



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1894281 B

(45) 授权公告日 2012. 10. 03

(21) 申请号 200480037908. 4

(22) 申请日 2004. 12. 17

(30) 优先权数据

0329254. 7 2003. 12. 17 GB

(85) PCT申请进入国家阶段日

2006. 06. 19

(86) PCT申请的申请数据

PCT/GB2004/005360 2004. 12. 17

(87) PCT申请的公布数据

W02005/058959 EN 2005. 06. 30

(73) 专利权人 AI2 有限公司

地址 英国曼彻斯特

(72) 发明人 C·多布森

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

代理人 王旭

(51) Int. Cl.

C07K 14/775 (2006. 01)

A61K 38/10 (2006. 01)

A61P 31/12 (2006. 01)

(56) 对比文件

W0 9916460 A, 1999. 04. 08, 权利要求 1-57.

W0 9210512 A, 1992. 06. 25, 权利要求 1-23.

ELIZABETH H. HIV-infected subjects with the E4 allele for APOE have excess dementia and peripheral neuropathy. NATURE MEDICINE 4 10. 1998, 4(10), 1182-1184.

R. F. ITZHAKI. ApoE-viral interactions. Nature Medicine 4 12. 1998, 4(12), 1344.

B J Owens. Apolipoprotein A-I and its amphipathic helix peptide analogues inhibit virus-induced syncytium formation. J Clin Invest 86 4. 1990, 86(4), 1142-1150.

审查员 肖晶

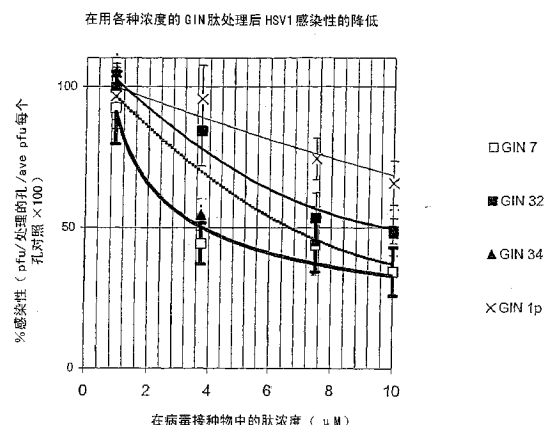
(54) 发明名称

病毒感染的治疗

(57) 摘要

本发明涉及来自 apoE₁₄₁₋₁₄₉ 的串联重复的多肽和它们作为药物的用途。所述肽包含串联重复和其平截,所述肽的至少一个亮氨酸(L) 被具有包含至少 4 个碳原子和至少一个氮原子的侧链的氨基酸替代。此类肽可以用于预防或治疗病毒感染。

权利要求书 1 页 说明书 22 页
序列表 26 页 附图 10 页



1. SEQ ID No. 2 的多肽或 SEQ ID NO. 2 的至多 3 个氨基酸的截短物, 其中 SEQ ID NO. 2 的至少一个亮氨酸 (L) 残基用色氨酸, 精氨酸或赖氨酸替代。

2. 根据权利要求 1 的多肽, 其中进行至少两个色氨酸、精氨酸或赖氨酸替代。

3. 根据权利要求 1 或 2 的多肽, 其中除了至少一个亮氨酸 (L) 残基以外, 将至少一个另外的亮氨酸 (L) 氨基酸用酪氨酸 (Y)、苯丙氨酸 (F)、或者组氨酸 (H) 替代或缺失。

4. 根据权利要求 1-3 任一项的多肽, 其氨基酸序列为:

WRKWRKRWWWRKWRKRWW (SEQ ID No. 3),

WRKWRKRWRKWRKR (SEQ ID No. 4),

WRKWRKRWWLRKLRKLL (SEQ ID No. 5),

WRKWRKRWWWRKWRKRWW (SEQ ID No. 52),

WRKWRKRWRKWRKRW (SEQ ID No. 53),

WRKWRKRWWFRKWRKRWW (SEQ ID No. 54),

WRKWRKRWFFRKWRKRFF (SEQ ID No. 55),

WRKCRKRCWWRKCRKRCW (SEQ ID No. 56),

LRKLRKRLLRKWRKRWW (SEQ ID No. 57),

LRKLRKRLLLRKLKRWW (SEQ ID No. 58),

LRKLRKRLLRKWRKRL (SEQ ID No. 59),

WRKWRKRLLLRKLKRLL (SEQ ID No. 60),

WRKLRKRLLLRKLKRLL (SEQ ID No. 61),

WRKWRKFFFRKWRKRWW (SEQ ID No. 62),

WRKWRKRWWFRKFRKRFF (SEQ ID No. 63),

RRKRRKRRRRRKRKR (SEQ ID No. 64) 或

KRKKRKRKKRKRKRKK (SEQ ID No. 65)。

5. 多肽, 其氨基酸序列为 WRKWRKRWWWRKWRKRWW (SEQ ID No. 66)。

6. 氨基酸序列为 YRKYRKRYYYRKYRKRY (SEQ ID No. 6) 的多肽。

7. 氨基酸序列为 LRKLRKRLLLRKLKR (SEQ ID No. 7) 的多肽。

8. 氨基酸序列为 LRKLRKRLRKLKR (SEQ ID No. 8) 的多肽。

9. 氨基酸序列为 LRKLRKLRKLRKLRK (SEQ ID No. 9) 的多肽。

10. 根据权利要求 1-9 任一项的多肽, 其用作药物。

11. 根据权利要求 1-9 任一项的多肽在制备用于治疗病毒感染的药物中的应用。

12. 核酸序列, 其编码根据权利要求 1-9 任一项的多肽。

13. 根据权利要求 12 的核酸序列, 其用作药物。

病毒感染的治疗

[0001] 本发明涉及具有抗病毒活性的多肽、其衍生物或者类似物，还涉及编码所述多肽、其衍生物或者类似物的核酸。本发明还提供了此类多肽、衍生物、类似物或者核酸作为药物的用途以及在治疗方法中的用途。

[0002] 抗病毒剂可以靶向病毒复制周期的 6 个阶段之一，这些阶段为：

[0003] 1. 病毒对细胞的附着；

[0004] 2. 渗透（或者病毒膜与细胞膜的融合）；

[0005] 3. 病毒的脱壳；

[0006] 4. 病毒核酸的复制；

[0007] 5. 子代病毒颗粒的成熟；和

[0008] 6. 子代病毒向细胞外流体的释放。

[0009] 这 6 个阶段中，复制（上面的阶段 4）是靶标，其通过常规抗病毒治疗可以最有效地影响。然而，可以论证病毒向细胞的附着是更吸引人的靶标，因为试剂不需要进入宿主细胞。然而，在该领域中还没有研发成功的疗法。

[0010] 因此本发明的一个目的是提供调节病毒向细胞的附着的治疗剂。

[0011] 脂蛋白（LP）是存在于血清和其他细胞外流体中的球形大分子复合体，由脂类和蛋白质组成，并且涉及脂类在身体周围的运输。已经将它们根据它们的密度分类，主要的类别是高密度脂蛋白（HDL）、低密度脂蛋白（LDL）、和极低密度脂蛋白（VLDL）。它们的蛋白质称作载脂蛋白，并且已经描述了许多载脂蛋白，包括载脂蛋白 A、B、C、D、E、F、G、H 和 J。此外，已经记载了载脂蛋白 A、B 和 C 的一些亚型。

[0012] 已经描述了将 LP 与病毒结合的多种相互作用。这些相互作用多数涉及病毒对脂蛋白的结合，这导致减小的病毒感染性，或者相反地，提供了病毒进入细胞的“搭车”方法。此外，一些病毒利用 LP 的细胞受体（例如，LDL 受体）作为进入细胞的工具，尽管这些受体也可以被细胞作为内源抗病毒剂释放（例如，VLDL 受体的可溶性形式被 HeLa 细胞释放到培养基中并且抑制人鼻病毒感染）。此外，也已经报导了某些载脂蛋白和病毒蛋白质之间的直接结合。例如：

[0013] a. 丙型肝炎病毒核心蛋白质结合载脂蛋白 AII；

[0014] b. 乙型肝炎病毒表面抗原结合载脂蛋白 H；和

[0015] c. 猿猴免疫缺陷病毒（SIV）gp32 蛋白质和人免疫缺陷病毒（HIV）

[0016] gp41 蛋白结合载脂蛋白 A1。

[0017] 在发明人的实验室中进行的工作表明脑中存在潜伏的 1 型单纯疱疹病毒（HSV1）和具有特定基因的特定等位基因 -APOE 基因的 APOE-e4 等位基因增加了患阿尔茨海默氏病（AD）的危险。考虑到还发现 APOE-e4 携带者更可能患感冒疮（其是外周神经系统中 HSV1 的再活化后发现的病变），这些结果提示 APOE-e4 携带者更可能遭受 HSV1 感染造成的伤害，并且提示在载脂蛋白 E 和某些病毒之间可能存在相互作用（尽管此类相互作用不必一定涉及抗病毒效应）。HSV1 和 apoE 之间的一种可能的作用方式涉及如下的独立发现：它们都使用细胞硫酸乙酰肝素蛋白聚糖（HSPG）分子作为它们对细胞的最初结合位点，随后附着到

二级受体,其引起在含有 LP 的 HSV1 和 apoE 之间这些 HSPG 位点发生竞争的可能性,这将影响病毒进入。

[0018] 已经表明载脂蛋白 E 影响免疫系统(似乎与它在脂类代谢中的角色无关),包括抑制 T 淋巴细胞增殖。已经检查了来自 apoE 的残基 130-169 的许多肽与淋巴细胞之间的相互作用。(Clay et al., *Biochemistry*, 34:11142-11151 (1995))。预测由 apoE 残基 141-149 组成的区域尤其重要。已经描述了神经元细胞系中此类肽的相似的相互作用。

[0019] WO 94/04177 公开使用含有脂类和两亲性螺旋肽的颗粒允许清除微生物产生的毒素,并且可以通过对细菌细胞膜的影响增加抗细菌药物的有效性。然而,没有提出含有此类 apoA 衍生的肽的颗粒可以用作抗病毒药物。也不清楚颗粒中肽的施用是否将导致有效利用该颗粒的任一组分的抗病毒作用,所述颗粒中的肽是所公开的研发中的关键成分(所述颗粒可以在使用前形成或是内源地形成)。

[0020] 已经表明来自 apoA 的两亲性螺旋肽 (Ananatharamiah 在 *Meth. Enz.*, 128: 627-647 (1986) 中描述) 防止病毒膜与细胞膜的融合,并且还防止受感染的细胞膜的融合 (Srinivas et al. *J. Cellular Biochem.*, 45:224-237 (1991))。该肽在防止 HSV1 和 HIV 的融合方面也是有效的 (Owens et al., *J Clin. Invest.*, 86:1142-1150 (1990))。然而,所述肽至少对于 HSV1 对细胞的附着是无效的 (Srinivas et al. 上文)。

[0021] Azuma 等人已经报导与庆大霉素相比, apoE 的肽衍生物具有强烈的抗细菌作用 (Peptides, 21:327-330 (2000))。ApoE 133-162 最有效, apoE134-155 几乎无效。

[0022] 按照上述研究,发明人进行实验来评估来自 ApoE 的肽(其能够形成螺旋)是否具有抗病毒活性。他发现 ApoE 的肽片段 apoE₁₄₁₋₁₄₉ 的串联重复(即, 2×LRKLRKRL-SEQ ID No. 1)实际上具有抗病毒作用。而本发明人不希望被任何假说束缚,他认为该片段防止病毒颗粒对细胞的附着,导致如通过噬菌斑减小测定技术测量的病毒的感染性减小。实施例 1 阐明了所述肽对诸如 HSV1、HSV2 和 HIV 的病毒是多么有效。因此,该肽当直接应用于病毒,或者当在细胞存在下应用于病毒时是有效的,并且因此该肽可以用于在病毒到达它们的靶细胞很久前灭活游离的病毒颗粒。

[0023] 按照对 apoE₁₄₁₋₁₄₉ 的串联重复(即 2×LRKLRKRL-SEQ ID No. 1)产生的数据,发明人决定研究载脂蛋白的其他片段的抗病毒活性。

[0024] 根据本发明的第一方面,提供了包含 SEQ ID No. 2 的 apoE₁₄₁₋₁₄₉ 的串联重复或者其平截的多肽、其衍生物或者类似物,其特征是将 SEQ ID No. 2 的至少一个亮氨酸(L)残基用具有包含至少 4 个碳原子和至少一个氮原子的侧链的氨基酸替代。

[0025] “SEQ ID No. 2 的 apoE₁₄₁₋₁₄₉ 的串联重复”指具有氨基酸序列:LRKLRKRLLLRKLRKRL 的肽。串联重复在这里指 apoE_{141-149dp} 或者 apoE_{141-149r}。将该肽也分配代码 GIN1 或者 GIN1p(其中 p 表示 N 末端保护(例如,通过乙酰基),和 C 末端保护(例如,通过酰胺基))。

[0026] “其平截”指通过除去氨基酸减小 SEQ ID No. 2 的 18 聚体的大小。氨基酸的减少可以通过从肽的 C 或者 N 末端除去残基或者可以通过从肽的核心(即, SEQ ID No. 2 的氨基酸 2-17)缺失一个或多个氨基酸来完成。

[0027] “其衍生物或类似物”指将氨基酸残基用具有相似侧链或者肽主链性质的残基(天然氨基酸、非天然氨基酸或者氨基酸模拟物)替代。此外,此类肽的末端可以通过用与乙酰基或者酰胺基有相似性质的 N 和 C-末端保护基保护。

[0028] 本发明人进行了详尽的实验来评估来自载脂蛋白的肽和其衍生物的抗病毒活性。来自 ApoE 的肽和衍生物尤其是焦点。令发明人惊奇的是,他们发现所测试的多数肽几乎没有或者没有抗病毒作用。令人惊奇的例外是根据本发明的第一方面的肽。实施例 2-7 阐明了与 apoE₁₄₁₋₁₄₉ 的串联重复和来自载脂蛋白的其他肽相比,根据本发明的肽的功效。

[0029] 本发明人已经鉴定色氨酸 (W)、精氨酸 (R) 或者赖氨酸 (K) 可以代替 apoE₁₄₁₋₁₄₉ 串联重复中的亮氨酸并且该类肽具有令人惊奇的抗病毒活性。本发明人明白这些氨基酸具有包含至少 4 个碳并且还含有氮原子的侧链。因此,在根据本发明的第一方面的肽中用于代替亮氨酸的氨基酸是色氨酸 (W)、精氨酸 (R) 或者赖氨酸 (K) 或者其衍生物。

[0030] 本发明人已经发现其中用 W 替代至少一个 L 的肽具有独特的抗病毒活性。因此最优选地,根据本发明的第一方面的肽包含含有 SEQ ID No. 2 的 apoE₁₄₁₋₁₄₉ 的串联重复或者其平截的多肽、其衍生物或者类似物,其特征是通过色氨酸 (W) 替代 SEQ ID No. 2 的至少一个亮氨酸 (L) 残基。

[0031] 在研发工作中,发明人注意到 W 替代可以预期增加该肽形成 α 螺旋的可能性并且想知道这是否可以解释根据本发明的第一方面的化合物的抗病毒功效。然而,他认为这不能解释根据本发明的肽的令人惊奇的功效。这是因为许多备选替代将预计增加 α 螺旋形成 (例如,对于形成 α 螺旋的多种 L 取代的肽的可能性计算见表 1)。然而,形成螺旋的可能性 (表 1) 不与根据本发明的肽的抗病毒活性相关 (见实施例 5)。

[0032] 表 1. 在水性 0.15M NaCl 缓冲液中 37°C 下形成 α 螺旋的多种肽分子的预计比例 (%) (使用 AGADIR 二级结构预测软件,可以从 <http://www.embl-heidelberg.de/Services/serrano/agadir/agadir-start.html> 得到)。

[0033]

氨基酸替代	肽序列	%螺旋
E, Glu	ERKERKREEERKERKREE	6.24
A, Ala	ARKARKRAAARKARKRAA	1.85
D, Asp	DRKDRKRDDDRKDRKRDD	1.59
W, Trp	WRKWRKRWWWRKWRKRWW	1.47
M, Met	MRKMRKRMMMRKMRKRMM	1.01
Y, Tyr	YRKYRKRYYYRKYRKRYYY	0.8
F, Phe	FRKFRKRFFFRKFRKRFF	0.79
I, Ile	IRKIRKRIRIRKIRKRIRI	0.6
Q, Gln	QRKQRKRQQQRKQRKRQQ	0.55
无交换		0.51

[0034] 发明人还注意到：

[0035] 1. 从 W 取代的增加非常小 (0.51% 的 GIN 1p 分子将形成螺旋, W 取代的肽微小地增加到 1.47%) ; 和

[0036] 2. 将预测许多其他替代将增加在任一时刻形成 α 螺旋的分子比例。例如, 用 E 或 A 替代 L 增加形成 α 螺旋的可能性高于 W 替代增加形成 α 螺旋的可能性 (分别增加到 6.24% 和 1.87%)。然而, 这些替代都实际上消除了抗病毒活性 (例如, 见实施例 3 或实施例 5 中的肽 GIN39)。

[0037] 因此, 形成 α 螺旋的可能性和根据本发明的“L- 被替代的”肽的抗病毒活性的强度之间没有相关性。

[0038] 根据本发明的肽的功效更加令人惊奇, 因为将 L (亮氨酸) 用根据本发明的第一方面的氨基酸替代将使得肽的两亲性减小。(表 2 阐明了认可的氨基酸的疏水性顺序)。技术人员可能实际上怀疑使得肽更具两亲性将赋予抗病毒特征。因此, 出人意料地, SEQ ID No. 2 的根据本发明的替代导致它们的抗病毒活性的显著增加。

[0039] 表 2

[0040] 氨基酸的疏水性

[0041] Phe > Leu = Ile > Tyr = Trp > Val > Met > Pro > Cys > Ala > Gly > Thr > Ser > Lys > Gln > Asn > His > Glu > Asp > Arg

[0042] 如下文中更详细讨论的,可以根据本发明的第一发明用许多不同的替代和缺失操作 SEQ ID No. 2 使得肽具有抗病毒活性。然而,优选根据本发明的第一方面的多肽具有至少两个 W、R 或者 K 替代,更优选地有三个或更多 W、R 或者 K 替代。

[0043] 除了用 W、R 或者 K 进行一个或多个 L 替代,还优选将至少一个其他氨基酸(优选至少一个其他亮氨酸残基)用天冬酰胺(N)、酪氨酸(Y)、半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)、苯丙氨酸(F)、异亮氨酸(I)、谷氨酰胺(Q)或者组氨酸(H)替代。尤其优选此类其他替代是 Y 或 C。

[0044] 所替代的多肽可以包含 18 个氨基酸(或者其衍生物)并且从而对应于 SEQ ID No. 2 的全长。然而,发明人已经令人惊奇地发现基于 SEQ ID No. 2 的截短的肽也具有作为抗病毒剂的功效。因此,优选的肽或者其衍生物可以具有小于 18 个氨基酸。例如,根据本发明的第一方面的一些肽可以长为 17、16、15、14、13、12、11、10 或者更少的氨基酸。

[0045] 根据本发明的肽和其衍生物优选具有抑制病毒生长的功效,从而它们的 IC₅₀ 值为 30 μM 或者更小。优选 IC₅₀ 值为 20 μM 或者更小,更优选 IC₅₀ 值为 10 μM 或者更小。

[0046] 优选的肽在病毒种之间具有相似的 IC₅₀。例如,优选的肽对于抑制 HSV1、HSV2 和 HIV 生长具有相似的 IC₅₀ 值。

[0047] 将理解可以用本领域技术人员已知的许多氨基酸变体将经修饰的氨基酸代替到 apoE₁₄₁₋₁₄₉ 的串联重复中。如果该修饰不显著改变肽的化学性质,那么此类肽将仍然具有抗病毒活性。例如,可以将 R 或者 K 的侧链胺上的氢用亚甲基(-NH₂ → -NH(Me) 或 -N(Me)₂)代替。

[0048] 根据本发明的第一方面的优选的肽具有氨基酸序列:

[0049] (a) WRKWRKRWWWRKWRKRWW (SEQ ID No. 3)。该肽对应于全长串联重复,其中用色氨酸残基替代所有亮氨酸。在本文中将该肽称作 GIN7。

[0050] (b) WRKWRKRWRKWRKR (SEQ ID No. 4)。该肽对应于全长串联重复,其中用色氨酸残基替代所有亮氨酸并通过切除氨基酸 9、10、17 和 18 而平截。在本文中将该肽称作 GIN32。

[0051] (c) WRKWRKRWWLRKLRKRL (SEQ ID No. 5)。该肽对应于全长串联重复,其中用色氨酸残基替代一部分亮氨酸。在本文中将该肽称作 GIN34。

[0052] (d) WRKWRKRWWWRKWRKRWW (SEQ ID No. 52)。该肽对应于缺失 9 位的 W 残基的 SEQ ID No. 3。在本文中将该肽称作 MU58。

[0053] (e) WRKWRKRWRKWRKRW (SEQ ID No. 53)。该肽对应于缺失 9、10 和 18 位的 W 残基的 SEQ ID No. 3。在本文中将该肽称作 MU59。

[0054] (f) WRKWRKRWWFRKWRKRWW (SEQ ID No. 54)。该肽对应于将 10 位的 W 残基用 F 替代的 SEQ ID No. 3。在本文中将该肽称作 MU60。

[0055] (g) WRKWRKRWWFRKWRKRFF (SEQ ID No. 55)。该肽对应于将 9、10、17 和 18 位的 W 残基用 F 替代的 SEQ ID No. 3。在本文中将该肽称作 MU61。

[0056] (h) WRKCRKRCWWRKCRKRCW (SEQ ID No. 56)。该肽对应于将 4、8、13 和 17 位的 W 残基用 C 残基替代的 SEQ ID No. 3。在本文中将该肽称作 MU68。

[0057] (i) LRKLRKRLLRKWRKRWW (SEQ ID No. 57)。该肽对应于将 10、13、17 和 18 位的 L 残基用 W 残基替代的 SEQ ID No. 2。在本文中将该肽称作 MU111。

[0058] (j) LRKLRKRLLRKLRKRWW (SEQ ID No. 58)。该肽对应于将 17 和 18 位的 L 残基用

W 残基替代的 SEQ ID No. 2。在本文中将该肽称作 MU112。

[0059] (k)LRKLRKRLLRKWRKRLL(SEQ ID No. 59)。该肽对应于将 10 和 13 位的 L 残基用 W 残基替代的 SEQ ID No. 2。在本文中将该肽称作 MU113。

[0060] (l)WRKWRKRLLRKLRKRLL(SEQ ID No. 60)。该肽对应于将 1 和 4 位的 L 残基用 W 残基替代的 SEQ ID No. 2。在本文中将该肽称作 MU114。

[0061] (m)WRKLRKRLLRKLRKRLL(SEQ ID No. 61)。该肽对应于将 1 位的 L 残基用 W 残基替代的 SEQ ID No. 2。在本文中将该肽称作 MU115。

[0062] (n)WRKWRKFFFRKWRKRWW(SEQ ID No. 62)。该肽对应于将 8、9 和 10 位的 W 残基用 F 残基替代并且缺失 7 位的 R 残基的 SEQ ID No. 3。在本文中将该肽称作 MU116。

[0063] (o)WRKWRKRWWFRKFRKRFF(SEQ ID No. 63)。该肽对应于将 10、13、17 和 18 位的 W 残基用 F 残基替代的 SEQ ID No. 3。在本文中将该肽称作 MU117。

[0064] (p)RRKRRKRRRRRKRRKRRR(SEQ ID No. 64)。该肽对应于全长串联重复,其中所有亮氨酸用精氨酸(R)残基替代。在本文中将该肽称作 MU16。

[0065] (q)KRKKRKRKKRKRKRKK(SEQ ID No. 65)。该肽对应于全长串联重复,其中所有亮氨酸用赖氨酸(K)残基替代。在本文中将该肽称作 MU18。

[0066] 发明人还理解可以根据本发明使用的肽可以包含超过仅 ApoE₁₄₁₋₁₄₉ 的简单的二聚体串联重复或者其平截。例如,可以将包含三聚体或者更大数目重复的肽用作抗病毒剂。

[0067] 在本发明的另一实施方案中,可以合成抗病毒肽,其包含如上定义的肽以及向其加入的另外的氨基酸。例如,可以对来自 SEQ ID No. 2 的肽的 C 或者 N 末端加入 1、2、3 或更多氨基酸。备选地,所述肽可以包含大于 SEQ ID No. 1 的 9 个氨基酸的肽的串联重复。此类肽可以具有加入 SEQ ID No. 2 的 N 末端、C 末端和 / 或第 9 和 10 个氨基酸之间的氨基酸。最优选地,向 SEQ ID No. 2 的 C 末端和第 9 和 10 个氨基酸之间加入氨基酸。将理解可以如上述对来自 SEQ ID No. 2 的肽进行修饰。作为实例,WRKWRKRWWWRKWRKRWWWR(SEQ ID No. 66) 代表根据本发明的另一种优选的肽。该肽对应于 ApoE₁₄₁₋₁₅₀ 的全长串联重复(即,LRKLRKRLLR-SEQ ID No. 67 的串联重复),其中用色氨酸残基替代所有亮氨酸。在本文中将该肽称作 MU83。

[0068] 在根据本发明的第一方面的 apoE₁₄₁₋₁₄₉ 的串联重复的衍生物的开发期间,理解 SEQ ID No. 2 的平截,和其变体也具有令人惊奇的抗病毒活性。这些包括:

[0069] LRKLRKRLLRKLRK(SEQ ID No. 7)。该肽对应于缺失残基 16、17 和 18 的全长串联重复的截短形式。该肽具有这样的优点:该肽短于 GIN1 并且因此生产更便宜。在本文中将该肽称作 GIN4。

[0070] LRKLRKRLRKLKR(SEQ ID No. 8)。该肽对应于通过切除氨基酸 9、10、17 和 18 截短的全长串联重复。在本文中将该肽称作 GIN8。

[0071] LRKLRKLRLRKLRLK(SEQ ID No. 9)。该肽对应于包含 LRK 基序重复的全长串联重复的变体。在本文中将该肽称作 GIN9。

[0072] 此外,发现 YRKYRKRYYYRKYRKYY(SEQ ID No. 6) 具有抗病毒剂的效果。该肽对应于 apoE₁₄₁₋₁₄₉ 的全长串联重复,其中酪氨酸残基替代所有亮氨酸残基。在本文中将该肽称作 GIN41。

[0073] 根据本发明的第二方面,提供了根据本发明的第一方面的多肽、其衍生物或者类

似物或者 SEQ ID No. 6、7、8 或 9 的肽,它们用作药物。

[0074] 根据本发明的第三方面,提供了根据本发明的第一方面的多肽、其衍生物或者类似物或者 SEQ ID No. 6、7、8 或 9 的肽用于生产治疗病毒感染的药物的用途。

[0075] 将理解根据本发明的第一方面的多肽、其衍生物或者类似物的治疗效果还可以由增加此类多肽、衍生物或类似物的活性的试剂“间接”介导。本发明提供了此类试剂的第一种医学用途。

[0076] 从而,根据本发明的第四方面,提供了能够增强根据本发明的第一方面的多肽、衍生物或者类似物的生物活性的试剂,其用作药物。

[0077] 能够增强根据本发明的多肽、衍生物或者类似物的生物活性的试剂可以通过多种方式实现它们的效果。例如,此类试剂可以增加此类多肽、衍生物或类似物的表达。备选地(或者额外地),此类试剂可以例如通过减小根据本发明的多肽、衍生物或者类似物的更新来增加根据本发明的多肽、衍生物或者类似物在生物系统中的半寿期。

[0078] 由于它们的增加的生物学活性,根据本发明的第一三方面的多肽、其衍生物或者类似物可以用作抗病毒剂。

[0079] 根据本发明的第一、二和三方面的多肽、衍生物或者类似物可以用于治疗多种病毒感染。所述病毒可以是任意病毒,尤其有包膜的病毒。优选的病毒是痘病毒、虹彩病毒、批膜病毒或者环状病毒。更优选的病毒是线状病毒、沙粒病毒、布尼病毒或者弹状病毒。甚至更优选的病毒是副黏病毒或者正黏病毒。设想病毒可以优选地包括肝 DNA 病毒、冠状病毒、黄病毒或者逆转录病毒。优选地,病毒包括疱疹病毒或者慢病毒。在优选实施方案中,病毒可以是人类免疫缺陷病毒(HIV)、人 2-型单纯疱疹病毒(HSV2),或者人 1 型单纯疱疹病毒(HSV1)。

[0080] 根据本发明的第一、二和三方面的多肽、衍生物或者类似物可以用于作为单一疗法(即仅使用该化合物)或者与用于抗病毒治疗的其他化合物或治疗(例如,无环鸟苷、gangcylovir、病毒唑、干扰素、抗-HIV 药物,包括逆转录酶的核苷、核苷酸或非核苷抑制剂、蛋白酶抑制剂和融合抑制剂)组合用于治疗病毒感染。

[0081] 该多肽、衍生物或类似物可以用作预防剂(以预防病毒感染的进展)或可以用于治疗存在的感染。

[0082] 根据本发明多肽的衍生物可以包括增加或者减小多肽的体内半寿期的衍生物。能够增加根据本发明多肽的半寿期的衍生物的实例包括所述多肽的拟肽衍生物、所述多肽的 D-氨基酸衍生物和肽-拟肽杂合分子。

[0083] 根据本发明的多肽可以受到多种方式的降解(如生物系统中的蛋白酶活性)。此类降解可以限制多肽的生物利用率并且因此限制多肽实现它们的生物功能的能力。有多种成熟的技术可以设计和产生在生物背景中具有增强的稳定性的肽衍生物。此类肽衍生物由于对蛋白酶介导的降解的抗性增加而具有改善的生物利用率。优选地,适于根据本发明使用的肽衍生物或者类似物比该它所来源的肽对蛋白酶更有抗性。肽衍生物和它所来源的肽的蛋白酶抗性可以通过公知的蛋白质降解测定法评价。然后可以比较肽衍生物和肽的蛋白酶抗性的相对值。

[0084] 可以从根据本发明的第一方面的肽的结构知识容易地设计本发明肽的拟肽衍生物。可以用通过商业途径可获得的软件根据成熟的方案开发拟肽衍生物。

[0085] 反拟肽 (Retropeptoid) (其中所有氨基酸都被拟肽残基以相反顺序替代) 也能够模拟来自载脂蛋白的抗病毒肽。预计与肽或者含有一个拟肽残基的拟肽-肽杂合分子相比,反拟肽以相反方向结合在配体结合沟中。结果,拟肽残基的侧链能够指向最初肽中侧链相同的方向。

[0086] 根据本发明多肽的修饰形式的另一实施方案包含多肽的 D-氨基酸形式。使用 D-氨基酸而不是 L-氨基酸制备肽极大地减小了正常代谢过程对此类试剂剂的不希望的分解,减小了需要使用的试剂的量,以及它的施用频率。

[0087] 本发明的多肽、类似物或衍生物代表生物细胞可以有利地表达的产物。

[0088] 从而,本发明在第五方面还提供了编码根据本发明的第一方面的多肽、衍生物或类似物的核酸序列。

[0089] 编码 apoE₁₄₁₋₁₄₉ 的核酸具有 DNA 序列 cttcgtaaacttcgtaaacgtcttctt (SEQ ID. No. 10), 而 GIN1 具有序列 cttcgtaaacttcgtaaacgtcttcttcttcgtaaacttcgtaaacgtcttctt (SEQ ID. No. 11)。

[0090] 根据本发明的第五方面的优选的核酸编码此处鉴定为 GIN 4、7、8、9、32、34 和 41 的肽,这些核酸各自具有下面的序列:

[0091] cttcgtaaac ttcgtaaact tcgtaaactt cgtaaacttc gtaaacttcg taaa (SEQ ID No. 16);

[0092] tggcgtaaat ggcgtaaacg ttggtggtgg cgtaaattggc gtaaacttg gtgg (SEQ ID No. 12);

[0093] cttcgtaaac ttcgtaaacg tcttcgtaaa cttcgtaaac gt (SEQ ID No. 17);

[0094] cttcgtaaac ttcgtaaact tcgtaaactt cgtaaacttc gtaaacttcg taaa (SEQ ID No. 18);

[0095] tggcgtaaat ggcgtaaacg ttggcgtaaa tggcgtaaac gt (SEQ ID No. 13);

[0096] tggcgtaaat ggcgtaaacg ttggtggtt cgtaaacttc gtaaacttct tctt, (SEQ ID No. 14); 和

[0097] tatcgtaaat atcgtaaacg ttattattat cgtaaataatc gtaaacttta ttat (SEQ ID No. 15)。

[0098] 技术人员将理解可以容易地产生根据本发明的其他优选的肽的核酸序列。

[0099] 将理解,由于遗传密码的冗余性,根据本发明的第五方面的核酸序列可以从天然存在的 ApoE 基因改变,只要密码子编码根据本发明的第一方面的多肽、其衍生物或者类似物。

[0100] 将理解根据本发明的多肽、衍生物和类似物代表通过技术施用的有利的试剂,所述技术包括编码此类分子的核酸序列的细胞表达。此类细胞表达方法尤其适于医学用途,在所述医学用途中需要所述多肽、衍生物和类似物的长时间的治疗效果。

[0101] 从而,根据本发明的第六方面,提供了根据本发明的第五方面的核酸序列,其用作药物。

[0102] 所述核酸可以优选是分离的或纯化的核酸序列。核酸序列可以优选是 DNA 序列。

[0103] 核酸序列可以还包含能够控制和/或增强其表达的元件。核酸分子可以包含在适宜的载体中以形成重组载体。该载体可以例如是质粒、粘粒或噬菌体。此类重组载体可以

非常用地用于本发明的递送系统来用核酸分子转化细胞。

[0104] 重组载体还可以包括其他功能元件。例如,可以设计重组载体使得该载体将在细胞中自主复制。在该情况中,在重组载体中可能需要诱导核酸复制的元件。备选地,可以设计重组载体使得载体和重组核酸分子整合到细胞的基因组中。在该情况中,有利于定位整合(例如,通过同源重组)的核酸序列是理想的。重组载体还可以具有编码用作克隆过程中的选择性标记的基因的 DNA。

[0105] 如果需要,重组载体可以还包含控制基因表达的启动子或调节子。

[0106] 核酸分子可以(但不是必须的)是整合到所治疗的受试者的细胞的 DNA 中的核酸分子。未分化的细胞可以被稳定转化,导致产生遗传修饰的子细胞(在该情况中,可能需要例如用特定转录因子或者基因激活子调节受试者中的表达)。备选地,可以将递送系统设计成有利于在所治疗的受试者中分化细胞的不稳定或者瞬时转化。当是这种情况时,表达的调节较不重要,因为当经转化的细胞死亡或者停止表达蛋白质时,所述 DNA 分子的表达将停止(理想地,当已经实现了所希望的治疗效果时)。

[0107] 递送系统可以对受试者提供核酸分子而不将该核酸分子整合到载体中。例如,核酸分子可以掺入脂质体或者病毒颗粒中。备选地,可以通过适宜的方法,如直接胞吞摄入将“裸露”的核酸分子插入受试者的细胞。

[0108] 可以通过转染、感染、显微注射、细胞融合、原生质体融合或者射弹轰击(ballistic bombardment)将核酸分子转移到受试者的细胞中。例如,可以通过用包被的金颗粒的射弹转染、含有核酸分子的脂质体、病毒载体(例如,腺病毒)和通过直接应用核酸分子提供直接核酸摄入(例如,胞吞)的方式进行转移。

[0109] 将理解根据本发明的多肽、试剂、核酸或者衍生物可以以单一疗法使用(即,仅使用根据本发明的多肽、试剂、核酸或者衍生物预防和/或治疗病毒感染)。备选地,可以将根据本发明的多肽、试剂、核酸或者衍生物用作添加剂(adjunct),或者与已知的疗法组合使用。

[0110] 根据本发明的多肽、试剂、核酸或者衍生物可以组合在具有许多不同形式的组合物中,这些形式具体取决于组合物使用的方式。从而,例如,组合物可以是粉剂、片剂、胶囊剂、液体、软膏剂、霜剂、凝胶剂、水凝胶、气溶胶、喷雾剂、微团、透皮贴剂、脂质体的形式或者可以施用于人或动物的任意其他适宜的形式。将理解本发明组合物的载体应该是对其施用的受试者良好耐受的,并且优选适于能够将所述多肽、试剂、核酸或衍生物递送到靶组织。

[0111] 包含根据本发明的多肽、试剂、核酸或者衍生物的组合物可以以多种方法使用。例如,可能需要经口使用,在该情况中化合物可以包含在组合物中,该组合物可以例如以片剂、胶囊剂或液体的形式经口摄入。备选地,可以通过注射将组合物施用到血流中。注射可以是静脉内(大丸剂(bolus)或灌注)或者皮下的(大丸剂或灌注)的。可以通过吸入(例如,鼻内)施用化合物。

[0112] 可以配制组合物用于局部使用。例如,可以将软膏剂应用于皮肤、口或生殖器中或者周围的区域以治疗特定病毒感染。局部应用于皮肤对于治疗皮肤的病毒感染或者作为经皮递送的工具递送到其他组织。阴道内施用对于治疗性传播疾病(包括艾滋病)尤其有效。

[0113] 多肽、试剂、核酸或衍生物还可以掺入缓释或延释装置。此类装置可以例如插入在皮肤上或皮肤下,并且化合物可以在几周或甚至几个月内释放。当需要用根据本发明的多肽、试剂、核酸或者衍生物长期治疗并且将通常需要频繁施用(例如,至少每天注射)时,此类装置尤其有用。

[0114] 将理解所需的多肽、试剂、核酸或者衍生物的量由它的生物学活性和生物利用率决定,生物利用率又取决于施用方式、所用多肽、试剂、核酸或者衍生物的理化性质和是否将所述多肽、试剂、核酸或者衍生物用作单一疗法或者用于组合疗法中。施用频率将也受到上述因素,尤其所述多肽、试剂、核酸或者衍生物在所治疗的受试者中的半寿期的影响。

[0115] 将施用的最佳剂量可以由本领域技术人员确定,并且随着施用的具体多肽、试剂、核酸或者衍生物、制剂的强度、施用方式和疾病状况的发展而变。取决于所治疗的具体受试者的额外因素将导致需要调节剂量,所述额外因素包括受试者年龄、体重、性别、饮食和施用时间。

[0116] 将理解技术人员能够根据肽的药物动力学,尤其实施例中给出的 IC_{50} 值计算所需的剂量,和靶组织处肽的最佳浓度。

[0117] 通常,可以 $0.01 \mu\text{g/kg}$ 体重到 0.5g/kg 体重的根据本发明的多肽、试剂、核酸或者衍生物的日剂量可以用于预防和/或治疗病毒感染,这取决于使用哪种特定多肽、试剂、核酸或者衍生物。更优选地,日剂量为 0.01mg/kg 体重到 200mg/kg 体重,最优选地,约 1mg/kg 到 100mg/kg 。

[0118] 已知方法,如制药工业通常使用的那些方法(例如,体内实验、临床 试验等等)可以用于建立根据本发明的多肽、试剂、核酸或者衍生物的特定剂型和精确治疗方案(如多肽、试剂、核酸或者衍生物的日剂量和施用频率)。

[0119] 日剂量可以作为单次施用(例如,单次每日注射)给予。备选地,所用的多肽、试剂、核酸或者衍生物可能需要一天内施用两次或多次。作为实例,根据本发明的多肽、试剂、核酸或者衍生物可以作为 25mg 到 7000mg (即,假设体重 70kg) 的两次(或者多次,取决于状况的严重性)日剂量施用。接受治疗的患者可以在醒来时服用第一次剂量然后在傍晚(如果两次剂量方案)服用第二次剂量,或者之后以 3 或 4 小时间隔服用。备选地,可以用缓释装置对患者提供最佳剂量,不需要施用重复剂量。

[0120] 本发明提供了药物组合物,其包含治疗有效量的根据本发明的多肽、试剂、核酸或者衍生物和任选地可药用的载体。在一个实施方案中,所述多肽、试剂、核酸或者衍生物的量约为 0.01mg 到约 800mg 。在另一实施方案中,多肽、试剂、核酸或者衍生物的量约为 0.01mg 到约 500mg 。在另一实施方案中,多肽、试剂、核酸或者衍生物的量约为 0.01mg 到约 250mg 。在另一实施方案中,多肽、试剂、核酸或者衍生物的量约为 0.1mg 到约 60mg 。在另一实施方案中,多肽、试剂、核酸或者衍生物的量约为 0.1mg 到约 20mg 。

[0121] 本发明提供了制备药物组合物的方法,其包括将治疗有效量的根据本发明的多肽、试剂、核酸或者衍生物与可药用载体合并。“治疗有效量”是根据本发明第一方面的多肽、试剂、核酸或者衍生物的任何剂量,其当施用于受试者时提供了病毒感染的预防和/或治疗。“受试者”是脊椎动物、哺乳动物、家畜或人。

[0122] 本文所用的“可药用载体”是本领域技术人员已知的用于配制药物组合物的任何生理学载体。

[0123] 在优选实施方案中,药物载体是液体并且药物组合物是溶液的形式。在另一实施方案中,可药用载体是固体并且组合物是粉末或片剂的形式。在另一实施方案中,药物载体是凝胶并且组合物是霜剂等形式。

[0124] 固态载体可以包括一种或多种物质,其也可以作为调味剂、润滑剂、增溶剂、悬浮剂、填充剂、助流剂、压缩助剂、粘合剂或者片剂崩解剂;它还可以是包胶材料。在粉剂中,载体是细分的固体,其与细分活性多肽、试剂、核酸或者衍生物混合。在片剂中,活性多肽、试剂、核酸或者衍生物与具有必要压缩性质的载体以适当比例混合并且以所希望的形状和大小压缩。粉剂和片剂优选含有高达 99% 活性多肽、试剂、核酸或者衍生物。适宜的固态载体包括例如,磷酸钙、硬脂酸镁、滑石粉、糖、乳糖、糊精、淀粉、明胶、纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、低熔点蜡和离子交换树脂。

[0125] 液态载体用于制备溶液、混悬剂、乳剂、糖浆剂、酏剂和压缩的组合物。活性多肽、试剂、核酸或者衍生物可以溶解或者悬浮在可药用液态载体中,所述载体为诸如水、有机溶剂、水和有机溶剂的混合物或者可药用油或脂肪。液态载体可以含有其他适宜的药物添加剂,如增溶剂、乳化剂、缓冲剂、防腐剂、增甜剂、调味剂、悬浮剂、增稠剂、着色剂、粘度调节剂、稳定剂或者渗透调节剂。用于经口或者肠胃外施用的液态载体的适宜的实例包括水(部分含有上面的添加剂,例如,纤维素衍生物,优选羧甲基纤维素钠溶液)、醇(包括一元醇和多元醇,例如,乙二醇)和它们的衍生物,和油(例如,分馏的椰子油和花生油)。对于肠胃外施用,载体还可以是油酯,如油酸乙酯和十四烷酸异丙酯。无菌液态载体可用于无菌液体形式的组合物用以肠胃外施用。用于压缩的组合物的液态载体可以是卤代烃或者其他可药用推进剂。

[0126] 通过例如肌内、鞘内、硬膜外、腹膜内、静脉内和特别是皮下、大脑内或脑室内注射可以利用液体药物组合物,其为无菌溶液或混悬剂。可以将所述多肽、试剂、核酸或衍生物制备成无菌固态组合物,其可以在施用时施用无菌水、盐水或其他适宜的无菌可注射介质溶解或者悬浮。载体意在包括必要的和惰性粘合剂、悬浮剂、润滑剂、调味剂、增甜剂、防腐剂、染料和包衣。

[0127] 根据本发明的多肽、试剂、核酸或衍生物可以以无菌溶液或者悬浮液的形式经口施用,所述溶液或悬浮液含有其他溶质或悬浮剂(例如,足够的盐水或葡萄糖使得溶液等渗)、胆汁盐、阿拉伯树胶、明胶、去水山梨糖醇单油酸酯、聚山梨酯 80(山梨醇的油酸酯和其与氧化乙烯共聚的酸酐)等等。

[0128] 根据本发明的多肽、试剂、核酸或衍生物还可以以液体或固体组合物形式经口施用。适于经口施用的组合物包括固体形式,如丸剂、胶囊剂、粒剂、片剂、和粉剂,和液体形式,如溶液、糖浆、酏剂和混悬剂。用于肠胃外施用的形式包括无菌溶液、乳剂和混悬剂。

[0129] 将仅作为实例进一步描述本发明,参考下面的实施例和附图,在附图中:

[0130] 图 1 显示了如实施例 1 中描述的 apoE_{141-149dp} 和 apoE₂₆₃₋₂₈₆ 对 HSV1 感染性的影响(点为来自多达 4 个值的平均值);

[0131] 图 2 显示了如实施例 1 中描述的 apoE_{141-149dp} 和 apoE₂₆₃₋₂₈₆ 对 HSV2 感染性的影响(点为来自多达 4 个值的平均值);

[0132] 图 3 图解如实施例 1 中描述的通过 ELISA 测量的 apoE_{141-149r} 和 apoE₂₆₃₋₂₈₆ 在急性感染的 U937 细胞中对 HIV-1p24 产生的抑制(点为三个实验的平均值)(apoE_{141-149dp} 对 HIV 具

有显著活性 (ANOVA, $p < 0.001$), 而 apoE₂₆₃₋₂₈₆ 对 HIV 的活性没有达到显著性 (ANOVA ; $0.06 < p < 0.62$)) ;

[0133] 图 4 图解了如实施例 2 中描述的 4 种肽 (GIN1、1p、2 和 3) 对 HSV1 感染性的影响 ;

[0134] 图 5 图解了如实施例 2 中描述的 4 种肽 (GIN4-7) 对 HSV1 感染性的影响 ;

[0135] 图 6 图解了如实施例 2 中描述的 4 种肽 (GIN8-11) 对 HSV1 感染性的影响 ;

[0136] 图 7 比较并图解了如实施例 2 中描述的肽 GIN7、GIN32、GIN34 和 GIN1p 对 HSV1 感染性的影响 ;

[0137] 图 8 图解了如实施例 4 中描述的肽 GIN7 对生长在过表达 CCR5 共同受体的 NP-2 神经胶质瘤细胞中的 HIV 分离物 SF162 的抗 HIV 作用 ;

[0138] 图 9 显示了 GIN7 的典型的质谱数据并且阐明该肽为 $> 95\%$ 纯度 ;

[0139] 图 10 显示了 GIN7 的典型的 HPLC 数据并且阐明该肽为 $> 95\%$ 纯度。

[0140] 实施例 1

[0141] 用 apoE₁₄₁₋₁₄₉ 进行实验以确定该肽是否具有作为抗病毒剂的任何功效。

[0142] 1.1 HSV1

[0143] 图 1 和表 1 显示了抗 -HSV1 活性测试的典型结果。测定法包括对 24 孔板中的汇合的 Vero 细胞用含有病毒和不同量的肽的培养基处理 1 小时, 然后除去该接种物, 并加入含有 0.2% 高粘度羧甲基纤维素的粘性“覆盖”培养基。覆盖培养基仅允许感染与受感染的细胞紧密相邻的那些细胞。孵育 2 天并固定和染色后, 可以见到受感染的细胞的小的斑点 (或者“噬斑”), 将它们计数。这些噬斑的每一个对应于 1 小时孵育期间单个细胞的感染。apoE_{141-149dp} 在约 $20 \mu\text{M}$ 的浓度下将噬斑数目减少 40% 。注意到肽仅在实验系统中存在 1 小时。

[0144] 表 1 : 用含有 apoE_{141-149dp} 或者 apoE₂₆₃₋₂₈₆ 的病毒接种后 Vero 细胞中 HSV1 噬斑形成。对未处理的孔的值加下划线。

[0145]

[μM]	ApoE _{141-149dp}					ApoE ₂₆₃₋₂₈₆				
	1	2	3	4	平均 $\pm$ SD	1	2	3	4	平均 $\pm$ sd
<u>0</u>	<u>96</u>	<u>102</u>	<u>123</u>		<u>107 $\pm$ 14.2</u>					
5	129	106	103	100	110 $\pm$ 13.2	113	119	122	126	120 $\pm$ 5.5
10	73	87	76	89	81 $\pm$ 7.9	116	124	102		114 $\pm$ 11.1
20	68	67	63	63	65 $\pm$ 2.6	148	112	133	114	127 $\pm$ 17.0
30	72	71	56		66 $\pm$ 9.0	134	109	114	125	121 $\pm$ 11.2
40	64	65	53	68	63 $\pm$ 6.6	120	113	125	144	126 $\pm$ 11.2

[0146] 1.2 HSV2

[0147] 图 2 和表 2 显示了抗 -HSV2 活性测试的典型结果。如对抗 HSV1 测定法一样进行

该测定法,只是使用 Hep-2 细胞而不是 Vero 细胞。apoE_{141-149dp} 在约 20 μ M 的浓度下导致噬斑数目减小 50%。再次注意到肽仅在实验系统中存在 1 小时。

[0148] 表 2:用含有 apoE_{141-149dp} 或者 apoE₂₆₃₋₂₈₆ 的病毒接种后 HEp-2 细胞中 HSV2 噬斑形成。对未处理的孔的值加下划线。

[0149]

[μ M]	ApoE _{141-149dp}					ApoE ₂₆₃₋₂₈₆				
	1	2	3	4	平均 $\pm$ SD	1	2	3	4	平均 $\pm$ sd
<u>0</u>	<u>156</u>	<u>137</u>	<u>162</u>	<u>152</u>	152 $\pm$ 10.7					
5	160	134	140	130	141 $\pm$ 13.3	135	160	161	152	152 $\pm$ 12.0
10	125	113	131	132	125 $\pm$ 8.7	157	121	151	134	141 $\pm$ 16.1
20	82	72	73	81	77 $\pm$ 5.2	118	150	182	134	146 $\pm$ 27.3
30	76	77	71	72	74 $\pm$ 2.9	118	117	103	159	124 $\pm$ 24.2
40	51	59	69	49	57 $\pm$ 9.1	132	144	125	124	131 $\pm$ 24.2

[0150] 1. 3. HIV

[0151] 图 3 和表 3 显示了抗-HIV 活性测试的典型结果。通过在不同水平的肽存在下孵育 HIV 感染的 U937 细胞 7 天,然后使用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 技术测定细胞中 HIV 蛋白质 p24 的水平来进行该测定法。apoE_{141-149dp} 在 20 μ M 下导致感染性降低 95%。apoE₂₆₃₋₂₈₆ 在 20 μ M 下导致感染性降低 20%,其没有达到统计学意义。

[0152] 对 HIV 的效果在较低肽浓度下出现,尽管这可能是由于肽与细胞接触 7 天,相比在用疱疹病毒进行的噬斑减少测定中肽与细胞接触仅 1 小时。

[0153] 表 3:如通过 ELISA 测定的,在急性感染的 U937 细胞中 apoE_{141-149dp} 和 apoE₂₆₃₋₂₈₆ 对 HIV-1 p24 产生的抑制。

[0154]

[μ M]	在 HIV p24 产生中的%降低							
	ApoE _{141-149dp}				ApoE ₂₆₃₋₂₈₆			
	Exp.1	Exp.2	Exp.3	平均 $\pm$ SD	Exp.1	Exp.2	Exp.3	平均 $\pm$ SD
0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	91.66	70.31	89.85	83.94 $\pm$ 11.84	31.75	8.50	29.38	23.21 $\pm$ 12.79
20	96.87	95.08	93.10	95.02 $\pm$ 1.89	7.69	29.71	30.91	22.77 $\pm$ 13.07
30	95.94	88.63	87.77	90.78 $\pm$ 4.49	37.94	27.83	41.78	35.85 $\pm$ 7.21
40	96.80	95.47	95.33	95.87 $\pm$ 0.81	23.50	30.08	48.04	38.87 $\pm$ 12.70
50	95.73	93.25	95.38	94.79 $\pm$ 1.34	33.36	41.45	45.66	40.16 $\pm$ 6.25

[0155] 在 1.1-1-3 中给出的结果表明 apoE_{141-149dp} 比 apoE₂₆₃₋₂₈₆ 更有效。

[0156] 按照这些结果,发明人继续测试从载脂蛋白产生的其他肽以研究此类肽是否具有抗病毒活性(见实施例 2)。

[0157] 实施例 2

[0158] 给定发明人按照实施例 1 中报导的工作得到的知识,进行实验来评估来自载脂蛋白的许多肽的抗病毒效果。令人惊奇地,发明人发现仅少数测试的肽具有抗病毒效果(见 2.2)。此类肽代表根据本发明的肽。

[0159] 2.1 材料和方法

[0160] 2.1.1 细胞培养

[0161] 将非洲绿猴肾(Vero)细胞保持在含有 Earle 盐的 Eagle 最低限度培养基(EMEM)中,并补加 10%胎牛血清(热失活的),4mM L-谷氨酰胺,和 1%(v/v)非必需氨基酸,加上青霉素和链霉素(分别为 100 IU/mg 和 100mg/ml)(维持培养基为 10% EMEM)。将细胞在含有 5% CO₂ 的潮湿空气中 37°C 孵育。

[0162] 收获时,将单层在磷酸缓冲盐水(PBS)中洗涤,通过与胰蛋白酶在 PBS 中孵育 30 分钟移去,之后通过加入等体积 10% EMEM 灭活胰蛋白酶并以 500g 离心(5 分钟,4°C)。将细胞沉淀物重悬浮在 10% EMEM 中,之后对细胞计数并接种 24 孔板。对于抗病毒测定,使用含有仅 0.5% FCS 的培养基(指 0.5% EMEM)。

[0163] 2.1.2 病毒

[0164] 通过感染 Vero 细胞制备 HSV1 病毒的三次单独传代物,并从组织培养上清液和细胞裂解物制备半纯的病毒悬浮液,然后在 -85°C 冷冻病毒的等分试样。通过对解冻的等分试样的连续稀释液进行噬斑测定评估病毒感染性(以 pfu/ml 表达)。

[0165] 2.1.3 肽

[0166] 从供应商(AltaBioscience, University of Birmingham or AdvancedBiomedical)以冻干形式得到肽并将其以 5 微摩尔规模产生。加入乙酰基保护 N-末端,加入酰胺基保护 C-末端。

[0167] 使用 Finnigan LASERMAT 2000 MALDI-飞行时间质量分析仪或者 Scientific Analysis Group MALDI-TOF 质谱仪通过激光解吸质谱法证实肽的分子量。使用 Vydac 分析型 C-4 反相柱,使用 0.1% TFA 和 0.1% TFA/80% 乙腈作为溶剂进行肽的 HPLC 纯化,或者对于某些肽,使用 ACE C18 反相柱,用 0.05% TFA 和 60% 乙腈作为溶剂。肽 GIN7 (SEQ ID No. 3) 的代表性质谱数据和高效液相层析 (HPLC) 迹线 (纯度 > 95%) 在图 9 和 10 中显示。

[0168] 在无菌 Eppendorf 管中称量小量肽,然后加入足够 0.5% EMEM 以产生 1.5mM 贮存液,将其以等分试样在 -20°C 冷冻。

[0169] 2.1.4 噬斑减少测定

[0170] 将 Vero 细胞以 125,000 个细胞/孔接种在 10% EMEM 中,并过夜孵育,得到汇合的单层。将肽在 0.5% EMEM 中稀释得到 $2 \times$ 最终目的浓度,并且将 100 μ l 等分试样在 96 孔板上以用于 24 孔板的排列方式排列;还准备含有正常 0.5% EMEM 的对照孔。将病毒原种 (p3) 解冻,用 0.5% EMEM 稀释使得在 100 μ l 中有约 100pfu。每个 24 孔板分开孵育。首先向在 96 孔板上排列的肽或者对照培养基加入 100 μ l 病毒原种。其在接种前在 37°C 孵育 10 分钟。从含有汇合的 Vero 的 24 孔板的 4 个孔除去培养基,将 200 μ l 接种物加入到合适的孔中。一旦处理了所有的孔,将该 24 孔板继续孵育 60-80 分钟。最后,除去含有肽的接种物,并向每孔加入含有 1% 羧甲基纤维素的 1ml 1% EMEM。将板继续孵育 22 小时或者在一些实验中孵育 40 小时,然后除去覆盖层,加入 PBS 中的 1% 甲醛。再孵育 1 小时后,除去固定剂,将单层用自来水洗涤几次,用溶解在水中的石炭酸品红染色。30 分钟后除去染料,并用自来水洗涤板数次,然后风干。用 Olympus IX70 倒置显微镜对噬斑计数,并将抗病毒效果表示为对于每种肽浓度对照值的百分数。从对肽浓度的抑制效果的曲线计算 IC50。

[0171] 2.1.5 毒性测试

[0172] 将 Vero 细胞以 30,000 个细胞/孔接种在 96 孔板中的 10% EMEM 中,并过夜孵育,得到汇合单层。将 GIN 肽在 0.5% EMEM 中稀释,得到最终目的浓度,并将 100 μ l 等分试样在分开的不含细胞的 96 孔板上排列,然后将 Vero 加入 96 孔板,除去 10% EMEM 并加入含有肽的 0.5% EMEM。孵育 48 小时后,每孔加入 25 μ l 1.5mg/ml MTT 溶液 (0.5% EMEM 中),将板返回到培养箱中培养 1 小时。最后,从孔中除去培养基,通过加入 100 μ l 二甲基亚砷溶解甲₂晶体。然后在 570nm 测量所得溶液的吸收,并将毒性效果表示为对于每种肽浓度对照值的百分数。可能时,从对肽浓度的抑制效果的曲线计算 EC50。幸运的是,使用暴露于细胞两天的 40 μ M 的肽没有发现对所测试的细胞系的毒性证据。

[0173] 2.2 结果

[0174] 表 4 总结了鉴定为 GIN1、GIN1p 和 GIN2-15 的 16 种肽所得数据。

[0175] 表 4

[0176]

肽	SEQ ID No.	Apparent IC50 (μ M)	序列	大小
GIN 1	2	16.5	LRKLRKRLLLRKLRKRL	18
GIN 1p	2	10	LRKLRKRLLLRKLRKRL	18
GIN 2	24	>40	LRKRLLLRKLRKRL	15
GIN 3	31	No Activity	RLLLRKLRKRL	12
GIN 4	7	29.5	LRKLRKRLLLRKLRK	15
GIN 5	25	>40	LRKLRKRLLLRK	12
GIN 6	26	>40	ERKERKREEERKERKREE	18
GIN 7	3	<5	WRKWRKRWWWRKWRKRWW	18
GIN 8	8	13	LRKLRKRLRKLRKR	14
GIN 9	9	15.5	LRKLRKLRKLRKLRKLRK	18
GIN 10	22	39	RLLRLRLRLRLRLRL	18
GIN 11	20	36.5	QSTEELRVRLASHLRKLRKRL	22
GIN 12	27	>40	LRKLRKRLLR DADDLQKRLA	20
GIN 13	28	>40	RDADDLQKR RDADDLQKR	20
GIN 14	29	>40	GERLRARMEGERLRARME	18
GIN 15	30	>40	RLRARMEEMRLRARMEEM	18

[0177] 图 4 表明 ApoE_{141-149dp} (标记为 GIN 1) 对减小 HSV1 感染性具有良好的效应。相关的肽 GIN 1p (具有 N 和 C 末端保护的 GIN 1) 具有相似功效。

[0178] 如表 4 中阐明的, 发明人测试了许多其他相关的肽 (鉴定为 GIN 2、GIN 3、GIN 4、GIN 5、GIN 6、GIN 10、GIN 11、GIN 12、GIN 13、GIN14 和 GIN 15) 并且发现它们对于减小病毒感染性没有功效或者有很弱的功效。

[0179] 此外, 发明人惊奇地发现一小组测试的肽 (它们是根据本发明的肽) 可以有效作为抗病毒剂。图 5 表明称作 GIN 7 的肽具有减小 HSV-1 感染性的功效。

[0180] 图 6 表明称作 GIN8 和 GIN9 的肽也具有减小 HSV-1 感染性的功效。

[0181] 表 5 表明与 ApoE_{141-149dp} 肽相关或相似的许多肽 (在表 5 中鉴定为肽 GIN 17-31) 对于减小病毒感染性没有功效或者有很弱的功效。发明人合理的设计了这些分子以期它们具有抗 HSV1 活性, 并且基于表 4 中给出的数据, 技术人员可以预期此类肽具有与根据本发明要求保护的那些肽具有相似的功效。这些肽具有很小的效果这一事实使得要求保护的肽的有用性更加令人惊奇。

[0182] 表 5

[0183]

肽	SEQ ID No.	Apparent IC ₅₀ (μM)	序列	大小
GIN 17	33	NA	RALVDTLKFVTQAEGAK	17
GIN 18	34	NA	PYLDDFQKKWQEEMELYRQKVE	22
GIN 19	35	NA	PLGEEMRDRARAHVDALRTHLA	22
GIN 20	36	NA	PYSDELQRQLAARLEALKENG	22
GIN 21	37	NA	ARLAEYHAKATEHLSTLSEKAK	22
GIN 22	19	36	DWLKAFYDKVAEKLKEAF	18
GIN 23	38	NA	PVLDEFREKLNEELEALKQKMK	22
GIN 24	39	NA	VTDYGKDLMEKVKSPQL	18
GIN 25	40	NA	VTDYGKDLMEKVKEWLNS	18
GIN 26	41	NA	NFHAMFQPFLEMIHEAQQ	28
GIN 27	42	NA	CKNKEKKCKKNKEKKC	18
GIN 28	43	NA	LRKEKKRLLLRKEKKRLL	18
GIN 29	21	38.5	HMLDVMDHFSRASSIDEL	20
GIN 30	44	NA	LQVAERLTRKYNELLKSYQ	19
GIN 31	45	NA	KFMETVAEKALQEYRK	16

[0184] 实施例 3

[0185] 对扩大数目的肽进行另一组实验来进一步评估根据本发明的肽对 HSV-1 的效果。表 6 证实称作 GIN1p 和 GIN7 的肽具有抗 -HSV-1 性质,而称作 GIN 32、34 和 41 的肽也具有功效。考虑到所测试的多数肽有很小或没有活性,这些肽的功效是令人惊奇的。

[0186] 图 7 比较并图解了肽 GIN7、GIN32、GIN34 和 GIN1p 对 HSV1 感染性的效果。

[0187] 表 6

[0188]

肽编码	SEQ ID No.	核酸 SEQ ID No.	序列	IC ₅₀ (μM)
7	SEQ ID No.3	SEQ ID No.12	WRKWRKRWWWRKWRKRWW	3.5
34	SEQ ID No.5	SEQ ID No.14	WRKWRKRWWLRKLRKRL	6
32	SEQ ID No.4	SEQ ID No.13	WRKWRKRWRKWRKR	10
41	SEQ ID No.6	SEQ ID No.15	YRK YRKRYYYRK YRKRY	16
1p	SEQ ID No.2	SEQ ID No.11	LRKLRKRLLRKLRKRL	17
活性低:				
4	SEQ ID No.7	SEQ ID No.16	LRKLRKRLLRKLRK	29.5
22	SEQ ID No.19	NA	DWLKAFYDKVAEKLKEAF	36
11	SEQ ID No.20	NA	QSTEELRVLASHLRKLRKRL	36.5
29	SEQ ID No.21	NA	HMLDVMQDHFSSRASSIDEL	38.5
10	SEQ ID No.22	NA	RLRLRLRLRLRLRLRL	39
44	SEQ ID No.23	NA	LRQLRQLRLRLRLRLRL	40
2	SEQ ID No.24	NA	LRKRLRLRLRLRLRL	>40
5	SEQ ID No.25	NA	LRKLRKRLRLRLK	>40
6	SEQ ID No.26	NA	ERKERKREEERKERKREE	>40
12	SEQ ID No.27	NA	LRKLRKRLRL DADDLQKRLA	>40
13	SEQ ID No.28	NA	RDADDLQKR RDADDLQKR	>40
14	SEQ ID No.29	NA	GERLRARMEGERLRARME	>40
15	SEQ ID No.30	NA	RLRARMEEMRLRARMEEM	>40
无活性:				
apoE 141-149	SEQ ID No.1	SEQ ID No.10	LRKLRKRL	NA
3	SEQ ID No.31	NA	RLRLRLRLRLRLRL	NA
6	SEQ ID No.32	NA	ERKERKREEERKERKREE	NA
17	SEQ ID No.33	NA	RALVDTLKFVTQAEQAK	NA
18	SEQ ID No.34	NA	PYLDDFQKKWQEEEMELYRQKVE	NA
19	SEQ ID No.35	NA	PLGEEMRDRARAHVDALRTHLA	NA
20	SEQ ID No.36	NA	PYSDELRLQRLAARLEALKENG	NA
21	SEQ ID No.37	NA	ARLAHYHAKATEHLSTLSEKAK	NA
23	SEQ ID No.38	NA	PVLDEFREKLNELALQKQMK	NA
24	SEQ ID No.39	NA	VTDYGKDLMEKVKSPQL	NA
25	SEQ ID No.40	NA	VTDYGKDLMEKVKEWLNS	NA
26	SEQ ID No.41	NA	NFHAMFQPFLEMIHEAQQ	NA
27	SEQ ID No.42	NA	CKNKEKKCKNKEKKC	NA
28	SEQ ID No.43	NA	LRKEKKRLRLRLKEKKRL	NA
30	SEQ ID No.44	NA	LQVAERLTRKYNELLKSYQ	NA
31	SEQ ID No.45	NA	KFMETVAEKALQEYRK	NA
39	SEQ ID No.46	NA	ARKARKRAAARKARKRAA	NA
40	SEQ ID No.47	NA	MRKMRKRMKMRKMRKMM	NA
42	SEQ ID No.48	NA	LRWLRWRLRLRLRLRL	NA
45	SEQ ID No.49	NA	LWKLWKWLLWKLWKWLL	NA
46	SEQ ID No.50	NA	LYKLYKYLLLYKLYKYLL	NA
47	SEQ ID No.51	NA	LQKLOKQLLQKLOKQLL	NA

[0189] [0189] 实施例 4

[0190] 进行与实施例 2 中所描述的相似的实验来测试根据本发明的肽对 HIV 感染的功

效。

[0191] 将过表达 CD4 和适宜的共同受体 (CCR5 或者 CXCR4) 的神经胶质瘤细胞系 NP2 保持在补加 10% FCS 的 DMEM 中。感染前对 48 孔板的每孔接种 2×10^4 个细胞并在 37°C 生长。然后洗涤细胞, 将其在含有浓度为 0.1 到 10 微摩尔的肽浓度的 DMEM/FCS 中在 37°C 孵育 20 分钟。然后向每孔中加入 200 个病灶形成单位的 HIV-1 原种, 并将细胞在 37°C 继续孵育 2 小时。然后将细胞在 PBS 中洗涤两次, 并用新鲜的培养基替换。生长 3 天后, 将细胞用冷甲醇:丙酮固定, 使用单克隆抗 -P24 然后通过二级抗 - 小鼠 β - 半乳糖苷酶缀合物原位染色来研究 HIV-1p24 的表达。通过 X-Gal 染色观察表达并通过光学显微术计数感染性病灶。

[0192] 发现根据本发明的肽对 HSV-1 和 HIV 具有相似的功效。

[0193] 图 8 图解了肽 GIN7 对生长在过表达 CCR5 共同受体的 NP-2 神经胶质瘤细胞中的 HIV 分离物 SF162 的抗 -HIV 作用。

[0194] 对于其他 HIV 株, 并且在其他宿主细胞类型中产生了相似数据。注意到在该肽对其测试的 HIV 株和细胞类型的一种组合中, 在这里使用的浓度下 (高达 10 μ M), 没有可检测的抗 HIV 活性。这将表明根据本发明的 W 取代的肽对于 HIV 比 GIN1p (ApoE_{141-149dp}) 更有效。

[0195] 实施例 5

[0196] 进行其他实验来测试根据本发明的肽对 HSV1 的功效。

[0197] 5.1 方法

[0198] 所用的方法如实施例 1-4 中描述, 只是将肽制备成磷酸缓冲盐水 (PBS) 中的 400 μ M 母液。

[0199] 5.2 结果

[0200] 5.2.1 完全替代亮氨酸的效果

[0201] 进行实验来研究用一种氨基酸完全替代 apoE₁₄₁₋₁₄₉ 串联重复中的 L 残基的效果。表 7 表明根据本发明的肽具有抑制 HSV1 生长的功效 (即, W、R 或者 K 替代)。根据本发明的第一方面的肽令人惊奇的比 apoE 串联重复 (GIN1/MU10) 具更高的功效。

[0202] 有趣的是注意到用 M、Y、F、I、Q、H 或 N 替代具有一定功效 (与 apoE 串联重复相当) 并且同样根据本发明的其他替代可以包含这些氨基酸。

[0203] 用 E、A、D、S、V、T、G 或 P 替代导致抗病毒活性消除。

[0204] 尽管发明人不希望被任何假说束缚, 但是他们注意到用具有小侧链的氨基酸替换倾向于消除抗病毒活性, 而用更大侧链的氨基酸保持抗病毒效应。然而, 如本发明的第一方面定义的用氨基酸替代 L 赋予令人惊奇的抗病毒活性。

[0205] 表 7

[0206]

肽编码	SEQ ID No.	序列	HSV1 IC ₅₀ (μ M)
MU 1(GIN 6)	67	ERKERKREEERKERKREE	NA
MU 2 (GIN 39)	68	ARKARKRAAARKARKRAA	NA
MU 3	69	DRKDRKRDDDRKDRKRDD	NA
MU 4 (GIN 7)	3	WRKWRKRWWWRKWRKRWW	3.5
MU 5 (GIN 40)	70	MRKMRKRMMMRKMRKRMM	>30
MU 6 (GIN 41)	6	YRKYRKRYYYRKYRKRY	>30
MU 7	71	FRKFRKRFFFRKFRKRFF	>30
MU 8	72	IRKIRKRIRIRKIRKRIR	>30
MU 9	73	QRKQRKRQQQRKQRKRQQ	>30
MU 10 (GIN 1p)	2.	LRKLRKRLLLRKLRKRLL	30
MU 10 (GIN 1)	2.	LRKLRKRLLLRKLRKRLL (no N / C protect)	16.5
MU 11	74	NRKNRKRNNNRKNRKRNN	27.5
MU 13	75	SRKSRKRSSSRKSRKRSS	NA
MU 14	76	VRKVRKRVVVRKVRKRVV	NA
MU 15	77	TRKTRKRTTTRKTRKRTT	NA
MU 16	64	RRKRRKRRRRRKRRKRRR	7.5
MU 17	78	GRKGRKRGGGRKGRKRGG	NA
MU 18	65	KRKKRKRKKKRKKRKRKK	7.5
MU 19	79	HRKHRKRHHHRKHRKRHH	NA
MU 20	80	PRKPRKRPPPRKPRKRPP	NA

[0207] 5. 2. 2 其他 apoE 衍生肽的测试

[0208] 发明人构建了肽的扩大文库来评估什么样 apoE 肽衍生物具有抗病毒活性。

[0209] 表 8 表明基于 SEQ ID No. 2 但是在根据本发明的第一方面的肽定义之外的许多肽没有活性或者有很弱的活性（例如，MU24-46）。有趣的是注意到 MU43 和 MU44 分别对应于 apoE₁₄₁₋₁₄₉ 的鼠和牛等价物的串联重复，而 MU46 对应于 apoE₁₄₁₋₁₄₉ (SEQ ID No. 1)。

[0210] 在表 8 关于 MU58-117 中给出的数据表明这些肽（它们是根据本发明的肽）的每一种都具有良好的抗病毒活性，其令人惊奇地优于 apoE_{141-149dp} (SEQ ID No. 2) 的抗病毒活性。

[0211] 表 8

[0212]

肽编码	SEQ ID No.	序列	HSV1 IC ₅₀ (μ M)
MU 24	81	LLRKRLKRLLLRKRLKRL	40
MU 38	82	LRRLRRLLLRRLRRLL	>30
MU 39	83	LKKLKKKLLLRKLLKLL	30
MU 40	84	LHHLHHHLLLRHHLHHLL	NA
MU 41	85	LDDLDDDLLLRDDLDDL	NA
MU 42	86	LEELEEEELLEELEEEL	NA
MU 43	87	MRKLRKRLMMRKLRKRLM	NA
MU 44	88	LRKLPKRLLLRKLPKRLL	>30
MU 45	89	WRKWRKRWW	NA
MU 46	1	LRKLRKRL	NA
MU 58	52	WRKWRKRWWWRKWRKRWW	4.25
MU 59	53	WRKWRKRWRKWRKRW	9.75
MU 60	54	WRKWRKRWWFRKWRKRWW	4
MU 61	55	WRKWRKRFFWRKWRKRFF	4.75
MU 68	56	WRKCRKRCWWRKCRKRCW	4.25
MU 83	66	WRKWRKRWWWRKWRKRW WR	2.5
MU 111	57	LRKLRKRLLRKWRKRWW	12.5
MU 112	58	LRKLRKRLLRKLRKRWW	>20
MU 113	59	LRKLRKRLLRKWRKRLL	18.5
MU 114	60	WRKWRKRLLLRKLRKRLL	16
MU 115	61	WRKLRKRLLRKLRKRLL	17.5
MU 116	62	WRKWRKFFFRKWRKRWW	3.3
MU 117	63	WRKWRKRWWFRKFRKRFF	3.3

[0213] 进行进一步的实验来测试根据本发明的肽对 HSV2 的功效。

[0214] 6.1 方法

[0215] 进行噬斑测定法。该方法如前面的实施例中对 HSV1 噬斑测定所描述（包括使用 Vero 细胞），只是使用 HSV2 临床分离物（由 Liverpool University 的 Anthony Hart 教授提供）。

[0216] 6.2 结果

[0217] 还测试了发现对 HSV1 具有功效的许多肽对 HSV2 的功效。表 9 表明根据本发明的肽对 HSV1 和 HSV2 有效。这表明这些肽将提供对抗病毒的广谱活性。

[0218] 表 9

[0219]

肽编码	SEQ ID No.	序列	HSV2 IC ₅₀ (μM)
GIN 34	5	WRKWRKRWWLRKLRKRL	< 3.3
GIN 32	4	WRKWRKRWRKWRKR	6.25
MU 4 (GIN 7)	3	WRKWRKRWWWRKWRKRWW	<3.3
MU 59	53	WRKWRKRWRKWRKRW	10
MU 83	66	WRKWRKRWWWRKWRKRWWR	<3.3
MU 111	57	LRKLRKRLLRKWRKRWW	6.5
MU 112	58	LRKLRKRLLRKLRKRWW	16
MU 113	59	LRKLRKRLLRKWRKRLL	11.75
MU 114	60	WRKWRKRLLLRKLRKRL	9

[0220] 实施例 7

[0221] 进行进一步实验来测试根据本发明的肽对人免疫缺陷病毒 (HIV) 的功效。测试根据本发明的肽对在实施例 4 中测试的不同的 HIV 毒株的效果。

[0222] 7.1 方法

[0223] 将肽 (如以前描述的制备) 在 50 μl 的等分试样中稀释并以 40,000 个细胞 / 孔与 T 细胞 (C8166) 混合。接着将 HIV-1 111B 以 0.01 的感染复数 (MOI) 加入, 并将混合物在 37°C 孵育 5 天。使用倒置显微镜通过视觉评估合胞体形成, 使用 GNA 用于抗原捕获, 通过 gp120 ELISA 评估上清液中的病毒 gp120 水平。洗涤用 50 μl GNA (*Galanthus nivalis*) 包被的 96 孔板, 然后用 100 μl RPMI (10% 胎牛血清) 处理并放置 1 小时。进一步洗涤后, 向孔中加入 25 μl 试样上清液, 以及受感染的对照样品的稀释液。通过用 0.5% Empigen (用于裂解病毒的去污剂) 对所有孔处理 3 小时裂解, 并洗涤后, 加入 50 μl 人抗-HIV 血清, 并过夜孵育平板。进一步洗涤后, 加入 50 μl 抗人 Ig 过氧化物酶缀合物的 1000× 稀释液, 并将平板在 37°C 孵育 90 分钟。最后洗涤后, 向每孔加入 50 μl 过氧化物酶底物, 并孵育平板 10-30 分钟。用 25 μl 2M H₂SO₄ 停止反应, 并测量 A450。

[0224] 7.2 结果

[0225] 进行其他试验来支持实施例 4 中给出的数据, 这些实验表明根据本发明的肽对 HIV 以及 HSV1 和 HSV2 都有效。

[0226] GIN32 (SEQ ID No. 4) 对于抑制 HIV-1 生长的 IC₅₀ 为 7.5 μM。该有效性与 HSV1、HSV2 和 HIV 中的相似。这证明根据本发明的肽具有宽的抗病毒效果。

[0001]

序列表

<110> 曼彻斯特大学

<120> 病毒感染的治疗

<130> PCB/AH/P89533WO

<160> 89

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 1

Leu Arg Lys Leu Arg Lys Arg Leu Leu
1 5

<210> 2

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 2

Leu Arg Lys Leu Arg Lys Arg Leu Leu Leu Arg Lys Leu Arg Lys Arg
1 5 10 15

Leu Leu

<210> 3

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

[0002]

<400> 3

Trp Arg Lys Trp Arg Lys Arg Trp Trp Trp Arg Lys Trp Arg Lys Arg
 1 5 10 15

Trp Trp

<210> 4

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

<400> 4

Trp Arg Lys Trp Arg Lys Arg Trp Arg Lys Trp Arg Lys Arg
 1 5 10

<210> 5

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 5

Trp Arg Lys Trp Arg Lys Arg Trp Trp Leu Arg Lys Leu Arg Lys Arg
 1 5 10 15

Leu Leu

<210> 6

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 6

Tyr Arg Lys Tyr Arg Lys Arg Tyr Tyr Tyr Arg Lys Tyr Arg Lys Arg
 1 5 10 15

Tyr Tyr

[0003]

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

<213> 人

<400> 7

Leu Arg Lys Leu Arg Lys Arg Leu Leu Leu Arg Lys Leu Arg Lys
1 5 10 15

<210> 8

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

<400> 8

Leu Arg Lys Leu Arg Lys Arg Leu Arg Lys Leu Arg Lys Arg
1 5 10

<210> 9

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 9

Leu Arg Lys Leu Arg Lys Leu Arg Lys Leu Arg Lys Leu Arg Lys Leu
1 5 10 15

Arg Lys

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> 人

<400> 10

cttcgtaaac ttcgtaaacg tcttctt

27

<210> 11

[0004]

<211> 54

<212> DNA

<213> 人

<400> 11

cttcgtaaac ttcgtaaacg tcttcttctt cgtaaacttc gtaaactgtt tctt 54

<210> 12

<211> 54

<212> DNA

<213> 人

<400> 12

tggcgtaaat ggcgtaaacg ttggtggtgg cgtaaatggc gtaaactgtt gtgg 54

<210> 13

<211> 42

<212> DNA

<213> 人

<400> 13

tggcgtaaat ggcgtaaacg ttggcgtaaa tggcgtaaac gt 42

<210> 14

<211> 54

<212> DNA

<213> 人

<400> 14

tggcgtaaat ggcgtaaacg ttggtggctt cgtaaacttc gtaaactgtt tctt 54

<210> 15

<211> 54

<212> DNA

<213> 人

<400> 15

tatcgtaaat atcgtaaacg ttattattat cgtaaatatc gtaaacttta ttat 54

[0005]

<210> 16

<211> 45

<212> DNA

<213> 人

<400> 16

cttcgtaaac ttcgtaaacg tcttcttctt cgtaaacttc gtaaa

45

<210> 17

<211> 42

<212> DNA

<213> 人

<400> 17

cttcgtaaac ttcgtaaacg tcttcgtaaa cttcgtaaac gt

42

<210> 18

<211> 54

<212> DNA

<213> 人

<400> 18

cttcgtaaac ttcgtaaact tcgtaaactt cgtaaacttc gtaaacttcg taaa

54

<210> 19

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 19

Asp	Trp	Leu	Lys	Ala	Phe	Tyr	Asp	Lys	Val	Ala	Glu	Lys	Leu	Lys	Glu
1				5					10				15		

Ala Phe

<210> 20

<211> 22

<212> PRT

[0006]

<213> 人

<400> 20

Gln Ser Thr Glu Glu Leu Arg Val Arg Leu Ala Ser His Leu Arg Lys
1 5 10 15

Leu Arg Lys Arg Leu Leu
20

<210> 21

<211> 20

<212> PRT

<213> 人

<400> 21

His Met Leu Asp Val Met Gln Asp His Phe Ser Arg Ala Ser Ser Ile
1 5 10 15

Ile Asp Glu Leu
20

<210> 22

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 22

Arg Leu Leu Arg Leu Leu Arg Leu Leu Arg Leu Leu Arg Leu Leu Arg
1 5 10 15

Leu Leu

<210> 23

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 23

Leu Arg Gln Leu Arg Gln Arg Leu Leu Leu Arg Gln Leu Arg Gln Arg
1 5 10 15

[0007]

Leu Leu

<210> 24

<211> 15

<212> PRT

<213> 人

<400> 24

Leu Arg Lys Arg Leu Leu Leu Arg Lys Leu Arg Lys Arg Leu Leu
1 5 10 15

<210> 25

<211> 12

<212> PRT

<213> 人

<400> 25

Leu Arg Lys Leu Arg Lys Arg Leu Leu Leu Arg Lys
1 5 10

<210> 26

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 26

Glu Arg Lys Glu Arg Lys Arg Glu Glu Glu Arg Lys Glu Arg Lys Arg
1 5 10 15

Glu Glu

<210> 27

<211> 20

<212> PRT

<213> 人

[0008]

<400> 27

Leu Arg Lys Leu Arg Lys Arg Leu Leu Arg Asp Ala Asp Asp Leu Gln
1 5 10 15

Lys Arg Leu Ala
20

<210> 28

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 28

Arg Asp Ala Asp Asp Leu Gln Lys Arg Arg Asp Ala Asp Asp Leu Gln
1 5 10 15

Lys Arg

<210> 29

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 29

Gly Glu Arg Leu Arg Ala Arg Met Glu Gly Glu Arg Leu Arg Ala Arg
1 5 10 15

Met Glu

<210> 30

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 30

Arg Leu Arg Ala Arg Met Glu Glu Met Arg Leu Arg Ala Arg Met Glu
1 5 10 15

Glu Met

[0009]

<210> 31

<211> 12

<212> PRT

<213> 人

<400> 31

Arg Leu Leu Leu Arg Lys Leu Arg Lys Arg Leu Leu
 1 5 10

<210> 32

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 32

Glu Arg Lys Glu Arg Lys Arg Glu Glu Glu Arg Lys Glu Arg Lys Arg
 1 5 10 15

Glu Glu

<210> 33

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 33

Arg Ala Leu Val Asp Thr Leu Lys Phe Val Thr Gln Ala Glu Gly Ala
 1 5 10 15

Lys

<210> 34

<211> 22

<212> PRT

<213> 人

[0010]

<400> 34

Pro Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu
 1 5 10 15

Tyr Arg Gln Lys Val Glu
 20

<210> 35

<211> 22

<212> PRT

<213> 人

<400> 35

Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala Arg Ala His Val Asp Ala
 1 5 10 15

Leu Arg Thr His Leu Ala
 20

<210> 36

<211> 22

<212> PRT

<213> 人

<400> 36

Pro Tyr Ser Asp Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala
 1 5 10 15

Leu Lys Glu Asn Gly Gly
 20

<210> 37

<211> 22

<212> PRT

<213> 人

<400> 37

Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu Ser Thr
 1 5 10 15

Leu Ser Glu Lys Ala Lys
 20

[0011]

<210> 38

<211> 22

<212> PRT

<213> 人

<400> 38

Pro Val Leu Asp Glu Phe Arg Glu Lys Leu Asn Glu Glu Leu Glu Ala
1 5 10 15

Leu Lys Gln Lys Met Lys
20

<210> 39

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 39

Val Thr Asp Tyr Gly Lys Asp Leu Met Glu Lys Val Lys Ser Pro Glu
1 5 10 15

Leu Gln

<210> 40

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 40

Val Thr Asp Tyr Gly Lys Asp Leu Met Glu Lys Val Lys Glu Trp Leu
1 5 10 15

Asn Ser

<210> 41

<211> 18

<212> PRT

[0012]

<213> 人

<400> 41

Asn Phe His Ala Met Phe Gln Pro Phe Leu Glu Met Ile His Glu Ala
1 5 10 15

Gln Gln

<210> 42

<211> 16

<212> PRT

<213> 人

<400> 42

Cys Lys Asn Lys Glu Lys Lys Cys Cys Lys Asn Lys Glu Lys Lys Cys
1 5 10 15

<210> 43

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 43

Leu Arg Lys Glu Lys Lys Arg Leu Leu Leu Arg Lys Glu Lys Lys Arg
1 5 10 15

Leu Leu

<210> 44

<211> 19

<212> PRT

<213> 人

<400> 44

Leu Gln Val Ala Glu Arg Leu Thr Arg Lys Tyr Asn Glu Leu Leu Lys
1 5 10 15

Ser Tyr Gln

[0013]

<210> 45

<211> 16

<212> PRT

<213> 人

<400> 45

Lys Phe Met Glu Thr Val Ala Glu Lys Ala Leu Gln Glu Tyr Arg Lys
1 5 10 15

<210> 46

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 46

Ala Arg Lys Ala Arg Lys Arg Ala Ala Ala Arg Lys Ala Arg Lys Arg
1 5 10 15

Ala Ala

<210> 47

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 47

Met Arg Lys Met Arg Lys Arg Met Met Met Arg Lys Met Arg Lys Arg
1 5 10 15

Met Met

<210> 48

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

[0014]

<400> 48

Leu Arg Trp Leu Arg Trp Arg Leu Leu Leu Arg Trp Leu Arg Trp Arg
 1 5 10 15

Leu Leu

<210> 49

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 49

Leu Trp Lys Leu Trp Lys Trp Leu Leu Leu Trp Lys Leu Trp Lys Trp
 1 5 10 15

Leu Leu

<210> 50

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 50

Leu Tyr Lys Leu Tyr Lys Tyr Leu Leu Leu Tyr Lys Leu Tyr Lys Tyr
 1 5 10 15

Leu Leu

<210> 51

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 51

Leu Gln Lys Leu Gln Lys Gln Leu Leu Leu Gln Lys Leu Gln Lys Gln
 1 5 10 15

Leu Leu

[0015]

<210> 52

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 52

Trp Arg Lys Trp Arg Lys Arg Trp Trp Arg Lys Trp Arg Lys Arg Trp
1 5 10 15

Trp

<210> 53

<211> 15

<212> PRT

<213> 人

<400> 53

Trp Arg Lys Trp Arg Lys Arg Trp Arg Lys Trp Arg Lys Arg Trp
1 5 10 15

<210> 54

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 54

Trp Arg Lys Trp Arg Lys Arg Trp Trp Phe Arg Lys Trp Arg Lys Arg
1 5 10 15

Trp Trp

<210> 55

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

[0016]

<400> 55

Trp Arg Lys Trp Arg Lys Arg Trp Phe Phe Arg Lys Trp Arg Lys Arg
1 5 10 15

Phe Phe

<210> 56

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 56

Trp Arg Lys Cys Arg Lys Arg Cys Trp Trp Arg Lys Cys Arg Lys Arg
1 5 10 15

Cys Trp

<210> 57

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 57

Leu Arg Lys Leu Arg Lys Arg Leu Leu Trp Arg Lys Trp Arg Lys Arg
1 5 10 15

Trp Trp

<210> 58

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 58

Leu Arg Lys Leu Arg Lys Arg Leu Leu Leu Arg Lys Leu Arg Lys Arg
1 5 10 15

Trp Trp

[0017]

<210> 59

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 59

Leu Arg Lys Leu Arg Lys Arg Leu Leu Trp Arg Lys Trp Arg Lys Arg
1 5 10 15

Leu Leu

<210> 60

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 60

Trp Arg Lys Trp Arg Lys Arg Leu Leu Leu Arg Lys Leu Arg Lys Arg
1 5 10 15

Leu Leu

<210> 61

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 61

Trp Arg Lys Leu Arg Lys Arg Leu Leu Leu Arg Lys Leu Arg Lys Arg
1 5 10 15

Leu Leu

<210> 62

<211> 17

<212> PRT

[0018]

<213> 人

<400> 62

Trp Arg Lys Trp Arg Lys Phe Phe Phe Arg Lys Trp Arg Lys Arg Trp
1 5 10 15

Trp

<210> 63

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 63

Trp Arg Lys Trp Arg Lys Arg Trp Trp Phe Arg Lys Phe Arg Lys Arg
1 5 10 15

Phe Phe

<210> 64

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 64

Arg Arg Lys Arg Arg Lys Arg Arg Arg Arg Arg Lys Arg Arg Lys Arg
1 5 10 15

Arg Arg

<210> 65

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 65

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Lys Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg
1 5 10 15

[0019]

Lys Lys

<210> 66

<211> 20

<212> PRT

<213> 人

<400> 66

Trp Arg Lys Trp Arg Lys Arg Trp Trp Arg Trp Arg Lys Trp Arg Lys
1 5 10 15

Arg Trp Trp Arg
20

<210> 67

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 67

Glu Arg Lys Glu Arg Lys Arg Glu Glu Glu Arg Lys Glu Arg Lys Arg
1 5 10 15

Glu Glu

<210> 68

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 68

Ala Arg Lys Ala Arg Lys Arg Ala Ala Ala Arg Lys Ala Arg Lys Arg
1 5 10 15

Ala Ala

<210> 69

[0020]

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 69

Asp Arg Lys Asp Arg Lys Arg Asp Asp Asp Arg Lys Asp Arg Lys Arg
1 5 10 15

Asp Asp

<210> 70

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 70

Met Arg Lys Met Arg Lys Arg Met Met Met Arg Lys Met Arg Lys Arg
1 5 10 15

Met Met

<210> 71

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 71

Phe Arg Lys Phe Arg Lys Arg Phe Phe Phe Arg Lys Phe Arg Lys Arg
1 5 10 15

Phe Phe

<210> 72

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

[0021]

<400> 72

Ile Arg Lys Ile Arg Lys Arg Ile Ile Ile Arg Lys Ile Arg Lys Arg
1 5 10 15

Ile Ile

<210> 73

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 73

Gln Arg Lys Gln Arg Lys Arg Gln Gln Gln Arg Lys Gln Arg Lys Arg
1 5 10 15

Gln Gln

<210> 74

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 74

Asn Arg Lys Asn Arg Lys Arg Asn Asn Asn Arg Lys Asn Arg Lys Arg
1 5 10 15

Asn Asn

<210> 75

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 75

Ser Arg Lys Ser Arg Lys Arg Ser Ser Ser Arg Lys Ser Arg Lys Arg
1 5 10 15

Ser Ser

[0022]

<210> 76

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 76

Val Arg Lys Val Arg Lys Arg Val Val Val Arg Lys Val Arg Lys Arg
1 5 10 15

Val Val

<210> 77

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 77

Thr Arg Lys Thr Arg Lys Arg Thr Thr Thr Arg Lys Thr Arg Lys Arg
1 5 10 15

Thr Thr

<210> 78

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 78

Gly Arg Lys Gly Arg Lys Arg Gly Gly Gly Arg Lys Gly Arg Lys Arg
1 5 10 15

Gly Gly

<210> 79

<211> 18

<212> PRT

[0023]

<213> 人

<400> 79

His Arg Lys His Arg Lys Arg His His His Arg Lys His Arg Lys Arg
1 5 10 15

His His

<210> 80

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 80

Pro Arg Lys Pro Arg Lys Arg Pro Pro Pro Arg Lys Pro Arg Lys Arg
1 5 10 15

Pro Pro

<210> 81

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 81

Leu Leu Arg Lys Arg Leu Lys Arg Leu Leu Leu Arg Lys Arg Leu Lys
1 5 10 15

Arg Leu

<210> 82

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 82

Leu Arg Arg Leu Arg Arg Arg Leu Leu Leu Arg Arg Leu Arg Arg Arg
1 5 10 15

[0024]

Leu Leu

<210> 83

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 83

Leu Lys Lys Leu Lys Lys Lys Leu Leu Leu Lys Lys Leu Lys Lys Lys
1 5 10 15

Leu Leu

<210> 84

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 84

Leu His His Leu His His His Leu Leu Leu His His Leu His His His
1 5 10 15

Leu Leu

<210> 85

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 85

Leu Asp Asp Leu Asp Asp Asp Leu Leu Leu Asp Asp Leu Asp Asp Asp
1 5 10 15

Leu Leu

<210> 86

[0025]

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 86

Leu Glu Glu Leu Glu Glu Glu Leu Leu Leu Glu Glu Leu Glu Glu Glu
1 5 10 15

Leu Leu

<210> 87

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 87

Met Arg Lys Leu Arg Lys Arg Leu Met Met Arg Lys Leu Arg Lys Arg
1 5 10 15

Leu Met

<210> 88

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 88

Leu Arg Lys Leu Pro Lys Arg Leu Leu Leu Arg Lys Leu Pro Lys Arg
1 5 10 15

Leu Leu

<210> 89

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

[0026]

<400> 89

Trp Arg Lys Trp Arg Lys Arg Trp Trp
1 5

在用各种浓度的 apoE 衍生的肽处理后 HSV1 感染性的降低

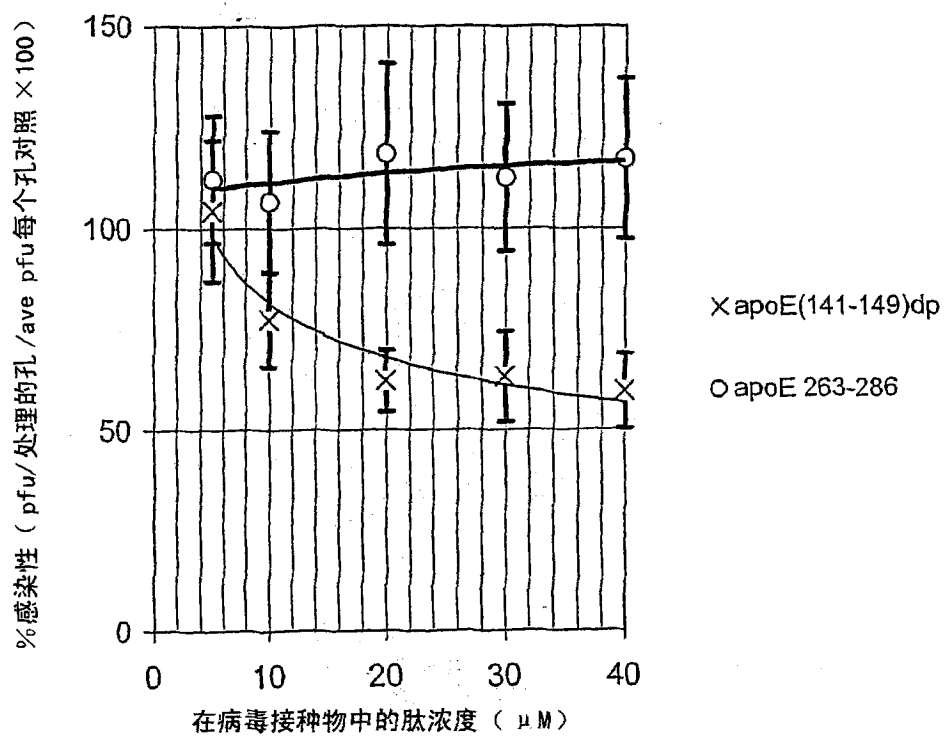


图 1

在用各种浓度的 apoE 衍生的肽处理后 HSV2 感染性的降低

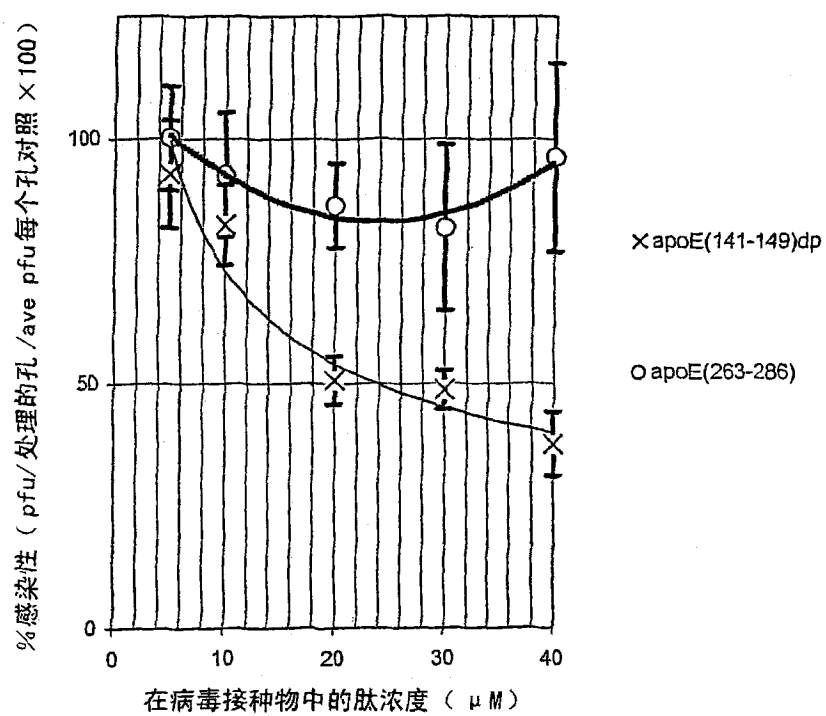


图 2

在用各种浓度的 apoE 衍生的肽处理后 HIV 感染性的降低

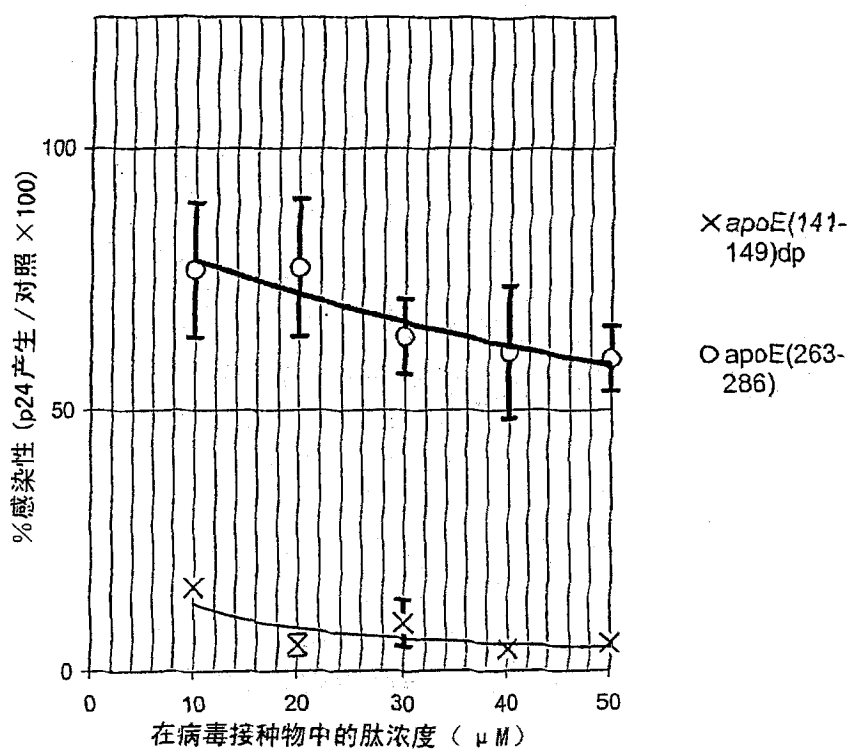


图 3

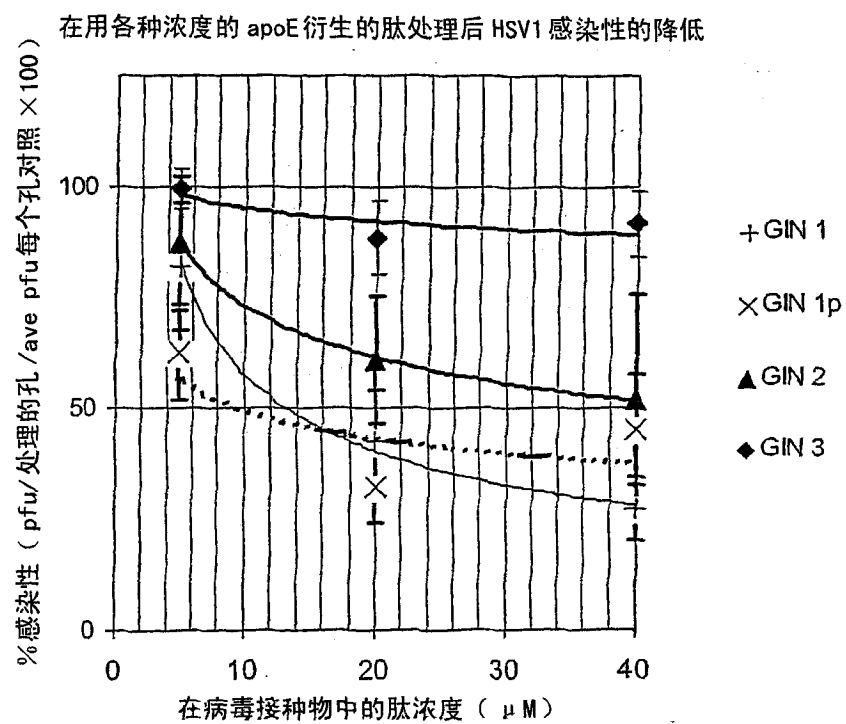


图 4

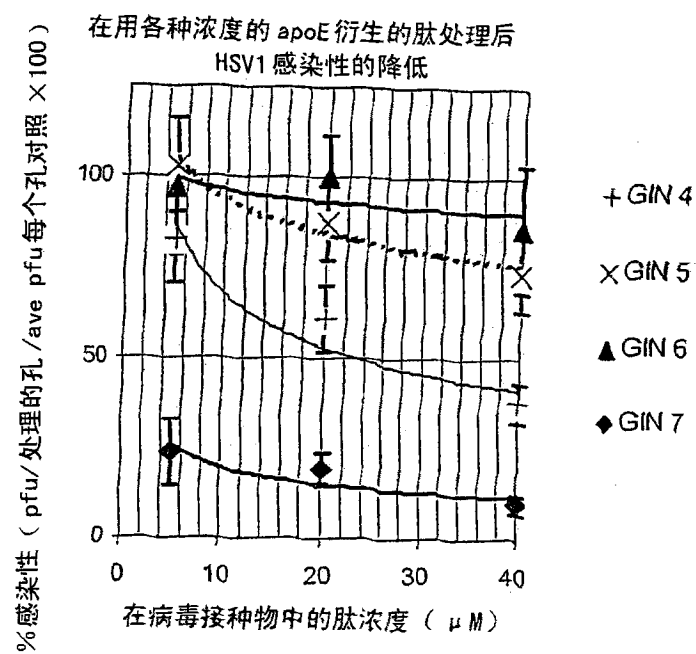


图 5

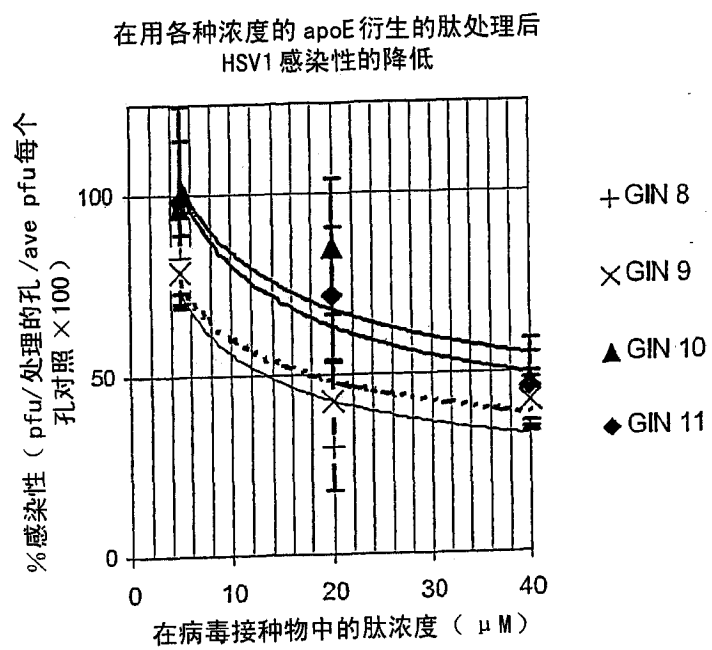


图 6

在用各种浓度的 GIN 肽处理后 HSV1 感染性的降低

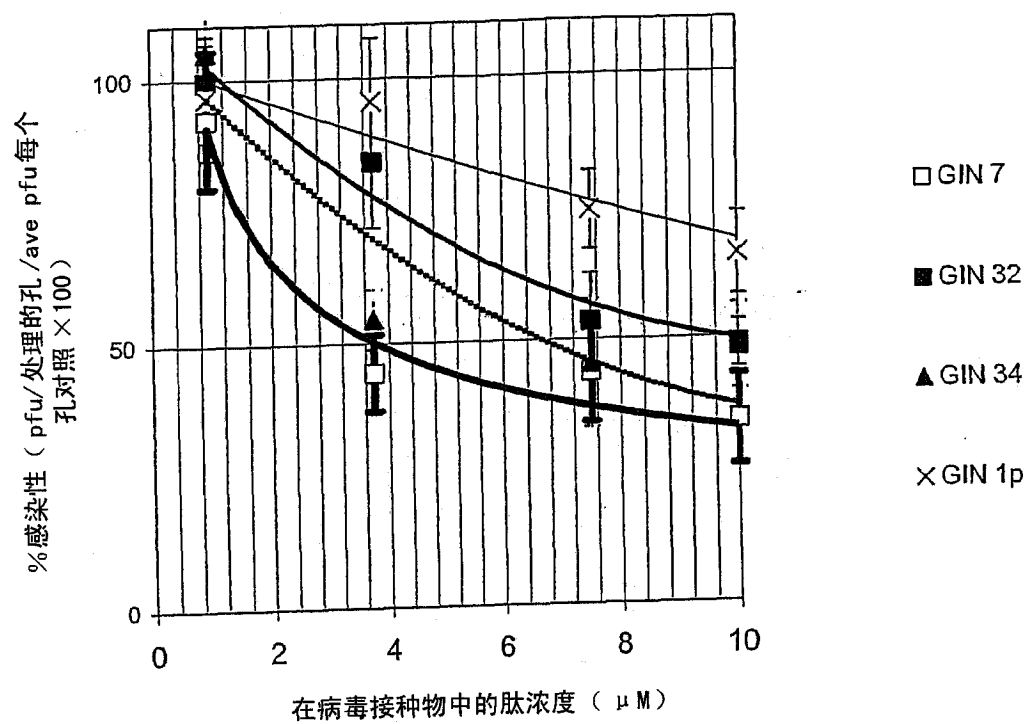


图 7

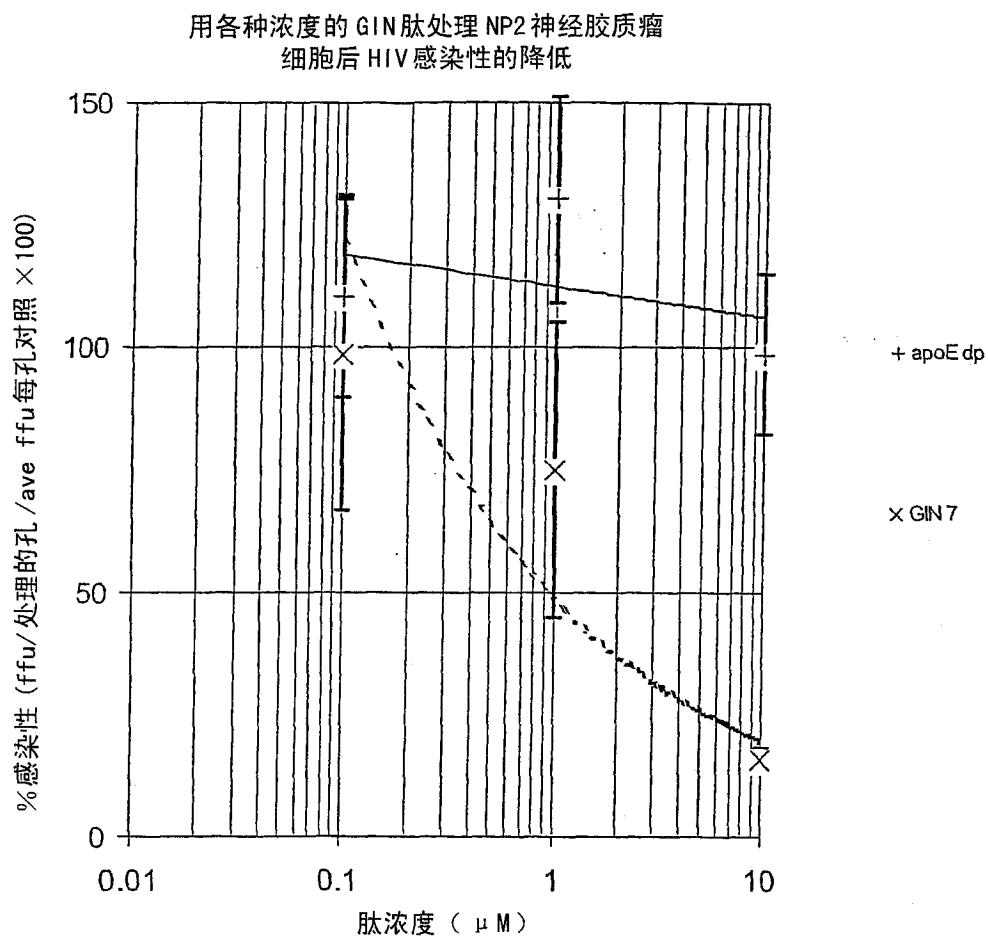


图 8

Advanced Biomedical Ltd

LaserMat 2000

Laser desorption mass spectrum

样品: GIN 7

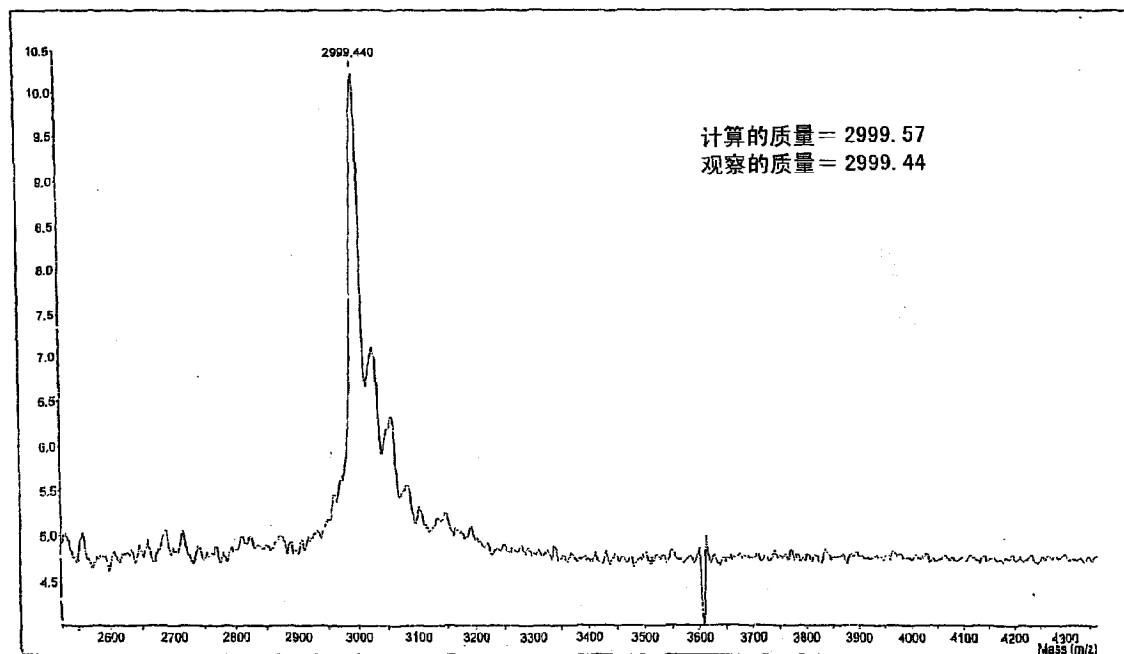
0.521264
6 shots

图 9

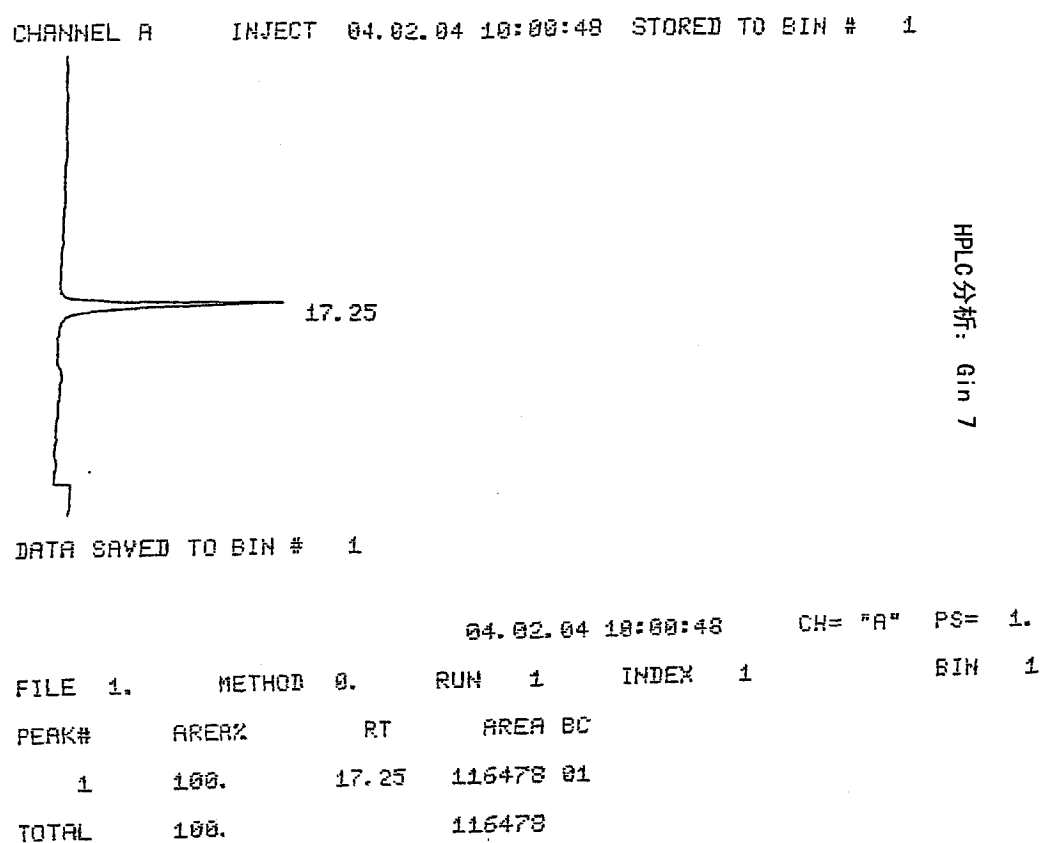


图 10