

# (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2016年7月14日 (14.07.2016)



(10) 国际公布号  
WO 2016/110177 A1

- (51) 国际专利分类号:  
C07K 7/08 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01)  
C07K 14/00 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)  
C07K 19/00 (2006.01) A61K 38/16 (2006.01)  
A61K 38/10 (2006.01) A61P 31/10 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2015/097734
- (22) 国际申请日: 2015年12月17日 (17.12.2015)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:  
201510009981.0 2015年1月7日 (07.01.2015) CN
- (71) 申请人: 中山大学 (SUN YAT-SEN UNIVERSITY)  
[CN/CN]; 中国广东省广州市海珠区新港西路 135 号张丽, Guangdong 510275 (CN)。
- (72) 发明人: 刘秋云 (LIU, Qiuyun); 中国广东省广州市海珠区新港西路 135 号张丽, Guangdong 510275 (CN)。何建国 (HE, Jianguo); 中国广东省广州市海珠区新港西路 135 号张丽, Guangdong 510275 (CN)。周文良 (ZHOU, Wenliang); 中国广东省广州市海珠区新港西路 135 号张丽, Guangdong 510275 (CN)。

(CN)。翁少萍 (WENG, Shaoping); 中国广东省广州市海珠区新港西路 135 号张丽, Guangdong 510275 (CN)。邢梦 (XING, Meng); 中国广东省广州市海珠区新港西路 135 号张丽, Guangdong 510275 (CN)。付敏 (FU, Min); 中国广东省广州市海珠区新港西路 135 号张丽, Guangdong 510275 (CN)。彭静立 (PENG, Jingli); 中国广东省广州市海珠区新港西路 135 号张丽, Guangdong 510275 (CN)。兰崇峰 (LAN, Chongfeng); 中国广东省广州市海珠区新港西路 135 号张丽, Guangdong 510275 (CN)。

- (74) 代理人: 广州粤高专利商标代理有限公司 (YOGO PATENT & TRADE MARK AGENCY LIMITED COMPANY); 中国广东省广州市天河区体育西路 191 号中石化大厦 B 塔 3912 室, Guangdong 510620 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST,

[见续页]

(54) Title: ALKALINE ANTIBACTERIAL PEPTIDE AND TARGETING DESIGN AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 碱性抗菌肽及其靶向设计和应用

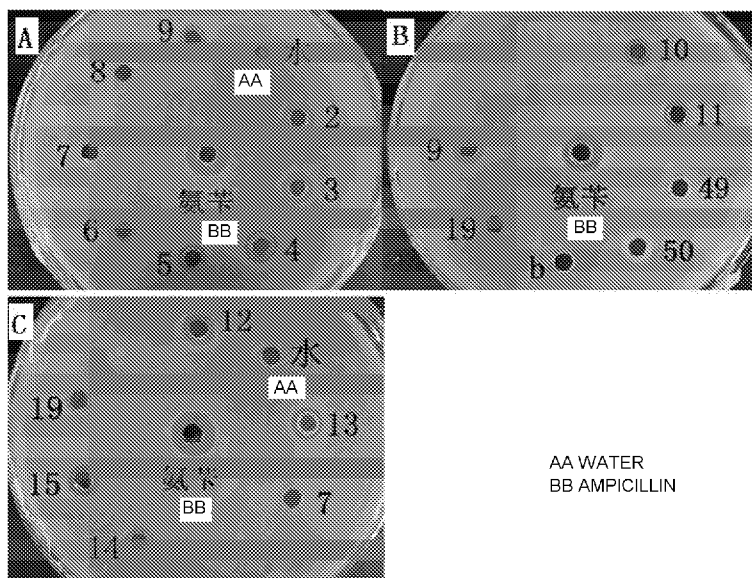


图 4

(57) Abstract: Disclosed is an alkaline antibacterial peptide consisting of leucine and lysine. The alkaline antibacterial peptide comprises 12-24 amino acids, wherein the proportion of lysine is more than 33.3%. Also disclosed is a targeted antibacterial peptide formed by the connection of the alkaline antibacterial peptide and the complementarity determining region of an antibody through leucine. The alkaline antibacterial peptide and the targeted antibacterial peptide can be used as an antibacterial and for cancer resistance.

(57) 摘要: 本发明公开了一种由亮氨酸和赖氨酸组成的碱性抗菌肽, 所述碱性抗菌肽的氨基酸个数为 12~24 个, 其中赖氨酸的比例大于 33.3%。还公开了由所述碱性抗菌肽与抗体互补决定区通过亮氨酸连接而成的靶向抗菌肽。所述碱性抗菌肽和靶向抗菌肽可用于抑菌和抗癌。

AA WATER  
BB AMPICILLIN



WO 2016/110177 A1



SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

(84) **指定国** (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO,

**本国际公布:**

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

## 碱性抗菌肽及其靶向设计和应用

### 技术领域

本发明涉及生物技术领域,更具体地,涉及碱性抗菌肽及其靶向设计和应用。

### 背景技术

抗生素(antibiotics)是一类天然或人工合成的化合物,能够杀死细菌或者可以抑制细菌的生长。随着科学技术的不断发展,抗生素的定义也不断被扩充,其中抗微生物,包括抗真菌等化合物都被纳入到抗生素的范围。

人类自 1940 年发现第一种抗生素青霉素(penicillin)并将其应用于临床之后,就开始了抗生素治疗的新时代。许多曾经严重危害人类生命健康的感染性疾病因抗生素的使用而得到了有效的控制,并大幅降低了婴儿出生的死亡率和手术后的感染率,人类的平均寿命也得以延长 15~20 年。因此,各种各样的抗生素已经成为多数疾病的治疗中必不可少的药物。

然而,随之而来的是抗生素的滥用导致的严重的问题:抗生素的耐药性(Drug resistance)。在临床上,耐药性是指病原体及癌细胞等对化学治疗药物敏感性降低。而抗生素的耐药性主要指当微生物暴露在抗生素环境中时,仍然能够生存并进行繁殖的现象。出现耐药性的原因是,在自然选择的压力下,拥有抗性基因的菌株会成为优势菌株存活下来。这些抗性基因通常存在于质粒中,而对于微生物(尤其是细菌),抗性基因可以通过转化、转导等现象进行转移并迅速复制,使一个菌落迅速获得抗性。

研究表明,研制一种新型抗生素大约需要十年或更长的时间,而细菌产生耐药性的时间却不足两年,新药的研制速度远远跟不上细菌耐药性产生的速度。而一旦出现拥有多种抗性基因的“超级细菌”,人们将对其无药可用。早在 1976 年,肺炎链球菌就被发现对青霉素产生了耐药。而在 2010 年在南亚地区发现的新型超级病菌 NDM-1,所有现存的抗生素都对其不起作用。目前为止,NDM-1 引起的疾病还找不到有效的治疗方法,而且有不断蔓延的趋势,引起了广泛关注。

因此在医疗卫生上迫切需要高效、低毒、高选择性广谱抑菌药物的研究和开发以保护人类的健康。而研究表明许多生物的基因组中也有编码抗生素的基因。这些基因编码的多为一些短肽,称为抗菌肽。抗菌肽一般携带正电荷,其具有抑

菌活性强、不易产生耐药性等特点。抗菌肽一般长为 10 到 40 个氨基酸，经常形成过膜通道并经常具有溶血性、毒性，缺乏靶向抗菌抗癌特性。如果能够人工设计抗菌肽，则能够开发新的抗生素的资源，有效地解决当前医学上抗生素耐药性的问题。

## 发明内容

本发明所要解决的技术问题是克服现有抗菌肽经常具有的溶血性、膜通透性和毒性的缺陷，提供一种碱性抗菌肽。

本发明的第二个目的是提供上述碱性抗菌肽的靶向设计方法。

本发明的第三个目的是提供一种由上述碱性抗菌肽设计得到的靶向抗菌肽，所述靶向抗菌肽可靶向抗癌。

本发明的第四个目的是提供上述碱性抗菌肽或靶向抗菌肽的应用。

本发明的目的是通过以下技术方案予以实现的：

一种碱性抗菌肽，所述碱性抗菌肽由亮氨酸和赖氨酸组成，所述碱性抗菌肽的氨基酸的个数为 12~24 个，其中，赖氨酸的比例大于 33.3%。

碱性氨基酸（赖氨酸）带有正电荷，一般可结合氯离子等负离子，加上一些疏水氨基酸，就可以结合到细胞膜上，破坏细胞膜的完整性，通过改变膜透性产生抑菌杀菌作用。现有技术中也有研究碱性氨基酸（赖氨酸）和疏水氨基酸（亮氨酸）所得到的抗菌肽，但所述抗菌肽的设计通常都需要考虑肽的二级结构，二级结构同时还会影响最终合成的碱性抗菌肽的活性，这不仅会增加抗菌肽的合成成本，也会影响抗菌肽的实际应用；另外，现有技术所合成的碱性抗菌肽通常形成过膜通道，多有溶血性，对人体是不安全的。

本发明所得到的抗菌肽碱性氨基酸的比例大于 33.3%时效果很好；同时，本发明所述碱性抗菌肽是非高通透型的肽（通常是低通透型）且不裂解人体红细胞，无溶血活性，一般不形成高效过膜通道，因此对人体是安全的。

申请人通过大量的筛选和研究发现，将疏水氨基酸置于抗菌肽的一端时，碱性抗菌肽的抗菌效果很好；具体地，所述疏水氨基酸位于碱性抗菌肽的一端，其疏水氨基酸的个数为 3~8 个。

本发明所述碱性抗菌肽有上万亿种组成，且抗菌肽的设计不用考虑氨基酸的二级结构和物化性质，只要由上述氨基酸组成和保持高的碱性氨基酸比例，就可以形成活性高的碱性抗菌肽。

优选地，所述碱性抗菌肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1~23 所示。

更优选地，所述碱性抗菌肽的序列为  $L_m(L/K)_n$ 、 $(L/K)_n L_m$ ，其中， $12 \leq n \leq 24$ ， $m \leq 8$ 。

优选地，所述抗菌肽中氨基酸可以是 D 型，也可以是 L 型，还可以同时具有 L 型和 D 型。

一种靶向抗菌肽，所述靶向抗菌肽由上述任意一种碱性抗菌肽与抗体互补决定区通过若干个亮氨酸连接获得；具体得，所述靶向抗菌肽结构组成为抗菌肽-Lo-抗体互补决定区；其中 o 为亮氨酸的个数， $o \geq 4$ 。

优选地，所述靶向抗菌肽的序列如 SEQ ID NO: 25~31 所示。

需要说明的是，仅仅有个别抗菌肽接上某些抗体互补决定区成为靶向抗菌肽后，会使不裂解人体红细胞的抗菌肽变为裂解人体红细胞的靶向抗菌肽。因此，开发靶向抗菌肽药物时要进行适当筛选。

另外，本发明的碱性抗菌肽和靶向抗菌肽均具有抗大肠杆菌（MG1655），绿脓杆菌（1.2464，北京中国普通微生物菌种保藏管理中心），金黄色葡萄球菌（ATCC6538），多重耐药金黄色葡萄球菌 Y5（张颖等，一起食物中毒事件的金黄色葡萄球菌分子分型研究，中华预防医学杂志，2008，42(9):672-676；Ran He et al. A combinatorial yeast overlay method for the isolation of antibacterial oligopeptides, Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences, 2014, 84(4):1069-1075），酿酒酵母（INVSc1）等的效果。

因此，本发明所述碱性抗菌肽和靶向抗菌肽可用于抑菌，也可用于制备抑菌药物。上述抗菌肽中，当赖氨酸个数等于或超过肽的 50% 时，对大肠杆菌较为有效。高于或低于 50%，对金黄色葡萄球菌和绿脓杆菌都有效；长度为 16 至 24 个氨基酸之间的抗菌肽对上述 3 个菌都有效。

同时，本发明所述碱性抗菌肽和靶向抗菌肽同样具有抗癌的作用，本发明所述碱性抗菌肽和靶向抗菌肽具有抗肺癌细胞 A549 的活性和对 SV40 病毒永生化的支气管上皮细胞株 16HBE14o- 的杀伤作用；所述靶向抗菌肽在较低的浓度下具有比对照抗菌肽更强的抗癌活性，特别是编号为 59 的抗菌肽，在 0.1mM 杀肺癌细胞的效率高达 100.3%；因此本发明所述靶向抗菌肽可以用于导向抑菌或导向抗癌，也可用于制备抑菌或抗癌药物。

对于靶向抗菌肽（编号为 49, 50, 59, 60）而言，中间的亮氨酸个数为 4。这几个肽在低浓度具有比对照抗菌肽 2 或对照抗菌肽 11 更强的杀癌活性，其用到的抗体互补决定区为 CD47 蛋白质的抗体的互补决定区 3 和 2（Yasufumi Kikuchi, Shinsuke Uno, Yasuko Kinoshita, et al. HUMANIZED ANTI-CD47 ANTIBODY. European Patent Application EP1693385），其序列分别为：ARGGYTYDDWG 和 YIYPYNDGTYNEKFKD。科学家检测过的人类癌细胞都表达 CD47，相比于正常细胞通常以较高水平表达（平均大约高 3 倍多）。将本发明所述抗菌肽与 CD47 蛋白的抗体互补决定区相连接，可以将抗菌肽带到癌细胞位置。

本发明所述抗菌肽与 CD47 蛋白的抗体互补决定区必须通过亮氨酸相连接，发明人通过实验发现，由编号为 2 的碱性抗菌肽直接连接 CD47 蛋白的抗体互补决定区形成的靶向抗菌肽（编号为 63）完全丧失抑菌活性。

因此，本发明还提供上述任一种碱性抗菌肽在制备抑菌或/和抗癌药物方面的应用；所述抑菌为抑制真菌或/和细菌；所述抗癌为杀死肺癌细胞或杀死永生化细胞。

本发明还提供所述靶向抗菌肽在制备抑菌或/和抗癌药物方面的应用；所述抑菌为抑制真菌或/和细菌；所述抗癌为杀死肺癌细胞或杀死永生化细胞。

与现有技术相比，本发明具有以下有益效果：

本发明提供了一种碱性抗菌肽，所述碱性抗菌肽由亮氨酸和赖氨酸组成，所述碱性抗菌肽的氨基酸的个数为 12~24 个，其中，赖氨酸的比例大于 33.3%；本发明所述碱性抗菌肽不用考虑氨基酸的二级结构和物化性质，所述抗菌肽可任意组合；是非高通透型的肽（通常低通透型）且不裂解人体红细胞，无溶血活性，一般不形成高效过膜通道，因此对人体是安全的；同时对大肠杆菌、绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌、多重耐药性金黄色葡萄球菌、酿酒酵母等具有广谱的抑菌作用；将上述碱性抗菌肽制成靶向抗菌肽，所述靶向抗菌肽在 0.1mM 杀肺癌细胞的效率高达 100.3%；本发明所述抗菌肽或靶向抗菌肽可用于抑菌和抗癌，可广泛用于医疗、农业、食品防腐剂等领域。

#### 附图说明

图 1 为抗菌肽和靶向抗菌肽的溶血活性。

图 2 为 80  $\mu$  M 不同的抗菌肽水解 ONPG 的速率。

图 3 为 80  $\mu$  M 不同的抗菌肽水解 ONPG 的速率。

图 4 为抗菌肽和靶向抗菌肽对多重耐药金黄色葡萄球菌 Y5 抑菌实验结果。

图 5 为抗菌肽和靶向抗菌肽对绿脓杆菌抑菌实验结果。

图 6 为抗菌肽和靶向抗菌肽对酿酒酵母 INVSc1 抑菌圈实验结果。

图 7 为抗菌肽和靶向抗菌肽对肺癌细胞系 A549 的杀伤作用。

图 8 为抗菌肽和靶向抗菌肽对 SV40 病毒永生化的支气管上皮细胞株 16HBE14o - 的杀伤作用。

图 9 为靶向抗菌肽对 SV40 病毒永生化的支气管上皮细胞株 16HBE14o - 的杀伤作用。

### 具体实施方式

下面结合说明书附图和具体实施例进一步说明本发明的内容，但不应理解为对本发明的限制。在不背离本发明精神和实质的情况下，对本发明方法、步骤或条件所作的简单修改或替换，均属于本发明的范围；若未特别指明，实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段。

#### 实施例 1 最小抑菌浓度 (MIC) 测定

按表 1 的多肽序列，由上海波泰生物科技有限公司采用 fmoc 固相合成法合成各种多肽，使用 RP-HPLC 纯化；所述多肽包括抗菌肽和靶向抗菌肽，其中靶向抗菌肽是由抗菌肽与抗体互补决定区通过若干个亮氨酸连接获得。

所用的细菌为大肠杆菌 (MG1655)，绿脓杆菌 (1.2464，北京中国普通微生物菌种保藏管理中心)，金黄色葡萄球菌 (ATCC6538)，多重耐药金黄色葡萄球菌 Y5 (张颖等，一起食物中毒事件的金黄色葡萄球菌分子分型研究，中华预防医学杂志,2008,42(9):672-676；Ran He et al. A combinatorial yeast overlay method for the isolation of antibacterial oligopeptides, Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences,2014, 84(4):1069-1075)，

最小抑菌浓度 (MIC) 测定过程如下：

(1) 接种细菌单菌落于常规 LB 液体培养基中，37°C，200 转/分钟摇床过夜培养 11 小时，并测定菌落形成单位。

(2) 将各肽 (抗菌肽和靶向抗菌肽) 分别设置四个终浓度：40  $\mu$  M、80  $\mu$

M、160 μM 和 320 μM；每个肽每个浓度设置 3 个平行。

(3)用常规 LB 液体培养基稀释培养过夜的菌液得到 10<sup>6</sup> 菌落形成单位的使用菌液；实验组：每孔多肽和菌液各 50 微升，对照组 1：100 微升无菌培养基；对照组 2：无菌培养基和菌液各 50 微升；对照组 3：50 微升的菌液+与样品相对应的相应量的 DMSO 和培养基；对照组 4：50 微升的菌液+与样品相对应的相应量的水和培养基。

(4) 将加好样品的 96 孔板在 37℃恒温箱培养 20 小时后，用酶标仪在 492 纳米及 620 纳米处测 OD 值。

(5) 数据分析

计算公式：用 492 纳米处的 OD 值计算。

抑制率 % = 100 × [1 - (肽与菌液实验组 - 不加菌液对照组) / (水或者 DMSO 与菌液对照组 - 不加菌液对照组)]

当抑菌率达到 79.5%时，记录为 MIC（最小抑菌浓度），结果见表 1。

表 1 抗菌肽对多种细菌的最小抑菌浓度

多肽编号*	序列	多肽 纯度	MG1655	1.2464	ATCC6538	Y5
1	LLLLLK KLKLK KLLKK LLLKKL KK	95 %	≤40 μM	≤40 μM	≤40 μM	160 μM 抑制率 56.2 %
2	LLLLLL KKKLLK KKLKK LKCLK KKK	95 %	≤40 μM	≤40 μM	仅在 80 μM 达到 MIC	80 μM 抑制率 47.8 %



3	LLLLL LKCLK KKKKK LKKKK LKK	95 %	40 $\mu$ M 抑制 率 56.1 %	80 $\mu$ M	160 $\mu$ M	-
4	LLLLL LLKKK KKKKK LKCLK KKK	95 %	40 $\mu$ M 抑制 率 49.9 %	80 $\mu$ M	>320 $\mu$ M ; 320 $\mu$ M 抑制 率 45.0 %	-
5	LLLKK KKCLK KKLKK LKKKL KKK	98 %	160 $\mu$ M	160 $\mu$ M	160 $\mu$ M 抑 制率 72.5 %	-
6	LLLKK KKKKL KKLKK KLKKK KKKK	95 %	40 $\mu$ M 抑制 率 49.7 %	无活性	>320 $\mu$ M; 320 $\mu$ M 抑制 率 60.6 %	-
7	LLLLK KKCLK K	95 %	80 $\mu$ M 抑 制率 54.3%	无活性	>320 $\mu$ M; 3 20 $\mu$ M 抑制 率 75.8 %	-

8	LLLLLK KLKLLK KKLKK	95 %	40 $\mu$ M 抑制 率 54 %	320 $\mu$ M	>320 $\mu$ M; 320 $\mu$ M 抑制 率 70.7 %	-
9	KKKKL KKKLLK KLKKK KKKKL LLLL	98 %	160 $\mu$ M	$\leq$ 40 $\mu$ M	>320 $\mu$ M; 320 $\mu$ M 抑制 率 77.9%	-
10	KKKKL KKLKL KKLKK LLKLLK KKK	98 %	$\leq$ 40 $\mu$ M	$\leq$ 40 $\mu$ M	>320 $\mu$ M; 320 $\mu$ M 抑制 率 73.0%	-
11	LLLLLK KKKLLK KKLKK LKKKK KKK	98 %	160 $\mu$ M	80 $\mu$ M	80 $\mu$ M 抑制 率 74.8 %	80 $\mu$ M 抑制 率 27.1 %
12	LLLLLK KKKKK KKKKK KKKKK KKK	98 %	80 $\mu$ M 抑制 率 52.3 %	无活性	160 $\mu$ M	-

13	LLLLLK KLLKLL KLLLKL LKLLK K	95 %	仅在 80 $\mu$ M 达到 MIC	仅在 80 $\mu$ M 达 到 MIC	$\leq 40 \mu$ M	80 $\mu$ M 抑制 率 59.9 %
14	KKLLK KLLKL KKKLLK LLKLLK KLLK	95 %	40 $\mu$ M, 80 $\mu$ M , 160 $\mu$ M	$\leq 40 \mu$ M	40 $\mu$ M 抑制 率 64.9 %	-
15	KLKKK LKKKK LKLKLL KKLLK LK	95 %	$\leq 40 \mu$ M	$\leq 40 \mu$ M	$> 320 \mu$ M; 320 $\mu$ M 抑制 率 67.4 %	-
16	KKKLLK KKLKL KKLKK LLKLLK KKK	95 %	$\leq 40 \mu$ M	$\leq 40 \mu$ M	160 $\mu$ M	-
17	KKKKK KKLKL KKLKK LLKKK KKKK	95 %	40 $\mu$ M 抑制 率 55.8 %	80 $\mu$ M	80 $\mu$ M 抑制 率 63.0 %	-

18	KKKKL KKKLK KLKKK KKKKK LLLL	95 %	40 $\mu$ M 抑制率 55.5 %	无活性	>320 $\mu$ M 320 $\mu$ M 抑制率 61.4 %	-
19	KKKKL KKKLK KLKKK KKKLL LLLL	95 %	$\leq$ 40 $\mu$ M	$\leq$ 40 $\mu$ M	160 $\mu$ M 抑制率 73.0 %	-
20	LLLLLL KKKLK KKKKK LKKK	98 %	320 $\mu$ M 抑制率 73.9 %	80 $\mu$ M	80 $\mu$ M	80 $\mu$ M 抑制率 64.0 %
21	LLLLLL KKKLK KKLKK LKKKL KKK	98 %	仅在 40 $\mu$ M 和 80 $\mu$ M 达到 MIC	$\leq$ 40 $\mu$ M	仅在 40 $\mu$ M 达到 MIC	80 $\mu$ M 抑制率 51.6 %
22	LLLLLL KKLKK KKLKK LKKLK KKK	98 %	>320 $\mu$ M; 320 $\mu$ M 抑制率 66.4 %	$\leq$ 40 $\mu$ M	仅在 40 $\mu$ M 和 320 $\mu$ M 达到 MIC	>320 $\mu$ M; 320 $\mu$ M 抑制率 77.3 %)

23	ILLLLL KKLKK KKLKK LKCLK KKk 第 一个和 倒数第 一个为D 型	98 %	>320 $\mu\text{M}$  (在 320 $\mu\text{M}$ 抑制 率 52.2 %)	40 $\mu\text{M}$ , 80 $\mu\text{M}$ 和 160 $\mu\text{M}$	(在 40 $\mu\text{M}$ 抑制率 61.3 %)	(在 320 $\mu\text{M}$ 抑制 率 39.3 %)
67	LLLLLL LLLLLL LLLLAR GGYYT YDDWG	98 %	无活性	无活性	(在 320 $\mu\text{M}$ 抑制了 27.0%)	-
靶向抗菌 肽编号						
49	LLLLLK KKKLLK KKLKK LKKKK KKKLL LLARG GYYTY DDWG	98 %	仅在 80 $\mu\text{M}$ 达到 MIC	仅在 40 $\mu\text{M}$ 和 80 $\mu\text{M}$ 达到 MIC	>320 $\mu\text{M}$ (在 320 $\mu\text{M}$ 抑制 率 70.3 %)	(在 80 $\mu\text{M}$ 抑制 率 47.3 %)

50	LLLLLK KKKLLK KKLKK LKKKK KKKLL LLYIYP YNDGT KYNEK FKD	95 %	≤40 μM	≤40 μM	(在 160 μM 抑制率 69.6 %)	-
59	LLLLLL KKKLLK KKLKK LKKLK KKKLL LLARG GYITY DDWG	98 %	(在 40 μM 抑制率 58.7 %)	(在 80 μM 抑制率 75.7 %)	(在 160 μM 抑制率 79.1 %)	-
60	LLLLLL KKKLLK KKLKK LKKLK KKKLL LLYIYP YNDGT KYNEK FKD	98 %	(在 40 μM 抑制率 65.4 %)	(在 80 μM 抑制率 75.0 %)	(在 160 μM 抑制率 17.7 %)	-

61	KKKKL KKLKL KKLKK LLKLLK KKKLL LLARG GYYTY DDWG	98 %	仅在 40 $\mu$ M 达到 MIC	仅在 40 $\mu$ M 和 80 $\mu$ M 达到 MIC	(在 160 $\mu$ M 抑制 率 71.2 %)	-
62	KKKKL KKLKL KKLKK LLKLLK KKKLL LLYIYP YNDGT KYNEK FD	98 %	160 $\mu$ M	320 $\mu$ M	仅在 40 $\mu$ M 达到 MIC	-
63	LLLLL KKKLLK KKLKK LKCLK KKKAR GGYYT YDDWG	98 %	(在 40 $\mu$ M 抑制 率 24.5 %)	无活性	(在 160 $\mu$ M 抑制率 44.0 %)	(在 40 $\mu$ M 抑制率 19.9 %)
a (DMSO)		98 %	无活性	无活性	无活性	-

b		95 %	(在 80μM 抑制率 53.1 %)	无活性	(在 320 μM 抑制率 26.5%)	-
---	--	------	---------------------	-----	----------------------	---

\*-表示未测定；编号的括号里标明 DMSO，表示为 DMSO 溶解的肽。未标注为水溶肽；无活性：所有 4 个浓度抑菌率低于 15%；促进生长：所有 4 个浓度抑菌率低于-20%；括号内表示为最大抑菌率。氨基酸小写为 D 型。a: ARGGYTYDDWG (CD47 蛋白质的抗体的互补决定区 3)。b: YIYPYNDGTKYNEKFKD (CD47 蛋白质的抗体的互补决定区 2)。

**实施例 2 溶血性实验**

1. 血液处理

(1) 采集新鲜人血 5 毫升放入含有 0.5 毫升 3.8%柠檬酸钠管中，吹打抗凝管中的血液，使其与抗凝剂充分混匀。

(2) 将上述血液在 2000 转/分钟条件下离心 8 分钟，去上清。用 10mM, pH=7.4 的 PBS 漂洗血液，2000 转/分钟离心 5 分钟，弃上清，重复操作，直到红细胞悬液清亮透彻无血清等杂质为止，弃去上清。然后按照 5% (v/v) 溶于 PBS 中，得到红细胞悬浮液。

2. 抗菌肽处理：将抗菌肽溶于 PBS，最后得到终浓度为 40 μ M、80 μ M、160 μ M、320 μ M 的抗菌肽溶液。

3. 体系混合

吸取 50 微升处理过的抗菌肽溶液加入到 96 孔板中，每个肽每个浓度 3 个平行，之后用排枪吸取倒在培养皿上的红细胞悬液，每孔 50 微升加入到 96 孔板中，全部加完后密封 96 孔板，放入摇床，37℃，200 转/分钟震荡 1 小时。

将 20 μ M、40 μ M、80 μ M 和 160 μ M 的天蚕素（简称 CecA）按照上述方法同红细胞悬浮液混合，阳性对照为 1% Triton X-100；阴性对照为 PBS 溶液。

4. 数据分析

将震荡培养后的 96 孔板在 2000 转/分钟条件下离心 8 分钟，吸取 60 微升上清液平行转移到新的 96 孔板中，酶标仪检测 540 纳米波长处的 OD 值。

$$\text{溶血百分值} = (A_{540} \text{ 样品} - A_{540} \text{ 阴性对照}) / (A_{540} \text{ 阳性对照} - A_{540} \text{ 阴性对照}) \times 100\%。$$



实验结果如图 1。

### 实施例 3 大肠杆菌膜通透性实验

$\beta$ -半乳糖苷酶是一种水解酶，位于细菌的细胞质中，可以将邻硝基苯  $\beta$ -D-半乳糖吡喃糖苷（ONPG）水解成半乳糖和邻硝基苯酚（呈黄色）。在体系中加入一定量的 ONPG，通过测量培养液在 420 纳米的吸光值的变化，可以判断 ONPG 的水解度，从而测知  $\beta$ -半乳糖苷酶是否水解 ONPG。一般情况下，由于酶位于细胞内部，而 ONPG 不能进入细胞内。但一旦细胞膜通透性改变时，ONPG 进入细胞内并水解，培养液迅速变成黄色， $A_{420}$  值在短时间内快速升高。因此，可以利用此法来检测抗菌肽对细胞膜通透性的影响。膜通透性高说明抗菌肽能形成过膜通道。

本发明所述通透性实验过程如下：

(1) 挑取大肠杆菌 ML-35 单菌落过夜培养，并测量其菌落形成单位；根据测量的菌落形成单位数值，取适量体积的过夜培养物于 EP 管中，10000 转离心 1 分钟，并用 10mM 磷酸钠（含 0.1M NaCl）缓冲液重悬。重复 3 次，用足量磷酸钠缓冲液将菌体重悬至菌落形成单位= $2 \times 10^7$ 。

(2) 取 10 微升 10mM 肽（包括抗菌肽和靶向抗菌肽），加入 490 微升磷酸钠缓冲液，得到 200  $\mu$ M、500 微升的肽稀释液；取 10 微升水或 DMSO 代替肽，加入 90 微升磷酸钠缓冲液作为对照组。

(3) 取 200 微升肽稀释液，加入 50 微升 ONPG 溶液，得到肽-ONPG 混合液；在对照组中也加入 50 微升 ONPG；用肽-ONPG 混合液加 96 孔板，每孔 50 微升，每个样三个重复；取 4 $^{\circ}$ C 保存的菌液，用排枪吸取 50 微升加入每孔。按此方法，最终实验组每孔溶液体积 100 微升，肽终浓度 80  $\mu$ M，ONPG 终浓度 1.5mM，菌浓度  $1 \times 10^7$  菌落形成单位；形成实验组每孔肽终浓度为 40  $\mu$ M 时方法同上。

室温加完菌液后迅速转移至多功能酶标仪，测量其在 37 $^{\circ}$ C 下 420 纳米的吸光值，从第一次测量起，每隔 10 分钟测量一次。测量 13 次。记录数据并分析，结果如图 2、图 3。

### 实施例 4 抑菌圈实验

肽对多重耐药金黄色葡萄球菌 Y5 和绿脓杆菌抑菌圈实验：接种细菌单菌落

于常规 LB 液体培养基中，37℃，200 转/分钟摇床过夜培养 11 小时，并测定菌落形成单位。待 LB 固体培养基冷却至不烫手但未凝固时分别接入计数好的金黄色葡萄球菌 Y5 和绿脓杆菌（1.2464）菌液，使菌液浓度约为  $1 \times 10^8$  菌落形成单位/毫升，倒入平板，冷却至完全凝固。

1. 样品处理：

金黄色葡萄球菌平板每个孔加入 40 微升、5mM 肽，阴性对照为 40 微升 DMSO/水，阳性对照为 10 微升 5 毫克/毫升 Amp<sup>+</sup>，30 微升水。

绿脓杆菌平板每个孔加入 25 微升、5mM 肽，阴性对照为 25 微升水/DMSO，阳性对照为 10 微升、5 毫克/毫升 Amp<sup>+</sup>，15 微升水。

将处理好的样品在 37℃ 恒温培养 16 小时后记录是否有抑菌圈及其大小结果（如图 4、5 和表 2）。

表 2 多肽对金黄色葡萄球菌和绿脓杆菌的抑菌圈大小

肽编号	纯度	对金黄色葡萄球菌 Y5 抑菌圈直径（毫米）	对绿脓杆菌抑菌 圈直径（毫米）
氨苄		10	4
1	95%	6.5	8
2	95%	5	11
3	95%	8	5
4	95%	8	2
5	95%	4	10
6	95%	3.5	4
7	95%	无抑菌圈	无抑菌圈
8	95%	无抑菌圈	4
9	95%	5	10
10	95%	3	13
11	95%	2.5	8
12	95%	5	无抑菌圈
13	95%	5	3
14	95%	3	11

15	95%	4.5	12
16	95%	无抑菌圈	9
17	95%	无抑菌圈	5
18	95%	无抑菌圈	4
19	95%	2	7
49	95%	无抑菌圈	8.5
50	95%	6	6
a	95%	无抑菌圈	无抑菌圈
b	95%	无抑菌圈	无抑菌圈

注：表中抑菌圈直径都不包括打孔器直径；a: ARGYYTYDDWG 是 CD47 蛋白质的抗体的互补决定区 3；

b: YIYPYNDGTYNEKFKD 是 CD47 蛋白质的抗体的互补决定区 2

### 实施例 5 酿酒酵母 INVSc1 抑菌圈实验

配置 YPD 培养基:葡萄糖 2%，蛋白胨 2%，酵母膏 1%，固体培养基还要加琼脂 2%；划线培养酿酒酵母 INVSc1 单菌落；接种单菌落 30℃摇床培养 24 小时后取出放 4℃保存；测菌落形成单位。

融化 YPD 固体培养基，等培养基不太热的时候加入上述测过菌落形成单位的菌液，按照菌液：YPD 培养基=1：20，使酵母菌液浓度为  $1 \times 10^6$  个/毫升；倒入直径为 15 厘米的平板约 50 毫升/板；冷却后用直径为 5 毫米打孔器打孔，每孔加入 40 微升、10mM 肽，阴性对照为 40 微升的水/DMSO 阴性对照，阳性对照为 10 微升、10 毫克/升的苯菌灵+30 微升水。用封口膜封好平板之后放入 30℃恒温箱培养约 18 小时后拍照并记录抑菌圈大小。结果如图 6 和表 3。

表 3 酿酒酵母抑菌圈大小

肽编号	纯度	抑菌圈直径大小（毫米）	
		18 小时	36 小时
2	95%	4	3.5
5	95%	4	无抑菌圈
6	95%	4	2
7	95%	8	7

8	95%	5	4
9	95%	6	6
10	95%	2	2
11	95%	6	无抑菌圈
12	95%	12	11
14	95%	5	4
16	95%	8	3
19	95%	5	2.5
61	98%	2	2
a	95%	无抑菌圈	无抑菌圈
b	95%	3	无抑菌圈
水/DMSO		无抑菌圈	无抑菌圈
苯菌灵		无抑菌圈	无抑菌圈

注：表中抑菌圈直径都不包括打孔器直径；a: ARGGYTYDDWG 是 CD47 蛋白质的抗体的互补决定区 3；  
b: YIYPYNDGTYNEKFKD 是 CD47 蛋白质的抗体的互补决定区 2

**实施例 6 肽对细胞活力的影响**

肺癌细胞系 A549 见参考文献(Lieber M, Smith B, Szakal A et al. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. Int J Cancer, 2006, 17(1): 62-70)。细胞培养方法如美国菌种保藏中心所述。永生化的人支气管上皮细胞株 16HBE14o-细胞见参考文献(Cozens A L, Yezzi M J, Kunzelmann K, Ohrui T, Chin L, Eng K, Finkbeiner W E, Widdicombe J H, and Gruenert D C. "CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells." American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 1994, 10(1):38-47) 培养于 DMEM/F12 培养基中，A549 细胞培养于 DMEM（高糖）培养基中，并且两种培养基中都加入 10%的胎牛血清。

细胞活力采用 3-(4, 5 dimethylthiazol-2yl)-2, 5-diphenyl -tetrazolium bromide (MTT; MBCHAM)比色法测定，具体步骤参见参考文献(Warshamana-Greene GS, Litz J, Buchdunger E et al. The insulin-like growth factor-I receptor kinase inhibitor, NVP-ADW742, sensitizes small cell lung cancer cell lines to the effects of

chemotherapy. Clin Cancer Res, 2005, 11(4):1563-1571)。主要步骤：16HBE14o-和 A549 细胞培养于 96 孔板中至指数生长期。然后对各孔细胞施以指定的不同浓度的肽。处理 24 小时后，用 MTT 法测定在 492 纳米的吸光度值。最后根据公式：细胞活力抑制率(%) = (对照组 492 纳米吸光值 - 实验组 492 纳米吸光值) / 对照组 492 纳米吸光值 × 100% 来计算出各种肽对细胞活力的抑制率，结果如图 7~9。

## 权 利 要 求 书

1. 一种碱性抗菌肽，其特征在于，所述碱性抗菌肽由亮氨酸和赖氨酸组成，所述碱性抗菌肽的氨基酸的个数为 12~24 个，其中，赖氨酸的比例大于 33.3%。

2. 根据权利要求 1 所述的碱性抗菌肽，其特征在于，所述碱性抗菌肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1~23 所示。

3. 根据权利要求 1 所述的碱性抗菌肽，其特征在于，所述氨基酸是 D 型或/和 L 型。

4. 一种靶向抗菌肽，其特征在于，所述靶向抗菌肽结构组成为抗菌肽-Lo-抗体互补决定区；其中 o 为亮氨酸的个数， $o \geq 4$ ；所述抗菌肽为权利要求 1 至 3 任一项所述的抗菌肽。

5. 根据权利要求 4 所述的靶向抗菌肽，其特征在于，所述靶向抗菌肽的序列如 SEQ ID NO: 25~31 所示。

6. 权利要求 1 至 3 任一项所述碱性抗菌肽在制备抑菌或/和抗癌药物方面的应用。

7. 权利要求 4 或 5 所述靶向抗菌肽在制备抑菌或/和抗癌药物方面的应用。

8. 根据权利要求 6 所述的应用，其特征在于，所述抑菌为抑制真菌或/和细菌；所述抗癌为杀死肺癌细胞或杀死永生化细胞。

9. 根据权利要求 7 所述的应用，其特征在于，所述抑菌为抑制真菌或/和细菌；所述抗癌为杀死肺癌细胞或杀死永生化细胞。

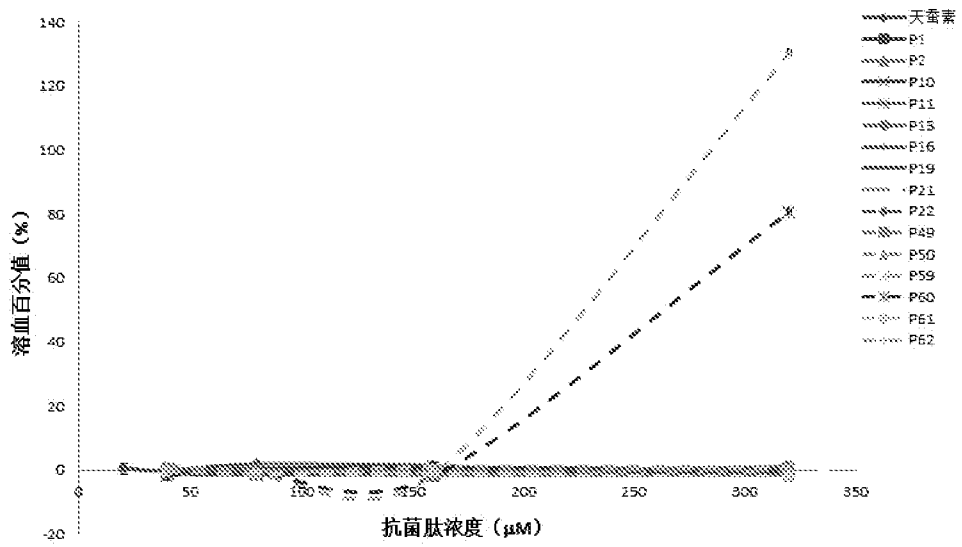


图 1

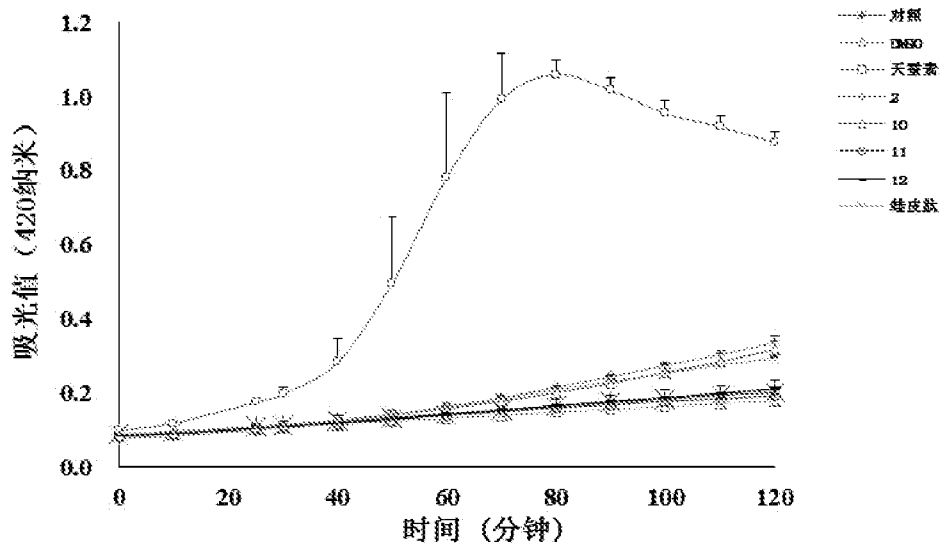


图 2

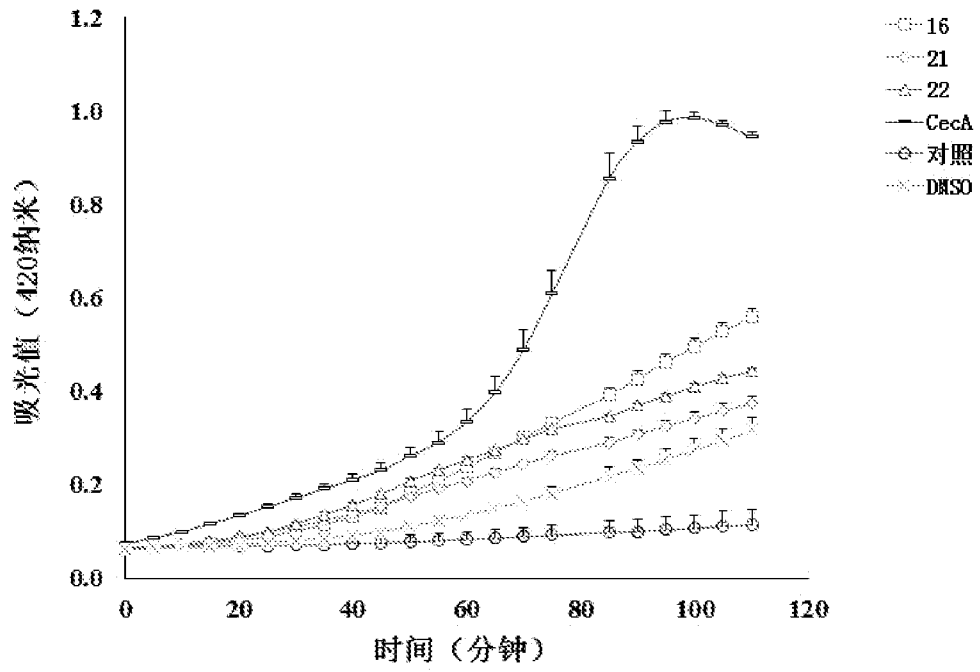


图 3

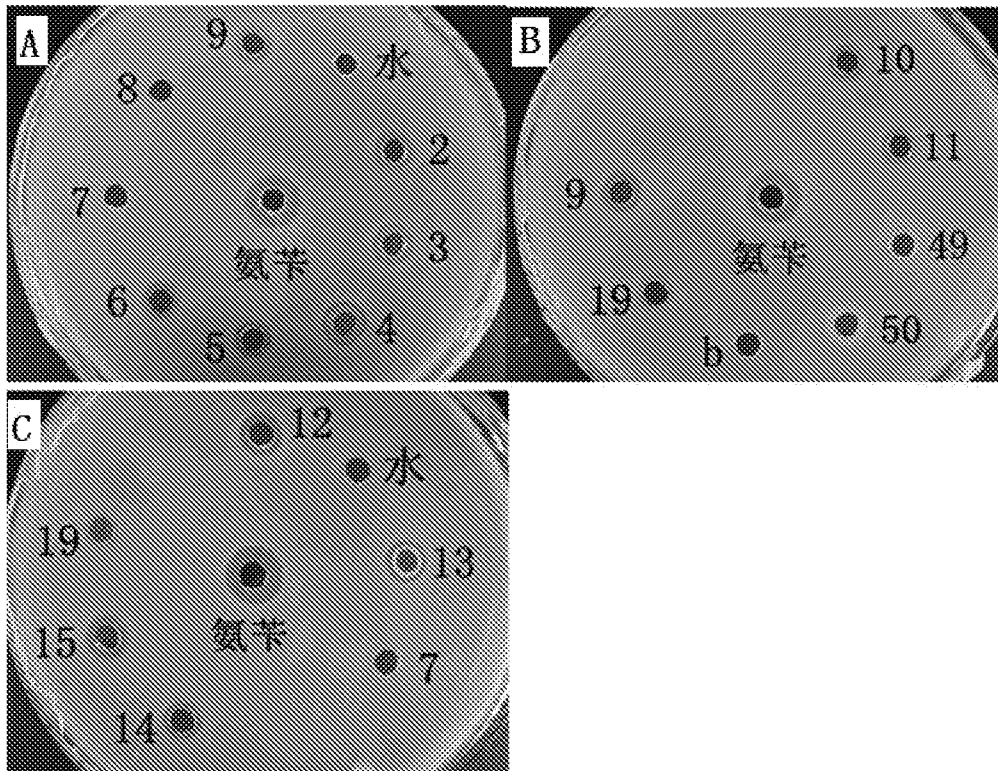


图 4



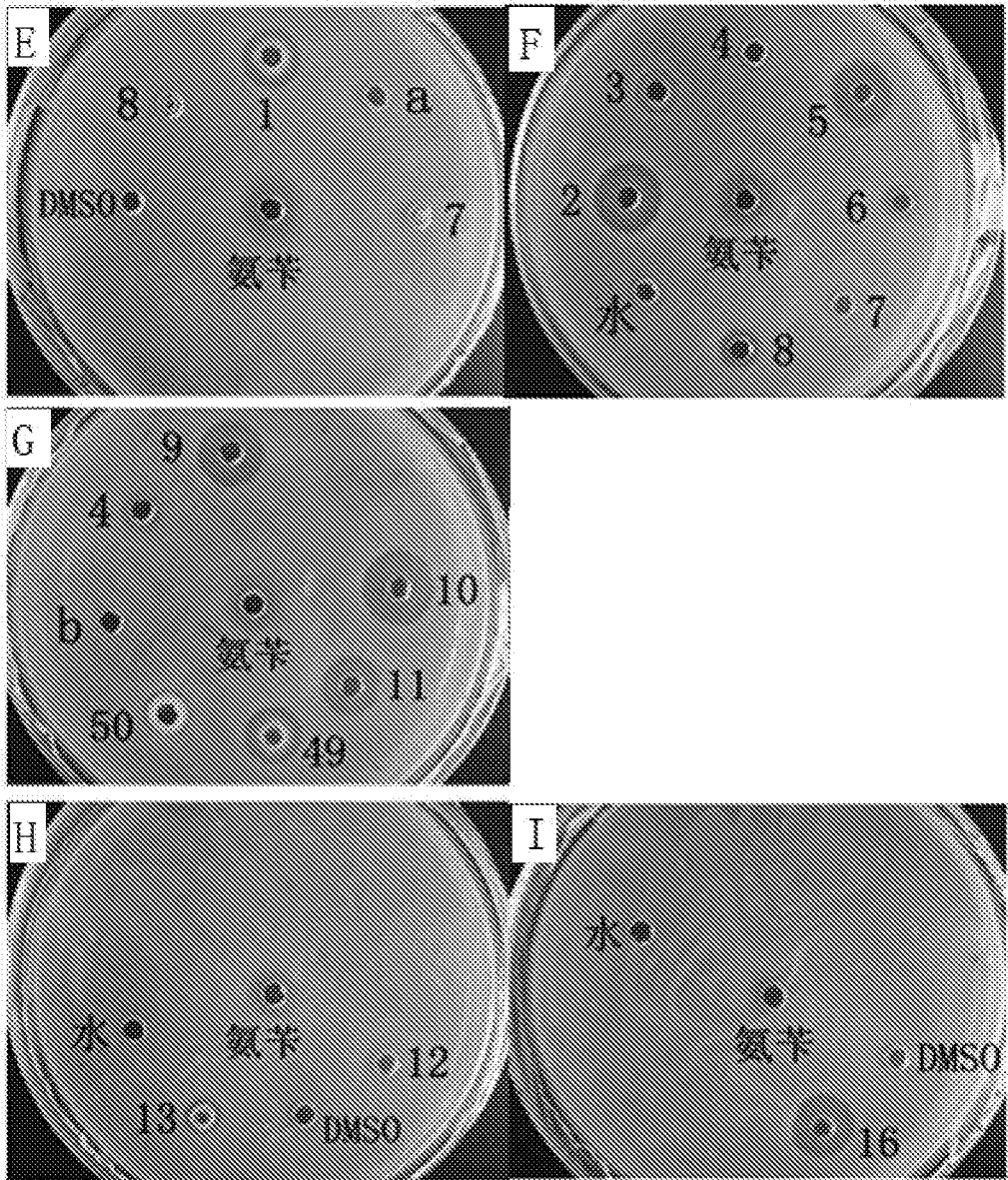


图 5

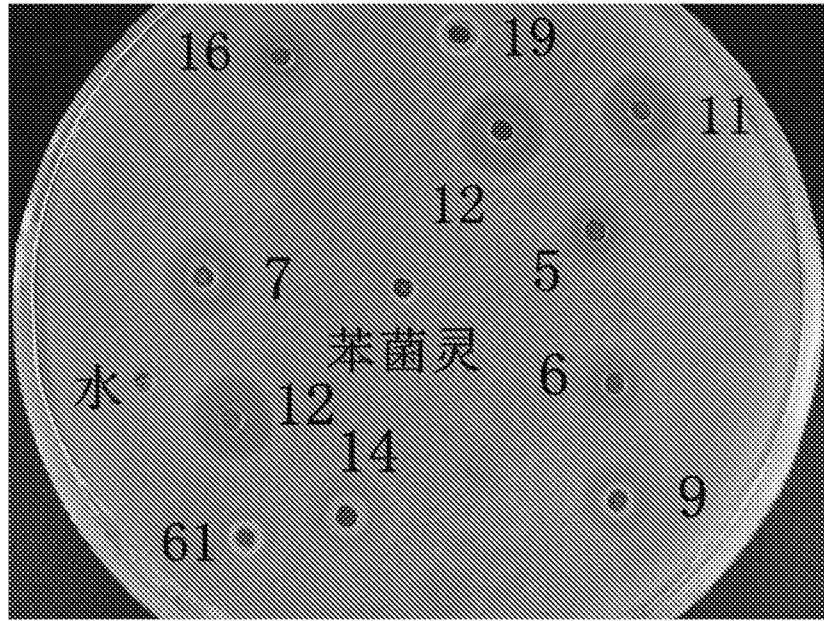


图 6

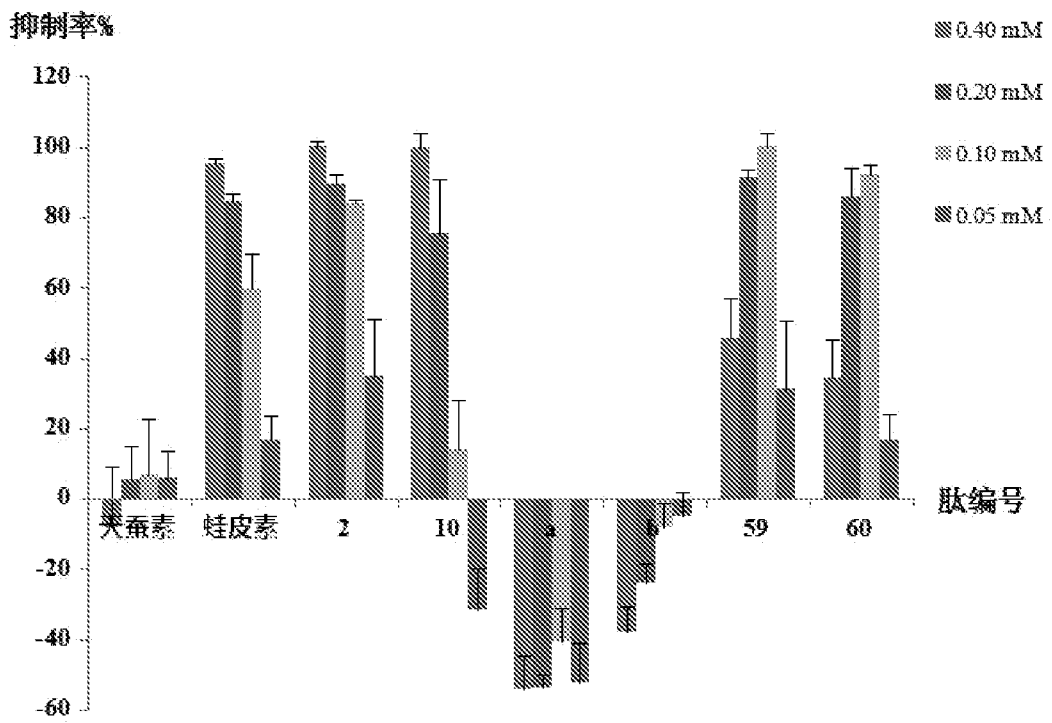


图 7

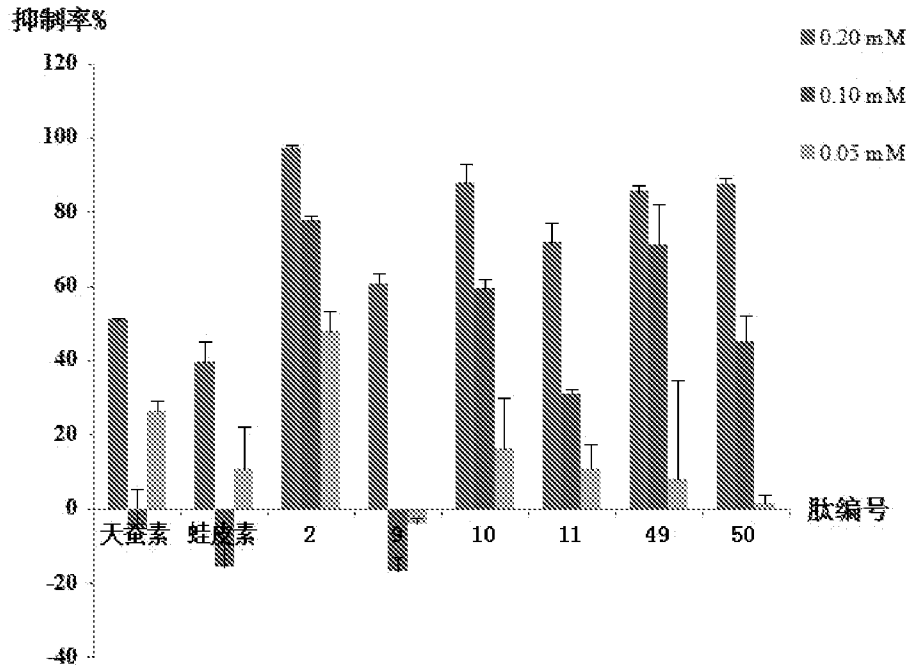


图 8

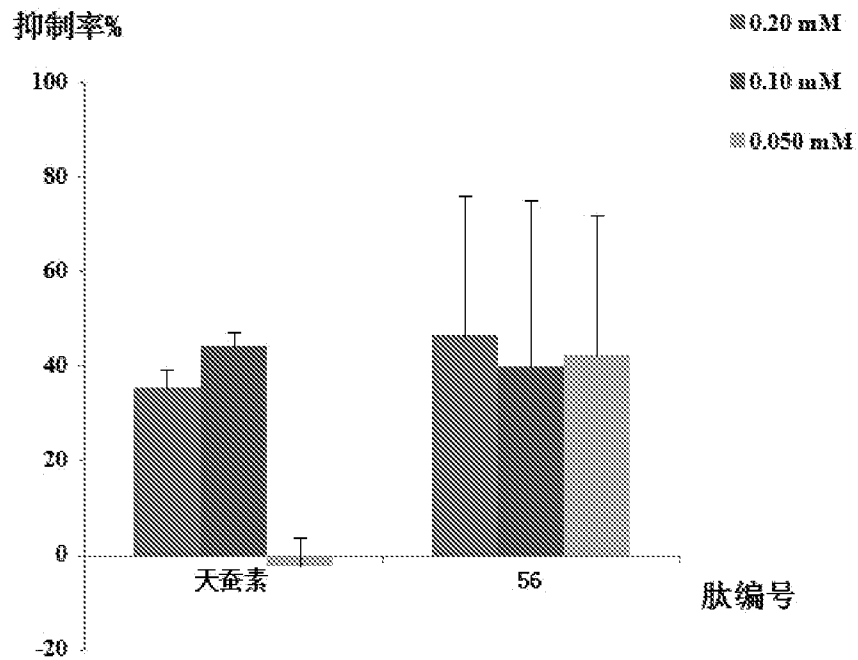


图 9

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/CN2015/097734

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 7/08 (2006.01) i; C07K 14/00 (2006.01) i; C07K 19/00 (2006.01) i; A61K 38/10 (2006.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i; A61K 47/48 (2006.01) i; A61P 31/04 (2006.01) i; A61K 38/16 (2006.01) i; A61P 31/10 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CPRSABS, CNMED, DWPI, SIPOABS, CPEA, ISI WEB OF KNOWLEDGE, CNKI, BAIDU and searched terms: antibacterial peptide, antimicrobial peptide, AMP, antibiotics peptide, basic, Leu, Lys, antibody, CDR, target+ et al. ; Retrieving System for Biological Sequence of Chinese Patent, Genbank, EMBL, STN and searched sequences: SEQ ID NOs: 1-23, 25-31.

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 104592360 A (UNIV SUN YAT-SEN) 06 May 2015 (06.05.2015) see claims 1-10, paragraphs [0007]-[0030] of the description, and embodiments 1-6	1-9
X	WANG, Liang et al., "Rational Design of $\alpha$ -helical Antimicrobial Peptide with Leu and Lys Residues", Microbiology China, vol. 41, no. 2, 20 February 2014 (20.02.2014) see the abstract; page 314, right column, the second paragraph to page 317, right column, the second paragraph	1-3, 6, 8

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search 28 December 2015	Date of mailing of the international search report 01 February 2016
---	--

Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer  MA, Zhenlian  Telephone No. (86-10) 62412131
---	--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/CN2015/097734

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WANG, Liang et al., "Rational Design of $\alpha$ -helical Antimicrobial Peptide with Leu and Lys Residues", Microbiology China, vol. 41, no. 2, 20 February 2014 (20.02.2014) see the abstract; page 314, right column, the second paragraph to page 317, right column, the second paragraph	4, 5, 7, 9
Y	CN 102816245 A (GUO, Kai) 12 December 2012 (12.12.2012) see the abstract, claims 1-10, and embodiments 1-4	4, 5, 7, 9
A	CN 102816245 A (GUO, Kai) 12 December 2012 (12.12.2012) see the abstract, claims 1-10, and embodiments 1-4	1-3, 6, 8
A	WO 2009124721 A1 (FORSCHUNGSZENTRUM BORSTEL LEIB) 15 October 2009 (15.10.2009) see the whole document	1-9

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/CN2015/097734

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 104592360 A	06 May 2015	None	
CN 102816245 A	12 December 2012	None	
WO 2009124721 A1	15 October 2009	US 8633164 B2	21 January 2014
		ES 2535457 T3	11 May 2015
		JP 5550634 B2	16 July 2014
		EP 2271356 A1	12 January 2011
		JP 2011520422 A	21 July 2011
		EP 2108372 A1	14 October 2009
		EP 2271356 B1	28 January 2015
		US 2011105416 A1	05 May 2011

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2015/097734

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07K 7/08(2006.01)i; C07K 14/00(2006.01)i; C07K 19/00(2006.01)i; A61K 38/10(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61K 47/48(2006.01)i; A61P 31/04(2006.01)i; A61K 38/16(2006.01)i; A61P 31/10(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																				
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07K, A61K, A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS, CPRSABS, CNMED, DWPI, SIPOABS, CPEA, ISI WEB OF KNOWLEDGE, CNKI, BAIDU和检索词: 抗菌肽, 抗微生物肽, 抗生素肽, 碱性, 亮氨酸, 赖氨酸, 抗体, 互补决定区, 靶向, antibacterial peptide, antimicrobial peptide, AMP, antibiotics peptide, basic, Leu, Lys, antibody, CDR, target+等; 中国专利生物序列检索系统, Genbank, EMBL, STN和检索的序列: SEQ ID NOS:1-23、25-31。</p>																				
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>CN 104592360 A (中山大学) 2015年 5月 6日 (2015 - 05 - 06) 参见权利要求1-10, 说明书第[0007]-[0030]段, 实施例1-6</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>王良等. "利用亮氨酸和赖氨酸设计新型<math>\alpha</math>-螺旋抗菌肽" 微生物学通报, 第41卷, 第2期, 2014年 2月 20日 (2014 - 02 - 20), 参见摘要, 第314页右栏第2段-第317页右栏第2段</td> <td>1-3、6、8</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>王良等. "利用亮氨酸和赖氨酸设计新型<math>\alpha</math>-螺旋抗菌肽" 微生物学通报, 第41卷, 第2期, 2014年 2月 20日 (2014 - 02 - 20), 参见摘要, 第314页右栏第2段-第317页右栏第2段</td> <td>4、5、7、9</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 102816245 A (郭铠) 2012年 12月 12日 (2012 - 12 - 12) 参见摘要, 权利要求1-10, 实施例1-4</td> <td>4、5、7、9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 102816245 A (郭铠) 2012年 12月 12日 (2012 - 12 - 12) 参见摘要, 权利要求1-10, 实施例1-4</td> <td>1-3、6、8</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	CN 104592360 A (中山大学) 2015年 5月 6日 (2015 - 05 - 06) 参见权利要求1-10, 说明书第[0007]-[0030]段, 实施例1-6	1-9	X	王良等. "利用亮氨酸和赖氨酸设计新型 $\alpha$ -螺旋抗菌肽" 微生物学通报, 第41卷, 第2期, 2014年 2月 20日 (2014 - 02 - 20), 参见摘要, 第314页右栏第2段-第317页右栏第2段	1-3、6、8	Y	王良等. "利用亮氨酸和赖氨酸设计新型 $\alpha$ -螺旋抗菌肽" 微生物学通报, 第41卷, 第2期, 2014年 2月 20日 (2014 - 02 - 20), 参见摘要, 第314页右栏第2段-第317页右栏第2段	4、5、7、9	Y	CN 102816245 A (郭铠) 2012年 12月 12日 (2012 - 12 - 12) 参见摘要, 权利要求1-10, 实施例1-4	4、5、7、9	A	CN 102816245 A (郭铠) 2012年 12月 12日 (2012 - 12 - 12) 参见摘要, 权利要求1-10, 实施例1-4	1-3、6、8
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
PX	CN 104592360 A (中山大学) 2015年 5月 6日 (2015 - 05 - 06) 参见权利要求1-10, 说明书第[0007]-[0030]段, 实施例1-6	1-9																		
X	王良等. "利用亮氨酸和赖氨酸设计新型 $\alpha$ -螺旋抗菌肽" 微生物学通报, 第41卷, 第2期, 2014年 2月 20日 (2014 - 02 - 20), 参见摘要, 第314页右栏第2段-第317页右栏第2段	1-3、6、8																		
Y	王良等. "利用亮氨酸和赖氨酸设计新型 $\alpha$ -螺旋抗菌肽" 微生物学通报, 第41卷, 第2期, 2014年 2月 20日 (2014 - 02 - 20), 参见摘要, 第314页右栏第2段-第317页右栏第2段	4、5、7、9																		
Y	CN 102816245 A (郭铠) 2012年 12月 12日 (2012 - 12 - 12) 参见摘要, 权利要求1-10, 实施例1-4	4、5、7、9																		
A	CN 102816245 A (郭铠) 2012年 12月 12日 (2012 - 12 - 12) 参见摘要, 权利要求1-10, 实施例1-4	1-3、6、8																		
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																				
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>"&amp;" 同族专利的文件</p>																				
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2015年 12月 28日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2016年 2月 1日</p>																		
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>受权官员</p> <p>马振莲</p> <p>电话号码 (86-10)62412131</p>																		

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	WO 2009124721 A1 (FORSCHUNGSZENTRUM BORSTEL LEIB) 2009年 10月 15日 (2009 - 10 - 15) 参见全文	1-9



国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2015/097734

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	104592360	A	2015年 5月 6日	无			
CN	102816245	A	2012年 12月 12日	无			
WO	2009124721	A1	2009年 10月 15日	US	8633164	B2	2014年 1月 21日
				ES	2535457	T3	2015年 5月 11日
				JP	5550634	B2	2014年 7月 16日
				EP	2271356	A1	2011年 1月 12日
				JP	2011520422	A	2011年 7月 21日
				EP	2108372	A1	2009年 10月 14日
				EP	2271356	B1	2015年 1月 28日
				US	2011105416	A1	2011年 5月 5日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)