



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 89108485.1

[51] Int.Cl⁵
A61K 37/02

[43] 公开日 1990年6月27日

[22]申请日 89.10.21

[30]优先权

[32]88.10.21 [33]US [31]261,237

[32]89.5.18 [33]US [31]353,618

[71]申请人 麦盖宁科学有限公司

地址 美国宾夕法尼亚州

[72]发明人 迈克尔·沙斯洛夫

华莱士·H·斯坦伯格

[74]专利代理机构 中国专利代理有限公司

代理人 杨九昌

A61K 37/24 C12Q 1/04

说明书页数: 21 附图页数:

[54]发明名称 生物活性肽和一些阴离子的组合物及其治疗作用

[57]摘要

将一种亲水脂性离子通道形成肽和一种有毒阴离子用作药物。

△
4
V

权 利 要 求 书

1. 一种方法, 它包括给一种宿主施用至少一种生物活性亲水脂肽和/或生物活性蛋白和一种有毒阴离子, 所述的肽或蛋白是一种离子通道形成肽或蛋白, 所述的这些组分以能有效地抑制宿主中靶细胞生长的剂量施用。

2. 按照权利要求1所述的方法, 其中所述的肽是马盖宁 (maguinin) 肽。

3. 按照权利要求1所述的方法, 其中所述的肽是西哥罗佩素 (Cecropin)。

4. 按照权利要求1所述的方法, 其中所述的肽是肉毒素 (sarcotoxin)。

5. 按照权利要求1所述的方法, 其中所述的肽是XPF肽。

6. 按照权利要求1所述的方法, 其中所述的肽是PGL_a肽。

7. 按照权利要求1所述的方法, 其中所述的肽是CPF肽。

8. 按照权利要求1所述的方法, 其中所述的有毒阴离子选自F⁻离子、HCO₃⁻离子和[O₂]²⁻离子。

9. 按照权利要求1所述的方法, 其中所述的阴离子是F⁻离子。

10. 按照权利要求1所述的方法, 其中所述的肽和氟离子独立地使用。

11. 按照权利要求9所述的方法, 其中F⁻离子为局部施用。

12. 按照权利要求9所述的方法, 其中肽为局部施用。

13. 按照权利要求9所述的方法, 其中肽和F⁻离子均是局部施用。

14. 按照权利要求9所述的方法, 其中肽和F⁻离子以有效抗菌

剂量施用。

15. 一种组合物，它包括：

(a) 至少一种生物活性亲水脂肽和/或生物活性蛋白，所述的肽或蛋白是一种离子通道形成肽或蛋白；以及

(b) 一种有毒阴离子。

16. 按照权利要求15所述的组合物，其中所述的组分(a)和(b)以足够抑制靶细胞生长的剂量存在。

17. 按照权利要求15所述的组合物，其中阴离子是 F^- 离子。

18. 按照权利要求17所述的组合物，其中所述的肽是马盖宁肽。

19. 按照权利要求17所述的组合物，其中所述的肽是西哥罗佩素。

20. 按照权利要求17所述的组合物，其中所述的肽是肉毒素。

21. 按照权利要求17所述的组合物，其中所述的肽是XPF肽。

22. 按照权利要求17所述的组合物，其中所述的肽是PGL₂肽。

23. 按照权利要求17所述的组合物，其中所述的肽是CPF肽。

24. 测定一种未知试样中是否存在离子通道形成肽的方法，它包括：

将所述的未知试样的第一部分与第一种靶细胞试样接触；

测定所述的第一部分对所述靶细胞的生物活性；

将所述的未知试样的第2部分和一定量的 F^- 离子与第2种靶细

胞试样接触，所述的第2种靶细胞试样含有与第一种试样相同类型的靶细胞。

测定所述的第2部分未知试样及所述的 H^+ 离子对所述的第2种靶细胞试样的生物活性。

比较所述的第一部分未知试样和所述的第二部分未知试样及所述的 H^+ 离子对所述靶细胞的生物活性，从而确定在所述的未知试样中是否存在离子通道形成肽。

2 5。按照权利要求2 4中所述的方法，其中所述的靶细胞为细菌。

生物活性肽和一些阴离
子的组合物及其治疗作用

本发明涉及生物活性肽，尤其涉及有关生物活性肽和一些阴离子的组合物及其用途。

本发明一方面提供了一种包括至少一种生物活性亲水脂肽(amphiphilic peptides)以及一种有毒阴离子的组合物。

本发明另一方面提供了一种方法，该方法为给一种宿主施用至少一种生物活性亲水脂肽(一种离子通道形成肽)和/或一种生物活性蛋白(一种离子通道形成蛋白)；以及一种有毒阴离子。

离子通道形成肽或蛋白或离子载体是一种能增加天然的或合成的脂质膜离子渗透性的肽或蛋白。B. Christensen 等人在 P N A S Vol 85 P. 5072—76 (July, 1988) 中描述了一种方法，用该法可以确定一种肽或蛋白是否具有离子通道形成特性，从而成为一种离子载体。经 Christensen 等人的方法确定，这里所用的离子通道形成肽或离子通道形成蛋白是一种具有离子通道形成特性的肽或蛋白。

本发明的另一方面提供了一种测定、或筛选试样中离子通道形成肽或蛋白的方法。

根据本发明的方法，将未知试样的第一部分与一种含有靶细胞(如，细菌细胞、真菌细胞、原生动物、肿瘤细胞、受病毒感染的细胞等)的试样接触，然后测定该试样作用于特定的靶细胞的生物活性。将加入了一定量的氟离子的未知试样的第二部分与另一种含有同样靶细胞(与未知试样的第一部分接触的)的试样接触，然后测定该未知

试样的第二部分与氟离子作用于该靶细胞的生物活性。如果，未知试样的第二部分和氟离子作用于靶细胞的生物活性比第一部分未加氟离子的更高，那么该未知试样中含有离子通道形成肽或蛋白。在本发明的一个优选实施方案中，该靶细胞是一种细菌。

亲水脂肽是一种同时包括疏水和亲水肽区域的肽。

有毒阴离子是这样一种离子——当将它导入靶细胞内后，它能抑制和/或阻止和/或破坏靶细胞的生长。

这类有毒阴离子当不存在离子通道形成肽时，就不能以足够量穿过天然的或合成的脂质膜（尤其是细胞膜）而对细胞产生不利影响。

根据本发明的一个方面，给宿主施用该生物活性肽或蛋白及有毒阴离子，该生物活性肽或蛋白及有毒阴离子可以以一种单一组合物或以独立的组合物形式施用，该单一的组合物或独立的组合物中除了肽或蛋白和/或有毒阴离子以外还可以含有一些其它活性的和/或非活性的物质。

本发明中所用的离子通道形成肽通常在中性 pH 水中能水溶至浓度至少为 20 毫克/毫升。此外，这种肽是非溶血性的，即它们不会以有效浓度破裂血细胞，另外，这种肽的结构保证肽分子具有柔韧性。当将这种肽放入水中时，它不呈现亲水脂结构，而当这种肽接触油性表面成膜时，其肽链才自己折叠成棒性结构。

通常，这种肽至少具有 16 个氨基酸，优选的至少为 20 个氨基酸，在绝大多数情况下，该肽不超过 40 个氨基酸。

通常，这类有毒阴离子作为一种适当化合物的组成部分使用，这类有毒阴离子的代表性例子为： F^- 、 $[\text{O}_2]^{2-}$ 和 HCO_3^- 离子。

在使用离子通道形成生物活性亲水脂肽或一种离子通道形成蛋白和一种有毒阴离子时，不管是以单一组合物还是以独立组合物施用或制备，均需以能有效抑制和/或阻止和/或破坏靶细胞生长的量使用肽或蛋白和有毒阴离子。在效果方面，该阴离子能加强肽或蛋白的作用，这里采用的术语“加强”是指有毒阴离子的量能有效地降低抑制靶细胞生长所需的肽或蛋白的最小浓度。

一般，当全身给药时，使用的肽或蛋白的肽剂量为 $1 \sim 500 \text{ mg/kg}$ 宿主重量，而当局部给药时，肽或蛋白的浓度为 $0.05\% \sim 5\%$ 。

局部使用时，通常使用的有毒阴离子浓度为 $0.05\% \sim 2.0\%$ ，当全身使用时，则其用量一般为 $1 \sim 10 \text{ mg/kg}$ 宿主重量。

根据本发明，将肽或蛋白和有毒阴离子结合起来用作为一种抗菌素是有效的，也可以将它们用来抑制、阻止或破坏微生物如细菌、真菌的生长或增殖，同样，该组合物还可以用作为一种抗病毒组合物，以抑制、阻止或破坏病毒的生长或增殖。

该组合物还可以用作为一种杀精子药，以抑制、阻止或破坏精子的游动。

该组合物还可以用作为一种抗肿瘤试剂以抑制肿瘤的生长或摧毁肿瘤。

该组合物还可以用作为抗寄生虫试剂，以抑制寄生虫的生长或摧毁寄生虫。

该组合物具有对包括革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌、真菌、原生动物等等在内的多种微生物有较宽范围的潜在抗菌活性，这类组合物还可以用来治疗或控制由对这类组合物敏感的生物引起的微生物感染。

这项治疗包括给宿主生物或组织（可能受细菌感染或与细菌感染有关的）施用抗菌量的肽或蛋白和有毒阴离子。

该组合物还可以用作为对细菌污染敏感的物质防腐剂和消毒剂。

根据本发明的一个优选实施方案，与有毒阴离子一起使用的肽是一种碱性（带正电荷）多肽，它至少具有16个氨基酸，其中该多肽包括至少8个疏水氨基酸和至少8个亲水氨基酸，尤其是，疏水氨基酸两两相邻成一组，而每组双疏水氨基酸与另一组双疏水氨基酸被至少一个非疏水氨基酸（最好至少两个氨基酸）隔开，但一般不会被四个以上的氨基酸隔开。在疏水氨基酸对之间的氨基酸可以是亲水的，也可以不是亲水性的。

亲水氨基酸通常也是两两相邻成一组，但这两个氨基酸中有一个是碱性亲水氨基酸，这些双亲水氨基酸组彼此之间被至少一个非亲水氨基酸（最好至少两个氨基酸）隔开，但一般不会被四个以上的氨基酸隔开，在亲水氨基酸对之间的氨基酸可以是疏水的，也可以不是疏水的。

根据本发明的一个特别优选实施方案，该多肽内一条至少有四个氨基酸组的链组成，其中的每一组至少有4个氨基酸，每一组中四个氨基酸中有两个是疏水性氨基酸，两个是亲水氨基酸，在每一组中的亲水氨基酸中至少有一个是碱性亲水氨基酸，另一个是碱性或中性的亲水氨基酸。

疏水氨基酸可以从Ala, Cys, Phe, Gly, Ile, Leu, Met, Val, Trp和Tyr中选择，中性亲水氨基酸可以从Asn, Gln, Ser和Thr中选择，碱性亲水氨基酸可以从Lys, Arg, His和鸟氨酸（O）中选择。

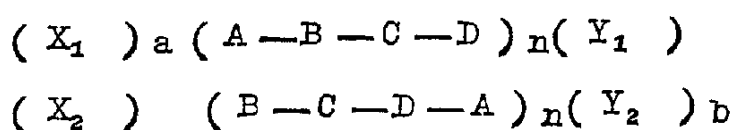
每四氨基酸组顺序可以为 A B C D、B C D A、C D A B 或 D A B C，其中 A 和 B 为疏水氨基酸，它们可以相同或不同，C 或 D 中一个是碱性亲水氨基酸，另一个则是碱性的或中性的亲水氨基酸，它们可以相同或不同，在一个优选的实施方案中，该多肽链可以由 5 个或 6 个这种顺序的组组成，在每一组中，A、B、C 和 D 在某些组中或在所有组中是相同的，或在某些组中或在所有组中是不同的。

优选地，该多肽链至少具有 20 个氨基酸，但不超过 50 个氨基酸。但应该懂得，该多肽不一定全部由上述组组成，它还可以在上述形成多肽链的组的一端或两端延伸出氨基酸和 / 或在至少四个组的一个或多个之间具有氨基酸，这些多肽均落在本发明的范围内。

氨基酸组可以重复，各种组中的氨基酸可以改变，只要在至少四个氨基酸组中，每一个组中均有两个疏水和两个亲水氨基酸。

因此，在一个优选实施方案中，该生物活性多肽由包括至少四个氨基酸组的链组成，其中每一组中含有四个氨基酸。四个氨基酸中有两个是疏水的，至少有一个是碱性亲水的，余下的一个是碱性的或中性亲水性的，该多肽链最好具有至少 20 个氨基酸，但不超过 50 个氨基酸。

在一个实施方案中，肽链中至少四个氨基酸组中的每一组具有 A—B—C—D，B—C—D—A，C—D—A—B 或 D—A—B—C 顺序，其中 A 和 B 是疏水氨基酸，C 或 D 中有一个是碱性亲水氨基酸，另一个是碱性的或中性的亲水氨基酸，由此而产生的多肽链具有下列之一顺序：



$$(X_3)_a (C-D-A-B)_n (Y_3)_b$$

$$(X_4)_a (D-A-B-C)_n (Y_4)_b$$

其中 X_1 是 D; $C-D-$ 或 $B-C-D-$, Y_1 是 $-A$ 或 $-A-B$ 或 $-A-B-C$

X_2 是 $A-$, $D-A-$ 或 $C-D-A-$,

Y_2 是 $-B$, $-B-C$ 或 $-B-C-D$,

X_3 是 B $A-B-$ 或 $D-A-B-$,

Y_3 是 $-C$, $-C-D$, $-C-D-A$

X_4 是 $C-$, $B-C-$, $A-B-C-$

Y_4 是 $-D$, $-D-A$, $-D-A-B$

a 是 0 或 1; b 是 0 或 1

n 至少是 4

应该明白, 该肽链在上述四氨基酸组之间可以含有氨基酸, 只要这些组间的间距以氨基酸上的电荷不改变该肽链所具有的亲水脂没正电荷特性, 而且也不会对该链的折叠特性产生不利影响, 从而使之与上述四氨基酸组相互不隔开的有明显不同即可。

本发明的肽的代表性例子为:

I Ala-Phe-Ser-Lys-Ala-Phe-Ser-Lys-Ala-Phe-Ser-Lys-Ala-Phe-Ser-Lys

II Ala-Phe-Ser-Lys-Ala-Phe-Ser-Lys-Ala-Phe-Ser-Lys-Ala-Phe-Ser-Lys

III P h e—S e r—L y s—A l a—P h e—S e r—
 L y s—A l a—P h e—S e r—L y s—A l a—
 P h e—S e r—L y s—A l a—

IV S e r—L y s—A l a—P h e—S e r—L y s—
 A l a—P h e—S e r—L y s—A l a—P h e—
 S e r—L y s—A l a—P h e—S e r—L y s—
 A l a—P h e—

V L y s—A l a—P h e—S e r—L y s—A l a—
 P h e—S e r—L y s—A l a—P h e—S e r—
 L y s—A l a—P h e—S e r

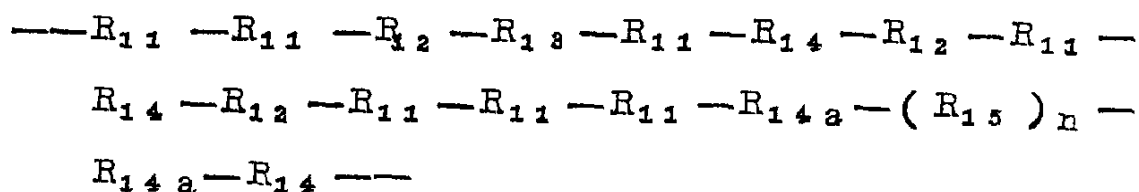
该肽可以含有一些由该链的一端延伸出的氨基酸，例如，在“ A l a ”端之前该链可以具有 S e r—L y s 顺序，和/或在“ L y s ”端之后具有 A l a—P h e 顺序，别的氨基酸也可以与“ A l a ”和/或“ L y s ”端相连。

同样地，在任何一个至少具有 4 个上述氨基酸组顺序的多肽链中，都可以在第一个 A—B—C—D 组之前具有例如 C—D 顺序，其它氨基酸顺序也可以与这些多肽链的“ A ”和/或“ D ”端相连，在该链中还可以具有一些氨基酸，它们使上述四氨基酸组的一个或多个组彼此隔开。

这种肽可以用已知的技术制得并能以基本纯净的形式获得，例如，该肽可以在一种自动合成器上合成得到（参见 Journal of American Chemical Society Vol 85 Page 2149—54 (1963)），也可以通过遗传工程技术制备这类肽。

根据另一优选实施方案，与有毒阴离子一起使用的肽是一种马盖宁 (magainin) 肽。

马盖宁 (maginin) 肽是一种马盖宁如马盖宁 I, II 或 III, 也可以是其类似物或衍生物，该马盖宁肽最好包括下列基本肽结构 X_{12}



其中 R_{11} 是一种疏水氨基酸， R_{12} 是一种碱性亲水氨基酸； R_{13} 是疏水的、中性亲水的、或碱性亲水的氨基酸； R_{14} 和 R_{14a} 是疏水的或碱性亲水的氨基酸； R_{15} 是谷氨酸或天冬氨酸，或者是疏水的或碱性亲水的氨基酸， n 为 0 或 1。在优选实施方案中， R_{13} 是疏水的或中性亲水的氨基酸， R_{14a} 是疏水的氨基酸， R_{15} 是谷氨酸或天冬氨酸。

因此，举例来说，该马盖宁肽可以包括下列结构：



其中 X_{12} 是上面所述的基本肽结构，而 Y_{12} 是：

- (i) R_{12}
- (ii) $R_{14a} \text{---} R_{12}$
- (iii) $R_{11} \text{---} R_{14a} \text{---} R_{12}$
- (iv) $R_{14} \text{---} R_{11} \text{---} R_{14a} \text{---} R_{12}$

其中 R_{11} ， R_{12} ， R_{14} 和 R_{14a} 如前所定义。

马盖宁肽可以具有下列结构：



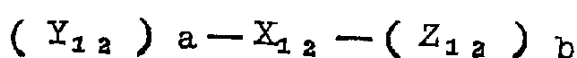
其中 X_{12} 如前所定义， Z_{12} 为：

(i) R_{16} , 这里 R_{16} 是一种碱性亲水氨基酸或天冬酰胺或谷氨酰胺。

(ii) $R_{16} - R_{17}$, 这里 R_{17} 是一种中性亲水氨基酸, 疏水氨基酸, 或碱性亲水氨基酸。

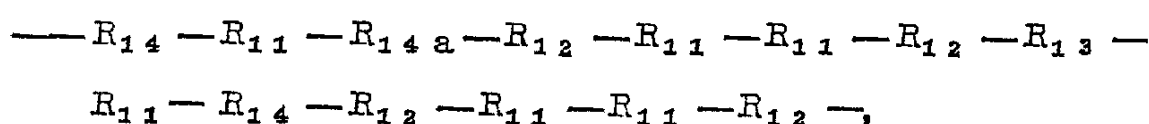
优选地, R_{17} 是一种中性亲水氨基酸。

马盖宁肽还可以具有下列结构:



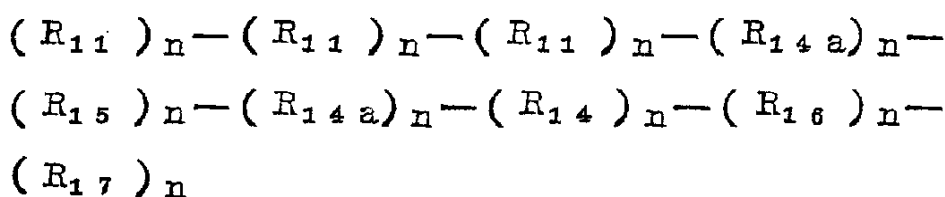
其中 X_{12} 、 Y_{12} 和 Z_{12} 如前面所定义, a 为 0 或 1, b 为 0 或 1。

马盖宁肽也可以包括下列基本肽结构 X_{13} :



其中 R_{11} , R_{12} , R_{13} , R_{14} 和 R_{14a} 是如前所定义的氨基酸。

马盖宁肽也可以包括下列结构 $X_{13} - Z_{13}$; 其中 X_{13} 是如前所定义的基本肽结构, 而 Z_{13} 是



其中 R_{11} , R_{14} , R_{14a} , R_{15} , R_{16} 和 R_{17} 如前面所定义, 而 n 为 0 或 1, 每一个 n 可以相同或不同。

马盖宁肽一般至少包括 14 个氨基酸, 但不超过 40 个氨基酸, 优选地, 该马盖宁肽具有 22 或 23 氨基酸, 因此, 马盖宁肽的上述基本肽结构可以在氨基端或在羧基端, 或在这两端处含有一些其它的氨基酸。

作为这类马盖宁肽的代表性例子，它们具有下列基本顺序（用一个字母代码表示）的肽及其合适的类似物和衍生物：

(a) (NH_2) GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS (OH) 或
 (NH_2)

(马盖宁 I)

(b) (NH_2) GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS (OH) 或
 (NH_2)

(马盖宁 II)

(c) (NH_2) GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMN (OH) 或 (NH_2)
(马盖宁 II)

下面是该基本结构的肽衍生物或类似物的例子：

(d) (NH_2) IGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS (OH) 或
 (NH_2)

(e) (NH_2) GKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS (OH) 或
 (NH_2)

(f) (NH_2) KFLHSAKKFGKAFVGEIMNS (OH) 或
 (NH_2)

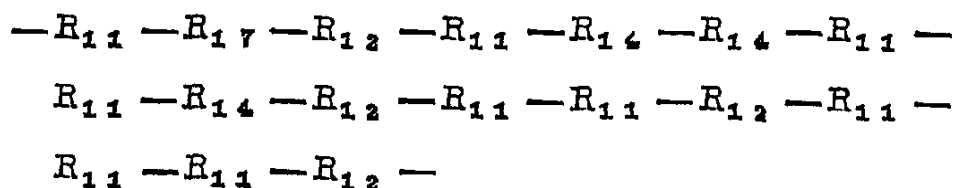
Proc Natl Acad Sci Vol 84 PP 5449—53

(Aug 87) 中描述了马盖宁肽，这里所用的术语“马盖宁肽”是指基本马盖宁结构及其衍生物和类似物，它们包括但不限于其代表性的衍生物或类似物。

根据另一个实施方案，与有毒阴离子一起使用的肽可以是
PGL_a 肽或 XP_F 肽。

PGL_a 肽是 PGL_a 肽或其类似物或衍生物，优选地，该

PGL_a包括下列基本肽结构 X_{14} :



其中 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{14} 和 R_{17} 如前面所定义。

PGL_a肽一般含有至少17个氨基酸, 但最多至40个氨基酸, 因此, PGL_a肽的上述基本肽结构中还可以在氨基端或羧基端, 或在两端处含有一些其它氨基酸。

因此, 举例来说, 该PGL_a肽可以具有下列结构:



其中 X_{14} 如前所定义,

Y_{14} 是

(i) R_{11} ;

(ii) $R_{14} - R_{11}$

其中 R_{11} 和 R_{14} 如前所定义。

例如, PGL_a肽还可以具有下列结构:



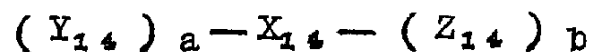
其中 X_{14} 如前所定义, Z_{14} 为:

(i) R_{11} 或

(ii) $R_{11} - R_{11}$

其中 R_{11} 如前所定义。

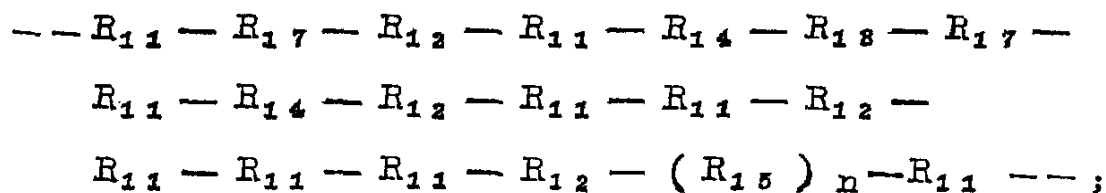
PGL_a肽还可以具有下列结构:



其中 X_{14} 、 Y_{14} 和 Z_{14} 如前所定义, a 为0或1, b 为0

或 1。

X P F 肽可以是 X P F，也可以是其类似物或衍生物，优选地，该 X P F 肽包括下列其本肽结构 X_{16} ；



其中 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{14} 、 R_{15} 和 R_{17} 如前所定义。

R_{18} 为谷氨酰胺或天冬酰胺或一种碱性亲水的、或疏水的氨基酸， n 为 0 或 1。

X P F 肽一段含有至少 19 个氨基酸，但不超过 40 个氨基酸，因此，X P F 的上述基本肽结构中可以在氨基端或羧基端，或在两端处含有一些其它氨基酸。

因此，举例来说，该 X P F 肽可以包括下列结构：



其中 X_{16} 如前所定义， Y_{16} 为：

(i) R_{11} 或

(ii) $R_{14} \text{---} R_{11}$

其中 R_{11} 、 R_{14} 如前所定义。

X P F 肽可以包括下列结构：



其中 X_{16} 如前所定义， Z_{16} 为：

(i) R_{11} ，或

(ii) $R_{11} \text{---} R_{18}$ ；或

(iii) $R_{11} \text{---} R_{18} \text{---}$ 脯氨酸；或

(iv) $R_{11} - R_{18} - \text{脯氨酸} - R_{12}$ 。

XPF肽还可以具有下列结构：

$(Y_{16})_a - X_{16} (Z_{16})_b$

其中 X_{16} 、 Y_{16} 和 Z_{16} 如前所定义， a 为0或1， b 为0或1。

优选的是XPF或PGLa肽，其特征在于具有下列基本氨基酸顺序（单个字母氨基酸代码）：

PGLa: GMASKAGAIAGKIAKVALKAL (NH_2)

XPF: GWASKIGQTLGKIAKVGLKELIQPK

有关XPF和PGLa的综述参见 Hoffman 等人 EMBO J. 2: 711—714, 1983; Andreu 等人 J. Biochem. 149, 531—535, 1985; Gibson 等人 J. Biol. Chem. 261: 5341—5349, 1986; 和 Giovanini 等人 Biochem J. 243: 113—120, 1987。

根据另一实施方案，与有毒阴离子一起使用的肽是一种CPF肽或其合适的类似物或衍生物。

CPF肽及其类似物和衍生物在这里有时从总体上来说是指CPF肽。

优选地，该CPF肽具有下列肽结构 X_{30} ：

$-R_{21} - R_{21} - R_{22} - R_{22} - R_{21} - R_{21} - R_{23} - R_{21}$
 $-R_{21} - R_{21} - R_{23} - R_{21} - R_{21} - R_{24} - R_{25} - R_{21} -$

其中 R_{21} 是疏水氨基酸

R_{22} 是碱性亲水氨基酸或疏水氨基酸

R_{23} 是碱性亲水氨基酸

R_{24} 是疏水氨基酸或中性亲水氨基酸

R_{25} 是碱性或中性亲水氨基酸,

上述的基本结构以后用符号 X_{30} 表示。

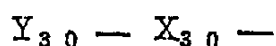
疏水氨基酸是 Ala 、 Cys 、 Phe 、 Gly 、 Ile 、 Leu 、 Met 、 Val 、 Trp 和 Tyr 。

中性亲水氨基酸是 Asn 、 Gln 、 Ser 和 Thr 。

碱性亲水氨基酸是 Lys 、 Arg 、 His 和鸟氨酸。

该 CPF 肽可以只包括上述氨基酸, 也可以在氨基端或羧基端, 或在这两端处含有一些别的氨基酸, 一般, 该肽不超过 40 个氨基酸。

包括上述基本肽结构的 CPF 肽在其氨基端可以含有 1—4 个别的氨基酸, 因此, 可以用下列结构分子式表示这种优选的肽:



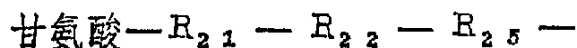
其中 X_{30} 是如前所述的基本肽结构, Y_{30} 为:

(i) R_{25} ; 或

(ii) $R_{22} - R_{25}$; 或

(iii) $R_{21} - R_{22} - R_{25}$; 或

(iv) $R_{22} - R_{21} - R_{22} - R_{25}$; 优选地,



其中 R_{21} 、 R_{22} 、和 R_{25} 如前所述。

该基本肽结构的羧基端还可以含有其它的氨基酸, 其数量为 1—13。

在优选的实施方案中, 该基本肽结构在羧基端处具有 1—7 个其它的氨基酸, 它可以用下列化学式表示,



其中, X_{30} 是如前所述的基本肽结构, Z_{30} 为:

(i) $R_{21} -$;

(i i) $R_{21} - R_{21} -$;

(i i i) $R_{21} - R_{21} - R_{24}$;

(i v) $R_{21} - R_{21} - R_{24} - R_{24}$;

(v) $R_{21} - R_{21} - R_{24} - R_{24} - R_{26}$;

(v i) $R_{21} - R_{21} - R_{24} - R_{24} - R_{26} - Gl n$; 或

(v i i) $R_{21} - R_{21} - R_{24} - R_{24} - R_{26} - Gl n - Gl n$,

其中 R_{21} 、 R_{24} 如前所述, R_{26} 是脯氨酸或疏水氨基酸。

优选的肽可以用下列结构分子式表示:

$(Y_{30})_a - X_{30} - (Z_{30})_b$

其中 X_{30} 、 Y_{30} 、 Z_{30} 如前所述, a 为 0 或 1, b 为 0 或 1。

可用于本发明的 C P F 肽的代表性例子 (其中有些已在文献中公开) 具有下列顺序 (单个字母氨基酸代码):

(1) GFGSFLGLALKAALKIGANALGGAPQQ

(2) GLASFLGKALKAGLKIGAHLGGAPQQ

(3) GLASLLGKALKAGLKIGTHFLGGAPQQ

(4) GLASLLGKALKATLKIGTHFLGGAPQQ

(5) GFASFLGKALKAALKIGANMLGGTPQQ

(6) GFGSFLGKALKAALKIGANALGGAPQQ

(7) GFGSFLGKALKAALKIGANALGGSPQQ

(8) GFASFLGKALKAALKIGANLLGGTPQQ

有关 C P F 肽的综述参见 Richter, K., Egger, R.,

和Krell (1986) J. Biol Chem 261, 3676—3680; Wakabayashi, T. Kato, H., 和Tachibana, S. (1985) Nucleic Acids Research 13, 1817—1828; Gibson, B. W., Poulter, L., Williams, D. H., 和Maggio, J. E. (1986) J. Biol. Chem. 261, 5341—5349。

可以用于本发明的C P F肽可用下列顺序表示(单个字母的氨基酸代码);

G₁2S₃L₄ALKA₅LKIG₆78LGG₉(10)QQ

其中:

1 = F, L

2 = G, A

3 = F, L

4 = K, L

5 = A, G, T

6 = A, T

7 = H, N

8 = A, M, F, L

9 = A, S, T

10 = P, L

该用数字标出的氨基酸可以按任何一种结合中所述的形式使用, 从而得到一种基本C P F肽结构或其类似物或衍生物, 术语“C P F肽”包括该基本肽结构及其类似物或衍生物。

在另一个实施方案中, 与有毒阴离子一起使用的肽是西哥罗佩素

(Cecropin), 这种西哥罗佩素及其类似物及衍生物已在 Ann. Rev, Microbiol. 1987 Vol. 41 第103—26页, 尤其是第108页中描述, 还在 Christensen 等人 PNAS, Vol. 85 第5072—76页中描述, 为了便于参考这两篇文献编入本申请。

术语“西哥罗佩素”包括其基本结构以及其类似物和衍生物。

在另一实施方案中, 与有毒阴离子一起使用的肽是肉毒素 (Sarcotoxin), 该肉毒素及其类似物和衍生物在 Molecular Entomology P 369—78, 尤其是 P 375, Alan R. Liss Inc (1987) 中描述, 作为参考该文献编入本申请。

术语“肉毒素”包括其基本物质以及其类似物和衍生物。

在另一实施方案中, 离子通道形成肽可以和有毒阴离子一起使用, 可以使用的离子通道形成肽包括得番新素 (defensins), 即人们所熟悉的人类嗜中性抗菌肽 (HNP)、嗜曙红细胞中的主要碱性蛋白 (MBP), 杀菌渗透性增强蛋白 (BPI), 以及一些叫做佩佛伍素 (perforin) 的溶细胞素或孔隙形成蛋白的孔隙形成细胞毒素。得番新素在 Selsted 等人的 J. Clin. Invest., Vol. 76, P 1436—1439 (1985) 中描述, MBP 蛋白在 Wasmoen 等人的 J. Biol. Chem., Vol. 263, P 12559—12563 (1988) 中描述, BPI 蛋白在 Ooi 等人的 J. Biol. Chem., Vol 262, P 14891—14894 (1987) 中描述, 佩佛伍素在 Henkart 等人的 J. Exp. Med. 160: 75 (1984) 以及 Podack 等人的 J. Exp. Med. 160: 695 (1984) 中描述, 为了便

于参考上述论文均编入本申请。

术语“离子通道形成蛋白”包括离子通道形成蛋白的基本结构及其类似物和衍生物。

本发明将通过下列实施例进行进一步描述，但本发明的范围不受这些实施例的限制。

表 I

亲水脂肽对于泄殖腔肠杆菌 (Enterobacter Cloagae)
的最小抑制浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

(平板A: 无NaF存在)		(平板B: +50毫 摩尔NaF)
NGN2 (马盖宁II)	>500	60—125
PGLa	250—500	60—125
Z-44	>500	30—60

表 II

亲水脂肽对绿脓杆菌 (Pseudomonas aeruginosa)
的最小抑制浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

(平板A: 无NaF存在)		(平板B: +50毫摩尔NaF)
MGN2	250—500	60—125
PGLa	>500	60—125
Z-44	30—60	6—15

将约1,000个细菌接种到约200微升胰蛋白酶大豆肉汤中, 在50mM NaF存在(板B)或不存在(板A)下, 以递增浓度加入马盖宁2羧基端部酰胺, PGLa, 或ALSKALSKALSKALSKALSKALSK (Z-44)。可以看出, 当无NaF存在时, 对泄殖

腔肠杆菌的MIC超过 $500\mu\text{g}/\text{ml}$ (对于MGN2), $250\mu\text{g}/\text{ml}$ (对于PGLa)和 $500\mu\text{g}/\text{ml}$ (对Z-44)。当加入 50mM NaF 时,对相同生物体的MIC下降到 $60-125\mu\text{g}/\text{ml}$ (对于MGN2和PGLa)和 $30\mu\text{g}/\text{ml}$ 至 $60\mu\text{g}/\text{ml}$ (对于Z-44)。对于绿脓杆菌可以得到类似的结果 (表II)。

在另一种实验中也证实了增强效应 (表III), 如果在 $60\mu\text{g}/\text{ml}$ MGN2存在下将 10^7 泄殖腔肠杆菌接种到 1ml TSB中, 则可以发现有约 10^6 细菌在平板上存活, 如果在含有MGN2的培养基中加入 50mM NaF , 则所有细菌均被杀死, 加入 F^- 离子, 该抗生素在给定浓度下的有效杀死力可以提高1百万倍。

表 III

添加物	CFU	EOP (%存活)
无	10^7	100
MGN2 (NH_2) ($60\mu\text{g}/\text{ml}$)	10^6	90
MGN ₂ (NH_2) ($60\mu\text{g}/\text{ml}$) + 25mM NaF	0	0
NaF 25mM	10^7	100

图表说明: 将生物体在 37°C 下, 在 1ml 胰蛋白酶大豆肉汤中或 1ml 含有所述物质的胰蛋白酶大豆肉汤中培养15分钟, 然后将其一部分稀释, 并制成平板以测定其存活的生物量。

F^- 离子作为增强剂的效果也可以用肿瘤细胞来证实, 如果将MGN2或Z-44加入到含有10%胎牛血清的最低Eagle培养

基中，并在 Vero 细胞（恶性上皮细胞株）存在下培养，在 250 和 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ MGN 2 或 Z-44 之间，约有 50% 的细胞表现为锥虫蓝渗透的，在以后的 24 小时培养中，细胞损伤范围保持相对稳定（37℃ 下），如果将 NaF 加入到含有 MGN 2 或 Z-44 的培养基中，则可以看到，在 125 和 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ MGN 2 或 Z-44 之间有 50% 的细胞被杀死。

上面所述的肽或蛋白和有毒阴离子可用来治疗多种宿主，根据优选的实施方案，宿主是一种动物，这类动物可以是人类或非人类动物，肽或蛋白和有毒阴离子可以同时用于单一组合物中，也可以用于独立的组合物中，此外，有毒阴离子和肽或蛋白可以以不同的形式输送或施用，例如，有毒阴离子可以口服使用，而肽或蛋白可以通过 I V 或 I P 施用。

肽或蛋白和/或有毒阴离子可以与一种无毒药物载体例如填料、无毒缓冲液或生理盐水一起用于多种药物组合物中，这种药物组合物可以局部或全身施用，它可以是任何一种合适的形式，如液体、固体、半固体、可注射的溶液、片剂、软膏、洗液、药膏、胶囊或类似的形式。肽或蛋白和/或有毒阴离子还可以和辅剂、蛋白酶抑制剂或相容的药物结合施用，只要这种结合对于控制由有害微生物（包括原生动物、病毒、和类似物）引起的感染是合适的或有利的即可。

可以将本发明的肽或蛋白与有毒阴离子一起以有效的抗生素和/或抗肿瘤和/或抗病毒和/或抗菌素和/或抗杀精子药量和/或抗寄生虫量向宿主，特别是一种动物给药，以增强该肽或蛋白的活性。

作为局部或定位施用该肽或蛋白及有毒阴离子的典型例子，可以将该肽或蛋白以低于 1%（重量/重量）的量使用，有毒阴离子以约

50 mM (约 0.1%) 的量输送。另外, 有毒阴离子 (以一种如 NaF 形式的盐存在) 可以口服使用, 与肽和/或蛋白同时全身使用, 举例来说, 该肽或蛋白可以通过 IV 或 IP 形式给药, 使血清剂量达到 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ($10 \text{ mg}/\text{kg}$), 同时口服有毒阴离子, 特别是 NaF。其用量为 10 毫克当量/公斤。

该肽或蛋白 (特别是肽) 与有毒阴离子可以以口服组合物形式使用, 从而用于口腔保健, 这种组合物可以被掺入到多种用于口腔保健的组合物或物质中, 它们包括但不限于牙膏、漱口液、牙胶和牙粉, 这种组合物可用来治疗或防止牙周炎, 防止或减轻牙斑, 和/或防止或治疗或减轻龋齿。该肽或蛋白及有毒阴离子可用于抑制, 防止或破坏链球菌 (Streptococcus mutans) 的生长, 该细菌与龋齿和牙周炎有关。

本发明的多种改进及变化均可能处于上述技术内容的范围内。