[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int.Cl[6]
C07K 14/00
C07K 14/435 C07K 14/46
A61K 38/04 A61K 38/16

[12]发明专利申请公开说明书

[21]申请号 97194000.2

[43]公开日 1999年5月12日

[11]公开号 CN 1216549A

[22]申请日 97.2.20 [21]申请号 97194000.2
[30]优先权
[32]96.2.22 [33]IL [31]117223
[86]国际申请 PCT/IL97/00066 97.2.20
[87]国际公布 WO97/31019 英 97.8.28
[85]进入国家阶段日期 98.10.22
[71]申请人 耶达研究及发展有限公司
地址 以色列雷霍沃特
[72]发明人 Y·沙伊 Z·奥伦

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 卢新华 齐曾度

权利要求书4页 说明书52页 附图页数14页

[54]发明名称 抗病原肽及包含该肽的组合物

[57]摘要

我们发现一种带净正电荷并且没有或仅有部分α-螺旋构型的多肽具有非溶血性的选择性溶细胞活性。这种多肽可由天然肽如pardaxin和mellitin或其片段衍生,在这些衍生片段中L-氨基酸残基被相应的D-氨基酸残基取代,也可以是前者的环形衍生物;或者是由不同比例的正电荷氨基酸和疏水氨基酸组成并且二者至少各有一个的线性多肽非对映体,其中至少有一个氨基酸残基是D-氨基酸,优选至少三分之一的序例是由D-氨基酸残基组成。含有该非溶血性溶细胞肽的药用组合物可用于治疗多种由病原体引起的疾病,包括抗细菌、真菌、病毒、支原体和原生动物感染,以及用于治疗癌症。

ISSN1008-4274

权　利　要　求　书

1. 一种具有选择性溶细胞活性的肽，其特征在于:

（a）它对病原细胞具有溶细胞活性，病原细胞是非天然地出现于机体中的细胞，包括病原微生物和恶性细胞；并且，

（b）它是非溶血性的，即它对红细胞没有溶血作用或它仅在比其在病原细胞上表现所说溶细胞活性明显高的浓度时，才对红细胞表现溶细胞活性。

2. 根据权利要求 1 的非溶血型溶细胞肽，它具有下列特征:

（a）它衍生自如下非选择性溶细胞天然肽

（aa）包含 L-氨基酸残基和 D-氨基酸残基二者的肽，或

（bb）含有 L-氨基酸残基和 D-氨基酸残基中的一种或两者的肽，并且含有一个α-螺旋中断组分；

（b）该肽具有大于“+1”的净电荷；并且

（c）该肽为两亲性。

3. 根据权利要求 2 的肽，它具有下列特征中的任一种

（i）无α-螺旋结构，

（ii）含有一个非末端α-螺旋结构，其长度不足以横跨细胞膜的宽度，或

（iii）含有一个末端α-螺旋结构，其长度小于（ii）中定义的α-螺旋结构长度的一半。

4. 根据权利 1-3 任一项中的肽，它具有对病原细胞的选择性溶细胞活性，其选择性表现在肽以远低于其诱导正常的、非病原细胞裂解的浓度诱导病原细胞裂解。

5. 根据权利要求 1-4 任一项中的肽，它具有对细菌、病毒、真菌、原生动物和支原体的病原细胞的溶细胞活性。

6. 根据权利要求 5 的肽，对细菌有溶细胞活性。

7. 根据权利要求 1-6 任一项中的肽，它同时含有 D-和 L-氨基酸残基，其序列使得仅含 L 或仅含 D 氨基酸残基并与所说肽具有相同氨基酸序列的均一型肽具有α-螺旋构型，并对多种细胞显示广谱的溶细胞活性。

8. 根据权利要求 1-7 任一项中的肽，它是衍生于 pardaxin 或其片段的非对映体以及前面二者的环形衍生物。

9. 根据权利要求 8 的肽，其中净正电荷大于“+1”是由于其天然的氨基酸组成，或通过游离羧基的中和或加入带正电荷的氨基酸残基和/或带正电荷的化学基团来获得。

10. 根据权利要求 9 的肽，它选自 pardaxin 或其片段的非对映体，其中 Lys 残基已被加入到 N 末端和/或氨基乙基氨基基团已被加入到 C 末端。

11. 根据权利要求 10 的肽，它选自本文命名为肽 1-7 的 pardaxin 衍生肽，其序列为：

1. Gly-Phe-Phe-Ala-Leu-Ile-Pro-Lys-Ile-Ile-Ser-Ser-Pro-Leu-Phe-Lys-Thr-Leu-Leu-Ser-Ala-Val-Gly-Ser-Ala-Leu-Ser-Ser-Ser-Gly-Gly-Gln-Glu-$(NH-CH_2-CH_2-NH_2)_2$

2. Gly-Phe-Phe-Ala-Leu-Ile-Pro-Lys-Ile-Ile-Ser-Ser-Pro-Leu-Phe-Lys-Thr-Leu-Leu-Ser-Ala-Val-$(NH-CH_2-CH_2-NH_2)_2$

3. Gly-Phe-Phe-Ala-Leu-Ile-Pro-Lys-Ile-Ile-Ser-Ser-Pro-Leu-Phe-Lys-Thr-Leu-Leu-Ser-Ala-Val

4. Lys-Gly-Phe-Phe-Ala-Leu-Ile-Pro-Lys-Ile-Ile-Ser-Ser-Pro-Leu-Phe-Lys-Thr-Leu-Leu-Ser-Ala-Val-$(NH-CH_2-CH_2-NH_2)_2$

5. Lys-Lys-Gly-Phe-Phe-Ala-Leu-Ile-Pro-Lys-Ile-Ile-Ser-Ser-Pro-Leu-Phe-Lys-Thr-Leu-Leu-Ser-Ala-Val-$(NH-CH_2-CH_2-NH_2)_2$

6. Lys-Lys-Gly-Phe-Phe-Ala-Leu-Ile-Pro-Lys-Ile-Ile-Ser-Ser-Pro-Leu-Phe-Lys-Thr-Leu-Leu-Ser-Ala-Val

7. Gly-Phe-Phe-Ala-Leu-Ile-Pro-Lys-Ile-Ile-Ser-$(NH-CH_2-CH_2-NH_2)_2$

12. 根据权利要求 1-7 任一项中的肽，它是衍生于 melittin 或其片段的非对映体，或前面二者的环形衍生物。

13. 根据权利要求 12 的肽，它选自本文命名为肽 18-21 的 melittin 衍生肽，其序列为：

18. Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-NH_2

19. Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-COOH

20. Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-

Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-NH-CH_2-CH_2-NH_2

21. Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-
Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg- NH-CH_2-CH_2-NH_2

14. 根据权利要求 1 的非溶血性溶细胞肽，它同时含有 L-氨基酸残基和 D-氨基酸残基，并且其氨基酸序列使得仅含有 L-氨基酸残基的相应氨基酸序列在自然界中不存在。

15. 根据权利要求 14 的肽，它含有净正电荷，并且不含α-螺旋结构。

16. 根据权利要求 14 或 15 的非溶血性溶细胞肽，它具有下列特征：

（a）它是一种非天然肽，包含不同比例的疏水氨基酸和带正电荷的氨基酸并且二者至少各有一个，在其序列中至少一个氨基酸残基是 D-氨基酸；

（b）该肽带有大于“+1”的净正电荷；及

（c）疏水性与带正电荷的氨基酸比例适当，使肽对病原细胞有溶细胞性但不引起红细胞裂解。

17. 权利要求 16 的肽，其中带正电荷的氨基酸选自赖氨酸、精氨酸和组氨酸，疏水氨基酸选自亮氨酸、异亮氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、酪氨酸、和色氨酸。

18. 根据权利要求 17 的肽，其中净正电荷大于+1 是因为氨基酸组成或添加带正电荷的化学基团，或其疏水性可通过加入极性氨基酸如丝氨酸、苏氨酸、甲硫氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺和半胱氨酸降低。

19. 至少有 6 个氨基酸残基的根据权利要求 18 的肽，其中疏水氨基酸是亮氨酸、丙氨酸或缬氨酸，并且带正电荷的氨基酸是赖氨酸。

20. 根据权利要求 19 的肽，它是由亮氨酸和赖氨酸组成的 6 聚体、8 聚体或 12 聚体肽的非对映体，其中至少三分之一的序列由 D-氨基酸组成。

21. 根据权利要求 20 的 Leu/Lys 非对映体，它选自本文命名为 23 至 29 的肽，其序列为：

23. Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Leu-Lys-NH_2

24. Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Lys-Leu-Lys-Leu-Leu-Lys-NH_2

25. Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Leu-Lys-Leu-Lys-Leu-Lys-Lys-NH_2

26. Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Leu-Lys-NH_2

27. Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Lys-Leu-Lys-Leu-Leu-Lys-NH_2

28. Lys-Leu-Leu-Leu-Leu-Lys

29. Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Leu-Lys

22. 根据权利要求 1 的非溶血性溶细胞肽，它是衍生于非选择性溶细胞天然肽或非天然合成肽的肽的环形非对映体。

23. 由 2 个或更多的根据权利要求 1-22 任一项中的非溶血性溶细胞肽组成的非溶血性溶细胞复合物，所说的肽是通过使用共价结合于每种肽的接头分子束在一起。

24. 权利要求 23 的复合物，其中束由 2 个或更多的，优选 5 个，分子的相同肽或不同肽组成，并且接头是根据前面任何权利要求的肽或一种常用接头。

25. 根据权利要求 1 至 22 任一项中的亲水性非对映体的非溶血性溶细胞混合物。

26. 由不同比例的疏水性、带正电荷和 D-氨基酸组成的非溶血性溶细胞性无规共聚物。

27. 根据权利要求 26 的非溶血性溶细胞性无规共聚物，它包含比例为 1: 1: 1、2: 1: 1、3: 1: 1（mol）的赖氨酸、亮氨酸和 D-亮氨酸。

28. 含有根据权利要求 1-22 任一项中的非溶血性溶细胞肽和一种可药用载剂的药用组合物。

29. 含有根据权利要求 23-24 的非溶血性溶细胞复合物、根据权利要求 25 的亲水肽混合物或根据权利要求 26-27 的无规共聚物，以及一种可药用载剂的药用组合物。

30. 根据权利要求 28 或 29 的药用组合物，用于治疗由病原有机体引起的感染。

31. 根据权利要求 30 的药用组合物，其中病原有机体选自细菌、真菌、原生动物、支原体和病毒。

32. 根据权利要求 28 或 29 的药用组合物，用于治疗癌症。

说　明　书

抗病原肽及包含该肽的组合物

发明领域

本发明涉及新型非溶血性溶细胞多肽、含有该多肽的组合物、及其在疾病或紊乱的治疗中和在农业中的应用。

发明背景

在下文中，对现有技术文献说明了出处，参考文献的完整项目可见权利要求前的说明书结尾部分的“参考文献”一节。

微生物对可用的抗微生物药物的抗性不断增加，促使人们对发展可以替代的抗微生物化合物进行着广泛的研究。

除了高度特异性的细胞介导的免疫应答，或作为其补充，脊椎动物和其他有机体还具有由不同族的广谱溶细胞性即抗菌性肽组成的防御系统。

对这种溶细胞多肽（也称为溶细胞素）的脂-肽相互作用研究趋向于强调，两亲性α-螺旋结构对它们的溶细胞活性非常重要。这一结论主要基于对单独作用于哺乳动物细胞或细菌或作用于两种细胞类型的溶细胞素的研究，这个溶细胞性多肽家族的一个重要的族是宿主防御性短链线形多肽（≤40 氨基酸），这类肽没有二硫键（Boman，1995）。这些肽在链长、疏水性和电荷的整体分布方面各不相同，但都共有与脂双层相关的结构，即两亲性α-螺旋结构（Segrest 等，1990）。

已知的溶细胞素的例子包括:（i）仅对细菌溶细胞的抗菌性多肽，例如，分离自 cecropia moth（Steiner 等，1981）的杀菌肽；分离自蛙类皮肤的爪蟾抗菌肽（Zasloff，1987）和 dermaseptins（Mor 等，1991）；（ii）对哺乳动物有选择性细胞毒的溶细胞素，例如分离自金黄葡萄球菌的δ-溶血素（Dhople 和 Nagaraj，1993）；以及（iii）没有细胞选择性的溶细胞素，例如能裂解哺乳动物细胞和细菌两者的蜂毒 mellitin（Habermann 和 Jentsch，1967）和神经毒素 pardaxin（shai 等，1988）。

抗菌多肽首先在无脊椎动物中被发现，接着在脊椎动物，包括人中

也被发现。作为补充或额外的防御系统，这种二级的化学免疫系统为有机体提供一组全套的小分子肽，这些肽在诱导后迅速产生，抵抗机会或专性病原体的侵入或抵抗共生微生物失去控制地增殖（Boman，1995）。迄今为止，已有100多种不同的抗菌肽获得了分离和特性分析。最大的家族，可能也是研究最多的家族，包括那些带正电荷并为两亲性α-螺旋结构的肽。对各种天然抗菌肽进行的大量研究趋向于强调两亲性α-螺旋结构和净正电荷对溶细胞活性非常重要。带正电荷能促进肽与带负电荷的膜相互作用（Andreu 等，1985），这种带负电荷的膜在病原细胞膜中浓度比在正常真核细胞中要高，而两亲性α-螺旋结构对裂解活性非常重要（Chen 等，1988）。据推测这种相互作用能通过增加能量传递膜的通透性来损坏靶机体的能量代谢（Okada 和 Natori，1984）。由于其两亲性结构，据认为这些抗菌多肽通过形成离子通道/孔，通过“桶-穿孔”机制使膜通透（Rizzo 等，1987）。根据此模型，跨膜的两亲性α-螺旋结构组成束，其中指向外面的疏水面与膜的脂成分相互作用，而向内的亲水面形成孔。或者，肽平行结合于膜的表面，以“毯状”方式覆盖在膜的表面，如同去污剂一样使膜溶解（Shai，1995）。

尽管进行了广泛的研究，但短的线性非细胞选择性肽如 pardaxin 和 mellitin 作用的精确模式还不清楚，并且也不清楚它们对哺乳动物细胞和细菌的细胞毒作用是否需要相似的结构特征。

Pardaxin 是一个 33 聚体的肽，它是从红海 Moses Sole *Pardachirus marmoratus*（Shai 等，1988）和西太平洋豹鳎 *Pardachirus pavoninus*（Thompson 等，1986）中纯化的一种兴奋性神经毒素。Pardaxin 依据其浓度，具有多种生物学活性（Shai 综述，1994）。在浓度低于 10^{-7} M 时，pardaxin 以一种钙依赖的方式诱导神经递质的释放。在 10^{-7} M 至 10^{-5} M 的较高浓度时，此过程不依赖于钙，而在高于 10^{-5} M 时，诱导细胞裂解。Pardaxin 在体外还影响多种生理制备物的活性。它的生物学作用被归因于它与上皮细胞中渗透调节系统的离子运输相互作用和通过形成离子通道的突触前活性，而后者是电势依赖的并且对钙有轻微的选择性。在其结构和多种生物物理研究的基础上，人们提出 pardaxin 插入膜的“桶-孔”机制（Shai 综述，1994）。Pardaxin 含有一个螺旋-铰链-螺旋结构：N 端螺旋包括 1-11 位残基，C 端螺旋包括 14-26 位残基，两

个螺旋被位于位置 13 的脯氨酸残基分开。这一结构基元在特异性作用于细菌的抗菌肽（如，杀菌肽）和能裂解多种细胞的细胞毒肽（如 mellitin）中都被发现。

Mellitin 是一个 26 聚体的两亲性肽，它是蜜蜂 *Apis mellifera* 的蜂毒的主要成分（Harbermann 和 Jentsch，1967），并且是研究最多的膜导向肽之一（Dempsey，1990）。Mellitin 对哺乳动物细胞有很强的毒性，但同时也是一种很强的抗菌剂（Steiner 等，1981）。已经进行了大量的研究来确定 mellitin 与膜相互作用的本质，其目的是理解 mellitin 诱导的溶血的分子机制，和作为研究膜蛋白结构的一般特征以及这种蛋白与磷脂膜相互作用的模型。目前已获得的许多证据表明 mellitin 不同的作用有不同的分子机制。但不管怎样，两亲性α-螺旋结构已显示是其多种活性所必需的（Perez 等，1994）。

Mellitin 的结构已用多种技术进行了研究。X-射线晶体学和在甲醇溶液中 NMR 的结果显示，其分子包括两个α-螺旋部分（残基 1-10 和 13-26），这两个螺旋以 120°的角度相交。这两个部分由一个铰链（11-12）连接，形成一个弯曲的α-螺旋杆，其中亲水位点和疏水位点朝向相反的方向。四个这种单体的 mellitin 分子通过疏水作用聚集成束，形成四体（Anderson 等，1980; Bazzo 等，1988; Terwilliger 和 Eisenberg，1982; Terwilliger 和 Eisenberg，1982）。在膜表面开始作用时，四聚体解离成单体，单体在插入到膜中前仍保留α-螺旋结构（Altenbach 和 Hubbell，1988）。

Mellitin 与 pardaxin 有一些相似之处，pardaxin 和 mellitin 都由两个螺旋组成，螺旋之间有一个脯氨酸铰链。而且，它们在其 N-螺旋中显示明显的同源性，它们的 N-螺旋主要是疏水性（Thompsn 等，1986）。但是，pardaxin（净电荷为+1）在其 C 端含有另外七个电荷为-2 的氨基酸残基，而 mellitin（净电荷为+6）以一个酰胺基团为终端，并含有带正电荷的四肽序列 Lys-Arg-Lys-Arg。pardaxin 和 melittin 之间有几个功能上的差别，pardaxin 与兼性和带负电荷的磷脂两者的结合相似（Rapaport 和 Shai，1991），而 mellitin 与带负电荷磷脂的结合要优于与兼性磷脂的结合（Batenburg 等，1987; Batenburg 等，1987），而且，pardaxin 与磷脂的结合是正协同效应（Rapaport 和 Shai，1991），

而 melittin 则是负协同效应（Batenburg 等，1987; Batenburg 等，1987）。虽然 pardaxin 和 mellitin 两者都是针对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的强抗菌肽，但 pardaxin 对人红细胞的溶血性比 mellitin 低 40-100 倍（Oren 和 Shai，1996）。

Pardaxin 用 L-至 D-替换获得的类似物显示能裂解人红细胞（Pouny 和 Shai，1992）随后的结果显示（见下面报道的结果），Pouny 和 Shai，1992 公开的两种肽，即 D-pro^{7}-pardaxin 和 D-Leu^{18}-Leu^{19}-pardaxin 具有溶血性，且带有很低的抗菌活性。爪蟾抗菌肽的 L 至 D 替代的类似物也被发现缺乏抗菌活性（Chen 等，1988）。

术语

下面，为了流畅地阅读本文及便于更好地理解本发明，将说明几个新造词的用法。但应当注意，为了完整地理解这些词，将对下面的完整描述不时列出参考文献。这里所说的词及其含义如下：

“不均一型肽”用于此处是指同时含有 D-和 L-氨基酸残基的肽。

“均一型肽”用于此处是指仅含有天然 L-氨基酸残基或仅含有 D-氨基酸残基的肽。

“均一型-L-肽”和“均一型-D-肽”用于此处分别是指完全由 L-或 D-氨基酸残基组成的多肽。

“不均一型-基于 L 的肽”和“不均一型-基于 D 的肽”用于此处分别是指主要含有 L-氨基酸残基的不均一型肽，如由均一型 L-肽衍生的其中一个或多个 L-氨基酸残基被对应的 D-对映体取代的肽；和主要含有 D-氨基酸的不均一型肽，其中一个或多个 D-氨基酸残基被对应的 L-对映体取代。

“螺旋型肽”用于此处是指含有一个连续的α-螺旋片段的肽，该α-螺旋片段贯穿其长度的大部分。螺旋型肽的螺旋部分完全由 L-氨基酸残基或 D-氨基酸残基组成。

“非螺旋型肽”用于此处是指不含α-螺旋结构或不含沿其长度伸展的连续α-螺旋结构的肽。根据本发明的非螺旋型肽可以含有一个α-螺旋片段，这个片段在末端时，其长度跨度小于细胞膜宽度的一半，如少于约 10－15 个氨基酸残基，而如果它不是末端的α-螺旋，其长度小于细

胞膜的全宽，如少于约 20－25 个氨基酸残基。非螺旋型肽可以是一个带有α-螺旋中断组分的均一型肽（见下文），或者可以是一个非均一型肽。

“α-螺旋中断组分”用于此处是指一个组分，当其插入螺旋结构时，破坏α-螺旋的连续性。这种组分的例子可以是氨基酸残基脯氨酸或甘氨酸、α-甲基-取代-α-氨基酸、环形和非环形的非α-氨基酸如 6-氨基-己酸、3-氨基-1-环己酸、4-氨基-1-环己酸，或者可以是一个插入到由其相反的对映体氨基酸残基组成的α-螺旋片段中的 L-或 D-对映体。

“病原细胞”用于此处是指非天然产生于机体内的细胞，包括癌细胞和病原有机体如细菌、真菌、原生动物、病毒和支原体，以及被病原有机体如寄生性原生动物如利什曼虫和疟原虫感染的哺乳动物细胞。

“选择性溶细胞活性”用于此处是指一种药剂诱导病原细胞裂解的活性，其选择性的表现如下：药剂诱导病原细胞裂解的浓度要远低于裂解正常的非病原细胞如红细胞所需的浓度。

“非溶血性”用于此处是指药剂导致红细胞溶血的浓度要远高于导致其他细胞如病原细胞诸如微生物细胞、癌细胞等裂解所需的浓度。

“非对映体”用于此处是“非均一型肽”的同义词。

发明概述

本发明基于如下令人惊奇的发现：某些不含或仅含部分α-螺旋构型的不均一型基于 L 的肽具有非溶血性的选择性溶细胞活性。此发现令人惊奇之处在于，流行的观点是细胞中肽诱导的溶细胞活性依赖于两亲性肽的α-螺旋构型。

根据本发明，我们认识到至少对某些细胞，如微生物，α-螺旋结构对肽具有溶细胞活性不是必需的。α-螺旋结构对哺乳动物细胞裂解是必需的，但对抗菌活性来说不是必需的。

因此，本发明提供表现如下特征的具有选择性溶细胞活性的肽：

（a）它对病原细胞具有溶细胞活性，病原细胞是非天然地出现于机体中的细胞，包括病原微生物和恶性细胞；并且，

（b）它是非溶血性的，即它对红细胞没有溶血作用或它仅在比其在病原细胞上表现所说溶细胞活性明显高的浓度时，才对红细胞表现溶细胞活性。

在一个实施方案中，本发明提供具有如下特征的非溶血性溶细胞肽:

（a）它衍生自如下非选择性溶细胞天然肽

（aa）包含 L-氨基酸残基和 D-氨基酸残基二者的肽，或

（bb）含有 L-氨基酸残基和 D-氨基酸残基中的一种或两者的多肽，并且含有一个α-螺旋中断组分;

（b）该肽具有大于“+1”的净正电荷；并且

（c）该肽是两亲性的。

非选择性溶细胞天然肽的例子有 pardaxin、mellitin 或其片段，净正电荷可由天然氨基酸组成、游离羧基基团的中和、和/或添加带正电荷的氨基酸残基或带正电荷的化学基团来产生。

在另一个实施方案中，本发明提供了具有如下特征的非溶血性溶细胞肽;

（a）它是一个非天然的合成肽，包含不同比例的疏水氨基酸和带正电荷的氨基酸并且二者至少各有一个，在其序列中至少有一个氨基酸残基是 D-氨基酸;

（b）该肽带有大于“+1”的净正电荷，并且

（c）疏水氨基酸与带正电荷的氨基酸的比例恰当，使该肽对病原细胞有溶细胞性，但不引起红细胞溶解。

带正电荷的氨基酸的例子有赖氨酸、精氨酸和组氨酸，疏水氨基酸的例子有亮氨酸、异亮氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、酪氨酸、和色氨酸。净正电荷由氨基酸组成产生，但也可考虑添加带正电荷的化学基团。此外，可以加入极性氨基酸如丝氨酸、苏氨酸、甲硫氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺和半胱氨酸来降低分子的疏水性和/或毒性。在一个优选的实施方案中，该肽包含一个疏水氨基酸如亮氨酸、丙氨酸或缬氨酸，以及一个带正电荷的氨基酸如赖氨酸或精氨酸。

合成肽至少有 6 个，优选有 10 个或更多的氨基酸残基。在一个优选的实施方案中，合成的非对映体是一个 12 聚体的肽，包含亮氨酸、丙氨酸或缬氨酸和赖氨酸，并且至少三分之一的序列由 D-氨基酸组成。

在更进一步的实施方案中，本发明的非溶血性溶细胞肽是衍生于上面介绍的非选择性溶细胞性天然肽的肽或非天然的合成肽的肽或其片段的环

形非对映体。这些环形非对映体通过肽的传统环化方法获得。在一个实施方案中，环形非对映体衍生自 pardaxin 的 1-22 片段，其 N 末端添加了 1 至 3 个赖氨酸残基，并且 N 末端和 C 末端两端都添加了半胱氨酸残基用于环化。

在另一个实施方案中，本发明提供了非溶血性溶细胞复合体，复合体由 2 个或更多的本发明的非溶血性溶细胞肽复合或“束”在一起，例如通过使用共价结合于每种肽的接头或“模板”分子进行复合。束可含有 2 个或更多的，优选为 5 个，相同的或不同的肽分子。接头/模板可以是本发明的肽或一种常用的接头，例如带有活性基团如 OH、SH、COOH、NH_2、CH_2Br 的聚合物如聚酯、聚酰胺、多肽、聚氨基酸（例如聚赖氨酸）。

在另一个更进一步的实施方案中，本发明提供一种本发明的疏水性非对映体的非溶血性溶细胞混合物，它通过在肽合成的固相法的每一个偶联步骤中加入包含 1 eq 的每种所需疏水、带正电荷和 D-氨基酸的混合物来获得。通过这种方法，使用赖氨酸、亮氨酸和 D-亮氨酸的混合物获得 3^{12} 种不同肽的混合物，然后经过 HF 裂解、水抽提和冻干，从中获得了亲水混合物。

在另一个实施方案中，本发明提供非溶血性溶细胞性无规共聚物，该共聚物包含不同比例的疏水氨基酸、带正电荷的氨基酸和 D-氨基酸，例如 1: 1: 1、2: 1: 1 和 3: 1: 1（mol）的 Lys: Leu: D-Leu 的共聚物。

优选地，根据本发明的非溶血性溶细胞肽不含α-螺旋结构或所具有的α-螺旋结构的长度不足以横跨细胞膜的宽度。因此本发明并不含有这样一种不被打断的片段，它全部由 D 或全部由 L-氨基酸残基组成，其长度能组成一个跨膜孔道部分。这一长度在该片段不是肽的终端部分时，一般为 20～22 氨基酸，而在该片段是肽的终端部分时，长度为一半，即 10～11 氨基酸，因为在这种情况下，两个肽会将其终端相连，并跨过细胞膜。

打断一个 D-或 L-氨基酸残基的片段可通过将片段中的一个或多个氨基酸用相反的对映体取代来进行，或在连续的片段中置入一个α-螺旋中断组分如脯氨酸、甘氨酸、一种α-甲基-α-氨基酸或非α-氨基酸。

本发明的肽带有大于“+1”的净正电荷，净正电荷可来自本发明的天然氨基酸组成、游离 COOH 羧基基团的中和如酰胺化、或来自带正电荷的氨基酸或化学基团的加入。已经发现选择性溶细胞活性有时可通过增加其净正电荷来提高，例如，在分子中的任何位置加入一个带正电荷的氨基酸和/或带正电荷的基团。例如聚胺基团、烷氨基基团或氨基烷氨基基团等可以加入至一个终端，一般在其羧基端。一个优选的这种基团是氨基乙基氨基基团（$-NH-CH_2-NH_2$），在下文称为“TA”。

由非选择性溶细胞天然肽如pardaxin和meilittin衍生的本发明的肽是两亲性的，其意思是它们的一个面主要由疏水氨基酸残基组成，而另一个面主要由亲水氨基酸组成。本发明范围内的肽的两亲性本质可根据本领域熟知的方法进行证明。这类方法的一个例子是使用 Shiffer and Edmondson 轮式设计，其中氨基酸残基依据其序列写入一个环，使序列中每个氨基酸与其相邻氨基酸呈 100°（每个环 3.6 个氨基酸）。如果大多数亲水氨基酸集中在轮的一面，而疏水氨基酸集中在轮的另一面，这个肽就被认为是两亲性的。

不是衍生于非选择性溶细胞天然肽的本发明的肽，例如包含疏水性的、带正电荷的和 D-氨基酸的合成非对映体，不是两亲性的。它们带有大于+1 的净正电荷，并且疏水氨基酸与带正电荷的氨基酸比例恰当，使所获得的肽对病原细胞有溶细胞性，但没有溶血活性。根据本发明，通过使用这里介绍的抗菌性和溶血性试验，这些肽可以很容易地进行筛选。在一个实施方案中，对于一个包含亮氨酸和赖氨酸的肽，在含有 6 个氨基酸残基的非对映体中，Leu: Lys 的合适比例可以是 64%: 36%，而在含有 12 个氨基酸残基的非对映体中，比例为 66%: 34%。

抛开理论的束缚，不管怎样都应当理解，溶细胞活性可能是一定数量的肽在膜表面聚集的结果，这样肽聚集导致细胞膜的损伤。因此，如上文的介绍，根据本发明我们还期望使用本发明的肽相互复合（或成束）的复合物，例如使用共价结合于每种肽的接头分子。

本发明的单个肽一般包含至少 6 个，优选 10 个或更多的氨基酸残基。在本发明的混合物中，每种单个的肽一般都有 5 个氨基酸残基以上的长度。

在一个优选的实施方案中，非溶血性溶细胞肽是一种不均一型肽，

同时含有D-和L-氨基酸残基，即是一个非对映体，它具有对病原细胞选择性的溶细胞活性，选择性用如下方式显示：该肽诱导病原细胞裂解的浓度远低于其诱导溶血即红细胞裂解所需的浓度。

本发明还提供一种药用组合物，其中含有一种本发明的非溶血性溶细胞肽作为活性试剂，以及一种可药用载剂。该药用组合物用于治疗由各种病原有机体如革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌、病毒、真菌、支原体及寄生性原生动物引起的疾病或紊乱，寄生性原生动物的例子有引起利什曼病的利什曼虫和引起疟疾的疟原虫。在一个优选的实施方案中该抗病原性组合物是一种抗微生物优选是抗细菌性的组合物。此外，本发明的组合物对于抵抗恶性细胞也是有用的，能够用于癌症的治疗。

本发明还提供一种治疗方法，包括给予有需要的受体以所说的非溶血性溶细胞肽。本发明的方法及上面的组合物能够在人类和兽类医学中应用。

根据本发明，还进一步提供所说的非溶血性溶细胞肽在制备药用组合物，特别是在抗细菌性组合物中的应用，该药用组合物用于治疗人或非人动物中的疾病。

在一个进一步的实施方案中，本发明的选择性肽可以用作消毒剂，用来清除微生物，即用于浸泡隐形眼镜的溶液中；可以用作防腐剂，例如用在化妆品或食品工业中；以及用作杀虫剂，应用于农业，例如杀真菌剂、杀细菌剂；或用作农产品例如水果和豆类储存的防腐剂。

附图简述

图1是氨基乙基氨基pardaxin（TApar）衍生肽的圆二色（CD）谱，图谱是在肽在40%的2,2,2-三氟乙醇(TFE)/水中的浓度为$0.8\text{-}2.0\times10^{-5}$ M时测定的。符号：TApar（—）；[D]P^7-TApar（.....）；[D]$L^{18}L^{19}$-TApar（—）；以及[D]$P^7L^{18}L^{19}$-TApar（·—）。

图2描述了TApar衍生肽对人红细胞（hRBC）溶血活性的剂量依赖曲线。插图显示在低浓度时的分析结果。符号：实心方块，melittin；实心三角，TApar；实心圆，[D]P^7-TApar；空心圆，[D]$L^{18}L^{19}$-TApar；空心方块，[D]$P^7L^{18}L^{19}$-TApar；空心三角，dermaseptin。

图3A-B显示TApar衍生肽诱导的囊泡中扩散电势的最大离散。这些

肽加入至含有由磷脂酰胆碱/磷脂酰丝氨酸（PC/PS）（图 3A）或 PC（图 3B）组成的小的单层囊泡（SUV）的等渗无 K^+缓冲液中，缓冲液预先用荧光染料 diS-C_2-5 和缬氨霉素平衡。在肽与囊泡混合 10-20 分钟后测量荧光恢复。符号：实心三角，TApar；实心圆，[D]P^7-TApar；空心圆，[D]$L^{18}L^{19}$-TApar；空心方块，[D]$P^7L^{18}L^{19}$-TApar。

图 4A-C 显示未处理的大肠杆菌（*Escherichia coli*）（图 4A）、或者用低于最小抑制浓度（MIC）（图 4B）或用浓度为 MIC（图 4C）的[D]$P^7L^{18}L^{19}$-TApar 处理的、负染大肠杆菌细胞的电子显微照片。

图 5 显示 melittin 和 melittin 衍生的非对映体的 CD 谱。图谱在肽浓度为 40% TFE/水中 0.8-2.0×10^{-5} M 时测得。符号：melittin（—）；[D]-$V^{5,8}$-I^{17}-K^{21}-melittin（.....）；[D]-$V^{5,8}$-I^{17}-K^{21}-melittin-COOH（- - - - -）。

图 6 描述 melittin 衍生的非对映体对 hRBC 的溶血活性的剂量依赖曲线。符号：实心圆，melittin；空心圆，[D]-$V^{5,8}$-I^{17}-K^{21}-melittin-COOH；实心三角，[D]-$V^{5,8}$-I^{17}-K^{21}-melittin。

图 7A-C 显示未处理的（图 7-A）或用浓度低于 MIC（7B）或用浓度为 MIC（7C）的[D]-$V^{5,8}$-I^{17}-K^{21}-melittin 处理的负染大肠杆菌的电子显微照片。

图 8A-B 显示由 melittin 和 melittin 衍生的非对映体诱导的囊泡中扩散电势的最大离散。肽加入至含有由 PC（8A）或 PC/PS（8B）组成的 SUV 的等渗无 K^+缓冲液中，缓冲液预先用荧光染料 diS-C_2-5 和缬氨霉素平衡，在肽与囊泡混合 10-20 分钟后测量荧光恢复。符号：实心圆，melittin；实心三角，[D]-$V^{5,8}$-I^{17}-K^{21}-melittin。

图 9A-B 显示在用 PC/PS 囊泡（实心三角）或 PC 囊泡（空心三角）滴定时[D]-$V^{5,8}$-I^{17}-K^{21}-melittin（总浓度 0.5μM）的荧光增强，激发波长设置为 280 nm，发射波长设置为 340 nm。实验于 25°C 在 50 mM Na_2SO_4、25 mM HEPES-SO_4^{-2}、pH6.8（图 9A）中进行；并通过绘制 X_b^*（每 60%脂的结合肽的摩尔比）对 C_f（溶液中游离肽的平衡浓度），而从图 9A 获得结合等温线（图 9B）。

图 10A-B 显示溴化磷脂对环境敏感的色氨酸的淬灭。Melittin（图

10A）和[D]-$V^{5,8}$-I^{17}-K^{21}-melittin（10B）加入至含有PC/PS（1: 1 w/w）SUV的缓冲液中。SUV含有25% 6, 7 Br-PC（-.-.-.-.-）或9, 10 Br-PC（------）或11, 12 Br-PC（.....）。温育2分钟后，用荧光分光光度计在激发波长设置为280 nm时记录色氨酸的发射光谱。PC/PS（1: 1 w/w）SUV与无Br-PC的比较用（—）显示。

图11显示Leu/Lys非对映体的疏水性对PR-HPLC保留时间的影响。

图12显示Leu/Lys非对映体对hRBC的溶血活性的剂量依赖曲线。插图显示在低浓度时的分析结果。符号：空心方块，melittin；实心方块，[D]-$L^{3,4,8,10}$-K_3L_9；实心圆，[D]-$L^{3,4,8,10}$-K_4L_8；空心三角，[D]-$L^{3,4,8,10}$-K_5L_7；实心三角，[D]-$L^{3,4,8,10}$-K_7L_5。

图13A-B显示由Leu/Lys非对映体诱导的囊泡中扩散电势的最大离散，肽加入至含有由PC（图13A）或PE/PG（13B）组成的SUV的等渗无K^+缓冲液中，缓冲液预先用荧光染料diS-C_2-5和缬氨霉素平衡。在肽与囊泡混合3-10分钟后测量荧光恢复。符号：实心方块，[D]-$L^{3,4,8,10}$-K_3L_9；实心圆，[D]-$L^{3,4,8,10}$-K_4L_8；空心三角，[D]-$L^{3,4,8,10}$-K_5L_7；空心圆，[D]-$L^{3,4,8,10}$-K_7L_5。

图14A-H显示未处理的和用80%的MIC的各种Leu/Lys非对映体处理的负染的大肠杆菌的电子显微照片。图14A，对照；图14B，用[D]-$L^{3,4,8,10}$-K_3L_9处理的大肠杆菌；图14C，用[D]-$L^{3,4,8,10}$-K_4L_8处理的大肠杆菌；图14D，用[D]-$L^{3,4,8,10}$-K_5L_7处理的大肠杆菌；图14E，用[D]-$L^{3,4,8,10}$-K_7L_5处理的大肠杆菌；图14F，对照；图14G，用[D]-$L^{3,4,8,10}$-K_4L_8处理的大肠杆菌；图14H，用[D]-$L^{3,4,8,10}$-K_5L_7处理的大肠杆菌。

发明详述

根据本发明，我们惊奇地发现，非均一型基于L的肽具有选择性溶细胞活性，其表现为对病原细胞如细菌具有选择性损伤作用，而对非病原细胞，即红细胞几乎没有或没有作用。该发现令人惊奇是因为，本领域中流行的观点是溶细胞肽在细胞中的溶细胞活性，不管是在病原细胞例如细菌还是在正常哺乳动物细胞中，是来自与α-螺旋构型有关的单一基本机制。若不为理论所束缚，本发明的这些发现显示肽诱导的溶细胞是几种溶细胞机制作用的结果，这些机制根据靶细胞膜的确切本质而作用于不同的细胞；因此，通过破坏肽的α-螺旋结构，例如用相对的对映

体在一种均一型肽中取代某些氨基酸残基，有可能获得这样一种溶细胞肽，它在一种溶细胞机制中有溶细胞活性而在另一种溶细胞机制中没有活性，因而获得特异地对特定病原靶细胞有溶细胞活性的肽。

在这里，用 pardaxin 和 melittin 的 D-氨基酸整合的类似物（非对映体）进行功能和结构研究的目的，是为了理解细胞选择性的分子机制，pardaxin 和 melittin 是已知的两种非细胞选择性溶细胞素。数据显示，所获得的非对映体并不保留其α-螺旋结构，这导致其对哺乳动物细胞的细胞毒作用丧失。但是，非对映体保留了高的抗菌活性，其表现是对革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌都能完全裂解。因此，pardaxin 和 melittin 的α-螺旋结构显示对于针对哺乳动物细胞的细胞毒活性非常重要，但对抗菌活性不是必需的。然而，在另一个研究中，向非溶血性抗菌肽爪蟾抗菌肽中整合一个单一的 D-氨基酸丧失了几乎全部的抗菌活性（Chen 等，1988）。在此处用 pardaxin 和 melittin 非对映体获得的结果提示，疏水性和净正电荷可向非选择性溶细胞肽提供选择性抗菌活性，而两亲性α-螺旋结构不是必需的。但 pardaxin 和 melittin 非对映体含有长序列的 L-氨基酸（14-17 aa 长），这提出了这样一种可能性，即低度的残基螺旋结构对于膜结合和去稳定已经足够。

为了检测调整线性细胞毒肽的疏水性和净正电荷是否足以提供选择性抗菌活性，我们选择短的模型肽（12 aa 长）的非对映体进行研究，非对映体包含各种比例的亮氨酸和赖氨酸，其中三分之一的序列由 D-氨基酸组成。肽的长度和 D-氨基酸的位置使短肽有非常短的连续 1-3 个 L 氨基酸片段，使其不能构成α-螺旋结构。非对映体用如下方面进行评价:（1）其对细菌和人红细胞的细胞毒作用;（2）其结构;（3）其作用和破坏细菌细胞壁和模型磷脂膜的能力。数据显示，调整疏水性和净正电荷足以提供抗菌活性和溶细胞选择性。而且，所获得的抗菌肽能以非致死浓度与可用抗菌药物如四环素协同作用，并且它们对能显著降低天然抗菌肽活性的人血清灭活作用有完全的抗性。我们制备了更短的非对映体（6 aa 和 8 aa 长），经试验发现具有非溶血性溶细胞活性。

特定的溶细胞非螺旋型肽具有抗病原体活性，这一发现为制备含有这种非螺旋型多肽的抗病原体药物开辟了道路。若非螺旋肽是包含 L-氨基酸和 D-氨基酸两者的非均一肽，该抗病原体药物的额外优点在于，一

方面比均一型 L 肽对降解如由蛋白酶引起的降解有较高的抗性；另一方面，又不象完全均一型 D 肽有完全的抗降解性。对降解的抗性在考虑到从机体中的缓慢清除时是一个缺点，这可能引起相关的毒副作用。这种非α-螺旋型抗病原体肽可用于多种治疗程序。

由于已知均一型 D-肽具有与相应的均一型 L-肽基本相同的溶细胞活性（Bessalle 等，1990），因此相应地很清楚，非均一型基于 D 的肽具有与非均一型基于 L 的肽相同的抗病原体特性。

本发明的发现，即特定的非α-螺旋型肽具有对细菌的溶细胞活性，而对红细胞没有溶细胞的活性，是如下事实的结果，细菌细胞与红细胞在其细胞膜的组成上不同。细胞膜组成上的差异还可见于多种病原细胞，例如癌细胞与正常细胞之间。因此，基于本发明的发现，即特定的非α-螺旋型肽具有针对一种细胞类型，即细菌细胞的特异性溶细胞活性，为发展各种具有下面特性的药物开辟了道路，即对机体内的一类细胞如细菌细胞、寄生虫细胞、真菌细胞、原生动物细胞或癌细胞具有选择性溶细胞活性，而对非病原的正常机体细胞几乎没有或没有活性。

对病原细胞具有选择性溶细胞活性而对正常的、非病原细胞几乎没有或没有溶细胞活性的本发明的非溶血性溶细胞肽，可以用于多种治疗应用而没有或几乎没有毒副作用。

根据本发明的一族肽是由具有广谱溶细胞活性的带α-螺旋结构的均一型肽衍生的非α-螺旋型非均一型肽。因此，根据一个实施方案，本发明提供含有 D-和 L-氨基酸残基的非均一型肽，该肽含有与具有如下性质的均一型肽同样的序列，该均一型肽仅包含 L 或 D 氨基酸残基，含有一个α-螺旋构型，并在多种细胞上显示广谱的溶细胞活性，所说的非均一型肽仅在某些所说均一型肽具有溶细胞活性的细胞上具有溶细胞活性。例如，非均一型的溶细胞活性仅在病原细胞上表现，而在正常细胞如红细胞上没有溶细胞活性。

根据本发明的溶细胞肽的例子有，衍生于具有α-螺旋结构并拥有溶细胞活性的天然肽的肽。本发明的非α-螺旋肽具有与天然肽的全部或部分序列基本上相当的序列，其中沿分子的 N 和 C 螺旋整合进 D 氨基酸，并用如下方法获得净正电荷，即通过加入一个带正电荷的氨基酸残基，如赖氨酸、精氨酸、组氨酸，例如在 N 末端；和/或加入带正电荷的基团，

如诸如氨基乙基氨基的氨基烷基氨基基团，例如在分子的 C 末端；或通过中和游离的羧基基团，例如将它们转为酰胺基团。这种天然肽的例子有 melittin 和 pardaxin 及其片段。

例如，非α-螺旋肽可以是来自 pardaxin 的 33 聚体的肽，或是来自 melittin 的 26 聚体的肽，非α-螺旋肽可以是 33 聚体或 26 聚体的肽，分别含有一段相当于 melittin 或 pardaxin 全序列的序列，或者可以是一个非螺旋肽，包含相当于 melittin 或 pardaxin 的部分序列，例如 8-23 聚体的 melittin 序列。在衍生于 pardaxin 的一个非均一型肽时，根据本发明的非均一型肽可以包含相当于 pardaxin 序列的部分序列，至少包含 10 个氨基酸残基，范围是 10-24 氨基酸残基之间。

根据本发明的另一族肽是非螺旋型肽，它包含一段没有天然类似物的序列，至少包含一个疏水氨基酸且至少有一个带正电荷的氨基酸，并且在其序列中至少有一个氨基酸残基是 D-氨基酸。

原先使用阐明抗菌肽的结构-功能研究的所用的模型肽进行的研究，注意力集中在三个参数：螺旋结构、疏水性和电荷（Anzai 等，1991；Agawa 等，1991）。这三个参数中任意一个改变都会使另外两个同时改变，这使得确定每个参数对全部抗菌活性的单独贡献非常困难。根据本发明，螺旋结构的影响被排除，因此就可以研究仅有的两个参数，即疏水性和净正电荷，这可通过改变亮氨酸和赖氨酸的比例来进行。为此，我们选择了含有仅为 1-3 个连续 L-氨基酸片段的模型短肽（12aa 长）的非对映体来进行研究，1-3 个连续 L-氨基酸片段太短而不能形成α--螺旋结构。

CD 光谱揭示，这些 Leu/Lys 非对映体确实完全没有α--螺旋结构（未显示数据），不象本发明的 melittin 和 pardaxin 的非对映体，它们还保留较低的α--螺旋结构。不管怎样，Leu/Lys 非对映体显示了与天然抗菌肽如 dermaseptin S 或抗生素药物四环素相似或更高的抗菌活性，而且，最强的肽[D]-$L^{3,4,8,10}$-K_4L_8和[D]-$L^{3,4,8,10}$-K_5L_7（分别为 23 和 24 肽，见实施例 3），对高度溶细胞敏感的人红细胞没有溶血活性。应当注意，[D]-$L^{3,4,8,10}$-K_3L_9（22 肽）没有α--螺旋结构，但具有相当的溶血活性，接近于天然的溶细胞肽 pardaxin。这可暗示，疏水性和正电荷的平衡补偿了两亲性α--螺旋结构的缺乏。但是，提高正电荷显著降低溶血活性，

而抗菌活性被保留，这证明两亲性α--螺旋结构不是抗菌活性所必需的。

我们检测了 Leu/Lys 非对映体与带负电荷和兼性的磷脂膜的相互作用，来说明它们对细菌选择性细胞毒作用的基础。带负电荷的 PE/PG 囊泡用来模仿大肠杆菌的脂组成（Shaw，1974），而兼性的 PC 囊泡用来模仿人红细胞外层小叶（Verkleij 等，1973）。Leu/Lys 肽在红细胞（图 12）和大肠杆菌（表 5）上的生物学活性与其透过模型膜的能力完全对应。能够透过 PC 囊泡的肽正是有显著溶血活性的肽。这些结果显示细菌膜的磷脂组成在这族抗菌肽的透过中起着一种作用，抗菌和非溶血型肽结合并穿透带负电荷的囊泡而不结合和穿透兼性磷脂囊泡的能力是天然抗菌肽的特征（Gazit 等，1994），其原因为这样一个事实，细菌表面含有脂多糖（LPS，在革兰氏阴性菌中）、多糖（磷壁酸，革兰氏阳性菌中），并且在它们的内膜含有磷脂酰甘油（PG），它们都是带负电荷的，而正常的真核细胞，例如红细胞，在其外层小叶中主要表达兼性磷脂 PC。

抗菌肽爪蟾抗菌肽是非溶血性肽，而 melittin、pardaxin 和一种序列类似于[D]-$L^{3,4,8,10}$-K_4L_8但全部由 L 氨基酸组成的模型肽是溶血性的，这主要是因为它们的高度疏水性。当爪蟾抗菌肽的α--螺旋结构为引入三个 D-氨基酸所破坏时，所产生的非对映体没有抗菌活性（Chen 等，1988），即使其净正电荷与爪蟾抗菌肽相同。因此，已经存在于天然爪蟾抗菌肽α--螺旋的疏水性和净正电荷的最佳平衡，使其具有选择性抗菌活性，这些特征中任意一个改变都可能丧失爪蟾抗菌肽的抗菌活性。与此相对，疏水性在补偿本发明的 melittin、pardaxin 和 Leu/Lys 非对映体中α--螺旋结构缺失时，似乎起主要作用。

根据本发明的结果提示了一种设计短的、简单的、且容易操作的抗菌肽库的新策略。每一种非对映体的模型 Leu/Lys 肽都具有独特的活性谱（表 5）。存在非对映体抗菌肽库使我们能选择针对靶细胞的最有效的肽。而且，同时用多种形式的非对映体肽进行给药，这些肽可单独或混合起作用，这样也可有选择性的残余值，并且可为抵抗大范围的感染性微生物提供更好的保护。所有的 Leu/Lys 非对映体都显示对革兰氏阳性菌的抗菌活性比对革兰氏阴性菌的抗菌活性高。考虑到革兰氏阳性菌如金黄色葡萄球菌、肠球菌和肺炎球菌对传统抗生素的抵抗力不断提高。

这些结果非常重要（Russell 等，1995）。此外，不像天然的抗菌肽 dermaseptin S，[D]-$L^{3,4,8,10}$-K_5L_7（24 肽）在存在混合的人血清时，仍保留其抗菌活性。

非对映体肽相对已知的抗菌肽具有以下几个优点：（1）这些肽没有由α--螺旋型溶解性溶细胞素诱导的多种病理和药学效应。例如，葡萄球菌δ毒素、抗菌肽丙甲甘肽、眼镜蛇毒素直接裂解因子，而 pardaxin 由于其形成孔道而对多种细胞产生组织病理影响，并激活花生四烯酸级联反应，但 pardaxin 非对映体并不具有这些活性。此外，许多两亲性α--螺旋肽与钙调蛋白结合，并引发几种细胞应答，即使是全 D-氨基酸的α--螺旋，包括 melittin 也有相同的活性（Fisher 等，1994）。α--螺旋被破坏的非对映体预期不会与钙调蛋白结合；（2）局部的 D-氨基酸替换与完全的 D-氨基酸替换所获得的全保护相比，将会产生可控制的蛋白水解酶对抗菌肽的清除（Wade 等，1990）。裂解型肽对降解有完全的抵抗作用，这在用于治疗时是一个缺陷。而且，含有 D、L 氨基酸的短片段的抗原性与其全部的 D 或 L 型氨基酸亲本分子相比有了很大改变（Benkirane 等，1993）；（3）由非对映体诱导的细菌生长的完全抑制作用与细菌细胞壁的完全裂解有关，这一点由电镜照片显示（图 14）。因此细菌不可能对以这样的损伤机制起作用的药物容易地产生抗性；（4）[D]-$L^{3,4,8,10}$-K_5L_7（24 肽）能够在低于其 MIC 的浓度时干扰细菌的细胞壁，见电镜照片（图 14）。某些临床用抗生素由于其不能穿透细菌的细胞壁而没有活性，在与 24 肽同时给药时，将会解决细菌的这种抗性机制。

我们可以总结如下，这里用 pardaxin、melittin 和模型肽非对映体获得的结果显示，没有特殊序列、长度或 D-氨基酸位置是肽具有抗菌活性所必需的。但是，这些因素显然对哺乳动物细胞的细胞毒作用更为重要。这些结果显示，仅调节线性细胞毒多肽的疏水性和净正电荷，就足以为治疗感染性疾病设计强效的抗菌非对映体多肽库。

本发明将参考某些非限制性的附图和实施例进行说明。

实验方法

（i）材料，叔丁氧羰基-（氨基酸）-（苯乙酰胺）甲基树脂购自 Applied Biosystems（Foster City，CA），叔丁氧羰基（BOC）氨基酸

购自 Peninsula Laboratories（Belmont，CA），其它用于肽合成的试剂包括三氟乙酸（TFA，Sigma）、N、N 二异丙基乙胺（DIEA，Aldrich，在茚三酮上蒸馏）、二环己基碳二亚胺（DCC，Fluka）、1-羟基苯并三唑（HOBT，Pierce）以及二甲基甲酰胺（肽合成级，Biolab）。来自牛脊髓的卵磷脂(PC)和磷脂酰丝氨酸(PS)（钠盐-I 级）购自 Lipid Products（South Nutfield. U.K.）。卵磷脂酰甘油（PG）和磷脂酰乙醇胺（V 型，来自大肠杆菌）购自 Sigma。胆固醇(超级纯)购自 Merk(Darmastadt，德国），并在乙醇中重结晶两次。3，3'-二乙硫基二碳花青碘化物（diS-C_2-5）获自 Molecular Probes（Eugene，OR）。天然 melittin 购自 Sigma。商品化 melittin 通常含有痕量的磷脂酶 A_2，它会引起磷脂的迅速水解。因此我们特别采用 RP-HPLC 从 melittin 中去除所有的磷脂酶 A_2。其它试剂为分析纯。缓冲液用双蒸水制备。

（ii）肽合成及纯化

肽在叔丁氧羰基-（氨基酸）-（苯乙酰胺）甲基树脂（0.05meg）上用固相法合成(Merrifield 等，1982)。树脂上结合的肽用氢氟酸(HF)从树脂上裂解下来，且在 HF 挥发后用无水乙醚抽提。这些粗制的肽制备物在 RP-HPLC 上含有一个主峰，它是 50-70 wt%纯的肽。这些合成肽在一个 C_{18} 反相 Bio-Rad-半制备柱（300Å 孔径大小）上用 RP-HPLC 进行进一步纯化。柱洗脱 40 分钟，使用线性梯度的 10-60%乙腈水溶液，均含 0.05%TFA(V/V)，流速为 1.8 ml/min. 用分析 HPLC 显示为均一（~95%）的纯化肽进行氨基酸分析，并用质谱证明其序列。

（iii）肽的转氨基

上述（ii）中树脂结合的肽用 DMF 中的 30%乙二胺转氨基 3 天，接着过滤树脂，用乙醚沉淀被保护的肽，即氨基乙基氨基（TA）肽，用 HF 去除保护基团。合成的 TA 肽在 C_{18} 柱上用反相 HPLC 纯化（>95%均一性），使用 0.01%TFA 中线性梯度为 25-80%的乙腈 40 分钟，然后进行氨基酸分析证实其组成。

（iv）肽的酰胺化

树脂结合的肽（20mg）用含有甲醇中 1: 1V/V 的饱和氨溶液（30%）和 DMSO（1: 1V/V）的混合物处理 3 天，这会导致位于[D]-$V^{5,8}$-I^{17}-K^{21}-melittin C 末端的谷氨酸残基的羧基基团酰胺化。这样，

获得了这样一种肽，其全部的保护基团仍存在，但其 C 末端残基被一个酰胺基团修饰。甲醇和氨在氮气流中挥发，被保护肽用 DMSO 从树脂中抽提出来，并用无水乙醚沉淀，然后用 HF 裂解产物，并如上所述用 RP-HPLC 进一步纯化。

（v）脂囊泡的制备

小的单层囊泡（SUV）用 PC/胆固醇（10: 1，w/w）或 PC/PS（1: 1，w/w）分散液的超声进行制备。简而言之，干燥的脂和胆固醇（10: 1，w/w）溶解在 $CHCl_3$/MeOH 混合物（2: 1，V/V）中。接着溶剂在氮气流中挥发，脂（浓度为 7.2mg/ml）在真空中处理 1 小时，然后重新溶解在合适的缓冲液中，剧烈振荡。所获得的脂分散物在槽式超声仪（G1125SP1 超声仪，Laboratory Supplies Company Inc.NY）超声处理 5～15 分钟直至清亮。所产生的制备物中的脂浓度用磷分析法（Bartlett，1959）进行测定。囊泡按如下方法用 JEOL JEM 100B 电子显微镜（Japen Electron Optics Laboratory Co.，Tokyo，Japan）进行观察。将一滴囊泡置于碳包被的网上，用乙酸双氧铀负染。对网的检查证明这些囊泡是单层的，平均直径为 20～25 nm（Papahadjopoulos 和 Miller，1967）。

(vi)血清制备

从 5 个志愿者采集血样，在室温下凝集 4 小时，然后将血在 1500 g 离心 15 分钟，移取血清并混合，血清补体在 56°C 加热 30 分钟进行灭活。

（vii）CD 谱

在仪器用（+）-10-樟脑磺酸校对后，用 Jasco J -500A 旋光分光光度计测量肽的 CD 谱。光谱在 23°C 在有盖透明石英杯中用 0.5 mm 的光程长度进行扫描。光谱在 250 至 190 nm 的波长时获取。对每个肽以以 20 nm/min 的扫描速率扫描 8 次。肽以在 40%的三氟乙醇（TFA）中 1.5×10^{-5}-2.0×10^{-5}M 的浓度进行扫描，TFE 是一种能强烈促进α-螺旋结构的溶剂。分级螺旋（Greenfield 和 Fasman，1969，Wu 等，1981）按如下进行计算。

$$f_n = \frac{[\theta]_{222} - [\theta]^0_{222}}{[\theta]^{100}_{222} - [\theta]^0_{222}}$$

其中，$[\theta]_{222}$是在实验中观察到的在220nm处的平均残基椭圆度，而$[\theta]^{0}_{222}$和$[\theta]^{100}_{222}$相当于222 nm时0%和100%的螺旋含量，其值分别估计为2000和32000 deg·cm^2/dmole (Wu等,1981)。

(viii)肽的抗菌活性

非对映体的抗菌活性在无菌的96孔板（Nunc F96微滴定板）中进行检测,其终体积为含如下物质的100μL: 1小份（50μl）含浓度为10^6集落形成单位（CFU）/ml LB（Lauria broth）培养基的细菌的悬浊液加入至50μl水或PBS中66%混合的正常人血清中，其中含有倍比稀释的肽。生长抑制在37C°温育18-20小时后用Microplate autoreader E1309（Bio-Tek Instruments）通过测量在492nm处的吸收值来测定。抗菌活性以最小抑制浓度（MIC）的方式表示，MIC是在温育18-20小时后能观察到生长被100%抑制的浓度，所使用的细菌为大肠杆菌D21、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)ATCC 27853、乙酸钙不动杆菌（*Acinetobacter calcoaceticus*）Ac11、伤寒沙门氏菌（*Salmonella typhimurium*）LT_2、巨大芽胞杆菌(*Bacillus Megaterium*) Bm11，藤黄微球菌（*Micrococcus luteus*）ATCC 9341、枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）ATCC 6051.

（ix）人红细胞的溶血

我们检测了肽对人红细胞（hRBC）的溶血活性。新鲜的hRBC与EDTA用PBS（35mM的磷酸缓冲液/0.15M NaCL, PH7.3）通过在800g离心10分钟洗涤3次并重新悬浮于PBS中，随后将溶解在PBS中的肽加入到50μl PBS中的hRBC贮存液中，使其终体积达到100μL（红细胞终浓度，5%V/V）。所获得的悬液在37C°振荡温育30分钟。样品随后在800g离心10分钟。血红蛋白的释放通过测量上清在540nm的吸收值来监测。0溶血（空白）和100%溶血的hRBC对照分别悬浮于PBS和1%Triton中。

（x）用电镜观察肽对细菌的影响

含在LB培养基中的大肠杆菌样品（10^6CFU/ml）与不同的肽在它们的MIC浓度和低于MIC的一个稀释度温育16小时，然后在3000 g离心10分钟。重新悬浮沉淀，将含有细菌的一小滴置于碳包被的网上，然后用2%的磷钨酸（PTA）pH6.8负染，网用JEOL JEM 100B电子显微镜检查。

（xi）肽诱导的膜穿透

膜穿透使用前面介绍（Shai 等，1991）的扩散电势实验（Loew 等，1983，Sims 等，1974）进行估算．在典型的实验中，在一个玻璃试管中，4 μl 溶于含 K^+缓冲液（50 mM K_2SO_4、25 mM HEPES-SO_4^{-2}、pH6.8)的脂质体悬液稀释于 1 mL 不含 K^+的等渗缓冲液(50 mM Na_2SO_4、25 mM HEPES-SO_4^{-2}、pH6.8）中，然后加入荧光标记的电势敏感染料 diS-C_2-5。在悬液中加入缬氨霉素（1ul、10^{-7}M）以在囊泡内部缓慢产生一种负的扩散电势，这会导致染料的荧光淬灭。当荧光稳定后，这需要 3-10 分钟，加入肽。在一台 Perkin Elmer LS-50B 荧光分光光度计上监测随后扩散电势的离散，这通过荧光的增强来反映。激发波长设置为 620 nm，发射波长设置为 670 nm，放大值设置为 100%。荧光恢复的百分比 F_t定义为

$$F_t = (I_t - I_0/I_f - I_0) \times 100$$

其中 I_0 = 初始荧光值，I_f = 在加入缬氨霉素前观察到的总荧光值，I_t = 在 t 时间加入肽后观察的荧光值。

（xii）肽与囊泡结合

[D]-$V^{5,8}$-I^{17}-K^{21}-melittin 与包含兼性（PC）或带负电荷磷脂（PC/PS）的囊泡的相互作用，通过测量 SUV 滴定实验中肽固有的色氨酸的发射强度来确定。简而言之，SUV 在 24°C 加入至溶于含 50 mM Na_2SO_4、25 mM HEPES-SO_4^{-2}、pH6.8 缓冲液的固定量的肽（0.5 μM）中。在所有实验中均使用含 2 ml 最终反应体积的 1 cm 光程长度的石英小杯，在 Perkin-Elmer LS-5 荧光分光光度计上测量荧光强度作为脂/肽摩尔比的函数（4 个单独的实验），激发波长设置为 280 nm，使用 5 nm 狭缝，发射波长设置为 340 nm，使用 2.5 nm 狭缝。结合等温线以分配平衡的形式进行分析，使用如下公式

$$X_b = K_P C_f$$

其中 X_b定义为每全脂（C_L）中结合肽（C_b）的摩尔比，K_p相当于分配常数，C_f代表溶液中游离肽的平衡浓度，为实用的目的，假定肽最初仅在 SUV 的外小叶（60%）分配。所以平衡方程变为

$$X_b^* = K_P^* C_f$$

其中 X_b^*定义为每 60%全脂上结合肽的摩尔比，K_P^*是估计的表观平衡常数，曲线用 X_b^* 对游离肽来绘制，C_f为传统结合等温线。

（xiii）色氨酸淬灭实验

色氨酸对其环境敏感，这一点在前面已用于与溴化的磷脂(Br-PC)来一起评价肽在膜上的定位（Bolen 和 Holloway，1990; De Kroon 等，1990）。Br-PC 作为色氨酸荧光淬灭剂适用于探测膜上插入的肽，因为它们在短距离内作用且不明显地破坏膜。melittin 及其非对映体都含有一个色氨酸残基，将它们（终浓度为 0.5 μM）加入至 2 ml 含有 20 μl（50 μM）Br-PC/PS（1: 1 w/w）SUV 的缓冲液（50 mM Na_2SO_4、25 mM HEPES-SO_4^{-2}、pH6.8）中，这样建立的脂/肽比例为 100: 1。在室温下保温 2 分钟后，用 Perkin-Elmer LS-50B 荧光分光光度计记录色氨酸的发射光谱，其中激发波长设置为 280 nm（8 nm 狭缝）。使用含有 PC/PS（1: 1 w/w）的 SUV，后者含有 25%的 6,7 Br-PC 或 9,10 Br-PC 或 11,12 Br-PC. 对每种肽进行 3 组单独的实验。在对照实验中，使用不含 Br-PC 的 PC/PS（1: 1 w/w）SUV。

实施例 1 pardaxin 衍生的非对映体的合成和生物活性

1. 1 合成

为检测聚阳离子溶细胞素中α-螺旋结构在其对哺乳动物细胞和细菌的细胞毒作用中所起的作用，我们按实验方法（ii）和（iii）中介绍的方法合成了一系列 pardaxin 衍生的肽，并分析了它们的结构、对 hRBC 的溶血活性、抗菌活性及对细菌形态的影响。

pardaxin（par）是有下列序列的 33-聚体肽

Gly-Phe-Phe-Ala-Leu-Ile-Pro-Lys-Ile-Ile-Ser-
Ser-Pro-Leu-Phe-Lys-Thr-Leu-Leu-Ser-Ala-Val-
Gly-Ser-Ala-Leu-Ser-Ser-Ser-Gly-Gly-Gln-Glu

为引入正电荷，pardaxin 分子的修饰使用下面方法进行：删除 pardaxin 的酸性 C 末端，或将 pardaxin 或其片段的酸性 C 末端转变成带正电荷，这通过将 C 末端上 Glu 残基的羧基基团与乙二胺（TA）反应实现，和/或在 N 末端添加带正电荷的氨基酸残基如 Lys，在 pardaxin 非对映体中，N 螺旋和/或 C 螺旋通过将 TApar 或 pardaxin 片段的位置 7 的 Pro 残基用 D-Pro（这里表示为[D]P^7）替换来转变，或将 TApar 或 pardaxin 片段的位置 18 和 19 两个 Leu 残基用 D-Leu（这里表示为[D]$P^7L^{18}L^{19}$）替换来改变，或用二者来改变（这里表示为[D]$P^7L^{18}L^{19}$）。D-氨基酸被引入到 N 和 C-螺旋的中央。

下面的 pardaxin 衍生的非对映体被发现无溶血性并显示选择性溶细胞活性（黑体和下面划线的残基为 D-氨基酸），这些肽在此之后用黑体数字来代表:

1. [D]$P^{7}L^{18}L^{19}$-TApar 的序列

Gly-Phe-Phe-Ala-Leu-Ile-Pro-Lys-Ile-Ile-Ser-
Ser-Pro-Leu-Phe-Lys-Thr-Leu-Leu-Ser-Ala-Val-
Gly-Ser-Ala-Leu-Ser-Ser-Ser-Gly-Gly-Gln-Glu-$(NH-CH_2-CH_2-NH_2)_2$

2. [D]$P^{7}L^{18}L^{19}$[1-22]-TApar 的序列

Gly-Phe-Phe-Ala-Leu-Ile-Pro-Lys-Ile-Ile-Ser-
Ser-Pro-Leu-Phe-Lys-Thr-Leu-Leu-Ser-Ala-Val-$(NH-CH_2-CH_2-NH_2)_2$

3. [D]$P^{7}L^{18}L^{19}$[1-22]-par 的序列

Gly-Phe-Phe-Ala-Leu-Ile-Pro-Lys-Ile-Ile-Ser-
Ser-Pro-Leu-Phe-Lys-Thr-Leu-Leu-Ser-Ala-Val-

4. K^{1}[D]$P^{7}L^{18}L^{19}$[1-22]-TApar 的序列

Lys-Gly-Phe-Phe-Ala-Leu-Ile-Pro-Lys-Ile-Ile-Ser-
Ser-Pro-Leu-Phe-Lys-Thr-Leu-Leu-Ser-Ala-Val-$(NH-CH_2-CH_2-NH_2)_2$

5. $K^{1}K^{2}$[D]$P^{7}L^{18}L^{19}$[1-22]-TApar 的序列

Lys-Lys-Gly-Phe-Phe-Ala-Leu-Ile-Pro-Lys-Ile-Ile-Ser-
Ser-Pro-Leu-Phe-Lys-Thr-Leu-Leu-Ser-Ala-Val-$(NH-CH_2-CH_2-NH_2)_2$

6. $K^{1}K^{2}$[D]$P^{7}L^{18}L^{19}$[1-22]-par 的序列

Lys-Lys-Gly-Phe-Phe-Ala-Leu-Ile-Pro-Lys-Ile-Ile-Ser-
Ser-Pro-Leu-Phe-Lys-Thr-Leu-Leu-Ser-Ala-Val

7. [D]P^{7}[1-11]-TApar 的序列

Gly-Phe-Phe-Ala-Leu-Ile-Pro-Lys-Ile-Ile-Ser-$NH-CH_2-CH_2-NH_2$

下面的 pardaxin 衍生物是合成的，并被发现有如后面表 1 显示的溶血活性:

8. TApar
9. [D]P^{13}-TApar
10. [D]$L^{5}L^{19}$-TApar
11. [D]$P^{7}L^{19}$-TApar
12. [D]P^{7}-TApar
13. [D]P^{7}-par
14. [D]$L^{18}L^{19}$-TApar
15. [D]$L^{18}L^{19}$-par
16. [D]$P^{7}L^{18}L^{19}$-par
17. [D]P^{7}[1-22]-TApar

1.2 确定肽的二级结构

肽 1, 8, 12, 14 的二级结构用其在 40%TFE 和 PBS（35mM 磷酸缓冲液 0.15M NaCL PH7.0）中的 CD 谱来评价，TFE 是一种强烈促进α-螺旋结构的溶剂，方法按实验方法中部分(vii)介绍。

pardaxin 衍生的非对映体的 CD 谱在图 1 中所示，其中[8](—)、[12]（.....）、[14]（----）、及[1]（-.-.-.-.-）。正如所预期的，当较多的 D-氨基酸整合时，肽的α-螺旋含量明显下降，这由 40%TFE 中 208 和 222nm 处的最低值反映出来。在 8（TApar）（50%α-螺旋）和 1（[D]$P^{7}L^{18}L^{19}$-TApar）之间有大于 90%的α-螺旋含量的降低。12（[D]P^{7}-TApar）和 14（[D]$L^{18}L^{19}$-TApar）的α-螺旋含量分别为 25%和 15%。应当注意，位置 7 的脯氨酸并非在结构中引入一个结，而是参与 N-螺旋的形成，这一点由 NMR 分光光度学所揭示（Zagorski 等，1991）。在 PBS 中，pardaxin 给出一个非常低值的约 12%的α-螺旋含量，而 D-氨基酸残基的类似物给出非常低的信号，不能归结为特殊结构（数据未显示）。

1.3 溶血性和抗菌活性

我们随后检测了 pardaxin 衍生肽 1-17 对高度敏感的人红细胞的溶血活性及其抑制不同种属细菌的潜力，方法分别按照实验方法部分（ix）和（xiii）。此外细胞毒性蜂毒 melittin、抗菌肽 dermaseptin S 和抗生素四环素用作对照。

图 2 显示了 1、8、12、14 溶血活性的剂量依赖曲线。据显示 D-氨基酸引入到 TApar 明显降低了其溶血活性，这与在相应类似物中α-螺旋含量的丧失相符。具有最大α-螺旋含量的肽 8TApaR 具有最大的溶血性，而具有最低α-螺旋含量的肽 1、[D]$P^{7}L^{18}L^{19}$-TApar 在最大测试浓度时（50 μM）基本上没有溶血活性。不能裂解 RBC 是大多数天然产生的抗菌肽如 dermaseptin（见图 2）、爪蟾抗菌肽和杀菌肽的特征。

表 1 给出了肽 1-17 对代表性的测试菌的 MIC（用μM 单位），代表菌株包括 2 个革兰氏阴性菌种类大肠杆菌和乙酸钙不动杆菌、两个革兰氏阳性菌种类巨大芽胞杆菌和枯草芽孢杆菌。表 1 还给出了 50 μM 肽的溶血%。表 2 给出了肽 1、8、12、14 和 melittin、dermaseptin S 和四环素对某些细菌种类的 MIC（用μM 单位），数据显示，尽管 1-7 非对映体类似物的α-螺旋含量和溶血活性明显降低，它们仍保留其亲本肽 pardaxin 的大部分强效抗菌活性，其活性与已知的天然抗菌肽相当。

表 1

pardaxin 类似物非对映体的最小抑制浓度（μM）和溶血活性

肽	最小抑制浓度（μM）						50μM肽的溶血%
	大肠杆菌（D21）	乙酸钙不动杆菌（Ac11）	巨大芽孢杆菌（Bm11）	藤黄微球菌（ATCC 9341）	伤寒沙门氏菌（LT2）	铜绿假单胞菌（ATCC 27853）	
1.	6	6	0.9	12.5	N.D	N.D	5
2.	12.5	12.5	2.5	N.D[a]	N.D	N.D	0
3.	130	>130	30	N.D	>130	>130	0
4.	7.5	7.5	1.5	N.D	N.D	N.D	0
5.	3.5	3.5	0.75	N.D	N.D	N.D	0
6.	15	6	6	N.D	120	60	0
7.	>120	>120	30	N.D	>120	>120	0
8.	3	3	0.8	5	15	8	100
9.	3	N.D	1.5	N.D	N.D	N.D	83
10.	3	N.D	1.3	N.D	N.D	N.D	56
11.	3	N.D	1.5	N.D	N.D	N.D	82

12.	10	5	1.2	5	N.D	N.D	49
13.	30	15	3.5	N.D	>100	>100	23
14.	3.5	1.5	0.6	2.5	N.D	N.D	100
15.	15	3.5	1.7	N.D	60	60	44
16.	100	100	50	N.D	>100	>100	0
17.	10	N.D	1	N.D	N.D	N.D	17

a-N. D, 未测定

表 2

肽的最小抑制浓度（μM）[a]

细菌种	菌株	8	12	14	1	Melttin	DermaseptinS	四环素
大肠杆菌	D21	3	10	3.5	6	5	6	1.5
乙酸钙不动杆菌	Ac11	3	5	2.5	6	2	3	1.5
巨大芽孢杆菌	Bm11	0.8	1.2	0.6	0.9	0.3	0.5	1.2
枯草芽胞杆菌	ATCC-6051	1.5	2	1.5	3	0.6	4	6.5

a. 结果是 3 个独立实验的平均值，每个独立试验做两个重复，标准偏差为 20%。

1．4　pardaxin 衍生肽诱导的膜不稳定

迄今为止研究的所有α-螺旋型、带正电荷的天然抗菌肽的共同特点是它们作用并穿透带负电荷磷脂的能力优于作用并穿透兼性磷脂的能力。这些发现与其生物靶膜的关联在于，细菌表面含有脂多糖（LPS，革兰氏阴性菌中）和多糖（磷壁酸，革兰氏阳性菌中），这两者都是酸性的，而正常的哺乳动物细胞（如红细胞）在其外层小叶上主要表达兼性磷脂 PC。用来评价肽对 PC 和 PC/PS 磷脂囊泡（根据实验方法部分 v 制备）的膜穿透能力的扩散电势的离散按实验方法部分 xi 的介绍进行分析。图 3 中所示肽 1、8、12、14 的结果指出，引入 pardaxin 的 D-氨基酸并不显著影响肽穿透磷脂膜的能力，但肽 1 穿透带负电荷磷脂明显优于兼性磷脂。肽 1 是唯一无溶血活性但保留抗菌活性的非对映体。在这方面它的行为类似于天然的抗菌肽，虽然它不含α-螺旋结构。肽 12 和 14 没有明显的中间活性，这可用下列事实来解释，即它们都含有完整的疏水 N-螺旋或两亲性 C-螺旋，这足以促进与两种类型的囊泡经疏水相互作用而强烈结合。

1．5 用电子显微镜观察细菌裂解

pardaxin 衍生肽对完整和经处理的细菌形态学的影响用负染电子显微技术进行观察，方法按实验程序部分 xx 的介绍。肽按抗菌实验（见上文实施例 1.3）相同条件以 MIC 或低于 MIC 的浓度加入至细菌中。样品在 18 小时温育后取出，立即固定，用透射显微镜检查。作为一个例子，图 4 显示了获自非溶血性类似物 1[D]$P^{7}L^{18}L^{19}$-TApar 的照片。我们发现在 MIC 时，肽 1 完全裂解细菌，并且仅能观察到小的片段（图 4C）。但是，在低于 MIC 的浓度时，在细胞壁上观察到斑点（图 4B）。这些观察很可能指明了参与裂解过程的开始步骤。

实施例 2　melittin 衍生的非对映体的合成和生物学活性

为进一步检测溶细胞素的α-螺旋结构在其对哺乳动物细胞和细菌的细胞毒中的作用，并了解这一作用内在机制，我们合成了 4 个 melittin（mel）的非对映体。

melittin 是一个有如下序列的 26 聚体肽

Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-NH_2

为了引入正电荷，melittin的修饰通过将melittin或其片段的酸性C末端转变为带正电荷来进行，这通过对C端羧基基团与乙二胺反应来进行。在melittin非对映体中，N-螺旋和C-螺旋通过分别用D-Val、D-Ile和D-Lys替换melittin的位置5和8的两个Val残基、位置17的Ile残基、位置21的Lys残基来改变（这里表示为[D]-V^5-V^8-I^{17}-K^{21}）。

下列melittin衍生的非对映体被发现是非溶血性的，并显示选择性细胞毒活性（黑体和下面划线的残基是D-氨基酸）

18. [D]-$V^5V^8I^{17}K^{21}$-mel的序列

Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-

Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln- NH_2

19. [D]-$V^5V^8I^{17}K^{21}$-mel-COOH的序列

Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-

Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-COOH

20. [D]-$V^5V^8I^{17}K^{21}$-[1-22]-TAmel的序列

Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-

Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-$NH-CH_2-CH_2-NH_2$

21. [D]-$V^5V^8I^{17}K^{21}$-[4-22]-TAmel的序列

Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-

Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-$NH-CH_2-CH_2-NH_2$

随后对肽18-21分析其结构、生物学功能以及与细菌和由兼性或带负电荷磷脂组成的模型膜的相互作用。

2. 2 CD分光光度学

肽18和19的α-螺旋结构的程度是由其在40% TFE的CD谱来确定，TFE是一种强烈促进α-螺旋结构的溶剂。正如所预期的，与melittin相比，非对映体的α-螺旋含量非常低（降低80%），这由在208和222 nm（图5）的最低值反映。melittin的α-螺旋含量为73%。与之相比，其非对映体18和19分别为15%和7%。

2. 3 melittin 非对映体 18-21 的抗菌和溶血活性

我们研究了肽 18-21 对 hRBC 的溶血活性及其抑制不同细菌种生长的能力。抗生素四环素在抗菌实验中用作对照。我们获得了肽溶血活性的剂量依赖曲线（图 6）。表 3 是对代表性测试细菌的 MIC。我们发现将 D-氨基酸引入 melittin 显著降低了其溶血活性。这与在相应类似物中α-螺旋含量的丧失平行。具有最高α-螺旋含量的 melittin 溶血性最大，而直到最大测试浓度（50 μM），具有最低α-螺旋含量的肽 18 和 19 实际上无溶血活性。但是，尽管 melittin 非对映体 18 和 19 的溶血性显著降低，它们仍都保留亲本肽的强烈抗菌活性。而且，肽 19 的抗菌活性仅略低于肽 18，这表明 melittin C 末端的酰胺基团对抗菌活性没有显著贡献。相反，已知带有一个游离羧基 C 末端的杀菌肽的抗菌活性明显低于带有一个酰胺化 C 末端的天然杀菌肽（Li 等，1988）。

表 3

melittin 类似物非对映体的最小抑制浓度（μM）和溶血活性

肽名称:	最小抑制浓度（μM）					
	大肠杆菌（D21）	乙酸钙不动杆菌（Ac11）	巨大芽孢杆菌（Bm11）	藤黄微球菌 (ATCC 9341)	枯草芽胞杆菌 (ATCC 6051)	50μM 肽的溶血%
Melittin	5	20	0.3	0.4	0.4	100
18	12	12	0.8	25	3.5	0
19	18	18	1.2	50	8	0
20	8	7	0.8	29	N.D	0
21	21	14	1.2	28	N.D	0
Dermaseptin-S	6	3	0.5	N.D	4	9
四环素	1.5	1.5	1.2	N.D	6.5	–

2. 4 细菌裂解的电子显微镜研究

肽 18 对完整和经处理细菌的形态学影响用透射电子显微镜来观察。如图 7 所示，在 MIC 时，肽 18 引起细菌的完全裂解（图 7C），但在低于 MIC 的浓度时，在细胞壁上观察到斑点（图 7B）。这些斑点可能代表裂解过程的初始步骤。

2. 5 与磷脂膜作用的模式

因为肽 18 和 19 的生物学活性相似，我们仅用肽 18 与模型磷脂膜的相互作用模式与 melittin 比较，来解释所观察到的膜选择性基础。为此，我们测量了肽在 PC 和 PC/PS 两种囊泡中离散扩散电势的能力，同时还测定了肽与两种类型囊泡的分配系数，以及当肽与膜结合时的定位。

2. 5. 1 肽诱导的膜穿透

不同浓度的 melittin 和肽 18 与预先用荧光染料 diS-C_2-5 和缬氨霉素处理的囊泡混合。荧光恢复的动力学按时间进行监测，并测定所达到的最高水平作为肽浓度的函数。如图 8 所示，melittin 和肽 18 具有相似的对 PC/PS 囊泡的膜穿透活性，这证明将 D-氨基酸引入 melittin 并不影响所产生的非对映体穿透带负电荷磷脂（PC/PS）膜的能力。但是，melittin 还对 PC 囊泡有高活性，而非对映体完全没有对 PC 囊泡的膜穿透活性（直至最大测试值）。

2. 5. 2 结合研究

非对映体 18 不能穿透 PC 囊泡可能是因为它不能与 PC 结合，或也可能是它能与 PC 结合，但一旦结合却不能组成能诱导膜渗漏的结构。为区别这两种可能性，我们进行了结合实验。位于肽 18 的位置 19 的单一 Trp 用作内在的荧光探针来追寻其与 PC 和 PC/PS 囊泡的结合。一个固定浓度（~0.5 μM）的肽用所需囊泡（PC 或 PC/PS）滴定，如果结合发生，就会观察到荧光强度的增加。将产生的 Trp 荧光强度增加作为脂:肽摩尔比例的函数作图，产生了传统的结合曲线（图 9A）。肽 18 与 PC/PS 的结合曲线显示，在脂: 肽摩尔比为 100: 1 时，几乎所有的肽分子都与囊泡结合。但对 PC 囊泡，即使在测试的最大脂: 肽摩尔比时也没有观察的 Trp 荧光的净增加。结合等温线用

X_b^*（每 60%全脂的结合肽的摩尔比）对 C_f（溶液中游离肽的平衡浓度）作图（图 5B）。表面分配系数通过将曲线初始斜率外延至 C_f 为 0 来估算。所估算的表面分配系数 K_p^*，对于肽 18 为 $1.1\pm0.2\times10^4\ M^{-1}$（获自 4 个测量）。这一数值与报道的 melittin 与磷脂酰甘油/卵磷脂的结合值相似（$4.5\pm0.6\times10^4\ M^{-1}$(Beschiaschvili 和 Seelig, 1990）。

肽结合等温线的形状可以提供肽在膜内组织的信息（Schwarz 等，1987）。肽 18 的结合等温线向下弯曲表明负协同。这种负协同的一个可能的解释是，在低浓度时，与无电荷作用分配平衡相比，肽 18 与 PC/PS 的结合被磷脂头部的负电荷增强。此外，在与膜结合时，肽部分中和了膜表面的负电荷。但是一旦膜表面的电荷被中和，进一步的肽 18 结合很困难，因为相同电荷的排斥作用变成了优势因素。相同的结果也在 melittin 与带负电荷的磷脂膜的结合研究中获得（Batenburg 等，1987; Beschiachvili 和 Seelig, 1990）。有趣的是，不象 meilittin 还能与 PC 囊泡强烈结合（Kuchinka 和 Seelig, 1989），肽 18 不与 PC 囊泡结合。

2. 6 色氨酸淬灭实验

天然存在于蛋白或肽的色氨酸残基可以用作肽在膜中定位的固有探针。melittin 含有一个位于位置 19、C 螺旋的 N 端的一个色氨酸。在 melittin 和肽 18 两者中，用 6、7-Br-PC/PS 囊泡（图 10）都观察到了最大的色氨酸荧光淬灭。用 9、10-Br-PC/PS 观察到了较小的淬灭，用 11、12-Br-PC/PS 最小。这些结果表明，在与囊泡结合时肽定位于磷脂的头部基团附近。

实施例 3 模型 Lys/Leu 非对映体的合成和生物学活性

3. 1 Lys/Leu 非对映体的设计

为如下目的，我们合成了 6 个包含不同比例的赖氨酸和亮氨酸的短的线性模型 12 聚体肽的非对映体：（1）分析疏水性和净正电荷的平衡是否是选择性细菌裂解必需的足够标准，和（2）获得这种作用的潜在机制。

在模型 Lys/Leu 12 聚体肽的第一个系列 22-25 中，它们三分之一序列由 D-氨基酸残基组成。D-氨基酸的位置在所有肽中都是恒定

的。这被构建来最大限度地破坏α-螺旋结构。D-氨基酸沿肽分布，仅留下极短的 1-3 个连续 L-氨基酸序列。我们合成下列肽:

22. [D]-$L^{3,4,8,10}$-K_3L_9的序列:

Lys-Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Leu-Leu-Leu-Lys-NH_2

23. [D]-$L^{3,4,8,10}$-K_4L_8的序列:

Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Leu-Lys-NH_2

24. [D]-$L^{3,4,8,10}$-K_5L_7的序列:

Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Lys-Leu-Lys-Leu-Leu-Lys-NH_2

25. [D]-$L^{3,4,8,10}$-K_7L_5的序列:

Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Leu-Lys-Leu-Lys-Leu-Lys-Lys-NH_2

在模型 Lys/Leu 12 聚体肽的第二个系列 26-27 中，它们三分之一序列由 D-氨基酸残基组成。这些 D-氨基酸残基位于肽 23 和 24 的 L 氨基酸残基的准确位置，其序列如下:

26. [D]-$K^{1,5,9,12}L^{2,6,7,11}K_4L_8$的序列:

Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Leu-Lys-NH_2

27. [D]- $K^{1,5,7,9,12}L^{2,6,11}K_5L_7$的序列:

Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Lys-Leu-Lys-Leu-Leu-Lys-NH_2

在模型 Lys/Leu 肽的第三个系列中我们合成了一个 6 聚体和一个 8 聚体的非对映体（分别为肽 28 和 29）

28. [D]-$L^{1,3}$-K_2L_4的序列

Lys-Leu-Leu-Leu-Leu-Lys

29. [D]-$L^{2,4,6}$-K_3L_5的序列

Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Leu-Lys

我们进一步合成了根据本发明的 Lys/Leu 非对映体:

30. Lys Leu Leu Leu Lys Leu Lys Leu Lys Leu Leu Lys

31. Lys Leu Leu Leu Lys Leu Lys Leu Lys Leu Leu Lys

32. Lys Leu Leu Leu Lys Leu Lys Leu Lys Leu Leu Lys

3. 2 Lys/Leu 非对映体的合成

肽按照实验方法部分（ii）的介绍进行合成。然后分析这些肽的结构、生物学功能以及与细菌和由兼性或带负电磷脂组成的模型膜的相互作用。

3. 3 疏水性

肽 22-25 的疏水性和净正电荷列于表 4，疏水性的平均值用疏水计的一致值进行计算（Eisenberg 等，1984）。如图 11 所示，肽的疏水性和保留时间之间发现了直接的关联，这提示结构并不显著影响与固定相的全部疏水相互作用。

表 4

Leu/Lys 非对映体的疏水性和净电荷

肽名称	净电荷	疏水性
22.	+4	0.12
23.	+5	-0.01
24.	+6	-0.15
25.	+8	-0.42

3. 4 CD 光谱学

非对映体 22-25 的α-螺旋结构的含量由它们在 40% TFE 中的 CD 谱来确定。正如所预期的，在 D-氨基酸整合后，对所有非对映体都没有发现信号，这证明缺乏任何特殊的二级结构（数据未显示）。应当注意，在最近的研究中，一个具有与肽 23 相同的序列，但仅包含 L-氨基酸的肽被发现在甲醇中和在 DMPC 囊泡中有大约 40%的α-螺旋结构（Cornut 等，1994）。

3. 5 肽 22-29 的抗菌和溶血活性

我们检测了肽 22-29 对 hRBC 的溶血活性。一个肽 22-25 溶血活性的剂量依赖曲线显示于图 12 中，其中 melittin 的溶血活性用作对照。非对映体的疏水性和溶血活性之间发现了直接的关联（表 4）。具有最高疏水性的肽 22[D]-$L^{3,4,8,10}$-K_3L_9 具有最大的溶血活性。但是其溶血活性与 melittin 的相比非常低（少>60 倍的活性）。其它肽直到最大测试浓度（100 μM）也没有显示溶血活性。肽 22-29 的溶血活性显示于表 5，应当注意即使肽 23[D]-$L^{3,4,8,10}$-K_4L_8 在浓度大于 melittin 溶血所需浓度 100 倍时，仍无溶血活性。但其全 L-氨基酸

型在最近的研究中显示具有与 melittin 相似的溶血活性(～少 5 倍)(Cornut 等, 1994)。

我们还检测了肽 22－29 对代表细菌的抗菌活性, 其中四环素、dermaseptin 和 melittin 用作对照。所获得的 MIC 示于表 5。数据显示非对映体 22-29 的抗菌活性被疏水性和带正电荷氨基酸的平衡调节。具有最大疏水性的肽 22 和具有最大亲水性的肽 25 都显示最小的抗菌活性范围(表 5)。但是, 肽 23 和 24 都对大多数测试细菌显示较高的抗菌活性, 而前者略强一些。而且, 每种肽都有独特的抗菌活性谱, 并且每种都对革兰氏阳性菌比对革兰氏阴性菌有更高的活性。

3. 6 血清中四环素和 Lys/Leu 非对映体的协同作用

为研究抗生素四环素与非对映体之间可能的协同作用, 我们检测了在存在恒定的等摩尔浓度(1 μM)的肽 24[D]-$L^{3,4,8,10}$-K_5L_7 时倍比稀释的四环素对铜绿假单胞菌(ATCC 27853)的抗性。混合物的抗菌活性按实验方法部分(xii)介绍的方法测定。

我们在四环素与非对映体 24 之间观察到了协同作用。四环素对铜绿假单胞菌活性极低。但是, 当与 1 μM 的肽 24 溶液混合时, 我们观察到了 8 倍的四环素活性增加(表 6), 1 μM 的肽 24 浓度比裂解铜绿假单胞菌所需的浓度低 10 倍。对这种协同作用的一个可能的解释是, 肽轻微破坏了细菌细胞壁, 促进了四环素分配进细菌。这一点为电子显微镜研究支持, 在电子显微镜研究中, 在低于其 MIC 时, 肽 24 在细菌细胞壁上引起形态学改变(图 14)。此外, 混合的人血清对肽 24 抗铜绿假单胞菌和大肠杆菌的抗菌活性的影响和对天然抗菌肽 dermaseptin 的影响被发现有相当的不同(表 6), dermaseptin 在存在血清时, 活性降低 8-10 倍, 而肽 24 保留其抗菌活性。

表 5

肽的最小抑制浓度（μM）

肽名称	最小抑制浓度[a]（μM） 大肠杆菌（D21）	乙酸钙不动杆菌（Acl1）	铜绿假单胞菌（ACTT－27853）	巨大芽胞杆菌（Bml1）	枯草芽胞杆菌（ATCC 6051）	100μM 时溶血%
22	9	20	125	0.7	1.1	58
23	3.5	4	10	0.4	0.5	0
24	7	20	10	0.25	2	0
25	80	200	>200	1	100	0
26	4	N.D	N.D	0.5	N.D	0
27	7	N.D	N.D	0.2	N.D	0
28	200	N.D	N.D	50	N.D	0
29	3	N.D	N.D	3	N.D	0
Dermaseptin S	6	3	25	0.5	4	–
Melittin	5	2	25	0.3	0.6	–
四环素	1.5	1.5	50	1.2	6.5	–

a.结果是 3 个独立试验的平均值，每个独立实验做两个重复，标准偏差为 20%

表 6

在存在人血清时的最小抑制浓度（μM）[a]及肽 24 的协同活性

	最小抑制浓度（μM）			
	铜绿假单胞菌（ATCC－27853）		大肠杆菌（D21）	
肽名称	0% 血清	33% 血清	0% 血清	33% 血清
24	10	10	7	7
Dermaseptin S	25	200	6	50
Tc[b]	50			
Tc+24 (1 μM)	6			

a. 结果是 2 个独立实验的均值，每个独立实验做两个重复。标准偏差为 20%

b. Tc－四环素

3. 7 肽诱导的膜穿透

不同浓度的肽与预先用荧光染料 diS-C_2-5 和缬氨霉素处理的囊泡混合。监测荧光恢复的动力学，并测定最大荧光水平作为肽浓度的函数（图 13）。PC/胆固醇囊泡（10: 1）用作构成红细胞外小叶的磷脂组成的模型（Verkleij 等，1973），PE/PG 的囊泡（7: 3）用来模仿大肠杆菌的用来模仿大肠杆菌的磷脂组成（Shaw，1974），我们发现了肽穿透模型磷脂膜的能力与其针对红细胞和细菌的裂解活性之间的直接联系。仅有溶血性肽 22 穿透了兼性磷脂膜，而且，肽穿透 PE/PG 囊泡的能力与肽对大肠杆菌的抗菌活性有关（表 5）。具有最低抗菌活性的肽 25，其穿透 PE/PG 囊泡的能力与其它与三个肽 22-24 相比也有明显降低。

3. 8 细菌裂解的电子显微镜研究

非对映体 22-25 对被处理的大肠杆菌的形态学影响用透射电子显微镜进行观察。所有的肽均在 MIC 时导致细菌的完全裂解（数据未显示），但是，当肽在相当于其 MIC 的 80%的浓度使用时，我们观察到了被处理的细菌形态学上的一些差别，依所用肽的不同而不同。具有最大疏水性的肽 22 对细胞壁和细胞膜造成了最大的损伤，而最小疏

水性的肽 25 仅导致局部的破坏（图 14）.

实施例 4 Lys/Ala 和 Lys/Val 模型非对映体的合成和生物学活性

4. 1 非对映体设计

为进一步检测调节线性细胞毒肽的疏水性和净正电荷是否足以提供选择性抗菌活性，我们分别合成了更进一步的模型 12 聚体肽 33 和 34-37，它们分别包含 Lys/Ala 或 Lys/Val 残基，它们的序列中至少三分之一是 D-Ala 或 D-Val 残基:

33. [D]-$A^{3,4,8,10}$-K_4A_8 的序列

Lys-Ala-Ala-Ala-Lys-Ala-Ala-Ala-Lys-Ala-Ala-Lys-NH_2

34. [D]-$V^{3,4,8,10}$-K_4V_8 的序列

Lys-Val-Val-Val-Lys-Val-Val-Val-Lys-Val-Val-Lys-NH_2

35. Lys Val Val Val Lys Val Lys Val Lys Val Val Lys

36. Lys Val Val Val Lys Val Lys Val Lys Val Val Lys

37. Lys Val Val Val Lys Val Lys Val Lys Val Val Lys

4. 2 合成

Lys/Ala 和 Lys/Val 非对映体按实验方法部分（ii）的介绍进行合成。

4. 3 抗菌和溶血活性

我们检测了 33 和 34 对大肠杆菌和巨大芽胞杆菌和 hRBC 的活性，表 7 中所示的结果显示模型非对映体都是抗菌性和非溶血性的:

表 7

肽 28 和 29 的最小抑制浓度（μM）和溶血活性

肽名称	最小抑制浓度（μM） 大肠杆菌（D21）	巨大芽胞杆菌（Bm11）	100μM 时溶血 %
33	12	1	0
34	3.5	0.8	0

实施例 5 进一步的模型非对映体的合成

我们合成了下列根据本发明的模型非对映体，它们包含 2 种、3 种或更多不同氨基酸的 6、8、12、14、16、19、25、26 和 30 个残基的序列

38. Lys Leu Ile Leu Lys Leu

39. Lys Val Leu His Leu Leu

40. Leu Lys Leu Arg Leu Leu

41. Lys Pro Leu His Leu Leu

42. Lys Leu Ile Leu Lys Leu Val Arg

43. Lys Val Phe His Leu Leu His Leu

44. His Lys Phe Arg Ile Leu Lys Leu

45. Lys Pro Phe His Ile Leu His Leu

46. Lys Ile Ile Ile Lys Ile Lys Ile Lys Ile Ile Lys

47. Lys Ile Ile Ile Lys Ile Lys Ile Lys Ile Ile Lys

48. Lys Ile Ile Ile Lys Ile Lys Ile Lys Ile Ile Lys

49. Lys Ile Pro Ile Lys Ile Lys Ile Lys Ile Pro Lys

50. Lys Ile Pro Ile Lys Ile Lys Ile Lys Ile Val Lys

51. Arg Ile Ile Ile Arg Ile Arg Ile Arg Ile Ile Arg

52. Arg Ile Ile Ile Arg Ile Arg Ile Arg Ile Ile Arg

53. Arg Ile Ile Ile Arg Ile Arg Ile Arg Ile Ile Arg

54. Arg Ile Val Ile Arg Ile Arg Ile Arg Leu Ile Arg

55. Arg Ile Ile Val Arg Ile Arg Leu Arg Ile Ile Arg

56. Arg Ile Gly Ile Arg Leu Arg Val Arg Ile Ile Arg

57. Lys Ile Val Ile Arg Ile Arg Ile Arg Leu Ile Arg

58. Arg Ile Ala Val Lys Trp Arg Leu Arg Phe Ile Lys

59. Lys Ile Gly Trp Lys Leu Arg Val Arg Ile Ile Arg

60. Lys Lys Ile Gly Trp Leu Ile Ile Arg Val Arg Arg

61. Arg Ile Val Ile Arg Ile Arg Ile Arg Leu Ile Arg Ile Arg

62. Arg Ile Ile Val Arg Ile Arg Leu Arg Ile Ile Arg Val Arg

63. Arg Ile Gly Ile Arg Leu Arg Val Arg Ile Ile Arg Arg Val

64. Lys Ile Val Ile Arg Ile Arg Ala Arg Leu Ile Arg Ile Arg Ile Arg

65. Arg Ile Ile Val Lys Ile Arg Leu Arg Ile Ile Lys Lys Ile Arg Leu

66. Lys Ile Gly Ile Lys Ala Arg Val Arg Ile Ile Arg Val Lys Ile Ile

67. Arg Ile Ile Val His Ile Arg Leu Arg Ile Ile His His Ile Arg Leu

68. His Ile Gly Ile Lys Ala His Val Arg Ile Ile Arg Val His Ile Ile

69. Arg Ile Tyr Val Lys Ile His Leu Arg Tyr Ile Lys Lys Ile Arg Leu

70. Lys Ile Gly His Lys Ala Arg Val His Ile Ile Arg Tyr Lys Ile Ile

71. Arg Ile Tyr Val Lys Pro His Pro Arg Tyr Ile Lys Lys Ile Arg Leu

72. Lys Pro Gly His Lys Ala Arg Pro His Ile Ile Arg Tyr Lys Ile Ile

73. Lys Ile Val Ile Arg Ile Arg Ile Arg Leu Ile Arg Ile Arg Ile Arg Lys Ile Val

74. Arg Ile Ile Val Lys Ile Arg Leu Arg Ile Ile Lys Lys Ile Arg Leu Ile Lys Lys

75. Lys Ile Gly Trp Lys Leu Arg Val Arg Ile Ile Arg Val Lys Ile Gly Arg Leu Arg

76. Lys Ile Val Ile Arg Ile Arg Ile Arg Leu Ile Arg Ile Arg Ile Arg Lys Ile Val Lys Val Lys Arg Ile Arg

77. Arg Phe Ala Val Lys Ile Arg Leu Arg Ile Ile Lys Lys Ile Arg Leu Ile Lys Lys Ile Arg Lys Arg Val Ile Lys

78. Lys Ala Gly Trp Lys Leu Arg Val Arg Ile Ile Arg Val Lys Ile Gly Arg Leu Arg Lys Ile Gly Trp Lys Lys Arg Val Arg Ile Lys

79. Arg Ile Tyr Val Lys Pro His Pro Arg Tyr Ile Lys Lys Ile Arg Leu

80. Lys Pro Gly His Lys Ala Arg Pro His Ile Ile Arg Tyr Lys Ile Ile

81. Lys Ile Val Ile Arg Ile Arg Ile Arg Leu Ile Arg Ile Arg Ile Arg Lys Ile Val

82. Arg Ile Ile Val Lys Ile Arg Leu Arg Ile Ile Lys Lys Ile Arg Leu Ile Lys Lys

83. Arg Ile Tyr Val Ser Lys Ile Ser Ile Tyr Ile Lys Lys Ile Arg Leu

84. Lys Ile Val Ile Phe Thr Arg Ile Arg Leu Thr Ser Ile Arg Ile Arg Ser Ile Val

85. Lys Pro Ile His Lys Ala Arg Pro Thr Ile Ile Arg Tyr Lys Met Ile

实施例 6 环形非对映体的合成和生物学活性

6. 1 设计

我们合成了下列在 N-和 C-末端有半胱氨酸残基的 pardaxin 片段的非对映体的环形衍生物:

86. Cyclic K^{1}[D]P^{7} $L^{18}L^{19}$ [1-22]-par of the sequence:

Cys-Lys-Gly-Phe-Phe-Ala-Leu-Ile-Pro-Lys-Ile-Ile-Ser-
Ser-Pro-Leu-Phe-Lys-Thr-Leu-Leu-Ser-Ala-Val-Cys

87. Cyclic K^1 K^2[D]P^7 $L^{18}L^{19}$ [1-22]-par of the sequence:

Cys-Lys-Lys-Gly-Phe-Phe-Ala-Leu-Ile-Pro-Lys-Ile-Ile-Ser-
Ser-Pro-Leu-Phe-Lys-Thr-Leu-Leu-Ser-Ala-Val-Cys

88. Cyclic K^1 K^2K^3 [D]P^7 $L^{18}L^{19}$ [1-22]-par of the sequence:

Cys-Lys-Lys-Lys-Gly-Phe-Phe-Ala-Leu-Ile-Pro-Lys-Ile-Ile-
Ser-Ser-Pro-Leu-Phe-Lys-Thr-Leu-Leu-Ser-Ala-Val-Cys

我们合成了下列在N和C末端具有半胱氨酸残基的不同氨基酸残基的非对映体的环形衍生物:

89. Cyclic Cys Arg Ile Val Ile Arg Ile Arg Ile Arg Leu Ile Arg Ile Arg Cys

90. Cyclic Cys Lys Pro Gly His Lys Ala Arg Pro His Ile Ile Arg Tyr Lys Ile Ile Cys

91. Cyclic Cys Arg Phe Ala Val Lys Ile Arg Leu Arg Ile Ile Lys Lys Ile Arg Leu Ile Lys Lys Ile Arg Lys Arg Val Ile Lys Cys

6. 2 环形非对映体的合成

环形肽用固相法按实验方法部分（ii）介绍的固相法合成，在肽的N和C末端均有半胱氨酸残基，在HF裂解和RP-HPLC纯化后，肽以低浓度溶于PBS（pH7.3）中，经12小时完成环化。环化的肽在RP-HPLC上进一步纯化，并进行氨基酸分析来证实其组成，并用SDS-PAGE证明其单体状态。

6. 3 抗菌和溶血活性

肽86-88用大肠杆菌、巨大芽胞杆菌和hRBC进行检测。表8的结果显示所有三种环形的pardaxin衍生非对映体是抗菌性和非溶血性的。

表 8

环形 pardaxin 衍生非对映体的最小抑制浓度（μM）和溶血活性

肽名称	最小抑制浓度（μM）		100μM 时溶血%
	大肠杆菌（D21）	巨大芽胞杆菌（Bm11）	
86	30	10	0
87	15	6	0
88	7.5	2	0

实施例 7 成束的 Lys/Leu 肽非对映体的合成和生物学活性

7. 1 设计

使用肽 23 为模板，在 C 末端有一个额外的半胱氨酸残基的肽 23 或 24（分别为 23C 和 24C）为单体，合成了下列成束序列：

92. ([D]-$L^{3,4,8,10}$-$K_4L_8C)_5$ [D]-$L^{3,4,8,10}$-K_4L_8 of the sequence:

(Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Leu-Leu -Lys-Leu-Leu-Lys-Cys-$NH_2)_5$ Lys-Leu-Leu- Leu-Lys-Leu-Leu-Leu -Lys-Leu-Leu-Lys-NH_2

93. ([D]-$L^{3,4,8,10}$-$K_5L_7C)_5$ [D]-$L^{3,4,8,10}$-K_4L_9 of the sequence:

(Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Leu-Lys-Leu -Lys-Leu-Leu-Lys-Cys-$NH_2)_5$ Lys-Leu-Leu- Leu-Lys-Leu-Leu-Leu -Lys-Leu-Leu-Lys-NH_2

7. 2 合成

为制备模板结合的非对映体，1: 1 摩尔比的 DCC 和溴乙酸在 25°C 于 DMSO 中反应 1 小时。将模板（肽 23）加入到反应混合物中，并搅拌 12 小时，然后将 DMSO 冷冻干燥，剩余的溴乙酸用无水乙醚抽提，然后将模板与过量的、在其 C 末端带有一个半胱氨酸残基的 23C 和 24C 非对映体反应，在 PBS pH7.3 中、25°C 反应 1 小时。模板结合的非对映体 92 和 93 在 RP-HPLC 上进一步纯化，并在 SDS-PAGE 上检查，以证明其聚集状态。

7. 3 抗菌和溶血活性

模板结合的非对映体 92 和 93 用大肠杆菌和巨大芽胞杆菌和 hRBC 进行检测，表 9 中所示的结果显示，两种成束序列都是抗菌和非溶血性的。

表 9

束的最小抑制浓度（μM）和溶血活性

肽名称	最小抑制浓度（μM） 大肠杆菌（D21）	巨大芽胞杆菌（Bm11）	100μM 时溶血%
92	0.2	0.05	0
93	0.1	0.02	0

实施例 8 亲水性 Lys/Leu 12 聚体肽非对映体混合物的合成和生物学活性

肽用固相法按上面实验方法部分（ii）的介绍进行合成。在每一个偶联步骤，将含有赖氨酸、亮氨酸和 D-亮氨酸各 1eq 的混合物加入反应中。合成产生 3^{12} 不同肽的混合物，HF 裂解后，亲水性肽用双蒸水（ddw）抽提并冷冻干燥。

Lys/Leu 12 聚体肽非对映体的亲水混合物用大肠杆菌 D21（MIC: 15 μg/ml）和巨大芽胞杆菌 Bm11 D21（MIC: 3 μg/ml）和 hRBC（在 100 μM 溶血性为 0）。正如所期望的，亲水性混合物具有抗菌活性但不溶血。

实施例 9 Lys/Leu/D-Leu 无规共聚物的合成和生物学活性

为制备不同大小的聚合物的非对映体，将对起始游离氨基酸过量的 N-羧酸酐残基在 DMF 中在 25°C 聚合 4 小时（Katchalski 和 Sela, 1995）。使用不同比例的赖氨酸-N-羧酸酐、亮氨酸-N-羧酸酐和 D-亮氨酸-N-羧酸酐制备不同比例的赖氨酸、亮氨酸和 D-亮氨酸的聚合物。三种这样的聚合物及其抗菌和溶血活性示于表 10。

表 10

Lys/Len/D-Len 共聚体的最小抑制浓度（μM）和溶血活性

氨基酸比例（摩尔） Lys:Leu:[D]-Leu	最小抑制浓度（μM） 大肠杆菌（D21）	巨大芽胞杆菌（Bm11）	100μM 时溶血%
1: 1: 1	90	15	0
2: 1: 1	35	8	0
3: 1: 1	80	20	0

实施例 10 非对映体的抗真菌活性

pardaxin 衍生的肽 1 和 16（见上文的实施例 1）的抗真菌活性按如下方法在无菌 96 孔板（Nunc F96 微滴定板）以终体积 100 μl 进行检测：将含有在培养基（Sabouraud's 葡萄糖肉汤培养基）中浓度为 1×10^6 集落形成单位（CFU）/ml 的 50 微升真菌悬液加入至 50 μl 含用水倍比稀释的肽的水中。生长抑制用 Microplate autoreader EL309（Bio-tek Instruments）在 492 nm 处测量吸收值来测定，预先于 30°C 温育 48 小时，抗真菌活性用最小抑制浓度（MIC）来表示，MIC 是 48 小时温育后观察到 100%生长抑制的浓度。所用的真菌为：白色假丝酵母（*Candida albicans*）（IP886-65）和新型隐球菌（*Cryptococcus neoformans*）（IP960-67）。如表 11 所示，肽 1 和 16 都显示抗真菌活性。

表 11

非对映体 1 和 16 对真菌的最小抑制浓度（μM）

肽名称	最小抑制浓度（μM） 白色假丝酵母（IP886－65）	新型隐球菌（IP960－67）
1	35	50
16	120	150

实施例 11 非对映体的抗癌活性

Lys/Leu 非对映体 23 和 24（见上文的实施例 3）用小鼠腺癌检

测其抗癌活性。细胞以 5-10 000/孔在 96 孔微滴定板上接种于 Dulbecco's 改良的 Eagle's 培养基中。细胞粘附后，将 20 μl 正常盐水中的稀释肽溶液转至孔中，使其终浓度范围为 20 至 150 μM。与肽温育 1 小时后，癌细胞活力用锥虫蓝（0.1% w/v）活体染色实验测定。在对照实验中，将肽的溶剂单独加入细胞中。抗癌活性用最小抑制浓度（MIC）表示，MIC 是经 1 小时温育后观察到 100%生长抑制的浓度。表 12 所示的结果显示两种肽都对恶性细胞有活性。

表 12

非对映体对小鼠腺瘤的最小抑制浓度（μM）

肽名	最小抑制浓度（μM） 小鼠腺瘤
23	50
24	80

实施例 12 非对映体抗墨西哥利什曼虫活性

melittin 衍生的非对映体肽 20（见上文实施例 2）和 Leu/Lys 非对映体肽 23（见上文实施例 3）用利什曼虫检测。用于实验的墨西哥利什曼虫 NR 株的前鞭毛体在 27°C 用补加了 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基培养。在 4°C 用 1200×g 离心 10 分钟收集寄生虫。并用 PBS（50 mM 磷酸钾、150 mM NaCl、pH7）洗涤两次。洗下的寄生虫在血球计数器中计数，并调至 1×10^6 寄生虫/ml。在存在或没有不同浓度的非对映体时 26°C 温育 24 小时后，通过计算活的（活动的）细胞以 100 μl 终体积分析此悬液。抗利什曼虫活性用最小抑制浓度（MIC）表示，MIC 是温育 24 小时后观察到 100%死亡的浓度，我们发现肽 23 的 MIC 是 17 μM，而肽 20 的 MIC 是 32 μM。

实施例 13 非对映体 23 的抗病毒活性

仙台病毒（Z 株）生长于 10～11 天的鸡胚尿囊中，注射 48 小时后采集并纯化。病毒重新悬浮于含 160 mM NaCl、20 mM tricine pH7.4 的缓冲液中，贮存于-70°C。病毒的血凝活性用血凝单位（HAU）测量，每毫升含～60000 HAU。新鲜人血获自血库，并在 4°C 保存 1 个月。

在使用前，红细胞用 PBS pH7.2 洗两次，并用相同缓冲液稀释至所需浓度（% v/v）。病毒、红细胞和肽按不同次序和不同量进行混合。最后的温育一般是在 37°C 温育 60 分钟，然后在 5700 g 离心 10 分钟除去完整的细胞。对每种情况使用双份的样品，并从每个样品的上清中取两份加至 96 孔板的两个孔中。血红蛋白的释放量通过用 ELISA 读板仪在 540 nm 测量孔的吸收值来监测。抗病毒活性用最小抑制浓度（MIC）表示，MIC 是在温育后没有观测到血红蛋白释放的浓度。我们发现 Lys/Leu 非对映体肽 23 的 MIC 是 80 μM。

参考文献

1. Agawa,Y., Lee, S., Ono, S., Aoyagi, H., Ohno, M., Taniguchi, T., Anzai, K., and Kirino,Y. 1991,《生物与化学杂志》226卷，20218-20222页。

2. Altenbach,C., and Hubbell, W. L. 1988《蛋白质》3卷，230-242页。“自旋标记的melittin在溶液中和与磷脂膜结合时的聚集状态：膜结合melittin是单体的证据”

3. Anderson, D., Terwilliger, T. C., Wickner, W., and Eisenberg, D. 1980《生物与化学杂志》225卷，2578-2582页。“melittin能形成适合于高分辨率X射线晶体分析的晶体并揭示其分子的二重对称轴”

4. Anzai, K., Hamasuna, M., Kadono, H., Lee, S., Aoyagi, H., and Kirino, Y. 1991《生物化学和生物物理学报》1064卷，256-266页。

5. Bartlett, G. R. 1959《生物与化学杂志》234卷，466-468页。“柱层析中的磷分析”

6. Batenburg, A. M., Hibbeln, J. C., and de, K.B. 1987《生物化学和生物物理学报》903卷，155-165。“melittin进入磷脂模型膜的脂特异性透过”

7. Batenburg, A. M., van, E. J., and de, K. B. 1988《生物化学》27卷，2324-2331页。“melittin诱导的磷脂酰乙醇胺的宏观结构的改变”

8. Batenburg, A. M., van, E. J., Leunissen, B. J., Verkleij, A. J., and de, K. B. 1987《Febs Lett》223卷，148-154。“melittin与带负电的磷脂的相互作用：脂组合的结果”

9. Bazzo, R., Tappin, M. J., Pastore, A., Harvey, T. S., Carver, J. A., and Campbell, I. D. 1988《欧洲生物化学杂志》173: 139-146页。“melittin的结构。在甲醇中的1H-NMR研究”

10. Benkirane, N., Friede, M., Guichard, G., Briand, J. P., Van, R. M., and Muller, S. 1993《生物与化学杂志》268卷，26279-26285页。

11. Beschiaschvili, G., and Seelig, J. 1990《生物化学》

29 卷，52-58 页。“melittin 与混合的磷脂酰甘油/磷脂酰胆碱膜结合”

12. Bessalle, R., Kapitkovsky, A., Goria, A., Shalit, I., and Fridkin, M. 1990 《Febs Lett》274 卷：151-155.

13. Bolen, E. J., and Holloway, P. W. 1990.《生物化学》29 卷，9638-9643 页。“溴化磷脂引起的色氨酸荧光淬灭”

14. Boman, H. G. 1995.《免疫学年度综述》13 卷，61-92 页。“肽类抗生素及其在先天免疫中的作用”

15. Chen, H. C., Brown, J. H., Morell, J. L., and Huang, C. M. 1998.《Febs Lett》236 卷，462-466 页。“具有增强的抗微生物活性的合成爪蟾抗菌肽类似物”

16. Cornut, I., Buttner, K., Dasseux, J. L., and Dufourcq, J. 1994.《Febs Lett》349 卷，29-33 页。“两亲性α螺旋的概念。在从头设计溶血活性比 melittin 高的理想两亲性 Leu、Lys 肽中的应用”

17. Dempsey, C. E. 1990.《生物化学和生物物理学报》1031 卷，143-161 页。“melittin 在膜上的作用”

18. Dhople, V. M., and Nagaraj, R. 1993.《生命科学报告》13 卷，245-250 页。“d-毒素，不象 melittin，它仅有溶血活性而没有抗菌活性：这种特殊生物活性的解释”

19. Eisenberg, D., Schwarz, E., Komaromy, M., and Wall, R. 1984.《分子生物学杂志》179 卷，125-142 页。“膜和带有重要疏水区域的表面蛋白序列的分析”

20. Fisher, P. J., Prendergast, F. G., Ehrhardt, M. R., Urbauer, J. L., Wand, A. J., Sedarous, S. S., M, c. D., and Buckley, P. J. 1994.《自然》368 卷，651-653 页。

21. Gazit, E., Lee, W. J., Brey, P. T., and Shai, Y. 1994.《生物化学》33 卷，10681-10692 页。

22. Greenfield, N., and Fasman, G. D. 1969.《生物化学》8 卷，4108-4116 页。“计算机控制的圆二色谱用来估计蛋白的构型”

23. Habermann, E., and Jentsch, J. 1967.《Hoppe Seyler'Z. Physiol. Chem》348 卷，37-50 页。

24. Katchalski, E., and Sela, M. 1958.《蛋白质化学进展》13卷，243-492页。

25. Kuchinka, E., and Seelig, J. 1989.《生物化学》28卷，4216-4221。“melittin与磷脂酰胆碱膜的相互作用。结合等温线和脂头部构型”

26. Li, Z. Q., Merrifield, R. B., Boman, I. A., and Boman, H. G. 1988.《Febs Lett》231卷，299-302页。“从合成的sarcotoxin IA移去两个残基并将相同残基添加至杀菌肽B对电泳迁移和抗菌谱的影响”

27. Loew, L. M., Rosenberg, I., Bridge, M., and Gitler, C. 1983.《生物化学》22卷，837-844。“扩散电势梯度。检测转膜孔道的传统方法”

28. Merrifield, R. B., Vizioli, L. D., and Boman, H. G. 1982.《生物化学》21卷，5020-5031。“抗菌肽杀菌肽A（1-33）的合成”

29. Mor, A., Nguyen, V. H., Delfour, A., Migliore, S. D., and Nicolas, P. 1991.《生物化学》30卷，8824-8830页。“两栖类动物皮肤的一种新型抗微生物肽dermaseptin的分离、氨基酸序列、和合成”

30. Okada, M., and Natori, S. 1984.《生物化学杂志》222卷，119-124页。“Sarcophage peregrina幼虫（flesh fly）血淋巴中诱导的杀菌蛋白的作用模式”

31. Oren, Z., and Shai, Y. 1996.《欧洲生物化学杂志》237卷，303-310。“从分离自Mose sole fish Pardchirus marmoratus的孔道形成肽pardaxin衍生的一族极有潜力的抗菌肽”

32. Papahadjopoulos, D., and Miller, N. 1967.《生物化学和生物物理学报》135卷，624-638页。“磷脂模型膜。水合液晶的结构特征”

33. Perez, P. E., Houghten, R. A., and Blondelle, S. E. 1994.《生物化学杂志》1994。“具有不同溶血活性的所选melittin类似物的二级结构的确定“

34. Pouny, Y., and Shai, Y., 1992.《生物化学》39卷，9482-9490。“pardaxin的D-氨基酸整合的类似物与膜的相互作用。

35. Rapaport, D., and Shai, Y., 1992.《生物与化学杂志》267卷，6502-6509 页。“pardaxin 在磷脂膜中聚集和组织。一种荧光能量传递研究”

36. Rapaport, D., and Shai, Y. 1991.《生物与化学杂志》266 卷 23769-23775。“荧光标记的 pardaxin 及其类似物与脂双层的相互作用”

37. Rizzo, V., Stankowski, S., and Schwarz, G. 1987.《生物化学》26 卷，2751-9。“丙甲甘肽整合到脂双层中：热力学研究”

38. Russell, P. E., Milling, R, J., and Wright, K. 1995.《抗微生物药物的 50 年。过去的繁荣和今后的趋势》(Hunter P. A., Darby G. K., and Russell N. J. ed)67-85 页，剑桥大学出版社，Cambridge。

39. Schwarz, G., Gerke, H., Rizzo, V., and Stankowski, S. 1987.《生物物理杂志》52 卷，685-692 页。“膜整合的动力学，应用孔道形成肽丙甲甘肽的研究”

40. Segrest, J. P., De, L. H., Dohlman, J. G., Brouillette, C. G., and Anantharamaiah, G. M. 1990.《蛋白质》8 卷，103-117 页。“两亲性螺旋基元[更正见“蛋白质”1991; 9(1):79]：分类和特性”

41. Shai, Y. 1995.《TIBS》待发表。“跨膜螺旋的分子识别”

42. Shai, Y. 1994.《毒素学》87 卷，109-129 页。“pardaxin: 来自鱼的鲨鱼驱虫肽的孔道形成”

43. Shai, Y., Fox, J., Caratsch, C., Shih, Y. L., Edwards, C., and Lazarovici, P. 1988.《FEBS Lett》242 卷，161-166。“一种来自红海 Moses sole 具有离子载体活性的多肽 pardaxin，测序与合成”

44. Shai, Y., Fox, J., Caratsch, C., Shih, Y. L., Edwards, C., and Lazarovici, P. 1988.《FEBS Lett》242 卷，161-166。“一种来自红海 Moses sole 具有离子载体活性的多肽 pardaxin，测序与合成”

45. Shai, Y., Hadari, Y. R., and Finkels, A. 1991.《生物与化学杂志》266 卷 22346-22354 页。“pardaxin 类似物的 pH 依赖的孔道形成特性”

46. Shaw, N. 1974.《应用微生物进展》17 卷，63-108 页。“脂

组成作为细菌分类的指导”

47. Sims, P. J., Waggoner, A. S., Wang, C. H., and Hoffmann, J. R. 1974.《生物化学》13 卷，3315-3330 页。“花菁染料测量红细胞和磷脂酰胆碱囊泡中的膜电势的机制研究”

48. Steiner, H., Hultmark, D., Engstrom, A., Bennich, H., and Boman, H. G. 1981.《自然》292 卷，246-248 页。“两种参与昆虫免疫的杀菌蛋白的序列和特异性”

49. Terwilliger, T. C., and Eisenberg, D. 1982.《生物与化学杂志》257 卷，6010-6015 页。“melittin 的结构。I 结构测定和部分确定”

50. Terwilliger, T. C., and Eisenberg, D. 1982.《生物与化学杂志》257 卷，6016-6022 页。“melittin 的结构。II 结构的解读”

51. Thompson, S. A., Tachibana, K., Kakanishi, K., and Kubota, I. 1986.《科学》233 卷，341-343。“来自豹鳐 Pardachirus pavoninus 的鲨鱼排斥性防御分泌物的 melittin 样肽”

52. Verkleij, A. J., Zwaal, R. F., Roelofsen, B., Comfurius, P., Kastelijn, D., and Deenen, L. v. 1973.《生物化学和生物物理学报》323 卷，178-193 页。“磷脂在人红细胞膜中的不对称分布。组合应用磷脂酶和冰冻蚀刻电子显微技术的研究”

53. Wade, D., Boman, A., Wahlin, B., Drain, C. M., Andreu, D., Boman, H. G., and Merrifield, R. B. 1990.《美国国家科学院院报》87 卷，4761-4765 页，1990。

54. Wu, C. S., Ikeda, K., and Yang, J. T. 1981.《生物化学》20 卷，566-570 页。“在酸性十二烷基硫酸钠溶液中多肽和蛋白质的有序构型”

55. Zagorski, M. G., Norman, D. G., Barrow, C. J., Iwashita, T., Tachibana, K., and Patel, D. J. 1991.《生物化学》30 卷，8009-8017 页。“pardaxin P2 的溶液结构”

说 明 书 附 图

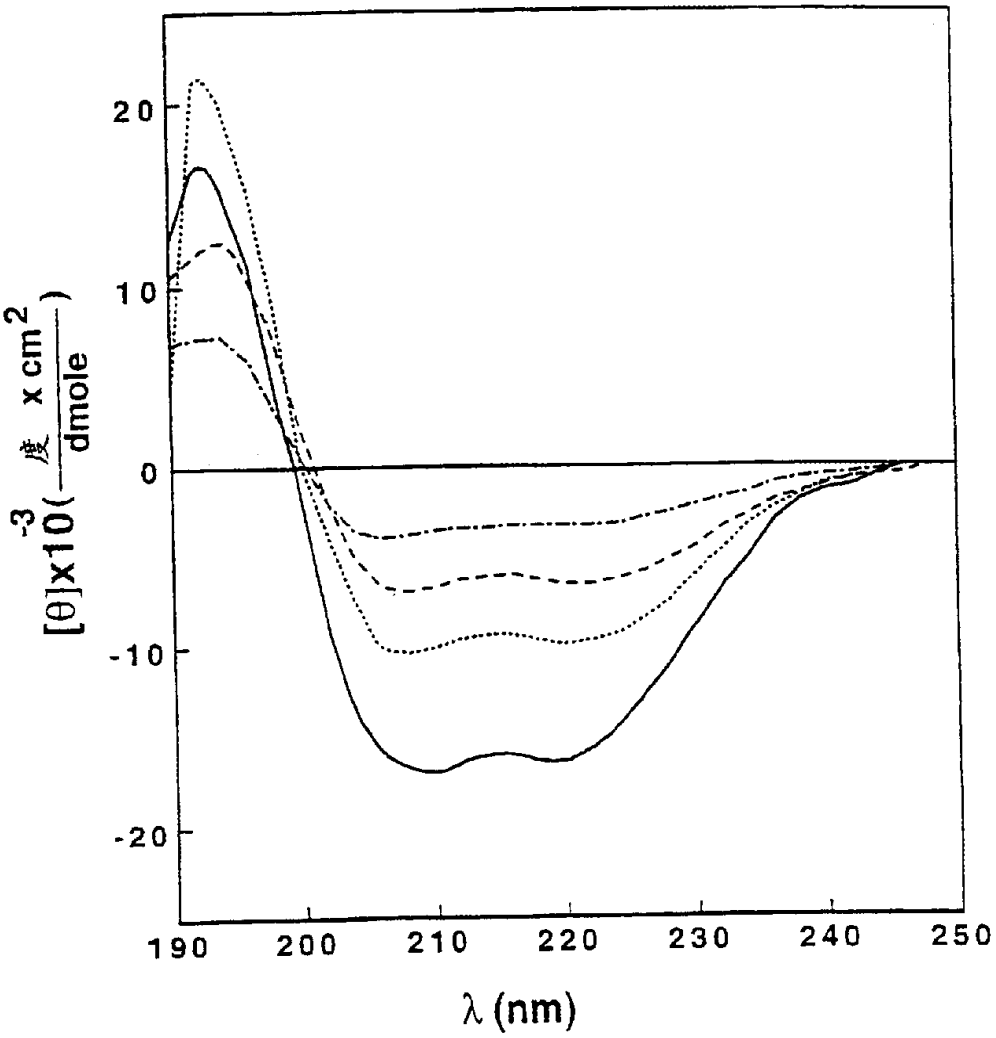

20
10
0
-10
-20
190
200
210
220
230
240
250
λ (nm)
$[\theta]x10^{-3}(\frac{度 \times cm^2}{dmole})$

图 1

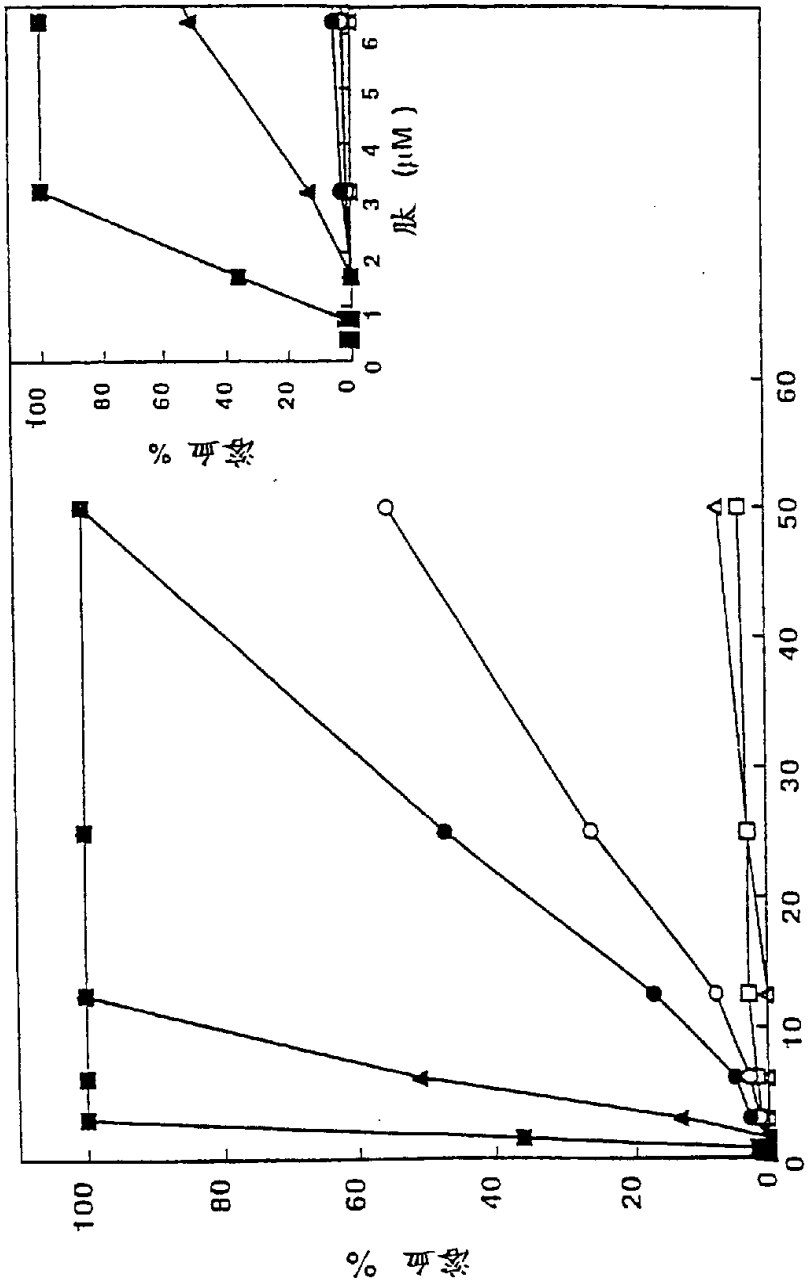


图 2

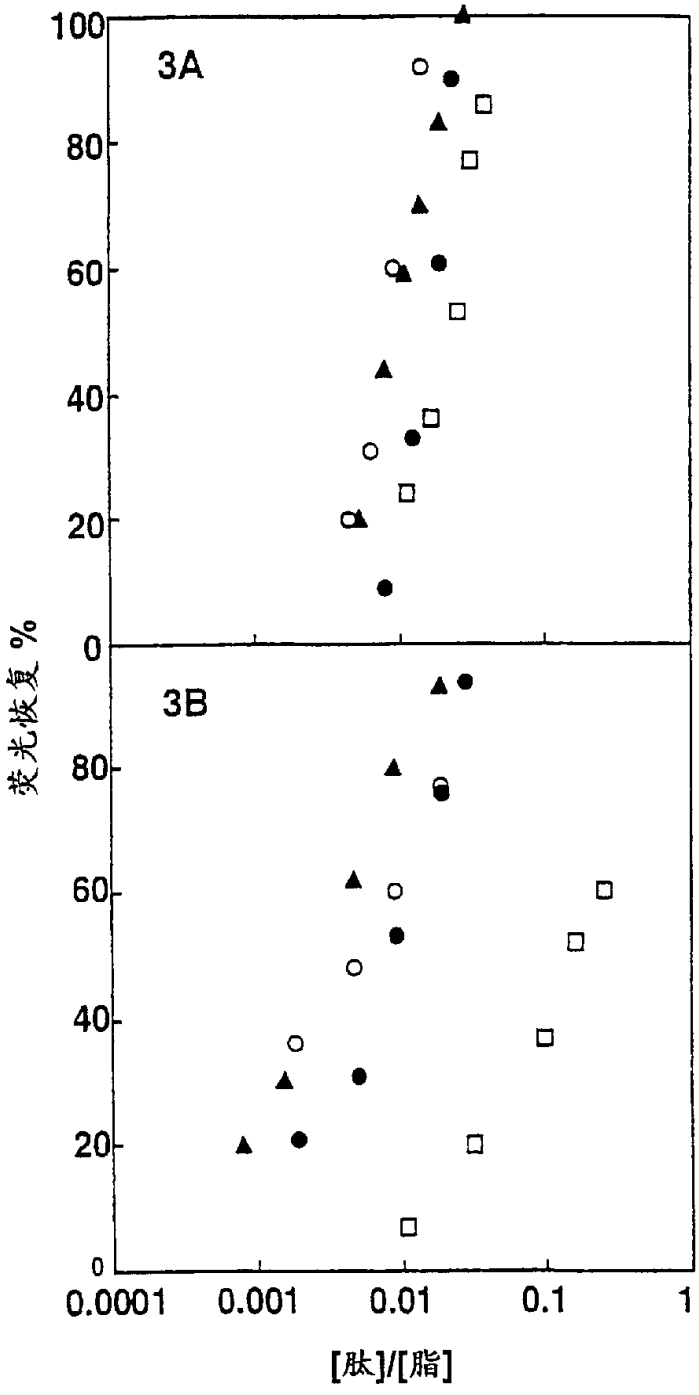


图 3

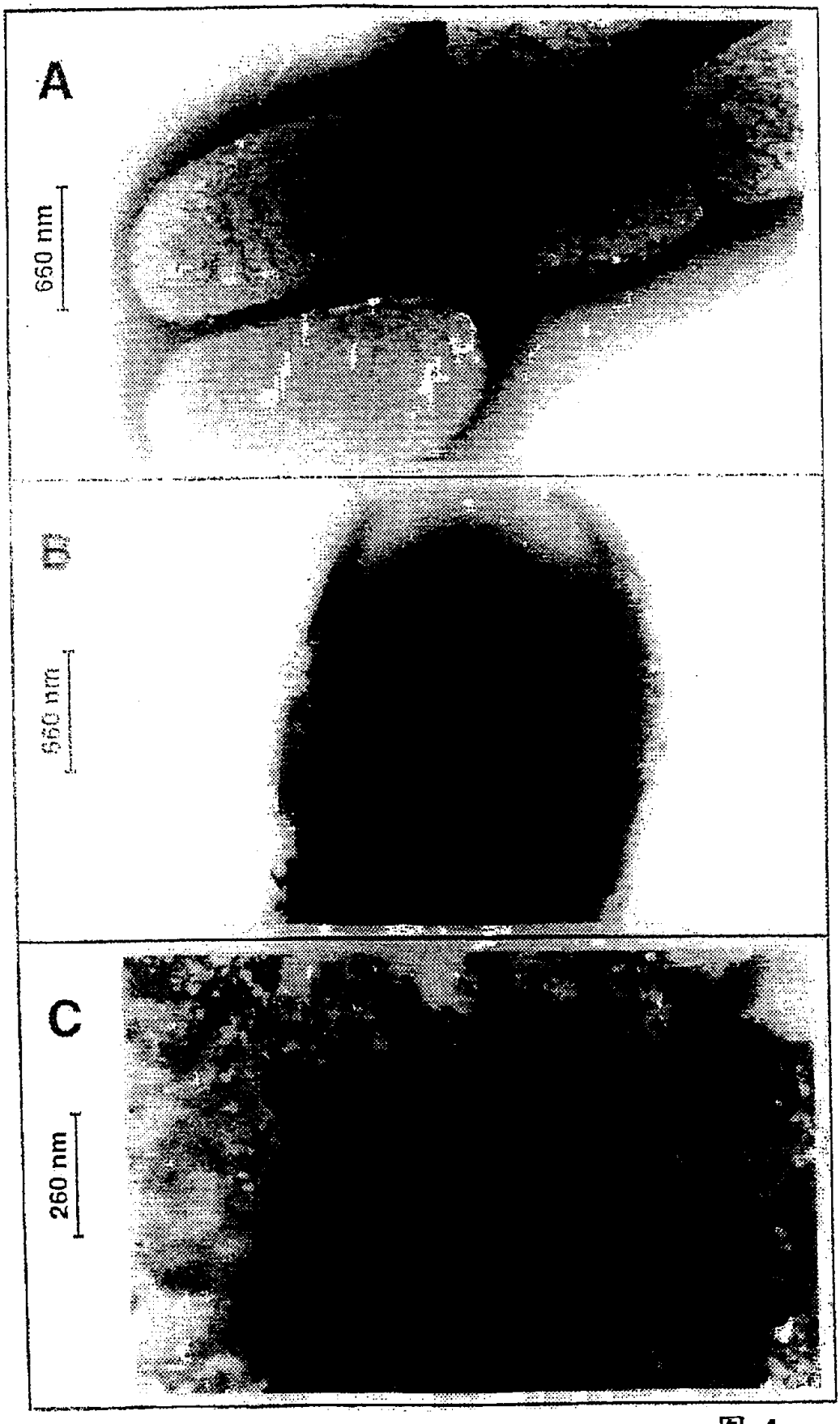


图 4

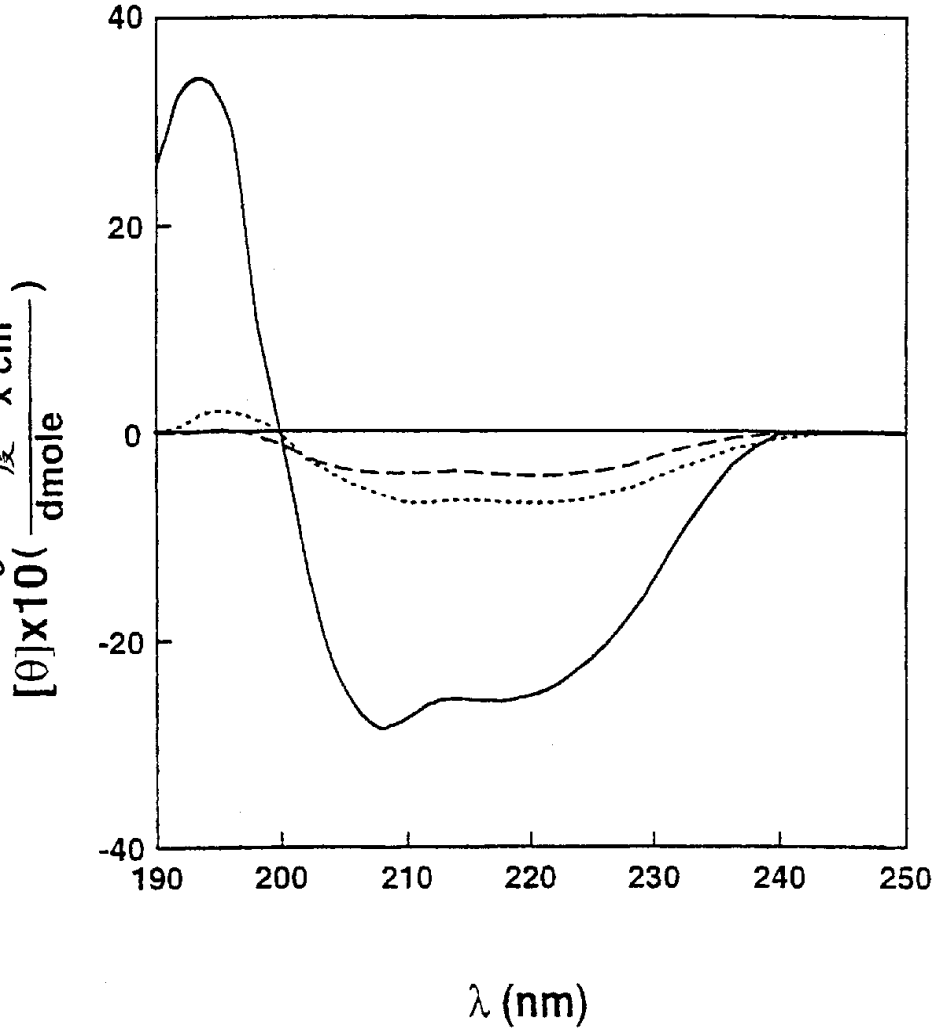

40
20
0
-20
-40
190
200
210
220
230
240
250
$[\theta]x10^{-3}$ (度 x cm^2 / dmole)
λ (nm)

图 5

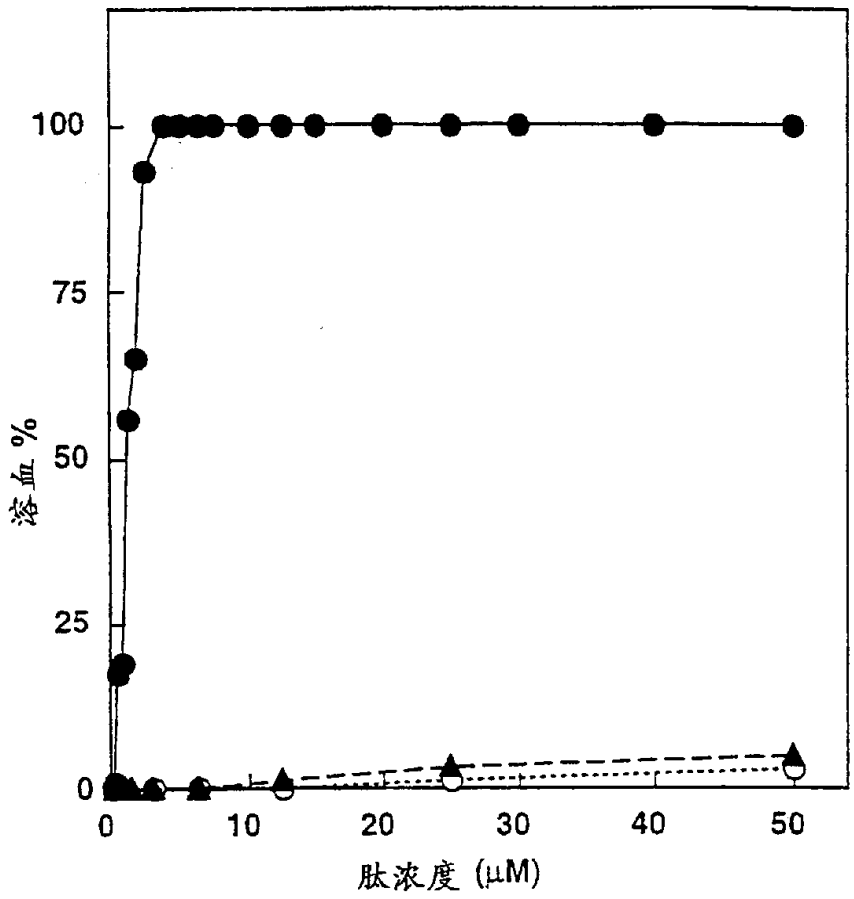


图 6

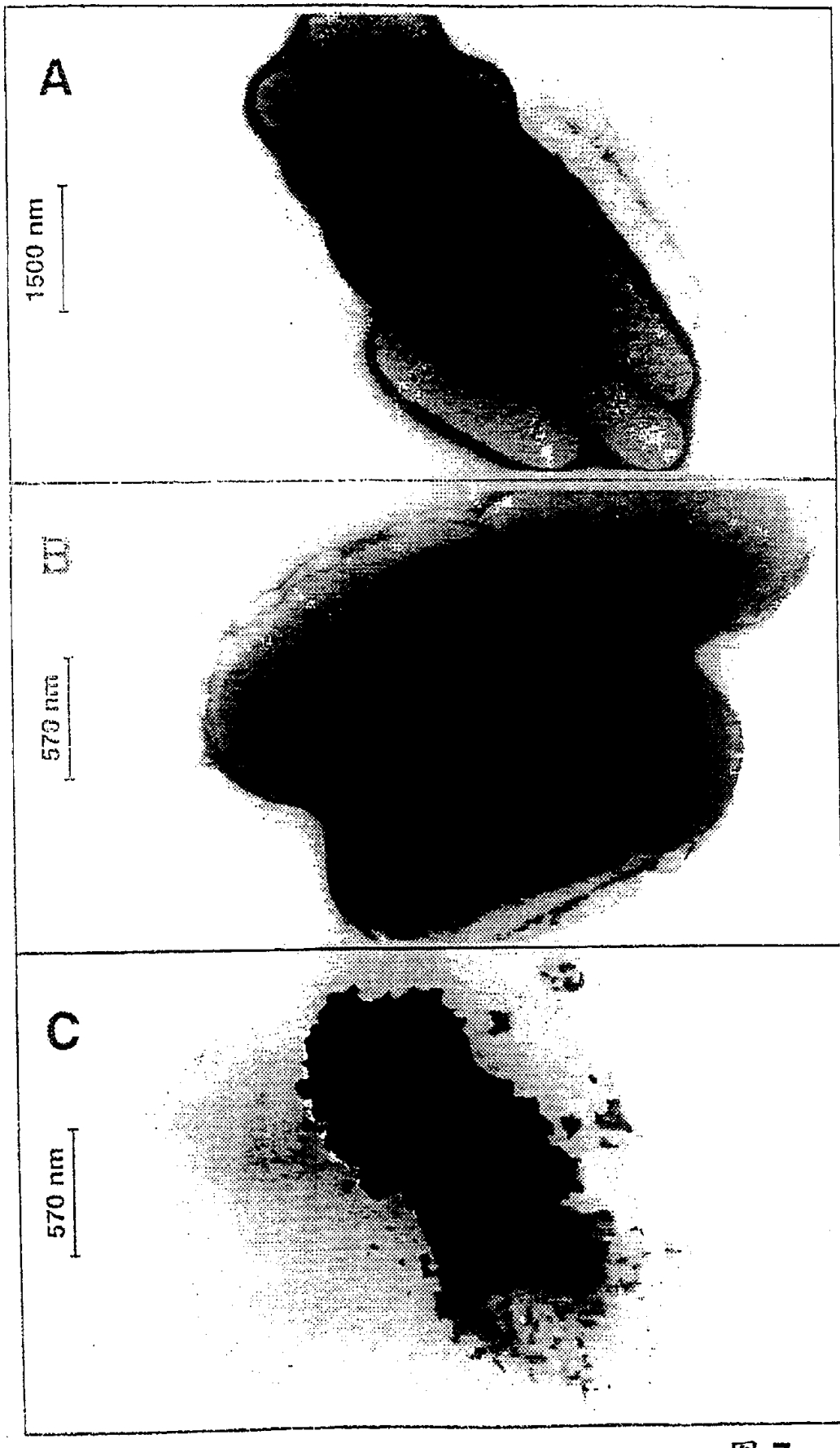


图 7

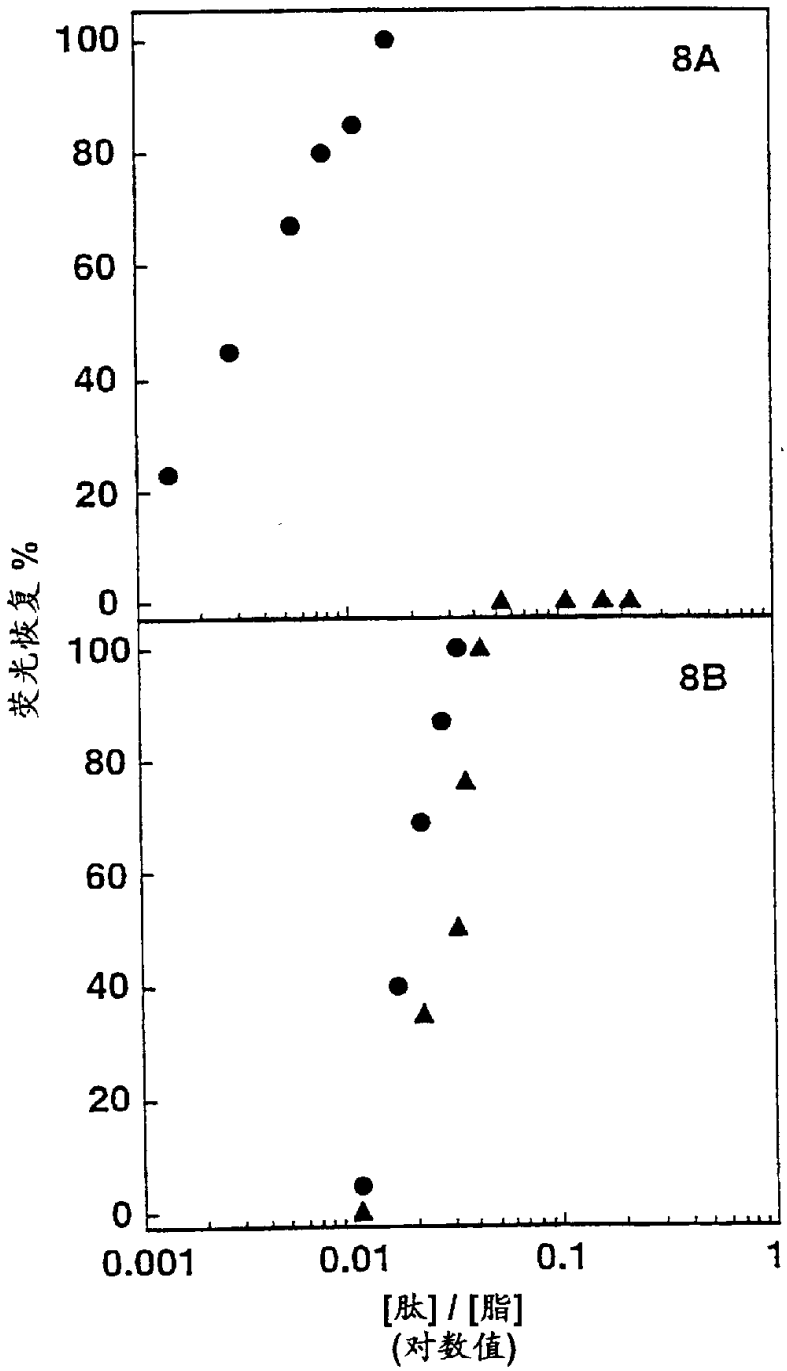


图 8

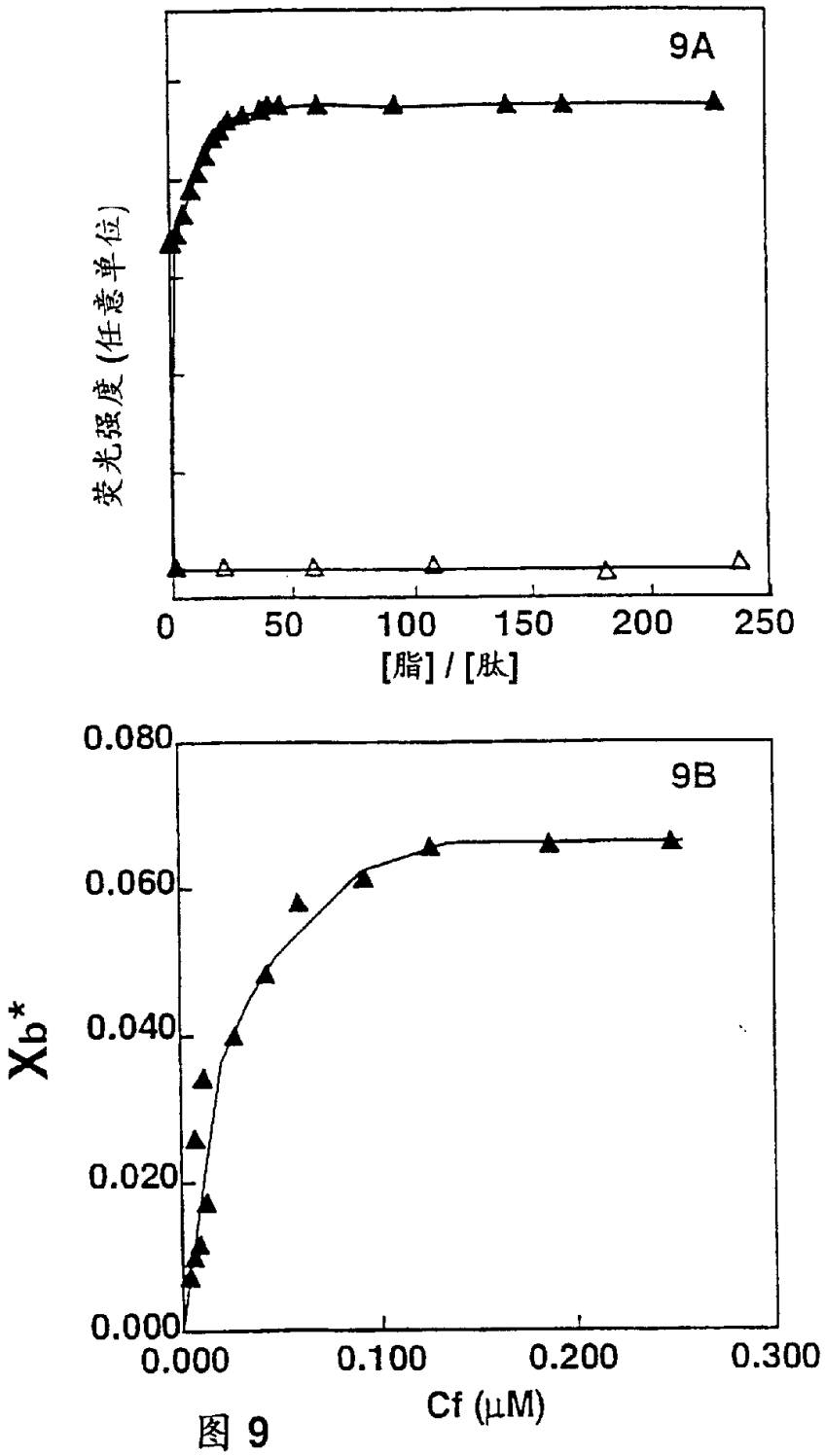

9A
荧光强度 (任意单位)
0
50
100
150
200
250
[脂] / [肽]
9B
0.080
0.060
0.040
0.020
0.000
Xb*
0.000
0.100
0.200
0.300
Cf (μM)

图 9

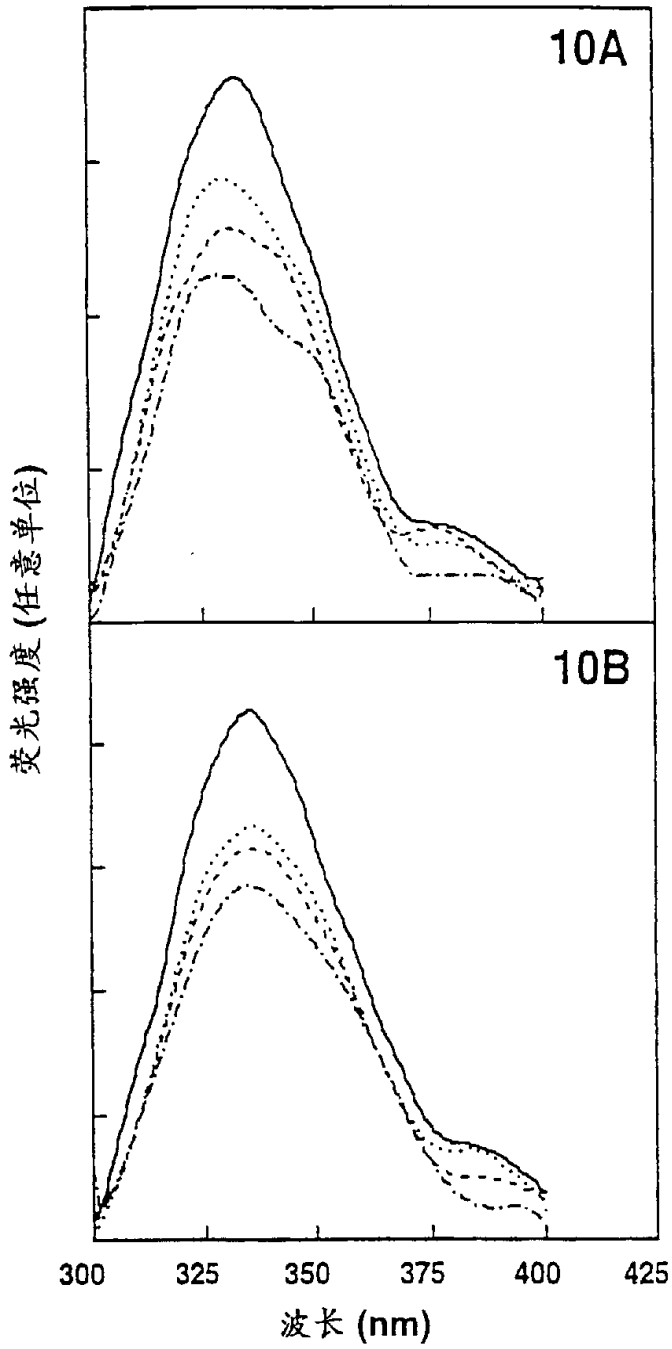


图 10

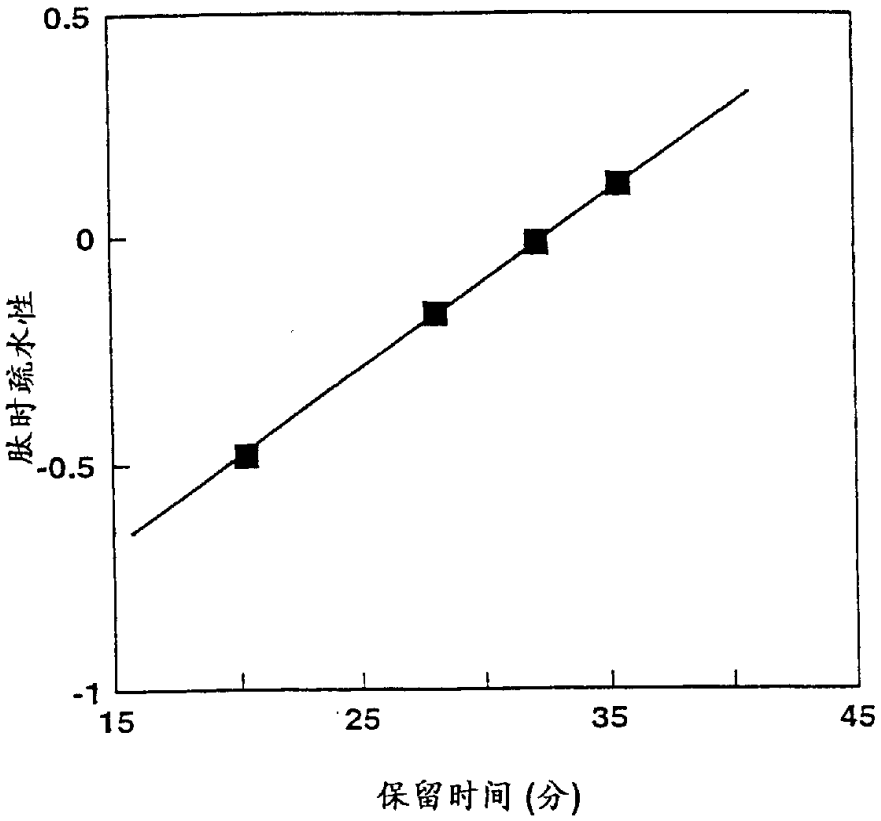


图 11

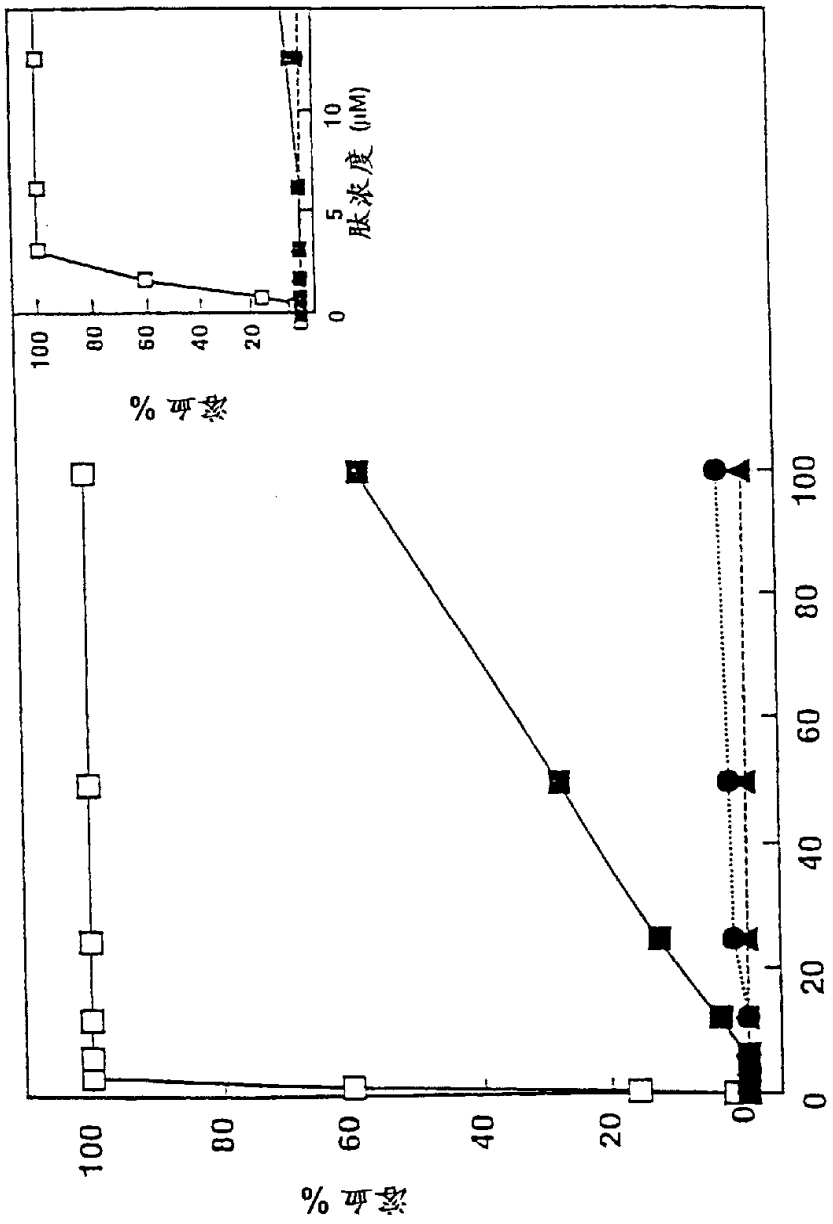


图12

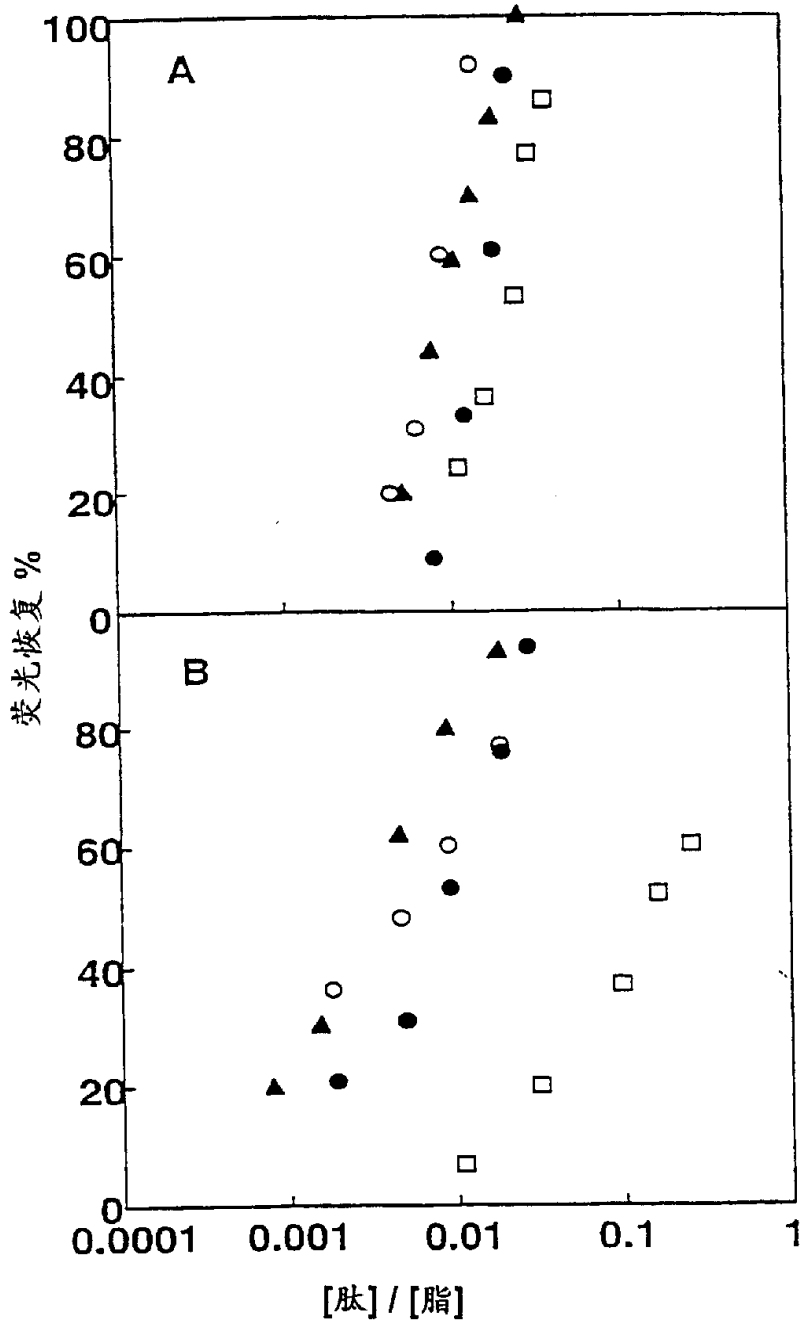


图 13

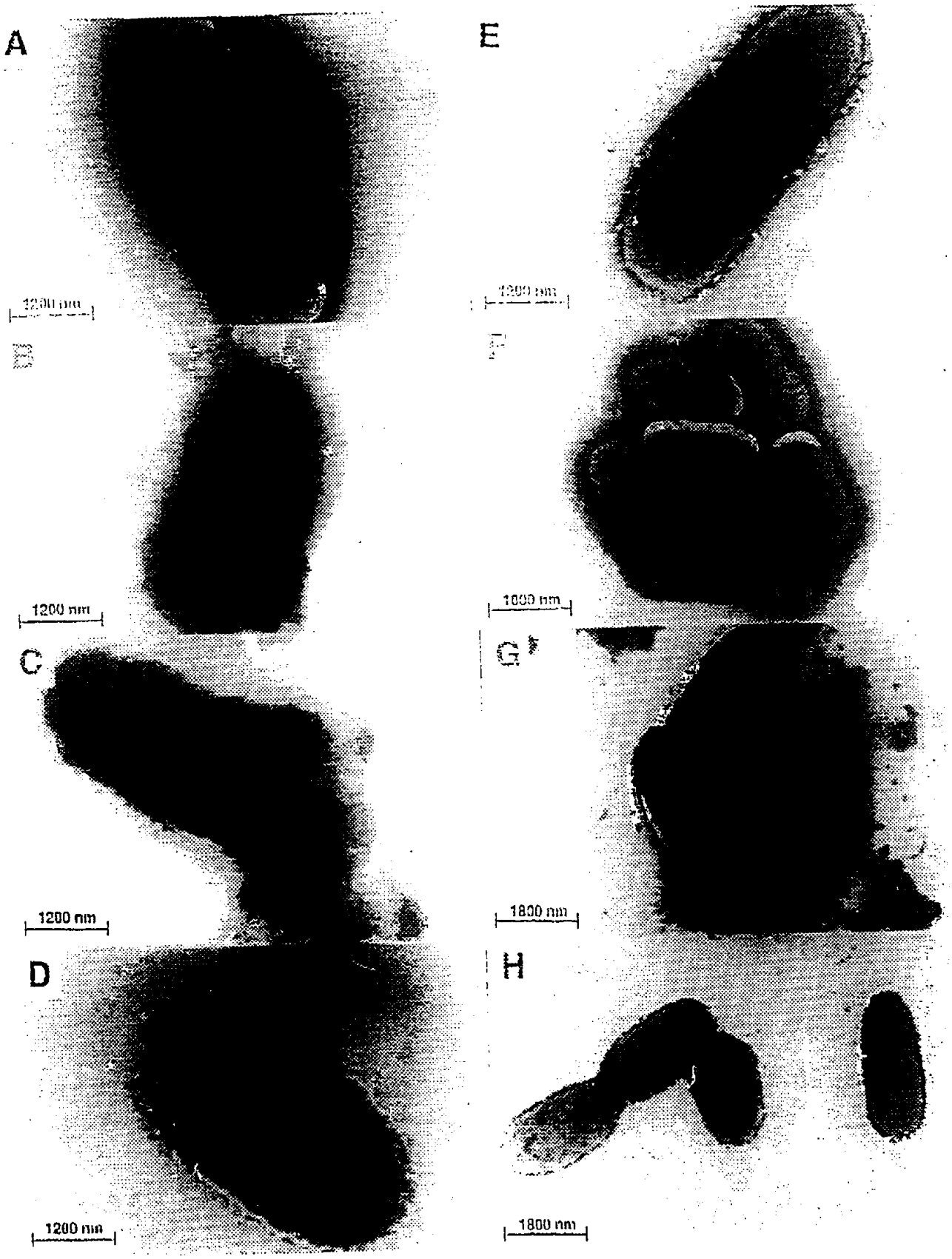

A
1200 nm
B
1200 nm
C
1200 nm
D
1200 nm
E
1800 nm
F
1800 nm
G
1800 nm
H
1800 nm

图 14