[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 39/21 (2006.01)
C07K 7/00 (2006.01)

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03816434.5

[45] 授权公告日 2007 年 7 月 25 日

[11] 授权公告号 CN 1327897C

[22] 申请日 2003.9.23 [21] 申请号 03816434.5
[30] 优先权
[32] 2002. 9.24 [33] US [31] 60/412,797
[86] 国际申请 PCT/US2003/029815 2003.9.23
[87] 国际公布 WO2004/029201 英 2004.4.8
[85] 进入国家阶段日期 2005.1.11
[73] 专利权人 重庆前沿生物技术有限公司
地址 400041 重庆市高新区科园四街 70 号 I 座三楼
[72] 发明人 谢 东 姜 和
[56] 参考文献
CN1351611A 2002.5.29
WO0070665A2 2000.11.23
CN1339318A 2002.3.13
WO0069911A1 2000.11.23
审查员 张秀丽
[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 罗菊华

权利要求书 5 页 说明书 44 页 附图 1 页

[54] 发明名称

HIV 感染的肽衍生物融合抑制剂

[57] 摘要

本发明涉及 gp41 变体肽，它们是病毒感染抑制剂和/或显示出抗融合性质。 特别是，本发明涉及具有抑制人类免疫缺陷病毒(HIV)和猿猴免疫缺陷病毒(SIV)活性、并且作用持续时间延长的 gp41 变体肽用于治疗相应的病毒感染。

1. 包含 SEQ ID NO:1 的序列或者具有 SEQ ID NO:1 的序列、并具有抗病毒、抑制病毒和/或抗融合活性的分离的肽。

2. 包含 SEQ ID NO:2 的序列或者具有 SEQ ID NO:2 的序列、并具有抗病毒、抑制病毒和/或抗融合活性的分离的肽。

3. 包含 SEQ ID NO:7 的序列或者具有 SEQ ID NO:7 的序列、并具有抗病毒、抑制病毒和/或抗融合活性的分离的肽。

4. 分离的经修饰肽，其选自：

(a) SEQ ID NO:1;

(b) SEQ ID NO:2; 和

(c) SEQ ID NO:7,

并且在该肽序列中不破坏有助于与病毒包膜蛋白 gp41 形成卷曲螺旋复合物的相互作用的预定位置具有至少一个置换的氨基酸残基，其中所述至少一个置换的氨基酸残基是亲水性氨基酸残基，而且所述分离的经修饰肽具有抗病毒、抑制病毒和/或抗融合活性。

5. 分离的经修饰肽，其选自：

(a) SEQ ID NO:1;

(b) SEQ ID NO:2; 和

(c) SEQ ID NO:7,

并且在该肽序列中不破坏有助于与病毒包膜蛋白 gp41 形成卷曲螺旋复合物的相互作用的预定位置具有至少一个置换的氨基酸残基，其中所述至少一个置换的氨基酸残基是具有形成α螺旋倾向性的氨基酸残基，而且所述分离的经修饰肽具有抗病毒、抑制病毒和/或抗融合活性。

6. 分离的经修饰肽，其选自：

(a) SEQ ID NO:1;

(b) SEQ ID NO:2; 和

(c) SEQ ID NO:7,

并且在该肽序列中不破坏有助于与病毒包膜蛋白 gp41 形成卷曲螺旋

复合物的相互作用的预定位置具有至少一个置换的氨基酸残基，其中所述至少一个置换的氨基酸残基是亲水性的或具有形成α螺旋倾向性的非天然存在氨基酸残基，而且所述分离的经修饰肽具有抗病毒、抑制病毒和/或抗融合活性。

7. 分离的衍生肽，其选自：

(a) SEQ ID NO:8 的 FB005M 肽;

(b) SEQ ID NO:9 的 FB005CM 肽;

(c) SEQ ID NO:10 的 FB006M 肽;

(d) SEQ ID NO:11 的 FB007M 肽;

(e) SEQ ID NO:14 的 FB066M 肽; 和

(f) SEQ ID NO:15 的 FB066KM 肽。

8. 分离的衍生肽，其选自：

(a) SEQ ID NO:1;

(b) SEQ ID NO:2; 和

(c) SEQ ID NO:7,

其中该肽序列中预定的氨基酸残基通过将偶联基团与所述预定的氨基酸残基缀合而衍生化，而且所述分离的衍生肽具有抗病毒、抑制病毒和/或抗融合活性。

9. 权利要求 4、5 或 6 的经修饰肽，其中该肽序列中预定的氨基酸残基通过将偶联基团与所述预定的氨基酸残基缀合而衍生化。

10. 权利要求 1 的分离的肽，其中该肽通过将偶联基团与赖氨酸连接而衍生化，所述赖氨酸置换了第 23 位的谷氨酸或添加在 C 末端。

11. 权利要求 2 的分离的肽，其中该肽通过将偶联基团与第 13 位的赖氨酸连接而衍生化。

12. 权利要求 2 的分离的肽，其中该肽通过用谷氨酸置换第 13 位的赖氨酸而被修饰和通过将偶联基团与添加在 C 末端的另外的赖氨酸残基连接而衍生化。

13. 权利要求 3 的分离的肽，其中该肽通过将偶联基团与第 13 位的赖氨酸、或与添加在 C 末端的另外的赖氨酸连接而衍生化。

14. 权利要求 7 或 8 的衍生肽、权利要求 9 的经修饰肽或者权利要求 10－13 任一项的肽，其中偶联基团选自下组:

（a） 马来酰亚胺基团;

（b） 琥珀酰亚胺基团;

（c） 肼基团; 和

（d） 羰基基团。

15. 权利要求 14 的衍生肽、经修饰肽或者肽，其中马来酰亚胺基团是通过[2-(2-氨基)乙氧基]乙氧基乙酸与赖氨酸的ε氨基连接的 3’-马来酰亚胺基丙酸或其盐。

16. 包含权利要求 1-6 任一项的肽、权利要求 7 或 8 的衍生肽、权利要求 9 的经修饰肽或者权利要求 10－13 任一项的肽的药物组合物。

17. 包含与血液成分缀合的权利要求 7 或 8 的衍生肽、权利要求 9 的经修饰肽或者权利要求 10－13 任一项的肽的缀合物。

18. 权利要求 17 的缀合物，其中血液成分选自下组:

（a） 人血清白蛋白;

（b） 人转铁蛋白;

（c） 人铁蛋白;

（d） 人免疫球蛋白;

（e） 人α-2-巨球蛋白;

（f） 人甲状腺素结合蛋白;

（g） 人类固醇结合蛋白; 和

（h） 它们的组合。

19. 权利要求 1-6 任一项的肽、权利要求 7 或 8 的衍生肽、权利要求 9 的经修饰肽或者权利要求 10－13 任一项的肽在制备用于减少哺乳动物细胞的病毒感染的药物组合物中的用途。

20. 权利要求 1-6 任一项的肽、权利要求 7 或 8 的衍生肽、权利要求 9 的经修饰肽或者权利要求 10－13 任一项的肽在制备用于预防哺乳动物细胞被病毒感染的药物组合物中的用途。

21. 权利要求 1-6 任一项的肽、权利要求 7 或 8 的衍生肽、权利要

求 9 的经修饰肽或者权利要求 10－13 任一项的肽在制备用于防止病毒在哺乳动物细胞中复制的药物组合物中的用途。

22. 权利要求 19 和 21 任一项的用途，其中所述的肽在所述病毒存在下提供。

23. 权利要求 19－21 任一项的用途，其中病毒选自下组:

（a） 人免疫缺陷病毒（HIV）和

（b） 猿猴免疫缺陷病毒（SIV）。

24. 权利要求 19－21 任一项的用途，其中肽或肽衍生物通过口服、局部表面、静脉内、动脉内、肌内或皮下途径给药。

25. 权利要求 19－21 任一项的用途，其中肽或肽衍生物与一种或多种另外的 HIV 治疗剂共同给予。

26. 权利要求 25 的用途，其中所述一种或多种另外的 HIV 治疗剂包括至少一种其它的 gp41 变体肽。

27. 权利要求 25 的用途，其中另外的 HIV 治疗剂选自下组:

(a) AGENERASE;

(b) COMBIVIR;

(c) CRIXIVAN;

(d) EMTRIVA;

(e) EPIVIR;

(f) FORTOVASE;

(g) HIVID;

(h) INVIRASE;

(i) KALETRA;

(j) NORVIR;

(k) RESCRIPTOR;

(l) RETROVIR;

(m) REYATAZ;

(n) SUSTIVA;

(o) TRIZIVIR;

(p) VIDEX EC;

(q) VIDEX;

(r) VIRACEPT;

(s) VIRAMUNE;

(t) VIREAD;

(u) ZERIT;和

(v) ZIAGEN。

28. 权利要求 19－21 任一项的用途，其中病毒是 HIV，哺乳动物细胞是人细胞。

29. 权利要求 7 或 8 的衍生肽、权利要求 9 的经修饰肽或者权利要求 10－13 任一项的肽在制备预防或减少其细胞已经接触 HIV 的患者 HIV 感染的药物中的用途，其中所述肽衍生物与所述患者的血液成分缀合，由此延长了该肽在所述患者的血液中的半衰期。

30. 权利要求 29 的用途，其中血液成分选自下组:

（a） 人血清白蛋白;

（b） 人转铁蛋白;

（c） 人铁蛋白;

（d） 人免疫球蛋白;

（e） 人α-2-巨球蛋白;

（f） 人甲状腺素结合蛋白;

（g） 人类固醇结合蛋白; 和

（h） 它们的组合。

31. 权利要求 29 的用途，其中缀合发生在体内。

32. 权利要求 29 的用途，其中缀合发生在体外。

33. 权利要求 31 的用途，其中血液成分通过血浆去除法分离，之后与衍生肽缀合。

34. 包含权利要求 1-6 任一项的肽、权利要求 7 或 8 的衍生肽、权利要求 9 的经修饰肽或者权利要求 10－13 任一项的肽和药物可接受载体的药物组合物。

HIV 感染的肽衍生物融合抑制剂

发明背景

发明领域

本发明涉及人类免疫缺陷病毒（以下称“HIV”）gp41 C-末端肽衍生物，这些肽衍生物是病毒感染的抑制剂和/或显示抗融合特性。尤其是，本发明涉及具有对 HIV 和猿猴免疫缺陷病毒（以下称“SIV”）的抑制活性，溶解度提高和作用持续时间延长的肽衍生物，可用于治疗相应的病毒感染。

相关技术综述

膜融合是正常细胞生物学过程的普遍事件，而且膜融合也参与各种疾病状态，包括，例如包膜病毒进入细胞内。一些包膜病毒可以通过病毒包膜蛋白与细胞表面蛋白之间的特异性结合反应而与靶细胞融合，该反应可以引发相关病毒蛋白的构象改变，然后促使病毒包膜与细胞膜的融合。

HIV 是一种包膜病毒，为逆转录病毒慢病毒家族的成员之一，HIV 有两种主要类型，HIV-1 和 HIV-2，已经鉴定了每个类型的各种菌株。HIV 与其宿主细胞的融合是通过病毒包膜蛋白 gp120 和 gp41 与细胞表面上的 CD4 糖蛋白和趋化因子共同受体的结合所介导的。gp120 与 T 细胞表面上 CD4 以及与共同受体（如 CCR5 或 CXCR4）结合后，gp41 插入到靶细胞膜中；接着 gp41 N-末端部分的螺旋与相同蛋白的 C-末端的螺旋形成卷曲螺旋结构，使得病毒与细胞接近而融合(Malashkevich, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998 Aug 4;95(16):9134-9)。

已知肽可以抑制或以其它方式破坏膜融合相关事件，包括，例如抑制反转录病毒传播到未感染细胞。来自 HIV 包膜蛋白 gp41 第二个七残基重复区域的肽，包括 T20(DP178)和 C34，在体外显示出有效抗 HIV 的抗病毒活性（见 Wild, et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:9770-4;

Chan, et al., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:15613-15617)。已证实的抗病毒活性包括抑制游离病毒对 $CD4^+$细胞的感染和/或抑制 HIV 诱导的感染和未感染 $CD4^+$细胞之间合胞体的形成。这种抑制可能是通过这些肽与 gp41 中第一个七残基重复区域的结合，因此阻止了第一个与第二个七残基重复区域形成融合性发夹结构而发生的。

尽管本领域描述的很多抗病毒或抗融合肽在体外显示出有效的抗病毒和/或抗融合活性，但是它们在体内半衰期短，主要由于快速血清清除和肽酶和蛋白酶活性。这又大大降低它们的有效抗病毒活性。因此需要一种延长肽在体内的半衰期，而基本上不影响抗融合活性的方法。

美国专利 5,612,034 公开了一个延长肽的半衰期的方法，它描述了将治疗性肽与在血流中找到的天然蛋白共价结合的方法。这个肽被化学反应性部分所修饰，该部分能够与血流中蛋白上存在的功能团反应。将该修饰肽注射到血流后，它与长期存活的血液成分连接形成肽的长期存活库。然而，因为血流中蛋白的分子量在 50－600kD 的范围，所以要考虑到这种大得多的蛋白的空间障碍可能危害这种连接肽的生物活性。

在 ConjuChem, Inc 的国际专利出版物 WO 00/69902（以下称“902 出版物”）中公开了延长已知的抗融合肽半衰期的尝试。在这个出版物中，DP178 被这样修饰：将 3-马来酰亚胺基丙酸通过酰胺键连接到赖氨酸的 ε 氨基上，然后这个赖氨酸通过肽键与 DP178 的 C-末端苯丙氨酸连接。“902 出版物”还提出了该修饰的 DP178 的类似物，它们是 DP178 的截短物或来自其它 HIV 病毒分离株的 gp41 的相应片段。“902 出版物”没有提示抗融合肽的任何其它设计标准。

因此，仍然需要延长肽在体内的半衰期而基本上不影响抗融合活性的方法。

发明概述

本发明涉及具有抗病毒、抑制病毒和/或抗融合活性的 HIV gp41 肽衍生物，包括但不限于表 1，2，3 和图 1 中的修饰肽，及其修饰和衍生形式（以下统称“gp41 变体肽”）。这些 gp41 变体肽使得体内稳定性增加和

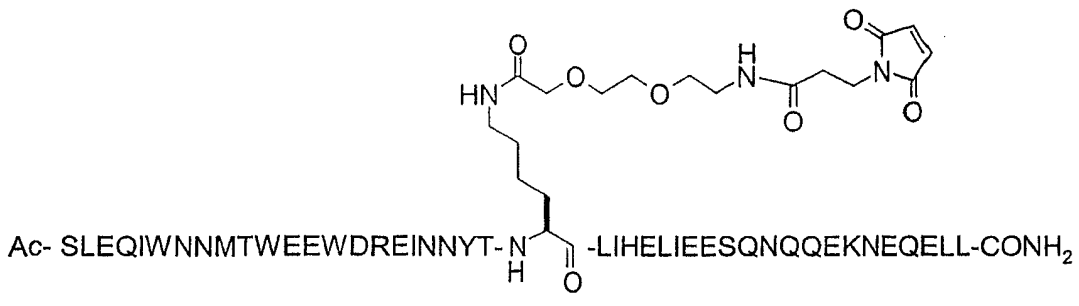
对肽酶或蛋白酶降解的易感性降低。结果，gp41 变体肽与未修饰的 HIV gp41 肽预期的相比，将更频繁或甚至持续给药的需要减至最小。本发明的肽衍生物，和使用本发明方法由其他病毒的 gp41 样序列制备的衍生物，可以用作例如很多病毒，包括但不限于 HIV 和 SIV 的感染的预防剂和/或治疗剂。

根据本发明，提供了与 HIV gp41 的相应未修饰肽序列相比具有增加的溶解度和抗病毒活性的肽衍生物。更具体一些，本发明涉及以下表 1、2 和 3 和图 1 中所示式子的化合物，它们包括在体内或离体能够与血液成分上的硫醇基发生反应形成稳定共价键的肽衍生物。

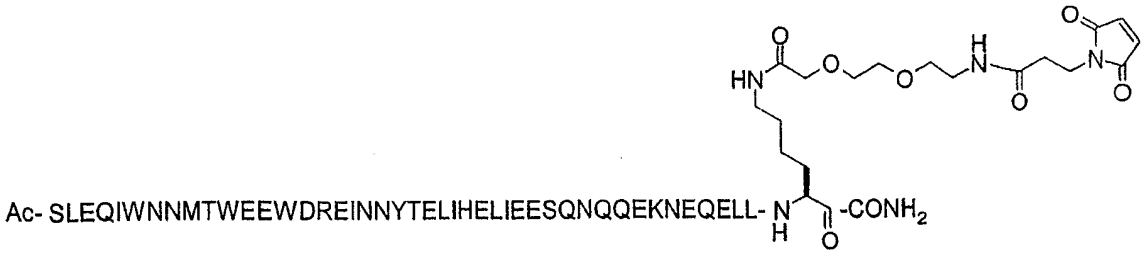
表 1 gp41 肽片断和修饰的类似物

Ac-SLEQIWNNMT WEEWDREINN YTELIHELIE ESQNQQEKNE QELL-NH2 FB005	(SEQ ID NO:1)
Ac-WEEWDREINN YTKLIHELIE ESQNQQEKNE QELL-NH2 FB006	(SEQ ID NO:2)
Ac-WEEWDREINN YTKLIHELIE ESQNQQEENE QELL-NH2 FB066	(SEQ ID NO:7)
Ac-WQE WEQKITALLE QAQIQQEKNE YELQKLDKWA SLWEWF-NH2 T-1249	(SEQ ID NO:3)
Ac-YTSLIHSLIE ESQNQQEKNE QELLELDKWA SLWNWF-NH2 T-20	(SEQ ID NO:4)
Ac-WMEWDREINN YTSLIHSLIE ESQNQQEKNE QELL-NH2 C-34	(SEQ ID NO:5)

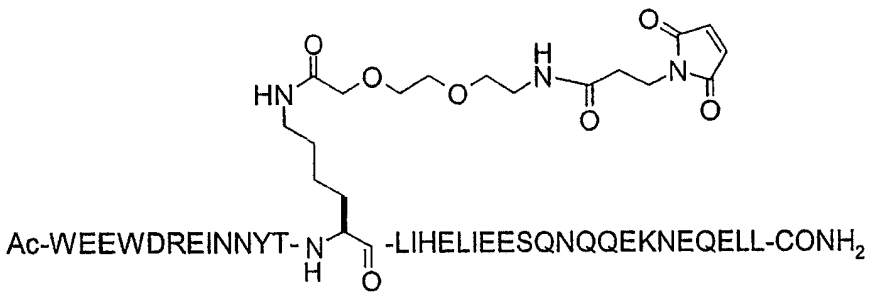
表 2 马来酰亚胺修饰的肽



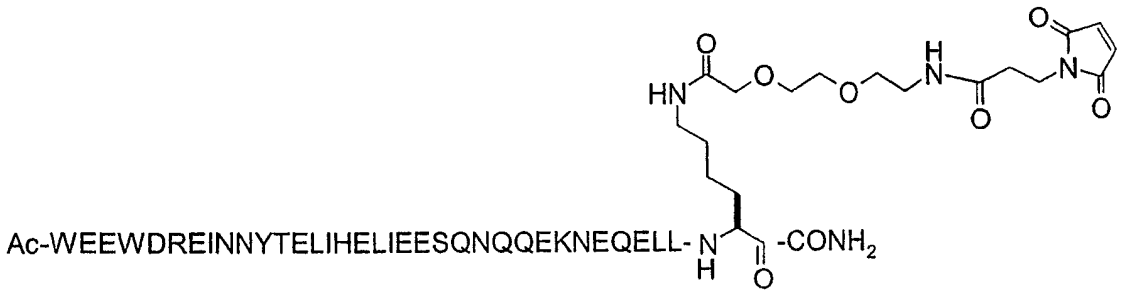
FB005M (SEQ ID NO:8)



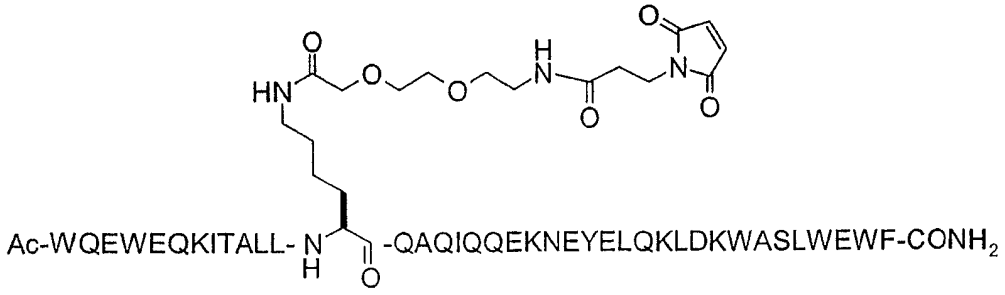
FB005CM (SEQ ID NO:9)



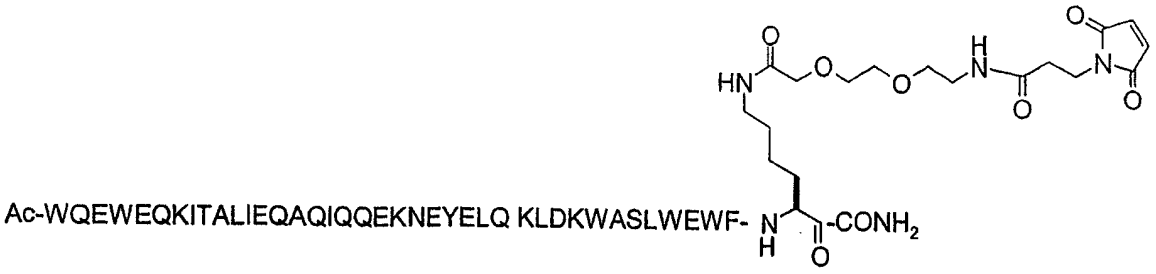
FB006M (SEQ ID NO:10)



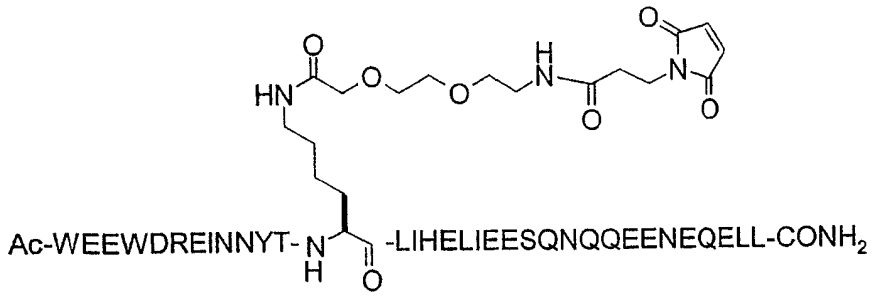
FB007M (SEQ ID NO:11)



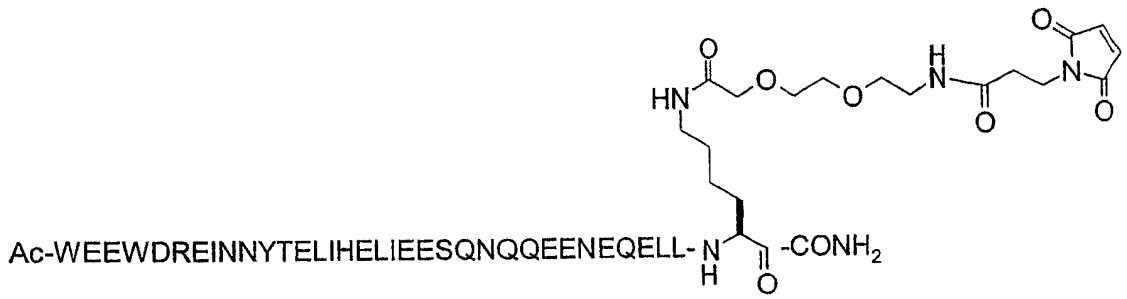
FB010M (SEQ ID NO:12)



FB010KM (SEQ ID NO:13)



FB066M (SEQ ID NO:14)



FB066KM (SEQ ID NO:15)

本发明提供了一些新的组合物，含有相对于天然肽具有预定残基的修饰（即点突变）的肽，它们导入后提高了活性和溶解度。该预定残基由表3中找到的肽序列的带下划线氨基酸残基组成。带有修饰残基的肽包括但不限于置换的氨基酸残基，其中具有亲水性或疏水性增加的性能的氨基酸残基置换了天然氨基酸残基。也可以用有高α螺旋形成倾向性的氨基酸残基置换gp41变体肽。可供选择地，带有修饰残基的肽包括但不限于衍生的氨基酸残基，其中偶联基团与预定氨基酸残基缀合，由此允许衍生肽与血液成分的共价键合。

另一方面，本发明提供了包含上述结构式的衍生物与药物可接受载体的药物组合物。这些药物组合物可用于抑制HIV（包括HIV-1、HIV-2及其所有血清型）和SIV的活性。

在本发明进一步的实施方案中，提供了抑制HIV或SIV感染的方法。该方法包括将抑制病毒有效量的一个或多个gp41变体肽，单独或联合药物可接受载体，或联合其它抗病毒剂（包括其它gp41变体肽）给予受试者，优选哺乳动物，最优选人。在本发明特别优选的实施方案中，至少一个gp41变体肽，单独或联合药物载体，或联合其它抗病毒剂（包括其它gp41变体肽）可以以抑制病毒量给予受试者。

本发明的进一步方面，提供了包含与血液成分共价键合的至少一个gp41变体肽的缀合物（conjugate）。在本发明的一个实施方案中，与本发明化合物反应的优选血液成分包括蛋白，例如免疫球蛋白，包括IgG和IgM，血清白蛋白、铁蛋白、类固醇结合蛋白、运铁蛋白、甲状腺素结合蛋白、α-2-巨球蛋白等，血清白蛋白和IgG是更优选的实施方案，而血清白蛋白是本发明最优选的实施方案。

本发明的进一步方面，提供了延长受试者中gp41变体肽的体内半衰期的方法，该方法包括将一个或多个gp41变体肽与血液成分共价键合。

本发明的另一个实施方案中，提供了设计、合成和测试具有对抗各种病毒的抗病毒、抑制病毒或抗融合活性的新肽的方法。该方法包括筛选参与进入细胞的病毒蛋白以鉴定其中具有α螺旋形成倾向的肽序列，和根据这些肽设计可以用于治疗相同病毒引起疾病的组合物。该方法还包括在体外测试这些肽组合物以证实抗病毒、抑制病毒或抗融合活性。

附图简述

图1—图1显示了本发明中公开的各种肽的比对序列。

发明详述

这里使用的“衍生”是指将偶联基团添加到肽序列上。下面更详细提供了代表性的偶联基团。

这里使用的“修饰”是指天然肽序列中的第一氨基酸被第二氨基酸置换。第二氨基酸可以选自非限制性组：亲水性氨基酸、疏水性氨基酸、具有螺旋倾向的氨基酸、非天然存在的氨基酸和天然存在的L-氨基酸的D-异构体。

HIV-1以及相关慢病毒与靶细胞的融合可以被实现融合的天然病毒包膜蛋白质的肽片断所抑制。这些肽片断可以与包膜蛋白结合并阻断病毒包膜蛋白的远端部分的结合，由此抑制对实现HIV-1与靶细胞融合很重要的天然蛋白的构象改变。这些肽通过阻断病毒与细胞的融合，中断了疾病发展所必需的感染过程。

本发明改善了现有抗病毒和抗融合肽的性质，并提供了有效治疗 HIV 和 SIV 的新肽组合物。用本发明肽可以抑制的病毒包括但不限于人逆转录病毒 HIV（包括 HIV-1 和 HIV-2，及其所有其它血清型）和 SIV。

修饰的肽

可以根据本发明制备具有对慢病毒的抗融合活性的修饰、衍生肽的方法。这些抗融合肽是基于天然 gp41 蛋白序列的形成螺旋的肽，它们通过改变该肽的所选择的氨基酸而被修饰。选择修饰的氨基酸以避免破坏有助于与病毒包膜蛋白 gp41 形成卷曲螺旋复合物的相互作用。在一个实施方案中，选择用来修饰的氨基酸残基是其侧链远离卷曲螺旋界面的残基。用将增加该肽的疏水或亲水特性的可替换残基置换这些残基，或可替换地衍化这些残基而提供能够使该肽与循环血液蛋白共价键合的反应性部分。亲水残基导入肽序列将增加肽的溶解度。疏水残基导入肽序列将降低肽的溶解度。在本发明的一个实施方案中，修饰的肽包括称做 FB005,FB006 和 FB066 的肽，特别是带有马来酰亚胺偶联部分或其它等同偶联结构的这些肽的衍生物，如 3-马来酰亚胺基丙酸通过[2-（2-氨基-乙氧基）乙氧基]乙酸与赖氨酸结合。本发明的另一个实施方案中，用具有形成α螺旋倾向性的氨基酸置换肽序列中的氨基酸。

可供选择地，化学基团可以被添加在它们的氨基和/或羧基末端，使得例如增加肽的稳定性、反应性和/或溶解度。例如，疏水基团如苄氧羰基、丹酰基（dansyl）、乙酰基或叔丁基氧羰基可以添加到肽的氨基末端。同样，乙酰基或 9-芴基甲氧基-羰基可以置于肽的氨基末端。另外，疏水基团，叔丁基氧羰基，或酰氨基可以添加在肽的羧基末端。类似地，对-硝基苄基酯基团可以置于肽的羧基末端。引入这种修饰的技术是本领域技术人员熟知的。

可以合成肽使得它们的空间构型改变。例如，可以使用肽的一个或多个氨基酸的 D-异构体，而不是常见的 L-异构体。在本发明的一个实施方案中，至少两个或多个氨基酸置换包括天然存在的 L 氨基酸的 D-异构体。本发明的另一个实施方案中，用相同氨基酸的 D-异构体置换完整肽序列中的每个天然存在的 L 氨基酸。本发明也包括可以用熟知的非天然存在的

氨基酸残基之一置换 gp41 变体肽中的至少一个氨基酸残基。在本发明的另一个实施方案中，可以对 gp41 变体肽进行天然存在的 L 氨基酸的 D-异构体、或非天然存在的氨基酸的置换的任何组合。改变（例如这些改变）可以用于增加 gp41 变体肽的稳定性、蛋白酶抗性、活性、反应性和/或溶解度。

本领域熟知非天然存在的氨基酸。此外，本领域也熟知合成具有天然存在 L 氨基酸的 D-异构体或非天然存在的氨基酸的肽的方法（见例如美国专利 5,840,697 和 6,268,479，以及 Biochemistry (Chap. 4), D. Voet and J.G. Voet, Wiley & Sons (1990)的公开内容，它们并入这里作为参考），并且这些方法也在本发明的范围中。

在本发明的一个实施方案中，修饰的肽包括记做 FB005,FB006 和 FB066 的肽，特别是带有马来酰亚胺偶联部分或其它等同偶联结构的这些肽的衍生物，如 3-马来酰亚胺丙酸通过[2-（2-氨基-乙氧基）乙氧基]乙酸与赖氨酸偶联。

本发明进一步包括 gp41 变体肽，其中其氨基酸残基被亲水或疏水残基置换，因此改变了该肽的水中性状（aqueous traits）。可供选择地，gp41 变体肽的其它氨基酸残基可以用马来酰亚胺连接部分衍生化。在本发明的优选实施方案中，用亲水或疏水残基置换或可供选择地用马来酰亚胺连接部分衍生化下列 gp41 变体肽（表 3 提供）的带下划线氨基酸残基。具有 C-末端赖氨酸残基的本发明所包括的任何其它肽也可以用亲水残基置换该 C-末端赖氨酸残基，或可供选择地用马来酰亚胺连接部分衍生化：

表 3

YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF	(SEQ ID NO:4)
WQEWEQKITALLEQAQIQQEKNEYELQKLDKWASLWEWF	(SEQ ID NO:3)
WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELL	(SEQ ID NO:5)
WQEWERKVDFLEENITALLEEAQIQQEKNMYELQ	(SEQ ID NO:6)
SLEQIWNNMTWEEWDREINNYTELIHELIEESQNQQEKNEQELL	(SEQ ID NO:1)
WEEWDREINNYTKLIHELIEESQNQQEKNEQELL	(SEQ ID NO:2)
WEEWDREINNYTKLIHELIEESQNQQEENEQELL	(SEQ ID NO:7)

SLEQIWNNMTWEEWDREINNYTXLIHELIEESQNQQEKNEQELL (SEQ ID NO:8)

SLEQIWNNMTWEEWDREINNYTELIHELIEESQNQQEKNEQELLX (SEQ ID NO:9)

WEEWDREINNYTXLIHELIEESQNQQEKNEWELL (SEQ ID NO:10)

WEEWDREINNYTELIHELIEESQNQQEKNEQELLX (SEQ ID NO:11)

WQEWEQKITALLXQAQIQQEKNEYELQKLDKWASLWEWF (SEQ ID NO:12)

WQEWEQKITALIEQAQIQQEKNEYELQKLDKWASLWEWFX (SEQ ID NO:13)

可以置换任何带下划线氨基酸的亲水氨基酸包括表 4 中列出的那些氨基酸。

可以置换任何带下划线氨基酸的疏水氨基酸包括表 5 中列出的那些氨基酸。

另外，表 3 中提供的任何带下划线氨基酸残基可以用马来酰亚胺连接部分衍生化，因此使得带有该氨基酸残基的 gp41 变体肽可以与血液成分上存在的可利用巯基共价键合。在本发明的优选实施方案中，赖氨酸用马来酰亚胺连接部分衍生。在本发明的特别优选实施方案中，用马来酰亚胺连接部分衍生化的赖氨酸与血液成分上存在的巯基基团共价键合。

本发明的另一个实施方案中，表 3 中提供的任何下划线氨基酸残基可以被具有高螺旋倾向性的氨基酸置换（见 Creamer, T., et al., Alpha-helix-forming propensities in peptides and proteins. Proteins, Jun; 19(2):85-97 (1994)）。表 6 中以 α 螺旋倾向性降序列举了具有高螺旋倾向性的氨基酸。因为据信当这些肽结合病毒靶 gp41 时，它们的活性构象是 α 螺旋，所以增加形成螺旋的趋势可以潜在地增加抗病毒活性。

表 4- 亲水性氨基酸

氨基酸	缩写
精氨酸	Arg
赖氨酸	Lys
天冬氨酸	Asp
谷氨酸	Glu
天冬酰胺	Asn
谷氨酰胺	Gln
组氨酸	His
丝氨酸	Ser
苏氨酸	Thr
甘氨酸	Gly

表 5- 疏水性氨基酸

氨基酸	缩写
丙氨酸	Ala
异亮氨酸	Ile
亮氨酸	Leu
甲硫氨酸	Met
苯丙氨酸	Phe
色氨酸	Trp
缬氨酸	Val
酪氨酸	Tyr

表 6- 具有高螺旋倾向性的氨基酸 [1]

氨基酸	α-螺旋偏好
谷氨酸	1.59
丙氨酸	1.41
亮氨酸	1.34
甲硫氨酸	1.30
谷氨酰胺	1.27
赖氨酸	1.23
精氨酸	1.21
苯丙氨酸	1.16
异亮氨酸	1.09
组氨酸	1.05
色氨酸	1.02
天冬氨酸	0.99
缬氨酸	0.90
苏氨酸	0.76
天冬酰胺	0.76
酪氨酸	0.74
半胱氨酸	0.66
丝氨酸	0.57
甘氨酸	0.43
脯氨酸	0.34

一般来说，本发明的肽是包含卷曲螺旋蛋白复合物一个α-螺旋的五个七残基区（heptads）的 C-34 类似物，优选类似物具有马来酰亚胺偶联基团和在第一个七残基区的 7 个残基的第 2 个，第二个七残基区的 7 个残基的第 6 个，第三个七残基区的 7 个残基的第 3 个，和/或第四个七残基区的 7 个残基的第 7 个处置换的比亲本序列极性更强的残基。在本发明的另一个实施方案中，本发明的肽包括上述的这些肽，但是进一步还包括在 C-34 肽 N 末端引入的 gp41 的另外 10 个残基。

FB006 肽基于 C-34 肽，第二和第十七位残基突变为谷氨酸，第十三位残基突变为赖氨酸。基于 N36/C34 复合体的晶体结构选择这些突变位

[1] 文献: T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties (2nd Ed.), W.H. Freeman and Co., 1993.

置。选择标准是这些残基不参与与 N36 螺旋的结合。改变为谷氨酸和赖氨酸旨在改善溶解性和螺旋倾向性，即在含水溶液中形成螺旋的趋势。因为相信 C34 的活性构象与在 N36/C34 晶体结构中一样是螺旋，所以增强螺旋倾向性应该提高生物学活性。FB005，FB006，FB066，FB005M，FB005CM，FB006M 和 FB007M 肽也含有这些置换。

gp41 变体肽包括表 1、2、3 和图 1 中列出的肽序列，及其修饰和衍生形式。肽 FB005 基于 FB006 肽，但是相对于其它 gp41 变体肽，在 N 末端具有另外 10 个氨基酸残基。

FB066 肽基于 FB006。它不同于 FB006，因为它带有单一氨基酸置换，第 28 位由赖氨酸变成谷氨酸。这个改变使得第 13 个氨基酸残基成为唯一充当缀合位点的赖氨酸残基。这个改变显著简化了带有马来酰亚胺修饰的类似物的合成。

本发明还提供了基于 FB005，FB006 和 T-1249（见 WO 01/03723）的衍生物，它们可与血清白蛋白缀合变成长效抑制剂。肽 FB005M 和 FB005CM 基于 FB005 序列；肽 FB006M 和 FB007M 基于 FB006 序列；肽 FB010M 和 FB010KM 基于 T-1249 序列。

选择使得肽能够连接血液蛋白载体的肽上连接位点的方法也是新的。发明人发现 gp41 变体肽通过肽的内部赖氨酸残基与白蛋白连接产生了效力超过 C 末端连接物（linkage）的缀合物。FB006，FB006M 和 FB007M 的 IC_{50}[2] 分别是 1.4，3.9 和 9.1 nM。FB006 是天然肽，FB006M 是在第 13 个残基带有马来酰亚胺连接物的修饰的肽复合体，而 FB007M 在 C 末端连接。当 FB006M 与血清白蛋白连接后，抗病毒作用所需的量增加了 2.8 倍，而通过 FB007M 的 C 末端连接物而连接白蛋白引起 IC_{50} 值增加了 6.5 倍。尽管预期与载体分子连接可延长肽的半衰期，但是理论上与白蛋白（66kDa 蛋白）缀合预期也通过提供空间位阻而阻断肽的生物活性。然而出乎意料的是，当发明人制备 FB006M 肽并把它与白蛋白缀合时，发现该复合体的抗病毒活性并没有受到明显的损害（仅增加 2.8 倍）。

本发明的偶联基团是能够与血液成分上存在的功能团

[2] IC_{50} 值是达到 50%病毒抑制的药物浓度，而 TC_{50} 值是达到 50%细胞毒性的药物浓度。

（functionality）形成共价键的化学基团。偶联基团一般在含水环境下保持稳定。血液成分上可利用的与偶联基团形成共价键的反应性功能团主要是氨基，羧基，和巯基。本发明的一个实施方案中，偶联基团包括但不限于，反应性双键、羧基、磷酰基或方便的酰基，作为酯或混和酐，或imidate，由此能够与移动蛋白（尤其是血液蛋白）上靶部位的功能团，如氨基、羟基或巯基形成共价键。反应性酯偶联基团由酚类化合物，硫醇酯、烷基酯、磷酸酯或类似基团组成。在本发明的特别优选实施方案中，偶联基团由琥珀酰亚胺基、马来酰亚胺基、肼基团或羰基基团组成。

本发明的焦点是修饰 gp41 肽序列，给肽提供更高的生物利用度、延长的半衰期和更好的分布（通过肽选择性连接到蛋白载体上），而基本上不改变肽的抗病毒、抑制病毒或抗融合性能。这里阐述的 gp41 变体肽的衍生允许该衍生肽与血液成分上的基团（特别是可利用的巯基）反应形成稳定的共价键。优选的 gp41 变体肽衍生物被设计为特异性地与流动血液蛋白上的巯基反应。这种反应通过带有马来酰亚胺连接物的肽与流动血液蛋白，如血清白蛋白或 IgG 上的巯基的共价键合而建立。因此，本发明的一个实施方案包括与血液蛋白共价连接的修饰肽，血液蛋白包括流动血液蛋白。本发明特别优选的实施方案包括修饰的肽与血清白蛋白的共价键合。

与 gp41 变体肽的本发明衍生物共价键合的血液成分可以是固定的或移动的。固定的血液成分是非流动的血液成分，包括组织、膜受体、间质蛋白、纤维蛋白、胶原、血小板、内皮细胞、上皮细胞以及它们相关的膜及膜受体，躯体的体细胞、骨骼和平滑肌细胞、神经成分、骨细胞和破骨细胞以及所有的身体组织特别是与循环和淋巴系统相关的那些。流动血液组分是在一段时间内，通常不超过 5 分钟，和更经常只有 1 分钟没有固定位置的血液成分。这些血液成分与膜不相关，它们以至少 0.1μg/ml 的浓度长时间存在于血液中。流动血液成分包括血清白质白、转铁蛋白、铁蛋白和免疫球蛋白如 IgM 和 IgG。这些流动血液成分的半衰期至少大约 12 小时。本发明精选的载体是通过其游离巯基缀合的白蛋白。

本发明的另一个实施方案提供了产生具有抗病毒、抑制病毒或抗融合活性的肽融合抑制剂预防或治疗包括逆转录病毒在内的病毒感染的方法。

根据该方法，鉴定参与病毒进入细胞和/或具有融合活性的病毒蛋白。接着筛选所述病毒蛋白的氨基酸序列，筛选据信参与蛋白－蛋白缔合的α螺旋形成区域。本领域技术人员可以用基于计算机的算法来筛选蛋白序列的α螺旋形成区域。可用于鉴定α螺旋形成区域的基于计算机的算法包括但不限于螺旋偏好的 Garnier-Robson 和 Chou-Fasman 指数，可在如 DNASTAR 等程序包中获得。

通过用增加肽序列的亲水性、疏水性或α螺旋形成趋势的氨基酸残基置换预定的氨基酸残基，可以根据前面讨论的本发明的方法设计来源于病毒蛋白中α螺旋形成区域的肽。可供选择地，可以用天然存在的 L-氨基酸的 D-异构体或非天然存在的氨基酸对本发明的肽进行置换。本发明的一个实施方案中，至少两个或多个氨基酸置换包括天然存在 L-氨基酸的 D-异构体。在本发明的另一个实施方案中，完整肽序列包括天然存在的 L 氨基酸的 D-异构体。改变（例如这些改变）可以用来增加本发明肽的稳定性、蛋白酶抗性、活性、反应性和/或溶解度。

这些衍生形式的肽一旦与血液成分例如血清白蛋白缀合，可用作具有延长半衰期的治疗剂。预计包括天然存在 L-氨基酸的 D-异构体的肽序列对蛋白酶活性抗性增加，增加模式与肽序列中天然存在 L-氨基酸的 D-异构体的数量成比例，而不依赖于这些肽是否与血液成分缀合。

本发明的这个方法进一步考虑了体外检测肽组合物以证实抗病毒、抑制病毒或抗融合活性。例如，本领域技术人员可以改变本文实施例 9 的指导而类似地建立筛选抗病毒活性的试验。作为非限制性例子，为了确定 IC_{50} 和 TC_{50} 值，本领域技术人员可以利用或改变实施例 9 的指导来检测在具有细胞类型（例如 PBMCs）特异性的病毒存在下抗病毒肽的作用。在肽抑制剂存在和缺乏下（具有适当对照）细胞类型的感染后，孵育所述细胞，确定病毒滴度和确定 IC_{50} 和 TC_{50} 值。

本发明方法适用的病毒包括但不限于，人类逆转录病毒，包括 HIV-1 和 HIV-2，人类 T-淋巴细胞病毒（HTLV-I 和 HTLV-II），和非人类逆转录病毒，包括牛造白细胞组织增生病毒，猫肉瘤病毒，猫白血病病毒，猿猴免疫缺陷病毒（SIV），猿肉瘤病毒，猿白血病，和绵羊进行性肺炎病毒。非逆转录病毒也可被抗病毒、抑制病毒或抗融合的肽所抑制，包括但不限

于人呼吸道合胞病毒(RSV),犬瘟病毒,新城疫病毒,人副流感病毒(HPV),流感病毒,麻疹病毒,Epstein-Barr 病毒,乙型肝炎病毒和猿 Mason-Pfizer 病毒。无包膜病毒也可以被本发明的肽所抑制,包括但不限于小核糖核酸病毒如脊髓灰质炎病毒,甲型肝炎病毒,肠道病毒,埃可病毒,柯萨奇病毒,乳头多瘤空泡病毒如乳头瘤病毒,细小病毒,腺病毒和呼肠孤病毒。

肽的合成

可以用本领域技术人员熟知的固相肽化学的标准方法合成衍生的 gp41 变体肽。例如,用固相化学合成技术,依照 Steward 等的《固相肽合成》,第二版,Pierce Chemical Company, Rockford, Ill., (1984) 所述步骤使用 Rainin PTI Sympphony 合成仪合成肽。可供选择地,可以合成肽片段,随后在溶液中组合或连接在一起形成 gp41 肽序列(片断缩合法,例如美国专利 6,281,331 所述(两个出版物都并入这里作为参考))。

对于固相肽合成,在Stewart等的 "Solid Phase Peptide Synthesis", W. H. Freeman Co. (San Francisco), 1963 和 Meienhofer, Hormonal Proteins and Peptides, 1973, 246 中可以找到许多技术的概述。对于经典的液相合成法,见例如Schroder等的"The Peptides",1卷, Acacemic Press (New York)。通常,这种方法包括向在聚合物上正在生长的的肽链上顺序添加一个或多个氨基酸或适当的保护氨基酸。正常情况下,第一个氨基酸的氨基或羧基被适当的保护性基团保护起来。接着这个被保护的和/或衍生的氨基酸连接到惰性固体载体上,或者在溶液中使用,在适合形成酰胺键的条件下,添加具有适当保护的(氨基或羧基)基团的序列中的下一个氨基酸。接着从这个新近添加氨基酸残基上除去保护性基团,添加下一个氨基酸(适当保护),等等。

所有需要的氨基酸以正确顺序连接之后,顺序或同时切割任何剩余保护性基团(以及任何固相载体)得到最终的肽。通过对这种常用方法的简单改变,可能给正在生长的链一次添加一个以上氨基酸,例如通过与适当保护的二肽(在不消旋手性中心的条件下)偶联保护的三肽,去保护后形成五肽。在本发明肽衍生物的合成过程中可能需要保护性基团。这些保护性基团是肽合成领域中常规的,并且通常它们可以描述为能够保护肽衍生

物不与其它功能基团反应的化学部分。各种保护性基团可以从市场上购买到，在美国专利 5,493,007 中可以找到其实例，该专利并入这里作为参考。典型的合适保护性基团实例包括乙酰基、芴基甲氧羰基（FMOC）、叔丁基氧羰基（BOC）、苄氧羰基（CBZ）等。另外，表 7 提供了天然存在氨基酸的三字母和单字母缩写。

表 7: 天然存在的氨基酸及它们的缩写

名称	三字母缩写	单字母缩写
丙氨酸	Ala	A
精氨酸	Arg	R
天冬酰胺	Asn	N
天冬氨酸	Asp	D
半胱氨酸	Cys	C
谷氨酸	Glu	E
谷氨酰胺	Gln	Q
甘氨酸	Gly	G
组氨酸	His	H
异亮氨酸	Ile	I
亮氨酸	Leu	L
赖氨酸	Lys	K
甲硫氨酸	Met	M
苯丙氨酸	Phe	F
脯氨酸	Pro	P
丝氨酸	Ser	S
苏氨酸	Thr	T
色氨酸	Trp	W
酪氨酸	Tyr	Y
缬氨酸	Val	V

制备 gp41 变体肽的特别优选方法包括固相肽合成法，其中氨基酸的 α-N 末端被酸性或碱性敏感基团保护起来。这些保护性基团应该具有对肽键形成条件稳定的性质，同时易于脱去而不破坏正在生长的肽链或使其中含有的任何手性中心消旋。N-保护性基团和羧基保护性基团的实例在 Greene 的"Protective Groups In Organic Synthesis," (John Wiley & Sons, New York pp. 152-186 (1981))中公开，该文献并入这里作为参考。N-保护性基团的实例包括但不限于，低级烷酰基如甲酰基、乙酰基（Ac）、丙酰基、 三甲基乙酰，叔丁基乙酰及相似的基团；其它的酰基还包括 2-氯乙酰、2-溴乙酰、三氟乙酰、三氯乙酰、邻苯二酰，邻硝基苯氧乙酰、

-氯丁酰，苯甲酰，4-氯苯甲酰、4-溴苯甲酰、4-硝基苯甲酰及类似基团；磺酰基团如苯磺酰基、 对甲苯磺酰基、邻硝基苯磺酰基、2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基（pmc）及类似基团；氨基甲酸酯形成性基团如 t-戊基氧羰基，苄氧羰基、对氯苄氧羰基、对甲氧苄氧羰基、对硝基苄氧羰基、2-硝基苄氧羰基、对溴苄氧羰基、3，4-二甲氧苄氧羰基、3，5-二甲氧基苄氧羰基、2，4-二甲氧基苄氧羰基、4-乙氧基苄氧羰基、2-硝基-4，5-二甲氧基苄氧羰基、3,4,5-三甲氧苄氧羰基、1-（对联苯基）-1-甲基乙氧羰基、α，α-二甲基-3,5-二甲氧基苄氧羰基、二苯甲氧羰基，t-丁基氧羰基 (Boc)、二异丙基甲氧羰基、异丙氧羰基、乙氧羰基、甲氧羰基、烯丙基氧羰基(Aloc)、2,2,2,-三氯乙氧羰基、 苯氧羰基，4-硝基苯氧羰基， 芴基-9-甲氧羰基，异冰片基氧羰基，环戊基氧羰基，adamantyloxycarbonyl，环己基氧羰基，苯硫羰基等等；芳基烷基如苯甲基、联苯基异丙氧基羰基、三苯甲基、苄氧甲基、9-芴基甲基氧羰基(Fmoc)等等和甲硅烷基类如三甲基甲硅烷基等等。优选的α-N-保护性基团是邻硝基苯亚磺酰基（O-nitrophenylsulfenyl）、9-芴基甲基氧羰基、t-丁基氧羰基 (boc)、异冰片基氧羰基、3,5-二甲氧苄氧羰基、t-戊基氧羰基；2-氰基-t-丁基氧羰基等等。9-芴基甲基氧羰基更优选，而优选侧链 N-保护性基团包括用于如赖氨酸、精氨酸等的侧链氨基的 2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰 (pmc)，硝基，p-甲苯磺酰，4-甲氧基苯-磺酰，Cbz，Boc，和金刚烷基氧羰基；用于赖氨酸的 Aloc；酪氨酸用的苯甲基，o-溴苯甲基氧羰基，2,6-二氯苯甲基，异丙基，t-丁基(t-Bu)，环己基，环戊基和 乙酰基(Ac)；丝氨酸用的 t-丁基，苯甲基和四氢吡喃基；组氨酸用的三苯甲基，苯甲基，Cbz，p-甲苯磺酰和 2,4-二硝基苯基 ；色氨酸用的甲酰基；谷氨酸和天冬氨酸用的苄基和 t-丁基；半胱氨酸用的三苯甲基。

羧基保护性基团通常是指羧酸保护性酯或酰胺基。这些羧基保护性基团是本领域技术人员熟知的，已经广泛用于青霉素和头孢菌素领域的羧基基团保护中，如美国专利 3,840,556 和美国专利 3,719,667 所述，这些公开物并入这里作为参考。

代表性的羧基保护性基团包括但不限于 C1-C8 的低级烷基、芳基烷基如苯乙基或苄基及其取代的衍生物如烷氧基苯甲基或硝基苯甲基；芳基链烯基如苯基乙烯基；芳基及其取代的衍生物如 5-茚满基；二烷基氨基烷基如二甲基氨乙基；烷酰氧基烷基如乙酸基甲基，丁酰氧基甲基，戊酰氧基甲基，异丁酰氧基甲基，异戊酰氧基甲基，1-(丙酸基)-1-乙基，1-(新戊酰氧基)-1-乙基，1-甲基-1-(丙酸基)-1-乙基，新戊酰氧基甲基，丙酸基甲基；环烷酰氧基烷基如 环丙基羰基氧甲基，环丁基羰基氧甲基，环戊基羰基氧甲基，环己基羰基氧甲基；芳酰氧基烷基如苯甲酰氧甲基，苯甲酰氧乙基；芳基烷基羰基氧基烷基如苯甲基羰氧甲基，2-苯甲基羰氧乙基；烷氧基羰基烷基或环烷基氧基羰基烷基如甲酯基甲基，环己基氧羰基甲基，1-甲酯基-1-乙基；烷氧基羰基氧基烷基或环烷氧基羰氧烷基如甲酯基氧甲基，t-丁基氧羰基-氧甲基，1-乙氧基羰氧基-1-乙基，1-环己基氧基羰基氧基-1-乙基；芳氧基-羰氧基烷基如 2-(苯氧羰基氧基)乙基，2-(5-茚满基氧羰基氧基)-乙基；烷氧基烷基羰基氧基烷基如 2-(1-甲氧基-2-甲基丙-2-酰基氧基)-乙基；芳基烷氧基羰氧基烷基如 2-(苯甲基氧羰基氧基)乙基；芳基烯氧基羰氧基烷基如 2-(3-苯基丙烯-2-基氧羰基氧基)乙基；烷氧基羰基氨基烷基如 t-丁基氧羰基氨基甲基；烷基氨基羰基-氨基烷基如甲基氨基羰基氨基甲基；烷酰基氨基烷基如乙酰基氨基甲基；杂环羰氧基烷基如 4-甲基哌嗪基-羰氧甲基；二烷基氨基羰基烷基如二甲基氨基羰基甲基，二乙基氨基羰基甲基；(5-(低级烷基)-2-氧代-1,3-dioxolen-4-yl)烷基如(5-t-丁基-2-氧代-1,3-dioxolen-4-yl)甲基；和 (5-苯基-2-氧代-1,3-dioxolen-4-yl)烷基如(5-苯基-2-氧代-1,3-dioxolen-4-yl)甲基。代表性的酰胺羧基保护性基团包括但不限于氨基羰基和低级烷基氨基羰基 基团。上述羧基保护性基团中，优选低级烷基，环烷基或芳基烷基酯，例如甲基酯，乙基酯，丙基酯，异丙基酯，丁基酯，仲-丁基酯，异丁基酯，戊基酯，异戊基酯，辛基酯，环己基酯，苯基乙基酯等等或烷酰基氧基烷基，环烷酰基氧基烷基，芳酰基氧基烷基或芳基烷基羰基氧基烷基酯。优选的酰胺羧基保护性基团是低级烷基氨基羰基。

在固相肽合成方法中，α-C-末端氨基酸与合适的固相载体或树脂连接。用于上述合成的合适固相载体是对每步缩合-去保护反应的试剂和反应条件稳定，以及在使用介质中不溶的那些材料。优选的合成α-C-末端羧基肽的固相载体是 4-羟甲基苯氧基乙酰-4'-甲基二苯甲基胺树脂（HMP 树脂）。优选的合成α-C-末端酰胺肽的固相载体是 Fmoc 保护的 Ramage 树脂，由 Bachem Inc., California 生产和销售。

在优选合成中，连接性的赖氨酸被 Aloc 保护。合成完成后，用 $Pd(Ph_3)_4$ 脱去 Aloc 而肽仍在树脂上，并允许接头分子和马来酰亚胺基团的偶联。特别是，接头是[2-（2-氨基）乙氧基]乙氧基乙酸，马来酰亚胺基团是 3'-马来酰亚胺基丙酸。修饰完成后，除去 Fmoc 基团，并从树脂上切除肽。

固相合成末期，以连续操作或在单一操作中，将肽从树脂上除去并去保护。肽的除去和去保护可以用常规一次操作完成，通过用包含茴香硫醚、三异丙基硅烷、苯酚和三氟乙酸的切割试剂处理与树脂结合的肽来实现。在肽的α-C-末端是烷基酰胺的情况下，树脂用烷基氨进行氨解断裂。可供选择地，也可以通过酯交换法，如用甲醇，随后氨解或通过直接酰胺基转移除去肽。保护的肽可在这时进行纯化或者直接进入下一步。使用上述切割混合物完成侧链保护性基团的去除。完全去保护的肽可以通过一系列层析步骤进行纯化，使用下列任何或全部类型层析：在弱碱性树脂（醋酸盐形式）上的离子交换；在非衍生的聚苯乙烯-二乙烯基苯（如 Amberlite XAD）上的疏水吸附层析；硅胶吸附层析；羧甲纤维素上的离子交换层析；分配层析，如葡聚糖凝胶 G-25，LH-20 或者反流分布法；高效液相色谱法（HPLC），特别是用辛基-或苯基/己基甲硅烷基-硅石键合的相柱填充物上的反相 HPLC 法。本领域技术人员可以确定可接受地纯化 gp41 变体肽所需的优选层析步骤或顺序。

可供选择地，可以在固相合成肽片断，包括马来酰亚胺基团的添加，然后可通过溶液偶联这些片断得到最终衍生的肽。

可以用电喷射质谱法或者 MALDI-TOF 质谱分析法确定这些肽的分子量。

修饰肽的治疗用途

gp41 变体肽，包括表 1、2、3 和图 1 中所列化合物，例如通过抑制细胞-细胞融合或者游离病毒感染而抑制病毒对细胞的感染。感染途径可以包括膜融合，如同包膜或被囊病毒的情况，或者涉及病毒和细胞结构如细胞受体的一些其它融合事件。

gp41 变体肽可以给予体内，使得在体内发生与血液成分缀合；或者，它们可以首先离体和血液成分缀合，再将所得缀合的衍生物给予到体内。本发明的另一个实施方案中，利用血浆去除法从患者的血液样品中分离需要的血液成分，然后将其与本发明的肽缀合，之后返回患者。

在体内巯基比例如血浆蛋白上的氨基少。因此，马来酰亚胺修饰的 gp41 变体肽共价结合的蛋白质较少。例如，在白蛋白（最丰富的血蛋白质）中，只有一个巯基。因此，一个修饰的 gp41 肽-马来酰亚胺-白蛋白缀合物将倾向于具有大约 1: 1 的 gp41 肽对白蛋白摩尔比例。除白蛋白之外，IgG 分子（II 类）也有游离的巯基。由于血液中可溶蛋白的大部分是 IgG 分子和血清白蛋白，所以它们也构成了在血液中可以与 gp41 变体肽共价结合的游离巯基的大部分。

进一步，由于白蛋白本身的独特性质，即使在带有游离巯基的血液蛋白质中，包括 IgGs，用马来酰亚胺进行特异标记使得优先形成修饰的 gp41 肽-马来酰亚胺-白蛋白缀合物。在不同种属中高度保守的白蛋白单个游离巯基位于第 34 氨基酸残基(Cys34)上。最近已经证明，相对于其他含游离巯基的蛋白上的游离巯基，白蛋白中的 Cys34 的反应性增加。这部分是由于白蛋白中的 Cys34 具有 5.5 的极低 pK 值。这比通常半胱氨酸残基的典型 pK 值 8.0 低得多。由于这个 pK 值低，在正常生理条件下，白蛋白中的 Cys34 大部分呈离子化形式，这就显著增强了其反应性。除了 Cys34 的低 pK 值，另一个提高 Cys34 反应性的因素是它的位置，它位于紧靠白蛋白 V 区域一个环表面的疏水袋中。该位置使 Cys34 非常有利于接触各种类型的配体，在 Cys34 作为自由基收集器和自由硫醇清除剂的生物学作用中，它是一个重要的因素。这些特性使得 Cys34 对具有马来酰亚胺连接的 gp41

肽具有高度反应性，而且该反应率可以比具有马来酰亚胺连接的 gp41 变体肽与其它含游离巯基的蛋白质发应的速率反应率高多达 1000 倍。

修饰的 gp41 肽-马来酰亚胺-白蛋白缀合物的另一个优点是与肽以 1:1 特异地加载至白蛋白的 Cys34 上相关的可重复性。其它技术，如戊二醛、DCC、EDC 和其它化学活化，例如游离氨基，都缺乏这种选择性。例如，白蛋白含有 52 个赖氨酸残基，其中 25-30 个位于白蛋白表面并因此可以用于结合。活化这些赖氨酸残基，或者作为替代方案修饰 gp41 变体肽使其通过这些赖氨酸残基偶联，会形成不均匀缀合物。即使采用 1: 1 摩尔比的 gp41 马来酰亚胺肽和白蛋白，胺衍生的白蛋白产物将由多个缀合产物组成，其中的一些，每个白蛋白中含有 0、1、2 或更多 gp41 肽，每个产物中肽可以与 25-30 个可用的赖氨酸位点的任意一个或多个结合。由于有多种可能组合，表征每个缀合批次的确切组成和性质变得很难，批次和批次的重复性几乎是不可能的，使得很难将这种缀合物作为治疗剂。

此外，尽管看起来通过白蛋白的赖氨酸残基的缀合物将至少具有每一白蛋白分子传递更多治疗剂的优点，但是研究表明优选治疗剂与白蛋白的比例为 1:1。在 Stehle 等的文章"The Loading Rate Determines Tumor Targeting properties of Methotrexate-Albumin Conjugates in Rats," *Anti-Cancer Drugs*, Vol. 8, pp. 677-685 (1988)中，（其全部内容并入这里作为参考），作者报道了比例为 1:1 的抗癌药物氨甲蝶呤与通过戊二醛结合的白蛋白得到最理想的结果。这些缀合物被肿瘤细胞优先吸收，而含有 5:1 至 20:1 的氨甲蝶呤分子的缀合物改变了 HPLC 的谱形，在体内被肝脏快速吸收。一种假说是，这种较高比例下，白蛋白的构象改变减少了其作为治疗载体的有效性。

通过将 gp41 变体肽在体内控制给药，可以控制体内白蛋白和 IgG 的特异性标记。在典型的给药过程中，给予的衍生 gp41 变体肽的 80-90％会标记白蛋白，少于 5％的会标记 IgG。游离巯基如谷光苷肽也会有微量标记。体内使用优选这种特异性标记，因为它允许准确计算 gp41 变体肽的估计半衰期。

除了提供体内控制的特异性标记外，衍生的 gp41 变体肽还可以提供

离体血清白蛋白和 IgG 的特异性标记。这种离体标记包括将带有马来酰亚胺键的 gp41 变体肽加入含有血清白蛋白和/或 IgG 的血液、血清或盐水溶液中。一旦与 gp41 变体肽离体缀合，可以把血液、血清或盐水溶液重新给入患者的血液进行体内治疗，或冻干。

gp41 变体肽可以单独或联合使用以优化它们的治疗效果。本发明的另一个实施方案中，gp41 变体肽与一个或多个另外的抗病毒 HIV 治疗药物共同给予。可以与 gp41 变体肽共同给予的另外的抗病毒 HIV 治疗药物包括，但不限于，AGENERASE (amprenavir; GlaxoSmithKline); COMBIVIR (拉米夫定，齐多夫定; GlaxoSmithKline); CRIXIVAN (indinavir, IDV, MK-639; Merck); EMTRIVA (FTC, emtricitabine; Gilead Sciences); EPIVIR (拉米夫定，3TC; GlaxoSmithKline); FORTOVASE (沙奎那韦; Hoffmann-La Roche); HIVID (扎西他滨，ddC，双脱氧胞苷; Hoffmann-La Roche); INVIRASE (沙奎那韦甲磺酸，SQV; Hoffmann-La Roche); KALETRA (lopinavir, ritonavir; Abbott Laboratories); NORVIR (ritonavir, ABT-538; Abbott Laboratories); RESCRIPTOR (Delaviridine, DLV; Pfizer); RETROVIR (齐多夫定，AZT，叠氮胸苷，ZDV; GlaxoSmithKline); REYATAZ (atazanavir sulfate; Bristol Myers-Squibb); SUSTIVA (efavirenz; Bristol Myers-Squibb); TRIZIVIR (abacavir，齐多夫定，拉米夫定; GlaxoSmithKline); VIDEX EC (肠衣去羟肌苷; Bristol Myers-Squibb); VIDEX (去羟肌苷，ddI，双脱氧肌苷; Bristol Myers-Squibb); VIRACEPT (nelfinavir mesylate, NFV; Agouron Pharmaceuticals); VIRAMUNE (奈韦拉平，BI-RG-587; Boehringer Ingelheim); VIREAD (tenofovir disoproxil fumarate; Gilead); ZERIT (stavudine, d4T; Bristol Myers-Squibb); ZIAGEN (abacavir; GlaxoSmithKline).

本发明另外的实施方案中，gp41 变体肽与用于治疗 HIV 或 HIV 诱发疾病的一个或多个另外的化合物共同给药。这些可与 gp41 肽共同给药的其它药物包括，但不限于，三甲曲沙葡糖醛酸盐(治疗卡氏肺孢子虫肺炎)；更昔洛韦(治疗巨细胞病毒性视网膜炎)；喷雾型喷他脒 (治疗卡氏肺孢

子虫肺炎)；红细胞生成素（治疗齐多夫定相关性贫血)；阿托伐醌(治疗卡氏肺孢子虫肺炎)；利福布汀(治疗鸟分枝杆菌)；VISTIDE（治疗复发性巨细胞病毒性视网膜炎)；和 SEROSTIM（治疗 AIDS 相关的消瘦)。

gp41 变体肽，包括但不限于表 1、2、3 和图 1 提供的那些肽，可以与表 1、2、3 和图 1 所列的一个或多个 gp41 变体肽共同给药。本发明另一个实施方案中，gp41 变体肽，包括但不限于表 1、2、3 和图 1 提供的那些肽，可以与 T-20 或 T-1249 肽共同给药。

gp41 变体肽可以用生理可接受的介质给药，如去离子水，磷酸缓冲盐水（PBS），盐水，含水乙醇或其它醇，血浆，蛋白溶液，甘露糖醇，葡糖水溶液，醇类，植物油等等。优选的是包含 gp41 变体肽的药物组合物与药物可接受载体给予。其它可以添加的成分包括缓冲剂，该介质通常被缓冲至 pH 值范围大约 5 至 10，缓冲剂浓度范围通常是 50-250 mM；盐，盐浓度范围通常从 5 至 500mM；生理可接受稳定剂，等等。该组合物可以冻干以便于贮存和运输。

gp41 变体肽可以经口服，胃肠外，如静脉内（IV）、动脉内（IA）、肌内（IM）、皮下（SC）或其它途径给药。在适当的时候可以通过输液给药。有些情况下，当功能性基团的反应相对缓慢时，可以采用经口、鼻、直肠，及经皮或喷雾方式给药，在这种情况下缀合物的性质允许输送到脉管系统。通常采用一次注射，尽管需要时可以使用一次以上注射。肽衍生物可以通过任何方便工具给予，包括注射器、套针、导管或其它。给药的具体方式将根据给药量，是一次性大剂量还是连续给药等等而变化。优选，静脉内给药，给药部位对本发明不重要，优选血液流动快的部位，如静脉内、外周或中心静脉。当与缓释技术或保护基质联合给药时可以使用其它途径。其目的是让 gp41 变体肽有效地分布到血液中，以便它能够与血液成分反应。给予的缀合物量将在较宽范围内变化，通常范围从 1mg 至 500mg。血管内给药的总量范围通常为大约 0.5 μg/公斤体重至大约 50 mg/公斤体重，更常用的是 0.5 mg/公斤体重至大约 10 mg/公斤体重。

通过与血液中寿命长的成分，如免疫球蛋白、血清白蛋白、红细胞和血小板等结合，产生了很多优点。gp41 变体肽活性延长至几天至几周。

在此期间，只需给药一次。由于活性物质主要与大分子结合，可以获得更大的特异性，活性物质进入细胞内和干涉其它生理过程的可能性更小。

与血液成分形成共价键可以发生在体内或离体。对于离体形成共价键，衍生的 gp41 变体肽加入到血液血清或含有纯化的血液成分如人血清白蛋白或 IgG 的盐水溶液中，以允许衍生物和血液成分之间的共价键形成。在优选实施方案中，gp41 变体肽在盐水溶液中与人血清白蛋白反应。待结合物形成后，后者可以给予受试者或冻干。

gp41 变体肽的活性和/或存在可以用哺乳动物宿主的血液检测。在不同时间从动物身上获取血液样品，可以确定 gp41 变体肽是否已经以足以产生治疗活性的量结合了寿命长的血液成分，同时还可以确定 gp41 变体肽在血液中的水平。如果需要，也可以确定 gp41 变体肽共价结合了哪个血液成分。也可以通过使用对 gp41 肽活性特异性的试验，HPLC-MS 或 gp41 变体肽的抗体进行监测。

gp41 变体肽可以通过这里描述的方法或本领域已知的其它方法给予患者。考虑治疗的患者包括那些在此所提到的任何病毒，尤其是 HIV-1 和 HIV-2 的感染患者。gp41 变体肽的有效治疗剂量可以通过本领域技术人员熟知的程序确定并考虑到这些 gp41 肽的潜在毒性。

gp41 变体肽也可以预防性给予尚未被感染的个体。这种给药有益于与病毒高危接触的个体的情况，当患者已经接触了感染的个体以及有病毒传播高风险时这可以发生。这对于没有已知治愈方法的病毒的情况，如 HIV 病毒时，特别有利。作为非限制性例子，在医疗工作者已经接触了来自 HIV 感染个体的血液的情况下，或患者从事可能接触 HIV 病毒的高风险活动的其它情况下，预防性给予 gp41 肽将是有益的。Gp41 变体肽的其它应用包括将相同物质给予携带病毒如 HIV 的个体，以预防病毒从感染个体传播到未感染个体。这种应用也包括预防通过哺乳或其它日常接触而发生的母婴传播，或通过性活动发生的传播。

本发明的另一个实施方案中，gp41 变体肽，包括但不限于表 1、2、3 和图 1 中提供的那些肽，可以与表 1、2、3 和图 1 中所列的一个或多个另外的肽，T-20，T-1249，或者其它 HIV 治疗药物共同给药，以防止 HIV（包

括 HIV-1，HIV-2，及其所有其它血清型）和 SIV 病毒颗粒在患者体内复制。

局部应用

gp41 变体肽，包括表 1、2、3 和图 1 中提供的那些，可以单独，或以包含或基本上由有效剂浓度的肽和药物可接受载体组成的组合物的形式使用。有效浓度可以通过观察该制剂是否有效阻断病毒感染来确定。

本发明的组合物包括体内和体外局部杀灭微生物，杀灭病毒，或抗融合用途，特别是阴道内和/或直肠内使用。为了这些目的，修饰的肽可以配制在任何适当的赋形剂中，条件是载体不减少修饰肽的抗融合活性。因此，该组合物的形式可以是乳膏、凝胶、泡沫、洗剂、软膏、片剂，溶液或喷雾剂。载体或赋形稀释剂可以是水溶性或非水溶性的，例如醇类的或油脂的，或其混合物，可以另外含有其它表面活性剂、润肤剂、滑润剂、稳定剂、染料、香料、抗菌剂作为活性成分或防腐剂，和调节 pH 的酸或碱。优选 pH 是大约 4 至 5。制备该组合物使用常规方法。

优选，局部应用组合物的药物可接受载体或赋形剂是含有本发明化合物的液体，胶状物，或泡沫形式。该化合物可以加入到:（a）软膏和胶状物，（b）插入物（栓剂、海绵等等），（c）泡沫，（d）冲洗剂和（e）清洗流体或身体清洗液。优选在性交时或优选性交之前将该制剂导入女性阴道或男性或女性的直肠，但也可以用于其它粘膜。该组合物可以用来治疗和预防性传播疾病，包括 HIV。设计给药方式优选使得含肽的本发明组合物与性传播疾病的成因物直接接触。

对局部应用来说，药物可接受载体可另外包含有机溶剂、乳化剂、凝胶剂、润湿剂、稳定剂、其它表面活性剂、湿润剂、防腐剂、缓释剂、和少量保湿剂、螯合剂、染料、香料和其它在局部用药的药物组合物中通常使用的成分。

关于本发明可提供的产品，本发明的组合物可以加入到吸收性的衬底材料，如海绵中，或者在固体衬底材料表面涂覆，比如阴茎套、子宫帽或医用手套，以优选在性交前或性交过程中将组合物送递到阴道或其它可能被感染的上皮。这种类型的其它产品和送递系统对本领域技术人员都是显

而易见的。目前优选产品是阴茎套，阴茎套的表面通过喷雾被修饰肽而涂覆，或者通过本领域熟知技术在制造过程中将肽掺入阴茎套中。优选的涂覆组合物包括硅氧烷（silicon），它提供润滑功效，并且能够以缓释方式释放修饰肽。生物粘附聚合物也可以用来延长使用的特殊局部或其它药剂的释放时间。

局部给药的固体剂型包括栓剂、粉末、片剂和颗粒剂。在固体剂型中，组分可以与至少一个惰性稀释剂，如蔗糖、乳糖或淀粉混合，也可以另外含有润滑剂、缓冲剂和其它本领域技术人员熟知的成分。

本发明的组合物和产品中的修饰肽实际剂量水平可以变化，使得在性传播流体部位达到对于特定肽和给药方法获得期望的治疗或预防效果的量。因此，选择的剂量水平会依赖于感染的性质和部位、期望得到的治疗反应、给药途径、希望治疗的持续时间和其它因素。一般来说，本发明修饰肽的优选剂量将在大约 0.01-2.0wt%的范围内。一个优选的局部阴道剂型是如上所述的乳膏或者栓剂，含有 0.01-2.0wt%的根据本发明的组合物。每次治疗中，典型的是每日两次，每次 1ml 到 5ml 的这种剂型在阴道内应用，优选在阴道口，或进入直肠。通常避免更多剂量以减少泄漏。

本发明的方法和组合物可以用来预防和治疗广谱致病微生物的感染。

实施例

为了便于更完全地理解本发明，下面提供了很多实施例。然而，这些实施例中公开的具体实施方案并不限制本发明的范围，而仅仅是为了举例说明的目的。

总论

除非另外说明，每个 gp41 变体肽的合成在 Symphony 肽合成仪上用自动操作固相方法实施，在衍生物产生过程由手工介入。该合成在 Fmoc 保护的 Ramage 酰胺接头树脂上，用 Fmoc 保护的氨基酸进行。使用 O-苯并三唑-1-基-N,N,N′,N′-四甲基-脲鎓六氟磷酸盐(HBTU)在 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)溶液中作为活化剂，二异丙基乙基胺（DIEA）作为碱来完成偶

联。用 20%哌啶/DMF 溶液除去 Fmoc 保护性基团。合成过程中使用的所有氨基酸具有 L-立体化学。在合成过程中使用玻璃反应容器。

实施例 1 FB005 的合成

步骤 1：该实施例描述了 1mmol 规模的化合物的固相肽合成。下列被保护的氨基酸被依次加到树脂上：Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-His-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Thr-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Asn-OH, Fmoc-Asn-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Gln-OH, Fmoc-Glu-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ser-OH。它们溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)中，并按照顺序用 O-苯并三唑-1-基-N,N,N′,N′-四甲基-脲鎓六氟磷酸盐(HBTU)和二异丙基乙基胺（DIEA）活化。用含 20%（v/v)哌啶的 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)溶液 20 分钟除去 Fmoc 保护性基团(步骤 1)。最后的氨基酸的氨基基团用以 O-苯并三唑-1-基-N,N,N′,N′-四甲基-脲鎓六氟磷酸盐(HBTU)和二异丙基乙基胺（DIEA）活化的乙酸进行乙酰化。

步骤 2：用 85%TFA/5%三异丙基硅烷（TIPS）/5%苯硫基甲烷和 5%苯酚将肽从树脂上切割下来，随后用以干冰冷却的 Et20 进行沉淀（步骤 2）。

实施例 2：FB005M 的合成

步骤 1：该实施例描述了 1mmol 规模的化合物的固相肽合成。下列

被保护的氨基酸被依次加到树脂上：Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-His-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Aloc)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Thr-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Asn-OH, Fmoc-Asn-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Gln-OH, Fmoc-Glu-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ser-OH。它们溶于N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中，按照顺序用O-苯并三唑-1-基-N,N,N′,N′-四甲基-脲鎓六氟磷酸盐(HBTU)和二异丙基乙基胺(DIEA)活化。用含20%(v/v)哌啶的N,N-二甲基甲酰胺(DMF)溶液20分钟除去Fmoc保护性基团(步骤1)。最后的氨基酸的氨基基团用以O-苯并三唑-1-基-N,N,N′,N′-四甲基-脲鎓六氟磷酸盐(HBTU)和二异丙基乙基胺(DIEA)活化的乙酸进行乙酰化。

步骤2：手动实施Lys(Aloc)基团的选择性去保护，并用3当量的Pd(PPh3)4溶解在5ml C6H6 CHC13 (1:1)：2.5% NMM (v:v)：5% AcOH (v:v)中的溶液处理树脂2小时来完成(步骤2)。然后用CHC13(6×5ml)，在DCM中的20% AcOH(6×5ml)，DCM(6×5ml)和DMF(6 x 5 mL)洗涤树脂。

步骤3：该合成接着再自动化进行，以添加Fmoc-AEEA-OH和3-马来酰亚胺基丙酸(步骤3)。在每次偶联之间，用N,N-二甲基甲酰胺(DMF)洗涤树脂3次，和用异丙醇(iPrOH)洗涤树脂3次。

步骤4：用85%TFA/5%TIS/5%苯硫基甲烷和5%苯酚将肽从树脂上切割下来，随后用干冰冷却的Et20进行沉淀(步骤4)。

实施例 3: FB005CM 的合成

步骤 1: 该实施例描述了 1mmol 规模的化合物的固相肽合成。下列被保护的氨基酸被依次加到树脂上: Fmoc-Lys(Aloc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-His-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Thr-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Asn-OH, Fmoc-Asn-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Gln-OH, Fmoc-Glu-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ser-OH。它们溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)中，按照顺序用 O-苯并三唑-1-基-N,N,N′,N′-四甲基-脲鎓六氟磷酸盐(HBTU)和二异丙基乙基胺（DIEA）活化。用含 20%（v/v）哌啶的 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)溶液 20 分钟除去 Fmoc 保护性基团（步骤 1）。最后的氨基酸的氨基基团用以 O-苯并三唑-1-基-N,N,N′,N′-四甲基-脲鎓六氟磷酸盐(HBTU)和二异丙基乙基胺（DIEA）活化的乙酸进行乙酰化。

步骤 2: 手动实施 Lys (Aloc)基团的选择性去保护，并用 3 当量的 Pd(PPh3)4 溶解在 5ml C6H6 CHC13 (1:1) : 2.5% NMM (v:v): 5% AcOH (v:v)中的溶液处理树脂 2 小时来完成(步骤 2）。然后用 CHC13（6×5ml），在 DCM 中的 20% AcOH（6×5ml），DCM（6 x 5 mL）和 DMF (6 x 5 mL)洗涤树脂。

步骤 3: 该合成接着再自动化进行，以添加 Fmoc-AEEA-OH 和 3-马来酰亚胺基丙酸 (步骤 3)。在每次偶联之间，用 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)洗涤树脂 3 次，和用异丙醇（iPrOH）洗涤树脂 3 次。

步骤 4:用 85%TFA/5%TIS/5% 苯硫基甲烷和 5%苯酚将肽从树脂上切割下来，随后用干冰冷却的 Et20 进行沉淀（步骤 4）。

实施例 4: FB006 的合成

步骤 1: 该实施例描述了 1mmol 规模的化合物的固相肽合成。下列被保护的氨基酸被依次加到树脂上: Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-His-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH。它们溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)中，按照顺序用 O-苯并三唑-1-基-N,N,N′,N′-四甲基-脲鎓六氟磷酸盐(HBTU)和二异丙基乙基胺(DIEA)活化。用含 20%(v/v)哌啶的 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)溶液 20 分钟除去 Fmoc 保护性基团(步骤 1)。最后的氨基酸的氨基基团用以 O-苯并三唑-1-基-N,N,N′,N′-四甲基-脲鎓六氟磷酸盐(HBTU)和二异丙基乙基胺（DIEA）活化的乙酸进行乙酰化。

步骤 4:用 85%TFA/5%TIS/5% 苯硫基甲烷和 5%苯酚将肽从树脂上切割下来，随后用干冰冷却的 Et20 进行沉淀（步骤 4）。

实施例 5: FB006M 的合成

步骤 1: 该实施例描述了 1mmol 规模的化合物的固相肽合成。下列被保护的氨基酸被依次加到树脂上: Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH,

Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-His-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Aloc)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH。它们溶于N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中，按照顺序用O-苯并三唑-1-基-N,N,N′,N′-四甲基-脲鎓六氟磷酸盐(HBTU)和二异丙基乙基胺(DIEA)活化。用含20%(v/v)哌啶的N,N-二甲基甲酰胺(DMF)溶液20分钟除去Fmoc保护性基团(步骤1)。最后的氨基酸的氨基基团用以O-苯并三唑-1-基-N,N,N′,N′-四甲基-脲鎓六氟磷酸盐(HBTU)和二异丙基乙基胺(DIEA)活化的乙酸进行乙酰化。

步骤2：手动实施Lys(Aloc)基团的选择性去保护，并用3当量的Pd(PPh3)4溶解在5ml C6H6 CHC13 (1:1)：2.5% NMM (v:v)：5% AcOH (v:v)中的溶液处理树脂2小时来完成(步骤2)。然后用CHC13(6×5ml)，在DCM中的20% AcOH(6×5ml)，DCM(6 x 5 mL)和DMF(6 x 5 mL)洗涤树脂。

步骤3：该合成接着再自动化进行，以添加Fmoc-AEEA-OH和3-马来酰亚胺基丙酸(步骤3)。在每次偶联之间，用N,N-二甲基甲酰胺(DMF)洗涤树脂3次，和用异丙醇(iPrOH)洗涤树脂3次。

步骤4：用85%TFA/5%TIS/5%苯硫基甲烷和5%苯酚将肽从树脂上切割下来，随后用干冰冷却的Et20进行沉淀(步骤4)。

实施例6：FB007M的合成

步骤1：该实施例描述了1mmol规模的化合物的固相肽合成。下列被保护的氨基酸被依次加到树脂上：Fmoc-Lys(Aloc)-OH, Fmoc-Leu-OH,

Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-His-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH。它们溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)中，按照顺序用 O-苯并三唑-1-基-N,N,N′,N′-四甲基-脲鎓六氟磷酸盐(HBTU)和二异丙基乙基胺（DIEA）活化。用含 20%（v/v）哌啶的 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)溶液 20 分钟除去 Fmoc 保护性基团（步骤 1）。最后的氨基酸的氨基基团用以 O-苯并三唑-1-基-N,N,N′,N′-四甲基-脲鎓六氟磷酸盐(HBTU)和二异丙基乙基胺（DIEA）活化的乙酸进行乙酰化。

步骤 2: 手动实施 Lys (Aloc)基团的选择性去保护，并用 3 当量的 Pd(PPh3)4 溶解在 5ml C6H6 CHC13 (1:1) : 2.5% NMM (v:v): 5% AcOH (v:v)中的溶液处理树脂 2 小时来完成(步骤 2）。然后用 CHC13（6×5ml），在 DCM 中的 20% AcOH（6×5ml），DCM（6 x 5 mL）和 DMF (6 x 5 mL)洗涤树脂。

步骤 3: 该合成接着再自动化进行，以添加 Fmoc-AEEA-OH 和 3-马来酰亚胺基丙酸 (步骤 3)。在每次偶联之间，用 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)洗涤树脂 3 次，和用异丙醇（iPrOH）洗涤树脂 3 次。

步骤 4:用 85%TFA/5%TIS/5% 苯硫基甲烷和 5%苯酚将肽从树脂上切割下来，随后用干冰冷却的 Et20 进行沉淀（步骤 4）。

实施例 7: FB010M 的合成

步骤 1: 该实施例描述了 1mmol 规模的化合物的固相肽合成。下列被保护的氨基酸被依次加到树脂上: Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH,

Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Aloc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH。它们溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)中，按照顺序用 O-苯并三唑-1-基-N,N,N′,N′-四甲基-脲鎓六氟磷酸盐(HBTU)和二异丙基乙基胺(DIEA)活化。用含20%(v/v)哌啶的N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)溶液20分钟除去 Fmoc保护性基团（步骤1）。最后的氨基酸的氨基基团用以 O-苯并三唑-1-基-N,N,N′,N′-四甲基-脲鎓六氟磷酸盐(HBTU)和二异丙基乙基胺(DIEA)活化的乙酸进行乙酰化。

步骤 2: 手动实施 Lys (Aloc)基团的选择性去保护，并用 3 当量的 Pd(PPh3)4 溶解在 5ml C6H6 CHC13 (1:1) : 2.5% NMM (v:v): 5% AcOH (v:v)中的溶液处理树脂 2 小时来完成(步骤 2）。然后用 CHC13（6×5ml），在 DCM 中的 20% AcOH（6×5ml），DCM(6 x 5 mL)和 DMF (6 x 5 mL)洗涤树脂。

步骤 3: 该合成接着再自动化进行，以添加 Fmoc-AEEA-OH 和 3-马来酰亚胺基丙酸 (步骤 3)。在每次偶联之间，用 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)洗涤树脂 3 次，和用异丙醇（iPrOH）洗涤树脂 3 次。

步骤 4:用 85%TFA/5%TIS/5% 苯硫基甲烷和 5%苯酚将肽从树脂上切割下来，随后用干冰冷却的 Et20 进行沉淀（步骤 4）。

实施例 8: FB010KM 的合成

步骤 1: 该实施例描述了 1mmol 规模的化合物的固相肽合成。下列

被保护的氨基酸被依次加到树脂上：Fmoc-Lys(Aloc)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH。它们溶于N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)中，按照顺序用 O-苯并三唑-1-基-N,N,N′,N′-四甲基-脲鎓六氟磷酸盐(HBTU)和二异丙基乙基胺(DIEA)活化。用含20%(v/v)哌啶的N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)溶液20分钟除去 Fmoc保护性基团(步骤1)。最后的氨基酸的氨基基团用以O-苯并三唑-1-基-N,N,N′,N′-四甲基-脲鎓六氟磷酸盐(HBTU)和二异丙基乙基胺(DIEA)活化的乙酸进行乙酰化。

步骤2：手动实施Lys (Aloc)基团的选择性去保护，并用3当量的Pd(PPh3)4溶解在5ml C6H6 CHC13 (1:1)：2.5% NMM (v:v)：5% AcOH (v:v)中的溶液处理树脂2小时来完成(步骤2)。然后用CHC13(6×5ml)，在DCM中的20% AcOH(6×5ml)，DCM (6 x 5 mL)和DMF (6 x 5 mL)洗涤树脂。

步骤3：该合成接着再自动化进行，以添加Fmoc-AEEA-OH和 3-马来酰亚胺基丙酸 (步骤3)。在每次偶联之间，用N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)洗涤树脂3次，和用异丙醇(iPrOH)洗涤树脂3次。

步骤4：用85%TFA/5%TIS/5% 苯硫基甲烷和5%苯酚将肽从树脂上切割下来，随后用干冰冷却的Et20进行沉淀(步骤4)。

实施例 9：修饰肽的病毒抑制作用

在新鲜人 PBMC 培养物中针对 $HIV\text{-}1_{IIIB}$检测 FB005，FB006，FB006M，FB007M，FB010KM 和 FM010M 的抗病毒活性和细胞毒性。在抗病毒检测前通过混合使得四个修饰肽 FB006M，FB007M，FB010M 和 FB010KM 与人血清白蛋白(HSA)结合。下表 8 显示了结果，其中 IC_{50}值是 50%病毒抑制的药物浓度， TC_{50}值是 50%细胞毒性的药物浓度。

细胞上抗-HIV 测定法

临使用之前从冷冻室（-80℃）中取出事先测定滴度的 $HIV\text{-}1_{IIIB}$，在生物安全箱中快速解冻至室温。

从筛选的供体分离新鲜的人 PBMCs，这些供体的 HIV 和 HBV 血清反应呈阴性(Interstate Blood Bank, Inc.; Memphis, TN)。通过低速离心并重悬于 PBS 中将细胞沉淀/洗涤 2-3 次，以除去污染的血小板。接着用 Dulbecco′s 磷酸缓冲盐水(PBS)将带白细胞血 1:1 稀释，然后层叠于 50ml 离心试管中 14ml 的淋巴细胞分离介质上，接着 600 X g 离心 30 分钟。从产生的界面上轻轻吸取成带的 PBMCs，随后用 PBS 在低速离心下洗涤 2 次。最后一次洗涤后，细胞用锥虫蓝排除法进行计数，并以 1×10^7 个细胞/mL 重悬于补充了 15%胎牛血清（FBS），2mM L-谷氨酸，4μg/mL 植物凝血素(PHA-P, Sigma)的 RPMI 1640 中。细胞被允许在 37 ℃孵育 48-72 小时。孵育后，PBMCs 被离心，并重悬于含 15% FBS, 2 mM L-谷氨酸, 100 U/mL 青霉素，100μg/mL 链霉素，10μg/mL 庆大霉素和 20 U/mL 重组人 IL-2(R&D Systems, Inc)的 RPMI 1640 中。PBMCs 以 $1\text{-}2 \times 10^6$ 个细胞/mL 的浓度维持在这个培养基中，隔周更换培养基，直到测定方案使用时。细胞在培养基中保持最多两周，此后认为用于试验已经太老并丢弃之。由于贴壁到组织培养瓶的原因，培养物中单核细胞衰竭了。

对于标准的 PBMC 试验，混合来自至少两位正常供体的 PHA-P 刺激的细胞，用新培养基稀释至终浓度为 1×10^6 个细胞/mL，以 50μL/孔 (5×10^4 个细胞/孔)铺在 96 孔圆底微板的内孔中。每板含有病毒/细胞对照孔

(细胞加病毒)，实验孔(药物加细胞加病毒) 和化合物对照孔(药物加培养基，不含细胞，细胞毒性的 MTS 监测需要)。因为 HIV-1 对 PBMCs 无细胞病变作用，这允许对抗病毒药活性和细胞毒性测定使用同一试验板。在微量滴定管中以 2 倍浓度制备测试药物的稀释物，和使用标准格式将 100 μL 每一浓度物质置于合适的孔中。50 μL 的预先确定的稀释病毒原液置于每一测试孔中(最终 MOI ≈ 0.1)。感染后 PBMC 培养物在 37℃，5% CO_2 的条件下保持七天，之后收集无细胞的上清样品以分析反转录酶活性和/或 HIV p24 含量。去除上清样品后，通过向板中添加 MTS 确定细胞活力来测定化合物的细胞毒性。也用显微镜检测各孔并记录任何异常。

二级细胞毒性试验

为了检测比抗-HIV 功效评估中所用更高浓度的化合物的毒性，使用二级试验。该试验基本上与上述抗-HIV 功效评估的方法相同，只是不向孔中添加病毒（用没有病毒的培养基代替），高试验浓度增加到 25 μM。温育后，使用 MTS 来检测板的细胞活力，结果如下。

表 8

化合物	注释	IC_{50} (nM)	TC_{50} (nM)
FB005	未修饰肽	0.93	14,300
FB006	未修饰肽	1.41	15,900
FB006M	与 HSA 缀合的修饰肽	3.94	>25,000
FB007M	与 HSA 缀合的修饰肽	9.09	> 25,000
FB010M	与 HSA 缀合的修饰肽	7.78	> 25,000
FB010KM	与 HSA 缀合的修饰肽	15.7	> 25,000

尽管为了清楚理解的目的，通过举例说明和实施例详细描述了前述发明，但很明显可以在所附权利要求的范围内实施某些改变和修改。对医学、免疫学、病毒学 、药理学、蛋白质合成和修饰和/或相关领域的技术人员显而易见的实施本发明的上述方式的修改也意欲在下列权利要求的范围内。

本说明中提及的所有出版物和专利申请表明本发明所属领域的普通技术人员的水平。所有这样的出版物和专利申请并入这里作为参考，其程度如同具体和单独指出各个出版物或专利申请并入作为参考。

2002 年 9 月 24 日申请的美国临时专利申请 60/412,797 中公开了有效预防和/或治疗病毒感染，特别是 HIV 感染的某些肽及其衍生物，其全部内容（包括这里包含的任何序列）并入这里作为参考。

序列表

<110> Xie, Dong
Jiang, He

<120> HIV感染的肽衍生物融合抑制剂

<130> 63024.000002

<150> 60/412,797
<151> 2002-09-24

<160> 15

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 44
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽序列

<400> 1

Ser Leu Glu Gln Ile Trp Asn Asn Met Thr Trp Glu Glu Trp Asp Arg
1 5 10 15

Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Glu Leu Ile His Glu Leu Ile Glu Glu Ser
20 25 30

Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu
35 40

<210> 2
<211> 34
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽序列

<400> 2

Trp Glu Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Lys Leu Ile His
1 5 10 15

Glu Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu
20 25 30

Leu Leu

<210> 3

<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽序列

<400> 3

Trp Gln Glu Trp Glu Gln Lys Ile Thr Ala Leu Leu Glu Gln Ala Gln
1 5 10 15

Ile Gln Gln Glu Lys Asn Glu Tyr Glu Leu Gln Lys Leu Asp Lys Trp
20 25 30

Ala Ser Leu Trp Glu Trp Phe
35

<210> 4
<211> 36
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽序列

<400> 4

Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln
1 5 10 15

Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu
20 25 30

Trp Asn Trp Phe
35

<210> 5
<211> 34
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽序列

<400> 5

Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile His
1 5 10 15

Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu
20 25 30

Leu Leu

<210> 6
<211> 34
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽序列

<400> 6

Trp Gln Glu Trp Glu Arg Lys Val Asp Phe Leu Glu Glu Asn Ile Thr
1 5 10 15

Ala Leu Leu Glu Glu Ala Gln Ile Gln Gln Glu Lys Asn Met Tyr Glu
20 25 30

Leu Gln

<210> 7
<211> 34
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽序列

<400> 7

Trp Glu Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Lys Leu Ile His
1 5 10 15

Glu Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Glu Asn Glu Gln Glu
20 25 30

Leu Leu

<210> 8
<211> 44
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽序列

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (23)..(23)
<223> Xaa 代表衍生有马来酰亚胺部分的赖氨酸残基

<400> 8

Ser Leu Glu Gln Ile Trp Asn Asn Met Thr Trp Glu Glu Trp Asp Arg
1 5 10 15

Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Xaa Leu Ile His Glu Leu Ile Glu Glu Ser
20 25 30

Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu
35 40

<210> 9
<211> 45
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽序列

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (45)..(45)
<223> Xaa 代表衍生有马来酰亚胺部分的赖氨酸残基

<400> 9

Ser Leu Glu Gln Ile Trp Asn Asn Met Thr Trp Glu Glu Trp Asp Arg
1 5 10 15

Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Glu Leu Ile His Glu Leu Ile Glu Glu Ser
20 25 30

Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Xaa
35 40 45

<210> 10
<211> 34
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽序列

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> Xaa 代表衍生有马来酰亚胺部分的赖氨酸残基

<400> 10

Trp Glu Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Xaa Leu Ile His
1 5 10 15

Glu Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Trp Glu
20 25 30

Leu Leu

<210> 11
<211> 35
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽序列

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (35)..(35)
<223> Xaa 代表衍生有马来酰亚胺部分的赖氨酸残基

<400> 11

Trp Glu Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Glu Leu Ile His
1 5 10 15

Glu Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu
20 25 30

Leu Leu Xaa
35

<210> 12
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽序列

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> Xaa 代表衍生有马来酰亚胺部分的赖氨酸残基

<400> 12

Trp Gln Glu Trp Glu Gln Lys Ile Thr Ala Leu Leu Xaa Gln Ala Gln
1 5 10 15

Ile Gln Gln Glu Lys Asn Glu Tyr Glu Leu Gln Lys Leu Asp Lys Trp
20 25 30

Ala Ser Leu Trp Glu Trp Phe
35

<210> 13
<211> 40
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽序列

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (40)..(40)
<223> Xaa 代表衍生有马来酰亚胺部分的赖氨酸残基

<400> 13

Trp Gln Glu Trp Glu Gln Lys Ile Thr Ala Leu Ile Glu Gln Ala Gln
1 5 10 15

Ile Gln Gln Glu Lys Asn Glu Tyr Glu Leu Gln Lys Leu Asp Lys Trp
20 25 30

Ala Ser Leu Trp Glu Trp Phe Xaa
35 40

<210> 14
<211> 34
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽序列

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> Xaa 代表衍生有马来酰亚胺部分的赖氨酸残基

<400> 14

Trp Glu Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Xaa Leu Ile His
1 5 10 15

Glu Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Glu Asn Glu Gln Glu

20 25 30

Leu Leu

<210> 15
<211> 35
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽序列

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (35)..(35)
<223> Xaa 代表衍生有马来酰亚胺部分的赖氨酸残基

<400> 15

Trp Glu Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Lys Leu Ile His
1 5 10 15

Glu Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Glu Asn Glu Gln Glu
20 25 30

Leu Leu Xaa
35

图1

显示形成螺旋的七残基区的序列:

T-20			YTSL	IHSLIEE	SQNQQEK	NEQELLE LDKWASL WNWF	(SEQ ID NO:4)
T-1249			WQEWEQK	ITALLEQ	AQIQQEK	NEYELQK LDKWASL WEWF	(SEQ ID NO:3)
C-34		WMEWDRE	INNYTSL	IHSLIEE	SQNQQEK	NEQELL	(SEQ ID NO:5)
SIV C34		WQEWERK	VDFLEEN	ITALLEE	AQIQQEK	NMYELQ	(SEQ ID NO:6)
FB005	**S LEQIWNNMT**	**W**E**E**WDRE	INNYT**E**L	IHELIEE	SQNQQEK	NEQELL	(SEQ ID NO:1)
FB006		**W**E**E**WDRE	INNYT**K**L	IHELIEE	SQNQQEK	NEQELL	(SEQ ID NO:2)
FB066		**W**E**E**WDRE	INNYT**K**L	IHELIEE	SQNQQE**E**	NEQELL	(SEQ ID NO:7)
FB005M	S LEQIWNNMT	WEEWDRE	INNYT**X**L	IHELIEE	SQNQQEK	NEQELL	(SEQ ID NO:8)
FB005CM	S LEQIWNNMT	WEEWDRE	INNYTEL	IHELIEE	SQNQQEK	NEQELL**X**	(SEQ ID NO:9)
FB006M		WEEWDRE	INNYT**X**L	IHELIEE	SQNQQEK	NEWELL	(SEQ ID NO:10)
FB007M		WEEWDRE	INNYTEL	IHELIEE	SQNQQEK	NEQELL**X**	(SEQ ID NO:11)
FB066M		WEEWDRE	INNYT**X**L	IH**E**LIEE	SQNQQE**E**	NEQELL	(SEQ ID NO:14)
FB066KM		WEEWDRE	INNYT**K**L	IH**E**LIEE	SQNQQE**E**	NEQELL**X**	(SEQ ID NO:15)
FB010M			WQEWEQK	ITALL**X**Q	AQIQQEK	NEYELQK LDKWASL WEWF	(SEQ ID NO:12)
FB010KM			WQEWEQK	ITALIEQ	AQIQQEK	NEYELQK LDKWASL WEWF**X**	(SEQ ID NO:13)

（上述式中X是用马来酰亚胺连接部分衍生的赖氨酸残基）