



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107001422 A

(43)申请公布日 2017. 08. 01

(21)申请号 201580049114.8

(22)申请日 2015.07.07

(30)优先权数据

62/023,678 2014.07.11 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.03.13

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/039439 2015.07.07

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/007551 EN 2016.01.14

(71)申请人 C3剑股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 R·H·埃克特 C·W·卡普兰

P·A·库迈 B·C·瓦纳姆

(74)专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285

代理人 孙占华 张广育

(51)Int.Cl.

C07K 7/08(2006.01)

C07K 19/00(2006.01)

A61K 38/10(2006.01)

A61K 47/62(2017.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

A61P 31/00(2006.01)

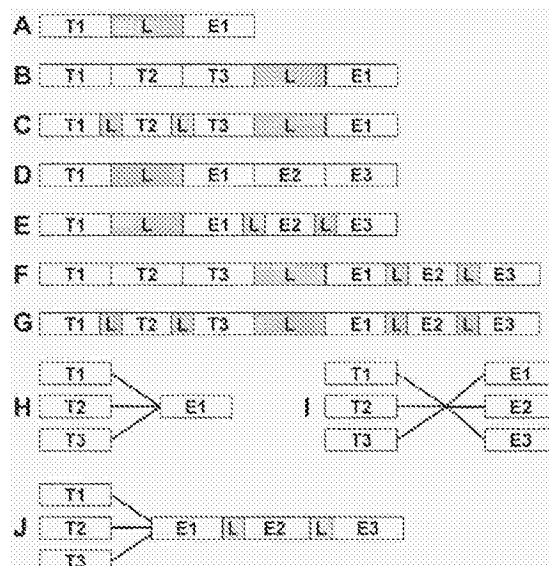
权利要求书7页 说明书67页 附图10页

(54)发明名称

结合变形链球菌的靶向肽、包含所述肽的构建体及其用途

(57)摘要

在某些实施方案中,本申请提供了特异性地/优先地结合于变形链球菌的新的靶向肽。所述靶向肽可与效应物(例如,可检测标记物、药物、抗微生物肽等)连接以形成嵌合构建体,用于特异性地/优先地将所述效应物递送至靶生物体和/或递送到靶生物体中。在某些实施方案中,例如与抗微生物肽连接的靶向肽可用于选择性地抑制和/或灭杀变形链球菌,并且当所述靶向肽用于哺乳动物的口腔中时,能够有效降低龋齿的发病率和/或严重性,和/或牙周病的发病率和/或严重性。



1. 一种结合变形链球菌 (*Streptococcus mutans*) 的靶向肽, 其中所述肽包含氨基酸序列

$X^1-X^2-F-R-X^5-X^6-X^7-R-X^9-X^{10}-X^{11}-X^{12}-X^{13}-X^{14}-X^{15}-X^{16}$ 或所述氨基酸序列的反向序列, 或由所述氨基酸序列或其反向序列组成, 其中:

X^1 是极性氨基酸或 A;

X^2 是 F、W、Q、A 或其类似物;

X^5 是疏水氨基酸;

X^6 是疏水氨基酸、N、Q 或其类似物;

X^7 是极性氨基酸、A、F 或其类似物;

X^9 是极性氨基酸、A 或其类似物;

X^{10} 是疏水氨基酸、Q、A 或其类似物;

X^{11} 是疏水氨基酸;

X^{12} 是 Q、A 或其类似物;

X^{13} 是非极性氨基酸;

X^{14} 是疏水氨基酸;

X^{15} 是非极性氨基酸、N、S、D 或其类似物;

X^{16} 是极性氨基酸、F、A 或其类似物; 以及

所述肽的长度范围为最多达 100 个氨基酸。

2. 权利要求 1 的肽, 其中 X^1 是 A 或 T。

3. 权利要求 1-2 中任一项的肽, 其中 X^2 是 F、W、Q 或 A。

4. 权利要求 3 的肽, 其中 X^2 是 F。

5. 权利要求 1-4 中任一项的肽, 其中 X^5 是 L、A 或其类似物。

6. 权利要求 5 的肽, 其中 X^5 是 L。

7. 权利要求 1-6 中任一项的肽, 其中 X^6 是 F、L、N、A、Q 或其类似物。

8. 权利要求 7 的肽, 其中 X^6 是疏水氨基酸。

9. 权利要求 7 的肽, 其中 X^6 是 F。

10. 权利要求 1-9 中任一项的肽, 其中 X^7 是极性氨基酸、A 或 F。

11. 权利要求 10 的肽, 其中 X^7 是极性氨基酸或 A。

12. 权利要求 10 的肽, 其中 X^7 是 N、A、S、D 或 F。

13. 权利要求 10 的肽, 其中 X^7 是 N 或 A。

14. 权利要求 10 的肽, 其中 X^7 是 N。

15. 权利要求 1-14 中任一项的肽, 其中 X^9 是极性氨基酸或 A。

16. 权利要求 15 的肽, 其中 X^9 是 S 或 A。

17. 权利要求 15 的肽, 其中 X^9 是 S。

18. 权利要求 1-17 中任一项的肽, 其中 X^{10} 是疏水氨基酸、Q 或 A。

19. 权利要求 18 的肽, 其中 X^{10} 是疏水氨基酸。

20. 权利要求 19 的肽, 其中 X^{10} 是 F、L 或其类似物。

21. 权利要求 19 的肽, 其中 X^{10} 是 F。

22. 权利要求 1-21 中任一项的肽, 其中 X^{11} 是 T、A 或其类似物。

23. 权利要求22的肽,其中X¹¹是T。

24. 权利要求1-23中任一项的肽,其中X¹²是Q或A。

25. 权利要求24的肽,其中X¹²是Q。

26. 权利要求1-25中任一项的肽,其中X¹³是P、A或其类似物。

27. 权利要求26的肽,其中X¹³是A。

28. 权利要求1-27中任一项的肽,其中X¹⁴是L、A或其类似物。

29. 权利要求28的肽,其中X¹⁴是L。

30. 权利要求1-29中任一项的肽,其中X¹⁵是非极性氨基酸、N、S或D。

31. 权利要求30的肽,其中X¹⁵是G、A、F、N、S、D或其类似物。

32. 权利要求31的肽,其中X¹⁵是G或A。

33. 权利要求1-32中任一项的肽,其中X¹⁶是极性氨基酸、F或A。

34. 权利要求33的肽,其中X¹⁶是极性氨基酸。

35. 权利要求34的肽,其中X¹⁶是K、Q或其类似物。

36. 权利要求34的肽,其中X¹⁶是K。

37. 权利要求1-36中任一项的肽,其中所述肽不包含氨基酸序列TFFRLFNRSFTQALGK。

38. 权利要求1的肽,其中所述肽包含选自以下的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成:AFFRAFNRAFAQALAK (SEQ ID NO:5)、TFFRAFARAFAQAAAK (SEQ ID NO:6)、AFFRAFARAFAQALAK (SEQ ID NO:7)、AFFRLFARAFAQAAAK (SEQ ID NO:8)、TLFRLNRSFTQALGK (SEQ ID NO:9)、TFFRLFNRSFTQALFK (SEQ ID NO:10)、TFFRLFNRSFTQALGK (SEQ ID NO:11)、TFFRLFNRSFTQALNK (SEQ ID NO:12)、AFFRAFARAFAQAAAK (SEQ ID NO:13)、AFFRAFNRAFAQAAAK (SEQ ID NO:14)、TFFRLFNRSFTQALSK (SEQ ID NO:15)、AFFRAFARSFAQAAAK (SEQ ID NO:16)、AFFRAFARAFAQAAGK (SEQ ID NO:17)、AFFRAFARAFTQAAAK (SEQ ID NO:18)、TFFRLFNRSFTQALGQ (SEQ ID NO:19)、TFFRLLNRSFTQALGK (SEQ ID NO:20)、TWFRLFNRSFTQALGK (SEQ ID NO:21)、AFFRAFARAFAQAFK (SEQ ID NO:22)、TQFRLFNRSFTQALGK (SEQ ID NO:23)、TFFRLFNRSFTQALDK (SEQ ID NO:24)、TFFRLFNRSFTQALAK (SEQ ID NO:25)、TFFRLFNRSFTQALGE (SEQ ID NO:26)、TFFRLFSRSFTQALGK (SEQ ID NO:27)、TFFRLFNRSFTQALGA (SEQ ID NO:28)、TFFRLFDRSFTQALGK (SEQ ID NO:29)、TFFRLFNRSFTQALGF (SEQ ID NO:30)、TFFRAFARSFTQAAAK (SEQ ID NO:31)、TFFRLFARSFTQAAGK (SEQ ID NO:32)、TFFRLFNRSFTQ L K (SEQ ID NO:33)、TFFRLFNRSFTQALGS (SEQ ID NO:34)、TLFRLFNRSFTQALGK (SEQ ID NO:35)、TFFRLNRSFTQALGK (SEQ ID NO:36)、TFFRLFNRSQTQALGK (SEQ ID NO:37)、TFFRLFAAAFTQALGK (SEQ ID NO:38)、TFFRLFNRSFTQALGK (SEQ ID NO:39)、TFFRLFNRSAAAALGK (SEQ ID NO:40)、TFFRLFFRSNTQALGK (SEQ ID NO:41)、TFFRLFNRSFTQPLGK (SEQ ID NO:42)、TAFRLANRSATQALGK (SEQ ID NO:43)、TFFRLFNRSFTQAAAA (SEQ ID NO:44)、TFFRLQNRSFTQALGK (SEQ ID NO:45)、TFFRLFNRSFTQALPK (SEQ ID NO:46)、TYRRLFNRSFTQALGK (SEQ ID NO:47)、TFFRLF RSFTQALGK (SEQ ID NO:48)和TQFRLQNRSQTQALGK (SEQ ID NO:49)。

39. 权利要求1-38中任一项的肽,其中所述肽的氨基酸序列是所述序列的反向序列。

40. 权利要求1-39中任一项的肽,其中所述肽的长度范围为最多达50个氨基酸或最多达25个氨基酸,或最多达20个氨基酸。

41. 权利要求1-40中任一项的肽,其中所述肽是“L”肽。

42. 权利要求1-40中任一项的肽,其中所述肽是“D”肽。

43. 权利要求1-40中任一项的肽,其中所述肽是 β 肽。

44. 权利要求1-42中任一项的肽,其中所述肽是化学合成的。

45. 权利要求1-44中任一项的肽,其中所述肽连接至效应物部分,所述效应物部分选自:可检测标记物、卟啉或其他光敏剂、抗微生物肽、抗生素、配体、脂质或脂质体、在物理上破坏微生物群落内的胞外基质的试剂,以及聚合颗粒。

46. 权利要求45的肽,其中所述肽与抗微生物肽连接。

47. 权利要求46的肽,其中所述肽与抗微生物肽连接,所述抗微生物肽包含表4中的氨基酸序列或由表4中的氨基酸序列组成。

48. 权利要求46的肽,其中所述肽与抗微生物肽连接,所述抗微生物肽包含选自以下的氨基酸序列或由选自以下的氨基酸序列组成:G2 KNLRIIRKGIHIIKKY*(SEQ ID NO:2)、Novispirin G10KNLRRRIIRKGIHIIKKYG(SEQ ID NO:49)、Novispirin T10KNLRRRIIRKTIHIIKKYG(SEQ ID NO:50)、Novispirin G7KNLRRIGRKIIHIIKKYG(SEQ ID NO:51)、Novispirin T7KNLRRITRKIIHIIKKYG(SEQ ID NO:52)、Ovispirin KNLRRRIIRKIIHIIKKYG(SEQ ID NO:53)、PGG GLLRRLRKKIGEIFKKYG(SEQ ID NO:54)、Protegrin-1 RGGRLCYCRRRFCVCVGR*(SEQ ID NO:55)、K-1 GLGRVIGRLIKQIIWRR(SEQ ID NO:56)、K-2 VYRKRSILKIYAKLKGWH(SEQ ID NO:57)、K-7 NYRLVNAIFSKIFKKKFIKF(SEQ ID NO:58)、K-8 KILKFLFKVVF(SEQ ID NO:59)、K-9 FIRKFLKKWLL(SEQ ID NO:60)、K-10 KLFKFLRKHLL(SEQ ID NO:61)、K-11 KILKFLFKQVF(SEQ ID NO:62)、K-12 KILKKLKFVVF(SEQ ID NO:63)、K-13 GILKKLFTKVF(SEQ ID NO:64)、K-14 LRKFLHKLF(SEQ ID NO:65)、K-15 LRKNLRWLF(SEQ ID NO:66)、K-16 FIRKFLQKLHL(SEQ ID NO:67)、K-17 FTRKFLKFLHL(SEQ ID NO:68)、K-18 KFKKFKVLKIL(SEQ ID NO:69)、K-19 LLKLLKLKKLKF(SEQ ID NO:70)、K-20 FLKFLKKFFKKLKY(SEQ ID NO:71)、K-21 GWLKMFKKIIGKFGKF(SEQ ID NO:72)、K-22 GIFKKFVKILYKVQKL(SEQ ID NO:73)和B-33 FKKFWKWFRRF(SEQ ID NO:107)。

49. 权利要求46-48中任一项的肽,其中所述抗微生物肽是“L”肽。

50. 权利要求46-48中任一项的肽,其中所述抗微生物肽是“D”肽。

51. 权利要求46-48中任一项的肽,其中所述抗微生物肽是 β 肽。

52. 权利要求1-51中任一项的肽,其中所述靶向肽与所述效应物化学缀合。

53. 权利要求52的肽,其中所述靶向肽通过接头与所述效应物化学缀合。

54. 权利要求53的肽,其中所述靶向肽通过接头与所述效应物化学缀合,所述接头包括聚乙二醇(PEG)或表5中的非肽接头。

55. 权利要求1-51中任一项的肽,其中所述靶向肽与所述效应物直接连接(即没有接头)。

56. 权利要求1-51中任一项的肽,其中所述靶向肽通过肽键与所述效应物连接。

57. 权利要求56的肽,其中所述效应物包含抗微生物肽并且所述构建体是融合蛋白。

58. 权利要求56和57中任一项的肽,其中所述靶向肽通过肽接头与所述效应物连接,所

述肽接头包含表5中的氨基酸序列或由表5中的氨基酸序列组成。

59. 权利要求58的肽,其中所述肽接头包含氨基酸序列GGG或由氨基酸序列GGG组成。

60. 权利要求1-59中任一项的肽,其中所述肽未携带末端保护基团。

61. 权利要求1-59中任一项的肽,其中所述靶向肽或包含与所述效应物部分连接的所述靶向肽的构建体携带一个或多个保护基团。

62. 权利要求61的肽,其中所述一个或多个保护基团独立地选自:乙酰基、酰胺、3至20碳烷基、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(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)、2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-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)、苯甲酰基(Bz)、3-硝基-2-吡啶亚磺酰基(Npys)、1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代亚环己基)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)、叔丁氧基羰基(Boc)、环己基氧基(cHexO)、叔丁氧基甲基(Bom)、叔丁氧基(tBuO)、叔丁基(tBu)和三氟乙酰基(TFA)。

63. 权利要求61的肽,其中所述靶向肽或与所述效应物部分连接的所述靶向肽在羧基末端和/或氨基末端包含保护基团。

64. 权利要求63的肽,其中所述羧基末端是酰胺化的。

65. 权利要求1-64中任一项的肽,其中将所述构建体用聚合物来官能化以增加血清半衰期。

66. 权利要求65的肽,其中所述聚合物包括聚乙二醇和/或纤维素或改性纤维素。

67. 一种长度范围为最长达100个氨基酸的抗微生物肽,所述肽包含选自以下的氨基酸序列或由选自以下的氨基酸序列组成:FIGAIARLLSKIFGKR (SEQ ID NO:228)、GIFSKLAGKKIKNLLISG (SEQ ID NO:229)、GIFSKLAGKKIKNLLISGLKG (SEQ ID NO:230)、GLFSKFVVGKIKNFLIKGVK (SEQ ID NO:231)、KAYSTPRCKGLFRALMCWL (SEQ ID NO:232)、KIFGAIWPLALGALKNLIK (SEQ ID NO:233)、GWGSFFKKAHVKGKHAALHYL (SEQ ID NO:234)、RGLRRLGRKIAHGKVKY (SEQ ID NO:235)、RGLRRLGRKIAHGKVKYGPTVLRIIRIAG (SEQ ID NO:236)、KIAHGKVKYGPTVLRIIR (SEQ ID NO:237)、LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTE (SEQ ID NO:238)、FLPLIGRVLSGIL (SEQ ID NO:239)、IGKFLKKAKKFGKAFVKILKK (SEQ ID NO:240)、GKFLKKAKKFGKAFVKIL (SEQ ID NO:241)、WFLKFLKKFFKKLKY (SEQ ID NO:242)、RGLRRLGRKIAHGKVKY (SEQ ID NO:243)、LLGDFFRKSKEKI (SEQ ID NO:244) 和ILRWPWWPWRK (SEQ ID NO:245)。

68. 权利要求67的抗微生物肽,其中所述肽的长度范围为最长达50个氨基酸,或最长达40个氨基酸。

69. 权利要求67-68中任一项的抗微生物肽,其中所述抗微生物肽携带一个或多个保护基团。

70. 权利要求69的抗微生物肽,其中所述一个或多个保护基团独立地选自:乙酰基、酰胺、3至20碳烷基、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(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)、2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-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)、苯甲酰基 (Bz)、3-硝基-2-吡啶亚磺酰基 (Npys)、1-(4,4-二甲基-2,6-二氧化代亚环己基) 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)、叔丁氧基羰基 (Boc)、环己基氧基 (cHxO)、叔丁氧基甲基 (Bum)、叔丁氧基 (tBuO)、叔丁基 (tBu) 和三氟乙酰基 (TFA)。

71. 权利要求69的抗微生物肽,其中所述抗微生物肽在羧基末端和/或氨基末端包含保护基团。

72. 权利要求71的抗微生物肽,其中所述肽的羧基末端是酰胺化的。

73. 权利要求67-72中任一项的抗微生物肽,其中将所述肽用聚合物官能化以增加血清半衰期。

74. 权利要求67-73中任一项的抗微生物肽,其中所述肽与权利要求1-43中任一项的靶向肽连接。

75. 一种药物组合物,其在可药用载体中包含权利要求1-74中任一项的肽。

76. 权利要求75的组合物,其中所述组合物被配制为单位剂量制剂。

77. 权利要求75的组合物,其中所述组合物被配制用于通过选自以下的方式给药:腹膜内给药、局部给药、口服给药、吸入给药、透皮给药、皮下储库给药和直肠给药。

78. 一种灭杀细菌或抑制细菌的生长或繁殖的方法,所述方法包括:

将所述细菌或包含所述细菌的生物膜与包含权利要求1-43中任一项的靶向肽的组合物接触,所述靶向肽与抗微生物肽和/或抗生素和/或卟啉或其他光敏剂连接;和/或

将所述细菌或包含所述细菌的生物膜与包含权利要求67-73中任一项的抗微生物肽的组合物接触。

79. 一种在哺乳动物中减少或预防龋齿形成和/或牙周病的发病率或严重性的方法,所述方法包括:

向所述哺乳动物的口腔给予包含权利要求1-43中任一项的靶向肽的组合物给予至,所述靶向肽与抗微生物肽和/或抗生素和/或卟啉或其他光敏剂连接;和/或

向所述哺乳动物的口腔给予包含权利要求67-73中任一项的抗微生物肽的组合物。

80. 权利要求78-79中任一项的方法,其中所述细菌或生物膜在人中和/或所述口腔是人的口腔。

81. 权利要求80的方法,其中所述细菌或生物膜在人的口腔中。

82. 权利要求78-81中任一项的方法,其中所述接触或给药至口腔包括将牙齿和/或牙龈与所述组合物接触。

83. 权利要求78-82中任一项的方法,其中所述组合物包括权利要求67-73中任一项的抗微生物肽。

84. 权利要求78-82中任一项的方法,其中所述组合物包括权利要求1-43中任一项的靶向肽,所述靶向肽与抗微生物肽连接。

85. 权利要求84的方法,其中所述靶向肽与抗生物肽连接,所述抗生物肽包含表4中的氨基酸序列或由表4中的氨基酸序列组成。

86. 权利要求84的方法, 其中所述靶向肽与抗微生物肽连接, 所述抗生物肽包含选自以下的氨基酸序列或由选自以下的氨基酸序列组成: G2 KNLRIIRKGIHIIKKY* (SEQ ID NO:2)、Novispirin G10 KNLRRIRKGIHIIKKYG (SEQ ID NO:49)、Novispirin T10 KNLRRIRKTIHIIKKYG (SEQ ID NO:50)、Novispirin G7 KNLRRIGRKIIHIIKKYG (SEQ ID NO:51)、Novispirin T7 KNLRRITRKIIHIIKKYG (SEQ ID NO:52)、Novispirin KNLRRIRKIIHIIKKYG (SEQ ID NO:53)、PGG GLLRRLRKKIGEIFKKYG (SEQ ID NO:54)、Protegrin-1 RGGRLCYCRRRFCVCVGR* (SEQ ID NO:55)、K-1 GLGRVIGRLIKQIIWRR (SEQ ID NO:56)、K-2 VYRKRKSILKIYAKLKGWH (SEQ ID NO:57)、K-7 NYRLVNAIFSKIFKKKFIKF (SEQ ID NO:58)、K-8 KILKFLFKKVF (SEQ ID NO:59)、K-9 FIRKFLKKWLL (SEQ ID NO:60)、K-10 KLFKFLRKHL (SEQ ID NO:61)、K-11 KILKFLFKQVF (SEQ ID NO:62)、K-12 KILKKLKFVF (SEQ ID NO:63)、K-13 GILKKLFTKVF (SEQ ID NO:64)、K-14 LRKFLHKL (SEQ ID NO:65)、K-15 LRKNLRWLF (SEQ ID NO:66)、K-16 FIRKFLQKLHL (SEQ ID NO:67)、K-17 FTRKFLKFLHL (SEQ ID NO:68)、K-18 KKFKKFKVLKIL (SEQ ID NO:69)、K-19 LLKLLKLKKLKF (SEQ ID NO:70)、K-20 FLKFLKKFFKKLKY (SEQ ID NO:71)、K-21 GWLKMFKKIIGKFGKF (SEQ ID NO:72)、K-22 GIFKKFVKILYKVQKL (SEQ ID NO:73) 和 B-33 FKKFWKWFRRF (SEQ ID NO:107)。

87. 权利要求78-86中任一项的方法, 其中所述靶向肽通过肽接头与所述抗微生物肽连接, 所述肽接头包含表5中的氨基酸序列或由表5中的氨基酸序列组成。

88. 权利要求87的方法, 其中所述肽接头包含氨基酸序列GGG或由氨基酸序列GGG组成。

89. 一种检测细菌和/或细菌膜的方法, 所述方法包括:

使所述细菌或细菌膜与包含权利要求1-43中任一项的靶向肽的组合物接触, 所述靶向肽与可检测标记物连接; 以及

检测所述可检测标记物, 其中所述可检测标记物的数量和/或位置是所述细菌和/或细菌膜的存在情况的指标。

90. 权利要求89的方法, 其中所述可检测标记物是选自以下的标记物: 放射性标记物、不透射线标记物、荧光染料、荧光蛋白、酶标记物、比色标记物和量子点。

91. 包括权利要求1-43中任一项的靶向肽的组合物, 所述靶向肽与光敏剂连接。

92. 权利要求91的组合物, 其中所述光敏剂是选自以下的试剂: 卟啉大环、卟啉、氯、冠醚、吡啶、吡嗪、酞菁、青色素、姜黄素、补骨脂素和花靛。

93. 权利要求91的组合物, 其中所述光敏剂是图1-12中任一个所示的试剂。

94. 权利要求91的组合物, 其中所述光敏剂通过非肽接头与所述靶向肽连接。

95. 权利要求91的组合物, 其中所述光敏剂通过包括聚乙二醇 (PEG) 的接头或通过表5中的非肽接头与所述靶向肽连接。

96. 一种抑制微生物或生物膜的生长或繁殖的方法, 所述方法包括使所述微生物或生物膜与权利要求90-95中任一项的组合物接触。

97. 一种在哺乳动物中减少或预防龋齿形成和/或牙周病的发病率或严重性的方法, 所述方法包括:

向所述哺乳动物的口腔给予权利要求90-95中任一项的组合物。

98. 权利要求96-97中任一项的方法, 还包括使所述微生物和/或生物膜和/或组合物暴露于光源。

99. 权利要求96的方法,其中所述微生物是选自以下的微生物:细菌、酵母、真菌、原生动物和病毒。

100. 权利要求96的方法,其中所述生物膜包括细菌生物膜。

101. 权利要求96的方法,其中所述生物膜是植入的或可植入的医疗设备上的生物膜。

102. 权利要求96的方法,其中所述微生物或生物膜是口腔中的微生物或生物膜。

结合变形链球菌的靶向肽、包含所述肽的构建体及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2014年7月11日提交的USSN 62/023,678的权益和优先权,其以全部目的通过引用的方式全文纳入本文。

[0003] 政府支持的声明

[0004] [不适用]

背景技术

[0005] 工业水平的抗生素研究最初关注的是鉴定已经存在的药物的改良的 (refined) 变体。这使得开发出诸如新型的青霉素类、头孢菌素类、大环内酯类和氟喹诺酮类的抗生素。

[0006] 然而,细菌病原体对旧抗生素和新型抗生素的抗性正在迅速发展,广泛的 β -内酰胺酶 (ESBL) 和喹诺酮抗性的革兰氏阴性的多抗性淋球菌、甲氧苯青霉素抗性的金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) (MRSA)、万古霉素抗性的肠球菌 (VRE)、青霉素不敏感的肺炎球菌 (PNSP),以及大环内酯抗性的肺炎球菌和链球菌 (参见,例如Panlilo et al. (1992) Infect.Control Hosp.Epidemiol.,13:582-586;Morris et al. (1995) Ann Intern Me.,d 123:250-259等) 就是例证。抗生素的过度使用和不当使用被认为对于药物抗性细菌的引发和扩散非常重要。在许多情况下,由于药物的持续暴露和不当使用,微生物已适应抗生素并产生抗性。

[0007] 药物抗性病原体代表了卫生保健系统的主要经济负担。例如,手术后和其他医院的感染将延长对医院护理的需求并增加抗生素药物费用。据估计,在美国每年治疗药物抗性感染的费用约为50亿美元。

发明内容

[0008] 在某些实施方案中,本申请提供了特异性地/优先地结合于微生物 (例如变形链球菌 (*S.mutans*) 等) 的新型靶向肽。靶向部分能够与效应物 (例如,可检测标记物、药物、抗微生物肽等) 连接以形成嵌合构建体,用于将所述效应物特异性地/优先地递送至靶生物和/或到靶生物中。在某些实施方案中,本申请提供了可用于抑制 (例如,灭杀和/或抑制) 某些微生物 (例如,某些细菌、酵母、真菌、霉菌、病毒、藻类、原生动物等) 生长和/或繁殖的新型抗微生物肽。

[0009] 因此,在某些实施方案中,本申请提供了嵌合构建体 (嵌合部分),其包含与一种或多种效应物 (例如抗微生物肽) 连接的一种或多种本文所述的靶向肽。

[0010] 本文考虑到的多个实施方案可包括但不限于以下实施方案中的一种或多种:

[0011] 实施方案1:结合于变形链球菌 (*Streptococcus mutans*) 的靶向肽,所述肽包含氨基酸序列 $X^1-X^2-F-R-X^5-X^6-X^7-R-X^9-X^{10}-X^{11}-X^{12}-X^{13}-X^{14}-X^{15}-X^{16}$ (SEQ ID NO:1) 或所述氨基酸序列的反向序列 (inverse),或者由所述氨基酸序列或其反向序列组成,其中: X^1 为极性氨基酸或A; X^2 为F、W、Q、A或其类似物; X^5 为疏水氨基酸; X^6 为疏水氨基酸、N、Q或其类似物; X^7

为极性氨基酸、A、F或其类似物； X^9 为极性氨基酸、A或其类似物； X^{10} 为疏水氨基酸、Q、A或其类似物； X^{11} 为疏水氨基酸； X^{12} 为Q、A或其类似物； X^{13} 为非极性氨基酸； X^{14} 为疏水氨基酸； X^{15} 为非极性氨基酸、N、S、D或其类似物； X^{16} 为极性氨基酸、F、A或其类似物；并且所述肽的长度范围为最多达100个氨基酸。

- [0012] 实施方案2:实施方案1的肽,其中 X^1 是A或T。
- [0013] 实施方案3:实施方案1-2中任一项的肽,其中 X^2 是F、W、Q或A。
- [0014] 实施方案4:实施方案3的肽,其中 X^2 是F。
- [0015] 实施方案5:实施方案1-4中任一项的肽,其中 X^5 是L、A或其类似物。
- [0016] 实施方案6:实施方案5的肽,其中 X^5 是L或A。
- [0017] 实施方案7:实施方案5的肽,其中 X^5 是L。
- [0018] 实施方案8:实施方案1-7中任一项的肽,其中 X^6 是F、L、N、A、Q或其类似物。
- [0019] 实施方案9:实施方案8的肽,其中 X^6 是F、L、N、A或Q。
- [0020] 实施方案10:实施方案8的肽,其中 X^6 是疏水氨基酸。
- [0021] 实施方案11:实施方案8的肽,其中 X^6 是F。
- [0022] 实施方案12:实施方案1-11中任一项的肽,其中 X^7 是极性氨基酸、A或F。
- [0023] 实施方案13:实施方案12的肽,其中 X^7 是极性氨基酸或A。
- [0024] 实施方案14:实施方案12的肽,其中 X^7 是N、A、S、D或F。
- [0025] 实施方案15:实施方案12的肽,其中 X^7 是N或A。
- [0026] 实施方案16:实施方案12的肽,其中 X^7 是N。
- [0027] 实施方案17:实施方案1-16中任一项的肽,其中 X^9 是极性氨基酸或A。
- [0028] 实施方案18:实施方案17的肽,其中 X^9 是S或A。
- [0029] 实施方案19:实施方案17的肽,其中 X^9 是S。
- [0030] 实施方案20:实施方案1-19中任一项的肽,其中 X^{10} 是疏水氨基酸、Q或A。
- [0031] 实施方案21:实施方案20的肽,其中 X^{10} 是疏水氨基酸。
- [0032] 实施方案22:实施方案21的肽,其中 X^{10} 是F、L或其类似物。
- [0033] 实施方案23:实施方案21的肽,其中 X^{10} 是F或L。
- [0034] 实施方案24:实施方案21的肽,其中 X^{10} 是F。
- [0035] 实施方案25:实施方案1-24中任一项的肽,其中 X^{11} 是T、A或其类似物。
- [0036] 实施方案26:实施方案25的肽,其中 X^{11} 是T或A。
- [0037] 实施方案27:实施方案25的肽,其中 X^{11} 是T。
- [0038] 实施方案28:实施方案1-27中任一项的肽,其中 X^{12} 是Q或A。
- [0039] 实施方案29:实施方案28的肽,其中 X^{12} 是Q。
- [0040] 实施方案30:实施方案1-29中任一项的肽,其中 X^{13} 是P、A或其类似物。
- [0041] 实施方案31:实施方案30的肽,其中 X^{13} 是P或A。
- [0042] 实施方案32:实施方案30的肽,其中 X^{13} 是A。
- [0043] 实施方案33:实施方案1-32中任一项的肽,其中 X^{14} 是L、A或其类似物。
- [0044] 实施方案34:实施方案33的肽,其中 X^{14} 是L或A。
- [0045] 实施方案35:实施方案33的肽,其中 X^{14} 是L。
- [0046] 实施方案36:实施方案1-35中任一项的肽,其中 X^{15} 是非极性氨基酸、N、S或D。

- [0047] 实施方案37:实施方案36的肽,其中X¹⁵是G、A、F、N、S、D 或其类似物。
- [0048] 实施方案38:实施方案37的肽,其中X¹⁵是G、A、F、N、S或D。
- [0049] 实施方案39:实施方案37的肽,其中X¹⁵是G或A。
- [0050] 实施方案40:实施方案1-39中任一项的肽,其中X¹⁶是极性氨基酸、F或A。
- [0051] 实施方案41:实施方案40的肽,其中X¹⁶是极性氨基酸。
- [0052] 实施方案42:实施方案41的肽,其中X¹⁶是K、Q或其类似物。
- [0053] 实施方案43:实施方案41的肽,其中X¹⁶是K或Q。
- [0054] 实施方案44:实施方案41的肽,其中X¹⁶是K。
- [0055] 实施方案45:实施方案1-44中任一项的肽,其中所述肽不包含氨基酸序列 TFFRLFNRSFTQALGK。
- [0056] 实施方案46:实施方案1的肽,其中所述肽包含选自以下的氨基酸序列或由这些氨基酸序列组成:AFFRAFNRAFAQALAK (SEQ ID NO: 5)、TFFRAFARAFAQAAAK (SEQ ID NO:6)、AFFRAFARAFAQALAK (SEQ ID NO:7)、AFFRLFARAFAQAAAK (SEQ ID NO:8)、TLFRLNRSLTQALGK (SEQ ID NO:9)、TFFRLFNRSFTQALFK (SEQ ID NO:10)、TFFRLFNRSLTQALGK (SEQ ID NO:11)、TFFRLFNRSFTQALNK (SEQ ID NO:12)、AFFRAFARAFAQAAAK (SEQ ID NO:13)、AFFRAFNRAFAQAAAK (SEQ ID NO:14)、TFFRLFNRSFTQALSK (SEQ ID NO:15)、AFFRAFARSFAQAAAK (SEQ ID NO:16)、AFFRAFARAFAQAAGK (SEQ ID NO:17)、AFFRAFARAFTQAAAK (SEQ ID NO:18)、TFFRLFNRSFTQALGQ (SEQ ID NO:19)、TFFRLLNRSFTQALGK (SEQ ID NO:20)、TWFRFNRSFTQALGK (SEQ ID NO:21)、AFFRAFARAFAQAFK (SEQ ID NO:22)、TQFRLFNRSFTQALGK (SEQ ID NO:23)、TFFRLFNRSFTQALDK (SEQ ID NO:24)、TFFRLFNRSFTQALAK (SEQ ID NO:25)、TFFRLFNRSFTQALGE (SEQ ID NO:26)、TFFRLFSRSFTQALGK (SEQ ID NO:27)、TFFRLFNRSFTQALGA (SEQ ID NO:28)、TFFRLFDRSFTQALGK (SEQ ID NO:29)、TFFRLFNRSFTQALGF (SEQ ID NO:30)、TFFRAFARSFTQAAAK (SEQ ID NO:31)、TFFRLFARSFTQAAGK (SEQ ID NO:32)、TFFRLFNRSFTQLK (SEQ ID NO:33)、TFFRLFNRSFTQALGS (SEQ ID NO:34)、TLFRLFNRSFTQALGK (SEQ ID NO:35)、TFFRLNFRSFTQALGK (SEQ ID NO:36)、TFFRLFNRSQTQALGK (SEQ ID NO:37)、TFFRLFAAAFTQALGK (SEQ ID NO:38)、TFFRLFNRSFTQALGK (SEQ ID NO:39)、TFFRLFNRSAAAALGK (SEQ ID NO:40)、TFFRLFRRSNTQALGK (SEQ ID NO:41)、TFFRLFNRSFTQPLGK (SEQ ID NO:42)、TAFRLANRSATQALGK (SEQ ID NO:43)、TFFRLFNRSFTQAAAA (SEQ ID NO:44)、TFFRLQNRSFTQALGK (SEQ ID NO:45)、TFFRLFNRSFTQALPK (SEQ ID NO:46)、TYYRLFNRSFTQALGK (SEQ ID NO:47)、TFFRLF RSFTQALGK (SEQ ID NO:48) 和 TQFRLQNRSQTQALGK (SEQ ID NO:49)。
- [0057] 实施方案47:实施方案46的肽,其中所述肽包含氨基酸序列 AFFRAFNRAFAQALAK (SEQ ID NO:5)或由该序列组成。
- [0058] 实施方案48:实施方案116的肽,其中所述肽包含氨基酸序列 TFFRAFARAFAQAAAK (SEQ ID NO:6)或由该序列组成。
- [0059] 实施方案49:实施方案116的肽,其中所述肽包含氨基酸序列 AFFRAFARAFAQALAK (SEQ ID NO:7)或由该序列组成。

- [0060] 实施方案50:实施方案116的肽,其中所述肽包含氨基酸序列 AFFRLFARAFAQAAAK (SEQ ID NO:8)或由该序列组成。
- [0061] 实施方案51:实施方案116的肽,其中所述肽包含氨基酸序列 TLFRLNRSFTQALGK (SEQ ID NO:9)或由该序列组成。
- [0062] 实施方案52:实施方案116的肽,其中所述肽包含氨基酸序列 TFFRLFNRSFTQALFK (SEQ ID NO:10)或由该序列组成。
- [0063] 实施方案53:实施方案116的肽,其中所述肽包含氨基酸序列 TFFRLFNRSFTQALGK (SEQ ID NO:11)或由该序列组成。
- [0064] 实施方案54:实施方案116的肽,其中所述肽包含氨基酸序列 TFFRLFNRSFTQALNK (SEQ ID NO:12)或由该序列组成。
- [0065] 实施方案55:实施方案116的肽,其中所述肽包含氨基酸序列 AFFRAFAARAFAQAAAK (SEQ ID NO:13)或由该序列组成。实施方案56:实施方案116的肽,其中所述肽包含氨基酸序列 AFFRAFNRFAQAAAK (SEQ ID NO:14)或由该序列组成。
- [0066] 实施方案57:实施方案116的肽,其中所述肽包含氨基酸序列 TFFRLFNRSFTQALSK (SEQ ID NO:15)或由该序列组成。
- [0067] 实施方案58:实施方案116的肽,其中所述肽包含氨基酸序列 AFFRAFARSFAQAAAK (SEQ ID NO:16)或由该序列组成。
- [0068] 实施方案59:实施方案116的肽,其中所述肽包含氨基酸序列 AFFRAFAARAFAQAAGK (SEQ ID NO:17)或由该序列组成。
- [0069] 实施方案60:实施方案116的肽,其中所述肽包含氨基酸序列 AFFRAFAARAFTQAAAK (SEQ ID NO:18)或由该序列组成。
- [0070] 实施方案61:实施方案116的肽,其中所述肽包含氨基酸序列 TFFRLFNRSFTQALGQ (SEQ ID NO:19)或由该序列组成。
- [0071] 实施方案62:实施方案116的肽,其中所述肽包含氨基酸序列 TFFRLNRSFTQALGK (SEQ ID NO:20)或由该序列组成。
- [0072] 实施方案63:实施方案116的肽,其中所述肽包含氨基酸序列 TWFRLFNRSFTQALGK (SEQ ID NO:21)或由该序列组成。
- [0073] 实施方案64:实施方案116的肽,其中所述肽包含氨基酸序列 AFFRAFAARAFAQAFK (SEQ ID NO:22)或由该序列组成。
- [0074] 实施方案65:实施方案116的肽,其中所述肽包含氨基酸序列 TQFRLFNRSFTQALGK (SEQ ID NO:23)或由该序列组成。
- [0075] 实施方案66:实施方案116的肽,其中所述肽包含氨基酸序列 TFFRLFNRSFTQALDK (SEQ ID NO:24)或由该序列组成。
- [0076] 实施方案67:实施方案116的肽,其中所述肽包含氨基酸序列 TFFRLFNRSFTQALAK (SEQ ID NO:25)或由该序列组成。
- [0077] 实施方案68:实施方案116的肽,其中所述肽包含氨基酸序列 TFFRLFNRSFTQALGE (SEQ ID NO:26)或由该序列组成。
- [0078] 实施方案69:实施方案116的肽,其中所述肽包含氨基酸序列 TFFRLFSRSFTQALGK (SEQ ID NO:27)或由该序列组成。

- [0079] 实施方案70:实施方案116的肽,其中所述肽包含氨基酸序列 TFFRLFNRSFTQALGA (SEQ ID NO:28)或由该序列组成。
- [0080] 实施方案71:实施方案116的肽,其中所述肽包含氨基酸序列 TFFRLFDRSFTQALGK (SEQ ID NO:29)或由该序列组成。
- [0081] 实施方案72:实施方案116的肽,其中所述肽包含氨基酸序列 TFFRLFNRSFTQALGF (SEQ ID NO:30)或由该序列组成。
- [0082] 实施方案73:实施方案116的肽,其中所述肽包含氨基酸序列 TFFRAFARSFTQAAAK (SEQ ID NO:31)或由该序列组成。
- [0083] 实施方案74:实施方案116的肽,其中所述肽包含氨基酸序列 TFFRLFARSFTQAAGK (SEQ ID NO:32)或由该序列组成。
- [0084] 实施方案75:实施方案116的肽,其中所述肽包含氨基酸序列 TFFRLFNRSFTQLK (SEQ ID NO:33)或由该序列组成。
- [0085] 实施方案76:实施方案116的肽,其中所述肽包含氨基酸序列 TFFRLFNRSFTQALGS (SEQ ID NO:34)或由该序列组成。
- [0086] 实施方案77:实施方案116的肽,其中所述肽包含氨基酸序列 TLFRLFNRSFTQALGK (SEQ ID NO:35)或由该序列组成。
- [0087] 实施方案78:实施方案116的肽,其中所述肽包含氨基酸序列 TFFRLNFRSFTQALGK (SEQ ID NO:36)或由该序列组成。
- [0088] 实施方案79:实施方案116的肽,其中所述肽包含氨基酸序列 TFFRLFNRSQTQALGK (SEQ ID NO:37)或由该序列组成。
- [0089] 实施方案80:实施方案116的肽,其中所述肽包含氨基酸序列 TFFRLFAAAFTQALGK (SEQ ID NO:38)或由该序列组成。
- [0090] 实施方案81:实施方案116的肽,其中所述肽包含氨基酸序列 TFFRLFNRSFTQALGK (SEQ ID NO:39)或由该序列组成。
- [0091] 实施方案82:实施方案116的肽,其中所述肽包含氨基酸序列 TFFRLFNRSAAAALGK (SEQ ID NO:40)或由该序列组成。
- [0092] 实施方案83:实施方案116的肽,其中所述肽包含氨基酸序列 TFFRLFFRSNTQALGK (SEQ ID NO:41)或由该序列组成。
- [0093] 实施方案84:实施方案116的肽,其中所述肽包含氨基酸序列 TFFRLFNRSFTQPLGK (SEQ ID NO:42)或由该序列组成。
- [0094] 实施方案85:实施方案116的肽,其中所述肽包含氨基酸序列 TAFRLANRSATQALGK (SEQ ID NO:43)或由该序列组成。
- [0095] 实施方案86:实施方案116的肽,其中所述肽包含氨基酸序列 TFFRLFNRSFTQAAAA (SEQ ID NO:44)或由该序列组成。
- [0096] 实施方案87:实施方案116的肽,其中所述肽包含氨基酸序列 TFFRLQNRSFTQALGK (SEQ ID NO:45)或由该序列组成。
- [0097] 实施方案88:实施方案116的肽,其中所述肽包含氨基酸序列 TFFRLFNRSFTQALPK (SEQ ID NO:46)或由该序列组成。
- [0098] 实施方案89:实施方案116的肽,其中所述肽包含氨基酸序列 TYYRLFNRSFTQALGK

(SEQ ID NO:47)或由该序列组成。

[0099] 实施方案90:实施方案116的肽,其中所述肽包含氨基酸序列 TFFRLF RSFTQALGK (SEQ ID NO:48)或由该序列组成。

[0100] 实施方案91:实施方案116的肽,其中所述肽包含氨基酸序列 TQFRLQNRSTQALGK (SEQ ID NO:49)或由该序列组成。

[0101] 实施方案92:实施方案1-91中任一项的肽,其中所述肽的氨基酸序列是所述序列的反向序列。

[0102] 实施方案93:实施方案1-92中任一项的肽,其中所述肽的长度范围为最多达50个氨基酸。

[0103] 实施方案94:实施方案1-92中任一项的肽,其中所述肽的长度范围为最多达25个氨基酸。

[0104] 实施方案95:实施方案1-92中任一项的肽,其中所述肽的长度范围为最多达20个氨基酸。

[0105] 实施方案96:实施方案1-95中任一项的肽,其中所述肽包含所述氨基酸序列。

[0106] 实施方案97:实施方案1-92中任一项的肽,其中所述肽由所述氨基酸序列组成。

[0107] 实施方案98:实施方案1-97中任一项的肽,其中所述靶向肽为“L”肽。

[0108] 实施方案99:实施方案1-97中任一项的肽,其中所述靶向肽为“D”肽。

[0109] 实施方案100:实施方案1-98中任一项的肽,其中所述肽是重组表达的。

[0110] 实施方案101:实施方案1-99中任一项的肽,其中所述肽是化学合成的。

[0111] 实施方案102:实施方案1-101中任一项的肽,其中所述肽是离体(ex vivo)纯化的。

[0112] 实施方案103:实施方案1-97中任一项的肽,其中所述靶向肽是 β 肽。

[0113] 实施方案104:实施方案1-103中任一项的肽,其中所述肽与效应物部分连接,所述效应物部分选自:可检测标记物、卟啉或其他光敏剂、抗微生物肽、抗生素、配体、脂质或脂质体、在物理上(physically)破坏微生物群落内的胞外基质的试剂、以及聚合颗粒。

[0114] 实施方案105:实施方案104的肽,其中所述肽与抗微生物肽连接。

[0115] 实施方案106:实施方案105的肽,其中所述肽与抗微生物肽连接,所述抗微生物肽包含表4中的氨基酸序列或由表4中的氨基酸序列组成。

[0116] 实施方案107:实施方案105的肽,其中所述肽与抗微生物肽连接,所述抗微生物肽包含选自以下的氨基酸序列或由选自以下的氨基酸序列组成:G2KNLRIIRKGIHIKKY*(SEQ ID NO:2)、Novispirin G10 KNLRIIRKGIHIKKYG (SEQ ID NO:49)、Novispirin T10 KNLRIIRKTIHIKKYG (SEQ ID NO:50)、Novispirin G7 KNLRIIRKGIHIKKYG (SEQ ID NO:51)、Novispirin T7 KNLRIIRKTIHIKKYG (SEQ ID NO:52)、Novispirin KNLRIIRKTIHIKKYG (SEQ ID NO:53)、PGG GLLRLRKKIGEIFKKYG (SEQ ID NO:54)、Protegrin-1 RGGRLCYCRRRFCVVCVGR* (SEQ ID NO:55)、K-1 GLGRVIGRLIKQIIWRR (SEQ ID NO:56)、K-2 VYRKRSILKIYAKLKGWH (SEQ ID NO:57)、K-7 NYRLVNAIFSKIFKKKFIKF (SEQ ID NO:58)、K-8KILKFLFKKVF (SEQ ID NO:59)、K-9FIRKFLKKWLL (SEQ ID NO:60)、K-10 KLFKFLRKHL (SEQ ID NO:61)、K-11KILKFLFKQVF (SEQ ID NO:62)、K-12KILKFLFKFVF (SEQ ID NO:63)、K-13 GILKFLTKVF (SEQ ID NO:64)、K-14LRKFLHKL (SEQ ID NO:65)、K-

15LRKNLRWLF (SEQ ID NO:66)、K-16FIRKFLQKLHL (SEQ ID NO:67)、K-17FTRKFLKFLHL (SEQ ID NO:68)、K-18 KKFKKFKVLKIL (SEQ ID NO:69)、K-19LLKLLKLKCLKF (SEQ ID NO:70)、K-20FLKFLKKFFKKLKY (SEQ ID NO:71)、K-21 GWLKMFKKIIGKFGKF (SEQ ID NO:72)、K-22 GIFKKFVKILYKVQKL (SEQ ID NO:73) 和B-33FKKFWKWFRRF (SEQ ID NO:107)。

[0117] 实施方案108:实施方案105的肽,其中所述肽与抗微生物肽连接,所述抗微生物肽包含选自以下的氨基酸序列或由选自以下的氨基酸序列组成:G2 KNLRRIIRKGIHIIKKY* (SEQ ID NO:2)、Novispirin G10 KNLRRIIRKGIHIIKKYG (SEQ ID NO:49)、Novispirin T10 KNLRRIIRKTIHIIKKYG (SEQ ID NO:50)、Novispirin G7 KNLRRIIRKGIHIIKKYG (SEQ ID NO:51)、Novispirin T7 KNLRRIIRKGIHIIKKYG (SEQ ID NO:52)、Novispirin KNLRRIIRKGIHIIKKYG (SEQ ID NO:53)、PGG GLLRRLRKKIGEIFKKYG (SEQ ID NO:54)、Protegrin-1 RGGRLCYCRRRFCVGVGR* (SEQ ID NO:55) 和B-33 FKKFWKWFRRF (SEQ ID NO:107)。

[0118] 实施方案109:实施方案105的肽,其中所述肽与抗微生物肽连接,所述抗微生物肽包含氨基酸序列KLFKFLRKHL (SEQ ID NO:226) 或FLKFLKKFFKKLK (SEQ ID NO:227) 或由这些氨基酸序列组成。

[0119] 实施方案110:实施方案105的肽,其中所述肽与抗微生物肽连接,所述抗微生物肽包含氨基酸序列KNLRRIIRKGIHIIKKY (SEQ ID NO: 2) 或由该氨基酸序列组成。

[0120] 实施方案111:实施方案105-110中任一项的肽,其中所述抗微生物肽为“L”肽。

[0121] 实施方案112:实施方案105-110中任一项的肽,其中所述抗微生物肽为“D”肽。

[0122] 实施方案113:实施方案105-110中任一项的肽,其中所述抗微生物肽为 β 肽。

[0123] 实施方案114:实施方案1-113中任一项的肽,其中所述靶向肽与所述效应物化学缀合。

[0124] 实施方案115:实施方案114的肽,其中所述靶向肽通过接头(linker) 与所述效应物化学缀合。

[0125] 实施方案116:实施方案115的肽,其中所述靶向肽通过包括聚乙二醇(PEG)的接头与所述效应物化学缀合。

[0126] 实施方案117:实施方案115的肽,其中所述靶向肽通过表5中的非肽接头与所述效应物化学缀合。

[0127] 实施方案118:实施方案1-113中任一项的肽,其中所述靶向肽与所述效应物直接连接(即没有接头)。

[0128] 实施方案119:实施方案1-113中任一项的肽,其中所述靶向肽通过肽键(peptide linkage) 与所述效应物连接。

[0129] 实施方案120:实施方案119的肽,其中所述效应物包括抗微生物肽,并且所述构建体为融合蛋白。

[0130] 实施方案121:实施方案109和120中任一项的肽,其中所述靶向肽通过肽接头与所述效应物连接,所述肽接头包含表5中的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

[0131] 实施方案122:实施方案121的肽,其中所述肽接头包含氨基酸序列GGG或由该序列组成。

[0132] 实施方案123:实施方案1-122中任一项的肽,其中所述肽未携带末端保护基团。

[0133] 实施方案124:实施方案1-122中任一项的肽,其中所述靶向肽或包含与所述效应物部分连接的所述靶向肽的构建体携带一个或多个保护基团。

[0134] 实施方案125:实施方案124的肽,其中所述一个或多个保护基团独立地选自:乙酰基、酰胺、3至20碳烷基、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(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)、2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-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)、苯甲酰基(Bz)、3-硝基-2-吡啶亚磺酰基(3-nitro-2-pyridinesulphenyl,Npys)、1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代亚环己基)乙基(1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexylidene)ethyl,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)、环己基氧基(cHexO)、叔丁氧基甲基(Bum)、叔丁氧基(tBuO)、叔丁基(tBu)和三氟乙酰基(TFA)。

[0135] 实施方案126:实施方案124的肽,其中所述靶向肽或与所述效应物部分连接的所述靶向肽在羧基末端和/或氨基末端包含保护基团。

[0136] 实施方案127:实施方案126的肽,其中所述羧基末端是酰胺化的。

[0137] 实施方案128:实施方案1-127中任一项的肽,其中将所述构建体用聚合物来官能化(functionalize)以增加血清半衰期。

[0138] 实施方案129:实施方案128的肽,其中所述聚合物包括聚乙二醇和/或纤维素或改性纤维素。

[0139] 实施方案130:长度范围为最长达100个氨基酸的抗微生物肽,其中所述肽包含选自以下的氨基酸序列或由选自以下的氨基酸序列组成:FIGAIARLLSKIFGKR(SEQ ID NO:228)、GIFSKLAGKKIKNLLISG(SEQ ID NO:229)、GIFSKLAGKKIKNLLISGLKG(SEQ ID NO:230)、GLFSKFVGKGIKNFLIKGVK(SEQ ID NO:231)、KAYSTPRCKGLFRALMCWL(SEQ ID NO:232)、KIFGAIWPLALGALKNLK(SEQ ID NO:233)、GWGSFFKKAHVKGKHAALTHYL(SEQ ID NO:234)、RGLRRLGRKIAHGKVKYK(SEQ ID NO:235)、RGLRRLGRKIAHGKVKYGPTVLRIRIIRAG(SEQ ID NO:236)、KIAHGKVKYKPTVLRIRIR(SEQ ID NO:237)、LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES(SEQ ID NO:238)、FLPLIGRVLSGIL(SEQ ID NO:239)、IGKFLKKAKKFGKAFVKILKK(SEQ ID NO:240)、GKFLKKAKKFGKAFVKIL(SEQ ID NO:241)、WFLKFLKKFFKKLKY(SEQ ID NO:242)、RGLRRLGRKIAHGKVKYK(SEQ ID NO:243)、LLGDFFRKSKEKI(SEQ ID NO:244)和ILRWPWWPWRK(SEQ ID NO:245)。

[0140] 实施方案131:实施方案130的抗微生物肽,其中所述肽包含氨基酸序列FIGAIARLLSKIFGKR(SEQ ID NO:228)或由该氨基酸序列组成。

[0141] 实施方案132:实施方案130的抗微生物肽,其中所述肽包含氨基酸序列或由该氨基酸序列组成。133:实施方案130的抗微生物肽,其中所述肽包含氨基酸序列或由该氨基酸序列组成。134:实施方案130的抗微生物肽,其中所述肽包含氨基酸序列或由该氨基酸序列组成。135:实施方案130的抗微生物肽,其中所述肽包含氨基酸序列或由该氨基酸序列组成。136:实施方案130的抗微生物肽,其中所述肽包含氨基酸序列或由该氨基酸序列组成。137:实施方案130的抗微生物肽,其中所述肽包含氨基酸序列或由该氨基酸序列组成。138:

实施方案130的抗微生物肽,其中所述肽包含氨基酸序列或由该氨基酸序列组成。139:实施方案130的抗微生物肽,其中所述肽包含氨基酸序列或由该氨基酸序列组成。140:实施方案130的抗微生物肽,其中所述肽包含氨基酸序列或由该氨基酸序列组成。141:实施方案130的抗微生物肽,其中所述肽包含氨基酸序列或由该氨基酸序列组成。142:实施方案130的抗微生物肽,其中所述肽包含氨基酸序列或由该氨基酸序列组成。143:实施方案130的抗微生物肽,其中所述肽包含氨基酸序列或由该氨基酸序列组成。144:实施方案130的抗微生物肽,其中所述肽包含氨基酸序列 GKFLKKAKKFGKAFVKIL (SEQ ID NO:241) 或由该氨基酸序列组成。

[0142] 实施方案145:实施方案130的抗微生物肽,其中所述肽包含氨基酸序列 WFLKFLKKFFKCLKY (SEQ ID NO:242) 或由该氨基酸序列组成。

[0143] 实施方案146:实施方案130的抗微生物肽,其中所述肽包含氨基酸序列 RGLRRLGRKIAHGKVKY (SEQ ID NO:243) 或由该氨基酸序列组成。

[0144] 实施方案147:实施方案130的抗微生物肽,其中所述肽包含氨基酸序列 LLGDFFRKSKEKI (SEQ ID NO:244) 或由该氨基酸序列组成。

[0145] 实施方案148:实施方案130的抗微生物肽,其中所述肽包含氨基酸序列 ILRWPWWPWRK (SEQ ID NO:245) 或由该氨基酸序列组成。

[0146] 实施方案149:实施方案130-148中任一项的抗微生物肽,其中所述肽的长度范围为最多达50个氨基酸,或最多达40个氨基酸。

[0147] 实施方案150:实施方案130-149中任一项的抗微生物肽,其中所述肽包含所述氨基酸序列。

[0148] 实施方案151:实施方案130-149中任一项的抗微生物肽,其中所述肽由所述氨基酸序列组成。

[0149] 实施方案152:实施方案130-151中任一项的抗微生物肽,其中所述抗微生物肽携带一个或多个保护基团。

[0150] 实施方案153:实施方案152的抗微生物肽,其中所述一个或多个保护基团独立地选自:乙酰基、酰胺、3至20碳烷基、Fmoc、Tboc、9-苄乙酰基、1-苄羧基、9-苄羧基、9-苄酮-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)、2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-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)、苯甲酰基 (Bz)、3-硝基-2-吡啶亚磺酰基 (Npys)、1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代亚环己基) 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)、叔丁氧基羰基 (Boc)、环己基氧基 (cHxO)、叔丁氧基甲基 (Bum)、叔丁氧基 (tBuO)、叔丁基 (tBu) 和三氟乙酰基 (TFA)。

[0151] 实施方案154:实施方案152的抗微生物肽,其中所述抗微生物肽在羧基末端和/或氨基末端包含保护基团。

[0152] 实施方案155:实施方案154的抗微生物肽,其中所述肽的羧基末端是酰胺化的。

[0153] 实施方案156:实施方案130-155中任一项的抗微生物肽,其中将所述肽用聚合物官能化以增加血清半衰期。

[0154] 实施方案157:实施方案156的抗微生物肽,其中所述聚合物包括聚乙二醇和/或纤维素或改性纤维素。

[0155] 实施方案158:实施方案130-157中任一项的抗微生物肽,其中所述肽与实施方案1-103中任一项的靶向肽连接。

[0156] 实施方案159:一种药物组合物,其在可药用载体中包括实施方案 1-158中任一项的肽。

[0157] 实施方案160:实施方案159的组合物,其中所述组合物被配制为单位剂量制剂。

[0158] 实施方案161:实施方案159的组合物,其中所述组合物被配制用于通过选自以下的方式给药:腹膜内给药、局部给药、口服给药、吸入给药、透皮给药、皮下储库(depot)给药和直肠给药。

[0159] 实施方案162:灭杀细菌或抑制细菌的生长或繁殖的方法,所述方法包括:将所述细菌或包含所述细菌的生物膜与包括实施方案1-103中任一项的靶向肽的组合物接触,所述靶向肽与抗微生物肽和/或抗生素和/或卟啉或其他光敏剂连接;和/或将所述细菌或包含所述细菌的生物膜与包括实施方案130-157中任一项的抗微生物肽的组合物接触。

[0160] 实施方案163:在哺乳动物中减少或预防龋齿形成和/或牙周病的发病率或严重性的方法,所述方法包括:向所述哺乳动物的口腔给予包括实施方案1-103中任一项的靶向肽的组合物,所述靶向肽与抗微生物肽和/或抗生素和/或卟啉或其他光敏剂连接;和/或向所述哺乳动物的口腔给予包括实施方案130-156中任一项的抗微生物肽的组合物。

[0161] 实施方案164:实施方案162-163中任一项的方法,其中所述细菌或生物膜在人中和/或所述口腔是人的口腔。

[0162] 实施方案165:实施方案164的方法,其中所述细菌或生物膜在人的口腔中。

[0163] 实施方案166:实施方案162-165中任一项的方法,其中所述接触或给药至口腔包括使牙齿和/或牙龈与所述组合物接触。

[0164] 实施方案167:实施方案162-166中任一项的方法,其中所述组合物包括实施方案130-157中任一项的抗微生物肽。

[0165] 实施方案168:实施方案162-166中任一项的方法,其中所述组合物包括实施方案1-103中任一项的靶向肽,所述靶向肽与抗微生物肽连接。

[0166] 实施方案169:实施方案168的方法,其中所述靶向肽与抗微生物肽连接,所述抗微生物肽包含表4中的氨基酸序列或由表4中的氨基酸氨基酸序列组成。

[0167] 实施方案170:实施方案168的方法,其中所述靶向肽与抗微生物肽连接,所述抗微生物肽包含选自以下的氨基酸序列或由选自以下的氨基酸序列组成:
G2KNLRIIRKGIHIKKY*(SEQ ID NO:2)、Novispirin G10KNLRRRIIRKGIHIKKYG (SEQ ID NO:49)、Novispirin T10 KNLRRRIIRKTIHIKKYG (SEQ ID NO:50)、Novispirin G7 KNLRRIGRKIIHIKKYG (SEQ ID NO:51)、Novispirin T7 KNLRRITRKIIHIKKYG (SEQ ID NO:52)、Ovispirin KNLRRRIIRKIIHIKKYG (SEQ ID NO:53)、PGG GLLRRLRKKIGEIFKKYG (SEQ ID NO:54)、Protegrin-1 RGGRLCYCRRRFCVCVGR*(SEQ ID NO:55)、K-1 GLGRVIGRLIKQIIWRR (SEQ ID NO:56)、K-2 VYRKRKSILKIYAKLKGWH (SEQ ID NO:57)、K-7 NYRLVNAIFSKIFKKKFIKF (SEQ ID NO:58)、K-8KILKFLFKKVF (SEQ ID NO:59)、K-9FIRKFLKKWLL (SEQ ID NO:60)、K-10 KLFKFLRKHLL (SEQ ID NO:61)、K-11KILKFLFKQVF (SEQ ID NO:62)、K-12KILKKLKFVVF

(SEQ ID NO:63)、K-13 GILKKLFTKVF (SEQ ID NO:64)、K-14LRKFLHKLF (SEQ ID NO: 65)、K-15LRKNLRWLF (SEQ ID NO:66)、K-16FIRKFLQKLHL (SEQ ID NO:67)、K-17FTRKFLKFLHL (SEQ ID NO:68)、K-18 KKFKKFKVLKIL (SEQ ID NO:69)、K-19LLKLLKLLKKLF (SEQ ID NO:70)、K-20FLKFLKKFFKKLKY (SEQ ID NO:71)、K-21 GWLKMFKKIIGKFGKF (SEQ ID NO:72)、K-22 GIFKKFVKILYKVQKL (SEQ ID NO:73) 和B-33FKKFWKWFRRF (SEQ ID NO:107)。

[0168] 实施方案171:实施方案168的方法,其中所述靶向肽与抗微生物肽连接,所述抗微生物肽包含选自以下的氨基酸序列或由选自以下的氨基酸序列组成:G2KNLRIIRKGIHIIKKY* (SEQ ID NO:2)、Novispirin G10 KNLRRRIIRKGIHIIKKYG (SEQ ID NO:49)、Novispirin T10 KNLRRRIIRKTIHIIKKYG (SEQ ID NO:50)、Novispirin G7 KNLRRIGRKIIHIIKKYG (SEQ ID NO:51)、Novispirin T7 KNLRRITRKIIHIIKKYG (SEQ ID NO:52)、Ovispirin KNLRRRIIRKIIHIIKKYG (SEQ ID NO:53)、PGG GLLRRLRKKIGEIFKKYG (SEQ ID NO:54)、Protegrin-1 RGGRLCYCRRRFCVCVGR* (SEQ ID NO:55) 和B-33 FKKFWKWFRRF (SEQ ID NO:107)。

[0169] 实施方案172:实施方案168的方法,其中所述靶向肽与抗微生物肽连接,所述抗微生物肽包含氨基酸序列KLFKFLRKHL (SEQ ID NO: 226) 或FLKFLKKFFKKLK (SEQ ID NO:227) 或由所述氨基酸序列组成。

[0170] 实施方案173:实施方案168的方法,其中所述肽连接至抗微生物肽,所述抗微生物肽包含氨基酸序列KNLRIIRKGIHIIKKY (SEQ ID NO: 2) 或由该序列组成。

[0171] 实施方案174:实施方案162-173中任一项的方法,其中所述肽通过肽接头与所述抗微生物肽连接,所述肽接头包含表5中的氨基酸序列或由表5中的氨基酸序列组成。

[0172] 实施方案175:实施方案174的方法,其中所述肽接头包含氨基酸序列GGG或由该氨基酸序列组成。

[0173] 实施方案176:实施方案162的方法,其中所述靶向肽与抗微生物肽连接,所述抗微生物肽包含氨基酸序列KNLRIIRKGIHIIKKY (SEQ ID NO:2) 或由该序列组成。

[0174] 实施方案177:检测细菌和/或细菌膜的方法,所述方法包括:使所述细菌或细菌膜与包括实施方案1-103中任一项的靶向肽的组合物接触,所述靶向肽与可检测标记物连接;以及检测所述可检测标记物,其中所述可检测标记物的数量和/或位置是所述细菌和/或细菌膜的存在情况的指标(indicator)。

[0175] 实施方案178:实施方案177的方法,其中所述可检测标记物是选自以下的标记物:放射性标记物、不透射线标记物、荧光染料、荧光蛋白、酶标记物、比色标记物(colorimetric label)和量子点。

[0176] 实施方案179:包括实施方案1-103中任一项的靶向肽的组合物,所述靶向肽与光敏剂连接。

[0177] 实施方案180:实施方案179的组合物,其中所述光敏剂是选自以下的试剂:卟啉大环、卟啉、氯、冠醚、吡啶、吡嗪、酞菁(phthalocyanine)、青色素(cyanine)、姜黄素(cucumin)、补骨脂素(psoralen)和花醌(perylenequinonoid)。

[0178] 实施方案181:实施方案179的组合物,其中所述光敏剂是图1-12 中任一个所示的试剂。

[0179] 实施方案182:实施方案179的组合物,其中所述光敏剂通过非肽接头与所述靶向

肽连接。

[0180] 实施方案183:实施方案179的组合物,其中所述光敏剂通过包括聚乙二醇(PEG)的接头与所述靶向肽连接。

[0181] 实施方案184:实施方案179的组合物,其中所述光敏剂通过表5 中的非肽接头与所述靶向肽连接。

[0182] 实施方案185:抑制微生物或生物膜的生长或繁殖的方法,所述方法包括使所述微生物或生物膜与实施方案178-184中任一项的组合物接触。

[0183] 实施方案186:在哺乳动物中减少或预防龋齿形成和/或牙周病的发病率或严重性的方法,所述方法包括向所述哺乳动物的口腔给予实施方案178-184中任一项的组合物。

[0184] 实施方案187:实施方案185-186中任一项的方法,所述方法还包括将所述微生物和/或生物膜和/或组合物暴露于光源。

[0185] 实施方案188:实施方案185的方法,其中所述微生物是选自以下的微生物:细菌、酵母、真菌、原生动物和病毒。

[0186] 实施方案189:实施方案185的方法,其中所述生物膜包括细菌膜。

[0187] 实施方案190:实施方案185的方法,其中所述生物膜是植入的或可植入的医疗设备上的生物膜。

[0188] 实施方案191:实施方案185的方法,其中所述微生物或生物膜是口腔中的生物体或生物膜。

[0189] 定义

[0190] 本文使用的术语“肽”指长度范围通常为2至约30、或至约40、或至约50、或至约60、或至约70个残基的氨基酸残基的聚合物。在某些实施方案中,所述肽的长度范围为约2、3、4、5、7、9、10或11个残基至约60、50、45、40、45、30、25、20或15个残基。在某些实施方案中,所述肽的长度范围为约8、9、10、11或12个残基至约15、20或 25个残基。在某些实施方案中,包含在所述肽中的氨基酸残基是“L型”氨基酸残基,然而,认为在多个实施方案中,“D”氨基酸可以被掺入所述肽中。肽也包括这样的氨基酸聚合物,即其中一个或多个氨基酸残基为对应的天然氨基酸的人工化学类似物,以及天然氨基酸聚合物。此外,所述术语适用于通过肽键或通过其他“修饰的键”连接的氨基酸(例如,其中肽键被 α -酯、 β -酯、硫代酰胺、磷酰胺、氨基甲酸酯、羟基化物等替换(参见,例如,Spatola, (1983) Chem. Biochem. Amino Acids and Proteins 7:267-357),其中酰胺被饱和胺替换(参见,例如,Skiles et al., 美国专利第4,496,542号,其以引用的方式纳入本文,以及Kaltenbronn et al., (1990) Pp.969-970 in Proc. 11th American Peptide Symposium, ESCOM Science Publishers, 荷兰等))。

[0191] 本文使用的术语“残基”指天然、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、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、正乙基甘氨酸、正乙基天冬酰胺、羟赖氨酸、别-羟赖氨酸、3-羟基脯氨酸、4-羟基脯氨酸、异锁链素、别-异亮氨酸、正甲基甘氨酸、肌氨酸、正甲基异亮氨酸、6-正甲基赖氨酸、正甲基缬氨酸、正缬氨酸、正亮氨酸、鸟氨酸等。这些修饰的氨基酸是示例性的,不意为限制性的。

[0192] “ β -肽”包括“ β 氨基酸”，其氨基连接至 β 碳，而不是如20种标准生物氨基酸中那样连接至 α 碳。通常唯一天然存在的 β 氨基酸是 β -丙氨酸。

[0193] 类肽或N取代的甘氨酸是肽模拟物的特殊亚类。它们与其天然肽对应物紧密相关，但化学上的差异在于它们的侧链连接于分子主链上的氮原子而非(如在天然氨基酸中的那样)连接于 α -碳。

[0194] 应用于本文的肽的术语“常规的”和“天然的”指仅由天然存在的氨基酸Ala、Cys、Asp、Glu、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp和Tyr构建的肽。如果本发明的化合物引发与天然存在的肽的生物活性和/或特异性相关的生物活性(例如抗微生物活性)，则本发明的化合物“相当于”天然肽。所引发的活性可以与天然肽的活性相同，大于或小于天然肽的活性。通常，这样的类肽将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替换(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来的氨基酸的话)。以下是示例性而非限制性的N取代的甘氨酸替换：N-(1-甲基丙-1-基)甘氨酸替换异亮氨酸(Ile)、N-(丙-2-基)甘氨酸替换缬氨酸(Val)、N-苄基甘氨酸替换苯丙氨酸(Phe)、N-(2-羟乙基)甘氨酸替换丝氨酸(Ser)等。在某些实施方案中，取代不需要“精确”。因此，例如，在某些实施方案中，N-(2-羟乙基)甘氨酸可替换Ser、Thr、Cys和/或Met；N-(2-甲基丙-1-基)甘氨酸可替换Val、Leu和/或Ile。在某些实施方案中，N-(2-羟乙基)甘氨酸可用于替换Thr和Ser，尽管存在结构差异：N-(2-羟乙基)甘氨酸的侧链是一个比Ser的侧链更大的亚甲基，并且羟基取代位置不同于Thr。通常，可使用N-羟基烷基取代的甘氨酸替换任何极性氨基酸，使用N-苄基取代的或N-芳烷基取代的甘氨酸替换任何芳族氨基酸(例如，Phe、Trp等)，使用N-烷基取代的甘氨酸例如N-丁基甘氨酸替换任何非极性氨基酸(例如，Leu、Val、Ile等)，以及使用N-(氨基烷基)甘氨酸衍生物替换任何碱性极性氨基酸(例如，Lys和Arg)。

[0195] 当本文提供了氨基酸序列时，也考虑到了所述序列的L-、D-或 β 氨基酸版本，以及逆序(retro)、反向(inversion)和逆序-反向同工型。此外，考虑到了保守性置换(例如，在结合肽和/或抗微生物肽和/或接头肽中)。也考虑到了包含非蛋白主链，例如PEG、烷烃、乙烯桥、酯主链以及其他主链。也考虑到了肽的片段，其长度范围为约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个氨基酸，最长至所述肽的全长减去一个氨基酸，其中所述片段保留全长肽的至少50%，优选至少60%、70%或80%，更优选至少90%、95%、98%、99%或至少100%的活性(例如，结合特异性和/或亲合力、抗微生物活性等)。

[0196] 在某些实施方案中，考虑到了本文所述的任何序列中包含的氨基酸的保守性置换。在各个实施方案中，置换了1、2、3、4或5个不同的残基。术语“保守性置换”用于反映基本上不改变分子活性(例如，抗微生物活性和/或特异性)的氨基酸置换。通常，保守性氨基酸置换包括用一个氨基酸置换另一个具有类似化学性质(例如电荷或疏水性)的氨基酸。某些保守性置换包括“类似物置换”，其中标准氨基酸被与亲本残基差异最小的非标准(例如稀有的、合成的等)氨基酸替换。氨基酸类似物被认为通过合成方法衍生自标准氨基酸，而未对亲本的结构进行充分的变化，其是异构体或代谢物前体。这样的“类似物置换”的实例包括但不限于1) Lys-Orn、2) Leu-正亮氨酸、3) Lys-Lys[TFA]、4) Phe-Phe[Gly]和5) δ -氨基酸丁基甘氨酸- ξ -氨基酸己基甘氨酸，其中 Phe[gly]指苯基甘氨酸(一种Phe衍生物，其在R基团中具有H而不是CH₃组分)，Lys[TFA]指其中带负电的离子(例如TFA)连接至胺R基团的

Lys。其他保守性置换包括“功能性置换”，其中两个残基的总体化学性质是相似的，并且能够足以模拟或部分恢复天然肽的功能。强的功能性置换包括但不限于1) Gly/Ala、2) Arg/Lys、3) Ser/Tyr/Thr、4) Leu/Ile/Val、5) Asp/Glu、6) Gln/Asn和7) Phe/Trp/Tyr，而其他功能性置换包括但不限于8) Gly/Ala/Pro、9) Tyr/His、10) Arg/Lys/His、11) Ser/Thr/Cys、12) Leu/Ile/Val/Met和13) Met/Lys (在疏水条件下的特殊情况)。各种“广义的保守性置换”包括氨基酸替换来自相同生物化学或生物物理学分组的其他氨基酸的置换。这在碱性水平是类似的并且源自对最初的20种天然氨基酸进行分类的尝试。这样的置换包括1) 非极性侧链：Gly/Ala/Val/Leu/Ile/Met/Pro/Phe/Trp，和/或2) 不带电的极性侧链Ser/Thr/Asn/Gln/Tyr/Cys。在某些实施方案中，广义水平的置换也以成对置换的形式发生。例如，任何疏水中性对[Ser、Thr、Gln、Asn、Tyr、Cys]+[Ser、Thr、Gln、Asn、Tyr、Cys]可被带电-中性带电对[Arg、Lys、His]+[Asp、Glu]替换。在某些实施方案中，以下六组均包含彼此为典型保守性置换的氨基酸：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)。当本文公开氨基酸序列时，也考虑到了包含一个或多个上文鉴定的保守性置换的氨基酸序列。

[0197] 在某些实施方案中，也考虑到了与本文所述任何序列具有至少80%，优选至少85%或90%，更优选至少95%或98%的序列同一性的靶向肽、抗微生物肽和/或STAMP。术语“相同的”或百分数“同一性”指使用以下序列对比算法之一或通过目测所测量的，对两个或多个序列的最大对应性进行比较和比对时，所述两个或多个序列相同或具有特定百分数的相同氨基酸残基。对于本发明的肽，在所述肽的全长上确定序列同一性。对于序列比较，通常将一个序列作为参照序列，将测试序列与其进行比较。当使用序列比较算法时，将测试和参照序列输入计算机，如果必要则指定子序列坐标(coordinate)，并且指定序列算法程序参数。然后，所述序列比较算法基于指定的程序参数计算测试序列相对于参照序列的序列同一性百分数。可进行最佳序列比对以进行比较，例如通过 Smith&Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482的局部同源性算法，通过Needleman&Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443的同源性比对算法，通过Pearson&Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85:2444的检索相似性方法，通过这些算法的计算机化执行 (Wisconsin Genetics 软件包 (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) 中的 GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA)，或通过目测。

[0198] 术语“特异性”在用于肽的抗微生物活性时表示，与其他相关和/或不相关的微生物相比，所述肽优先地抑制特定微生物物种的生长和/或繁殖和/或灭杀特定微生物物种。在某些实施方案中，所述优先抑制或灭杀是对靶物种至少大10% (例如，LD₅₀低于10%)，优选地至少20%、30%、40%或50%，更优选地至少大2倍、至少5倍或至少10倍。

[0199] 如本文所使用，病症的“治疗”可以指预防所述病症、减慢所述病症的发生或发展速率、降低发生所述病症的风险、预防或延迟与所述病症相关的症状的发展，减轻或终止与所述病症相关的症状，产生所述病症的完全或部分消退，或它们的某些组合。

[0200] 当用于本文所述的抗微生物肽 (AMP) 或AMP基序时，术语“基本上由……组成”表示文库中涵盖的肽或其变体、类似物或衍生物具有与参照肽基本上相同或更大的抗微生物活性和/或特异性。在某些实施方案中，基本上相同或更大的抗微生物活性表示参照肽针对特

定的细菌物种(例如变形链球菌)的抗微生物活性的至少80%,优选地至少90%,更优选地至少95%。

[0201] 术语“STAMP”指特异性靶向的抗微生物肽。在各个实施方案中, STAMP包括与一种或多种抗微生物部分(例如,抗微生物肽(AMP)) 连接的一种或多种靶向肽。MH-STAMP是携带两个或多个靶向结构域的STAMP(即多头STAMP(multi-headed STAMP))。

[0202] 术语“分离的”、“纯化的”或“生物纯的”指实质上或基本上不含在其天然状态下通常与之伴随的组分的物质。在肽的情况下,分离的(天然存在的)肽通常基本上不含在细胞、组织或生物体中与其相关联的组分。术语“分离的”也表示所述肽不存在于噬菌体展示文库、酵母展示文库或其他肽文库中。

[0203] 在各个实施方案中,本文中使用表1中所示的氨基酸缩写。

[0204] 表1.氨基酸缩写

[0205]

名称	缩写	
	三字母	单字母
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

[0206]

谷氨酸	Glu	E
谷氨酰胺	Gln	Q
甘氨酸	Gly	G
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 ($\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_5\text{-COOH}$)	Ahx	J
4-氨基丁酸 ($\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-COOH}$)	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

附图说明

[0207] 图1示出了适合用作靶向部分和/或抗微生物效应物的一些示例性的卟啉(化合物92-99)。

[0208] 图2示出了适合用作靶向部分和/或抗微生物效应物的一些示例性的卟啉(化合物100-118)。

[0209] 图3示出了适合用作靶向部分和/或抗微生物效应物的一些示例性的卟啉(特别是酞菁)(化合物119-128)。

[0210] 图4举例说明了适合用作抗微生物效应物的两种酞菁—— Monoastral Fast Blue B和Monoastral Fast Blue G的结构。

[0211] 图5举例说明了适合用作本文所述的组合物和方法中的抗微生物效应物的某些吡啶光敏剂。

[0212] 图6示出了适合用作本文所述的组合物和方法中的抗微生物效应物的示例性青色素。

[0213] 图7示出了适合用作本文所述的组合物和方法中的抗微生物效应物的示例性补骨脂素(当归根素)光敏剂。

[0214] 图8示出了适合用作本文所述的组合物和方法中的抗微生物效应物的示例性金丝桃素(hypericin)和茈醌(perylenequinonoid)色素。

[0215] 图9示出了适合用作本文所述的组合物和方法中的抗微生物效应物的示例性吡啶类。

[0216] 图10举例说明了吡啶玫瑰红(Rose Bengal)的结构。

[0217] 图11举例说明了适合用作本文所述的组合物和方法中的抗微生物效应物的各种冠醚。

[0218] 图12举例说明了小茴香(cumin)的结构。

[0219] 图13举例说明了靶向的光激活的卟啉的实例,所述卟啉包含与靶向肽(SEQ ID NO:1)偶联的卟啉。

[0220] 图14图解示出了本文所述的嵌合构建体的一些示例性的构型。A:示出了通过接头/间隔基L与单一效应物E1连接的单一靶向肽T1,所述 L在某些实施方案中可被省略。B:示出了直接彼此连接并且通过接头L 与单一效应物E1连接的靶向肽T1、T2、T3。在各个实施方案中,T1、T2和T3可以是融合蛋白中的结构域。C:示出了通过接头L彼此连接并且通过接头L与单一效应物E1连接的多个靶向肽T1、T2、T3。在各个实施方案中,T1、T2和T3可以是融合蛋白中的结构域。D:示出了通过接头L与多个效应物E1、E2和E3连接的单一靶向肽T1,所述效应物E1、E2和E3彼此直接连结。E:示出了通过接头L与多个效应物 E1、E2和E3连接的单一靶向肽T1,所述效应物E1、E2和E3通过接头L彼此连结。F:示出了彼此直接连结并且通过接头L连结至多个效应物的多个靶向肽,所述多个效应物通过接头L彼此连结。G:示出了通过接头L彼此连结并且通过接头L连结至多个效应物的多个靶向肽,所述多个效应物通过接头L彼此连结。在各个实施方案中,T1、T2和 T3和/或E1、E2和E3可以是融合蛋白中的结构域。H:举例说明了其中多个靶向肽与单一效应物连接的分支构型。I:举例说明了其中多个靶向肽与多个效应物连接的双分支构型。J:举例说明了其中多个靶向肽与多个效应物连接的分支构型,其中所述效应物以线性构型彼此连结。在这些示例性而非限制性的实施方案的任一种中,可去除一个或多个接头,并且所述靶向肽可直接连接至一个或多个效应物。

具体实施方式

[0221] 在各个实施方案中,本申请提供了结合(例如优先地和/或特异性地结合)于微生物(例如细菌、真菌、酵母等)的靶向肽。一个或多个这样的靶向肽可与一个或多个“效应物部分”(例如,可检测标记物、卟啉或其他光敏剂、抗微生物肽、抗生素、配体、脂质或脂质体、在物理上破坏微生物群落内的胞外基质的试剂和聚合颗粒等)连接以提供能够将所述效应

物递送至靶标(例如细菌、包含细菌的生物膜等)的嵌合部分。在某些实施方案中,靶向肽(直接或通过接头)与抗微生物肽(AMP)连接,从而提供对所述抗微生物肽的特异性/选择性。这样的构建体可被命名为特异性靶向的抗微生物肽或“STAMP”。

[0222] 在各个实施方案中,靶向肽包括但不限于优先地结合特定微生物(例如变形链球菌)的肽。

[0223] 尤其结合变形链球菌的某些优选的靶向肽包含氨基酸序列 $X^1-X^2-F-R-X^5-X^6-X^7-R-X^9-X^{10}-X^{11}-X^{12}-X^{13}-X^{14}-X^{15}-X^{16}$ (SEQ ID NO:1) 或所述氨基酸序列的反向序列,或者由所述氨基酸序列或其反向序列组成,其中 X^1 为极性氨基酸或A; X^2 为F、W、Q、A或其类似物; X^5 为疏水氨基酸; X^6 为疏水氨基酸、N、Q或其类似物; X^7 为极性氨基酸、A、F或其类似物; X^9 为极性氨基酸、A或其类似物; X^{10} 为疏水氨基酸、Q、A或其类似物; X^{11} 为疏水氨基酸; X^{12} 为Q、A或其类似物; X^{13} 为非极性氨基酸; X^{14} 为疏水氨基酸; X^{15} 为非极性氨基酸、N、S、D或其类似物; X^{16} 为极性氨基酸、F、A或其类似物;并且所述肽的长度范围为最长达100个氨基酸。所述肽不包含C16的氨基酸序列(TFFRLFNRSFTQALGK (SEQ ID NO:2))或不由该序列组成。

[0224] 在某些实施方案中, X^1 是极性氨基酸或A,在某些实施方案中是A或T;和/或 X^2 是F、W、Q、A,在某些实施方案中是F;和/或 X^5 是疏水氨基酸,在某些实施方案中是L或A,在某些实施方案中是L;和/或 X^6 是疏水氨基酸、N或Q,在某些实施方案中是F、L、N、A或Q,在某些实施方案中是疏水氨基酸,在某些实施方案中是F;和/或 X^7 是极性氨基酸、A或F,在某些实施方案中是极性氨基酸或A,在某些实施方案中是N、A、S、D或F,在某些实施方案中是N或A,在某些实施方案中是N;和/或 X^9 是极性氨基酸或A,在某些实施方案中是S或A,在某些实施方案中优选S;和/或 X^{10} 是疏水氨基酸、Q或A,在某些实施方案中是疏水氨基酸,在某些实施方案中是F或L,在某些实施方案中是F; X^{11} 是疏水氨基酸,在某些实施方案中是T或A,在某些实施方案中是T;和/或 X^{12} 是Q或A,在某些实施方案中是Q;和/或 X^{13} 是非极性氨基酸,在某些实施方案中是P或A,在某些实施方案中优选A;和/或 X^{14} 是疏水氨基酸,在某些实施方案中是L或A,在某些实施方案中是L;和/或 X^{15} 是非极性氨基酸、N、S或D,在某些实施方案中是G、A、F、N、S或D,在某些实施方案中是G或A;和/或 X^{16} 是极性氨基酸、F或A,在某些实施方案中是极性氨基酸,在某些实施方案中是K或Q,在某些实施方案中是K。

[0225] 在某些实施方案中,所述靶向肽包含一个或多个表1中所示的氨基酸序列。

[0226] 表2. 变形链球菌靶向肽。示出了包含靶向肽的构建体的抗生物膜活性水平(%变形链球菌残余的存活力),所述靶向肽通过GGG接头与抗微生物肽(KNLRIIRKGIHIKKY (SEQ ID NO:3))连接。注意到包含相同抗微生物肽和GGG接头的C16G2构建体(TFFRLFNRSFTQALGK GGG KNLRIIRKGIHIKKY (NH2) (SEQ ID NO:4))在相同的测定法中显示出5-18%残余的活性。

[0227]	名称	氨基酸序列	SEQ ID NO	%残余的存活力
	C16AG2 (N7,L14)	AFFRAFNRAFAQALAK	5	16
	C16AG2 (T1)	TFRAFARAFAQAANK	6	18
	C16AG2 (L14)	AFFRAFARAFAQALAK	7	20

[0228]

C16AG2 (L5)	AFFRLFAFAFAQAAAK	8	21
F2F6F10-L2L6L10_C16G2	TLFRLNRSLTQALGK	9	26
G15-F15_C16G2	TFFRLFNRSFTQALFK	10	29
F10-L10_C16G2	TFFRLFNRSLTQALGK	11	30
G15-N15_C16G2	TFFRLFNRSFTQALNK	12	30
C16AG2	AFFRAFAFAFAQAAAK	13	30
C16AG2 (N7)	AFFRAFNRAFAQAAAK	14	34
G15-S15_C16G2	TFFRLFNRSFTQALSK	15	37
C16AG2 (S9)	AFFRAFARSFAQAAAK	16	38
C16AG2 (G15)	AFFRAFAFAFAQAAGK	17	38
C16AG2 (T11)	AFFRAFAFAFTQAAAK	18	39
K16-Q16_C16G2	TFFRLFNRSFTQALGQ	19	42
F6-L6_C16G2	TFFRLNRSFTQALGK	20	43
F2-W2_C16G2	TWFRLFNRSFTQALGK	21	45
C16AG2 (F14)	AFFRAFAFAFAQAFK	22	46
F2 to Q2_C16G2	TQFRLFNRSFTQALGK	23	47
G15-D15_C16G2	TFFRLFNRSFTQALDK	24	47
G15-A15_C16G2	TFFRLFNRSFTQALAK	25	47
K16-E16_C16G2	TFFRLFNRSFTQALGE	26	48
N7-S7_C16G2	TFFRLFSRSFTQALGK	27	50
K16-A16_C16G2	TFFRLFNRSFTQALGA	28	51
N7-D7_C16G2	TFFRLFDRSFTQALGK	29	52
K16-F16_C16G2	TFFRLFNRSFTQALGF	30	53
C16AG2 (T1,S9,T11)	TFFRAFARSFTQAAAK	31	56
C16AG2 (T1,L5,S9,T11,G15)	TFFRLFARSFTQAAGK	32	57
ΔA13_ΔG15_C16G2	TFFRLFNRSFTQ L K	33	57
K16-S16_C16G2	TFFRLFNRSFTQALGS	34	59
F2-L2_C16G2	TLFRLFNRSFTQALGK	35	63
N7-F6 / N21-I24	TFFRLNFRSFTQALGK	36	65
F10 to Q10_C16G2	TFFRLFNRSQTQALGK	37	73

[0229]	Scan-16	TFFRLFAAAFTQALGK	38	73
	Scan-24	TFFRLFNRSFTQALGK**	39	75
	Scan-17	TFFRLFNRSAAAALGK	40	76
	N7-F10 / N21-I32	TFFRLFFRSNTQALGK***	41	76
	Scan-22	TFFRLFNRSFTQPLGK	42	77
	F2/6/10-A2/6/10_C16G2	TAFRLANRSATQALGK	43	78
	Scan-18	TFFRLFNRSFTQAAAA	44	78
	F6 to Q6_C16G2	TFFRLQNRSTQALGK	45	79
	Scan-23	TFFRLFNRSFTQALPK	46	79
	TFF-TYY_C16G2	TYRRLFNRSFTQALGK	47	80
	ΔN7_C16G2	TFFRLFRSFTQALGK	48	84
	F7/11/15 sub Q_C16G2	TQFRLQNRSTQALGK	49	93

[0230] STAMP和其他嵌合构建体的设计和构建

[0231] 在各个实施方案中,本文所述的一种或多种靶向肽可与一种或多种效应物(例如,抗微生物肽、抗生素、配体、脂质或脂质体、在物理上破坏微生物群落内的胞外基质的试剂、可检测标记物、卟啉、光敏剂、表位标签等)连接以形成嵌合构建体。

[0232] 所述效应物包含这样的部分,即所述部分的活性通常被递送至靶微生物、包含靶微生物的生物膜、包含靶微生物的细胞或组织等。

[0233] 在某些实施方案中,一种或多种靶向肽与单一效应物连接。在某些实施方案中,一种或多种效应物与单一靶向肽连接。在某些实施方案中,多个靶向肽与多个效应物连接。所述靶向肽可直接或通过接头与效应物连接。当所述靶向肽和效应物包含肽时,嵌合部分可以是融合蛋白。

[0234] 靶向增强子/调理素

[0235] 在某些实施方案中,考虑到了包含靶向增强子(例如调理素)和一种或多种靶向肽的组合物。靶向增强子包括增强结合亲和力和/或结合特异性和/或靶细胞/微生物对部分的内化作用的部分。

[0236] 因此,在某些实施方案中,靶向肽和/或靶向抗微生物分子包括本文所述的靶向肽,其与调理素连接(例如缀合)。当通过靶向肽连接至靶细胞时,所述调理素成分通过定居巨噬细胞、树突细胞、单核细胞或PMN 促使吞噬作用和破坏。考虑到用于缀合的调理素可以是直接类型或间接类型。

[0237] 直接调理素包括,例如任何细菌表面抗原、PAMP(病原体相关的分子模式)或宿主PRR(病原体识别受体)识别的其他分子。调理素可包括但不限于细菌蛋白、脂质、核酸、碳水化合物和/或寡糖部分。

[0238] 在某些实施方案中,调理素包括但不限于N-乙酰-D-葡萄糖胺(GlcNAc)、N-乙酰-D-半乳糖胺(GalNAc)、含有N-乙酰葡萄糖胺的胞壁酰肽、NAG-胞壁酰肽、NAG-NAM、肽聚糖、磷壁酸、脂磷壁酸、LPS、o-抗原、甘露糖、岩藻糖、ManNAc、半乳糖、麦芽糖、葡萄糖、葡萄糖胺、蔗糖、甘露糖胺、半乳糖-α-1,3-半乳糖基-β-1,4-N-乙酰葡萄糖胺,或α-1,3-gal-gal,或其

他糖类。

[0239] 在某些实施方案中,调理素包括间接调理素。间接调理素通过与已经存在的直接调理素结合而发挥作用。例如,抗体的Fc部分、糖结合凝集素蛋白(例如MBL)或宿主补体因子(例如C3b、C4b、iC3b)。

[0240] 在某些实施方案中,调理素为半乳糖- α -1,3-半乳糖基- β -1,4-N-乙酰葡萄糖胺或 α -1,3-gal-gal。

[0241] 调理素分子的其他实例包括但不限于抗体(例如IgG和IgA)、补体系统的组分(例如,C3b、C4b和iC3b)、甘露糖结合凝集素(MBL)(引发C3b的形成)等。

[0242] 将调理素与靶向肽偶联的方法是本领域技术人员公知的(参见,例如,下文关于效应物与靶向肽的连接的讨论)。

[0243] 效应物

[0244] 多种效应物中的任一种均可与本文所述的靶向肽偶联以优先地将所述效应物递送至靶生物体和/或组织。示例性的效应物包括但不限于可检测标记物、小分子抗体、抗微生物肽、卟啉或其他光敏剂、用于预靶向方案的表位标签/抗体、在物理上破坏微生物群落内的胞外基质的试剂、微颗粒和/或微胶囊、纳米颗粒和/或纳米胶囊,“载体”赋形剂包括但不限于脂质、脂质体、树突状聚合物(dendrimer)、基于胆酸的肽模拟物或其他肽模拟物、甾族抗生素类等。

[0245] 可检测标记物

[0246] 在某些实施方案中,本申请提供了包含一种或多种靶向肽(例如表2中所述的)的嵌合部分,所述靶向肽直接或通过接头与可检测标记物连接。所述嵌合部分可有效地用于检测靶向肽所针对的微生物(例如变形链球菌)的存在和/或数量和/或位置。同样地,所述嵌合部分可用于鉴定被所靶向的微生物感染的细胞和/或组织和/或食品和/或其他组合物。

[0247] 适用于所述嵌合部分的可检测标记物包括可通过光谱、光化学、生物化学、免疫化学、电学、光学或化学手段检测的任何组合物。示例性的有用标记物包括但不限于,用于以经标记的链霉亲和素缀合物染色的生物素、用于以生物素缀合物荧光染料(例如,荧光素、德克萨斯红、罗丹明、绿色荧光蛋白等,参见例如Molecular Probes, Eugene, Oregon, 美国)标记的亲合素或链霉亲和素、放射性标记物(例如, ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{99}Tc 、 ^{203}Pb 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{72}As 、 ^{111}In 、 $^{113\text{m}}\text{In}$ 、 ^{97}Ru 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{52}Fe 、 $^{52\text{m}}\text{Mn}$ 、 ^{51}Cr 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{77}As 、 ^{90}Y 、 ^{67}Cu 、 ^{169}Er 、 ^{121}Sn 、 ^{127}Te 、 ^{142}Pr 、 ^{143}Pr 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 、 ^{161}Tb 、 ^{109}Pd 、 ^{165}Dy 、 ^{149}Pm 、 ^{151}Pm 、 ^{153}Sm 、 ^{157}Gd 、 ^{159}Gd 、 ^{166}Ho 、 ^{172}Tm 、 ^{169}Yb 、 ^{175}Yb 、 ^{177}Lu 、 ^{105}Rh 、 ^{111}Ag 等)、酶(例如,辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶和其他通常用于ELISA的酶)、各种比色标记物、磁性或顺磁性标记物(例如,磁性或顺磁性纳米颗粒)、自旋标记物(spin label)、不透射线标记物等。教导这些标记物的使用的专利包括,例如美国专利第3,817,837、3,850,752、3,939,350、3,996,345、4,277,437、4,275,149和4,366,241号。

[0248] 应当认识到,荧光标记物不限于单一种类的有机分子,而包括无机分子、有机和/或无机分子的多分子混合物、晶体、杂聚物等。因此,例如,可容易地将包封在二氧化硅壳体中的CdSe-CdS核壳纳米晶体衍生化以与生物分子偶联(Bruchez et al. (1998) Science, 281:2013-2016)。类似地,使高荧光量子点(硫化锌加帽(capped)的硒化镉)与生物分子共

价偶联以用于超灵敏的生物检测 (Warren and Nie (1998) Science, 281:2016-2018)。

[0249] 在各个实施方案中,通过具有不成对电子自旋的报告分子来提供自旋标记物,其可通过电子自旋共振 (ESR) 光谱检测。示例性的自旋标记物包括有机自由基、过渡金属复合物 (特别是钒、铜、铁和锰) 等。示例性的自旋标记物包括例如氮氧自由基。

[0250] 检测此类标记物的手段是本领域技术人员公知的。因此,例如,当标记物是放射性标记物时,检测手段包括如放射自显影术中的闪烁计数器或摄影胶片。当标记物是荧光标记物时,可通过用适当波长的光激发荧光染料并检测产生的荧光来检测荧光标记物,例如通过显微术、目测、通过摄影胶片、通过使用电子检测器 (如电荷偶联装置 (CCD) 或光电倍增管) 等。类似地,可通过提供酶的适当底物并检测产生的反应产物来检测酶标记物。最后,可通过观察与标记物相关的颜色来检测简单的比色标记物。

[0251] 抗生素

[0252] 在某些实施方案中,本申请提供了包含一种或多种靶向肽 (例如表 2 中所述的) 的嵌合部分,所述靶向肽直接或通过接头与小分子抗生素和/或与包含小分子抗生素的载体 (例如脂质或脂质体、聚合物等) 连接。示例性的抗生素如表 3 中所示。

[0253] 表 3. 用于本文所述的嵌合部分的示例性抗生素

[0254]

类别	一般名称	商品名
氨基糖苷类		
	阿米卡星 (Amikacin)	AMIKIN®
	庆大霉素 (Gentamicin)	GARAMYCIN®
	卡那霉素 (Kanamycin)	KANTREX®
	新霉素 (Neomycin)	
	奈替米星 (Netilmicin)	NETROMYCIN®
	链霉素 (Streptomycin)	
	妥布霉素 (Tobramycin)	NEBCIN®
	巴龙霉素 (Paromomycin)	HUMATIN®
碳头孢烯类		
	氯碳头孢 (Loracarbef)	LORABID®
碳青霉烯类		
	厄他培南 (Ertapenem)	INVANZ®
	多立培南 (Doripenem)	FINIBAX®
	亚胺培南/西司他丁 (Imipenem/Cilastatin)	PRIMAXIN®
	美罗培南 (Meropenem)	MERREM®
头孢菌素类 (第一代)		
	头孢羟氨苄 (Cefadroxil)	DURICEF®

[0255]

	头孢唑林 (Cefazolin)	ANCEF®
	头孢噻吩 (Cefalotin或Cefalothin)	KEFLIN®
	头孢氨苄 (Cefalexin)	KEFLEX®
头孢菌素类 (第二代)		
	头孢克洛 (Cefaclor)	CECLOR®
	头孢孟多 (Cefamandole)	MANDOLE®
	头孢西丁 (Cefoxitin)	MEFOXIN®
	头孢丙烯 (Cefprozil)	CEFZIL®
	头孢呋辛 (Cefuroxime)	CEFTIN,ZINNAT®
头孢菌素类 (第三代)		
	头孢克肟 (Cefixime)	SUPRAX®
	头孢地尼 (Cefdinir)	OMNICEF®
	头孢托仑 (Cefditoren)	SPECTRACEF®
	头孢哌酮 (Cefoperazone)	CEFOBID®
	头孢噻肟 (Cefotaxime)	CLAFORAN®
	头孢泊肟 (Cefpodoxime)	
	头孢他啶 (Ceftazidime)	FORTAZ®
	头孢布烯 (Ceftibuten)	CEDAX®
	头孢唑肟 (Ceftizoxime)	
	头孢曲松 (Ceftriaxone)	ROCEPHIN®
头孢菌素类 (第四代)		
	头孢吡肟 (Cefepime)	MAXIPIME®
头孢菌素类 (第五代)		
	头孢比普 (Ceftobiprole)	
糖肽类		
	替考拉宁 (Teicoplanin)	
	万古霉素 (Vancomycin)	VANCOCIN®
	达巴凡星 (Dalbavancin)	
大环内酯类		
阿奇霉素 (Azithromycin)	希舒美 (Zithromax)	

[0256]

克拉霉素 (Clarithromycin)	克拉霉素 (Biaxin)	
地红霉素 (Dirithromycin)		
红霉素 (Erythromycin)	红霉素 (Erythocin)，乙琥红霉素 (Erythroped)	
罗红霉素 (Roxithromycin)		
醋竹桃霉素 (Troleandomycin)		
泰利霉素 (Telithromycin)	Ketek	
单酰胺菌素类		
	氮曲南 (Aztreonam)	
青霉素类		
	阿莫西林 (Amoxicillin)	NOVAMOX®, AMOXIL®
	氨苄西林 (Ampicillin)	
	阿洛西林 (Azlocillin)	
	羧苄西林 (Carbenicillin)	
	氯唑西林 (Cloxacillin)	
	双氯西林 (Dicloxacillin)	
	氟氯西林 (Flucloxacillin)	FLOXAPEN®
	美洛西林 (Mezlocillin)	
	甲氧西林 (Meticillin)	
	萘夫西林 (Nafcillin)	
	苯唑西林 (Oxacillin)	
	青霉素 (Penicillin)	
	哌拉西林 (Piperacillin)	
	替卡西林 (Ticarcillin)	
多肽类		

[0257]

	杆菌肽 (Bacitracin)	
	粘菌素 (Colistin)	
	多粘菌素 B (Polymyxin B)	
喹诺酮类		
	磺胺米隆 (Mafenide)	
	百浪多息 (Prontosil) (不再使用)	
	磺胺醋酰 (Sulfacetamide)	
	磺胺甲二唑 (Sulfamethizole)	
	磺胺 (Sulfanilimide) (不再使用)	
	柳氮磺吡啶 (Sulfasalazine)	
	磺胺异噁唑 (Sulfisoxazole)	
	甲氧苄啶 (Trimethoprim) 甲氧苄啶-磺胺甲噁唑 (复方新诺明) (TMP-SMX)	BACTRIM®
四环素类		
	地美环素 (Demeclocycline)	
	多西环素 (Doxycycline)	VIBRAMYCIN®
	米诺环素 (Minocycline)	MINOCIN®
	土霉素 (Oxytetracycline)	TERRACIN®
	四环素 (Tetracycline)	SUMYCIN®
天然产物		
	抗微生物草本提取物	
	精油 (Essential oil)	
	法尼醇 (Farnesol)	
	甘草提取物	
	Glycyrrhizol A	
	Glycyrrhizol B	
	6,8-二异戊二烯基-5,7,4'-三羟基异黄酮	
其他		
	肿凡纳明 (Arsphenamine)	SALVARSAN®

[0258]

	氯霉素 (Chloramphenicol)	CHLOROMYCETIN®
	克林霉素 (Clindamycin)	CLEOCIN®
	林可霉素 (Lincomycin)	
	乙胺丁醇 (Ethambutol)	
	磷霉素 (Fosfomycin)	
	梭链孢酸 (Fusidic acid)	FUCIDIN®
	呋喃唑酮 (Furazolidone)	
	异烟肼 (Isoniazid)	
	利奈唑胺 (Linezolid)	ZYVOX®
	特地唑胺 (Tedizolid)	
	甲硝唑 (Metronidazole)	FLAGYL®
	莫匹罗星 (Mupirocin)	BACTROBAN®
	呋喃妥因 (Nitrofurantoin)	MACRODANTIN®, MACROBID®
	平板霉素 (Platensimycin)	
	吡嗪酰胺 (Pyrazinamide)	
	奎奴普丁/达福普汀 (Quinupristin/Dalfopristin)	SYNCERCID®
	利福平 (Rifampin 或 Rifampicin)	
	替硝唑 (Tinidazole)	
	青蒿素 (Artemisinin)	
	非达米星 (Fidaxomicin)	
抗真菌类		
	两性霉素 B (Amphotericin B)	
	阿尼芬净 (Anidulafungin)	
	乙酸卡泊芬净 (Caspofungin acetate)	
	克霉唑 (Clotrimazole)	
	氟康唑 (Fluconazole)	
	氟胞嘧啶 (Flucytosine)	
	灰黄霉素 (Griseofulvin)	
	伊曲康唑 (Itraconazole)	

[0259]

	酮康唑 (Ketoconazole)	
	米卡芬净 (Micafungin)	
	咪康唑 (Miconazole)	
	制霉菌素 (Nystatin)	
	喷他脒 (Pentamidine)	
	泊沙康唑 (Posaconazole)	
	特比萘芬 (Terbinafine)	
	伏立康唑 (Voriconazole)	
抗霉菌类 (antimycobiotic)		
	对氨基水杨酸 (Aminosalicylic Acid)	
	卷曲霉素 (Capreomycin)	
	氯法齐明 (Clofazimine)	
	环丝氨酸 (Cycloserine)	
	乙硫异烟胺 (Ethionamide)	
	利福布汀 (Rifabutin)	
	利福喷汀 (Rifapentine)	
抗病毒类		
	阿巴卡韦 (Abacavir)	
	阿昔洛韦 (Acyclovir)	
	阿德福韦 (Adefovir)	
	金刚烷胺 (Amantadine)	
	阿扎那韦 (Atazanavir)	
	西多福韦 (Cidofovir)	
	达芦那韦 (Darunavir)	
	去羟肌苷 (Didanosine)	
	二十二醇 (Docosanol)	
	依法韦仑 (Efavirenz)	
	恩曲他滨 (Emtricitabine)	
	恩夫韦肽 (Enfuvirtide)	
	恩替卡韦 (Entecavir)	

[0260]

	伊曲韦林 (Etravirine)	
	泛昔洛韦 (Famciclovir)	
	福米韦生 (Fomivirsen)	
	呋山那韦 (Fosamprenavir)	
	膦甲酸 (Foscarnet)	
	更昔洛韦 (Ganciclovir)	
	碘苷 (Idoxuridine)	
	印地那韦 (Indinavir)	
	干扰素 α (Interferon alpha)	
	拉米夫定 (Lamivudine)	
	洛匹那韦/利托纳韦 (Lopinavir/ritonavir)	
	马拉韦罗 (Maraviroc)	
	奈非那韦 (Nelfinavir)	
	奈韦拉平 (Nevirapine)	
	奥司他韦 (Oseltamivir)	
	喷昔洛韦 (Penciclovir)	
	培拉米韦 (Peramivir)	
	拉替拉韦 (Raltegravir)	
	利巴韦林 (Ribavirin)	
	金刚乙胺 (Rimantadine)	
	利托那韦 (Ritonavir)	
	沙奎那韦 (Saquinavir)	
	司他夫定 (Stavudine)	
	替比夫定 (Telbivudine)	
	替诺福韦 (Tenofovir)	
	替拉那韦 (Tipranavir)	
	曲氟尿苷 (Trifluridine)	
	伐昔洛韦 (Valacyclovir)	
	缬更昔洛韦 (Valganciclovir)	
	扎那米韦 (Zanamivir)	

[0261]

	齐多夫定 (Zidovudine)	
抗寄生虫类		
	阿苯达唑 (Albendazole)	
	青蒿琥酯 (Artesunate)	
	阿托伐醌 (Atovaquone)	
	羟萘苄芬宁 (Bephenium hydroxynaphthoate)	
	氯喹 (Chloroquine)	
	氯苯砒 (Dapsone)	
	乙胺嗪 (Diethyl-carbamazine)	
	糠酯酰胺 (Diloxanide furoate)	
	依氟鸟氨酸 (Eflornithine)	
	盐酸依米丁 (Emetine HCl)	
	呋喃唑酮 (Furazolidone)	
	伊维菌素 (Ivermectin)	
	林丹 (Lindane)	
	甲苯达唑 (Mebendazole)	
	甲氟喹 (Mefloquine)	
	美拉唑醇 (Melarsoprol)	
	米替福新 (Miltefosine)	
	氯硝柳胺 (Niclosamide)	
	硝呋替莫 (Nifurtimox)	
	硝唑尼特 (Nitazoxanide)	
	奥沙尼喹 (Oxamniquine)	
	巴龙霉素 (Paromomycin)	
	扑灭司林 (Permethrin)	
	哌嗪 (Piperazine)	
	吡喹酮 (Praziquantel)	
	伯氨喹 (Primaquine)	
	噻嘧啶双羟萘酸盐 (Pyrantel pamoate)	

[0262]

	乙胺嘧啶 (Pyrimethamine)	
	氯胍 (Proguanil)	
	盐酸奎纳克林 (Quinacrine HCl)	
	奎尼丁 (Quinidine)	
	奎宁 (Quinine)	
	葡萄糖酸锑钠 (Sodium Stibogluconate)	
	螺旋霉素 (Spiramycin)	
	噻苯咪唑 (Thiabendazole)	
	替硝唑 (Tinidazole)	

[0263] 卟啉和非卟啉光敏剂

[0264] 在某些实施方案中,本文所述的靶向肽(例如表2中所示的肽)可与卟啉和其他光敏剂连接。光敏剂是增加生物体(例如,细菌、酵母、真菌等)的光敏性的药物或其他化学品。光敏剂可用于光动力的抗微生物化学疗法(PACT)。在各个实施方案中,PACT利用光敏剂和光(例如可见光、紫外光、红外光等)以在靶生物中产生光毒性反应,通常是通过氧化损伤而产生。

[0265] 目前,PACT的主要用途是血液产品的消毒,特别是用于病毒灭活,但是更多基于临床的方案被用于例如治疗口腔感染或局部感染。所述技术已被证明在体外针对细菌(包括抗药菌株)、酵母、病毒、寄生虫等是有效的。

[0266] 将本文所述的靶向肽与光敏剂连接提供了使光敏剂特异性地或优先地靶向微生物的特定物种或菌株(例如变形链球菌)的手段。

[0267] 多种天然和合成的光敏剂是本领域技术人员已知的(参见例如 Wainwright (1998) J. Antimicrob. Chemotherap. 42:13-28)。可获得具有不同的物理化学组成和光吸收特性的光敏剂。在各个实施方案中,光敏剂通常是有效形成长时间三线激发态的芳族分子。在被芳族体系吸收的能量方面,这同样取决于所涉及的分子结构。例如,呋喃香豆素(furocoumarin)光敏剂(补骨脂素)吸收相对高能量的紫外(UV)光(c.300-350nm),而大环杂芳族分子如酞菁吸收更低能量的近红外光。

[0268] 示例性的光敏剂包括但不限于卟啉大环类(特别是卟啉、氯等,参见例如图1和图2)。特别地,金属卟啉类,特别是许多非铁金属卟啉类在它们的分子结构中模拟血红素并且通过高亲和力血红素吸收系统被细菌主动累积。相同的吸收系统可用于递送抗生素-卟啉和抗菌-卟啉缀合物。适于该目的的示例性的靶向卟啉类记载于美国专利6,066,628中并且在本文图1和图2中示出。

[0269] 靶向卟啉的示例性实例如图13所示。

[0270] 例如,某些人工(非铁)金属卟啉(MP)(Ga-IX,Mn-IX)对以下细菌具有活性:革兰氏阴性细菌和革兰氏阳性细菌以及抗酸杆菌(例如,小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Y. enterocolitica*)、脑膜炎奈瑟氏菌(*N. meningitides*)、粘质沙雷氏菌

(*S.marcescens*)、大肠杆菌 (*E.coli*)、奇异变形杆菌 (*P.mirabilis*)、肺炎克雷伯氏菌 (*K.pneumoniae*)、产酸克雷伯氏菌 (*K.oxytoca*)、铜绿假单胞菌 (*Ps.aeruginosa*)、弗氏柠檬酸菌 (*C.freundii*)、产气肠杆菌 (*E.aerogenes*)、脑膜炎奈瑟菌 (*N.meningitidis*)、金黄色葡萄球菌 (*S.aureus*)、枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)、化脓性链球菌 (*S.pyogenes*)、粪肠球菌 (*E.faecalis*)、包皮垢分枝杆菌 (*M.smegmatis*)、牛分枝杆菌 (*M.bovis*)、结核分枝杆菌 (*M.tuberculosis*)、酿酒酵母 (*S.cerevisiae*)，如美国专利6,066,628 的表1-5所述。这些MP可用作针对这些微生物的靶向肽。

[0271] 类似地，一些MP也对酵母是生长抑制性的，表明它们可用于使肽靶向目标念珠菌属 (*Candida*) 物种 (例如，白色念珠菌 (*Candida albicans*)、克鲁斯氏念珠菌 (*C.krusei*)、*C.pillosus*、光滑念珠菌 (*C.glabrata*) 等) 和其他霉菌病 (mycoses)，包括但不限于由发癣菌属 (*Trichophyton*)、表皮癣菌属 (*Epidermophyton*)、组织胞浆菌属 (*Histoplasma*)、曲霉菌属 (*Aspergillus*)、隐球菌属 (*Cryptococcus*) 等引起的那些。

[0272] 其他光敏剂包括但不限于，青色素类 (参见例如图6) 和酞菁类 (参见例如图4)、吡啶类 (参见例如图5) (特别包括亚甲蓝和甲苯胺蓝)、金丝桃素 (参见例如图8)、吡啶类 (参见例如图9) 特别包括玫瑰红 (参见例如图10)、冠醚 (参见例如图11) 等。在某些实施方案中，光敏剂包括锡氯 (tin chlorin) 6和相关化合物 (例如其他氯和锡卟啉)。

[0273] 另一种光激活的化合物是姜黄素 (参见图12)。

[0274] 在某些实施方案中，光敏剂在没有光激活的情况下是有毒的或生长抑制剂。例如，一些非铁金属卟啉 (MP) (参见例如本文的图1和图2) 具有不依赖于强光的抗微生物活性。此外，氯化血红素——最为公知的天然卟啉——具有显著的抗细菌活性，该活性在存在生理浓度的过氧化氢或还原剂的情况下可得到增强。

[0275] 通常当被光激活时，毒性或生长抑制作用显著增加。通常，它们产生影响邻近的任何物质的基团种类 (radical species)。在某些实施方案中，为了从靶向光敏剂获得最佳选择性，可使用抗氧化剂以淬灭未结合的光敏剂，将损伤仅局限在其中因靶向肽而累积缀合物的细胞。在这种情况下，靶细胞的膜结构作为质子供体而起作用。

[0276] 在典型的光动力的抗微生物化学疗法 (PACT) 中，通过应用光源 (例如，可见光源、紫外光源、红外光源等) 激活靶向光敏剂。然而，PACT 应用不必限制于局部使用。口、喉咙、鼻、鼻窦的区域易于被照射 (illuminate)。类似地，使用内镜技术也易于照射肠区。使用腹腔镜方法或在其他手术操作中可照射其他内部区域。例如，在某些涉及可植入装置 (例如假体装置) 的插入或修复或替换的实施方案中，考虑到可用嵌合部分包覆所述装置，或者使所述装置与嵌合部分接触，所述嵌合部分包含本文所述的与光敏剂连接的靶向肽。在手术操作中和/或刚好在闭合之前，可用适合的光源照射所述装置以激活光敏剂。

[0277] 本文所述的靶向光敏剂及其用途是示例性的而非限制性的。使用本文提供的教导，本领域技术人员可获得其他靶向光敏剂及其用途。

[0278] 抗微生物肽

[0279] 在某些实施方案中，本文所述的靶向肽 (例如表2中所示的肽) 可与一种或多种抗微生物肽连接以形成选择性靶向的抗微生物肽 (STAMP)。许多抗微生物肽是本领域技术人员公知的。

[0280] 在某些实施方案中，所述抗微生物肽包含一种或多种例如以下表4 中所述的氨基

酸序列。在某些实施方案中,所述抗微生物肽包含一种或多种的氨基酸序列,所述氨基酸序列记载于“抗微生物肽收藏 (CAMP)”——一个为促进对抗微生物肽的了解而开发的在线数据库 (参见,例如Thomas et al.(2009) Nucleic Acids Research, 2009, 1-7.doi: 10.1093/nar/gkp1021),其可在www.bicnirrh.res.in/antimicrobial 访问。

[0281] 表4. 新型抗微生物肽、靶微生物和MIC值

ID	生物 MIC	序列	SEQ ID NO
G2		KNLRIIRKGIHIIKKY*	3
Novispirin G10		KNLRRRIIRKGIHIIKKYG	50
Novispirin T10		KNLRRRIIRKTIHIIKKYG	51
Novispirin G7		KNLRRIGRKIIHIIKKYG	52
Novispirin T7		KNLRRITRKIIHIIKKYG	53
Ovispirin		KNLRRRIIRKIIHIIKKYG	54
PGG		GLLRRRLRKKIGEIFKKYG	55
Protegrin-1		RGGRLCYCRRRFCVCVG R*	56
K-1	变形链球菌, 25 μM	GLGRVIGRLIKQIIWRR	57
K-2	变形链球菌, 12.5 μM	VYRKRKSILKIYAKLKGW H	58
K-7	变形链球菌, 12.5 μM	NYRLVNAIFSKIFKKKFIKF	59
K-8	变形链球菌, 4 μM	KILKFLFKKVF	60
K-9	变形链球菌, 4 μM	FIRKFLKKWLL	61
K-10	变形链球菌, 4 μM	KLFKFLRKHLL	62
K-11	变形链球菌, 4 μM	KILKFLFKQVF	63
K-12	变形链球菌, 8 μM	KILKKLKFQVF	64
K-13	变形链球菌, 16 μM	GILKKLFTKVF	65

[0283]

K-14	变形链球菌, 8 μM	LRKFLHKLF	66
K-15	变形链球菌, 4 μM	LRKNLRWLF	67
K-16	变形链球菌, 8 μM 铜绿假单胞菌, 12.5 μM MRSA, 25 μM	FIRKFLQKLHL	68
K-17	变形链球菌, 8 μM	FTRKFLKFLHL	69
K-18	变形链球菌, 16 μM	KKFKKFKVLKIL	70
K-19	变形链球菌, 16 μM	LLKLLKLKKLKF	71
K-20	变形链球菌, 8 μM	FLKFLKKFFKKLKY	72
K-21	变形链球菌, 8 μM	GWLKMFKKIIGKFGKF	73
K-22	变形链球菌, 8 μM	GIFKKFVKILYKVQKL	74
1T-88		GRLVLEITADEVKALGEAL ANAKI	75
PF-531	鲍氏不动杆菌(<i>A. baumannii</i>), 25 μM 铜绿假单胞菌, 50 μM 红色毛癣菌(<i>T. rubrum</i>), 50 μM 黑曲霉(<i>A. niger</i>), 25 μM	YIQFHLNQQPRPKVKKIK IFL-NH2	76

[0284]

	枯草芽孢杆菌, 25 μ M 艰难梭菌 (<i>C. difficile</i>), 12.5 μ M 杰氏棒状杆菌 (<i>C. jeikeium</i>), 6.25 μ M 表皮葡萄球菌 (<i>S. epidermidis</i>), 50 μ M 变形链球菌, 12.5 μ M		
PF-527	铜绿假单胞菌, 50 μ M 红色毛癣菌, 25 μ M 黑曲霉, 50 μ M 枯草芽孢杆菌, 12.5 μ M 杰氏棒状杆菌, 6.25 μ M MRSA, 50 μ M 表皮葡萄球菌, 25 μ M	GSVIKRRKRMAKKKHR KLLKKTRIQRRRAGK	77
PF-672	白色念珠菌, 1.56 μ M 红色毛癣菌, 0.78 μ M 黑曲霉, 3 μ M 枯草芽孢杆菌, 0.78 μ M	MRFGSLALVAYDSAICKS WPRPSSVRRLRM	78

[0285]

	粪肠球菌, 3.13 μM MRSA, 1.56 μM 表皮葡萄球菌, 0.39 μM		
PF-606	大肠杆菌, 50 μM MRSA, 50 μM 表皮葡萄球菌, 50 μM 变形链球菌, 50 μM 肺炎链球菌 (<i>S. pneumoniae</i>), 50 μM	FESKILNASKELDKEKKV NTALSFNSHQDFAKAYQN GKI	79
PF-547	红色毛癣菌, 25 μM 枯草芽孢杆菌, 25 μM 变形链球菌, 12.5 μM	WSRVPGHSDTGWKVWH RW-NH2	80
PF-006	鲍氏不动杆菌, 50 μM 枯草芽孢杆菌, 25 μM MRSA, 50 μM	MGIHAGIHKFIKGLIEKFTG K	81
PF-545	黑曲霉, 50 μM 枯草芽孢杆菌, 25 μM MRSA, 50 μM	RESKLIAMADMIRRRRI-NH 2	82
PF-278	白色念珠菌, 50 μM 红色毛癣菌, 50	LSLATFAKIFMTRSNWSL KRFNRL	83

[0286]

	μM 表皮葡萄球菌, 50 μM		
PF-283	红色毛癣菌, 50 μM 枯草芽孢杆菌, 50 μM 表皮葡萄球菌, 50 μM	MIRIRSPTKKKLNRSISD WKSNTSGRFFY	84
PF-307	白色念珠菌, 50 μM 红色毛癣菌, 50 μM 枯草芽孢杆菌, 50 μM	MKRRRCNWCGKLFYLEE KSKEAYCCKECRKKAKK VKK	85
PF-168	红色毛癣菌, 50 μM 黑曲霉, 50 μM MRSA, 50 μM	VLPFPAIPLSRRRACVAAP RPRSRQRAS	86
PF-538	鲍氏不动杆菌, 25 μM 艰难梭菌, 25 μM	KNKKQTDILEKVKEILDK KKKTKSVGQKLY	87
PF-448	黑曲霉, 25 μM 肺炎链球菌, 50 μM	SLQSQLGPCLHDQRH	88
PF-583	MRSA, 50 μM 表皮葡萄球菌, 50 μM	KFQGEFTNIGQSYIVSASH MSTSLNTGK	89
PF-600	大肠杆菌, 50 μM 肺炎链球菌, 50 μM	TKKIELKRFVDAFVKKSY ENYILERELKKLIKAIN LPTK	90
PF-525	黑曲霉, 50 μM	KFSDQIDKGQDALKDKLG	91

[0287]

	肺炎链球菌, 50 μ M	DL	
PF-529	黑曲霉, 50 μ M 肺炎链球菌, 50 μ M	LSEMERRRLRKRA-NH2	92
PF-148	黑曲霉, 50 μ M 枯草芽孢杆菌, 50 μ M	RRGCTERLRRMARRNAW DLYAEHFY	93
PF-530	鲍氏不动杆菌, 25 μ M	SKFKVLRKIIIKEYKGEL MLSIQKQR	94
PF-522	艰难梭菌, 25 μ M	FELVDWLETNLGKILKSK SA-NH2	95
PF-497	枯草芽孢杆菌, 50 μ M	LVLRICTDLFTFIKWTIKQ RKS	96
PF-499	枯草芽孢杆菌, 50 μ M	VYSFLYVLVIVRKLLSMK KRIERL	97
PF-322	枯草芽孢杆菌, 50 μ M	GIVLIGLKLIPLLANVLR	98
PF-511	肺炎链球菌, 50 μ M	VMQSLYVKPPLILVTKLA QQN	99
PF-512	肺炎链球菌, 50 μ M	SFMPEIQKNTIPTQMK	100
PF-520	肺炎链球菌, 50 μ M	LGLTAGVAYAAQPTNQPT NQPTNQPTNQPTNQPTNQ PRW-NH2	101
PF-521	肺炎链球菌, 50 μ M	CGKILLEQKNFFLKTR	102
PF-523	肺炎链球菌, 50 μ M	ASKQASKQASKQASKQAS KQASRSLKNHLL	103
PF-524	肺炎链球菌, 50 μ M	PDAPRTCYHKPILAALSRI VVTDR	104
PF-209	MRSA, 50 μ M	NYAVVSHT	105

[0288]

PF-437	肺炎链球菌, 50 μM	FQKPFTGEEVEDFQDDDE IPTII	106
CAM135		GWRLIKKILRVFKGL	107
B-33		FKKFWKWFRRF	108
B-34		LKRFLKWFKRF	109
B-35		KLFKRWKHLFR	110
B-36		RLLKRFKHLFK	111
B-37		FKTFLKWLHRF	112
B-38		IKQLLHFFQRF	113
B-39		KLLQTFKQIFR	114
B-40		RILKELKNLFK	115
B-41		LKQFVHFIHRF	116
B-42		VKTLLHIFQRF	117
B-43		KLVEQLKEIFR	118
B-44		RVLQEIKQILK	119
B-45		VKNLAELVHRF	120
B-46		ATHLLHALQRF	121
B-47		KLAENVKEILR	122
B-48		RALHEAKEALK	123
B-49		FHYFWHWFHRF	124
B-50		LYHFLHWFQRF	125
B-51		YLFQTWQHLFR	126
B-52		YLLTEFQHLEFK	127
B-53		FKTFLQWLHRF	128
B-54		IKTLLHFFQRF	129
B-55		KLLQTFNQIFR	130
B-56		TILQSLKNIFK	131
B-57		LKQFVKFIHRF	132
B-58		VKQLLKIFNRF	133
B-59		KLVQQLKNIFR	134
B-60		RVLNQVKQILK	135

[0289]

B-61		VKKLAKLVRRF	136
B-62		AKRLLKVLKRF	137
B-63		KLAQKVKRVLR	138
B-64		RALKRIKHVLK	139
1C-1		RRRRWWW	140
1C-2		RRWWRRW	141
1C-3		RRRWWR	142
1C-4		RWRWRWR	143
2C-1		RRRFWR	144
2C-2		RRWWRRF*	145
2C-3		RRRWWWF*	146
2C-4		RWRWRWF*	147
3C-1		RRRRWWK	148
3C-2		RRWWRRK	149
3C-3		RRRWWWK	150
3C-4		RWRWRWK	151
4C-1		RRRKWWK	152
4C-2		RRWKRRK	153
4C-3		RRRKWWK	154
4C-4		RWRKRWK	155
a-3		LHLLHQLLHLLHQF*	156
a-4		AQAAHQAAHAAHQF*	157
a-5		KLKKLLKKLKKLLK	158
a-6		LKLLKKLLKLLKKF*	159
a-7		LQLLKQLLKLLKQF*	160
a-8		AQAAKQAAKAAKQF*	161
a-9		RWRRWWRHFHFFH*	162
a-10		KLKKLLKWRRWWR	163
a-11		RWRRLKLLHLLH*	164
a-12		KLKKLLKHLHLLH*	165
BD-1		FVERHKWVWKHRELF	166

[0290]

BD-2		VFIHRHVWVHKHVLF	167
BD-3		WRWRARWRWRLRWRF	168
BD-4		WRIHLRARLHVKFRF	169
BD-5		LRIHARFKVHIRLKF	170
BD-6		FHIKFRVHLKVRHFH	171
BD-7		FHVKIHERLHVKFHF	172
BD-8		LHIHAHFHVHIHLHF	173
BD-9		FKIHFRCLKVHIRFKF	174
BD-10		FKAHIRFKLRVKFHF	175
BD-11		LKAKIKFKVKLKIKF	176
BD-12		WIWKHKFLHRHFLF	177
BD-13		VFLHRHVVIKHKLVF	178
BD-14		FLHKHVLRRHIVF	179
BD-15		VFKHKIVRRHILF	180
BD-16		FLFKHLFLHRIFF	181
BD-17		LFKHILIHVRVIF	182
BD-18		FLHKHLFKHKLF	183
BD-19		VFRHRFIHRHVF	184
BD-20		FIHKLVBKHKVLF	185
BD-21		VLRHLFRHRIVF	186
BD-22		LVHKLILRHLLF	187
BD-23		VFKRVLIHKLIF	188
BD-24		IVRKFLFRHKVF	189
BD-25		VLKHVIAHKRLF	190
BD-26		FIRKFLFKHLF	191
BD-27		VIRHVWVRKLF	192
BD-28		FLFRHRFRHRLVF	193
BD-29		LFLHKHAKHKFLF	194
BD-30		FKHKFKHKFIF	195
BD-31		LRHRLRHRLIF	196
BD-32		LILKFLFKFVF	197

[0291]

BD-33		VLIRILVRVIF	198
BD-34		FRHRFRHRF	199
BD-35		LKHKLKHKF	200
BD-36		FKFKHKLIF	201
BD-37		LRLRHRVLF	202
BD-38		FKFLFKFLF	203
BD-39		LRLFLRWLF	204
BD-40		FKFLFKHKF	205
BD-41		LRLFLRHRF	206
BD-42		FKFLFKF	207
BD-43		LRLFLRF	208
AA-1		HFFFHFFHFFHFF*	209
AA-2		FHFFHFFHFFHFF*	210
AA-3		KLLKGATEHFFHFFHFF HHF	211
AA-4		KLLKFHFFHFFHFFHFF	212
AA-5		FHFFHFFHFFHFFHFKLLK	213
RIP		YSPWTNF*	214
LL-37		LLGDFFRKSKEKIGKEFK RIVQRIKDFLRNLVPRTES	215
Cys-LL-37		CLLGDDFRKSKEKIGKEF KRIVQRIKDFLRNLVPRT ES	216
LL-37(17-32)		FKRIVQRIKDFLRNLV	217
Cys-LL-37-Cys		CLLGDDFRKSKEKIGKEF KRIVQRIKDFLRNLVPRT ESC	218
LL-37FK-13		FKRIVQRIKDFLR	219
LL-37FKR		FKRIVQRIKDFLRNLVPRT ES	220
LL-37GKE		GKEFKRIVQRIKDFLRNL	221

[0292]

		VPR	
LL-37KRI		KRIVQRIKDFLRNLVPRT ES	222
LL-37LLG		LLGDFFRKSKEKIGKEFK RIV	223
LL-37RKS		RKSKEKIGKEFKRIVQRI KDFLRNLVPRTES	224
LL-37SKE		SKEKIGKEFKRIVQRIKDF LR	225
LL-37-Cys		LLGDFFRKSKEKIGKEFK RIVQRIKDFLRNLVPRTES C	226
BD2.21		KLFKFLRKHLL	227
AF5		FLKFLKKFFKCLK	228
		FIGAIARLLSKIFGKR-NH2	229
		GIFSKLAGKKIKNLLISG- NH2	230
		GIFSKLAGKKIKNLLISGL KG-NH2	231
		GLFSKFVGKGKIKNFLIKG VK-NH2	232
		KAYSTPRCKGLFRALMC WL	233
		KIFGAIWPLALGALKNLI K-NH ₂	234
		GWGSFFKKAHVGVKHVG KAALTHYL-NH ₂	235
		RGLRRLGRKIAHGVKKY G-NH2	236
		RGLRRLGRKIAHGVKKY GPTVLRIRIAG	237
		KIAHGVKKYGPTVLRIR	238

[0293]		LLGDEFRKSKEKIGKEFK	239
		RIVQRIKDFLRNLVPRTES	
		FLPLIGRVLSGIL-NH₂	240
		IGKFLKKAKKFGKAFVKI	241
		LKK-NH₂	
		GKFLKKAKKFGKAFVKIL	242
		-NH₂	
		WFLKFLKKFFKKLKY	243
		RGLRRLGRKIAHGVKKY	244
		LLGDEFRKSKEKI	245
		ILRWPWWPWRRK-酰胺	246

[0294] 许多抗微生物肽也公开于美国专利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中,其中关于特定抗微生物的公开内容肽以引用的方式纳入本文。

[0295] 在某些实施方案中,所述抗微生物肽包含一种或多种氨基酸序列,所述氨基酸序列记载于“抗微生物肽收藏(CAMP)”——一个为促进对抗微生物肽的了解而开发的在线数据库(参见,例如Thomas et al. (2009) Nucleic Acids Research, 2009, 1-7. doi: 10.1093/nar/gkp1021),其可在www.bicnirrh.res.in/antimicrobial访问。

[0296] 在某些实施方案中,所述抗微生物肽是novispirin、novispirin片段或类似物,例如以上表4中所示。在某些实施方案中,考虑到这样的构建体,即在该构建体中一种或多种本文所述的靶向肽(例如,直接或通过接头)连接至novispirin G10的调节版本,其被命名为G2 (KNLRIIRKGIHIKKY (SEQ ID NO:3))。在这种情况下,除去C末端氨基酸并且除去一个内部的精氨酸以促进化学合成。Novispirin G10 (亲本分子)是抗微生物的 α -螺旋十八肽,其在结构上与cathelicidin和其他先天免疫肽相关。

[0297] 配体

[0298] 在某些实施方案中,效应物可包括一种或多种配体、表位标签和/或抗体。在某些实施方案中,优选的配体和抗体包括结合于免疫细胞上的表面标记物的配体和抗体。利用此类抗体作为效应物分子的嵌合部分起双功能接头的作用,它建立起携带配体或抗体的结合伴侣的免疫细胞和靶微生物之间的联系。

[0299] 在本文中,术语“表位标签”或“亲和标签”可互换使用,并且用于指被抗体或其他结合伴侣特异性识别的分子或分子结构域。所述术语也指结合伴侣复合物。因此,例如,生物素或生物素/抗生物素复合物都被认为是亲和标签。除了在表位/抗体相互作用中被识别的表位,亲和标签还包括被其他结合分子识别的“表位”(例如与受体结合的配体)、与其他配体结合以形成异二聚体或同二聚体的配体、与Ni-NTA结合的 His₆,与抗生物素蛋白、链霉亲和素或抗生物素抗体结合的生物素等。

[0300] 表位标签是本领域技术人员公知的。另外,特异性针对多种表位标签的抗体是市售的。这些包括但不限于:针对DYKDDDDK (SEQ ID NO: 247) 表位的抗体,c-myc抗体(可获得

自Sigma, St. Louis), HNK-1 碳水化合物表位, HA表位, HSV表位, 被His表位特异性抗体(参见, 例如Qiagen) 识别的His4 (SEQ ID NO: 248)、His5 (SEQ ID NO: 249) 和His6 (SEQ ID NO: 250) 表位等。此外, 用于表位标记蛋白的载体是市售的。因此, 例如, pCMV-Tag1载体是为在哺乳动物细胞中的基因表达而设计的表位标记载体。可用**FLAG®**表位(N末端、C末端或内部标记)、c-myc表位(C末端)或FLAG(N末端)和c-myc(C末端)表位来标记被插入到pCMV-Tag1载体中的靶基因。

[0301] 脂质和脂质体

[0302] 在某些实施方案中, 本文所述的靶向肽(例如表2中所示的肽)与一种或多种微颗粒或纳米颗粒连接, 所述微颗粒或纳米颗粒可负载效应物试剂(例如药物、标记物等)。在某些实施方案中, 所述微颗粒或纳米颗粒是脂质颗粒。脂质颗粒是包含至少一种形成浓缩脂质相的脂质组分的微颗粒或纳米颗粒。通常, 在脂质纳米颗粒的组成中, 脂质占有优势。各种浓缩脂质相包括固定无定形相或真正的结晶相; 同型液相(液滴); 以及各种水合液晶态定向的脂质相, 例如液晶和伪晶双层相(L- α 、L- β 、P- β 、Lc)、交错的双层相和非片层相(参见, 例如The Structure of Biological Membranes, ed. By P. Yeagle, CRC Press, Boca Raton, FL, 1991)。脂质微颗粒包括但不限于脂质体、脂质-核酸复合物、脂质-药物复合物、脂质-标记物复合物、固体脂质颗粒、微乳剂液滴等。制备和使用这些类型的脂质微颗粒和纳米颗粒以及将它们与亲和部分(例如抗体)连接的方法是本领域已知的(参见, 例如美国专利5,077,057、5,100,591、5,616,334、6,406,713、5,576,016、6,248,363; Bondi et al., (2003) Drug Delivery 10:245-250; Pedersen et al., (2006) Eur. J. Pharm. Biopharm. 62:155-162, 2006 (固体脂质颗粒); 美国专利: 5,534,502、6,720,001; Shiokawa et al., (2005) Clin. Cancer Res. 11:2018-2025 (微乳剂); 美国专利6,071,533 (脂质-核酸复合物)等)。

[0303] 脂质体通常被定义为包含一种或多种脂质双层的颗粒, 所述脂质双层包封内部(通常是水性内部)。因此, 脂质体通常为由双层脂质膜形成的囊泡(vesicle)。制备脂质体的方法有多种。一些方法用于制备小囊泡($d < 0.05$ 微米), 一些方法用于制备更大的囊泡($d > 0.05$ 微米)。一些方法用于制备多层囊泡, 一些方法用于制备单层囊泡。脂质体制备方法详细记载于若干综述文章中, 例如Szoka and Papahadjopoulos (1980) Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 9:467, Deamer和Uster (1983) 第27-51页, Liposomes, 编辑: M. J. Ostro, Marcel Dekker, 纽约, 等等。

[0304] 在各个实施方案中, 所述脂质体包含亲水性聚合物链的表面包衣。“表面包衣”指脂质体表面上任何亲水性聚合物的包衣。通过使脂质体组成中包含一种或多种用亲水性聚合物链衍生化的形成囊泡的脂质而使脂质体中包含亲水性聚合物。在某些实施方案中, 优选具有二酰基链的形成囊泡的脂质, 例如磷脂。一个示例性的磷脂是磷脂酰乙醇胺(PE), 其包含有利于与被激活的聚合物偶联的反应性氨基。一个示例性的PE是二硬脂酰PE(DSPE)。另一个实例是非磷脂双链两亲性脂质, 例如二酰基或二烷基丙三醇, 其用亲水性聚合物链衍生化。

[0305] 在某些实施方案中, 用于与形成囊泡的脂质偶联的亲水性聚合物是聚乙二醇(PEG), 优选地作为分子量为1,000-10,000道尔顿的PEG链, 更优选1,000-5,000道尔顿, 最优选2,000-5,000道尔顿。PEG的甲氧基和乙氧基加帽类似物也是有用的亲水性聚合物, 其

以多种聚合物尺寸(例如120-20,000道尔顿)市售。

[0306] 其他适合的亲水性聚合物包括但不限于聚乳酸、聚乙醇酸、聚乙烯吡咯烷酮、聚甲基噁唑啉、聚乙基噁唑啉、聚羟丙基甲基丙烯酰胺、聚甲基丙烯酰胺、聚二甲基丙烯酰胺和衍生化的纤维素,例如羟甲基纤维素或羟乙基纤维素。

[0307] 包含与适合的脂质(例如PE)连接的这些聚合物的脂质-聚合物缀合物的制备记载于,例如美国专利第5,395号中。

[0308] 可任选地制备脂质体以与一种或多种本文所述的靶向肽连接。在这里,包含于脂质体中的脂质组分包括用靶向肽衍生化的脂质,或例如在接头上具有极性头部化学基团的脂质,其可根据已知方法在预形成的脂质体中用靶向肽衍生化。

[0309] 用亲和部分(例如抗体)来官能化脂质和脂质体的方法是本领域技术人员公知的(参见,例如DE 3,218,121;Epstein et al.(1985)Proc.Natl. Acad.Sci.,USA,82:3688(1985);Hwang et al.(1980)Proc.Natl.Acad. Sci.,USA,77:4030;EP 52,322;EP 36,676;EP 88,046;EP 143,949;EP 142,641;日本专利申请83-118008;美国专利第4,485,045和4,544,545号;以及EP 102,324,其全部以引用的形式纳入本文)。

[0310] 在物理上破坏微生物群落内的胞外基质的试剂

[0311] 在某些实施方案中,本文所述的靶向肽(例如表2中所示的肽)可与在物理上破坏微生物群落内的胞外基质(例如生物膜)的试剂偶联。在某些优选的实施方案中,这样的试剂可以是细菌细胞壁降解酶,例如SAL-2、或Dispersin B,或糖苷酶、藻酸酶、肽酶、蛋白酶、脂肪酶、或DNA或RNA降解酶或化合物(例如rhRNase)的任意种类。生物膜的胞外基质的破坏可带来清除和治疗益处。

[0312] 所述肽可连接至抗微生物蛋白,例如蛋白抑制剂C或大肠杆菌素(Colicin),或其片段,例如大肠杆菌素的IIa结构域或蛋白抑制剂C的肝素结合结构域。

[0313] 聚合微颗粒和/或纳米颗粒

[0314] 在某些实施方案中,本文所述的靶向肽(例如表2中所示的肽)与聚合微颗粒和/或纳米颗粒和/或微团(micelle)连接。

[0315] 基于微颗粒和纳米颗粒的药物递送系统具有相当大的潜力来用于处理各种微生物。聚合微颗粒或纳米颗粒用作药物载体的技术优势为高稳定性、高载体能力、同时纳入亲水性和疏水性物质的可行性,以及各种给药途径(包括口服应用和吸入)的可行性。也可以将聚合纳米颗粒设计为允许从基质的受控的(持续的)药物释放。这些纳米颗粒的特性能够改善药物的生物可利用率并减少给药频率。

[0316] 聚合纳米颗粒通常是微米或亚微米(<1 μ m)胶体颗粒。该定义包括整体的纳米颗粒(纳米球)(其中药物在整个基质中被吸收、溶解或分散)和纳米胶囊(其中药物被限制在由类壳外壁围绕的水性或油性核心中)。或者,在某些实施方案中,药物可共价连接至表面或基质中。

[0317] 聚合微颗粒和纳米颗粒通常是由生物相容性和生物可降解材料(例如天然聚合物(例如明胶、白蛋白)或合成聚合物(例如聚丙交酯、聚氰基丙烯酸烷酯)或固体脂质)制成。在体内,纳米颗粒中负载的药物通常是通过扩散、膨胀、侵蚀或降解而从基质中释放。一种通常使用的材料是聚(丙交酯共乙交酯)(PLG)。

[0318] 制备和负载聚合纳米颗粒或微颗粒的方法是本领域技术人员公知的。因此,例如

Matsumoto et al. (1999) *Intl. J. Pharmaceutics*, 185:93-101 教导了聚(L-丙交酯)-聚(乙二醇)-聚(L-丙交酯)纳米颗粒的制备, Chawla et al. (2002) *Intl. J. Pharmaceutics* 249:127-138教导了聚(ϵ -己内酯)纳米颗粒的制备和递送他莫昔芬的用途, Bodmeier et al. (1988) *Intl. J. Pharmaceutics*, 43:179-186教导了使用溶剂蒸发法制备聚(D,L-丙交酯)微球。Intl. J. Pharmaceutics, 1988, 43, 179-186。其他纳米颗粒制剂记载于例如 Williams et al. (2003) *J. Controlled Release*, 91:167-172; Leroux et al. (1996) *J. Controlled Release*, 39:339-350; Soppimath et al. (2001) *J. Controlled Release*, 70:1-20; Brannon-Peppas (1995) *Intl. J. Pharmaceutics*, 116:1-9; 等等。

[0319] 肽制剂

[0320] 使用标准化学肽合成技术可化学合成本文所述的肽, 或特别地当所述肽不包含“D”氨基酸残基时, 可重组表达所述肽。当重组表达“D”多肽时, 可在生物体提供一种或多种仅“D”型氨基酸的环境中培养宿主生物(例如细菌、植物、真菌细胞等)。在这样的系统中重组表达的肽则掺入那些D氨基酸。

[0321] 在某些实施方案中, 使用识别D氨基酸的经修饰的氨基酰基tRNA 合成酶, 可在重组表达的肽中掺入D氨基酸。

[0322] 在某些实施方案中, 通过本领域技术人员已知的多种液相或固相肽合成技术的任一种来化学合成所述肽。对于本发明的多肽的化学合成, 固相合成是优选方法, 其中将序列的C末端氨基酸连接到不可溶的载体 (support) 上, 然后依次添加序列中其余的氨基酸。固相合成技术是本领域技术人员公知的并且记载于例如Barany和Merrifield (1963) *Solid-Phase Peptide Synthesis*; pp.3-284 in *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*. 第2卷: *Special Methods in Peptide Synthesis, Part A.*; Merrifield et al. (1963) *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2156; 以及 Stewart et al. (1984) *Solid Phase Peptide Synthesis*, 第2版Pierce Chem. Co., Rockford, Ill中。

[0323] 在一个实施方案中, 使用二苯胺树脂 (Beckman Bioproducts, 0.59 mmol NH₂/g 树脂) 作为固体载体, 通过固相肽合成方法来合成所述肽。COOH末端氨基酸(例如叔丁基羰基-Phe) 是通过4-(氧基甲基) 苯乙酰基连接至固体载体。这是比常规的苄酯键更稳定的键, 但生成的肽仍可通过氢化作用而被裂解。使用甲酸作为氢供体的转移氢化可用于该目的。

[0324] 应注意的是, 在肽(特别是包含D氨基酸的肽)的化学合成中, 除所需全长产物以外, 所述合成通常产生许多被截短的肽。因此, 通常使用如HPLC来纯化所述肽。

[0325] 通过在化学合成中使用适当衍生化的氨基酸残基, 可容易地在所述肽的一个或多个位置处掺入D氨基酸、 β 氨基酸、非天然氨基酸等。用于固相肽合成的修饰残基是市售的, 可购自许多供应商(参见, 例如 Advanced Chem Tech, Louisville; Nova Biochem, San Diego; Sigma, St Louis; Bachem California Inc., Torrance等)。根据需要, 可完全去掉或在肽中的任何位置掺入D型氨基酸和/或另外修饰的氨基酸。因此, 例如, 在某些实施方案中, 所述肽可包含单个的修饰氨基酸, 而在其他实施方案中, 所述肽包含至少2个、通常至少3个、更通常至少4个、最通常至少5个、优选至少6个、更优选至少7个或甚至全部修饰的氨基酸。在某些实施方案中, 基本上每个氨基酸都是D型氨基酸。

[0326] 如以上所述, 本发明的肽和/或融合蛋白也可重组表达。因此, 在某些实施方案中, 使用重组表达系统来合成本文所述的抗微生物肽和/或靶向肽和/或融合蛋白。通常这包括

产生编码所需肽或融合蛋白的DNA序列,将所述DNA放置在特定启动子控制下的表达盒中,在宿主中表达所述肽或融合蛋白,分离表达的肽或融合蛋白,以及(如果需要)使所述肽或融合蛋白复性。

[0327] 可通过上述任何适合的方法来制备编码本文所述的肽或融合蛋白的DNA,所述方法包括例如适合序列的克隆和限制性酶切或直接化学合成。

[0328] 可将该核酸容易地连接到适合的载体中,所述载体包含适合的表达控制序列(例如启动子、增强子等),以及任选地包含一个或多个选择性标记物(例如抗生素抗性基因)。

[0329] 可在多种宿主细胞中表达编码本文所述的肽或融合蛋白的核酸序列,所述宿主细胞包括但不限于大肠杆菌、其他细菌宿主、酵母、真菌和多种高等真核生物细胞如昆虫细胞(例如SF3)、COS、CHO和HeLa细胞系和骨髓瘤细胞系。重组蛋白基因通常可操作地连接至每个宿主的适合的表达控制序列。对于大肠杆菌,这可包括启动子(例如T7、trp或 λ 启动子)、核糖体结合位点和优选地转录终止信号。对于真核细胞,所述控制序列可包括启动子和通常地增强子(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,并且可包括剪接供体和受体序列。

[0330] 通过公知的方法(例如对于大肠杆菌的氯化钙转化,以及对于哺乳动物细胞的磷酸钙处理或电穿孔),可将质粒转移到所选择的宿主细胞中。通过由质粒中包含的基因(例如amp、gpt、neo和hyg基因)所赋予的对抗生素的抗性,可选择被质粒转化的细胞。

[0331] 一旦被表达,可根据本领域的标准方法(包括硫酸铵沉淀、亲和柱、柱色谱法、凝胶电泳等)来纯化重组肽或融合蛋白(一般参见R.Scopes,(1982)Protein Purification, Springer-Verlag,N.Y.;Deutscher(1990)Methods in Enzymology第182卷:Guide to Protein Purification., Academic Press,Inc.N.Y.)。优选具有至少约90%至95%均一度(homogeneity)的基本上纯的组合物,最优选98%至99%或更大均一度。

[0332] 本领域技术人员将理解,在化学合成、生物表达或纯化之后,所述肽或融合蛋白可能具有与所需的天然构象实质上不同的构象。在这种情况下,可能需要变性并还原所述肽或融合蛋白,然后使所述分子重新折叠成优选的构象。还原和变性蛋白并诱导重新折叠的方法是本领域技术人员公知的(参见,例如Debinski et al.(1993)J.Biol.Chem.,268:14065-14070;Kreitman and Pastan(1993)Bioconjug.Chem.,4:581-585;以及Buchner et al.,(1992)Anal.Biochem.,205:263-270)。例如,Debinski et al.记载了胍-DTE中包涵体蛋白的变性和还原。之后所述蛋白在包含氧化型谷胱甘肽和L-精氨酸的氧化还原缓冲液中重新折叠。

[0333] 本领域技术人员将理解,可对所述肽和/或融合蛋白进行修饰而不降低它们的生物活性。可进行一些修饰以促进克隆、表达或将靶分子并入融合蛋白中。这样的修饰是本领域技术人员公知的,并且包括例如在氨基末端添加甲硫氨酸以提供起始位点,或任一末端放置额外的氨基酸(例如多聚His)以产生可以方便地定位的限制性位点或终止密码子或纯化序列。

[0334] 将靶向肽连结到其他部分

[0335] 化学缀合

[0336] 通过将本文所述的一种或多种靶向肽连结到一种或多种效应物而形成嵌合部分。在某些实施方案中,所述靶向肽通过天然存在的反应性基团直接连接到效应物,或者可使

所述靶向肽和/或效应物官能化以提供这样的反应性基团。

[0337] 在各个实施方案中,所述靶向肽通过一个或多个连接试剂与效应物连接。因此,在各个实施方案中,靶向肽和效应物可通过单一连接试剂或多个连接试剂缀合。例如,靶向肽和效应物可通过单一多功能(例如,双-、三-或四-)连接试剂或一对互补连接试剂缀合。在另一个实施方案中,所述靶向肽和所述效应物通过二、三或更多个连接试剂缀合。适合的连接试剂包括但不限于,例如官能团、亲和试剂、稳定基团,以及其组合。

[0338] 在某些实施方案中,所述连接试剂是或包括官能团。官能团包括单功能接头,其包含反应性基团;以及多功能交联剂,其包含能够与两个或更多个不同的功能性靶标(例如,标记物、蛋白、大分子、半导体纳米晶体或底物)形成键合的两个或多个反应性基团。在一些优选的实施方案中,所述多功能交联剂是包含两个或多个不同的反应性基团的异双功能交联剂。

[0339] 适合的反应性基团包括但不限于巯基(-SH)、羧化物(COOH)、羧基(-COOH)、羰基、胺(NH₂)、羟基(-OH)、醛(-CHO)、醇(ROH)、酮(R₂CO)、活性氢、酯、巯基(SH)、磷酸(-PO₃)或光反应性基团。胺反应性基团包括但不限于,例如异硫氰酸酯类、异氰酸酯类、酰基叠氮化物、NHS酯、磺酰氯、醛类和乙二醛、环氧化物和环氧乙烷、碳酸酯类、芳化剂、亚氨酸酯(imidoester)、碳二亚胺类和酞类。巯基反应性基团包括但不限于,例如卤代乙酰基和烷基卤化物衍生物、马来酰亚胺类、氮丙啶类、丙烯酰衍生物、芳化剂和巯基二硫化物交换试剂。羧化物反应性基团包括但不限于,例如重氮烷和重氮乙酰基化合物,例如羰基二咪唑类和碳二亚胺类。羟基反应性基团包括但不限于,例如环氧化物和环氧乙烷、羰基二咪唑、用高碘酸盐的氧化、N,N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯或N-羟基琥珀酰亚胺基氯甲酸酯、酶促氧化、卤代烷基(alkyl halogen)和异氰酸酯。醛和酮反应性基团包括但不限于,例如用于希夫碱形成或还原胺化作用的胍衍生物。活性氢反应性基团包括但不限于,例如用于曼尼希缩合和碘化反应的重氮衍生物。光反应性基团包括但不限于,例如芳基叠氮化物和卤代芳基叠氮化物、二苯甲酮类、重氮化合物和双吡丙啶(diazirine)衍生物。

[0340] 适用于形成嵌合部分的其他适合的反应性基团和反应类别包括生物缀合化学领域中公知的那些。可使用反应性螯合物进行的目前有利的反应类别为在相对温和的条件下进行的那些反应。这些反应包括但不限于亲核取代(例如,胺和醇与酰基卤化物、活性酯的反应)、亲电取代(例如烯胺反应),以及碳-碳和碳-杂原子多键加成反应(例如Michael反应、Diels-Alder加成反应)。这些和其他有用的反应在例如March (1985) *Advanced Organic Chemistry*, 第3版, John Wiley & Sons, 纽约; Hermanson (1996) *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego; 以及 Feeney et al. (1982) *Modification of Proteins: Advances in Chemistry Series*, 第198卷, American Chemical Society, Washington, D.C. 中被讨论。

[0341] 在某些实施方案中,连接试剂包括螯合剂。例如,可容易地用放射性标记物(例如Gd³⁺和⁶⁴Cu)来标记包含分子DOTA(DOTA=1,4,7,10-四(羧甲基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷)的螯合剂,分别产生与靶向肽连接的Gd³⁺-DOTA和⁶⁴Cu-DOTA。其他适合的螯合物是本领域技术人员已知的,例如最为公知的那些中的1,4,7-三氮杂环壬烷-N,N',N''-三乙酸(NOTA)衍生物(参见,例如Lee et al. (1997) *Nucl. Med. Biol.* 24: 2225-23019)。

[0342] 本文使用的“接头”或“连接试剂”是用于连结两个或更多个分子的分子。在某些实

施方案中,所述接头通常能够与两个分子(例如靶向肽和效应物)形成共价键。适合的接头是本领域技术人员公知的,包括但不限于直链或支链碳接头、杂环碳接头或肽接头。在某些实施方案中,所述接头可通过其侧基团(例如通过与半胱氨酸的二硫键)与组成氨基酸连接。然而,在某些实施方案中,所述接头将与末端氨基酸的 α -碳氨基和羧基连接。

[0343] 双功能性接头——其具有与一个分子(例如靶向肽)上的基团反应的一个官能团,以及与另一个分子(例如抗微生物肽)具有反应性的另一个基团——可用于形成所需的缀合物。或者可以进行衍生化以提供官能团。因此,例如,用于在肽上产生游离的巯基的方法也是已知的(参见美国专利第4,659,839号)。

[0344] 在某些实施方案中,所述连接试剂是异双功能性交联剂,其包含两个或更多个不同的反应性基团,所述反应性基团形成可与肽相互作用的杂环。例如,异双功能性交联剂(如半胱氨酸)可包含胺反应性基团和巯基反应性基团,所述反应性基团可与衍生肽上的醛相互作用。适于异双功能性交联剂的反应性基团的其他组合包括,例如胺和巯基反应性基团;羰基和巯基反应性基团;胺和光反应性基团;巯基和光反应性基团;羰基和光反应性基团;羧化物和光反应性基团;以及精氨酸和光反应性基团。在一个实施方案中,所述异双功能性交联剂是SMCC。

[0345] 用于将各种分子连接到肽或蛋白的许多方法和接头分子是已知的(参见,例如欧洲专利申请第188,256号;美国专利第4,671,958、4,659,839、4,414,148、4,699,784、4,680,338、4,569,789和4,589,071号,以及Borlinghaus et al. (1987) Cancer Res. 47: 4071-4075)。本文在实施例2和3中提供了示例性的连接方案。

[0346] 融合蛋白

[0347] 在其中靶向肽和被连接的部分都是肽或都包含肽的某些实施方案中,可化学合成嵌合部分,或者将嵌合部分表达为重组融合蛋白(即嵌合融合蛋白)。

[0348] 在某些实施方案中,使用重组DNA方法来合成嵌合融合蛋白。通常,这包括产生编码所述融合蛋白的DNA序列,将所述DNA放置在特定启动子控制下的表达盒中,在宿主中表达所述蛋白,分离所表达的蛋白,以及(如果需要)使所述蛋白复性。

[0349] 可通过任何适合的方法来制备编码所述融合蛋白的DNA,所述方法包括,例如适合序列的克隆和限制性酶切,或者通过例如以下方法的直接化学合成:Narang et al. (1979) Meth. Enzymol. 68:90-99的磷酸三酯法;Brown et al. (1979) Meth. Enzymol. 68:109-151的磷酸二酯法;Beaucage et al. (1981) Tetra. Lett., 22:1859-1862的二乙基亚磷酰胺法;和美国专利第4,458,066号的固体载体法。

[0350] 化学合成产生单链的寡核苷酸。通过与互补序列的杂交或通过使用单链作为模板且使用DNA聚合酶的聚合反应,将单链寡核苷酸转化为双链DNA。本领域技术人员将认识到,尽管DNA的化学合成局限在约100个碱基的长度,但可通过连接较短的序列来获得更长的序列。

[0351] 或者,可以克隆子序列并且使用适合的限制性酶来裂解适合的子序列。然后可连接片段以产生所需的DNA序列。

[0352] 在某些实施方案中,使用DNA扩增方法如聚合酶链式反应(PCR)可克隆编码本发明的融合蛋白的DNA。因此,例如,使用包含NdeI限制性位点的正义引物和包含HindIII限制性位点的反义引物,PCR扩增编码靶向抗体、靶向肽等的核酸。这产生了编码靶向序列并且

具有末端限制性位点的核酸。类似地,可提供具有互补的限制性位点的效应物和/或效应物/接头/间隔基。序列的连接和插入到载体中产生了编码所述融合蛋白的载体。

[0353] 尽管靶向肽和其他部分(例如AMP)可直接连结在一起,技术人员将了解,它们可被由一个或多个氨基酸组成的肽间隔基/接头分开。通常,所述间隔基除了连结蛋白或保留蛋白之间的某种最小距离或其他空间关系以外,不具有特定的生物活性。然而,可以选择间隔基的组成氨基酸以影响所述分子的一些特性如折叠、净电荷或疏水性。

[0354] 可在多种宿主细胞中表达编码融合蛋白的核酸序列,所述宿主细胞包括大肠杆菌、其他细菌宿主、酵母和各种高等真核生物细胞如COS、CHO和HeLa细胞系和骨髓瘤细胞系。重组蛋白基因通常可操作地连接至每个宿主的适合的表达控制序列。对于大肠杆菌,这可包括启动子(例如T7、trp或 λ 启动子)、核糖体结合位点并优选地转录终止信号。对于真核细胞,所述控制序列可包括启动子并优选地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,并且可包括剪接供体和受体序列。

[0355] 通过公知的方法(例如对于大肠杆菌的氯化钙转化,以及对于哺乳动物细胞的磷酸钙处理或电穿孔),可将质粒转移到所选择的宿主细胞中。通过由质粒中包含的基因(例如amp、gpt、neo和hyg基因)所赋予的对抗生素的抗性,可选择被质粒转化的细胞。

[0356] 一旦被表达,可根据本领域的标准方法(包括硫酸铵沉淀、亲和柱、柱色谱法、凝胶电泳等)来纯化重组融合蛋白(一般参见R.Scopes(1982) Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y.; Deutscher(1990) Methods in Enzymology第182卷:Guide to Protein Purification., Academic Press, Inc. N.Y.)。优选具有至少约90%至95%均一度的基本上纯的组合物,对于制药用途,最优选98%至99%或更大的均一度。一旦纯化,部分地或达到所需的均一度,可在治疗上使用所述多肽。

[0357] 本领域技术人员将理解,在化学合成、生物表达或纯化之后,所述融合蛋白可能具有与组成型多肽的天然构象实质上不同的构象。在这种情况下,可能需要变性并还原所述多肽,然后使所述多肽重新折叠成优选的构象。还原和变性蛋白并诱导重新折叠的方法是本领域技术人员公知的(参见,Debinski et al.(1993) J.Biol.Chem., 268:14065-14070; Kreitman and Pastan(1993) Bioconjug.Chem., 4:581-585;以及Buchner et al., (1992) Anal.Biochem., 205:263-270)。

[0358] 本领域技术人员将理解,可对所述融合蛋白进行修饰而不降低它们的生物活性。可进行一些修饰以促进克隆、表达或将靶分子并入融合蛋白中。这样的修饰是本领域技术人员公知的,包括例如在氨基末端添加甲硫氨酸以提供起始位点,或在任一末端放置额外的氨基酸以产生可方便地定位的限制性位点或终止密码子。

[0359] 如上文所述,在各个实施方案中,肽接头/间隔基用于将一种或多种靶向肽与一种或多种效应物连结。在各个实施方案中,所述肽接头相对较短,通常少于约10个氨基酸,优选地少于约8个氨基酸,更优选地约3至约5个氨基酸。适合的示例性的接头包括但不限于PSGSP(SEQ ID NO:251)、ASASA(SEQ ID NO:252)或GGG。在某些实施方案中,可使用更长的接头,例如(GGGGS)₃(SEQ ID NO:253)。示例性的肽接头和其他接头如表5所示。

[0360] 表5. 示例性的肽和非肽接头

[0361]

接头	SEQ ID NO:
AAA	
GGG	
SGG	
SAT	
PYP	
ASA	
GGGG	254
PSPSP	255
PSPSP	256
KKKK	257
RRRR	258
ASASA	259
GGSGGS	260
GGGGS	261
GGGGS GGGGS	262
GGGGS GGGGS GGGGS	263
GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS	264
GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS	265
GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS	266
2-硝基苯或邻硝基苄基	
硝基吡啶基二硫化物	
二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE)	
S-乙酰基巯基琥珀酸	
1, 4, 7, 10-四氮杂环十二烷-1, 4, 7, 10-四乙酸 (DOTA)	
β -葡萄糖苷酸和 β -葡萄糖苷酸变体	
聚(烷基丙烯酸)	
基于苯的接头 (例如: 2,5-二(己氧基)-1,4-二[2,5-二(己氧基)-4-甲酰基-亚苯基亚乙烯基]苯) 和类似的分子	
二硫键	
在一个分子中连接多个靶标和灭杀肽的聚酰胺-胺型或类似的树突	

[0362]	状聚合物	
	碳纳米管	
	脘和脘变体接头	
	任何链长度的 PEG	
	琥珀酸、甲酸、乙酸、丁酸、其他类似的有机酸	
	醛醇 (aldol)、醇类或烯醇	
	过氧化物	
	任何链长度的烷烃或烯烃基团	
	包含游离酰胺和羧酸基团的一种或多种叶啉或染料分子	
	一种或多种 DNA 或 RNA 核苷酸, 包括聚胺和含聚羧基的变体	
	菊粉、蔗糖、葡萄糖或其他单糖、二糖或多糖	
	亚油酸或其他多不饱和脂肪酸	
	包含卤素或巯基的任一种上述接头的变体	

[0363] (所有基于氨基酸的接头可以是L型、D型、L型和D型的组合、 β -型等)。

[0364] 多个靶向肽和/或效应物

[0365] 如以上所述,在某些实施方案中,本文所述的嵌合部分可包括与单一效应物连接的多个靶向肽,或与单一靶向肽连接的多个效应物,或与多个效应物连接的多个靶向肽。

[0366] 当嵌合构建体是融合蛋白时,这通过提供多个结构域而容易地完成,所述多个结构域是与一个或多个效应物结构域连接的靶向结构域。图14 图解说明了一些而非全部构型。在各个实施方案中,多个靶向结构域和/或多个效应物结构域可彼此直接连接或可被接头(例如上述的氨基酸或肽接头)分隔开。

[0367] 当嵌合构建体是化学缀合物时,通过使用分支的或多功能接头和/或多个不同的接头可容易地产生线性或分支构型(例如,如图14所示)。

[0368] 保护基团

[0369] 尽管可示出没有保护基团的本文所述的各种肽,但是在某些实施方案中它们可携带1、2、3、4或更多个保护基团。在各个实施方案中,所述保护基团可与肽的C末端和/或N末端偶联,和/或与构成肽的一个或多个内部残基偶联(例如,组成氨基酸上的一个或多个R基团可被阻断)。因此,例如,在某些实施方案中,本文所述的任何肽可携带,例如保护氨基末端的乙酰基和/或保护羧基末端的酰胺基。这样的受保护的肽的实例包括 AFFRAFNRAFAQALAKGGGKNLRIIRKGIHIKKY* (SEQ ID NO: 267)、TFFRAFARAFQAQAAAKGGGKNLRIIRKGIHIKKY* (SEQ ID NO: 268)、AFFRAFARAFQAQALAKGGGKNLRIIRKGIHIKKY* (SEQ ID NO: 269)、AFFRLFARAFQAQAAAKGGGKNLRIIRKGIHIKKY* (SEQ ID NO: 270)、TLFRLLNRSALTQALGKGGGKNLRIIRKGIHIKKY* (SEQ ID NO: 271)、TFFRLFNRSFTQALFKGGGKNLRIIRKGIHIKKY* (SEQ ID NO: 272)、TFFRLFNRSALTQALGKGGGKNLRIIRKGIHIKKY* (SEQ ID NO: 273)、

TFFRLFNRSFTQALNKG GGGKNLRIIRKGIHIKKY* (SEQ ID NO: 274)、
AFFRAFARAFQA AAKGGGKNLRIIRKGIHIKKY* (SEQ ID NO: 275)、
AFFRAFNRFAQA AAKGGGKNLRIIRKGIHIKKY* (SEQ ID NO: 276)、
TFFRLFNRSFTQALSKGGGKNLRIIRKGIHIKKY* (SEQ ID NO: 277)、
AFFRAFARSFAQA AAKGGGKNLRIIRKGIHIKKY* (SEQ ID NO: 278)、
AFFRAFARAFQAAGKGGGKNLRIIRKGIHIKKY* (SEQ ID NO: 279)、
AFFRAFARAFTQA AAKGGGKNLRIIRKGIHIKKY* (SEQ ID NO: 280)、
TFFRLFNRSFTQALGQGGGKNLRIIRKGIHIKKY* (SEQ ID NO: 281)、
TFFRLLNRSFTQALGKGGGKNLRIIRKGIHIKKY* (SEQ ID NO: 282)、
TWFRLFNRSFTQALGKGGGKNLRIIRKGIHIKKY* (SEQ ID NO: 283)、
AFFRAFARAFQAFAKGGGKNLRIIRKGIHIKKY* (SEQ ID NO: 284)、
TQFRLFNRSFTQALGKGGGKNLRIIRKGIHIKKY* (SEQ ID NO: 285)、
TFFRLFNRSFTQALDKGGGKNLRIIRKGIHIKKY* (SEQ ID NO: 286)、
TFFRLFNRSFTQALAKGGGKNLRIIRKGIHIKKY* (SEQ ID NO: 287)、
TFFRLFNRSFTQALGEGGGKNLRIIRKGIHIKKY* (SEQ ID NO: 288)、
TFFRLFSRSFTQALGKGGGKNLRIIRKGIHIKKY* (SEQ ID NO: 289)、
TFFRLFNRSFTQALGAGGGKNLRIIRKGIHIKKY* (SEQ ID NO: 290)、
TFFRLFDRSFTQALGKGGGKNLRIIRKGIHIKKY* (SEQ ID NO: 291)、
TFFRLFNRSFTQALGFGGGKNLRIIRKGIHIKKY* (SEQ ID NO: 292)、
TFFRAFARSFTQA AAKGGGKNLRIIRKGIHIKKY* (SEQ ID NO: 293)、
TFFRLFARSFTQAAGKGGGKNLRIIRKGIHIKKY* (SEQ ID NO: 294)、
TFFRLFNRSFTQLKGGGKNLRIIRKGIHIKKY* (SEQ ID NO: 295)、
TFFRLFNRSFTQALGSGGGKNLRIIRKGIHIKKY* (SEQ ID NO: 296)、
TLFRLFNRSFTQALGKGGGKNLRIIRKGIHIKKY* (SEQ ID NO: 297)、
TFFRLNFRSFTQALGKGGGKILRNIRKGIHIKKY* (SEQ ID NO: 298)、
TFFRLFNRSQTQALGKGGGKNLRIIRKGIHIKKY* (SEQ ID NO: 299)、
TFFRLFAAAFTQALGKGGGKNLRIIRKGIHIKKY* (SEQ ID NO: 300)、
TFFRLFNRSFTQALGKPYPKNLRIIRKGIHIKKY* (SEQ ID NO: 301)、
TFFRLFNRSAAAALGKGGGKNLRIIRKGIHIKKY* (SEQ ID NO: 302)、
TFFRLFFRSNTQALGKGGGKILRIIRKGIHINKKY* (SEQ ID NO: 303)、
TFFRLFNRSFTQPLGKGGGKNLRIIRKGIHIKKY* (SEQ ID NO: 304)、
TAFRLANRSATQALGKGGGKNLRIIRKGIHIKKY* (SEQ ID NO: 305)、
TFFRLFNRSFTQAAAAGGGKNLRIIRKGIHIKKY* (SEQ ID NO: 306)、
TFFRLQNRSFTQALGKGGGKNLRIIRKGIHIKKY* (SEQ ID NO: 307)、
TFFRLFNRSFTQALPKGGGKNLRIIRKGIHIKKY* (SEQ ID NO: 308)、
TYYRLFNRSFTQALGKGGGKNLRIIRKGIHIKKY* (SEQ ID NO: 309) 及
TFFRLFRSFTQALGKGGGKNLRIIRKGIHIKKY* (SEQ ID NO: 310), 其中星号表示任选的酰胺化的羧基末端。当然, 可去掉该保护基团和/或用本文所述的另一个保护基团替换该保护基团。

[0370] 不局限于特定的理论,发现添加保护基团,特别是添加到羧基末端以及在某些实施方案中添加到氨基末端能够改善肽的稳定性和功效。

[0371] 许多保护基团适于该目的。这样的基团包括但不限于乙酰基、酰胺和烷基,特别优选地将乙酰基和烷基用于N末端保护,优选地将酰胺基用于羧基末端保护。在某些特别优选的实施方案中,保护基团包括但不限于烷基链(如在脂肪酸中)、丙酰基、甲酰基等。特别优选的羧基保护基团包括酰胺、酯和形成醚的保护基团。在一个优选的实施方案中,乙酰基用于保护氨基末端,酰胺基用于保护羧基末端。这些阻断基团增大了肽形成螺旋的倾向。某些特别优选的阻断基团包括各种长度的烷基,例如具有下式的基团: $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-$,其中n的范围为约1至约20,优选地约1至约16或18,更优选地约3至约13,最优选地约3至约10。

[0372] 在某些实施方案中,保护基团包括但不限于烷基链(如在脂肪酸中)、丙酰基、甲酰基等。特别优选的羧基保护基团包括酰胺、酯和形成醚的保护基团。在一个实施方案中,乙酰基用于保护氨基末端,和/或氨基用于保护羧基末端(即酰胺化的羧基末端)。在某些实施方案中,阻断基团包括各种长度的烷基,例如具有下式的基团: $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-$,其中 n 的范围为约3至约20,优选地约3至约16,更优选地约3至约13,最优选地约3至约10。

[0373] 在某些实施方案中,可使用醇、醛或酮基团阻断C末端的酸基团,和/或N末端残基可具有天然酰胺基团,或用酰基、羧酸、醇、醛或酮基团阻断N末端残基。

[0374] 其他保护基团包括但不限于Fmoc、叔丁氧羰基(t-BOC)、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(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)、2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-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)、苯甲酰基(Bz)、3-硝基-2-吡啶亚磺酰基(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)、环己基氧基(cHxO)、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)。

[0375] 保护/阻断基团是技术人员公知的,如将这样的基团与构成本发明的肽的适合的残基偶联的方法(参见,例如Greene et al., (1991) Protective Groups in Organic Synthesis, 第2版, John Wiley & Sons, Inc. Somerset, N.J.)。在示例性的实施方案中,例如,当肽在树脂上时,使用乙酸酐在合成过程中实现乙酰化。通过选择用于合成的适合的树脂来实现酰胺保护。例如,可使用rink酰胺树脂。在合成完成之后,酸性双功能氨基酸(例如Asp和Glu)和碱性氨基酸Lys、Tyr的羟基上的半永久性保护基团全部同时被除去。使用酸处理从这样的树脂上释放的肽出现时,其N末端被乙酰基保护,羧基被 NH_2 保护,并且所有其他保护基团被同时除去。

[0376] 当本文中公开的氨基酸序列时,也考虑到包含一个或多个保护基团的氨基酸序列,所述保护基团为例如如上文所述的或者用于所使用的氨基酸的任何其他市售保护基团(例如在boc或fmoc肽合成中)。

[0377] 肽环化

[0378] 在某些实施方案中,本文所述的肽被环化以产生环肽。本文考虑到的环肽包括头/尾、头/侧链、尾/侧链和侧链/侧链环肽。此外,本文考虑到的环肽包括仅包含肽键的均环肽

(homodet), 以及包含额外的二硫键、酯键、硫酯键或其他键的杂环肽 (heterodet)。

[0379] 实际上可使用任何本领域已知的用于制备环肽的技术来制备环肽。例如, 可使用常规溶液或固相肽合成来制备线性的或非环化形式的肽, 并且使用标准化学作用 (chemistry) 使所述肽环化。优选地, 用于使所述肽环化的化学作用是足够温和的以基本上避免降解所述肽。用于合成本文所述的肽的适合的方法以及使所述肽环化的适合的化学作用是本领域中公知的。

[0380] 在各个实施方案中, 可通过使N末端和C末端直接偶联以形成肽 (或其他) 键而实现环化, 但是也可通过氨基酸侧链来实现环化。此外, 环化也可基于使用其他官能团, 包括但不限于氨基、羟基、巯基、卤素、磺酰基、羧基和硫代羧基。这些基团可位于氨基酸侧链或可与它们的N 末端或C末端连接。

[0381] 因此, 应理解, 用于共价地环化本发明的肽的化学键不必是酰胺键。在许多情况下, 可能需要修饰线性肽或非环化的肽的N末端和C末端以提供例如反应性基团, 所述反应性基团可在温和的反应条件下被环化。这样的键包括, 例如但不限于酰胺、酯、硫酯、 $\text{CH}_2\text{-NH}$ 等。用于合成具有经修饰的末端的技术和试剂以及适于使这样的修饰肽环化的化学作用是本领域中公知的。

[0382] 或者, 当肽的末端在构象上或其他情况下受限而难以环化时, 可能需要将接头连接至N末端和/或C末端以促使肽环化。当然, 应了解, 这样的接头将携带能够与肽的末端形成共价键的反应性基团。适合的接头和化学作用是本领域中公知的, 并且包括上文所述的那些。

[0383] 环肽类和缩酚酸肽类 (depsipeptide) (包含酯 (缩酚酸) 键作为它们的主链一部分的杂环肽 (heterodetic peptide) 已被详细地表征, 并且显示出广谱的生物活性。由环化引起的构象自由度降低通常产生更高的受体结合亲和力。通常在这些环状化合物中, 引入额外的构象限制, 例如使用D-和N-烷基化氨基酸、 α, β -脱氢氨基酸或 α, α -双取代氨基酸残基。

[0384] 在肽中形成二硫键的方法是本领域技术人员公知的 (参见, 例如 Eichler and Houghten (1997) *Protein Pept.Lett.* 4:157-164)。

[0385] 也可参考Marlowe (1993) *Bioorg.Med.Chem.Lett.* 3:437-444, 其记载了使用三甲基硅烷基 (TMSE) 酯作为正交的 (orthogonal) 保护基团在TFA树脂上的肽环化; Pallin和Tam (1995) *J.Chem.Soc.Chem. Comm.* 2021-2022, 其记载了通过脒形成, 在水溶液中进行未受保护的肽的环化; Algin et al. (1994) *Tetrahedron Lett.* 35:9633-9636, 其公开了通过赖氨酸侧链锚定, 进行头至尾环肽的固相合成; Kates et al. (1993) *Tetrahedron Lett.* 34:1549-1552, 其记载了通过三维固相策略, 进行头至尾环肽的生产; Tumelty et al. (1994) *J.Chem.Soc.Chem.Comm.* 1067-1068, 其记载了从固定的激活的中间体进行的环肽的合成, 其中进行固定肽的激活并保持N-保护基团完整, 随后除去保护基团, 导致环化; McMurray et al. (1994) *Peptide Res.* 7:195-206, 其公开了通过天冬氨酸和谷氨酸的侧链, 与不溶性载体连接的肽的头至尾环化; Hruby et al. (1994) *Reactive Polymers* 22:231-241, 其教导了通过固体载体使肽环化的替代性方法; 以及Schmidt and Langer (1997) *J.Peptide Res.* 49: 67-73, 其公开了合成环四肽和环五肽的方法。

[0386] 这些肽环化方法是示例性的和非限制性的。使用本文提供的教导, 本领域技术人员可获得其他环化方法。

[0387] 活性肽的鉴定/验证

[0388] 使用体外筛选测定可鉴定和/或验证活性的AMP、STAMP等。实际上,在许多情况下,本文所述的AMP和/或STAMPs在体外被用作防腐剂、局部抗微生物处理等。此外,尽管体外敏感性试验有某些明显限制,临床数据表明在最小抑制浓度(MIC)试验结果和抗生素化合物的体内功效之间存在着良好的相关性(参见,例如Murray et al.(1994) Antimicrobial Susceptibility Testing,Poupard et al.eds.,Plenum Press, 纽约;Knudsen et al.(1995)Antimicrob.Agents Chemother.39(6): 1253-1258等)。因此,也可通过针对特定的微生物靶标的体外抗微生物活性证明(例如,如表4说明的),方便地鉴定适用于治疗感染及其相关疾病的AMP。

[0389] 通常,使用标准NCCLS细菌抑制测定或MIC试验来测试抗微生物试剂的体外抗微生物活性(参见National Committee on Clinical Laboratory Standards"Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing,"NCCLS Document M100-S5第14卷,第16号,1994年12月;"Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically-Third Edition,"Approved Standard M7-A3,National Committee for Clinical Standards,Villanova,Pa)。

[0390] 应了解,本领域中公知的或本领域技术人员阅读本公开内容之后将变得显而易见的其他测定也可用于鉴定活性AMP。这样的测定包括,例如Lehrer et al.(1988) J.Immunol.Meth.,108:153及Steinberg and Lehrer,"Designer Assays for Antimicrobial Peptides:Disputing the`One Size Fits All`Theory,"In: Antibacterial Peptide Protocols,Shafer Ed., Humana Press,N.J.中记载的测定。通常,本发明的活性肽将表现出小于约100 μ M的MIC(使用实施例中所述的测定进行测量),MIC优选小于约80或60 μ M,更优选约50 μ M或更小,约25 μ M或更小,或约15 μ M或更小,或约10 μ M或更小。

[0391] 给药和制剂

[0392] 药物制剂

[0393] 在某些实施方案中,将本文所述的构建体(例如与抗微生物肽连接的靶向肽,与可检测标记物连接的靶向肽等)给予有需要的哺乳动物、细胞、组织、组合物(例如食品)等。在各个实施方案中,可给予所述组合物以检测和/或定位和/或定量特定微生物、微生物群体、包含特定微生物的生物膜等的存在。在各个实施方案中,可给予所述组合物以抑制特定微生物、微生物群体、包含特定微生物的生物膜等。

[0394] 可以以"天然"形式,或(如果需要)以盐、酯、酰胺、药物前体、衍生物等形式给予这些活性剂(抗微生物肽和/或嵌合部分),只要所述盐、酯、酰胺、药物前体或衍生物在制药上是适合的,即在本方法中是有效的。使用合成有机化学领域的技术人员已知并记载于例如March (1992)Advanced Organic Chemistry;Reactions,Mechanisms and Structure,第4版N.Y.Wiley-Interscience中的标准方法,可制备活性剂的盐、酯、酰胺、药物前体和其他衍生物。

[0395] 配制这样的衍生物的方法是本领域技术人员已知的。例如,多种递送试剂的二硫化物盐类记载于PCT公开文本W0 2000/059863中,将其以引用的形式纳入本文。类似地,使用通常包括与适合的酸的反应的常规方法,可从游离碱制备治疗性肽、类肽或其他模拟物

的酸性盐。通常,将药物的碱性形式溶解于极性有机溶剂如甲醇或乙醇中,并向其中加入酸。所生成的盐会沉淀,或者通过加入极性较弱的溶剂将其从溶液中取出。用于制备酸加成盐的适合的酸包括但不限于:有机酸,例如乙酸、丙酸、羟基乙酸、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、对甲苯磺酸、水杨酸等;以及无机酸,例如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等。通过用适合的碱进行的处理,可将酸加成盐重新转化为游离的碱。在本文中,活性剂的某些特别优选的酸加成盐包括卤化物盐类,例如可使用盐酸或氢溴酸来制备。相反,使用可药用的碱(例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙、三甲胺等)以类似的方式来制备本发明的活性剂的碱性盐制剂。在某些实施方案中,碱性盐包括碱金属盐类,例如钠盐,以及铜盐。

[0396] 对于碱性药物的盐形式的制备,反离子的pKa优选地比药物的pKa 低至少约2pH。类似地,对于酸性药物的盐形式的制备,反离子的pKa 优选地比药物的pKa高至少约2pH。这允许反离子使溶液的pH达到低于pH_{max}的水平以达到盐平稳期(salt plateau),在这个阶段盐的溶解度超过游离酸或碱的溶解度。在活性药物成分(API)中及在酸或碱中可电离基团的pKa单位的差异的一般规则意欲使质子转移在能量上是有利的。当API和反离子的pKa不具有显著差异时,可形成固体复合物,但是其在水环境中可快速歧化(disproportionate)(即分解成单独的药物和反离子实体)。

[0397] 优选地,所述反离子是可药用的反离子。适合的阴离子盐形式包括但不限于乙酸盐、苯甲酸盐、苄化物(benzylate)、酒石酸氢盐、溴化物、碳酸盐、氯化物、柠檬酸盐、乙二胺四乙酸盐、乙二磺酸盐、丙酸酯十二烷基硫酸盐、延胡索酸盐、葡庚糖酸盐、葡糖酸盐、氢溴酸盐、盐酸盐、碘化物、乳酸盐、乳糖酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、扁桃酸盐、甲磺酸盐、甲基溴化物、甲基硫酸盐、粘酸盐、萘磺酸盐、硝酸盐、双羟萘酸盐、磷酸盐和二磷酸盐、水杨酸盐和二水杨酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、甲苯磺酸盐、三乙基碘、戊酸盐等,而适合的阳离子盐形式包括但不限于铝盐、苄星青霉素(benzathine)、钙盐、乙二胺、赖氨酸、镁盐、葡甲胺、钾盐、普鲁卡因(procaine)、钠盐、氨基丁三醇、锌盐等。

[0398] 在各个实施方案中,酯的制备通常包括活性剂的分子结构内部存在的羟基和/或羧基的官能化。在某些实施方案中,酯通常是游离的醇基团的酰基取代的衍生物,即衍生自式RCOOH的羧酸的部分,其中R是烷基,优选地为低级烷基。如果需要,通过使用常规的氢解或水解方法,可将酯重新转化为游离酸。

[0399] 使用本领域技术人员已知或记载于相关文献中的技术也可制备酰胺。例如,使用适合的胺反应物可从酯制备酰胺,或者通过与氨或低级烷基胺的反应可从酸酐或酰基氯制备酰胺。

[0400] 在各个实施方案中,本文鉴定的活性剂适用于胃肠外、局部、口服、经鼻(或者吸入)、直肠或局部给药,例如通过气溶胶或透皮给药,用于检测和/或定量和/或定位和/或预防性和/或治疗性处理感染(例如微生物感染)。根据给药方法,可以以多种单位剂型给予组合物。适合的单位剂型包括但不限于粉剂、片剂、丸剂、胶囊、锭剂(lozenge)、栓剂、贴片(patch)、鼻腔喷雾、注射剂、可植入缓释制剂、脂质复合物等。

[0401] 本文所述的活性剂(例如抗微生物肽和/或嵌合构建体)也可与可药用载体(赋形剂)结合以形成药物组合物。在某些实施方案中,可药用载体包括联邦政府或州政府管理机构批准的,或美国药典或其他通常公认的药典中列出的用于动物,更特别地用于人的那些

载体。“载体”指，例如同本发明的活性剂一起被给予的稀释剂、佐剂、赋形剂、辅助试剂或媒介物(vehicle)。

[0402] 可药用载体可包含一种或多种生理上可接受的化合物，其作用为例如稳定组合物或增加或减少活性剂的吸收。生理上可接受的化合物可包括，例如碳水化合物类如葡萄糖、蔗糖或葡聚糖，抗氧化剂如抗坏血酸或谷胱甘肽，螯合剂，低分子量蛋白，保护和吸收增强剂如脂质，降低活性剂清除或水解的组合物，或赋形剂或其他稳定剂和/或缓冲剂。

[0403] 其他生理上可接受的化合物，特别是用于制备片剂、胶囊、凝胶帽等的化合物，包括但不限于粘合剂、稀释剂/填充剂、崩解剂(disintegrant)、润滑剂、悬浮剂等。

[0404] 在某些实施方案中，为了制备口服剂型(例如片剂)，例如可将赋形剂(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、淀粉羟乙酸钠、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(例如滑石、硬脂酸镁、聚乙二醇6000等)加入到活性组分(例如活性肽)中，并压缩所获得的组合物。必要时，通过例如用于掩盖味道或用于肠溶解或持续释放的已知方法来包覆压缩产物。适合的包覆材料包括但不限于乙基纤维素、羟甲基纤维素、聚氧乙二醇、乙酸邻苯二甲酸纤维素、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯和Eudragit(Rohm&Haas, 德国; 甲基丙烯酸-丙烯酸共聚物)。

[0405] 其他生理上可接受的化合物包括特别适用于阻止微生物生长或作用的润湿剂、乳化剂、分散剂或防腐剂。各种防腐剂是公知的，并且包括例如苯酚或抗坏血酸。本领域技术人员将了解，可药用载体(包括生理上可接受的化合物)的选择取决于活性剂的给药途径以及活性剂的特定的生理-化学特征。

[0406] 在某些实施方案中，所述赋形剂是无菌的并且通常没有不想要的物质。可通过常规、公知的灭菌技术对这些组合物进行灭菌。对于各种口服剂型赋形剂(例如片剂和胶囊)，不需要进行灭菌。USP/NF标准通常是足够的。

[0407] 在某些治疗应用中，以足以预防和/或治疗和/或至少部分预防或阻止疾病和/或其并发症的量，将本发明的组合物给予(例如，局部给予或给予至口腔或鼻腔)至患有感染或处于感染风险中的患者，以预防龋齿或特征为微生物感染的其他牙齿或口腔粘膜病状。足以实现这一点的量被定义为“治疗有效剂量”。该用途的有效量将取决于疾病的严重性和患者健康的总体情况。根据所需的剂量和频率可单次或多次给予组合物，并被患者所耐受。在任何情况下，所述组合物应提供足够量的本发明的制剂的活性剂以有效治疗患者(缓解患者(的一种或多种症状))。

[0408] 活性剂的浓度可在较宽的范围内变化，并且可根据所选的特定给药方式和患者需要，主要基于活性成分的活性、体重等进行选择。然而，通常选择浓度以提供范围为约0.1或1mg/kg/天至约50mg/kg/天(有时更高)的剂量。通常剂量范围为约3mg/kg/天至约3.5mg/kg/天，优选地约3.5mg/kg/天至约7.2mg/kg/天，更优选地约7.2mg/kg/天至约11.0 mg/kg/天，最优选地约11.0mg/kg/天至约15.0mg/kg/天。在某些优选的实施方案中，剂量范围为约10mg/kg/天至约50mg/kg/天。在某些实施方案中，剂量范围为约20mg至约50mg，每天口服两次。应理解，这样的剂量可被改变以优化特定受试者或受试者群体中的治疗性和/或预防性方案(regimen)。

[0409] 在某些实施方案中，将本发明的活性剂给予至口腔。这可通过使用锭剂、气溶胶喷

雾剂、漱口剂、包衣拭子等而容易地完成。

[0410] 在某些实施方案中,将本发明的活性剂局部给予至例如皮肤表面、局部损伤或伤口、手术部位等。

[0411] 在某些实施方案中,根据本领域技术人员公知的标准方法,全身性地(例如口服,或作为注射剂)给予本发明的活性剂。在其他优选的实施方案中,也可使用常规的透皮药物递送系统(即透皮“贴片”)通过皮肤来递送所述试剂,其中所述活性剂通常被包含在片层结构中,该结构作为附着于皮肤上的药物递送装置起作用。在这样的结构中,药物组合物通常被包含在上方支持层(backing layer)下面的层或“库(reservoir)”中。应理解,在本文上下文中“库”指最终可用于递送到皮肤表面的一定量“活性成分”。因此,例如,“库”可包括贴片的支持层上的胶粘剂中,或本领域技术人员已知的多种不同的基质制剂的任一种中的活性成分。所述贴片可包含单一库,或可包含多个库。

[0412] 在一个实施方案中,所述库包括可药用的接触粘合材料的聚合基质,其在药物递送过程中使所述系统附着在皮肤上。适合的皮肤接触粘合材料的实例包括但不限于聚乙烯类、聚硅氧烷类、聚异丁烯类、聚丙烯酸酯类、聚氨酯类等。或者,包含药物的库和皮肤接触胶粘剂作为单独和不同的层存在,所述胶粘剂在所述库的下方,在这种情况下,所述库可以是如上所述的聚合基质,或者可以是液体或水凝胶库,或者可以为一些其他形式。在这些分层中的支持层——其作为装置的上表面起作用——优选地作为“贴片”的主要结构元件发挥作用,并且为所述装置提供了许多灵活性。选择用于支持层的材料优选地为活性剂和所存在的任何其他材料基本上不能透过的材料。

[0413] 其他用于局部递送的制剂包括但不限于软膏剂、凝胶剂、喷雾剂、流体(fluid)和乳膏剂。软膏剂是半固体制品,其通常基于矿油(petrolatum)或其他石油衍生物。包含所选择的活性剂的乳膏剂通常是粘性液体或半固体乳剂,通常为水包油或油包水的。乳膏基通常是可水洗的,并且包含油相、乳化剂和水相。油相有时也被称为“内部”相,其通常包含矿油和脂肪醇(例如十六烷醇或硬脂醇);水相通常(尽管不是必须的)在体积上超过油相,并且通常包含保湿剂。乳膏制剂中的乳化剂通常是非离子、阴离子、阳离子或两性表面活性剂。要使用的具体的软膏基或乳膏基——如本领域技术人员了解的——是将保证最佳药物递送的那些。与其他载体或媒介物一样,软膏基应当是惰性、稳定、非刺激性和非致敏的。

[0414] 如上所述,也考虑到各种含服制剂和舌下制剂。

[0415] 在某些实施方案中,可将一种或多种本发明的活性剂提供为“浓缩剂”,例如在准备用于稀释的贮存容器中(例如以预测量的容积),或在准备用于添加一定体积的水、醇、过氧化氢或其他稀释剂的可溶性胶囊中。

[0416] 尽管针对在人体中的使用来描述本发明,本发明也适用于动物,例如兽医用途。因此,某些优选的生物包括但不限于人、非人灵长类动物、犬、马、猫、猪、有蹄类动物、兔(largomorph)等。

[0417] 纳米乳剂制剂

[0418] 在某些实施方案中,将本文所述的肽和/或嵌合部分(例如STAMP)配制于纳米乳剂中。纳米乳剂包括但不限于水包油(O/W)纳米乳剂和油包水(W/O)纳米乳剂。纳米乳剂可被定义为平均微滴直径范围为约20nm至约1000nm的乳剂。通常,平均微滴尺寸为约20nm或50nm至约500nm。术语“亚微米乳剂(SME)”和“微乳剂”被用作同义词。

[0419] 示例性的水包油 (O/W) 纳米乳剂包括但不限于：

[0420] 表面活性剂微团——包含小分子表面活性剂或洗涤剂的微团 (例如 SDS/PBS/2-丙醇)，其适用于主要疏水的肽；

[0421] 聚合物微团——包含聚合物、共聚物或嵌段共聚物表面活性剂的微团 (例如 Pluronic L64/PBS/2-丙醇)，其适用于主要疏水的肽；

[0422] 混合微团：其中有多于一种表面活性剂组分或其中一种液相 (通常是醇或脂肪酸化合物) 参与形成微团的微团 (例如辛酸/PBS/EtOH)，其适用于主要疏水的肽；

[0423] 完整的肽微团——其中肽作为辅助表面活性剂，形成微团的一个完整部分的混合微团 (例如两亲性肽/PBS/矿物油)，其适用于两亲性肽；和

[0424] Pickering (固相) 乳剂——其中肽与固体纳米颗粒的外部相连的乳剂 (例如聚苯乙烯纳米颗粒/PBS/无油相)，其适用于两亲性肽。

[0425] 示例性的油包水 (W/O) 纳米乳剂包括但不限于：

[0426] 表面活性剂微团——包含小分子表面活性剂或洗涤剂的微团 (例如磺基琥珀酸二辛酯/PBS/2-丙醇，肉豆蔻酸异丙酯/PBS/2-丙醇等)，其适用于主要亲水的肽；

[0427] 聚合物微团——包含聚合物、共聚物或嵌段共聚物表面活性剂的微团 (例如 **PLURONIC®** L121/PBS/2-丙醇)，其适用于主要亲水的肽；

[0428] 混合微团：其中有多于一种表面活性剂组分或其中一种液相 (通常是醇或脂肪酸化合物) 参与微团形成的微团 (例如癸酸/辛酸甘油二酯 /PBS/EtOH)，其适用于主要亲水的肽；

[0429] 完整的肽微团——其中肽作为辅助表面活性剂，形成微团的一个完整部分的混合微团 (例如两亲性肽/PBS/聚丙二醇)，其适用于两亲性肽；和

[0430] Pickering (固相) 乳剂——其中肽与固体纳米颗粒的外部相连的乳剂 (例如壳聚糖纳米颗粒/无水相/矿物油)，其适用于两亲性肽。

[0431] 如以上所述，在某些实施方案中，所述纳米乳剂包括一种或多种表面活性剂或洗涤剂。在一些实施方案中，所述表面活性剂是非阴离子型洗涤剂 (例如聚山梨醇酯表面活性剂、聚氧乙烯醚等)。可用于本发明的表面活性剂包括但不限于例如 **TWEEN®**、**TRITON®** 和 **TYLOXAPOL®** 化合物家族的表面活性剂。

[0432] 在某些实施方案中，乳剂还包括一种或多种含卤素的阳离子化合物，包括但不限于氯化十六烷基吡啶。在其他实施方案中，所述组合物还包括一种或多种增加组合物与微生物相互作用 (“相互作用增强剂”) 的化合物 (例如，螯合剂如缓冲剂中的乙二胺四乙酸或乙烯双 (氧基乙烯氮川基) 四乙酸 (ethylelebis (oxyethylenenitrilo) tetraacetic acid))。

[0433] 在一些实施方案中，所述纳米乳剂还包括乳化剂以有助于乳剂形成。乳化剂包括在油/水界面聚集以形成一种连续膜的化合物，所述连续膜阻止两个相邻微滴之间直接接触。本发明的某些实施方案描述了水包油乳剂组合物，所述组合物易于用水稀释到所需浓度而不损害它们的抗病原体特性。

[0434] 除了分散在水相中的不连续油微滴，某些水包油乳剂也可包含其他脂质结构，例如小脂质囊泡 (例如，通常由彼此间被水相层分隔开的若干基本上同心的脂质双层组成的脂质球)、微团 (例如，两亲性分子以 50-200 分子的小簇排列，从而使极性头部基团向外朝

向水相,并且非极性尾部向内远离水相)、或层状相(脂质分散相(dispersion),其中每个颗粒由被水的薄膜分隔开的平行两亲性双层组成)。

[0435] 由于驱动非极性残基(例如长烃链)远离水的疏水力,形成了这些脂质结构。通常可将以上脂质制品描述为表面活性剂脂质制品(SLP)。SLP对粘膜的毒性极低,并且被认为可在小肠内代谢(参见,例如 Hamouda et al., (1998) J. Infect. Disease 180:1939)。

[0436] 在某些实施方案中,所述乳剂包括分布在水相中的不连续油相,第一组分包括醇和/或甘油,第二组分包括表面活性剂或含卤素的化合物。水相可包括任何类型的水相,包括但不限于水(例如,去离子水、蒸馏水、自来水)和溶液(例如磷酸缓冲盐溶液或其他缓冲体系)。油相可包括任何类型的油相,包括但不限于植物油(例如大豆油、鳄梨油、亚麻籽油、椰子油、棉籽油、角鲨烯油、橄榄油、芥花籽(canola)油、玉米油、油菜籽油、红花油和向日葵油)、动物油(例如鱼油)、调味油、水不溶性维生素、矿物油和汽油。在某些实施方案中,油相包含30-90 vol%的水包油乳剂(即组成最终乳剂总体积的30-90%),更优选 50-80%。

[0437] 在某些实施方案中,当存在醇类时,所述醇为乙醇。

[0438] 尽管本发明不限于表面活性剂的性质,在一些优选的实施方案中,所述表面活性剂是聚山梨醇酯表面活性剂(例如TWEEN**20®**、TWEEN **40®**、TWEEN**60®**和TWEEN**80®**)、苯氧基聚乙氧基乙醇(例如**TRITON®**X-100、X-301、X-165、X-102和X-200和**TYLOXAPOL®**)或十二烷基硫酸钠等。

[0439] 在某些实施方案中,存在含卤素的组分。含卤素的化合物的性质,在一些优选的实施方案中,所述含卤素的化合物包括盐酸盐(例如NaCl、KCl等)、卤化十六烷基吡啶、十六烷基三甲基卤化铵、十六烷基二甲基乙基卤化铵、十六烷基二甲基苄基卤化铵、十六烷基三丁基卤化磷、十二烷基三甲基卤化铵、四癸基三甲基卤化铵、氯化十六烷基吡啶、十六烷基三甲基氯化铵、十六烷基苄基二甲基氯化铵、溴化十六烷基吡啶、十六烷基三甲基溴化铵、十六烷基二甲基乙基溴化铵、十六烷基三丁基溴化磷、十二烷基三甲基溴化铵、四癸基三甲基溴化铵等。

[0440] 在某些实施方案中,所述乳剂包括季铵化合物。季铵化合物包括但不限于N-烷基二甲基苄基糖精铵、1,3,5-三嗪-1,3,5 (2H,4H,6H)-三乙醇; 1-癸铵(1-Decanaminium), N-癸基-N,N-二甲基-,氯化物(或)二癸基二甲基氯化铵; 2-(2-(对-(二异丁基) 甲苯氧基(cresosxy)) 乙氧基) 乙基二甲基苄基氯化铵; 2-(2-(对-(二异丁基) 苯氧基) 乙氧基) 乙基二甲基苄基氯化铵; 氯化烷基1或3苄基-1-(2-羟乙基)-2-咪唑啉; 烷基双(2-羟乙基) 苄基氯化铵; 烷基二甲基苄基氯化铵; 烷基二甲基3,4-二氯苄基氯化铵 (100%C12); 烷基二甲基3,4-二氯苄基氯化铵 (50%C14、40%C12、10%C16); 烷基二甲基3,4-二氯苄基氯化铵 (55%C14、23%C12、20%C16); 烷基二甲基苄基氯化铵; 烷基二甲基苄基氯化铵 (100%C14); 烷基二甲基苄基氯化铵 (100%C16); 烷基二甲基苄基氯化铵 (41%C14、28%C12); 烷基二甲基苄基氯化铵 (47%C12、18%C14); 烷基二甲基苄基氯化铵 (55%C16、20%C14); 烷基二甲基苄基氯化铵 (58%C14、28%C16); 烷基二甲基苄基氯化铵 (60%C14、25%C12); 烷基二甲基苄基氯化铵 (61%C11、23%C14); 烷基二甲基苄基氯化铵 (61%C12、23%C14); 烷基二甲基苄基氯化铵 (65%C12、25%C14); 烷基二甲基苄基氯化铵 (67%C12、24%C14); 烷基二甲基苄基氯化铵 (67%C12、25%C14); 烷基二甲基苄基氯化铵 (90%C14、5%C12); 烷基二甲基苄基氯化铵 (93%C14、4%C12); 烷基二甲基苄基氯化铵 (95%C16、5%C18); 烷基二

甲基苄基氯化铵(和)二癸基二甲基氯化铵;烷基二甲基苄基氯化铵(如在脂肪酸中);烷基二甲基苄基氯化铵(C12-C16);烷基二甲基苄基氯化铵(C12-C18);烷基二甲基苄基和二烷基二甲基氯化铵;烷基二甲基二甲基苄基氯化铵;烷基二甲基乙基溴化铵(90%C14、5%C16、5%C12);烷基二甲基乙基溴化铵(如在大豆油的脂肪酸中的混合烷基和烯基);烷基二甲基乙基苄基氯化铵;烷基二甲基乙基苄基氯化铵(60%C14);烷基二甲基异丙基苄基氯化铵(50%C12、30%C14、17%C16、3%C18);烷基三甲基氯化铵(58% C18、40%C16、1%C14、1%C12);烷基三甲基氯化铵(90%C18、10%C16);烷基二甲基(乙基苄基)氯化铵(C12-18);二-(C8-10)-烷基二甲基氯化铵;二烷基二甲基氯化铵;二烷基二甲基氯化铵;二烷基二甲基氯化铵;二烷基甲基苄基氯化铵;二癸基二甲基氯化铵;二异癸基二甲基氯化铵;二辛基二甲基氯化铵;十二烷基双(2-羟乙基)辛基氯化氢铵;十二烷基二甲基苄基氯化铵;十二烷基氨甲酰基甲基二甲基苄基氯化铵;氯化十七烷基羟乙基咪唑啉;六氢-1,3,5-三(2-羟乙基)-均三嗪;十四烷基二甲基苄基氯化铵(myristalkonium chloride)(和)Quaternium 14;N,N-二甲基-2-羟丙基氯化铵聚合物;正烷基二甲基苄基氯化铵;正烷基二甲基乙基苄基氯化铵;正十四烷基二甲基苄基氯化铵一水合物;辛基癸基二甲基氯化铵;辛基十二烷基二甲基氯化铵;辛基苯氧基乙氧基乙基二甲基苄基氯化铵;氧基二乙烯双(烷基二甲基氯化铵);季铵化合物,二椰油基(dicoco)烷基二甲基氯化物;三甲氧基甲硅烷基丙基二甲基十八烷基氯化铵;三甲氧基甲硅烷基季铵化合物,三甲基十二烷基苄基氯化铵;正十二烷基二甲基乙基苄基氯化铵;正十六烷基二甲基苄基氯化铵;正十四烷基二甲基苄基氯化铵;正十四烷基二甲基乙基苄基氯化铵;和正十八烷基二甲基苄基氯化铵。

[0441] 纳米乳剂制剂及其制备方法是本领域技术人员公知的,并且记载于例如美国专利第7,476,393、7,468,402、7,314,624、6,998,426、6,902,737、6,689,371、6,541,018、6,464,990、6,461,625、6,419,946、6,413,527、6,375,960、6,335,022、6,274,150、6,120,778、6,039,936、5,925,341、5,753,241、5,698,219和5,152,923号,以及Fanun et al.(2009) Microemulsions: Properties and Applications (Surfactant Science), CRC Press, Boca Raton Fl.

[0442] 制剂优化活性

[0443] 在某些实施方案中,选择制剂以优化靶向肽、抗微生物肽、嵌合部分和/或STAMP的结合特异性和/或结合亲合力和/或抗微生物活性和/或稳定性/构象。在这方面出乎意料的发现是,在存在盐的情况下,某些 STAMP和推定的组成型靶向肽和/或抗微生物肽的活性得到优化。因此,考虑到某些实施方案,其中配制与一种或多种盐结合的靶向肽和/或抗微生物肽和/或STAMP。然而,本文公开的制剂并不限于包含盐的那些。也考虑到在不存在盐的情况下配制靶向肽和/或抗微生物肽和/或STAMP 的实施方案。

[0444] 在某些实施方案中,氯化钠加上一点氯化钾产生被测试盐的最佳活性。然而,其他盐例如CaCl₂、MgCl₂、MnCl₂也增加活性。因此,在某些实施方案中,考虑到使用一种或多种盐来配制靶向肽和/或抗微生物肽和/或嵌合部分和/或STAMP。

[0445] 在某些实施方案中,适合的盐包括许多可药用盐的任一种。代表性的盐类包括氢溴酸盐、盐酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、硝酸盐、乙酸盐、戊酸盐、油酸盐、棕榈酸盐、硬脂酸盐、月桂酸盐、苯甲酸盐、乳酸盐、磷酸盐、甲磺酸盐、柠檬酸盐、马来酸盐、延胡索酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、萘酸盐(naphylate)、甲磺酸盐、苯磺酸盐、葡庚糖酸盐、乳糖醛酸

盐和十二烷基磺酸盐等(参见,例如Berge et al. (1977) J.Pharm.Sci.66:1-19)。

[0446] 在某些实施方案中,本发明的可药用的盐包括化合物的常规无毒性盐或季铵盐,例如来自无毒性有机酸或无机酸。例如,这样的常规无毒性盐包括获得自以下无机酸的那些:例如盐酸、氢溴酸、硫酸、氨基磺酸、磷酸、硝酸等;以及从以下有机酸制备的盐:例如乙酸、丙酸、琥珀酸、羟基乙酸、硬脂酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、抗坏血酸、棕榈酸、马来酸、羟基马来酸、苯乙酸、谷氨酸、苯甲酸、水杨酸、对氨基苯磺酸、2-乙氧基苯甲酸、延胡索酸、甲苯磺酸、甲磺酸、苯磺酸、乙烷二磺酸、草酸、异硫碳酸(isothonic acid)等。

[0447] 在其他情况下,本发明的化合物可包含一个或多个酸性官能团,因此能够与可药用的碱形成可药用的盐。在这些情况下,术语“可药用的盐”指本发明化合物的相对无毒的无机和有机碱加成盐。同样,可在给药媒介物或剂型制备过程中来原位制备这些盐,或通过用适合的碱(例如可药用的金属阳离子的氢氧化物、碳酸盐或碳酸氢盐),用氨,或用可药用的有机伯胺、仲胺或叔胺单独地处理游离酸形式的化合物,来制备这些盐。代表性的碱金属或碱土金属盐包括锂盐、钠盐、钾盐、钙盐、镁盐和铝盐等。适用于形成碱加成盐的代表性的有机胺包括乙胺、二乙胺、乙二胺、乙醇胺、二乙醇胺、哌嗪等(参见,例如Berge et al.,同前;及Stahl and Wermuth (2002) Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, Wiley-VCH, Zurich, 瑞士)。

[0448] 在各个实施方案中,所述盐只是氯化钠和/或氯化钾并且可容易地例如作为磷酸缓冲盐(PBS)溶液而制备。在某些实施方案中,盐浓度相当于0.5X PBS至约2.5X PBS,更优选地约0.5X PBS至约1.5X PBS。在某些实施方案中,在1X PBS中观察到最佳活性。

[0449] 在各个实施方案中,制剂的pH范围为约pH 5.0至约pH 8.5,优选地约pH 6.0至约pH 8.0,更优选地约pH 7.0至约pH 8.0。在某些实施方案中,pH约为pH 7.4。

[0450] 尽管使用PBS缓冲体系观察到某些STAMP的最佳结果,其他缓冲体系也是可接受的。这样的缓冲剂包括但不限于硫酸盐缓冲剂、碳酸盐缓冲剂、Tris缓冲剂、CHAPS缓冲剂、PIPES缓冲剂等,只要包含所述盐。

[0451] 在各个实施方案中,靶向肽和/或抗微生物肽和/或嵌合部分和/或 STAMP是以约1nM至约1、10或100mM,更优选地从约1nM、约 10nM、约100nM、约1μM或约10μM至约50μM、约100μM、约 200μM、约300μM、约400μM或约500μM,优选地约1μM、约10μM、约25μM或约50μM至约1mM、约10mM、约20mM或约5mM,最优选地约10μM、约20μM或约50μM至约100μM、约150μM或约200μM的浓度存在于制剂中。

[0452] 家庭健康护理/卫生产品制剂

[0453] 在某些实施方案中,一种或多种本文所述的靶向肽和/或抗微生物肽 (AMP) 和/或嵌合部分和/或STAMP被加入到健康护理制剂中,例如用于家庭用途的制剂。这样的制剂包括但不限于牙膏;漱口剂;牙齿美白贴或溶液;隐形眼镜储存、湿润或清洗溶液;牙线;牙签;牙刷毛;口腔喷雾剂;口腔含片(oral lozenge);鼻腔喷雾;用于口腔和/或鼻应用的雾化器、伤口敷料(例如绷带)等。

[0454] 例如,针对变形链球菌的嵌合部分和/或STAMP和/或AMP也良好地适用于抑制龋齿形成、牙菌斑形成、牙周病和/或口臭的频率或严重性。

[0455] 针对棒杆菌属种(*Corynebacterium* spp.)的嵌合部分和/或STAMP 和/或AMP在应用于皮肤表面时能够减少/消除棒杆菌,从而减少气味。可将这样的部分容易地加到肥皂、

抗生素、防腐剂(antiseptics)、消毒剂等中。

[0456] 这样的健康产品制剂是技术人员公知的,并且以有效剂量(例如抑制龋齿形成等的预防性剂量)将抗微生物肽和/或嵌合构建体简单地添加到所述制剂中。

[0457] 例如,牙膏制剂是本领域技术人员公知的。通常这样的制剂是以下的混合物:研磨剂和表面活性剂;抗龋剂,例如氟化物;牙垢控制成分,例如焦磷酸四钠和甲基乙烯醚/马来酸酐共聚物;pH缓冲剂;保湿剂,以防止脱水(dry out)并增加令人舒服的口感;以及粘合剂,以提供稠度和形状(参见例如表6)。粘合剂使固相恰当地悬浮于液相中以防止液相从牙膏中分离出来。它们也为牙粉提供形体,特别是在从管中挤压到牙刷上之后。

[0458] 表6牙膏的典型组分

[0459]

成分	Wt %
保湿剂	40-70
水	0-50
缓冲剂/水/牙垢控制物	0.5-10
有机增稠剂(胶)	0.4-2
无机增稠剂	0-12
研磨剂	10-50
活性成分(例如三氯生)	0.2-1.5
表面活性剂	0.5-2
香料和甜味剂	0.8-1.5

[0460] 氟化物来源提供468-15000ppm氟。

[0461] 表7中列出了用于制剂中的典型成分;最终的组合将取决于若干因素,例如成分相容性和成本、当地风俗,以及要在产品中实现的所需的益处和质量。应理解,可容易地将一种或多种本文所述的抗微生物肽和/或嵌合构建体添加到所述制剂中,或使用一种或多种本文所述的抗微生物肽和/或嵌合构建体以代替一种或多种其他成分。

[0462] 表7典型成分列表

[0463]

胶	无机增稠剂	研磨剂	表面活性剂	保湿剂	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	十二烷基硫酸钠	甘油	焦磷酸四钠
纤维素醚	硅酸铝钠	磷酸二钙二水合物	N-十二烷基肌氨酸钠	山梨醇	Gantrez S-70
黄原胶	粘土	碳酸钙	普郎尼克 (Pluronic)	丙二醇	三聚磷酸钠
角叉菜胶		碳酸氢钠		木糖醇	
海藻酸钠		焦磷酸钙	十二烷基磺基乙酸钠	聚乙二醇	
聚羧乙烯 (Carbopol)		氧化铝 (alumina)			

[0464] 美国专利6,113,887中记载的一个示例性的制剂包括：(1)选自吡啶化合物、季铵化合物和双胍化合物的水溶性杀菌剂，其量为0.001%至5.0% (重量)，以组合物的总重量计；(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或更高并且阳离子化程度为0.05至0.5mol/葡萄糖，其量为0.5%至5.0% (重量)，以组合物的总重量计；(3)选自聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物和烷醇胺化合物的表面活性剂，其量为0.5%至13% (重量)，以组合物的总重量计；和(4)非二氧化硅型抛光剂，其量为5%至50% (重量)，以组合物的总重量计。在某些实施方案中，本文所述的抗微生物肽和/或嵌合构建体可用于代替杀菌剂或与杀菌剂组合使用。

[0465] 类似地，漱口制剂也是本领域技术人员公知的。因此，例如，包含氟化钠的漱口剂公开于美国专利第2,913,373、3,975,514和4,548,809号，以及美国专利公开文本US 2003/0124068 A1、US 2007/0154410 A1等。包含各种碱金属化合物的漱口剂也是已知的：苯甲酸钠(WO 9409752)；碱金属次卤酸盐(alkali metal hypohalite) (US 20020114851A1)；二氧化氯(CN 1222345)；碱金属磷酸盐(US 2001/0002252 A1、US 2003/0007937 A1)；硫酸氢盐/碳酸氢盐(JP 8113519)；氯化十六烷基吡啶(CPC) (参见，例如US 6,117,417、US 5,948,390和JP 2004051511)。包含高级醇的漱口剂(参见，例如US 2002/0064505 A1、US 2003/0175216 A1)；过氧化氢(参见，例如CN 1385145)；CO₂气泡(参见，例如JP 1275521和JP 2157215)也是已知的。在某些实施方案中，这些和其他漱口制剂可还包括一种或多种本发明的AMP或复合AMP。

[0466] 隐形眼镜储存、湿润或清洗溶液；牙线；牙签；牙刷毛；口腔喷雾剂；口腔含片；鼻腔喷雾；用于口腔和/或鼻应用的雾化器等也是本领域技术人员公知的，并且可以容易地被改造为适于加入一种或多种本文所述的抗微生物肽和/或嵌合构建体。

[0467] 以上药物和/或家庭健康护理制剂和/或装置意欲为示例性的而非限制性的。使用

本文提供的教导,可以容易地将本文所述的抗微生物肽和/或嵌合构建体加入到其他产品中。

[0468] 示例性的口腔护理制剂

[0469] 本文所述的靶向肽和/或嵌合部分和/或STAMP可用于多种应用,例如以上所述。在某些实施方案中,抗变形链球菌的STAMP、AMP和/或其他嵌合部分可用于降低龋齿的发病率和严重性、抑制牙菌斑形成、减少口臭等。因此,在某些实施方案中,这样的部分被包含在用于牙科应用的装置和制剂中,例如茶或其他饮料、牙签包衣、牙线包衣、牙膏、凝胶、漱口剂、涂剂(varnish),甚至是专用的牙科产品。

[0470] 在某些实施方案中,提供了治疗牙周病或降低牙周病的发病率、持续时间或严重性的方法。所述方法可包括将组合物应用于龈缝或牙周袋,所述组合物包括本文所述的靶向肽和/或抗微生物肽和/或STAMP和/或其他嵌合部分,以及载体/稳定剂。在所应用的组合物中,所述载体/稳定剂可提供活性剂(例如STAMP)的保持、组织渗透、沉积和持续释放,用于减少牙周生物膜和相关组织内特定细菌物种的种群。在某些实施方案中,所述载体试剂提供渗透并保留在龈缝或牙周袋和相关组织中,并持续释放活性剂,以加强龈组织和牙本质小管组织内所选择的细菌种群的减少。

[0471] 在各个实施方案中,载体试剂可包括但不限于聚丙交酯、聚乙交酯、聚丙交酯-共-乙交酯、聚己酸内酯、基于纤维质的聚合物、乙二醇聚合物及其共聚物、氧乙烯聚合物(oxyethylene polymer)、聚乙烯醇、壳聚糖和透明质酸(hyaluronan)及其共聚物。一方面,所述载体试剂包括羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟甲基纤维素、聚乙烯醇、聚乙二醇、聚环氧乙烷、环氧乙烷-环氧丙烷共聚物、壳聚糖、透明质酸及其共聚物,或其组合。另一方面,所述载体试剂包括透明质酸或透明质酸及其共聚物,包括透明质酸的盐、透明质酸的酯、透明质酸的交联凝胶、透明质酸的酶衍生物、透明质酸的化学修饰衍生物,或它们的组合。如本文所使用,透明质酸广义上指由D-葡萄糖醛酸多糖和N-乙酰基-D-葡萄糖胺的残基组成的具有多种分子量的酸性多糖的天然的、微生物的和合成的衍生物。

[0472] 在某些实施方案中,活性剂(例如STAMP、AMP等)和载体试剂为混合物形式,复合物形式、共价连接的,或它们的组合。在某些实施方案中,所述载体试剂包括生物胶粘剂。适合的生物胶粘载体试剂包括但不限于基于纤维素的聚合物和/或糊精。适合的基于纤维素的聚合物包括但不限于羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟甲基纤维素,或其混合物。在一个示例性的实施方案中,所述生物胶粘载体试剂包括但不限于聚丙交酯、聚乙交酯、聚丙交酯-共-乙交酯、聚乙二醇、透明质酸、透明质酸、壳聚糖,或它们的混合物。在某些实施方案中,所述生物胶粘载体试剂可包括共聚物,所述共聚物包含聚乙二醇、透明质酸、透明质酸、壳聚糖,或它们的混合物。

[0473] 在某些实施方案中,所述载体试剂透过牙周组织。适合的渗透性载体试剂包括但不限于透明质酸、透明质酸衍生物、壳聚糖、壳聚糖衍生物,或它们的混合物。在一个实施方案中,渗透性载体试剂包括透明质酸的盐、透明质酸的酯、透明质酸的酶衍生物、透明质酸的交联凝胶、透明质酸的化学修饰衍生物,或它们的混合物。

[0474] 微生物检测

[0475] 如以上所述,所述靶向肽和/或STAMP适用于诊断组合物和方法以在环境、食品、生物样品中等测定一种或多种微生物的存在或不存在,和/或对存在的一种或多种微生物的

量进行定量。

[0476] 例如,可将靶向肽-抗微生物肽缀合物(例如特异性靶向的抗微生物肽(STAMP))用作诊断试剂。STAMP(和其他本文所述的靶向抗微生物构建体)能够特异性结合于微生物(例如变形链球菌)并渗透或破坏微生物的膜,从而使不能透过细胞的染料或其他试剂(碘化丙啶等)可进入微生物,或导致靶微生物的胞内分子或内含物(ATP、DNA、钙等)被释放到环境中以进行分析。在一项方法中,在体外或体内生物膜中,STAMP(例如C16G2)本身能够渗透或破坏所制备的培养物中或临床样品中的靶微生物(例如变形链球菌)的膜。向样品中加入不能透过细胞的染料(例如碘化丙啶等)以标记并允许检测STAMP靶向的那些微生物。也加入可透过细胞的染料(例如SYTO9)以标记和检测样品中微生物的整个种群。然后可通过荧光显微镜法、荧光测定法、流式细胞术或其他方法来对所标记的细胞进行定量。

[0477] 在另一个实施例中,将经STAMP处理的样品与荧光素酶和荧光素(其与从经STAMP处理的细胞释放出的ATP反应)混合,并将所产生的冷光用于检测和定量靶细胞。

[0478] 试剂盒

[0479] 在另一个实施方案中,提供了用于在哺乳动物中抑制感染和/或用于治疗和/或预防龋齿的试剂盒。所述试剂盒通常包括含有一种或多种本文所述的活性剂(即抗微生物肽和/或嵌合构建体)的容器。在某些实施方案中,可以以单位剂量制剂形式(例如栓剂、片剂、小胶囊(caplet)、贴片等)提供所述活性剂,和/或所述活性剂可任选地与一种或多种可药用的赋形剂组合。

[0480] 在某些实施方案中,所述试剂盒包括一种或多种本文所述的家庭护理产品制剂(例如,牙膏;漱口剂;牙齿美白贴或溶液;隐形眼镜储存、湿润或清洗溶液;牙线;牙签;牙刷毛;口腔喷雾剂;口腔含片;鼻腔喷雾;用于口腔和/或鼻应用的雾化器等)。

[0481] 在某些实施方案中,提供试剂盒以检测和/或定位和/或定量某些靶微生物,和/或包含某些靶微生物的细胞或组织,和/或携带某些靶微生物的假体,和/或包含某些靶微生物的生物膜。在各个实施方案中,这些试剂盒通常包括嵌合部分,所述嵌合部分包括本文所述的靶向肽和可检测标记物和/或用于本文所述的预靶向策略的与亲和标签连接的靶向肽。

[0482] 此外,所述试剂盒任选地包括标签和/或说明材料,为实施本发明的方法或使用本发明的“治疗剂(therapeutic)”或“预防剂(prophylactic)”或检测试剂的提供指导(即方案)。某些指导材料描述了一种或多种本发明的活性剂用于治疗性地或预防性地抑制或预防感染和/或抑制龋齿形成的用途。所述说明材料也可任选地教导优选的剂量/治疗方案、禁忌症(counter indication)等。

[0483] 尽管指导材料通过包括书写或印刷材料,但它们不局限于此。本发明考虑到了任何能够存储这些说明并将其传达给终端用户的介质。所述介质包括但不限于电子存储介质(例如磁盘、磁带、胶卷(cartridge)、芯片)、光学介质(例如CD ROM)等。所述介质可包括提供所述说明材料的互联网地址。

[0484] 应理解,本文所述的实施例和实施方案仅用于示例性的目的,根据它们的各种修改或变化会被本领域技术人员想到并且将包含在本申请的宗旨和范围内以及所附权利要求的范围内。因此,本文引用的全部出版物、专利和专利申请以全部目的、以引用的方式全文纳入本文。

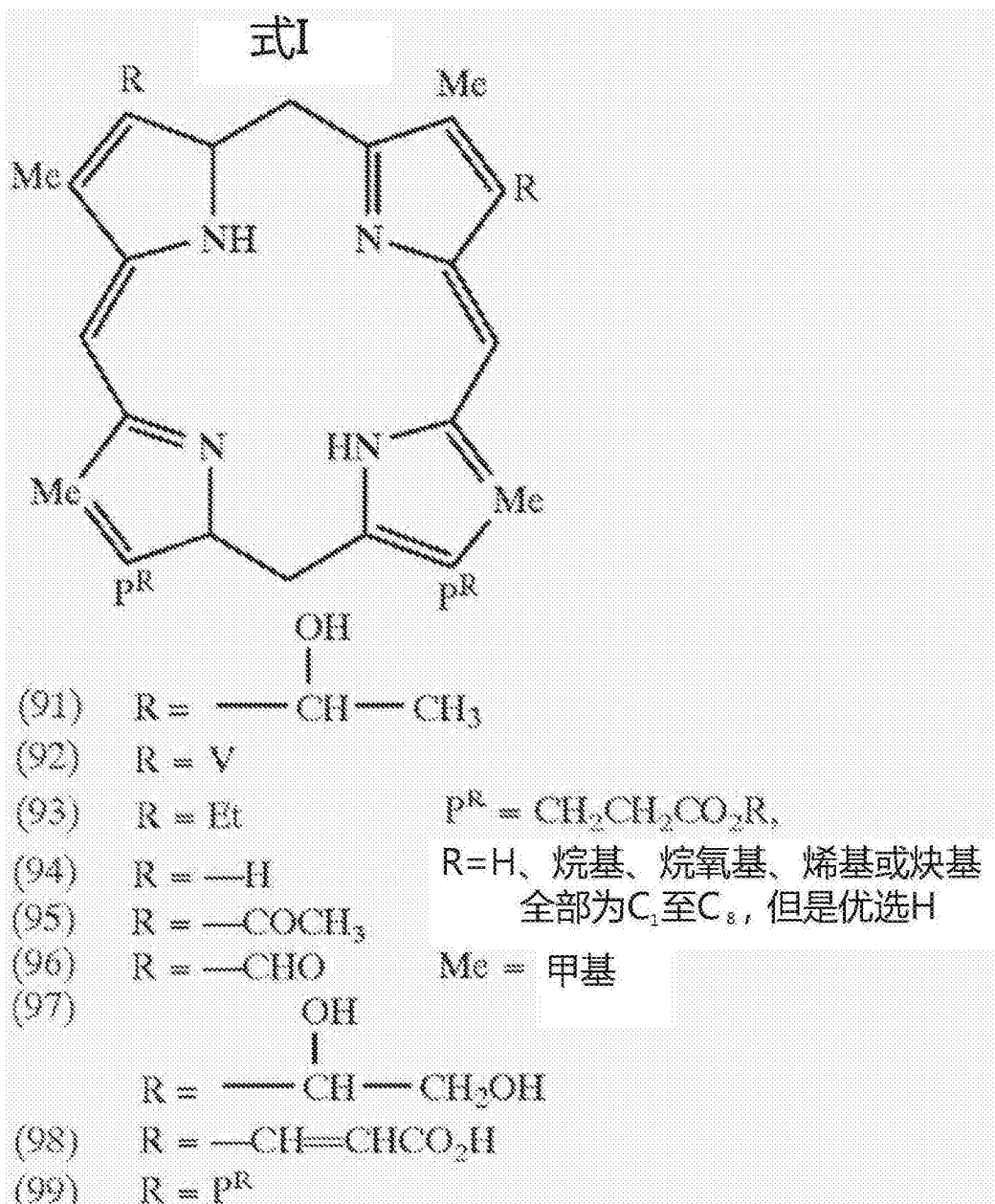


图1

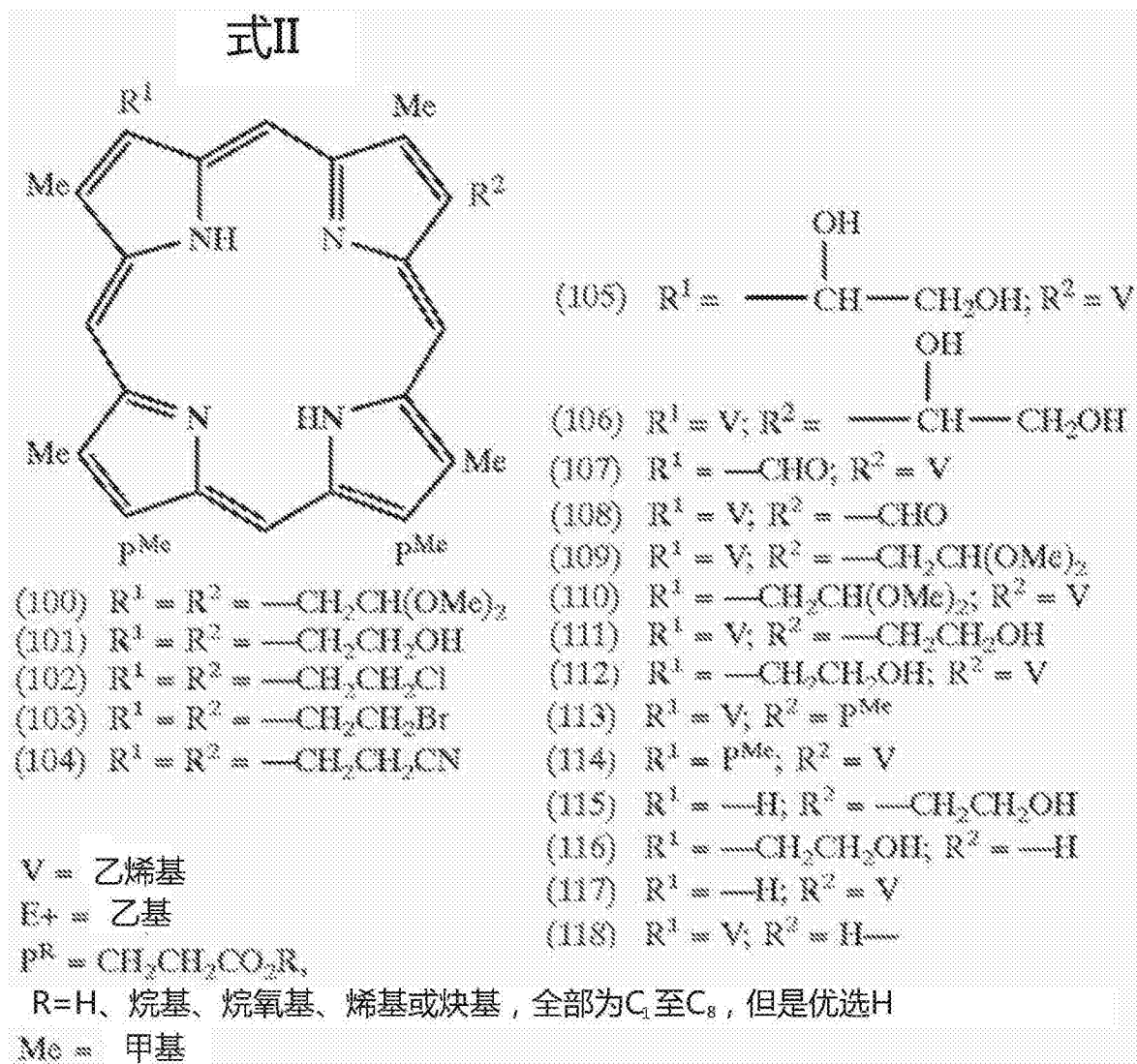


图2

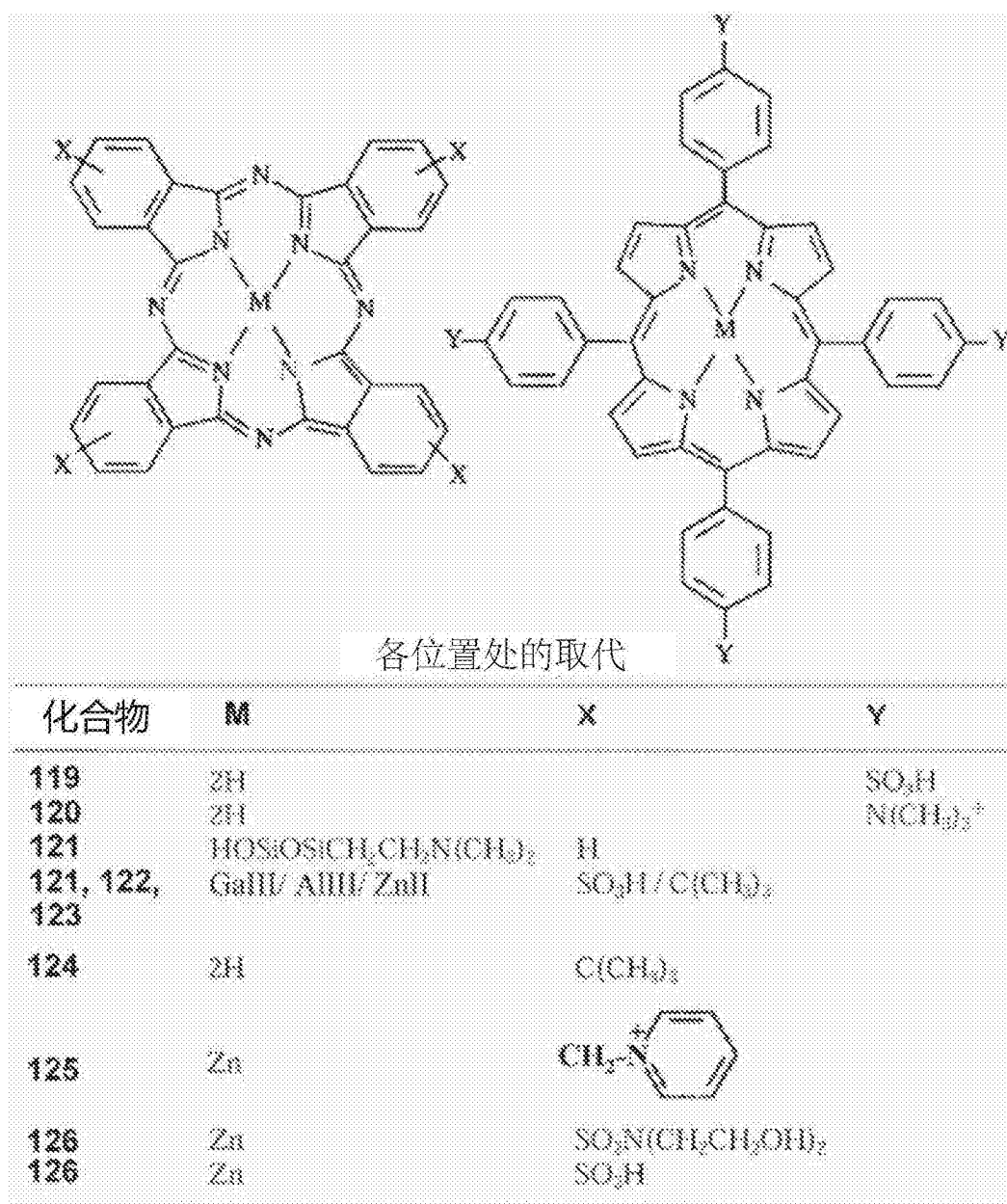


图3

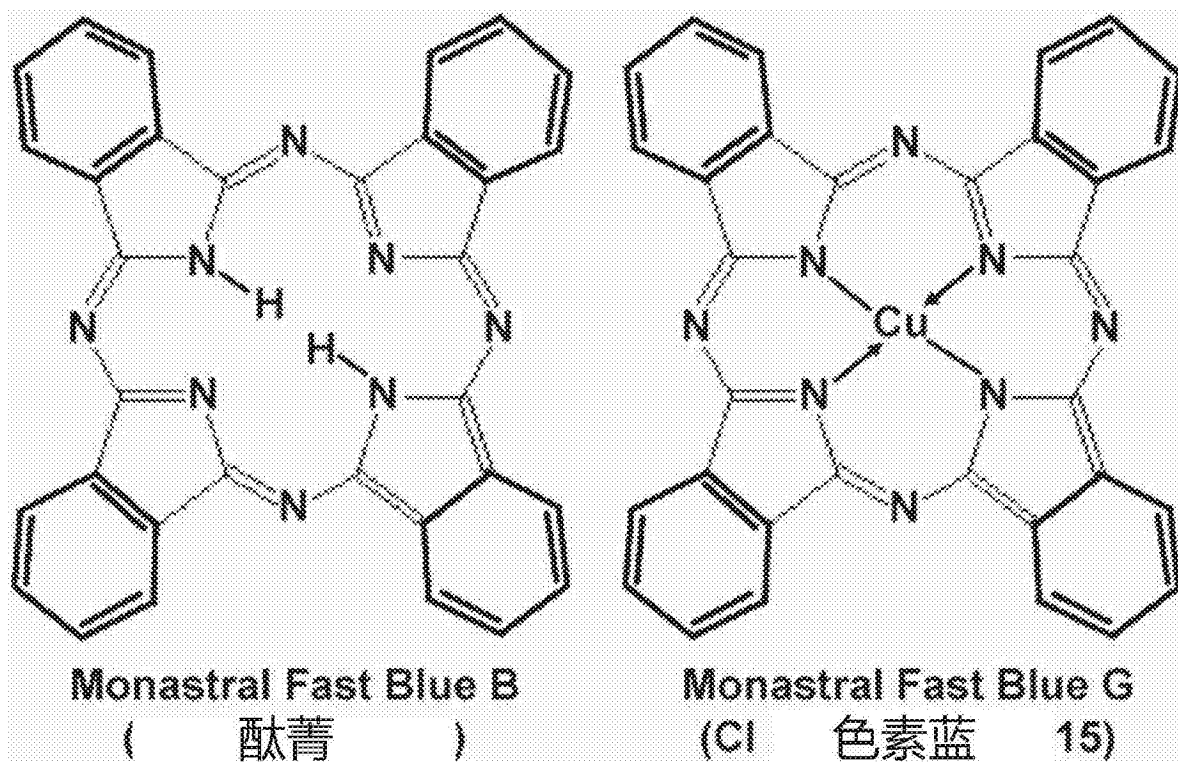


图4

	R	R''	R'	X	Y
亚甲蓝	$(\text{CH}_3)_2\text{N}$	$\text{N}(\text{CH}_3)_2$	H	N	S
甲苯胺蓝O	$(\text{CH}_3)_2\text{N}$	NH_2	CH_3	N	S
中性红	$(\text{CH}_3)_2\text{N}$	NH_2	CH_3	N	NH
原黄素	H_2N	NH_2	H	CH	NH
吖啶橙	$(\text{CH}_3)_2\text{N}$	$\text{N}(\text{CH}_3)_2$	H	CH	NH
氨基吖啶	H	H	H	C-NH ₂	NH
依沙吖啶	H_2N	H	OC_2H_5	C-NH ₂	NH

图5

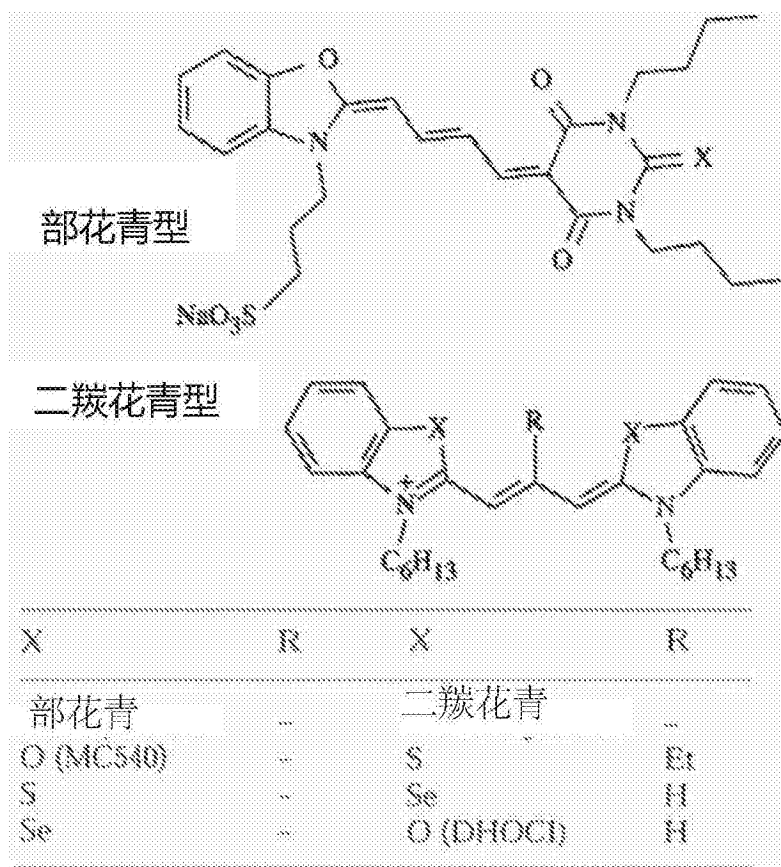


图6

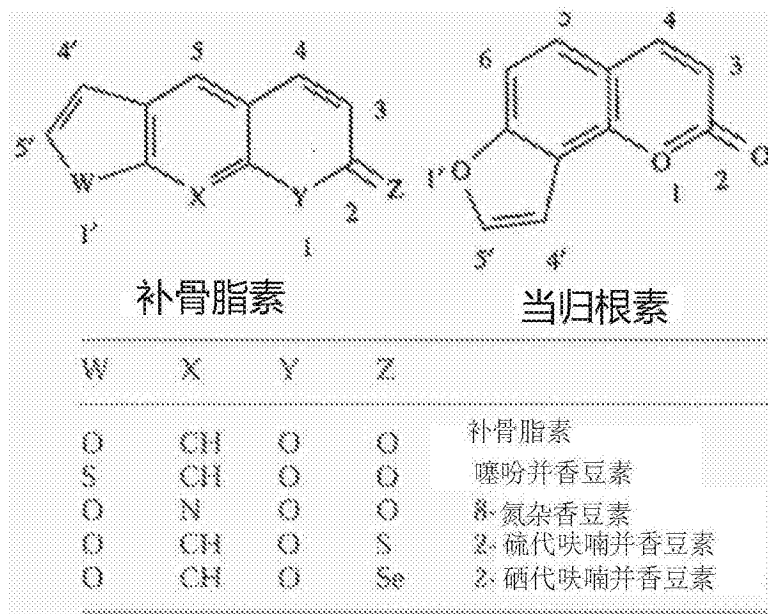


图7

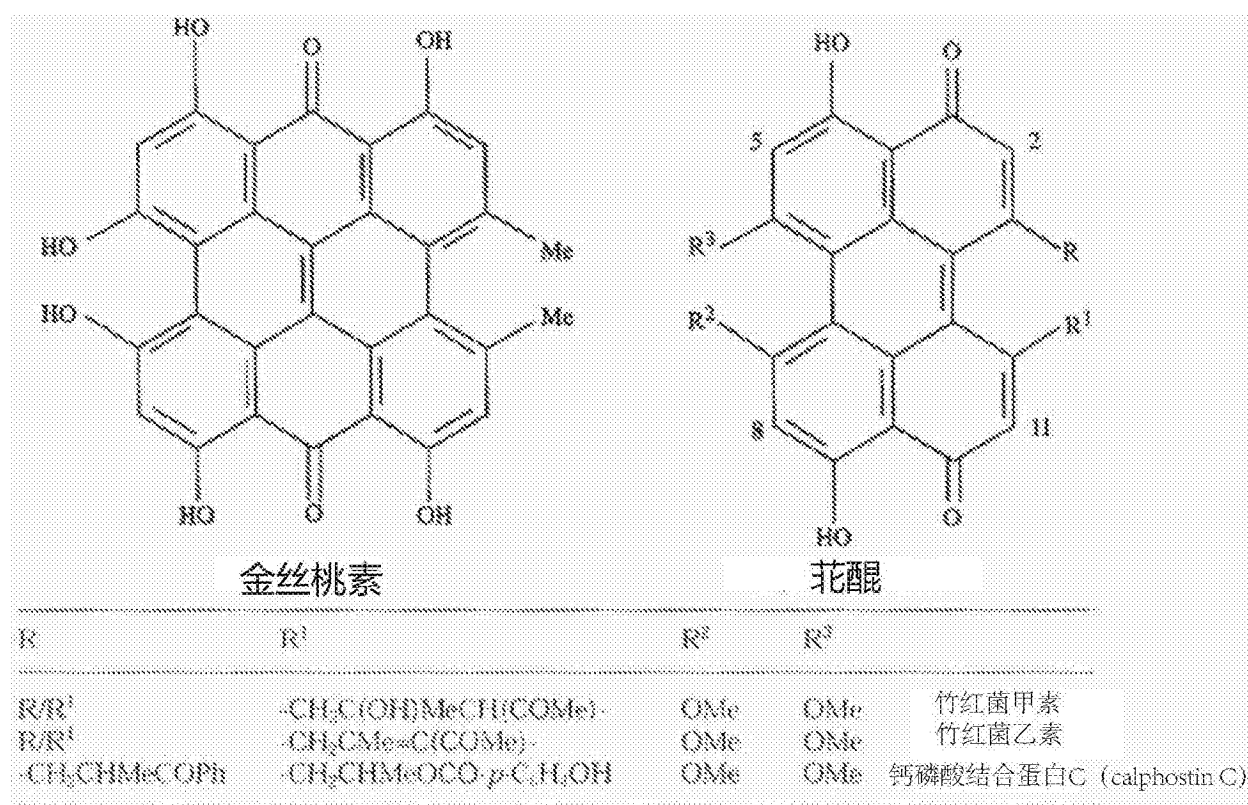


图8

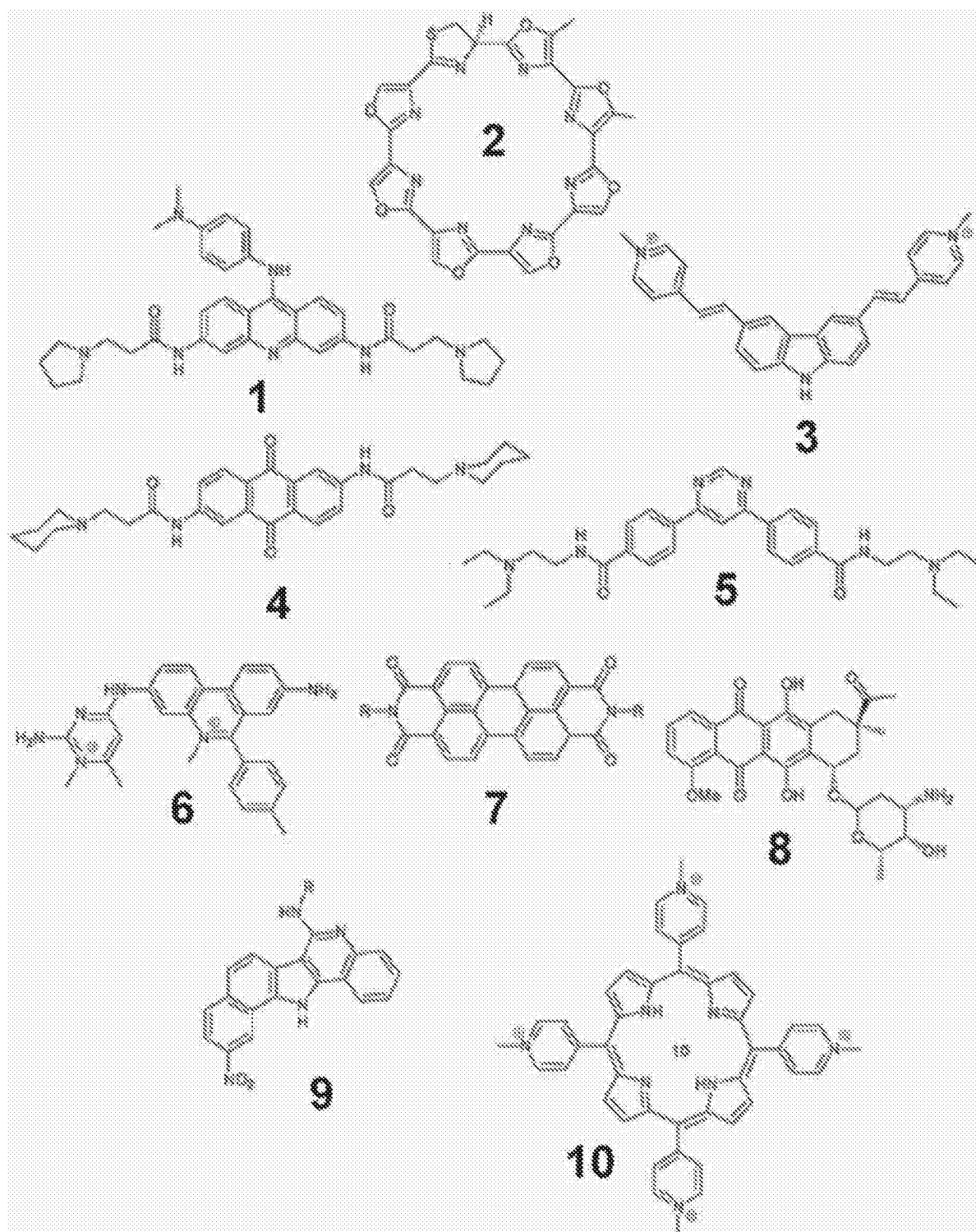


图9

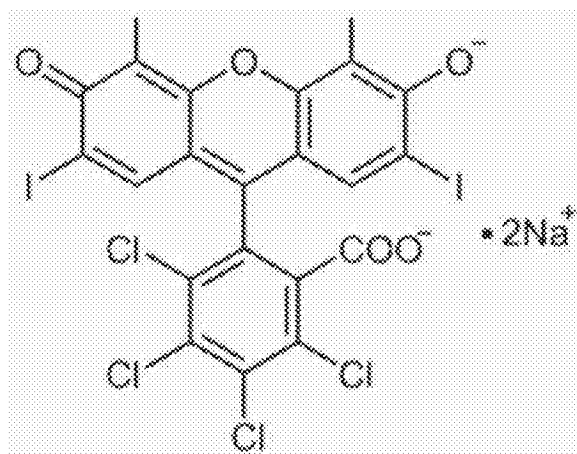


图10

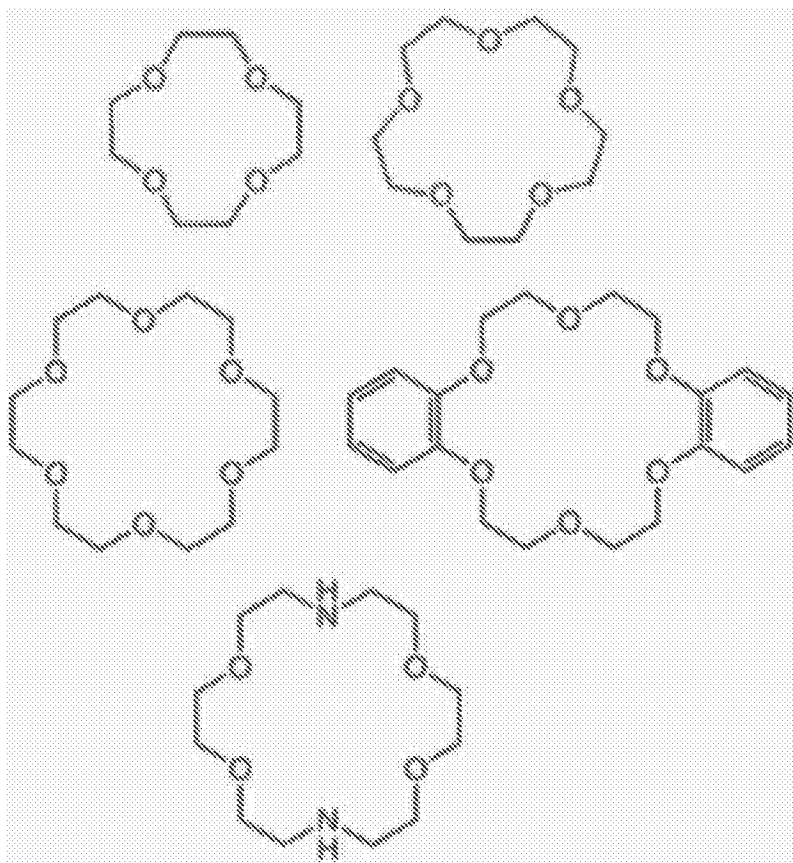


图11

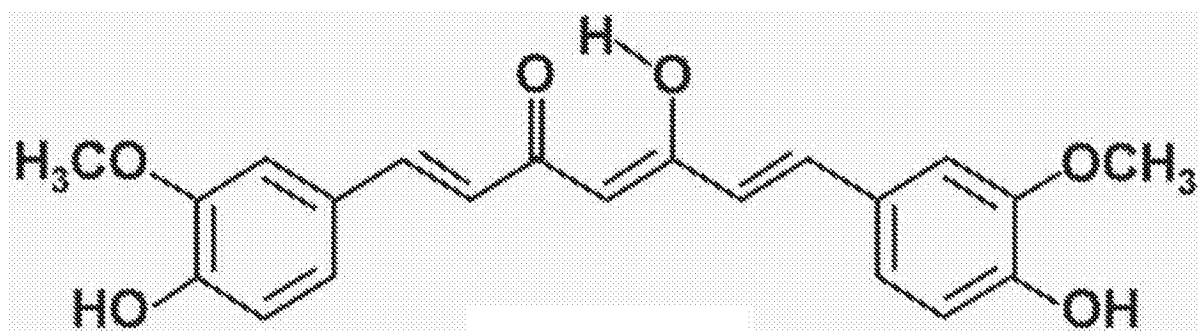


图12

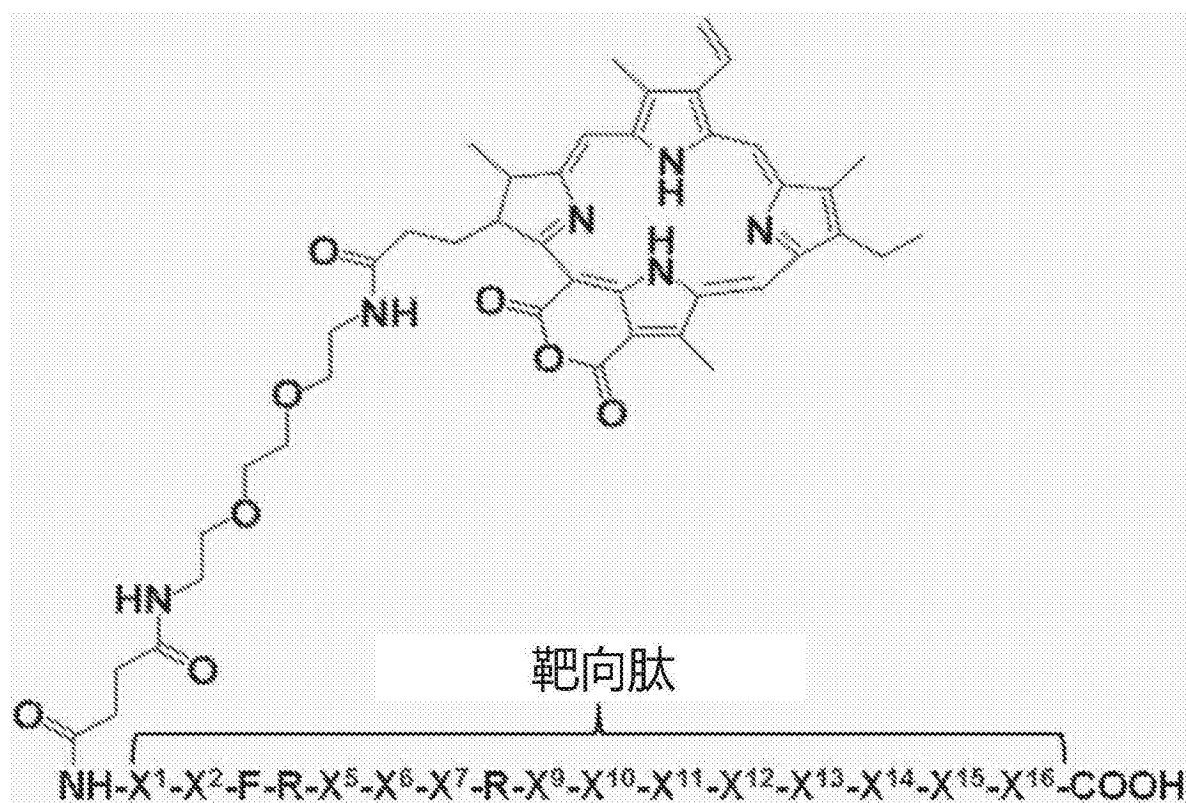


图13

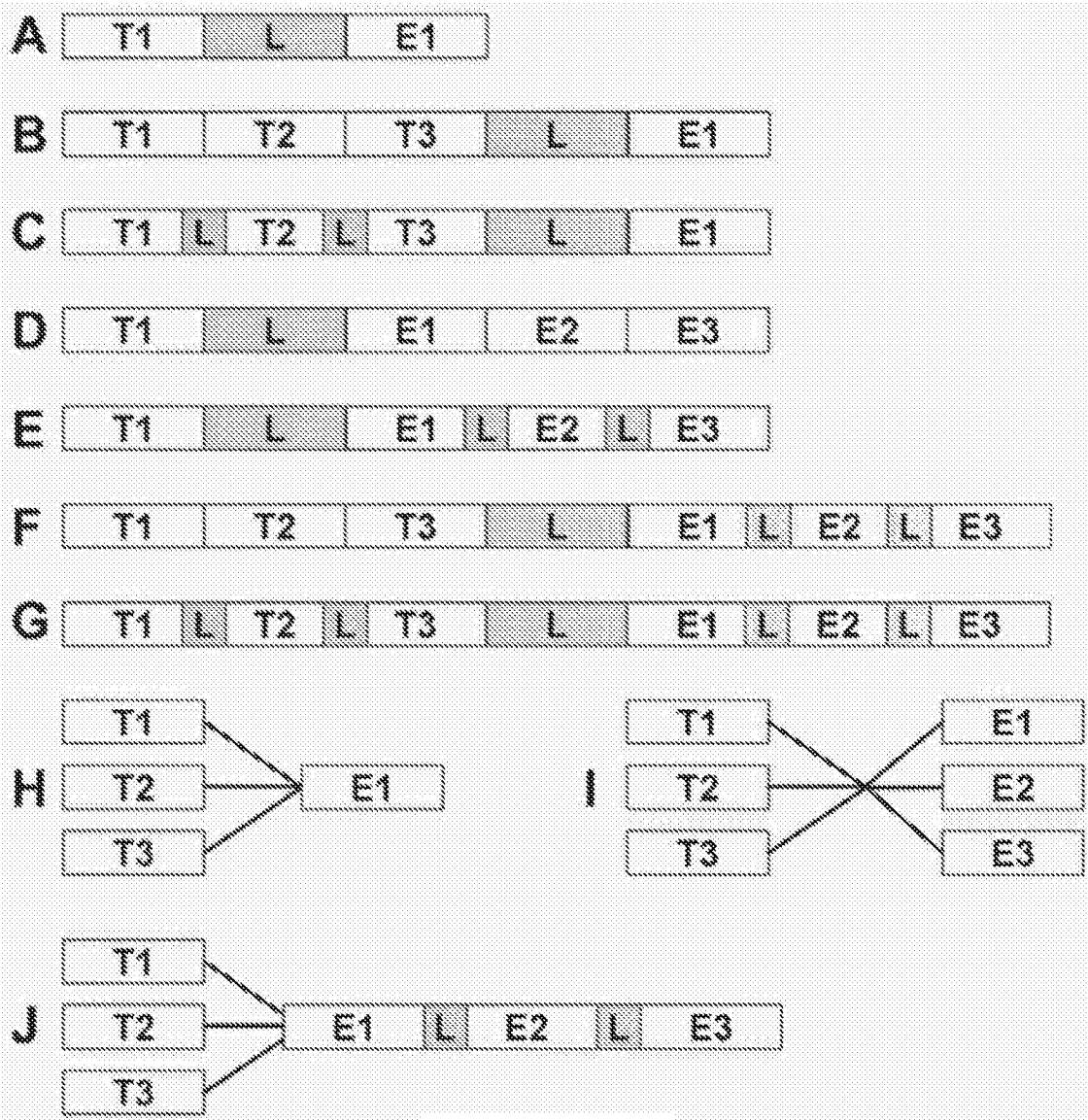


图14