



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101622271 B

(45) 授权公告日 2014. 08. 27

(21) 申请号 200880002256. 9

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008. 01. 15

C07K 2/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

60/880, 783 2007. 01. 16 US

(56) 对比文件

WO 2004110341 A3, 2005. 09. 09,

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2009. 07. 15

审查员 周霞

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2008/051101 2008. 01. 15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02008/140834 EN 2008. 11. 20

(73) 专利权人 加利福尼亚大学董事会

地址 美国加利福尼亚州

专利权人 C3 剑股份有限公司

(72) 发明人 何坚 R·H·埃克特 齐凤霞

M·H·安德森 施文元

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 余颖 张静

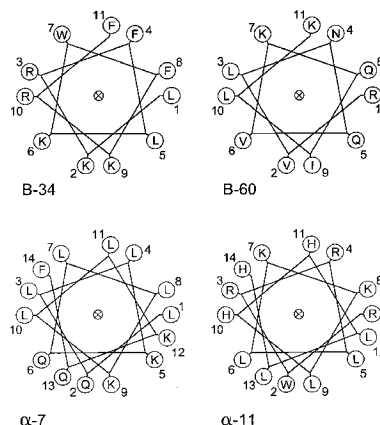
权利要求书2页 说明书35页 附图3页

(54) 发明名称

抗微生物肽

(57) 摘要

本发明提供了能够有效抑制各种革兰氏阳性菌的生长和/或增殖的新型抗微生物肽。具体说, 所述肽能有效对抗变异链球菌, 变异链球菌是一种常见口腔病原体, 可导致龋齿。



1. 一种酸活化的抗微生物肽,所述肽由选自下组的氨基酸序列构成:SEQ ID NO:109 所示的 HHHFHHFHHFHHF, SEQ ID NO:110 所示的 FHFFHHFHHFHHF, SEQ ID NO:111 所示的 KLLKGATFHFFHHFHHFHHF, SEQ ID NO:112 所示的 KLLKFHHFHHFHHFHHF, SEQ ID NO:113 所示的 FHFFHHFHHFHHFKLLK, SEQ ID NO:114 所示的 FHYFWHWFHRF 和 SEQ ID NO:115 所示的 LYHFLHWFQRF。

2. 如权利要求 1 所述的抗微生物肽,其特征在于,所述肽的氨基酸序列由 SEQ ID NO:110 所示的 FHFFHHFHHFHHF 构成。

3. 如权利要求 1 所述的抗微生物肽,其特征在于,所述肽由 SEQ ID NO:109 所示的 HHHFHHFHHFHHF 所示氨基酸序列构成。

4. 如权利要求 1 所述的抗微生物肽,其特征在于,所述肽由 SEQ ID NO:111 所示的 KLLKGATFHFFHHFHHFHHF 所示氨基酸序列构成。

5. 如权利要求 1 所述的抗微生物肽,其特征在于,所述肽由 SEQ ID NO:112 所示的 KLLKFHHFHHFHHFHHF 所示氨基酸序列构成。

6. 如权利要求 1 所述的抗微生物肽,其特征在于,所述肽由 SEQ ID NO:113 所示的 FHFFHHFHHFHHFKLLK 所示氨基酸序列构成。

7. 如权利要求 1 所述的抗微生物肽,其特征在于,所述肽由 SEQ ID NO:114 所示的 FHYFWHWFHRF 所示氨基酸序列构成。

8. 如权利要求 1 所述的抗微生物肽,其特征在于,所述肽由 SEQ ID NO:115 所示的 LYHFLHWFQRF 所示氨基酸序列构成。

9. 如权利要求 1-8 中任一项所述的抗微生物肽,其特征在于,所述肽具有一个或多个保护基。

10. 如权利要求 9 所述的抗微生物肽,其特征在于,所述肽具有一个或多个选自下组的保护基:乙酰基、酰胺、3-20 个碳的烷基、Fmoc、Tboc、9- 芴乙酰基、1- 芴羧基、9- 芴羧基、9- 芴酮-1- 羧基、苄氧基羰基、咕吨基、三苯甲基、4- 甲基三苯甲基、4- 甲氧基三苯甲基、4- 甲氧基-2,3,6- 三甲基- 苯磺酰基、均三甲基苯-2- 磺酰基、4,4- 二甲氧基二苯甲基、甲苯磺酰基、2,2,5,7,8- 五甲基色满-6- 磺酰基、4- 甲基苄基、4- 甲氧基苄基、苄氧基、苄基、苄甲酰基、3- 硝基-2- 吡啶次磺酰基、1-(4,4- 二甲基-2,6- 二氧杂环亚己基) 乙基、2,6- 二氯苄基、2- 氯苄氧基羰基、2- 溴苄氧基羰基、苄氧基甲基、叔丁氧基羰基、环己氧基、叔丁氧基甲基、叔丁氧基、叔丁基、乙酰基和三氟乙酰基。

11. 如权利要求 10 所述的抗微生物肽,其特征在于,所述肽在羧基末端连有胺。

12. 一种药物制剂,其包含如权利要求 1-11 中任一项所述的抗微生物肽;和药学上可接受的赋形剂。

13. 如权利要求 12 所述的药物制剂,其特征在于,所述制剂是单位剂量制剂。

14. 如权利要求 12 所述的药物制剂,其特征在于,所述赋形剂是口腔粘膜给药可接受的。

15. 一种健康护理产品,其包含:

如权利要求 1-11 中任一项所述的抗微生物肽,其中所述抗微生物肽包含在选自下组的产品中:牙膏、漱口水、牙齿增白条或溶液、隐形眼镜储存液、润湿剂、或清洁溶液、牙线、牙签、牙刷刷毛、口腔喷雾剂、口腔锭剂、鼻腔喷雾剂、口腔和 / 或鼻腔应用的粉雾剂和伤口

敷料。

16. 一种体外抑制链球菌生长和 / 或增殖的方法,所述方法包括使所述细菌与足以抑制所述细菌的生长和 / 或增殖量的如权利要求 1-11 中任一项所述的肽相接触。

17. 如权利要求 16 所述的方法,其特征在于,所述量是足以杀死所述细菌的量。

18. 如权利要求 16 所述的方法,其特征在于,所述细菌是变异链球菌。

19. 权利要求 1-11 中任一项所述抗微生物菌肽用于制造通过抑制变异链球菌的生长和 / 或增殖来抑制龋齿形成的药物的用途。

20. 如权利要求 19 所述的用途,其特征在于,所述接触包括使所述牙齿和 / 或口腔粘膜与选自下组的组合物相接触:牙膏、漱口剂、增白条或溶液、锭剂、气溶胶和拭子。

21. 权利要求 1-11 中任一项所述的抗微生物肽在制造用于抑制链球菌感染的药物中的用途。

22. 权利要求 21 所述用途,所述药物抑制变异链球菌感染。

抗微生物肽

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求 2007 年 1 月 16 日提交的 USSN 60/880,783 的优先权,其全部内容通过参考结合于此。

[0003] 国立资助的研究与开发下进行的发明权利的声明

[0004] 本发明部分地得到国立卫生研究院 (National Institute of Health) 的资助,授权号为 MD01831。政府在本发明中拥有一定的权益。

发明领域

[0005] 本发明涉及抗微生物化合物领域。具体说,本发明涉及能够有效对抗变异链球菌 (*Streptococcus mutans*) 及其他细菌的新型抗微生物肽的鉴别。

[0006] 发明背景

[0007] 近年来,由于抗微生物肽 (AMPs) 具有针对包括耐药菌在内的广谱菌属的强效杀伤活性而成为抗生素替代品的最前沿。AMPs 是在单细胞和多细胞生命型中发现的一类具有内在免疫性的遗传共同分子 (Tossi 等, (2000) *Biopolymers* 55 :4-30 ;Diamond (2001) *Biologist* (London) 48 :209-212 ;Lehrer 和 Ganz (2002) *Curr. Opin. Immunol.* 14 :96-102 ;Brogden 等, (2003) *Int. J. Antimicrob. Agents* 22 :465-478)。虽然它们在肽序列和翻译后修饰 (线性,环状等) 方面存在显著不同,大多数 AMPs 能够通过破坏脂质膜而杀伤细菌,虽然该机制的细节似乎存在很大差异 (Shai (2002) *Biopolymers* 66 :236-248 ;Brogden (2005) *Nat. Rev. Microbiol.* 3 :238-250)。过去的研究已经证明 AMP 功能中基本疏水和正电荷特性的关键作用,包括在许多 AMPs 中发现的芳族 Trp 和正电荷 Arg 残基的显著贡献 (Chan 等, (2007) *Biochim Biophys Acta.* 51(4) :1351-1359 ;Wei 等, (2006) *J. Bacteriol.* 188 :328-334)。虽然 AMP 较小 (大多数 AMP 不到 50 个氨基酸),但其二级结构似乎也对其活性发挥重要作用。某些线性 AMP 与类似细菌膜的疏水环境 (例如去污剂或脂质囊泡) 相互作用时可能采取 α -螺旋或 β -折叠构型,提示这种构型变化是抗微生物功能所必需的 (Kiyota 等, (1996) *Biochemistry* 35 :13196-13204 ;Wei 等, (2006) *J. Bacteriol.* 188 :328-334 ;Wimmer 等, (2006) *Biochemistry* 45 :481-497)。此外,膜-活性 α -螺旋 (及其他结构) 似乎要求残基的两性空间排列,即在肽表面两侧的疏水性梯度 (Kiyota 等, (1996) *Biochemistry* 35 :13196-13204 ;Shai (1999) *Biochim Biophys Acta* 1462 :55-70 ;Lee (2002) *Curr Pharm Des* 8 :795-813)。

[0008] 过去,抗微生物肽的合理设计主要集中在改变现有的天然序列,或者通过大型组合文库开发新型肽 (Kiyota 等, (1996) *Biochemistry* 35 :13196-13204 ;Blondelle 和 Lohner (2000) *Biopolymers* 55 :74-87 ;Hong 等, (2001) *Peptides* 22 :1669-1674 ;Sawai 等, (2002) *Protein Eng.* 15 :225-232)。这些努力提供了关于 AMP 构效关系的有价值信息。

[0009] 变异链球菌是一种常见的口腔病原体,可导致龋齿,即使不断努力去除或根除,它们仍然保留在牙齿上,甚至越发繁茂。非常需要对抗该生物体的新型治疗剂,因为饮食中糖的存在使得变异链球菌成为牙齿表面的顽固菌落,即使专用机械去除 (刷牙) 和一般抗菌

努力,它们仍然保留在口腔微生物群(称为牙菌斑)中(Keene 和 Shklair(1974)J. Dent. Res. 53 :1295)。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明涉及新型抗微生物肽的发现。在某些实施方式中,这些肽具有对抗革兰氏阳性菌的显著活性,尤其是对抗口腔中的革兰氏阳性菌(如,变异链球菌)。这些肽可用于配制各种抗微生物组合物和/或用于与预防或减少龋齿的发生。

[0012] 因此,在某些实施方式中,本发明提供了一种抗微生物肽,该肽包含以下氨基酸基序或以下氨基酸基序的环状变换: $(H^1C^1H^2H^3C^3H^4H^5C^4C^5)_n$,其中n为1-5并以0.1为单位递增; H^1, H^2, H^3, H^4 和 H^5 独立地选自疏水性或亲水性氨基酸; C^1, C^2, C^3, C^4 和 C^5 独立地选自不带电的氨基酸、正电荷氨基酸或负电荷氨基酸;该肽形成 α 螺旋;并且,该肽能有效杀伤或抑制培养物中变异链球菌的生长和/或增殖。在某些实施方式中, C^1, C^2, C^3, C^4 和 C^5 独立地选自正电荷氨基酸,或负电荷氨基酸。在某些实施方式中,不带电的氨基酸独立地选自:S, T和Y(或其类似物、衍生物或保守取代),和/或正电荷氨基酸独立地选自:K, R和H(或其类似物、衍生物或保守取代),和/或负电荷氨基酸s独立地选自:N, Q, D和E(或其类似物、衍生物或保守取代),和/或疏水性或亲水性氨基酸独立地选自:L, I, V, W和F(或其类似物、衍生物或保守取代)。在某些实施方式中,该肽在生理学pH下具有至少+3的净正电荷。在某些实施方式中,n为1.1;所述肽包含基序 $H^1C^1H^2H^3C^3H^4H^5C^4C^5H^6$,其中 H^6 独立地选自疏水性氨基酸。示例性的n=1.1的肽包括但不限于:FKKFWKWFRRF(SEQ ID NO:31)(B-33), LKRFLKWFKRF(SEQ ID NO:32)(B-34), KLFKRWKHLFR(SEQ ID NO:33)(B-35), RLLKRFKHLFK(SEQ ID NO:34)(B-36), FKTFKLWLHRF(SEQ ID NO:35)(B-37), IKQLLHFFQRF(SEQ ID NO:36)(B-38), KLLQTFKQIFR(SEQ ID NO:37)(B-39), RILKELKNLKF(SEQ ID NO:38)(B-40), LKQFVHFIHRF(SEQ ID NO:39)(B-41), VKTLLHIFQRF(SEQ ID NO:40)(B-42), KLVEQLKEIFR(SEQ ID NO:41)(B-43), RVLQEIKQILK(SEQ ID NO:42)(B-44), VKNLAELVHRF(SEQ ID NO:43)(B-45), ATHLLHALQRF(SEQ ID NO:44)(B-46), KLAENVKEILR(SEQ ID NO:45)(B-47), RALHEAKEALK(SEQ ID NO:46)(B-48), FHYFWHWFHRF(SEQ ID NO:47)(B-49), LYHFLHWFQRF(SEQ ID NO:48)(B-50), YLFQTWQHLFR(SEQ ID NO:49)(B-51), YLLTEFQHLFK(SEQ ID NO:50)(B-52), FKTFLLQWLHRF(SEQ ID NO:51)(B-53), IKTLLHFFQRF(SEQ ID NO:52)(B-54), KLLQTFNQIFR(SEQ ID NO:53)(B-55), TILQSLKNIFK(SEQ ID NO:54)(B-56), LKQFVKFIHRF(SEQ ID NO:55)(B-57), VKQLLKIFNRF(SEQ ID NO:56)(B-58), KLVQQLKNIFR(SEQ ID NO:57)(B-59), RVLNQVKQILK(SEQ ID NO:58)(B-60), VKKLAKLVRRF(SEQ ID NO:59)(B-61), AKRLLKVLKRF(SEQ ID NO:60)(B-62), KLAQKVQRVLR(SEQ ID NO:61)(B-63)和RALKRIKHVLK(SEQ ID NO:62)(B-64)。在某些实施方式中n为1.4;所述肽包含基序 $H^1C^1H^2H^3C^3H^4H^5C^4C^5H^6C^6H^7$,其中 H^6 和 H^7 独立地选自疏水性氨基酸, C^6 和 C^7 独立地选自正电荷或负电荷氨基酸。示例性的n=1.4的肽包括但不限于:KLKKLLKKLKKLLK(SEQ ID NO:64)(α -5), LKLLKKLLKKLKKF(SEQ ID NO:65)(α -6), LQLLKQLLKKLKKF(SEQ ID NO:66)(α -7), RWRRLKHLHLLH(SEQ ID NO:68)(α -9), KLKKLLKRRRWR(SEQ ID NO:69)(α -10), RWRRLKHLHLLH(SEQ ID NO:70)(α -11)和KLKKLLKHLHLLH(SEQ ID NO:71)(α -12)。

[0013] 在某些实施方式中,抗微生物肽(AMP)是包括7个毗连氨基酸的肽,其中除两个氨基酸外的所有其他氨基酸均为 Arg 或 Trp、或其衍生物或类似物;两个非 -Arg 或 Trp 氨基酸是 Lys 或 Phe、或其衍生物或类似物;N-末端残基是 Arg 或其衍生物或类似物。在各个实施方式中,除两个氨基酸外的所有其他氨基酸均为 Arg 或 Trp(或其衍生物或类似物);两个非 -Arg 或 Trp 氨基酸是 Lys 或 Phe(或其衍生物或类似物);N-末端残基是 Arg(或其衍生物或类似物)。在某些实施方式中,肽包含选自下组的氨基酸序列:RRRRWWW(SEQ ID NO:72)(1C-1),RRWRRW(SEQ ID NO:73)(1C-2),RRRWWW(RSEQ ID NO:74)(1C-3),RWRWRWR(SEQ ID NO:75)(1C-4),RRRFWRW(SEQ ID NO:76)(2C-1),RRWRRF(SEQ ID NO:77)(2C-2),RRRWWWF(SEQ ID NO:78)(2C-3),RWRWRWF(SEQ ID NO:79)(2C-4),RRRRWWK(SEQ ID NO:80)(3C-1),RRWRRK(SEQ ID NO:81)(3C-2),RRRWWK(SEQ ID NO:82)(3C-3),RWRWRK(SEQ ID NO:83)(3C-4),RRRKWWK(SEQ ID NO:84)(4C-1),RRWKRRK(SEQ ID NO:85)(4C-2),RRRKWWK(SEQ ID NO:86)(4C-3)和 RWRKRWK(SEQ ID NO:87)(4C-4)。

[0014] 还提供了酸活化的抗微生物肽(AMP),包括长度约7-11个氨基酸的两性螺旋肽,其中大多数带电残基(超过一半)是在酸性pH下具有正电荷的His或其衍生物或类似物,这些pH下该肽基本上没有抗微生物活性,但在酸性pH下具有针对变异链球菌的抗微生物活性。在某些实施方式中,所有带电残基是在酸性pH(例如pH6或更低)下具有正电荷的His或其衍生物或类似物。在某些实施方式中,肽包括HH和FF的交替重复。在某些实施方式中,肽的一端或两端包括氨基酸序列KLLK(SEQ ID NO:166)。在一端或两端具有KLLK(SEQ ID NO:166)的某些实施方式中,KLLK通过接头(如,GAT,SEQ ID NO:167)连接于末端。在某些实施方式中,肽包含氨基酸序列FHFFHHFFHHFFHHF(SEQ ID NO:110)。示例性的酸活化AMP包括但不限于:HHFFHHFFHHFFHHF(SEQ ID NO:109)(AA-1),FHFFHHFFHHFFHHF(SEQ ID NO:110)(AA-2),KLLKGATFHFFHHFFHHFFHHF(SEQ ID NO:111)(AA-3),KLLKFHHFFHHFFHHFFHHF(SEQ ID NO:112)(AA-4),FHFFHHFFHHFFHHFKLLK(SEQ ID NO:113)(AA-5),FHYFWHWFHFRF(SEQ ID NO:114)(AA-6)和LYHFLHWFQRF(SEQ ID NO:115)(AA-7)。

[0015] 在某些实施方式中,本发明提供了杀伤文库#7 AMP。这些肽包括:LKQKLKILF(SEQ ID NO:116)(S6L1-2),LKQLKAGIY(SEQ ID NO:117)(S6L1-3),VGKCVKLLY(SEQ ID NO:118)(S6L1-4),KFVKLI LAY(SEQ ID NO:119)(S6L1-5),KLVKLVFLY(SEQ ID NO:120)(S6L1-6),IKVFAKQKY(SEQ ID NO:121)(S6L1-7)和RFRHFQERY(SEQ ID NO:122)(S6L1-8)。

[0016] 在某些实施方式中,本发明提供了 β -缺失文库AMP。这些肽包括:FVFRHKWVWKHRFLF(SEQ ID NO:123)(S3L8-1),VFI VWVHKHVLf(SEQ ID NO:124)(S3L8-2),WRWRARWRRLRWRF(SEQ ID NO:125)(S3L8-3),WRIHLRARLHVKFRF(SEQ ID NO:126)(S3L8-4),LRIHARFKVHIRLKF(SEQ ID NO:127)(S3L8-5),FHIKFRVHLKVRHFH(SEQ ID NO:128)(S3L8-6),FHVKIHFRLHVKFHF(SEQ ID NO:129)(S3L8-7),LHIHAHFVHIHLHF(SEQ ID NO:130)(S3L8-8),FKIHFVRKHIRFKF(SEQ ID NO:131)(S3L8-9),FKAHIRFKLRVKFHF(SEQ ID NO:132)(S3L8-10),LKAKIKFKVCLKIKF(SEQ ID NO:133)(S3L8-11),WIWKHKFLHRHFLF(SEQ ID NO:134)(S3L8-12),VFLHRHVIKHKLVF(SEQ ID NO:135)(S3L8-13),FLHKHVLRRHIVF(SEQ ID NO:136)(S3L8-14),VFKHKIVHRHILF(SEQ ID NO:137)(S3L8-15),FLFKHLFLHRIFL(SEQ ID NO:138)(S3L8-16),LFKHILIHVRVIF(SEQ ID NO:139)(S3L8-17),FLHKHLFKHKLF(SEQ ID NO:140)(S3L8-18),VFRHRFIHRHVf(SEQ ID NO:141)(S3L8-19),FIHKLHVHKHVLf(SEQ ID NO:142)(S3L8-20)。

142) (S3L8-20), VLRHLFRHRIVF (SEQ ID NO :143) (S3L8-21), LVHKLILRHLLF (SEQ ID NO :144) (S3L8-22), VFKRVLH HKLIF (SEQ ID NO :145) (S3L8-23), IVRKFLFRHKVF (SEQ ID NO :146) (S3L8-24), VLKHVIAHKRLF (SEQ ID NO :147) (S3L8-25), FIRKFLFKHLF (SEQ ID NO :148) (S3L8-26), VIRHVWVRKLF (SEQ ID NO :149) (S3L8-27), FLFRHRFRHRLVF (SEQ ID NO :150) (S3L8-28), LFLHKHAKHKFLF (SEQ ID NO :151) (S3L8-29), FKHKFKHKFIF (SEQ ID NO :152) (S3L8-30), LRHRLRHRLIF (SEQ ID NO :153) (S3L8-31), LILKFLFKFVF (SEQ ID NO :154) (S3L8-32), VLIRILVRVIF (SEQ ID NO :155) (S3L8-33), FRHRFRHRF (SEQ ID NO :156) (S3L8-34), LKHKLKHKF (SEQ ID NO :157) (S3L8-35), FKFKHKLIF (SEQ ID NO :158) (S3L8-36), LRLRHRVLF (SEQ ID NO :159) (S3L8-37), FKFLFKFLF (SEQ ID NO :160) (S3L8-38), LRLFLRWLF (SEQ ID NO :161) (S3L8-39), FKFLFKHKF (SEQ ID NO :162) (S3L8-40), LRLFLRHRF (SEQ ID NO :163) (S3L8-41), FKFLFKF (SEQ ID NO :164) (S3L8-42) 和 LRLFLRF (SEQ ID NO :165) (S3L8-43)。

[0017] 在某些实施方式中,本文所述的任意肽连接第二抗微生物肽 (AMP) 从而形成化合抗微生物肽。两个肽可以是直接化学偶联或通过接头基团化学连接,或者以有或没有肽接头的融合蛋白的形式表达 (或合成)。在某些实施方式中,第二抗微生物肽是:包含以下氨基酸基序的肽或以下氨基酸基序的环状变换: $(H^1C^1H^2H^3C^3H^4H^5C^4C^5)_n$, 其中 n 为 1-5, 以 0.1 为单位递增; H^1 、 H^2 、 H^3 、 H^4 和 H^5 独立地选自疏水性或亲水性氨基酸; 和 C^1 、 C^2 、 C^3 、 C^4 和 C^5 独立地选自中性氨基酸、正电荷氨基酸或负电荷氨基酸; 或者包含 7 个毗连氨基酸的肽, 其中除两个氨基酸外的所有其他氨基酸为 Arg 或 Trp、或其衍生物或类似物; 两个非 -Arg 或 Trp 氨基酸是 Lys 或 Phe、或其衍生物或类似物; N-末端残基是 Arg 或其衍生物或类似物。在某些实施方式中,第二抗微生物肽如表 6、表 10、表 11 或表 12 所示。

[0018] 在某些实施方式中,本文所述的任意肽或化合 AMP 还在羧基末端包含游离 (例如,来自精氨酸或赖氨酸,或来自酰胺化的非 - 正电荷残基)。在某些实施方式中,本文所述的任意肽或化合 AMP 经聚乙二醇化。在某些实施方式中,本文所述的任意肽或化合 AMP 具有一个或多个保护基 (如,乙酰基、酰胺以及 3-20 个碳的烷基、Fmoc、Tboc、9- 芴乙酰基、1- 芴羧基、9- 芴酮-1- 羧基、苄氧基羰基、咕吨基 (Xan)、三苯甲基 (Trt)、4- 甲基三苯甲基 (Mtt)、4- 甲氧基三苯甲基 (Mmt)、4- 甲氧基-2,3,6- 三甲基- 苯磺酰基 (Mtr)、均三甲苯-2- 磺酰基 (Mts)、4,4- 二甲氧基二苯甲基 (Mbh)、甲苯磺酰基 (Tos)、2,2,5,7,8- 五甲基色满-6- 磺酰基 (Pmc)、4- 甲基苄基 (MeBzl)、4- 甲氧基苄基 (MeOBzl)、苄氧基 (Bzl)、苄基 (Bzl)、苯甲酰基 (Bz)、3- 硝基-2- 吡啶次磺酰基 (Npys)、1-(4,4- 二甲氧基-2,6- 二氧杂环亚己基 (diaxocyclohexylidene)) 乙基 (Dde)、2,6- 二氯苄基 (2,6-DiCl-Bzl)、2- 氯苄氧基羰基 (2-Cl-Z)、2- 溴苄氧基羰基 (2-Br-Z)、苄氧基甲基 (Bom)、叔丁氧基羰基 (Boc)、环己氧基 (cHexO)、叔丁氧基甲基 (Bum)、叔丁氧基 (tBuO)、叔丁基 (tBu)、乙酰基 (Ac) 和三氟乙酰基 (TFA) 等)。在某些实施方式中,本文所述的任意肽或化合 AMP 中的氨基酸都是天然产生的氨基酸。在某些实施方式中,本文所述的任意肽包含一个或多个“D”氨基酸和 / 或一个或多个 β 氨基酸。在某些实施方式中,用可检测的标记 (例如,酶标记、荧光标记、比色标记、自旋标记、反射性标记等) 标记本文所述的任意肽或化合 AMP。

[0019] 还提供了药物制剂,其包含任意一种或多种本文所述抗微生物肽或化合 AMP 以及药学上可接受的赋形剂。在某些实施方式中,所述制剂是单位剂量制剂。在某些实施方式

中,赋形剂适合口腔粘膜给药。

[0020] 在某些实施方式中,本发明提供了一种健康护理产品,例如家用、旅行中、工作中、在牙科诊所、医院等场所使用的处方药或非处方药,其包含本文所述的任意一种或多种抗微生物肽或化合 AMP,其中抗微生物肽和 / 或化合 AMP 包含在选自下组的产品中:牙膏、漱口剂、牙齿增白条或溶液、隐形眼镜储存液、润湿剂、或清洁溶液、牙线、牙签、牙刷刷毛、口腔喷雾剂、口腔锭剂、鼻腔喷雾剂、口腔和 / 或鼻腔应用的粉雾剂以及伤口敷料。

[0021] 还提供了抑制细菌(或其他病原体)的生长和 / 或增殖的方法。该方法通常包括使细菌或其他病原体与一种或多种本文所述的抗微生物肽和 / 或化合 AMP 相接触,所述抗微生物肽和 / 或化合 AMP 的量足以抑制所述细菌或其他病原体的生长和 / 或增殖。在某些实施方式中,所述用量足以杀伤细菌。在某些实施方式中,细菌是革兰氏阳性菌。在某些实施方式中,细菌是革兰氏阳性口腔细菌(如,链球菌属(*Streptococcus* sp.))。在某些实施方式中,接触步骤包括接触粘膜表面(例如,口腔粘膜、鼻粘膜等)。

[0022] 还提供了抑制龋齿形成的方法。该方法通常包括使牙齿和 / 或口腔粘膜与一种或多种本文所述的抗微生物肽和 / 或化合 AMP 接触,所述抗微生物肽和 / 或化合 AMP 的量足以抑制变异链球菌的生长和 / 或增殖。在某些实施方式中,接触步骤包括使牙齿和 / 或口腔粘膜与选自下组的组合物相接触:牙膏、漱口剂、增白条或溶液、锭剂、气溶胶和拭子。

[0023] 在某些实施方式中,本发明的肽和 / 或类别通式显然不包括肽 B-33(FKKFWKWFRRF, SEQ ID NO:31)。

[0024] 定义

[0025] 本文所用术语“肽”表示长度通常约为 2-50 个残基的氨基酸残基的聚合物。在某些实施方式中,肽的长度约为 2、3、4、5、7、9、10 或 11 个残基到约 50、45、40、30、25、20 或 15 个残基。在某些实施方式中,肽的长度约为 8、9、10、11 或 12 个残基到约 15、20 或 25 个残基。在某些实施方式中,构成肽的氨基酸残基是“L-型”氨基酸残基,然而也认识到在各种实施方式中,肽中也可包含“D-型”氨基酸。肽还可包括氨基酸聚合物,其中一个或多个氨基酸残基是相应的天然来源氨基酸的人工化学合成类似物,以及天然产生的氨基酸聚合物。此外,该术语适用于由肽连接键或其他“修饰的连接键”连接的氨基酸(例如,肽键被 α -酯、 β -酯、硫酰胺、磷酰胺,碳酸酯(carbomate)、羟基化物等取代(参见例如,Spatola, (1983) Chem. Biochem. Amino Acids and Proteins 7:267-357),酰胺被饱和胺取代(参见例如,Skiles 等,美国专利 4,496,542,其内容被纳入本文作为参考和 Kaltenbronn 等, (1990) 第 969-970 页,美国第 11 届肽研讨会(Proc. 11th American Peptide Symposium), ESCOM 科学出版社(ESCOM Science Publishers), 荷兰,等))。

[0026] 本文所用术语“残基”表示天然、合成或修饰的氨基酸。各种氨基酸类似物包括但不限于:2-氨基己二酸、3-氨基己二酸、 β -丙氨酸(β -氨基丙酸)、2-氨基丁酸、4-氨基丁酸、哌啶酸(piperidinic acid)、6-氨基己酸、2-氨基庚酸、2-氨基异丁酸、3-氨基异丁酸、2-氨基庚二酸、2,4-二氨基丁酸、锁链素、2,2'-二氨基庚二酸、2,3-二氨基丙酸、n-乙基甘氨酸、n-乙基天冬酰胺、羟基赖氨酸、别(allo)-羟基赖氨酸、3-羟基脯氨酸、4-羟基脯氨酸、异锁链素、别-异亮氨酸、n-甲基甘氨酸、肌氨酸、n-甲基异亮氨酸、6-n-甲基赖氨酸、n-甲基缬氨酸、正缬氨酸、正亮氨酸、鸟氨酸等。这些修饰的氨基酸是示例性而非限制性的。

[0027] “ β 氨基酸”构成的“ β -肽”在 20 个标准生物学氨基酸中其氨基与 β -碳而非 α -碳键合。唯一共同的天然来源 β 氨基酸是 β -丙氨酸。

[0028] 类肽或 N-取代的甘氨酸是肽模拟物的特殊亚型。它们与其天然肽部分密切相关，但化学结构存在差异，其侧链沿分子主链连接于氮原子，而不是 α -碳（天然氨基酸连接 α -碳）。

[0029] 本文中术语“常规”和“天然”用于肽时表示仅由天然来源的氨基酸构成的肽：Ala, Cys, Asp, Glu, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 和 Tyr。如果本发明的化合物具有与天然来源肽的生物学活性和 / 或特异性相关的生物学活性（例如，抗微生物活性），该化合物“相当于”天然的肽。所得活性可与天然肽相同，大于或小于天然肽的活性。一般来说，如果 N-取代的甘氨酸衍生物在亲水性、疏水性、极性等方面类似于原始氨基酸，所述类肽具有基本上对应的单体序列，其中天然氨基酸被 N-取代的甘氨酸衍生物取代。因此，例如以下肽对被认为是“对应的”：

[0030] Ia. Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe（血管紧张素 II）(SEQ ID NO :1) 和

[0031] Ib. Asp-Arg-Val*-Tyr-Ile*-His-Pro-Phe (SEQ ID NO :2) ；

[0032] IIa. Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg（缓激肽）(SEQ ID NO :3) 和

[0033] IIb :Arg-Pro-Pro-Gly-Phe*-Ser*-Pro-Phe*-Arg (SEQ ID NO :4) ；

[0034] IIIa :Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr（ β -内啡肽）(SEQ ID NO :5) ；和

[0035] IIIb :Gly-Gly-Phe*-Met-Ser*-Ser-Glu-Lys*-Ser-Gln-Ser*-Pro-Leu-Val*-Thr (SEQ ID NO :6)。

[0036] 在这些例子中，“Val*”表示 N-(丙-2-基)甘氨酸，“Phe*”表示 N-苄基甘氨酸，“Ser*”表示 N-(2-羟乙基)甘氨酸，“Leu*”表示 N-(2-甲基丙-1-基)甘氨酸和“Ile*”表示 N-(1-甲基丙-1-基)甘氨酸。对应性不需要是精确的：例如，N-(2-羟乙基)甘氨酸可取代 Ser、Thr、Cys 和 Met；N-(2-甲基丙-1-基)甘氨酸可取代 Val、Leu 和 Ile。注意在上述 IIIa 和 IIIb 中，用 Ser* 取代 Thr 和 Ser，虽然存在结构差异；Ser* 中的侧链是一个比 Ser 长并且不同于 Thr 羟基取代位置的亚甲基。一般来说，可以用 N-羟基烷基-取代的甘氨酸来取代任何极性氨基酸，用 N-苄基-或 N-芳烷基-取代的甘氨酸取代任何芳族氨基酸（如，Phe、Trp 等），用 N-烷基-取代的甘氨酸如 N-丁基甘氨酸取代任何非极性氨基酸（如，Leu、Val、Ile 等），用 N-(氨基烷基)甘氨酸衍生物取代任何碱性极性氨基酸（如，Lys 和 Arg）。

[0037] “化合抗微生物肽”或“化合 AMP”表示包含两个或更多个连接在一起的 AMP 的结构。AMP 可直接连接或通过接头连接。它们可以化学偶联，或者直接连接在一起或通过肽连接键连接从而形成融合蛋白。

[0038] 在某些实施方式中，考虑包括任何本文所述序列的氨基酸的保守取代。在各个实施方式中，一个、两个、三个、四个或五个不同的残基被取代。术语“保守取代”用于表示基本上不改变分子活性（例如抗微生物活性和 / 或特异性）的氨基酸取代。通常，保守氨基酸取代包括一个氨基酸被具有类似化学特性（例如电荷或疏水性）的另一个氨基酸取代。以下六组各自包含相互间通常保守取代的氨基酸：1) 丙氨酸 (A)，丝氨酸 (S)，苏氨酸 (T)；2) 天冬氨酸 (D)，谷氨酸 (E)；3) 天冬酰胺 (N)，谷氨酰胺 (Q)；4) 精氨酸 (R)，赖氨酸 (K)，

组氨酸 (H) ;5) 异亮氨酸 (I), 亮氨酸 (L), 甲硫氨酸 (M), 缬氨酸 (V) ;和 6) 苯丙氨酸 (F), 酪氨酸 (Y), 色氨酸 (W)。

[0039] 在某些实施方式中, 也考虑与本文所述的任意序列具有至少 80%, 优选至少 85% 或 90%, 更优选至少 95% 或 98% 序列相同性的抗微生物肽。术语“相同”或“相同”百分比表示以最大对应性比较和比对时, 用以下序列比较算法或视觉观察测定的相同或具有特定百分比的相同氨基酸残基的两个或更多个序列。相对于本发明的肽, 沿肽链全长测定序列相同性。对于序列比较, 通常一个序列用作参比序列, 测试序列与之进行比对。采用比较算法时, 将测试和参比序列输入计算机, 然后如果需要的话设定坐标轴, 并设定序列算法程序参数。然后基于设定的程序参数, 由序列比较算法计算测试序列相对于参比序列的百分序列相同性。对用于比较的序列进行最佳排列, 例如通过 Smith 和 Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2 :482 的局部同源性算法, 通过 Needleman 和 Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48 :443 的同源性排列算法, 通过 Pearson 和 Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85 :2444 的相似性检索方法, 通过这些算法的计算机化实现 (GAP, BESTFIT, FASTA 和 TFASTA, 威斯康星基因软件包 (Wisconsin Genetics Software), 基因计算机组 (Genetics Computer Group), 威斯康星州麦迪逊科学路 575 号 (575 Science Dr., Madison, WI)), 或者通过视觉观察。

[0040] 术语“特异性”与肽的抗微生物活性联用时表示, 与其他相关物质相比, 该肽优先抑制某些微生物的生长和 / 或增殖和 / 或优先杀伤某些微生物。在某些实施方式中, 优先抑制或杀伤是指对靶物质的作用大至少 10% (如, LD_{50} 低 10%), 优选大至少 20%、30%、40% 或 50%, 更优选大至少 2- 倍, 至少 5- 倍, 或至少 10- 倍。

[0041] 本文所用疾病的“治疗”或“处理”表示预防疾病, 减缓疾病的发生或发展速率, 降低疾病发生的风险, 防止或延缓与疾病相关症状的发展, 减轻或终止与疾病相关的症状, 引发疾病的完全或部分消退, 或它们的一些组合。

[0042] 术语“基本上由……构成”与本文所述抗微生物肽 (AMP) 或 AMP 基序联用时表示, 文库所包括的一种或多种肽、或其变体、类似物或衍生物具有与参比肽基本上相同或更高的抗微生物活性和 / 或特异性。在某些实施方式中, 基本上相同或更高的抗微生物活性表示对抗特定菌种 (例如变异链球菌) 时, 具有至少 80%, 优选至少 90%, 更优选至少 95% 参比肽的抗微生物活性。

[0043] 在各种实施方式中, 本文采用表 1 所示的氨基酸缩写。

[0044] 表 1 : 氨基酸缩写

[0045]

名称	缩写	
	3 个字母	1 个字母
丙氨酸	Ala	A
β 丙氨酸($\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$)	β Ala	
精氨酸	Arg	R
天冬酰胺	Asn	N
天冬氨酸	Asp	D
半胱氨酸	Cys	C
谷氨酸	Glu	E
谷氨酰胺	Gln	Q
甘氨酸	Gly	G

[0046]

组氨酸	His	H
高丝氨酸	Hse	-
异亮氨酸	Ile	I
亮氨酸	Leu	L
赖氨酸	Lys	K
甲硫氨酸	Met	M
甲硫氨酸亚砷	Met (O)	-
甲硫氨酸甲基砷	Met (S-Me)	-
正亮氨酸	Nle	-
苯丙氨酸	Phe	F
脯氨酸	Pro	P
丝氨酸	Ser	S
苏氨酸	Thr	T
色氨酸	Trp	W
酪氨酸	Tyr	Y
缬氨酸	Val	V
ϵ -氨基己酸 ($\text{NH}_2\text{-(CH}_2)_5\text{-COOH}$)	Ahx	J
4-氨基丁酸 ($\text{NH}_2\text{-(CH}_2)_3\text{-COOH}$)	gAbu	
四氢异喹啉-3-羧酸		O
Lys(N(ϵ)-三氟乙酰基)		K[TFA]
α -氨基异丁酸	Aib	B

[0047] 附图简要说明

[0048] 图1示出二元和 α -螺旋文库 (SEQ ID NOS :32,58,66和70) 中代表性肽的 α -螺旋轮突 (wheel projection)。残基从N端到C端连续编号。

[0049] 图2A和2B示出二元- α -螺旋和二元-RW融合肽的比较性杀伤。用25 μ g/ml 二元- α -螺旋 (图2A) 或二元-RW (图2B) 融合肽或母体AMP攻击变异链球菌,在加入后的各个时间点接种存活CFU。0分钟的样品在肽处理之前接种。所有数据点代表至少三次独立实验结果的平均值 $\pm$ 标准差。

[0050] 发明详述

[0051] 在各个实施方式中,本发明涉及具有抗微生物活性的新型肽的发现。在某些实施方式中,该肽能有效杀伤和/或抑制变异链球菌和某些其他菌种 (例如,真菌类 [如,白色念珠菌 (*Candida albicans*) 等],革兰氏阴性菌 [如,绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas*

aeruginosa) 等] 和革兰氏阳性菌 [如, 粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*), 金黄色酿脓葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*), 乳酸杆菌 (*Lactobacillus*) 等) 的生长和 / 或增殖。

[0052] 变异链球菌是一种在口腔中发现的病原体, 是导致龋齿形成的主要原因, 是全世界普遍存在且花费巨大的感染源之一 (参见例如, 国立卫生研究院 (National Institutes of Health) (2000), 美国口腔健康: 一份普通医师的报告 (oralhealth in America: a report of the Surgeon general), 卫生与公共事业部 (Department of Health and Human Services), 国立牙齿与颅面研究机构 (National Institute of Dental and Craniofacial Research), 马里兰州贝斯达的国立卫生研究院 (National Institutes of Health, Bethesda, MD); 华盛顿州卫生部门 (Washington State Department of Health) (2002), 感染疾病 - 龋齿 (Infectious Diseases - Dental Caries), 华盛顿州奥林匹亚的华盛顿州卫生部 (Washington State Department of Health, Olympia, WA); Loesche (1986) *Microbial Rev.*, 50: 353-380; Anderson 和 Shi (2006) *Pediatr. Dent.* 28: 151-153; discussion 192-198 等)。在美国, 治疗龋齿的高昂经济负担, 尤其对于穷苦和少数人群, 以及口腔链球菌 (包括变异链球菌) 可能直接导致更严重的临床结局如心脏病的证据 (Doyuk 等, (2002) *J. Infect* 45: 39-41; Nakano 等, (2006) *J. Clin. Microbiol.*, 44: 3313-3317) 进一步强调了开发该病原体其他治疗手段的重要性。

[0053] 本发明抗微生物肽 (AMP) 可用于许多领域。例如, 肽可全身或局部给药以抑制或消除包括变异链球菌和其他菌株或菌种在内的感染。在某些实施方式中, 也可将抗微生物肽掺入各种保健品中。例如, 可将肽掺入牙膏或漱口剂中以降低或防止口腔集落形成或再形成, 从而降低龋齿形成的发生率和 / 或程度。在各个实施方式中, 出于类似目的可将 AMP 掺入牙线中, 或者可掺入用于拭抹牙齿和口腔粘膜的拭子中。

[0054] 在某些实施方式中, 可将 AMP 加入产品中作为防腐剂组分, 以抑制细菌集落形成和 / 或产品的降解。

[0055] 这些应用是示例性而非限制性的。采用本文公开的内容, 本领域技术人员将明白, 肽可用作抗微生物制剂中的活性成分用于各种应用, 这些应用包括 但不限于制品的表面处理以对抗所述表面上的微生物生长, 以及用作人和动物食品、卫生护理产品、消毒剂、清洁剂、生物杀灭剂中的添加剂。

[0056] I. 抗微生物肽。

[0057] 为避免合成大量随机肽的组合文库, 通过合理设计几种小结构多样肽文库制备具有变异链球菌活性的合成肽, 然后筛选这些文库的变异链球菌杀伤能力。在某些实施方式中, 每个文库限于限定尺寸和结构框架的肽, 每个文库中序列递增变化以产生具有各种生物化学特征的肽。这些特征包括: 芳族疏水残基含量、净正电荷和预测的两性 α -螺旋形成特性。从一些活性两亲序列系统性删除残基来构件一个文库 (参见例如, 实施例 4)。另一个文库通过取代组氨酸 (His) 产生。设计这些酸活化的肽, 使其在低于 pH 6.0 时具有活性 (参见例如, 实施例 2)。

[0058] 为了进一步提高具有抗变异链球菌特性的肽的有效性, 将来自各个文库的大多数抗菌肽以单个分子、各种组合以及每个抗微生物区域之间具有柔性肽接头或没有该接头的形式合成在一起, 产生融合肽。与原始非偶联分子相比, 许多这些融合肽中杀伤活性提高。

[0059] 因此, 本文所述结果提供了新型抗微生物肽和用小型经合理设计的文库鉴别其他

抗微生物肽的新方法。有趣的是,看来该研究中活性最高的肽是一些革兰氏阳性口腔细菌选择性的。由于变异链球菌通常在体内生物膜状态中生长,这就激励我们在载玻片上体外生长的变异链球菌生物膜中发现本文所述肽的活性(数据未显示)。

[0060] 示例性的肽如表 6 所述(二元文库, α 螺旋文库和 RW 文库)。在各种实施方式中,本发明考虑肽的多联体(整体或片段,例如下式 I 所示),以及两个肽直接连接在一起、或者通过肽接头或化学偶联在一起的嵌合体。

[0061] 在某些实施方式中(例如,二元文库和 α -螺旋文库),抗微生物肽包括式 I 的氨基酸基序或氨基酸基序的环状变换:

[0062] $(H^1C^1C^2H^2H^3C^3H^4H^5C^4C^5)_n$ I

[0063] 其中 n 为 1-5,可以 0.1 为单位递增; H^1 、 H^2 、 H^3 、 H^4 和 H^5 独立地选自疏水或亲水氨基酸; C^1 、 C^2 、 C^3 、 C^4 和 C^5 独立地选自正电荷或负电荷氨基酸和/或在某些实施方式中,中性氨基酸;所述肽能有效杀伤或抑制培养物中变异链球菌的生长和/或增殖。在某些实施方式中,肽形成 α 螺旋。在某些实施方式中,所述肽不包括氨基酸序列 FKKFWKW FRRF (SEQ ID NO:31)。

[0064] 在式 I 中,n 以 0.1 为单位递增以识别可能部分重复的基序。该过程如表 2 所示。

[0065] 表 2:n 以 0.1 为单位递增时基序如何部分重复

[0066]

n	基序
1	$H^1C^1C^2H^2H^3C^3H^4H^5C^4C^5$
1.1	$H^1C^1C^2H^2H^3C^3H^4H^5C^4C^5H^6$
1.2	$H^1C^1C^2H^2H^3C^3H^4H^5C^4C^5H^6C^6$
1.3	$H^1C^1C^2H^2H^3C^3H^4H^5C^4C^5H^6C^6C^7$
1.4	$H^1C^1C^2H^2H^3C^3H^4H^5C^4C^5H^6C^6C^7H^7$
1.5	$H^1C^1C^2H^2H^3C^3H^4H^5C^4C^5H^6C^6C^7H^7H^8$
1.6	$H^1C^1C^2H^2H^3C^3H^4H^5C^4C^5H^6C^6C^7H^7H^8C^8$
1.7	$H^1C^1C^2H^2H^3C^3H^4H^5C^4C^5H^6C^6C^7H^7H^8C^8H^9$
1.8	$H^1C^1C^2H^2H^3C^3H^4H^5C^4C^5H^6C^6C^7H^7H^8C^8H^9H^{10}$
1.9	$H^1C^1C^2H^2H^3C^3H^4H^5C^4C^5H^6C^6C^7H^7H^8C^8H^9H^{10}C^9$
2	$H^1C^1C^2H^2H^3C^3H^4H^5C^4C^5H^6C^6C^7H^7H^8C^8H^9H^{10}C^9C^{10}$

[0067] H 或 C 残基的上标随加入的新残基(n 增加)而递增,表明新的疏水残基(H)独立地选自其他疏水残基,新的带电或中性残基(C)独立地选自其他带电或中性残基。

[0068] 在某些实施方式中,本发明考虑式 I 所涵盖的肽的环状变换。基序的环状变换表示基序可以从任何残基开始。连接基序两端(氨基连接至羧基末端),然后在另一位置打开成环的肽是相同的。当然,环状变换的肽无需以这种方式进行,而是仅仅具有相当于该操作所产生的序列或基序的氨基酸序列或基序。

[0069] 表 3 示出了式 I 的各种环状变换。

[0070] 表 3:式 I 的环状变换 (CP)

[0071]

式 /CP N	基序
式 I n = 1	$H^1C^1C^2H^2H^3C^3H^4H^5C^4C^5$
CPn = 1	$C^1C^2H^2H^3C^3H^4H^5C^4C^5H^1$
CPn = 1	$H^2H^3C^3H^4H^5C^4C^5H^1C^2$
CPn = 1	$H^4H^5C^4C^5H^1C^2H^2H^3C^3$
式 I n = 1.7	$H^1C^1C^2H^2H^3C^3H^4H^5C^4C^5H^6C^6C^7H^7H^8C^8H^9$

[0072]

CPn = 1.7	H ³ C ³ H ⁴ H ⁵ C ⁴ C ⁵ H ⁶ C ⁶ C ⁷ H ⁷ H ⁸ C ⁸ H ⁹ H ¹ C ¹ C ² H ²
CPn = 1.7	H ⁴ H ⁵ C ⁴ C ⁵ H ⁶ C ⁶ C ⁷ H ⁷ H ⁸ C ⁸ H ⁹ H ¹ C ¹ C ² H ³ C ³
CPn = 2	H ¹ C ¹ C ² H ² H ³ C ³ H ⁴ H ⁵ C ⁴ C ⁵ H ⁶ C ⁶ C ⁷ H ⁷ H ⁸ C ⁸ H ⁹ H ¹⁰ C ⁹ C ¹⁰
CPn = 2	H ⁵ C ⁴ C ⁵ H ⁶ C ⁶ C ⁷ H ⁷ H ⁸ C ⁸ H ⁹ H ¹⁰ C ⁹ C ¹⁰ H ¹ C ¹ C ² H ³ C ³ H ⁴
式 I n = 2	H ² H ³ C ³ H ⁴ H ⁵ C ⁴ C ⁵ H ⁶ C ⁶ C ⁷ H ⁷ H ⁸ C ⁸ H ⁹ H ¹⁰ C ⁹ C ¹⁰ H ¹ C ¹ C ²

[0073] 在某些实施方式中,利用不带电的 S、T、Y;带正电的 K、R、H;或带负电 N、Q、D、E 残基改变 C 位电荷。在某些实施方式中,用 L、I、V、W 和 F 氨基酸控制疏水性变化。

[0074] 在某些实施方式中,表 6 所示二元文库肽包括式 I 的肽,其中 n 为 1.1,而 α-螺旋文库肽包括式 I 的肽,其中 n 为 1.4。

[0075] 还提供了 RW 文库的肽(参见例如,表 6)。在各种实施方式中,RW 文库的肽是 7 个、8 个、9 个、10 个或 11 个氨基酸的肽,除 2 个之外的所有其他氨基酸是以任意组合排列的 Arg(R) 或 Trp(W)(或类似物或其衍生物)。2 个非 -Arg 或 Trp RW 残基是 Lys 或 Phe 或其衍生物或类似物。在某些实施方式中,肽是七个残基的肽,除 2 个之外的所有其他氨基酸是 Arg 或 Trp(以任意组合排列)。2 个非 -Arg 或 Trp 残基是 Lys 或 Phe 或其衍生物或类似物。在各个实施方式中,RW 文库肽的 N-末端残基是精氨酸。

[0076] 在某些实施方式中,本发明的肽包括但不限于:酸活化的肽(例如参见实施例 2),杀伤文库 #7 的肽(参见例如,实施例 3)和 β-删除文库的肽(参见例如,实施例 4)。类似于上文所述,杀伤文库 #7 和 β-删除文库中的肽由疏水和带电氨基酸的交替簇的序列框架构成。对于杀伤文库 #7,氨基酸的最大数目限于 9,在某些实施方式中限于酰胺化的 C-末端(参见例如,表 11)。对于 β-删除文库(参见例如,表 12),改变序列大小,从 14 到 7 个残基,但所有序列限于相当的两亲和疏水特性(数据未显示)。

[0077] 组氨酸残基的侧链 pKa 接近 6.0,因而在 pH 等于和小于 6.0 时带正电,而在中性 pH 时不带电。根据这一特征,我们构建了酸活化的文库,使得两性螺旋形成排列(引起抗变异链球菌活性)可导致低 pH 环境(例如龋病损时变异链球菌产生的环境),但肽在 pH 超过 6.0 时仍然无活性。因此,在某些实施方式中,活性抗微生物肽包括长约 7-11 个氨基酸的酸活化的两性螺旋肽,其中绝大部分带电残基是在酸性 pH 时带正电的 His 或其衍生物或类似物。通常在中性 pH 时肽几乎没有或者基本上没有抗微生物活性(例如,对变异链球菌),但在酸性 pH(例如,pH 约为 6 或以下,例如从约 pH 1.4 到约 pH6,从约 pH 2,约 pH3,约 pH4,或约 pH 5 到约 pH 6,或约 pH 6.5)时具有抗微生物活性(例如对于变异链球菌)。在某些实施方式中,这些肽中的所有带电残基是在负 pH 时带正电的 His 或其衍生物或类似物。某些酸活化的肽包括 HH 和 FF 的交替重复。在某些实施方式中,肽在一端或两端还包含氨基酸序列 KLLK(SEQ ID NO:166),或其保守取代。在某些实施方式中,肽的一端或两端还包含氨基酸序列 KLLK(SEQ ID NO:166),或其保守取代,其中 KLLK(SEQ ID NO:166)通过接头(如, GAT(SEQ ID NO:167)连接于末端。各种酸活化的肽包含氨基酸序列 FHFFHHFFHHFFHHF(SEQ ID NO:110)。许多酸活化的 AMP 在实施例 2 中阐述(例如参见表 10)。

[0078] 在各个实施方式中,任何本文所述的肽可包含天然产生的氨基酸,或非天然产生的氨基酸,包括天然产生的氨基酸的衍生物和类似物。此外,各种肽可包含 L-型氨基酸、D-型氨基酸和/或 β-氨基酸。

[0079] 还应理解,除了本文特别指出的 D-型、L-型和 β-肽序列之外,本发明也考虑反

和反-逆 (retro-inverso) 形式的各种肽。在反形式 (retro form) 中, 序列方向反转。在逆形式中, 组成氨基酸的手性反转 (即, L 型氨基酸变成 D 型氨基酸, D 型氨基酸变成 L 型氨基酸)。在反-逆形式中, 氨基酸的顺序和手性都反转。因此, 例如, 肽 B-36 (RLLKRFKHLFK, SEQ ID NO:34) 的反形式具有序列 KFLHKFRKLLR (SEQ ID NO:28)。如果 B-36 肽中所有氨基酸为 L 型, 则其逆形式将包括所有 D 型氨基酸, 反-逆形式将具有包括所有 D 型氨基酸的序列 SEQ ID NO:28。

[0080] 在各种实施方式中, 任何本文所述的肽可具有一个或多个保护基。因此, 例如, 羧基末端可被酰胺化。在各个实施方式中, 某些末端和 / 或侧链具有一个或多个封端基团。可用如本文所述的一个或多个封端基团对 C-端、和 / 或 N-端、和 / 或中间残基进行封端。

[0081] 许多保护基适用于该目的。这些基团包括但不限于: 乙酰基, 酰胺和烷基, 乙酰基和烷基尤其适用于 N-端保护, 而酰胺基团优选用于羧基端保护。在某些实施方式中, 保护基包括但不限于: 脂肪酸中的烷基链, 丙酰基 (propeonyl), 甲酰基等。某些优选的羧基保护基包括但不限于: 形成酰胺、酯和醚的保护基。在一个实施方式中, 可使用乙酰基保护氨基端, 用酰胺基团保护羧基端。这些封端基团提高的肽的螺旋形成倾向。某些尤其优选的封端基团包括各种长度的烷基, 例如具有通式 $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-$ 的基团, 其中 n 约为 1-20, 优选约 1-16 或 18, 更优选约 3-13, 最优选约 3-10。

[0082] 其他合适的保护基包括但不限于: Fmoc、叔丁氧基羰基 (t-BOC)、9-苄乙酰基、1-苄羧基、9-苄羧基、9-苄酮-1-羧基、苄氧基羰基、吨基 (Xan)、三苯甲基 (Trt)、4-甲基三苯甲基 (Mtt)、4-甲氧基三苯甲基 (Mmt)、4-甲氧基-2,3,6-三甲基-苯磺酰基 (Mtr)、均三甲基苯-2-磺酰基 (Mts)、4,4-二甲氧基二苯甲基 (Mbh)、甲苯磺酰基 (Tos)、2,2,5,7,8-五甲基色满-6-磺酰基 (Pmc)、4-甲基苄基 (MeBzl)、4-甲氧基苄基 (MeOBzl)、苄氧基 (BzlO)、苄基 (Bzl)、苄甲酰基 (Bz)、3-硝基-2-吡啶次磺酰基 (sulphenyl) (Npys)、1-(4,4-二甲基-2,6-二氧杂环亚己基) 乙基 (Dde)、2,6-二氯苄基 (2,6-DiCl-Bzl)、2-氯苄氧基羰基 (2-Cl-Z)、2-溴苄氧基羰基 (2-Br-Z)、苄氧基甲基 (Bom)、环己氧基 (cHexO)、叔丁氧基甲基 (Bum)、叔丁氧基 (tBuO)、叔丁基 (tBu)、乙酰基 (Ac) 和三氟乙酰基 (TFA) 等。

[0083] 保护 / 封端基团, 以及将这些基团偶联到本发明的肽的适当残基的方法是本领域技术人员所公知的 (参见例如, Greene 等, (1991), 《有机合成中的保护基》(Protective Groups in Organic Synthesis), 第 2 版, 新泽西州索姆赛特的约翰威利父子公司 (John Wiley & Sons, Inc. Somerset, N.J.))。在一个实施方式中, 例如, 合成期间当肽在树脂上时用乙酸酐实现乙酰化。通过选择用于合成的适当树脂实现酰胺保护。例如, 使用洗脱型 (rink) 酰胺树脂作为固相载体, 进行本发明所述的肽的合成。合成完成后, 同时去除酸性双官能氨基酸如 Asp 和 Glu 和碱性氨基酸 Lys 上的半永久性保护基以及 Tyr 上的羟基。由该树脂通过酸性处理洗脱得到的肽具有乙酰基保护的 N 端和 NH_2 保护的羧基端, 同时去除了所有其他保护基。

[0084] 在各个实施方式中, 本发明还考虑本发明各种保护或未保护的 L-型、D-型、 β -、反-、逆-、和 / 或反-逆肽的聚乙二醇化形式。聚乙二醇可用于改善肽的生物相容性和 / 或提高血清半衰期。对肽进行聚乙二醇化的方法是本领域技术人员所公知的 (参见例如, 美国专利 7,256,258, 6,552,170 和 6,420,339, 以及本文引用的参考文献)。

[0085] 对于本文所述的二元杀伤肽 #7, β -删除和 α -螺旋文库, 结果表明, 相对疏水性

高并且净电荷超过 +3 的肽对变异链球菌的活性最高。具有上述任一种特性的肽的活性处于中间水平。这些结果与具有阳离子两性特征的大多数合成和天然 AMP 的已知内容一致,提示这些文库中的 B-33, α -7 和其他序列的性能类似于其他 AMP;即,肽的正电荷提供了对阴离子细菌膜的 AMP 吸引作用,而两性则有利于膜相互作用、螺旋转化和细胞杀伤作用(Hancock 和 Lehrer(1998)Trends Biotechnol., 16:82-88;Shai(1999)Biochim Biophys Acta1462:55-70)。这些结果也表明,高的<螺旋>值本身可能不与阳离子两性 AMP 的抗变异链球菌活性的提高有关。然而,在 pH 6.0,酸活化文库中的一些肽具有强的两性螺旋形成特征,似乎与 His 相对含量以及抗变异链球菌活性的提高有关。

[0086] 对于 RW 文库,如二元和 α -螺旋文库所述,大多数疏水和正电荷序列活性最高(2C-3, -4)。虽然与其他文库中的肽相比长度和周期性不同,RW 肽由于初始肽结合或膜插入的改善而活性提高。不受具体理论的束缚,据信富含 Arg 和 Trp 的肽虽然<螺旋>值较低,却能在与膜相互作用时形成稳定的螺旋样两性排列,Trp H 电子与 Arg 官能团之间通过静电键合稳定(参见例如,Mecozzi 等,(1996)Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 93:10566-10571;Jing 等,(2003)J. Pept. Res. 61:219-229)。因此,RW 文库中的肽独特的序列性质使它们具有高度有利于抗微生物活性的二级结构。

[0087] 在各种实施方式中,本发明考虑多联体,其包含两个或更多个直接连接或通过接头(例如,肽接头或其他接头)连接在一起的本发明不同肽的组合。因此,考虑了化学偶联物及融合蛋白。本文提供的结果表明,融合肽,以单一线性分子合成的 AMP 二聚体,与其他母体肽相比杀伤动力学提高。一些融合肽可能通过增加膜表面处每个分子中螺旋形成单元的数目而起作用,如束形 AMP 所述(参见例如,Sal-Man 等,(2002)Biochemistry 41:11921-11930)。而且,本文的结果提示,组成性排列(融合肽亚单位在 C 端或 N 端)的效果可能难以预测(比较 FB α -12 和 FB α -20 的 MIC),虽然其他工作已证明,两性且推定形成螺旋的 AMP 似乎更耐受 N 端添加(Eckert 等,(2006)Antimicrob. Agents Chemother. 50:3833-3838;Szynol 等,(2006)Chem Biol Drug Des 67:425-431)。

[0088] 总之,本文提供的结果显示,变异链球菌易受疏水性和正电荷相对较高的 AMP 的作用,用本文提供的方法可容易地从文库分离这些 AMP。因此,将这些文库内或者这些文库之间的活性序列连接在一起而构建的融合肽能够改善这些肽的杀伤动力学。

[0089] 据信本文所述的 AMP 能有效对抗正常无菌和粘膜表面的微生物感染,即使所述感染是由抗生素耐药株引起的。可通过任意常规方法局部递送 AMP。或者,可通过例如口服给药或注射全身递送 AMP。本文提供的经合理设计的 AMP 较小(大多不到 20 个氨基酸),因而容易以高产率化学合成,相对于显著更长(30-40 个氨基酸)的其他合成 AMP 这是一种改进,这些更长的 AMP 难以构建和纯化。也易于将本文所述的 AMP 调节成蛋白酶耐受,例如通过掺入 D-异构体氨基酸,聚乙二醇化,利用非天然产生的氨基酸,等等。

[0090] II. 肽的制备

[0091] 肽的制备

[0092] 本发明中使用的肽可采用标准化学肽合成技术进行化学合成,或者尤其是在所述肽不包括“D”型氨基酸残基时,肽也可重组表达。在“D”型多肽是重组表达的情况下,可在向生物提供都是 D 型的一种或多种氨基酸的环境中培养宿主生物(例如细菌、植物、真菌细胞等)。这样,该系统中重组表达的肽掺入所述 D 型氨基酸。

[0093] 在某些实施方式中,采用识别 D 型氨基酸的氨基酰基-tRNA 合成酶,使 D 型氨基酸掺入重组表达的肽中。

[0094] 在某些实施方式中,通过本领域技术人员已知的任意液相或固相肽合成技术化学合成所述肽。固相合成中,序列的 C 端氨基酸连接于不溶性载体,然后相继加入序列中的剩余氨基酸,这是本发明多肽化学合成的优选方法。固相合成技术是本领域技术人员所公知的,例如参见 Barany 和 Merrifield(1963),固相肽合成 (Solid-Phase Peptide Synthesis);第 3-284 页,《肽:分析、合成、生物学》(The Peptides:Analysis,Synthesis,Biology),第 2 卷:肽合成的专用方法, A 部;Merrifield 等,(1963)J. Am. Chem. Soc.,85:2149-2156 和 Stewart 等(1984),《固相肽合成》(Solid Phase Peptide Synthesis),第 2 版,伊利诺斯州罗克福德皮尔斯化学品公司(Pierce Chem. Co., Rockford, Ill)。

[0095] 在一个实施方式中,采用二苯甲基胺树脂(贝克曼生物产品公司(BeckmanBioproducts),0.59mmol NH₂/克树脂)作为固相,通过固相肽合成方法合成肽。COOH 末端氨基酸(如,叔丁基羰基-Phe)通过 4-(氧基甲基)苯乙酰基连接于固相载体。这是比常规苄基酯连接键更稳定的键,而最终的肽仍然能够氢化裂解。用甲酸作为氢供体的转移氢化可用于该目的。肽合成的详细方案以及合成肽的分析在 Anantharamaiah 等,(1985)J. Biol. Chem.,260(16):10248-10255 的小型印刷补充材料中描述。

[0096] 应理解,在肽,尤其是包含 D-氨基酸的肽的化学合成中,除了所需的全长产物外,合成通常还产生许多截短的肽。因此,肽通常需要通过例如 HPLC 进行纯化。

[0097] 化学合成中采用适当衍生化的氨基酸残基可容易地在肽的一个或多个位置掺入 D-氨基酸、β 氨基酸、非天然氨基酸等。固相肽合成的修饰残基可从许多供应商购得(参见例如,先进化学技术公司(Advanced Chem Tech),路易斯维尔;NB 公司(Nova Biochem),圣地亚哥;西格玛公司(Sigma),圣路易斯;BC 有限公司(Bachem California Inc.),托兰斯等)。需要的话,可在肽中任意位置掺入 D-型和/或其他修饰的氨基酸或者完全省去。因此,例如,在某些实施方式中,肽可包含一个修饰的酸,而在其它实施方式中,肽包含至少两个、通常至少三个、更常见至少四个、更常见至少五个、优选至少六个、更优选至少 7 个或者甚至所有都是修饰的氨基酸。在某些实施方式中,基本上每个氨基酸都是 D-型氨基酸。

[0098] 如上所述,本发明的肽或融合蛋白也可重组表达。

[0099] 在某些实施方式中,采用重组表达系统来合成本发明的抗微生物肽。通常,该过程包括产生编码所需的肽或融合蛋白的 DNA 序列,将该 DNA 放置到处于特定启动子控制下的表达盒中,在宿主中表达肽或融合蛋白,分离表达的肽或融合蛋白,以及需要的话使所述肽或融合蛋白变性。

[0100] 编码本文所述的肽或融合蛋白的 DNA 可通过上文所述的任何合适的方法进行制备,包括例如克隆和限制适当序列或直接化学合成。

[0101] 核酸可容易地连接到含有适当表达控制序列(例如,启动子、增强子等)以及任选地含有一种或多种选择性标记物(例如,抗生素耐受基因)的载体中。

[0102] 编码本发明的肽或任何蛋白的核酸序列可以在各种宿主细胞中表达,包括但不限于:大肠杆菌(E. coli),其他细菌宿主,酵母,真菌,以及各种高等真核细胞如昆虫细胞(例如, SF3), COS, CHO 和 HeLa 细胞系和骨髓瘤细胞系。重组蛋白质基因通常可操作地连接于每个宿主适当的表达控制序列。在大肠杆菌中,该表达控制序列包括启动子如 T7、trp 或 λ

启动子,核糖体结合位点和优选的转录终止信号。对于真核细胞,控制序列可包括启动子和常见的增强子(例如,源自免疫球蛋白基因、SV40、巨细胞病毒等的增强子)以及聚腺苷酸化序列,并可包括剪接供体和受体序列。

[0103] 可通过公知方法将本发明质粒转移到选定的宿主细胞中,所述方法包括大肠杆菌的氯化钙转化以及哺乳动物细胞的磷酸钙处理或电穿孔。可通过质粒上含有的基因(例如 amp、gpt、neo 和 hyg 基因)所产生的抗生素耐受性来选择被所述质粒转染的细胞。

[0104] 表达后,可根据本领域标准方法纯化重组的肽或融合蛋白,这些方法包括:硫酸铵沉淀法、亲和柱、柱层析、凝胶电泳等(通常参见 R. Scopes(1982),蛋白质纯化(Protein Purification),纽约 SV 出版社(Springer-Verlag, N.Y.);Deutscher(1990),酶学方法(Methods in Enzymology),第 182 卷:蛋白质纯化指导(Guide to Protein Purification),纽约学术出版社公司(Academic Press, Inc. N.Y.))。优选同质性至少约 90-95%的基本上纯的组合物,更优选地同质性 98-99%。

[0105] 本领域技术人员将理解,化学合成、生物表达或纯化之后,本发明的肽或融合蛋白的构象可显著不同于所需的天然构象。因此,需要变性并还原肽或融合蛋白,使其重新折叠形成优选的构象。使蛋白质还原和变性并诱导重新折叠的方法是本领域技术人员所公知的(参见例如,Debinski 等,(1993)J. Biol. Chem., 268:14065-14070;Kreitman 和 Pastan(1993)Bioconjug. Chem., 4:581-585;和 Buchner,等,(1992)Anal. Biochem., 205:263-270)。例如,Debinski 等描述了在胍-DTE 中包涵体蛋白质的变性和还原。然后在含有氧化的谷胱甘肽和 L-精氨酸的氧化还原缓冲液中蛋白质重新折叠。

[0106] 本领域技术人员应理解,可对所述肽和/或融合蛋白进行修饰而不降低其生物学活性。可进行一些修饰以促进靶分子克隆、表达或掺入到融合蛋白中。这些修饰是本领域技术人员所公知的,包括例如在氨基末端添加甲硫氨酸以提供引发位点,或者在任一末端设置额外的氨基酸(例如多 His)以形成方便定位的限制位点或终止密码子或纯化序列。

[0107] 化合肽的制备

[0108] 在某些实施方式中,本发明涉及含有连接在一起的两个或更多个抗微生物肽(AMP)的“化合”抗微生物肽的应用。所述肽可直接相连或者通过接头相连。在各种实施方式中,AMP 化学偶联或者可选地,它们可以直接相连或者通过肽接头相连而使所述化合 AMP 表现为融合蛋白。

[0109] 通常,化合 AMP 包括附连于第二 AMP 的至少一个本文所述的 AMP。第二 AMP 可以是本文所述的 AMP,或者本领域技术人员已知的其他 AMP。许多不同的 AMP 是本领域技术人员已知的(参见例如,美国专利 7,271,239,7,223,840,7,176,276,6,809,181,6,699,689,6,420,116,6,358,921,6,316,594,6,235,973,6,183,992,6,143,498,6,042,848,6,040,291,5,936,063,5,830,993,5,428,016,5,424,396,5,032,574,4,623,733,具体 AMP 的内容被纳入本文作为参考)。

[0110] 在某些实施方式中,化合 AMP 包含两个或更多个相互附连的本发明 AMP。

[0111] 在一个实施方式中,AMP 相互间化学偶联。分子间化学偶联的方式是本领域技术人员所熟知的。肽通常含有各种官能团,例如,羧酸(COOH)或游离胺(-NH₂)基团,能够与合适的官能团反应而相互结合。

[0112] 或者,可对肽进行衍生化以暴露或附连额外的反应性官能团。衍生物作用可

包括连接任意的接头分子,例如美国伊利诺斯州罗克福德的皮尔斯化学品公司(Pierce Chemical Company, Rockford Illinois)的那些)。

[0113] 本文所用术语“接头”表示用于连接两个分子的分子。接头通常能够与两边的分子(例如 AMP)形成共价键。合适的接头是本领域技术人员所熟知的,包括但不限于:直链或支链碳接头、杂环碳接头、或肽接头。在某些实施方式中,接头可通过其侧接基团连接于组成氨基酸(例如,通过二硫键连接半胱氨酸)。然而,在某些优选的实施方式中,接头连接于 α 碳氨基和末端氨基酸的羧基。

[0114] 一个官能团与一个分子(例如 AMP)上的基团反应,另一官能团与另一个分子(例如,另一 AMP)上的基团反应的双官能接头可用于形成所需的偶联物。或者,进行衍生化以提供官能团。因此,例如,用于在肽上产生游离巯基的方法也是已知的(参见美国专利 4,659,839)。

[0115] 将各种分子连接至肽或蛋白的许多方法和接头分子是已知的(参见例如,欧洲专利申请 188,256;美国专利 4,671,958,4,659,839,4,414,148,4,699,784;4,680,338;4,569,789;和 4,589,071;和 Borlinghaus 等(1987), Cancer Res. 47:4071-4075)。

[0116] 如果 AMP 直接连接或通过肽接头连接,它们可采用标准化学合成技术进行合成。如果两个组分相对较短,嵌合部分可作为单一邻接多肽合成。或者,可分别合成各部分,然后使一个分子的氨基末端与另一个分子的羧基末端发生缩合反应融合形成肽键。或者,AMP 各自可与肽间隔物的一端缩合从而形成邻接融合蛋白。

[0117] 在某些实施方式中,可采用重组 DNA 方法以融合蛋白的形式合成化合 AMP。通常,该方法包括产生编码融合蛋白的 DNA 序列,将该 DNA 序列置于特定启动子控制下的表达盒中,在宿主中表达蛋白质,分离表达的蛋白质,以及如果需要的话使蛋白质变性。产生融合蛋白的方法是本领域技术人员已知的。

[0118] 在各种实施方式中,使用肽接头连接各个 AMP。在各种实施方式中,肽接头相对较短,通常不到约 10 个氨基酸,优选不到约 8 个氨基酸,更优选约 3-5 个氨基酸。合适的示例性接头包括但不限于 PSGSP(SEQ ID NO:106)、ASASA(SEQ ID NO:107)或 GGG(SEQ ID NO:108)。在某些实施方式中,也可使用较长的接头如 (GGGGS)₃(SEQ ID NO:29)。

[0119] 在某些实施方式中,本发明克隆将本发明的 AMP 或化合 AMP 附连于靶部分(例如细菌特异性肽或抗体)以提高 AMP 的特异性。示例性的抗体和/或肽靶部分例如在 USSN 10/706,391 中描述,以 US 2004/0137482 公开。

[0120] 靶部分可化学偶联于 AMP 或化合 AMP,或者嵌合部分可以融合蛋白的形式表达,例如如上所述,用于化合 AMP 的构建。

[0121] 肽的标记

[0122] 在各个实施方式中,用可检测的标记物对本文所述的抗微生物肽和/或化合 AMP 进行标记。适用于本发明的可检测的标记物包括可通过分光光度法、光化学方法、生物化学方法、免疫化学方法、电学方法、光学方法或化学方法检测的任何组合。本发明中有用的标记物包括但不限于:用标记的亲合素偶联物染色的生物素、磁珠(例如 Dynabeads™)、荧光染料(例如荧光素、得克萨斯红、罗丹明、绿色荧光蛋白、量子点(quantum dot)等,参见例如,美国俄勒冈州尤金分子探针公司(Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA)),放射标记(例如,³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C 或 ³²P),酶(例如,辣根过氧化物酶,碱性磷酸酶及其他 ELISA 中常

用的酶),和比色标记如胶态金(例如,高效散射绿光的直径 40–80nm 的金颗粒)或有色玻璃或塑料(例如,聚苯乙烯、聚丙烯、胶乳等)小珠。公开这些标记物的专利包括美国专利 3,817,837 ;3,850,752 ;3,939,350 ;3,996,345 ;4,277,437 ;4,275,149 ;和 4,366,241。

[0123] 在某些实施方式中,优选荧光标记,因为它们能提供非常强的信号而背景低并且无放射性。它们也可以高分辨率和灵敏度通过快速扫描方法进行光学检测。

[0124] 可采用的合适的色原包括能够吸收特定波长范围的光的那些分子和化合物,因而在用特定波长或波长范围的辐射进行照射时(例如荧光剂)能够看到颜色,或者可选地发射光。

[0125] 理想地,荧光标记应吸收大于约 300nm,优选约 350nm,更优选大于约 400nm 的光,通常在比吸收光波长高 10nm 的波长处发射光。应理解,结合染料的吸收和发射特征不同于未结合染料的这些特征。因此,当表示染料的不同波长范围和特征时,旨在说明采用的染料而不是在任意溶剂中的未偶联和表征的染料。

[0126] 可检测的信号也可通过化学发光和生物发光源提供。化学发光源包括,化学反应电激发后发射光的化合物,发射的光用作可检测的信号或向荧光受体供给能量。或者,萤光素与萤光素酶或光泽精联用而产生生物发光。

[0127] 自旋标记由具有不配对的电子自旋的报告分子提供,可通过电子自旋共振(ESR)分光光度计检测。示例性的自旋标记包括但不限于:有机自由基、过渡金属复合物、尤其是钒、铜、铁和锰等。示例性的自旋标记包括硝基氧自由基。

[0128] 标记可直接或者通过接头部分连接于 AMP。一般来说,标记或接头标记附连的位置并不限于任何具体位置。例如,标记可附连于氨基酸侧链,或者末端残基的氨基或羧基端,通常在任何不会干扰肽的活性和/或特异性的位置。

[0129] 应理解,荧光标记并不限于单种有机分子,而是包括无机分子、有机和/或无机分子的多分子混合物、结晶、杂聚物等。因此,例如,硅胶壳体中包裹的 CdSe–CdS 核–壳纳米晶体(nanocrystal)便于衍生化以偶联生物分子(Bruchez 等,(1998)Science,281:2013–2016)。类似地,高荧光强度量子点(硫化锌–封端的硒化镉)共价偶联于生物分子,用于超灵敏生物检测(Warren 和 Nie(1998)Science,281:2016–2018)。

[0130] III. 制剂

[0131] 药物制剂

[0132] 为了实施本发明的方法,给予需要的哺乳动物,例如患有微生物感染的哺乳动物或预防性地给予该哺乳动物,一种或多种活性剂(例如,本文所述的抗微生物肽(AMP)或化合抗微生物肽),以防止微生物感染和/或防止或降低龋齿的发病率或严重程度。

[0133] 活性剂可以“天然”形式,或者在需要时以盐、酯、酰胺、前药、衍生物等形式给予,前提是这些盐、酯、酰胺、前药或衍生物适合药用,即在本发明方法中有效。活性剂的盐、酯、酰胺、前药和其他衍生物可采用合成有机化学领域技术人员已知的标准方法进行制备,例如参见 March(1992),《高等有机化学;反应、机理与结构》(Advanced Organic Chemistry; Reactions, Mechanisms and Structure),第 4 版,纽约威利国际出版社(N.Y.Wiley-Interscience)。

[0134] 配制这些衍生物的方法是本领域技术人员已知的。例如,许多递送试剂的二硫化盐在 PCT 公开 WO 00/059863 中揭示,其内容被纳入本文作为参考。类似地,治疗型肽、类肽

或其他模拟物的酸性盐可采用常规方法由游离碱制备,该方法通常包括与合适的酸进行反应。通常,将碱式药物溶解在极性有机溶剂如甲醇或乙醇中,然后加入酸。所得盐沉淀出来或者通过加入少量极性溶剂而析出。用于制备酸加成盐的合适的酸包括但不限于:有机酸,例如乙酸、丙酸、乙醇酸、丙酮酸、草酸、苹果酸、丙二酸、琥珀酸、马来酸、延胡索酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、肉桂酸、苦杏仁酸、甲磺酸、乙磺酸、p- 甲苯磺酸、水杨酸等;和无机酸,例如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等。用合适的碱处理,酸加成盐可重新转化为有机碱。某些尤其优选的本文所述活性剂的酸加成盐包括:氯化物盐,例如可用盐酸或氢溴酸制备。相反,本发明活性剂的碱性盐的制备可采用药学上可接受的碱,例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙、三甲胺等,以类似的方式制备。尤其优选碱性盐包括碱金属盐,如钠盐和铜盐。

[0135] 酯的制备通常包括使活性剂分子结构内存在的羟基和 / 或羧基官能化。在某些实施方式中,酯通常是游离醇基团的酰基取代衍生物,即由通式 RCOOH 的羧酸衍生化所得部分,其中 R 是烷基,尤其低级烷基。需要时,采用常规氢解或水解方法可将酯重新转化为游离酸。

[0136] 酰胺也可采用本领域技术人员已知的或相关文献中描述的技术进行制备。例如,酰胺可采用合适的胺试剂进行制备,或者可通过酸酐或酸氯化物与氨或低级烷基胺反应进行制备。

[0137] 在各种实施方式中,本文所述的活性剂适合胃肠外、外用、口服、鼻腔(或吸入)、直肠或局部给药,如气雾剂或透皮,用于感染(例如,微生物感染)以及本文所述的一种或多种病状和 / 或适应症(例如动脉粥样硬化和 / 或其症状)的预防和 / 或治疗。可以多种单位剂型给予药物组合物,取决于给药方法。合适的单位剂型包括但不限于:粉末剂、片剂、丸剂、胶囊、锭剂、栓剂、贴剂、鼻腔喷雾剂、注射剂、可植入缓释制剂、脂质复合物等。

[0138] 本发明的活性剂可与药学上可接受的载体(赋形剂)组合从而形成药理学组合物。药学上可接受的载体可包含一种或多种生理学上可接受的化合物,例如用于稳定组合物或用于提高或降低活性剂的吸收。生理学上可接受的化合物可包括例如:糖,如葡萄糖、蔗糖或右旋糖苷;抗氧化剂,如抗坏血酸或谷胱甘肽;螯合剂;低分子量蛋白质;保护和摄取促进剂,如脂质;降低活性剂的清除或水解的组合物,或赋形剂或其他稳定剂和 / 或缓冲液。

[0139] 其他生理学上可接受的化合物,尤其是适合片剂、胶囊、软胶囊的制备应用的化合物包括但不限于粘合剂、稀释剂 / 填充剂、崩解剂、润滑剂、悬浮剂等。

[0140] 在某些实施方式中,为制备口服剂型(例如片剂),将赋形剂(例如乳糖、蔗糖、淀粉、甘露醇等),任选的崩解剂(例如碳酸钙、羧甲基纤维素钙、乙醇酸淀粉钠、交聚维酮等),粘合剂(例如 α - 淀粉、阿拉伯胶、微晶纤维素、羧甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、羟丙基纤维素、环糊精等)和任选的润滑剂(如,滑石粉、硬脂酸镁、聚乙二醇 6000 等)加入活性成分(如活性肽和水杨苯胺)中,然后压制所得组合物。如果需要,采用已知方法对压制的产物进行包衣,例如用于掩蔽味道或为了肠溶出或缓释。合适的包衣材料包括但不限于:乙基-纤维素、羟甲基纤维素、聚氧乙二醇、乙酸邻苯二甲酸盐纤维素、邻苯二甲酸盐羟丙基甲基纤维素和优拉剂(Eudragit)(德国罗姆哈斯公司(Rohm & Haas, Germany);甲基丙烯酸-丙烯酸共聚物)。

[0141] 其他生理学上可接受的化合物包括尤其适用于防止微生物的生长或作用的湿润剂、乳化剂、分散剂或防腐剂。各种防腐剂是众所周知的,包括例如,苯酚和抗坏血酸。本领域技术人员应理解,根据活性剂的给药途径以及活性剂的具体物理化学性质来选择药学上可接受的载体,包括生理学上可接受的化合物。

[0142] 在某些实施方式中,赋形剂无菌且基本没有不良物质。这些组合物可通过常规公知的灭菌技术进行灭菌。对于各种口服剂型的赋形剂(例如片剂和胶囊),不要求灭菌。USP/NF 标准通常已足够。

[0143] 在治疗应用中,局部给予或者口服或鼻腔给予患有感染或处于感染风险或者预防性给予本发明的组合物,以防止龋齿或表现为微生物感染的其他牙齿或口腔粘膜的病状,给药量足以防止和/或治愈和/或至少部分地防止或阻止疾病和/或其并发症。足以实现该目的的量定义为“治疗有效剂量”。用于该用途的有效量将取决于疾病的严重程度以及患者的一般健康状况。组合物的单剂量或多剂量给药取决于剂型以及患者所需且耐受的给药频率。在任何事件中,组合物应提供足够量的本发明制剂的活性剂以有效治疗患者(缓解一种或多种症状)。

[0144] 根据选定的具体给药模式及患者需要可改变活性剂的浓度,主要基于活性剂的活性、患者体重等进行选择。然而,通常选择的浓度能提供约 0.1 或 1 毫克/千克/天到约 50 毫克/千克/天,有时更高的剂量。常用剂量约为 3-3.5 毫克/千克/天,优选约 3.5-7.2 毫克/千克/天,更优选约 7.2-11.0 毫克/千克/天,最优选约 11.0-15.0 毫克/千克/天。在某些优选的实施方式中,剂量约为 10-50 毫克/千克/天。在某些实施方式中,剂量约为 20-50 毫克,口服每天两次。应理解,可改变该剂量以优化针对具体对象或对象组的治疗和/或预防方案。

[0145] 在某些实施方式中,将本发明的活性剂给予口腔。这可通过使用锭剂、气雾剂、漱口剂、涂覆拭子等容易地实现。

[0146] 在某些实施方式中,将本发明活性剂局部给予(例如)皮肤表面,给予局部病灶或伤口、给予外科手术部位,等等。

[0147] 在某些实施方式中,根据本领域技术人员所熟知的标准方法全身给予(例如,口服,或者用作注射剂)本发明的活性剂。在其他优选的实施方式中,也可采用常规经皮药物递送系统,即透皮“贴剂”经皮肤递送药剂,该递送系统中活性剂通常包含在层状结构中,用作可固定到皮肤上的药物递送装置。在该结构中,药物组合物通常包含在上方背衬层之下的一层或“储器”中。应理解,本文中的术语“储器”表示最终能够递送到皮肤表面的一定量的“活性剂”。因此,例如,“储器”可包括贴剂背衬层上粘合剂中的活性剂,或者在本领域技术人员已知的任何各种不同的基质制剂中。贴剂可包括单个储器,或者可包含多个储器。

[0148] 在一个实施方式中,储器包括在药物递送期间用于将系统固定到皮肤上的药学上可接受的接触型粘合材料的聚合物基质。合适的皮肤接触型粘合材料的例子包括但不限于:聚乙烯、聚硅氧烷、聚异丁烯、聚丙烯酸酯、聚氨酯等。或者,含药储器和皮肤接触型粘合剂分别位于不同的层中,粘合剂在储器下方,在这种情况下,储器即可以是上文所述的聚合物基质,也可以是液态或水凝胶形式,或者可采取一些其他的形式。所述叠层中的背衬层用作装置的上表面,优选作为贴片的主要结构元件并提供装置大部分的柔性。选择用于背衬层的材料优选基本上不可渗透活性剂和存在的任何其他物质。

[0149] 局部递送的其他制剂包括但不限于：软膏、凝胶、喷雾剂、流体和乳膏。软膏是一种半固体制剂，通常基于矿脂或其他石油衍生物。含选定活性剂的乳膏通常是粘稠液态或半固体乳剂，常常是水包油或油包水乳剂。乳膏基质通常是可水洗的，含有油相、乳化剂和水洗。油相有时也称为“内相”，常常由矿脂和脂肪醇（例如鲸蜡醇或硬脂醇）构成；虽然不是必需的，水相通常在体积上超过油相，常常含有致湿剂。乳膏制剂中的乳化剂通常是非离子、阴离子、阳离子或两性离子表面活性剂。本领域技术人员应理解使用的具体的软膏或乳膏基质，该基质能够优化药物递送。对于其他载体或运载体，乳膏基质应为惰性、稳定、无刺激且无致敏性。

[0150] 如上所述，也考虑了各种口颊、舌下制剂。

[0151] 在某些实施方式中，本发明的一种或多种活性剂可以是“浓缩物”的形式，在储存容器（例如，预定体积）中稀释后使用，或者位于可溶性胶囊中加入一定体积的水、醇、过氧化氢或其他稀释剂后使用。

[0152] 虽然相对于人体使用描述的本发明，本发明也适用于动物，例如兽医使用。因此，某些优选的生物体包括但不限于：人、非人灵长动物、犬、马、猫、猪、有蹄动物、兔形目动物等。

[0153] 上述制剂和给药方法是示例性而非限制性的。应理解，采用本文所提供的内容，可容易地设计其他合适的制剂和给药模式。

[0154] 健康护理产品制剂

[0155] 在某些实施方式中，本发明的一种或多种抗微生物肽（AMP）和 / 或化合 AMP 可掺入健康护理制剂，例如家用、旅行中、工作中、在牙科诊所、医院等场所使用的处方或非处方产品。这些制剂包括但不限于：牙膏、漱口水、牙齿增白条或溶液、隐形眼镜储存液、润湿剂、或清洁溶液、牙线、牙签、牙刷刷毛、口腔喷雾剂、口腔锭剂、鼻腔喷雾剂、口腔和 / 或鼻腔应用的粉雾剂、伤口敷料（例如绷带）等等。

[0156] 这些健康产品的制剂是本领域技术人员所熟知的，可简单地将本发明 AMP 和 / 或化合 AMP 以有效剂量（例如，抑制龋齿形成的预防剂量等）加入这些制剂中。

[0157] 例如，牙膏制剂是本领域技术人员所熟知的。通常，这些制剂是一些成分的混合物：磨料和表面活性剂；抗龋剂，如氟化物；牙垢控制成分，如焦磷酸四钠和甲基乙烯基醚 / 马来酸酐共聚物；pH 缓冲液；致湿剂，以防止干透并增加令人愉快的口感；和粘合剂，以提供稠度和形状（参见例如，表 4）。粘合剂使固相保持适当悬浮在液相中以防止液相从牙膏中分离出来。它们还可提供牙粉主体，尤其是从牙膏管中挤压到牙刷上之后。

[0158] 表 4：常用牙膏组分

[0159]

成分	重量%
致湿剂	40-70
水	0-50
缓冲液 / 盐 / 牙垢控制	0.5-10
有机增稠剂（树胶）	0.4-2
无机增稠剂	0-12
磨料	10-50
活性剂（如三氯生）	0.2-1.5
表面活性剂	0.5-2

调味剂和甜味剂

0.8-1.5

[0160] 氟化物来源提供 1000-15000ppm 的氟。

[0161] 表 5 列出了制剂中的常用成分 ; 最终的组合将取决于以下因素 : 各成分的相容性和成本 ; 地方惯例、所需的效益以及产品递送的品质等。应理解, 可简单地将本发明的一种或多种 AMP 和 / 或化合 AMP 加入这些制剂中或代替一种或多种其他成分使用。

[0162] 表 5 : 常用成分列表

[0163]

树脂	无机增稠剂	磨料	表面活性剂	致湿剂	牙垢控制成分
羧甲基纤维素钠	二氧化硅增稠剂	水合二氧化硅	月桂基硫酸钠	甘油	焦磷酸四钠
纤维素醚	硅酸钠铝	磷酸二钙	N- 月桂基肌	山梨糖醇	Gantrez S-70

[0164]

		二水合物 (digydrate)	氨酸钠		
黄原胶	粘土	碳酸钙	普流罗尼	丙二醇	三聚磷酸钠
角叉聚糖		碳酸氢钠		木糖醇	
藻酸钠		焦磷酸钙	月桂醇磺基乙酸酯钠盐	聚乙二醇	
卡波泊尔		氧化铝			

[0165] 美国专利 6, 113, 887 中描述的一种示例性制剂包含 : (1) 选自下组的水溶性杀菌剂 : 吡啶鎓化合物, 季铵化合物和双胍化合物, 以组合物的总重量计, 含量为 0.001-5.0 重量 % ; (2) 阳离子修饰的羟乙基纤维素, 其羟乙基纤维素部分的平均分子量为 1, 000, 000 或更高, 阳离子化程度为 0.05-0.5 摩尔 / 葡萄糖, 以组合物的总重量计, 其含量为 0.5-5.0 重量 % ; (3) 选自聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段共聚物和醇胺化合物的表面活性剂, 以组合物的总重量计, 含量为 0.5-13 重量 % ; 和 (4) 非二氧化硅型抛光剂, 以组合物的总重量计, 含量为 5-50 重量 % 。在某些实施方式中, 可使用本发明的 AMP 和 / 或化合 AMP 代替杀菌剂或杀菌剂的组合。

[0166] 类似地, 漱口制剂也是本领域技术人员所熟知的。因此, 例如, 含有氟化钠的漱口剂在美国专利 : 2, 913, 373, 3, 975, 514 和 4, 548, 809 和美国专利公开 US 2003/0124068 A1, US 2007/0154410 A1 等中描述。含有各种碱金属化合物的漱口剂也是已知的 : 苯甲酸钠 (WO 9409752) ; 碱金属次石盐 (alkali metalhypohalite) (US 20020114851A1) ; 二氧化氯 (CN 1222345) ; 碱金属磷酸盐 (US2001/0002252 A1, US 2003/0007937 A1) ; 硫酸氢盐 / 碳酸氢盐 (JP 8113519) ; 十六烷基氯化吡啶鎓 (CPC) (参见例如, US 6, 117, 417, US 5, 948, 390 和 JP2004051511) 。含有高级醇 (参见例如, US 2002/0064505 A1, US 2003/0175216A1) ; 过氧化氢 (参见例如, CN 1385145) ; CO₂ 气泡 (参见例如, JP 1275521 和 JP 2157215) 的漱口剂也是已知的。在某些实施方式中, 这些和其他漱口剂还可包含一种或多种本发明的 AMP 或化合 AMP。

[0167] 隐形眼镜储备液、润湿剂、或清洁溶液、牙线、牙签、牙刷刷毛、口腔喷雾剂、口腔锭剂、鼻腔喷雾剂、口腔和 / 或鼻腔应用的粉雾剂等也是本领域技术人员所熟知的, 可容易地适配以掺入一种或多种本发明的 AMP 和 / 或化合 AMP。

[0168] 上述健康护理制剂和 / 或装置是示例性而非限制性的。采用本文提供的内容, 本发明的 AMP 和 / 或化合 AMP 可容易地掺入其他产品中。

[0169] IV. 药盒

[0170] 在另一个实施方式中, 本发明提供了在哺乳动物中抑制感染和 / 或治疗和 / 或预防龋齿的药盒。该药盒通常包括: 含有一种或多种本文所述的活性剂 (即抗微生物肽或化合抗微生物肽) 的容器。在某些实施方式中, 活性剂以单位剂量制剂 (例如, 栓剂、片剂、囊片、贴剂等) 形式提供, 和 / 或任选地与一种或多种药学上可接受的赋形剂组合。

[0171] 在某些实施方式中, 药盒包含一种或多种本文所述的健康护理产品制剂 (例如, 牙膏、漱口剂、牙齿增白条或溶液、隐形眼镜储存液、润湿剂、或清洁溶液、牙线、牙签、牙刷刷毛、口腔喷雾剂、口腔锭剂、鼻腔喷雾剂、口腔和 / 或鼻腔应用的粉雾剂等等)。

[0172] 此外, 药盒可任选地包括标签和 / 或说明材料, 为本发明“治疗”或“预防”的实施方案或应用提供指导 (即方案)。优选的说明材料描述了本发明一种或多种活性剂治疗性或预防性抑制或防止感染和 / 或抑制龋齿形成的应用。说明材料也可任选地描述优选的剂型 / 治疗方案, 计数指示等。

[0173] 虽然说明材料通常包括书面或印刷材料, 但并不限于这些材料。能够储存说明并将这些说明传递给最终使用者的任何介质都包括的本发明范围内。这些介质包括但不限于: 电子储存介质 (例如, 磁盘、磁带、盒带、芯片)、光学介质 (例如 CD ROM) 等。这些介质可包含能够提供这些说明材料的英特网的地址。

[0174] 实施例

[0175] 提供下面的实施例是为了阐述而非限制本发明。

[0176] 实施例 1: 对抗变异链球菌的新型合成抗微生物肽

[0177] 变异链球菌是一种常见的口腔病原体, 可导致龋齿, 即使不断努力去除或根除, 它们仍然保留在牙齿上, 甚至越发繁茂。在本研究中, 我们通过构建和筛选一些结构多样的肽文库得到许多对抗变异链球菌的合成抗微生物肽, 各个文库中疏水性和电荷递增变化以产生具有不同生物化学特性的肽的集合。我们从这些文库鉴定了具有争对变异链球菌的强效杀菌活性的多种肽。为了进一步改善其效力, 将来自各个文库的杀菌性最强的肽以各种组合合成到一起成为一个分子, 每个抗微生物区域之间有或没有柔性肽接头。与原始未连接分子相比, 这些“融合”肽中的许多杀菌活性提高。该结果表明, 生物化学约束肽的小型文库可用于产生争对变异链球菌的抗微生物肽, 其中的一些可能是功能性抗龋剂。

[0178] 材料与amp;方法

[0179] 菌株

[0180] 使用前将变异链球菌临床分离物 UA140 (32), UA159 (1), T8 (33), ATCC 25175, GS5 (Kuramitsu 和 Ingersoll (1977) Infect Immun., 17 :330-337) 和下面列出的所有革兰氏阳性菌 (见表 9) 在心脑浸液或 Todd-Hewitt (TH) 肉汤 (Difco) 中在厌氧条件下于 37°C 培养过夜 (Eckert 等, (2006) Antimicrob. Agents Chemother. 50 :3651-3657)。非典型韦荣球菌 (*Veillonella atypica*) PK1910 在韦荣球菌属培养基中进行培养 (Egland 等, (2004) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 101 :16917-16922)。所有菌株在 80% N₂、10% CO₂ 和 10% H₂ 的厌氧环境中培养。

[0181] 肽的合成与纯化

[0182] 采用 9- 芴基甲氧基羰基 (Fmoc) 固相方法, 在 Apex 396 肽合成仪 (AAPPT 公司 (AAPPTec), 肯塔基州路易维尔 (Louisville, KY)) 上合成肽。购得的所有氨基酸, 适当取代的树脂 (Anaspec) 和反应试剂 (Fisher) 为肽合成级别。线性肽的一般合成包括以下过程: 将 0.6 毫升 25% 吡啶的二甲基甲酰胺 (DMF) 溶液加入负载有第一氨基酸的树脂上, 然后搅拌 27 分钟, 二氯甲烷 (一次洗涤用 1 毫升) 和 N- 甲基吡咯烷酮 (共 7 次, 每次 0.8 毫升) 洗涤循环。为进行偶联反应, 加入 DMF (0.1 毫升) 和 N- 甲基吡咯烷酮 (0.2 毫升) 配制的 5M 过量 Fmoc- 保护的氨基酸、N- 羟基苯并三唑、HBTU (O- 苯并三唑 -N, N, N', N' - 四甲基脲六氟磷酸) 和二异丙基乙基胺 (10M 过量) 的溶液, 并将该反应混合物搅拌 45 分钟。最后的氨基酸偶联于树脂之后, 用 1 毫升三氟乙酸 - 硫代茴香醚 - 水 - 1, 2- 乙烷二硫醇 (10 毫升: 0.5 毫升: 0.5 毫升: 0.25 毫升) 在室温下处理 2 小时, 然后相继用 DMF、甲醇和二氯甲烷洗涤, 真空干燥过夜, 使受保护的肽从树脂解离。

[0183] 用 Source 15RPC 柱进行分析型和制备型反相高效液相色谱 (ACTA 纯化器; 安玛西亚公司 (Amersham)), 用含 0.1% 三氟乙酸的 H₂O 和 CH₃CN 以线性梯度进行洗脱, 如之前所述 (Eckert 等, (2006) Antimicrob. Agents Chemother. 50 :3833-3838)。所有肽纯化至 > 90% (数据未显示)。将样品溶解在 H₂O-CH₃CN 1 : 2 的混合物中, 通过基质辅助的激光解吸电离质谱证实肽的质量。采用 α - 氰基 -4- 羟基肉桂酸基质 (航行者系统 (Voyager system); ABI) 以线性模式进行测量。所有情况下所得质量等于计算值 (数据未显示)。

[0184] 肽特性的评估

[0185] 采用 [//us.expasy.org/tools/pscale/Hphob.Fauchere.html](http://us.expasy.org/tools/pscale/Hphob.Fauchere.html) 上显示的 Fauchere 和 Pliska 标度 (Fauchere 和 Pliska (1983) Eur. J. Med. Chem. 18 :369-375), 计算每个残基的肽平均疏水性 (<H>)。选择该方法计算 AMP 的疏水性是因为它与描述宿主 - 客体系统中单个氨基酸的膜亲和力的实验证据相一致 (Thorgeirsson 等, (1996) Biochemistry 35 :1803-1809)。采用 Liu 和 Deber 开发的限定单个氨基酸在非极性膜环境中的螺旋倾向的标度来估计每个残基的平均 α - 螺旋 - 形成倾向 (<螺旋>), 例如 AMP 在靶细胞表面上遇到的情况 (Lehrer 和 Ganz (2002) Curr. Opin. Immunol. 14 :96-102)。

[0186] MIC 分析

[0187] 采用无菌 96- 孔板, 以最终体积 100 μ L TH 或韦荣球菌属培养基进行抗菌生长抑制实验, 如过去所述 (Qi 等, (2005) FEMS Microbial Lett. 251 :321-326)。简言之, 将细菌细胞培养过夜, 使其在 600nm 处的光密度为 0.75-0.8 (对应于 1×10^8 CFU/ml), 然后在肉汤中稀释至 1×10^5 CFU/ml, 接种到板上。板的第一列中加入适当体积的肽储备液 (5-20mg/ml, 用水或甲醇配制, 取决于溶解度), 500 μ g/ml 或 512 μ g/ml, 沿板以 1 : 2 的比例连续稀释, 使含肽各孔的浓度从 500 到 1.95 μ g/ml 或 512 到 2 μ g/ml。对照孔仅加入甲醇以研究溶剂影响。然后将板在厌氧条件下, 37°C 静置孵育 16-20 小时, 测定 MIC, 以视觉观察后最后的澄清孔中存在的肽的浓度表示。一直到 5% (体积比) 的甲醇未发现抗微生物效应 (数据未显示)。所有细菌一式三份进行 MIC 测定。

[0188] 抗微生物动力学的评估

[0189] 融合和母体肽的杀伤动力学的测定过程基本上如过去所述 (Eckert 等, (2006) Antimicrob. Agents Chemother. 50 :1480-1488)。简言之, 在预定的时间间隔, 用浓度 25 μ g/ml 的肽处理培养基稀释的过夜 UA159 培养物 (0.5×10^6 到 1×10^6 CFU/ml) (“0 分

钟”表示未处理样品),取出 10- μ L 试样,(1 : 50) 稀释到生长培养基中复苏存活 CFU,然后铺展到 TH 琼脂板上进行定量。初步实验提示存在一些存活者 ($< 3,000\text{CFU/ml}$),将全部 1- 毫升样品接种到板中。记录在肽存在下存活 CFU/ml 的平均数与孵育时间来确定动力学(所有试验独立地重复进行 3-5 次)。在表 8 中,将细菌杀伤时间 (TC) 值定义为肽处理培养物的存活水平 CFU/ml 比从未处理样品回收的变异链球菌的水平 CFU/ml 低 $3\log_{10}$ 所需的时间。

[0190] 结果

[0191] 约束肽文库的设计

[0192] 我们假设在约束预测构象的构架内具有递增变化的疏水和正电荷特性的一系列小型肽文库将包含具有抗变异链球菌活性的 AMP。本研究开发了三个文库:二元、 α -螺旋和 RW 文库。二元和 α -螺旋文库内的肽由两性 α -螺旋序列排列构架 (HCCHHCHHCC_n 设计,其中 H 是疏水残基,C 是带电残基),它是从一些公开的 AMP 两亲序列模板产生的 (Blondelle 和 Lohner (2000) *Biopolymers* 55 :74-87 ;Zelezetsky 等, (2005) *Peptides* 26 : 2368-2376) 并采用螺旋-轮突 (Schiffer 和 Edmundson (1967) *Biophys J.*, 7 :121-135) 和平均螺旋倾向 $\langle \text{螺旋} \rangle$ 验证 (表 6)。图 1 显示了来自各个文库的两个代表性轮突。二元和 α -螺旋文库内肽的长度分别限制在 11 和 14 个氨基酸,接近形成跨膜通孔所需的最少残基的估计量 (Shai (2002) *Biopolymers* 66 :236-248)。在该结构构架内,通过用疏水/芳族或正电荷程度较低的残基进行取代 (B-33 已用比较命名法公开, S6L3-33 [Eckert 等, (2006) *Antimicrob. Agents Chemother.* 50 :3651-3657]),以逐步方式减少基线序列 FKKFWKW FRRF (B-33, SEQ ID NO :31) 内疏水/芳族和正电荷组分来构建二元文库。32 种肽的该文库内所得电荷梯度和疏水性 ($\langle \text{H} \rangle$) 在表 6 中示出。 α -螺旋文库的设计比二元文库长 (14 相对于 11 个氨基酸),以类似于二元文库的方式,在整个 α -螺旋文库中递增改变疏水性和电荷特性 (表 6)。

[0193] 表 6 :对抗变异链球菌临床分离物的二元、 α -螺旋和 RW 文库的肽的序列和抗微生物活性

[0194]

肽	序列 ^a (SEQ ID NO)	MIC ^b (μg/ml)	净电荷 ^c	<H>	<螺旋>
二元文库					
B-33	FKKFWKWFRF* (SEQ ID NO:31)	8-24	+6	0.61	0.71
B-34	LKRFLKWFKRF* (SEQ ID NO:32)	8-24	+6	0.55	0.94
B-35	KLFKRWKHLFR (SEQ ID NO:33)	31.25-125	+5	0.18	0.85
B-36	RLLKRFKHLFK (SEQ ID NO:34)	31.25-125	+5	0.35	1.05
B-37	FKTFLKWLHRF* (SEQ ID NO:35)	24	+4	0.77	1.06
B-38	IKQLLHFFQRF* (SEQ ID NO:36)	24	+3	0.75	1.21
B-39	KLLQTFKQIFR (SEQ ID NO:37)	>250	+3	0.50	1.11
B-40	RILKELKNLKF (SEQ ID NO:38)	>250	+3	0.32	1.23
B-41	LKQFVHFIHRF* (SEQ ID NO:39)	32	+3	0.74	1.20
B-42	VKTLLHIFQRF* (SEQ ID NO:40)	31.25-125	+3	0.56	1.32
B-43	KLVEQLKEIFR (SEQ ID NO:41)	>250	+1	0.16	1.10
B-44	RVLQEIKQILK (SEQ ID NO:42)	>250	+2	0.43	1.21
B-45	VKNLAELVHRF* (SEQ ID NO:43)	>250	+2	0.35	1.25
B-46	ATHLLHALQRF* (SEQ ID NO:44)	>250	+2	0.62	1.31
B-47	KLAENVKEILR (SEQ ID NO:45)	>250	+1	0.25	1.12
B-48	RALHEAKEALK (SEQ ID NO:46)	>250	+1	0.02	1.02
B-49	FHYFWHWFHRF* (SEQ ID NO:47)	125	+2	1.09	0.79
B-50	LYHFLHWFQRF* (SEQ ID NO:48)	125	+2	1.00	1.05
B-51	YLFQTWQHLFR (SEQ ID NO:49)	>125	+1	0.83	0.95
B-52	YLLTEFQHLFK (SEQ ID NO:50)	>125	0	0.74	1.13
B-53	FKTFLQWLHRF* (SEQ ID NO:51)	16-64	+3	0.84	1.06
B-54	IKTLLHFFQRF* (SEQ ID NO:52)	32-62.5	+3	0.79	1.26
B-55	KLLQTFNQIFR (SEQ ID NO:53)	>125	+2	0.54	1.10
B-56	TILQSLKNIFK	>125	+2	0.56	1.24

[0195]

	(SEQ ID NO:54)				
B-57	LKQFVKFIHRF* (SEQ ID NO:55)	24	+4	0.64	1.18
B-58	VKQLLKIFNRF* (SEQ ID NO:56)	32-62.5	+4	0.56	1.25
B-59	KL VQQLKNIFR (SEQ ID NO:57)	>125	+3	0.38	1.11
B-60	RVLNQVKQILK (SEQ ID NO:58)	>125	+3	0.33	1.17
B-61	VKKLAKLVRRF* (SEQ ID NO:59)	16-32	+6	0.27	1.21
B-62	AKRLKVLKRF* (SEQ ID NO:60)	16-32	+6	0.31	1.25
B-63	KLAQKVKRVLK (SEQ ID NO:61)	>125	+5	0.18	1.10
B-64	RALKRIKHVLK (SEQ ID NO:62)	>125	+5	0.06	1.15
α -螺旋文库					
α -4	AQAAHQAAHAHQF* (SEQ ID NO:63)	>125	+1	0.26	1.13
α -5	KLKKLLKKLKKLLK (SEQ ID NO:64)	8	+8	0.16	1.13
α -6	LKLLKKLLKLLKFF* (SEQ ID NO:65)	8	+7	0.55	1.42
α -7	LQLLKQLLKLLKQF* (SEQ ID NO:66)	8	+4	0.72	1.42
α -8	AQAAKQAQAAKQF* (SEQ ID NO:67)	>125	+4	0.026	1.09
α -9	RWRRWWRHFHFFH* (SEQ ID NO:68)	8	+5	0.61	0.55
α -10	KLKKLLKRWRWRWR (SEQ ID NO:69)	8	+8	0.28	0.68
α -11	RWRLLKKLHLLH* (SEQ ID NO:70)	8	+6	0.44	1.02
α -12	KLKKLLKHLHLLH* (SEQ ID NO:71)	8	+5	0.48	1.18
RW 文库					
1C-1	RRRRWWW (SEQ ID NO:72)	16	+4	0.39	0.24
1C-2	RRWRRRW (SEQ ID NO:73)	16	+4	0.39	0.24
1C-3	RRRWWR (SEQ ID NO:74)	32	+4	0.39	0.24
1C-4	RWRWRWR (SEQ ID NO:75)	32	+4	0.39	0.24
2C-1	RRRFWR (SEQ ID NO:76)	31.25-125	+4	0.32	0.41
2C-2	RRWRRF* (SEQ ID NO:77)	12-24	+5	0.32	0.41
2C-3	RRRWWF* (SEQ ID NO:78)	4-8	+4	0.79	0.46
2C-4	RWRWRF* (SEQ ID NO:79)	4-8	+4	0.79	0.46

[0196]

3C-1	RRRRWWK (SEQ ID NO:80)	125	+5	-0.076	0.19
3C-2	RRWRRK (SEQ ID NO:81)	125	+5	-0.076	0.19
3C-3	RRRWWK (SEQ ID NO:82)	31.25-125	+4	0.39	0.24
3C-4	RWRWRWK (SEQ ID NO:83)	32	+4	0.39	0.24
4C-1	RRRKWWK (SEQ ID NO:84)	250	+5	-0.073	0.19
4C-2	RRWKRRK (SEQ ID NO:85)	500	+6	-0.39	0.13
4C-3	RRRKWWK (SEQ ID NO:86)	125	+5	-0.51	0.19
4C-4	RWRKRWK (SEQ ID NO:87)	125-500	+5	-0.51	0.19

[0197] a 星号表示酰胺化的 C 端。

[0198] b 测定所有变异链球菌分离物的 MIC 范围或值。

[0199] pH 7.0 的电荷, 如前所述进行计算 (Zhang 等, (2001) *J. Biol. Chem.*, 276 : 35714-35722)。

[0200] 许多天然产生的 AMP 含有许多 Arg 和 Trp 残基 (Chan 等, (2007) *Biochim Biophys Acta*. 51(4) :1351-1359), 过去的报道表明在通过合成组合或类似方法产生的六聚 (hexameric) AMP 中这些氨基酸的占优势 (Blondelle 和 Houghten (1996) *Trends Biotechnol.*, 14 :60-65 ; Chan 等, (2007) *Biochim Biophys Acta*. 51(4) :1351-1359)。因此, 我们构建 RW 文库以包含富含 Arg- 和 Trp- (R 和 W) 的七聚体, 其碱性 (Arg 或 Lys) 和 Trp 残基的顺序以及碱性和疏水残基的比例不同, 如表 6 所示。设计这些序列不是为了形成常规的 α -螺旋构象, 如其低 $\langle$ 螺旋 $\rangle$ 值所反映的那样。

[0201] 二元文库肽的活性

[0202] 通过 MIC 试验评价二元文库对抗一系列临床分离物的抗变异链球菌活性 (表 6)。二元文库中 MIC 最低 (范围, 8-24 $\mu\text{g/ml}$) 的两种肽 B-33 和 B-34 也显示最强的疏水和正电荷特性。类似地, 具有活性但活性不如 B-33 或 B-34 的肽 B-37、-38、-41、-53、-54、-57 和 -58 的净电荷至少为 +3, $\langle\text{H}\rangle$ 为 > 0.55 。相反, 疏水性低于 0.55 的肽不具有抗微生物活性, 但有两个例外 B-61 和 B-62 (MIC 范围, 16-32 $\mu\text{g/ml}$)。显然, 这两种肽各自仅具有一个芳族残基, 但净电荷 +6, 可能有助于其持久活性。

[0203] MIC 结果与以下想法相一致: 净正电荷和一些疏水含量是设计活性肽的关键参数 (Chan 等, (2007) *Biochim Biophys Acta*. 51(4) :1351-1359 ; Deslouches 等, (2005) *Antimicrob. Agents Chemother.* 49 :316-322)。因此, 加入负电荷残基, 尤其是在肽的中间区域, 似乎会消除 AMP 活性 (例如, B-43), 可能是因为将肽吸引到细菌表面所需的正电荷的中断。数据显示两种感兴趣的例外 B-49 和 B-50, 虽然缺乏强的正电荷特性, 却具有弱活性。这些肽特别高的 $\langle\text{H}\rangle$ 值 (因而可能快速分配到宿主膜中) 可能解释了这种现象。选择 B-33、-34 和 -38, 该文库中三种活性较强的肽进行进一步增强。有趣的是, 在整个研究过程中, 没有变异链球菌的菌株对测试的 AMP 更敏感或耐受 (数据未显示)。

[0204] α -螺旋文库肽的活性

[0205] 如表 6 所示, MIC 测定表明许多 α -螺旋文库的肽具有对抗变异链球菌强效活性;

仅两种净正电荷或 <H> 值（分别是 α -4 和 α -8）较低的肽无活性。虽然许多 α -螺旋文库的肽具有对抗变异链球菌相等的强效杀伤活性，仅选择 α -11 进行进一步的修饰。

[0206] RW 文库肽的活性

[0207] 如表 6 所示，我们发现 2C-3 和 2C-4 是 RW（富含 Arg- 和 Trp）文库中对抗变异链球菌活性最高的肽（MIC 范围，4-8 μ g/ml）。数据表明，为实现强效抗微生物活性，要求疏水氨基酸与带电氨基酸（包括酰胺化 C 端 Phe 作为带电残基）的比率接近 1 : 1，类似于研究富含 Trp/Arg- 的 AMP 的 Blondelle 等人观察到的 4 : 3 的比率（Blondelle 等，(1996) Antimicrob. Agents Chemother. 40 :1067-1071 ;Shai (2002) Biopolymers 66 :236-248）。疏水氨基酸与带电氨基酸比率较低的 RW 文库的肽（表现为 <H> 值较低）的活性不如 2C-3 或 2C-4。由于其 MIC 较低，选择这些肽进行进一步增强。

[0208] 融合 AMP 的设计

[0209] 过去的研究已表明，与单个组成型 AMP 相比，合成各种排列的联接线性二聚体或五聚体束形式的 AMP 可提高肽活性（Devi 等，(1998) J. Biomol. Struct. Dyn. 15 :653-651 ; Sal-Man 等，(2002) Biochemistry 41 :11921-11930）。以类似的方式，我们假设表 6 所示变异链球菌活性序列的活性可通过将两个 AMP 头尾连接到一起形成单一融合线性肽分子而提高。注意在过去的研究中，肽之间的接头区域对抗微生物活性有影响（Eckert 等，(2006) Antimicrob. Agents Chemother. 50 :1480-1488）。因此，为产生具有更高抗变异链球菌活性的肽，我们合成了融合蛋白文库（表 7），该文库中组成性 AMP 的排列和各个 AMP 之间的接头区域（或没有接头）的序列不同。

[0210] 在二元- α -螺旋集合中，将 B-33 和 B-38 在 N 或 C 端与 α -11 合成在一起。三-Gly (SEQ ID NO108) 接头在过去已显示能有效分隔线性序列内功能上独立的肽区域（Eckert 等，(2006) Antimicrob. Agents Chemother. 50 :1480-1488）并且可能是模型膜中肽二级结构转变的关键（Tack 等，(2002) Eur. J. Biochem. 269 :1181-1189），采用该三-Gly 接头来分隔两个 AMP 区域。融合肽的 RW-RW 集合含有线性同型二聚体形式 2C-3 和 2C-4，其间有或没有各种接头区域。在表 7 所示的最后一组（二元-RW 集合）中，将 2C-4 在 N 或 C 端与 B-33、-34 或 -38 合成到一起，同样由 Gly 接头区域分隔。这些排列允许我们研究接头组成（及存在）以及 AMP 亚基排列（融合肽内的 N 或 C 端）对抗变异链球菌活性的重要性。

[0211] 融合 AMP 的抗微生物活性

[0212] MIC 揭示，融合 AMP 对抗变异链球菌的活性与其母体 AMP 大致相当或稍低（表 7）。例外包括 FB α -20，与 B-33 或 α -11 相比其 MIC 范围降低；FBRW-22，与母体肽 B-33 相比，其 MIC 范围稍微降低。总体上，这些数据表明，融合 AMP 最多仅能够实现适度的 MIC 改善。然而，MIC 试验会使比较肽之间杀菌速率的显著差异变得模糊不清（Eckert 等，(2006) Antimicrob. Agents Chemother. 50 :1480-1488），提示需要更详细的肽杀伤动力学试验来全面评价融合 AMP。

[0213] 表 7：融合文库的肽的序列和活性

[0214]

肽	序列 ^a	(μ g/ml) ^b	SEQ ID NO
二元- α -螺旋接头			

FB α -12	FKKFWKWFRRF-GGG- RWRRLKKLHLLH*	16	88
FB α -13	IKQLLHFFQRF-GGG- RWRRLKKLHLLH*	16	89
FB α -20	RWRRLKKLHLLH- GGG-FKKFWKWFRRF*	4-8	90
FB α -21	RWRRLKKLHLLH- GGG-IKQLLHFFQRF*	16	91
RW-RW 接头			
FRW-2	RRRWWWFRRRWWF*	16	92
FRW-8	RWRWRWFRRRWWF*	16	93
FRW-3	RRRWWF-ASASA- RRRWWF*	32	94
FRW-4	RRRWWF-PSGSP- RRRWWF*	32	95
FRW-5	RRRWWF-GGG- RRRWWF*	16	96
FRW-9	RWRWRWF-ASASA- RWRWRWF*	16	97
FRW-10	RWRWRWF-PSGSP- RWRWRWF*	32	98
FRW-11	RWRWRWF-GGG- RWRWRWF*	16	99
二元 -RW 接头			
FBRW-14	FKKFWKWFRRF-GGG- RWRWRWF*	4-16	100
FBRW-15	IKQLLHFFQRF-GGG- RWRWRWF*	4-16	101
FBRW-16	LKRFLKWFKRF-GGG- RWRWRWF*	4-16	102
FBRW-22	RWRWRWF-GGG- FKKFWKWFRRF*	4-8	103
FBRW-23	RWRWRWF-GGG- IKQLLHFFQRF*	8-16	104
FBRW-24	RWRWRWF-GGG- LKRFLKWFKRF*	8	105

[0215] ^a 星号表示酰胺化的 C 端。

[0216] ^b 测试的所有变异链球菌分离物的 MIC 范围或值, 三次独立试验的最小值。

[0217] 采用时间-杀菌试验分析融合 AMP 对抗变异链球菌的杀伤动力学。如图 2A 所示, 与 B-34 或 o-11 相比, 融合肽 FB α -21 的杀伤动力学明显提高: 与母体肽处理的样品相比, 30 分钟后融合肽处理的培养物中 CFU/ml 要小超过 2 个 $\log_{10}$ 的值。该趋势在所有 FB α 肽中具有代表性 (数据未显示)。

[0218] 所有二元-RW 文库偶联物 (FBRW-14 和 -23 除外) 的杀伤动力学的提高也显著 (图 2B): 与用任一母体肽处理的样品相比, 处理 30 分钟后, 2C-4 在 N 或 C 端与二元文库 AMP 的融合肽在改善变异链球菌杀伤动力学水平方面同样有效, 大于 3 个 $3\log_{10}$ 。这些结果表明, 联接的 AMP 区域可产生对抗变异链球菌的杀菌效果, 短时肽处理后尤其显著。

[0219] 如表 8 所示, 我们还发现, 一些 RW-RW 融合肽的杀伤动力学提高。在用没有接头区域的 2C-4 同型二聚体 (FRW-8) 处理的样品中, 变异链球菌的存活数 CFU/ml 比未处理样品低 $3\log_{10}$ (定义为杀菌活性时间, 或 T_c) 需要 50 分钟, 而 2C-4 的 T_c 为 220 分钟。与用其母体肽 (2C-3) 处理的样品相比, 在较低的程度, 该趋势在接触没有接头的 2C-3 同型二聚体 (FRW-2) 的样品中也存在。有趣的是, 在 2C-3 趋势间加入柔性氨基酸的接头区域 (PSGSP (SEQ ID NO:106), ASASA (SEQ ID NO:107) 或 GGG (SEQ ID NO:108)) 不能提高杀伤动力学 (FRW-3 或 -5 的 $T_c > 250$ 分钟), 而 2C-4 同型二聚体 FRW-9 和 -11 虽然存在 ASASA (SEQ ID NO:107) 和 GGG (SEQ ID NO:108) 接头趋势, 与其母体 2C-4AMP 相比的杀菌速率提高 (表 8)。这些结果提示, 合成没有接头区域的肽可提高 RW-基肽对抗变异链球菌的活性, 而当采用接头区域时, 数据表明提高的动力学是类似序列, 因而二级结构依赖性的, 因为通过与柔性氨基酸的接头区域偶联可提高 2C-4 的活性 (除了 PSGSP, SEQ ID NO:106), 但 2C-3 不能。

[0220] 表 8: 母体 RW 和融合 FRW 文库的肽的杀菌动力学

[0221]

肽	接头组合物	T _c (分钟) ^a
母体 AMP		
2C-3		220
2C-4		230
2C-3 融合		
FRW-2	无接头	60
FRW-3	ASASA	480
FRW-4	PSGSP	420
FRW-5	GGG	270
2C-4 融合		
FRW-8	无接头	50
FRW-9	ASASA	45
FRW-10	PSGSP	270
FRW-11	GGG	90

[0222] ^aT_c, 使可回收 CFU/ml 下降 3 个 log₁₀ 所需的时间。

[0223] 对抗其他口腔细菌的肽活性

[0224] 选择具有最佳抗变异链球菌活性的一系列肽 (MIC 测定) 来研究这些 AMP 对抗一些正常共生的口腔链球菌株和干酪乳酸杆菌 (*Lactobacillus casei*) 以及口腔革兰氏阴性非典型韦荣球菌的活性 (表 9)。MIC 结果表明, 这些序列具有活性, 但其对抗格氏链球菌 (*Streptococcus gordonii*)、干酪乳酸杆菌 (*L. casei*) 和血链球菌 (*Streptococcus sanguinis*) 的程度不如对抗变异链球菌的活性程度。进行试验的所有肽通常对缓症链球菌 (*Streptococcus mitis*. V. *atypica*) 仅具有弱活性。非典型韦荣球菌似乎比测试的其他细菌更敏感, 但对 RW 文库的肽 2C-3 和 2C-4 较耐受。

[0225] 表 9 : 选定的肽对抗非变异链球菌口腔分离物的 MIC

[0226]

肽	MIC (μg/ml)				
	格氏链球菌 Challis DL1	缓症链球菌 ATCC 903	血链球菌 NY101	干酪乳酸杆菌 ATCC 4646	非典型韦荣球菌 PK1910
B-33	32	32	32	32	16
B-34	32	64	16	16	32
B-38	32	64	64	32	64
α-11	16	32	16	16	4
2C-3	32	32	16	16	64
2C-4	32	32	32	32	64
FBα-20	16	32	16	8	8
FBRW-14	32	64	16	8	8
FBRW-15	32	64	16	16	8
FBRW-16	64	64	16	16	8
FBRW-22	16	64	8	8	8
FBRW-24	32	64	16	8	16

[0227] 讨论

[0228] 在美国, 通过补充更有效的抗变异链球菌疗法的牙齿卫生方案能够缓解与龋齿治疗有关的高昂经济负担, 尤其是在穷苦和少数人群中 (Anderson 和 Shi (2006) *Pediatr. Dent.*, 28 : 151-153 ; 讨论部分 192-198 ; 国立卫生研究院 (National Institutes of Health) (2000), 美国口腔健康 : 一份普通医师的报告 (oralhealth in America : a

report of the Surgeon general), 公共健康服务部 (Department of Health and Human Services), 国立牙齿与颅面研究机构 (National Institute of Dental and Craniofacial Research), 马里兰州贝瑟达的国立健康机构 (National Institutes of Health, Bethesda, MD); 华盛顿州健康部门 (Washington State Department of Health) (2002), 感染性疾病-龋齿 (Infectious Diseases-Dental Caries), 华盛顿州奥林匹亚的华盛顿州健康部门 (Washington State Department of Health, Olympia, WA)。因此, 本文提供的结果提示, 通过筛选小型合理设计的文库能够鉴别具有强效抗变异链球菌活性的肽。有趣的是, 源自该研究的活性最强的肽似乎对其他革兰氏阳性口腔细菌具有一些活性, 虽然需要的更多数据来全面评估这些序列的疏水和两亲特性是否能够指示抗革兰氏阳性菌的一般活性。由于变异链球菌通常在体内生物膜状态下生长, 这就激励我们研究所有表 9 中的肽在体外对蔗糖存在下、载玻片上生长的变异链球菌生物膜是否具有活性 (数据未显示)。

[0229] 对于二元和 α -螺旋文库, 结果表明, 疏水性较高且净正电荷超过 +3 的肽具有最大变异链球菌活性。其特性被一种性质控制的肽具有中间活性水平。这些结果与具有阳离子两亲特性的大多数合成和天然 AMP 已知的结果相一致, 提示这些文库中的 B-33、 α -7 和其他活性肽序列可能以类似于该结构类型中其他 AMP 的方式起作用; 即需要肽的正电荷以使 AMP 吸引到阴离子细菌膜上, 而需要两性来实现膜相互作用、螺旋转变和细胞杀伤作用 (Jing 等, (2003) J. Pept. Res. 61 :219-229 ;Shai (2002) Biopolymers 66 :236-248)。这些结果也表明, 高 $\langle$ 螺旋 $\rangle$ 值本身可能不与阳离子两性 AMP 的抗变异链球菌活性的提高相关。

[0230] 对于 RW 文库, 如二元和 α -螺旋文库所述, 疏水性最高且正电荷的序列活性最高 (2C-3 和 -4)。虽然与其他文库中的肽相比长度和周期性存在差异, 认为 RW 肽能够从初始肽结合或膜插入的改善获得活性的提高。该结果得到证据支持, 表明富含 Arg- 和 Trp- 的肽虽然 $\langle$ 螺旋 $\rangle$ 值较低, 却能够通过 Trp H 电子与 Arg 官能团之间的静电键稳定化的膜相互作用形成稳定的螺旋样两性排列 (Jing 等, (2003) J. Pept. Res. 61 :219-229 ;Mecozzi 等, (1996) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 93 :10566-10571)。因此, RW 文库肽的独特序列性质使它们获得对抗微生物活性高度有益的二级结构。

[0231] 有趣的是, 我们的结果表明, 融合肽, 以单一线性分子合成的 AMP 二聚体, 与其他母体肽相比杀伤动力学提高。一些融合肽可能通过增加膜表面处每个分子中螺旋形成单元的数目而起作用, 如束形 AMP 所述 (Sawai 等, (2002) Protein Eng. 15 :225-232)。关于 AMP 区间间的接头区域的影响尚不清楚, 虽然数据的确表明接头区域可能对单个肽具有不同的作用 (参见表 7 和 8 中 FRW-3 和 FRW-9 的结果)。正在进行的工作直接研究接头组合物对 AMP 活性的影响。而且, 我们的结果提示, 组成性排列 (融合肽亚单位在 C 端或 N 端) 的效果可能难以预测 (比较 FB α -12 和 FB α -20 的 MIC), 虽然其他工作已证明, 两性且推定形成螺旋的 AMP 似乎更耐受 N 端添加, 但原因尚不清楚 (Eckert 等, (2006) Antimicrob. Agents Chemother. 50 :1480-1488 ;Szynol 等, (2006) Chem. Bio. l Drug Des., 67 :425-431)。

[0232] 结论是, 我们的结果表明, 变异链球菌似乎对疏水性较高且正电荷的肽较敏感, 而这些肽是从我们的约束文库中容易分离得到的。此外, 将这些文库内或文库之间的活性序列联接后构建形成的融合肽能够改善这些肽的杀伤动力学。

[0233] 实施例 2: 酸活化文库肽的活性

[0234] 组氨酸残基的侧链 pKa 接近 6.0, 因而在 pH 等于和小于 6.0 使具有正电荷, 但在

中性 pH 下不带电。根据这一特征,我们构建了酸活化的文库,使得两性螺旋形成排列(引起抗变异链球菌活性)可导致低 pH 环境(例如龋病损时变异链球菌产生的环境),但肽在 pH 超过 6.0 时仍然无活性。为验证该假设,发现文库中的大多数序列在 pH4.9 时具有对抗变异链球菌的强效抗微生物活性,但在 pH7.4 时无活性(表 10)。该研究期间不选择来自该文库的肽进行进一步增强。

[0235] 表 10:酸活化文库肽抗变异链球菌的 MIC

[0236]

肽	序列	SEQ ID NO	MIC (μ M)	
			pH 7.4	pH 4.9
AA-1	HHFFHHFFHHFFHHF*	109	>125	12.5
AA-2	FHFFHHFFHHFFHHF*	110	>125	3.125
AA-3	KLLKGATFHFFHHFFHHFF	111	>125	6.25
AA-4	KLLKFHFFHHFFHHFFHHF	112	>125	3.125
AA-5	FHFFHHFFHHFFHHFKLLK	113	>125	28.125
AA-6	FHYFWHWFHRF	114	125	>50
AA-7	LYHFLHWFQRF	115	125	>50

[0237] * 表示酰胺化的 C 端

[0238] 实施例 3:杀伤肽文库 #7 的活性

[0239] 设计杀伤文库 #7 内的肽(表 11),相对于本文所述的其他文库,分子较小、疏水并具有弱的阳离子特性。抗变异链球菌的 MIC 研究揭示,该文库内的许多序列无活性或弱活性。S6L1-5 显示中等活性。不选择该文库内的肽进行进一步研究。

[0240] 表 11:杀伤肽文库 #7

[0241]

肽	序列	SEQ ID NO	MIC (μ g/mL)		
			变异链球菌	金黄色葡萄球菌	绿脓假单胞菌
S6L1-2	LKQKLKILF*	116	125	>500	>500
S6L1-3	LKQLKAGIY*	117	>500	>500	250
S6L1-4	VGKCVKLLY*	118	125	500	250
S6L1-5	KFVKLILAY*	119	32	>500	92
S6L1-6	KLVLVFLY*	120	125	>500	>500
S6L1-7	IKVFAKQKY*	121	>500	>500	>500
S6L1-8	RFRHFQERY*	122	64	125	>500

[0242] * 表示酰胺化的 C 端

[0243] 实施例 4: β -删除文库肽的活性

[0244] 将该文库内的疏水性阳离子肽从 15 个氨基酸系统性缩短至 7 个氨基酸,得到物理大小的梯度,同时保持疏水性和电荷参数基本稳定。我们发现,通过 MIC 评价,该文库内的一些序列具有强效抗变异链球菌活性(表 12)。活性序列包括各种大小的肽,虽然数据表明至少 9 个残基是活性必需的。我们还发现,该文库内的肽对所检查的革兰氏阴性菌-绿脓假单胞菌通常无活性,但对一些其他革兰氏阳性菌有活性。本研究期间不选择这些肽进行进一步增强。

[0245] 表 12: β -删除文库

[0246]

肽	序列	MIC (μg/mL)				
		粪肠球菌	干酪乳酸杆菌	金黄色葡萄球菌	绿脓假单胞菌	变异链球菌
S3L8-1	FVFRHKWVWKHRFLF (SEQ ID NO:123)	32	62.5	>125	>125	16
S3L8-2	VFI VVVKHVLVLF (SEQ ID NO:124)	>125	>62.5	>125	>125	N/A
S3L8-3	WRWRARWRWRLRWR (SEQ ID NO:125)	8	16	16	>125	4
S3L8-4	WR1HLRARLHVKF (SEQ ID NO:126)	8	8	62.5	>125	N/A
S3L8-5	LRIHARFKVHIRLKF (SEQ ID NO:127)	12	8	>125	>125	60
S3L8-6	FHIKFRVHLKVRFFH (SEQ ID NO:128)	>125	8	>125	>125	N/A
S3L8-7	FHVK1HFRLHVKFHF (SEQ ID NO:129)	>125	16	>125	>125	N/A
S3L8-8	LHIHAHFVHIHLHF (SEQ ID NO:130)	>125	>62.5	>125	>125	N/A
S3L8-9	FKIHFRVKVHIRFKF (SEQ ID NO:131)	>125	8	>125	>125	N/A
S3L8-10	FKAHIRFKLRVKFHF (SEQ ID NO:132)	>125	8	>125	>125	N/A

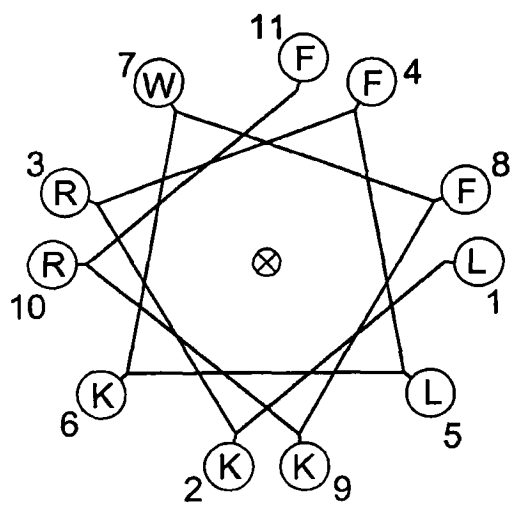
[0247]

S3L8-11	LKAKIKFKVKLKIKF (SEQ ID NO:133)	39	3	125	32-62.5	8
S3L8-12	WIWKHKFLHRHFLF (SEQ ID NO:134)	125	>62.5	>125	>125	125
S3L8-13	VFLHRHVIKHKLVF (SEQ ID NO:135)	125	>62.5	>125	>125	N/A
S3L8-14	FLHKHVLHRHIVF (SEQ ID NO:136)	>125	>62.5	>125	>125	N/A
S3L8-15	VFKHKIVHRHILF (SEQ ID NO:137)	125	>62.5	>125	>125	31
S3L8-16	FLFKHLFLHRIF (SEQ ID NO:138)	>125	>62.5	>125	>125	>125
S3L8-17	LFKHILHRVIF (SEQ ID NO:139)	125	>62.5	>125	>125	>125
S3L8-18	FLHKHLFKHKLF (SEQ ID NO:140)	>125	>62.5	>125	>125	>125
S3L8-19	VFRHRFIHRHVF (SEQ ID NO:141)	>125	>62.5	>125	>125	>125
S3L8-20	FIHKL VHKHVLF (SEQ ID NO:142)	>125	>62.5	>125	>125	>125
S3L8-21	VLRHLFRHRIVF (SEQ ID NO:143)	93.5	>62.5	>125	>125	60
S3L8-22	LVHKLILRHLLF (SEQ ID NO:144)	>125	>62.5	>125	>125	>125
S3L8-23	VFKRVLI HKLIF (SEQ ID NO:145)	32	62.5	>125	>125	>125
S3L8-24	IVRKFLFRHKVF (SEQ ID NO:146)	32	62.5	>125	>125	>125
S3L8-25	VLKHVIAHKRLF (SEQ ID NO:147)	>125	>62.5	>125	>125	>125
S3L8-26	FIRKFLFKHLF (SEQ ID NO:148)	24	16	62.5	>125	16
S3L8-27	VIRHVWVRKLF (SEQ ID NO:149)	>125	>62.5	>125	>125	60
S3L8-28	FLFRHRFRHRLVF (SEQ ID NO:150)	62.5	>62.5	>125	>125	60
S3L8-29	LFLIKHAKIHKFLF (SEQ ID NO:151)	>125	>62.5	>125	>125	>125
S3L8-30	FKHKFKHKFIF (SEQ ID NO:152)	>125	>62.5	>125	>125	>125
S3L8-31	LRHRLRHRLIF (SEQ ID NO:153)	125	>62.5	>125	>125	>125
S3L8-32	LILKFLFKFVF (SEQ ID NO:154)	16	16	16	>125	31
S3L8-33	VLIRILVRVIF (SEQ ID NO:155)	16	16	125	>125	>125
S3L8-34	FRHRFRHRF (SEQ ID NO:156)	>125	>62.5	>125	>125	>125
S3L8-35	LKHKLKHKF (SEQ ID NO:157)	>125	>62.5	>125	>125	>125
S3L8-36	FKFKHKLIF (SEQ ID NO:158)	>125	>62.5	>125	>125	>125
S3L8-37	LRLRHRVLF	>125	>62.5	>125	>125	>125

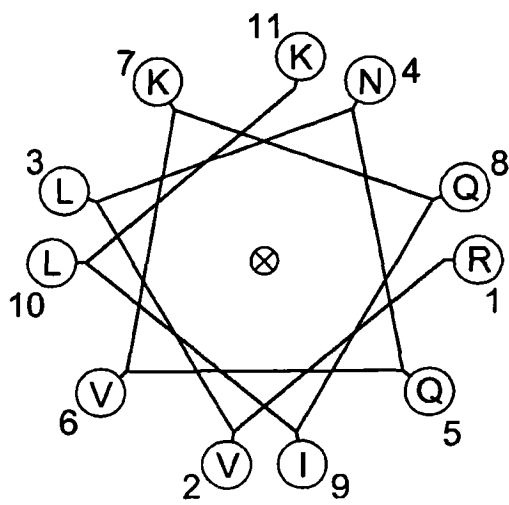
[0248]

	(SEQ ID NO:159)					
S3L8-38	FKFLFKFLF (SEQ ID NO:160)	>125	32	>125	>125	>125
S3L8-39	LRLFLRWLF (SEQ ID NO:161)	32	16	16	>125	16
S3L8-40	FKFLFKHKF (SEQ ID NO:162)	62.5	62.5	>125	>125	30
S3L8-41	LRLFLRHRF (SEQ ID NO:163)	62.5	>62.5	>125	>125	16
S3L8-42	FKFLFKF (SEQ ID NO:164)	>125	>62.5	>125	>125	>125
S3L8-43	LRLFLRF (SEQ ID NO:165)	>125	>62.5	>125	>125	>125

[0249] 应理解,本文所述的实施例和实施方式仅仅是为了说明的目的,根据这些内容的各种改性或改变是本领域技术人员所明白的,包括在本申请的精神和范围以及所附权利要求书的范围内。本文引用的所有出版物、专利和专利申请以其全部内容纳入本文作为参考。



B-34



B-60

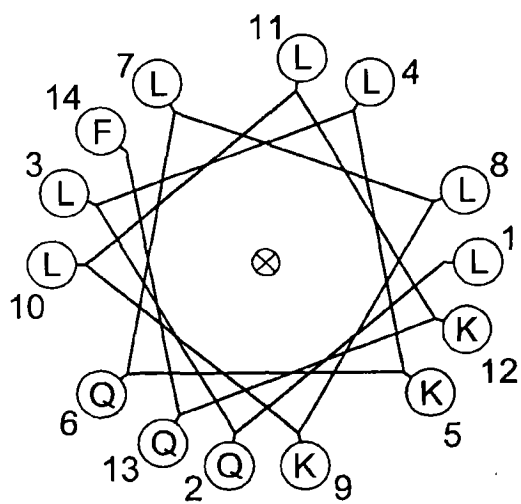
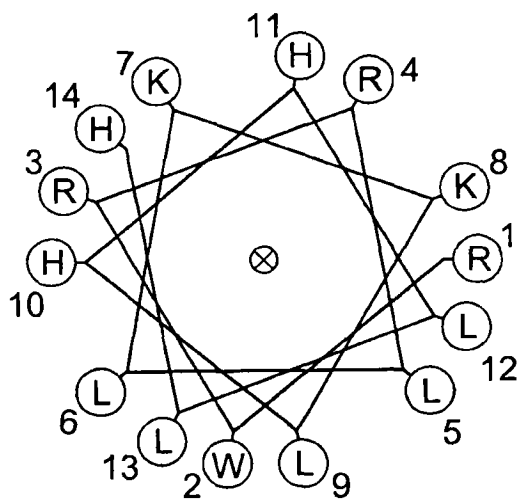
 α -7 α -11

图 1

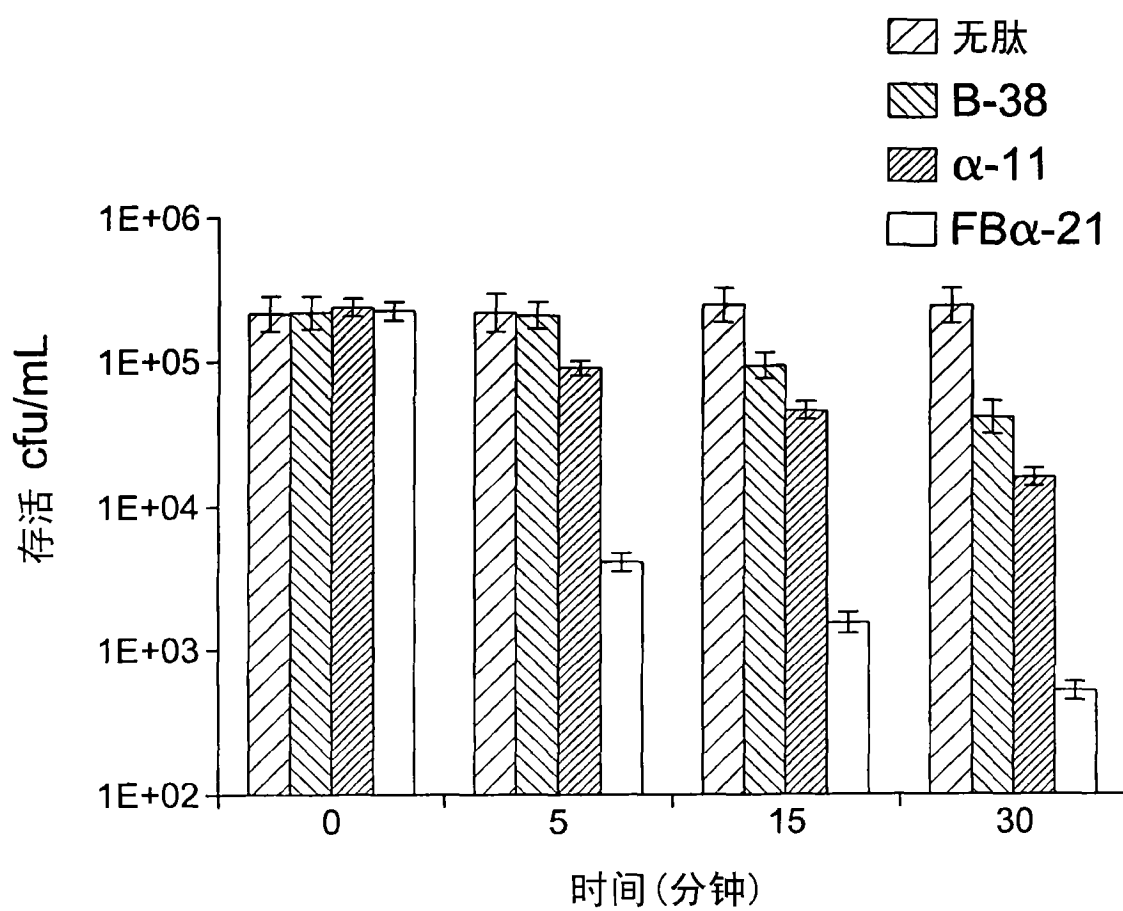


图 2a

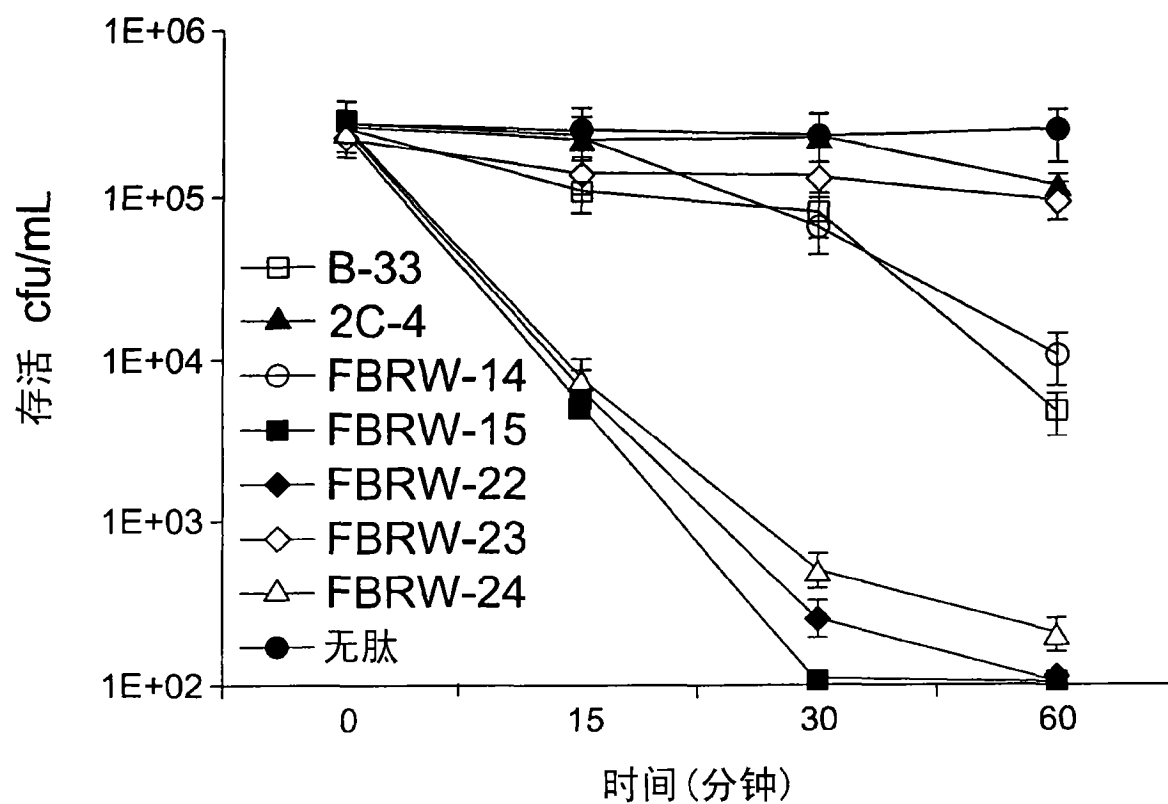


图 2b