



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119301144 A

(43) 申请公布日 2025. 01. 10

|                                                   |                                                                                                                                                               |
|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (21) 申请号 202380038272.8                           | (74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127                                                                                                                              |
| (22) 申请日 2023.05.10                               | 专利代理师 李栋修 张培源                                                                                                                                                 |
| (30) 优先权数据<br>22172622.7 2022.05.10 EP            | (51) Int.Cl.<br>C07K 14/415 (2006.01)<br>A61K 38/16 (2006.01)<br>A01N 37/00 (2006.01)<br>A01N 65/08 (2006.01)<br>A61P 31/04 (2006.01)<br>A61P 31/10 (2006.01) |
| (85) PCT国际申请进入国家阶段日<br>2024.11.04                 |                                                                                                                                                               |
| (86) PCT国际申请的申请数据<br>PCT/EP2023/062397 2023.05.10 |                                                                                                                                                               |
| (87) PCT国际申请的公布数据<br>W02023/217847 EN 2023.11.16  |                                                                                                                                                               |
| (71) 申请人 卡波塞自然有限公司<br>地址 比利时哈勒                    |                                                                                                                                                               |
| (72) 发明人 G·柯普 H·伯纳特<br>M·乌尔里希 N·库内特<br>N·库马里      | 权利要求书2页 说明书28页<br>序列表(电子公布) 附图4页                                                                                                                              |

(54) 发明名称  
具有抗微生物活性的肽

(57) 摘要  
本发明涉及一种肽,其中,所述肽具有与SEQ ID N°1或SEQ ID N°2表现出至少95%序列同一性的氨基酸序列。本发明还公开了包含所述肽的组合物,以及具体用途。

1. 一种肽,其中,所述肽具有根据SEQ ID N°1的氨基酸序列,或与SEQ ID N°2表现出至少98%序列同一性,或与根据SEQ ID N°2的序列的差异在于最多2个氨基酸。
2. 如权利要求1所述的肽,其中,所述肽是根据SEQ ID N°1或SEQ ID N°2的肽。
3. 如权利要求1或2所述的肽,其中,所述肽在其N末端包含信号肽。
4. 如前述权利要求1至3中任一项所述的肽,其中,所述信号肽与SEQ ID N°3具有至少95%的序列同一性或具有根据SEQ ID N°3的序列。
5. 如前述权利要求1至4中任一项所述的肽,其中,所述肽具有抗细菌和/或抗真菌活性。
6. 如权利要求5所述的肽,其中,所述活性是针对革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌和/或真菌,优选菌丝真菌和酵母。
7. 如前述权利要求中任一项所述的肽,其中,所述肽来源于或分离自可可(Theobroma cacao),优选可可品种CCN-51。
8. 如前述权利要求中任一项所述的肽,其中,所述肽是重组肽或合成肽。
9. 如前述权利要求中任一项所述的肽,其中,所述肽设置有亲和和标签。
10. 一种组合物,其包含与SEQ ID N°1或SEQ ID N°2表现出至少95%序列同一性或根据SEQ ID N°1或SEQ ID N°2的序列的差异在于最多5个氨基酸的肽,以及赋形剂。
11. 如权利要求10所述的组合物,其中,所述肽包含信号肽,所述信号肽与SEQ ID N°3具有至少95%的序列同一性或具有根据SEQ ID N°3的序列。
12. 如权利要求10或11中任一项所述的组合物,其中,所述组合物是液体、半固体、固体或气体形式,和/或其中,所述组合物的剂型是片剂、胶囊、粉末、颗粒、气雾剂、糊剂、糖浆、混悬剂、乳液或溶液。
13. 与SEQ ID N°1或SEQ ID N°2表现出至少95%序列同一性或根据SEQ ID N°1或SEQ ID N°2的序列的差异在于最多5个氨基酸的肽或如权利要求10至12中任一项所述的组合物,其用于治疗用途。
14. 如权利要求13所述的用于治疗用途的肽或组合物,其中,所述肽包含信号肽,所述信号肽与SEQ ID N°3具有至少95%的序列同一性或具有根据SEQ ID N°3的序列。
15. 与SEQ ID N°1或SEQ ID N°2表现出至少95%序列同一性或根据SEQ ID N°1或SEQ ID N°2的序列的差异在于最多5个氨基酸的肽或如权利要求10至12所述的组合物,其用于治疗有需要的受试者的细菌和/或真菌感染的用途。
16. 如权利要求15所述用途的肽或组合物,其中,所述肽包含信号肽,所述信号肽与SEQ ID N°3具有95%的序列同一性或具有根据SEQ ID N°3的序列。
17. 如权利要求15至16所述用途的肽或组合物,其中,所述受试者是人类或动物。
18. 与SEQ ID N°1或SEQ ID N°2表现出至少95%序列同一性或根据SEQ ID N°1或SEQ ID N°2的序列的差异在于最多5个氨基酸的肽或权利要求10至11所述的组合物用于作物保护、作为饲料或食品添加剂、防腐剂、作为去污剂或化妆品应用的用途。
19. 如权利要求18所述的用途,其中,所述肽包含信号肽,所述信号肽与SEQ ID N°3具有95%的序列同一性或具有根据SEQ ID N°3的序列。
20. 如权利要求18至19中任一项所述的用途,其中,所述肽或组合物用于控制植物、优选作物中的病原体。

21. 如权利要求20所述的用途,其中,所述病原体选自革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌和/或真菌的组。

22. 用于获得肽的方法,所述肽与SEQ ID N°1或SEQ ID N°2表现出至少95%序列同一性或者与根据SEQ ID N°1或SEQ ID N°2的序列的差异在于最多5个氨基酸,其中,所述肽为重组肽、合成肽、或者从可可中提取或沉淀出。

23. 如权利要求22所述的方法,其中,所述肽提取自可可豆浆液。

24. 一种载体,其包含下述肽的编码序列,所述肽与SEQ ID N°1或SEQ ID N°2具有至少95%的序列同一性或根据SEQ ID N°1或SEQ ID N°2的序列的差异在于最多5个氨基酸,并且可选地包含N末端信号肽序列,所述信号肽序列与SEQ ID N°3具有95%的序列同一性,其中,所述载体被设计为允许所述肽在表达系统中表达。

25. 一种表达权利要求1至9中任一项所述的肽的转基因植物。

26. 一种生产权利要求25所述的转基因植物的方法,其中,所述方法包括下述步骤:将编码所述肽的核酸引入植物细胞中,从而产生表达所述肽的经转化的植物细胞,和将所述经转化的植物细胞再生为转基因植物。

27. 一种植物种子,其包覆有权利要求1至12中任一项的肽或组合物。

## 具有抗微生物活性的肽

### 技术领域

[0001] 本发明涉及抗微生物肽的技术领域,更具体而言,涉及天然植物衍生的肽,其对各种细菌和真菌菌株表现出抗微生物活性。具体而言,本发明涉及一种源自可可植物豌豆球蛋白的天然、重组或合成肽。本发明还涉及所述肽在治疗植物、动物和人类的细菌和真菌感染中的用途。

### 背景技术

[0002] 细菌抗生素耐药性是食品和农业行业、医疗和兽医行业等面临的一个重大问题。特别令人担忧的是,具有致命抗生素耐药性的细菌可能会从食用动物转移到人类消费者身上。

[0003] 目前控制抗生素耐药细菌发展和扩散的方法包括改变抗生素的使用和不同抗生素的使用模式、加强政府监督和监管、以及不断开发新的和改良的抗生素。然而,大多数细菌适应抗生素的使用以及对现有和新抗生素产生耐药性的能力通常会克服这些常规措施,并需要继续开发控制细菌抗生素耐药性的替代手段。

[0004] 抗微生物肽(AMP)是存在于动物、植物、昆虫和微生物中的一类多样化的天然化合物。这些肽负责防御(其他)微生物,因此,它们可以进一步用作化学防腐剂的替代品。然而,由于自然界中可用性差、生产成本低、稳定性低以及配制成合适的治疗产品复杂,它们在治疗植物、人类和/或动物微生物感染方面的应用迄今为止受到限制。因此,抗微生物肽在作物保护以及人类和兽医治疗中的应用仍然有限。

[0005] 抗微生物蛋白表现出多种三维结构,这在很大程度上决定了它们的活性和稳定性。某种蛋白质的稳定性通常是临床和/或工业应用的关键参数。

[0006] 最初对植物衍生的AMP分子产生兴趣之后,分离出了第一种植物衍生的AMP-嘌呤硫素。Caleya等在Appl.Microbiol,1972,23(5)998-100中报道了来自小麦和大麦粉的低分子量蛋白质嘌呤硫素,它是一种AMP,可有效对抗多种植物病原菌,如青枯假单胞菌(*Pseudomonas solanacearum*)、菜豆黄单胞菌(*Xanthomonas phaseoli*)、野油菜黄单胞菌(*X.campestris*)、解淀粉欧文氏菌(*Erwinia amylovora*)和五种棒状杆菌菌株。此后,发现了几类主要的AMP,包括硫脲(I-V型)、防御素、环肽、2S白蛋白样蛋白和脂质转移蛋白。

[0007] 植物豌豆球蛋白是一类常见的植物种子储存蛋白。据显示,某些豌豆球蛋白经过加工产生植物防御肽。由豌豆球蛋白产生的抗微生物肽中,最具代表性的是澳洲坚果(*Macadamia integrifolia*)的抗微生物肽。澳洲坚果仁含有666个氨基酸的豌豆球蛋白,其包括靠近N端信号序列的212个氨基酸的高度亲水区。

[0008] W01998027805公开了一类具有抗微生物特性的豌豆球蛋白型肽。原型蛋白质是天然来源的并且从澳洲坚果以及包括可可(*Theobroma cacao*)在内的某些其他物种中分离出来。特别是,标记为47个氨基酸的TcAMP1(可可抗微生物蛋白1)和60个氨基酸的TcAMP2(可可抗微生物蛋白2)的两个序列源自编码566个氨基酸(aa)的可可豌豆球蛋白种子储存蛋白基因序列,并在大肠杆菌中重组表达。然而,分离的重组肽及其制备的组合物在高剂量(5-

20 $\mu$ g/ml) 下具有有效的抗微生物特性。

[0009] Marcus等在Plant.Mol.Biol Rep(2008) 26, 75-87中研究了在豌豆球蛋白种子蛋白的N端亲水区中鉴定出的三种澳洲坚果肽序列和两种可可肽序列。根据N端近端亲水区中特征性的C-X-X-X-C-(10-12)-C-X-X-X-C基序的存在来预测该肽的抗微生物活性。在大肠杆菌中表达了带有His标签版本的假定肽。获得的重组肽显示对六种植物病原体菌株具有体外抗微生物活性,但有效剂量非常高。

[0010] 厄瓜多尔是最重要的口味优良的可可生产国,约占世界产量的50%。厄瓜多尔生产的口味优良的可可主要属于Nacional品种(有时也称为National或Arriba)。除了香气浓郁的传统Nacional可可外,厄瓜多尔自20世纪60年代以来一直在种植可可克隆品种CCN-51。与Nacional不同,CCN-51因其香气较弱而被视为散装可可类型。然而,它对气候条件的变化的耐受性更强,对不同的病原体有抵抗力,产量也高于其他可可类型。因此,CCN-51杂交品种对于厄瓜多尔农民种植而言非常受欢迎。US 2004/0172683描述了几种来自可可豆种子的多肽,这些多肽负责可可风味。

[0011] W02002086125A2公开了一种豌豆球蛋白衍生肽,其作为可可增味剂用于生产可可和巧克力。

[0012] 本发明描述了一种衍生自可可的未知肽,其对大量动物和植物病原微生物具有高效和活性。所述肽使用安全,优选不含可能有毒并且对环境有害的腐蚀性化学物质。

## 发明内容

[0013] 本发明及其实施方式旨在提供解决上述一个或多个缺点的解决方案。为此,本发明涉及权利要求1所述的具有抗微生物活性的肽。更具体而言,本发明提供了与SEQ ID N°1或SEQ ID N°2表现出至少95%序列同一性的肽。令人惊讶的是,发现这种从可可中获得的或通过重组或合成产生的肽具有针对广谱病原体的抗细菌和/或抗真菌活性。所述肽的优选实施方式示于权利要求2至9中的任一项中。

[0014] 在第二方面,本发明涉及根据权利要求10所述的包含肽的组合物。所述组合物的优选实施方式示于权利要求11和12。

[0015] 在第三方面,本发明涉及权利要求13所述的肽用于治疗目的的用途。所述用途的优选实施方式示于权利要求14至21中的任一项中。更特别地,所述肽用于治疗人类、动物或植物中的革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌和/或真菌,优选菌丝真菌或酵母的感染。

[0016] 在第四方面,本发明涉及一种根据权利要求22和23所述的获得所述肽的方法。

[0017] 在第五方面,本发明涉及一种包含编码肽的基因序列的载体,该载体允许表达权利要求24所述的肽,本发明还涉及权利要求25所述的转基因植物,以及权利要求26所述的获得转基因植物的方法。

[0018] 在最后方面,本发明涉及根据权利要求27所述的包覆有所述肽的种子。

## 附图说明

[0019] 图1显示了在二维(2D)SDS聚丙烯酰胺凝胶上分离后从可可豆中分离出的蛋白质。水平分离是根据它们的等电点(pI, pH 4-7)进行的,垂直分离是基于它们的分子量进行的。如图2A所示,突出显示的点通过肽质量指纹分析。左边的数字表示参考标志物的分子量

(kDa)。

[0020] 图2显示了通过MALDI-ToF分析确定的肽质量指纹片段的检测和序列定位的代表性方案。图2A中带下划线的氨基酸序列被鉴定为从可可蛋白的2D SDS聚丙烯酰胺凝胶中获得的根据SEQ ID N° 1的肽的胰蛋白酶消化产物。图2B中带下划线的氨基酸序列被鉴定为从SDS聚丙烯酰胺凝胶中获得的根据SEQ ID N° 2的重组肽的胰蛋白酶消化产物。

[0021] 图3显示了含有SEQ ID N° 2肽的样品的LC-MS结果。在非还原 (图3A) 和还原 (图3B) 样品中,检测到的肽的质量均为15.3kDa。

[0022] 图4显示了根据乳酸脱氢酶 (LDH) 释放试验得出的SEQ ID N° 2肽对白色念珠菌 (*Candida albicans*) 和HaCaT细胞的细胞毒性。每个实验都使用10,000个细胞进行,见所述细胞与不同浓度的肽一起温育1小时。

### 具体实施方式

[0023] 本发明涉及用于医疗或药物用途的肽或包含所述肽作为活性成分的组合,其中,所述肽具有根据SEQ ID N° 1或SEQ ID N° 2的氨基酸序列。此外,本发明涉及所述肽的用途、获得所述肽的方法、以及允许表达所述肽的载体。

[0024] 除非另有定义,本发明公开中使用的所有术语,包括技术术语和科学术语,均具有本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义。为了进一步指导,包括术语定义,以便更好地理解本发明的教导。

[0025] 本文使用的下列术语具有以下含义:

[0026] 本文中使用的“一个”、“一种”和“所述”既指单数,又指复数,除非上下文另有明确规定。例如,“一个区室”是指的是一个或多个区室。

[0027] 本文使用的“约”是指可测量的值,如参数、量、时距等,旨在涵盖与指定值之间的 $\pm 20\%$ 以下的变化,优选 $\pm 10\%$ 以下,更优选 $\pm 5\%$ 以下,甚至更优选 $\pm 1\%$ 以下,并且更优选 $\pm 0.1\%$ 以下的变化,只要这种变化适合在所公开的发明中实施。然而,应当理解的是,修饰语“约”所指的值本身也是具体公开的。

[0028] 本文使用的“包括”、“包含”和“含有”及“由...组成”与“包括”及其变形或“含有”及其变形同义,并且是包容性或开放式术语,指定后面的内容(例如组件)的存在,并且不是排除或不包括本领域中已知或本文公开的额外的、未列举的组件、特征、元素、成员、步骤的存在。

[0029] 此外,除非另有说明,说明书和权利要求书中的术语第一、第二、第三等用于区分类似元素,而不一定用于描述连续的或时间顺序。应当理解的是,在适当的情况下,如此使用的术语可以互换,并且本文描述的本发明的实施方式能够按照与本文描述或说明的顺序不同的顺序进行操作。

[0030] 通过端点表述的数值范围包括该范围内的所有数字和分数,以及所表述的端点。

[0031] 除非另有定义,此处以及整个说明书中的表述“重量%”、“重量百分比”、“%wt”或“wt%”是指基于制剂总重量的各个组分的相对重量。

[0032] 尽管术语“一个或多个”或“至少一个”,如一组成员中的一个或多个或者至少一个成员,本身是清楚的,但通过进一步举例,该术语尤其涵盖对所述成员中的任一个,或对所述成员中的任意两个以上,例如,任意 $\geq 3$ 、 $\geq 4$ 、 $\geq 5$ 、 $\geq 6$ 或 $\geq 7$ 个等所述成员,以及直至所有

所述成员的提及。

[0033] 本文所用的术语“肽”是指含有两个以上氨基酸残基的任何化合物,所述氨基酸残基通过由一个氨基酸残基的羧基和相邻氨基酸残基的氨基形成的酰胺键连接。氨基酸残基可以具有L型以及D型,并且可以是天然存在的或合成的,线性的和环状的。

[0034] 术语“治疗有效量”是指可以有效改善疾病症状的量。治疗有效量可以是“预防有效量”,因为预防可以被认为是治疗。

[0035] 本文中使用的可可豆“浆液”定义为分离可可脂后的研磨可可碎粒(nibs)质量。

[0036] 除非另有定义,本发明公开中使用的所有术语,包括技术术语和科学术语,均具有本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义。作为进一步的指导,对说明书中使用的术语进行了定义,以便更好地理解本发明的教导。本文使用的术语或定义仅用于帮助理解本发明。

[0037] 在本说明书各处提到的“一个实施方式”或“实施方式”意味着结合该实施方式描述的特定特征、结构或特性包含在本发明的至少一个实施方式中。因此,本说明书各处出现的短语“在一个实施方式中”或“在实施方式中”不一定都指同一实施方式,但是也可以是。此外,本领域技术人员从本公开内容可以清楚地看出,特定的特征、结构或特性可以以任何合适的方式在一个或多个实施方式中进行组合。此外,尽管本文描述的某些实施方式包括其他实施方式中包括的某些特征但不包括其他特征,但是不同实施方式的特征的组合意图在本发明的范围内并且形成不同的实施方式,正如本领域技术人员所理解的。例如,在以下权利要求中,任何要求保护的实施方式均可以任意组合使用。

[0038] 在第一方面,本发明涉及一种肽,其中,所述肽具有与SEQ ID N°1或SEQ ID N°2表现出至少80%序列同一性的氨基酸序列。优选地,所述肽具有与SEQ ID N°1或SEQ ID N°2表现出至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或更优选100%序列同一性的氨基酸序列。在优选实施方式中,所述肽具有与SEQ ID N°1或SEQ ID N°2表现出至少95%同一性的氨基酸序列。

[0039] 本文所用的术语“序列同一性”是指在比较窗口内序列在逐个氨基酸基础上相同的程度。因此,“序列同一性百分比”是通过如下计算的:在比较窗口上比较两个最佳比对的序列,确定两个序列中出现相同氨基酸的位置数以得到匹配位置的数量,将匹配位置的数量除以比较窗口(即窗口大小)中的总位置数,并将结果乘以100以得到序列同一性百分比。缺口,即比对中残基存在于一个序列中但不存在于另一序列中的位置,被视为具有不相同残基的位置。确定序列同一性的百分比可以手动完成,或者利用本领域中可用的计算机程序完成。PILEUP就是一个有用算法的实例。执行BLAST分析的软件可通过美国国家生物技术信息中心(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)公开获取。

[0040] 在另一实施方式中,所述肽具有的序列与序列SEQ ID N°1或SEQ ID N°2之一的差异在于最多24个、更优选最多23个、甚至更优选最多22,甚至更优选最多21个、甚至更优选最多20个、甚至更优选最多19个、甚至更优选最多18个、甚至更优选最多17个、甚至更优选最多16个、甚至更优选最多15个、甚至更优选最多14个、甚至更优选最多13个、甚至更优选最多12个、甚至更优选最多11个、甚至更优选最多10个、甚至更优选最多9个、甚至更优选最多8个、甚至更优选最多7个、甚至更优选最多6个、甚至更优选最多5个、甚至更优选最多4

个、甚至更优选最多3个、甚至更优选最多2个、甚至更优选最多1个氨基酸残基。

[0041] 在一个实施方式中,所述肽具有根据SEQ ID N°1的氨基酸序列,或与SEQ ID N°2表现出至少98%序列同一性或根据SEQ ID N°2的序列的差异在于最多2个氨基酸。

[0042] 作为另选,本发明的肽具有根据SEQ ID N°1或N°2的序列同一性。

[0043] 本文考虑的肽的氨基酸序列变体可以是取代、插入或缺失变体。缺失变体缺少一个或多个肽残基,所述残基可能对功能并不重要。替代变体通常在肽内的一个或多个位点含有替代氨基酸,并且可以被设计用于调节多肽的一种或多种特性,诸如对抗蛋白水解切割的稳定性。取代优选是保守的,即一个氨基酸被具有相似大小和侧链或官能团的氨基酸所取代。保守取代是本领域所熟知的,并且包括例如丙氨酸变为甘氨酸、缬氨酸或亮氨酸;精氨酸变为赖氨酸;天冬酰胺变为谷氨酰胺;天冬氨酸变为谷氨酸;半胱氨酸变为蛋氨酸;谷氨酰胺变为天冬酰胺;谷氨酸变为天冬氨酸;甘氨酸变为脯氨酸;组氨酸变为谷氨酰胺、酪氨酸、精氨酸、赖氨酸、天冬酰胺或半胱氨酸;异亮氨酸变为亮氨酸或缬氨酸;亮氨酸变为缬氨酸或异亮氨酸;赖氨酸变为精氨酸;苯丙氨酸变为酪氨酸、亮氨酸或蛋氨酸;丝氨酸变为苏氨酸;苏氨酸变为丝氨酸;色氨酸变为苯丙氨酸;酪氨酸变为色氨酸或苯丙氨酸;缬氨酸变为异亮氨酸或亮氨酸。

[0044] 优选地,本发明的肽衍生自或分离自可可。更具体而言,本发明的所述肽衍生自可可的豌豆球蛋白的N末端区域。豌豆球蛋白是在多种植物物种中存在和表征的储存蛋白,所述植物诸如但不限于菠萝 (*Ananas comosus*)、花生 (*Arachis hypogaea*)、甜菜 (*Beta vulgaris*)、墨西哥辣椒 (*Capsicum annuum*)、中华辣椒 (*Capsicum chinense*)、美国山核桃 (*Carya illinoensis*)、藜麦 (*Chenopodium quinoa*)、长蒴黄麻 (*Corchorus olitorius*)、笋瓜 (*Cucurbita maxima*)、野草莓 (*Fragaria vesca*)、大豆 (*Glycine max*)、树棉 (*Gossypium arboreum*)、哥伦比亚锦葵 (*Herrania umbratica*)、大麦 (*Hordeum vulgare*)、麻风树 (*Jatropha curcas*)、胡桃 (*Juglans regia*)、澳洲坚果 (*Macadamia integrifolia*)、博落回 (*Macleaya cordata*)、小果野蕉 (*Musa acuminata*)、鸦片罂粟 (*Papaver somniferum*)、蓖麻 (*Ricinus communis*)、番茄 (*Solanum lycopersicum*)、菠菜 (*Spinacia oleracea*)、火轮木 (*Stenocarpus sinuatus*)、可可 (*Theobroma cacao*) 和玉米 (*Zea mays*)。这种蛋白质通常含有极其亲水的N近端区域和C端区域。此外,它们携带有疏水性N端信号肽,该信号肽通常在蛋白质成熟过程中被去除。所述前体蛋白的N近端区域特别有趣,因为它包含至少两对、优选四对具有相同间距模式的半胱氨酸基序(CXXXX)。

[0045] 在其他实施方式中,本文公开的肽源自可可品种CCN-51。令人惊讶的是,已知对微生物感染具有高度抵抗力的可可品种CCN-51显示特别富含豌豆球蛋白衍生的N端肽。

[0046] 在另一个或其他实施方式中,所述肽在其N末端包含信号肽。优选地,所述信号肽具有根据SEQ ID N°3的序列。在另一实施方式中,所述信号肽与SEQ ID N°3表现出至少95%、96%、97%、98%、99%或更优选100%的序列同一性。作为另选,所述肽具有信号肽序列,所述信号肽序列与序列SEQ ID N°3的差异在于最多3个氨基酸残基、更优选最多2个氨基酸残基、甚至更优选1个氨基酸残基。从天然来源分离的豌豆球蛋白通常不具有所述信号肽。令人惊讶的是,当将信号肽添加到肽中时,其抗微生物活性得到增强。

[0047] 在另一实施方式中,所述肽是重组肽或合成肽。合适的表达系统,如大肠杆菌,或本领域已知的另一种合适系统,在插入含有具有SEQ ID N°1或SEQ ID N°2的肽的编码序列

的载体后,产生肽。可以采用本领域已知的任何合适的蛋白质/肽合成方法来合成本发明的肽。

[0048] 在其他或另一个实施方式中,本文所述的肽在其N和/或C末端设置有亲和标签。亲和标签用于在大肠杆菌和其他系统中表达的重组蛋白和肽的亲和纯化。所述标签可以是多组氨酸标签,其是由至少六个组氨酸(His)残基组成的氨基酸基序。

[0049] 在一个实施方式中,含有信号肽的本文公开的肽具有根据SEQ ID N°4或N°5的序列同一性。

[0050] 作为另选且非限制性地,所述肽可以用交替组氨酸和谷氨酰胺残基的HQ标签(HQHQQ)、交替组氨酸和天冬酰胺的HN标签(HNHNHNHNHNHN)、HAT标签(KDHLIHNHVHKEEHAHAHNK)、ALFA标签(SRLEEELRRRLTE)、Avi标签(GLNDIFEAQKIEWHE)、C标签(EPEA)、钙调蛋白标签(KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL)、聚谷氨酸标签、聚精氨酸标签、E标签(GAPVPYPDPLEPR)、FLAG标签(DYKDDDDK)、HA标签(YPYDVPDYA)、Myc标签(EQKLISEEDL)、NE标签(TKENPRSNQEESYDDNES)、Rho1D4标签(TETSQVAPA)、S标签(KETAAAKFERQHMDs)、SBP标签(DEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREP)或Strep标签(WSHPQFEK)来标记。

[0051] 对本发明肽的分析表明,该肽具有抗细菌和/或抗真菌活性。

[0052] 抗微生物肽本身具有特定的三维结构,可以使用X射线晶体学或核磁共振技术确定。尽管不希望受理论的束缚,但据认为这种结构在所观察到的所述肽的活性中发挥作用。本发明的肽所属的 $\alpha$ 螺旋植物衍生抗微生物肽(AMP)通常具有两亲性螺旋,其中螺旋的一面主要为亲水性,而另一面主要为疏水性。这种结构通常出现在破坏细胞膜而导致细胞内容物泄漏和裂解的AMP中,以及进入细胞来攻击细胞内其他结构的AMP中。 $\alpha$ -螺旋AMP在溶液中通常结构无序,这有助于穿过细胞壁的致密网络。与脂质头部下方的疏水性且带电的细胞膜结合后,形成二级结构( $\alpha$ -螺旋),使蛋白质能够穿透细胞膜。这种有序/无序转变主要受 $\alpha$ 螺旋内疏水域长度的调节。过长的疏水螺旋会导致溶液中出现有序结构,这对AMP活性产生负面影响。

[0053] 在一个实施方式中,所述肽对革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌和真菌,优选菌丝真菌或酵母菌具有活性。非限制性地,所述肽对选自包含以下的组的细菌具有活性:不动杆菌属(*Acinetobacter* spp.)、巴尔通体属(*Bartonella* spp.)、博德特菌属(*Bordetella* spp.)、包柔螺旋体属(*Borrelia* spp.)、布鲁氏菌属(*Brucella* spp.)、弯曲菌属(*Campylobacter* spp.)、衣原体属(*Chlamydia* spp.)、梭菌属(*Clostridium* spp.)、棒杆菌属(*Corynebacterium* spp.)、肠球菌属(*Enterococcus* spp.)、肠杆菌属(*Enterobacter* spp.)、欧文氏菌属(*Erwinia* spp.)、埃希氏菌属(*Escherichia* spp.)、弗朗西斯菌属(*Francisella* spp.)、嗜血杆菌属(*Haemophilus* spp.)、螺杆菌属(*Helicobacter* spp.)、克雷伯菌属(*Klebsiella* spp.)、军团菌属(*Legionella* spp.)、钩端螺旋体属(*Leptospira* spp.)、李斯特菌属(*Listeria* spp.)、分枝杆菌属(*Mycobacterium* spp.)、支原体属(*Mycoplasma* spp.)、奈瑟菌属(*Neisseria* spp.)、立克次氏体属(*Rickettsia* spp.)、沙门氏菌属(*Salmonella* spp.)、志贺氏杆菌属(*Shigella* spp.)、葡萄球菌属(*Staphylococcus* spp.)、链球菌属(*Streptococcus* spp.)、密螺旋体属(*Treponema* spp.)、脲原体属(*Ureaplasma* spp.)、弧菌属(*Vibrio* spp.)、耶尔森菌属(*Yersinia* spp.)、食酸菌属(*Acidovorax* spp.)、农杆菌属(*Agrobacterium* spp.)、节杆菌属(*Arthrobacter* spp.)、芽

孢杆菌属(*Bacillus* spp.)、伯克氏菌属(*Burkholderia* spp.)、棒形杆菌属(*Clavibacter* spp.)、克罗诺杆菌属(*Cronobacter* spp.)、短小杆菌属(*Curtobacterium* spp.)、雷夫松氏菌属(*Lefisonia* spp.)、泛菌属(*Pantoea* spp.)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus* spp.)、果胶杆菌属(*Pectobacterium* spp.)、植原体属(*Phytoplasma* spp.)、变形杆菌属(*Proteus* spp.)、假单胞菌属(*Pseudomonas* spp.)、罗尔斯通氏菌属(*Ralstonia* spp.)、根瘤杆菌属(*Rhizobacter* spp.)、根单胞菌属(*Rhizomonas* spp.)、红球菌属(*Rhodococcus* spp.)、沙雷氏菌属(*Serratia* spp.)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas* spp.)、螺原体属(*Spiroplasma* spp.)、链霉菌属(*Streptomyces* spp.)、黄单胞菌属(*Xanthomonas* spp.)、木质部小菌属(*Xylella* spp.)或嗜木质菌属(*Xylophilus* spp.)。

[0054] 不受限制地,本发明的肽对选自包含以下的组的真菌具有活性:阿耶罗菌属(*Ajellomyces* spp.)、曲霉属(*Aspergillus* spp.)、蛙粪霉属(*Basidiobolus* spp.)、芽生菌属(*Blastomyces* spp.)、念珠菌属(*Candida* spp.)、球孢子菌属(*Coccidioides* spp.)、耳霉属(*Conidiobolus* spp.)、隐球菌属(*Cryptococcus* spp.)、伊蒙菌属(*Emmonsia* spp.)、组织胞浆菌属(*Histoplasma* spp.)、有孢汉逊酵母属(*Hanseniaspora* spp.)、拉卡齐亚菌属(*Lacazia* spp.)、副球孢子菌属(*Paracoccidioides* spp.)、肺孢子虫属(*Pneumocystis* spp.)、孢子丝菌属(*Sporothrix* spp.)、葡萄状穗霉属(*Stachybotrys* spp.)、篮状菌属(*Talaromyces* spp.)、青风藤内生真菌属(*Acrocalymma* spp.)、春孢锈菌属(*Aecidium* spp.)、多隔镰刀菌属(*Albonectria* spp.)、*Allodus* spp.、链格孢菌属(*Alternaria* spp.)、葡萄孢属(*Amphobotrys* spp.)、李黑节病菌属(*Apiosporina* spp.)、蜜环菌属(*Armillaria* spp.)、布氏白粉菌属(*Blumeria* spp.)、葡萄核盘菌属(*Botryotinia* spp.)、葡萄孢菌属(*Botrytis* spp.)、长喙壳菌属(*Ceratosystis* spp.)、炭疽菌属(*Colletotrichum* spp.)、拟隐壳孢属菌属(*Cryptosporiopsis* spp.)、外担菌属(*Exobasidium* spp.)、镰刀菌属(*Fusarium* spp.)、肉座菌属(*Hypocrea* spp.)、小球腔菌属(*Leptosphaeria* spp.)、梨孢菌属(*Magnaporthe* spp.)、栅锈菌属(*Melampsora* spp.)、季也蒙酵母属(*Meyerozyma* spp.)、褐腐病菌属(*Monilinia* spp.)、球腔菌属(*Mycospharella* spp.)、叉丝壳属属(*Microsphaera* spp.)、毛霉属(*Mucor* spp.)、青霉菌属(*Penicillium* spp.)、毕赤酵母属(*Pichia* spp.)、疫霉属(*Phytophthora* spp.)、酵母菌属(*Saccharomyces* spp.)、掷孢酵母属(*Sporobolomyces* spp.)、根肿菌属(*Plasmodiophora* spp.)、叉丝单囊壳属属(*Podosphaera* spp.)、柄锈菌属(*Puccinia* spp.)、腐霉菌属(*Pythium* spp.)、丝核菌属(*Rhizoctonia* spp.)、核盘菌属(*Sclerotinia* spp.)、壳针孢属属(*Septoria* spp.)、外囊菌属(*Taphrina* spp.)、亡革菌属(*Thanatephorus* spp.)、孢圆酵母属(*Torulaspora* spp.)、单胞锈菌属(*Uromyces* spp.)、黑粉菌属(*Ustilago* spp.)、黑星菌属(*Venturia* spp.)或轮枝菌属(*Verticillium* spp.)。

[0055] 第二方面,本发明提供了包含如上文段落中描述的肽的组合物。该组合物特别适用于药物和兽医应用、用于作物保护和/或用于化妆品应用。

[0056] 在一个实施方式中,所述组合物包含与SEQ ID N°1或SEQ ID N°2表现出至少95%序列同一性或与根据SEQ ID N°1或SEQ ID N°2的序列的差异在于最多5个氨基酸的肽和赋形剂。

[0057] 在本文公开的组合物的某些实施方式中,所述肽包含信号肽,所述信号肽与SEQ

ID N°3具有至少95%的序列同一性或具有根据SEQ ID N°3的序列。

[0058] 在一个实施方式中,所述组合物为液体、半固体、固体或气体,和/或为片剂、胶囊、粉末、颗粒、气雾剂、糊剂、糖浆、悬浮液、乳液或溶液的剂型。所述组合物的非限制性实例是可溶性粉末、可溶性颗粒、可湿性颗粒、片剂制剂、干流动剂、水流动剂、可湿性可分散颗粒、油分散液、悬浮液浓缩液、可分散浓缩液、可乳化浓缩液、水性悬浮液、肥料颗粒或可喷雾组合物。所述组合物可配制为适合口服、注射、静脉内、肌肉内、皮肤、吸入、局部或鼻内施用。在其他实施方式中,所述组合物被配制为允许涂覆一个或多个物体、喷涂、喷雾涂覆、蒸发、雾化、雾状化、悬浮、稀释等。

[0059] 在某些实施方式中,组合物包含药理学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。优选地,所述赋形剂选自填充剂、粘合剂、崩解剂、甜味剂、包衣剂、润滑剂和/或助流剂。稀释剂或填充剂可增加固体组合物的体积,并可使得含有该组合物的剂型更易于患者和护理人员处理。适用于本发明片剂的稀释剂包括,例如,微晶纤维素(例如 **Avicel®**)、超细纤维素、乳糖、淀粉、预胶化淀粉、碳酸钙、硫酸钙、糖、葡萄糖结合剂、糊精、葡萄糖、二水合磷酸氢钙、三水合磷酸钙、高岭土、碳酸镁、氧化镁、麦芽糊精、甘露醇、聚甲基丙烯酸酯(例如 **Eudragit®**)、氯化钾、粉状纤维素、氯化钠、山梨醇和滑石。

[0060] 压制成剂型(如片剂)的固体组合物可以包含赋形剂,其功能包括帮助在压制后将活性成分和其他赋形剂包含在一起。合适的粘合剂包括阿拉伯胶、海藻酸、卡波姆(例如卡波普)、羧甲基纤维素钠、糊精、乙基纤维素、明胶、瓜尔胶、氢化植物油、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素(例如 **Klucel®**)、羟丙基甲基纤维素(例如 **Methocel®**)、液体葡萄糖、硅酸镁铝、麦芽糊精、甲基纤维素、聚甲基丙烯酸酯、聚维酮(例如 **Kollidon®**、**Plasdone®**)、预胶化淀粉、海藻酸钠和淀粉。

[0061] 可以通过向组合物中添加崩解剂来增加压实固体组合物的溶解速率。合适的崩解剂包括海藻酸、羧甲基纤维素钙、羧甲基纤维素钠(例如 **Ac-Di-Sol®**、**Primellose®**)、胶体二氧化硅、交联羧甲基纤维素钠、交联聚维酮(例如 **Kollidon®**、**Polyplasdone®**)、瓜尔胶、硅酸镁铝、甲基纤维素、微晶纤维素、波拉克林钾、粉状纤维素、预胶化淀粉、海藻酸钠、淀粉甘醇酸钠(例如 **Explotab®**)和淀粉。

[0062] 可以添加助流剂来改善非压实固体组合物的流动性并提高剂量的准确性。可用作助流剂的赋形剂包括胶体二氧化硅、三硅酸镁、硬脂酸镁、粉状纤维素、淀粉、滑石和磷酸三钙。

[0063] 当通过压制粉末状组合物来制作诸如片剂等剂型时,组合物会受到冲头和模具的压力。某些赋形剂和活性成分往往会粘附在冲头和模具的表面上,这会导致产品具有凹坑和其他表面不规则现象。可以向组合物中添加润滑剂以减少粘附并简化产品从模具中的释放。润滑剂包括硬脂酸镁、硬脂酸钙、单硬脂酸甘油酯、棕榈酸硬脂酸甘油酯、氢化蓖麻油、氢化植物油、矿物油、聚乙二醇、苯甲酸钠、十二烷基硫酸钠、硬脂酰富马酸钠、硬脂酸、滑石和硬脂酸锌。优选地,所述润滑剂以0.25重量%至1重量%(w/w)存在。

[0064] 调味剂和增味剂使剂型对患者来说更可口。可以包括在本文所述组合物中的用于药物产品的常见调味剂和增味剂包括麦芽酚、香兰素、乙基香兰素、薄荷醇、柠檬酸、富马酸、乙基麦芽酚和酒石酸。

[0065] 固体组合物还可以使用任何药学上可接受的着色剂进行染色,以改善其外观和/或方便患者识别产品和单位剂量水平。

[0066] 在一个实施方式中,特别是当组合物旨在用于农业用途时,所述赋形剂是农业相容性赋形剂。所述的“农业相容性载体”或“农业相容性辅料”可视为一种载体,一般是惰性的并且必须是农业上可接受的。因此,“农业相容性”一词表示可以在田间条件下常规使用而不会干扰种植者的种植设备,并且不会对种植区域中的作物生长或所需的生态平衡产生不利影响的物质。

[0067] 农业上相容的载体或赋形剂可以是固体。固体载体或赋形剂可以包括但不限于粘土、天然或合成的硅酸盐、二氧化硅、树脂、蜡、固体肥料、聚合物、颗粒状物质、珍珠岩、珍珠岩颗粒、泥炭、泥炭颗粒、土壤、蛭石、木炭、糖厂碳化压榨泥、稻壳、羧甲基纤维素、细砂、碳酸钙、面粉、明矾、淀粉、滑石、聚乙烯吡咯烷酮或其组合。农业上相容的载体或赋形剂可以是液体。液体载体或赋形剂可以包括但不限于水、醇、酮、石油馏分、油、芳香烃或石蜡烃、氯化烃、液化气或其组合。更具体而言,农业上相容的载体或赋形剂可以包括分散剂、表面活性剂、添加剂、增稠剂、抗结块剂、残渣分解剂、堆肥配方、颗粒应用、硅藻土、着色剂、稳定剂、防腐剂、聚合物、涂层或或其组合。本领域技术人员可以考虑多种因素,诸如特定化合物、待施用接种物的植物、土壤类型、气候条件、接种物是液体、固体还是粉末形式等,容易地确定待使用的适当的载体或赋形剂。添加剂可以包括油、树胶、树脂、粘土、聚氧乙二醇、萜烯、粘性有机物、脂肪酸酯、硫酸化醇、烷基磺酸盐、石油磺酸盐、醇硫酸盐、烷基丁烷二酸钠、硫代丁烷二酸钠的聚酯、苯乙腈衍生物、蛋白质材料或其组合。蛋白质材料可以包括奶制品、小麦粉、豆粕、血液、白蛋白、明胶或其组合。增稠剂可以包括聚乙二醇的长链烷基磺酸酯、聚氧乙烯油酸酯或其组合。表面活性剂可以含有重质石油、重质石油馏分、多元醇脂肪酸酯、聚乙氧基化脂肪酸酯、芳基烷基聚氧乙烯二醇、烷基胺乙酸酯、烷基芳基磺酸盐、多元醇、烷基磷酸酯或其组合。所述防结块剂可以包括钠盐,如亚硫酸钠、硫酸钠、单甲基萘磺酸钠或其组合;或者钙盐,如碳酸钙、硅藻土或其组合。

[0068] 在一个实施方式中,所述组合物还包含下列中的一种或多种:水、其他营养物质、弱酸、植物油、精油、代谢促进剂、乳化剂、粘度剂、着色材料、助悬剂、分散剂、防腐剂、络合剂、稳定剂、载体、赋形剂或润湿剂或其任意组合。在一个实施方式中,所述组合物还包含至少一种油、表面活性剂和聚合物。

[0069] 所述组合物可以以常规方式制造。在某些实施方式中,本文提供的组合物包含一种或多种防腐剂以抑制微生物活性。合适的防腐剂包括含汞物质,如汞芬(metfen)和硫柳汞;稳定化二氧化氯;以及季铵化合物,如苯扎氯铵、十六烷基三甲基溴化铵和十六烷基氯化吡啶。

[0070] 本文所述的肽可以以0.1至50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、优选0.1至45 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、优选0.1至40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、优选0.1至35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、优选0.1至30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、优选0.1至25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、优选0.1至20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、优选0.1至15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、优选0.1至10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、优选0.1至9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、优选0.1至8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、优选0.1至7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、优选0.1至6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、优选0.1至5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、优选0.1至4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、优选0.1至3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、优选0.1至2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、优选0.1至1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、优选0.1至0.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、优选0.1至0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、优选0.1至0.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、优选0.1至0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、优选0.1至0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或优选0.1至0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的量配制在组合物中。

[0071] 作为另选,所述肽可以以0.2至50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、优选0.3至50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、优选0.4至50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、

优选0.5至50 $\mu$ g/ml、优选0.6至50 $\mu$ g/ml、优选0.7至50 $\mu$ g/ml、优选0.8至50 $\mu$ g/ml、优选0.9至50 $\mu$ g/ml、优选1至50 $\mu$ g/ml、优选2至50 $\mu$ g/ml、优选3至50 $\mu$ g/ml、优选4至50 $\mu$ g/ml、优选5至50 $\mu$ g/ml、优选6至50 $\mu$ g/ml、优选7至50 $\mu$ g/ml、优选8至50 $\mu$ g/ml、优选9至50 $\mu$ g/ml、优选10至50 $\mu$ g/ml、优选15至50 $\mu$ g/ml、优选0.5至20 $\mu$ g/ml、优选25至50 $\mu$ g/ml、优选30至50 $\mu$ g/ml、优选35至50 $\mu$ g/ml、优选40至50 $\mu$ g/ml、优选45至50 $\mu$ g/ml的量配制在组合物中。

[0072] 在另一实施方式中,所述组合物含有至少0.1重量%的肽,更优选至少0.5%、1重量%、2重量%、3重量%、4重量%、5重量%、6重量%、7重量%、8重量%、9重量%、10重量%、11重量%、12重量%、13重量%、14重量%、15重量%、16重量%、17重量%、18重量%、19重量%、20重量%、21重量%、22重量%、23重量%、24重量%、25重量%、26重量%、27重量%、28重量%、29重量%、30重量%、31重量%、32重量%、33重量%、34重量%、35重量%、36重量%、37重量%、38重量%、39重量%、40重量%、41重量%、42重量%、43重量%、44重量%、45重量%、46重量%、47重量%、48重量%、49重量%、50重量%、51重量%、52重量%、53重量%、54重量%、55重量%、56重量%、57重量%、58重量%、59重量%、60重量%、61重量%、62重量%、63重量%、64重量%、65重量%、66重量%、67重量%、68重量%、69重量%、70重量%、71重量%、72重量%、73重量%、74重量%、75重量%、76重量%、77重量%、78重量%、79重量%、80重量%、81重量%、82重量%、83重量%、84重量%、85重量%、86重量%、87重量%、88重量%、89重量%、90重量%、91重量%、92重量%、93重量%、94重量%、95重量%、96重量%、97重量%、98重量%、99重量%或99.5重量%的肽。

[0073] 第三方面,本文所述的肽或组合物适用于治疗用途。

[0074] 在一个实施方式中,用于治疗用途的肽或组合物包含与SEQ ID N°1或SEQ ID N°2表现出至少95%序列同一性的肽,或与根据SEQ ID N°1或SEQ ID N°2的序列的差异在于最多5个氨基酸差异。

[0075] 在其他实施方式中,所述肽包含信号肽,所述信号肽与SEQ ID N°3具有至少95%的序列同一性或具有根据SEQ ID N°3的序列。

[0076] 本文所述的“治疗用途”是指使用肽或其组合物来改善人类或非人类动物的疾病症状。在实践本文提供的治疗或使用方法时,将治疗有效量的本文描述的药物组合物施用于受试者,例如患有待治疗的疾病、病症或状况的哺乳动物或非哺乳动物。在某些实施方式中,受试者是人类。治疗有效量可能因疾病的严重程度、受试者的年龄和相对健康状况、所用治疗剂的效力和其他因素而有很大差异。本文所述的治疗剂以及在某些情况下的组合物可以单独使用,也可以与一种或多种治疗剂组合作为混合物的组分使用。

[0077] 在一个实施方式中,如本文所述的肽在药物组合物中用于治疗或预防有需要的受试者中由多种微生物(包括革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌和/或真菌,优选菌丝真菌或酵母)引起的感染。所述受试者可以是人类或动物。所述药物组合物可以包含治疗有效量的抗微生物肽和合适的载体。

[0078] 在一个实施方式中,用于治疗有需要的受试者的细菌和/或真菌感染的肽或组合物包含与SEQ ID N°1或SEQ ID N°2表现出至少95%序列同一性或根据SEQ ID N°1或SEQ ID N°2的序列的差异在于最多5个氨基酸的肽。

[0079] 在其他实施方式中,所述肽包含信号肽,所述信号肽与SEQ ID N°3具有至少95%的序列同一性或具有根据SEQ ID N°3的序列。

[0080] 本文描述的肽或组合物可以通过适当的施用途施用于受试者,其包括但不限于静脉内、动脉内、口服、肠胃外、颊内、局部、透皮、直肠、肌内、皮下、骨内、透粘膜、吸入或腹腔内施用途。本文描述的组合物可以包括但不限于水性液体分散体、自乳化分散体、固体溶液、脂质体分散体、气雾剂、固体剂型、粉末、速释制剂、控释制剂、速溶制剂、片剂、胶囊、丸剂、延迟释放制剂、延长释放制剂、脉冲释放制剂、多颗粒制剂、以及混合速释和控释制剂。

[0081] 在一个实施方式中,可以将本文所述的肽或组合物添加到动物饲料中以减少牲畜中潜在的微生物感染。在另一实施方式中,本文所述的肽或组合物被配制用于口服、局部或肠胃外使用以治疗兽医学中的微生物感染。

[0082] 在另一实施方式中,本文所述的肽或组合物适用于作物保护、作为饲料或食品添加剂、用于药物用途、作为防腐剂和/或作为去污剂。

[0083] 在一个实施方式中,所述肽或肽组合物包含与SEQ ID N°1或SEQ ID N°2表现出至少95%序列同一性或根据SEQ ID N°1或SEQ ID N°2的序列的差异在于最多5个氨基酸的肽。

[0084] 在其他实施方式中,所述肽包含信号肽,所述信号肽与SEQ ID N°3具有至少95%的序列同一性或具有根据SEQ ID N°3的序列。

[0085] 当用于作物保护时,本文所述的肽或组合物根据上述实施方式与农业上相容的载体或农业上相容的赋形剂一起配制。本领域技术人员将根据所处理的作物和目标病原体的作用来确定所述组合物的正确剂量、形式和施用方法。

[0086] 在一个实施方式中,本文描述的肽或组合物被掺入饲料或食品添加剂中以防止病原体通过饲料和食品传播。众所周知,饲料可能携带对动物健康和福利有害的病原体。诸如甲醛等防腐产品通常用于给饲料消毒,但这些产品反过来会产生负面影响。本文所述的抗微生物肽是一种安全的替代品。

[0087] 在另一实施方式中,本文所述的肽或组合物适合用作表面、工具、仪器、装置、物体或身体部位的去污剂或消毒剂。在一个实施方式中,这样的装置或物体包括但不限于亚麻布、布料、塑料、乳胶织物、天然橡胶、可植入装置、表面或储存容器。在特定实施方式中,本文所公开的肽或组合物被掺入清洁剂、去垢剂、肥皂或喷雾剂中。

[0088] 在某些实施方式中,本文所述的肽也可以加入到各种保健产品中,特别是化妆品中。例如,可将肽加入牙膏、漱口水、洗发水、肥皂、面霜或止汗剂中,以减少或防止微生物在口腔或皮肤中的定植或重建。

[0089] 在另一实施方式中,本文所述的肽和组合物可用作食品、饲料、化妆品或药物防腐剂或用于处理食品以控制、减少或消除潜在的病原体或污染物。

[0090] 在另一实施方式中,本文所述的肽或组合物用于控制植物中的病原体,优选用于作物中的病原体,其中所述病原体是革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌和/或真菌,优选是菌丝真菌或酵母。所述植物可以是单子叶植物或双子叶植物,包括饲料或牧草豆科植物、观赏植物、粮食作物、树木或灌木。在一个实施方式中,所述植物优选为作物。优选地,所述植物属于下组:槭属(*Acer* spp.)、猕猴桃属(*Actinidia* spp.)、秋葵属(*Abelmoschus* spp.)、剑麻(*Agave sisalana*)、冰草属(*Agropyron* spp.)、匍匐剪股颖(*Agrostis stolonifera*)、葱属(*Allium* spp.)、苋属(*Amaranthus* spp.)、滨草(*Ammophila arenaria*)、凤梨(*Ananas*

comosus)、番荔枝(*Annona* spp.)、旱芹(*Apium graveolens*)、落花生属(*Arachis* spp.)、菠萝密属(*Artocarpus* spp.)、芦笋(*Asparagus officinalis*)、燕麦属(*Avena* spp.)、阳桃(*Averrhoa carambola*)、刺竹属(*Bambusa* spp.)、冬瓜(*Benincasa hispida*)、巴西栗(*Bertholletia excelsa*)、甜菜(*Beta vulgaris*)、芥属(*Brassica* spp.)、粉叶蛭果柑(*Cadaba farinosa*)、茶树(*Camellia sinensis*)、美人蕉(*Canna indica*)、大麻(*Cannabis sativa*)、辣椒属(*Capsicum* spp.)、翘唇草(*Carex elata*)、番木瓜(*Carica papaya*)、大花假虎刺(*Carissa macrocarpa*)、山核桃属(*Carya* spp.)、红花(*Carthamus tinctorius*)、栗属(*Castanea* spp.)、吉贝(*Ceiba pentandra*)、菊苣(*Cichorium endivia*)、樟属(*Cinnamomum* spp.)、西瓜(*Citrullus lanatus*)、柑橘属(*Citrus* spp.)、椰子属(*Cocos* spp.)、咖啡属(*Coffea* spp.)、芋(*Colocasia esculenta*)、可乐果属(*Cola* spp.)、黄麻(*Corchorus* spp.)、芫荽(*Coriandrum sativum*)、榛属(*Corylus* spp.)、山楂属(*Crataegus* spp.)、藏红花(*Crocus sativus*)、南瓜属(*Cucurbita* spp.)、黄瓜属(*Cucumis* spp.)、菜蓟属(*Cynara* spp.)、胡萝卜(*Daucus carota*)、山蚂蝗属(*Desmodium* spp.)、龙眼(*Dimocarpus longan*)、薯蓣属(*Dioscorea* spp.)、柿属(*Diospyros* spp.)、稗属(*Echinochloa* spp.)、油棕属(*Elaeis* spp.)、穆(*Eleusine coracana*)、苔麸(*Eragrostis tef*)、蔗茅属(*Erianthus* spp.)、枇杷(*Eriobotrya japonica*)、桉树属(*Eucalyptus* spp.)、红果子(*Eugenia uniflora*)、荞麦属(*Fagopyrum* spp.)、山毛榉属(*Fagus* spp.)、高羊茅(*Festuca arundinacea*)、无花果(*Ficus carica*)、金桔属(*Fortunella* spp.)、草莓属(*Fragaria* spp.)、银杏(*Ginkgo biloba*)、大豆属(*Glycine* spp.)、陆地棉(*Gossypium hirsutum*)、向日葵属(*Helianthus* spp.)、萱草(*Hemerocallis fulva*)、木槿属(*Hibiscus* spp.)、大麦属(*Hordeum* spp.)、番薯(*Ipomoea batatas*)、核桃属(*Juglans* spp.)、莴苣(*Lactuca sativa*)、山黧豆属(*Lathyrus* spp.)、兵豆(*Lens culinaris*)、亚麻(*Linum usitatissimum*)、荔枝(*Litchi chinensis*)、莲花属(*Lotus* spp.)、棱角丝瓜(*Luffa acutangula*)、羽扇豆属(*Lupinus* spp.)、地杨梅(*Luzula sylvatica*)、番茄属(*Lycopersicon* spp.)、硬皮豆属(*Macrotyloma* spp.)、苹果属(*Malus* spp.)、凹缘金虎尾(*Malpighia emarginata*)、马米杏(*Mammea americana*)、芒果(*Mangifera indica*)、木薯属(*Manihot* spp.)、人心果(*Manilkara zapota*)、苜蓿(*Medicago sativa*)、草木樨属(*Melilotus* spp.)、薄荷属(*Mentha* spp.)、芒(*Miscanthus sinensis*)、苦瓜属(*Momordica* spp.)、黑桑(*Morus nigra*)、芭蕉属(*Musa* spp.)、烟草属(*Nicotiana* spp.)、木犀榄属(*Olea* spp.)、仙人掌属(*Opuntia* spp.)、富牧草(*Ornithopus* spp.)、水稻属(*Oryza* spp.)、黍(*Panicum miliaceum*)、柳枝稷(*Panicum virgatum*)、鸡蛋果(*Passiflora edulis*)、欧防风(*Pastinaca sativa*)、狼尾草属(*Pennisetum* spp.)、鳄梨属(*Persea* spp.)、欧芹(*Petroselinum crispum*)、藨草(*Phalaris arundinacea*)、菜豆(*Phaseolus* spp.)、梯牧草(*Phleum pratense*)、海枣属(*Phoenix* spp.)、芦苇(*Phragmites australis*)、酸浆属(*Physalis* spp.)、松属(*Pinus* spp.)、开心果(*Pistacia vera*)、豌豆属(*Pisum* spp.)、早熟禾属(*Poa* spp.)、杨树(*Populus* spp.)、牧豆树属(*Prosopis* spp.)、李属(*Prunus* spp.)、番石榴(*Psidium* spp.)、石榴(*Punica granatum*)、西洋梨(*Pyrus communis*)、栎属(*Quercus* spp.)、萝卜(*Raphanus sativus*)、波叶大黄(*Rheum rhabarbarum*)、茶藨子属(*Ribes* spp.)、蓖麻(*Ricinus communis*)、悬钩子属(*Rubus*

spp.)、甘蔗属(*Saccharum* spp.)、柳属(*Salix* spp.)、接骨木属(*Sambucus* spp.)、黑麦属(*Secale cereale*)、胡麻属(*Sesamum* spp.)、芥属(*Sinapis* spp.)、茄属(*Solanum* spp.)、高粱(*Sorghum bicolor*)、菠菜属(*Spinacia* spp.)、蒲桃属(*Syzygium* spp.)、万寿菊属(*Tagetes* spp.)、酸豆(*Tamarindus indica*)、可可(*Theobroma cacao*)、三叶草属(*Trifolium* spp.)、鸭茅状磨擦禾(*Tripsacum dactyloides*)、小黑麦(*Triticosecale rimpaii*)、小麦属(*Triticum* spp.)、小旱金莲(*Tropaeolum minus*)、旱金莲(*Tropaeolum majus*)、越橘属(*Vaccinium* spp.)、蚕豆属(*Vicia* spp.)、豇豆属(*Vigna* spp.)、香堇菜(*Viola odorata*)、葡萄属(*Vitis* spp.)、玉米(*Zea mays*)、沼生荻(*Zizania palustris*)、枣属(*Ziziphus* spp.)；包括上述品种的后代及杂交品种。

[0091] 本文所述的肽或组合物适合引入植物、植物部分或包含或承载所述植物的基质，从而赋予所述植物病原体抗性 or 病原体控制。所述引入可以是人工的。

[0092] 将肽或其组合物引入植物的方法可以包括：处理植物和/或植物部分和/或所述植物生长的生长培养基、接种种子、包衣种子、直接接种植物或植物部分、喷洒或润湿植物或植物部分(例如，谷穗)。可以根据要引入肽或组合物的植物的类型来选择适当的方法。

[0093] 作为另一个非限制性实例，本文所述的肽或组合物可以以涂层的形式应用。可以通过在种子上喷洒或将所述种子浸泡在含有肽或组合物的溶液中来将涂层应用于种子。在另一实例中，为了用如前一个实例中所述的溶液涂覆种子，可以添加粘合剂，例如包含碳化物(碳酸钙)的粘合剂。

[0094] 在实施方式中，涂层可以施用于裸露且未处理的植物部分。在其他实施方式中，涂层可以作为外涂层施用于先前处理过的植物部分。种子涂层在土壤真菌疾病的治疗中特别优选。在实施方式中，种子涂层可以施用于裸露的和未处理的种子。在其他实施方式中，种子涂层可以作为种子外衣施用于先前处理过的种子上。

[0095] 在一个实施方式中，可以将本文所述的肽或组合物施用至所述植物生长的土壤或任何其他基质中，以从所述基质中去除害虫和/或病原体。

[0096] 可以通过例如但不限于使用施用到基质上的粉末、颗粒、小球、塞子或土壤浸液的方式来进行包含或承载所述植物或植物部分的基质的接种。接种也可以通过液体施用进行，诸如叶面喷雾或液体组合物。施用可以是施用于生长中的植物或施用于基质。植物，特别是农作物，可以在基质中生长。在一个实施方式中，所述基质是土壤、沙子、砾石、多糖、盖土(mulch)、堆肥、泥炭藓、稻草、原木、粘土或它们的组合。在另一实施方式中，基质还可以包括水培系统或体外培养系统。在某些实施方式中，采用了本文所述的不同施用方法的组合。

[0097] 在一个实施方式中，如本文所述的肽或组合物适用于治疗或预防病原体感染，其中，病原体选自由如前述任一实施方式中所述的革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌和/或真菌组成的组。

[0098] 本文公开的发明还涉及用前述任一实施方式中描述的肽或组合物包覆的植物种子。

[0099] 另一方面，本发明涉及获得本文公开的肽的方法，其中，所述肽是重组肽、合成肽、或从可可中提取或沉淀。

[0100] 在一个实施方式中，本文公开的方法用于获得与SEQ ID N°1或SEQ ID N°2表现出

至少95%序列同一性或者与根据SEQ ID N°1或SEQ ID N°2的序列的差异在于最多5个氨基酸的肽,并且其中,所述肽为重组肽、合成肽、或从可可中提取或沉淀结果发现,CCN-51可可品种中本发明的肽含量较高,因此可以使用合适的提取和沉淀技术,然后采用优化的色谱技术以及其他现有技术中已知的方法,从CCN-51可可豆中经济地纯化本发明的肽。因此,本发明提供了一种直接利用CCN-51可可豆,特别是未发酵的CCN-51可可豆来分离表现出抗微生物活性的肽的解决方案。

[0101] 在优选的实施方式中,未发酵的和/或发酵并干燥的可可豆用于提取如本文所公开的肽。在另一实施方式中,提取任何类型的可可组织/器官以获得本发明的肽。应当理解的是,可可豆荚和/或可可豆壳、叶、茎和根可以用作提取本发明肽的植物材料,而不脱离本发明的范围。在另一实施方式中,可以从任何加工过的可可材料中提取或沉淀本文所公开的肽。

[0102] 在一个实施方式中,从选定的可可种植农场收集可可植物材料并用于分离如本文所述的肽。优选地,将样品储存在4℃,以便进一步处理。作为另选,在处理前将样品储存在-80℃。

[0103] 对于肽的提取,可以使用未发酵的、干燥的豆类。通常会去除未发酵豆类的粘性果肉,优选完全去除。用无菌手术刀、镊子和/或任何其他合适的器械剥去种皮。

[0104] 豆类富含脂质,在优选实施方式中,在肽提取之前将可可豆脱脂。在一个实施方式中,可以在丙酮中对磨碎的可可豆脱脂,将残留的粉状豆干燥,然后在水性缓冲液中提取。在提取过程中缓慢加入极冷的丙酮可减少酶失活。

[0105] 在一个实施方式中,所述可可豆在肽提取之前进行去壳。与可可的其他部分(诸如但不限于壳和果肉)相比,去壳豆类材料表现出了最佳的肽提取率。

[0106] 使用合适的磨机、研磨机或研钵和研杵将可可豆研磨成细粉,由此所述装置优选在冷空气、冷冻室中预冷,或通过液氮冷却。研磨后的粉末通常储存在温度不超过4℃的环境中,优选不超过0℃,最优选在-20℃,以用于进一步加工。

[0107] 在另一实施方式中,使用冷冻植物材料提取本文所述的肽。所有操作均在0℃至4℃进行(即在冷室或冰上)。提取过程进行迅速,以尽量减少目标蛋白质暴露于细胞破碎时释放的潜在有害化合物和酶。

[0108] 在一个实施方式中,将可可豆研磨而不让液氮与组织接触。为了确保样品保持冷冻状态,研钵/磨机和/或研磨机可以放置在浅液氮池中(例如,在标准聚苯乙烯盒的盖子中)。新鲜的材料可以直接在冰冷的缓冲液中研磨。在一个实施方式中,组织匀浆器用于研磨未发酵的新鲜可可豆。在另一实施方式中,将可可豆在搅拌机或研钵和研杵中研磨,并加入酸洗过的沙子。混合时起泡可能是一个问题,可以通过添加几滴正辛醇或本领域已知的任何其他合适的有机溶剂来实现某种程度的控制。

[0109] 在一个实施方式中,pH值优选为8的提取缓冲液用于提取。所述缓冲液从pH值和离子强度的角度维持了分离肽的稳定性。所用的缓冲液的某些非限制性实例包括在丙酮、苯酚或任何其他合适溶剂或其混合物中的N-2-羟乙基哌嗪N-2-乙磺酸(HEPES)、磷酸盐、2-(N-吗啉)-乙磺酸(MES)、三氨基甲烷(TRIS)、TAE缓冲液(Tris碱、乙酸和EDTA)、TBE(Tris碱、硼酸和EDTA)或其任何混合物。本领域技术人员应当理解的是,缓冲液的选择和类型是根据可可品种、提取过程中使用发酵或非发酵豆来优化的。可以采用本领域中常用的任何

合适的缓冲液来提取肽,而不脱离本发明的范围。每单位重量的植物材料和/或可可豆使用的提取缓冲液的体积取决于植物材料的类型和肽浓度。根据本发明的一个实施方式,通过使用更高的缓冲液体积与植物材料和/或可可豆重量之比(例如,10:1),可以实现更好的提取。

[0110] 在一个实施方式中,在本文所述的肽的提取过程中,首先浓缩样品提取物。这可以通过沉淀、合适的色谱技术或本领域已知的任何其他方法来实现。在一个实施方式中,将10%至20%的甘油(v/v)添加到提取缓冲液中以确保肽的稳定性。

[0111] 在一个实施方式中,向提取缓冲液中添加抗氧化剂,以防止肽的氧化,维持游离巯基的还原状态,并减少诸如酚类等其他组分的氧化。此类抗氧化剂的某些非限制性实例包括二硫苏糖醇(DTT)、 $\beta$ -巯基乙醇或抗坏血酸,以及在某些情况下,如果需要的话还包括更强的还原剂,如连二亚硫酸钠。在另一实施方式中,可以使用一种以上的还原剂,诸如但不限于DTT和 $\beta$ -巯基乙醇的组合。

[0112] 在一个实施方式中,向缓冲液中添加去垢剂,以增强膜的破坏和膜蛋白的溶解。某些非限制性实例包括十二烷基硫酸钠(例如0.1至1.0%)、吐温80(例如0.1%至1%)、Triton X-100(例如0.1%至1%)、3-[ (3-胆酰胺丙基) 二甲铵 ]-2-羟基-1-丙磺酸盐(CHAPS)或辛基糖苷,或其任意混合物。本领域技术人员应当理解的是,需要进行初步的经验测试来确定表面活性剂的最佳组合,以最大化提取物中获得的豌豆球蛋白(前体)肽的浓度。

[0113] 应当理解的是,可以使用保护剂,诸如但不限于聚乙烯聚吡咯烷酮(PVPP)、可溶性聚乙烯吡咯烷酮(PVP)和/或聚乙二醇来防止诸如单宁等多酚与本发明的抗微生物肽结合。

[0114] 此外,可以在抗微生物肽的提取过程中将任何蛋白酶抑制剂添加到缓冲液中,以控制提取后蛋白质的降解。所述蛋白酶抑制剂的某些非限制性实例是苯甲基磺酰氟(PMSF)、牛胰蛋白酶抑制剂(也称为抑肽酶)、4-(2-氨基乙基)-苯磺酰氟盐酸盐、乙二胺四乙酸(EDTA)、1,10-菲咯啉、或2,2-联吡啶、反式环氧琥珀酰-L-亮氨酸-酰胺-(4-胍基)丁烷、抗痛素和亮肽素、胃酶抑素、天冬氨酸蛋白酶、含有针对植物定制的这些抑制剂混合物的市售蛋白酶抑制剂(例如,Roche以片剂形式提供的抑制剂和Sigma以溶液形式提供的抑制剂)等。

[0115] 在特别优选的实施方式中,在碱性环境中并且可选地在蛋白酶抑制剂混合物的存在下,使用添加了作为抗氧化剂的二硫苏糖醇(DTT)和作为阴离子表面活性剂的十二烷基硫酸钠(SDS)的Tris-HCl缓冲液进行提取。

[0116] 提取/温育时间根据提取混合物和植物材料中的抗微生物肽浓度进行优化,可以为15分钟至48小时,优选不少于30分钟,最优选不少于1小时,并且优选不超过5小时,最优选不超过3小时。提取温度优选不超过40℃,优选不超过室温(23℃),最优选在不超过15℃的温度下完成。

[0117] 在一个实施方式中,本文公开的肽可以从可可豆中分离。所述可可豆可以是发酵的或非发酵的。在另一个或其他实施方式中,它们可以是干燥和/或非干燥的可可豆。在优选实施方式中,本文所述的肽可以从未发酵的干燥可可豆中分离。在一个实施方式中,将可可豆压碎,除去壳,然后将碎粒放入压榨机中压榨。从而获得黄油和浆料的混合物。在某些实施方式中,将所述浆液用于肽提取。

[0118] 在使用其他可可植物部分提取肽的实施方式中,使用多种保护剂(如缓冲剂、抗氧化剂、蛋白酶抑制剂等)来稳定提取物中的蛋白质。提取溶剂的量保持在合理的最低限度,以避免稀释蛋白质提取物。可可果实是酸性的,多酚含量高,需要高缓冲浓度来维持pH值。

[0119] 优选地,采用沉降、离心、过滤或任何其他常用技术分离根据本发明的提取步骤获得的蛋白质提取物,以获得不含残留植物材料的蛋白质提取物。可以使用布料(例如但不限于Miracloth等)进行过滤。在另一实施方式中,优选使用尼龙网过滤器,因为它非常坚固并且可以清洗和重复使用。

[0120] 在一个实施方式中,使滤液运行通过大型快速色谱柱。通过这种方式,在大规模生产过程中与蛋白质结合的各种低分子量多酚可以从蛋白质中分离出来。

[0121] 对于用于粗分析的小组织样本的制备,可以使用小型凝胶过滤柱对提取物进行脱盐,例如但不限于PD-10或NAP柱、Amersham Biosciences等。

[0122] 在另一实施方式中,本文所述的肽是通过等电沉淀从可可豆中分离的。通常,一旦通过本领域已知的任何合适方法去除不需要的部分(例如碳水化合物、脂肪和/或油),就会进行这种沉淀。此步骤将植物材料剩余部分中的蛋白质浓缩。

[0123] 根据本发明,将所述部分溶解在特定pH值的缓冲液中,并将pH值降低至蛋白质的等电点,以便它们能够沉淀。在优选实施方式中,使用硫酸铵溶液沉淀来自提取物中的蛋白质,优选浓度为至少10重量%且最多20重量%的硫酸铵溶液,最优选浓度为12重量%至14重量%的硫酸铵溶液。通过离心从蛋白质沉淀物中收集蛋白质。

[0124] 在其他优选的实施方式中,通过电泳进一步分离沉淀/提取的蛋白质。在特别优选的实施方式中,所述电泳分离是二维电泳。所述电泳优选在聚丙烯酰胺凝胶中进行。在一个实施方式中,所述电泳在15% SDS-PAGE凝胶中进行。电泳技术可以对肽进行高度纯化,消除了非电泳技术劳动强度大、成本高的缺点。垂直场根据蛋白质在场中的移动性将蛋白质“分离”,而移动性主要基于蛋白质的分子量。

[0125] 在其他实施方式中,分离之后进行电洗脱等,由此肽被吸引到凝胶表面,从而能够提取和随后分析所述肽。在一个实施方式中,从电泳凝胶中切除对应于肽的条带,在Tris-EDTA中清洗,通过超声处理和离心提取。

[0126] 在其他优选的实施方式中,感兴趣的肽通过冻干或真空离心干燥。作为另选,可以用合适的试剂沉淀肽。冻干和/或沉淀的肽可选择性地重新悬浮在蒸馏水和/或任何其他合适的溶剂中,并用于进一步分析。

[0127] 在另一实施方式中,提取或沉淀的肽被浓缩。优选地,所述肽采用标准盐或有机溶剂沉淀法浓缩。作为选择,通过对挥发性缓冲液(例如碳酸铵)进行透析,通过使用基于过滤器的浓缩器或通过离子交换色谱法来浓缩肽。本领域技术人员应该知道,提取物/沉淀物的浓缩是一个缓慢而关键的过程,因此应特别注意在这些过程中不要让肽暴露于多酚和蛋白酶。

[0128] 肽含量的量化是通过分光光度法(如Lowry法或Bradford测定法)或本领域已知的任何其他方法进行的。在另一实施方式中,肽的量化是通过本领域已知的任何合适的色谱方法进行的。在优选实施方式中,采用LC-MS方法来量化肽含量。在优选实施方式中,对通过胰蛋白酶消化从可可提取物中获得的蛋白质所产生的片段进行MALDI-TOF分析。在一个实施方式中,通过准备和执行免疫化学分析来检测样品之间的特定差异,从而进一步证实从

MALDI-MS胰蛋白酶消化分析获得的数据。

[0129] 在其他优选的实施方式中,所述肽基本上不含其他肽。本文中使用的术语“基本上不含”是指至少95重量%不含其他肽;优选至少99重量%不含其他肽。在优选实施方式中,所述肽以晶体和/或固体形式存在。

[0130] 另一方面,本发明涉及一种载体,所述载体包含与SEQ ID N°1或SEQ ID N°2具有至少95%的序列同一性或根据SEQ ID N°1或SEQ ID N°2的序列的差异在于最多5个氨基酸的肽的编码序列,并且可选地包含编码N末端信号肽的序列,所述信号肽序列与SEQ ID N°3具有95%的序列同一性,或者是根据SEQ ID N°3的序列,其中,所述载体被设计为允许所述肽在表达系统中表达。在优选实施方式中,载体包含与SEQ ID N°1或SEQ ID N°2具有96%、更优选97%、更优选98%、更优选99%或更优选100%同一性的肽的编码序列。在一个实施方式中,所述载体包含如前一实施方式中公开的纯化标签。

[0131] 在一个实施方式中,从可可豆中提取的DNA用于扩增肽的编码序列,并将其克隆到合适的表达载体中,诸如设计用于细胞中基因表达的任何质粒或病毒中。

[0132] 因此,本文所述的肽可以在任何合适的系统中表达,目的是产生用于进一步用途的肽。适合表达所述蛋白质的宿主包括大肠杆菌、真菌细胞、昆虫细胞、哺乳动物细胞和植物。在这些宿主中表达蛋白质的标准方法在多种文本中有所描述,包括Current Protocols in Molecular Biology(上文)的第16节(蛋白质表达)。

[0133] 通常,编码感兴趣的氨基酸序列的DNA包含在表达载体中,在某些情况下,在5'或3'端框内连接至另一个编码序列,从而编码与SEQ ID N°1或SEQ ID N°2具有至少95%序列同一性的肽,并且可选地在N端包含SEQ ID N°3。总编码序列可操作地连接至启动子,使得启动子驱动编码序列的表达。编码序列在本文中也称为“靶基因”。

[0134] 根据一个实施方式,启动子是微生物天然的启动子(例如大肠杆菌trpE启动子)、合成启动子如Tac启动子、或可从异源生物体获得的启动子,例如病毒、细菌或噬菌体,如能够在微生物中发挥作用的噬菌体λ或T7。启动子可以是组成型的,或者更优选地是诱导型的。表达载体还可以含有选择性标志物基因,其可以是抗生素抗性基因,如氨苄青霉素、四环素、氯霉素或卡那霉素抗性基因。

[0135] 有许多启动子系统可供使用,通常来自商业来源,其适用于在大肠杆菌中表达本发明的肽。例如,araBAD(阿拉伯糖)操纵子的P<sub>BAD</sub>启动子具有良好的诱导特性,可诱导性比背景高出1,200倍(Guzman等,1995)。其他启动子包括P<sub>LAC</sub>、P<sub>TAC</sub>、P<sub>TRC</sub>、PL和PR。P<sub>TAC</sub>启动子是大肠杆菌的trp和lac启动子的混合体,是已知最有效的基于大肠杆菌的启动子系统之一。它可由IPTG诱导,如lac启动子。

[0136] 本发明的优选宿主细胞是大肠杆菌M15宿主菌株。在另一优选实施方式中,毕赤酵母用作表达本发明肽的宿主细胞。

[0137] 在其他优选实施方式中,完成克隆的选择,并使用Ni-NTA琼脂糖通过其亲和标签提取过表达的肽。采用与先前实施方式中从天然来源分离的肽相同的方法,分离和纯化重组肽。

[0138] 新肽在基因工程细胞中的表达通常将产生具有与从可可植物材料中分离的天然肽相同的三维结构的产品。该三维结构包括在半胱氨酸残基之间正确形成的分子内二硫键。然而,即使蛋白质是化学合成的,本领域中也已知进一步加工蛋白质的方法,以破坏不

需要的二硫键并在所需的半胱氨酸残基之间形成桥,从而得到所需的三维结构(如果这是必要的)。

[0139] 在本发明的另一实施方式中,所述肽可以通过化学合成获得,采用已知的肽合成技术,如在室温肽合成仪、微波肽合成仪、平行肽合成仪等仪器上进行固相合成。

[0140] 在本发明的一个实施方式中,可以在转基因植物中表达如本文所述的肽。因此,本发明还涉及表达如本文所述的一种或多种肽的转基因植物。

[0141] 在一个实施方式中,所述转基因植物表达与SEQ ID N°1或SEQ ID N°2表现出至少95%序列同一性或与根据SEQ ID N°1或SEQ ID N°2的序列的差异在于最多5个氨基酸的肽。在其他实施方式中,所述肽包含N端信号肽的序列,所述信号肽序列与SEQ ID N°3具有95%的序列同一性。

[0142] 在其他实施方式中,所述转基因植物表达与SEQ ID N°1或SEQ ID N°2具有96%、更优选97%、更优选98%、更优选99%或更优选100%同一性的肽。

[0143] 在一个实施方式中,所述肽包含如前一实施方式中公开的纯化标签。

[0144] 根据本发明,可以根据多种已知的基因工程方法(根瘤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)转化、Ti质粒、电穿孔、显微注射、微弹枪、PEG介导的转化等)利用DNA构建体转化植物细胞。本文使用的基因工程方法可以理解为用于将外来DNA序列引入植物细胞的任何方法,以再生表达所需性状或特性的转基因植物。

[0145] 在本发明的一个实施方式中,编码与SEQ ID N°1或SEQ ID N°2具有至少95%序列同一性并且可选地在N端包含SEQ ID N°3的肽的DNA序列(),以及编码来自其他植物物种的同源物的DNA,可用于与编码产生成熟蛋白质的前体蛋白质的DNA序列结合使用。该前体蛋白质含有天然肽序列,该序列会将蛋白质靶向特定的细胞区室(例如,质外体或液泡)。这些编码序列可以连接至植物启动子序列,以确保在植物细胞中强烈表达。该启动子序列可以确保蛋白质在大多数或所有植物细胞中强烈的组成性表达,它可以是确保在易受微生物感染的特定组织或细胞中表达的启动子,并且其也可以是确保在感染过程中强烈诱导表达的启动子。这些类型的基因盒还将包括抗微生物蛋白编码区3'的转录终止和多聚腺苷酸化序列,以确保编码抗微生物蛋白的mRNA的有效生产和稳定。通过将它们各自的DNA序列纳入编码更大肽的序列中,可能会促进本文公开的抗微生物肽的有效表达。

[0146] 使用本领域已知的方法在植物细胞中表达编码肽的基因盒。首先,将基因盒连接至携带下列内容的二元载体中:i)侧接根瘤农杆菌Ti质粒的T-DNA的左边界序列和右边界序列;ii)用于选择抗生素抗性植物细胞的合适的选择标记基因;iii)在根瘤农杆菌和大肠杆菌中均有功能的复制起点;和iv)允许选择携带质粒的根瘤农杆菌和大肠杆菌细胞的抗生素抗性基因。不希望受限制,本文公开的肽的DNA序列可以克隆到本领域已知的任何二元载体中,诸如质粒(pEXA128、pBR322、pUC19),噬菌体( $\lambda$ 噬菌体、M13噬菌体),粘粒,BAC或YAC。携带肽的DNA序列的二元载体可以通过热休克、电穿孔或三亲交配引入携带卸甲Ti质粒的根瘤农杆菌菌株(如菌株LBA4404、GV3101和AGL1)或发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)菌株(如A4或NCCP1885)。然后可以将这些农杆菌菌株与合适的植物外植体或完整的植物组织共培养,并利用抗生素抗性选择转化的植物细胞和/或再生体。作为另选,携带肽的DNA序列的二元载体可以在细菌或真菌细胞中过表达。

[0147] 本公开内容还涉及一种获得转基因植物的方法,所述转基因植物表达与SEQ ID

N°1或SEQ ID N°2表现出至少95%序列同一性或者与根据SEQ ID N°1或SEQ ID N°2的序列的差异在于最多5个氨基酸的肽,并且可选地包含编码N末端信号肽的序列,所述信号肽序列与SEQ ID N°3具有95%的序列同一性。

[0148] 所述方法包括以下步骤:

[0149] (a) 可选地分离或合成编码与SEQ ID N°1或SEQ ID N°2表现出至少95%序列同一性或根据SEQ ID N°1或SEQ ID N°2的序列的差异在于最多5个氨基酸的肽的核酸序列;

[0150] 并将所述核酸序列并入到合适的表达载体中;

[0151] (b) 通过基因工程方法将核酸引入至少一种植物细胞,以产生表达所述肽的转化植物细胞;

[0152] (c) 将转化的植物细胞再生为完整的转基因植物;和

[0153] (d) 使用合适的筛选方法选择和鉴定表达所述肽的转基因植物。

[0154] 在本文公开的方法的一个实施方式中,使用本领域已知的任何方法(如基因克隆方法)分离编码肽的核酸序列。基因克隆的非限制性实例包括基于PCR的克隆和基于限制酶的克隆。

[0155] 在本文公开的方法的另一实施方式中,通过基因枪轰击将肽的DNA序列引入植物细胞。基因枪轰击涉及使用基因枪将外来DNA序列引入植物细胞。将本文公开的编码抗微生物肽的DNA序列附着到诸如金颗粒等金属颗粒上,然后轰击到植物细胞中。

[0156] 在另一实施方式中,通过电穿孔将肽的DNA序列引入植物细胞,电穿孔涉及使用电脉冲在细胞膜上产生孔隙,从而使编码抗微生物肽的DNA序列进入所述细胞。作为另选,可以将编码抗微生物肽的DNA序列直接注射到植物细胞中(微注射)。

[0157] 在另一替代实施方式中,编码所述肽的DNA序列通过PEG介导的转化引入植物细胞,该转化涉及使用聚乙二醇(PEG)在细胞膜上产生临时孔,从而使DNA序列进入细胞。

[0158] 任何植物器官、组织或外植体都可以采用基因工程方法来获得本文所公开的转基因植物。非限制性实例包括:单个细胞、愈伤组织、种子、叶外植体、茎外植体、根外植体、胚胎组织、分生组织或花粉。

[0159] 总体而言,用于获得表达本文所公开的肽的转基因植物的具体基因工程方法和外植体取决于植物物种、转化方法的效率和所需的抗微生物肽表达水平等因素。

[0160] 在本文公开的方法的其他实施方式中,转化细胞再生为表达肽的完整植物。

[0161] 鉴定和选择表达肽的转基因植物。此步骤对于消除未转化植物至关重要。抗生素或除草剂抗性选择是转基因植物最常用的选择方法之一。转基因植物转化有能赋予对抗生素或除草剂抗性的基因,然后在含有所述抗生素或除草剂的培养基中生长,这种抗生素或除草剂会杀死或抑制未转化植物的生长。在某些实施方式中,转基因植物转化有编码报告蛋白的基因,然后可以根据报告基因的表达容易地进行识别和选择。

[0162] 在其他实施方式中,通过营养选择来选择转基因植物。该方法基于转基因植物在缺乏非转化植物生长所必需的特定营养素的培养基中生长的能力。转基因植物转化有赋予了植物合成缺失营养物质的能力的基因。

[0163] 无标志物选择涉及使用可选择的标志物,这些标志物可以在选择后从转基因植物中去除。这可以通过使用位点特异性重组系统来实现,例如Cre-lox系统,该系统允许去除可选择的标志物基因而不留下任何外来DNA的痕迹。

[0164] 本发明通过下列非限制性实施例进一步描述,这些实施例进一步说明了本发明,但并非旨在、也不应被解释为限制本发明的范围。

[0165] 实施例

[0166] 实施例1:肽的提取、纯化和鉴定

[0167] 源自可可杂交种CCN-51的可可豆样品是从厄瓜多尔30年历史的小型传统可可种植园中采集的。样品由Barry Callebaut AG以非发酵和发酵/干燥形式提供。非发酵样品在干冰上运输,到达后储存在-80℃,而发酵干燥样品则在4℃运输和储存以备进一步处理。从未发酵豆擦去粘浆,并用无菌手术刀剥去种皮。用镊子去除发酵豆的种皮。使用Retsch Grindomix GM200刀具研磨机以10,000rpm的转速将豆子磨碎。研磨后的粉末可直接使用(或储存在-20℃以供进一步处理)。

[0168] 将250mg细磨粉末转移到2ml聚丙烯微量离心管中,并悬浮在1ml蛋白质提取缓冲液中(100mM Tris HCl、1%DTT和1%SDS;pH值调节至8.1;蛋白酶抑制剂混合物根据制造商的说明)。将混合物彻底旋涡60秒,并在4℃轻轻摇动温育60分钟,然后在台式5810R离心机中以13,200rpm的速度离心20分钟,并在4℃离心。使用移液器将含有蛋白质部分的上清液轻轻转移到新杯中,并储存在-20℃以供进一步分析。

[0169] 使用Bradford MM在“Analytical Biochemistry”1976;72:248-54中公开的方法评估提取的可可蛋白的含量。

[0170] 根据Bradford方法,将300μl Bradford试剂加入到微量滴定板中的10μl稀释蛋白溶液中,短暂涡旋。室温下温育10分钟后,在595nm处测量吸光度,重复三次。使用浓度范围为1-1500μg/ml的牛血清白蛋白,通过标准曲线对提取的蛋白质浓度进行量化。

[0171] 使用SDS-PAGE根据分子量分离提取的可可蛋白和/或肽。简而言之,将25μl蛋白质样品与5μl含有溴酚蓝作为示踪染料的6X样品缓冲液混合。将混合物在95℃加热5分钟,然后上样到含有12.5%或15% (w/v) 丙烯酰胺的SDS-PAGE凝胶(83mm×65mm×1mm)上。电泳在130V下进行90分钟。电泳后,凝胶用考马斯® 蓝(45% (v/v) 甲醇、10%乙酸、 $2.93 \times 10^{-3}$ M考马斯® 亮蓝G-250)染色20分钟,或通过电泳印迹到PVDF膜上,如Towbin先前在Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1979,76,4350-4354中所述。将印迹用PBST中的5% (w/v) 牛奶在4℃处理过夜。随后,用在含有5% (w/v) 奶粉的PBST中按1:2,000稀释的多克隆抗体探测蛋白质印迹,并在室温下温育2小时(h)。此外,将印迹洗涤6次,每次在室温下轻轻摇动5分钟。随后,将印迹在室温下与HRP偶联的山羊抗兔IgG抗体一起温育1小时,该抗体在含有5% (w/v) 奶粉的PBST中按1:10,000稀释。温育后,将印迹用PBST洗涤6次,每次在室温下轻轻摇晃5分钟。最后,在过氧化氢存在下,使用鲁米诺作为底物,通过酶活性检测间接结合的HRP,如Mruk和Cheng在Spermatogenesis,2011,1,121-122中所述。

[0172] 在进行双向电泳之前,使用Ready rep™ 2D清理试剂盒纯化总蛋白提取物。为了去除离子洗涤剂、脂质或酚类化合物等干扰物质,按照制造商的推荐使用该试剂盒对总蛋白提取物进行纯化。在试剂盒提供的洗涤缓冲液中沉淀和洗涤后,将蛋白质样品重新悬浮在130μL复水缓冲液(2M硫脲、6M尿素、 $16.2 \times 10^{-3}$ M CHAPS、 $25.9 \times 10^{-3}$ M DTT)中,并补充两性电解质。

[0173] 采用等电聚焦和随后的SDS-PAGE对可可蛋白进行2D凝胶电泳。为此,将80μg蛋白质应用于固定化pH梯度(IPG)条带(7cm,pH 3-10)并在室温下浸泡14小时。在Bio-Rad

**Protean® i12TM** IEF电泳槽中进行等电聚焦(50V,70分钟;150V,20分钟;300V,15分钟;梯度至600V,10分钟;600V,15分钟;梯度至1,500V,10分钟;1,500V,30分钟;梯度至3,000V,20分钟;3,000V,210分钟;暂停于50V)。接下来,将IPG条带在室温下在 $6.48 \times 10^{-2}$ M DTT和0.216M 碘乙酰胺溶液中平衡15分钟,该溶液溶解在平衡缓冲液(6M尿素、30% (w/v) 甘油、 $69.2 \times 10^{-3}$ M SDS溶于0.05M Tris-HCl缓冲液,pH 8.8)中。通过12.5%或15%聚丙烯酰胺凝胶在Bio-Rad **Mini-Protean® Tetra**系统(110V,10分钟;继续130V)上进行分子量分离。通过聚丙烯酰胺凝胶中的视觉移动性和预测的氨基酸序列重量来评估蛋白质的分子量。染色和脱色后,用Epson扫描仪扫描所得的2D凝胶。

[0174] 扫描的2D凝胶由ImageMaster 2D Platinum软件6.0软件(GE Healthcare)处理。在此过程中,所有样品的自动斑点检测参数均设置为:平滑度=6,显著性=100,最小面积=5。在手动斑点选择过程中,检测到的非蛋白质斑点(即包括条纹和灰尘颗粒在内的污染伪影)被去除。默认情况下,点体积是根据点的背景减去的,通过从点边界内的所有其他像素值中排除点边界上最低的十分之一百分点的像素值。为了匹配二维凝胶组,定义了参考样品(称为主凝胶),它可以在不同的凝胶中识别相同的蛋白质点。所得的匹配报告列出了各个2D凝胶中的匹配点与主凝胶中的对应点以及各自的标准化相对点体积。

[0175] 从2D凝胶中切下感兴趣的蛋白质点,切成小块,在100 $\mu$ L 0.05M碳酸氢铵缓冲液(含50% ACN(v/v))中洗涤两次,15分钟。通过添加500 $\mu$ L乙腈对凝胶碎片进行脱水,并在室温下温育10分钟。倾析和短暂风干后,使样品补充胰蛋白酶消化缓冲液,并按照先前确定的方法在55℃温育30分钟。样品直接用于基质辅助激光解吸电离-TOF质谱(MALDI-TOF-MS)分析。

[0176] 对于肽模式的光谱鉴定,将肽用15mM TCEP还原,或以非还原形式使用。将肽装载到配备窄孔保护柱Zorbax 300SB-C8(内径2.1mm x 12.5mm,5 $\mu$ m颗粒)的Proshell 300SB-C8柱(内径1mmx75mm,5 $\mu$ m颗粒)上。蛋白质通过5分钟线性梯度从95%溶剂A(0.1%甲酸(FA)、0.05%三氟乙酸(TFA)水溶液)洗脱到90%溶剂B(0.1%FA、0.05%TFA乙腈溶液),然后用90%溶剂B清洗3分钟,2分钟后返回5%溶剂B,平衡2.5分钟。质谱仪以MS模式运行,分辨率为60000(m/z 400),质量范围为600至4000m/z。使用的AGC设置是1E7,允许在1秒内填充陷阱。源设置为SID为15V,毛细管温度为325℃,电压为4.2kV。

[0177] 利用Freestyle软件(Thermo fisher scientific,USA)中的Xtract™算法对记录的光谱进行解卷积。

[0178] 结果:本文公开的肽是在从CCN-51可可品种的豆类分离的总蛋白质级分中鉴定的。从可可豆中分离出的蛋白质进行2D分离后,切除对应于15kDa的斑点并用胰蛋白酶消化(图1)。使用MALDI-TOF-MS)分析鉴定消化的肽(图2A)。通过SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离SEQ ID No 2的重组肽,从凝胶中切除,并进行胰蛋白酶消化,得到图2B中所示的MALDI-TOF-MS肽指纹。在含有根据SEQ ID N°2的肽的还原和非还原样品中,使用完整质量指纹法检测到的质量均为15.3kDa。根据SEQ ID N°2的样品的LC-MS结果如图3所示。

#### [0179] 实施例2:重组肽生产

[0180] 从CCN-51可可豆胚胎中提取总DNA,并使用引物正向\_BamH1-5' CGCGGATCCTATGGCAGAAAACAATAT3' 和反向\_Kpn1-5' CGCGGTACCTTTGTGATTATGGTAATT3' 扩增编码肽的核苷酸序列。这产生300bp DNA(目标DNA)的扩增片段。

[0181] 将扩增的DNA片段连接到克隆载体pEXA128的BamHI/KpnI位点。将携带肽DNA的质粒和pQE30过表达质粒均转化到大肠杆菌DH5 $\alpha$ 细胞中进行扩增。从隔夜培养物中提取质粒,在37℃用BamHI和KpnI消化2小时,然后在1%琼脂糖凝胶上分离。从凝胶中提取线性化的pQE30质粒和来自pEXA128质粒的插入片段,并将插入片段连接到pQE30质粒中。pQE30过表达质粒编码HIS标签,本发明的肽的过表达将产生由该肽和N端HIS标签组成的融合肽。将所得质粒转化到大肠杆菌M15过表达细胞中。对从过夜培养物中提取的质粒进行测序,并且仅使用与预期序列匹配的克隆进行过表达。将16ml过夜培养物接种于37℃的800ml液体LB培养基中。一旦OD<sub>600</sub>达到0.6至0.8之间时,添加IPTG至最终浓度为1mM以诱导过度表达。将过表达含有信号肽的肽的细胞在20℃下温育24小时,将过表达不含信号肽的肽的细胞在37℃温育5小时。

[0182] 重组肽的纯化和鉴定如实施例1所述。

[0183] 实施例3:肽的合成

[0184] 序列与SEQ ID N°1和SEQ ID N°2相同的肽由Seramun Diagnostica GmbH (Heidesee,德国)化学合成。

[0185] 实施例4:最低抑菌浓度(MIC)测定

[0186] MIC测定确定化合物抑制微生物群生长的最低浓度。本文描述的肽的抗微生物潜力与W01998027805中讨论的两种其它AMP(TcAMP1和TcAMP2)以及抗生素或杀真菌剂的活性进行了比较。针对几种细菌和真菌进行了比较MIC测定(表1)。

[0187] 将根据SEQ ID N°1、SEQ ID N°2、SEQ ID N°4、SEQ ID N°6和SEQ ID N°7的肽进行连续稀释,以创建0.39 $\mu$ g/ml至303 $\mu$ g/ml的浓度序列范围。

[0188] 泛菌、葡萄球菌和李斯特菌在胰酪大豆肉汤(TSY)培养基中培养,该培养基由1.7%酪蛋白胨、0.3%大豆蛋白胨、0.25%葡萄糖、0.5% NaCl、0.25% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>和可选的1.5%琼脂组成。念珠菌细胞在由1%酵母提取物、2%蛋白胨、2%葡萄糖和可选2%琼脂组成的酵母提取物蛋白胨葡萄糖(YPD)肉汤培养基中培养。在由2.4% Difco预混肉汤和可选的1.5%琼脂组成的马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基中培养长喙壳菌(Ceratocystis)、葡萄孢菌(Botrytis)、小球腔菌(Leptosphaeria)、球腔菌(Mycosphaerella)、核盘菌(Sclerotinia)和轮枝菌(Verticillium)。

[0189] 为了进行MIC测定,细菌和真菌在琼脂平板上用各自的培养基生长。通过在5ml相应的液体培养基中接种单个细菌菌落或小块真菌来制备预培养物。一至五天后测量600nm处的光密度(OD),并将OD<sub>600</sub>调整为1。该细胞悬浮液用于制备1:500稀释液,相当于约2 $\times$ 10<sup>6</sup>个微生物细胞/ml。

[0190] 为了评估MIC,用测试抗微生物肽制备了96孔板。每个孔含有100 $\mu$ l微生物细胞培养物、90 $\mu$ l培养基和10 $\mu$ l相应稀释度的肽或对照。将所述板在每种受试生物的最佳生长温度下温育过夜(ON)(表1)。目测评估结果,并根据生长或不生长确定MIC。

[0191] 表1.在MIC测定中测试了一系列抗微生物肽的生物体。给出了物种名称、分类以及生长条件。DSM指德国微生物保藏中心(German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) GmbH(DSMZ, Braunschweig,德国)的订购编号。SF指从耶拿微生物资源保藏中心(JMRC, Jena,德国)获得的生物。

[0192]

| 物种                                              | 订购编号        | 分类      | 生长培养基 | 生长温度 |
|-------------------------------------------------|-------------|---------|-------|------|
| 成团泛菌<br>( <i>Pantoea agglomerans</i> )          | JUB-CC-3253 | 革兰氏阴性细菌 | TSY   | 37°C |
| 金黄色葡萄球菌 MRSA                                    | DSM 11729   | 革兰氏阳性细菌 | TSY   | 37°C |
| 单核细胞增生李斯特菌<br>( <i>Listeria monocytogenes</i> ) | DSM 102976  | 革兰氏阳性细菌 | TSY   | 37°C |
| 白色念珠菌                                           | DSM 1386    | 酵母      | YPD   | 30°C |
| 奇异长喙壳菌<br>( <i>Ceratosystis paradoxa</i> )      | DSMZ 63054  | 真菌      | PDA   | 18°C |
| 灰葡萄孢菌<br>( <i>Botrytis cinerea</i> )            | DSMZ 877    | 真菌      | PDA   | 24°C |
| 十字花科小球腔菌<br>( <i>Leptosphaeria maculans</i> )   | SF 70       | 真菌      | PDA   | 18°C |
| 豌豆球腔菌<br>( <i>Mycosphaerella pinodes</i> )      | DSMZ 62763  | 真菌      | PDA   | 30°C |
| 油菜核盘菌<br>( <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> )    | SF 79       | 真菌      | PDA   | 18°C |
| 大丽轮枝菌<br>( <i>Verticillium dahlia</i> )         | SF 76       | 真菌      | PDA   | 28°C |

[0193] 以至少两次独立的重复实验,并使用了不同的肽起始浓度,进行了MIC测定。预测表明,纯化测试蛋白质的任何步骤都不会影响获得的MIC。

[0194] 结果:本发明的所有肽对所有测试生物体均表现出强的抗微生物活性。

[0195] 表2显示了根据SEQ ID N°1、SEQ ID N°2、SEQ ID N°4、SEQ ID N°6和SEQ ID N°7的肽针对真菌物种获得的MIC值。本发明的所有肽在较低浓度下均比现有技术的肽更有效地抑制真菌生长。

[0196] 表2.使用真菌物种作为测试生物体以及本发明的肽 (SEQ ID N°1、N°2、N°4) 和现有技术肽 (SEQ ID N°6和N°7) 进行MIC测定的结果。以克霉唑作为参考。

| 真菌           | 最低抑菌浓度( $\mu\text{g/ml}$ ) |                       |                       |                       |                        |                        |
|--------------|----------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
|              | 克霉唑                        | 根据 SEQ ID N° 1 的本发明的肽 | 根据 SEQ ID N° 2 的本发明的肽 | 根据 SEQ ID N° 4 的本发明的肽 | 根据 SEQ ID N° 6 的现有技术的肽 | 根据 SEQ ID N° 7 的现有技术的肽 |
| [0197] 白色念珠菌 | 3.1                        | 0.4                   | 3.1                   | 0.4                   | 13.1                   | 12.75                  |
| 奇异长喙壳菌       | 0.4                        | 5                     | 6.25                  | 1                     | 4.8                    | 4.7                    |
| 灰葡萄孢菌        | 6.25                       | 6.25                  | 6.25                  | 3.1                   | 14.5                   | 12.75                  |
| 十字花科小球腔菌     | 0.4                        | 3.75                  | 6.25                  | 4.1                   | 37.9                   | 9.4                    |
| 豌豆球腔菌        | 3.1                        | 1.9                   | 4.5                   | 2                     | 13.12                  | 10.68                  |
| 油菜核盘菌        | 25                         | 10.25                 | 19.3                  | 1.5                   | 27.2                   | 23.5                   |
| 大丽轮枝菌        | 1.56                       | 1.6                   | 3.1                   | 1.55                  | 14.5                   | 12.7                   |

[0198] 表3显示了根据SEQ ID N°1、SEQ ID N°2、SEQ ID N°4、SEQ ID N°6和SEQ ID N°7的肽针对细菌物种获得的MIC值。本发明的所有肽均抑制细菌生长,并且在所有测试物种中,根据SEQ N°1、N°2和N°4的肽比现有技术的肽更有效。

[0199] 表3.使用细菌物种作为测试生物体以及本发明的肽 (SEQ ID N°1、N°2和N°4) 和现有技术肽 (SEQ ID N°6和N°7) 进行MIC测定的结果。使用庆大霉素和链霉素作为参考。

| 细菌             | 最低抑菌浓度( $\mu\text{g/ml}$ ) |      |             |             |             |             |             |
|----------------|----------------------------|------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|                | 庆大霉素                       | 链霉素  | SEQ ID N° 1 | SEQ ID N° 2 | SEQ ID N° 4 | SEQ ID N° 6 | SEQ ID N° 7 |
| [0200] 金黄色葡萄球菌 | 0.8                        | >125 | 3.1         | 7.1         | 1.8         | 13          | 13.6        |
| 单核细胞增生利斯特菌     | 0.4                        | 7.8  | 3.1         | 7.1         | 1.8         | 3.25        | 13.6        |
| 成团泛菌           | 1.56                       | NA   | 1.1         | 1.9         | 1           | 7.9         | 9.45        |
| 大肠杆菌           | 1                          | NA   | 3.1         | 6.2         | NA          | NA          | NA          |

[0201] 实施例5:肽在体液中的稳定性

[0202] 羊血测定

[0203] 进行了体外实验,以测试本文公开的肽在血液中对抗白色念珠菌的行为。使用来自人类血液的白色念珠菌分离株 (DSMZ 6569)。将根据SEQ ID N°1的肽调整至1mg/ml的浓度,并与等量的羊血混合。将此混合物在30°C温育过夜。为了去除血液中的固体部分,将混合物离心,并将获得的血浆上清液用于MIC。

[0204] 尿液测定

[0205] 进行了体外实验,以测试本文公开的肽在尿液中对抗白色念珠菌的行为。将根据SEQ ID N°1的肽调整至1mg/ml的浓度,并与等量的合成尿液或人尿混合。这些混合物在30°C温育过夜。为了去除尿液中的固体部分,将混合物离心,并将所得上清液用于MIC。

[0206] 牛乳测定

[0207] 进行了体外实验,以测试本文所公开的肽在3.5%脂肪牛乳中对抗单核细胞增生李斯特菌的行为。将根据SEQ ID N°1的肽调整至1mg/ml的浓度,并与等量的乳混合。将此混合物在37℃温育过夜。为了去除乳液中的固体部分,将混合物离心,并将所得上清液用于MIC。

[0208] 结果:当肽与羊血混合时,抑制白色念珠菌细胞生长的能力下降。然而,本文所述的肽在羊血中为25µg/ml时仍然有活性(表4)。

[0209] 肽与尿液混合对抑制白色念珠菌细胞生长的能力影响较小。在合成尿液中,2µg/ml肽时实现有效抗微生物活性,在人类尿液中,5µg/ml肽时实现有效抗微生物活性,而对照条件下的抗微生物活性为0.4µg/ml(表4)。

[0210] 类似地,当肽与牛奶混合时,抑制单核细胞增生李斯特菌生长的浓度从无乳条件下的3.2µg/ml增加到80µg/ml(表4)。

[0211] 所述肽并没有完全失去抑制体液中细菌和酵母生长的能力,这表明它们适合用于治疗用途。

[0212] 表4.本发明的肽(SEQ ID N°1)与羊血、尿液或牛乳混合时的MIC测定结果。对照是不含体液的肽,并使用卡泊芬净和四环素作为参考。

| [0213] | 测试生物体      | 条件   | 最低抑菌浓度(µg/ml) |
|--------|------------|------|---------------|
|        | 白色念珠菌      | 对照   | 0.4           |
|        |            | 卡泊芬净 | 0.5           |
|        |            | 羊血   | 25            |
|        |            | 合成尿液 | 2             |
|        |            | 人类尿液 | 5             |
|        | 单核细胞增生利斯特菌 | 对照   | 3.1           |
|        |            | 四环素  | 1.6           |
|        |            | 牛乳   | 80            |

[0214] 实施例6:土壤泥浆中的MIC测定

[0215] 进行了体外实验,以测试本文公开的肽在土壤泥浆中对抗解淀粉欧文氏菌(*Erwinia amylovora*)的行为。通过将5g土壤与20ml水混合,生成土壤泥浆。将该混合物在顶置式振荡器上温育1小时。通过离心去除固体部分,并将获得的上清液(称为土壤浆液)用于MIC测定。将等体积的SEQ ID N°1肽(8mg/ml)和土壤泥浆混合,并在28℃温育过夜。该混合物用于对解淀粉欧文氏菌进行MIC测试。

[0216] 结果:与对照条件下的15µg/ml相比,本文所述的肽在土壤泥浆中以25µg/ml的浓度抑制细菌生长。由于它们不会完全失去抑制土壤中细菌生长的能力,因此本文所述的肽适合于农业用途。

[0217] 实施例7:肽在技术表面上的适用性。

[0218] 进行实验以测试本文公开的肽在技术表面上对抗白色念珠菌的行为。

[0219] 在生物膜反应器中的陶瓷(孔径为1100µm)、不锈钢和硅表面测试了该生物体的生物膜形成。将四根圆盘放入每个反应器并拧紧,每根圆盘包含3个表面的圆盘。系统在安装所有圆盘后进行高压灭菌。每个反应器中装入297ml SU培养基,并加入3ml SU中的白色念珠菌(阴道分离物)预培养物( $OD_{600}=0.1$ )。生物膜反应器在30℃和200rpm搅拌下温育。总共运行了三个生物反应器系统:对照系统、从第0天开始用富含肽的可可提取物处理的系统,

以及从第3天开始用该提取物处理的系统。可可提取物的最终总蛋白质浓度为100 $\mu$ g/mL。

[0220] 在第1、3、5和7天,从每个反应器中取出一根圆盘。将圆盘拧开并浸入2mL SU中。这些液体在SU培养基中稀释,并制备 $10^{-1}$ - $10^{-5}$ 的稀释系列。将稀释液平铺到YPD固体培养基中,在30 $^{\circ}$ C培养48小时。计数平板上形成的集落,并计算集落形成单位(CFU)/cm<sup>2</sup>盘。

[0221] 结果:在所有测试表面上均未观察到白色念珠菌的生长。这些结果表明,本文公开的肽具有高度稳定性,可有效用作表面消毒剂或去污剂。

[0222] 实验8:酵母和哺乳动物细胞的体外试验

[0223] 为了研究肽的生长抑制作用是否具有抑菌性或杀微生物性,对作为选择的模型生物体的白色念珠菌(阴道分离株)和对人类角质形成细胞(HaCaT)进行了乳酸脱氢酶(LDH)释放测定。LDH是一种存在于多种细胞类型中的酶。细胞膜损伤会导致LDH释放到细胞培养基中,随后可以通过偶联酶显色反应进行检测和定量。

[0224] HaCaT细胞在37 $^{\circ}$ C和8% CO<sub>2</sub>条件下在补充有4.5g/L葡萄糖、2mM L-谷氨酰胺和10%胎牛血清(FCS)的DMEM培养基中生长。细胞在具有约20mL DMEM的75cm<sup>2</sup>细胞培养瓶中生长。培养基每周更换两次。一旦达到90%以上的汇合度,细胞将以1:10的比例传代。传代溶液由PBS中的EDTA(0.05%原液)和胰蛋白酶(0.1%原液)的1:1混合物组成,不含Ca<sup>2+</sup>和Mg<sup>2+</sup>。

[0225] LDH细胞毒性试验CyQUANT<sup>TM</sup>(Invitrogen,编号C20300和C20301)按照公司提供的方案进行。根据试剂盒中描述的标准方案,确定HaCaT或白色念珠菌细胞的最佳接种密度为10,000个细胞/100 $\mu$ L。将细胞暴露于SEQ ID N<sup>o</sup>2的肽中1h或过夜,浓度范围为1.95 $\mu$ g/mL至250 $\mu$ g/mL,检测LDH释放。使用公司提供的以下公式计算细胞毒性:细胞毒性%=[(肽-处理的LDH活性)-(自发LDH活性)/(最大LDH活性)-(自发LDH活性)]\*100,在未处理(加水)样品中测量自发LDH活性,在使用试剂盒供应商提供的裂解剂测量最大LDH活性。

[0226] 结果:检测到的目标生物体白色念珠菌的细胞死亡率从0至250 $\mu$ g/mL呈线性,在最高测试蛋白质浓度下细胞毒性高达92%(图4)。相反,用肽处理HaCaT细胞时,几乎不诱导LDH释放。肽对HaCaT细胞的细胞毒性在125 $\mu$ g/mL的肽浓度时为0%至1%,在250 $\mu$ g/mL的肽浓度时达到6%(图4)。

[0227] 提出本发明不限于先前描述的任何实现形式,并且可以在不重新评估所附权利要求的情况下对所呈现的制造实例添加某些修改。例如,本发明的优选实施方式针对可可树的CCN-51品种,但是可以使用产生足够量的豌豆球蛋白以供进一步加工的任何可可品种而不脱离本发明的范围。

[0228] 实施例9:从未发酵的可可豆中提取肽

[0229] 本文公开的肽是从未发酵但充分干燥的可可豆中分离的。使用碎豆机将可可豆机械粉碎,以获得碎粒和壳的混合物。除去壳并将去壳的碎粒转移到压榨机中。由此得到黄油和浆液的混合物,将其在40 $^{\circ}$ C以16,600x g的速度离心10分钟。将收集在顶部的黄油级分丢弃,将固体浆液颗粒粉碎并储存在4 $^{\circ}$ C直至进一步使用。

[0230] 然后以3种方式提取肽。

[0231] 方法1:PEB(蛋白质提取缓冲液)提取

[0232] 将粉碎的浆状颗粒在50 $^{\circ}$ C水浴中预热10分钟,然后溶解在蛋白质提取缓冲液(100mM Tris、1% SDS和1% DTT,pH 8.1)中,以1:4的颗粒与缓冲液重量比添加。溶解的浆

状颗粒在室温下搅拌温育1小时,然后以16 600x g的速度离心20分钟。收集含肽的液相并通过透析或超滤(Centricon Plus-70,Merck Chemicals GmbH,Merck KGaA的子公司,Darmstadt,德国)纯化以去除PEB的成分。

[0233] 方法2:PEB提取后进行酸沉淀

[0234] 将粉碎后的浆状颗粒按方法1所述进行处理,即将粉碎的浆状颗粒在50℃水浴中预热10min,然后溶于PEB中。溶解的浆状沉淀在室温下搅拌温育1小时,然后以16,600xg的速度离心20分钟。收集含有肽的液相,并进行酸沉淀,以根据其等电点富集在蛋白质混合物中的本发明的肽。因此,用1M柠檬酸将蛋白质提取物的pH值降低至6.0,导致颜色从深灰色变为红色。然后将该混合物以16,600x g的速度离心10分钟。弃去上清液,使用超声波将蛋白质颗粒重新悬浮在PEB中,以充分溶解所述颗粒。随后,通过5kDa MWCO超滤去除有害物质(CentriconPlus-70,Merck Chemicals GmbH,Merck KGaA的子公司,Darmstadt,德国)。

[0235] 方法3:热提取

[0236] 将粉碎的浆料颗粒在自来水中加热至60℃,颗粒与水的重量体积比为1:4,搅拌10分钟。将获得的混合物在10℃以16,600xg的速度离心20分钟。

[0237] 收集用方法1至3中的任一种方法提取后获得的含有肽的上清液,并通过SDS-PAGE和MIC进行定量或分析。在使用之前,将蛋白质提取物冻干或真空离心以提高浓度。

[0238] 序列表

[0239] SEQ ID N°1(根据本发明的一个实施方式的肽)

[0240] YGRKQYERDPRQQYEQCQRRCESEATEEREQEQCERCEREYKEQQRQQEEELQRQYQQCQGRCEQQQ  
GQREQQQCQRKCWEQYKEQERGEHENYHNHKKN

[0241] SEQ ID N°2(根据本发明的一个实施方式的肽)

[0242] YGRKQYERDPRQQYEQCQRRCESEATEEREQEQCERCEREYKEQQRQQEEELQRQYQQCQGRCEQQQ  
GQREQQQCQRKCWEQYKEQERGEHENYHNHKK

[0243] SEQ ID N°3(根据本发明的一个实施方式的信号肽)

[0244] MVISKSPFIVLIFSLLLSFALLCSGVSA

[0245] SEQ ID N°4(根据本发明的一个实施方式的肽)

[0246] MVISKSPFIVLIFSLLLSFALLCSGVSA YGRKQYERDPRQQYEQCQRRCESEATEEREQEQCERCERE  
YKEQQRQQEEELQRQYQQCQGRCEQQQGQREQQQCQRKCWEQYKEQERGEHENYHNHKKN

[0247] SEQ ID N°5(根据本发明的一个实施方式的肽)

[0248] MVISKSPFIVLIFSLLLSFALLCSGVSA YGRKQYERDPRQQYEQCQRRCESEATEEREQEQCERCERE  
YKEQQRQQEEELQRQYQQCQGRCEQQQGQREQQQCQRKCWEQYKEQERGEHENYHNHKK

[0249] SEQ ID N°6(现有技术肽)

[0250] YERDPRQQYEQCQRRCESEATEEREQEQCERCEREYKEQQRQQEEE

[0251] SEQ ID N°7(现有技术肽)

[0252] LQRQYQQCQGRCEQQQGQREQQQCQRKCWEQYKEQERGEHENYHNHKKNRSEEEEGQQR

[0253] SEQ ID N°8(Forward\_BamH1正向引物)

[0254] CGCGGATCCTATGGCAGAAAACAATAT

[0255] SEQ ID N°9(Reverse\_Kpn1正向引物)

[0256] CGCGGTACCTTTGTGATTATGGTAATT

[0257] SEQ ID N°10 (HQ标签)  
[0258] HQHQHQ  
[0259] SEQ ID N°11 (HN标签)  
[0260] HNNHNNHNNHNN  
[0261] SEQ ID N°12 (HAT标签)  
[0262] KDHLIHNVHKEEHAHAHNK  
[0263] SEQ ID N°13 (ALFA标签)  
[0264] SRLEEELRRRLTE  
[0265] SEQ ID N°14 (Avi标签)  
[0266] GLNDIFEAQKIEWHE  
[0267] SEQ ID N°15 (C-标签)  
[0268] EPEA  
[0269] SEQ ID N°16 (钙调蛋白-标签)  
[0270] KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL  
[0271] SEQ ID N°17 (E-标签)  
[0272] GAPVPYPDPLEPR  
[0273] SEQ ID N°18 (FLAG-标签)  
[0274] DYKDDDDK  
[0275] SEQ ID N°19 (HA-标签)  
[0276] YPYDVPDYA  
[0277] SEQ ID N°20 (Myc-标签)  
[0278] EQKLISEEDL  
[0279] SEQ ID N°21 (NE-标签)  
[0280] TKENPRSNQEESYDDNES  
[0281] SEQ ID N°22 (Rho1D4标签)  
[0282] TETSQVAPA  
[0283] SEQ ID N°23 (S-标签)  
[0284] KETAAAKFERQHMDs  
[0285] SEQ ID N°24 (SBP标签)  
[0286] DEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREP  
[0287] SEQ ID N°25 (链霉素-标签)  
[0288] WSHPQFEK

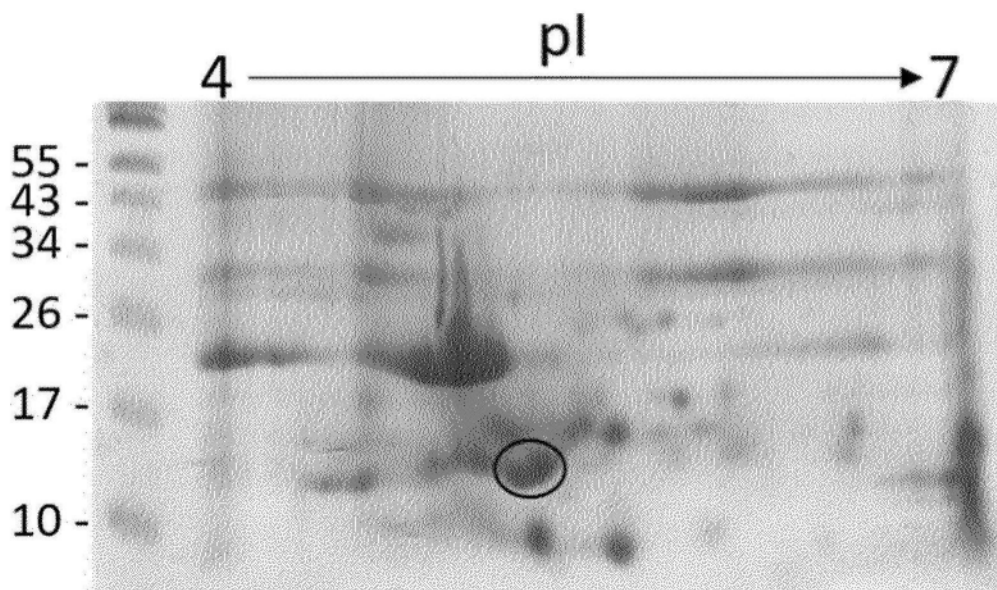


图1

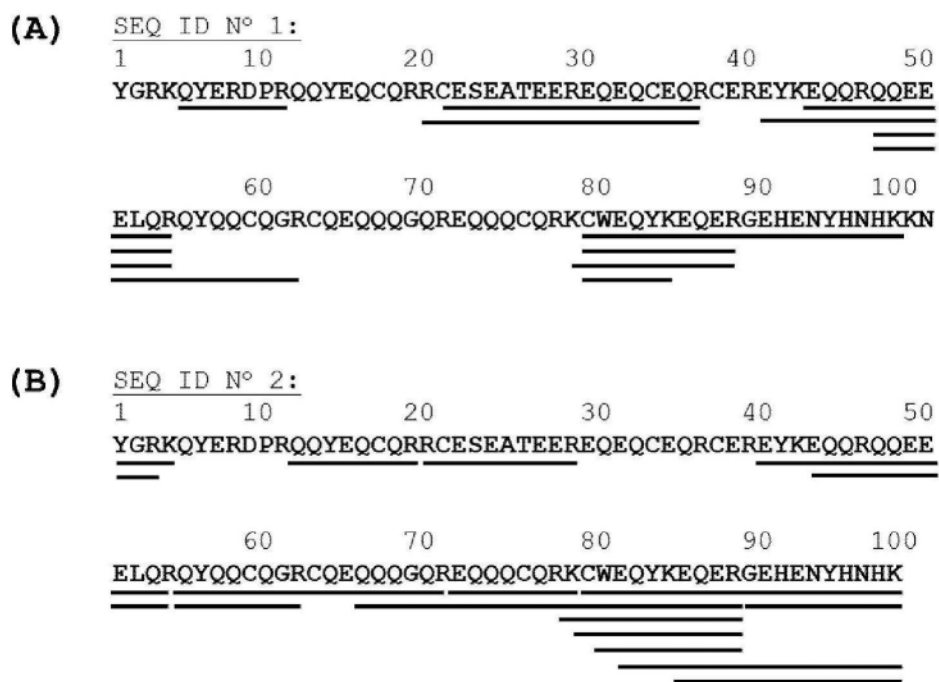


图2

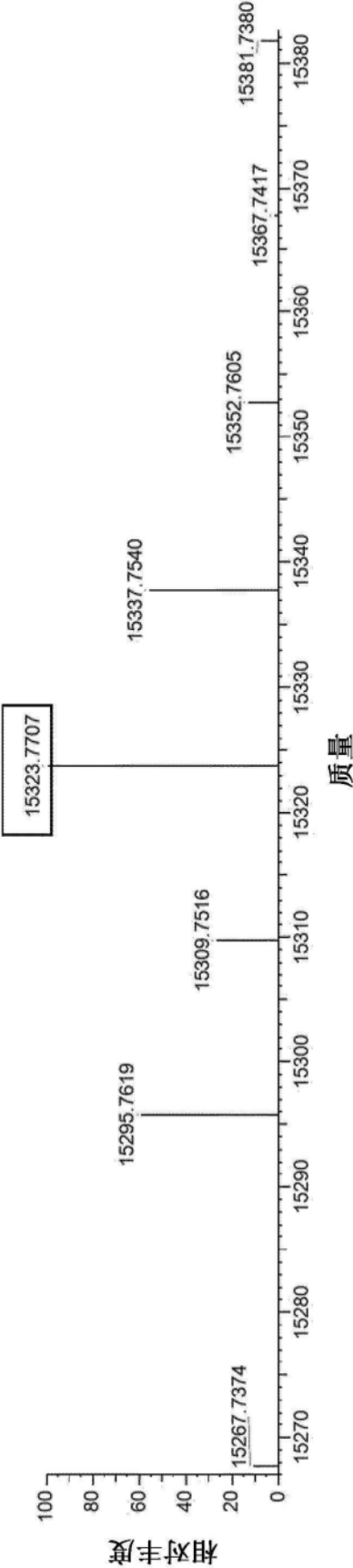


图3A

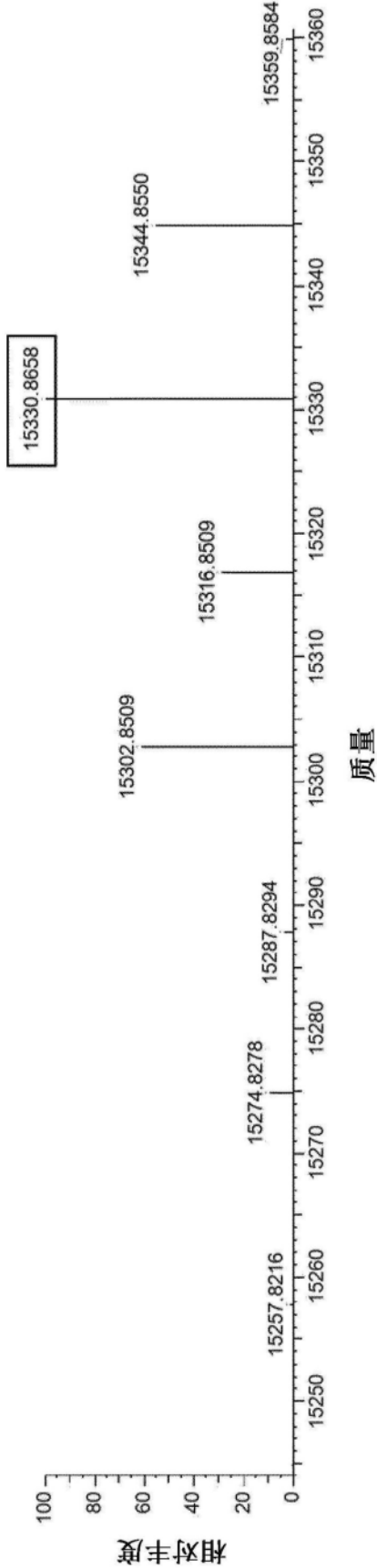


图3B

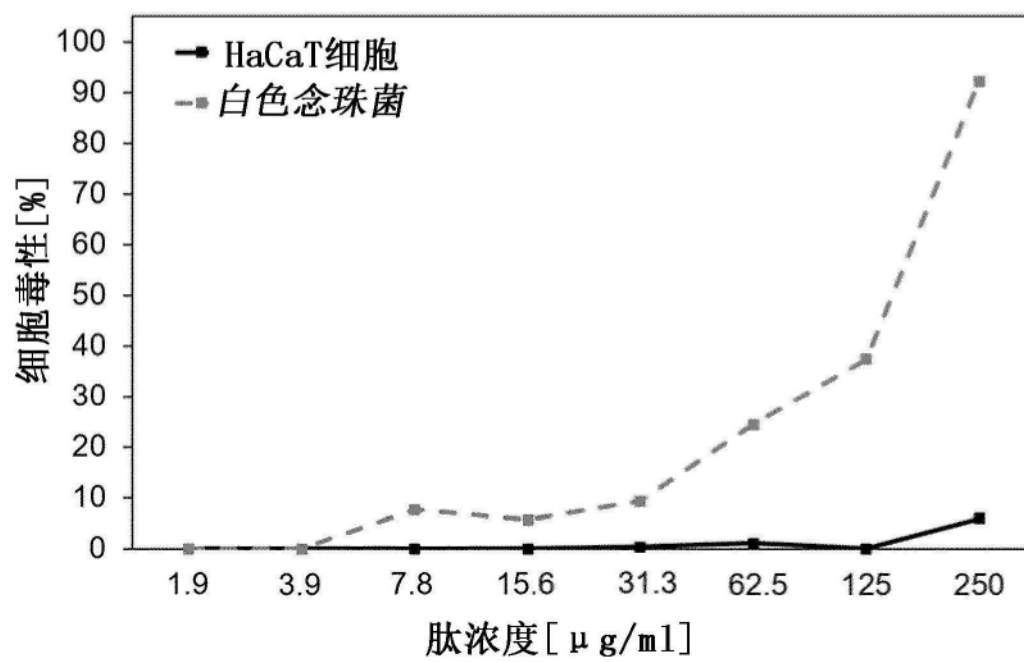


图4