



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101804200 A

(43) 申请公布日 2010.08.18

- (21) 申请号 200910180019.8 A61K 38/16(2006.01)
- (22) 申请日 2003.11.21 A61K 38/47(2006.01)
- (30) 优先权数据 A61K 38/55(2006.01)
 - 60/428,535 2002.11.22 US A61K 47/48(2006.01)
 - 60/464,217 2003.04.19 US A61P 31/04(2006.01)
- (62) 分案原申请数据 A61P 31/12(2006.01)
 - 200380107241.6 2003.11.21 A61P 31/16(2006.01)
- (71) 申请人 余芒
- 地址 美国加利福尼亚州
- 申请人 房芳
- (72) 发明人 余芒 房芳
- (74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理
有限公司 11262
- 代理人 武晶晶 郑霞
- (51) Int. Cl.
- A61K 39/00(2006.01)

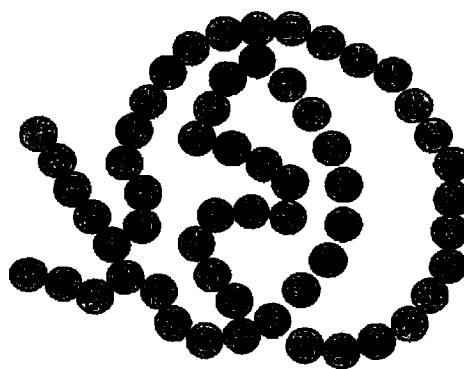
权利要求书 4 页 说明书 36 页 附图 3 页

(54) 发明名称

广谱抗病毒的治疗和预防

(57) 摘要

本发明提供了用于预防和治疗病原感染的新组合物和方法。特别是,本发明提供了化合物,该化合物具有一个将该化合物锚定至靶细胞表面的锚定域,和一个能在细胞外发挥作用以预防病原如病毒对靶细胞感染的治疗域。优选的靶细胞为上皮细胞。本发明提供了用于预防病毒疾病如流感的组合物和方法,使用了这样的化合物,该化合物具有能将连接的靶细胞结合至能在细胞外发挥用来影响靶细胞病毒感染的酶活性的锚定域。本发明也提供了用于预防病毒疾病如流感的组合物和方法,使用了这样的化合物,该化合物具有能将连接的靶细胞结合至能在细胞外发挥用来影响靶细胞病毒感染的蛋白酶抑制剂的锚定域。



1. 一种基于蛋白质的组合物,所述的组合物包含:
含一种肽或蛋白质的至少一个治疗域,其具有能预防病原对靶细胞感染的至少一种细胞外唾液酸酶或蛋白酶抑制剂活性;和
含一种肽或蛋白质的至少一个锚定域,其中,所述的锚定域能结合在或接近所述的靶细胞表面的糖胺聚糖。
2. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述的靶细胞为上皮细胞或内皮细胞。
3. 根据权利要求2所述的组合物,其中所述的靶细胞为上皮细胞。
4. 根据权利要求3所述的组合物,其中所述的上皮细胞是呼吸道上皮细胞、支气管上皮细胞或腺样上皮细胞。
5. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述的锚定域能结合肝素或硫酸乙酰肝素。
6. 根据权利要求5所述的组合物,其中所述的锚定域是一种肽。
7. 根据权利要求6所述的组合物,其中所述的锚定域的肽含有一种天然存在的蛋白质的一段糖胺聚糖结合氨基酸序列,或一段实质上同源于天然存在的蛋白质的糖胺聚糖结合氨基酸序列的序列。
8. 根据权利要求7所述的组合物,其中所述的锚定域的肽含有一种哺乳动物蛋白质的糖胺聚糖结合氨基酸序列。
9. 根据权利要求8所述的组合物,其中所述的锚定域的肽含有一种人蛋白质的糖胺聚糖结合氨基酸序列。
10. 根据权利要求9所述的组合物,其中所述的氨基酸序列包括人血小板因子4(SEQ ID NO :2)、人白介素8(SEQ ID NO :3)、人抗凝血酶III(SEQ ID NO :4)、人阿朴脂蛋白E(SEQ ID NO :5)、人血管相关迁移细胞蛋白(SEQ ID NO :6)或者人双调蛋白(SEQ ID NO :7)的糖胺聚糖结合氨基酸序列或其实质上同源的序列。
11. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述的病原是一种病毒。
12. 根据权利要求11所述的组合物,其中所述的病毒是一种流感病毒或一种副流感病毒。
13. 根据权利要求12所述的组合物,其中所述的病毒是一种流感病毒,所述的流感病毒是一种流感A型病毒或一种流感B型病毒。
14. 根据权利要求13所述的组合物,其中所述的至少一个治疗域含有一种蛋白酶抑制剂。
15. 根据权利要求14所述的组合物,其中所述的蛋白酶抑制剂抑制一种涉及加工病毒蛋白质的酶。
16. 根据权利要求15所述的组合物,其中所述的涉及加工病毒蛋白质的酶是一种宿主的酶。
17. 根据权利要求16所述的组合物,其中所述的蛋白酶抑制剂是一种丝氨酸蛋白酶抑制剂。
18. 根据权利要求17所述的组合物,其中所述的丝氨酸蛋白酶抑制剂是抑肽酶、亮抑酶肽、大豆蛋白酶抑制剂、e-氨基己酸或者n-对甲苯磺酰-L-赖氨酸。
19. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述的治疗域是唾液酸酶或者其活性部分,其中所述的活性部分保留唾液酸酶活性并且不含有全长的唾液酸酶。

20. 根据权利要求 19 所述的组合物,其中所述的唾液酸酶是或者是实质上同源至少一种病毒唾液酸酶、至少一种细菌唾液酸酶或者至少一种真核唾液酸酶。

21. 根据权利要求 20 所述的组合物,其中所述的唾液酸酶是或者是实质上同源至少一种细菌唾液酸酶。

22. 根据权利要求 21 所述的组合物,其中所述的唾液酸酶是或者是实质上同源能切割唾液酸 α 2-6 连接和唾液酸 α 2-3 连接的一种细菌唾液酸酶。

23. 根据权利要求 22 所述的组合物,其中所述的唾液酸酶是或者是实质上同源霍乱弧菌唾液酸酶、产气荚膜梭状芽孢杆菌唾液酸酶、粘性放线菌唾液酸酶或者 *Micromonospora viridifaciens* 唾液酸酶。

24. 根据权利要求 23 所述的组合物,其中所述的唾液酸酶是或者是实质上同源粘性放线菌唾液酸酶。

25. 根据权利要求 24 所述的组合物,其含有仅一种细菌唾液酸酶。

26. 根据权利要求 20 所述的组合物,其中所述的唾液酸酶是或者是实质上同源至少一种真核唾液酸酶。

27. 根据权利要求 26 所述的组合物,其中所述的唾液酸酶是或者是实质上同源至少一种人唾液酸酶。

28. 根据权利要求 27 所述的组合物,其中所述的唾液酸酶是或者是实质上同源 NEU1、NEU3、NEU2 或者 NEU4。

29. 根据权利要求 28 所述的组合物,其中所述的唾液酸酶是或者是实质上同源 NEU2 (SEQ ID NO :8) 或者 NEU4 (SEQ ID NO :9)。

30. 根据权利要求 1 所述的组合物,其进一步含有将所述的至少一个锚定域连接至所述的至少一个治疗域的至少一种肽连接子。

31. 根据权利要求 30 所述的组合物,其中所述的至少一种肽连接子含有至少一个甘氨酸残基。

32. 根据权利要求 31 所述的组合物,其中所述的至少一种肽连接子含有序列 (GGGS)_n,这里 n 是从 1 至 20 的一个整数。

33. 根据权利要求 1 所述的组合物,其含有仅一个锚定域。

34. 根据权利要求 33 所述的组合物,其中所述的锚定域是所述的至少一个治疗域的 N 末端。

35. 根据权利要求 33 所述的组合物,其中所述的锚定域是所述的至少一个治疗域的 C 末端。

36. 根据权利要求 1 所述的组合物,其含有至少两个锚定域。

37. 根据权利要求 36 所述的组合物,其中所述的锚定域中的至少一个是所述的治疗域的 N 末端,和所述的锚定域中的至少一个是所述的治疗域的 C 末端。

38. 根据权利要求 37 所述的组合物,其中所述的锚定域和所述的治疗域是用肽连接子连接的。

39. 根据权利要求 1 所述的组合物,其含有至少两个治疗域。

40. 一种药物制剂,其含有权利要求 1 所述的组合物。

41. 根据权利要求 40 所述的药物制剂,其被配制成喷剂、吸入剂、混悬液、用于注射的

溶液、用于口服施用的混悬液、药膏、凝胶、软膏剂、片剂、胶囊或锭剂。

42. 根据权利要求 1 所述的组合物在制备防止、预防或治疗流感感染的药物制剂中的用途。

43. 根据权利要求 42 所述的用途,其中所述的药物制剂在一种递送系统中。

44. 根据权利要求 43 所述的用途,其中所述的递送系统是喷雾器。

45. 根据权利要求 43 所述的用途,其中所述的递送系统是雾化器或滴瓶。

46. 根据权利要求 19 所述的组合物在制备防止、预防或治疗病原感染的药物制剂中的用途。

47. 根据权利要求 46 所述的用途,其中所述的组合物含有唾液酸酶,所述的唾液酸酶是或者是实质上同源至少一种病毒唾液酸酶、至少一种细菌唾液酸酶或者至少一种真核唾液酸酶。

48. 根据权利要求 47 所述的用途,其中所述的唾液酸酶是或者是实质上同源至少一种真核唾液酸酶。

49. 根据权利要求 48 所述的用途,其中所述的唾液酸酶是或者是实质上同源至少一种人唾液酸酶。

50. 根据权利要求 49 所述的用途,其中所述的唾液酸酶的编码基因是或者是实质上同源至少一种 NEU2 或者 NEU4 基因,并且编码是或者是实质上同源至少一种 SEQ ID NO :8 或者 SEQ ID NO :9 中所列的氨基酸序列的氨基酸序列。

51. 根据权利要求 46 所述的用途,其中所述的药物制剂在一种递送系统中。

52. 根据权利要求 51 所述的用途,其中所述的递送系统是喷雾器、雾化器或滴瓶。

53. 根据权利要求 47 所述的用途,其中所述的唾液酸酶是或者是实质上同源至少一种细菌唾液酸酶。

54. 根据权利要求 53 所述的用途,其中所述的细菌唾液酸酶选自霍乱弧菌唾液酸酶、产气荚膜梭状芽孢杆菌唾液酸酶、粘性放线菌唾液酸酶和 *Micromonospora viridifaciens* 唾液酸酶组成的组。

55. 根据权利要求 54 所述的用途,其中所述的细菌唾液酸酶是粘性放线菌唾液酸酶。

56. 根据权利要求 46 所述的用途,其中所述的病原是一种细菌。

57. 根据权利要求 46 所述的用途,其中所述的病原是一种病毒。

58. 根据权利要求 57 所述的用途,其中所述的病毒是副流感病毒或流感病毒。

59. 根据权利要求 46 所述的用途,其中受治疗者是人类受治疗者或动物受治疗者。

60. 根据权利要求 7 所述的组合物,其中所述的治疗域是或者是实质上同源至少一种人唾液酸酶,所述的人唾液酸酶的编码基因选自 NEU1、NEU3、NEU2 或 NEU4 基因;或者细菌唾液酸酶,所述的细菌唾液酸酶选自霍乱弧菌唾液酸酶、产气荚膜梭状芽孢杆菌唾液酸酶、粘性放线菌唾液酸酶和 *Micromonosporaviridifaciens* 唾液酸酶。

61. 根据权利要求 46 所述的用途,其中所述的靶细胞是上皮细胞或内皮细胞。

62. 根据权利要求 61 所述的用途,其中所述的靶细胞是上皮细胞。

63. 根据权利要求 62 所述的用途,其中所述的上皮细胞是呼吸道上皮细胞、腺样上皮细胞或支气管上皮细胞。

64. 一种递送系统,所述递送系统含有权利要求 40 所述的药物制剂。

65. 根据权利要求 64 所述的递送系统,所述的递送系统是喷雾器、雾化器或者滴瓶。
66. 根据权利要求 47 所述的用途,其中所述的唾液酸酶是或者是实质上同源于至少一种细菌唾液酸酶。
67. 根据权利要求 66 所述的用途,其中所述的细菌唾液酸酶选自由霍乱弧菌唾液酸酶、产气荚膜梭状芽孢杆菌唾液酸酶、粘性放线菌唾液酸酶和 *Micromonospora viridifaciens* 唾液酸酶组成的组。
68. 根据权利要求 67 所述的用途,其中所述的细菌唾液酸酶是粘性放线菌唾液酸酶。
69. 根据权利要求 46 所述的用途,其中所述的病原是一种细菌。
70. 根据权利要求 46 所述的用途,其中所述的病原是一种病毒。
71. 根据权利要求 70 所述的用途,其中所述的病毒是副流感病毒或流感病毒。
72. 根据权利要求 46 所述的用途,其中受治疗者是人类受治疗者或动物受治疗者。
73. 根据权利要求 7 所述的组合物,其中所述的治疗域是或者是实质上同源于人唾液酸酶,所述的人唾液酸酶的编码基因选自 NEU1、NEU3、NEU2 或 NEU4 基因;或者细菌唾液酸酶,所述的细菌唾液酸酶选自由霍乱弧菌唾液酸酶、产气荚膜梭状芽孢杆菌唾液酸酶、粘性放线菌唾液酸酶和 *Micromonosporaviridifaciens* 唾液酸酶。
74. 根据权利要求 46 所述的用途,其中所述的靶细胞是上皮细胞或内皮细胞。
75. 根据权利要求 74 所述的用途,其中所述的靶细胞是上皮细胞。
76. 根据权利要求 75 所述的用途,其中所述的上皮细胞是呼吸道上皮细胞、腺样上皮细胞或支气管上皮细胞。
77. 一种药物制剂,其包括唾液酸酶或者其活性部分,其中所述的活性部分保留酶活性并且不含有全长的酶。
78. 根据权利要求 77 所述的药物制剂,其被配制成喷剂、吸入剂、混悬液、用于注射的溶液、用于口服施用的溶液、用于滴眼剂的溶液、霜剂、药膏、凝胶、软膏剂、片剂、胶囊或锭剂。
79. 根据权利要求 77 所述的药物制剂,其中所述的唾液酸酶是一种真核唾液酸酶、一种细菌唾液酸酶或者一种病毒唾液酸酶或实质上与其同源的唾液酸酶。
80. 根据权利要求 79 所述的药物制剂,其中所述的唾液酸酶是一种真核唾液酸酶或者实质上同源于真核唾液酸酶。
81. 根据权利要求 79 所述的药物制剂,其中所述的唾液酸酶是一种细菌唾液酸酶或者实质上同源于细菌唾液酸酶。
82. 根据权利要求 81 所述的药物制剂,其中所述的细菌唾液酸酶选自由霍乱弧菌唾液酸酶、产气荚膜梭状芽孢杆菌唾液酸酶、粘性放线菌唾液酸酶和 *Micromonospora viridifaciens* 唾液酸酶组成的组。
83. 根据权利要求 82 所述的药物制剂,其中所述的细菌唾液酸酶是粘性放线菌唾液酸酶。
84. 一种递送系统,所述的递送系统含有权利要求 77 所述的药物制剂。
85. 根据权利要求 84 所述的递送系统,所述的递送系统是喷雾器、雾化器或者滴瓶。

广谱抗病毒的治疗和预防

[0001] 对相关申请的交互参考

[0002] 本申请要求下列申请的优先权：2002年11月22日提交的美国临时申请，申请号60/428,535，发明名称“广谱抗病毒的治疗和预防”，这里引入参考；和2003年4月19日提交的美国临时申请，申请号60/464,217，发明名称“一类广谱抗病毒蛋白质”，这里引入参考。

[0003] 发明背景

[0004] 发明的技术领域

[0005] 本发明涉及可用于预防和治疗人与动物个体病原感染的治疗组合物，而且特别是可用于预防和治疗病毒感染，例如预防和治疗流感性感染，基于蛋白质的治疗组合物。

[0006] 相关文献的描述

[0007] 流感是一种高传染性急性呼吸道疾病，从古时起即困扰人类。其特征是每年复发的流行病和周期性的、主要的全球性大流行病。由于该疾病相关的发病率和死亡率较高，流感对社会经济的直接和间接影响是巨大的。仅在美国，每年的流行病导致300,000人住院和25,000人死亡。上世纪爆发了四次大流行病；共导致数千万人死亡。基于早期大流行病经验的数学模型，预计在下一次大流行病期间将发生89,000-207,000人死亡，18-42百万人门诊病人就诊和20-47百万人患另外的疾病 (Meltzer, MI, Cox, NJ 和 Fukuda, K. (1999) *Emerg Infect Dis* 5:659-671)。

[0008] 流感主要由两种类型病毒，流感病毒A型和流感病毒B型（第三种类型的流感病毒C型只导致少数人的普通伤风样症状），感染而引起。它们属于RNA病毒的正粘病毒科。A型和B型病毒都具有封闭在源自宿主细胞的脂包封 (lipid envelope) 中的、8节段的负链RNA基因组。这种病毒包封被刺突覆盖，该刺突由三种类型的蛋白质组成：血凝素 (HA)，将病毒附着于宿主细胞受体和调节病毒的与细胞的膜融合；神经氨酸酶 (NA)，便于新病毒从宿主细胞中释放；以及少数的M2蛋白，用作离子通道。

[0009] 流感A型和B型病毒的感染主要始于上呼吸道粘膜表面。病毒复制主要被限于上呼吸道，但是能够延伸至下呼吸道，而且导致可致命的支气管肺炎。

[0010] 流感病毒的蛋白血凝素 (HA) 是主要的病毒包封蛋白。其在病毒感染中发挥着重要作用。HA的重要性已经被下列事实所证明，它是用于保护宿主免疫应答产生的中性抗体的主要靶 (Hayden, FG. (1996) *In Antiviral drug resistance* (主编 D. D. Richman), pp. 59-77. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd.)。现已明确，HA在病毒感染中具有两种不同的功能。首先，HA负责将病毒附着于唾液酸细胞受体。其次，HA通过刺激病毒包封与细胞膜融合来调节病毒进入靶细胞。

[0011] HA被合成为前体蛋白，HA0，其作为三聚体分子复合物从高尔基体被转移至细胞表面。HA0被进一步切割，产生HA1的C末端 (HA0的328残基) 和HA2的N末端。通常认为，切割发生在细胞表面或在被释放的病毒之上。对于HA结合至唾液酸受体而言，不需要HA0切割成HA1/HA2；但是，据认为，对于病毒的感染性而言还是必要的 (Klenk, HD 和 Rott, R. (1988) *Adv Vir Res.* 34:247-281; Kido, H, Niwa, Y, Beppu, Y 和 Towatari, T. (1996) *Advan*

Enzyme Regul 36 :325-347 ;Skehel, JJ and Wiley, DC. (2000)Annu Rev Biochem 69 : 531-569 ;Zambon, M. (2001)Rev Med Virol 11 :227-241.)

[0012] 目前,通过疫苗接种和抗病毒化合物来控制流感。灭活流感疫苗现已在全世界范围内使用,尤其用于高危人群。将疫苗病毒生长在能繁殖的母鸡卵中,通过化学手段灭活和纯化。疫苗通常是三价的,含有代表性的流感 A 型病毒 (H1N1 和 H3N2) 和流感 B 型病毒株。为了维持有效性,需要定期更新疫苗株;世界卫生组织 (WHO) 协调此工作。在洲际大流行病 (inter-pandemic) 期间,在更新的流感疫苗可以上市前通常需要 8 个月 (Wood, J. (2001) Phil Trans R Soc Lond B 356 :1953-1960)。尽管如此,从历史上看,在 6 个月内大流行病传播至大多数的洲,而且随着国际旅游的增加,预计未来大流行病传播得更快 (Gust, ID, Hampson, AW., 和 Lavanchy, D. (2001)Rev Med Virol 11 :59-70)。因此,不可避免的是,在未来大流行病的第一轮期间有效的疫苗将是得不到的或者非常短缺的。

[0013] 抗病毒化合物已经成为治疗洲际大流行性疾病主流。目前,在初始阶段当得不到疫苗时,它们也是唯一用于控制大流行病的有效选择。目前上市的有两类抗病毒化合物: M2 抑制剂,例如金刚烷胺和金刚乙胺;和 NA 抑制剂,其包括奥司他韦 (Tamiflu) 和扎那米韦 (Relenza)。两类分子都证明了在预防和治疗流感方面的有效性。但是,就作为化学预防 (chemoprophylaxis) 广泛地使用它们而言,副作用和产生抗药性病毒的风险仍然是两个主要的顾虑 (Hayden, FG. (1996) In Antiviral drug resistance (主编 D. D. Richman), pp. 59-77. Chichester, UK :John Wiley&Sons Ltd.)。最重要的是,未来大流行病毒株,既可能是自然进化的也可能是通过生物战争中遗传工程人造的,对所有可获得的抗病毒化合物有抗性,这将导致全球毁灭性后果。

[0014] 总之,目前可获得的疫苗免疫和抗病毒化合物都受限于一些基础性缺陷,需要新的治疗和预防形式来应对未来流感大流行病。

[0015] 发明概述

[0016] 本发明认识到用于预防和治疗病原感染的现有治疗常常是难于及时的提供,有副作用,以及导致抗药性病原株。

[0017] 本发明提供了预防和治疗病原感染的新组合物和方法。特别是,本发明提供了化合物,所述化合物具有将该化合物锚定至靶细胞表面的锚定域,和在细胞外发挥用来预防病原如病毒对靶细胞感染的治疗域。

[0018] 另一方面,本发明提供了一种用于预防或治疗病原感染的、基于蛋白质的组合物。所述的组合物包含一种化合物,该化合物包含至少一个含一种肽或蛋白质的治疗域,这里所述的治疗域具有至少一种能预防病原对靶细胞感染的细胞外活性,和至少一个可结合在或者接近靶细胞膜的锚定域。

[0019] 在本发明这方面的一些具体实施例中,所述至少一个治疗域包括预防或阻止病原对靶细胞感染的一种抑制活性。在优选的具体实施例中,所述的抑制活性抑制能加工靶细胞感染必需的病毒蛋白质的蛋白酶活性。在特别优选的具体实施例中,所述的化合物包括能抑制流感病毒的 HA 蛋白加工的治疗域,和能在呼吸道上皮细胞表面结合该化合物的锚定域。

[0020] 在本发明的一些具体实施例中,至少一个治疗域包括催化活性。在优选的具体实施例中,所述的催化活性从靶细胞表面除去靶细胞感染必需的部分。在特别优选的具体实

施例中,所述的治疗域是在上皮靶细胞表面上能消化唾液酸部分的唾液酸酶,以及所述的锚定域是在上皮细胞表面能结合肝素或者硫酸乙酰肝素部分的人蛋白质的 GAG- 结合域。

[0021] 另一个方面,本发明包括一种用于治疗或者预防病原在个体中感染的药物组合物。所述的药物组合物含有包含至少一个治疗域和至少一个锚定域的本发明化合物。所述的药物组合物还可含有溶液、稳定剂、填充剂及其他。在一些优选的具体实施例中,将所述的药物组合物制成吸入剂。在一些优选的具体实施例中,将该药物组合物制成鼻喷剂。

[0022] 另一方面,本发明包括一种治疗或者预防病原感染的方法。所述的方法包括将一种药学上有效量的本发明化合物应用于至少一种个体的靶细胞。通过使用喷剂或吸入剂,来应用所述的药物组合物。

附图说明

[0023] 图 1 是抑肽酶 (aprotinin) 主要的氨基酸示意描述。

[0024] 图 2 表示下列四种人类基因的 GAG- 结合序列:PF4,人血小板因子 4;IL8,人白介素 8;AT III,人抗凝血酶 III;ApoE,人阿朴脂蛋白 E;AAMP,人血管相关迁移细胞蛋白。

[0025] 图 3 表示的是人唾液酸酶 NEU2 和 NEU4 之间的序列比较。

[0026] 图 4 表示的是细菌和真菌唾液酸酶的底物特异性对比的表格。

[0027] 本发明的详细描述

[0028] 定义

[0029] 除另有定义外,这里使用的所用技术和科学术语具有如本发明所属技术领域的普通技术人员一般理解的含义。一般而言,这里使用的命名和下面描述的制造或实验步骤是本领域熟知的和经常使用的。这些步骤都是使用常规的方法,如本领域和各种一般参考文献规定的那些。当以单数规定术语时,本发明人也考虑到了该术语的复数。在引入作为参考的文献中使用的术语和定义存在歧义时,本申请中使用的术语将在这里给出定义。如在本公开通篇使用的,下列术语,除非另有说明,应当被理解为具有如下的含义:

[0030] 一种“病原”可以是能感染细胞的任何的病毒或微生物。一种病原可以是一种病毒、细菌或者原生虫。

[0031] 一种“靶细胞”是能被病原感染任何细胞。

[0032] 一种“能预防病原对靶细胞感染的细胞外活性”是指通过在或接近靶细胞表面外部起作用能阻碍或阻止病原对靶细胞感染的任何活性。所述的细胞外活性可以是如,但不限于,催化活性或者抑制性活性的一种活性。例如,催化活性可以是一种能破坏病原上、靶细胞上或者在靶细胞邻近内的一种或多种实体(如,但不限于,配体、受体或者酶)的酶活性,其中,所述的一种或多种实体有助于该感染过程。催化活性也可修饰病原上、靶细胞上或者在靶细胞邻近内的一种或多种实体,以致于该实体的促进感染性质被减少。抑制性活性可以是指这样的活性,例如,结合受体或配体和防止该受体和配体结合部分(moiety),其中,所述的结合是感染过程必需的或者促进感染过程。抑制性活性也可以是一种酶或者受体的抑制剂,所述的抑制剂防止该酶或受体发挥感染过程必需的或促进感染过程的作用。靶细胞的外部包括该靶细胞膜自身以及围绕靶细胞的细胞外围(extracellular milieu),包括细胞外基质、细胞内空间和细胞腔空间。就上皮细胞而言,靶细胞的外部还包括形成腔衬(luminal lining)的细胞膜的顶端或腔表面,和接近腔表面的细胞外围。一种“能预防

病原对靶细胞感染的细胞外活性”可以是任何类型化学实体,包括蛋白质、多肽、肽、核酸、肽核酸、核酸类似物、核苷、核苷类似物、小的有机分子、聚合物、脂类、甾体、脂肪酸、碳水化合物及其它,包括它们的任意组合。尽管如此,优选地,该活性包括一种肽或蛋白质或者被偶合到一种肽或蛋白质。

[0033] 一种“能锚定所述至少一个治疗域至靶细胞膜的域”,也称作“细胞外锚定域”或者简称,“锚定域”是指这样的化学实体,其能稳定地结合位于或在细胞表面外部上或者在细胞表面邻近内的部分。细胞外锚定域可以被可逆或不可逆地连接至一个或多个部分,如,优选地,一个或多个治疗域,和因此导致一个或多个被附着的治疗部分被保留在或者邻近真核细胞外表面。优选地,细胞外锚定域结合至少一种在靶细胞表面上的分子或者一种发现与靶细胞表面有密切相关的分子。例如,细胞外锚定域能共价或者非共价地结合与靶细胞的细胞膜相关的分子,或者结合存在于靶细胞周围细胞外基质的分子。细胞外锚定域优选地是一种肽、多肽或者蛋白质,而且也可含有任何另外类型的化合物实体,包括一种或多种另外的蛋白质、多肽或者肽、核酸、肽核酸、核酸类似物、核苷、核苷类似物、小的有机分子、聚合物、脂质、甾体、脂肪酸、碳水化合物,或者它们任意的组合。

[0034] 如这里所用的,当蛋白质或肽与参考序列相同,或者含有一个或多个氨基酸缺失、一个或多个另外的氨基酸或者一种或多种保持型 (conservative) 氨基酸取代,和保留与参考序列相同或基本相同的活性的时候,蛋白质或肽序列与参考序列是“实质同源的”。保持型取代可定义为下列五组中之一的互换:

[0035] I. 小的、脂肪族的、非极性或非极性残基 :Ala, Ser, Thr, Pro, Gly

[0036] II. 极性、带负电荷残基及其酰胺 :Asp, Asn, Glu, Gln

[0037] III. 极性、带正电荷残基 :His, Arg, Lys

[0038] IV. 大的、脂肪族非极性残基 :Met, Leu, Ile, Val, Cys

[0039] V. 大的芳香族残基 :Phe, Try, Trp

[0040] 在上述的各组中,下列的取代被认为是“高度保持型”:Asp/Glu, His/Arg/Lys, Phe/Tyr/Trp,和 Met/Leu/Ile/Val。半保持型取代定义为在上述 (I)-(IV) 两组之间的互换,限于包括上述 (I)、(II)、和 (III) 的大组 (A) 或者包括 (IV) 和 (V) 的大组 (B)。另外,在应用中指定为疏水性氨基酸,它们是指 Ala、Gly、Pro、Met、Leu、Ile、Val、Cys、Phe 和 Trp,而亲水性氨基酸是指 Ser、Thr、Asp、Asn、Glu、Gln、His、Arg、Lys 和 Tyr。

[0041] “唾液酸酶”是一种能从底物分子除去唾液酸残基的酶。唾液酸酶 (N-acetylneuraminosylglycohydrolases, EC 3.2.1.18) 是一组从唾液酸化糖缀合物 (sialo-glycoconjugates) 中水解除去唾液酸残基。

[0042] 唾液酸是具有 9 碳骨架的 α -酮酸,常见于附着于糖蛋白和糖脂的寡糖链的最外端。其中一个主要类型的唾液酸是 N-乙酰神经氨酸 (Neu5Ac),为大多数其它类型的生物合成前体。底物分子可以是,作为非限定性例子,寡糖、多糖、糖蛋白、神经节苷脂或者一种合成的分子。例如,唾液酸酶能切断在唾液酸残基和底物分子剩余部分之间具有 α (2, 3)-Gal、 α (2,6)-Gal 或者 α (2,8)-Gal 连接的键。唾液酸酶也能切断在唾液酸残基和该底物分子剩余部分之间的任何的或者所有的连接。在自然界中发现了在 Neu5Ac 与碳水化合物支链的次末端半乳糖残基之间两种主要的连接, Neu5Ac α (2,3)-Gal 和 Neu5Ac α (2,6)-Gal。Neu5Ac α (2,3)-Gal 和 Neu5Ac α (2,6)-Gal 分子都能被流感病毒认作受体,然

而人类的病毒似乎优选 Neu5Ac α (2,6)-Gal, 禽类和马科的病毒主要识别 Neu5Ac α (2,3)-Gal。唾液酸酶可以是天然唾液酸酶、(基因)工程唾液酸酶(例如,但不限于,具有基于天然唾液酸酶序列的氨基酸序列的唾液酸酶,包括与天然唾液酸酶序列是实质上同源的序列)。如这里所用的,“唾液酸酶”也可以是指天然唾液酸酶的活性部分,或者含有基于天然唾液酸酶活性部分序列的一种肽或蛋白质。

[0043] I 预防或者治疗病原感染的组合物

[0044] 本发明包括基于肽或者蛋白质的化合物,所述的化合物含有至少一个能将至少一个治疗域锚定至真核细胞膜的域,和至少一个具有预防病原感染细胞活性的治疗域。所述的“基于肽或者蛋白质”化合物,其含义为该化合物的两个主要域具有氨基酸构架,其中氨基酸是通过肽键连结的。一种基于肽或者蛋白质的化合物也可具有附着至该氨基酸构架或骨架的其它化学化合物或基团,包括有助于锚定域的锚定活性的部分、或者有助于预防感染活性或治疗域的部分。例如,本发明的基于蛋白质的治疗剂可含有化合物和分子如但不限于:碳水化合物、脂肪酸、脂质、甾体、核苷、核苷类似物、核酸分子、核酸类似物、肽核酸分子、小的有机分子或者聚合物。本发明的基于蛋白质的治疗剂也可含有修饰的或者非天然氨基酸。所述化合物的非氨基酸部分可用作任何目的,包括但不限于:便于该化合物的纯化,改善溶解度或分配或者该化合物(如在治疗制剂中),该化合物的域连接或者将化学部分连接至该化合物,有助于该化合物二维或者三维结构,增加该化合物总的大小,提高该化合物的稳定性,以及有助于该化合物锚定活性或治疗活性。

[0045] 本发明基于肽或者蛋白质的化合物,除了含有锚定域或治疗域的那些序列外,也可包括蛋白质或者肽序列。所述另外的蛋白质序列可用于任何目的,包括但不限于上面概括的任何目的(便于该化合物的纯化,改善溶解度或分配或者该化合物,该化合物的连接域或者将化学部分连接至该化合物,有助于该化合物二维或者三维结构,增加该化合物总的大小,提高该化合物的稳定性,或者有助于该化合物锚定活性或治疗活性)。优选地,任何另外的蛋白质或氨基酸序列是包括锚定域(或域)和治疗域(或域)的单一多肽或蛋白质链的部分,但是蛋白质序列任何可行的排列在本发明的范围内。

[0046] 能以任何合适的方式排列所述的锚定域和治疗域,允许该化合物结合在或者接近靶细胞膜,以便于该治疗域能发挥预防或者阻止病原对靶细胞感染的细胞外活性。所述化合物优选地具有至少一个基于蛋白质或肽的锚定域和至少一个基于肽或蛋白质的治疗域。在此情况下,可以沿着肽骨架以任何顺序、线性地排列该域。该锚定域可以是治疗域的N末端、或者可以是治疗域的C末端。也可能的是,具有一个或多个治疗域在每个末端被至少一个锚定域侧接。换言之,一个或多个锚定域可以被至少一个治疗域在每个末端侧接。可任选使用化学的优选肽的连接子连结化合物一些或全部的该域。

[0047] 也可能的是,具有以非线性、分支排列的域。例如,治疗域可以被附着于氨基酸的衍生侧链,该氨基酸是多肽链的部分,也包括或者被连接至锚定域。

[0048] 本发明的化合物可具有一种以上的锚定域。在化合物具有一种以上锚定域的情况下,该锚定域可以是相同的或不同的。本发明的化合物可具有一种以上的治疗域。在化合物具有一种以上治疗域的情况下,该治疗域可以是相同的或不同的。当化合物含有多个锚定域时,该锚定域被(使用或者没使用连接子)串联排列,或者被排列在其它域如治疗域的对侧。当化合物含有多个治疗域时,该治疗域被(使用或者没使用连接子)串联排列,

或者被排列在其它域如,但不限于,锚定域的交替侧面。

[0049] 本发明的基于肽或蛋白质的化合物可以任何适宜的方式制备,包括纯化天然蛋白质,任选地蛋白水解切断该蛋白质以获得所需的功能域,以及将该功能域缀合至其它功能域。肽也可以化学合成,和任选地化学缀合至其它的肽或化学部分。尽管如此,优选地,本发明的基于肽或蛋白质的化合物是通过(遗传)工程核酸构建将至少一种锚定域和至少一种治疗域共同(使用或者不使用核酸连接子)编码在一个连续多肽中制备的。该核酸构建,优选具有适宜表达序列的,可以转染至原核或真核细胞,而且基于蛋白质治疗化合物可以通过细胞表达和纯化。任何想得到的化合物部分都可以在纯化后缀合到基于肽或蛋白质的化合物。在有些情况下,可以选择细胞系来表达基于蛋白质的治疗,能够进行满意的后转译修饰(post-translational modifications)(例如,但不限于糖基化)。

[0050] 可以设计大量的构建,以及检验它们的蛋白质产品的期待活性(如,例如,锚定域的结合活性,或者治疗域的结合、催化或抑制活性)。也可以检测核酸构建的蛋白质产品在预防或阻止病原对靶细胞感染方面的有效性。在现有技术中,已知病原感染体外和体内的检验,如在流感病毒感染的实施例中描述的那些。

[0051] 锚定域

[0052] 如这里所用的,“细胞外锚定域”或“锚定域”是指任何的能稳定地结合位于或在靶细胞外表面上或者邻近靶细胞外表面的实体。锚定域用于保持本发明化合物位于或接近靶细胞的外表面。

[0053] 细胞外锚定域优选地结合 1) 表达在靶细胞表面上的分子,或者表达在靶细胞表面上分子的残基、域或表位,2) 附着至表达在靶细胞表面上分子的化学实体,或者 3) 靶细胞周围的细胞外基质的分子。

[0054] 锚定域优选地为肽或蛋白质的域(包括修饰的或衍生的肽或者蛋白质的域),或者包含偶连至肽或蛋白质的部分。偶连至肽或蛋白质的部分可以是任何类型的能有助于锚定域结合至位于或接近靶细胞表面的分子,而且优选地是有机分子,如,例如核酸、肽核酸、核酸类似物、核苷、核苷类似物、小的有机分子、聚合物、脂质、甾体、脂肪酸、碳水化合物,或者它们的任意组合。

[0055] 通过锚定域结合的分子、复合物、域或表位对靶细胞可以是或者不是特异性的。例如,锚定域可结合存在于分子上之上或在靶细胞邻近表位,以及在位点而不是靶细胞附近发生的表位。在许多情况下,尽管如此,本发明治疗化合物的局部化传输限制其主要出现在靶细胞表面。在其它情况下,锚定域结合的分子、复合物、部分、域或者表位对靶组织或靶细胞类型可以是特异性的。

[0056] 靶组织或靶细胞包括动物或人体内病原侵入或扩增的位点。例如,靶细胞可以是能被病原感染的上皮细胞。本发明的组合物可以含有治疗域,该治疗域能结合细胞表面的表位,例如对上皮细胞类型是特异性的表位。在另一个例子中,靶细胞可以是一种上皮细胞,而且本发明的组合物可以结合存在于许多类型上皮细胞的细胞表面上的表位,或者存在于不同类型上皮细胞的细胞外基质中表位。在这种情况下,该组合物的局部化传输可限制其定位于病原靶的上皮细胞的位点。

[0057] 一种用于预防或治疗病原感染的化合物可以含有能结合位于或接近上皮细胞表面的锚定域。例如,硫酸类肝素,与肝素密切相关,是一类糖胺聚糖(GAG),其普遍地存在于

细胞膜上,包括呼吸道上皮的表面。许多蛋白质特异性地结合到硫酸肝素 / 类肝素上,而且在这些蛋白质中的 GAG- 结合序列已经被鉴定 (Meyer, FA, King, M 和 Gelman, RA. (1975) *Biochimica et Biophysica Acta* 392 :223-232 ;Schauer, S. 等, pp233. 唾液酸化学、代谢和功能。Springer-Verlag, 1982)。例如,人血小板因子 (PF4) 的 GAG- 结合序列 (SEQ ID NO :2)、人白介素 (IL8) (SEQ ID NO :3)、人抗凝血酶 III (AT III) (SEQ ID NO :4)、人阿朴脂蛋白 E (ApoE) (SEQ ID NO :5)、人血管相关迁移细胞蛋白 (AAMP) (SEQ ID NO :6) 或者人双调蛋白 (SEQ ID NO :7) (附图 2) 都表现出对肝素具有极高的亲合性 (在毫微摩尔的范围内) (Lee, MK 和 Lander, AD. (1991) *Pro Natl Acad Sci USA* 88 :2768-2772 ;Goger, B, Halden, Y, Rek, A, Mosl, R, Pye, D. Gallagher, J 和 Kungl, AJ. (2002) *Biochem.* 41 :1640-1646 ;Witt, DP 和 Lander AD (1994) *Curr Bio* 4 :394-400 ;Weisgraber, KH, Rall, SC, Mahley, RW, Milne, RW 和 Marcel, Y. (1986) *J Bio Chem* 261 :2068-2076)。这些蛋白质的 GAG- 结合序列不同于它们受体结合的序列,因此它们就不能诱导与全长的蛋白质或受体结合域有关的生物活性。这些序列,或者已经或将来鉴定为硫酸肝素 / 类肝素结合序列的,或者实质上同源于一已鉴定的硫酸肝素 / 类肝素结合序列并且具有硫酸肝素 / 类肝素结合活性的其它序列,可以在本发明的化合物中用作上皮 - 锚定 - 域,可用于预防或治疗,例如,呼吸道上皮 - 感染病毒如,但不限于,流感病毒。

[0058] 锚定域能结合对某一特定种类的靶细胞类型为特异性的部分,或者能结合在一种以上种类的靶细胞类型中发现的部分。当锚定域能结合在一种以上种类的靶细胞表面存在的部分,而且病毒或病原能感染一种以上种类的时候,治疗化合物对一种以上的种类有效 (如果该治疗域对所有的相关种类也有效。) 例如,如果治疗化合物能用作抗流感病毒、本发明的治疗化合物具有结合硫酸肝素 / 类肝素的锚定域,该化合物能用于哺乳动物 (包括人) 以及禽类。

[0059] 治疗域

[0060] 本发明的化合物包括至少一种具有能预防或阻止病原对细胞感染的细胞外活性的治疗域。该治疗活性可以是,非限定性举例,结合活性、催化活性或者抑制性活性。在本发明的一些具体实施例中,该治疗活性发挥作用,来修饰或抑制有助于病原对细胞感染性的该病原功能。在其它的具体实施例中,治疗域能修饰或抑制该靶细胞或靶有机体的功能。

[0061] 例如,该治疗域能结合靶细胞上的、病原结合至靶细胞所必需的受体。通过这种方式,该治疗部分能阻滞病原结合至靶细胞和预防感染。换言之,治疗域也能结合病原上的分子或表位来预防感染所必需的、该分子或表位与靶细胞的相互作用。治疗域也具有催化活性,降解允许或促进宿主对靶细胞感染的该病原或宿主的分子或者表位。在其它的具体实施例中,治疗域可以是病原对靶细胞感染所必需活性的抑制剂。该抑制的活性可以是该宿主有机体的或病原的活性。

[0062] 该治疗域优选地在细胞外发挥作用,含义为其预防感染活性发生在靶细胞表面或在靶细胞周围的中间地区内,包括在细胞外基质、细胞内空间或组织内腔空间内的位点。

[0063] 治疗域优选地是一种肽或蛋白质域 (包括修饰或衍生的肽或蛋白质域),或者含有偶联至一种肽或蛋白质的部分。偶联至一种肽或蛋白质的部分可以是任何类型的、能预防或阻止病原对靶细胞感染的分子并且优选地使有机分子,如,例如,核酸、肽核酸、核酸类似物、核苷、核苷类似物、小的有机分子、聚合物、脂质、甾体、脂肪酸、碳水化合物,或者它们

的任意组合。

[0064] 治疗域可以是一种合成的肽或多肽,或者可以含有能缀合至肽或多肽的合成的分子,可以是一种天然的肽或蛋白质,或者天然蛋白质的域。治疗域也可以是一种与天然肽或蛋白质实质上同源的肽或蛋白质。

[0065] 治疗域可用于特定种类中,或者可预防和阻止在一个以上种类中的病原感染。例如,抑制病原功能的治疗域通常可用于广泛的能被宿主感染的种类中,而通过干扰该宿主的所有物来阻断宿主-病原相互作用的治疗域,可以是或者可以不是种类-特异性的。在许多情况下,锚定域和治疗域在一种以上的品种中可以是有效的,所以本发明的化合物可用于发展人类和动物的健康,同时,减少通过动物宿主的病毒繁殖和传播。例如,当该治疗域为唾液酸酶时,能切断唾液酸残基与底物分子剩余部分之间一种以上连接类型的唾液酸酶,特别是,能切断 $\alpha(2,6)$ -Gal 与 $\alpha(2,3)$ -Gal 之间连接的唾液酸酶,能保护人类免于广谱流感病毒的感染,该病毒包括自然宿主在不同种类如鸟、猪或者马中的病毒。

[0066] 连接子

[0067] 本发明的化合物可任选包括能连结该化合物域的一种或多种连接子。连接子可用于提供化合物域的优化间隔或折叠。连接子连结的化合物的域可以是治疗域、锚定域或者任何其它的域或能提供额外功能如增加化合物稳定性、易于纯化等的该化合物残基。用于连结本发明化合物域的连接子可以是化学连接子或者氨基酸或肽连接子。当化合物含有一种以上连接子时,该连接子可以是相同的或不同的。当化合物含有一种以上连接子时,该连接子可以是相同长度的或不同的长度的。

[0068] 各种组合物的许多化学连接子、极性、反应性、长度、弹性以及可切断性在有机化学的现有技术中都是已知的。本发明优选的连接子包括氨基酸或肽连接子。在现有技术中肽连接子是熟知的。优选的连接子是长度为 1 至 100 个之间的氨基酸,特别地优选长度为 1 至 30 个之间的氨基酸,尽管如此,长度却不是对本发明化合物连接子的限制。优选地,连接子含有不影响本发明单体编码的肽或蛋白质的构象和活性。一些本发明优选的连接子是那些包括甘氨酸的。例如,具有序列:(GGGGS(SEQ ID NO:10)) n ,这里 n 是 1 至 20 间的整数,或更优选 1 至 12 间的连接子,可用于连接本发明治疗化合物的域。

[0069] 含有至少一个锚定域和至少一个蛋白酶抑制剂的组合物

[0070] 在本发明的一些方面,具有能预防病原对细胞感染细胞外活性的治疗域是蛋白酶抑制剂。该蛋白酶抑制剂可以是任何类型化学实体,如,例如,一种碳水化合物或聚合物,但优选的是抑制酶活性的一种蛋白质或肽。优选地,该蛋白酶抑制剂抑制至少部分加工至少一种病原或宿主细胞蛋白的酶活性,这里,该病原或宿主细胞蛋白的这种加工对于病原感染性来说是必需的。能加工病原感染性必需的病毒蛋白的酶,可以是一种病原酶,或源自宿主有机体的一种酶。优选地,该加工酶发挥作用于或者接近靶细胞表面,因此,被锚定在或接近靶细胞表面的本发明化合物,能有效地抑制该酶的活性。

[0071] 含有蛋白酶抑制域的本发明化合物可用于抑制任何病原的感染,所述的病原在其生命周期中需要一种蛋白酶,其中,该蛋白酶位于或接近宿主细胞表面是活性的。这些基于蛋白质的组合物可具有,例如,其中一个下列的结构:

[0072] (锚定域) n -连接子-(蛋白酶抑制剂) n ($n = 1, 2, 3$, 或者更大)

[0073] 或者:

[0074] (蛋白酶抑制剂) n -连接子-(锚定域) n ($n = 1, 2, 3$, 或者更大)

[0075] 该蛋白酶抑制剂可以是一种肽或多肽的单体形式, 或者可以是直接或之间具有间隔序列连接的同样多肽的多倍(体)。作为一种选择, 不同的基于多肽的蛋白酶抑制剂可互相连接, 如, 例如, 用大豆蛋白酶抑制剂连接的抑肽酶用作蛋白酶抑制功能的域。该多肽或肽可以被直接或者通过含有肽连接子序列的间隔片(spacer)连接。该锚定域可以是能结合在或者接近靶细胞表面的任何肽或多肽。

[0076] 该蛋白酶抑制剂可以是一种天然的蛋白酶抑制剂(或者其活性部分)或者可以是一种(遗传)工程的蛋白酶抑制剂。用在本发明化合物中的一种蛋白酶抑制剂可以具有实质上同源天然蛋白酶的序列, 当保持天然蛋白酶抑制剂活性或实质上保持相同活性时, 具有一个或多个缺失、加成或取代。

[0077] 在本发明的一个优选的具体实施例中, 本发明的治疗化合物是用于人流感的预防和治疗, 和该治疗域是一种能抑制丝氨酸蛋白酶的蛋白质或肽的蛋白酶抑制剂, 该丝氨酸蛋白酶能将流感病毒的血凝素前体蛋白 HAO 切成 HA1 和 HA2。

[0078] 现已表明, 许多丝氨酸蛋白酶抑制剂在培养细胞中、在鸡卵中和在感染小鼠的肺中减少 HA 切割以及流感病毒活性。它们包括许多常用胰蛋白酶抑制剂, 如: 抑肽酶(Zhirnov OP, Ikizler MR 和 Wright PF. (2002) J Virol 76 :8682-8689), 亮抑肽酶(Zhirnov OP, Ikizler MR 和 Wright PF. (2002) J Virol 76 :8682-8689; Tashiro M, Klenk HD 和 Rott R. (1987) J Gen Virol 68 :2039-2043), 大豆蛋白酶抑制剂(Barbey-Morel CL, Oeltmann TN, Edwards KM 和 Wright PF. (1987) J Infect Dis 155 :667-672), ϵ -氨基己酸(Zhirnov OP, Ovcharenko AV 和 Bukrinskaya AG. 1982. Arch Virol 73 :263-272) 和 n -对甲苯磺酰-L-赖氨酸氯甲基酮(TLCK)(Barbey-Morel CL, Oeltmann TN, Edwards KM 和 Wright PF. (1987) J Infect Dis 155 :667-672)。其中, 抑肽酶气雾吸入剂在小鼠(Zhirnov OP, Ovcharenko AV 和 Bukrinskaya AG. (1984) J Gen Virol 65 :191-196; Zhirnov OP, Ovcharenko AV 和 Bukrinskaya AG. (1985) J Gen Virol 66 :1633-1638; Zhimov OP. (1987) J Med Virol 21 :161-167; Ovcharenko AV 和 Zhirnov OP. (1994) Antiviral Res 23 :107-118) 以及人(Zhirnov OP. (1983) Problems Virol. 4 :9-12(俄文)) 抗流感和副流感支气管肺炎方面已表现出确切的治疗作用。

[0079] 抑肽酶(SEQ ID NO :1; 附图 1) 是 58 个氨基酸的多肽抑制剂(也称作 Trasylol 或牛胰蛋白酶抑制剂(BPTI))。本发明的化合物可具有一个或多个抑肽酶的域; 例如, 本发明的治疗组合物可具有从 1 个至 6 个抑肽酶多肽, 更优选从 1 个至 3 个抑肽酶多肽。本发明的化合物也可具有含实质上同源抑肽酶氨基酸序列的多肽或肽的一种治疗域。

[0080] 用于预防或治疗流感的、含有蛋白酶抑制剂的化合物, 优选地, 包含一种能结合在或接近上皮细胞表面的锚定域。在一些优选的具体实施例中, 该上皮锚定域是一种来自人蛋白质的 GAG- 结合序列, 如, 例如, 人血小板因子 4(PF4)(SEQ ID NO :2)、人白介素 8(IL8)(SEQ ID NO :3)、人抗凝血酶 III(ATIII)(SEQ ID NO :4)、人阿扑脂蛋白 E(ApoE)(SEQ ID NO :5)、人血管相关迁移细胞蛋白(AAMP)(SEQ ID NO :6) 的 GAG- 结合序列或者人双调蛋白(SEQ ID NO :7)(附图 7)。本发明的化合物也可具有包含一个多肽或肽的锚定域, 该多肽或肽具有实质上同源在 SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6 和 SEQ ID NO :7 中列出的 GAG 结合域的氨基酸序列。

[0081] 临床上,含有抑肽酶和一种上皮锚定域的药品可通过气雾吸入的方式给药,覆盖整个呼吸道来预防和治疗在其生命周期内需要丝氨酸蛋白酶的流感病毒或者任何其它的病毒如副流感病毒引起的支气管肺炎。作为一种选择,一种抑肽酶/上皮锚定域融合蛋白可通过鼻喷剂给药,来治疗非并发的早期流感病例或呼吸道病毒的其它感染。另外,抑肽酶/上皮锚定域融合蛋白可用于感染发生前流感或其它病毒感染的预防。

[0082] 含有至少一种锚定域和至少一种催化活性的组合物

[0083] 在本发明的一些方面中,具有能预防病原对细胞感染的细胞外活性的治疗域是一种催化的活性。这种酶活性可以是一种催化的活性,其除去、破坏或修饰有助于病原感染性的一种宿主分子或复合物或者一种病原分子或复合物。优选地,通过本发明化合物的这种酶活性来除去、破坏或修饰的该种宿主分子或复合物或者该种病原分子或复合物是在靶细胞表面之上、位于或接近靶细胞表面,这样,被锚定至靶细胞表面的本发明化合物能有效地抑制该宿主或病原分子或者复合物。

[0084] 例如,治疗域可具有能消化病原或者靶细胞的分子或表位的催化活性,该分子或表位是宿主-病原结合以及该病原随后进入靶细胞所必需的。在靶细胞上允许病毒进入细胞的受体可以是本发明化合物的一种酶活性的靶。

[0085] 含有催化域的本发明化合物可用于抑制任何病原的感染,该病原利用受体进入靶细胞,条件是除去该受体不妨碍该有机体。这些基于蛋白质的组合物可具有,例如,其中一个下列的结构:

[0086] (锚定域) n -连接子-(酶活性) n ($n = 1, 2, 3$, 或者更大)

[0087] 或者:

[0088] (酶活性) n -连接子-(锚定域) n ($n = 1, 2, 3$, 或者更大),这里连接子是任选的。

[0089] 这种酶的活性可以是一种肽或多肽的单体形式,或者可以是直接或之间具有间隔序列连接的同样多肽的多倍(体)。该多肽或肽可以被直接或者通过含有肽连接子序列的间隔片连接。该锚定域可以是能结合至或者接近靶细胞表面的任何肽或多肽。作为一种选择,不同的基于多肽的蛋白酶抑制剂可互相连接,如,例如,用大豆蛋白酶抑制剂连接的抑肽酶用作蛋白酶抑制功能的域。

[0090] 在本发明一个优选的具体实施例中,治疗域含有一种唾液酸酶,该唾液酸酶能消除或大量地降低在上皮细胞表面的唾液酸水平。唾液酸是流感病毒的一种受体。因此,用唾液酸酶处理呼吸道上皮细胞的表面能预防流感感染或阻断早期感染。该治疗域可以包含一个完整的唾液酸酶蛋白,或者其活性部分。使用现有技术中已知的以及在实施例中描述的方法,可以检测组合物在切断唾液酸残基和减少流感病毒对靶细胞感染方面的有效性。

[0091] 优选的唾液酸酶是能破坏受体唾液酸 Neu5Ac α (2,6)-Gal 和 Neu5Ac α (2,3)-Gal 的较大的细菌唾液酸酶。例如,可以使用源自产气荚膜梭状芽孢杆菌 (*Clostridium perfringens*) (Genbank 登录号 X87369)、粘性放线菌 (*Actinomyces viscosus*) (Genbank 登录号 X62276)、*Arthrobacter ureafaciens* 或 *Micromonospora viridifaciens* (Genbank 登录号 D01045) 的细菌唾液酸酶的酶。本发明化合物的治疗域可以含有全部的或部分的较大细菌唾液酸酶的氨基酸序列,或者可以含有实质上与全部的或部分的较大细菌唾液酸酶的氨基酸序列是同源的氨基酸序列。其它优选的唾液酸酶是人唾液酸酶如下列基因编码的那些唾液酸酶:NEU2 (SEQ ID NO:8; Genbank 登录号 Y16535; Monti, E, Preti, Rossi, E.,

Ballabio, A 和 Borsani G. (1999) *Genomics* 57 :137-143) 和 NEU4 (SEQ ID NO :9 ;Genbank 登录号 NM080741 ;Monti, E, Preti, A, Venerando, B 和 Borsani, G. (2002) *Neurochem Res* 27 :646-663) (附图 3)。本发明化合物的治疗域可以含有全部的或部分的人唾液酸酶的氨基酸序列, 或者可以含有实质上与全部的或部分的人唾液酸酶的氨基酸序列是同源的氨基酸序列。优选地, 当治疗域含有天然唾液酸酶的或者与其氨基酸序列实质上同源的一部分氨基酸序列时, 该部分含有如人唾液酸酶的基本相同的活性。用于预防或治疗流感的、含有一种酶域的化合物, 优选地包含能结合在或接近上皮细胞表面的一种锚定域。在一些优选的具体实施例中, 这种上皮-锚定域是一种 GAG-结合序列, 源自人蛋白, 如, 例如, 人血小板因子 4 (PF4) (SEQ ID NO :2)、人白介素 8 (IL8) (SEQ ID NO :3)、人抗凝血酶 III (ATIII) (SEQ ID NO :4)、人阿朴脂蛋白 E (ApoE) (SEQ ID NO :5)、人血管相关迁移细胞蛋白 (AAMP) (SEQ ID NO :6) 的 GAG-结合氨基酸序列和人双调蛋白 (SEQ ID NO :7) (附图 2)。上皮锚定域也可以是实质上同源天然 GAG-结合序列, 如附图 2 中列出的那些。

[0092] 含有人唾液酸酶、或者含有实质上同源于人唾液酸酶的唾液酸酶的化合物, 在缺少锚定域的情况下, 用于治疗 and 预防病原感染如但不限于流感、副粘性病毒、冠状病毒、轮状病毒和铜绿假单胞菌感染, 这些也都属于本发明的范围内。本发明认识到, 通过使用唾液酸酶, 如但不限于人唾液酸酶如 NEU2 和 NEU4, 可以预防或减少这种感染。遗传或化学工程或者药学的制剂, 使得该唾液酸酶可任意地适应于改善其半衰期或在呼吸道上皮的保持性。

[0093] 因为流感病毒首先感染上呼吸道, 所以除去分布在鼻腔和鼻咽区内的受体唾液酸酶就可以预防感染或者阻断早期感染。该唾液酸酶可以随着鼻喷剂传输至上呼吸道, 而且可用于流感 (或其他感染) 早期的治疗模式中或者感染发生之前的预防模式中。作为一种选择, 它可随着吸入剂传输至下呼吸道, 来治疗流感和预防流感并发症如支气管肺炎。

[0094] II 药物组合物

[0095] 本发明包括制成药物组合物的化合物。该药物组合物含有制备用于储备和优选后来用药目的、药学上可接受的载体, 其在药学上可接受的载体或稀释剂中含有药学上有效量的该化合物。在药学的现有技术中, 治疗用的可接受的载体或稀释剂都是熟知的, 而且是有描述的, 例如, Remington 的《制药学》18 版, Mack 出版公司, Easton 市, 宾夕法尼亚州 (1990 年)。在该药物组合物中可以规定有防腐剂、稳定剂、染料及其芳香剂。例如, 可以加入苯甲酸钠、山梨酸和对羟基苯甲酸酯作防腐剂。另外, 也可使用抗氧化剂和助悬剂。

[0096] 根据靶细胞的情况, 本发明的化合物可以制成并作为下列剂型来使用: 片剂、胶囊剂或口服给药的酞剂; 局部应用的药膏或软膏; 用于直肠给药的栓剂; 用作吸入或鼻喷的无菌溶液剂、混悬剂及其类似剂型。也可将注射剂制成常规的形式如液体溶液或混悬剂、在注射前为适合溶解的固体形式或液体混悬剂、或者乳剂。适合的赋形剂为, 例如, 水、盐水、葡萄糖、甘露醇、乳糖、卵磷脂、白蛋白、谷氨酸钠、盐酸半胱氨酸及类似物。另外, 如需要, 该可注射的药物组合物可以含有少量的无毒性辅助物质如润湿剂、pH 缓冲剂及类似物。

[0097] 根据剂量要求的、检验化合物的药学上有效量将依赖于给药途径、治疗动物或患者的类型以及考虑到的特定动物的身体特点。为了取得理想效果, 剂量可进行修整但是将依赖于这些因素如体重、饮食、共同用药以及那些医学领域的技术人员认识到的其他因素。在实施本发明的方法时, 该药物组合物可单独或与另一种组合、或者与其他的治疗或诊断

剂组合使用。这些产品可用于体内,优选地用于哺乳动物,优选地用于人,或者体外。在体内使用这些产品时,可以各种方式对患者给药,包括局部的、非胃肠道的、静脉的、皮下的、肌肉内的、结肠的、直肠的、鼻腔的或者腹膜内的方式,同时使用各种剂型。这些方法也可用于检验检测化合物在体内的活性。

[0098] 在优选的具体实施例中,这些药物组合物可以是以下列形式:可口服给药的混悬剂、片剂;鼻喷剂;或吸入剂。

[0099] 当作为混悬剂口服给药时,根据药物制剂现有技术中熟知的技术制备本发明的组合物,而且该组合物可含有用作填充剂的微晶纤维素、用作助悬剂的藻酸或藻酸钠、用作增稠剂的甲基纤维素以及现有技术中已知的甜味剂/芳香剂。作为即释性片剂,这些组合物可含有微晶纤维素、磷酸二钙、淀粉、硬脂酸镁以及乳糖和/或现有技术已知的其它赋形剂、粘合剂、填充剂、崩解剂、稀释剂以及润滑剂。在漱口水或漱洗的制剂中成份包括抗菌剂、表面活性剂、共表面活性剂 (consurfactants)、油、水和其它的现有技术已知的添加剂如甜味剂/芳香剂。

[0100] 当通过饮用溶液给药时,该组合物含有一种或多种本发明的化合物,溶解在水中,具有适宜的 pH 调节以及载体。该化合物可以溶解于蒸馏水、自来水、矿泉水以及类似物中。优选地,将 pH 调节至约 3.5 和约 8.5 之间。可以添加甜味剂例如 1% (w/v) 蔗糖。

[0101] 可以根据美国专利号 3,439,089,这里为此目的而引入作参考,制备锭剂 (lozenges)。

[0102] 当通过鼻腔气雾剂或吸入剂给药时,根据药物制剂现有技术中熟知的技术制备该药物组合物,并且可制备成含盐水的溶液,同时使用了苯醇或者现有技术已知的其它合适的防腐剂、提高生物利用度的助吸收剂、氟碳化合物和/或其它增溶或分散剂。参见,例如, H. C. Ansel 等,《药物剂型和传输系统》,第六版。(1995年)。优选地,用合适的、无毒的、药学上可接受的成份制备这些组合物和制剂。对于那些在鼻用剂型和 Remington 的《制药学》,18 版, Mack 出版公司, Easton 市,宾夕法尼亚州 (1990 年)——该领域的标准参考书中可发现的一些(剂型)的制备方面熟悉的技术人员来说,这些成份是已知的。适合载体的选择主要取决于所需鼻用剂型(例如溶液剂、混悬剂、软膏或凝胶)的准确性质。通常,鼻用剂型除了活性成份外含有大量的水。也可含有少量的其它成份如 pH 调节剂、乳化剂或分散剂、防腐剂、表面活性剂、凝结剂、或者缓冲剂以及其它的稳定剂和助溶剂。优选地,该鼻用剂型应当与鼻腔分泌物是等渗的。

[0103] 鼻用制剂可以滴剂、喷雾剂、气雾剂或者任何其它鼻腔内的剂型来给药。任选地,该传输系统可以是单位剂量传输系统。每一剂量传输的溶液或混悬剂体积可以是优选地从约 5 至约 2000 毫升之间,更优选地从约 10 至约 1000 毫升之间,和更加优选地从约 50 至约 500 毫升之间的任一值。用于这些各种剂型的传输系统可以是以单位剂量或多剂量包装的滴瓶、塑料挤压装置、喷雾器、雾化器或者药用气雾剂。

[0104] 本发明的制剂可以是变化的,包括 (1) 调节 pH 值的其它酸和碱;(2) 其它的增渗剂如山梨醇、甘油和葡萄糖;(3) 其它抗菌防腐剂如其它的对羟基苯甲酸酯、山梨酸盐、苯甲酸盐、丙酸盐、三氯丁醇、苯乙醇、苯扎氯铵和汞制剂;(4) 其它增稠剂如羧甲基纤维素钠、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇和其它的树胶;(5) 适合的助吸收剂;(6) 稳定剂如抗氧化剂、类酸式亚硫酸盐和抗坏血酸盐,金属络合剂如依地酸钠和药物增溶剂如聚

乙二醇。

[0105] III. 预防或治疗病原感染的方法

[0106] 本发明也包括预防或治疗病原感染的方法。该方法包括：用本发明的组合物治疗病原感染的或者有病原感染风险的个体，该组合物含有这样的化合物，该化合物含有至少一种能锚定该化合物在或接近靶细胞表面的锚定域和至少一种含肽或蛋白质的治疗域，所述的肽或蛋白质具有至少一种能预防病原对靶细胞感染的细胞外活性。被治疗的个体可以是动物或人。

[0107] 本发明的化合物可以设计为人用或者动物用。在本发明的一些方面中，本发明的化合物可用于预防在一类动物如哺乳类动物中的病原感染。在本发明的一些方面中，组合物可用于人用和动物用（尽管制剂可以不同）。在这些方面中，化合物的活性域可以有效地抵抗一种以上的病原种类、型、亚型（subtype）或株，而且可以在一种以上的宿主种类中是活性的。例如，一些优选的本发明化合物可用于鸟类、哺乳动物或人，所述的化合物含有例如活性域如预防流感病毒的 HA 蛋白加工的蛋白酶抑制剂、或者从靶细胞除去唾液酸受体的唾液酸酶、或者锚定域如结合硫酸类肝素或肝素。这些化合物也能用于人，来抗击被天然宿主于其它种类的病原感染，该化合物可有效地抵抗具有感染不同宿主种类能力的广泛的病原。

[0108] 在一些本发明优选的具体实施例中，该药物组合物预防流感感染，并将治疗有效量的该药物组合物应用于个体的呼吸道上皮细胞。这可以通过使用吸入器或者使用鼻喷器来实现。优选地，每天使用一至四次该吸入器或鼻喷器。

[0109] 剂量

[0110] 对于本领域的技术人员来说是非常显然的，在体内有用的给药剂量和特定的给药模式将根据被治疗患者的年龄、体重和类型、使用的特定药物组合物以及该药物组合物的特定用途而变化。本领域的技术人员利用上述的常规方法可以完成有效剂量水平即达到预期结果必需剂量水平的确定。在非人类的动物研究中，开始时以高剂量水平应用该药物组合物，降低剂量，直至不再达到预期效果或者副作用减少或消失。本发明化合物的剂量范围广泛，取决于预期的效果、治疗的适应症、给药途径以及该化合物的纯度和活性。典型地，产品的人临床应用开始时以较低的剂量，剂量水平升高，直至达到预期的效果。作为一种选择地，可接受的体外试验可用于建立该检验化合物的有用的剂量和给药途径。典型地，剂量可以是约 1ng/kg 至约 10mg/kg 之间，优选约 10ng/kg 至约 1mg/kg 之间，更优选约 100ng/kg 至约 100 μg/kg 之间。

[0111] 单独的医生视患者的情况可选择正确的制剂、给药途径和剂量（参见，Fingle 等，治疗的药理学基础（1975 年））。应当注意的是，主治医生须知道由于毒性、器官功能障碍或者其它的副作用如何和何时终止、中断或调节给药。相反地，如果临床响应不足，该主治医生也应当知道将治疗调节至较高水平。在感兴趣的疾病管理方面，给药剂量的大小随着被治疗状况的严重程度和给药的途径而变化。例如，通过标准预后评价方法，可部分地评价该状况的严重程度。进一步地，剂量和可能的剂量频率也可根据年龄、体重和个体患者的响应而变化，包括用于兽药应用的那些情况。

[0112] 因此，根据本发明，进一步地提供了一种检测方法和一种用于治疗流感病毒感染和预防流感病毒的药物组合物。该治疗涉及向需要此种治疗的患者给予一种药物载体和一

种治疗有效量的本发明的任一组合、或者其药学上可接受的盐。

[0113] 在一个优选的方案中,通过鼻喷剂或口服锭剂,给予每个患者合适的剂量。尽管如此,应当理解为,用于任何特定患者的特定剂量和剂量频率可以是变化的,而且取决于各种因素,包括特定盐或其它使用形式的活性、该化合物代谢的稳定性和作用的时间长短、年龄、体重、总健康状况、性别、饮食、给药时间和模式、排泄速度、药物组合、特定状况的严重程度以及经历治疗的宿主。

实施例

[0114] 实施例 1 合成抑肽酶基因、纯化和检测抑肽酶融合蛋白

[0115] 简介

[0116] 流感病毒蛋白血凝素 (HA) 是主要的包封蛋白。其在病毒感染中发挥着重要作用。HA 的重要性已经被下列事实所证明,它是主要的靶,用于保护宿主免疫反应产生的中性抗体 (Hayden, FG. (1996) In Antiviral drugresistance (主编 D. D. Richman), pp. 59-77. Chichester, UK :John Wiley&SonsLtd.)。现已明确,HA 在病毒感染中具有两种不同的功能。首先,HA 负责将病毒附着至唾液酸细胞受体。其次,HA 通过刺激病毒包膜与细胞膜融合来调节病毒进入靶细胞。

[0117] HA 被合成为前体蛋白,HA0,其作为三聚体分子复合物通过高尔基体被转移至细胞表面。HA0 被进一步分裂,产生 HA1 的 C 末端 (HA0 的 328 残基) 和 HA2 的 N 末端。通常认为,分裂发生在细胞表面或在释放的病毒上。HA0 分裂成 HA1/HA2 不需要 HA 结合到唾液酸受体;但是,对于病毒的感染性而言这还是非常重要的 (Klenk,HD 和 Rott,R. (1988) AdvVir Res. 34 :247-281 ;Kido, H, Niwa, Y, Beppu, Y 和 Towatari, T. (1996) Advan Enzyme Regul 36 :325-347 ;Skehel, JJ 和 Wiley, DC. (2000) AnnuRev Biochem 69 :531-569)。

[0118] HA0 对宿主蛋白酶的敏感性由在 HA0 分子的外环内的蛋白水解位点确定。该蛋白水解位点可包含单个 Arg 或 Lys 残基 (单碱基切割位点) 或者在 R-X-K/R-R 基元 (motif) 中的几个 Lys 和 / 或 Arg 残基 (多碱基切割位点)。只有流感病毒 A 型的亚型 H5 和 H7 具有带有多碱基切割位点的 HA 蛋白。其它的所有流感病毒 A 型、B 型和 C 型都含有带有单碱基切割位点的 HA 蛋白。具有多碱基切割位点的流感病毒 A 型致病性更强,并且在宿主中诱导系统感染,而带有单碱基 HA 位点的病毒只是在哺乳动物的呼吸道内或者禽类的呼吸道和肠道内开始感染 (Klenk,HD 和 Garten W. 1994. Trend Micro 2 :39-43 for review)。幸运的是,高致病性的、带有多碱基切割位点的禽流感 A 型的 H5 和 H7 亚型导致的人感染,迄今仅发生在少数的病例中,而且这些病例主要是在香港发现的。绝大多数的流感感染是由具有在单碱基切割位点切割的 HA 蛋白的病毒引起的。

[0119] 包含多碱基切割位点的流感病毒 HA 亚型 5 和 7 是由弗林蛋白酶 (furin) 即枯草杆菌蛋白酶样内源蛋白酶或者前体蛋白质转化酶家族的成员活化的。弗林蛋白酶在细胞内切割该病毒,而且普遍地存在于许多细胞类型之中,使得高致病性、系统性感染与这些病毒同时可见 (Klenk,HD 和 Garten W. 1994. Trend Micro 2 :39-43 ;Nakayama, K. 1997. Biochem 327 :625-635)。

[0120] 其它所有的流感病毒,即具有带有单碱基切割位点 HAs 的,是由分泌的、胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶活化的。已包含在流感病毒活化中的酶包括:血浆酶 (Lazarowitz SG,

Goldberg AR 和 Choppin PW. 1973. *Virology* 56 :172-180), 小型 - 血浆酶 (Murakami M, Towatari T, Ohuchi M, Shiota M, Akao M, Okumura Y, Parry MA 和 Kido H. (2001) *Eur J Biochem* 268 :2847-2855), 类胰蛋白酶 Clara (Kido H, Chen Y 和 Murakami M. (1999) *InB. Dunn* (主编), *Proteases of infectious agents*. p. 205-217, Academic Press, New York, N. Y), 激肽释放酶, 尿激酶, 凝血酶 (Scheiblaue H, Reinacher M, Tashiro M 和 Rott R. (1992) *J Infect Dis* 166 :783-791), 凝血因子 Xa (Gotoh B, Ogasawara T, Toyoda T, Inocencio N, Hamaguchi M 和 Nagai Y. (1990) *EMBO J* 9 :4189-4195), 精子顶体酶 (Garten W, Bosch FX, Linder D, Rott R 和 Klenk HD. (1981) *Virology* 115 :361-374.), 源自人呼吸道灌洗的蛋白酶 (Barbey-Morel CL, Oeltmann TN, Edwards KM 和 Wright PF. (1987) *J Infect Dis* 155 :667-672), 和源自金黄色葡萄球菌的细菌蛋白酶 (Tashiro M, Ciborowski P, Reinacher M, Pulverer G, Klenk HD 和 Rott R. (1987) *Virology* 157 :421-430), 和铜绿假单胞菌 (Callan RJ, Hartmann FA, West SE 和 Hinshaw VS. (1997) *J Virol* 71 :7579-7585)。通常认为, 宿主丝氨酸蛋白酶对流感病毒的活化发生在细胞外, 或者位于质膜, 或者病毒从细胞释放之后。

[0121] 抑肽酶, 亦称作 Trasylo1 或牛胰蛋白酶抑制剂 (BPTI), 是具有 58 个氨基酸的多肽抑制剂。其属于 Kunitz 类型抑制剂家族, 并且竞争性地抑制广谱地丝氨酸蛋白酶, 包括胰蛋白酶、糜蛋白酶、血浆酶和血浆激肽释放酶。抑肽酶作为人的治疗剂已很长时间了, 如治疗胰腺炎、休克综合症的各种情形、高纤溶出血 (hyperfibrinolytic haemorrhage) 和心肌梗塞。其也可用于心脏手术, 包括体外循环术, 以减少失血 (Fritz H 和 Wunderer G. (1983) *Arzneim-Forsch* 33 :479-494)。

[0122] 通过多年的临床应用, 已经详细地记录了抑肽酶在人的安全性。另外, 抑肽酶显然是一种非常弱的免疫原, 因为迄今为止尚未发现抑肽酶特异性抗体 (Fritz H 和 Wunderer G. (1983) *Arzneim-Forsch* 33 :479-494)。抑肽酶作为药物候选的另一个理想的特性是其超稳定性。可在室温将其保存至少 18 个月而活性没有任何损失 (Fritz H and Wunderer G. (1983) *Arzneim-Forsch* 33 :479-494)。

[0123] 为了在已经进行的动物研究中取得显著的病毒抑制, 高剂量给予抑肽酶。例如, 每天将 280 μ g 至 840 μ g 的抑肽酶腹膜内注射给每个小鼠, 共 6 天 (Zhirnov OP, Ovcharenko AV 和 Bukrinskaya AG. (1984) *J Gen Virol* 65 :191-196); 对于气雾剂吸入则需要较低的剂量, 也是每天给予每个小鼠 63-126 μ g, 共 6 天 (Ovcharenko AV 和 Zhirnov OP. (1994) *Antiviral Res* 23 :107-118)。基于从小鼠的数据外推, 人会需要很高剂量的抑肽酶。因此, 为了在人中取得较好的疗效, 抑肽酶分子的效力需要显著地改进。

[0124] 通过竞争性抑制主要在宿主呼吸道上皮细胞表面上地丝氨酸蛋白酶, 抑肽酶发挥作用。在宿主蛋白酶邻近内, 抑肽酶的局部浓度因此成为了决定抑肽酶竞争优势的关键因素。我们使用了两种协同运作方法, 来增强抑肽酶在呼吸道上皮表面上的竞争优势。

[0125] 首先, 通过连接子连接, 制备由两个、三个或更多的抑肽酶蛋白组成的多价抑肽酶融合蛋白, 提高抑肽酶的亲合力 (功能亲合力)。这样的分子能以多价的方式结合至膜蛋白酶, 这比抑肽酶单体具有显著的动力学优势。单体抑肽酶非常紧密地结合至牛胰蛋白酶, 其解离常数 (K_i) 为 6.0×10^{-14} mol/l。尽管如此, 与已经包含在流感病毒活化中其它蛋白酶如糜蛋白酶、血浆酶和激肽释放酶相比较其亲合力还比较低的, K_i 位于 10^{-8} 至 10^{-9} mol/l 水平

(Fritz H and Wunderer G. (1983) *Arzneim-Forsch* 33 :479-494)。多聚化可以呈指数级地提高抑肽酶对这些蛋白酶的亲合力。

[0126] 其次,我们将一种呼吸道上皮锚定域与抑肽酶融合。该锚定域将抑肽酶局限于宿主膜相关的蛋白酶的附近,并且维持在上皮表面上抑肽酶的局部高浓度。该锚定域也增加药物在呼吸道上皮上保留的时间。

[0127] 克隆

[0128] 抑肽酶是一个具有 58 个氨基酸、3 个链内二硫键的单链多肽 (SEQ ID NO :1)。抑肽酶的氨基酸序列表示在附图 1 中。通过使用寡核苷酸与用于大肠杆菌表达为模板的优化密码子重叠的 PCR,合成编码抑肽酶的基因和抑肽酶融合蛋白酶。将该 PCR 产物克隆至 pCR2.1-TOPO 载体 (Invitrogen)。排序后,将该基因亚克隆至一种表达载体 pQE (Qiagen)。该载体带有纯化标签 Hisx6,使得该重组蛋白质易于纯化。该构建可用于转换大肠杆菌。根据标准方案,用 IPTG 将在 LB- 氨苄西林媒介中生长的转换细胞诱导至中等对数阶段 (mid-log phase)。通过超声降解法,细胞在磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 中被丸状化和溶化。使用镍填充柱 (Qiagen) 纯化具有 Hisx6 纯化标签的酶。

[0129] 制备下列的抑肽酶融合蛋白:

[0130] 1. 二聚和三聚的抑肽酶. 通过柔性连接子 (flexible linker) 将两个或三个抑肽酶基因连接,构建如下:

[0131] 抑肽酶-(GGGGS (SEQ ID NO :10))_n (n = 3,4 或 5)-抑肽酶;

[0132] 和

[0133] 抑肽酶-(GGGGS (SEQ ID NO :10))_n (n = 3,4 或 5)-抑肽酶-(GGGGS (SEQ ID NO :10))_n (n = 3,4 或 5)-抑肽酶

[0134] 该连接子序列的长度可决定多聚抑肽酶的三维柔性,也因此影响该分子的功能亲合力。于是,制备了具有不同长度连接子的构建。

[0135] 全功能重组单体抑肽酶已经在大肠杆菌中生产出来 (Auerswald EA, Horlein D, Reinhardt G, Schroder W 和 Schnabel E. (1988). *Biol Chem Hoppe-Seyler* Vol 369, Suppl., pp27-35)。因此,我们期望在大肠杆菌细胞中得到适当倍数的多价抑肽酶蛋白。除了在各种常用的如 BL21、JM83 等大肠杆菌细胞株中表达蛋白质,多价抑肽酶蛋白质也可表达在 Origami™ 细胞 (Novagen, Bad Soden, 德国) 中。Origami™ 细胞株没有硫氧还蛋白和谷胱甘肽还原酶,因此具有氧化性细胞质。已经用这种细胞株成功地表达许多含有二硫键的蛋白质 (Bessette PH, Aslund F, Beckwith J 和 Georgiou G. (1999) *Pro Natl Acad Sci USA* 96 :13703-13708 ; Venturi M, Seifert C 和 Hunte C. (2001) *J Mol Biol* 315 :1-8.)。

[0136] 2. 上皮细胞锚定抑肽酶.

[0137] 将上皮细胞锚定序列与抑肽酶融合。该上皮锚定序列可以是任何的对上皮细胞表面具有亲合力的肽或者多肽。我们选择了三种人 GAG 结合序列: PF4 (氨基酸 47-70 ; SEQ ID NO :2)、IL-8 (氨基酸 46-72 ; SEQ ID NO :3) 和 AT III (氨基酸 118-151 ; SEQ ID NO :4) (附图 2)。这些序列以毫微摩尔水平亲合力结合至类肝素 / 肝素硫酸盐 (表 1)。类肝素 / 肝素硫酸盐普遍地存在于呼吸道上皮上。在单独的构建中, GAG 结合序列与抑肽酶基因通过一个通用连接子序列 GGGGS 在 N 末端上和 C 末端上融合,构建如下:

[0138] (GAG 域 -GGGGS (SEQ ID NO :10)-抑肽酶); 和

[0139] (抑肽酶 -GGGS(SEQ ID NO:10)-GAG 域)

[0140] 表 1 对肝素的亲合力

	蛋白质	Kd nM	(参照)
	PF4	27	(44)
[0141]	IL-8	<5	(43)
	ATIII	11	(42)
	ApoE	620	(45)

[0142] 光度测定的胰蛋白酶抑制检验

[0143] 抑肽酶和抑肽酶融合蛋白的胰蛋白酶抑制活性通过以前详细描述的光度测定检验来测量 (Fritz H and Wunderer G. (1983) *Arzneim-Forsch* 33:479-494)。概括地说,在本检验中,抑肽酶抑制胰蛋白酶催化的 Na- 苯甲酰 -L- 精氨酸 - 对硝基酰替苯胺 (BzArgpNA 或者 L-BAPA) (Sigma 公司) 的水解, L-BAPA 的光度测定是在 405nm。一个胰蛋白酶单位 (U_{BAPA}) 对应于每分钟水解 1 微摩尔底物。一个抑制剂单位 (IU_{BAPA}) 降低两个胰蛋白酶单位活性的 50%, 即相当于算术上抑制 $1U_{BAPA}$ 的胰蛋白酶。抑肽酶的这种特异性活性是以 IU_{BAPA}/mg 多肽表示的。

[0144] 表面等离子体谐振检验

[0145] 使用表面等离子体谐振检验, 或 BIAcore 分析 (BIAcore, 皮斯卡塔韦, 新泽西州) 用人血浆酶作为靶, 来比较二聚和三聚抑肽酶与各种连接子相对于单体抑肽酶的亲合力。同样地, 用肝素作为靶的 BIAcore 检验用于分析 GAG 结合抑肽酶融合蛋白与肝素之间的亲合力。

[0146] 当血浆酶用作靶时, 根据制造商的说明书 (BIAcore, 皮斯卡塔韦, 新泽西州), 将纯化的人血浆酶 (Sigma) 固定在 CM5 芯片。当肝素为靶时, 生物素化白蛋白和白蛋白 - 肝素 (Sigma) 被捕获在包被链酶亲合素地 BIAcore SA 芯片上, 如以前文献描述的 (Xiang Y 和 Moss B. (2003) *J Virol* 77:2623-2630)。

[0147] 实施例 2: 建立用于研究流感病毒感染的改进的组织培养模型。

[0148] 流感病毒备料

[0149] 流感病毒株获得来自于 ATCC (美国菌种保藏中心) 和位于圣朱迪儿童研究医院贮藏室。所有涉及流感病毒的实验都是在生物安全水平 II 级条件下进行的。

[0150] 通过注射至九天大的小鸡胚胎中, 繁殖病毒, 如 (Zhirnov OP, Ovcharenko AV 和 Bukrinskaya AG. (1985) *J Gen Virol* 66:1633-1638) 所描述的。作为一种选择地, 将病毒备料生长在最低要求培养基 (MEM) 中的考克斯班尼犬肾脏 (MDCK) 细胞上, 该培养基每毫升还补充了 0.3% 牛血清白蛋白和 0.5 微克的胰蛋白酶。在孵化 48 至 72 小时后, 使用低速离心机将培养基分离。用超声离心法并通过 25% 蔗糖垫将病毒颗粒小球化。将纯化病毒悬浮液 50% 甘油 -0.1M Tris 缓冲液, 并储藏于 -20°C。

[0151] 空斑检验

[0152] 通过两种空斑检验, 一种传统的和一种改进的 (Tobita, K, Sugiura, A, Enomoto, C

和 Furuyama, M. (1975) *Med Microbiol Immunol* 162 :9-14 ; Zhirnov OP, Ovcharenko AV 和 Bukrinskaya AG. (1982) *Arch Virol* 71 :177-183), 来测定病毒备料的感染性和滴度。该传统空斑检验通常用作病毒滴定方法。其要求是, 在病毒感染至 MDCK 单层之后, 将外源的胰蛋白酶迅速地加入琼脂覆层 (Tobita, K, Sugiura, A, Enomoto, C 和 Furuyama, M. (1975) *Med Microbiol Immunol* 162 :9-14)。可以通过活化具有未切割 HA 的所有病毒检测到, 这种方法人为地增加了病毒备料的感染性。

[0153] Zhirnov 等设计了一种改进的空斑检验, 包括一个双琼脂覆层, 在感染 24 小时后, 将胰蛋白酶加入到第二层 (Zhirnov OP, Ovcharenko AV 和 Bukrinskaya AG. (1982) *Arch Virol* 71 :177-183)。在感染三天后, 用 10% 的甲醛溶液稳定细胞, 除去琼脂糖层, 用苏木素 - 伊红溶液染色稳定化细胞, 以及空斑计数。改进的空斑检验可以准确地测定含有切割和未切割 HA 病毒备料的真实感染性。将从传统和改进空斑检验的结果相组合, 就可区分含有切割或未切割 HA 的病毒, 并且病毒备料的感染性与 HA 切割的状态相关。

[0154] 人细胞培养模型

[0155] 1. 原生的人上皮细胞的短期培养基

[0156] 传统的体外流感病毒感染多数是在 MDCK 细胞中完成, 将外源的胰蛋白酶加入到培养基。这绝非生理学的, 而且不适合这里提出的工作, 原因是胰蛋白酶不是活化体内流感病毒的蛋白酶。迄今为止, 已报道非常有限数量的没有外源蛋白酶而能支持流感病毒生长的体外组织培养基模型, 那些都是原生培养基, 具有肾来源的灵长类细胞、内衬胚胎卵尿囊腔和羊膜腔细胞, 胎儿气管环器官培养以及原生的人腺样上皮细胞 (Endo Y, Carroll KN, Ikizler MR 和 Wright PF. (1996) *J Virol* 70 :2055-2058)。其中, 最近关于原生的人腺样上皮细胞的工作是最接近人的条件的。在这个工作中, Endo 等 (Endo Y, Carroll KN, Ikizler MR 和 Wright PF. (1996) *J Virol* 70 :2055-2058) 从人腺样的手术样品中分离到上皮细胞, 并将该上皮细胞培养在 Transwell 嵌入物 (Costar, Cambridge, Mass) 内的胶原基质 (Vitrogen 100, Celtrix Laboratories, Palo Alto, California) 上。将细胞维持在 50% 的 Ham' sF12 和补充了生长因子和微量元素的 50% Eagles 最低要求培养基。该细胞在 10 至 14 天内达到汇合 (confluency), 大部分是以单层保留, 但是带有离散的纤毛细胞片, 在达到汇合后将维持常规的纤毛活性 1 至 3 周。在这个系统中, 流感 A 型病毒生长至 106PFU/ml 滴度, 具有 0.001 的感染复数 (multiplicity of infection) (Endo Y, Carroll KN, Ikizler MR 和 Wright PF. (1996) *J Virol* 70 :2055-2058)。在感染期间, 也存在进行性细胞致病作用。这个系统的缺点是它需要新鲜的腺样组织。

[0157] 为了解决这个问题, 用商业上可得到的、原生的人气管上皮细胞 (Cambrex) 代替原生的人腺样上皮细胞, 而且在同样的条件下生长这些细胞。原生的人气管上皮细胞的短期培养基可相对较快地建立, 而且作为用于大多数体外感染和抗病毒实验的一线实验模式是有用的。

[0158] 2. 分化良好的人气管上皮 (WD-HAE)

[0159] 为了最佳地模拟人气管的体内条件, 使用分化良好的人气管上皮 (WD-HAE)。WD-HAE 是覆层上皮, 具有正常的人气管上皮的所有分化细胞, 包括功能纤毛细胞和粘液分泌细胞。因此, 在这个模型系统中, 流感病毒最大的可能是被生理上相关的宿主蛋白酶活化。尽管已经广泛地使用 WD-HAE 以研究呼吸道病毒感染如呼吸道合胞病毒 (RSV) Zhang L,

Peeples ME, Boucher RC, Collins PL 和 Pickles RJ. (2002) *J Virol* 76 :5654-5666) 麻疹病毒 (Sinn PL, Williams G, Vongpunsawad S, Cattaneo R 和 McCray PB. (2002) *J Virol* 76 :2403-2409), 或人鼻病毒, 但是之前没有用它来研究流感病毒。

[0160] WD-HAE 的详细方案已经在此前被描述了 (Krunkosky TM, Fischer BM, Martin LD, Jones N, Akley NJ 和 Adler KB. (2000) *Am J Respir Cell Mol Biol* 22 :685-692)。概括地说, 商业上的原生的人支气管上皮细胞 (Cambrex) 被培养在 Transwell-clear 培养嵌入物 (Coster) 上, 该嵌入物用鼠尾胶原 (rat-tail collagen) I 薄薄地包被着。最初的 5 至 7 天, 将细胞培养浸在含支气管上皮细胞生长媒介 (BEGM) (Cambrex) 与带有高浓度葡萄糖的、补充了生长因子的 DMEM1:1 的混合物的媒介中 (Krunkosky TM, Fischer BM, Martin LD, Jones N, Akley NJ 和 Adler KB. (2000) *Am J Respir Cell Mol Biol* 22 :685-692)。当培养是 70% 汇合 (5 至 7 天) 时, 通过除去顶部的媒介产生气-液界面, 并将细胞只暴露于在它们基础表面上的媒介。气-液界面中再培养细胞 14 天, 总共培养 21 天, 就准备好了用于实验的细胞。分化的上皮可在体外维持数周。

[0161] 在常规的组织学中记载了上皮形态和分化程度 (Endo Y, Carroll KN, Ikizler MR 和 Wright PF. (1996) *J Viro* 170 :2055-2058)。概括地说, 在用 10% 缓冲甲醛溶液稳定化后, 将该上皮细胞植入石蜡, 切开, 用苏木糖和伊红染色, 和使用过碘酸-Schiff 氏染色用于粘液分泌细胞。

[0162] 通过加入 MOI 值为 0.001 至 1 的病毒至分化细胞, 在上面的两个模型系统中完成流感感染。在上清液中病毒滴度和感染性延续 3 至 7 天的周期。使用传统的和改进的空斑检验来评价流感病毒扩增的水平和流感病毒的感染性。

[0163] 实施例 3: 体外比较抑肽酶融合蛋白功能

[0164] 抑肽酶融合蛋白的抗病毒作用

[0165] 1. 感染前的处理

[0166] 将抑肽酶融合蛋白加入各种浓度的原生的人细胞培养基, 和这些细胞孵化 1 小时。用新鲜的媒介冲洗细胞, 然后立刻与 MOI 至 0.01 至 1 的流感病毒孵化。1 小时后, 再次冲洗细胞, 然后培养 3 至 5 天。

[0167] 在各个时间点, 用两种空斑检验法来测定上清液中病毒的滴度和感染性。用结晶紫染色活细胞, 来评价病毒感染导致的细胞病理作用, 和在实验尾声测定在 570nm 处吸收, 来进行定量。以 $100 \times \{(\text{抑肽酶处理的样品} - \text{未处理感染的样品}) / (\text{未感染对照} - \text{未处理的感染的样品})\}$ 来计算抑肽酶融合蛋白保护细胞的百分比。药物细胞保护功效是通过达到 50% 细胞保护 (EC_{50}) 的其作用浓度来描述的。由于 HA 活化仅发生于新释放的病毒颗粒, 病毒感染的首轮正常地发生, 而且病毒滴度在感染后的最初 24 小时内上升。尽管如此, 从第二轮起, 抑肽酶的治疗结果是, 病毒的感染性降低而且病毒滴度逐渐下降。这个实验结果通过在单一预防性处理中的功效来区分各种类型的不同抑肽酶融合蛋白。作为一种选择的, 开始病毒孵化的时间从抑肽酶处理后的立刻到 2-24 小时的后处理是变化的。如上所述, 在感染之后 3-5 天, 测定病毒滴度、感染性和细胞病理作用。这些实验的结果通过单一预防性处理之后有效窗口的长度来区别各种抑肽酶融合蛋白。

[0168] 2. 感染后的处理 对于多剂量的处理, 细胞通过在 0.001 至 0.1 MOI 值病毒接种 (viral inoculations) 1 小时被最初感染。然后, 立刻加入各种浓度的抑肽酶融合蛋白, 在

感染后的最初 48 小时期间以 8 小时的间隔应用另外的处理。在整个过程中,跟踪在媒介里的病毒滴度和感染性。在实验尾声时评价细胞病理作用。

[0169] 对于单一剂量的处理,细胞通过在 0.001 至 0.1MOI 值病毒接种 1 小时被最初感染。在感染后的最初 48 小时期间,在不同的时间点应用各种浓度的抑肽酶融合蛋白的治疗,但是,在整个实验过程中,每一个细胞样品仅接受一种处理。培养细胞直至 7 天感染后。在整个过程中,跟踪在媒介里的病毒滴度和感染性。在实验尾声时评价细胞病理作用。这些实验的结果区分不同类型的抑肽酶融合蛋白的治疗效力。

[0170] 用抑肽酶融合蛋白抑制 HA 切割

[0171] 为了证实抑肽酶融合蛋白通过抑制流感 HA 蛋白切割来抑制流感病毒的感染,将人原生上皮细胞培养基用 MOI 值为 1 的流感病毒来感染。可在病毒接种前或者在病毒感染后立刻将抑肽酶融合蛋白加入培养基。在感染后 6.5 小时,在缺少冷甲硫氨酸而含有 35S 标记甲硫氨酸 (Amersham)、浓度为 100microCi/ml 的 MEM 中孵化该培养基(脉冲)。然后,用含有 10 倍浓度冷甲硫氨酸的 MEM 冲洗细胞两次,而且在 MEM 中孵化额外 3 小时(跟踪)。在标价后,将细胞溶解于发射免疫沉淀检验 (RIPA) 缓冲液,用抗用于感染的特定病毒株的抗血清(可以从 ATCC 和美国疾病预防控制中心获得抗流感血清)沉淀 HA,然后用蛋白 G-琼脂糖 (Amersham) 纯化免疫复合物。用带有自动射线照相术的 SDS-PAGE 分离样品。在抑肽酶融合蛋白没有处理过的样品中,HA1 和 HA2 是主要的 HA 种类;而在抑肽酶处理过的样品中,HA0 是存在的 HA 的主要类型。

[0172] 实施例 4:合成五个唾液酸酶的基因,表达和纯化该唾液酸酶蛋白

[0173] 简介

[0174] 流感病毒属于 RNA 病毒的正粘病毒科。A 型和 B 型病毒都具有 8 节段负链 RNA 基因组,其封闭于源自宿主细胞的脂包膜中。病毒包膜被刺突覆盖,该刺突由三种类型蛋白质组成:血凝素 (HA),将病毒附着于宿主细胞受体和调节病毒和细胞的膜融合;神经氨酸酶 (NA),便于新病毒从宿主细胞中释放;以及少量的 M2 蛋白,用作离子通道。对于流感 A 性病毒而言,HA 和 NA 都经过了抗原性飘流和抗原性转移,病毒亚型是通过它们的 HA 和 NA 蛋白之间的血清学差异来区别的。总共有 15 个 HA 类型 (H1-H15) 和 9 个 NA 类型 (N1-N9),但是,迄今为止在人流感 A 型病毒中仅发现了 3 个 HA (H1-H3) 和 2 个 NA (N1 和 N2) (Granoff, A. & Webster, R. G. 编辑,《病毒学百科全书》,第二版,卷 2)。与流感 A 型病毒相对照,流感病毒 B 没有独特的抗原亚型。

[0175] 流感 B 型病毒仅在人类中传播,而流感 A 型病毒可以从动物如猪、马、鸡、鸭和其它鸟类的所有宿主中分离到,这说明了产生抗原转移的流感 A 型病毒的遗传重配。野生的水鸟被认为是禽类和哺乳动物类的所用流感病毒的原始蓄积地。有大量的证据表明水鸟与包括猪和马的其它种类之间传播病毒,以及通过猪间接传播给人。从猪或鸡到人的直接传播也已经有报道 (Ito, T. (2000) Microbiol Immunol 44(6):423-430)。

[0176] 宿主细胞的流感病毒受体是该细胞表面的唾液酸。唾液酸是具有 9 碳骨架的 α -酮酸,常见于寡糖链的最外端,并且附着于糖蛋白和糖脂。其中一个主要的唾液酸类型是 N-乙酰神经氨酸 (Neu5Ac),为大多数其它类型的生物合成前体。在自然界中发现了在 Neu5Ac 与碳水化合物支链的次末端半乳糖残基之间两种主要的连接, Neu5Ac α (2,3)-Gal 和 Neu5Ac α (2,6)-Gal。Neu5Ac α (2,3)-Gal 和 Neu5Ac α (2,6)-Gal 都能被流感病毒认作

受体 (Schauer, R. (1982) *Adv. Carbohydrate Chem&Biochem* 40 :131-235), 即使人类的病毒似乎优选 Neu5Ac α (2,6)-Gal, 禽类和马科的病毒主要认可 Neu5Ac α (2,3)-Gal (Ito, T. (2000) *Microbiol Immunol* 44(6) :423-430)。

[0177] 流感 A 型和 B 型病毒的感染典型地开始于上呼吸道的粘膜表面。病毒复制最初限于上呼吸道, 但是能延伸至下呼吸道并且导致可致命的支气管肺炎。致死的风险为每 10,000 感染有一例, 但是, 在大流行期, 对于具有既存心肺状况的高风险组以及免疫学上的初始个体来说, 该风险显著性增加。

[0178] 一种含有能有效地破坏 Neu5Ac α (2,3)-Gal 和 Neu5Ac α (2,6)-Gal 两种受体的唾液酸酶的治疗化合物, 可以给予抗最宽泛的、包括动物的流感病毒的保护。即使病毒株每年都改变, 它也能保持有效。由于唾液酸酶以宿主细胞而不是病毒为靶, 而且在病毒生命周期的“临界点 (choking point)”发挥作用, 所以抗性病毒的产生是不可能的。结合了蛋白质的唾液酸在细胞表面同源性交接 (turns over), 半衰期为 33 小时 (Kreisel, W, Volk, BA, Buchsel, R. 和 Reutter, W. (1980) *Proc Natl Acad Sci USA* 77 :1828-1831)。因此, 我们估计, 每天一次或每天二次给予唾液酸酶将产生充分的抗病毒保护。

[0179] 在高级真核细胞中以及在一些主要的病原微生物包括病毒、细菌和原生虫中可发现唾液酸酶。病毒和细菌的唾液酸酶已经被明确地表征, 而且其中一些的三维结构已经被确定 (Crennell, SJ, Garman, E, Laver, G, Vimr, E 和 Taylor, G. (1994) *Structure* 2 :535-544 ;Janakiraman, MN, White, CL, Laver, WG, Air, GM 和 Luo, M. (1994) *Biochemistry* 33 :8172-8179 ;Pshezhetsky, A, Richard, C, Michaud, L, Igdoura, S, Wang, S, Elsliger, M, Qu, J, Leclerc, D, Gravel, R, Dallaire, L 和 Potier, M. (1997) *Nature Genet* 15 :316-320)。在最近几年里, 也已经克隆了几个人唾液酸酶 (Milner, CM, Smith, SV, Carrillo MB, Taylor, GL, Hollinshead, M 和 Campbell, RD. (1997) *J Bio Chem* 272 :4549-4558 ;Monti, E, Preti, A, Nesti, C, Ballabio, A 和 Borsani G. 1999. *Glycobiol* 9 :1313-1321 ;Wada, T, Yoshikawa, Y, Tokuyama, S, Kuwabara, M, Akita, H 和 Miyagi, T. (1999) *Biochem Biophys Res Commun* 261 :21-27 ;Monti, E, Bassi, MT, Papini, N, Riboni, M, Manzoni, M, Veneranodo, B, Croci, G, Preti, A, Ballabio, A, Tettamanti, G 和 Borsani, G. (2000) *Biochem J* 349 :343-351)。所有表征的唾液酸酶在氨基末端部分共享一 4 个氨基酸的基团, 跟着是取决于蛋白质被重复三至四次的 Asp 盒 (box) 基元 (Monti, E, Bassi, MT, Papini, N, Riboni, M, Manzoni, M, Veneranodo, B, Croci, G, Preti, A, Ballabio, A, Tettamanti, G 和 Borsani, G. (2000) *Biochem J* 349 :343-351 ;Copley, RR, Russell, RB 和 Ponting, CP. (2001) *Protein Sci* 10 :285-292)。尽管唾液酸酶超级家族的所有氨基酸的相同性较低, 为约 20-30%, 分子的全部折叠, 尤其是催化氨基酸, 是非常相似 (Wada, T, Yoshikawa, Y, Tokuyama, S, Kuwabara, M, Akita, H 和 Miyagi, T. (1999) *Biochem Biophys Res Commun* 261 :21-27 ;Monti, E, Bassi, MT, Papini, N, Riboni, M, Manzoni, M, Veneranodo, B, Croci, G, Preti, A, Ballabio, A, Tettamanti, G 和 Borsani, G. (2000) *Biochem J* 349 :343-351 ;Copley, RR, Russell, RB and Ponting, CP. (2001) *Protein Sci* 10 :285-292)。

[0180] 唾液酸酶通常被分为两个家族: “小的”唾液酸酶具有约 42kDa 的分子量, 而且为了最大活性不需要二价金属离子; “大的”唾液酸酶具有约 65kDa 的分子量, 而且为了最大活性需要二价金属离子 (Wada, T, Yoshikawa, Y, Tokuyama, S, Kuwabara, M, Akita, H 和

Miyagi, T. (1999) *Biochem Biophys Res Commun* 261 :21-27 ;Monti, E, Bassi, MT, Papini, N, Riboni, M, Manzoni, M, Veneranodo, B, Croci, G, Preti, A, Ballabio, A, Tettamanti, G 和 Borsani, G. (2000) *Biochem J* 349 :343-351 ;Copley, RR, Russell, RB 和 Ponting, CP. (2001) *Protein Sci* 10 :285-292)。

[0181] 15 个以上的唾液酸酶蛋白已被纯化, 而且在底物特异性和酶动力方面彼此变化较大。为了产生广谱抗流感病毒的保护, 唾液酸酶必须有效地破坏在 α (2,6)-Gal 和 α (2,3)-Gal 连接中以及在糖蛋白和一些糖脂彼此关系中的唾液酸。病毒唾液酸酶, 如那些源自流感 A 型病毒、禽痘病毒、纽卡斯尔 (Nercastle) 疫病毒, 通常是 Neu5Ac α (2,3)-Gal 特异性的, 而且仅破坏 Neu5Ac α (2,6)-Gal。小的细菌唾液酸酶通常与在糖蛋白和糖脂彼此关系中的唾液酸基本不发生反应。相反地, 大的细菌唾液酸酶可有效地切割在多数天然底物彼此关系的 (α 2,6)-Gal 和 (α 2,3)-Gal 连接中的唾液酸 (附图 4 ;Vimr, DR. (1994) *Trends Microbiol* 2 :271-277 ;Drzeniek, R. (1973) *Histochem J* 5 :271-290 ;Roggentin, P, Kleineidam, RG 和 Schauer, R. (1995) *Biol Chem Hoppe-Seyler* 376 :569-575 ;Roggentin, P, Schauer, R, Hoyer, LL 和 Vimr, ER. (1993) *Mol Microb* 9 :915-921)。由于它们广泛的底物特异性, 大的细菌唾液酸酶是较好的候选。

[0182] 在附图 4 表示的、已知底物特异性的大的细菌唾液酸酶中, 霍乱弧菌 (*Vibrio cholera*) 唾液酸酶为了活性需要 Ca^{2+} , 使得较少优选它。更优选的唾液酸酶包括源自产气荚膜梭状芽孢杆菌 (*Clostridium perfringens*) 的 71kDa 酶、源自粘性放线菌 (*Actinomyces Viscosus*) 的 113kDa 酶以及 *Arthrobacter ureafaciens* 的唾液酸酶。第三个唾液酸酶, 即源自 *Micromonospora viridifaciens* 的 68kDa 酶, 已知可破坏流感病毒受体 (Air, GM and Laver, WG. (1995) *Virology* 211 :278-284), 并且也是一个候选。

[0183] 这些酶具有高度特异活性 (产气荚膜梭状芽孢杆菌 (*C. perfringens*) 为 600U/mg 蛋白质 (Corfield, AP, Veh, RW, Wember, M, Michalski, JC 和 Schauer, R. (1981) *Biochem J* 197 :293-299), 和粘性放线菌 (*A. Viscosus*) 为 680U/mg 蛋白质 (Teufel, M, Roggentin, P. 和 Schauer, R. (1989) *Biol Chem Hoppe Seyler* 370 :435-443)), 都是没有二价金属离子的完全活性, 而且已经被克隆和从大肠杆菌种纯化为重组蛋白 (Roggentin, P, Kleineidam, RG 和 Schauer, R. (1995) *Biol Chem Hoppe-Seyler* 376 :569-575, Teufel, M, Roggentin, P. 和 Schauer, R. (1989) *Biol Chem Hoppe Seyler* 370 :435-443, Sakurada, K, Ohta, T 和 Hasegawa, M. (1992) *J Bacteriol* 174 :6896-6903)。另外, 产气荚膜梭状芽孢杆菌 (*C. perfringens*) 于 2-8°C 在溶液中经过数周仍是稳定的, 而且于 4°C 和白蛋白存在的条件下可达两年以上 (Wang, FZ, Akula, SM, Pramod, NP, Zeng, L 和 Chandran, B. (2001) *J Virol* 75 :7517-27)。粘性放线菌 (*A. Viscosus*) 对于冷冻和融合是不稳定的, 但是于 4°C、在 0.1M 醋酸缓冲液中 pH 5 的条件下是稳定的 (Teufel, M, Roggentin, P. 和 Schauer, R. (1989) *Biol Chem Hoppe Seyler* 370 :435-443)。尽管用细菌唾液酸酶诱导免疫反应的几率较低, 原因是这些蛋白质典型地用于上呼吸道而不是全身性被吸收, 但是对于在人个体中长期使用, 一种人的酶是更理想的。目前, 已经从人克隆了四种唾液酸酶基因 :NEU1/G9/ 溶酶体 (lysosomal) 唾液酸酶 (Pshezhetsky, A, Richard, C, Michaud, L, Igdoura, S, Wang, S, Elsliger, M, Qu, J, Leclerc, D, Gravel, R, Dallaire, L 和 Potier, M. (1997) *Nature Genet* 15 :316-320., Milner, CM, Smith, SV, Carrillo MB, Taylor, GL, Hollinshead, M 和 Campbell,

RD. (1997). J Bio Chem 272 :4549-4558), NEU3, 一种从人脑中分离到的膜相关的唾液酸酶 (Wada, T, Yoshikawa, Y, Tokuyama, S, Kuwabara, M, Akita, H 和 Miyagi, T. (1999) Biochem Biophys Res Commun 261 :21-27, Monti, E, Bassi, MT, Papini, N, Riboni, M, Manzoni, M, Venerando, B, Croci, G, Preti, A, Ballabio, A, Tettamanti, G 和 Borsani, G. (2000) Biochem J 349 :343-351), NEU2, 一种以非常低的水平在人骨骼肌中表达的 42kDa 唾液酸酶 (Monti, E, Preti, A, Nesti, C, Ballabio, A 和 Borsani G. (1999) Glycobiol 9 :1313-1321), 以及 NEU4, 一种在所用的人检查组织中表达的、含 497 个氨基酸的蛋白质 (Genebank NM080741) (Monti, E, Preti, A, Venerando, B 和 Borsani, G. (2002) Neurochem Res 27 :646-663)。

[0184] 氨基酸序列对比揭示了, NEU2 (SEQ ID NO :8) 和 NEU4 (SEQ ID NO :9) 都是胞液唾液酸酶。形成鼠伤寒沙门氏菌 (*S. typhimurium*) 唾液酸酶催化位点的 12 个氨基酸残基中的 9 个被保存在 NEU2 和 NEU4 中 (Monti, E, Preti, A, Nesti, C, Ballabio, A 和 Borsani G. (1999) Glycobiol 9 :1313-1321, 附图 3)。另外, NEU4 也表示一个延展度 (stretch) 约 80 个氨基酸的残基 (氨基酸 294-373), 其可能是已知哺乳动物类唾液酸酶中独有的 (Monti, E, Preti, A, Venerando, B 和 Borsani, G. (2002) Neurochem Res 27 :646-663)。不像被选的、大的细菌唾液酸酶, NEU2 和 NEU4 的底物特异性是未知的。需要检测 NEU2 和 NEU4 能否有效地破坏流感病毒受体。

[0185] 唾液酸酶检验

[0186] 将 NEU2、NEU4 和 *M. viridifaciens* 于 -20°C 保存在 PBS 和 50% 甘油中。将产气荚膜梭状芽孢杆菌 (*C. perfringens*) 和粘性放线菌 (*A. viscosus*) 酶于 4°C 保存在 10mM 醋酸缓冲液 (pH5) 中。蛋白质制品通过 HPLC 和 SDS-PAGE 电泳表征。通过唾液酸酶检验可监视酶的特异性活性和稳定性。用作为底物的荧光的 2'-(4-甲基伞形酮基)- α -D-N-乙酰神经氨酸 (4MU-NANA) (Sigma) 来测定唾液酸酶的酶活性。特别地, 将反应以两份的形式 (in duplicate) 建立在 0.1M 枸橼酸 / 磷酸钠缓冲液 pH5.6, 在最终的 100 微升中还含有 400 微克牛血清白蛋白以及 0.2mM 4MU-NANA, 并且 37°C 孵化 5-10 分钟。加入 1ml 的 0.2M 甘氨酸 / NaOH pH10.2 停止反应。通过 365nm 激发和 445nm 发射的荧光计测定荧光发射, 利用 4-甲基伞形酮 (4-MU) 获得校正曲线。

[0187] 实施例 5 : 比较体外唾液酸酶的功能以及为进一步研究挑选出一种唾液酸酶

[0188] 1. 流感病毒备料

[0189] 从 ATCC 和圣朱迪儿童研究医院获得流感病毒株。

[0190] 将病毒备料生长在最低要求培养基 (MEM) 中的考克斯班尼犬肾脏 (MDCK) 细胞上, 该培养基每毫升还补充了 0.3% 牛血清白蛋白和 0.5 微克的胰蛋白酶。在孵化 48 至 72 小时后, 使用低速离心机将培养基分离。用超声离心法并通过 25% 蔗糖垫将病毒颗粒小球化。将纯化病毒悬浮于 50% 甘油 -0.1M Tris 缓冲液中, 并储藏于 -20°C 。用空斑检验 (法) (Tobita, K, Sugiura, A, Enomoto, C 和 Furuyama, M. (1975) Med Microbiol Immunol 162 : 9-14) 或者 TCID_{50} 测定病毒滴度, TCID_{50} 是感染 50% 的 MDCK 细胞所需要的病毒剂量。

[0191] 选出的人与动物流感 A 性株, 对 Neu5Ac α (2,6)-Gal 或 Neu5Ac α (2,3)-Gal 具有特异性和对受体具有高度亲合性 (通过高血凝聚活性测定), 选择其作体外检测:

[0192] 1. 识别受体 Neu5Ac α (2,6)-Gal 的株, 包括从人分离的 A/aichi/2/68, A/Udom/307/72, A/Prot Chaimers/1/73 和 A/Victoria/3/75 等 (Connor, RJ, Kawaoka, Y,

Webster, RG 和 Paulson JC. (1994) *Virology* 205 :17-23)。

[0193] 2. 具有 Neu5Ac α (2,3)-Gal 特异性的株, 包括从动物分离的 A/duckUkraine/1/63, A/duckMemphis/928/74, A/duckhokk/5/77, A/Eq/Miami/1/63, A/Eq/Ur/1/63, A/Eq/Tokyo/71, A/Eq/Prague/71, 等等 (Connor, RJ, Kawaoka, Y, Webster, RG 和 Paulson JC. (1994) *Virology* 205 :17-23)。

[0194] 2. 血凝聚检验

[0195] 本检验用于快速测定每种酶破坏受体 Neu5Ac α (2,6)-Gal 和 Neu5Ac α (2,3)-Gal 的效率。

[0196] 特别地, 将 6ml 鸡的红 (血) 细胞 (red blood cells) (SPAFAS 公司, Norwich, CT) 稀释于两倍体积的 PBS, 以 500xg 离心 5 分钟, 再悬浮于原始容量的 PBS 中。将唾液酸酶加入各种浓度的鸡红细胞中, 室温孵化 30 分钟。然后, 冲洗该细胞三次以除去唾液酸酶蛋白, 然后再悬浮于 6ml 的 PBS 中。用 BSA 孵化对照细胞, 并且冲洗。将各种流感病毒的株, 即将 Neu5Ac α (2,6)-Gal 或 Neu5Ac α (2,3)-Gal 识别为上面列出受体的株, 制备在微滴定板 (microtiter plates) 中, 用原病毒备料的 PBS (100 微升) 连续稀释。将处理的唾液酸酶或者对照的鸡红细胞混悬液 (100 微升上述制备的 0.5% 溶液) 于 4°C 加入每一个井。2 小时后读取这些板。导致血细胞凝聚的病毒最低浓度定义为一个血凝聚单位。我们将寻找能有效地消除所用病毒株产生血凝聚的酶。

[0197] 3. 病毒抑制性检验

[0198] 用各种浓度的唾液酸酶处理汇合单层的 MDCK 细胞 1 小时, 用缓冲液冲洗两次, 然后用各种流感病毒株感染。在孵化 1 小时后, 再次冲洗这些细胞以除去未结合的病毒。由于预计在细胞表面上的病毒结合位点减少, 故用琼脂过载细胞, 并于 37°C 孵化。用在唾液酸酶处理过的细胞内的空斑数与在对照细胞内的那些进行对比。作为一种选择地, 将细胞于 37°C 培养在常规的媒介中, 并且在培养过程中的各个时刻, 测定在培养媒介中的病毒滴度如 TCID₅₀。

[0199] 为了证实唾液酸酶处理可以抑制既存的感染, 首先用一低滴度的病毒感染 MDCK 单层。在冲洗掉未结合的病毒后, 在唾液酸酶存在的条件下培养细胞。每 24 小时向细胞培养基添加新鲜的唾液酸酶。在逾 72 小时的周期里, 测定在培养媒介中的病毒滴度。

[0200] 4. 细胞毒性检验

[0201] 购买原生的人支气管上皮细胞 (Clonetics), 并根据制造商的说明书在补充最小培养基中培养。将唾液酸酶加入各种浓度的培养媒介。细胞生长逾 7-10 天周期后进行测定。为了 (获得) 显微镜可见的细胞病理效应, 也可定期地观察细胞。

[0202] 实施例 6. 构建和检测唾液酸酶融合蛋白

[0203] 1. 挑选作为锚定域的 GAG 结合序列

[0204] 一种唾液酸酶被选定是由于其最佳的总的性质, 包括抗病毒活性、毒性、稳定性和易生产等。然后, 我们通过基因 (genetically) 将其连接到一个 GAG 结合序列, 将融合基因亚克隆至 pQE 载体, 表达并从大肠杆菌中纯化该融合蛋白。

[0205] 我们选择了六种可能的人 GAG 结合序列: PF4 (氨基酸 47-70) (SEQ ID NO :2), IL-8 (氨基酸 46-72) (SEQ ID NO :3), AT III (氨基酸 118-151) (SEQ ID NO :4), ApoE (氨基酸 132-165) (SEQ ID NO :5), 人双调蛋白 (氨基酸 25-45) (SEQ ID NO :6), 和人血管相关迁

移细胞蛋白 (AAMP) (氨基酸 14-25) (SEQ ID NO :7) (附图 2)。这些序列通常以毫微摩尔水平亲合力来结合肝素;尽管如此,它们的亲合力彼此间却以数量级变化(表 1)。由于不清楚哪一个锚定域使得唾液酸酶发挥功能最有效,所以,将所有的四个 GAG 结合序列通过基因连接子序列 GGGGS 与唾液酸酶基因在 N 末端或者 C 末端融合,构建如下:

[0206] (GAG 结合域 -GGGGS (SEQ ID NO :10) -唾液酸酶);或

[0207] (唾液酸酶 -GGGGS (SEQ ID NO :10) -GAG 结合域)

[0208] 通过一种改进的病毒抑制性检验来比较不同的融合蛋白。特别地,在有限的期限如 30 分钟内,用相同数量的每一种融合蛋白处理汇合单层的 MDCK 细胞。然后用缓冲液冲洗细胞两次,以除去未结合的唾液酸酶融合蛋白,并且在培养媒介中再孵化 1 小时。随后,将流感病毒株加入细胞 1 小时,然后再次冲洗细胞以除去未结合病毒。在 72 小时培养过程中,测定在培养媒介中的病毒滴度如 TCID₅₀。用未融合唾液酸酶蛋白与本检验的融合蛋白相比较。如果结果太相近无法对所用融合蛋白分级,我们就通过缩小用于融合蛋白的处理窗口、降低蛋白质浓度和提高病毒激发水平使检验更精确。

[0209] 2. 优化融合蛋白构建

[0210] 从早期的实验中选定最佳的融合蛋白之后,通过检测不同连接子的长度进一步优选该构建。基于此考虑,制备了下列构建:

[0211] (唾液酸酶 -GGGS (SEQ ID NO :10))_n (n = 0, 1, 2, 3, 或 4) -GAG 结合域) 根据上述的改进病毒保护检验(法),进行蛋白表达、纯化和比较。

[0212] 另外,如果早期的数据显示融合蛋白对硫酸肝素的亲合力越高带来功效更好,同样,我们就会设计来检测是否通过提高 GAG 结合的亲合力能进一步改善功效。这可以通过在如下构建的融合蛋白中创造一个多价的 GAG 结合机制来取得:

[0213] (唾液酸酶 -(GGGGS (SEQ ID NO :10))_n -HS 结合域 -GAG 结合域);

[0214] 或:

[0215] (GAG 结合域 -(GGGGS (SEQ ID NO :10))_n -唾液酸酶 -(GGGGS (SEQ ID NO :10))_n -GAG 结合蛋白)

[0216] 根据上述的改进病毒保护检验(法),对纯化的融合蛋白基于其活性进行分级。

[0217] 3. 细胞毒性检验

[0218] 通过用各种浓度融合蛋白来培养原生的人支气管上皮细胞、遵循细胞生长曲线以及观察任何显微镜下可见的细胞病理效应,监控融合蛋白对正常细胞生长和多态性的作用。

[0219] 实施例 7:抗其它传染性微生物的融合蛋白

[0220] 设计由一个功能域和一个锚定域组成的融合蛋白,用于许多不同的应用。例如,这里提出的唾液酸酶融合蛋白也可用作一种抗除流感病毒以外的其它病毒和细菌感染的治疗/预防剂,原因是同样已知了许多其它的传染性微生物,如副粘性病毒 (paramyxoviruses) (Wassilewa, L. (1977) Arch Virol 154 :299-305)、冠状病毒 (Vlasak, R., Luytjes, W., Spaan, W. 和 Palese, P. (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85 :4526-4529)、轮状病毒 (Fukudome, K., Yoshie, O. 和 Konno, T. (1989) Virology 172 :196-205) 和铜绿假单胞菌 (Ramphal, R. 和 Pyle, M. (1983) Infect Immun 41 :339-44) 等,用唾液酸作为细胞受体。例如用肝素结合域融合的抑肽酶可制造一种融合蛋白,其可用于预防/治疗除需要宿

主丝氨酸蛋白酶活化的流感之外的其它病毒如副流感病毒的感染。

[0221] 参考目录

[0222] Achyuthan, KE and Achyuthan AM. 2001. Comparative enzymology, biochemistry and pathophysiology of human exo- α -sialidases (neuraminidases). *Comparative Biochem & Physiol part B* 129 :29-64.

[0223] Air, GM and Laver, WG. 1995. Red cells bound to influenza virus N9neuraminidase are not released by the N9 neuraminidase activity. *Virology* 211 : 278-284.

[0224] Auerswald EA, Horlein D, Reinhardt G, Schroder W and Schnabel E. 1988. Expression, isolation and characterization of recombinant [Arg 5, Glu52] Aprotinin. *Biol Chem Hoppe-Seyler Vol* 369, Suppl., pp27-35.

[0225] Barbey-Morel CL, Oeltmann TN, Edwards KM and Wright PF. 1987. Role of respiratory tract proteases in infectivity of influenza A virus. *J Infect Dis* 155 :667-672.

[0226] Bessette PH, Aslund F, Beckwith J and Georgiou G. 1999. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 :13703-13708.

[0227] Callan RJ, Hartmann FA, West SE and Hinshaw VS. 1997. Cleavage of influenza A virus H1 hemagglutinin by swine respiratory bacterial proteases. *J Virol* 71 : 7579-7585.

[0228] Connor, RJ, Kawaoka, Y, Webster, RG and Paulson JC. 1994. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology* 205 : 17-23.

[0229] Copley, RR, Russell, RB and Ponting, CP. 2001. Sialidase-like Asp-boxes : sequence-similar structures within different protein folds. *Prot Sci* 10 : 285-292.

[0230] Corfield, AP, Veh, RW, Wember, M, Michalski, JC and Schauer, R. 1981. The release of N-acetyl- and N-glycolloyl-neuraminic acid from soluble complex carbohydrates and erythrocytes by bacterial, viral and mammalian sialidases. *Biochem J* 197 : 293-299.

[0231] Crennell, SJ, Garman, E, Laver, G, Vimr, E and Taylor, G. 1994. Crystal structure of *Vibrio Cholerae* neuraminidase reveals dual lectin-like domains in addition to the catalytic domain. *Structure* 2 :535-544.

[0232] Drzeniek, R. Substrate specificity of neuraminidases. 1973. *Histochem J* 5 : 271-290.

[0233] Endo Y, Carroll KN, Ikizler MR and Wright PF. 1996. Growth of influenza virus in primary, differentiated epithelial cells derived from adenoids. *J Virol* 70 :2055-2058.

[0234] Fritz H and Wunderer G. 1983. Biochemistry and applications of aprotinin,

- thekallikrein inhibitor from bovine organs. *Arzneim-Forsch* 33 :479-494.
- [0235] Fukudome, K., Yoshie, O. and Konno, T. 1989. Comparison of human, simian, and bovine rotaviruses for requirement of sialic acid in hemagglutination and cell adsorption. *Virology* 172 :196-205.
- [0236] Garten W, Bosch FX, Linder D, Rott R and Klenk HD. 1981. Proteolytic activation of the influenza virus hemagglutinin: the structure of the cleavage site and the enzymes involved in cleavage. *Virology* 115 :361-374.
- [0237] Goger, B, Halden, Y, Rek, A, Mosl, R, Pye, D, Gallagher, J and Kungl, AJ. 2002. Different affinities of glycosaminoglycan oligosaccharides for monomeric and dimeric interleukin-8: a model for chemokine regulation at inflammatory sites. *Biochem* 41 :1640-1646.
- [0238] Gotoh B, Ogasawara T, Toyoda T, Inocencio N, Hamaguchi M and Nagai Y. 1990. An endoprotease homologous to the blood clotting factor X as a determinant of viral tropism in chick embryo. *EMBO J* 9 :4189-4195.
- [0239] Granoff, A. & Webster, R. G., ed. *Encyclopedia of Virology*, 2nd Edition, Vol. 2.
- [0240] Gust, ID, Hampson, AW. and Lavanchy, D. 2001. Planning for the next pandemic. *Rev Med Virol* 11 :59-70.
- [0241] Hayden, FG. 1996. Amantadine and rimantadine—mechanisms. In *Antiviral drug resistance* (ed. D. D. Richman), pp. 59-77. Chichester, UK : John Wiley & Sons Ltd.
- [0242] Hosoya M, Matsuyama S, Baba M, Susuki H and Shigeta S. 1992. Effects of protease inhibitors on replication of various myxoviruses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 36 :1432-1436.
- [0243] Ito, T. 2000. Interspecies transmission and receptor recognition of influenza A virus. *Microbiol Immunol* 44(6) :423-430.
- [0244] Janakiraman, MN, White, CL, Laver, WG, Air, GM and Luo, M. 1994.
- [0245] Structure of influenza virus neuraminidase B/lee/40 complexed with sialic acid and a dehydro analog at 1.8-Å resolution: implications for the catalytic mechanism. *Biochemistry* 33 :8172-8179.
- [0246] Kido, H, Niwa, Y, Beppu, Y and Towatari, T. 1996. Cellular proteases involved in the pathogenicity of enveloped animal viruses, human immunodeficiency virus, influenza virus A and Sendai virus. *Adv Enzyme Regul* 36 :325-347.
- [0247] Kido H, Chen Y and Murakami M. 1999. Cellular proteinases and viral infection: influenza virus, Sendai virus and HIV-1, p. 205-217. In B. Dunn (ed.), *Proteases of infectious agents*. Academic Press, New York, N. Y.
- [0248] Klenk, HD and Garten W. 1988. The molecular biology of influenza virus pathogenicity. *Adv Vir Res* 34 :247-281.

- [0249] Trend Micro 2 :39-43.
- [0250] Kreisel, W, Volk, BA, Buchsel, R. and Reutter, W. 1980. Different half-lives of the carbohydrate and protein moieties of a 110,000-dalton glycoprotein isolated from plasma membranes of rat liver. Proc Natl Acad Sci USA 77 :1828-1831.
- [0251] Krunkosky TM, Fischer BM, Martin LD, Jones N, Akley NJ and Adler KB. 2000.
- [0252] Effects of TNF- β on expression of ICAM-1 in human airway epithelial cells invitro.
- [0253] Am J Respir Cell Mol Biol 22 :685-692.
- [0254] Lazarowitz SG, Goldberg AR and Choppin PW. 1973. Proteolytic cleavage by plasmin of the HA polyPeptide of influenza virus : host cell activation of serum plasminogen. Virology 56 :172-180.
- [0255] Lee, MK and Lander, AD. 1991. Analysis of affinity and structural selectivity in the binding of proteins to glycosaminoglycans : development of a sensitive electrophoretic approach. Proc Natl Acad Sci USA 88 :2768-2772.
- [0256] Meltzer, MI, Cox, NJ and Fukuda, K. 1999. The economic impact of pandemic influenza in the United States : priorities for intervention. Emerg Infect Dis 5 :659-671.
- [0257] Meyer, FA, King, M and Gelman, RA. ,1975. On the role of sialic acid in the rheological properties of mucus. Biochimica et Biophysica Acta 392 :223-232.
- [0258] Milner, CM, Smith, SV, Carrillo MB, Taylor, GL, Hollinshead, M and Campbell, RD. 1997. Identification of a sialidase encoded in the human major histocompatibility complex. J Bio Chem 272 :4549-4558.
- [0259] Monti, E, Preti, A, Venerando, B and Borsani, G. 2002. Recent development in mammalian sialidase molecular biology. Neurochem Res 27 :646-663.
- [0260] Monti, E, Preti, A, Nesti, C, Ballabio, A and Borsani G. 1999. Expression of a novel human sialidase encoded by the NEU2 gene. Glycobiol 9 :1313-1321.
- [0261] Monti, E, Bassi, MT, Papini, N, Riboni, M, Manzoni, M, Venerando, B, Croci, G, Preti, A, Ballabio, A, Tettamanti, G and Borsani, G. 2000. Identification and expression of NEU3, a novel human sialidase associated to the plasma membrane. Biochem J 349 :343-351.
- [0262] Murakami M, Towatari T, Ohuchi M, Shiota M, Akao M, Okumura Y, Parry MA and Kido H. 2001. Mini-plasmin found in the epithelial cells of bronchioles triggers infection by broad-spectrum influenza A viruses and Sendai virus. Eur J Biochem 268 :2847-2855.
- [0263] Nakayama, K. 1997. Furin : a mammalian subtilisin/kex2p-like endoprotease involved in process of a wide variety of precursor proteins. Biochem 327 :625-635.
- [0264] Ovcharenko AV and Zhirnov OP. 1994. Aprotinin aerosol treatment

of influenza and paramyxovirus bronchopneumonia of mice. *Antiviral Res* 23 : 107-118.

[0265] Pshezhetsky, A, Richard, C, Michaud, L, Igdoura, S, Wang, S, Elsliger, M, Qu, J, Leclerc, D, Gravel, R, Dallaire, L and Potier, M. 1997. Cloning, expression and chromosomal mapping of human lysosomal sialidase and characterization of mutations in sialidosis. *Nature Genet* 15 :316-320.

[0266] Ramphal, R. and Pyle, M. 1983. Evidence for mucins and sialic acid receptors for *Pseudomonas aeruginosa* in the lower respiratory tract. *Infect Immun* 41 :339-44.

[0267] Roggentin, P, Kleineidam, RG and Schauer, R. 1995. Diversity in the properties of two sialidase isoenzymes produced by *Clostridium perfringens* spp.. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 376 :569-575.

[0268] Roggentin, P, Schauer, R, Hoyer, LL and Vimr, ER. 1993. The sialidase superfamily and its spread by horizontal gene transfer. *Mol Microb* 9 : 915-921.

[0269] Rosenberg A. ed. *Biology of the Sialic Acids*. 1995. pp270-273.

[0270] Sakurada, K, Ohta, T and Hasegawa, M. 1992. Cloning, expression and characterization of the *Micromonospora viridifaciens* neuraminidase gene in *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol* 174 :6896-6903.

[0271] Schauer, S. ed., pp233. *Sialic Acids Chemistry, Metabolism and Function*. Springer-Verlag, 1982.

[0272] Schauer, R. 1982. Chemistry, metabolism, and biological functions of sialic acids. *Adv. Carbohydrate Chem&Biochem* 40 :131-235.

[0273] Scheiblaue H, Reinacher M, Tashiro M and Rott R. 1992. Interactions between bacteria and influenza A virus in the development of influenza pneumonia. *J Infect Dis* 166 :783-791.

[0274] Sinn PL, Williams G, Vongpunsawad S, Cattaneo R and McCray PB. 2002. Measles virus preferentially transduces the basolateral surface of well-differentiated human airway epithelia. *J Virol* 76 :2403-2409.

[0275] Skehel, JJ and Wiley, DC. 2000. Receptor binding and membrane fusion in virus entry : the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* 69 :531-569.

[0276] Tashiro M, Klenk HD and Rott R. 1987. Inhibitory effect of a protease inhibitor, leupeptin, on the development of influenza pneumonia, mediated by concomitant bacteria. *J Gen Virol* 68 :2039-2043.

[0277] Tashiro M, Ciborowski P, Reinacher M, Pulverer G, Klenk HD and Rott R. 1987. Synergistic role of staphylococcal proteases in the induction of influenza virus pathogenicity. *Virology* 157 :421-430.

[0278] Teufel, M, Roggentin, P. and Schauer, R. 1989. Properties of sialidase isolated from *Actinomyces viscosus* DSM43798. *Biol Chem Hoppe Seyler* 370 :435-443.

- [0279] Tobita, K, Sugiura, A, Enomoto, C and Furuyama, M. 1975. Plaque assay and primary isolation of influenza A viruses in an established line of canine kidney cells (MDCK) in the presence of trypsin. *Med Microbiol Immunol* 162 :9-14.
- [0280] Venturi M, Seifert C and Hunte C. 2001. High level production of functional antibody Fab fragments in an oxidizing bacterial cytoplasm. *J Mol Biol* 315 :1-8.
- [0281] Vimr, DR. 1994. Microbial sialidases: does bigger always mean better? *Trends Microbiol* 2 :271-277.
- [0282] Vlasak, R., Luytjes, W., Spaan, W. and Palese, P. 1988. Human and bovine coronaviruses recognize sialic acid-containing receptors similar to those of influenza C viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 85 :4526-4529.
- [0283] Wada, T, Yoshikawa, Y, Tokuyama, S, Kuwabara, M, Akita, H and Miyagi, T. 1999. Cloning, expression, and chromosomal mapping of a human ganglioside sialidase. *Biochem Biophys Res Commun* 261 :21-27.
- [0284] Wang, FZ, Akula, SM, Pramod, NP, Zeng, L and Chandran, B. 2001. Human herpesvirus 8 envelope glycoproteins K8.1A interaction with the target cells involves heparan sulfate. *J Virol* 75 :7517-27
- Wassilewa, L. 1977. Cell receptor for paramyxoviruses. *Arch Virol* 54 :299-305.
- [0285] Weisgraber, KH, Rall, SC, Mahley, RW, Milne, RW and Marcel, Y. 1986.
- [0286] Human apolipoprotein E, determination Witt, DP and Lander AD. 1994.
- [0287] Differential binding of chemokines to glycosaminoglycan subpopulations. *Curr Bio* 4 :394-400.
- [0288] Wood, J. 2001. Developing vaccines against pandemic influenza. *Phil Trans RSoc Lond B* 356 :1953-1960.
- [0289] Xiang Y and Moss B. 2003. Molluscum contagiosum virus interleukin-18 (IL-18) binding protein is secreted as a full-length form that bind cell surface glycosaminoglycans through the C-terminal tail and a furin-cleaved form with only the IL-18 binding domain. *J Virol* 77 :2623-2630.
- [0290] Zambon, M. 2001. The pathogenesis of influenza in humans. *Rev Med Virol* 11 :227-241.
- [0291] Zhang L, Peeples ME, Boucher RC, Collins PL and Pickles RJ. 2002.
- [0292] Respiratory syncytial virus infection of human airway epithelial cells is polarized, specific to ciliated cells, and without obvious cytopathology. *J Virol* 76 :5654-5666.
- [0293] Zhirnov OP, Ovchartenko AV and Bukrinskaya AG. 1982. Protective effect of protease inhibitors in influenza virus infected animals. *Arch Virol* 73 :263-272
- [0294] Zhirnov OP, Ovcharenko AV and Bukrinskaya AG. 1982. A modified plaque assay method for accurate analysis of infectivity of influenza viruses with uncleaved

hemagglutinin. Arch Virol 71 :177-183.

[0295] Zhirnov OP. 1983. Proteolytic activation of myxoviruses and a new strategy in the treatment of viral diseases. Problems Virol. 4 :9-12. (In Russian).

[0296] Zhirnov OP, Ovcharenko AV and Bukrinskaya AG. 1984. Suppression of influenza virus replication in infected mice by protease inhibitors. J Gen Virol 65 :191-196.

[0297] Zhirnov OP, Ovcharenko AV and Bukrinskaya AG. 1985. Myxovirus replication in chicken embryos can be suppressed by aprotinin due to the blockage of viral glycoprotein cleavage. J Gen Virol 66 :1633-1638.

[0298] Zhirnov OP. 1987. High protection of animals lethally infected with influenza virus by aprotinin-rimantadine combination. J Med Virol 21 :161-167.

[0299] Zhirnov OP, Ikizler MR and Wright PF. 2002. Cleavage of influenza A virus hemagglutinin in human respiratory epithelium is cell associated and sensitive to exogenous antiproteases. J Virol 76 :8682-8689.

[0300] 本申请参考的所有出版物, 包括专利文献, 含核苷、氨基酸序列及附带信息的 Genbank 序列数据库条目, 科学论文, 及参考目录和附件, 都被以其全部的形式作为参考引入用于任何目的, 其程度如同每一个出版物单独地被引入作参考

[0301] 所有的标题是为了方便于读者, 不应当被用于限制标题下正文的含义, 除非另有规定。

[0302] 序列表

[0303] <110> 余芒

[0304] 房芳

[0305] <120> 广谱抗病毒治疗和预防

[0306] <130> NB10IP. 1-PCT

[0307] <150> US 60/428, 535

[0308] <151> 2002-11-22

[0309] <150> US 60/464, 217

[0310] <151> 2003-04-19

[0311] <160> 10

[0312] <170> PatentIn version 3.2

[0313] <210> 1

[0314] <211> 58

[0315] <212> PRT

[0316] <213> 牛

[0317] <400> 1

[0318] Arg Pro Asp Phe Cys Leu Glu Pro Pro Tyr Thr Gly Pro Cys Lys Ala

[0319] 1 5 10 15

[0320] Arg Ile Ile Arg Tyr Phe Tyr Asn Ala Lys Ala Gly Leu Cys Gln Thr

[0321] 20 25 30

[0322] Phe Val Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Lys Arg Asn Asn Phe Lys Ser Ala
 [0323] 35 40 45
 [0324] Glu Asp Cys Met Arg Thr Cys Gly Gly Ala
 [0325] 50 55
 [0326] <210>2
 [0327] <211>24
 [0328] <212>PRT
 [0329] <213> 人类
 [0330] <400>2
 [0331] Asn Gly Arg Arg Ile Cys Leu Asp Leu Gln Ala Pro Leu Tyr Lys Lys
 [0332] 1 5 10 15
 [0333] Ile Ile Lys Lys Leu Leu Glu Ser
 [0334] 20
 [0335] <210>3
 [0336] <211>27
 [0337] <212>PRT
 [0338] <213> 人类
 [0339] <400>3
 [0340] Gly Arg Glu Leu Cys Leu Asp Pro Lys Glu Asn Trp Val Gln Arg Val
 [0341] 1 5 10 15
 [0342] Val Glu Lys Phe Leu Lys Arg Ala Glu Asn Ser
 [0343] 20 25
 [0344] <210>4
 [0345] <211>34
 [0346] <212>PRT
 [0347] <213> 人类
 [0348] <400>4
 [0349] Gln Ile His Phe Phe Phe Ala Lys Leu Asn Cys Arg Leu Tyr Arg Lys
 [0350] 1 5 10 15
 [0351] Ala Asn Lys Ser Ser Lys Leu Val Ser Ala Asn Arg Leu Phe Gly Asp
 [0352] 20 25 30
 [0353] Lys Ser
 [0354] <210>5
 [0355] <211>34
 [0356] <212>PRT
 [0357] <213> 人类
 [0358] <400>5
 [0359] Glu Leu Arg Val Arg Leu Ala Ser His Leu Arg Lys Leu Arg Lys Arg
 [0360] 1 5 10 15

[0361] Leu Leu Arg Asp Ala Asp Asp Leu Gln Lys Arg Leu Ala Val Tyr Gln
 [0362] 20 25 30
 [0363] Ala Gly
 [0364] <210>6
 [0365] <211>12
 [0366] <212>PRT
 [0367] <213> 人类
 [0368] <400>6
 [0369] Arg Arg Leu Arg Arg Met Glu Ser Glu Ser Glu Ser
 [0370] 1 5 10
 [0371] <210>7
 [0372] <211>21
 [0373] <212>PRT
 [0374] <213> 人类
 [0375] <400>7
 [0376] Lys Arg Lys Lys Lys Gly Gly Lys Asn Gly Lys Asn Thr Thr Asn Thr
 [0377] 1 5 10 15
 [0378] Lys Lys Lys Asn Pro
 [0379] 20
 [0380] <210>8
 [0381] <211>379
 [0382] <212>PRT
 [0383] <213> 人类
 [0384] <400>8
 [0385] Met Ala Ser Leu Pro Val Leu Gln Lys Glu Ser Val Phe Gln Ser Gly
 [0386] 1 5 10 15
 [0387] Ala His Ala Tyr Arg Ile Pro Ala Leu Leu Tyr Leu Pro Gly Gln Gln
 [0388] 20 25 30
 [0389] Ser Leu Leu Ala Phe Ala Glu Gln Arg Ala Ser Lys Lys Asp Glu His
 [0390] 35 40 45
 [0391] Ala Glu Leu Ile Val Leu Arg Arg Gly Asp Tyr Asp Ala Pro Thr His
 [0392] 50 55 60
 [0393] Gln Val Gln Trp Gln Ala Gln Glu Val Val Ala Gln Ala Arg Leu Asp
 [0394] 65 70 75 80
 [0395] Gly His Arg Ser Met Asn Pro Cys Pro Leu Tyr Asp Ala Gln Thr Gly
 [0396] 85 90 95
 [0397] Thr Leu Phe Leu Phe Phe Ile Ala Ile Pro Gly Gln Val Thr Glu Gln
 [0398] 100 105 110
 [0399] Gln Gln Leu Gln Thr Arg Ala Asn Val Thr Arg Leu Cys Gln Val Thr

[0400] 115 120 125
 [0401] Ser Thr Asp His Gly Arg Thr Trp Ser Ser Pro Arg Asp Leu Thr Asp
 [0402] 130 135 140
 [0403] Ala Ala Ile Gly Pro Ala Tyr Arg Glu Trp Ser Thr Phe Ala Val Gly
 [0404] 145 150 155 160
 [0405] Pro Gly His Cys Leu Gln Leu Asn Asp Arg Ala Arg Ser Leu Val Val
 [0406] 165 170 175
 [0407] Pro Ala Tyr Ala Tyr Arg Lys Leu His Pro Ile Gln Arg Pro Ile Pro
 [0408] 180 185 190
 [0409] Ser Ala Phe Cys Phe Leu Ser His Asp His Gly Arg Thr Trp Ala Arg
 [0410] 195 200 205
 [0411] Gly His Phe Val Ala Gln Asp Thr Leu Glu Cys Gln Val Ala Glu Val
 [0412] 210 215 220
 [0413] Glu Thr Gly Glu Gln Arg Val Val Thr Leu Asn Ala Arg Ser His Leu
 [0414] 225 230 235 240
 [0415] Arg Ala Arg Val Gln Ala Gln Ser Thr Asn Asp Gly Leu Asp Phe Gln
 [0416] 245 250 255
 [0417] Glu Ser Gln Leu Val Lys Lys Leu Val Glu Pro Pro Pro Gln Gly Cys
 [0418] 260 265 270
 [0419] Gln Gly Ser Val Ile Ser Phe Pro Ser Pro Arg Ser Gly Pro Gly Ser
 [0420] 275 280 285
 [0421] Pro Gln Trp Leu Leu Tyr Thr His Pro Thr His Ser Trp Gln Arg Ala
 [0422] 290 295 300
 [0423] Asp Leu Gly Ala Tyr Leu Asn Pro Arg Pro Pro Ala Pro Glu Ala Trp
 [0424] 305 310 315 320
 [0425] Ser Glu Pro Val Leu Leu Ala Lys Gly Ser Cys Ala Tyr Ser Asp Leu
 [0426] 325 330 335
 [0427] Gln Ser Met Gly Thr Gly Pro Asp Gly Ser Pro Leu Phe Gly Cys Leu
 [0428] 340 345 350
 [0429] Tyr Glu Ala Asn Asp Tyr Glu Glu Ile Val Phe Leu Met Phe Thr Leu
 [0430] 355 360 365
 [0431] Lys Gln Ala Phe Pro Ala Glu Tyr Leu Pro Gln
 [0432] 370 375
 [0433] <210>9
 [0434] <211>424
 [0435] <212>PRT
 [0436] <213> 人类
 [0437] <400>9
 [0438] Leu Ala Gly Gly Ser Val Arg Trp Gly Ala Leu His Val Leu Gly Thr

[0439]	1	5	10	15
[0440]	Ala Ala Leu Ala Glu His Arg Ser Met Asn Pro Cys Pro Val His Asp			
[0441]		20	25	30
[0442]	Ala Gly Thr Gly Thr Val Phe Leu Phe Phe Ile Ala Val Leu Gly His			
[0443]		35	40	45
[0444]	Thr Pro Glu Ala Val Gln Ile Ala Thr Gly Arg Asn Ala Ala Arg Leu			
[0445]		50	55	60
[0446]	Cys Cys Val Ala Ser Arg Asp Ala Gly Leu Ser Trp Gly Ser Ala Arg			
[0447]	65	70	75	80
[0448]	Asp Leu Thr Glu Glu Ala Ile Gly Gly Ala Val Gln Asp Trp Ala Thr			
[0449]		85	90	95
[0450]	Phe Ala Val Gly Pro Gly His Gly Val Gln Leu Pro Ser Gly Ara Leu			
[0451]		100	105	110
[0452]	Leu Val Pro Ala Tyr Thr Tyr Arg Val Asp Arg Leu Glu Cys Phe Gly			
[0453]		115	120	125
[0454]	Lys Ile Cys Arg Thr Ser Pro His Ser Phe Ala Phe Tyr Ser Asp Asp			
[0455]		130	135	140
[0456]	His Gly Arg Thr Trp Arg Cys Gly Gly Leu Val Pro Asn Leu Arg Ser			
[0457]	145	150	155	160
[0458]	Gly Glu Cys Gln Leu Ala Ala Val Asp Gly Gly Gln Ala Gly Ser Phe			
[0459]		165	170	175
[0460]	Leu Tyr Cys Asn Ala Arg Ser Pro Leu Gly Ser Arg Val Gln Ala Leu			
[0461]		180	185	190
[0462]	Ser Thr Asp Glu Gly Thr Ser Phe Leu Pro Ala Glu Arg Val Ala Ser			
[0463]		195	200	205
[0464]	Leu Pro Glu Thr Ala Trp Gly Cys Gln Gly Ser Ile Val Gly Phe Pro			
[0465]		210	215	220
[0466]	Ala Pro Ala Pro Asn Arg Pro Arg Asp Asp Ser Trp Ser Val Gly Pro			
[0467]	225	230	235	240
[0468]	Arg Ser Pro Leu Gln Pro Pro Leu Leu Gly Pro Gly Val His Glu Pro			
[0469]		245	250	255
[0470]	Pro Glu Glu Ala Ala Val Asp Pro Arg Gly Gly Gln Val Pro Gly Gly			
[0471]		260	265	270
[0472]	Pro Phe Ser Arg Leu Gln Pro Arg Gly Asp Gly Pro Arg Gln Pro Gly			
[0473]		275	280	285
[0474]	Pro Arg Pro Gly Val Ser Gly Asp Val Gly Ser Trp Thr Leu Ala Leu			
[0475]		290	295	300
[0476]	Pro Met Pro Phe Ala Ala Pro Pro Gln Ser Pro Thr Trp Leu Leu Tyr			
[0477]	305	310	315	320

[0478] Ser His Pro Val Gly Arg Arg Ala Arg Leu His Met Gly Ile Arg Leu
 [0479] 325 330 335
 [0480] Ser Gln Ser Pro Leu Asp Pro Arg Ser Trp Thr Glu Pro Trp Val Ile
 [0481] 340 345 350
 [0482] Tyr Glu Gly Pro Ser Gly Tyr Ser Asp Leu Ala Ser Ile Gly Pro Ala
 [0483] 355 360 365
 [0484] Pro Glu Gly Gly Leu Val Phe Ala Cys Leu Tyr Glu Ser Gly Ala Arg
 [0485] 370 375 380
 [0486] Thr Ser Tyr Asp Glu Ile Ser Phe Cys Thr Phe Ser Leu Arg Glu Val
 [0487] 385 390 395 400
 [0488] Leu Glu Asn Val Pro Ala Ser Pro Lys Pro Pro Asn Leu Gly Asp Lys
 [0489] 405 410 415
 [0490] Pro Arg Gly Cys Cys Trp Pro Ser
 [0491] 420
 [0492] <210>10
 [0493] <211>5
 [0494] <212>PRT
 [0495] <213> 人造序列
 [0496] <220>
 [0497] <223> 合成的构建
 [0498] <400>10
 [0499] Gly Gly Gly Gly Ser
 [0500] 1 5

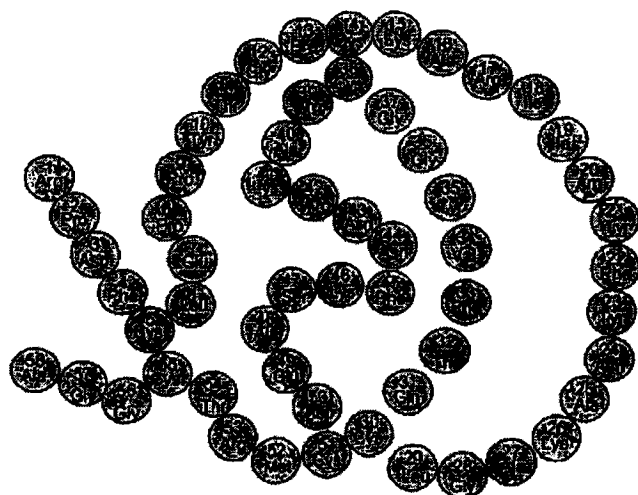


图 1

PF4 (SEQ ID NO:2): ¹⁷NGRRICLDLQAPLYKKI IKKLLS⁷⁰
IL-8 (SEQ ID NO:3): ⁴⁶GRELCLDPKENWVQRVVEKFLKRAENS⁷²
ATIII (SEQ ID NO:4): ¹¹⁸QIHFFAKLNCRLYRKANKSSKLVSANRLFGDKS¹⁵¹
ApoE (SEQ ID NO:5): ¹³²ELRVRLASHLRKLRKRLRDADDLQKRLAVYQAG¹⁶⁵
AAMP (SEQ ID NO:6): ¹⁴RRLRMESESES²⁵
双调蛋白 (SEQ ID NO:7): ²⁵KRKKKGGKNGKNTTNTKKKNP⁴⁵

图 2

NEU2 (SEQ ID NO:8): 1 MASLPVLOKE SVFQSGAHA- -YRIPALLYL PGQSQLLAFA EQRASKKDEH
 YR+P+LL + P +LLAF EQR S D H

NEU4 (SEQ ID NO:9): 1 MGVPRTPSRT VLFERERTGL TYRVPSLLPV PFGPTLLAFV EQRSLPDDSH

NEU2: 49 AELIVLRRGD YDAPTHQVQV QAQEVVAQAR LDGHRSMNPC PLYDAQTGTL FLFFIAIPGQ
 A +VLRRG +W A ++ A HRSMNPC P++DA TGT+ FLFFIA+ G

NEU4: 51 AHRVLRRGT LAGGSV--RW GALHVLGTAA LAEHRSMNPC PVHDAGTGTV FLFFIAVLGH

NEU2: 110 VTEQQQLQTR ANVTRLCQVT STOHRGTWSS PROLTDAAIG PAYREWSTFA VGPGHCLQLN
 E Q+ T N RLC V S D G +W S RDLT+ AIG A ++W+TFA VGPGH +QL

NEU4: 109 TPEAVQIATG RNAARLCCVA SRDAGLSWGS ARDLTEEAG GAVQDWATFA VGPGHGVLPL

NEU2: 170 DRARSLVPPA YAYRKLHP-- ---IQRPIPS AFCFLSHDHG RTWARGHFVA QD-TLECOVA
 R L+VPA Y YR I R P +F F S DHG RTW G V + ECQ+A

NEU4: 169 S-GR-LLVPA YTYRVDRLC FGKICRTSPH SFAFYSDDHG RTWRCGGLVP NLRSGECQLA

NEU2: 224 EVETGEQRVV TL-NARSHLR ARVQAQSTND GLDFQESQLV KKLVEPPPQG CQGSVISFPS
 V+ G+ NARS L +RVQA ST++ G F ++ V L E G CQGS++ FP

NEU4: 227 AVDGGQAGSF LYCNARSPLG SRVQALSTDE GTSFPAERV ASLPETAW-G CQGSIVGFPA

NEU2: 283 P-----

NEU4: 286 PAPNRPRDDS WSVGPRSPQL PPLLGPGVHE PPEAAVDPR GGQVPGGPFPS RLQPRGDGP

NEU2: 284 -----

NEU4: 346 RQPGPRPGVSG DVGSWTLALP MPFAAPPQSP TNLLYSHPVG RRARLHMGR LSQSPLDPRS

NEU2: 321 WSEPVLAKG SCAYSDLQSM GTGPDGSPLF GCLYEANDY- --EEIVFLMF TLKQAFPAEY
 W+EP ++ + YSDL S+ G P+G +F +CLYE +L++

NEU4: 406 WTEFWVIYEG PSGYSDLASI GPAPEGGLVF ACLYESGART SYDEISCTF SLREVLENVP

NEU2: 378 LPQ

NEU4: 466 ASPKPPNLGD KPRGCCWPS

图 3

细菌和真菌唾液酸酶的底物特异性

底物	唾液酸酶活性*					
	霍乱弧菌	产气荚膜梭状芽孢杆菌 (71Kd)	产气荚膜梭状芽孢杆菌 (43Kd)	<i>Arctobacter ureofaciens</i>	鼠伤寒沙门氏菌	粘性放线菌
寡糖与多糖						
II ⁺ Neu5AcLac	100	100	100	100	100	100
II ⁻ Neu5AcLac	53	44	19	157	0.4	462
Colominic acid (α 2-8)	30	33	4.0	63	0.1	300
糖蛋白						
Fetuin (α 2-3> α 2-6)	340	272	6.6	39	17	—
α 1-Acid glycoprotein (α 2-6> α 2-3)	1000	555	—	—	—	761
Submandibular gland mucin (α 2-6)	400	139	5.1	—	—	123
Submaxillary gland mucin (α 2-6)	—	—	—	56	—	—
神经节苷脂						
神经节苷脂混合物	(360)	(350)	1.6	78	34	285
合成的						
4MU-Neu5Ac	1580	605	58	—	1050	—

* 当对II⁺Neu5AcLac的活性视为100时，每一个数值代表相对的唾液酸酶活性。

图 4