



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101775068 A

(43) 申请公布日 2010.07.14

(21) 申请号 200910045258.2

A61P 33/00(2006.01)

(22) 申请日 2009.01.14

(71) 申请人 上海南方模式生物科技发展有限公司

地址 201210 上海市张江金科路 3577 号 1207 室

申请人 上海南方模式生物研究中心

(72) 发明人 费照亮 王一成 王维刚 万颖寒
周嘉斌 费俭 王铸钢

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

代理人 徐迅 陈静

(51) Int. Cl.

C07K 14/00(2006.01)

C12N 15/11(2006.01)

C12N 15/63(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

C12P 21/02(2006.01)

A61K 38/16(2006.01)

A61P 31/00(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 21 页 附图 2 页

(54) 发明名称

新的天然抗菌肽、其编码序列及用途

(57) 摘要

本发明公开了新的天然抗菌肽、其编码序列及用途。所述的抗菌肽可以抑制多种有害病原体的感染,效果优异。所述的抗菌肽是天然抗菌肽,且以人源的为主,在临床应用过程中具有较低的免疫排斥风险。

1. 一种分离的多肽,其特征在于,所述的多肽选自下组:
 - (a) 如 SEQ ID NO :n 所示氨基酸序列的多肽 ;或
 - (b) 将 SEQ ID NO :n 所示的氨基酸序列经过 1-5 个氨基酸残基的缺失、插入或取代而形成的,且具有抑制病原体功能的由 SEQ ID NO :n 所示氨基酸序列的多肽衍生的多肽 ;其中, n 是选自 1-7 的正整数。
2. 如权利要求 1 所述的多肽,其特征在于,所述的多肽是如 SEQ ID NO :n 所示氨基酸序列的多肽。
3. 一种分离的多核苷酸,其特征在于,所述的多核苷酸编码权利要求 1 所述的多肽。
4. 如权利要求 3 所述的多核苷酸,其特征在于,所述的多核苷酸选自下组:
 - (1) 如 SEQ ID NO :(n+7) 所示核苷酸序列的多核苷酸 ;或
 - (2) 与多核苷酸 (1) 互补的多核苷酸。
5. 一种载体,其特征在于,所述载体含有权利要求 3-4 任一所述的多核苷酸。
6. 一种遗传工程化的细胞,其特征在于,所述细胞含有权利要求 5 所述的载体或其基因组中整合有权利要求 3-4 任一所述的多核苷酸。
7. 一种制备权利要求 1 所述的多肽的方法,其特征在于,所述方法包括:
 - (i) 在适合表达的条件下,培养权利要求 6 所述的细胞 ;和
 - (ii) 分离出权利要求 1 所述的多肽。
8. 权利要求 1 所述的多肽的用途,用于制备抑制病原体的组合物。
9. 一种组合物,其特征在于,所述组合物含有:
 - (A) 有效量的权利要求 1 所述的一种或多种多肽 ;和
 - (B) 药学上可接受的载体。
10. 一种非治疗性地抑制病原体的方法,其特征在于,所述方法包括 :给予需要抑制病原体的对象有效量的权利要求 1 所述的一种或多种多肽。

新的天然抗菌肽、其编码序列及用途

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术和医药领域,具体的说,本发明涉及新的天然抗菌肽,以及编码所述抗菌肽的多核苷酸。本发明还涉及所述抗菌肽的制备方法、用途和组合物。

背景技术

[0002] 抗生素的产生对保护人类健康作出了巨大的贡献,但随着抗生素的广泛和长期使用,耐药菌株的不断产生和日益增多的过敏反应等,迫使人们开始寻找新一代的抗菌剂。地球上的生物经过长期的进化逐渐形成了抵抗外来微生物侵袭的机制,生物机体可以通过分泌抗体和各种防御分子对抗微生物的侵袭。防御分子包括各种细胞因子、趋化因子、酶类和抗菌肽等(陈小章,王子栋,杨冠群;外分泌生理学;北京:科学出版社,2003527-540)。其中种类繁多的抗菌肽已受到人们的广泛重视,它们是生物体内产生的一种具有强抗菌作用的多肽类物质,而且具有青霉素类抗生素无法比拟的优越性,即不会诱导抗药菌株的产生,有的还具有抗寄生虫,病毒,癌细胞的功能。迄今为止,已在多种生物包括昆虫、动物、植物及原核生物中发现多种抗菌活性肽。其作为药物所具有的应用前景十分可观。

[0003] 天然抗菌肽通常是由 30-60 多个氨基酸残基组成的碱性小分子多肽,水溶性好,分子量大约为 4000-10000 道尔顿。大部分抗菌肽具有热稳定性,等电点大于 7,表现出较强的阳离子特征。同时有的抗菌肽还具备抵抗胰蛋白酶或胃蛋白酶水解的能力。许多抗菌肽具有疏水区域和带电荷区域,这些结构特点对于抗菌肽的抗菌活性机制的形成有重要意义。研究表明,至少是部分抗菌肽的抗菌作用和溶液中的钠离子浓度存在负相关性(M. J. Goldman 等;Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis, Cell 88(1997)553-560.),有些抗菌肽在 150mM NaCl 时失去抗菌作用(I. Nagaoka 等;Synergistic actions of antibacterial neutrophil defensins and cathelicidins, Inflamm Res 49(2000)73-79)。

[0004] 根据抗菌肽的氨基酸组成,可将其分为 5 类:(1) 单链无半胱氨酸残基的 α -螺旋,或由无规卷曲连接的两段 α -螺旋组成的结构,如最早分离到的 Cecropins(J. Fink, A. Boman 等;Design, synthesis and antibacterial activity of cecropin-like model peptides, Int J Pept Protein Res 33(1989)412-421.)。(2) 富含某些氨基酸残基但不含半胱氨酸的抗菌肽如 Apidaecins(M. J. Clague 等;A comparative study of band 3 aggregation in erythrocyte membranes by melittin and other cationic agents, Biochim Biophys Acta 980(1989)93-99.)。(3) 含 1 个二硫键的抗菌多肽,如来源于牛中性粒细胞的 Bactenecin(K. Ando, S. Natori, Inhibitory effect of sarcotoxin IIA, an antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina*, on growth of *Escherichia coli*, J Biochem(Tokyo)103(1988)735-739)。(4) 具有 β -折叠结构的抗菌肽防御素(Defensin)。(5) 含有特殊有机基团抗菌肽如 Lantibiotics(J. N. Hansen, Antibiotics synthesized by posttranslational modification, Annu Rev Microbiol 47(1993)535-564)(羊毛硫抗生素)。

[0005] 抗菌肽功能从目前的研究结果来看,一般认为抗菌肽杀菌机理主要是作用于细菌的细胞膜,破坏其完整性并产生穿孔现象,造成细胞内容物溢出胞外而死亡。首先由静电吸引而附于细菌膜表面,疏水性的 C 端插入膜内疏水区并改变膜的构象,多个抗菌肽在膜上形成离子通道导致某些离子的逸出而死亡。也有学者认为抗菌肽作用于膜蛋白引起凝聚、失活及离子通道,引起膜渗透性改变而导致死亡,也有学者提出抗菌肽是否存在特异性的膜受体及有无其它因子的协同作用等问题。不同类别的抗菌肽的作用机理可能不一样。

[0006] 抗菌肽多数具有强碱性、热稳定性以及广谱抗菌等特点。某些抗菌肽对部分真菌、原虫、病毒及癌细胞等均具有强有力的杀伤作用。

[0007] 1、抗菌肽对细菌的杀伤作用

[0008] 抗菌肽对细菌具有杀伤作用,有些抗菌肽对革兰氏阴性和阳性菌都有杀伤作用如 Cecropin(C. Lowenberger 等 ;Antimicrobial activity spectrum, cDNAcloning, and mRNA expression of a newly isolated member of the cecropin familyfrom the mosquito vector *Aedes aegypti*, J Biol Chem 274(1999)20092-20097),而果蝇雄成虫生殖道中存在的 Andropin,只作用于革兰氏阴性菌,对革兰氏阳性菌无效。抗菌肽的抗菌作用机理有几种不同的假说。电势依赖通道假说认为 Cecropin, Magainins, Defensins 等抗菌肽可以形成双亲螺旋结构通过自身所带正电荷与表面带负电荷的细菌细胞膜通过静电吸引结合,进而作用于细菌的细胞膜,依赖于跨膜电势在膜上形成离子通道 (S. Cociancich 等 ;Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*, J Biol Chem 268(1993)19239-19245),而 K⁺ 快速被析出,继而导致细胞死亡 (M. Okada, S. Natori, Ionophore activity of sarcotoxin I, a bactericidal protein of *Sarcophaga peregrina*, Biochem J 229(1985)453-458)。Lockey 等通过电镜直接观察到抗菌肽在细胞膜上造成的孔道,为电势依赖通道的形成提供了直接证据 ;蛋白变性假说 (M. Okada, S. Natori, Ionophore activity of sarcotoxin I, a bactericidal protein of *Sarcophaga peregrina*, Biochem J 229(1985)453-458) 认为,抗菌肽作用于膜蛋白,引起蛋白质凝聚失活,细胞膜变性形成离子通道。另外有的抗菌肽如 Thanatin(P. Fehlbauer 等 ;Structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides, Proc Natl Acad Sci USA 93(1996)1221-1225) 可能通过抑制细菌的呼吸作用杀死细菌,但具体的机制还不清楚。还有研究报道,抗菌肽可以通过干扰细菌基因的转录使细菌的生长受到抑制,如 Attacin(A. Carlsson 等 ;Attacin, an antibacterial protein from *Hyalophora cecropia*, inhibits synthesis of outer membrane proteins in *Escherichia coli* by interfering with omp gene transcription, Infect Immun 59(1991)3040-3045) 能够干扰大肠杆菌细胞外膜蛋白 Omp C、Omp F、Omp A 以及 Lam B 基因的转录,使这些蛋白质含量减少,细菌的生长受到抑制。Sarcotoxins II (K. Ando, S. Natori, Inhibitory effect of sarcotoxin IIA, an antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina*, on growth of *Escherichia coli*, J Biochem(Tokyo) 103(1988)735-739) 能够抑制细菌细胞壁的形成,使细菌不能维持正常的细胞形态而生长受阻。

[0009] 2、抗菌肽对真菌的杀伤作用

[0010] 抗菌肽可能同时具有抗细菌和抗真菌的活性,如蛙类的 PGQ、Dermaseptin,兔防

御素 NP-1, 植物防御素。硫堇 (Thionins) 对多种植物致病真菌有杀伤作用。Cecropin A 及其类似物如天蚕素—蜂毒素杂合肽对感染昆虫的真菌具有一定的杀伤作用。有研究报道 Cecropins N 端 α 螺旋区域的 11 个氨基酸序列与抗真菌活性有关 (L. Cavallarin 等; Cecropin A-derived peptides are potent inhibitors of fungal plant pathogens, *Mol Plant Microbe Interact* 11(1998)218-227)。目前对于抗菌肽抗真菌的作用机制还不清楚, 有研究报道推测抗菌肽 Ib-AMP1 (D. G. Lee 等; Antifungal mechanism of a cysteine-rich antimicrobial peptide, Ib-AMP 1, from *Impatiens balsamina* against *Candida albicans*; *Biotechnology Letters*, 21(1999), 1047-1050)、LL-37 (M. D. Howell, J. F. Jones, K. O. Kisich, J. E. Streib, R. L. Gallo, D. Y. Leung, Selective killing of vaccinia virus by LL-37: implications for eczema vaccinatum, *J Immunol* 172(2004)1763-1767) 可能通过引起真菌细胞进程的变化起作用。

[0011] 3、抗菌肽对原虫的杀伤作用

[0012] 有些抗菌肽可以有效杀死寄生于人类或动物体内的寄生虫。Shive-I、蛙皮肤的抗菌肽 Magainins 可以杀死疟原虫。而 Cecropin/melittin 杂合肽可以杀死莱什曼鞭毛虫 (孙超, 王晖, 孙波, 彭学贤; 多肽抗生素研究进展; *中国药理学通报*, 2000; 16(6): 605-609)。柞蚕抗菌肽 D 对阴道毛滴虫亦有杀伤作用, 但作用机制尚不清楚。

[0013] 4、抗菌肽对病毒的杀伤作用

[0014] 多种抗菌肽具有抗病毒的作用 (L. Zhang 等; Contribution of human α -defensin 1, 2, and 3 to the anti-HIV-1 activity of CD8 antiviral factor, *Science* 298(2002)995-1000)。有的抗菌肽可以通过与病毒外膜的直接结合发挥作用, 如 α -抗菌素、Modelin-1 对疱疹病毒的作用, Polyphemusins 对 HIV 病毒的作用。有的抗菌肽能够抑制病毒的繁殖, 如 Cecropin A, Melittin 在亚毒性浓度下通过阻遏基因表达来抑制 HIV-1 病毒的增殖。还有的抗菌肽如 Melittin 可以通过干扰病毒的组装而对病毒产生作用。

[0015] 5、抗菌肽对癌细胞的杀伤作用

[0016] 有些抗菌肽如 Magainin、Cecropin A、Melittin、 α -防御素 1, 2 都有对癌细胞的选择性杀伤作用。抗菌肽对癌细胞的选择性杀伤作用的原理可能有: 1. 癌细胞的高代谢引起细胞膜电位的改变, 易被抗菌肽识别结合, 进而抑制其生长。2. 癌细胞膜外表面含有更高的酸性磷脂能与碱性的抗菌肽结合。3. 抗菌肽激活肿瘤细胞内的 P53 等抗癌基因, 诱导肿瘤细胞的凋亡。4. 抗菌肽与肿瘤发生时所需的调控因子相互作用, 封闭其活性位点, 从而抑制肿瘤的生长。

[0017] 由于抗菌肽种类多, 具有抗菌作用强和广谱的特性, 以及较少出现耐药菌株的优点, 使其有望成为抗感染的重要药物。同时, 针对一些抗菌肽所具有的其它生物学功能, 抗菌肽还将可能应用于抗肿瘤、生殖系统感染、不育等疾病的治疗。抗菌肽的合成、表达和纯化工艺正在得到不断的发展。化学方法已用于研究抗菌肽类似物, 以增强抗微生物活性或减少细胞毒性, 但大分子的抗菌肽, 化学合成方法费用昂贵, 基因工程表达的策略可望解决这个问题。

[0018] 综上, 本领域还有必要找到新的抗菌肽, 以开发对于抗菌、抗病毒或抗癌等有效的药物。

发明内容

- [0019] 本发明的目的在于提供新的天然抗菌肽、其编码序列及用途。
- [0020] 在本发明的第一方面,提供一种分离的多肽,所述的多肽选自下组:
- [0021] (a) 如 SEQ ID NO :n 所示氨基酸序列的多肽 ;或
- [0022] (b) 将 SEQ ID NO :n 所示的氨基酸序列经过 1-5 个氨基酸残基的缺失、插入或取代而形成的,且具有抑制病原体功能的由 SEQ IDNO :n 所示氨基酸序列的多肽衍生的多肽 ;
- [0023] 其中, n 是选自 1-7 的正整数。
- [0024] 在另一优选例中,所述的多肽是如 SEQ ID NO :n 所示氨基酸序列的多肽。
- [0025] 在本发明的第二方面,提供一种分离的多核苷酸,所述的多核苷酸编码所述的多肽。
- [0026] 在另一优选例中,所述的多核苷酸选自下组:
- [0027] (1) 如 SEQ ID NO :(n+7) 所示核苷酸序列的多核苷酸 ;或
- [0028] (2) 与多核苷酸 (1) 互补 (优选完全互补) 的多核苷酸。
- [0029] 在本发明的第三方面,提供一种载体,所述载体含有所述的多核苷酸。
- [0030] 在本发明的第四方面,提供一种遗传工程化的细胞,所述细胞含有所述的载体或其基因组中整合有所述的多核苷酸。
- [0031] 在本发明的第五方面,提供一种制备所述的多肽的方法,所述方法包括:
- [0032] (i) 在适合表达的条件下,培养所述的细胞 ;和
- [0033] (ii) 分离出所述的多肽。
- [0034] 在本发明的第六方面,提供所述的多肽的用途,用于制备抑制病原体 (如细菌、真菌、原虫等) 的组合物。
- [0035] 在本发明的第七方面,提供一种组合物,所述组合物含有:
- [0036] (A) 有效量的所述的一种或多种多肽 ;和
- [0037] (B) 药学上可接受的载体。
- [0038] 在本发明的第八方面,提供一种非治疗性地抑制病原体的方法,所述方法包括 :给予需要抑制病原体的对象有效量的所述的一种或多种多肽。
- [0039] 在另一优选例中,所述的需要抑制病原体的对象是带有所述病原体的哺乳动物个体,或是带有所述病原体的场所或物品。
- [0040] 本发明的其它方面由于本文的公开内容,对本领域的技术人员而言是显而易见的。

附图说明

- [0041] 图 1. 含有内含肽 (Intein) 和抗菌肽编码基因的质粒的示意图。
- [0042] 图 2. 抗菌肽 PCR 鉴定图,泳道 1 :DNA Marker,从上到下依次为 :500bp, 400bp, 300bp, 200bp, 100bp, 泳道 2-8 依次为 :hBD-134, hBD-116, hBD-114, hBD-113, hBD-110, hBD-spape, mBD-12。
- [0043] 图 3. 抗菌肽融合蛋白表达电泳鉴定图,泳道 1 :IPTG 诱导前细菌全蛋白 ;泳道 2 ; IPTG 诱导后细菌全蛋白 ;泳道 3 :IPTG 诱导后细菌破壁上清蛋白 ;泳道 4 :蛋白 Marker,分子

量从上到下依次为 :97. 4KD, 66. 2KD, 43KD, 31KD, 20KD。

[0044] 图 4. 抗菌肽纯化后蛋白电泳鉴定图, 泳道 1 :蛋白 Marker, 分子量从上到下依次为 :60KD, 45KD, 34KD, 16KD, 7KD, 4KD ;泳道 2 :抗菌肽融合蛋白经几丁质柱结合, 经缓冲液 B2 洗脱后蛋白。

[0045] 图 5. 大肠杆菌存活率与不同抗菌肽作用时间关系图。

[0046] 图 6. 白色念珠菌存活率与不同抗菌肽作用时间图。

[0047] 图 7 本发明的抗菌肽与抗菌肽 Bin1b 抑菌活性的比较。

具体实施方式

[0048] 本发明人经过深入的研究, 找到了一组具有抑制病原体功能的天然抗菌肽, 经证明所述抗菌肽抑制病原体的效果优异, 可以抑制多种病原体的感染, 包括针对由抗生素耐药病原体引发的感染。在此基础上完成了本发明。

[0049] 本发明人首先通过一些蛋白质活性功能预测网站或者软件, 如 :UniProtKB/Swiss-Prot 和 SignalP 3.0Server-prediction 预测具有抗菌肽活性的天然多肽序列, 再通过基因工程表达的手段获得目的蛋白, 并进行反复试验筛选其中具有抑菌活性的蛋白, 从而得到一组具有抗菌肽活性的新的天然抗菌肽。

[0050] 如本文所用, 所述的“抗菌肽”是指具有 SEQ ID NO :n 所示氨基酸序列的多肽 (如表 1) 或其衍生肽, 其具有抑制病原体的功能 ;其中, n 是选自 1-7 的正整数 (即 1、2、3、4、5、6 或 7)。本发明中, 术语“多肽”、“蛋白”可互换使用。

[0051] 表 1

[0052]

SEQID NO :	抗菌肽	氨基酸序列 (N 端 → C 端)
1	hBD-134	GINSLSSEMHHKCYKNGICRLECYESEMLVAYCMFQLECCV KGNPAP
2	hBD-116	GLFRSHNGKSREPWNPCELYQGMCRNACREYEIQYLTCPN QKCCCLKLSVKITSSKNVKEDYDSNSNLSVTNSSSYSHI
3	hBD-114	DRCTKRYGRCKRDCLESEKQIDICSLPRKICCTEKLYEEDDM F
4	hBD-113	GPSVPQKKTREVAERKRECQLVRGACKPECNSWEYVYYC NVNPCCAVWEYQKPIINKITSKLHQK
5	hBD-110	NFEPKYRFERCEKVRGICKTFCDVEYDYGYSIKWRSQCCV

SEQID NO :	抗菌肽	氨基酸序列 (N 端 → C 端)
6	hBD-spape (hBD-SP)	DVPPGIRNTICHMQQGICRLFFCHSGEKKRDI CSDPWNRCCV SNTDEEGKEKPEMDGRSGI
7	mBD-12	GLEYSQSFPGGEI A VCETCRLGRGKCRRTCIESEKIAGWCKL NFFCCRERI

[0053] 如本文所用,“分离的”是指物质从其原始环境中分离出来(如果是天然物质,原始环境即是天然环境)。例如,活体细胞内的天然状态下的多聚核苷酸和多肽是没有分离纯化的,但同样的多聚核苷酸和多肽如果与天然状态一起存在的其他物质分开,则为分离纯化的。

[0054] 本发明所述的病原体包括各种对于哺乳动物(包括人)有害的生物,例如易于对哺乳动物(包括人)造成感染性疾病的生物。所述的病原体包括但不限于:病毒,细菌,真菌,原虫,或携带病毒、细菌、真菌或原虫的有害生物等。较特别的,所述的病原体是细菌或真菌,或携带所述细菌或真菌的有害生物。

[0055] 本发明的多肽可以是重组多肽、天然多肽、合成多肽,优选重组多肽。本发明的多肽可以是天然纯化的产物,或是化学合成的产物,或使用重组技术从原核或真核宿主(例如,细菌、酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞)中产生。根据重组生产方案所用的宿主,本发明的多肽可以是糖基化的,或可以是非糖基化的。

[0056] 本发明还包括所述抗菌肽的片段、衍生物和类似物。如本文所用,术语“片断”、“衍生物”和“类似物”是指基本上保持本发明的天然多肽相同的生物学功能或活性的多肽。本发明的多肽片断、衍生物和类似物可以是:(1)有一个或多个保守或非保守性氨基酸残基(优选保守性氨基酸残基)被取代的多肽,或(2)在一个或多个氨基酸残基中具有取代基团的多肽,或(3)成熟多肽与另一个化合物(比如延长多肽半衰期的化合物,例如聚乙二醇)融合所形成的多肽,或(4)附加的氨基酸序列融合于此多肽序列而形成的多肽(如前导序列或分泌序列或用来纯化的多肽序列或蛋白原序列,或与抗原 IgG 片断的形成的融合蛋白)。这些片断、衍生物和类似物属于本领域熟练技术人员公知的范围。

[0057] 一类特殊的抗菌肽类似物是在其他哺乳动物(如牛、羊、兔、狗、猴、鼠等)中与 SEQ ID NO. n(n 选自 1-7 的正整数)所示的蛋白同源的蛋白。这些其他物种的同源蛋白的编码序列,可根据本发明公开的序列,通过杂交或扩增的方法而获得,进而通过常规重组方法获得这些同源蛋白。

[0058] 本发明中,术语“抗菌肽”还包括具有抑制病原体功能的、SEQ ID NO. n(n 选自 1-7 的正整数)序列的变异形式。这些变异形式包括(但不限于):若干个(通常为 1-10 个,较佳地 1-5 个,更佳地 1-3 个)氨基酸的缺失、插入和/或取代,以及在 C 末端和/或 N 末端添加一个或数个(通常为 10 个以内,较佳地为 5 个以内,更佳地为 3 个以内)氨基酸。例

如,在本领域中,用性能相近或相似的氨基酸进行取代时,通常不会改变蛋白质的功能。又比如,在 C 末端和 / 或 N 末端添加一个或数个氨基酸通常也不会改变蛋白质的功能。

[0059] 本发明中,该组蛋白保守性变异多肽是指与 SEQ ID NO. n(n 选自 1-7 的正整数)所示氨基酸序列相比,有至多 10 个,较佳地至多 5 个,更佳地至多 3 个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成多肽。这些保守性变异多肽最好根据表 2 进行氨基酸替换而产生。

[0060] 表 2

[0061]

最初的残基	代表性的取代	优选的取代
Ala(A)	Val ;Leu ;Ile	Val
Arg(R)	Lys ;Gln ;Asn	Lys
Asn(N)	Gln ;His ;Lys ;Arg	Gln
Asp(D)	Glu	Glu
Cys(C)	Ser	Ser
Gln(Q)	Asn	Asn
Glu(E)	Asp	Asp
Gly(G)	Pro ;Ala	Ala
His(H)	Asn ;Gln ;Lys ;Arg	Arg
Ile(I)	Leu ;Val ;Met ;Ala ;Phe	Leu
Leu(L)	Ile ;Val ;Met ;Ala ;Phe	Ile
Lys(K)	Arg ;Gln ;Asn	Arg
Met(M)	Leu ;Phe ;Ile	Leu
Phe(F)	Leu ;Val ;Ile ;Ala ;Tyr	Leu
Pro(P)	Ala	Ala
Ser(S)	Thr	Thr

最初的残基	代表性的取代	优选的取代
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr ;Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp ;Phe ;Thr ;Ser	Phe
Val (V)	Ile ;Leu ;Met ;Phe ;Ala	Leu

[0062] 本发明还包括经修饰的抗菌肽,修饰(通常不改变一级结构)形式包括:体内或体外的多肽的化学衍生形式如乙酰化或羧基化。修饰还包括糖基化,如那些在多肽的合成和加工中或进一步加工步骤中进行糖基化修饰而产生的多肽。这种修饰可以通过将多肽暴露于进行糖基化的酶(如哺乳动物的糖基化酶或去糖基化酶)而完成。修饰形式还包括具有磷酸化氨基酸残基(如磷酸酪氨酸,磷酸丝氨酸,磷酸苏氨酸)的序列。还包括被修饰从而提高了其抗蛋白水解性能或优化了溶解性能的多肽。

[0063] 本发明的多核苷酸可以是 DNA 形式或 RNA 形式。DNA 形式包括 cDNA、基因组 DNA 或人工合成的 DNA。DNA 可以是单链的或是双链的。DNA 可以是编码链或非编码链。编码成熟多肽的编码区序列可以与 SEQ ID NO:(n+7) 所示的编码区序列(如表 3)相同或者是简并的变异体。如本文所用,“简并的变异体”在本发明中是指编码具有 SEQ ID NO:n 的蛋白质,但与 SEQ ID NO:(n+7) 中相应编码区序列有差别的核酸序列。

[0064] 表 3

[0065]

SEQID NO :	抗菌肽	多核苷酸序列 (5-3)
8	hBD-134	GGTATAAATTCATTATCATCAGAAATGCACAAGAAATGCTATAAAAA TGGCATCTGCAGACTTGAATGCTATGAGAGTGAAATGTTAGTTGCCT ACTGTATGTTTCAGCTGGAGTGCTGTGTCAAAGGAAATCCTGCACCC TGA
9	hBD-116	GGCCTGTTTCAGATCCCACAATGGCAAGAGCCGAGAGCCTTGGAATCC ATGTGAGCTTTACCAAGGCATGTGCAGAAACGCCTGCAGAGAAATATG AAATCCAATACTTAACCTGCCCAAATGATCAAAAAGTGCTGCCTGAAA CTTTCTGTGAAAATAACCAGTTCTAAAAATGTGAAGGAGGATTACGA CTCTAACTCCAACCTTGTTCAGTTACAAAACAGTTCAAGCTACTCTCACAT TTGA

SEQID NO :	抗菌肽	多核苷酸序列 (5-3)
10	hBD-114	GATCGTTGCACCAAACGTTACGGTCGTTGTAAAAGAGACTGTCTTGA GAGTGAAAAGCAAATAGACATATGTTTCCTTACCAAGAAAAATTTGCT GCACTGAGAAATTGTATGAAGAAGATGATATGTTTTGA
11	hBD-113	GGTCCATCAGTTCACAGAAAAAACAAGAGAAGTTGCAGAGAGAA AAAGAGAATGTCAGCTTGTTCGTGGTGCTTGCAAGCCGGAATGCAAC AGCTGGGAATATGTATATTATTACTGCAATGTTAACCCCTGCTGTGCG GTATGGGAATACCAAAAAGCCAATCATTAAACAAAAATCACTAGTAACT CCATCAAAAAATAA
12	hBD-110	AATTTTGAACCAAAGTATAGATTTGAAAGATGCGAAAAAGTGAGAG GAATATGTAAAACGTTTTGTGATGATGTTGAGTATGATTATGGATACT GCATTAATGGAAAGAAGTCAGTGCTGCGTAT
13	hBD-spape	GATGTTCCACCGGAATTAGAAATACCATCTGCCATATGCAGCAAGG GATCTGCAGACTTTTTTCTGCCATTCTGGTGAGAAAAAGCGTGACAT TTGCTCTGATCCCTGGAATAGGTGTTGCGTATCAAATACAGATGAAG AAGGAAAAGAGAAAACCAGAGATGGATGGCAGATCTGGGATCTAA
14	mBD-12	GGACTTGAGTATTCCAGTCATTTCCAGGAGGGGAGATTGCTGTGTG CGAGACATGCAGGCTCGGCCGGGAAAAATGCAGGAGAACATGCATA GAGAGTGAGAAGATTGCGGGCTGGTGCAAGCTGAACTTCTTCTGCTG TCGAGAGAGGATCTGA

[0066] 术语“编码多肽的多核苷酸”可以是包括编码本发明的抗菌肽的多核苷酸，也可以是还包括附加编码和 / 或非编码序列的多核苷酸。

[0067] 本发明还涉及上述多核苷酸的变体，其编码与本发明有相同的氨基酸序列的多肽或多肽的片断、类似物和衍生物。此多核苷酸的变体可以是天然发生的等位变体或非天然发生的变体。这些核苷酸变体包括取代变体、缺失变体和插入变体。如本领域所知，等位变体是一种多核苷酸的替换形式，它可能是一个或多个核苷酸的取代、缺失或插入，但这种变化不会从实质上改变其编码的多肽功能。

[0068] 本发明还涉及与上述的序列杂交且两个序列之间具有至少 50%，较佳地至少

70%，更佳地至少 80% 相同性的多核苷酸。本发明特别涉及在严格条件下与本发明所述多核苷酸可杂交的多核苷酸。在本发明中，“严格条件”是指：(1) 在较低离子强度和较高温度下的杂交和洗脱，如 $0.2 \times \text{SSC}$, $0.1\% \text{ SDS}$, 60°C ；或 (2) 杂交时加有变性剂，如 $50\% \text{ (v/v)}$ 甲酰胺, $0.1\% \text{ 小牛血清 / } 0.1\% \text{ Ficoll}$, 42°C 等；或 (3) 仅在两条序列之间的相同性至少在 90% 以上，更好是 95% 以上时才发生杂交。并且，可杂交的多核苷酸编码的多肽与 SEQ ID NO: n 所示的抗菌肽有相同的生物学功能和活性。

[0069] 本发明所述的多核苷酸通常可以用 PCR 扩增法、重组法或人工合成的方法获得。对于 PCR 扩增法，可根据本发明所公开的有关核苷酸序列，尤其是开放阅读框序列来设计引物，并用市售的 cDNA 库或按本领域技术人员已知的常规方法所制备的 cDNA 库作为模板，扩增而得有关序列。所述的重组法通常是将所述多核苷酸克隆入载体，再转入细胞，然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。此外还可以通过人工合成的方法来合成有关序列。

[0070] 目前，已经可以完全通过化学合成来得到编码本发明蛋白（或其片段，或其衍生物）的 DNA 序列。然后可将该 DNA 序列引入本领域中已知的各种现有的 DNA 分子（或如载体）和细胞中。此外，还可通过化学合成将突变引入本发明蛋白序列中。

[0071] 本发明也涉及包含本发明的多核苷酸的载体，以及本发明的载体或抗菌肽编码序列经基因工程产生的宿主细胞，以及经重组技术生产本发明所述多肽的方法。

[0072] 通过常规的重组 DNA 技术 (Science, 1984, 224 :1431)，可利用本发明的多核苷酸序列来表达或生产重组的抗菌肽。一般来说有以下步骤：

[0073] (1) 用本发明的编码抗菌肽的多核苷酸（或变异体），或用含有该多核苷酸的重组表达载体转化或转导合适的宿主细胞；

[0074] (2) 在合适的培养基中培养宿主细胞；和

[0075] (3) 从培养基或细胞中分离、纯化蛋白质。

[0076] 本发明中，编码所述抗菌肽的多核苷酸可插入到重组表达载体中。术语“重组表达载体”指本领域熟知的细菌质粒、酵母质粒、植物细胞病毒、哺乳动物细胞病毒如腺病毒、逆转录病毒或其他载体。总之，只要能在宿主体内复制和稳定，任何质粒和载体都可以用。表达载体的一个重要特征是通常含有复制起点、启动子、标记基因和翻译控制元件。

[0077] 本领域的技术人员熟知的方法能用于构建含所述多核苷酸序列和合适的转录 / 翻译控制信号的表达载体。这些方法包括体外重组 DNA 技术、DNA 合成技术、体内重组技术等。所述的 DNA 序列可有效连接到表达载体中的适当启动子上，以指导 mRNA 合成。此外，表达载体优选地包含一个或多个选择性标记基因，以提供用于选择转化的宿主细胞的表型性状，如真核细胞培养用的二氢叶酸还原酶、新霉素抗性以及绿色荧光蛋白 (GFP)，或用于大肠杆菌的四环素或氨苄青霉素抗性。

[0078] 包含上述的编码所述的抗菌肽的多核苷酸以及适当启动子或者控制序列的载体，可以用于转化适当的宿主细胞，以使其能够表达蛋白质。

[0079] 宿主细胞可以是原核细胞，如细菌细胞；或是低等真核细胞，如酵母细胞；或是高等真核细胞，如哺乳动物细胞。代表性例子有：大肠杆菌，酵母等。针对不同的宿主细胞，还可对所述的多核苷酸序列进行密码子优化，以获得改进的表达效果，密码子优化技术是本领域人员熟知的。

[0080] 本领域一般技术人员都清楚如何选择适当的载体、启动子、增强子和宿主细胞。

[0081] 用重组 DNA 转化宿主细胞可用本领域技术人员熟知的常规技术进行。当宿主为原核生物如大肠杆菌时,能吸收 DNA 的感受态细胞可在指数生长期后收获,用 CaCl_2 法处理,所用的步骤在本领域众所周知。另一种方法是使用 MgCl_2 。如果需要,转化也可用电穿孔的方法进行。当宿主是真核生物,可选用如下的 DNA 转染方法:磷酸钙共沉淀法,常规机械方法如显微注射、电穿孔、脂质体包装等。

[0082] 获得的转化子可以用常规方法培养,以表达所述的抗菌肽。根据所用的宿主细胞,培养中所用的培养基可选自各种常规培养基。在适于宿主细胞生长的条件下进行培养。

[0083] 所述的抗菌肽可在细胞内表达、或分泌到细胞外。可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但并不限于:常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理(盐析方法)、离心、渗透破菌、超处理、超离心、分子筛层析(凝胶过滤)、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析(HPLC)和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

[0084] 本发明还提供了一种验证抗菌肽活性的方法。此方法包括抗菌肽稀释的方法,细菌稀释的方法,以及抗菌肽和细菌作用时间及确定抗菌肽活性的方法。

[0085] 本发明的抗菌肽有多方面的用途。这些用途包括(但不限于):直接作为药物预防或治疗病原体感染相关疾病,和用于筛选促进或对抗所述抗菌肽功能的抗体、多肽或其它配体。用表达的重组抗菌肽筛选多肽库可用于寻找有治疗价值的能刺激所述的抗菌肽功能的多肽分子。

[0086] 在使用本发明的抗菌肽时,还可同时使用其他药剂,如青霉素等抗菌素。

[0087] 本发明还提供了一种组合物(优选药物组合物),它含有安全有效量的本发明的抗菌肽(或其激动剂)以及药学上可接受的载体或赋形剂。这类载体包括(但不限于):盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。药物制剂应与给药方式相匹配。本发明的药物组合物可以被制成针剂形式,例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。诸如片剂和胶囊之类的药物组合物,可通过常规方法进行制备。药物组合物如针剂、溶液、片剂和胶囊宜在无菌条件下制造。活性成分的给药量是治疗有效量,例如每天约 1 微克/千克体重-约 5 毫克/千克体重。此外,本发明的多肽还可与其他治疗剂一起使用。

[0088] 使用药物组合物时,是将安全有效量的本发明的抗菌肽(或其激动剂)施用于哺乳动物(包括人),其中该安全有效量通常至少约 1 微克/千克体重,而且在大多数情况下不超过约 8 毫克/千克体重,较佳地该剂量是约 10 微克/千克体重-约 1 毫克/千克体重。当然,具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素,这些都是熟练医师技能范围内的。此外,所述抗菌肽的核苷酸序列也可用于多种治疗目的。

[0089] 抗菌肽作为一种具有多种生物活性的天然分子,其生物学功能还将会有新的拓展。随着研究的不断深入和技术的不断发展,抗菌肽对人类的贡献将会越来越大。

[0090] 本发明的优点主要在于:

[0091] (1) 本发明所述的抗菌肽是天然抗菌肽,且多数是人源的,在临床应用过程中具有较低的免疫排斥的风险。

[0092] (2) 本发明所述的抗菌肽对于真菌具有良好的杀菌效果,对于临床上目前比较棘

手的深部真菌感染（如白念珠菌导致的感染）疾病有广阔的应用前景；且目前应用的抗真菌药物都有肝肾毒性，本发明所述人源天然抗菌肽不会产生类似的肝肾毒性。

[0093] (3) 本发明所述的抗菌肽与现有技术中同类抗菌肽相比较，其抑菌活力有较大的增加。

[0094] 下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件如 Sambrook 等人，分子克隆：实验室指南（New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989）中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明，否则百分比和份数按重量计算。

[0095] 实施例 1. 抗菌肽表达质粒的构建

[0096] 本发明人选用了一种蛋白内含子介导纯化的原核表达载体，即 pTWIN1 表达载体（购自 NEB 公司）。其优点在于：蛋白质剪切是一种翻译后修饰事件，它将插入前体蛋白的中间的蛋白质内含子（Intein）剪切出来，并用正常肽键将两侧蛋白质多肽链连接起来。在此过程中不需要辅酶或辅助因子的作用，仅需四步分子内反应。Intein 及其侧翼序列可以通过突变产生高度特异性的自我切割用于蛋白质纯化、蛋白质连接和蛋白质环化反应。pTWIN 1 载体在 Intein 的 N 末端融合有几丁质结合区域（chitin binding domain, CBD），它可使 Intein 融合蛋白吸附于几丁质珠上。当将目的蛋白融合到 Intein 的 C 末端表达时，在 pH 值为 7，温度为 25℃ 的条件下，Intein 被诱导在其和目的蛋白之间进行自切割，这样，目的蛋白就被释放出来。基于 Intein 自切割的蛋白纯化系统属于一次性纯化系统，该系统无需使用蛋白酶，避免了蛋白酶切割所带来的非特异性酶解，也无需进一步纯化去除蛋白酶，是一个省时经济的好方法。

[0097] 用 PCR 方法扩增得到抗菌肽编码区的 DNA 序列。PCR 以人类基因组为模板，用 La Taq 酶（TaKaRa）进行扩增，引物如表 4 所示。

[0098] 表 4

[0099]

	引物 (5 → 3)	SEQID NO :
hBD-116	AAAGCTCTTCTAACggcctgttcagatcccacaat	15
	AAAGGATCCtcaaatgtgagagtagcttga	16
hBD-134	AAAGCTCTTCTAACggtataaattcattatcatca	17
	AAAGGATCCtcagggtgcaggatttccttt	18
hBD-110	aaaGCTCTTCTAACaattttgaaccaaagtatag	19
	aaaCTGCAGtcatacgagcactgacttc	20
hBD-113	aaaGCTCTTCTAACggtccatcagttccacagaa	21
	aaaCTGCAGtcatttttgatggagtttacta	22

	引物 (5 → 3)	SEQID NO :
hBD-114	aaaGCTCTTCTAACgatcggttgacacaaacgttac	23
	aaaCTGCAGtcaaaacatatcatcttcttc	24
hBD-SP	aaaGCTCTTCTAACgatgttccaccgggaattagaaata	25
	aaaCTGCAGttagatcccagatctgccatccatc	26
mBD-12	aaaGCTCTTCTAACggacttgagtattcccagtc	27
	aaaCTGCAGtcagatcctctctcgacagc	28

[0100] PCR程序为:95℃ 2min,94℃ 30s,60℃ 30s,72℃ 30s,30个循环,72℃ 5min,16℃ forever。PCR扩增到的DNA片段两端加有克隆载体需要的酶切位点HBD-116和HBD-134为BstQ I和BamH I,HBD-110、HBD-113、HBD-114、HBD-SP和mBD-12为BstQ I和Pst I,PCR产物经酶切回收克隆到pTWIN1载体的BstQ I和BamH I或BstQ I和Pst I位点上。酶切和测序鉴定正确的质粒分别命名为:pTWIN1-116、pTWIN1-134、pTWIN1-110、pTWIN1-113、pTWIN1-114、pTWIN1-SP、pTWIN1-12,质粒示意图见图1。

[0101] 实施例2. 抗菌肽表达质粒的转化和鉴定

[0102] 从-70℃冰箱中取200μl感受态细胞E. coli ER2566菌株(New England Biolabs)悬液,室温下使其解冻,解冻后立即置冰上。加入质粒DNA溶液(含量不超过50ng,体积不超过10μl),轻轻摇匀,冰上放置30分钟后。42℃水浴中热击90秒或37℃水浴5分钟,热击后迅速置于冰上冷却3-5分钟。向管中加入1ml LB液体培养基(不含Amp),混匀后37℃振荡培养1小时,使细菌恢复正常生长状态,并表达质粒编码的抗生素抗性基因(Amp)。将上述菌液摇匀后取100μl涂布于含Amp的筛选平板上,正面向上放置半小时,待菌液完全被培养基吸收后倒置培养皿,37℃培养16-24小时。

[0103] 挑取单克隆于3ml LB培养基中,37℃培养8-16小时,菌液用于PCR鉴定和测序鉴定。PCR扩增后电泳鉴定的结果见图2,测序结果正确。

[0104] 实施例3. 抗菌肽蛋白的制备

[0105] 从平板上挑取单克隆,接种到含有0.1μg/ml的3ml LB试管中,37℃ 200rpm培养过夜,取1ml菌,转接到含有100ml LB的摇瓶中,37℃ 200rpm培养3hr,测OD600到0.5-0.7左右,加入0.5mM的IPTG于25℃ 200rpm诱导培养过夜。

[0106] 将培养过夜的100ml菌液12000rpm 4℃离心10min弃上清,在沉淀中加入10ml溶解缓冲液B1(20mM Tris-HCl,50mM NaCl,1mM EDTA,pH 8.5)和0.15% Tween20和20μM PMSF,超声破碎,超声时间8s,间歇15s,能量300W,总时间10min,超声2次后12000rpm 4℃离心15min取上清。

[0107] 将10ml上清加入含有4ml 几丁质填料的柱子中,柱子先用20ml缓冲液B1洗涤平衡,超声破壁上清结合几丁质填料2小时后,循环过柱5-10次,用20ml B1洗涤柱子后,加入4ml洗脱缓冲液B2(20mM Tris-HCl,50mM NaCl,1mM EDTA,pH 7.0)结合切割,25℃结合切割过夜后的4ml含有抗菌肽的液体用于做抑菌实验。由于抗菌肽蛋白大小类似,制备方

法相同,本发明人以 hBD-spage 蛋白表达纯化结果为例,见图 3 和图 4。

[0108] 实施例 4. 抑菌实验

[0109] 先将菌稀释到 10^3 cfu/ 5μ l, 将 5μ l 菌和 50μ l 含有抗菌肽的 B2 混合, 37°C 处理不同的时间,涂板, 37°C 培养过夜,数平板上克隆数,计算不同处理时间的存活率:

[0110]

$$\text{存活率} = \frac{\text{含有抗菌肽的B2处理的菌克隆数}}{\text{B2处理的菌克隆数}}$$

[0111] 抗菌肽对于大肠杆菌 *E. coli* 的抑菌实验结果见图 5, 抗菌肽浓度为 0.3mg/ml , 菌浓度为 10^3 cfu/ 5μ l, 作用时间为 6 小时, 每小时取样测菌的存活率, 经过 6 小时的抑菌, 大肠杆菌的存活率均在 10% 以下。

[0112] 抗菌肽对于白色念珠菌 *Candida albicans* 的抑菌实验结果见图 6, 抗菌肽浓度为 0.3mg/ml , 菌浓度为 10^3 cfu/ 5μ l, 作用时间为 6 小时, 每小时取样测菌的存活率, 经过 6 小时的抑菌, 大肠杆菌的存活率均在 10% 以下。

[0113] 实施例 5. 抗菌肽的抑菌活性比较

[0114] 将本发明所述几个抗菌肽与现有技术中的抗菌肽 (抗菌肽 Bin1b (参见申请号 200410018102.2)) 进行抑菌活力比较, 采用大肠杆菌 *E. coli* 的抑菌实验。抗菌肽浓度为 0.4mg/ml , 菌浓度为 10^3 cfu/ 5μ l, 作用时间为 4 小时, 每隔 1 小时取样测菌的存活率。

[0115] 结果见图 7, 从图中可以看出, 本发明所述的抗菌肽对于大肠杆菌 *E. coli* 的抑菌作用均显著优于 Bin1b。

[0116] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考, 如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解, 在阅读了本发明的上述讲授内容之后, 本技术领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改, 这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0117] 序列表

[0118] <110> 上海南方模式生物科技发展有限公司 ; 上海南方模式生物研究中心

[0119] <120> 新的天然抗菌肽、其编码序列及用途

[0120] <130>083733

[0121] <160>28

[0122] <170>PatentIn version 3.3

[0123] <210>1

[0124] <211>47

[0125] <212>PRT

[0126] <213> 智人 (*Homo Sapiens*)

[0127] <400>1

[0128] Gly Ile Asn Ser Leu Ser Ser Glu Met His Lys Lys Cys Tyr Lys Asn

[0129] 1 5 10 15

[0130] Gly Ile Cys Arg Leu Glu Cys Tyr Glu Ser Glu Met Leu Val Ala Tyr

[0131] 20 25 30

[0132] Cys Met Phe Gln Leu Glu Cys Cys Val Lys Gly Asn Pro Ala Pro

[0133]	35	40	45
[0134]	<210>2		
[0135]	<211>79		
[0136]	<212>PRT		
[0137]	<213> 智人 (Homo Sapiens)		
[0138]	<400>2		
[0139]	Gly Leu Phe Arg Ser His Asn Gly Lys Ser Arg Glu Pro Trp Asn Pro		
[0140]	1	5	10 15
[0141]	Cys Glu Leu Tyr Gln Gly Met Cys Arg Asn Ala Cys Arg Glu Tyr Glu		
[0142]	20	25	30
[0143]	Ile Gln Tyr Leu Thr Cys Pro Asn Asp Gln Lys Cys Cys Leu Lys Leu		
[0144]	35	40	45
[0145]	Ser Val Lys Ile Thr Ser Ser Lys Asn Val Lys Glu Asp Tyr Asp Ser		
[0146]	50	55	60
[0147]	Asn Ser Asn Leu Ser Val Thr Asn Ser Ser Ser Tyr Ser His Ile		
[0148]	65	70	75
[0149]	<210>3		
[0150]	<211>43		
[0151]	<212>PRT		
[0152]	<213> 智人 (Homo Sapiens)		
[0153]	<400>3		
[0154]	Asp Arg Cys Thr Lys Arg Tyr Gly Arg Cys Lys Arg Asp Cys Leu Glu		
[0155]	1	5	10 15
[0156]	Ser Glu Lys Gln Ile Asp Ile Cys Ser Leu Pro Arg Lys Ile Cys Cys		
[0157]	20	25	30
[0158]	Thr Glu Lys Leu Tyr Glu Glu Asp Asp Met Phe		
[0159]	35	40	
[0160]	<210>4		
[0161]	<211>66		
[0162]	<212>PRT		
[0163]	<213> 智人 (Homo Sapiens)		
[0164]	<400>4		
[0165]	Gly Pro Ser Val Pro Gln Lys Lys Thr Arg Glu Val Ala Glu Arg Lys		
[0166]	1	5	10 15
[0167]	Arg Glu Cys Gln Leu Val Arg Gly Ala Cys Lys Pro Glu Cys Asn Ser		
[0168]	20	25	30
[0169]	Trp Glu Tyr Val Tyr Tyr Tyr Cys Asn Val Asn Pro Cys Cys Ala Val		
[0170]	35	40	45
[0171]	Trp Glu Tyr Gln Lys Pro Ile Ile Asn Lys Ile Thr Ser Lys Leu His		

[0172] 50 55 60
 [0173] Gln Lys
 [0174] 65
 [0175] <210>5
 [0176] <211>41
 [0177] <212>PRT
 [0178] <213> 智人 (Homo Sapiens)
 [0179] <400>5
 [0180] Asn Phe Glu Pro Lys Tyr Arg Phe Glu Arg Cys Glu Lys Val Arg Gly
 [0181] 1 5 10 15
 [0182] Ile Cys Lys Thr Phe Cys Asp Asp Val Glu Tyr Asp Tyr Gly Tyr Cys
 [0183] 20 25 30
 [0184] Ile Lys Trp Arg Ser Gln Cys Cys Val
 [0185] 35 40
 [0186] <210>6
 [0187] <211>61
 [0188] <212>PRT
 [0189] <213> 智人 (Homo Sapiens)
 [0190] <400>6
 [0191] Asp Val Pro Pro Gly Ile Arg Asn Thr Ile Cys His Met Gln Gln Gly
 [0192] 1 5 10 15
 [0193] Ile Cys Arg Leu Phe Phe Cys His Ser Gly Glu Lys Lys Arg Asp Ile
 [0194] 20 25 30
 [0195] Cys Ser Asp Pro Trp Asn Arg Cys Cys Val Ser Asn Thr Asp Glu Glu
 [0196] 35 40 45
 [0197] Gly Lys Glu Lys Pro Glu Met Asp Gly Arg Ser Gly Ile
 [0198] 50 55 60
 [0199] <210>7
 [0200] <211>51
 [0201] <212>PRT
 [0202] <213> 鼠 (Muc musculus)
 [0203] <400>7
 [0204] Gly Leu Glu Tyr Ser Gln Ser Phe Pro Gly Gly Glu Ile Ala Val Cys
 [0205] 1 5 10 15
 [0206] Glu Thr Cys Arg Leu Gly Arg Gly Lys Cys Arg Arg Thr Cys Ile Glu
 [0207] 20 25 30
 [0208] Ser Glu Lys Ile Ala Gly Trp Cys Lys Leu Asn Phe Phe Cys Cys Arg
 [0209] 35 40 45
 [0210] Glu Arg Ile

[0211]	50	
[0212]	<210>8	
[0213]	<211>144	
[0214]	<212>DNA	
[0215]	<213> 智人 (Homo Sapiens)	
[0216]	<400>8	
[0217]	ggtataaatt cattatcatc agaaatgcac aagaaatgct ataaaaatgg catctgcaga	60
[0218]	cttgaatgct atgagagtga aatgttagtt gcctactgta tgtttcagct ggagtgctgt	120
[0219]	gtcaaaggaa atcctgcacc ctga	144
[0220]	<210>9	
[0221]	<211>240	
[0222]	<212>DNA	
[0223]	<213> 智人 (Homo Sapiens)	
[0224]	<400>9	
[0225]	ggcctgttca gatcccacaa tggcaagagc cgagagcctt ggaatccatg tgagctttac	60
[0226]	caaggcatgt gcagaaacgc ctgcagagaa tatgaaatcc aataactaac ctgcccacaaat	120
[0227]	gatcaaaagt gctgcctgaa actttctgtg aaaataacca gttctaaaaa tgtgaaggag	180
[0228]	gattacgact ctaactccaa cttgtcagtt acaaacagtt caagctactc tcacatttga	240
[0229]	<210>10	
[0230]	<211>132	
[0231]	<212>DNA	
[0232]	<213> 智人 (Homo Sapiens)	
[0233]	<400>10	
[0234]	gatcgttgca ccaaacgtta cggtcgttgt aaaagagact gtcttgagag tgaaaagcaa	60
[0235]	atagacatat gttccttacc aagaaaaatt tgctgcactg agaaattgta tgaagaagat	120
[0236]	gatatgtttt ga	132
[0237]	<210>11	
[0238]	<211>201	
[0239]	<212>DNA	
[0240]	<213> 智人 (Homo Sapiens)	
[0241]	<400>11	
[0242]	ggtccatcag ttccacagaa aaaaacaaga gaagttgcag agagaaaaag agaatgtcag	60
[0243]	cttgttcgtg gtgcttcaa gccggaatgc aacagctggg aatatgtata ttattactgc	120
[0244]	aatgttaacc cctgtgtgc ggtatgggaa taccaaaagc caatcattaa caaaatcact	180
[0245]	agtaaactcc atcaaaaata a	201
[0246]	<210>12	
[0247]	<211>126	
[0248]	<212>DNA	
[0249]	<213> 智人 (Homo Sapiens)	

[0250]	<400>12	
[0251]	aat t t t t g a a c c a a a g t a t a g a t t t g a a a g a t g c g a a a a a g t g a g a g g a a t a t g t a a a a c g	60
[0252]	t t t t g t g a t g a t g t t g a g t a t g a t t a t g g a t a c t g c a t t a a a t g g a a a g a a g t c a g t g c t	120
[0253]	g c g t a t	126
[0254]	<210>13	
[0255]	<211>186	
[0256]	<212>DNA	
[0257]	<213> 智人 (Homo Sapiens)	
[0258]	<400>13	
[0259]	g a t g t t c c a c c g g g a a t t a g a a a t a c c a t c t g c c a t a t g c a g c a a g g g a t c t g c a g a c t t	60
[0260]	t t t t t c t g c c a t t c t g g t g a g a a a a g c g t g a c a t t t g c t c t g a t c c c t g g a a t a g g t g t	120
[0261]	t g c g t a t c a a a t a c a g a t g a a g a a g g a a a g a g a a a c c a g a g a t g g a t g g c a g a t c t g g g	180
[0262]	a t c t a a	186
[0263]	<210>14	
[0264]	<211>156	
[0265]	<212>DNA	
[0266]	<213> 鼠 (Muc musculus)	
[0267]	<400>14	
[0268]	g g a c t t g a g t a t t c c c a g t c a t t t c c a g g a g g g g a g a t t g c t g t g t g c g a g a c a t g c a g g	60
[0269]	c t c g g c c g g g g a a a a t g c a g g a g a a c a t g c a t a g a g a g t g a g a a g a t t g c g g g c t g g t g c	120
[0270]	a a g c t g a a c t t e t t c t g c t g t c g a g a g a g g a t c t g a	156
[0271]	<210>15	
[0272]	<211>35	
[0273]	<212>DNA	
[0274]	<213> 人工序列	
[0275]	<221>misc_feature	
[0276]	<223> 引物	
[0277]	<400>15	
[0278]	a a a g c t e t t c t a a c g g c c t g t t c a g a t c c c a c a a t	35
[0279]	<210>16	
[0280]	<211>30	
[0281]	<212>DNA	
[0282]	<213> 人工序列	
[0283]	<221>misc_feature	
[0284]	<223> 引物	
[0285]	<400>16	
[0286]	a a a g g a t c c t c a a a t g t g a g a g t a g c t t g a	30
[0287]	<210>17	
[0288]	<211>35	

[0289]	<212>DNA	
[0290]	<213> 人工序列	
[0291]	<221>misc_feature	
[0292]	<223> 引物	
[0293]	<400>17	
[0294]	aaagctcttc taacgtata aattcattat catca	35
[0295]	<210>18	
[0296]	<211>30	
[0297]	<212>DNA	
[0298]	<213> 人工序列	
[0299]	<221>misc_feature	
[0300]	<223> 引物	
[0301]	<400>18	
[0302]	aaagatcct cagggtgcag gatttccttt	30
[0303]	<210>19	
[0304]	<211>34	
[0305]	<212>DNA	
[0306]	<213> 人工序列	
[0307]	<221>misc_feature	
[0308]	<223> 引物	
[0309]	<400>19	
[0310]	aaagctcttc taacaatttt gaaccaaagt atag	34
[0311]	<210>20	
[0312]	<211>29	
[0313]	<212>DNA	
[0314]	<213> 人工序列	
[0315]	<221>misc_feature	
[0316]	<223> 引物	
[0317]	<400>20	
[0318]	aaactgcagt catacgcagc actgacttc	29
[0319]	<210>21	
[0320]	<211>34	
[0321]	<212>DNA	
[0322]	<213> 人工序列	
[0323]	<221>misc_feature	
[0324]	<223> 引物	
[0325]	<400>21	
[0326]	aaagctcttc taacgtcca tcagttccac agaa	34
[0327]	<210>22	

[0328]	<211>31	
[0329]	<212>DNA	
[0330]	<213> 人工序列	
[0331]	<221>misc_feature	
[0332]	<223> 引物	
[0333]	<400>22	
[0334]	aaactgcagt catttttgat ggagtttact a	31
[0335]	<210>23	
[0336]	<211>35	
[0337]	<212>DNA	
[0338]	<213> 人工序列	
[0339]	<221>misc_feature	
[0340]	<223> 引物	
[0341]	<400>23	
[0342]	aaagctcttc taacgatcgt tgcaccaaac gttac	35
[0343]	<210>24	
[0344]	<211>30	
[0345]	<212>DNA	
[0346]	<213> 人工序列	
[0347]	<221>misc_feature	
[0348]	<223> 引物	
[0349]	<400>24	
[0350]	aaactgcagt caaaacatat catcttcttc	30
[0351]	<210>25	
[0352]	<211>39	
[0353]	<212>DNA	
[0354]	<213> 人工序列	
[0355]	<221>misc_feature	
[0356]	<223> 引物	
[0357]	<400>25	
[0358]	aaagctcttc taacgatggt ccaccgggaa ttagaaata	39
[0359]	<210>26	
[0360]	<211>34	
[0361]	<212>DNA	
[0362]	<213> 人工序列	
[0363]	<221>misc_feature	
[0364]	<223> 引物	
[0365]	<400>26	
[0366]	aaactgcagt tagatcccag atctgceate catc	34

[0367]	<210>27	
[0368]	<211>34	
[0369]	<212>DNA	
[0370]	<213> 人工序列	
[0371]	<221>misc_feature	
[0372]	<223> 引物	
[0373]	<400>27	
[0374]	aaagctcttc taacggactt gagtattccc agtc	34
[0375]	<210>28	
[0376]	<211>29	
[0377]	<212>DNA	
[0378]	<213> 人工序列	
[0379]	<221>misc_feature	
[0380]	<223> 引物	
[0381]	<400>28	
[0382]	aaactgcagt cagatcctct ctcgacagc	29

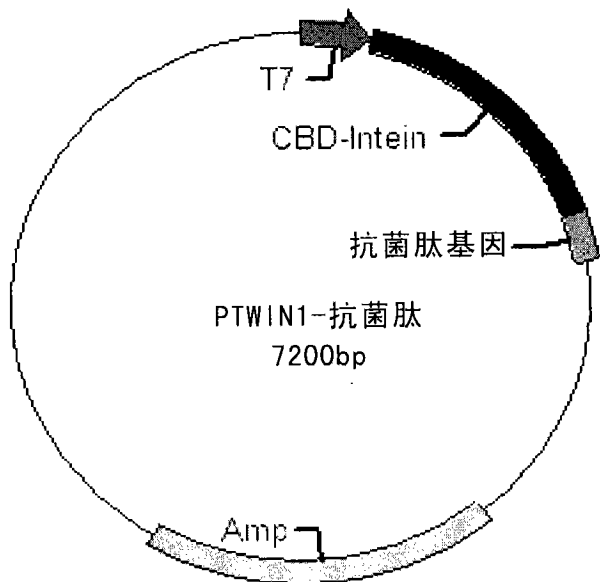


图 1

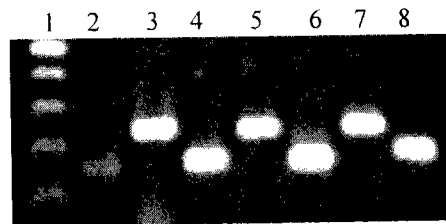


图 2

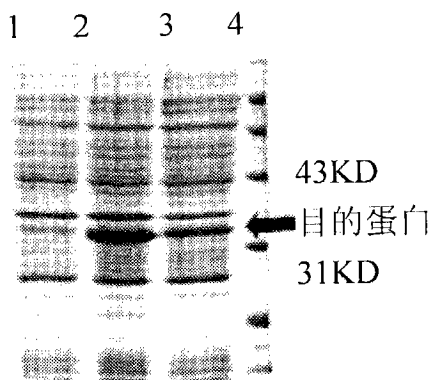


图 3

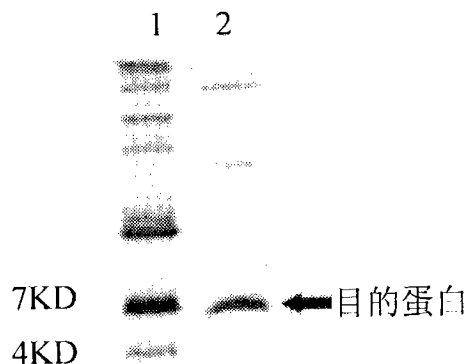


图 4

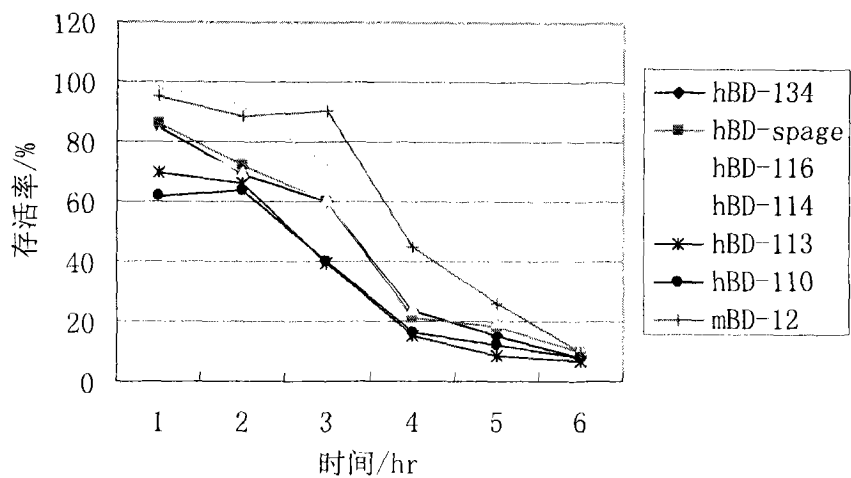


图 5

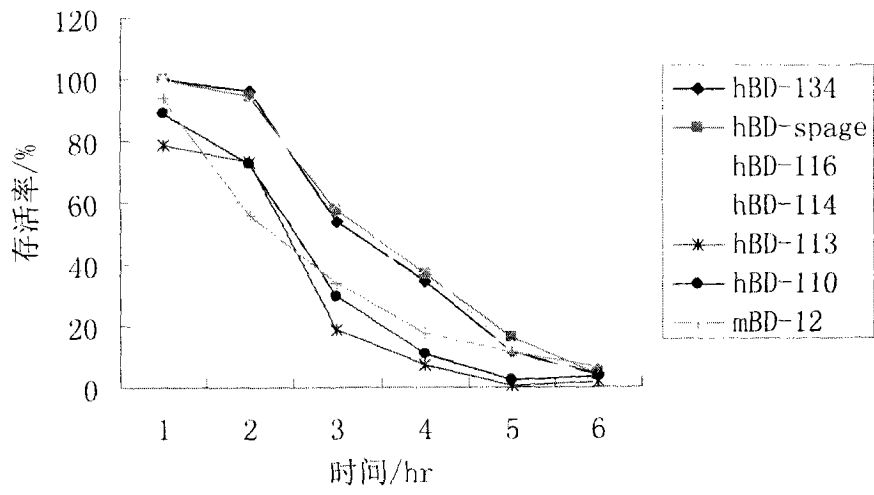


图 6

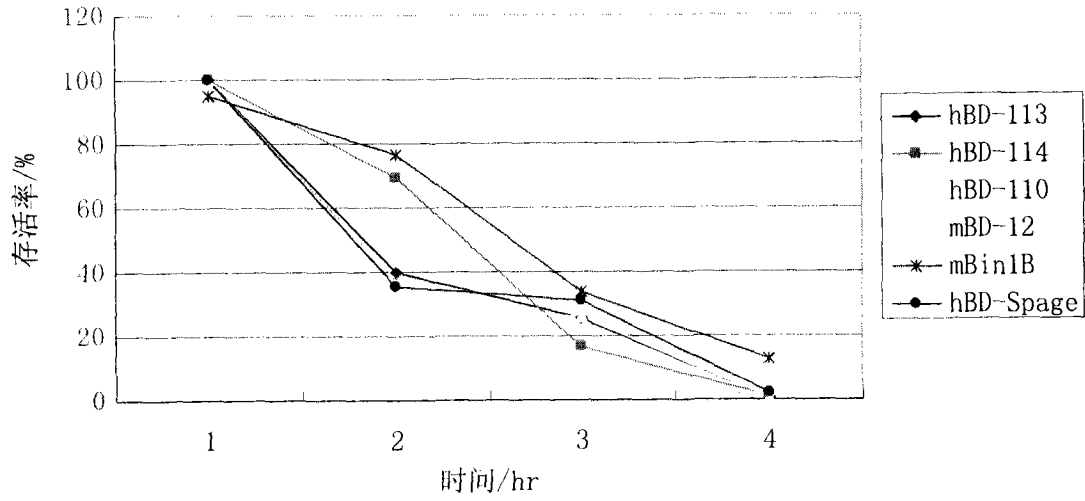


图 7