



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I577697 B

(45)公告日：中華民國 106 (2017) 年 04 月 11 日

(21)申請案號：102143445

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 11 月 28 日

(51)Int. Cl. :            *C07K7/06*    (2006.01)            *C07K7/08*    (2006.01)  
                               *A61K38/08*   (2006.01)            *A61K38/10*   (2006.01)  
                               *A61P31/04*   (2006.01)

(71)申請人：國立清華大學(中華民國) NATIONAL TSING HUA UNIVERSITY    (TW)  
                   新竹市光復路 2 段 101 號

(72)發明人：程家維 CHENG, JYA WEI (TW)；游輝元 YU, HUI YUAN (TW)；鄭錫聰 CHENG,  
                   HIS TSUNG (TW)

(74)代理人：王正利

(56)參考文獻：

US    2011/0077192A1

審查人員：俞樹生

申請專利範圍項數：6 項    圖式數：3    共 22 頁

(54)名稱

耐高鹽及抗蛋白之抗菌胜肽及其製造方法

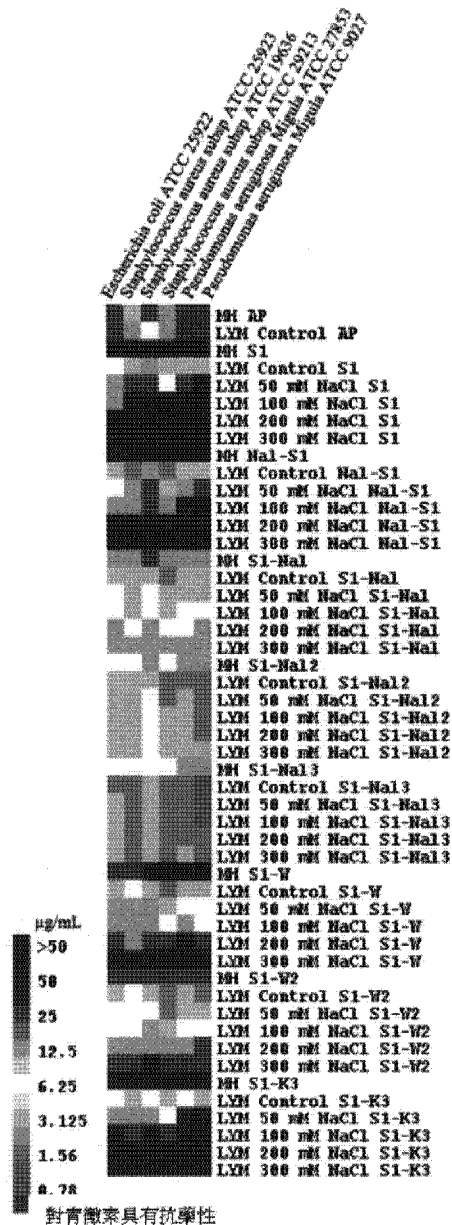
SALT AND PROTEASE-RESISTANCE OF ANTIMICROBIAL PEPTIDE AND THE MANUFACTURE THEREOF

(57)摘要

一種抗微生物胜肽，其中在胜肽的胺基及/或羧基端具有至少一人工巨大胺基酸(bulky amino acid)，以增加抗微生物胜肽的鹽類耐受性及蛋白酶耐受性。本發明之高鹽類耐受性之抗微生物胜肽具有高鹽類耐受性、高蛋白酶耐受性、以及低溶血性。

The present invention provides an antimicrobial peptide, wherein the amino terminal and/or carboxyl terminal of the peptide is linked with at least one artificial bulky amino acid to increase the salt resistance and protease resistance of the antimicrobial peptide. The antimicrobial peptide of the invention has a high salt resistance, a high protease resistance, and a low hemolytic activity, simultaneously.

指定代表圖：



第 1a 圖

## 發明摘要

※ 申請案號：102143445

※ 申請日：102. 11. 28

【發明名稱】(中文/英文)

耐高鹽及抗蛋白之抗菌胜肽及其製造方法

Salt and protease-resistance Of Antimicrobial Peptide and the Manufacture  
Thereof

C07K 9/06 (2006.01)

C07K 9/08 (2006.01)

A61K 38/08 (2006.01)

A61K 38/10 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

※IPC 分類：

【中文】

一種抗微生物胜肽，其中在胜肽的胺基及/或羧基端具有至少一人工巨大胺基酸 (bulky amino acid)，以增加抗微生物胜肽的鹽類耐受性及蛋白酶耐受性。本發明之高鹽類耐受性之抗微生物胜肽具有高鹽類耐受性、高蛋白酶耐受性、以及低溶血性。

【英文】

The present invention provides an antimicrobial peptide, wherein the amino terminal and/or carboxyl terminal of the peptide is linked with at least one artificial bulky amino acid to increase the salt resistance and protease resistance of the antimicrobial peptide. The antimicrobial peptide of the invention has a high salt resistance, a high protease resistance, and a low hemolytic activity, simultaneously.

**【代表圖】**

**【本案指定代表圖】**：第（ 1a ）圖。

**【本代表圖之符號簡單說明】**：

無

**【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】**：

無



## 發明專利說明書

公告本

## 【發明名稱】(中文/英文)

耐高鹽及抗蛋白之抗菌胜肽及其製造方法

Salt and protease-resistance Of Antimicrobial Peptide and the Manufacture  
Thereof

## 【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種抗微生物胜肽及其製造方法，具特別有關於透過在抗微生物胜肽的胺基或羧基端連接人工巨大胺基酸 (bulky amino acid) 以獲得耐高鹽、低溶血性、抗蛋白酶的抗微生物胜肽。

## 【先前技術】

【0002】 在公開文獻和專利中，已揭示各種生物活性胜肽。生物活性胜肽早期是由自然來源分離而得，近年則主要針對胜肽的結構及功能進行研究。而且，可依據自然的胜肽設計人工合成胜肽。

【0003】 R. E. W. Hancock in 1997 (*Lancet* 349: 418-422) 文獻已揭露抗菌胜肽，且針對胜肽的結構、功能及其臨床上的應用進行研究。此外，也有文獻揭露帶正電的抗菌胜肽 (Hancock, R. E. W. and Lehrer, R. *Trends Biotechnol.* 16: 82-88)。一般來說，抗菌胜肽為 12 至 45 個胺基酸的帶正電兩性物質。抗菌胜肽可穿透細胞膜作為微生物製劑，R. E. W. Hancock 於 1999 揭露了帶正電胜肽臨床上的應用 (*Drugs* 57(4): 469-473; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43(6): 1317-1323)。

【0004】 抗菌胜肽在宿主防禦的保護功用，在果蠅實驗已被證實；當果蠅被微生物感染後，若抗菌胜肽的表現量減少，則會大大降低其存活率。而在哺乳動物中，肺囊胞性纖維症

病人和小鼠的缺陷性細菌致死 (defective bacterial killing) 也可證實此類抗菌胜肽在宿主防禦的保護功能。

**【0005】** 在哺乳動物中所發現的抗菌胜肽可被分類為富含半胱氨酸的防禦素 ( $\alpha$ 、 $\beta$  防禦素) 和多樣的卡色力西丁 (cathelicidin) 類。卡色力西丁類含有一段高度保留的訊號序列和前區域卡色林 (cathelin)，及位於 C 端區塊具變異性的抗菌序列。許多卡色力西丁在帶負電的卡色林區塊和帶正電的 C 端區塊之間含有獨特的彈性蛋白酶切割作用位；此作用位的蛋白質水解反應在牛或豬的嗜中性淋巴球中都被觀察到且為抗菌活性所必須。根據胺基酸成分及構造，卡色力西丁家族可再分類為三群：第一群具有親水脂的  $\alpha$ -螺旋胜肽，比如 LL-37、CRAMP、SMAP-29、PMAP-37、BMAP-27 和 BMAP-28；第二類則是富含精氨酸/脯氨酸或色氨酸胜肽，如 Bac5, Bac7, PR-39 和吲哚力西丁 (indolicidin)；第三群則為含半胱氨酸胜肽，如波地金 (protegrins)。

**【0006】** 學界認為，非抗生素類的抗微生物用藥，如抗微生物胜肽一類，可能是未來抗微生物藥物的發展主軸，尤其是在抗生素抗藥性日益嚴重的今日而言，其醫療用途或使用在養殖漁業及畜產等產業，均有極佳的產業利用性，可望解決今日抗生素藥物氾濫隨之而來的可能隱憂。

**【0007】** 雖然，目前已有具鹽耐受性的胜肽，但在提升鹽耐受性的同時，也會提高胜肽的溶血性。因此，業界亟需一種對鹽類具有耐受性，同時兼具低溶血性及抗菌性的抗菌胜肽。

### **【發明內容】**

**【0008】** 因為抗微生物胜肽為一生物性巨分子，由生物體的特定部位所製造、分泌，故對其所處的生理環境，如鹽濃度、pH 值等，有一定的要求跟限制，如此便在無形中限制了其使用範疇跟療效。因此對這類胜肽之胺基酸進行適度的修

飾，以提升其在高鹽環境下的療效，對於未來在醫療上、適用環境上、對劑型開發的廣泛適應性上，均可以有極大的幫助。本發明係關於開發一種耐高鹽類濃度之抗微生物胜肽及使胜肽耐高鹽的方法，以解決目前抗微生物胜肽普遍面臨的問題。

【0009】 有鑑於此，本發明提供一種胜肽，如下列式 (I) 所示： $A_n-(X_p)-B_m$ ，其中該  $A_n$  與  $B_m$  係選自由巨大胺基酸 (bulky amino acid) 或  $\beta$ -萘基丙胺酸 ( $\beta$ -Nal) 所組成之群組，其中  $1 \leq p \leq 9$ ，且當  $n=0$  時， $1 \leq m \leq 3$ ；當  $m=0$  時， $1 \leq n \leq 3$ 。

【0010】 在本發明一實施例中，其中式 (I) 的 ( $X_p$ ) 具有帶正電或不帶電的胺基酸。

【0011】 在本發明一實施例中，其中式 (I) 的 ( $X_p$ ) 具有至少兩個帶正電的胺基酸。

【0012】 在本發明一實施例中，其中帶正電胺基酸包括賴胺酸 (lysine)。

【0013】 在本發明一實施例中，其中不帶電胺基酸包括色胺酸 (tryptophan)。

【0014】 在本發明一實施例中，其中 A 或 B 為人工巨大胺基酸 (bulky amino acid)。

【0015】 在本發明一實施例中，其中 A 或 B 包括  $\beta$ -萘基丙胺酸 ( $\beta$ -Nal)。

【0016】 本發明另提供一種人工  $X_p$ ，其胺基及/或羧基端具有至少一人工巨大胺基酸 (bulky amino acid)。

【0017】 在本發明一實施例中，其中人工巨大胺基酸包括  $\beta$ -萘基丙胺酸 ( $\beta$ -Nal)。

【0018】 在本發明一實施例中，此高鹽類耐受性之抗微生物胜分子量小於 1000kb。

【0019】 在本發明一實施例中，此高鹽類耐受性之抗微生物胜肽具有 6-12 個胺基酸。

【0020】 本發明更提供一種增加胜肽耐鹽性、蛋白酶耐受

性的方法，包括，提供一胜肽，以及於該胜肽的胺基及/或羧基端連接一人工巨大胺基酸 (bulky amino acid)。

【0021】 在本發明一實施例中，其中人工巨大胺基酸包括  $\beta$ -萘基丙胺酸 ( $\beta$ -Nal)。

【0022】 在本發明一實施例中，其中該胜肽為一抗微生物胜肽。

### 【圖式簡單說明】

#### 【0023】

第 1a 圖顯示胜肽抗微生物活性。

第 1b 圖顯示超短胜肽抗微生物活性。

第 2a 圖顯示不同濃度胜肽的溶血性。

第 2b 圖顯示不同濃度超短胜肽的溶血性。

第 3a 圖顯示胜肽的蛋白酶耐受性。

第 3b 圖顯示超短胜肽的蛋白酶耐受性。

### 【實施方式】

【0024】 在一實施例，本發明短胜肽具有如式 (I) 結構： $A_n - (X_p) - B_m$ 。

【0025】 式 (I) 中的  $(X_p)$  係指任何短鏈胜肽。胜肽長度並無特別限制，具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個以上的胺基酸，較佳為 1-9 個，更佳為 4-6 個。

【0026】 式 (I) 中  $A_n$  與  $B_m$  可相同或不同，且當  $n=0$  時， $1 \leq m \leq 3$ ；當  $m=0$  時， $1 \leq n \leq 3$ 。

【0027】 在一實施例中， $(X_p)$  具有帶正電或不帶電的胺基酸。在另一實施例中， $(X_p)$  中帶正電胺基酸的數目並無特別限制，較佳具有至少 2 個帶正電胺基酸。



【0028】 在本發明中，帶正電胺基酸包括賴胺酸 (lysine)、精胺酸 (arginine)、組胺酸 (histidine) 等，較佳為賴胺酸 (lysine)。

【0029】 本發明中，不帶電的胺基酸包括 Leucine、Isoleucine、Alanine、Phenylalanine、甘胺酸 (glycine)、絲胺酸 (serine)、酥胺酸 (threonine)、半胱胺酸 (cysteine)、酪胺酸 (tyrosine)、天門冬醯胺 (asparagines)、色胺酸 (tryptophan) 等，較佳為色胺酸 (tryptophan)。

【0030】 本發明中式 (I) 所述之 (X<sub>p</sub>) 較佳為一抗微生物胜肽。

【0031】 本發明所述抗微生物胜肽泛指任何具有抗微生物活性的胜肽。

【0032】 本發明中所述之“抗微生物活性”係指胜肽可改變目標微生物的功能或代謝，例如，影響複製、生長、毒素的產生、生存等。在一實施例中，抗微生物活性係指抑制微生物的生長。在一特定實施例中，抗微生物活性係指本發明胜肽可毒殺至少一種微生物。

【0033】 本發明中所述之微生物包括細菌、真菌、病毒、及原生動物。特別是，具有脂質雙層膜之細胞或結構的微生物。細菌可包括革蘭氏陽性及革蘭氏陰性菌。可能的革蘭氏陰性菌包括，但不限於，大腸桿菌 (Escherichia coli)、綠膿桿菌 (Pseudomonas aeruginosa)、沙門氏菌 (Salmonella)、流感嗜血桿菌 (Hemophilus influenza)、霍亂弧菌 (Vibrio cholerae)、副溶血性弧菌 (Vibrio parahaemolyticus)、幽門螺旋桿菌 (Helicobacter pylori)。可能的革蘭氏陽性菌包括，但不限於，金黃色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)、表皮葡萄球菌 (Staphylococcus epidermis)、無乳鏈球菌 (Streptococcus agalactiae)、A 型鏈球菌 (Group A streptococcus)、化膿性鏈球菌 (Streptococcus pyogenes)、糞腸球菌 (Enterococcus faecalis)、B 型革蘭氏陽性鏈球菌 (Group B gram positive

streptococcus)、單核細胞增生李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*)。可能的真菌包括，酵母菌，例如，白色念珠菌 (*Candida albicans*)。可能病毒包括麻疹病毒、疱疹病毒 (HSV-1、 HSV-2)、HIV、C 肝病毒、水皰性口炎病毒 (VSV)、綿羊髓鞘脫落病毒 (*visna virus*)、巨細胞病毒 (CMV)。可能的原生動物包括賈第鞭毛蟲 (*Giardia*)。

**【0034】** 本發明另提共一種人工短胜肽，在胜肽的胺基端 (N-端) 或羧基端 (C-端) 具有至少一人工巨大胺基酸 (bulky amino acid)。

**【0035】** 本發明之人工短胜肽的分子量為 1000kb 以下。在一實施例中，本發明人工短胜肽的長度為 3-30 個胺基酸，較佳為 6-12 個胺基酸。一般來說，胜肽越短越不容易遭受人體代謝或分解，且 12 個以內之胺基酸在產業上與合成上均有最佳的經濟效益。在另一實施例中，本發明之人工短胜肽為一抗微生物胜肽。

**【0036】** 應注意的是，本發明之人工短胜肽在其 N-端或 C-端具有至少一人工巨大胺基酸 (bulky amino acid)。本發明中所述之人工巨大胺基酸包括，但不限於，Bal、1-Nal、 $\beta$ -萘基丙胺酸  $\beta$ -naphthylalanine ( $\beta$ -Nal)、Dip、Bip、Ath、Tbt，較佳為  $\beta$ -萘基丙胺酸 ( $\beta$ -Nal)。

**【0037】** 人工巨大胺基酸的數目並無特別限制，可為 1、2、3、4、5、6、7、8、9 個以上，較佳為 1-3 個。事實上，人工巨大胺基酸的數目可依照抗微生物胜肽的長度及分子量進行調整。在一實施例中，1 個人工巨大胺基酸即可達到增加胜肽耐鹽性的目的。

**【0038】** 而本發明另提供一種超短多胜肽，此種超短多胜肽原本並不具有抑制或毒殺微生物之效用，當其 N 端具有一個以上之人工巨大胺基酸，便具有高鹽類耐受性、高蛋白酶耐受性、以及低溶血性之效用。

**【0039】** 由於人工巨大胺基酸可提高胜肽的 (1) 抗微生

物活性、(2)耐鹽性、(3)穩定性(蛋白酶耐受性)、(4)並可降低胜肽的溶血性。因此，本發明連接人工巨大胺基酸的抗微生物胜肽具有高耐鹽性、低溶血性、以及高穩定性(蛋白酶耐受性)，且仍可保持、甚至是增加抗微生物的活性。因此，本發明抗微生物胜肽具有高鹽類耐受性、高蛋白酶耐受性、以及低溶血性，因此，可增加本發明胜肽的應用環境，即可應用於更多種的生物體組織環境，具有更強大利用性。

【0040】除了人工巨大胺基酸之外，本發明之胜肽也可同時連接色胺酸(tryptophan)等其它胺基酸或其它物質等。

【0041】本發明之人工短胜肽即便在鹽(NaCl)濃度範圍大於50mM、100mM、150mM，較佳大於200mM、250mM，更佳大於300mM以上時，仍保持著良好的抗微生物能力。另外，胜肽在連接3個 $\beta$ -Nal後，胜肽的抗蛋白酶耐受性為90%以上，較佳為91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%。同時，本發明抗微生物胜肽在有效的抗菌濃度下，其溶血性小於10%，較佳小於9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%。

【0042】本發明另提供一種增加胜肽耐鹽性、蛋白酶耐受性的方法，包括，提供一胜肽，以及於該胜肽的胺基及/或羧基端連接一人工巨大胺基酸(bulky amino acid)，例如， $\beta$ -Nal。

【0043】本發明另包括使用上述胜肽抑制或毒殺微生物的方法。此方法通常為直接將胜肽接觸微生物。此接觸可為*in vivo*、*in vitro*、局部、口服、經皮、全身性或其它任何已知的方法。此接觸較佳在一足夠抑制或毒殺微生物的量下進行。胜肽的濃度可至少約0.1 $\mu$ M，至少約0.5 $\mu$ M，至少約1 $\mu$ M，至少約10 $\mu$ M，至少約20 $\mu$ M，至少約50 $\mu$ M，或至少約100 $\mu$ M。

【0044】本發明之方法可直接抑制或毒殺微生物。此接觸可為全身性注射、口服、皮下、IP、IM、IV注射或局部給予。

對於注射，劑量可為約 1 mg/kg、約 5 mg/kg、約 10 mg/kg、約 25 mg/kg、約 50 mg/kg、約 75 mg/kg、與約 100 mg/kg。胜肽可投予至哺乳動物、貓、狗、牛、馬、豬、雞、植物、魚等，較佳為人類。

### 【實施例】

#### 【0045】 1.胜肽的製備

由 xx 公司購得 S1 胜肽 (Ac-KKWRKWLAKK-NH<sub>2</sub>, SEQ ID NO: 1) 以及 S2 超短胜肽 (Ac-KWWK-NH<sub>2</sub>, SEQ ID NO: 2), 分別在 S1 胜肽的 N 端或 C 端連接上  $\beta$ -萘基丙胺酸 ( $\beta$ -Nal) 或色胺酸, 如表一所示。

本發明中是利用固相 Fmoc 方法合成所需之多胜肽。每一次之循環中均加入 HOBt/DIPEA 做為偶合試劑以及過量之四倍 Fmoc 胺基酸。將 20% 吡啶的二甲基甲酰胺於室溫下緩慢搖晃 2 小時便可移除 Fmoc 中之 N 端保護基團, 而將 10 倍無水醋酸以及 20 倍 DIPEA 溶於二甲基甲酰胺中並於室溫下搖晃 2 小時便可得到乙醯化之多胜肽。利用管柱分離所得之多胜肽, 並利用 K 試劑將附著於管柱內部橡膠上之多胜肽沖洗出而得粗步萃取之多胜肽。藉由高效液相色譜法精粹所得之粗粹多胜肽, 並將精粹後之多胜肽以電噴灑游離質譜儀鑑定是否為所製備之多胜肽。

【0046】 表一、胜肽序列

胜肽	序列
S1 ( SEQ ID NO: 1 )	KKWRKWLAKK
Nal-S1	KK-Nal-RK-Nal-LAKK
S1-Nal	KKWRKWLAKK-Nal
S1-Nal-Nal	KKWRKWLAKK-Nal-Nal
S1-Nal-Nal-Nal	KKWRKWLAKK-Nal-Nal-Nal
S1-W	KKWRKWLAKKW
S1-W-W	KKWRKWLAKKWW
S1-K-K-K	KKWRKWLAKKKKK
S2 ( SEQ ID NO: 2 )	KWWK
S2-Nal	KWWK-Nal
S2-FNal	KWWK-F-Nal
S2-Nal-Nal	KWWK-Nal-Nal

## 【0047】 2. 耐鹽性試驗

【0048】 為測試 S1、Nal-S1、S1-Nal、S1-Nal-Nal、S1-Nal-Nal-Nal、S1-W、S1-W-W、S1-K-K-K、S2-Nal、S2-FNal、S2-Nal-Nal 在不同鹽類濃度之抗微生物能力，以抗微生物活性試驗 (Antibacterial activity assay) 進行測試，使用三種菌種：大腸桿菌 (Escherichia coli; ATCC 25922)、金黃色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus; ATCC 25923、29213 與 19636) 和綠膿桿菌 (Pseudomonas aeruginosa; ATCC 27853 與 9027)。

【0049】 以國家臨床實驗室標準委員會 (National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS) 之微量稀釋法測量最低抑制濃度 (minimal inhibition concentration, MIC)。以抑制 90% 或更多的微生物生長之最低胜肽濃度 (MIC) 作為最低抑制濃度。

【0050】 其中，微量稀釋法將為 1  $\mu$ l 的胜肽溶液 (濃度在 5000  $\mu$ g/ml 至 78.1  $\mu$ g/ml 之範圍) 與 99  $\mu$ l 接種菌 (5

$\times 10^5$  CFU/ml) 混合培養於聚丙烯之 96 井培養皿中。在  $37^\circ\text{C}$  下培養 16 小時後，以 ELISA 偵測儀 (Thermo Max, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 測量其在 O.D.600 之濁度。並分別以未加入胜肽之 Muller-Hinton Broth 培養基 (MHB) 和接種菌懸浮物之讀值作為陰性對照組和陽性對照組。測出之 MIC 值為抑制菌株生長 (等於或大於 90%) 之最低胜肽濃度。所有菌種皆測試 3 次。結果如圖 1 所示。

**【0051】** 參照第 1a 圖，S1、Nal-S1、S1-W、S1-WW、S1-KKK 胜肽在 MHB 培養基或高鹽環境中，其抗菌活性會受到抑制。在 MHB 培養基或高鹽環境中，相較之下，S1-Nal、S1-Nal-Nal、S1-Nal-Nal-Nal 比 S1 更佳。S1-Nal-Nal、S1-Nal-Nal-Nal 在 300 mM NaCl 的環境下仍具有抗菌活性。此外，Nal 不管位於 S1 的 N 端或 C 端皆可提高胜肽的耐鹽性。

**【0052】** 參照第 1b 圖 S2-Nal、S2-FNal、S2-Nal-Nal 胜肽在 MHB 培養基或高鹽環境中，其抗菌活性會受到抑制。在 MHB 培養基或高鹽環境中，相較之下 S2-FNal、S2-Nal-Nal 的抗菌能力比 S2-Nal 更佳。S2-FNal、S2-Nal-Nal 在 300 mM NaCl 的環境下仍具有抗菌活性。

**【0053】** 另外，在螢光猝滅實驗 (fluorescence quenching experiment) 中證實  $\beta$ -Nal 有助於抗微生物胜肽穿入微生物的膜中，可更有效地瓦解微生物膜。

### **【0054】** 3. 溶血性試驗

**【0055】** 多胜肽之溶血性係由評估多胜肽對人類紅血球細胞 (hRBCs) 所造成之溶血性影響。人類紅血球細胞係由 PBS 緩衝溶液沖洗肝素化之人類血液 3 次並離心，之後存放於具有 10% 磷酸鹽緩衝液之生理食鹽水。將多胜肽溶於 PBS 緩衝溶液並加入  $50 \mu\text{l}$  之體積百分比濃度為 10% 的人類紅血球細胞，並且於  $37^\circ\text{C}$  下培養 1 小時 (最後人類紅血球之體積百分比濃度為 5%)，待培養 1 小時後離心人類紅血球細胞。將不同濃度之多胜肽與處理後之人類紅血球細胞共培養並藉由光電比

色計測量吸光值(OD540)以檢測多胜肽之溶血百分比；其中，處理後之人類紅血球細胞溶液之溶血百分比為 0%，處理後之人類紅血球溶液與 1% Triton-X 100 共培養後之溶血百分比為 100%。

【0056】 由第 2a 圖以及第 2b 圖可知，相較其它胜肽，S1-Nal-Nal、S1-Nal-Nal-Nal 具有較高的溶血性。即使如此，所有胜肽在其有效的 MIC 濃度下，其溶血性皆小於 5%。

#### 【0057】 4. 蛋白酶耐受性試驗

【0058】 本實施例在 25% (v/v)的液態胎牛血清(HyClone, cat.AUE-34962)中進行胜肽的血清穩定性試驗。首先，將胜肽溶於血清中，濃度為 150  $\mu$ g/mL，在 37°C 下處理 0.5、1、2、4、8 小時。接著，置於冰上 45 分鐘，沉澱血清蛋白，於 4°C 下以 12,000g 離心 10 分鐘，並將上清液冷凍乾燥。以 RP-HPLC 偵測胜肽的殘留量。

【0059】 由第 3a 圖以及第 3b 圖可知， $\beta$ -Nal 具有保護胜肽的作用。參照第 3 圖，S1-Nal-Nal-Nal 在胎牛血清中處理 8 小時後仍幾乎還具有 100%的完整胜肽。胜肽在血清中的蛋白酶耐受性（穩定性）為：S1-Nal-Nal-Nal > S2-Nal-Nal = S2-Nal > S1-Nal-Nal > S1-Nal > S2-FNal > S1-KKK > S1 > Nal-S1 = S1-W > S1-WW。

【0060】 所有說明書中所揭示之發明技術特點可以任意方式組合。說明書中揭示之每一技術特點可以提供相同、等同或相似目的之其他方式替換。因此，除非另有特別說明，文中所有揭示之特點均只是等同或相似特點之一般系列之實例。

【0061】 由上述可知，熟習此技藝者能輕易地了解本發明之必要特徵，在不脫離其精神與範圍之下能就本發明做許多改變與調整以應用於不同用途與條件。

【符號說明】 無

序列表

<110> 清華大學

<120> 抗微生物胜肽及其製造方法

<150>

<151>

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 1

Lys Lys Trp Arg Lys Trp Leu Ala Lys Lys  
1                    5                    10

<210> 2

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 1

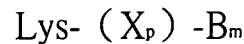
Lys Trp Trp Lys  
1                    5                    10



## 申請專利範圍

修正  
本 年 月 日  
補充 105. 12. 9

1. 一種具有高耐鹽性、低溶血性及高蛋白酶耐受性之抗微生物胜肽，如下列式 (I) 所示：



其中該B<sub>m</sub>係選自由一巨大胺基酸 (bulky amino acid) 所組成之群組，其中m為整數且m為2至3；且 $1 \leq p \leq 8$ ；

其中該巨大胺基酸係選自由Bal、1-Nal、β-萘基丙胺酸 (β-naphthylalanine, β-Nal)、Dip、Bip、Ath、Tbt所組成之群組；

其中X係選自由賴胺酸 (lysine)、精胺酸 (arginine)、亮胺酸 (Leucine)、丙胺酸 (Alanine) 以及色胺酸 (tryptophan) 所組成之群組；

其中X的第一個胺基酸及第二個胺基酸分別為賴胺酸 (lysine) 及色胺酸 (tryptophan)，或者X的第一個胺基酸及第二個胺基酸皆為色胺酸 (tryptophan)；

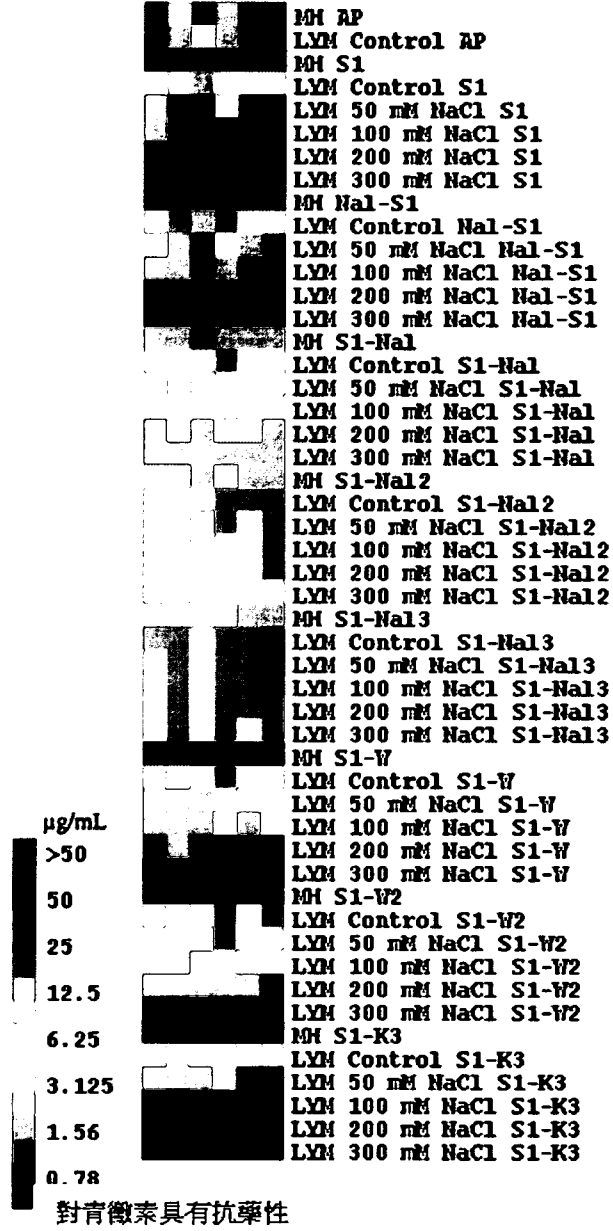
其中X係不包含該巨大胺基酸。

2. 如申請專利範圍第 1 項所述之胜肽，其中該式 (I) 的 (X<sub>p</sub>) 係為帶正電或不帶電的胺基酸。

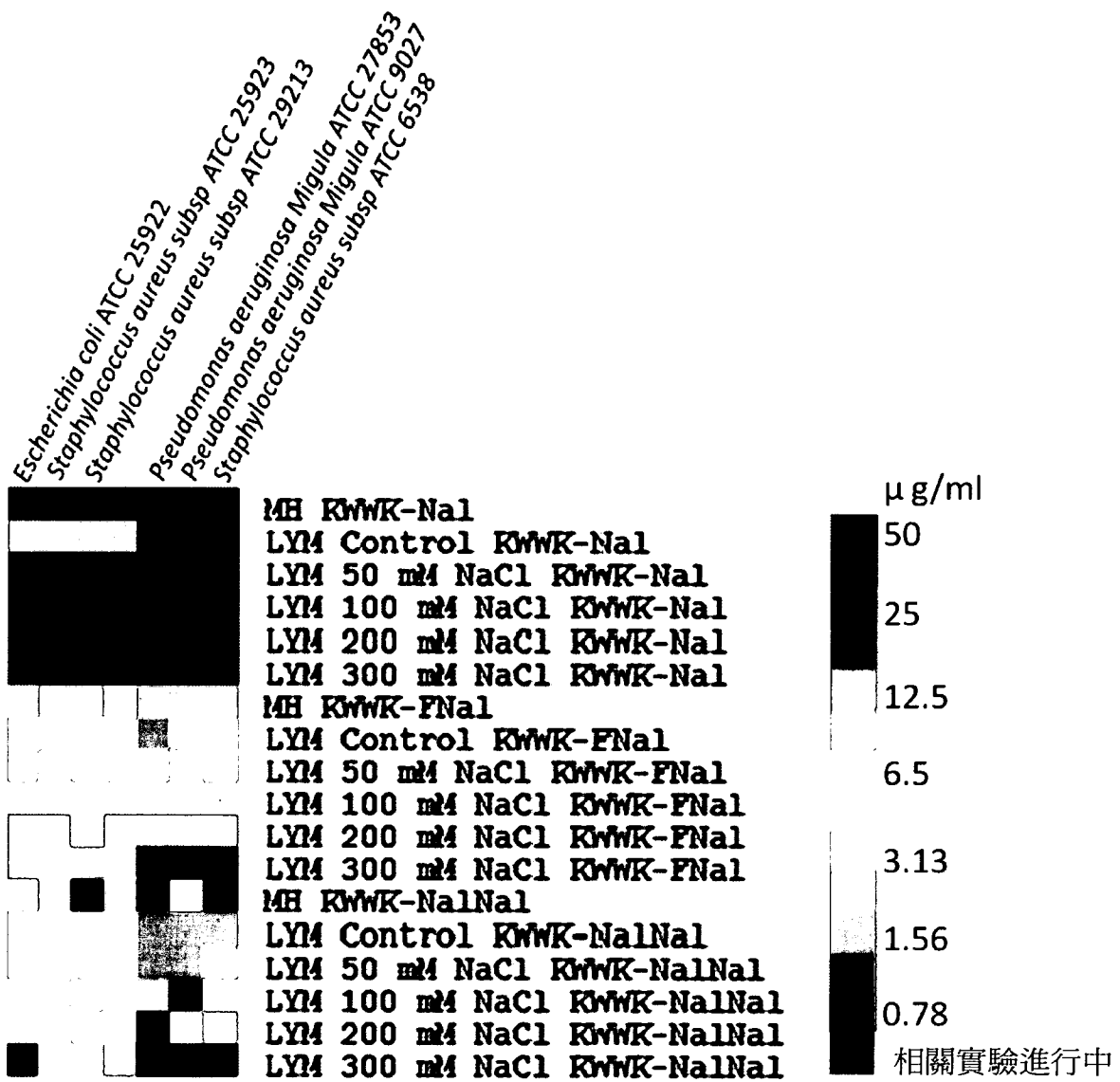
3. 如申請專利範圍第 1 項所述之胜肽，其中該式 (I) 的 (X<sub>b</sub>) 係為至少兩個帶正電的胺基酸。
4. 如申請專利範圍第 1 項所述之胜肽，其中該式 (I) 長度為不超過 12 個胺基酸。
5. 一種可抑制微生物感染之抗生素，包括如申請專利範圍第 1 項所述之胜肽，以及一藥學上可接受之佐劑或載體。
6. 一種具有高耐鹽性、低溶血性及高蛋白酶耐受性之抗微生物胜肽，係包括 KKWRKWLAKK、KK-Nal-RK-Nal-LAKK、KKWRKWLAKK-Nal、KKWRKWLAKK-Nal-Nal、KKWRKWLAKK-Nal-Nal-Nal、KKWRKWLAKKW、KKWRKWLAKKKKK、KWWK、KWWK-Nal、KWWK-F-Nal、KWWK-Nal-Nal。

圖式

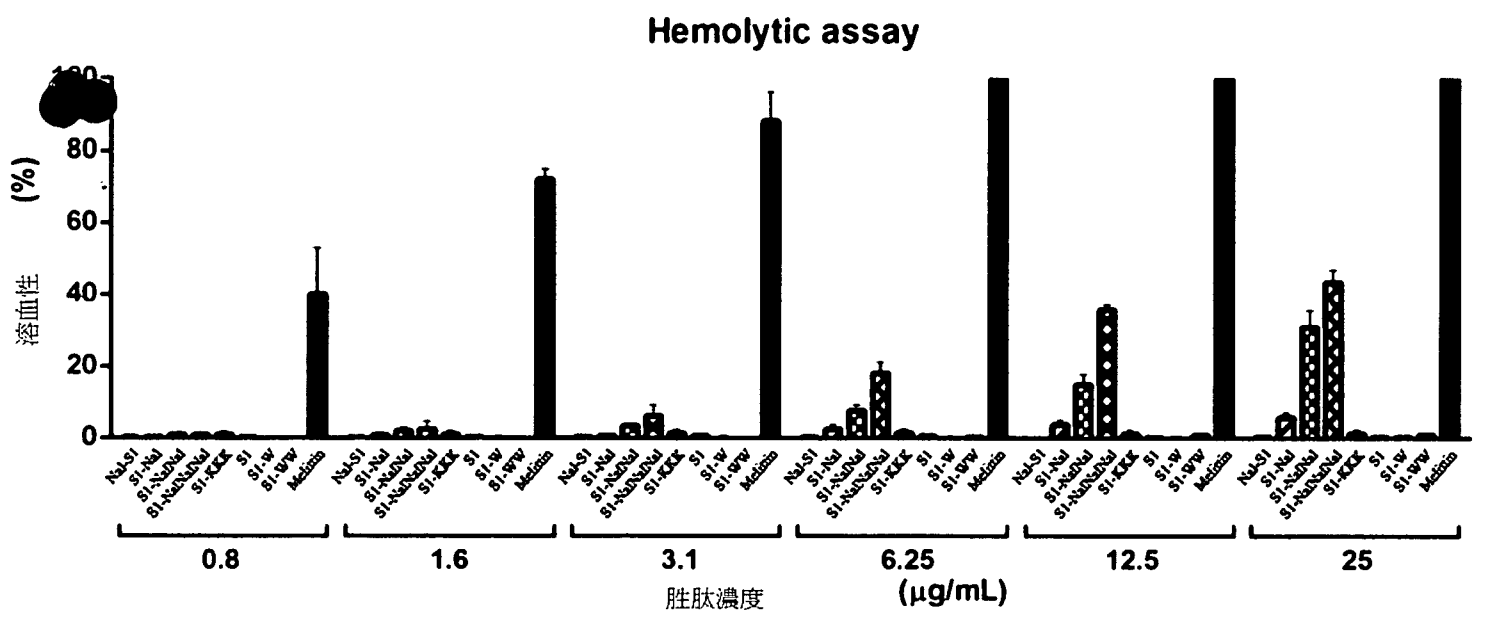
*Escherichia coli* ATCC 25922  
*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 25923  
*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 19836  
*Pseudomonas aeruginosa* Migula ATCC 29213  
*Pseudomonas aeruginosa* Migula ATCC 27853  
*Pseudomonas aeruginosa* Migula ATCC 9027



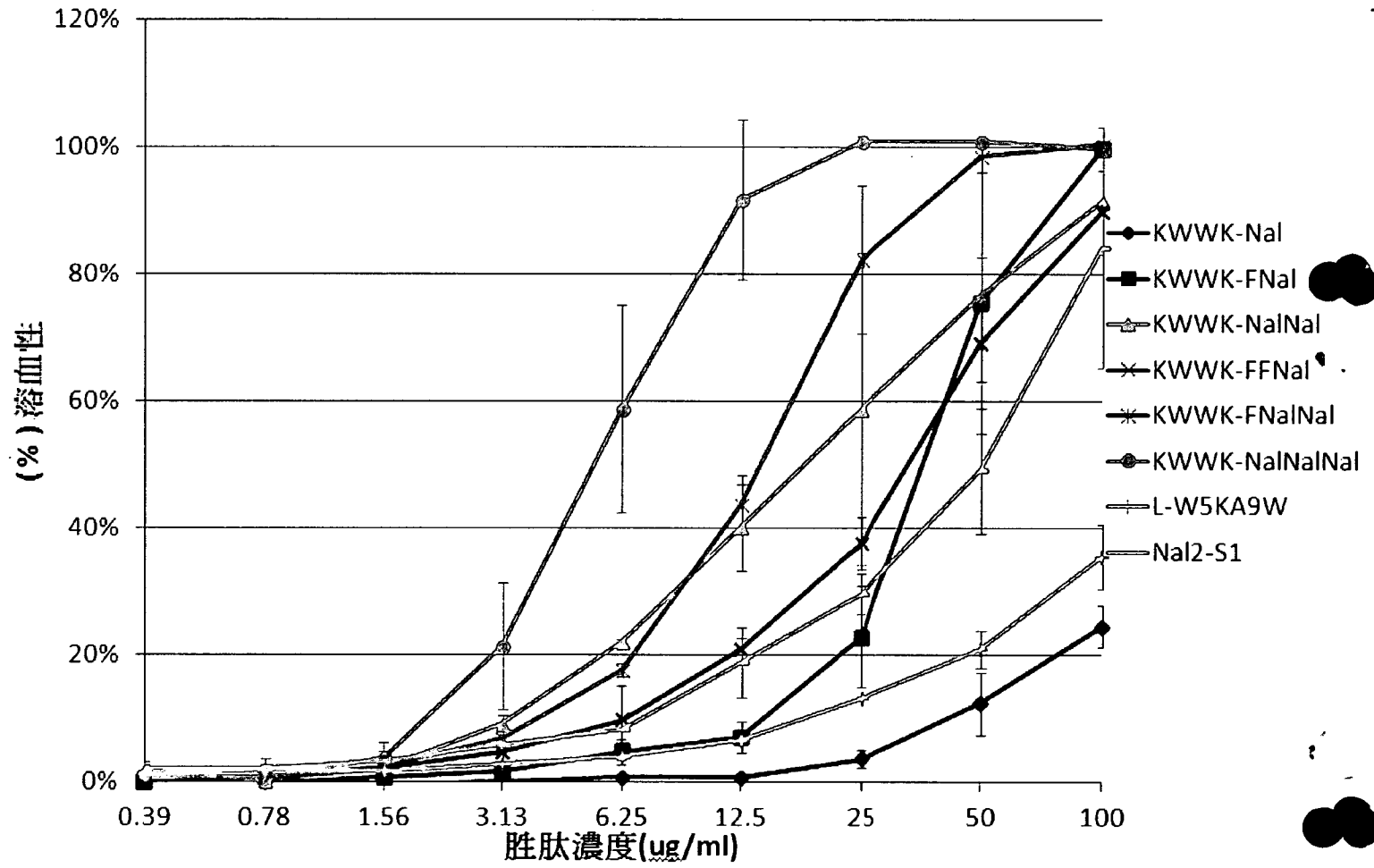
第 1a 圖



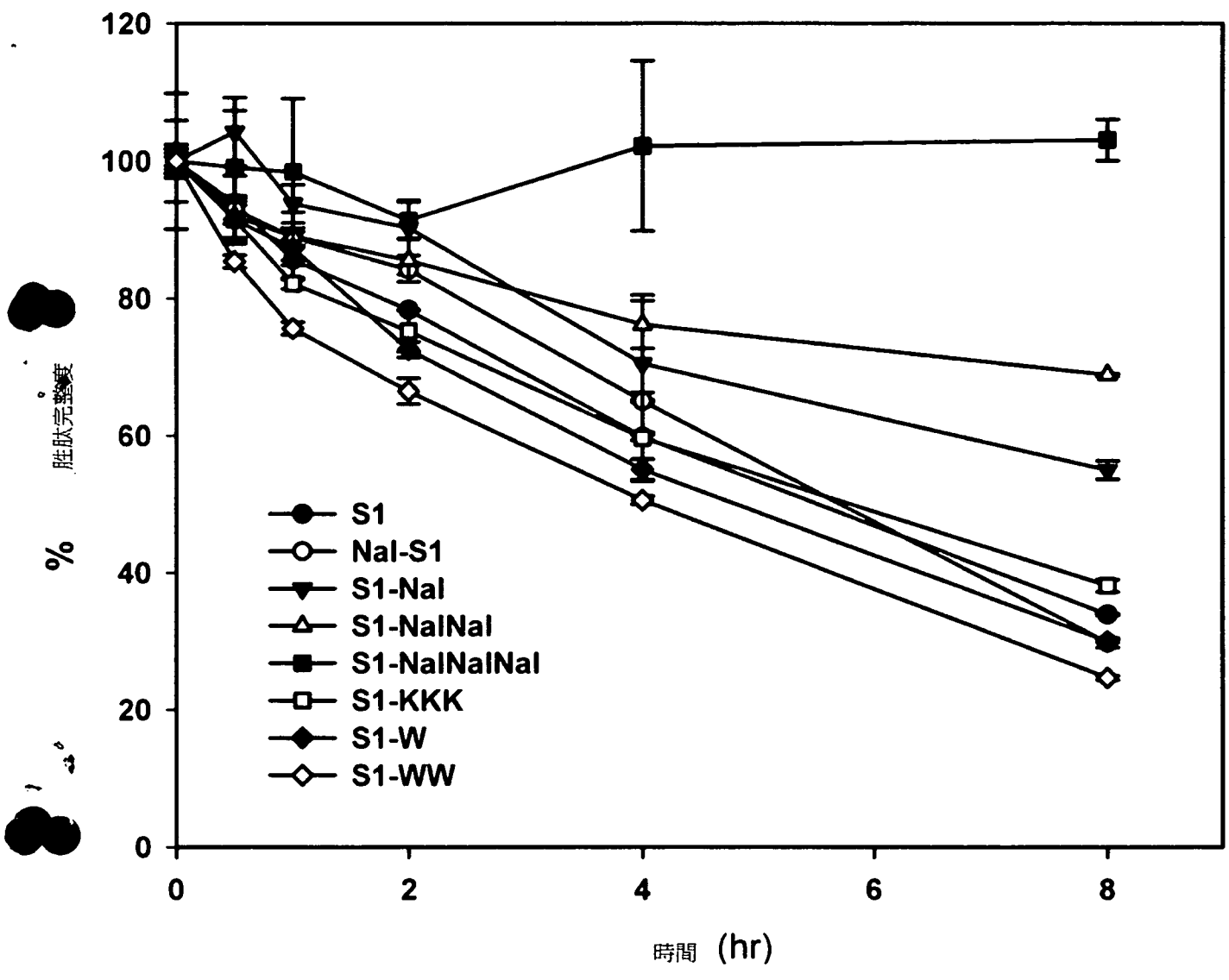
第 1b 圖



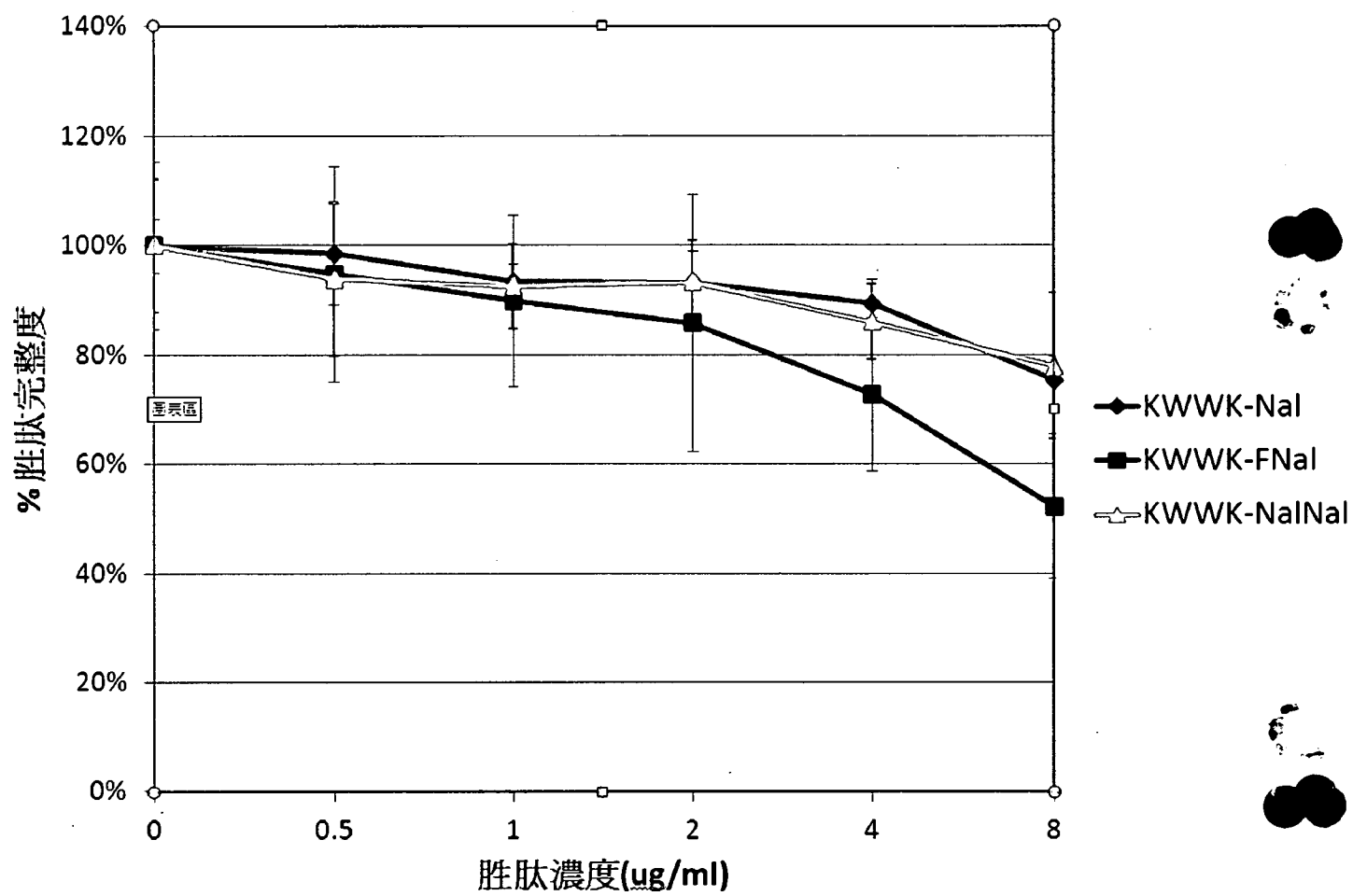
第 2a 圖



第 2b 圖



第 3a 圖



第 3b 圖