(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111479824 A
(43)申请公布日 2020.07.31

(21)申请号 201880078731.4

(22)申请日 2018.12.05

(30)优先权数据
62/595,725 2017.12.07 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.06.05

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/064029 2018.12.05

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/113181 EN 2019.06.13

(71)申请人 硕腾服务有限责任公司
地址 美国新泽西

(72)发明人 M•库恩 R•A•埃温
D•J•希恩 E•拜马
C•A•祖克 H•菲尔普斯

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038
代理人 陈晓娜

(51)Int.Cl.
C07K 14/78(2006.01)
C07K 14/435(2006.01)
C12N 15/82(2006.01)

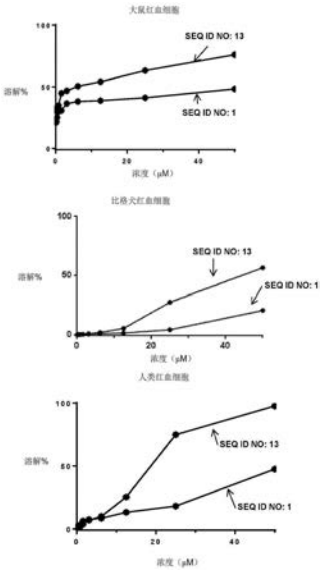
权利要求书4页 说明书17页 附图1页

(54)发明名称

抗微生物肽及其使用方法

(57)摘要

提供通式为$X_0X_1X_2CX_3X_4X_5CX_6X_7X_8X_9CYX_{10}X_{11}CX_{12}X_{13}$的抗微生物肽。还提供含有这些肽的某些制剂以及使用这些肽治疗有需要的动物的皮肤感染的方法。



CN 111479824 A

1.一种17至22个氨基酸长并且在其N末端处包含SEQ ID NO:12($X_0X_1X_2CX_3X_4X_5CX_6X_7X_8X_9CYX_{10}X_{11}CX_{12}X_{13}$)的氨基酸序列,其中

X_0不存在或是脯氨酸

X_1是赖氨酸、精氨酸、甘氨酸或脯氨酸;

X_2是苯丙氨酸、色氨酸或精氨酸;

X_3是苯丙氨酸、缬氨酸或色氨酸;

X_4是精氨酸、酪氨酸或苯丙氨酸;

X_5是缬氨酸或丙氨酸;

X_6是酪氨酸、精氨酸、赖氨酸或色氨酸;

X_7是精氨酸、苯丙氨酸或甘氨酸;

X_8是精氨酸或甘氨酸;

X_9是异亮氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸或缬氨酸;

X_{10}是精氨酸或组氨酸;

X_{11}是精氨酸或赖氨酸

X_{12}是精氨酸、赖氨酸、丙氨酸或天冬酰胺;

X_{13}是0至4个氨基酸长的多肽;

其限制条件是

如果X_0是脯氨酸,则X_1不是脯氨酸;

如果所述氨基酸序列包含SEQ ID NO:13(KWCFRVCYRGICYRRCR)或SEQ ID NO:28(KWCFRVCYRGICYRKCR),则X_{13}为1至4个氨基酸长;

如果X_{13}为1个氨基酸长或更长,则X_{13}中的N末端氨基酸是天冬酰胺、精氨酸、天冬氨酸或谷氨酸;

如果与SEQ ID NO:1的位置1对应的位置处的氨基酸是甘氨酸,则所述甘氨酸不是酰基或棕榈酸改性的;

如果氨基酸是X_{11}赖氨酸,则$X_6X_7X_8X_9$(SEQ ID NO:14)不是RRRF(SEQ ID NO:15);并且

如果氨基酸是GFCWYVCYRGICYRRCN(SEQ ID NO:16),则C末端天冬酰胺被酰胺化。

2.根据权利要求1所述的氨基酸序列,其中X_0是脯氨酸。

3.根据权利要求1或2所述的氨基酸序列,其中X_6是精氨酸或酪氨酸。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的氨基酸序列,其中X_7是精氨酸或甘氨酸。

5.根据权利要求4所述的氨基酸序列,其中X_7是精氨酸。

6.根据权利要求1至5中任一项所述的氨基酸序列,其中X_9是异亮氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸或缬氨酸。

7.根据权利要求1所述的氨基酸序列,其中X_9是异亮氨酸。

8.根据权利要求1至7中任一项所述的氨基酸序列,其中X_1是赖氨酸。

9.根据权利要求1至8中任一项所述的氨基酸序列,其中X_{12}是精氨酸、赖氨酸或天冬酰胺。

10.根据权利要求1至9中任一项所述的氨基酸序列,其中X_{13}为1个氨基酸长或更长,并且X_{13}中的所述N末端氨基酸是天冬氨酸或谷氨酸。

11.根据权利要求1至10中任一项所述的氨基酸序列,其中$X_6X_7X_8X_9$(SEQ ID NO:14)选自

由YRGI(SEQ ID NO:17)、YRGV(SEQ ID NO:18)、YRGF(SEQ ID NO:19)组成的群组。

12.根据权利要求1至11中任一项所述的氨基酸序列,其中X_{10}是精氨酸。

13.根据权利要求1至12中任一项所述的氨基酸序列,其中X_{11}是精氨酸。

14.根据权利要求1至13中任一项所述的氨基酸序列,其中$X_3X_4X_5$(SEQ ID NO:20)是FRV(SEQ ID NO:21)、WYV(SEQ ID NO:22)。

15.根据权利要求1至14中任一项所述的氨基酸序列,其中X_1是脯氨酸。

16.根据权利要求1至15中任一项所述的氨基酸序列,其中所述序列的C末端氨基酸是天冬氨酸。

17.一种多聚体,包含根据权利要求16所述的氨基酸序列的多个重复。

18.根据权利要求17所述的多聚体,其中所述重复彼此直接连接。

19.根据权利要求17或18所述的多聚体,其中所述多个是在2与20之间。

20.一种制作根据权利要求16所述的氨基酸序列的方法,包含:

a)合成根据权利要求17至19中任一项所述的多聚体;以及

b)使所述多聚体与弱酸接触,从而使D-P键断裂。

21.根据权利要求1所述的氨基酸序列,其选自由以下组成的群组:KFCVYVCYRGICYRRCK(SEQ ID NO:23)、KWCFRVCYRGVCYRRCR(SEQ ID NO:24)、KWCFRVCRRRFCYRRCR(SEQ ID NO:25)、GFCWYVCYRGICYRRCN-NH_2(SEQ ID NO:26)以及GFCWYVCYRGFCYRRCN-NH_2(SEQ ID NO:27)、PKWCFRVCYRGICYRRCR(SEQ ID NO:28);PKWCFRVCYRGICYRRCRD(SEQ ID NO:29);PWCFRVCYRGICYRRCR(SEQ ID NO:30);PWCFRVCYRGICYRRCRD(SEQ ID NO:31)。

22.根据权利要求1所述的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列为18至21个氨基酸长,并且在其N末端处包含SEQ ID NO:1(KWCFRVCYRGICYRRCRD)或SEQ ID NO:29(PKWCFRVCYRGICYRRCRD)或者与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:29相差一个、两个、三个或四个氨基酸的肽,其中与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:29的氨基酸不同的氨基酸独立地选自由以下组成的群组:

与SEQ ID NO:1的位置1对应的位置处的精氨酸或甘氨酸;

与SEQ ID NO:1的位置2对应的位置处的苯丙氨酸或精氨酸;

与SEQ ID NO:1的位置4对应的位置处的缬氨酸或色氨酸;

与SEQ ID NO:1的位置5对应的位置处的酪氨酸;

与SEQ ID NO:1的位置8对应的位置处的精氨酸;

与SEQ ID NO:1的位置9对应的位置处的甘氨酸;

与SEQ ID NO:1的位置10对应的位置处的精氨酸;

与SEQ ID NO:1的位置11对应的位置处的丙氨酸、苯丙氨酸或缬氨酸;

与SEQ ID NO:1的位置14对应的位置处的组氨酸;

与SEQ ID NO:1的位置15对应的位置处的赖氨酸;

与SEQ ID NO:1的位置17对应的位置处的天冬酰胺

23.根据权利要求22所述的氨基酸序列,包含与SEQ ID NO:1的位置18对应的位置处的天冬氨酸。

24.根据权利要求22至23中任一项所述的氨基酸序列,包含与SEQ ID NO:1的位置17对应的位置处的天冬酰胺。

25.根据权利要求22至24中任一项所述的氨基酸序列，包含与SEQ ID NO:1的位置1对应的位置处的甘氨酸。

26.根据权利要求22至25中任一项所述的氨基酸序列，包含与SEQ ID NO:1的位置11对应的位置处的丙氨酸。

27.根据权利要求22至26中任一项所述的氨基酸序列，其中精氨酸存在于与SEQ ID NO:1的位置14对应的位置处、与SEQ ID NO:1的位置15对应的位置处、或者前述两个位置处。

28.根据权利要求22至27中任一项所述的氨基酸序列，包含与SEQ ID NO:1的位置14对应的位置及与SEQ ID NO:1的位置15对应的位置处的精氨酸。

29.根据权利要求22至28中任一项所述的氨基酸序列，其中所述氨基酸序列为18个氨基酸长。

30.根据权利要求22至29中任一项所述的氨基酸序列，其中所述肽与SEQ ID NO:1相差三个、两个或一个氨基酸。

31.根据权利要求22所述的氨基酸序列，在其N末端处包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2(RWCFRVCYRGICYRRCRD)、SEQ ID NO:3(GWCFRVCYRGICYRRCRD)、SEQ ID NO:4(KFCFRVCYRGICYRRCRD)；SEQ ID NO:5(KWCFYVCYRGICYRRCRD)、SEQ ID NO:6(KWCFRVCRRGICYRRCRD)、SEQ ID NO:7(KWCFRVCYRGVCYRRCRD)、SEQ ID NO:8(KWCFRVCYRGACYRRCRD)、SEQ ID NO:9(KWCFRVCYRGFCYRRCRD)、SQEID NO:10(KWCFRVCYRGICYHRCRD)、SEQ ID NO:11(KWCFRVCYRGICYRRCND)。

32.根据权利要求31所述的氨基酸序列，包含SEQ ID NO:1SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:12。

33.根据权利要求31所述的氨基酸序列，包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8。

34.一种治疗有需要的动物的皮肤感染的方法，包含对所述动物施用包含根据权利要求1至16、22至33中任一项所述的氨基酸序列的制剂。

35.一种治疗有需要的动物的皮肤感染的方法，包含对所述动物施用包含根据权利要求22至33中任一项所述的氨基酸序列的制剂。

36.根据权利要求34或权利要求35所述的方法，其中所述制剂被局部施用。

37.根据权利要求33至36中任一项所述的方法，其中所述动物是狗。

38.一种治疗有需要的动物的乳腺炎的方法，包含对所述动物施用包含根据权利要求1至16、22至33中任一项所述的氨基酸序列的制剂。

39.根据权利要求38所述的方法，其中所述制剂被施用于所述动物的乳腺。

40.根据权利要求38或39所述的方法，其中所述动物是雌性牛、绵羊、猪或山羊。

41.一种治疗有需要的动物的呼吸道感染的方法，包含对所述动物施用包含根据权利要求1至16、22至33中任一项所述的氨基酸序列的制剂。

42.根据权利要求41所述的方法，其中所述动物是牛、绵羊、猪、山羊、马、猫科动物或犬科动物。

43.根据权利要求1至16、22至33中任一项所述的氨基酸序列，用于治疗动物中的医学病况。

44.根据权利要求22至33中任一项所述的氨基酸序列,用于治疗动物中的医学病况。

45.根据权利要求43或44所述的氨基酸序列,其中所述医学病况是皮肤感染。

46.根据权利要求43至45中任一项所述的氨基酸序列,其中所述动物是狗。

47.根据权利要求43或44所述的氨基酸序列,其中所述医学病况是呼吸道感染或乳腺炎。

48.根据权利要求45至47中任一项所述的氨基酸序列,被配制用于局部施用。

49.根据权利要求48所述的氨基酸序列,被配制成乳膏、软膏、喷雾剂或乳剂。

抗微生物肽及其使用方法

技术领域

[0001] 本发明是在抗微生物肽及这种肽用于治疗感染的用途的领域。

背景技术

[0002] 抗生素是在稀溶液中具有杀灭微生物或抑制微生物生长的能力的化学物质。对宿主足够无毒的抗生素被用作化学治疗剂来治疗人类、动物及植物的感染性疾病。所述术语最初被限于由微生物产生的物质，但已扩展至包括具有相似化学活性的合成及半合成化合物。

[0003] 抗微生物药物的大量及广泛使用导致出现微生物的耐药菌株。这些微生物不再对目前可用的抗微生物药物敏感。为了降低或预防致命的感染性疾病并维持公共健康，需要新的抗微生物剂。

[0004] 抗微生物肽(AMP)是整个自然界中有机体的宿主防御系统的重要组成部分，并且阻止入侵的病原体。它们显示出对革兰氏阳性菌及革兰氏阴性菌、真菌、寄生虫及病毒的强效抗微生物活性。较小的AMP(通常为约15至40个氨基酸)主要通过破坏微生物细胞膜的结构或功能来发挥作用，它们不会针对单一界定的分子结构。因此，与常规抗生素相反，无论细菌的代谢活性如何，它们均为有效的。人类AMP(诸如防御素及凯萨林菌素(cathelicidin)(LL-37)存在于白血球中，并由皮肤及粘膜表面中的各种上皮细胞分泌。除了其抗微生物活性外，AMP还是炎症、免疫激活及创伤愈合中的重要效应分子。AMP在序列及二级结构方面非常不同，但会共享一些共同的性质。它们通常是阳离子、两亲性的，并通过损害细菌膜的完整性来发挥其杀微生物作用。AMP与目标微生物的阴离子膜表面的相互作用导致膜透化、细胞溶解及死亡。

发明内容

[0005] 在第一方面，本发明提供一种17至22个氨基酸长并且在其N末端处包含SEQ ID NO:12($X_0X_1X_2CX_3X_4X_5CX_6X_7X_8X_9CYX_{10}X_{11}CX_{12}X_{13}$)的氨基酸序列，其中$X_0$不存在或是脯氨酸；$X_1$是赖氨酸、精氨酸、甘氨酸或脯氨酸；$X_2$是苯丙氨酸、色氨酸或精氨酸；$X_3$是苯丙氨酸、缬氨酸或色氨酸；$X_4$是精氨酸、酪氨酸或苯丙氨酸；$X_5$是缬氨酸或丙氨酸；$X_6$是酪氨酸或精氨酸或赖氨酸或色氨酸；$X_7$是精氨酸、苯丙氨酸或甘氨酸；$X_8$是精氨酸、苯丙氨酸或甘氨酸；$X_9$是异亮氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸或缬氨酸；$X_{10}$是精氨酸或组氨酸；$X_{11}$是精氨酸或赖氨酸；$X_{12}$是精氨酸、赖氨酸或天冬酰胺；$X_{13}$是0至4个氨基酸长的多肽；其限制条件是如果$X_0$是脯氨酸，则$X_1$不是脯氨酸；如果所述氨基酸序列包含SEQ ID NO:13(KWCFRVCYRGICYRRCR)或SEQ ID NO:28(KWCFRVCYRGICYRKCR)，则X_{13}为1至4个氨基酸长；如果X_{13}为1个氨基酸长或更长，则X_{13}中的N末端氨基酸是天冬氨酸或谷氨酸；如果与SEQ ID NO:1的位置1对应的位置处的氨基酸是甘氨酸，则所述甘氨酸不是酰基或棕榈酸改性的；如果氨基酸是X_{11}赖氨酸，则$X_6X_7X_8X_9$(SEQ ID NO:14)不是RRRF(SEQ ID NO:15)；并且如果氨基酸是GFCWYVCYRGICYRRCN(SEQ ID NO:16)，则C末端天冬酰胺被酰胺化。

[0006] 在某些实施例中，X_0不存在，并且X_6是精氨酸或赖氨酸；及/或X_7是精氨酸或赖氨酸；$X_6X_7X_8X_9$(SEQ ID NO:14)选自由YRGI(SEQ ID NO:17)、YRGV(SEQ ID NO:18)、YRGF(SEQ ID NO:19)组成的群组；及/或X_{10}是精氨酸；及/或$X_3X_4X_5$(SEQ ID NO:20)是FRV(SEQ ID NO:21)、WYV(SEQ ID NO:22)；及/或X_{13}为1个氨基酸长或更长，并且X_{13}中的N末端氨基酸是天冬氨酸。

[0007] 在一组特定的实施例中，氨基酸序列为17至21个氨基酸长，并且在其N末端处包含SEQ ID NO:12($X_0X_1X_2C$ $X_3X_4X_5CX_6X_7X_8X_9CYX_{10}X_{11}CX_{12}X_{13}$)，其中$X_0$不存在；$X_1$是赖氨酸、精氨酸或甘氨酸；$X_2$是苯丙氨酸、色氨酸或精氨酸；$X_3$是苯丙氨酸、缬氨酸或色氨酸；$X_4$是酪氨酸或苯丙氨酸；$X_5$是缬氨酸或丙氨酸；$X_6$是酪氨酸或精氨酸；$X_7$是精氨酸或甘氨酸；$X_8$是精氨酸、苯丙氨酸或甘氨酸；$X_9$是丙氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸或缬氨酸；$X_{10}$是精氨酸或组氨酸；$X_{11}$是精氨酸或赖氨酸$X_{12}$是精氨酸、赖氨酸或天冬酰胺；$X_{13}$是0至4个氨基酸长的多肽。

[0008] 在根据第一方面的另一组实施例中，所述氨基酸序列为18至21个氨基酸长，并且在其N末端处包含SEQ ID NO:1(KWCFRVCYRGICYRRCRD)或与SEQ ID NO:1相差一个、两个、三个或四个氨基酸的肽，其中与SEQ ID NO:1的氨基酸不同的氨基酸独立地选自由以下组成的群组：与SEQ ID NO:1的位置1对应的位置处的精氨酸或甘氨酸；与SEQ ID NO:1的位置2对应的位置处的苯丙氨酸或精氨酸；与SEQ ID NO:1的位置4对应的位置处的缬氨酸或色氨酸；与SEQ ID NO:1的位置5对应的位置处的酪氨酸；与SEQ ID NO:1的位置8对应的位置处的精氨酸；与SEQ ID NO:1的位置9对应的位置处的甘氨酸；与SEQ ID NO:1的位置10对应的位置处的精氨酸；与SEQ ID NO:1的位置11对应的位置处的丙氨酸、苯丙氨酸或缬氨酸；与SEQ ID NO:1的位置14对应的位置处的组氨酸；与SEQ ID NO:1的位置15对应的位置处的赖氨酸；与SEQ ID NO:1的位置17对应的位置处的天冬酰胺。

[0009] 更具体来说，所述氨基酸序列包含与SEQ ID NO:1的位置18对应的位置处的天冬氨酸；及/或与SEQ ID NO:1的位置17对应的位置处的天冬酰胺；及/或与SEQ ID NO:1的位置1对应的位置处的甘氨酸；与SEQ ID NO:1的位置11对应的位置处的丙氨酸；及/或与SEQ ID NO:1的位置14对应的位置处、与SEQ ID NO:1的位置15对应的位置处、或者前述两个位置处的精氨酸。

[0010] 在一组实施例中，所述氨基酸序列选自由在各自的N末端处包含以下者的氨基酸序列组成的群组：SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2(RWCFRVCYRGICYRRCRD)、SEQ ID NO:3(GWCFRVCYRGICYRRCRD)、SEQ ID NO:4(KFCFRVCYRGICYRRCRD)；SEQ ID NO:5(KWCFYVCYRGICYRRCRD)、SEQ ID NO:6(KWCFRVCRRGICYRRCRD)、SEQ ID NO:7(KWCFRVCYRGVCYRRCRD)、SEQ ID NO:8(KWCFRVCYRGACYRRCRD)、SEQ ID NO:9(KWCFRVCYRGFCYRRCRD)、SQE ID NO:10(KWCFRVCYRGICYHRCRD)或SEQ ID NO:11(KWCFRVCYRGICYRRCND)。

[0011] 在另外的实施例中，氨基酸序列选自由以下组成的群组：SEQ ID NO:97(KRCFRVCYRGICYRRCRD)；SEQ ID NO:98(KWCVRVCYRGICYRRCRD)、SEQ ID NO:99(KWCFFVCYRGICYRRCRD)；SEQ ID NO:100(KWCFWVCYRGICYRRCRD)、SEQ ID NO:102(KWCFRACYRGICYRRCRD)、SEQ ID NO:104(KWCFRVCYFGICYRRCRD)、SEQ ID NO:105(KWCFRVCYRGICYRRCRN)、SEQ ID NO:106(KWCWRVCYRGICYRRCRD)、SEQ ID NO:107(KWCFRVCWRGICYRRCRD)、SEQ ID NO:108(KWCFRVCYGGICYRRCRD)、SEQ ID NO:109

(KWCFRVCYRRICYRRCRD)、SEQ ID NO:110(KWCFRVCYRGYCYRRCRD)、SEQ ID NO:112(KWCFRVCYRGICYRRCKD)、SEQ ID NO:113(KWCFRVCYRGICYRRCAD)、SEQ ID NO:114(KWCFRVCYRGICYRRCRR)、SEQ ID NO:115(GWCFRVCYRGICYRRCND)、SEQ ID NO:116(KWCFYVCYRGICYRRCND)、SEQ ID NO:117(GWCFYVCYRGICYRRCRD)、SEQ ID NO:118(GWCFYVCYRGICYRRCND)。

[0012] 在另外的实施例中,氨基酸序列选自由以下组成的群组:SEQ ID NO:28、29、30、31。

[0013] 在第二方面,本发明提供一种包含根据本发明前述方面所述的氨基酸序列的多个重复的多聚体,其中进一步地,所述序列的N末端氨基酸是脯氨酸,并且所述序列的C末端氨基酸是天冬氨酸。有利的是,氨基酸序列的重复直接彼此连接,从而形成D-P键。在某些实施例中,所述多个是在2与20之间。

[0014] 本发明还提供一种制作适于制作本发明的第二方面中所述的多聚体的氨基酸序列的方法。所述方法包含合成多聚体,并且使多聚体与弱酸(例如甲酸)接触,从而使D-P键断裂。

[0015] 在第三方面,本发明提供一种治疗有需要的动物的感染的方法,所述方法包含对动物施用包含根据本发明第一方面所述的氨基酸序列的制剂。在某些实施例中,感染是皮肤感染。在其他实施例中,感染是乳腺炎、呼吸道感染、耳部感染、泌尿道感染或生殖道感染。

[0016] 在某些实施例中,动物是伴侣动物,例如狗、猫或马。在特定实施例中,动物是狗。在某些实施例中,制剂被配制用于局部应用。在一些实施例中,制剂是凝胶、乳膏、乳剂或喷雾剂。

附图说明

[0017] 图1示出SEQ ID NOs:1及13在人类、比格犬及大鼠红血细胞中的毒性。

具体实施方式

[0018] 定义

[0019] 为了更好地理解本发明,提供以下非限制性定义:

[0020] 当与可测量的数值变量结合使用时,“约”或“近似”是指变量的指示值及变量的处于指示值的实验误差内(例如,处于平均值的95%置信区间内)或处于指示值的10%内的所有值,除非“约”用来指以周为单位的时间间隔(其中“约3周”是17至25天,并且约2至约4周是10至40天),否则以较大者为准。

[0021] “乳剂”意指两种不混溶液体的组合物,其中一种液体的小液滴悬浮在另一种液体的连续相中。

[0022] “肠胃外施用”是指通过或经由不包括消化道的途径将诸如疫苗等物质引入受试者体内。肠胃外施用包括皮下、肌内、经皮、皮内、腹膜内、眼内及静脉内施用。

[0023] 与参考序列的某个位置“对应的[感兴趣序列中]的位置”是通过以下方式来确定:以感兴趣序列及参考序列的半胱氨酸残基彼此匹配的方式对准参考序列与感兴趣序列,然后确定感兴趣序列中与参考序列中的所期望位置匹配的位置。

[0024] “药学上可接受的”是指处于合理的医学判断范围内，适合与受试者的组织接触使用而没有不当毒性、刺激、过敏反应等，符合合理的效益-风险比，并对其预期用途有效的物质。

[0025] “治疗有效量”是指氨基酸序列和/或含有氨基酸序列的制剂的量，其将在接受氨基酸或制剂的受试者中诱导足以预防或减少感染的病征或病症的反应。

[0026] “治疗”是指预防此术语所适用的障碍、病况或疾病(包括但不限于感染)，或者预防或减轻这种障碍、病况或疾病的一种或多种病症。

[0027] “治疗”是指上文定义的“治疗”行为。

[0028] 肽

[0029] 一般来说，本发明提供一种17至22个氨基酸长并且在其N末端处包含SEQ ID NO:12($X_0X_1X_2C$ $X_3X_4X_5CX_6X_7X_8X_9CYX_{10}X_{11}CX_{12}X_{13}$)的氨基酸序列，其中

[0030] X_0不存在或是脯氨酸；

[0031] X_1是赖氨酸、精氨酸、甘氨酸或脯氨酸；

[0032] X_2是苯丙氨酸、色氨酸或精氨酸；

[0033] X_3是苯丙氨酸、缬氨酸或色氨酸；

[0034] X_4是精氨酸、酪氨酸或苯丙氨酸；

[0035] X_5是缬氨酸或丙氨酸；

[0036] X_6是酪氨酸或精氨酸；

[0037] X_7是精氨酸、苯丙氨酸或甘氨酸；

[0038] X_8是精氨酸、苯丙氨酸或甘氨酸；

[0039] X_9是异亮氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸或缬氨酸；

[0040] X_{10}是精氨酸或组氨酸；

[0041] X_{11}是精氨酸或赖氨酸；

[0042] X_{12}是精氨酸、赖氨酸或天冬酰胺；

[0043] X_{13}是0至4个氨基酸长的多肽；

[0044] 其限制条件是如果X_0是脯氨酸，则X_1不是脯氨酸；如果所述氨基酸序列包含SEQ ID NO:13(KWCFRVCYRGICYRRCR)或SEQ ID NO:28(KWCFRVCYRGICYRKCR)，则X_{13}为1至4个氨基酸长；如果X_{13}为1个氨基酸长或更长，则X_{13}中的N末端氨基酸是天冬氨酸或谷氨酸；如果与SEQ ID NO:1的位置1对应的位置处的氨基酸是甘氨酸，则所述甘氨酸不是酰基或棕榈酸改性的；如果氨基酸是X_{11}赖氨酸，则$X_6X_7X_8X_9$(SEQ ID NO:14)不是RRRF(SEQ ID NO:15)；并且如果氨基酸是GFCWYVCYRGICYRRCN(SQE ID NO:16)，则C末端天冬酰胺被酰胺化。

[0045] 在某些实施例中，X_0不存在，并且X_6是精氨酸或赖氨酸；及/或X_7是精氨酸或赖氨酸；$X_6X_7X_8X_9$(SEQ ID NO:14)选自由YRGI(SEQ ID NO:17)、YRGV(SEQ ID NO:18)、YRGF(SEQ ID NO:19)组成的群组；及/或X_{10}是精氨酸；及/或$X_3X_4X_5$(SEQ ID NO:20)是FRV(SEQ ID NO:21)、WYV(SEQ ID NO:22)；及/或X_{13}为1个氨基酸长或更长(例如，1、2、3或4个氨基酸长)，并且X_{13}中的N末端氨基酸是天冬氨酸。

[0046] 在根据第一方面的一组特定的实施例中，所述氨基酸序列为18至21个氨基酸长，并且在其N末端处包含SEQ ID NO:1(KWCFRVCYRGICYRRCRD)或与SEQ ID NO:1相差一个、两个、三个或四个氨基酸的肽，其中与SEQ ID NO:1的氨基酸不同的氨基酸独立地选自由以下

组成的群组:与SEQ ID NO:1的位置1对应的位置处的精氨酸或甘氨酸;与SEQ ID NO:1的位置2对应的位置处的苯丙氨酸或精氨酸;与SEQ ID NO:1的位置4对应的位置处的缬氨酸或色氨酸;与SEQ ID NO:1的位置5对应的位置处的酪氨酸;与SEQ ID NO:1的位置8对应的位置处的精氨酸;与SEQ ID NO:1的位置9对应的位置处的甘氨酸;与SEQ ID NO:1的位置10对应的位置处的精氨酸;与SEQ ID NO:1的位置11对应的位置处的丙氨酸、苯丙氨酸或缬氨酸;与SEQ ID NO:1的位置14对应的位置处的组氨酸;与SEQ ID NO:1的位置15对应的位置处的赖氨酸;与SEQ ID NO:1的位置17对应的位置处的天冬酰胺。

[0047] 在不同的实施例中,氨基酸序列与SEQ ID NO:1相差一个、两个或三个氨基酸。

[0048] 在某些实施例中,所述氨基酸序列包含与SEQ ID NO:1的位置18对应的位置处的天冬氨酸;及/或与SEQ ID NO:1的位置17对应的位置处的天冬酰胺;及/或与SEQ ID NO:1的位置1对应的位置处的甘氨酸;与SEQ ID NO:1的位置11对应的位置处的丙氨酸;及/或与SEQ ID NO:1的位置14对应的位置处、与SEQ ID NO:1的位置15对应的位置处、或者前述两个位置处的精氨酸。

[0049] 在一组实施例中,所述氨基酸序列选自由在各自的N末端处包含以下者的氨基酸序列组成的群组:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2(RWCFRVCYRGICYRRCRD)、SEQ ID NO:3(GWCFRVCYRGICYRRCRD)、SEQ ID NO:4(KFCFRVCYRGICYRRCRD);SEQ ID NO:5(KWCFYVCYRGICYRRCRD)、SEQ ID NO:6(KWCFRVCRRGICYRRCRD)、SEQ ID NO:7(KWCFRVCYRGVCYRRCRD)、SEQ ID NO:8(KWCFRVCYRGACYRRCRD)、SEQ ID NO:9(KWCFRVCYRGFCYRRCRD)、SQE ID NO:10(KWCFRVCYRGICYHRCRD)或SEQ ID NO:11(KWCFRVCYRGICYRRCND)。

[0050] 另外的氨基酸序列可见于SEQ ID NO:97(KRCFRVCYRGICYRRCRD);SEQ ID NO:98(KWCVRVCYRGICYRRCRD)、SEQ ID NO:99(KWCFFVCYRGICYRRCRD)、SEQ ID NO:100(KWCFWVCYRGICYRRCRD)、SEQ ID NO:101(KWCFRVYCYRGICYRRCRD)、SEQ ID NO:102(KWCFRACYRGICYRRCRD)、SEQ ID NO:103(KWCFRVCKRGICYRRCRD)、SEQ ID NO:104(KWCFRVCYFGICYRRCRD)、SEQ ID NO:105(KWCFRVCYRGICYRRCRN)、SEQ ID NO:106(KWCWRVCYRGICYRRCRD)、SEQ ID NO:107(KWCFRVCWRGICYRRCRD)、SEQ ID NO:108(KWCFRVCYGGICYRRCRD)、SEQ ID NO:109(KWCFRVCYRRICYRRCRD)、SEQ ID NO:110(KWCFRVCYRGYCYRRCRD)、SEQ ID NO:111(KWCFRVCYRGICRYRRCRD)、SEQ ID NO:112(KWCFRVCYRGICYRRCKD)、SEQ ID NO:113(KWCFRVCYRGICYRRCAD)、SEQ ID NO:114(KWCFRVCYRGICYRRCRR)、SEQ ID NO:115(GWCFRVCYRGICYRRCND)、SEQ ID NO:116(KWCFYVCYRGICYRRCND)、SEQ ID NO:117(GWCFYVCYRGICYRRCRD)、SEQ ID NO:118(GWCFYVCYRGICYRRCND)中。

[0051] 因此,氨基酸序列可选自由以下组成的群组:SEQ ID NO:97(KRCFRVCYRGICYRRCRD);SEQ ID NO:98(KWCVRVCYRGICYRRCRD)、SEQ ID NO:99(KWCFFVCYRGICYRRCRD)、SEQ ID NO:100(KWCFWVCYRGICYRRCRD)、SEQ ID NO:102(KWCFRACYRGICYRRCRD)、SEQ ID NO:104(KWCFRVCYFGICYRRCRD)、SEQ ID NO:105(KWCFRVCYRGICYRRCRN)、SEQ ID NO:106(KWCWRVCYRGICYRRCRD)、SEQ ID NO:107(KWCFRVCWRGICYRRCRD)、SEQ ID NO:108(KWCFRVCYGGICYRRCRD)、SEQ ID NO:109(KWCFRVCYRRICYRRCRD)、SEQ ID NO:110(KWCFRVCYRGYCYRRCRD)、SEQ ID NO:112

(KWCFRVCYRGICYRRCKD)、SEQ ID NO:113(KWCFRVCYRGICYRRCAD)、SEQ ID NO:114(KWCFRVCYRGICYRRCRR)、SEQ ID NO:115(GWCFRVCYRGICYRRCND)、SEQ ID NO:116(KWCFYVCYRGICYRRCND)、SEQ ID NO:117(GWCFYVCYRGICYRRCRD)、SEQ ID NO:118(GWCFYVCYRGICYRRCND)中。

[0052] 根据本发明的肽可通过本领域中众所周知的方法来制造,所述方法包括但不限于固相肽合成。也可在真菌、细菌或真核系统中使用生物工程技术(例如发酵)来合成肽。

[0053] 在某些实施例中,在抗微生物肽的N末端氨基酸是脯氨酸,并且C末端氨基酸是天冬氨酸的情况下,制造抗微生物肽的方法可能需要合成抗微生物肽的多聚体。在不同的实施例中,多聚体中的单体的数量可为1至约20,例如约5、约10或约15。方便地,抗微生物肽的单体将经由上游单体的C末端天冬氨酸与下游单体的N末端脯氨酸之间的肽键(D-P键)连接。这种D-P键可方便地经由弱酸(例如甲酸或柠檬酸)水解来裂解。因此,在本发明的组合物及方法中可使用由例如$(SEQ\ ID\ NO:29)_n$或$(SEQ\ ID\ NO:31)_n$这种描述所囊括的分子,其中n是1与20之间的整数。

[0054] 制剂

[0055] 根据上述实施例的肽可被配制用于递送至目标部位(即,被感染的部位或由于创伤、刺激等而处于被感染危险中的部位)。这些部位包括但不限于皮肤、眼睛、耳朵、乳腺、生殖道、膀胱、鼻腔及口腔。根据感兴趣的部位配制包含本发明的肽的组合物。

[0056] 还提供可通过将本文所述的一种或多种抗微生物肽与药学上可接受的载体、赋形剂、粘合剂、稀释剂等混合来制备的组合物,以治疗或改善多种细菌感染。治疗有效剂量或治疗有效量是指本文所述的一种或多种化合物足以引起感染病症改善的量。本发明的药物组合物可通过本领域中众所周知的方法来制造,所述方法为例如常规制粒、混合、溶解、包封、冻干或乳化工艺等。所述组合物可为例如颗粒剂、粉末、片剂、胶囊糖浆、栓剂、注射剂、乳剂、酏剂、悬浮液或溶液的形式。本发明的组合物可被配制用于各种施用途径,例如,通过口服施用、局部施用、经粘膜施用、直肠施用或皮下施用,以及鞘内、静脉内、乳房内、肌内、腹膜内、鼻内、眼内或心室内注射。本发明的一种或多种化合物也可以局部方式(例如注射)来施用作为缓释制剂。以下剂型是以举例的方式给出,并且不应被解释为对本发明进行限制。

[0057] 对于口服施用、颊施用及舌下施用,粉末、悬浮液、颗粒剂、片剂、丸剂、胶囊、软胶囊及囊片作为固体剂型是可接受的。这些可通过例如将本发明的一种或多种化合物或其药学上可接受的盐或互变异构体与至少一种添加剂或赋形剂(诸如淀粉或其他添加剂)混合来制备。合适的添加剂或赋形剂是蔗糖、乳糖、纤维素糖、甘露醇、麦芽糖醇、葡聚糖、山梨醇、淀粉、琼脂、藻酸盐、壳质、壳聚糖、果胶、黄蓍胶、阿拉伯树胶、明胶、胶原、酪蛋白、白蛋白、合成或半合成聚合物或甘油酯、甲基纤维素、羟丙基甲基-纤维素及/或聚乙烯吡咯烷酮。任选地,口服剂型可含有其他有助于施用的成分,诸如非活性稀释剂、或润滑剂(诸如硬脂酸镁)、或防腐剂(诸如尼泊金或山梨酸)、或抗氧化剂(诸如抗坏血酸、生育酚或半胱氨酸)、崩解剂、粘合剂、增稠剂、缓冲剂、甜味剂、调味剂或增香剂。此外,可添加染料或颜料来识别。片剂及丸剂可用本领域中已知的合适的包衣材料进一步处理。

[0058] 用于口服施用的液体剂型可为药学上可接受的乳剂、糖浆剂、酏剂、悬浮液、浆液及溶液的形式,其可含有非活性稀释剂,诸如水。可使用无菌液体(诸如但不限于油、水、醇

及其组合)将药物制剂制备成液体悬浮液或溶液。可添加药学上合适的表面活性剂、悬浮剂、乳化剂以用于口服或肠胃外施用。

[0059] 如上所述,悬浮液可包括油。这种油包括花生油、芝麻油、棉籽油、玉米油、橄榄油及油的混合物。悬浮液制剂还可含有脂肪酸酯,例如油酸乙酯、肉豆蔻酸异丙酯、脂肪酸甘油酯及乙酰化脂肪酸甘油酯。悬浮液制剂可包括醇,诸如但不限于乙醇、异丙醇、十六烷基醇、甘油及丙二醇。也可在悬浮液制剂中使用醚,诸如但不限于聚(乙二醇)、石油烃(诸如矿物油及矿脂);及水。

[0060] 对于某些施用途径,药物制剂可为喷雾剂或气雾剂,其含有适当的溶剂及任选的其他化合物,诸如但不限于稳定剂、抗微生物剂、抗氧化剂、pH调节剂、表面活性剂、生物利用度调节剂及其组合。气雾剂制剂的推进剂可包括压缩空气、氮气、二氧化碳或烃系低沸点溶剂。本发明的一种或多种化合物是从喷雾器或类似器件以气雾喷雾呈现形式方便地递送。

[0061] 可注射剂型一般包括水性悬浮液或油悬浮液,其可使用合适的分散剂或润湿剂及悬浮剂来制备。可注射形式可为用溶剂或稀释剂制备的溶液相或悬浮液形式。可接受的溶剂或载体包括无菌水、林格氏溶液或等渗盐水溶液。另选地,无菌油可用作溶剂或悬浮剂。一般来说,油或脂肪酸是非挥发性的,包括天然或合成油、脂肪酸、单甘油酯、二甘油酯或三甘油酯。

[0062] 为了注射,药物制剂可为适于用如上所述的适当溶液来重构的粉末。这些粉末的实例包括冷冻干燥、旋转干燥或喷雾干燥的粉末、无定形粉末、颗粒剂、沉淀物或微粒。为了注射,制剂可任选地含有稳定剂、pH调节剂、表面活性剂、生物利用度调节剂及其组合。化合物可被配制用于通过注射(诸如通过快速注射或连续输注)来进行肠胃外施用。用于注射的单位剂型可为安瓿或多剂量容器。

[0063] 为了直肠施用,药物制剂可为栓剂、软膏、灌肠剂、片剂或乳膏的形式,以用于在肠、乙状结肠曲和/或直肠中释放化合物。直肠栓剂是通过将本发明的一种或多种化合物或所述化合物的药学上可接受的盐或互变异构体与可接受的载体(例如可可脂或聚乙二醇)混合而制备的,其在正常存储温度下以固相存在,而在适于在体内(诸如在直肠中)释放药物的温度下以液相存在。油也可用于制备软明胶型制剂及栓剂。水、盐水、右旋糖水溶液及相关的糖溶液以及甘油可用于制备悬浮液制剂,所述悬浮液制剂还可含有悬浮剂(诸如果胶、卡波姆、甲基纤维素、羟丙基纤维素或羧甲基纤维素)以及缓冲剂及防腐剂。

[0064] 除了上述那些代表性剂型之外,药学上可接受的赋形剂及载体一般是本领域中的技术人员已知的,因此包括在本发明中。这种赋形剂及载体在例如“Remington's Pharmaceutical Sciences”,Mack Pub.Co.,New Jersey(1991)中有所描述。

[0065] 本发明的制剂可被设计成短效的、快释的、长效的及缓释的。因此,药物制剂也可被配制用于控释或缓释。

[0066] 本发明的组合物还可包含例如微团或脂质体或一些其他包封形式,或者可以缓释形式施用,以提供持久的存储及/或递送效果。因此,可将药物制剂压制成小球或圆柱体,并作为贮库型注射剂或作为植入物(例如支架)进行肌内或皮下植入。这种植入物可采用已知的材料,诸如硅酮及可生物降解的聚合物。

[0067] 所述组合物还可含有止痒药物,包括但不限于奥克拉替尼(oclatinib)及其盐(例

如，APOQUEL®及抗白介素-31抗体(例如，CYTOPOINT™)。

[0068] 所述组合物还可包含类固醇或抗真菌药物。合适的类固醇包括但不限于倍他米松、曲安奈德、醋丙氢化可的松、氢化可的松、去炎松、甲基强的龙醋酸盐等。合适的抗真菌药物包括但不限于氯三唑(chlotrimazole)、益康唑、依曲康唑、酮康唑、咪康唑。

[0069] 根据施用方法，组合物可含有例如约0.1重量％至约90重量％或更多的抗微生物肽。在组合物包含剂量单位的情况下，每一单位可含有例如每剂量约0.5mg至约10mg的抗微生物肽。例如，一剂组合物可含有约1mg、1.5mg、2mg、2.5mg、3mg、3.5mg、4mg、4.5mg、5mg、5.5mg、6mg、6.5mg、7mg、7.5mg、8mg、8.5mg、9mg、9.5mg。根据创伤的严重程度及动物的大小，所述组合物可含有每剂量约1mg至约5mg的抗微生物肽，或每剂量约1.5mg至约5mg的抗微生物肽，或每剂量约2.5mg至约7.5mg，或每剂量约1.5mg至约2.5mg。

[0070] 方法

[0071] 再一方面，本发明还提供治疗或预防受试者中的细菌感染的方法，所述方法包含对受试者施用有效量的一种或多种本文所述的化合物。可治疗的合适受试者包括狗、猫、马、家牛、羊、猪、家禽、灵长类动物(例如，恒河猴及食蟹猴(cynomolgus monkey)(也称为食蟹猴(crab-eating monkey)或长尾猴)、狨猴、罗望子、黑猩猩、猕猴)、兔子及啮齿动物(大鼠、小鼠、豚鼠等)。在某些实施例中，受试者是狗，并且本发明的抗微生物肽被局部、鼻内、眼内或耳内递送。抗微生物肽可以滴剂、喷雾剂、乳膏、凝胶、软膏等形式递送。

[0072] 可用所述化合物治疗的感染包括外耳感染、中耳感染(诸如急性中耳炎)、颅窦感染、眼睛感染、口腔感染(诸如牙齿、牙龈及粘膜感染)、上呼吸道感染、下呼吸道感染、泌尿生殖道感染、胃肠道感染、妇科感染、败血症、骨及关节感染、皮肤及皮肤结构感染、烧伤、外科手术的抗菌预防及免疫抑制受试者(诸如接受癌症化疗的患者或器官移植患者)的抗菌预防。这些感染可在医院或社区环境中经由本文所述的各种施用途径进行治疗。

[0073] 本文所述的化合物或组合物也可以预防性使用。因此，可对被视为处于发生微生物感染风险下的受试者施用一种或多种本发明的化合物或组合物。处于发生微生物感染风险下的受试者包括暴露于特定微生物(诸如病原菌种群)的个体；免疫系统受损的个体，或由于自然防御受损(例如，在由于烧伤或割伤而使皮肤受损的情况下)而特别易受感染的受试者。

[0074] 本文所述的抗微生物肽可用于治疗或预防由多种细菌有机体造成的感染性障碍，包括由病原菌种群引起的感染。细菌感染的非限制性实例包括革兰氏阳性及革兰氏阴性需氧及厌氧菌，诸如葡萄球菌，例如金黄色葡萄球菌；肠球菌，例如粪肠球菌；链球菌，例如化脓性链球菌及肺炎链球菌；大肠杆菌菌种，例如大肠杆菌，包括产肠毒素的、致肠病的、肠侵入性的、肠出血性的及肠聚集性的大肠杆菌菌株；丙酸杆菌菌株，例如痤疮丙酸杆菌；嗜血杆菌，例如流感嗜血杆菌；莫拉菌，例如卡他莫拉菌。其他实例包括分枝杆菌，例如结核分枝杆菌、禽胞内分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、牛分枝杆菌、非洲分枝杆菌、日内瓦分枝杆菌、麻风分枝杆菌、蟾分枝杆菌、猿分枝杆菌、瘰疬分枝杆菌、玛尔摩分枝杆菌、隐藏分枝杆菌、脓肿分枝杆菌、龟分枝杆菌、楚尔盖分枝杆菌、戈氏分枝杆菌、嗜血分枝杆菌、福图分枝杆菌(M.fortuni)及海洋分枝杆菌；棒状杆菌，例如白喉杆菌；假单胞菌种，例如铜绿假单胞菌；包柔氏螺旋体菌种，例如伯氏疏螺旋体；李斯特菌种，例如单核细胞增生李斯特菌；芽孢杆菌菌种，例如蜡样芽孢杆菌；博代氏杆菌菌种，例如支气管博代氏杆菌；克雷伯氏菌菌种、梭

菌菌种(例如产气荚膜梭菌)、破伤风杆菌;衣原体菌种,例如鹦鹉热衣原体;立克次氏体菌种,例如立氏立克次氏体菌及普氏立克次氏体菌;沙门氏菌菌种,例如鼠伤寒沙门氏菌;耶尔森菌菌种,例如小肠结肠炎耶尔森菌及假结核耶尔森菌;克雷伯氏菌菌种,例如肺炎克雷伯氏菌;及支原体,例如肺炎支原体、放线杆菌菌种、副猪嗜血杆菌;及化脓隐秘杆菌。

[0075] 在某些方面,所述细菌选自葡萄球菌,例如假中间葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、施氏葡萄球菌、产色葡萄球菌、模仿葡萄球菌、木糖葡萄球菌。所述细菌也可选自链球菌,例如乳房链球菌、无乳链球菌、停乳链球菌、猪链球菌。进一步地,巴氏杆菌科细菌适合用本文所述的组合物治疗。合适的巴氏菌科细菌包括溶血性曼氏杆菌、多杀性巴氏杆菌、睡眠嗜血杆菌、埃希氏菌种,例如大肠杆菌及克雷伯氏菌种。

[0076] 在某些实施例中,细菌是假中间葡萄球菌及/或铜绿假单胞菌。

[0077] 本文所述的组合物可以不同的频率团施用。例如,合适的方案包括每天4次至每周一次,例如,每天三次、每天两次、每天一次、每两天一次、每三天一次、每周两次、每五天一次等。类似地,本文描述的发明可以不同的持续时间方案施用(例如,单次施用)两天、三天、四天、一周、两周、一个月、六周等。在确定施用本文所要求保护的抗微生物组合物的适当剂量-时间-频率方案时,可一起考虑每剂量的抗微生物肽的持续时间、频率及量,以及创伤的种类及状态及/或感染的状态。

[0078] 以下实例被呈现为说明性实施例,但不应别视为对本发明的范围进行限制。对于本领域中的技术人员来说,本发明的许多变化、变型、修改以及其他用途及应用将是显而易见的。

[0079] 实例

[0080] 实例1.体外抗微生物活性及安全性

[0081] 表1中所列的根据SEQ ID NO的肽是由商业制造商(CS Bio,Menlo Park,California)使用固相合成制备的。通过确定对金黄色葡萄球菌及大肠杆菌的最低抑菌浓度(MIC)来评估抗微生物活性。简单来说,使用CLSI方法(VET01-S2)进行微肉汤(Microbroth)MIC。对于金黄色葡萄球菌及大肠杆菌ATCC菌株,使用含有5%溶解的马血琼脂的TSA在37℃的环境空气下进行过夜培养。用细胞培养水、0.01%的乙酸制作每种肽的0.5mM储备液,并在96孔板中连续稀释及点斑(10μL),以测定剂量滴定浓度为50μM至0.05μM。0.5McFarland标准的每种菌株在米勒-欣顿肉汤(MHB)中进行1:250的稀释。然后在96孔板中的药物上添加90μL培养悬浮液,以过夜孵育18至20小时。在对应浓度下没有可见生长的第一个孔处视觉确定出MIC。

[0082] 这些实验的结果提供在表1中。

[0083] 表1

[0084]

SEQ	结构	金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 μM	大肠杆菌 ATCC 25922 μM
SEQ ID NO：23	KFCVYVCYRGICYRRCK	1.6	0.4
SEQ ID NO：24	KWCFRVCYRGVCYRRCR	1.6	0.4
SEQ ID NO：1	KWCFRVCYRGICYRRCRD	1.6	0.4
SEQ ID NO：13	KWCFRVCYRGICYRRCR	3.1	0.8
SEQ ID NO：91	GFCWYVCYRGFCYRRCN	3.1	0.8
SEQ ID NO：92	RGGRLCYCRRRFCVCVGR	3.1	3.1
SEQ ID NO：93	RRWCFRVCYRGFCYRKCR	3.1	1.6
SEQ ID NO：28	KWCFRVCYRGICYRKCR	3.1	1.6
SEQ ID NO：94	GFCWYVCRRRFCYRRCN	3.1	0.4
SEQ ID NO：25	KWCFRVCRRRFCYRRCR	3.1	0.8

[0085]

SEQ ID NO：26	GFCWYVCYRGICYRRCN-NH2	3.1	0.8
SEQ ID NO：27	GFCWYVCYRGFCYRRCN-NH2	3.1	0.8
SEQ ID NO：95	GFCWYVCRRRFCYRRCN	6.2	0.4
SEQ ID NO：33	PGFCWYVCRRRFCYRRCN	6.2	0.4
SEQ ID NO：34	PFCWYVCRRRFCYRRCN	6.2	0.4
SEQ ID NO：35	GFCWYVCRRRFCHRRCN	6.2	0.4
SEQ ID NO：36	GVCVYVCRRRFCYRRCN	6.2	0.4
SEQ ID NO：37	GVCVYVCRRRFCYRRCN	6.2	0.4
SEQ ID NO：38	GFCWYVCRRRFCYRRCN-NH2	6.2	0.4
SEQ ID NO：39	PGFCWYVCRRRFCYRRCND	6.2	0.4
SEQ ID NO：40	GFCWYVCRRRHCYRRCN	6.2	0.8
SEQ ID NO：41	KFCVYVCRRRFCYRRCK	6.2	0.8
SEQ ID NO：42	GHCWYVCRRRFCYRRCN	6.2	0.4
SEQ ID NO：43	GFCWYVCRRRFCYRRCS	6.2	0.4
SEQ ID NO：44	*GFCWYVCYRGICYRRCN-NH2	6.2	0.4
SEQ ID NO：45	*GFCWYVCYRGFCYRRCN-NH2	6.2	0.8
SEQ ID NO：16	GFCWYVCYRGICYRRCN	6.25	0.4
SEQ ID NO：46	GFCWYVCYRGFCYRRCN	6.25	0.4
SEQ ID NO：47	KFCWRVCRRRFCRRRCN	12.5	0.8
SEQ ID NO：48	GFCWYVCRRGFCYRRCN	12.5	0.4
SEQ ID NO：49	KWCFRVCRNGVCYRRCR	12.5	0.2
SEQ ID NO：50	GFCWYTCRRRFCYRRCN	12.5	0.4
SEQ ID NO：51	GFCWYVCYRGFCHRRCN	25	6.2
SEQ ID NO：52	GFCWYVCRRRFCHRRCN	25	0.8
SEQ ID NO：53	**GFCWYVCRRRFCYRRCN	25	50
SEQ ID NO：54	KFCWNVCRRRFCHRRCK	25	0.4
SEQ ID NO：55	GFCWYVCRRGICYRRCN	25	0.8
SEQ ID NO：56	GFCWYVCRRGICYRRCN	25	0.8
SEQ ID NO：57	GFCWNVCRRRFCRRRCN	25	0.4
SEQ ID NO：58	KFCVNVCYRGICHRRCK	25	0.2
SEQ ID NO：59	KFCVNVCRRRFCHRRCK	25	0.8
SEQ ID NO：60	KFCVNVCRRRFCRRRCK	25	0.4
SEQ ID NO：61	GFCWYVCYRGFCYQQCN	25	6.2
SEQ ID NO：62	GFCWYVCYRGFCYDDCN	25	50
SEQ ID NO：63	GFCWYVCPKGYCYRRCN	50	50
SEQ ID NO：64	GFCWYVCKNGFCYRRCN	50	3.1
SEQ ID NO：65	RKGCKCKNGFCVCR-NH2	50	6.25
SEQ ID NO：66	GFCWNVCRRRFCHRRCN	50	3.1
SEQ ID NO：67	GFCWNVCRRRFCHRRCN	50	1.6
SEQ ID NO：68	GFCWNVCYRGICHRRCN	50	1.6
SEQ ID NO：69	KVCVNVCKQGICRKRCK	50	50
SEQ ID NO：70	GCWYVCRNGVCYRRCN	50	25
SEQ ID NO：71	GFCWYVCRNGVCYRRCN	50	3.1
SEQ ID NO：72	GFCWNVCYRGFCHRRCN	50	3.1
SEQ ID NO：73	GFCWYVCYRGFCYHHCN	50	3.1

[0086]

SEQ ID NO：74	NVCVVRCRRGFCNRRCK	50	12.5
SEQ ID NO：75	KCVRVCRRRACRRRCK	50	50
SEQ ID NO：76	KCVRVCRRGFCNRRCK	50	50
SEQ ID NO：77	GFCWYVCKNGYCYRRCN	50	3.1
SEQ ID NO：78	GFCWYVCRNGYCYRRCN	50	3.1
SEQ ID NO：79	GFCWYVCRNGYCHRRCN	50	6.2
SEQ ID NO：80	GFCWYVCYRGICHRRCN	50	1.6
SEQ ID NO：81	KCVRVCRRGFCNRRCK	50	50
SEQ ID NO：82	GFCRYVCYRGICRRRCN	50	6.2
SEQ ID NO：83	KFCVNVCRNGICRRRCK	50	1.6
SEQ ID NO：84	GVCVNVCRRRFCHRRCN	50	3.1
SEQ ID NO：85	KKVCVNVCKQGICHKRCK	50	50
SEQ ID NO：86	KKVCVNVCRQGICHRRCK	50	50
SEQ ID NO：87	GFCRYVCRRGICRRRCN	50	12.5
SEQ ID NO：88	KFCVNVCYRGICRRRCK	50	0.4
SEQ ID NO：89	KCRRVCRRGFCYVVCN	50	25
SEQ ID NO：90	GHCHHVCRRRHCHRRCN	50	50

[0087] *指N-乙酰化

[0088] **指N-棕榈酸改性

[0089] SEQ ID NO:1被选择用于进一步研究。将SEQ ID NO:1对真核血细胞的毒性与速普肽(SEQ ID NO:13)对真核血细胞的毒性进行比较。针对多个种群采用标准的、参考良好的红血细胞溶血测定来测试肽的溶解潜力。通过几个离心及洗涤步骤来除去血浆部分而制备及分离红血细胞(RBC)。在384孔板中从50mM的储备液对测试肽及对照肽蜂毒素的剂量滴定(50μM至0.05μM)进行点斑。将制备的RBC与肽在37℃下孵育1小时。通过405nm下的光学密度并利用1％TritonX100作为百分百效应(HPE)且利用单独的磷酸盐缓冲液作为零百分比效应(ZPE)来测量溶血百分比。

[0090] 发明人出乎意料地发现,SEQ ID NO:1不仅提高了抗微生物活性,而且还降低了对红血细胞的毒性。图1示出使用人类、比格犬及大鼠红血细胞的实验结果。简单来说,SEQ ID NO:1对人类、比格犬或大鼠红血细胞的毒性是SEQ ID NO:13的二分之一至四分之一。在小鼠或牛科动物的红血细胞中,差异可忽略不计。

[0091] 如上所述,已经通过固相合成而合成了SEQ ID NO:1的另外的衍生物。如上所述,通过确定抗金黄色葡萄球菌及大肠杆菌的MIC来评估抗微生物活性。这些实验的结果提供在表2中。

[0092] 表2

[0093]

SEQ ID		金黄色葡萄球菌	大肠杆菌 2

[0094]

	序列	ATCC 29213 μM	ATCC 5922 μM
SEQ ID NO：3	GWCFRVCYRGICYRRCRD	6.2	3.1
SEQ ID NO：4	KFCFRVCYRGICYRRCRD	3.1	1.6
SEQ ID NO：5	KWCFYVCYRGICYRRCRD	6.2	1.6
SEQ ID NO：2	RWCFRVCYRGICYRRCRD	12.5	0.8
SEQ ID NO：6	KWCFRVCRRGICYRRCRD	12.5	3.1
SEQ ID NO：96	KWCFRVCYGRICYRRCRD	3.1	1.6
SEQ ID NO：7	KWCFRVCYRGVCYRRCRD	6.2	1.6
SEQ ID NO：8	KWCFRVCYRGACYRRCRD	3.1	1.6
SEQ ID NO：9	KWCFRVCYRGFCYRRCRD	6.2	3.1
SEQ ID NO：10	KWCFRVCYRGICYHRCRD	6.2	1.6
SEQ ID NO：11	KWCFRVCYRGICYRRCND	6.2	0.8
SEQ ID NO：1	KWCFRVCYRGICYRRCRD	3.1	0.8

[0095] 进一步评估表2中列出的肽对不同MSSP(甲氧西林敏感假中间葡萄球菌)菌株及MRSP(耐甲氧西林假中间葡萄球菌)菌株的抗微生物活性。结果分别在表3及表4中。

[0096] 表3.抵抗MSSP选定菌株的MIC

[0097]

SEQ ID	49051	71990	72036	72191	76986	77378	78032	81923	84250	84658	86000	86001
3	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	0.4	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	0.8
4	1.6	1.6	0.8	0.8	0.8	0.4	0.8	1.6	1.6	1.6	1.6	0.8
5	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	0.8	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
2	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	3.1	1.6	3.1	1.6	1.6
6	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	1.6	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1
96	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	0.8	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
7	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	0.8	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
8	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	0.8	1.6	3.1	1.6	1.6	1.6	1.6
9	1.6	1.6	0.8	1.6	0.8	0.4	0.8	1.6	1.6	1.6	0.8	0.8
10	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	0.8	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
11	0.8	1.6	0.8	0.8	0.8	0.4	0.8	1.6	0.8	0.8	0.4	0.8
1	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6

[0098] 表4.抵抗MRSP选定菌株的MIC

[0099]

SEQ ID	71994	72035	72192	76923	79882	80729	81926	86002	87655	88493
3	1.6	1.6	1.6	1.6	0.8	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
4	1.6	1.6	1.6	0.8	0.8	0.8	0.8	1.6	1.6	1.6
5	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
2	1.6	1.6	1.6	1.6	0.8	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
6	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1
96	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
7	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
8	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	3.1	1.6	1.6
9	1.6	1.6	1.6	1.6	0.8	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6

[0100]

10	1.6	1.6	1.6	1.6	0.8	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
11	1.6	1.6	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	1.6
1	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6

[0101] 如上所述合成了另外的肽。这些肽的抗微生物性质已被确定出，并总结如下

[0102] 表5.选定抗微生物序列对MSSP菌株的影响

[0103]

SEQ ID	71990	72036	72191	76986	77378	78032	81923	84250	84658	86000	86001
97	3.1	3.1	3.1	1.6	1.6	3.1	3.1	3.1	3.1	1.6	1.6
98	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
99	1.6	1.6	3.1	1.6	1.6	1.6	1.6	3.1	3.1	3.1	1.6
100	1.6	1.6	3.1	1.6	3.1	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
102	1.6	1.6	3.1	1.6	0.8	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
103	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	6.2	3.1	3.1	3.1
104	1.6	3.1	1.6	1.6	1.6	1.6	3.1	3.1	1.6	3.1	1.6
105	1.6	1.6	1.6	1.6	0.8	1.6	1.6	1.6	3.1	1.6	1.6
106	1.6	1.6	1.6	1.6	0.8	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
107	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
108	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1
109	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
110	1.6	3.1	3.1	1.6	1.6	1.6	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1
112	1.6	1.6	1.6	1.6	0.8	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
113	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
114	1.6	3.1	3.1	1.6	1.6	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	1.6
115	1.6	1.6	1.6	1.6	0.8	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
116	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
117	1.6	1.6	1.6	0.8	0.8	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
118	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	3.1	3.1	1.6	1.6
28	1.6	1.6	1.6	0.8	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
29	1.6	1.6	1.6	1.6	0.8	0.8	0.8	0.8	1.6	1.6	1.6
30	0.8	0.8	1.6	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	1.6	1.6	1.6
31	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6

[0104] 表6

[0105] 抗微生物肽对不同细菌的影响MR＝MRSP，SA＝金黄色葡萄球菌，EC＝大肠杆菌

[0106] SP＝假中间葡萄球菌

[0107]

SEQ ID	MR 71994	MR 72035	MR 72192	MR 76923	MR 79882	MR 80279	MR 81926	MR 86002	MR 87665	MR 88493	SA 29213	EC 25922	SP 49051
97	1.6	3.1	3.1	1.6	1.6	3.1	1.6	3.1	3.1	3.1	6.2	3.1	3.1
98	1.6	3.1	1.6	1.6	0.8	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	3.1	1.6	1.6
99	1.6	3.1	3.1	1.6	1.6	1.6	3.1	3.1	1.6	1.6	6.2	1.6	3.1

[0108]

100	1.6	3.1	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	3.1	6.2	0.8	1.6
102	3.1	3.1	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	3.1	6.2	1.6	1.6
103	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	25	6.2	3.1
104	3.1	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	3.1	3.1	6.2	3.1	1.6
105	1.6	1.6	1.6	1.6	0.8	1.6	1.6	1.6	1.6	3.1	6.2	3.1	1.6
106	1.6	3.1	1.6	1.6	0.8	1.6	1.6	1.6	1.6	3.1	3.1	3.1	1.6
107	1.6	3.1	1.6	1.6	0.8	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	3.1	3.1	1.6
108	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	12.5	0.8	3.1
109	1.6	1.6	1.6	1.6	0.8	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	3.1	1.6	1.6
110	3.1	3.1	3.1	3.1	1.6	1.6	3.1	3.1	3.1	3.1	6.2	1.6	3.1
112	1.6	1.6	1.6	1.6	0.8	0.8	1.6	1.6	1.6	1.6	3.1	1.6	1.6
113	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	6.2	1.6	1.6
114	3.1	3.1	3.1	3.1	1.6	1.6	3.1	3.1	3.1	3.1	6.2	1.6	3.1
115	1.6	1.6	1.6	1.6	0.8	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	3.1	0.8	1.6
116	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	3.1	1.6	1.6	6.2	0.8	1.6
117	1.6	1.6	0.8	1.6	0.8	1.6	1.6	0.8	1.6	1.6	6.2	0.8	1.6
118	3.1	3.1	1.6	3.1	1.6	1.6	3.1	1.6	1.6	1.6	12.5	1.6	3.1
28	1.6	3.1	3.1	1.6	0.8	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	6.2	0.8	1.6
29	1.6	1.6	0.8	1.6	0.8	0.8	0.8	1.6	1.6	1.6	3.1	1.6	1.6
30	1.6	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	1.6	1.6	1.6	1.6	3.1	1.6	1.6
31	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	3.1	1.6	1.6

[0109] 表2中列出的肽的安全性是通过测量细胞存活率来确定的。使犬源性上皮角质形成细胞(CPEK)增殖以确定在肽存在下的细胞存活率。细胞从T75烧瓶中的CnT-09-5(具有补充剂)预热培养基中的冷冻储备液生长，并在37℃、5％的CO_2下孵育过夜。用磷酸盐缓冲液洗涤细胞，并用预热的CnT-05-9培养基补充，并重复几天，直至细胞达到6.6×10^4个细胞/毫升的密度。然后将细胞转移至384孔板中，使其沉降，并被投加肽及蜂毒素对照肽(50μM至0.05μM)，并在37℃、5％的CO_2下孵育过夜。将作为(HPE)的0.1％TritonX100及单独作为(ZPE)的磷酸盐缓冲液添加至板中，以计算一旦用10μL CELLTITER-GLO®测定试剂终止测定时的百分比效应(percent effect)，用于发光读数。结果提供在表7中。

[0110] 表7

[0111]

SEQ ID NO:	CPEK（50 μM）	cRBC（50 μM）
3	42.1	67.1
4	16.6	67.1
5	28.6	3.1
2	-1.7	64.0
6	4.1	1.1
96	51.9	101.4
7	11.3	84.1

[0112]

8	24.6	30.2
9	52.3	101.3
10	31.5	101.1
11	22.0	57.8
1	21.5	20.5

[0113] 表6中列出的肽的安全性是通过如上所述测量细胞存活率来确定的。结果提供在表8中。

[0114] 表8

[0115]

SEQ ID	cRBC(50μM)	CPEK(50μM)
97	31.2	12.9
98	35.0	9.3
99	100.0	19.9
100	100.0	29.5
102	23.9	-2.1
103	7.9	-0.5
104	100.6	6.0
105	97.9	8.6
106	101.5	25.2
107	101.8	26.3
108	27.7	9.6
109	99.8	19.2
110	46.3	10.7
112	61.0	14.2
113	86.3	15.7
114	97.9	11.9
115	94.6	5.1
116	87.0	16.0
117	97.8	14.7
118	98.3	9.1
28	94.4	19.4
29	68.2	17.5
30	63.5	17.0
31	43.5	11.0

[0116] 这些数据表明,本发明的抗微生物肽不仅对测试的细菌菌株有效,而且是安全的,特别是对于非系统性(例如局部)施用。

[0117] 本说明书中引用的所有出版物(包括专利出版物及非专利出版物)均是为了说明本发明所属领域中的技术人员的技术水平。所有这些出版物以引用方式全部并入本文中,以达到如同每一单独的出版物被具体地及单独地表示成以引用方式并入般。

[0118] 尽管本文已经参考特定实施例描述了本发明,但应当理解,这些实施例仅仅是为

了说明本发明的原理及应用。因此,应当理解,在不脱离由以下权利要求书界定的本发明的精神及范围的条件下,可对说明性实施例进行多种修改,并且可设计其他布置。

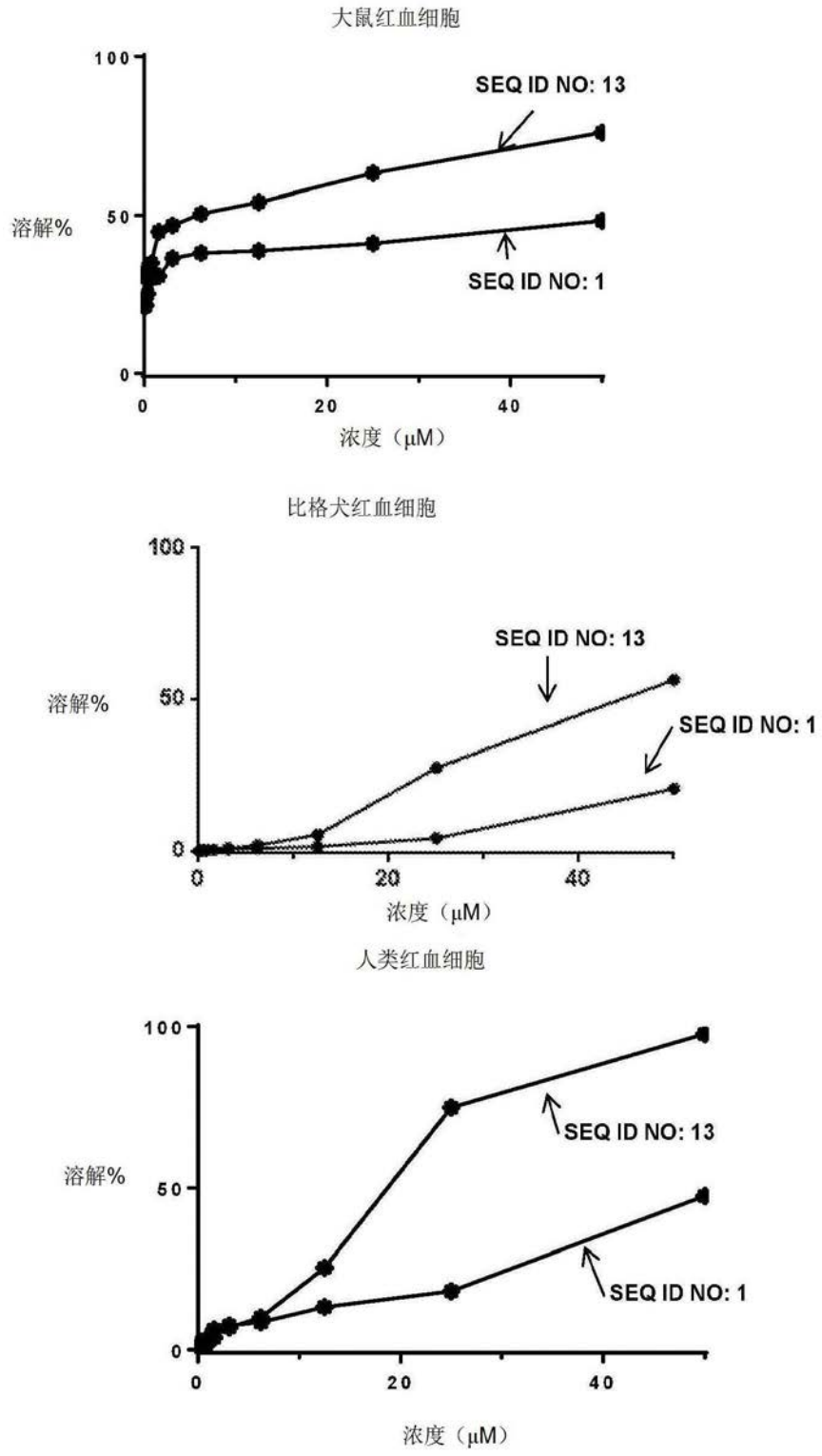

大鼠红血细胞
100
50
0
溶解%
SEQ ID NO: 13
SEQ ID NO: 1
0
20
40
浓度（μM）
比格犬红血细胞
100
50
0
溶解%
SEQ ID NO: 13
SEQ ID NO: 1
0
20
40
浓度（μM）
人类红血细胞
100
50
0
溶解%
SEQ ID NO: 13
SEQ ID NO: 1
0
20
40
浓度（μM）

图1