〔19〕中华人民共和国专利局

[11]公开号 CN 1040033A

〔12〕发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 89104630.5

[51] Int.Cl[5]
C07K 7/04

〔43〕公开日 1990年2月28日

[22]申请日 89.5.26

[30]优先权

[32]88.5.27 [33]US [31]199,927

[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·扎斯洛夫

[74]专利代理机构 中国专利代理有限公司

代理人 杨九昌

A61K 37/02

说明书页数: 12 附图页数:

[54]发明名称 两亲肽及其用途

[57]摘要

两亲性的生物活性的肽及中间体。例如，该多肽包括至少四组由四个氨基酸组成的链。在每组的四个氨基酸中，两个氨基酸是疏水的，一个氨基酸是碱性亲水的，另一氨基酸是碱性或中性亲水的。较好的氨基酸序列是 AIa-Phe-Ser-Lys。

权　利　要　求　书

1　一种肽包括：

所述的肽至少含八个氨基酸，所说的肽至少含两组氨基酸A－B，其中每个A－B组被除疏水氨基酸以外的至少一个氨基酸隔开，及所说的肽至少两组氨基酸C－D，其中C－D至少被除亲水氨基酸以外至少一个氨基酸隔开，其中每个A和B都是疏水的氨基酸，其中每个A和B可以是相同的或不同的氨基酸，C和D之一是碱性的亲水氨基酸，和C和D的另一个是碱性的或中性的亲水氨基酸。

2　权利要求1的肽，其中该肽有8－15个氨基酸。

3　权利要求2的肽，其中该肽包括以下序列之一：

（Ⅰ）　$(W_1)_a(A-B-C-D)_n(Z_1)_b$

（Ⅱ）　$(W_2)_a(B-C-D-A)_n(Z_2)_b$

（Ⅲ）　$(W_3)_a(C-D-A-B)_n(Z_3)_b$

（Ⅳ）　$(W_4)_a(D-A-B-C)_n(Z_4)_b$

其中W_1是D－、C－D、B－C－D－

W_2是A－，D－A，C－D－A－

W_3是B－，A－B－、D－A－B－

W_4是C－、B－C－、A－B－C－

Z_1是－A、－A－B、－A－B－C

Z_2是－B、－B－C、－B－C－D

Z_3是－C、－C－D、－C－D－A

Z_4是－D、－D－A、－D－A－B

n是2或3，a是0或1和b是0或1

4. 权利要求1—3的任何一项的肽，其中所说的肽包括所述的四个氨基酸的重复组。

5. 权利要求1的肽，其中该肽含至少16个氨基酸，和至少有四组氨基酸A－B和至少有三组氨基酸C－D。

6. 权利要求5的肽，其中至少有四组氨基酸C－D。

7. 权利要求5或6任何一项的肽，其中该肽包括至少四组肽序列－A－B－C－D、－B－C－D－A、－C－D－A－B、D－A－B－C－。

8. 权利要求5、6或7中任何一项的肽，其中该肽包括以下序列之一：

$$(X_1)_a(A\text{—}B\text{—}C\text{—}D)_n(Y_1)$$

$$(X_2)(B\text{—}C\text{—}D\text{—}A)_n(Y_2)_b$$

$$(X_3)_a(C\text{—}D\text{—}A\text{—}B)_n(Y_3)_b$$

$$(X_4)_a(D\text{—}A\text{—}B\text{—}C)_n(Y_4)_b$$

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、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和n至少是4

9. 权利要求5—8的任何一项的肽，其中所说的疏水氨基酸可

从下类氨基酸中选择Ala、Cys、Phe、Gly、Ile、Leu、Met、Val、Trp和Tyr，所说的中性亲水氨基酸可从下类氨基酸中选择：Ser、Asn、Gln和Thr，及所说的碱性亲水氨基酸可从下类氨基酸中选择：Lys、Arg和His。

10. 权利要求5—9中任何一项的多肽，其中所说的多肽包括以下序列：

$$-(Ala-Phe-Ser-Lys)_4-$$

11. 权利要求5—10中任何一项的多肽，其中所说的多肽由至少20个氨基酸和不多于50个氨基酸的链组成。

12. 权利要求7或8中任何一项的多肽，其中所说的多肽包括五组上述序列。

13. 权利要求7或8中任何一项的肽，其中所说的多肽包括六组上述序列。

14. 一种包括给动物权利要求5—13中任何一种施用的有效抗细菌量的肽的方法。

15. 一种包括给动物权利要求5—13中任何一种施用的有效抗病毒量的肽的方法。

16. 一种包括给动物权利要求5—13中任何一种施用的有效抗肿瘤量肽的方法。

17. 一种包括给动物权利要求5—13中任何一种施用的有效抗菌素量的肽的方法。

18. 一种包括给动物权利要求5—13中任何一种施用的有效杀精子量的肽的方法。

19. 一种包括含有效抗菌量的权利要求5—13中任何一种的

肽的药物载体的组合物。

20. 一种包括含有效抗病毒量的权利要求5—13中任何一种肽的药物载体的组合物。

21. 一种包括含有效抗菌素量的权利要求5—13中任何一种肽的药物载体的组合物。

22. 一种包括含有效抗肿瘤量的权利要求5—13中任何一种肽的药物载体的组合物。

23. 一种包括含有效杀精子量的权利要求5—13中任何一种肽的药物载体的组合物。

说　　明　　书

两亲肽及其用途

本发明涉及新颖的多肽。更详细地说，本发明涉及有生物活性的新颖多肽，它们能用作抗菌素、抗细菌剂、杀精子剂及抗病毒剂以及其中间体。

Proc. Natl. Acad. Sci.，第84卷第5449—53页（87年8月）公开了被称为“魔素”的具有生物活性的肽。

按照本发明的一个方面，提供了一种两亲性和带正电荷（碱性的）合成多肽。

更详细地说，本发明提供了一种至少有十六个氨基酸的碱性（带正电荷）的多肽，其中该多肽包括至少八个疏水氨基酸和至少八个亲水氨基酸。更具体一点说，疏水氨基酸是在两个邻近的氨基酸的组中并且每组的两个疏水氨基酸与另一组的两个疏水氨基酸被除疏水氨基酸之外的至少一个氨基酸（最好至少两个）和一般不多于四个疏水氨基酸所隔开。各对疏水氨基酸之间的氨基酸可以是亲水的，也可以不是亲水的。

一般，亲水氨基酸也是在两个邻近的氨基酸的组中，其中至少两个氨基酸中的一个是碱性的亲水氨基酸，同时这种两个亲水氨基酸的组被除亲水氨基酸以外的至少一个氨基酸（最好是至少两个）和一般不多于四个氨基酸彼此隔开。各对亲水氨基酸之间的氨基酸可以是疏水氨基酸，也可不是疏水的。

按照详细地最佳实施方案，该多肽包括至少由四组氨基酸的链，每组由四个氨基酸组成。每组中四个氨基酸的两个是疏水氨基酸，和

每组中四个氨基酸的两个是亲水的氨基酸，每组中至少有一个亲水氨基酸是碱性亲水氨基酸，另一个是碱性的或者中性的亲水氨基酸。

疏水氨基酸可从下类氨基酸中选择：Ala，Cys、Phe、Gly、Ile、Leu、Met、Val、Trp及Tyr。中性亲水氨基酸可从下类氨基酸中选择：Ser、Asn、Gln及Thr。碱性亲水氨基酸可选自Lys、Arg及His。

每组的四个氨基酸的序列可以是A B C D、B C D A、C D A B及D A B C，其中A和B各自为疏水氨基酸，并且可以相同或不同；C或D之一是碱性亲水氨基酸，C或D的另一个是碱性的或者中性的亲水氨基酸，并且可以相同或不同。在最佳实施方案中，多肽链可含5或6组上述序列。在每组中每个A、B、C及D在某些或全部组中可以相同，或在某些或全部组中，也可以不同。

该多肽链最好含有至少20个氨基酸，和不多于50个氨基酸。需要了解的是：多肽没有必要由全部的上述组组成。多肽可以有所提到的组的任意一端或两端伸出的氨基酸形成多肽链，和／或在至少四个组中的一个或多个组之间有氨基酸，并且这也属于本发明的范围。

氨基酸组可以是重复的，或者在不同组中的氨基酸也可以不同，条件是如上述在至少四组氨基酸中的每个组中，有两个疏水的和两个亲水的氨基酸。

因此，在最佳实施方案中，该生物活性的多肽由包括至少四组氨基酸的、每组含四个氨基酸的链组成。在每组中，四个氨基酸中的两个是疏水的，至少一个氨基酸是碱性亲水的，余下的一个是碱性或中性亲水的，多肽链最好至少有20个氨基酸，但不多于50个氨基酸。

在一个实施方案中，至少四组处于多肽链中的氨基酸每一组的序

列为A－B－C－D、B－C－D－A、C－D－A－B或D－A－B－C，其中A和B是疏水的，C或D之一是碱性亲水的，C或D的另一个是碱性或中性亲水的。因此，所得到的多肽链可以是下述序列之一。

$$(X_1)_a(A—B—C—D)_n(Y_1)$$

$$(X_2)(B—C—D—A)_n(Y_2)_b$$

$$(X_3)_a(C—D—A—B)_n(Y_3)_b$$

$$(X_4)_a(D—A—B—C)_n(Y_4)_b$$

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、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*

和n至少是*4*

需要了解的是：该肽链在上述提到的四个氨基酸的各组之间可以含有氨基酸，其条件是这些组之间的间隔及氨基酸上的电荷不改变两亲性及正电荷的肽链的特性，并且对相当不同于上述提到的四个氨基酸的组彼此没有隔开的那种链折叠性没有产生不利的影响。

按照本发明，作为有代表性的肽的实例可提及：

Ⅰ Ala—Phe—Ser—LYs—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—Ala—Phe—Ser—LYs—Ala—Phe—Ser—LYs

Ⅲ Phe—Ser—LYs—Ala—Phe—Ser—LYs—Ala—Phe—Ser—LYs—Ala—Phe—Ser—LYa—Ala

Ⅳ Ser—LYs—Ala—Phe—Ser—LYs—Ala—Phe—Ser—LYs—Ala—Phe—Ser—LYs—Ala—Phe—Ser—LYs—Als—Phe

Ⅴ LYs—Ala—Phe—Ser—LYs—Ala—Phe—Ser—LYs—Ala—Phe—Ser—LYs—Ala—Phe—Ser

该肽可有从链的任意一端延伸的氨基酸。例如，该链在“Ala”端前可以有Ser—LYs序列，和／或在“LYs”端后有Ala—Phe序列。其它氨基酸序列也可以连于“Ala”和／或“LYs”端。

同样，在本发明的至少有四组上述序列的氨基酸的任何多肽链中，该链在第一个A－B－C－D组前可以有例如C－D序列，其它氨基酸序列也可连于这些多肽链之一的“A”和／或“D”端。同时在链中也可以有氨基酸将上述提到的四个氨基酸的一组或几组彼此隔开。

本发明的多肽一般是水溶性的，中性PH在水中的浓度至少为20mg／ml。该多肽是非溶血性的，也就是说，在有效抗细菌浓度下它不破坏红血细胞。本发明的多肽结构提供了该多肽分子的柔韧性。当该多肽放入水中时，它不呈现两亲结构，当该多肽遇到油性表

面或膜时，其链自身折叠成类似棒状结构。

该肽可以用已知的技术生产，并以大体上纯的形式得到。例如，它们可以手工合成或用自动合成器来合成（J、A、C、S，85卷2149—54页（1963））。用基因工程技术生产这种肽也是可能的。

本发明的多肽是生物学活性或是生物活性的。其组合物可作抗细菌剂、抗病毒剂、抗菌素、抗肿瘤剂、杀精子剂以及显示其它的生物活性作用。

本文中使用的“抗细菌的”这一术语是指：本发明的多肽能抑制、防止或破坏如细菌、真菌、病毒等微生物的生长或增殖。

本文中所用的“抗菌的”这一术语是指：本发明中所用的多肽能对不利于细胞、组织或器官的正常生物功能，包括死亡或破坏产生影响，并当和该多肽接触时，能防止生物体系的生长和增殖。

本文中所用的“杀精子的”这一术语是指：本发明中使用的多肽抑制、阻止或破坏精子的游动。

本文中所用的“抗病毒的”这一术语是指：本发明中所用的多肽能抑制、防止或破坏病毒的生长或增殖。

本文中所用“抗肿瘤”这一术语是指：该肽能抑制或破坏肿瘤的生长。

本发明的多肽具有广泛的潜在的抗菌活性，可抗大多数微生物，包括革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、真菌、原生动物等。本发明的多肽提供了一种治疗或控制对该多肽敏感的有机体所引起的细菌传染的方法。这些的治疗可包括将抗细菌量的至少一种多肽施用到对细菌感染敏感的或受其感染的宿主机体或组织上。

因为该多肽的抗菌性，它们也可用作对于细菌污染敏感的物质的防腐剂或消毒剂。

除此，包括本发明多肽的药物组合物可以在无毒的药物载体或赋形剂如填料、无毒缓冲剂或生理盐水溶液结合或放在一起。这种药物组合物可以局部地或全身地被使用，并可以任何适用的形式使用，如液体、固体、半固体、注射溶液、片剂、软膏、洗剂、糊剂、胶囊等。该多肽组合物也可以和辅药、蛋白酶 抑制剂或能相容的药物结合使用，此时这种结合在控制包括原生动物病毒由有害的微生物引起的感染方面被认为是需要的或有好处的。

本发明的生物活性肽（类）可以施予宿主上：在特殊动物中，在有效的抗菌、和／或抗肿瘤和／或抗病毒和／或抗细菌和／或杀精子剂量中。

按照本发明另一方面，提供了含8—15个氨基酸的其中至少包括四个疏水氨基酸和四个亲水氨基酸的一种肽（多肽）。疏水氨基酸是在两个邻近的氨基酸组中，其中由两个疏水氨基酸组成的每一组被除疏水氨基酸以外的至少一个氨基酸（最好至少两个氨基酸），和一般不多于四个氨基酸彼此隔开，各对疏水氨基酸之间的氨基酸可以是亲水的，也可以不是亲水的。一般亲水氨基酸也是在两个邻近的氨基酸组中，其中两个氨基酸中至少一个是碱性或中性的。两个亲水氨基酸的组被除亲水氨基酸以外的至少一个氨基酸（最好至少是两个氨基酸）和一般不多于四个氨基酸彼此隔开，各对亲水氨基酸之间的氨基酸可以是疏水的，也可不是疏水的。

含8—15个氨基酸的肽是两亲性的和带正电荷的（碱性的）。

上述含8—15个氨基酸的肽可以是生物活性的，也可不是生物

活性的。当这种肽是非生物活性时，它可用作制备上述至少有16个氨基酸和生物活性肽的有用中间体。例如，两个肽，其一有8个氨基酸，另一有12个氨基酸，它们可彼此偶合形成上述类型的有生物活性的含20个氨基酸的肽。这种肽可以用标准的肽化学技术偶合起来。例如这种肽可用Johnson等人在Peptides 239—42页中所述的技术进行溶液缩合而制得（Walter de Gruzter & Co., 1986）。

作为这种肽的有代表性的例子，可以提出用下述结构表示的肽，其中A、B、C和D定义如前。

$$(I)\quad (W_1)_a(A\text{—}B\text{—}C\text{—}D)_n(Z_1)_b$$

$$(II)\quad (W_2)_a(B\text{—}C\text{—}D\text{—}A)_n(Z_2)_b$$

$$(III)\quad (W_3)_a(C\text{—}D\text{—}A\text{—}B)_n(Z_3)_b$$

$$(IV)\quad (W_4)_a(D\text{—}A\text{—}B\text{—}C)_n(Z_4)_b$$

其中W_1是D—、C—D—、B—C—D—

W_2是A—、D—A、C—D—A—

W_3是B—、A—B、D—A—B—

W_4是C—、B—C—、A—B—C—

Z_1是—A、—A—B、—A—B—C

Z_2是—B、—B—C、—B—C—D

Z_3是—C、—C—D、—C—D—A

Z_4是—D、—D—A、—D—A—B

n是2或3，a是0或1和b是0或1。

下述实施例用以说明本发明的生物活性多肽组合物的各种使用，但本发明的范围并不仅限于此。

实 施 例

在430A实用生物系统合成器中合成肽。通常的方法是使用上述的叔丁氧基(保护) Merrifield化学。

方法：叔丁氧基(保护)的—Lys(Cl—Z)—Pam树脂，取代0.57 mmol／g。

链的组合：0.5 mmol标度。予先对称酸酐以DMF为溶剂进行偶联，基于水合茚三酮监测，偶联效率超过97%。偶联温度10—15℃。

解离：用无水HF解除封闭，并从树脂上脱离。

纯度：基于反相HPLC分离，经过 C8 300 Å 10cm ×2.1 mm柱，在45分钟内用0—60%的缓冲剂B梯度展开，纯度大于95%(A＝0.1%TFA；B＝100 CH3OH／0.09% TFA)。在220nm处检查。本方法也用于肽的提纯。

表 1　　肽系列的抗细菌活性

	肽	抑制区	
		大肠杆菌	
		E.coli	*S.aureus*
1.	Ala—Phe—Ser—Lys	0	0
2.	Ala—Phe—Ser—Lys	0	0
	Ala—Phe—Ser—Lys—		
	Ala—Phe—Ser—Lys	0	0
3.	Ala—Phe—Ser—Lys—		
	Ala—Phe—Ser—Lys—		
	Ala—Phe—Ser—Lys	0	0
4.	Ala—Phe—Ser—Lys—		
	Ala—Phe—Ser—Lys—		
	Ala—Phe—Ser—Lys—		
5.	Ala—Phe—Ser—Lys—		
	Ala—Phe—Ser—Lys—		
	Ala—Phe—Ser—Lys—		
	Ala—Phe—Ser—Lys—		
	Ala—Phe—Ser—Lys	10	5
6.	Ala—Phe—Ser—Lys		
	Ala—Phe—Ser—Lys—		
	Ala—Phe—Ser—Lys—		
	Ala—Phe—Ser—Lys—		
	Ala—Phe—Ser—Lys—		
	Ala—Phe—Ser—Lys	20	10

来自中期对数生长的培养基约10^5细菌，注入到在胰蛋白酶解酪蛋白大豆培养基中的8 ml 10.7% 琼脂糖中，然后在胰蛋白酶解酪蛋白大豆培养基的1.5%琼脂糖的碟子上分层。在上层散置着浓度为5 mg／ml的10 μl各种肽，碟子在37℃保温8小时，测量生长的抑制区。

表 2　肽(类)的抗原生动物活性

肽	最低破坏浓度		
ug/ml	尾状核	螺旋体	
	P caudatum	A.castellani	T.pyriformis
1. Ala—Phe—Ser—Lys	>500	>500	>500
2. Ala—Phe—Ser—Lys—Ala—Phe—Ser—Lys	>500	>500	>500
3. Ala—Phe—Ser—Lys—Ala—Phe—Ser—Lys—Ala—Phe—Ser—Lys	>500	>500	>500
4. Ala—Phe—Ser—Lys—Ala—Phe—Ser—Lys—Ala—Phe—Ser—Lys—Ala—Phe—Ser—Lys	>500	>500	>500
5. Ala—Phe—Ser—Lys—Ala—Phe—Ser—Lys—Ala—Phe—Ser—Lys—Ala—Phe—Ser—Lys—Ala—Phe—Ser—Lys	50	10	50
6. Ala—Phe—Ser—Lys—Ala—Phe—Ser—Lys—Ala—Phe—Ser—Lys—Ala—Phe—Ser—Lys—Ala—Phe—Ser—Lys—Ala—Phe—Ser—Lys	10	5	10

把约10^2有机物置入约200ul的蒸馏水中，从在水中的5m／ml溶液中将肽加入。记录在室温下在10分钟之内发生的完全物理破坏时的浓度，可通过直接的显微镜检测加以测定。

取决于使用情况，本发明的组合物含有效抗细菌量的，和／或有效杀精子剂量的、和／或有效抗病毒剂量的、和／或有效抗肿瘤剂量的、和/ 或有效抗菌剂量的一个或多个具有如此活性的上述肽。

当用作局部地组合物时，该肽一般用量至少为0．1%重量。在大多数情况下，不必使用大于1．0%重量的肽。

在全身地使用这种组合物时（肌肉、静脉内的、腹膜内的），活性肽存在的量要达到该肽至少为5μg／ml的血清水平，一般而言，肽的血清水平不必要超过500μg／ml。通过全身地施用，将该肽以约10mg／Kg的剂量加入到组合物中，可以达到这样的血清水平。一般而言，该肽不必以超过100mg／Kg的剂量施用。

需要了解的是：本发明的范围不限于上述的特殊实施例。除了特别列举出的以外，各种多肽组合物的实施方案均可以被使用。除如特别说明外，本发明可被实施，并仍在附带的权利要求书范围内。