

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁶

C07K 14/47
A61K 38/17

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 97198246.5

[43]公开日 1999 年 10 月 13 日

[11]公开号 CN 1231674A

[22]申请日 97.9.11 [21]申请号 97198246.5 [30]优先权 [32]96.9.13 [33]IT [31]MI96A001884 [86]国际申请 PCT/EP97/04966 97.9.11 [87]国际公布 WO98/11137 英 98.3.19 [85]进入国家阶段日期 99.3.25 [71]申请人 泽特希斯有限公司 地址 意大利米兰诺 [72]发明人 A·巴托莱利 C·德吉尤力莫克翰	[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 代理人 周中琦 权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图页数 0 页
--	---

[54]发明名称 作为抗逆转录病毒试剂的蛋白的用途

[57]摘要

本发明涉及用高氯酸从动物器官中提取的蛋白的用途,用于具有抗病毒活性,特别是抗 HIV(人类免疫缺陷病毒)活性的药物的制备。

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 可用高氯酸从哺乳动物肝脏中提取的蛋白的用途, 用于制备治疗由 HIV, 人类免疫缺陷病毒引起的感染的药物。

2. 根据权利要求 1 所述的用途, 其中上述制品的活性成分具有以下序列:

Met	Ser	Glu	Asn	Ser	Glu	Glu	Pro	Val	Gly	Glu	Ala	Lys	Ala
1				5					10				
Pro	Ala	Ala	Ile	Gly	Pro	Tyr	Ser	Gln	Ala	Val	Leu	Val	Asp
15					20					25			
Arg	Thr	Ile	Tyr	Ile	Ser	Gly	Gln	Leu	Gly	Met	Asp	Pro	Ala
	30					35					40		
Ser	Gly	Gln	Leu	Val	Pro	Gly	Gly	Val	Val	Glu	Glu	Ala	Lys
		45					50					55	
Gln	Ala	Leu	Thr	Asn	Ile	Gly	Glu	Ile	Leu	Lys	Ala	Ala	Gly
			60					65					70
Cys	Asp	Phe	Thr	Asn	Val	Val	Lys	Ala	Thr	Val	Leu	Leu	Ala
				75					80				
Asp	Ile	Asn	Asp	Phe	Ser	Ala	Val	Asn	Asp	Val	Tyr	Lys	Gln
85					90					95			
Tyr	Phe	Gln	Ser	Ser	Phe	Pro	Ala	Arg	Ala	Ala	Tyr	Gln	Val
	100					105					110		
Ala	Ala	Leu	Pro	Lys	Gly	Gly	Arg	Val	Glu	Ile	Glu	Ala	Ile
		115					120					125	
Ala	Val	Gln	Gly	Pro	Leu	Thr	Thr	Ala	Ser	Val			
			130					135					

3. 根据权利要求 1 所述的用途, 其中的蛋白与权利要求 2 中表示的序列有至少 80 % 的同源性。

4. 含有与适当佐剂混合的权利要求 1 - 3 的蛋白作为活性成分的药物组合物。

5. 根据权利要求 4 所述的组合物, 其中所述佐剂选自氢氧化铝、多糖或载体蛋白。

说明书

作为抗逆转录病毒试剂的蛋白的用途

本发明涉及从动物器官提取的分子量约为 14kda 的蛋白的用途，用于具有抗逆转录病毒，尤其抗 HIV（人类免疫缺陷病毒）活性的药物的制备。

与 HIV 逆转录病毒感染有关的治疗问题已众所周知。特别是病毒感染不断增长的扩散和由病毒引起的疾病（称为获得性免疫缺陷综合症或 AIDS）的严重性引起了很多的研究努力，这些研究正在产生有关感染控制和治疗的有希望的结果。例如，最近一些蛋白酶抑制剂已成为反转录酶抑制剂，如叠氮胸苷。而且，还在进行预防或治疗疫苗的开发研究，但是目前这些研究由于 HIV 通过突变逃避免疫系统的非凡能力而受到阻碍。

另一方面，用药物治疗的主要问题在于会产生对所用药物的抗性。

目前已发现，WO 92/10197 中描述的可用高氯酸从哺乳动物器官提取的蛋白能在体外抑制病毒复制，并在 AIDS 感染的病人中诱导对病毒侵染的淋巴细胞的免疫和细胞毒性应答。具有如下序列的蛋白表现有特别的活性。

Met	Ser	Glu	Asn	Ser	Glu	Glu	Pro	Val	Gly	Glu	Ala	Lys	Ala
1				5					10				
Pro	Ala	Ala	Ile	Gly	Pro	Tyr	Ser	Gln	Ala	Val	Leu	Val	Asp
15					20					25			
Arg	Thr	Ile	Tyr	Ile	Ser	Gly	Gln	Leu	Gly	Met	Asp	Pro	Ala
	30					35					40		
Ser	Gly	Gln	Leu	Val	Pro	Gly	Gly	Val	Val	Glu	Glu	Ala	Lys
		45					50					55	
Gln	Ala	Leu	Thr	Asn	Ile	Gly	Glu	Ile	Leu	Lys	Ala	Ala	Gly
			60					65					70
Cys	Asp	Phe	Thr	Asn	Val	Val	Lys	Ala	Thr	Val	Leu	Leu	Ala
				75					80				
Asp	Ile	Asn	Asp	Phe	Ser	Ala	Val	Asn	Asp	Val	Tyr	Lys	Gln
85					90					95			
Tyr	Phe	Gln	Ser	Ser	Phe	Pro	Ala	Arg	Ala	Ala	Tyr	Gln	Val
	100					105					110		

Ala Ala Leu Pro Lys Gly Gly Arg Val Glu Ile Glu Ala Ile
115 120 125

Ala Val Gln Gly Pro Leu Thr Thr Ala Ser Val
130 135

上述具有约 14kda 分子量的蛋白（以下称为 p14）可以按照 WO 96/02567 中所述的方法通过哺乳动物肝脏的高氯酸抽提和随后用渗析、HPLC 和疏水交换层析的纯化来得到。

本发明也涉及与上述序列有至少 80 %（优选地 90 %）同源性的蛋白的用途。一些作者描述了从羊肝分离的具有与上述序列非常相似的序列的蛋白[例如 Levy-Favatier, Eur. Biochem. 1903, 213(3), 665-673]，也得到不同动物种类，特别是大鼠肝脏的 cDNA 序列。

使用 P14 事先免疫的动物或人的血浆来证明由 p14 蛋白引起的抗 HIV 活性。为此目的，以每 7 天 1 - 2mg 的剂量皮下注射蛋白，持续 4 - 6 周直至得到明显的抗 p14 抗体滴度。将所得血清与 E - 细胞系（用 HIV - 1_{SF2} 病毒长期感染人 T - 淋巴细胞细胞系 HUT78 衍生的细胞系）或正常未感染的 HUT78 细胞一起培养。

将上述细胞以 1:1000 比例混合到 1ml 含 5 % 胎牛血清和抗生素的 RPMI 1640 培养基中，并以 1×10^5 细胞/加样孔的浓度加入 24 孔加样板。然后将所测血清以 5 % 终浓度加入每个加样孔以达到 10 % 总血清终浓度。对照样品中加入含 5 % 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基和 5 % 正常人血清。

使用鼠抗 HIV - 1 超免疫血清作为阳性对照，该血清能以 10^{-3} 稀释度抑制病毒感染性。

培养 5 天后，将培养基离心并通过 HIV-1 p24 核心抗原捕获实验对所产生的病毒进行定量。

所测血清表现高抑制百分率，证明了 p14 蛋白的治疗活性，可以用作免疫原抗原。也可以使用针对这种蛋白的抗体。

这样的活性事实上已在 HIV 阳性和临床发病的 AIDS 病人体内得到证实，尽管目前只在有限的病例中得到证实。

每隔 7 天用 1mg p14 对六位病人进行皮下注射治疗，时间为 4 周。

每次注射之后和治疗之前，测量以下参数：



- T4/T8 比例;
- 玫瑰花形受体数;
- 总淋巴细胞数;
- T4 增量;
- B 细胞数;
- 粒性白细胞数。

在治疗结束时，血清学参数倾向于改善，而血液学参数表现正常化。治疗几年后，病人仍然活着并且他们的健康状况令人满意。

根据本发明，可以以适当的配方形式，常常是可注射的配方形式施用 p14 蛋白。配方中选择性地含有常规佐剂如氢氧化铝、多糖、载体蛋白等。施用方式（施用剂量、频率等）根据情况依赖于诸如病人情况、疾病阶段、血液学和血清学参数等因素而定。抗 p14 抗体的滴度可以与用于免疫学功能的常用参数一起用于控制治疗。一般地，可以每星期进行蛋白剂量为 0.1-10mg（优选地 1 - 2mg）的皮下注射，持续 3 - 6 周或无论如何直至得到治疗效果。



序列表

(1) 基本信息:

(i) 申请人

(A) 名称: zetesis s.p.a.

(B) 街名: Galleria del Corso 2

(C) 城市: Milano

(E) 国家: 意大利

(F) 邮政编码 (ZIP): 20122

(ii) 发明名称: 作为抗逆转录病毒试剂的蛋白的用途

(iii) 序列数目: 1

(iv) 计算机可读形式:

(A) 介质类型: 软盘

(B) 计算机: IBM PC 兼容机

(C) 操作系统: PC - DOS/MS - DOS

(D) 软件: PatentIn Release # 1.0, 版本#1.30 (EPO)

(2) 关于 SEQ ID NO: 1 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 137 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 假设: 无

(iv) 反义: 无

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 1:

Met	Ser	Glu	Asn	Ser	Glu	Glu	Pro	Val	Gly	Glu	Ala	Lys	Ala
1				5					10				
Pro	Ala	Ala	Ile	Gly	Pro	Tyr	Ser	Gln	Ala	Val	Leu	Val	Asp
15				20						25			

Arg	Thr	Ile	Tyr	Ile	Ser	Gly	Gln	Leu	Gly	Met	Asp	Pro	Ala
	30					35					40		
Ser	Gly	Gln	Leu	Val	Pro	Gly	Gly	Val	Val	Glu	Glu	Ala	Lys
		45					50					55	
Gln	Ala	Leu	Thr	Asn	Ile	Gly	Glu	Ile	Leu	Lys	Ala	Ala	Gly
			60					65					70
Cys	Asp	Phe	Thr	Asn	Val	Val	Lys	Ala	Thr	Val	Leu	Leu	Ala
				75					80				
Asp	Ile	Asn	Asp	Phe	Ser	Ala	Val	Asn	Asp	Val	Tyr	Lys	Gln
85					90					95			
Tyr	Phe	Gln	Ser	Ser	Phe	Pro	Ala	Arg	Ala	Ala	Tyr	Gln	Val
	100					105					110		
Ala	Ala	Leu	Pro	Lys	Gly	Gly	Arg	Val	Glu	Ile	Glu	Ala	Ile
		115					120					125	
Ala	Val	Gln	Gly	Pro	Leu	Thr	Thr	Ala	Ser	Val			
			130					135					