



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114040773 A

(43) 申请公布日 2022.02.11

(21) 申请号 202080041523.4

(22) 申请日 2020.04.03

(30) 优先权数据

62/830207 2019.04.05 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.12.03

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/026681 2020.04.03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/206327 EN 2020.10.08

(71) 申请人 康特拉费克特公司

地址 美国纽约州

(72) 发明人 R·舒赫

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 罗文锋 初明明

(51) Int.Cl.

A61K 38/46 (2006.01)

C12N 15/55 (2006.01)

C12Q 1/34 (2006.01)

C12N 9/36 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

权利要求书3页 说明书35页
序列表27页

(54) 发明名称

在存在人血清的情况下对铜绿假单胞菌具有杀菌活性的溶素及其衍生物

(57) 摘要

公开了对革兰氏阴性菌,特别是铜绿假单胞菌具有活性的新的溶素多肽、含有它们的药用组合物及其用于治疗革兰氏阴性菌感染,并且更通常地用于抑制生长或减少群体或杀灭革兰氏阴性菌(包括但不限于破坏由这种细菌形成的生物膜)的方法。与溶素的氨基酸序列相比较,某些所公开的溶素已通过用非荷电氨基酸置换某些荷电氨基酸和/或通过经或不经间接接头在N-或C-末端与抗菌肽序列融合而在氨基酸序列上进行修饰。

1. 一种药用组合物,其包含:选自GN147、GN146、GN156、GN92、GN54、GN201、GN202、GN121、GN94、GN200、GN204、GN205中的一种或多种的分离的溶素多肽或其具有溶解活性的片段或其具有溶解活性并与所述溶素多肽具有至少80%序列同一性的变体以及药学上可接受的载剂,其中所述溶素多肽或其片段或变体以有效抑制生长或减少群体或杀灭铜绿假单胞菌和任选地至少一种其他革兰氏阴性菌物种的量存在。

2. 一种药用组合物,其包含有效量的选自GN3、GN13、GN17、GN9、GN10、GN105、GN108、GN123、GN150、GN203中的一种或多种的分离的溶素多肽或其具有溶解活性的片段或其具有溶解活性并与所述溶素多肽具有至少80%序列同一性的变体以及药学上可接受的载剂,其中所述溶素多肽或其片段或变体以有效抑制生长或减少群体或杀灭铜绿假单胞菌和任选地至少一种其他革兰氏阴性菌物种的量存在;以及药学上可接受的载剂。

3. 权利要求1或2的药用组合物,其为溶液剂、混悬剂、乳剂、可吸入粉剂、气雾剂或喷雾剂。

4. 权利要求2的药用组合物,其进一步包含一种或多种适合于治疗革兰氏阴性菌的抗生素。

5. 一种包含分离的多核苷酸或所述多核苷酸的互补序列的载体,所述多核苷酸包含编码权利要求1或2的溶素多肽的核酸分子,其中所编码的溶素多肽抑制生长或减少群体或杀灭铜绿假单胞菌和任选地至少一种其他革兰氏阴性菌物种。

6. 一种包含编码溶素多肽的核酸的重组表达载体,所述多肽包含权利要求1或2的多肽的氨基酸序列,其中所编码的溶素多肽具有抑制生长或减少群体或杀灭铜绿假单胞菌和任选地至少一种其他革兰氏阴性菌物种的特性,所述核酸可操作地连接于异源启动子。

7. 一种包含权利要求5或6的载体的宿主细胞。

8. 权利要求5或6的重组载体,其中所述核酸序列为cDNA序列。

9. 一种分离的多核苷酸,其包含编码选自GN147、GN146、GN156、GN92、GN54、GN201、GN202、GN121、GN94、GN200、GN204、GN205的溶素多肽或其具有溶解活性的片段或其具有溶解活性并与所述溶素多肽具有至少80%序列同一性的变体的核酸分子,其中所述溶素多肽或其片段或变体抑制生长或减少群体或杀灭铜绿假单胞菌和任选地至少一种其他革兰氏阴性菌物种。

10. 权利要求9的多核苷酸,其为cDNA。

11. 一种抑制至少一种革兰氏阴性菌物种的生长或减少至少一种革兰氏阴性菌物种的群体或杀灭至少一种革兰氏阴性菌物种的方法,所述方法包括以有效抑制生长或减少群体或杀灭铜绿假单胞菌和任选地至少一种其他革兰氏阴性菌物种的量使所述细菌与药用组合物接触,所述药用组合物含有选自GN147、GN146、GN156、GN92、GN54、GN201、GN202、GN121、GN94、GN200、GN204、GN205、GN3、GN13、GN17、GN9、GN10、GN105、GN108、GN123、GN150、GN203中的一种或多种的溶素多肽或其具有溶解活性的片段或其具有溶解活性并与所述溶素多肽具有至少80%序列同一性的变体。

12. 一种治疗由选自铜绿假单胞菌和任选地一种或多种另外的革兰氏阴性菌物种的革兰氏阴性菌引起的细菌感染的方法,其包括以有效抑制生长或减少群体或杀灭铜绿假单胞菌和任选地至少一种其他革兰氏阴性菌物种的量给予诊断患有细菌感染、处于细菌感染风险下或呈现出细菌感染的症状的受试者以下组合物,所述组合物含有选自GN147、GN146、

GN156、GN92、GN54、GN201、GN202、GN121、GN94、GN200、GN204、GN205、GN3、GN13、GN17、GN9、GN10、GN105、GN108、GN123、GN150、GN203中的一种或多种的溶素多肽或其具有溶解活性的片段或其具有溶解活性并与所述溶素多肽具有至少80%序列同一性的变体。

13. 权利要求12的方法,其中至少一种革兰氏阴性菌物种选自铜绿假单胞菌、克雷伯菌属物种、肠杆菌属物种、大肠埃希氏菌、弗氏柠檬酸杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、鼠疫耶尔森氏菌和土拉弗朗西斯菌。

14. 权利要求12的方法,其中所述革兰氏阴性菌感染为由铜绿假单胞菌引起的感染。

15. 一种在受试者中治疗由选自铜绿假单胞菌和任选地一种或多种另外的革兰氏阴性菌物种的革兰氏阴性菌引起的局部或全身性病原菌感染的方法,其包括以有效抑制生长或减少群体或杀灭铜绿假单胞菌和任选地至少一种其他革兰氏阴性菌的量给予受试者以下组合物,所述组合物含有选自GN147、GN146、GN156、GN92、GN54、GN201、GN202、GN121、GN94、GN200、GN204、GN205、GN3、GN13、GN17、GN9、GN10、GN105、GN108、GN123、GN150、GN203中的一种或多种的溶素多肽或其具有溶解活性的片段或其具有溶解活性并与所述溶素多肽具有至少80%序列同一性的变体。

16. 一种预防或治疗细菌感染的方法,其包括将第一有效量的含有有效量的选自GN147、GN146、GN156、GN92、GN54、GN201、GN202、GN121、GN94、GN200、GN204、GN205、GN3、GN13、GN17、GN9、GN10、GN105、GN108、GN123、GN150、GN203中的一种或多种或其具有溶解活性的片段或其具有溶解活性并与所述溶素多肽具有至少80%序列同一性的变体的组合物和第二有效量的适合于治疗革兰氏阴性菌感染的抗生素的组合共同给予诊断患有细菌感染、处于细菌感染风险下或呈现出细菌感染的症状的受试者。

17. 权利要求16的方法,其中所述抗生素选自头孢他啶、头孢吡肟、头孢哌酮、头孢吡普、环丙沙星、左氧氟沙星、氨基糖苷类、亚胺培南、美罗培南、多利培南、庆大霉素、妥布霉素、阿米卡星、哌拉西林、替卡西林、青霉素、利福平、多粘菌素B 和粘菌素中的一种或多种。

18. 一种用于增强适合于治疗革兰氏阴性菌感染的抗生素的功效的方法,其包括共同给予抗生素与一种或多种选自GN147、GN146、GN156、GN92、GN54、GN201、GN202、GN121、GN94、GN200、GN204、GN205、GN3、GN13、GN17、GN9、GN10、GN105、GN108、GN123、GN150、GN203中的一种或多种的溶素多肽或其具有溶解活性的片段或其具有溶解活性并与所述溶素多肽具有至少80%序列同一性的变体的组合,其中给予所述组合在抑制生长或减少群体或杀灭革兰氏阴性菌方面比单独给予抗生素或溶素多肽或其片段或变体更有效。

19. 一种选自GN147、GN146、GN156、GN92、GN54、GN201、GN202、GN121、GN94、GN200、GN204、GN205的分离的溶素多肽或其具有溶解活性的片段或其具有溶解活性并与所述溶素多肽具有至少80%序列同一性的变体,其中所述溶素多肽抑制生长或减少群体或杀灭铜绿假单胞菌和任选地至少一种其他革兰氏阴性菌物种。

20. 一种包含选自GN3、GN9、GN10、GN13、GN17、GN105、GN108、GN123、GN150和GN203的革兰氏阴性天然溶素的溶素多肽或其具有溶解活性的片段或其具有溶解活性并与所述溶素多肽具有至少80%序列同一性的变体,其中所述天然溶素或其片段或变体已任选地通过用非荷电氨基酸残基取代1-3个荷电氨基酸残基而进行修饰,所述经修饰的天然溶素或其片段或变体保留溶解活性。

21. 一种包含选自GN2、GN4、GN14、GN43和GN37的革兰氏阴性天然溶素的溶素多肽或其

具有溶解活性的片段或其具有溶解活性并与所述溶素多肽具有至少80%序列同一性的变体,其中所述天然溶素或其片段或变体已通过用非荷电氨基酸残基取代1-3个荷电氨基酸残基而进行修饰,所述经修饰的天然溶素或其片段或变体保留溶解活性。

22. 权利要求1或2的药用组合物,其中所述溶素多肽选自GN156、GN121、GN108和GN123中的一种或多种或其具有溶解活性的活性片段或其具有溶解活性并与所述溶素多肽具有至少80%序列同一性的变体。

23. 权利要求11的方法,其中所述细菌处于生物膜中,所述方法实现所述生物膜的破坏。

24. 前述权利要求中任一项的药用组合物、载体、宿主细胞、分离的多核苷酸、分离的溶素多肽或方法,其中所述溶素多肽或分离的溶素多肽使革兰氏阴性菌对抗生素重新敏感。

25. 权利要求24的药用组合物、载体、宿主细胞、分离的多核苷酸、分离的溶素多肽或方法,其中所述革兰氏阴性菌是铜绿假单胞菌。

26. 权利要求24或25中任一项的药用组合物、载体、宿主细胞、分离的多核苷酸、分离的溶素多肽或方法,其中所述抗生素是碳青霉烯。

在存在人血清的情况下对铜绿假单胞菌具有杀菌活性的溶素及其衍生物

[0001] 对相关申请的交叉参考

本申请要求2019年4月5日提交的美国临时专利申请号62/830,207的权益,并依赖于该申请的申请日,该申请的全部公开内容通过参考而并入本文。

[0002] 序列表

本申请包含序列表,其已以ASCII格式通过电子方式提交,并在此通过参考以其全部并入。所述ASCII副本创建于2020年4月2日,名为0341.0025-PCT_ST25.txt,大小为62,107字节。

[0003] 背景

革兰氏阴性菌,特别是假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 的成员,是严重且可能威胁生命的侵袭性感染的重要原因。假单胞菌属感染构成烧伤、慢性伤口、慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 和其他结构性肺病、囊性纤维化、植入生物材料上的表面生长以及医院表面和供水内的主要问题,其中其对脆弱患者比如免疫抑制患者和重症监护 (ICU) 患者造成许多威胁。

[0004] 一旦在患者体内确立,铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*) 可能尤其难以治疗。该基因组编码许多抗性基因,包括多药外排泵和赋予对 β -内酰胺和氨基糖苷抗生素抗性的酶,由于缺少新的抗微生物治疗剂,使得针对这种革兰氏阴性病原体的治疗特别具有挑战性。铜绿假单胞菌在生物膜中生长的能力加剧了这一挑战,该生物膜可通过保护细菌免受宿主防御和常规抗微生物化学治疗的影响来增强其引起感染的能力。

[0005] 在医疗保健环境中,铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 耐药菌株的发生率正在增加。一项多州点流行率调查估计,铜绿假单胞菌引起所有医疗保健获得性感染 (HAI) 的7% (1)。每年由铜绿假单胞菌引起的51000 HAI中有超过6000 (13%) 为多药耐药 (MDR), 每年约有400人死亡 (2)。广泛耐药 (XDR) 和泛耐药 (PDR) 菌株代表新出现的威胁,对其具有有限或没有可用的治疗 (3)。包括血流感染 (BSI) 在内的侵袭性铜绿假单胞菌感染是最致命的HAI之一,例如铜绿假单胞菌占有所有BSI的3%-7%,死亡率在27%-48%之间 (4)。由于美国的大多数医疗保健均在较小的非教学型社区医院进行,因此可能低估包括铜绿假单胞菌引起的那些在内的侵袭性血流感染的发生率。在社区医院的BSI观察性研究中,铜绿假单胞菌为前4种MDR病原体之一 (5),并且整体医院死亡率为18%。另外,很好地描述了MDR铜绿假单胞菌的暴发 (6)。结果差与铜绿假单胞菌的MDR菌株 (stains) 有关,后者经常需要用万不得已的药物比如粘菌素治疗 (7)。显然,对于具有新颖机制以靶向MDR铜绿假单胞菌以治疗包括 (但不限于) BSI在内的侵袭性感染的不同抗微生物剂存在尚未满足的医学需求。

[0006] 一种创新的治疗细菌感染的方法集中于称为溶素的噬菌体编码的细胞壁肽聚糖 (PG) 水解酶家族 (8)。溶素技术目前基于使用纯化的重组溶素蛋白,该蛋白在外部作用于多种革兰氏阳性 (GP) 病原体,导致细菌细胞在接触时溶解,具有多重对数倍数杀灭。溶素起“分子剪刀”作用,降解负责保持细胞形状和承受内部渗透压的肽聚糖 (PG) 网状结构。PG的降解导致渗透性溶解。除了与抗生素相比较快速杀灭和新颖的作用方式之外,溶解活性的其他标志还包括抗生物膜活性、不存在先前存在的抗性、与抗生素 (以亚最低抑制浓度

(MIC))的有效协同作用和当除溶素之外还使用抗生素时抑制对抗生素的抗性。重要的是,多个研究者组在多种动物模型中证明了局部、鼻内和胃肠外给予溶素控制抗生素抗性GP细菌病原体的能力(9-11)。

[0007] 溶素技术最初开发是用于治疗GP病原体的。迄今为止,溶素靶向革兰氏阴性(GN)菌的开发受到限制。革兰氏阴性菌的外膜(OM)起着细胞外大分子的屏障的至关重要作用,并限制下邻肽聚糖的进入(12-14)。

[0008] OM为GN菌的区别特征,并包含脂质双层,其具有内部磷脂小叶和外部两亲性小叶,主要由脂多糖(LPS)组成(15)。LPS具有3个主要部分:称为脂质A的六酰化基于氨基葡萄糖的磷脂、多糖核心和称为O-抗原的延伸的外部多糖链。OM表现出通过3种主要相互作用稳定的非流体连续体,所述相互作用包括:i) LPS分子彼此之间的亲和结合,尤其是如果存在阳离子以中和磷酸根基团时;ii) 大量饱和的酰基链的紧密堆积;和iii) 脂质A部分的疏水堆积。所得结构为疏水和亲水分子两者的屏障。在OM下,PG形成对水解裂解非常敏感的薄层——与厚度为30-100 nm且由最多40层组成的GP菌的PG不同,GN菌的PG厚度仅为2-3 nm且由仅1-3层组成。如果将针对GN菌的溶素改造成单独或与OM去稳定剂和/或抗生素组合渗透OM,则可实现有效的抗微生物活性。

[0009] 因此,发现和开发渗透OM的GN溶素是一个重要的目标,并将满足重要但尚未满足的需求,以设计出有效的疗法来治疗或预防革兰氏阴性菌感染。先前已经描述了具有OM透化和OM破坏活性的多种药物。例如,包括多粘菌素抗生素和氨基糖苷类在内的多聚阳离子化合物与OM中的稳定二价阳离子竞争与LPS中的磷脂相互作用,从而导致OM解体(16)。类似地,EDTA和弱酸会螯合二价阳离子,导致OM解体(17)。还已知大量天然存在的抗微生物肽及其合成肽模拟物(本文称为AMP)基于自我促进的吸收途径渗透OM(18-20)。多聚阳离子和两亲性AMP两者的易位由与LPS的初级静电相互作用驱动,然后是阳离子置换、膜的解体和瞬时开口,并且在某些情况下是AMP的内化。通过经由改变疏水性、总电荷和极性残基在疏水面上的定位或经由掺入D,L残基代替全L对应物来策略性地改造两亲性结构域,可在血液中“激活”许多AMP的膜相互作用抗微生物活性(18,19,21,22)。

[0010] 如本文概述的,已经使用多种使得OM能够渗透的技术而推进溶素技术来解决GN病原体。在此方面,先前提交的国际专利申请PCT/US2016/052338(于2016年9月16日提交,并作为W0/2017/049233公开)通过参考完全结合至本文中用于所有目的。例如,首先在前述PCT申请中公开了溶素GN2、GN4、GN14、GN43和GN37。

[0011] 最近的研究确定了溶素具有对GN菌固有的抗微生物活性(12,13,17)。在某些情况下,抗微生物作用归因于N-或C-末端的两亲性或多聚阳离子 α 螺旋结构域,这些结构域驱动LPS的渗透和跨OM的易位,从而导致PG降解和渗透性溶解。有趣的是,通过包括EDTA和温和的有机酸在内的OM去稳定化合物可促进这种溶素接近PG。尽管与EDTA和温和的有机酸的组合作为药物不切实际,但该发现说明促进GN溶解活性的概念。

[0012] 最近的方法使用融合于具有多聚阳离子、两亲性和疏水性特征的特定 α 螺旋结构域的GN溶素来促进跨OM的易位。这些发现导致称为“artilysin”的GN溶素,其在体外高度活性,并有望用于局部应用(17)。然而,据报道artilysin体内活性低。一致地,在本公开中被列为对照的artilysin GN126(参见表4)也呈现出低活性。

[0013] 尽管artilysin和溶素(包括GN溶素)具有固有的抗微生物活性的体外效力,但在

人血基质中明显缺少活性方面仍然是主要局限性,使得全身治疗成为一个挑战(13,14)。据认为,生理盐和二价阳离子竞争LPS结合位点并干扰溶素(包括GN溶素)的 α -螺旋易位结构域,从而限制血液中的活性,并且更具体地讲在存在血清的情况下,从而限制使用溶素治疗侵袭性感染的可能性(23)。据报道,多种不同的OM-渗透性和去稳定的AMP在血液中类似的缺少活性(18-20,22)。

[0014] 概述

用于经全身给予来治疗侵袭性感染的GN溶素开发面临的主要设计挑战为需要减少血液(或例如人血清)中的失活。

[0015] 首先鉴定具有固有活性(即HEPES缓冲液中的高水平活性和人血清中的低水平活性)的天然GN溶素,并然后通过用非荷电氨基酸置换荷电氨基酸和/或与 α -螺旋抗微生物肽融合进行修饰,以改善活性和改善血清中的活性。

[0016] 基于这项工作,鉴定了推定的天然溶素并对活性进行评估。溶素列于表3中,并通过其序列进行描述。在存在人血清的情况下,未经修饰的溶素呈现出不同水平的活性。

[0017] 溶素蛋白的修饰基于以下:i) 将氨基酸取代掺入到溶素蛋白中以改变分子的整体pI,以促进OM渗透或降低对人血清的敏感性或两者兼而有之;和/或ii) 抗微生物肽序列(优选地为已知在血清中有活性的序列)融合于溶素的N-或C-末端,形成融合多肽,以促进外膜的渗透和易位。

[0018] 如本文所述通过修饰溶素蛋白获得经修饰的GN-溶素。与亲本(未经修饰的)溶素相比较,经修饰的GN-溶素被证明在人血清中呈现出改善的活性。通过非荷电氨基酸残基随机诱变天然溶素蛋白的荷电氨基酸残基,并测试所得多肽的活性,包括在存在人血清情况下的活性。经活性修饰的多肽一般地与亲本多肽的区别在于1-3个氨基酸残基。备选地或另外,将抗微生物肽(AMP)序列经或不经接头融合到天然或经修饰的GN溶素序列上。抗微生物肽的特征为 α -螺旋结构域,以介导溶素的外膜破坏和易位。接头是长度为5-20个氨基酸的短肽序列,其具有柔性(例如富含丝氨酸和/或甘氨酸残基),并且设计成不干扰融合多肽的AMP或溶素部分的结构并允许各自自由移动。

[0019] 本文所述的每种推定的溶素和经修饰的GN-溶素已经或可纯化至> 90%同质性,并在一系列测定中进行检查以评价体外活性。

[0020] 本公开包括合成和/或重组产生的溶素多肽和经修饰的溶素多肽。本文公开了新颖的溶素多肽和经修饰的溶素多肽,以及所述多肽用于治疗革兰氏阴性菌,并且尤其是在存在血液基质例如人血清的情况下进行治疗的用途。

[0021] 此外,本文公开了溶素多肽和经修饰的溶素多肽用于在体内、离体或体外破坏例如假体或其他医疗装置中包含革兰氏阴性微生物的生物膜的用途。生物膜的革兰氏阴性微生物包括假单胞菌属物种,例如铜绿假单胞菌。

[0022] 一方面,本公开涉及一种药用组合物或药物制剂,其包含有效量的具有选自SEQ ID NO: 2、4、5-9和SEQ ID NO: 13-27的氨基酸序列的分离的溶素多肽或与其具有至少80%序列同一性的肽,所述肽具有溶解活性,其中溶素多肽抑制生长或减少群体或杀灭至少一种革兰氏阴性菌物种;以及药学上可接受的载剂。

[0023] 在一个实施方案中,药用组合物包含有效量的至少一种选自肽GN3、CN147、GN146、GN156、GN54、GN92、GN121、GN94、GN9、GN10、GN13、GN17、GN105、GN108、GN123、GN150、GN200、

GN201、GN203、GN204和GN205的溶素多肽或其保持溶解活性的片段,其中所述溶素多肽或片段抑制生长或减少群体或杀灭至少一种革兰氏阴性菌物种;以及药学上可接受的载剂。

[0024] 在一个实施方案中,本发明的药用组合物/药物制剂包含有效量的至少一种溶素多肽和至少一种适合于治疗革兰氏阴性菌的抗生素。在一些实施方案中,组合物为两种组合或单独给予的组分的组合,一种含有本公开的溶素,和一种含有抗生素。在一些实施方案中,抗生素以亚最佳剂量提供。在一些实施方案中,抗生素可为革兰氏阴性菌对其出现抗性的抗生素,使用溶素用于克服该抗性。

[0025] 在一些实施方案中,本发明的组合物(含或不含抗生素)或组合(含有溶素和抗生素)适合于口服、局部、胃肠外或可吸入给予。在一些实施方案中,组合的一种组分可适合于通过与另一组分不同的途径来给予。例如,在以下详述的实验中,抗生素皮下(SC)给予,而溶素则静脉内(IV)给予。

[0026] 在一个实施方案中,抗生素可选自以下提供的GN合适的抗生素的列表及其组合。在一个更具体的实施方案中,抗生素可选自阿米卡星(amikacin)、阿奇霉素、氨基糖苷类、环丙沙星、粘菌素、利福平、碳青霉烯类和妥布霉素以及前述中两种或更多种的组合。

[0027] 本公开的某些实施方案考虑无菌容器,容器含有上述药用组合物之一,药物组合物包含溶素多肽和任选地一种或多种另外的组分。举例来说但非限制性地,无菌容器为试剂盒的一个组件;试剂盒还可含有例如第二无菌容器,其含有至少一种另外的治疗剂。因此,本文公开的GN抗生素和GN溶素的组合之一可任选地以这种试剂盒提供。

[0028] 一方面,本文公开了载体,所述载体包含编码具有选自SEQ ID NO: 2、4、5-9和SEQ ID NO: 13-27的氨基酸序列的溶素肽或与其具有至少80%序列同一性的肽的核酸分子,所述肽具有溶解活性,其中编码的溶素多肽在不存在或存在人血清的情况下抑制生长或减少群体或杀灭至少一种革兰氏阴性菌物种。

[0029] 在另一个实施方案中,载体为重组表达载体,其包含编码前述溶素多肽之一的核酸,所述溶素多肽包括其至少80%序列同一性变体,其中编码的溶素肽具有在不存在和/或存在人血清的情况下抑制生长或减少群体或至少一种革兰氏阴性菌物种的特性,该核酸可操作地连接于异源启动子。

[0030] 还考虑包含前述载体的宿主细胞。在一些实施方案中,核酸序列为cDNA序列。

[0031] 在仍然另一方面,本公开涉及编码包含选自SEQ ID NO: 2、4、5-9和SEQ ID NO: 13-27的序列的溶素多肽的分离的纯化核酸。在一个备选实施方案中,分离的纯化核酸包含选自SEQ ID NO: 33至SEQ ID NO: 54的核苷酸序列、其简并密码及其转录物。根据本文提出的实施方案,所定义的核酸不仅包括同一的核酸,而且还包括任何较小的碱基变异,特别是包括导致同义密码子(规定相同氨基酸残基的不同密码子)的取代。因此,对核酸所述的权利要求被认为包括任何所述单链序列的互补序列。任选地,核酸为cDNA。

[0032] 在另一方面,本公开涉及一种使革兰氏阴性菌对抗生素重新敏感的方法,该方法包括使革兰氏阴性菌与抗生素和本文所述的溶素接触,从而使革兰氏阴性菌对抗生素重新敏感。通常地,溶素和抗生素对革兰氏阴性菌显示协同活性。

[0033] 在其他方面,本公开涉及各种方法/用途。一种这种方法/用途为用于抑制至少一种革兰氏阴性菌物种的生长或减少至少一种革兰氏阴性菌物种的群体或杀灭至少一种革兰氏阴性菌物种的方法/用途,所述方法包括使细菌与包含有效量的包含选自SEQ ID NO:

2、4、5-9和SEQ ID NO: 13-27的序列的GN溶素多肽或与其具有至少80%序列同一性的肽的组合物接触,持续足以在不存在和/或存在人血清的情况下抑制所述生长或减少所述群体或杀灭所述至少一种革兰氏阴性菌物种的时间段,所述肽具有溶解活性。

[0034] 另一种这种方法/用途为用于抑制至少一种革兰氏阴性菌物种的生长或减少至少一种革兰氏阴性菌物种的群体或杀灭至少一种革兰氏阴性菌物种,所述方法包括使细菌与包含有效量的至少一种选自如SEQ ID NO: 2、4、5-9和SEQ ID NO: 13-27所述的GN溶素的GN溶素多肽或其活性片段的组合物接触,其中所述多肽或活性片段具有在不存在和/或存在人血清的情况下抑制生长或减少群体或杀灭铜绿假单胞菌和任选地至少一种其他革兰氏阴性菌物种的特性。

[0035] 另一种方法/医学用途为用于治疗由革兰氏阴性菌比如铜绿假单胞菌或鲍曼不动杆菌(*A. baumannii*) (包括抗生素抗性革兰氏阴性菌,例如耐碳青霉烯的革兰氏阴性菌,包括耐碳青霉烯的铜绿假单胞菌或鲍曼不动杆菌)引起的细菌感染,其包括给予诊断患有细菌感染、处于其风险下或呈现出其症状的受试者一种或多种前述组合物。

[0036] 在任何前述方法/医学用途中,革兰氏阴性菌为选自鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、铜绿假单胞菌、大肠杆菌(*E. coli*)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)、阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)、沙门氏菌属物种(*Salmonella* spp.)、淋病奈瑟氏菌(*N. gonorrhoeae*)和志贺氏菌属物种(*Shigella* spp.)的至少一种。或者,革兰氏阴性菌为铜绿假单胞菌。

[0037] 另一种方法/医学用途为用于治疗或预防由革兰氏阴性菌引起的局部或全身性病原菌感染,其包括给予需要治疗的受试者前述组合物之一。局部感染包括可通过局域或局部施用抗菌剂治疗的感染。局部感染的实例包括局限于特定位置比如器官或组织或植入假体或其他医疗装置的那些感染。实例为皮肤、牙龈、感染伤口的感染、耳朵等的感染、导管安装区域的感染等。

[0038] 另一种这种方法/医学用途为用于预防或治疗细菌感染,其包括将第一有效量的前述组合物之一和第二有效量的适合于治疗革兰氏阴性菌感染的抗生素的组合共同给予诊断患有细菌感染、处于其风险下或呈现出其症状的受试者。

[0039] 详述

定义

除非上下文另外明确指明,否则本文使用的以下术语及其同源词应具有以下赋予它们的含义。

[0040] “载剂”是指与活性化合物一起给予的溶剂、添加剂、赋形剂、分散介质、增溶剂、包衣、防腐剂、等渗和吸收延迟剂、表面活性剂、推进剂、稀释剂、媒介物等。这种载剂可为无菌液体,比如水、盐水溶液、右旋糖水溶液、甘油水溶液和油类,包括石油、动物、植物或合成来源的那些油类,比如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。

[0041] “药学上可接受的载剂”是指生理学相容的任何和所有溶剂、添加剂、赋形剂、分散介质、增溶剂、包衣、防腐剂、等渗和吸收延迟剂、表面活性剂、推进剂、稀释剂、媒介物等。载剂必须是在以一般地用于药物的量对待治疗的受试者无害的意义上“可接受的”。药学上可接受的载剂与组合物的其他成分相容,而不会使得组合物不适合于其预期目的。此外,药学上可接受的载剂适合于与本文提供的受试者一起使用而没有不适当的不良副作用(比如毒

性、刺激性和过敏反应)。当副作用的风险超过由组合物提供的益处时,它们是“不适当的”。药学上可接受的载剂或赋形剂的非限制性实例包括任何标准药用载剂,如磷酸盐缓冲盐水溶液、水和乳剂如油/水乳剂和微乳剂。例如,在E.W. Martin的Remington's Pharmaceutical Sciences (第18版)中描述了合适的药用载剂。药学上可接受的载剂可以是自然界中不存在的载剂。

[0042] “杀菌的”或“杀菌活性”是指在18-24小时时间段内在初始细菌群体中至少减少3- $\log_{10}$ (99.9%)或更好的减少的程度上引起细菌死亡或能够杀灭细菌的特性。

[0043] “抑菌的”或“抑菌活性”是指抑制细菌生长(包括抑制细菌细胞的生长),从而在18-24小时时间段内在初始细菌群体中引起减少2- $\log_{10}$ (99%)或更好的减少并且最多略低于3- $\log$ 的特性。

[0044] “抗菌的”是指抑菌剂和杀菌剂两者。

[0045] “抗生素”是指具有以下性质的化合物,所述性质对细菌具有负面影响,如致死性或减少生长。抗生素可对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌或两者都具有负面影响。举例来说,抗生素可影响细胞壁肽聚糖生物合成、影响细胞膜完整性或影响细菌中DNA或蛋白合成。对革兰氏阴性菌具有活性的抗生素的非限制性实例包括头孢菌素类,比如头孢曲松-头孢噻肟、头孢他啶、头孢吡肟、头孢哌酮和头孢吡普;氟喹诺酮类,比如环丙沙星和左氧氟沙星;氨基糖苷类,比如庆大霉素、妥布霉素和阿米卡星,哌拉西林、替卡西林、亚胺培南、美罗培南、多利培南、广谱青霉素类(含或不含 β -内酰胺酶抑制剂)、利福平、多粘菌素B和粘菌素。

[0046] “耐药的”通常是指对药物的抗菌活性具有抗性的细菌。当以某些方式使用时,耐药性可具体地讲是指抗生素抗性。在某些情况下,通常对特定抗生素敏感的细菌可对抗生素出现抗性,从而成为耐药微生物或菌株。“多药耐药的”(“MDR”)病原体为对各自用作单一治疗的至少两类抗微生物药物出现抗性的病原体。例如,发现金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)的某些菌株对几种抗生素具有抗性,所述抗生素包括甲氧西林和/或万古霉素(Antibiotic Resistant Threats in the United States, 2013, U.S. Department of Health and Services, Centers for Disease Control and Prevention)。本领域的技术人员可使用确定细菌对药物或抗生素的敏感性或抗性的常规实验室技术易于确定细菌是否耐药。

[0047] “有效量”是指当以适当的频率或给药方案施用或给予时足以预防、减少、抑制或消除细菌生长或细菌负荷或者预防、减少或改善所治疗病症的发作、严重性、持续时间或进展(例如革兰氏阴性菌病原体的生长或感染)、阻止所治疗病症的发展、导致所治疗病症的消退或者增强或改善另一种治疗(比如抗生素或抑菌治疗)的预防或治疗效果的量。

[0048] “共同给予”是指以依序方式给予两种物质例如溶素或溶素-AMP多肽和抗生素或任何其他抗菌剂以及以基本上同时的方式给予这些物质,比如以单一混合物/组合物或以分开给予的剂量但是仍然基本上同时给予受试者,例如在同一天或24小时时间内的不同时间。两种物质例如溶素或溶素-AMP多肽与一种或多种另外的抗菌剂的这种共同给予可作为持续长达数天、数周或数月的连续治疗提供。另外,取决于用途,共同给予不必为连续的或共同扩展的。例如,如果用途是作为局部抗菌剂治疗例如细菌性溃疡或感染的糖尿病性溃疡,则溶素或溶素-AMP多肽可只在另外的抗生素的24小时内初始给予,并且然后可继续使用另外的抗生素而无需进一步给予溶素或溶素-AMP多肽。

[0049] “受试者”是指哺乳动物、植物、低等动物、单细胞生物体或细胞培养物。例如，术语“受试者”旨在包括对细菌感染例如革兰氏阳性或革兰氏阴性菌感染易感或患有该感染的生物体，例如原核生物和真核生物。受试者的实例包括哺乳动物，例如人、狗、牛、马、猪、绵羊、山羊、猫、小鼠、兔、大鼠和转基因非人动物。在某些实施方案中，受试者为人，例如患有革兰氏阴性菌感染、处于患有该感染的风险下或对该感染易感的人，无论这种感染是全身性的、局部的还是以其他方式集中或局限于特定的器官或组织。

[0050] “多肽”本文可与术语“肽”或“蛋白”互换使用，并且是指由氨基酸残基制成并且通常具有至少约30个氨基酸残基的聚合物。该术语不仅包括分离形式的多肽，而且还包括其活性片段和衍生物。术语“多肽”还包括包含如本文所述的溶素或AMP并保持例如溶解功能的融合蛋白或融合多肽。取决于上下文，多肽可为天然存在的多肽或者重组、改造或合成产生的多肽。例如，特定的溶素多肽可例如通过酶促或化学切割从天然蛋白衍生或取出，或者可使用常规肽合成技术（例如固相合成）或分子生物学技术（比如Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) 中公开的那些技术）制备，或者可策略性地将其截短或分段以产生保持例如针对相同或至少一种常见目标细菌的溶解活性的活性片段。

[0051] “融合多肽”是指由两个或更多个核酸区段融合，导致融合的表达产物一般地具有两个或更多个通常具有不同特性或功能性的结构域或区段而产生的表达产物。在更具体的意义上，术语“融合多肽”还可指包含直接或经氨基酸或肽接头共价连接的两个或更多个异源多肽或肽的多肽或肽。尽管形成融合多肽的多肽也可将C-末端连接于C-末端、将N-末端连接于N-末端或将N-末端连接于C-末端，但是它们一般地将C-末端连接于N-末端。术语“融合多肽”可与术语“融合蛋白”互换使用。开放式表述“包含某种结构的多肽”包括比所述结构更大的分子，比如融合多肽。

[0052] “异源的”是指不是天然连续的核苷酸、肽或多肽序列。例如，在本公开的上下文中，术语“异源的”可用于描述两种或更多种肽和/或多肽的组合或融合，其中融合肽或多肽在自然界通常不存在，比如溶素或其活性片段和抗微生物肽，包括阳离子和/或多聚阳离子肽、两亲性肽、寿司肽(sushi peptide) (Ding et al. *Cell Mol Life Sci.*, 65(7-8): 1202-19 (2008))、防御素肽(Ganz, T. *Nature Reviews Immunology* 3, 710-720 (2003))、疏水性肽，其可具有增强的溶解活性。

[0053] “活性片段”是指多肽的一部分，该部分保留从其中获取片段的分离多肽的一种或多种功能或生物活性，例如对一种或多种革兰氏阴性菌的杀菌活性。

[0054] “两亲性肽”是指具有亲水和疏水性官能团两者的肽。在某些实施方案中，二级结构可将疏水和亲水性氨基酸残基置于两亲性肽的对侧（例如在肽在溶剂例如水中时，内侧相对于外侧）。这些肽可在某些实施方案中采用螺旋二级结构例如 α 螺旋二级结构。

[0055] “阳离子肽”是指具有高百分比的荷正电氨基酸残基的肽。在某些实施方案中，阳离子肽的pKa值为8.0或更大。在本公开的上下文中，术语“阳离子肽”还包括多聚阳离子肽，其为主要由荷正电氨基酸残基，例如赖氨酸(Lys)和/或精氨酸(Arg)残基组成的合成产生的肽。不荷正电的氨基酸残基可为中性荷电氨基酸残基、荷负电氨基酸残基和/或疏水性氨基酸残基。

[0056] “疏水性基团”是指化学基团比如氨基酸侧链，其对水分子具有低亲和力或无亲和

力但对油分子具有较高亲和力。疏水性物质在水或水相中倾向于具有低溶解性 or 无溶解性,并且一般地为非极性的,但在油相中倾向于具有较高溶解性。疏水性氨基酸的实例包括甘氨酸(Gly)、丙氨酸(Ala)、缬氨酸(Val)、亮氨酸(Leu)、异亮氨酸(Ile)、脯氨酸(Pro)、苯丙氨酸(Phe)、甲硫氨酸(Met)和色氨酸(Trp)。

[0057] “增强”是指物质活性例如抗微生物活性的程度高于其原来的情况。“增强”包括加性以及协同(超加性)作用。

[0058] “协同”或“超加性”是指由两种物质组合产生的有益作用,其超过两种物质独立起作用的作用总和。在某些实施方案中,协同或超加性作用显著(即统计学显著)超过两种物质独立起作用的作用总和。一种或两种活性成分可以亚阈值水平,即如果单独使用活性物质则不会产生作用或作用非常有限的水平使用。可通过测定比如此处所述的棋盘测定来测量效果。

[0059] “治疗”是指任何过程、行动、应用、疗法等,其中受试者(例如人)受到医疗援助,目的是直接或间接地治愈病症、根除病原体或改善受试者的状况。治疗还指降低发生率、减轻症状、消除复发、预防复发、预防发生、降低发生的风险、改善症状、改善预后或其组合。“治疗”可进一步包括减少受试者中细菌的群体、生长速率或毒力,从而控制或减少受试者中的细菌感染或者器官、组织或环境的细菌污染。因此,降低发生率的“治疗”可例如有效抑制特定环境中至少一种革兰氏阴性菌的生长,无论其为受试者还是环境。另一方面,对已经建立的感染的“治疗”是指抑制造成感染或污染的革兰氏阴性菌的生长、减少该革兰氏阴性菌的群体、杀灭(包括根除)该革兰氏阴性菌。

[0060] “预防”是指预防病症比如细菌感染的发生、复发、扩散、发作或建立。不旨在将本公开限于完全预防或防止感染的建立。在一些实施方案中,发作被延迟,或随后感染的疾病的严重性或感染该疾病的机会被降低,并且这构成了预防的实例。

[0061] “感染的疾病”是指表现出临床或亚临床症状(比如发烧、败血症或菌血症的检测)的疾病,以及当尚未表现出与这种病理学相关的症状时可通过细菌病原体(例如培养物中)的生长检测的疾病。

[0062] 在肽或多肽或其活性片段的上下文中,术语“衍生物”旨在包括例如修饰成含有除氨基酸以外的基本上不会不利地影响或破坏多肽活性(例如溶解活性)的一个或多个化学部分的多肽。化学部分可例如经氨基末端氨基酸残基、羧基末端氨基酸残基或在内部氨基酸残基处共价连接于肽。这种修饰可为天然或非天然的。在某些实施方案中,非天然修饰可包括在反应性部分添加保护性或封端基团、添加可检测标记(比如抗体和/或荧光标记)、添加或修饰糖基化或添加填充基团(比如PEG(聚乙二醇化))和其他本领域技术人员已知的变化。在某些实施方案中,非天然修饰可以是封端修饰,如N-末端乙酰化和C-末端酰胺化。可添加至溶素多肽或AMP的示例性保护基包括(但不限于) t-Boc和Fmoc。常用的荧光标记蛋白,比如(但不限于)绿色荧光蛋白(GFP)、红色荧光蛋白(RFP)、青色荧光蛋白(CFP)、黄色荧光蛋白(YFP)和mCherry,为致密蛋白,其可与多肽共价或非共价结合或者融合于多肽而不干扰细胞蛋白的正常功能。在某些实施方案中,可将编码荧光蛋白的多核苷酸插入溶素或AMP多核苷酸序列的上游或下游。这将产生不干扰细胞功能或其附接的多肽的功能的融合蛋白(例如溶素多肽::GFP)。聚乙二醇(PEG)与蛋白的缀合已被用作延长许多药用蛋白循环半衰期的方法。因此,在多肽衍生物例如溶素多肽衍生物的上下文中,术语“衍生物”包括

通过共价附接一个或多个PEG分子而化学修饰的多肽例如溶素多肽。预计与未聚乙二醇化的多肽相比较,溶素多肽例如聚乙二醇化的溶素将呈现出延长的循环半衰期,同时保留生物学和治疗活性。

[0063] “氨基酸序列同一性百分比”是指在比对序列并引入缺口(如果必要的话)以达到最大序列同一性百分比之后,并且不考虑将任何保守取代作为序列同一性的一部分,候选序列中与参考多肽序列例如溶素多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。用于确定氨基酸序列同一性百分比目的的比对可以本领域技术内的各种方式来实现,例如,使用可公开获得的软件比如BLAST或可例如自DNASTAR市售获得的软件。两个或更多个多肽序列可为0-100%同一性的任何值,或之间的任何整数值。在本公开的上下文中,当至少80%的氨基酸残基(例如至少约85%、至少约90%、至少约92.5%、至少约95%、至少约98%或至少约99%)相同时,两个多肽为“基本上相同的”。如本文所述的术语“氨基酸序列同一性百分比(%)”也适用于肽。因此,术语“基本上相同”将包括本文所述的分离的溶素多肽和肽和AMP的突变、截短、融合或者其他序列修饰的变体及其活性片段以及与参照(野生型或其他完整)多肽相比较具有显著序列同一性(例如,如例如通过上述一种或多种方法测量的至少80%、至少85%、至少90%、至少92.5%、至少95%、至少98%或至少99%同一性)的多肽。

[0064] 如本文所用的,当至少约80%的氨基酸残基(例如至少约85%、至少约90%、至少约92.5%、至少约95%、至少约98%或至少约99%)相同或代表保守取代时,两个氨基酸序列为“基本上同源的”。当多肽例如本文所述的溶素、AMP和/或融合多肽的一个或多个例如至多10%、至多15%或至多20%的氨基酸被相似或保守的氨基酸取代进行取代时,并且其中所得肽具有参考多肽例如本文所述的溶素、AMP和/或融合多肽的至少一种活性(例如抗菌作用)和/或细菌特异性,本公开多肽的序列为基本上同源的。

[0065] 如本文所用的,“保守的氨基酸取代”是其中氨基酸残基被具有拥有类似电荷的侧链的氨基酸残基所替换的氨基酸取代。本领域已经定义了具有拥有类似电荷的侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括具有碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电的极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、 β -分支侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳族侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。

[0066] “可吸入组合物”是指配制成在常规或辅助呼吸期间或者连同常规或辅助呼吸一起直接递送至呼吸道(例如通过气管支气管内、肺和/或鼻给予)的本公开药用组合物,包括(但不限于)雾化、喷雾化、干粉和/或气雾化制剂。

[0067] “生物膜”是指附着于表面并聚集在水合聚合物基质中的细菌,该基质可包含细菌和/或宿主衍生的组分。生物膜为微生物的聚集体,其中细胞在生物或非生物表面上彼此粘附。这些粘附细胞通常被嵌入包含(但不限于)胞外聚合物(EPS)的基质内。生物膜EPS也称为粘液(尽管并非所有描述为粘液的东西均为生物膜)或菌斑,为一种通常包含胞外DNA、蛋白和多糖的聚合物团聚物。

[0068] 在适用于针对某些细菌使用的抗生素的上下文中,“合适的”是指即使随后出现抗性也发现对那些细菌有效的抗生素。

[0069] “外膜”或“OM”是指革兰氏阴性菌的一个特征。外膜包含脂质双层,其具有内部磷

脂小叶和外部两亲性小叶,主要由脂多糖(LPS)组成。LPS具有3个主要部分:称为脂质A的六酰化基于氨基葡萄糖的磷脂、多糖核心和称为O-抗原的延伸的外部多糖链。OM表现出通过3种主要相互作用稳定的非流体连续体,所述相互作用包括:i) LPS分子彼此之间的亲和结合,尤其是如果存在阳离子以中和磷酸根基团时;ii) 大量饱和的酰基链的紧密堆积;和iii) 脂质A部分的疏水堆积。所得结构为疏水和亲水分子两者的屏障。在OM下,肽聚糖形成对水解裂解非常敏感的薄层——与厚度为30-100纳米(nm)且由最多40层组成的革兰氏阴性菌的肽聚糖不同,革兰氏阴性菌的肽聚糖厚度仅为2-3 nm且由仅1-3层组成。

[0070] 对人血清中的铜绿假单胞菌具有杀菌活性的溶素的鉴定。本公开基于鉴定对指数期铜绿假单胞菌菌株PA01具有有效抗菌活性的5种溶素(实施例1和2)。该菌株代表铜绿假单胞菌菌株。为了鉴定本公开的溶素多肽,使用了与抗菌筛选结合的基于生物信息学的方法。从GenBank数据库中鉴定出推定的溶素和溶素样分子(参见表1)。GenBank序列注释为假设或预测蛋白,并且在某些情况下列为推定的噬菌体蛋白和/或推定的溶素。不知道关于这些多肽的活性的任何报道。

[0071] 表1.

溶素	pI	GenBank 登录号
GN3	9.98	WP_012273008.1
GN13	9.47	YP_00638255.1
GN17	7.85	ACD38663.1
GN9	8.85	ECJ78460.1
GN10	9.70	YP_002600773.1
GN105	9.01	WP_016046696.1
GN108	9.28	YP_009288673.1
GN123	9.30	YP_009217242.1
GN150	9.30	WP_034684053.1
GN203	7.87	YP_024745.1

对人血清中的铜绿假单胞菌具有改善的杀菌活性的经修饰的溶素的鉴定。5种溶素GN3、GN150、GN203、GN4和GN37用于生成12种新的GN-溶素衍生物。参见表2。考虑修饰(氨基酸取代或者经或不经接头的N-或C-末端肽融合)可单独或同时应用于天然溶素或修饰的溶素。因此,例如,考虑添加表2中公开的N-和/或C-末端肽以修饰溶素多肽。作为更具体的实例,对GN147考虑作为GN156或GN92的一部分的肽,即使在表2中未举例说明这种构建体。并且这种肽可添加到例如GN4或GN146中。换句话说,可将抗微生物肽融合于天然溶素或通过非荷电氨基酸取代而代替荷电氨基酸残基进行修饰的溶素的N-或C-末端。此外,N-末端

和/或C-末端肽和/或抗微生物肽可经接头结构域例如表2中定义的接头结构域,或如本节以上所述的另一合适的接头,与溶素多肽连接。

[0072] 表2.

溶素	pI	天然溶素(登录号/类别)*	修饰
GN147	9.39	GN3 (WP_012273008.1/溶菌酶)	氨基酸取代(R101D, R117H)
GN146	8.01	GN4 (YP_002284361.1/溶菌酶)	氨基酸取代(K99D, R115H)
GN156	10.51	GN4 (YP_002284361.1/溶菌酶)	添加 N-末端肽 (GPRRPRRPGRAPV; SEQ ID NO:28)
GN92	9.93	GN4 (YP_002284361.1/溶菌酶)	经接头 (AGAGAGAGAGAGAGAGAS; SEQ ID NO:31)添加 N-末端肽 (KFFKFFKFFK; SEQ ID NO:29)
GN54	10.34	GN4 (YP_002284361.1/溶菌酶)	经接头 (AGAGAGAGAGAGAGAGAS; SEQ ID NO:31)添加 N-末端肽 (KRKKRKKRK; SEQ ID NO:30)
GN201	10.47	GN3 (WP_012273008.1/溶菌酶)	添加 C-末端肽 (GPRRPRRPGRAPV; SEQ ID NO:28); 氨基酸取代(R101D, R117H)
GN202	10.13	GN4 (YP_002284361.1/溶菌酶)	添加 C-末端肽 (GPRRPRRPGRAPV; SEQ ID NO:28); 氨基酸取代(K99D, R115H)
GN121	10.13	GN37 (WP_014102102.1/VanY)	添加 C-末端肽 (RKKTRKRLKKIGKVLKWI; SEQ ID NO:32)
GN94	9.77	GN37 (WP_014102102.1/VanY)	经接头 (AGAGAGAGAGAGAGAGAS; SEQ ID NO:31)添加 N-末端肽 (KFFKFFKFFK; SEQ ID NO:29)
GN200	9.97	GN150 (WP_034684053.1/VanY)	添加 C-末端肽 (RKKTRKRLKKIGKVLKWI; SEQ ID NO:32)
GN204	9.88	GN203 (YP_024745.1/VanY)	添加 C-末端肽 (RKKTRKRLKKIGKVLKWI; SEQ ID NO:32)
GN205	11.02	GN3 (WP_012273008.1/溶菌酶)	添加 N-末端肽 (GPRRPRRPGRAPV; SEQ ID NO:28)

本发明的溶素和经修饰的GN-溶素及其氨基酸序列概述于表3中。表3中还包括如上所述的W0/2017/049233中公开的未经修饰的溶素。

[0073] 表3

溶素	氨基酸序列
GN2	MKISLEGLSLIKKFEGCKLEAYKCSAGVWTIGYGHTAGVKEGDVCTQEEAEKLLRGDI FKFEEYVQDSVKVDLDQSQFDALVAWTFNLGPGNLRSSTMLKKLNNGEYESVPFEMR RWNKAGGKTL DGLIRRRQAESLLFESKEWHQV (SEQ ID NO:1)
GN3	MRTSQRGLSLIKSFEGRLRLQAYQDSVGVTIGYGTTTRGVKAGMKISKDQAERMLLND VQRFEP EVERLIKVPLNQDQWDALMSFTYNLGAANLESSTLRLLNAGNYAAAAEQF PRWNKAGGQVLAGLTRRRAAERELFLGAA (SEQ ID NO:2)
GN4	MRTSQRGIDLIKSFEGRLRLSAYQDSVGVTIGYGTTTRGVTRYMTITVEQAERMLSNDI QRFEP ELDR LAKVPLNQNW DALMSFVYNLGAANLASSTLLKLLNKGDYQGAADQF PRWVNAGGKRLDGLVKRRAAERALFLEPLS (SEQ ID NO:3)
GN146	MRTSQRGIDLIKSFEGRLRLSAYQDSVGVTIGYGTTTRGVTRYMTITVEQAERMLSNDI QRFEP ELDR LAKVPLNQNW DALMSFVYNLGAANLASSTLLDLLNKGDYQGAADQF PHWVNAGGKRLDGLVKRRAAERALFLEPLS (SEQ ID NO:4)
GN147	MRTSQRGLSLIKSFEGRLRLQAYQDSVGVTIGYGTTTRGVKAGMKISKDQAERMLLND VQRFEP EVERLIKVPLNQDQWDALMSFTYNLGAANLESSTLRDLLNAGNYAAAAEQF PHWNKAGGQVLAGLTRRRAAERELFLGAA (SEQ ID NO: 5)
GN156	GPRRPRRPGRRAPVMRTSQRGIDLIKSFEGRLRLSAYQDSVGVTIGYGTTTRGVTRYMT ITVEQAERMLSNDIQRFEP ELDR LAKVPLNQNW DALMSFVYNLGAANLASSTLLKLL NKGDYQGAADQFPRWVNAGGKRLDGLVKRRAAERALFLEPLS (SEQ ID NO:6)
GN92	KFFKFFKFFKAGAGAGAGAGAGAGAGASMTSQRGIDLIKSFEGRLRLSAYQDSVGW TIGYGTTTRGVTRYMTITVEQAERMLSNDIQRFEP ELDR LAKVPLNQNW DALMSFVY NLGAANLASSTLLKLLNKGDYQGAADQFPRWVNAGGKRLDGLVKRRAAERALFLEP LS (SEQ ID NO:7)
GN54	KRKKRKKR KAGAGAGAGAGAGAGAGASMTSQRGIDLIKSFEGRLRLSAYQDSVGW TIGYGTTTRGVTRYMTITVEQAERMLSNDIQRFEP ELDR LAKVPLNQNW DALMSFVY NLGAANLASSTLLKLLNKGDYQGAADQFPRWVNAGGKRLDGLVKRRAAERALFLEP LS (SEQ ID NO:8)
GN202	MRTSQRGIDLIKSFEGRLRLSAYQDSVGVTIGYGTTTRGVTRYMTITVEQAERMLSNDI QRFEP ELDR LAKVPLNQNW DALMSFVYNLGAANLASSTLLDLLNKGDYQGAADQF PHWVNAGGKRLDGLVKRRAAERALFLEPLSGPRRPRRPGRRAPV (SEQ ID NO:9)
GN14	MNNELPWVAEARKYIGLREDTSKTSHPKLLAMLDRMGESNESRAWWHDETPWC GLFVG YCLGVAGRYV VREWYRARAW EAPQLTKLDRPAYGALVTFTSRGGGHVGFIV GKDARGNLMVLGGNQSN AVSIAPFAVSRVTGYFWPSFWRNKTAVKSVPFERYSLPL LKSNGELSTNEA (SEQ ID NO:10)
GN43	MKRTTLNLELESNTDRLLQEKKDLLPQSVTNSSDEGTPFAQVEGASDDNTAEQDSDKP GASVADADTKPVDPEWKTITVASGDTLSTVFTKAGLSTSAMHDMLTSSKDAKRFTHL KVGQEVKLLDPKGELQALRVKQSELETIGLDKTDKGYSFKREKAQIDLHTAYAHGRI TSSLFVAGRNAGLPYNLVTSLSNIFGYDIDFALDLREGDEFDVIYEQHKVNGKQVATG NILAARFVNRGKTYTAVRYTNKQGNTSYYRADGSSMRKAFIRTPVDFARISSRFSLGR RHPILNKIRAHKGV DYA APIGTPIKATGDGKILEAGR KGGYGN AVVIQH GQRYRTIYG HMSRFAKGIRAGTSVKQGQIIGYVGMTGLATGPHLHYEFQINGRHVDPLSAKLPMADP LGGADRKR FMAQTQPMIARMDQEKKTLLALNKQR (SEQ ID NO:11)

GN37	MTYTLSKRSLDNLKGVHPDLVAVVHRAIQLTPVDFAVIEGLRSVSRQKELVAAGASKT MNSRHLTGHAVDLAAYVNGIRWDWPLYDAIAVAVKAAAKELGVAIVWGGDWTTFK DGPHELDRLSKYR (SEQ ID NO:12)
GN121	MTYTLSKRSLDNLKGVHPDLVAVVHRAIQLTPVDFAVIEGLRSVSRQKEL VAAGASKTMNSRHLTGHAVDLAAYVNGIRWDWPLYDAIAVAVKAAAKELGVAIVW GGDWTTFKDGPHELDRLSKYRRKKTRKRLKKIGKVLKWI (SEQ ID NO:13)
GN94	KFFKFFKFFKAGAGAGAGAGAGAGASMTYTLSKRSLDNLKGVHPDL VAVVHRAIQLTPVDFAVIEGLRSVSRQKELVAAGASKTMNSRHLTGHAVDLAAYVNG IRWDWPLYDAIAVAVKAAAKELGVAIVWGGDWTTFKDGPHELDRLSKYR (SEQ ID NO:14)
GN201	MRTSQRGLSLIKSFEGLRLQAYQDSVGVWVTIGYGTTRGVKAGMKISKDQAERMLLND VQRFEPERLIKVPLNQDQWDALMSFTYNLGAANLESSTLRDLLNAGNYAAAAEQF PHWNKAGGQVLAGLTRRAAERELFLGAAGPRRPRRPGRRAPV (SEQ ID NO:15)
GN205	GPRRPRRPGRRAPVMRTSQRGLSLIKSFEGLRLQAYQDSVGVWVTIGYGTTRGVKAGMKI SKDQAERMLLNDVQRFEPERLIKVPLNQDQWDALMSFTYNLGAANLESSTLRLL NAGNYAAAAEQFPRWNKAGGQVLAGLTRRAAERELFLGAA (SEQ ID NO:16)
GN200	MSFKLGKRSLNLEGVHPDLIKVVKRAIELTECDFTVTEGLRSKERQAQL LKEKKTTSNSRHLTGHAVDLAAWVNNTVSWDWKYYYQIADAMKKAASELNVSID WGGDWKKFKDGPHELTWSKYPIKGASRKKTRKRLKKIGKVLKWI (SEQ ID NO:17)
GN204	MKLSEKRALFTQLLAQLILWAGTQDRVSVALDQVKRTQAEADANAKSGAGIRNSLHL LGLAGDLILYKDGKYMDSKEDYKFLGDYWKSLHPLCRWGGDFKSRPDGNHFSLEHE GVQRKKTRKRLKKIGKVLKWI (SEQ ID NO:18)
GN150	MSFKLGKRSLNLEGVHPDLIKVVKRAIELTECDFTVTEGLRSKERQAQLLKEKKTTS NSRHLTGHAVDLAAWVNNTVSWDWKYYYQIADAMKKAASELNVSIDWGGDWKKF KDGPHELTWSKYPIKGAS (SEQ ID NO:19)
GN203	MKLSEKRALFTQLLAQLILWAGTQDRVSVALDQVKRTQAEADANAKSGAGIRNSLHL LGLAGDLILYKDGKYMDSKEDYKFLGDYWKSLHPLCRWGGDFK SRPDGNHFSLEHEGVQ (SEQ ID NO:20)
GN9	MKNFNEIIEHVLKHEGGYVNDPKDLGGETKYGITKRFYPDLDIKNLTIEQATEIYKKDY WDKNKVESLPQNLWHIYFDMCVNMGKRTAVKVLQRAAVNRGRDIEVDGGLGPATIG ALKGVELDRVAFRV KYYVDLITAR PEQEKFYLGW FRRATEV (SEQ ID NO:21)
GN10	MSKQGGVKVAQAVAALSSPGLKIDGIVGKATRAAVSSMPSSQKAATDKILQSAGIGSL DSLLAEPAAATS DTFREVVLA V AREARKRLN PAFYVAHIAL ETGWGRSVKLPDGRSSYNYAGLKAAVKTQVKGKTETNTLEYIKSLPKT VRDSFAVFASAGDFSRVYFWYLLDSPSAYRYPGLKNAKTAQEFGDILQKGGYATDPA YAAKVASIASTAVARYGSDVSSVA (SEQ ID NO:22)
GN13	MSDKRVEITGNVSGFFESGGRGVKTVSTGKGDNGGVSYGKHQLASNNGSMALFLESP FGAPYRAQFAGLKPGTAAFTSVYNKIANETPTAFERDQFYIAASHYDPQAAKLKAE INVDDRHVAVRECVFSVAVQYGRNTSIIKALGSNFRGSDKDFIEKVQDYRGATVNTYF KSSSQQTRDSVKNRSQKEQMLLKLLNS (SEQ ID NO:23)
GN17	MTLRYGDRSQEVRQLQRRNLNTWAGANLYEDGHFGAATEDAVRAFRQSHGLVADGIA

	GPKTAAALGGADCSHLLQNADLVAAATRLGLPLATIYAVNQVESNGQGFLGNGKPAI LFERHIMYRRLAAHDQVTADQLAAQFPALVNPRPGGYAGGTAEHQRLANARQIDDTA ALESASWGAFQIMGFHWQRLGYISVQAFEAEMGRSESAQFEAFVRFIDTDPALHKALK ARKWADFARLYNGPDYKRNLYDNKLARAYEQHANCAEASA (SEQ ID NO:24)
GN105	MAVVSEKTAGGRNVLAFLDMLAWSEGSTIRGSDNGYNVVVGGGLFNGYADHPRLK VYLPYKVVYSTAAGRYQLLSRYWDAYRESLALKGGFTPSNQDLVALQQIKERRSLADI QAGRLADAVQKCSNIWASLPGAGYGQREHSLDDLT AHYLAAGGVLS (SEQ ID NO:25)
GN108	MILTKDGFSIIRNELFEGKLDQTQVD AIN FIVEKATEYGLTYPEAAYLLATIYHETGLPS GYRTMQPIKEAGSDSYLRSKKYYPYIGYGYVQLTWEENYERIGKLIGIDL VKNPEKAL EPLIAIQIAIKGMLNGWFTGVGFRRKRPVSKYNKQQYVAARNIINGKDKAELIAKYAIIF ERALRSL (SEQ ID NO:26)
GN123	MTLLKKGDKGDAVKQLQQKLKDLGYTLGVDGNFGNGTDTVVRSFQTKMKLSVDGV VGNGTMSTIDSTLAGIKAWKTSVFPATNKS RAMAMPTLTEIGRLTNVDPKLLATFCSE ESAFDYTA KPYKPDGTVYSSAEGWFQFLDATWDDEV RKHGKQYSFPVDPGRSLRKDP RANGLMGA EFLKGNAAILRPVLGHEPSD TDLYLAHFMGAGGAKQFLMADQNKLAAE LFPGPAKANPNIFYKSGNIARTLA EVYAVLDAKVAKHRA (SEQ ID NO:27)

对于GN3和GN4（各自均为溶菌酶样超家族的成员），基于在与人溶菌酶中所示位置（31-33）等同的位置引入两个氨基酸取代以改善体外（在缓冲液和/或培养基中）和体内抗菌活性（在动物感染模型中）两者，分别生成经修饰的衍生物GN147和GN146。

[0074] 修饰GN3溶素多肽以包含氨基酸取代，特别是R101D和R117H氨基酸取代。这产生经修饰的多肽GN147。这些氨基酸取代导致pI从GN3多肽的9.98降至GN147多肽的9.39。

[0075] GN4溶素被修饰成包含氨基酸取代，特别是K99D、R115H。这产生经修饰的溶素多肽GN146。这些氨基酸取代导致pI从GN4多肽的9.58降至GN146多肽的8.01。

[0076] 基于与人溶菌酶（HuLYZ）中的突变的粗略比较，估量GN3和GN4中每个突变的位置，因为HuLYZ在氨基酸序列水平上与GN3或GN4没有显著同源性。

[0077] 尽管在氨基酸水平上溶素GN3和GN4与T4溶菌酶并不相似，但它们具有类似的大小。其结构的排列揭示了荷电残基。因此，仅通过T4溶菌酶的一级序列中大致相同位置的GN3和GN4中荷电残基的存在来判断等价性。再次，如上所述，通常，荷电氨基酸被无电荷氨基酸取代，并筛选突变体的活性。

[0078] 还引入了GN3和GN4多肽两者的另外修饰，包括添加N-末端肽序列（GPRRPRRPGRAPV - SEQ ID NO:28）（源自Daniels和Schepartz，2007（34）所述的大得多的抗微生物肽（AMP）），分别生成GN205和GN156。

[0079] GN溶素多肽可通过添加pI修饰突变来进一步修饰。在一个实施方案中，将氨基酸取代（R101D）和（R117H）引入到GN3溶素中以产生GN147溶素。在另一个实施方案中，将氨基酸取代（K99D）和（R115H）引入到GN4溶素中以产生GN146溶素。

[0080] GN4多肽还通过添加两种不同的先前描述的N-末端阳离子AMP进行修饰，它们分别是经Briers et al. 2014（36）先前描述的接头结构域AGAGAGAGAGAGAGAS（SEQ ID NO:31）连接于GN4的KFFKFFKFFK（SEQ ID NO:29）或KRKKRKKRK（SEQ ID NO:30）（35,36），分别生成经修饰的溶素GN92和GN54。

[0081] 溶素GN37、GN150和GN203（各自均为VanY超家族的成员）的修饰通过添加C-末端AMP（RKKTRKRLKKIGKVLKWI（SEQ ID NO:32））而产生，该AMP为先前作为猪髓系抗微生物肽-36（PMAP-36）的衍生物开发（22）。通过添加C-末端RI18肽序列对GN37、GN150和GN203进

行修饰分别产生经修饰的衍生物GN121、GN200和GN204。还包括另外的修饰,藉此上述AMP (KFFKFFKFFK - SEQ ID NO:29) (35)和接头结构域(AGAGAGAGAGAGAGAS - SEQ ID NO:31) (36)被附加到GN37的N-末端,以产生经修饰的溶素GN94。

[0082] 不认为用于制备GN121、GN156、GN200、GN201、GN202、GN204和GN205的肽先前已用于修饰溶素。使用它们的基本原理如下:1) 当添加到指定的溶素中时,AMP和溶素两者的预测二级结构不会明显改变或完全不改变(如使用已知的蛋白结构预测程序确定的),2) 这些肽先前已在文献中描述为具有有效活性;和3) 在血清中测试了这些AMP并发现了有效活性。GN92和GN9中使用的肽也是如此。然而,当AMP融合于溶素时,在这些构建体中也使用接头序列来连接AMP和溶素,以获得AMP适当的二级结构(密切类似于游离AMP的二级结构)。

[0083] 对于GN54,AMP和接头两者先前均已用于修饰溶素,但在文献中未见有关血清中活性的报道。GN54在血清中确实有活性。

[0084] 已将溶素GN3、GN9、GN10、GN13、GN17、GN105、GN108、GN123和GN150合成和/或重组生产,并纯化至(> 90%)同质性,且以一系列活性测定进行检查。使用以两种培养基类型(CAA和补充有25%人血清的CAA (“CAA/HuS”))培养的铜绿假单胞菌进行MIC测定。在CAA和CAA/HuS两者中均抑制许多GN溶素(包括表4中的对照T4溶菌酶)的活性。

[0085] 对于此处检查的9种新的GN溶素(即GN3、GN9、GN10、GN13、GN17、GN105、GN108、GN123和GN150)组,我们在CAA和CAA/HuS两者中观察到的MIC均在2-> 128范围内。

[0086] 将经修饰的溶素GN54、GN92、GN94、GN121、GN146和GN147各自纯化至(> 90%)同质性,并以一系列体外活性测定进行检查。CAA/HuS中每种GN溶素的MIC值(以 $\mu\text{g/mL}$ 计)如下:GN54,2;GN92,4;GN94,2;GN121,0.5;GN146,2;GN147,4,如表4所示。

[0087] 表4:纯化的GN溶素的最小抑制浓度(MIC)分析。

溶素	溶素类型	CAA中的MIC ($\mu\text{g/mL}$)	CAA/HuS中的MIC ($\mu\text{g/mL}$)
GN3	天然	16	16
GN147	修饰的GN3	2	4
GN4	天然	64	16
GN146	修饰的GN4	2	2
GN156	修饰的GN4	32	2
GN54	修饰的GN4	64	2
GN92	修饰的GN4	32	4
GN37	天然	>128	32
GN121	修饰的GN37	0.5	0.5
GN94	修饰的GN37	16	2
GN9	天然	8	2
GN10	天然	8	16
GN13	天然	8	>128
GN17	天然	32	16
GN105	天然	>128	32
GN108	天然	8	8
GN123	天然	2	128

GN150	天然	2	32
GN126	天然 (对照)	2	128
T4 LYZ	天然 (对照)	>128	>128

显著的是,使用CAA/HuS测定的每种亲本溶素分子GN3、GN4和GN37的MIC值(以 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 计)分别为16、16和32;因此,每种物质的修饰导致人血清中活性的改善。T4溶菌酶(MIC = $>128 \mu\text{g}/\text{mL}$)作为在人血清中无活性的GN溶素的对照标准品包括在内。GN126 (MIC = $128 \mu\text{g}/\text{mL}$)也作为对照包括在内,并且对应于Art-175 (37);Art-175为一种artilysin,如文献所述,由AMP SMAP-29与GN溶素KZ144的融合物组成。

[0088] 除MIC分析之外,还显示经修饰的GN溶素(GN54、GN92、GN94、GN121、GN146和GN147)具有有效的抗生物膜活性,其中最小生物膜根除浓度(MBEC)值在 $0.25-2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内,参见表5。

[0089] GN3、GN9、GN10、GN13、GN17、GN105、GN108和GN123中的每一种均显示出有效的抗生物膜活性,MBEC值在 $0.125-4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内(表5),并且无任何溶血活性(表6)。预计与亲本溶素相比较,其余经修饰的溶素将对生物膜呈现出改善的活性,并且在存在包括人血清在内的血液基质的情况下,还将具有降低或消除的溶血特性以及增加的活性。

[0090] 表5:纯化的GN溶素的最小生物膜根除浓度(MBEC)分析

溶素	溶素类型	MBEC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
GN3	天然	0.25
GN147	修饰的GN3	0.25
GN4	天然	1
GN146	修饰的GN4	2
GN156	修饰的GN4	0.5
GN54	修饰的GN4	n.d.
GN92	修饰的GN4	0.5
GN37	天然	0.25
GN121	修饰的GN37	0.25
GN94	修饰的GN37	2
GN9	天然	0.125
GN10	天然	0.5
GN13	天然	0.125
GN17	天然	0.125
GN105	天然	4
GN108	天然	0.125
GN123	天然	4
GN150	天然	0.25

经修饰的GN溶素(GN54、GN92、GN94、GN121、GN146和GN147)也显示出无溶血活性(MHC值 $> 128 \mu\text{g}/\text{mL}$),参见表6。

[0091] 表6:纯化的GN溶素的最小溶血浓度(MHC)分析

溶素	溶素类型	MHC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
----	------	---------------------------------

GN3	天然	>128
GN147	修饰的GN3	>128
GN4	天然	>128
GN146	修饰的GN4	>128
GN156	修饰的GN4	>128
GN54	修饰的GN4	>128
GN92	修饰的GN4	>128
GN37	天然	>128
GN121	修饰的GN37	>128
GN94	修饰的GN37	>128
GN9	天然	>128
GN10	天然	>128
GN13	天然	>128
GN17	天然	>128
GN105	天然	>128
GN108	天然	>128
GN123	天然	>128
GN150	天然	>128

经修饰的GN溶素 (GN54、GN92、GN94、GN121、GN146和GN147) 也显示出具有时间-杀灭形式的杀菌活性,如由到溶素添加之后3小时CFU降低 $\geq 3\text{-Log}_{10}$ 所定义的。参见表7和表8。

[0092] 在时间-杀灭测定形式中,GN3、GN17、GN108、GN123和GN150各自在以CAA/HuS或HEPES缓冲液中浓度为10 $\mu\text{g/mL}$ 加入之后3小时的时间点均表现出杀菌活性 (分别为表7和8)。

[0093] 表7. CAA/HuS中纯化的GN溶素活性的时间-杀灭分析

溶素	溶素类型	Log ₁₀ CFU/mL		
		T = 0	T = 1 hr	T = 3 hr*
无	缓冲液对照	7.8	7.7	7.2
GN3	天然	7.8	5.8	<3.7‡
GN147	修饰的 GN3	7.8	6.5	4.2‡
GN4	天然	7.8	6.0	<3.7‡
GN146	修饰的 GN4	7.8	5.9	4.0‡
GN156	修饰的 GN4	7.8	5.7	<3.7‡
GN54	修饰的 GN4	7.8	n.d.	n.d.
GN92	修饰的 GN4	7.8	6.2	<3.7‡
GN37	天然	7.8	6.2	<3.7‡
GN121	修饰的 GN37	7.8	7.4	<3.7‡
GN94	修饰的 GN37	7.8	6.4	<3.7‡
GN9	天然	7.8	6.8	7.3
GN10	天然	7.8	7.4	7.4
GN13	天然	7.8	n.d.	n.d.
GN17	天然	7.8	6.4	4.2‡
GN105	天然	7.8	7.0	6.3
GN108	天然	7.8	5.7	<3.7‡
GN123	天然	7.8	6.7	<3.7‡
GN150	天然	7.8	6.0	<3.7‡

*检测限为3.7 Log₁₀ CFU/mL。‡表示杀菌活性。

[0094] 表8:HEPES缓冲液中纯化的GN溶素活性的时间-杀灭分析

溶素	溶素类型	Log ₁₀ CFU/mL		
		T = 0	T = 1 hr	T = 3 hr*
无	缓冲液对照	7.8	7.7	7.2
GN3	天然	7.8	<3.7‡	<3.7‡
GN147	修饰的 GN3	7.8	<3.7‡	<3.7‡
GN4	天然	7.8	5.7	<3.7‡
GN146	修饰的 GN4	7.8	6.7	<3.7‡
GN156	修饰的 GN4	7.8	5.7	<3.7‡
GN54	修饰的 GN4	7.8	n.d.	n.d.
GN92	修饰的 GN4	7.8	5.7	<3.7‡
GN37	天然	7.8	6.3	<3.7‡
GN121	修饰的 GN37	7.8	<3.7‡	<3.7‡
GN94	修饰的 GN37	7.8	6.0	<3.7‡
GN9	天然	7.8	6.7	5.7
GN10	天然	7.8	5.7	<3.7‡
GN13	天然	7.8	n.d.	n.d.
GN17	天然	7.8	5.4	<3.7‡
GN105	天然	7.8	6.6	<3.7
GN108	天然	7.8	6.4	<3.7‡
GN123	天然	7.8	5.6	<3.7‡
GN150	天然	7.8	5.7	<3.7‡

*检测限为3.7 Log₁₀ CFU/mL。‡表示杀菌活性。

[0095] 使用CAA/HuS以棋盘测定检查GN溶素的子集 (GN4、GN37、GN108和GN150), 并显示出其与多种抗生素 (包括阿米卡星、阿奇霉素、氨曲南、环丙沙星、粘菌素、利福平、妥布霉素、磷霉素、庆大霉素、哌拉西林或碳青霉烯如亚胺培南、美罗培南和哌拉西林 (表9)) 具有协同作用, 并且其对革兰氏阴性菌例如耐碳青霉烯的临床菌株WC-452表现出活性。

[0096] 如表9所示, 经修饰的溶素GN92、GN121和GN147各自也均在CAA/HuS中显示出与多

种抗生素(包括阿米卡星、阿奇霉素、氨曲南、环丙沙星、粘菌素、利福平、妥布霉素、磷霉素、庆大霉素、哌拉西林或碳青霉烯如亚胺培南、美罗培南和哌拉西林)具有协同作用,并对革兰氏阴性菌例如耐碳青霉烯的临床菌株WC-452表现出活性。这些数据表明,在存在人血清的情况下,协同作用将在体内持续存在。确定了所有组合的分级抑制浓度指数(Fractional inhibitor concentration index,FICI)值; <0.5 的值指示协同作用。

[0097] 此外,这些协同作用数据还表明,在一些实施方案中,本发明的溶素将能够驱动包括MDR生物体(例如实施例中所述的耐碳青霉烯的铜绿假单胞菌)在内的革兰氏阴性菌的重新敏感化。一般来说,重新敏感化发生在协同组合中,其中抗生素MIC值低于确立的断点,例如抗生素敏感细菌的MIC值 ≤ 2 ,中间敏感细菌的MIC值为4,抗生素抗性细菌例如耐碳青霉烯的分离株的MIC值 ≥ 8 。参见临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI), CLSI. 2019. M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 第29版. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA

表9:纯化的GN溶素与抗生素的棋盘分析

	阿米卡星	阿奇霉素	氨曲南	环丙沙星	粘菌素	利福平	妥布霉素
GN4	0.531	0.094	0.156	0.250	0.156	0.156	0.375
GN92	0.375	0.063	0.188	0.281	0.094	0.094	0.500
GN147	0.375	0.250	0.188	0.281	0.188	0.281	0.5
GN37	0.125	0.188	0.531	0.281	0.156	0.281	0.156
GN121	0.375	0.188	0.625	0.313	0.375	0.313	0.188
GN108	0.156	0.060	0.250	0.281	0.133	0.125	0.188
GN150	0.313	0.125	0.188	0.250	0.094	0.094	0.500

表9(续)

溶素	磷霉素	庆大霉素	亚胺培南	美罗培南	哌拉西林
GN37	0.313	0.313	0.313	0.500	0.375
GN108	0.188	0.188	0.039	0.250	0.531
GN4	0.250	0.375	0.125	n.d.	0.313
GN92	0.500	0.375	0.125	0.375	0.500
GN147	0.250	0.375	0.375	0.375	0.188
GN121	0.375	0.375	0.375	0.313	0.375
GN123	0.250	0.375	0.188	0.125	0.500
GN150	0.375	0.375	0.375	n.d.	0.500

基于特定GN溶素在存在人血清情况下的活性(和基于其氨基酸序列的性质和与其他溶素的同源性以及蛋白的表达和纯化概况),预计溶素GN3、GN9、GN10、GN13、GN17、GN105、GN108、GN123、GN150和203为以其天然溶素形式或以本文所述的方式进一步修饰(即一般地用非荷电残基取代1-3个荷电氨基酸残基(并且在不存在和存在人血清的情况下保持活性),和/或在N-或C-末端融合于具有 α 螺旋结构的AMP肽)之后进行进一步开发的优良候选物。

[0098] 对应于GN200-GN205的经修饰的溶素仍在分析中,并且可具有类似于GN54、GN92、

GN94、GN121、GN146和GN147的活性。

[0099] 在存在人血清的情况下鉴定了具有不同活性水平的GN-溶素。另外,获得了经修饰的GN-溶素,并且证明与亲本溶素或已知溶菌酶(T4)或已知的artilysin (GN126)相比较,在存在人血清的情况下呈现出改善的活性。此外,与本文所述的抗生素协同作用的本发明溶素可用于使抗生素抗性细菌重新敏感。

[0100] 本文公开的特定实施方案可使用“由...组成”和/或“基本上由...组成”的语言在权利要求中进一步限制。当在权利要求中使用,无论是原始提交的还是根据修改增加的,过渡术语“由...组成”不包括权利要求中未指定的任何要素、步骤或成分。过渡术语“基本上由...组成”将权利要求的范围限制为指定的材料或步骤以及不会实质性地影响基本和新颖特征的那些材料或步骤。如此要求保护的本发明的实施方案在本文中固有或明确地描述和能够实现。申请人保留放弃本文描述的任何实施方案或特征的权利。

实施例

[0101] 实施例1. 细菌菌株和生长条件. 使用从纽约特种外科医院(the Hospital for Special Surgery)获得的(由病理和实验室医学(Pathology and Laboratory Medicine)教授Lars Westblade博士提供的)人血中的铜绿假单胞菌临床分离株(CFS-1292)进行抗菌筛选。菌株CFS-1292在溶源性肉汤(LB; Sigma-Aldrich)、酪蛋白氨基酸(CAA)培养基(5 g/L酪蛋白氨基酸, Ameresco/VWR; 5.2 mM K_2HPO_4 , Sigma-Aldrich; 1 mM $MgSO_4$, Sigma-Aldrich)或补充有25%人血清(AB型,男性,合并;Sigma-Aldrich)的CAA中进行培养。对于本公开的目的,铜绿假单胞菌的特定分离株并不重要,并且本实验中可使用市售可获得的分离株。

[0102] 实施例2. 基因合成与克隆. 所有溶素和经修饰的溶素均作为gBlocks (IDT Technologies)进行合成,并通过重叠延伸PCR或通过兼容粘性末端的连接克隆到阿拉伯糖诱导表达载体pBAD24 (24)中。将所有构建体转化到大肠杆菌菌株TOP10 (Thermo Fisher Scientific)中。可使用其他市售可获得的表达载体和系统。

[0103] 实施例3. 具有固有活性的溶素的鉴定. 在铜绿假单胞菌基因组序列的GenBank数据库中鉴定出一组多达250种推定的溶素和溶素样酶。使用3种搜索方法:i) 使用已知溶素的查询序列对所有铜绿假单胞菌基因组进行有针对性的BLASTp筛选,ii) 对所有带注释的铜绿假单胞菌基因组进行基于关键词的搜索,重点是溶素(和细胞壁水解酶)催化和结合结构域相关的所有超家族名称;和iii) 在非注释基因组的噬菌体序列中目视搜索溶素样基因。一旦鉴定,就将溶素序列合成为gBlocks,克隆到pBAD24中并转化到大肠杆菌TOP10细胞中。然后使用基于琼脂覆盖板的方法(11,13)以初级抗菌活性筛选(针对活铜绿假单胞菌)对大肠杆菌克隆进行检查,所述方法具有修改,以允许检测包含悬浮于50 mM Tris缓冲液(pH7.5)中的软琼脂的覆盖物中的GN溶素活性。鉴定出一组109种溶解克隆,并将其选择用于进行表达和纯化。

[0104] 实施例4. 溶素和经修饰的溶素的表达和纯化.

广泛种类的宿主/表达载体组合可用于表达编码本公开溶素多肽的多核苷酸序列。大量合适的载体为本领域技术人员已知的,并且是可市售获得的。合适的载体的实例提供于Sambrook et al,编辑, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第3版),

Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory (2001) 中。这种载体尤其包括染色体、附加型和病毒衍生的载体,例如衍生自细菌质粒、噬菌体、转座子、酵母附加体、插入元件、酵母染色体元件、病毒(比如杆状病毒、乳多空病毒比如SV40、牛痘病毒、腺病毒、禽痘病毒、假性狂犬病毒和逆转录病毒)的载体以及衍生自其组合的载体(比如衍生自质粒和噬菌体遗传元件的那些载体,比如粘粒和噬菌粒)。此外,所述载体可提供本公开溶素多肽的组成型或诱导型表达。更具体地讲,合适的载体包括(但不限于)SV40的衍生物和已知的细菌质粒(例如大肠杆菌质粒colE1、pCR1、pBR322、pMB9及其衍生物)、质粒(比如RP4、pBAD24和pBAD-TOP0)、噬菌体DNAs(例如噬菌体λ的许多衍生物,例如NM989及其他噬菌体DNA,例如M13和丝状单链噬菌体DNA)、酵母质粒(比如2D质粒或其衍生物)、可用于真核细胞的载体(比如可用于昆虫或哺乳动物细胞的载体)、衍生自质粒和噬菌体DNA的组合的载体(比如经修饰以使用噬菌体DNA或其他表达控制序列的质粒)等。上述许多载体可从供应商比如New England Biolabs、Addgene、Clontech、Life Technologies等市售获得,其中许多还提供合适的宿主细胞。

[0105] 另外,载体可包含各种调控元件(包括启动子、核糖体结合位点、终止子、增强子、用于控制表达水平的各种顺式元件),其中根据宿主细胞构建载体。在这些载体中可使用广泛种类的表达控制序列(控制与其可操作地连接的多核苷酸序列的表达的序列)中的任何一种,以表达编码溶素多肽的多核苷酸序列。有用的控制序列包括(但不限于):SV40、CMV、牛痘、多瘤或腺病毒的早期或晚期启动子、lac系统、trp系统、TAC系统、TRC系统、LTR系统、噬菌体λ的主要操纵子和启动子区域、fd外壳蛋白的控制区域、3-磷酸甘油酸激酶或其他糖酵解酶的启动子、酸性磷酸酶(例如Pho5)的启动子、酵母-交配因子的启动子、用于在细菌中表达的大肠杆菌启动子以及已知控制原核或真核细胞或其病毒的基因表达的其他启动子序列及其各种组合。

[0106] 广泛种类的宿主细胞可用于表达本公开的溶素多肽。适合于表达本公开溶素多肽的宿主细胞的非限制性实例包括众所周知的真核和原核宿主,比如大肠杆菌、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、真菌比如酵母的菌株和动物细胞比如CHO、R1.1、B-W和L-M细胞、非洲绿猴肾细胞(例如COS 1、COS 7、BSC1、BSC40和BMT10)、昆虫细胞(例如Sf9)以及组织培养中的人类细胞和植物细胞。尽管表达宿主可为任何已知的表达宿主细胞,但是在优选的实施方案中,表达宿主为大肠杆菌的菌株之一。这些包括(但不限于)市售可获得的大肠杆菌菌株,比如Top 10 (Thermo Fisher Scientific)、DH5oc (Thermo Fisher Scientific)、XL1-Blue (Agilent Technologies)、SCS110 (Stratagene)、JM109 (Promega)、LMG194 (ATCC)和BL21 (Thermo Fisher Scientific)。使用大肠杆菌作为宿主系统有几个优点,包括:快速生长动力学,其中在最佳环境条件下其倍增时间为约20分钟(Sezonov et al., J. Bacteriol. 189 8746-8749 (2007));易于实现高密度培养;用外源性DNA的简便快速转化等。Rosano, G.和Ceccarelli, E., Front Microbiol., 5: 172 (2014)详细讨论了关于大肠杆菌中蛋白表达的细节,包括质粒选择以及菌株选择。

[0107] 溶素多肽及其载体的有效表达取决于多种因素,比如最佳表达信号(在转录和翻译两者水平上)、正确的蛋白折叠和细胞生长特征。关于构建载体的方法和将构建的重组载体转导到宿主细胞中的方法,可利用本领域已知的常规方法。尽管理解的是,并非所有载

体、表达控制序列和宿主均同样良好地起作用以表达编码本公开溶素肽的多核苷酸序列，但是本领域的技术人员将能够选择合适的载体、表达控制序列和宿主而无需进行过度实验即可完成期望的表达而不背离本公开的范围。在一些实施方案中，已经发现表达水平和所表达多肽的活性之间的相关性；特别是在大肠杆菌表达系统中，中等水平的表达（例如约1-10 mg/L之间）产生的溶素多肽的活性水平要高于在大肠杆菌中以较高水平表达（例如约20-约100 mg/L之间）的溶素多肽，后者有时产生完全无活性的多肽。

[0108] 本公开的溶素多肽可通过众所周知的方法从重组细胞培养物中回收和纯化，所述方法包括而不限于硫酸铵或乙醇沉淀、酸提取、阴离子或阳离子交换色谱、磷酸纤维素色谱、疏水相互作用色谱、亲和色谱、羟基磷灰石色谱和凝集素色谱。高效液相色谱也可用于溶素多肽纯化。

[0109] 或者，用于产生本公开溶素多肽的载体系统可为无细胞表达系统。各种无细胞表达系统为可市售获得的，包括（但不限于）可从Promega、LifeTechnologies、Clonetech等获得的那些。

[0110] 蛋白的溶解和纯化（使用一种或多种色谱技术）在缓冲良好的溶液中进行，该溶液含有合适的离子强度的一价盐，例如相当于300-500 mM NaCl的离子强度。

[0111] 固定化金属亲和色谱（IMAC）优选地用作初始纯化步骤。如果需要另外的纯化，可在另一步骤中使用尺寸排阻色谱（凝胶过滤）。如果必要，可将离子交换色谱用作最终步骤。

[0112] 使用一系列诱导时间和温度来确定蛋白表达和纯化的最佳条件。主要方法已在先前研究中进行描述（11, 13, 25）。简而言之，在24°C-37°C下在2-24小时时间内，在LB和RM培养基（Thermo Fisher Scientific）两者中均诱导了每种表达克隆的重复。然后使诱导的培养物沉淀，并使用BugBuster（Millipore Sigma）破坏，之后通过SDS-PAGE和考马斯染色评价可溶性蛋白的表达。然后使用表达每种溶素的最佳条件扩大生产规模。使用阴离子交换（HiTrap DEAE FF）、阳离子交换（HiTrap Capto MMC）、疏水相互作用柱（HiTrap Phenyl FF）和/或尺寸排阻柱（HiLoad 16/600 SuperDex）和运行Unicorn 6.3软件的Akta™ Pure FPLC系统纯化。有时使用添加Mg²⁺来提高溶解度并增加与色谱树脂的结合能力。在纯化期间，使用还原性SDS Page凝胶通过分子量鉴定靶GN溶素。在最后的纯化步骤之后，合并含有目标GN溶素的级分，将缓冲液更换为pH值在7.2-9.0范围内（取决于蛋白的pI）的25 mM Tris 150 mM氯化钠，并浓缩至约2 mg/mL。通过NanoDrop测量浓度，并将蛋白以500 μL等分试样储存于-80°C下。

[0113] 实施例5. 最小抑制浓度（MIC）的测定。使用临床和实验室标准协会（Clinical and Laboratory Standards Institute）（CLSI）定义的标准肉汤微量稀释参考方法的修改，确定每种GN溶素对铜绿假单胞菌的最小抑制浓度（26）。该修改基于用CAA培养基或补充有25%人血清的CAA置换Mueller Hinton Broth。

[0114] 实施例6. 最小生物膜根除浓度（MBEC）的确定。CF-301的MBEC使用具有修改的肉汤微量稀释MIC方法的变体确定（27, 28）。在此，将铜绿假单胞菌菌株ATCC 17647的新鲜菌落悬浮于PBS（0.5 McFarland单位）中，在TSBg（补充有0.2%葡萄糖的胰蛋白酶大豆肉汤）中以1:100稀释，作为0.15 ml等分试样添加到Calgary Biofilm Device（盖子上带有96个聚碳酸酯钉的96孔板；Innovotech）中，并在37°C下温育24小时。洗涤生物膜，并在37°C下用以TSBg进行2倍稀释系列的CF-301处理24小时。所有样品一式三份进行检查。处理之后，

洗涤孔,在37℃下风干并用0.05%结晶紫染色10分钟。染色之后,将生物膜在33%乙酸中脱色,并测定所提取的结晶紫的OD₆₀₀。每个样品的MBEC为通过结晶紫定量评价的去除>95%的生物膜生物量所需的最小药物浓度。

[0115] 实施例7. 检查与抗生素的协同作用的棋盘测定. 棋盘测定基于对CLSI方法的修改,该方法用于通过肉汤微量稀释进行MIC测定(26,29)。通过首先准备96孔聚丙烯微量滴定板的列来构建棋盘,其中每孔具有相同量的沿水平轴稀释2倍的抗生素。在单独的板中,准备可比较的行,其中每孔具有相同量的沿垂直轴稀释2倍的GN溶素。然后将GN溶素和抗生素稀释液合并,使得每列具有恒定量的抗生素和GN溶素的倍增稀释液,而每行具有恒定量的GN溶素和抗生素的倍增稀释液。因此,每孔具有GN溶素和抗生素的独特组合。在含有25%人血清的CAA中,将细菌以 1×10^5 CFU/mL的浓度添加到药物组合中。然后在37℃下于环境空气中16小时之后记录单独和组合的每种药物的MIC。计算每种药物的分级抑菌浓度总和(Σ FIC),并使用最小 Σ FIC值(Σ FICmin)确定协同作用。 Σ FIC的计算如下: Σ FIC= FIC A + FIC B,其中FIC A为组合中每种抗生素的MIC/单独的每种抗生素的MIC,和FIC B为组合中每种GN溶素的MIC/单独的每种GN溶素的MIC。当 Σ FIC $\leq$ 0.5时,组合认为是协同的;当 Σ FIC>0.5至<1时,认为是强加性的;当 Σ FIC为1-<2时,认为是加性的;和当 Σ FIC $\geq$ 2时,认为是拮抗的。

[0116] 实施例8. GN溶素溶血活性的测定. GN溶素的溶血活性作为人红细胞溶解释放的血红蛋白的量来测量(30)。简而言之,将3 ml从合并的健康供体(BioreclamationIVT)中获得的新鲜人血细胞(hRBC)在含有肝素的聚碳酸酯试管中于4℃下以1000 $\times$ g离心5分钟。将获得的红细胞用磷酸盐缓冲盐水(PBS)溶液(pH 7.2)洗涤3次,并重悬于30 PBS中。将50 μ l体积的红细胞溶液与50 μ l每种GN溶素(在PBS中)以2倍稀释范围(从128 μ g/mL到0.25 μ g/mL)在37℃下一起温育1小时。通过在4℃下以1000 $\times$ g离心5分钟沉淀完整的红细胞,并将上清液转移至新的96孔板中。通过测量570 nm处的吸光度来监测血红蛋白的释放。作为阴性对照,将PBS中的hRBC用0.1% Triton X-100进行如上处理。

[0117] 实施例9. GN溶素活性的时间-杀灭试验. 将铜绿假单胞菌的过夜培养物以1:50稀释到新鲜的CAA培养基中,并伴随搅拌于37℃下生长2.5小时。然后使指数期细菌沉淀并重悬于1/5培养体积的25 mM HEPES (pH7.4)中,之后最终调节至对应于McFarland值为0.5的光密度。然后将经调节的培养物以1:50稀释到25 mM HEPES (pH7.4)或CAA/HuS中,并以10 μ g/mL的最终浓度添加GN溶素。无添加溶素的对照培养物(即缓冲液对照)包括在内。将所有处理物在37℃下伴随通气进行温育。在添加溶素(或缓冲液对照)之前的时间点以及之后的1小时和3小时间隔,取出培养样品以在CAA琼脂平板上定量铺板。

[0118] 实施例10. 使用抗生素与溶素的组合使耐碳青霉烯的临床菌株重新敏感化。

[0119] 通过将GN121和GN123的每一种与两种碳青霉烯类,即亚胺培南(IPM)或美罗培南(MEM)相组合,评估了前述每种溶素使耐碳青霉烯的铜绿假单胞菌菌株对碳青霉烯类重新敏感的能力。评估了多达七种耐碳青霉烯的分离株。重新敏感化发生在协同组合中,其中碳青霉烯MIC值低于确立的断点,例如碳青霉烯敏感分离株的MIC值 $\leq$ 2,中间敏感碳青霉烯分离株的MIC值为4,耐碳青霉烯的分离株的MIC值 $\geq$ 8。参见临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI), CLSI. 2019. M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 第29版. Clinical and

Laboratory Standards Institute, Wayne, PA。

[0120] 如表10-13所示,与GN123或GN121的协同组合显示,对于所检测的七种碳青霉烯类中的每一种,IPM和MEM MIC降低到低于断点值。这些观察结果与重新敏感化是一致的。溶素使抗生素抗性菌株对常规抗生素重新敏感的这种新能力表明,这些生物制剂作为对抗和逆转抗微生物剂抗性的治疗剂的益处。

[0121] 表10. 使用亚胺培南和GN123的组合的革兰氏阴性菌重新敏感化

分离株	亚胺培南 MIC (μg/mL)		GN123 (μg/mL)		FICI
	单独	组合	单独	组合	
PA19	32 (R)	0.5 (S)	8	0.125	0.03
额外的碳青霉烯 ^R 分离株的分析:					
PA20	16 (R)	1(S)	16	2	0.188
PA21	32 (R)	0.5(S)	8	1	0.141
PA22	16 (R)	2(S)	16	1	0.188
PA23	8 (R)	0.25(S)	8	2	0.281
PA24	32 (R)	2(S)	16	2	0.188
WC-452	16 (R)	1(S)	16	2	0.188

(R)= 抗性 (S)= 敏感

表11. 使用美罗培南和GN123的组合的革兰氏阴性菌重新敏感化

分离株	美罗培南 MIC (μg/mL)		GN123 (μg/mL)		FICI
	单独	组合	单独	组合	
PA19	32 (R)	0.5 (S)	8	0.25	0.046
PA20	16 (R)	0.5 (S)	16	1	0.094
PA21	32 (R)	1 (S)	8	1	0.156
PA22	16 (R)	1(S)	16	1	0.125
PA23	16 (R)	0.5 (S)	8	1	0.156
PA24	32 (R)	2 (S)	16	0.5	0.094
WC-452	16 (R)	1 (S)	16	1	0.125

(R)= 抗性 (S)= 敏感

表12. 使用亚胺培南和GN121的组合的革兰氏阴性菌重新敏感化

分离株	亚胺培南 MIC ($\mu\text{g/mL}$)		GN121 ($\mu\text{g/mL}$)		FICI
	单独	组合	单独	组合	
PA19	32 (R)	1 (S)	1	0.125	0.155
PA20	16 (R)	0.5 (S)	1	0.25	0.265
PA21	32 (R)	1 (S)	1	0.125	0.155
PA22	32 (R)	2 (S)	2	0.25	0.188
PA23	16 (R)	0.125 (S)	1	0.25	0.257
PA24	32 (R)	1(S)	1	0.125	0.155

(R) = 抗性 (S)= 敏感

表13. 使用美罗培南和GN121的组合的革兰氏阴性菌重新敏感化

分离株	美罗培南 MIC ($\mu\text{g/mL}$)		GN121 ($\mu\text{g/mL}$)		FICI
	单独	组合	单独	组合	
PA19	32 (R)	1	2	0.5	0.281
PA20	16 (R)	1	2	0.5	0.313
PA21	32 (R)	2	1	0.125	0.188
PA22	16 (R)	1	1	0.25	0.313
PA23	16 (R)	2	2	0.5	0.375
PA24	32 (R)	1	1	0.125	0.156
WC-452	16 (R)	1	1	0.06	0.123

(R) = 抗性; (S)= 敏感

计划的体内实验

目前正在如下进行一项或多项实验以测试本发明多肽的体内活性:

A. 在急性致死菌血症小鼠模型中的试验PK筛选和功效

为了鉴定具有全身性暴露的GN溶素,将在用作为单次IV注射给予的GN溶素治疗的CD1小鼠中进行PK筛选。将使用适合小鼠血清的研究级生物分析测定分析多达10种GN溶素的血液PK特征。预计将鉴定出具有适当PK特征的多种GN溶素。将以全身性感染模型测试显示达到大于1的AUC/MIC浓度的血液暴露的候选物。对于该模型,铜绿假单胞菌菌株(PA01和其他临床分离株)将被重悬于猪胃粘蛋白中,并通过腹膜内给予以接种物给予到CD1小鼠体内,该接种物在对照小鼠中在24-48小时内产生完全发病率和死亡率。在致死性攻击后2小时,通过侧尾静脉中的静脉内(IV)注射给予小鼠媒介物或GN溶素。在72小时内评价发病率和死亡率。预计以适当的剂量浓度,与媒介物对照相比较,经GN溶素治疗的小鼠将显示出降低的发病率和死亡率。研究可能涉及抗生素的共同给予。A. 生存数据将使用GraphPad prism通过Kaplan Meyer生存分析进行分析,对每种分子计算50%的有效浓度(EC50)。预计将鉴定出具有体内活性的多种GN溶素。

[0122] B. GN溶素在已建立的鼠侵袭性感染模型中的功效

该实验和其他小鼠感染模型(比如肺和肾)的目标为在这些模型中生成功效数据。在该子目标中提出的功效模型通常利用小鼠组织(大腿、肺或肾)中的细菌感染。用溶素治疗后,在实验结束时对组织中的细菌负荷进行定量(CFU/克组织),以评价治疗的稳健性。另

外,这些模型中的每一个均可用于定义PK/PD指数和功效幅度,例如AUC/MIC。因此,这些模型将用于评估代表性GN抗假单胞菌属溶素单独或与抗生素组合在鼠肺感染模型中的功效,以确定用于进一步体内测试和开发的最佳GN溶素候选物。可使用鲍曼不动杆菌建立类似模型,并用于测试本发明溶素的功效。

[0123] B.1鼠中性粒细胞减少大腿感染和肺感染模型

大腿感染模型

为了建立第一个模型,按照给药方案,通过腹膜内给予20 mg/mL的环磷酰胺使得CD-1小鼠($n = 12$)中性粒细胞减少,所述给药方案提供中性粒细胞计数减少超过99% (第4天为150 mg/kg和第1天为100 mg/kg)。在第二剂免疫抑制剂之后24小时,通过向两大腿外侧肌肉肌内(IM)注射适当的铜绿假单胞菌接种物(3×10^4 或 1×10^5 或 3×10^5 或 1×10^6 cfu/大腿)建立大腿感染。在吸入麻醉下,通过肌内注射到两大腿外侧肌肉进行小鼠感染。每条大腿可接受约 1.4×10^5 CFU鲍曼不动杆菌NCTC 13301 (和/或等量的铜绿假单胞菌菌株)。但是如果测试表明合适的话,可对接种物的量进行调整。

[0124] 在感染后2、6和10小时,通过静脉内(iv)注射,将4只小鼠的组(6,仅媒介物(最末组))给予测试GN溶素或媒介物或对照溶素。在感染后2小时,使用戊巴比妥过量剂量对4只动物的对照组实施人道安乐死,以提供治疗前的对照组(开始)。感染后16小时,通过戊巴比妥对所有其余组实施人道安乐死。取下每只动物的两条大腿并单独称重(视为两项独立评估)。将测试的溶素包括天然和经修饰的溶素,它们具有有前途的特性,即具有显著溶解活性和在存在血液基质的情况下保持显著活性。在本文详述的该实验和其他实验中测试的剂量范围将在0.01-500 mg/kg的宽范围内,但上限可能取决于毒性,而下限可能取决于固有活性而更高。待测试的溶素的实例包括GN108、GN121、GN123和GN156。

[0125] 将单独大腿组织样品在冰冷的无菌磷酸盐缓冲盐水中匀浆。然后将大腿匀浆定量培养到CLED琼脂上,并在37°C下温育24小时,之后计数菌落。预计溶素将导致细菌菌落的显著减少或消除。

[0126] 小鼠肺感染模型

将每次治疗多达8只麻醉(IP注射100 mg/kg氯胺酮/6 mg/kg甲苯噻嗪混合物)小鼠的组通过向每个鼻孔鼻内滴注20 μ l接种物(鼻孔之间5分钟)进行感染,并在感染后保持直立姿势~10分钟。如上所述先前确定合适的接种物的强度和量。

[0127] 铜绿假单胞菌ATCC 27853的接种物浓度为 $\sim 2.5 \times 10^6$ cfu/ml (1.0×10^5 cfu/肺),或鲍曼不动杆菌NCTC 13301的接种物浓度为 $\sim 8.8 \times 10^8$ cfu/ml (3.5×10^7 cfu/肺)。使用相同的给予途径和给药指南将溶素(例如在前述实验中鉴定的溶素)给药,并取出肺,且准备按照大腿模型进行计数。在37°C下温育24小时后计数菌落。将根据小鼠的体重和肺匀浆的细菌负荷来评价功效。如通过显著减少或消除的细菌菌落所测量的,预计溶素在减轻感染方面将令人满意地发挥作用。

[0128] B.2中性粒细胞减少鼠肺感染模型

将中性粒细胞减少的BALB/c小鼠用含有足以建立肺感染的接种物的铜绿假单胞菌细菌在麻醉下经鼻内滴注进行接种。在感染后2、6和10小时,通过皮下(SC)注射,将4只小鼠的组(6,仅媒介物(最末组))给予GN溶素、媒介物或对照溶素。在感染后2小时,使用戊巴比妥过量剂量对4只动物的对照组实施人道安乐死,以提供治疗前的对照组(开始)。感染后

16小时,通过戊巴比妥对所有其余组实施人道安乐死。将动物称重,并取下每只动物的两个肺且单独称重。溶素和给药可与上述相同。

[0129] 将单独肺组织样品在冰冷的无菌磷酸盐缓冲盐水中匀浆。然后将大腿匀浆定量培养到CLED琼脂上,并在37℃下温育24小时,之后计数菌落。根据体重和细菌负荷来评价治疗功效。

[0130] 将每次治疗多达8只麻醉(IP注射100 mg/kg氯胺酮/6 mg/kg甲苯噻嗪混合物)小鼠的组通过向每个鼻孔鼻内滴注铜绿假单胞菌接种物(鼻孔之间5分钟)进行感染,并在感染后保持直立姿势~10分钟。在第-4天以200 mg/kg和第-1天以150 mg/kg皮下给予环磷酰胺对小鼠事先进行免疫抑制。在第二剂免疫抑制之后24小时发生感染。

[0131] 对于铜绿假单胞菌ATCC 27853,起始接种物浓度可为 $\sim 2.5 \times 10^6$ cfu/ml (1.0×10^5 cfu/肺)。可对接种物进行调整,目的是使未经治疗的小鼠细菌负荷增加约1 log 10 cfu/g肺。对于以下所述的存活研究,将选择导致在24-72小时内死亡的接种物。

[0132] 然后将溶素鼻内给药,对小鼠实施安乐死,称重,抽出肺并称重,且取出肺并准备按照大腿模型进行计数。在37℃下温育24小时后计数菌落。可使用与以上相同的溶素和给药。溶素以5 ml/kg静脉内给予。

[0133] 在相关实验中,将选择亚最佳剂量的对革兰氏阴性菌具有活性的抗生素,并与溶素一起以亚阈值水平使用。可通过用低于、处于或高于最小有效剂量的各种剂量的抗生素治疗感染的小鼠来建立适当的亚阈值水平。对照小鼠单独用各种剂量的媒介物治疗。将有一种媒介物作为溶素治疗的替代品,和另一种媒介物作为抗生素的替代品。对于每种测试的溶素,将使用40只小鼠(每组5只)。

[0134] 如果亚胺培南为抗生素,则合适的亚阈值剂量可能在10-100 mg/kg之间(更通常地,亚阈值或亚最佳剂量可为使细菌负荷减少1或2 log的剂量),并例如以5 ml/kg皮下或静脉内给予进行该实验和组合(抗生素+溶素)实验。

[0135] 对于组合实验,考虑抗生素(例如亚胺培南)的剂量将为所测试的最大亚阈值剂量。通过在组合治疗中测试不同剂量的溶素来确定适当的溶素剂量,以观察在何处出现协同作用。然后将选择最佳的溶素和抗生素用量组。感染后2小时给予溶素和抗生素的首次治疗;感染后6小时给予第二次抗生素治疗。感染后9小时收获组织。

[0136] 使用相同的小鼠肺感染模型进行类似研究,但仅评价小鼠的存活。感染的小鼠在感染后24小时给予溶素(或媒介物或对照溶素)。考虑使用3种不同剂量的每种溶素。亚胺培南(或媒介物)将在溶素给药后6小时给予。实验在感染之后72小时结束。考虑存活实验使用每组7只小鼠,即对于每种测试的溶素使用63只小鼠。预计当给予组合时,存活百分比将更好。

[0137] C. 鼠感染模型中的PK/PD分析

描述与功效最密切相关的PK/PD变量(例如C_{max}/MIC、AUC/MIC或%时间/MIC)的使用抗感染剂的动物实验高度预测临床成功(31)。剂量分割用于确定与功效相关的PK/PD参数。通过将单个总剂量分割成一天一次(q24h)、一天两次(q12h)或一天四次(q6h)给药,可在保持恒定AUC的同时获得C_{max}和游离药物时间>MIC (fT>MIC)的多个值。多个剂量的分割产生独特的暴露曲线,其当与功效终点相比较,能够将C_{max}/MIC、fT>MIC和AUC/MIC区分为PK指数和功效所需的幅度。

[0138] 在上文鉴定的一种或多种鼠感染模型中具有稳健活性的GN溶素将进行PK/PD分析。将进行PK研究以生成多个PK曲线,并进行建模以覆盖C_{max}/MIC、AUC/MIC和fT>MIC的范围。剂量分割研究将在如上所述的肺功效模型(小鼠、大鼠或兔)中进行。组织细菌负荷用作PD终点,并通过绘制CFU/g组织与不同PK/PD参数的函数图来分析数据。非线性回归分析将确定哪个PK/PD参数对于功效重要。这些数据将用于告知非临床活动的剂量。

[0139] 一种进行PK研究的方法如下:

表14

剂量水平(mg/kg)	给予途径	样品采集时间点(h)	动物数量/时间点	小鼠总数
10	IV	0.083, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24	3	24
30	IV	0.083, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24	3	24
100	IV	0.083, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24	3	24

在表14所示的时间,对小鼠实施安乐死,并且每个时间点3只小鼠的组通过心脏穿刺采集血液样品。将分离的血浆样品分为两个等分试样。采血后,从气管中形成的狭窄横向开口采集3x支气管肺泡灌洗液样品(PBS)。将3个BAL样品合并并离心以去除细胞碎片。将BAL上清液分为两个等分试样。进一步测试血浆和BAL的一个样品的溶素含量和细菌负荷。分析第二个样品的尿素含量,以计算在采集BAL期间上皮细胞衬液(ELF)的稀释度。

[0140] D. 监测体内抗性的出现

为了确定出现抗性的可能性,对来自小鼠功效研究的体内匀浆进行MIC分析。如果观察到MIC超过2倍的增加,则将细菌铺板,并分离菌落以进行全基因组测序。

[0141] 实施方案

A. 一种药用组合物,其包含:选自GN147、GN146、GN156、GN92、GN54、GN201、GN202、GN121、GN94、GN200、GN204、GN205中的一种或多种的分离的溶素多肽或其具有溶解活性的片段或其具有溶解活性并与所述溶素多肽具有至少80%序列同一性的变体以及药学上可接受的载剂,其中溶素多肽或片段或变体以有效抑制生长或减少群体或杀灭铜绿假单胞菌和任选地至少一种其他革兰氏阴性菌物种的量存在。

[0142] B. 一种药用组合物,其包含有效量的选自GN3、GN13、GN17、GN9、GN10、GN105、GN108、GN123、GN150、GN203中的一种或多种的分离的溶素多肽或其具有溶解活性的片段或其具有溶解活性并与所述溶素多肽具有至少80%序列同一性的变体以及药学上可接受的载剂,其中溶素多肽以有效抑制生长或减少群体或杀灭铜绿假单胞菌和任选地至少一种其他革兰氏阴性菌物种的量存在;以及药学上可接受的载剂。

[0143] C. 实施方案A或B的药用组合物,其为溶液剂、混悬剂、乳剂、可吸入粉剂、气雾剂或喷雾剂。

[0144] D. 实施方案B的药用组合物,其进一步包含一种或多种适合于治疗革兰氏阴性菌的抗生素。

[0145] E. 一种包含分离的多核苷酸或所述多核苷酸的互补序列的载体,所述多核苷酸

包含编码实施方案A或B的溶素多肽的核酸分子,其中所编码的溶素多肽抑制生长或减少群体或杀灭铜绿假单胞菌和任选地至少一种其他革兰氏阴性菌物种。

[0146] F. 一种包含编码溶素多肽的核酸的重组表达载体,所述多肽包含实施方案A或B的多肽的氨基酸序列,其中所编码的溶素多肽具有抑制生长或减少群体或杀灭铜绿假单胞菌和任选地至少一种其他革兰氏阴性菌物种的特性,所述核酸可操作地连接于异源启动子。

[0147] G. 一种包含实施方案E或F的载体的宿主细胞。

[0148] H. 实施方案E或F的重组载体,其中核酸序列为cDNA序列。

[0149] I. 一种分离的多核苷酸,其包含编码选自GN147、GN146、GN156、GN92、GN54、GN201、GN202、GN121、GN94、GN200、GN204、GN205的溶素多肽或其具有溶解活性的片段或其具有溶解活性并与所述溶素多肽具有至少80%序列同一性的变体的核酸分子,其中溶素多肽抑制生长或减少群体或杀灭铜绿假单胞菌和任选地至少一种其他革兰氏阴性菌物种。

[0150] J. 实施方案I的多核苷酸,其为cDNA。

[0151] K. 一种抑制至少一种革兰氏阴性菌物种的生长或减少至少一种革兰氏阴性菌物种的群体或杀灭至少一种革兰氏阴性菌物种的方法,所述方法包括以有效抑制生长或减少群体或杀灭铜绿假单胞菌和任选地至少一种其他革兰氏阴性菌物种的量使细菌与药用组合物接触,所述药用组合物含有选自GN147、GN146、GN156、GN92、GN54、GN201、GN202、GN121、GN94、GN200、GN204、GN205、GN3、GN13、GN17、GN9、GN10、GN105、GN108、GN123、GN150、GN203中的一种或多种的溶素多肽或其具有溶解活性的片段或其具有溶解活性并与所述溶素多肽具有至少80%序列同一性的变体。

[0152] L. 一种治疗由选自铜绿假单胞菌和任选地一种或多种另外的革兰氏阴性菌物种的革兰氏阴性菌引起的细菌感染的方法,其包括以有效抑制生长或减少群体或杀灭铜绿假单胞菌和任选地至少一种其他革兰氏阴性菌物种的量给予诊断患有细菌感染、处于其风险下或呈现出其症状的受试者以下组合物,所述组合物含有选自GN147、GN146、GN156、GN92、GN54、GN201、GN202、GN121、GN94、GN200、GN204、GN205、GN3、GN13、GN17、GN9、GN10、GN105、GN108、GN123、GN150、GN203中的一种或多种的溶素多肽或其具有溶解活性的片段或其具有溶解活性并与所述溶素多肽具有至少80%序列同一性的变体。

[0153] M. 实施方案L的方法,其中至少一种革兰氏阴性菌物种选自铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、克雷伯菌属物种(*Klebsiella* spp.)、肠杆菌属物种(*Enterobacter* spp.)、大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)、弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、鼠疫耶尔森氏菌(*Yersinia pestis*)和土拉弗朗西斯菌(*Franciscella tularensis*)。

[0154] N. 实施方案L的方法,其中革兰氏阴性菌感染为由铜绿假单胞菌引起的感染。

[0155] O. 一种在受试者中治疗由选自铜绿假单胞菌和任选地一种或多种另外的革兰氏阴性菌物种的革兰氏阴性菌引起的局部或全身性病原菌感染的方法,其包括以有效抑制生长或减少群体或杀灭铜绿假单胞菌和任选地至少一种其他革兰氏阴性菌的量给予受试者以下组合物,所述组合物含有选自GN147、GN146、GN156、GN92、GN54、GN201、GN202、GN121、GN94、GN200、GN204、GN205、GN3、GN13、GN17、GN9、GN10、GN105、GN108、GN123、GN150、GN203中的一种或多种的溶素多肽或其具有溶解活性的片段或其具有溶解活性并与所述溶素多肽

具有至少80%序列同一性的变体。

[0156] P. 一种预防或治疗细菌感染的方法,其包括将第一有效量的含有有效量的选自GN147、GN146、GN156、GN92、GN54、GN201、GN202、GN121、GN94、GN200、GN204、GN205、GN3、GN13、GN17、GN9、GN10、GN105、GN108、GN123、GN150、GN203中的一种或多种或其具有溶解活性的片段或其具有溶解活性并与所述溶素多肽具有至少80%序列同一性的变体的组合物和第二有效量的适合于治疗革兰氏阴性菌感染的抗生素的组合共同给予诊断患有细菌感染、处于其风险下或呈现出其症状的受试者。

[0157] Q. 实施方案P的方法,其中抗生素选自头孢他啶、头孢吡肟、头孢哌酮、头孢吡普、环丙沙星、左氧氟沙星、氨基糖苷类、亚胺培南、美罗培南、多利培南、庆大霉素、妥布霉素、阿米卡星、哌拉西林、替卡西林、青霉素、利福平、多粘菌素B和粘菌素中的一种或多种。

[0158] R. 一种用于增强适合于治疗革兰氏阴性菌感染的抗生素的功效的方法,其包括共同给予抗生素与一种或多种选自GN147、GN146、GN156、GN92、GN54、GN201、GN202、GN121、GN94、GN200、GN204、GN205、GN3、GN13、GN17、GN9、GN10、GN105、GN108、GN123、GN150、GN203中的一种或多种的溶素多肽或其具有溶解活性的片段或其具有溶解活性并与所述溶素多肽具有至少80%序列同一性的变体的组合,其中给予所述组合在抑制生长或减少群体或杀灭革兰氏阴性菌方面比单独给予抗生素或溶素多肽或其活性片段更有效。

[0159] S. 一种选自GN147、GN146、GN156、GN92、GN54、GN201、GN202、GN121、GN94、GN200、GN204、GN205的分离的溶素多肽或其具有溶解活性的片段或其具有溶解活性并与所述溶素多肽具有至少80%序列同一性的变体,其中溶素多肽抑制生长或减少群体或杀灭铜绿假单胞菌和任选地至少一种其他革兰氏阴性菌物种。

[0160] T. 一种包含选自GN3、GN9、GN10、GN13、GN17、GN105、GN108、GN123、GN150和GN203的革兰氏阴性天然溶素的溶素多肽或其具有溶解活性的片段或其具有溶解活性并与所述溶素多肽具有至少80%序列同一性的变体,其中天然溶素或片段已任选地通过用非荷电氨基酸残基取代1-3个荷电氨基酸残基而进行修饰,经修饰的天然溶素或片段保留溶解活性。

[0161] U. 一种包含选自GN2、GN4、GN14、GN43和GN37的革兰氏阴性天然溶素的溶素多肽或其具有溶解活性的片段或其具有溶解活性并与所述溶素多肽具有至少80%序列同一性的变体,其中天然溶素或变体或片段已通过用非荷电氨基酸残基取代1-3个荷电氨基酸残基而进行修饰,经修饰的天然溶素或片段保留溶解活性。

[0162] V. 实施方案A或B的药用组合物,其中溶素多肽选自GN156、GN121、GN108和GN123中的一种或多种或其活性片段或其具有溶解活性并与所述溶素多肽具有至少80%序列同一性的变体。

[0163] W. 实施方案K的方法,其中所述细菌处于生物膜中,该方法实现生物膜的破坏。

[0164] 参考文献

1. Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, Beldavs ZG, Dumyati G, Kainer MA, Lynfield R, Maloney M, McAllister-Hollod L, Nadle J, Ray SM, Thompson DL, Wilson LE, Fridkin SK, Emerging Infections Program Healthcare-Associated I, Antimicrobial Use Prevalence Survey T. 2014. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. N Engl J Med 370:1198-1208.

2. Rossolini GM, Arena F, Pecile P, Pollini S. 2014. Update on the

antibiotic resistance crisis. *Curr Opin Pharmacol* 18:56-60.

3. Potron A, Poirel L, Nordmann P. 2015. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. *Int J Antimicrob Agents* 45:568-585.

4. Hattmer A, Hauser A, Diaz M, Scheetz M, Shah N, Allen JP, Porhomayon J, El-Solh AA. 2013. Bacterial and clinical characteristics of health care- and community-acquired bloodstream infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 57:3969-3975.

5. Anderson DJ, Moehring RW, Sloane R, Schmader KE, Weber DJ, Fowler VG, Jr., Smathers E, Sexton DJ. 2014. Bloodstream infections in community hospitals in the 21st century: a multicenter cohort study. *PLoS One* 9:e91713.

6. Willmann M, Bezdan D, Zapata L, Susak H, Vogel W, Schroppel K, Liese J, Weidenmaier C, Autenrieth IB, Ossowski S, Peter S. 2015. Analysis of a long-term outbreak of XDR *Pseudomonas aeruginosa*: a molecular epidemiological study. *J Antimicrob Chemother* 70:1322-1330.

7. Bassetti M, Righi E. 2015. New antibiotics and antimicrobial combination therapy for the treatment of gram-negative bacterial infections. *Curr Opin Crit Care* 21:402-411.

8. Wittekind M, Schuch R. 2016. Cell wall hydrolases and antibiotics: exploiting synergy to create efficacious new antimicrobial treatments. *Curr Opin Microbiol* 33:18-24.

9. Schmelcher M, Donovan DM, Loessner MJ. 2012. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future Microbiol* 7:1147-1171.

10. Schuch R, Lee HM, Schneider BC, Sauve KL, Law C, Khan BK, Rotolo JA, Horiuchi Y, Couto DE, Raz A, Fischetti VA, Huang DB, Nowinski RC, Wittekind M. 2014. Combination therapy with lysin CF-301 and antibiotic is superior to antibiotic alone for treating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-induced murine bacteremia. *J Infect Dis* 209:1469-1478.

11. Schuch R, Nelson D, Fischetti VA. 2002. A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. *Nature* 418:884-889.

12. Briers Y, Lavigne R. 2015. Breaking barriers: expansion of the use of endolysins as novel antibacterials against Gram-negative bacteria. *Future Microbiol* 10:377-390.

13. Lood R. 2015. Novel phage lysin capable of killing the multidrug-resistant gram-negative bacterium *Acinetobacter baumannii* in a mouse bacteremia model. 59:1983-1991.

14. Thandar M, Lood R, Winer BY, Deutsch DR, Euler CW, Fischetti VA. 2016. Novel Engineered Peptides of a Phage Lysin as Effective Antimicrobials against Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents*

Chemother 60:2671-2679.

15. Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. 2010. The bacterial cell envelope. Cold Spring Harb Perspect Biol 2:a000414.

16. Vaara M. 1992. Agents that increase the permeability of the outer membrane. Microbiol Rev 56:395-411.

17. Gerstmans H, Rodriguez-Rubio L, Lavigne R, Briers Y. 2016. From endolysins to Artilysin(R)s: novel enzyme-based approaches to kill drug-resistant bacteria. Biochem Soc Trans 44:123-128.

18. Zhu X, Ma Z, Wang J, Chou S, Shan A. 2014. Importance of Tryptophan in Transforming an Amphipathic Peptide into a Pseudomonas aeruginosa-Targeted Antimicrobial Peptide. PLoS One 9:e114605.

19. Deslouches B, Islam K, Craigo JK, Paranjape SM, Montelaro RC, Mietzner TA. 2005. Activity of the de novo engineered antimicrobial peptide WLBU2 against Pseudomonas aeruginosa in human serum and whole blood: implications for systemic applications. Antimicrob Agents Chemother 49:3208-3216.

20. Yeaman MR, Yount NY. 2003. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. Pharmacol Rev 55:27-55.

21. Wang J, Chou S, Xu L, Zhu X, Dong N, Shan A, Chen Z. 2015. High specific selectivity and Membrane-Active Mechanism of the synthetic centrosymmetric alpha-helical peptides with Gly-Gly pairs. Sci Rep 5:15963.

22. Lyu Y, Yang Y, Lyu X, Dong N, Shan A. 2016. Antimicrobial activity, improved cell selectivity and mode of action of short PMAP-36-derived peptides against bacteria and Candida. Sci Rep 6:27258.

23. Sanchez-Gomez S, Lamata M, Leiva J, Blondelle SE, Jerala R, Andra J, Brandenburg K, Lohner K, Moriyon I, Martinez-de-Tejada G. 2008. Comparative analysis of selected methods for the assessment of antimicrobial and membrane-permeabilizing activity: a case study for lactoferricin derived peptides. BMC Microbiol 8:196.

24. Guzman LM, Belin D, Carson MJ, Beckwith J. 1995. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P_{BAD} promoter. J Bacteriol 177:4121-4130.

25. Lood R, Raz A, Molina H, Euler CW, Fischetti VA. 2014. A highly active and negatively charged Streptococcus pyogenes lysin with a rare D-alanyl-L-alanine endopeptidase activity protects mice against streptococcal bacteremia. Antimicrob Agents Chemother 58:3073-3084.

26. CLSI. 2015. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-10th Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

27. Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. 1999. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol* 37:1771-1776.
28. Schuch R, Khan BK, Raz A, Rotolo JA, Wittekind M. 2017. Bacteriophage Lysin CF-301, a Potent Antistaphylococcal Biofilm Agent. *Antimicrob Agents Chemother* 61.
29. Moody J. 2010. Synergy testing: broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods, p 5.12.11-15.12.23. *In* Garcia LS (ed), *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, vol 2. ASM Press, Washington, D.C.
30. Lv Y, Wang J, Gao H, Wang Z, Dong N, Ma Q, Shan A. 2014. Antimicrobial properties and membrane-active mechanism of a potential alpha-helical antimicrobial derived from cathelicidin PMAP-36. *PLoS One* 9:e86364.
31. Scanlon TC, Teneback CC, Gill A, Bement JL, Weiner JA, Lamma JW, Leclair LW, Griswold KE. 2010. Enhanced antimicrobial activity of engineered human lysozyme. *ACS Chem Biol* 5:809-818.
32. Teneback CC, Scanlon TC, Wargo MJ, Bement JL, Griswold KE, Leclair LW. 2013. Bioengineered lysozyme reduces bacterial burden and inflammation in a murine model of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *Antimicrob Agents Chemother* 57:5559-5564.
33. Griswold KE, Bement JL, Teneback CC, Scanlon TC, Wargo MJ, Leclair LW. 2014. Bioengineered lysozyme in combination therapies for *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *Bioengineered* 5:143-147.
34. Daniels DS, Schepartz A. 2007. Intrinsically cell-permeable miniature proteins based on a minimal cationic PPII motif. *J Am Chem Soc* 129:14578-14579.
35. Vaara M, Porro M. 1996. Group of peptides that act synergistically with hydrophobic antibiotics against gram-negative enteric bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 40:1801-1805.
36. Briers Y, Walmagh M, Van Puyenbroeck V, Cornelissen A, Cenens W, Aertsen A, Oliveira H, Azeredo J, Verween G, Pirnay JP, Miller S, Volckaert G, Lavigne R. 2014. Engineered endolysin-based "Artilynsins" to combat multidrug-resistant gram-negative pathogens. *MBio* 5:e01379-01314.
37. Briers Y, Walmagh M, Grymonprez B, Biebl M, Pirnay JP, Defraigne V, Michiels J, Cenens W, Aertsen A, Miller S, Lavigne R. 2014. Art-175 is a highly efficient antibacterial against multidrug-resistant strains and persists of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 58:3774-3784.

序列表

<110>	康特拉费克特公司
<120>	在存在人血清的情况下对铜绿假单胞菌具有杀菌活性的溶素及其衍生物
<130>	0341.0025-PCT
<150>	US 62/830,207
<151>	2019-04-05
<160>	54
<170>	PatentIn version 3.5
<210>	1
<211>	147
<212>	PRT
<213>	未知
<220>	
<223>	Marine metagenome
<400>	1

[illegible]

145
 <210> 2
 <211> 143
 <212> PRT
 <213> 恶臭假单胞菌
 <400> 2
 Met Arg Thr Ser Gln Arg Gly Leu Ser Leu Ile Lys Ser Phe Glu Gly
 1 5 10 15
 Leu Arg Leu Gln Ala Tyr Gln Asp Ser Val Gly Val Trp Thr Ile Gly
 20 25 30

[0002]

Tyr Gly Thr Thr Arg Gly Val Lys Ala Gly Met Lys Ile Ser Lys Asp
 35 40 45
 Gln Ala Glu Arg Met Leu Leu Asn Asp Val Gln Arg Phe Glu Pro Glu
 50 55 60
 Val Glu Arg Leu Ile Lys Val Pro Leu Asn Gln Asp Gln Trp Asp Ala
 65 70 75 80
 Leu Met Ser Phe Thr Tyr Asn Leu Gly Ala Ala Asn Leu Glu Ser Ser
 85 90 95
 Thr Leu Arg Arg Leu Leu Asn Ala Gly Asn Tyr Ala Ala Ala Glu
 100 105 110
 Gln Phe Pro Arg Trp Asn Lys Ala Gly Gly Gln Val Leu Ala Gly Leu
 115 120 125
 Thr Arg Arg Arg Ala Ala Glu Arg Glu Leu Phe Leu Gly Ala Ala
 130 135 140
 <210> 3
 <211> 144
 <212> PRT
 <213> 假单胞菌噬菌体 PAJU2
 <400> 3
 Met Arg Thr Ser Gln Arg Gly Ile Asp Leu Ile Lys Ser Phe Glu Gly
 1 5 10 15
 Leu Arg Leu Ser Ala Tyr Gln Asp Ser Val Gly Val Trp Thr Ile Gly
 20 25 30
 Tyr Gly Thr Thr Arg Gly Val Thr Arg Tyr Met Thr Ile Thr Val Glu
 35 40 45
 Gln Ala Glu Arg Met Leu Ser Asn Asp Ile Gln Arg Phe Glu Pro Glu
 50 55 60
 Leu Asp Arg Leu Ala Lys Val Pro Leu Asn Gln Asn Gln Trp Asp Ala
 65 70 75 80
 Leu Met Ser Phe Val Tyr Asn Leu Gly Ala Ala Asn Leu Ala Ser Ser
 85 90 95
 Thr Leu Leu Lys Leu Leu Asn Lys Gly Asp Tyr Gln Gly Ala Ala Asp
 100 105 110
 Gln Phe Pro Arg Trp Val Asn Ala Gly Gly Lys Arg Leu Asp Gly Leu
 115 120 125
 Val Lys Arg Arg Ala Ala Glu Arg Ala Leu Phe Leu Glu Pro Leu Ser
 130 135 140
 <210> 4
 <211> 144
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽
 <400> 4

[0003]

Met Arg Thr Ser Gln Arg Gly Ile Asp Leu Ile Lys Ser Phe Glu Gly
 1 5 10 15
 Leu Arg Leu Ser Ala Tyr Gln Asp Ser Val Gly Val Trp Thr Ile Gly
 20 25 30
 Tyr Gly Thr Thr Arg Gly Val Thr Arg Tyr Met Thr Ile Thr Val Glu
 35 40 45
 Gln Ala Glu Arg Met Leu Ser Asn Asp Ile Gln Arg Phe Glu Pro Glu
 50 55 60
 Leu Asp Arg Leu Ala Lys Val Pro Leu Asn Gln Asn Gln Trp Asp Ala
 65 70 75 80
 Leu Met Ser Phe Val Tyr Asn Leu Gly Ala Ala Asn Leu Ala Ser Ser
 85 90 95
 Thr Leu Leu Asp Leu Leu Asn Lys Gly Asp Tyr Gln Gly Ala Ala Asp
 100 105 110
 Gln Phe Pro His Trp Val Asn Ala Gly Gly Lys Arg Leu Asp Gly Leu
 115 120 125
 Val Lys Arg Arg Ala Ala Glu Arg Ala Leu Phe Leu Glu Pro Leu Ser
 130 135 140
 <210> 5
 <211> 143
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽
 <400> 5
 Met Arg Thr Ser Gln Arg Gly Leu Ser Leu Ile Lys Ser Phe Glu Gly
 1 5 10 15
 Leu Arg Leu Gln Ala Tyr Gln Asp Ser Val Gly Val Trp Thr Ile Gly
 20 25 30
 Tyr Gly Thr Thr Arg Gly Val Lys Ala Gly Met Lys Ile Ser Lys Asp
 35 40 45
 Gln Ala Glu Arg Met Leu Leu Asn Asp Val Gln Arg Phe Glu Pro Glu
 50 55 60
 Val Glu Arg Leu Ile Lys Val Pro Leu Asn Gln Asp Gln Trp Asp Ala
 65 70 75 80
 Leu Met Ser Phe Thr Tyr Asn Leu Gly Ala Ala Asn Leu Glu Ser Ser
 85 90 95
 Thr Leu Arg Asp Leu Leu Asn Ala Gly Asn Tyr Ala Ala Ala Ala Glu
 100 105 110
 Gln Phe Pro His Trp Asn Lys Ala Gly Gly Gln Val Leu Ala Gly Leu
 115 120 125
 Thr Arg Arg Arg Ala Ala Glu Arg Glu Leu Phe Leu Gly Ala Ala
 130 135 140
 <210> 6

<211> 158
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽
 <400> 6
 Gly Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Gly Arg Arg Ala Pro Val Met Arg
 1 5 10 15
 Thr Ser Gln Arg Gly Ile Asp Leu Ile Lys Ser Phe Glu Gly Leu Arg
 20 25 30
 Leu Ser Ala Tyr Gln Asp Ser Val Gly Val Trp Thr Ile Gly Tyr Gly
 35 40 45
 Thr Thr Arg Gly Val Thr Arg Tyr Met Thr Ile Thr Val Glu Gln Ala
 50 55 60
 Glu Arg Met Leu Ser Asn Asp Ile Gln Arg Phe Glu Pro Glu Leu Asp
 65 70 75 80
 Arg Leu Ala Lys Val Pro Leu Asn Gln Asn Gln Trp Asp Ala Leu Met
 85 90 95
 Ser Phe Val Tyr Asn Leu Gly Ala Ala Asn Leu Ala Ser Ser Thr Leu
 100 105 110
 Leu Lys Leu Leu Asn Lys Gly Asp Tyr Gln Gly Ala Ala Asp Gln Phe
 115 120 125
 Pro Arg Trp Val Asn Ala Gly Gly Lys Arg Leu Asp Gly Leu Val Lys
 130 135 140
 Arg Arg Ala Ala Glu Arg Ala Leu Phe Leu Glu Pro Leu Ser
 145 150 155
 <210> 7
 <211> 172
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽
 <400> 7
 Lys Phe Phe Lys Phe Phe Lys Phe Phe Lys Ala Gly Ala Gly Ala Gly
 1 5 10 15
 Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Ser Met Arg Thr Ser
 20 25 30
 Gln Arg Gly Ile Asp Leu Ile Lys Ser Phe Glu Gly Leu Arg Leu Ser
 35 40 45
 Ala Tyr Gln Asp Ser Val Gly Val Trp Thr Thr Ile Gly Tyr Gly Thr Thr
 50 55 60
 Arg Gly Val Thr Arg Tyr Met Thr Ile Thr Val Glu Gln Ala Glu Arg
 65 70 75 80
 Met Leu Ser Asn Asp Ile Gln Arg Phe Glu Pro Glu Leu Asp Arg Leu

[0004]

	85	90	95
	Ala Lys Val Pro Leu Asn Gln Asn Gln Trp Asp Ala Leu Met Ser Phe		
	100	105	110
	Val Tyr Asn Leu Gly Ala Ala Asn Leu Ala Ser Ser Thr Leu Leu Lys		
	115	120	125
	Leu Leu Asn Lys Gly Asp Tyr Gln Gly Ala Ala Asp Gln Phe Pro Arg		
	130	135	140
	Trp Val Asn Ala Gly Gly Lys Arg Leu Asp Gly Leu Val Lys Arg Arg		
	145	150	155
	Ala Ala Glu Arg Ala Leu Phe Leu Glu Pro Leu Ser		160
	165	170	
<210>	8		
<211>	171		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成多肽		
<400>	8		
	Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala		
	1	5	10
	Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Ser Met Arg Thr Ser Gln		15
	20	25	30
[0005]	Arg Gly Ile Asp Leu Ile Lys Ser Phe Glu Gly Leu Arg Leu Ser Ala		
	35	40	45
	Tyr Gln Asp Ser Val Gly Val Trp Thr Ile Gly Tyr Gly Thr Thr Arg		
	50	55	60
	Gly Val Thr Arg Tyr Met Thr Ile Thr Val Glu Gln Ala Glu Arg Met		
	65	70	75
	Leu Ser Asn Asp Ile Gln Arg Phe Glu Pro Glu Leu Asp Arg Leu Ala		80
	85	90	95
	Lys Val Pro Leu Asn Gln Asn Gln Trp Asp Ala Leu Met Ser Phe Val		
	100	105	110
	Tyr Asn Leu Gly Ala Ala Asn Leu Ala Ser Ser Thr Leu Leu Lys Leu		
	115	120	125
	Leu Asn Lys Gly Asp Tyr Gln Gly Ala Ala Asp Gln Phe Pro Arg Trp		
	130	135	140
	Val Asn Ala Gly Gly Lys Arg Leu Asp Gly Leu Val Lys Arg Arg Ala		
	145	150	155
	Ala Glu Arg Ala Leu Phe Leu Glu Pro Leu Ser		160
	165	170	
<210>	9		
<211>	158		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		

<220>
 <223> 合成多肽
 <400> 9
 Met Arg Thr Ser Gln Arg Gly Ile Asp Leu Ile Lys Ser Phe Glu Gly
 1 5 10 15
 Leu Arg Leu Ser Ala Tyr Gln Asp Ser Val Gly Val Trp Thr Ile Gly
 20 25 30
 Tyr Gly Thr Thr Arg Gly Val Thr Arg Tyr Met Thr Ile Thr Val Glu
 35 40 45
 Gln Ala Glu Arg Met Leu Ser Asn Asp Ile Gln Arg Phe Glu Pro Glu
 50 55 60
 Leu Asp Arg Leu Ala Lys Val Pro Leu Asn Gln Asn Gln Trp Asp Ala
 65 70 75 80
 Leu Met Ser Phe Val Tyr Asn Leu Gly Ala Ala Asn Leu Ala Ser Ser
 85 90 95
 Thr Leu Leu Asp Leu Leu Asn Lys Gly Asp Tyr Gln Gly Ala Ala Asp
 100 105 110
 Gln Phe Pro His Trp Val Asn Ala Gly Gly Lys Arg Leu Asp Gly Leu
 115 120 125
 Val Lys Arg Arg Ala Ala Glu Arg Ala Leu Phe Leu Glu Pro Leu Ser
 130 135 140
 Gly Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Gly Arg Arg Ala Pro Val
 145 150 155
 <210> 10
 <211> 181
 <212> PRT
 <213> 假单胞菌噬菌体 Lu11
 <400> 10
 Met Asn Asn Glu Leu Pro Trp Val Ala Glu Ala Arg Lys Tyr Ile Gly
 1 5 10 15
 Leu Arg Glu Asp Thr Ser Lys Thr Ser His Asn Pro Lys Leu Leu Ala
 20 25 30
 Met Leu Asp Arg Met Gly Glu Phe Ser Asn Glu Ser Arg Ala Trp Trp
 35 40 45
 His Asp Asp Glu Thr Pro Trp Cys Gly Leu Phe Val Gly Tyr Cys Leu
 50 55 60
 Gly Val Ala Gly Arg Tyr Val Val Arg Glu Trp Tyr Arg Ala Arg Ala
 65 70 75 80
 Trp Glu Ala Pro Gln Leu Thr Lys Leu Asp Arg Pro Ala Tyr Gly Ala
 85 90 95
 Leu Val Thr Phe Thr Arg Ser Gly Gly Gly His Val Gly Phe Ile Val
 100 105 110
 Gly Lys Asp Ala Arg Gly Asn Leu Met Val Leu Gly Gly Asn Gln Ser
 115 120 125

[0006]

[0007]

```

Asn Ala Val Ser Ile Ala Pro Phe Ala Val Ser Arg Val Thr Gly Tyr
 130                135                140
Phe Trp Pro Ser Phe Trp Arg Asn Lys Thr Ala Val Lys Ser Val Pro
145                150                155                160
Phe Glu Glu Arg Tyr Ser Leu Pro Leu Leu Lys Ser Asn Gly Glu Leu
                165                170                175
Ser Thr Asn Glu Ala
                180
<210> 11
<211> 439
<212> PRT
<213> 假单胞菌属物种
<400> 11
Met Lys Arg Thr Thr Leu Asn Leu Glu Leu Glu Ser Asn Thr Asp Arg
 1                5                10                15
Leu Leu Gln Glu Lys Asp Asp Leu Leu Pro Gln Ser Val Thr Asn Ser
                20                25                30
Ser Asp Glu Gly Thr Pro Phe Ala Gln Val Glu Gly Ala Ser Asp Asp
                35                40                45
Asn Thr Ala Glu Gln Asp Ser Asp Lys Pro Gly Ala Ser Val Ala Asp
                50                55                60
Ala Asp Thr Lys Pro Val Asp Pro Glu Trp Lys Thr Ile Thr Val Ala
65                70                75                80
Ser Gly Asp Thr Leu Ser Thr Val Phe Thr Lys Ala Gly Leu Ser Thr
                85                90                95
Ser Ala Met His Asp Met Leu Thr Ser Ser Lys Asp Ala Lys Arg Phe
                100                105                110
Thr His Leu Lys Val Gly Gln Glu Val Lys Leu Lys Leu Asp Pro Lys
                115                120                125
Gly Glu Leu Gln Ala Leu Arg Val Lys Gln Ser Glu Leu Glu Thr Ile
                130                135                140
Gly Leu Asp Lys Thr Asp Lys Gly Tyr Ser Phe Lys Arg Glu Lys Ala
145                150                155                160
Gln Ile Asp Leu His Thr Ala Tyr Ala His Gly Arg Ile Thr Ser Ser
                165                170                175
Leu Phe Val Ala Gly Arg Asn Ala Gly Leu Pro Tyr Asn Leu Val Thr
                180                185                190
Ser Leu Ser Asn Ile Phe Gly Tyr Asp Ile Asp Phe Ala Leu Asp Leu
                195                200                205
Arg Glu Gly Asp Glu Phe Asp Val Ile Tyr Glu Gln His Lys Val Asn
                210                215                220
Gly Lys Gln Val Ala Thr Gly Asn Ile Leu Ala Ala Arg Phe Val Asn
225                230                235                240
Arg Gly Lys Thr Tyr Thr Ala Val Arg Tyr Thr Asn Lys Gln Gly Asn

```

245 250 255
 Thr Ser Tyr Tyr Arg Ala Asp Gly Ser Ser Met Arg Lys Ala Phe Ile
 260 265 270
 Arg Thr Pro Val Asp Phe Ala Arg Ile Ser Ser Arg Phe Ser Leu Gly
 275 280 285
 Arg Arg His Pro Ile Leu Asn Lys Ile Arg Ala His Lys Gly Val Asp
 290 295 300
 Tyr Ala Ala Pro Ile Gly Thr Pro Ile Lys Ala Thr Gly Asp Gly Lys
 305 310 315 320
 Ile Leu Glu Ala Gly Arg Lys Gly Gly Tyr Gly Asn Ala Val Val Ile
 325 330 335
 Gln His Gly Gln Arg Tyr Arg Thr Ile Tyr Gly His Met Ser Arg Phe
 340 345 350
 Ala Lys Gly Ile Arg Ala Gly Thr Ser Val Lys Gln Gly Gln Ile Ile
 355 360 365
 Gly Tyr Val Gly Met Thr Gly Leu Ala Thr Gly Pro His Leu His Tyr
 370 375 380
 Glu Phe Gln Ile Asn Gly Arg His Val Asp Pro Leu Ser Ala Lys Leu
 385 390 395 400
 Pro Met Ala Asp Pro Leu Gly Gly Ala Asp Arg Lys Arg Phe Met Ala
 405 410 415
 [0008] Gln Thr Gln Pro Met Ile Ala Arg Met Asp Gln Glu Lys Lys Thr Leu
 420 425 430
 Leu Ala Leu Asn Lys Gln Arg
 435
 <210> 12
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Micavibrio aeruginosavorus
 <400> 12
 Met Thr Tyr Thr Leu Ser Lys Arg Ser Leu Asp Asn Leu Lys Gly Val
 1 5 10 15
 His Pro Asp Leu Val Ala Val Val His Arg Ala Ile Gln Leu Thr Pro
 20 25 30
 Val Asp Phe Ala Val Ile Glu Gly Leu Arg Ser Val Ser Arg Gln Lys
 35 40 45
 Glu Leu Val Ala Ala Gly Ala Ser Lys Thr Met Asn Ser Arg His Leu
 50 55 60
 Thr Gly His Ala Val Asp Leu Ala Ala Tyr Val Asn Gly Ile Arg Trp
 65 70 75 80
 Asp Trp Pro Leu Tyr Asp Ala Ile Ala Val Ala Val Lys Ala Ala Ala
 85 90 95
 Lys Glu Leu Gly Val Ala Ile Val Trp Gly Gly Asp Trp Thr Thr Phe
 100 105 110

	Lys	Asp	Gly	Pro	His	Phe	Glu	Leu	Asp	Arg	Ser	Lys	Tyr	Arg		
	115							120					125			
	<210>	13														
	<211>	144														
	<212>	PRT														
	<213>	人工序列														
	<220>															
	<223>	合成多肽														
	<400>	13														
	Met	Thr	Tyr	Thr	Leu	Ser	Lys	Arg	Ser	Leu	Asp	Asn	Leu	Lys	Gly	Val
	1				5					10					15	
	His	Pro	Asp	Leu	Val	Ala	Val	Val	His	Arg	Ala	Ile	Gln	Leu	Thr	Pro
				20					25					30		
	Val	Asp	Phe	Ala	Val	Ile	Glu	Gly	Leu	Arg	Ser	Val	Ser	Arg	Gln	Lys
		35						40					45			
	Glu	Leu	Val	Ala	Ala	Gly	Ala	Ser	Lys	Thr	Met	Asn	Ser	Arg	His	Leu
	50						55					60				
	Thr	Gly	His	Ala	Val	Asp	Leu	Ala	Ala	Tyr	Val	Asn	Gly	Ile	Arg	Trp
	65					70					75				80	
	Asp	Trp	Pro	Leu	Tyr	Asp	Ala	Ile	Ala	Val	Ala	Val	Lys	Ala	Ala	Ala
				85					90					95		
[0009]	Lys	Glu	Leu	Gly	Val	Ala	Ile	Val	Trp	Gly	Gly	Asp	Trp	Thr	Thr	Phe
				100					105					110		
	Lys	Asp	Gly	Pro	His	Phe	Glu	Leu	Asp	Arg	Ser	Lys	Tyr	Arg	Arg	Lys
		115						120					125			
	Lys	Thr	Arg	Lys	Arg	Leu	Lys	Lys	Ile	Gly	Lys	Val	Leu	Lys	Trp	Ile
		130					135						140			
	<210>	14														
	<211>	154														
	<212>	PRT														
	<213>	人工序列														
	<220>															
	<223>	合成多肽														
	<400>	14														
	Lys	Phe	Phe	Lys	Phe	Phe	Lys	Phe	Phe	Lys	Ala	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly
	1				5					10					15	
	Ala	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Ala	Ser	Met	Thr	Tyr	Thr
				20					25					30		
	Leu	Ser	Lys	Arg	Ser	Leu	Asp	Asn	Leu	Lys	Gly	Val	His	Pro	Asp	Leu
		35						40					45			
	Val	Ala	Val	Val	His	Arg	Ala	Ile	Gln	Leu	Thr	Pro	Val	Asp	Phe	Ala
	50						55					60				
	Val	Ile	Glu	Gly	Leu	Arg	Ser	Val	Ser	Arg	Gln	Lys	Glu	Leu	Val	Ala
	65					70					75				80	

	Ala Gly Ala Ser Lys Thr Met Asn Ser Arg His Leu Thr Gly His Ala	
	85	90 95
	Val Asp Leu Ala Ala Tyr Val Asn Gly Ile Arg Trp Asp Trp Pro Leu	
	100	105 110
	Tyr Asp Ala Ile Ala Val Ala Val Lys Ala Ala Lys Glu Leu Gly	
	115	120 125
	Val Ala Ile Val Trp Gly Gly Asp Trp Thr Thr Phe Lys Asp Gly Pro	
	130	135 140
	His Phe Glu Leu Asp Arg Ser Lys Tyr Arg	
	145	150
	<210> 15	
	<211> 157	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多肽	
	<400> 15	
	Met Arg Thr Ser Gln Arg Gly Leu Ser Leu Ile Lys Ser Phe Glu Gly	
	1	5 10 15
	Leu Arg Leu Gln Ala Tyr Gln Asp Ser Val Gly Val Trp Thr Ile Gly	
	20	25 30
[0010]	Tyr Gly Thr Thr Arg Gly Val Lys Ala Gly Met Lys Ile Ser Lys Asp	
	35	40 45
	Gln Ala Glu Arg Met Leu Leu Asn Asp Val Gln Arg Phe Glu Pro Glu	
	50	55 60
	Val Glu Arg Leu Ile Lys Val Pro Leu Asn Gln Asp Gln Trp Asp Ala	
	65	70 75 80
	Leu Met Ser Phe Thr Tyr Asn Leu Gly Ala Ala Asn Leu Glu Ser Ser	
	85	90 95
	Thr Leu Arg Asp Leu Leu Asn Ala Gly Asn Tyr Ala Ala Ala Glu	
	100	105 110
	Gln Phe Pro His Trp Asn Lys Ala Gly Gly Gln Val Leu Ala Gly Leu	
	115	120 125
	Thr Arg Arg Arg Ala Ala Glu Arg Glu Leu Phe Leu Gly Ala Ala Gly	
	130	135 140
	Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Gly Arg Arg Ala Pro Val	
	145	150 155
	<210> 16	
	<211> 157	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多肽	
	<400> 16	

[0011]

Gly Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Gly Arg Arg Ala Pro Val Met Arg
 1 5 10 15
 Thr Ser Gln Arg Gly Leu Ser Leu Ile Lys Ser Phe Glu Gly Leu Arg
 20 25 30
 Leu Gln Ala Tyr Gln Asp Ser Val Gly Val Trp Thr Ile Gly Tyr Gly
 35 40 45
 Thr Thr Arg Gly Val Lys Ala Gly Met Lys Ile Ser Lys Asp Gln Ala
 50 55 60
 Glu Arg Met Leu Leu Asn Asp Val Gln Arg Phe Glu Pro Glu Val Glu
 65 70 75 80
 Arg Leu Ile Lys Val Pro Leu Asn Gln Asp Gln Trp Asp Ala Leu Met
 85 90 95
 Ser Phe Thr Tyr Asn Leu Gly Ala Ala Asn Leu Glu Ser Ser Thr Leu
 100 105 110
 Arg Arg Leu Leu Asn Ala Gly Asn Tyr Ala Ala Ala Glu Gln Phe
 115 120 125
 Pro Arg Trp Asn Lys Ala Gly Gly Gln Val Leu Ala Gly Leu Thr Arg
 130 135 140
 Arg Arg Ala Ala Glu Arg Glu Leu Phe Leu Gly Ala Ala
 145 150 155
 <210> 17
 <211> 150
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽
 <400> 17
 Met Ser Phe Lys Leu Gly Lys Arg Ser Leu Ser Asn Leu Glu Gly Val
 1 5 10 15
 His Pro Asp Leu Ile Lys Val Val Lys Arg Ala Ile Glu Leu Thr Glu
 20 25 30
 Cys Asp Phe Thr Val Thr Glu Gly Leu Arg Ser Lys Glu Arg Gln Ala
 35 40 45
 Gln Leu Leu Lys Glu Lys Lys Thr Thr Thr Ser Asn Ser Arg His Leu
 50 55 60
 Thr Gly His Ala Val Asp Leu Ala Ala Trp Val Asn Asn Thr Val Ser
 65 70 75 80
 Trp Asp Trp Lys Tyr Tyr Tyr Gln Ile Ala Asp Ala Met Lys Lys Ala
 85 90 95
 Ala Ser Glu Leu Asn Val Ser Ile Asp Trp Gly Gly Asp Trp Lys Lys
 100 105 110
 Phe Lys Asp Gly Pro His Phe Glu Leu Thr Trp Ser Lys Tyr Pro Ile
 115 120 125
 Lys Gly Ala Ser Arg Lys Lys Thr Arg Lys Arg Leu Lys Lys Ile Gly

	130	135	140
	Lys Val Leu Lys Trp Ile		
	145	150	
	<210> 18		
	<211> 134		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成多肽		
	<400> 18		
	Met Lys Leu Ser Glu Lys Arg Ala Leu Phe Thr Gln Leu Leu Ala Gln		
	1 5 10 15		
	Leu Ile Leu Trp Ala Gly Thr Gln Asp Arg Val Ser Val Ala Leu Asp		
	20 25 30		
	Gln Val Lys Arg Thr Gln Ala Glu Ala Asp Ala Asn Ala Lys Ser Gly		
	35 40 45		
	Ala Gly Ile Arg Asn Ser Leu His Leu Leu Gly Leu Ala Gly Asp Leu		
	50 55 60		
	Ile Leu Tyr Lys Asp Gly Lys Tyr Met Asp Lys Ser Glu Asp Tyr Lys		
	65 70 75 80		
	Phe Leu Gly Asp Tyr Trp Lys Ser Leu His Pro Leu Cys Arg Trp Gly		
	85 90 95		
[0012]	Gly Asp Phe Lys Ser Arg Pro Asp Gly Asn His Phe Ser Leu Glu His		
	100 105 110		
	Glu Gly Val Gln Arg Lys Lys Thr Arg Lys Arg Leu Lys Lys Ile Gly		
	115 120 125		
	Lys Val Leu Lys Trp Ile		
	130		
	<210> 19		
	<211> 132		
	<212> PRT		
	<213> 不动杆菌属物种		
	<400> 19		
	Met Ser Phe Lys Leu Gly Lys Arg Ser Leu Ser Asn Leu Glu Gly Val		
	1 5 10 15		
	His Pro Asp Leu Ile Lys Val Val Lys Arg Ala Ile Glu Leu Thr Glu		
	20 25 30		
	Cys Asp Phe Thr Val Thr Glu Gly Leu Arg Ser Lys Glu Arg Gln Ala		
	35 40 45		
	Gln Leu Leu Lys Glu Lys Lys Thr Thr Thr Ser Asn Ser Arg His Leu		
	50 55 60		
	Thr Gly His Ala Val Asp Leu Ala Ala Trp Val Asn Asn Thr Val Ser		
	65 70 75 80		
	Trp Asp Trp Lys Tyr Tyr Tyr Gln Ile Ala Asp Ala Met Lys Lys Ala		

	85	90	95
	Ala Ser Glu Leu Asn Val Ser Ile Asp Trp Gly Gly Asp Trp Lys Lys		
	100	105	110
	Phe Lys Asp Gly Pro His Phe Glu Leu Thr Trp Ser Lys Tyr Pro Ile		
	115	120	125
	Lys Gly Ala Ser		
	130		
	<210> 20		
	<211> 116		
	<212> PRT		
	<213> 假单胞菌噬菌体 PaP2		
	<400> 20		
	Met Lys Leu Ser Glu Lys Arg Ala Leu Phe Thr Gln Leu Leu Ala Gln		
	1 5 10 15		
	Leu Ile Leu Trp Ala Gly Thr Gln Asp Arg Val Ser Val Ala Leu Asp		
	20 25 30		
	Gln Val Lys Arg Thr Gln Ala Glu Ala Asp Ala Asn Ala Lys Ser Gly		
	35 40 45		
	Ala Gly Ile Arg Asn Ser Leu His Leu Leu Gly Leu Ala Gly Asp Leu		
	50 55 60		
	Ile Leu Tyr Lys Asp Gly Lys Tyr Met Asp Lys Ser Glu Asp Tyr Lys		
	65 70 75 80		
[0013]	Phe Leu Gly Asp Tyr Trp Lys Ser Leu His Pro Leu Cys Arg Trp Gly		
	85 90 95		
	Gly Asp Phe Lys Ser Arg Pro Asp Gly Asn His Phe Ser Leu Glu His		
	100 105 110		
	Glu Gly Val Gln		
	115		
	<210> 21		
	<211> 157		
	<212> PRT		
	<213> 未知		
	<220>		
	<223> Marine metagenome		
	<400> 21		
	Met Lys Asn Phe Asn Glu Ile Ile Glu His Val Leu Lys His Glu Gly		
	1 5 10 15		
	Gly Tyr Val Asn Asp Pro Lys Asp Leu Gly Gly Glu Thr Lys Tyr Gly		
	20 25 30		
	Ile Thr Lys Arg Phe Tyr Pro Asp Leu Asp Ile Lys Asn Leu Thr Ile		
	35 40 45		
	Glu Gln Ala Thr Glu Ile Tyr Lys Lys Asp Tyr Trp Asp Lys Asn Lys		
	50 55 60		
	Val Glu Ser Leu Pro Gln Asn Leu Trp His Ile Tyr Phe Asp Met Cys		

65	70	75	80
Val Asn Met Gly Lys Arg Thr Ala Val Lys Val Leu Gln Arg Ala Ala			
85	90	95	
Val Asn Arg Gly Arg Asp Ile Glu Val Asp Gly Gly Leu Gly Pro Ala			
100	105	110	
Thr Ile Gly Ala Leu Lys Gly Val Glu Leu Asp Arg Val Arg Ala Phe			
115	120	125	
Arg Val Lys Tyr Tyr Val Asp Leu Ile Thr Ala Arg Pro Glu Gln Glu			
130	135	140	
Lys Phe Tyr Leu Gly Trp Phe Arg Arg Ala Thr Glu Val			
145	150	155	
<210>	22		
<211>	231		
<212>	PRT		
<213>	假单胞菌噬菌体 phi2954		
<400>	22		
Met Ser Lys Gln Gly Gly Val Lys Val Ala Gln Ala Val Ala Ala Leu			
1	5	10	15
Ser Ser Pro Gly Leu Lys Ile Asp Gly Ile Val Gly Lys Ala Thr Arg			
20	25	30	
Ala Ala Val Ser Ser Met Pro Ser Ser Gln Lys Ala Ala Thr Asp Lys			
35	40	45	
Ile Leu Gln Ser Ala Gly Ile Gly Ser Leu Asp Ser Leu Leu Ala Glu			
50	55	60	
Pro Ala Ala Ala Thr Ser Asp Thr Phe Arg Glu Val Val Leu Ala Val			
65	70	75	80
Ala Arg Glu Ala Arg Lys Arg Gly Leu Asn Pro Ala Phe Tyr Val Ala			
85	90	95	
His Ile Ala Leu Glu Thr Gly Trp Gly Arg Ser Val Pro Lys Leu Pro			
100	105	110	
Asp Gly Arg Ser Ser Tyr Asn Tyr Ala Gly Leu Lys Tyr Ala Ala Val			
115	120	125	
Lys Thr Gln Val Lys Gly Lys Thr Glu Thr Asn Thr Leu Glu Tyr Ile			
130	135	140	
Lys Ser Leu Pro Lys Thr Val Arg Asp Ser Phe Ala Val Phe Ala Ser			
145	150	155	160
Ala Gly Asp Phe Ser Arg Val Tyr Phe Trp Tyr Leu Leu Asp Ser Pro			
165	170	175	
Ser Ala Tyr Arg Tyr Pro Gly Leu Lys Asn Ala Lys Thr Ala Gln Glu			
180	185	190	
Phe Gly Asp Ile Leu Gln Lys Gly Gly Tyr Ala Thr Asp Pro Ala Tyr			
195	200	205	
Ala Ala Lys Val Ala Ser Ile Ala Ser Thr Ala Val Ala Arg Tyr Gly			
210	215	220	

[0014]

[0015]

Ser Asp Val Ser Ser Val Ala
 225 230
 <210> 23
 <211> 202
 <212> PRT
 <213> 假单胞菌噬菌体 Lu11
 <400> 23
 Met Ser Asp Lys Arg Val Glu Ile Thr Gly Asn Val Ser Gly Phe Phe
 1 5 10 15
 Glu Ser Gly Gly Arg Gly Val Lys Thr Val Ser Thr Gly Lys Gly Asp
 20 25 30
 Asn Gly Gly Val Ser Tyr Gly Lys His Gln Leu Ala Ser Asn Asn Gly
 35 40 45
 Ser Met Ala Leu Phe Leu Glu Ser Pro Phe Gly Ala Pro Tyr Arg Ala
 50 55 60
 Gln Phe Ala Gly Leu Lys Pro Gly Thr Ala Ala Phe Thr Ser Val Tyr
 65 70 75 80
 Asn Lys Ile Ala Asn Glu Thr Pro Thr Ala Phe Glu Arg Asp Gln Phe
 85 90 95
 Gln Tyr Ile Ala Ala Ser His Tyr Asp Pro Gln Ala Ala Lys Leu Lys
 100 105 110
 Ala Glu Gly Ile Asn Val Asp Asp Arg His Val Ala Val Arg Glu Cys
 115 120 125
 Val Phe Ser Val Ala Val Gln Tyr Gly Arg Asn Thr Ser Ile Ile Ile
 130 135 140
 Lys Ala Leu Gly Ser Asn Phe Arg Gly Ser Asp Lys Asp Phe Ile Glu
 145 150 155 160
 Lys Val Gln Asp Tyr Arg Gly Ala Thr Val Asn Thr Tyr Phe Lys Ser
 165 170 175
 Ser Ser Gln Gln Thr Arg Asp Ser Val Lys Asn Arg Ser Gln Gln Glu
 180 185 190
 Lys Gln Met Leu Leu Lys Leu Leu Asn Ser
 195 200
 <210> 24
 <211> 268
 <212> PRT
 <213> 铜绿假单胞菌
 <400> 24
 Met Thr Leu Arg Tyr Gly Asp Arg Ser Gln Glu Val Arg Gln Leu Gln
 1 5 10 15
 Arg Arg Leu Asn Thr Trp Ala Gly Ala Asn Leu Tyr Glu Asp Gly His
 20 25 30
 Phe Gly Ala Ala Thr Glu Asp Ala Val Arg Ala Phe Gln Arg Ser His
 35 40 45

[0016]

Gly Leu Val Ala Asp Gly Ile Ala Gly Pro Lys Thr Leu Ala Ala Leu
 50 55 60
 Gly Gly Ala Asp Cys Ser His Leu Leu Gln Asn Ala Asp Leu Val Ala
 65 70 75 80
 Ala Ala Thr Arg Leu Gly Leu Pro Leu Ala Thr Ile Tyr Ala Val Asn
 85 90 95
 Gln Val Glu Ser Asn Gly Gln Gly Phe Leu Gly Asn Gly Lys Pro Ala
 100 105 110
 Ile Leu Phe Glu Arg His Ile Met Tyr Arg Arg Leu Ala Ala His Asp
 115 120 125
 Gln Val Thr Ala Asp Gln Leu Ala Ala Gln Phe Pro Ala Leu Val Asn
 130 135 140
 Pro Arg Pro Gly Gly Tyr Ala Gly Gly Thr Ala Glu His Gln Arg Leu
 145 150 155 160
 Ala Asn Ala Arg Gln Ile Asp Asp Thr Ala Ala Leu Glu Ser Ala Ser
 165 170 175
 Trp Gly Ala Phe Gln Ile Met Gly Phe His Trp Gln Arg Leu Gly Tyr
 180 185 190
 Ile Ser Val Gln Ala Phe Ala Glu Ala Met Gly Arg Ser Glu Ser Ala
 195 200 205
 Gln Phe Glu Ala Phe Val Arg Phe Ile Asp Thr Asp Pro Ala Leu His
 210 215 220
 Lys Ala Leu Lys Ala Arg Lys Trp Ala Asp Phe Ala Arg Leu Tyr Asn
 225 230 235 240
 Gly Pro Asp Tyr Lys Arg Asn Leu Tyr Asp Asn Lys Leu Ala Arg Ala
 245 250 255
 Tyr Glu Gln His Ala Asn Cys Ala Glu Ala Ser Ala
 260 265
 <210> 25
 <211> 160
 <212> PRT
 <213> 铜绿假单胞菌
 <400> 25
 Met Ala Val Val Ser Glu Lys Thr Ala Gly Gly Arg Asn Val Leu Ala
 1 5 10 15
 Phe Leu Asp Met Leu Ala Trp Ser Glu Gly Thr Ser Thr Ile Arg Gly
 20 25 30
 Ser Asp Asn Gly Tyr Asn Val Val Val Gly Gly Gly Leu Phe Asn Gly
 35 40 45
 Tyr Ala Asp His Pro Arg Leu Lys Val Tyr Leu Pro Arg Tyr Lys Val
 50 55 60
 Tyr Ser Thr Ala Ala Gly Arg Tyr Gln Leu Leu Ser Arg Tyr Trp Asp
 65 70 75 80
 Ala Tyr Arg Glu Ser Leu Ala Leu Lys Gly Gly Phe Thr Pro Ser Asn

	85	90	95
	Gln Asp Leu Val Ala Leu Gln Gln Ile Lys Glu Arg Arg Ser Leu Ala		
	100	105	110
	Asp Ile Gln Ala Gly Arg Leu Ala Asp Ala Val Gln Lys Cys Ser Asn		
	115	120	125
	Ile Trp Ala Ser Leu Pro Gly Ala Gly Tyr Gly Gln Arg Glu His Ser		
	130	135	140
	Leu Asp Asp Leu Thr Ala His Tyr Leu Ala Ala Gly Gly Val Leu Ser		
	145	150	155
	160		
<210>	26		
<211>	185		
<212>	PRT		
<213>	不动杆菌噬菌体 phiAB6		
<400>	26		
	Met Ile Leu Thr Lys Asp Gly Phe Ser Ile Ile Arg Asn Glu Leu Phe		
	1	5	10
	Glu Gly Lys Leu Asp Gln Thr Gln Val Asp Ala Ile Asn Phe Ile Val		
	20	25	30
	Glu Lys Ala Thr Glu Tyr Gly Leu Thr Tyr Pro Glu Ala Ala Tyr Leu		
	35	40	45
	Leu Ala Thr Ile Tyr His Glu Thr Gly Leu Pro Ser Gly Tyr Arg Thr		
	50	55	60
[0017]	Met Gln Pro Ile Lys Glu Ala Gly Ser Asp Ser Tyr Leu Arg Ser Lys		
	65	70	75
	Lys Tyr Tyr Pro Tyr Ile Gly Tyr Gly Tyr Val Gln Leu Thr Trp Glu		
	85	90	95
	Glu Asn Tyr Glu Arg Ile Gly Lys Leu Ile Gly Ile Asp Leu Val Lys		
	100	105	110
	Asn Pro Glu Lys Ala Leu Glu Pro Leu Ile Ala Ile Gln Ile Ala Ile		
	115	120	125
	Lys Gly Met Leu Asn Gly Trp Phe Thr Gly Val Gly Phe Arg Arg Lys		
	130	135	140
	Arg Pro Val Ser Lys Tyr Asn Lys Gln Gln Tyr Val Ala Ala Arg Asn		
	145	150	155
	Ile Ile Asn Gly Lys Asp Lys Ala Glu Leu Ile Ala Lys Tyr Ala Ile		
	165	170	175
	Ile Phe Glu Arg Ala Leu Arg Ser Leu		
	180	185	
<210>	27		
<211>	266		
<212>	PRT		
<213>	假单胞菌噬菌体 PhiPA3		
<400>	27		
	Met Thr Leu Leu Lys Lys Gly Asp Lys Gly Asp Ala Val Lys Gln Leu		

[0018]

1	5	10	15
Gln Gln Lys Leu Lys Asp Leu Gly Tyr Thr Leu Gly Val Asp Gly Asn			
20	25	30	
Phe Gly Asn Gly Thr Asp Thr Val Val Arg Ser Phe Gln Thr Lys Met			
35	40	45	
Lys Leu Ser Val Asp Gly Val Val Gly Asn Gly Thr Met Ser Thr Ile			
50	55	60	
Asp Ser Thr Leu Ala Gly Ile Lys Ala Trp Lys Thr Ser Val Pro Phe			
65	70	75	80
Pro Ala Thr Asn Lys Ser Arg Ala Met Ala Met Pro Thr Leu Thr Glu			
85	90	95	
Ile Gly Arg Leu Thr Asn Val Asp Pro Lys Leu Leu Ala Thr Phe Cys			
100	105	110	
Ser Ile Glu Ser Ala Phe Asp Tyr Thr Ala Lys Pro Tyr Lys Pro Asp			
115	120	125	
Gly Thr Val Tyr Ser Ser Ala Glu Gly Trp Phe Gln Phe Leu Asp Ala			
130	135	140	
Thr Trp Asp Asp Glu Val Arg Lys His Gly Lys Gln Tyr Ser Phe Pro			
145	150	155	160
Val Asp Pro Gly Arg Ser Leu Arg Lys Asp Pro Arg Ala Asn Gly Leu			
165	170	175	
Met Gly Ala Glu Phe Leu Lys Gly Asn Ala Ala Ile Leu Arg Pro Val			
180	185	190	
Leu Gly His Glu Pro Ser Asp Thr Asp Leu Tyr Leu Ala His Phe Met			
195	200	205	
Gly Ala Gly Gly Ala Lys Gln Phe Leu Met Ala Asp Gln Asn Lys Leu			
210	215	220	
Ala Ala Glu Leu Phe Pro Gly Pro Ala Lys Ala Asn Pro Asn Ile Phe			
225	230	235	240
Tyr Lys Ser Gly Asn Ile Ala Arg Thr Leu Ala Glu Val Tyr Ala Val			
245	250	255	
Leu Asp Ala Lys Val Ala Lys His Arg Ala			
260	265		

<210> 28

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 28

Gly Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Gly Arg Arg Ala Pro Val

1

5

10

<210> 29

<211> 10

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<400> 29
Lys Phe Phe Lys Phe Phe Lys Phe Phe Lys
1 5 10
<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<400> 30
Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys
1 5
<210> 31
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
[0019] <400> 31
Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly
1 5 10 15
Ala Ser

<210> 32
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<400> 32
Arg Lys Lys Thr Arg Lys Arg Leu Lys Lys Ile Gly Lys Val Leu Lys
1 5 10 15
Trp Ile

<210> 33
<211> 432
<212> DNA
<213> 恶臭假单胞菌
<400> 33
atgcggacat cgcaacgcgg cttgagcctc atcaagtcgt tcgagggcct gcgtctgcag 60

	gcatatcaag attcagtagg cgtctggacg attggctacg ggaccactcg tggcgtgaag	120
	gccggcatga aaatcagcaa ggaccaggca gagcgcagtc tgcagaacga cgtgcagcgc	180
	ttcagcctg aagttgagcg cctgatcaag gtgcccgtga atcaggatca gtgggacgcc	240
	ctgatgagct tcacctaaa cctgggggcg gcaaacctcg aatcgtccac gctccgccga	300
	ctgctcaatg ctggcaacta cgcagctgct gctgagcagt tcccgcgctg gaacaaggct	360
	ggcgggcaag tacttgccgg cctaaccctg cggcgtgcag ctgagcggga gctgttcctg	420
	ggggcccgct ga	432
	<210> 34	
	<211> 609	
	<212> DNA	
	<213> 假单胞菌噬菌体 Lu11	
	<400> 34	
	atgtctgata aacgcgttga aattaccgga aacgtttccg gttttttcga gtccggtggc	60
	cgtggtgtaa aaaccgttcc taccggcaaa ggtgacaacg gcggtgtgag ctaccgcaag	120
	catcagctgg cgtcgaataa cggctctatg gctctgttcc ttgaatctcc gtccggtgct	180
	ccgtaccgtg cgcaattcgc aggactgaaa ccgggaaccg ctgcgtttac ttccgtgtac	240
	aacaaaatcg caaatgaaac gccgaccgcg ttgaaacggg accagttcca atacatcgcg	300
	gcttcgcaact acgatccaca agcggccaag ctgaaagccg aaggcattaa cgtcgatgac	360
	cgacatgtcg cgggtgcgtga atgcgtgttc agcgtagccg tgcaatatgg tcgaaatact	420
	tcgatcatta tcaaagcact cggcagtaat ttccggggca gcgacaaaga cttcatcgaa	480
	aagggtcagg actatcgcgg tgccacgggt aacacctact ttaaattccag tagccagcaa	540
[0020]	actcgcgaca gcgtgaaaaa ccgctcgcag caagaaaagc aaatgctgct gaaactcctg	600
	aatagttaa	609
	<210> 35	
	<211> 807	
	<212> DNA	
	<213> 铜绿假单胞菌	
	<400> 35	
	atgacccttc gatatggtga tcgtttctcaa gaggtccgcc agcttcagcg tcgactgaac	60
	acctgggccc gcgccaacct ctacgaggac ggccacttcg gcgcccac tgaggacgcg	120
	gtgcgcgctc tccagcgtc gcgatggcctg gtcgccgatg gcacgccgg cccgaagacc	180
	ctggccgctc tcggcggagc tgactgctcg cacctgctgc agaacgccga cctcgtcgcc	240
	gccgcaactc gcctcggcct gccgctggcg acgatctatg cgggtcaatca ggtcgagtgc	300
	aacggccagg ggttcctggg caacggcaag ccggcaatcc tgttcgaacg ccacatcatg	360
	taccgccgtc tcgccccca cgatcaggtc accgccgacc agttggccgc acagttcccc	420
	gcgctggtga atcctcgccc gggcggctat gccggcggaa ccgccgagca ccagcgctg	480
	gcgaacgctc gccagatcga cgataccgcc gcactggagt cggccagttg gggagccttc	540
	cagatcatgg gtttccactg gcaacgcctg ggctacatca gcgtgcaggc cttcgccgag	600
	gccatggggc gcagcgagtc ggctcagttc gaagcgttcg tccgcttcat cgacaccgac	660
	ccggcgctac acaaggcgct gaaggctcgc aaatgggccc acttcgcccc cctctacaat	720
	ggccccgact acaagcgga cctctacgac aacaagctcg cgcgggccta cgagcaacac	780
	gccaaactgcg ccgaggccag cgcgtga	807
	<210> 36	
	<211> 474	

<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成核酸	
<400>	36	
	atgaaaaatt ttaatgaaat aattgaacat gttttaaaac atgagggtgg ttatgtaaat	60
	gaccctaaag atttaggtgg tgaaaccaag tatggtatca ctaaaaggtt ttatccagat	120
	cttgatatta agaatctaac aatagaacaa gcaacagaaa tctataaaaa agattattgg	180
	gataaaaaca aagtagaatc tcttcctcaa aatctatggc acatttattt tgatatgtgt	240
	gttaatatgg gtaagagaac tgcagttaaa gttctacaaa gagcagctgt caataggggt	300
	agagatatag aagttgatgg cggtttagga ccagcgacaa tcggagctct caaagggtga	360
	gaattagata gagttagagc tttcagagta aagtattatg tggatttaat aacagctaga	420
	ccagaacaag agaaatttta tttaggaatgg tttagaagag caactgaagt ataa	474
<210>	37	
<211>	696	
<212>	DNA	
<213>	假单胞菌噬菌体 phi2954	
<400>	37	
	atgagcaaac aaggcggcgt gaaagttgca caggcagtag ccgcgctgtc ttgcgcctggt	60
	ctcaaaatcg acggtatcgt cggtaaagcg actcgggcgg ctgtgtcatc gatgcctagc	120
	agccagaagg cggctacgga taagatactg caaagcgtg gaattggatc gcttgactcc	180
	ctcttggtcg agccggcagc agcgacgtcc gataccttcc gcgaagtggg gcttgccgtt	240
	gcgcgtgagg caagaaaacg ggggtctaat cccgctttct atgtggctca catcgcttg	300
	gaaactgggt gggggcggtt cgtcccgaaa ctccctgacg ggcgttccag ttacaactac	360
	gcagggctca aatatgcggc ggtaagacg caggttaagg gtaaaaccga aaccaatact	420
	cttgaatata tcaagagcct accgaagacg gtgcgagact ctttcgcagt gtttgcttcg	480
	gcaggggatt tttcgagggt gtacttctgg tacctcctcg acagtccgtc tgcttatcgg	540
	taccccggtc tcaagaatgc gaagacagct caggagtttg gtgacatcct ccaaaagggc	600
	ggctacgca ctgaccgcgc atacgccgca aaagtagcgt cgatcgcaag caccgccgtg	660
	gctcgtacg gtagtgatgt gagttccgtt gcatag	696
<210>	38	
<211>	483	
<212>	DNA	
<213>	铜绿假单胞菌	
<400>	38	
	atggctgttg tttctgaaaa aaccgctggt ggtcgtaacg ttctggcttt cctggacatg	60
	ctggcttggt ctgaaggtae ctctaccatc cgtggttctg acaacggtta caacgttggt	120
	gttggtggtg gtctgttcaa cggttacgt gaccacccgc gtctgaaagt ttacctgccg	180
	cgttacaag tttactctac cgtgctggt cgttaccagc tgctgtctcg ttactgggac	240
	gcttaccgtg aatctctggc tctgaaaggt ggtttcacce cgtctaacca ggacctgggt	300
	gctctgcagc agatcaaaga acgtcgttct ctggctgaca tccaggtgg tcgtctggct	360
	gacgtgttc agaaatgctc taacatctgg gcttctctgc cgggtgctgg ttacggtcag	420
	cgtgaacact ctctggacga cctgaccgct cactacctgg ctgctgggtg tgttctgtct	480
	taa	483

[0021]

<210>	39	
<211>	558	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成核酸	
<400>	39	
	atgacectga ccaaagacgg tttctctatc atccgtaacg aactgttcga aggtaaactg	60
	gaccagaccc aggttgacgc tatcaacttc atcggtgaaa aagctaccga atacggtctg	120
	acctaccccg aagctgctta cctgctggct accatctacc acgaaaccgg tctgccgtct	180
	ggttacccgta ccatgcagcc gatcaaagaa gctggttctg actcttacct gcgttctaaa	240
	aaatactacc cgtacatcgg ttacggttac gttcagctga cctgggaaga aaactacgaa	300
	cgtatcggta aactgatcgg tatcgacctg gttaaaaacc cggaaaaagc tctggaaccg	360
	ctgatcgcta tccagatcgc tatcaaaggt atgctgaacg gttggttcac cgggtgttgg	420
	ttccgctgta aacgtccggt ttctaaatac aacaaacagc agtacgttgc tgctcgtaac	480
	atcatcaacg gtaaagacaa agctgaactg atcgctaaat acgctatcat cttcgaacgt	540
	gctctgcgtt ctctgtaa	558
<210>	40	
<211>	798	
<212>	DNA	
<213>	假单胞菌噬菌体 PhiPA3	
<400>	40	
[0022]	atgacattac tgaagaaagg cgacaagggt gacgccgtaa aacaactaca gcagaaactc	60
	aaagaccttg ggtataccct ggggtgtcgtat ggcaacttcg gtaatggcac cgatactgtc	120
	gttcgttctt tccaaaccaa aatgaagctt agtgttgatg gtgtggttgg taatggtact	180
	atgagtacta ttgactctac tctagcaggc attaaagcgt ggaagactag tgtaccttc	240
	cctgcgacga acaaatcccg agcaatggca atgccaacgt tgactgaaat aggtcgactg	300
	acaaacgttg atcctaaatt gctagcgaca ttctgttcta tcgaaagcgc gtttgattac	360
	acagctaaac cctacaagcc cgatggcaca gtgtacagct ccgccgaagg ttggttcag	420
	ttcctggatg caacatggga tgacgaagtg cgtaaacacg gtaagcaata tagcttcct	480
	gttgatcctg gtcgttcttt gcgtaaagat ccacgggcta atggcttgat gggecgtgag	540
	ttctctaaag ggaatgctgc tattctgcgg ccagtactgg gtcatgaacc gagcgacaca	600
	gatctttatc tagcccatth catgggagca ggtggcgcaa aacagttcct tatggccgat	660
	caaaataaat tggctgccga attgttcctt ggtccagcta aggctaattc taacatcttc	720
	tataaatccg gaaatattgc ccgcacttta gcagaggtct atgcagtcct cgatgctaag	780
	gtagccaagc atagagct	798
<210>	41	
<211>	399	
<212>	DNA	
<213>	不动杆菌属物种 1294596	
<400>	41	
	atgtctttca aactgggtaa acgttctctg tctaacctgg aagggtttca cccggacctg	60
	atcaaagttg ttaaactgtc tatcgaaactg accgaatgcg acttcaccgt taccgaaggt	120
	ctgcgttcta aagaactgca ggctcagctg ctgaaagaaa aaaaaaccac cacctctaac	180

	tctcgtcacc tgaccggtca cgctgttgac ctggctgctt gggttaacaa caccgtttct	240
	tgggactgga aataactacta ccagatcgct gacgctatga aaaaagctgc ttctgaactg	300
	aacgtttcta tcgactgggg tggtagctgg aaaaaattca aagacgggcc gcacttcgaa	360
	ctgacctggt ctaaataccc gatcaaaggt gcttcttaa	399
	<210> 42	
	<211> 351	
	<212> DNA	
	<213> 假单胞菌噬菌体 PaP2	
	<400> 42	
	atgaaactca gcgaaaaacg agcactgttc acccagctgc ttgcccagtt aattctttgg	60
	gcaggaactc aggatcgagt gtcagtagcc ttggatcaag tgaaaaggac acaggctgaa	120
	gctgatgcca atgctaagtc tggagcaggc attaggaact ctctccatct actgggatta	180
	gccggtgatc ttatcctcta caaggatggt aaatacatgg ataagagcga ggattataag	240
	ttcctgggag attactggaa gagtctccat cctctttgtc ggtggggcgg agattttaaa	300
	agccgtcctg atggtaatca tttctccttg gaacacgaag gagtgaata a	351
	<210> 43	
	<211> 432	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核酸	
	<400> 43	
[0023]	atgcggacat cgcaacgcgg cttgagcctc atcaagtcgt tcgaggccct gcgtctgcag	60
	gcatatcaag attcagtagg cgtctggacg attggctacg ggaccactcg tggcgtgaag	120
	gccggcatga aaatcagcaa ggaccaggca gagcgcacgc tgctgaacga cgtgcagcgc	180
	ttcgagcctg aagttgagcg cctgatcaag gtgccgctga atcaggatca gtgggacgcc	240
	ctgatgagct tcacctacaa cctggggcgg gcaaacctcg aatcgtccac gctccgcgac	300
	ctgtcfaatg ctggcaacta cgcagctgct gctgagcagt tcccgcattg gaacaaggct	360
	ggcgggcaag tacttgccgg cctaaccctg cggcgtgcag ctgagcggga gctgttctctg	420
	ggggccgcgt ga	432
	<210> 44	
	<211> 435	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核酸	
	<400> 44	
	atgcgtacat cccaacgagg catcgacctc atcaaatcct tcgaggccct gcgcctgtcc	60
	gcttaccagg actcgtggg tgtctggacc ataggttacg gcaccactcg gggcgtcacc	120
	cgctacatga cgatcacctg cgagcaggcc gagcggatgc tgtcgaacga cattcagcgc	180
	ttcgagccag agctagacag gctggcgaag gtgccactga accagaacca gtgggatgcc	240
	ctgatgagct tcgtgtacaa cctgggcgcg gccaatctgg cgtcgtccac gctgctcgac	300
	ctgctgaaca agggtagcta ccaggagca gcggaccagt tcccgcattg ggtgaatgcg	360
	ggcggttaag gcttggtatg tctggttaag cgtcgagcag ccgagcgtgc gctgttctctg	420

	gagccactat cgtga	435
	<210> 45	
	<211> 474	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核酸	
	<400> 45	
	atgcgtacat cccaacgagg catcgacctc atcaaatcct tcgagggcct gcgcctgtcc	60
	gcttaccagg actcgggtggg tgtctggacc ataggttacg gcaccactcg gggcgtcacc	120
	cgctacatga cgatcacctg cgagcaggcc gagcggatgc tgcgaacga cattcagcgc	180
	ttcagagccag agctagacag gctggcggaag gtgccactga accagaacca gtgggatgcc	240
	ctgatgagct tcgtgtacaa cctgggcgcg gccaatctgg cgtcgtccac gctgctcaag	300
	ctgctgaaca aggggtgacta ccaggagca gcggaccagt tcccgcgtg ggtgaatgcg	360
	ggcggtaagc gcttggatgg tctggttaag cgtcagcag ccgagcgtgc gctgttcctg	420
	gagccactat cgggcccccg ccggccacga cgacctggac gccgggcacc tgtc	474
	<210> 46	
	<211> 519	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核酸	
[0024]	<400> 46	
	aaattcttta agttcttta gttttttaaa gccggcgag gagctggtgc aggagctggt	60
	gcaggagctg gtgcaggagc tagcatgcgt acatccaac gaggcacga cctcatcaaa	120
	tccttcgagg gcctgcgct gtccgcttac caggactcgg tgggtgtctg gaccataggt	180
	tacggcacca ctcgggcggt caccgcgtac atgacgatca ccgtcagca ggccgagcgg	240
	atgtgtcga acgacattca gcgcttcgag ccagagctag acaggctggc gaaggtgcc	300
	ctgaaccaga accagtggga tgccctgatg agcttcgtgt acaacctggg cgcggccaat	360
	ctggcgtcgt ccacgtgct caagctgctg aacaagggtg actaccagg agcagcggac	420
	cagttcccgc gctgggtgaa tgcgggcggg aagcgttgg atggtctggt taagcgtcga	480
	gcagccgagc gtgcgtggt cctggagcca ctatcgtaa	519
	<210> 47	
	<211> 516	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核酸	
	<400> 47	
	aaacgcaaga aacgtaagaa acgcaaagcc ggcgcaggag ctggtgcagg agctggtgca	60
	ggagctggtg caggagctag catgcgtaca tccaacgag gcacgcacct catcaaatcc	120
	ttcaggggcc tgcgcctgtc cgcttaccag gactcgggtg gtgtctggac cataggttac	180
	ggcaccactc ggggcgtcac ccgtacatg acgatcaccg tcgagcaggc cgagcggatg	240
	ctgtcgaacg acattcagcg ctctgagcca gagctagaca ggctggcgaa ggtgccactg	300

	aaccagaacc agtgggatgc cctgatgagc ttcgtgtaca acctgggcgc ggccaatctg	360
	gcgtcgtcca cgctgctcaa gctgctgaac aagggtgact accagggagc agcggaccag	420
	ttcccgcgct ggggtgaatgc gggcggttaag cgcttgatg gtctggttaa gcgtcgagca	480
	gccgagcgtg cgctgttctt ggagccacta tcgtaa	516
	<210> 48	
	<211> 432	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核酸	
	<400> 48	
	atgacctaca ccctgtctaa acgtttctctg gacaacctga aaggtgttca cccggacctg	60
	gttgctgttg ttcaccgtgc tatccagctg accccggttg acttcgctgt tatcgaaggt	120
	ctgcgttctg tttctcgtca gaaagaactg gttgctgctg gtgcttctaa aaccatgaac	180
	tctcgtcacc tgaccggtca cgctgttgac ctggctgctt acgttaacgg tatccgttgg	240
	gactggccgc tgtacgacgc tatcgtgtt gctgttaaag ctgctgctaa agaactgggt	300
	gttgctatcg tttggggtgg tgactggacc acctcaaag acggtccgca cttcgaactg	360
	gaccgttcta aataccgtaa aaaaaccgt aaacgtctga aaaaaatcgg taaagtctg	420
	aatggatct aa	432
	<210> 49	
	<211> 465	
	<212> DNA	
[0025]	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核酸	
	<400> 49	
	aaattcttta agttctttaa gttttttaa gccggcgcag gagctggtgc aggagctggt	60
	gcaggagctg gtgcaggagc tagcatgaca tacaccctga gcaaaagaag cctggataac	120
	ctaaaaggcg ttcattccga tctggttgcc gttgtccatc gcgccatcca gcttacaccg	180
	gttgatttcg cggatgatca aggcctgcgc tccgtatccc gccaaaagga actggtggcc	240
	gccggcgcca gcaagacat gaacagccga cacctgacag gccatgcggt tgatctagcc	300
	gcttacgtca atggcatccg ctgggactgg cccctgtatg acgccatcgc cgtggctgtg	360
	aaagccgcag caaaggaatt ggggtgtggc atcgtgtggg gcggtgactg gaccacgttt	420
	aaggatggcc cgcacttga actggatcgg agcaaatata gataa	465
	<210> 50	
	<211> 453	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核酸	
	<400> 50	
	atgtctttca aactgggtaa acgtttctctg tctaacctgg aaggtgttca cccggacctg	60
	atcaaagttg ttaaactgc tatcgaactg accgaatgcg acttcaccgt taccgaaggt	120
	ctgcgttcta aagaactga ggctcagctg ctgaaagaaa aaaaaaccac cacctctaac	180

	tctcgtcacc tgaccgggtca cgctgttgac ctggctgctt gggttaacaa caccgtttct	240
	tgggactgga aatactacta ccagatcgct gacgctatga aaaaagctgc ttctgaactg	300
	aacgtttcta tcgactgggg tggtagctgg aaaaaattca aagacgggcc gcacttcgaa	360
	ctgacctggg ctaaataccc gatcaaaggt gcttctcgta aaaaaacccg taaacgtctg	420
	aaaaaaatcg gttaaagtct gaaatggatc taa	453
	<210> 51	
	<211> 474	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核酸	
	<400> 51	
	ggctccgcgtc gtccgcgtcg tccgggtcgt cgtgctccgg ttatgcggac atcgcaacgc	60
	ggcttgagcc tcatcaagtc gtccgagggc ctgcgtctgc aggcatatca agattcagta	120
	ggcgtctgga cgattggcta cgggaccact cgtggcgtga aggccggcat gaaaatcagc	180
	aaggaccagg cagagcgcat gctgctgaac gacgtgcagc gcttcgagcc tgaagttgag	240
	cgctgatca aggtgccgtt gaatcaggat cagtgggacg ccctgatgag cttcacctac	300
	aacctggggg cggcaaacct cgaatcgcc acgctccgcg acctgctcaa tgctggcaac	360
	tacgcagctg ctgctgagca gtccccgat tggacaagg ctggcgggca agtacttgcc	420
	ggcctaaccg gtcggcgtgc agctgagcgg gagctgttcc tggggggcgc gtga	474
	<210> 52	
	<211> 480	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核酸	
	<400> 52	
	ggctccgcgtc gtccgcgtcg tccgggtcgt cgtgctccgg ttatgcgtac atcccaacga	60
	ggcatcgacc tcatcaaatc ctccgagggc ctgcgctgt catgcgctta ccaggactcg	120
	gtgggtgtct ggaccatagg ttacggcacc actcggggcg tcaccgcta catgacgac	180
	accgtcgagc aggccgagcg gatgctgtcg aacgacattc agcgtctga gccagagcta	240
	gacaggctgg cgaaggtgcc actgaaccag aaccagtggg atgccctgat gagcttcgtg	300
	tacaacctgg gcgcggccaa tctggcgtcg tccacgtgc tcgacctgt gaacaagggt	360
	gactaccagg gagcagcgga ccagttcccg cattgggtga atgcgggcgg taagcgttg	420
	gatggtctgg ttaagcgtcg agcagccgag cgtgcgtgt tcctggagcc actatcgtga	480
	<210> 53	
	<211> 405	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核酸	
	<400> 53	
	atgaaactca gcgaaaaacg agcactgttc acccagctgc ttgcccagtt aattctttgg	60
	gcaggaactc aggatcgagt gtcagtagcc ttgatcaag tgaaaaggac acaggctgaa	120

[0026]

	gctgatgcca atgctaagtc tggagcaggc attaggaact ctctccatct actgggatta	180
	gccggtgata ttatcctcta caaggatggg aaatacatgg ataagagcga ggattataag	240
	ttcctgggag attactggaa gagtctccat cctctttgtc ggtggggcgg agattttaaa	300
	agccgtcctg atggtaatca tttctccttg gaacacgaag gagtgcacg taaaaaaccc	360
	cgtaaacgtc tgaaaaaat cggtaaagtt ctgaaatgga tctaa	405
	<210> 54	
	<211> 432	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0027]	<223> 合成核酸	
	<400> 54	
	atgcggacat cgcaacgcgg cttgagcctc atcaagtcgt tcgaggcct gctctgcag	60
	gcataatcaag attcagtagg cgtctggacg attggctacg ggaccactcg tggcgtgaag	120
	gccggcatga aaatcagcaa ggaccaggca gagcgcatgc tgcagaacga cgtgcagcgc	180
	ttcgagcctg aagttgagcg cctgatcaag gtgccgctga atcaggatca gtgggacgcc	240
	ctgatgagct tcacctaaa cctgggggag gcaaacctcg aatcgccac gctccgcgac	300
	ctgctcaatg ctggcaacta cgcagctgct gctgagcagt tcccgcactg gaacaaggct	360
	ggcgggcaag tacttgccgg cctaaccgt cggcgtgcag ctgagcggga gctgttcctg	420
	ggggccgcgt ga	432