



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103635584 B

(45)授权公告日 2017.10.27

(21)申请号 201280026193.7

巴拉希·西瑞兰姆

(22)申请日 2012.04.12

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理
有限责任公司 11204

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103635584 A

代理人 王达佐 洪欣

(43)申请公布日 2014.03.12

(51)Int.Cl.

C12P 21/06(2006.01)

(30)优先权数据

1277/CHE/2011 2011.04.12 IN

(56)对比文件

W0 0193875 A1,2001.12.13,

W0 0029588 A1,2000.05.25,

GenPept.ACCESSION NP_877475.

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2013.11.28

《GenPept》.2009,

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IN2012/000261 2012.04.12

Briers Y.等.Muralytic activity and

(87)PCT国际申请的公布数据

W02012/140676 EN 2012.10.18

modular structure of the endolysins of

Pseudomonas aeruginosa bacteriophages fKZ

and EL.《Molecular Microbiology》.2007,第65

卷(第5期),第1334-1344页.

(73)专利权人 冈戈根股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

审查员 马静

(72)发明人 C·B·阿巴艾亚

斯里拉姆·帕德马纳博汗

R·桑吉弗·萨拉瓦纳恩

权利要求书1页 说明书56页

序列表30页 附图4页

(54)发明名称

嵌合抗菌多肽

(57)摘要

本文中提供了抗菌组合物以及制备和使用
该组合物的方法。

1.抑制细菌细胞生长的嵌合多肽,其中所述嵌合多肽包含选自以下的序列:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:13。

2.根据权利要求1所述的嵌合多肽,其中所述嵌合多肽包含SEQ ID NO:9的序列。

3.根据权利要求1所述的嵌合多肽,其中所述嵌合多肽包含SEQ ID NO:11的序列。

4.根据权利要求1所述的嵌合多肽,其中所述嵌合多肽包含SEQ ID NO:13的序列。

5.药物组合物,其包含前述权利要求中任一项所述的嵌合多肽和药学上可接受的赋形剂。

6.权利要求5所述的药物组合物在制备用于抑制个体内细菌细胞生长的药物中的用途。

7.根据权利要求6所述的用途,其中所述细菌选自:绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、肺炎克雷伯杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、肺炎克雷伯杆菌、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、婴儿沙门氏菌(*Salmonella infantis*)、志贺氏菌(*Shigella*)、奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)和泰国伯克氏菌(*Burkholderia thailandensis*)。

8.抗菌剂,包含权利要求1-4中任一项所述的嵌合多肽和减少氧化作用的药剂。

9.抑制环境中细菌细胞生长的方法,包括将权利要求1所述的嵌合多肽应用到所述环境中。

10.根据权利要求9所述的方法,其中所述细菌选自:绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、肺炎克雷伯杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、肺炎克雷伯杆菌、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、婴儿沙门氏菌(*Salmonella infantis*)、志贺氏菌(*Shigella*)、奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)和泰国伯克氏菌(*Burkholderia thailandensis*)。

嵌合抗菌多肽

技术领域

[0001] 本发明提供了减少微生物菌落生长(包括感染)的方法和组合物,且包括治疗感染的治疗性组合物、方法,以及鉴别其他此类组合物的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 细菌无处不在、生态学上多种多样,且可在特殊的生存生境中生存。它们存在于所有环境中,例如,土壤、灰尘、水和几乎所有表面上。

[0004] 致病菌可以引起人、其他动物和植物的传染性疾病。一些细菌仅能感染特定宿主或给其造成问题,而其他细菌则具有更为广泛的宿主特异性,且能给许多宿主造成问题。由细菌引起的疾病几乎与细菌自身一样多种多样,例如,食物中毒、龋齿、炭疽热、常规传染性疾病,以及甚至某些形式的癌症。

[0005] 某些细菌通常是无害的,但在合适的时机变得具有致病性,在引入到异常位点或异常情形下变得可引起麻烦。缺少有效免疫系统的人最易受到攻击,且某些细菌利用虚弱的宿主来进行增殖并在该人群中传播。

[0006] 抗生素在过去的半个世纪中革新了临床医学。由于抗菌现象的首次发现,其作用机制和这类突出的治疗性实体(entities)的发展取得了巨大的进步。参见,例如,Therrien and Levesque (2000) FEMS Microbiol Rev. 24:251-62; Durgess (1999) Chest 115 (3Suppl) : 19S-23S; Medeiros (1997) Clin. Infect. Dis. 24 (Suppl1) : S19-45; Jones (1996) Am. J. Med. 100 (6A) : 3S-12S; Ford and Hait (1993) Cytotechnology 12 (1-3) : 171-212 和 Liu (1992) Compr Ther. 18:35-42。2002年抗生素在全世界范围内具有约320亿美元的销量。

[0007] 然而,耐抗生素菌的广泛出现突出了当前的抗菌治疗相对于细菌适应性的脆弱性。参见,例如, Walsh (1992) Antibiotics: Actions, Origins, Resistance Amer. Soc. Microbiol.; Cunha (1992) Antibiotic Essentials (Physicians Press); Amyes (2003) Magic Bullets, Lost Horizons: The Rise and Fall of Antibiotics (Taylor & Francis); Axelsen (2001) Essentials of Antimicrobial Pharmacology: A Guide to Fundamentals for Practice (Humana Press); 以及 Mainous 和 Pomeroy (eds. 2001) Management of Antimicrobials in Infectious Diseases: Impact of Antibiotic Resistance (Humana Press)。已经报道了一种多重耐药质粒NDM-1 (Kumarasamy et al. (2010) Lancet Infectious Diseases 10:597-602; 以及 Walsh et al. (2011) Lancet Infectious Diseases, Early Online Publication, 7 April 2011, doi:10.1016/S1473-3099(11)70059-7)。

[0008] 因此,改进的减少细菌生长和存活或限制细菌致病性的方法具有巨大的效用,尤其是对于抗生素耐受菌,其多数通常为革兰氏阴性的。抑菌效应适用于环境、区域、局部且尤其是体内的定殖。本发明解决了这些和其他重要的问题。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明提供了抗菌性嵌合多肽,其包含可穿越革兰氏阴性菌外膜的组分(component) (即,跨膜结构域或MTD) 和用于降解细菌细胞壁(即,胞壁质水解结构域

(muralytic domain)或MD)的组分。

[0011] 本发明提供了嵌合多肽,其包含源自表A所列MD源中一种的MD和源自表B所列MTD源中一种的MTD。在一些实施方案中,相比未处理的对照培养物,嵌合多肽可减少革兰氏阴性菌培养物的CFU。在一些实施方案中,1-100nmol的嵌合多肽可在CFU下降试验(CFU drop assay)中溶解至少50%的 10^7 个革兰氏阴性菌。在一些实施方案中,所述细菌选自:绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、肺炎克雷伯杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、肺炎克雷伯杆菌、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、婴儿沙门氏菌(*Salmonella infantis*)、志贺氏菌(*Shigella*)、奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)和泰国伯克氏菌(*Burkholderia thailandensis*)。

[0012] 在一些实施方案中,MTD包含选自以下的序列:SEQ ID NO:4的16-39位氨基酸;SEQ ID NO:15的242-264位氨基酸;SEQ ID NO:17的242-271位氨基酸;SEQ ID NO:19的220-406位氨基酸;SEQ ID NO:21的220-400位氨基酸;SEQ ID NO:23的220-885位氨基酸;和DAS谱为1.2-2.6的以上序列的变体。在一些实施方案中,所述以上序列的变体有1-6个疏水性氨基酸被亲水性分数为-2或更低的氨基酸替换。在一些实施方案中,MTD的DAS谱低于2.5。在一些实施方案中,嵌合多肽的DAS谱低于2.5。在一些实施方案中,MTD包含选自以下的序列:SEQ ID NO:4的16-39位氨基酸;SEQ ID NO:15的242-264位氨基酸;SEQ ID NO:17的242-271位氨基酸;SEQ ID NO:19的220-406位氨基酸;SEQ ID NO:21的220-400位氨基酸;SEQ ID NO:23的220-885位氨基酸;和以上序列的变体,所述变体与选自以下的序列具有至少80%(例如,至少85%、87%、90%、92%、95%、98%或99%)的相同性:SEQ ID NO:4的16-39位氨基酸;SEQ ID NO:15的242-264位氨基酸;SEQ ID NO:17的242-271位氨基酸;SEQ ID NO:19的220-406位氨基酸;SEQ ID NO:21的220-400位氨基酸;SEQ ID NO:23的220-885位氨基酸。

[0013] 在一些实施方案中,嵌合多肽包含选自以下的序列:SEQ ID NOs:9、11、13、15、17、19、21和23以及以上序列的变体,其中所述变体与SEQ ID NOs:9、11、13、15、17、19、21或23具有至少90%(例如,至少92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)的相同性。在一些实施方案中,以上序列的变体有1-10个半胱氨酸或甲硫氨酸氨基酸被非半胱氨酸、非甲硫氨酸氨基酸替换。

[0014] 在一些实施方案中,嵌合多肽包含MD,其包含SEQ ID NO:2的737-875位氨基酸序列或该氨基酸序列的变体,且其能溶解经氯仿处理过的革兰氏阴性菌。在一些实施方案中,该氨基酸序列的变体与SEQ ID NO:2的737-875位氨基酸具有至少90%(例如,至少92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)的相同性。在一些实施方案中,MD包含SEQ ID NO:2的683-889位氨基酸序列或该氨基酸序列的变体,其中所述变体与SEQ ID NO:2的683-889位氨基酸具有至少90%(例如,至少92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)的相同性。在一些实施方案中,1-100nmol的MD在CFU下降试验中可溶解至少50%的 10^7 个经氯仿处理过的绿脓杆菌细菌。在一些实施方案中,该氨基酸序列的变体有1-7个甲硫氨酸氨基酸被非甲硫氨酸氨基酸替换。

[0015] 在一些实施方案中,嵌合多肽包含MD,其包含与SEQ ID NO:2的737-875位氨基酸具有至少90%的相同性的序列,且MTD包含与SEQ ID NO:4的16-39位氨基酸具有至少80%的相同性的序列。在一些实施方案中,嵌合多肽包含与SEQ ID NO:11或13具有至少95%(例如,

96%、97%、98%、99%或100%)的相同性的序列。

[0016] 在一些实施方案中,通过包含3-5个带正电荷的氨基酸的连接臂(linker)(例如,R、H、K及其组合)连接MTD和MD。在一些实施方案中,带正电荷的氨基酸是连续的或彼此很靠近(例如,具有1-3个插入中间的非正电荷氨基酸)。在一些实施方案中,MD位于N末端和C末端一侧,并具有3-5个带正电荷的氨基酸。在一些实施方案中,嵌合多肽被连接到PAG或PEG分子上。

[0017] 本发明进一步提供了抗菌组合物,其包含如上所述的嵌合多肽。在一些实施方案中,抗菌组合物包含所述嵌合多肽——一种可减少氧化作用的药剂。在一些实施方案中,抗菌组合物为包含所述嵌合多肽和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

[0018] 本发明进一步提供了治疗个体内细菌感染的方法,例如,抑制细菌细胞生长和/或减少个体内靶细菌的数目。在一些实施方案中,该方法包括将有效量包含嵌合多肽的药物组合物给予到个体,例如,相比未处理的对照,从而抑制个体内靶细菌的细胞生长。在一些实施方案中,该方法包括将有效量包含嵌合多肽的药物组合物给予到个体,相比治疗前存在的靶细菌的数目,从而减少个体内靶细菌的数目。在一些实施方案中,靶细菌(可感染个体的细菌)选自:绿脓杆菌、肺炎克雷伯杆菌、大肠杆菌、肺炎克雷伯杆菌、鲍曼不动杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、婴儿沙门氏菌、志贺氏菌、奇异变形杆菌和泰国伯克氏菌。

[0019] 本发明进一步提供了减少靶细菌数目或抑制环境中细菌细胞生长的方法,包括将如本文中描述的嵌合物应用到环境中。在一些实施方案中,靶细菌选自:绿脓杆菌、肺炎克雷伯杆菌、大肠杆菌、肺炎克雷伯杆菌、鲍曼不动杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、婴儿沙门氏菌、志贺氏菌、奇异变形杆菌和泰国伯克氏菌。在一些实施方案中,所述环境为表面(例如,用于食物准备或医学应用的)、药物组合物、医疗设备、水源或液体源或食物产品。

[0020] 本发明部分基于该认识——作为噬菌体细胞溶解功能核心的噬菌体编码的细胞壁降解活性,例如,胞壁质-降解(或胞壁质水解)酶,也被发现为噬菌体病毒粒子的结构组分,它们可能为感染细菌所必须。革兰氏阴性细菌的特征在于由外膜环绕薄的肽聚糖细胞壁,在革兰氏阳性菌中缺乏该肽聚糖细胞壁。虽然胞壁质水解酶可以降解革兰氏阴性细胞的薄的肽聚糖层,但外膜通常可阻止胞壁质水解活性从外面介质中进入。将酶促活性胞壁质水解片段(segment/fragment)连接到药剂(实体)上,提供了将片段转移穿越外膜,从而允许酶活性接触肽聚糖层,导致肽聚糖层的降解。由于穿越细胞膜内膜的巨大渗透压,肽聚糖层的毁坏导致细胞破裂。

[0021] 本发明提供了重组性嵌合多肽,包含:

[0022] a) 片段,其包含与BPI TMD的16-39位氨基酸相匹配的至少20个氨基酸;和

[0023] b) 多个至少20个氨基酸的不同片段,其与GP36的683-898位氨基酸展现至少85%的相同性且其片段不重叠。

[0024] 在一些实施方案中,至少20个氨基酸的片段匹配数为至少22处、23处或24处匹配。在一些实施方案中,所述多个数目至少为3。在一些实施方案中,所述不同的片段包括一个展现至少92%的相同性的至少40个氨基酸的片段。在一些实施方案中,嵌合多肽相比GP36,展现出对源自革兰氏阴性细菌宿主的纯化肽聚糖的至少25%、30%、35%、40%、50%、55%、60%、75%、80%、85%、90%、95%或更高%的胞壁质水解活性。在一些实施方案中,嵌合多肽相比SEQ ID NO:9的多肽,展现出对完整革兰氏阴性细菌宿主的至少25%、30%、35%、40%、50%、55%、

60%、75%、80%、85%、90%、95%或更高%的胞壁质水解活性。在一些实施方案中,多肽与SEQ ID NO:9的多肽展现出至少85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列相同性。在一些实施方案中,嵌合多肽包含至少BPI TMD的16-39位氨基酸。在一些实施方案中,嵌合多肽包含与GP36的683-889位或737-875位氨基酸具有至少85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同性的序列。在一些实施方案中,所述嵌合多肽包含或由SEQ ID NO:9组成。

[0025] 在一些实施方案中,嵌合多肽大体上不含有其他噬菌体蛋白;或大体上不含有其他蛋白质材料。在一些实施方案中,将所述嵌合多肽与另一抗菌剂组合,包括抗菌剂或解聚酶制剂。在一些实施方案中,将所述嵌合多肽与药学赋形剂掺合在一起或将其溶在缓冲性 or 无菌的组合物中。

[0026] 在一些实施方案中,所述嵌合多肽展现细菌细胞壁降解活性,所述活性选自:胞壁质水解活性、葡萄糖酰胺酶活性、胞壁酰胺酶活性、酰胺酶活性或肽链内切酶活性。在一些实施方案中,细胞壁降解(例如,胞壁质水解)活性对多种革兰氏阴性的细菌菌株有效。在一些实施方案中,细胞壁降解(例如,胞壁质水解)活性对假单胞菌(*Pseudomonas*)、伯克氏菌(*Burkholderia*)或埃希氏菌(*Escherichia*)细菌菌株有效。在一些实施方案中,细胞壁降解(例如,胞壁质水解)活性对下述一种或多种菌株有效:克雷伯氏菌(*Klebsiella*)、不动杆菌(*Acinetobacter*)、沙门氏菌(*Salmonella*)、变形杆菌(*Proteus*)、奈瑟氏菌(*Neisseria*)、莫拉菌(*Moraxella*)、嗜血杆菌(*Hemophilus*)、肠杆菌(*Enterobacter*)、沙雷氏菌(*Serratia*)、军团菌(*Legionella*)或螺杆菌(*Helicobacter*)物种。

[0027] 本发明提供了包含编码本文中描述的嵌合多肽的单独或重组核酸的表达载体。在一些实施方案中,本发明提供了包含所述表达载体的重组细胞。在一些实施方案中,所述细胞为真核或原核细胞,例如,用来表达核酸以制备或分泌蛋白。

[0028] 本发明提供了例如,通过将细菌暴露于本文中描述的嵌合多肽来酶促降解细菌细胞壁的方法。在一些实施方案中,所述方法导致表面(例如,医院、工作或家具等)上的敏感性细菌群体减少至少50%、60%、70%、80%或90%。在一些实施方案中,所述方法包括引入嵌合多肽到动物(例如,人或其他哺乳动物)体内,并导致动物体内或表面上选定位置的敏感性细菌群体减少至少20%。在一些实施方案中,将所述嵌合多肽与(施放到)动物表面或间室(compartment)(例如,消化道)接触。在一些实施方案中,将嵌合多肽施放到(给予)个体来治疗皮肤、粘膜组织、血液、尿路、呼吸道或胃肠道的细菌感染。在一些实施方案中,所述方法包括使用所述嵌合多肽以使用死的或溶解的细菌接种个体(诱导其体内的免疫应答)(参见,例如,W02003/026690)。

[0029] 本发明还提供了嵌合多肽,包含:胞壁质水解结构域,其包含来自SEQ ID NO:2的683-898位氨基酸的至少15个连续氨基酸的至少两个非重叠性片段,和包含SEQ ID NO:4的16-39位氨基酸的外膜转运结构域,其中所述胞壁质水解结构域具有对靶细菌的细胞壁降解活性。在一些实施方案中,所述胞壁质水解结构域包含来自与溶解性噬菌体的胞壁质水解活性相关的病毒粒子的至少15个连续氨基酸的多个非重叠性片段。在一些实施方案中,所述胞壁质水解结构域包含由前噬菌体结构基因编码的至少15个连续氨基酸的多个非重叠性片段。在一些实施方案中,所述胞壁质水解结构域来自肌尾噬菌体或短尾噬菌体。在一些实施方案中,所述胞壁质水解结构域源自噬菌体用来感染宿主细胞的胞壁质水解结构域。

[0030] 在一些实施方案中,靶细菌为革兰氏阴性菌(具有细菌外膜)。在一些实施方案中,靶细菌为假单胞菌、埃希氏菌、伯克氏菌、克雷伯氏菌、不动杆菌、沙门氏菌、变形杆菌、奈瑟氏菌、莫拉菌、嗜血杆菌、肠杆菌、沙雷氏菌、军团菌或螺杆菌物种。在一些实施方案中,靶细菌耐一种或多种临床常用的抗菌剂(例如,抗菌剂耐受性)。

[0031] 在一些实施方案中,本发明提供了用于治疗需要治疗的对象(例如患有细菌感染或存在发展为感染的风险的个体)体内的细菌感染的方法,包括:将如本文中描述的嵌合多肽给予到对象,从而治疗细菌感染(例如,减少个体内靶细菌的数目)。对象可以为患者或患兽,包括人、灵长类动物、表演用动物或宠物。在一些实施方案中,所述方法导致在个体内靶革兰氏阴性细菌群体的CFU减少至少20%、25%、30%、50%、60%、70%、80%或更高%,或在培养物中减少至少50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%或更高%(或在体外应用中,例如,在表面上)。本发明进一步提供了通过用嵌合多肽(或其组合物)接触液体表面对表面或液体消毒的方法。

[0032] 在一些实施方案中,本发明提供了用于制备嵌合多肽的方法,包括表达可编码嵌合多肽的核酸,例如,在真核细胞内。在一些实施方案中,核酸位于诸如质粒的表达载体内。

[0033] 在一些实施方案中,本发明提供了包含连接到胞壁质水解结构域上的BPI TMD的16-39位氨基酸的重组胞壁质水解蛋白,其中所述蛋白具有细菌外膜穿越能力(活性)和肽聚糖降解活性。在一些实施方案中,胞壁质水解蛋白相比GP36,具有对源自革兰氏阴性菌的纯化肽聚糖的50%、55%、60%、75%、80%、85%、90%、95%或更高%的肽聚糖降解活性。在一些实施方案中,使用非肽键将BPI TMD的16-39位氨基酸和胞壁质水解结构域连接在一起。在一些实施方案中,胞壁质水解蛋白为嵌合蛋白。本发明进一步提供了可编码胞壁质水解蛋白的重组核酸和包含所述核酸的宿主细胞。在一些实施方案中,本发明提供了用于杀伤拥有外膜的细菌的方法,包括将该菌与胞壁质水解蛋白接触。

[0034] 在一些实施方案中,本发明提供了重组胞壁质水解蛋白,其包含连接到膜转移结构域上的GP36的737-875位氨基酸(或GP36的683-889位氨基酸),其中所述蛋白具有细菌外膜穿越能力和肽聚糖降解活性。在一些实施方案中,所述胞壁质水解蛋白相比BPI-TMD,具有50%、55%、60%、75%、80%、85%、90%、95%或更高%的细菌外膜穿越活性。在一些实施方案中,使用非肽键将BPI TMD的16-39位氨基酸和胞壁质水解结构域连接在一起。在一些实施方案中,胞壁质水解蛋白为嵌合蛋白。本发明进一步提供了编码胞壁质水解蛋白的重组核酸和包含核酸的宿主细胞。在一些实施方案中,本发明提供了用于杀伤拥有外膜的细菌的方法,包括将该菌与胞壁质水解蛋白接触。

[0035] 在一些实施方案中,本发明提供了单独的重组胞壁质水解蛋白,其包含连接到膜转移结构域(提供细菌外膜穿越能力)上的胞壁质水解结构域(提供肽聚糖降解活性)。进一步提供了可编码胞壁质水解蛋白的重组型核酸和包含核酸的宿主细胞。本发明进一步提供了通过将该细菌与胞壁质水解蛋白接触用于杀伤拥有外膜的细菌的方法。

[0036] 在一些实施方案中,本发明提供了对胞壁质水解结构域和膜转移结构域的新的组合具有特异性的抗体,例如,可识别结合多肽的唯一表位的抗体。在一些实施方案中,抗体对SEQ ID NO:9的多肽和与SEQ ID NO:9具有至少85%、90%、92%、95%或更高%相同性的多肽具有特异性,但不明显地结合到SEQ ID NO:4的多肽或SEQ ID NO:5的多肽上。在一些实施方案中,本发明提供了方法来检测或分离如本文中描述的嵌合多肽,包括将抗体与包含嵌合多肽的液体或表面接触。

附图说明

[0037] 图1显示了(A) P266和(B) P275的DAS疏水性图。沿着蛋白质的长度显示了相对疏水性,其中N端在左,且C端在右。注意在修饰的P275蛋白中被减少的P266的C末端刺突。

[0038] 图2显示了(A) P266和(B) P275的TMHMM(使用隐马尔可夫模型的跨膜)预测。尽管该程序不预测P275的跨膜结构域,所述嵌合蛋白仍然可在与P266相同的水平下有效穿越细菌外膜并杀伤细菌。

[0039] 图3显示了使用(A) DAS图、(B) TMHMM和(C) Kyte Doolittle预测的大肠杆菌跨膜蛋白CydA的疏水性测量和跨膜预测。DAS图显示第6个和第7个预测的TMDs具有相对高的疏水性,表明这些结构域可以作为氨基酸替换的靶标。

[0040] 发明详述

[0041] I. 简介

[0042] 肽聚糖(胞壁质)小囊是大多数细菌细胞壁的必要结构组件。由通过短肽交叉结合的聚糖链构成,该小囊形成了环绕细菌细胞质膜的袋状封闭结构。小囊必须经受多达25个大气压的渗透压。小囊具有弹性,允许压力下的可逆扩张,其允许甚至大蛋白分子的扩散。参见,例如,Silhavy et al. (2010) *CSH Persp. Biol.*, 2:a000414; Vollmer et al. (2008) *FEMS Microbio. Revs* 32:149-167; Bos et al. (2007) *Ann. Rev. Microbiol.* 61:191-214以及 Costerton et al. (1974) *Bact. Revs.* 38:87-110。

[0043] 许多抗生素作用于靶细菌物种的肽聚糖层。因此该结构为靶细菌生存的关键组件。攻击肽聚糖是杀伤靶细菌宿主的合理策略。尽管肽聚糖层通常为约1-3层厚,外膜起着渗透屏障的作用,其可阻止外部施加的胞壁质水解酶到达它们的基质。

[0044] 本发明将胞壁质水解功能与膜通透性功能结合起来以获得新的实体。本文描述的嵌合(和连接)构建体(construct)将肽聚糖降解酶活性与膜穿越功能组合。在一些实施方案中,使蛋白具有胞壁质水解活性的蛋白片段被转移穿越细菌外膜而实现穿越功能。在一些实施方案中,穿越片段本身可调节膜转移事件,从而将胞壁质水解活性从细菌外膜的外部移到内部,从而允许酶和其肽聚糖基质间的接触。在一些实施方案中,穿越片段通过展现向系统发出信号以将分子输入到细胞周质间隙的特征基序(earmark),利用了外膜中的内源性转运系统。在一些实施方案中,穿越片段引导胞壁质水解多肽进入到外膜的外部小叶中,然后胞壁质水解多肽从外膜的外部小叶反转到内部小叶中,从而将胞壁质水解片段递送到肽聚糖基质。

[0045] II. 胞壁质降解酶、溶菌酶和细胞溶解素

[0046] 胞壁质水解结构域(本文中也称为催化结构域),包括例如溶菌酶蛋白(Salazar和Asenjo (2007) *Biotechnol. Lett.* 29:985-94)。天然情况下肽聚糖结构的破坏在至少4种情形下发生。一种为结构本身的生物合成;当细菌细胞生长和分裂时,其必须要破坏该结构。参见,例如,Vollmer (2008) *FEMS Microbiol. Rev.* 32:287-306; Scheurwater, et al. (2008) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40:586-91; Keep, et al. (2006) *Trends Microbiol.* 14:271-276,以及Baba和Schneewind (1998) *EMBO J.* 17:4639-4646。存在细胞自身必须重新排列或修饰之前合成的结构的其他情形。这些活性可能来源于细菌自己。第二,真核宿主在清除感染时降解该结构,例如,使用变溶菌素或溶菌酶。参见,例如,Callewaert和Michiels (2010)

J.Biosci.35:127-60;Harder,et al.(2007)Endocr.Metab.Immune Disord Drug Targets7:75-82,以及Lichtman,et al.(1992)J.Clin.Invest.90:1313-1322。这些活性通常来源于细菌所生活或能够定殖的真核宿主。第三个区域为在噬菌体复制中,其中噬菌体通常采用细胞内容素来释放复制的噬菌体并溶解细菌宿主细胞。参见,例如,Srividhya和Krishnaswamy(2007)J.Biosci.32:979-90,以及Loessner(2005)Curr.Opin.Microbiol.8:480-487。通常可在噬菌体基因组中发现这些活性。这是从细胞内部溶解肽聚糖层。第四种情形为噬菌体感染需要肽聚糖屏障被穿越的情形,如Padmanabhan,et al.WO2007/130655中所描述。这是从细胞外部降解肽聚糖层。这些活性作为噬菌体病毒粒子的组件被发现,且通常编码于噬菌体基因组中。

[0047] 这些机制的每一种都涉及一些拆解肽聚糖结构的手段。因此,胞壁质水解活性被发现于细菌的真核宿主基因组中、细菌自己的基因组中,以及把细菌作为宿主的噬菌体(和相关的前噬菌体)中。可以通过任何这些来源的同源物发现胞壁质水解结构域,且可以使用信息学用它们各自的标准基序来确定候选基因。

[0048] 可以将肽聚糖“降解活性”转化成高效的杀菌活性,用于在治疗情形下对抗革兰氏阴性细菌病原体,且可以包含胞壁酰胺酶、葡萄糖酰胺酶、酰胺酶或肽链内切酶活性。可以将典型的胞壁质水解结构域鉴定、整合到嵌合构建体内递送至肽聚糖基质、制备、纯化和确认具有针对有外膜细菌宿主的杀菌活性。包含此类活性的重组构建体作为抗菌组合物和抗菌剂具有重要的有益性能。本发明的许多肽聚糖降解活性针对革兰氏阴性菌或具有外膜的细菌,但其他的则具有目标特异性,其可以包含革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌的一种或两种。两种类型细菌的肽聚糖结构共有某些连接和结构,其可能对选定的胞壁质水解活性敏感。因此,可水解共有连接的胞壁质水解结构域可能比不能水解共有连接的胞壁质水解结构域具有更广的目标范围。

[0049] 本发明的连接多肽的实例使用了包含来自假单胞菌噬菌体P134的溶菌酶结构域的片段,噬菌体P134与噬菌体phiKMV密切相关。对应于phiKMV内ORF36的噬菌体P134内ORF36可溶解外膜已被去除的革兰氏阴性细菌细胞。在去除外膜后将构建体接触多种不同的革兰氏阴性细菌,导致细胞被破坏。这些结果证明,来自不同革兰氏阴性细菌物种的肽聚糖对胞壁质水解活性敏感。

[0050] 序列同源性搜索可鉴定能被用作肽聚糖降解活性替代源的多种其他类似结构域。展现这些活性的多肽的较小尺寸为有效的大规模生产提供了条件。提供了目标细菌的相关细胞壁目标组分,例如肽聚糖的可获得性,其为基于体内给药的药理学分布。

[0051] 可以在以下分子内发现相关的胞壁质水解活性:溶菌酶样超家族、溶菌糖基转移酶(LT)、鹅蛋白溶菌酶(GEWL);含有溶菌酶样结构域的超家族C100442,其含有多个成员包括可溶性溶菌糖基转移酶(SLT)、鹅蛋白溶菌酶(GEWL)、鸡蛋白溶菌酶(HEWL)、壳多糖酶、 λ 噬菌体溶菌酶、内容素、自溶素、壳聚糖酶。所有这些成员都涉及 β -1,4-连接多糖的水解。在噬菌体内溶素和细菌自溶素中发现了半胱氨酸组氨酸依赖性酰胺水解酶/肽酶(CHAP)结构域。含有CHAP结构域的多数蛋白可充当肽聚糖水解酶,且通常与酰胺酶相关。参见Bateman和Rawlings(2003)Trends Biochem.Sci.5:234-237,以及Pritchard,et al.(2004)Microbiology150:2079-2087。也参见创立于cazy.org网站的Carbohydrate-Active enZymes数据库。CAZY数据库描述了酶的结构相关的催化和碳水化合物结合模块(或功能

域)的家族,这些酶可降解、修饰或制备糖苷键。肽链内切酶的另一来源为来自创立于 merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/clan_index?type=P 的网站的数据库。表A提供了可用于本发明的具有肽聚糖降解活性的典型酶清单。可以发现其他类似的或同功的活性,其被类似地注释、与清单中的成员共享特征基序或同源。

[0052] 表A:胞壁质水解结构域(MD)源

[0053]

描述	详细说明
噬菌体溶菌酶	通过破坏肽聚糖,溶菌酶有助于从细胞壁释放成熟的噬菌体颗粒。该酶可水解原核细胞壁的肽聚糖杂聚物中 N-乙酰-D-葡萄糖胺和 N-乙酰胞壁酸之间的 1,4- β 连接。
C 型溶菌酶/ α -乳白蛋白家族	C 型溶菌酶为分泌的溶菌酶,其可切割细菌细胞壁的肽聚糖。结构为多结构域,混合的 α 和 β 折叠,含有 4 个保守的二硫键。
基因 25 样溶菌酶	该家族包括来自 T4 的噬菌体蛋白基因 25,其为具有酸性溶菌酶活性的基片外楔突的结构组件。
A1 前肽	大多数真核肽链内切酶(Merops 家族 A1)可用信号分子和前肽合成。该动物性胃蛋白酶样肽链内切酶前肽形成了独特的前肽家族,其含有约 30 残基长的保守基序。
前噬菌体肽链内切酶尾	该家族为可能起着肽链内切酶作用的前噬菌体尾蛋白。(例如:来自单核细胞增生性李斯特菌(<i>Listeria monocytogenes</i>)的前噬菌体尾蛋白 gp18 (NP_465809.1)。
Reprolysin (M12B)家族锌金属蛋白酶	该家族的成员为可切割肽类的酶。这些蛋白酶需要锌来催化。该家族的成员也称为 Adamalysin。该家族的大多数成员为蛇毒肽链内切酶,但也存在一些诸如 P78325 和受精素的哺乳动物蛋白。
来自噬菌体的病毒粒子相关胞壁	

[0054]

质水解酶(VAMes)	
变溶菌素	来源于球孢链霉菌(<i>Streptomyces globisporus</i>)的胞壁质酶
肽聚糖水解酶, 例如: Mur-1 N-乙酰胞壁质酶, Mur-2 N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶	来自海氏肠球菌(<i>Enterococcus hirae</i>)ATCC9790
噬菌体 PhiKMV	gp36 蛋白结构域: 溶菌酶样超家族
噬菌体 LKD16	orf3 蛋白结构域: 溶菌酶样超家族
噬菌体 LKD19	gp36 蛋白结构域: 溶菌酶样超家族
噬菌体 phikF77	gp40 蛋白结构域: 溶菌酶样超家族
噬菌体 PT2	gp42 蛋白结构域: 溶菌酶样超家族
噬菌体 PT4	gp40 蛋白结构域: 溶菌酶样超家族
噬菌体 201	gp276 蛋白结构域: 溶菌糖基转移酶(LT)或鹅蛋白溶菌酶(GEWL)
噬菌体 F8	orf38 蛋白结构域: 溶菌糖基转移酶(LT)或鹅蛋白溶菌酶(GEWL)
噬菌体 14-1	gp39 蛋白结构域: 溶菌糖基转移酶(LT)或鹅蛋白溶菌酶(GEWL)
噬菌体 LBL3	gp36 蛋白结构域: 溶菌糖基转移酶(LT)或鹅蛋白溶菌酶(GEWL)
噬菌体 LMA2	gp38 蛋白结构域: 溶菌糖基转移酶(LT)或鹅蛋白溶菌酶(GEWL)
噬菌体 PB1 噬菌体 SN	gp39、gp40 蛋白结构域: 溶菌糖基转移酶(LT)或鹅蛋白溶菌酶(GEWL)
噬菌体 phiKZ	orf181 蛋白结构域: 溶菌糖基转移酶(LT)或鹅蛋白溶菌酶(GEWL)

[0055] III. 跨膜结构域

[0056] 为了到达内部及有效感染宿主细胞,噬菌体必须穿越围绕细胞的结构层。在革兰氏阳性细菌细胞内,从外部开始,这些为肽聚糖层和细胞膜内膜。在革兰氏阴性细菌细胞内,另外存在围绕肽聚糖层的磷脂双分子层外膜。该另外的磷脂双分子层在外膜和内膜间形成了另一间室,其为细胞周质间隙。参见,例如,Silhavy,et al.(2010) *CSH Persp.Biol.*2:a000414;Bos,et al.(2007) *Ann.Rev.Microbiol.*61:191-214;Nanninga (1998) *Microbiol and Molec.Biol.Revs.*62:110-129和Costerton,et al.(1974) *Bacteriol.Revs.*38:87-110。细胞周质间隙环境起着中间屏障的作用。相比革兰氏阳性菌内较薄的肽聚糖层,革兰氏阴性细菌内的肽聚糖通常要厚得多。

[0057] 因为细菌外膜是连续的双分子层,其作为屏障阻止较大的分子进入细胞周质间隙。该外膜为选择性的半渗透性屏障,其可以保护细胞不受环境中包括抗生素的有害化合物的影响,且可将较大蛋白(例如,胞壁质酶)有效地排除在细胞周质间隙外。

[0058] 可用来影响所连接的胞壁质水解结构域穿膜运输的运输片段的来源清单包括:哺乳动物细菌渗透增强蛋白(BPI);P134和其他穿孔素(holin);来自PRD1噬菌体的蛋白P11&P7;假单胞菌噬菌体的TAMes;霍乱弧菌(*V.cholerae*)内的VI型分泌系统;来自(山羊)皮肤表面的穿孔素样蛋白(Tmp1);Apidaecin肽1a&1b;噬菌体P22尾刺突蛋白;大肠杆菌噬菌体phiV10-预测尾纤维蛋白;假设尾纤维肠细菌噬菌体JK06;细菌噬菌体K1F(一种T7样噬菌体);细菌噬菌体K1F(一种带有内-N-乙酰神经氨酸苷酶的T7样噬菌体);T7尾纤维蛋白-肠细菌噬菌体T7;尾纤维蛋白假单胞菌噬菌体gh-1;和P2gpH肠细菌噬菌体P2。也参见,PDBTM,蛋白质数据库(PDB)的第一个全面和最新的跨膜蛋白挑选。PDBTM数据库在酶学研究所(the

Institute of Enzymology)由蛋白结构研究组(the Protein Structure Research Group)维护,位于创立于pdhtm.enzim.hu的网站。可以发现其他类似的或同功的活性,其被类似地注释、与清单中成员共享特征基序或同源。表B提供了膜转运片段的其他实例。

[0059] 表B:膜转运结构域(MTDs)源

[0060]

描述	详细说明
噬菌体穿孔素(holin)1	用于细菌溶解的噬菌体蛋白通常包括破膜蛋白或穿孔素。
ABC_膜	ABC 转运体涉及范围从小离子到大分子的多种基质的输出或输入。仅在原核生物内发现它们,且它们的4种组成型结构域通常由独立的多肽(两种ABC蛋白和两种跨膜结构域(TMD)蛋白)编码。
TonB	该系列中的序列都含有保守的C末端结构域,其以TonB为特征且为同源的。在该结构域的N末端发现了富含脯氨酸的重复区;这些低复杂度的区域高度变异且不能容易地将它们比对。该区域被认为是跨越周质的。
LolA	LolA 脂蛋白复合物可穿越周质,随后与外膜受体LolB相互作用,这对将脂蛋白锚定在外膜上至关重要。
Mem_trans	该入口代表了真核生物、细菌和古菌内发现的通常不典型的膜转运蛋白家族。这些蛋白通常为600-700个氨基酸残基的长度且展示8-12个跨膜片段。
YojJ	YojJ 为细菌蛋白家族的N端,它们中一些与朝向C端的DUF147 PF02457相关。其为预测跨膜蛋白。
Mistic	Mistic 为自动折叠到膜内的膜内在蛋白。其在杆菌内是保守的。该蛋白与极性脂质朝向面形成螺旋束。
细菌渗透增强蛋白(BPI)的跨膜结构域(TMD)	BPI 由中性粒细胞产生,且已知可结合到革兰氏阴性菌的OM上。通过生物信息学分析鉴定了TMD。

[0061]

来自 P134 穿孔素的 TMD	穿孔素已知可在噬菌体溶解期间插入到细菌的内膜(IM)中。该 TMD 为插入到 IM 中的区域。纯化穿孔素面临着挑战,因为细胞会在表达后 45 分钟和穿孔素插入到膜内时溶解。因此决定使用融合到 GP36 上穿孔素的 TMD。
来自 PRD1 噬菌体的蛋白 P11 & P7	蛋白 P11 & P7 属于 PRD1 的 DNA 运输装置。在通过刺突状复合物连接到 IncP 编码的 DNA 转移复合物上后,受体结合信号被转移到 DNA 运输装置,并引起 PRD1 顶点的构象变化。这导致刺突状复合物的去除和顶点的开放,其中顶点的开放使得含有蛋白 P11 & P7(溶菌糖基转移酶)的尾能够伸出。P11 位于病毒膜上且具有强粘合性。据信 P11 可与 OM 相互作用,并随后与 P7 相互作用,其可实现与肽聚糖的接近。
细菌噬菌体的病毒体相关胞壁质水解酶(VAMEs)	来自细菌噬菌体 VAMEs 的潜在 OM 穿越分子的分析&识别
抗菌肽	阴离子肽,线性阳离 α -螺旋肽、富集特定氨基酸的阳离子肽、含有半胱氨酸并形成二硫键的阴离子和阳离子肽以及较大蛋白的阴离子和阳离子肽片段。
细菌素	S 型绿脓杆菌素:蛋白酶敏感性。S1、S2、S3 & AP41 可通过 DNA 破坏引起细胞死亡。S4 被预测具有 tRNase 活性,S5 被预测具有细胞质膜小孔形成活性。具有 3 个结构域——N 末端受体结合结构域、转运结构域和 C 末端杀伤结构域。R & F 型绿脓杆菌素来自假单胞菌。
	来自大肠杆菌的大肠杆菌素;通道形成大肠杆菌素(大肠杆菌素 A、B、E1、Ia、Ib 和 N)为可去除细胞质膜极性的跨膜结构域。具有 3 个结构域——N 末端转运结构域、结合结构域和 C 末端杀伤结构域。初始结合是到孔蛋白和外膜蛋白上的结合。
内毒素结合蛋白(LBP)	LBP 结合到细菌细胞的脂质 A 外膜上。LBP 在清除来自由 CD14 介导的传播的细菌中起着重要作用。
甘露糖结合蛋白(MBP)	人 MBP。MBP 选择性识别装饰微生物如细菌、酵母、寄生虫、分枝杆菌和某些病毒的碳水化合物样式。MBP 不识别装饰自体糖蛋白的糖类。
Toll 样受体(TLR)	为识别来源于微生物的结构保守分子的单一、跨膜、非催化性受体
霍乱弧菌内的 VI 型分泌系统	
来自山羊皮肤表面的穿孔素样蛋白(Tmp1)	
Apidaccin 肽 1a & 1b	
P22 尾刺突蛋白	识别沙门氏菌的表面上的 O 抗原;具有内鼠李糖活性(667 个氨基酸)
大肠杆菌噬菌体 phiV10-预测尾纤维蛋白	已报导具有 LPS 降解活性
假设尾纤维肠细菌噬菌体 JK06	
细菌噬菌体 K1F, 一种 T7 样噬菌体	
细菌噬菌体 K1F, 一种带有内-N-乙酰神经氨酸苷酶的 T7 样噬菌体	
T7 尾纤维蛋白-肠细菌噬菌体 T7	
尾纤维蛋白假单胞菌噬菌体 gh-1	
P2 gpH 肠细菌噬菌体 P2	

[0062]	人 Cathelicidins – hCAP18、LL37	
	人防御素	
	哺乳动物溶菌酶	
	哺乳动物乳铁蛋白	
	哺乳动物乳过氧化物酶	
	由肺细胞制备的表面活性蛋白 A 和 D (胶原凝集素)	
	由气道上皮细胞制备的趋化因子配体 20 (CCL20)	

[0063] 在一些实施方案中,可以通过化学结构而非蛋白质结构域获得移位功能。如上所述,供选择的胞壁质水解片段可以具有不同的转移穿越外膜效率。

[0064] 可以通过多种方法测量转移穿越外膜的速率。一种方法为间接评估转移结果,例如,胞壁质水解片段到达其周质基质的影响。测量标准可以为可测量的细胞内容物释放、基质释放或细胞溶解。细胞杀伤还可以为肽聚糖消化的替代测量。参见以下描述产物结合到细胞的实施例部分。

[0065] 更直接的方法为追踪转移到细胞周质间隙中的分子数目,例如,使用可测量的标记。常常会通过测量转移的承载片段的量来评估特定转移片段的转移效率。可使用可检测的标记来区分细胞周质间隙状况(比在OM外更具氧化性)和细胞外环境。参见Rajarao et al. (2002) FEMS Microbiology Letters 215:267-272。

[0066] 相比缺乏膜转移片段时,有效的膜转移片段通过胞壁质水解结构域产生至少3倍增加的杀伤靶宿主水平,或至少3倍增加的转移水平。在一些实施方案中,相比没有膜转移片段时,膜转移片段会增加杀伤水平或转移水平至少5、7、10、15、20、30、50、80、100、150、250倍或更多倍。该分析通常在接近可用于本申请的浓度的条件下实施。该分析通常测量从分钟例如,1、2、5、10、15或30分钟到1小时或2小时时间范围内的转移。

[0067] IV. 连接片段的连接臂;化学结合

[0068] 本发明包括包含来自异源性来源的两个不同结构域的嵌合蛋白。在一些实施方案中,两个结构域为单一多肽的一部分,作为连续(嵌合)蛋白。可以以两种顺序中的任一种连接这两部分,使其胞壁质水解结构域N端接近膜转移结构域(MTD),或反过来也可以。可以直接或用连接臂(肽或非肽)连接片段。有时,会使用术语跨膜结构域(TMD)。该功能在肽与疏水膜双分子层的热力学相互作用的生物物理学特征中可能更被动,或可以与作为与主动运输过程相互作用的片段(例如,作为主动运输机制的识别组件)起作用的活动过程相互作用,其中的主动运输机制可将实体从革兰氏阴性细菌的细菌外膜外部运输到内部。

[0069] 在一些实施方案中,MTD可以转移胞壁质水解片段穿越原核生产宿主的内膜。在一些实施方案中,MTD不转移MD穿越内膜,但保留对革兰氏阴性菌外膜的MTD活性。在一些实施方案中,可代之以在真核细胞系统内制备本文中描述的构建体。

[0070] 在一些实施方案中,单独制备组成片段并进行化学连接。在一些情形下,使用了合成聚合方法将肽加入到已有序列上。

[0071] 可以使用化学连接或生物偶联技术。参见,例如,Niemeyer (ed. 2010) Bioconjugation Protocols: Strategies and Methods (Methods in Molecular Biology) Humana Press; Hermanson (2008) Bioconjugate Techniques (2d ed.) Academic Press; Lahann (ed. 2009) Click Chemistry for Biotechnology and Materials Science Wiley;

Rabuka (2010) “Chemoenzymatic methods for site-specific protein modification” Curr Opin Chem Biol.14:790-96.Epub2010Oct26;Tiefenbrunn and Dawson (2010) “Chemoselective ligation techniques:modern applications of time-honored chemistry” Biopolymers94:95-106;Nwe and Brechbiel (2009) “Growing applications of “click chemistry” for bioconjugation in contemporary biomedical research” Cancer Biother Radiopharm.24:289-302;de Graaf,et al. (2009) “Nonnatural amino acids for site-specific protein conjugation” Bioconjug Chem.20:1281-95;the journal Bioconjugate Chemistry (ACS);and Thordarson,et al. (2006) “Well-defined protein-polymer conjugates—synthesis and potential applications” Applied Microbiology and Biotechnology73:243-254,DOI:10.1007/s00253-006-0574-4。例如,可在任一末端将特定氨基酸并入或加入到已经去除了非关键性可能残基例如半胱氨酸残基的构建体。可以使用接近的半胱氨酸残基通过二硫键来连接片段。还可以用带有硫醚键的双官能团马来酰亚胺连接臂来连接半胱氨酸残基。该连接臂还可以具有合适长度的碳氢化合物间隔区,例如,6、9、12、15、18、21、25、29、35条或更多条碳链。

[0072] 产生了构建体,其具有位于GP36CD溶菌酶区域侧面的接近的半胱氨酸,分别位于N端和C端或两端均有。这些可以用来连接多种其他化学部分(moieties)。例如,使用烷基或卤化酰基,例如,溴代十六烷或酰氯,可以将包括十六烷醇基或类似基团的较长非肽类疏水分子连接到Cys残基上。烷基形式会提供稳定的硫醚键,而酰基形式会提供较低稳定性的硫酯连接。烷基或酰基型碳氢化合物可以融入到外膜外部小叶中,它们会以可检测的速率翻转到内部小叶,例如,以随温度升高而增加的速率。

[0073] V.定义

[0074] “细胞壁降解活性”为降解、破坏、瓦解或者减小或减少细菌细胞壁(肽聚糖层)完整性的酶活性。除非另有说明,例如,通过上下文,所用术语“胞壁质水解的”一般指“细胞壁降解的”。大多数的壁降解催化活性为水解活性。因此,所用的术语多数是指“胞壁质水解”,即使该催化机制不涉及水解作用。可以在该目标的群体基础上将确定的或人造基质的降解用来测量胞壁质水解或静态活性。噬菌体环境中的“细胞壁胞壁质水解活性”通常为基于在人工条件下测定的指定给结构的特征,但此类特征可能对细菌的种、科、属或亚纲(可以通过敏感性对其定义)具有特异性。因此,“对细胞壁降解活性敏感的细菌”描述了其细胞壁被降解、破坏、瓦解或者通过特定细胞壁降解活性而细胞壁完整性被减小或减少的细菌。如本文中解释,其他细胞壁降解活性源自宿主细菌细胞或起源于噬菌体结构(例如,如果在准备好释放完整的噬菌体前破坏宿主细胞,这些活性将在渗透中起作用,但不能参与噬菌体复制)。可用于渗透步骤的结构与本发明尤为相关,其中这些活性从外部对正常的宿主起作用。

[0075] 在一些情形下,可以在细菌基因组中检测到前噬菌体序列。前噬菌体常常为整合的噬菌体基因组的残留物,这些噬菌体基因组可能已经丢失某些基本功能,因此被嵌入到其中并反映出过去的生物学功能。参见,例如,Kropinski,et al. (2007) Methods Mol.Biol.394:133-75;Canchaya,et al. (2004) Mol Microbiol.53:9-18;Canchaya,et al. (2003) Microbiol Mol Biol Rev.67:238-76和Casjens (2003) Mol Microbiol.49:277-300。尽管前噬菌体可以编码溶菌性噬菌体基因组的功能的大部分,前噬菌体通常不经历裂

解周期。溶菌性噬菌体的许多结构组件具有从前噬菌体序列发现的等效或对应形式。信息学分析通常可以确定曾经编码过用于感染的溶菌活性的序列与用来在噬菌体组装后溶解靶宿主细胞的内溶素活性之间的差异。

[0076] “结合片段”指的是目标基序,其可以识别细菌外表面上的特定结构。在革兰氏阳性菌中,细菌的外表面通常为胞壁质层(细胞壁)。因此,革兰氏阳性细菌的结合片段可以把细胞表面实体例如,蛋白质、脂质、糖或组合物作为目标。已知且可以使用来自溶菌酶、内溶素等的结合片段。可结合到细菌上的其他蛋白包括下述的PGRPs、TLRs、鞭毛和纤毛结合实体,以及涉及目标识别的噬菌体尾蛋白。在革兰氏阴性细菌中,外膜呈现了不同的结构,其可以被作为特定结合的目标。可以将磷脂双分子层的外部小叶或脂多糖暴露到外部环境中。

[0077] “膜转移结构域(MTD)”,也被称为TMD(跨膜结构域)、转运结构域、转移片段及类似的术语,指的是分子实体,例如,多肽结构域或化学实体,其能影响转移连接的胞壁质水解片段穿越革兰氏阴性菌的外膜。此类结构域其自身可能具有转运相关片段穿越膜的能力,或被影响连接的催化片段运输的内源性转运系统所识别。嵌合多肽可以被完整转移穿越膜,或在转运期间被修饰。在一些实施方案中,MTD不显著渗透表达宿主的内膜。在一些实施方案中,MTD不显著渗透真核细胞的细胞膜。

[0078] 尽管革兰氏阴性细菌的外膜可保护细胞免受许多外部药剂的影响,通过多种特定药剂可能将其削弱,这些药剂统称为渗透剂,其有助于瓦解LPS层和增加OM对疏水性药剂的通透性。渗透剂为通过促进能抑制或破坏细胞功能的外部物质进入来削弱OM从而能增加抗菌剂活性的化合物。该进入可以为穿越OM进入到细胞周质间隙,且可能最终进入到细胞的细胞质。渗透剂自身可能不是杀菌性的,但可以增强其他化合物的活性,从而提供协同作用的可能性。渗透剂的典型实例为可螯合二价阳离子的螯合剂EDTA,其中二价阳离子通过提供与蛋白质和LPS的静电相互作用而有助于OM的稳定性。用EDTA处理可从OM释放大部分的LPS,暴露出疏水性磷脂质并为某些物质制备出疏水性通道。这明显体现在对疏水性药剂的增加的敏感性。渗透剂可能不适合用于治疗情形,因为在高浓度下,它们通常对细胞有毒性。在其它的情形下,它们可能是有用的,例如,应用于表面或设备消毒。在较低的浓度下,它们能在渗透外膜从而允许分子进入以到达肽聚糖中起作用。

[0079] 表C:具有外膜破坏活性的药剂

名称	药剂	作用方式
A	螯合剂	
	1 乙二胺四乙酸	从 OM 去除稳定化阳离子, 尤其是 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 。释放 LPS 到外部介质并产生疏水性通道。
	2 六偏磷酸钠	从 OM 去除稳定化阳离子, 尤其是 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 。增加对疏水性抗生素的敏感性。
	3 焦磷酸钠、正磷酸钠	破坏 OM 稳定性。使细胞对乳链菌肽敏感。
[0080] B	4 次氨基三乙酸	破碎 OM。增加对疏水性抗生素的敏感性。
	聚阳离子剂	
	1 多粘菌素 Tris (高浓度)	从 OM 取代阳离子, 导致膜损坏。结合到 OM 并增加对疏水性抗生素的敏感性。
	2 多粘菌素 B 九肽	在没有明显的 LPS 释放下渗透 OM。增加细胞表面疏水性。
	3 聚 L-鸟氨酸, 聚 L-赖氨酸	使 OM 对疏水性抗生素具有通透性并释放 LPS。
	4 L-抗坏血酸盐、乙酰水杨酸盐	破坏 OM 稳定性。
	5 乳铁蛋白, 转移性	释放 LPS, 增加对利福平的敏感性。
C	6 阳离子洗涤剂, 例如苯扎氯铵	使 OM 内的疏水性相互作用失去平衡。
	7 聚乙烯亚胺	插入到 OM 内, 并在不释放 LPS 相关的细胞物质下增加膜表面积。使靶细胞对疏水性抗生素和对洗涤剂敏感; 导致 OM 表面上形成多孔结构。
	膜扰乱蛋白和肽类	
D	1 合成的阳离子肽类、阳离子两亲性肽类	通过肽与阴离子和疏水性脂质 A 的相互作用使 LPS 解体。
	2 浆果和草本植物中发现的萜类化合物和酚类化合物	
E	1 百里香酚、香芹酚	破坏 OM 稳定性并引起 LPS 释放。
	2 没食子酸	从 OM 取代阳离子, 造成膜损坏和 LPS 释放。
	3 酚的浆果提取物(云莓和树莓)	从 OM 取代阳离子, 造成膜损坏和 LPS 释放。
	有机酸和它们的盐	
F	1 柠檬酸	从 OM 取代阳离子, 尤其是 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} , 引起 LPS 的释放。
	2 琥珀酸盐、醋酸盐、柠檬酸盐	微弱地增加膜通透性
[0081]	其他化合物	
	1 壳聚糖(聚 β -1,4-N-乙酰氨基葡萄糖)	结合到 OM 上, 导致屏障功能丧失
	2 喹诺酮, 低量(0.25 x MIC)	通过与 OM 相互作用、通过从 LPS 结合位点去除稳定化二价阳离子, 增加革兰氏阴性细菌对抗菌肽的敏感性。

[0082] 细菌“环境”可以包括体外或体内环境。体外环境可以包括反应容器, 例如, 装有分离的或纯化的细菌的反应容器、待消毒的表面(例如, 公共医疗机构内的表面)、设备、动物房内的表面或公共卫生设施如水、粪便或下水道设施。其他的体外条件可以提供混合的物种群体, 例如, 包含多种共生性或相互作用的极为贴近的物种。体内环境可以为被目标细菌感染的宿主生物体。体内环境可包括器官, 如膀胱、肾、肺、皮肤、心脏和血管、胃、毛皮、肠、肝、脑或脊髓、诸如眼睛、耳朵、鼻子、舌头的感觉器官、胰腺、脾脏、甲状腺等。体内环境可包括组织, 如牙龈、神经组织、淋巴组织、腺组织和生物体液, 例如, 血液、痰等。被引进或附于身体的导管、管、植入物和监视或治疗装置可以为常规使用下的感染源。环境还包括食物表面, 例如, 鱼、肉或植物材料。肉类包括, 例如, 牛肉、猪肉、鸡肉、火鸡肉或其他家禽肉。植物

材料包括蔬菜、水果或由水果和/或蔬菜制得的果汁,或者可以包括服装或遮蔽物。在一些实施方案中,用本发明的蛋白处理了接触过细菌性感染的食物产品的表面,所述蛋白包括VAME构建体或嵌合体,例如,GP36CD片段或P225。蔗糖和/或山梨醇可用于增加渗透压以使得目标对肽聚糖层的降解更为敏感。

[0083] “引入”组合物到环境中包括施加或给予化合物或组合物,以便将目标细菌暴露于该化合物或组合物。通过可制备或释放此类化合物或组合物的活细菌或死细菌能够达到引入所述化合物或组合物的目的。

[0084] “细胞壁降解性蛋白质”为对可接近的细胞壁或其组分具有可检测的,例如,明显降解活性的蛋白质。“胞壁质水解”活性可以为降解活性的结果。示例性降解多肽包括,例如,GP36CD片段或P225产物以及它们的功能结构相关的实体、突变体和变体。细胞壁降解蛋白的实例描述于序列表中,或例如,来源于噬菌体phiKMV(参见NC_005045),或来源于高度同源的来自噬菌体phiKMV的ORF36(参见Gene ID1482616和NP_877475)。通过以下方式可以确定类似的降解结构域:基序分析、在噬菌体基因组(或类似的前噬菌体序列)中它们的基因位置、在噬菌体(或前噬菌体对应物)结构上它们的结构位置,例如,天然噬菌体的尾或接触点、来自突变型噬菌体残留物(例如,绿脓杆菌素)或由前噬菌体序列编码的的类似基序。细胞壁降解结构域可以,例如,来源于肌尾噬菌体科噬菌体的尾板或来源于长尾噬菌体科噬菌体的尾末端以及其他噬菌体病毒粒子胞壁质水解多肽。

[0085] “GP36催化结构域(CD)多肽”或其语法变体,指的是展现溶菌(抑菌)活性的多肽序列,其通常由与噬菌体phiKMV或紧密相关的突变体或突变型噬菌体的ORF36高度同源的假单胞菌噬菌体P134序列编码。SEQ ID NO:1提供了假单胞菌噬菌体P134的片段的序列,其与噬菌体phiKMV的对应ORF36高度同源。ORF36多肽的示例性变体包括多肽的多形态变体、等位基因(alleles)、突变体和种间同系物,其:(1)具有与来自与phiKMV(参见,例如,登录号1482616)同源的假单胞菌噬菌体P134的ORF36核酸编码的氨基酸序列具有以下相同性的氨基酸序列:大于约60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%,优选91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%或更大的氨基酸序列相同性,优选为一个或多个区域的相同性,例如,至少约8、12、17、25、33、50、65、80、100、200个或更多个氨基酸的区域;(2)可结合到抗体上,例如,多克隆抗体、提高的对包含ORF36的活性片段氨基酸序列的大体上纯化的免疫原具有抗性的抗体,以及它们的经保守修饰的变体;或(3)在严格的杂交条件下与对应于编码ORF36多肽的天然核酸序列以及其经保守修饰的变体的反义链特异性杂交;或(4)具有与编码ORF36的核酸或可编码其片段的核酸序列具有以下相同性的核酸序列:大于约65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%,优选大于约96%、97%、98%、99%或更高的核苷酸序列相同性,优选为具有至少约25、50、100、150、200、250、300、400、500、600、700个等或更多个核苷酸的区域的相同性。GP36CD的实例为分布于GP36的737-875位氨基酸的溶菌酶结构域。本发明的核酸和蛋白质包括天然或重组性分子。全长ORF36多肽和其截短的片段可以被用来测试对细胞壁组分的降解活性,以确定期望性能的严格边界。在优选的实施方案中,GP36催化结构域多肽具有对多种假单胞菌、埃希氏菌、克雷伯氏菌、不动杆菌、沙门氏菌、变形杆菌、志贺氏菌和伯克氏菌的抑菌活性。一些实施方案还可以展现对缺少外膜的革兰氏阳性菌的活性。可以对浓度、作用时间、温度和条件进行优化来使其具有此类对革兰氏阳性目标的活性。

[0086] 可以基于描述的细胞壁降解性多肽的序列使用PCR引物扩增编码细胞壁降解性多

肽的核酸。例如,可使用引物扩增编码GP36CD多肽变体和其片段的核酸,以及可能的壁降解性活性候选物。参见,例如,Vybiral et al. (2003) *FEMS Microbiol. Lett.* 219:275-283。因此,细胞壁降解性多肽和其片段包括核酸编码的多肽,这些核酸基于确定的细胞壁降解性多肽序列通过PCR扩增而来。在优选的实施方案中,抑菌多肽或其片段由通过与描述的GP36CD序列相关的引物扩增的核酸来编码。

[0087] “噬菌体颗粒组件(component)”指的是,例如,噬菌体如噬菌体phiKMV的头部或尾部组件。本发明证明了许多不同的噬菌体类型可以为归于噬菌体组件的胞壁质水解活性的来源。参见,例如,Piuri和Hatfull (2006) *Molecular Microbiology* 62:1569-1585。可以在前噬菌体或不完整的噬菌体基因组中发现相关的序列,通常发现其被整合到细菌宿主基因组中。尾部组件通常可介导噬菌体识别并附着于靶宿主,且可具有细胞壁降解活性,其协助噬菌体组件渗透到宿主内。

[0088] “GMP条件”,指的是良好生产规范,例如,如美国政府的食品药品监督管理局所规定。类似的规范和规则存在于欧洲、日本和大多数发达国家。

[0089] 以上“大体上纯的”定义中的术语“大体上”通常指不论蛋白质、核酸或是其他结构或其他类型分子的至少约60%、至少约70%、至少约80%,或更优选至少约90%,且甚至更优选至少约92%、95%、97%或99%的纯度。

[0090] 术语“氨基酸”指的是自然发生和合成的氨基酸,以及以类似于自然发生的氨基酸的方式发挥功能的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。自然发生的氨基酸为由遗传密码编码的氨基酸,以及后来被修饰的那些氨基酸,例如,羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物指的是与自然发生的氨基酸具有相同的基础化学结构的化合物,例如,结合到氢上的 α 碳、羧基、氨基和R基团,例如,高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基砷。此类类似物具有修饰的R基团(例如,正亮氨酸)或修饰的肽骨架,但保留自然发生的氨基酸的基本化学机构。氨基酸模拟物指的是具有与氨基酸一般化学结构不同的结构的化合物,但以类似于自然发生氨基酸的方式发挥功能。

[0091] “蛋白质”、“多肽”或“肽”指的是其中大多数或所有单体都为氨基酸且通过酰胺键结合在一起的聚合物,其或者称为多肽。当氨基酸为 α -氨基酸时,可以使用L-光学异构体或D-光学异构体。此外,还包括非天然的氨基酸,例如, β -丙氨酸、苯基甘氨酸和高精氨酸。在本发明中也可以使用不是由基因编码的氨基酸。此外,在本发明中还可以使用进行了修饰来包含合适的结构或反应基团的氨基酸。本发明中使用的氨基酸可以为D-异构体或L-异构体,或它们的混合物。通常优选L-异构体。此外,在本发明中其他模拟肽也是有用的。对于一般性综述,参见,Spatola, A.F., in Weinstein, et al. (eds. 1983) *CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF AMINO ACIDS, PEPTIDES AND PROTEINS*, Marcel Dekker, New York, p. 267。

[0092] 当涉及细胞来使用术语“重组体”时,指该细胞复制异源性核酸或表达由异源性核酸编码的肽或蛋白质。重组细胞可以包含天然(非重组)形式细胞内未发现的基因。重组细胞还可以包含天然形式细胞中已发现的基因,其中该基因通过人工方式进行了修饰并被重新引入到了细胞中。该术语还包括含有这样的核酸的细胞,所述核酸为在不从细胞去除核酸的情况下被进行了修饰的细胞的内源性核酸;这类修饰包括通过基因置换、位点特异性突变和相关技术获得的修饰。具体来说,可以产生序列融合,例如,在期望序列的上游并入

上游分泌盒来产生分泌性蛋白产品。

[0093] “融合蛋白”、“嵌合蛋白”、“蛋白缀合物”和类似的术语指的是包含这样的氨基酸序列的蛋白,所述氨基酸序列多于、替换、少于和/或不同于编码原始或天然全长蛋白的氨基酸序列或其亚序列。可将多于一种另外的结构域加入到如本文中描述的细胞壁胞壁质水解蛋白上,例如,表位标签或纯化标签或者多个表位标签或纯化标签。可连接其他结构域,例如,可以加入其他胞壁质水解活性(对混合菌落或生物膜的目标生物体或相关的生物体的活性)、目标功能的结构域,或可影响生理学过程,例如,血管通透性或生物膜完整性的结构域。或者,可将结构域结合以导致不同多肽间的物理亲和力,从而产生多链聚合性复合物。

[0094] 术语“核酸”指的是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸或混合的单链或双链形式的聚合物,且,除非另有限制,包括以类似于自然发生的核苷酸的方式与核酸杂交的已知天然核苷酸的类似物。除非另有说明或通过上下文判断出并非如此,具体的核酸序列包括其互补序列。

[0095] “重组表达盒”或简单地“表达盒”为核酸构建体,其通过重组或合成产生,具有能影响结构基因在与此类序列兼容的宿主中表达的核酸成分。表达盒通常至少包含启动子和/或转录终止信号。通常,重组表达盒包含待转录的核酸(例如,编码期望多肽的核酸)和启动子。可以包括引起表达的其他因子。在某些实施方案中,表达盒还可以包括编码指导从宿主细胞表达的蛋白分泌的信号序列的核苷酸序列。还可以将影响基因表达的转录终止信号、增强子和其他核酸序列包含在表达盒中。在某些实施方案中,在细菌宿主细胞内表达了编码包含对细胞壁的胞壁质水解活性的氨基酸序列的重组表达盒。

[0096] “异源序列”或“异源核酸”,如本文中所使用,为源自特定宿主细胞之外来源的序列或核酸,或,如果来自相同的来源,从其原型修饰而来。可进行异源序列的修饰,例如,通过用限制酶处理DNA来产生能被可操作地结合到启动子上的DNA片段。诸如定点诱变的技术也对可用于修饰异源性序列。

[0097] 术语“分离的”指的是大体上或基本上没有可干扰酶活性的组分的材料。对于本发明的糖类、蛋白质或核酸,术语“分离的”指的是大体上或基本上没有在其天然态中所发现的通常伴随该材料的组分的材料。通常,本发明的分离的糖、蛋白质或核酸为至少约80%的纯度,经常为至少约90%或至少约95%的纯度,其中纯度通过银染凝胶上的谱带强度或其他用于测定纯度的方法测得。可以通过本领域熟知的多种方式表示纯度或同质性。例如,可以通过聚丙烯酰胺凝胶电泳完成样品中蛋白质或核酸的测定,随后可以通过染色来显示蛋白质或核酸。对于某些目的,高分辨率的蛋白质或核酸可能是合适的,例如,可将HPLC或质谱法或类似的方法用于纯化。

[0098] 术语“可操作地连接”指的是核酸表达控制序列(如启动子、信号序列或转录因子结合位点阵列)和第二核酸序列之间的功能性连接,其中所述表达控制序列影响对应于第二序列的核酸的转录和/或翻译。

[0099] 术语“相同性(identical)”或百分比“相同性(identity)”,在两条或多条核酸或蛋白质序列的情形下,指的是当比较和比对最大一致性时,两条或多条序列或亚序列为相同的或具有特定百分比的相同氨基酸残基或核苷酸,其中相同性使用一种序列比较算法或通过目测测量。在某些相同性比对中,不允许有空白,但在其他算法中,允许有空白但有合

适的罚分 (penalty) 措施。

[0100] 词组“大体上相同的”，在两种核酸或蛋白质的情形下，指的是当比较和比对最大一致性时，在两条或多条序列或亚序列的合适片段上具有以下相同性：至少大于约60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%的核酸或氨基酸序列相同性，优选91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的核苷酸或氨基酸残基相同性，其中相同性使用一种以下的序列比较算法或通过目测测量。优选地，大体上的相同性存在于序列的一个或多个区域上，该区域对应于至少约13、15、17、23、27、31、35、40、50个或更多个氨基酸残基的长度，更优选在至少约60、70、80或100个残基的区域上，且最优选序列在至少约150个残基或在参考序列的全长大体上相同。应当注意，3种具体描述的构建体具有23、23和30个氨基酸的高疏水性拉伸物 (stretch)，且数据表明23个氨基酸残基中至少3个可被非保守性残基替换，但仍保留活性。

[0101] 对于序列比较，通常一条序列用作与测试序列比较的参考序列。当使用序列比较算法时，将测试和参考序列输入到计算机中，如有必要，指定亚序列坐标系，并指定序列算法程序参数。随后序列比较算法基于指定的程序参数计算测试序列相对于参考序列的百分比序列相同性。

[0102] 可以进行比较序列的最佳比对，例如，通过Smith和Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482的局部同源性算法，通过Needleman和Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443的同源性比对算法，通过Pearson和Lipman (1988) *Proc. Nat' l. Acad. Sci. USA* 85:2444的相似性搜索方法，通过这些算法或相关算法 (Wisconsin Genetics Software Package中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA、Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI)，或者通过目测 (一般参见, *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel et al., eds., *Current Protocols*, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc. (1995和副刊) (Ausubel))。

[0103] 适合测定百分比序列相同性和序列相似性的算法实例为BLAST和BLAST2.0算法，其分别描述于Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410和Altschuel et al. (1977) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402。进行BLAST分析的软件可通过国家生物技术信息中心 (the National Center for Biotechnology Information) (ncbi.nlm.nih.gov) 或类似的资源公开获取。

[0104] 两种核酸序列或蛋白质大体上相同的其他指示为，由第一核酸编码的蛋白质与由第二核酸编码的蛋白质可发生免疫学交叉反应，如下所述。因此，蛋白质通常与第二蛋白质大体上相同，例如，其中两种肽仅通过保守替换发生差异。两条核酸序列大体上相同的另一指示为，这两个分子在严格的条件下可彼此杂交，如下所述。

[0105] 词组“特异性结合到蛋白”或“与…特异性免疫反应”，当提及抗体时指的是结合反应，其为蛋白质和其他生物产品的异源群体存在时该蛋白质存在的决定条件。因此，在指定的免疫分析条件下，指定的抗体优先结合到特定蛋白质上而不以明显的量结合到样品中存在的其他蛋白质上。在这样的条件下特异性结合到蛋白质，需要有针对性地对特定蛋白质的特异性而挑选出的抗体。可使用多种免疫分析程式来挑选与特定蛋白质发生特异性免疫反应的抗体。例如，常规使用固相ELISA免疫分析来挑选与蛋白质发生特异性免疫反应的单克隆抗体。参见Harlow和Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, New York, 其描述了可用于测定特定免疫反应性的免疫分析程式和

条件。

[0106] 特定多核苷酸序列的“经保守修饰的变异”指的是编码相同的或基本上相同的氨基酸序列的那些多核苷酸,或者如果这些多核苷酸不编码氨基酸序列,则指的是基本上相同的多核苷酸。由于遗传密码的简并性,大量功能上相同的核酸编码出任何给定的蛋白质。例如,密码子CGU、CGC、CGA、CGG、AGA和AGG都可编码氨基酸精氨酸。因此,在每个被密码子指定为精氨酸位点,该密码子可更改为描述的另一对应密码子,而不改变所编码出的蛋白。此类核酸变异为“沉默变异”,其为一种“经保守修饰的变异”。除非另有说明,本文中描述的可编码蛋白质的每一多核苷酸序列,也描述了可能的沉默变异。本领域技术人员应理解,可以通过标准技术对核酸中每一密码子(除AUG和UGG外,前者通常为甲硫氨酸的唯一密码子,后者通常为色氨酸的唯一密码子)进行修饰来产生功能上相同的分子。因此,编码蛋白的核酸的每个“沉默突变”通常都隐含在每个描述的序列中。

[0107] 本领域技术人员应理解,蛋白质中许多氨基酸可以彼此替换而不会影响该蛋白质的功能,例如,保守替换可以作为蛋白如公开的细胞壁胞壁质水解蛋白的经保守修饰的变体的基础。以下为保守氨基酸替换的不完整清单。以下八组中每组都含有通常为彼此的保守替换的氨基酸:1) 丙氨酸(A)、甘氨酸(G);2) 天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);3) 天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);4) 精氨酸(R)、赖氨酸(K);5) 异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V)、丙氨酸(A);6) 苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W);7) 丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、半胱氨酸(C);和8) 半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)(参见,例如,Creighton(1984)Proteins)。

[0108] 此外,本领域技术人员应理解,在编码序列中改变、加入或删除单个氨基酸或小百分比氨基酸(通常小于5%,更通常小于1%)的单独替换、删除或添加为有效的“经保守修饰的变异”,其中所述改变导致氨基酸被化学上类似的氨基酸替换。可提供功能上相似的氨基酸的保守替换表为本领域所熟知。

[0109] 本领域技术人员应理解,蛋白质(例如,细胞壁胞壁质水解蛋白)和编码蛋白质的核酸的许多保守变异,产生基本上相同的产物。例如,由于遗传密码的简并性,“沉默替换”(例如,不导致所编码蛋白质改变的核酸序列的替换)是编码氨基酸的每条核酸序列的隐含特征。如本文中所描述,优选对序列优化,用于在用来制备细胞壁胞壁质水解蛋白的特定宿主细胞(例如,酵母、人等)内表达。类似地,将氨基酸序列中一个或几个氨基酸的“保守氨基酸替换”用具有高度相似特性的不同氨基酸来替换,也由于与特定氨基酸序列或与编码氨基酸的特定核酸序列高度相似而容易识别。任何特定序列的此类保守替换变异都为本发明的特征。也参见,Creighton(1984)Proteins,W.H.Freeman and Company。另外,在编码的序列中改变、加入或删除单个氨基酸或小百分比氨基酸的单独替换、删除或添加通常也为“经保守修饰的变异”。

[0110] 本发明的实施可以包括重组核酸的构建和在宿主细胞,优选细菌宿主细胞中基因的表达。用于特定宿主的优选密码子常常是合适的。用来达到这些目标的分子克隆技术为本领域已知。多种适合构建重组核酸如表达载体的克隆和体外扩增方法为技术人员所熟知。在以下文献中可找到这些技术的实例和足以指导技术人员完成许多克隆实操作的说明书:Berger和Kimmel,Guide to Molecular Cloning Techniques,Methods in Enzymology volume152Academic Press,Inc.,San Diego,CA(Berger);和Current Protocols in Molecular Biology,F.M.Ausubel et al.,eds.,Current Protocols,a joint venture

between Greene Publishing Associates, Inc. 以及 John Wiley & Sons, Inc., (1999 副刊) (Ausubel)。用于表达重组多肽的合适宿主细胞为本领域技术人员已知, 且包括, 例如, 原核细胞如大肠杆菌, 和真核细胞, 包括昆虫 (杆状病毒)、哺乳动物 (CHO 细胞)、真菌细胞 (例如, 酵母菌、毕赤酵母 (*Pichia*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)), 以及细菌噬菌体表达系统。注意在原核生产宿主内通常将 N 末端甲硫氨酸去除。本发明描述的嵌合多肽包括在任何或所有肽组分上具有和没有 N 末端甲硫氨酸的嵌合多肽。

[0111] 在以下文档中可以找到足以指导技术人员完成体外扩增方法 (包括聚合酶链式反应 (PCR)、连接酶链式反应 (LCR)、Q β -复制酶扩增和其他 RNA 聚合酶介导的技术) 的方案实例: Berger, Sambrook 和 Ausubel 以及 Mullis et al. (1987), 第 4683202 号美国专利; PCR Protocols A Guide to Methods and Applications (Innis et al. eds) Academic Press Inc. San Diego, CA (1990) (Innis); Arnheim & Levinson (October 1, 1990) C&EN 36-47; The Journal Of NIH Research (1991) 3: 81-94; (Kwoh et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173; Guatelli et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874; Lomell et al. (1989) J. Clin. Chem. 35: 1826; Landegren et al. (1988) Science 241: 1077-1080; Van Brunt (1990) Biotechnology 8: 291-294; Wu and Wallace (1989) Gene 4: 560 以及 Barringer et al. (1990) Gene 89: 117。在 Wallace et al., 第 5426039 号美国专利中描述了克隆体外扩增的核酸的改进方法。

[0112] VI. 商业应用

[0113] 本文中描述的多肽的许多应用可以立即得到承认。许多由细菌感染引起的医疗病症, 在传染病和医学微生物教科书中得到进一步描述。参见, 例如, Kasper 和 Fauci (2010) Harrison's Infectious Diseases McGraw-Hill Professional, ISBN-10: 0071702938, ISBN-13: 978-0071702935; Mandel (2008) Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases: Expert Consult Premium Edition (7th Ed.) Churchill Livingstone, ISBN-10: 0443068399, ISBN-13: 978-0443068393; Schlossberg (ed. 2008) Clinical Infectious Disease Cambridge University Press, ISBN-10: 0521871123, ISBN-13: 978-0521871129; Bauman (2011) Microbiology with Diseases by Body System (3d ed.) Benjamin Cummings, ISBN-10: 0321712714, ISBN-13: 978-0321712714 以及 Murray, et al. (2008) Medical Microbiology (with Student Consult Online Access, 6th ed.) Mosby, ISBN-10: 0323054706, ISBN-13: 978-0323054706。可以理解这些多肽构建体的治疗应用。

[0114] 可以将本发明描述的可穿越外膜的胞壁质水解嵌合蛋白用于对常规使用中可能被污染的物品进行抗菌处理。可以使用本文中描述的胞壁质水解多肽处理其中目标细菌为公共健康危害的位点、表面、设备或环境。目标位点包括目标细菌污染材料存在的公共健康设施。这些材料可以包括废品, 例如, 液体、固体或气体。含水废物处理厂可以掺入所述胞壁质水解多肽, 来通过用胞壁质水解多肽或表达和释放胞壁质水解多肽的细胞处理而从废水中清除目标细菌。固体废物站点可以引入胞壁质水解多肽来将目标宿主发作的可能性减到最小。

[0115] 可以使用胞壁质水解多肽组合物定期处理食物准备区域和设备, 从而提供有效清除目标细菌的手段。遭受污染的医疗和其他公共环境, 可以使用类似手段来将其中目标微

生物的生长和传播减到最小。可以将本发明方法用于期望清除目标细菌的环境,包括空气过滤系统,例如,用于加强监护的病房。

[0116] 可以将嵌合胞壁质水解蛋白用作蛋白稳定剂或防腐剂,即其中所述靶细菌为减稳剂。可以将此类组合物用作药物制剂的部分或者肉或其他食物产品的防腐剂。在一些实施方案中,可以将胞壁质水解多肽用于水产食物产品,例如,用作稳定剂或用作防腐剂制剂的组分。此类应用对必须保持无菌但不能含有传统抗生素的材料尤其有用。

[0117] 可选的应用包括用于兽医或医学环境。用来确定特定细菌的存在或用来鉴定特定目标的方法,可以利用选择性药剂对群体或培养物的效应。包含抑菌活性物到清洁剂中,包括清洗动物和宠物,可能是合适的。

[0118] 可以将本文中描述的胞壁质水解多肽用来治疗例如,人、动物和植物的细菌感染。可以将胞壁质水解多肽预防性地给予到对象(subject),或给予到患有细菌感染的对象。另外,可以将本发明方法应用于展示动物(例如,动物园或表演的)、宠物(例如,狗、猫、其他宠物)、比赛动物(例如,马)或家畜(例如,奶牛和肉牛、绵羊、山羊、猪、鸡、鱼、虾、龙虾等),其中应用所述组合物来减少细菌的存在。可以将胞壁质水解多肽用来治疗由复制缓慢的细菌引起的感染,因为其杀伤机制不取决于宿主细胞复制。许多当前的抗菌剂,例如,抗生素,对抗复制性细菌最有效。例如,可以将胞壁质水解多肽用来将以下述倍增时间复制的细菌作为目标,例如,1-72小时、1-48小时、1-24小时、1-12小时、1-6小时、1-3小时或1-2小时。

[0119] 医学上相关的革兰氏阴性球菌物种包括:淋病奈瑟氏菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) 和螺旋体 (引起性传播疾病);脑膜炎奈瑟氏菌 (*Neisseria meningitidis*) (造成脑膜炎);和卡他莫拉菌 (*Moraxella catarrhalis*) (造成呼吸道症状)。相关的革兰氏阴性杆菌物种包括:流感嗜血杆菌 (*Hemophilus influenzae*)、肺炎克雷伯杆菌、嗜肺军团菌 (*Legionella pneumophila*)、伯克氏菌和绿脓杆菌 (呼吸道问题);大肠杆菌、奇异变形杆菌、阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*) 和粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*) (泌尿问题),和幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*)、肠炎沙门氏菌 (*Salmonella enteritidis*)、伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhi*) (胃肠问题),和螺旋体 (性传播疾病)。与医院感染相关的革兰氏阴性细菌包括:鲍氏不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*),其造成菌血症、二次脑膜炎和呼吸机相关肺炎,例如,在医院机构的加强监护病房内。

[0120] 可以使用本发明胞壁质水解多肽将其作为目标的其他相关细菌包括革兰氏阴性物种,包括寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas*)、蛭弧菌 (*Bdellovibrio*)、醋酸菌和 α -变形杆菌,如沃尔巴克氏体 (*Wolbachia*)、蓝细菌、螺旋体、绿色硫细菌和绿色非硫细菌。

[0121] 也可以使用本发明胞壁质水解多肽,将在某些条件下可以具有外膜的革兰氏染色不定生物体 (对革兰氏染色展现革兰氏染色不定模式) 作为目标。革兰氏染色不定细菌包括:例如,放线菌属 (*Actinomyces*)、节杆菌属 (*Arthobacter*)、棒状杆菌属 (*Corynebacterium*)、分支杆菌属 (*Mycobacterium*) 和丙酸菌属 (*Propionibacterium*),它们具有在细胞分裂期间对破坏特别敏感的细胞壁,且展现革兰氏阴性染色特征。在芽孢杆菌 (*Bacillus*)、丁酸弧菌 (*Butyrivibrio*) 和梭菌 (*Clostridium*) 的培养物中,生长期间肽聚糖厚度的减少与染色为革兰氏阴性细胞数目的增加一致。另外,细菌培养物的时龄可以影响革兰氏染色的结果。

[0122] VII. 给予

[0123] 本文中描述的胞壁质水解多肽的给予途径和剂量随感染细菌菌株、位点和感染程度(例如,局部或全身)以及被治疗的对象不同而发生改变。给予途径包括但不限于:经口、用于递送到肺的气雾剂或其他装置、鼻用喷雾、经静脉(IV)、肌肉内、腹膜内、囊内、眼内、经阴道、经直肠、局部、腰椎穿刺、鞘内和直接施加到脑和/或脑膜。可用作递送治疗剂的载体的赋形剂对本领域技术人员显而易见。例如,胞壁质水解多肽可以为冻干形式,并在在给予前被溶解(重悬)(例如,通过IV注射)。在宿主感染中针对每个细菌的预期剂量为0.03、0.1、0.3、1、3、10、30、100、300、1000、3000、10000或更多个胞壁质水解多肽分子的范围。根据蛋白的大小,剂量可以为约1百万至约10万亿/kg/天,且优选为约1万亿/kg/天,且可以为约 10^6 杀伤单位/kg/天至约 10^{13} 杀伤单位/kg/天,其中蛋白可以自身被串联联合,或为多重亚单位形式(二聚体、三聚体、四聚体、五聚体等)或与一种或多种其他的实体结合,例如,不同特异性的酶或片段。

[0124] 评估杀伤能力的方法可以与技术人员用来评估完整复制性噬菌体的方法相似,例如,噬菌斑形成单位或pfu,尽管通过在滴定杀伤单位后测定存活细菌的数目可以更好地评估杀伤单位。杀伤的量化是独特的,因为非复制性噬菌体不会在细菌宿主菌苔上形成噬斑。因此,可以用连续稀释方法替代标准的pfu来评估“杀伤”单位的量。可将暴露于杀伤组合物的细菌培养物连续稀释以用来定量杀伤单位。可将总细菌计数与有生活力的菌落单位比较,以确立细菌的有生活力片段和什么片段对杀伤构建体敏感。用于评估静态活性的其他方法可以包括天然或载入的细胞内含物的释放,或者针对对应于天然细胞壁结构的界定的或制备的基质的酶活性。

[0125] 通常给予治疗剂直到成功地清除致病菌。本发明考虑本发明组合物的单剂量形式和多剂量形式,以及实现递送此类单剂量和多剂量形式的持续释放手段的方法。当确定了感染菌株的特定诊断时,可以使用广谱制剂。

[0126] 对于气雾剂给予到肺或其他黏膜表面,将所述治疗组合物掺入至专为给予设计的气雾剂制剂中。许多这类气雾剂为本领域已知,且本发明不限于任何特定的制剂。这类气雾剂的一个实例为先灵葆雅公司(Schering-Plough)制造的Proventil™吸入器,其推进剂含有三氯单氟甲烷、二氯二氟甲烷和油酸。其他实施方案包括设计用于给予到个体或患者的鼻和鼻窦通道的吸入器。如有必要,可基于治疗中使用的特定组合物调整推进剂成分和乳化剂的浓度。每气雾剂治疗待给予的酶杀伤单位数目范围通常为约 10^6 至 10^{13} 杀伤单位,例如,约 10^{12} 杀伤单位。

[0127] 通常,杀伤会以至少3倍,例如,10、30、100、300倍等将宿主复制能力降低到许多个数量级。减缓宿主复制的速率而不对其杀伤还可以具有重大的治疗或商业价值。基因失活效率可以为4、5、6、7、8或更多的对数单位。

[0128] VIII. 制剂

[0129] 本发明进一步考虑了药物组合物,其包含在药学上可接受的赋形剂中提供的至少一种本发明的细胞壁降解酶,例如,溶菌酶。因此本发明的制剂和药物组合物考虑了包含对细菌宿主具有特异性的分离的酶片段的制剂;可影响相同或典型的细菌宿主的两种、三种、五种、十种或二十种或更多种酶的混合物;和可影响不同细菌宿主或相同细菌宿主的不同菌株的两种、三种、五种、十种或二十种或更多种酶的混合物,例如,共同抑制多种革兰氏阴性细菌物种生长的酶混合物。以这种方式,可以使本发明的组合物适合患者的需要。所述化

合物或组合物可以为无菌的或接近无菌的。

[0130] “药学有效剂量”为其被给予后可产生效应(抑菌(减少细菌生长)或杀菌(杀伤细菌))的剂量。精确剂量取决于治疗目的,且本领域技术人员使用已知技术可确定。参见,例如,Ansel,et al.(2010),Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery;Lieberman (1992)Pharmaceutical Dosage Forms(vols.1-3),Dekker;Lloyd(1999)The Art,Science and Technology of Pharmaceutical Compounding;以及Pickar(1999)Dosage Calculations。如本领域已知的,调整蛋白质降解、全身相对局部给予,以及年龄、体重、总体健康状况、性别、饮食、给予时间、药物相互作用和病症的严重性可能是必要的,且本领域技术人员可确定。

[0131] 药学上可接受的不同赋形剂为本领域所熟知。如本文中所使用,“药学上可接受的赋形剂”包括这样的材料,当其与组合物的活性成分结合时,可允许该成分保持生物学活性且不会造成与个体免疫系统的破坏性反应。此类赋形剂包括稳定剂、防腐剂、盐或糖复合物或晶体等。

[0132] 示例性药学载体包括无菌水的或非水的溶液、悬浮液和乳浊液。实例包括,但不限于,标准的药学赋形剂,如磷酸盐缓冲盐溶液、水、诸如油/水乳浊液的乳浊液,以及各种润湿剂。非水溶剂的实例为丙二醇、聚乙二醇、诸如橄榄油的植物油,以及诸如油酸乙酯的可注射有机酯。含水载体包括水、酒精/水溶液、乳浊液或悬浮液,包括盐水和缓冲介质。非肠道载体包括氯化钠溶液、林格氏葡萄糖、葡萄糖和氯化钠、乳酸林格氏液或固定油。静脉内载体包括流体和营养补充液、电解质补充液(如基于林格氏葡萄糖的电解质补充液)等。在其他实施方案中,将所述组合物掺入至固体基质中,包括缓慢释放颗粒、玻璃珠、绷带、眼上嵌入物和局部应用形式。

[0133] 进一步包括用于脂质体递送到制剂和包含微胶囊化酶包括糖晶体的制剂。可通过众所周知的常规方法配制包含此类赋形剂的组合物(参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences,Chapter43,14th Ed.,Mack Publishing Col)。蛋白质可以接受PEG化来获得通常源于PEG化的益处。参见,例如,Jevsevar,et al.(2010)Biotechnol.J.5:113-128;Brocchini,et al.(2008)Adv.Drug Delivery Revs.60:3-12;Jain and Jain(2008)Crit.Rev.Ther.Drug Carrier Syst.25:403-47,PMID:190626331以及Shaunak,et al.(2006)Nature Chemical Biology2:312-313。存在获得类似稳定化结果的替代方法。参见,例如,Schellenberger,et al.(2009)Nature Biotechnology27:1186-1192。

[0134] 一般来说,可以将药物组合物制备成多种形式,如颗粒剂、片剂、丸剂、胶囊剂(例如,用于经口给予)、栓剂、微珠、微球、脂质体、悬浮剂、药膏、洗剂等。可以将适合经口给予和局部应用的药用级有机或无机载体和/或稀释剂用来制备包含具有治疗活性的化合物的组合物。本领域已知的稀释剂包括含水介质、植物油和动物油和油脂。制剂可掺入稳定剂、润湿剂和乳化剂、用于改变渗透压的盐或用于确保适当pH值的缓冲剂。

[0135] 除了胞壁质水解多肽外,所述药物组合物可以包含其他组分,例如,多于一种活性成分,例如,2种或更多种、3种或更多种、5种或更多种,或者10种或更多种不同的酶,其中所述不同的酶可以对相同的、不同的或伴随的细菌具有特异性。例如,所述药物组合物可以含有多数(例如,至少2种或更多种)确定的壁降解酶,其中组合物中的至少两种酶具有不同的

细菌宿主特异性或不同的肽聚糖连接特异性,如转乙二醇酶和肽链内切酶的组合。以这种方式,所述治疗组合物可以被用于治疗不同细菌的混合性感染,或可以为选中用来有效对抗通常在特定的制度环境中发现的各种感染的组合物。例如,通过挑选来源于具有不同特异性的不同细菌噬菌体的不同组群的细胞壁降解活性,可以产生挑选的组合,以便将存在或部分存在于感染中的多种菌株作为目标。如上面所看到的,壁降解酶可以连同其他药剂一起给予,如常规抗菌剂和可提供对抗生物膜或胶囊形成培养物功效的抗菌剂。在以下文档中描述了各种材料:例如,Davies and Marques(2009) *J. Bacteriology* 191:393-403; Kimura and Itoh(2002) *Appl. and Env. Microbiology* 69:2491-2497; Kim and Geider(2000) *Phytopathology* 90:1263-1268; Hughes, et al. (1998) *J. Appl. Microbiology* 85:583-590和Bartell and Orr(1969) *J. Virology* 4:580-584。在一些实施方案中,可以将添加剂(例如,脂肪酸)或生物膜解聚酶作为附加结构域添加到嵌合性构建体上以作为制剂中的附加组分,或者可以同时或依次地将其与细胞壁降解活性组合给予。可以将基于所述源自噬菌体的多糖解聚酶的活性构建体与所提供的胞壁质水解活性组合。

[0136] IX. 为改善生产进行的蛋白质序列修饰

[0137] MTDs本质上通常为疏水性的,且包含此类MTD的嵌合蛋白质在诸如大肠杆菌的生产宿主中被表达时可能是不溶的。可以产生出展现意想不到的组合特性的构建体。如实施例中所显示,可以将构建体设计成足够亲水的,从而能在生产细胞宿主内保持可溶性,且不能穿越生产宿主细胞。经过修饰的构建体令人吃惊地保持着MTD穿越细菌外部细胞壁来产生靶细菌杀伤的功能。这可以获得是因为细菌细胞膜特性(和结构)与细菌外膜足够不同。

[0138] 此类改善的生产构建体组合了3种特性:(1)在宿主细胞,通常是革兰氏阴性大肠杆菌内以充分可溶的形式生产;(2)保留穿越细菌外部细胞壁的功能来接近细胞周质间隙,其中在细胞周质间隙中肽聚糖基质可接近催化结构域;和(3)不存在生产细胞内膜的大幅破坏。会掺入合适的对照(如未经过修饰的构建体)来确保细胞存活、表达和催化活性得到定量或相对评估。

[0139] 亲水性正向影响蛋白质溶解度,且通过破坏具有集中的疏水性区域的蛋白的这类区域可以使该蛋白更具溶解性。由于MTD片段通常属于嵌合构建体最具疏水性的片段,MTD最易接受氨基酸替换。

[0140] 在来自这些嵌合体的某些不溶的(或具有最低程度的溶解性的)构建体中,MTD片段为短跨膜片段。可以使用已知的疏水性测量方法来定位跨膜片段,其通常跨越约20个氨基酸残基。减少这些区域的整体疏水性常常会改变总蛋白质溶解度。

[0141] 可以使用DAS TMD分析鉴别高疏水性的区域(参见,例如,Cserzo, et al. (1997) *Protein Engineering* 10(6):673-676);可以使用隐马尔可夫模型(TMHMM)分析鉴别跨膜区域(参见,例如,Krogh, et al. (2001) *J. Mol. Biol.* 305(3):567-580);可以鉴别一般疏水性(参见,例如,Kyte and Doolittle(1982) *J. Mol. Biol.* 157(1):105-132),或者总平均亲水性分数(GRAVY;参见Gasteiger, et al (2005) "Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server" in Walker(ed.2005) *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press, pp.571-607)。

[0142] 密度排列界面(DAS)预测服务器被用于预测膜蛋白中的跨膜螺旋体。该程序使用了膜蛋白由被极性连接环隔开的15-30个主要疏水性残基的拉伸物组成这一条件。这意味

着在跨膜区可检测到主要由疏水性氨基酸组成、两侧为亲水残基或极性残基的片段。DAS基于使用先前获得的、专门的打分矩阵的查询序列对于许多非同源膜蛋白的低严紧度点状图。因为内在膜蛋白由比水溶性球状蛋白更多的疏水性残基组成,所以可以根据它们的组成辨别它们。DAS方法和基于疏水性图的程序间的主要差异为DAS在3个水平上描述了疏水性片段。疏水性的这种复合途径为DAS方法灵敏性的关键。

[0143] DAS图在2.2的DAS分数处表示“紧度”阈值,且在1.7处表示“松度”阈值。值为2.2提供匹配片段的数目方面的信息,而值为1.7给出跨膜片段的实际位置。通常,在蛋白跨度上小于3(例如,小于2.8、2.5或2.2)的DAS分数表明,当该蛋白在宿主细胞内过表达时为可溶的。

[0144] 具有带电侧链的氨基酸包括:精氨酸、组氨酸、赖氨酸(带正电),它们分别具有-4.5、-3.2和-3.9的亲水性分数;以及谷氨酸和天冬氨酸(带负电),它们具有-3.5的亲水性分数。带极性但侧链不带电的氨基酸包括丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺,它们分别具有-0.8、-0.7、-3.5和-3.2的亲水性分数。非极性的氨基酸(具有疏水性侧链):丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸,它们分别具有1.8、4.5、3.8、1.9、2.8、-0.9、-1.3和4.2的亲水性分数。可替换缬氨酸的氨基酸实例包括酪氨酸、色氨酸、精氨酸、组氨酸或赖氨酸。可替换异亮氨酸的氨基酸实例包括酪氨酸或色氨酸、精氨酸、组氨酸或者赖氨酸。可替换亮氨酸的氨基酸实例包括酪氨酸、色氨酸、精氨酸、组氨酸或赖氨酸。

[0145] 例如,在图1A中,C末端MTD结构域的峰值测量为超过约3.5。将该片段进行修饰来减小局部DAS图分数,其反映在图1B中。通常,将大量的峰值作为目标(例如,高于约3.1、3.0、2.9、2.7、2.5的峰值)来将局部峰值降低到小于约2.2、2.1、2.0、1.8或1.5。DAS图分数的减小通常为至少约0.2、0.3、0.4或0.5DAS单位。然而,MTD片段的DAS图必须维持足够高,以有效运输包含MTD的嵌合蛋白穿越革兰氏阴性菌的外膜。

[0146] TMHMM为基于隐马尔可夫模型的软件分析方法。其可预测跨膜螺旋体并可以高精度区分可溶蛋白质和膜蛋白。仅使用疏水性分析预测跨膜螺旋体的方法并不总是可靠的。该方法隐含地将可检测跨膜(TM)片段的疏水性信号和电荷偏置组合到一种整合的算法中,其中电荷偏置为位于膜蛋白的细胞质侧的序列部分中带正电荷残基的丰度。螺旋形膜蛋白具有交替的细胞质环和非细胞质环。TMHMM可以将疏水性、电荷偏置、螺旋长度和语法约束整合到一个预测模型中。改程序允许预测跨膜 α -螺旋的位置和介于中间的环区域的位置,还可以预测螺旋之间的哪些环会位于细胞或细胞器的内部或外部。该程序不能检测 β -折叠跨膜结构域。其用约20个氨基酸来以 α -螺旋形跨越磷脂双分子层。程序通过寻找至少约20个氨基酸长的 α -螺旋的存在,可以检测出这些跨膜结构域,沿着该 α -螺旋含有疏水性氨基酸。该程序可正确预测出97-98%的跨膜螺旋,而密度排列界面法(DAS)可预测出任何膜内在蛋白中的跨膜片段。DAS具有两种水平的严紧度(stringency),其比TMHMM更全面。

[0147] 为了增加包含TMHMM预测出的跨膜结构域的蛋白的溶解度,可以对疏水性氨基酸进行取代或修饰,例如,降低TMD的几率约0.5、0.6、0.7、0.8或甚至约0.9而下降到较低的值,例如,降低约0.2、0.3、0.4或0.5而位于约0.6的范围或更低的范围。

[0148] Kyte-Doolittle亲水性图为蛋白质结构的另一预测性量度,其指示跨膜区或表面区域。这不预测二级结构,因此其检测 α -螺旋和 β -折叠跨膜结构域。大于0的数字指示增加

的疏水性,小于0的数字指示亲水性氨基酸的增加。

[0149] 首先,给予每个氨基酸4.6至-4.6之间的疏水性分数。分数为4.6是最疏水的,分数为-4.6是最亲水的。当设定好窗口大小后,对该氨基酸数目的这些氨基酸的疏水性分数求平均值并被指定给窗口中第一个氨基酸。默认的窗口大小为9个氨基酸。计算机程序从氨基酸的第一个窗口开始,并计算那一窗口中所有疏水性分数的平均值。随后计算机程序向下移动一个氨基酸并计算第二窗口中所有疏水性分数的平均值。该模式继续直到该蛋白的末端,计算每一窗口的平均分数并将其指定给该窗口中第一个氨基酸。随后将均值描点在图上。y轴表示疏水性分数,x轴表示窗口数。

[0150] Kyte-Doolittle数值被广泛用于检测蛋白的疏水性区域。具有正值的区域为疏水的,负值为较亲水的。基于使用的窗口大小,可以将该数值用于鉴别表面暴露区域和跨膜区。5-7的短窗口大小通常可有效预测表面暴露区域。如果计算出的值超过约1.6,19-21的大窗口大小很适合寻找跨膜结构域。

[0151] 通常,在蛋白跨度上Kyte-Doolittle分数小于3(例如,小于2.8、2.5、2.2或2.0),指示当该蛋白在宿主细胞内过表达时为可溶的。应当将这些值用作经验法则,且与该规则发生偏离的情况可能发生。

[0152] Kyte和Doolittle还描述了整体GRAVY分数,其为蛋白中所有氨基酸的平均亲水性分数。内在膜蛋白通常比球状蛋白质具有更高的GRAVY分数。该指数为假定翻译的基因产品的总平均亲水性(GRAVY)分数。其被计算为每个氨基酸的亲水指数之和的算术平均值。

[0153] 计算GRAVY分数的软件可在expasy Protparam网上在线免费获取。输入为单字母形式的氨基酸一级序列。由于分数为平均值,需要选择的参数为用来调整氨基酸数目的窗口大小,其中对该数目的氨基酸求平均值以获得单独的亲水性分数。

[0154] 通常,具有负GRAVY分数的蛋白为可溶的(尽管此类蛋白可能在结构上和功能上与膜锚定蛋白相关)。而且,由于与疏水性蛋白的相互作用,几种亲水性蛋白被保留在亲脂性膜部分内(Althage, et al. (2004) *Biochim Biophys Acta* 1659:73-82; Guenebaut, et al. (1997) *J. Mol. Biol.* 265:409-418和Guenebaut, et al. (1998) *J. Mol. Biol.* 276:105-112)。GRAVY简单地计算了线性多肽序列的整体疏水性,其中递增的正分数指示更大的疏水性,但不用于解释残基顺序、蛋白质三维折叠方式或埋在蛋白质的疏水性核中的残基百分比。

[0155] 虽然不是最具指示性的测量,例如,相比DAS,小于1.5的GRAVY分数(例如,小于1.2、1.0或0.8)通常表明当蛋白在宿主细胞中表达时为可溶的。在本发明描述的MTDs的情况下,MTD的GRAVY分数不应当降至-1以下,以确保MTD保留外膜穿越活性。

[0156] 对于较长的跨膜或疏水性片段,可以定位出高度疏水的片段或氨基酸,以使用可供选择的方法来为锁定替换。例如,可以测定表面暴露的氨基酸残基和它们的疏水性指数。如果疏水性指数或GRAVY分数为负值,那么可以使用亲水性残基来替换具有较少亲水性的部分。例如,可以测定出可及表面面积(ASA)或溶剂可及表面。ASA为溶剂可接近的生物分子的表面面积(Lee和Richards (1971) *J. Mol. Biol.* 55:379-400)。氨基酸的溶剂暴露测量了残基被埋入蛋白三级结构中多深,且可用于分析和预测蛋白质结构和功能(Li, et al. (2011) *Proteomics* 11:3793-801; Ahmad, et al. (2003) *Proteins* 50:629-35)。

[0157] 还可以使用预测表面暴露残基的神经网络。来自蛋白质晶体结构的数据被用来教给计算机模拟的神经网络从序列预测表面暴露的规则。这些受训的网络能正确预测表面暴

露。参见,例如,Holbrook,et al. (1990) Protein Eng.3:659-665;Rost and Sander (1994) Proteins20:216-226;Lebeda,et al. (1998) J.Protein Chem.17:311-318;Pollastri,et al. (2002) Proteins47:142-153和Ahmad and Gromiha (2002) Bioinformatics18:819-824。其他的方法包括逻辑函数 (Mucchielli-Giorgi,et al. (1999) Bioinformatics15:176-177);贝叶斯分析 (Mucchielli-Giorgi,et al. (1999) Bioinformatics15:176-177);信息理论 (Naderi-Manesh,et al. (2001) Proteins42:452-459;Richardson and Barlow (1999) Protein Eng.12:1051-1054和Carugo (2000) Protein Eng.13:607-609);以及替换矩阵 (Pascarella,et al. (1998) Proteins32:190-199)。预测溶剂可及性的较少定量的方法仅仅基于疏水性图 (参见Lesk (2002) Introduction to Bioinformatics Oxford University Press)。

[0158] 这些方法指示了每个残基的可及性(暴露的、埋入的,以及可能的、中间的)。被暴露到溶剂下的残基更可能影响溶解度并与水溶液相互作用。可以用更具极性或亲水性的残基替换暴露的残基,以增加蛋白质或结构域在表达时的溶解度。

[0159] 以下参考文献提供了增加蛋白质溶解度的进一步指导:Trevino,et al. (2007) J.Mol.Biol.366:449-460;Magnan,et al. (2009) Bioinformatics25:2200-2207;Ahuja,et al. (2006) Malaria Journal5:52;Smialowski,et al. (2007) Bioinformatics23:2536-2542;Trevino,et al. (2008) J.Pharm Sci97:4155-66;Makrides (1996) Microbiological Reviews60:512-538;Karlsson,et al. (2005) J.Biol.Chem.280:25558-564;Maxwell,et al. (1999) Protein Sci.8:1908-1911和Wilkinson and Harrison (1991) BioTechnology9:443448。

[0160] X.为改善半衰期、稳定性、储藏进行的蛋白质修饰

[0161] 将聚亚烷基乙二醇 (PAG) 部分添加到多肽或其他分子上被称为PAG化。PAG化(通常为PEG化)可以提高多肽的药物代谢动力学和药效动力学性能,例如,增加体外和体内活性及稳定性、增加半衰期、减少蛋白质降解、减少免疫原性和提高生物利用度和生物分布。通常被作为PAG化目标的氨基酸为精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、酪氨酸、丝氨酸、苏氨酸、组氨酸、半胱氨酸和赖氨酸。赖氨酸侧链上的 ϵ -氨基通常被作为PAG化的目标。

[0162] 市场上可以买到300g/mol至10,000,000g/mol的大范围分子量的聚乙二醇 (PEG)。可以使用聚合过程的不同引发剂制备不同形式的PEG,其中最常用的为单官能团的甲醚PEG (甲氧基聚(乙二醇)),被称为mPEG。也可以获得更纯的低聚物形式的较低分子量PEGs,被称为单分散的、均匀的或离散的。

[0163] PEG分子可以具有不同的几何形状。支化PEGs具有从中心核心基团发出的3至10条PEG链。星形PEGs具有从中心核心基团发出的10-100条PEG链。梳齿形PEGs具有通常嫁接到聚合物骨架上的多条PEG链。

[0164] 熔点根据聚合物的MW发生变化。PEG具有以下结构:

[0165] $\text{HO}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2-\text{OH}$

[0166] 其中n=9时将具有约400道尔顿的平均分子量 (PEG400)。理想地,由于治疗的相容性和管理的原因,被加到多肽上的PEG聚合物为高度均匀的(低分散性)。对于约5KDa的MW,n为约100;且对于约20KDa的MW,n为约400。

[0167] 除了氨基酸附着位点,PEG化反应的注意事项包括引发性PEG化试剂、PEG到蛋白质

结合率、pH、反应时间和温度(参见,例如,Seely et al. (2005) “Making Site-specific PEGylation Work: Purification and analysis of PEGylated protein pharmaceuticals presents many challenges” BioPharm International)。

[0168] 半胱氨酸特异性试剂包括碘乙酰胺或氯乙酰胺化学品,且还应用了马来酰亚胺化学品(Kalia and Raines (2010) Curr Org Chem.14:138-147)。因此PEG马来酰亚胺、PEG碘乙酸、PEG硫醇和PEG乙烯基砒为允许半胱氨酸在温和条件下特异性PEG化的有效试剂。

[0169] 将PEG加入到给定多肽的N末端氨基酸上的试剂包括PEG NHS酯、PEG三氟乙基磺酸酯(tresylate)、PEG醛、PEG异硫氰酸酯和几种其他试剂(Nucci et al. (1991) Adv. Drug Del. Rev.6:133-151; Harris, et al. (1984) J. Poly. Sci. Polymer Chem. Ed.22:341-352; Bailon and Berthold (1998) Pharm. Sci. Technol. Today1:352-356)。所有都在温和条件下反应,且为对氨基具有相当的特异性。通常, α -氨基的pK比赖氨酸残基的 ϵ -氨基低1-2个pH单位。通过PEG化可获得pH为7或更低、对N-端具有高选择性的分子。

[0170] PEG分子和PEG化条件为本领域已知。参见,例如,Abuchowski, et al. (1984) Cancer Biochem. Biophys.7:175-186; Abuchowski, et al. (1977) J. Biol. Chem.252:3582-3586; Jackson, et al. (1987) Anal. Biochem.165:114-127; Koide, et al. (1983) Biochem. Biophys. Res. Commun.111:659-667; 三氟乙基磺酸酯(Nilsson, et al. (1984) Methods Enzymol.104:56-69; Delgado, et al. (1990) Biotechnol. Appl. Biochem.12:119-128); 源自N-羟基琥珀酰亚胺的活性酯(Buckmann, et al. (1981) Makromol. Chem.182:1379-1384; Joppich, et al. (1979) Makromol. Chem.180:1381-1384; Abuchowski, et al. (1984) Cancer Biochem. Biophys.7:175-186; Katre, et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.84:1487-1491; Kitamura, et al. (1991) Cancer Res.51:4310-4315; Boccu, et al. (1983) Z. Naturforsch.38C:94-99); 碳酸盐(Zalipsky, et al. pp.347-370 in Harris (ed.1992) Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications Plenum Press, New York; Zalipsky, et al. (1992) Biotechnol. Appl. Biochem.15:100-114; Veronese, et al. (1985) Appl. Biochem. Biotech.11:141-152); 咪唑基甲酸盐(Beauchamp, et al. (1983) Anal. Biochem.131:25-33; Berger, et al. (1988) Blood71:1641-1647); 4-二硫吡啶(Woghiren, et al. (1993) Bioconjugate Chem.4:314-318); 异氰酸酯(Byun, et al. (1992) ASAI0 Journal M649-M653) 和环氧化合物(第4806595号美国专利,授予Noishiki, et al. (1989))。其他连接基团包括氨基和活化的PEG之间的尿烷键(Veronese et al. (1985) Appl. Biochem. Biotechnol.11:141-152)。

[0171] 可以将双官能团PEG用来作为本文中描述的嵌合蛋白质的胞壁质水解结构域和MTD的连接臂。例如,可以将同源双官能团PEG用来将MTD的N端连接到催化结构域的N端上(或反过来也可以)。在一些实施方案中,使用了Y结构PEG衍生物,其Y的一个枝上具有N端特异性基团(例如,醛反应性基团),且另一枝上具有C端特异性基团(例如,胍)。在一些实施方案中,使用了在其中一个末端具有反应性基团的线性PEG。

[0172] 在一些实施方案中,将半胱氨酸残基引入到结构域的N端或C端上,且使用了异源双官能团PEG(例如,硫醇-PEG-胺,一种一端为硫醇且另一端为胺的产品)。可以使用叔丁氧羰基(Boc)或苄氧羰基(Fmoc)来封阻氨基。

[0173] 可以连续地进行结合反应,且可以包括纯化步骤来去除不想要的反应物和产品。纯化方法通常为标准的肽纯化方法,在蛋白质化学中已知许多这类方法。这些方法可以包括尺寸排阻色谱、离子交换色谱等。

[0174] C端的PEG反应性基团可以为肼或类似的特异性反应基团。反应通常持续0.5-18小时;在合适的反应温度下,例如,20-40℃;具有合适的肽浓度,例如,0.5-3mg/ml;具有合适的PEG试剂浓度,例如,PEG超过靶蛋白约1-10倍;以及合适的pH,例如,pH4-7。可以终止反应、去除反应物并分离期望的PEG化多肽。

[0175] 将结构域-PEG反应基团连接到另一结构域的N端上的反应可为醛或类似的特异性反应基团。再次地,反应可以进行合适的时间、在合适的反应温度下、具有合适的肽浓度和具有合适的反应物浓度以及合适的pH。

[0176] 可以将甲氧基聚乙二醇三氟乙基磺酸酯(mPEG-三氟乙基磺酸酯,MW为5kDA)用于靶蛋白的赖氨酸特异性PEG化。通常,将mPEG-三氟乙基磺酸酯与蛋白质在30℃下孵育3小时。

[0177] 可以将甲氧基聚乙二醇马来酰亚胺(mPEG-马来酰亚胺,MW为5kDA)——一种半胱氨酸特异性PEG靶试剂用来对期望蛋白质PEG化。通常,将mPEG-马来酰亚胺与靶蛋白在30℃下反应3小时。

[0178] 甲氧基聚乙二醇丙醛为N末端PEG靶试剂(mPEG-醛,MW为20kDA)。通常,将mPEG-醛与期望的蛋白质在30℃下孵育3-4小时。

[0179] 通常采用标准的SDS-PAGE电泳来监测PEG化反应和衍生产物。相比分子量标记的异常SDS-PAGE迁移通常产生于PEG化产物的非线性特性。具体来说,因为PEG提供了相比蛋白质的不同的SDS结合,所以标准的蛋白质分子量标记的迁移与用不同整数数目的PEG部分衍生化的蛋白质的迁移不相关。SDS到PEG的结合的化学计量学不同于线性蛋白质,且带电比为非线性的。

[0180] 可以使用基于微流体的电泳系统——Agilent2100生物分析仪(P230assay)测定PEG化的程度。对于生物分析仪,按照制备商的方案描述进行了蛋白质载入和芯片上的样品分析。参见Protein230Kit Guide,Agilent Technologies Publication Number G2938-90054。PEG化反应通常产生不同PEG化的蛋白质种类(未PEG化、单PEG化、双PEG化、三PEG化等),它们具有具有不同数目的连接的PEG部分。

[0181] XI. 方法学

[0182] 本发明描述的嵌合多肽的生产和使用包括熟知的方法:普通临床微生物学方法、操作噬菌体的一般方法,以及生物技术、法则和方法的一般原理。这些方法的参考文献罗列如下。

[0183] A. 普通临床微生物学

[0184] 普通微生物学为微生物研究。参见,例如,Sonenshein,et al. (ed.2002) Bacillus Subtilis and Its Closest Relatives:From Genes to Cells Amer.Soc.Microbiol.; Alexander and Strete (2001) Microbiology:A Photographic Atlas for the Laboratory Benjamin/Cummings;Cann (2001) Principles of Molecular Virology (3d ed.);Garritty (ed.2005) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2vol.2d ed.) Plenum,;Salyers and Whitt (2001) Bacterial Pathogenesis:A Molecular Approach (2d

ed.) Amer.Soc.Microbiol.;Tierno (2001) The Secret Life of Germs:Observations and Lessons from a Microbe Hunter Pocket Star;Block (ed.2000) Disinfection, Sterilization,and Preservation (5th ed.) Lippincott Williams&Wilkins Publ.; Cullimore (2000) Practical Atlas for Bacterial Identification Lewis Pub.; Madigan,et al. (2000) Brock Biology of Microorganisms (9th ed.) Prentice Hall; Maier,et al. (eds.2000) Environmental Microbiology Academic Pr.; Tortora,et al. (2000) Microbiology:An Introduction 包括 Microbiology Place (TM) Website, Student Tutorial CD-ROM 和 Bacteria ID CD-ROM (7th ed.), Benjamin/Cummings; Demain,et al. (eds.1999) Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology (2d ed.) Amer.Soc.Microbiol.; Flint,et al. (eds.1999) Principles of Virology:Molecular Biology,Pathogenesis,and Control Amer.Soc.Microbiol.; Murray,et al. (ed.1999) Manual of Clinical Microbiology (7th ed.) Amer.Soc.Microbiol.; Burlage,et al. (eds.1998) Techniques in Microbial Ecology Oxford Univ.Press; Forbes,et al. (1998) Bailey&Scott's Diagnostic Microbiology (10th ed.) Mosby; Schaechter,et al. (ed.1998) Mechanisms of Microbial Disease (3d ed.) Lippincott,Williams&Wilkins; Tomes (1998) The Gospel of Germs:Men,Women,and the Microbe in American Life Harvard Univ.Pr.; Snyder and Champness (1997) Molecular Genetics of Bacteria Amer.Soc.Microbiol., ISBN:1555811027; Karlen (1996) MAN AND MICROBES:Disease and Plagues in History and Modern Times Touchstone Books 和 Bergey (ed.1994) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (9th ed.) Lippincott,Williams&Wilkins。

[0185] B.操作噬菌体的一般方法

[0186] 操作噬菌体的一般方法为众所周知,参见,例如,Snustad and Dean (2002) Genetics Experiments with Bacterial Viruses Freeman; O'Brien and Aitken (eds.2002) Antibody Phage Display:Methods and Protocols Humana; Ring and Blair (eds.2000) Genetically Engineered Viruses BIOS Sci.Pub.; Adolf (ed.1995) Methods in Molecular Genetics:Viral Gene Techniques vol.6, Elsevier; Adolf (ed.1995) Mehtods in Molecular Genetics:Viral Gene Techniques vol.7, Elsevier 和 Hoban and Rott (eds.1988) Molec.Biol.of Bacterial Virus Systems (Current Topics in Microbiology and Immunology No.136) Springer-Verlag。

[0187] C.生物技术、法则和方法的一般原理

[0188] 生物技术、法则和方法的一般原理,描述于例如以下文献中:Alberts,et al. (2002) Molecular Biology of the Cell (4th ed.) Garland; Lodish,et al. (1999) Molecular Cell Biology (4th ed.) Freeman; Janeway,et al. (eds.2001) Immunobiology (5th ed.) Garland; Flint,et al. (eds.1999) Principles of Virology:Molecular Biology,Pathogenesis,and Control, Am.Soc.Microbiol.; Nelson,et al. (2000) Lehninger Principles of Biochemistry (3d ed.) Worth; Freshney (2000) Culture of Animal Cells:A Manual of Basic Technique (4th ed.) Wiley-Liss; Arias and Stewart (2002) Molecular Principles of Animal Development, Oxford University Press; Griffiths,et al. (2000) An Introduction to Genetic Analysis (7th ed.) Freeman;

Kierszenbaum(2001)Histology and Cell Biology,Mosby;Weaver(2001)Molecular Biology(2d ed.)McGraw-Hill;Barker(1998)At the Bench:A Laboratory Navigator CSH Laboratory;Branden and Tooze(1999)Introduction to Protein Structure(2d ed.),Garland Publishing;Sambrook and Russell(2001)Molecular Cloning:A Laboratory Manual(3vol.,3d ed.),CSH Lab.Press;Scopes(1994)Protein Purification:Principles and Practice(3d ed.)Springer Verlag;Simpson,et al. (eds.2009)Basic Methods in Protein Purification and Analysis:A Laboratory Manual,CSHL Press,NY,ISBN978-087969868-3;Friedmann and Rossi(eds.2007)Gene Transfer:Delivery and Expression of DNA and RNA,A Laboratory Manual,CSHL Press,NY,ISBN978-087969764-8;Link and LaBaer(2009)Proteomics:A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual,CSHL Press,NY,ISBN978-087969793-8,以及Simpson (2003)Proteins and Proteomics:A Laboratory Manual,CSHL Press,NY,ISBN978-087969554-5。其他涉及生物信息学的参考文献包括,例如:Mount(2004)Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis(2d ed.),CSHL Press,NY,ISBN978-087969687-0; Pevsner(2009)Bioinformatics and Functional Genomics(2d ed.)Wiley-Blackwell, ISBN-10:0470085851,ISBN-13:978-0470085851;Lesk(2008)Introduction to Bioinformatics(3d ed.)Oxford Univ.Press,ISBN-10:9780199208043,ISBN-13:978-0199208043;Zvelebil and Baum(2007)Understanding Bioinformatics,Garland Science,ISBN-10:0815340249,ISBN-13:978-0815340249;Baxeavanis and Ouellette (eds.2004)Bioinformatics:A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins(3ded.)Wiley-Interscience;ISBN-10:0471478784,ISBN-13:978-0471478782; Gu and Bourne(eds.2009)Structural Bioinformatics(2d ed.),Wiley-Blackwell, ISBN-10:0470181052,ISBN-13:978-0470181058;Selzer,et al. (2008)Applied Bioinformatics:An Introduction,Springer,ISBN-10:9783540727996,ISBN-13:978-3540727996;Campbell and Heyer(2006)Discovering Genomics,Proteomics and Bioinformatics(2d ed.),Benjamin Cummings,ISBN-10:9780805382198,ISBN-13:978-0805382198;Jin Xiong(2006)Essential Bioinformatics,Cambridge Univ Press,ISBN-10:0521600820,ISBN-13:978-0521600828;Krane and Raymer(2002)Fundamental Concepts of Bioinformatics,Benjamin Cummings,ISBN-10:9780805346336,ISBN-13: 978-0805346336;He and Petoukhov(2011)Mathematics of Bioinformatics:Theory, Methods and Applications(Wiley Series in Bioinformatics),Wiley-Interscience, ISBN-10:9780470404430,ISBN-13:978-0470404430;Alterovitz and Ramoni(2011)Knowledge-Based Bioinformatics:From analysis to interpretation,Wiley,ISBN-10: 9780470748312,ISBN-13:978-0470748312;Gopakumar(2011)Bioinformatics:Sequence and Structural Analysis,Alpha Science Intl Ltd.,ISBN-10:184265490X,ISBN-13: 978-1842654903;Barnes(ed.2007)Bioinformatics for Geneticists:A Bioinformatics Primer for the Analysis of Genetic Data(2d ed.)Wiley,ISBN-10:9780470026199, ISBN-13:978-0470026199;Neapolitan(2007)Probabilistic Methods for Bioinformatics,Kaufmann Publishers,ISBN-10:0123704766,ISBN-13:978-0123704764;

Rangwala and Karypis (2010) Introduction to Protein Structure Prediction: Methods and Algorithms (Wiley Series in Bioinformatics), Wiley, ISBN-10: 0470470593, ISBN-13: 978-0470470596; Ussery, et al. (2010) Computing for Comparative Microbial Genomics: Bioinformatics for Microbiologists (Computational Biology), Springer, ISBN-10: 9781849967631, ISBN-13: 978-1849967631 以及 Keith (ed. 2008) Bioinformatics: Volume I: Data, Sequence Analysis and Evolution (Methods in Molecular Biology), Humana Press, ISBN-10: 9781588297075, ISBN-13: 978-1588297075。

[0189] 以下参考文献提供了融合和嵌合蛋白的其他指导: Hammarstrom, et al. (2001) Protein Science 11: 313-321; Harrison (1999) Innovations 11: 4-7; Banerjee and Padmanabhan WO/2010/125588。

[0190] D. 诱变; 位点特定、随机、改组

[0191] 基于本文中提供的结构和功能描述, 可以产生同源和功能变体。通过结构同源性可以找到具有渗透功能的片段。通常可在特定的基因排列中找到噬菌体尾基因, 且可以将相应的排列中找到的其他实体用于进行细胞壁降解功能的测试。这些实体还可以作为筛选结构变体的起始点, 例如, 诱变处理此类结构和筛选具有期望特征的变体, 例如, 较广的基质特异性。可以使用诱变的标准方法, 参见, 例如, Johnson-Boaz, et al. (1994) Mol. Microbiol. 13: 495-504; 第6506602号、第6518065号、第6521453号、第6579678号美国专利。

[0192] 可以类似地鉴定膜转移片段, 且可以筛选普遍性或特异性靶基序用于特异性互相作用的受体结构域。靶标可以为含有在不同的靶株系上发现的结构的表面表达的蛋白质、糖类或脂质。可以将诱变用来拓宽结合选择性或增加片段或整个构建体的稳定性, 删除策略可以清除外来片段。

[0193] 可以将革兰氏阳性细菌细胞壁的组分与革兰氏阴性的细胞壁的组分共享, 或与其他分支杆菌或孢子共享。如有必要, 可以结合其他源自噬菌体的活性以渗透更复杂的革兰氏阴性的细胞壁结构。具体来说, 可以将多重催化片段用来提供多种活性, 它们可以在单个构建体内或当与另一治疗剂, 例如抗生素或抗菌剂组合时, 协同起作用。

[0194] 寻靶部分 (targeting moiety) 可以增加活性部分的局部浓度, 但合适长度的连接臂也可以局部增加壁降解事件的数目。因此, 可以将与靶标和细胞壁降解片段相容的或者合适长度的连接臂用来增加细胞壁渗透活性, 导致靶细菌的停滞或杀伤。

[0195] 对噬菌体进行了挑选来使其在细胞外生存, 经常是在不适宜生物居留的条件下。因此, 所述结构有可能为特别强壮和坚固的, 且可抵抗在其他时候可能使酶性实体或催化实体失活的环境条件。生活在不宜居住的环境中的细菌, 例如, 温度、盐的极端环境、氧化或反应极端条件、高压等, 为特别适应生存在那些条件下的噬菌体所靶向的目标。在各自纯化过程、存储和使用的药理学条件中, 来源于这些噬菌体的多肽有可能是更稳定的。

[0196] E. 筛选

[0197] 可以设计筛选方法, 用于评估突变体或新的候选胞壁质水解片段。可以筛选噬菌体颗粒的纯化制剂, 以确认此类基因产品存在于所述噬菌体结构上。

[0198] 胞壁质水解活性筛选可以使用粗细菌培养物、分离的细菌细胞壁组分、肽聚糖制

剂、合成的基质或纯化的试剂,以测定靶细胞上的基质位点的亲和力和数目。可以结合渗透或壁降解分析来评估靶株系外膜的完整性、菌苔抑制分析、培养物活力测试、对细胞壁制剂或其他基质的活性,或者基于胞壁质水解活性的细胞壁组分(例如,糖类、氨基酸、聚合物)的释放。可以通过可溶的N-乙酰己糖胺的释放(例如,修饰的Morgan-Elson反应)测量酰胺酶活性,或者通过游离氨基分析((丙氨酸-甘氨酸肽链内切酶的L-丙氨酸,甘氨酸-甘氨酸肽链内切酶的L-甘氨酸),使用DNFB分析)测量肽链内切酶活性,所有这三种分析都基于Petit et al. (1966) Biochemistry 5:2764-76。还可以将甘氨酸-甘氨酸肽链内切酶活性测量为来自N-乙酰化的6甘氨酸(乙酰基-Gly6)的游离氨基的释放,参见Kline, et al. (1994) Anal. Biochem. 217:329-331。

[0199] 可以测试连接臂来比较对膜转移或降解的影响,或来比较不同朝向的活性片段的活性。可以使用细胞壁降解片段筛选目标(例如,革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌、分支杆菌和孢子)面板(panels),以测定哪些片段位于较宽或较窄的靶标谱上。

[0200] 一种测试细胞壁降解活性的方法为用温和洗涤剂或变性剂处理噬菌体来释放与病毒粒子相关的蛋白质。进一步测试这些蛋白质对细菌细胞的壁降解活性或胞壁质水解活性。另一种方法为测定对噬菌体抗性宿主的细胞壁降解活性或外溶菌作用(LO)。用来评估与噬菌体结构组分相关的壁降解活性或胞壁质水解活性的第三种方法为进行酶谱分析,例如,其中将纯的噬菌体制剂在掺有高压处理过的宿主细胞的SDS-聚丙烯酰胺凝胶上电泳。凝胶上的蛋白质被允许原位复性并随后对细胞壁组分起作用,当胶的剩余部分被用甲基蓝燃料染成蓝色时产生清晰的“胞壁质水解”区域。参见,例如,Lepeuple, et al. (1998) Appl. Environ. Microbiol. 64:4142-428。将该清晰的区域显示出来并对每个带区的蛋白条带进行洗脱。可以鉴定蛋白质,例如,通过N末端测序或通过质谱分析。随后可以分离降解性蛋白的编码序列。

[0201] XII. 分离编码MTDs和/或胞壁质水解结构域的核酸

[0202] 进一步提供了编码细胞壁降解或膜转移结构域的核酸。此类多核苷酸编码本文中描述的胞壁质水解蛋白,包括具有CHAP结构域(具体来说,C末端CHAP结构域)的蛋白和具有细胞壁降解活性的其他蛋白。

[0203] 编码细胞壁降解多肽的核酸与本发明的核酸实施方案相关。可将这些核酸(例如,cDNA、基因组序列或亚序列(探针))克隆,或者通过体外方法扩增,如聚合酶链式反应(PCR)、连接酶链式反应(LCR)、转录依赖的扩增系统(TAS)或自主序列复制系统(SSR)。除了合成型方法,很多种克隆和体外扩增方法为技术人员所熟知。足以指导技术人员完成许多克隆操作的这些技术和说明的实例,在以下文献中可以找到:Berger and Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology 152 Academic Press, Inc.; Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning-A Laboratory Manual (2nd ed.) Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press; Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds., Current Protocols (Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., 1994 Supplement); Cashion et al., US5017478; 以及Carr, 第0246864号欧洲专利。

[0204] 可以通过以上描述的合适方法制备编码细胞壁降解多肽的DNA,包括例如,克隆和采用限制酶限制合适的序列。可以通过常规克隆方法分离编码细胞壁降解多肽的核酸。可

以将细胞壁降解多肽的示例性核苷酸序列,例如,登录号为YP_024486的序列,用来设计可特异性杂交到基因上或可特异性杂交到总核酸样品中编码细胞壁降解蛋白的mRNA上(例如,在Southern杂交或Northern杂交中)的探针。一旦鉴别出编码细胞壁降解蛋白的靶核酸,就可以根据本领域技术人员已知的标准方法将其分离。此外,可以用限制酶切割分离的核酸来制备编码全长细胞壁降解多肽或其亚序列的核酸,例如,含有可编码至少一种细胞壁降解多肽的催化结构域的亚序列。随后可以将这些编码细胞壁降解多肽或其亚序列的限制酶片段连接起来,例如,以制备编码细胞壁降解多肽的核酸。

[0205] 可以将类似的方法用来产生合适的细胞壁结合片段或片段间的连接臂。

[0206] 通过分析表达的产物可以表征编码合适多肽的核酸或其亚序列。可以使用基于表达的多肽的物理、化学或免疫特性检测的分析。例如,可以通过核酸编码的多肽降解或消化细菌细胞的能力鉴定细胞壁降解多肽,例如,如本文中所描述。

[0207] 另外,可以化学合成编码期望的多肽或其亚序列的核酸。合适的方法包括:Narang et al. (1979) Meth. Enzymol. 68:90-99的磷酸三酯法;Brown et al. (1979) Meth. Enzymol. 68:109-151的磷酸二酯法;Beaucage et al. (1981) Tetra. Lett., 22:1859-1862的二乙基亚磷酰胺法;以及第4458066号美国专利的固相支持物法。化学合成制备单链的寡核苷酸。可以通过与互补序列杂交或通过使用单链作为模板用DNA聚合酶进行聚合将该单链转化为双链DNA。技术人员理解,虽然DNA的化学合成常常限于约100碱基的序列,但通过连接较短序列可以获得较长的序列。

[0208] 可以使用诸如聚合酶链式反应(PCR)的DNA扩增方法克隆编码期望的多肽或其亚序列的核酸。因此,例如,使用含有一个限制酶位点(例如,NdeI)的正义引物和含有另一限制酶位点(例如,HindIII)的反义引物可PCR扩增核酸序列或亚序列。这会制备出编码期望的多肽或亚序列且具有末端限制酶位点的核酸。随后可以将该核酸容易地连接到含有编码第二分子且具有合适对应限制酶位点的核酸的载体内。本领域技术人员可以使用GenBank或其他资源中提供的序列信息确定出合适的PCR引物。还可以通过定点诱变将合适的限制酶位点加入到编码细胞壁降解多肽或其多肽亚序列的核酸中。根据标准的方法,用合适的限制性内切核酸酶切割含有编码细胞壁降解多肽的核苷酸序列或亚序列的质粒,随后将其连接到合适的载体中,用于扩增和/或表达。在以下文献中可找到足以指导技术人员完成体外扩增方法的技术实例:Berger、Sambrook和Ausubel以及Mullis et al. (1987) 第4683202号美国专利;PCR Protocols A Guide to Methods and Applications (Innis et al, eds) Academic Press Inc. (1990);Arnhem&Levinson (1990年10月1日) C&EN 36-47; The Journal Of NIH Research (1991) 3:81-94;Kwoh et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173;Guatelli et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1874;Lomell et al. (1989) J. Clin. Chem., 35:1826;Landegren et al., (1988) Science 241:1077-1080;Van Brunt (1990) Biotechnology 8:291-294;Wu and Wallace (1989) Gene 4:560;以及Barringer et al. (1990) Gene 89:117。

[0209] 可以使用基于确定多肽的序列的PCR引物来扩增编码细胞壁降解多肽的一些核酸。

[0210] 可以将其他物理性质,例如,由特定核酸表达的重组细胞壁降解多肽的物理性质,与已知的期望多肽的特性比较,来提供另一种鉴别合适序列或结构域的方法,例如,为细菌

特异性、结合特异性和/或催化活性决定因素的细胞壁降解蛋白的序列或结构域。或者,可以将编码细胞壁降解多肽的核酸或重组细胞壁降解多肽基因进行突变,且通过测定通常由未突变的、自然发生的或对照细胞壁降解多肽加强的细菌“溶解”的变异,可以确立其作为细胞壁降解多肽的作用或特定序列或结构域的作用。技术人员理解,通过分子生物学技术来操作编码多肽的核酸,例如PCR,可以促进本发明的细胞壁降解多肽的突变或修饰,。可以将其他诱变或基因改造技术应用到本文中描述的功能片段上,包括与嵌合构建体相容的壁降解活性、壁结合特性或连接臂特征。

[0211] 通过使用诱变或修饰多肽的标准方法并测试它们的活性如受体基质活性和/或催化活性,可以确定新鉴定的细胞壁降解多肽的功能域,如本文中所述。可以将各种细胞壁降解蛋白的功能域的序列用来构建编码或组合一种或多种细胞壁降解多肽功能域的核酸。随后可以测试这些多重活性多肽融合物的期望的抑菌或溶菌活性。细胞壁降解多肽来源的具体实例包括前噬菌体序列,其包括功能噬菌体基因组的不完整残留物或绿脓杆菌素样结构,包括来源于噬菌体样基因片段的颗粒,例如,残留在细菌DNA中的噬菌体的删除或突变的基因残留物。

[0212] 可以通过与已知的细胞壁降解多肽的核酸或氨基酸序列比对和比较来鉴定编码细胞壁降解多肽的核酸,例如,来确定它们之间的序列相同性的量。可以将该信息用来鉴定和挑选赋予或调节细胞壁降解多肽活性的多肽结构域,例如,基于目标多肽之间序列相同性的量的靶细菌特异性或结合特异性和/或降解活性。例如,可以将具有目标细胞壁降解多肽之间序列相同性的结构域以及与其已知的活性相关的结构域,用来构建含有那种结构域和其他结构域且具有与那种结构域(例如,细菌或结合特异性和/或壁降解活性)相关活性的多肽。可以将类似的策略用来分离细菌SH3结构域,其可结合到细胞壁结构、肽聚糖识别蛋白(PGRPs)、噬菌体尾“胞壁质水解”多肽上,或可结合到连接结构域之间的间隙的连接臂上。

[0213] XIII. 宿主细胞内期望的多肽的表达

[0214] 可以将本文中描述的蛋白质在多种宿主细胞内表达,包括大肠杆菌、其他的细菌宿主和酵母。宿主细胞可以为微生物,例如,酵母细胞、细菌细胞或丝状真菌细胞。合适宿主细胞的实例包括,例如,固氮菌属(*Azotobacter* sp.) (例如,棕色固氮菌(*A.vinelandii*))、假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)、根瘤菌属(*Rhizobium* sp.)、欧文氏菌属(*Erwinia* sp.)、埃希氏菌属(*Escherichia* sp.) (例如大肠杆菌)、芽孢杆菌、假单胞菌、变形杆菌、沙门氏菌、沙雷氏菌、志贺氏菌、根瘤菌(*Rhizobia*)、透明颤菌(*Vitreoscilla*)、副球菌(*Paracoccus*)、葡萄球菌(*Staphylococcus*)和克雷伯氏菌属(*Klebsiella* sp.),还包括很多其他宿主细胞。细胞可以为几个属中任何一属,包括:酵母属(*Saccharomyces*) (例如,啤酒酵母(*S.cerevisiae*))、假丝酵母(*Candida*) (例如,产朊假丝酵母(*C.utilis*)、近平滑假丝酵母(*C.parapsilosis*)、克柔假丝酵母(*C.krusei*)、易变假丝酵母(*C.versatilis*)、解脂假丝酵母(*C.lipolytica*)、涎沫假丝酵母(*C.zealandica*)、高里假丝酵母(*C.guilliermondii*)、白假丝酵母(*C.albicans*)和土生假丝酵母(*C.humicola*));毕赤酵母属(*Pichia*) (例如,粉状毕赤酵母(*P.farinosa*)和奥默毕赤酵母(*P.ohmeri*));球拟酵母属(*Torulopsis*) (例如,白色球拟酵母(*T.candida*)、球面球拟酵母(*T.sphaerica*)、木醋球拟酵母(*T.xylinus*)、无名球拟酵母(*T.famata*)和易变球拟酵母(*T.versatilis*));德巴利酵母属(*Debaryomyces*)

(例如,亚球形德巴利酵母 (*D.subglobosus*)、坎塔雷利德巴利酵母 (*D.cantarellii*)、球形德巴利酵母 (*D.globosus*)、汉逊氏德巴利酵母 (*D.hansenii*) 和日本德巴利酵母 (*D.japonicus*));接合酵母属 (*Zygosaccharomyces*) (例如,鲁氏接合酵母 (*Z.rouxii*) 和拜耳接合酵母 (*Z.bailii*));克鲁维酵母属 (*Kluyveromyces*) (例如,马克斯克鲁维酵母 (*K.marxianus*));汉逊酵母属 (*Hansenula*) (例如,异常汉逊酵母 (*H.anomala*) 和杰丁汉逊酵母 (*H.jadinii*));以及酒香酵母属 (*Brettanomyces*) (例如,郎比可酒香酵母 (*B.lambicus*) 和异酒香酵母 (*B.anomalous*))。有用细菌的实例包括,但不限于,埃希氏菌、肠杆菌、固氮菌、欧文氏菌、克雷伯氏菌、芽孢杆菌、假单胞菌、变形杆菌和沙门氏菌。可以将真核细胞,例如,CHO细胞用于生产。

[0215] 一旦在宿主细胞内得到表达,可以将细胞壁降解多肽用来阻止靶细胞生长或杀伤靶细胞。在一些实施方案中,将P225多肽 (SEQ ID NO:9) 用来减少革兰氏阴性细菌的生长。在一些实施方案中,将所述蛋白用来减少假单胞菌的生长,例如,绿脓杆菌、杆菌。可以产生结合此类片段的融合构建体,包括包含多种壁降解活性的融合蛋白,包括肽酶和酰胺酶两种催化活性(其可以切开甘氨酸-甘氨酸和甘氨酸-丙氨酸两种连接)。

[0216] 通常,将编码细胞壁降解多肽的多核苷酸置于可在期望的宿主细胞内发挥功能的启动子的控制下。相当多种的启动子是广为人知的,且可以被用于本发明的表达载体中,这取决于具体的应用。一般地,选出的启动子取决于该启动子将在其中显示活性的细胞。可以包含入诸如核糖体结合位点、转录终止位点等的其他的表达控制序列。包含这些控制序列的一条或多条的构建体被称为“表达盒”。因此,本发明提供了表达盒,其中整合有用于在期望的宿主细胞内表达的编码融合蛋白的核酸,例如,该融合蛋白为结合有外膜结合片段的细胞壁降解片段。

[0217] 通过克隆在那一细胞中得到表达的基因,可以获得适合用于特定宿主细胞的表达控制序列。常用的原核控制序列,本文中被定义为包括用于转录起始的启动子,任选地具有操纵子,连同核糖体结合位点序列的,包括常用的启动子如 β -内酰胺酶(青霉素酶)和乳糖(lac)启动子系统、色氨酸(trp)启动子系统 (Goeddel et al., Nucleic Acids Res. (1980) 8:4057)、tac启动子 (DeBoer, et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. (1983) 80:21 25); 以及源自 λ 的P_L启动子和N-基因核糖体结合位点 (Shimatake et al. (1981) Nature 292: 128)。细菌噬菌体T7启动子被用于不同的实例中,尽管技术人员理解,具体的启动子系统对本发明来说不是至关重要的。

[0218] 对于在原核细胞而非大肠杆菌中表达细胞壁降解多肽,使用了可在特定原核生产物种内发挥功能的启动子。可以从由该物种克隆来的基因获得此类启动子,或者可以使用异源性启动子。例如,除大肠杆菌外,杂合trp-lac启动子还在芽孢杆菌内发挥功能。

[0219] 高表达的蛋白质可以引起内含体形成。启动子越强,每细胞的蛋白质产量越高,并且在一些情况下,相比强启动子,中等强度的启动子导致更高的可溶性蛋白质产量。一些实例包括T7启动子、阿拉伯糖启动子、T5启动子和杂合启动子等。此外,已经发现由于细菌细胞内的渗漏表达,一些毒性蛋白难以表达。通过使用像阿拉伯糖启动子一样的受到强有力调控的启动子,可以阻止此类渗漏表达。参见,例如,Correa and Oppezzo (2011) Biotechnol.J. 6:715-730 和 Alakomi (2007) “Weakening of the Gram-negative bacterial membrane: A tool for increasing microbiological safety” thesis, Univ

Helsinki, June 2007。

[0220] 可方便地将核糖体结合位点(RBS)包含在本发明的表达盒中。大肠杆菌内的一种示例性RBS由3-9个核苷酸长度的核苷酸序列组成,其位于起始密码子上游3-11个核苷酸处(Shine and Dalgarno (1975) Nature 254:34;Steitz (1979) In Biological regulation and development:Gene expression (ed.R.F.Goldberger), vol.1, p.349, Plenum Publishing, NY)。

[0221] 对于酵母内蛋白质的表达,方便的启动子包括GAL1-10 (Johnson and Davies (1984) Mol. Cell. Biol. 4:1440-1448)、ADH2 (Russell et al. (1983) J. Biol. Chem. 258:2674-2682)、PHO5 (EMBO J. (1982) 6:675-680) 和MF (Herskowitz and Oshima (1982) in The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces (eds. Strathern, Jones, and Broach) Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, N.Y., pp.181-209)。另一合适的在酵母中使用的启动子为ADH2/GAPDH杂合启动子,如Cousens et al. (1987) Gene 61:265-275中所描述。对于丝状真菌,例如,曲霉属真菌的菌株(McKnight et al., 第4935349号美国专利),有用启动子的实例包括来源于构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)糖分解基因的启动子,如ADH3启动子(McKnight et al., EMBO J. 4:2093-2099 (1985)) 和tpiA启动子。合适终止子的一个实例为ADH3终止子(McKnight et al.)。

[0222] 可以将组成性或受调控的启动子用于本发明。受调控的启动子可能是有利的,因为在诱导融合蛋白表达前宿主细胞可生长至高密度。异源性多肽的高水平表达在一些情形下可减缓细胞生长。可诱导的启动子为可指导基因表达的启动子,其中表达水平可被诸如,例如,温度、pH、无氧或有氧条件、光、转录因子和化学品的环境或发展性因素改变。此类启动子在本文中被称为“可诱导的”启动子,其允许控制期望的多肽表达的时间进程。对于大肠杆菌和其他的细菌宿主细胞,可诱导的启动子为本领域技术人员已知。这些启动子包括,例如,lac启动子、细菌噬菌体 λ -P_L启动子、杂合trp-lac启动子(Amann et al. (1983) Gene 25:167; de Boer et al. (1983) Proc. Nat' l. Acad. Sci. USA 80:21),以及细菌噬菌体T7启动子(Studier et al. (1986) J. Mol. Biol.; Tabor et al. (1985) Proc. Nat' l. Acad. Sci. USA 82:1074-8)。在Sambrook et al. (同上)中讨论了这些启动子和它们的使用。

[0223] 多核苷酸构建体的构建通常需要使用能在细菌内复制的载体。多种用于从细菌中提纯质粒的试剂盒为可商购的(参见,例如,EasyPrep J、FlexiPrep J,两种都来自Pharmacia Biotech;StrataClean J来自Stratagene;和QIAexpress Expression System, Qiagen)。随后可以进一步操作分离和纯化的质粒来制备其他质粒,并将其用来转染细胞。在链霉菌或芽孢杆菌中克隆也是可能的。

[0224] 通常将可选标记整合至用来表达本发明多核苷酸的表达载体内。这些基因可以编码基因产品,如对在培养基中生长的转化的宿主细胞的生存或生长是必需的多肽。多种可选标记为本领域技术人员已知,且被描述在例如Sambrook et al. (同上)中。

[0225] 采用标准连接技术构建含有一种或多种以上列出的组分的合适载体,如以上引用的参考文献中所描述。将分离的质粒或DNA片段切割、裁剪并以期望的形式重新连接,以产生所需的质粒。为了确认所构建质粒中的正确序列,可以通过标准的技术分析质粒,如根据已知的方法通过限制性内切酶消化和/或测序。获得这些末端的分子克隆技术为本领域已

知。很多种适合构建重组核酸的克隆和体外扩增方法为技术人员熟知。

[0226] 多种适合作构建本发明表达载体的起始材料的常见载体为本领域熟知。对于细菌内的克隆,常见的载体包括源自pBR322的载体,如pBLUESCRIPT和源自 λ -噬菌体的载体。在酵母内,载体包括酵母整合性质粒(例如,YIp5)和酵母复制性质粒(YRp系列质粒)以及pGPD-2。使用多种一般可获得的质粒,包括pSV2、pBC12BI和p91023以及裂解病毒载体(例如,牛痘病毒、腺病毒和杆状病毒)、附加型病毒载体(例如,牛乳头瘤病毒)和逆转录病毒载体(例如,鼠逆转录病毒),可以实现在哺乳动物细胞内的表达。

[0227] 使用本领域技术人员已知的标准方法可以将表达载体引入到选中的宿主细胞内。例如,通过氯化钙转化,可以将表达载体引入到原核细胞内,包括大肠杆菌,且通过磷酸钙处理或电穿孔可以将其引入到真核细胞内。

[0228] 可以将翻译偶联作用用来提高表达。该策略使用源自产生于翻译系统的高表达基因的上游短开放阅读框,其被置于启动子的下游,且在核糖体结合位点几个氨基酸密码子后为终止密码子。刚好在终止密码子前,为第二核糖体结合位点,且终止密码子后为启动翻译的起始密码子。该系统可解开RNA的二级结构,允许翻译的有效启动。见Squires, et al. (1988), J. Biol. Chem. 263:16297-16302。

[0229] 可以在细胞内表达本发明的各种多肽,或可以将其从细胞分泌出来。细胞内表达常常导致高产量。如有必要,通过执行再次折叠程序可以增加可溶的、有活性的融合多肽的量(参见,例如,Sambrook et al. (同上);Marston et al. (1984) Bio/Technology 2:800; Schoner et al. (1985) Bio/Technology 3:151)。在分泌多肽无论是分泌到细胞周质中或是分泌到胞外介质中的实施方案中,DNA序列常常被连接到可被切割的信号肽序列上。该信号序列指导融合多肽转运穿越细胞膜。含有启动子信号序列单元并用于大肠杆菌的合适载体的实例为pTA1529,其具有大肠杆菌phoA启动子和信号序列(参见,例如,Sambrook et al. (同上);Oka et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:7212;Talmadge et al. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:3988;Takahara et al. (1985) J. Biol. Chem. 260:2670)。在另一个实施方案中,融合多肽被融合到蛋白A或牛血清白蛋白(BSA)的亚序列上,例如,来促进纯化、分泌或稳定性。亲和力方法,例如,使用用于催化片段的基质的方法,可能是合适的。

[0230] 还可以将本发明的细胞壁降解多肽进一步连接到其他多肽片段上,例如,生物膜解聚酶片段。该方法常常引起高产量,因为正常的原核控制序列可指导转录和翻译。在大肠杆菌中,lacZ融合物常常被用来表达异源性蛋白。合适的载体可以容易地获得,如pUR、pEX和pMR100系列。对于某些应用,在纯化后将外来序列从融合多肽切割可能是可取的。通过本领域已知的几种方法中任何一种都可以实现该切割,包括通过溴化氰、蛋白酶或通过Factor Xa切割(参见,例如,Sambrook et al. (同上);Itakura et al. (1977) Science 198:1056;Goeddel et al. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:106;Nagai et al. (1984) Nature 309:810;Sung et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:561)。可以在期望的切割位点处将切割位点构建到融合多肽的基因内。

[0231] 通过在单个表达载体内放置多个转录盒,或通过利用在克隆策略中采用的每个表达载体的不同可选标记,可以将多于一种重组多肽表达在单个宿主细胞内。

[0232] Miller et al (1989) Biotechnology 7:698-704已经描述过用于从大肠杆菌获得重组蛋白的合适系统,其可维持它们的N端完整性。在该系统中,目标基因被制备为融合到

含有肽酶切割位点的酵母泛素基因的开始76个残基上的C末端融合物。在两个部分的连接处的切割导致具有完整的真正N末端残基的蛋白质产生。

[0233] XIV.期望的多肽的纯化

[0234] 可以将含有本文中描述的表达的胞内或分泌多肽的粗细胞提取物用于本发明的方法。

[0235] 还可以根据本领域的标准程序,包括硫酸铵沉淀、亲和柱、柱层析、凝胶电泳等纯化多肽(参见,一般地,R.Scopes (1982) Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y., Deutscher (1990) Methods in Enzymology Vol.182:Guide to Protein Purification., Academic Press, Inc. N.Y.)。因为降解片段,至少,源自针对稳定性选出的噬菌体蛋白质,纯化可以包括污染材料的变性。大体上纯的组合物通常为约70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、98%至99%或更高的均质性。还可以将纯化的多肽,例如,用作抗体生产的免疫原,可以将其中的抗体用于免疫选择纯化方法。

[0236] 为了促进本发明的多肽的纯化,编码它们的核酸还可以包含表位或“标签”的编码序列,对于该表位或“标签”可使用亲和结合试剂例如纯化标签。合适表位的实例包括myc和V-5报告基因;可用于具有这些表位的融合多肽重组体的表达载体可商购获得(例如, Invitrogen (Carlsbad CA) 载体pcDNA3.1/Myc-His和pcDNA3.1/V5-His适用于在哺乳动物细胞内表达)。适用于将标签连接到本发明多肽上的其他表达载体以及相应的检测系统为本领域技术人员已知,且它们中几种可商购获得(例如,FLAG、Kodak、Rochester NY)。合适标签的另一实例为聚组氨酸序列,其能结合到金属螯合物亲和配体上。通常,使用6个相邻的组氨酸(SEQ ID NO:24),尽管可以使用比6个更多或更少的组氨酸。可以用作聚组氨酸标签的结合部分的合适金属螯合物亲和配体包括次氨基-三-乙酸(NTA) (Hochuli (1990) Genetic Engineering:Principles and Methods, J.K.Setlow, Ed., Plenum Press, NY;可从Qiagen (Santa Clarita, CA) 购买)。纯化标签还包括麦芽糖结合结构域和淀粉结合结构域。麦芽糖结合结构域蛋白质的纯化方法为本领域技术人员已知。

[0237] 适合作为标签的其他半抗原为本领域技术人员已知且被描述于,例如, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (6th Ed., Molecular Probes, Inc., Eugene OR)。例如,二硝基苯酚(DNP)、地高辛、巴比妥(参见,例如,第5414085号美国专利),几种荧光团可用作半抗原,它们为这些化合物的衍生物。试剂盒可商购获得以用于将半抗原和其他部分连接到蛋白质和其他分子上。例如,如果半抗原包含硫醇,则可以将诸如SMCC的异源双官能团连接臂用来将标签连接到俘获反应物上存在的赖氨酸残基上。

[0238] 技术人员应理解,可以对多肽的催化结构域或功能域进行某些修饰而不降低它们的生物活性。可以进行一些修饰来促进克隆、表达或将催化结构域整合到融合多肽中。此类修饰为本领域技术人员已知且包括,例如,在编码催化结构域的多核苷酸任一端添加密码子,例如,在氨基端添加甲硫氨酸来提供起始位点或者将另外的氨基酸(例如,聚His)放置在任一端,以方便地制备定点的限制酶位点或终止密码子或纯化序列。

[0239] 本发明的以下讨论是为了说明和描述,且不试图将本发明限制到本文中公开的形式。尽管本发明的描述已经包括了一个或多个实施方案以及某些变化和修改的描述,但是其他变化和修改仍位于本发明范围中,例如,在理解本公开后,可能位于本领域的技术和知识范围内的变化和修改。为所有目的,本文中引用的所有出版物、专利、专利申请、Genbank

号和网站以引用的方式全部并入本文。

实施例

[0240] 实施例1.GP36酶测试构建体

[0241] A.胞壁质水解结构域构建体

[0242] 我们从假单胞菌噬菌体P134 (SEQ ID NO:1) 分离了ORF36序列。翻译产物如SEQ ID NO:2所示。基于序列分析,鉴定出胞壁质降解催化结构域片段跨越SEQ ID NO:2的737-875位氨基酸。用启动子和毗邻的连接到683位氨基酸上的起始密码子构建了表达载体,以便核酸构建体编码683-898位氨基酸。参见SEQ ID NO:5,其被翻译为SEQ ID NO:6。该片段被指定为GP36CD片段。

[0243] 添加序列(从而从GP36末端去除终止密码子)来提供包含有6个His (SEQ ID NO:24) 纯化标签(用于在镍柱上纯化)的13个氨基酸的延伸。该构建体使得多肽具有SEQ ID NO:7。

[0244] 将表达构建体引入到大肠杆菌中,诱导蛋白生产并收获细胞。处理细胞团来分离蛋白,并采用标准技术使用过Ni-NTA树脂的亲和层析纯化。通过SDS-PAGE分析发现得到的蛋白为大于95%的纯度。

[0245] B.细菌杀伤试验

[0246] 如上面所指出,革兰氏阴性细菌的细菌外膜可阻止从细胞的外部环境接近肽聚糖,但外膜对危害膜完整性的药剂敏感。用氯仿(其危害外膜)处理绿脓杆菌细胞,随后用纯化的GP36CD片段处理。GP36CD片段引起OD快速、浓度依赖性的减少(细菌溶解)。使用时间进程的杀伤和GP36CD的滴定量,进行了另外的测试和对照来确认活性。细菌溶解取决于氯仿处理,且证实一旦其到达肽聚糖层胞壁质水解结构域即可杀伤革兰氏阴性靶标。

[0247] C.细菌靶标

[0248] 如上面所指出,大多数革兰氏阴性细菌的肽聚糖层相对较薄。在革兰氏阴性靶细菌的具有不同临床相关性的物种肽聚糖上测试了GP36CD构建体。在鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯杆菌、大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、鸡沙门氏菌 (Salmonella gallinarum)、肠炎沙门氏菌和都柏林沙门氏菌 (Salmonella dublin) 上进行了类似的试验。GP36CD类似地引起所有测试物种中经氯仿处理过的细菌快速、浓度依赖性的溶解。

[0249] 实施例2.膜转移结构域

[0250] A.包含胞壁质水解结构域和膜转移结构域的嵌合体

[0251] 为了接近正常革兰氏阴性细菌靶标的肽聚糖层,考虑了渗透细菌外膜屏障的生理学上可兼容的方式。具体来说,渗透活性必须对细菌外膜具有特异性,而不会对真核细胞具有明显的负效应。

[0252] 将GP36CD酶片段连接到来源于人细菌渗透增强(BPI)蛋白的膜转移结构域上。人BPI核酸序列为NM_001725.2(见SEQ ID NO:3),其编码蛋白质序列BAG37729(见SEQ ID NO:4)。将该构建体设计为包含聚His(用于纯化)的22个氨基酸的N端延伸,随后为GP36的683-898位残基,其通过3个精氨酸残基被连接到BPI TMD片段(SEQ ID NO:4)的16-39位氨基酸上,随后为另外的3个C末端精氨酸残基。TMD为具有膜渗透活性的片段的名称,例如,跨膜结构域。所述多核苷酸构建体被指定为SEQ ID NO:8,其编码被指定为P225(SEQ ID NO:9)的

多肽。

[0253] 如上所述,将所述表达构建体引入到大肠杆菌内,诱导蛋白质生产并收获细胞。处理细胞团来分离蛋白质,其大多数都位于内含体内。溶解蛋白质,并使用Ni-NTA柱层析纯化该产物。通过SDS-PAGE分析发现得到的蛋白为大于95%的纯度。

[0254] B. 细菌杀伤试验

[0255] 将绿脓杆菌细胞暴露于纯化的P225,在其他渗透性药剂(例如,氯仿)存在时,其引起快速、浓度依赖性的OD减少(即,细菌溶解)。进行了其他测试和对照来确认活性、1小时的时间点时蛋白的滴定量。使用不同的CFU减少试验观察了细菌杀伤。活革兰氏阴性细菌的杀伤证明,BPI TMD可以成功地提供可接近细菌外膜里面的肽聚糖层的GP36酶结构域。

[0256] C. 其他细菌靶标

[0257] 测试了P225构建体的对革兰氏阴性靶细菌的不同的具有临床相关性的物种的肽聚糖的活性。在绿脓杆菌、大肠杆菌、克雷伯氏菌(其对许多抗生素具有高度抗性)和鲍曼不动杆菌的其他菌株上进行了类似的实验,所有这些菌株都被有效杀伤。

[0258] 实施例3:P266构建体和生物活性

[0259] SEQ ID NO:10表示P225的变体,被指定为P266(由SEQ ID NO:11编码)。可以去除N末端Met以便所述多肽用Gly开始。相对于P225,P266具有较短的、6个近N端的His(SEQ ID NO:24)标签,且缺少紧随组氨酸的片段。这提供了具有以下片段的构建体:6xHis标签-GP36CD-RRR-BPI TMD-RRR。GP36CD跨越从约Gly(9)至Glu(224),第一个RRR对应于R(225)至R(227),BPI TMD对应于Ala(228)至R(251),且最终的RRR对应于残基252-254。设计的分子量为约27.6kDa,pI为约9.48。这包含可被去除的N末端Met。

[0260] 如同P225构建体,用IPTG诱导后通过在大肠杆菌BL21(DE3)细胞内表达,P266为不溶的。将诱导的细胞团重悬在裂解缓冲液(50mM Tris碱,0.1M NaCl,0.1%TritonX100)中,并使用13mm探头进行声波处理10分钟。将经声波处理过的细胞团在16,000rpm下离心10分钟并收集内含体团。通过在缓冲液A(6M GuHCl,100mM NaH₂PO₄,10mM TrisCl,pH8.0)中重悬所述团块并在室温下保持振动30min而溶解内含体团。IB:缓冲液体积的比为1克湿重的IB与40ml的缓冲液A。将溶解的蛋白在16,000rpm下离心10分钟并收集上层清液。用缓冲液B(8M尿素,100mM NaH₂PO₄,10mM TrisCl,pH8.0)平衡Ni-NTA基质,其中平衡使用了5个柱子的体积。将溶解的上层清液载入到平衡的Ni-NTA柱上,并允许其以重力模式通过,并收集流过液。用10个柱子体积的缓冲液B洗脱柱子来去除杂质和未结合的蛋白质。随后用10-15个柱子体积的缓冲液C(8M尿素,100mM NaH₂PO₄,10mM TrisCl,pH6.5)洗脱柱子。在缓冲液E(8M尿素,100mM NaH₂PO₄,10mM TrisCl,pH4.5)中进行蛋白洗脱。收集了洗脱部分并通过SDS PAGE分析。合并SDS PAGE凝胶上看到的高含量的含有目标蛋白的部分,并以阶段式方式透析。

[0261] 对~100倍于合并洗出液体积的缓冲液体积进行透析(例如,10ml洗出液对1升缓冲液透析),以三步式方式,首先对溶于20mM磷酸钠缓冲液的4M尿素,pH6.0,在4℃下进行5小时;第二对溶于20mM磷酸钠缓冲液的2M尿素,pH6.0,在4℃下进行5小时;和第三在4℃下对含有5%蔗糖、5%山梨醇和0.2%Tween80的20mM磷酸钠缓冲液,pH6.0,进行5小时。蔗糖、山梨醇和Tween80组分有助于稳定蛋白质,防止其聚合和沉淀。将透析后取出的洗出液离心来分离任何沉淀。收集上层清液,并评估蛋白含量用于活性分析。通过SDS PAGE,用考马斯蓝染色和银染发现最终产品为约85%-95%的均质性。

[0262] 使用CFU下降试验分析了纯化蛋白的细菌杀伤作用,且通常同时在使用蛋白产物的16小时处理结束时监测其残留物OD600。将对数期PA01绿脓杆菌靶细胞按吸光度为1.0重悬于合适的缓冲液中,其相当于约 $1E7$ 个细胞。以 $50\mu\text{g}$ 溶于醋酸盐或甘氨酸缓冲液中的浓度测试所述蛋白。在含有20mM醋酸钠(pH6.0)或50mM甘氨酸-NaOH(pH7.0)的20mM磷酸钠缓冲液(pH6.0)、5%蔗糖、5%山梨醇和0.2%Tween80中,于 37°C 以200rpm搅动进行2小时的试验分析。

[0263] 用所述蛋白处理后,醋酸钠缓冲液中的CFU下降试验提供了约5个对数的下降,且在甘氨酸缓冲液中提供了至少7个对数的下降。从残留物OD600中,醋酸盐缓冲液提供了相比对照约80%的减少,而甘氨酸缓冲液提供了相比对照约95%的残留物减少。

[0264] 对在孵育中不含有蔗糖、山梨醇和tween80稳定剂的甘氨酸缓冲液(pH7.0)中的CFU下降试验进行评估。没有稳定剂的CFU下降与在试验中含有稳定剂的相同,至少为7个对数的下降。在许多情况下,其他稳定剂或添加剂可能是有用的或重要的。这些可以包括诸如多元醇的材料,例如,山梨醇和相关的化合物;甘油,例如,0-10%范围内的甘油;诸如蔗糖的糖类,例如,0-5%范围内的蔗糖;洗涤剂或表面活性剂,如TritonX100、Brij35、NP-40、Tween20、辛基 β -葡萄糖苷、十二烷基肌氨酸钠、Tween80等,优选tween80,例如,0.1%至0.5%范围内的tween80;以及金属螯合剂,如EGTA、EDTA,优选EDTA,例如, $50\mu\text{M}$ - $100\mu\text{M}$ 范围内的EDTA。

[0265] 通过滴定PA01靶菌株上蛋白的浓度测量了P266的生物活性。CFU下降和残留物OD600都随2小时孵育取得进展,因为蛋白从5、10、25和 $50\mu\text{g}$ 的蛋白中得到增强。在测试的条件下,不管是通过CFU下降还是残留物OD600,使用 $50\mu\text{g}$ P266在 37°C 下进行以及2小时孵育,处理都能杀伤试验中在 $1E6$ 和 $1E7$ 个细胞时的几乎所有细胞,但在试验中在 $1E8$ 或更多细胞时显示减少许多的杀伤力。孵育时间超过1-4小时范围看起来对PA01杀伤试验不具有明显的影响。

[0266] 通过测定P266在不同温度下的稳定性,所述蛋白似乎可在暴露到 37°C 、 42°C 和 65°C 1小时后维持杀伤活性。该产物似乎具有相当的热稳定性,可在达至 65°C 的温度下稳定1小时。

[0267] 通过测试靶杀伤功效,通过对绿脓杆菌、NDM1质粒运载性肺炎克雷伯杆菌、NDM1质粒运载性大肠杆菌、肺炎克雷伯杆菌、鲍曼不动杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、婴儿沙门氏菌和大肠杆菌分离株的CFU下降试验以及OD600下降试验,P266都具有大量的杀伤活力。使用相同的条件和浓度,P266对志贺氏菌、奇异变形杆菌和泰国伯克氏菌分离株具有较少的杀伤活性。类似地,P266对革兰氏阳性细菌菌株的杀伤活性低于对绿脓杆菌的杀伤活性,但可能可以使用较长的孵育或较高浓度进行增加。然而,结果表明,P266具有广范围的靶细菌,即,比任何已知的噬菌体的靶范围广。

[0268] 用人红细胞孵育P266的效应在最高测试量25和 $50\mu\text{g}$ 下最小。孵育1小时,红细胞保持完整性,例如,含有血红蛋白,但细胞可以被沉淀成团。因此,P266不破坏真核细胞膜,表明与该蛋白质产品的体内使用兼容。

[0269] 实施例4:可溶的P266变体;P275

[0270] P266当在大肠杆菌内表达时为不可溶的,这使得生产存在困难。该不可溶性需要蛋白质纯化和变性来使其溶解,且再折叠可以引起活性蛋白质的显著的丢失。此外,蛋白质

氧化作用可以进一步减少活性。

[0271] P266的变体被设计用来减少BPI片段(23个氨基酸的MTD)的疏水性。目的是为了精细地破坏蛋白质的折叠结构来将更多的疏水性内部部分暴露到水溶液中,例如,去除一些在折叠蛋白表面的疏水性补丁上形成的水分子壳。具体来说,核酸构建体被设计用来从P266产生变体蛋白,被指定为P275,其中将V232转化为E;将V234转化为D;并将I236转化为K。见SEQ ID NO:12和13。

[0272] 图1显示了P266和P275的DAS谱图的比较。图2显示了P266和P275的TMHMM图的比较。BPI结构域和其变体的相对GRAVY分数显示如下。

[0273] BPI TMD GRAVY分数

[0274] 野生型序列(SEQ ID NO:):

[0275] ASLMVLVAIGTAVTA AVNPGVVVR (25):1.658

[0276] 变体(SEQ ID NO:):

[0277] ASLMELDAKGTAVTA AVNPGVVVR (26):0.667

[0278] ASLMKLKARGTAKTAAKNPGKKRR (27):-1.104

[0279] ASLMKLKARGTAKTAAKNPGKVRR (28):-0.767

[0280] ASRMVLVARGTAKTAAVNPGVVRR (29):0.237--

[0281] P275展现出多种令人吃惊的和意想不到的特性。该表达构建体在大肠杆菌BL21(DE3)中得到表达,通过在37℃用1mM IPTG诱导,其为P266表达。然而,P275不形成内含体,且大多数蛋白产物被限于可溶片段。此外,且出乎意料地,该可溶蛋白质不穿越细菌细胞膜来接近肽聚糖层(位于细胞周质间隙中)和杀伤革兰氏阴性大肠杆菌生产细胞宿主。结果表明可以操作MTDs,使得其在细胞内被表达时为可溶的但不能穿越细菌细胞膜。然而,经过操作的MTD,保留允许构建体穿越革兰氏阴性菌外膜的功能。因此,经过操作的MTD-胞壁质水解结构域嵌合体可以接近革兰氏阴性细菌的敏感肽聚糖层。

[0282] 可溶的P275产物的纯化和回收操作要容易得多,并提供了高得多的活性蛋白产量。pH8.0下在Ni-NTA柱上纯化了可溶的P275蛋白;pH4.5下用咪唑洗脱,透析以去除咪唑,并重新制成试验缓冲液。将P275诱导的细胞团重悬于裂解缓冲液(50mM Tris碱,0.1M NaCl,0.1%TritonX100)中并进行声波处理。16,000rpm下将经声波处理过的细胞团离心10分钟,并收集上清液,并将pH调节至8.0。用5个柱子体积的(50mM Tris.Cl,pH8.0)平衡Ni-NTA基质。将被溶解的蛋白载入到平衡的Ni-NTA柱上并允许其通过。收集流过液并将其再一次过柱。用10-15个柱子体积的20mM磷酸钠缓冲液,pH6.5洗脱柱子,接着用5个柱子体积的20mM磷酸钠缓冲液,pH4.5洗脱。用溶于20mM磷酸钠缓冲液的1M咪唑,pH4.5进行蛋白洗脱。收集洗脱部分并通过SDS PAGE分析。将在SDS PAGE凝胶上所见到的高含量的含有目标蛋白的部分合并和透析。对~100倍于合并的洗出液体积的缓冲液体积进行透析,其中对20mM磷酸钠缓冲液进行了3次更换,pH6.0,每次进行5小时,在4℃下进行。将透析后取出的洗出液离心来分离任何沉淀,并收集上清液,且加入了添加剂蔗糖、山梨醇和Tween80,以分别形成5%、5%和0.2%的最终浓度。评估了蛋白含量,用于活性分析。

[0283] P275产物为可溶的且易于纯化,其允许更具成本效益的下游操作,避免需要变性剂,且可在产生生物活性产物的简单过程中获得约85%的纯度。此外,且令人吃惊的是,在标准的50μg蛋白的量下于37℃孵育2小时的CFU下降试验中,P275具有可比较的或更好的活

性。

[0284] 实施例5:氧化作用对嵌合蛋白质(例如,P275)的影响

[0285] 测试了P275来看蛋白氧化作用是否可以影响生物活性。最倾向于被氧化的两种氨基酸为Cys和Met。P275没有Cys残基,但Met可能遭受氧化作用。在甲硫氨酸或硫代硫酸钠存在下的试验可以将蛋白氧化作用减到最小。当在0.05%甲硫氨酸或0.1%硫代硫酸钠存在下对P275蛋白质进行CFU下降试验时,CFU下降大幅大于不存在两种药剂中任一种时的情形。因此,可以加入如本文中所描述的具有可减少氧化作用的药剂的嵌合蛋白制剂,所述药剂为例如,甲硫氨酸、硫代硫酸钠或抗坏血酸,它们的加入范围分别为0.001-0.2%、0.001-0.3%和1-100mM,例如,0.05%、0.1%和5mM的这些药剂,例如,在其中氧化作用可能发生的存储或试验条件中保持生物活性。

[0286] 为了将氧化作用减到最小(其可能在所述蛋白中发生),可以例如,通过定点诱变来去除/替换met残基。这为相对简单和直接的,如描述的丙氨酸扫描诱变。参见,例如,Kristensen,et al. (1997) J.Biol.Chem.272:12978-12983。用另一种较少敏感性的氨基酸,例如,苏氨酸,替换一个或多个Met,可将作用于所述蛋白构建体的氧化作用减到最小。在开始定点诱变前,可以先测试构建体对由于氧化作用引起的活性丢失的敏感性。

[0287] 以下参考文献提供了处理与氧化作用相关的稳定性问题的其他指导:Yokota,et al. (2000) J.Pharmaceutical and Biomedical Analysis24:317-324;Grune,et al. (1997) FASEB J.11:526-534;Lam,et al. (2003) J.Pharmaceutical Sci.86:1250-1255;Kenley and Warne (1994) Pharmaceutical Research11:72-76。

[0288] 实施例6:用替代性MTDs替换BPI

[0289] 表B列出了可以与表A中列出的催化性胞壁质水解片段结合的MTD片段。在P225、P266和P275中,催化结构域为N端邻近MTD。可以翻转两个结构域的相对位置,使MTD N端邻近催化结构域。如果包含有的话,带正电荷的片段,例如RRR、KKK、NNN、QQQ或这些带正电荷的氨基酸的混合物,通常毗邻MTD,例如,来将MTD吸引到带负电荷的外膜上。

[0290] 合适的结构域的序列可从GenBank和文献中获得,且可以制备合适的构建体来产生嵌合表达载体。可以用结构域的不同组合(例如,挑选的表A和表B中结构域的亚集)产生嵌合表达构建体。一旦构建出了组合,就可以将表达载体引入到合适的表达宿主中。通过表达,可以使用CFU下降试验或OD600下降试验来测试产物对靶细菌的生物活性。可以修改或优化具有活性的产物的活性参数、蛋白质稳定性、靶特异性、关键残基或结构域的边界以及如显示的其他特征。

[0291] 例如,作为BPI的替代物,可以将来自假单胞菌噬菌体P134穿孔素的膜转移结构域(MTD)用于以选出的催化结构域,例如GP36片段发挥功能的MTD。描述的为除上述BPI外的另外5条替代性MTD片段的构建体。

[0292] 5种经替换的MTD构建体如下所述:

[0293] A.10xHis-GP36CD-RRR-P134穿孔素MTD-RRR

[0294] B.10xHis-GP36CD-RRR-LPS BP肽-RRR

[0295] C.GP36CD-T4噬菌体gp5 β -螺旋-LE-6xHis

[0296] D.GP36CD-S型绿脓杆菌素OM结合结构域-LE-6xHis

[0297] E.GP36CD-P22尾刺-LE-6xHis

[0298] A.P134穿孔素TMD:(SEQ ID NO:14和15)

[0299] 噬菌体P134穿孔素跨膜结构域来源于噬菌体P134的穿孔素基因。基于跨膜螺旋预测程序DAS和TMHMM鉴定了来自P134穿孔素的MTD。将23个aa的TMD克隆到具有连接臂和末端精氨酸的GP36CD的C末端上。将GP36CD-RRR-P134TMD-RRR克隆为N末端10xHis (SEQ ID NO:30) 标签。804个核苷酸的构建体,带有10xHis (SEQ ID NO:30) 标签和来源于载体的其他载体序列的GP36CD-RRR-P134穿孔素TMD-RRR,被描述于SEQ ID NO:14中。

[0300] NT1-66编码载体-10xHis;残基1-22(原核生物中Met被去除)

[0301] NT67-714编码GP36胞壁质水解结构域;残基23-238

[0302] NT715-723编码RRR连接臂;残基239-241

[0303] NT724-792编码P134穿孔素MTD;残基242-264

[0304] NT793-801编码C末端RRR;残基265-267

[0305] NT802-804编码终止密码子--

[0306] 用于修饰目的的P134MTD内高度疏水的残基被显示为可替换以下“变体”中野生型氨基酸的带有下列划线的残基。可以被替换以增加稳定性的野生型残基包括:Ile243; Leu246、Ala248、Ala249、Val250、Val256、Ile261和Leu264(见SEQ ID NO:15)。根据SEQ ID NO:15将残基编号,其中SEQ ID NO:15包含生产中被去除的N末端Met。替换氨基酸通常为带有类似大小侧链的氨基酸。替换的实例包括但不限于:Ile替换为Arg、Asp、Asn或Lys;Leu替换为Pro、Arg或Lys;Val替换为Asp、Lys或Arg;以及Ala替换为Lys。

[0307] P134TMD GRAVY分数

[0308] 野生型序列(SEQ ID NO:):

[0309] EIASLCAAVLTALYVGAQLITLL (31):1.774

[0310] 变体(SEQ ID NO:):

[0311] EIASLCAARPTALYVGAQLITLL (32):1.161

[0312] ERASLCAARLTALYRGAQLRTLL (33):0.235

[0313] EKASLCKKRRTALYKGAQLDTLL (34):-0.526

[0314] EIASRCAAVLTALYVGAQLNTLK (35):0.730--

[0315] B.脂多糖结合蛋白肽(SEQ ID NO:16和17):

[0316] 鉴定了涉及结合至革兰氏阴性菌的LPS的30个氨基酸的延伸,并将其选作替代性MTD。见Horwitz,Williams,and Nowakowski(1995)Infection and Immunity63:522-527。来源于该报道;蛋白ID:CAA67226(106位至135位AA)。将该序列融合到GP36催化结构域(CD)上,来产生825个核苷酸的构建体,其编码分子GP36CD-RRR-LBP肽-RRR。用N末端组氨酸标签克隆该构建体。该构建体为825个核苷酸,预测为274个残基(包含原核宿主内应当被去除的N末端Met) Mw:30.38kDa, pI:9.72。

[0317] NT1-3为起始Met,在大多数原核宿主内被去除

[0318] NT4-66编码载体片段-10xHis;残基2-22

[0319] NT67-714编码GP36胞壁质水解结构域;残基23-238

[0320] NT715-723编码RRR连接臂;残基239-241

[0321] NT724-813编码LPS BP MTD;残基242-271

[0322] NT814-822编码RRR连接臂;残基272-274

[0323] NT823-825编码终止密码子

[0324] 源自LPS结合蛋白的MTD描述于SEQ ID NO:17中。被指出用于替换以产生更易溶的变体的残基包括:Val248;Val267;Val269;Phe258和Phe259。

[0325] C.T4噬菌体gp5 β -螺旋 (SEQ ID NO:18和19):

[0326] 来自噬菌体T4的蛋白gp5的C末端 β -螺旋结构域被报导为在感染期间负责渗透细菌细胞的外膜。参见Leiman,et al. (2010) Virology J.7:355。克隆了带有C末端6x组氨酸 (SEQ ID NO:24) 标签的GP36CD的C末端gp5 β -螺旋序列 (187个aa;来自NP_049757.1的389-575位残基)。该构建体为1245个核苷酸;预测具有414个残基,预测的pI/Mw:5.43/45353.99,其中N末端Met未被切割。

[0327] NT1-651编码起始MET和GP36胞壁质水解结构域;残基1-217

[0328] NT652-657编码KL (由限制酶位点Hind III产生);残基218-219

[0329] NT658-1218编码T4噬菌体gp5 β -螺旋;残基220-406

[0330] NT1219-1224编码LE (由限制酶位点XhoI产生);残基407-408

[0331] NT1225-1242编码6xHis (SEQ ID NO:24);残基409-414

[0332] NT1243-1245编码终止密码子

[0333] D.S型绿脓杆菌素外膜转运 (OMT) 结构域 (SEQ ID NO:20和21):

[0334] 来自S型绿脓杆菌素的外膜转运结构域转运穿越绿脓杆菌的外膜。参见Ling, Saeidi,Rasouliha,and Chang (2010) "A predicted S-type pyocin shows a bactericidal activity against clinical Pseudomonas aeruginosa isolates through membrane damage"FEBS Letters584:3354-3358。克隆了在C末端带有组氨酸标签的GP36CD的C末端OMT结构域 (181个残基;见蛋白登录号EHS39709,217-397位残基;绿脓杆菌MPA0/P1)。该1227个核苷酸的构建体编码408个氨基酸 (包含通常被原核宿主去除的N末端Met),其具有预测的pI/Mw:8.44/44543.37。

[0335] NT1-651编码起始MET和GP36胞壁质水解结构域;残基1-217

[0336] NT652-657编码KL (由Hind III位点产生);残基218-219

[0337] NT658-1200编码OM转运结构域;残基220-400

[0338] NT1201-1206编码LE (由限制酶位点XhoI产生);残基401-402

[0339] NT1207-1224编码6xHis (SEQ ID NO:24);残基403-408

[0340] NT1225-1227编码终止密码子

[0341] E.P22尾刺突蛋白 (SEQ ID NO:22和23):

[0342] 噬菌体P22的尾刺突蛋白具有鼠李糖苷内切酶活性,能修饰O-抗原,因此,包含沙门氏菌的脂多糖结构。参见,例如,Steinbacher,et al. (1997) "Phage P22tailspike protein:crystal structure of the head-binding domain at2.3A,fully refined structure of the endorhamnosidase at1.56A resolution,and the molecular basis of O-antigen recognition and cleavage"J Mol Biol.267:865-80和Waseh,et al. (2010) "Orally Administered P22Phage Tailspike Protein Reduces Salmonella Colonization in Chickens:Prospects of a Novel Therapy against Bacterial Infections"PLoS One5 (11):e13904。克隆了在C末端带有组氨酸标签的GP36CD的C末端沙门氏菌尾刺突蛋白 (见蛋白ID:NP_059644,2-667位氨基酸)。理论大小为893个氨基酸;pI/

Mw:5.76/96694.40。

[0343] NT1-651起始MET和GP36胞壁质水解结构域;残基1-217

[0344] NT652-657编码KL(由限制酶位点Hind III产生),残基218-219

[0345] NT658-2655编码P22尾刺突蛋白结构域,残基220-885

[0346] NT2659-2664编码LE(由限制酶位点XhoI产生),残基886-887

[0347] NT2665-2682编码6xHis (SEQ ID NO:24);残基888-893

[0348] NT2683-2685编码终止密码子

[0349] 实施例7嵌合蛋白的表达、纯化和验证

[0350] 以下描述为如何制备和验证其他嵌合构建体的实例。如蛋白质表达和设计领域的技术人员所理解,可以修改缓冲液、培养基、时间和其他条件。

[0351] 可以使用以下策略来提高期望的构建体的表达:用于在大肠杆菌内表达的密码子优化(密码子偏爱)、改变GC含量、并入替代性融合标签(例如,谷胱甘肽S-转移酶(GST)、nusA转录延长因子、麦芽糖结合蛋白(MBP)、内含肽,还有许多其他的可能性)、改变诱导物浓度、温度、与伴侣一同表达以增加折叠,以及使用不同的表达宿主。

[0352] 例如,用各自的质粒转化生产宿主的感受态细胞,例如大肠杆菌,接种于LB+氨苄青霉素(100g/ml)或卡那霉素(20g/ml),并在37℃下孵育过夜。将来自平板的培养物刮入LB+抗生素中,通常为液体,并生长至OD₆₀₀~0.8至1.0。随后用1mM的IPTG诱导细胞,并在37℃下孵育4小时。通过在8000rpm下离心10分钟收获细胞并将细胞团储存在-80℃。

[0353] 如果构建体在体内积聚,则将诱导的细胞团重悬于裂解缓冲液(50mM Tris碱,0.1M NaCl,0.1%TritonX100)中,并使用13mm探头声波处理10分钟。16000rpm下离心经声波处理后的细胞团10分钟,并收集含有内含体(IB)的团块。通过将团块重悬于缓冲液A(6M GuHCl,100mM NaH₂PO₄,10mM TrisCl,pH8.0)中并在室温下保持振荡30分钟,溶解内含体团。IB:缓冲液体积的比通常为1克湿重的IB与40ml的缓冲液A。16000rpm下离心裂解产物10分钟,并收集上层清液。用缓冲液B(8M尿素,100mM NaH₂PO₄,10mM TrisCl,pH8.0)平衡Ni-NTA柱,其中使用了5个柱子体积用于平衡。将来自IB的上清液载入平衡的Ni-NTA柱上并允许其以重力模式通过,并收集流过液。用10个柱子体积的缓冲液B洗脱柱子,以去除杂质和未结合的蛋白质。随后用10-15个柱子体积的缓冲液C(8M尿素,100mM NaH₂PO₄,10mM TrisCl,pH6.5)洗脱柱子。在缓冲液E(8M尿素,100mM NaH₂PO₄,10mM TrisCl,pH4.5)中进行结合的蛋白洗脱。收集洗脱部分,并通过SDS PAGE分析。将在SDS PAGE凝胶上所看到的高含量的含有目标蛋白的洗脱部分合并,并以阶段式方式透析。合并部分经受了对~100倍于合并洗出液体积的缓冲液体积(例如,10ml洗出液对1升缓冲液透析)进行的透析。首先在4℃下对溶于20mM磷酸钠缓冲液的4M尿素,pH6.0,进行透析5小时;接着第二在4℃下对溶于20mM磷酸钠缓冲液的2M尿素,pH6.0,进行5小时;以及第三在4℃下对含有5%蔗糖、5%山梨醇和0.2%Tween80的20mM磷酸钠缓冲液,pH6.0,进行5小时。将透析后取出的洗出液离心,以分离任何沉淀物质。收集经清除处理后的上清液,并评估蛋白质含量用于活性分析。

[0354] 为了验证活性(细菌细胞杀伤活性),按如下进行了CFU下降试验。将细菌细胞生长在LB液体培养基中,至600nm处的吸光度达到0.8至1.0的范围。随后13000rpm下旋转1ml的培养物1分钟并丢弃上清液。将细胞团重悬于1ml的50mM甘氨酸-NaOH缓冲液(pH7.0)中,并调节细胞数目至约 1×10^8 /ml。将测试蛋白加入到100μl细胞中来获得约50μg的终浓度,并用

含有添加剂的20mM磷酸钠缓冲液(pH6.0)将体积制成200 μ l。37℃、200rpm搅动下用细胞孵育蛋白2小时,随后将样品进行对数稀释到LB液体培养基中,并接种到LB琼脂上以定量残留的CFU。37℃下培养平板过夜以使菌落生长。

[0355] 也可以将新陈代谢染料还原试验用来测定活细胞数目。该试验基于活细胞可还原碘硝基四唑(INT)——一种新陈代谢指示剂染料这一原理。简单地说,将100 μ l体积中 1×10^7 个靶细胞,例如,绿脓杆菌,与100 μ l中测试蛋白混合来获得约50 μ g的终浓度,并在微量滴定盘孔中用含有添加剂的20mM磷酸钠缓冲液(pH6.0)将体积制成200 μ l。还保持细胞控制。37℃、200rpm下孵育样品2小时并将INT染料(1X)加入到所有的样品中。黑暗、室温下孵育微板20分钟,并记录492nm处的吸光度。通过将30mg四唑紫罗兰(Loba Chemie,印度)溶解于10ml的50mM磷酸钠缓冲溶液(pH7.5)中,制备了10x INT储备溶液。

[0356] 实施例8:细菌细胞结合的检测

[0357] 在革兰氏阴性细菌中,外膜(OM)和肽聚糖由脂蛋白连接。OM包含孔蛋白,其允许通过小的亲水分子。参见,例如,Cabeen and Jacobs-Wagner (2005) “Bacterial Cell Shape” *Nature Revs Microbiology* 3:601-610; Nikaido (2003) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67:593-656。据报道细胞的最外层结构和组成在不同的细菌之间是不同的。在外部包膜的细胞上可能具有多糖荚膜(参见,例如, Sutherland (1999) *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 16:217-29和 Snyder, et al. (2006) *Carbohydr. Res.* 341:2388-97) 或者蛋白质S层(Antikainen, et al. (2002) *Mol. Microbiol.* 46:381-94; Schäffer and Messner (2005) *Microbiology*. 151:643-51; 和Avall-Jääskeläinen and Palva (2005) *FEMS Microbiol Rev.* 29:511-29), 其可在不利条件下保护细菌并影响它们的粘附。脂多糖(LPS)的基本结构——共价连接的脂质和杂多糖,为研究的所有LPS分子共有的,但根据细菌属、种和株存在变异。参见,例如, Trent, et al. (2006) *J. Endotoxin Res.* 12:205-23; Raetz and Whitfield (2002) *Ann. Rev. Biochem.* 71:635-700; Yethon and Whitfield (2001) *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* 1:91-106和Yethon and Whitfield (2001) *J. Biol. Chem.* 276:5498-504。

[0358] 因此可以测试本文中描述的嵌合构建体,用于结合到靶细菌上。在此描述的为构建体(具有MTD)是否到达了肽聚糖层的不同分析试验。可以将SDS-PAGE用来检测蛋白到细胞的结合。例如,用合适量的蛋白处理 10^7 个细胞约2小时。接着通过离心使细胞成团,在SDS-PAGE上检测上清液中所述蛋白的量,并染色。所述蛋白被称为被吸附到细胞上,如果蛋白在被吸附到细胞上之前的强度高于吸附后的强度,则该差异有可能由于细胞结合引起。还可以使用,例如,共焦成像检测结合,来检测通过暴露于嵌合构建体对细菌OM的改变。技术人员应理解,还可以使用荧光标签或荧光素酶。

[0359] 非正式的序列表

[0360] SEQ ID NO:1 (P134GP36全长DNA序列;与基因ID1482616高度同源)

[0361] SEQ ID NO:2 (SEQ1 (GP36) 的AA翻译;与NP877475高度同源)

[0362] SEQ ID NO:3 (智人(Homo sapiens) cDNA, FLJ96367, 与智人杀菌/渗透增强蛋白(BPI)、mRNA高度相似;GenBank:AK315328.1)

[0363] SEQ ID NO:4 (BPI;未命名的蛋白产物[智人]GenBank:BAG37729.1)

[0364] SEQ ID NO:5 (GP36CD核酸;最初的CHCl₃测试构建体)

[0365] SEQ ID NO:6 (24Kda构建体;SEQ ID NO:5的翻译产物,217个氨基酸)

- [0366] SEQ ID NO:7[连接到24Kda上13个aa的C末端延伸,用于纯化目的]
[0367] SEQ ID NO:8{编码连接到BPI片段上的嵌合体GP36片段;P225}
[0368] SEQ ID NO:9[连接臂-GP36胞壁质水解结构域-RRR-BPI TMD-RRR;P225多肽]
[0369] SEQ ID NO:1 (P134GP36全长DNA编码序列:[与基因ID1482616紧密同源])
[0370] P134GP36的核苷酸序列:

[0371] 1 ATGGCGGAATCGCAACGTGCTTCCCAAGAGCTTGGGATCAACGTCGGACAGGCGCAACTC 60
61 CAGCCGGGCCAGAGTGCCCGGGCGGAGTGCGCGACTCCGAGGTCAACTACAGCGGTCCG 120
121 AGTGTAGGCTCGCAGATTCTCGACGGCATCTGGGTGCCGGTCAGCAGATCGCTGGCAAA 180

181 TGGTTCGAGCACAACGTGCAGCAGGAAGTTCTGCGCGGTGAGCGTGCCCGTATGGCCGGC 240
241 GAGGCTGAGGAGGCAGTAGACAGCAACGTACTGGCCAAACCATTCGTGAAGGGTGGTTGG 300
301 CGTAAGCAGGACTACCGTATCGCCAGGCGGACTTCAGCCTGAAGATGCAGCGATTTCATC 360
361 GCCAACAAGGGCCGGGAGATGACTCCCGAGGAGTTCCGCAAGTACCTGTCCAGGAGGCT 420
421 ACGCAGCTCCTGGACTCGACCGAGGGCATGAACCCCAACGATGCCCTACAGGCGATGGCA 480
481 CAGCAGCAGAAGGCCGAGGAACAGCTCTTTGGCATGCAGGCTAAGGCGTACATGGATTGG 540
541 TCCATCGACAGGCGCCACGGGGCTTCGCGACCCAGGGTAACAGCATCTGGCCAAAGGCC 600
601 GTACATGCCAGGCCACCGGCGACGAGCTATCCCGGCAACTCAGCCTGGAAGAGGCCGGC 660
661 CTGTTCTATACCAACATCATGACCTCCGAGGATATCCCGCTGGAGGTACGTGACAAGGTG 720
721 GGTATGCAAGTTCTTGGCGGCCAGCCTGGACATGAACCAGCGGGGCATCTATGAGGGCCTG 780
781 CGCGATGCCGGGTTCTTGGACAGTATGTCCTTTGACGACCGGCGTGCCTCAACGGCCTC 840
841 TATGAAAAATCGAAGGCACAGACCCGTGCCAAGGAATCGATGGCTACCTTGCGGGCCGAC 900
901 GCGGACTTCCAGCAGCGGGTGGCCAAAGCGGCCATCACAGACCTTGCCGAGGTTGAGGCG 960
961 TACTCAGGAGGCATGGTTCGAGGAGGGCCGCTGGAGCGACGCTCAGGCCATCTCGTTTCATG 1020
1021 ACCAAGGCCATGACCGGCCTGGGCAACGCTCAGCGCATGCAGGGCATCATGGCGGCCTTG 1080
1081 GAAGCCGGAGACATCAACGCCCTCCACACGCTGGGTACCAACGTCACCGAGGCGCTGGAG 1140
1141 CAGTGGGACAAGATGCAGGCCGCCAACGGCTCAAGCCTGACTGACCGTCTCGTGCAGGGC 1200
1201 ACACAGCTCGGCCTGCGCCTGGGGACCTTCCCAAGACCTACGGCGAGTCCGTGGGCAGC 1260
1261 GCGGTGCGCATGATCCAGGCCGCCAAGGAAGGCGAGGCAACCCGGAGCTGGTCAACACG 1320
1321 CTGAACAGCATCTTCGAACAGGTGGCTCGGGCCAGGAGATCAACCCATCCGCCGGCAAC 1380
[0372] 1381 GTGATGCTATCCGGCATCCCGGAAGCCGAGCAGGGCGCCGTGGCCTGGGCACTCAAGCAG 1440
1441 ATGAAGATGGGCATCGCACCAGCTCAAGCTCTGCGCGAGTTTAGCGCCAACGCCGAAGTC 1500
1501 GTGAAGCAGATGGACGAGTTCGAGAAAGCCAGAACACCAAGGCATTCAAGGACAACCTC 1560
1561 GGTAAGCAGGTCAACGACAAGTTCTGTAACAACATCTTCGGTTCGAGCCTGGAACATGCTG 1620
1621 ACCGGCGAGAGCGACCTGAGCAACAACGAGGGCCGTCTGAGCATGTATCGCCGGGCGACC 1680
1681 ATCGACGAGGCCAACTGGCTGGCCAGCGACCGCAAGCATGCGGGTCTGCTCACCAGCGAC 1740
1741 ACGGGCCGCGAGGCCCTGCTGGAGATCGCCGCCGCCAAGTGCCTAACCGCACCATCCAG 1800
1801 GTAGGCGAAGGTCGGAACCTGAAGGAAGGGGACCTATTAGCCGCGCGGATAGCGCGCCG 1860
1861 CTGATCTTCGCTCGCGGCACACCGCCGAGCAGCTATTGCGGACCAACGACACCGAGACC 1920
1921 ATCGGAACCGTCTCTGGCCGAGCAGCACAAAGCCGCATGTGCAAGGACTCCTCGGCTACAAG 1980
1981 TCGGTAGTCGCCTTCGAGTACGACCGCACCAGTGGCAGCCTCCTCGCCGTCGAGTACGAC 2040
2041 GAGAACGGTGTGGCCCTGGACCGCACGCGGGTTGATCCCCAGGCAGTCGGCAACGAGGTG 2100
2101 CTCAAGCGCAACGCGGATAAGCTGAATGCGATGCGGGGCGCCGAGTACGGTGCCAACGTC 2160
2161 AAGGTCAGCGGCACGGACATTCGCATGAACGGGGGTAAACAGTGCCGGCATGCTGAAGCAG 2220
2221 GACGTGTTCAACTGGCGGAAGGAATGGCTCAGTTCGAGGCTTACCGAGGGGAGGCGTAT 2280
2281 AAGGATGCCGATGGTTATAGTGTGGCCCTGGGGCATTACCTGGGCAGTGGCAATGCTGGG 2340
2341 GCAGGTAATACAGTACGCTCAGCAAGCCGCGAGTGGTTCGCCGAGGACACCGACCGC 2400
2401 GCACTCGACAGGGTGTGAGGTGGCCGACGAGCTGGGCGTTACGAACAATGCCTCTATC 2460
2461 CTGGGATTGGCCGGTATGGCCTTCCAGATGGGCGAAGGACGTGCCCGGCAGTTCGGTAAC 2520
2521 ACCTTCCAGGCGATCAAGGATCGCAACAAGGAAGCCTTCGAGGCTGGTGTGCGAAACAGC 2580
2581 AAGTGGTACACGCAGACGCCCCACGGGGCCGAGGCATTATCAAGCGCATGGCGCCCCAC 2640
2641 TTCGATACACCGAGTCAAATCGGTGTCGATTGGTACAGCGCCGCAACAGCGGAGTAA 2697

- [0373] SEQ ID NO:2 (SEQ ID NO:1 (P134GP36) 的AA翻译;与NP877475高度同源)
[0374] P134GP36的氨基酸序列:

1 MAESQRASQELGINVGQAQLQPGQSARRGVRDSEVNYSGPSVGSQILDGILGAGQQIAGK 60
 61 WFEHNVQQEVLRRGERARMAGEAEEAVDSNVLAKPFVKGGWRKQDYRIAQADFSCLKMQRFI 120
 121 ANKGREMTPEEFRKYLSEATHVLDSTEGMNPNDALQAMAQQQKAEEQLFGMQAKAYMDW 180
 181 SIDQAARGFRTQGNISILAKAVHAQATGDELSRQLSLEEAGLFYTNIMTSEDIPLVDRKV 240
 241 GMQFLAASLDNQRGIYEGLRDAGFLDSMSFDDRRALNGLYEKSKAQTRAKESMATLRAD 300
 301 ADFQQRVANGAITDLAEVEAYSRCGMVEEGRWSDAQAI SFMTKAMTGLGNAQRMQGIMAAL 360
 361 EAGDINALHTLGTNVTEALEQWDKMQAANGSSLTDRLVQGTQLGLRLGTFPKTYGESVGS 420
 [0375] 421 AVRMIQAAKEGEANPELVNTLNSIFEQVASAQEI NPSAGNVMLSGIPEAEQGAVAWALKQ 480
 481 MKMGIAPAQALREFSANAEEVVKQMDFEFEKGQNTKAFKDNLGKQVNDKFVNNIFGRAWNML 540
 541 TGESDLNNEAVLSMYRRATIDEANWLASDRKHAGLLTSDTGREALLEIAAANVRNRTIQ 600
 601 VGEGRNLKEGDLFSRRDSAPLILPRGTTAEQLFGTNDTETIGTVLAEQHKPHVEGLLGK 660
 661 SVVAFEYDRTSGSLLAVEYDENGVALDRTRVDPQAVGNEVLKRNADKLNAMRGAEYGANV 720
 721 KVSQTDIRMNGGNSAGMLKQDVFNWRKELAQFEAYRGEAYKDADGYSVGLGHYLGSGNAG 780
 781 AGTTVTPEQAAQWFAEDTDRALDQGVRLADELGVTTNNASILGLAGMAFQMGEGRARQFRN 840
 841 TFQAIKDRNKEAFEAGVRNSKWYTQTPTGABAFIKRMAPHFDTPSQIGVDWYSAATAE 898

[0376] SEQ ID NO:3 (智人cDNA, FLJ96367, 与智人杀菌/渗透增强蛋白(BPI)、mRNA高度相似; GenBank: AK315328.1)

[0377] 原始序列

1 aggccttgag gttttggcag ctctggagga tgagagagaa catggccagg ggccttgca
 61 acgcgcgcag atgggcgcgc ctgatgggtgc tggctgcat aggcacgcgc gtgacagcgg
 121 ccgtcaacc ccgctgcgtg gtcaggatct cccagaagg cctggactac gccagccagg
 181 aggggacggc cgtctgcag aaggagctga agaggatcaa gattcctgac tactcagaca
 241 gctttaagat caagcatctt gggaaggggc attatagctt ctacagcatg gacatccgtg
 301 aattccagct tcccagttcc cagataagca tgggtgccaa tgtgggcctt aagtctcca
 361 tcagcaacgc caatatcaag atcagcggga aatggaaggc acaaaagaga ttcttaaaaa
 421 tgagcggcaa ttttgacctg agcatagaag gcatgtccat ttggctgat ctgaagctgg
 481 gcagtaacc cagctcaggc aagcccacca tcacctgctc cagctgcagc agccacatca
 541 acagtgtcca cgtgcacatc tcaaaagagc aagtgggtg gctgatccaa ctcttcacca
 601 aaaaaattga gtctgcgtt cgaaacaaga tgaacagcca ggtctgcgag aaagtgacca
 661 attctgtatc ctccgagctg caacctatt tcacagactc gccagtaatg accaaaatag
 [0378] 721 attctgtggc tgggaatcaac tatggtcttg tggcacctcc agcaaccacg gctgagaccc
 781 tggatgtaca gatgaagggg gagttttaca gtgagaacca ccacaatcca cctccctttg
 841 ctccaccagt gatggagttt cccgctgccc atgaccgcat ggtatacctg ggcctctcag
 901 actacttctt caacacagcc gggtctgtat accaagaggc tggggctctg aagatgaccc
 961 ttagagatga catgattcca aaggagtcca aatttcgaat gacaaccaag ttctttggaa
 1021 ccttcctacc tgaggtggcc aagaagtttc ccaacatgaa gatacagatc catgtctcag
 1081 cctccacccc gccacacctg tctgtgcagc ccacccgctt tacctcttac cctgcccgtg
 1141 atgtccaggc ctttgcgctc ctccccaact cctccctggc ttccctcttc ctgattggca
 1201 tgcacacaac tggttccatg gaggtcagcg ccgagtcgga caggcttgtt ggagagctca
 1261 agctgtatag gctgctcctg gaactgaagc actcaaatat tggccccttc ccggttgaat
 1321 tctgtctgga tatcatgaac tacattgtac ccattcttgt gctgcccagg gttaacgaga
 1381 aactacagaa aggtctccct ctcccagcgc cggccagagt ccagctctac aacgtagtgc
 1441 ttcagcctca ccagaacttc ctgctgttcg gtgcagacgt tgtctataaa tga

[0379] SEQ ID NO:4 (BPI; 未命名的蛋白产物[智人] GenBank: BAG37729.1)

[0380] 原始序列

1 mrenmargpc naprwaslmv lvaigtavta avnpgvvvri sqkgldyasq qgtaalqkel
 61 krikipdyd sfkikhlgkg hysfysmdir efqlpssqis mvpnvglkfs isnanikisg
 121 kwkagkrflk msgnfdlsie gmsisadkl gsnptsgkpt itesscshi nsvvhisks
 181 kvgwliqlfh kkiesalrnk mnsqvcekv nsvsselqpy fgtlpvmtki dsvaginygl
 [0381] 241 vappattaet ldvqmkgefy senhhnpppf appvmefpaa hdrmvylgls dyffntaglv
 301 yqeagvlkmt lrddmipkes kfrlttkffg tflpevakkf pnmkiqihvs astpplhsq
 361 ptgltfypav dvqafavlpn sslasflfig mhttgsmvsa aesdrlvgl kldrlillelk
 421 hsnigpfpve lldimnyiv pilvlpvne klqkgfplpt parvqlynvv lqphqnfllf
 481 gadvvyk

[0382] SEQ ID NO:5 (P134GP36核酸; 最初的CHCl₃测试构建体)

- [0383] 1 ATGGGTGTGGCCCTGGACCGCACGCGGGTTGATCCCCAGGCAGTCGGCAACGAGGTGCTC 60
61 AAGCGCAACGCGGATAAGCTGAATGCGATGCGGGGCGCCGAGTACGGTGCCAACGTCAAG 120
121 GTCAGCGGCACGGACATTGCGATGAACGGGGTAACAGTCCCGGCATGCTGAAGCAGGAC 180
181 GTGTTCAACTGGCGGAAGGAACTGGCTCAGTTTCGAGGCTTACCGAGGGGAGCGGTATAAG 240
241 GATGCCGATGGTTATAGTGTGGGCCTGGGGCATTACCTGGGCAGTGGCAATGCTGGGGCA 300
301 GGTACTACAGTCACGCCTGAGCAAGCCGCGCAGTGGTTCGCGGAGGACACCGACCGCGCA 360
361 CTCGACCAGGGTGTGAGGTTGGCCGACGAGCTGGGCGTTACGAACAATGCCTCTATCCTG 420
421 GGATTGGCCGGTATGGCCTTCAGATGGGCGAAGGACGTGCCCGGCAGTCCGTAACACC 480
481 TTCCAGGCGATCAAGGATCGCAACAAGGAAGCCTTCGAGGCTGGTGTGCGAAACAGCAAG 540
541 TGGTACACGCAGACGCCACCGGGGCGGAGGCATTATCAAGCGCATGGCGCCCCACTTC 600
601 GATACACCGAGTCAAATCGGTGTGATTGGTACAGCGCCGCAACAGCGGAGTAA 654
- [0384] SEQ ID NO:6 (24Kda构建体;SEQ ID NO:5的翻译产物,217个氨基酸。可以去除原核生产宿主内的N末端Met,以使蛋白质的N端可以从G开始)
- [0385] 1 MGVALDRTRVDPQAVGNEVLKRNADKLNAMRGAHEYGANVKVSGTDIRMNGGNSAGMLKQD 60
61 VFNWRKELAQFEAYRGEAYKDADGYSVGLGHYLGSGNAGAGTTVTPEQAAQWFAEDTDRA 120
121 LDQGVRLADELGVTNNASILGLAGMAFQMGEGRARQFRNTFQAIKDRNKEAFEAGVRNSK 180
181 WYTQTPTGAEEAFIKRMAPHFDTPSQIGVDWYSAATAE 217
- [0386] SEQ ID NO:7 [连接到24Kda上13个aa的C末端延伸,用于纯化目的]
- [0387] 1 MGVALDRTRVDPQAVGNEVLKRNADKLNAMRGAHEYGANVKVSGTDIRMNGGNSAGMLKQD 60
61 VFNWRKELAQFEAYRGEAYKDADGYSVGLGHYLGSGNAGAGTTVTPEQAAQWFAEDTDRA 120
121 LDQGVRLADELGVTNNASILGLAGMAFQMGEGRARQFRNTFQAIKDRNKEAFEAGVRNSK 180
181 WYTQTPTGAEEAFIKRMAPHFDTPSQIGVDWYSAATAEKLAAALEHHHHHHH 230
- [0388] SEQ ID NO:8 [编码连接到BPI片段上的嵌合体GP36片段;P225]
- [0389] a. 构建体核苷酸序列:P225
- [0390] 1 ATGGGCCATCATCATCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCATATCGAAGGTCGT 60
61 CATATGGGTGTGGCCCTGGACCGCACGCGGGTTGATCCCCAGGCAGTCGGCAACGAGGTG 120
121 CTAAGCGCAACGCGGATAAGCTGAATGCGATGCGGGGCGCCGAGTACGGTGCCAACGTC 180
181 AAGGTCAGCGGCACGGACATTTCGATGAACGCGGGTAACAGTGC CGGCATGCTGAAGCAG 240
241 GACGTGTTCAACTGGCGGAAGGAACTGGCTCAGTTTCGAGGCTTACCGAGGGGAGGCGTAT 300
301 AAGGATGCCGATGGTTATAGTGTGGGCCTGGGGCATTACCTGGGCAGTGGCAATGCTGGG 360
361 GCAGGTACTACAGTCACGCCTGAGCAAGCCGCGCAGTGGTTCGCGGAGGACACCGACCGC 420
421 GCACTCGACCAGGGTGTGAGGTTGGCCGACGAGCTGGGCGTTACGAACAATGCCTCTATC 480
481 CTGGGATTGGCCGGTATGGCCTTCAGATGGGCGAAGGACGTGCCCGCAGTTCGGTAAC 540
541 ACCTTCAGGCGATCAAGGATCGCAACAAGGAAGCCTTCGAGGCTGGTGTGCGAAACAGC 600
601 AAGTGGTACACGCAGACGCCCACCGGGGCGGAGGCATTATCAAGCGCATGGCGCCCCAC 660
661 TTCGATACACCGAGTCAAATCGGTGTGATTGGTACAGCGCCGCAACAGCGGAGCGCCGT 720
721 CGCGCGTCCCTGATGGTGTGCTGCTCGCCATAGGCACCGCCGTGACAGCGGCCGTCAACCCT 780
781 GGCGTCGTGGTCAGGCGCCGTGCTAA 807
- [0391] 第一部分 (1-66) 为包含用于纯化的聚His的N末端延伸 (22个aa)
- [0392] 第二部分 (67-714) 为GP36胞壁质水解片段结构域片段 (683位至898位aa;217个aa)
- [0393] 第三部分 (715-804) 为具有带有RRR C端 (33个aa) 的BPI TMD结构域片段 (16-39位aa) 的连接臂 (RRR)
- [0394] SEQ ID NO:9 [载体序列-GP36胞壁质水解结构域-RRR-BPI TMD-RRR;P225多肽;N端可以具有在原核生产宿主内被去除的Met]
- [0395] 1 MGHHHHHHHHHSSGHIEGRHMGVALDRTRVDPQAVGNEVLKRNADKLNAMRGAHEYGANV 60
61 KVS GTDIRMNGGNSAGMLKQDVFNWRKELAQFEAYRGEAYKDADGYSVGLGHYLGSGNAG 120
121 AGTTVTPEQAAQWFAEDTDRLDQGVRLADELGVTNNASILGLAGMAFQMGEGRARQFRN 180
181 TFQAIKDRNKEAFEAGVRNSKWYTQTPTGAEEAFIKRMAPHFDTPSQIGVDWYSAATAERR 240
241 RASLMVLVAIGTAVTA AVNPGVVRRRR 268
- [0396] SEQ ID NO:10 P266构建体核酸:
- [0397] 1-6=ATG (起始密码子) GGC:由于克隆酶 (NheI) 位点产生的碱基
- [0398] 7-24=编码6xHis (SEQ ID NO:24) 标签的序列
- [0399] 25-672=编码GP36CD序列的序列

- [0400] 673-681=编码连接臂精氨酸的序列
[0401] 682-753=编码BPI MTD的序列
[0402] 754-762=编码末端精氨酸的序列
[0403] 763-765=TGA:编码终止密码子的序列--

[0404] 1 ATGGGCCATCATCATCATCATCATGGTGTAGCTCTTGATCGCACGCGGGTTGATCCCCAG 60
61 GCAGTCGGCAACGAGGTGCTCAAGCGCAACGCGGATAAGCTGAATGCGATGCGGGGCGCC 120
121 GAGTACGGTGCCAACGTCAAGGTGAGCGGACGGACATTCGCATGAACGGGGTAACAGT 180
181 GCCGGCATGCTGAAGCAGGACGTGTTCAACTGGCGGAAGGAAGTGGCTCAGTTCGAGGCT 240
241 TACCGAGGGGAGGCGTATAAGGATGCCGATGGTTATAGTGTGGGCCTGGGGCATTACCTG 300
301 GGCAGTGGCAATGCTGGGGCAGGTACTACAGTCACGCCTGAGCAAGCCGCGCAGTGGTTC 360
[0404] 361 GCCGAGGACACCGACCGCGCACTCGACCAGGGTGTGAGGTTGGCCGACGAGCTGGGCGTT 420
421 ACGAACAATGCCTCTATCCTGGGATTGGCCGGTATGGCCTTCCAGATGGGCGAAGGACGT 480
481 GCCCGGCAGTTCCTAACACCTTCCAGCGCATCAAGGATCGCAACAAGGAAGCCTTCGAG 540
541 GCTGGTGTGGGAAACAGCAAGTGGTACACGCGAGACGCCCAACCGGGCCGAGGCATTCATC 600
601 AAGCGCATGGCGCCCCACTTCGATACACCGAGTCAAATCGGTGTGATTTGGTACAGCGCC 660
661 GCAACAGCGGAGCGCGCTCGCGCGTCCCTGATGGTGTGTCGTCGATAGGCACCGCCGTG 720
721 ACAGCGGCGGTCAACCTGGCGTCTGTGGTCAGGCGCCGTCGCTGA 765

- [0405] SEQ ID NO:11P266氨基酸序列 (254个aa):

[0406] 1=M(起始密码子;由生产大肠杆菌宿主去除)

[0407] 2=G:由于克隆酶位点产生的氨基酸

[0408] 3-8=6xHis (SEQ ID NO:24) 标签

[0409] 9-224=GP36催化(胞壁质水解)结构域序列

[0410] 225-227=连接臂精氨酸

[0411] 228-251=BPI TMD

[0412] 252-254=N末端精氨酸--

[0413] [载体序列-his6-GP36胞壁质水解结构域-RRR-BPI TMD-RRR;P266多肽]

[0414] 1 MGHHHHHHGV ALDRTRVDPQ AVGNVLEKRN ADKLNAMRGA EYGANVKVSG TDIRMNGGNS 60
61 AGMLKQDVFN WRKELAQFEA YRGEAYKDAD GYSVGLGHYL GSGNAGAGTT VTPEQAAQWF 120
121 AEDTDRALDQ GVRLADELGV TNNASILGLA GMAFQMGEGR ARQFRNTFQA IKDRNKEAFE 180
181 AGVRNSKWYT QTPTGAFAFI KRMAPHFDTF SQIGVDWYSA ATAERRRASL MVLVAIGTAV 240
241 TAAVNPGVVV RRRR 254

[0415] SEQ ID NO:12P275构建体的核苷酸序列

[0416] 1 ATGGGCCATCATCATCATCATCATGGTGTAGCTCTTGATCGCACGCGGGTTGATCCCCAG 60
61 GCAGTCGGCAACGAGGTGCTCAAGCGCAACGCGGATAAGCTGAATGCGATGCGGGGCGCC 120
121 GAGTACGGTGCCAACGTCAAGGTGAGCGGACGGACATTCGCATGAACGGGGTAACAGT 180
181 GCCGGCATGCTGAAGCAGGACGTGTTCAACTGGCGGAAGGAAGTGGCTCAGTTCGAGGCT 240
241 TACCGAGGGGAGGCGTATAAGGATGCCGATGGTTATAGTGTGGGCCTGGGGCATTACCTG 300
301 GGCAGTGGCAATGCTGGGGCAGGTACTACAGTCACGCCTGAGCAAGCCGCGCAGTGGTTC 360
361 GCCGAGGACACCGACCGCGCACTCGACCAGGGTGTGAGGTTGGCCGACGAGCTGGGCGTT 420
421 ACGAACAATGCCTCTATCCTGGGATTGGCCGGTATGGCCTTCCAGATGGGCGAAGGACGT 480
[0417] 481 GCCCGGCAGTTCCTAACACCTTCCAGCGCATCAAGGATCGCAACAAGGAAGCCTTCGAG 540
541 GCTGGTGTGGGAAACAGCAAGTGGTACACGCGAGACGCCCAACCGGGCCGAGGCATTCATC 600
601 AAGCGCATGGCGCCCCACTTCGATACACCGAGTCAAATCGGTGTGATTTGGTACAGCGCC 660
661 GCAACAGCGGAGCGCGCTCGCGCGTCCCTGATGGAGCTGGACGCCAAGGCACCGCCGTG 720
721 ACAGCGGCGGTCAACCTGGCGTCTGTGGTCAGGCGCCGTCGCTGA 765

[0418] SEQ ID NO:13P275多肽构建体;在BPI结构域中,V232转化为E;V234转化为D;I236转化为K

[0419] 1 MGHHHHHHGV ALDRTRVDPQ AVGNVLEKRN ADKLNAMRGA EYGANVKVSG TDIRMNGGNS 60
61 AGMLKQDVFN WRKELAQFEA YRGEAYKDAD GYSVGLGHYL GSGNAGAGTT VTPEQAAQWF 120
121 AEDTDRALDQ GVRLADELGV TNNASILGLA GMAFQMGEGR ARQFRNTFQA IKDRNKEAFE 180
181 AGVRNSKWYT QTPTGAFAFI KRMAPHFDTF SQIGVDWYSA ATAERRRASL MELDAKGTAV 240
241 TAAVNPGVVV RRRR 254

[0420] SEQ ID NO:14GP36MD-P134穿孔素MTD嵌合体构建体

- [0421] 1 ATGGGCCATCATCATCATCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCATATCGAAGGTCGT 60
61 CATATGGGTGTGGCCCTGGACCGCACGCGGGTTGATCCCCAGGCAGTCGGCAACGAGGTG 120
121 CTCAAGCGCAACCGCGGATAAGCTGAATGCGATGCGGGGCGCCGAGTACGGTGCCAACGTC 180
181 AAGGTCAGCGGCACGGACATTCGCATGAACGGGGGTAACAGTGCCGGCATGCTGAAGCAG 240
241 GACGTGTTCAACTGGCGGAAGGAAGTGGCTCAGTTTCGAGGCTTACCGAGGGGAGGCGTAT 300
301 AAGGATGCCGATGGTTATAGTGTGGGCTTGGGGCATTACCTGGGCAGTGGCAATGCTGGG 360
361 GCAGGTACTACAGTCACGCCTGAGCAAGCCGCGCAGTGGTTTCGCCGAGGACACCGACCGC 420
421 GCACTCGACCAGGGTGTGAGGTTGGCCGACGAGCTGGGCGTTACGAACAATGCCTCTATC 480
481 CTGGGATTGGCCGGTATGGCCTTCCAGATGGGCGAAGGACGTGCCCGGCAGTTCGGTAAC 540
541 ACCTTCCAGGCGATCAAGGATCGCAACAAGGAAGCCTTCGAGGCTGGTGTGCGAAACAGC 600
601 AAGTGGTACACGCAGACGCCACCGGGGCGGAGGCATTATCAAGCGCATGGCGCCCCAC 660
661 TTCGATACACCGAGTCAAAATCGGTGTGATTGGTACAGCGCCGCAACAGCGGAGCGCCGT 720
721 CGCGAGATCGCCAGCCTCTGTGCTGCGGTACTCACCAGCGCTCTACGTGGGCGCCAGCTC 780
781 ATCACCCTGCTCCGCGCTCGCTGA 804
- [0422] SEQ ID NO:15GP36MD-P134穿孔素MTD多肽序列
- [0423] 1 MGHHHHHHHH HHSSGHIEGR HMGVALDRTR VDPQAVGNEV LKRNADKLNA MRGA EYGANV 60
61 KVS GTDIRMN GGNSAGMLKQ DVFNWRKELA QFEAYRGEAY KDADGYSVGL GHYLGSGNAG 120
121 AGTTVTPEQA AQWFAEDTDR ALDQGVRLAD ELGVTNNASI LGLAGMAFQM GEGRARQFRN 180
181 TFQAIKDRNK EAFEAGVRNS KWTQTPTGA EAFIKRMAPH FDTPSQIGVD WYSAATAERR 240
241 RELASLCAAV LTALYVGAQL ITLLRRR 267
- [0424] SEQ ID NO:16GP36MD-脂多糖结合蛋白MTD构建体
- [0425] 1 ATGGGCCATCATCATCATCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCATATCGAAGGTCGT 60
61 CATATGGGTGTGGCCCTGGACCGCACGCGGGTTGATCCCCAGGCAGTCGGCAACGAGGTG 120
121 CTCAAGCGCAACCGCGGATAAGCTGAATGCGATGCGGGGCGCCGAGTACGGTGCCAACGTC 180
181 AAGGTCAGCGGCACGGACATTCGCATGAACGGGGGTAACAGTGCCGGCATGCTGAAGCAG 240
241 GACGTGTTCAACTGGCGGAAGGAAGTGGCTCAGTTTCGAGGCTTACCGAGGGGAGGCGTAT 300
301 AAGGATGCCGATGGTTATAGTGTGGGCTTGGGGCATTACCTGGGCAGTGGCAATGCTGGG 360
361 GCAGGTACTACAGTCACGCCTGAGCAAGCCGCGCAGTGGTTTCGCCGAGGACACCGACCGC 420
421 GCACTCGACCAGGGTGTGAGGTTGGCCGACGAGCTGGGCGTTACGAACAATGCCTCTATC 480
481 CTGGGATTGGCCGGTATGGCCTTCCAGATGGGCGAAGGACGTGCCCGGCAGTTCGGTAAC 540
541 ACCTTCCAGGCGATCAAGGATCGCAACAAGGAAGCCTTCGAGGCTGGTGTGCGAAACAGC 600
601 AAGTGGTACACGCAGACGCCACCGGGGCGGAGGCATTATCAAGCGCATGGCGCCCCAC 660
661 TTCGATACACCGAGTCAAAATCGGTGTGATTGGTACAGCGCCGCAACAGCGGAGCGCCGT 720
721 CGCTCCGACTCCTCCATCCGGGTCCAGGGCCGTTTGAAGGTGCGCGCGTCATTCTTCAA 780
781 CTGCAGGGCTCCTTCGATGTCAGTGTCAAGGGCCGCGCTCGCTGA 825
- [0426] SEQ ID NO:17GP36MD-LPS结合蛋白MTD构建体多肽序列
- [0427] 1 MGHHHHHHHH HHSSGHIEGR HMGVALDRTR VDPQAVGNEV LKRNADKLNA MRGA EYGANV 60
61 KVS GTDIRMN GGNSAGMLKQ DVFNWRKELA QFEAYRGEAY KDADGYSVGL GHYLGSGNAG 120
121 AGTTVTPEQA AQWFAEDTDR ALDQGVRLAD ELGVTNNASI LGLAGMAFQM GEGRARQFRN 180
181 TFQAIKDRNK EAFEAGVRNS KWTQTPTGA EAFIKRMAPH FDTPSQIGVD WYSAATAERR 240
241 RSDSSIRVQG RWKVRASFFK LQGSFVSVK GRRR 274
- [0428] SEQ ID NO:18GP36MD-T4噬菌体, gp5 β -螺旋型MTD嵌合体构建体
- [0429] 1 ATGGGTGTGGCCCTGGACCGCACGCGGGTTGATCCCCAGGCAGTCGGCAACGAGGTGCTC 60
61 AAGCGCAACCGCGGATAAGCTGAATGCGATGCGGGGCGCCGAGTACGGTGCCAACGTC AAG 120
121 GTCAGCGGCACGGACATTCGCATGAACGGGGGTAACAGTGCCGGCATGCTGAAGCAGGAC 180
181 GTGTTCAACTGGCGGAAGGAAGTGGCTCAGTTTCGAGGCTTACCGAGGGGAGGCGTATAAG 240
241 GATGCCGATGGTTATAGTGTGGGCTTGGGGCATTACCTGGGCAGTGGCAATGCTGGGGCA 300
301 GGTACTACAGTCACGCCTGAGCAAGCCGCGCAGTGGTTTCGCCGAGGACACCGACCGCGCA 360
361 CTCGACCAGGGTGTGAGGTTGGCCGACGAGCTGGGCGTTACGAACAATGCCTCTATCCTG 420
421 GGATTGGCCGGTATGGCCTTCCAGATGGGCGAAGGACGTGCCCGGCAGTTCGGTAACACC 480
481 TTCAGGCGATCAAGGATCGCAACAAGGAAGCCTTCGAGGCTGGTGTGCGAAACAGCAAG 540
541 TGGTACACGCAGACGCCCAACCGGGGCGGAGGCATTATCAAGCGCATGGCGCCCCACTTC 600
601 GATACACCGAGTCAAAATCGGTGTGATTGGTACAGCGCCGCAACAGCGGAGAAAGCTTAT 660
661 GTGCATACAATGGAACTGAAAGCGGACATATTCAGGAATTTGATGATACCCCTGGGCA 720
721 GAACGATATAGATTAGTTTATCCAACTGGAACCTTAAGAAAGTATACCATCAGGAAGA 780
781 AGAACAAGAAAACTGTTGATAATTTGATGATATAACCAATGCTGATGGTAATTTTTTG 840
841 GTAGCCGGTGATAAAAAGACTAACGTCGGTGGTTTCAAGAAATTTATTATAACATGGATAAT 900
901 CGTTTACATCAAAATCGATGGAAGCAATACAATATTTGTACGTGGAGACGAAACGAAACT 960
961 GTTGAAGGTAATGGAACATCTCTAGTTAAAGGTAATGTTACTATTATAGTTGAAGGTAAT 1020
1021 GCTGACATTACAGTTAAAGGAGATGCTACCACCTTTAGTTGAAGGAAATCAAACATAACACA 1080
1081 GTAAATGGAAATCTTTCTTGGAAAGTTGCCGGACAGTTGATTGGGATGTCGGTGGTGAT 1140
1141 TGGACAGAAAAATGGCATCTATGAGTTCTATTTCATCTGGTCAATACACAATTGATGGA 1200
1201 TCGAGGATTGACATTGGCCTCGAGCACCACCACCACCACCCTAA 1245

[0430] SEQ ID NO:19GP36MD-T4噬菌体, gp5 β -螺旋型MTD嵌合体多肽

```

1 MGVALDRTRV DPQAVGNEVL KRNADKLNAM RGAEYGANVK VSGTDIRMNG GNSAGMLKQD 60
61 VFNWRKELAQ FEAYRGEAYK DADGYSVGLG HYLGSNGAGA GTTVTPPEQAA QWFAEDTDRA 120
121 LDQGVRLADE LGVTNNASIL GLAGMAFQMG EGRARQFRNT FQAIKDRNKE AFEAGVRNSK 180
[0431] 181 WYTQTPNRAE AFIKRMAPHF DTPSQIGVDW YSAATAEKLY VHTMETESGH IQEFDDTPGQ 240
241 ERYRLVHPTG TYEEVSPSGR RTRKTVDNLY DITNADGNFL VAGDKKTNVG GSEIYYNMDN 300
301 RLHQIDGSNT IFVRGDETKT VEGNGTILVK GNVTLIVEGN ADITVKGDAT TLVEGNQTNT 360
361 VNGNLSWKVA GTVDWDVGGD WTEKMASMSS ISSGQYTIDG SRIDIGLEHH HHHH 414

```

[0432] SEQ ID NO:20GP36MD-S型绿脓杆菌素外膜转运 (OMT) 结构域嵌合体构建体

```

1 ATGGGTGTGGCCCTGGACCGCACGCGGGTTGATCCCCAGGCAGTCGGCAACGAGGTGCTC 60
61 AAGCGCAACGCGGATAAGCTGAATGCGATGCGGGGCGCCGAGTACGGTGCCAACGTC AAG 120
121 GTCAGCGGCACGGACATTCGCATGAACGGGGTAACAGTGCCGGCATGCTGAAGCAGGAC 180
181 GTGTTCAACTGGCGGAAGGAACTGGCTCAGTTCGAGGCTTACCGAGGGGAGGCGTATAAG 240
241 GATGCCGATGGTTATAGTGTGGGCTGGGGCATTACCTGGGCACTGGCAATGCTGGGGCA 300
301 GGTACTACAGTCACGCCCTGAGCAAGCCGCGCAGTGGTTCGCCGAGGACACCGACCGCGCA 360
[0433] 361 CTCGACCAGGGTGTGAGGTTGGCCGACGAGCTGGGCGTTACGAACAATGCCTCTATCCTG 420
421 GGATTGGCCGGTATGGCCTTCCAGATGGGCGAAGGACGTGCCCGGCAGTTCGGTAACACC 480
481 TTCCAGGCGATCAAGGATCGCAACAAGGAAGCCTTCGAGGCTGGTGTGCGAAACAGCAAG 540
541 TGGTACACGCAGACGCCCAACCGGGCCGAGGCATTATCAAGCGCATGGCGCCCCACTTC 600
601 GATACACCGAGTCAAATCGGTGTGATTGTTACAGCGCCGCAACAGCGGAGAAGCTTCAA 660
661 GCGTTGCAAGATGCTATTAAATTTACTGCGGACTTTTATAAGGAAGTAACAGAGAAATTT 720
721 GGCGCACGAACATCGGAGATGGCGCGCCAACTGGCCGAAGGCGCCAGGGGGAAAAATATC 780
781 AGGAGTTGCGCGGAAGCAATCAAGTCGTTGAAAAGCACAAGGATGCGTTAAATAAAAAA 840

```

```

841 CTTAGCCTTAAAGATAGGCAAGCCATTGCCAAAGCCTTTGATTCTCTAGACAAGCAGATG 900
901 ATGCCGAAGAGCCTTGAGAAATTTAGCAAAGGCTTTGGAGTTGAGGCAAAGCTATTGAC 960
961 GCGCCAGCCTGTACCAAGAGTTCAAGATATCTACGGAACCGGGGACTGGAAACCATTTC 1020
[0434] 1021 TTTGTAAAAAATTGAAACACTAGCTGCTGGTGC GGCCGCCAGTTGGCTTGTGGGTATTGCA 1080
1081 TTTGCCACGGCAACAGCCACTCCTATAGGCATTCTGGGGTTTCGCACTGGTAATGGCAGTT 1140
1141 ACCGGGGCGATGATTGACGAAGACCTTCTAGAAAAAGCAAACAATCTTGTAATATCCATT 1200
1201 CTCGAGCACCACCACCACCACCCTAA 1227

```

[0435] SEQ ID NO:21GP36MD-S形绿脓杆菌素 (OMT) 结构域嵌合体多肽408个aa。理论pI/Mw:8.44/44543.37

```

1 MGVALDRTRV DPQAVGNEVL KRNADKLNAM RGAEYGANVK VSGTDIRMNG GNSAGMLKQD 60
61 VFNWRKELAQ FEAYRGEAYK DADGYSVGLG HYLGSNGAGA GTTVTPPEQAA QWFAEDTDRA 120
121 LDQGVRLADE LGVTNNASIL GLAGMAFQMG EGRARQFRNT FQAIKDRNKE AFEAGVRNSK 180
[0436] 181 WYTQTPNRAE AFIKRMAPHF DTPSQIGVDW YSAATAEKLY ALQDAIKFTA DFYKEVTEKF 240
241 GARTSEMARQ LAEGARGKNI RSSAEAIKSF EKHKDALNKK LSLKDRQAIA KAFDSLQKQM 300
301 MAKSLKFSK GFGVVGAID AASLYQEFKI STETGDWKPF FVKIETLAAG AAASWLVGIA 360
361 FATATATPIG ILGFALVMAV TGAMIDEDLL EKANNLVISI LEHHHHHH 408

```

[0437] SEQ ID NO:22GP36MD-P22尾刺突蛋白MTD嵌合体构建体

[0438] 1 ATGGGTGTGGCCCTGGACCGCACGGGGTTGATCCCCAGGCAGTCGGCAACGAGGTGCTC 60
61 AAGCGCAACGCGGATAAGCTGAATGCGATGCGGGGCGCCGAGTACGGTGCCAACGTC AAG 120
121 GTCAGCGGCACGGACATTTCGCATGAACGGGGGTAACAGTGCCTGGCATGCTGAAGCAGGAC 180
181 GTGTTCAACTGGCGGAAGGAAGTGGCTCAGTTTCGAGGCTTACCGAGGGGAGGCGTATAAG 240
241 GATGCCGATGGTTATAGTGTGGGCTGGGGCATTACCTGGGCAGTGGCAATGCTGGGGCA 300
301 GGTACTACAGTCACGCCTGAGCAAGCCGCGCAGTGGTTCGCGGAGGACACCGACCGCGCA 360
361 CTCGACCAGGGTGTGAGGTGGCCGACGAGCTGGGCGTTACGAACAATGCCTCTATCCTG 420
421 GGATTGGCCGGTATGGCCCTCCAGATGGGCGAAGGACGTGCCCGGCAGTTCGGTAACACC 480
481 TTCCAGGCGATCAAGGATCGCAACAAGGAAGCCTTCGAGGCTGGTGTGCGAAACAGCAAG 540
541 TGGTACACGCAGACGCCCAACCGGGCCGAGGCATTATCAAGCGCATGGCGCCCCACTTC 600
601 GATACACCGAGTCAAATCGGTGTGATTTGGTACAGCGCCGCAACAGCGGAGAAGCTTACA 660
661 GACATCACTGCAACCGTAGTTGTTTCTAACCCCTCGTCCAATCTTCACTGAATCCCGTTCG 720
721 TTTAAAGCTGTTGCTAATGGGAAAATTTACATTGGTCAGATTGATACCGATCCGGTTAAT 780
781 CCTGCCAATCAGATACCCGTATACATTGAAAATGAGGATGGCTCTCAGTCCAGATTACT 840
841 CAGCCGCTAATTATCAACGCAGCCGTTAAATCGTATACAACGGCCAACCTGGTGAAAATT 900
901 GTCACCGTTCAGGGTCATAGCATGGCTATCTATGATGCCAATGGTTCTCAGGTTGACTAT 960
961 ATTGCTAACGTATTGAAGTACGATCCAGATCAATATTC AATAGAGCTGATAAAAAATTT 1020
1021 AAGTATTCAGTAAAATTATCAGATTATCCAACATTG CAGGATGCAGCATCTGCTGCGGTT 1080
1081 GATGGCCTTCTTATCGATCGAGATTATAATTTTTAT GGTGGAGAGACAGTTGATTTTGGC 1140
1141 GGAAAGGTTCTGACTATAGAATGTAAAGCTTAAATTTATAGSAGATGGAAATCTTATTTT 1200
1201 ACCGAAATTAGGCAAAGGTTCCCGCATTGCGGGGTTT TATGGAAAGCACTACAACACCA 1260
1261 TGGGTTATCAAGCCTTGGACGGATGACAATCAGTGGCTAACGGATGCCCGCAGCGGTCTGTT 1320
1321 GCCACTTTAAAACAATCTAAACTGATGGGTATCAGCCAACCGTAAGCGATTACGTTAAA 1380
1381 TTCCACGGAATAGAAAAGCTTACTCCCACCTAATGCAAAAGGGCAAAACATAACGCTCTACG 1440
1441 TTAGAAAATTAGAGAATGTATAGGGGTGCAAGTTCA TCGGGCTAGCGGTCTAATGGCTGGT 1500
1501 TTTTGTGTTAGAGGGTGTCACTTCTGCAAGATGGT AGACGCCAATAATCCAAGCGGAGGT 1560
1561 AAAGATGGCATTATTAACCTTCGAAAACCTTAGCGGC GATTGGGGGAAGGGTAACTATGTC 1620
1621 ATTGGCGGACGAACCAGCTATGGGTCACTAAGTAGC GCGCCAGTTTTTACGTAATAATGGT 1680
1681 GGCTTTGAACGTGATGGTGGAGTTATTGGGTTTACT TCATATCGCGCTGGGGAGAGTGGC 1740
1741 GTTAAAACTTGGCAAGGTACTGTGGGCTCGACAACCT CCGCAACTATAATCTGCAATTC 1800
1801 CGCGACTCGGTCTGTTATTTACCCCGTATGGGACGG ATTCGATTTAGGTGCTGACACTGAC 1860
1861 ATGAATCCGGAGTTGGACAGGCCAGGGGACTACCC TATAACCCAATACCCACTGCATCAG 1920
1921 TTACCCTTAAATCACCTGATTGATAAATCTCTGTTG TCGCGGGCGTTAGGTGTAGGTTT 1980
1981 GGTATGGATGGTAAGGGCATGTATGTGTCTAATAAT TACCGTAGAAGATTGCGCTGGGTCT 2040
2041 GGC GCGTACCTACTCACCCACGAATCAGTATTTACCA ATATAGCCATAATTGACACCAAT 2100
2101 ACTAAGGATTTCCAGGCGAATCAGATTTATATATCT GGGGCTTGCCGTGTGAACGGTTTA 2160
2161 CGTTTAAATTGGGATCCGCTCAACCGATGGGCAGGGT CTAACCATAGACGCCCCCTAATCT 2220
2221 ACCGTAAGCGGTATAACCGGGATGGTAGACCCCTCT AGAATTAATGTTGCTAATTTGGCA 2280
2281 GAAGAAGGGTTAGGTAATATCCGCGCTAATAGTTTC CGGCTATGATAGCGCAGCGATTAAA 2340
2341 CTGCGGATTACATAAGTTATCAAAGACATTAGATAGC GAGCATTGTACTCCACATTAAAC 2400
2401 GGGGGGGCCGGTTCTGGCTCAGCGTATACTCAACTT ACTGCTATTTACGGTAGCACACCT 2460
2461 GACGCTGTATCATTAAAAGTTAACCACAAAGATTGC AGGGGGGCAGAGATACCATTTGTT 2520
2521 CCTGACATCGCGTCAGATGATTTTATAAAGGATTCT CATGTTTTTTGCCATATTGGGAA 2580
[0439] 2581 AATAATTCTACTTCTTTAAAGGCTTTAGTGAAAAA ACCCAATGGAGAATTAGTTAGATTA 2640
2641 ACCTTGGCAACACTTCTCGAGCAGCACCACCACCAC CACTAG 2682

[0440] SEQ ID NO:23GP36-P22尾刺突蛋白MTD多肽

[0441] 1 MGVALDRTRV DPQAVGNEVL KRNADKLNAM RGA EYGANVK VSGTDIRMNG GNSAGMLKQD 60
61 VFNWRKELAQ FEAYRGEAYK DADGYSVGLG HYL GSGNAGA GTTVTPEQAA QWFAEDTDRA 120
121 LDQGVRLADE LGVTNNASIL GLAGMAFQMG EGRARQFRNT FOAIKDRNKE AFEAGVRNSK 180
181 WYTQTPNRAE AFIKRMAPHF DTFSQIGVDW YSAATAEKL TITANVVVSN PRPIFTESRS 240
241 FKAVANGKIY IGQIDTDPVN PANQIPVYIE NEDGSHVQIT QPLIINAAGK IVYNGQLVKI 300
301 VTVQGHSMAI YDANGSQVDY IANVLKYDPD QYSIEADKKE KYSVKLSDYP TLQDAASAAV 360
361 DGLLIDRDYN FYGGETVDFG GKVLITIECKA KFIGDGNLIF TKLGKGSRIA GVFMESTTTP 420
421 WVIKPWTDN QWLTDAAAVV ATLKQSKTDG YQPTVSDYVK FPGIETLLPP NAKGQNIIST 480
481 LEIRECIGVE VHRASGLMAG FLFRGCHFCG MVDANNPSGG KDGIITFENL SGDWGKGNYV 540
541 IGGRTSYGSV SSAQFLRNNG GFERDGGVIG FTSYRAGESG VKTWQGTVGS TTSRNYNLQF 600
601 RDSVVIYPVW DGFDLGADTD MNPFLDRPGD YPITQYPLHQ LPLNLHIDNL LVRGALGVGF 660
661 GMDGKGMYSV NITVEDCAGS GAYLLTHESV FTNIAIIDTN TKDFQANQIY ISGACRVNGL 720
721 RLIGIRSTDG QGLTIDAPNS TVSGITGMVD PSRINVANLA EEGLGNIRAN SFQYDSAAIK 780
781 LRIHKLSKTL DSGALYSHIN GGAGSGSAYT QLTAISGSTP DAVSLKVNHK DCRGAEIPFV 840
841 PDIASDDFIK DSSCFLPYWE NNSTSLKALV KKPNGELVRL TLATLLEHHH HHH 893

<110> 冈戈根股份有限公司(Gangagen Inc.)

<120> 嵌合抗菌多肽

<130> 88675-834853

<140> WO PCT/IN12/00261

<141> 2012-04-12

<150> IN 1277/CHE/2011

<151> 2011-04-12

<160> 35

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 2697

<212> DNA

<213> 假单胞菌噬菌体P134

<220>

<223> 假单胞菌噬菌体P134 GP36全长DNA, 包含C-末端溶菌酶结构域的假单胞菌噬菌体phiKMV ORF36结构蛋白的同系物

<400> 1

[0001]

```

atggcggaat cgcaacgtgc ttcccaagag cttgggatea acgtcggaca ggcgcaactc 60
cagccggggc agagtgeccg gcgaggagtg cgcgactccg aggtcaacta cagcgggtccg 120
agtgttagct cgcagattct cgacggcatc ctgggtgccc gtcagcagat cgctggcaaa 180
tggttcgagc acaacgtgca gcaggaagtt ctgcgggtg agcgtgcccg tatggccggc 240
gaggctgagg aggcagtaga cagcaacgta ctggccaaac cattcgtgaa ggggtggttg 300
cgtaagcagg actaacgtat egcccaggcg gactteagcc tgaagatgca gcgattcatc 360
gccaacaagg gcccggagat gactcccgag gacttccgca agtacctgtc ccaggagget 420
acgcacgtcc tggactcgac cgagggcatg aaccccaacg atgccctaca ggcgatggca 480
cagcagcaga aggcgagga acagctcttt ggcatgcagg ctaaggcgta catggattgg 540
tccatcgacc aggcgcacg gggttccgc acccagggtg acagcactct ggccaaggcc 600
gtacatgccc aggcacccg cgacgagcla tcccggcaac tcagcclgga agaggccggc 660
ctgtttctata ccaacatcat gacctccgag gatateccgc tggaggtacg tgacaaggtg 720
ggtatgcagt tcttggcggc cagcctggac atgaaccagc ggggcatcta tgagggcctg 780
cgcgatgccg ggttcttgga caglatgicc ttlgacgacc ggctgccccl caacggctc 840
tatgaaaaat cgaaggcaca gaccctgccc aaggaatcga tggtacctt cggggccgac 900
gcccacttcc agcagcgggt ggccaacggc gccatcacag accttgcga ggtttagggc 960
taclacgag gcatggtcga ggaggccgc tggagcgacg ctccagccat ctggttcatg 1020
accaaggcca tgaccggcct gggcaacgct cagcgcagtc agggcactat ggccgcttg 1080
gaagccggag acatcaacgc cctccacacg ctgggtacca acgtcaccga ggccctggag 1140
cagtgggaca agatgcaggc cgcgaacggc tcaagcctga ctgaccgtct cgtgcagggc 1200
acacagctcg gcctgcgctt ggggaccttc cccaagacct acggcgagtc cgtgggcagc 1260
gggtgcgca tgatccagcg cgcgaaggaa ggcgaggcaa acccgagct ggtcaacacg 1320
ctgaacagca tcttcgaaca ggtggcctcg gccaggaga tcaacctatc cgcgggcaac 1380
gtgatgctat ccggcatccc ggaagccgag cagggcgcgc tggcctgggc actcaagcag 1440
atgaagatgg gcatcgaccc agctcaagct ctgcgcgagt tttagcgcaa cgcgaagtc 1500
gtgaagcaga tggacgagtt cgagaaaggc cagaacacca aggcattcaa ggacaacctc 1560
ggtaagcagg tcaacgacaa gtctgtgaac aacatcttcg gtcagacctg gaacatgtg 1620
accggcgaga gcgacctgag caacaacgag gccgtcttga gcatgtatcg ccgggcgacc 1680
atcgacgagg cgaactgget ggccagcgac cgaagcatg cgggtctgct caccagcgac 1740
acgggcccgc aggccttget ggagatcgcc gccccaacg tgcgtaaccg caccatccag 1800
gtaggcgaag gtgcgaacct gaaggaaggg gacctattca gccgcgcga tagcgcgccg 1860
ctgactctgc ctgcggcac caccgcgag cagctattcg ggaccaacga caccgagacc 1920
atcggaaccg tcttggcga gcagcacaag ccgatgtcga aaggactcct cggctacaag 1980

```

```

tcggtagtcg ccttcgagta cgaccgcacc agtggcagcc tectcgccgt cgagtagcac 2040
gagaacgggtg tggccctgga ccgcacgcgg gttgatcccc aggcagtcgg caacgaggtg 2100
ctcaagcgca acgcggataa gctgaatgcg atgcggggcg ccgagtaggg tgccaacgtc 2160
aaggtcagcg gcacggacat tcgcatgaac gggggtaaca gtgccggcat gctgaagcag 2220
gacgtgttca actggcggaa ggaactggct cagttcgagg cttaccgagg ggaggcgtat 2280
aaggatgcgg atggttatag tgtgggcctg gggcattacc tgggcagtgg caatgetggg 2340
gcaggtacta cagtcacgcc tgagcaagcc gcgcagtggg tcgccgagga caccgaccgc 2400
gcactcgacc aggggtgtgag gttggccgac gagctgggcg ttacgaacaa tgcctctatc 2460
ctgggattgg ccggtatggc cttccagatg ggccaaggac gtgcccgcca gttccgtaac 2520
acettccagg cgatcaagga tcgcaacaag gaagccttcg aggettggtg gcgaaacagc 2580
aagtggtaga cgcagacgcc caccggggcc gaggcattca tcaagcgcat ggcgcccccac 2640
ttcgatacac cgagtcaaat cgggtgtgat tggtagcgcg ccgcaacagc ggagtaa 2697

```

<210> 2

<211> 898

<212> PRT

<213> 假单胞菌噬菌体P134

<220>

<223> 假单胞菌噬菌体P134 GP36, 包含C-末端溶菌酶结构域的
假单胞菌噬菌体phiKMV ORF36结构蛋白的同系物

<220>

<221> DOMAIN

<222> (683)... (898)

<223> GP36胞壁质水解片段结构域片段

<220>

<221> DOMAIN

<222> (736)... (875)

<223> 24Kda构建体中的GP36催化结构域(CD)

[0002]

<400> 2

```

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

```

[0003]

```

225          230          235          240
Gly Met Gln Phe Leu Ala Ala Ser Leu Asp Met Asn Gln Arg Gly Ile
          245          250          255
Tyr Glu Gly Leu Arg Asp Ala Gly Phe Leu Asp Ser Met Ser Phe Asp
          260          265          270
Asp Arg Arg Ala Leu Asn Gly Leu Tyr Glu Lys Ser Lys Ala Gln Thr
          275          280          285
Arg Ala Lys Glu Ser Met Ala Thr Leu Arg Ala Asp Ala Asp Phe Gln
          290          295          300
Gln Arg Val Ala Asn Gly Ala Ile Thr Asp Leu Ala Glu Val Glu Ala
305          310          315          320
Tyr Ser Arg Gly Met Val Glu Glu Gly Arg Trp Ser Asp Ala Gln Ala
          325          330          335
Ile Ser Phe Met Thr Lys Ala Met Thr Gly Leu Gly Asn Ala Gln Arg
          340          345          350
Met Gln Gly Ile Met Ala Ala Leu Glu Ala Gly Asp Ile Asn Ala Leu
          355          360          365
His Thr Leu Gly Thr Asn Val Thr Glu Ala Leu Glu Gln Trp Asp Lys
          370          375          380
Met Gln Ala Ala Asn Gly Ser Ser Leu Thr Asp Arg Leu Val Gln Gly
385          390          395          400
Thr Gln Leu Gly Leu Arg Leu Gly Thr Phe Pro Lys Thr Tyr Gly Glu
          405          410          415
Ser Val Gly Ser Ala Val Arg Met Ile Gln Ala Ala Lys Glu Gly Glu
          420          425          430
Ala Asn Pro Glu Leu Val Asn Thr Leu Asn Ser Ile Phe Glu Gln Val
          435          440          445
Ala Ser Ala Gln Glu Ile Asn Pro Ser Ala Gly Asn Val Met Leu Ser
          450          455          460
Gly Ile Pro Glu Ala Glu Gln Gly Ala Val Ala Trp Ala Leu Lys Gln
465          470          475          480
Met Lys Met Gly Ile Ala Pro Ala Gln Ala Leu Arg Glu Phe Ser Ala
          485          490          495
Asn Ala Glu Val Val Lys Gln Met Asp Glu Phe Glu Lys Gly Gln Asn
          500          505          510
Thr Lys Ala Phe Lys Asp Asn Leu Gly Lys Gln Val Asn Asp Lys Phe
          515          520          525
Val Asn Asn Ile Phe Gly Arg Ala Trp Asn Met Leu Thr Gly Glu Ser
          530          535          540
Asp Leu Ser Asn Asn Glu Ala Val Leu Ser Met Tyr Arg Arg Ala Thr
545          550          555          560
Ile Asp Glu Ala Asn Trp Leu Ala Ser Asp Arg Lys His Ala Gly Leu
          565          570          575
Leu Thr Ser Asp Thr Gly Arg Glu Ala Leu Leu Glu Ile Ala Ala Ala
          580          585          590
Asn Val Arg Asn Arg Thr Ile Gln Val Gly Glu Gly Arg Asn Leu Lys
          595          600          605
Glu Gly Asp Leu Phe Ser Arg Asp Ser Ala Pro Leu Ile Leu Pro
          610          615          620
Arg Gly Thr Thr Ala Glu Gln Leu Phe Gly Thr Asn Asp Thr Glu Thr
625          630          635          640
Ile Gly Thr Val Leu Ala Glu Gln His Lys Pro His Val Glu Gly Leu
          645          650          655
Leu Gly Tyr Lys Ser Val Val Ala Phe Glu Tyr Asp Arg Thr Ser Gly
          660          665          670
Ser Leu Leu Ala Val Glu Tyr Asp Glu Asn Gly Val Ala Leu Asp Arg
          675          680          685
Thr Arg Val Asp Pro Gln Ala Val Gly Asn Glu Val Leu Lys Arg Asn
          690          695          700
Ala Asp Lys Leu Asn Ala Met Arg Gly Ala Glu Tyr Gly Ala Asn Val
705          710          715          720
Lys Val Ser Gly Thr Asp Ile Arg Met Asn Gly Gly Asn Ser Ala Gly

```

```

          725          730          735
Met Leu Lys Gln Asp Val Phe Asn Trp Arg Lys Glu Leu Ala Gln Phe
          740          745          750
Glu Ala Tyr Arg Gly Glu Ala Tyr Lys Asp Ala Asp Gly Tyr Ser Val
          755          760          765
Gly Leu Gly His Tyr Leu Gly Ser Gly Asn Ala Gly Ala Gly Thr Thr
          770          775          780
Val Thr Pro Glu Gln Ala Ala Gln Trp Phe Ala Glu Asp Thr Asp Arg
          785          790          795          800
Ala Leu Asp Gln Gly Val Arg Leu Ala Asp Glu Leu Gly Val Thr Asn
          805          810          815
Asn Ala Ser Ile Leu Gly Leu Ala Gly Met Ala Phe Gln Met Gly Glu
          820          825          830
Gly Arg Ala Arg Gln Phe Arg Asn Thr Phe Gln Ala Ile Lys Asp Arg
          835          840          845
Asn Lys Glu Ala Phe Glu Ala Gly Val Arg Asn Ser Lys Trp Tyr Thr
          850          855          860
Gln Thr Pro Thr Gly Ala Glu Ala Phe Ile Lys Arg Met Ala Pro His
          865          870          875          880
Phe Asp Thr Pro Ser Gln Ile Gly Val Asp Trp Tyr Ser Ala Ala Thr
          885          890          895
Ala Glu

```

<210> 3
 <211> 1493
 <212> DNA
 <213> 智人(Homo sapiens)

[0004] <220>
 <223> 人FLJ96367 cDNA, 类似于
 杀菌/渗透性增强蛋白(BPI)

```

<400> 3
aggectttag gttttggcag ctctggagga tgagagagaa catggccagg ggccttgc 60
acgcgccgag atgggcgtcc ctgatgggtc tggcgcgat aggcaccgcc gtgacagcgg 120
ccgtcaaccc tggcgtcgtg gtcaggatct cccagaaggg cctggactac gccagccagc 180
agggggacgc cgtctcgcag aaggagctga agaggatcaa gattcctgac tactcagaca 240
gctttaagat caagcatctt gggaaggggc attatagctt ctacagcatg gacatccgtg 300
aattccagct tcccagttcc cagataagca tggtgcccaa tgtgggcctt aagttctcca 360
tcagcaacgc caatatcaag atcagcggga aatggaaggg acaaaagaga ttcttaaaaa 420
tgagcggcaa ttttgacctg agcatagaag gcatgtccat ttcggctgat ctgaagctgg 480
gcagtaaccc cagtcaggc aagcccacca tcacctgctc cagctgcagc agccacatca 540
acagtgtcca cgtgcacatc tcaaagagca aagtggggtg gctgatccaa ctcttcacca 600
aaaaaattga gtctgcgtt cgaacaaga tgaacagcca ggtctgcgag aaagtgacca 660
attctgtatc ctccgagctg caaccttatt tcagactct gccagtaatg accaaaatag 720
attctgtggc tggaatcaac tatggtctgg tggcacctcc agcaaccacg gctgagaccc 780
tggtgttaca gatgaagggg gagttttaca gtgagaacca ccacaatcca cctcccttgg 840
ctccaccagt gatggagttt cccgtgccc atgaccgcat ggtataacct ggcctctcag 900
actacttctt caacacagcc gggttgtat accaagaggc tgggggtctg aagatgaccc 960
ttagagatga catgattcca aaggagtcca aatttcgact gacaaccaag ttctttggaa 1020
ccttctacc tgaggtggcc aagaagttc ccaacatgaa gatacagatc catgtctcag 1080
cctccacccc gccacacctg tctgtgcagc ccaccggcct taccttctac cctgcgctgg 1140
atgtccaggc ctttgcgtc ctcccaact cctccctggc ttccctcttc ctgattggca 1200
tgcacacaac tggttccatg gaggtcagcg ccgagtcgga caggettgtt ggagagctca 1260
agetggatag gctgctcctg gaactgaagc actcaaatat tggccccttc ccggttgaat 1320
tctgtctgga tatcatgaac tacattgtac ccattcttgt gctgccaggg gttaacgaga 1380
aactacagaa aggttccct ctcccgacgc cggccagagt ccagctctac aacgtagtgc 1440
ttcagctca ccagaacttc ctgtgttctg gtgcagaagt tgtctataaa tga 1493

```

<210> 4
 <211> 487

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<223> 人FLJ96367, 类似于
杀菌/渗透性增强蛋白(BPI)

<220>

<221> DOMAIN

<222> (16)... (39)

<223> 跨膜结构域(TMD)

<400> 4

[0005]

```

Met Arg Glu Asn Met Ala Arg Gly Pro Cys Asn Ala Pro Arg Trp Ala
 1           5           10           15
Ser Leu Met Val Leu Val Ala Ile Gly Thr Ala Val Thr Ala Ala Val
          20           25           30
Asn Pro Gly Val Val Val Arg Ile Ser Gln Lys Gly Leu Asp Tyr Ala
          35           40           45
Ser Gln Gln Gly Thr Ala Ala Leu Gln Lys Glu Leu Lys Arg Ile Lys
          50           55           60
Ile Pro Asp Tyr Ser Asp Ser Phe Lys Ile Lys His Leu Gly Lys Gly
65           70           75           80
His Tyr Ser Phe Tyr Ser Met Asp Ile Arg Glu Phe Gln Leu Pro Ser
          85           90           95
Ser Gln Ile Ser Met Val Pro Asn Val Gly Leu Lys Phe Ser Ile Ser
          100          105          110
Asn Ala Asn Ile Lys Ile Ser Gly Lys Trp Lys Ala Gln Lys Arg Phe
          115          120          125
Leu Lys Met Ser Gly Asn Phe Asp Leu Ser Ile Glu Gly Met Ser Ile
130          135          140
Ser Ala Asp Leu Lys Leu Gly Ser Asn Pro Thr Ser Gly Lys Pro Thr
145          150          155          160
Ile Thr Cys Ser Ser Cys Ser Ser His Ile Asn Ser Val His Val His
          165          170          175
Ile Ser Lys Ser Lys Val Gly Trp Leu Ile Gln Leu Phe His Lys Lys
          180          185          190
Ile Glu Ser Ala Leu Arg Asn Lys Met Asn Ser Gln Val Cys Glu Lys
          195          200          205
Val Thr Asn Ser Val Ser Ser Glu Leu Gln Pro Tyr Phe Gln Thr Leu
          210          215          220
Pro Val Met Thr Lys Ile Asp Ser Val Ala Gly Ile Asn Tyr Gly Leu
225          230          235          240
Val Ala Pro Pro Ala Thr Thr Ala Glu Thr Leu Asp Val Gln Met Lys
          245          250          255
Gly Glu Phe Tyr Ser Glu Asn His His Asn Pro Pro Pro Phe Ala Pro
          260          265          270
Pro Val Met Glu Phe Pro Ala Ala His Asp Arg Met Val Tyr Leu Gly
          275          280          285
Leu Ser Asp Tyr Phe Phe Asn Thr Ala Gly Leu Val Tyr Gln Glu Ala
          290          295          300
Gly Val Leu Lys Met Thr Leu Arg Asp Asp Met Ile Pro Lys Glu Ser
305          310          315          320
Lys Phe Arg Leu Thr Thr Lys Phe Phe Gly Thr Phe Leu Pro Glu Val
          325          330          335
Ala Lys Lys Phe Pro Asn Met Lys Ile Gln Ile His Val Ser Ala Ser
          340          345          350
Thr Pro Pro His Leu Ser Val Gln Pro Thr Gly Leu Thr Phe Tyr Pro
          355          360          365
Ala Val Asp Val Gln Ala Phe Ala Val Leu Pro Asn Ser Ser Leu Ala
          370          375          380
Ser Leu Phe Leu Ile Gly Met His Thr Thr Gly Ser Met Glu Val Ser

```

```

385          390          395          400
Ala Glu Ser Asp Arg Leu Val Gly Glu Leu Lys Leu Asp Arg Leu Leu
          405          410          415
Leu Glu Leu Lys His Ser Asn Ile Gly Pro Phe Pro Val Glu Leu Leu
          420          425          430
Leu Asp Ile Met Asn Tyr Ile Val Pro Ile Leu Val Leu Pro Arg Val
          435          440          445
Asn Glu Lys Leu Gln Lys Gly Phe Pro Leu Pro Thr Pro Ala Arg Val
          450          455          460
Gln Leu Tyr Asn Val Val Leu Gln Pro His Gln Asn Phe Leu Leu Phe
465          470          475          480
Gly Ala Asp Val Val Tyr Lys
          485

```

<210> 5
 <211> 654
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的假单胞菌噬菌体P134 GP36催化结构域(CD),
 24Kda构建体, 最初的CHC13测试构建体

[0006]

```

<400> 5
atgggtgtgg ccctggaccg cacgcggggtt gatccccagg cagtcggcaa cgaggtgctc 60
aagcgcaacg cggataagct gaatgcgatg cggggcgccg agtacgggtc caacgtcaag 120
gtcagcggca cggacattcg catgaacggg ggtaacagtg ccggcatgct gaagcaggac 180
gtgttcaact ggcggaagga actggctcag ttcgaggett accgagggga ggcgtataag 240
gatgccgatg gttatagtgt gggcctgggg cattacctgg gcagtggcaa tgctggggca 300
ggtactacag tcacgcctga gcaagccgcg cagtgggttc ccgaggacac cgaccgcgca 360
ctcgaccagg gtgtgagggt ggcgcacgag ctgggcgtta cgaacaatgc ctctatcctg 420
ggattggccg gtatggcctt ccagatgggc gaaggacgtg cccggcagtt ccgtaacacc 480
ttccaggcga tcaaggatcg caacaaggaa gccttcgagg ctggtgtgcg aaacagcaag 540
tggtacacgc agacgcccac cggggccgag gcattcatca agegcattgc gcccacctic 600
gatacaccga gtcaaatcgg tgcgattgg tacagcgccg caacagcgga gtaa 654

```

<210> 6
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的假单胞菌噬菌体P134 GP36催化结构域(CD),
 24Kda构建体, 最初的CHC13测试构建体

<220>
 <221> DOMAIN
 <222> (56)... (194)
 <223> 假单胞菌噬菌体P134 GP36催化结构域(CD)

```

<400> 6
Met Gly Val Ala Leu Asp Arg Thr Arg Val Asp Pro Gln Ala Val Gly
 1          5          10          15
Asn Glu Val Leu Lys Arg Asn Ala Asp Lys Leu Asn Ala Met Arg Gly
          20          25          30
Ala Glu Tyr Gly Ala Asn Val Lys Val Ser Gly Thr Asp Ile Arg Met
          35          40          45
Asn Gly Gly Asn Ser Ala Gly Met Leu Lys Gln Asp Val Phe Asn Trp
          50          55          60
Arg Lys Glu Leu Ala Gln Phe Glu Ala Tyr Arg Gly Glu Ala Tyr Lys
65          70          75          80

```

```

Asp Ala Asp Gly Tyr Ser Val Gly Leu Gly His Tyr Leu Gly Ser Gly
      85                      90                      95
Asn Ala Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Pro Glu Gln Ala Ala Gln Trp
      100                    105                    110
Phe Ala Glu Asp Thr Asp Arg Ala Leu Asp Gln Gly Val Arg Leu Ala
      115                    120                    125
Asp Glu Leu Gly Val Thr Asn Asn Ala Ser Ile Leu Gly Leu Ala Gly
      130                    135                    140
Met Ala Phe Gln Met Gly Glu Gly Arg Ala Arg Gln Phe Arg Asn Thr
      145                    150                    155                    160
Phe Gln Ala Ile Lys Asp Arg Asn Lys Glu Ala Phe Glu Ala Gly Val
      165                    170                    175
Arg Asn Ser Lys Trp Tyr Thr Gln Thr Pro Thr Gly Ala Glu Ala Phe
      180                    185                    190
Ile Lys Arg Met Ala Pro His Phe Asp Thr Pro Ser Gln Ile Gly Val
      195                    200                    205
Asp Trp Tyr Ser Ala Ala Thr Ala Glu
      210                    215

```

<210> 7
 <211> 230
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的假单胞菌噬菌体P134 GP36催化结构域(CD),
 24Kda构建体, 具有13个aa的C-末端延伸的最初的CHC13测试结构域

[0007] <220>
 <221> DOMAIN
 <222> (56)... (194)
 <223> 假单胞菌噬菌体P134 GP36催化结构域(CD)

<220>
 <221> DOMAIN
 <222> (218)... (230)
 <223> 具有用于纯化的6xHis标签的13个aa的C-末端延伸

```

<400> 7
Met Gly Val Ala Leu Asp Arg Thr Arg Val Asp Pro Gln Ala Val Gly
  1                      5                      10                      15
Asn Glu Val Leu Lys Arg Asn Ala Asp Lys Leu Asn Ala Met Arg Gly
      20                    25                    30
Ala Glu Tyr Gly Ala Asn Val Lys Val Ser Gly Thr Asp Ile Arg Met
      35                    40                    45
Asn Gly Gly Asn Ser Ala Gly Met Leu Lys Gln Asp Val Phe Asn Trp
      50                    55                    60
Arg Lys Glu Leu Ala Gln Phe Glu Ala Tyr Arg Gly Glu Ala Tyr Lys
      65                    70                    75                    80
Asp Ala Asp Gly Tyr Ser Val Gly Leu Gly His Tyr Leu Gly Ser Gly
      85                      90                      95
Asn Ala Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Pro Glu Gln Ala Ala Gln Trp
      100                    105                    110
Phe Ala Glu Asp Thr Asp Arg Ala Leu Asp Gln Gly Val Arg Leu Ala
      115                    120                    125
Asp Glu Leu Gly Val Thr Asn Asn Ala Ser Ile Leu Gly Leu Ala Gly
      130                    135                    140
Met Ala Phe Gln Met Gly Glu Gly Arg Ala Arg Gln Phe Arg Asn Thr
      145                    150                    155                    160
Phe Gln Ala Ile Lys Asp Arg Asn Lys Glu Ala Phe Glu Ala Gly Val
      165                    170                    175

```

```

Arg Asn Ser Lys Trp Tyr Thr Gln Thr Pro Thr Gly Ala Glu Ala Phe
      180      185      190
Ile Lys Arg Met Ala Pro His Phe Asp Thr Pro Ser Gln Ile Gly Val
      195      200      205
Asp Trp Tyr Ser Ala Ala Thr Ala Glu Lys Leu Ala Ala Ala Leu Glu
      210      215      220
His His His His His His
      225      230

```

<210> 8
 <211> 807
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的嵌合P225构建体, 连接至BPI片段的GP36片段,
 载体序列-GP36胞壁质水解结构域-RRR-BPI TMD-RRR

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)... (66)
 <223> 部分1的包含用于纯化的聚His的N-末端延伸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (67)... (714)
 <223> 部分2的GP36胞壁质水解片段结构域片段

[0008] <220>
 <221> misc_feature
 <222> (715)... (804)
 <223> 部分3的包含具有RRR C-末端的BPI TMD结构域片段的连接臂(RRR)

```

<400> 8
atgggccatc atcatcatca tcatcatcat catcacagca ggggccatat cgaaggtegt 60
catatgggtg tggccttga cgcacgcgg gttgatcccc aggcagtcgg caacgaggtg 120
ctcaagcgca acgcggataa gctgaatgcg atgcggggcg ccgagtacgg tgccaacgtc 180
aaggtcagcg gcacggacat tcgcatgaac gggggtaaca gtgccggcat gctgaagcag 240
gacgtgttca actggcggaa ggaactggct cagttcgagg cttaccgagg ggagcggtat 300
aaggatgccg atggttatag tgtggcctg gggcattacc tgggcagtgg caatgctggg 360
gcaggtacta cagtcacgcc tgagcaagcc gcgcagtggt tcgccgagga caccgaccgc 420
gcactegacc aggggtgtgag gttgcccgc gagctgggcg ttacgaacaa tgctctate 480
ctgggatitg ccggtatggc cttccagatg ggccaaggac gtgcccgcca gtcccgtaac 540
accttcagc cgatcaagga tcgcaacaag gaagccttcg aggctggtgt gcgaaacage 600
aagtgttaca cgcagacgcc caccggggcc gaggcattca tcaagcgcgt ggcgccccac 660
ttcgatacac cgagtcacaa cggtgtcgat tggtaacagc ccgcaacage ggagcgcgt 720
cgcgcgtccc tgatgtgtct ggtcgccata ggcaccgccg tgacagcggc cgtaaccct 780
ggcgtcgtgg tcaggcgccg tcgctaa 807

```

<210> 9
 <211> 268
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的嵌合P225构建体, 连接至BPI片段的GP36片段,
 载体序列-GP36胞壁质水解结构域-RRR-BPI TMD-RRR

<220>
 <221> DOMAIN
 <222> (1)... (22)

<223> 部分1的包含用于纯化的聚His的N-末端延伸

<220>

<221> DOMAIN

<222> (23)... (238)

<223> 部分2的GP36胞壁质水解片段结构域片段

<220>

<221> DOMAIN

<222> (239)... (268)

<223> 部分3的包含具有RRR C-末端的BPI TMD结构域片段的连接臂(RRR)

<400> 9

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

[0009]

<210> 10

<211> 765

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的嵌合P266构建体, 连接至BPI MTD片段的GP36片段
P225变体, 6xHis标签-GP36 CD-RRR-BPI TMD-RRR, 载体
序列-his6-GP36胞壁质水解结构域-RRR-BPI TMD-RRR

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)... (6)

<223> 由于克隆酶(NheI)位点产生的起始密码子和碱基

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)... (24)

<223> 6xHis标签

<220>

<221> misc_feature

<222> (25)... (672)

<223> GP36催化(胞壁质水解)结构域(CD)

<220>

<221> misc_feature

<222> (673)... (681)

<223> 连接臂精氨酸(RRR)

<220>

<221> misc_feature

<222> (682)... (753)

<223> BPI MTD

<220>

<221> misc_feature

<222> (754)... (762)

<223> N-末端精氨酸(RRR)

<220>

<221> misc_feature

<222> (763)... (765)

[0010]

<223> 终止密码子

<400> 10

```
atgggccatc atcateatca tcatgggtga getcttgatc gcacgcgggt tgatccccag 60
gcagtcggca acgaggtget caagegcaac geggataage tgaatgegat gegggegece 120
gagtacgggt ccaacgtcaa ggtcagcggc acggacattc gcataaacgg gggtaacagt 180
gccggcatgc tgaagcagga cgtgttcaac tggcgggaagg aactggctca gttegagget 240
taccgagggg aggcgtataa ggatgccgat ggttatagtg tgggcctggg gcattacctg 300
ggcagtggca atgetggggc aggtactaca gtcacgcctg agcaagccgc gcagtgggtc 360
gccgaggaca ccgaccgcgc actcgaccag ggtgtgaggt tggccgacga gctgggcgtt 420
acgaacaatg cctctatcct gggattggcc ggtatggcct tccagatggg cgaaggacgt 480
gcccggcagt tccgtaaac cttccaggcg atcaaggate gcaacaagga agccttcgag 540
gctggtgtgc gaaacagcaa gtggtacacg cagacgccc accgggccga ggcattcatc 600
aagcgcattg cgcceactt cgataaccc agtcaaatcg gtgtcgattg gtacagegce 660
gcaacagegg agcgccgtcg cgcgtccctg atggtgctgg tcgcatagg caccgccgtg 720
acagcggccg tcaacctgg cgtegtggc aggcgccgtc gctga 765
```

<210> 11

<211> 254

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的嵌合P266构建体, 连接至BPI MTD片段的GP36片段
P225变体, 6xHis标签-GP36 CD-RRR-BPI TMD-RRR, 载体
序列-his6-GP36胞壁质水解结构域-RRR-BPI TMD-RRR

<220>

<221> SITE

<222> (1)... (2)

<223> 由于克隆酶(NheI)位点产生的起始密码子和氨基酸

<220>
 <221> DOMAIN
 <222> (3)... (8)
 <223> 6xHis标签

<220>
 <221> DOMAIN
 <222> (9)... (224)
 <223> GP36催化(胞壁质水解)结构域(CD)

<220>
 <221> DOMAIN
 <222> (225)... (227)
 <223> 连接臂精氨酸(RRR)

<220>
 <221> DOMAIN
 <222> (228)... (251)
 <223> BPI MTD

<220>
 <221> DOMAIN
 <222> (252)... (254)
 <223> N-末端精氨酸(RRR)

<400> 11
 Met Gly His His His His His His Gly Val Ala Leu Asp Arg Thr Arg
 1 5 10 15
 Val Asp Pro Gln Ala Val Gly Asn Glu Val Leu Lys Arg Asn Ala Asp
 20 25 30
 [0011] Lys Leu Asn Ala Met Arg Gly Ala Glu Tyr Gly Ala Asn Val Lys Val
 35 40 45
 Ser Gly Thr Asp Ile Arg Met Asn Gly Gly Asn Ser Ala Gly Met Leu
 50 55 60
 Lys Gln Asp Val Phe Asn Trp Arg Lys Glu Leu Ala Gln Phe Glu Ala
 65 70 75 80
 Tyr Arg Gly Glu Ala Tyr Lys Asp Ala Asp Gly Tyr Ser Val Gly Leu
 85 90 95
 Gly His Tyr Leu Gly Ser Gly Asn Ala Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr
 100 105 110
 Pro Glu Gln Ala Ala Gln Trp Phe Ala Glu Asp Thr Asp Arg Ala Leu
 115 120 125
 Asp Gln Gly Val Arg Leu Ala Asp Glu Leu Gly Val Thr Asn Asn Ala
 130 135 140
 Ser Ile Leu Gly Leu Ala Gly Met Ala Phe Gln Met Gly Glu Gly Arg
 145 150 155 160
 Ala Arg Gln Phe Arg Asn Thr Phe Gln Ala Ile Lys Asp Arg Asn Lys
 165 170 175
 Glu Ala Phe Glu Ala Gly Val Arg Asn Ser Lys Trp Tyr Thr Gln Thr
 180 185 190
 Pro Thr Gly Ala Glu Ala Phe Ile Lys Arg Met Ala Pro His Phe Asp
 195 200 205
 Thr Pro Ser Gln Ile Gly Val Asp Trp Tyr Ser Ala Ala Thr Ala Glu
 210 215 220
 Arg Arg Arg Ala Ser Leu Met Val Leu Val Ala Ile Gly Thr Ala Val
 225 230 235 240
 Thr Ala Ala Val Asn Pro Gly Val Val Val Arg Arg Arg Arg
 245 250

<210> 12
 <211> 765

<212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的嵌合P275构建体, 可溶的P266变体, 具有V232E, V234D和I236K的BPI结构域

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)... (6)
 <223> 由于克隆酶(NheI)位点产生的起始密码子和碱基

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)... (24)
 <223> 6xHis标签

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)... (672)
 <223> GP36催化(胞壁质水解)结构域(CD)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (673)... (681)
 <223> 连接臂精氨酸(RRR)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (682)... (753)
 <223> BPI MTD

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (754)... (762)
 <223> N-末端臂精氨酸(RRR)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (763)... (765)
 <223> 终止密码子

<400> 12
 atgggccatc atcatcatca tcatggtgta gctcttgatc gcacgcggtg tgateccccag 60
 gcagtcggca acgaggtget caagcgcaac gcggataagc tgaatgcgat gcggggcgcc 120
 gagtacggtg ccaacgtcaa ggtcagcggc acggacatc gcattgaacgg gggtaacagt 180
 gccggcatgc tgaagcagga cgtgttcaac tggcggaagg aactggctca gttcgagget 240
 taaccgagggg aggcgtataa ggatgccgat gggttatagt tgggcctggg gcattacctg 300
 ggcagtggea atgetggggc aggtactaca gtcacgctg agcaagccgc gcagtggttc 360
 gccgaggaca ccgaccgcgc actcgaccag ggtgtgaggt tggccgacga gctgggcggt 420
 acgaacaatg cctctatcct gggattggcc ggtatggcct tccagatggg cgaaggacgt 480
 gcccggcagt tccgtaacac ctccagggc atcaaggatc gcaacaagga agccttcgag 540
 gctggtgtgc gaaacagcaa gtggtacacg cagacgcca accgggcccga ggcattcatc 600
 aagcgcatgg cgcgccactt cgatacccg agtcaaatcg gtgtcgattg gtacagegcc 660
 gcaacagcgg agcgcgctcg cgcgtccctg atggagctgg acgcaaaagg caccgccgtg 720
 acagcgcccg tcaacctgg cgtcgtgggc aggcgcgctc gctga 765

<210> 13
 <211> 254
 <212> PRT
 <213> 人工序列

- <220>
 <223> 合成的嵌合P275构建体, 可溶的P266变体, 具有V232E, V234D和I236K的BPI结构域

 <220>
 <221> SITE
 <222> (1)... (2)
 <223> 由于克隆酶(NheI)位点产生的起始密码子和氨基酸

 <220>
 <221> DOMAIN
 <222> (3)... (8)
 <223> 6xHis标签

 <220>
 <221> DOMAIN
 <222> (9)... (224)
 <223> GP36催化(胞壁质水解)结构域(CD)

 <220>
 <221> DOMAIN
 <222> (225)... (227)
 <223> 连接臂精氨酸(RRR)

 <220>
 <221> DOMAIN
 <222> (228)... (251)
 <223> BPI MTD

 <220>
 <221> DOMAIN
 <222> (252)... (254)
 <223> N-末端臂精氨酸(RRR)

[0013]

<400> 13
 Met Gly His His His His His Gly Val Ala Leu Asp Arg Thr Arg
 1 5 10 15
 Val Asp Pro Gln Ala Val Gly Asn Glu Val Leu Lys Arg Asn Ala Asp
 20 25 30
 Lys Leu Asn Ala Met Arg Gly Ala Glu Tyr Gly Ala Asn Val Lys Val
 35 40 45
 Ser Gly Thr Asp Ile Arg Met Asn Gly Gly Asn Ser Ala Gly Met Leu
 50 55 60
 Lys Gln Asp Val Phe Asn Trp Arg Lys Glu Leu Ala Gln Phe Glu Ala
 65 70 75 80
 Tyr Arg Gly Glu Ala Tyr Lys Asp Ala Asp Gly Tyr Ser Val Gly Leu
 85 90 95
 Gly His Tyr Leu Gly Ser Gly Asn Ala Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr
 100 105 110
 Pro Glu Gln Ala Ala Gln Trp Phe Ala Glu Asp Thr Asp Arg Ala Leu
 115 120 125
 Asp Gln Gly Val Arg Leu Ala Asp Glu Leu Gly Val Thr Asn Asn Ala
 130 135 140
 Ser Ile Leu Gly Leu Ala Gly Met Ala Phe Gln Met Gly Glu Gly Arg
 145 150 155 160
 Ala Arg Gln Phe Arg Asn Thr Phe Gln Ala Ile Lys Asp Arg Asn Lys
 165 170 175
 Glu Ala Phe Glu Ala Gly Val Arg Asn Ser Lys Trp Tyr Thr Gln Thr
 180 185 190
 Pro Thr Gly Ala Glu Ala Phe Ile Lys Arg Met Ala Pro His Phe Asp
 195 200 205
 Thr Pro Ser Gln Ile Gly Val Asp Trp Tyr Ser Ala Ala Thr Ala Glu

210	215	220
Arg Arg Arg Ala Ser Leu Met Glu Leu Asp Ala Lys Gly Thr Ala Val		
225	230	235
Thr Ala Ala Val Asn Pro Gly Val Val Val Arg Arg Arg Arg		240
	245	250

<210> 14
 <211> 804
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的嵌合GP36 MD-P134穿孔素MTD构建体,
 GP36CD-RRR-P134穿孔素TMD-RRR,
 10xHis-GP36 CD-RRR-P134穿孔素MTD-RRR

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)... (66)
 <223> 载体-10xHis

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (67)... (714)
 <223> GP36胞壁质水解结构域

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (715)... (723)
 <223> RRR连接臂

[0014]

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (724)... (792)
 <223> P134穿孔素MTD

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (793)... (801)
 <223> C-末端RRR

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (802)... (804)
 <223> 终止密码子

<400> 14
 atgggccate atcatcatea tcatcatcat catcacagea ggggccatat cgaaggtegt 60
 catatgggtg tgccctgga ccgcaecgg gtigateccc aggcagtcgg caacgaggtg 120
 ctcaagcgca acgcgataa gctgaatgcg atgcggggcg ccgagtacgg tgccaacgtc 180
 aaggtcagcg gcacggacat legcalgaac gggggtaaca glgccggcat gctgaagcag 240
 gacgtgttca acfggcgga ggaactgget cagttcgagg ettaccgagg ggaggcgtat 300
 aaggatgccg atggttatag tgtgggectg gggcattacc tgggcagtgg caatgctggg 360
 gcaggtacta cagtcacgcc tgagcaagcc gcgcagtgtg tegccgagga caccgaccgc 420
 geactcgacc aggtgtgag gttggcggac gagetgggcg ttacgaacaa tgctetate 480
 ctgggattgg ceggtatggc ctccagatg ggcaaggac gtgcccgga gttccgtaac 540
 accttcagg cgatcaanga tcgaacaag gaagccttcg aggetggtgt gcgaacacgc 600
 aagtgttaca cgcagacgcc caccggggcc gaggcattca tcaagcgcac ggcgccccac 660
 ttcgatacac cgagtcaaat cgggtgctgat tggtagcgc ccgcaacagc ggagcgccgt 720
 cgcgagatcg ccagcctctg tctgcggta ctaccgcgc tctacgtggg cgccagctc 780
 atcacctgc tccgcgtgc ctga 804

<210> 15
 <211> 267
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的嵌合GP36 MD-P134穿孔素MTD构建体,
 GP36CD-RRR-P134穿孔素TMD-RRR,
 10xHis-GP36 CD-RRR-P134穿孔素MTD-RRR

<220>
 <221> DOMAIN
 <222> (1)... (22)
 <223> 载体-10xHis

<220>
 <221> DOMAIN
 <222> (23)... (238)
 <223> GP36胞壁质水解结构域

<220>
 <221> DOMAIN
 <222> (239)... (241)
 <223> RRR连接臂

<220>
 <221> DOMAIN
 <222> (242)... (264)
 <223> P134穿孔素MTD

[0015] <220>
 <221> DOMAIN
 <222> (265)... (267)
 <223> C-末端RRR

<400> 15
 Met Gly His His His His His His His His His His Ser Ser Gly His
 1 5 10 15
 Ile Glu Gly Arg His Met Gly Val Ala Leu Asp Arg Thr Arg Val Asp
 20 25 30
 Pro Gln Ala Val Gly Asn Glu Val Leu Lys Arg Asn Ala Asp Lys Leu
 35 40 45
 Asn Ala Met Arg Gly Ala Glu Tyr Gly Ala Asn Val Lys Val Ser Gly
 50 55 60
 Thr Asp Ile Arg Met Asn Gly Gly Asn Ser Ala Gly Met Leu Lys Gln
 65 70 75 80
 Asp Val Phe Asn Trp Arg Lys Glu Leu Ala Gln Phe Glu Ala Tyr Arg
 85 90 95
 Gly Glu Ala Tyr Lys Asp Ala Asp Gly Tyr Ser Val Gly Leu Gly His
 100 105 110
 Tyr Leu Gly Ser Gly Asn Ala Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Pro Glu
 115 120 125
 Gln Ala Ala Gln Trp Phe Ala Glu Asp Thr Asp Arg Ala Leu Asp Gln
 130 135 140
 Gly Val Arg Leu Ala Asp Glu Leu Gly Val Thr Asn Asn Ala Ser Ile
 145 150 155 160
 Leu Gly Leu Ala Gly Met Ala Phe Gln Met Gly Glu Gly Arg Ala Arg
 165 170 175
 Gln Phe Arg Asn Thr Phe Gln Ala Ile Lys Asp Arg Asn Lys Glu Ala
 180 185 190
 Phe Glu Ala Gly Val Arg Asn Ser Lys Trp Tyr Thr Gln Thr Pro Thr

<400> 16	atgggccatc	atcatcatca	tcatcatcat	catecacgea	gcggccatat	cgaaggtcgt	60
	cataatgggtg	tggccctgga	cgcacgcggg	gttgatcccc	aggcagtcgg	caacgaggtg	120
	ctcaagcgca	acgcggataa	tetgaatgcg	atgcggggcg	ccaggtacgg	tgccaacgtc	180
	aaggtcagcg	gcacggacat	gtcgatgaac	gggggtaaca	gtgcggcgat	gtcgaagcag	240
	gcagctgttca	actggcgaaa	ggaactgact	cggttcgagg	cttaccgagg	ggaggcgat	300

```

aaggatgccg atggttatag tgtgggcctg gggcattacc tgggcagtgg caatgctggg 360
gcaggtaacta cagtcacgcc tgagcaagcc gcgcagtggg tegccgagga caccgaccgc 420
gcactcgacc aggggtgtgag gttggccgac gagctgggcg ttacgaacaa tgcctctatc 480
ctgggatttg cgggtatggc cttccagatg ggccaaggac gtgcccgga gttccgtaac 540
accttccagg cgatcaagga tcgaacaag gaagccttcg aggctggtgt gcgaaacagc 600
aagtggtaaa cgcagacgcc caccggggcc gaggcattca tcaagcgcac ggcgccccac 660
ttcgataaac cgagtcacaa eggtgtcgat tggtaacagc ccgaacagc ggagcgccgt 720
cgctccgaact cctccatccg ggtccagggc cgttgggaagg tgcgcgcgtc attcttcaaa 780
ctgcagggct ctttcgatgt cagtgtcaag ggccgcgcgc gctga 825

```

<210> 17

<211> 274

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的嵌合GP36 MD-脂多糖结合蛋白MTD构建体,
GP36CD-RRR-LBP肽-RRR,
10xHis-GP36 CD-RRR-LPS BP肽-RRR

<220>

<221> SITE

<222> (1)... (1)

<223> 起始Met

<220>

<221> DOMAIN

<222> (2)... (22)

<223> 载体片段-10xHis

[0017]

<220>

<221> DOMAIN

<222> (23)... (238)

<223> GP36胞壁质水解结构域

<220>

<221> DOMAIN

<222> (239)... (241)

<223> RRR连接臂

<220>

<221> DOMAIN

<222> (242)... (271)

<223> LPS BP MTD

<220>

<221> DOMAIN

<222> (272)... (274)

<223> C-末端RRR

<400> 17

```

Met Gly His His His His His His His His His Ser Ser Gly His
1          5          10          15
Ile Glu Gly Arg His Met Gly Val Ala Leu Asp Arg Thr Arg Val Asp
20          25          30
Pro Gln Ala Val Gly Asn Glu Val Leu Lys Arg Asn Ala Asp Lys Leu
35          40          45
Asn Ala Met Arg Gly Ala Glu Tyr Gly Ala Asn Val Lys Val Ser Gly
50          55          60
Thr Asp Ile Arg Met Asn Gly Gly Asn Ser Ala Gly Met Leu Lys Gln
65          70          75          80
Asp Val Phe Asn Trp Arg Lys Glu Leu Ala Gln Phe Glu Ala Tyr Arg

```

```

      85      90      95
Gly Glu Ala Tyr Lys Asp Ala Asp Gly Tyr Ser Val Gly Leu Gly His
      100      105      110
Tyr Leu Gly Ser Gly Asn Ala Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Pro Glu
      115      120      125
Gln Ala Ala Gln Trp Phe Ala Glu Asp Thr Asp Arg Ala Leu Asp Gln
      130      135      140
Gly Val Arg Leu Ala Asp Glu Leu Gly Val Thr Asn Asn Ala Ser Ile
      145      150      155      160
Leu Gly Leu Ala Gly Met Ala Phe Gln Met Gly Glu Gly Arg Ala Arg
      165      170      175
Gln Phe Arg Asn Thr Phe Gln Ala Ile Lys Asp Arg Asn Lys Glu Ala
      180      185      190
Phe Glu Ala Gly Val Arg Asn Ser Lys Trp Tyr Thr Gln Thr Pro Thr
      195      200      205
Gly Ala Glu Ala Phe Ile Lys Arg Met Ala Pro His Phe Asp Thr Pro
      210      215      220
Ser Gln Ile Gly Val Asp Trp Tyr Ser Ala Ala Thr Ala Glu Arg Arg
      225      230      235      240
Arg Ser Asp Ser Ser Ile Arg Val Gln Gly Arg Trp Lys Val Arg Ala
      245      250      255
Ser Phe Phe Lys Leu Gln Gly Ser Phe Asp Val Ser Val Lys Gly Arg
      260      265      270
Arg Arg

```

<210> 18

<211> 1245

<212> DNA

<213> 人工序列

[0018]

<220>

<223> 合成的嵌合GP36 MD-T4噬菌体, gp5 β -螺旋MTD构建体,
GP36 CD-T4噬菌体 gp5 β -螺旋-LE-6xHis

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)... (3)

<223> 起始Met

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)... (651)

<223> GP36胞壁质水解结构域

<220>

<221> misc_feature

<222> (652)... (657)

<223> 通过限制酶位点HindIII产生的KL

<220>

<221> misc_feature

<222> (658)... (1218)

<223> T4噬菌体gp5 β -螺旋

<220>

<221> misc_feature

<222> (1219)... (1224)

<223> 通过限制酶位点XhoI产生的LE

<220>

<221> misc_feature

<222> (1225)... (1242)
 <223> 6xHis

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1243)... (1245)
 <223> 终止密码子

<400> 18
 atgggtgtgg ccctggaccg cacgcgggtt gatecccgagg cagtcggcaa cgagggtctc 60
 aagcgcaacg cggataagct gaatgcgatg cggggcgccg agtacgggtg caacgtcaag 120
 gtcagcggca cggacattcg catgaacggg ggtaacagtg ccggcatgct gaagcaggac 180
 gtgttcaact ggcggaagga actggctcag ttcgaggett accgagggga ggcgtataag 240
 gatgccgatg gttatagtgt gggcctgggg cattacctgg gcagtggcaa tgctggggca 300
 ggtactacag tcacgcctga gcaagcccg cagtggttcg ccgaggacac cgaccgcgca 360
 ctcgaccagg gtgtgagggt ggccgacgag ctgggcgtta cgaacaatgc ctctatcctg 420
 ggattggcgg gtatggcett ccagatgggc gaaggacgtg cccggcagti ccgtaacacc 480
 ttccaggcga tcaaggatcg caacaaggaa gccttcgagg ctgggtgtcg aaacagcaag 540
 tggtaacgc agacgcccaa ccgggcccag gcattcatca agcgcatggc gccccacttc 600
 gatacaccca gtcaaatcgg tgcgattgg tacagcgccg caacagcgga gaagctttat 660
 gtgcatacaa tggaaactga aagcggacat attcaggaat ttgatgatac cctggggcaa 720
 gaacgatata gattagtcca tccaactgga acttatgaag aagtatcacc atcaggaaga 780
 agaacaagaa aaactgttga taatttgtat gatataacca atgctgatgg taattttttg 840
 gtageccgtg ataaaaagac taacgtcggg ggttcagaaa ttattataaa catggataat 900
 cgtttacatc aaatcgatgg aagcaataca atatttgtac gtggagacga aacgaaaact 960
 gttgaaggta atggaactat cctagttaaa ggtaattgta ctattatagt tgaaggtaat 1020
 gctgacatta cagttaaagg agatgtacc actttagttg aaggaaatca aactaacaca 1080
 gtaaatggaa atctttcttg gaaagttgcc gggacagttg attgggatgt cgggtgtgat 1140
 tggacagaaa aaatggcatc tatgagttct atttcactcg gtcaatacac aattgatgga 1200
 tcgaggattg acattggcct cgagcaccac caccaccacc actaa 1245

[0019]

<210> 19
 <211> 414
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的嵌合GP36 MD-T4噬菌体, gp5 β -螺旋MTD构建体,
 GP36 CD-T4噬菌体 gp5 β -螺旋-LE-6xHis

<220>
 <221> SITE
 <222> (1)... (1)
 <223> 起始Met

<220>
 <221> DOMAIN
 <222> (2)... (217)
 <223> GP36胞壁质水解结构域

<220>
 <221> SITE
 <222> (218)... (219)
 <223> 通过限制酶位点HindIII产生的KL

<220>
 <221> DOMAIN
 <222> (220)... (406)
 <223> T4噬菌体gp5 β -螺旋

<220>
 <221> SITE

<222> (407)... (408)
 <223> 通过限制酶位点XhoI产生的LE

<220>
 <221> DOMAIN
 <222> (409)... (414)
 <223> 6xHis

<400> 19

[0020] Met Gly Val Ala Leu Asp Arg Thr Arg Val Asp Pro Gln Ala Val Gly
 1 5 10 15
 Asn Glu Val Leu Lys Arg Asn Ala Asp Lys Leu Asn Ala Met Arg Gly
 20 25 30
 Ala Glu Tyr Gly Ala Asn Val Lys Val Ser Gly Thr Asp Ile Arg Met
 35 40 45
 Asn Gly Gly Asn Ser Ala Gly Met Leu Lys Gln Asp Val Phe Asn Trp
 50 55 60
 Arg Lys Glu Leu Ala Gln Phe Glu Ala Tyr Arg Gly Glu Ala Tyr Lys
 65 70 75 80
 Asp Ala Asp Gly Tyr Ser Val Gly Leu Gly His Tyr Leu Gly Ser Gly
 85 90 95
 Asn Ala Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Pro Glu Gln Ala Ala Gln Trp
 100 105 110
 Phe Ala Glu Asp Thr Asp Arg Ala Leu Asp Gln Gly Val Arg Leu Ala
 115 120 125
 Asp Glu Leu Gly Val Thr Asn Asn Ala Ser Ile Leu Gly Leu Ala Gly
 130 135 140
 Met Ala Phe Gln Met Gly Glu Gly Arg Ala Arg Gln Phe Arg Asn Thr
 145 150 155 160
 Phe Gln Ala Ile Lys Asp Arg Asn Lys Glu Ala Phe Glu Ala Gly Val
 165 170 175
 Arg Asn Ser Lys Trp Tyr Thr Gln Thr Pro Asn Arg Ala Glu Ala Phe
 180 185 190
 Ile Lys Arg Met Ala Pro His Phe Asp Thr Pro Ser Gln Ile Gly Val
 195 200 205
 Asp Trp Tyr Ser Ala Ala Thr Ala Glu Lys Leu Tyr Val His Thr Met
 210 215 220
 Glu Thr Glu Ser Gly His Ile Gln Glu Phe Asp Asp Thr Pro Gly Gln
 225 230 235 240
 Glu Arg Tyr Arg Leu Val His Pro Thr Gly Thr Tyr Glu Glu Val Ser
 245 250 255
 Pro Ser Gly Arg Arg Thr Arg Lys Thr Val Asp Asn Leu Tyr Asp Ile
 260 265 270
 Thr Asn Ala Asp Gly Asn Phe Leu Val Ala Gly Asp Lys Lys Thr Asn
 275 280 285
 Val Gly Gly Ser Glu Ile Tyr Tyr Asn Met Asp Asn Arg Leu His Gln
 290 295 300
 Ile Asp Gly Ser Asn Thr Ile Phe Val Arg Gly Asp Glu Thr Lys Thr
 305 310 315 320
 Val Glu Gly Asn Gly Thr Ile Leu Val Lys Gly Asn Val Thr Ile Ile
 325 330 335
 Val Glu Gly Asn Ala Asp Ile Thr Val Lys Gly Asp Ala Thr Thr Leu
 340 345 350
 Val Glu Gly Asn Gln Thr Asn Thr Val Asn Gly Asn Leu Ser Trp Lys
 355 360 365
 Val Ala Gly Thr Val Asp Trp Asp Val Gly Gly Asp Trp Thr Glu Lys
 370 375 380
 Met Ala Ser Met Ser Ser Ile Ser Ser Gly Gln Tyr Thr Ile Asp Gly
 385 390 395 400
 Ser Arg Ile Asp Ile Gly Leu Glu His His His His His His
 405 410

- <210> 20
 <211> 1227
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的嵌合GP36 MD-S型绿脓杆菌素外膜转运(OMT)结构域构建体,
 GP36 CD-S型绿脓杆菌素OM结合结构域-LE-6xHis
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)... (3)
 <223> 起始Met
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)... (651)
 <223> GP36胞壁质水解结构域
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> (652)... (657)
 <223> 通过限制酶位点HindIII产生的KL
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> (658)... (1200)
 <223> S型绿脓杆菌素OM转运结构域
- [0021] <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1201)... (1206)
 <223> 通过限制酶位点XhoI产生的LE
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1207)... (1224)
 <223> 6xHis
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1225)... (1227)
 <223> 终止密码子
- <400> 20
 atgggtgtgg ccctggaccg cagcgggggtt gatccccagg cagtcggcaa cgaggtgtctc 60
 aagcgcaacg cggataagct gaatgcgatg cggggcgccg agtacgggtgc caacgtcaag 120
 gtcagcgga cggacattcg caigaacggg ggtaacagtg ccggcatgct gaagcaggac 180
 gtgttcaact ggcggaagga actggtctcag ttcgaggett accgagggga ggcgtataag 240
 gatgccgatg gttatagtgt gggcctgggg cattacctgg gcagtggcaa tgctggggca 300
 ggtactacag tcacgcctga gcaagccgag cagtgttctg ccgaggacac cgaccgcgca 360
 ctgaccagg gtgtgaggtt ggccgacgag ctgggcgtta cgaacaatgc ctctatcctg 420
 ggattggcgg gtatggcctt ccagatgggc gaaggacgtg cccggcagtt ccgtaacacc 480
 ttccaggcga tcaaggatcg caacaaggaa gccttcgagg ctggtgtgctg aaacagcaag 540
 ttggtacacgc agacgccaa ccgggcgag gcattcatca agcgcatggc gcccaacttc 600
 gatacaccga gtcaaatcgg tgtcgattgg tacagcgccg caacagcgga gaagcttcaa 660
 gcgttgcaag atgctattaa atttactgcc gacttttata aggaagtaac tgagaaattt 720
 ggcgccagaa catcgagat ggcgcccaa ctggccgaag gcgccagggg gaaaaatata 780
 aggagttcgg cggaagcaat caagtcgttt gaaaagcaca aggatgcgtt aaataaaaaa 840
 cttagcctta aagataggca agccattgcc aaagcctttg attctctaga caagcagatg 900
 atggcgaaga gccttgagaa atttagcaaa ggctttggag ttgtaggcaa agctattgac 960

```

gccgccagcc tgtaccaaga gttcaagata tctacggaaa ccggggactg gaaaccattc 1020
tttgtaaaaa ttgaaacact agctgctggg gcggccgcca gtggccttgt gggtattgca 1080
tttgcacagg caacagccac tectatagge attctggggg tgcactggg aatggcagtt 1140
accggggcga tgattgacga agaccttcta gaaaaagcaa acaatcttgt aatatccatt 1200
ctcagcacc accaccacca ccaactaa 1227

```

<210> 21
 <211> 408
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的嵌合GP36 MD-S型绿脓杆菌素外膜转运(OMT)结构域构建体,
 GP36 CD-S型绿脓杆菌素OM结合结构域-LE-6xHis

<220>
 <221> SITE
 <222> (1)... (1)
 <223> 起始Met

<220>
 <221> DOMAIN
 <222> (2)... (217)
 <223> GP36胞壁质水解结构域

<220>
 <221> SITE
 <222> (218)... (219)
 <223> 通过限制酶位点HindIII产生的KL

[0022] <220>
 <221> DOMAIN
 <222> (220)... (400)
 <223> S型绿脓杆菌素OM转运结构域

<220>
 <221> SITE
 <222> (401)... (402)
 <223> 通过限制酶位点XhoI产生的LE

<220>
 <221> DOMAIN
 <222> (403)... (408)
 <223> 6xHis

<400> 21
 Met Gly Val Ala Leu Asp Arg Thr Arg Val Asp Pro Gln Ala Val Gly
 1 5 10 15
 Asn Glu Val Leu Lys Arg Asn Ala Asp Lys Leu Asn Ala Met Arg Gly
 20 25 30
 Ala Glu Tyr Gly Ala Asn Val Lys Val Ser Gly Thr Asp Ile Arg Met
 35 40 45
 Asn Gly Gly Asn Ser Ala Gly Met Leu Lys Gln Asp Val Phe Asn Trp
 50 55 60
 Arg Lys Glu Leu Ala Gln Phe Glu Ala Tyr Arg Gly Glu Ala Tyr Lys
 65 70 75 80
 Asp Ala Asp Gly Tyr Ser Val Gly Leu Gly His Tyr Leu Gly Ser Gly
 85 90 95
 Asn Ala Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Pro Glu Gln Ala Ala Gln Trp
 100 105 110
 Phe Ala Glu Asp Thr Asp Arg Ala Leu Asp Gln Gly Val Arg Leu Ala
 115 120 125

Asp Glu Leu Gly Val Thr Asn Asn Ala Ser Ile Leu Gly Leu Ala Gly
 130 135 140
 Met Ala Phe Gln Met Gly Glu Gly Arg Ala Arg Gln Phe Arg Asn Thr
 145 150 155 160
 Phe Gln Ala Ile Lys Asp Arg Asn Lys Glu Ala Phe Glu Ala Gly Val
 165 170 175
 Arg Asn Ser Lys Trp Tyr Thr Gln Thr Pro Asn Arg Ala Glu Ala Phe
 180 185 190
 Ile Lys Arg Met Ala Pro His Phe Asp Thr Pro Ser Gln Ile Gly Val
 195 200 205
 Asp Trp Tyr Ser Ala Ala Thr Ala Glu Lys Leu Gln Ala Leu Gln Asp
 210 215 220
 Ala Ile Lys Phe Thr Ala Asp Phe Tyr Lys Glu Val Thr Glu Lys Phe
 225 230 235 240
 Gly Ala Arg Thr Ser Glu Met Ala Arg Gln Leu Ala Glu Gly Ala Arg
 245 250 255
 Gly Lys Asn Ile Arg Ser Ser Ala Glu Ala Ile Lys Ser Phe Glu Lys
 260 265 270
 His Lys Asp Ala Leu Asn Lys Lys Leu Ser Leu Lys Asp Arg Gln Ala
 275 280 285
 Ile Ala Lys Ala Phe Asp Ser Leu Asp Lys Gln Met Met Ala Lys Ser
 290 295 300
 Leu Glu Lys Phe Ser Lys Gly Phe Gly Val Val Gly Lys Ala Ile Asp
 305 310 315 320
 Ala Ala Ser Leu Tyr Gln Glu Phe Lys Ile Ser Thr Glu Thr Gly Asp
 325 330 335
 Trp Lys Pro Phe Phe Val Lys Ile Glu Thr Leu Ala Ala Gly Ala Ala
 340 345 350
 Ala Ser Trp Leu Val Gly Ile Ala Phe Ala Thr Ala Thr Ala Thr Pro
 355 360 365
 [0023] Ile Gly Ile Leu Gly Phe Ala Leu Val Met Ala Val Thr Gly Ala Met
 370 375 380
 Ile Asp Glu Asp Leu Leu Glu Lys Ala Asn Asn Leu Val Ile Ser Ile
 385 390 395 400
 Leu Glu His His His His His
 405

<210> 22

<211> 2682

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的嵌合GP36 MD-P22尾刺突蛋白MTD构建体,
GP36 CD-P22尾刺突-LE-6xHis

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)... (3)

<223> 起始Met

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)... (651)

<223> GP36胞壁质水解结构域

<220>

<221> misc_feature

<222> (652)... (657)

<223> 通过限制酶位点HindIII产生的KL

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (658)... (2655)
 <223> 肠细菌噬菌体P22尾刺突蛋白结构域

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2656)... (2661)
 <223> 通过限制酶位点XhoI产生的LE

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2662)... (2679)
 <223> 6xHis

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2680)... (2682)
 <223> 终止密码子

[0024] <400> 22
 atgggtgtgg ccctggaccg cagcggggtt gatccccagg cagtcggcaa cgaggtgctc 60
 aagcgcaacg cggataagcl gaatgcgatg cggggcgccg aglaecglgc caacgtcaag 120
 gtcacgggea cggacattcg catgaacggg ggtaacagtg cggcatgct gaagcaggac 180
 gtgttcaact ggcggaagga actggctcag ttcgaggctt accgagggga ggcgtataag 240
 gatgccatg gttatagtgt gggcctgggg cattacctgg gcagtggcaa tgctggggca 300
 ggtaactacag tcacgcctga gcaagccgeg cagtggttcg ccgaggacac cgaccgcgca 360
 ctgcaccagg gtgtgaggtt ggcgcacgag ctgggcgtta cgaacaatgc ctctatctg 420
 ggattggccg gtatggcctt ccagatgggc gaaggacgtg cccggcagtt ccgtaacacc 480
 ttccaggcga tcaaggatcg caacaaggaa gccttcgagg ctggtgtgcg aaacagcaag 540
 tggtaacacg agacgcccc aaggggccgag gcattcatca agegcattgc gccccacttc 600
 gatacaccca gtcaaatcgg tgcgattgg tacagcgccg caacagcgga gaagcttaca 660
 gacatcaactg caaacgtagt tgtttctaac cctcgctcaa tcttcaactga atcccgttcg 720
 tttaaagctg ttgctaattg gaaaatttac attggtcaga ttgataccga tccggttaat 780
 cctgccaatc agataaccgt atacattgaa aatgaggatg gcctcactgt ccagattact 840
 cagccgctaa ttatcaacgc agccggtaaa atcgataaca accgccaact ggtgaaaatt 900
 gtcaccgttc agggcatag catggctate tatgatgcca atggttctca ggttgactat 960
 attgctaacg tattgaagta cgateccgat caatatteaa tagaagctga taaaaaatit 1020
 aagtattcag taaaattate agattatcea acattgcagg atgeagcate tgcctcggtt 1080
 gatggccttc ttatcgatcg agattataat ttttatgggt gagagacagt tgattttggc 1140
 ggaaaggttc tgactataga atgtaaagct aaatttatag gagatggaaa tcttattttt 1200
 acgaaattag gcaaaaggtc ccgcattgac ggggttttta tggaaagcac tacaacacca 1260
 tgggttatca agccttgga cggatgacaat cagtggctaa cggatgccgc agcggtcgtt 1320
 gccacttta aacaatctaa aactgatggg tatcagccaa ccgtaagcga ttacgttaaa 1380
 tteccaggaa tagaaacgtt actccacact aatgcaaaag ggcaaaacat aacgtctacg 1440
 ttagaaatta gagaatgtat aggggtcgaa gtteatcggt ctageggtet aatggetggt 1500
 tttttgttta gaggtgtgca cttctgcaag atggttagac ccaataatcc aageggaggt 1560
 aaagatggca ttataacett cgaaaacett ageggcgatt gggggaaggg taactatgct 1620
 attggcggac gaaccageta tgggtcagta agtagcgccc agtttttacg taataatggt 1680
 ggctttgaac gtgatgggtg agttattggg tttaactcat atcgcgctgg ggagagtggc 1740
 gttaaaactt ggcaaggtag tgtgggctcg acaacctctc gcaactataa tctgcaattc 1800
 cgcgactcgg tcgttatlla ccccglatgg gacggattcg atllaggltc tgacacigac 1860
 atgaatccgg agttggacag gccaggggac taccctataa eccaatacce actgcatcag 1920
 ttacccttaa atcacctgat tgataatctt ctggttcgcg gggegttagg ttaggtttt 1980
 ggtatggatg gtaaggcat gtatgtgtet aatattaccg tagaagattg cgtgggtct 2040
 ggcgcgtaec tactcaceca cgaateagta tttaaccaata tagccataat tgacaccaat 2100
 actaaggatt tccaggcgaa tcagatttat atatctgggg cttgccgtgt gaacggttta 2160
 cgttttaatt ggatccgctc aaccgatggg cagggtctaa ccatagacgc cctaactct 2220
 accgtaagcg gtataaccgg gatggtagac cctctagaa ttaatgttgc taatttggca 2280
 gaagaagggt taggtaatat ccgcgcta atgtttcggt atgatagcgc agcattataa 2340
 ctgcggattc ataagtatc aaagacatta gatagcggag cattgtactc ccacattaac 2400
 gggggggccg gttctggtct agcgtatact caacttactg ctatttcagg tagcacacct 2460

```

gacgctgtat cattaagaat taaccacaaa gattgcaggg gggcagagat accatttggt 2520
cctgacatcg cgtcagatga tttataaag gattcctcat gttttttgcc atattgggaa 2580
aataattcta cttctttaaa ggccttagtg aaaaaacca atggagaatt agttagatta 2640
accttggeaa caattctega geaccaccac caccaccact ag 2682

```

<210> 23
 <211> 893
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的嵌合GP36 MD-P22尾刺突蛋白MTD构建体,
 GP36 CD-P22尾刺突-LE-6xHis

<220>
 <221> SITE
 <222> (1)... (1)
 <223> 起始Met

<220>
 <221> DOMAIN
 <222> (2)... (217)
 <223> GP36胞壁质水解结构域

<220>
 <221> SITE
 <222> (218)... (219)
 <223> 通过限制酶位点HindIII产生的KL

[0025] <220>
 <221> DOMAIN
 <222> (220)... (885)
 <223> 肠细菌噬菌体P22尾刺突蛋白结构域

<220>
 <221> SITE
 <222> (886)... (887)
 <223> 通过限制酶位点XhoI产生的LE

<220>
 <221> DOMAIN
 <222> (888)... (893)
 <223> 6xHis

<400> 23
 Met Gly Val Ala Leu Asp Arg Thr Arg Val Asp Pro Gln Ala Val Gly
 1 5 10 15
 Asn Glu Val Leu Lys Arg Asn Ala Asp Lys Leu Asn Ala Met Arg Gly
 20 25 30
 Ala Glu Tyr Gly Ala Asn Val Lys Val Ser Gly Thr Asp Ile Arg Met
 35 40 45
 Asn Gly Gly Asn Ser Ala Gly Met Leu Lys Gln Asp Val Phe Asn Trp
 50 55 60
 Arg Lys Glu Leu Ala Gln Phe Glu Ala Tyr Arg Gly Glu Ala Tyr Lys
 65 70 75 80
 Asp Ala Asp Gly Tyr Ser Val Gly Leu Gly His Tyr Leu Gly Ser Gly
 85 90 95
 Asn Ala Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Pro Glu Gln Ala Ala Gln Trp
 100 105 110
 Phe Ala Glu Asp Thr Asp Arg Ala Leu Asp Gln Gly Val Arg Leu Ala
 115 120 125
 Asp Glu Leu Gly Val Thr Asn Asn Ala Ser Ile Leu Gly Leu Ala Gly

[0026]

130	Met	Ala	Phe	Gln	Met	Gly	Glu	Gly	Arg	Ala	Arg	Gln	Phe	Arg	Asn	Thr
145	Phe	Gln	Ala	Ile	Lys	Asp	Arg	Asn	Lys	Glu	Ala	Phe	Glu	Ala	Gly	Val
165	Arg	Asn	Ser	Lys	Trp	Tyr	Thr	Gln	Thr	Pro	Asn	Arg	Ala	Glu	Ala	Phe
180	Ile	Lys	Arg	Met	Ala	Pro	His	Phe	Asp	Thr	Pro	Ser	Gln	Ile	Gly	Val
195	Asp	Trp	Tyr	Ser	Ala	Ala	Thr	Ala	Glu	Lys	Leu	Thr	Asp	Ile	Thr	Ala
210	Asn	Val	Val	Val	Ser	Asn	Pro	Arg	Pro	Ile	Phe	Thr	Glu	Ser	Arg	Ser
225	Phe	Lys	Ala	Val	Ala	Asn	Gly	Lys	Ile	Tyr	Ile	Gly	Gln	Ile	Asp	Thr
245	Asp	Pro	Val	Asn	Pro	Ala	Asn	Gln	Ile	Pro	Val	Tyr	Ile	Glu	Asn	Glu
260	Asp	Gly	Ser	His	Val	Gln	Ile	Thr	Gln	Pro	Leu	Ile	Ile	Asn	Ala	Ala
275	Gly	Lys	Ile	Val	Tyr	Asn	Gly	Gln	Leu	Val	Lys	Ile	Val	Thr	Val	Gln
290	Gly	His	Ser	Met	Ala	Ile	Tyr	Asp	Ala	Asn	Gly	Ser	Gln	Val	Asp	Tyr
305	Ile	Ala	Asn	Val	Leu	Lys	Tyr	Asp	Pro	Asp	Gln	Tyr	Ser	Ile	Glu	Ala
325	Asp	Lys	Lys	Phe	Lys	Tyr	Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Asp	Tyr	Pro	Thr	Leu
340	Gln	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	Val	Asp	Gly	Leu	Leu	Ile	Asp	Arg	Asp
355	Tyr	Asn	Phe	Tyr	Gly	Gly	Glu	Thr	Val	Asp	Phe	Gly	Gly	Lys	Val	Leu
370	Thr	Ile	Glu	Cys	Lys	Ala	Lys	Phe	Ile	Gly	Asp	Gly	Asn	Leu	Ile	Phe
385	Thr	Lys	Leu	Gly	Lys	Gly	Ser	Arg	Ile	Ala	Gly	Val	Phe	Met	Glu	Ser
405	Thr	Thr	Thr	Pro	Trp	Val	Ile	Lys	Pro	Trp	Thr	Asp	Asp	Asn	Gln	Trp
420	Leu	Thr	Asp	Ala	Ala	Ala	Val	Val	Ala	Thr	Leu	Lys	Gln	Ser	Lys	Thr
435	Asp	Gly	Tyr	Gln	Pro	Thr	Val	Ser	Asp	Tyr	Val	Lys	Phe	Pro	Gly	Ile
450	Glu	Thr	Leu	Leu	Pro	Pro	Asn	Ala	Lys	Gly	Gln	Asn	Ile	Thr	Ser	Thr
465	Leu	Glu	Ile	Arg	Glu	Cys	Ile	Gly	Val	Glu	Val	His	Arg	Ala	Ser	Gly
485	Leu	Met	Ala	Gly	Phe	Leu	Phe	Arg	Gly	Cys	His	Phe	Cys	Lys	Met	Val
500	Asp	Ala	Asn	Asn	Pro	Ser	Gly	Gly	Lys	Asp	Gly	Ile	Ile	Thr	Phe	Glu
515	Asn	Leu	Ser	Gly	Asp	Trp	Gly	Lys	Gly	Asn	Tyr	Val	Ile	Gly	Gly	Arg
530	Thr	Ser	Tyr	Gly	Ser	Val	Ser	Ser	Ala	Gln	Phe	Leu	Arg	Asn	Asn	Gly
545	Gly	Phe	Glu	Arg	Asp	Gly	Gly	Val	Ile	Gly	Phe	Thr	Ser	Tyr	Arg	Ala
565	Gly	Glu	Ser	Gly	Val	Lys	Thr	Trp	Gln	Gly	Thr	Val	Gly	Ser	Thr	Thr
580	Ser	Arg	Asn	Tyr	Asn	Leu	Gln	Phe	Arg	Asp	Ser	Val	Val	Ile	Tyr	Pro
595	Val	Trp	Asp	Gly	Phe	Asp	Leu	Gly	Ala	Asp	Thr	Asp	Met	Asn	Pro	Glu
610	Leu	Asp	Arg	Pro	Gly	Asp	Tyr	Pro	Ile	Thr	Gln	Tyr	Pro	Leu	His	Gln
615																
620																

625
 Leu Pro Leu Asn His 630
 Leu Ile Asp Asn Leu Leu Val Arg Gly Ala Leu
 645
 Gly Val Gly Phe Gly Met Asp Gly Lys Gly Met Tyr Val Ser Asn Ile
 660
 Thr Val Glu Asp Cys Ala Gly Ser Gly Ala Tyr Leu Leu Thr His Glu
 675
 Ser Val Phe Thr Asn Ile Ala Ile Ile Asp Thr Asn Thr Lys Asp Phe
 690
 Gln Ala Asn Gln Ile Tyr Ile Ser Gly Ala Cys Arg Val Asn Gly Leu
 705
 Arg Leu Ile Gly Ile Arg Ser Thr Asp Gly Gln Gly Leu Thr Ile Asp
 725
 Ala Pro Asn Ser Thr Val Ser Gly Ile Thr Gly Met Val Asp Pro Ser
 740
 Arg Ile Asn Val Ala Asn Leu Ala Glu Glu Gly Leu Gly Asn Ile Arg
 755
 Ala Asn Ser Phe Gly Tyr Asp Ser Ala Ala Ile Lys Leu Arg Ile His
 770
 Lys Leu Ser Lys Thr Leu Asp Ser Gly Ala Leu Tyr Ser His Ile Asn
 785
 Gly Gly Ala Gly Ser Gly Ser Ala Tyr Thr Gln Leu Thr Ala Ile Ser
 805
 Gly Ser Thr Pro Asp Ala Val Ser Leu Lys Val Asn His Lys Asp Cys
 820
 Arg Gly Ala Glu Ile Pro Phe Val Pro Asp Ile Ala Ser Asp Asp Phe
 835
 Ile Lys Asp Ser Ser Cys Phe Leu Pro Tyr Trp Glu Asn Asn Ser Thr
 850
 Ser Leu Lys Ala Leu Val Lys Lys Pro Asn Gly Glu Leu Val Arg Leu
 865
 Thr Leu Ala Thr Leu Leu Glu His His His His His His
 885
 890

[0027]

<210> 24

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的聚组氨酸纯化标签, 6个邻近的组氨酸,
6xHis, 6个近N端的His标签

<400> 24

His His His His His His

1

5

<210> 25

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的野生型BPI TMD

<400> 25

Ala Ser Leu Met Val Leu Val Ala Ile Gly Thr Ala Val Thr Ala Ala

1

5

10

15

Val Asn Pro Gly Val Val Val Arg

20

<210> 26
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的BPI TMD变体

<400> 26
Ala Ser Leu Met Glu Leu Asp Ala Lys Gly Thr Ala Val Thr Ala Ala
1 5 10 15
Val Asn Pro Gly Val Val Val Arg
20

<210> 27
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的BPI TMD变体

<400> 27
Ala Ser Leu Met Lys Leu Lys Ala Arg Gly Thr Ala Lys Thr Ala Ala
1 5 10 15
Lys Asn Pro Gly Lys Lys Arg Arg
20

[0028]

<210> 28
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的BPI TMD变体

<400> 28
Ala Ser Leu Met Lys Leu Lys Ala Arg Gly Thr Ala Lys Thr Ala Ala
1 5 10 15
Lys Asn Pro Gly Lys Val Arg Arg
20

<210> 29
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的BPI TMD变体

<400> 29
Ala Ser Arg Met Val Leu Val Ala Arg Gly Thr Ala Lys Thr Ala Ala
1 5 10 15
Val Asn Pro Gly Val Val Arg Arg
20

- <210> 30
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<223> 合成的N-末端10xHis标签
- <400> 30
His His His His His His His His His His
1 5 10
- <210> 31
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<223> 合成的野生型P134 TMD, 野生型P134 MTD
- <400> 31
Glu Ile Ala Ser Leu Cys Ala Ala Val Leu Thr Ala Leu Tyr Val Gly
1 5 10 15
Ala Gln Leu Ile Thr Leu Leu
20
- [0029] <210> 32
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<223> 合成的P134 TMD变体, P134 MTD变体
- <400> 32
Glu Ile Ala Ser Leu Cys Ala Ala Arg Pro Thr Ala Leu Tyr Val Gly
1 5 10 15
Ala Gln Leu Ile Thr Leu Leu
20
- <210> 33
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<223> 合成的P134 TMD变体, P134 MTD变体
- <400> 33
Glu Arg Ala Ser Leu Cys Ala Ala Arg Leu Thr Ala Leu Tyr Arg Gly
1 5 10 15
Ala Gln Leu Arg Thr Leu Leu
20
- <210> 34
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的P134 TMD变体, P134 MTD变体

<400> 34
Glu Lys Ala Ser Leu Cys Lys Lys Arg Arg Thr Ala Leu Tyr Lys Gly
1 5 10 15
Ala Gln Leu Asp Thr Leu Leu
20

[0030] <210> 35
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的P134 TMD变体, P134 MTD变体

<400> 35
Glu Ile Ala Ser Arg Cys Ala Ala Val Leu Thr Ala Leu Tyr Val Gly
1 5 10 15
Ala Gln Leu Asn Thr Leu Lys
20

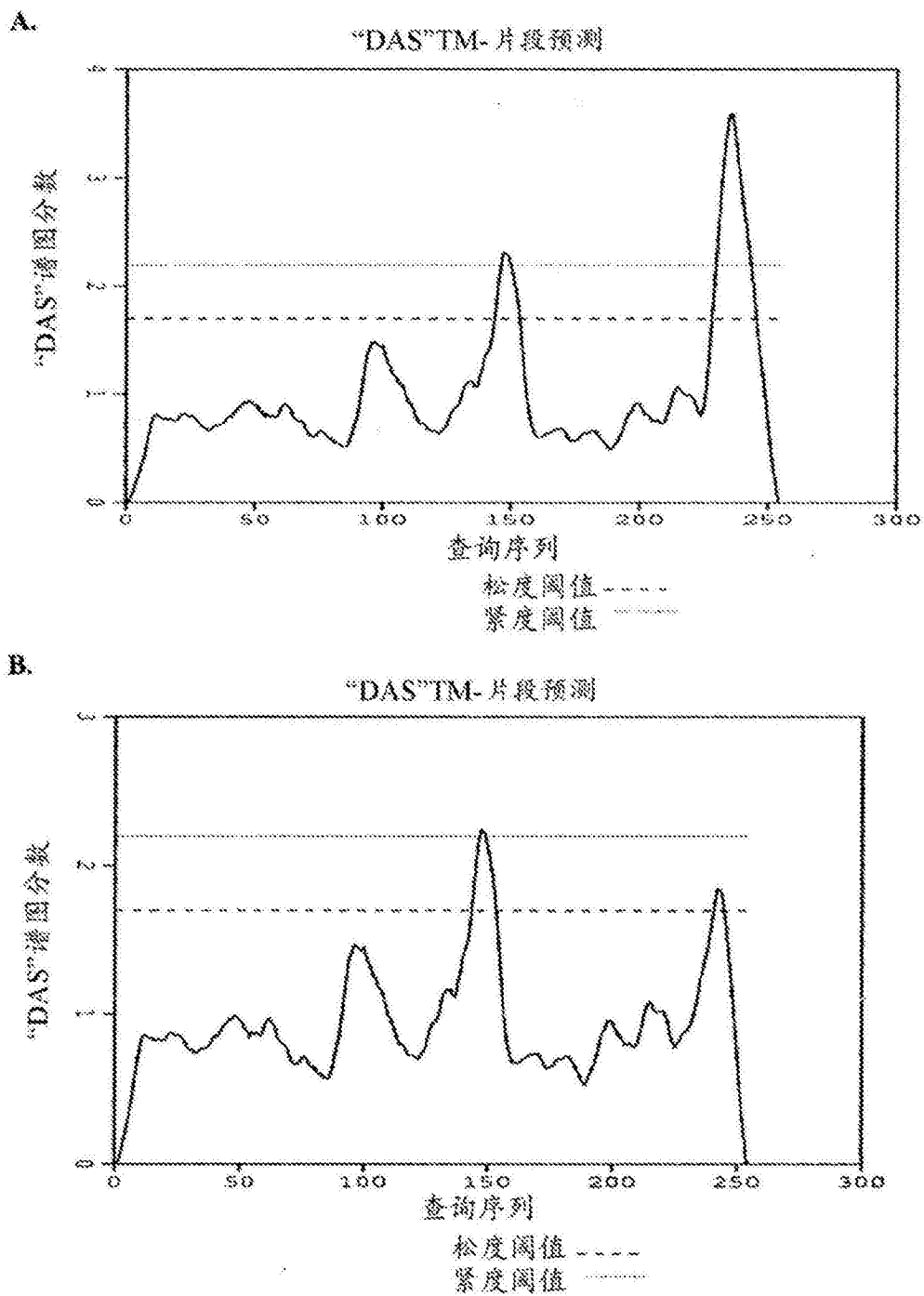
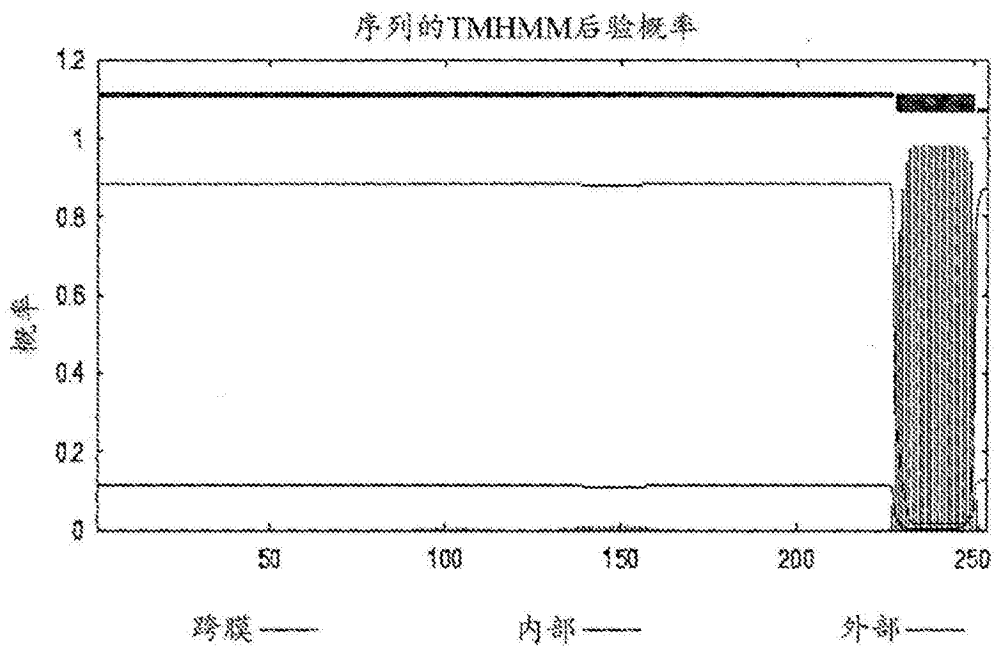


图1

A.



B.

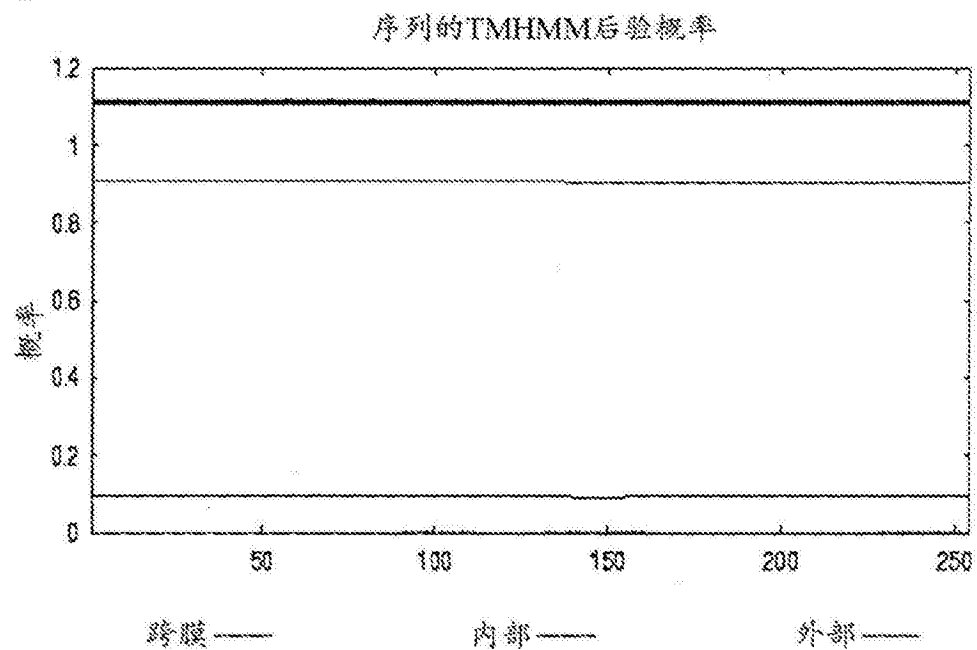


图2

A.

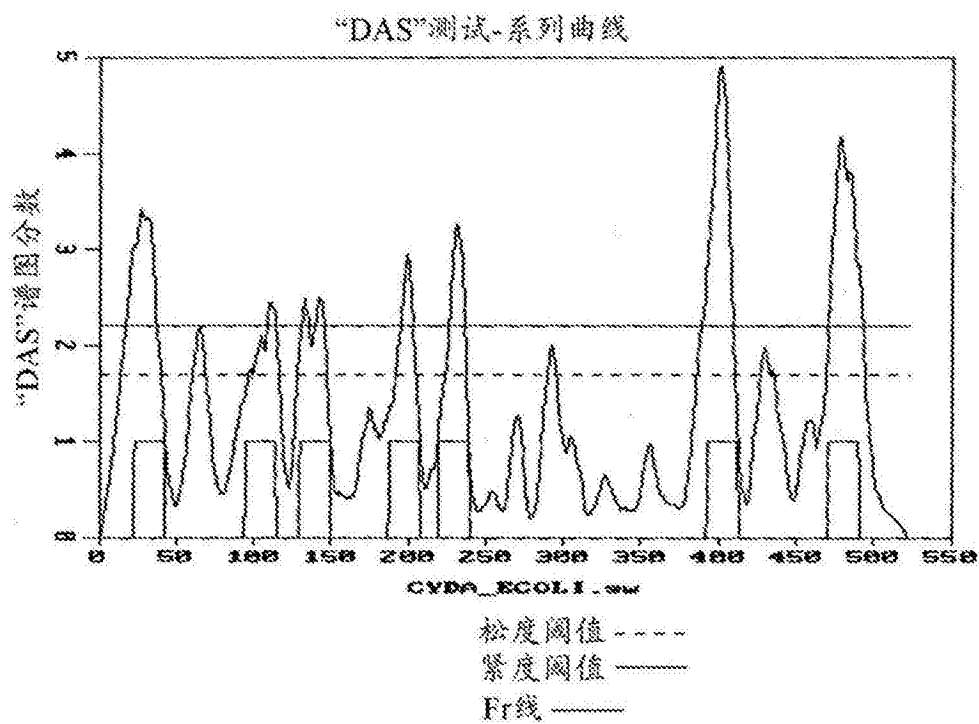
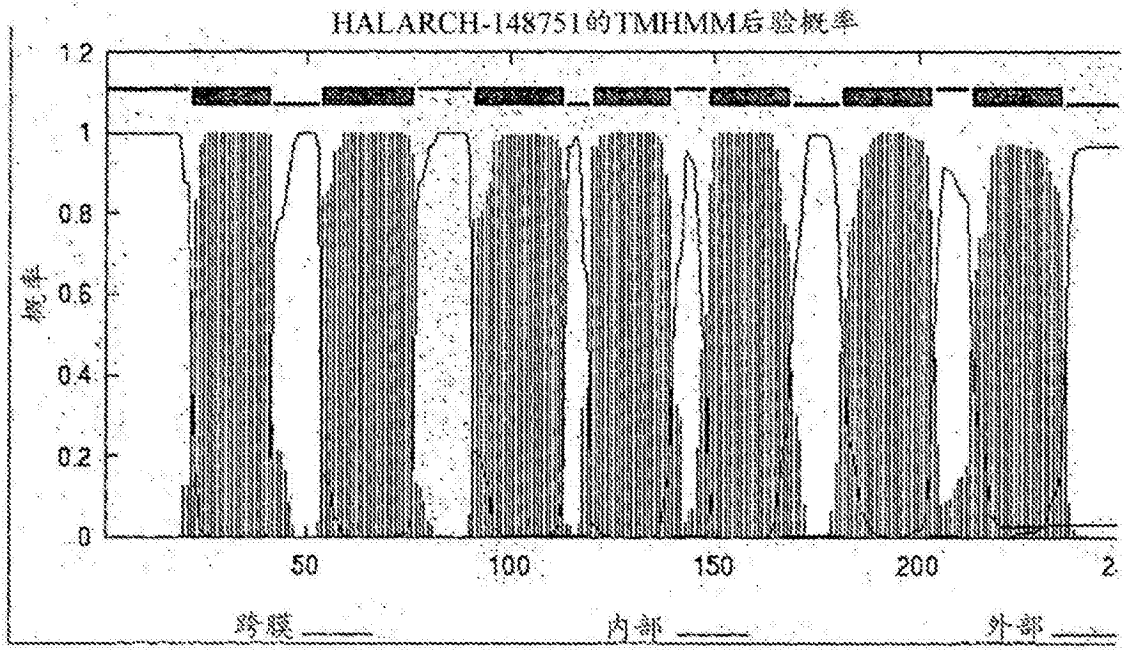


图3

B.



C.

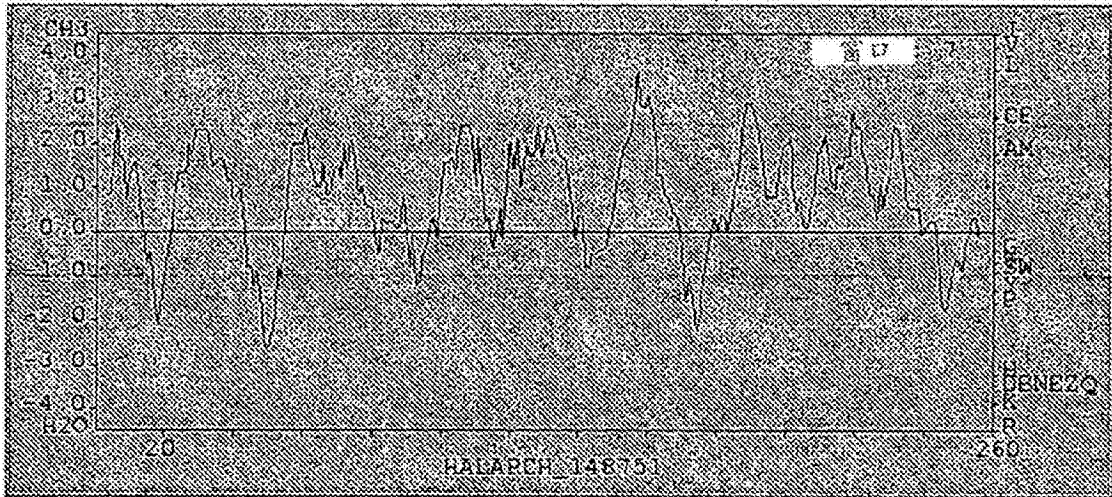


图3(续)