菌属 (*Shigella* spp.)、宋内志贺氏菌 (*Shigella sonnei*)、斑点病密螺旋体 (*Treponema carateum*)、梅毒密螺旋体 (*Treponema pallidum*)、地方性梅毒密螺旋体 (*Treponema pallidum endemicum*)、极细密螺旋体 (*Treponema pertenuis*)、韦荣氏菌属 (*Veillonella* spp.)、霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*)、创伤弧菌 (*Vibrio vulnificus*)、结肠炎耶尔森氏菌 (*Yersinia enterocolitica*)、鼠疫耶尔森氏菌 (*Yersinia pestis*)。

[0161] 本文中使用的术语“真菌”是指以存在几丁质细胞壁以及在大部分物种中以多细胞菌丝形式丝状生长为特征的异养生物。可根据本发明方法防止粘附的代表性真菌包括白色念珠菌 (*Candida albicans*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、光滑念珠菌 (*Candida glabrata*)、近平滑念珠菌 (*Candida parapsilosis*) 和都柏林念珠菌 (*Candida dubliniensis*)。

[0162] 本文中使用的短语“防止粘附”是指减少或消除细胞附着于表面 (例如通过降低在表面上的生长速率)。如利用细胞粘附分析所测量, 本发明组合物优选防止多达10%、更优选防止20%、更优选防止30%、更优选防止40%、更优选防止50%、更优选防止60%、更优选防止70%、更优选防止80%、更优选防止90%的细胞粘附, 且最优选防止100%细胞粘附。示范性细胞粘附分析将于下文中和下文实例部分中描述。应理解, 本发明组合物也能够防止细胞集合

(即,细胞不能集合于表面)。

[0163] 本发明涵盖防止细胞粘附于多种表面,包括织物、纤维、泡沫材料、薄膜、混凝土、砖石建筑、玻璃、金属、塑料、聚合物等。

[0164] 根据一个实施例,所述表面包含在易于形成生物膜的装置中。表面涵盖在本发明中的示范性装置包括(但不限于)容器外壳、汽车表面、飞机表面、膜、过滤器和工业设备。

[0165] 所述表面也可包含在医疗装置、仪器和植入物中。所述医疗装置、仪器和植入物的实例包括能够暂时或持久地植入哺乳动物生物(例如人类)体内的任何物品。可根据本发明使用的代表性医疗装置、仪器和植入物包括例如中心静脉导管、导尿管、气管插管、机械心脏瓣膜、起搏器、血管移植物、支架和人工关节。防止细胞粘附于医疗装置的方法和其它实例将于下文中描述。

[0166] 根据另一实施例,所述表面是包含在生物组织中,诸如哺乳动物组织,例如皮肤。

[0167] 如所提到的,通过使细胞与来自生物物的能够防止细胞粘附于表面的组合物接触,可实现本发明的方法。

[0168] 本文中使用的术语“接触”是指定位本发明的组合物,以致所述组合物可通过使其内包含的活性剂能防止细胞粘附的方式与粘附的细胞直接或间接接触。因此,本发明涵盖将本发明组合物施用于想要的表面和/或直接施用于粘附的细胞。

[0169] 所述接触可以在活体内(即,在哺乳动物体内)、离体(即,在从体内取出的细胞中)和/或活体外(即,哺乳动物身体外部)实现。

[0170] 组合物与表面的接触可以使用此项技术中已知的任何方法实现,包括喷雾、散布、润湿、浸泡、浸渍、涂漆、超声波焊接、焊接、粘结或粘附。本发明的组合物可以单层或多层形式附着。

[0171] 根据一个实施例,本发明组合物可包含在整个活生物中。例如,本发明涵盖将活的水生生物添加到水下环境中,以使其能够接触表面和/或与其粘附的细胞(例如水下管道、船身),由此防止微生物粘附。应理解,活性剂可以由水生生物分泌。在此情况下,水生生物无需与表面或微生物细胞直接接触,但要足够接近,以便活性剂能够扩散到其作用位点。因此,本发明组合物可分泌到水中,并用于水纯化处理过程,诸如海水或微咸水的脱盐。

[0172] 根据本发明另一方面,提供一种医药组合物,其包含医药学上可接受载剂或稀释剂,以及作为活性成分的分离的天然肽分离的肽,所述肽包含选自由以下组成的群组的序列:YDYNWY、YDYNLY、FDYNFY、FDYNLY、WDYNLY、FDYNWY、YDWNLY和YDWHLY,或本文中描述的任何其它序列。

[0173] 根据本发明其它实施例,可任选改变上述肽,以形成非肽类似物,包括(但不限于)用不太易变化的键替换一个或一个以上键、环化(如下文较为详细地描述)等。其它或另外,如例如PCT申请案第W0/2007/147098号(以引用的方式并入本文中,引用程度就如同完整阐述于本文中一般)中所述,可任选通过计算机建模将肽转化成小分子。

[0174] “模拟肽有机部分(peptidomimetic organic moiety)”可任选以保守和非保守性取代方式取代本发明肽中的氨基酸残基。这些部分也称为“非天然氨基酸”,并且能任选置换氨基酸残基、氨基酸或在肽内充当间隔基团代替缺失的氨基酸。模拟肽有机部分的空间、电子或构型特性任选且优选类似于被置换的氨基酸,并且这些模拟肽是用于置换必要位置的氨基酸,且被视为保守性取代。然而,这些类似性未必需要。使用模拟肽的唯一限制是,与

本发明的天然肽相比较,这种组合物至少实质上保留其生理学活性。

[0175] 模拟肽可任选用于抑制酶或其它降解过程所引起的肽降解。模拟肽可任选且优选利用有机合成技术产生。适合模拟肽的非限制性实例包括相应L氨基酸的D氨基酸、四唑(扎博茨基(Zabrocki)等人,美国化学协会杂志(J.Am.Chem.Soc.) 110:5875-5880(1988))、酰胺键的电子等排体(琼斯(Jones)等人,四面体通讯(Tetrahedron Lett.) 29:3853-3856(1988))、LL3氨基2丙烯酮6甲酸(LL3amino2propenidone6carboxylic acid,LLAcp)(坎普(Kemp)等人,有机化学杂志(J.Org.Chem.) 50:5834-5838(1985))。类似类似物显示于以下文献中:坎普(Kemp)等人,四面体通讯(Tetrahedron Lett.) 29:5081-5082(1988),以及坎普等人,四面体通讯,29:5057-5060(1988);坎普等人,四面体通讯,29:4935-4938(1988)和坎普等人,有机化学杂志(J.Org.Chem.) 54:109-115(1987)。其它适合的示范性模拟肽显示于以下文献中:永井(Nagai)和佐藤(Sato),四面体通讯(Tetrahedron Lett.) 26:647-650(1985);戴马欧(Di Maio)等人,化学协会杂志.帕尔金汇刊(J.Chem.Soc.Perkin Trans.), 1687(1985);卡恩(Kahn)等人,四面体通讯,30:2317(1989);奥尔森(Olson)等人,美国化学协会杂志(J.Am.Chem.Soc.) 112:323-333(1990);盖维(Garvey)等人,有机化学杂志(J.Org.Chem.) 56:436(1990)。其它适合的示范性模拟肽包括羟基1,2,3,4四氢异喹啉3甲酸酯(三宅(Miyake)等人,武田研究实验室杂志(J.Takeda Res.Labs) 43:53-76(1989));1,2,3,4四氢-异喹啉3甲酸酯(卡兹米尔斯基(Kazmierski)等人,美国化学协会杂志(J.Am.Chem.Soc.) 133:2275-2283(1991));组氨酸异喹啉酮甲酸(histidine isoquinolone carboxylic acid,HIC)(扎赫尔(Zechel)等人,国际肽和蛋白质研究杂志(Int.J.Pep.Protein Res.) 43(1991));(2S,3S)甲基苯丙氨酸、(2S,3R)甲基苯丙氨酸、(2R,3S)甲基苯丙氨酸和(2R,3R)甲基苯丙氨酸(卡兹米尔斯基(Kazmierski)和赫鲁拜(Hruby),四面体通讯(Tetrahedron Lett.) (1991))。

[0176] 示范性、说明性但非限制性非天然氨基酸包括 β -氨基酸(β 3和 β 2)、高氨基酸、环状氨基酸、芳香族氨基酸、Pro和Pyr衍生物、3-取代的丙氨酸衍生物、甘氨酸衍生物、环经取代的Phe和Tyr衍生物、线性核氨基酸或二氨基酸。这些氨基酸可从多种供应商获得,诸如美国的西格玛-阿尔德里奇公司(Sigma-Aldrich)。

[0177] 在本发明中,肽的任何部分可任选经化学修饰,即,通过添加官能团进行改变。如果化学合成过程继之以例如添加经化学修饰的氨基酸,那么所述修饰可任选在合成分子期间进行。然而,当氨基酸已经存在于分子中时,也可能对所述氨基酸进行化学修饰(“原位”修饰)。

[0178] 所述分子任一序列区的氨基酸都可任选根据以下示范性修饰类型中的任一种进行修饰(在肽中,概念上视为“化学修饰”)。非限制性示范性修饰类型包括羧甲基化、酰化、磷酸化、糖基化或脂肪酰化(fatty acylation)。可任选使用醚键将丝氨酸或苏氨酸羟基与糖羟基连接。可任选使用酰胺键将谷氨酸或天冬氨酸的羧基与糖上的氨基连接(盖格(Garg)和杰诺兹(Jeanloz),碳水化合物化学与生物化学进展(Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry),第43卷,学术出版社(Academic Press)(1985);昆兹(Kunz),德国应用化学杂志(英文版)(Ang.Chem.Int.Ed.English) 26:294-308(1987))。也可任选在氨基酸与碳水化合物之间形成缩醛和缩酮键。举例来说,可任选通过酰化游离氨基(例如赖氨酸)来制备脂肪酸酰基衍生物(托斯(Toth)等人,肽:化学、结构和生物学

(Peptides:Chemistry,Structure and Biology),瑞文(Rivier)和马萨尔(Marshall)编, ESCOM出版社(ESCOM Publ.),莱顿(Leiden),1078-1079(1990))。

[0179] 当涉及本发明的肽时,本文中使用的术语“化学修饰”是指利用天然过程(诸如加工或其它翻译后修饰)或利用此项技术中众所周知的化学修饰技术来修饰肽中至少一个氨基酸残基。多种已知的修饰的实例通常包括(但不限于):乙酰化、酰化、酰胺化、ADP-核糖基化、糖基化、GPI锚形成(GPI anchor formation)、共价连接脂质或脂质衍生物、甲基化、十四烷基化、聚乙二醇化、异戊烯化、磷酸化、泛素化或任何类似方法。

[0180] 根据本发明这一方面的一些实施例,提供一种预防或治疗有需要个体的病原体感染的方法,所述方法包含投予个体治疗有效量的医药组合物,由此治疗或预防所述病原体感染。

[0181] 根据本发明这一方面的其它实施例,提供一种防止外源性细菌附着于胃肠道的办法。

[0182] 哺乳动物的胃肠道含有多种固有的微生物群落,来抵抗肠道病原体的定植。代之以使宿主对病原体的防御增强,固有的微生物群落可以使用营养丰富的稳定环境,并由此与宿主的肠道建立共生关系。

[0183] 共生细菌在高亲和力、受体介导的附着的作用下附着于人体胃肠上皮细胞。相比之下,外源性细菌则以低亲和力机制附着于上皮细胞。不希望受单一假定的限制,预期本发明组合物可选择性防止或减少此低亲和力附着,由此防止生物膜形成的初始步骤。

[0184] 因此,本发明组合物适用于治疗或预防胃肠道疾病,诸如克隆氏病(Crohn's disease),或溃疡性结肠炎,包括例如胶原性结肠炎、淋巴细胞性结肠炎、缺血性结肠炎、分流结肠炎、感染性结肠炎和白塞氏综合症(Behcet's syndrome)。

[0185] 本文中使用的“医药组合物”是指由一种或一种以上本文中描述的活性成分与其它化学组分(诸如生理学上适合的载剂和赋形剂)构成的制剂。医药组合物旨在便利将化合物投予生物。

[0186] 本文中使用的术语“活性成分”是指可负责预定生物作用的生物组合物(和由其纯化的试剂)。

[0187] 下文中,短语“生理学上可接受载剂”与“医药学上可接受载剂”可互换使用,意思指不会对生物带来显著刺激且不会消除所投予化合物的生物活性和特性的载剂或稀释剂。在这些短语中包括佐剂。

[0188] 本文中术语“赋形剂”是指添加到医药组合物中用于进一步便利投予活性成分的惰性物质。赋形剂的实例(不限于)包括碳酸钙、磷酸钙、各种糖和各种类型的淀粉、纤维素衍生物、明胶、植物油,及聚乙二醇。

[0189] 有关调配和投予药物的技术可见于最新一版的“雷氏药学大全(Remington's Pharmaceutical Sciences)”,默克出版公司(Mack Publishing Co.),宾夕法尼亚州伊斯顿(Easton,PA),其以引用的方式完整并入本文中且下文将作进一步描述。

[0190] 如所提到的,本发明医药组合物可投予有需要个体,以便预防或治疗病原体感染。

[0191] 本文中使用的术语“有需要个体”是指哺乳动物,优选人类个体。

[0192] 本文中使用的术语“治疗”是指治愈、逆转、削弱、减轻、最小化、抑制或停止病原体感染的有害影响。

[0193] 本文中使用的短语“病原体感染”是指由病原体生物引起的任何医学病状。病原体感染的实例包括(但不限于)慢性感染性疾病、亚急性感染性疾病、急性感染性疾病、病毒病、细菌病、原生生物疾病、寄生虫病、真菌疾病、支原体病、古生菌病和朊病毒病。

[0194] 根据一个实施例,病原体感染是由能够在生物膜中或生物膜上生长的生物引起。

[0195] 由微生物生物膜引起的病原体感染的实例包括自体瓣膜心内膜炎(native valve endocarditis,NVE)、中耳炎(otitis media,OM)、慢性细菌性前列腺炎、囊肿性纤维化(cystic fibrosis,CF)和牙周炎。并非特别归咎于生物膜的其它病原体感染包括(但不限于)泌尿道感染、女性生殖道感染和肺炎。由植入医疗装置引起的感染包括血管导管感染、人工血管感染(arterial prosthetic infection)、人工心脏瓣膜感染、人工关节感染、中枢神经系统分流器感染、矫形植入物感染、起搏器和除颤器感染、血液透析和腹膜透析感染、眼睛感染、尿道感染、女性生殖道感染、气管插管相关性感染,以及气管造口术和牙科感染。

[0196] 本文中使用的短语“病原生物”是指能够引起疾病的任何单细胞生物,尤其是活微生物,诸如细菌或真菌。优选的病原生物能够在生物膜中或生物膜上生长。许多常见的病原生物是以生物膜形式存在于哺乳动物(例如人类)体内,并引起疾病。这些生物包括(但不限于)溶血性曼氏杆菌(*Mannheimia haemolytica*)和多杀巴斯德杆菌(引起肺炎);坏疽梭杆菌(*Fusobacterium necrophorum*) (引起肝脓肿);金黄色葡萄球菌和绿脓杆菌(引起伤口感染);大肠杆菌和沙门氏菌属(引起肠炎);金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌(引起OM);以及链球菌属(*Streptococci* sp.)、葡萄球菌属(*Staphylococci* sp.)、念珠菌属(*Candida*)和曲霉属(*Aspergillus* sp.) (引起NVE)。

[0197] 应理解,根据本发明的感染性疾病治疗法可与此项技术中已知的其它治疗方法组合(即组合疗法)。这些方法包括(但不限于)抗微生物剂,诸如青霉素类(penicillins)、头孢菌素类(cephalosporins)、碳青霉烯类(carbapenems)、氨基糖苷类(aminoglycosides)、大环内酯类(macrolides)、林可霉素类(lincomycins)、四环素类(tetracyclines)、氯霉素(chloramphenicol)和灰黄霉素(griseofulvin)。

[0198] 适合的投药途径可例如包括经口、直肠、经粘膜(尤其是经鼻)、经肠,或不经肠递送,包括肌肉内、皮下和髓内注射,以及鞘内、直接心室内、静脉内、腹膜内、鼻内或眼内注射。

[0199] 另外,可以用局部而非全身方式投予医药组合物,例如将医药组合物直接注射到患者的组织区中。

[0200] 可利用此项技术中众所周知的方法,诸如通过常规混合、溶解、制粒、糖衣丸制备、研磨、乳化、封入胶囊、包埋或冻干方法,来制备本发明的医药组合物。

[0201] 因此,可以使用一种或一种以上生理学上可接受载剂(包含赋形剂和佐剂),以常规方式调配用于本发明中的医药组合物,所述载剂可便利将活性成分加工成可供医药上使用的制剂。适合的调配物视所选投药途径而定。

[0202] 对于注射,可优选在诸如汉克斯溶液(Hank's solution)、林格氏溶液(Ringer's solution)或生理盐水缓冲液等生理学相容性缓冲液中将医药组合物中的活性成分调配成水溶液。对于经粘膜投药,调配物中可使用适于渗透障壁的渗透剂。此项技术中一般已知所述渗透剂。

[0203] 对于局部投药,可将本发明组合物调配为凝胶、乳膏、洗液、冲洗液或喷雾剂。

[0204] 对于经口投药,可通过将活性化合物与此项技术中众所周知的医药学上可接受载剂组合,容易地调配出医药组合物。所述载剂能够将医药组合物调配成片剂、丸剂、糖衣丸、胶囊、液体、凝胶、糖浆、浆液、悬浮液等以供患者经口摄取。可使用固体赋形剂,必要时,在添加适合的佐剂后,任选研磨所得混合物,并加工颗粒混合物,以获得片剂或糖衣丸核心,由此得到口服药物制剂。具体来说,适合的赋形剂为填充剂,诸如糖,包括乳糖、蔗糖、甘露醇糖或山梨醇糖;纤维素制剂,诸如玉米淀粉、小麦淀粉、大米淀粉、马铃薯淀粉、明胶、黄芪胶、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素和羧甲基纤维素钠;和/或生理学上可接受的聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone,PVP)。需要时,可添加崩解剂,诸如交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂,或者海藻酸或其盐,诸如海藻酸钠。

[0205] 糖衣核可具有适合的包衣。为此,可使用浓糖溶液,其可任选含有阿拉伯胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、卡波普凝胶(carbopol gel)、聚乙二醇、二氧化钛、漆溶液(lacquer solution)和适合的有机溶剂或溶剂混合物。可将染料或颜料添加到片剂或糖衣丸包衣中以便标识或表征活性化合物剂量的不同组合。

[0206] 口服使用的医药组合物包括由明胶制成的推入配合型(push-fit)胶囊,以及由明胶和增塑剂(诸如甘油或山梨糖醇)制成的软密封胶囊。推入配合型胶囊可含有活性成分与填充剂(诸如乳糖)、粘合剂(诸如淀粉)、润滑剂(诸如滑石或硬脂酸镁)和任选使用的稳定剂的混合物。对于软胶囊,可将活性成分溶解或悬浮于适合的液体(诸如,脂肪油、液体石蜡或液体聚乙二醇)中。此外,还可添加稳定剂。供口服的所有调配物剂量都应适合于所选投药途径。

[0207] 对于经颊投药,组合物可呈以常规方式调配的片剂或锭剂的形式。

[0208] 对于经鼻吸入投药,可便利地使用例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷或二氧化碳等适合的推进剂,从加压包装或喷雾器以气雾剂喷雾的形式递送用于本发明的活性成分。在加压气雾剂的情况下,可通过提供阀来递送定计量的量来确定剂量。用于分配器中的胶囊和药包(例如由明胶制成)可调配成含有化合物与适当粉末基质(诸如乳糖或淀粉)的粉末混合物。

[0209] 可调配本文中描述的医药组合物用于不经肠投药,例如通过快速注射或连续输注投予。注射用调配物可以单位剂型提供于任选加有防腐剂的例如安瓿或多剂量容器中。组合物可以是于油性或水性媒剂中的悬浮液、溶液或乳液的形式,并且可含有调配剂,诸如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。

[0210] 供不经肠投药的医药组合物包括水溶性形式活性制剂的水溶液。此外,也可将活性成分的悬浮液制备为适宜的油性或水基注射悬浮液。合适的亲脂性溶剂或媒剂包括脂肪油,诸如芝麻油;或合成脂肪酸酯,诸如油酸乙酯、甘油三酯;或脂质体。水性注射悬浮液可含有增加悬浮液粘度的物质,诸如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇或葡聚糖。悬浮液还可任选含有适当稳定剂,或增加活性成分的溶解性以允许制备高浓度溶液的试剂。

[0211] 或者,活性成分可为在使用前用适当媒剂(例如,无菌无热原水基溶液)复原的粉末形式。

[0212] 也可使用诸如可可脂或其它甘油酯等常规栓剂基质,将本发明医药组合物调配成直肠组合物,诸如栓剂或保留灌肠剂。

[0213] 适用于本发明中的医药组合物包括活性成分含量有效实现预定目的的组合。更具体点说,“治疗有效量”是指有效预防、减轻或缓解病原体感染的症状(例如发烧)或延长所治疗个体存活期的活性成分(例如水生生物组合物或藓类植物组合物)的量。

[0214] 所属领域技术人员特别依据本文中提供的详细描述将有能力确定治疗有效量。

[0215] 对于用于本发明方法中的任何制剂,最初可根据活体外和细胞培养分析估计剂量或治疗有效量。举例来说,可以在动物模型中制订达到所需浓度或滴度的剂量。此类信息可用于更准确地确定适用人类的剂量。

[0216] 本文中所述活性成分的毒性和治疗功效可在活体外、细胞培养物或实验动物中利用标准医药程序测定。可使用从这些活体外以及细胞培养分析和动物研究中获得的数据,制订出用于人类的剂量范围。这一剂量可视所用剂型和所用投药途径而有所改变。确切调配物、投药途径和剂量可由个别医师考虑患者的状况来选择。(参看例如芬格尔(Fingl,E.)等人(1975),“治疗的药理学基础(The Pharmacological Basis of Therapeutics),”第1章,第1页。)

[0217] 可独立地调整剂量和投药时间间隔,以使所提供的血浆或脑部活性成分含量足以诱导或抑制生物作用(即,最小有效浓度,MEC)。各制剂的MEC将不同,但可由活体外数据进行估计。达到MEC所需的剂量将视个体特征和投药途径而定。可以使用检测分析来确定血浆浓度。

[0218] 视欲治疗病状的严重程度和反应性而定,可在治疗过程中进行单次或多次投药,持续数天到数周时间,或直到治愈,或减轻疾病状态。

[0219] 当然,欲投予组合物的量将视治疗的个体、病痛的严重程度、投予方式、处方医师的判断等而定。

[0220] 必要时,可以将本发明组合物提供于包装或分配装置中,诸如FDA批准的试剂盒中,其中可含有一个或一个以上含有活性成分的单位剂型。所述包装可例如包含金属或塑料箔,诸如发泡包装。所述包装或分配装置可附有投药说明书。所述包装或分配装置也可附有由管理医药品制造、使用或销售的政府机构规定形式的公告,所述公告反映了政府机构批准将此种形式的组合物用于人类或兽用投药。所述公告例如可包括由美国食品和药品管理局(U.S.Food and Drug Administration)批准的处方药标签,或获批准的产品插页。如上文进一步详细描述,也可制备包含本发明制剂调配于医药学上可接受载剂中的组合物,将其放入适当容器中,并加标签以用于治疗指定病状。

[0221] 如所提到的,在一些必需去除可植入装置的情况下,医疗装置和植入物常常会感染机会致病细菌和其它感染性微生物(例如真菌)。这些感染也会导致不适、长期住院,甚至是死亡。因此,防止生物膜形成和医疗装置感染就显得特别迫切。

[0222] 本发明由此也涵盖附着上述组合物的医疗装置。

[0223] 本文中使用的术语“医疗装置”是指打算用于诊断、治疗、治愈或预防疾病或其它病状的任何植入物、仪器、器械、工具、机器、装置,或任何其它类似或相关的物品(包括任何组件或附件)。此类医疗装置拟用于人类或其它动物,并且预期其将影响体内的结构或任何功能。所述医疗装置不是通过化学作用实现其主要预定目的,也不取决于代谢来达到其主要预定目的。

[0224] 本文中使用的术语“植入物”是指打算放入人体中的任何物品,所述物品并非活组

织。植入物可以是临时的或持久的。植入物可以是包含人造组件的物件,诸如导管或起搏器。植入物也可包括天然来源的物品,这些物品经过处理,致使其上的活组织失去生命。举例来说,骨骼移植物经过处理而去除了活细胞(去细胞),但仍保留其形状,以便用作宿主的骨骼内生长的模板。再举个例子,可以对天然存在的珊瑚进行处理,以得到羟磷灰石制剂,其可施用于身体进行某些矫形和牙科治疗。

[0225] 因此,本发明预想涂有本发明组合物的医疗装置,其可防止细胞粘附,从而减少/消除已知在植入后会发生的任何可能的细胞集合和生物膜形成。装置相关性感染通常是由在装置插入或植入程序期间引入微生物(主要是细菌)引起,或是由带在血液里的生物附着于新插入的装置,随后在该装置的表面上繁殖所致。因此,用本发明组合物涂覆医疗装置将抑制一种或一种以上微生物物种的生物膜形成,预防医疗装置相关性感染,并由此降低抗生素治疗或从个体体内取出医疗装置的需求。

[0226] 根据本发明的教导,可涂覆的医疗装置包括(但不限于)人造血管、导管和其它用于将流体去除或将流体递送到患者的装置;人造心脏、人造肾脏、矫形针、人工关节、板和植入物;导管和其它管子(包括泌尿道和胆道管、支气管内管、外周可插入中心静脉导管、透析导管、长期留置的隧道式中心静脉导管、外周静脉导管、短期留置的中心静脉导管、动脉导管、肺导管、斯-甘二氏导管(Swan-Ganz catheter)、导尿管、腹膜导管)、泌尿装置(包括长期使用的泌尿装置、组织粘合的泌尿装置、人造尿道括约肌、尿道扩张器)、分流器(包括心室或动静脉分流器);假体(包括乳房植入物、阴茎假体、血管移植假体、动脉瘤修复装置、机械心脏瓣膜、人造关节、人造喉、耳用植入物)、接合装置、血管导管端口、血管支架、夹钳、栓塞装置、伤口引流管、眼镜、牙科植入物、脑积水分流器、起搏器和植入式除纤颤器、无针接头、发音假体等。

[0227] 本发明组合物的另一可能的应用是涂覆在可见于医疗和牙科环境中的表面。这些表面包括各种仪器和装置的内部和外部形状,其可以是一次性的或是打算重复使用的。所述表面包括所有适于医用的物件,包括(不限于)解剖刀、针、剪刀和其它用于创伤手术、治疗或诊断程序的装置;血液过滤器。这些领域的从业人员将易于了解其它实例。

[0228] 医疗环境中所见的表面还包括人员在卫生保健环境中穿着或携带的医疗设备、医疗传动装置(medical gear)各工件的内部和外部形状。所述表面可包括拟在医疗环境中用作感染性生物的生物屏障的表面,诸如手套、围裙和面罩。生物屏障的常用材料为热塑性或聚合材料,诸如聚乙烯、涤纶(dacron)、尼龙(nylon)、聚酯、聚四氟乙烯、聚氨酯、乳胶、硅树脂和乙烯基。其它表面可包括用于医疗程序或用于制备医疗器械的区域中的柜台面和固定设备,用于呼吸系统治疗(包括投予氧气、溶解于喷雾器中的药物和麻醉剂)的管子和滤器。其它此类表面可包括用于医疗或牙科设备的不欲灭菌的手柄和钢丝绳。此外,这些表面也可包括在常碰到血液或体液或者其它有害生物材料的区域中所见的管子和其它器械的非灭菌性外表面。

[0229] 本发明组合物可用于这些医疗装置的表面上或内部,以便提供针对微生物定植的长期防护,并降低装置相关性感染的发生率。这些组合物也可与抗微生物剂(例如抗生素试剂)组合并入医疗装置的涂层中。这一组合将足以杀死或抑制最初定植的细菌,并预防装置相关性感染,只要提供到装置-微生物界面的物质为抑制浓度即可。

[0230] 本发明组合物可以在聚合物合成阶段或装置制造阶段直接并入医疗装置的聚合

物基质中。这些组合物也可以与医疗装置聚合物共价连接。涂覆医疗装置的这些和许多其它方法将为所属领域一般技术人员显而易见。

[0231] 可根据本发明的教导进行处理的其它表面包括水纯化、水储存和供水中所涉及的物件以及食品加工中所涉及物件的内部和外部形状。因此,本发明预想涂覆食品或饮料容器的固体表面以延长其内含物的保存期限。

[0232] 健康相关性表面也可包括提供营养、卫生设施或疾病防护所涉及的家用物件的内部和外部形状。因此,本发明组合物可用于去除外表面的致病性微生物。这些家用物件包括例如家用食品加工设备、婴儿护理用材料、棉塞、肥皂、清洁剂、卫生和皮肤护理产品、家用清洁器和抽水马桶。

[0233] 表面也可以是实验室物件,包括(但不限于)载玻片、培养超净台(culturing hood)、皮氏培养皿(Petri dish),或此项技术中已知的任何其它适合类型的组织培养容器。

[0234] 本申请案的发明者也预想本发明组合物作为防污剂的用途。

[0235] 本文中使用的术语“防污剂”是指用于保护水下表面免于附着单细胞生物的化合物。这些单细胞生物包括微生物,诸如细菌和真菌。

[0236] 这些水下表面包括任何浸水表面,包括船身(即船体或框架)、潜水器(submergence vehicle)、助航设备、显示屏、网、建筑物、漂浮或安置就位的海上平台(例如码头)、浮标、发信号的设备和与海水或盐水接触的物件。其它水下表面包括暴露于海水的结构,包括桩材、航海标志(marine marker)、海底运输工具(如电缆和管道)、鱼网、舱壁、冷却塔,以及沉入水中操作的任何装置或结构。

[0237] 本发明组合物可并入船舶涂料中以限制不必要的海洋污损。因此,本发明的防污剂可调配成不含有毒材料(诸如重金属),但仍保留其功效。本发明的防污剂可进一步含有粘合剂、颜料、溶剂和添加剂。

[0238] 可以使用的溶剂的实例包括芳香烃类,诸如二甲苯和甲苯;脂肪烃类,诸如己烷和庚烷;酯类,诸如乙酸乙酯和乙酸丁酯;酰胺类,诸如N-甲基吡咯烷酮和N,N-二甲基甲酰胺;醇类,诸如异丙醇和丁醇;醚类,诸如二噁烷、THF和乙醚;和酮类,诸如甲基乙基酮、甲基异丁基酮和甲基异戊基酮。这些溶剂可单独使用或组合使用。

[0239] 可以使用的粘合剂的实例包括醇酸树脂、丙烯酸或乙烯基乳液、聚氨酯树脂、环氧树脂、基于硅的树脂、丙烯酸树脂、基于无机硅酸盐的树脂、乙烯树脂(尤其氯乙烯/乙酸乙烯酯共聚物)和松香。

[0240] 可以使用的颜料的实例包括二氧化钛、氧化亚铜、氧化铁、滑石、薄铝片、云母薄片、三氧化二铁、硫氰酸亚铜、氧化锌、乙酸偏砷酸铜、铬酸锌、二甲基二硫代氨基甲酸锌、亚乙基双(二硫代氨基甲酸)锌和二乙基二硫代氨基甲酸锌。

[0241] 可并入涂料组合物中的添加剂的实例包括减湿剂、润湿/分散剂、抗沉降剂、防结皮剂、干燥剂/硬化剂、防擦伤剂(anti-marring agent),以及常用于涂料组合物中的添加剂,如稳定剂和消泡剂。此外,相对不易溶于海水中的任何抗生素也可用于防污船舶漆。

[0242] 美国专利第4,678,512号、美国专利第4,286,988号、美国专利第4,675,051号、美国专利第4,865,909号和美国专利第5,143,545号中详细阐明了制备船舶防污漆的方法。

[0243] 本发明组合物也可用于使化妆品具有抗细菌特性,以防产品变质。

[0244] 这些组合物可诸如通过并入牙膏、漱口水或口香糖中而进一步对口腔、牙齿和牙龈提供抗细菌作用。总的说来,本发明教导描绘了从诸如水生生物和藓类植物等生物分离的多种新颖抗粘附剂。这些试剂的广谱抗粘附作用(例如抑制革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌粘附)结合其影响微生物生物膜形成的初始最脆弱阶段的能力,使得这些试剂成为抗生物膜剂的最佳候选物。而且,本文中描述的抗粘附剂是可克隆的,使得能够进行修饰和大批量制造。此外,其稳定性(即,对环境条件具有抗性)使得这些试剂适用于多种应用。

[0245] 所属领域一般技术人员在检验本发明以下非限制性实例后,就将对本发明的其它目的、益处和新颖特征显而易见。另外,上文所述以及前文权利要求书部分中所主张的本发明各个实施例和方面也将在以下实例中获得实验支持。

[0246] 一般说来,本文中使用的专用名词和本发明中利用的实验程序包括分子、生物化学、微生物和重组DNA技术。这些技术在文献中都已得到完整说明。参看例如,“分子克隆实验手册(Molecular Cloning:A laboratory Manual)”,萨姆布鲁克(Sambrook)等人(1989);“现代分子生物学方案(Current Protocols in Molecular Biology)”,第I-III卷,奥斯贝尔(Ausubel,R.M.)编,(1994);奥斯贝尔(Ausubel)等人,“现代分子生物学方案”,约翰威立出版公司(John Wiley and Sons),马里兰州巴尔的摩(Baltimore, Maryland)(1989);贝堡(Perbal),“分子克隆实用指南(A Practical Guide to Molecular Cloning)”,约翰威立出版公司(John Wiley&Sons),纽约(New York)(1988);沃特森(Watson)等人,“重组DNA(Recombinant DNA)”,科学美国人出版公司(Scientific American Books),纽约(New York);拜伦(Birren)等人(编),“基因组分析:实验手册丛书(Genome Analysis:A Laboratory Manual Series)”,第1-4卷,冷泉港实验出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),纽约(1998);以下美国专利中所述的方法:美国专利第4,666,828号、第4,683,202号、第4,801,531号、第5,192,659号和第5,272,057号;“细胞生物学:实验手册(Cell Biology:A Laboratory Handbook)”,第I-III卷,克里斯(Cellis, J.E.)编(1994);“现代免疫学方案(Current Protocols in Immunology)”第I-III卷,克里根(Coligan J.E.)编,(1994);斯蒂兹(Stites)等人(编),“基础和临床免疫学(Basic and Clinical Immunology)”(第8版),艾普顿-朗阁出版公司(Appleton&Lange),康乃狄格州诺沃克(Norwalk,CT)(1994);米歇尔(Mishell)和椎木(Shiigi)(编),“细胞免疫学方法选择(Selected Methods in Cellular Immunology)”,弗里曼出版公司(W.H.Freeman and Co.),纽约(1980);可用免疫分析完整描述于以下专利和科技文献中,参看例如美国专利第3,791,932号、第3,839,153号、第3,850,752号、第3,850,578号、第3,853,987号、第3,867,517号、第3,879,262号、第3,901,654号、第3,935,074号、第3,984,533号、第3,996,345号、第4,034,074号、第4,098,876号、第4,879,219号、第5,011,771号和第5,281,521号;“寡聚核苷酸合成方法(Oligonucleotide Synthesis)”,盖特(Gait,M.J.)编(1984);“核酸杂交(Nucleic Acid Hybridization)”,海姆斯(Hames,B.D.)和希根斯(Higgins S.J.)编(1985);“转录和翻译(Transcription and Translation)”,海姆斯(Hames,B.D.)和希根斯(Higgins S.J.)编(1984);“动物细胞培养(Animal Cell Culture)”,弗雷西里(Freshney, R.I.)编(1986);“固定细胞和酶(Immobilized Cells and Enzymes)”,IRL出版社(1986);“分子克隆实用指南(A Practical Guide to Molecular Cloning)”,派堡(Perbal,B.), (1984);和“酶学方法(Methods in Enzymology)”,第1-317卷,学术出版社(Academic

Press);“PCR方案:方法和应用指南(PCR Protocols:A Guide To Methods And Applications)”,学术出版社,加利福尼亚州圣地亚哥(San Diego,CA)(1990);马肖克(Marshak)等人,“蛋白质纯化和表征策略-实验过程手册(Strategies for Protein Purification and Characterization-A Laboratory Course Manual)”,CSHL出版社(1996);所有参考文献都以引用的方式并入本文中,引用程度就如同完整阐述于本文中一般。本发明全文中还提供其它常用参考文献。相信此项技术中众所周知这些文献中的程序,并出于便利读者的目的提供。其中所含所有信息都以引用的方式并入本文中。

[0247] 实例

[0248] 现将提到以下实例,结合上述描述以非限制性方式说明本发明。

[0249] 实例1:针对从垃圾葵(*Aiptesia anemone*)提取的活性部分的MS/MS分析

[0250] 在葡聚糖凝胶G-10柱上分离美丽海葵(完整生物)的粗提取物,得到2个展现抗粘附/生物膜形成活性的部分(图13)。

[0251] 在葡聚糖凝胶G-75上再次色谱分离来自葡聚糖凝胶G-10的高分子部分,得到表示高分子部分和低分子部分的两个主峰(图14)。

[0252] 利用c-18柱,以含乙腈(3-80%,从第5到第75分钟)的0.1%TFA线性梯度(流速2ml/min),对来自G-75柱的低分子部分进行反相高效液相色谱(RP-HPLC)分离,得到数种针对绿脓杆菌ATCC27853的活性部分作为抗粘附化合物。每2分钟收集洗脱部分(图15)。

[0253] 用胰蛋白酶消化所有活性部分,在Qtof Premier质谱仪(沃特世公司(Waters))和LTQ-Orbitrap质谱仪(赛默公司(Thermo))上进行LC-MS/MS分析,并利用Pep-Miner和Sequest软件,针对nr数据库中的真核生物部分进行鉴别。人们发现,利用72.3%乙腈(以红箭头标记)洗脱出的活性部分与来自等指海葵的等指海葵毒素5相似。

[0254] 实例2:鉴别海葵细胞毒素的保守区

[0255] 根据制造商提供的有关分离动物组织中的基因组DNA的方案,使用wizard基因组DNA纯化试剂盒(普洛麦格公司(Promega),USDA),由25mg美丽海葵和蛇发海葵制备纯化的模板DNA。遵循以下方案,使用Reddy Mix PCR master mix试剂盒(英国AB基因公司(ABgene,UK)),对500ng来自美丽海葵和蛇发海葵的纯化的模板DNA进行PCR:95℃-5分钟(95℃,30秒;52℃,30秒;和72℃,1分钟),重复35次;72℃,持续10分钟。

[0256] 将引物Eqt-F(GTR TCG ACA ACG AGT CRG G)和Eqt-R252(TGA CAT YCC ACC AGT TGC TG)添加到反应混合物中,分别达到0.5μM最终浓度。

[0257] 为进行DNA测序,执行阳性PCR反应,获得尺寸为约250bp的DNA扩增子。

[0258] 来自美丽海葵的PCR扩增子产生以下265bp的序列:

[0259] GTGTCGCCAACGAGTCGGGATGCACTTGGGAAAAGCCAAATACATACTTCTTCTCTG

[0260] GTACTGAGGTATAAAGTGCCTCCCTCTAAAGCTTGAGAATAAAAAAGCACTTTTGTA

[0261] CGGCCACGTAAGACAACAGGGCCTGTTGCCACGGGAGCTGTTGGAGTGCTCACTT

[0262] ACAAAATGTTGTGCACCAATGAGACGAACACTCTGGCTGTTCTTTTCAGTGTAACCT

[0263] TCGACTACAACCTGTACAGCAACTGGTGGAATGTCAA

[0264] 利用BLASTx程序比较由上述多聚核苷酸序列编码的预计氨基酸序列与基因库中的已知蛋白质序列,得到以下结果:一致性=54/88(61%),正选择=62/88(70%)。与如以下各物的其它海葵细胞毒素比较:溶血毒素[冲绳海葵(*Actinaria villosa*)],PsTX-20A[叶

盘海葵 (*Phyllodiscus semoni*)]、溶细胞素I前体[玫瑰红绿海葵 (*Sagartia rosea*)]和等指海葵毒素IV前体[等指海葵]; (寄存编号:BAD74019.1、BAC45007.1、AAP04347.1和AF057028_1)。

[0265] 相关肽序列[FSVPFDYNLYSNWW]出现在垃圾葵的序列中。

[0266] 来自蛇发海葵的PCR扩增子为以下254bp的序列:

[0267] TGTGTCGACAACGAGTCgGGCaagacgtGgaCCGCantgaaCACATACTTCGTTCTGGcAC

[0268] CTCTGATnTCrTCCTTCCCCATACAGTTCCACATGGTAAGGCACTGCTCTACAACGGT

[0269] CAGAAAGATCGTGGTCCAGTTGCGACTGGCGtgGTTGGAGTACTTGCTTATGcCATGA

[0270] GCgATGGAAACACCCtGGCCGTTTTgTTCAGCrTTCCTaTGACTATAACCTGTACAGCA

[0271] ACTGGTGAATGTCAA

[0272] 利用BLASTn程序,将基因库中的已知核苷酸序列与等指海葵毒素5[寄存编号AEU51900]、4[寄存编号:AF057028]和2[寄存编号:AEU41661]相比较,分别得到97%、96%和95%相似性。

[0273] 基于第二个正向ORF的翻译所预计的氨基酸序列得到以下氨基酸序列

[0274] CRQRVGMHLGKAKYIILLWY*GIKCLPLKLENKKALLYGPRKTTGPVATGAVGVLTyk

[0275] MLCTNETNTLAVLFSVPFDYNLYSNWWKCQ

[0276] 实例3:比较合成肽的活性

[0277] 使用固相法合成下文所列的肽,并通过派普顿公司(Pepttron Inc.) (韩国大田广域市(Taejeon, Korea))纯化达到90%标度(scale)。

[0278] 使用20μl二甲亚砜(DMSO)溶解肽,并在双蒸水中稀释,达到5mg/ml浓度。在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中再进行稀释。

[0279] 研究以下合成肽针对鲍氏不动杆菌的临床分离株和绿脓杆菌ATCC27853的活性,其中肽浓度在500到0.5μg/ml范围内。将稀释到适宜浓度的肽与细菌一起培育24到48小时。

[0280] 对于细菌粘附生物分析,在96孔圆底聚苯乙烯板中生长生物膜。简单点说,将180μl培育过夜的培养物添加到各孔中,这些孔补充有20μl在PBS中稀释的适宜肽。在37℃下培育24小时后,用水洗涤各孔,并用250μl结晶紫溶液进行染色。随后通过用水充分洗涤来去除染料。为进行附着细胞的定量,将结晶紫溶解于250μl 1%十二烷基硫酸钠(SDS)中,并在595nm下测量吸光度。

	CMFSVPFDYNWYSNWWC	AbacZ-17C
[0281]	Ac-MFSVPFDYNWYSNWW-NH ₂	AbacZ-15
	CFSVPFDYNWYSNWWC	AbacZ-16C
	FDYNWY	AbacZ-6
[0282]	CFDYNWYC	AbacZ-8C

[0283] 结果显示于图1到12中。如从图1、3、5和7中可看出,这些肽不能杀死细菌或抑制细菌生长。图2、4、6、8和10到12显示,这些肽防止生物膜形成。

[0284] 实例4:鉴别优选肽

[0285] 为了鉴别根据本发明最具活性的环状肽,使用带有肽提纯器的手动多肽合成仪(Parallel Peptide synthesizer)来制备长度和环化策略互不相同的肽。在微型板和流式细胞分析中针对抗粘附活性筛选每一种肽,并选择具有较高活性的肽。使用数种肽型式的

计算机模型,来优化对活性化合物的选择。

[0286] 为了更灵敏地进行筛选,使用美国普洛麦格公司 (Promega,USA) 的Bac Titer-Glo微生物细胞活力分析,来按比例放大生物分析。这一方法使用了基于发光的较为灵敏的光谱测定技术。

[0287] 使用各种环化策略,由具有令人满意的生物活性的线性类似物获得优化的环状肽。图16A显示了带有乳化剂臂的环状头的一般结构。所述线性类似物是一种带有疏水核心(6个氨基酸)的14mer肽,称为药效团(pharmacophore)。制备出的环状头保存此药效团,接着添加乳化剂臂(疏水性部分),诸如聚乙烯、聚丙烯、特氟隆(Teflon)等,以使疏水性聚合物表面具有吸收能力(图16B)。

[0288] 使用表位定位、电子扫描(escanning)和Cycloscan法显示出具有所需生物活性的较短、成本效益较高的肽。

[0289] 使用9H-芴-9-基甲氧基碳基固相肽合成法(Fmoc SPPS)制备环状头。

[0290] 根据代表性程序,如图17中所示,在二氯甲烷(DCM)中使用N,N-二异丙基乙胺(DIEA),使第一个经保护氨基酸与三苯甲基氯(C1-Trt)树脂缩合,或使用六氟磷酸O-苯并三唑-N,N',N'-四甲基脒(HBTU)作为偶联试剂,使所述氨基酸与Rink Amide树脂缩合。

[0291] 接下来使用标准Fmoc方案,用六氟磷酸2-(1H-7-氮杂苯并三唑-1-基)--1,1,3,3-四甲基脒甲铵(HATU)或六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三批咯烷基膦(PyBoP)、DIEA在N-甲基-2-吡咯烷酮(NMP)中进行偶联。使用乙酰基氢氧化物(acetyl hydroxide)/N-甲基马来酰亚胺/1,2-二氯乙烷(diethene chloride)(AcOH/NMM/DCE)混合物,利用四(三苯膦)钯脱除烯丙氧基碳基(alloc)。

[0292] 根据标准偶联反应(在形成酰胺键的情况下)或通过鼓入氧气(在形成二硫桥键的情况下),进行环化步骤。也可进行此项技术中已知的其它类型的环化反应。

[0293] 通过在1,2-乙二硫醇存在下(对于C1-Trt树脂),以及在95%TFA、TIS和H₂O存在下(对于Rink Amide树脂),用1:98:1的三氟乙酸:二氯甲烷:三异丙基硅烷(TFA:DCM:TIS)处理,将肽从树脂裂解。

[0294] 利用制备型HPLC或MPLC纯化溶液中(AcOH/H₂O,1:1)的粗产物,得到纯环状肽。利用分析型HPLC测定纯度。借助LC-MS和AA分析确定结构。

[0295] 下一阶段涉及连接疏水性臂,以赋予环状肽头吸收特性。使用标准SPPS方案连接这种疏水性臂。

[0296] 图17显示的流程图大致描述了开发带有乳化臂的环状肽头的过程。

[0297] 实例4:处理水或流体介质

[0298] 可任选且优选使用上述肽和/或组合物和/或生物来处理水和/或流体介质,或含有水和/或流体介质的系统或器械,包括(但不限于)反渗过滤器和/或过滤器械或系统。

[0299] 如下所述,在无过滤的流槽中,使用聚酰胺取样管测试海葵提取物对生物膜形成的影响。在共聚焦显微镜专用的流槽中,分析生物膜生长对作为反渗透(reverse osmosis, RO)活性层的类似聚酰胺表面的影响。利用模式菌株(model strain)和从放在地中海上所选位置的反渗透(RO)膜取样管取得的实时微生物接种物,操作补充有不同浓度(每毫升数纳克到数微克)提取物的双通道流槽(FC270,生物表面科技公司(Biosurface Technologies);美国蒙大拿州(Montana,USA))。在这些流槽中,流动形态是层流,这与典型

RO操作的流动状况类似。对于模式菌株,确定海水合成培养基(参看(弗雷兹曼(Fritzmann)等人,2007:弗雷兹曼(Fritzmann,C),劳文伯格(Lowenberg,J.),温特格斯(Wintgens,T.)和梅林(Melin,T.)(2007),反渗透脱盐的技术现状(State-of-the-art of reverse osmosis desalination).脱盐(Desalination) 216:1-76)和IDE报告<http://www.ide-tech.tech.com/>),并用于细胞附着生物膜生长实验。对于从位于帕勒马希姆(Palmachim)的脱盐工厂分离的微生物群,使用实时海水作为培养基进行微生物附着和生物膜生长实验。所用模式菌株是费希尔氏弧菌(*Vibrio fisheri*)和新月柄杆菌(*Caulobacter crescentus*)。在双通道流槽中,一个通道补充有提取物,另一通道用作对照,其中只在培养基中添加溶剂(例如当将提取物溶解于乙醇中时)。

[0300] 当用荧光探针对活细胞、死细胞和细胞外聚物质(Extra cellular polymeric substance,EPS)进行染色(使用不同的荧光标记的凝集素探查EPS中的不同多糖组分),并利用激光扫描共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscopy,LSCM)观察时,在不同时间点(为期14天的实验时间),用显微镜分析流槽生物膜。使用图像处理分析软件,诸如Imaris bitplane和COMSTAT,进行显微分析(海多恩(Heydorn)等人,2002:艾斯波尔(Ersboll,B.),卡托(Kato,J.),汉泽尔(Hentzer,M.),帕赛科(Parsek,M.R.),托勒-尼尔森(Tolker-Nielsen,T.)等人(2002)绿脓杆菌生物膜产生的统计学分析:颤动、细胞间信号传导和静止期 δ 因子表达所涉及的基因突变的影响(Statistical analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: impact of mutations in genes involved in twitching motility, cell-to-cell signaling, and stationary-phase sigma factor expression).应用与环境微生物学(Applied and Environmental Microbiology) 68: 2008-2017)。

[0301] 此外,使用钙特异性荧光染料,诸如Fura-2,借助LSCM也监测和观察到钙,其对生物膜粘附性和致密性具有显著影响(格尼克维兹(Gryniewicz)等人,1985:格尼克维兹(Gryniewicz,G.),鲍尼(Poenie,M.)和泰森(Tsien,R.Y.)(1985)荧光特性极大改良的新一代 Ca^{2+} 指示剂(A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties).生物化学杂志(Journal of Biological Chemistry) 260: 3440-3450;尼奥(Neu)等人,2002:尼奥(Neu,T.R.),库汗林克(Kuhlicke,U.)和劳伦斯(Lawrence,J.R.)(2002)荧光染料在针对生物膜的双光子激光扫描显微术中的作用的评估(Assessment of Fluorochromes for Two-Photon Laser Scanning Microscopy of Biofilms).应用与环境微生物学(Applied and Environmental Microbiology) 68:901-909)。

[0302] 也通过用共价链接不同肽的QCM-D表面改性晶体分析不同类型EPC/细菌的粘附性,以此检验防污特性。

[0303] QCM-D使用了一种超敏感的质量传感器(涂有二氧化硅的石英晶体),传感器的内部装有呈预定几何形状且具有预定流体动力学特征的流槽,这一设计允许实时监测质量吸收,而无需进行标记。当向固定于压电石英晶体的电极施加电压时,石英晶体发生侧向振荡,振幅为1到2nm。当晶体表面上发生沉积(吸收)时,将使晶体的振动频率发生偏移。除监测频率偏移来确定吸收质量外,还可通过同时监测散逸的能量(即,每一振荡周期系统内所有能量损失的总和),来获得吸收层的厚度和结构构象。有趣的是,QCM-D除了在不同环境条

件(即,二价阳离子浓度不同)下测量不同类型EPS(即,多糖/蛋白质含量不同)的吸收和粘附性外,还能展现沉淀纳米层的粘弹性、构象改变和厚度。

[0304] 实例5:在脱盐条件下活性肽对反渗透生物污损的影响

[0305] 确定在脱盐条件下海藻提取物对反渗透生物污损的影响。

[0306] 操作两个实验室规模的RO(反渗透)单元以使海水脱盐,并在合成海水培养基和实时海水中进行利用候选模式菌株以及从GES脱盐工厂分离的微生物群(如上文所述)的生物污损实验。使用市面上的平板膜SW-30型Dow-Filmtec进行这些生物污损实验。得到各处理条件下的特定测量结果:渗透通量、总有机碳(total organic carbon,TOC)、渗透液中和盐水溶液中的氧浓度、摄氧率以及膜对不同离子和阳离子的排斥作用。分析不同生物膜组分:生物污损层的化学分析包括对蛋白质、碳水化合物、脂质和DNA的表征。如上文所述进行显微镜观察和分析。

[0307] 尽管已经参照少数几个实施例描述了本发明,但应了解,可对本发明进行许多变更、修改和其它应用。

序列表

<110> 特尔哈肖梅尔医学研究基础设施和服务有限公司
<120> 用于防止细胞粘附的肽和组合物及其使用方法
<130> 096382-0101
<140> PCT/IB2009/006926
<141> 2009-09-23
<150> 61/136,673
<151> 2008-09-24
<160> 62
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 6
<212> PRT
<213> 未知序列
<220>
<221> source
<223> 应注意：“未知序列的描述：水生生物或藓类植物序列”
<400> 1
Tyr Asp Tyr Asn Trp Tyr
1 5

[0001]

<210> 2
<211> 6
<212> PRT
<213> 未知序列
<220>
<221> source
<223> 应注意：“未知序列的描述：水生生物或藓类植物序列”
<400> 2
Tyr Asp Tyr Asn Leu Tyr
1 5

<210> 3
<211> 6
<212> PRT
<213> 未知序列
<220>
<221> source
<223> 应注意：“未知序列的描述：水生生物或藓类植物序列”
<400> 3
Phe Asp Tyr Asn Phe Tyr
1 5

<210> 4
<211> 6
<212> PRT
<213> 未知序列

<220>
<221> source
<223> 应注意: “未知序列的描述: 水生生物或藓类植物序列”

<400> 4
Phe Asp Tyr Asn Leu Tyr
1 5

<210> 5
<211> 6
<212> PRT
<213> 未知序列

<220>
<221> source
<223> 应注意: “未知序列的描述: 水生生物或藓类植物序列”

<400> 5
Phe Asp Tyr Asn Trp Tyr
1 5

<210> 6
<211> 6
<212> PRT
<213> 未知序列

<220>
<221> source
<223> 应注意: “未知序列的描述: 水生生物或藓类植物序列”

[0002] <400> 6
Tyr Asp Trp Asn Leu Tyr
1 5

<210> 7
<211> 6
<212> PRT
<213> 未知序列

<220>
<221> source
<223> 应注意: “未知序列的描述: 水生生物或藓类植物序列”

<400> 7
Tyr Asp Trp His Leu Tyr
1 5

<210> 8
<211> 6
<212> PRT
<213> 未知序列

<220>
<221> source
<223> 应注意: “未知序列的描述: 水生生物或藓类植物序列”

<400> 8
Trp Asp Tyr Asn Leu Tyr
1 5

<210> 9
<211> 15
<212> PRT
<213> 未知序列

<220>
<221> source
<223> 应注意: “未知序列的描述: 肽序列”

<400> 9
Leu Phe Ser Val Pro Tyr Asp Tyr Asn Trp Tyr Ser Asn Trp Trp
1 5 10 15

<210> 10
<211> 14
<212> PRT
<213> 未知序列

<220>
<221> source
<223> 应注意: “未知序列的描述: 肽序列”

<400> 10
Phe Ser Val Pro Tyr Asp Tyr Asn Leu Tyr Ser Asn Trp Trp
1 5 10

[0003] <210> 11
<211> 15
<212> PRT
<213> 未知序列

<220>
<221> source
<223> 应注意: “未知序列的描述: 肽序列”

<400> 11
Met Phe Ser Val Pro Phe Asp Tyr Asn Phe Tyr Ser Asn Trp Trp
1 5 10 15

<210> 12
<211> 15
<212> PRT
<213> 未知序列

<220>
<221> source
<223> 应注意: “未知序列的描述: 肽序列”

<400> 12
Met Phe Ser Val Pro Phe Asp Tyr Asn Leu Tyr Ser Asn Trp Trp
1 5 10 15

<210> 13
<211> 15
<212> PRT
<213> 未知序列

<220>
<221> source
<223> 应注意: “未知序列的描述: 肽序列”

<400> 13
Met Phe Ser Val Pro Phe Asp Tyr Asn Leu Tyr Thr Asn Trp Trp
1 5 10 15

<210> 14
<211> 15
<212> PRT
<213> 未知序列

<220>
<221> source
<223> 应注意: “未知序列的描述: 肽序列”

<400> 14
Met Trp Ser Val Pro Phe Asp Tyr Asn Leu Tyr Ser Asn Trp Trp
1 5 10 15

<210> 15
<211> 15
<212> PRT
<213> 未知序列

<220>
<221> source
<223> 应注意: “未知序列的描述: 肽序列”

<400> 15
Met Phe Ser Val Pro Trp Asp Tyr Asn Leu Tyr Lys Asn Trp Phe
1 5 10 15

[0004]

<210> 16
<211> 15
<212> PRT
<213> 未知序列

<220>
<221> source
<223> 应注意: “未知序列的描述: 肽序列”

<400> 16
Met Phe Ser Val Pro Phe Asp Tyr Asn Leu Tyr Lys Asn Trp Leu
1 5 10 15

<210> 17
<211> 16
<212> PRT
<213> 未知序列

<220>
<221> source
<223> 应注意: “未知序列的描述: 肽序列”

<400> 17
Met Phe Ser Val Pro Phe Phe Asp Tyr Asn Trp Tyr Ser Asn Trp Trp
1 5 10 15

<210> 18
<211> 15
<212> PRT
<213> 未知序列

<220>
<221> source
<223> 应注意: “未知序列的描述: 肽序列”

<400> 18
Leu Phe Ser Val Pro Phe Asp Tyr Asn Leu Tyr Ser Asn Trp Trp
1 5 10 15

<210> 19
<211> 15
<212> PRT
<213> 未知序列

<220>
<221> source
<223> 应注意: “未知序列的描述: 肽序列”

<400> 19
Met Ala Ser Ile Pro Tyr Asp Trp Asn Leu Tyr Gln Ser Trp Ala
1 5 10 15

<210> 20
<211> 15
<212> PRT
<213> 未知序列

<220>
<221> source
<223> 应注意: “未知序列的描述: 肽序列”

[0005]

<400> 20
Met Ala Ser Ile Pro Tyr Asp Trp Asn Leu Tyr Ser Ala Trp Ala
1 5 10 15

<210> 21
<211> 15
<212> PRT
<213> 未知序列

<220>
<221> source
<223> 应注意: “未知序列的描述: 肽序列”

<400> 21
Met Ala Ser Ile Pro Tyr Asp Trp His Leu Tyr Asn Ala Trp Ala
1 5 10 15

<210> 22
<211> 19
<212> DNA
<213> 美丽海葵

<400> 22
gtrtcgacaa cgagtcrgg

19

<210> 23
<211> 20
<212> DNA
<213> 蛇发海葵

	<400> 23 tgacatycca ccagttgctg	20
	<210> 24 <211> 15 <212> PRT <213> 未知序列	
	<220> <221> source <223> 应注意: “未知序列的描述: EqT-IV序列”	
	<400> 24 Leu Phe Ser Val Pro Tyr Asp Tyr Asn Trp Tyr Ser Asn Trp Trp 1 5 10 15	
	<210> 25 <211> 14 <212> PRT <213> 未知序列	
	<220> <221> source <223> 应注意: “未知序列的描述: Actinoporin Or-A序列”	
	<400> 25 Phe Ser Val Pro Tyr Asp Tyr Asn Leu Tyr Ser Asn Trp Trp 1 5 10	
[0006]	<210> 26 <211> 15 <212> PRT <213> 公主海葵	
	<400> 26 Met Phe Ser Val Pro Phe Asp Tyr Asn Phe Tyr Ser Asn Trp Trp 1 5 10 15	
	<210> 27 <211> 15 <212> PRT <213> 未知序列	
	<220> <221> source <223> 应注意: “未知序列的描述: Avt-I RTX-A序列”	
	<400> 27 Met Phe Ser Val Pro Phe Asp Tyr Asn Leu Tyr Ser Asn Trp Trp 1 5 10 15	
	<210> 28 <211> 15 <212> PRT <213> 未知序列	
	<220> <221> source <223> 应注意: “未知序列的描述: Pstx20序列”	

<400> 28

Met	Phe	Ser	Val	Pro	Phe	Asp	Tyr	Asn	Leu	Tyr	Thr	Asn	Trp	Trp
1				5					10				15	

<210> 29

<211> 15

<212> PRT

<213> 小立碗藓

<400> 29

Met	Trp	Ser	Val	Pro	Phe	Asp	Tyr	Asn	Leu	Tyr	Ser	Asn	Trp	Trp
1				5					10				15	

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> 斑马鱼

<400> 30

Met	Phe	Ser	Val	Pro	Trp	Asp	Tyr	Asn	Leu	Tyr	Lys	Asn	Trp	Phe
1				5					10				15	

<210> 31

<211> 15

<212> PRT

<213> 黑青斑河豚

<400> 31

[0007]	Met	Phe	Ser	Val	Pro	Phe	Asp	Tyr	Asn	Leu	Tyr	Lys	Asn	Trp	Leu
	1				5					10				15	

<210> 32

<211> 17

<212> PRT

<213> 未知序列

<220>

<221> source

<223> 应注意：“未知序列的描述：肽序列”

<400> 32

Cys	Met	Phe	Ser	Val	Pro	Phe	Asp	Tyr	Asn	Trp	Tyr	Ser	Asn	Trp	Trp
1				5					10				15		

Cys

<210> 33

<211> 213

<212> PRT

<213> 等指海葵

<400> 33

Met	Ser	Arg	Leu	Ile	Ile	Val	Phe	Ile	Val	Val	Thr	Met	Ile	Cys	Ser
1				5				10					15		

Ala Thr Ala Leu Pro Ser Lys Lys Ile Ile Asp Glu Asp Glu Glu Asp

	20	25	30
	Glu Lys Arg Ser Ala Asp Val 35	Ala Gly Ala Val Ile Asp Gly Ala Ser 40	45
	Leu Ser Phe Asp Ile Leu Lys Thr Val Leu Ala Leu Gly Asn Val Lys 50	55	60
	Arg Lys Ile Ala Val Gly Val Asp Asn Glu Ser Gly Lys Thr Trp Thr 65	70	75 80
	Ala Leu Asn Thr Tyr Phe Arg Ser Gly Thr Ser Asp Ile Val Leu Pro 85	90	95
	His Lys Val Pro His Gly Lys Ala Leu Leu Tyr Asn Gly Gln Lys Asp 100	105	110
	Arg Gly Pro Val Ala Thr Gly Ala Val Gly Val Leu Ala Tyr Leu Met 115	120	125
	Ser Asp Gly Asn Thr Leu Ala Val Leu Phe Ser Val Pro Tyr Asp Tyr 130	135	140
[0008]	Asn Trp Tyr Ser Asn Trp Trp Asn Val Arg Ile Tyr Lys Gly Lys Arg 145	150	155 160
	Arg Ala Asp Gln Arg Met Tyr Glu Glu Leu Tyr Tyr Asn Leu Ser Pro 165	170	175
	Phe Arg Gly Asp Asn Gly Trp His Thr Arg Asn Leu Gly Tyr Gly Leu 180	185	190
	Lys Ser Arg Gly Phe Met Asn Ser Ser Gly His Ala Ile Leu Glu Ile 195	200	205
	His Val Ser Lys Ala 210		
	<210> 34 <211> 175 <212> PRT <213> 加勒比海海葵		
	<400> 34 Ala Leu Ala Gly Thr Ile Ile Ala Gly Ala Ser Leu Thr Phe Gln Val 1 5 10 15		
	Leu Asp Lys Val Leu Glu Glu Leu Gly Lys Val Ser Arg Lys Ile Ala 20	25	30

Val Gly Ile Asp Asn Glu Ser Gly Gly Thr Trp Thr Ala Leu Asn Ala
35 40 45

Tyr Phe Arg Ser Gly Thr Thr Asp Val Ile Leu Pro Glu Phe Val Pro
50 55 60

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

Ala Thr Gly Ala Val Ala Ala Phe Ala Tyr Tyr Met Ser Ser Gly Asn
85 90 95

Thr Leu Gly Val Met Phe Ser Val Pro Phe Asp Tyr Asn Trp Tyr Ser
100 105 110

Asn Trp Trp Asp Val Lys Ile Tyr Ser Gly Lys Arg Arg Ala Asp Gln
115 120 125

Gly Met Tyr Glu Asp Leu Tyr Tyr Gly Asn Pro Tyr Arg Gly Asp Asn
130 135 140

Gly Trp His Glu Lys Asn Leu Gly Tyr Gly Leu Arg Met Lys Gly Ile
145 150 155 160

[0009]

Met Thr Ser Ala Gly Glu Ala Lys Met Gln Ile Lys Ile Ser Arg
165 170 175

<210> 35

<211> 176

<212> PRT

<213> 等指海葵

<400> 35

Asp Val Ala Gly Ala Val Ile Asp Gly Ala Ser Leu Ser Phe Asp Ile
1 5 10 15

Leu Lys Thr Val Leu Glu Ala Leu Gly Asn Val Lys Arg Lys Ile Ala
20 25 30

Val Gly Val Asp Asn Glu Ser Gly Lys Thr Trp Thr Ala Leu Asn Thr
35 40 45

Tyr Phe Arg Ser Gly Thr Ser Asp Ile Val Leu Pro His Lys Val Pro
50 55 60

His Gly Lys Ala Leu Leu Tyr Asn Gly Gln Lys Asp Arg Gly Pro Val
65 70 75 80

Ala Thr Gly Ala Val Gly Val Leu Ala Tyr Leu Met Ser Asp Gly Asn
85 90 95

Thr Leu Ala Val Leu Phe Ser Val Pro Tyr Asp Tyr Asn Trp Tyr Ser
100 105 110

Asn Trp Trp Asn Val Arg Ile Tyr Lys Gly Lys Arg Arg Ala Asp Gln
115 120 125

Arg Met Tyr Glu Glu Leu Tyr Tyr Asn Leu Ser Pro Phe Arg Gly Asp
130 135 140

Asn Gly Trp His Thr Arg Asn Leu Gly Tyr Gly Leu Lys Ser Arg Gly
145 150 155 160

Phe Met Asn Ser Ser Gly His Ala Ile Leu Glu Ile His Val Ser Lys
165 170 175

<210> 36
<211> 114
<212> PRT
<213> 斑马鱼

<400> 36
Met Thr Glu Ser Ala Glu Ala Val Ala Ala Asn Val Ser Ser Arg Arg
1 5 10 15

[0010]

His Ala Thr Val Glu Ile Thr Asn Leu Thr Asn Asn Tyr Cys Phe Leu
20 25 30

Asn Pro Lys Val Tyr Leu Glu Asn Gly Glu Thr Ser Asn Pro Pro Gln
35 40 45

Pro Thr Val Arg Pro Leu Lys Thr Glu Val Cys Thr Phe Ser Lys Ser
50 55 60

Ala Ala His Ala Thr Gly Ala Asn Gly Ser Gly Ile Asn Phe Glu Gly
65 70 75 80

Lys Asn Leu Asp Ile Arg Ala Thr Met Cys Pro Met Gly Arg Ala Ile
85 90 95

Val Lys Val Glu Val Trp Asp Lys Leu Leu Ser Pro Met Ala Gln Met
100 105 110

Asp Cys

<210> 37
<211> 156
<212> PRT
<213> 等指海葵

<400> 37

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

Asn Glu Ser Gly Lys Thr Trp Thr Ala Leu Asn Thr Tyr Phe Arg Ser
20 25 30

Gly Thr Ser Asp Ile Val Leu Pro His Lys Val Pro His Gly Lys Ala
35 40 45

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

Val Gly Val Leu Ala Tyr Leu Met Ser Asp Gly Asn Thr Leu Ala Val
65 70 75 80

Leu Phe Ser Val Pro Tyr Asp Tyr Asn Trp Tyr Ser Asn Trp Trp Asn
85 90 95

Val Arg Ile Tyr Lys Gly Lys Arg Arg Ala Asp Gln Arg Met Tyr Glu
100 105 110

Glu Leu Tyr Tyr Asn Leu Ser Pro Phe Arg Gly Asp Asn Gly Trp His
115 120 125

[0011]

Thr Arg Asn Leu Gly Tyr Gly Leu Lys Ser Arg Gly Phe Met Asn Ser
130 135 140

Ser Gly His Ala Ile Leu Glu Ile His Val Ser Lys
145 150 155

<210> 38

<211> 166

<212> PRT

<213> 斑马鱼

<400> 38

Val Ala Ala Asn Val Ser Ser Arg Arg His Ala Thr Val Glu Ile Thr
1 5 10 15

Asn Leu Thr Asn Asn Tyr Cys Phe Leu Asn Pro Lys Val Tyr Leu Glu
20 25 30

Asn Gly Glu Thr Ser Asn Pro Pro Gln Pro Thr Val Arg Pro Leu Lys
35 40 45

Thr Glu Val Cys Thr Phe Ser Lys Ser Ala Ala His Ala Thr Gly Ser
50 55 60

Val Gly Val Leu Thr Tyr Asp Leu Phe Glu Arg Arg Arg Asn Asp Tyr
65 70 75 80

Thr Glu Thr Leu Ala Ile Met Phe Ser Val Pro Trp Asp Tyr Asn Leu
85 90 95

Tyr Lys Asn Trp Phe Ala Val Gly Ile Tyr Pro Lys Gly Lys Glu Cys
100 105 110

Asp Gln Ala Leu Tyr Lys Glu Met Tyr Tyr Gln Lys Asn Gln His Gly
115 120 125

Phe Val Arg Glu Glu Ala Asn Gly Ser Gly Ile Asn Phe Glu Gly Lys
130 135 140

Asn Leu Asp Ile Arg Ala Thr Met Cys Pro Met Gly Arg Ala Ile Val
145 150 155 160

Lys Val Glu Val Trp Asp
165

<210> 39

<211> 181

<212> PRT

<213> 黑青斑河豚

<400> 39

[0012] Met Glu Ser Ala Glu Ala Val Ala Ala Asp Val Ser Arg Ser Arg Ser
1 5 10 15

Val Thr Ile Glu Ile Ser Asn Leu Thr Lys Asn Tyr Cys Leu Ile Asn
20 25 30

Pro Arg Val Tyr Leu Glu Ser Gly Glu Thr Tyr Asn Pro Pro Gln Pro
35 40 45

Thr Val Arg Pro Leu Met Thr Glu Val Cys Thr Phe Ser Lys Ser Ser
50 55 60

Gly Ile Pro Thr Gly Ser Val Gly Val Leu Thr Tyr Glu Leu Leu Glu
65 70 75 80

Arg Arg Ser Thr Met Leu Pro Glu Thr Leu Ala Ile Met Phe Ser Val
85 90 95

Pro Tyr Asp Tyr Ser Phe Tyr Asn Asn Trp Phe Ala Val Gly Ile Tyr
100 105 110

Glu Thr Gly Thr Lys Cys Asn Glu Gly Leu Tyr Lys Gln Met Tyr Asn
115 120 125

Glu Lys Lys Gln Ala Glu His Gly Phe Val Arg Glu Lys Ala Asn Gly
130 135 140

Ser Gly Ile Asn Tyr Val Gly Gly Asn Leu Asp Ile Arg Ala Thr Met
145 150 155 160

Asn Pro Leu Gly Lys Ala Ile Met Lys Val Glu Val Trp Asp Ala Phe
165 170 175

Phe Pro Phe Ser Glu
180

<210> 40

<211> 157

<212> PRT

<213> 等指海葵

<400> 40

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

Asn Glu Ser Gly Lys Thr Trp Thr Ala Leu Asn Thr Tyr Phe Arg Ser
20 25 30

Gly Thr Ser Asp Ile Val Leu Pro His Lys Val Pro His Gly Lys Ala
35 40 45

[0013] Leu Leu Tyr Asn Gly Gln Lys Asp Arg Gly Pro Val Ala Thr Gly Ala
50 55 60

Val Gly Val Leu Ala Tyr Leu Met Ser Asp Gly Asn Thr Leu Ala Val
65 70 75 80

Leu Phe Ser Val Pro Tyr Asp Tyr Asn Trp Tyr Ser Asn Trp Trp Asn
85 90 95

Val Arg Ile Tyr Lys Gly Lys Arg Arg Ala Asp Gln Arg Met Tyr Glu
100 105 110

Glu Leu Tyr Tyr Asn Leu Ser Pro Phe Arg Gly Asp Asn Gly Trp His
115 120 125

Thr Arg Asn Leu Gly Tyr Gly Leu Lys Ser Arg Gly Phe Met Asn Ser
130 135 140

Ser Gly His Ala Ile Leu Glu Ile His Val Ser Lys Ala
145 150 155

<210> 41

<211> 169

<212> PRT

<213> 黑青斑河豚

<400> 41

Val Ala Ala Asp Val Ser Arg Ser Arg Ser Val Thr Ile Glu Ile Ser
1 5 10 15

Asn Leu Thr Lys Asn Tyr Cys Leu Ile Asn Pro Arg Val Tyr Leu Glu
20 25 30

Ser Gly Glu Thr Tyr Asn Pro Pro Gln Pro Thr Val Arg Pro Leu Met
35 40 45

Thr Glu Val Cys Thr Phe Ser Lys Ser Ser Gly Ile Pro Thr Gly Ser
50 55 60

Val Gly Val Leu Thr Tyr Glu Leu Leu Glu Arg Arg Ser Thr Met Leu
65 70 75 80

Pro Glu Thr Leu Ala Ile Met Phe Ser Val Pro Tyr Asp Tyr Ser Phe
85 90 95

Tyr Asn Asn Trp Phe Ala Val Gly Ile Tyr Glu Thr Gly Thr Lys Cys
100 105 110

Asn Glu Gly Leu Tyr Lys Gln Met Tyr Asn Glu Lys Lys Gln Ala Glu
115 120 125

[0014]

His Gly Phe Val Arg Glu Lys Ala Asn Gly Ser Gly Ile Asn Tyr Val
130 135 140

Gly Gly Asn Leu Asp Ile Arg Ala Thr Met Asn Pro Leu Gly Lys Ala
145 150 155 160

Ile Met Lys Val Glu Val Trp Asp Ala
165

<210> 42

<211> 199

<212> PRT

<213> 小立碗藓

<400> 42

Met Val Val His Leu Ile Ala Met Gly Leu Arg Tyr Ser Glu Thr Ile
1 5 10 15

Met Lys Thr Ala Arg Met Ala Glu Ala Ile Ile Pro Ala Ala Glu Leu
20 25 30

Ser Ile Lys Thr Leu Gln Asn Ile Val Glu Gly Ile Thr Gly Val Asp
35 40 45

Arg Lys Ile Ala Ile Gly Phe Lys Asn Leu Thr Asp Tyr Thr Leu Glu
50 55 60

Asn Leu Gly Val Tyr Phe Asn Ser Gly Ser Ser Asp Arg Ser Ile Ala
65 70 75 80

Tyr Lys Ile Asn Ala Gln Glu Ala Leu Leu Phe Ser Ala Arg Lys Ser
85 90 95

Asp His Thr Ala Arg Gly Thr Val Gly Thr Phe Ser Tyr Tyr Ile Gln
100 105 110

Asp Glu Asp Lys Thr Val His Val Met Trp Ser Val Pro Phe Asp Tyr
115 120 125

Asn Leu Tyr Ser Asn Trp Trp Asn Ile Ala Val Val Asp Gly Arg Gln
130 135 140

Pro Pro Asp Ser Asn Val His Asp Asn Leu Tyr Asn Gly Ser Gly Gly
145 150 155 160

Met Pro Tyr Pro Asn Lys Pro Asp Gln Tyr Ile Asn Asn Glu Gln Lys
165 170 175

Gly Phe His Leu Phe Gly Ser Met Thr Asn Asn Gly Gln Ala Thr Ile
180 185 190

[0015]

Glu Val Glu Leu Lys Lys Ala
195

<210> 43

<211> 180

<212> PRT

<213> 等指海葵

<400> 43

Arg Ser Ala Asp Val Ala Gly Ala Val Ile Asp Gly Ala Ser Leu Ser
1 5 10 15

Phe Asp Ile Leu Lys Thr Val Leu Glu Ala Leu Gly Asn Val Lys Arg
20 25 30

Lys Ile Ala Val Gly Val Asp Asn Glu Ser Gly Lys Thr Trp Thr Ala
35 40 45

Leu Asn Thr Tyr Phe Arg Ser Gly Thr Ser Asp Ile Val Leu Pro His
50 55 60

Lys Val Pro His Gly Lys Ala Leu Leu Tyr Asn Gly Gln Lys Asp Arg
65 70 75 80

Gly Pro Val Ala Thr Gly Ala Val Gly Val Leu Ala Tyr Leu Met Ser

	85	90	95
	Asp Gly Asn Thr Leu Ala Val Leu Phe Ser Val Pro Tyr Asp Tyr Asn 100 105 110		
	Trp Tyr Ser Asn Trp Trp Asn Val Arg Ile Tyr Lys Gly Lys Arg Arg 115 120 125		
	Ala Asp Gln Arg Met Tyr Glu Glu Leu Tyr Tyr Asn Leu Ser Pro Phe 130 135 140		
	Arg Gly Asp Asn Gly Trp His Thr Arg Asn Leu Gly Tyr Gly Leu Lys 145 150 155 160		
	Ser Arg Gly Phe Met Asn Ser Ser Gly His Ala Ile Leu Glu Ile His 165 170 175		
	Val Ser Lys Ala 180		
	<210> 44 <211> 182 <212> PRT <213> 小立碗藓		
[0016]	<400> 44 Lys Thr Ala Arg Met Ala Glu Ala Ile Ile Pro Ala Ala Glu Leu Ser 1 5 10 15		
	Ile Lys Thr Leu Gln Asn Ile Val Glu Gly Ile Thr Gly Val Asp Arg 20 25 30		
	Lys Ile Ala Ile Gly Phe Lys Asn Leu Thr Asp Tyr Thr Leu Glu Asn 35 40 45		
	Leu Gly Val Tyr Phe Asn Ser Gly Ser Ser Asp Arg Ser Ile Ala Tyr 50 55 60		
	Lys Ile Asn Ala Gln Glu Ala Leu Leu Phe Ser Ala Arg Lys Ser Asp 65 70 75 80		
	His Thr Ala Arg Gly Thr Val Gly Thr Phe Ser Tyr Tyr Ile Gln Asp 85 90 95		
	Glu Asp Lys Thr Val His Val Met Trp Ser Val Pro Phe Asp Tyr Asn 100 105 110		
	Leu Tyr Ser Asn Trp Trp Asn Ile Ala Val Val Asp Gly Arg Gln Pro 115 120 125		

Pro Asp Ser Asn Val His Asp Asn Leu Tyr Asn Gly Ser Gly Gly Met
130 135 140

Pro Tyr Pro Asn Lys Pro Asp Gln Tyr Ile Asn Asn Glu Gln Lys Gly
145 150 155 160

Phe His Leu Phe Gly Ser Met Thr Asn Asn Gly Gln Ala Thr Ile Glu
165 170 175

Val Glu Leu Lys Lys Ala
180

<210> 45
<211> 204
<212> PRT
<213> 原鸡

<400> 45
Met Pro Pro Lys Glu Lys Lys Glu Asn Asp Lys Pro Cys Asn Asp Asn
1 5 10 15

Cys Gln Pro Lys Pro Gln Gly Lys Gly Val Glu Ser Leu Met Lys Asn
20 25 30

[0017] Ile Asp Val Cys Arg Ser Val Gly Leu Glu Ile Ile Asn Arg Thr Arg
35 40 45

Thr Val Thr Leu Thr Asp Phe Arg Ser Tyr Cys Phe Ser Gly Lys Ile
50 55 60

Val Thr Thr Leu Pro Phe Glu Ile Gly Pro Asp Ser Lys Gly Ile Cys
65 70 75 80

Ile Phe Ala Lys Thr Pro Tyr Ser Leu Arg Gly Ser Val Gly Thr Val
85 90 95

Val Cys Lys Ala Asp Thr Phe Phe Leu Ala Ile Thr Phe Ser Asn Pro
100 105 110

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

Glu Pro Asn His Leu Gly Asn Leu Gly Asp Val Phe Ser Lys Met Met
130 135 140

Lys Ser Lys Pro Tyr Cys Gly Ser Ser Leu Phe Gln Arg Ala Val Leu
145 150 155 160

Glu Ser Glu His Glu Thr Leu Glu Val Ser Lys Gly Ser Ile Arg Val
165 170 175

Gln Ala Lys Met Ser Asn Asn Arg Lys Ala Ile Leu Lys Val Gln Val
180 185 190

Glu Asp Met Asp Pro Pro Pro Tyr Ser Lys Gly Met
195 200

<210> 46
<211> 166
<212> PRT
<213> 原鸡

<400> 46
Leu Met Lys Asn Ile Asp Val Cys Arg Ser Val Gly Leu Glu Ile Ile
1 5 10 15

Asn Arg Thr Arg Thr Val Thr Leu Thr Asp Phe Arg Ser Tyr Cys Phe
20 25 30

Ser Gly Lys Ile Val Thr Thr Leu Pro Phe Glu Ile Gly Pro Asp Ser
35 40 45

Lys Gly Ile Cys Ile Phe Ala Lys Thr Pro Tyr Ser Leu Arg Gly Ser
50 55 60

[0018] Val Gly Thr Val Val Cys Lys Ala Asp Thr Phe Phe Leu Ala Ile Thr
65 70 75 80

Phe Ser Asn Pro Tyr Asp Tyr Ile Leu Tyr Lys Ile Glu Phe Ala Leu
85 90 95

Glu Ile Phe Thr Glu Pro Asn His Leu Gly Asn Leu Gly Asp Val Phe
100 105 110

Ser Lys Met Met Lys Ser Lys Pro Tyr Cys Gly Ser Ser Leu Phe Gln
115 120 125

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

Ser Ile Arg Val Gln Ala Lys Met Ser Asn Asn Arg Lys Ala Ile Leu
145 150 155 160

Lys Val Gln Val Glu Asp
165

<210> 47
<211> 220
<212> PRT
<213> 鸭嘴兽
<400> 47

Met Ala Gln Thr Ile Glu His Leu Val His Glu Val Glu Ala Gly Arg
1 5 10 15

Cys Val Gly Ile Glu Ile Thr Asn Thr Thr Asn Met Thr Phe Arg Ser
20 25 30

Pro Arg Thr Phe Cys Phe Ser Gly His Thr Leu Thr Pro Pro Thr Pro
35 40 45

Ile Ile His Pro Asn Asn Ala Gly Phe Cys Ile Phe Val Lys Arg Lys
50 55 60

Phe Ser Leu Arg Gly Ser Val Gly Leu Leu Val Tyr Glu Ile Glu Asp
65 70 75 80

Gln Thr Leu Ala Ile Met Phe Ser Asn Pro Phe Asp Tyr Asn Phe Phe
85 90 95

Lys Val Glu Phe Ala Val Ala Leu Ser Gly Tyr Lys Glu Glu Thr Gln
100 105 110

Asp Leu Lys Ala Phe Phe Glu Leu Leu Tyr His Glu Lys Gln Lys Gly
115 120 125

[0019]

Trp Leu Lys Met Ala Lys Glu Lys Leu Cys Glu Cys Gln Cys Pro Val
130 135 140

Ser Leu Glu Asn Asn Gly Ile Arg Val Thr Ala Thr Met Ser Asn Asn
145 150 155 160

Ala Lys Ala Ile Ile Lys Leu Ser Ser Pro Asp Ala Lys Pro Pro Glu
165 170 175

Gly Asp Val Ala Asp Val Gln Pro Thr Thr Val Arg Arg Pro Asn Pro
180 185 190

Pro Pro Phe Pro Ser Pro Arg Pro Arg Ile Gly Ser Asp Leu Thr Gly
195 200 205

Asp Gln Leu Ala Thr Leu Asp Phe Glu Ser Gly Lys
210 215 220

<210> 48

<211> 157

<212> PRT

<213> 等指海葵

<400> 48

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

Asn Glu Ser Gly Lys Thr Trp Thr Ala Leu Asn Thr Tyr Phe Arg Ser
20 25 30

Gly Thr Ser Asp Ile Val Leu Pro His Lys Val Pro His Gly Lys Ala
35 40 45

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

Val Gly Val Leu Ala Tyr Leu Met Ser Asp Gly Asn Thr Leu Ala Val
65 70 75 80

Leu Phe Ser Val Pro Tyr Asp Tyr Asn Trp Tyr Ser Asn Trp Trp Asn
85 90 95

Val Arg Ile Tyr Lys Gly Lys Arg Arg Ala Asp Gln Arg Met Tyr Glu
100 105 110

Glu Leu Tyr Tyr Asn Leu Ser Pro Phe Arg Gly Asp Asn Gly Trp His
115 120 125

Thr Arg Asn Leu Gly Tyr Gly Leu Lys Ser Arg Gly Phe Met Asn Ser
130 135 140

[0020]

Ser Gly His Ala Ile Leu Glu Ile His Val Ser Lys Ala
145 150 155

<210> 49

<211> 165

<212> PRT

<213> 鸭嘴兽

<400> 49

Leu Val His Glu Val Glu Ala Gly Arg Cys Val Gly Ile Glu Ile Thr
1 5 10 15

Asn Thr Thr Asn Met Thr Phe Arg Ser Pro Arg Thr Phe Cys Phe Ser
20 25 30

Gly His Thr Leu Thr Pro Pro Thr Pro Ile Ile His Pro Asn Asn Ala
35 40 45

Gly Phe Cys Ile Phe Val Lys Arg Lys Phe Ser Leu Arg Gly Ser Val
50 55 60

Gly Leu Leu Val Tyr Glu Ile Glu Asp Gln Thr Leu Ala Ile Met Phe
65 70 75 80

Ser Asn Pro Phe Asp Tyr Asn Phe Phe Lys Val Glu Phe Ala Val Ala
85 90 95

Leu Ser Gly Tyr Lys Glu Glu Thr Gln Asp Leu Lys Ala Phe Phe Glu
100 105 110

Leu Leu Tyr His Glu Lys Gln Lys Gly Trp Leu Lys Met Ala Lys Glu
115 120 125

Lys Leu Cys Glu Cys Gln Cys Pro Val Ser Leu Glu Asn Asn Gly Ile
130 135 140

Arg Val Thr Ala Thr Met Ser Asn Asn Ala Lys Ala Ile Ile Lys Leu
145 150 155 160

Ser Ser Pro Asp Ala
165

<210> 50

<211> 265

<212> DNA

<213> 美丽海葵

<400> 50

gtgtcgccaa cgagtcggga tgcacttggg aaaagccaaa tacatacttc ttctctggta 60

ctgaggtata aagtgcctcc ctctaaagct tgagaataaa aaagcacttt tgtacggccc 120

acgtaagaca acagggcctg ttgccacggg agctgttggga gtgctcactt acaaaatgtt 180

gtgcaccaat gagacgaaca ctctggctgt tcttttcagt gtacccttcg actacaactt 240

gtacagcaac tgggtggaaat gtcaa 265

[0021]

<210> 51

<211> 14

<212> PRT

<213> 美丽海葵

<400> 51

Phe Ser Val Pro Phe Asp Tyr Asn Leu Tyr Ser Asn Trp Trp

1 5 10

<210> 52

<211> 254

<212> DNA

<213> 蛇发海葵

<220>

<221> modified_base

<222> (37)..(37)

<223> a、c、t、g, 未知序列或其它序列

<220>

<221> modified_base

<222> (70)..(70)

<223> a、c、t、g, 未知序列或其它序列

<400> 52

tgtgtcgaca acgagtcggg caagacgtgg accgcantga acacatactt ccgttctggc	60
acctctgatn tcttccttcc ccatacagtt ccacatggta aggcactgct ctacaacggt	120
cagaaagatc gtgggtccagt tgcgactggc gtgggttgag tacttgctta tgccatgagc	180
gatggaaaca ccctggccgt ttgtttcagc rtccctatg actataacct gtacagcaac	240
tggtggaatg tcaa	254

<210> 53

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> 应注意: “人工序列的描述: 合成肽”

<400> 53

Cys	Arg	Gln	Arg	Val	Gly	Met	His	Leu	Gly	Lys	Ala	Lys	Tyr	Ile	Leu
1				5					10					15	

Leu	Leu	Trp	Tyr
			20

[0022]

<210> 54

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> 应注意: “人工序列的描述: 合成肽”

<400> 54

Met	Phe	Ser	Val	Pro	Phe	Asp	Tyr	Asn	Trp	Tyr	Ser	Asn	Trp	Trp
1				5					10				15	

<210> 55

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> 应注意: “人工序列的描述: 合成肽”

<400> 55

Cys	Phe	Ser	Val	Pro	Phe	Asp	Tyr	Asn	Trp	Tyr	Ser	Asn	Trp	Trp	Cys
1				5					10				15		

<210> 56

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> 应注意: “人工序列的描述: 合成肽”

<400> 56
Cys Phe Asp Tyr Asn Trp Tyr Cys
1 5

<210> 57
<211> 15
<212> PRT
<213> 未知序列

<220>
<221> source
<223> 应注意: “未知序列的描述: 肽序列”

<400> 57
Leu Phe Ser Val Pro Tyr Asp Tyr Asn Leu Tyr Ser Asn Trp Trp
1 5 10 15

<210> 58
<211> 15
<212> PRT
<213> 未知序列

<220>
<221> source
<223> 应注意: “未知序列的描述: 肽序列”

<400> 58
Met Phe Ser Val Pro Tyr Asp Tyr Asn Leu Tyr Ser Asn Trp Val
1 5 10 15

[0023]

<210> 59
<211> 15
<212> PRT
<213> 未知序列

<220>
<221> source
<223> 应注意: “未知序列的描述: 肽序列”

<400> 59
Leu Phe Ser Val Pro Phe Asp Tyr Asn Phe Tyr Ser Asn Trp Trp
1 5 10 15

<210> 60
<211> 15
<212> PRT
<213> 未知序列

<220>
<221> source
<223> 应注意: “未知序列的描述: 肽序列”

<400> 60
Leu Phe Ser Ile Pro Phe Asp Tyr Asn Leu Tyr Ser Asn Trp Trp
1 5 10 15

<210> 61
<211> 15
<212> PRT

<213> 未知序列

<220>

<221> source

<223> 应注意: “未知序列的描述: 肽序列”

<400> 61

Met Phe Ser Val Pro Phe Asp Tyr Asn Leu Tyr Lys Asn Trp Phe
1 5 10 15

<210> 62

<211> 67

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> 应注意: “人工序列的描述: 合成多肽”

[0024]

<400> 62

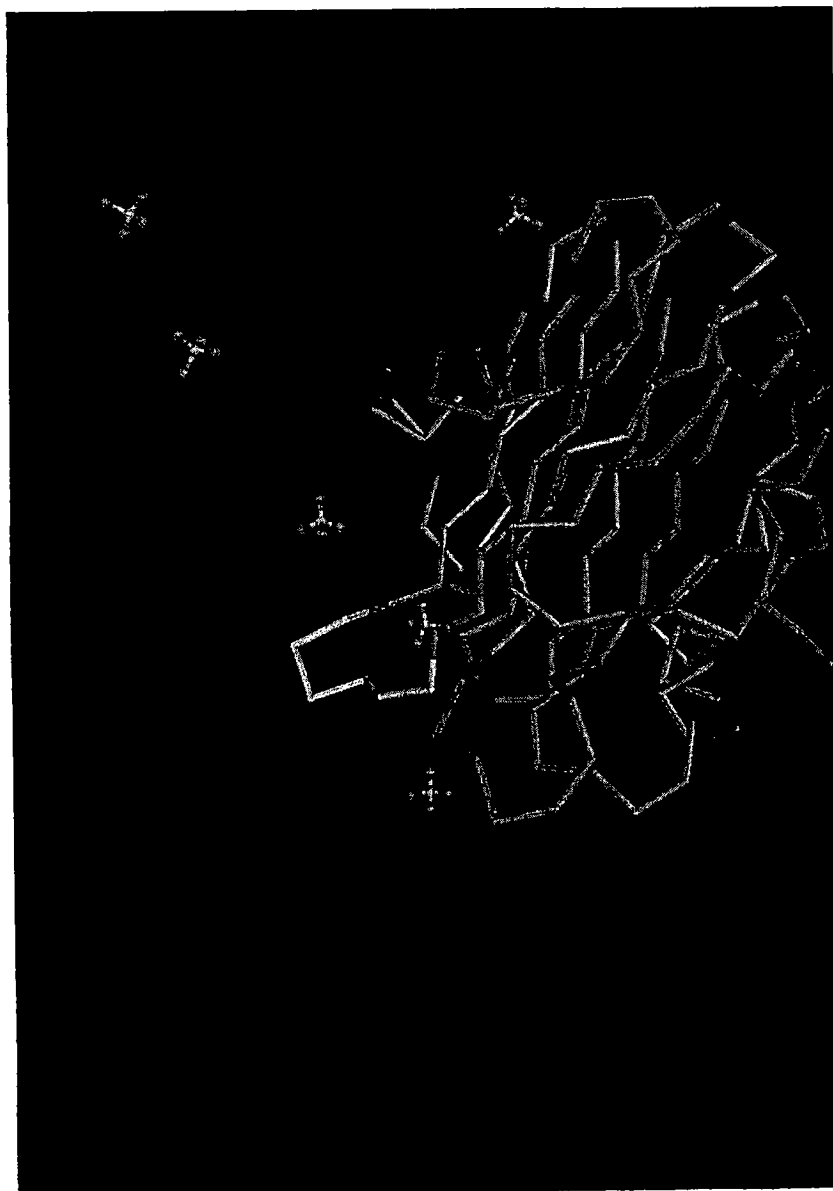
Gly Ile Lys Cys Leu Pro Leu Lys Leu Glu Asn Lys Lys Ala Leu Leu
1 5 10 15

Tyr Gly Pro Arg Lys Thr Thr Gly Pro Val Ala Thr Gly Ala Val Gly
20 25 30

Val Leu Thr Tyr Lys Met Leu Cys Thr Asn Glu Thr Asn Thr Leu Ala
35 40 45

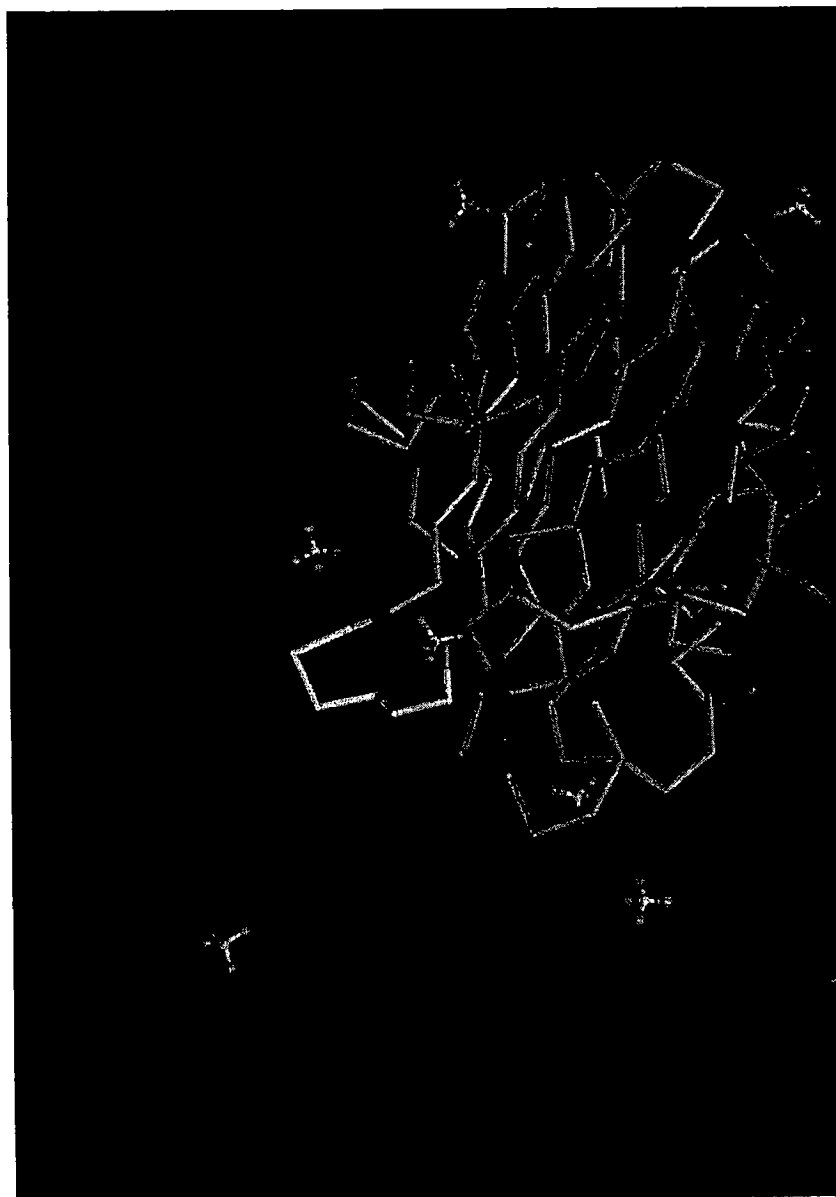
Val Leu Phe Ser Val Pro Phe Asp Tyr Asn Leu Tyr Ser Asn Trp Trp
50 55 60

Lys Cys Gln
65



水溶性状态的成孔溶细胞素海葵溶细胞素Ii的1C6WY A链的晶体结构

图1



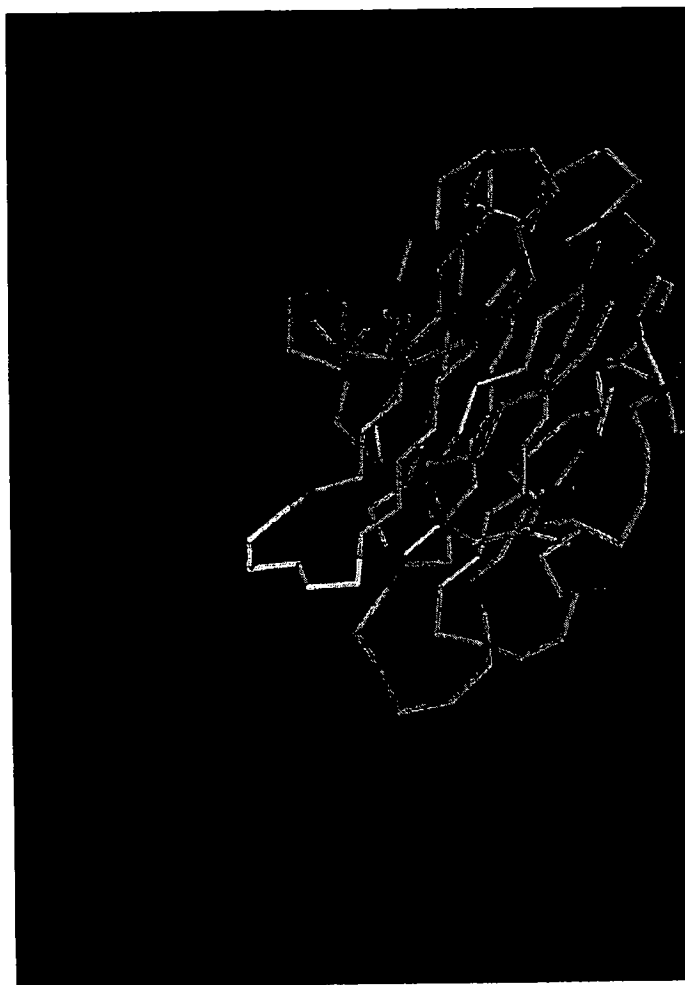
水溶性状态的成孔细胞素II的1GWY B链的晶体结构

图2



真核成孔溶细胞素等指海葵毒素1i的1KD6 A链的溶液结构

图3



等指海葵毒素Ii的8-69双半胱氨酸突变体的1TZQ A链的晶体结构

图4

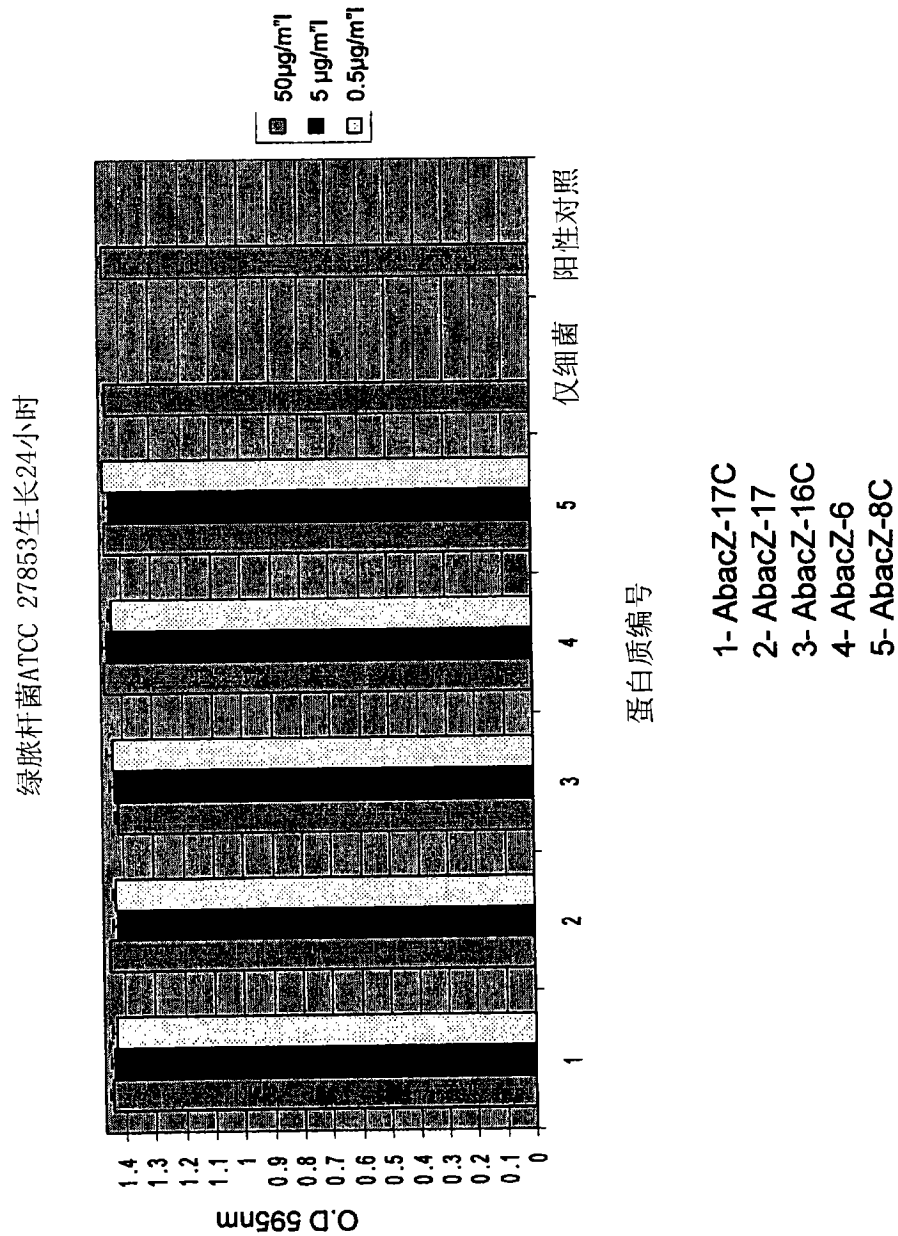


图5

防止绿脓杆菌ATCC 27853生物膜形成

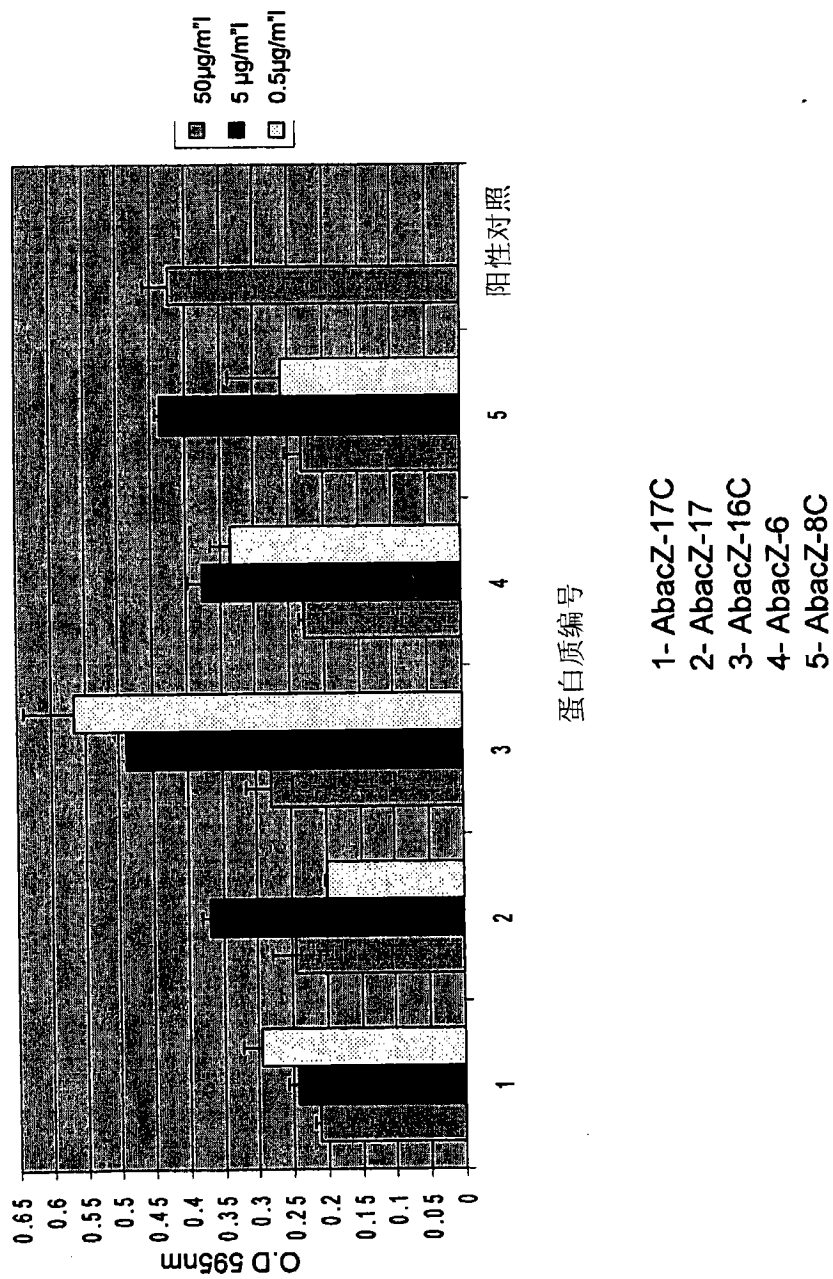


图6

鲍氏不动杆菌（临床分离株）生长24小时

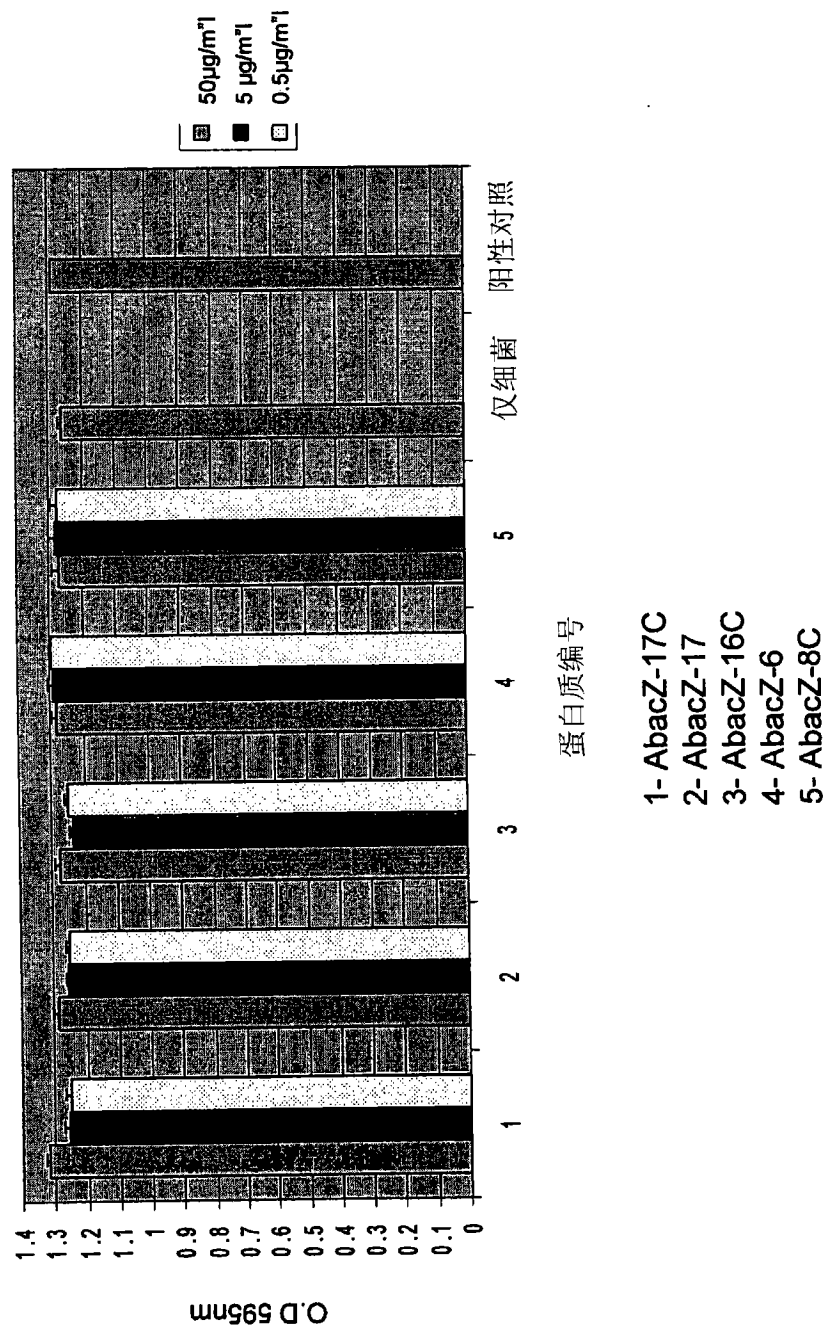


图7

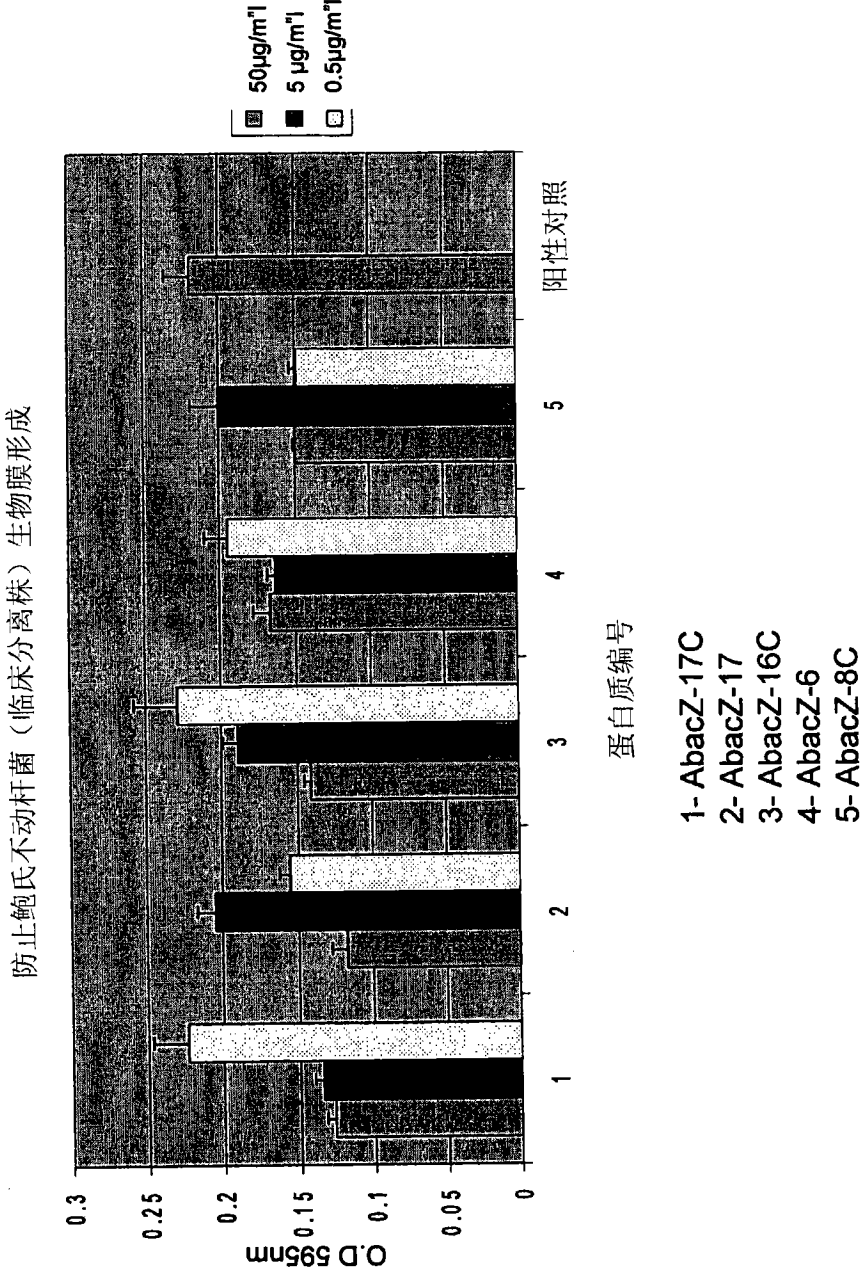


图8

利用等指海葵部分防止鲍氏不动杆菌生物膜形成

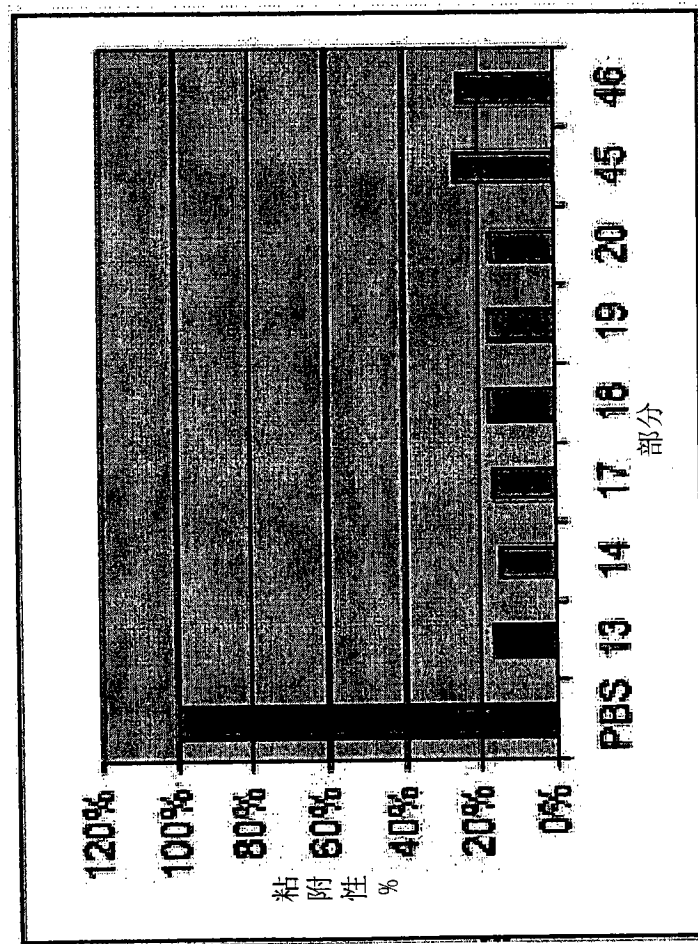


图9

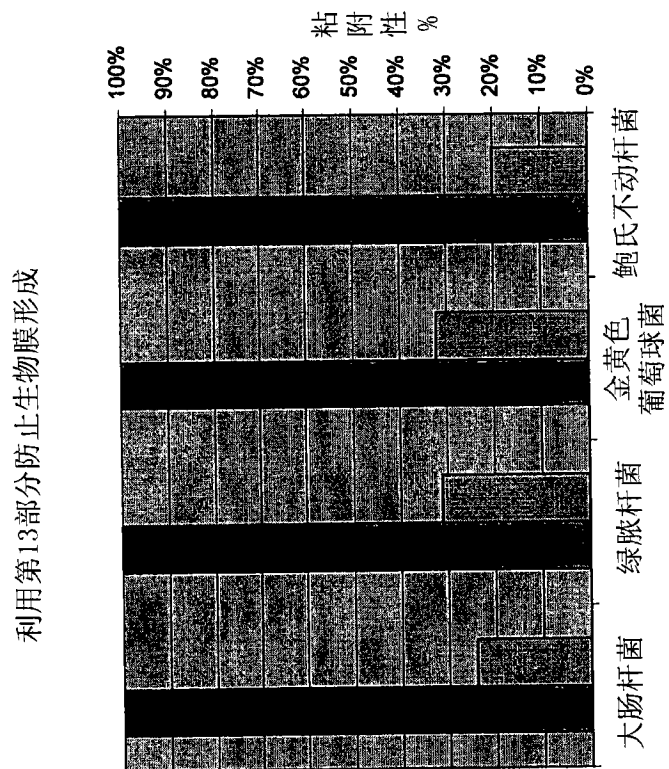


图10

利用迎风海葵属、垃圾葵属和小立碗藓属（藓类植物）防止绿脓杆菌生物膜形成

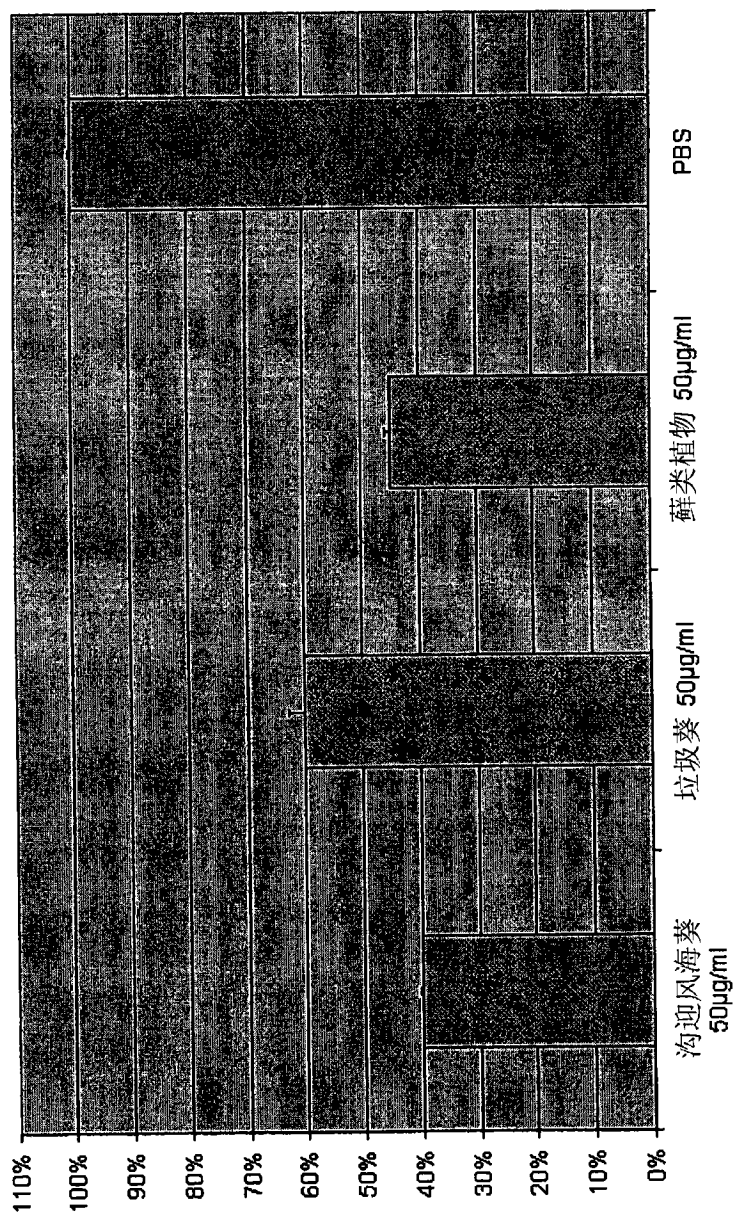


图11

用AbcZ肽和藓类植物进行的针对金黄色葡萄球菌的抗粘附测试

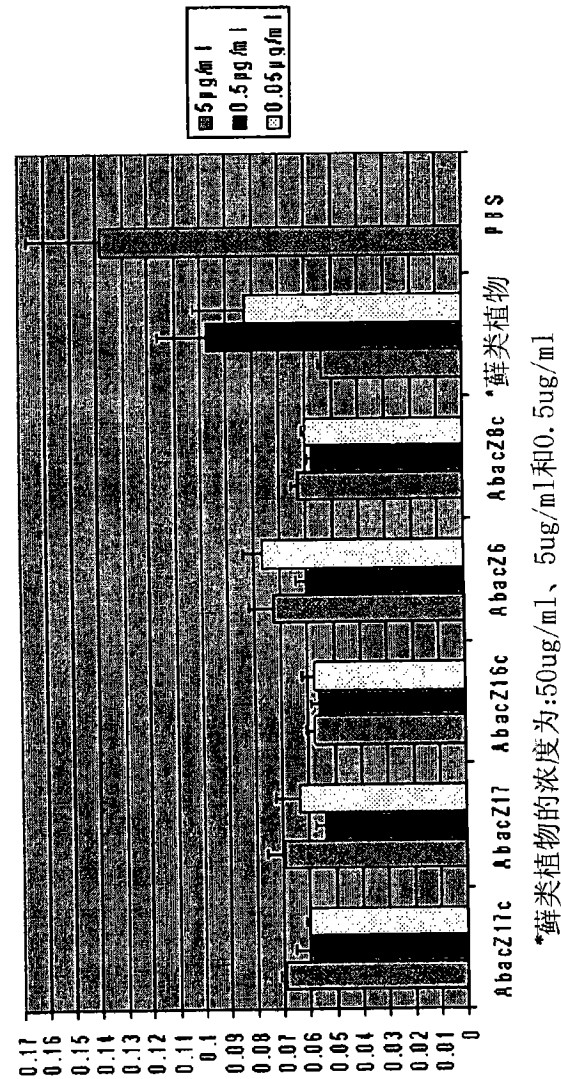


图12

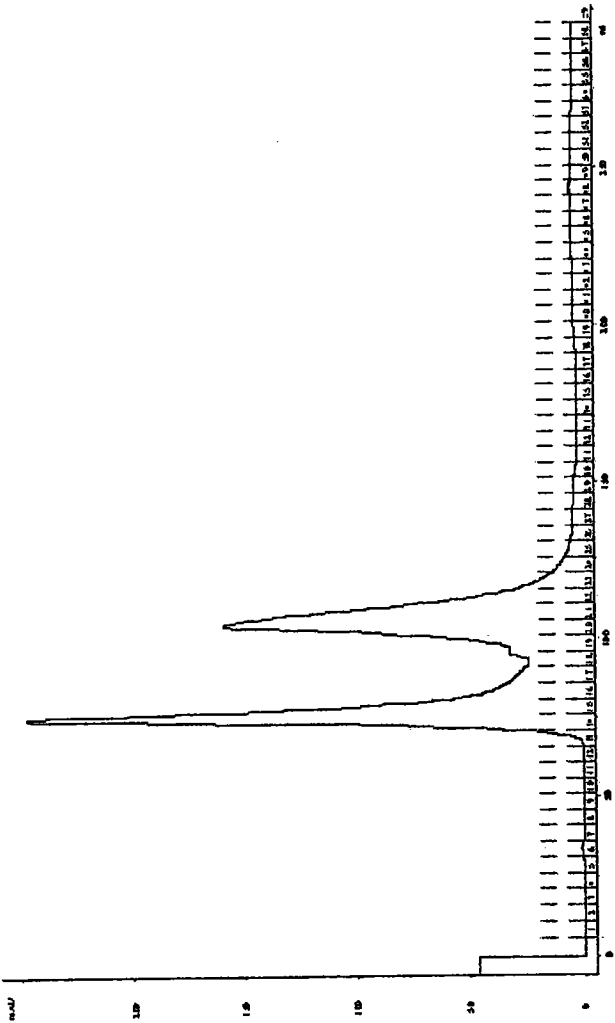


图13

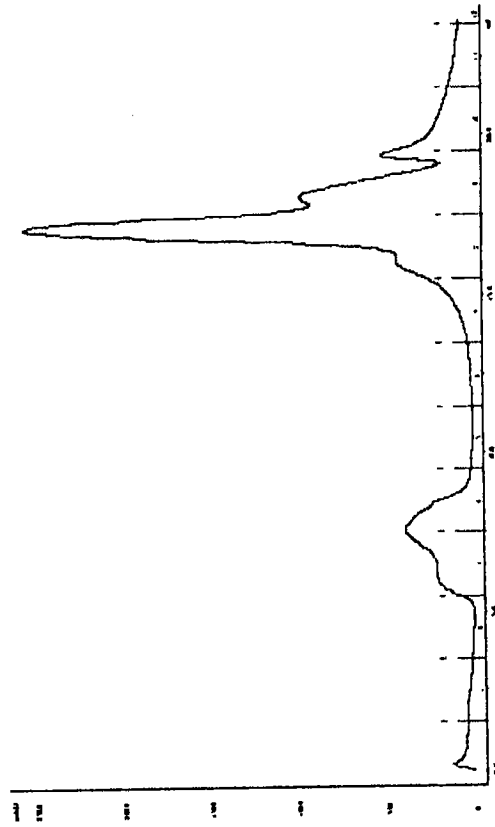


图14

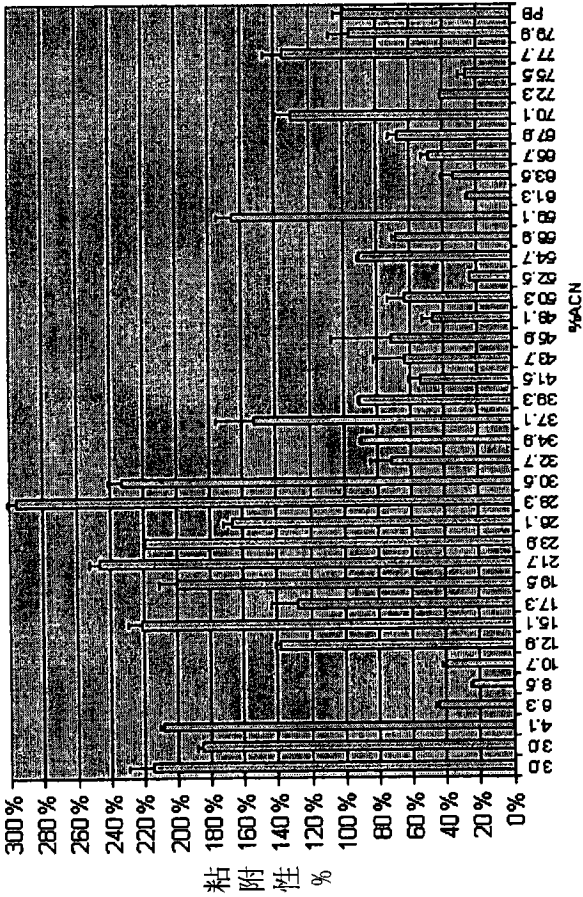
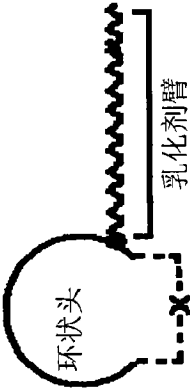


图15



方案1. 带有乳化剂臂的环状头的一般结构

图16A

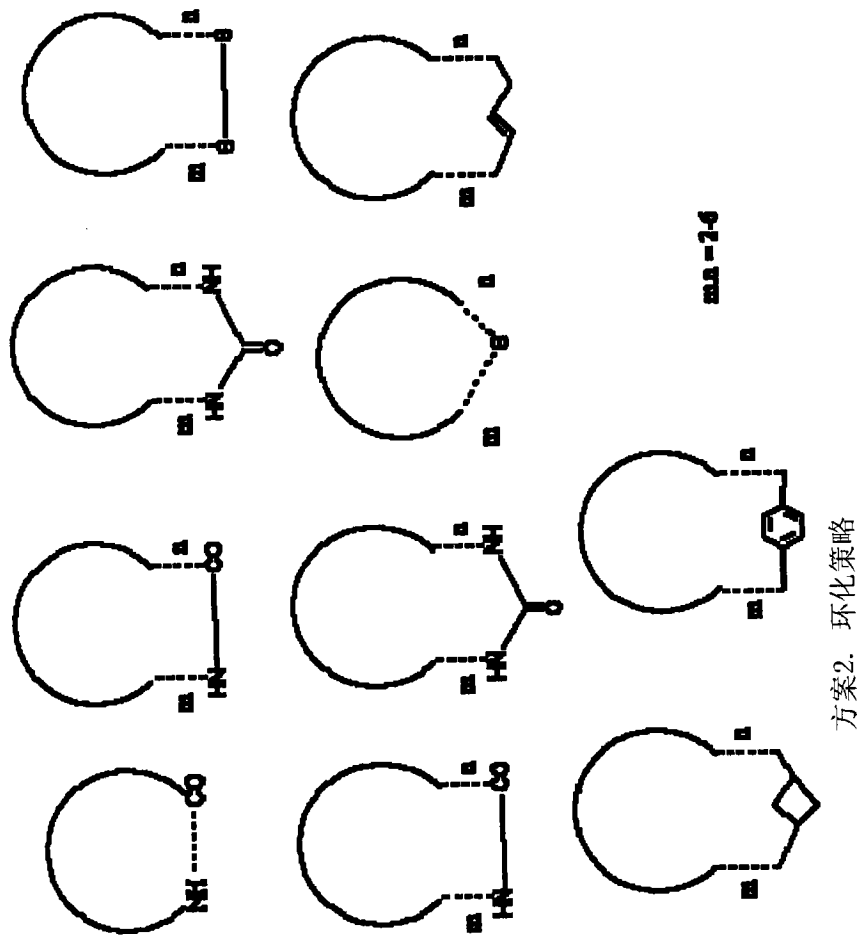


图16B

用于开发具有乳化臂的环状肽头的流程图

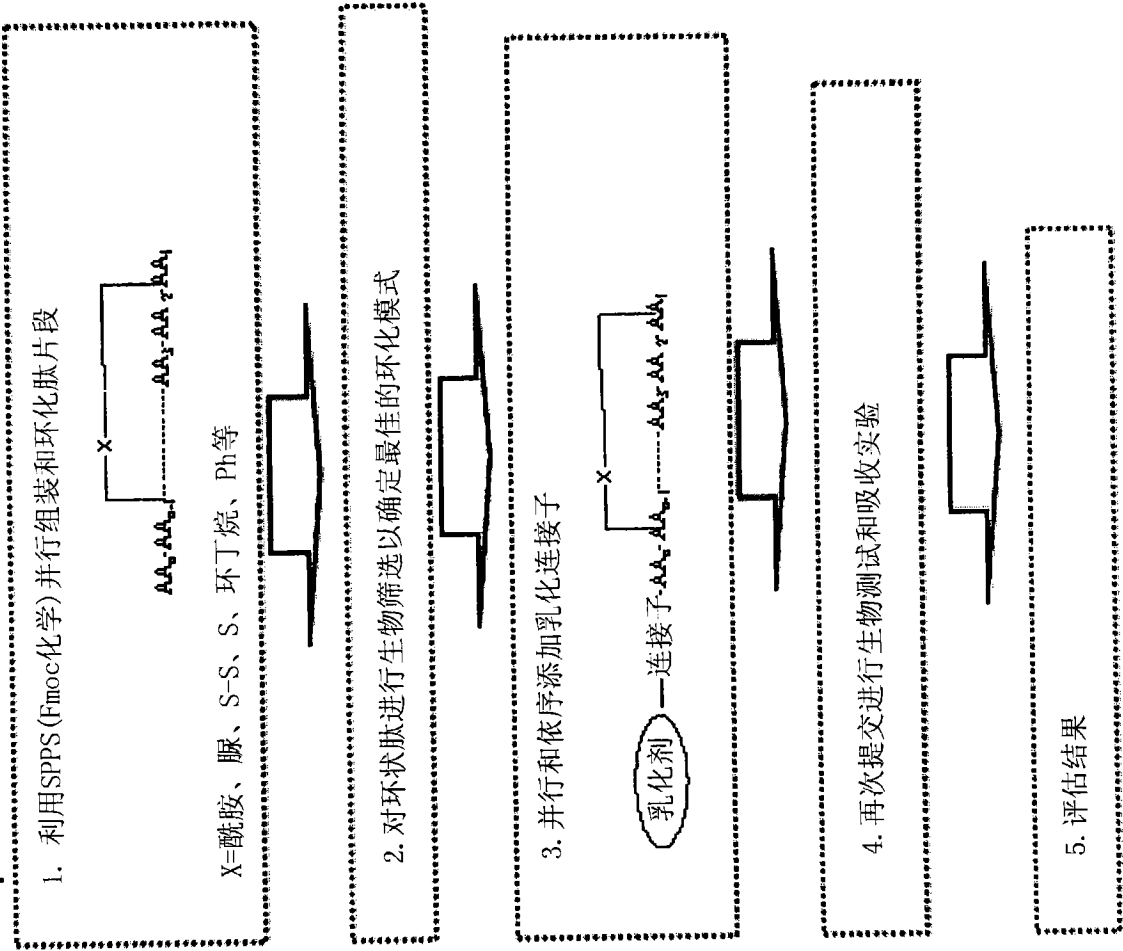


图17