



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114269771 B

(45) 授权公告日 2024. 11. 29

(21) 申请号 202080058005.3
(22) 申请日 2020.06.17
(65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 114269771 A
(43) 申请公布日 2022.04.01
(30) 优先权数据
 10-2019-0071635 2019.06.17 KR
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2022.02.16
(86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/KR2020/007802 2020.06.17
(87) PCT国际申请的公布数据
 W02020/256387 KO 2020.12.24
(73) 专利权人 高丽大学校产学协力团
 地址 韩国首尔
(72) 发明人 刘永道 李慧罗
(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
 专利代理师 张福誉 韩晓帆
(51) Int.Cl.
 C07K 7/08 (2006.01)
 A61K 8/64 (2006.01)

A61K 38/10 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61Q 17/00 (2006.01)
A23K 20/147 (2016.01)
A23K 20/195 (2016.01)
A23L 3/3463 (2006.01)
A23L 3/3526 (2006.01)
A23L 33/18 (2016.01)
A01N 37/46 (2006.01)
A01P 1/00 (2006.01)
A01P 7/04 (2006.01)

(56) 对比文件
LEE, H.-R. et al..Romol-Derived
Antimicrobial Peptide Is a New
Antimicrobial Agent Bacteria in a Murine
of against Multidrug-Resistant
Sepsis.Mbio.2020,第11卷(第1期),第e03258-
19篇. (续)

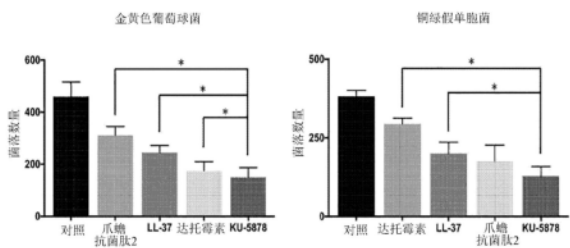
审查员 奚静

权利要求书1页 说明书28页
序列表17页 附图3页

(54) 发明名称
ROMO1来源抗微生物肽及其变体
(57) 摘要

本发明涉及来源于Romol蛋白的抗微生物肽,并且具体而言,确定了具有Romol蛋白的α-螺旋2区的氨基酸序列的多种肽具有针对革兰氏阳性、革兰氏阴性和耐多药细菌的抗微生物活性,以提供所述肽以及包含所述肽的抗微生物组合物。本发明的Romol来源肽及其变体针对多种类型的细菌和耐多药细菌的抗生素能力优于现有抗生素和抗生素肽,并且特别地,具有针对血管中的多种细菌的抗微生物活性,因此,是可作为用于预防或治疗广泛的细菌感染性疾病的物

质提供的新抗生素。因此,包含本发明抗微生物肽的组合物预期用于多种领域,例如用作药物、准药物、食品和饲料添加剂以及农化和化妆品添加剂,以预防或治疗感染性疾病。



[转续页]

[接上页]

(56) 对比文件

Gi Young Lee et al..Romol is a
mitochondrial nonselective cation channel

with viroporin-like
characteristics.Journal of Cell
Biology.2018,第217卷(第6期),205 -2071.

1. 抗微生物肽,其包含由SEQ ID NO:13组成的氨基酸序列。
2. 权利要求1所述的抗微生物肽,其在其N端或C端被修饰,其中所述修饰为聚乙二醇化、乙酰化、羧化、脂化或酰胺化。
3. 抗微生物肽,其由SEQ ID NO:17至25、27、38、39和42中任一个的氨基酸序列组成。
4. 权利要求3所述的抗微生物肽,其在其N端、C端或任意氨基酸处被修饰,其中所述修饰为聚乙二醇化、乙酰化、羧化、脂化或酰胺化。
5. 抗微生物肽,其由相对于SEQ ID NO:13的氨基酸序列包含选自以下 (b) 至 (f) 和 (h) 中的一个氨基酸替换的序列组成:
 - (b) 氨基酸第2位处的T至K或R替换,
 - (c) 氨基酸第5位处的Q至K或R替换,
 - (d) 氨基酸第6位处的S至K、R或H替换,
 - (e) 氨基酸第9位处的T至K或R替换,
 - (f) 氨基酸第10位处的F至W替换,以及
 - (h) 氨基酸第20位处的I至G替换。
6. 权利要求1所述的抗微生物肽,其还包含正亮氨酸对所有四个甲硫氨酸的替换。
7. 权利要求1所述的抗微生物肽,其还包含第3、4、5、7、8、9、11、17、18或19位处的氨基酸的缺失,或者第3位处的氨基酸的缺失和第7位处的氨基酸的缺失。
8. 权利要求1所述的抗微生物肽,其还包含与其C端连接的氨基酸序列,其中所述与C端连接的氨基酸序列由三个重复的R或两个重复的K的序列组成。

ROM01来源抗微生物肽及其变体

技术领域

[0001] 本发明涉及来源于Romol蛋白的抗微生物肽,并且具体地,提供了具有Romol蛋白的 α -螺旋2区的氨基酸序列的多种肽以及包含各肽的抗菌组合物,因为确定了所述肽针对革兰氏阳性、革兰氏阴性和耐多药(multidrug-resistant)细菌具有抗菌活性。

背景技术

[0002] 用作针对细菌感染的治疗手段的抗生素的最大问题是细菌获得抗生素抗性。根据英国政府的Wellcome Trust报告,预计到2050年,由于无法用现有抗生素治疗的超级细菌而造成的全世界死亡数将超过10,000,000,因此超级细菌感染将取代癌症作为死亡原因。

[0003] 此外,世界卫生组织(WHO)选择耐碳青霉烯鲍氏不动杆菌(carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*)、耐碳青霉烯铜绿假单胞菌(carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*)、耐碳青霉烯肠杆菌属(carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* sp.)菌株作为众多耐多药细菌中的关键优先类别中的细菌,并宣布应最优先解决对被作为最后的抗生素的基于碳青霉烯的抗生素具有抗性的革兰氏阴性超级细菌。

[0004] 同时,菌血症是指其中细菌在血液中存活的病症,而脓毒症是由感染的直接或间接影响引起的。也就是说,脓毒症是由侵袭人体的细菌感染血液引起的全身炎症反应综合征,并且是在感染之后6小时存活率低于30%的疾病。引起脓毒症的细菌非常多样,包括链球菌(*streptococcus*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、肺炎球菌(*pneumococcus*)、铜绿假单胞菌和真菌,并且由于这些引起脓毒症的细菌的多样性,脓毒症的治疗是困难的。

[0005] 迄今为止,脓毒症的最佳治疗主要是为了缓解症状的目的,例如抑制免疫应答或抑制血液凝固。对于脓毒症的根本治疗,需要在初始阶段进行细菌鉴定,以鉴定感染患者的细菌种类。然而,存在如下的问题:由于如上所述由脓毒症引起的速发全身炎症反应,无法确保细菌鉴定所需的时间。此外,即使成功地鉴定出引起脓毒症的细菌,当引起脓毒症的细菌是针对抗生素具有抗性的耐多药细菌时,也会出现没有适合于其治疗的药物的问题。因此,有必要开发针对广泛的细菌具有抗菌活性而无需鉴定引起脓毒症的细菌的抗生素,并且特别需要开发针对耐多药细菌具有抗菌活性的抗生素。

[0006] 如上所述,迄今为止人类使用抗生素的最大问题是细菌获得抗性。为了解决这个问题,进行了许多研究,特别是已积极开发了抗微生物肽(antimicrobial peptide,AMP)以克服细菌获得的抗生素抗性。已开发了源自动物或人宿主防御蛋白的多种抗微生物肽,但问题在于人免疫系统中的细菌有可能获得抗性,并且它们在血液中的半衰期短,对人体有毒,并且与现有抗生素相比显示出有限的药物效果。由于这些问题,抗微生物肽尚未投入实际应用。例如,爪蟾抗菌肽(magainin)是1999年在美国开发的抗微生物肽,并且在3期临床试验之后请求FDA批准其,但该批准被拒绝,因为其药物效果并不优于那些传统抗生素。此外,2003年的达托霉素(daptomycin)和2014年的奥利万星(oritavancin)获得美国食品和

药物管理局的批准,但这两种肽均仅针对革兰氏阳性菌显示抗菌活性,且仅可应用于皮肤感染性疾病。

[0007] 如上所述,由于有限的药物效果和应用,可用于治疗例如菌血症和脓毒症的细菌感染性疾病的抗微生物肽尚未被开发。本发明人发现位于线粒体内膜的Romo1蛋白的 α -螺旋2结构针对革兰氏阳性、革兰氏阴性和耐多药细菌表现出抗菌活性,并因此可应用于治疗广泛的细菌感染性疾病,从而完成本发明。

[0008] [现有技术文件]

[0009] (非专利文件1):WHO,Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research,Discovery,and Development of New Antibiotics (2017.2.27)

[0010] (非专利文献2):Lee et al.,J.Cell Biol.,217,2059-2071,2018

[0011] 公开内容

[0012] 技术问题

[0013] 本发明的一个目的是提供来源于Romo1蛋白的抗微生物肽,和由该肽的一些氨基酸的替换或缺失产生的经修饰抗微生物肽。

[0014] 本发明的另一个目的是提供含有抗微生物肽作为活性成分的抗生素,以及各自含有抗微生物肽的食品和饲料添加剂、化妆品组合物、生物杀虫剂和抗菌准药物组合物。

[0015] 然而,本发明待实现的目的不限于上述目的,并且本领域技术人员根据以下描述将清楚地理解本文中未提及的其他目的。

[0016] 技术方案

[0017] 一个方面提供了抗微生物肽,其包含在羧基(C-)端方向上延伸的7至28个连续氨基酸的序列,该序列起始于选自由SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列组成的Romo1蛋白序列的第52至79位氨基酸区的任何氨基酸。

[0018] 一个实施方案提供了由构成抗微生物肽的氨基酸序列的至少一个氨基酸的替换或缺失产生的抗微生物肽。

[0019] 在另一个实施方案中,肽可以是包含选自SEQ ID NO:2至15的任一个氨基酸序列或由其组成的肽。

[0020] 在另一个实施方案中,肽可以是包含选自SEQ ID NO:16、30、40和45的任一个氨基酸序列或由其组成的肽。

[0021] 在另一个实施方案中,由SEQ ID NO:16的氨基酸序列组成的肽可由例如选自SEQ ID NO:17至29的任一个氨基酸序列组成。

[0022] 在另一个实施方案中,由SEQ ID NO:30的氨基酸序列组成的肽可由例如选自SEQ ID NO:31至39的任一个氨基酸序列组成。

[0023] 在另一个实施方案中,由SEQ ID NO:40的氨基酸序列组成的肽可由例如选自SEQ ID NO:41至44的任一个氨基酸序列组成。

[0024] 在另一个实施方案中,由SEQ ID NO:45的氨基酸序列组成的肽可由例如选自SEQ ID NO:46和47的任一个氨基酸序列组成。

[0025] 在另一个实施方案中,肽可优选为包含选自SEQ ID NO:17至25、27、34、37、39、42和44的任一个氨基酸序列或由其组成的肽,更优选为包含选自SEQ ID NO:22、23和24的任

一个氨基酸序列或由其组成的肽。

[0026] 在另一个实施方案中,肽可为抗微生物肽,其由SEQ ID NO:13的氨基酸序列组成,或由相对于SEQ ID NO:13的氨基酸序列包含选自以下(a)至(h)中的至少一个氨基酸替换的序列组成。(a)氨基酸第1位处的K至R替换,(b)氨基酸第2位处的T至K或R替换,(c)氨基酸第5位处的Q至K或R替换,(d)氨基酸第6位处的S至K、R或H替换,(e)氨基酸第9位处的T至K或R替换,(f)氨基酸第10位处的F至W替换,(g)氨基酸第16位处的I至L替换,以及(h)氨基酸第20位处的I至G或L替换。

[0027] 在另一个实施方案中,抗微生物肽可以是其中至少一个甲硫氨酸被正亮氨酸或异亮氨酸替换的肽。

[0028] 在另一个实施方案中,抗微生物肽可以是其中第3、4、5、7、8、9、11、17、18和19位处的氨基酸中的任一个缺失或者第3或4位处的氨基酸和第7或8位处的氨基酸缺失的肽。

[0029] 在另一个实施方案中,抗微生物肽可还包含与C端连接的氨基酸序列,并且与C端连接的氨基酸序列可由一至三个重复的R或K的序列组成。

[0030] 在另一个实施方案中,肽可以是其中其序列中的至少一个氨基酸被修饰的肽。

[0031] 在另一个实施方案中,修饰可为聚乙二醇化、乙酰化、羧化、脂化或酰胺化。

[0032] 在另一个实施方案中,构成肽的氨基酸可各自独立地为L-或D-氨基酸,并且可为放射性或荧光标记的氨基酸类似物。

[0033] 在另一个实施方案中,肽可具有针对选自革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和耐多药细菌的一种或更多种细菌的抗菌活性。

[0034] 在另一个实施方案中,革兰氏阳性菌可以是属于选自葡萄球菌属(*Staphylococcus* sp.)、芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)、肠球菌属(*Enterococcus* sp.)、链霉菌属(*Streptomyces* sp.)和链球菌属(*Streptococcus* sp.)的一个属的细菌。优选地,革兰氏阳性菌可以是选自金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)、仙台链霉菌(*Streptomyces sindenensis*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)和肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)的一种或更多种细菌。

[0035] 在另一个实施方案中,革兰氏阴性菌可以是属于选自埃希氏杆菌属(*Escherichia* sp.)、克雷伯菌属(*Klebsiella* sp.)、不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.)、假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)和肠杆菌属的一个属的细菌。优选地,革兰氏阴性菌可以是选自大肠杆菌、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)、鲍氏不动杆菌、铜绿假单胞菌和产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)的一种或更多种细菌。

[0036] 在另一个实施方案中,耐多药细菌可以是上述革兰氏阳性或革兰氏阴性菌,其对属于青霉素类、碳青霉烯类、头孢菌素类、喹诺酮类、大环内酯类、四环素类或糖肽类的一种或更多种抗生素具有抗性。优选地,耐多药细菌可以是属于选自耐甲氧西林葡萄球菌属、耐多药假单胞菌属、耐万古霉素(vancomycin-resistant)肠球菌属、耐多药克雷伯菌属、耐多药不动杆菌属和耐万古霉素葡萄球菌属的一个属的细菌。

[0037] 在另一个实施方案中,耐多药细菌可以是选自耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、耐多药铜绿假单胞菌、耐多药鲍氏不动杆菌、耐多药肺炎克雷伯菌、耐万古霉素屎肠球菌和耐万古霉素金黄色葡萄球菌的一种或更多种细菌。

[0038] 在另一个实施方案中,耐多药铜绿假单胞菌可对选自哌拉西林(piperacillin)、哌拉西林-三唑巴坦(tazobactam)、头孢他啶(ceftazidime)、亚胺培南(imipenem)、美罗培南(meropenem)、庆大霉素(gentamicin)、阿米卡星(amikacin)和环丙沙星(ciprofloxacin)的一种或更多种抗生素具有抗性;耐多药鲍氏不动杆菌可对选自哌拉西林、哌拉西林-三唑巴坦、头孢他啶、亚胺培南、美罗培南、庆大霉素、阿米卡星、环丙沙星和头孢吡肟(cefepime)的一种或更多种抗生素具有抗性;并且耐多药肺炎克雷伯菌可对选自哌拉西林-三唑巴坦、头孢他啶、头孢吡肟、亚胺培南、庆大霉素和环丙沙星的一种或更多种抗生素具有抗性。

[0039] 在另一个实施方案中,耐万古霉素屎肠球菌除了对万古霉素具有抗性之外,还可以对选自利福平(rifampin)、四环素、庆大霉素、红霉素、链霉素和氨苄西林的一种或更多种抗生素具有抗性,并且耐万古霉素金黄色葡萄球菌除了对万古霉素具有抗性之外,还可以对选自苯唑西林(oxacillin)、苄基青霉素、氨苄西林和头孢唑啉(cefazolin)的一种或更多种抗生素具有抗性。

[0040] 另一方面提供了含有抗微生物肽作为活性成分的抗生素。

[0041] 又一方面提供了用于预防或治疗细菌感染性疾病的药物组合物,其包含抗微生物肽作为活性成分。

[0042] 又一方面提供了用于预防或治疗细菌感染性疾病的方法,该方法包括向对象施用抗微生物肽的步骤。

[0043] 又一方面提供了抗微生物肽用于制造用于预防或治疗细菌感染性疾病的药物的用途。

[0044] 在一个实施方案中,细菌感染性疾病可以是选自皮肤感染、食物中毒、中耳炎、膀胱炎、腹膜炎、尿路感染、乳腺炎、肺炎、心内膜炎、结膜炎、关节炎、子宫内膜炎、腺疫、菌血症、脓毒症和痤疮的一种或更多种疾病,并且可优选是肺炎或脓毒症。

[0045] 另一方面提供了抗菌准药物组合物、化妆品组合物、食品添加剂和饲料添加剂,其各自含有抗微生物肽。

[0046] 有益效果

[0047] 根据本发明的Romo1来源肽及其变体相比于现有抗生素和抗生素肽可具有针对多种类型细菌的更高的抗菌活性,并因此可在早期从患有细菌感染性疾病的患者的血液中同时去除多种致病菌。具体而言,本发明的肽可针对耐抗生素细菌表现出高抗菌活性,并因此可作为由耐多药细菌引起的感染性疾病的预防性或治疗性药剂提供,超出现有抗生素的应用限制。此外,根据本发明的Romo1来源肽及其变体预期用于在包括药物、准药物、食品和饲料添加剂、杀虫剂和化妆品添加剂的多种应用中预防或治疗广泛的细菌感染性疾病的目的,因为细菌获得针对Romo1来源肽及其变体的抗性的可能性低,Romo1来源肽及其变体毒性低,并且特别地在血液中具有比现有的抗微生物肽更高的抗菌活性。

附图说明

[0048] 图1示出了比较KU-5878与传统抗微生物肽(LL-37、爪蟾抗菌肽2和达托霉素)针对革兰氏阳性和革兰氏阴性菌的抗菌活性的结果。

[0049] 图2示出了比较KU-5878与传统抗微生物肽(LL-37、爪蟾抗菌肽2和达托霉素)针对

耐多药细菌的抗菌活性的结果。

[0050] 图3示出了比较KU-5878与传统抗生素(亚胺培南)针对革兰氏阳性和革兰氏阴性菌的抗菌活性的结果。

[0051] 图4示出了比较KU-5878与传统抗生素(亚胺培南)针对耐多药细菌的抗菌活性的结果。

[0052] 图5示出了比较KU-5878与传统抗微生物肽(爪蟾抗菌肽2和蜂毒肽)对人血管内皮细胞(HUVEC)的细胞毒性的结果。

[0053] 图6示出了通过红细胞溶血程度比较KU-5878和KU-5878变体(KU-5878-K4和KU-5878-K4-D)与传统抗微生物肽(LL-37、爪蟾抗菌肽2和蜂毒肽)对小鼠红细胞的细胞毒性的结果。

[0054] 图7示出了观察小鼠重量以确定KU-5878在体内无毒性的结果。

具体实施方式

[0055] 活性氧调节剂1(Reactive oxygen species modulator 1, Romo1)蛋白是位于线粒体内膜的膜蛋白,并已知其参与线粒体活性氧产生、TNF- α 信号传导、细胞衰老、癌症进展和侵袭以及线粒体蛋白转运等。Romo1蛋白的结构是包含两个 α 螺旋的蛋白质,其中 α -螺旋1主要由疏水性氨基酸构成,且 α -螺旋2具有亲水性和疏水性二者。

[0056] 本发明人将Romo1蛋白的 α -螺旋1区排除在研究之外,因为该区在水中不能很好地溶解。本发明人已合成了具有 α -螺旋2区的氨基酸序列(第52至79位a.a.)的多种长度的肽,评价了其抗菌活性,并发现肽的变体具有抗菌活性,从而完成本发明。

[0057] 在本发明的一个具体实施方案中,本发明人合成了数种不同长度的肽,其包含起始于选自Romo1蛋白的第52至79位氨基酸区的一个氨基酸的连续氨基酸序列,并且本发明人使用最低杀菌浓度测定法评价了每种肽针对铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌的抗菌活性。作为结果,确定了包含18个连续氨基酸(起始于选自Romo1蛋白的第52至62位氨基酸区的任何氨基酸)序列的所有肽针对铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌均具有抗菌活性。特别地,可以确定包含Romo1蛋白的第58至78位氨基酸序列的KU-5878肽具有优异的抗菌活性(参见实施例1)。

[0058] 因此,本发明提供了Romo1来源的抗微生物肽。

[0059] 在本说明书中,“Romo1来源肽”是包含来自自由SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列组成的Romo1蛋白的第52至79位氨基酸区的连续氨基酸序列的肽,并且“肽”是指通过肽键连接在一起的氨基酸残基形成的线性分子。Romo1来源肽可通过使Romo1蛋白片段化来获得,并可根据本领域已知的化学合成方法,特别是固相合成技术或液相合成技术来产生。

[0060] 此外,本发明的Romo1来源肽的长度不受限制,只要该肽包含起始于选自由SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列组成的Romo1蛋白序列的第52至79位氨基酸区的任何氨基酸的连续氨基酸序列即可,但长度可优选为7至28聚体,更优选为18至28聚体。

[0061] 更具体地,抗微生物肽可包含起始于选自Romo1蛋白序列的第52至62位氨基酸区的任何氨基酸的18个连续氨基酸的序列。优选地,抗微生物肽可包含选自SEQ ID NO:2至15、更优选选自SEQ ID NO:5、8、9、13和14的任一个氨基酸序列。

[0062] 在本说明书中,氨基酸以从N端到C端的顺序列出,并且表述起始于选自Romo1蛋白

序列特定区域的氨基酸的“连续氨基酸序列”是指起始于所选氨基酸、在C端方向上延伸的连续氨基酸序列。此外,在本说明书中,表述起始于选自Romo1蛋白特定区域的任何氨基酸的“7至28个连续氨基酸的序列”是指由总共7至28个连续氨基酸组成的序列,其包括选自Romo1蛋白的特定区域的起始氨基酸,并且包括起始于起始氨基酸、在C端方向上延伸的连续氨基酸。

[0063] 在本发明的一个具体实施方案中,本发明人选择了包含SEQ ID NO:13中所示氨基酸序列的KU-5878肽作为代表以确定Romo1来源抗微生物肽的应用范围,并评价了该肽针对以下的抗菌活性:金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、屎肠球菌、仙台链霉菌、粪肠球菌、肺炎链球菌、大肠杆菌、肺炎克雷伯菌、鲍氏不动杆菌、铜绿假单胞菌、产气肠杆菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、耐多药铜绿假单胞菌、耐多药鲍氏不动杆菌、耐多药肺炎克雷伯菌、耐万古霉素屎肠球菌和耐万古霉素金黄色葡萄球菌。作为结果,可以看出,本发明的Romo1来源抗微生物肽表现出针对所有革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和耐多药细菌的广谱抗菌活性(参见实施例2)。

[0064] 此外,为了鉴定具有更好抗菌活性的肽,将构成KU-5878的氨基酸根据其特性分类为 $X_1X_1MMX_1X_1GGX_1FGX_1FMAIGMGIR$ (SEQ ID NO:16)、 $KTX_2X_2QSGGTFGTFX_2AX_2GX_2GX_2R$ (SEQ ID NO:30)、 $KTMMQSGGTX_3GTX_3MAIGMGIR$ (SEQ ID NO:40),和 $KTMMQSX_4X_4TFX_4TFMX_4IX_4MX_4IR$ (SEQ ID NO:45),并合成了其中氨基酸 X_1 至 X_4 中的每一个均已被替换的肽,评价了其抗菌活性。

[0065] 在本发明的一个具体实例中,本发明人检查了当KU-5878肽中的亲水性氨基酸残基被带正电的氨基酸替换时,KU-5878肽的抗菌活性的改变。在KU-5878肽中,亲水性氨基酸残基的位置在SEQ ID NO:16中用 X_1 标记,并且 X_1 位置处的氨基酸各自独立地被替换。已确定,当Romo1蛋白的 α -螺旋2区中的亲水性氨基酸被带正电的氨基酸(R、H或K)或另一亲水性氨基酸(T、S、Q或N)替换时,其抗菌活性改变。作为结果,可以看出肽的抗菌活性得以维持,或者表现出更好的抗菌活性(参见实施例4-1)。

[0066] 在本发明的另一具体实例中,本发明人检查了当KU-5878肽中的甲硫氨酸(M)或异亮氨酸(I)被具有与其类似的结构的水溶性氨基酸残基(M、L、I、V或N1e)替换时,以及当KU-5878肽中的甲硫氨酸(M)或异亮氨酸(I)被具有与其不同的结构的水溶性氨基酸残基(F、Y或W)替换时,KU-5878肽的抗菌活性的变化。在KU-5878肽中,甲硫氨酸(M)和异亮氨酸(I)在SEQ ID NO:30中用 X_2 标记,并且 X_2 位置处的氨基酸各自独立地被替换。作为结果,当甲硫氨酸被正亮氨酸(N1e)替换时,肽的抗菌活性得以维持,而当异亮氨酸被色氨酸(W)替换时,肽的抗菌活性降低。在另一方面,确定了当异亮氨酸被甘氨酸替换时,可以获得具有改善的抗菌活性的肽(参见实施例4-3)。

[0067] 在本发明的另一具体实例中,本发明人检查了当KU-5878肽中的疏水性残基苯丙氨酸(F)被亲水性氨基酸或具有与其类似的结构的水溶性氨基酸(F、Y或W)或具有与其不同的结构的水溶性氨基酸(M、L、I、V或N1e)替换时,KU-5878肽的抗菌活性的变化。在KU-5878肽中,苯丙氨酸在SEQ ID NO:40中用 X_3 标记,并且 X_3 位置处的氨基酸各自独立地被替换。作为结果,确定了当用色氨酸(W)替换苯丙氨酸时,可获得具有改善的抗菌活性的肽(参见实施例4-4)。

[0068] 在本发明的另一个具体实例中,本发明人检查了当KU-5878中的丙氨酸(A)或甘氨酸(G)被甘氨酸或丙氨酸替换时,KU-5878的抗菌活性的变化。在KU-5878肽中,丙氨酸和甘

氨酸在SEQ ID NO:45中用X₄标记,并且X₄位置处的氨基酸各自独立地被替换。作为结果,确定了当丙氨酸被甘氨酸替换时,以及当甘氨酸被丙氨酸替换时,该肽表现出抗菌活性,但与KU-5878肽相比,其表现出降低的抗菌活性(参见实施例4-5)。

[0069] 综上所述,本发明的Romo1来源肽包含起始于选自Romo1的第52至79位氨基酸区的任何氨基酸的7至28个连续氨基酸的序列,同时,可包含至少一个氨基酸替换(在其表现出抗菌活性的范围内)。

[0070] 在本发明的一个具体实例中,本发明人选择了KU-5878-K4作为代表以确定KU-5878变体的应用范围,并且本发明人评价了KU-5878-K4针对多种细菌的抗菌活性。作为结果,可以看出,与KU-5878类似,KU-5878-K4也表现出针对所有革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和耐多药细菌的广谱抗菌活性(参见实施例4-2)。

[0071] 此外,通过一些具体实例,本发明人可以看到,即使通过用D-氨基酸替换构成相应的KU-5878和KU-5878-K4的氨基酸中的一些或全部而获得的肽表现出与KU-5878类似的抗菌活性,并且特别是在存在牛血清的情况下,KU-5878和KU-5878-K4表现出显著降低的抗菌活性,但通过用D-氨基酸替换获得的变体的抗菌活性的降低很小(参见实施例4-6)。

[0072] 综上所述,构成本发明的Romo1来源肽的氨基酸可各自独立地为L-或D-氨基酸,且各氨基酸可为氨基酸类似物、放射性标记的氨基酸或荧光标记的氨基酸。

[0073] 同时,本发明的Romo1来源肽的一部分氨基酸序列可在氨基(N-)端或羧基(C-)端进行选择 and 修饰,以提高其活性。通过该修饰,当在体内施用,本发明的肽可具有提高的半衰期。

[0074] 通过一个具体实例,本发明人确定了在C端处酰胺化的KU-5878变体具有提高的抗菌活性(参见实施例5)。

[0075] 因此,保护基团,例如乙酰基、苄基甲氧羰基、甲酰基、棕榈酰基、肉豆蔻基、硬脂基或聚乙二醇(PEG)可与本发明Romo1来源肽的氨基端结合,并且肽的羧基端可以用羟基(-OH)、氨基(-NH₂)、叠氮基(-NHNH₂)等修饰。此外,脂肪酸、寡糖链、任何纳米颗粒(金颗粒、脂质体、肝素、水凝胶等)、氨基酸、载体蛋白质等可与本发明肽的末端或氨基酸的R-基团结合。上述氨基酸修饰发挥作用以改善本发明肽的效力和稳定性。在本说明书中,术语“稳定性”不仅指体内稳定性,还指储存稳定性(包括室温储存、冷藏储存或冷冻储存期间的储存稳定性)。

[0076] 同时,本发明的Romo1来源抗微生物肽可以是这样的肽:其中构成其的一个或多个氨基酸缺失。根据前述内容,可以确定,通过替换、修饰或缺失构成本发明Romo1来源肽的一个或多个氨基酸而获得的肽也表现出抗菌活性。因此,本发明可提供Romo1来源肽变体作为抗微生物肽。

[0077] 在本发明中,术语“变体”是指这样的肽:其中构成Romo1来源肽的氨基酸中的一个或多个被替换、修饰和/或缺失(在其表现出抗菌活性的范围内)。只要变体表现出抗菌活性,则认为该变体表现出比本发明的Romo1来源肽更好的抗菌活性,且不受特别限制。

[0078] 本发明的抗微生物肽可由SEQ ID NO:13的氨基酸序列组成,或由相对于SEQ ID NO:13的氨基酸序列包含选自以下(a)至(h)中的至少一个氨基酸替换的序列组成。

[0079] (a) 氨基酸第1位处的K至R替换, (b) 氨基酸第2位处的T至K或R替换, (c) 氨基酸第5位处的Q至K或R替换, (d) 氨基酸第6位处的S至K、R或H替换, (e) 氨基酸第9位处的T至K或R替

换, (f) 氨基酸第10位处的F至W替换, (g) 氨基酸第16位处的I至L替换, 以及 (h) 氨基酸第20位处的I至G或L替换。根据实施例8和9, 本发明人确定, 当KU-5878的氨基酸序列中的一个或更多个氨基酸被以上 (a) 至 (h) 中的任一个替换时, 肽的抗菌效果得到改善。

[0080] 在另一个实施方案中, 抗微生物肽可以是其中至少一个甲硫氨酸被正亮氨酸或异亮氨酸替换的肽。除了硫(S)被替换为碳之外, 正亮氨酸具有与甲硫氨酸相同的结构, 并且异亮氨酸与正亮氨酸的共同点在于其具有与正亮氨酸的烷基取代基具有相同碳原子数的烷基取代基。本发明人确定, 当KU-5878氨基酸序列中的4个甲硫氨酸中的1至4个被正亮氨酸替换时, 肽的抗菌活性得到改善(参见表13)。

[0081] 在另一个实施方案中, 抗微生物肽可以是其中第3、4、5、7、8、9、11、17、18和19位处的氨基酸中的任一个缺失或者第3或4位处的氨基酸和第7或8位处的氨基酸缺失的肽。根据本申请的实施例6和7, 当KU-5878中第3、4、5、7、8、9、11、17、18和19位处的氨基酸中的任一个缺失时, 肽的抗菌活性提高, 并且对于其中KU-5878的一些氨基酸被替换的肽可预期相同的效果。

[0082] 在另一个实施方案中, 抗微生物肽可还包含与其C端连接的氨基酸序列, 其中与C端连接的氨基酸序列可由一至三个重复的R或K的序列组成。根据实施例10, 本发明人确定, 当由RRR或KK组成的氨基酸序列另外添加至KU-5878的C端时, 肽的抗菌活性提高。

[0083] 根据本发明的Romo1来源肽及其变体具有针对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和耐多药细菌的抗菌活性。因此, 本发明可提供用于预防或治疗细菌感染性疾病的药物组合物, 其包含抗微生物肽作为活性成分。

[0084] 其增殖和/或生长被根据本发明的Romo1来源肽及其变体抑制的革兰氏阳性菌的非限制性实例包括葡萄球菌属、芽孢杆菌属、肠球菌属、链霉菌属和链球菌属。优选地, 革兰氏阳性菌可以是金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、屎肠球菌、仙台链霉菌、粪肠球菌和/或肺炎链球菌。

[0085] 此外, 其增殖和/或生长被根据本发明的Romo1来源肽及其变体抑制的革兰氏阳性菌的非限制性实例包括埃希氏杆菌属、克雷伯菌属、不动杆菌属、假单胞菌属和肠杆菌属。优选地, 革兰氏阳性菌可以是大肠杆菌、肺炎克雷伯菌、鲍氏不动杆菌、铜绿假单胞菌和/或产气肠杆菌。

[0086] 此外, 根据本发明的Romo1来源肽及其变体具有针对耐多药细菌的抗菌活性。因此, 其增殖和/或生长被Romo1来源肽及其变体抑制的耐多药细菌可以是上述革兰氏阳性菌或革兰氏阴性菌, 其对属于青霉素类、碳青霉烯类、头孢菌素类、喹诺酮类、大环内酯类、四环素类或糖肽类的一种或更多种抗生素具有抗性。优选地, 耐多药细菌可以是耐甲氧西林葡萄球菌属、耐多药假单胞菌属、耐万古霉素肠球菌属、耐多药克雷伯菌属、耐多药不动杆菌属和/或耐万古霉素葡萄球菌属。

[0087] 本发明可提供包含Romo1来源肽和/或其变体作为活性成分的药物组合物(即抗生素)。待通过本发明的药物组合物预防或治疗的“细菌感染性疾病”可以由革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和/或耐多药细菌感染引起的疾病。优选地, 细菌感染性疾病可以由细菌感染引起的皮肤感染、食物中毒、中耳炎、膀胱炎、腹膜炎、尿路感染、乳腺炎、肺炎、心内膜炎、结膜炎、关节炎、子宫内膜炎、腺疫、菌血症、脓毒症和/或痤疮。更优选地, 细菌感染性疾病可以是脓毒症或肺炎。

[0088] 本发明还提供了用于预防或治疗细菌感染性疾病的方法,该方法包括向对象施用Romo1来源肽和/或其变体的步骤。

[0089] 在本发明中,“对象”不受限制,只要是其是哺乳动物即可。优选地,对象可以是人或牲畜。

[0090] 在本发明中,术语“预防”意指通过施用根据本发明的药物组合物来延迟革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和/或耐多药细菌的感染或延迟由感染引起的疾病的发病的任何作用。术语“治疗”意指通过施用根据本发明的药物组合物来减轻或有益地改变细菌感染症状的任何作用。

[0091] 在本发明中,药物组合物还可以包含除了Romo1来源肽和/或其变体之外的一种或更多种已知抗生素,并且还可以包含常用于药物组合物的制备的合适载体、赋形剂和稀释剂。

[0092] 在本发明中,“载体”也称为载剂,并且是指促进蛋白质或肽并入到细胞或组织中的化合物。例如,二甲基亚砜(DMSO)是常用的载体,其促进将许多有机化合物摄取到生物体的细胞或组织中。

[0093] 在本发明中,“稀释剂”被定义为在水中稀释的化合物,其将溶解目标蛋白质或肽,以及使蛋白质或肽的生物活性形式稳定。在本领域中,溶解在缓冲溶液中的盐用作稀释剂。常用的缓冲溶液是磷酸盐缓冲盐水,因为其模拟了人溶液的盐条件。由于缓冲盐可以以低浓度控制溶液的pH,所以缓冲的稀释剂很少改变化合物的生物活性。包括如本文中所用的壬二酸的化合物可按原样或作为与其他成分或与合适载体或赋形剂混合的药物组合物(如在联合治疗中)施用于人患者。

[0094] 此外,根据本发明的包含Romo1来源肽和/或其变体作为活性成分、用于预防或治疗细菌感染性疾病的药物组合物可以以散剂、颗粒剂、片剂、胶囊剂、混悬剂、乳剂、糖浆剂、外用制剂例如气溶胶和无菌注射溶液剂的形式根据各自的常规方法配制和使用。本发明的抗菌组合物可根据期望方法经口或肠胃外(例如,静脉内、皮下、腹膜内或表面)施用。其剂量取决于患者的状况和体重、疾病的严重程度、药物的形式以及施用的途径和持续时间而变化,但可由本领域技术人员适当选择。例如,抗菌组合物可以以约0.001mg至1000mg的量与可药用载体组合施用。本发明的抗菌组合物可根据需要一天施用一次或数次,并且其可单独使用或与手术、激素治疗、药物治疗和使用生物应答调节剂的方法组合使用。

[0095] 此外,根据本发明的Romo1来源肽和/或其变体可提供用于预防或缓解细菌感染性疾病的目的的准药物组合物。本发明的准药物组合物可与其他准药物或准药物成分一起使用,并且其可根据常规方法适当地使用。准药物组合物可用于但不限于消毒剂清洁剂、沐浴泡沫、漱口水、湿纸巾、洗涤剂皂、洗手液、加湿器填料、面膜、软膏或过滤器填料。

[0096] 此外,根据本发明的Romo1来源肽和/或其变体可以以化妆品组合物的形式提供。根据本发明的化妆品组合物的制剂可以以皮肤洗剂、皮肤软化剂、紧肤剂、收敛剂、洗剂、乳液洗剂、保湿乳液、滋养乳液、按摩霜、滋养霜、保湿霜、护手霜、粉底、精华液、滋养精华液、剥撕式面膜、皂、清洁泡沫、清洁洗剂、清洁霜、身体洗剂、或身体清洁剂的形式。如有必要,本发明的化妆品组合物除了含有以上必需成分外还可与化妆品中常用的其他成分组合。

[0097] 此外,本发明提供了含有Romo1来源肽和/或其变体作为活性成分的食品组合物或饲料组合物。当根据本发明的Romo1来源肽和/或其变体用作食品或饲料的添加剂时,Romo1

来源肽和/或其变体可按原样添加或与其他食品、饲料或其组分一起使用,并且可根据常规方法适当使用。可根据预期用途(通过抑制细菌增殖和生长预防性或治疗性地治疗感染性疾病,或健康治疗)合适地确定组合中活性成分的含量。一般而言,在饲料、食品或饮料的生产中,根据本发明的Romo1来源肽和/或其变体的添加量为基于原料的总重量的15wt%或更少,优选10wt%或更少。然而,在出于健康和卫生或健康控制的目的而长期摄入的情况下,量可小于以上范围的下限,并且由于在安全性方面没有问题,因此活性成分的使用量可大于以上范围的上限。对食品和饲料的类型没有特别的限制。

[0098] 在本发明中,根据IUPAC-IUB命名法,氨基酸缩写如下。

[0099] 精氨酸(Arg,R)、赖氨酸(Lys,K)、组氨酸(His,H)、丝氨酸(Ser,S)、苏氨酸(Thr,T)、谷氨酰胺(Gln,Q)、天冬酰胺(Asp,N)、甲硫氨酸(Met,M)、亮氨酸(Leu,L)、异亮氨酸(Ile,I)、缬氨酸(Val,V)、苯丙氨酸(Phe,F)、色氨酸(Trp,W)、酪氨酸(Tyr,Y)、丙氨酸(Ala,A)、甘氨酸(Gly,G)、脯氨酸(Pro,P)、半胱氨酸(Cys,C)、天冬氨酸(Asp,D)、谷氨酸(Glu,E)和正亮氨酸(Nle)。

[0100] 虽然本发明可以不同地进行修改并且具有多个实施方案,但在附图中示出并在具体实施方式中详细地描述了一些具体实施方案。然而,应该理解,本发明不限于所述具体实施方案,并且包括在本发明的精神和范围内包括的所有变化、等同方案和替代方案。在下面的描述中,当相关公知技术可能使本发明的主题模糊时,将省略对其的详细描述。

[0101] [实施例]

[0102] 实施例1.Romo1来源肽的抗菌活性评价及最佳肽的鉴定

[0103] Romo1蛋白包含两个 α -螺旋。本发明人合成了具有亲水性和疏水性二者的 α -螺旋2区,并且使用最低杀菌浓度(minimum bactericidal concentration,MBC)测定法来评价其抗菌活性。 α -螺旋2区被命名为KU-5279(Romo1蛋白的第52至79位氨基酸区)。然后,为了鉴定有益于人应用且具有优异抗菌活性的肽,本发明人合成了数种包含起始于选自Romo1蛋白的第52至79位氨基酸区的任何氨基酸的连续氨基酸序列的肽,并通过最低杀菌浓度测定法对肽的抗菌活性进行了比较性评价(每种肽的信息参见下表1)。通过最低杀菌浓度测定法评价每种肽的抗菌活性具体如下进行。

[0104] 首先,将铜绿假单胞菌(ATCC 27853)和金黄色葡萄球菌(ATCC 29213)各自在3%(w/v)TSB(胰蛋白酶大豆肉汤(Tryptic Soy Broth))液体培养基中在37°C和200rpm下培养4小时,然后在相同条件下进一步培养3小时至 5×10^6 CFU/ml的浓度。通过用SP(磷酸钠;10mM磷酸钠,1%TSB)缓冲液稀释每种进一步培养的菌株至 2×10^5 CFU/ml的最终浓度来制备菌株溶液。

[0105] 然后,将不同浓度(0 μ g/ml至300 μ g/ml)的每种肽分配到96孔微板的每个孔中,并向其中添加100 μ l(1×10^5 CFU/ml)的每种所制备的菌株溶液,与之混合,并允许在37°C下在培养箱中与肽反应1小时。

[0106] 此外,将30g/L的TS(胰蛋白酶大豆)和15g/L的琼脂溶解在蒸馏水中并杀菌,然后将25ml溶液倒在100mm圆形板上,并使其在室温下固化一天或更长时间,从而制备TS琼脂板。将10 μ l的肽和菌株的每种反应溶液以恒定尺寸铺在TS琼脂板上,并在37°C下在培养箱中孵育18小时,然后检查板上的菌落形成。最低杀菌浓度被定义为未形成菌落的最低肽浓度,并且实验结果在下表1中示出。

[0107] [表1]

SEQ ID NO	肽	氨基酸序列	针对金黄色葡萄球菌的 MBC值 ($\mu\text{g/ml}$)	针对铜绿假单胞菌的 MBC值 ($\mu\text{g/ml}$)
1	Romo1	MPVAVGPYGQSQPSCFDRVKMGFV MGCAVGMAAGALFGTFSCLRIGMR GRELMGGIGKTMMQSGGTFGTFMA IGMGIRC	不可溶	不可溶
2	KU-527 8	LMGGIGKTMMQSGGTFGTFMAIGM GIR	300	300
3	KU-527 9	LMGGIGKTMMQSGGTFGTFMAIGM GIRC	300	300
4	KU-547 8	GGIGKTMMQSGGTFGTFMAIGMGI R	300	300
5	KU-547 9	GGIGKTMMQSGGTFGTFMAIGMGI RC	200	300
6	KU-567 8	IGKTMMQSGGTFGTFMAIGMGIR	300	300
7	KU-567 9	IGKTMMQSGGTFGTFMAIGMGIRC	300	300
8	KU-577 8	GKTMMQSGGTFGTFMAIGMGIR	280	300
9	KU-577 9	GKTMMQSGGTFGTFMAIGMGIRC	250	280
10	KU-587 5	KTMMQSGGTFGTFMAIGM	>300	>300
11	KU-587 6	KTMMQSGGTFGTFMAIGMG	>300	>300
12	KU-587 7	KTMMQSGGTFGTFMAIGMGI	>300	>300
13	KU-587 8	KTMMQSGGTFGTFMAIGMGIR	100	100
14	KU-587	KTMMQSGGTFGTFMAIGMGIRC	150	150

[0108]

[0109]		9			
	15	KU-607	MMQSGGTFGTGMAIGMGIRC	>300	>300
		9			
	48	pCM19	CLRIGMRGRELMGGIGKTM	250	300
	49	pCM12	CLRIGMRGRELM	>300	>300

[0110] 如表1中所示,pCM19和KU-5279肽显示出类似的杀菌活性,但pCM12具有低杀菌活性,并因此无法使用最低杀菌浓度测定法测量其抗菌活性。同时,可以确定由21个氨基酸残基组成的KU-5878肽具有最好的抗菌活性,并且确定了KU-5878的抗菌活性是KU-5279的三倍。

[0111] 实施例2.KU-5878的抗菌活性评价

[0112] 2-1.针对多种细菌的抗菌活性评价

[0113] 为了鉴定如下的细菌类型:包含Romo1蛋白的第52至79位氨基酸区或该区的一部分并在实施例1中被确定为具有抗菌活性的肽针对所述细菌类型表现出杀菌活性,选择KU-5878作为上表1中所示的合成肽中的代表,并且使用最低杀菌浓度测定法测量其针对下表2中所示细菌的抗菌活性。最低杀菌浓度测定法与实施例1中使用的方法相同。

[0114] 具体而言,将每种类型的细菌在3% (w/v) TSB (胰蛋白酶大豆肉汤) 液体培养基中在37℃和200rpm下培养4小时,然后在相同条件下进一步培养3小时至 5×10^6 CFU/ml的浓度。通过用SP缓冲液稀释每种进一步培养的菌株至 2×10^5 CFU/ml的最终浓度来制备菌株溶液。

[0115] 然后,将不同浓度(0μg/ml至300μg/ml)的KU-5878肽分配到96孔微板的每个孔中,并向其中添加100μl (1×10^5 CFU/ml)的每种所制备的菌株溶液,与之混合,并允许在37℃下在培养箱中与肽反应1小时。

[0116] 此外,将10μl的肽和菌株的每种反应溶液以恒定尺寸铺在TS琼脂板上,并在37℃下在培养箱中孵育18小时,然后检查板上的菌落形成。最低杀菌浓度被定义为未形成菌落的最低肽浓度,并且实验结果在下表2中示出。

[0117] 同时,下表2中的耐多药铜绿假单胞菌、耐多药不动杆菌和耐多药克雷伯菌是从韩国大学Anam医院的患者中分离的细菌。确定了耐多药铜绿假单胞菌对哌拉西林、哌拉西林-三唑巴坦、头孢他啶、亚胺培南、美罗培南、庆大霉素、阿米卡星和环丙沙星抗生素具有抗性,耐多药不动杆菌对哌拉西林、哌拉西林-三唑巴坦、头孢他啶、亚胺培南、美罗培南、庆大霉素、阿米卡星、环丙沙星和头孢吡肟抗生素具有抗性,并且耐多药克雷伯菌对哌拉西林-三唑巴坦、头孢他啶、头孢吡肟、亚胺培南、庆大霉素和环丙沙星抗生素具有抗性。然后,将这些细菌用于实验。

[0118] [表2]

	组	引起脓毒症和肺炎的细菌以及耐多药细菌	登记 No.	KU-5878 的 MBC 值 (µg/ml)
[0119]	革兰氏阳性	金黄色葡萄球菌	ATCC 29213	100
		枯草芽孢杆菌	ATCC 6633	90
		屎肠球菌	ATCC 19434	85
		仙台链霉菌	ATCC 12392	95
		粪肠球菌	ATCC 19433	85
		肺炎链球菌	NCCP 14585	100
	革兰氏阴性	大肠杆菌	ATCC 25922	85
		肺炎克雷伯菌	ATCC 13883	100
		鲍氏不动杆菌	ATCC 19606	100
		铜绿假单胞菌	ATCC 27853	100
		产气肠杆菌	ATCC 13048	90
耐多药细菌	耐甲氧西林金黄色葡萄球菌	ATCC 33591	100	
	耐多药铜绿假单胞菌	-	110	
	耐多药鲍氏不动杆菌	-	110	
	耐多药肺炎克雷伯菌	-	100	
[0120]		耐万古霉素屎肠球菌	NCCP 11522	100
		耐万古霉素金黄色葡萄球菌	NCCP 15872	120

[0121] 如上表2中所示,可以看出KU-5878针对所有革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和耐多药细菌均表现出广谱抗菌活性。

[0122] 2-2.KU-5878与已知的抗微生物肽的抗菌活性的比较性评价

[0123] 为了确定在体外被确定为具有抗菌活性的KU-5878肽是否在体内(特别是在动物的血管中)有效地表现出针对细菌的杀菌活性,选择为革兰氏阳性菌的金黄色葡萄球菌、为革兰氏阴性菌的铜绿假单胞菌、为耐多药细菌的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌和耐多药铜绿假单胞菌作为代表,然后进行以下实验。

[0124] 具体而言,将金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌和耐多药铜绿假单胞菌在3% (w/v) TSB液体培养基中在37℃和200rpm下培养4小时,然后在相同条件下进一步培养3小时至 $5 \times 10^9 \text{CFU/ml}$ 的浓度。通过用PBS溶液稀释每种进一步培养的菌株

至 1×10^5 CFU/ μ l的最终浓度来制备菌株溶液。

[0125] 接下来,将100 μ l的每种菌株溶液静脉内注射(IV)到每只10周龄雄性小鼠(C57BL/6)的尾静脉中。1小时之后,以10mg/kg的浓度静脉内注射KU-5878。作为对照,以10mg/kg的浓度静脉内注射PBS,并且作为阳性对照,以10mg/kg的浓度静脉内注射LL-37、爪蟾抗菌肽2或达托霉素。

[0126] 在静脉内注射每种药物之后40分钟,使用手术剪刀从每只小鼠尾部末端切割约1cm,并在切割末端处收集10 μ l血液并在PBS中稀释。将稀释的血液样品铺在先前制备的TSB琼脂板上,并在37℃下在培养箱中孵育18小时,并对形成的菌落进行计数以进行比较。

[0127] 作为结果,如图1和2中所示,可以看出,通过静脉内注射药物,留在小鼠血管中的细菌数量减少,并且在施用KU-5878时,细菌数量减少最为显著。因此,可以看出,KU-5878表现出比已知具有抗菌活性的LL-37、爪蟾抗菌肽2和达托霉素显著更优的抗菌活性。

[0128] 2-3. KU-5878与已知的抗生素的抗菌活性的比较性评价

[0129] 根据实施例2-2,为了评价KU-5878肽在体内的抗菌活性,选择金黄色葡萄球菌作为革兰氏阳性菌,铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌和鲍氏不动杆菌作为革兰氏阴性菌,以及耐多药铜绿假单胞菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、耐多药肺炎克雷伯菌和耐多药鲍氏不动杆菌作为耐多药细菌,并进行以下实验。

[0130] 实验方法如以上实施例2-2中所述。但是,向小鼠施用的每种菌株的最终浓度在下表3中示出。对于阳性组,将每种类型的细菌注射到小鼠中,并在24小时之后腹膜内(IP)注射30mg/kg亚胺培南(基于碳青霉烯的抗生素),然后以12小时的间隔腹膜内施用相同量的亚胺培南共4次。以24小时的间隔测量每个对照组和实验组的存活率。

[0131] [表3]

细菌	最终浓度(CFU)
金黄色葡萄球菌	1×10^8
铜绿假单胞菌	2×10^7
肺炎克雷伯菌	8×10^8
鲍氏不动杆菌	4×10^8
耐甲氧西林金黄色葡萄球菌	3×10^8
耐多药铜绿假单胞菌	8×10^7
耐多药鲍氏不动杆菌	5×10^8
耐多药肺炎克雷伯菌	8×10^8

[0133] 作为结果,如图3中所示,仅注射革兰氏阳性或革兰氏阴性菌的小鼠的存活率为0至20%,注射KU-5878的小鼠的存活率为60%,以及注射亚胺培南的小鼠的存活率为约60至80%。此外,如在图4中可见的,仅注射耐多药细菌的小鼠显示存活率为0至7%,注射KU-5878的小鼠显示存活率为60至67%,以及注射亚胺培南的小鼠显示存活率为7至27%。

[0134] 实施例3. KU-5878的毒性评价

[0135] 为了确定包含Romo1蛋白的第52至79位氨基酸区或该区的一部分并在实施例1和2中被确定为具有针对革兰氏阳性、革兰氏阴性和耐多药细菌的杀菌活性的肽是否适用于对象,测量了肽的毒性。在接下来的实验中,选择KU-5878作为表1中所示合成肽的代表,并评价了KU-5878的毒性。

[0136] 3-1. 对人血管内皮细胞 (HUVEC) 的毒性的评价

[0137] 将人血管内皮细胞 (HUVEC) 在96孔微板中培养, 并将MTT (3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑氮溴化物) 试剂以2mg/ml的浓度溶解在PBS中, 然后通过0.2 μ m膜过滤器进行无菌过滤。PBS用作对照。

[0138] 用新鲜培养基替换HUMEC培养基, 并将KU-5878、蜂毒肽或爪蟾抗菌肽2以不同浓度 (0 μ g/ml至300 μ g/ml) 分配。然后, 用100 μ l MTT试剂处理每个孔, 并在37 $^{\circ}$ C下孵育2小时。然后, 小心地去除培养基和肽以免分离细胞, 并向每个孔中添加100 μ l DMSO (二甲基亚砷), 并使用分光光度计测量570nm波长处的吸光度。相对细胞生存力计算为未经处理的对照细胞的生存力的百分比。

[0139] 作为结果, 如图5中所示, 可以看出KU-5878对HUVEC显示出非常低的毒性。

[0140] 3-2. 对红细胞的毒性的评价

[0141] 用PBS稀释红细胞, 在900g下离心3次、10分钟, 然后洗涤。将100 μ l稀释的红细胞溶液 (10% v/v PBS) 分配到96孔微板的每个孔中, 并将KU-5878、KU-5878-K4、KU-5878-K4-D、蜂毒肽、爪蟾抗菌肽2或达托霉素添加到每个孔中, 然后用PBS填充至200 μ l, 然后通过37 $^{\circ}$ C下孵育1小时进行反应。然后, 分离反应溶液的上清液, 并使用分光光度计测量550nm波长处的吸光度。作为对照, 使用PBS和0.1% Triton X-100 (Triton X-100) 溶液。

[0142] 基于吸光度测量结果, 根据下面的等式1计算红细胞破坏的程度, 并且计算结果在图6中示出。

[0143] [等式1]

[0144]
$$\text{完整RBC \%} = 100 (\%) - [(\text{经肽处理的红细胞溶液的吸光度} - \text{经PBS处理的红细胞溶液的吸光度}) / (\text{经Triton X-100处理的红细胞溶液的吸光度} - \text{经PBS处理的红细胞溶液的吸光度}) \times 100 (\%)]$$

[0145] 作为结果, 如图6中所示, 确定了KU-5878即使在高浓度下也几乎没有显示溶血。与KU-5878类似, KU-5878-K4和KU-5878-K4-D与爪蟾抗菌肽2、达托霉素和蜂毒肽相比, 也几乎没有显示红细胞的溶血, 表明它们对红细胞的毒性很低。

[0146] 3-3. 体内毒性的评价

[0147] 为了评价在体外被确定为无毒性的KU-5878肽在体内, 特别是当注射到动物 (对象) 的血管中时是否对对象不显示毒性, 将KU-5878以100mg/kg的浓度静脉内注射到每只10周龄雄性小鼠 (C57BL/6) 的尾静脉中。此时, 注射剂量的最大体积为150 μ l。在注射之后的1小时中观察小鼠的行为, 然后以24小时的间隔测量小鼠重量的变化, 持续12天。

[0148] 作为结果, 可以确定施用了KU-5878的小鼠全部存活, 并且KU-5878对小鼠的重量没有影响, 如图7中所示。

[0149] 实施例4. 其中构成KU-5878的氨基酸中的一些被替换的肽的抗菌活性的评价

[0150] 4-1. 包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的KU-5878变体的抗菌活性的评价

[0151] 接下来, 为了鉴定具有更好抗菌活性的肽, 用带正电的赖氨酸 (K) 或精氨酸 (R) 替换KU-5878的亲水性氨基酸残基, 然后使用最低杀菌浓度测定法比较性地评价变体的抗菌活性。以与实施例1相同的方式进行实验。关于KU-5878变体及其针对每种细菌的MBC值的具体信息在下表4中示出。

[0152] [表4]

[0153]

SEQ ID NO	肽	氨基酸序列	针对金黄色葡萄球菌的MBC值(μg/ml)	针对铜绿假单胞菌的MBC值(μg/ml)	针对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的MBC值(μg/ml)	针对耐多药铜绿假单胞菌的MBC值(μg/ml)
13	KU-5878	KTMMQSGGTFGTFMAIGMGIR	100	100	100	110
17	KU-5878-T59K	K <u>K</u> MMQSGGTFGTFMAIGMGIR	40	50	45	45
18	KU-5878-Q62K	KTMM <u>K</u> SGGTFGTFMAIGMGIR	80	90	85	90
19	KU-5878-S63K	KTMMQ <u>K</u> GGTFGTFMAIGMGIR	50	60	60	60
20	KU-5878-T66K	KTMMQSGG <u>K</u> FGTFMAIGMGIR	60	80	70	80
21	KU-5878-T69K	KTMMQSGGTFG <u>K</u> FMAIGMGIR	130	140	150	150
22	KU-5878-K2(T59K, Q62K)	K <u>K</u> MM <u>K</u> SGGTFGTFMAIGMGIR	8	8	8	8
23	KU-5878-K3(T59K, Q62K, S63K)	K <u>K</u> MM <u>KK</u> GGTFGTFMAIGMGIR	4	4	5	4
24	KU-5878-K3(T59K, Q62K, S63K,	K <u>K</u> MM <u>KK</u> GG <u>K</u> FGTFMAIGMGIR	3	4	5	5

	T66K)					
25	KU-5878 -K58R	R TMMQSGGTFGT FMAI GMGIR	120	120	130	120
26	KU-5878 -K58A	A TMMQSGGTFGT FMAI GMGIR	>300	>300	>300	>300
27	KU-5878 -T59R	K R MMQSGGTFGT FMAIG MGIR	25	30	30	35
28	KU-5878 -R78A	KTMMQSGGTFGT FMAI GMGI A	>300	>300	>300	>300
29	KU-5878 -R78K	KTMMQSGGTFGT FMAI GMGI K	>300	>300	>300	>300

[0155] 如在表4中可以看出的,可以看出,通过用赖氨酸替换Romo1蛋白第59、62、63或66位处的氨基酸获得的肽和通过用精氨酸替换第59位处的氨基酸获得的肽具有比KU-5878更好的抗菌活性。此外,可以确定,通过用精氨酸替换Romo1蛋白第58位处的氨基酸获得的KU-5878变体也显示出与KU-5878的抗菌活性相似的抗菌活性。从以上结果可以看出,即使当Romo1蛋白的 α -螺旋2区中的亲水性氨基酸被带正电的氨基酸,特别是赖氨酸(K)或精氨酸(R)替换时,肽也可以表现出类似的抗菌活性或更好的抗菌活性。

[0156] 从以上结果可以看出,即使当Romo1蛋白的 α -螺旋2区中的亲水性氨基酸被带正电的氨基酸,特别是赖氨酸(K)或精氨酸(R)替换时,肽也可以表现出类似的抗菌活性或更好的抗菌活性。

[0157] 4-2.KU-5878-K4针对多种细菌的抗菌活性的评价

[0158] 为了鉴定如下的细菌类型:在实施例4-1中被确定为具有抗菌活性的KU-5878变体针对所述细菌类型表现出杀菌活性,选择了KU-5878-K4作为上表4中所示的KU-5878变体中的代表,并且使用最低杀菌浓度测定法测量其针对下表5中所示细菌的抗菌活性。以与实施例1相同的方式进行最低杀菌浓度测定法。

[0159] [表5]

[0160]

组	引起脓毒症和肺炎的细菌以及耐多药细菌	登记号	KU-5878-K4 的 MBC 值($\mu\text{g/ml}$)
革兰氏阳性	金黄色葡萄球菌	ATCC 29213	3
	枯草芽孢杆菌	ATCC 6633	5
	尿肠球菌	ATCC 19434	5
	仙台链霉菌	ATCC 12392	5
	粪肠球菌	ATCC 19433	5
	肺炎链球菌	NCCP 14585	4
革兰氏阴性	大肠杆菌	ATCC 25922	5
	肺炎克雷伯菌	ATCC 13883	5
	鲍氏不动杆菌	ATCC 19606	4
	铜绿假单胞菌	ATCC 27853	4
	产气肠杆菌	ATCC 13048	5
耐多药细菌	耐甲氧西林金黄色葡萄球菌	ATCC 33591	5
	耐多药铜绿假单胞菌	-	5
	耐多药鲍氏不动杆菌	-	4
	耐多药肺炎克雷伯菌	-	5
	耐万古霉素尿肠球菌	NCCP 11522	5
	耐万古霉素金黄色葡萄球菌	NCCP 15872	6

[0161] 如在上表5中可以看出的,可以看出KU-5878-K4针对所有革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和耐多药细菌均表现出广谱抗菌活性。

[0162] 4-3. 包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的KU-5878变体的抗菌活性的评价

[0163] 在实施例4-1中,确定了即使当KU-5878的亲水性残基被带正电的氨基酸替换时,其抗菌活性仍得以保持或表现出更好的抗菌活性。然后,用亲水性氨基酸或具有不同残基结构的氨基酸替换KU-5878中的疏水性且具有类似残基结构的甲硫氨酸(M)或异亮氨酸(I),然后使用最低杀菌浓度测定法比较性地评价变体的抗菌活性。以与实施例1相同的方式进行实验。关于KU-5878变体及其针对每种细菌的MBC值的具体信息在下表6中示出。

[0164] [表6]

[0165]

SEQ ID NO	肽	氨基酸序列	针对金黄色葡萄球菌的MBC值(μg/ml)	针对铜绿假单胞菌的MBC值(μg/ml)
31	KU-5878-M60A	KT MQSGGTFGTFMAIGMGIR <u>A</u>	>300	>300
32	KU-5878-I73A	KTMMQSGGTFGTFMA GMGIR <u>A</u>	>300	>300
33	KU-5878-I73K	KTMMQSGGTFGTFMA GMGIR <u>K</u>	>300	>300
34	KU-5878-I73W	KTMMQSGGTFGTFMA GMGIR <u>W</u>	300	300
35	KU-5878-I77A	KTMMQSGGTFGTFMAIGMG <u>A</u> R	>300	>300
36	KU-5878-I73K	KTMMQSGGTFGTFMAIGMG <u>K</u> R	>300	>300
37	KU-5878-I73T	KTMMQSGGTFGTFMAIGMG <u>T</u> R	>300	>300
38	KU-5878-I73G	KTMMQSGGTFGTFMAIGMG <u>G</u> R	90	80
39	KU-5878-4N1e	KT(N1e)(N1e)QSGGTFGTF(N1e)AIG(N1e)GIR	90	110

[0166] 如在上表6中可以看出的,当KU-5878中的疏水性且具有类似残基结构的甲硫氨酸或异亮氨酸被亲水性氨基酸替换时,肽的抗菌活性降低。在另一方面,当甲硫氨酸被具有类似残基结构的正亮氨酸(N1e)替换时,肽的抗菌活性变化不显著。此外,可以看出,当异亮氨酸被甘氨酸(G)替换时,肽的抗菌活性提高。

[0167] 4-4. 包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的KU-5878变体的抗菌活性的评价

[0168] 接下来,为了鉴定具有与KU-5878的抗菌活性相当或更高的抗菌活性的KU-5878变体,将KU-5878中的疏水性的苯丙氨酸(F)替换为亲水性氨基酸或具有不同的残基结构的氨基酸,然后使用最低杀菌浓度测定法比较性地评价变体的抗菌活性。以与实施例1相同的方式进行实验。关于KU-5878变体及其针对每种细菌的MBC值的具体信息在下表7中示出。

[0169] [表7]

SEQ ID NO	肽	氨基酸序列	针对金黄色葡萄球菌的MBC值(μg/ml)	针对铜绿假单胞菌的MBC值(μg/ml)	
[0170]	41	KU-5878-F67 A	KTMMQSGGT GTFMAIGMGIR	<u>A</u> >300	>300
	42	KU-5878-F67 W	KTMMQSGGT GTFMAIGMGIR	<u>W</u> 80	80
	43	KU-5878-F70 K	KTMMQSGGTAGT MAIGMGIR	<u>K</u> >300	>300
	44	KU-5878-F70 W	KTMMQSGGTAGT MAIGMGIR	<u>W</u> 300	300

[0171] 作为结果,如在上表7中可以看出的,可以看出当KU-5878中第67位处的疏水性的苯丙氨酸被具有类似残基结构的色氨酸替换时,肽的抗菌活性提高。

[0172] 4-5. 包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的KU-5878变体的抗菌活性的评价

[0173] 在实施例4-4之后,将KU-5878中的丙氨酸(A)或甘氨酸(G)替换为甘氨酸或丙氨酸,然后使用最低杀菌浓度测定法比较性地评价变体的抗菌活性。以与实施例1相同的方式进行实验。关于KU-5878变体及其针对每种细菌的MBC值的具体信息在下表8中示出。

[0174] [表8]

SEQ ID NO	肽	氨基酸序列	针对金黄色葡萄球菌的MBC值(μg/ml)	针对铜绿假单胞菌的MBC值(μg/ml)
[0175]	46	KU-5878-A72 G	KTMMQSGGTFGTFM <u>G</u>	350
	47	KU-5878-G76 A	KTMMQSGGTFGTFMAIGM <u>A</u> IR	>400

[0176] 作为结果,如在上表8中可以看出的,可以看出通过将KU-5878中的丙氨酸替换为甘氨酸或甘氨酸替换为丙氨酸而获得的肽显示出抗菌活性,但与KU-5878的抗菌活性相比,显示出降低的抗菌活性。

[0177] 4-6. 其中构成KU-5878和KU-5878-K4的氨基酸中的一些或全部被替换为D-氨基酸的肽的抗菌活性的评价

[0178] 在实施例1-5之后,通过用D-氨基酸替换构成KU-5878和KU-5878-K4的氨基酸来合成肽(KU-5878-D(a11)和KU-5878-K4-D),并对其抗菌活性进行比较性评价。KU-5878-K4-D是通过用D-氨基酸替换KU-5878-K4中第59、62、63和66位处的赖氨酸氨基酸残基而获得的肽,而KU-5878-D(a11)是通过用D-氨基酸替换KU-5878的所有氨基酸而获得的肽。

[0179] 在存在或不存在牛血清的情况下,以与实施例1相同的方式对每种肽的最高杀菌浓度进行测量,并且结果在下表9中示出。

[0180] [表9]

肽名称	牛血清 X		牛血清 O	
	针对金黄色葡萄球菌的 MBC 值 ($\mu\text{g/ml}$)	针对铜绿假单胞菌的 MBC 值 ($\mu\text{g/ml}$)	针对金黄色葡萄球菌的 MBC 值 ($\mu\text{g/ml}$)	针对铜绿假单胞菌的 MBC 值($\mu\text{g/ml}$)
KU-5878	100	100	300	300
KU-5878-D(all)	300	300	>500	>500
KU-5878-K4	3	4	40	32
KU-5878-K4-D	3	3	25	20

[0182] 如在上表9中可以看出的,可以看出在牛血清存在下进行的抗菌活性实验中,KU-5878和KU-5878-K4具有降低的抗菌活性,但KU-5878-K4-D的抗菌活性降低与KU-5878-K4的相比很小。

[0183] 实施例5.其中构成KU-5878的氨基酸中的一些被修饰的肽的抗菌活性的评价

[0184] 为了鉴定比KU-5878具有更好抗菌活性和更高稳定性的肽,对KU-5878的C端进行酰胺化,然后使用最低杀菌浓度测定法对肽的抗菌活性进行比较性地评价。以与实施例1相同的方式进行实验。关于KU-5878变体及其针对每种细菌的MBC值的具体信息在下表10中示出。

[0185] [表10]

肽	氨基酸序列	针对金黄色葡萄球菌的 MBC 值 ($\mu\text{g/ml}$)	针对铜绿假单胞菌的 MBC 值 ($\mu\text{g/ml}$)
KU-5878-NH ₂	KTMMQSGGTFGTfMAIG MGIR	70	60

[0187] 如上表10中所示,可以看出,通过修饰KU-5878末端而获得的肽具有提高的抗菌活性。

[0188] 实施例6. 通过从KU-5878中缺失一个氨基酸而获得的肽的抗菌活性的评价

[0189] 通过从KU-5878的氨基酸序列 (SEQ ID NO:13) 中缺失一个氨基酸制备变体,并评价其抗菌活性。抗菌活性的评价结果在下表11中示出。

[0190] 作为结果,当认为KU05878的氨基酸序列由第58至78位处的氨基酸组成时,在第60、61、62、64、65、66、68、74、75或76位处氨基酸的缺失导致抗菌活性的提高。考虑到相同的氨基酸是连续的,第61位处M的缺失与第60位处M的缺失相同,以及第65位处G的缺失与第64位处G的缺失相同。

[0191] 关于SEQ ID NO:13,第3、4、5、7、8、9、11、17、18或19位处氨基酸的缺失导致抗菌活性的提高。

[0192] [表11]

肽名称	氨基酸序列	MBC				活性的提高
		铜绿假单胞菌	金黄色葡萄球菌	CRPA	MRS A	
5878	KTMMQSGGTFGTFMAIGMGIR	100	100	110	100	
5878-d58K	-TMMQSGGTFGTFMAIGMGIR	300	300	300	>300	
5878-d59T	K-MMQSGGTFGTFMAIGMGIR	150	150	150	150	
5878-d60M	KT-MQSGGTFGTFMAIGMGIR	90	90	90	100	O
5878-d61M	KTM-QSGGTFGTFMAIGMGIR	90	90	90	100	O
5878-d62Q	KTMM-SGGTFGTFMAIGMGIR	100	90	100	100	O
5878-d63S	KTMMQ-GGTFGTFMAIGMGIR	200	200	200	200	
5878-d64G	KTMMQS-GTFGTFMAIGMGIR	100	100	110	100	O
5878-d65G	KTMMQSG-TFGTFMAIGMGIR	100	100	110	100	O
5878-d66T	KTMMQSGG-FGTFMAIGMGIR	90	90	100	90	O
5878-d67F	KTMMQSGGT-GTFMAIGMGIR	200	200	200	200	
5878-d68G	KTMMQSGGTF-TFMAIGMGIR	25	20	18	25	O
5878-d69T	KTMMQSGGTFG-FMAIGMGIR	120	120	140	140	
5878-d70F	KTMMQSGGTFGT-MAIGMGIR	200	200	200	200	

[0193]

[0194]

5878-d71M	KTMMQSGGTFGTF-AIGM GIR	250	250	300	300	
5878-d72A	KTMMQSGGTFGTFM-IGM GIR	150	150	170	160	
5878-d73I	KTMMQSGGTFGTFMA-G MGIR	>300	>300	>300	>300	
5878-d74G	KTMMQSGGTFGTFMAI-M GIR	20	25	30	25	O
5878-d75M	KTMMQSGGTFGTFMAIG- GIR	100	100	100	110	O
5878-d76G	KTMMQSGGTFGTFMAIG M-IR	80	70	90	90	O
5878-d77I	KTMMQSGGTFGTFMAIG MG-R	>300	>300	>300	>300	
5878-d78R	KTMMQSGGTFGTFMAIG MGI-	300	300	>300	>300	

[0195] 实施例7. 通过从KU-5878中缺失两个或更多个氨基酸而获得的肽的抗菌活性的评价

[0196] 通过从KU-5878的氨基酸序列 (SEQ ID NO:13) 中缺失两个或更多个氨基酸制备变体, 并评价其抗菌活性。抗菌活性的评价结果在下表12中示出。

[0197] 除了其中缺失第60位处的M和第64位处的G的变体之外, 在大多数变体中, 抗菌活性降低。考虑到相同的氨基酸是连续的, 第60位处M的缺失与第61位处M的缺失相同, 以及第64位处G的缺失与第65位处G的缺失相同。

[0198] 关于SEQ ID NO:13, 第3或4位处氨基酸的缺失以及第7或8位处氨基酸的缺失导致抗菌活性的提高。

[0199] [表12]

[0200]

肽名称	氨基酸序列	MBC				活性的提高
		铜绿假单胞菌	金黄色葡萄球菌	CRPA	MRS A	
5878-d60M, d64G	KT-MQS-GTFGTFMA-IGMGIR	100	100	100	110	O
5878-d71M, d75M	KTMMQSGGTFGTF-AIG-GIR	300	250	300	300	
5878-d60M, d72A, d75M	KT-MQSGGTFGTFM-IG-GIR	300	280	300	300	
5878-d64G, d71M, d76G	KTMMQS-GTFGTF-AIGM-IR	200	200	200	200	
5878-d60M, d64G, d72A, d75M	KT-MQS-GTFGTFM-IG-GIR	120	100	120	120	
5878-d60M, d64G, d71M, d72A, d75M	KT-MQS-GTFGTF-IG-GIR	200	200	200	200	

[0201] 实施例8.通过KU-5878中一个氨基酸的替换而获得的肽的抗菌活性的评价

[0202] 替换KU-5878的氨基酸序列 (SEQ ID NO:13) 中的一个氨基酸,并评价肽的抗菌活性。抗菌活性的评价结果在下表13中示出。

[0203] 关于SEQ ID NO:13,氨基酸第1位处的K至R替换,氨基酸第2位处的T至K或R替换,氨基酸第5位处的Q至K或R替换,氨基酸第6位处的S至K、R或H替换,氨基酸第9位处的T至K或R替换,氨基酸第10位处的F至W替换,氨基酸第16位处的I至L替换,或氨基酸第20位处的I至G或L替换导致抗菌活性提高。

[0204] 此外,参考下表13中的KU-5878-4N1e,确定了由于用正亮氨酸替换KU-5878中的所有四个甲硫氨酸,肽的抗菌活性得到了提高。这可能是因为除了硫变成了碳之外,甲硫氨酸和正亮氨酸的结构彼此相同。

[0205] [表13]

[0206]

肽名称	氨基酸序列	MBC				活性的提高
		铜绿假单胞菌	金黄色葡萄球菌	CRPA	MRS A	
KU-5878	KTMMQSGGTFGTFMAL GMGIR	100	100	110	110	
KU-5878-T59K	KKMMQSGGTFGTFMAL GMGIR	50	40	50	50	O
KU-5878-Q62K	KTMMKSGGTFGTFMAL GMGIR	90	80	90	90	O
KU-5878-S63K	KTMMQKGGTFGTFMAL GMGIR	60	50	50	50	O
KU-5878-T66K	KTMMQSGGKFGTFMAL GMGIR	80	60	70	80	O
KU-5878-T69K	KTMMQSGGTFGKFMAI GMGIR	140	130	150	150	
KU-5878-T59R	KRMMQSGGTFGTFMAL GMGIR	30	25	30	30	O
KU-5878-Q62R	KTMMRSGGTFGTFMAL GMGIR	80	80	80	90	O
KU-5878-S63R	KTMMQRGGTFGTFMAL GMGIR	20	15	20	25	O
KU-5878-T66R	KTMMQSGGRFGTFMAL GMGIR	80	90	80	90	O
KU-5878-T59H	KHMMQSGGTFGTFMAL GMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-Q62H	KTMMHSGGTFGTFMAL GMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-S63H	KTMMQHGGTFGTFMAL GMGIR	100	100	100	110	O
KU-5878-T66H	KTMMQSGGHFGTFMAL GMGIR	>300	>300	>300	>300	

[0207]

KU-5878-T59S	KSMMQSGGTFGTFFMAI GMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-Q62S	KTMMSSGGTFGTFFMAI GMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-S63T	KTMMQTGGTFGTFFMAI GMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-T66S	KTMMQSGGSFGTFFMAI GMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878- <u>K58A</u>	ATMMQSGGTFGTFFMAI GMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-T59A	KAMMQSGGTFGTFFMAI GMGIR	150	120	130	140	
KU-5878-Q62A	KTMMASGGTFGTFFMAI GMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-S63A	KTMMQAGGTFGTFFMAI GMGIR	300	300	300	>300	
KU-5878-T66A	KTMMQSGGAFGTFFMAI GMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-T69A	KTMMQSGGTFGAFMAI GMGIR	300	300	300	300	
KU-5878-K58R	RTMMQSGGTFGTFFMAI GMGIR	120	120	120	120	
KU-5878- <u>K58A</u>	ATMMQSGGTFGTFFMAI GMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-R78A	KTMMQSGGTFGTFFMAI GMGIA	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-R78K	KTMMQSGGTFGTFFMAI GMGIK	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-M60A	KTAMQSGGTFGTFFMAI GMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-I73A	KTMMQSGGTFGTFFMA AGMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-I73K	KTMMQSGGTFGTFFMA KGMGIR	>300	>300	>300	>300	

[0208]

KU-5878-I73W	KTMMQSGGTFGTFMA WGMGIR	300	300	300	>300	
KU-5878-I77A	KTMMQSGGTFGTFMAI GMGAR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-I77K	KTMMQSGGTFGTFMAI GMGKR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-I77T	KTMMQSGGTFGTFMAI GMGTR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-I77G	KTMMQSGGTFGTFMAI GMGGR	80	90	100	90	O
KU-5878-4Nle	KT(Nle)(Nle)QSGGTFGT F(Nle)AIG(Nle)GIR	110	90	100	100	O
KU-5878-F67A	KTMMQSGGTAGTFMAI GMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-F67W	KTMMQSGGTWGTfMA IGMGIR	80	80	80	90	O
KU-5878-F70K	KTMMQSGGTFGTKMAI GMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-F70W	KTMMQSGGTFGTWMA IGMGIR	300	300	300	>300	
KU-5878-A72G	KTMMQSGGTFGTFMGI GMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-G76A	KTMMQSGGTFGTFMAI GMAIR	>300	>300	>300	>300	

[0209] 实施例9. 基于KU-5878中第59位处氨基酸替换的多替换肽的抗菌活性的评价

[0210] 将Q62K、S63K和T66K的替换顺序地添加到U-5878-T59K的氨基酸序列中,并评价肽的抗菌活性。抗菌活性的评价结果在下表14中示出。

[0211] T59K、Q62K、S63K和T66K的替换位置对应于关于SEQ ID NO:13第2、5、6和9位处的氨基酸。

[0212] [表14]

[0213]

肽名称	氨基酸序列	MBC				活性的提高
		铜绿假单胞菌	金黄色葡萄球菌	CRPA	MRSA	
KU-5878	KTMMQSGGTFGTFMAI GMGIR	100	100	110	110	
KU-5878-T59K	KKMMQSGGTFGTFMAI GMGIR	50	40	50	50	O
KU-5878-K2(T59K,Q62K)	KKMMKSGGTFGTFMAI GMGIR	8	8	6	8	O
KU-5878-K3(T59K,Q62K,S63K)	KKMMKKGGTFGTFMAI GMGIR	4	4	4	5	O
KU-5878-K4(T59K,Q62K,S63K,T66K)	KKMMKKGGKFGTFMA IGMGIR	4	3	3	4	O

[0214] 实施例10. 包含添加到C端的氨基酸序列的KU-5878的抗菌活性的评价

[0215] 将氨基酸重复序列添加到KU-5878的C端,并评价肽的抗菌活性。根据下表15,当将R(精氨酸)重复序列或K(赖氨酸)序列添加到KU-5878的C端时,肽的抗菌活性提高。

[0216] [表15]

[0217]

肽名称	氨基酸序列	MBC				活性的提高
		铜绿假单胞菌	金黄色葡萄球菌	CRPA	MRS A	
5878-3R	KTMMQSGGTFGTFMAIG MGIR <u>RRR</u>	8	8	8	10	O
5878-KK	KTMMQSGGTFGTFMAIG MGIRK <u>K</u>	15	16	16	16	O
5878-Q	KTMMQSGGTFGTFMAIG MGIR <u>Q</u>	150	180	180	180	

[0218] 尽管已经参考一些具体特征详细描述了本发明,但是对于本领域技术人员来说明显的是,该详细描述仅是其优选实施方案的,并且不限制本发明的范围。因此,本发明的实质性范围将由所附权利要求及其等同方案限定。

[0001]	<110>	Korea University Research and Buisness Foundation
[0002]	<120>	ROM01来源抗微生物肽及其变体
[0003]	<130>	PX200020PCT
[0004]	<150>	KR 10-2019-0071635
[0005]	<151>	2019-06-17
[0006]	<160>	49
[0007]	<170>	KoPatentIn 3.0
[0008]	<210>	1
[0009]	<211>	79
[0010]	<212>	PRT
[0011]	<213>	人工序列
[0012]	<220>	
[0013]	<223>	智人 Romo1
[0014]	<400>	1
[0015]	Met Pro Val Ala Val Gly Pro Tyr Gly Gln Ser Gln Pro Ser Cys Phe	
[0016]	1 5 10 15	
[0017]	Asp Arg Val Lys Met Gly Phe Val Met Gly Cys Ala Val Gly Met Ala	
[0018]	20 25 30	
[0019]	Ala Gly Ala Leu Phe Gly Thr Phe Ser Cys Leu Arg Ile Gly Met Arg	
[0020]	35 40 45	
[0021]	Gly Arg Glu Leu Met Gly Gly Ile Gly Lys Thr Met Met Gln Ser Gly	
[0022]	50 55 60	
[0023]	Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile Gly Met Gly Ile Arg Cys	
[0024]	65 70 75	
[0025]	<210>	2
[0026]	<211>	27
[0027]	<212>	PRT
[0028]	<213>	人工序列
[0029]	<220>	
[0030]	<223>	KU-5278
[0031]	<400>	2
[0032]	Leu Met Gly Gly Ile Gly Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe	
[0033]	1 5 10 15	
[0034]	Gly Thr Phe Met Ala Ile Gly Met Gly Ile Arg	
[0035]	20 25	
[0036]	<210>	3
[0037]	<211>	28
[0038]	<212>	PRT

[0039]	<213>	人工序列
[0040]	<220>	
[0041]	<223>	KU-5279
[0042]	<400>	3
[0043]	Leu Met Gly Gly Ile Gly Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe	
[0044]	1	5 10 15
[0045]	Gly Thr Phe Met Ala Ile Gly Met Gly Ile Arg Cys	
[0046]		20 25
[0047]	<210>	4
[0048]	<211>	25
[0049]	<212>	PRT
[0050]	<213>	人工序列
[0051]	<220>	
[0052]	<223>	KU-5478
[0053]	<400>	4
[0054]	Gly Gly Ile Gly Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr	
[0055]	1	5 10 15
[0056]	Phe Met Ala Ile Gly Met Gly Ile Arg	
[0057]		20 25
[0058]	<210>	5
[0059]	<211>	26
[0060]	<212>	PRT
[0061]	<213>	人工序列
[0062]	<220>	
[0063]	<223>	KU-5479
[0064]	<400>	5
[0065]	Gly Gly Ile Gly Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr	
[0066]	1	5 10 15
[0067]	Phe Met Ala Ile Gly Met Gly Ile Arg Cys	
[0068]		20 25
[0069]	<210>	6
[0070]	<211>	23
[0071]	<212>	PRT
[0072]	<213>	人工序列
[0073]	<220>	
[0074]	<223>	KU-5678
[0075]	<400>	6
[0076]	Ile Gly Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met	
[0077]	1	5 10 15

[0078]	Ala Ile Gly Met Gly Ile Arg
[0079]	20
[0080]	<210> 7
[0081]	<211> 24
[0082]	<212> PRT
[0083]	<213> 人工序列
[0084]	<220>
[0085]	<223> KU-5679
[0086]	<400> 7
[0087]	Ile Gly Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met
[0088]	1 5 10 15
[0089]	Ala Ile Gly Met Gly Ile Arg Cys
[0090]	20
[0091]	<210> 8
[0092]	<211> 22
[0093]	<212> PRT
[0094]	<213> 人工序列
[0095]	<220>
[0096]	<223> KU-5778
[0097]	<400> 8
[0098]	Gly Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala
[0099]	1 5 10 15
[0100]	Ile Gly Met Gly Ile Arg
[0101]	20
[0102]	<210> 9
[0103]	<211> 23
[0104]	<212> PRT
[0105]	<213> 人工序列
[0106]	<220>
[0107]	<223> KU-5779
[0108]	<400> 9
[0109]	Gly Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala
[0110]	1 5 10 15
[0111]	Ile Gly Met Gly Ile Arg Cys
[0112]	20
[0113]	<210> 10
[0114]	<211> 18
[0115]	<212> PRT
[0116]	<213> 人工序列

[0117]	<220>	
[0118]	<223>	KU-5875
[0119]	<400>	10
[0120]	Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile	
[0121]	1	5 10 15
[0122]	Gly Met	
[0123]	<210>	11
[0124]	<211>	19
[0125]	<212>	PRT
[0126]	<213>	人工序列
[0127]	<220>	
[0128]	<223>	KU-5876
[0129]	<400>	11
[0130]	Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile	
[0131]	1	5 10 15
[0132]	Gly Met Gly	
[0133]	<210>	12
[0134]	<211>	20
[0135]	<212>	PRT
[0136]	<213>	人工序列
[0137]	<220>	
[0138]	<223>	KU-5877
[0139]	<400>	12
[0140]	Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile	
[0141]	1	5 10 15
[0142]	Gly Met Gly Ile	
[0143]		20
[0144]	<210>	13
[0145]	<211>	21
[0146]	<212>	PRT
[0147]	<213>	人工序列
[0148]	<220>	
[0149]	<223>	KU-5878
[0150]	<400>	13
[0151]	Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile	
[0152]	1	5 10 15
[0153]	Gly Met Gly Ile Arg	
[0154]		20
[0155]	<210>	14

[0156]	<211>	22
[0157]	<212>	PRT
[0158]	<213>	人工序列
[0159]	<220>	
[0160]	<223>	KU-5879
[0161]	<400>	14
[0162]	Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile	
[0163]	1	5 10 15
[0164]	Gly Met Gly Ile Arg Cys	
[0165]	20	
[0166]	<210>	15
[0167]	<211>	20
[0168]	<212>	PRT
[0169]	<213>	人工序列
[0170]	<220>	
[0171]	<223>	KU-6079
[0172]	<400>	15
[0173]	Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile Gly Met	
[0174]	1	5 10 15
[0175]	Gly Ile Arg Cys	
[0176]	20	
[0177]	<210>	16
[0178]	<211>	21
[0179]	<212>	PRT
[0180]	<213>	人工序列
[0181]	<220>	
[0182]	<223>	人工肽
[0183]	<220>	
[0184]	<221>	变体
[0185]	<222>	(1) .. (2)
[0186]	<223>	X = 以下中的任一种:R、K、H、S、T、Q 或 N
[0187]	<220>	
[0188]	<221>	变体
[0189]	<222>	(5) .. (6)
[0190]	<223>	X = 以下中的任一种:R、K、H、S、T、Q 或 N
[0191]	<220>	
[0192]	<221>	变体
[0193]	<222>	(9)
[0194]	<223>	X = 以下中的任一种:R、K、H、S、T、Q 或 N

[0195]	<220>	
[0196]	<221>	变体
[0197]	<222>	(12)
[0198]	<223>	X = 以下中的任一种:R、K、H、S、T、Q 或 N
[0199]	<400>	16
[0200]	Xaa Xaa Met Met Xaa Xaa Gly Gly Xaa Phe Gly Xaa Phe Met Ala Ile	
[0201]	1	5 10 15
[0202]	Gly Met Gly Ile Arg	
[0203]	20	
[0204]	<210>	17
[0205]	<211>	21
[0206]	<212>	PRT
[0207]	<213>	人工序列
[0208]	<220>	
[0209]	<223>	KU-5878-T59K
[0210]	<400>	17
[0211]	Lys Lys Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile	
[0212]	1	5 10 15
[0213]	Gly Met Gly Ile Arg	
[0214]	20	
[0215]	<210>	18
[0216]	<211>	21
[0217]	<212>	PRT
[0218]	<213>	人工序列
[0219]	<220>	
[0220]	<223>	KU-5878-Q62K
[0221]	<400>	18
[0222]	Lys Thr Met Met Lys Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile	
[0223]	1	5 10 15
[0224]	Gly Met Gly Ile Arg	
[0225]	20	
[0226]	<210>	19
[0227]	<211>	21
[0228]	<212>	PRT
[0229]	<213>	人工序列
[0230]	<220>	
[0231]	<223>	KU-5878-S63K
[0232]	<400>	19
[0233]	Lys Thr Met Met Gln Lys Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile	

[0234]	1	5	10	15
[0235]	Gly Met Gly Ile Arg			
[0236]	20			
[0237]	<210>	20		
[0238]	<211>	21		
[0239]	<212>	PRT		
[0240]	<213>	人工序列		
[0241]	<220>			
[0242]	<223>	KU-5878-T66K		
[0243]	<400>	20		
[0244]	Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Lys Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile			
[0245]	1	5	10	15
[0246]	Gly Met Gly Ile Arg			
[0247]	20			
[0248]	<210>	21		
[0249]	<211>	21		
[0250]	<212>	PRT		
[0251]	<213>	人工序列		
[0252]	<220>			
[0253]	<223>	KU-5878-T69K		
[0254]	<400>	21		
[0255]	Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Lys Phe Met Ala Ile			
[0256]	1	5	10	15
[0257]	Gly Met Gly Ile Arg			
[0258]	20			
[0259]	<210>	22		
[0260]	<211>	21		
[0261]	<212>	PRT		
[0262]	<213>	人工序列		
[0263]	<220>			
[0264]	<223>	KU-5878-K2		
[0265]	<400>	22		
[0266]	Lys Lys Met Met Lys Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile			
[0267]	1	5	10	15
[0268]	Gly Met Gly Ile Arg			
[0269]	20			
[0270]	<210>	23		
[0271]	<211>	21		
[0272]	<212>	PRT		

[0273]	<213>	人工序列
[0274]	<220>	
[0275]	<223>	KU-5878-K3
[0276]	<400>	23
[0277]	Lys Lys Met Met Lys Lys Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile	
[0278]	1	5 10 15
[0279]	Gly Met Gly Ile Arg	
[0280]		20
[0281]	<210>	24
[0282]	<211>	21
[0283]	<212>	PRT
[0284]	<213>	人工序列
[0285]	<220>	
[0286]	<223>	KU-5878-K4
[0287]	<400>	24
[0288]	Lys Lys Met Met Lys Lys Gly Gly Lys Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile	
[0289]	1	5 10 15
[0290]	Gly Met Gly Ile Arg	
[0291]		20
[0292]	<210>	25
[0293]	<211>	21
[0294]	<212>	PRT
[0295]	<213>	人工序列
[0296]	<220>	
[0297]	<223>	KU-5878-K58R
[0298]	<400>	25
[0299]	Arg Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile	
[0300]	1	5 10 15
[0301]	Gly Met Gly Ile Arg	
[0302]		20
[0303]	<210>	26
[0304]	<211>	21
[0305]	<212>	PRT
[0306]	<213>	人工序列
[0307]	<220>	
[0308]	<223>	KU-5878-K58A
[0309]	<400>	26
[0310]	Ala Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile	
[0311]	1	5 10 15

[0312]	Gly Met Gly Ile Arg
[0313]	20
[0314]	<210> 27
[0315]	<211> 21
[0316]	<212> PRT
[0317]	<213> 人工序列
[0318]	<220>
[0319]	<223> KU-5878-T59R
[0320]	<400> 27
[0321]	Lys Arg Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile
[0322]	1 5 10 15
[0323]	Gly Met Gly Ile Arg
[0324]	20
[0325]	<210> 28
[0326]	<211> 21
[0327]	<212> PRT
[0328]	<213> 人工序列
[0329]	<220>
[0330]	<223> KU-5878-R78A
[0331]	<400> 28
[0332]	Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile
[0333]	1 5 10 15
[0334]	Gly Met Gly Ile Ala
[0335]	20
[0336]	<210> 29
[0337]	<211> 21
[0338]	<212> PRT
[0339]	<213> 人工序列
[0340]	<220>
[0341]	<223> KU-5878-R78K
[0342]	<400> 29
[0343]	Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile
[0344]	1 5 10 15
[0345]	Gly Met Gly Ile Lys
[0346]	20
[0347]	<210> 30
[0348]	<211> 21
[0349]	<212> PRT
[0350]	<213> 人工序列

[0351]	<220>	
[0352]	<223>	人工肽
[0353]	<220>	
[0354]	<221>	变体
[0355]	<222>	(3) .. (4)
[0356]	<223>	X = 以下中的任一种:Met、Leu、Ile、Val 或 Nle
[0357]	<220>	
[0358]	<221>	变体
[0359]	<222>	(14)
[0360]	<223>	X = 以下中的任一种:Met、Leu、Ile、Val 或 Nle
[0361]	<220>	
[0362]	<221>	变体
[0363]	<222>	(16)
[0364]	<223>	X = 以下中的任一种:Met、Leu、Ile、Val 或 Nle
[0365]	<220>	
[0366]	<221>	变体
[0367]	<222>	(18)
[0368]	<223>	X = 以下中的任一种:Met、Leu、Ile、Val 或 Nle
[0369]	<220>	
[0370]	<221>	变体
[0371]	<222>	(20)
[0372]	<223>	X = 以下中的任一种:Met、Leu、Ile、Val、Gly 或 Nle
[0373]	<400>	30
[0374]	Lys Thr Xaa Xaa Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Xaa Ala Xaa	
[0375]	1	5 10 15
[0376]	Gly Xaa Gly Xaa Arg	
[0377]	20	
[0378]	<210>	31
[0379]	<211>	21
[0380]	<212>	PRT
[0381]	<213>	人工序列
[0382]	<220>	
[0383]	<223>	KU-5878-M60A
[0384]	<400>	31
[0385]	Lys Thr Ala Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile	
[0386]	1	5 10 15
[0387]	Gly Met Gly Ile Arg	
[0388]	20	
[0389]	<210>	32

[0390]	<211>	21	
[0391]	<212>	PRT	
[0392]	<213>	人工序列	
[0393]	<220>		
[0394]	<223>	KU-5878-I73A	
[0395]	<400>	32	
[0396]	Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ala		
[0397]	1	5	10 15
[0398]	Gly Met Gly Ile Arg		
[0399]		20	
[0400]	<210>	33	
[0401]	<211>	21	
[0402]	<212>	PRT	
[0403]	<213>	人工序列	
[0404]	<220>		
[0405]	<223>	KU-5878-I73K	
[0406]	<400>	33	
[0407]	Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Lys		
[0408]	1	5	10 15
[0409]	Gly Met Gly Ile Arg		
[0410]		20	
[0411]	<210>	34	
[0412]	<211>	21	
[0413]	<212>	PRT	
[0414]	<213>	人工序列	
[0415]	<220>		
[0416]	<223>	KU-5878-I73W	
[0417]	<400>	34	
[0418]	Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Trp		
[0419]	1	5	10 15
[0420]	Gly Met Gly Ile Arg		
[0421]		20	
[0422]	<210>	35	
[0423]	<211>	21	
[0424]	<212>	PRT	
[0425]	<213>	人工序列	
[0426]	<220>		
[0427]	<223>	KU-5878-I77A	
[0428]	<400>	35	

[0429]	Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile
[0430]	1 5 10 15
[0431]	Gly Met Gly Ala Arg
[0432]	20
[0433]	<210> 36
[0434]	<211> 21
[0435]	<212> PRT
[0436]	<213> 人工序列
[0437]	<220>
[0438]	<223> KU-5878-I77K
[0439]	<400> 36
[0440]	Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile
[0441]	1 5 10 15
[0442]	Gly Met Gly Lys Arg
[0443]	20
[0444]	<210> 37
[0445]	<211> 21
[0446]	<212> PRT
[0447]	<213> 人工序列
[0448]	<220>
[0449]	<223> KU-5878-I77T
[0450]	<400> 37
[0451]	Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile
[0452]	1 5 10 15
[0453]	Gly Met Gly Thr Arg
[0454]	20
[0455]	<210> 38
[0456]	<211> 21
[0457]	<212> PRT
[0458]	<213> 人工序列
[0459]	<220>
[0460]	<223> KU-5878-I77G
[0461]	<400> 38
[0462]	Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile
[0463]	1 5 10 15
[0464]	Gly Met Gly Gly Arg
[0465]	20
[0466]	<210> 39
[0467]	<211> 21

[0468]	<212>	PRT
[0469]	<213>	人工序列
[0470]	<220>	
[0471]	<223>	KU-5878-4Nle
[0472]	<220>	
[0473]	<221>	变体
[0474]	<222>	(3) .. (4)
[0475]	<223>	X = 正亮氨酸(Nle)
[0476]	<220>	
[0477]	<221>	变体
[0478]	<222>	(14)
[0479]	<223>	X = 正亮氨酸(Nle)
[0480]	<220>	
[0481]	<221>	变体
[0482]	<222>	(18)
[0483]	<223>	X = 正亮氨酸(Nle)
[0484]	<400>	39
[0485]	Lys Thr Xaa Xaa Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Xaa Ala Ile	
[0486]	1	5 10 15
[0487]	Gly Xaa Gly Ile Arg	
[0488]	20	
[0489]	<210>	40
[0490]	<211>	21
[0491]	<212>	PRT
[0492]	<213>	人工序列
[0493]	<220>	
[0494]	<223>	人工肽
[0495]	<220>	
[0496]	<221>	变体
[0497]	<222>	(10)
[0498]	<223>	X = 以下中的任一种:F、Y 或 W
[0499]	<220>	
[0500]	<221>	变体
[0501]	<222>	(13)
[0502]	<223>	X = 以下中的任一种:F、Y 或 W
[0503]	<400>	40
[0504]	Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Xaa Gly Thr Xaa Met Ala Ile	
[0505]	1	5 10 15
[0506]	Gly Met Gly Ile Arg	

[0507]		20	
[0508]	<210>	41	
[0509]	<211>	21	
[0510]	<212>	PRT	
[0511]	<213>	人工序列	
[0512]	<220>		
[0513]	<223>	KU-5878-F67A	
[0514]	<400>	41	
[0515]	Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Ala Gly Thr Phe Met Ala Ile		
[0516]	1	5	10 15
[0517]	Gly Met Gly Ile Arg		
[0518]		20	
[0519]	<210>	42	
[0520]	<211>	21	
[0521]	<212>	PRT	
[0522]	<213>	人工序列	
[0523]	<220>		
[0524]	<223>	KU-5878-F67W	
[0525]	<400>	42	
[0526]	Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Trp Gly Thr Phe Met Ala Ile		
[0527]	1	5	10 15
[0528]	Gly Met Gly Ile Arg		
[0529]		20	
[0530]	<210>	43	
[0531]	<211>	21	
[0532]	<212>	PRT	
[0533]	<213>	人工序列	
[0534]	<220>		
[0535]	<223>	KU-5878-F70K	
[0536]	<400>	43	
[0537]	Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Lys Met Ala Ile		
[0538]	1	5	10 15
[0539]	Gly Met Gly Ile Arg		
[0540]		20	
[0541]	<210>	44	
[0542]	<211>	21	
[0543]	<212>	PRT	
[0544]	<213>	人工序列	
[0545]	<220>		

[0546]	<223>	KU-5878-F70W
[0547]	<400>	44
[0548]	Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Trp Met Ala Ile	
[0549]	1	5 10 15
[0550]	Gly Met Gly Ile Arg	
[0551]		20
[0552]	<210>	45
[0553]	<211>	21
[0554]	<212>	PRT
[0555]	<213>	人工序列
[0556]	<220>	
[0557]	<223>	人工肽
[0558]	<220>	
[0559]	<221>	变体
[0560]	<222>	(7) .. (8)
[0561]	<223>	X = 以下中的任一种:A 或 G
[0562]	<220>	
[0563]	<221>	变体
[0564]	<222>	(11)
[0565]	<223>	X = 以下中的任一种:A 或 G
[0566]	<220>	
[0567]	<221>	变体
[0568]	<222>	(15)
[0569]	<223>	X = 以下中的任一种:A 或 G
[0570]	<220>	
[0571]	<221>	变体
[0572]	<222>	(17)
[0573]	<223>	X = 以下中的任一种:A 或 G
[0574]	<220>	
[0575]	<221>	变体
[0576]	<222>	(19)
[0577]	<223>	X = 以下中的任一种:A 或 G
[0578]	<400>	45
[0579]	Lys Thr Met Met Gln Ser Xaa Xaa Thr Phe Xaa Thr Phe Met Xaa Ile	
[0580]	1	5 10 15
[0581]	Xaa Met Xaa Ile Arg	
[0582]		20
[0583]	<210>	46
[0584]	<211>	21

[0585]	<212>	PRT
[0586]	<213>	人工序列
[0587]	<220>	
[0588]	<223>	KU-5878-A72G
[0589]	<400>	46
[0590]	Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Gly Ile	
[0591]	1	5 10 15
[0592]	Gly Met Gly Ile Arg	
[0593]	20	
[0594]	<210>	47
[0595]	<211>	21
[0596]	<212>	PRT
[0597]	<213>	人工序列
[0598]	<220>	
[0599]	<223>	KU-5878-G76A
[0600]	<400>	47
[0601]	Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile	
[0602]	1	5 10 15
[0603]	Gly Met Ala Ile Arg	
[0604]	20	
[0605]	<210>	48
[0606]	<211>	19
[0607]	<212>	PRT
[0608]	<213>	人工序列
[0609]	<220>	
[0610]	<223>	pCM19
[0611]	<400>	48
[0612]	Cys Leu Arg Ile Gly Met Arg Gly Arg Glu Leu Met Gly Gly Ile Gly	
[0613]	1	5 10 15
[0614]	Lys Thr Met	
[0615]	<210>	49
[0616]	<211>	18
[0617]	<212>	PRT
[0618]	<213>	人工序列
[0619]	<220>	
[0620]	<223>	pCM12
[0621]	<400>	49
[0622]	Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Met Gly	
[0623]	1	5 10 15

[0624] Ile Arg

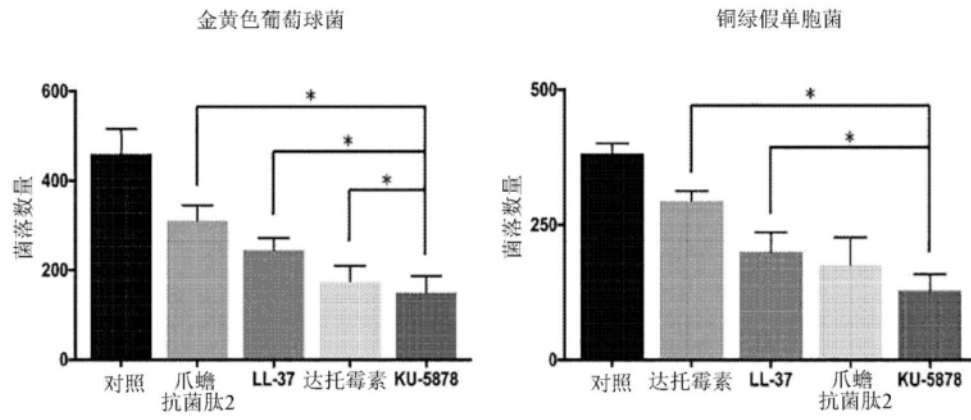


图1

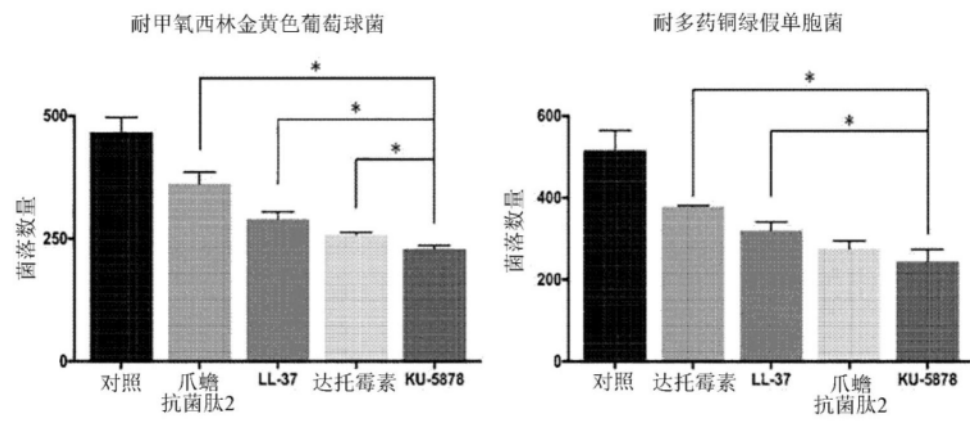


图2

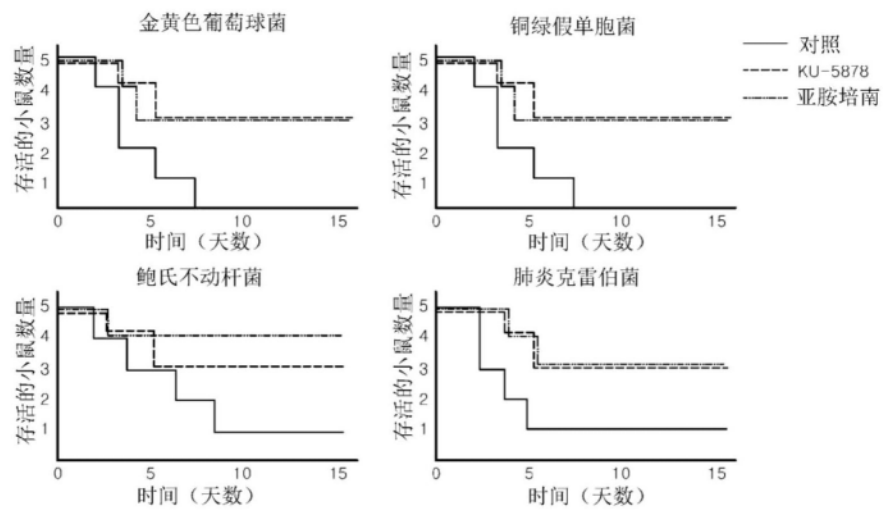
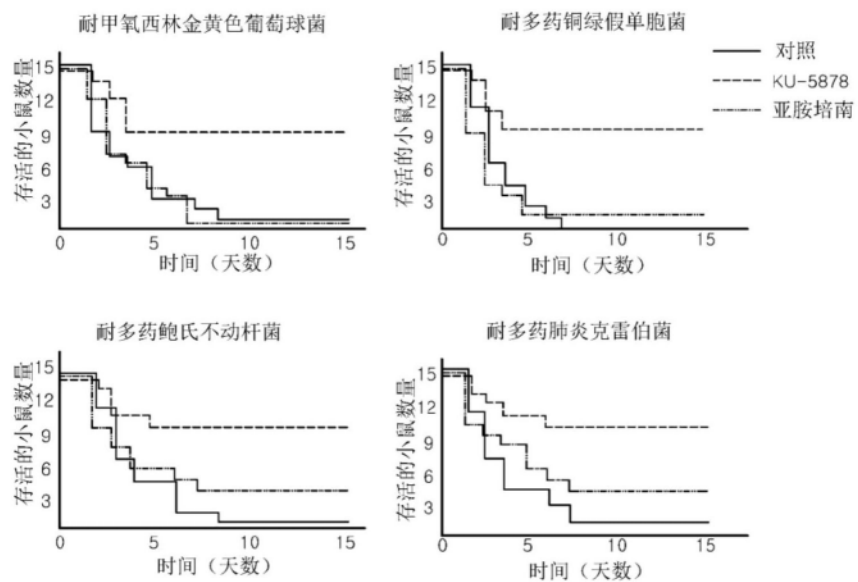


图3



对照	存活率(%)		
	对照	亚胺培南 (施用4次)	KU-5878 (施用一次)
耐甲氧西林金黄色葡萄球菌	7	7	60
耐多药铜绿假单胞菌	0	7	60
耐多药鲍氏不动杆菌	7	27	67
耐多药肺炎克雷伯菌	7	27	67

图4

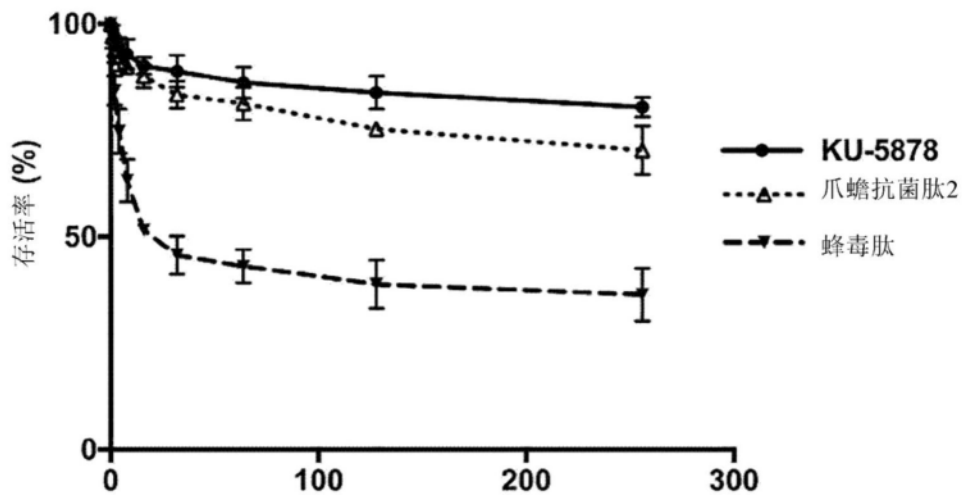


图5

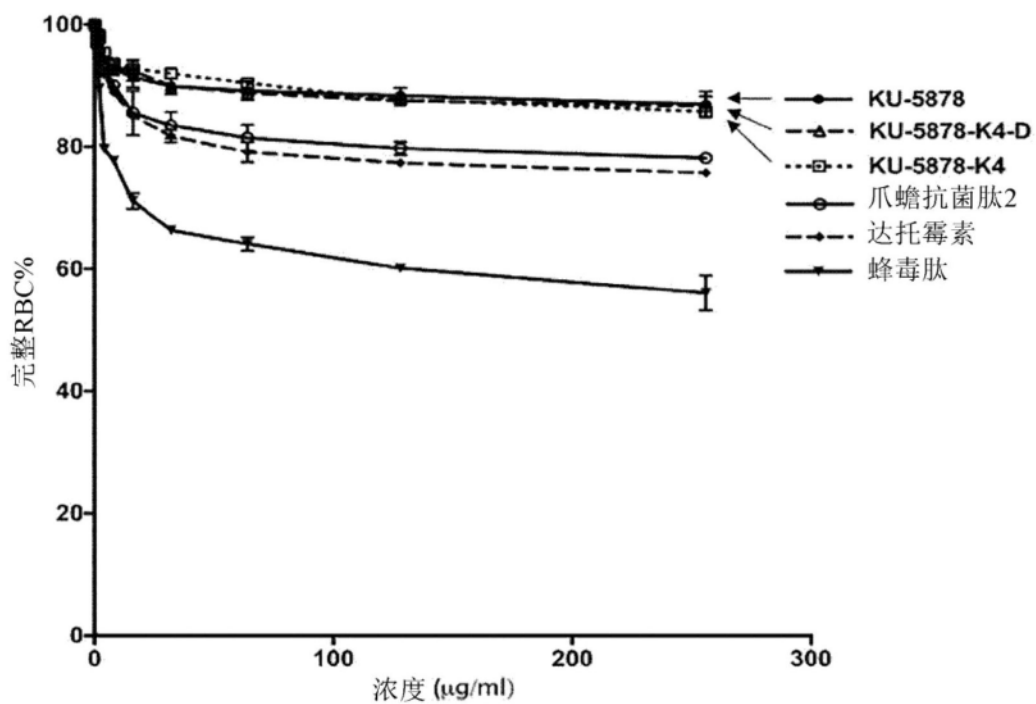


图6

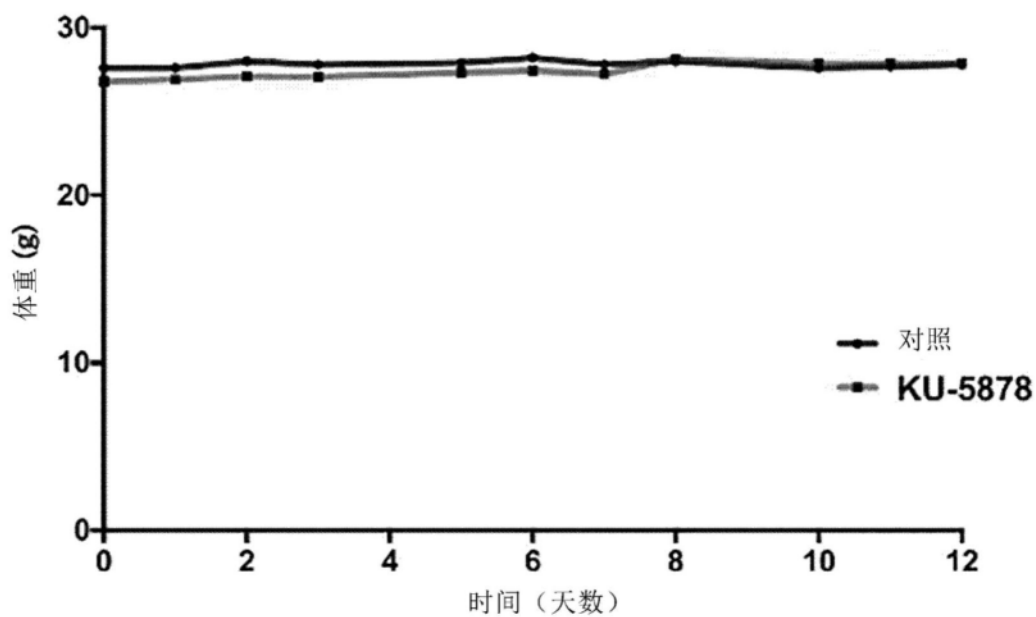


图7