(19) 国家知识产权局

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115475232 A
(43) 申请公布日 2022.12.16

(21) 申请号 202211040273.X

(22) 申请日 2016.03.23

(30) 优先权数据
62/137,206 2015.03.23 US

(62) 分案原申请数据
201680025771.3 2016.03.23

(71) 申请人 激流生物科学有限公司
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 杰西·杰尼斯
L·爱德华·克莱门斯
亨利·W·洛佩兹　乔治·R·马丁
凯瑟琳·伍德伯恩

(74) 专利代理机构 北京弘权知识产权代理有限公司 11363
专利代理师 许伟群　李少丹

(51) Int.Cl.
A61K 38/10 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)
A61P 33/02 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

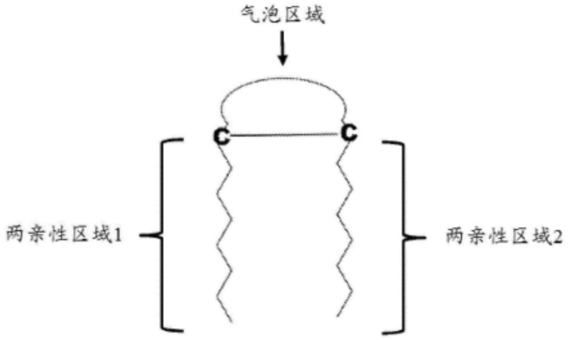
权利要求书2页　说明书18页　附图1页

(54) 发明名称

抗微生物肽及其使用方法

(57) 摘要

本发明的各方面涉及具有抗微生物活性的肽。在某些方面，本发明涉及具有强效抗微生物活性、广谱抗微生物活性和/或杀死另外的抗生素抗性微生物或受生物膜保护的微生物的能力的肽。



CN 115475232 A

1.一种包含抗微生物肽的抗微生物组合物,其中所述抗微生物肽包含与SEQ ID NO:23、25、17、12、13、27、1至6、8、9、14至16、18至22、24、26以及28至30中任一个具有至少60%序列同一性的氨基酸序列。

2.如权利要求1所述的抗微生物组合物,其中所述抗微生物肽有效地杀死至少一种细菌、真菌或原生动物生物体。

3.如权利要求2所述的抗微生物组合物,其中所述生物体是分类在选自由以下组成的组的属中的物种:不动杆菌属、放线杆菌属、伯克霍尔德氏菌属、假丝酵母属、梭菌属、肠杆菌属、肠球菌属、埃希氏菌属、梭杆菌属、卟啉单胞菌属、假单胞菌属、葡萄球菌属和链球菌属。

4.如权利要求3所述的抗微生物组合物,其中所述生物体选自由以下组成的组:鲍曼不动杆菌、伴放线放线杆菌、洋葱伯克霍尔德氏菌、泰国伯克霍尔德氏菌、白假丝酵母、克鲁斯假丝酵母、热带假丝酵母、艰难梭菌、产气肠杆菌、阴沟肠杆菌、屎肠球菌、大肠埃希氏菌、具核梭杆菌、牙龈卟啉单胞菌、铜绿假单胞菌、铜绿假单胞菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌和肺炎链球菌。

5.如权利要求2至4中任一项所述的抗微生物组合物,其中所述抗微生物肽有效地杀死作为微生物生物膜生长的微生物。

6.如任一前述权利要求所述的抗微生物组合物,其中所述抗微生物肽包含具有与微生物病原体的膜结合的阳离子表面的两亲性区域。

7.如任一前述权利要求所述的抗微生物组合物,其中所述抗微生物肽包含聚脯氨酸螺旋结构。

8.如任一前述权利要求所述的抗微生物组合物,其中所述抗微生物肽在N末端、C末端或两者上包含疏水性尾部区域,其中所述疏水性尾部区域具有4个至10个疏水性氨基酸的序列。

9.如权利要求8所述的抗微生物组合物,其中所述疏水性尾部区域具有SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列。

10.如任一前述权利要求所述的抗微生物组合物,其中所述抗微生物肽包含两个两亲性区域。

11.如权利要求10所述的抗微生物组合物,其中所述两个两亲性区域通过接头连接在一起。

12.如权利要求11所述的抗微生物组合物,其中所述接头包含气泡区域或β转角。

13.如权利要求10至12中任一项所述的抗微生物组合物,其中所述两个两亲性区域形成二聚体结构。

14.如权利要求10至13中任一项所述的抗微生物组合物,其中所述两个两亲性区域具有相同的氨基酸序列。

15.如权利要求10至13中任一项所述的抗微生物组合物,其中所述两个两亲性区域具有不同的氨基酸序列。

16.如任一前述权利要求所述的抗微生物组合物,其中所述抗微生物肽包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:23、25、17、12、13、27、1至6、8、9、14至16、18至22、24、26、28至30;与SEQ ID NO:23、25、17、12、13、27、1至6、8、9、14至16、18至22、24、26、28至30的

任一个具有5个或更少的氨基酸差异的氨基酸序列；和其通过接头连接的同二聚体或异二聚体。

17.一种药物组合物，其包含如权利要求1至16中任一项所述的抗微生物组合物和药学上可接受的载体。

18.如权利要求17所述的药物组合物，其中所述组合物被配制用于口服施用、肠胃外施用或局部施用。

19.如权利要求18所述的药物组合物，其中所述组合物被配制用于口服施用，并且还包含肠溶包衣。

20.如权利要求18所述的药物组合物，其中所述组合物被配制用于以选自由以下组成的组的形式进行局部递送：凝胶混悬剂、霜剂、微针以及浸渍至绷带或局部贴剂中。

21.如权利要求17至20中任一项所述的药物组合物，其还包含另外的生物活性剂。

22.如权利要求21所述的药物组合物，其中所述另外的生物活性剂选自由以下组成的组：抗微生物剂、抗炎药、抗恶心药、抗疼痛药物及其组合。

23.如权利要求17所述的药物组合物，其中所述组合物被配制以涂覆在可植入医疗装置的表面上。

24.如权利要求23所述的药物组合物，其中所述医疗装置选自由手术器械和留置医疗装置组成的组。

25.一种在有此需要的受试者中治疗或预防微生物感染的方法，所述方法包括向所述受试者施用根据权利要求17至24中任一项所述的药物组合物。

26.如权利要求25所述的方法，其中向所述受试者口服、肠胃外或局部施用所述药物组合物。

27.如权利要求25所述的方法，其中通过在将医疗装置插入所述受试者之前将所述组合物施加于所述医疗装置的表面来向所述受试者施用所述药物组合物。

28.如权利要求25至27中任一项所述的方法，其中所述受试者选自由以下组成的组：人、驯养动物、农场动物和动物园动物。

抗微生物肽及其使用方法

[0001] 分案说明

[0002] 本申请是2017年11月3日提交的申请号为201680025771.3的中国专利申请“抗微生物肽及其使用方法”的分案申请。

[0003] 相关申请的交叉引用

[0004] 根据35 U.S.C.§119(e),本申请要求2015年3月23日提交的美国临时专利申请序列号62/137,206的优先权的权益,所述申请的公开内容据此通过引用整体并入本文。

技术领域

[0005] 本发明总体涉及具有抗微生物活性的肽。更具体地,本发明涉及具有强效抗微生物活性、广谱抗菌活性和/或杀死另外的抗生素抗性细菌或受生物膜保护的细菌的能力的肽。

背景技术

[0006] 抗生素抗性是一个主要的健康问题。这部分归因于不仅在医药中而且在农牧业中广泛使用抗生素。这种过度使用,在杀死易感生物体的同时,也已创造了强大的抗生素抗性细菌选择偏向。所得菌株对具有减弱的免疫系统的个体造成特殊问题。另外,它们代表了针对住院患者的日益严重的问题。

[0007] 除了显示遗传的抗生素抗性以外,许多新出现的细菌菌株可存在于称为生物膜的复杂关联物中。生物膜的结构构成对抗生素暴露的物理屏障。生物膜可以在组织中和组织上,特别是在慢性伤口和医疗植入物(诸如留置导管、人造器官等)上形成,其中它们具有引起需要冒险式治疗的全身性感染的潜力。迫切需要针对以游离形式和生物膜形式存在的抗生素抗性生物体具有活性的材料。

[0008] 许多生物体(包括昆虫、两栖动物、哺乳动物和人),作为它们对细菌的天然防御的一部分,产生抗微生物肽。此类肽是化学多样化的。有些肽似乎通过穿透细菌细胞膜并破坏细胞膜而起作用。其它肽影响细菌细胞过程。观察到相当大的选择性,其中许多肽优先于宿主细胞地靶向细菌。不幸的是,宿主产生的抗微生物肽不能有效地消除广泛的微生物剂,包括许多抗生素抗性细菌菌株。因此,能够增强宿主的抗微生物防御的抗微生物肽是符合需要的。

发明内容

[0009] 在某些实施方案中,本发明提供抗微生物肽。所述肽可具有抗细菌、抗真菌和/或抗原生动物活性。所述肽可具有杀死对常规抗生素具有抗性的微生物菌株的能力。在某些实施方案中,本发明的抗微生物肽能够杀死以微生物生物膜形式生长的微生物(例如,细菌)。

[0010] 在某些实施方案中,本发明的抗微生物肽具有与对特定微生物膜区产生亲和力的总阳离子电荷、疏水性、体积和质量关联的两亲性结构。因此,抗微生物肽可包含至少一个

两亲性区域。两亲性区域可包含适于结合细菌膜的阳离子表面。抗微生物肽可包含通过第三区域诸如气泡区域或β-转角连接在一起的两个两亲性区域。在某些实施方案中，两个两亲性区域可二聚化为异二聚体或同二聚体。在本发明中设想了将各种结构域从一个肽交换至另一个肽或在肽中复制结构域来增强对临床应用重要的活性、药效学或类似特征。

[0011] 本发明的抗微生物肽包含氨基酸残基。在某些实施方案中，氨基酸残基是天然存在的L-氨基酸残基。在一些实施方案中，抗微生物肽中的一个或多个氨基酸残基可以是非天然存在的氨基酸残基、D-氨基酸残基和/或β-氨基酸残基。在某些实施方案中，本发明的抗微生物肽具有抗蛋白酶解的序列。例如，肽可包含赋予蛋白酶抗性的天然或非天然存在的氨基酸残基。

[0012] 在某些实施方案中，抗微生物肽对非哺乳动物细胞具有特异性。例如，肽杀死目标微生物细胞的效力为杀死宿主哺乳动物(例如，人)细胞的10^2倍、10^3倍、10^4倍、10^5倍或更多倍。本发明的一些抗微生物肽对一种类型的微生物生物体具有活性但对其它类型的微生物生物体不具有活性，从而提供了抗微生物选择性。例如，本发明的某些肽可以杀死抗生素抗性目标细菌，同时对其它细菌菌株，特别是共生细菌(例如，通常存在于哺乳动物诸如人的肠腔中的细菌)具有最小的影响。

[0013] 在一些实施方案中，本发明提供包含本发明的一种或多种抗微生物肽的组合物，特别是药物组合物。此类组合物可被配制用于口服施用、肠胃外施用、局部施用等。配制用于口服递送的组合物可以例如包含肠溶包衣，以确保其中所含的抗微生物肽到达肠和更远的部位。可将配制用于局部递送的组合物例如混悬在凝胶剂或霜剂中或浸渍至绷带中，以延长其中所含的抗微生物肽的作用持续时间。或者，可将本发明的抗微生物肽涂覆在医疗装置诸如手术器械和留置医疗装置(例如，起搏器、导管、人工关节等)的表面上，作为防止感染的手段。

[0014] 在一些实施方案中，本发明提供了治疗微生物感染或预防性预防此类感染的方法。所述方法可包括施用含有本发明的一种或多种抗微生物肽的组合物。可通过口服、肠胃外，局部等施用组合物。口服或肠胃外施用可用于治疗例如全身感染。局部施用可用于治疗例如伤口或烧伤。为了治疗需要留置医疗装置(诸如导管或人工关节)的患者，治疗可包括在将医疗装置插入患者之前将一种或多种抗微生物肽施加于所述医疗装置。该方法可用于治疗各种动物，特别是哺乳动物，诸如人、驯养动物、农场动物、动物园动物、野生动物等中的任何一种。

附图说明

[0015] 图1显示根据本发明的一个方面的发夹肽的简图。

[0016] 图2显示本发明的两种肽(分别称为“RP-439”和“RP-442”;SEQ ID NO:18和21)相较于抗生素万古霉素的针对与医院内获得性感染相关的选定的微生物生物体的活性的数据。所测试的与医院内获得性感染相关的生物体是金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)、铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)和艰难梭菌(Clostridium difficile)。

具体实施方式

[0017] 如上所述，本文公开的本发明涉及抗微生物多肽和向受试者施用此类抗微生物多肽以预防或治疗微生物感染的方法。

[0018] 在更详细地描述本发明之前，应当理解，本发明不限于所描述的特定实施方案，所述实施方案同样地当然可以变化。还应当理解，本文使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的，并不旨在限制，因为本发明的范围将仅由所附权利要求限制。

[0019] 当提供数值范围时，应当理解，介于该范围上限与下限之间的每个居间值(直至下限单位的十分之一，除非上下文另有明确指出)以及该所述范围内的任何其它所述值或居间值均涵盖在本发明内。这些较小范围的上限和下限可独立地包含在所述较小范围内，并且也涵盖在本发明内，受所述范围内任何具体排除的限值的约束。当所述范围包括所述限值的一个或两个时，排除这些所含限值一者或两者的范围也包括在本发明内。

[0020] 本文中提供了某些在数值之前加有术语“约”的范围。术语“约”在本文中用于为其之后的确切数字以及与所述术语之后的数字接近或近似的数字提供文字支持。在确定数字是否与明确引用的数字接近或近似中，接近或近似的未引用的数字可以是在其出现的上下文中提供明确引用的数字的基本等同物的数字。

[0021] 除非另外定义，否则本文中所使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域内的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。虽然与本文中描述的方法和材料相似或等同的任何方法和材料也可用于实施或测试本发明，但现在描述代表性举例说明的方法和材料。

[0022] 本说明书中引用的所有公布和专利通过引用并入本文，就如同特定地及个别地表明各个公布或专利通过引用并入，并且通过引用并入本文以公开和描述与公布一起被引用的方法和/或材料。任何公布的引用是针对其提交日期之前的公开内容，并且不应当解释为承认本发明无权先于因先前发明所作的此类披露。另外，提供的公布日期可与可能需要独立确认的实际公布日期不同。

[0023] 应指出的是，如本文和所附权利要求中所使用的，除非上下文明确地另有说明，否则单数形式“一种/个(a)”、“一种/个(an)”和“该/所述(the)”包括复数指示物。还应指出，可撰写权利要求来排除任何可选元素。这样，该陈述意图用作与权利要求要素的描述联合使用此类排他性术语如“单独地”、“仅仅”等或使用“否定(negative)”限制的在先基础。

[0024] 对于本领域技术人员在阅读本公开时将显而易见的是，本文描述和所示的单个实施方案的每一个具有可容易地与其它几个实施方案的任一个的特征分开或组合的分立的组分和特征而不背离本发明的范围或精神。可以以所引用事件的顺序或以逻辑上可能的任何其它顺序进行任何引用的方法。

[0025] 术语“肽”和“多肽”在本文中同义地用于指从氨基酸残基构建的聚合物。

[0026] 如本文中所用，术语“氨基酸残基”是指任何天然存在的氨基酸(L或D形式)、非天然存在的氨基酸或氨基酸模拟物(诸如类肽单体)。

[0027] 多肽的“长度”是构成多肽的首尾相接的氨基酸残基的数目，不包括多肽可含有的任何非肽接头和/或修饰。

[0028] “接头”或“接头序列”可以是将两个肽序列连接在一起的任何部分。在一些实施方案中，接头是与被连接在一起的肽序列共线的氨基酸序列，而在其它实施方案中，接头是例

如通过共价键联附接至两个肽序列的单独部分。接头可以是氨基酸序列或是非氨基酸部分。在某些实施方案中,使用接头来促进两个两亲性区域的二聚化。

[0029] 疏水性氨基酸残基的特征在于主要具有非极性化学性质的官能团(“侧链”)。此类疏水性氨基酸残基可以是天然存在的(L或D型)或非天然存在的。或者,疏水性氨基酸残基可以是以主要具有非极性化学性质的官能团(“侧链”)为特征的氨基酸模拟物。相反地,亲水性氨基酸残基的特征在于主要具有极性(带电荷或不带电荷)的化学性质的官能团(“侧链”)。此类亲水性氨基酸残基可以是天然存在的(L或D型)或非天然存在的。或者,亲水性氨基酸残基可以是以主要具有极性(带电荷或不带电荷)的化学性质的官能团(“侧链”)为特征的氨基酸模拟物。亲水性和疏水性氨基酸残基的实例示于下表1中。合适的非天然存在的氨基酸残基和氨基酸模拟物是本领域已知的。参见,例如Liang等(2013),“An Index for Characterization of Natural and Non-Natural Amino Acids for Peptidomimetics,” PLoS ONE 8(7):e67844。

[0030] 虽然大多数氨基酸残基可被认为是疏水的或亲水的,但少数氨基酸残基,取决于它们的背景,可表现为疏水的或亲水的。例如,甘氨酸、脯氨酸和/或半胱氨酸由于它们相对弱的非极性特性,有时可用作亲水性氨基酸残基。相反,组氨酸和精氨酸由于它们庞大的略微疏水的侧链,有时可用作疏水性氨基酸残基。

[0031] 表1:疏水性和亲水性氨基酸残基

[0032]

亲水性残基(X)	疏水性残基(Y)
精氨酸	色氨酸
组氨酸	苯丙氨酸
赖氨酸	酪氨酸
天冬氨酸	异亮氨酸
谷氨酸	亮氨酸
天冬酰胺	缬氨酸
谷氨酰胺	甲硫氨酸
吡咯赖氨酸	半胱氨酸
鸟氨酸	苏氨酸
	丝氨酸
	丙氨酸
	脯氨酸
	甘氨酸
	硒代半胱氨酸
	N-甲酰甲硫氨酸
	正亮氨酸
	正缬氨酸

[0033] 如下文中进一步详细描述的,本公开的方面包括具有至少一个具有特定程度的阳离子电荷的两亲性区域的抗微生物肽。在某些实施方案中,抗微生物肽包含尾部区域(例如,疏水性尾序列)。在某些实施方案中,抗微生物肽(或肽剂)包含两个或更多个两亲性区域。在此类实施方案中,抗微生物肽(或肽剂)的两个两亲性区域呈二聚体形式,其中所述两

个两亲性区域可具有相同或不同的氨基酸序列(即,为同二聚体或异二聚体)。在某些实施方案中,两个(或更多个)两亲性区域通过接头连接。接头可以是如用户所期望的连续(或呈线性)氨基酸序列或非氨基酸部分。接头可以是例如气泡区域或β转角区域。在某些实施方案中,抗微生物肽包含聚脯氨酸螺旋结构。

[0034] 示例性抗微生物肽序列如下所示。本领域技术人员可以通过以如本文所述的不同方式组合示例性抗微生物肽的不同区域来容易地设计另外的抗微生物肽。

[0035] 两亲性区域

[0036] 两亲性区域是指具有疏水性和亲水性元件或特征的肽区域,例如具有亲水性表面和疏水性表面的肽区域。当肽表现出两亲性特征时,肽区域被认为处于两亲性构象,这通常取决于在其下制备肽和/或所述肽所经历的条件。为了被认为是两亲性的,肽序列(或其部分)不必始终处于两亲性构象。相反,两亲性构象以至少50%、60%、70%、80%或更多的时间存在就足够了。

[0037] 在某些实施方案中,本发明的抗微生物肽的两亲性区域的长度可以为5个至35个氨基酸残基,所述两亲性区域的至少25%(例如,30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%或更多)的氨基酸序列表现出两亲性。在某些实施方案中,两亲性区域可包含1个至3个疏水性和1个至3个亲水性氨基酸残基的交替序列。因此,两亲性区域可以由式$(X_{1-3}Y_{1-3})_n$表示,其中X表示亲水性氨基酸残基,Y表示疏水性氨基酸残基,n为2至15的整数。例如,两亲性区域可以具有根据式1、式2(式1的反向)或式3的序列:

[0038] 式1:XYYXXYYXXYXXYYXXYY

[0039] 式2:YYXXYYXXYXXYYXXYYX

[0040] 式3:XYXYXYXYXYXYXYX

[0041] 每个疏水性氨基酸残基Y选自由以下组成的组:天然存在的疏水性氨基酸、非天然存在的疏水性氨基酸和疏水性氨基酸模拟物。每个亲水性氨基酸残基X选自由以下组成的组:天然存在的亲水性氨基酸、非天然存在的亲水性氨基酸和亲水性氨基酸模拟物。通常,两亲性构象将与特定的二级结构诸如螺旋结构相关联。因此,抗微生物多肽的两亲性区域可具有两亲性3_{10}-螺旋构象、两亲性α-螺旋构象、两亲性π-螺旋构象或两亲性聚脯氨酸螺旋构象。或者,抗微生物多肽的两亲性区域可具有两亲性β-链构象。

[0042] 在某些实施方案中,根据本公开的方面的抗微生物肽的两亲性区域包含一个或多个(例如,2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多个)大的疏水性氨基酸残基。大的疏水性氨基酸残基的实例包括色氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸。另外,在某些情况下,组氨酸或精氨酸可以被认为是大的疏水性氨基酸残基。在某些实施方案中,根据本公开的方面的抗微生物肽的两亲性区域包含一个或多个(例如,2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多个)小的疏水性氨基酸残基。小的疏水性残基的实例包括甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、半胱氨酸、缬氨酸、苏氨酸和脯氨酸。在某些实施方案中,抗微生物多肽具有包含大的和小的疏水性残基的组合的两亲性区域。

[0043] 两亲性区域的具体实例包括:

[0044] RVFKKAFRKFKKLFKRAF(SEQ ID NO:1);

[0045] FARKFLKKFKRFAKKFVR(SEQ ID NO:2);和

[0046] FKRKIKAKLRFKAKVRLK(SEQ ID NO:3)。

[0047] <u>阳离子电荷/表面</u>

[0048] 根据本公开的方面的抗微生物多肽包含具有阳离子表面的两亲性区域。在某些实施方案中，两亲性区域具有阳离子电荷(即，电荷>0，例如，+1、+2、+3、+4、+5、+6、+7、+8、+9、+10或更多)。因此，在某些实施方案中，所公开的肽的两亲性区域含有一个或多个极性阳离子氨基酸残基(即，具有带正电荷的侧链)。具有带正电的侧基(假设生理条件)的氨基酸残基的实例包括赖氨酸，通常是精氨酸，有时是组氨酸。因此，抗微生物多肽可具有包含1个至20个阳离子氨基酸残基的两亲性区域。因此，本发明的抗微生物肽可包含极性氨基酸残基，其至少40％(例如，50％、60％、70％、80％、90％或100％)是带阳离子电荷的(例如Arg、Lys、His)。

[0049] <u>尾部区域</u>

[0050] 在某些实施方案中，抗微生物肽包含尾部区域。本发明的抗微生物肽的尾部区域的长度可为3个至15个氨基酸残基，至少50％(例如，60％、70％、75％、80％、85％、90％或更多)的尾部区域中的氨基酸残基是疏水性的。尾部区域可位于抗微生物肽的N末端、C末端或两个末端。在某些实施方案中，尾部区域每6个氨基酸包括一个极性氨基酸。尾部区域序列的实例示于式4中，其中Y表示疏水性氨基酸残基。

[0051] 式4:YYYYY

[0052] 根据本发明方面的包括具有序列FAFAF(SEQ ID NO:4)的尾部区域的抗微生物肽的具体实例包括(尾部区域加以下划线)：

[0053] <u>FAFAF</u>RVFKKAFRKFKKLFKRAF(SEQ ID NO:5)；和

[0054] FARKFLKKFKRFAKKFVR<u>FAFAF</u>(SEQ ID NO:6)。

[0055] <u>气泡区域</u>

[0056] 在某些实施方案中，抗微生物肽包含气泡区域。本发明的抗微生物肽的“气泡”区域由一段在每个末端处侧接半胱氨酸残基(C)的氨基酸残基组成(见图1)。半胱氨酸残基之间的氨基酸残基的区段的长度可以是2个至10个氨基酸残基，并且可由疏水性和亲水性氨基酸的任何组合组成。气泡区域可连接两个两亲性区域并促进抗微生物肽形成发夹二级结构(见图1)。因此，该区域可被分类为一种类型的“接头区域”(本文别处所述的其它区域也可被分类为所述类型)。在某些实施方案中，发夹二级结构可显著增强抗微生物活性。

[0057] 气泡区域可以具有例如如式5所示的序列，其中Y表示疏水性氨基酸残基，X表示亲水性氨基酸残基。

[0058] 式5:C(Y/X)(Y/X)(Y/X)(Y/X)C

[0059] 本发明的包含具有序列CLGRFC(SEQ ID NO:7)的气泡区域的抗微生物肽的具体实例包括：

[0060] KIRAKL<u>CLGRFC</u>IRAKLR(SEQ ID NO:8)；和

[0061] KIKARL<u>CLGKFC</u>IKARLK(SEQ ID NO:9)。

[0062] <u>二聚化</u>

[0063] 不期望受理论的限制，据信本发明的抗微生物肽的功效在很大程度上取决于目标微生物(例如，细菌细胞)的细胞膜上的肽二聚化和群集。据信二聚体在穿透和最终裂解细胞膜方面更加高效。当例如使用接头区域将肽物理连接在一起时，此类二聚体的形成在热力学上可更有利。接头区域可包含另外的氨基酸残基(例如，如上所述的气泡区域)或为不

含氨基酸的接头部分。

[0064] β转角区域

[0065] β转角序列可用于物理地连接单个单体，使得分子内相互作用更可能发生。这对于两亲性裂解肽似乎是特别重要的，因为其允许它们的疏水性表面被保护而不受水相的影响。β-转角序列允许两个链内两亲性区域形成反向平行取向的二聚体。因此，该区域可被分类为一种类型的“接头区域”(本文别处所述的其它区域也可被分类为所述类型)。例如，SEQ ID NO:6(如上所示的)的单体以1.26μM的浓度杀死了大于2个对数的金黄色葡萄球菌，而SEQ ID NO:12(如下所示的)的二聚体以小于0.156μM的浓度杀死了大于2个对数的相同细菌(见实施例5)。

[0066] β-转角序列可以是本领域已知的任何β-转角序列。β-转角序列可具有例如SEQ ID NO:10所示的序列，其中Y表示疏水性氨基酸残基，X表示亲水性氨基酸残基(即，任何氨基酸残基)。

[0067] (Y/X)GPGR(Y/X)(SEQ ID NO:10)

[0068] 本发明的包含具有序列FGPGRF(SEQ ID NO:11)的β-转角序列的抗微生物肽的具体实例包括：

[0069] FAFAFKAFKKAFKKFKKAFKKAFGPGRFAKKFAKKFKKFAKKFAKFAFAF(SEQ ID NO:12)

[0070] 聚脯氨酸螺旋二级结构

[0071] 不期望受理论的限制，据信，其中重复脯氨酸残基的螺旋结构(导致每转角约3.0个氨基酸残基，而不是每转角更常见的3.6个氨基酸残基)，可导致所得肽的半衰期延长。可在保持如上所示的必要结构特征(包含两亲性区域、阳离子电荷和任选的尾部区域)的同时形成此类螺旋。

[0072] 抗微生物肽的实例

[0073] 下面在表2中提供了根据本发明的方面的抗微生物肽的实例。这些实施例是代表性的，并不意味着限制本发明的范围。下面所列序列中的“O”残基代表氨基酸鸟氨酸。

[0074] 表2:抗微生物肽的实例

[0075]

RP #	SEQ ID	氨基酸序列
Na	SEQ ID NO: 1	RVFKKAFRKFKKLFKRAF
Na	SEQ ID NO: 2	FARKFLKKFKRFAKKFVR
Na	SEQ ID NO: 3	FKRKIKAKLRFKAKVRLK
Na	SEQ ID NO: 5	FAFAFRVFKKAFRKFKKLFKRAF
Na	SEQ ID NO: 6	FARKFLKKFKRFAKKFVRFAFAF
Na	SEQ ID NO: 8	KIRAKLCLGRFCIRAKLR
Na	SEQ ID NO: 9	KIKARLCLGKFCIKARLK
RP-433	SEQ ID NO: 12	FAFAFKAFKKAFKKFKKAFKKAFGPGRFAKKFAKK FKKFAKKFAKFAFAF
RP-434	SEQ ID NO: 13	FAKKFAKKFKKFAKKFAKFAFAFGPGRFAFAFKAF KKAFKKFKKAFKKAF
RP-435	SEQ ID NO: 14	MGFKLRAKIKVRLRAKIKL

[0076]

RP-436	SEQ ID NO: 15	CVOLFPVOLFPC
RP-437	SEQ ID NO: 16	CKLRFRGPGRIKVRLC
RP-438	SEQ ID NO: 17	CPGFAKKFAKKFKKFAKKFAKFAFAF
RP-439	SEQ ID NO: 18	KIRAKLCLGRFCIRAKLR
RP-440	SEQ ID NO: 19	KKKPKPPYLPKPKPPPFFPPKLPPKI
RP-441	SEQ ID NO: 20	FAFAFKAFKKAFKKFKKAFKKAFGPC
RP-442	SEQ ID NO: 21	FAFAFAFKKAFKKFKKAFKKAF
RP-443	SEQ ID NO: 22	FAFAFOAFOOAFOOFOOAFOOAF
RP-444	SEQ ID NO: 23	FAOOFAOOFOOFAOOFAOFAFAF
RP-445	SEQ ID NO: 24	FAKKFAKKFKKFAKKFAFAFAF
RP-500	SEQ ID NO: 25	RLARIVGGFAOOFAOOFOOFAOOFAOFAFAF
RP-501	SEQ ID NO: 26	CRLARIVCGGFAOOFAOOFOOFAOOFAOFAFAF
RP-504	SEQ ID NO: 27	FOIOAOLGGCLGOFCGGIOAOLOF
RP-505	SEQ ID NO: 28	OLOSLLKTLSOAOOOOLOTOOOAISO
RP-507	SEQ ID NO: 29	ALWMTLOOOVLOAOAOALNAVLVGANA
RP-508	SEQ ID NO: 30	AFAFTAOOOFAOFOAOFANFAFAGFNA

[0077] 因此，本发明还提供了多肽，所述多肽包含与本文公开的任一种抗微生物多肽(例如，如表xx中所示的)具有至少50％同一性(例如，至少60％、70％、80％、90％、95％、98％、99％或更多同一性)的氨基酸序列，并且仍保留至少一种抗微生物性质。在某些实施方案中，此类多肽序列包含具有如上详述的阳离子电荷的两亲性区域。此外，此类多肽可包括如本文所述的另外的结构特征，包括：气泡区域、β-转角区域、聚脯氨酸螺旋结构、尾部、两亲性区域二聚体等。

[0078] 因此，在某些实施方案中，本发明提供了多肽，所述多肽包含与本文公开的任一种抗微生物多肽(例如，如表xx中所示的)具有1个至10个氨基酸差异(例如，10个或更少、9个或更少、8个或更少、7个或更少、6个或更少、5个或更少、4个或更少、3个或更少、2个或更少或1个氨基酸差异)的氨基酸序列，并且仍保留至少一种抗微生物性质。如本文中所用，“氨基酸差异”包括：氨基酸取代、氨基酸插入、末端氨基酸添加、氨基酸缺失、末端氨基酸截短或其任意组合。取代的氨基酸残基(或多个残基)可与被替换的氨基酸残基不相关(例如，在疏水性/亲水性、尺寸、电荷、极性等方面不相关)，或者取代的氨基酸残基可构成相似的、保守的或高度保守的氨基酸取代。如本文中所用，“相似的”、“保守的”和“高度保守的”氨基酸取代是如下表3中所示定义的。氨基酸残基取代是否相似、保守或高度保守的确定完全基于氨基酸残基的侧链而不是肽主链，可修饰所述肽主链以增加肽的稳定性，如下所论述的。

[0079] 表3：氨基酸取代的分类

[0080]

主题多肽中的氨基酸	相似的氨基酸取代	保守的氨基酸取代	高度保守的氨基酸取代
甘氨酸(G)	A,S,N	A	n/a
丙氨酸(A)	S,G,T,V,C,P,Q	S,G,T	S
丝氨酸(S)	T,A,N,G,Q	T,A,N	T,A
苏氨酸(T)	S,A,V,N,M	S,A,V,N	S
半胱氨酸(C)	A,S,T,V,I	A	n/a
脯氨酸(P)	A,S,T,K	A	n/a
甲硫氨酸(M)	L,I,V,F	L,I,V	L,I
缬氨酸(V)	I,L,M,T,A	I,L,M	I
亮氨酸(L)	M,I,V,F,T,A	M,I,V,F	M,I
异亮氨酸(I)	V,L,M,F,T,C	V,L,M,F	V,L,M
苯丙氨酸(F)	W,L,M,I,V	W,L	n/a
酪氨酸(Y)	F,W,H,L,I	F,W	F
色氨酸(W)	F,L,V	F	n/a
天冬酰胺(N)	Q	Q	Q
谷氨酰胺(Q)	N	N	N
天冬氨酸(D)	E	E	E
谷氨酸(E)	D	D	D
组氨酸(H)	R,K,O*	R,K,O	R,K,O
赖氨酸(K)	R,H,O	R,H,O	R,H,O
精氨酸(R)	K,H,O	K,H,O	K,H,O

[0081] *“O”表示鸟氨酸。

[0082] 组合物

[0083] 本公开提供了包含如本文所述的抗微生物多肽的组合物。例如，抗微生物多肽可以是表2中列出的任何多肽或其保留抗微生物活性的片段或变体。在某些实施方案中，包含在本发明的组合物中的抗微生物多肽将是合成多肽(例如，通过化学合成制成的和/或重组

产生的)。

[0084] 本发明的组合物可包含单一抗微生物多肽或不同抗微生物多肽的组合。组合物可基本上不含蛋白质和其它多肽。如本文中所用,术语“基本上不含蛋白质和其它多肽”意指少于5%的组合物的蛋白质含量由不是本发明的抗微生物多肽的蛋白质和其它多肽组成。本发明的基本上不含非抗微生物多肽的组合物可具有少于4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、0.01%或更少的其它非抗微生物多肽。

[0085] 在某些实施方案中,本发明的组合物含有不是天然存在于人或其它哺乳动物或动物中的抗微生物多肽。

[0086] 本发明的组合物可包含至少1mg(例如,至少5mg、10mg、20mg、30mg、40mg、50mg、75mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg、500mg、600mg、700mg、800mg、900mg、1000mg或更多)的抗微生物多肽。因此,例如,组合物可包含一定量的抗微生物多肽,该量等于约1mg至约1000mg(例如,约5mg至约900mg、约5mg至约800mg、约5mg至约700mg、约5mg至约600mg、约10mg至约500mg、约10mg至约400mg、约10mg至约300mg、约10mg至约250mg、约10mg至约200mg、约10mg至约150mg、约10mg至约100mg、约50mg至约500mg、约50mg至约400mg、约50mg至约300mg、约50mg至约250mg、约50mg至约200mg、约50mg至约150mg、约50mg至约100mg、约75mg至约500mg、约75mg至约400mg、约75mg至约300mg、约75mg至约250mg、约75mg至约200mg、约75mg至约150mg、约75mg至约100mg、约100mg至约500mg、约100mg至约400mg、约100mg至约300mg、约100mg至约250mg、约100mg至约200mg、或含有前述终点中的两个终点的任何其它范围)。

[0087] 本发明的组合物可包括含有至少1mg/ml(例如,至少5mg/ml、10mg/ml、15mg/ml、20mg/ml、25mg/ml、30mg/ml、35mg/ml、40mg/ml、45mg/ml、50mg/ml、55mg/ml、60mg/ml、65mg/ml、70mg/ml、75mg/ml、80mg/ml、85mg/ml、90mg/ml、95mg/ml、100mg/ml或更多)的抗微生物多肽的溶液。因此,例如,组合物可包括具有为以下浓度的抗微生物多肽浓度的溶液:约1mg/ml至约1000mg/ml(例如,约5mg/ml至约900mg/ml、约5mg/ml至约800mg/ml、约5mg/ml至约700mg/ml、约5mg/ml至约600mg/ml、约5mg/ml至约500mg/ml、约10mg/ml至约500mg/ml、约10mg/ml至约400mg/ml、约10mg/ml至约300mg/ml、约10mg/ml至约250mg/ml、约10mg/ml至约200mg/ml、约10mg/ml至约150mg/ml、约10mg/ml至约100mg/ml、约50mg/ml至约500mg/ml、约50mg/ml至约400mg/ml、约50mg/ml至约300mg/ml、约50mg/ml至约250mg/ml、约50mg/ml至约200mg/ml、约50mg/ml至约150mg/ml、约50mg/ml至约100mg/ml、约75mg/ml至约500mg/ml、约75mg/ml至约400mg/ml、约75mg/ml至约300mg/ml、约75mg/ml至约250mg/ml、约75mg/ml至约200mg/ml、约75mg/ml至约150mg/ml、约75mg/ml至约100mg/ml、约100mg/ml至约500mg/ml、约100mg/ml至约400mg/ml、约100mg/ml至约300mg/ml、约100mg/ml至约250mg/ml、约100mg/ml至约200mg/ml、约10mg/ml至约150mg/ml,或包含前述终点中的两个终点的任何其它范围)。

[0088] 本发明的组合物包括药物组合物。此类药物组合物可包含一种或多种抗微生物多肽和药学上可接受的载体。药物组合物还可包含除本发明的抗微生物多肽外的活性成分。另一种活性成分可以是治疗剂/抗微生物剂,诸如常规抗生素。常规抗生素可具有本发明的抗微生物多肽增强或被其增强的抗微生物性质或其它性质。在某些实施方案中,药物组合物包含可被纯化或重组产生的载体,诸如载体蛋白,诸如血清白蛋白(例如,HAS、BSA等)。通

过将药物组合物中的抗微生物多肽与血清白蛋白混合，可将抗微生物多肽有效地“负载”至血清白蛋白上，从而允许更大量的抗微生物多肽被成功地递送至感染部位。本发明的药物组合物可被配制用于口服施用、肠胃外施用、局部施用等。经配制用于口服递送的组合物可以例如包含肠溶包衣，以确保其中所含的抗微生物肽到达肠和更远的部位。可将经配制用于局部递送的组合物例如混悬于凝胶剂或霜剂中或浸渍至绷带中，以延长其中所含的抗微生物肽的作用持续时间。或者，可将本发明的抗微生物肽涂覆在医疗装置诸如手术器械和留置医疗装置(例如，起搏器、导管、人工关节等)的表面上，作为防止感染的手段。

[0089] 方法

[0090] 本发明的抗微生物多肽提供了用于治疗或预防受试者中的微生物感染的强大工具。因此，本发明提供了在受试者中消除、减少至少一种微生物生物体的数量或显著减少其复制的方法。受试者可以是任何动物，诸如驯养动物(例如，马、牛、猪、山羊、绵羊、兔、鸡、火鸡、鸭等)、宠物(例如，狗、猫、兔、仓鼠、沙鼠、鸟、鱼等)、实验动物(例如，小鼠、大鼠、猴、黑猩猩、猫头鹰、鱼等)、动物园动物(例如，大猩猩、猩猩、黑猩猩、猴、大象、骆驼、斑马、公猪、狮子、虎、长颈鹿、熊、鸟等)、野生动物(例如，鹿、狼、山狮、鸟等)或人类受试者(例如，患者)。

[0091] 可以以取决于动物的类型、动物的尺寸和所治疗的病状的剂量和频率施用抗微生物多肽。通常，以在约1mg与约1000mg之间(例如，约5mg至约900mg、约5mg至约800mg、约5mg至约700mg、约5mg至约600mg、约10mg至约500mg、约10mg至约400mg、约10mg至约300mg、约10mg至约250mg、约10mg至约200mg、约10mg至约150mg、约10mg至约100mg、约50mg至约500mg、约50mg至约400mg、约50mg至约300mg、约50mg至约250mg、约50mg至约200mg、约50mg至约150mg、约50mg至约100mg、约75mg至约500mg、约75mg至约400mg、约75mg至约300mg、约75mg至约250mg、约75mg至约200mg、约75mg至约150mg、约75mg至约100mg、约100mg至约500mg、约100mg至约400mg、约100mg至约300mg、约100mg至约250mg、约100mg至约200mg，或包含前述终点中的两个终点的任何其它范围)的量每日(或每隔一日或每周)一次施用抗微生物多肽。日剂量可在一天中施用一次，或分解成在一天中的多个时间点服用的较小剂量。对于人(和其它类似尺寸的哺乳动物)，可以每隔一天施用5mg/kg的剂量。可间隔(例如，施用多肽2-3周，等待2-3周，然后重复周期)施用抗微生物多肽，持续固定的时间段(例如2-3周)，或可施用抗微生物多肽直至此类时间，如微生物生物体已被消除或显著减少，微生物感染的症状已得到改善，或潜在的微生物感染风险已被降低或消除(例如，伤口已愈合)。

[0092] 可通过植入型长效制剂，使用基于纳米颗粒的递送系统、微针贴片、微球、珠粒、渗透或机械泵和/或其它机械装置来静脉内、腹膜内、肠胃外、原位、皮下、局部、经鼻、口服、舌下、眼内进行与任何上述方法结合的抗微生物多肽(或包含此类多肽的药物组合物)的施用。

[0093] 结合任何前述方法，可将抗微生物多肽(或包含此类多肽的药物组合物)与另一种药物(例如抗生素、抗病毒、抗真菌、抗原生动物、抗疟药或用于治疗非感染性疾病或其它病状的药物)组合施用。在某些实施方案中，另一种药物是可减轻疾病/微生物感染的症状(例如，减轻或预防发烧，治疗或预防恶心等)的药物。在每种情况下，可在施用其它药物之前、与之同时或之后施用抗微生物多肽。

[0094] 实施例

[0095]　提供下列实施例为本领域普通技术人员提供如何产生和使用本发明的完整公开内容和描述，并且无意限制本发明者视为它们的发明的范围，它们也无意表示下面的实验是进行的全部实验或唯一实验。已努力确保关于使用的数字(例如量、温度等)的准确性，但应当考虑一些实验误差和偏差。除非另外指出，否则份数是重量份，分子量是平均分子量，温度以摄氏度表示，并且压力是大气压或接近大气压。

[0096]　实施例1：针对浮游型革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌的活性

[0097]　按照厌氧菌的抗微生物易感性测试的M11-A8E CLSI标准(M11-A8E CLSI standard for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria)针对以下激发生物体测试肽：屎肠球菌(Enterococcus faecium)ATCC 700221；产气肠杆菌(Enterobacter aerogens)ATCC 13048；金黄色葡萄球菌MRSA ATCC 33591；肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)ATCC 49619；铜绿假单胞菌ATCC 27853；鲍曼不动杆菌(Acinetobacter baumannii)ATCC 17978D-5；铜绿假单胞菌ATCC 19660；和表皮葡萄球菌(Staphylococcus epidermidis)ATCC 51625。样品稀释度的范围是从初始样品至1:2048。由MQA实验室在96孔板上以一式两份测试十一(11)个浓度。结果在表4中显示为最低杀菌浓度(MBC)，其是对于八种激发生物体中的每一种产生99.9%致死率所必需的每种肽的浓度。(表4中的浓度是以μM计的所有测试的细菌的MBC平均值)。

[0098]　表4

[0099]

肽	SEQ ID NO	平均MBC(μM)
RP438	17	5.3
RP444	23	7.5
RP441	20	8.8
RP445	24	10.4
RP443	22	11.3
RP442	21	15.2
RP440	19	18
RP439	18	18.4
RP435	14	19.6
RP437	16	27.4
RP436	15	40.9

[0100]　实施例2：针对生物膜细菌的活性

[0101]　使用最低生物膜消除浓度(MBEC)测定法。MBEC值提供了杀死生物膜细菌所需的抗微生物产品的浓度的估计值。卡尔加里生物膜装置(CBD)板用于在包含96个栓的盖子上实现生物膜形成。将细菌培养物生长并在胰蛋白酶大豆肉汤(TSB)中稀释至约$1x10^7$CFU/mL，然后接种CBD板，然后将其在35℃下在振荡器上以125rpm孵育24小时。

[0102]　首先在PBS中冲洗含有生物膜的栓盖以除去浮游细胞，之后于35℃下用测试品的2倍连续稀释液和对照处理过夜。在PBS中冲洗栓盖两次，之后在于新鲜介质中超声处理以破坏附着至栓上的生物膜。然后将板孵育过夜以评估生长。通过测量650nm处的吸光度(A650)进行细菌定量。根据定义，小于0.1的A650读数表示生物膜根除。结果示于表5中。

[0103]　表5

[0104]

	平均 MBEC (μM)			
	肽			
细菌	RP438 (SEQ ID NO:17)	RP442 (SEQ ID NO:21)	RP443 (SEQ ID NO:22)	RP444 (SEQ ID NO:23)
金黄色葡萄球菌MRSA (G+)	12.89	14.68	7.36	14.41
表皮葡萄球菌(G+)	12.89	14.68	3.68	14.41
鲍曼不动杆菌(G-)	6.45	1.87	3.68	3.68
铜绿假单胞菌(G-)	51.43	234.28	57.62	57.62

[0105] 实施例3:针对生物威胁细菌(泰国伯克霍尔德氏菌(B.thailandensis))的活性

[0106] 如下测试测试品和比较抗生素(头孢他啶)的体外活性:在无菌96孔板中,用抗生素(对照)和肽在10mM磷酸盐缓冲液中的连续稀释液孵育(3小时,37℃)$1x10^5$CFU/孔的细菌。通过连续稀释在无菌PBS中的每个肽浓度下测定细菌存活率。将稀释液以一式三份铺在营养琼脂上,并在37℃下孵育24小时;然后计数菌落以测定存活率。通过每个实验板上的菌落数与缺乏任何抗微生物肽的对照板中的平均菌落数的比率来计算细菌存活率。通过绘制百分比存活率对比肽浓度的对数的曲线来确定杀死50%的泰国伯克霍尔德氏菌所需的抗微生物肽浓度(EC50)。通过将数据与标准S形剂量-反应曲线拟合来确定EC50。每个实验进行三次重复。表6显示了每种测试的肽和抗生素头孢他啶的EC50结果。

[0107] 表6

[0108]

肽	以 μM 计的 EC50
RP438 (SEQ ID NO:17)	11.21
RP442 (SEQ ID NO:21)	0.95
RP443 (SEQ ID NO: 22)	55.63
RP444 (SEQ ID NO:23)	14.77
头孢他啶	39.13

[0109] 实施例4:所选肽的抗细菌和抗真菌活性(IC50值)

[0110] 通过标准微米稀释法测定抗微生物和抗真菌活性的测量值。简言之,将细胞在针对每种菌株指定的培养基中生长过夜,并在相同的培养基中稀释。将所述肽的连续稀释液以50μl的体积添加至微量滴定板中,然后加入50ul细菌或真菌($5x10^5$CFU/ml)。将板在37度

下孵育24小时，并将最低抑制浓度(MIC)确定为抑制50%的细菌生长的最低肽浓度。表7显示每种测试的细菌分离株的以uM计的IC50，且表8显示每种测试的真菌的以uM计的IC50。

[0111]　表7:细菌细胞结果

[0112]

	IC50 (以 μM 计)		
	肽		
细菌	RP500 (SEQ ID NO:25)	RP501 (SEQ ID NO:26)	RP504 (SEQ ID NO: 27)
鲍曼不动杆菌			
分离株 6043	7.6	7.3	21.7
分离株 4838	7.6	29.0	43.3
大肠埃希氏菌 (E. coli)			
分离株 6571	3.8	7.3	10.8
分离株 6572	3.8	7.3	10.8
阴沟肠杆菌(E. cloaca)			
分离株 6053	7.6	14.5	10.8
分离株 6054	7.6	14.5	21.7
假单胞菌属 (Pseudomonas)			
Xen5	0.5	14.5	10.8
葡萄球菌属 (Staphylococcus)			
Xen36	3.8	14.5	10.8
平均值	5.3	13.6	17.6

[0113]　表8:真菌细胞结果

[0114]

	IC50 (以 uM 计)			
	肽			
真菌	RP504 (SEQ ID NO: 27)	RP505 (SEQ ID NO: 28)	RP507 (SEQ ID NO: 29)	RP508 (SEQ ID NO: 30)
白假丝酵母 (C. albicans)				
分离株 Y-326	43.3	17.5	79.9	-
分离株 Y-6359	43.3	8.8	40.0	38.3
克鲁斯假丝酵母 (C. krusei)				
分离株 Y-27803	2.7	17.5	20.0	38.3
分离株 Y-27825	2.7	17.5	20.0	38.3
热带假丝酵母 (C. tropicalis)				
分离株 Y-48158	-	8.8	40.0	76.6
分离株 Y-48166	-	8.8	40.0	38.3
平均值	23.0	13.2	43.3	46.0

[0115] 实施例5:筛选肽的体外杀菌活性

[0116] 测试的细菌包括洋葱伯克霍尔德氏菌(Burkholderia cepacia)菌株Toronto (B.c.)、牙龈卟啉单胞菌(Porphyromonas gingivalis)菌株A7436和HG405、伴放线放线杆菌(Actinobacillus actinomycetemcomitans)菌株A7154(A.a.)、具核梭杆菌(Fusobacterium nucleatum)菌株1594(F.n.)、大肠埃希氏菌(Escherichia coli)菌株(E.c.)、金黄色葡萄球菌ATCC菌株29213(S.a.)和铜绿假单胞菌菌株(P.a.)。将所有细菌在适当的培养基中于适当的气氛下生长至生长的早期指数期。用一定剂量的细菌接种培养基,以确保在收获前最少进行5次倍增。通过离心将培养物在盐水中洗涤两次,并以适当浓度重新混悬于盐水中。在初始筛选中,以在盐水中10μM的终浓度使用所有肽,目标细菌为10^6CFU/ml,如通过660nm处的光密度估计的。用等体积的盐水处理对照。将混悬剂在环境气氛中于37℃下孵育,并按时间(0至2小时)取出等分式样以定量回收菌落形成单位。这允许

测定各种肽杀死不同细菌菌株的动力学。一般地，在整个盐水对照组的两小时测试期期间，各种菌株的活力几乎没有或没有损失。然而，在该时期内，在具核梭杆菌和伴放线放线杆菌的对照中均存在显著的活力损失(>1log_{10})，但直到30分钟后才出现可检测到的降低。如果在肽处理的组中对比盐水处理的对照组存在可回收CFU的大于1个对数的减少，则杀死被认为是显著的。未能在10μM下杀死的肽被认为是无活性的。按照2倍、5倍或10倍稀释度滴定导致大于2个对数减少的任何肽，之后用10^6CFU/ml的目标细菌测试。终点滴定被测定为对比盐水处理的对照产生大于2个对数的可回收CFU减少的最终肽浓度(以μM计)(“2个-对数减少浓度”)。SEQ ID NO:12和6针对每种测试细菌的该2个-对数减少浓度以及所有细菌的平均值(最后一栏)示于表9中。

[0117] 表9

[0118]

	2个-对数减少浓度(以μM计)								
	细菌								
SEQ ID NO	B.c.	A7436	HG405	A.a.	F.n.	E.c.	S.a.	P.a.	平均值
12 (RP-433)	0.12	0.16	0.36	0.10	1.25	0.63	0.15	0.90	0.46
6	1.25	1.88	2.50	0.40	3.75	0.63	1.26	ND	1.67

[0119] 实施例6:杀死抗生素抗性细菌

[0120] 测试金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和艰难梭菌对RP-439和RP-442(分别为SEQ ID NO:18和21)的敏感性。这些生物体与医院内获得性感染有关。如实施例5中所述进行实验。图2显示在加入指定的肽或万古霉素后1小时的时间点获得的结果。如图2中清楚地所示的，金黄色葡萄球菌被两种肽以类似于万古霉素的水平有效地杀死。然而，发现这些肽显示比这种常规抗生素更广泛的功效范围。具体来说，RP-439和RP-442可有效地杀死铜绿假单胞菌和艰难梭菌，然而万古霉素对这些微生物生物体无效。无论细菌以单细胞形式(图2中显示)还是以生物膜形式(如前述实施例中所述;RP-442针对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的生物膜数据如上所示;未显示艰难梭菌和肽RP-439的生物膜数据)暴露，获得了类似的结果。

[0121] 实施例中提供的结果证明本发明的抗微生物肽在杀死广泛的微生物生物体(包括引起医学上重要的人感染的微生物)中的功效。

[0122] 实施方案

[0123] 提供以下非限制性实施方案来举例说明本发明的方面。

[0124] 1.一种包含抗微生物肽的抗微生物组合物，其中所述抗微生物肽包含与SEQ ID NO:23、25、17、12、13、27、1至6、8、9、14至16、18至22、24、26以及28至30中任一个具有至少60％序列同一性的氨基酸序列。

[0125] 2.如实施方案1所述的抗微生物组合物，其中所述抗微生物肽有效地杀死至少一种细菌、真菌或原生动物生物体。

[0126] 3.如实施方案2所述的抗微生物组合物，其中所述生物体是分类在选自由以下属组成的组的属中的物种:不动杆菌属(Acinetobacter)、放线杆菌属(Actinobacillus)、伯克霍尔德氏菌属(Burkholderia)、假丝酵母属(Candida)、梭菌属(Clostridium)、肠杆菌属(Enterobacter)、肠球菌属(Enterococcus)、埃希氏菌属(Escherichia)、梭杆菌属(Fusobacterium)、卟啉单胞菌属(Porphyromonas)、假单胞菌属、葡萄球菌属和链球菌属

(Streptococcus)。在一些实施方案中,生物体对一种或多种常规抗生素具有抗性(例如,MRSA生物体)。

[0127] 4.如实施方案3所述的抗微生物组合物,其中所述生物体选自由以下组成的组:鲍曼不动杆菌、伴放线放线杆菌、洋葱伯克霍尔德氏菌、泰国伯克霍尔德氏菌、白假丝酵母、克鲁斯假丝酵母、热带假丝酵母、艰难梭菌、产气肠杆菌(Enterobacter aerogens)、阴沟肠杆菌(Enterobacter cloaca)、屎肠球菌、大肠埃希氏菌、具核梭杆菌、牙龈卟啉单胞菌、铜绿假单胞菌、铜绿假单胞菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌和肺炎链球菌。

[0128] 5.如实施方案2至4中任一项所述的抗微生物组合物,其中所述抗微生物肽有效地杀死作为微生物生物膜生长的微生物。

[0129] 6.如任一前述实施方案所述的抗微生物组合物,其中所述抗微生物肽包含具有与微生物病原体的膜结合的阳离子表面的两亲性区域。

[0130] 7.如任一前述实施方案所述的抗微生物组合物,其中所述抗微生物肽包含聚脯氨酸螺旋结构。

[0131] 8.如任一前述实施方案所述的抗微生物组合物,其中所述抗微生物肽在N末端、C末端或两者上包含疏水性尾部区域,其中所述疏水性尾部区域具有4个至10个疏水性氨基酸的序列。

[0132] 9.如实施方案8所述的抗微生物组合物,其中所述疏水性尾部区域具有SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列。

[0133] 10.如任一前述实施方案所述的抗微生物组合物,其中所述抗微生物肽包含两个两亲性区域。

[0134] 11.如实施方案10所述的抗微生物组合物,其中所述两个两亲性区域通过接头连接在一起。

[0135] 12.如实施方案11所述的抗微生物组合物,其中所述接头包含气泡区域或β转角。

[0136] 13.如实施方案10至12中任一项所述的抗微生物组合物,其中所述两个两亲性区域形成二聚体结构。

[0137] 14.如实施方案10至13中任一项所述的抗微生物组合物,其中所述两个两亲性区域具有相同的氨基酸序列。

[0138] 15.如实施方案10至13中任一项所述的抗微生物组合物,其中所述两个两亲性区域具有不同的氨基酸序列。

[0139] 16.如任一前述实施方案所述的抗微生物组合物,其中所述抗微生物肽包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:23、25、17、12、13、27、1至6、8、9、14至16、18至22、24、26、28至30;与SEQ ID NO:23、25、17、12、13、27、1至6、8、9、14至16、18至22、24、26、28至30的任一个具有5个或更少的氨基酸差异的氨基酸序列;和其通过接头连接的同二聚体或异二聚体。

[0140] 17.一种药物组合物,其包含实施方案1至16中任一项所述的抗微生物组合物和药学上可接受的载体。

[0141] 18.如实施方案17所述的药物组合物,其中所述组合物被配制用于口服施用、肠胃外施用或局部施用。

[0142] 19.如实施方案18所述的药物组合物,其中所述组合物被配制用于口服施用,并且还包含肠溶包衣。

[0143] 20.如实施方案18所述的药物组合物,其中所述组合物被配制用于以选自由以下形式组成的组的形式进行局部递送:凝胶剂混悬剂、霜剂、微针以及浸渍至绷带或局部贴剂中。

[0144] 21.如实施方案17至20中任一项所述的药物组合物,所述药物组合物还包含另外的生物活性剂。

[0145] 22.如实施方案21所述的药物组合物,其中所述另外的生物活性剂选自由以下组成的组:抗微生物剂、抗炎药、抗恶心药、抗疼痛药物及其组合。

[0146] 23.如实施方案17所述的药物组合物,其中所述组合物被配制以涂覆在可植入医疗装置的表面上。

[0147] 24.如实施方案23所述的药物组合物,其中所述医疗装置选自由手术器械和留置医疗装置组成的组。

[0148] 25.一种在有此需要的受试者中治疗或预防微生物感染的方法,所述方法包括向所述受试者施用根据实施方案17至24中任一项所述的药物组合物。

[0149] 26.如实施方案25所述的方法,其中向所述受试者口服、肠胃外或局部施用所述药物组合物。

[0150] 27.如实施方案25所述的方法,其中通过在将医疗装置插入所述受试者之前将所述组合物施加于所述医疗装置的表面来向所述受试者施用所述药物组合物。

[0151] 28.如实施方案25至27中任一项所述的方法,其中所述受试者选自由以下组成的组:人、驯养动物、农场动物和动物园动物。

[0152] 本领域技术人员还将认识到,虽然上面已经根据优选实施方案描述了本发明,但其是并不限于此。上述发明的各种特征和方面可单独使用或共同使用。另外,尽管已经在其在特定环境中的实现的上下文中描述了本发明,并且对于特定应用,本领域技术人员将认识到,其实用性不限于此,并且本发明可以有益地用于许多环境和实施方式。因此,应当根据本文所公开的本发明的全部宽度和精神来解释下面所示的权利要求。

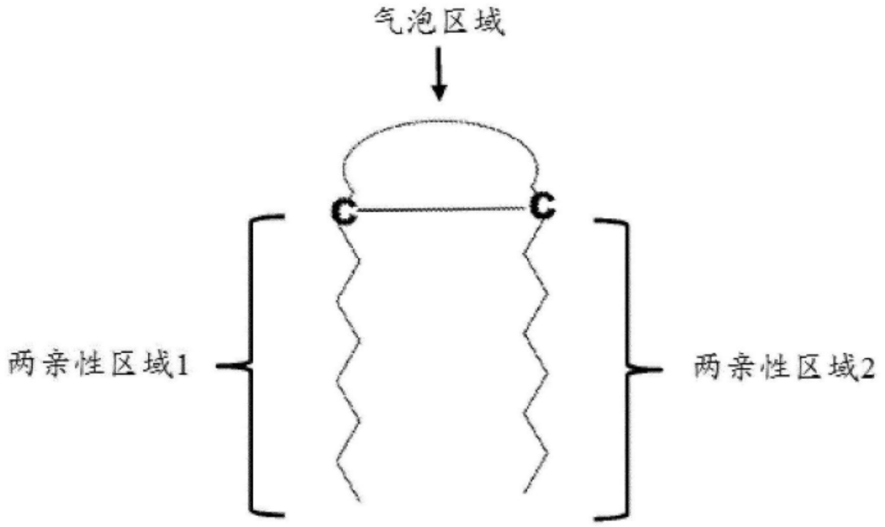

气泡区域
C
C
两亲性区域1
两亲性区域2

图1

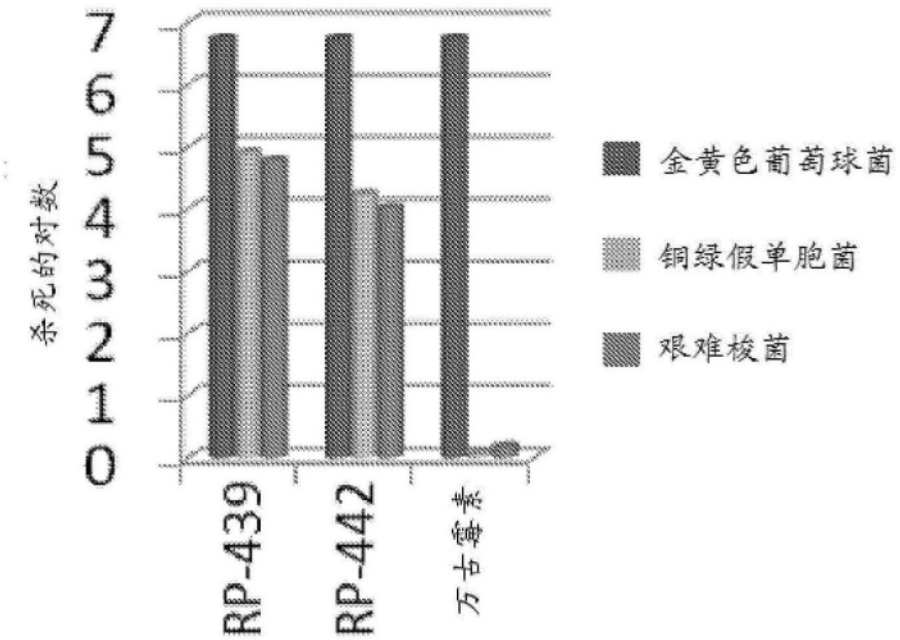

7
6
5
4
3
2
1
0
杀死的对数
金黄色葡萄球菌
铜绿假单胞菌
艰难梭菌
RP-439
RP-442
万古霉素

图2