



(10) 授权公告号 CN 114829374 B

(45) 授权公告日 2025. 04. 04

(21) 申请号 202080058189.3

(22) 申请日 2020.08.28

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114829374 A

(43) 申请公布日 2022.07.29

(30) 优先权数据
1912320.7 2019.08.28 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2022.02.17

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/GB2020/052058 2020.08.28

(87) PCT国际申请的公布数据
W02021/038232 EN 2021.03.04

(73) 专利权人 拜斯科技开发有限公司
地址 英国剑桥

(72) 发明人 K·V·里茨霍滕 P·贝斯维克
M·道森 M·巴姆福斯
M·斯凯纳 L·陈

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314
专利代理师 程伟 程云

(51) Int.Cl.
C07K 7/08 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(56) 对比文件
WO 2019002842 A1, 2019.01.03
审查员 肖愿

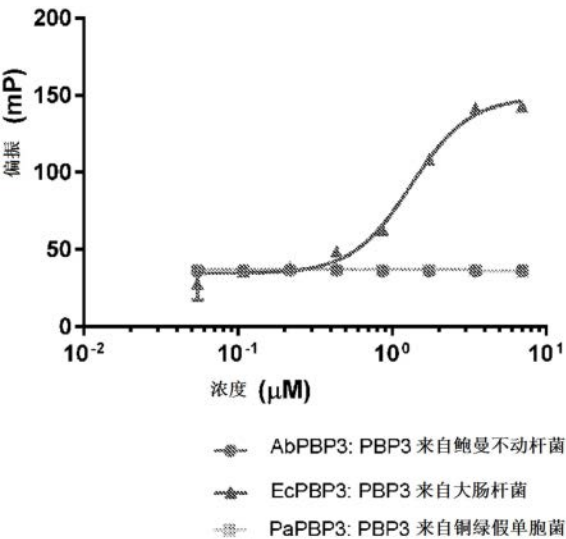
权利要求书2页 说明书21页
序列表9页 附图5页

(54) 发明名称

结合PBP的双环肽配体

(57) 摘要

本发明涉及多肽,其与分子支架共价结合,使得在支架的连接点之间对向存在两个或更多个肽环。特别地,本发明描述了作为青霉素结合蛋白(PBP)的高亲和力结合物的肽。本发明还包括包含所述肽配体的药物组合物、和所述肽配体在抑制或治疗由细菌感染介导的疾病或疾患中的用途、或在有感染风险的受试者提供预防中的用途。



1. 一种能够结合青霉素结合蛋白 (PBP) 的肽配体或其药学上可接受的盐, 所述肽配体包含多肽和分子支架, 所述多肽包含被至少两个环序列隔开的至少三个半胱氨酸残基, 并且所述分子支架与所述多肽的半胱氨酸残基形成共价键, 使得在所述分子支架上形成至少两个多肽环, 其中

(a) 所述分子支架是 1,1',1''-(1,3,5-三嗪烷-1,3,5-三基)三丙-2-烯-1-酮 (TATA); 和

(b) 所述 PBP 是

(i) 肺炎链球菌 PBP1a, 并且所述多肽具有选自以下的氨基酸序列:

C_iRFSSC_{ii}PPYHVC_{iii} (SEQ ID NO:1);
 C_iPYTSC_{ii}PPHTMC_{iii} (SEQ ID NO:2);
 C_iHPRHQEGYC_{ii}MPC_{iii} (SEQ ID NO:3);
 C_iYNHKGAMC_{ii}THPC_{iii} (SEQ ID NO:4);
 C_iHDWDYRHL C_{ii}YWRC_{iii} (SEQ ID NO:5);
 C_iDIYREC_{ii}HYTSWSVC_{iii} (SEQ ID NO:6);
 C_iKPSLSC_{ii}QHLPRALC_{iii} (SEQ ID NO:7);
 C_iPFTGPC_{ii}RPHYIC_{iii} (SEQ ID NO:8);
 C_iYTSC_{ii}PEHHVFAC_{iii} (SEQ ID NO:9);
 C_iDNC_{ii}WERQWYAC_{iii} (SEQ ID NO:10);
 C_iNPRC_{ii}HPVYTSFFC_{iii} (SEQ ID NO:11);
 C_iGAPC_{ii}RPHYVPWFC_{iii} (SEQ ID NO:12);
 C_iPPVC_{ii}RPHYVHWC_{iii} (SEQ ID NO:21);
 C_iPVGC_{ii}RPHYVHWC_{iii} (SEQ ID NO:22);
 C_iRYTSC_{ii}PPYTVC_{iii} (SEQ ID NO:23);
 C_iPYTSC_{ii}PPYTHC_{iii} (SEQ ID NO:24);
 C_iPYTTC_{ii}PPYHAC_{iii} (SEQ ID NO:25);
 C_iVFTTC_{ii}PPYTVC_{iii} (SEQ ID NO:26); 和
 C_iTYTTC_{ii}PPFTIC_{iii} (SEQ ID NO:27); 或

(ii) 大肠杆菌 PBP1b, 并且所述多肽具有选自以下的氨基酸序列:

C_iVYAPENLLC_{ii}GSC_{iii} (SEQ ID NO:13);
 C_iSNPTC_{ii}VYTPTNLFC_{iii} (SEQ ID NO:14);
 C_iNTC_{ii}IYASENLLC_{iii} (SEQ ID NO:15);
 C_iSATWGSRC_{ii}PVKFC_{iii} (SEQ ID NO:16);
 C_iPNAC_{ii}WTVHYSYGQC_{iii} (SEQ ID NO:17);
 C_iHEFSLDC_{ii}ILFGTSC_{iii} (SEQ ID NO:18);
 C_iWGSWRC_{ii}PIVHSC_{iii} (SEQ ID NO:28);
 C_iWGLRC_{ii}PIVHSC_{iii} (SEQ ID NO:29);
 C_iWGLRC_{ii}PIHYSC_{iii} (SEQ ID NO:30);
 C_iWGLRC_{ii}PIKWDC_{iii} (SEQ ID NO:31);
 C_iWGLRC_{ii}PITAHSC_{iii} (SEQ ID NO:32);
 C_iWGSKAC_{ii}PITWHC_{iii} (SEQ ID NO:33);

C_i WGS RQC_{ii} PISW TC_{iii} (SEQ ID NO:34) ;

C_i WGTQ KC_{ii} PVG YWC_{iii} (SEQ ID NO:35) ;

C_i WGS KSC_{ii} PITW KC_{iii} (SEQ ID NO:36) ;和

C_i WGTS AC_{ii} PVT HEC_{iii} (SEQ ID NO:37) ;或

(iii) 大肠杆菌PBP3, 并且所述多肽具有选自以下的氨基酸序列:

C_i SFP KC_{ii} PWVE GC_{iii} (SEQ ID NO:19) ;和

C_i RTF GC_{ii} WW EGC_{iii} (SEQ ID NO:20) ,

其中 C_i 、 C_{ii} 和 C_{iii} 表示第一、第二和第三半胱氨酸残基。

2. 如权利要求1所定义的肽配体或其药学上可接受的盐, 其中所述药学上可接受的盐选自钠、钾、钙和铵盐。

3. 如权利要求1所定义的肽配体或其药学上可接受的盐, 其中所述PBP是大肠杆菌PBP3, 并且所述多肽具有氨基酸序列 C_i SFP KC_{ii} PWVE GC_{iii} (SEQ ID NO:19) 。

4. 如权利要求3所定义的肽配体或其药学上可接受的盐, 其中所述药学上可接受的盐选自钠、钾、钙和铵盐。

5. 一种药物组合物, 其包含权利要求1或权利要求2所述的肽配体或其药学上可接受的盐, 与一种或多种药学上可接受的赋形剂组合。

6. 如权利要求5所定义的药物组合物, 其另外包含一种或多种治疗剂。

7. 一种药物组合物, 其包含权利要求3或权利要求4所述的肽配体或其药学上可接受的盐, 与一种或多种药学上可接受的赋形剂组合。

8. 如权利要求7所定义的药物组合物, 其另外包含一种或多种治疗剂。

9. 权利要求3或权利要求4所定义的肽配体或其药学上可接受的盐、或如权利要求7或权利要求8所定义的药物组合物在制备用于抑制或治疗大肠杆菌细菌感染介导的疾病或疾患、或用于对有这种感染风险的受试者提供预防的药物中的用途。

结合PBP的双环肽配体

技术领域

[0001] 本发明涉及多肽,其与分子支架共价结合,使得在支架的连接点之间对向存在(subtend)两个或更多个肽环。特别地,本发明描述了作为青霉素结合蛋白(PBP)的高亲和力结合物的肽。本发明还包括包含所述肽配体的药物组合物、和所述肽配体在抑制或治疗由细菌感染介导的疾病或疾患中的用途、或在对有感染风险的受试者提供预防中的用途。

背景技术

[0002] 环肽能够以高亲和力和靶标特异性与蛋白质靶标结合,因此是对于治疗剂开发有吸引力的分子类别。事实上,临床上已经成功使用了几种环肽,例如抗菌肽万古霉素、免疫抑制剂环孢霉素或抗癌药奥曲肽(Driggers等人(2008),Nat Rev Drug Discov 7(7),608-24)。良好的结合特性是由于肽与靶标之间形成的相对较大的相互作用表面以及环状结构的构象柔韧性降低所致。通常,大环与数百平方埃的表面结合,例如环肽CXCR4拮抗剂CVX15 ($400 \text{ \AA}^2$;Wu等人(2007),Science 330,1066-71)、具有与整合蛋白 $\alpha\text{V}\beta 3$ ($355 \text{ \AA}^2$)结合的Arg-Gly-Asp基序的环肽(Xiong等人(2002),Science 296(5565),151-5)或结合尿激酶型纤溶酶原激活因子的环肽抑制剂upain-1 ($603 \text{ \AA}^2$;Zhao等人(2007),J Struct Biol 160(1),1-10)。

[0003] 由于其环状构型,肽大环比线性肽柔韧性差,导致与靶标结合后熵损失较小,并导致更高的结合亲和力。与线性肽相比,降低的柔韧性还导致锁定靶标特异性构象,增加结合特异性。这种作用已通过一种基质金属蛋白酶8(MMP-8)的有效的和选择性抑制剂得到了例证,该抑制剂在开环时失去相对于其他MMP的选择性(Cherney等人(1998),J Med Chem 41(11),1749-51)。通过大环化获得的有利的结合性质在具有多于一个肽环的多环肽中更为显著,例如在万古霉素、乳酸链球菌肽和放线菌素中。

[0004] 不同的研究团队先前已将具有半胱氨酸残基的多肽系于(tether)一个合成的分子结构上(Kemp和McNamara(1985),J.Org.Chem;Timmerman等人(2005),ChemBioChem)。Meloan和同事已使用三(溴甲基)苯和相关分子将多个肽环快速定量地环化到合成支架上,以结构模拟蛋白质表面(Timmerman等人(2005),ChemBioChem)。WO 2004/077062和WO 2006/078161中公开了用于生成候选药物化合物的方法,其中所述化合物是通过将包含半胱氨酸的多肽连接到分子支架上而生成的,所述分子支架例如为三(溴甲基)苯。

[0005] 已经开发了基于噬菌体展示的组合方法以生成和筛选针对目标靶标的双环肽的大型文库(Heinis等人(2009),Nat Chem Biol 5(7),502-7和WO 2009/098450)。简而言之,在噬菌体上展示了包含三个半胱氨酸残基和两个六随机氨基酸的区域(Cys-(Xaa)₆-Cys-(Xaa)₆-Cys)的线性肽的组合文库,并通过将半胱氨酸侧链共价连接至小分子支架来进行环化。

发明内容

[0006] 根据本发明的第一方面,提供了一种能够结合一种或多种青霉素结合蛋白(PBP)

的肽配体,其包含多肽和分子支架,所述多肽包含被至少两个环序列隔开的至少三个半胱氨酸残基,并且所述分子支架与所述多肽的半胱氨酸残基形成共价键,使得在分子支架上形成至少两个多肽环。

[0007] 根据本发明的进一步的方面,提供了一种药物组合物,其包含如本文所定义的肽配体,与一种或多种药学上可接受的赋形剂组合。

[0008] 根据本发明的进一步的方面,提供了如本文所定义的肽配体,其用于抑制或治疗细菌感染介导的疾病或疾患的用途、或对有感染风险的受试者提供预防的用途。

附图说明

[0009] 图1:BCY12130与来自鲍曼不动杆菌 (*A.baumannii*) (圆圈)、大肠杆菌 (*E.coli*) (三角形) 和铜绿假单胞菌 (*P.aeruginosa*) (方形) 的PBP3结合的荧光偏振试验的直接结合数据。

[0010] 图2:A) 使用BCY12130与Bocillin (BODIPY-青霉素) 竞争的大肠杆菌PBP3荧光偏振试验的竞争结合数据。B) 如A中所述,但使用BCY12130 (圆圈, K_i 0.24 μ M) 和羧苄青霉素 (方形, K_i 0.52 μ M) 的大肠杆菌PBP3荧光偏振试验的竞争结合数据。

[0011] 图3:A) 显微图像显示了在不存在或存在指定浓度的BCY12130时生长的大肠杆菌的形态。B) 如A中所述,但为鼠伤寒沙门氏菌 (*S.typhimurium*)。C) 如B中所述,但为阴沟肠杆菌 (*E.cloacae*) (所有比例尺=10 μ m)。

具体实施方式

[0012] 在一个实施方案中,所述环序列包含2、3、4、5、6、7、8或9个氨基酸。

[0013] 在进一步的实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列均由4个氨基酸组成。此类环序列的例子是如本文所述的BCY12132内的那些。

[0014] 在进一步的实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的一个由4个氨基酸组成,另一个由5个氨基酸组成。此类环序列的例子是如本文所述的BCY9377、BCY9378、BCY12130、BCY10020、BCY10022、BCY10024、BCY10025和BCY10026内的那些。

[0015] 在进一步的实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的一个由8个氨基酸组成,另一个由2个氨基酸组成。此类环序列的例子是如本文所述的BCY9381、BCY9226和BCY9229内的那些。

[0016] 在进一步的实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的一个由8个氨基酸组成,另一个由3个氨基酸组成。此类环序列的例子是如本文所述的BCY9382、BCY9383、BCY9389、BCY9391、BCY10027和BCY10028内的那些。

[0017] 在进一步的实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的一个由5个氨基酸组成,另一个由7个氨基酸组成。此类环序列的例子是如本文所述的BCY9384和BCY9385内的那些。

[0018] 在进一步的实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的一个由5个氨基酸组成,另一个由5个氨基酸组成。此类环序列的例子

是如本文所述的BCY9386、BCY13797、BCY14381、BCY14613、BCY14618、BCY14619、BCY14621、BCY14627、BCY14629、BCY14631和BCY14641内的那些。

[0019] 在进一步的实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的一个由3个氨基酸组成,另一个由7个氨基酸组成。此类环序列的例子是如本文所述的BCY9387内的那些。

[0020] 在进一步的实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的一个由2个氨基酸组成,另一个由7个氨基酸组成。此类环序列的例子是如本文所述的BCY9388内的那些。

[0021] 在进一步的实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的一个由4个氨基酸组成,另一个由8个氨基酸组成。此类环序列的例子是如本文所述的BCY9227和BCY9233内的那些。

[0022] 在进一步的实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的一个由3个氨基酸组成,另一个由9个氨基酸组成。此类环序列的例子是如本文所述的BCY9237内的那些。

[0023] 在进一步的实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的一个由6个氨基酸组成,另一个由6个氨基酸组成。此类环序列的例子是如本文所述的BCY9238内的那些。

[0024] 本文提及的PBP包括“青霉素结合蛋白”,其可以存在于任何细菌物种中。在一个实施方案中,所述PBP是存在于一种或多种病原细菌物种内的PBP。在进一步的实施方案中,所述一种或多种病原细菌物种选自以下任一项:鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、炭疽杆菌(*Bacillus anthracis*)、百日咳博德特氏菌(*Bordetella pertussis*)、伯氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)、流产布鲁氏菌(*Brucella abortus*)、犬布鲁氏菌(*Brucella canis*)、马耳他布鲁氏菌(*Brucella melitensis*)、猪布鲁氏菌(*Brucella suis*)、空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*)、肺炎衣原体(*Chlamydia pneumonia*)、沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)、鹦鹉热衣原体(*Chlamydophila psittaci*)、肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*)、艰难梭菌(*Clostridium difficile*)、产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)、破伤风梭菌(*Clostridium tetani*)、白喉棒状杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*)、棘球绦虫(*Echinococcus*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*) (如产肠毒素大肠杆菌、肠致病性大肠杆菌、肠出血大肠杆菌或肠聚集性大肠杆菌)、土拉弗朗西斯菌(*Francisella tularensis*)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)、嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)、问号钩端螺旋体(*Leptospira interrogans*)、单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、麻风分枝杆菌(*Mycobacterium leprae*)、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、溃疡分枝杆菌(*Mycobacterium ulcerans*)、肺炎支原体(*Mycoplasma pneumonia*)、淋病奈瑟菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎奈瑟菌(*Neisseria meningitidis*)、肺炎球菌(*Pneumococcus*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、立克次氏体(*Rickettsia rickettsia*)、沙门氏菌(如邦戈尔沙门氏菌(*Salmonella bongori*)、肠沙门氏菌(*Salmonella enterica*)、地下沙门氏菌(*Salmonella*

subterranean)、伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhi*) 或鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、志贺氏菌 (如索氏志贺氏菌 (*Shigella sonnei*) 或痢疾志贺氏菌 (*Shigella dysenteriae*))、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) (如MRSA)、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)、腐生葡萄球菌 (*Staphylococcus saprophyticus*)、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、苍白密螺旋体 (*Treponema pallidum*)、霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 或鼠疫耶尔森菌 (*Yersinia pestis*)。

[0025] 在一个实施方案中,所述PBP是存在于肺炎链球菌内的PBP。在进一步的实施方案中,所述存在于肺炎链球菌内的PBP选自以下5种PBP:1a、1b、2a、2x和2b。在更进一步的实施方案中,所述存在于肺炎链球菌内的PBP是PBP1a。

[0026] 在可选的实施方案中,所述PBP是存在于大肠杆菌内的PBP。在进一步的实施方案中,所述存在于大肠杆菌内的PBP选自以下12种PBP:1a、1b、1c、2、3、4、5、6、7/8、DacD、AmpC和AmpH。在更进一步的实施方案中,所述存在于大肠杆菌内的PBP是PBP1b。在另一个实施方案中,所述存在于大肠杆菌内的PBP是PBP3。

[0027] 在进一步的实施方案中,所述PBP是存在于铜绿假单胞菌内的PBP。在更进一步的实施方案中,所述存在于铜绿假单胞菌内的PBP选自以下7种PBP:1a、1b、2、3、3a、4和5。在进一步的实施方案中,所述存在于铜绿假单胞菌内的PBP是PBP3。

[0028] 在进一步的实施方案中,所述PBP是存在于鲍曼不动杆菌内的PBP。在更进一步的实施方案中,所述存在于鲍曼不动杆菌内的PBP选自以下9种PBP:1a、1b、2、3、4、5、6、7和8。在进一步的实施方案中,所述存在于鲍曼不动杆菌内的PBP是PBP3。

[0029] 在一个实施方案中,细胞分裂需要PBP,如FtsI。在进一步的实施方案中,所述FtsI存在于大肠杆菌、鲍曼不动杆菌或铜绿假单胞菌中,并且称为PBP3。因此,根据本发明的某些实施方案,PBP3是FtsI。在一个实施方案中,所述PBP不是PBP3和/或FtsI。

[0030] 在一个实施方案中,所述PBP是肺炎链球菌PBP1a,所述肽配体包含选自以下的氨基酸序列:

- [0031] C_iRFSSC_{ii}PPYHVC_{iii} (SEQ ID NO:1);
- [0032] C_iPYTSC_{ii}PPHTMC_{iii} (SEQ ID NO:2);
- [0033] C_iHPRHQEGYC_{ii}MPC_{iii} (SEQ ID NO:3);
- [0034] C_iYNHKGAMC_{ii}THPC_{iii} (SEQ ID NO:4);
- [0035] C_iHDWDYRHLC_{ii}YWRC_{iii} (SEQ ID NO:5);
- [0036] C_iDIYREC_{ii}HYTSWSVC_{iii} (SEQ ID NO:6);
- [0037] C_iKPSLSC_{ii}QHLPRALC_{iii} (SEQ ID NO:7);
- [0038] C_iPFTGPC_{ii}RPHYIC_{iii} (SEQ ID NO:8);
- [0039] C_iYTSC_{ii}PEHHVFAC_{iii} (SEQ ID NO:9);
- [0040] C_iDNC_{ii}WERQWYAC_{iii} (SEQ ID NO:10);
- [0041] C_iNPRC_{ii}HPVYTSFFC_{iii} (SEQ ID NO:11);
- [0042] C_iGAPC_{ii}RPHYVPWFC_{iii} (SEQ ID NO:12);
- [0043] C_iPPVC_{ii}RPHYVHWC_{iii} (SEQ ID NO:21);
- [0044] C_iPVGC_{ii}RPHYVHWC_{iii} (SEQ ID NO:22);

- [0045] C_i RYTSC $_{ii}$ PPYTVC $_{iii}$ (SEQ ID NO:23) ;
[0046] C_i PYTSC $_{ii}$ PPYTHC $_{iii}$ (SEQ ID NO:24) ;
[0047] C_i PYTTC $_{ii}$ PPYHAC $_{iii}$ (SEQ ID NO:25) ;
[0048] C_i VFTTC $_{ii}$ PPYTVC $_{iii}$ (SEQ ID NO:26) ;和
[0049] C_i TYTTC $_{ii}$ PPFTIC $_{iii}$ (SEQ ID NO:27) ,
[0050] 或其药学上可接受的盐,其中 C_i 、 C_{ii} 和 C_{iii} 分别表示第一、第二和第三半胱氨酸残基。

[0051] 在进一步的实施方案中,所述PBP是肺炎链球菌PBP1a,所述肽配体包含选自以下的氨基酸序列:

- [0052] A- (SEQ ID NO:1) -A (BCY9377) ;
[0053] A- (SEQ ID NO:2) -A (BCY9378) ;
[0054] A- (SEQ ID NO:3) -A (BCY9381) ;
[0055] A- (SEQ ID NO:4) -A (BCY9382) ;
[0056] A- (SEQ ID NO:5) -A (BCY9383) ;
[0057] A- (SEQ ID NO:6) -A (BCY9384) ;
[0058] A- (SEQ ID NO:7) -A (BCY9385) ;
[0059] A- (SEQ ID NO:8) -A (BCY9386) ;
[0060] A- (SEQ ID NO:9) -A (BCY9387) ;
[0061] A- (SEQ ID NO:10) -A (BCY9388) ;
[0062] A- (SEQ ID NO:11) -A (BCY9389) ;
[0063] A- (SEQ ID NO:12) -A (BCY9391) ;
[0064] A- (SEQ ID NO:21) -A (BCY10028) ;
[0065] A- (SEQ ID NO:22) -A (BCY10027) ;
[0066] A- (SEQ ID NO:23) -A (BCY10026) ;
[0067] A- (SEQ ID NO:24) -A (BCY10025) ;
[0068] A- (SEQ ID NO:25) -A (BCY10024) ;
[0069] A- (SEQ ID NO:26) -A (BCY10022) ;和
[0070] A- (SEQ ID NO:27) -A (BCY10020) ,
[0071] 或其药学上可接受的盐。

[0072] 在一个实施方案中,所述PBP是大肠杆菌PBP1b,所述肽配体包含选自以下的氨基酸序列:

- [0073] C_i VYAPENLLC $_{ii}$ GSC $_{iii}$ (SEQ ID NO:13) ;
[0074] C_i SNPTC $_{ii}$ VYTPTNLFC $_{iii}$ (SEQ ID NO:14) ;
[0075] C_i NTC $_{ii}$ IYASENLLC $_{iii}$ (SEQ ID NO:15) ;
[0076] C_i SATWGSRSC $_{ii}$ PVKFC $_{iii}$ (SEQ ID NO:16) ;
[0077] C_i PNAC $_{ii}$ WTVHYSYGYQC $_{iii}$ (SEQ ID NO:17) ;
[0078] C_i HEFSLDC $_{ii}$ ILFGTSC $_{iii}$ (SEQ ID NO:18) ;
[0079] C_i WGSWRC $_{ii}$ PIVHSC $_{iii}$ (SEQ ID NO:28) ;
[0080] C_i WGSRLC $_{ii}$ PIVHSC $_{iii}$ (SEQ ID NO:29) ;

- [0081] C_i WGSLRC $_{ii}$ PIHYSC $_{iii}$ (SEQ ID NO:30) ;
[0082] C_i WGSLRC $_{ii}$ PIKWDC $_{iii}$ (SEQ ID NO:31) ;
[0083] C_i WGSLRC $_{ii}$ PITAHC $_{iii}$ (SEQ ID NO:32) ;
[0084] C_i WGSKAC $_{ii}$ PITWHC $_{iii}$ (SEQ ID NO:33) ;
[0085] C_i WGSRQC $_{ii}$ PISWTC $_{iii}$ (SEQ ID NO:34) ;
[0086] C_i WGTQKC $_{ii}$ PVGYWC $_{iii}$ (SEQ ID NO:35) ;
[0087] C_i WGSKSC $_{ii}$ PITWKC $_{iii}$ (SEQ ID NO:36) ;和
[0088] C_i WGTSAC $_{ii}$ PVTHEC $_{iii}$ (SEQ ID NO:37) ,
[0089] 或其药学上可接受的盐,其中 C_i 、 C_{ii} 和 C_{iii} 分别表示第一、第二和第三半胱氨酸残基。

[0090] 在进一步的实施方案中,所述PBP是大肠杆菌PBP1b,所述肽配体包含选自以下的氨基酸序列:

- [0091] A- (SEQ ID NO:13) -A (BCY9226) ;
[0092] A- (SEQ ID NO:14) -A (BCY9227) ;
[0093] A- (SEQ ID NO:15) -A (BCY9229) ;
[0094] A- (SEQ ID NO:16) -A (BCY9233) ;
[0095] A- (SEQ ID NO:17) -A (BCY9237) ;
[0096] A- (SEQ ID NO:18) -A (BCY9238) ;
[0097] A- (SEQ ID NO:28) -A (BCY14613) ;
[0098] A- (SEQ ID NO:29) -A (BCY13797) ;
[0099] A- (SEQ ID NO:30) -A (BCY14618) ;
[0100] A- (SEQ ID NO:31) -A (BCY14621) ;
[0101] A- (SEQ ID NO:32) -A (BCY14619) ;
[0102] A- (SEQ ID NO:33) -A (BCY14627) ;
[0103] A- (SEQ ID NO:34) -A (BCY14629) ;
[0104] A- (SEQ ID NO:35) -A (BCY14631) ;
[0105] A- (SEQ ID NO:36) -A (BCY14641) ;和
[0106] A- (SEQ ID NO:37) -A (BCY14381) ,
[0107] 或其药学上可接受的盐。

[0108] 在一个实施方案中,所述PBP是大肠杆菌PBP3,所述肽配体包含选自以下的氨基酸序列:

- [0109] C_i SFPKC $_{ii}$ PWVEGC $_{iii}$ (SEQ ID NO:19) ;和
[0110] C_i RTFGC $_{ii}$ WVEGC $_{iii}$ (SEQ ID NO:20) ,
[0111] 或其药学上可接受的盐,其中 C_i 、 C_{ii} 和 C_{iii} 表示第一、第二和第三半胱氨酸残基。
[0112] 在进一步的实施方案中,所述PBP是大肠杆菌PBP3,所述肽配体包含选自以下的氨基酸序列:
[0113] A- (SEQ ID NO:19) -A (在本文中称为BCY12130) ;和
[0114] A- (SEQ ID NO:20) -A (在本文中称为BCY12132) ,
[0115] 或其药学上可接受的盐。

[0116] 在一个实施方案中,所述肽配体不是BCY12130和BCY12132。

[0117] 除非另有定义,否则本文所用的所有技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常理解的相同含义,如肽化学、细胞培养和噬菌体展示、核酸化学和生物化学领域。分子生物学、遗传和生化方法使用了标准技术(参见Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第3版,2001,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY;Ausubel等人,Short Protocols in Molecular Biology(1999),第4版,John Wiley&Sons,Inc.),其通过引用并入本文。

[0118] 术语

[0119] 编号

[0120] 当提及本发明的肽内的氨基酸残基位置时,由于半胱氨酸残基(C_i 、 C_{ii} 和 C_{iii})不变而从编号中省略了,因此,本发明的肽内的氨基酸残基的编号如下提及:

[0121] C_i -R₁-F₂-S₃-S₄-C_{ii}-P₅-P₆-Y₇-H₈-V₉-C_{iii}(SEQ ID NO:1)。

[0122] 为了该描述的目的,假定所有双环肽都与1,1',1''-(1,3,5-三嗪烷-1,3,5-三基)三丙-2-烯-1-酮(TATA)环化并产生三取代的结构。与TATA的环化发生在 C_i 、 C_{ii} 和 C_{iii} 上。

[0123] 分子形式

[0124] 双环核心序列的N-或C-末端延伸区添加于序列的左侧或右侧,以连字符分隔。例如,N-末端的βAla-Sar10-Ala尾巴将表示为:

[0125] βAla-Sar10-A- (SEQ ID NO:X)。

[0126] 反向肽序列

[0127] 根据Nair等人(2003),J Immunol 170(3),1362-1373中的公开,设想本文公开的肽序列也将以其逆-反形式使用。例如,该序列逆转(即N-末端变为C-末端,反之亦然),其立体化学同样也逆转(即D-氨基酸变为L-氨基酸,反之亦然)。

[0128] 肽配体

[0129] 如本文所指的,肽配体是指与分子支架共价结合的肽。通常,这样的肽包含两个或更多个能够与支架形成共价键的反应性基团(即半胱氨酸残基),和在所述反应性基团之间对向存在的序列,所述序列因为当所述肽与所述支架结合时形成环而被称为环序列。在这种情况下,所述肽包含至少三个半胱氨酸残基(在本文中称为 C_i 、 C_{ii} 和 C_{iii}),并且在所述支架上形成至少两个环。

[0130] 肽配体的优点

[0131] 本发明的某些双环肽具有许多有利的性质,其使它们被认为是适合注射、吸入、经鼻、经眼、口服或局部施用的类药物分子。这样的有利的性质包括:

[0132] -物种交叉反应性。某些配体在来自不同细菌物种的PBP之间表现出交叉反应性,因此能够治疗由多种细菌物种引起的感染。其他配体可以对某些细菌物种的PBP具有高度特异性,其可以有利于治疗感染而不会对患者的有益菌群造成附带损害;

[0133] -蛋白酶稳定性。双环肽配体理想地应表现出对血浆蛋白酶、上皮(“膜锚定的”)蛋白酶、胃和肠蛋白酶、肺表面蛋白酶、细胞内蛋白酶等的稳定性。蛋白酶的稳定性应当在不同物种之间保持,使得可以在动物模型中开发双环先导候选物,并可以有把握地对人施用;

[0134] -理想的溶解度曲线。其是带电荷的和亲水的残基相对于疏水的残基和分子内/分子间氢键的比例的函数,其对于制剂和吸收目的很重要;

[0135] -在循环中最佳的血浆半衰期。取决于临床适应症和治疗方案,可能需要开发在急性疾病管理环境中短时间暴露的双环肽;或者开发在循环中保留增强的双环肽,其因此对于治疗更慢性的疾病状态是最佳的。导致理想的血浆半衰期的其他因素是持续暴露以实现最大治疗效率的要求,相对于由于持续暴露于试剂而伴随的毒理;和

[0136] -选择性。本发明的某些肽配体表现出对特定PBP同种型的选择性,并且本发明的某些其他肽配体可以抑制一种以上的PBP同种型。

[0137] 药学上可接受的盐

[0138] 将理解的是,盐形式在本发明的范围内,并且提及肽配体包括所述配体的盐形式。

[0139] 本发明的盐可以由包含碱性或酸性部分的母体化合物合成,其通过常规化学方法如Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, P. Heinrich Stahl (编辑), Camille G. Wermuth (编辑), ISBN: 3-90639-026-8, 精装, 388页, 2002年8月中所述的方法。通常,这样的盐可以通过使这些化合物的游离酸或碱形式与合适的碱或酸在水中或在有机溶剂中、或在两者的混合物中反应来制备。

[0140] 可以用很多种无机和有机酸形成酸加成盐(单盐或二盐)。酸加成盐的示例包括与酸形成的单盐或二盐,所述酸选自乙酸、2,2-二氯乙酸、己二酸、藻酸、抗坏血酸(例如L-抗坏血酸)、L-天冬氨酸、苯磺酸、苯甲酸、4-乙酰氨基苯甲酸、丁酸、(+)-樟脑、樟脑磺酸、(+)-(1S)-樟脑-10-磺酸、癸酸、己酸、辛酸、肉桂酸、柠檬酸、环己氨磺酸、十二烷基硫酸、乙烷-1,2-二磺酸、乙磺酸、2-羟基乙磺酸、甲酸、富马酸、半乳糖二酸、龙胆酸、葡庚糖酸、D-葡萄糖酸、葡萄糖醛酸(例如D-葡萄糖醛酸)、谷氨酸(例如L-谷氨酸)、 α -氧代戊二酸、乙醇酸、马尿酸、氢卤酸(例如氢溴酸、盐酸、氢碘酸)、羟基乙磺酸、乳酸(例如(+)-L-乳酸、(±)-DL-乳酸)、乳糖酸、马来酸、苹果酸、(-)-L-苹果酸、丙二酸、(±)-DL-扁桃酸、甲磺酸、萘-2-磺酸、萘-1,5-二磺酸、1-羟基-2-萘酸、烟酸、硝酸、油酸、乳酸、草酸、棕榈酸、扑酸、磷酸、丙酸、丙酮酸、L-焦谷氨酸、水杨酸、4-氨基水杨酸、癸二酸、硬脂酸、琥珀酸、硫酸、鞣酸、(+)-L-酒石酸、硫氰酸、对甲苯磺酸、十一碳烯酸和戊酸,以及酰化的氨基酸和阳离子交换树脂。

[0141] 一组特别的盐由由以下形成的盐组成:乙酸、盐酸、氢碘酸、磷酸、硝酸、硫酸、柠檬酸、乳酸、琥珀酸、马来酸、苹果酸、羟基乙磺酸、富马酸、苯磺酸、甲苯磺酸、硫酸、甲磺酸(methanesulfonic, mesylate)、乙磺酸、萘磺酸、戊酸、丙酸、丁酸、丙二酸、葡萄糖醛酸和乳糖酸。一种特别的盐是盐酸盐。另一种特别的盐是乙酸盐。

[0142] 如果化合物是阴离子的,或具有可以是阴离子的官能团(例如-COOH可以是-COO⁻),则可以与有机或无机碱形成盐,生成合适的阳离子。合适的无机阳离子的示例包括但不限于:碱金属离子如Li⁺、Na⁺和K⁺,碱土金属阳离子如Ca²⁺和Mg²⁺,和其他阳离子如Al³⁺或Zn²⁺。合适的有机阳离子的示例包括但不限于铵离子(即NH₄⁺)和被取代的铵离子(例如NH₃R⁺、NH₂R₂⁺、NHR₃⁺和NR₄⁺)。一些合适的被取代的铵离子的示例是那些衍生自以下的:甲胺、乙胺、二乙胺、丙胺、二环己胺、三乙胺、丁胺、乙二胺、乙醇胺、二乙醇胺、哌嗪、苄胺、苯基苄胺、胆碱、葡甲胺和氨丁三醇,以及氨基酸,如赖氨酸和精氨酸。常见的季铵离子的一个示例是N(CH₃)₄⁺。

[0143] 当本发明的肽包含胺官能团时,其可以例如根据技术人员众所周知的方法与烷基化剂反应而形成季铵盐。这样的季铵化合物在本发明的肽的范围内。

[0144] 修饰衍生物

[0145] 将理解的是,本文所定义的肽配体的修饰衍生物在本发明的范围内。这样的合适的修饰衍生物的示例包括选自以下的一种或多种修饰:N-末端和/或C-末端修饰;用一个或多个非天然氨基酸残基替换一个或多个氨基酸残基(如用一个或多个电子等排的或等电子的氨基酸替换一个或多个极性氨基酸残基;用其他非天然电子等排的或等电子的氨基酸替换一个或多个非极性氨基酸残基);间隔基团的添加;用一个或多个抗氧化氨基酸残基替换一个或多个对氧化敏感的氨基酸残基;用丙氨酸替换一个或多个氨基酸残基,用一个或多个D-氨基酸残基替换一个或多个L-氨基酸残基;双环肽配体中一个或多个酰胺键的N-烷基化;用替代键替换一个或多个肽键;肽骨架长度的修饰;用另一个化学基团取代一个或多个氨基酸残基的 α -碳上的氢,用合适的胺、硫醇、羧酸和酚反应性试剂修饰氨基酸(如半胱氨酸、赖氨酸、谷氨酸/天冬氨酸和酪氨酸)以官能化所述氨基酸,以及引入或替换引入适合于官能化的正交反应活性的氨基酸,例如带有叠氮基或炔基的氨基酸,其分别允许用带有炔基或叠氮基的部分进行官能化。

[0146] 在一个实施方案中,所述修饰衍生物包含N-末端和/或C-末端修饰。在一个进一步的实施方案中,其中所述修饰衍生物包含使用合适的氨基反应性化学的N-末端修饰和/或使用合适的羧基反应性化学的C-末端修饰。在一个进一步的实施方案中,所述N-末端或C-末端修饰包括添加效应基团,所述效应基团包括但不限于细胞毒性剂、放射螯合剂或发色团。

[0147] 在进一步的实施方案中,所述修饰衍生物包含N-末端修饰。在一个进一步的实施方案中,所述N-末端修饰包含N-末端乙酰基。在该实施方案中,在肽合成过程中,N-末端半胱氨酸基团(在本文中称为 C_i 的基团)被乙酸酐或其他合适的试剂封端,导致分子被N-末端乙酰化。该实施方案提供了去除氨基肽酶的潜在识别点的优点,并避免了所述双环肽降解的可能性。

[0148] 在可选的实施方案中,所述N-末端修饰包括添加分子间隔基团,其促进效应基团的缀合和保持所述双环肽对其靶标的效力。

[0149] 在进一步的实施方案中,所述修饰衍生物包含C-末端修饰。在一个进一步的实施方案中,所述C-末端修饰包含酰胺基。在该实施方案中,在肽合成过程中,C-末端半胱氨酸基团(在本文中称为 C_{iii} 的基团)被合成为酰胺,导致分子被C-末端酰胺化。该实施方案提供了去除羧肽酶的潜在识别点的优点,并降低了所述双环肽的蛋白水解降解的可能性。

[0150] 在一个实施方案中,所述修饰衍生物包括用一个或多个非天然氨基酸残基替换一个或多个氨基酸残基。在该实施方案中,可以选择具有电子等排的/等电子的侧链的非天然氨基酸,其既不被降解蛋白酶识别,也不对靶标效力产生任何不利影响。

[0151] 可选地,可以使用具有受约束的氨基酸侧链的非天然氨基酸,使得附近的肽键的蛋白水解在构象和空间上受到阻碍。特别地,其涉及脯氨酸类似物、大型侧链、 $C\alpha$ -二取代的衍生物(例如氨基异丁酸(Aib))和环氨基酸,一个简单的衍生物是氨基-环丙基羧酸。

[0152] 在一个实施方案中,所述修饰衍生物包括添加间隔基团。在一个进一步的实施方案中,所述修饰衍生物包括在N-末端半胱氨酸(C_i)和/或C-末端半胱氨酸(C_{iii})上添加间隔基团。

[0153] 在一个实施方案中,所述修饰衍生物包括用一个或多个抗氧化氨基酸残基替换一个或多个对氧化敏感的氨基酸残基。

[0154] 在一个实施方案中,所述修饰衍生物包括用一个或多个疏水氨基酸残基替换一个或多个带电荷的氨基酸残基。在一个可选的实施方案中,所述修饰衍生物包括用一个或多个带电荷的氨基酸残基替换一个或多个疏水氨基酸残基。带电荷的与疏水的氨基酸残基的正确平衡是所述双环肽配体的重要特征。例如,疏水氨基酸残基影响血浆蛋白结合的程度,从而影响血浆中游离可利用部分的浓度,而带电荷的氨基酸残基(特别是精氨酸)可以影响所述肽与细胞表面磷脂膜的相互作用。两者组合起来可以影响所述肽药物的半衰期、分布容积和暴露,并且可以根据临床终点进行调整。另外,(如果所述肽药物已经皮下施用)带电荷的和疏水的氨基酸残基的正确组合和数量可以减少在注射部位的刺激。

[0155] 在一个实施方案中,所述修饰衍生物包括用一个或多个D-氨基酸残基替换一个或多个L-氨基酸残基。该实施方案被认为通过空间位阻和通过D-氨基酸稳定 β -转角构象的倾向来增加蛋白水解稳定性(Tugyi等人(2005),PNAS,102(2),413-418)。

[0156] 在一个实施方案中,所述修饰衍生物包括去除任何氨基酸残基并用丙氨酸取代。该实施方案提供了去除潜在的蛋白水解进攻位点的优点。

[0157] 应当指出的是,每个上述修饰用于有意地改善所述肽的效力或稳定性。通过修饰,可以通过以下机制进一步提高效力:

[0158] -并入利用疏水作用并导致较低的解离速率的疏水部分,使得实现更高的亲和力;

[0159] -并入利用长距离离子相互作用的带电基团,导致更快的结合速率和更高的亲和力(参见例如Schreiber等人,Rapid,electrostatically assisted association of proteins(1996),Nature Struct.Biol.3,427-31);和

[0160] -将附加的约束并入肽中,例如通过正确地约束氨基酸的侧链使得在靶标结合时熵的损失最小,通过限制骨架的扭转角使得在靶标结合时熵的损失最小,和出于相同的原因在分子中引入另外的环化。

[0161] (综述见Gentilucci等人,Curr.Pharmaceutical Design(2010)16,3185-203和Nestor等人,Curr.Medicinal Chem(2009)16,4399-418)。

[0162] 同位素变体

[0163] 本发明包括所有药学上可接受的(放射性)同位素标记的本发明的肽配体,其中一个或多个原子被具有相同原子序数但原子质量或质量数不同于通常自然界中存在的原子质量或质量数的原子替换,和本发明的肽配体,其中连接金属螯合基团(称为“效应子”),其能够持有相关的(放射性)同位素,和本发明的肽配体,其中某些官能团被相关的(放射性)同位素或同位素标记的官能团共价取代。

[0164] 适用于包含在本发明的肽配体中的同位素的示例包括氢同位素,如 ^2H (D)和 ^3H (T);碳同位素如 ^{11}C 、 ^{13}C 和 ^{14}C ;氯同位素如 ^{36}Cl ;氟同位素如 ^{18}F ;碘同位素如 ^{123}I 、 ^{125}I 和 ^{131}I ;氮同位素如 ^{13}N 和 ^{15}N ;氧同位素如 ^{15}O 、 ^{17}O 和 ^{18}O ;磷同位素如 ^{32}P ;硫同位素如 ^{35}S ;铜同位素如 ^{64}Cu ;镓同位素如 ^{67}Ga 或 ^{68}Ga ;钇同位素如 ^{90}Y ;和镥同位素如 ^{177}Lu ;和铋同位素如 ^{213}Bi 。

[0165] 某些同位素标记的本发明的肽配体,例如并入放射性同位素的那些,可用于药物和/或底物的组织分布研究。本发明的肽配体进一步可以具有有价值的诊断特性,其可用于检测或鉴定标记的化合物与其他分子、肽、蛋白质、酶或受体之间的复合物的形成。检测或鉴定方法可以使用用标记剂标记的化合物,如放射性同位素、酶、荧光物质、发光物质(例如鲁米诺、鲁米诺衍生物、荧光素、水母发光蛋白和荧光素酶)等。放射性同位素氚即 ^3H (T)和

碳-14即 ^{14}C ,由于其易于并入和现成的检测方法而对于这一目的特别有用。

[0166] 用更重的同位素如氘即 ^2H (D) 取代,可以由于更大的代谢稳定性而提供某些治疗优势,例如增加的体内半衰期或减少的剂量要求,因此在某些情况下可能是优选的。

[0167] 用正电子发射同位素如 ^{11}C 、 ^{18}F 、 ^{15}O 和 ^{13}N 取代,可以用于正电子发射成像 (PET) 研究以检查靶标占有率。

[0168] 通常可以通过本领域技术人员已知的常规技术或通过所附实施例中描述的那些方法类似的方法,使用合适的同位素标记的试剂代替之前采用的非标记的试剂,来制备本发明的肽配体的同位素标记的化合物。

[0169] 分子支架

[0170] 在一个实施方案中,分子支架包括非芳香族分子支架。本文提及的“非芳香族分子支架”是指不包含芳香族(即不饱和)碳环或杂环系统的如本文所定义的任何分子支架。

[0171] 非芳香族分子支架的合适示例描述于Heinis等人(2014),*Angewandte Chemie, International Edition* 53(6),1602-1606中。

[0172] 如上述文档中所提及,所述分子支架可以是小分子,如有机小分子。

[0173] 在一个实施方案中,所述分子支架可以是高分子。在一个实施方案中,所述分子支架是由氨基酸、核苷酸或碳水化合物组成的大分子。

[0174] 在一个实施方案中,所述分子支架包含能够与多肽的官能团反应以形成共价键的反应性基团。

[0175] 所述分子支架可以包含与肽形成连接的化学基团,如胺、硫醇、醇、酮、醛、腈、羧酸、酯、烯烃、炔烃、叠氮化物、酸酐、琥珀酰亚胺、马来酰亚胺、烷基卤和酰基卤。

[0176] 含有 $\alpha\beta$ 不饱和羰基的化合物的一个示例是1,1',1''-(1,3,5-三嗪-1,3,5-三基)三丙-2-烯-1-酮(TATA) (*Angewandte Chemie International Edition* (2014), 53(6), 1602-1606)。

[0177] 合成

[0178] 本发明的肽可以通过标准技术合成制造,然后与分子支架在体外反应。进行此操作时,可以使用标准化学方法。这使得能够快速大规模地制备可溶性材料,以用于进一步的下游实验或验证。可以使用如Timmerman等人(同上)中公开的常规化学方法来完成这样的方法。

[0179] 因此,本发明还涉及如本文所述选择的多肽的制造,其中所述制造包括如下所述的任选的进一步的步骤。在一个实施方案中,这些步骤在通过化学合成制备的最终产物多肽上进行。

[0180] 肽也可以延伸,以并入例如另一个环并因此引入多种特异性。

[0181] 为了延伸所述肽,可以使用常规固相或溶液相化学方法,使用正交保护的赖氨酸(和类似物)简单地在其N-末端或C-末端或环内进行化学延伸。可以使用标准的(生物)缀合技术来引入激活的或可激活的N-或C-末端。可选地,可以通过片段缩合或天然化学连接进行添加,例如(Dawson等人1994.*Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation.Science* 266:776-779)中描述的,或通过酶进行添加,例如使用如(Chang等人, *Proc Natl Acad Sci U S A*.1994Dec 20;91(26):12544-8或Hikari等人,*Bioorganic& Medicinal Chemistry Letters* Volume 18, Issue 22, 15 November 2008, 6000-6003页)

中描述的变位酶(subtiligase)。

[0182] 可选地,可以通过二硫键的进一步缀合来延伸或修饰所述肽。这具有额外的优点,即允许第一和第二肽一旦在细胞的还原环境中即彼此解离。在这种情况下,可以在第一肽的化学合成过程中加入分子支架(例如TATA),以便与三个半胱氨酸基团反应;然后可以将进一步的半胱氨酸或硫醇附加到第一肽的N-或C-末端,使得该半胱氨酸或硫醇仅与第二肽的游离半胱氨酸或硫醇反应,形成二硫键连接的双环肽-肽缀合物。

[0183] 类似的技术同样用于两个双环和双特异性大环的合成/偶联,潜在地产生四特异性分子。

[0184] 此外,可以使用适当的化学方法,以相同的方式,在N-或C-末端或经由侧链偶联来添加其他官能团或效应基团。在一个实施方案中,以不阻断任一个实体的活性的方式进行偶联。

[0185] 药物组合物

[0186] 根据本发明的进一步的方面,提供了一种药物组合物,其包含如本文所定义的肽配体,与一种或多种药学上可接受的赋形剂组合。

[0187] 一般地,本发明的肽配体将以纯化形式与药理学上合适的赋形剂或载体(carrier)一起使用。通常,这些赋形剂或载体包括水性或醇/水溶液,乳液或悬浮液,包括盐水和/或缓冲介质。肠胃外载剂(vehicle)包括氯化钠溶液、林格氏葡萄糖、葡萄糖和氯化钠和乳酸林格氏液。如果需要使多肽复合物保持悬浮,则合适的生理学上可接受的佐剂可以选自增稠剂如羧甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、明胶和藻酸盐。

[0188] 静脉内载剂包括液体和营养补充剂和电解质补充剂,如基于林格氏葡萄糖的那些。也可以存在防腐剂和/或其他添加剂,如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体(Mack (1982), Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版)。

[0189] 本发明的化合物可以单独使用或与另一种或多种试剂组合使用。组合使用的另一种试剂可以是例如另一种抗生素,或抗生素“佐剂”,如用于提高革兰氏阴性菌渗透性的试剂、耐药决定子抑制剂或毒力机制抑制剂。

[0190] 与本发明的化合物组合使用的合适的抗生素包括但不限于:

[0191] β 内酰胺类,如青霉素类、头孢菌素类、碳青霉烯类或单环内酰胺类。合适的青霉素类包括苯唑西林、甲氧西林、氨苄西林、氯唑西林、羧苄西林、哌拉西林、替卡西林、氟氯西林和萘夫西林;合适的头孢菌素类包括头孢唑啉、头孢氨苄、头孢噻吩、头孢他啶、头孢吡肟、头孢吡普(ceftobiprole)、头孢洛林、头孢洛生(ceftolozane)和头孢地尔(cefiderocol);合适的碳青霉烯类包括美罗培南、多利培南、亚胺培南、厄他培南、比阿培南和泰比培南(tebipenem);合适的单环内酰胺类包括氨曲南;

[0192] 林可胺类,如克林霉素和林可霉素;

[0193] 大环内酯类,如阿奇霉素、克拉霉素、红霉素、泰利霉素(telithromycin)和索利霉素(solithromycin);

[0194] 四环素类,如替加环素(tigecycline)、奥马环素(omadacycline)、依拉环素(eravacycline)、强力霉素和米诺环素;

[0195] 喹诺酮类,如环丙沙星、左氧氟沙星、莫西沙星和德拉沙星(delafloxacin);

[0196] 利福霉素类,如利福平、利福布汀、利福拉齐(rifalazil)、利福喷丁

(rifapentine) 和利福昔明 (rifaximin);

[0197] 氨基糖苷类, 如庆大霉素、链霉素、妥布霉素、阿米卡星 (amikacin) 和普拉佐米星 (plazomicin);

[0198] 糖肽类, 如万古霉素、替考拉宁 (teichoplanin)、特拉万星 (telavancin)、达巴万星 (dalbavancin) 和奥利万星 (oritavancin);

[0199] 截短侧耳素类 (pleuromutilin), 如来法莫林 (lefamulin);

[0200] 噁唑烷酮类, 如利奈唑胺 (linezolid) 或特地唑胺 (tedizolid);

[0201] 多粘菌素类, 如多粘菌素B或粘菌素;

[0202] 甲氧苄氨嘧啶、艾拉普林 (iclaprim)、磺胺甲噁唑;

[0203] 甲硝唑;

[0204] 非达霉素 (fidaxomicin);

[0205] 莫匹罗星 (mupirocin);

[0206] 夫西地酸;

[0207] 达托霉素 (daptomycin);

[0208] Murepavidin;

[0209] 磷霉素; 和

[0210] 呋喃妥因 (nitrofurantoin)。

[0211] 合适的抗生素“佐剂”包括但不限于:

[0212] 已知可改善细菌摄入的药物, 如外膜透化剂或外排泵抑制剂; 外膜透化剂可以包括多粘菌素B九肽或其他多粘菌素类似物, 或依地酸钠;

[0213] 耐药机制的抑制剂, 如 β -内酰胺酶抑制剂; 合适的 β -内酰胺酶抑制剂包括克拉维酸、他唑巴坦、舒巴坦、阿维巴坦 (avibactam)、瑞来巴坦 (relebactam) 和那库巴坦 (nacubactam); 和

[0214] 毒力机制 (如毒素和分泌系统) 的抑制剂, 包括抗体。

[0215] 本发明的化合物还可以与生物疗法组合使用, 如基于核酸的疗法、抗体、噬菌体或噬菌体溶解酶。

[0216] 根据本发明的药物组合物的施用途径可以是本领域普通技术人员通常已知的任何途径。为了治疗, 可以根据标准技术将本发明的肽配体施用于任何患者。施用途径包括但不限于: 口服 (例如通过摄食); 经颊; 舌下; 透皮 (包括例如通过贴剂、膏药等); 经粘膜 (包括例如通过贴剂、膏药等); 鼻内 (例如通过鼻腔喷雾); 经眼 (例如通过滴眼液); 经肺 (例如通过吸入或吹入疗法, 例如通过使用气雾剂, 例如经口或鼻); 经直肠 (例如栓剂或灌肠剂); 经阴道 (例如通过阴道栓); 肠胃外, 例如通过注射, 包括皮下、皮内、肌肉内、静脉内、动脉内、心内、鞘内、脊柱内、囊内、囊下、眶内、腹膜内、气管内、表皮下、关节内、蛛网膜下和胸骨下注射; 通过植入贮库 (depot) 或储存器 (reservoir), 例如皮下或肌肉内植入。优选地, 根据本发明的药物组合物将肠胃外施用。施用的剂量和频率将取决于患者的年龄、性别和状况、其他药物的同时施用、禁忌症和临床医生要考虑的其他参数。

[0217] 可以将本发明的肽配体冻干用于储存, 并在使用前在合适的载体中重构。已经表明该技术是有效的, 并且可以采用本领域已知的冻干和重构技术。本领域技术人员将认识到, 冻干和重构可以导致不同程度的活性损失, 并且可能必须向上调节水平以进行补偿。

[0218] 可以施用包含本发明的肽配体或其混合物的组合物以进行治疗性治疗。在某些治疗应用中,将足以完成选择的细胞群体的至少部分抑制(inhibition)、抑制(suppression)、调节、杀伤或一些其他可测量参数的量定义为“治疗有效剂量”。达到该剂量所需的量将取决于疾病的严重程度和患者自身免疫系统的一般状态,但一般为每千克体重10 μ g至250mg选择的肽配体,更常用的剂量为100 μ g至25mg/kg/剂量。

[0219] 包含根据本发明的肽配体的组合物可以用于治疗环境中以治疗微生物感染或为有感染风险(例如正在接受手术、化学疗法、人工通气或其他病症或计划的干预)的受试者提供预防。另外,本文所述的肽配体可以在体外(extracorporeally)或体外(in vitro)选择性地用于从异质细胞集合中杀伤、消耗或以其他方式有效地去除靶细胞群体。可以将来自哺乳动物的血液与选择的肽配体在体外组合,从而将不期望的细胞杀伤或以其他方式从血液中去掉,用于根据标准技术返回至哺乳动物。

[0220] 治疗用途

[0221] 本发明的双环肽作为PBP结合剂具有特殊的用途。

[0222] 青霉素结合蛋白(PBP)是一组特征在于其对青霉素的亲和力和结合能力的蛋白质,它们存在于许多细菌物种中。所有的 β -内酰胺类抗生素(除了抑制谷氨酰胺合成酶的tabtoxinine- β -内酰胺)均与细菌细胞壁合成所必需的PBP结合。PBP是称为转肽酶的酶亚组的成员。具体地,一些PBP是DD-转肽酶,而双功能PBP具有转糖基酶活性。PBP均参与肽聚糖合成的最后阶段,肽聚糖是细菌细胞壁的主要成分。细菌细胞壁合成对于细菌的生长、细胞分裂(从而繁殖)和维持细胞结构至关重要。抑制PBP导致细胞壁结构不规则,如伸长、损伤、丧失选择通透性以及最终细胞死亡和裂解。Macheboeuf等人(2006)FEMS Microbiology Reviews 30(5),673-691提供了PBP的综述。

[0223] 因此,不受理论的束缚,据信本发明的肽配体将能够通过和抑制细胞壁合成而引起细菌生长抑制、细胞死亡和裂解。Silver(2007)Nature Reviews Drug Discovery 6,41-55和Zervosen等人(2012)Molecules 17(11),12478-12505提供了PBP作为治疗靶标的综述。将理解的是,本发明的肽配体可以在能够干扰所述PBP的作用机制的任何位点与PBP结合。例如,肽配体可以与所述PBP的活性位点结合并抑制转肽酶或转糖基酶。可选地,肽配体可以结合PBP上的其他位置以干扰其作用机制。

[0224] 根据本发明的方法选择的多肽配体可以用于体内治疗应用、体外和体内诊断应用、体外试验和试剂应用等。在某些应用如疫苗应用中,可以利用对预定范围的抗原引起免疫反应的能力来调整疫苗适应特定的疾病和病原体。

[0225] 对哺乳动物的施用优选具有至少90%至95%同质性的基本纯的肽配体,对于药物用途,特别是当所述哺乳动物是人时,最优选98%至99%或更高的同质性。选择的多肽一旦部分纯化或纯化至所期望的同质性,就可以用于诊断或治疗(包括体外)或用于开发和进行试验步骤、免疫荧光染色等(Lefkovite和Pernis(1979和1981),Immunological Methods, Volumes I and II,Academic Press,NY)。

[0226] 根据本发明的进一步的方面,提供了如本文所定义的肽配体,其用于抑制或治疗细菌感染介导的疾病或疾患、或对有感染风险的受试者提供预防。

[0227] 根据本发明的进一步的方面,提供了抑制或治疗细菌感染介导的疾病或疾患、或对有感染风险的受试者提供预防的方法,其包括向有需要的患者施用如本文所定义的肽配

体。

[0228] 本发明的肽配体或包含所述肽配体的药物组合物可用于治疗皮肤和软组织感染、胃肠道感染、尿路感染、肺炎、败血症、腹腔内感染和产科/妇科感染。所述感染可能由革兰氏阳性菌(如肺炎链球菌)或革兰氏阴性菌(如大肠杆菌、铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌)引起,也可能由多于一种细菌物种引起。

[0229] 在一个实施方案中,细菌感染介导的疾病或疾患选自:

- [0230] • 百日咳(可能由百日咳博德特氏菌引起);
- [0231] • 破伤风(可能由破伤风梭菌引起);
- [0232] • 白喉(可能由白喉棒状杆菌引起);
- [0233] • 棘球绦虫病(可能由棘球绦虫引起);
- [0234] • 腹泻、溶血性尿毒综合征或尿路感染(可能由大肠杆菌引起);
- [0235] • 呼吸道感染或脑膜炎(可能由流感嗜血杆菌引起);
- [0236] • 胃炎、消化性溃疡病或胃肿瘤(可能由幽门螺杆菌引起);
- [0237] • 结核病(可能由结核分枝杆菌引起);
- [0238] • 脑膜炎、肺炎、菌血症或中耳炎(可能由肺炎球菌引起);
- [0239] • 食物中毒(可能由沙门氏菌引起);
- [0240] • 志贺氏菌病或肠胃炎(可能由志贺氏菌引起);和
- [0241] • 霍乱(可能由霍乱弧菌引起)。

[0242] 本文中提及的术语“抑制”是指在诱导事件之后但在疾病的临床表现之前施用组合物。“治疗”涉及在疾病症状变得明显之后施用保护性组合物。

[0243] 已有可以用于筛选肽配体在预防或治疗疾病中的有效性的动物模型系统。

[0244] 以下参考下列实施例进一步描述本发明。

[0245] 实施例

[0246] 材料和方法

[0247] 肽的合成

[0248] 肽的合成基于Fmoc化学,使用Peptide Instruments生产的Symphony肽合成仪和MultiSynTech生产的Syro II合成仪。使用标准的Fmoc-氨基酸(Sigma,Merck),其带有适当的侧链保护基团:在每种情况下均使用适用的标准偶联条件,然后使用标准方法进行脱保护。

[0249] 可选地,使用HPLC纯化肽,并在分离后将其用1,3,5-三丙烯酰基六氢-1,3,5-三嗪(TATA,Sigma)修饰。为此,将线性肽用50:50MeCN:H₂O稀释至约35mL,加入约500μL的100mM TATA的乙腈溶液,然后用5mL的1M NH₄HCO₃的H₂O溶液引发反应。使反应在室温进行约30至60分钟,并且一旦反应完成即冻干(通过MALDI判断)。完成后,在室温将1mL的1M L-半胱氨酸盐酸盐一水合物(Sigma)的H₂O溶液加入反应中约60分钟以淬灭任何过量的TATA。

[0250] 冻干后,如上纯化修饰的肽,同时用Gemini C18柱(Phenomenex)替换Luna C8,并将酸改为0.1%三氟乙酸。合并包含正确的TATA修饰材料的纯级分,冻干并在-20°C进行保存。

[0251] 除非另有说明,所有氨基酸均以L-构型使用。

[0252] 在某些情况下,在使用以下方法与毒素的游离硫醇基偶联之前,先将肽转化为活

化的二硫化物;将4-甲基(琥珀酰亚胺基4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯)(100mM)在干燥DMSO(1.25mol当量)中的溶液加入到肽(20mM)在干燥DMSO(1mol当量)中的溶液中。将反应充分混合并加入DIPEA(20mol当量)。通过LC/MS监测反应直至完成。

[0253] 生物数据

[0254] 荧光偏振直接结合试验

[0255] 使用荧光素标记的肽和未修饰的PBP蛋白进行荧光偏振,并使用配备FP 485 520 520光学模块的BMG Labtech PHERAstar FS进行测量。

[0256] 在结合缓冲液(10mM HEPES、pH 8、300mM NaCl、2%甘油)中将DMSO中的10mM荧光肽稀释至2.5nM。然后在结合缓冲液中跨12个孔制备PBP蛋白的两倍系列稀释液,最高浓度为21 μ M,最低浓度为17nM。

[0257] 将10 μ l稀释的荧光肽(2.5nM)加入384孔NBS™低容量微孔板(Fisher Scientific)的12个孔中。然后将10 μ l PBP系列稀释液加入含有荧光肽的孔中,并加入5 μ l结合缓冲液以使总体积达到25 μ l,使肽示踪剂的终浓度达到1nM。在结合缓冲液中制备缺乏PBP蛋白的对照孔,最终肽浓度为1nM,最终体积为25 μ l。在室温每5分钟测量一次荧光偏振,持续1小时。使用缺乏蛋白质的对照孔优化增益和焦高。在485nm激发孔,发射检测设置为520nm。

[0258] 在GraphPad软件中分析数据以得出解离常数的值。实验至少重复三次。

[0259] 在上述结合试验中测试了本发明的某些肽配体(具有用Sar₆-赖氨酸接头连接到C-末端的荧光素),结合指定PBP的结果示于表1中:

[0260] 表1:选择的本发明的肽配体的直接结合数据

[0261]

肽编号	肽序列	Kd (μ M)	检测的PBP
BCY9377	A-(SEQ ID NO:1)-A	0.31	1a
BCY9378	A-(SEQ ID NO:2)-A	0.08	1a
BCY9381	A-(SEQ ID NO:3)-A	3.95	1a
BCY9382	A-(SEQ ID NO:4)-A	2.37	1a
BCY9383	A-(SEQ ID NO:5)-A	0.40	1a
BCY9384	A-(SEQ ID NO:6)-A	1.32	1a
BCY9385	A-(SEQ ID NO:7)-A	1.02	1a
BCY9386	A-(SEQ ID NO:8)-A	0.87	1a
BCY9387	A-(SEQ ID NO:9)-A	3.14	1a
BCY9388	A-(SEQ ID NO:10)-A	0.57	1a
BCY9389	A-(SEQ ID NO:11)-A	0.79	1a
BCY9391	A-(SEQ ID NO:12)-A	0.45	1a
BCY9226	A-(SEQ ID NO:13)-A	3.75	1b
BCY9227	A-(SEQ ID NO:14)-A	2.15	1b
BCY9229	A-(SEQ ID NO:15)-A	2.24	1b
BCY9233	A-(SEQ ID NO:16)-A	0.37	1b
BCY9237	A-(SEQ ID NO:17)-A	0.36	1b
BCY9238	A-(SEQ ID NO:18)-A	1.35	1b
BCY12130	A-(SEQ ID NO:20)-A	2.00	3

BCY14613	A- (SEQ ID NO:28) -A	0.131	1b
BCY13797	A- (SEQ ID NO:29) -A	0.095	1b
BCY14618	A- (SEQ ID NO:30) -A	0.142	1b
BCY14621	A- (SEQ ID NO:31) -A	0.239	1b
BCY14619	A- (SEQ ID NO:32) -A	0.049	1b
BCY14627	A- (SEQ ID NO:33) -A	0.158	1b
BCY14629	A- (SEQ ID NO:34) -A	0.059	1b
BCY14631	A- (SEQ ID NO:35) -A	0.062	1b
BCY14641	A- (SEQ ID NO:36) -A	0.163	1b
BCY14381	A- (SEQ ID NO:37) -A	1.386	1b

[0262] 对照抑制剂Bocilllin与大肠杆菌PBP3结合, K_d 为0.44 μ M。在本试验中, 进一步测定了BCY12130与相关物种(铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌)的PBP的结合。没有观察到BCY12130与铜绿假单胞菌或鲍曼不动杆菌的PBP3结合, 说明了对大肠杆菌PBP3的选择性(见图1)。因此, 该数据表明本发明的肽配体以高亲和力选择性结合PBP。值得注意的是, 本文所示的直接结合值利用了与荧光示踪剂分子结合的肽配体。

[0263] 荧光偏振竞争结合试验

[0264] 方法1

[0265] 使用BODIPY标记的青霉素示踪剂和未标记的肽进行荧光偏振竞争, 与未修饰的PBP蛋白竞争。使用配备FP 485 520 520光学模块的BMG Labtech PHERAstar FS测量偏振。

[0266] 在结合缓冲液(10mM HEPES、pH 8、300mM NaCl、2%甘油)中将DMSO中的5mM荧光BODIPY标记青霉素稀释至6.25nM。在结合缓冲液中将未修饰的PBP稀释至2 μ M。在结合缓冲液中跨12个孔制备未修饰肽的两倍系列稀释液, 最终孔浓度最高为60 μ M, 最低浓度为50nM。将5 μ l未修饰肽的系列稀释液或羧苄青霉素加入384孔NBS™低容量微孔板(Fisher Scientific)的12个孔中。然后将10 μ l稀释的荧光BODIPY标记青霉素(6.25nM)加入含有未修饰肽稀释液的12个孔中。然后将10 μ l未修饰PBP(2 μ M)加入含有未修饰肽和荧光BODIPY标记青霉素的12个孔中, 使总体积达到25 μ l, 荧光BODIPY标记青霉素的终浓度达到2.5nM, 未修饰PBP达到800nM。

[0267] 在结合缓冲液中制备缺乏未修饰肽的对照孔, 最终荧光BODIPY标记青霉素的浓度为2.5nM, 未修饰PBP的终浓度为800nM, 最终体积为25 μ l。在结合缓冲液中制备缺乏未修饰肽和未修饰PBP的第二对照孔, 最终荧光BODIPY标记青霉素的浓度为2.5nM, 最终体积为25 μ l。

[0268] 在室温每5分钟测量一次荧光偏振, 持续1小时。使用缺乏未修饰肽和未修饰PBP的对照孔优化增益和焦高。在485nm激发孔, 发射检测设置为520nm。

[0269] 在GraphPad软件中分析数据以得出抑制常数的值。实验至少重复三次。

[0270] 在上述竞争试验中测试了本发明的某些肽配体, 其结果示于表2中:

[0271] 表2: 选择的本发明的肽配体的竞争结合数据

[0272]

肽编号	肽序列	K_i (μ M)
BCY12130	A- (SEQ ID NO:19) -A	0.24
BCY12132	A- (SEQ ID NO:20) -A	0.57

[0273] 图2中显示了BCY12130的该试验的进一步数据。从本文所示的数据可以看出,BCY12130在结合大肠杆菌PBP3的方面胜过Bocillin。BCY12130比对照抑制剂羧苄青霉素(0.52 μ M)对Bocillin竞争表现出更高的 K_i (0.24 μ M)。因此,本发明的肽配体选择性地结合并抑制PBP的 β -内酰胺结合。

[0274] 方法2

[0275] 使用BCY9378作为示踪剂(并具有用Sar₆-赖氨酸接头连接到C-末端的荧光素)和未标记肽进行荧光偏振竞争,竞争未修饰PBP蛋白。使用配备FP 485 520 520光学模块的BMG Labtech PHERAstar FS测量偏振。

[0276] 在结合缓冲液(10mM HEPES、pH 8、300mM NaCl、2%甘油)中将BCY9378(5mM,DMSO中)稀释至6.25nM。在结合缓冲液中将未修饰PBP蛋白稀释至2 μ M。在结合缓冲液中跨12个孔制备未修饰肽的两倍系列稀释液,最终孔浓度最高为60 μ M,最低浓度为50nM。将5 μ l未修饰肽的系列稀释液加入384孔NBS™低容量微孔板(Fisher Scientific)的12个孔中。然后将10 μ l稀释的BCY9378(6.25nM)加入含有未修饰肽稀释液的12个孔中。然后将10 μ l未修饰PBP(2 μ M)加入含有未修饰肽和BCY9378的12个孔中,使总体积达到25 μ l,BCY9378的终浓度达到2.5nM,未修饰PBP达到800nM。

[0277] 在结合缓冲液中制备缺乏未修饰肽的对照孔,最终BCY9378的浓度为2.5nM,未修饰PBP的终浓度为800nM,最终体积为25 μ l。在结合缓冲液中制备缺乏未修饰肽30和未修饰PBP的第二对照孔,最终BCY9378的浓度为2.5nM,最终体积为25 μ l。

[0278] 在室温每5分钟测量一次荧光偏振,持续1小时。使用缺乏未修饰肽和未修饰PBP的对照孔优化增益和焦高。在485nm激发孔,发射检测设置为520nm。

[0279] 在GraphPad软件中分析数据以得出抑制常数的值。实验至少重复三次。

[0280] 在上述竞争试验中测试了本发明的某些肽配体,其结果示于表3中:

[0281] 表3:选择的本发明的肽配体的竞争结合数据

肽编号	肽序列	K_i (μ M)
BCY10028	A- (SEQ ID NO:21) -A	0.61382
BCY10027	A- (SEQ ID NO:22) -A	0.11
BCY10026	A- (SEQ ID NO:23) -A	0.55475
BCY10025	A- (SEQ ID NO:24) -A	0.06668
BCY10024	A- (SEQ ID NO:25) -A	0.19585
BCY10022	A- (SEQ ID NO:26) -A	1.1667
BCY10020	A- (SEQ ID NO:27) -A	0.6019

[0283] 最小抑制浓度和最小杀菌浓度测定

[0284] 使用来自Zgurskaya实验室的大肠杆菌菌株进行最小抑制浓度(MIC)测定,该菌株经工程化为具有可诱导的孔以使外膜具有可渗透性(Krishnamoorthy等人(2016) doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.01882-16>)。使用的菌株:GKCW101;GKCW102;GKCW103;和GKCW104。

[0285] 首先制备细菌的过夜培养物,通过将单个细菌菌落转移到补充50 μ g/mL卡那霉素的5mL阳离子调节的Mueller-Hinton液体培养基(CA-MHB)中来制备。第二天,在具有50 μ g/mL卡那霉素的25mL CA-MHB中将过夜培养物1/100稀释,并培养直到如在光谱仪上600nm处

所测量的光密度达到0.3。

[0286] 然后加入过滤灭菌的阿拉伯糖至浓度为0.1% w/v,随后培养直到600nm处的光密度等于1。

[0287] 然后在补充0.1% w/v阿拉伯糖和50 μ g/mL卡那霉素的CA-MHB中将培养基稀释至 1×10^6 CFU mL⁻¹。

[0288] 在96孔微量滴定板中,第2-12列的孔中分配100 μ L CA-MHB,第1列的孔中加入200 μ L,以制备2倍系列稀释液。

[0289] 然后将最多8 μ L肽配体加入第1列的孔中,并在板上稀释两倍。G行和H行中分别包含阳性对照(有效抗生素)和DMSO对照。然后用透气密封物将板密封,并在37 $^{\circ}$ C孵育18小时。然后使用PheraStar FSx读板器测量每个孔在600nm处的光密度。将MIC值确定为细菌可见生长和不生长之间的截止浓度。

[0290] 通过将5 μ L MIC培养物从每个孔中分配到的LB琼脂板(100mL)上、然后在37 $^{\circ}$ C孵育过夜来确定最小杀菌浓度(MBC)。MBC计算为在琼脂上未检测到菌落时的抗生素浓度。

[0291] 可选地,使用大肠杆菌(ATCC 25922)、鼠伤寒沙门氏菌(ATCC 19585)和阴沟肠杆菌(NCTC 13405)进行10 μ L MIC测定,用于评估肽配体的MIC。测试化合物以高浓度溶解于所需溶剂中。在使用DMSO溶解测试化合物的情况下,对于每个测试生物,都包括了具有等效DMSO浓度的DMSO对照。对于每个测试生物,平行测试对照抗生素(已知测试生物对对照抗生素的易感性)。这允许比较在运行之间的结果并验证测试程序和生物。

[0292] 使用无菌技术,在96孔板的倒置的盖上,在5 μ L阳离子调节的Muller Hinton液体培养基(CA-MHB)中制备测试化合物的2倍系列稀释液(跨10个点的范围)。在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中制备每个测试生物的接种物,以匹配0.5麦氏浊度标准(McFarland standard)的浊度,然后稀释100倍。每个孔(阴性对照孔除外)接种5 μ L接种物。对于每种测试抗生素,包括了仅由CA-MHB组成的阴性对照(无细菌);以及仅含CA-MHB和细菌的阳性对照(无抗生素)。将96孔板的底部用作盖子,并在保湿盒中孵育板以减少蒸发。通过将测试板密封在装有用PBS饱和的纸巾的预热塑料盒中来构建保湿盒。在CLSI指南规定的MIC测定温度和时间段下孵育测试板。使用穿透板底部照射的白光来照亮液滴,基于浊度评估MIC。

[0293] 在上述抑制和杀菌浓度测定中与对照抗生素羧苄青霉素一起测试了本发明的某些肽配体,其结果示于表4和表5中:

[0294] 表4:选择的本发明的肽配体的MIC数据

肽编号	MIC (μ g/ml)				
	大肠杆菌 (ATCC 25922)	大肠杆菌 GKCW101 (WT)	大肠杆菌 GKCW102 (WT-孔)	大肠杆菌 GKCW103 (Δ TolC)	大肠杆菌 GKCW104 (Δ TolC-孔)
BCY12130	27.5	94	0.4	66	3.0
BCY12132	>903	>224	24	>224	48
羧苄青霉素	16	14	0.8	2.3	n.t.

[0296] 表4续:

肽编号	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
	鼠伤寒沙门氏菌 (ATCC 19585)	阴沟肠杆菌 (NCTC 13405)
BCY12130	13.7	298
BCY12132	>903	n.t.
羧苄青霉素	16	256

[0298] “n.t.”表示未测试,带有“>”的值表示在测试的肽配体的指定最高浓度下未观察到抑制。

[0299] 表5:选择的本发明的肽配体的MBC数据

肽编号	MBC ($\mu\text{g/ml}$)				
	大肠杆菌 (ATCC 25922)	大肠杆菌 GKCW101 (WT)	大肠杆菌 GKCW102 (WT-孔)	大肠杆菌 GKCW103 (ΔTolC)	鼠伤寒沙门氏菌 (ATCC 19585)
BCY12130	55	93	23	>214	13.7
BCY12132	>903	>224	97	>224	>903

[0301] 带有“>”的值表示在测试的肽配体的指定最高浓度下未观察到杀菌作用。

[0302] 这些数据证明了本发明的肽配体抑制大肠杆菌和密切相关的物种鼠伤寒沙门氏菌和阴沟肠杆菌的细菌生长的能力。虽然肽配体BCY12130对没有外排泵的大肠杆菌菌株GKCW103没有杀菌作用,但观察到了抑菌作用。

[0303] 细胞毒性试验

[0304] 在细胞毒性试验中测定肽,以确定肽对人细胞系的毒性。记录发光值作为细胞活力的量度,并使用Ultra-GloTM萤光素酶催化的ATP依赖性的萤光素转化为氧化萤光素进行测定。

[0305] 根据针对特定细胞类型(在本例中为HepG2#HB-8065和HT-1080#CCL-121)的ATCC指南,在适当的培养基中维持细胞系。在加入肽之前24小时,在96孔侧边不透明的板(VWR 734-1660)中以每孔100 μl 体积中10,000个细胞的密度接种细胞。在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵育板过夜。第二天,在适当的细胞系培养基中将肽稀释至最终DMSO浓度为0.5%(最终肽浓度为40-80 μM)的浓度。从含有细胞的孔中去除培养基并替换为含有肽的培养基。包括了对照孔,其含有:仅细胞、细胞+0.5%DMSO、或细胞+11 μM 星形孢菌素(Sigma#S5921,已知的蛋白激酶抑制剂)。在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵育处理过的板72小时。在此时间后,按照制造商的说明100 μl CellTiter-Glo[®] (Promega#G7570)加入孔中,并震荡孵育10分钟以诱导裂解。使用配备LUM plus光学模块的BMG Labtech PHERAstar FS读取发光值。

[0306] 在GraphPad软件中分析数据以确定活细胞,以含有细胞+0.5%DMSO的孔的百分比来表示。引用的值代表两次独立实验。

[0307] 在上述细胞毒性试验中测试了本发明的某些肽配体(BCY12130和BCY12132),在最高测试浓度(分别为54 μM 和56 μM 肽配体)下未观察到对人细胞系的细胞毒性。

[0308] 形态学试验

[0309] 在不存在或存在未修饰的肽配体的情况下,将2 μ l体积的细菌生长物置于载玻片(Hendley multispot显微镜载玻片)上并在45°C热固定。通过加入结晶紫30秒、革兰氏碘液30秒和丙酮2秒对载玻片进行革兰氏染色。用番红进行复染30秒。在每个阶段之间,用水彻底清洗载玻片。使用Zeiss AxioCam ERc 5s在油浸($\times 100$ 放大倍率)下观察图像。

[0310] 将每个液滴与不含抗微生物剂的生长对照进行比较,以检测细胞形态的差异。

[0311] 在上述形态学试验中测试了本发明的某些肽配体,其结果示于图3中。

[0312] 这些数据表明,在亚MIC浓度(13.75 μ g/ml和27.5 μ g/ml)的BCY12130存在下孵育大肠杆菌和密切相关的物种鼠伤寒沙门氏菌和阴沟肠杆菌,导致丝状生长,表明BCY12130是PBP3抑制剂。

[0313] 总之,本文所示的数据证明,本发明的肽配体结合大肠杆菌的PBP3,抑制 β -内酰胺结合,并通过靶向细胞分裂抑制大肠杆菌和密切相关菌株的细菌生长。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 拜斯科技开发有限公司
- [0003] <120> 结合PBP的双环肽配体
- [0004] <130> BIC-C-P2622PCT
- [0005] <150> GB1912320.7
- [0006] <151> 2019-08-28
- [0007] <160> 37
- [0008] <170> PatentIn version 3.5
- [0009] <210> 1
- [0010] <211> 12
- [0011] <212> PRT
- [0012] <213> 人工序列
- [0013] <220>
- [0014] <223> 合成肽
- [0015] <400> 1
- [0016] Cys Arg Phe Ser Ser Cys Pro Pro Tyr His Val Cys
- [0017] 1 5 10
- [0018] <210> 2
- [0019] <211> 12
- [0020] <212> PRT
- [0021] <213> 人工序列
- [0022] <220>
- [0023] <223> 合成肽
- [0024] <400> 2
- [0025] Cys Pro Tyr Thr Ser Cys Pro Pro His Thr Met Cys
- [0026] 1 5 10
- [0027] <210> 3
- [0028] <211> 13
- [0029] <212> PRT
- [0030] <213> 人工序列
- [0031] <220>
- [0032] <223> 合成肽
- [0033] <400> 3
- [0034] Cys His Pro Arg His Gln Glu Gly Tyr Cys Met Pro Cys
- [0035] 1 5 10
- [0036] <210> 4
- [0037] <211> 14
- [0038] <212> PRT

[0039]	<213>	人工序列
[0040]	<220>	
[0041]	<223>	合成肽
[0042]	<400>	4
[0043]	Cys Tyr Asn His Lys Trp Gly Ala Met Cys Thr His Pro Cys	
[0044]	1	5 10
[0045]	<210>	5
[0046]	<211>	14
[0047]	<212>	PRT
[0048]	<213>	人工序列
[0049]	<220>	
[0050]	<223>	合成肽
[0051]	<400>	5
[0052]	Cys His Asp Trp Asp Tyr Arg His Leu Cys Tyr Trp Arg Cys	
[0053]	1	5 10
[0054]	<210>	6
[0055]	<211>	15
[0056]	<212>	PRT
[0057]	<213>	人工序列
[0058]	<220>	
[0059]	<223>	合成肽
[0060]	<400>	6
[0061]	Cys Asp Ile Tyr Arg Glu Cys His Tyr Thr Ser Trp Ser Val Cys	
[0062]	1	5 10 15
[0063]	<210>	7
[0064]	<211>	15
[0065]	<212>	PRT
[0066]	<213>	人工序列
[0067]	<220>	
[0068]	<223>	合成肽
[0069]	<400>	7
[0070]	Cys Lys Pro Ser Leu Ser Cys Gln His Leu Pro Arg Ala Leu Cys	
[0071]	1	5 10 15
[0072]	<210>	8
[0073]	<211>	13
[0074]	<212>	PRT
[0075]	<213>	人工序列
[0076]	<220>	
[0077]	<223>	合成肽

[0078]	<400> 8
[0079]	Cys Pro Phe Thr Gly Pro Cys Arg Pro His Tyr Ile Cys
[0080]	1 5 10
[0081]	<210> 9
[0082]	<211> 13
[0083]	<212> PRT
[0084]	<213> 人工序列
[0085]	<220>
[0086]	<223> 合成肽
[0087]	<400> 9
[0088]	Cys Tyr Thr Ser Cys Pro Glu His His Val Phe Ala Cys
[0089]	1 5 10
[0090]	<210> 10
[0091]	<211> 12
[0092]	<212> PRT
[0093]	<213> 人工序列
[0094]	<220>
[0095]	<223> 合成肽
[0096]	<400> 10
[0097]	Cys Asp Asn Cys Trp Glu Arg Gln Trp Tyr Ala Cys
[0098]	1 5 10
[0099]	<210> 11
[0100]	<211> 14
[0101]	<212> PRT
[0102]	<213> 人工序列
[0103]	<220>
[0104]	<223> 合成肽
[0105]	<400> 11
[0106]	Cys Asn Pro Arg Cys His Pro Val Tyr Thr Ser Phe Phe Cys
[0107]	1 5 10
[0108]	<210> 12
[0109]	<211> 14
[0110]	<212> PRT
[0111]	<213> 人工序列
[0112]	<220>
[0113]	<223> 合成肽
[0114]	<400> 12
[0115]	Cys Gly Ala Pro Cys Arg Pro His Tyr Val Pro Trp Phe Cys
[0116]	1 5 10

[0117]	<210>	13
[0118]	<211>	13
[0119]	<212>	PRT
[0120]	<213>	人工序列
[0121]	<220>	
[0122]	<223>	合成肽
[0123]	<400>	13
[0124]	Cys Val Tyr Ala Pro Glu Asn Leu Leu Cys Gly Ser Cys	
[0125]	1	5 10
[0126]	<210>	14
[0127]	<211>	15
[0128]	<212>	PRT
[0129]	<213>	人工序列
[0130]	<220>	
[0131]	<223>	合成肽
[0132]	<400>	14
[0133]	Cys Ser Asn Pro Thr Cys Val Tyr Thr Pro Thr Asn Leu Phe Cys	
[0134]	1	5 10 15
[0135]	<210>	15
[0136]	<211>	13
[0137]	<212>	PRT
[0138]	<213>	人工序列
[0139]	<220>	
[0140]	<223>	合成肽
[0141]	<400>	15
[0142]	Cys Asn Thr Cys Ile Tyr Ala Ser Glu Asn Leu Leu Cys	
[0143]	1	5 10
[0144]	<210>	16
[0145]	<211>	15
[0146]	<212>	PRT
[0147]	<213>	人工序列
[0148]	<220>	
[0149]	<223>	合成肽
[0150]	<400>	16
[0151]	Cys Ser Ala Thr Trp Gly Ser Arg Ser Cys Pro Val Lys Phe Cys	
[0152]	1	5 10 15
[0153]	<210>	17
[0154]	<211>	15
[0155]	<212>	PRT

[0156]	<213>	人工序列
[0157]	<220>	
[0158]	<223>	合成肽
[0159]	<400>	17
[0160]	Cys Pro Asn Ala Cys Trp Thr Val His Tyr Ser Gly Tyr Gln Cys	
[0161]	1	5 10 15
[0162]	<210>	18
[0163]	<211>	15
[0164]	<212>	PRT
[0165]	<213>	人工序列
[0166]	<220>	
[0167]	<223>	合成肽
[0168]	<400>	18
[0169]	Cys His Glu Phe Ser Leu Asp Cys Ile Leu Phe Gly Thr Ser Cys	
[0170]	1	5 10 15
[0171]	<210>	19
[0172]	<211>	12
[0173]	<212>	PRT
[0174]	<213>	人工序列
[0175]	<220>	
[0176]	<223>	合成肽
[0177]	<400>	19
[0178]	Cys Ser Phe Pro Lys Cys Pro Trp Val Glu Gly Cys	
[0179]	1	5 10
[0180]	<210>	20
[0181]	<211>	11
[0182]	<212>	PRT
[0183]	<213>	人工序列
[0184]	<220>	
[0185]	<223>	合成肽
[0186]	<400>	20
[0187]	Cys Arg Thr Phe Gly Cys Trp Trp Glu Gly Cys	
[0188]	1	5 10
[0189]	<210>	21
[0190]	<211>	14
[0191]	<212>	PRT
[0192]	<213>	人工序列
[0193]	<220>	
[0194]	<223>	合成肽

[0195]	<400> 21
[0196]	Cys Pro Pro Val Cys Arg Pro His Tyr Val His Trp Met Cys
[0197]	1 5 10
[0198]	<210> 22
[0199]	<211> 14
[0200]	<212> PRT
[0201]	<213> 人工序列
[0202]	<220>
[0203]	<223> 合成肽
[0204]	<400> 22
[0205]	Cys Pro Val Gly Cys Arg Pro His Tyr Val His Trp Ser Cys
[0206]	1 5 10
[0207]	<210> 23
[0208]	<211> 12
[0209]	<212> PRT
[0210]	<213> 人工序列
[0211]	<220>
[0212]	<223> 合成肽
[0213]	<400> 23
[0214]	Cys Arg Tyr Thr Ser Cys Pro Pro Tyr Thr Val Cys
[0215]	1 5 10
[0216]	<210> 24
[0217]	<211> 12
[0218]	<212> PRT
[0219]	<213> 人工序列
[0220]	<220>
[0221]	<223> 合成肽
[0222]	<400> 24
[0223]	Cys Pro Tyr Thr Ser Cys Pro Pro Tyr Thr His Cys
[0224]	1 5 10
[0225]	<210> 25
[0226]	<211> 12
[0227]	<212> PRT
[0228]	<213> 人工序列
[0229]	<220>
[0230]	<223> 合成肽
[0231]	<400> 25
[0232]	Cys Pro Tyr Thr Thr Cys Pro Pro Tyr His Ala Cys
[0233]	1 5 10

[0234]	<210>	26
[0235]	<211>	12
[0236]	<212>	PRT
[0237]	<213>	人工序列
[0238]	<220>	
[0239]	<223>	合成肽
[0240]	<400>	26
[0241]	Cys Val Phe Thr Thr Cys Pro Pro Tyr Thr Val Cys	
[0242]	1	5 10
[0243]	<210>	27
[0244]	<211>	12
[0245]	<212>	PRT
[0246]	<213>	人工序列
[0247]	<220>	
[0248]	<223>	合成肽
[0249]	<400>	27
[0250]	Cys Thr Tyr Thr Thr Cys Pro Pro Phe Thr Ile Cys	
[0251]	1	5 10
[0252]	<210>	28
[0253]	<211>	13
[0254]	<212>	PRT
[0255]	<213>	人工序列
[0256]	<220>	
[0257]	<223>	合成肽
[0258]	<400>	28
[0259]	Cys Trp Gly Ser Trp Arg Cys Pro Ile Val His Ser Cys	
[0260]	1	5 10
[0261]	<210>	29
[0262]	<211>	13
[0263]	<212>	PRT
[0264]	<213>	人工序列
[0265]	<220>	
[0266]	<223>	合成肽
[0267]	<400>	29
[0268]	Cys Trp Gly Ser Leu Arg Cys Pro Ile Val His Ser Cys	
[0269]	1	5 10
[0270]	<210>	30
[0271]	<211>	13
[0272]	<212>	PRT

[0273]	<213>	人工序列
[0274]	<220>	
[0275]	<223>	合成肽
[0276]	<400>	30
[0277]	Cys Trp Gly Ser Leu Arg Cys Pro Ile His Tyr Ser Cys	
[0278]	1	5 10
[0279]	<210>	31
[0280]	<211>	13
[0281]	<212>	PRT
[0282]	<213>	人工序列
[0283]	<220>	
[0284]	<223>	合成肽
[0285]	<400>	31
[0286]	Cys Trp Gly Ser Leu Arg Cys Pro Ile Lys Trp Asp Cys	
[0287]	1	5 10
[0288]	<210>	32
[0289]	<211>	13
[0290]	<212>	PRT
[0291]	<213>	人工序列
[0292]	<220>	
[0293]	<223>	合成肽
[0294]	<400>	32
[0295]	Cys Trp Gly Ser Leu Arg Cys Pro Ile Thr Ala His Cys	
[0296]	1	5 10
[0297]	<210>	33
[0298]	<211>	13
[0299]	<212>	PRT
[0300]	<213>	人工序列
[0301]	<220>	
[0302]	<223>	合成肽
[0303]	<400>	33
[0304]	Cys Trp Gly Ser Lys Ala Cys Pro Ile Thr Trp His Cys	
[0305]	1	5 10
[0306]	<210>	34
[0307]	<211>	13
[0308]	<212>	PRT
[0309]	<213>	人工序列
[0310]	<220>	
[0311]	<223>	合成肽

[0312]	<400> 34
[0313]	Cys Trp Gly Ser Arg Gln Cys Pro Ile Ser Trp Thr Cys
[0314]	1 5 10
[0315]	<210> 35
[0316]	<211> 13
[0317]	<212> PRT
[0318]	<213> 人工序列
[0319]	<220>
[0320]	<223> 合成肽
[0321]	<400> 35
[0322]	Cys Trp Gly Thr Gln Lys Cys Pro Val Gly Tyr Trp Cys
[0323]	1 5 10
[0324]	<210> 36
[0325]	<211> 13
[0326]	<212> PRT
[0327]	<213> 人工序列
[0328]	<220>
[0329]	<223> 合成肽
[0330]	<400> 36
[0331]	Cys Trp Gly Ser Lys Ser Cys Pro Ile Thr Trp Lys Cys
[0332]	1 5 10
[0333]	<210> 37
[0334]	<211> 13
[0335]	<212> PRT
[0336]	<213> 人工序列
[0337]	<220>
[0338]	<223> 合成肽
[0339]	<400> 37
[0340]	Cys Trp Gly Thr Ser Ala Cys Pro Val Thr His Glu Cys
[0341]	1 5 10

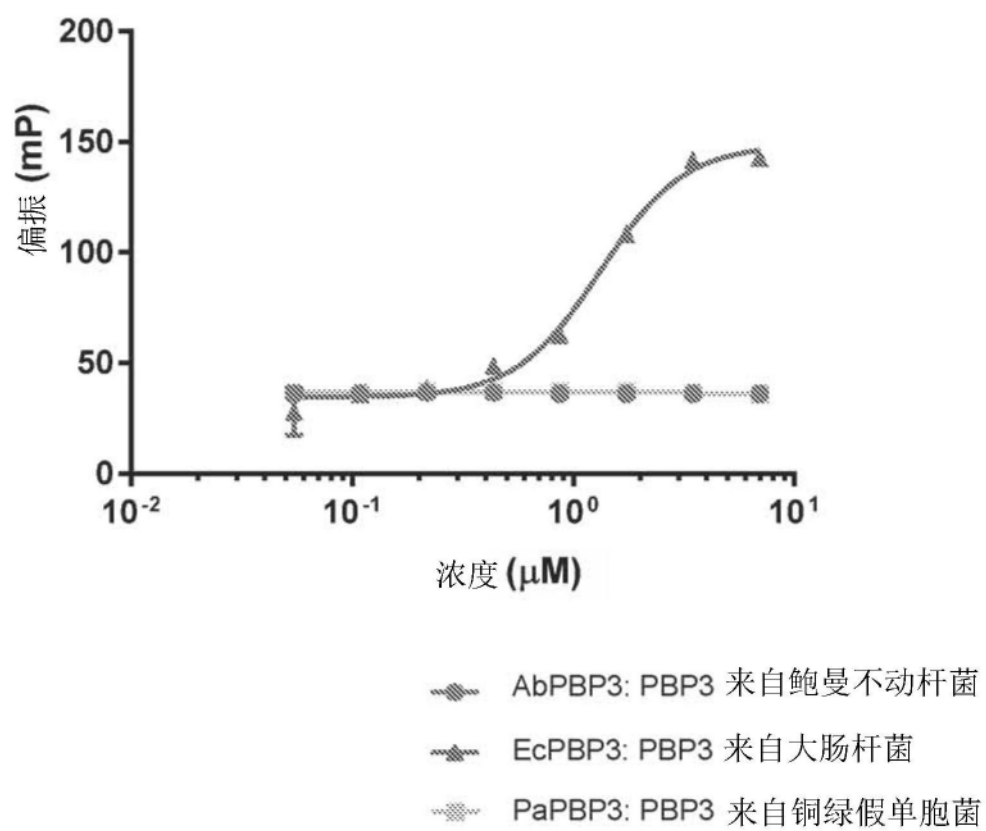
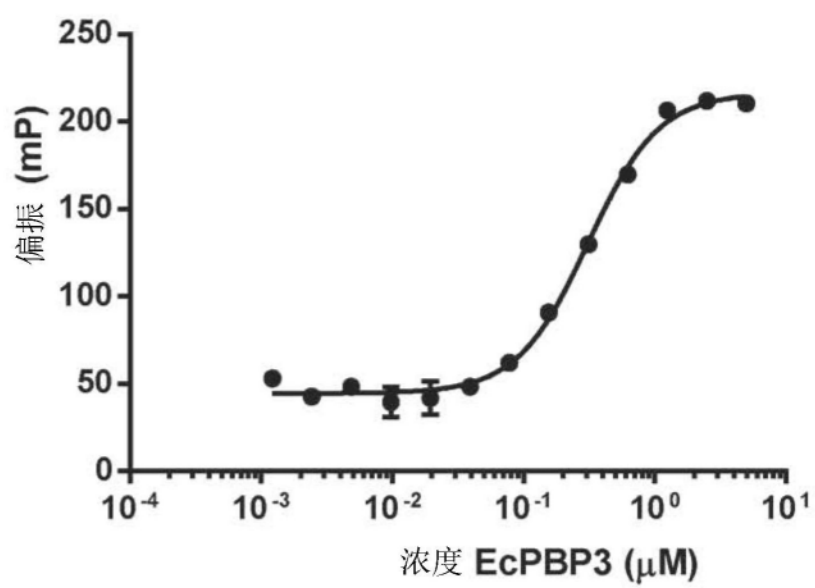


图1

A



B

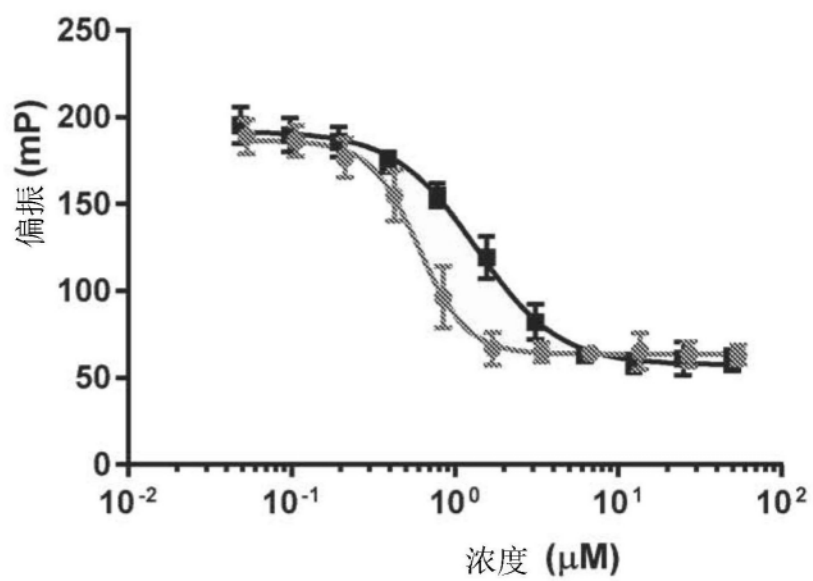
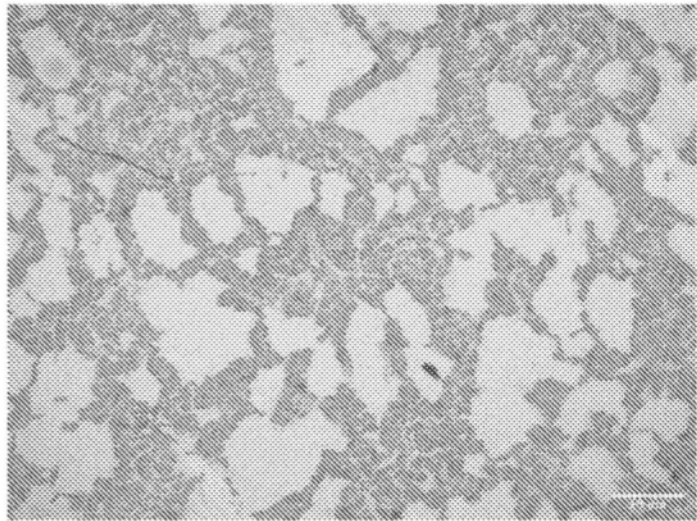


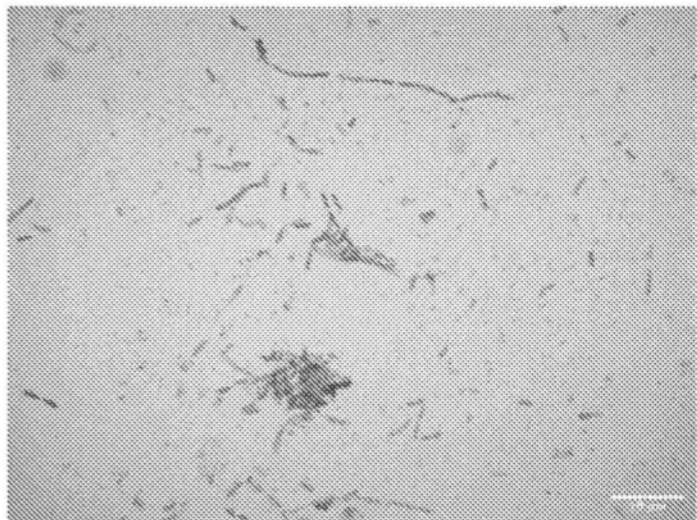
图2

A

大肠杆菌+
没有肽配体:



大肠杆菌+
13.75 $\mu\text{g/ml}$ BCY12130:



大肠杆菌+
27.5 $\mu\text{g/ml}$ BCY12130:

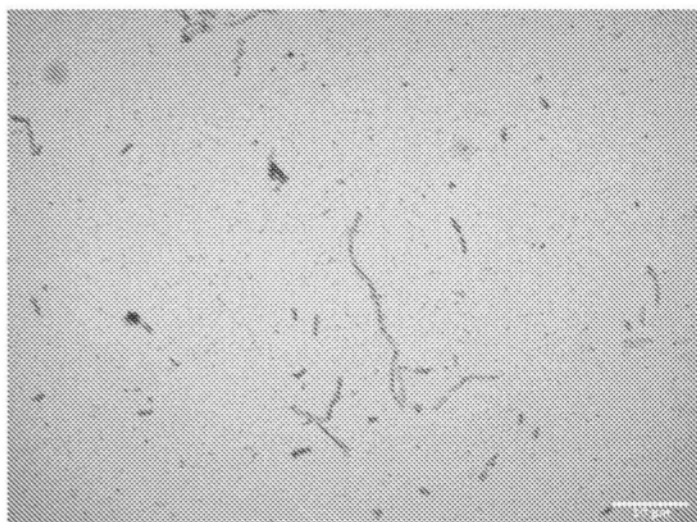


图3

B

鼠伤寒沙门氏菌+
没有肽配体:



鼠伤寒沙门氏菌+
13.75 $\mu\text{g/ml}$ BCY12130:

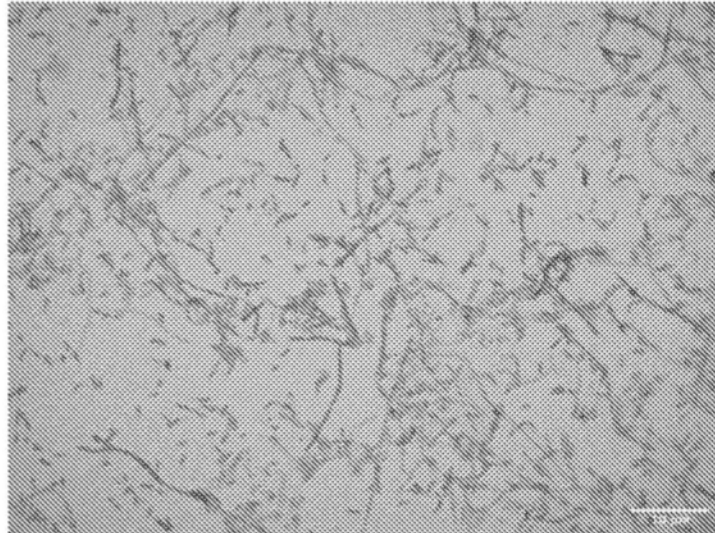
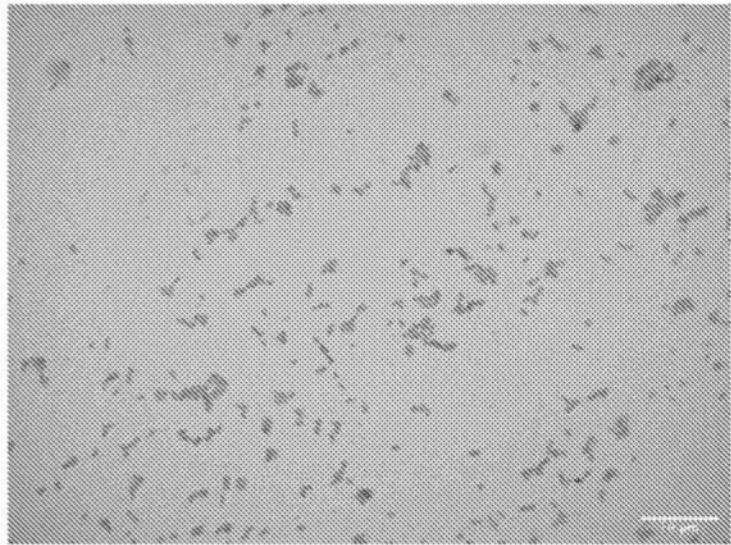


图3(续)

C

阴沟肠杆菌+
没有肽配体:



阴沟肠杆菌+
297.5 $\mu\text{g/ml}$ BCY12130:

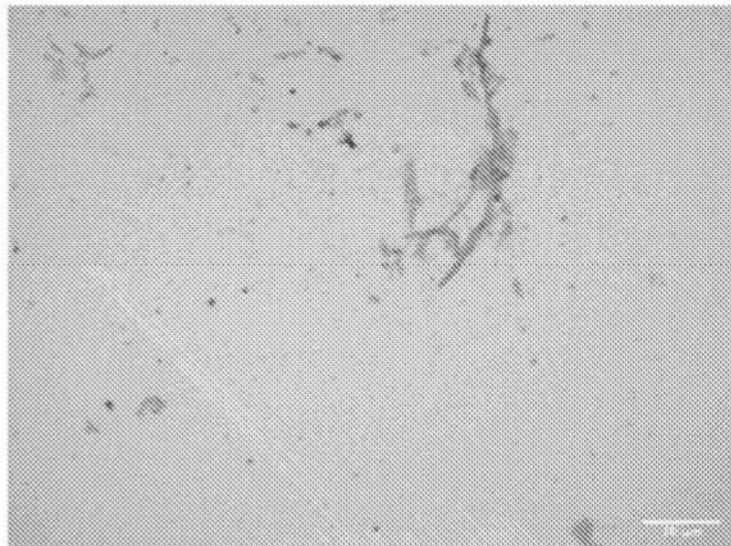


图3(续)