



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107073073 B

(45) 授权公告日 2021.07.09

(21) 申请号 201580057704.5

(22) 申请日 2015.09.22

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 107073073 A

(43) 申请公布日 2017.08.18

(30) 优先权数据  
1416788.6 2014.09.23 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2017.04.24

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/EP2015/071768 2015.09.22

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02016/046218 EN 2016.03.31

(73) 专利权人 格拉斯哥大学大学行政评议会  
地址 英国格拉斯哥

(72) 发明人 丹尼尔·沃克 劳拉·麦考伊

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 郑斌 刘振佳

(51) Int.Cl.

A61K 38/16 (2006.01)

C07K 14/21 (2006.01)

A61K 9/72 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

审查员 樊艳爽

权利要求书1页 说明书22页  
序列表42页 附图4页

(54) 发明名称

经肺施用绿脓菌素用于治疗细菌性呼吸道感染

(57) 摘要

本发明涉及使用称为绿脓菌素的细菌来源抗生素来治疗细菌性呼吸道感染。特别地,本发明提供了通过经肺施用而施用的S型绿脓菌素用于治疗这样的感染的用途。

1. S型绿脓菌素用于制备用于在对象中预防或治疗细菌性呼吸道感染之药物的用途, 其中所述绿脓菌素通过经肺施用来递送, 并且其中所述S型绿脓菌素为S5绿脓菌素, 并且其中感染的细菌包含铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)。

2. 根据权利要求1所述的用途, 其中所述对象患有细菌性肺炎, 或者处于其发生的风险之中。

3. 根据权利要求2所述的用途, 其中所述对象的呼吸道功能受损和/或免疫功能受损。

4. 根据权利要求2所述的用途, 其中所述对象患有囊性纤维化或慢性阻塞性肺病。

5. 根据权利要求2所述的用途, 其中所述对象是癌症患者或者受到充血性心力衰竭或AIDS影响的患者。

6. 根据权利要求2所述的用途, 其中待治疗的对象患有社区获得性肺炎、呼吸机相关性肺炎或医院获得性肺炎, 或者处于其发生的风险之中。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的用途, 其中向所述对象施用两种或更多种绿脓菌素的组合。

8. 根据权利要求7所述的用途, 其中所述组合还包含L1绿脓菌素、S2绿脓菌素、SD2 绿脓菌素和/或AP41绿脓菌素。

9. 根据权利要求8所述的用途, 其中所述组合包含L1绿脓菌素和S2绿脓菌素, L1绿脓菌素和AP41绿脓菌素, S2绿脓菌素和AP41绿脓菌素, 或者L1绿脓菌素、S2 绿脓菌素和AP41 绿脓菌素; 其任选地与 SD2绿脓菌素组合。

10. 制备用于预防或治疗细菌性呼吸道感染的药物的方法, 其包括提供S型绿脓菌素并将所述S型绿脓菌素配制成用于经肺施用, 其中所述S型绿脓菌素为S5绿脓菌素, 并且其中感染的细菌包含铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)。

## 经肺施用绿脓菌素用于治疗细菌性呼吸道感染

### 技术领域

[0001] 本发明涉及细菌性呼吸道感染 (bacterial respiratory infection) 的治疗, 并且特别地涉及称为绿脓菌素 (pyocin) 的细菌来源抗生素用于治疗此类感染中的用途。

### 背景技术

[0002] 对于例如铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 和大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的革兰氏阴性病原体, 治疗选择常常是有限的。这是由于抗生素耐药性决定子的平向获取 (horizontal acquisition) 和高度非渗透性的外膜的存在严重限制了很多种类抗生素的效力<sup>1-3</sup>。在机会性病原体铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*) 的情况下, 在世界范围内存在对可利用的所有抗生素均具有耐药性的临床分离株, 并且18%至25%的临床分离株具有多重耐药性<sup>1,4</sup>。另外, 铜绿假单胞菌在慢性感染中形成多重耐药性生物膜的能力, 以及在长时间的抗生素治疗期间抗生素耐药性表型变体的出现, 可使得用现有的抗生素基本上无法治疗该类病原体<sup>5-7</sup>。在患有囊性纤维化的患者中, 铜绿假单胞菌是下呼吸道的慢性感染首要的死亡原因, 所述患者尽管接受强力的抗生素治疗, 但是仍仅具有41.5年的中位预测存活期 (2011)<sup>8</sup>。另外, 铜绿假单胞菌感染是例如呼吸机相关性肺炎的医院内感染的主要且日益增长的原因。铜绿假单胞菌感染还与慢性阻塞性肺病的发病机理相关, 该病是西方世界中首要死亡原因<sup>9-12</sup>。因此, 迫切需要考虑用于抗生素开发的替代策略以支持其开发途径, 其在近几十年来已很少产生针对这些难以治疗的细菌具有活性的小分子抗生素<sup>13-15</sup>。

[0003] 一种用于发现有效抗生素的替代策略是利用由许多细菌为了种内竞争而产生的强效窄谱抗生素。在铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌 (*K. pneumoniae*) 和大肠杆菌 (*E. coli*) 中, 这些抗生素分别采用称为S型绿脓菌素、克雷伯菌素 (klebicin) 和大肠杆菌素 (colicin) 的多结构域蛋白抗生素的形式<sup>16-18</sup>。这些细菌素 (bacteriocin) 已进化成经由寄生于现有的活性营养物质摄取途径来高效地穿过革兰氏阴性外膜, 这是革兰氏阴性菌的致命要害<sup>19-24</sup>。这些蛋白质抗生素的细胞靶标高度保守, 其中细胞毒活性最常采用靶向DNA、rRNA或tRNA的核酸酶活性或者靶向细胞质膜的成孔活性的形式<sup>17</sup>。对于现今已表征的绿脓菌素, 已知绿脓菌素S1、S2、S3和AP41显示出DNA酶活性, 而绿脓菌素S4为tRNA酶, 并且绿脓菌素S5为成孔毒素<sup>16</sup>。对于最近得到描述的凝集素样绿脓菌素L1, 其细胞杀伤机理是未知的。

### [0004] 发明概述

[0005] 尽管绿脓菌素显示出针对铜绿假单胞菌的不匹配效力, 并且绿脓菌素S2在铜绿假单胞菌感染的无脊椎动物模型中具有活性<sup>25</sup>, 但是先前并未提出或表明绿脓菌素是用于临床用途的优良候选物。作为细菌性来源的多肽, 其显示出特别地不适用于治疗影响呼吸道的病症, 因为预期肺中存在细菌蛋白会引发免疫应答, 这对敏感的呼吸组织极具损伤性。

[0006] 令人惊讶的是, 本发明人已发现, 在使细菌载量急剧降低的情况下, S型绿脓菌素可成功地递送至肺, 而不引发免疫应答或导致其他组织损伤。

[0007] 本发明提供了S型绿脓菌素, 其用于预防或治疗细菌性呼吸道感染之方法, 其中所

述绿脓菌素通过经肺施用来递送。

[0008] 本发明还提供了S型绿脓菌素在制备用于预防或治疗细菌性呼吸道感染的药物中的用途,其中所述绿脓菌素通过经肺施用来递送。

[0009] 本发明还提供了用于在对象中预防或治疗细菌性呼吸道感染的方法,其中通过经肺施用向该对象递送S型绿脓菌素。

[0010] 感染性细菌通常包含假单胞菌物种,例如铜绿假单胞菌。

[0011] 待治疗的对象可患有由感染引起的细菌性肺炎或者可处于发生由感染引起的细菌性肺炎的风险之中。因此,可使用S型绿脓菌素来预防和/或治疗细菌性肺炎。

[0012] 待治疗的对象可具有受损的呼吸道功能和/或受损的免疫功能。

[0013] 待治疗的对象可患有囊性纤维化或慢性阻塞性肺病(chronic obstructive pulmonary disease,COPD)。或者,所述对象可为癌症患者(尤其是正进行化学治疗的癌症患者)或者患有充血性心力衰竭或AIDS的患者。

[0014] 待治疗的对象可患有社区获得性肺炎和医院内感染(例如呼吸机相关性肺炎和医院获得性肺炎),或者处于其发生的风险之中。

[0015] 如下文更详细描述, S型绿脓菌素包含靶向部分和效应物部分。

[0016] S型绿脓菌素可例如包含S2、SD2、S5或AP41靶向部分。在一些实施方案中,所述绿脓菌素包含S5靶向部分。

[0017] 作为替代或补充, S型绿脓菌素可例如包含S2、SD2、S5或AP41效应物部分。或者,其可包含来自大肠杆菌素,例如来自E2或E3大肠杆菌素的细胞毒结构域。在一些实施方案中,所述绿脓菌素包含S5效应物部分。

[0018] 在一些实施方案中, S型绿脓菌素为SD2、SD2、S5、AP41或L1绿脓菌素,例如S5绿脓菌素。

[0019] 可期待向对象施用两种或更多种绿脓菌素的组合。所述组合可包含具有至少两种不同受体特异性和/或效应物活性的S型绿脓菌素。

[0020] 所述组合可包含S5绿脓菌素。

[0021] 所述组合可包含L1绿脓菌素。

[0022] 所述组合可包含S2绿脓菌素。

[0023] 所述组合可包含AP41绿脓菌素。

[0024] 所述组合可包含SD2绿脓菌素。

[0025] 所述组合可包含L1绿脓菌素和S2绿脓菌素; L1绿脓菌素和AP41绿脓菌素; S2绿脓菌素和AP41绿脓菌素; 或者L1绿脓菌素、S2绿脓菌素和AP41绿脓菌素。任何这些组合可另外包含S5绿脓菌素和/或SD2绿脓菌素。无论存在哪些其他绿脓菌素,均可期望所述组合包含S5绿脓菌素。

[0026] 本发明还提供了制备用于预防或治疗细菌性呼吸道感染的药物的方法,其包括提供S型绿脓菌素并将所述S型绿脓菌素配制成用于经肺施用。

[0027] S型绿脓菌素可通过重组方法来表达。

[0028] 所述方法可包括重组表达S型绿脓菌素和任选地分离S型绿脓菌素的步骤。

[0029] 本发明还提供了用于向对象经肺施用活性剂的装置,所述装置包含S型绿脓菌素。所述装置可例如为吸入器(例如,定量吸入器、干粉吸入器)或喷雾器(例如,超声喷雾器、喷

射喷雾器、振动筛喷雾器)。

[0030] 现在将参照附图和实施例,通过举例而非限制的方式对本发明进行更详细说明。

### 附图说明

[0031] 图1.从经绿脓菌素处理的小鼠中进行铜绿假单胞菌P8细菌回收。所有的绿脓菌素均以 $3\text{mg ml}^{-1}$ 给予。通过匀浆肺的CFU计数来确定细菌计数。(a)在感染前6小时用绿脓菌素处理小鼠,所有小鼠在感染后5小时被淘汰;(b)在感染前6小时用绿脓菌素处理小鼠,经绿脓菌素处理的小鼠存活至24小时;(c)在感染后1小时用绿脓菌素处理小鼠,所有小鼠在感染后4.5小时被淘汰;(d)在感染后1小时用绿脓菌素处理小时,经绿脓菌素处理的小鼠存活至24小时。从a)、b)和d)中经绿脓菌素S5处理的小鼠未回收到菌落。条棒表示平均值 $\pm$ SEM,\*表示通过应用Bonferroni校正的单侧Mann-Whitney U检验来比较处理相对于对照的统计学显著性。

[0032] 图2.对经铜绿假单胞菌P8感染的小鼠进行绿脓菌素S5和妥布霉素处理。(A)在感染后1小时处理小鼠,所有小鼠在感染后4.5小时被淘汰;(B)在感染后1小时处理小鼠(S5  $30\text{ng ml}^{-1}$ 和妥布霉素 $300\mu\text{g ml}^{-1}$ ),小鼠存活至24小时。所有的其他小鼠在感染后5.5小时被淘汰。条棒表示平均值 $\pm$ SEM,\*表示通过应用Bonferroni校正的单侧Mann-Whitney U检验来比较处理相对于对照的统计学显著性。

[0033] 图3.可通过用多种绿脓菌素处理来克服针对绿脓菌素的获得性耐受性。(a)确定绿脓菌素S5、AP41和L1的细胞毒活性的斑点测试。将 $200\mu\text{g ml}^{-1}$ 的经纯化蛋白质点样到生长的菌苔上。透明的区域指示绿脓菌素细胞毒性。P8AP41T是P8的AP41耐受性菌株,P8AP41T\*是从(b)中所示的未经处理的对照小鼠回收的菌株P8AP41T。(b)经(a)中所示的P8AP41T感染,然后在感染后1小时用 $3\text{mg ml}^{-1}$ 绿脓菌素处理的小鼠的细菌计数。经绿脓菌素处理的小鼠存活至24小时。从经绿脓菌素S5处理的小鼠未回收到菌落菌落。条棒表示平均值 $\pm$ SEM,\*表示通过应用Bonferroni校正的单侧Mann-Whitney U检验来比较处理相对于对照的统计学显著性。

[0034] 图4.用于处理经铜绿假单胞菌P8感染的小鼠的绿脓菌素组合。在感染后1小时用储液浓度为 $300\mu\text{g ml}^{-1}$ 的绿脓菌素处理小鼠;经绿脓菌素处理的小鼠存活至24小时。条棒表示平均值 $\pm$ SEM,\*表示通过应用Bonferroni校正的单侧Mann-Whitney U检验来比较处理相对于对照的统计学显著性。

[0035] 图5.图1(c)和(d)中实验的生物学重复。从经绿脓菌素处理的小鼠中进行铜绿假单胞菌P8细菌回收。所有的绿脓菌素均以 $3\text{mg ml}^{-1}$ 给予。通过匀浆肺的CFU计数来确定细菌计数。将来自经绿脓菌素处理的小鼠的计数与来自经PBS处理的小鼠的计数进行比较。(a)在感染后1小时用绿脓菌素处理小鼠,所有小鼠在感染后4.5小时被淘汰;(b)在感染后1小时用绿脓菌素处理小鼠,经绿脓菌素处理的小鼠存活至24小时。条棒表示平均值 $\pm$ SEM,\*表示通过应用Bonferroni校正的单侧Mann-Whitney U检验来比较处理相对于对照的统计学显著性。

[0036] 图6.图2(a)中实验的重复。用绿脓菌素S5和妥布霉素处理经铜绿假单胞菌P8感染的小鼠。在感染后1小时处理小鼠,所有小鼠在感染后4.5小时被淘汰。条棒表示平均值 $\pm$ SEM,\*表示通过应用Bonferroni校正的单侧Mann-Whitney U检验来比较处理相对于对照

的统计学显著性。

[0037] 图7. 将绿脓菌素SD2用于处理经铜绿假单胞菌PA01感染的小鼠。在感染后1小时用储液浓度为 $3\text{mg ml}^{-1}$ 的绿脓菌素SD2处理小鼠。对照小鼠在感染后6小时被淘汰, 经绿脓菌素SD2处理的小鼠存活至24小时。条棒表示平均值 $\pm$ SEM, \*表示通过应用Bonferroni校正的单侧Mann-Whitney U检验来比较处理相对于对照的统计学显著性。

[0038] 图8. 绿脓菌素S5可在绿脓菌素S5抗体存在下提供针对致死性铜绿假单胞菌感染的保护。(a) 将小鼠经鼻内重复暴露于绿脓菌素S5或PBS, 并随后用铜绿假单胞菌P8感染, 且在感染后用绿脓菌素S5或PBS处理, 对所述小鼠进行的细菌计数。通过来自经匀浆肺的CFU计数来确定细菌计数。在四周内以两周为间隔经三次施用多个剂量的绿脓菌素S5 ( $75\mu\text{g}/$ 剂量)。在13周, 用铜绿假单胞菌P8感染小鼠并在感染后1小时用绿脓菌素S5 ( $75\mu\text{g}$ ) 或PBS处理小鼠。\*表示通过应用Bonferroni校正的单侧Mann-Whitney U检验来比较处理相对于对照的统计学显著性。(b) 经重复暴露于绿脓菌素S5或PBS (如a中所述) 的小鼠的IgG和IgA血清水平。对照组以两周为间隔经三次皮下施用绿脓菌素S5 ( $75\mu\text{g}/$ 剂量) 与弗氏完全/不完全佐剂。条棒表示平均值 $\pm$ SEM。(c) 和(d) 与(a) 和(b) 一样, 不同之处在于通过腹膜内(I.P.)途径来使小鼠重复暴露于绿脓菌素S5。

[0039] 发明详述

[0040] 绿脓菌素

[0041] 绿脓菌素是由假单胞菌物种, 尤其是铜绿假单胞菌产生并且对其有效抵抗的蛋白质性抗微生物毒素。

[0042] 绿脓菌素一般分为三类: 即, S型、R型和F型。

[0043] R型(棒状的)和F型(柔性且非收缩性的)绿脓菌素二者均涉及噬菌体尾蛋白(分别来自P2噬菌体和 $\lambda$ 噬菌体)并且通过在细菌膜中形成孔来起作用。

[0044] S型(可溶性)绿脓菌素具有与大肠杆菌素(认为S型绿脓菌素在进化上与之相关)类似的特征性多结构域结构。除非上限文另外要求, 否则术语“绿脓菌素”在本说明书中用于指S型绿脓菌素。产生S型绿脓菌素的生物体在正常情况下通常不受其自身绿脓菌素的影响, 因为其还产生作为针对绿脓菌素的拮抗剂的“免疫蛋白”。

[0045] S型绿脓菌素包含靶向部分和效应物部分。通常来说, 靶向部分在分子的N端末端, 效应物部分在C端末端。然而, 这些部分的顺序对功能而言并非必需。因此, 具有N端效应物部分和C端靶向部分的绿脓菌素分子的使用也在考虑之内。

[0046] 效应物部分可构成单一独立折叠的结构域。靶向部分也可构成单一独立折叠的结构域或者可细分为两个或更多个独立折叠的结构域。

[0047] 靶向部分与靶生物体的表面(即, 革兰氏阴性外膜)的受体结合并且介导绿脓菌素跨过外膜的转位。为了避免疑问, 术语“受体”简单地用于指靶生物体上与靶向部分结合分子, 并且不应认为其暗指在通常预期用于由单一生物体表达的分子对的情况下的协作性受体-配体相互作用。

[0048] 一般来说, 绿脓菌素的靶向部分决定绿脓菌素的物种和菌株特异性(或向性, tropism)。与绿脓菌素结合的受体通常对假单胞菌, 例如对假单胞菌属或者甚至对铜绿假单胞菌或其菌株具有特异性。

[0049] 大多数天然存在的S型绿脓菌素的靶向部分具有包含多达三个可识别亚区的特征

性模块结构,每个亚区可表现出单独折叠的结构域,或者可能缺乏可识别的二级结构,并且因此形成该分子的柔性区域。这些亚区在文献中通常被称为受体结合区、功能未知区和转位区,并且通常(尽管不是排他性地)以N至C端方向的顺序存在。然而,这些蛋白质并未得到充分表征,并且认为其具有的功能也可能是不正确的。因此,在本文中将这些区域分别称为靶向部分的区域I、II和III。

[0050] 不希望受任何特定理论的约束,认为区域I、II和III至少在一定程度上是可在绿脓菌素分子之间互换的,并且区域II全部或部分可以是非必需的。因此,靶向部分可至少包含区域I序列和区域III序列,任选地被区域II序列、其片段或肽接头隔开。可期望区域I、区域II或片段或接头(如果存在的话)和区域III以N至C-端方向的顺序存在。

[0051] 效应物部分通常一旦跨过外膜即具有细胞杀伤活性。其可在周质中起作用或者可能需要转运至细胞质以发挥其细胞杀伤作用。不管机理如何,效应物部分可称为绿脓菌素分子的“细胞毒性”部分。

[0052] 绿脓菌素分子的效应物部分或细胞毒性部分通常为成孔性的或酶促性的。成孔绿脓菌素(例如S5绿脓菌素)通过使细胞质膜去极化来杀伤靶细胞。酶促绿脓菌素通常在细胞质中作为核酸酶起作用并且包括具有DNA酶活性的(例如绿脓菌素S1、S2、SD2、S3和AP41)和tRNA酶活性(例如绿脓菌素S4)的那些。

[0053] 效应物部分作用于其上的靶标在细菌界往往高度保守,并且其作用机理与其他抗菌毒素类似,例如大肠杆菌素的效应物结构域。实际上,已证明包含与来自E2或E3大肠杆菌素的效应物部分连接的来自S1或S2绿脓菌素的靶向部分的嵌合绿脓菌素保留假单胞菌杀伤活性<sup>37</sup>。因此,绿脓菌素可包含任何合适的抗菌蛋白或蛋白质结构域作为效应物部分,只要该蛋白质或结构域保留针对一种或更多种假单胞菌生物体的细胞毒活性即可。例如,效应物组分可为来自大肠杆菌素(例如(但不限于)E2或E3大肠杆菌素)的细胞毒性结构域。

[0054] 绿脓菌素S2

[0055] S2绿脓菌素的靶向结构域与TonB依赖性铁-铁载体受体FpvAI结合。S2效应物结构域具有DNA酶活性。

[0056] S2绿脓菌素的一个实例具有以下序列:

[0057] MAVNDYEPGSMVITHVQGGGRDIIQYIPARSSYGTPPFVPPGSPYVGTGMQEYRKLRLSTLTKSHSEL  
KKNLKNLTLKEVDELKSEAGLPGKAVSANDIRDEKSIVDALMDAKAKSLKAIEDRPANLYTASDFPQKSESMYQSQ  
LLASRKFYGEFLDRHMSELAKAYSADIYKAQIAILKQTSQELENKARSLEAEAQRAAAEVEADYKARKANVEKKVQ  
SELDQAGNALPQLTNPTPEQWLERATQLVTQAIANKKLQTANNALIAKAPNALEKQKATYNADLLVDEIASLQAR  
LDKLNAAETARRKEIARQAAIRAANTYAMPANGSVVATAAGRGLIQVAQGAASLAQAISDAIAVLGRVLASAPSVMA  
VGFASLTYSRRTAEQWQDQTPDSVRYALGMDAAKLGLPPSVNLNAVAKASGTVDLPMRLTNEARGNTTTLVSVSTD  
GVSVPKAVPVRMAAYNATTGLYEVTVPSTTAEAPPLILTWTPASPPGNQNPSSSTTPVVPKVPVYEGATLTPVKAT  
PETYPGVITLPEDLIIGFPADSGIKPIYVMFRDPRDVPGAATGKGQPVSGNWLGAASQGEQAPIPSQIADKLRGKT  
FKNWRDFREQFWIAVANDPELSKQFNPGSLAVMRDGGAPYVRESEQAGGRKIEIHHKVR IADGGGVYNMGNLVAV  
TPKRHIEIHKGGK[SEQ ID NO:1]。

[0058] S2绿脓菌素的靶向部分具有以下序列:

[0059] MAVNDYEPGSMVITHVQGGGRDIIQYIPARSSYGTPPFVPPGSPYVGTGMQEYRKLRLSTLTKSHSEL  
KKNLKNLTLKEVDELKSEAGLPGKAVSANDIRDEKSIVDALMDAKAKSLKAIEDRPANLYTASDFPQKSESMYQSQ

LLASRKIFYGEFLDRHMSELAKAYSADIYKAQIAILKQTSQELENKARSLEAEAQRAAAEVEADYKARKANVEKKVQ  
 SELDQAGNALPQLTNPTPEQWLERATQLVTQAIANKKKLQTANNALIAKAPNALEKQKATYNADLLVDEIASLQAR  
 LDKLNAETARRKEIARQAAIRAANTYAMPANGSVVATAAGRGLIQVAQGAASLAQAISDAIAVLGRVLASAPSVMA  
 VGFASLTYSRTAEQWQDQTPDSVRYALGMDAAKLGLPPSVNLNAVAKASGTVDLPMRLTNEARGNTTTLVSVVSTD  
 GVSVPKAVPVRMAAYNATTGLYEVTVPSTTAEAPPLILTWTASPPGNQNPSSSTTPVVPKVPVYEGATLTPVKAT  
 PETYPGVITLPEDLIIGFPADSGIKPIYVMFRDP[SEQ ID NO:2]。

[0060] S2靶向部分的区域I具有以下序列:

[0061] MAVNDYEPGSMVITHVQGGGRDIIQYIPARSSYGTTPPFVPPGSPYVGTGMQEYRKLKRLSTLTKSHSEL  
 KKNLKNETLKEVDELKSEAGLPGKAVSANDIRDEKSIVDALMDAKAKSLKAIEDRPANLYTASDFPQKSESMYQSQ  
 LLASRKIFYGEFLDRHMSELAKAYSADIYKAQIAILKQTSQELENKARSLEAEAQRAAAEVEADYKARKANVE[SEQ  
 ID NO:3]。

[0062] S2靶向部分的区域II具有以下序列:

[0063] KKVQSELQAGNALPQLTNPTPEQWLERATQLVTQAIANKKKLQTANNALIAKAPNALEKQKATYNAD  
 LLVDEIASLQARLDKLNAETARRKEIAR[SEQ ID NO:4]。

[0064] S2靶向部分的区域III具有以下序列:

[0065] AAIRAANTYAMPANGSVVATAAGRGLIQVAQGAASLAQAISDAIAVLGRVLASAPSVMAVGFASLTYS  
 SRTAEQWQDQTPDSVRYALGMDAAKLGLPPSVNLNAVAKASGTVDLPMRLTNEARGNTTTLVSVVSTDGVSVPKAVP  
 VRMAAYNATTGLYEVTVPSTTAEAPPLILTWTASPPGNQNPSSSTTPVVPKVPVYEGATLTPVKATPETYPGVIT  
 LPEDLIIGFPADSGIKPIYVMFRDP[SEQ ID NO:5]。

[0066] S2绿脓菌素的效应物部分具有以下序列:

[0067] RDVPGAATGKGQPVSGNWLGAASQGEQAPIPSQIADKLRGKTFKNWRDFREQFWIANDPELSKQFN  
 PGSLAVMRDGGAPYVRESEQAGGRIKIEIHHKVRIADGGVYVMGNLVAVTPKRHIEIHKGGK[SEQ ID NO:6]。

[0068] 绿脓菌素SD2

[0069] McCaughey等(出版中)对原型SD2绿脓菌素序列进行了描述。SD2绿脓菌素的靶向部分与来自铜绿假单胞菌的脂多糖(LPS)结合并且更具体地与LPS中的共有多糖抗原(common polysaccharide antigen, CPA)结合,所述抗原主要为D-鼠李糖的均聚物,尽管特异性结合可能不是杀伤所必需的。认为SD2效应物结构域具有tRNA酶活性。

[0070] SD2绿脓菌素的一个实例具有以下序列:

[0071] MAVNDYEPGSMVITHVQGGGRDIIQYIPARSSYGTTPPFVPPGSPYVGTGMQEYRKLKRLSTLTKSHSEL  
 KKNLKNETLKEVDELKSEAGLPGKAVSANDIRDEKSIVDALMDAKAKSLKAIEDRPANLYTASDFPQKSESMYQSQ  
 LLASRKIFYGEFLDRHMSELAKAYSADIYKAQIAILKQTSQELENKARSLEAEAQRAAAEVEADYKARKANVEKKVQ  
 SELDQAGNALPQLTNPTPEQWLERATQLVTQAIANKKKLQTANNALIAKAPNALEKQKATYNADLLVDEIASLQAR  
 LDKLNAETARRKEIARQAAIRAANTYAMPANGSVVATAAGRGLIQVAQGAASLAQAISDAIAVLGRVLASAPSVMA  
 VGFASLTYSRTAEQWQDQTPDSVRYALGMDANKLGLTSSVNL SAVAKAGGTVDLPMRLTNEARGNTTTLVSVVSTD  
 GVSVPKAAVPVRMAAYNATTGLYEVTVPSTTAEAPPLILTWTASPPGNQNPSSSTTPVIPKVPVYEGAALTPLKTG  
 PESYPGMLLDLNDLIVIFPADSGVKPVYVMLSSPLDSGIFTRRQLQKKFDSHKYDFGLGEKSANNGTLAEFRDKIL  
 EHLADPATVEKGYHSEVNSKVHYNARTNIVVIIGEDGMFVSGWRIEPGTDQYNFYMKNEVL[SEQ ID NO:7]。。

[0072] SD2绿脓菌素的靶向部分具有以下序列:

[0073] MAVNDYEPGSMVITHVQGGGRDIIQYIPARSSYGTTPPFVPPGSPYVGTGMQEYRKLKRLSTLTKSHSEL



KKNLKNETLKEVDELKSEAGLPGKAVSANDIRDEKSIVDALMDAKAKSLKAIEDRPANLYTASDFPQKSESMYQSQ  
LLASRKFYGEFLDRHMSSELAKAYSADIYKAQIAILKQTSQELNKARSLEAEAQRAAAEVEADYKARKANVEKKVQ  
SELDQAGNALPQLTNPTPEQWLERATQLVTQAIANKKKLQTANNALIAKAPNALEKQKATYNADLLVDEIASLQAR  
LDKLNAEARRKEIARQAAIRAANTYAMPANGSVVATAAGRGLIQVAQGAASLAQAISDAIAVLGRVLASAPSVMA  
VGFASLTYSSRTAEQWQDQTPDSVRYALGMDANKLGLTSSVNL SAVAKAGGTVDLPMRLTNEARGNTTTL SVVSTD  
GVSVPKAA PVRMAAYNATTGLYEVTVPSTTAEAPPLILTWT PASPPGNQNPSSSTTPVIPKVPVYEGAALTPLKTG  
PESYPGMLLDLNDLIVIFPADSGVKPVYVM[SEQ ID NO:8]。。

[0074] SD2靶向部分的区域I具有以下序列:

[0075] MAVNDYEPGSMVITHVQGGGRDIIQYIPARSSYGTTPPFVPPGSPYVGTGMQEYRKLRLSTLTKSHSEL  
KKNLKNETLKEVDELKSEAGLPGKAVSANDIRDEKSIVDALMDAKAKSLKAIEDRPANLYTASDFPQKSESMYQSQ  
LLASRKFYGEFLDRHMSSELAKAYSADIYKAQIAILKQTSQELNKARSLEAEAQRAAAEVEADYKARKANVE[SEQ  
ID NO:9]。

[0076] 所述绿脓菌素SD2靶向部分的区域II:

[0077] KKVQSELDQAGNALPQLTNPTPEQWLERATQLVTQAIANKKKLQTANNALIAKAPNALEKQKATYNAD  
LLVDEIASLQARLDKLNAEARRKEIAR[SEQ ID NO:10]。

[0078] SD2靶向部分的区域III具有以下序列:

[0079] QAAIRAANTYAMPANGSVVATAAGRGLIQVAQGAASLAQAISDAIAVLGRVLASAPSVMAVGFASLTY  
SSRTAEQWQDQTPDSVRYALGMDANKLGLTSSVNL SAVAKAGGTVDLPMRLTNEARGNTTTL SVVSTDGVSVPKAA  
PVRMAAYNATTGLYEVTVPSTTAEAPPLILTWT PASPPGNQNPSSSTTPVIPKVPVYEGAALTPLKTGPESYPGML  
LDLNDLIVIFPADSGVKPVYVM[SEQ ID NO:11]。

[0080] SD2绿脓菌素的效应物部分具有以下序列:

[0081] LSSPLDSGIFTRRQLQKKFDSHKYDFGLGEKSANNGTLAEFRDKILEHLADPATVEKGYHSEVNSKV  
HYNARTNIVVIIIGEDGMFVSGWRIEPGTDQYNFYMKNEVL[SEQ ID NO:12]。

[0082] 绿脓菌素S5

[0083] S5绿脓菌素的靶向结构域与TonB依赖性铁-铁载体受体F<sub>ptA</sub>结合。S5效应物结构域具有成孔活性。

[0084] 绿脓菌素S5的靶向部分的序列分析表明区域III可存在于区域I的N端,并且可不存在区域II。

[0085] S5绿脓菌素的一个实例具有以下序列:

[0086] MSNDNEVPGSMVIVAQGPDDQYAYEVPPIIDSAAVAGNMFGDLIQREIYLQKNIYYPVRSIFEQGTKEK  
KEINKKVSQVDGLLKQITQGKREATRQERVDVMSAVLHKMESDLEGYKKTFTKGPFDIYEQSSLSIYEAWVKIW  
EKNSWEERKKYPFQQLVRELERAVAYYKQDSLSEAVKVLRLQELNKQKALKEKEDLSQLERDYRTRKANLEMKVQS  
ELDQAGSALPPLVSPTPEQWLERATRLVTQAIADKKQLQTTNNTLIKNSPTPLEKQKAIYNGELLVDEIASLQARL  
VKLNAETTRRRTEAERKAAEEQALQDAIKFTADFYKEVTEKFGARTSEMARQLAEGARGKNIRSSAEAIKSFKEKH  
DALNKKLSLKDRQAIKAFDSLQMMAKSLEKFSKGFVVGKAIDAASLYQEFKISTETGDWKPFVFKIETLAAG  
AAASWLVGIAFATATATPIGILGFALVMAVTGAMIDEDLLEKANNLVSI[SEQ ID NO:13]。

[0087] S5绿脓菌素的靶向部分具有以下序列:

[0088] MSNDNEVPGSMVIVAQGPDDQYAYEVPPIIDSAAVAGNMFGDLIQREIYLQKNIYYPVRSIFEQGTKEK  
KEINKKVSQVDGLLKQITQGKREATRQERVDVMSAVLHKMESDLEGYKKTFTKGPFDIYEQSSLSIYEAWVKIW



[0101] AP41靶向部分的区域I具有以下序列:

[0102] MSDVFDLGSMTTVATATGQYSFYTPPPPTPIPYLTYIARPGINKFDLPEGAKIKDLIKRYQYIGSQIP  
AAIMIRGVQEEIKKSTNTALANVGAIVDGELAYLASQKKEKLNPAEATPLQMASAEKAAVELLASKQKELADART  
IANAFFGYDPLTVNYVNMNEIYGRREDKDFSFDNWSKSYSAAQKIRLIEAKISVLNSRSSALDGKVAELTRLQRL  
EDAQHAAEAARQTEAERLA[SEQ ID NO:20]。

[0103] AP41靶向部分的区域II具有以下序列:

[0104] QEQRQAEARRQAEARRQAEARQAEQLRLAEAEAKRVAEAEKKRQDEINARLQAIIVSESEAKRIEE  
IYKRLEEQDKISNPTVTTPPAVDAGSRVDDALAHTGTRVTSGETGATGGSGRDVDTGTGQGGITARPVDVGSVSI  
PDRRDPKIPDQPRDL[SEQ ID NO:21]。

[0105] AP41靶向部分的区域III具有以下序列:

[0106] GSLVPTFPDFPTFPSFPGVGPAAKPLIPAGGGAASVSRTLKTAVDLLSVARKTPGAMLGQVAAVVA  
TMAVSSFWPKLNNGERQASFAIPVAELSPPLAVDWQAIAAKGTVDLPYRLKTLNVDGSIQIIAVPTEPGSAAVPV  
RALTLDSASGTYYKTTTGGGGTILVTPDTPPGQIDPSSSTPAVPRGPLIMP GTLLIPKEPQIESYPELDQREFND  
GIYVYPEDSGIPPLYIVYRD[SEQ ID NO:22]。

[0107] AP41绿脓菌素的效应物部分具有以下序列:

[0108] PRDEPGVATGNGQPVTGNWLAGASQGDGVPIPSQIADQLRGKEFKSWRDFREQFWMVSKDPSALENL  
SPSNRYFVSQGLAPYAVPEEHLGSKEKFEIHHVPLESGGALYNIDNLVIVTPKRHSEIHKELKLRKEK[SEQ ID  
NO:23]。

[0109] 绿脓菌素L1

[0110] 绿脓菌素L1可视为“凝集素样”绿脓菌素,其与细菌表面上的碳水化合物部分结合。其在铜绿假单胞菌上的受体被认为是LPS,并且更具体地为LPS内的共有多糖抗原(CPA),所述抗原主要是D-鼠李糖的均聚物。

[0111] 出于本说明书的目的,认为绿脓菌素L1为S型绿脓菌素,因为其是可溶性的并且与噬菌体尾蛋白没有同源性(因此不容易与R型或F型绿脓菌素归类)。

[0112] L1绿脓菌素的一个实例具有以下序列:

[0113] MASSLAPRQVIRDGQFITSPNGKYKLVMDAGNLVLYEDGTPKIWNTPVGPAGAKAVMEFNLNLYNKA  
GQVAWSSNVYTAYLFEEFKDEAYLNLQDDGDFGIFSDEAKWGSIVLSRPEVGVKNKIIPTGTVMVPGTEYINGNYR  
LAFQGDGNLVVIYQINPVVIWATYTMGADRAVVQEDGNFVIYKGTALWHTHTATGMPAYLKFTNTGKFLSQPTL  
LWTLKRGSLSKPKVIPGQHGLDTPPIWSWPHDYP[SEQ ID NO:24]。

[0114] 加有下划线的四条序列被认为表示碳水化合物结合基序。L1绿脓菌素通常包含1、2、3或4个具有共有序列Q-X-D-X-N/D-X-V/G-Y/F的碳水化合物结合基序。

[0115] 因此,用于本发明的S型绿脓菌素包含这样的靶向部分,其可包含:与来自绿脓菌素S2、SD2、S5或AP41的区域I序列(分别为SEQ ID NO:3、9、15和20)具有至少80%序列同一性,例如至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的区域I序列;

[0116] 与来自绿脓菌素S2、SD2、S5或AP41的区域III序列(分别为SEQ ID NO:5、11、16和22)具有至少80%序列同一性,例如至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的区域III序列;

[0117] 以及任选地:

[0118] 与来自绿脓菌素S2、SD2或AP41的区域II序列(分别为SEQ ID NO:4、10和21)具有

至少80%序列同一性,例如至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的区域II序列。

[0119] 靶向部分可与来自绿脓菌素S2、SD2、S5或AP41的靶向部分序列(分别为SEQ ID NO:2、8、14和19)具有至少80%序列同一性,例如至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性。

[0120] 这样的靶向部分可分别描述为S2、SD2、S5和AP41靶向部分。通常来说,其与在此提供的示例性序列结合相同的受体。

[0121] 用于本发明的S型绿脓菌素包含可与来自绿脓菌素S2、SD2、S5或AP41的效应物区序列(分别为SEQ ID NO:6、12、17和23)具有至少80%序列同一性,例如至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的效应物部分。这样的效应物部分可分别描述为S2、SD2、S5和AP41效应物部分。通常来说,其与在此提供的示例性序列具有相同的活性,即DNA酶(S2、SD2、AP41)或成孔(S5)活性。

[0122] 或者,效应物部分可以是来自大肠杆菌素(例如,来自大肠杆菌素E1、E3、E9、D、Ia、E2、E7、E8、E4、E6、E5、A、B、N、M或S4的细胞毒性结构域,示例性的序列提供于WO2014/009744中)或任何其他合适的细胞毒性蛋白的细胞毒性结构域。

[0123] 绿脓菌素分子可与上文提供的绿脓菌素S2、SD2、S5、AP41或L1的示例性序列(分别为SEQ ID NO:1、7、13、18和24)具有至少80%序列同一性,例如至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性。这样的分子可分别描述为SD2、SD2、S5、AP41或L1绿脓菌素。通常来说,其与提供的示例性序列结合相同的受体并且具有相同的细胞毒活性。L1绿脓菌素通常包含1、2、3或4个各自符合上述共有序列的碳水化合物结合基序。在一些实施方案中,L1绿脓菌素包含1、2、3或所有4个上述SEQ ID NO:24中加有下划线的特定碳水化合物结合基序。

[0124] 将相对于参考序列的氨基酸序列同一性百分比(%)定义为:在比对序列并引入空位(如有需要的话)以实现最大百分比序列同一性之后,在不将任何保守替换考虑为序列同一性的一部分的情况下,在候选序列中与参考序列的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。%同一性值可通过WU-BLAST-2(Altschul等,Methods in Enzymology,266:460-480(1996))来确定。WU-BLAST-2使用数个检索参数,其中大部分设置为默认值。可调参数设置为以下值:重叠跨度=1,重叠分数=0.125,字阈值(T)=11。%氨基酸序列同一性值为通过用由WU-BLAST确定的匹配相同残基数除以参考序列的总残基数(忽略为了使比对评分最大化而通过WU-BLAST-2向参考序列中引入的空位),再乘以100来确定。

[0125] 绿脓菌素蛋白可通过任何合适的方法来合成或纯化。例如,其可从天然表达其的生物(假单胞菌属)中纯化、其可通过化学方法合成、其可在无细胞系统中表达,或者其可由包含编码相关绿脓菌素的核酸的非假单胞菌宿主细胞表达。

[0126] 宿主细胞可以是原核生物的或真核生物的,但是可优选原核生物宿主,因为绿脓菌素本身是细菌蛋白质。原核生物宿主可以是革兰氏阳性的或革兰氏阴性的。大肠杆菌(E.coli)是常见革兰氏阳性宿主细胞的一个实例,其可容易地通过引入编码期望绿脓菌素的核酸来被改造成表达绿脓菌素,例如,如下文实施例中所述。

[0127] 绿脓菌素通常在质粒上编码。因此,可通过引入编码绿脓菌素的质粒来将宿主细胞改造成用于产生绿脓菌素,但是也可采用其他表达载体或构建体,包括染色体整合的表

达构建体。

[0128] 在一些情况下,宿主细胞可对绿脓菌素敏感。在这样的情况下,期望宿主细胞还包含编码互补免疫蛋白(即能够拮抗绿脓菌素的活性的互补免疫蛋白)的核酸,并且能够表达该免疫蛋白。例如,当在大肠杆菌中表达绿脓菌素S2、SD2和AP41时,期望共表达免疫蛋白。绿脓菌素L1和S5通常可在不存在免疫蛋白的情况下在大肠杆菌中表达。绿脓菌素和免疫蛋白可在同一表达构建体(例如质粒)上或者在不同的表达构建体上编码。

[0129] 免疫蛋白序列的实例包括以下:

[0130] 绿脓菌素S2免疫蛋白:

[0131] MKSKISEYTEKEFLEFVKDIYTNKKKFPTEESHIQAVLEFKKLTEHPGSDLLYYPNENREDSPAGV  
VKEVKEWRASKGLPGFKAG[SEQ ID NO:25],绿脓菌素SD2免疫蛋白:

[0132] MSMEMIDIARKLLASSIDGKTFSEEFFKTWRSERDSGVLAQDDASLGRCLSLMFLGADSFTEGKKERP  
GELTEGELKIALSDLLKEYKYI[SEQ ID NO:26],

[0133] 绿脓菌素S5免疫蛋白:

[0134] MSFKYYWAKFFWGAFFFLVAWKGSVFPVSLASVNPLVVAGLSTILFPFSVKLVEDFALKYTEREFWVT  
GFFSETPAKTGLYAVFYLSCYLFSIPLGMVFLFYKYGKAS[SEQ ID NO:27],

[0135] 绿脓菌素AP41免疫蛋白:

[0136] MDIKNNLSDYTESEFLEIIEEFFKNKSGLKGSELEKRMKLVKHFEEVTSHPRKSGVIFHPKPGFETP  
EGIVKEVKEWRAANGLPGFKAG[SEQ ID NO:28]。

[0137] 绿脓菌素从宿主细胞释放的机理未得到充分表征。当在非假单胞菌宿主细胞中表达时,某些绿脓菌素可被天然分泌并且因此可从培养基中回收。对于另一些绿脓菌素,可方便地从细胞本身回收绿脓菌素,例如通过适当的裂解和纯化操作来回收。本领域技术人员完全能够根据其特定需求以及所涉及的具体细胞和蛋白质来设计合适的方案。

[0138] 治疗的对象和病症

[0139] 本发明的材料和方法适于预防和/或治疗假单胞菌(尤其是铜绿假单胞菌)的感染以及与这样的感染相关的细菌性肺炎。

[0140] 感染可以是急性的或慢性的。

[0141] 下呼吸道的铜绿假单胞菌感染在患有囊性纤维化(其中其表现为死亡率的主要原因)和慢性阻塞性肺疾病(COPD)的患者中特别常见。另一些呼吸道功能受损和/或免疫功能受损的患者也可能易受感染,这包括患有充血性心力衰竭的患者、AIDS患者和针对以下病症而服用免疫抑制性药物或进行其他免疫抑制性治疗的患者:例如癌症(尤其是化学治疗)、类风湿性关节炎、多发性硬化、重症肌无力、系统性红斑狼疮、结节病、局灶性节段性肾小球硬化、克罗恩病(Crohn's disease)、白塞病(Behcet's Disease)、天疱疮、溃疡性结肠炎等。

[0142] 与假单胞菌感染相关或由其引起的急性病症包括社区获得性肺炎和医院内感染(例如呼吸机相关性肺炎和医院获得性肺炎)。

[0143] 应理解,由于铜绿假单胞菌的临床菌株之间的变异性,并非所有的绿脓菌素可对所有菌株都有效。影响绿脓菌素有效性或毒性的因素包括其中不同菌株之间免疫蛋白的差异分布和绿脓菌素靶向部分所结合表面受体中的遗传变异性。

[0144] 待施用的绿脓菌素应有效抵抗铜绿假单胞菌的一种或更多种感染性菌株。因此,

可期望提供来自对象的感染性菌株的样品,确定所述菌株的身份并相应地选择需施用的绿脓菌素。

[0145] 例如,如果感染包含菌株P5,则可期望施用除S2之外的绿脓菌素。类似地,如果感染包含菌株E2,则可期望施用除S2和AP41之外的绿脓菌素。如果感染包含菌株P17,则可期望施用除L1以外的绿脓菌素。当然,由于任何感染均可能涉及一种以上细菌菌株,因此仍可期望包括这些绿脓菌素作为包含多种绿脓菌素的混合物的一部分。然而,通常还建议施用一种或更多种对主要物种或菌株具有活性的绿脓菌素。

[0146] 作为替代互补充,可期望提供来自对象的感染性菌株的样品,在体外测试一种或多种绿脓菌素对感染性菌株的毒性,并选择具有用于治疗该对象的合适毒性的一种或更多种绿脓菌素。

[0147] 上述方法可包括从对象获得样品的步骤或者可利用已经获得的样品。

[0148] 通常来说,待治疗的对象为哺乳动物。对象通常为人,但还可为任何其他的灵长类(大猿(great ape)、旧世界猴(old world monkey)或新世界猴(new world monkey))或者家养、实验室或家畜动物,例如小鼠,大鼠、豚鼠、兔形动物(例如兔)、猫、狗、猪、牛、马、绵羊或山羊。

[0149] 药物组合物

[0150] 用于本发明目的的绿脓菌素递送通过经肺施用来进行。术语“经肺施用”旨在涵盖通过呼吸道将活性剂递送至肺的任何合适的递送方法。

[0151] 最常见的经肺施用方法是经口和/或经鼻吸入。作为替代方案,可采用气管内滴注,但是通常不认为这是在临床上向人对象施用的合适途径。

[0152] 活性剂,即S-型绿脓菌素,通常在治疗性组合物或可药用组合物中提供。活性剂可以以任何合适的方式,例如以液体或固体(通常为散剂)形式配制用于经肺施用。制剂可通过任何合适的机构或递送装置来递送,所述机构或递送装置包括吸入器(例如计量吸入器、干粉吸入器)、喷雾器(例如超声雾化器、喷射喷雾器、振动筛喷雾器)等。

[0153] 因此,本发明还提供了用于向对象经肺施用治疗性组合物的装置,所述组合物包含本说明书中其他部分所述的S型绿脓菌素。装置可为吸入器(例如计量吸入器、干粉吸入器)或喷雾器(例如超声喷雾器、喷射雾化器、振动筛喷雾器)。

[0154] 除一种或更多种活性剂之外,用于递送的组合物还可包含本领域技术人员公知的可药用赋形剂、载体、缓冲剂、稳定剂或其他材料。这些材料应无毒并且应不干扰活性成分的效力。载体或其他材料的准确性质可以取决于所采用的制剂和递送装置的准确性质。

[0155] 液体组合物一般包含水性载体,例如水或生理盐水溶液。可包含葡萄糖或其他糖溶液或者二醇例如乙二醇、丙二醇或聚乙二醇。

[0156] 还可采用乳剂和纳米颗粒包封剂,二者均采用脂质。

[0157] 固体(例如散剂)制剂可利用例如糖、环糊精等的载体。其可通过任何合适的方法制备,包括喷雾干燥、喷雾冷冻干燥、溶剂沉淀、喷射研磨等。

[0158] 在所有情况下,根据需要,均可包含防腐剂、稳定剂、缓冲剂、抗氧化剂和/或其他添加剂。

[0159] 优选地以“预防有效量”或“治疗有效量”(视情况而定,但是可认为预防为治疗)进行施用,这足以显示出对个体的益处。实际的施用量以及施用速率和时程将取决于所治疗

病症的性质和严重程度。治疗的处方(例如剂量的决定等)在全科医师及其他医生的责任范围之内,并且通常考虑待治疗的疾病、个体患者的状况、递送部位、施用方法以及医师已知的其他因素。上述技术和方案的实例可见于Remington的Pharmaceutical Sciences,第20版,2000,出版:Lippincott,Williams&Wilkins。

[0160] 发明人已表明,反复暴露于绿脓菌素不会显著损害治疗的效力。因此,治疗过程可包括单次施用或多次施用或者由其组成。多剂量方案可包括2、3、4、5次或甚至更多次单独施用,例如多至10次单独施用,或者由其组成。连续剂量可独立地以任何合适的时间间隔分开,例如长达12小时、长达一天、长达一周、长达2周或长达一个月。

[0161] 根据待治疗的病症,组合物可单独施用,或者与其他治疗同时地或顺序地组合施用。

## 实施例

### [0162] 方法

[0163] 研究设计。本研究的目的是显示绿脓菌素在急性铜绿假单胞菌肺感染的小鼠模型中的效力,并且显示绿脓菌素处理在无感染情况下无害。对于所有的实验,均使用体重为15至21g的6周龄、雌性、无鼠病原体C57/BL6小鼠(Charles Rivers Laboratories,UK)。在实验期间使所有小鼠随意接受食物和水,并分组圈养。使用功效计算来预先确定样本量(对于所有的处理实验, $n=6$ )。当需要时,根据评分系统所确定对小鼠进行淘汰,或者在预定的24小时时间点时进行淘汰。将所有的小鼠(包括异常值)均包括在统计学分析中。实验一次只进行一次或重复一次(根据每个实验而定)。

[0164] 伦理声明。所有的动物实验均根据在英国内政部许可之下授权并经格拉斯哥大学动物项目审查委员会(animal project review committee of the University of Glasgow)批准的英国动物(科学程序)法来进行。动物研究未随机化,并且盲法在本研究中不可行。格拉斯哥大学动物项目审查委员会分配的项目批准号为60/4361。

[0165] 绿脓菌素的克隆和纯化。使用引物通过PCR来从铜绿假单胞菌C763的基因组DNA中扩增编码绿脓菌素AP41及其免疫蛋白(ImAP41)的基因,所述引物设计成在绿脓菌素编码基因的起始引入NdeI位点(ACA GAT CAT ATG AGC GAC GTT TTT GAC CTT GG)并且引入XhoI来代替在ImAP41编码基因的终止密码子(ACA GAT CTC GAG GCC AGC CTT GAA GCC AGG G)。用NdeI和XhoI消化PCR产物,并连接到大肠杆菌表达载体pET21a的相应位点得到其用于产生绿脓菌素AP41-ImAP41复合物的pETPyoAP41,其中ImAP41携带C端His<sub>6</sub>-标签。类似地,使用引物从菌株PA01的基因组DNA扩增编码绿脓菌素S5的基因,所述引物设计成在该基因的起始处引入NdeI位点(GAG ACA TAT GTC CAA TGA CAA CGA AGT AC)并且在终止子密码子之后引入XhoI位点(TTT GAC GTC TCG AGT TAA ATG GAT ATT ACA AGA TTG TTT GC),将经消化的PCR产物连接到pET15b中以得到pETPyoS5,其编码具有N端His<sub>6</sub>-标签的绿脓菌素S5。由携带相关质粒的大肠杆菌BL21(DE3) pLysS过表达绿脓菌素AP41和S5。通过添加1mM异丙基β-D-1-硫代半乳糖吡喃糖苷(IPTG)来诱导蛋白质产生,将细胞在37°C下再培养4小时并通过离心收获。将细胞重悬于20mM Tris-HCl、500mM NaCl、5mM咪唑(pH 7.5)中,使用MSE Soniprep 150(Wolf Laboratories)裂解,并通过离心分离细胞碎片。将无细胞的裂解物施加至在20mM Tris-HCl、500mM NaCl、5mM咪唑(pH 7.5)中平衡的5-ml His Trap HP柱(GE

Healthcare), 并经5至500mM的咪唑梯度洗脱。在Superdex S200 26/600柱(GE Healthcare)上通过凝胶过滤色谱除去剩余的污染物。如前所述纯化绿脓菌素L1和绿脓菌素S2-ImS2复合物<sup>(25,32)</sup>。使用离心浓缩机(Vivaspin 20)以5kDa的分子量截止值来浓缩绿脓菌素,并过夜透析到磷酸缓冲盐水(pH 7.3)中。使用1ml重力流动内毒素去除柱(Thermo Scientific)来除去污染的脂多糖(LPS),并使用0.2 $\mu$ M注射器过滤器来对蛋白质进行过滤器灭菌。将绿脓菌素等分并储存在-80 $^{\circ}$ C,直至需要。

[0166] 绿脓菌素敏感性测定。覆盖点板法(overlay spot plate method)。使用<sup>35</sup>的方法进行软琼脂覆盖点板。向6ml的0.8%软琼脂添加150 $\mu$ l的 $OD_{600nm}=0.6$ 的测试菌株培养物,并倒在LB琼脂平板上。将5 $\mu$ l的不同浓度的细菌素、肺匀浆物或血液点样在平板上并在37 $^{\circ}$ C下孵育24小时。

[0167] 绿脓菌素递送。对于绿脓菌素向未经感染的肺的递送,在用异氟烷诱导麻醉之后,通过鼻内途径递送25 $\mu$ l的3mg ml<sup>-1</sup>绿脓菌素(n=4)。24小时通过二氧化碳窒息淘汰小鼠。将套管插入气管中,并通过在恒定压力下轻缓地输注10%福尔马林溶液2分钟来将肺原位固定。然后,将肺移除并置于具有更多固定剂的容器中。由格拉斯哥大学兽医学院内的兽医诊断服务实验室(Veterinary Diagnostic Services Laboratory)进行组织学处理以及苏木精和伊红(H&E)染色。在Leica SCN400载玻片扫描仪上捕获高分辨率的全部载玻片图像,并由两名独立的评估者针对支气管周浸润和肺泡受累来对载玻片进行盲法分析。

[0168] 急性肺感染的模型。向雌性C57/BL6小鼠鼻内接种25 $\mu$ l含有约10<sup>7</sup>CFU的所选铜绿假单胞菌菌株的细菌培养物<sup>36</sup>。在感染前6小时或感染后1小时施用抗生素治疗,并且仅施用一次。如上所述通过鼻内施用来施用溶解于PBS中的绿脓菌素或妥布霉素。在这些实验中使用两个不同的终点。为了确定与未处理的对照相比肺的细菌载量降低,在感染后4至6小时通过二氧化碳窒息同时淘汰实验中的所有小鼠。为了确定小鼠是否可在绿脓菌素或妥布霉素处理之后从感染中存活,密切监测小鼠,当需要时根据评分系统所确定的通过二氧化碳窒息淘汰小鼠或者在预定的24小时时间点淘汰小鼠。在第一系列实验中使用经绿脓菌素处理的未经感染小鼠作为对照以确保没有来自绿脓菌素处理的不利影响。一旦清楚绿脓菌素无害,则在稍后实验中停止这些对照以减少动物的使用数量。对于CFU测定,在无菌条件下移除肺,并保持在750 $\mu$ l PBS中的冰上,直至匀浆。将经匀浆肺的连续10倍稀释液铺板于假单胞菌选择性琼脂(20g蛋白胨、1.5g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1.5g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、10ml甘油、15g琼脂、0.025g Irgasan/升)上并在37 $^{\circ}$ C下孵育24小时,然后在室温下培养24小时,之后计数菌落。

[0169] 重复绿脓菌素暴露。通过鼻内途径(称为I.N.组)或腹膜内途径(称为I.P组)的施用方式以两周为间隔给予绿脓菌素S5或PBS三次。对于I.N.施用,分组为:PBS和绿脓菌素S5(75 $\mu$ g;3mg ml<sup>-1</sup>下25 $\mu$ l)。对于I.P施用,分组为:绿脓菌素S5(75 $\mu$ g;750 $\mu$ g ml<sup>-1</sup>下100 $\mu$ l)。将PBS I.N.组用作I.P.组的对照组。在第一次暴露后13周,用铜绿假单胞菌P8鼻内感染小鼠(n=5)(I.N组以1.4 $\times$ 10<sup>7</sup>CFU进行感染,I.P组以5.0 $\times$ 10<sup>6</sup>CFU进行感染),并如前所述在感染后1小时用75 $\mu$ g绿脓菌素S5或PBS鼻内处理。

[0170] 通过间接ELISA来确定绿脓菌素S5特异性抗体效价。对于IgG和IgA应答的分析,在二氧化碳窒息后立即通过心脏穿刺获得血液。通过将样品在13,500g下离心10分钟,然后收集上清液来获得血清。将血清储存在-80 $^{\circ}$ C。将Greiner 96孔板(MaxiSorp)用PBS中的经纯化重组绿脓菌素S5(7.5 $\mu$ gml<sup>-1</sup>,50 $\mu$ l/孔)蛋白在4 $^{\circ}$ C下包被过夜。将板用磷酸缓冲盐水+



0.05% TWEEN20 (PBST) 洗涤三次,然后用150 $\mu$ l封闭缓冲液(PBS中的1%牛血清白蛋白(BSA))在37 $^{\circ}$ C下封闭1小时。在洗涤之后,以封闭缓冲液中1/50的稀释度开始,添加经5倍连续稀释的样品,并在37 $^{\circ}$ C下孵育2小时。使用来自在四周内经三次皮下给予绿脓菌素S5+弗氏完全/不完全佐剂的小鼠的血清作为阳性对照,并且使用未经包被的孔作为阴性对照。分析来自单独小鼠的血清,并在不同天数进行样品重复。在用PBST洗涤之后,添加PBST/0.1% BSA中的50 $\mu$ l抗小鼠IgG(Fc特异性)-过氧化物酶抗体((1/1000稀释度)Sigma,UK)或抗小鼠IgA( $\alpha$ -链特异性)-过氧化物酶抗体((1/250稀释度)Sigma,UK),并将板在37 $^{\circ}$ C下孵育1小时。使用SIGMAFAST OPD(邻苯二胺二盐酸盐)片剂(Sigma,UK)来使板显色,并使用3M HCl来停止反应。使用FLUOstar OPTIMA读板器(BMG labtech,Germany)在450nm下读取光密度(OD)。

[0171] 统计学。由于样本量较小,使用非参数检验来进行分析。使用Kruskal-Wallis单向方差分析方法来测试样品是否来源于相同的分布。然后,使用单侧Mann-Whitney U检验来分析特定样本对的显著差异,其中显著性阈值为 $P < 0.05$ ,并用Bonferroni校正调整以用于多重比较。所有小鼠(包括异常值)均包括在统计学分析中。

[0172] 结果

[0173] 绿脓菌素在小鼠肺中稳定并且不引起炎症或组织损伤

[0174] 为了确定绿脓菌素是否可有效地递送至肺以及其在该环境中是否稳定,向健康的C57/BL6小鼠鼻内施用重组绿脓菌素S2、S5、AP41和L1。在24小时的孵育期之后,从经处理的小鼠移除后腔静脉叶(postcaval lobe),匀浆并通过点样到铜绿假单胞菌的生长菌苔上来测试活性绿脓菌素的存在(将菌株P8用于大多数绿脓菌素,P17用于绿脓菌素S2)。用来自经绿脓菌素L1、S2和S5处理的小鼠的肺匀浆物检测到对铜绿假单胞菌的杀伤,但在来自经绿脓菌素AP41或PBS处理的小鼠的匀浆中未观察到(数据未示出)。这些数据表明,绿脓菌素在鼻内施用之后在肺中分布良好,并且在绿脓菌素L1、S2和S5的情况下,在该环境中稳定。对于绿脓菌素AP41,未检测到活性。这可能是由于铜绿假单胞菌指示菌株的灵敏性,或者可能表明与其他受试绿脓菌素相比,这种绿脓菌素在体内可能更快地降解。为了确定绿脓菌素是否可能对宿主有害,再次鼻内施用绿脓菌素,并在24小时后,将经绿脓菌素处理的肺固定。针对支气管周浸润和肺泡巨噬细胞受累,对使用苏木精和伊红染色可视化的肺组织进行了评分。经绿脓菌素处理的肺显示没有这样的特征迹象,并且与经PBS处理的组织无法区分,表明施用单高浓度剂量的该多样化蛋白质抗生素组中的任一种均不会导致明显的炎症或组织损伤(数据未示出)。

[0175] 绿脓菌素可提供针对致死性铜绿假单胞菌感染的保护

[0176] 为了确定绿脓菌素是否具有降低肺中的细菌载量的足够活性,在用正常致死剂量(约 $10^7$ CFU)的铜绿假单胞菌P8感染前6小时经鼻内施用绿脓菌素S2、S5、AP41和L1(3mg ml<sup>-1</sup>)或PBS(用于对照小鼠)。在感染后4小时淘汰所有小鼠并确定来自肺匀浆物的活细菌计数(图1a)。所有绿脓菌素均降低细菌载量,但是在该时间点观察到效力上的不同,其中绿脓菌素S2、AP41和L1分别使细菌数量降低约25倍、650倍和1500倍。在绿脓菌素S5的情况下,没有回收到活细菌。

[0177] 为了确定绿脓菌素活性是否足以提供针对正常致死剂量的铜绿假单胞菌的保护,类似地在用铜绿假单胞菌P8感染前6小时用绿脓菌素预处理小鼠,监测患病情况并在达到

预定严重程度的疾病临床评分时淘汰。在感染后5小时6只PBS对照小鼠中有5只被淘汰,而所有经绿脓菌素处理的小鼠在24小时均存活至实验终点。在该时间点的活细菌计数表明绿脓菌素S2、AP41和L1具有类似的杀伤活性,其全部使细菌计数显著降低超过10,000倍。再次,在该时间点,从经绿脓菌素S5处理的小鼠未回收到活细菌(图1b)。

[0178] 使用绿脓菌素SD2进行类似的实验。用大约 $1.5 \times 10^7$ CFU的铜绿假单胞菌PA01感染C57/BL6小鼠( $n=6$ ),并在感染后1小时用 $3\text{mg ml}^{-1}$ 的绿脓菌素SD2处理。监测经感染小鼠的患病情况,并且如果达到足够的临床评分或者在实验终点(感染后24小时)时进行淘汰。经绿脓菌素SD2处理的小鼠存活至24小时的实验终点,而对照小鼠在感染后6小时被淘汰。确定了肺的细菌载量,并且对照小鼠在感染后6小时具有约 $2 \times 10^5$ CFU/肺。对于绿脓菌素SD2小鼠,在感染后24小时未回收到菌落或回收到10CFU/肺(图7)。

[0179] 然后,确定了感染后施用绿脓菌素的降低细菌数量的能力。在感染后1小时用 $3\text{mg ml}^{-1}$ 的绿脓菌素S2、S5、AP41和L1处理经铜绿假单胞菌P8感染的小鼠。在这些实验中,在感染后4.5小时淘汰小鼠,并将来自肺匀浆物的细菌计数与经PBS处理的对照进行比较。类似于预处理实验,绿脓菌素S5在降低细菌数量方面显示出最大的效力,但是在该实验中,从6只经S5处理的小鼠中的3只中回收到活细菌。绿脓菌素L1、S2和AP41分别使细菌载量显著降低约20、80和130倍(图1c)。重复该实验,并且再次,所有的绿脓菌素处理组均显示出显著降低的细菌计数(图5a)。

[0180] 为了确定感染后的绿脓菌素处理是否提供针对致死性铜绿假单胞菌感染的保护,类似地用铜绿假单胞菌P8感染小鼠,并在感染后1小时用 $3\text{mg ml}^{-1}$ 的绿脓菌素S2、S5、AP41和绿脓菌素L1处理。监测经感染小鼠的患病情况,并且如果达到足够的临床评分或者在实验终点(感染后24小时)淘汰。在感染后4.5小时淘汰所有经PBS处理的小鼠,所有经绿脓菌素处理的小鼠均存活至24小时的实验终点。确定了肺的细菌载量,并且再次,绿脓菌素S5显示出最大的效力,其中经绿脓菌素S5处理的六只小鼠中任何一只均未回收到细菌。另外,绿脓菌素S2、L1和AP41在该模型中也高度有效,使细菌计数显著降低超过4-10log个单位(图1d)。重复该实验,并且再次,所有经绿脓菌素处理的小鼠均存活至24小时且细菌计数类似地显著降低(图5b)。因此,绿脓菌素在降低肺中的细菌载量方面高度有效,并且当在感染前和感染后施用均能够提供针对致死性铜绿假单胞菌感染的保护。

[0181] 由于铜绿假单胞菌的菌株在表型上多样化,因此我们测试了绿脓菌素对另外三种分离株的效力:铜绿假单胞菌P17和铜绿假单胞菌P5(黏液样),二者均来自囊性纤维化患者;以及铜绿假单胞菌E2,其是一种环境分离株。绿脓菌素S2在体外没有抵抗铜绿假单胞菌P5或铜绿假单胞菌E2活性,因此不用于在体内处理这些菌株,并且类似地,绿脓菌素L1不用于绿脓杆菌P17。所有三种铜绿假单胞菌菌株在急性肺部感染模型中均显示出与铜绿假单胞菌P8类似的毒力水平,并且经铜绿假单胞菌P5、P17和E2感染的对照分别在感染后4.5小时、4小时和5.5小时后全部需要淘汰。经铜绿假单胞菌P17、P5或E2感染的小鼠经绿脓菌素S5、L1和S2处理后全部存活直至实验的24小时终点,并且活细菌计数降低到显著低的水平或者不存在(表1)。相比之下,用绿脓菌素AP41处理铜绿假单胞菌E2未能提供保护,并且这些小鼠在感染后5.5小时被淘汰。来自经铜绿假单胞菌E2感染的经AP41处理的小鼠的肺匀浆物含有高水平的活细菌,相对于对照小鼠而言仅降低10倍(表1)。然而,绿脓菌素AP41处理对于经铜绿假单胞菌P5感染的小鼠和六只经铜绿假单胞菌P17感染的小鼠中的五只是成

功的。因此,绿脓菌素显示出对多种铜绿假单胞菌菌株的强效力,其中绿脓菌素S5处理显示出在降低细菌载量方面中的最大作用。

[0182] 表1.对多种铜绿假单胞菌分离株的绿脓菌素处理。用致死剂量的铜绿假单胞菌处理小鼠。未经药物处理的小鼠在感染后4小时至5.5小时被淘汰。经绿脓菌素处理的小鼠( $3\text{mg ml}^{-1}$ )存活至24小时。 $\star$ 小鼠与对照在相同时间被淘汰。 $^+$ 1只小鼠咳出绿脓菌素AP41处理物并且在感染后4小时被淘汰,细菌计数为 $1.3 \times 10^5 \text{CFU/肺}$ 。X-绿脓菌素不用于抵抗该菌株。

处理	P5	P17	E2
无处理	$1.7 \times 10^5 \text{CFU/肺}$	$4.4 \times 10^5 \text{CFU/肺}$	$1.5 \times 10^5 \text{CFU/肺}$
绿脓菌素L1	40	X	未检测到菌落
绿脓菌素S2	X	未检测到菌落	X
绿脓菌素AP41	未检测到菌落	未检测到菌落 $^+$	$1.3 \times 10^4 \text{CFU/肺}^{\star}$
绿脓菌素S5	未检测到菌落	未检测到菌落	未检测到菌落

[0184] 与妥布霉素相比,绿脓菌素S5在小鼠肺中显示出提高的铜绿假单胞菌杀伤

[0185] 为了直接比较绿脓菌素效力与目前的前沿治疗,我们比较了绿脓菌素S5与妥布霉素,妥布霉素在患有囊性纤维化的患者中广泛用作针对铜绿假单胞菌肺感染的吸入治疗。如前所述,用铜绿假单胞菌P8感染小鼠,并在感染后1小时用 $30$ 或 $3\text{mg ml}^{-1}$ 的妥布霉素或者 $0.3$ 或 $3\text{mg ml}^{-1}$ 的绿脓菌素S5处理,在感染后4.5小时淘汰并由肺匀浆物确定活细菌计数。与PBS对照相比,所有的四种处理均显著降低细菌载量。与妥布霉素相比,两个浓度下的绿脓菌素S5均在更大程度上降低细菌载量(图2a)。重复该实验,并且再次,与妥布霉素相比,绿脓菌素S5在更大程度上降低细菌计数(图6)。为了确定绿脓菌素S5与妥布霉素相比的相对效力,用 $30\text{ng ml}^{-1}$ 、 $300\text{pg ml}^{-1}$ 或 $3\text{pg ml}^{-1}$ 的绿脓菌素S5和 $300\mu\text{g ml}^{-1}$ 、 $3\mu\text{g ml}^{-1}$ 或 $30\text{ng ml}^{-1}$ 妥布霉素处理经铜绿假单胞菌P8感染的小鼠。经 $30\text{ng ml}^{-1}$ 绿脓菌素S5和 $300\mu\text{g ml}^{-1}$ 的妥布霉素处理的组存活至24小时,其他的所有组均由于严重感染而在感染后5.5小时被淘汰。在感染后24小时,与PBS对照相比, $30\text{ng ml}^{-1}$ 绿脓菌素S5和 $300\mu\text{g ml}^{-1}$ 妥布霉素二者均显著降低细菌计数(图2b)。这些结果表明,绿脓菌素S5起效的最低浓度介于 $30\text{ng ml}^{-1}$ 和 $300\text{pg ml}^{-1}$ 之间,妥布霉素起效的最低浓度介于 $300\mu\text{g ml}^{-1}$ 和 $3\mu\text{g ml}^{-1}$ 之间。因此,在该感染模型中,绿脓菌素S5的效力至少比妥布霉素高100倍(表2)。

[0186] 表2.提供针对铜绿假单胞菌P8感染的保护的最小受试绿脓菌素浓度。所测试的最低活性浓度表示使经处理的小鼠存活至24小时的最低受试浓度。

绿脓菌素	最低受试活性浓度	对应的摩尔浓度
绿脓菌素L1	$30\mu\text{g ml}^{-1}$	$1.06\mu\text{M}$
绿脓菌素S2	$30\mu\text{g ml}^{-1}$	$358\text{nM}$
绿脓菌素AP41	$30\mu\text{g ml}^{-1}$	$319\text{nM}$
绿脓菌素S5	$30\text{ng ml}^{-1}$	$535\text{pM}$
妥布霉素	$300\mu\text{g ml}^{-1}$	$641\mu\text{M}$

[0188] 在确定了在该模型中绿脓菌素S5在低于 $1\text{nM}$ 的浓度下有效之后,我们测试了绿脓菌素S2、L1和AP41在比之前所使用的更低的浓度下的效力。所有三种绿脓菌素均以 $300\mu\text{g ml}^{-1}$ 和 $30\mu\text{g ml}^{-1}$ 使用。由于症状的严重性,经 $30\mu\text{g ml}^{-1}$ 绿脓菌素L1处理的六只小鼠中有三

只和PBS对照小鼠在感染后6小时被淘汰。经两个浓度的绿脓菌素和AP41处理的所有小鼠以及经 $300\mu\text{g ml}^{-1}$ 绿脓菌素L1处理的小鼠存活直至感染后24小时的实验终点(表S1)。因此,针对铜绿假单胞菌P8,绿脓菌素S2和AP41的最低有效浓度为 $\leq 30\mu\text{g ml}^{-1}$ ,绿脓菌素L1的最低有效浓度为 $30$ 至 $300\mu\text{g ml}^{-1}$ 。表S1显示,体内测试的所有绿脓菌素均显示出与妥布霉素相当或者比其更大的效力。

#### [0189] 绿脓菌素耐受性和缓解策略

[0190] 为了确定在体内绿脓菌素处理之后是否获得绿脓菌素耐受性或耐药性,在本项工作中讨论的所有实验中,测试了从感染中存活直至24小时终点的小鼠中回收的活细菌的绿脓菌素敏感性。从这些实验中,未分离到绿脓菌素耐药性菌落。然而,我们从经绿脓菌素AP41( $3\text{mg ml}^{-1}$ ,感染后)处理的细菌中获得显示对绿脓菌素AP41的耐受性提高(约1000倍)的单分离株(P8AP41T)。重要的是,在该绿脓菌素AP41耐受性菌株中,其对绿脓菌素S5和L1的敏感性在体外不受影响(图3a),并且当用P8AP41T感染小鼠时在体内也显示为这种情况。与在感染后6小时被淘汰的PBS对照相比,经绿脓菌素处理( $3\text{mg ml}^{-1}$ )的经P8AP41T感染的小鼠存活直至24小时的实验终点,并且显著降低肺匀浆物中的细菌数(图3b)。令人感兴趣的是,这不仅适用于用绿脓菌素L1、S2、S5的处理,而且还适用于用绿脓菌素AP41的处理,表明该绿脓菌素AP41耐受性突变体仍然可用高浓度的绿脓菌素AP41成功处理。绿脓菌素敏感性测试表明,该菌株在感染期间保留对绿脓菌素AP41的耐受性(图3a)。

[0191] 由于本研究中使用的所有四种绿脓菌素寄生于铜绿假单胞菌中的不同营养物质摄取受体,因此防止出现绿脓菌素耐药性的一种明显策略是使用由两种或更多种绿脓菌素的组合组成的绿脓菌素混合物。因此,我们测试了两种或更多种绿脓菌素的组合在铜绿假单胞菌P8的急性肺感染模型中的效力。测试了以下绿脓菌素组合:L1/S2、L1/AP41、S2/AP41和L1/S2/AP41,其中所有的绿脓菌素均为 $300\mu\text{g ml}^{-1}$ 。PBS对照小鼠在感染后4.5小时被淘汰,所有经绿脓菌素处理的小鼠存活直至24小时。从经绿脓菌素处理的小鼠回收到低水平的活细菌,并且对于L1/S2/AP41的组合,仅从6只经处理小鼠中的1只中回收到细菌,表明与使用单一绿脓菌素相比,绿脓菌素组合显示出增强的效力(图4)。对于在用多种绿脓菌素处理之后回收到的细菌,未观察到绿脓菌素耐药性或耐受性。

#### [0192] 绿脓菌素S5可在绿脓菌素S5抗体存在下提供针对致死性铜绿假单胞菌感染的保护

[0193] 为了确定重复暴露于绿脓菌素是否导致对治疗不利的抗体应答,使小鼠重复暴露于绿脓菌素S5以诱导抗体应答,并且如前述在用铜绿假单胞菌P8感染之后确定绿脓菌素处理的效力。通过鼻内途径(I.N.)或腹膜内(I.P.)途径施用绿脓菌素S5三次,其中每次施用之间间隔两周。在第一次处理后13周,用铜绿假单胞菌P8鼻内感染小鼠( $n=5$ ) (I.N.组用 $1.4 \times 10^7$ CFU进行感染,I.P.组用 $5.0 \times 10^6$ CFU进行感染)并在感染后1小时用 $75\mu\text{g}$ 绿脓菌素S5或PBS处理。还包括在感染前仅鼻内施用PBS的对照组。对于I.N.组,所有经绿脓菌素S5处理的小鼠均存活至24小时时间点,而所有经PBS处理的小鼠均由于症状严重而在感染后5小时被淘汰。确定肺的细菌载量,并且从任何经绿脓菌素S5处理小鼠中均未回收到活细菌(图8a)。分析每只小鼠的绿脓菌素S5特异性IgG和IgA的水平。在这些小鼠中未检测到IgA抗体;然而,在预先暴露于绿脓菌素S5的小鼠中存在低水平的IgG(是弗氏完全/不完全佐剂对照组的10倍低)(图8b)。对于通过I.P.途径重复暴露于绿脓菌素S5的小鼠,在感染后用绿脓菌

素S5鼻内处理的小鼠全部存活至24小时时间点,而经PBS处理的小鼠由于症状严重而在感染后5小时被淘汰。确定肺的细菌载量,并且从任何经绿脓菌素S5处理的小鼠中均未回收到活细菌(图8c)。绿脓菌素S5特异性IgG水平在仅绿脓菌素S5的组中非常低(是弗氏完全/不完全佐剂对照组的1000倍低),并且未检测到绿脓菌素S5特异性IgA(图8d)。因此,绿脓菌素S5在重复施用之后并且在绿脓菌素S5特异性抗体存在下显示出强效力。

#### [0194] 讨论

[0195] 在这项工作中,我们已经表明:绿脓菌素在直接递送至肺时在急性铜绿假单胞菌肺感染的致死模型中高度有效地降低细菌载量并且提供保护。值得注意的是,显示,绿脓菌素S5在为妥布霉素(广泛用于治疗铜绿假单胞菌肺感染的抗生素)的最小有效浓度的至少100倍低的浓度下提供保护。在体内测试的所有绿脓菌素均显示出与妥布霉素相当或比其更强的效力。另外,以高浓度施用这些高度稳定的经染色体编码的绿脓菌素不会在肺中引起明显炎症或组织损伤。总而言之,这些数据表明,绿脓菌素具有制备用于治疗铜绿假单胞菌肺感染的有用治疗剂的潜力。这些包括与囊性纤维化相关的铜绿假单胞菌感染、医院获得性肺炎和呼吸机相关性肺炎以及慢性阻塞性肺疾病(COPD),其所有都是当前医疗需求尚未满足的领域<sup>10,11</sup>。事实上,相关的大肠杆菌素样和凝集素样细菌素也可制备用于治疗常见抗生素耐药性病原体(例如肺炎克雷伯菌和伯克霍尔德氏菌属(*Burkholderia* spp.))的呼吸道感染的有用治疗剂。

[0196] 除效力之外,大肠杆菌素样细菌素的一个额外优点是其窄杀伤谱。这提供了成功地治疗细菌感染,同时使正常的细菌菌群保持完整的可能性。与使用广谱抗生素和生态失调相关的明确并发症包括抗生素相关性腹泻和艰难梭菌(*Clostridium difficile*)感染<sup>26,27</sup>。最近已表明,微生物失衡在例如克罗恩病、糖尿病、肥胖和类风湿性关节炎的多种慢性疾病中发挥作用<sup>28-31</sup>。

[0197] 在本研究中测试的绿脓菌素中,已知绿脓菌素S2和S5的受体分别为TonB依赖性铁-铁载体受体FpvAI和FptA<sup>21,22</sup>,并且最近表明绿脓菌素L1的受体为脂多糖的共有多糖抗原(common polysaccharide antigen,CPA)<sup>32</sup>。然而,绿脓菌素AP41的受体仍有待发现。已知FptA和CPA在铜绿假单胞菌的菌株中广泛分布<sup>33</sup>,并且令人感兴趣的是,已表明铜绿假单胞菌的CPA产生在囊性纤维化肺中上调<sup>34</sup>,这意味着绿脓菌素L1可能具有针对无法检测到体外活性的体内菌株的活性。使用靶向不同细胞表面受体的绿脓菌素的“混合物(cocktail)”将降低获得性绿脓菌素耐药性的机会,并且还降低绿脓菌素产生菌株中由于绿脓菌素特异性免疫蛋白基因的存在而赋予耐药性的可能性。然而,固有的绿脓菌素特异性免疫并非对这些抗微生物剂的巨大限制,因为绿脓菌素AP41和S5具有针对多种环境和临床分离株的集合中87%的菌株的活性。

#### [0198] \*\*\*

[0199] 虽然已经结合上述示例性实施例描述了本发明,但是当给出本公开内容时,许多等同的修改和变化对于本领域技术人员将是显而易见的。因此,所阐述的本发明的示例性实施例被认为是举例说明性的而不是限制性的。在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可以对所描述的实施例进行多种改变。本文中引用的所有文献均明确地通过引用并入。

#### [0200] 参考文献

[0201] 1Souli,M.,Galani,I.,&Giamarellou,H.,(2008)Emergence of extensively

drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. *Eurosurveillance*.13,19045-19045.

[0202] 2Vila,J.&Luis Martinez,J.,Clinical Impact of the Over-Expression of Efflux Pump in Nonfermentative Gram-Negative Bacilli,Development of Efflux Pump Inhibitors. (2008) *Current Drug Targets*.9,797-807.

[0203] 3Nikaido,H.,Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. (2003) *Microbiol Mol Biol Rev*.67,593-656.

[0204] 4Flamm,R.K.et al.,Factors associated with relative rates of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates tested in clinical laboratories in the United States from 1999to 2002. (2004) *Antimicrob Agents Chemother*.48,2431-2436.

[0205] 5Mah,T.F.et al.,A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. (2003) *Nature*.426,306-310.

[0206] 6Drenkard,E.&Ausubel,F.M.,*Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. (2002) *Nature*.416,740-743.

[0207] 7Livermore,D.M.,Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*:Our worst nightmare? (2002) *Clinical Infectious Diseases*.34,634-640.

[0208] 8Cystic Fibrosis Trust Annual data report 2011,UK CF Registry,2013.

[0209] 9Chastre,J.&Fagon,J.Y.,Ventilator-associated pneumonia. (2002) *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*.165,867-903.

[0210] 10Planquette,B.et al.,*Pseudomonas aeruginosa* Ventilator-associated Pneumonia Predictive Factors of Treatment Failure. (2013) *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*.188,69-76.

[0211] 11Martinez-Solano,L.,Macia,M.D.,Fajardo,A.,Oliver,A.,&Martinez,J.L.,Chronic *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. (2008) *Clinical Infectious Diseases*.47,1526-1533.

[0212] 12Murphy,T.F.et al.,*Pseudomonas aeruginosa* in chronic obstructive pulmonary disease. (2008) *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*.177,853-860.

[0213] 13Payne,D.J.,Gwynn,M.N.,Holmes,D.J.,&Pompliano,D.L.,Drugs for bad bugs:confronting the challenges of antibacterial discovery. (2007) *Nat Rev Drug Discov*.6,29-40.

[0214] 14Bumann,D.,Has nature already identified all useful antibacterial targets? (2008) *Current Opinion in Microbiology*.11,387-392.

[0215] 15 Shlaes,D.M.,Sahm,D.,Opiela,C.,&Spellbergc,B.,The FDA Reboot of Antibiotic Development. (2013) *Antimicrob Agents Chemother*.57,4605-4607.

[0216] 16Michel-Briand,Y.&Baysse,C.,The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*.

- (2002) *Biochimie*.84,499-510.
- [0217] 17Cascales,E.et al.,Colicin biology. (2007) *Microbiol Mol Biol Rev*.71, 158-229.
- [0218] 18Parret,A.H.A.&De Mot,R.,Bacteria killing their own kind:novel bacteriocins of pseudomonas and other gamma-proteobacteria. (2002) *Trends Microbiol*.10,107-112.
- [0219] 19Ferguson,A.D.&Deisenhofer,J.,TonB-dependent receptors-structural perspectives. (2002) *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*.1565,318-332.
- [0220] 20Kleanthous,C.,Swimming against the tide:progress and challenges in our understanding of colicin translocation. (2010) *Nat.Rev.Microbiol*.8,843-848.
- [0221] 21Elfarash,A.,Wei,Q.,&Cornelis,P.,The soluble pyocins S2 and S4 from *Pseudomonas aeruginosa* bind to the same FpvAI receptor. (2012) *MicrobiologyOpen*.1,268-275.
- [0222] 22Elfarash,A.et al.,Pore-forming pyocin S5 utilizes the FptA ferripyochelin receptor to kill *Pseudomonas aeruginosa*. (2014) *Microbiology*.160,261-269.
- [0223] 23Housden,N.G.et al.,Intrinsically Disordered Protein Threads Through the Bacterial Outer-Membrane Porin OmpF. (2013) *Science*.340,1570-1574.
- [0224] 24Baysse,C.et al.,Uptake of pyocin S3 occurs through the outer membrane ferripyoverdine type II receptor of *Pseudomonas aeruginosa*. (1999) *J Bacteriol*.181,3849-3851.
- [0225] 25Smith,K.et al.,Activity of Pyocin S2 against *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. (2012) *Antimicrob Agents Chemother*.56,1599-1601.
- [0226] 26Gorkiewicz,G.,Nosocomial and antibiotic-associated diarrhoea caused by organisms other than *Clostridium difficile*. (2009) *Int J Antimicrob Agents*.33,S37-S41.
- [0227] 27Carroll,K.C.&Bartlett,J.G.,Biology of *Clostridium difficile*: Implications for Epidemiology and Diagnosis. (2011) *Annu Rev Microbiol*.65,501-521.
- [0228] 28Manichanh,C.,Borrueal,N.,Casellas,F.,&Guarner,F.,The gut microbiota in IBD. (2012) *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*.9,599-608.
- [0229] 29Qin,J.et al.,A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. (2012) *Nature*.490,55-60.
- [0230] 30Scher,J.U.&Abramson,S.B.,The microbiome and rheumatoid arthritis. (2011) *Nat Rev Rheumatol*.7,569-578.
- [0231] 31Heno-Mejia,J.et al.,Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. (2012) *Nature*.482,179-U167.
- [0232] 32McCaughey,L.C.et al.,Lectin-like bacteriocins from *Pseudomonas* spp.utilise D-rhamnose containing lipopolysaccharide as a cellular receptor.

(2014) PLoS Pathog.10,e1003898.

[0233] 33Hao,Y.,King,J.D.,Huszczynski,S.,Kocincova,D.,&Lam,J.S.,Five New Genes Are Important for Common Polysaccharide Antigen Biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. (2013) Mbio.4.

[0234] 34Weisner,A.M.,Chart,H.,Bush,A.,Davies,J.C.,&Pitt,T.L.,Detection of antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* in serum and oral fluid from patients with cystic fibrosis. (2007) J Med Microbiol.56,670-674.

[0235] 35Fyfe,J.A.M.,Harris,G.,&Govan,J.R.W.,Revised Pyocin Typing Method For *Pseudomonas-Aeruginosa*. (1984) J Clin Microbiol.20,47-50.

[0236] 36Bragonzi,A.,Murine models of acute and chronic lung infection with cystic fibrosis pathogens. (2010) International Journal of Medical Microbiology.300,584-593.

[0237] 37Kageyama M,Kobayashi M,Sano Y,Masaki H. (1996) Construction and characterization of pyocin-colicin chimeric proteins.J Bacteriol.178(1),103-10.



## 序列表

<110> 格拉斯哥大学大学委员会  
 <120> 经肺施用绿脓菌素用于治疗细菌性呼吸道感染  
 <130> GRF/BP7147614  
 <140> PCT/EP2015/071768  
 <141> 2015-09-22  
 <150> GB 1416788.6  
 <151> 2014-09-23  
 <160> 40  
 <170> PatentIn version 3.3  
 <210> 1  
 <211> 689  
 <212> PRT  
 <213> 铜绿假单胞菌 (Pseudomonas aeruginosa)  
 <400> 1  
 Met Ala Val Asn Asp Tyr Glu Pro Gly Ser Met Val Ile Thr His Val  
 1 5 10 15  
 Gln Gly Gly Gly Arg Asp Ile Ile Gln Tyr Ile Pro Ala Arg Ser Ser  
 20 25 30  
 Tyr Gly Thr Pro Pro Phe Val Pro Pro Gly Pro Ser Pro Tyr Val Gly  
 35 40 45  
 Thr Gly Met Gln Glu Tyr Arg Lys Leu Arg Ser Thr Leu Asp Lys Ser  
 50 55 60  
 His Ser Glu Leu Lys Lys Asn Leu Lys Asn Glu Thr Leu Lys Glu Val  
 65 70 75 80  
 Asp Glu Leu Lys Ser Glu Ala Gly Leu Pro Gly Lys Ala Val Ser Ala  
 85 90 95  
 Asn Asp Ile Arg Asp Glu Lys Ser Ile Val Asp Ala Leu Met Asp Ala  
 100 105 110  
 Lys Ala Lys Ser Leu Lys Ala Ile Glu Asp Arg Pro Ala Asn Leu Tyr  
 115 120 125  
 Thr Ala Ser Asp Phe Pro Gln Lys Ser Glu Ser Met Tyr Gln Ser Gln  
 130 135 140

[0001]

Leu Leu Ala Ser Arg Lys Phe Tyr Gly Glu Phe Leu Asp Arg His Met  
 145 150 155 160

Ser Glu Leu Ala Lys Ala Tyr Ser Ala Asp Ile Tyr Lys Ala Gln Ile  
 165 170 175

Ala Ile Leu Lys Gln Thr Ser Gln Glu Leu Glu Asn Lys Ala Arg Ser  
 180 185 190

Leu Glu Ala Glu Ala Gln Arg Ala Ala Ala Glu Val Glu Ala Asp Tyr  
 195 200 205

Lys Ala Arg Lys Ala Asn Val Glu Lys Lys Val Gln Ser Glu Leu Asp  
 210 215 220

Gln Ala Gly Asn Ala Leu Pro Gln Leu Thr Asn Pro Thr Pro Glu Gln  
 225 230 235 240

Trp Leu Glu Arg Ala Thr Gln Leu Val Thr Gln Ala Ile Ala Asn Lys  
 245 250 255

Lys Lys Leu Gln Thr Ala Asn Asn Ala Leu Ile Ala Lys Ala Pro Asn  
 260 265 270

[0002]

Ala Leu Glu Lys Gln Lys Ala Thr Tyr Asn Ala Asp Leu Leu Val Asp  
 275 280 285

Glu Ile Ala Ser Leu Gln Ala Arg Leu Asp Lys Leu Asn Ala Glu Thr  
 290 295 300

Ala Arg Arg Lys Glu Ile Ala Arg Gln Ala Ala Ile Arg Ala Ala Asn  
 305 310 315 320

Thr Tyr Ala Met Pro Ala Asn Gly Ser Val Val Ala Thr Ala Ala Gly  
 325 330 335

Arg Gly Leu Ile Gln Val Ala Gln Gly Ala Ala Ser Leu Ala Gln Ala  
 340 345 350

Ile Ser Asp Ala Ile Ala Val Leu Gly Arg Val Leu Ala Ser Ala Pro  
 355 360 365

Ser Val Met Ala Val Gly Phe Ala Ser Leu Thr Tyr Ser Ser Arg Thr  
 370 375 380

Ala Glu Gln Trp Gln Asp Gln Thr Pro Asp Ser Val Arg Tyr Ala Leu



Val Arg Glu Ser Glu Gln Ala Gly Gly Arg Ile Lys Ile Glu Ile His  
645 650 655

His Lys Val Arg Ile Ala Asp Gly Gly Gly Val Tyr Asn Met Gly Asn  
660 665 670

Leu Val Ala Val Thr Pro Lys Arg His Ile Glu Ile His Lys Gly Gly  
675 680 685

Lys

<210> 2

<211> 558

<212> PRT

<213> 铜绿假单胞菌

<400> 2

Met Ala Val Asn Asp Tyr Glu Pro Gly Ser Met Val Ile Thr His Val  
1 5 10 15

[0004]

Gln Gly Gly Gly Arg Asp Ile Ile Gln Tyr Ile Pro Ala Arg Ser Ser  
20 25 30

Tyr Gly Thr Pro Pro Phe Val Pro Pro Gly Pro Ser Pro Tyr Val Gly  
35 40 45

Thr Gly Met Gln Glu Tyr Arg Lys Leu Arg Ser Thr Leu Asp Lys Ser  
50 55 60

His Ser Glu Leu Lys Lys Asn Leu Lys Asn Glu Thr Leu Lys Glu Val  
65 70 75 80

Asp Glu Leu Lys Ser Glu Ala Gly Leu Pro Gly Lys Ala Val Ser Ala  
85 90 95

Asn Asp Ile Arg Asp Glu Lys Ser Ile Val Asp Ala Leu Met Asp Ala  
100 105 110

Lys Ala Lys Ser Leu Lys Ala Ile Glu Asp Arg Pro Ala Asn Leu Tyr  
115 120 125

Thr Ala Ser Asp Phe Pro Gln Lys Ser Glu Ser Met Tyr Gln Ser Gln  
130 135 140

Leu Leu Ala Ser Arg Lys Phe Tyr Gly Glu Phe Leu Asp Arg His Met  
 145 150 155 160

Ser Glu Leu Ala Lys Ala Tyr Ser Ala Asp Ile Tyr Lys Ala Gln Ile  
 165 170 175

Ala Ile Leu Lys Gln Thr Ser Gln Glu Leu Glu Asn Lys Ala Arg Ser  
 180 185 190

Leu Glu Ala Glu Ala Gln Arg Ala Ala Ala Glu Val Glu Ala Asp Tyr  
 195 200 205

Lys Ala Arg Lys Ala Asn Val Glu Lys Lys Val Gln Ser Glu Leu Asp  
 210 215 220

Gln Ala Gly Asn Ala Leu Pro Gln Leu Thr Asn Pro Thr Pro Glu Gln  
 225 230 235 240

Trp Leu Glu Arg Ala Thr Gln Leu Val Thr Gln Ala Ile Ala Asn Lys  
 245 250 255

Lys Lys Leu Gln Thr Ala Asn Asn Ala Leu Ile Ala Lys Ala Pro Asn  
 260 265 270

[0005]

Ala Leu Glu Lys Gln Lys Ala Thr Tyr Asn Ala Asp Leu Leu Val Asp  
 275 280 285

Glu Ile Ala Ser Leu Gln Ala Arg Leu Asp Lys Leu Asn Ala Glu Thr  
 290 295 300

Ala Arg Arg Lys Glu Ile Ala Arg Gln Ala Ala Ile Arg Ala Ala Asn  
 305 310 315 320

Thr Tyr Ala Met Pro Ala Asn Gly Ser Val Val Ala Thr Ala Ala Gly  
 325 330 335

Arg Gly Leu Ile Gln Val Ala Gln Gly Ala Ala Ser Leu Ala Gln Ala  
 340 345 350

Ile Ser Asp Ala Ile Ala Val Leu Gly Arg Val Leu Ala Ser Ala Pro  
 355 360 365

Ser Val Met Ala Val Gly Phe Ala Ser Leu Thr Tyr Ser Ser Arg Thr  
 370 375 380

Ala Glu Gln Trp Gln Asp Gln Thr Pro Asp Ser Val Arg Tyr Ala Leu



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

[0007]

<210> 4  
 <211> 96  
 <212> PRT  
 <213> 铜绿假单胞菌  
 <400> 4  
 Lys Lys Val Gln Ser Glu Leu Asp Gln Ala Gly Asn Ala Leu Pro Gln  
 1 5 10 15  
 Leu Thr Asn Pro Thr Pro Glu Gln Trp Leu Glu Arg Ala Thr Gln Leu  
 20 25 30  
 Val Thr Gln Ala Ile Ala Asn Lys Lys Lys Leu Gln Thr Ala Asn Asn





Val Pro Ser Thr Thr Ala Glu Ala Pro Pro Leu Ile Leu Thr Trp Thr  
165 170 175

Pro Ala Ser Pro Pro Gly Asn Gln Asn Pro Ser Ser Thr Thr Pro Val  
180 185 190

Val Pro Lys Pro Val Pro Val Tyr Glu Gly Ala Thr Leu Thr Pro Val  
195 200 205

Lys Ala Thr Pro Glu Thr Tyr Pro Gly Val Ile Thr Leu Pro Glu Asp  
210 215 220

Leu Ile Ile Gly Phe Pro Ala Asp Ser Gly Ile Lys Pro Ile Tyr Val  
225 230 235 240

Met Phe Arg Asp Pro  
245

<210> 6

<211> 131

<212> PRT

<213> 铜绿假单胞菌

[0009]

<400> 6

Arg Asp Val Pro Gly Ala Ala Thr Gly Lys Gly Gln Pro Val Ser Gly  
1 5 10 15

Asn Trp Leu Gly Ala Ala Ser Gln Gly Glu Gly Ala Pro Ile Pro Ser  
20 25 30

Gln Ile Ala Asp Lys Leu Arg Gly Lys Thr Phe Lys Asn Trp Arg Asp  
35 40 45

Phe Arg Glu Gln Phe Trp Ile Ala Val Ala Asn Asp Pro Glu Leu Ser  
50 55 60

Lys Gln Phe Asn Pro Gly Ser Leu Ala Val Met Arg Asp Gly Gly Ala  
65 70 75 80

Pro Tyr Val Arg Glu Ser Glu Gln Ala Gly Gly Arg Ile Lys Ile Glu  
85 90 95

Ile His His Lys Val Arg Ile Ala Asp Gly Gly Gly Val Tyr Asn Met  
100 105 110

Gly Asn Leu Val Ala Val Thr Pro Lys Arg His Ile Glu Ile His Lys

115	120	125
Gly Gly Lys		
130		
<210> 7		
<211> 662		
<212> PRT		
<213> 铜绿假单胞菌		
<400> 7		
Met Ala Val Asn Asp Tyr Glu Pro Gly Ser Met Val Ile Thr His Val		
1	5	10 15
Gln Gly Gly Gly Arg Asp Ile Ile Gln Tyr Ile Pro Ala Arg Ser Ser		
	20	25 30
Tyr Gly Thr Pro Pro Phe Val Pro Pro Gly Pro Ser Pro Tyr Val Gly		
	35	40 45
Thr Gly Met Gln Glu Tyr Arg Lys Leu Arg Ser Thr Leu Asp Lys Ser		
	50	55 60
His Ser Glu Leu Lys Lys Asn Leu Lys Asn Glu Thr Leu Lys Glu Val		
65	70	75 80
Asp Glu Leu Lys Ser Glu Ala Gly Leu Pro Gly Lys Ala Val Ser Ala		
	85	90 95
Asn Asp Ile Arg Asp Glu Lys Ser Ile Val Asp Ala Leu Met Asp Ala		
	100	105 110
Lys Ala Lys Ser Leu Lys Ala Ile Glu Asp Arg Pro Ala Asn Leu Tyr		
	115	120 125
Thr Ala Ser Asp Phe Pro Gln Lys Ser Glu Ser Met Tyr Gln Ser Gln		
	130	135 140
Leu Leu Ala Ser Arg Lys Phe Tyr Gly Glu Phe Leu Asp Arg His Met		
145	150	155 160
Ser Glu Leu Ala Lys Ala Tyr Ser Ala Asp Ile Tyr Lys Ala Gln Ile		
	165	170 175
Ala Ile Leu Lys Gln Thr Ser Gln Glu Leu Glu Asn Lys Ala Arg Ser		
	180	185 190

[0010]

Leu Glu Ala Glu Ala Gln Arg Ala Ala Ala Glu Val Glu Ala Asp Tyr  
 195 200 205

Lys Ala Arg Lys Ala Asn Val Glu Lys Lys Val Gln Ser Glu Leu Asp  
 210 215 220

Gln Ala Gly Asn Ala Leu Pro Gln Leu Thr Asn Pro Thr Pro Glu Gln  
 225 230 235 240

Trp Leu Glu Arg Ala Thr Gln Leu Val Thr Gln Ala Ile Ala Asn Lys  
 245 250 255

Lys Lys Leu Gln Thr Ala Asn Asn Ala Leu Ile Ala Lys Ala Pro Asn  
 260 265 270

Ala Leu Glu Lys Gln Lys Ala Thr Tyr Asn Ala Asp Leu Leu Val Asp  
 275 280 285

Glu Ile Ala Ser Leu Gln Ala Arg Leu Asp Lys Leu Asn Ala Glu Thr  
 290 295 300

[0011] Ala Arg Arg Lys Glu Ile Ala Arg Gln Ala Ala Ile Arg Ala Ala Asn  
 305 310 315 320

Thr Tyr Ala Met Pro Ala Asn Gly Ser Val Val Ala Thr Ala Ala Gly  
 325 330 335

Arg Gly Leu Ile Gln Val Ala Gln Gly Ala Ala Ser Leu Ala Gln Ala  
 340 345 350

Ile Ser Asp Ala Ile Ala Val Leu Gly Arg Val Leu Ala Ser Ala Pro  
 355 360 365

Ser Val Met Ala Val Gly Phe Ala Ser Leu Thr Tyr Ser Ser Arg Thr  
 370 375 380

Ala Glu Gln Trp Gln Asp Gln Thr Pro Asp Ser Val Arg Tyr Ala Leu  
 385 390 395 400

Gly Met Asp Ala Asn Lys Leu Gly Leu Thr Ser Ser Val Asn Leu Ser  
 405 410 415

Ala Val Ala Lys Ala Gly Gly Thr Val Asp Leu Pro Met Arg Leu Thr  
 420 425 430

Asn Glu Ala Arg Gly Asn Thr Thr Thr Leu Ser Val Val Ser Thr Asp  
 435 440 445  
 Gly Val Ser Val Pro Lys Ala Ala Pro Val Arg Met Ala Ala Tyr Asn  
 450 455 460  
 Ala Thr Thr Gly Leu Tyr Glu Val Thr Val Pro Ser Thr Thr Ala Glu  
 465 470 475 480  
 Ala Pro Pro Leu Ile Leu Thr Trp Thr Pro Ala Ser Pro Pro Gly Asn  
 485 490 495  
 Gln Asn Pro Ser Ser Thr Thr Pro Val Ile Pro Lys Pro Val Pro Val  
 500 505 510  
 Tyr Glu Gly Ala Ala Leu Thr Pro Leu Lys Thr Gly Pro Glu Ser Tyr  
 515 520 525  
 Pro Gly Met Leu Leu Asp Leu Asn Asp Leu Ile Val Ile Phe Pro Ala  
 530 535 540  
 Asp Ser Gly Val Lys Pro Val Tyr Val Met Leu Ser Ser Pro Leu Asp  
 545 550 555 560  
 Ser Gly Ile Phe Thr Arg Arg Gln Leu Gln Lys Lys Phe Asp Ser His  
 565 570 575  
 Lys Tyr Asp Phe Gly Leu Gly Glu Lys Ser Ala Asn Asn Gly Thr Leu  
 580 585 590  
 Ala Glu Phe Arg Asp Lys Ile Leu Glu His Leu Ala Asp Pro Ala Thr  
 595 600 605  
 Val Glu Lys Gly Thr Tyr His Ser Glu Val Asn Ser Lys Val His Tyr  
 610 615 620  
 Asn Ala Arg Thr Asn Ile Val Val Ile Ile Gly Glu Asp Gly Met Phe  
 625 630 635 640  
 Val Ser Gly Trp Arg Ile Glu Pro Gly Thr Asp Gln Tyr Asn Phe Tyr  
 645 650 655  
 Met Lys Asn Glu Val Leu  
 660

[0012]

&lt;210&gt; 8

<211> 554  
 <212> PRT  
 <213> 铜绿假单胞菌  
 <400> 8  
 Met Ala Val Asn Asp Tyr Glu Pro Gly Ser Met Val Ile Thr His Val  
 1 5 10 15  
 Gln Gly Gly Gly Arg Asp Ile Ile Gln Tyr Ile Pro Ala Arg Ser Ser  
 20 25 30  
 Tyr Gly Thr Pro Pro Phe Val Pro Pro Gly Pro Ser Pro Tyr Val Gly  
 35 40 45  
 Thr Gly Met Gln Glu Tyr Arg Lys Leu Arg Ser Thr Leu Asp Lys Ser  
 50 55 60  
 His Ser Glu Leu Lys Lys Asn Leu Lys Asn Glu Thr Leu Lys Glu Val  
 65 70 75 80  
 Asp Glu Leu Lys Ser Glu Ala Gly Leu Pro Gly Lys Ala Val Ser Ala  
 85 90 95  
 [0013] Asn Asp Ile Arg Asp Glu Lys Ser Ile Val Asp Ala Leu Met Asp Ala  
 100 105 110  
 Lys Ala Lys Ser Leu Lys Ala Ile Glu Asp Arg Pro Ala Asn Leu Tyr  
 115 120 125  
 Thr Ala Ser Asp Phe Pro Gln Lys Ser Glu Ser Met Tyr Gln Ser Gln  
 130 135 140  
 Leu Leu Ala Ser Arg Lys Phe Tyr Gly Glu Phe Leu Asp Arg His Met  
 145 150 155 160  
 Ser Glu Leu Ala Lys Ala Tyr Ser Ala Asp Ile Tyr Lys Ala Gln Ile  
 165 170 175  
 Ala Ile Leu Lys Gln Thr Ser Gln Glu Leu Glu Asn Lys Ala Arg Ser  
 180 185 190  
 Leu Glu Ala Glu Ala Gln Arg Ala Ala Ala Glu Val Glu Ala Asp Tyr  
 195 200 205  
 Lys Ala Arg Lys Ala Asn Val Glu Lys Lys Val Gln Ser Glu Leu Asp  
 210 215 220

	Gln	Ala	Gly	Asn	Ala	Leu	Pro	Gln	Leu	Thr	Asn	Pro	Thr	Pro	Glu	Gln
	225					230					235					240
	Trp	Leu	Glu	Arg	Ala	Thr	Gln	Leu	Val	Thr	Gln	Ala	Ile	Ala	Asn	Lys
				245						250					255	
	Lys	Lys	Leu	Gln	Thr	Ala	Asn	Asn	Ala	Leu	Ile	Ala	Lys	Ala	Pro	Asn
			260						265					270		
	Ala	Leu	Glu	Lys	Gln	Lys	Ala	Thr	Tyr	Asn	Ala	Asp	Leu	Leu	Val	Asp
			275					280					285			
	Glu	Ile	Ala	Ser	Leu	Gln	Ala	Arg	Leu	Asp	Lys	Leu	Asn	Ala	Glu	Thr
	290						295					300				
	Ala	Arg	Arg	Lys	Glu	Ile	Ala	Arg	Gln	Ala	Ala	Ile	Arg	Ala	Ala	Asn
	305					310					315					320
	Thr	Tyr	Ala	Met	Pro	Ala	Asn	Gly	Ser	Val	Val	Ala	Thr	Ala	Ala	Gly
				325						330						335
[0014]	Arg	Gly	Leu	Ile	Gln	Val	Ala	Gln	Gly	Ala	Ala	Ser	Leu	Ala	Gln	Ala
			340						345					350		
	Ile	Ser	Asp	Ala	Ile	Ala	Val	Leu	Gly	Arg	Val	Leu	Ala	Ser	Ala	Pro
			355					360					365			
	Ser	Val	Met	Ala	Val	Gly	Phe	Ala	Ser	Leu	Thr	Tyr	Ser	Ser	Arg	Thr
	370						375					380				
	Ala	Glu	Gln	Trp	Gln	Asp	Gln	Thr	Pro	Asp	Ser	Val	Arg	Tyr	Ala	Leu
	385					390					395					400
	Gly	Met	Asp	Ala	Asn	Lys	Leu	Gly	Leu	Thr	Ser	Ser	Val	Asn	Leu	Ser
				405						410					415	
	Ala	Val	Ala	Lys	Ala	Gly	Gly	Thr	Val	Asp	Leu	Pro	Met	Arg	Leu	Thr
			420						425					430		
	Asn	Glu	Ala	Arg	Gly	Asn	Thr	Thr	Thr	Leu	Ser	Val	Val	Ser	Thr	Asp
			435					440					445			
	Gly	Val	Ser	Val	Pro	Lys	Ala	Ala	Pro	Val	Arg	Met	Ala	Ala	Tyr	Asn
	450						455					460				

Ala Thr Thr Gly Leu Tyr Glu Val Thr Val Pro Ser Thr Thr Ala Glu  
465 470 475 480

Ala Pro Pro Leu Ile Leu Thr Trp Thr Pro Ala Ser Pro Pro Gly Asn  
485 490 495

Gln Asn Pro Ser Ser Thr Thr Pro Val Ile Pro Lys Pro Val Pro Val  
500 505 510

Tyr Glu Gly Ala Ala Leu Thr Pro Leu Lys Thr Gly Pro Glu Ser Tyr  
515 520 525

Pro Gly Met Leu Leu Asp Leu Asn Asp Leu Ile Val Ile Phe Pro Ala  
530 535 540

Asp Ser Gly Val Lys Pro Val Tyr Val Met  
545 550

<210> 9  
<211> 216  
<212> PRT  
<213> 铜绿假单胞菌

<400> 9

[0015] Met Ala Val Asn Asp Tyr Glu Pro Gly Ser Met Val Ile Thr His Val  
1 5 10 15

Gln Gly Gly Gly Arg Asp Ile Ile Gln Tyr Ile Pro Ala Arg Ser Ser  
20 25 30

Tyr Gly Thr Pro Pro Phe Val Pro Pro Gly Pro Ser Pro Tyr Val Gly  
35 40 45

Thr Gly Met Gln Glu Tyr Arg Lys Leu Arg Ser Thr Leu Asp Lys Ser  
50 55 60

His Ser Glu Leu Lys Lys Asn Leu Lys Asn Glu Thr Leu Lys Glu Val  
65 70 75 80

Asp Glu Leu Lys Ser Glu Ala Gly Leu Pro Gly Lys Ala Val Ser Ala  
85 90 95

Asn Asp Ile Arg Asp Glu Lys Ser Ile Val Asp Ala Leu Met Asp Ala  
100 105 110

Lys Ala Lys Ser Leu Lys Ala Ile Glu Asp Arg Pro Ala Asn Leu Tyr  
115 120 125

Thr Ala Ser Asp Phe Pro Gln Lys Ser Glu Ser Met Tyr Gln Ser Gln  
 130 135 140

Leu Leu Ala Ser Arg Lys Phe Tyr Gly Glu Phe Leu Asp Arg His Met  
 145 150 155 160

Ser Glu Leu Ala Lys Ala Tyr Ser Ala Asp Ile Tyr Lys Ala Gln Ile  
 165 170 175

Ala Ile Leu Lys Gln Thr Ser Gln Glu Leu Glu Asn Lys Ala Arg Ser  
 180 185 190

Leu Glu Ala Glu Ala Gln Arg Ala Ala Ala Glu Val Glu Ala Asp Tyr  
 195 200 205

Lys Ala Arg Lys Ala Asn Val Glu  
 210 215

<210> 10  
 <211> 96  
 <212> PRT  
 <213> 铜绿假单胞菌

[0016] <400> 10

Lys Lys Val Gln Ser Glu Leu Asp Gln Ala Gly Asn Ala Leu Pro Gln  
 1 5 10 15

Leu Thr Asn Pro Thr Pro Glu Gln Trp Leu Glu Arg Ala Thr Gln Leu  
 20 25 30

Val Thr Gln Ala Ile Ala Asn Lys Lys Lys Leu Gln Thr Ala Asn Asn  
 35 40 45

Ala Leu Ile Ala Lys Ala Pro Asn Ala Leu Glu Lys Gln Lys Ala Thr  
 50 55 60

Tyr Asn Ala Asp Leu Leu Val Asp Glu Ile Ala Ser Leu Gln Ala Arg  
 65 70 75 80

Leu Asp Lys Leu Asn Ala Glu Thr Ala Arg Arg Lys Glu Ile Ala Arg  
 85 90 95

<210> 11  
 <211> 242  
 <212> PRT  
 <213> 铜绿假单胞菌



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

[0017]

Val Met

<210> 12  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> 铜绿假单胞菌

&lt;400&gt; 12

Leu Ser Ser Pro Leu Asp Ser Gly Ile Phe Thr Arg Arg Gln Leu Gln  
 1 5 10 15

Lys Lys Phe Asp Ser His Lys Tyr Asp Phe Gly Leu Gly Glu Lys Ser  
 20 25 30

Ala Asn Asn Gly Thr Leu Ala Glu Phe Arg Asp Lys Ile Leu Glu His  
 35 40 45

Leu Ala Asp Pro Ala Thr Val Glu Lys Gly Thr Tyr His Ser Glu Val  
 50 55 60

Asn Ser Lys Val His Tyr Asn Ala Arg Thr Asn Ile Val Val Ile Ile  
 65 70 75 80

[0018]

Gly Glu Asp Gly Met Phe Val Ser Gly Trp Arg Ile Glu Pro Gly Thr  
 85 90 95

Asp Gln Tyr Asn Phe Tyr Met Lys Asn Glu Val Leu  
 100 105

<210> 13  
 <211> 498  
 <212> PRT  
 <213> 铜绿假单胞菌

&lt;400&gt; 13

Met Ser Asn Asp Asn Glu Val Pro Gly Ser Met Val Ile Val Ala Gln  
 1 5 10 15

Gly Pro Asp Asp Gln Tyr Ala Tyr Glu Val Pro Pro Ile Asp Ser Ala  
 20 25 30

Ala Val Ala Gly Asn Met Phe Gly Asp Leu Ile Gln Arg Glu Ile Tyr  
 35 40 45

Leu Gln Lys Asn Ile Tyr Tyr Pro Val Arg Ser Ile Phe Glu Gln Gly

50	55	60
Thr 65	Lys 70	Glu 75
Lys	Lys	Val
Glu	Ile	Ser
Lys	Asn	Asp
Lys	Lys	Gln
Val	Val	Asp
80		
Gly	Leu	Leu
Lys	Lys	Gln
85	Ile	Thr
Gln	Thr	Gln
Gly	Gly	Lys
90	Arg	Glu
Ala	Thr	Arg
95	Gln	
Glu	Arg	Val
Asp	Val	Met
100	Ser	Ala
Val	Val	Leu
105	His	Lys
Met	Glu	Ser
110	Asp	Tyr
Leu	Glu	Gly
115	Tyr	Lys
Lys	Lys	Thr
120	Phe	Thr
125	Lys	Gly
Pro	Phe	Ile
125	Asp	Tyr
Glu	Lys	Gln
130	Ser	Ser
Leu	Ser	Ile
135	Tyr	Glu
Ala	Trp	Val
140	Lys	Ile
Trp	140	
Glu	Lys	Asn
145	Ser	Trp
Glu	Glu	Arg
150	Lys	Lys
Tyr	Pro	Phe
155	Gln	Gln
160	Leu	
Val	Arg	Asp
165	Glu	Leu
Glu	Arg	Ala
170	Val	Ala
Tyr	Tyr	Lys
175	Gln	Asp
Ser		
[0019]	Leu	Ser
180	Glu	Ala
185	Val	Lys
190	Val	Leu
Arg	Gln	Glu
190	Leu	Asn
Lys	Gln	Lys
195	Ala	Leu
200	Ser	Gln
205	Leu	Glu
Arg	Asp	Tyr
205	Arg	
Thr	Arg	Lys
210	Ala	Asn
215	Leu	Glu
220	Met	Lys
220	Val	Gln
Ser	Glu	Leu
220	Asp	Gln
Ala	Gly	Ser
225	Ala	Leu
230	Pro	Pro
235	Leu	Val
235	Ser	Pro
240	Thr	Pro
Glu	Gln	Trp
240	240	
Leu	Glu	Arg
245	Ala	Thr
250	Arg	Leu
255	Val	Thr
255	Gln	Ala
Ile	Ala	Asp
255	Lys	Lys
Gln	Leu	Gln
260	Thr	Thr
265	Asn	Asn
270	Thr	Leu
270	Ile	Lys
270	Asn	Ser
270	Pro	Thr
270	Pro	
Leu	Glu	Lys
275	Gln	Lys
280	Ala	Ile
280	Tyr	Asn
285	Gly	Glu
285	Leu	Leu
285	Val	Asp
285	Glu	
Ile	Ala	Ser
290	Leu	Gln
295	Ala	Arg
300	Leu	Val
300	Lys	Leu
300	Asn	Ala
300	Glu	Thr
300	Thr	

Arg Arg Arg Thr Glu Ala Glu Arg Lys Ala Ala Glu Glu Gln Ala Leu  
 305 310 315 320  
 Gln Asp Ala Ile Lys Phe Thr Ala Asp Phe Tyr Lys Glu Val Thr Glu  
 325 330 335  
 Lys Phe Gly Ala Arg Thr Ser Glu Met Ala Arg Gln Leu Ala Glu Gly  
 340 345 350  
 Ala Arg Gly Lys Asn Ile Arg Ser Ser Ala Glu Ala Ile Lys Ser Phe  
 355 360 365  
 Glu Lys His Lys Asp Ala Leu Asn Lys Lys Leu Ser Leu Lys Asp Arg  
 370 375 380  
 Gln Ala Ile Ala Lys Ala Phe Asp Ser Leu Asp Lys Gln Met Met Ala  
 385 390 395 400  
 Lys Ser Leu Glu Lys Phe Ser Lys Gly Phe Gly Val Val Gly Lys Ala  
 405 410 415  
 [0020] Ile Asp Ala Ala Ser Leu Tyr Gln Glu Phe Lys Ile Ser Thr Glu Thr  
 420 425 430  
 Gly Asp Trp Lys Pro Phe Phe Val Lys Ile Glu Thr Leu Ala Ala Gly  
 435 440 445  
 Ala Ala Ala Ser Trp Leu Val Gly Ile Ala Phe Ala Thr Ala Thr Ala  
 450 455 460  
 Thr Pro Ile Gly Ile Leu Gly Phe Ala Leu Val Met Ala Val Thr Gly  
 465 470 475 480  
 Ala Met Ile Asp Glu Asp Leu Leu Glu Lys Ala Asn Asn Leu Val Ile  
 485 490 495  
 Ser Ile  
 <210> 14  
 <211> 300  
 <212> PRT  
 <213> 铜绿假单胞菌  
 <400> 14

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

[0021]

	245	250	255
	Gln Leu Gln Thr Thr Asn Asn Thr	Leu Ile Lys Asn Ser	Pro Thr Pro
	260	265	270
	Leu Glu Lys Gln Lys Ala Ile Tyr Asn Gly Glu Leu	Leu Val Asp Glu	
	275	280	285
	Ile Ala Ser Leu Gln Ala Arg Leu Val Lys Leu Asn		
	290	295	300
<210>	15		
<211>	150		
<212>	PRT		
<213>	铜绿假单胞菌		
<400>	15		
	Glu Arg Lys Lys Tyr Pro Phe Gln Gln Leu Val Arg Asp Glu Leu Glu		
	1	5	10 15
	Arg Ala Val Ala Tyr Tyr Lys Gln Asp Ser Leu Ser Glu Ala Val Lys		
	20	25	30
[0022]	Val Leu Arg Gln Glu Leu Asn Lys Gln Lys Ala Leu Lys Glu Lys Glu		
	35	40	45
	Asp Leu Ser Gln Leu Glu Arg Asp Tyr Arg Thr Arg Lys Ala Asn Leu		
	50	55	60
	Glu Met Lys Val Gln Ser Glu Leu Asp Gln Ala Gly Ser Ala Leu Pro		
	65	70	75 80
	Pro Leu Val Ser Pro Thr Pro Glu Gln Trp Leu Glu Arg Ala Thr Arg		
	85	90	95
	Leu Val Thr Gln Ala Ile Ala Asp Lys Lys Gln Leu Gln Thr Thr Asn		
	100	105	110
	Asn Thr Leu Ile Lys Asn Ser Pro Thr Pro Leu Glu Lys Gln Lys Ala		
	115	120	125
	Ile Tyr Asn Gly Glu Leu Leu Val Asp Glu Ile Ala Ser Leu Gln Ala		
	130	135	140
	Arg Leu Val Lys Leu Asn		
	145	150	

<210> 16  
 <211> 150  
 <212> PRT  
 <213> 铜绿假单胞菌  
  
 <400> 16  
 Met Ser Asn Asp Asn Glu Val Pro Gly Ser Met Val Ile Val Ala Gln  
 1 5 10 15  
 Gly Pro Asp Asp Gln Tyr Ala Tyr Glu Val Pro Pro Ile Asp Ser Ala  
 20 25 30  
 Ala Val Ala Gly Asn Met Phe Gly Asp Leu Ile Gln Arg Glu Ile Tyr  
 35 40 45  
 Leu Gln Lys Asn Ile Tyr Tyr Pro Val Arg Ser Ile Phe Glu Gln Gly  
 50 55 60  
 Thr Lys Glu Lys Lys Glu Ile Asn Lys Lys Val Ser Asp Gln Val Asp  
 65 70 75 80  
 Gly Leu Leu Lys Gln Ile Thr Gln Gly Lys Arg Glu Ala Thr Arg Gln  
 85 90 95  
 Glu Arg Val Asp Val Met Ser Ala Val Leu His Lys Met Glu Ser Asp  
 100 105 110  
 Leu Glu Gly Tyr Lys Lys Thr Phe Thr Lys Gly Pro Phe Ile Asp Tyr  
 115 120 125  
 Glu Lys Gln Ser Ser Leu Ser Ile Tyr Glu Ala Trp Val Lys Ile Trp  
 130 135 140  
 Glu Lys Asn Ser Trp Glu  
 145 150

[0023]

<210> 17  
 <211> 198  
 <212> PRT  
 <213> 铜绿假单胞菌  
  
 <400> 17  
 Ala Glu Thr Thr Arg Arg Arg Thr Glu Ala Glu Arg Lys Ala Ala Glu  
 1 5 10 15  
 Glu Gln Ala Leu Gln Asp Ala Ile Lys Phe Thr Ala Asp Phe Tyr Lys  
 20 25 30

Glu Val Thr Glu Lys Phe Gly Ala Arg Thr Ser Glu Met Ala Arg Gln  
 35 40 45

Leu Ala Glu Gly Ala Arg Gly Lys Asn Ile Arg Ser Ser Ala Glu Ala  
 50 55 60

Ile Lys Ser Phe Glu Lys His Lys Asp Ala Leu Asn Lys Lys Leu Ser  
 65 70 75 80

Leu Lys Asp Arg Gln Ala Ile Ala Lys Ala Phe Asp Ser Leu Asp Lys  
 85 90 95

Gln Met Met Ala Lys Ser Leu Glu Lys Phe Ser Lys Gly Phe Gly Val  
 100 105 110

Val Gly Lys Ala Ile Asp Ala Ala Ser Leu Tyr Gln Glu Phe Lys Ile  
 115 120 125

Ser Thr Glu Thr Gly Asp Trp Lys Pro Phe Phe Val Lys Ile Glu Thr  
 130 135 140

[0024]

Leu Ala Ala Gly Ala Ala Ala Ser Trp Leu Val Gly Ile Ala Phe Ala  
 145 150 155 160

Thr Ala Thr Ala Thr Pro Ile Gly Ile Leu Gly Phe Ala Leu Val Met  
 165 170 175

Ala Val Thr Gly Ala Met Ile Asp Glu Asp Leu Leu Glu Lys Ala Asn  
 180 185 190

Asn Leu Val Ile Ser Ile  
 195

<210> 18

<211> 777

<212> PRT

<213> 铜绿假单胞菌

<400> 18

Met Ser Asp Val Phe Asp Leu Gly Ser Met Thr Thr Val Ala Thr Ala  
 1 5 10 15

Thr Gly Gln Tyr Ser Phe Tyr Thr Pro Pro Pro Pro Thr Pro Ile Pro  
 20 25 30



Tyr Leu Thr Tyr Ile Ala Arg Pro Gly Ile Asn Lys Phe Asp Leu Pro  
 35 40 45  
 Glu Gly Ala Lys Ile Lys Asp Leu Ile Lys Arg Tyr Gln Tyr Ile Gly  
 50 55 60  
 Ser Gln Ile Pro Ala Ala Ile Met Ile Arg Gly Val Gln Glu Glu Ile  
 65 70 75 80  
 Lys Lys Ser Thr Asn Thr Ala Leu Ala Asn Val Gly Ala Ile Val Asp  
 85 90 95  
 Gly Glu Leu Ala Tyr Leu Ala Ser Gln Lys Lys Glu Lys Leu Asn Pro  
 100 105 110  
 Ala Glu Ala Thr Pro Leu Gln Met Ala Ser Ala Glu Lys Ala Ala Ala  
 115 120 125  
 Val Glu Leu Leu Ala Ser Lys Gln Lys Glu Leu Ala Asp Ala Arg Thr  
 130 135 140  
 Ile Ala Asn Ala Phe Phe Gly Tyr Asp Pro Leu Thr Val Asn Tyr Val  
 145 150 155 160  
 Asn Val Met Asn Glu Ile Tyr Gly Arg Arg Glu Asp Lys Asp Phe Ser  
 165 170 175  
 Phe Asp Asn Trp Ser Lys Ser Tyr Ser Ala Ala Gln Lys Ile Arg Leu  
 180 185 190  
 Ile Glu Ala Lys Ile Ser Val Leu Asn Ser Arg Ser Ser Ala Leu Asp  
 195 200 205  
 Gly Lys Val Ala Glu Leu Thr Arg Leu Gln Arg Leu Glu Asp Ala Gln  
 210 215 220  
 His Ala Ala Glu Ala Ala Arg Gln Thr Glu Ala Glu Arg Leu Ala Gln  
 225 230 235 240  
 Glu Gln Arg Gln Ala Glu Ala Arg Arg Gln Ala Glu Glu Ala Arg Arg  
 245 250 255  
 Gln Ala Glu Ala Gln Arg Gln Ala Glu Leu Gln Arg Leu Ala Glu Ala  
 260 265 270  
 Glu Ala Lys Arg Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys Arg Gln Asp Glu Ile

[0025]

275	280	285
Asn Ala Arg Leu Gln Ala 290	Ile Val Val Ser Glu 295	Ser Glu Ala Lys Arg 300
Ile Glu Glu Ile Tyr Lys Arg 305	Leu Glu Glu Gln Asp Lys Ile Ser Asn 310	315
Pro Thr Val Thr Thr Pro Pro Ala Val Asp Ala Gly Ser Arg Val Asp 325	330	335
Asp Ala Leu Ala His Thr Gly Thr Arg Val Thr Ser Gly Gly Glu Thr 340	345	350
Gly Ala Thr Gly Gly Ser Gly Arg Asp Val Asp Thr Gly Thr Gly Gln 355	360	365
Gly Gly Ile Thr Ala Arg Pro Val Asp Val Gly Ser Val Ser Ile Pro 370	375	380
Asp Arg Arg Asp Pro Lys Ile Pro Asp Gln Pro Arg Arg Asp Leu Gly 385	390	395
Ser Leu Val Pro Thr Phe Pro Asp Phe Pro Thr Phe Pro Ser Phe Pro 405	410	415
Gly Val Gly Val Pro Ala Ala Ala Lys Pro Leu Ile Pro Ala Gly Gly 420	425	430
Gly Ala Ala Ser Val Ser Arg Thr Leu Lys Thr Ala Val Asp Leu Leu 435	440	445
Ser Val Ala Arg Lys Thr Pro Gly Ala Met Leu Gly Gln Val Ala Ala 450	455	460
Val Val Ala Thr Met Ala Val Ser Ser Phe Trp Pro Lys Leu Asn Asn 465	470	475
Gly Glu Arg Gln Ala Ser Phe Ala Ile Pro Val Ala Glu Leu Ser Pro 485	490	495
Pro Leu Ala Val Asp Trp Gln Ala Ile Ala Ala Ala Lys Gly Thr Val 500	505	510
Asp Leu Pro Tyr Arg Leu Lys Thr Leu Asn Val Asp Gly Ser Ile Gln 515	520	525

[0026]

Ile Ile Ala Val Pro Thr Glu Pro Gly Ser Ala Ala Val Pro Val Arg  
 530 535 540

Ala Leu Thr Leu Asp Ser Ala Ser Gly Thr Tyr Lys Tyr Thr Thr Thr  
 545 550 555 560

Gly Pro Gly Gly Gly Thr Ile Leu Val Thr Pro Asp Thr Pro Pro Gly  
 565 570 575

Gln Ile Asp Pro Ser Ser Ser Thr Pro Ala Val Pro Arg Gly Pro Leu  
 580 585 590

Ile Met Pro Gly Thr Leu Leu Ile Pro Lys Glu Pro Gln Ile Glu Ser  
 595 600 605

Tyr Pro Glu Leu Asp Gln Arg Glu Phe Asn Asp Gly Ile Tyr Val Tyr  
 610 615 620

Pro Glu Asp Ser Gly Ile Pro Pro Leu Tyr Ile Val Tyr Arg Asp Pro  
 625 630 635 640

[0027] Arg Asp Glu Pro Gly Val Ala Thr Gly Asn Gly Gln Pro Val Thr Gly  
 645 650 655

Asn Trp Leu Ala Gly Ala Ser Gln Gly Asp Gly Val Pro Ile Pro Ser  
 660 665 670

Gln Ile Ala Asp Gln Leu Arg Gly Lys Glu Phe Lys Ser Trp Arg Asp  
 675 680 685

Phe Arg Glu Gln Phe Trp Met Ala Val Ser Lys Asp Pro Ser Ala Leu  
 690 695 700

Glu Asn Leu Ser Pro Ser Asn Arg Tyr Phe Val Ser Gln Gly Leu Ala  
 705 710 715 720

Pro Tyr Ala Val Pro Glu Glu His Leu Gly Ser Lys Glu Lys Phe Glu  
 725 730 735

Ile His His Val Val Pro Leu Glu Ser Gly Gly Ala Leu Tyr Asn Ile  
 740 745 750

Asp Asn Leu Val Ile Val Thr Pro Lys Arg His Ser Glu Ile His Lys  
 755 760 765

Glu Leu Lys Leu Lys Arg Lys Glu Lys  
 770 775

<210> 19  
 <211> 639  
 <212> PRT  
 <213> 铜绿假单胞菌

<400> 19

Met Ser Asp Val Phe Asp Leu Gly Ser Met Thr Thr Val Ala Thr Ala  
 1 5 10 15

Thr Gly Gln Tyr Ser Phe Tyr Thr Pro Pro Pro Pro Thr Pro Ile Pro  
 20 25 30

Tyr Leu Thr Tyr Ile Ala Arg Pro Gly Ile Asn Lys Phe Asp Leu Pro  
 35 40 45

Glu Gly Ala Lys Ile Lys Asp Leu Ile Lys Arg Tyr Gln Tyr Ile Gly  
 50 55 60

Ser Gln Ile Pro Ala Ala Ile Met Ile Arg Gly Val Gln Glu Glu Ile  
 65 70 75 80

[0028]

Lys Lys Ser Thr Asn Thr Ala Leu Ala Asn Val Gly Ala Ile Val Asp  
 85 90 95

Gly Glu Leu Ala Tyr Leu Ala Ser Gln Lys Lys Glu Lys Leu Asn Pro  
 100 105 110

Ala Glu Ala Thr Pro Leu Gln Met Ala Ser Ala Glu Lys Ala Ala Ala  
 115 120 125

Val Glu Leu Leu Ala Ser Lys Gln Lys Glu Leu Ala Asp Ala Arg Thr  
 130 135 140

Ile Ala Asn Ala Phe Phe Gly Tyr Asp Pro Leu Thr Val Asn Tyr Val  
 145 150 155 160

Asn Val Met Asn Glu Ile Tyr Gly Arg Arg Glu Asp Lys Asp Phe Ser  
 165 170 175

Phe Asp Asn Trp Ser Lys Ser Tyr Ser Ala Ala Gln Lys Ile Arg Leu  
 180 185 190

Ile Glu Ala Lys Ile Ser Val Leu Asn Ser Arg Ser Ser Ala Leu Asp

	195		200		205														
	Gly	Lys	Val	Ala	Glu	Leu	Thr	Arg	Leu	Gln	Arg	Leu	Glu	Asp	Ala	Gln			
	210						215					220							
	His	Ala	Ala	Glu	Ala	Ala	Arg	Gln	Thr	Glu	Ala	Glu	Arg	Leu	Ala	Gln			
	225					230					235					240			
	Glu	Gln	Arg	Gln	Ala	Glu	Ala	Arg	Arg	Gln	Ala	Glu	Glu	Ala	Arg	Arg			
				245						250					255				
	Gln	Ala	Glu	Ala	Gln	Arg	Gln	Ala	Glu	Leu	Gln	Arg	Leu	Ala	Glu	Ala			
				260					265					270					
	Glu	Ala	Lys	Arg	Val	Ala	Glu	Ala	Glu	Lys	Lys	Arg	Gln	Asp	Glu	Ile			
			275					280					285						
	Asn	Ala	Arg	Leu	Gln	Ala	Ile	Val	Val	Ser	Glu	Ser	Glu	Ala	Lys	Arg			
	290						295					300							
	Ile	Glu	Glu	Ile	Tyr	Lys	Arg	Leu	Glu	Glu	Gln	Asp	Lys	Ile	Ser	Asn			
	305					310					315					320			
[0029]	Pro	Thr	Val	Thr	Thr	Pro	Pro	Ala	Val	Asp	Ala	Gly	Ser	Arg	Val	Asp			
					325					330					335				
	Asp	Ala	Leu	Ala	His	Thr	Gly	Thr	Arg	Val	Thr	Ser	Gly	Gly	Glu	Thr			
				340					345					350					
	Gly	Ala	Thr	Gly	Gly	Ser	Gly	Arg	Asp	Val	Asp	Thr	Gly	Thr	Gly	Gln			
			355					360					365						
	Gly	Gly	Ile	Thr	Ala	Arg	Pro	Val	Asp	Val	Gly	Ser	Val	Ser	Ile	Pro			
	370						375					380							
	Asp	Arg	Arg	Asp	Pro	Lys	Ile	Pro	Asp	Gln	Pro	Arg	Arg	Asp	Leu	Gly			
	385					390					395				400				
	Ser	Leu	Val	Pro	Thr	Phe	Pro	Asp	Phe	Pro	Thr	Phe	Pro	Ser	Phe	Pro			
					405					410					415				
	Gly	Val	Gly	Val	Pro	Ala	Ala	Ala	Lys	Pro	Leu	Ile	Pro	Ala	Gly	Gly			
				420					425					430					
	Gly	Ala	Ala	Ser	Val	Ser	Arg	Thr	Leu	Lys	Thr	Ala	Val	Asp	Leu	Leu			
				435				440					445						

	Ser	Val	Ala	Arg	Lys	Thr	Pro	Gly	Ala	Met	Leu	Gly	Gln	Val	Ala	Ala	
	450						455					460					
	Val	Val	Ala	Thr	Met	Ala	Val	Ser	Ser	Phe	Trp	Pro	Lys	Leu	Asn	Asn	
	465					470					475					480	
	Gly	Glu	Arg	Gln	Ala	Ser	Phe	Ala	Ile	Pro	Val	Ala	Glu	Leu	Ser	Pro	
				485						490					495		
	Pro	Leu	Ala	Val	Asp	Trp	Gln	Ala	Ile	Ala	Ala	Ala	Lys	Gly	Thr	Val	
				500					505					510			
	Asp	Leu	Pro	Tyr	Arg	Leu	Lys	Thr	Leu	Asn	Val	Asp	Gly	Ser	Ile	Gln	
			515					520					525				
	Ile	Ile	Ala	Val	Pro	Thr	Glu	Pro	Gly	Ser	Ala	Ala	Val	Pro	Val	Arg	
		530					535						540				
	Ala	Leu	Thr	Leu	Asp	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Tyr	Lys	Tyr	Thr	Thr	Thr	
	545					550					555						560
[0030]	Gly	Pro	Gly	Gly	Gly	Thr	Ile	Leu	Val	Thr	Pro	Asp	Thr	Pro	Pro	Gly	
				565						570					575		
	Gln	Ile	Asp	Pro	Ser	Ser	Ser	Thr	Pro	Ala	Val	Pro	Arg	Gly	Pro	Leu	
				580					585					590			
	Ile	Met	Pro	Gly	Thr	Leu	Leu	Ile	Pro	Lys	Glu	Pro	Gln	Ile	Glu	Ser	
			595					600					605				
	Tyr	Pro	Glu	Leu	Asp	Gln	Arg	Glu	Phe	Asn	Asp	Gly	Ile	Tyr	Val	Tyr	
	610						615					620					
	Pro	Glu	Asp	Ser	Gly	Ile	Pro	Pro	Leu	Tyr	Ile	Val	Tyr	Arg	Asp		
	625					630					635						
	<210>	20															
	<211>	239															
	<212>	PRT															
	<213>	铜绿假单胞菌															
	<400>	20															
	Met	Ser	Asp	Val	Phe	Asp	Leu	Gly	Ser	Met	Thr	Thr	Val	Ala	Thr	Ala	
	1				5					10					15		

Thr Gly Gln Tyr Ser Phe Tyr Thr Pro Pro Pro Pro Thr Pro Ile Pro  
 20 25 30  
 Tyr Leu Thr Tyr Ile Ala Arg Pro Gly Ile Asn Lys Phe Asp Leu Pro  
 35 40 45  
 Glu Gly Ala Lys Ile Lys Asp Leu Ile Lys Arg Tyr Gln Tyr Ile Gly  
 50 55 60  
 Ser Gln Ile Pro Ala Ala Ile Met Ile Arg Gly Val Gln Glu Glu Ile  
 65 70 75 80  
 Lys Lys Ser Thr Asn Thr Ala Leu Ala Asn Val Gly Ala Ile Val Asp  
 85 90 95  
 Gly Glu Leu Ala Tyr Leu Ala Ser Gln Lys Lys Glu Lys Leu Asn Pro  
 100 105 110  
 Ala Glu Ala Thr Pro Leu Gln Met Ala Ser Ala Glu Lys Ala Ala Ala  
 115 120 125  
 Val Glu Leu Leu Ala Ser Lys Gln Lys Glu Leu Ala Asp Ala Arg Thr  
 130 135 140  
 Ile Ala Asn Ala Phe Phe Gly Tyr Asp Pro Leu Thr Val Asn Tyr Val  
 145 150 155 160  
 Asn Val Met Asn Glu Ile Tyr Gly Arg Arg Glu Asp Lys Asp Phe Ser  
 165 170 175  
 Phe Asp Asn Trp Ser Lys Ser Tyr Ser Ala Ala Gln Lys Ile Arg Leu  
 180 185 190  
 Ile Glu Ala Lys Ile Ser Val Leu Asn Ser Arg Ser Ser Ala Leu Asp  
 195 200 205  
 Gly Lys Val Ala Glu Leu Thr Arg Leu Gln Arg Leu Glu Asp Ala Gln  
 210 215 220  
 His Ala Ala Glu Ala Ala Arg Gln Thr Glu Ala Glu Arg Leu Ala  
 225 230 235  
 <210> 21  
 <211> 160  
 <212> PRT  
 <213> 铜绿假单胞菌

[0031]

<400> 21  
 Gln Glu Gln Arg Gln Ala Glu Ala Arg Arg Gln Ala Glu Glu Ala Arg  
 1 5 10 15  
 Arg Gln Ala Glu Ala Gln Arg Gln Ala Glu Leu Gln Arg Leu Ala Glu  
 20 25 30  
 Ala Glu Ala Lys Arg Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys Arg Gln Asp Glu  
 35 40 45  
 Ile Asn Ala Arg Leu Gln Ala Ile Val Val Ser Glu Ser Glu Ala Lys  
 50 55 60  
 Arg Ile Glu Glu Ile Tyr Lys Arg Leu Glu Glu Gln Asp Lys Ile Ser  
 65 70 75 80  
 Asn Pro Thr Val Thr Thr Pro Pro Ala Val Asp Ala Gly Ser Arg Val  
 85 90 95  
 Asp Asp Ala Leu Ala His Thr Gly Thr Arg Val Thr Ser Gly Gly Glu  
 100 105 110  
 Thr Gly Ala Thr Gly Gly Ser Gly Arg Asp Val Asp Thr Gly Thr Gly  
 115 120 125  
 Gln Gly Gly Ile Thr Ala Arg Pro Val Asp Val Gly Ser Val Ser Ile  
 130 135 140  
 Pro Asp Arg Arg Asp Pro Lys Ile Pro Asp Gln Pro Arg Arg Asp Leu  
 145 150 155 160  
  
 <210> 22  
 <211> 240  
 <212> PRT  
 <213> 铜绿假单胞菌  
  
 <400> 22  
 Gly Ser Leu Val Pro Thr Phe Pro Asp Phe Pro Thr Phe Pro Ser Phe  
 1 5 10 15  
 Pro Gly Val Gly Val Pro Ala Ala Ala Lys Pro Leu Ile Pro Ala Gly  
 20 25 30  
 Gly Gly Ala Ala Ser Val Ser Arg Thr Leu Lys Thr Ala Val Asp Leu  
 35 40 45

[0032]



Leu Ser Val Ala Arg Lys Thr Pro Gly Ala Met Leu Gly Gln Val Ala  
 50 55 60

Ala Val Val Ala Thr Met Ala Val Ser Ser Phe Trp Pro Lys Leu Asn  
 65 70 75 80

Asn Gly Glu Arg Gln Ala Ser Phe Ala Ile Pro Val Ala Glu Leu Ser  
 85 90 95

Pro Pro Leu Ala Val Asp Trp Gln Ala Ile Ala Ala Ala Lys Gly Thr  
 100 105 110

Val Asp Leu Pro Tyr Arg Leu Lys Thr Leu Asn Val Asp Gly Ser Ile  
 115 120 125

Gln Ile Ile Ala Val Pro Thr Glu Pro Gly Ser Ala Ala Val Pro Val  
 130 135 140

Arg Ala Leu Thr Leu Asp Ser Ala Ser Gly Thr Tyr Lys Tyr Thr Thr  
 145 150 155 160

Thr Gly Pro Gly Gly Gly Thr Ile Leu Val Thr Pro Asp Thr Pro Pro  
 165 170 175

Gly Gln Ile Asp Pro Ser Ser Ser Thr Pro Ala Val Pro Arg Gly Pro  
 180 185 190

Leu Ile Met Pro Gly Thr Leu Leu Ile Pro Lys Glu Pro Gln Ile Glu  
 195 200 205

Ser Tyr Pro Glu Leu Asp Gln Arg Glu Phe Asn Asp Gly Ile Tyr Val  
 210 215 220

Tyr Pro Glu Asp Ser Gly Ile Pro Pro Leu Tyr Ile Val Tyr Arg Asp  
 225 230 235 240

<210> 23  
 <211> 138  
 <212> PRT  
 <213> 铜绿假单胞菌

<400> 23

Pro Arg Asp Glu Pro Gly Val Ala Thr Gly Asn Gly Gln Pro Val Thr  
 1 5 10 15

Gly Asn Trp Leu Ala Gly Ala Ser Gln Gly Asp Gly Val Pro Ile Pro  
 20 25 30

[0033]

Ser Gln Ile Ala Asp Gln Leu Arg Gly Lys Glu Phe Lys Ser Trp Arg  
 35 40 45  
 Asp Phe Arg Glu Gln Phe Trp Met Ala Val Ser Lys Asp Pro Ser Ala  
 50 55 60  
 Leu Glu Asn Leu Ser Pro Ser Asn Arg Tyr Phe Val Ser Gln Gly Leu  
 65 70 75 80  
 Ala Pro Tyr Ala Val Pro Glu Glu His Leu Gly Ser Lys Glu Lys Phe  
 85 90 95  
 Glu Ile His His Val Val Pro Leu Glu Ser Gly Gly Ala Leu Tyr Asn  
 100 105 110  
 Ile Asp Asn Leu Val Ile Val Thr Pro Lys Arg His Ser Glu Ile His  
 115 120 125  
 Lys Glu Leu Lys Leu Lys Arg Lys Glu Lys  
 130 135

[0034]

<210> 24  
 <211> 256  
 <212> PRT  
 <213> 铜绿假单胞菌  
 <400> 24  
 Met Ala Ser Ser Leu Ala Pro Arg Gln Val Ile Arg Asp Gly Gln Phe  
 1 5 10 15  
 Ile Thr Ser Pro Asn Gly Lys Tyr Lys Leu Val Met Gln Ala Asp Gly  
 20 25 30  
 Asn Leu Val Leu Tyr Glu Asp Gly Thr Lys Pro Ile Trp Asn Thr Thr  
 35 40 45  
 Pro Val Gly Pro Gly Ala Lys Ala Val Met Glu Phe Asn Leu Asn Leu  
 50 55 60  
 Tyr Asn Lys Ala Gly Gln Val Ala Trp Ser Ser Asn Val Tyr Thr Ala  
 65 70 75 80  
 Tyr Leu Phe Glu Glu Phe Lys Asp Glu Ala Tyr Leu Asn Leu Gln Asp  
 85 90 95

Asp Gly Asp Phe Gly Ile Phe Ser Asp Glu Ala Lys Trp Gly Ser Ile  
 100 105 110

Val Leu Ser Arg Pro Glu Val Gly Val Lys Asn Lys Ile Ile Pro Thr  
 115 120 125

Gly Thr Val Met Val Pro Gly Thr Glu Tyr Ile Asn Gly Asn Tyr Arg  
 130 135 140

Leu Ala Phe Gln Gly Asp Gly Asn Leu Val Ile Tyr Gln Ile Asn Pro  
 145 150 155 160

Gln Val Val Ile Trp Ala Thr Tyr Thr Met Gly Ala Asp Arg Ala Val  
 165 170 175

Val Gln Glu Asp Gly Asn Phe Val Ile Tyr Lys Gly Thr Thr Ala Leu  
 180 185 190

Trp His Thr His Thr Ala Thr Gly Met Pro Ala Tyr Leu Lys Phe Thr  
 195 200 205

Asn Thr Gly Lys Leu Phe Leu Ser Gln Pro Thr Leu Leu Trp Thr Leu  
 210 215 220

[0035]

Lys Arg Gly Ser Leu Ser Lys Pro Pro Lys Val Ile Pro Gly Gln His  
 225 230 235 240

Gly Pro Leu Asp Thr Thr Pro Ile Trp Ser Trp Pro His Asp Tyr Pro  
 245 250 255

<210> 25  
 <211> 87  
 <212> PRT  
 <213> 铜绿假单胞菌  
 <400> 25

Met Lys Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Thr Glu Lys Glu Phe Leu Glu Phe  
 1 5 10 15

Val Lys Asp Ile Tyr Thr Asn Asn Lys Lys Lys Phe Pro Thr Glu Glu  
 20 25 30

Ser His Ile Gln Ala Val Leu Glu Phe Lys Lys Leu Thr Glu His Pro  
 35 40 45

Ser Gly Ser Asp Leu Leu Tyr Tyr Pro Asn Glu Asn Arg Glu Asp Ser  
 50 55 60

Pro Ala Gly Val Val Lys Glu Val Lys Glu Trp Arg Ala Ser Lys Gly  
65 70 75 80

Leu Pro Gly Phe Lys Ala Gly  
85

<210> 26

<211> 90

<212> PRT

<213> 铜绿假单胞菌

<400> 26

Met Ser Met Glu Met Ile Asp Ile Ala Lys Arg Leu Leu Ala Ser Ser  
1 5 10 15

Ile Asp Gly Lys Thr Phe Ser Glu Glu Phe Phe Lys Thr Trp Arg Ser  
20 25 30

Glu Arg Asp Ser Gly Val Leu Ala Gln Asp Asp Ala Ser Leu Gly Arg  
35 40 45

Cys Leu Ser Leu Met Phe Gly Leu Ala Asp Ser Phe Thr Glu Gly Lys  
50 55 60

[0036]

Lys Glu Arg Pro Gly Glu Leu Thr Glu Gly Glu Leu Lys Ile Ala Leu  
65 70 75 80

Ser Asp Leu Leu Lys Glu Tyr Lys Tyr Ile  
85 90

<210> 27

<211> 108

<212> PRT

<213> 铜绿假单胞菌

<400> 27

Met Ser Phe Lys Tyr Tyr Trp Ala Lys Phe Phe Trp Gly Ala Phe Phe  
1 5 10 15

Phe Val Leu Val Ala Trp Lys Gly Ser Val Phe Pro Ser Leu Ala Ser  
20 25 30

Val Asn Pro Leu Val Val Ala Gly Leu Ser Thr Ile Leu Phe Pro Phe  
35 40 45

Ser Val Lys Leu Val Glu Asp Phe Ala Leu Lys Tyr Thr Glu Arg Glu



[0038]

<222> (4)..(4)  
 <223> Xaa为任意氨基酸

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa为任意氨基酸

<400> 29

Gln Xaa Asp Xaa Asn Xaa Val Tyr  
 1 5

<210> 30  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 碳水化合物结合基序的共有序列

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa为任意氨基酸

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa为任意氨基酸

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa为任意氨基酸

<400> 30

Gln Xaa Asp Xaa Asn Xaa Val Phe  
 1 5

<210> 31  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 碳水化合物结合基序的共有序列

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa为任意氨基酸

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa为任意氨基酸



[0040]

<223> Xaa为任意氨基酸  
 <400> 33  
 Gln Xaa Asp Xaa Asp Xaa Val Tyr  
 1 5

<210> 34  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 碳水化合物结合基序的共有序列

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa为任意氨基酸

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa为任意氨基酸

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa为任意氨基酸

<400> 34  
 Gln Xaa Asp Xaa Asp Xaa Val Phe  
 1 5

<210> 35  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 碳水化合物结合基序的共有序列

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa为任意氨基酸

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa为任意氨基酸

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa为任意氨基酸

<400> 35



	Gln Xaa Asp Xaa Asp Xaa Gly Tyr	
	1 5	
	<210> 36	
	<211> 8	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 碳水化合物结合基序的共有序列	
	<220>	
	<221> 变体	
	<222> (2)..(2)	
	<223> Xaa为任意氨基酸	
	<220>	
	<221> 变体	
	<222> (4)..(4)	
	<223> Xaa为任意氨基酸	
	<220>	
	<221> 变体	
	<222> (6)..(6)	
	<223> Xaa为任意氨基酸	
	<400> 36	
[0041]	Gln Xaa Asp Xaa Asp Xaa Gly Phe	
	1 5	
	<210> 37	
	<211> 32	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成引物	
	<400> 37	
	acagatcata tgagcgacgt ttttgacett gg	32
	<210> 38	
	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成引物	
	<400> 38	
	acagatctcg aggccagcct tgaagccagg g	31
	<210> 39	
	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	合成引物	
	<400>	39	
		gagacatatg tccaatgaca acgaagtac	29
[0042]	<210>	40	
	<211>	41	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成引物	
	<400>	40	
		tttgacgtct cgagttaaat ggatattaca agattgtttg c	41

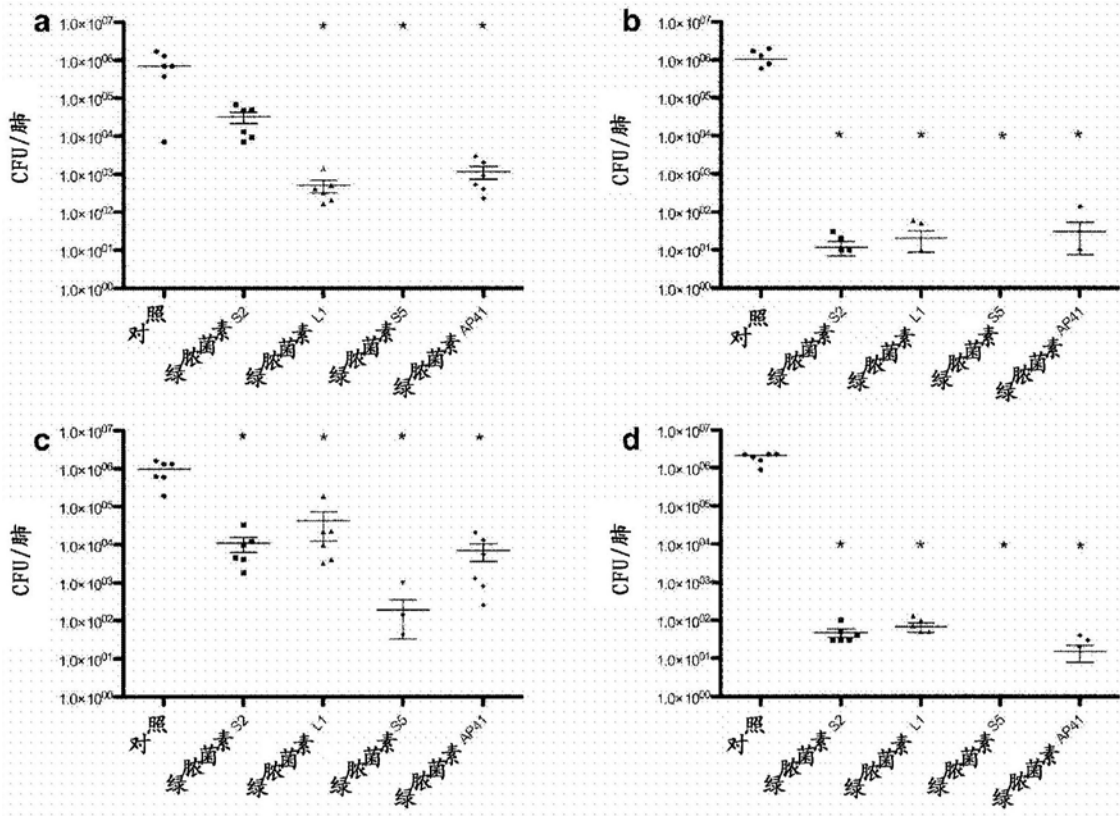


图1

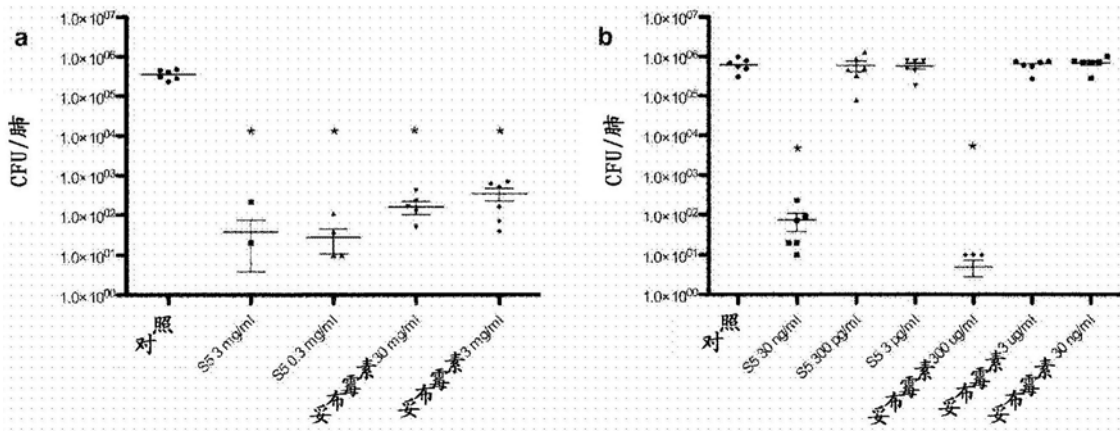


图2

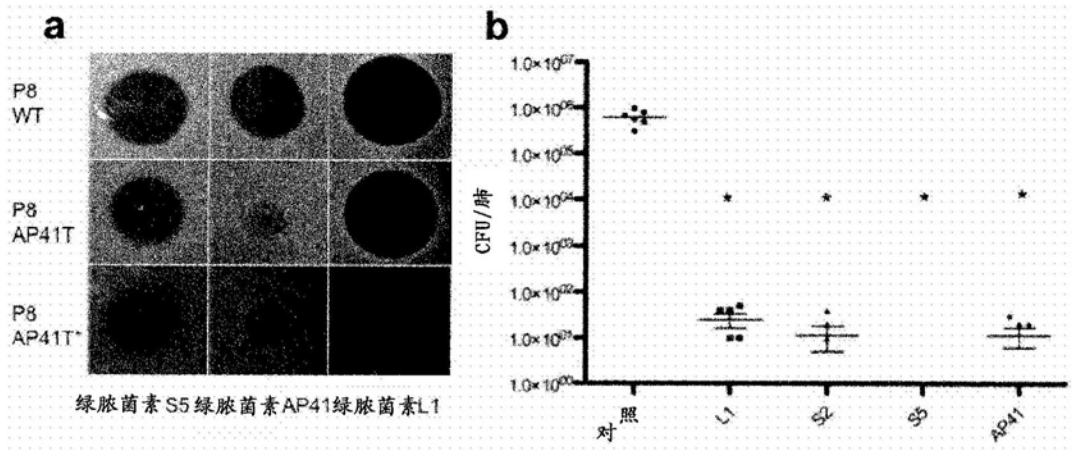


图3

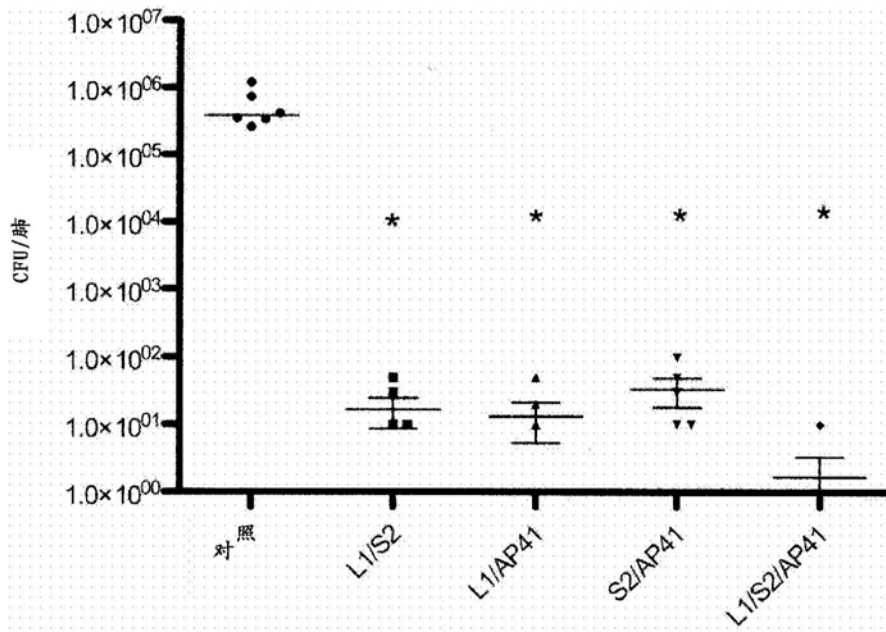


图4

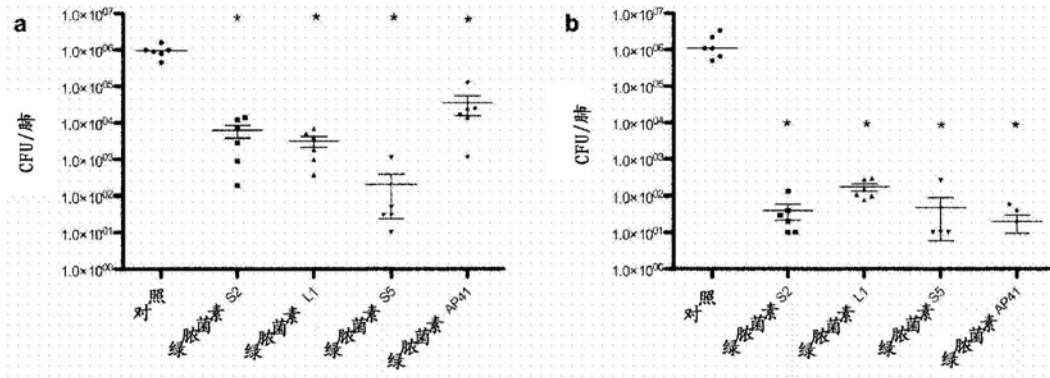


图5

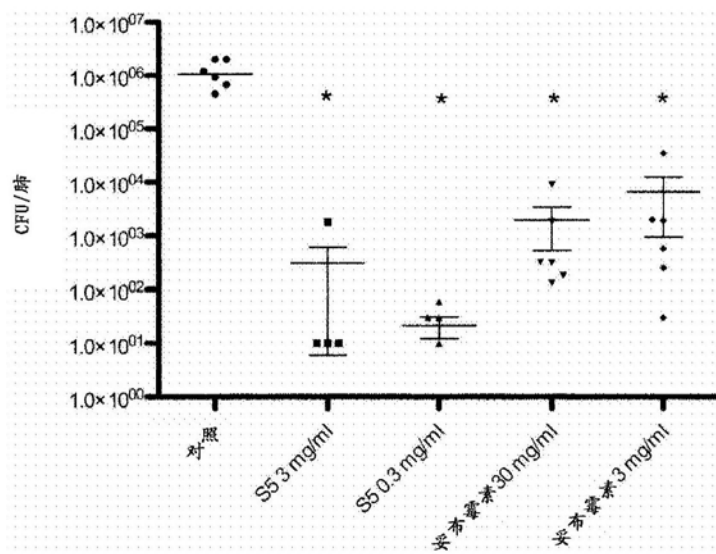


图6

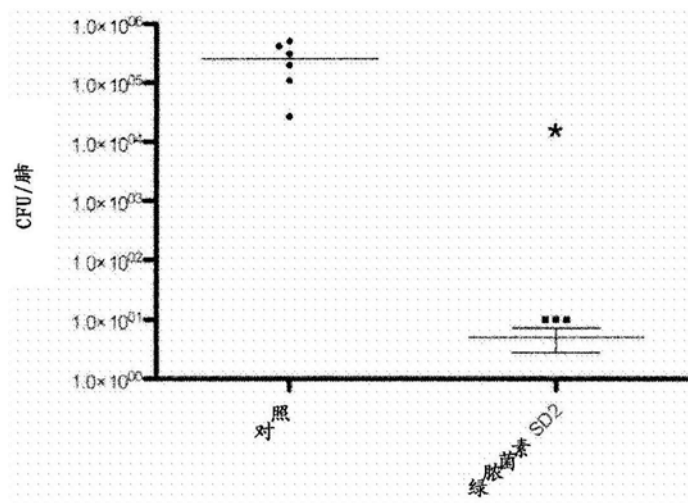


图7

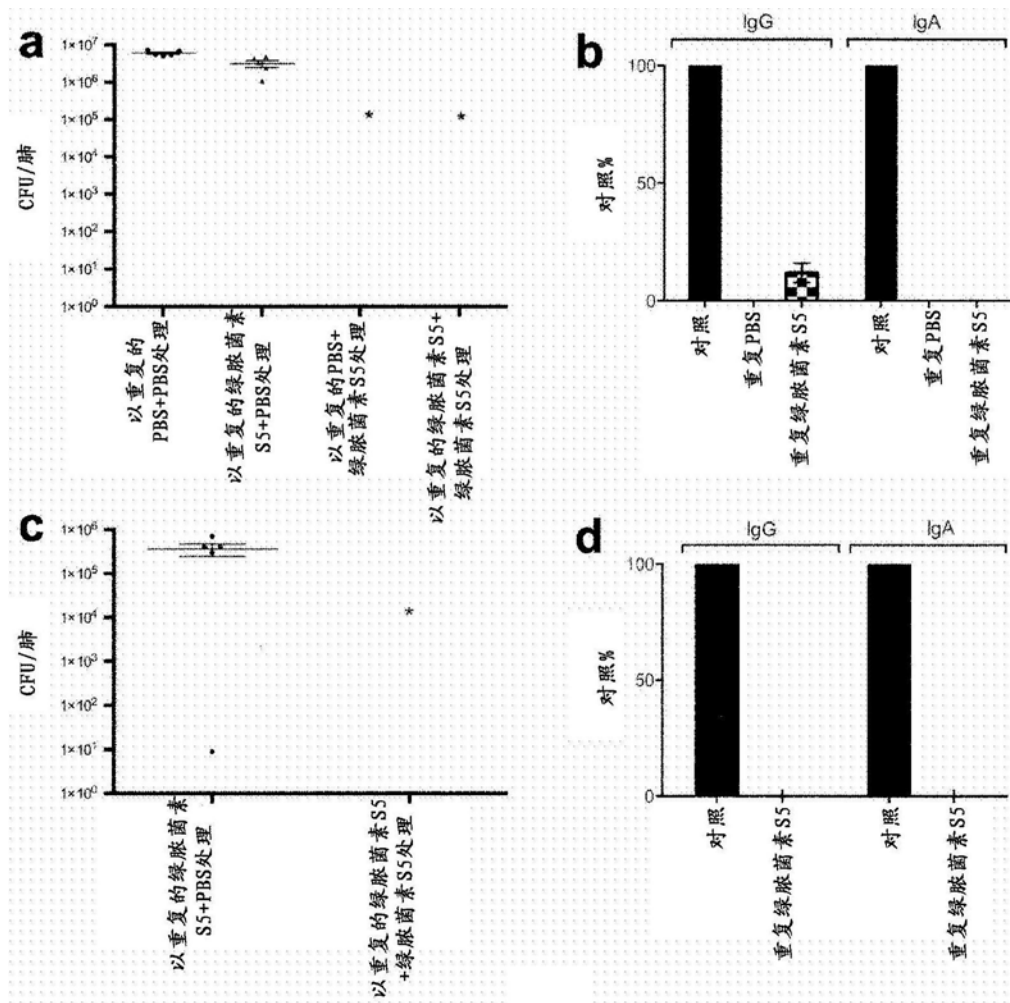


图8