[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C07K 14/47 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00802284.4

[45] 授权公告日 2008 年 5 月 14 日

[11] 授权公告号 CN 100387619C

[22] 申请日 2000.9.15 [21] 申请号 00802284.4

[30] 优先权

[32] 1999.9.17 [33] GB [31] 9921881.0

[86] 国际申请 PCT/GB2000/003566 2000.9.15

[87] 国际公布 WO2001/025275 英 2001.4.12

[85] 进入国家阶段日期 2001.6.18

[73] 专利权人 鲁珀特·唐纳德·霍姆斯

地址 英国伦敦

[72] 发明人 鲁珀特·唐纳德·霍姆斯

[56] 参考文献

WO9712975 1997.4.10

WO9533768 1995.12.14

US5773573 1998.6.30

审查员 王大鹏

[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 李 琪

权利要求书 1 页 说明书 44 页 附图 2 页

[54] 发明名称

埃滋蛋白的调节/伸展肽

[57] 摘要

本发明描述了人埃滋蛋白(Hep 受体)中的一种新型调节位点以及与该位点结合诱导免疫反应的带电分子。 本发明人已测定，埃滋蛋白的可溶性构象中的 Hep 受体(人埃滋蛋白的跨越氨基酸 308 – 373)由两个相邻 α 螺旋结构域组成，它们在铰合区(M339 – M340)折叠在一起形成两个反向平行的螺旋线，该螺旋线通过初级氨基酸序列的互补侧链电荷来稳定的(参见表 1 和图 1)。 本发明人测定了在埃滋蛋白的未折叠膜相关构象中，该 Hep 受体被迫通过细胞膜并暴露在细胞外表面上(参见图 2)。 这种出人意料的发现与至今科学出版物中的膜组构模型相反，在细胞外表面上未显示埃滋蛋白 α 结构域的任何部分。 本发明为氨基酸序列与部分 Hep 受体相同的肽与 Hep 受体的互补部分结合，这样引起药用免疫反应。 本发明还在于与该位点结合的任何带电分子将诱导药用免疫反应。 这些带电分子可以口服和通过其它途径施用以治疗各种传染病和癌症。

1. 一种用于制备治疗感染性疾病、癌症或要求刺激免疫应答的病状的药物的肽，其中该肽为 KEELMLRLQDYEE。

2. 权利要求 1 的肽在制备用于治疗感染性疾病、癌症和要求刺激免疫应答的病状的药物中的用途。

埃滋蛋白的调节/伸展肽

发明背景

本发明的领域涉及通过诱导疾病斗争免疫反应来治疗传染病和癌症。耐受抗生素的病原菌的新菌株的生长问题、有效地抗慢性病毒和真菌引起的感染的化合物有限以及缺乏有效的抗癌治疗方法证实需要能够提高宿主防御这些医学问题的化合物。本发明涉及通过结合到 Hep 受体(为本发明人在人埃滋蛋白中发现的一种新型活性位点)上刺激免疫反应的新型带电分子。优选的带电分子为序列与人埃滋蛋白中的 Hep 受体相同的新型肽。

埃滋蛋白为蛋白质中 ERM(埃滋蛋白-根蛋白-膜突蛋白)家族的一员，在许多细胞类型中起结构和调节作用。大量事实证明，埃滋蛋白调节皮层细胞骨架的结构，从而控制细胞表面拓扑图。埃滋蛋白采取两种主要构象：1)在细胞质中发现的可溶性折叠形式，2)伸展和伸长形式，发现它附着在细胞膜的胞质表面上，特别是与微绒毛以及其它激活相关的结构相连。该蛋白质的 N 端结构域附着在细胞膜的胞质表面上，同时其 C 端部分与肌动蛋白细胞骨架结合。埃滋蛋白为 T 细胞中的酪氨酸激酶底物，并且表皮生长因子(EGF)受体的 EGF 刺激还导致其经过酪氨酸磷酰化。埃滋蛋白在其伸展构象中的 N 端结构域在有 PIP_2 的情况下与 CD44 的胞质尾区结合。埃滋蛋白还可以与 ICAM-2 的胞质尾区结合。埃滋蛋白对诸如钙蛋白酶的调节蛋白酶非常敏感，并且在细胞激活期间被快速转换。

Anthony Bretscher、David Reczek 和 Mark Berryman(1997)的“埃滋蛋白：一种在细胞表面结构集群中需要构象激活以使微丝与质膜相连的蛋白质”《细胞科学杂志》110:3011-3018

对埃滋蛋白的二级结构的详细分析显示，有三个主要结构域：氨基酸 1-300 的 N 端结构域，氨基酸 300-470 的高带电的α结构域以及氨基酸 470-585 的 C 端结构域。结构模拟暗示，尽管还没有鉴定出铰合部的位置，

但是α结构域以埃滋蛋白的可溶性球状形式折叠成两个反向平行的螺旋线。在其伸展的磷酰化形式的模型中，埃滋蛋白通过 N 端结构域附着在细胞膜的内表面上，两个埃滋蛋白分子的α结构域配对成反向平行二聚体并位于细胞表面膜的下面。在该伸展形式中，埃滋蛋白在第 353 位的酪氨酸上经酪氨酸磷酰化(Yp353)。

Ossi Turunen、Markku Sainio、Juha Jaaskelainen、Olli Carpen 和 Antti Vaheri(1998)的“埃滋蛋白家族中的结构-功能关系以及在神经纤维瘤 2 蛋白质中肿瘤相关点突变的作用”《生物化学和生物物理学学报》1387:1-16

本发明人在 US5773573 中公开了与 gp120 的 C 端具有 70%相同性的 14 氨基酸肽 HEP1 (氨基酸序列 TEKKRRETEREKE, SEQ ID 28, 与人埃滋蛋白的氨基酸 324-337 相同)，它能够在人体内抑制 HIV 复制。此时本发明人相信，观察到的肽 HEP1 的抗 HIV 作用是由于口服 HEP1 诱导了对 gp120 的 C 端的互补 HIV 序列诱导的自体反应性免疫反应的免疫耐性。

本发明人现已公开了 HEP1 的抗－HIV 活性是由于激活了新型免疫途径，其中 HEP1 与 Hep 受体的结构域 B 中的其互补序列结合(HEP1 与该 Hep 受体的结构域 A 部分相同)。

表 1. 氨基酸、三字母代码、一字母代码和侧链电荷

在生理 pH 下氨基酸侧链上的电荷				
氨基酸	三字母代码	一字母代码	电荷	符号
甘氨酸	Gly	G	无	
丙氨酸	Ala	A	无	
缬氨酸	Val	V	无	
异亮氨酸	Ile	I	无	
亮氨酸	Leu	L	无	
丝氨酸	Ser	S	无	
苏氨酸	Thr	T	无	
天冬氨酸	Asp	D	负电	—
谷氨酸	Glu	E	负电	—
磷酸酪氨酸	Tyr(P)	Yp	负电	—
天冬酰胺	Asn	N	弱负电	-
谷氨酰胺	Gln	Q	弱负电	-
赖氨酸	Lys	K	正电	+
精氨酸	Arg	R	正电	+
组氨酸	His	H	弱正电	+
脯氨酸	Pro	P	无	
色氨酸	Trp	W	无	
苯丙氨酸	Phe	F	无	
酪氨酸	Tyr	Y	无	
甲硫氨酸	Met	M	无	
半胱氨酸	Cys	C	无	

附图简述

图 1 为以下初级氨基酸序列的对比:

a) 可溶性埃滋蛋白中 Hep 受体的折叠反向平行相关的螺旋线。

b) 在具有肽配体的膜相关埃滋蛋白中 Hep 受体的伸展螺旋线。

c) 在两个细胞相互作用期间形成反向平行相关的螺旋线的二聚体的两个伸展 Hep 受体。

图 2 为埃滋蛋白上的 Hep 受体、其配体、细胞膜、细胞表面受体和

细胞骨架组分之间关系的说明。

序列简述

SEQ ID 1 为本发明的肽的氨基酸序列。
SEQ ID 2 为本发明的肽的氨基酸序列。
SEQ ID 3 为本发明的肽的氨基酸序列。
SEQ ID 4 为本发明的肽的氨基酸序列。
SEQ ID 5 为本发明的肽的氨基酸序列。
SEQ ID 6 为本发明的肽的氨基酸序列。
SEQ ID 7 为本发明的肽的氨基酸序列。
SEQ ID 8 为本发明的肽的氨基酸序列。
SEQ ID 9 为本发明的肽的氨基酸序列。
SEQ ID 10 为本发明的肽的氨基酸序列。
SEQ ID 11 为本发明的肽的氨基酸序列。
SEQ ID 12 为本发明的肽的氨基酸序列。
SEQ ID 13 为本发明的肽的氨基酸序列。
SEQ ID 14 为本发明的肽的氨基酸序列。
SEQ ID 15 为本发明的肽的氨基酸序列。
SEQ ID 16 为本发明的肽的氨基酸序列。
SEQ ID 17 为本发明的肽的氨基酸序列。
SEQ ID 18 为本发明的肽的氨基酸序列。
SEQ ID 19 为本发明的肽的氨基酸序列。
SEQ ID 20 为本发明的肽的氨基酸序列。
SEQ ID 21 为本发明的肽的氨基酸序列。
SEQ ID 22 为本发明的肽的氨基酸序列。
SEQ ID 23 为本发明的肽的氨基酸序列。
SEQ ID 24 为本发明的肽的氨基酸序列。
SEQ ID 25 为本发明的肽的氨基酸序列。
SEQ ID 26 为本发明的肽的氨基酸序列。

SEQ ID 27 为本发明的肽的氨基酸序列。

SEQ ID 28 为本发明的肽的氨基酸序列。

发明详述

在细胞质中发现的埃滋蛋白的可溶性构象由两个相邻α螺旋结构域组成，它们在铰合区(M339-M340)折叠在一起形成两个反向平行的螺旋线，该螺旋线通过初级氨基酸序列的互补侧链电荷来稳定。本发明的主题是Hep受体结构域A的氨基酸序列的正电侧链和负电侧链与Hep受体结构域B的氨基酸序列的正电侧链和负电侧链互补。在埃滋蛋白的激活的开放构象中，两个不同埃滋蛋白分子的Hep受体的结构域A和结构域B相互作用能够形成反向平行二聚体。除了在细胞表面下面形成的埃滋蛋白的反向平行二聚体之外，本发明人已测定这些二聚体可以在暴露在一个细胞表面上的Hep受体与暴露在另一个细胞表面上的Hep受体之间形成。当两个Hep受体在两个细胞表面紧密相连期间进行接触时，在两个细胞中都引发激活信号(图2)。部分地模拟Hep受体的结构域A和结构域B的侧链电荷之间的相互作用的任何带电分子将引起药用生物反应。

Hep受体-结构域A(人埃滋蛋白的氨基酸号码308-339)，由以下32个氨基酸序列组成。

(这些序列是使用每个氨基酸的单字母代码从多肽的N端至C端列出的。Yp代表体内发现的磷酸酪氨酸的形式)

SEQ ID 1

AREEKHQKQLERQQLETEKKRRETVEREKEQM

在US5773573中，本发明人公开了肽HEP1(SEQ ID 28)的抗-HIV活性，本发明人现已发现它具有与Hep受体-结构域A的一部分(人埃滋蛋白序列的跨越氨基酸324-337)相同的序列。在上述专利中，本发明人假设抗-HIV活性是由于对由HIV gp120的C端诱导的自身反应性免疫反应的免疫耐性的诱导所导致的。本发明人现在可以公开HEP1的抗-HIV活性是由于其与Hep受体结构域B结合并诱导新型免疫反应的结果。本发明的主题是由埃滋蛋白的Hep受体获得的活性明显优于HEP1的新型肽。

Hep 受体-结构域 B(人埃滋蛋白的氨基酸号码 340-373)，由以下 34 个氨基酸序列组成(在埃滋蛋白的膜相关构象中酪氨酸 353[Y]可以被磷酸化为磷酸酪氨酸[Yp]):

SEQ ID 2

MREKEELMLRLQDY$_{(p)}$EEKTKKAERELSEQIQRALQ

本发明人已测定 Hep 受体的结构域 B 为埃滋蛋白上的在脑感染期间 HIV gp120 与其结合的位点。(HIV gp120 使用与一部分 Hep 受体结构域 A 具有 70%相同性的其带电 C 端氨基酸与 Hep 受体结构域 B 结合)。与 Hep 受体结合的新型带电分子可用于治疗 HIV 相关的痴呆。

Claudia Hecker、Christoph Weise、Jurgen Schneider-Schaulies、Harvey Holmes、Volker ter Meulen(1997)

“HIV-1 包膜蛋白 gp120 与结构膜蛋白埃滋蛋白和膜突蛋白的特异性结合”《病毒研究》49 215-223

本发明人已证实(实施例 1A)，Hep 受体肽具有显著的辅助活性，并且通过在小鼠中使用 HEP1、Rupe312、Rupe1014、Rupe1024 和 Rupe2032 使对卵清蛋白的 IgG 抗体反应提高证实了这一点。本发明人也已证实(实施例 1B)在小鼠中使用 HEP1、Rupe312、Rupe15、Rupe1014、Rupe1024 和 Rupe2032 之后 Hep 受体肽具有提高胸腺中对羊红细胞(SRBC)的抗体依赖性细胞毒素反应的活性。

(Rupe312 SEQ ID 8:KKRRETVERE 和 Rupe15 SEQ ID 3:TEKKR 和 Rupe1014 SEQ ID 16:EREKE 和 Rupe1024 SEQ ID 17:EREKEQMMREKEEL 和 Rupe2032 SEQ ID 19:KEELMLRLQDYEE 和 HEP1 SEQ ID 28:TEKKRRETVEREKE)

本发明人已证实(实施例 2)hep 受体肽具有显著的抗肿瘤活性，并且通过在小鼠中使用 Rupe312 和 Rupe414 Hep 受体肽降低快速生长的移植肉瘤和生长较慢的移植宫颈癌的生长速率证实了这一点。

(Rupe312 SEQ ID 8:KKRRETVERE 和 Rupe414 SEQ ID 13:KRRETVEREKE)

本发明人已证实(实施例 3)，在 21 位 HIV 感染的患者中 HEP1 治疗(每天口服 10mg，治疗 30 天或 90 天)诱导使治疗后 6 个月时间内临床好转的免疫反应，这可以通过以下来度量: CD4 T 淋巴细胞群体增加和机会感

染降低、HIV 感染性降低和 CD38、T 淋巴细胞的 CD8 群体(一种公认的向 AIDS 发展的预后标记物)降低。

M Levancher、F Hulstaert、S. Tallet、S Ullery、J J Pocidalo、B A Bach(1992)"CD8 淋巴细胞上的激活标记物在人免疫缺陷综合征中的重要性: 疾病分期和预后观察到值"《临床实验免疫学》90 376-382

CD44 和 MHC 类别 I 在 T 淋巴细胞上持续 6 个月的表达水平的平均增加, 显然它也与临床好转有关。通过给予 HEP1 未检测到毒性。MHC 类别 I 表达和 CD44 表达的增加与记忆 T 细胞和 I 型限制性细胞介导的免疫性的增加有关。

Stephan Oehen 和 Karin Brduscha-Riem(1998)

"效应器的原初 CTL 和记忆 CTL 的区别: 效应器功能与表型和细胞分裂的相关性"《免疫学杂志》161 5338-5346

该试验的结果证实模拟 Hep 受体全部或部分的肽或其它带电分子可以引起最后导致免疫系统的同源状态改变的激活信号并长期正调节细胞介导免疫性和体液免疫性。本发明人也已证实, 通过由 Hep 受体刺激引起的免疫反应可以治疗并治愈妇女中急性和慢性念珠菌感染(实施例 4)。本发明人已证实, 由 Hep 受体获得的肽可以在小鼠体外和体内激活单核细胞和巨噬细胞, 从而引起保护性免疫反应(实施例 5)。本发明的肽的活性比 HEP1 的高得多。Hep 受体刺激还导致激活人外周血单核细胞, 通过测定放射性含氚胸腺嘧啶核苷掺入生长细胞的 DNA 中证实了这一点。由 Hep 受体结构域 A 获得的新型肽 Rupe312 和 Rupe414 的活性比 HEP1 的高 10 倍(实施例 6)。

(Rupe312 SEQ ID 8:KKRRETVERE 和 Rupe414 SEQ ID 13:KRRETVEREKE)

本发明人也发现用由 Hep 受体获得的肽将人白细胞(WBC)培养 24 小时将引起 MHC 类别 I 的细胞表面表达降低, 这可能是由于细胞激活和受体内在化以及表达 MHC 类别 I 的巨噬细胞总群体增加。这与 HEP1 治疗之后的 6 个月内 HIV 患者中看到的表达 MHC 类别 I 的群体细胞长期增加相一致。在该试验系统中, Rupe312 和 Rupe414 的活性明显高于 HEP1 的活性(实施例 7)。

(Rupe312 SEQ ID 8:KKRRETVERE 和 Rupe414 SEQ ID 13:KRRETVEREKE)

本发明人已证实(实施例 8), Hep 受体肽对 IL-8 的表达具有明显的抑制效果。IL-8 的抑制可以在 Hep 受体肽激活单核细胞/巨噬细胞的选择活性中起作用。

(Rupe312 SEQ ID 8:KKRRETVERE)

本发明人已证实(实施例 9), 非常低剂量的 Hep 受体肽(1-100ng/小鼠)保护小鼠免受鼠伤寒沙门氏杆菌的急性感染。

(Rupe15 SEQ ID 3:TEKKR 和 Rupe1024 SEQ ID 17:EREKEQMMREKEEL 和 HEP1 SEQ ID 28:TEKKRRETVEREKE)

本发明人已证实(实施例 10), 非常低剂量的 Hep 受体肽(1-1000ng/小鼠)提高了小鼠致命疱疹病毒感染模型的存活时间。(HEP1 SEQ ID 28:TEKKRRETVEREKE)

本发明描述了特异性地与 Hep 受体结合的带电分子。本发明人已设计了三组新型带电肽, 其序列与 Hep 受体的互补结构域的氨基酸序列相同, 并且或者与 Hep 受体结构域 B(SEQ ID 3-SEQ ID 16)结合, 或者与结构域 A 和 B(SEQ ID 17)结合, 或者与结构域 A(SEQ ID 18-SEQ ID 27)结合。为本发明主题的肽可能与细胞表面暴露的 Hep 受体结合并稳定埃滋蛋白的伸展构象、诱导免疫-调节效应。优选的肽的长度为 5-13 个氨基酸, 并且优选序列如下。

Hep 受体结构域 B 结合肽:

SEQ ID 3

Rupe 15: TEKKR

SEQ ID 4

Rupe 19: TEKKRRETV

SEQ ID 5

Rupe 111: TEKKRRETVER

SEQ ID 6

Rupe 37: KKRRE

SEQ ID 7

Rupe 310: KKRRETVE

SEQ ID 8

Rupe 312: KKRRETVERE

SEQ ID 9

Rupe 313: KKRRETVEREK

SEQ ID 10

Rupe 314: KKRRETVEREKE

SEQ ID 11

Rupe 411: KRRETVER

SEQ ID 12

Rupe 413: KRRETVEREK

SEQ ID 13

Rupe 414: KRRETVEREKE

SEQ ID 14

Rupe 59: RRETV

SEQ ID 15

Rupe 614: RETVEREKE

SEQ ID 16

Rupe 1014: EREKE

Hep 受体结构域 A 和结构域 B 结合肽:

SEQ ID 17

Rupe 1024: EREKEQMMREKEEL

Hep 受体结构域 A 结合肽:

SEQ ID 18

Rupe 2024: KEELM

SEQ ID 19

Rupe 2032: KEELMLRLQDYEE

SEQ ID 20

Rupe 2032p: KEELMLRLQDYpEE

SEQ ID 21

Rupe 2132: EELMLRLQDYEE

SEQ ID 22

Rupe 2132p: EELMLRLQDYpEE

SEQ ID 23

Rupe 2232: ELMLRLQDYEE

SEQ ID 24

Rupe 2232p: ELMLRLQDYpEE

SEQ ID 25

Rupe 2428: MLRLQ

SEQ ID 26

Rupe 2832: QDYEE

SEQ ID 27

Rupe 2832p: QDYpEE

与结构域A或结构域B结合或者桥接Hep受体的结构域A和结构域B的其它肽或其它带电分子可能具有生物活性。这些肽或其它带电分子可以经口服或者通过用于治疗各种传染病和癌症的其它途径施用。

制备方法

本发明所用的肽可以使用例如用Boc或Fmoc化学方法的固相法或者肽合成领域中技术人员已知的肽合成的任何其它实际途径来合成。

可以Merrifield方法为基础进行用Boc-氨基酸的逐步固相合成(《美国化学学会杂志》85 2149-2154)。可以使用以下化合物: (新生物化学树脂: Boc-Glu(OBzl)-PAM, 氨基酸: Boc-Lys (2Cl-Z-)OH, Boc-Glu(OBzl)OH, Boc-Arg(Tos)OH, Boc-Val-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, 溶剂: DMF (Rathburn), 二氯甲烷(BDH), 乙酸乙酯(BDH), 试剂: HBTU (相分离有限公司), 对甲酚(Lanchester) TFA (Halocarbon Products Corporation) HF (BOC) DIEA (Fluka)。Boc-氨基酸的推荐的反应性侧链保护基团有:Arg (Tos), Asn(Xan), Asp (OcHxl), Glu (OcHxl) Gln (Xan)或 Gln, His (DNP), Lys (CIZ), Ser (Bzl) Tyr (BrZ) Trp (CHO)。这

些缩写的含义如下：DCC=二环己基碳二亚胺，DIC=二异丙基碳二亚胺，DCM=二氯甲烷，DMF=二甲基甲酰胺，TFA=三氟乙酸，Boc=叔丁氧基羰基，HOBT=羟基苯并三唑，DIEA=二异丙基乙胺，DCU=二环己基脲。

例如，本发明肽的 Boc 合成可以按如下进行：使用 0.5 mmol 树脂和 3 倍量的激活 Boc 氨基酸进行 0.5mmol 等级的 HBTU 激活/就地中和。Boc 氨基酸和激活试剂(HBTU)应以等摩尔量使用，即在这种情况下各 2mmol 与 3 倍过量相等。使用 DIEA 中和用于偶联的树脂并激活 Boc-氨基酸。(因此使用 2.5mmol、1 当量 Boc-aa 和 1 当量树脂)。试剂：0.5M 在 DMF 中的 HBTU (MW=379，0.5M=18.95g 于 100ml 中，注意它对光不稳定)要求 2mmol=4ml 并且 2.5mmol DIEA=0.46ml (MW=129，d=0.742)。氨基酸的激活：Boc-氨基酸应仅在加入树脂之前即刻被激活，特别是在 Arg(Tos)的情况下。就所有 Boc 氨基酸而言：称重 2mmol Boc 氨基酸并置于 20ml 玻璃样品瓶中。加入 4ml 0.5M HBTU溶液并摇荡至固体溶解。加入 0.46 ml DIEA 并混合(可以观察到颜色有一定的变化)。方法：用 DMF 洗涤树脂，用 100%TFA 除去 Boc-保护基团-摇荡 2 次，各 1 分钟，其间进行排水，排水，用 DMF 流动洗涤 1 分钟，排水，加入激活的氨基酸溶液，摇荡 10 分钟，然后取样并进行茚三酮试验，以测定偶联效率。完成合成之后用 DMF 流动洗涤，然后用 DCM 流动洗涤，干燥。使用 3 倍过量的于 DMF 中的 HBTU 激活的 Boc-氨基酸完成第一和接下来每一水平的肽构建的合成。在所有偶联中，如定量茚三酮试验显示，偶联效率应大于 99%。在 100% TFA 中进行 N-端去保护。在去保护之前和之后应小心地将树脂肽流动洗涤。最后偶联并除去 Boc-保护之后，用二氯甲烷将肽树脂洗涤并经空气干燥。通过高 HF 法(2 g 树脂肽，2g 甲酚，20ml HF，在-5℃下 1.5 小时)从树脂载体上除去肽，得到用乙酸乙酯(100ml)沉淀并再溶于 6M脉 HCL-0.1M TRIS 溶液(20ml)的粗制肽。

该肽可以按如下进行提纯：在 Vydac C_{18} 5 RAC 柱上使用分析 HPLC 分离。将 HPLC 级乙腈(aldrich)和水通过一膜滤器过滤并在使用前用氦流脱气。用开始在 20 分钟内从 0%乙腈恒定增加到 60%乙腈，在该浓度下保持 20 分钟，并在 10 分钟内稳定降低到 0%乙腈的溶剂梯度以 1.2ml/min

的恒定流速进行分析分离。在 TSK-GEL 制备 C_{18} 柱上进行肽的制备性分离。用开始在 60 分钟内从 0%乙腈恒定增加到 18%乙腈，然后在 60%乙腈下持续 80 分钟，在该浓度下保持 30 分钟的溶剂梯度以 8ml/min 的恒定流速进行分离。可以通过两个微处理器控制的 Gilson 302 单活塞泵来控制该梯度。可以用 Waters 486 可调吸光度检测器在 214nm 下检测化合物，并用 HP 5L 激光喷墨打印机记录分析色谱仪。用于制备色谱仪的 Holochrome UV-VIS 检测器 220 nm 可以用 LKB 2210 单道记录器记录。可以使用 Waters Quanta 4000 设备用磷酸盐缓冲液(75 μM) pH2.5 在 15kV 下运行，抽样时间 20 秒，通过流体静力注射加样到 60cm 柱上，运行时间 12 分钟，进行毛细管电泳质量控制。1 g 0.46mmol 树脂合成的产量应约为 250mg 纯肽。

也可以使用其它溶液合成法生产大量的本发明肽。使用通过肽合成领域中技术人员已知的活性酯法的分步合成可以获得得到保护的三聚体片段。然后，在除去相关 C 和 N 端保护基团之后，用 DCC/HOBT 组装这些片段。除去所有保护基团之后，将该粗制肽在 SP-Sephadex-C25 离子交换色谱柱上经部分提纯，之后进行制备性 HPLC，然后经冷冻干燥。

使用方法

可以将 0.01-1000mg 冻干肽溶于 1-10ml 蒸馏水中并口服或经阴道施用。可以将 0.01-1000mg 与丸剂或胶囊或栓剂制造领域中技术人员常用的并口服或经阴道或肛门施用的载体配制成丸剂或胶囊或栓剂。可以将蒸馏水中 0.001-100mg 肽的过滤灭菌溶液经皮下或静脉内或肌内注射。

以下实施例仅用于说明本发明，无论如何不应构成对本发明的限制。

实施例 1A

Hep 受体肽在小鼠中提高对卵清蛋白的 IgG 血清抗体反应的辅助活性

在小鼠中注射 50μg 卵清蛋白与不同浓度的不同 Hep 受体肽 2 周后测定其中的 IgG 反应。IgG 反应是在有卵清蛋白的情况下通过 1-100 稀释的小鼠血清的光密度(OD)测定的。

结果

以 OD 记录的 IgG 反应

肽代码	对照	IP 注射(μg/小鼠)				肽序列
	0	0.01	0.1	1	10	
HEP1	0.69	0.45	0.44	0.56	0.57	TEKKRRETVEREKE
Rupe312	0.69	0.68	0.88	0.55	0.44	KKRRETVERE
Rupe1014	0.127	0.232	0.231	0.477	0.508	EREKE
Rupe1024	0.152	0.250	0.262	0.489	0.445	EREKEQMMREKEEL
Rupe2032	0.127	0.509	0.606	0.327	0.203	KEELMLRLQDYEE

然后将以 OD 记录的 IgG 反应以每个对照相应于 100 经过换算。

肽代码	对照	IP 注射(μg/小鼠)				肽序列
	0	0.01	0.1	1	10	
HEP1	100	65	64	81	83	TEKKRRETVEREKE
Rupe312	100	99	128	80	64	KKRRETVERE
Rupe1014	100	183	182	376	400	EREKE
Rupe1024	100	164	172	322	293	EREKEQMMREKEEL
Rupe2032	100	401	477	257	160	KEELMLRLQDYEE

结论

除了 HEP1 之外的所有 hep 受体肽都显示了辅助活性，但都具有不同的最佳浓度。

实施例 1B

Hep 受体肽在小鼠中提高胸腺中对羊红细胞(SRBC)的抗体依赖性细胞毒素反应的活性

测定 Hep 受体肽对在小鼠(CBA-C57B1 F1 杂种，2 月龄，体重 18-22g)中激活抗羊红细胞(SRBC)的形成抗体的细胞的影响。首先向小鼠经腹膜内注射或者作为对照的 0.5ml 无菌生理盐水或者在相同体积生理盐水中的 Hep 受体肽，注射 Hep 受体肽 30 分钟之后，向每只小鼠经腹膜内施用

含有 5 百万 SRBC 的细胞悬液。免疫 4 天之后，通过颈脱臼杀死小鼠，并无菌地获得脾。将每只脾在 2ml 培养基 199 中均化，然后将 100μl 该悬液放入 1ml 在培养基 199 中的制备琼脂糖(贮藏在 48℃下的水浴中)，加入 SRBC 悬液，获得 1%琼脂糖的最终浓度。将 1ml 琼脂糖-细胞混合物搅拌后转移到培替氏培养皿中静置。当琼脂糖变成固体时，将该培替氏培养皿在 37℃下培养 1 小时，然后在琼脂糖凝胶上面加入 0.5ml 1:20 稀释的培养基 199 中的豚鼠血清作为补体源。继续培养另外 1 小时。然后使用 8x 双目显微镜对培养皿进行目测并计数噬斑数(每个噬斑相当于一个分泌抗体的小鼠脾细胞)。结果以每百万有核脾细胞中抗体分泌细胞的数量和整个脾中抗体分泌细胞的数量来表示。由于没有观察到促有丝分裂作用(施用 Hep 受体肽导致正常大小的小鼠脾)，因此这两个计算的结果相似。

每百万有核脾细胞中抗体形成细胞的数量的平均数据(来自每个数据点的 30 只小鼠)。数据为将每个对照组对应于 100 换算的。

肽代码	对照	IP 注射(μg/小鼠)		肽序列
	0	1	10	
HEP1	100	192	203	TEKKRRETVEREKE
Rupe312	100	317	267	KKRRETVERE
Rupe15	100	255	134	TEKKR
Rupe1014	100	202	325	EREKE
Rupe1024	100	401	397	EREKEQMMREKEEL
Rupe2032	100	236	232	KEELMLRLQDYEE

(Rupe312 SEQ ID 8:KKRRETVERE 和 Rupe15 SEQ ID 3:TEKKR 和 Rupe1014 SEQ ID 16:EREKE 和 Rupe1024 SEQ ID 17:EREKEQMMREKEEL 和 Rupe2032 SEQ ID 19:KEELMLRLQDYEE 和 HEP1 SEQ ID 28:TEKKRRETVEREKE)

结论

所有 Hep 受体肽都提高了胸腺中的抗体依赖性细胞毒素反应，但都具有不同的最佳浓度。

实施例 2

使用 Rupe312 和 Rupe414 作为例子的 Hep 受体肽对子宫 SM-322 的移植肉瘤的生长和 CBA 小鼠中进行的子宫颈 CUS-5 的癌的抗癌活性

材料和方法

移植的小鼠肉瘤 SM-322 模型(内皮肿瘤)

使用 1,2-二甲基肼在雌性小鼠中诱导子宫的初生肿瘤。将几个初生肿瘤移植到同基因小鼠中。4 天后在移植点开始出现第一个可见的小瘤。带有移植肿瘤的小鼠的估计寿命为 22-24 天。

移植小鼠子宫颈癌模型 CUC-5(上皮肿瘤)

使用甲基胆蒽在雌性小鼠中诱导初生肿瘤。然后将几个初生肿瘤自移植到子宫颈中。带有移植肿瘤的小鼠的估计寿命为 43 天。

CBA 小鼠

CBA 雌性小鼠体重 21.4=/-1.2g, 2-3 月龄。以 0.5ml 肿瘤悬液(1g 肿瘤/10ml Igla 培养基)引入肿瘤, 每个处理组使用 10 只小鼠。

肽制备和施用

在使用前即刻以三个浓度将冻干肽溶于无菌生理盐水中。实验期间将 0.5ml 溶液以每周 2 次注射到小鼠的腹膜内。使用 3 个不同浓度的肽使每只小鼠每次注射的三个最终剂量为 10、1.0 和 0.1μg。

结果

以三个时间点记录相对于对照组的肿瘤体积平均降低的百分数。将处理组和对照组中小鼠的寿命进行比较并比较对照和处理组之间的肿瘤历史。

移植小鼠肉瘤模型 SM-322

肽	浓度	相对于对照的肿瘤体积降低的百分数			估计寿命(天)
	μg/小鼠	第 8 天	第 12 天	第 15 天	估计
Rupe312	10	63	54	27	12-27
	1	67	32	38	12-19
	0.1	61	34	59	12-22
Rupe414	10	65	43	43	13-20
	1	68	28	43	12-20
	0.1	68	39	22	12-19
		第 8 天的体积	第 12 天的体积	第 15 天的体积	
对照		1.49	11.2	17.7	12-16

移植小鼠子宫颈癌模型 CUC-5

肽	浓度	相对于对照的肿瘤体积降低的百分数			估计寿命(天)
	μg/小鼠	第 5 天	第 12 天	第 19 天	估计
Rupe312	10	50	25	49	48-76
	1	50	26	49	47-76
	0.1	50	18	45	42-76
Rupe414	10	50	16	48	36-76
	1	50	16	43	36-76
	0.1	50	18	57	47-76
		第 5 天的体积	第 12 天的体积	第 19 天的体积	
对照		0.06	0.68	1.56	47-76

(Rupe312 SEQ ID 8:KKRRETVERE 和 Rupe414 SEQ ID 13:KRRETVEREKE)

结论

Hep 受体肽 Rupe312 和 Rupe414 降低了快速生长的移植肉瘤的生长速率，使得估计寿命略有增加(3-18%)。

Hep 受体肽 Rupe312 和 Rupe414 降低了生长较慢的移植子宫颈癌的生

长速率，但是未检测到估计寿命的明显增加(或者降低)。

Hep 受体肽 Rupe312 和 Rupe414 在一致地使肿瘤体积更小的两个模型中都诱导肿瘤中心的非出血性溃疡破坏。

实施例 3

HEP1，一种 Hep 受体肽，经 21 位 HIV 感染的患者口服使用(10mg/天，或者持续 30 天或者持续 90 天)，使得临床好转。该研究的成功通常证实了由 Hep 受体获得的肽的实用性和付诸实施

用药用级 HEP1，一种与 Hep 受体的结构域 A 的一部分具有相同序列的肽，进行该研究。在莫斯科免疫学院在 Ravshan Ataullakhanov 教授的指导下为该研究招募 HIV-感染的志愿者。在开始试验之前，该药用级 HEP1 通过了广泛的动物(大鼠和兔)毒性和临床前试验，证实该化合物安全。(毒性的初步评价-阴性，1000x 治疗剂量的作用-阴性，局部刺激-阴性，对 CNS 和 HVS 的影响-阴性，亚急性毒性-阴性，诱变作用-阴性，慢性毒性-阴性，胚胎毒性-阴性)

研究方案

在早上早餐之前一天一次让患者口服 10mg 在 2ml 无菌蒸馏水中的 HEP1 溶液(制备该溶液并将其分成份儿，每份 10mg 贮存在－20℃下)。在治疗之前，让所有患者连续 30 天服用编码的安慰剂蒸馏水溶液。第一组 11 个患者服用 HEP1 持续 90 天，15 个月之后，在分析了来自第一组患者的数据后让第二组 10 个患者服用 HEP1 持续 30 天。治疗期间，要求患者 1 周看 1 次门诊，接受体格检查并抽取分析用的血样。还要求患者与治疗后监控合作并且 1 个月看 1 次门诊持续 6 个月，进行体格检查并提供血样。治疗期间，21 个患者都与监控进行了合作，并且 21 个患者中有 14 个同意治疗后监控。在 HEP1 治疗之前 1 个月或治疗期间患者没有接受任何其它抗逆转录病毒治疗。

患者

患者从莫斯科周围的不同诊所招募并提供同意参与该试验的书面承诺。他们通过阳性 ELISA 试验被鉴定为被 HIV 感染，具有降低的 T 细胞计数并且经历着 HIV 相关疾病的一些临床表现。接着显示患者具有 17-801

的 CD4 细胞/μl 以及从不能检测出至 230000 的血清 HIV RNA 拷贝数/ml (Roche Labs Amplicor 定量 PCR 试验)。

试验开始时的患者特征

ID 编码	性别	年龄	估计的注射时间	CD4 细胞/μl	HIV RNA 拷贝数/ml	机会感染	其它
P1	男	45	8	219	500	严重	
P2	男	33	2	192	10000	严重	
P3	女	45	6	481	2000	严重	
P4	女	16	8	237	43000	严重	
P5	男	27	2	123	<400	中度	病重
P6	女	23	1	357	10000	中度	带状疱疹
P7	男	23	8	139	94000	非常低	带状疱疹
P8	女	38	10	320	22000	非常低	卵巢囊肿
P9	男	43	3	17	10000	严重	
P10	男	19	2	155	21000	严重	依赖鸦片剂
P11	男	35	3	188	<400	严重	活性 TB
P12	男	32	8	175	13000	严重	
P17	男	25	1	478	11000	严重	
P21	女	37	10	98	11000	严重	
P63	男	35	1	651	4000	严重	
P67	女	31	7	124	230000	严重	病重
P68	女	51	2	597	<400	严重	病重
P69	男	34	1	192	8000	严重	活性 TB
P72	男	33	1	534	25000	严重	活性 TB
P73	男	30	1	801	<400	严重	活性 TB
P76	女	38	7	72	9000	严重	

常规观察

患者汇报对 HEP1 没有不良反应，并且 17 个患者汇报他们一般感觉较好，并且在 HEP1 治疗时体重增加 1.5Kg-4.5Kg(一个患者在安慰剂期间也感觉较好)。

不良反应

未检测出不良反应。临床测定包括超声波检查和一系列生物化学、血液学、免疫学血检和尿检。

机会感染

通过微生物学分析检测机会感染，通过 HEP1 治疗的患者或者稳定，没有新的感染，或者感染降低。例如，在治疗之前 38%的患者有严重的咽部的白色念珠菌感染，治疗之后仅有 9%的患者严重感染。治疗之前，52%的患者具有严重的咽部的绿色链球菌感染，治疗之后仅有 33%的患者严重感染。治疗之前，33%的患者患有咽部金黄色葡萄球菌感染，治疗之后仅有 19%的患者感染。

CD4 T 淋巴细胞

11 个患者组用 HEP1 治疗 3 个月，到治疗结束时平均增加 9%的 T 细胞数,并且在治疗之后接下来的 6 个月内平均增加 32%。10 个患者组用 HEP1 治疗 1 个月，到治疗结束时平均增加 3%的 T 细胞数，并且在治疗之后接下来的 6 个月内平均增加 20%。这种连续改善暗示，在患者中已诱导了一定的阳性免疫学变化。

通过 TCID 的 HIV 感染性试验

通过将来自患者的 HIV 感染的外周血单核细胞(PBMC)与未感染的供体 PBMC 以样品细胞与培养细胞之比为 1/16 的比例混合并在 37℃下培养 14 天，测定病毒载荷。通过 Innogenetics HIVp24 试验测定培养病毒载荷并且结果以每 ml 的 HIVp24 抗原的微微克数记录。

3个月治疗

患者	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11
试验开始时的感染性(pg/ml p24max)	1039	315	na	386	515	203	1113	369	1074	na	480
开始时基数为100	100	100	0	100	100	100	100	100	100	0	100
第0阶段(平均)						130					
第1阶段(平均)	7	32		0	28	0	47	0	39		
第2阶段(平均)	21	218		198	129	251	70	217	40		835
第3阶段(平均)	0	61		0	85	0	48		24		

1个月治疗

患者	P12	P17	P21	P63	P67	P68	P69	P72	P73	P76
试验开始时的感染性(pg/ml p24max)	465	0.3	3.1	2.9	6642	6.5	3.2	2	1	4.5
开始时基数为100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
第0阶段(平均)	288							251		
第1阶段(平均)	24	0			5		29	0		73
第2阶段(平均)	1815	209	6924	659	334	993	28919	115	236	141
第3阶段(平均)	5	39	54	51	51		15	57		102

在两组患者(P1-P11 和 P12-P76)中，在检测感染的病毒颗粒的 TCID 试验中观察到感染性的一般模式。在 HEP1 治疗开始时，(第 0 阶段-第 1 阶段)，感染性 HIV 病毒的载荷急剧降到治疗的头 3 个星期的低水平，并且 21 个患者中有 9 个降至零持续至少 1 周。在感染性在第 2 周降至零之前，在治疗的头 1 周有 3 个患者经历感染性增加。在接下来的第 2 期中，大多数患者中在治疗开始后的 4-8 周，HIV 感染性上升 2-600 倍。在这期间患者反应其症状没有恶化。接下来的第 3 阶段中，感染性降至治疗前水平以下。

在第 1 阶段中，在治疗前基线以下的病毒平均降低的最大水平为-80%。在第 2 阶段中，病毒增加的平均最大值为 22 倍。在第 3 阶段中，在治疗前基线以下的病毒平均降低的最大水平为-64%。在第 3 阶段中，

在 3 个患者中病毒感染性降低至零。用 HEP1 治疗结束 6 个月后，病毒感染性通常返回到治疗前水平。

本发明人将这些结果解释成显示免疫系统被 HEP1 激活以在第 1 阶段中对抗 HIV。免疫系统中激活的水平增加刺激潜在地感染了 HIV 的细胞储存器的激活，导致第 2 阶段中感染性病毒增加。最后在第 3 阶段中，激活的免疫系统成功地破坏新激活的病毒储存器。用 HEP1 治疗仅 1 个月的 10 个患者组显示出，通过第 2 阶段和第 3 阶段的过程不依赖 HEP1 的存在。

通过定量血浆 HIV RNA PCR 的 HIV 病毒载荷

通过 Roche labs PCR 试验进行病毒载荷分析: Amplicor HIV-1 监测器。

患者	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11
HIV 血浆 RNA (1000 拷贝数/ml)	0.5	10	2	43	<0.4	10	94	22	10	21	<0.4
开始时基数为 100	100	100	100	100	0	100	100	100	100	100	0
第 0 阶段(平均)						108	143		101		
第 1 阶段(平均)			38	39	28	37	68	78	90	45	
第 2 阶段(平均)	476	197	103	64	28	223	112	110	1535	92	
第 3 阶段(平均)		85	66	77	0	64	92	52		39	

患者	P12	P17	P21	P63	P67	P68	P69	P72	P73	P76
HIV 血浆 RNA (1000 拷贝数/ml)	13	11	11	4	230	<0.4	8	25	<0.4	9
开始时基数为 100	100	100	100	100	100	0	100	100	100	100
第 0 阶段(平均)										
第 1 阶段(平均)		0			78					55
第 2 阶段(平均)	219	177	273	206	91		142	191		139
第 3 阶段(平均)	135	86		98	63		138	72		72

在 1 个月治疗和 3 个月治疗的大多数患者中，观察到相似的阶段:

病毒抑制(第 1 阶段)，接着暂时病毒激活(第 2 阶段)，接着抑制(第 3 阶段)；它们与 TCID 数据相似。第 1 阶段延续 1-4 周，病毒载荷平均降低-47%。第 2 阶段延续 8-40 周(比用 TCID 试验看到的延续时间长)，并且在血浆中的病毒 RNA 平均增加 3 倍。在此后的第 3 阶段，血浆中的病毒 RNA 降至治疗前水平以下，平均降低-19%。

通过细胞计量术的细胞表面标记物的细胞群体和表达

使用显微镜、荧光标记抗体、流动细胞计量术和相关步骤详细分析在用 HEP1 治疗 1 个月的 10 个患者组(P12-P76)的外周血单核细胞上的细胞表面标记物。HEP1 治疗对 10 个患者组求平均的各细胞群体具有以下作用:

a)淋巴细胞

治疗期间淋巴细胞的绝对数平均增加 7%，治疗 5 个月后增加 25%。

b)白细胞

治疗期间平均增加 10%，治疗 5 个月后增加约 20%。

d)天然杀伤细胞

治疗期间平均增加 10%，治疗 5 个月后增加约 30%。

e)B 细胞

治疗期间平均增加 5%，治疗 5 个月后增加约 80%。

f) CD3 表达细胞

治疗期间平均增加 15%，治疗 5 个月后增加约 30%。

g) CD8 表达细胞

治疗期间平均增加 15%，治疗 5 个月后增加约 20%。

h) CD44-CD4 表达细胞

治疗期间平均增加 25%，治疗 5 个月后增加约 60%。

h)CD44-CD8 表达细胞

治疗期间平均增加 12%，治疗 5 个月后增加约 30%。

i)在 CD4 细胞上的 HLA 类别 I 表达水平

治疗期间平均增加 10%，治疗 5 个月后增加约 70%。

j)在 CD8 细胞上的 HLA 类别 I 表达水平

治疗期间平均增加 10%，治疗 5 个月后增加约 70%。

k)CD25-CD8 表达细胞

低水平治疗期间平均增加 5%，治疗 5 个月后增加约 100%。CD25-CD4 细胞未显示出明显变化。

l)CD38-CD4 表达细胞

低水平治疗期间平均增加 2%，治疗 5 个月后降低约 15%。

m)CD38-CD8 表达细胞

低水平治疗期间平均增加 2%，治疗 5 个月后降低约 25%。（下一节将讨论在 CD38 中的明显降低）

其它标记物如 CD28、HLA-DR、CD45RO、CD45RA、CD57、CD62L，显示出在患者之间的一致模式没有明显变化。

CD38-CD8 细胞：向 AIDS 发展的预后指示剂

已知表达 CD38-CD8 的细胞群体大小的增加与 HIV 感染的患者中的 AIDS 发展有关。

M Levancher、F Hulstaert、S. Tallet、S Ullery、J J Pocidalo、B A Bach(1992) “CD8 淋巴细胞上的激活标记物在人免疫缺陷综合征中的重要性：疾病分期和预后值”《临床实验免疫学》90 376-382

简言之，CD38-CD8 细胞占总的 CD8 群体的百分比与 HIV 疾病进展有关，在许多最近的出版物中已证实了这一观察。在健康人群中，也表达 CD38 的 CD8 细胞的百分比为 30-50%，在无症状 HIV 感染的患者中为 50-65%，在患有 ARC 的 HIV 感染的患者中为 65-80%，在 AIDS 患者中为 80-98%。在对连续 1 个月口服 10mg HEP1 的 10 个患者的跟踪研究中，5 个患者提供了分析用的血样。在所有这些患者中，很显然，CD38-CD8 细胞群体占总的 CD8 群体的百分数朝显示 HIV 疾病危险性降低且改善健康的值的方向降低。

CD38-CD8 细胞占总的 CD8 细胞的百分比	基线	治疗 1 个月	2 个月	3 个月	4 个月	5 个月	6 个月
患者 12	92	94		79	84	73	72
患者 17	66	71		69	50	55	57
患者 21	83	86				66	
患者 69	90	94		86	79	71	
患者 76	78	84		77	64	54	50

血浆中的抗-HIV 抗体

在 10 个患者(P12-P76)用 HEP1 治疗 1 个月结束时，5 个患者显示抗各种 HIV 抗原的明显较高的抗体滴度(滴度以治疗前 100 为基准)

	抗 gp120	抗 gp41	抗-p31	抗 p24	抗 p17
患者 17	216	93	157	97	101
患者 21	127	110	71	103	110
患者 63	110	131	387	146	154
患者 69	160	274	813	507	116
患者 72	93	111	147	245	143

机会感染的抗体反应

HEP1 治疗刺激对机会感染的抗体反应(抗体滴度以治疗前 100 为基准)

治疗期间的最大滴度	P12	P17	P21	P63	P67	P68	P69	P72	P73	P76
曲霉属 IgG	122	97	132	116	89	114	119	190	142	111
念珠菌属 IgG	127	100	126	170	447	51	293	214	120	129
CMV IgG	290	81	227	186	118	91	105	112	152	88
CMV IgM	120	141	142	215	159	92	102	148	120	142
HSV1 IgM	113	129	158	134	99	89	116	101	107	106
HSV2 IgM	107	129	109	108	156	158	146	111	300	186
弓形体属 IgG	105	107	98	108	125	101	104	95	105	98

曲霉属 IgG 的抗体滴度的平均增加为+23%，念珠菌属 IgG 的为+78%，CMV IgG 的为+50%，CMV IgM 的为+38%，HSV1 IgM 的为+15%，HSV2 IgM 的为+51，弓形体属 IgG 的为+5%。

结论

上面数据同序列与一部分 Hep 受体相同的肽在 HIV 患者的人临床试验中导致免疫激活和临床益处的本发明一致。

实施例 4

妇女中严重急性和慢性念珠菌感染可以通过 Hep 受体刺激所致的免疫反应治愈

临床研究：复发性中度念珠菌感染

刚突发念珠菌感染且未经治疗的妇女(27 岁)自愿加入该研究。她汇报已预先经阴道内涂敷 1%克霉唑治疗的复发性中度阴道念珠菌感染(在前面 12 个月发作 6 次)。她自己连续两天用一 5ml 注射器经阴道内施用 5ml 的 1mg/ml HEP1 溶液。3 天之后念珠菌感染的所有临床症状都消失了并且她汇报在后面的 12 个月内还没有复发念珠菌感染。

临床研究：严重的持续性念珠菌感染

3 个参加莫斯科 Nearmedic 和 STD 临床研究的女性患者自愿加入该研究，她们患有严重的阴道念珠菌感染，之前她们已用用于各种泌尿生殖器感染的抗生素治疗过。这些患者连续 3 天用 5ml 的 2mg/ml HEP1 溶液治疗(没有使用其它的抗真菌治疗)。比较治疗前和治疗 3 周后的微生物分析(尿道、子宫颈管和阴道棉拭培养)和临床分析，证实感染或者明显改善或者消除。

患者	年龄	时间	临床分析	尿道棉拭	子宫颈管棉拭	阴道棉拭
LLA	34	之前	严重感染	强生长	低生长	低生长
KEM	28	之前	严重感染	强生长	强生长	强生长
ALN	35	之前	严重感染	强生长	强生长	强生长
LLA	34	之后	无症状	没有	没有	没有
KEM	28	之后	轻微症状	低生长	很少	没有
ALN	35	之后	无症状	没有	没有	没有

实施例 5

Rupe312、Rupe414、Rupe111 和 Rupe411 在小鼠中诱导强的巨噬细胞激活反应

在小鼠中研究由 Hep 受体结构域 A 获得的包括 HEP1 的许多肽。

诱导激活的巨噬细胞

将体重为 22-24g 的 3 只小鼠(CDAxC57B1)F1 组经腹部注射 1.0μg 肽溶于 0.5ml 生理盐水的每种肽溶液。24 小时之后使用颈椎骨脱臼法将动物杀死，并将 5ml Hanks 溶液注入腹部。将腹部按摩 30 秒钟，然后收集腹膜液。将收集的液体使用尼龙滤器过滤到含有 1.5mg/ml EDTA 的硅化管中。

然后使用 Nihon 血细胞计数器在显微镜检查下测定 1μg 滤液中含核细胞的数目。细胞在 880g 下离心 5 分钟沉淀，将该沉淀再悬浮于胎牛血清中，将该细胞悬液滴到显微镜载玻片上，并干燥，然后在甲醇中固定，用 Romanovski 氏着色剂染色。使用一 Opton 光学显微镜在 1600 放大倍数下进行腹膜渗出液中的细胞形态分析。测定淋巴细胞、静止巨噬细胞、激活的巨噬细胞、粒细胞和其它类型的细胞的数量。结果是：所有肽都使激活的巨噬细胞的数目增加，但是 Rupe111、Rupe312、Rupe411 和 Rupe414 明显比 HEP1 跃性强。

1.0μg 肽/小鼠	生理盐水	HEP1	Rupe111	Rupe312	Rupe411	Rupe414
激活的巨噬细胞占细胞总数的百分比	1.9	2.2	4.3	13.9	5.5	8.5

HEP1	SEQ ID 28	TEKKRRETVEREKE
Rupe111	SEQ ID 5:	TEKKRRETVER
Rupe312	SEQ ID 8:	KKRRETVERE
Rupe411	SEQ ID 11:	KRRETVER
Rupe414	SEQ ID 13:	KRRETVEREKE

实施例6

通过测定放射性含氚胸腺嘧啶核苷掺入生长细胞的DNA中证实Hep受体肽在体外激活人外周血单核细胞

使用分级分离标准方法以菲克梯度从健康供体的外周血中分离外周血单核细胞(PBMC)。将该PBMC悬浮于含RPMI1640培养基+10%胎牛血清、1mM L-谷氨酰胺和抗生素(BM)的培养基中。将该细胞悬液置于96孔微孔平皿的孔中培养细胞(每个孔中有100μl悬液,含100,000个细胞)。然后将100μl BM加入含肽孔中(最终浓度为0.001-10μg/ml)。阴性对照孔含BM,但不含肽。将该平皿在37℃下培养3天,然后加入放射性^{3}H胸腺嘧啶核苷,使其最终浓度为1微居里/ml。使用β计数器用标准步骤测定^{3}H胸腺嘧啶核苷掺入细胞DNA。将该实验重复2次,结果用两个实验中的放射性计数/分钟的平均值来表示。结果显示,所有肽都激活单核细胞增殖,但是Rupe312和Rupe414明显比HEP1活性强,峰活性约3ng/ml。

肽μg/ml	对照	HEP1	Rupe 19	Rupe 312	Rupe 414	Rupe 411	Rupe 111	Rupe 614
0.0001	370	410	426	563	493	385	483	464
0.0003	370	500	602	742	580	510	483	503
0.001	370	989	718	976	684	702	710	550
0.003	370	700	756	3222	2087	598	665	752
0.01	370	628	545	656	650	532	537	607
0.03	370	517	586	539	596	500	642	538
0.1	370	456	537	533	485	499	633	596
0.3	370	399	563	611	492	486	668	635
1	370	400	509	472	449	468	529	600
3	370	412	502	455	437	420	486	499
10	370	501	517	405	394	390	470	412

HEP1 SEQ ID 28 TEKKRRETVEREKE

Rupe19 SEQ ID 4: TEKKRRETV

Rupe312 SEQ ID 8: KKRRETVERE

Rupe414 SEQ ID 13:KRRETVEREKE

Rupe411 SEQ ID 11:KRRETVER

Rupe111 SEQ ID 5: TEKKRRETVER

Rupe614 SEQID 18: RETVEREKE

实施例7

Hep受体肽对MHC类别I在不同免疫细胞上的表达的作用

在37℃下用人白细胞(WBC)将Hep受体衍生的肽(0.003μg/ml)培养24小时，结果HLA在所有WBC细胞表面上的表达强度降低(由于细胞激活和受体内在化)。Rupe312比Rupe414活性强，而Rupe414比HEP1活性强。

在没有肽的情况下以对照值为100得出的数据

HLA类别I的细胞表面表达的密度					
	单核细胞/巨噬细胞	CD8淋巴细胞	CD4淋巴细胞	B和NK细胞	粒细胞
对照	100	100	100	100	100
HEP1	83	83	80	84	89
Rupe414	83	76	77	77	85
Rupe312	71	72	70	73	81

这种激活的细胞特异性作用是表达MHC类别I的单核细胞群体增加并且表达MHC类别I的CD8 淋巴细胞群体减少。

在没有肽的情况下以对照值为100得出的数据

表达HLA类别I的细胞集落的百分数					
	单核细胞/巨噬细胞	CD8淋巴细胞	CD4淋巴细胞	B和NK细胞	粒细胞
对照	100	100	100	100	100
HEP1	108	91	105	102	100
Rupe414	109	89	105	101	98
Rupe312	119	85	104	105	98

(Rupe312 SEQ ID 8:KKRRETVERE和Rupe414 SEQ ID 13: KRRETVEREKE)

实施例8

Hep受体肽抑制IL-8在WBC中产生

在37℃下培养48小时后检测增加浓度的Rupe312(一种Hep受体肽)对IL-8被人WBC表达的抑制作用。IL-8为一种响应吸引并激活T细胞、嗜中性白细胞、嗜碱细胞、粒细胞，但不吸引并激活单核细胞/巨噬细胞的炎症刺激所产生的趋化因子。IL-8的抑制可以起到Rupe312在激活单核细胞和巨噬细胞的选择活性的作用。IL-8的测定提供了一种测定各种Hep受体衍生的肽的活性的试验。

Rupe312浓度(μg/ml)	培养物中IL-8的浓度(pg/ml)
0	18900
0.001	13900
0.003	10700
0.01	8984
0.03	7869
0.1	6426

(由比利时的Innogenetics设计的IL-8 EIA试验)

(Rupe312 SEQ ID 3:KKRRETVERE)

实施例9

非常低剂量的Hep受体肽(1-100ng/小鼠)保护小鼠免受鼠伤寒沙门氏杆菌的急性感染

将实验室小鼠(CBAxC57B1 F1杂种)分成5个或者接受0.5ml生理盐水或者接受0.5ml 生理盐水+不同浓度的不同Hep受体肽(1、10或100ng)的组。24小时后小鼠用鼠伤寒沙门氏杆菌急性感染(每只小鼠经腹膜内注射10,000或100,000个细菌)。记录20天后每组小鼠的存活百分数(致死性感染的对照动物在感染3天内就死亡了)。

注射20天之后小鼠组存活的百分数

肽代码	1000个细菌/小鼠	对照	Hep受体肽(ng/小鼠)			肽序列
		0	1	10	100	
HEP1	10	0%	20%	20%	40%	TEKKRRETVEREKE
	100	0%	0%	0%	0%	
Rupe15	10	0%	20%	40%	40%	TEKKR
	100	0%	20%	20%	0%	
Rupe124	10	0%	40%	40%	40%	EREKEQMMREKEEL
	100	0%	0%	20%	40%	

(Rupe15 SEQ ID 3: TEKKR和Rupe1024 SEQ ID 17: EREKEQMMREKEEL和HEP1 SEQ ID 28: TEKKRRETVEREKE)

结论

Hep受体肽保护动物免受致死性细菌感染。

实施例10

非常低剂量的Hep受体肽(1-1000ng/小鼠)提高小鼠致死性疱疹病毒感染模型的存活时间

在以0.2ml培养基中3.5 LD50的滴度致死性注射疱疹病毒(VPG-1毒株L2)之前48小时和24小时，对实验室白色B/P小鼠(每组5只)腹膜内注射Hep受体肽(1-1000ng/小鼠)。

记录每组小鼠的平均存活时间(天)。

肽代码	对照	Hep受体肽(ng/小鼠)				肽序列
	0	1	10	100	1000	
HEP1	10	18	19	27	28	TEKKRRETVEREKE

(HEP1 SEQ ID 28: TEKKRRETVEREKE)

结论

Hep受体肽明显提高遭受致死性病毒感染的存活时间。

优先权文件

UK patent application GB9921881.0, Holms R., 17th September 1999

专利文件

United States Patent 5,773,573
Rupert Holms 30th June 1998

其它出版物

Ossi Turunen, Markku Sainio, Juha Jaaskelainen, Olli Carpen, Antti Vaheri (1998)
"Structure – Function relationships in the ezrin family and the effect of tumor-associated point mutations in neurofibromatosis 2 protein" *Biochimica et Biophysica Acta* **1387:** 1-16

Anthony Bretscher, David Reczek and Mark Berryman (1997)
"Ezrin: a protein requiring conformational activation to link microfilaments to the plasma membrane in the assembly of cell surface structures" *Journal of Cell Science* **110**: 3011-3018

Claudia Hecker, Christoph Weise, Jurgen Schneider-Schaulies, Harvey Holmes, Volker ter Meulen (1997) " Specific binding of HIV-1 envelope protein gp120 to the structural membrane proteins ezrin and moesin." *Virus Research* **49:** 215-223

M Levancher, F Hulstaert, S. Tallet, S Ullery, J J Pocidalo, B A Bach (1992)
"The significance of activation markers on CD8 lymphocytes in human immunodeficiency syndrome: staging and prognostic value" *Clinical Experimental Immunology* **90** 376-382

Stephan Oehen and Karin Brduscha-Riem (1998)
"Differentiation of Naïve CTL to Effector and Memory CTL: Correlation of Effector Function with Phenotype and Cell Division" *The Journal of Immunology* **161** 5338-5346

序列表

一般信息

序列数: 28

SEQ ID 1的信息

序列特征:

长度: 32氨基酸

类型: 氨基酸

链数: 单链

拓扑学: 线性

分子类型: 肽

序列说明

SEQ ID 1

Hep受体的结构域A

A R E E K H Q K Q L E R Q Q L E T E K K R R E T V E R E K E Q M
1 5 10 15 20 25 30

SEQ ID 2的信息

序列特征:

长度: 34氨基酸

类型: 氨基酸

链数: 单链

拓扑学: 线性

分子类型: 肽

序列说明

SEQ ID 2

Hep受体的结构域B

M R E K E E L M L R L Q D $Y_{(p)}$ E E K T K K A E R E L S E Q I Q R A L Q
1 5 10 15 20 25 30

SEQ ID 3的信息

序列特征:

长度: 5氨基酸

类型: 氨基酸

链数: 单链

拓扑学: 线性

分子类型: 肽

序列说明

SEQ ID 3

Rupe15: TEKKR
1 5

SEQ ID 4的信息

序列特征:

长度: 9氨基酸

类型: 氨基酸

链数: 单链

拓扑学: 线性

分子类型: 肽

序列说明

SEQ ID 4

Rupe19: TEKKRRETV
1 5

SEQ ID 5的信息

序列特征:

长度: 11氨基酸

类型: 氨基酸

链数: 单链

拓扑学: 线性

分子类型: 肽

序列说明

SEQ ID 5

Rupe111: TEKKRRETVER
1 5 10

SEQ ID 6的信息

序列特征:

长度: 5氨基酸

类型: 氨基酸

链数: 单链

拓扑学: 线性

分子类型: 肽

序列说明

SEQ ID 6

Rupe37: KKRRE
1 5

SEQ ID 7的信息

序列特征:

长度: 8氨基酸

类型: 氨基酸

链数: 单链

拓扑学: 线性

分子类型: 肽

序列说明

SEQ ID 7

Rupe310: KKRRETVE
1 5

SEQ ID 8的信息

序列特征:

长度: 10氨基酸

类型: 氨基酸

链数: 单链

拓扑学: 线性

分子类型: 肽

序列说明

SEQ ID 8

Rupe312: KKRRETVERE
1 5 10

SEQ ID 9的信息

序列特征:

长度: 11氨基酸

类型: 氨基酸

链数: 单链

拓扑学: 线性

分子类型: 肽

序列说明

SEQ ID 9

Rupe313: KKRRETVEREK
1 5 10

SEQ ID 10的信息

序列特征:

长度: 12氨基酸

类型: 氨基酸

链数: 单链

拓扑学: 线性

分子类型: 肽

序列说明

SEQ ID 10

Rupe314: KKRRETVEREKE
1 5 10

SEQ ID 11的信息

序列特征:

长度: 8氨基酸

类型: 氨基酸

链数: 单链

拓扑学: 线性

分子类型: 肽

序列说明

SEQ ID 11

Rupe411: KRRETVER
1 5

SEQ ID 12的信息

序列特征:

长度: 10氨基酸

类型: 氨基酸

链数: 单链

拓扑学: 线性

分子类型: 肽

序列说明

SEQ ID 12

Rupe413: KRRETVEREK
1 5 10

SEQ ID 13的信息

序列特征:

长度: 11氨基酸

类型: 氨基酸

链数: 单链

拓扑学: 线性

分子类型: 肽

序列说明

SEQ ID 13

Rupe414: KRRETVEREKE
1 5 10

SEQ ID 14的信息

序列特征:

长度: 5氨基酸

类型: 氨基酸

链数: 单链

拓扑学: 线性

分子类型: 肽

序列说明

SEQ ID 14

Rupe59: RRETV
1 5

SEQ ID 15的信息

序列特征:

长度: 9氨基酸

类型: 氨基酸

链数: 单链

拓扑学: 线性

分子类型: 肽

序列说明

SEQ ID 15

Rupe614: RETVEREKE
1 5

SEQ ID 16的信息

序列特征:

长度: 5氨基酸

类型: 氨基酸

链数: 单链

拓扑学: 线性

分子类型: 肽

序列说明

SEQ ID 16

Rupe1014: EREKE
1 5

SEQ ID 17的信息

序列特征:

长度: 14氨基酸

类型: 氨基酸

链数: 单链

拓扑学: 线性

分子类型: 肽

序列说明

SEQ ID 17

Rupe1024 EREKEQMMREKEEL
1 5 10

SEQ ID 18的信息

序列特征:

长度: 5氨基酸

类型: 氨基酸

链数: 单链

拓扑学: 线性

分子类型: 肽

序列说明

SEQ ID 18

Rupe2024: KEELM
1 5

SEQ ID 19的信息

序列特征:

长度: 13氨基酸

类型: 氨基酸

链数: 单链

拓扑学: 线性

分子类型: 肽

序列说明

SEQ ID 19

Rupe2032: KEELMLRLQDYEE
1 5 10

SEQ ID 20的信息

序列特征:

长度: 13氨基酸

类型: 氨基酸

链数: 单链

拓扑学: 线性

分子类型: 肽

序列说明

SEQ ID 20

Rupe2032p: KEELMLRLQDYpEE
1 5 10

SEQ ID 21的信息

序列特征:

长度: 12氨基酸

类型: 氨基酸

链数: 单链

拓扑学: 线性

分子类型: 肽

序列说明

SEQ ID 21

Rupe2132: EELMLRLQDYEE
1 5 10

SEQ ID 22的信息

序列特征:

长度: 12氨基酸

类型: 氨基酸

链数: 单链

拓扑学: 线性

分子类型: 肽

序列说明

SEQ ID 22

Rupe2132p: EELMLRLQDYpEE
1 5 10

SEQ ID 23的信息

序列特征:

长度: 11氨基酸

类型: 氨基酸

链数: 单链

拓扑学: 线性

分子类型: 肽

序列说明

SEQ ID 23

Rupe2232: ELMLRLQDYEE
1 5 10

SEQ ID 24的信息

序列特征:

长度: 11氨基酸

类型: 氨基酸

链数: 单链

拓扑学: 线性

分子类型: 肽

序列说明

SEQ ID 24

Rupe2232p: ELMLRLQDYpEE
1 5 10

SEQ ID 25的信息

序列特征:

长度: 5氨基酸

类型: 氨基酸

链数: 单链

拓扑学: 线性

分子类型: 肽

序列说明

SEQ ID 25

Rupe2428: MLRLQ
1 5

SEQ ID 26的信息

序列特征:

长度: 5氨基酸

类型: 氨基酸

链数: 单链

拓扑学: 线性

分子类型: 肽

序列说明

SEQ ID 26

Rupe2832: QDYEE
1 5

SEQ ID 27的信息

序列特征:

长度: 5氨基酸

类型: 氨基酸

链数: 单链

拓扑学: 线性

分子类型: 肽

序列说明

SEQ ID 27

Rupe2832p: QDYpEE
1 5

SEQ ID 28的信息

序列特征:

长度: 14氨基酸

类型: 氨基酸

链数: 单链

拓扑学: 线性

分子类型: 肽

序列说明

SEQ ID 28

HEP1: TEKKRRETVEREKE
1 5 10

Hep 受体的初级/二级结构

说明当高带电区与其自身结合、与例如 Rupe312 的合成配体结合或与另一 Hep 受体结合时，高带电区正电荷与负电荷如何匹配的

图 1a ： Hep 受体的失活的折叠构象



图 1b ： 结合配体(Rupe312)的 Hep 受体的活性开放构象

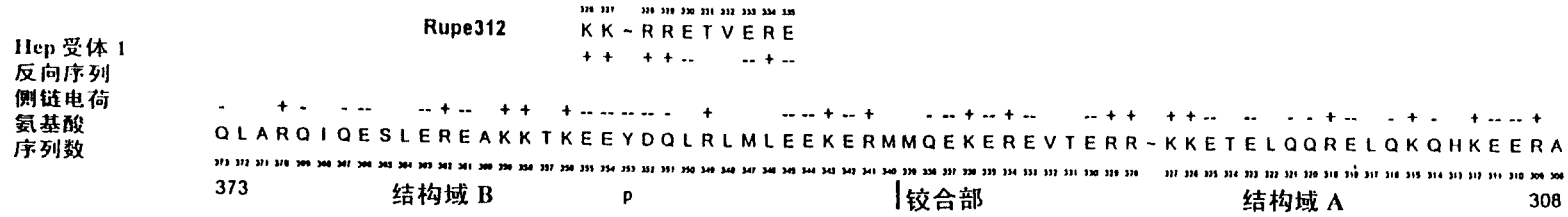
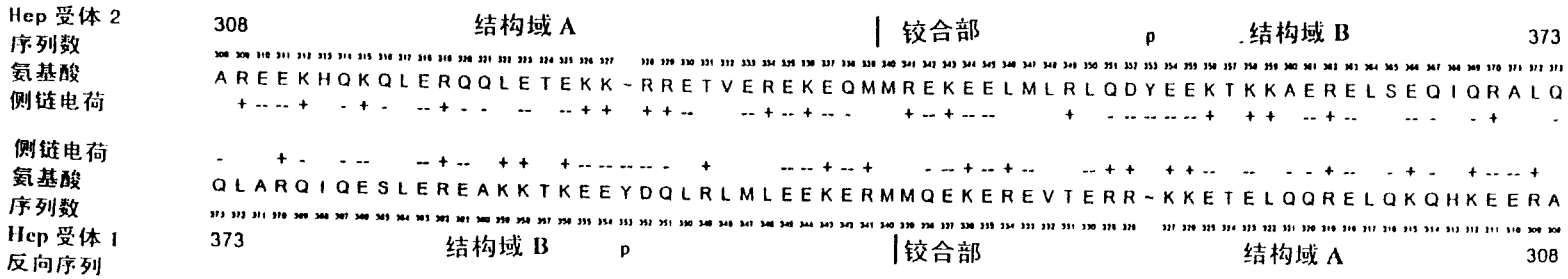


图 1c ： 两个活性开放构象的 Hep 受体的二聚合



埃滋蛋白的细胞位置和复合物

