说明书

一种制备新型抗生素的方法及依据该方法的平台系统

技术领域

本发明涉及生物药研制技术，特别是一种制备新型抗生素的方法和平台系统。

背景技术

目前，制药业的研发特别是抗生素的研发面临困境：1.耐药性致病菌越来越多，现有抗生素对耐药菌构不成危险导致因感染耐药菌所致的死亡率增高。2. 新药开发的速度远远跟不上耐药菌出现的速度。传统筛选抗生素的方法所需时间长，研发出成果所需时间漫长且昂贵。3. 现有采用基因工程或生物技术开发的新型抗生素仍然容易导致细菌产生耐药性。

即据世界卫生组织统计，每年全球有数百万人感染耐药金黄色葡萄球菌，其中约 30%的人最终会不治身亡---这样的致死率比爱滋病毒的致死率还高。为了治疗耐药金葡菌感染，每年全世界的总花费超过 200 亿美元。耐药金葡菌出现后，万古霉素成为治疗金葡菌感染的主力。然而自 2002 年起，医院中开始出现耐万古霉素金葡菌。虽然耐万古霉素金葡菌的传播范围还比较小，但由于只有极少药物能有效抑制它们，因此由耐万古霉素金葡菌感染所致的死亡率非常高。近十年来又出现了另一类耐药菌—多重耐药革兰氏阴性菌，它们具有更强的耐药性。现在临床使用的所有抗生素，对这类耐药菌几乎都不能构成威胁。

现有抗生素大部分是由细菌和真菌合成，或是天然抗生素经化学修饰后得到的衍生物。其传统筛选方法是从土壤样本中分离微生物，自其生长的培养基中提取分泌物，测试分泌物中具有抑菌或杀菌效果的物质，分离出具有潜在医用价值的单一药物成分。在抗生素开发的黄金时代（1940-1950），这种方法非常有效。但现在似乎已经走到了尽头，因为这样的筛选方法依赖于：自然界细菌或真菌的分泌物，在人类发现的微生物分泌物中筛选并修饰从而获得新的抗生素。这种传统的抗生素研发方法难免需要漫长的时间，并且其结果充满不确定性。因此，在过去 50 年里，尽管制药公司从未停止过筛选抗生素，但新发现的抗生素却越来越少。据美国传染病学会 (IDSA) 的统计，近年来美国 FDA 收到的新药上市申请中，新型抗生素的申请只有 16 种。能对抗高度耐药革兰氏阴性菌的抗生素专利申请却一份也没有；2009～2012 年世界著名科普杂志《科学美国人》已经连续警告：超级细菌正在威胁人类生命安全；美国 CDC 预测再过 10～20 年，目前使用的抗生素将可能完全失效；美国纽约时报报道：由于农业滥用抗生素，再过 5 年人类将重新回到无抗生素可用的时代，NDM-1 超级细菌突变基因已经引起了全世界的恐慌。畜牧业抗生素和耐药菌也是一个突出的问题，已经影响到农产品安全。近 40 年，几乎是抗生素研发的真空期。一言以概之，新药开发的速度远远跟不上细菌耐药突变的速度。

目前开发新型抗生素的方法有两种：（1）修饰已有抗生素或者合成全新类型，（2）对合成抗生素的细菌进行基因改造。然而这样的改进仍然没有跳出这样一个基调：即这些抗生素的抗菌机制早已为细菌所熟悉，所以无一例外，细菌会很快对这些"新"抗生素产生耐药性。

在对抗变异能力超强、生存能力超强、致病性强、种类多种多样的病原微生物这件事情上，目前急需解决以下问题：

1.提供对致病菌特别是耐药性致病菌具有较强的抗/杀菌效果的抗生素；

2.提供第 1 条中所述的抗生素的方法最好是能够应对致病菌的变异能力的，即开发周期短，能够灵敏地应对新出现的或新变异出的致病微生物的抗生素研发方法；

3.所开发抗生素在短时间内不会产生耐药性。

而以上问题正是现有的数代抗生素及传统抗生素研发方法无法打破的“魔咒”。

发明内容

本发明根据上述领域获得新型抗生素所面临的技术困境，提供一种与传统研发抗生素的策略完全不同的方法和平台。该方法和平台针对任意致病微生物、靶标细胞或靶标组织等，能够在短期内提供具有特异识别和灭杀能力的新型抗生素； 且该方法能够灵敏应对病原微生物由于变异而不断产生的耐药性，即能够随着变异菌种的出现而快速地提供对应的新型抗生素；而该方法创建的新型抗生素由于其杀菌机制的新颖性，本身也不易引起病原微生物的变异，从而不易引起耐药性。本发明的技术方案如下：

一种制备新型抗生素的方法，其步骤如下：

（1）确定靶标物：所述靶标物指所述新型抗生素将直接作用的原核细胞、真核细胞、病毒或其产物；

（2）设计新型抗生素的分子结构：

依据以下结构通式设计所述新型抗生素的分子结构：



其中 R 为识别区域，特异性识别或结合所述靶标物； F 指效应区域，对所述靶标物产生药理功能；所述药理功能指特异性地对所述靶标物具有调节、修复、标记、致死和 / 或致衰竭的作用；

建立识别区域分子结构库；建立效应区域分子结构库；

根据上述结构通式，以所述识别区域分子结构库与效用区域分子结构库设计得到重组物分子结构库

所述设计指基于收集的、选取的或制备的作为效应区域或识别区域的物质的分子结构进行结构调整、结构重组和 / 或结构确认的过程；

（3）根据所述重组物分子结构库，制备并验证重组物从而获得候选新型抗生素

（4）从候选新型抗生素中筛选出符合药物标准的新型抗生素。

所述建立识别区域分子结构库，指通过检索分析收集已知的能特异性识别和 / 或结合所述靶标物的天然物质；或 / 和人工制备特异性识别和 / 或结合所述靶标物的人工物质。

所述天然物质指能够被靶标物所具有的受体识别的天然生物活性分子、噬菌体的识别功能区；所述人工物质指抗体模拟物，所述抗体模拟物指根据能特异性识别所述靶标物上的特有物质的免疫球蛋白的氨基酸序列设计而得。

所述抗体模拟物是由所述免疫球蛋白的 Fab 短臂上的区域 V_HCDR1、V_HFR2、V_LCDR3 构

更正页（细则第 91 条）

成的从氨基端到羧基端为:V_HCDR1-V_HFR2-V_LCDR3 结构的短肽；或

是所述短肽的变构物；所述短肽的变构物指对所述短肽中构成 V_HCDR1 的 5 位氨基酸残基及构成 V_LCDR3 的 9 位氨基酸残基进行人工点突变获得的对所述靶标物上的特有物质保持识别能力的产物。

所述免疫球蛋白可以是多个。例如，将 V_HCDR1-V_HFR2-V_LCDR3 中的一个 CDR1 突变为来源于另一个识别所述靶物质的免疫球蛋白的 CDR。

所述免疫球蛋白是以靶标物上的特有物质为免疫原免疫动物而制备得到的。

所述免疫球蛋白是以多种靶标物上共有的特有物质为免疫原免疫动物而制备得到的。

所述免疫球蛋白是以靶标物上的多种特有物质分别作为免疫原免疫动物而制备得到的。

当所述靶标物为以磷脂双分子膜为其细胞膜或包膜基本结构的病毒、原核细胞或真核细胞，所述药理作用指致死和／或致衰竭，

所述效应区域指可在磷脂双分子膜上形成离子通道或孔道的生物活性物质。

所述效应区域指绿脓杆菌细菌素 Pyosin。

所述效应区域指大肠菌素 E1、Ia、Ib 、A、 B 或 N；或

大肠菌素 E1、Ia、Ib 、A、 B 和／或 N 分子中可形成离子通道的结构域；或由大肠菌素分子 E1、Ia、Ib 、A、 B、N、大肠菌素分子 E1、Ia、Ib 、A、B 或 N 中可形成离子通道的结构域变构而得且具有在所述磷脂双分子膜上形成离子通道功能的分子。

所述重组物为重组多肽，所述制备重组物指将编码所述重组多肽的基因转入到生物表达系统中表达融合蛋白，分离纯化融合蛋白物获得候选新型抗生素。

所述生物表达系统指大肠杆菌 pET 系统工程菌 *E.coli* B834（DE3）。

所述药理作用指标记，所述效应区域指标记物，所述制备重组物指可操作地连接效应区域和识别区域。

一种制备新型抗生素的平台系统，包括 3 个相互配合的系统：（1）目标提出系统（2）设计系统和（3）实验室系统；

所述平台依据权利要求 1~11 任一所述的方法准备新型抗生素，所述目标提出系统确定开发目标，并对所述设计系统发出任务指令；

所述设计系统根据所述目标提出系统的任务指令以及所述结构通式，建立所述识别区域分子结构库、效应区域分子结构库并设计出所述重组物分子结构库，并将所述分子结构库提供给所述实验室系统，

所述实验室系统向设计系统提供实验结果，所述设计系统向市场系统汇报最终选出的作为开发成果的候选产品，

所述设计指基于收集的、选取的或制备的作为效应区域或识别区域的物质的分子结构进行结构调整、结构重组和／或结构确认的过程。

所述实验室系统包括至少一家承包所述实验工作的第三方合作机构。

本发明制备新型素的方法，能够针对大多数靶标物制备一批候选新型抗生素，并从候选中筛选出特异性针对该靶标物的具有识别区域和效应区域的新型抗生素。在本发明的方法中，针

对的靶标物可以是原核细胞（如实施例 5 记载的耐药性金葡菌等，实施例 6 中记载的环境污染物-蓝藻，如实施例 3 中记载的炭疽杆菌）、真核细胞（如实施例 4 中的抗真菌多肽所抗的农业真菌，如实施例 1 中 EB 病毒所致肿瘤细胞）、病毒（如实施例 1 中 EB 病毒所特有的包膜糖蛋白），所述真核 / 原核细胞的产物。

在制备过程中，依据 

结果通式，建立效应区域分子结构库和识别区域分子结构库，并设计重组物分子结构库。

由于自然界中，天然存在特异性识别特定种类细胞的物质，例如，信息素、识别细胞上的受体的配体，人或动物产生的免疫球蛋白。并且动物的免疫系统天然能够产生针对异源物质的免疫球蛋白。基于天然存在的或人工免疫动物制备而得的免疫球蛋白，基本上可以获得针对任何所述靶物质的识别物质。这使得本发明的方法适用性广泛。

另外，自然界中，也天然存在能够在特定细胞上形成致死性改变的物质，例如大肠菌素，绿脓杆菌细菌素，等都可以作为效应区域。这些物质的缺点是所针对的靶细胞种类有限。

本发明的方法所制备的新型抗生素利用了上述两类物质的特点，取长补短，识别区域带领整个重组物分子区别靶物质，然后由效应区域完成药理作用。

本发明的方法的原理在于，基于一个结构通式来制备新型抗生素，针对提出的靶物质，收集和/或设计一批识别区域的分子结构以及效应区域的分子结构建立分子结构库，然后再根据建立的分子结构库设计新型抗生素的分子结构，也会获得一批重组物的分子结构库。最后再根据重组物的分子结构库的分子结构信息，制备出一批候选新型抗生素，最后一一验证这些候选新型抗生素选出符合制药标注的新型抗生素。本发明的制备方法的优点有以下几点：

（1）本发明的方法，仅仅针对原核细胞、真核细胞、病毒或其产物制备新型抗生素，而这些物质要么存在天然的识别物，要么具有特有的表面物质或其自身就可以作为免疫原免疫动物从而获得识别它们自身的免疫球蛋白，这保证了本发明的制备方法中，总能获得识别区域；这有效地克服了现有开发抗生素过程中的一个瓶颈——可用作药物作用靶标的蛋白质（即药物靶标）已经逐渐用完，剩下的靶标都不具有药理意义（undruggable,不会与药物发生反应）的现实。

而作为效应区域的物质也有天然具备的，只是在针对不同药理作用时有所选择而已，例如，如果目的是制备一种致死靶细胞的新型抗生素，那么大肠菌素类物质就足以胜任，如果目的是调节、干扰或标记等，将选用或设计具有这类作用的物质分子为效应区域的候选即可。基于本发明的方法所依据的通式，可以保证对大多数靶物质制备出新型抗生素。即成功率高，适用性广。

（2）本发明的方法的一个最大的优点在于：针对一种靶物质，一次可以制备出若干种新型抗生素，能够有备地应对病原微生物的耐药性。因为本发明是基于一个结构通式来制备针对某种靶物质的新型抗生素，通过分别建立效应区域库、识别区域库最后得出重组物库，然后从重组物库中筛选可以工作的以及效果好的重组物作为新型抗生素。这解决了目前新药研发中的

一个问题：即病原微生物产生耐药性速度快，当出现耐药性时，没有其它抗生素备选。

本发明的方法中，在建立识别区域库时，优选特异性单克隆抗体作为设计识别区域，即设计成现有技术中通常设计的单链抗体、小分子抗体，或本发明发明人前期已经发表的如表 1 所列结构的抗体模拟物。即建立的识别区域的分子结构可以是表 1 中的抗体模拟物，或者这些抗体模拟物的点突变产物，点突变指对构成抗体模拟物的两个识别区域的氨基酸残基进行人工点突变获得的对所述靶标物仍具备识别能力的短肽。

这使得建立的识别区域分子结构库的成员得以无限扩充，从而本发明的方法上述的第二个优点得以放大，能够更好地应对病原物的突变。例如靶标物（病原细胞）对一种识别区域产生的耐药性而不识别，那么可以有很多近似的识别区域分子结构作为候选。

抗体模拟物比抗体本身具有很多优势，更易于获得和人工操作。因为针对的靶标物的不同，用作识别区域的物质可以是从现有数据库中收集的信息素，噬菌体识别区域，或特异性单克隆抗体。毕竟非常有限在动植物、微生物里发现的生物活性物质中，能够最有效识别单个分子的生物活性物质，就是抗体。为了规避天然抗体尺寸庞大的弊病，人们一直在设计和制备尺寸更小的抗体变构物。然而这些变构物由数百个氨基酸残基组成，与我们所追求的识别区域相比，尺寸仍然太大。每个天然抗体的 Fab 短臂具有 6 个抗原结合区，它们和支撑它们的骨架区一道组成了复杂的空间结构。这个空间结构具有识别和结合特异抗原的功能，而本发明的平台所要研发的新型抗生素中，识别区域只需要具有识别功能就足够了，并不需要识别区域与相应抗原结合。根据

（Qiu et al, Small antibody mimetic comprising two complementarity-determining regions and a framework region for tumor targeting. Nature Biotechnology 25(8):921-929(2007)）中记载，Qiu 等人参照天然抗体的构造，选择天然抗体 Fab 短臂中的两个抗原结合区、一个骨架区组成一个短肽抗体模拟物，它的尺寸虽然比天然抗体小了 50 至 300 倍，却保留了天然抗体的基本生物活性：即能够特异地识别某一种抗原。由于人体或动物体，在受到免疫原刺激后免疫系统会应激产生特异针对该免疫原的免疫球蛋白，本发明优选采取制备识别靶标物的单克隆抗体并基于该单克隆抗体以及上述 Qiu et al，2007 的文章中的抗体模拟物设计思路的方法来提供识别区域。这样一来，理论上，针对任何病原微生物细胞，或待处理的细胞都能制备出特异性单克隆抗体，相应也就能制备出适合的识别区域物质——抗体模拟物。这使得本发明的方法针对某种靶标物的新型抗生素的成功率相对于传统抗生素研发方法产生的质的飞跃，而且出成果的时间大大缩短，理论上，制备针对一个靶物质的新型抗生素所需的时间等于获得特异性单克隆抗体的时间加上生物工程方法制备重组蛋白的时间，而且是能够制备出一批。

所述靶标物为具有共同或相似表面抗原的多个，如图 3 上，所述抗体模拟物来源于以所述共同或相似表面抗原为免疫原成分免疫动物制备得到的免疫球蛋白。以这样的抗体模拟物为识别区域所制备而得的新型抗生素能够识别多种所述靶标物，即具有广谱抗生素功效。

本发明的方法中建立的识别区域分子结构库，如果选择的靶标物表面特有物质是多种靶标物的表面共有的，那么相应的抗体模拟物就成为了一种广谱识别区域：只要其表面具有类似物质的微生物细胞均会被识别，那么制备的新型抗生素就是广谱的。如果选择的特异物质是一种

微生物细胞的表面特有的，那么相应的抗体模拟物就成为了一种窄谱识别区域，只有其表面具有类似物质的微生物细胞才会被识别。

以靶标物的多种表面物质为免疫原，分别用它们去免疫动物产生相应多种的免疫球蛋白，从而得到多种可以特异识别该靶标物的抗体模拟物及其变构物，这是另外一种扩建识别区域库的途径，如图 3 下。这种情况下，用于制备本发明的新型抗生素的识别区域的蓝本—免疫球蛋白就有多个选项，相应制备的出来的抗体模拟物的数量会更大，制备出来的用于识别一种靶标物的新型抗生素种类就更多。在实际使用中先选择一种新型抗生素，实际使用一段时间，该微生物对这个识别区域产生耐药性之后（如，改变相应表面物质（抗原）的结构，使这个识别区域无法识别），再选用第二种、第三种、第四种，这有效克服了现有技术中，抗生素被耐药之后不能立即提供后继药物替代治疗的困境。即效的延长一类新型抗生素的有效应用寿命。

本发明中，设计的 V_HCDR1-V_HFR2-V_LCDR3 结构的抗体模拟物，其中的两个 CDR 可以来源于同一个免疫球蛋白，也可以在点突变过程中，将其中一个突变为另一个免疫球蛋白的 CDR，前提是这“另一个”免疫球蛋白可以识别所述靶物质。例如本发明实施例 1，2，3，6 中的点突变都采用了这种策略，将其中一个抗原识别区域点突变成了其它识别所述靶物质的免疫球蛋白的 CDR，如图 4。

当所述靶标物为以磷脂双分子膜为其细胞膜或包膜基本结构的病毒、原核细胞或真核细胞，所述药理作用指致死和 / 或致衰竭，

所述效应区域指可在磷脂双分子膜上形成离子通道或孔道的生物活性物质。例如目前已知的大肠菌素，绿脓杆菌细菌素 Pyosin.

所述效应区域指大肠菌素 E1、Ia、Ib 、A、 B 或 N；或大肠菌素 E1、Ia、Ib 、A、 B 和 / 或 N 分子中可形成离子通道的结构域；或

由大肠菌素分子 E1、Ia、Ib 、A、 B 或 N，或大肠菌素分子 E1、Ia、Ib 、A、 B 或 N 中可形成离子通道的结构域变构而得且具有在所述磷脂双分子膜上形成离子通道功能的分子。

根据背景技术部分的描述可以看出，目前以及将来人类面临的主要病原微生物都具有相同的特点，即其细胞膜具有磷脂双分子膜结构。自然界中有不少细菌素直接在细菌胞膜上形成离子通道来杀死细菌。其典型代表就是大肠杆菌分泌的一种细菌素—大肠菌素。其生物功能是杀伤同种异株的大肠杆菌，却不伤害其他种类的细菌以及大肠杆菌的宿主---人类及动物。作为形成离子通道大肠菌素的一个模式标本，大肠菌素 Ia 自 1952 年被 Jacob 发现之后，经过数代人的努力，1996 年终于揭示了大肠菌素 Ia 在人工脂质双分子膜上所形成离子通道开放和关闭时的跨膜立体结构（Qiu et al, Major transmembrane movement associated with colicin Ia channel gating. J. Gen. Physiology, 107:313-328 (1996) ），为在分子水平上设计和制备新型的抗生素奠定了理论基础。但野生型大肠菌素只能作用于同种异株的大肠杆菌，需改变它的靶向性，才能使大肠菌素转而攻击其它致病菌；大肠菌素是本发明研发新型抗生素的平台的理想的效应区域物质候选项。

当所述重组物为重组多肽时，上述可操作连接效应区域与识别区域指将编码所述重组多肽的基因转入到生物表达系统中表达融合蛋白，分离纯化融合蛋白物获得新型抗生素。

当所述药理作用指标记，所述效应区域指标记物，所述效应区域和识别区域通过现有可操作地连接。例如，可在识别区域的分子上标记上用于放射性标记物。

本发明的方法，针对靶标物确定识别区域的分子之后，选择效应区域的分子，效应区域分子的选取与创建该抗生素的目的有关，如目的是针对靶标物进行调节，则选择具有修复功能的分子；如目的是使靶标物死亡或遏制其生长发育，则选择如大肠菌素类的能够在靶标物的细胞膜上形成致死性离子通道的生物多肽分子；如果目的是对靶标物进行标记或显影，这可以选择显影剂或标记物与识别区域进行连接得到针对用于标记的新型抗生素，通过识别区域将标记物带到靶标物上，如以便于进行针对标记细胞的后续治疗或研究工作。

本发明开发新型抗生素的方法中，可重点将制备工作放在建立识别区域库的上，因为以磷脂双分子层为其细胞膜或包膜基本结构的靶标物占大多数，本发明的方法中，优选大肠菌素，绿脓杆菌细菌素 Pyosin 作为效应区域。大肠菌素是大肠细菌间生存竞争和维持生物多样性的有效调节动力，大肠杆菌为了对抗大肠菌素的杀伤，不断地变异，大肠菌素已经存在了数亿年，直至此刻仍在每一个多细胞生物个体的消化道内发挥着不可替代的生理作用。由于本发明的方法要创建的新型抗生素的攻击目标为其他种类的微生物或细胞，而这些微生物或细胞从未遭遇过大肠菌素的攻击，这些细菌要产生出类似于大肠杆菌的免疫蛋白，将需要相当的时日，因此可预见本发明的开发方法得到的新型抗生素将比传统抗生素具有更长的应用寿命。大肠菌素通过在靶标物膜上形成离子通道，其杀菌效力极为强大，大约为传统抗生素，如青霉素、头孢菌素、万古霉素、链霉素、碳青霉烯、替加环素等传统抗生素杀菌效力的数百倍至数万倍。作为本发明的方法中优选采用的效应区域，将赋予本发明的方法创建的新型抗生素远远强过传统抗生素的杀菌效力。

对于识别区域和效应区域都是多肽分子的重组物，连接识别区域和效应区域的方法，优选合成编码所述重组物的核苷酸序列，然后构建装载有该核苷酸序列的重组表达载体，最后将所述重组表达载体转入到生物表达系统中，如大肠杆菌工程菌中表达并分离该重组物。更进一步地，本发明的方法优选采用大肠杆菌 pET 系统工程菌指 *E.coli* B834（DE3）作为生物表达系统，经验证，该系统表达这类重组蛋白具有高表达率。

本发明的方法创建的新型抗生素，在获得重组物的步骤，会得到一批重组物，最后通过常规的功能验证，即采用每种重组物的靶标物以及非靶标物对其进行识别和药理功能的验证，最后选择出那些至少对靶标物有识别和药理功能的重组物，即新型抗生素。对于其中一些对靶标物没有功能但是对其它非靶标物有功能的重组物，可进行进一步的验证工作已确定其作为范围。

本发明还提供了操作上述开发新型抗生素的方法的平台系统，以便于使本发明开发新型抗生素的方法的操作规程化以及模式化，提高开发新型抗生素的效率，平台包括 3 个相互配合的系统组：（1）目标提出系统，（2）设计系统和（3）实验室系统；

目标提出系统所述目标提出系统确定开发目标，设计系统并对设计系统发出任务指令；其工作任务为：明确针对何种靶标物开发新型抗生素，新型抗生素对所述靶标物执行何种药理功能；例如通过检索分析医药领域的需求、抗生素的耐药性状况、收集新出现的致病菌及信息、

收集统计试验结果数据或外接的承包项目，确定开发目标。在这里，药理功能指调节、修复、标记、致死和/或致衰竭。目标提出系统可包括研发团队、市场团队的核心成员，确定的工作目标可以是外接的承包项目，其指定针对某种病原微生物开发新型抗生素；

设计系统根据目标提出系统的任务指令以及所述结构通式设计识别区域、效应区域及所述重组物的分子结构，并提供给实验室系统完成所需的实验室工作；新型抗生素设计系统根据目标提出系统提供的任务指令，需创建识别区域库和效应区域库。根据所述目标提出系统发出的指令，收集、选取或制备特异性识别所述靶标物的物质的作为识别区域，所述制备特异性识别所述靶标物的物质指采用所述靶标物或者靶标物表面上分离的特有物质作为免疫原对动物进行免疫制备并筛选获得到特异性识别所述靶标物的单克隆抗体。；

所述实验室系统向新型抗生素设计系统提供实验结果，新型抗生素设计系统向目标提出系统汇报最终选出的作为开发成果的候选产品，

所述设计指基于收集的、选取的或制备的物质的分子结构进行结构调整、结构重组和/或结构确认的过程。

本发明的平台系统中，所述实验室系统，根据新型抗生素设计系统发出的指令完成实验工作，例如制备用作识别区域的候选物的单克隆抗体、制备用作效应区域的多肽，以及制备所述重组物并进行一系列验证工作。基本上，所述实验室系统的工作包括制备针对靶标物的单克隆抗体、测序获得单克隆抗体的氨基酸序列，合成设计的抗体模拟物的基因，合成编码重组物的基因并制备纯化重组物，或制备重组物，验证重组物，拿出实验报告并反馈给设计系统。

根据本发明设计的开发平台中，设计系统是技术核心部分，而实验室系统的工作都是现有技术可以完成的，因此可以自己组建一支完整的实验室工作队伍，也可以仅仅设置实验室工作队伍的组织管理人员，由实验室系统织管理人员将实验工作外包给专注与相应阶段工作内容的第三方合作机构。这样能够快速高效高质量地完成开发工作，经济有效低地整合了研发资源，本发明组建的开发平台相当于一个新型抗生素研发工厂。

本发明的平台系统的各个系统之间各司其职，相互配合地高效运转，使一种目标新型抗生素的诞生只需要半年左右的时间，实际上，这半年左右的时间创建出的针对一种靶标物的抗生素式一批，抗生素的制备效率远远高于传统制备方式。并且由于每个系统的工作都有针对性的开展，使得企业或者科研机构的经费有的放矢地分配，不会盲目投入到没有实际应用意义或者市场需求的项目中。特别是，本发明的平台中，一些系统的工作是可以外包给专职做相应领域的第三方单位完成。这样，实现了研发设备以及资源的高效整合利用，有效提降低研发经费和耗费的时间。

本发明的平台系统的工作流程图如 5 所示，能够最大程度的避免开发工作的浪费和重复。

综合而言，本发明的方法及平台系统提供了一种制备药物的全新方法，其优于传统抗生素制备方法之处在于：

（1）不在受传统抗生素筛选方法的局限性：本发明的方法所制备的新型抗生素素具有共同的结构构成：即由效应区域和识别区域构成。在针对具有磷脂双分子细胞膜的靶标物的开发项目中，效应区域可选择目前现成的大肠菌素，在识别区域的引导下，新型抗生素中的大肠菌素

几乎能在所有具有磷脂双分子层细胞膜结构的细胞膜上形成致死性离子通道。

由于大多数微生物的细胞膜表面都有其种或属或菌株特有的表面物质，用这些表面物质或具有该表面物质的细胞作为免疫原制备特异性识别该靶标物的单克隆抗体，是目前非常成熟的技术，获得该单克隆抗体之后再根据发明人前期发明的抗体模拟物设计思路获得抗体模拟物作为识别区域。这样一来，本发明的开发方法，不再受到目前发现的可用作药物作用靶标的蛋白质（即药物靶标）已经逐渐用完，剩下的靶标都不具有药理意义（undruggable,不会与药物发生反应）这一局限。能针对大多数病原微生物开发出专门针对其的新型抗生素。

（2）能够灵敏地应对病原微生物的耐药性：由于病原微生物的表面抗原物质不止一种，可以选择靶标物微生物表面的多种表面物质，用它们去免疫动物产生相应的单克隆抗体，从而得到许多种可以特异识别该微生物细胞的抗体模拟物及其变构物。如图 3,先选择这些抗体模拟物中的任一种作为本发明化合物的第一种识别区域，实际使用一段时间，该微生物对这个识别区域产生耐药性之后（如，改变相应表面物质（抗原）的结构，使这个识别区域无法识别），再选用这些抗体模拟物中的另一种作为本发明化合物的第二种识别区域、第三种识别区域、第四种识别区域……从而提供多份新型抗生素的备选项，有效克服了现有技术中，抗生素被耐药之后没有后继药物替代治疗的困境。即效的延长一类新型抗生素的有效应用寿命。

（3）本发明方法或平台中，提供的识别区域物质包括，优选包括抗体模拟物，以及基于该抗体模拟物短肽进行点突变的变构物，这样，针对的病原微生物的表面抗原发生突变时，已经有不止一个候补的抗体模拟物等待与其识别，这使得本发明的开发方法应对耐药性的能力进一步提高，如图 4 所示。

（4）靶标物不易产生耐药性。由于本发明的方法中，新型抗生素的效应区域的物质优选大肠菌素，大肠菌素的杀菌机制与目前大多数抗生素的杀菌机制都不相同且不为病原微生物所熟悉，病原微生物要产生耐药性需要相当的时日，这为开发下一代抗生素提供的了富裕的时间。

（5）大肠菌素通过在靶标物膜上形成离子通道，其杀菌效力极为强大，大约为传统抗生素，如青霉素、头孢菌素、万古霉素、链霉素、碳青霉烯，替加环素等传统抗生素杀菌效力的数百倍至数万倍。作为本发明的方法中优选的一种效应区域，将赋予本发明的方法创建的新型抗生素远远强过传统抗生素的杀菌效力。

（6）与目前漫长耗时的传统抗生素筛选方式不同，本发明的方法只需四至六个月就可能产生一种针对不同病原微生物的新型抗生素：应用不同的抗原免疫动物（小鼠），经过两至三周的抗体生成期，即可抽血筛选相应的单克隆抗体；使用蛋白质测序与基因的互译技术，即可得到编码单克隆抗体 Fab 段的重链和轻链可变区和骨架区的核苷酸序列；根据得到的核苷酸序列设计出识别区域---抗体模拟物的基因，其与效应区域—编码大肠菌素的基因连接并构建得到重组质粒，重组质粒转染工程菌，即可增殖表达出一种新型抗生素。对分离纯化出的新型抗生素进行抗菌或杀细胞的特异性和灵敏性验证，全程只需半年左右即可筛选出一批新型抗生素。如此之高的构建和产生效率将给传统抗生素构建和生产带来革命性的变化。

（7）本发明的平台，提供了高效研发新型抗生素的团队合作方法和资源利用途径，由于开发的抗生素具有共同的结构特征，使得本发明的平台可以有效地整合利用研发资源流水线式地

进行研发工作，相当于提供了一种抗生素研发工厂。

综上，本发明的开发新型抗生素的方法和平台系统，能够针对大多数病原微生物，靶标物提供特异性具有识别区域和效应区域的新型抗生素。对大多数靶标物而言，目前已知的细菌素足以胜任效应区域的角色，因此一个新型抗生素的开发周期取决于：分子结构设计所需的时间，加上制备和验证重组物的时间。由于识别区域不仅仅依赖于选取天然的物质，更主要是依赖于人工制备抗体模拟物来作为识别区域，而以一个免疫原免疫动物获得单克隆抗体，继而获得该单克隆抗体的氨基酸序列是目前的成熟技术，因此，基于目前的生物技术水平，开发一个新型抗生素的时间基本上可控制在非常短的时间内。本发明用于操作该开发方法的平台，充分优化利用整合人力资源、技术资源，保证开发过程高效进行，使得研发新型抗生素以一种流水线式的方式运转。

附图说明

图 1 本发明的方法开发的新型抗生素的结构通式：

其中 F 指效应区域，R 指识别区域。

图 2 抗体模拟物结构。

图 3 构建识别区域的策略 1。

图 4 构建识别区域的策略 2。

图 5 平台系统工作流程图,其中 M 表述目标提出系统，D 表示设计系统，L 表示实验室系统。双向箭头表示制备新型抗生素过程中的信息交流途径。

图 6 新型抗生素对 EB 病毒所致人恶性淋巴肉瘤(Burkitt's lymphoma)体外杀伤效果比较

(A) 对照组，(B)新型抗生素组 1 处理组。

图 7 本发明新型抗生素与野生型大肠菌素、抗金葡菌多肽（ZL 01128836.1）对耐甲氧西林金葡菌（ATCC BAA-42)、耐万古霉素肠球菌 （ATCC 700802)、多重耐药绿脓杆菌（华西医院临床分离株 13578）抑制作用的比较之生存曲线

纵座标为最小抑菌浓度 （nMol)；

其中 A 图为耐万古霉素肠球菌，（1）抗金葡菌多肽，MIC = 0.91 nMol, (2) 野生型大肠菌素 Ia, MIC = 0.91 nMol, (3) PMC-AM1，MIC = 0.23 nMol；B 图为耐甲氧西林金葡菌，（1）抗金葡菌多肽，MIC = 0.06 nMol, (2) 野生型大肠菌素 Ia, MIC = 0.23 nMol, (3) PMC-AM1，MIC = 0.06 nMol；C 图为多重耐药绿脓杆菌，（1）抗金葡菌多肽，MIC = 0.91 nMol, (2) 野生型大肠菌素 Ia, MIC = 0.91 nMol, (3) PMC-AM1，MIC = 0.23 nMol。

图 8A 抗蓝藻多肽对生长于液体培养基中铜绿微囊藻的抑制试验结果,图中左侧烧瓶为对照，右侧烧瓶为 35 μg/ml 抗蓝藻多肽。

图 8B 抗蓝藻多肽对生长于液体培养基中鱼腥藻的抑制试验结果,图中左侧烧瓶为对照，右侧烧瓶为 35 μg/ml 抗蓝藻多肽。

图 8C 抗蓝藻多肽对生长于液体培养基中小球藻的抑制试验结果, 图中左侧烧瓶为对照，右侧烧瓶为 35 μg/ml 抗蓝藻多肽。

图 8D 抗蓝藻多肽对生长于液体培养基中栅藻的抑制试验结果, 图中左侧烧瓶为对照，右

侧烧瓶为 35 μg/ml 抗蓝藻多肽。

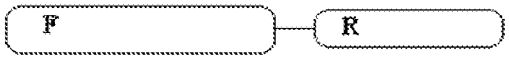
具体实施方式

以下通过目前完成的开发实例说明本发明的方法和平台：

实施例 1. 制备针对病毒引起的肿瘤的新型抗生素

（1）确定靶标物：确定针对 EB 病毒所致肿瘤细胞的致死新型抗生素。

（2）设计新型抗生素分子结构：

根据结构通式 

其中 F 指效应区域，R 指识别区域，进行以下设计工作，

建立识别区域分子结构库：通过检索数据库发现现有技术中已经有特异性识别抗 EB 病毒的单克隆抗体——抗 EB 病毒包膜糖蛋白抗体 gp320，即 ATCC HB-168 杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体及其氨基酸序列信息。

基于该单克隆抗体，发明人设计出了一系列抗体模拟物结构，如下表 1 所示，以及基于表 1 中所列结构的抗体模拟物前 5 及后 9 位氨基酸进行随机点突变得到一系列变构物，

表 1 设计出的抗体模拟物结构

V_HCDR1-V_HFR2-V_HCDR3
V_LCDR1-V_HFR2-V_LCDR3
V_HCDR1-V_HFR2-V_LCDR3
V_HCDR2-V_HFR2-V_LCDR3
V_LCDR1-V_HFR2-V_HCDR3
V_LCDR2-V_HFR2-V_HCDR3

建立效应区域分子结构库：由于制备目标为致死 EB 病毒所致肿瘤细胞的新型抗生素，大肠菌素本身能够在同种异株大肠杆菌的细胞膜上形成致死性离子通道而导致同种异株大肠杆菌死亡，是很好的效应区域候选物质。因此选择大肠菌素 Ia、Ib 、A、 B 和 N 或它们的突变序列为效应区域库的物质，并提供给实验室系统。

初步得出设计的重组物的分子结构库：从氨基端到羧基端：大肠菌素或其变构物+可识别抗 EB 病毒包膜糖蛋白的 28 肽模拟物，其中部分重组物的分子结构如表 2：

重组物编号	识别区域分子	效应区域分子	重组物分子(氨基端—羧基端)
1	V_HCDR1-V_HFR2-V_HCDR3	Ia	Ia-V_HCDR1-V_HFR2-V_HCDR3
2	V_LCDR1-V_HFR2-V_LCDR3	Ia	Ia-V_LCDR1-V_HFR2-V_LCDR3
3	V_HCDR1-V_HFR2-V_LCDR3	Ia	Ia-V_HCDR1-V_HFR2-V_LCDR3
4	V_HCDR2-V_HFR2-V_LCDR3	Ia	Ia-V_HCDR2-V_HFR2-V_LCDR3
5	V_LCDR1-V_HFR2-V_HCDR3	Ia	Ia-V_LCDR1-V_HFR2-V_HCDR3

6	V_LCDR2-V_HFR2-V_HCDR3	Ia	Ia-V_LCDR2-V_HFR2-V_HCDR3
7	V_HCDR1-V_HFR2-V_HCDR3	mIa (Seq ID No.1)	mIa-V_HCDR1-V_HFR2-V_HCDR3
8	V_LCDR1-V_HFR2-V_LCDR3	mIa	mIa-V_LCDR1-V_HFR2-V_LCDR3
9	V_HCDR1-V_HFR2-V_LCDR3	mIa	mIa-V_HCDR1-V_HFR2-V_LCDR3
10	V_HCDR2-V_HFR2-V_LCDR3	mIa	mIa-V_HCDR2-V_HFR2-V_LCDR3
11	V_LCDR1-V_HFR2-V_HCDR3	mIa	mIa-V_LCDR1-V_HFR2-V_HCDR3
12	V_LCDR2-V_HFR2-V_HCDR3	mIa	mIa-V_LCDR2-V_HFR2-V_HCDR3

注*ATCC HB-168 杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体极其 V_LCDR1、V_LCDR2、V_HCDR1、V_HCDR2 V_HFR2、V_LCDR3、V_HCDR3、大肠菌素 Ia 的氨基酸序列及核苷酸序列都为已知内容，因此重组物分子的氨基酸序列和核苷酸序列也可以由此准确推出，并且会占太多篇幅，因此不再在本说明书中列出这些序列信息。

（3）实验室系统：连接被提供的效应区域与识别区域获得重组物库，将编码这些重组物的基因构建到表达载体中获得重组表达载体，将获得的重组表达载体分别转化工程菌从而一批重组多肽。

对获得的重组物进行抗靶细胞验证实验（验证方法及实验设计完全同 ZL200410081446.8 中记载），表 2 中的重组物 3 和 9 对 EB 病毒所致肿瘤细胞具有最好的杀伤作用，其对 EB 病毒所致恶性淋巴肉瘤体外杀伤实验结果如图 6 所示，其它 9 种对抗 EB 病毒所致肿瘤都具有不同程度的杀伤活性，但是弱于重组物 3 和 9，都对正常细胞无毒副作用，验证实验过程与 ZL200410081446.8 中实施例 2～5 相同。

以重组物 3 和 9 中的抗体模拟物的突变体为识别区域制备得到的重组物，经验证，表 3 中 Seq ID No.2～6 为识别区域的重组物对 EB 病毒所致肿瘤细胞具有 3 或 9 基本相同的杀伤作用。

表 3　抗 EB 病毒所致肿瘤 28 肽模拟物 V_HCDR1-V_HFR2-V_LCDR3 及变构物氨基酸序列

序列编号	V_HCDR1-V_HFR2-V_LCDR3 及其点突变体
Seq ID No.2	SFGMHWVRQAPEKGLEWVAGQGYSYPYT
Seq ID No.3	SYGMHWVRQAPEKGLEWVAGQGYSYPYT
Seq ID No.4	SFGMHWVRQAPEKGLEWVAQQWSSNPYT
Seq ID No.5	SFGMHWVRQAPEKGLEWVALQGTHQPYT
Seq ID No.6	SFGMHWVRQAPEKGLEWVAQQLHFYPHT
Seq ID No.7	RQGMHWVRQAPEKGLEWVAGQGYSYPYT

本次制备历时不到 6 个月，成功获得了一批对靶标物具有特异性杀伤力的候选新型抗生素。

本实施例中获得的每种重组物所采用的实验操作步骤和实验材料，除构建载体时插入的基因序列不同，其它完全同发明专利 ZL200410081446.8 中所记载，在此不再赘述。

实施例 2. 制备针对抗脑膜炎双球菌的新型抗生素

（1）确定靶标物：脑膜炎双球菌。

（2）设计新型抗生素分子结构：

根据结构通式 

其中 F 指效应区域，R 指识别区域，进行以下设计工作，

建立识别区域分子结构库：

孔蛋白是葡萄球菌、链球菌、肠球菌等革兰氏阳性菌和大肠杆菌、肺炎克雷伯氏菌、绿脓杆菌、鲍曼氏不动杆菌、阴沟肠杆菌、鼠伤寒沙门菌、粘质沙雷菌、单胞菌、弧菌、粘球菌等革兰氏阴性菌，以及结核杆菌所共有的一类外膜蛋白（out membrane protein），是非常理想的抗原蛋白，膜孔蛋白 PorA 是其中一种。

通过检索找到发现现有技术中已经有特异性识别膜孔蛋白 PorA 的单克隆抗体，其重链肽链的 PUBMED 登录号为 2MPA_H，轻链肽链的 PUBMED 登录号为 2MPA_L。基于该单克隆抗体，发明人设计出了如实施例 1 中表 1 所示结构的一系列抗体模拟物分子结构，

建立效应区域分子结构库：由于制备目标为是靶标物脑膜炎双球菌致死的新型抗生素，大肠菌素是很好的效应区域候选物质。因此选择大肠菌素 Ia、Ib 、A、 B 和 N 为效应区域库的物质，这些大肠菌素 Ia、Ib 、A、 B 和 N 及其离子通道结构域分子，及其点突变分子构成了效应区域分子结构库

初步设计的重组物库的分子结构为，从氨基端到羧基端：大肠菌素或离子通道结构域或其变构物+抗膜孔蛋白 PorA 的抗体模拟物。其中部分重组物的分子结构如下表 4：

重组物编号	识别区域分子	效应区域分子	重组物分子(氨基端—羧基端)
1	V_HCDR1-V_HFR2-V_HCDR3	Ia	Ia-V_HCDR1-V_HFR2-V_HCDR3
2	V_LCDR1-V_HFR2-V_LCDR3	Ia	Ia-V_LCDR1-V_HFR2-V_LCDR3
3	V_HCDR1-V_HFR2-V_LCDR3	Ia	Ia-V_HCDR1-V_HFR2-V_LCDR3
4	V_HCDR2-V_HFR2-V_LCDR3	Ia	Ia-V_HCDR2-V_HFR2-V_LCDR3
5	V_LCDR1-V_HFR2-V_HCDR3	Ia	Ia-V_LCDR1-V_HFR2-V_HCDR3
6	V_LCDR2-V_HFR2-V_HCDR3	Ia	Ia-V_LCDR2-V_HFR2-V_HCDR3

注★特异性识别膜孔蛋白 PorA 的单克隆抗体，其重链肽链的 PUBMED 登录号为 2MPA_H，轻链肽链的 PUBMED 登录号为 2MPA_L,都已知，因此其 VLCDR1、VLCDR2、VHCDR1、VHCDR2 VHFR2、VLCDR3、VHCDR3 都已知，因此重组物分子的氨基酸序列和核苷酸序列也可以由此准确推出，因此不再在本说明书中列出这些序列信息。

（3）实验室系统：将编码这些重组物的基因构建到表达载体中获得重组表达载体，将获得的重组表达载体分别转化工程菌从而一批重组多肽。

对获得的重组物进行抗靶细胞验证实验，验证对多重耐药绿脓杆菌绿脓杆菌、抗耐万古霉素肠球菌、抗耐甲氧西林金葡菌、鲍曼氏不动杆菌、肺炎克雷伯氏菌，结核杆菌的杀伤作用（验证方法及实验设计完全同 ZL200910092128.4 中记载），表 4 中的重组物 3 对这些病原菌具有最好的杀伤作用，本发明新型抗生素对耐甲氧西林金葡菌（ATCC BAA-42）、耐万古霉素肠球菌

（ATCC 700802）、多重耐药绿脓杆菌（华西医院临床分离株 13578）抑制作用的比较之生存曲线见图 7，其它 5 种对这些耐药菌都具有不同程度的杀伤活性，但是弱于重组物 3，但都对正常细胞无毒副作用，验证实验过程与 ZL200910092128.4 中实施例 2～6 相同。

以重组物 3 中的抗体模拟物的突变体为识别区域，大肠菌素 Ia 为效应区域制备得到的重组物，其中经验证，表 5 中 Seq ID No.9～13 为识别区域的重组物对上述病原菌具有与 3 基本相同的杀伤作用。

表 5　抗脑膜炎双球菌抗体模拟物 V_HCDR1-V_HFR2-V_LCDR3 及变构物氨基酸序列

序列编号	V_HCDR1-V_HFR2-V_LCDR3 及其点突变体
Seq ID No.8	SYWLHWIKQRPGQGLWIGSQSTHVPRT
Seq ID No.9	SYGMHWIKQRPGQGLWIGSQSTHVPRT
Seq ID No.10	SYWIEWIKQRPGQGLWIGSQSTHVPRT
Seq ID No.11	NYWMHWIKQRPGQGLWIGSQSTHVPRT
Seq ID No.12	SYWLHWIKQRPGQGLWIGMQNIGLPWT
Seq ID No.13	SYWLHWIKQRPGQGLWIGQQFTSSPYT

本次制备历时不到 6 个月，成功获得了一批具有广谱抗菌效果的候选新型抗生素。

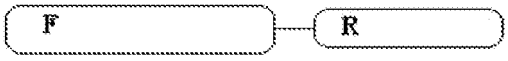
本实施例中获得的每种重组物所采用的实验操作步骤和实验材料，除构建载体时插入的基因序列不同，其它完全同发明专利 ZL200910092128.4 中所记载，在此不再赘述。

实施例 3. 制备针对抗炭疽杆菌的新型抗生素

（1）目标提出系统确定炭疽毒素或炭疽杆菌为靶物质：炭疽毒素或炭疽杆菌所致的致死性感染疾病一直对人类健康造成巨大的威胁，在恐怖袭击者，炭疽毒素也一直是最骇人听闻的病原体或毒素。

本次制备的目标为提供一种破坏炭疽杆菌或炭疽毒素的毒性的新型抗生素，即阻止或干扰炭疽毒素 PA 抗原形成有活性的 PA 七聚体。

（2）设计新型抗生素。

根据结构通式 

其中 F 指效应区域，R 指识别区域，进行以下设计工作，

基于炭疽毒素的一般特性：是一种高度生物危害性的二元毒素，由蛋白抗原 PA 和坏死因子和水肿因子 LF/EF 构成，蛋白抗原 PA 是运输结构且能识别靶细胞，它跨膜运输坏死因子和水肿因子进入靶标物内。动物实验表明，蛋白抗原与坏死因子联合使用可迅速引起细胞死亡，两种成分单独给予动物则不引起反应，初步设计思路的新型抗生素为，其识别区域识别炭疽 PA 抗原，效应区域干扰或在阻止炭疽毒素 PA 抗原形成有活性的 PA 七聚体。

建立识别区域分子结构库：通过检索数据库发现现有技术中食蟹猴产生的抗炭疽杆菌蛋白抗原-致死因子复合体抗体（NCBI CAL58671）和家鼠产生的抗炭疽杆菌蛋白抗体

（NCBIABF69350），能非常好地特异性识别炭疽毒素中的蛋白抗原 PA。根据上述抗体的氨基酸信息设计了 V_HCDR1-V_HFR2-V_LCDR3 结构的一系列识别野生型炭疽毒素中 PA 的抗体模拟物结构及其突变体从而建立起识别区域分子结构库，并提供给实验室系统。

建立效应区域分子结构库：由于制备目标为炭疽毒素 PA 抗原形成 PA 七聚体，根据炭疽毒素的感染原理，本次试验中，对炭疽毒素 PA 抗原进行人工突变获得一些突变的炭疽毒素 PA 抗原（见 ZL200810045212.6 中记载的 Seq ID No.10）作为效应区域分子结构库的成员，使得 PA 丧失了对靶细胞上相关受体的识别能力，该突变的炭疽毒素 PA 抗原与野生型炭疽毒素 PA 抗原形成杂合的 PA 七聚体，该七聚体丧失或部分丧失其跨膜活性，从而干扰炭疽毒素发挥其感染能力。

（3）实验室系统：连接被提供的效应区域与识别区域获得重组物库，将编码这些重组物的基因构建到表达载体中获得重组表达载体，将获得的重组表达载体分别转化工程菌从而一批重组多肽。

经验证获得一批以表 6 所列的氨基酸序列为识别区域，突变的炭疽毒素 PA 抗原（见 ZL200810045212.6 中记载的 Seq ID No.10）为效应区域的重组物，能够保护被炭疽杆菌感染的小鼠，验证实验及结果与 ZL200810045212.6 中记载的 pCHCA-PA1 效果相似。

表 6 识别野生型炭疽毒素中 PA 的抗体模拟物及变构物氨基酸序列

序列编号	V_HCDR1-V_HFR2-V_LCDR3 及其点突变体
Seq ID No.14	STALHWRQAPGKGLEWVPRYDEFPYT
Seq ID No.15	SFGMHWRQAPGKGLEWVPRYDEFPYT
Seq ID No.16	NYWMHWRQAPGKGLEWVPRYDEFPYT
Seq ID No.17	STALHWRQAPGKGLEWVFQGSHVPFT
Seq ID No.18	STALHWRQAPGKGLEWVYCHQWSMYT
Seq ID No.19	STALHWRQAPGKGLEWVQQWSSNPYT
Seq ID No.20	STALHWRQAPGKGLEWVQQFTSSPYT

本次制备历时不到 6 个月，成功获得了一批能够对炭疽杆菌的感染起到保护性作用的新型抗生素。

本次制备方法中，获得的每一种重组物所涉及到实验部分（例如，载体构建，转化，验证试验等），其操作和材料（除插入的新型抗生素基因）完全同发明专利 ZL200810045212.6 中记载的实施例，在此不再赘述。

实施例 4 制备针对真菌的新型抗生素

（1）目标提出系统确定白色念珠菌为靶标物，

确定制备目标为杀伤农业真菌—白色念珠菌的新型抗生素。

（2）新型抗生素设计系统，

根据结构通式 

其中 F 指效应区域，R 指识别区域，进行以下设计工作，

创建识别区域分子结构库：近年来真菌基础研究取得很大的进展，已确定某些真菌如白色念珠菌信息素的氨基酸序列（Seq ID No.21）是 14 个氨基酸残基组成的多肽。它可以在生活介质中自由游动，具有自动寻找同种真菌细胞胞膜上相应受体的生物学活性。因此可以利用真菌信息素的这种自动寻找活性使其作为识别区域诱导效应区域如大肠菌素这一类细菌外毒素到达这些真菌的细胞膜上形成离子通道来杀伤这些真菌，从而构建出一类新型生物农药。

因此以 Seq ID No.21 所示的白色念珠菌信息素为识别区域。

建立效应区域分子结构库：由于制备目标为是靶标物农业真菌（白色念珠菌）致死的新型抗生素，基于大肠菌的特性，大肠菌素是很好的效应区域候选物质。因此选择大肠菌素 Ia、Ib 、A、 B 和 N，和其离子通道结构域为效应区域分子结构库的成员，提供给实验室系统。

初步设计的新型抗生素分子结构为，从氨基端到羧基端：大肠菌素或其离子通道结构域或其变构物+白色念珠菌信息素。

（3）实验室系统：连接效应区域与识别区域的获得重组物库，编码这些重组物的人工合成的基因构建到表达载体中获得重组表达载体，将获得的重组表达载体分别转化工程菌从而表达重组多肽，从而实现识别区域与效应区域的可操作连接。

验证获得的重组物中，经验证，均能够对真菌稻梨孢、黄曲霉菌等感染的水稻起到保护作用，对稻瘟病感染的保护作用比现有农业看真菌药的效果高出数千部。

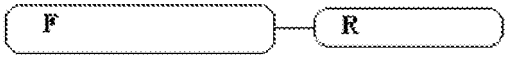
本次制备方法中，获得的每一种重组物所涉及到实验部分及数据（例如，载体构建，转化），记载于发明专利 ZL200710050926.1 中的实施例，或根据现有技术的记载，本领域技术人员经过有限次的实验也能得出完成本发明的制备方法中所需的实验方法，因此，在此不再赘述。

本次制备历时 6 个月，包括田间试验，也仅仅需要 1 年半~2 年的时间。远比现有制备新药的效率高和成功率高。

实施例 5 制备针对耐药性金黄色葡萄球菌的新型抗生素

（1）目标提出系统确定金黄色葡萄球菌为靶标物质：自 1944 年青霉素等抗生素投入使用以来，使细菌，尤其是威胁生命的致病菌，如金葡球菌、肺炎链球菌、绿脓杆菌、结核杆菌等已对其产生了耐药性，人类急需针对出现的耐药菌研制出新的抗生素。

（2）设计新型抗生素，

根据结构通式 

其中 F 指效应区域，R 指识别区域，进行以下设计工作，

创建识别区域分子结构库：很多细胞分泌信号传导多肽到胞外，这些多肽能够自动寻找同种细菌胞膜上的相应受体，与受体结合后将信息传入细菌，葡萄球菌也分泌信号传导多肽到胞外，这些多肽能够自动寻找同种细菌胞膜上的相应受体，与受体结合后将信息传入细菌。这些

传导多肽多由数个至十数个氨基酸组成，是理想的针对葡萄球菌识别区域经检索收集到如 Seq ID No.22~26 的信息素序列作为识别区域库的成员。

提供效应区域：由于制备目标为使靶标物耐药性金黄色葡萄球菌致死的新型抗生素，基于大肠菌的特性，大肠菌素是很好的效应区域候选物质。因此选择大肠菌素 Ia、Ib 、A、 B 和 N 或其离子通道结构域为效应区域，提供给实验室系统。

初步设计的新型抗生素分子结构为，从氨基端到羧基端：

大肠菌素或其离子通道结构域或其变构物 + 信息素，以及信息素 + 大肠菌素或其离子通道结构域或其变构物。

（3）实验室系统：连接效应区域与识别区域的获得重组物库，将这些重组物的人工合成的基因构建到表达载体中获得重组表达载体，将获得的重组表达载体分别转化工程菌从而表达重组多肽，从而实现识别区域与效应区域的可操作连接。

验证获得一批重组物，其对耐甲氧西林金葡菌、耐青霉素金黄色葡萄球菌、耐万古霉素肠球菌、绿脓杆菌以及多重耐药绿脓杆菌具有显著的杀伤作用，例如其中重组质粒 pBHC-SA1、pBHC-SA2、pBHC-SA3 pBHC-SA4、pBHC-SE 和 pBHC-PA 表达的重组多肽（记载于发明专利 ZL200910157564.5 中）。

本次制备方法中，获得的每一种重组物所涉及到实验部分及数据（例如，载体构建，转化），记载于发明专利 ZL200910157564.5 中的实施例，或根据现有技术的记载，本领域技术人员经过有限次的实验也能得出完成本发明的制备方法中所需的实验方法，因此，在此不再赘述。

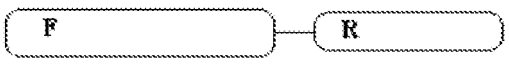
本次制备历时 5 个月，制备出一批针对耐药菌的信息抗生素。远比现有制备新药的效率高和成功率高。

实施例 6. 制备针对蓝藻的新型抗生素

（1）目标提出系统确定蓝藻为靶标物：水体过度营养化造成的蓝藻增生、水体污染是目前威胁世界范围水环境的最大危害，给人类造成巨大的经济损失，给地球生物圈造成无法修复的危害。随着我国经济发展造成的加速工业化和城镇化，生态环境污染和恶化日益加剧，水环境生态防治已成为我们必需面对和解决的重大问题。现用抗菌药物对蓝藻基本无效；蓝藻属细菌域第 X 门-蓝细菌门的一类原核细胞，目前能够控制蓝藻的只有重金属类化学制剂，如硫酸铜等。而在实际应用中，由于效果有限，往往不惜超剂量多次重复用药，造成的结果是在杀伤蓝藻的同时也将水体中其他有益藻类、水生植物和生物破坏殆尽，给环境造成了无法逆转的永久性破坏。

制备目标为杀伤或抑制蓝藻的新型抗生素

（2）新型抗生素设计系统：

根据结构通式 

其中 F 指效应区域，R 指识别区域，进行以下设计工作，

建立识别区域分子结构库：

以蓝藻为抗原免疫小鼠获得一批分泌抗蓝藻的单克隆抗体的杂交瘤细胞，其中一株其保

藏号为：CGMCC No.4783。

对杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体测序获得氨基酸序列，基于该氨基酸序列设计了一批抗体模拟物，基于每种单克隆抗体所设计的抗体模拟物的结构如表 1 所示，并对这些抗体模拟物的前 5 及后 9 位氨基酸进行随机点突变得到抗体模拟物变构物，以所述抗体模拟物分子及其变构分子为成员建立的识别区域库分子结构库。其中杂交瘤细胞 CGMCC No.4783 分泌的单克隆抗体的 V_HCDR1-V_HFR2-V_LCDR3 结构的抗体模拟物，其氨基酸序列如 Seq ID No.27 所示。

建立效应区域分子结构库：由于制备目标为杀伤或抑制蓝藻的新型抗生素，大肠菌素本身能够在同种异株大肠杆菌的细胞膜上形成致死性离子通道而导致同种异株大肠杆菌死亡，是很好的效应区域候选物质。因此选择大肠菌素 Ia、Ib 、A、 B 和 N 或它们的突变序列为效应区域库分子结构库的成员。

初步得出设计的新型抗生素的分子结构：从氨基端到羧基端：大肠菌素或其变构物+抗蓝藻抗体模拟物 / 变构物。

（3）实验室系统：

基于设计系统提供的的效应区域与识别区域分子信息连接成重组物的分子结构，将编码这些重组物的基因构建到表达载体中获得重组表达载体，将获得的重组表达载体分别转化工程菌从而分离出表达的重组物，

对获得的重组物验证对蓝藻抑制作用（验证实验设计及操作同 ZL201110155221.2 所记载实施例 3~5），实验结果显示，获得一批铜绿微囊藻、鱼腥藻由显著抑制作用而对其它有益藻类如小球藻、硅藻、栅藻等无抑制作用的重组物，部分实验结果如图 8A~8D 所示。部分选出的重组物的分子结构如表 7 所列。

表 7　抗铜绿微囊藻表面抗原的抗体模拟物及变构物氨基酸序列

序列编号	V_HCDR1-V_HFR2-V_LCDR3 及其点突变体
Seq ID No.27	SYWMQWVKQRPGQGLEWIGQQYWSTPPWT
Seq ID No.28	SYGMHWVKQRPGQGLEWIGQQYWSTPPWT
Seq ID No.29	DHYMHWVKQRPGQGLEWIGQQYWSTPPWT
Seq ID No.30	SYWIEWVKQRPGQGLEWIGQQYWSTPPWT
Seq ID No.31	SYWMQWVKQRPGQGLEWIGQQQFTSSPWT
Seq ID No.32	SYWMQWVKQRPGQGLEWIGQQQSREYPYT
Seq ID No.33	SYWMQWVKQRPGQGLEWIGQLQGTHQPYT

本次制备历时不到 11 个月，成功获得了一批经验证的对靶标物由特异性杀伤力的新型抗生素。

本次制备中获得的重组物所采用的实验操作步骤、材料（除构建载体过程中插入的新型抗生素基因）完全同发明利 ZL201110155221.2 所记载，在此不再赘述。

实施例 7.筛选适合本发明的方法的生物表达系统

重组质粒：载实施例5～6制备新型抗生素过程中获得的重组质粒：pBHC-SA1、pBHC-SA2、pBHC-SA3 pBHC-SA4、pBHC-SE，pBHC-PA 和 pBHC-PorA1。

步骤 1.转化感受态细胞

将重组突变质粒 100ng 分别转染入 4040 ul Novagen 数种 pET 系统工程菌 BL-21(DE3)、B834(DE3)、Nova Blue(DE3)，618 中，冰孵 5 分钟，42 ℃热冲击 30 秒，再置入冰中 2 分钟，加入 SOC 培养基 160 ul, 220 rpm, 37 oC 摇菌 1 小时后铺板（LB 培养基加 1%琼脂，加 50 ug/ml 氨苄青霉素，37 ℃过夜），挑取单克隆菌落增菌，获得菌种，低温保存菌种；

步骤 2.菌种复苏

1.菌种复苏

取出保存菌种 4℃解冻，取 1.5ml 倒入 10ml LB 培养基中（含 AMP 50μg/ml），220rpm、37℃培养 5—8 小时。

2.接种单克隆菌

复苏后的菌液稀释 10^4 或 10^5 倍，取 10ul 稀释后的菌液加入到制备好的 LB 固体培养基（AMP 50μg/ml）平板上，涂平板。放湿盒中，37℃恒温培养箱培养 10-12 小时，培养基表面长出圆形单菌落。

步骤 3.挑菌和扩菌

（1）用已灭菌牙签或接菌环从长好的平板上挑选规则圆形，边缘光滑的单菌落，放入 1.5mlLB 培养基中，振荡培养：220rpm、37℃培养 5-8 小时。

（2）1.5mlLB 菌液翻至 100ml LB 培养基中，振荡培养：220rpm、37℃培养 5-8 小时。

（3）一级扩大培养：将上步的 100ml 菌液加入到 700ml 改良的 FB-M9 复合培养基中培养，振荡培养：220rpm、37℃培养 5-8 小时。

（4）二级扩大培养：将上步 700ml 菌液分别加入到 6×700ml 改良的 FB-M9 复合培养基中，振荡培养：220rpm、37℃培养 5-8 小时。

（5）三级扩大培养：将上步 6×700ml 菌液加入到 20L 改良的 FB-M9 复合培养基中，在发酵罐中培养：搅拌速度 220rpm、最大通氧量，37℃培养 3—5 小时。

（6）工程菌发酵和诱导表达蛋白：将上步 20L 菌液加入到 200L 改良的 FB-M9 复合培养基中，在发酵罐中培养和诱导表达蛋白：搅拌速度 220 rpm, 最大通氧量，30 ℃，2～4 小时；42℃，0.5 小时；37 ℃，1～2 小时，注：达到 42 ℃时加入终浓度为 0.5mM 的 IPTG。

步骤 4.离心收菌

培养液 6000g，4℃离心 20min。收取离心后的沉淀，放入 50mM 的硼酸缓冲液（pH9.0）中，使菌体重悬浮于硼酸缓冲液中，注：硼酸缓冲液中加入 2mM 的 PMSF（中文名：苯甲基磺酰氟丝氨酸蛋白酶抑制剂，自菌体重悬浮之后的操作须在 4℃进行。

步骤 5.破碎菌体

待菌体完全悬浮于 pH9.0 硼酸缓冲液后，用高压匀质机 500～600bar 高压破碎菌体，反复破碎 7 次，每次破菌间隔 3～5 分钟。

步骤 6.沉淀菌体 DNA

将破碎后的菌液，55000g，4℃离心 40min。取上清液，加入硫酸链霉素（每 200ml 液体加入 16 瓶 100 万单位的硫酸链霉素），在磁力搅拌器上搅拌 1h。

步骤 7.透析

将上步的菌液 55000g，4℃离心 20min，取上清液，装入透析袋中，置硼酸缓冲液中透析 8h~12 小时，每 4h 换透析液一次。

步骤 8.蛋白药物纯化得到抗菌工程多肽药物

将透析后的菌液 55000g，4℃离心 20min，取上清液放入烧杯中，采用离子交换法纯化蛋白。取上清上样于 CM 离子交换柱，测蛋白浓度计算单位体积中蛋白质含量， 上样量与 CM 离子凝胶颗粒的比例按操作手册，充分冲洗后，用含 0.2 M NaCl 的 50 mM 硼酸缓冲液洗脱得到新型抗菌工程多。

结果如表 8 所示，*E.coli* B834(DE3)对于 PMC-SA 的表达效率是最高的。

表 8 菌株表达效率比较（平均单位产量=提取的 PMC-SA1 的总产量/菌液体积）

工程菌种	TG1	BL-21	618	NavaBlue	B834
平均单位产量（mg/L）	0.8	10	5.8	8.1	24.4

对于其余 6 种重组突变质粒进行相同操作和比较，结果均与表 1 表示的结果出现相同的趋势，即相较于其余的工程菌，*E.coli* B834（DE3）对于这 7 种重组突变质粒的表达效率都是最高的。

基于本筛选实验，在本发明的方法优选采用 *E.coli* B834（DE3）为表达系统。以便于高效地表达制备获得的新型抗生素。但不限于此。

综上，本发明的制备新型抗生素的方法和平台，能够针对大多数病原微生物，靶标物提供特异性具有识别区域和效应区域的新型抗生素。对大多数靶标物而言，目前已知的大肠菌素足以胜任效应区域的角色，因此一个新型抗生素的制备周期取决于：分子结构设计所需的时间，加上提供识别区域分子信息，以及最后制备和验证重组物的时间。由于识别区域不仅仅依赖于选取天然的物质，更主要是依赖于人工制备抗体模拟物来作为识别区域，因此，基于目前的生物技术水平，制备一个新型抗生素的时间基本上可控制在非常短的时间内。本发明用于操作该制备方法的平台，充分优化利用整合人力资源、技术资源，保证制备过程高效进行，使得研发新型抗生素以一种流水线式的方式运转。

权利要求书

1．一种制备新型抗生素的方法，其步骤如下：

（1）确定靶标物：所述靶标物指所述新型抗生素将直接作用的原核细胞、真核细胞、病毒或其产物；

（2）设计新型抗生素的分子结构：

依据以下结构通式设计所述新型抗生素的分子结构：



其中 R 为识别区域，特异性识别或结合所述靶标物，F 指效应区域，对所述靶标物产生药理功能，所述药理功能指特异性地对所述靶标物具有调节、修复、标记、致死和／或致衰竭的作用；

建立识别区域分子结构库；建立效应区域分子结构库；

根据上述结构通式，以所述识别区域分子结构库与效用区域分子结构库设计得到重组物分子结构库；

所述设计指基于收集的、选取的或制备的作为效应区域或识别区域的物质的分子结构进行结构调整、结构重组和／或结构确认的过程；

（3）根据所述重组物分子结构库，制备并验证重组物从而获得候选新型抗生素；

（4）从候选新型抗生素中筛选出符合药物标准的新型抗生素。

2．根据权利要求 1 所述的方法，所述建立识别区域分子结构库，指通过检索分析收集已知的能特异性识别和／或结合所述靶标物的天然物质并获得其分子结构；或／和人工制备特异性识别和／或结合所述靶标物的人工物质并获得其分子结构。

3．根据权利要求 2 所述的方法，所述天然物质指能够被靶标物所具有的受体识别的天然生物活性分子、噬菌体的识别功能区； 所述人工物质指抗体模拟物，所述抗体模拟物指根据能特异性识别所述靶标物上的特有物质的免疫球蛋白的氨基酸序列设计而得。

4．根据权利要求 3 所述的方法，所述抗体模拟物是由所述免疫球蛋白的 Fab 短臂上的区域 V_HCDR1、V_HFR2、V_LCDR3 构成的从氨基端到羧基端为:V_HCDR1-V_HFR2-V_LCDR3 结构的短肽；或

是所述短肽的变构物；所述短肽的变构物指对所述短肽中构成 V_HCDR1 的 5 位氨基酸残基或构成 V_LCDR3 的 9 位氨基酸残基进行人工点突变获得的对所述靶标物上的特有物质保持识别能力的产物。

5．根据权利要求 4 所述的方法，所述免疫球蛋白可以是多个。例如，V_HCDR1-V_HFR2-V_LCDR3 中的 V_HCDR1 来源于一个免疫球蛋白，而 V_LCDR3 来源于另一个免疫球蛋白。

6．根据权利要求 3~5 任一所述的方法，所述免疫球蛋白是以靶标物上的特有物质为免疫

更正页(细则第 91 条)

原免疫动物而制备得到的。

7．根据权利要求 3~5 任一所述的方法，所述免疫球蛋白是以多种靶标物上共有的特有物质为免疫原免疫动物而制备得到的。

8．根据权利要求 3~5 任一所述的方法，所述免疫球蛋白是以靶标物上的多种特有物质分别作为免疫原免疫动物而制备得到的。

9．根据权利要求 1~8 任一所述的方法，

所述靶标物为以磷脂双分子膜为其细胞膜或包膜基本结构的病毒、原核细胞或真核细胞，所述药理作用指致死和／或致衰竭，

所述效应区域指可在磷脂双分子膜上形成离子通道或孔道的生物活性物质。

10．根据权利要求 9 所述的方法，所述效应区域指绿脓杆菌细菌素 Pyosin。

11．根据权利要求 9 所述的方法，所述效应区域指大肠菌素 E1、Ia、Ib 、A、 B 或 N：或

大肠菌素 E1、Ia、Ib 、A、 B 和／或 N 分子中可形成离子通道的结构域；或由大肠菌素分子 E1、Ia、Ib 、A、 B、N、大肠菌素分子 E1、Ia、Ib 、A、B 或 N 中可形成离子通道的结构域变构而得且具有在所述磷脂双分子膜上形成离子通道功能的分子。

12．根据权利要求 9 所述的方法，所述重组物为重组多肽，所述制备重组物指将编码所述重组多肽的基因转入到生物表达系统中表达融合蛋白，分离纯化融合蛋白物获得候选新型抗生素。

13．根据权利要求 12 所述的方法，所述表达系统指 *E.coli* B834（DE3）。

14．根据权利要求 1 所述的方法，所述药理作用指标记，所述效应区域指标记物，所述制备重组物指可操作地连接效应区域和识别区域。

15．一种制备新型抗生素的平台系统，包括 3 个相互配合的系统：（1）目标提出系统（2）设计系统和（3）实验室系统：

所述平台依据权利要求 1~14 任一所述的方法准备新型抗生素，所述目标提出系统确定开发目标，并对所述设计系统发出任务指令；

所述设计系统根据所述目标提出系统的任务指令以及所述结构通式，建立所述识别区域分子结构库、效应区域分子结构库并设计出所述重组物分子结构库，并将所述分子结构库提供给所述实验室系统，

所述实验室系统向设计系统提供实验结果，所述设计系统向市场系统汇报最终选出的作为开发成果的候选产品，

所述设计指基于收集的、选取的或制备的作为效应区域或识别区域的物质的分子结构进行结构调整、结构重组和／或结构确认的过程。

16．根据权利要求 15 所述的平台，所述实验室系统包括至少一家承包所述实验工作的第三方合作机构。