

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510005990.9

A61K 38/16

A61K 38/38

A61P 31/12

A61P 31/16

A61P 31/18

[43] 公开日 2005 年 11 月 23 日

[11] 公开号 CN 1698881A

[22] 申请日 2000.5.17

[21] 申请号 200510005990.9

分案原申请号 00807671.5

[30] 优先权

[32] 1999. 5. 17 [33] US [31] 60/134,406

[32] 1999. 9. 10 [33] US [31] 60/153,406

[71] 申请人 康久化学公司

地址 加拿大魁北克

[72] 发明人 多米尼克·P·布里顿

罗伯特·P·迪弗雷纳

尼塞·布迪耶莱布 马丁·罗比塔利

彼得·G·米尔纳

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任
公司

代理人 杨 青 樊卫民

权利要求书 3 页 说明书 171 页

[54] 发明名称 病毒感染的长效融合肽抑制剂

[57] 摘要

具有抗病毒和抗融合活性的肽经修饰提供更高的稳定性和改进的体内半衰期。所选肽包括融合抑制剂 DP178 和 DP107 和有关的肽及其类似物。经修饰的肽能够与一种或多种血液组分，优选流动的血液组分形成共价键。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

-
1. 一种偶联物，含有：
- 肽，具有抗病毒和抗融合活性，与马来酰亚胺基偶联，该基团与
- 5 血液组分上的巯基反应形成稳定共价键；和
- 血液组分，
- 其中所述肽与所述血液组分通过已同所述血液组分的巯基反应的
- 所述马来酰亚胺基而共价键合。
- 10 2. 权利要求 1 的偶联物，其中血液组分是血清白蛋白。
3. 权利要求 1 的偶联物，其中所述肽是 DP178 或 DP107。
4. 权利要求 1-3 任一项的偶联物，其中所述肽对人免疫缺陷病毒
- 15 (HIV)显示出抗病毒和抗融合活性。
5. 权利要求 4 的偶联物，其中所述肽选自 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID
- NO:9。
- 20 6. 权利要求 4 的偶联物，其中所述肽是 DP178 或 DP107。
7. 权利要求 1 或 2 的偶联物，其中所述肽对人呼吸道合胞病毒
- (RSV)显示出抗病毒和抗融合活性。
- 25 8. 权利要求 7 的偶联物，其中所述肽选自 SEQ ID NO:10 至 SEQ ID
- NO:30。
9. 权利要求 7 的偶联物，其中所述肽选自 SEQ ID NO:14 至 SEQ ID
- NO:17 和 SEQ ID NO:29。
- 30

10. 权利要求 1 的偶联物，其中所述肽对人副流感病毒(HPIV)显示出抗病毒和抗融合活性。

5 11. 权利要求 10 的偶联物，其中所述肽选自 SEQ ID NO:31 至 SEQ ID NO:62。

12. 权利要求 10 的偶联物，其中所述肽选自 SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:38 至 SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:52 和 SEQ ID NO:58。

10 13. 权利要求 1 或 2 的偶联物，其中所述肽对麻疹病毒(MeV)显示出抗病毒和抗融合活性。

14. 权利要求 13 的偶联物，其中所述肽选自 SEQ ID NO:74 至 SEQ ID NO:86。

15 15. 权利要求 13 的偶联物，其中所述肽选自 SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:81 和 SEQ ID NO:84。

16. 权利要求 1 或 2 的偶联物，其中所述肽对猿猴免疫缺陷病毒(SIV)显示出抗病毒和抗融合活性。

17. 权利要求 16 的偶联物，其中所述肽选自 SEQ ID NO:63 至 SEQ ID NO:73。

25 18. 一种用于预防和/或治疗获得性免疫缺陷综合征(AIDS)的组合物，所述组合物含有对人免疫缺陷病毒(HIV)具有抗病毒和抗融合活性的偶联物，所述偶联物包括对人免疫缺陷病毒(HIV)显示出抗病毒和抗融合活性并修饰有马来酰亚胺基的肽以及血液组分，所述马来酰亚胺基已与所述血液组分上的巯基反应形成稳定的共价键。

30

19. 权利要求 18 的组合物，其中所述肽是 DP178 或 DP107。

20. 一种用于预防和/或治疗人呼吸道合胞病毒(RSV)感染的组合物，所述组合物含有对人呼吸道合胞病毒(RSV)具有抗病毒和抗融合活性的偶联物，所述偶联物包括对人呼吸道合胞病毒(RSV)显示出抗
5 病毒和抗融合活性并修饰有马来酰亚胺基的肽以及血液组分，所述马来酰亚胺基已与所述血液组分上的巯基反应形成稳定的共价键。

21. 权利要求 20 的组合物，其中所述肽选自 SEQ ID NO:14 至 SEQ
10 ID NO:17 和 SEQ ID NO:29。

22. 一种用于预防和/或治疗人副流感病毒(HPIV)感染的组合物，所述组合物含有对人副流感病毒(HPIV)表现出抗病毒和抗融合活性的偶联物，所述偶联物包括对人副流感病毒(HPIV)显示出抗病毒和抗融
15 合活性并修饰有马来酰亚胺基的肽以及血液组分，所述马来酰亚胺基已与所述血液组分上的巯基反应形成稳定的共价键。

23. 权利要求 22 的组合物，其中所述肽选自 SEQ ID NO:35、SEQ
20 ID NO:38 至 SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:52 和 SEQ ID NO:58。

24. 一种用于预防和/或治疗麻疹病毒(MeV)感染的组合物，所述组合物含有对麻疹病毒(MeV)表现出抗病毒和抗融合活性的偶联物，所述偶联物包括对麻疹病毒(MeV)显示出抗病毒和抗融合活性并修饰
25 有马来酰亚胺基的肽以及血液组分，所述马来酰亚胺基已与所述血液组分上的巯基反应形成稳定的共价键。

25. 权利要求 24 的组合物，其中所述肽选自由 SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:81 和 SEQ ID NO:84。

26. 权利要求 18-25 任一项的组合物，其中血液组分是血清白蛋白。

病毒感染的长效融合肽抑制剂

5 本申请为国际申请 PCT/US00/13651 于 2001 年 11 月 16 日进入中国
国家阶段、申请号为 00807671.5、发明名称为“病毒感染的长效融合肽抑制剂”的分案申请。

发明领域

10 本发明涉及经修饰的肽，其是病毒活性的抑制剂和/或表现出抗
融合特性。特别是，本发明涉及人免疫缺陷病毒(HIV)、呼吸道合胞
病毒(RSV)、人副流感病毒(HPV)、麻疹病毒(MeV)和猿猴免疫缺陷病
毒(SIV)的经修饰的肽抑制剂，其在各个病毒感染的治疗中具有长效作
15 用。本发明还涉及经修饰的肽和内源性载体的偶联物，特别是经修饰
的肽和多种流动的血液成分、尤其是流动的内源性蛋白的偶联物。

发明背景

 虽然在正常细胞生物学过程中是寻常的，但膜融合活动也参与多
种疾病状态，包括例如有包膜病毒进入细胞内。已知肽类能够阻止或
20 中断膜融合相关性活动，包括例如抑制逆转录病毒传播给未感染细
胞。譬如，合成肽 DP-107 和 DP-178 衍生自 I 型人免疫缺陷病毒
(“HIV-1”)跨膜(“TM”)糖蛋白 gp41 的独立结构域，是 HIV-1 侵染
和 HIV 诱导的细胞-细胞融合的有效抑制剂。

25 Lambert 等在“副粘病毒融合(F)蛋白的保守区的肽是病毒融合的有效抑制剂”Proc. Natl. Acad. Science U.S.A., March 5,1996, Vol.93(5),
pp.2186-91 中公开了合成肽 DP-107 和 DP-178(T-20)，它们衍生自 I 型
人免疫缺陷病毒(HIV-1)跨膜(TM)蛋白 gp41 内的独立结构域，是 HIV-
1 侵染和融合的有效抑制剂。利用计算机搜索策略(computerized
30 antiviral searching technology,C. A. S. T.)基于 DP-107 和 DP-178(T20)

的二级结构，Lambert 等在其它融合病毒的糖蛋白内鉴定出类似于 HIV-1gp41 的 DP-107 和 DP-178 区的保守七重(复)结构域。由三种代表性副粘病毒呼吸道合胞病毒(RSV)、III 型人副流感病毒(HPIV-3)和麻疹病毒(MV)衍生的抗病毒肽阻断同源病毒介导的合胞体形成且表现的 EC₅₀ 值在 0.015-0.250 μ M 范围内。此外，这些肽对于病毒的来源非常有选择性。

U.S.专利 6,013,263、6,017,536 和 6,020,459 在此全文引入作为参考，同样地公开了 36 个氨基酸的肽 DP178，其相当于源自 HIV-1 分离物 LAI(HIV-1_{LAI})的 gp41 的氨基酸 638-673，和 38 个氨基酸的肽 DP107，其相应于 HIV-1_{LAI} 的 gp41 的氨基酸 558-595，两者均表现出抗 HIV-1 活性。

尽管现有技术中公开的许多抗病毒或抗融合肽显示出有效的抗病毒和/或抗融合活性，但这些肽存在体内血浆半衰期短的缺陷，这主要归因于血清清除快和肽酶和蛋白酶的作用。因此极大地降低了所述肽的有效抗病毒活性。所以，需要一种延长现有抗病毒和/或抗融合肽的半衰期并使这些肽的体内作用时间更长久的方法。

20 发明概述

本发明符合这些和其他的需求，并且涉及具有抗病毒活性和/或抗融合活性的经修饰的肽。这些经修饰的肽提供增强的体内稳定性且降低了对肽酶或蛋白酶降解的敏感性。因而这些经修饰的肽最大程度地减小了例如这些肽非常频繁或者甚至连续给药的需要。本发明的不同实施方式的产品可以用作例如对多种病毒感染的抵预和/或治疗，包括人免疫缺陷病毒(HIV)、人呼吸道合胞病毒(RSV)、人副流感病毒(HPV)、麻疹病毒(MeV)和猿猴免疫缺陷病毒(SIV)。参与病毒转染(例如肝炎、埃-巴二氏病毒和其他有关病毒)的其他肽的修饰也属于本发明的范围内。

30

本发明涉及具有抗病毒和/或抗融合活性的肽的化学上反应性修饰，因此这些经修饰的肽可以与血液组分上可利用的官能度(functionalitis)反应形成稳定的共价键。在本发明的一个实施方式中，所述的经修饰的肽含有与血液组分上的氨基、羟基或巯基反应形成稳定共价键的反应性基团。在本发明的另一实施方式中，反应性基团可以是与血液蛋白上的巯基反应的马来酰亚胺，所述的血液蛋白包括流动血液蛋白如白蛋白。

特别是，本发明涉及 DP107 和 DP178 肽及其类似物的化学反应性修饰，类似物包括含有源自其他(非 HIV)病毒氨基酸序列的肽，其相应于产生 DP107 和 DP178 的 HIV 的 gp41 区并表现出抗病毒或抗融合活性。更特别地，其中这些肽可以对人呼吸道合胞病毒(RSV)、人副流感病毒(HPV)、麻疹病毒(MeV)和猿猴免疫缺陷病毒(SIV)具有抗病毒作用。本发明还涉及 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:86 的肽的化学反应性修饰。

本发明也涉及用于预防和/或治疗病毒感染的组合物，其中含有用所述反应性基团修饰的具有抗病毒活性的肽。更特别地，本发明涉及用于预防和/或治疗 AIDS、人呼吸道合胞病毒(RSV)、人副流感病毒(HPV)、麻疹病毒(MeV)和猿猴免疫缺陷病毒(SIV)的组合物。

附表简述

通过参考附表可以更好地理解本发明，其中：

表 1 列出了常见氨基酸及其单字母和三字母缩写，和常用的保护基。

表 2 表示 DP178 羧基端平截。

表 3 表示 DP178 氨基端平截。

表 4 表示 DP107 羧基端平截。

表 5 表示 DP107 氨基端平截。

表 6 表示 HIV-2_{NIH2} DP178 类似物羧基端平截。

表 7 表示 HIV-2_{NIH2} DP178 类似物氨基端平截。

表 8 表示 RSV F2 区 DP107 类似物羧基端平截。

表 9 表示 RSV F2 区 DP107 类似物氨基端平截。

表 10 表示 RSV F1 区 DP178 类似物羧基端平截。

5 表 11 表示 RSV F1 区 DP178 类似物氨基端平截。

表 12 表示 HPV3 F1 区 DP178 类似物羧基端平截。

表 13 表示 HPV3 F1 区 DP178 类似物氨基端平截。

表 14 表示 HPV3 F1 区 DP107 类似物羧基端平截。

表 15 表示 HPV3 F1 区 DP107 类似物氨基端平截。

10 表 16 表示典型的抗 RSV 肽。

表 17 表示典型的抗 HPV3 肽。

表 18 表示典型的抗 SIV 肽。

表 19 表示典型的抗 MeV 肽。

15 序列表的简述

参考序列列表将更好地理解本发明，其中：

SEQ ID NO:1 表示 DP178 的肽序列。

SEQ ID NO:2 表示 DP107 的肽序列。

SEQ ID NO:3-9 表示某些 DP178 类似物的肽序列。

20 SEQ ID NO:10-30 表示相应于 DP178 和 DP107 的 RSV F1 区和 F2 区和典型的抗 RSV 肽的肽序列；

SEQ ID NO:31-62 表示相应于 DP178 和 DP107 的 HPV3 F1 区和典型的抗 HPV3 肽的肽序列；

25 SEQ ID NO:63-73 表示相应于 DP178 的 SIV 和典型的抗 SIV 肽的肽序列；且

SEQ ID NO:74-78 表示相应于 DP178 的 MeV 和典型的抗 MeV 肽的肽序列。

发明详述

30 为了确保完全理解本发明，提供下列定义：

5 抗病毒肽：在此所用的抗病毒肽将是指抑制细胞的病毒感染的肽，其通过例如抑制细胞-细胞融合或游离病毒感染。感染的途径可以包括膜融合，如同有包膜病毒情况中所出现的；或一些涉及病毒和细胞结构的其他融合活动。抑制特定病毒的病毒感染的肽可以相对于该特定病毒引用，例如抗 HIV 肽、抗 RSV 肽等。

10 抗融合肽：抗融合肽是指证实有能力抑制或降低两个或多个实体如病毒-细胞或细胞-细胞之间的膜融合活动的水平的肽，其相对于肽不存在下出现膜融合的水平而言。

15 HIV 和抗 HIV 肽：导致获得性免疫缺陷综合征的人免疫缺陷病毒(HIV)是反转录病毒的慢病毒属的一员。HIV 存在两种流行类型 HIV-1 和 HIV-2，业已鉴定出其各自具有多种株。HIV 以 CD-4+细胞为靶向，而病毒的进入依赖于 HIV 蛋白 gp41 与 CD-4+细胞表面受体的结合。抗 HIV 肽是指对 HIV 表现出抗病毒活性的肽，包括抑制游离病毒对 CD-4+细胞的感染和/或抑制感染和未感染 CD-4+细胞之间的 HIV 诱导的合胞体形成。

20 SIV 和抗 SIV 肽：猿猴免疫缺陷病毒(SIV)是在易感猿猴子中引起获得性免疫缺陷综合征(AIDS)样疾病的慢病毒。抗 SIV 肽是对 SIV 表现出抗病毒活性的肽，包括抑制 SIV 对细胞的感染和抑制感染或未感染细胞之间合胞体形成。

25 RSV 和抗 RSV 肽：呼吸道合胞病毒(RSV)是一种呼吸道病原体，对于婴儿和低龄儿童尤其危险，该病毒在他们中可以引起细支气管炎(细小气道的炎症)和肺炎。RSV 是负义、单链 RNA 病毒且是病毒的副粘病毒科的成员。RSV 的感染途径通常经过呼吸道即鼻、咽喉、气管、支气管和细支气管的粘膜。抗 RSV 肽是对 RSV 表现出抗病毒活性的肽，包括抑制游离 RSV 病毒的粘膜细胞感染以及感染和未感染细胞之间的合胞体形成。

30

HPV 和抗 HPV 肽：人副流感病毒(HPIV 或 HPV)，如同 RSV，是另一种导致呼吸道疾病的因素，而且如同 RSV 类病毒，是负义、单链 RNA 病毒，其是病毒的副粘病毒科的成员。存在四种已识别 HPIV 的血清型--HPIV-1、HPIV-2、HPIV-3 和 HPIV-4。HPIV-1 是导致儿童中哮喘的原因，并且 HPIV-1 和 HPIV-2 皆引起上下呼吸道疾病。HPIV-3 常常与细支气管炎和肺炎有关。抗 HPV 肽是对 HPV 表现出抗病毒活性的肽，包括抑制游离 HPV 病毒的感染和感染和未感染细胞之间合胞体形成。

MeV 和抗 MeV 肽：麻疹病毒(VM 或 MeV)是一种有包膜负义、单链 RNA 病毒，属于病毒的副粘病毒科。如同 RSV 和 HPV，MeV 引起呼吸疾病，并且产生导致附加、机会性感染的免疫抑制。在一些情形中，MeV 可以建立脑部的感染导致神经学上的(neurological)并发症。抗 MeV 肽是对 MeV 表现出抗病毒活性的肽，包括抑制游离 MeV 病毒的感染和感染与未感染之间的合胞体形成。

DP-178 和 DP178 类似物：除非另外明确指出或记载，DP-178 是指 36 个氨基酸 DP-178 肽，其相应于 HIV-1 分离物 LAI(HIV_{LAI})的 gp41 糖蛋白的氨基酸残基 638-673 并且具有序列：

YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF (SEQ ID NO:1)及其平截、缺失和/或插入。DP178 肽的平截可以包括 3-36 个氨基酸的肽。缺失包括从 DP178 肽去除一个或多个氨基酸残基，并且可以去除肽序列的一个邻接部分和多个部分。插入可以包括一个氨基酸残基或残基链，并且可以在 DP178 肽的羧基或氨基末端或在该肽的内部位置进行。

DP178 肽类似物是肽，其氨基酸序列含有除 HIV-1_{LAI} 之外的病毒的肽区的序列，其相应于产生 DP178 的 gp41 区，以及其平截、缺失

或插入。所述的其他病毒可以包括但不限于其他 HIV 分离物如 HIV-2_{NIH2}、呼吸道合胞病毒(RSV)、人副流感病毒(HPV)、猿猴免疫缺陷病毒(SIV)和麻疹病毒(MeV)。DP178 类似物也是指那些通过 ALLMOTI5、107x178x4 和 PLZIP 搜索基元鉴定或识别的具有与 DP178 相似的结构和/或氨基酸基元的肽序列，其公开在美国专利 6,013,263、6,017,536 和 6,020,459 并且在此引入。DP178 类似物进一步是指称作“DP178 样”的肽，该术语在美国专利 6,013,263、6,017,536 和 6,020,459 中。

DP-107 和 DP107 类似物：除非另外明确指出或记载，DP-107 是指 38 个氨基酸的 DP-107 肽，其相应于 HIV-1 分离物 LAI(HIV_{LAI})的 gp41 糖蛋白的氨基酸残基 558-595 并且具有序列：

NNLLRAIEAQQHLLQLTVWQIKQLQARILAVERYLKDQ (SEQ ID NO:2)

及其平截、缺失和/或插入。DP107 肽的平截可以含有 3-38 氨基酸的肽。缺失是包括从 DP107 肽去除一个或多个氨基酸残基，并且可以去除肽序列的一个邻接部分和多个部分。插入可以包括一个氨基酸残基或残基链，并且可以在 DP107 肽的羧基或氨基末端或在该肽的内部位置进行。

DP107 肽类似物是肽，其氨基酸序列含有除 HIV-1_{LAI} 之外的病毒的肽区的序列，其相应于产生 DP107 的 gp41 区，以及其平截、缺失或插入。所述的其他病毒可以包括但不限于其他 HIV 分离物如 HIV-2_{NIH2}、呼吸道合胞病毒(RSV)、人副流感病毒(HPV)、猿猴免疫缺陷病毒(SIV)和麻疹病毒(MeV)。DP107 类似物也是指那些通过 ALLMOTI5、107x178x4 和 PLZIP 搜索基元鉴定或识别的具有与 DP107 相似的结构和/或氨基酸基元的肽序列，其公开在美国专利 6,013,263、6,017,536 和 6,020,459 中。DP107 类似物进一步是指称作“DP107 样”的肽，该术语在美国专利 6,013,263、6,017,536 和 6,020,459 中定义。

5 反应性基团：反应性基团是能够形成共价键的化学基团。所述的反应性基团与 DP-107 或 DP-178 肽或其类似物或其他感兴趣的抗病毒或抗融合肽偶联或键合。反应性基团一般在含水环境中稳定，而且通常为羧基、磷酰基或适宜的酰基，或者是酯或混合酸酐，或亚胺酸酯(盐)，由此能够与位于流动血液组分上的靶向位点处的官能度如氨基、羟基或巯基形成共价键。对于绝大部分，所述的酯应包括酚类化合物，或是硫羟酸酯、烷基酯、磷酸酯等。

10 官能度：官能度是血液组分上的与经修饰的抗病毒肽上的反应性基团反应形成共价键的基团。官能度包括：键合酯反应性实体的羟基；与马来酰亚胺、亚胺酸酯和硫酯基反应的巯基；键合羧基、磷酰基或酰基的氨基；和与氨基键合的羧基。

15 血液组分：血液组分可以或固定或流动。固定的血液组分是非流动血液组分且包括组织、膜受体、间质蛋白、纤维蛋白、胶原、血小板、内皮细胞、上皮细胞及其相关的膜和膜受体、体细胞、骨骼肌和平滑肌细胞、神经元组分、骨细胞和破骨细胞以及全部机体组织，尤其是与循环和淋巴系统有关的组织。流动的血液组分是在任意延长的
20 时间内不具有固定位点的血液组分，一般不超过 5 分钟，更经常是 1 分钟。这些血液组分与膜无关，而且长时间存在于血液内并以至少 0.1 μ g/ml 的最低浓度存在。流动的血液组分包括血清白蛋白、转铁蛋白、铁蛋白和免疫球蛋白如 IgM 和 IgG。流动的血液组分的半衰期至少约 12 小时。

25 保护基：保护基是用来保护肽衍生物不发生自身反应的化学基团。多种保护基公开在本文和 U.S. 5,493,007(在此引入作为参考)中。此类保护基包括乙酰基、苄基甲氧基羰基(Fmoc)、叔丁氧基羰基(Boc)、苄氧基羰基(CBZ)等。具体的保护氨基酸列在表 1 中。

30

表 1			
天然氨基酸及其缩写			
名称	3 个字母 的缩写	1 个字母 的缩写	经修饰的氨基酸
丙氨酸	Ala	A	Fmoc-Ala-OH
精氨酸	Arg	R	Fmoc-Arg(Pbf)-OH
天门冬酰胺	Asn	N	Fmoc-Asn(Trt)-OH
天门冬氨酸	Asp	D	Asp(tBu)-OH
半胱氨酸	Cys	C	Fmoc-Cys(Trt)
谷氨酸	Glu	E	Fmoc-Glu(tBu)-OH
谷氨酰胺	Gln	Q	Fmoc-Gln(Trt)-OH
甘氨酸	Gly	G	Fmoc-Gly-OH
组氨酸	His	H	Fmoc-His(Trt)-OH
异亮氨酸	Ile	I	Fmoc-Ile-OH
亮氨酸	Leu	L	Fmoc-Leu-OH
赖氨酸	Lys	Z	Boc-Lys(Aloc)-OH
赖氨酸	Lys	X	Fmoc-Lys(Aloc)-OH
赖氨酸	Lys	K	Fmoc-Lys(Mtt)-OH
蛋氨酸	Met	M	Fmoc-Met-OH
苯丙氨酸	Phe	F	Fmoc-Phe-OH
脯氨酸	Pro	P	Fmoc-Pro-OH
丝氨酸	Ser	S	Fmoc-Ser(tBu)-OH
苏氨酸	Thr	T	Fmoc-Thr(tBu)-OH
色氨酸	Trp	W	Fmoc-Trp(Boc)-OH
酪氨酸	Tyr	Y	Boc-Tyr(tBu)-OH
缬氨酸	Val	V	Fmoc-Val-OH

连接基团:连接(间隔)基团是将反应性实体键合或相连于抗病毒或抗融合肽的化学基团。连接基团可以包括一个或多个烷基部分、烷氧基部分、链烯基部分、炔基部分或被烷基部分取代的氨基部分、环烷基部分、多环部分、芳基部分、多芳基部分、取代芳基部分、杂环部分和取代杂环部分；连接基团也可以含有聚乙氧基氨基酸，例如 AEA((2-氨基)乙氧基乙酸)或优选的连接基团 AEEA([2-(2-氨基)乙氧基])乙氧基乙酸)。

应位点的基团。如果存在，可以选择敏感官能团作为连接体-反应性基团修饰的连接点。敏感官能团包括但不限于羧基、氨基、巯基和羟基。

经修饰的肽-经修饰的肽是已经通过连接反应性基团修饰的抗病毒和/或抗融合肽。所述的反应性基团可以通过连接基团与所述的肽连接，或任选地不采用连接基团。也可以考虑把一个或多个附加氨基酸引入所述的肽以便于反应性基团的连接。经修饰的肽可以体内给药使其在体内发生与血液组分的结合，或者首先使它们与体外血液组分结合并且将所得的偶联肽(如下定义)体内给药。

偶联肽-偶联肽是已经与血液组分通过经修饰的肽的反应性基团和血液组分的官能度之间的共价键、在可有可无的连接基团下偶联的经修饰的肽。本申请中所用的术语“偶联肽”可以更加具体地指特定的偶联肽，例如“偶联 DP178”或“偶联 DP107”。

鉴于上述定义，本发明具有现有抗病毒和抗融合肽的特性的优越性。可以利用所述的肽抑制的病毒包括但不限于例如在美国专利 6,013,263、6,017,536 和 6,020,459 的表 V-VII 和 IX-XIV 中所列病毒的所有毒株。这些病毒包括，例如：人反转录病毒，包括 HIV-1、HIV-2；和人 T 淋巴细胞病毒(HTLV-I 和 HTLV-II)；和非人反转录病毒，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)、猿猴肉瘤病毒、猿猴白血病和绵羊进行性肺炎病毒。非反转录病毒也可以通过本发明的肽抑制，包括人呼吸道合胞病毒(RSV)、犬瘟热病毒、新城疫病毒、人副流感病毒(HPIV)、流感病毒、麻疹病毒(MeV)、埃-巴氏病毒、乙型肝炎病毒和猿猴 Mason-Pfizer 病毒。非有包膜病毒也可以用本发明的肽抑制，并且包括但不限于细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状瘤病毒、细小病毒、腺病毒和呼肠孤病毒。

如实施例所述，HIV 融合肽的作用机理已经在本申请背景部分中探讨，并且所述肽的抗病毒和抗融合特性业已很好地确立。相应于羧基末端胞外结构域序列的合成肽(例如，LAI 毒株的 B 型 HIV-1 的氨基酸残基 643-678 或源自相似毒株的残基 638-673 以及残基 558-595)已经显示出在非常低的浓度下抑制病毒介导的细胞-细胞融合。融合肽与天然病毒 gp41 的亮氨酸拉链结构区竞争，由此干扰病毒进入细胞的融合/感染。

本发明的重点在于利用 DAC(药物活性复合物)技术、通过选择性地肽偶联在蛋白载体上修饰选定的抗病毒和/或抗融合肽，赋予这种肽改进的生物利用度、延长的本申请和更良好的分布，但不改变肽的抗病毒特性。本发明选择(但不限于)的载体是白蛋白，通过其游离巯基与用马来酰亚胺基团修饰的抗病毒和/或抗融合肽偶联。

对 HIV-1 融合/感染的预防非常有效的若干肽序列业已公开在文献中。例如，肽 DP178 结合与融合有关的 gp41 的构象。因此在本发明的一个实施方式中，修饰 DP178 和 DP178 样肽。同样地，本发明的其他实施方式包括用于抗 HIV 的 DP107 和 DP107 样肽以及类似于在 RSV、HPV、MeV 和 SIV 病毒中发现的 DP107 和 DP178 的肽的修饰。

1. DP178 和 DP107

A. DP178 肽

DP178 肽相应于源自 HIV-1_{LAI} 分离物的跨膜蛋白 gp41 的氨基酸残基 638-673，并且具有 36 个氨基酸的序列(从氨基向羧基末端读取)：

NH₂-YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF-COOH (SEQ ID NO:1)

除了全长 DP178 的 36 聚体以外，本发明的肽包括含有 3-36 个氨基酸残基的 DP178 肽的平截(即，肽的大小范围是三肽至 36 聚多肽)，这些平截肽如表 2 和 3 所示。

此外 DP178 的氨基酸替换也属于本发明的范围内。HIV-1 和 HIV-2 包膜蛋白在结构式上不同，但在 HIV-1 和 HIV-2 相应 DP178 的区域内存在明显的氨基酸保守性。该氨基酸保守性具有周期性，提示了一些结构和/或功能的保守性。因此，氨基酸替换的一种可能类型将包括那些预计稳定本发明的 DP178 肽的结构的氨基酸变化。利用在此所述的 DP178 和 DP178 类似物序列，所属领域普通技术人员可以很容易地编译 DP178 共有序列并由此确定代表优选氨基酸替换的保守性氨基酸残基。

氨基酸替换可以具有保守或非保守性。保守的氨基酸替换由用具有相似电荷、大小和/或疏水特性的氨基酸置换 DP178 肽序列的一个或多个氨基酸组成，例如谷氨酸(E)对天门冬氨酸(D)的氨基酸替换。非保守性替换由用具有相异电荷、大小和/或疏水特性的氨基酸置换 DP178 肽序列的一个或多个氨基酸组成，例如谷氨酸(E)对缬氨酸(V)的替换。

DP178 的氨基酸插入可以由一个氨基酸残基或残基链组成。插入可以在 DP178 或 DP178 平截肽的羧基或氨基末端进行，并且可以在肽的内部位置进行。

所述的插入在长度上一般为 2-15 个氨基酸。值得考虑的是，在感兴趣肽的羧基或氨基末端进行的插入可以在更加宽的大小范围内，优选约 2 至约 50 个氨基酸。可以将一个或多个所述插入引入 DP178 或 DP178 平截中，只要这样的插入使所得的肽仍然可以通过上述 107x178x4、ALLMOTI5 或 PLZIP 搜索基元识别。

优选的氨基或羧基末端插入是长度范围在约 2 至约 50 个氨基酸残基内的肽，这些肽分别相应于实际 DP178 gp41 氨基酸序列氨基或羧基侧的 gp41 蛋白区域。所以，优选的氨基末端或羧基末端氨基酸

插入将含有 gp41 氨基酸序列，该序列紧接于 gp41 蛋白的 DP178 区的氨基或羧基端。

5 DP178 或 DP178 平截的缺失也属于本发明的范围内。所述的缺失由除去 DP178 或 DP178 样肽序列的一个或多个氨基酸组成，并且所得肽序列的长度的下限为 4-6 个氨基酸。

10 所述缺失可以包括肽序列的一个邻接部分或一个以上的不连续部分。可以将一个或多个这样的缺失引入 DP178 或 DP178 平截中，只要这些缺失得到的肽可以通过上述 107x178x4、ALLMOTI5 或 PLZIP 搜索基元识别。

B. DP107 肽

15 DP107 是一种 38 个氨基酸的肽，其具有有效的抗病毒活性，并且相应于源自 HIV-1_{LAI} 分离物的跨膜蛋白 gp41 的氨基酸残基 558-595，如下所示：

NH₂-NNLLRAIEAQQHLLQLTVWQIKQLQARILAVEERYLKDQ-COOH (SEQ ID NO:2)

20 除了全长 DP107 的 38 聚体以外，本发明的肽包括含有 3-38 个氨基酸残基的 DP107 肽的平截(即，肽的大小范围是三肽至 38 聚多肽)，这些平截肽如表 4 和 5 所示。

25 此外 DP178 的氨基酸替换也属于本发明的范围内。如同 DP178，在 HIV-1 和 HIV-2 相应 DP178 的区域内也存在明显的氨基酸保守性。该氨基酸保守性具有周期性，提示了结构和/或功能的保守性。因此，氨基酸替换的一种可能类型包括那些预计稳定本发明的 DP107 肽的结构氨基酸变化。利用在此所述的 DP107 和 DP107 类似物序列，所属领域普通技术人员可以很容易地编译 DP107 共有序列并由此确定代表优选氨基酸替换的保守性氨基酸残基。

30

氨基酸替换可以具有保守或非保守性。保守的氨基酸替换由用具有相似电荷、大小和/或疏水特性的氨基酸置换 DP107 肽序列的一个或多个氨基酸组成，例如谷氨酸(E)对天门冬氨酸(D)的氨基酸替换。非保守性替换由用具有相异电荷、大小和/或疏水特性的氨基酸置换 DP107 肽序列的一个或多个氨基酸组成，例如谷氨酸(E)对缬氨酸(V)的替换。

氨基酸插入可以由一个氨基酸残基或残基链组成。插入可以在 DP107 或 DP107 平截肽的羧基或氨基末端进行，并且可以在肽的内部位置进行。

所述的插入在长度上一般为 2-15 个氨基酸。值得考虑的是，在感兴趣肽的羧基或氨基末端进行的插入可以在更加宽的大小范围内，优选约 2 至约 50 个氨基酸。可以将一个或多个所述插入引入 DP107 或 DP107 平截中，只要这样的插入得到的肽仍然可以通过上述 107x178x4、ALLMOTI5 或 PLZIP 搜索基元识别。

优选的氨基或羧基末端插入是长度范围在约 2 至约 50 个氨基酸残基内的肽，分别相应于实际 DP107 gp41 氨基酸序列氨基或羧基侧的 gp41 蛋白区域。所以，优选的氨基末端或羧基末端氨基酸插入将含有 gp41 氨基酸序列，该序列紧接于 gp41 蛋白的 DP107 区的氨基或羧基端。

DP107 或 DP107 平截的缺失也属于本发明的范围内。所述的缺失包括除去 DP107 或 DP107 样肽序列的一个或多个氨基酸，并且所得肽序列的长度的下限为 4-6 个氨基酸。

所述缺失可以包括肽序列的一个邻接部分或一个以上的不连续部分。可以将一个或多个这样的缺失引入 DP107 或 DP107 平截中，只要这些缺失得到的肽可以通过上述 107x178x4、ALLMOTI5 或 PLZIP

搜索基元识别。

DP107 和 DP107 平截全面公开在美国专利 5,656,480 中，其在此全文引入作为参考。

5

2. DP107 和 DP178 类似物

本发明的相应于上述 DP178 的类似物、DP178 平截、DP107 和 DP107 平截序列的肽可以在其它病毒中发现，包括例如非 HIV-1 有包膜病毒、非有包膜病毒和其它非病毒生物。

10

所述的 DP178 和 DP107 类似物可以例如相应于存在于有包膜病毒的跨膜(“TM”)蛋白中的肽序列，并且可以相应于存在于非包膜和非病毒生物中的肽序列。所述肽可以具有抗融合活性、抗病毒活性，最特别的是对发现其中天然序列的病毒具有特异性的抗病毒活性，或者可以表现出调节涉及卷曲螺旋结构的胞内过程的性能。

15

A. DP178 类似物

DP178 类似物是肽，其氨基酸序列含有例如其它(即非 HIV-1)病毒的肽区的氨基酸序列，该氨基酸序列相应于产生 DP178 的 gp41 肽区。所述的病毒可以包括但不限于其它 HIV-1 分离物和 HIV-2 分离物。

20

衍生自其它(即非 HIV-1LAI)HIV-1 分离物的相应 gp41 肽区的 DP178 类似物可以包括，例如如下所示的肽序列：

NH2-YTNTIYTLLEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF-COOH (SEQ ID NO:3)

25

NH2-YTGHIYNLLEESQNQQEKNEQELLELDKWANLWNWF-COOH (SEQ ID NO:4)

NH2-YTSLIYSLLEKSQIQQEKNEQELLELDKWASLWNWF-COOH (SEQ ID NO:5)

30

SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:5 的肽分别衍生自 HIV-1_{SF2}、HIV-1_{RF} 和 HIV-1_{MN}。其它 DP178 类似物包括衍生自 HIV-2 的那些，包括 SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:7 的肽，它们分别衍生自 HIV-2_{ROD} 和 HIV-2_{NIHZ}。其它有效的类似物包括 SEQ ID NO:8 和 SEQ ID NO:9 的肽，已经证实它们具有抗病毒活性。

在本发明中，优选 DP178 类似物表示那些其氨基酸序列相应于 gp41 蛋白的 DP178 区的肽；另外，也可以考虑本此处所述的肽含有长度范围在约 2 至约 50 个氨基酸残基内的氨基酸序列，该序列相应于实际 DP178 氨基酸序列氨基或羧基端的 gp41 区。

表 6 和表 7 表示 HIV-2_{NIHZ} DP178 类似物的一些可能的平截，它们含有 3 至 36 氨基酸残基的肽(即肽大小范围是三肽至 36 聚多肽)。这些表中的肽序列是从氨基(左方)向羧基(右方)末端列出。

15

B.另外的 DP178 类似物和 DP107 类似物

DP178 和 DP107 类似物是通过例如用一个或多个上述 107x178x4、ALLMOTI5 或 PLZIP 计算机辅助搜索策略进行识别和鉴定。这些搜索策略鉴别出预知具有类似于 DP107 和/或 DP178 的结构和/或氨基酸序列特征的附加肽区。

20

上述搜索策略全面公开在美国专利 6,013,263、6,017,536 和 6,020,459 的第 9 部分中的实施例。虽然这种搜索策略部分基于由 DP107 和 DP178 演绎的基本氨基酸基元，但它不仅仅基于搜索基本氨基酸序列同源性，因为这种蛋白序列同源性存在于病毒的主要组群中，但不存在于各主要组群之间。譬如，基本氨基酸序列同源性在 HIV-1 的不同毒株的 TM 蛋白内或在猿猴免疫缺陷病毒(SIV)的不同分离物的 TM 蛋白内非常高。

25

公开在美国专利 6,013,263、6,017,536 和 6,020,459 中的计算机搜

30

索策略成功地鉴别了类似于 DP107 或 DP178 的蛋白的区域。这种搜索策略被设计为与市售序列数据库包、优选 PC/Gene 一起使用。

在美国专利 6,013,263、6,017,536 和 6,020,459 中，设计了一系列的搜索基元 107x178x4、ALLMOTI5 和 PLZIP 基元，并且在从严到宽的严格范围内内工程化，其中优选 107x178x4。经过上述搜索基元鉴定的序列，例如那些在美国专利 6,013,263、6,017,536 和 6,020,459 中的表 V-XIV 中和本申请引入作为参考的所列序列，潜在地具有抗融合(如抗病毒)活性，可以另外用于抗融合(如抗病毒)化合物的鉴定。

3. 其它抗病毒肽

A. 抗 RSV 肽

抗 RSV 肽包括由 RSV 中相应肽序列鉴定出的 DP178 和/或 DP107 类似物，其进一步鉴定能够抑制 RSV 的病毒感染。感兴趣的此类肽包括表 16 的肽和 SEQ ID NO:10 至 SEQ ID NO:30 的肽。特别感兴趣的是下列肽：

YTSVITIELSNIKENKCNGAKVKLIKQELDKYK (SEQ ID NO:14)

TSVITIELSNIKENKCNGAKVKLIKQELDKYKN (SEQ ID NO:15)

VITIELSNIKENKCNGAKVKLIKQELDKYKNAV (SEQ ID NO:16)

IALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDK (SEQ ID NO:29)

SEQ ID NO:10 的肽衍生自 RSV 的 F2 区，并且在美国专利 6,103,236 和 6,020,459 中利用相应于 DP107 和 DP178 肽的所述搜索基元(即“DP107/178 样”)鉴定。SEQ ID NO:14 至 SEQ ID NO:16 的肽分别具有 SEQ ID NO:10 中所含的氨基酸序列，并且各自已经显示出抗 RSV 活性，特别是在低于 50 μ g/ml 的浓度下抑制 RSV 感染和未感染 Hep-2 细胞之间的融合和合胞体形成。

SEQ ID NO:11 的肽衍生自 RSV 的 F1 区，并且在美国专利 6,103,236 和 6,020,459 中利用相应于 DP107 的所述搜索基元(即“DP107

样”)鉴定。SEQ ID NO:29 含有 SEQ ID NO:10 中所含的氨基酸序列，并且同样地表现出抗 RSV 活性，特别是在低于 50 μ g/ml 的浓度下抑制 RSV 感染和未感染 Hep-2 细胞之间的融合和合胞体形成。

5 B.抗 HPIV 肽

抗 HPIV 肽包括由 HPIV 中相应肽序列鉴定的 DP178 和/或 DP107 类似物，并且其进一步鉴定为可以抑制 HPIV 的病毒感染。感兴趣的此类肽包括表 17 的肽和 SEQ ID NO:31 至 SEQ ID NO:62 的肽。特别感兴趣的是下列肽：

10 VEAKQARSDIEKLKEAIRDTNKAVQSVQSSIGNLI (SEQ ID
NO:52) RSDIEKLKEAIRDTNKAVQSVQSSIGNLIVAIKSV (SEQ ID
NO:58)

 NSVALDPIDISIELNKA KSDLEESKEWIRRSNQKL (SEQ ID
NO:35)

15 ALDPIDISIELNKA KSDLEESKEWIRRSNQKLDSI (SEQ ID
NO:38)

 LDPIDISIELNKA KSDLEESKEWIRRSNQKLDSIG (SEQ ID
NO:39)

20 DPIDISIELNKA KSDLEESKEWIRRSNQKLDSIGN (SEQ ID
NO:40)

 PIDISIELNKA KSDLEESKEWIRRSNQKLDSIGNW (SEQ ID
NO:41)

 IDISIELNKA KSDLEESKEWIRRSNQKLDSIGNWH (SEQ ID
NO:42)

25

SEQ ID NO:31 的肽衍生自 HPIV-3 的 F1 区，并且在美国专利 6,103,236 和 6,020,459 中利用相应 DP107 的所述搜索基元(即“DP107 样”)鉴定。SEQ ID NO:52 和 SEQ ID NO:58 的肽分别具有 SEQ ID NO:30 中所含的氨基酸序列，而且各自显示出抗 HPIV-3 活性，特别是在低
30 于 1 μ g/ml 的浓度下抑制 HPIV-3-感染的 Hep-2 细胞和未感染的 CV-1W

细胞之间的融合和合胞体形成。

SEQ ID NO:32 的肽衍生自 HPIV-3 的 F1 区, 并且在美国专利 6,103,236 和 6,020,459 中利用相应 DP178 的所述搜索基元(即“DP178 样”)鉴定。SEQ ID NO:35 和 SEQ ID NO:38 至 SEQ IN NO:42 的肽分别具有 SEQ ID NO:32 中所含的氨基酸序列, 而且各自显示出抗 HPIV-3 活性, 特别是在低于 1 μ g/ml 的浓度下抑制 HPIV-3-感染的 Hep-2 细胞和未感染的 CV-1W 细胞之间的融合和合胞体形成。

10 C.抗 MeV 肽

抗 MeV 肽是由麻疹病毒(MeV)中相应肽序列鉴定出的 DP178 和/或 DP107 类似物, 其进一步鉴定为可以抑制麻疹病毒的病毒性感染。特别感兴趣的此类肽包括表 19 的肽和 SEQ ID NO:74 至 SEQ ID NO:86 的肽。特别感兴趣的是下列肽:

15 HRIDLGPPISLERLDVGNTNLGNIAIAKLEAKELLE (SEQ ID NO:77)

IDLGPPISLERLDVGNTNLGNIAIAKLEAKELLELESS (SEQ ID NO:79)

LGPPISLERLDVGNTNLGNIAIAKLEAKELLELESSDQ (SEQ ID NO:81)

20 PISLERLDVGNTNLGNIAIAKLEAKELLELESSDQILR (SEQ ID NO:84)

衍生自麻疹病毒的序列在美国专利 6,103,236 和 6,020,459 中利用相应 DP178 的所述搜索基元(即“DP178 样”)鉴定。SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:81 和 SEQ ID NO:83 的肽分别具有由此鉴定的氨基酸序列, 并且各自显示出抗 MeV 活性, 特别是在低于 1 μ g/ml 的浓度下抑制 MeV 感染的 Hep2 细胞和未感染的 Vero 细胞之间的融合和合胞体形成。

25 D.抗 SIV 肽

30 抗 SIV 肽是由 SIV 中相应肽序列鉴定出的 DP178 和/或 DP107 类

似物，其进一步鉴定为可以抑制 SIV 的病毒性感染。感兴趣的此类肽包括表 18 的肽和 SEQ ID NO:63 至 SEQ ID NO:73 的肽。特别感兴趣的是下列肽：

- 5 WQEWERKVDFLEENITALLEEAAIQQEKKNMYELQK (SEQ ID NO:64)
- QEWERKVDFLEENITALLEEAAIQQEKKNMYELQKL (SEQ ID NO:65)
- EWERKVDFLEENITALLEEAAIQQEKKNMYELQKLN (SEQ ID NO:66)
- 10 WERKVDFLEENITALLEEAAIQQEKKNMYELQKLNS (SEQ ID NO:67)
- ERKVDFLEENITALLEEAAIQQEKKNMYELQKLNSW (SEQ ID NO:68)
- RKVDFLEENITALLEEAAIQQEKKNMYELQKLNSWD (SEQ ID NO:69)
- 15 KVDFLEENITALLEEAAIQQEKKNMYELQKLNSWDV (SEQ ID NO:70)
- VDFLEENITALLEEAAIQQEKKNMYELQKLNSWDVF (SEQ ID NO:71)
- 20 DFLEENITALLEEAAIQQEKKNMYELQKLNSWDVFG (SEQ ID NO:72)
- FLEENITALLEEAAIQQEKKNMYELQKLNSWDVFGN (SEQ ID NO:73)

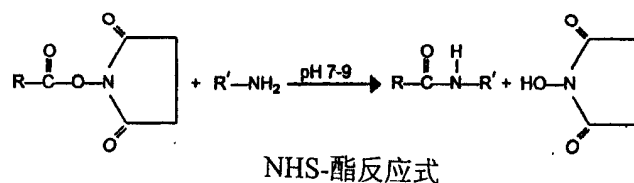
- 25 衍生自 SIV 跨膜融合蛋白的序列在美国专利 6,103,236 和 6,020,459 中利用相应 DP178 的所述搜索序列(即“DP178 样”)鉴定。SEQ ID NO:64 至 SEQ ID NO:73 的肽分别具有由此鉴定的氨基酸序列，并且各自作为粗品肽显示出有效的抗 SIV 活性。

30 4. 抗病毒和抗融合肽的修饰

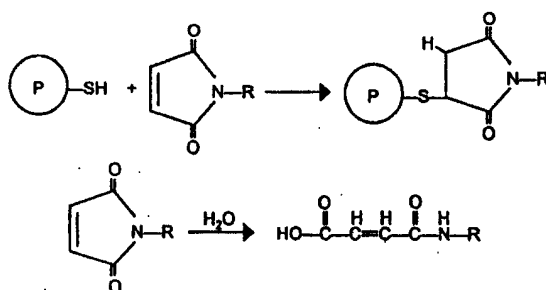
本发明涉及具有抗病毒和/或抗融合活性的肽的修饰,包括 DP-107 和 DP-178 及其类似物的这种修饰。所述的经修饰的肽可以与血液组分上的可利用反应性官能度经共价键反应。本发明还涉及所述的修饰、与血液组分的结合及其应用方法。这些方法包括与给患者施用未偶联肽相比延长偶联抗病毒肽衍生物的有效治疗寿命。所述的经修饰的肽是设计成为 DAC(药物亲和复合物)类型的肽,其含有抗病毒肽分子和连接基团以及能够与流动的血液蛋白的反应性官能度反应的反应性基团。通过与血液组分或蛋白反应,所述的经修饰的肽或 DAC 可以经血液传递至适当的位点或受体。

为了与蛋白上的官能度形成共价键,人们可以利用多种活性羧基、特别是酯作为反应性基团,其中羟基在经修饰的肽所需要的水平为生理可接受的。当这些反应性基团中采用多种不同的羟基时,最常见的将是 N-羟基琥珀酰亚胺或(NHS)、N-羟基-磺基琥珀酰亚胺(磺基-NHS)。在本发明的优选实施方式中,蛋白质上的官能度是巯基且反应性基团是含马来酰亚胺基的基团,例如 γ -马来酰亚胺-丁酰胺(butylamide)(GMBA)和马来酰亚胺基(maleimido)丙酸(MPA)。

伯胺是 NHS 酯的主要靶向。蛋白质的 N 末端上存在的可用 α -氨基与 NHS 酯反应。然而,蛋白质上的 α -氨基也可以不是 NHS 偶联所需要的或可利用的。当 5 个氨基酸在其侧链中含氮时,只有赖氨酸的 ϵ -胺明显地与 NHS 酯反应。当 NHS 酯与伯胺的偶联反应释放 N-羟基琥珀酰亚胺时会形成酰胺键,如下反应式所示。



在本发明的优选实施方式中, 这种蛋白上的官能团应是巯基且化学上的反应性基团应是含马来酰亚胺基的基团, 如 MPA 和 GMBA(γ -马来酰亚胺-丁酰胺)。当反应混合物的 pH 维持在 6.5 至 7.4 之间时马来酰亚胺基首选肽上的巯基。在 pH 7.0 下, 马来酰亚胺基与巯基的反应的速率比与胺反应的速率快 1000 倍。马来酰亚胺基和巯基之间形成稳定的硫醚键, 该硫醚键在生理条件下不能断裂, 如下反应式所示。



马来酰亚胺反应式

10 A.特异性标记

更可取地, 本发明的经修饰的肽被设计为特异性地与流动血液蛋白质上的巯基反应。此类反应适宜通过用马来酰亚胺键(例如, 由 GMBS、MPA 或其它马来酰亚胺)修饰的肽与流动血液蛋白(如血清白蛋白或 IgG)上的巯基之间的共价键来建立。

15

在某些环境下, 采用马来酰亚胺的特异性标记提供了比用基团如 NHS 和磺基-NHS 的流动蛋白的非特异性标记若干种更好的优越性。巯基在体内不如氨基酸丰富。所以, 本发明的马来酰亚胺修饰的肽(即马来酰亚胺肽)应该与较少的蛋白共价键合。譬如, 在白蛋白(最丰富的血液蛋白)中只存在一个巯基。因此, 肽-马来酰亚胺-白蛋白偶联物将倾向于含有摩尔比约 1:1 的肽和白蛋白。除白蛋白以外, IgG 分子(II 型)也具有游离巯基。由于 IgG 分子和血清白蛋白构成了血液中可溶性

20

蛋白的绝大多数，因而它们也构成血液中多数的能够与马来酰亚胺修饰的肽共价结合的游离巯基。

此外，在含游离巯基的血液蛋白(包括 IgG 类)中，用马来酰亚胺特异性标记导致肽-马来酰亚胺-白蛋白偶联物的优先形成，这归因于白蛋白自身的独特特性。在多种物质中高度保守的白蛋白的唯一游离巯基位于氨基酸残基 34(Cys³⁴)上。目前业已证实，白蛋白的 Cys³⁴ 比位于其他含游离巯基的蛋白质上的游离巯基具有更高的反应性。这部分归因于白蛋白 Cys³⁴ 具有非常低的 pK 值 5.5。该值比普通半胱氨酸残基的典型 pK 值低很多，所述的典型 pK 值一般为约 8。由于这种低 pK，在正常的生理条件下白蛋白的 Cys³⁴ 主要呈电离形式，这极大提高了其反应性。除了低的 Cys³⁴pK 值以外，另一个提高 Cys³⁴ 的反应性的因素是其位置，它位于接近于白蛋白 V 区的一个环状结构的表面的裂隙内。这样的位置使 Cys³⁴ 非常容易被所有种类的配体利用，并且在 Cys³⁴ 作为游离基捕获物和游离巯基清除剂的生物作用中是一个非常重要的因素。这些特性令 Cys³⁴ 非常容易和马来酰亚胺-肽反应，并且反应速率的加快可以是马来酰亚胺-肽与其他含游离巯基蛋白的反应速率的 1000 倍。

肽-马来酰亚胺-白蛋白偶联物的另一优越性是重现性，这种重现性与在 Cys³⁴ 处特定的 1:1 的肽负载到白蛋白上有关。其他技术如戊二醛、DCC、EDC 和其他化学活化(如游离胺)缺乏这样的选择性。譬如，白蛋白含有 52 个赖氨酸残基，其中的 25-30 个位于白蛋白的表面并因此被偶联反应利用。活化这些赖氨酸残基，或者另外对肽修饰以通过这些赖氨酸残基偶联，得到异源偶联物群体。即使采用 1:1 摩尔比的肽和白蛋白，产物将由多种偶联产物组成，一些含有 0、1、2 或更多肽/个白蛋白，并且各自具有随机在 25-30 个可利用赖氨酸位点的任意一个或多个位点上偶联的肽。由于可能存在多种组合形式，所以精确组合物和各偶联批次性质的特性记述变得困难，并且批次和批次之间的重现性几乎是不可能的，致使此类偶联物无法成为所期望的治疗

剂。此外，虽然通过白蛋白的赖氨酸残基的偶联似乎应该至少具备每个白蛋白分子传递更多治疗剂的优点，但研究显示 1:1 的治疗剂和白蛋白比例更加可取。在 Stehle 等的“负载率决定甲氨蝶呤-白蛋白偶联物在大鼠中的肿瘤靶向特性” *Anti-Cancer Drugs*, Vol. 8, pp. 677-685(1997)(该文献在此引入作为参考)中，作者报导抗癌氨甲蝶呤和经戊二醛偶联的白蛋白的 1:1 比例产生最有希望的结果。这些偶联物优先被肿瘤细胞吸收，而携带 5:1 至 20:1 氨甲蝶呤分子的偶联物改变了 HPLC 分布并在体内迅速被肝脏摄取。由此假定在这些较高的比例下，白蛋白的构象改变削弱了其作为治疗载体的有效性。

10

通过控制马来酰亚胺-肽的体内给药，人们也可以控制体内白蛋白和 IgG 的特异性标记。在常规的给药中，所施用马来酰亚胺-肽的 80-90%将标记白蛋白而不到 5%标记 IgG。也可以出现游离巯基如谷胱甘肽的痕量标记。此类特异性标记适合于体内应用，它能够精确计算所给药物的理论半衰期。

15

除了提供受控的体内特异性标记以外，马来酰亚胺-肽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马来酰亚胺-肽加入血液、血清或含有血清白蛋白和/或 IgG 的盐水溶液中。一旦出现与马来酰亚胺-肽离体偶联，可以将血液、血清或盐水溶液再次给予到患者血液中用于体内治疗。

20

与 NHS-肽对照，马来酰亚胺-肽在水溶液和游离胺的存在下一般相当稳定。由于马来酰亚胺-肽只与游离巯基反应，通常不需要用保护基来防止马来酰亚胺-肽发生自身反应。此外，经修饰的肽的增强了的稳定性允许应用进一步的纯化步骤，例如利用 HPLC 制备非常纯的适合体内使用的产物。最后，增强了的化学稳定性为产物提供了更长的半衰期。

25

30 B.非特异性标记

本发明的抗病毒肽也可以被修饰用于血液组分的非特异性标记。对于非特异性标记，也采用与氨基键合，尤其是形成酰胺键。为了形成这种键，可以采用多种活性羧基、特别是酯作为化学反应性基团，其中羟基部分在所需水平下为生理上可接受的。虽然这些连接剂中可以采用多种不同的羟基，但最常用的是 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和 N-羟基-磺基琥珀酰亚胺(磺基-NHS)。

其他可利用的连接剂公开在 U.S.专利 5,612,034 中，其在此引入作为参考。

经修饰的肽的化学反应性基团可以与其在体内反应的不同位点包括：细胞，特别是血液红细胞(红细胞)和血小板；和蛋白质，例如免疫球蛋白，包括 IgG 和 IgM、血清白蛋白、铁蛋白、甾类结合蛋白、转铁蛋白、甲状腺素结合蛋白、 α -2-巨球蛋白等。那些与经修饰的肽反应且无法长时间存活的受体一般在约 3 天内从人体宿主中消除。基于在血液中的浓度，上述蛋白质(包括细胞的蛋白)在血流中至少保留 3 天，并且可以特别保留 5 天或更长时间(一般不超过 60 天，更常见不超过 30 天)作为半衰期。

首先，反应是与血液中的流动组分进行，特别是血液蛋白和细胞，更加特别是血液蛋白和红细胞。所谓“流动”是指在任何长时间内没有固定位点，一般不超过 5 分钟，更常为 1 分钟，虽然一些血液组分可能在长时间内相对静止。最初，应存在相对异源的官能化蛋白和细胞群体。然而，在多数情况中，上述群体在数天内将从起始群体发生实质性变化，这取决于官能化蛋白在血流中的半衰期。所以，通常是在约 3 天或更长时间内，IgG 将变为血流中的主要官能化蛋白。

通常，在给药后 5 天，IgG、血清白蛋白和红细胞在血液中是血液偶联组分的至少约 60mole%、通常至少约 75mole%，并且 IgG、IgM(基本在非常低的范围)和血清白蛋白是非细胞偶联组分的至少约

50mole%、通常至少约 75mole%、更常常是至少约 80mole%。

5 通过给患者施用经修饰的肽可以在体内制得预期的非特异经修饰的肽与和血液组分的偶联物，该患者可以是人体或其他哺乳动物。给药可以采取快速浓注或通过输注长时间缓慢引入的形式、利用计量流量等进行。

10 如果希望，也可以通过把血液和本发明的经修饰的肽混合来离体制备目标偶联物，使经修饰的肽和血液组分上的反应性官能度共价键合，随后把偶联血液返回或施用给宿主。此外，上述制备也通过首先纯化各血液组分或有限数量的组分如红细胞、免疫球蛋白、血清白蛋白等来实现，并且把这些离体组分与化学反应性经修饰的肽结合。随后把官能化血液或血液组分返回给宿主，在体内提供目标治疗有效的偶联物。在离体操作中也可以对血液进行处理防止其凝集。

15

5. 经修饰的抗病毒和抗融合肽的合成

A. 肽合成

20 本发明的抗病毒和/或抗融合肽可以通过所属领域普通技术人员熟知的固相肽化学的标准方法合成。譬如，肽可以通过固相化学技术按照下面由 Steward 和 Young(Steward, J. M.和 Young, J. D., 《固相肽合成》(Solid Phase Peptide Synthesis)第 2 版, Pierce Chemical Company, Rockford, III.,(1984))所述方法、利用 Applied Biosystem 合成仪制备。同样地，可以合成多个肽片段，随后连接在一起形成更大的肽片段。这些合成肽片段也在特定位置进行氨基酸替换。

25

对于固相肽合成，有关多种技术的概述可以参见 J. M. Stewart 和 J. D. Young, 《固相肽合成》，W. H. Freeman Co.(San Francisco), 1963 和 J.Meienhofer, 《激素蛋白和肽》(Hormonal Proteins and Peptide) vol 2, p. 46, Academic Press(New York), 1973。经典的溶液合成法可参见 G. Schroder 和 K. Lupke, 《肽》(The Peptides), Vol. 1, Academic

30

Press(New York)。一般地, 这些方法包括一种或多种氨基酸或适当保护的氨基酸的顺序加入使肽链延长。通常情况下, 第一个氨基酸的氨基或羧基被适宜的保护基保护。随后, 该保护或衍生化的氨基酸连接在惰性固相载体上或在溶液中通过加入下一个在序列中具有互补(氨基或羧基)基团的适当保护的氨基酸且在适合形成酰胺键的条件下利用。随后从新加入的氨基酸残基上除去保护基并且加入下一个氨基酸(适当保护的), 并且如此继续。

当全部预期的氨基酸已经以适当的序列连接后, 依次或同时脱除任何残留的保护基(和任何固相载体), 得到最终的多肽。通过对这种通用方法的简单改进, 可以一次性地向延长中的链上添加一个以上的氨基酸, 譬如, 通过偶联(在不外消旋化手性中心的条件下)保护的三肽和适当保护的二肽, 在脱保护后形成五肽。

特别优选的制备本发明化合物的方法包括固相肽合成法, 其中用酸或碱敏感基团保护氨基酸的 α -N-末端。这样的保护基应该具有对肽键形成的条件稳定的特性, 同时易于脱除但不会破坏延长的肽链或不会使其中所含的任何手性中心外消旋化。适用的保护基是: 9-苄基甲氧基羰基(Fmoc)、叔丁氧基羰基(Boc)、苄氧基羰基(Cbz)、联苯基异丙氧基羰基、叔戊氧基羰基、异冰片基氧基羰基、 α,α -二甲基-3,5-二甲氧基苄氧基羰基、邻硝基苯基亚磺酰基、2-氰基-叔丁氧基羰基等。9-苄基-甲氧基羰基(Fmoc)保护基特别适合本发明的肽的合成。其他优选的侧链保护基是: 对于侧链氨基如赖氨酸和精氨酸来说, 是 2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基(pmc)、硝基、对甲苯磺酰基、4-甲氧基苯磺酰基、Cbz、Boc 和金刚烷基氧基羰基; 对于酪氨酸来说, 苄基、邻溴苄氧基羰基、2,6-二氯苄基、异丙基、叔丁基(t-Bu)、环己基、环戊基和乙酰基(Ac); 对于丝氨酸, 叔丁基、苄基和四氢吡喃基; 对于组氨酸, 三苯甲基、苄基、Cbz、对甲苯磺酰基和 2,4-二硝基苯基; 对于色氨酸, 甲酰基; 对于天门冬氨酸和谷氨酸, 苄基和叔丁基; 和对于半胱氨酸, 三苯基甲基(三苯甲基)。

在固相肽合成法中， α -C-末端氨基酸连接在适当的固相载体或树脂上。上述合成适用的固相载体是那些对逐级缩合-脱保护反应的试剂和条件呈惰性且在所用介质内不溶解的物质。C-末端羧基肽的合成所
5 优选的固相载体是 4-羟基甲基苯氧基甲基-共聚(苯乙烯-1%二乙烯基苯)。 α -C-末端酰胺肽的优选固相载体是 Applied Biosystems(Foster City, Calif.)出售的 4-(2',4'-二甲氧基苯基-Fmoc-氨基甲基)苯氧基乙酰胺基乙基树脂。在可有可无的 4-二甲基氨基吡啶(DMAP)、1-羟基苯并三唑(HOBT)、苯并三唑-1-基氧基-三(二甲基氨基)磷六氟磷酸盐(BOP)或双
10 (2-氧代-3-咪唑烷基)氯化磷(BOPCl)下， α -C-末端氨基酸与树脂在 N,N' -二环己基碳二亚胺(DCC)、 N,N' -二异丙基碳二亚胺(DIC)或 O-苯并三唑-1-基- N,N,N',N' -四甲基脲-六氟磷酸盐(HBTU)介导下在 10 至 50°C 的温度内、于溶剂(如二氯甲烷或 DMF)中偶联约 1 至约 24 小时。

15 当固相载体是 4-(2',4'-二甲氧基苯基-Fmoc-氨基甲基)苯氧基-乙酰胺基乙基树脂时，在与上述 α -C-末端氨基酸偶联之前，Fmoc 基用仲胺、优选哌啶裂解。与脱保护的 4-(2',4'-二甲氧基苯基-Fmoc-氨基甲基)苯氧基-乙酰胺基乙基树脂偶联的优选方法是在 DMF 中利用 O-苯并三唑-1-基- N,N,N',N' -四甲基脲六氟-磷酸(HBTU, 1 当量)和 1-羟基苯并三唑(HOBT, 1 当量)。成功保护的氨基酸的偶联可以在所属领域熟知的自动多肽合成仪中进行。在一个优选实施方式中，用 Fmoc 保护生长肽链的 α -N-末端氨基酸。通过用仲胺、优选哌啶处理可以脱去生长肽链的 α -N-末端侧的 Fmoc 保护基。随后将各种保护的氨基酸以约 3 倍
20 摩尔过量引入，偶联反应适宜在 DMF 中进行。偶联剂一般是 O-苯并三唑-1-基- N,N,N',N' -四甲基脲六氟磷酸(HBTU, 1 当量)和 1-羟基苯并三唑(HOBT, 1 当量)。

在固相合成结束时，树脂上多肽的脱除和脱保护或者连续进行或者在一个操作中进行。可以在同一操作中利用裂解剂处理树脂结合的多肽来完成多肽的脱除和脱保护，裂解剂包括苯硫基甲烷、水、乙烷
30

二硫醇和三氟乙酸。在多肽的 α -C-末端为烷酰胺的情况中，树脂用烷基胺通过氨解裂解。另外，肽可以通过酯基转移，例如用甲醇，随后通过氨解或直接酰胺基转移脱除。保护的肽可以在此时纯化，或者直接进行下一步。侧链保护基的脱除是利用上述混合裂解剂进行。完全脱保护的肽通过一系列采用下列任何或全部类型的色谱步骤进行纯化：弱碱性树脂(乙酸盐型)上的离子交换；未衍生聚苯乙烯-二乙烯基苯(例如 Amberlite XAD)上的疏水吸附色谱；硅胶吸附色谱；羧甲基纤维素上的离子交换色谱；分配色谱，例如在 Sephadex G-25、LH-20 上或逆流分配；高效液体色谱(HPLC)，尤其是在辛基-或十八烷基甲硅烷基-硅胶键合相柱填充上的反相 HPLC。

这些 ITP 的分子量利用快速原子轰击(FAB)质谱法测定。

1. N-末端保护基

如上所述，术语“N-保护基”是指那些用于保护氨基酸或肽的 α -N-末端或保护氨基酸或肽的氨基在合成过程中不发生不期望反应的基团。常用的 N-保护基公开在“有机合成中的保护基”(Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, New York(1981))，其在此引入作为参考。另外，保护基可以作为前药使用，其易于在体内通过例如酶促水解裂解释放出生物活性母体。 α -N-保护基包括：低级链烷酰基(loweralkanoyl)，例如甲酰基、乙酰基("Ac")、丙酰基、新戊酰基、叔丁基乙酰基等；其他酰基，包括 2-氯乙酰基、2-溴乙酰基、三氟乙酰基、三氯乙酰基、邻苯二甲酰基、邻硝基苯氧基乙酰基、-氯丁酰基、苯甲酰基、4-氯苯甲酰基、4-溴苯甲酰基、4-硝基苯甲酰基等；磺酰基，例如苯磺酰基、对甲苯磺酰基等；氨基甲酸酯形成基团，例如苄氧基羰基、对氯苄氧基羰基、对甲氧基苄氧基羰基、对硝基苄氧基羰基、2-硝基苄氧基羰基、对溴苄氧基羰基、3,4-二甲氧基苄氧基羰基、3,5-二甲氧基苄氧基羰基、2,4-二甲氧基苄氧基羰基、4-乙氧基苄氧基羰基、2-硝基-4,5-二甲氧基苄氧基羰基、3,4,5-三甲氧基苄氧基羰基、1-(对联苯基)-1-甲基乙氧基羰基、 α,α -二甲基-3,5-二甲氧基苄氧基羰基

基、二苯甲基氧基羰基、叔丁氧基羰基(Boc)、二异丙基甲氧基羰基、异丙氧基羰基、乙氧基羰基、甲氧基羰基、烯丙氧基羰基、2,2,2-三氯乙氧基羰基、苯氧基羰基、4-硝基苯氧基羰基、苄基-9-甲氧基羰基、环戊基氧基羰基、金刚烷氧基羰基、环己基氧基羰基、苯基硫代羰基等；芳烷基，例如苄基、三苯甲基、苄氧基甲基、9-苄基甲氧基羰基(Fmoc)等；和甲硅烷基，例如三甲基甲硅烷基等。

2.羧基保护基

如上所述，术语"羧基保护基"是指在进行涉及化合物的其他官能位点的反应时用于阻隔或保护羧酸官能度的羧酸保护酯或酰胺基。羧基保护基公开在 Greene 的“有机合成中的保护基” pp. 152-186(1981)，其在此引入作为参考。此外，羧基保护基可以用作前药，由此羧基保护基可以易于在体内裂解，例如通过酶促水解，释放出生物活性母体。此类羧基保护基为所属领域技术人员熟知，它们业已广泛应用于青霉素和头孢菌素领域中的羧基保护，如 U.S.专利 3,840,556 和 3,719,667 所述，其公开内容在此引入作为参考。典型的羧基保护基是： C_1 - C_8 低级烷基(例如甲基、乙基或叔丁基等)；芳烷基，例如苄基或苄基及其取代衍生物，例如烷氧基苄基或硝基苄基等；芳基链烯基，例如苄基乙烯基等；芳基及其取代衍生物，例如 5-二氢茚基等；二烷基氨基烷基，例如二甲基氨基乙基等)；烷酰氧基烷基，例如乙酰氧基甲基、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-(丙酰氧基)-1-乙基、1-(新戊酰氧基)-1-乙基、1-甲基-1-(丙酰氧基)-1-乙基、新戊酰乙基甲基、丙酰氧基甲基等；环烷酰氧基烷基，例如环丙基羧氧基甲基、环丁基羧氧基甲基、环戊基羧氧基甲基、环己基羧氧基甲基等；芳酰氧基烷基，例如苄甲酰氧基甲基、苄甲酰氧基乙基等；芳烷基羧氧基烷基，例如苄基羧氧基甲基、2-苄基羧氧基乙基等；烷氧基羧基烷基或环烷氧基羧基烷基，例如甲氧基羧基甲基、环己氧基羧基甲基、1-甲氧基羧基-1-乙基等；烷氧基羧氧基烷基或环烷氧基羧氧基烷基，例如甲氧基羧氧基甲基、叔丁氧基羧氧基甲基、1-乙氧基羧氧基-1-乙基、1-环己氧基羧氧基-1-乙基等；芳氧基羧氧基烷基，

例如 2-(苯氧基羰氧基)乙基、2-(5-二氢茚基氧基羰氧基)乙基等；烷氧基烷基羰氧基烷基，例如 2-(1-甲氧基-2-甲基丙-2-酰氧基)乙基等；芳烷氧基羰氧基烷基，例如 2-(苄氧基羰基氧基)乙基等；芳基链烯基氧基羰氧基烷基，例如 2-(3-苯基丙烯-2-基氧基羰氧基)乙基等；烷氧基羰基氨基烷基，例如叔丁氧基羰基氨基甲基等；烷基氨基羰基氨基烷基，例如甲基氨基羰基氨基甲基等；烷酰基氨基烷基，例如乙酰基氨基甲基等；杂环羰氧基烷基，例如 4-甲基哌嗪基羰氧基甲基等；二烷基氨基羰基烷基，例如二甲基氨基羰基甲基、二乙基氨基羰基甲基等；(5-(低级烷基)-2-氧代-1,3-二氧杂环戊烯-4-基)烷基，例如(5-叔丁基-2-氧代-1,3-二氧杂环戊烯-4-基)甲基等；和(5-苯基-2-氧代-1,3-二氧杂环戊烯-4-基)烷基，例如(5-苯基-2-氧代-1,3-二氧杂环戊烯-4-基)甲基等。

代表性的酰胺羧基保护基是氨基羰基和低级烷基氨基羰基。

优选的本发明羧基保护化合物是其中保护的羧基是低级烷基、环烷基或芳烷基酯，譬如甲酯、乙酯、丙酯、异丙酯、丁酯、仲丁酯、异丁酯、戊酯、异戊酯、辛酯、环己酯、苯乙酯等；或烷酰氧基烷基、环烷酰氧基烷基、芳酰氧基烷基或芳烷基羰氧基烷基酯的化合物。优选的酰胺羧基保护基是低级烷基氨基羰基。譬如，天门冬氨酸可以在 α -C-末端用酸不稳定基团(例如叔丁基)保护并在 β -C-末端用氢化敏感基团(例如苄基)保护，随后在合成过程中选择性地脱保护。

B. 肽的修饰

本发明制备经修饰的肽的方式可以根据含肽在内的不同因素的本质进行多种变化。合成方法的选择应简便，提供高收率并且能够得到高纯度的产物。通常，化学反应性基团应在合成的最后阶段产生，譬如，对于羧基，酯化生成活性酯。本发明制备经修饰的肽的具体方法如下所述。

特别是，首先测定所选择肽的抗病毒活性，随后仅在肽的 N 端、

C 端或内部用连接基团修饰。随后测定这种经修饰的肽-连接基团的抗病毒活性。如果抗病毒活性没有急剧降低(即降低小于 10 倍), 则利用其体内寿命测定该经修饰的肽-连接体的稳定性。如果稳定性没有改进达到预期的水平, 则在另一位点修饰该肽, 重复该过程直至获得预期的抗病毒水平和稳定性。

更具体地说, 选择经受连接体和反应实体基团修饰的各肽应按照下列标准修饰: 如果肽上的末端羧基可以利用且对抗病毒活性的保持没有决定性作用, 同时肽上不存在其他敏感官能团, 则选择该羧基作为连接体-反应基团修饰的连接点。如果末端羧基参与抗病毒活性, 或如果没有羧基可以利用, 则选择任何其他对保持抗病毒活性没有实质影响的敏感官能团作为连接体-反应实体修饰的连接点。如果在肽上存在若干个可利用的敏感官能团, 保护基的联合形式应以一定方式应用, 以使连接体/反应实体的加入和所有被保护敏感官能团的脱保护后, 仍然能够保持抗病毒活性。如果肽上没有敏感官能团可利用, 或者希望进行更简单的修饰途径, 对于起始肽的修饰的合成实践应以能够维持抗病毒活性的方式进行。在这种情况下, 修饰发生在肽的相反末端。

NHS 衍生物可以由羧酸在肽中不存在其他敏感官能团的条件下合成。具体而言, 这种肽在无水 CH_2Cl_2 和 EDC 中与 N-羟基琥珀酰亚胺反应, 产物通过层析或重结晶从适当的溶剂体系纯化得到 NHS 衍生物。

另外, NHS 衍生物可以从含有氨基和/或巯基和羧酸的肽合成。当分子中存在游离氨基或巯基时, 优选在加入 NHS 衍生物之前将这些敏感官能团保护起来。譬如, 如果分子含有游离氨基, 有必要在实施上述化学之前使胺转化为 Fmoc 或优选转化为 tBoc 保护的胺。胺官能度不是在 NHS 衍生物的制备之后脱保护。所以, 这种方法只适用于那些不必释放其氨基产生预期抗病毒效应的化合物。如果需要释放

氨基保持分子的原有特性，则不得不进行下面另一种化学。

此外，NHS 衍生物可以从含有氨基或巯基但无羧酸的肽合成。当选择的分子不含有羧酸时，可以利用一组双官能连接体使分子转化为反应性 NHS 衍生物。譬如，将乙二醇-双(琥珀酰亚胺基琥珀酸酯)(EGS)和三乙胺溶于 DMF 中，向其中加入含游离氨基的分子(与 EGS 的比例适宜为 10:1)，产生单 NHS 衍生物。为了从巯基衍生分子制备 NHS 衍生物，可以利用存在于 DMF 中的 N-[-马来酰亚胺基丁酰氧基]琥珀酰亚胺酯(GMBS)和三乙胺。马来酰亚胺基与游离巯基反应，利用在硅胶上层析或通过 HPLC 可以从反应混合物纯化 NHS 衍生物。

NHS 衍生物也可以从含有多个敏感官能团的肽合成。各种情况已经过分析且以不同的方式解决。然而，借助于大量市售的保护基和双官能连接体，本发明可以应用于任何肽，优选通过一个化学步骤来修饰所述肽(如上所述)，或两个步骤(如上所述包括敏感基团的在先保护)或三个步骤(保护、活化和脱保护)。只有在例外的情形中，需要利用多步(超过三个步骤)的合成把肽转化为活性 NHS 或马来酰亚胺衍生物。

马来酰亚胺衍生物也可以由含有游离氨基和游离羧酸的肽合成。为了从氨基衍生化分子制备马来酰亚胺衍生物，可以利用存在于 DMF 中的 N-[-马来酰亚胺基丁酰氧基]琥珀酰亚胺酯(GMBS)和三乙胺。琥珀酰亚胺酯基与游离氨基反应，并且通过结晶或在硅胶上层析或 HPLC 可以从反应混合物中纯化马来酰亚胺衍生物。

最后，马来酰亚胺衍生物可以从含有多个其他敏感官能团且无游离羧酸的肽合成。当选择不含有羧酸的分子时，可以利用一组双官能交联剂把该分子转化为反应性 NHS 衍生物。譬如，通过游离胺和 MPA 的羧基的反应、利用 HBTU/HOBt/DIEA 活化，在 DMF 中马来酰亚胺基丙酸(MPA)可以和游离胺偶联生成马来酰亚胺衍生物。

许多市售的其他杂双官能交联剂可以在必要时作为替代。大量双官能化合物可以用来连接实体。试剂的实例包括：叠氮基苯甲酰肼、N-[4-(对叠氮基水杨基氨基)丁基]-3'-[2'-吡啶基二硫代)丙酰胺)、双磺基琥珀酰亚胺基辛二酸盐、二甲基己二酰亚胺酯、二琥珀酰亚胺基酒石酸酯、N-γ-马来酰亚胺基丁酰氧基琥珀酰亚胺酯、N-羟基磺基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基苯甲酸酯、N-琥珀酰亚胺基[4-叠氮基苯基]-1,3'-二硫代丙酸酯、N-琥珀酰亚胺基[4-碘代乙酰基]氨基苯甲酸酯、戊二醛和琥珀酰亚胺基 4-[N-马来酰亚胺基甲基]环己烷-1-甲酸酯。

6. 经修饰的抗病毒肽的应用

本发明的经修饰抗病毒肽可以在患有病毒感染的患者的治疗中用作治疗剂，并且可以按照下面所述的方法和所属领域其它已知方法对患者给药。经修饰的肽的有效治疗剂量可以通过所属领域技术人员熟知的方法测定并且应考虑肽的潜在毒性。

经修饰的肽也可以预防性给予在先未感染个体。这有益于那些接触病毒的危险性高的个体情况，这可能出现在与那些携带高危病毒传染的已感染个体相接触的个体中。这尤其有利于那些已知的病毒(如 HIV 病毒)的治疗。例如，经修饰的抗 HIV 肽的预防性给药将有益于那些已经接触了 HIV 感染个体血液的保健工作者的情况，或在其它从事可能接触 HIV 病毒的高危活动的个体情况。

7. 经修饰的抗病毒和抗融合肽的给药

通常，经修饰的肽在给药时应存在于生理可接受的介质中，例如去离子水、磷酸盐缓冲盐水(PBS)、盐水、含水乙醇或其它醇、血浆、蛋白性溶液、甘露糖醇、葡萄糖水、醇、植物油等。其它可以含有的添加剂包括：缓冲剂，其中介质一般被缓冲在约 5 至 10 的 pH 范围内，而缓冲剂的浓度一般约为 50 至 250mM；盐，其中盐的浓度通常约为 5 至 500mM；生理可接受稳定剂等。组合物可以被冷冻干燥以便常规

储存和运输。

5 经修饰的肽多数是经非肠道给药如血管内(IV)、动脉内(IA)、肌肉内(IM)、皮下(SC)等。在适当情况中可以通过输液给药。在某些场合中，当官能团的反应相对缓慢时，可以通过口服、经鼻、直肠、透皮或气溶胶给药，由此偶联物的特性允许传递到血管系统。通常应采用单剂量注射，虽然如果需要时可以采用注射一次以上。经修饰的肽可以利用任何工具给药，包括注射器、套管针、插管等。

10 具体的给药方式应根据给药量、是否单剂量快速浓注或是连续给药等而改变。更加可取地，应血管内给药，引入的位点对于本发明而言并不重要，优选的位点是血流迅速的位置，例如静脉内，外周或中枢静脉。发现也可以利用其它途径，其中给药与缓释技术或保护性基质相结合。这样做的意图在于，使经修饰的肽有效分布在血液中，由此能够与血液组分反应。偶联物的浓度将变化多端，通常约为 1pg/ml
15 至 50mg/ml。血管内给药的总量一般应在约 0.1mg/ml 至约 10mg/ml、更常为约 1mg/ml 至约 5mg/ml 的范围内。

20 通过与长寿命血液组分如免疫球蛋白、血清白蛋白、红细胞和血小板结合，产生了多个优越性。所述肽的活性被延长到数天至数周。在这段时间内只需要给药一次。可以获得更高的特异性，因为活性化合物主要与大分子键合，由此似乎很少被吸收到细胞内干扰其它生理过程。

25 8. 监测经修饰的肽的存在

为了监测经修饰的肽的存在可以监测哺乳动物宿主的血液一次或多次。通过采集一部分或宿主血液的样本，可以测定出是否已经有足够量的肽与长寿命血液组分键合转变为具有治疗活性，而且随后可以测定血液中肽化合物的水平。如果希望，还可以测定肽究竟与何种血液组分键合。这在采用非特异性经修饰的肽时非常重要。对于特异性
30

马来酰亚胺-修饰的肽，计算血清白蛋白和 IgG 的半衰期会更加简单。

A. 免疫测定

5 本发明的另一方面涉及测定抗病毒肽和/或类似物或其衍生物和偶联物在生物样本(例如血液)中的浓度的方法，该方法利用了对所述的肽、肽类似物或其衍生物和偶联物特异性的抗体；并且涉及此类抗体在与所述的肽、类似物和/或其衍生物或偶联物可能有关的毒性的治疗中的应用。这是有益的，因为所述肽提高了的体内稳定性和寿命可能在治疗中导致新的问题，包括中毒可能性的增加。

10

对特定肽、肽类似物或其衍生物具有特异性的单克隆或多克隆的抗治疗剂抗体的应用可以有助于解决此类问题。抗体可以产生或衍生自用特定肽、类似物或其衍生物免疫的宿主，或用试剂的免疫原性片段或用试剂的免疫决定簇相应的合成免疫原免疫的宿主。优选的抗体15 应对天然的、经修饰和偶联形式的肽具有高度的特异性和亲和力。此类抗体也可以用酶、荧光染料或放射性标记物进行标记。

用纯化的肽可以制备对经修饰的肽具有特异性的抗体，从而诱导肽特异性抗体。通过抗体的诱导，不但经过给动物注射后可以刺激免疫反应，而且在合成抗体或其它特异性结合分子的制备中也以进行类似步骤，例如筛选重组免疫球蛋白文库。单克隆和多克隆抗体都可以20 通过所属领域熟知的方法制备。

还可以利用抗肽抗体来治疗由经修饰的肽、其类似物或衍生物给药引起的中毒，并且可以离体或体内使用。离体方法包括利用固定在固相载体上的抗治疗剂抗体对中毒进行免疫透析治疗。体内方法包括25 以有效引发抗体-治疗剂复合物的清除的量施用抗治疗剂抗体。

通过在灭菌条件下令血液与抗体接触，用抗体可以除去患者离体血液中的经修饰的肽或其类似物或偶联物。譬如，抗体可以固定在柱30

基质上，患者血液从患者取出并且经过该基质。经修饰的肽、肽类似物、衍生物或偶联物将与该抗体结合，含有低浓度的肽、类似物、衍生物或偶联物的血液可以返回到患者循环系统中。通过调节压力和流量可以控制肽化合物的除去量。

5

所述的肽、类似物、衍生物和偶联物从患者血液的血浆组分中优先除去会受到影响，譬如，利用半透膜；或首先利用所属领域的已知方法将细胞组分与血浆组分分开，随后令血浆组分流经含有抗治疗剂抗体的基质。另外，肽偶联的血细胞(包括红细胞)的优先除去可以通过收集和浓缩患者血液中的血细胞并使这些细胞与固定的抗 ITP 抗体

10 接触以排除患者血液的血清组分而受到影响。

抗治疗剂抗体可以经非肠道体内施用给接受所述肽、类似物、衍生物或偶联物治疗的患者。抗体将与肽化合物和偶联物结合。一旦结合，即使不是完全阻断，肽的活性也将受到阻碍，由此降低肽化合物在患者血流中的生物有效浓度并减轻有害的副作用。此外，结合的抗体-肽复合物将有助于患者血流中肽化合物和偶联物的清除。

15

全面描述的本发明现将通过下列非限定实施例举例说明。

20

实施例 1

经修饰的 DP178 的制备--

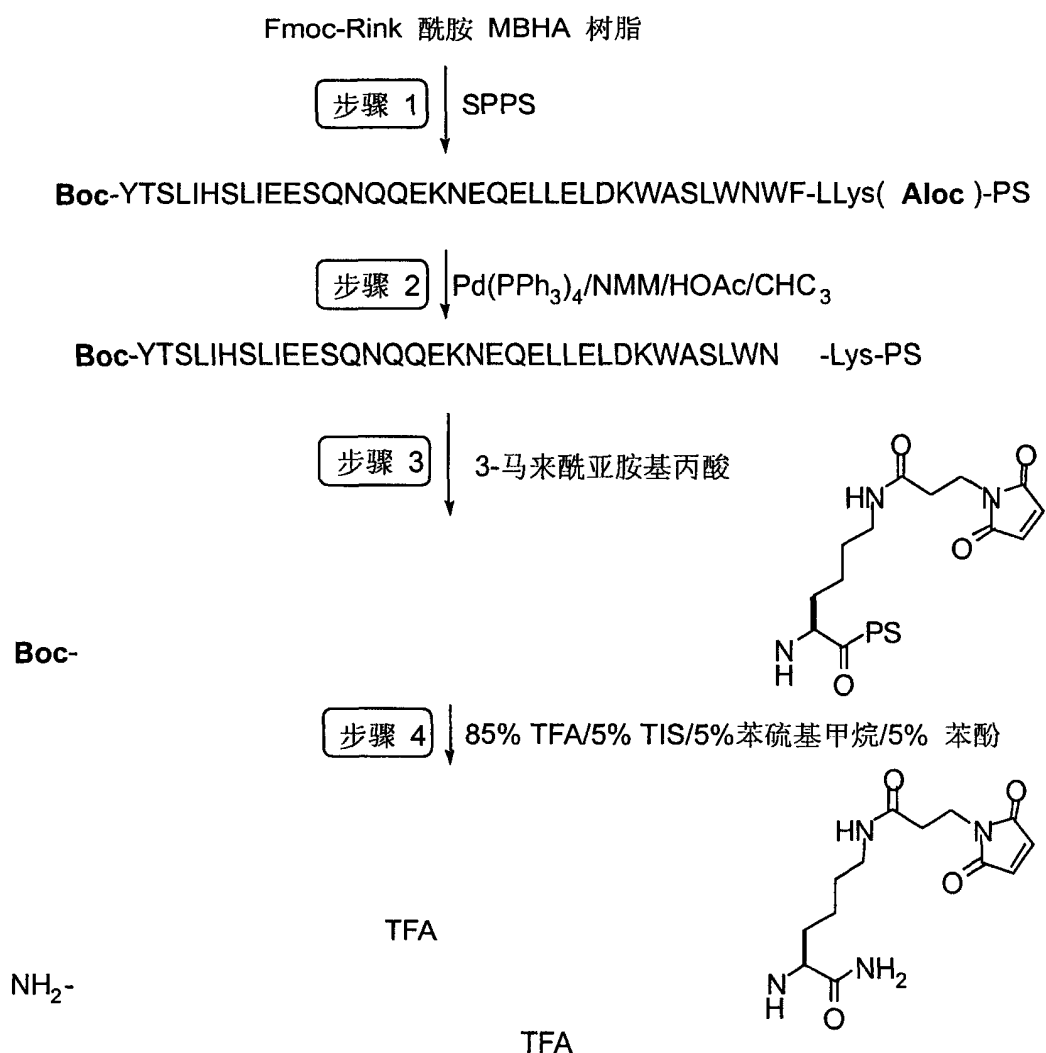
YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWFK(MPA)-NH₂ 的合成

25 在本实施例中，按照下面的合成路线合成和修饰 DP178(SEQ ID NO:1)为含有连接体和马来酰亚胺基团。如美国专利 6,013,236 和 6,020,459 所述，DP178 是 HIV-1 的有效抑制剂，并且能够抑制 HIV-1 感染和未感染细胞之间的细胞诱导的合胞体形成以及未感染细胞被无细胞 HIV-1 病毒的感染。

30

100 μ mole 规模上的经修饰的肽的固相肽合成是采用手动固相合成、协同肽合成仪(Symphony Peptide Synthesizer)和 Fmoc 保护 Rink 酰胺 MBHA 树脂进行。将下列保护的氨基酸顺序加入树脂: Fmoc-Lys(Aloc)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, 5 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-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, 10 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-Ser(tBu)-OH, Fmoc-His(Boc)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH。把它们溶于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)并且按照序列用 O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基-脲六氟磷酸盐(HBTU)和二异丙基乙胺(DIEA)活化。用存在于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中的 20%(V/V)哌啶溶液在 20 分钟内进行 Fmoc 保护基的脱除(步骤 1)。合成结束时,通过用 3 当量溶于 5mL CHCl₃:NMM:HOAc(18:1:0.5)中的 Pd(PPh₃)₄ 溶液处理树脂 2 小时 20 手动完成 Lys(Aloc)基的选择性脱保护(步骤 2)。随后树脂用 CHCl₃(6 x 5 mL)、20% 存在于 DCM 中的 HOAc(6 x 5 mL)、DCM(6 x 5 mL)和 DMF(6 x 5 mL)洗涤。此后再次自动合成以便添加 3-马来酰亚胺基丙酸(步骤 3)。每次偶联之间,树脂用 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)洗涤 3 次并用异丙醇洗涤 3 次。用 85%TFA/5%TIS/5%苯硫基甲烷和 5%苯酚从树脂脱 25 下肽,随后用干冰冷却的 Et₂O 沉淀(步骤 4)。产物通过制备反相 HPLC、使用 Varian(Rainin)的制备二元 HPLC 系统纯化:在约 180 分钟内 30-55%B(含 0.045%TFA 的 H₂O(A)和含 0.045%TFA 的 CH₃CN(B))以 9.5mL/分钟进行的梯度洗脱;使用 Phenomenex Luna 10 μ 苯基-己基 21mm x 25cm 柱和 λ 214 和 254nm 的 UV 检测仪(Varian Dynamax UVD II)得到 30 预期的经修饰的肽(即 DAC),通过 RP-HPLC 测出肽的纯度>95%。

DP-178 C



实施例 2

5 经修饰的 DP107 的制备--

NNLLRAIEAQQHLLQLTVWQIKQLQARILAVEYLKDQK(MPA)NH₂
的合成

在本实施例中，按照下面的合成路线合成和修饰 DP107(SEQ ID NO:2)为含有连接体和马来酰亚胺基团。如美国专利 6,013,236 和
10 6,020,459 所述，DP107 表现出对 HIV-1 有效的抗病毒活性。

100 μ mole 规模上的经修饰的肽的固相肽合成是采用手动固相合成、协同肽合成仪和 Fmoc 保护 Rink 酰胺 MBHA 树脂进行。将下列保护的氨基酸顺序加入树脂: Fmoc-Lys(Aloc)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-His(Boc)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH。把它们溶于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)并且按照序列用 O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基-脲六氟磷酸盐(HBTU)和二异丙基乙胺(DIEA)活化。用存在于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中的 20%(V/V)哌啶溶液在 20 分钟内进行 Fmoc 保护基的脱除(步骤 1)。通过用 3 当量溶于 5mL CHCl₃:NMM:HOAc(18:1:0.5)中的 Pd(PPh₃)₄ 溶液处理树脂 2 小时手动完成 Lys(Aloc)基的选择性脱保护(步骤 2)。随后树脂用 CHCl₃(6 x 5 mL)、20% 存在于 DCM 中的 HOAc(6 x 5 mL)、DCM(6 x 5 mL)和 DMF(6 x 5 mL)洗涤。此后再次自动合成以便添加 3-马来酰亚胺基丙酸(步骤 3)。每次偶联之间,树脂用 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)洗涤 3 次并用异丙醇洗涤 3 次。用 85%TFA/5%TIS/5%苯硫基甲烷和 5%苯酚从树脂脱下肽,随后用干冰冷却的 Et₂O 沉淀(步骤 4)。产物通过制备反相 HPLC、使用 Varian(Rainin)的制备二元 HPLC 系统纯化:在约 180 分钟内 30-55%B(含 0.045%TFA 的 H₂O(A)和含 0.045%TFA 的 CH₃CN(B))以 9.5mL/分钟进行的梯度洗脱;使用 Phenomenex Luna 10 μ 苯基-己基 21mm x 25cm 柱和 λ 214 和 254nm 的 UV 检测仪(Varian Dynamax UVD II)得到预期的经修饰的肽(即 DAC),通过 RP-HPLC 测出肽的纯度>95%。

DP-107 C

Fmoc-Rink 酰胺 MBHA 树脂

步骤 1

SPPS

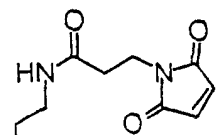
Boc-NNLLRAIEAQQHLLQLTVWQIKQLQARILAVEYLKDQ-Lys(**Aloc**)-PS

步骤 2

 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4/\text{NMM}/\text{HOAc}/\text{CHCl}_3$ **Boc**-NNLLRAIEAQQHLLQLTVWQIKQLQARILAVEYLKDQ-Lys-PS

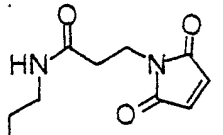
步骤 3

3-马来酰亚胺基丙酸

Boc-NNLLRAIEAQQHLLQLTVWQIKQLQARILAVEYLKDQ-NH--PS

步骤 4

85% TFA/5% TIS/5% 苯硫基甲烷/5% 苯酚

NH₂-NNLLRAIEAQQHLLQLTVWQIKQLQARILAVEYLKDQ-NH-
TFA
TFA

实施例 3

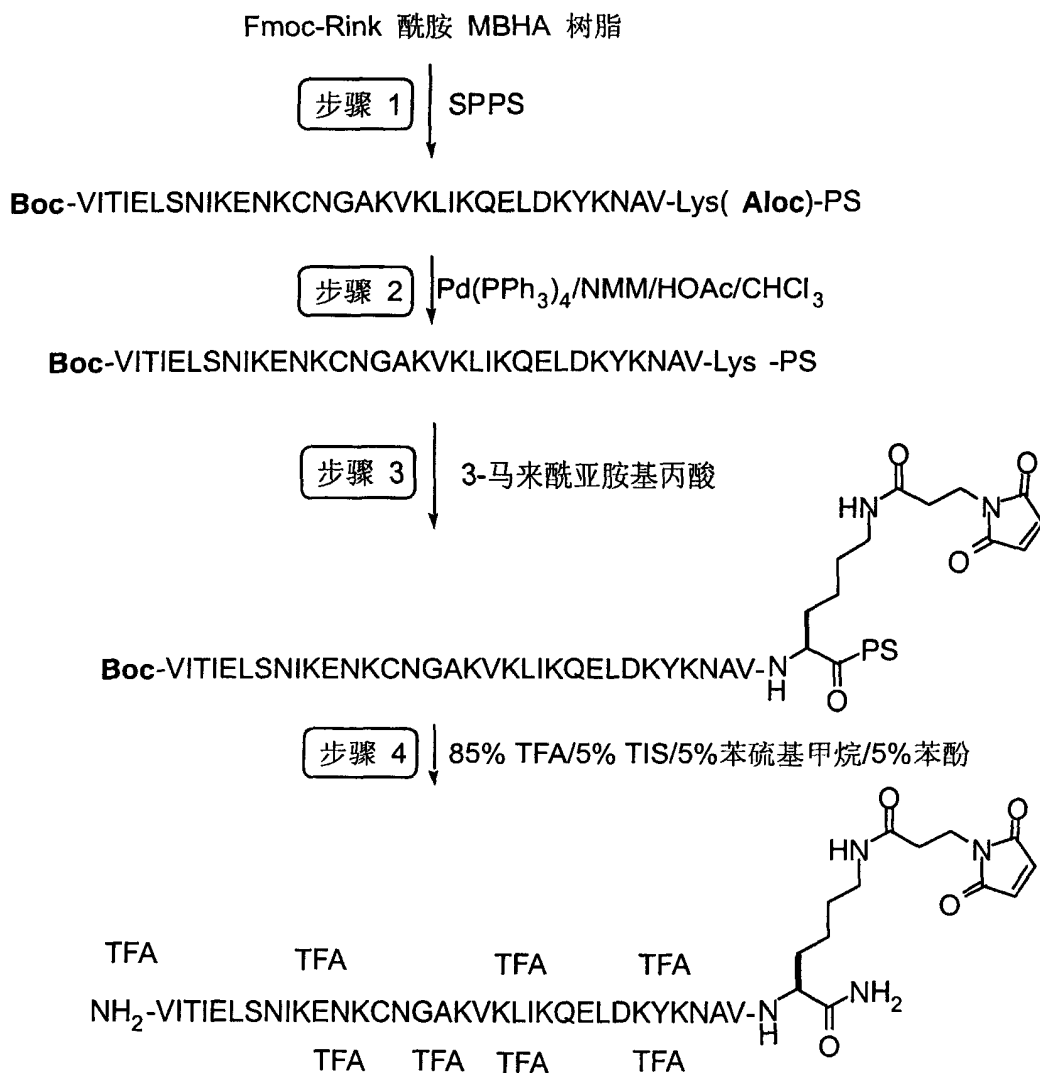
5 经修饰的抗 RSV 肽的制备(C 末端 I)

在本实施例中，按照下面的合成路线将肽

VITIELSNIKENKCNGAKVKLIKQELDKYKNAV (SEQ ID NO:16)

修饰为含有连接体和马来酰亚胺基团。如美国专利 6,013,236 和 6,020,459 所述，天然序列(SEQ ID NO)抑制呼吸道合胞病毒(RSV)的病毒性感染，包括抑制 RSV 感染和未感染 Hep-2 细胞之间的融合和合胞体形成。

100 μ mole 规模上的经修饰的肽的固相肽合成是采用手动固相合成、协同肽合成仪和 Fmoc 保护 Rink 酰胺 MBHA 树脂进行。将下列保护的氨基酸顺序加入树脂：Fmoc-Lys(Aloc)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Val-OH。把它们溶于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)并且按照序列用 O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基-脲六氟磷酸盐(HBTU)和二异丙基乙胺(DIEA)活化。用存在于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中的 20%(V/V)哌啶溶液在 20 分钟内进行 Fmoc 保护基的脱除(步骤 1)。通过用 3 当量溶于 5mL CHCl₃:NMM:HOAc(18:1:0.5)中的 Pd(PPh₃)₄ 溶液处理树脂 2 小时手动完成 Lys(Aloc)基的选择性脱保护(步骤 2)。随后树脂用 CHCl₃(6 x 5 mL)、20% 存在于 DCM 中的 HOAc(6 x 5 mL)、DCM(6 x 5 mL)和 DMF(6 x 5 mL)洗涤。此后再次自动合成以便添加 3-马来酰亚胺基丙酸(步骤 3)。每次偶联之间,树脂用 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)洗涤 3 次并用异丙醇洗涤 3 次。用 85%TFA/5%TIS/5%苯硫基甲烷和 5%苯酚从树脂脱下肽,随后用干冰冷却的 Et₂O 沉淀(步骤 4)。产物通过制备反相 HPLC、使用 Varian(Rainin)的制备二元 HPLC 系统纯化:在约 180 分钟内 30-55%B(含 0.045%TFA 的 H₂O(A)和含 0.045%TFA 的 CH₃CN(B))以 9.5mL/分钟进行的梯度洗脱;使用 Phenomenex Luna 10 μ 苯基-己基 21mm x 25cm 柱和 λ 214 和 254nm 的 UV 检测仪(Varian Dynamax UVD II)得到预期的经修饰的肽(即 DAC),通过 RP-HPLC 测出肽的纯度>95%。



实施例 4

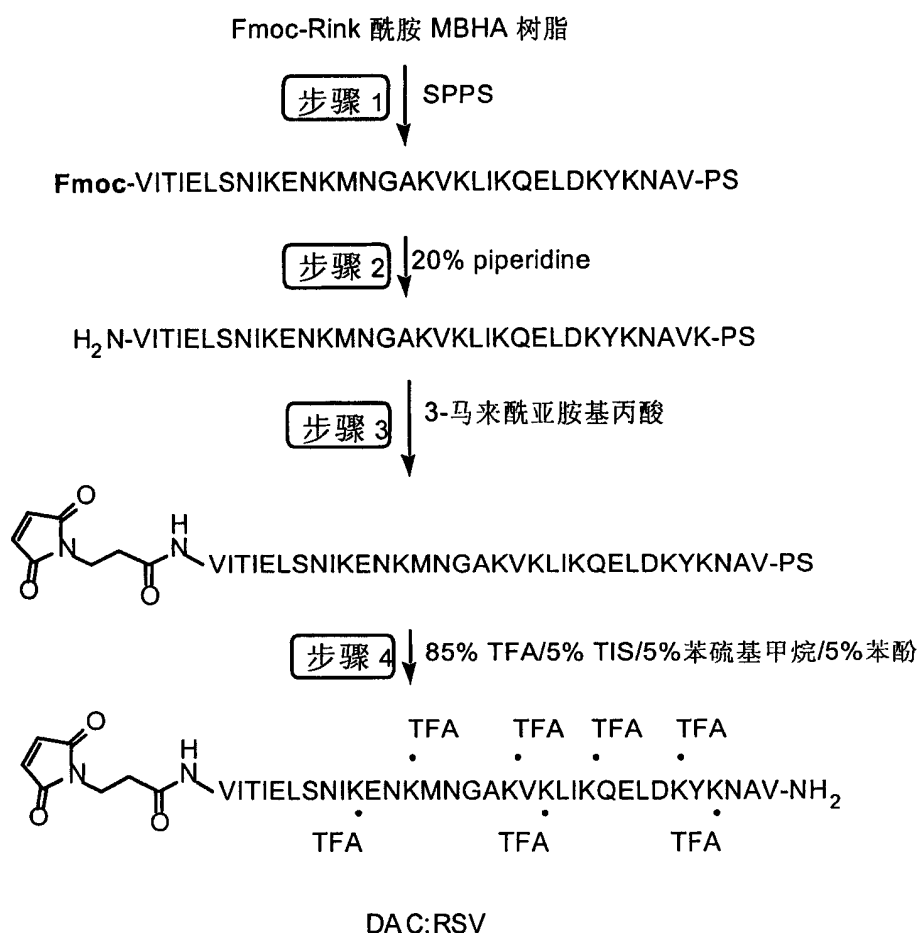
经修饰的抗 RSV 肽的制备(T-N 末端)

5 在本实施例中，按照下面的合成路线合成肽

VITIELSNIKENKCNGAKVKLIKQELDKYKNAV (SEQ ID NO:17),
 其相应于 SEQ ID NO:16 的肽但半胱氨酸(C)被蛋氨酸(M)残基替换，
 并且修饰为含有连接体和马来酰亚胺基团。如美国专利 6,013,236 和
 6,020,459 所述，天然序列(SEQ ID NO:16)抑制呼吸道合胞病毒(RSV)
 10 的病毒性感染，包括抑制 RSV 感染和未感染 Hep-2 细胞之间的融合和
 合胞体形成。

100μmole 规模上的经修饰的肽的固相肽合成是采用手动固相合

成、协同肽合成仪和 Fmoc 保护 Rink 酰胺 MBHA 树脂进行。将下列保护的氨基酸顺序加入树脂：Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Val-OH。把它们溶于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)并且按照序列用 O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基-脒六氟磷酸盐(HBTU)和二异丙基乙胺(DIEA)活化。用存在于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中的 20%(V/V)哌啶溶液在 20 分钟内进行 Fmoc 保护基的脱除(步骤 1)。此后再次自动合成以便添加 3-马来酰亚胺基丙酸(步骤 3)。每次偶联之间,树脂用 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)洗涤 3 次并用异丙醇洗涤 3 次。用 85%TFA/5%TIS/5%苯硫基甲烷和 5%苯酚从树脂脱下肽,随后用干冰冷却的 Et₂O 沉淀(步骤 4)。产物通过制备反相 HPLC、使用 Varian(Rainin)的制备二元 HPLC 系统纯化:在约 180 分钟内 30-55%B(含 0.045%TFA 的 H₂O(A)和含 0.045%TFA 的 CH₃CN(B))以 9.5mL/分钟进行的梯度洗脱;使用 Phenomenex Luna 10μ 苯基-己基 21mm x 25cm 柱和 λ 214 和 254nm 的 UV 检测仪(Varian Dynamax UVD II)得到预期的经修饰的肽(即 DAC),通过 RP-HPLC 测出肽的纯度>95%。



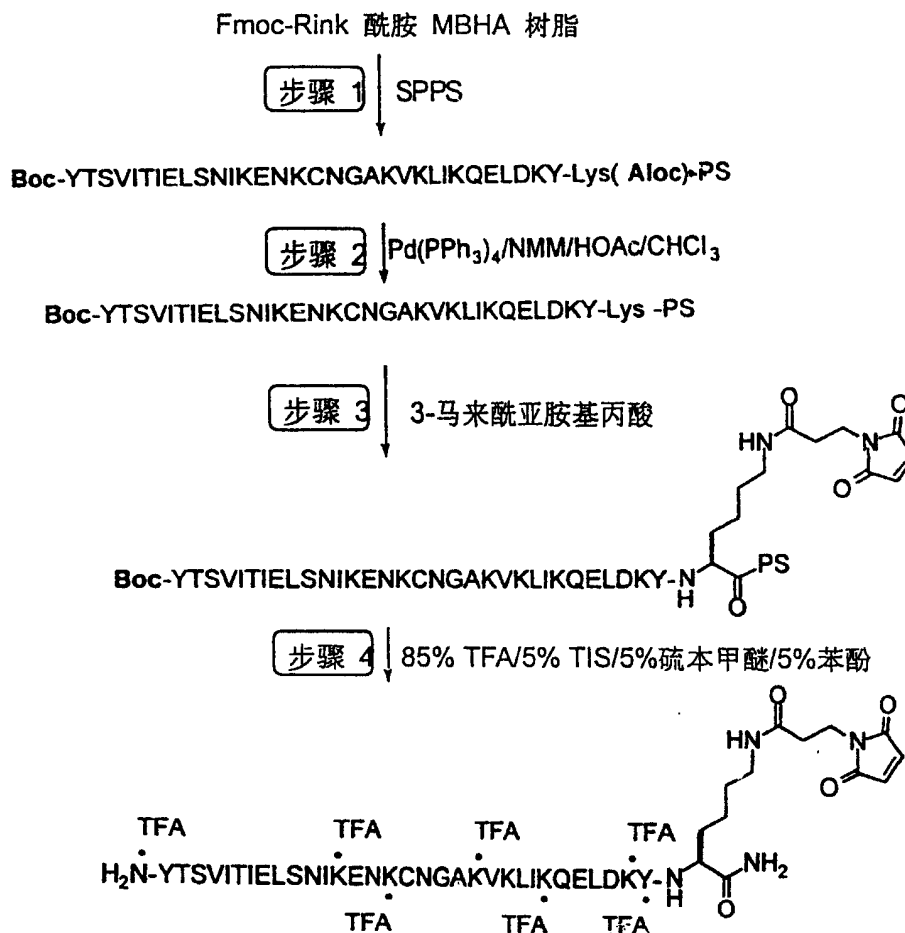
5 实施例 5

经修饰的抗 RSV 肽的制备

在本实施例中，按照下面的合成路线合成并修饰肽 SEQ ID NO:14 为含有连接体和马来酰亚胺基团。如美国专利 6,013,236 和 6,020,459 所述，SEQ ID NO:14 抑制呼吸道合胞病毒(RSV)的病毒性感染，包括抑制 RSV 感染和未感染 Hep-2 细胞之间的融合和合胞体形成。

100 μ mole 规模上的经修饰的肽的固相肽合成是采用手动固相合成、协同肽合成仪和 Fmoc 保护 Rink 酰胺 MBHA 树脂进行。将下列保护的氨基酸顺序加入树脂：Fmoc-Lys(Aloc)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Leu-

OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH。把它们溶于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)并且按照序列用 O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基-脲六氟磷酸盐(HBTU)和二异丙基乙胺(DIEA)活化。用存在于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中的 20%(V/V)哌啶溶液在 20 分钟内进行 Fmoc 保护基的脱除(步骤 1)。通过用 3 当量溶于 5mL CHCl₃:NMM:HOAc(18:1:0.5)中的 Pd(PPh₃)₄ 溶液处理树脂 2 小时手动完成 Lys(Aloc)基的选择性脱保护(步骤 2)。随后树脂用 CHCl₃(6 x 5 mL)、20% 存在于 DCM 中的 HOAc(6 x 5 mL)、DCM(6 x 5 mL)和 DMF(6 x 5 mL)洗涤。此后再次自动合成以便添加 3-马来酰亚胺基丙酸(步骤 3)。每次偶联之间,树脂用 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)洗涤 3 次并用异丙醇洗涤 3 次。用 85%TFA/5%TIS/5%苯硫基甲烷和 5%苯酚从树脂脱下肽,随后用干冰冷却的 Et₂O 沉淀(步骤 4)。产物通过制备反相 HPLC、使用 Varian(Rainin)的制备二元 HPLC 系统纯化:在约 180 分钟内 30-55%B(含 0.045%TFA 的 H₂O(A)和含 0.045%TFA 的 CH₃CN(B))以 9.5mL/分钟进行的梯度洗脱;使用 Phenomenex Luna 10μ 苯基-己基 21mm x 25cm 柱和λ 214 和 254nm 的 UV 检测仪(Varian Dynamax UVD II),得到预期的经修饰的肽(即 DAC),通过 RP-HPLC 测出肽的纯度>95%。



实施例 6(T-143)

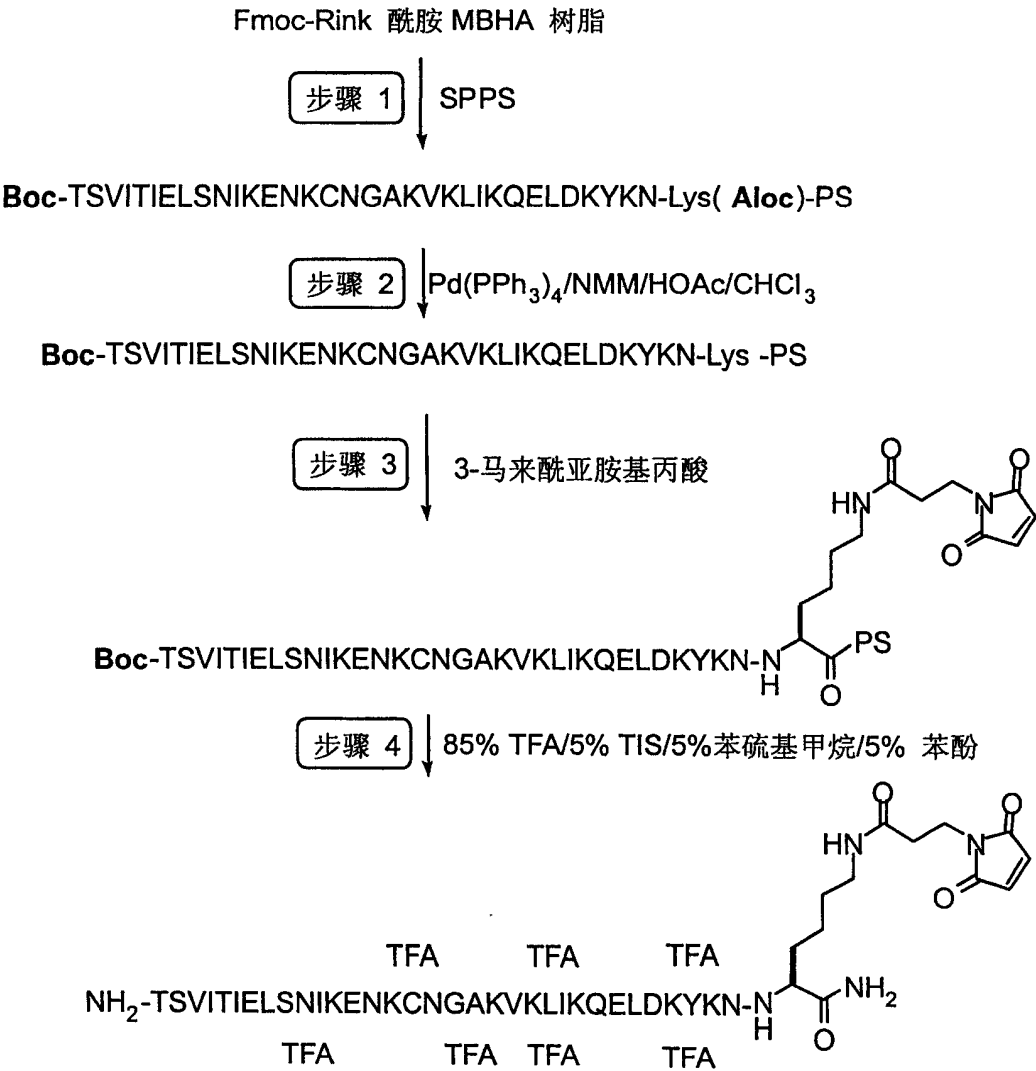
经修饰的抗 RSV 肽的制备

5 在本实施例中，按照下面的合成路线合成并修饰肽 SEQ ID NO:15 为含有连接体和马来酰亚胺基团。如美国专利 6,013,236 和 6,020,459 所述，SEQ ID NO:15 抑制呼吸道合胞病毒(RSV)的病毒性感染，包括抑制 RSV 感染和未感染 Hep-2 细胞之间的融合和合胞体形成。

10 100μmole 规模上的经修饰的肽类似物的固相肽合成是采用手动固相合成、协同肽合成仪和 Fmoc 保护 Rink 酰胺 MBHA 树脂进行。将下列保护的氨基酸顺序加入树脂：Fmoc-Lys(Aloc)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-

15

Lys(Boc)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH。把它们溶于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)并且按照序列用 O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐(HBTU)和二异丙基乙胺(DIEA)活化。用存在于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中的 20%(V/V)哌啶溶液在 20 分钟内进行 Fmoc 保护基的脱除(步骤 1)。通过用 3 当量溶于 5mL CHCl_3 :NMM:HOAc(18:1:0.5)中的 $\text{Pd(PPh}_3)_4$ 溶液处理树脂 2 小时手动完成 Lys(Aloc)基的选择性脱保护(步骤 2)。随后树脂用 CHCl_3 (6 x 5 mL)、20% 存在于 DCM 中的 HOAc(6 x 5 mL)、DCM(6 x 5 mL)和 DMF(6 x 5 mL)洗涤。此后再次自动合成以便添加 3-马来酰亚胺基丙酸(步骤 3)。每次偶联之间,树脂用 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)洗涤 3 次并用异丙醇洗涤 3 次。用 85%TFA/5%TIS/5%苯硫基甲烷和 5%苯酚从树脂脱下肽,随后用干冰冷却的 Et_2O 沉淀(步骤 4)。产物通过制备反相 HPLC、使用 Varian(Rainin)的制备二元 HPLC 系统纯化:在约 180 分钟内 30-55%B(含 0.045%TFA 的 H_2O (A)和含 0.045%TFA 的 CH_3CN (B))以 9.5mL/分钟进行的梯度洗脱;使用 Phenomenex Luna 10 μ 苯基-己基 21mm x 25cm 柱和 λ 214 和 254nm 的 UV 检测仪(Varian Dynamax UVD II),得到预期的经修饰的肽(即 DAC),通过 RP-HPLC 测出肽的纯度>95%。



实施例 7

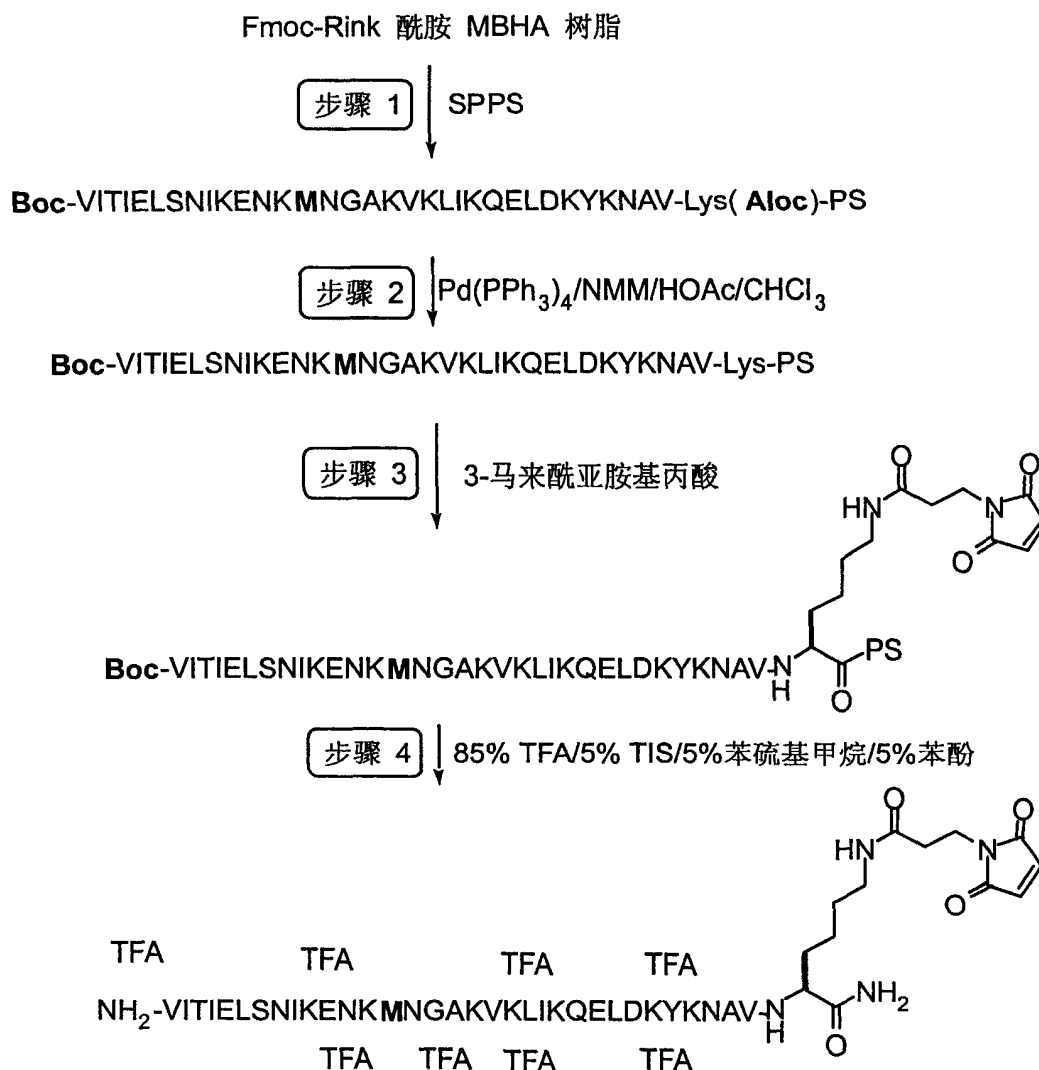
经修饰的抗 RSV 肽的制备(C 末端)

5 在本实施例中，按照下面的合成路线合成肽 SEQ ID NO:17)，其相应于其相应于 SEQ ID NO:16 的肽但半胱氨酸(C)被蛋氨酸(M)残基替换，并且修饰为含有连接体和马来酰亚胺基团。如美国专利 6,013,236 和 6,020,459 所述，天然序列 SEQ ID NO:16 抑制呼吸道合胞病毒(RSV)的病毒性感染，包括抑制 RSV 感染和未感染 Hep-2 细胞之间的融合和

10 合胞体形成。

100μmole 规模上的经修饰的肽的固相肽合成是采用手动固相合成、协同肽合成仪和 Fmoc 保护 Rink 酰胺 MBHA 树脂进行。将下列

保护的氨基酸顺序加入树脂：Fmoc-Lys(Aloc)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Val-OH。把它们溶于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)并且按照序列用 O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基-脲六氟磷酸盐(HBTU)和二异丙基乙胺(DIEA)活化。用存在于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中的 20%(V/V) 哌啶溶液在 20 分钟内进行 Fmoc 保护基的脱除(步骤 1)。通过用 3 当量溶于 5mL CHCl₃:NMM:HOAc(18:1:0.5)中的 Pd(PPh₃)₄ 溶液处理树脂 2 小时手动完成 Lys(Aloc)基的选择性脱保护(步骤 2)。随后树脂用 CHCl₃(6 x 5 mL)、20% 存在于 DCM 中的 HOAc(6 x 5 mL)、DCM(6 x 5 mL)和 DMF(6 x 5 mL)洗涤。此后再次自动合成以便添加 3-马来酰亚胺基丙酸(步骤 3)。每次偶联之间,树脂用 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)洗涤 3 次并用异丙醇洗涤 3 次。用 85%TFA/5%TIS/5%苯硫基甲烷和 5% 苯酚从树脂脱下肽,随后用干冰冷却的 Et₂O 沉淀(步骤 4)。产物通过制备反相 HPLC、使用 Varian(Rainin)的制备二元 HPLC 系统纯化:在约 180 分钟内 30-55%B(含 0.045%TFA 的 H₂O(A)和含 0.045%TFA 的 CH₃CN(B))以 9.5mL/分钟进行的梯度洗脱;使用 Phenomenex Luna 10μ 苯基-己基 21mm x 25cm 柱和λ 214 和 254nm 的 UV 检测仪(Varian Dynamax UVD II)得到预期的经修饰的肽(即 DAC),通过 RP-HPLC 测出肽的纯度>95%。



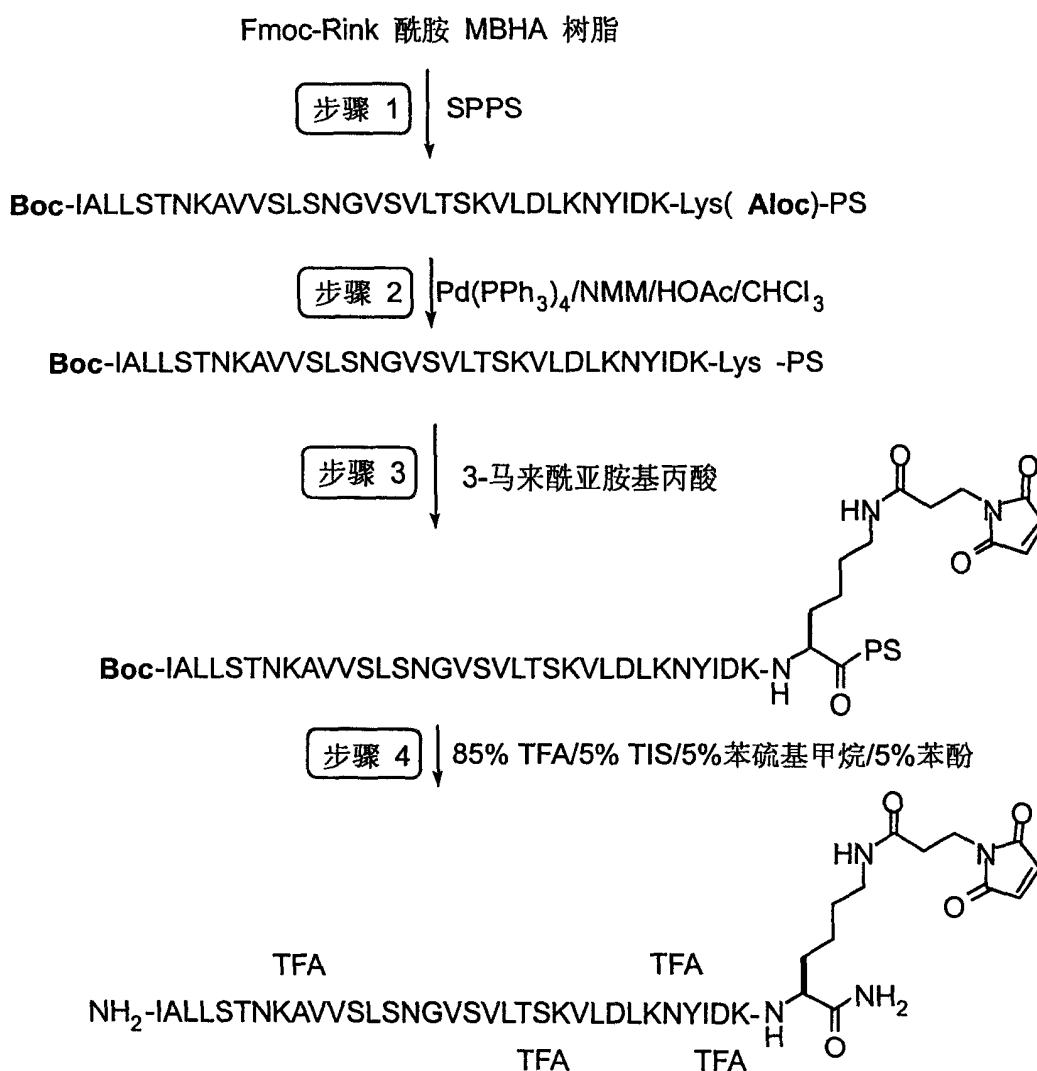
实施例 8

经修饰的抗 RSV 肽的制备

5 在本实施例中，按照下面的合成路线合成并修饰肽 SEQ ID NO:29 为含有连接体和马来酰亚胺基团。如美国专利 6,013,236 和 6,020,459 所述，SEQ ID NO:29 抑制呼吸道合胞病毒(RSV)的病毒性感染，包括抑制 RSV 感染和未感染 Hep-2 细胞之间的融合和合胞体形成。

10 100 μmole 规模上的经修饰的肽的固相肽合成是采用手动固相合成、协同肽合成仪和 Fmoc 保护 Rink 酰胺 MBHA 树脂进行。将下列保护的氨基酸顺序加入树脂：Fmoc-Lys(Aloc)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-

OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ile-OH。把它们溶于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)并且按照序列用 O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基-脒六氟磷酸盐(HBTU)和二异丙基乙胺(DIEA)活化。用存在于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中的 20%(V/V)哌啶溶液在 20 分钟内进行 Fmoc 保护基的脱除(步骤 1)。通过用 3 当量溶于 5mL CHCl_3 :NMM:HOAc(18:1:0.5)中的 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ 溶液处理树脂 2 小时手动完成 Lys(Aloc)基的选择性脱保护(步骤 2)。随后树脂用 CHCl_3 (6 x 5 mL)、20% 存在于 DCM 中的 HOAc(6 x 5 mL)、DCM(6 x 5 mL)和 DMF(6 x 5 mL)洗涤。此后再次自动合成以便添加 3-马来酰亚胺基丙酸(步骤 3)。每次偶联之间,树脂用 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)洗涤 3 次并用异丙醇洗涤 3 次。用 85%TFA/5%TIS/5%苯硫基甲烷和 5%苯酚从树脂脱下肽,随后用干冰冷却的 Et_2O 沉淀(步骤 4)。产物通过制备反相 HPLC、使用 Varian(Rainin)的制备二元 HPLC 系统纯化:在约 180 分钟内 30-55%B(含 0.045%TFA 的 H_2O (A)和含 0.045%TFA 的 CH_3CN (B))以 9.5mL/分钟进行的梯度洗脱;使用 Phenomenex Luna 10 μ 苯基-己基 21mm x 25cm 柱和 λ 214 和 254nm 的 UV 检测仪(Varian Dynamax UVD II),得到预期的经修饰的肽(即 DAC),通过 RP-HPLC 测出肽的纯度>95%。



实施例 9(T-173)

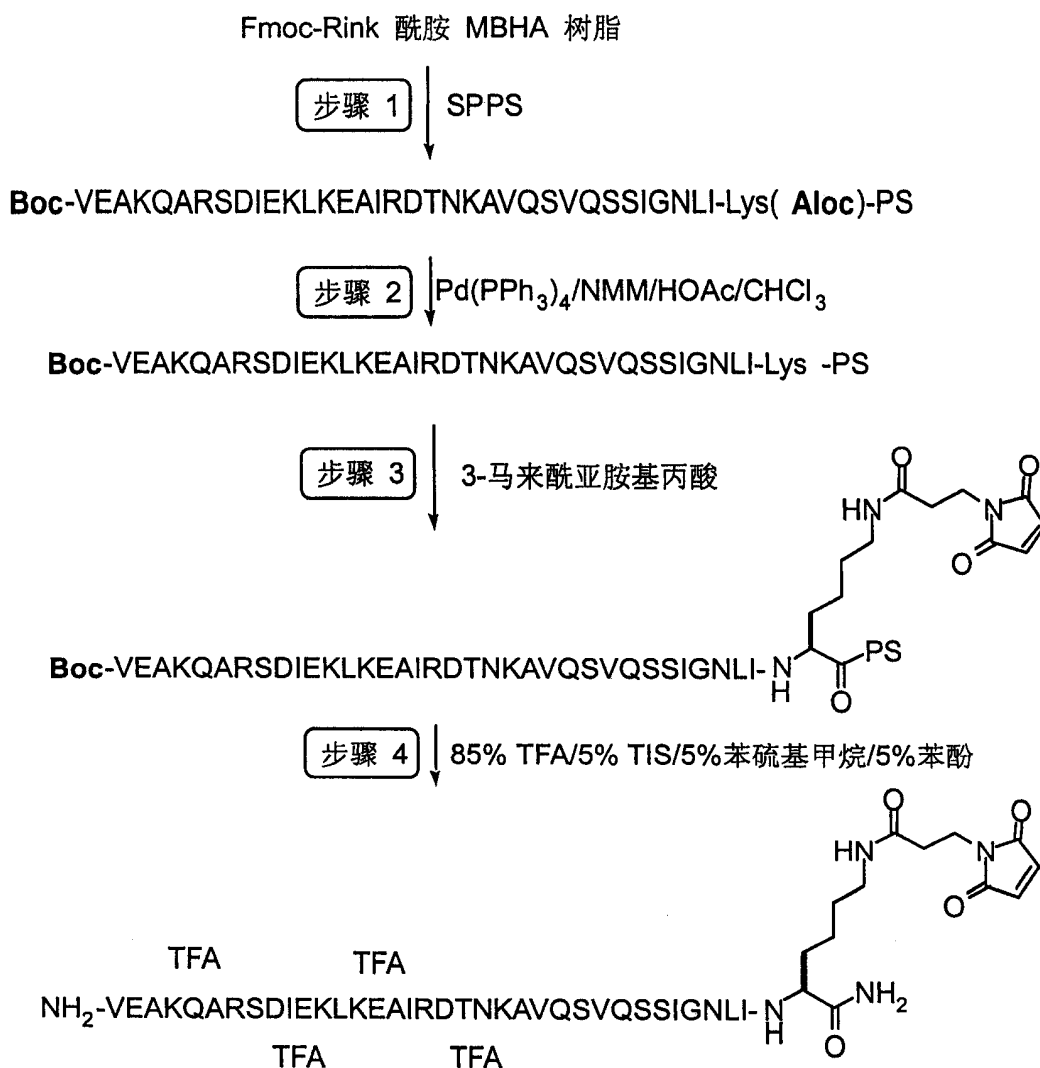
5 经修饰的抗 HPIV 肽的制备

在本实施例中，按照下面的合成路线合成并修饰肽 SEQ ID NO:52 为含有连接体和马来酰亚胺基团。如美国专利 6,013,236 和 6,020,459 所述，SEQ ID NO:52 抑制人副流感病毒 3(HPIV3)的病毒性感染，包括抑制 HPIV3 感染 Hep-2 细胞和未感染 CV-1W 细胞之间的融合和合胞体形成。

10

100 μ mole 规模上的经修饰的肽的固相肽合成是采用手动固相合成、协同肽合成仪和 Fmoc 保护 Rink 酰胺 MBHA 树脂进行。将下列

保护的氨基酸顺序加入树脂：Fmoc-Lys(Aloc)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH。把它们溶于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)并且按照序列用 O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基-脒六氟磷酸盐(HBTU)和二异丙基乙胺(DIEA)活化。用存在于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中的 20%(V/V)哌啶溶液在 20 分钟内进行 Fmoc 保护基的脱除(步骤 1)。通过用 3 当量溶于 5mL CHCl₃:NMM:HOAc(18:1:0.5)中的 Pd(PPh₃)₄ 溶液处理树脂 2 小时手动完成 Lys(Aloc)基的选择性脱保护(步骤 2)。随后树脂用 CHCl₃(6 x 5 mL)、20% 存在于 DCM 中的 HOAc(6 x 5 mL)、DCM(6 x 5 mL)和 DMF(6 x 5 mL)洗涤。此后再次自动合成以便添加 3-马来酰亚胺基丙酸(步骤 3)。每次偶联之间, 树脂用 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)洗涤 3 次并用异丙醇洗涤 3 次。用 85%TFA/5%TIS/5%苯硫基甲烷和 5%苯酚从树脂脱下肽, 随后用干冰冷却的 Et₂O 沉淀(步骤 4)。产物通过制备反相 HPLC、使用 Varian(Rainin)的制备二元 HPLC 系统纯化: 在约 180 分钟内 30-55%B(含 0.045%TFA 的 H₂O(A)和含 0.045%TFA 的 CH₃CN(B))以 9.5mL/分钟进行的梯度洗脱; 使用 Phenomenex Luna 10μ苯基-己基 21mm x 25cm 柱和λ 214 和 254nm 的 UV 检测仪(Varian Dynamax UVD II), 得到预期的经修饰的肽(即 DAC), 通过 RP-HPLC 测出肽的纯度>95%。



实施例 10

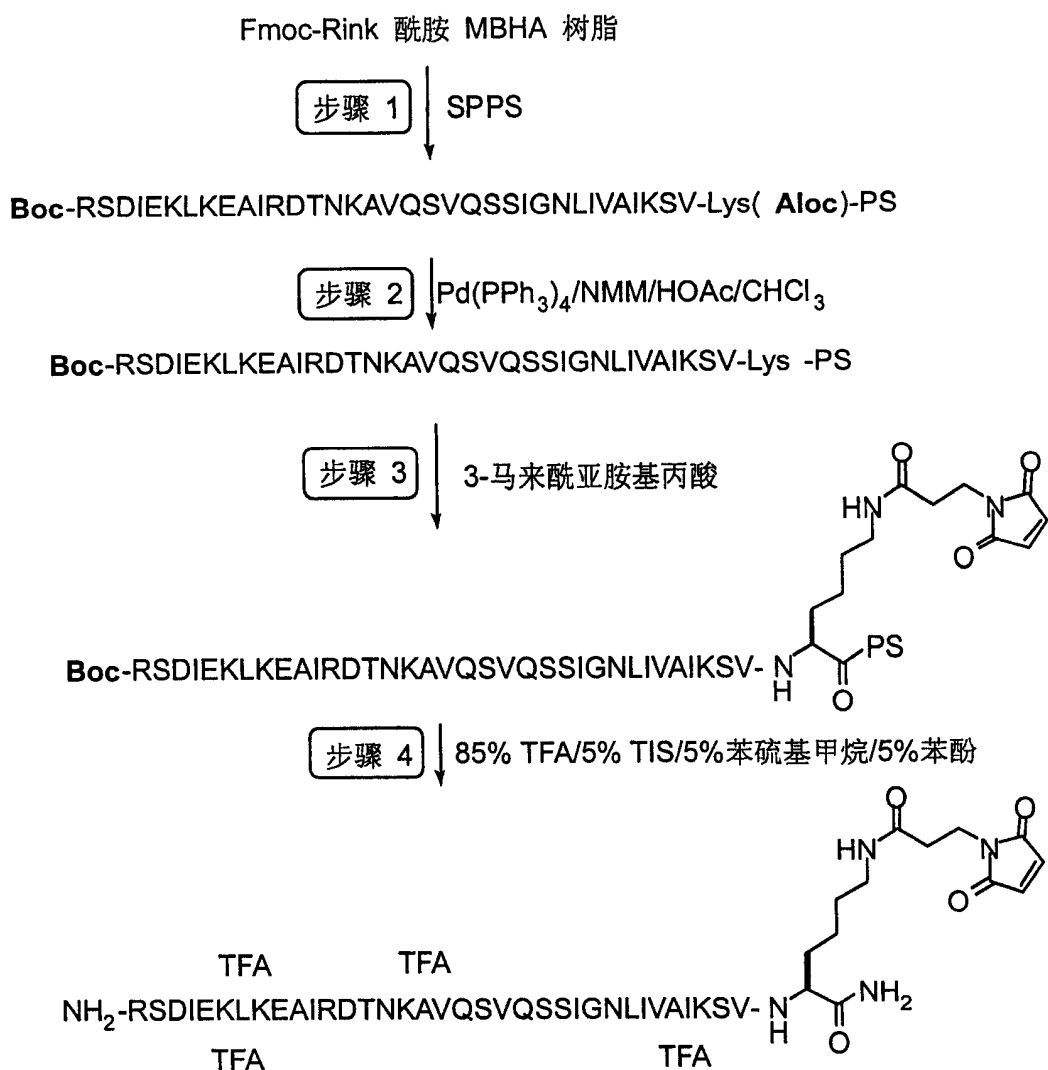
经修饰的抗 HPIV 肽的制备

- 5 在本实施例中，按照下面的合成路线合成并修饰肽 SEQ ID NO:58 为含有连接体和马来酰亚胺基团。如美国专利 6,013,236 和 6,020,459 所述，SEQ ID NO:58 抑制人副流感病毒 3(HPIV3)的病毒性感染，包括抑制 HPIV3 感染 Hep-2 细胞和未感染 CV-1W 细胞之间的融合和合胞体形成。

10

100 μ mole 规模上的经修饰的肽的固相肽合成是采用手动固相合成、协同肽合成仪和 Fmoc 保护 Rink 酰胺 MBHA 树脂进行。将下列

保护的氨基酸顺序加入树脂：Fmoc-Lys(Aloc)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH。把它们溶于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)并且按照序列用 O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基-脲六氟磷酸盐(HBTU)和二异丙基乙胺(DIEA)活化。用存在于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中的 20%(V/V)哌啶溶液在 20 分钟内进行 Fmoc 保护基的脱除(步骤 1)。通过用 3 当量溶于 5mL CHCl₃:NMM:HOAc(18:1:0.5)中的 Pd(PPh₃)₄ 溶液处理树脂 2 小时手动完成 Lys(Aloc)基的选择性脱保护(步骤 2)。随后树脂用 CHCl₃(6 x 5 mL)、20% 存在于 DCM 中的 HOAc(6 x 5 mL)、DCM(6 x 5 mL)和 DMF(6 x 5 mL)洗涤。此后再次自动合成以便添加 3-马来酰亚胺基丙酸(步骤 3)。每次偶联之间,树脂用 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)洗涤 3 次并用异丙醇洗涤 3 次。用 85%TFA/5%TIS/5%苯硫基甲烷和 5%苯酚从树脂脱下肽,随后用干冰冷却的 Et₂O 沉淀(步骤 4)。产物通过制备反相 HPLC、使用 Varian(Rainin)的制备二元 HPLC 系统纯化:在约 180 分钟内 30-55%B(含 0.045%TFA 的 H₂O(A)和含 0.045%TFA 的 CH₃CN(B))以 9.5mL/分钟进行的梯度洗脱;使用 Phenomenex Luna 10μ 苯基-己基 21mm x 25cm 柱和λ 214 和 254nm 的 UV 检测仪(Varian Dynamax UVD II),得到预期的经修饰的肽(即 DAC),通过 RP-HPLC 测出肽的纯度>95%。



实施例 11

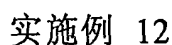
经修饰的抗 HPIV 肽的制备

- 5 在本实施例中，按照下面的合成路线合成并修饰肽 SEQ ID NO:35 为含有连接体和马来酰亚胺基团。如美国专利 6,013,236 和 6,020,459 所述，SEQ ID NO:35 抑制人副流感病毒 3(HPIV3)的病毒性感染，包括抑制 HPIV3 感染 Hep-2 细胞和未感染 CV-1W 细胞之间的融合和合胞体形成。

10

100 μ mole 规模上的经修饰的肽的固相肽合成是采用手动固相合成、协同肽合成仪和 Fmoc 保护 Rink 酰胺 MBHA 树脂进行。将下列

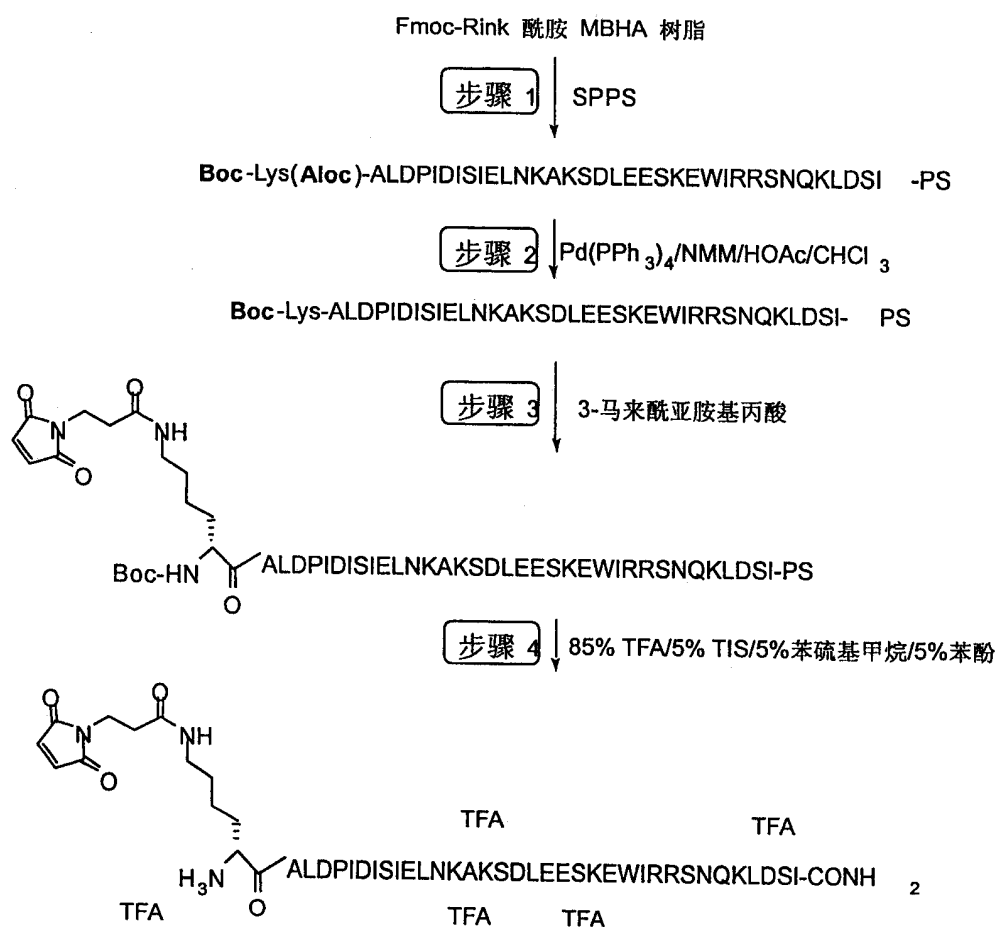
保护的氨基酸顺序加入树脂：Fmoc-Lys(Aloc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH。把它们溶于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)并且按照序列用 O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基-脲六氟磷酸盐(HBTU)和二异丙基乙胺(DIEA)活化。用存在于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中的 20%(V/V)哌啶溶液在 20 分钟内进行 Fmoc 保护基的脱除(步骤 1)。通过用 3 当量溶于 5mL CHCl₃:NMM:HOAc(18:1:0.5)中的 Pd(PPh₃)₄ 溶液处理树脂 2 小时手动完成 Lys(Aloc)基的选择性脱保护(步骤 2)。随后树脂用 CHCl₃(6 x 5 mL)、20% 存在于 DCM 中的 HOAc(6 x 5 mL)、DCM(6 x 5 mL)和 DMF(6 x 5 mL)洗涤。此后再次自动合成以便添加 3-马来酰亚胺基丙酸(步骤 3)。每次偶联之间, 树脂用 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)洗涤 3 次并用异丙醇洗涤 3 次。用 85%TFA/5%TIS/5%苯硫基甲烷和 5%苯酚从树脂脱下肽, 随后用干冰冷却的 Et₂O 沉淀(步骤 4)。产物通过制备反相 HPLC、使用 Varian(Rainin)的制备二元 HPLC 系统纯化: 在约 180 分钟内 30-55%B(含 0.045%TFA 的 H₂O(A)和含 0.045%TFA 的 CH₃CN(B))以 9.5mL/分钟进行的梯度洗脱; 使用 Phenomenex Luna 10μ 苯基-己基 21mm x 25cm 柱和 λ 214 和 254nm 的 UV 检测仪(Varian Dynamax UVD II), 得到预期的经修饰的肽(即 DAC), 通过 RP-HPLC 测出肽的纯度>95%。



在本实施例中，按照下面的合成路线合成并修饰肽 SEQ ID NO:38 为含有连接体和马来酰亚胺基团。如美国专利 6,013,236 和 6,020,459 所述，SEQ ID NO:38 抑制人副流感病毒 3(HPIV3)的病毒性感染，包括抑制 HPIV3 感染 Hep-2 细胞和未感染 CV-1W 细胞之间的融合和合胞体形成。

100 μ mole 规模上的经修饰的肽的固相肽合成是采用手动固相合成、协同肽合成仪和 Fmoc 保护 Rink 酰胺 MBHA 树脂进行。将下列

保护的氨基酸顺序加入树脂: Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ala-OH BOC-Lys(Aloc)-OH。把它们溶于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)并且按照序列用 O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基-脲六氟磷酸盐(HBTU)和二异丙基乙胺(DIEA)活化。用存在于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中的 20%(V/V)哌啶溶液在 20 分钟内进行 Fmoc 保护基的脱除(步骤 1)。通过用 3 当量溶于 5mL CHCl₃:NMM:HOAc(18:1:0.5)中的 Pd(PPh₃)₄ 溶液处理树脂 2 小时手动完成 Lys(Aloc)基的选择性脱保护(步骤 2)。随后树脂用 CHCl₃(6 x 5 mL)、20% 存在于 DCM 中的 HOAc(6 x 5 mL)、DCM(6 x 5 mL)和 DMF(6 x 5 mL)洗涤。此后再次自动合成以便添加 3-马来酰亚胺基丙酸(步骤 3)。每次偶联之间,树脂用 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)洗涤 3 次并用异丙醇洗涤 3 次。用 85%TFA/5%TIS/5%苯硫基甲烷和 5%苯酚从树脂脱下肽,随后用干冰冷却的 Et₂O 沉淀(步骤 4)。产物通过制备反相 HPLC、使用 Varian(Rainin)的制备二元 HPLC 系统纯化:在约 180 分钟内 30-55%B(含 0.045%TFA 的 H₂O(A)和含 0.045%TFA 的 CH₃CN(B))以 9.5mL/分钟进行的梯度洗脱;使用 Phenomenex Luna 10μ 苯基-己基 21mm x 25cm 柱和λ 214 和 254nm 的 UV 检测仪(Varian Dynamax UVD II),得到预期的经修饰的肽(即 DAC),通过 RP-HPLC 测出肽的纯度>95%。



实施例 13

经修饰的抗 HPIV 肽的制备

5 在本实施例中，按照下面的合成路线合成并修饰肽 SEQ ID NO:39 为含有连接体和马来酰亚胺基团。如美国专利 6,013,236 和 6,020,459 所述，SEQ ID NO:39 抑制人副流感病毒 3(HPIV3)的病毒性感染，包括抑制 HPIV3 感染 Hep-2 细胞和未感染 CV-1W 细胞之间的融合和合

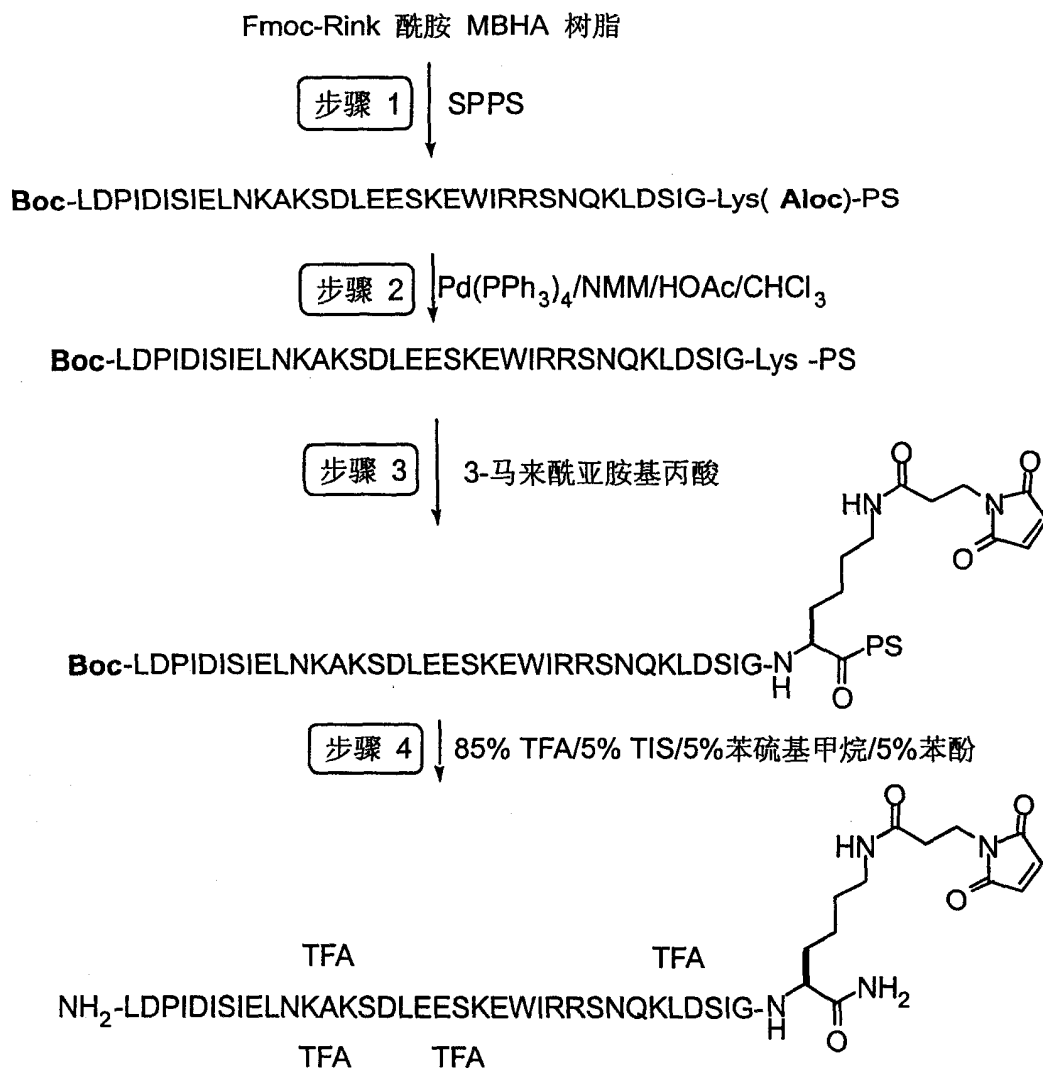
10 胞体形成。

100μmole 规模上的经修饰的肽的固相肽合成是采用手动固相合成、协同肽合成仪和 Fmoc 保护 Rink 酰胺 MBHA 树脂进行。将下列保护的氨基酸顺序加入树脂：Fmoc-Lys(Aloc)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-

15

OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH。把它们溶于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)并且按照序列用 O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基-脲六氟磷酸盐(HBTU)和二异丙基乙胺(DIEA)活化。

用存在于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中的 20%(V/V)哌啶溶液在 20 分钟内进行 Fmoc 保护基的脱除(步骤 1)。通过用 3 当量溶于 5mL CHCl₃:NMM:HOAc(18:1:0.5)中的 Pd(PPh₃)₄ 溶液处理树脂 2 小时手动完成 Lys(Aloc)基的选择性脱保护(步骤 2)。随后树脂用 CHCl₃(6 x 5 mL)、20% 存在于 DCM 中的 HOAc(6 x 5 mL)、DCM(6 x 5 mL)和 DMF(6 x 5 mL)洗涤。此后再次自动合成以便添加 3-马来酰亚胺基丙酸(步骤 3)。每次偶联之间,树脂用 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)洗涤 3 次并用异丙醇洗涤 3 次。用 85%TFA/5%TIS/5%苯硫基甲烷和 5%苯酚从树脂脱下肽,随后用干冰冷却的 Et₂O 沉淀(步骤 4)。产物通过制备反相 HPLC、使用 Varian(Rainin)的制备二元 HPLC 系统纯化:在约 180 分钟内 30-55%B(含 0.045%TFA 的 H₂O(A)和含 0.045%TFA 的 CH₃CN(B))以 9.5mL/分钟进行的梯度洗脱;使用 Phenomenex Luna 10μ 苯基-己基 21mm x 25cm 柱和λ 214 和 254nm 的 UV 检测仪(Varian Dynamax UVD II),得到预期的经修饰的肽(即 DAC),通过 RP-HPLC 测出肽的纯度>95%。



实施例 14

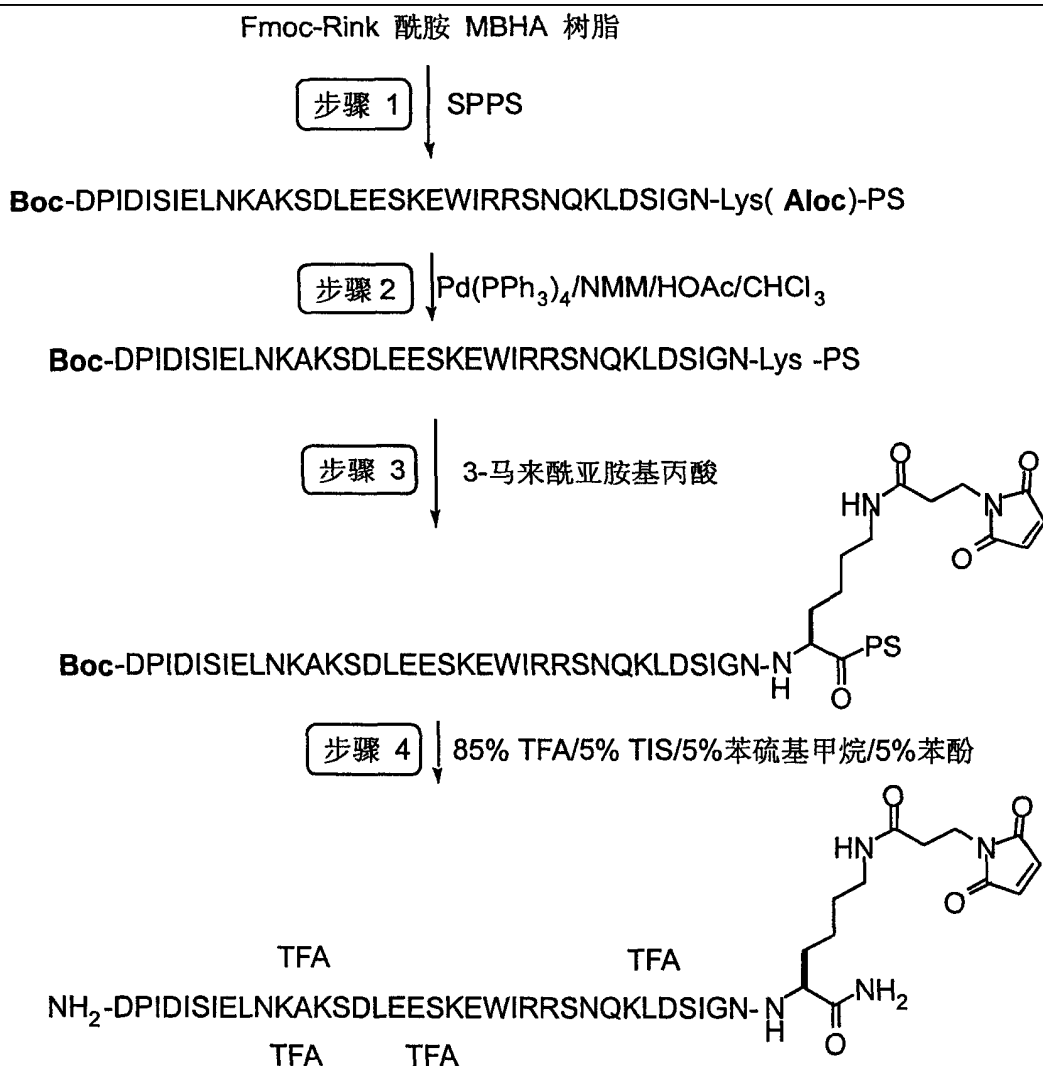
经修饰的抗 HPIV 肽的制备

5 在本实施例中，按照下面的合成路线合成并修饰肽 SEQ ID NO:40 为含有连接体和马来酰亚胺基团。如美国专利 6,013,236 和 6,020,459 所述，SEQ ID NO:40 抑制人副流感病毒 3(HPIV3)的病毒性感染，包括抑制 HPIV3 感染 Hep-2 细胞和未感染 CV-1W 细胞之间的融合和合胞体形成。

10

100 μ mole 规模上的经修饰的肽的固相肽合成是采用手动固相合成、协同肽合成仪和 Fmoc 保护 Rink 酰胺 MBHA 树脂进行。将下列保护的氨基酸顺序加入树脂：Fmoc-Lys(Aloc)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH,

Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH。把它们溶于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)并且按照序列用 O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基-脒六氟磷酸盐(HBTU)和二异丙基乙胺(DIEA)活化。用存在于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中的 20%(V/V)哌啶溶液在 20 分钟内进行 Fmoc 保护基的脱除(步骤 1)。通过用 3 当量溶于 5mL CHCl₃:NMM:HOAc(18:1:0.5)中的 Pd(PPh₃)₄ 溶液处理树脂 2 小时手动完成 Lys(Aloc)基的选择性脱保护(步骤 2)。随后树脂用 CHCl₃(6 x 5 mL)、20% 存在于 DCM 中的 HOAc(6 x 5 mL)、DCM(6 x 5 mL)和 DMF(6 x 5 mL)洗涤。此后再次自动合成以便添加 3-马来酰亚胺基丙酸(步骤 3)。每次偶联之间,树脂用 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)洗涤 3 次并用异丙醇洗涤 3 次。用 85%TFA/5%TIS/5%苯硫基甲烷和 5%苯酚从树脂脱下肽,随后用干冰冷却的 Et₂O 沉淀(步骤 4)。产物通过制备反相 HPLC、使用 Varian(Rainin)的制备二元 HPLC 系统纯化:在约 180 分钟内 30-55%B(含 0.045%TFA 的 H₂O(A)和含 0.045%TFA 的 CH₃CN(B))以 9.5mL/分钟进行的梯度洗脱;使用 Phenomenex Luna 10μ 苯基-己基 21mm x 25cm 柱和λ 214 和 254nm 的 UV 检测仪(Varian Dynamax UVD II),得到预期的经修饰的肽(即 DAC),通过 RP-HPLC 测出肽的纯度>95%。



实施例 15

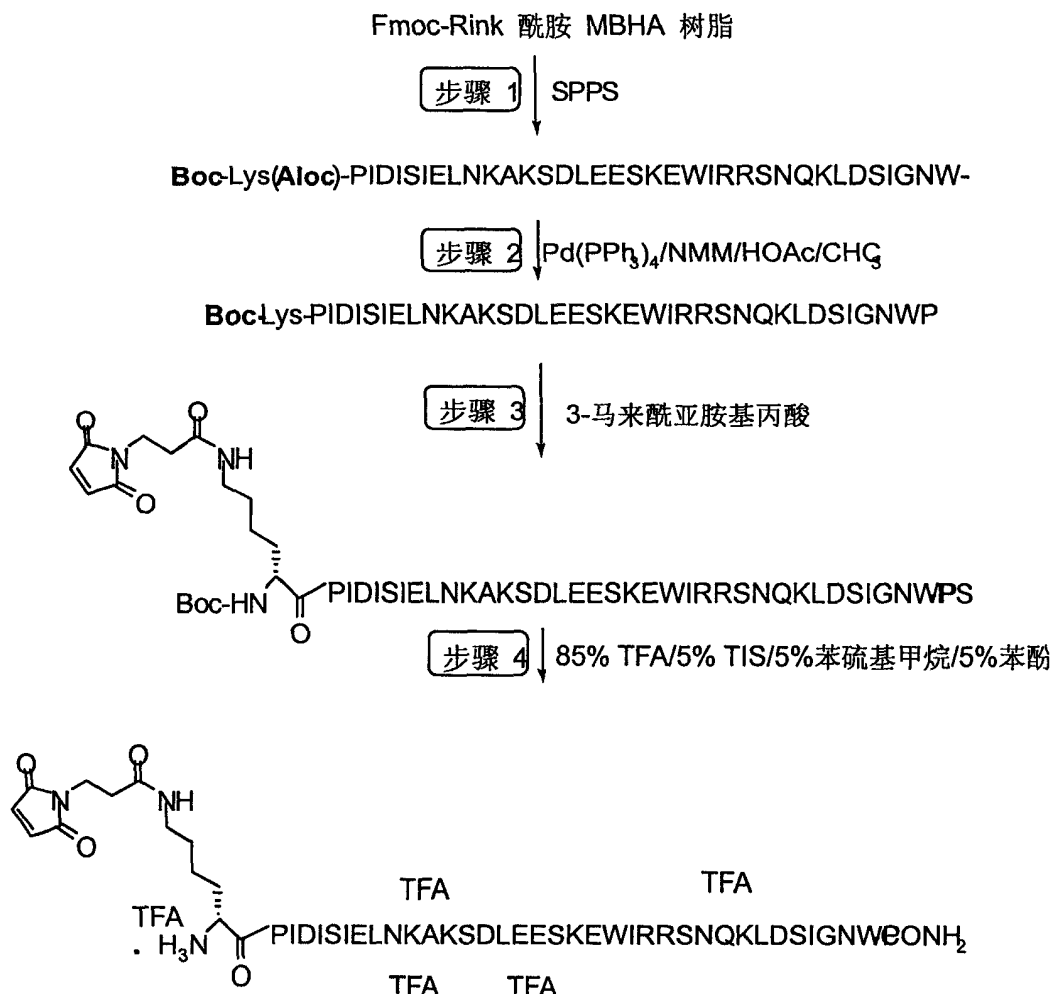
经修饰的抗 HPIV 肽的制备

- 5 在本实施例中，按照下面的合成路线合成并修饰肽 SEQ ID NO:41 为含有连接体和马来酰亚胺基团。如美国专利 6,013,236 和 6,020,459 所述，SEQ ID NO:41 抑制人副流感病毒 3(HPIV3)的病毒性感染，包括抑制 HPIV3 感染 Hep-2 细胞和未感染 CV-1W 细胞之间的融合和合胞体形成。

10

100μmole 规模上的经修饰的肽的固相肽合成是采用手动固相合成、协同肽合成仪和 Fmoc 保护 Rink 酰胺 MBHA 树脂进行。将下列保护的氨基酸顺序加入树脂：Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH,

Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Pro-OH Boc-Lys(Aloc)-OH。把它们溶于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)并且按照序列用 O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基-脒六氟磷酸盐(HBTU)和二异丙基乙胺(DIEA)活化。用存在于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中的 20%(V/V)哌啶溶液在 20 分钟内进行 Fmoc 保护基的脱除(步骤 1)。通过用 3 当量溶于 5mL CHCl_3 :NMM:HOAc(18:1:0.5)中的 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ 溶液处理树脂 2 小时手动完成 Lys(Aloc)基的选择性脱保护(步骤 2)。随后树脂用 CHCl_3 (6 x 5 mL)、20% 存在于 DCM 中的 HOAc(6 x 5 mL)、DCM(6 x 5 mL)和 DMF(6 x 5 mL)洗涤。此后再次自动合成以便添加 3-马来酰亚胺基丙酸(步骤 3)。每次偶联之间,树脂用 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)洗涤 3 次并用异丙醇洗涤 3 次。用 85%TFA/5%TIS/5%苯硫基甲烷和 5%苯酚从树脂脱下肽,随后用干冰冷却的 Et_2O 沉淀(步骤 4)。产物通过制备反相 HPLC、使用 Varian(Rainin)的制备二元 HPLC 系统纯化:在约 180 分钟内 30-55%B(含 0.045%TFA 的 H_2O (A)和含 0.045%TFA 的 CH_3CN (B))以 9.5mL/分钟进行的梯度洗脱;使用 Phenomenex Luna 10μ 苯基-己基 21mm x 25cm 柱和 λ 214 和 254nm 的 UV 检测仪(Varian Dynamax UVD II),得到预期的经修饰的肽(即 DAC),通过 RP-HPLC 测出肽的纯度>95%。



实施例 16

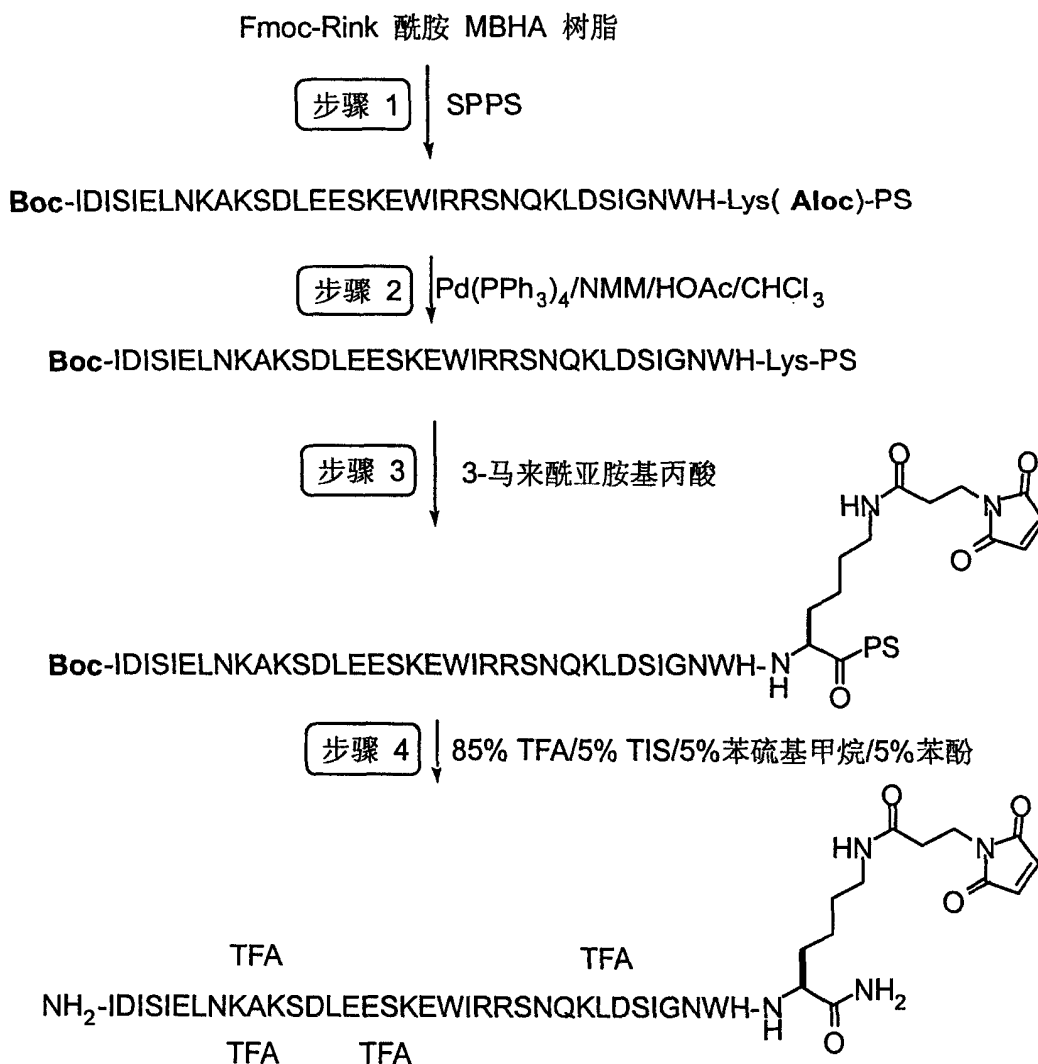
经修饰的抗 HPIV 肽的制备

5 在本实施例中，按照下面的合成路线合成并修饰肽 SEQ ID NO:42 为含有连接体和马来酰亚胺基团。如美国专利 6,013,236 和 6,020,459 所述，SEQ ID NO:42 抑制人副流感病毒 3(HPIV3)的病毒性感染，包括抑制 HPIV3 感染 Hep-2 细胞和未感染 CV-1W 细胞之间的融合和合胞体形成。

10

100 μ mole 规模上的经修饰的肽的固相肽合成是采用手动固相合成、协同肽合成仪和 Fmoc 保护 Rink 酰胺 MBHA 树脂进行。将下列保护的氨基酸顺序加入树脂：Fmoc-Lys(Aloc)-OH, Fmoc-His(Boc)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ile-OH,

Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH。把它们溶于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)并且按照序列用 O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基-脲六氟磷酸盐(HBTU)和二异丙基乙胺(DIEA)活化。用存在于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中的 20%(V/V)哌啶溶液在 20 分钟内进行 Fmoc 保护基的脱除(步骤 1)。通过用 3 当量溶于 5mL CHCl₃:NMM:HOAc(18:1:0.5)中的 Pd(PPh₃)₄ 溶液处理树脂 2 小时手动完成 Lys(Aloc)基的选择性脱保护(步骤 2)。随后树脂用 CHCl₃(6 x 5 mL)、20% 存在于 DCM 中的 HOAc(6 x 5 mL)、DCM(6 x 5 mL)和 DMF(6 x 5 mL)洗涤。此后再次自动合成以便添加 3-马来酰亚胺基丙酸(步骤 3)。每次偶联之间,树脂用 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)洗涤 3 次并用异丙醇洗涤 3 次。用 85%TFA/5%TIS/5%苯硫基甲烷和 5%苯酚从树脂脱下肽,随后用干冰冷却的 Et₂O 沉淀(步骤 4)。产物通过制备反相 HPLC、使用 Varian(Rainin)的制备二元 HPLC 系统纯化:在约 180 分钟内 30-55%B(含 0.045%TFA 的 H₂O(A)和含 0.045%TFA 的 CH₃CN(B))以 9.5mL/分钟进行的梯度洗脱;使用 Phenomenex Luna 10μ 苯基-己基 21mm x 25cm 柱和λ 214 和 254nm 的 UV 检测仪(Varian Dynamax UVD II),得到预期的经修饰的肽(即 DAC),通过 RP-HPLC 测出肽的纯度>95%。



实施例 17

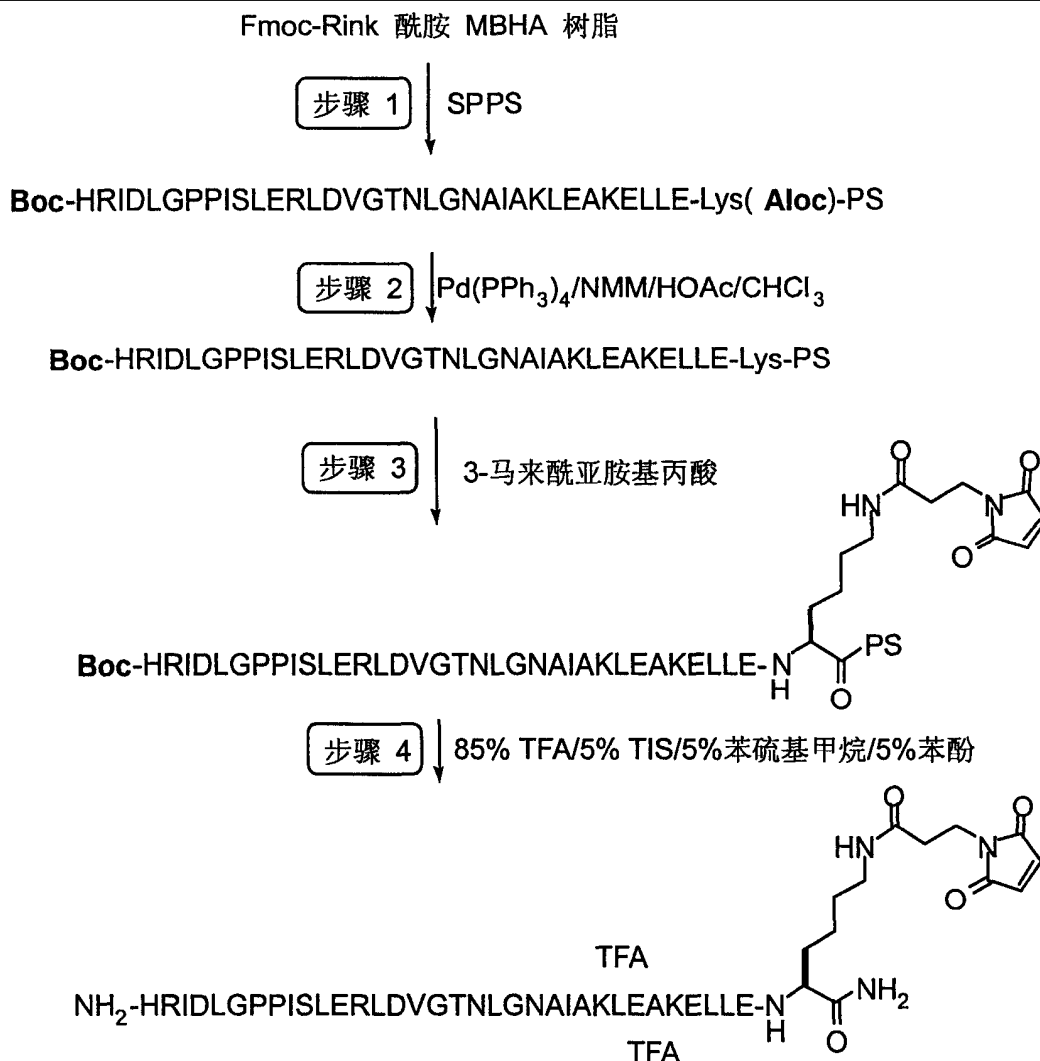
经修饰的抗 MeV 肽的制备

5 在本实施例中，按照下面的合成路线合成并修饰肽 SEQ ID NO:77 为含有连接体和马来酰亚胺基团。如美国专利 6,013,236 和 6,020,459 所述，SEQ ID NO:77 抑制麻疹病毒(MeV)的病毒性感染，包括抑制 MeV 感染和未感染 Vero 细胞之间的融合和合胞体形成。

10 100 μ mole 规模上的经修饰的肽的固相肽合成是采用手动固相合成、协同肽合成仪和 Fmoc 保护 Rink 酰胺 MBHA 树脂进行。将下列保护的氨基酸顺序加入树脂：Fmoc-Lys(Alloc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH,

Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-His(Boc)-OH。把它们溶于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)并且按照序列用 O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基-脒六氟磷酸盐(HBTU)和二异丙基乙胺(DIEA)活化。用存在于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中的 20%(V/V) 哌啶溶液在 20 分钟内进行 Fmoc 保护基的脱除(步骤 1)。通过用 3 当量溶于 5mL CHCl₃:NMM:HOAc(18:1:0.5)中的 Pd(PPh₃)₄ 溶液处理树脂 2 小时手动完成 Lys(Aloc)基的选择性脱保护(步骤 2)。随后树脂用 CHCl₃(6 x 5 mL)、20% 存在于 DCM 中的 HOAc(6 x 5 mL)、DCM(6 x 5 mL)和 DMF(6 x 5 mL)洗涤。此后再次自动合成以便添加 3-马来酰亚胺基丙酸(步骤 3)。每次偶联之间,树脂用 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)洗涤 3 次并用异丙醇洗涤 3 次。用 85%TFA/5%TIS/5%苯硫基甲烷和 5% 苯酚从树脂脱下肽,随后用干冰冷却的 Et₂O 沉淀(步骤 4)。产物通过制备反相 HPLC、使用 Varian(Rainin)的制备二元 HPLC 系统纯化:在约 180 分钟内 30-55%B(含 0.045%TFA 的 H₂O(A)和含 0.045%TFA 的 CH₃CN(B))以 9.5mL/分钟进行的梯度洗脱;使用 Phenomenex Luna 10μ 苯基-己基 21mm x 25cm 柱和λ 214 和 254nm 的 UV 检测仪(Varian Dynamax UVD II),得到预期的经修饰的肽(即 DAC),通过 RP-HPLC 测出肽的纯度>95%。

25



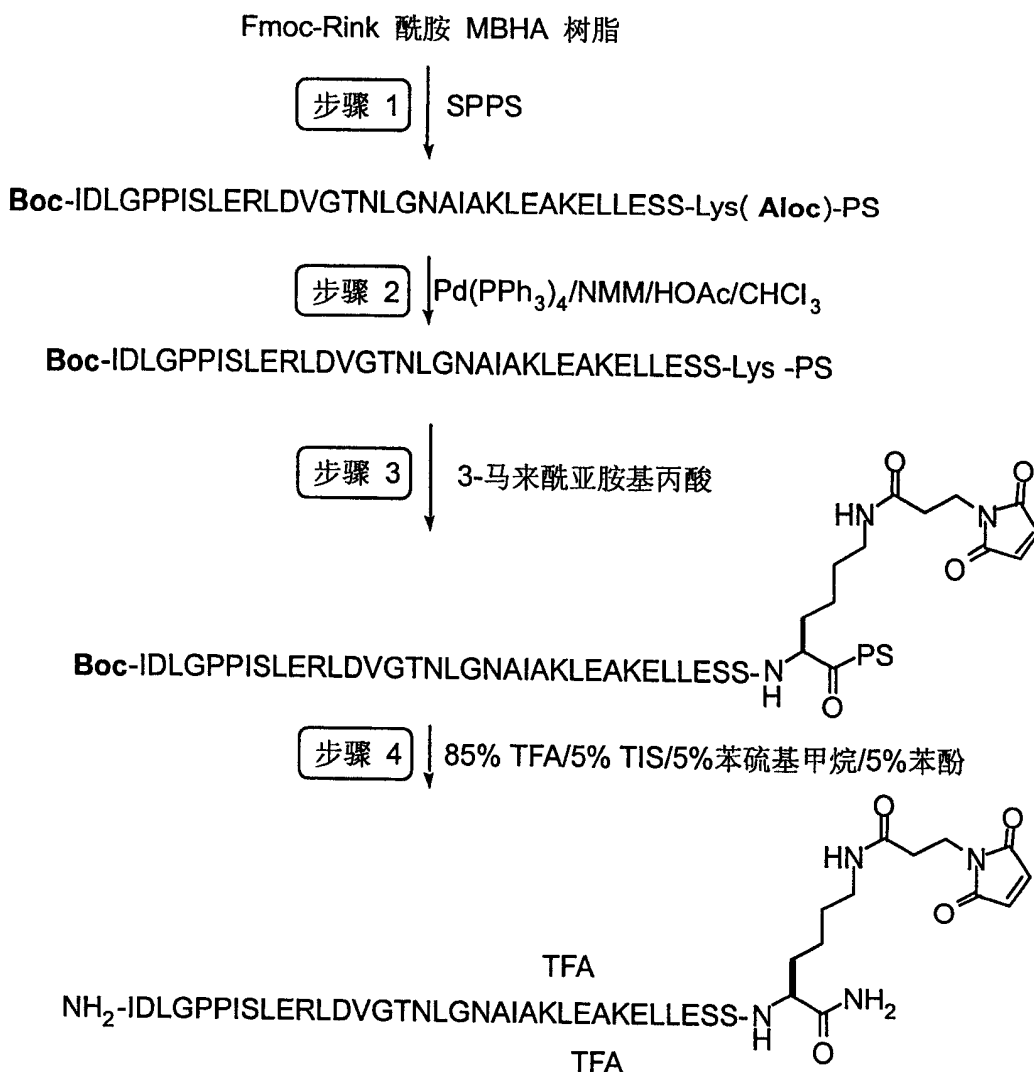
实施例 18

经修饰的抗 MeV 肽的制备

5 在本实施例中，按照下面的合成路线合成并修饰肽 SEQ ID NO:79 为含有连接体和马来酰亚胺基团。如美国专利 6,013,236 和 6,020,459 所述，SEQ ID NO:79 抑制麻疹病毒(MeV)的病毒性感染，包括抑制 MeV 感染和未感染 Vero 细胞之间的融合和合胞体形成。

10 100 μ mole 规模上的经修饰的肽的固相肽合成是采用手动固相合成、协同肽合成仪和 Fmoc 保护 Rink 酰胺 MBHA 树脂进行。将下列保护的氨基酸顺序加入树脂：Fmoc-Lys(Aloc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Leu-OH,

Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH。把它们溶于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)并且按照序列用 O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基-脲六氟磷酸盐(HBTU)和二异丙基乙胺(DIEA)活化。用存在于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中的 20%(V/V)哌啶溶液在 20 分钟内进行 Fmoc 保护基的脱除(步骤 1)。通过用 3 当量溶于 5mL CHCl₃:NMM:HOAc(18:1:0.5)中的 Pd(PPh₃)₄ 溶液处理树脂 2 小时手动完成 Lys(Aloc)基的选择性脱保护(步骤 2)。随后树脂用 CHCl₃(6 x 5 mL)、20% 存在于 DCM 中的 HOAc(6 x 5 mL)、DCM(6 x 5 mL)和 DMF(6 x 5 mL)洗涤。此后再次自动合成以便添加 3-马来酰亚胺基丙酸(步骤 3)。每次偶联之间,树脂用 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)洗涤 3 次并用异丙醇洗涤 3 次。用 85%TFA/5%TIS/5%苯硫基甲烷和 5%苯酚从树脂脱下肽,随后用干冰冷却的 Et₂O 沉淀(步骤 4)。产物通过制备反相 HPLC、使用 Varian(Rainin)的制备二元 HPLC 系统纯化:在约 180 分钟内 30-55%B(含 0.045%TFA 的 H₂O(A)和含 0.045%TFA 的 CH₃CN(B))以 9.5mL/分钟进行的梯度洗脱;使用 Phenomenex Luna 10μ 苯基-己基 21mm x 25cm 柱和λ 214 和 254nm 的 UV 检测仪(Varian Dynamax UVD II),得到预期的经修饰的肽(即 DAC),通过 RP-HPLC 测出肽的纯度>95%。



实施例 19

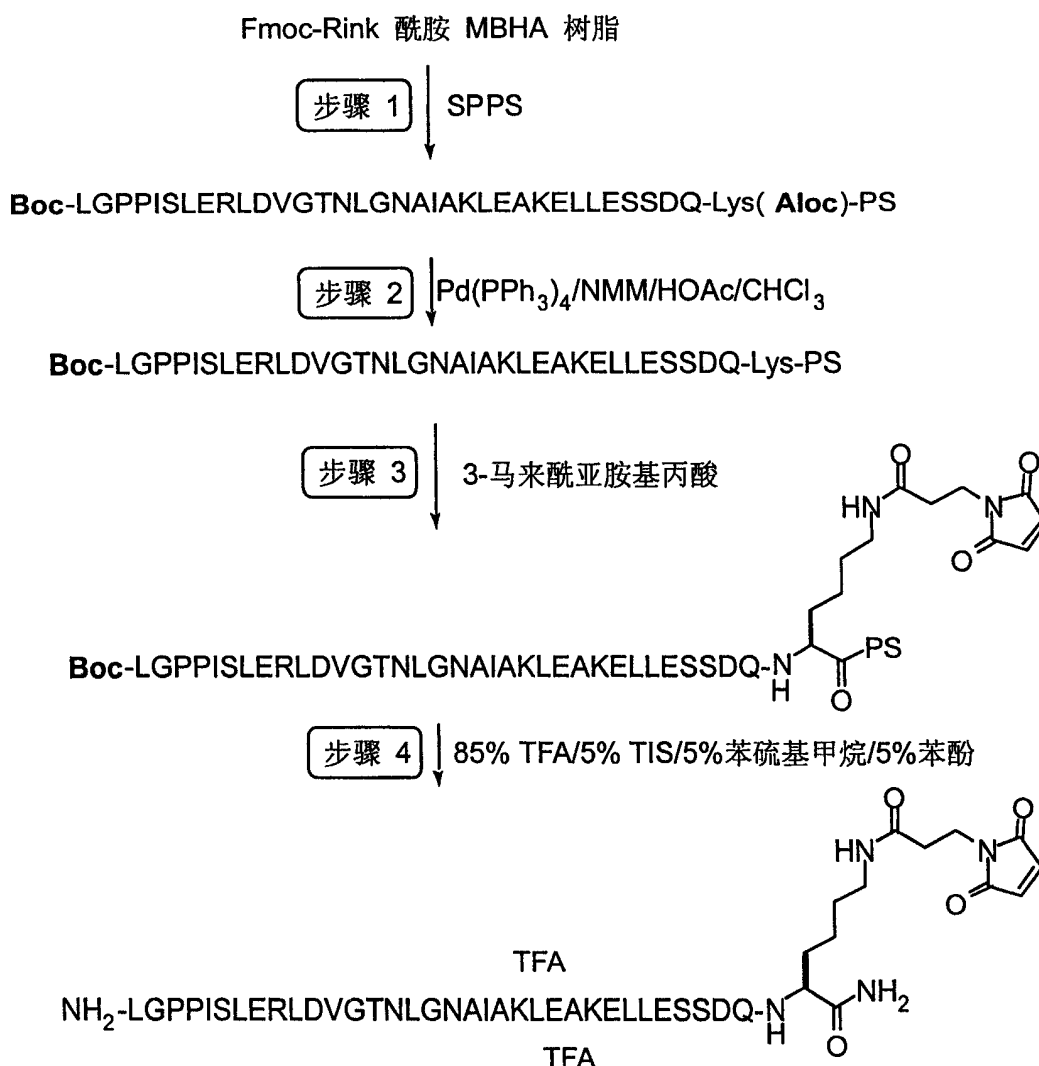
经修饰的抗 MeV 肽的制备

5 在本实施例中，按照下面的合成路线合成并修饰肽 SEQ ID NO:81 为含有连接体和马来酰亚胺基团。如美国专利 6,013,236 和 6,020,459 所述, SEQ ID NO:79 抑制麻疹病毒(MeV)的病毒性感染, 包括抑制 MeV 感染和未感染 Vero 细胞之间的融合和合胞体形成。

10 100 μ mole 规模上的经修饰的肽的固相肽合成是采用手动固相合成、协同肽合成仪和 Fmoc 保护 Rink 酰胺 MBHA 树脂进行。将下列保护的氨基酸顺序加入树脂: Fmoc-Lys(Alloc)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-

Glu(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH。把它们溶于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)并且按照序列用 O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基-脲六氟磷酸盐(HBTU)和二异丙基乙胺(DIEA)活化。用存在于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中的 20%(V/V)哌啶溶液在 20 分钟内进行 Fmoc 保护基的脱除(步骤 1)。通过用 3 当量溶于 5mL CHCl₃:NMM:HOAc(18:1:0.5)中的 Pd(PPh₃)₄ 溶液处理树脂 2 小时手动完成 Lys(Aloc)基的选择性脱保护(步骤 2)。随后树脂用 CHCl₃(6 x 5 mL)、20% 存在于 DCM 中的 HOAc(6 x 5 mL)、DCM(6 x 5 mL)和 DMF(6 x 5 mL)洗涤。此后再次自动合成以便添加 3-马来酰亚胺基丙酸(步骤 3)。每次偶联之间,树脂用 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)洗涤 3 次并用异丙醇洗涤 3 次。用 85%TFA/5%TIS/5%苯硫基甲烷和 5%苯酚从树脂脱下肽,随后用干冰冷却的 Et₂O 沉淀(步骤 4)。产物通过制备反相 HPLC、使用 Varian(Rainin)的制备二元 HPLC 系统纯化:在约 180 分钟内 30-55%B(含 0.045%TFA 的 H₂O(A)和含 0.045%TFA 的 CH₃CN(B))以 9.5mL/分钟进行的梯度洗脱;使用 Phenomenex Luna 10 μ 苯基-己基 21mm x 25cm 柱和 λ 214 和 254nm 的 UV 检测仪(Varian Dynamax UVD II),得到预期的经修饰的肽(即 DAC),通过 RP-HPLC 测出肽的纯度>95%。

25



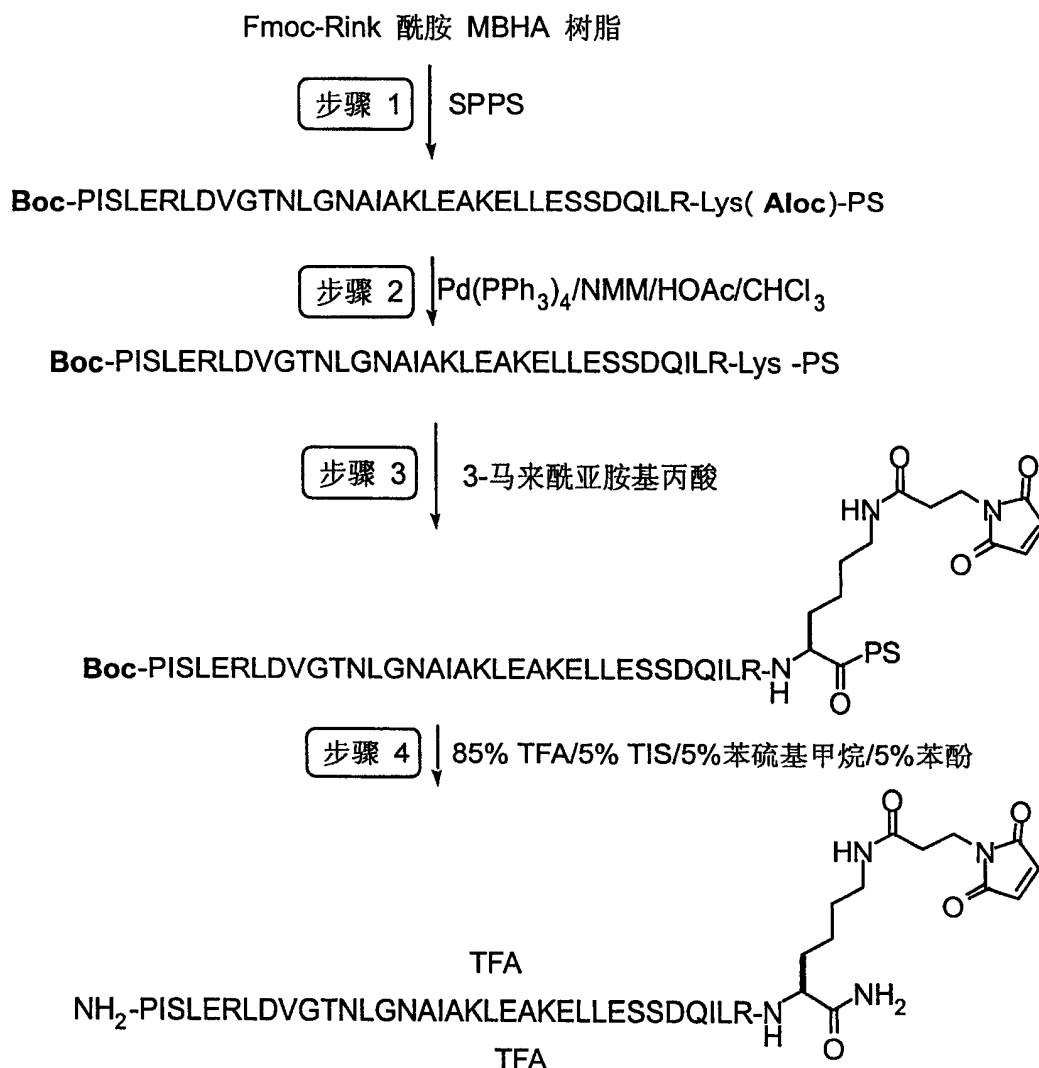
实施例 20

经修饰的抗 MeV 肽的制备

5 在本实施例中，按照下面的合成路线合成并修饰肽 SEQ ID NO:84 为含有连接体和马来酰亚胺基团。如美国专利 6,013,236 和 6,020,459 所述, SEQ ID NO:84 抑制麻疹病毒(MeV)的病毒性感染, 包括抑制 MeV 感染和未感染 Vero 细胞之间的融合和合胞体形成。

10 100 μ mole 规模上的经修饰的肽的固相肽合成是采用手动固相合成、协同肽合成仪和 Fmoc 保护 Rink 酰胺 MBHA 树脂进行。将下列保护的氨基酸顺序加入树脂: Fmoc-Lys(Aloc)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH,

Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Pro-OH。把它们溶于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)并且按照序列用 O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基-脲六氟磷酸盐(HBTU)和二异丙基乙胺(DIEA)活化。用存在于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中的 20%(V/V)哌啶溶液在 20 分钟内进行 Fmoc 保护基的脱除(步骤 1)。通过用 3 当量溶于 5mL CHCl₃:NMM:HOAc(18:1:0.5)中的 Pd(PPh₃)₄ 溶液处理树脂 2 小时手动完成 Lys(Aloc)基的选择性脱保护(步骤 2)。随后树脂用 CHCl₃(6 x 5 mL)、20% 存在于 DCM 中的 HOAc(6 x 5 mL)、DCM(6 x 5 mL)和 DMF(6 x 5 mL)洗涤。此后再次自动合成以便添加 3-马来酰亚胺基丙酸(步骤 3)。每次偶联之间,树脂用 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)洗涤 3 次并用异丙醇洗涤 3 次。用 85%TFA/5%TIS/5%苯硫基甲烷和 5%苯酚从树脂脱下肽,随后用干冰冷却的 Et₂O 沉淀(步骤 4)。产物通过制备反相 HPLC、使用 Varian(Rainin)的制备二元 HPLC 系统纯化:在约 180 分钟内 30-55%B(含 0.045%TFA 的 H₂O(A)和含 0.045%TFA 的 CH₃CN(B))以 9.5mL/分钟进行的梯度洗脱;使用 Phenomenex Luna 10μ 苯基-己基 21mm x 25cm 柱和λ 214 和 254nm 的 UV 检测仪(Varian Dynamax UVD II),得到预期的经修饰的肽(即 DAC),通过 RP-HPLC 测出肽的纯度>95%。



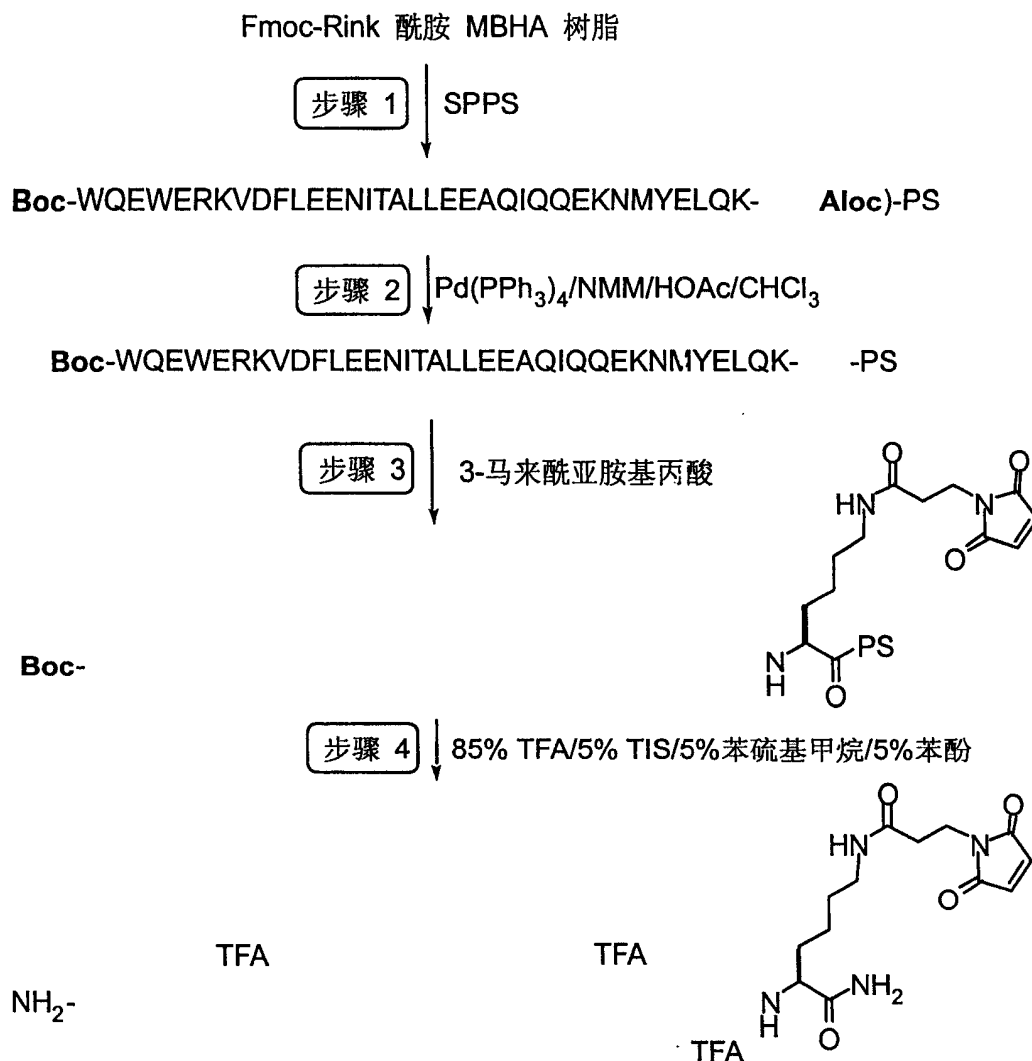
实施例 21

经修饰的抗 SIV 肽的制备

5 在本实施例中，按照下面的合成路线合成并修饰 SEQ ID NO:64 为含有连接体和马来酰亚胺基团。如美国专利 6,013,236 和 6,020,459 所述，SEQ ID NO:64 作为粗品肽表现出对猿猴免疫缺陷病毒(SIV)的抗病毒活性。

10 100 μ mole 规模上的经修饰的肽的固相肽合成是采用手动固相合成、协同肽合成仪和 Fmoc 保护 Rink 酰胺 MBHA 树脂进行。将下列保护的氨基酸顺序加入树脂：Fmoc-Lys(Aloc)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-

Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Met-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-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH。把它们溶于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)并且按照序列用 O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基-脲六氟磷酸盐(HBTU)和二异丙基乙胺(DIEA)活化。用存在于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中的 20%(V/V)哌啶溶液在 20 分钟内进行 Fmoc 保护基的脱除(步骤 1)。通过用 3 当量溶于 5mL CHCl₃:NMM:HOAc(18:1:0.5)中的 Pd(PPh₃)₄ 溶液处理树脂 2 小时手动完成 Lys(Aloc)基的选择性脱保护(步骤 2)。随后树脂用 CHCl₃(6 x 5 mL)、20% 存在于 DCM 中的 HOAc(6 x 5 mL)、DCM(6 x 5 mL)和 DMF(6 x 5 mL)洗涤。此后再次自动合成以便添加 3-马来酰亚胺基丙酸(步骤 3)。每次偶联之间,树脂用 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)洗涤 3 次并用异丙醇洗涤 3 次。用 85%TFA/5%TIS/5%苯硫基甲烷和 5%苯酚从树脂脱下肽,随后用干冰冷却的 Et₂O 沉淀(步骤 4)。产物通过制备反相 HPLC、使用 Varian(Rainin)的制备二元 HPLC 系统纯化:在约 180 分钟内 30-55%B(含 0.045%TFA 的 H₂O(A)和含 0.045%TFA 的 CH₃CN(B))以 9.5mL/分钟进行的梯度洗脱;使用 Phenomenex Luna 10μ 苯基-己基 21mm x 25cm 柱和λ 214 和 254nm 的 UV 检测仪(Varian Dynamax UVD II),得到预期的经修饰的肽(即 DAC),通过 RP-HPLC 测出肽的纯度>95%。



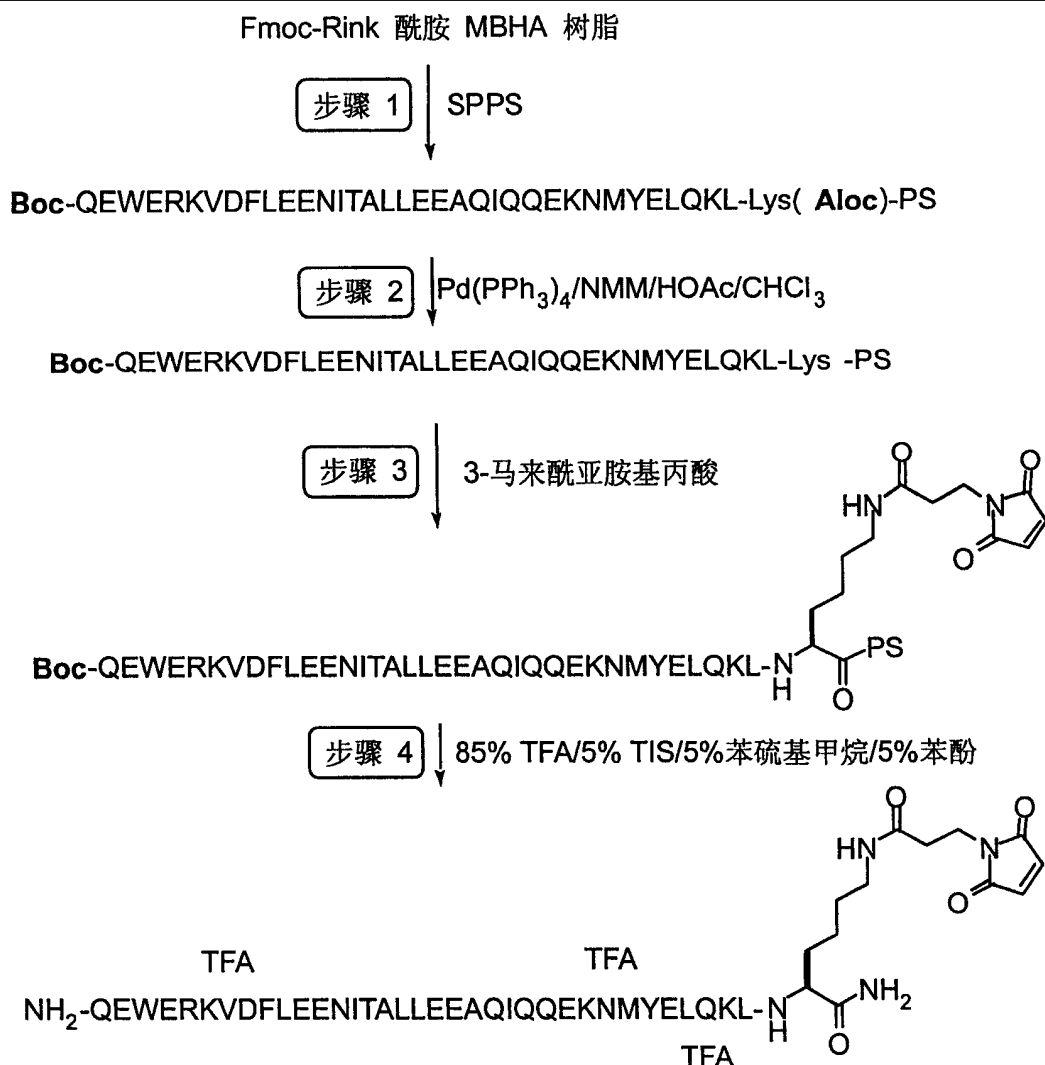
实施例 22

经修饰的抗 SIV 肽的制备

5 在本实施例中，按照下面的合成路线合成并修饰 SEQ ID NO:65 为含有连接体和马来酰亚胺基团。如美国专利 6,013,236 和 6,020,459 所述，SEQ ID NO:65 作为粗品肽表现出对猿猴免疫缺陷病毒(SIV)的抗病毒活性。

10 100 μ mole 规模上的经修饰的肽的固相肽合成是采用手动固相合成、协同肽合成仪和 Fmoc 保护 Rink 酰胺 MBHA 树脂进行。将下列保护的氨基酸顺序加入树脂：Fmoc-Lys(Aloc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-

OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Met-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-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH。把它们溶于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)并且按照序列用 O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基-脲六氟磷酸盐(HBTU)和二异丙基乙胺(DIEA)活化。用存在于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中的 20%(V/V)哌啶溶液在 20 分钟内进行 Fmoc 保护基的脱除(步骤 1)。通过用 3 当量溶于 5mL CHCl₃:NMM:HOAc(18:1:0.5)中的 Pd(PPh₃)₄ 溶液处理树脂 2 小时手动完成 Lys(Aloc)基的选择性脱保护(步骤 2)。随后树脂用 CHCl₃(6 x 5 mL)、20% 存在于 DCM 中的 HOAc(6 x 5 mL)、DCM(6 x 5 mL)和 DMF(6 x 5 mL)洗涤。此后再次自动合成以便添加 3-马来酰亚胺基丙酸(步骤 3)。每次偶联之间,树脂用 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)洗涤 3 次并用异丙醇洗涤 3 次。用 85%TFA/5%TIS/5%苯硫基甲烷和 5%苯酚从树脂脱下肽,随后用干冰冷却的 Et₂O 沉淀(步骤 4)。产物通过制备反相 HPLC、使用 Varian(Rainin)的制备二元 HPLC 系统纯化:在约 180 分钟内 30-55%B(含 0.045%TFA 的 H₂O(A)和含 0.045%TFA 的 CH₃CN(B))以 9.5mL/分钟进行的梯度洗脱;使用 Phenomenex Luna 10μ 苯基-己基 21mm x 25cm 柱和λ 214 和 254nm 的 UV 检测仪(Varian Dynamax UVD II),得到预期的经修饰的肽(即 DAC),通过 RP-HPLC 测出肽的纯度>95%。



实施例 23

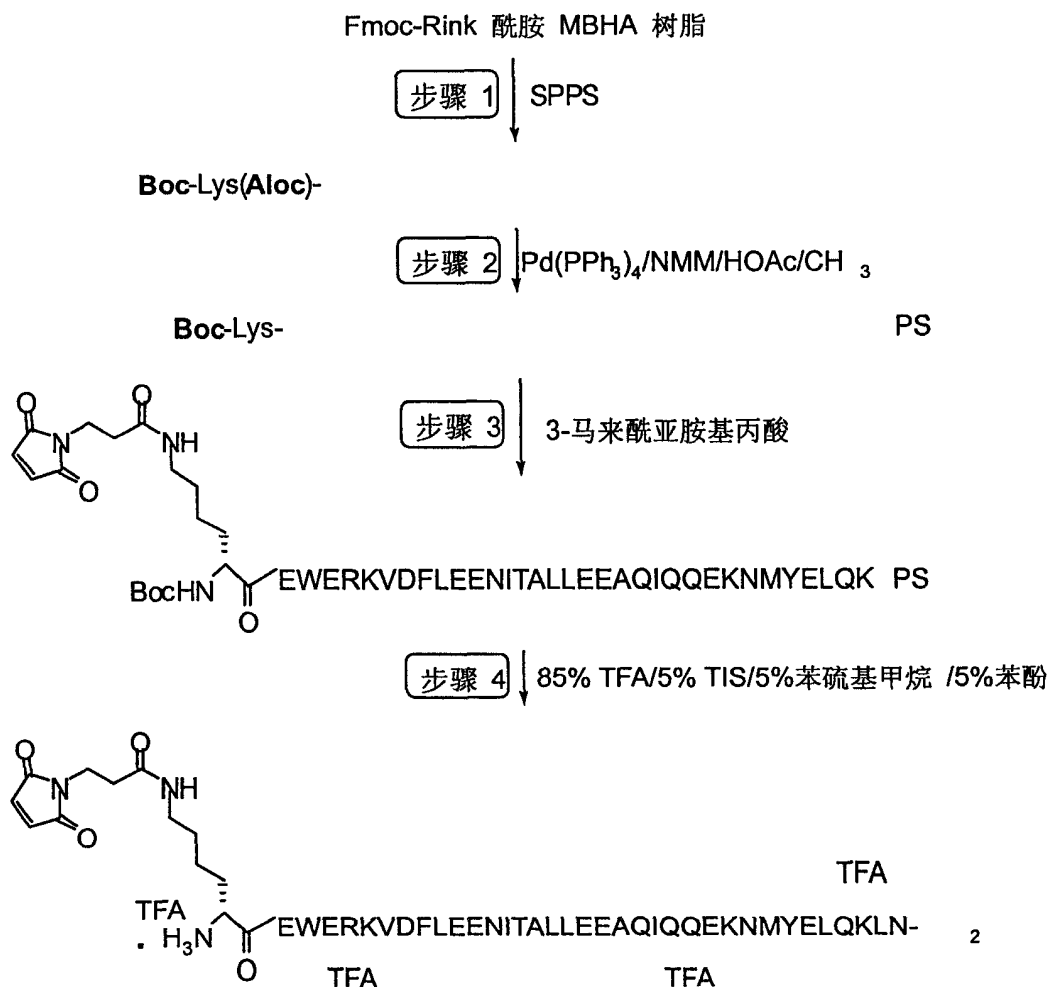
经修饰的抗 SIV 肽的制备

5 在本实施例中，按照下面的合成路线合成并修饰 SEQ ID NO:66 为含有连接体和马来酰亚胺基团。如美国专利 6,013,236 和 6,020,459 所述，SEQ ID NO:66 作为粗品肽表现出对猿猴免疫缺陷病毒(SIV)的抗病毒活性。

10 100 μmole 规模上的经修饰的肽的固相肽合成是采用手动固相合成、协同肽合成仪和 Fmoc 保护 Rink 酰胺 MBHA 树脂进行。将下列保护的氨基酸顺序加入树脂：Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-

OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Met-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-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH Boc-Lys(Aloc)-OH。把它们溶于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)并且按照序列用 O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基-脒六氟磷酸盐(HBTU)和二异丙基乙胺(DIEA)活化。用存在于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中的 20%(V/V)哌啶溶液在 20 分钟内进行 Fmoc 保护基的脱除(步骤 1)。通过用 3 当量溶于 5mL CHCl₃:NMM:HOAc(18:1:0.5)中的 Pd(PPh₃)₄ 溶液处理树脂 2 小时手动完成 Lys(Aloc)基的选择性脱保护(步骤 2)。随后树脂用 CHCl₃(6 x 5 mL)、20% 存在于 DCM 中的 HOAc(6 x 5 mL)、DCM(6 x 5 mL)和 DMF(6 x 5 mL)洗涤。此后再次自动合成以便添加 3-马来酰亚胺基丙酸(步骤 3)。每次偶联之间, 树脂用 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)洗涤 3 次并用异丙醇洗涤 3 次。用 85%TFA/5%TIS/5%苯硫基甲烷和 5%苯酚从树脂脱下肽, 随后用干冰冷却的 Et₂O 沉淀(步骤 4)。产物通过制备反相 HPLC、使用 Varian(Rainin)的制备二元 HPLC 系统纯化: 在约 180 分钟内 30-55%B(含 0.045%TFA 的 H₂O(A)和含 0.045%TFA 的 CH₃CN(B))以 9.5mL/分钟进行的梯度洗脱; 使用 Phenomenex Luna 10μ 苯基-己基 21mm x 25cm 柱和λ 214 和 254nm 的 UV 检测仪(Varian Dynamax UVD II), 得到预期的经修饰的肽(即 DAC), 通过 RP-HPLC 测出肽的纯度>95%。

25



实施例 24

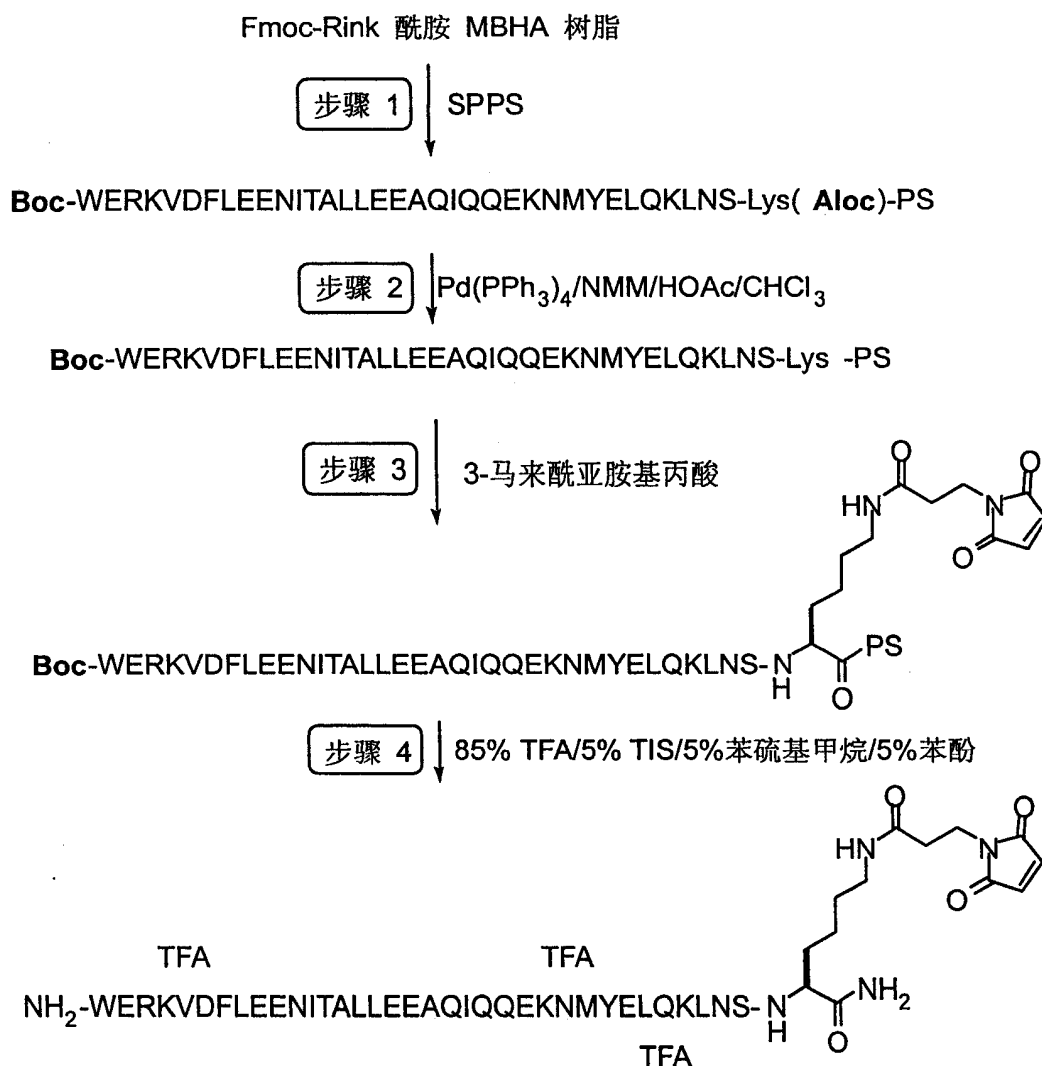
经修饰的抗 SIV 肽的制备

5 在本实施例中，按照下面的合成路线合成并修饰 SEQ ID NO:67 为含有连接体和马来酰亚胺基团。如美国专利 6,013,236 和 6,020,459 所述，SEQ ID NO:67 作为粗品肽表现出对猿猴免疫缺陷病毒(SIV)的抗病毒活性。

10 100 μmole 规模上的经修饰的肽的固相肽合成是采用手动固相合成、协同肽合成仪和 Fmoc 保护 Rink 酰胺 MBHA 树脂进行。将下列保护的氨基酸顺序加入树脂：Fmoc-Lys(Aloc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Met-

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-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH。把它们溶于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)并且按照序列用 O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基-脒六氟磷酸盐(HBTU)和二异丙基乙胺(DIEA)活化。

用存在于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中的 20%(V/V)哌啶溶液在 20 分钟内进行 Fmoc 保护基的脱除(步骤 1)。通过用 3 当量溶于 5mL CHCl₃:NMM:HOAc(18:1:0.5)中的 Pd(PPh₃)₄ 溶液处理树脂 2 小时手动完成 Lys(Aloc)基的选择性脱保护(步骤 2)。随后树脂用 CHCl₃(6 x 5 mL)、20% 存在于 DCM 中的 HOAc(6 x 5 mL)、DCM(6 x 5 mL)和 DMF(6 x 5 mL)洗涤。此后再次自动合成以便添加 3-马来酰亚胺基丙酸(步骤 3)。每次偶联之间,树脂用 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)洗涤 3 次并用异丙醇洗涤 3 次。用 85%TFA/5%TIS/5%苯硫基甲烷和 5%苯酚从树脂脱下肽,随后用干冰冷却的 Et₂O 沉淀(步骤 4)。产物通过制备反相 HPLC、使用 Varian(Rainin)的制备二元 HPLC 系统纯化:在约 180 分钟内 30-55%B(含 0.045%TFA 的 H₂O(A)和含 0.045%TFA 的 CH₃CN(B))以 9.5mL/分钟进行的梯度洗脱;使用 Phenomenex Luna 10μ 苯基-己基 21mm x 25cm 柱和λ 214 和 254nm 的 UV 检测仪(Varian Dynamax UVD II),得到预期的经修饰的肽(即 DAC),通过 RP-HPLC 测出肽的纯度>95%。



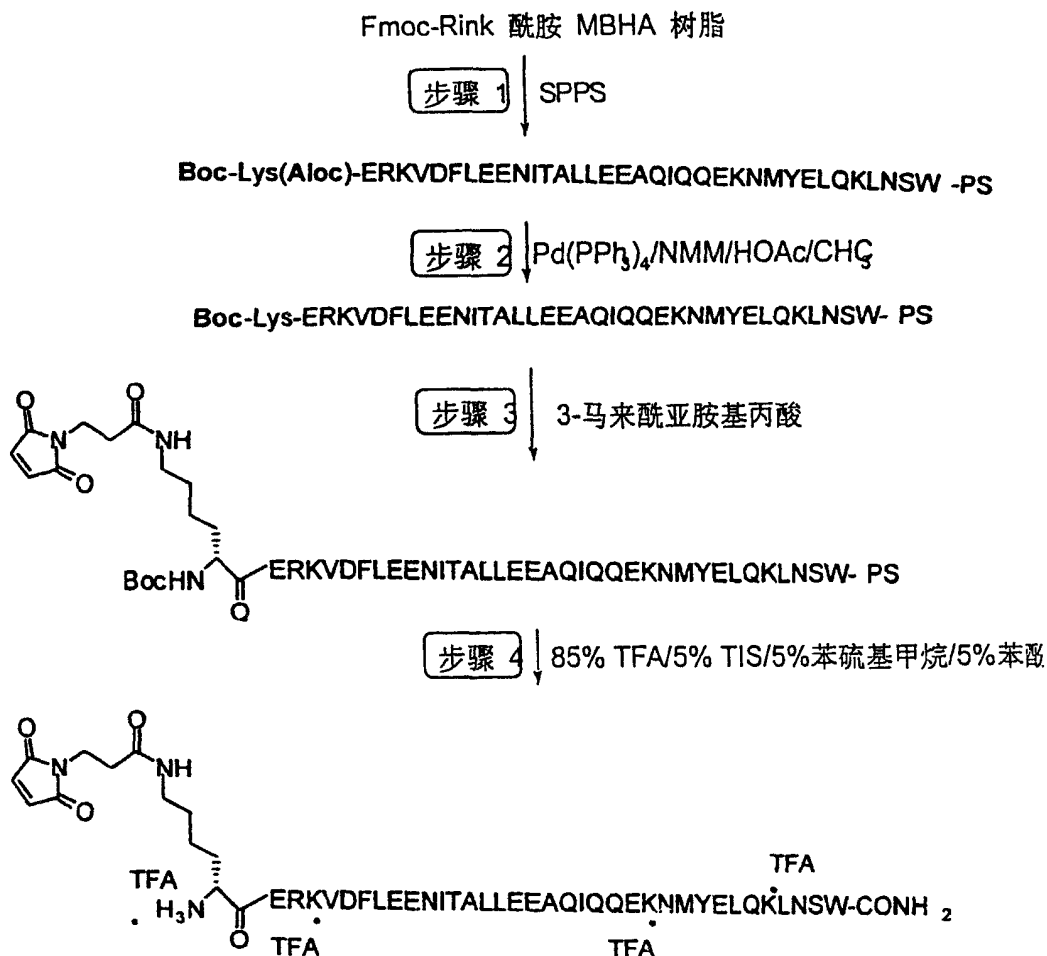
实施例 25

经修饰的抗 SIV 肽的制备

5 在本实施例中，按照下面的合成路线合成并修饰 SEQ ID NO:68 为含有连接体和马来酰亚胺基团。如美国专利 6,013,236 和 6,020,459 所述，SEQ ID NO:68 作为粗品肽表现出对猿猴免疫缺陷病毒(SIV)的抗病毒活性。

10 100 μmole 规模上的经修饰的肽的固相肽合成是采用手动固相合成、协同肽合成仪和 Fmoc 保护 Rink 酰胺 MBHA 树脂进行。将下列保护的氨基酸顺序加入树脂：Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-

OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Met-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-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH Boc-Lys(Aloc)-OH。把它们溶于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)并且按照序列用 O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基-脲六氟磷酸盐(HBTU)和二异丙基乙胺(DIEA)活化。用存在于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中的 20%(V/V)哌啶溶液在 20 分钟内进行 Fmoc 保护基的脱除(步骤 1)。通过用 3 当量溶于 5mL CHCl₃:NMM:HOAc(18:1:0.5)中的 Pd(PPh₃)₄ 溶液处理树脂 2 小时手动完成 Lys(Aloc)基的选择性脱保护(步骤 2)。随后树脂用 CHCl₃(6 x 5 mL)、20% 存在于 DCM 中的 HOAc(6 x 5 mL)、DCM(6 x 5 mL)和 DMF(6 x 5 mL)洗涤。此后再次自动合成以便添加 3-马来酰亚胺基丙酸(步骤 3)。每次偶联之间,树脂用 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)洗涤 3 次并用异丙醇洗涤 3 次。用 85%TFA/5%TIS/5%苯硫基甲烷和 5%苯酚从树脂脱下肽,随后用干冰冷却的 Et₂O 沉淀(步骤 4)。产物通过制备反相 HPLC、使用 Varian(Rainin)的制备二元 HPLC 系统纯化:在约 180 分钟内 30-55%B(含 0.045%TFA 的 H₂O(A)和含 0.045%TFA 的 CH₃CN(B))以 9.5mL/分钟进行的梯度洗脱;使用 Phenomenex Luna 10μ苯基-己基 21mm x 25cm 柱和λ 214 和 254nm 的 UV 检测仪(Varian Dynamax UVD II),得到预期的经修饰的肽(即 DAC),通过 RP-HPLC 测出肽的纯度>95%。



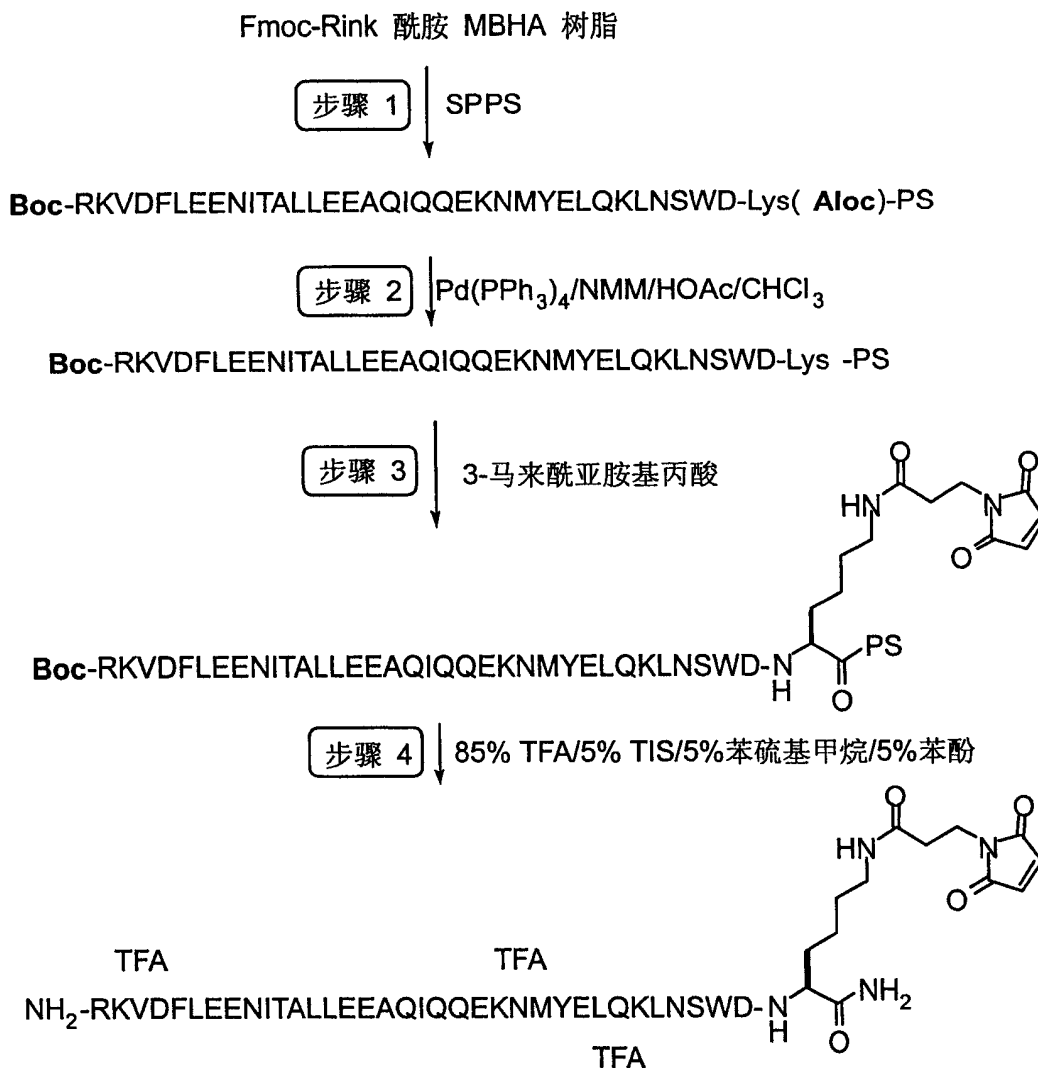
实施例 26

经修饰的抗 SIV 肽的制备

- 5 在本实施例中，按照下面的合成路线合成并修饰 SEQ ID NO:69 为含有连接体和马来酰亚胺基团。如美国专利 6,013,236 和 6,020,459 所述，SEQ ID NO:69 作为粗品肽表现出对猿猴免疫缺陷病毒(SIV)的抗病毒活性。
- 10 100 μ mole 规模上的经修饰的肽的固相肽合成是采用手动固相合成、协同肽合成仪和 Fmoc 保护 Rink 酰胺 MBHA 树脂进行。将下列保护的氨基酸顺序加入树脂：Fmoc-Lys(Aloc)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-
- 15 Glu(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Met-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-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH。

把它们溶于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)并且按照序列用 O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基-脲六氟磷酸盐(HBTU)和二异丙基乙胺(DIEA)活化。用存在于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中的 20%(V/V)哌啶溶液在 20 分钟内进行 Fmoc 保护基的脱除(步骤 1)。通过用 3 当量溶于 5mL CHCl₃:NMM:HOAc(18:1:0.5)中的 Pd(PPh₃)₄ 溶液处理树脂 2 小时手动完成 Lys(Aloc)基的选择性脱保护(步骤 2)。随后树脂用 CHCl₃(6 x 5 mL)、20% 存在于 DCM 中的 HOAc(6 x 5 mL)、DCM(6 x 5 mL)和 DMF(6 x 5 mL)洗涤。此后再次自动合成以便添加 3-马来酰亚胺基丙酸(步骤 3)。每次偶联之间,树脂用 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)洗涤 3 次并用异丙醇洗涤 3 次。用 85%TFA/5%TIS/5%苯硫基甲烷和 5%苯酚从树脂脱下肽,随后用干冰冷却的 Et₂O 沉淀(步骤 4)。产物通过制备反相 HPLC、使用 Varian(Rainin)的制备二元 HPLC 系统纯化:在约 180 分钟内 30-55%B(含 0.045%TFA 的 H₂O(A)和含 0.045%TFA 的 CH₃CN(B))以 9.5mL/分钟进行的梯度洗脱;使用 Phenomenex Luna 10μ 苯基-己基 21mm x 25cm 柱和λ 214 和 254nm 的 UV 检测仪(Varian Dynamax UVD II),得到预期的经修饰的肽(即 DAC),通过 RP-HPLC 测出肽的纯度>95%。



实施例 27

经修饰的抗 SIV 肽的制备

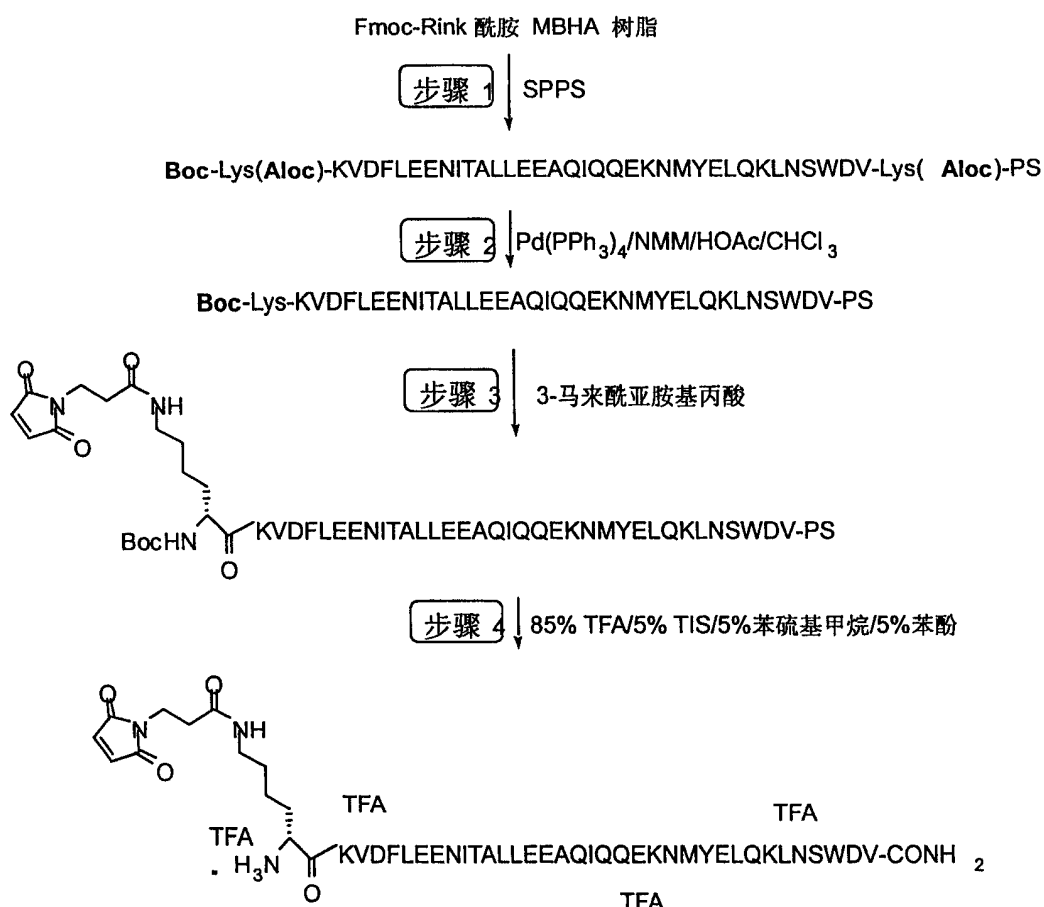
5 在本实施例中，按照下面的合成路线合成并修饰 SEQ ID NO:70 为含有连接体和马来酰亚胺基团。如美国专利 6,013,236 和 6,020,459 所述，SEQ ID NO:70 作为粗品肽表现出对猿猴免疫缺陷病毒(SIV)的抗病毒活性。

10 100 μ mole 规模上的经修饰的肽的固相肽合成是采用手动固相合成、协同肽合成仪和 Fmoc 保护 Rink 酰胺 MBHA 树脂进行。将下列保护的氨基酸顺序加入树脂：Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Leu-

OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Met-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-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Boc-Lys(Aloc)-OH。

把它们溶于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)并且按照序列用 O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基-脲六氟磷酸盐(HBTU)和二异丙基乙胺(DIEA)活化。用存在于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中的 20%(V/V)哌啶溶液在 20 分钟内进行 Fmoc 保护基的脱除(步骤 1)。通过用 3 当量溶于 5mL CHCl₃:NMM:HOAc(18:1:0.5)中的 Pd(PPh₃)₄ 溶液处理树脂 2 小时手动完成 Lys(Aloc)基的选择性脱保护(步骤 2)。随后树脂用 CHCl₃(6 x 5 mL)、20% 存在于 DCM 中的 HOAc(6 x 5 mL)、DCM(6 x 5 mL)和 DMF(6 x 5 mL)洗涤。此后再次自动合成以便添加 3-马来酰亚胺基丙酸(步骤 3)。每次偶联之间,树脂用 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)洗涤 3 次并用异丙醇洗涤 3 次。用 85%TFA/5%TIS/5%苯硫基甲烷和 5%苯酚从树脂脱下肽,随后用干冰冷却的 Et₂O 沉淀(步骤 4)。产物通过制备反相 HPLC、使用 Varian(Rainin)的制备二元 HPLC 系统纯化:在约 180 分钟内 30-55%B(含 0.045%TFA 的 H₂O(A)和含 0.045%TFA 的 CH₃CN(B))以 9.5mL/分钟进行的梯度洗脱;使用 Phenomenex Luna 10μ 苯基-己基 21mm x 25cm 柱和λ 214 和 254nm 的 UV 检测仪(Varian Dynamax UVD II),得到预期的经修饰的肽(即 DAC),通过 RP-HPLC 测出肽的纯度>95%。

25



实施例 28

5 经修饰的抗 SIV 肽的制备

在本实施例中，按照下面的合成路线合成并修饰 SEQ ID NO:71 为含有连接体和马来酰亚胺基团。如美国专利 6,013,236 和 6,020,459 所述，SEQ ID NO:71 作为粗品肽表现出对猿猴免疫缺陷病毒(SIV)的抗病毒活性。

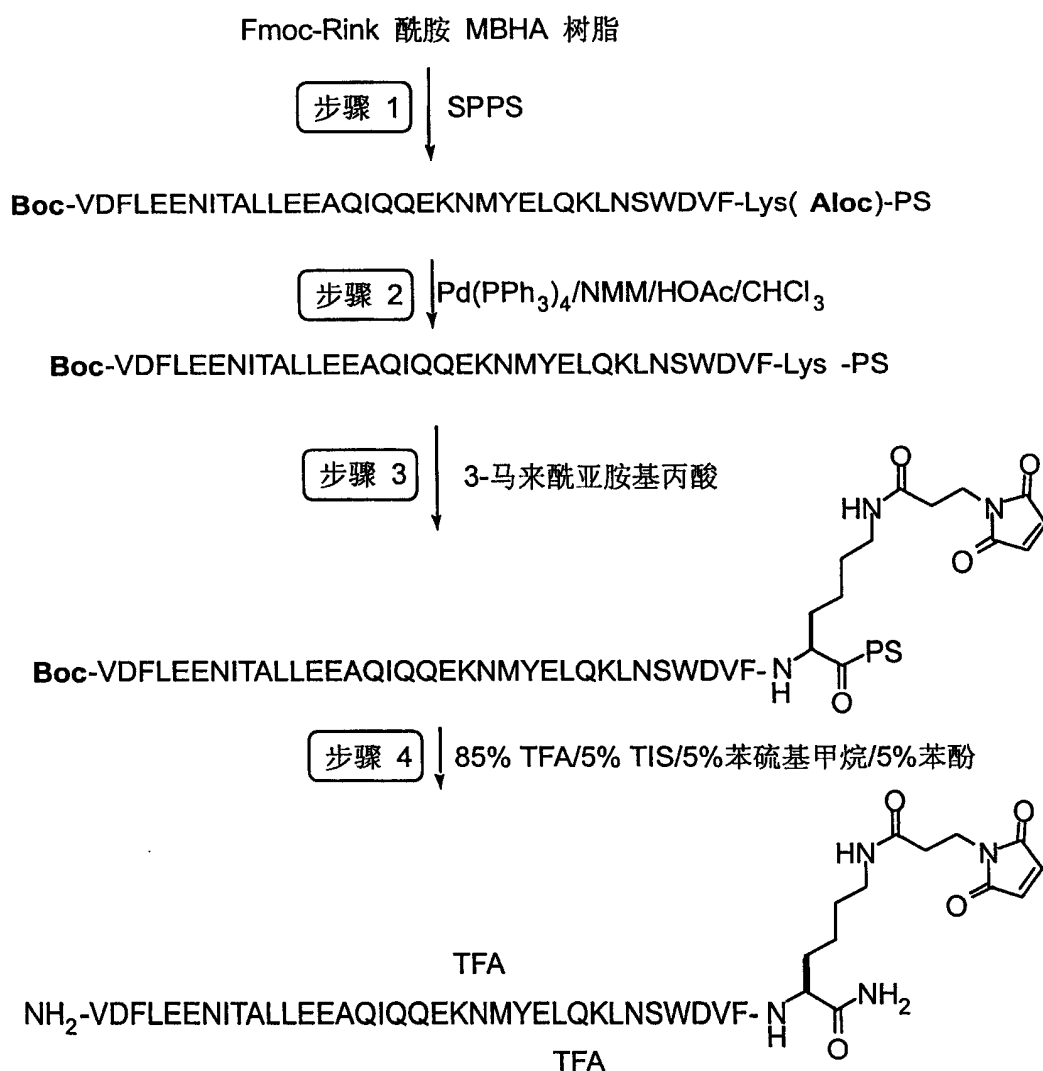
10

100 μmole 规模上的经修饰的肽的固相肽合成是采用手动固相合成、协同肽合成仪和 Fmoc 保护 Rink 酰胺 MBHA 树脂进行。将下列保护的氨基酸顺序加入树脂：Fmoc-Lys(Aloc)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-

15

Gln(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Met-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-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH。把它们溶于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)并且按照序列用 O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基-脲六氟磷酸盐(HBTU)和二异丙基乙胺(DIEA)活化。

用存在于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中的 20%(V/V)哌啶溶液在 20 分钟内进行 Fmoc 保护基的脱除(步骤 1)。通过用 3 当量溶于 5mL CHCl₃:NMM:HOAc(18:1:0.5)中的 Pd(PPh₃)₄ 溶液处理树脂 2 小时手动完成 Lys(Aloc)基的选择性脱保护(步骤 2)。随后树脂用 CHCl₃(6 x 5 mL)、20% 存在于 DCM 中的 HOAc(6 x 5 mL)、DCM(6 x 5 mL)和 DMF(6 x 5 mL)洗涤。此后再次自动合成以便添加 3-马来酰亚胺基丙酸(步骤 3)。每次偶联之间,树脂用 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)洗涤 3 次并用异丙醇洗涤 3 次。用 85%TFA/5%TIS/5%苯硫基甲烷和 5%苯酚从树脂脱下肽,随后用干冰冷却的 Et₂O 沉淀(步骤 4)。产物通过制备反相 HPLC、使用 Varian(Rainin)的制备二元 HPLC 系统纯化:在约 180 分钟内 30-55%B(含 0.045%TFA 的 H₂O(A)和含 0.045%TFA 的 CH₃CN(B))以 9.5mL/分钟进行的梯度洗脱;使用 Phenomenex Luna 10μ苯基-己基 21mm x 25cm 柱和λ 214 和 254nm 的 UV 检测仪(Varian Dynamax UVD II),得到预期的经修饰的肽(即 DAC),通过 RP-HPLC 测出肽的纯度>95%。



实施例 29

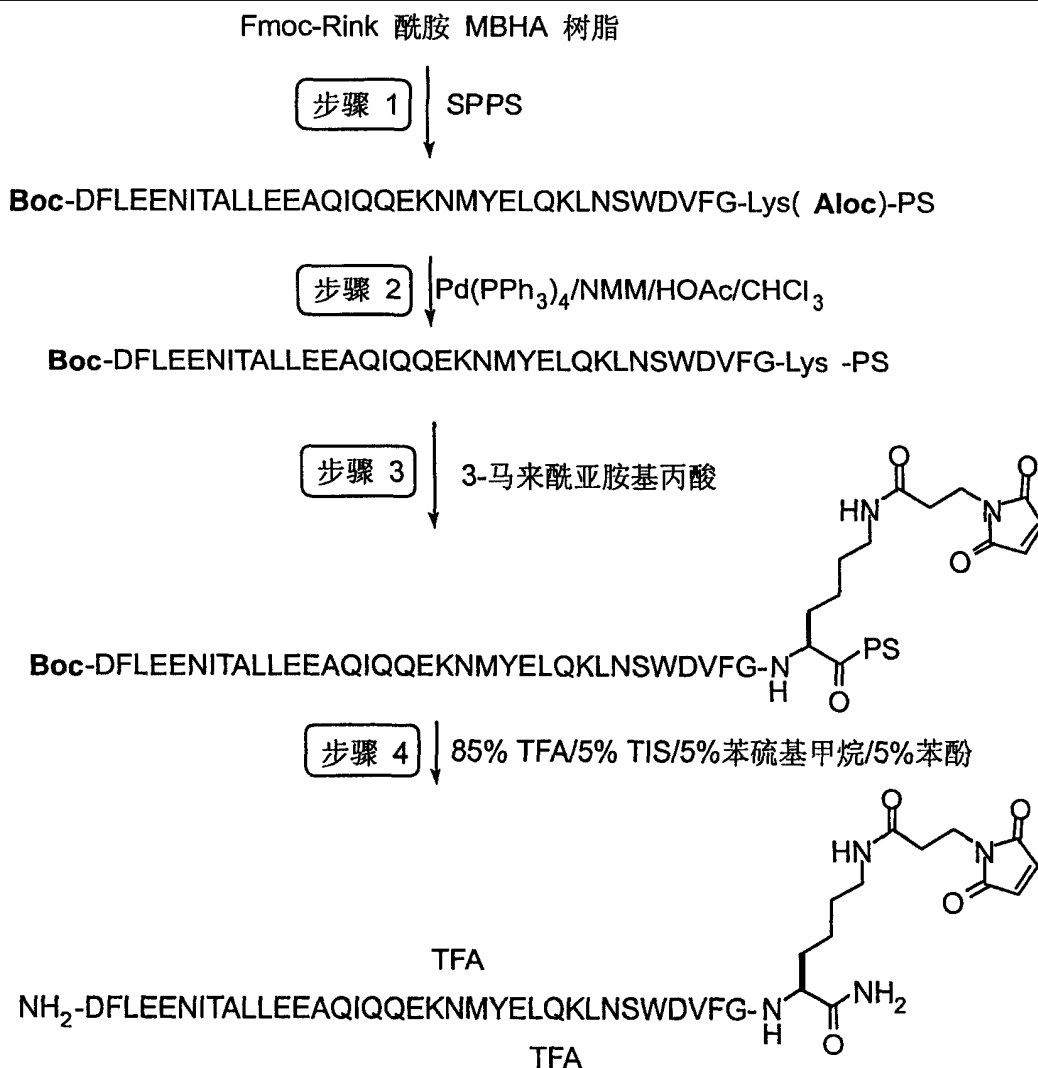
经修饰的抗 SIV 肽的制备

5 在本实施例中，按照下面的合成路线合成并修饰 SEQ ID NO:72 为含有连接体和马来酰亚胺基团。如美国专利 6,013,236 和 6,020,459 所述，SEQ ID NO:72 作为粗品肽表现出对猿猴免疫缺陷病毒(SIV)的抗病毒活性。

10 100μmole 规模上的经修饰的肽的固相肽合成是采用手动固相合成、协同肽合成仪和 Fmoc 保护 Rink 酰胺 MBHA 树脂进行。将下列保护的氨基酸顺序加入树脂：Fmoc-Lys(Aloc)-OH, Fmoc-Gly-OH,

Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Met-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-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH.

把它们溶于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)并且按照序列用 O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基-脲六氟磷酸盐(HBTU)和二异丙基乙胺(DIEA)活化。用存在于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中的 20%(V/V)哌啶溶液在 20 分钟内进行 Fmoc 保护基的脱除(步骤 1)。通过用 3 当量溶于 5mL CHCl₃:NMM:HOAc(18:1:0.5)中的 Pd(PPh₃)₄ 溶液处理树脂 2 小时手动完成 Lys(Alloc)基的选择性脱保护(步骤 2)。随后树脂用 CHCl₃(6 x 5 mL)、20% 存在于 DCM 中的 HOAc(6 x 5 mL)、DCM(6 x 5 mL)和 DMF(6 x 5 mL)洗涤。此后再次自动合成以便添加 3-马来酰亚胺基丙酸(步骤 3)。每次偶联之间,树脂用 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)洗涤 3 次并用异丙醇洗涤 3 次。用 85%TFA/5%TIS/5%苯硫基甲烷和 5%苯酚从树脂脱下肽,随后用干冰冷却的 Et₂O 沉淀(步骤 4)。产物通过制备反相 HPLC、使用 Varian(Rainin)的制备二元 HPLC 系统纯化:在约 180 分钟内 30-55%B(含 0.045%TFA 的 H₂O(A)和含 0.045%TFA 的 CH₃CN(B))以 9.5mL/分钟进行的梯度洗脱;使用 Phenomenex Luna 10μ 苯基-己基 21mm x 25cm 柱和λ 214 和 254nm 的 UV 检测仪(Varian Dynamax UVD II),得到预期的经修饰的肽(即 DAC),通过 RP-HPLC 测出肽的纯度>95%。



实施例 30

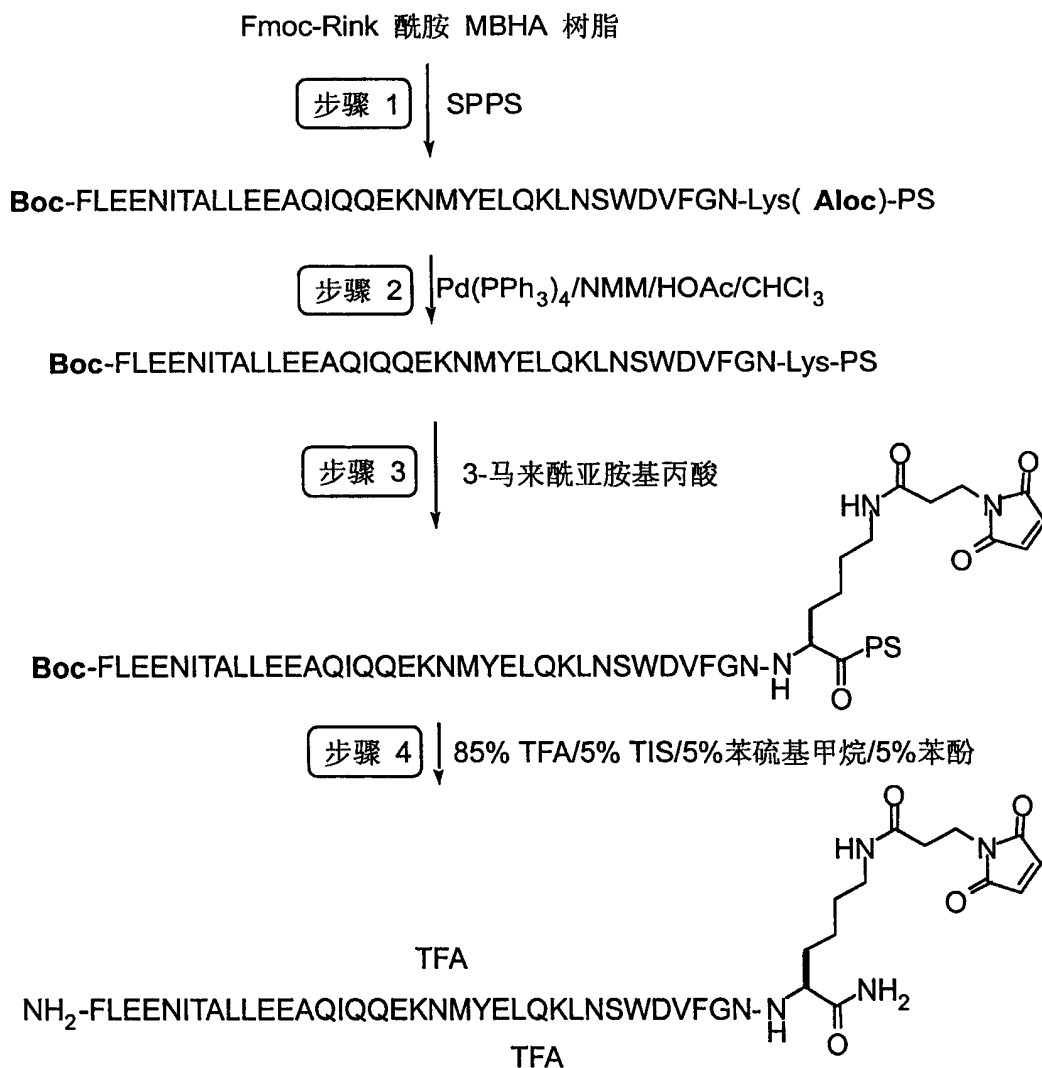
经修饰的抗 SIV 肽的制备

5 在本实施例中，按照下面的合成路线合成并修饰 SEQ ID NO:73 为含有连接体和马来酰亚胺基团。如美国专利 6,013,236 和 6,020,459 所述，SEQ ID NO:73 作为粗品肽表现出对猿猴免疫缺陷病毒(SIV)的抗病毒活性。

10 100 μ mole 规模上的经修饰的肽的固相肽合成是采用手动固相合成、协同肽合成仪和 Fmoc 保护 Rink 酰胺 MBHA 树脂进行。将下列保护的氨基酸顺序加入树脂：Fmoc-Lys(Aloc)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-

Trp(Boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Met-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-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Phe-OH。把它们溶于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)并且按照序列用 O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基-脒六氟磷酸盐(HBTU)和二异丙基乙胺(DIEA)活化。用存在于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中的 20%(V/V)哌啶溶液在 20 分钟内进行 Fmoc 保护基的脱除(步骤 1)。通过用 3 当量溶于 5mL CHCl₃:NMM:HOAc(18:1:0.5)中的 Pd(PPh₃)₄ 溶液处理树脂 2 小时手动完成 Lys(Aloc)基的选择性脱保护(步骤 2)。随后树脂用 CHCl₃(6 x 5 mL)、20% 存在于 DCM 中的 HOAc(6 x 5 mL)、DCM(6 x 5 mL)和 DMF(6 x 5 mL)洗涤。此后再次自动合成以便添加 3-马来酰亚胺基丙酸(步骤 3)。每次偶联之间,树脂用 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)洗涤 3 次并用异丙醇洗涤 3 次。用 85%TFA/5%TIS/5%苯硫基甲烷和 5%苯酚从树脂脱下肽,随后用干冰冷却的 Et₂O 沉淀(步骤 4)。产物通过制备反相 HPLC、使用 Varian(Rainin)的制备二元 HPLC 系统纯化:在约 180 分钟内 30-55%B(含 0.045%TFA 的 H₂O(A)和含 0.045%TFA 的 CH₃CN(B))以 9.5mL/分钟进行的梯度洗脱;使用 Phenomenex Luna 10μ 苯基-己基 21mm x 25cm 柱和λ 214 和 254nm 的 UV 检测仪(Varian Dynamax UVD II),得到预期的经修饰的肽(即 DAC),通过 RP-HPLC 测出肽的纯度>95%。

25



虽然已经描述和例举了本发明的某些实施方式，但所属领域普通技术人员应理解本发明不受这些实施方式具体内容的限定，而由所附的权利要求书限定。

表 2

DP178 羧基端平截	
5	YTS YTSL YTSLI YTSLIH YTSLIHS
10	YTSLIHSL YTSLIHSLI YTSLIHSLIE YTSLIHSLIEE YTSLIHSLIEES
15	YTSLIHSLIEESQ YTSLIHSLIEESQN YTSLIHSLIEESQNNQ YTSLJHSLJEESSQNNQ YTSLIHSLIEESQNNQNE
20	YTSLIHSLIEESQNNQNEK YTSLIHSLIEESQNNQNEKN YTSLIHSLIEESQNNQNEKNE YTSLIHSLIEESQNNQNEKNEQ YTSLIHSLIEESQNNQNEKNEQE
25	YTSLIHSLIEESQNNQNEKNEQEL YTSLIHSLIEESQNNQNEKNEQELL YTSLIHSLIEESQNNQNEKNEQELLE YTSLIHSLIEESQNNQNEKNEQELLEL YTSLIHSLIEESQNNQNEKNEQELLELD
30	YTSLIHSLIEESQNNQNEKNEQELLELDK

5 YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQEELLELDKW
YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQEELLELDKWA
YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQEELLELDKVAS
YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQEELLELDKVASL
YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQEELLELDKVASLW
YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQEELLELDKVASLWN
YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQEELLELDKVASLWNW
YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQEELLELDKVASLWNWF

10 采用表 1 的单字母氨基酸编码

表 3

	DP178 氨基端平截
5	NWF WNWF LWNWF SLWNWF
10	ASLWNWF WASLWNWF KWASLWNWF DKWASLWNWF LDKWASLWNWF
15	ELDKWASLWNWF LELDKWASLWNWF LLELDKWASLWNWF ELLELDKWASLWNWF QELLELDKWASLWNWF
20	EQELLELDKWASLWNWF NEQELLELDKWASLWNWF KNEQELLELDKWASLWNWF EKNEQELLELDKWASLWNWF QEKNEQELLELDKWASLWNWF
25	QQEKNEQELLELDKWASLWNWF NQQEKNEQELLELDKWASLWNWF QNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF SQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF ESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF
30	EESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF

IEESQNQQEKNEQEELLELDKWASLWNWF
LIEESQNQQEKNEQEELLELDKWASLWNWF
SLIEESQNQQEKNEQEELLELDKWASLWNWF
HSLIEESQNQQEKNEQEELLELDKWASLWNWF
5 IHSLIEESQNQQEKNEQEELLELDKWASLWNWF
LIHSLIEESQNQQEKNEQEELLELDKWASLWNWF
SLIHSLIEESQNQQEKNEQEELLELDKWASLWNWF
TSLIHSLIEESQNQQEKNEQEELLELDKWASLWNWF
YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQEELLELDKWASLWNWF

10

采用表 1 的单字母氨基酸编码

表 4

DP107 羧基端平截

5	NNL
	NNLL
	NNLLR
	NNLLRA
	NNLLRAI
10	NNLLRAIE
	NNLLRAIEA
	NNLLRAIEAQ
	NNLLRAIEAQQ
	NNLLRAIEAQQH
15	NNLLRAIEAQQHL
	NNLLRAIEAQQHLL
	NNLLRAIEAQQHLLQ
	NNLLRAIEAQQHLLQL
	NNLLRAIEAQQHLLQLT
20	NNLLRAIEAQQHLLQLTV
	NNLLRAIEAQQHLLQLTVW
	NNLLRAIEAQQHLLQLTVWQ
	NNLLRAIEAQQHLLQLTVWQI
	NNLLRAIEAQQHLLQLTVWQIK
25	NNLLRAIEAQQHLLQLTVWQIKQ
	NNLLRAIEAQQHLLQLTVWQIKQL
	NNLLRAIEAQQHLLQLTVWQIKQLQ
	NNLLRAIEAQQHLLQLTVWQIKQLQA
	NNLLRAIEAQQHLLQLTVWQIKQLQAR
30	NNLLRAIEAQQHLLQLTVWQIKQLQARI

	NNLLRAIEAQQHLLQLTVWQIKQLQARIL
	NNLLRAIEAQQHLLQLTVWQIKQLQARILA
	NNLLRAIEAQQHLLQLTVWQIKQLQARILAV
	NNLLRAIEAQQHLLQLTVWQIKQLQARILAVE
5	NNLLRAIEAQQHLLQLTVWQIKQLQARILAVER
	NNLLRAIEAQQHLLQLTVWQIKQLQARILAVERY
	NNLLRAIEAQQHLLQLTVWQIKQLQARILAVERYL
	NNLLRAIEAQQHLLQLTVWQIKQLQARILAVERYLK
	NNLLRAIEAQQHLLQLTVWQIKQLQARILAVERYLKD
10	NNLLRAIEAQQHLLQLTVWQIKQLQARILAVERYLKDQ

采用表 1 的单字母氨基酸编码

表 5

DP107 氨基端平截	
5	KDQ LKDQ YLKDQ RYLKDQ ERYLKDQ
10	VERYLKDQ AVERYLKDQ LAVERYLKDQ ILAVERYLKDQ RILAVERYLKDQ
15	ARILAVERYLKDQ QARILAVERYLKDQ LQARILAVERYLKDQ QLQARILAVERYLKDQ KQLQARILAVERYLKDQ
20	IKQLQARILAVERYLKDQ QIKQLQARILAVERYLKDQ WQIKQLQARILAVERYLKDQ VWQIKQLQARILAVERYLKDQ TVWQIKQLQARILAVERYLKDQ
25	LTVWQIKQLQARILAVERYLKDQ QLTVWQIKQLQARILAVERYLKDQ LQLTVWQIKQLQARILAVERYLKDQ LLQLTVWQIKQLQARILAVERYLKDQ HLLQLTVWQIKQLQARILAVERYLKDQ
30	QHLLQLTVWQIKQLQARILAVERYLKDQ

	QQHLLQLTVWQIKQLQARILAVEYLKDQ
	AQQHLLQLTVWQIKQLQARILAVEYLKDQ
	EAQQHLLQLTVWQIKQLQARILAVEYLKDQ
	IEAQQHLLQLTVWQIKQLQARILAVEYLKDQ
5	AIEAQQHLLQLTVWQIKQLQARILAVEYLKDQ
	RAIEAQQHLLQLTVWQIKQLQARILAVEYLKDQ
	LRAIEAQQHLLQLTVWQIKQLQARILAVEYLKDQ
	LLRAIEAQQHLLQLTVWQIKQLQARILAVEYLKDQ
	NLLRAIEAQQHLLQLTVWQIKQLQARILAVEYLKDQ
10	NNLLRAIEAQQHLLQLTVWQIKQLQARILAVEYLKDQ

采用表 1 的单字母氨基酸编码

表 6

HIV-2_{NIH2} DP178 类似物羧基端平截

5	LEA
	LEAN
	LEANI
	LEANIS
	LEANISQ
10	LEANISQS
	LEANISQSL
	LEANISQSLE
	LEANISQSLEQ
	LEANISQSLEQA
15	LEANISQSLEQAQ
	LEANISQSLEQAQI
	LEANISQSLEQAQIQ
	LEANISQSLEQAQIQQ
	LEANISQSLEQAQIQQE
20	LEANISQSLEQAQIQQEK
	LEANISQSLEQAQIQQEKN
	LEANISQSLEQAQIQQEKNM
	LEANISQSLEQAQIQQEKNMY
	LEANISQSLEQAQIQQEKNMYE
25	LEANISQSLEQAQIQQEKNMYEL
	LEANISQSLEQAQIQQEKNMYELQ
	LEANISQSLEQAQIQQEKNMYELQK
	LEANISQSLEQAQIQQEKNMYELQKL
	LEANISQSLEQAQIQQEKNMYELQKLN
30	LEANISQSLEQAQIQQEKNMYELQKLNS

LEANISQSLEQAQIQQEKNMYELQKLNSW
LEANISQSLEQAQIQQEKNMYELQKLNSWD
LEANISQSLEQAQIQQEKNMYELQKLNSWDV
LEANISQSLEQAQIQQEKNMYELQKLNSWDVF
5 LEANISQSLEQAQIQQEKNMYELQKLNSWDVFT
LEANISQSLEQAQIQQEKNMYELQKLNSWDVFTN
LEANISQSLEQAQIQQEKNMYELQKLNSWDVFTNW
LEANISQSLEQAQIQQEKNMYELQKLNSWDVFTNWL

10 采用表 1 的单字母氨基酸编码

表 7

HIV-2_{NIH2} DP178 类似物氨基端平截

5	NWL
	TNWL
	FTNWL
	VFTNWL
	DVFTNWL
10	WDVFTNWL
	SWDVFTNWL
	NSWDVFTNWL
	LNSWDVFTNWL
	KLNSWDVFTNWL
15	QKLNSWDVFTNWL
	LQKLNSWDVFTNWL
	ELQKLNSWDVFTNWL
	YELQKLNSWDVFTNWL
	MYELQKLNSWDVFTNWL
20	NMYELQKLNSWDVFTNWL
	KNMYELQKLNSWDVFTNWL
	EKNMYELQKLNSWDVFTNWL
	QEKNMYELQKLNSWDVFTNWL
	QQEKNMYELQKLNSWDVFTNWL
25	IQQEKNMYELQKLNSWDVFTNWL
	QIQQEKNMYELQKLNSWDVFTNWL
	AQIQQEKNMYELQKLNSWDVFTNWL
	QAQIQQEKNMYELQKLNSWDVFTNWL
	EQAQIQQEKNMYELQKLNSWDVFTNWL
30	LEQAQIQQEKNMYELQKLNSWDVFTNWL

5 SLEQAQIQQEKNMYELQKLNSWDVFTNWL
 QSLEQAQIQQEKNMYELQKLNSWDVFTNWL
 SQSLEQAQIQQEKNMYELQKLNSWDVFTNWL
 ISQSLEQAQIQQEKNMYELQKLNSWDVFTNWL
 NISQSLEQAQIQQEKNMYELQKLNSWDVFTNWL
 ANISQSLEQAQIQQEKNMYELQKLNSWDVFTNWL
 EANISQSLEQAQIQQEKNMYELQKLNSWDVFTNWL
 LEANISQSLEQAQIQQEKNMYELQKLNSWDVFTNWL

10 采用表 1 的单字母氨基酸编码

表 8

 呼吸道合胞病毒（RSV）DP107

F2 区类似物羧基端平截

5	YTS
	YTSV
	YTSVI
	YTSVIT
10	YTSVITI
	YTSVITIE
	YTSVITIEL
	YTSVITIELS
	YTSVITIELSN
15	YTSVITIELSNI
	YTSVITIELSNIK
	YTSVITIELSNIKE
	YTSVITIELSNIKEN
	YTSVITIELSNIKENK
20	YTSVITIELSNIKENKC
	YTSVITIELSNIKENKCN
	YTSVITIELSNIKENKCNG
	YTSVITIELSNIKENKCNGT
	YTSVITIELSNIKENKCNGTD
25	YTSVITIELSNIKENKCNGTDA
	YTSVITIELSNIKENKCNGTDAK
	YTSVITIELSNIKENKCNGTDAKV
	YTSVITIELSNIKENKCNGTDAKVK
	YTSVITIELSNIKENKCNGTDAKVKL
30	YTSVITIELSNIKENKCNGTDAKVCLI

	YTSVITIELSNIKENKCNGTDAKVKLIK
	YTSVITIELSNIKENKCNGTDAKVKLIQ
	YTSVITIELSNIKENKCNGTDAKVKLIKQE
	YTSVITIELSNIKENKCNGTDAKVKLIKQEL
5	YTSVITIELSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELD
	YTSVITIELSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDK
	YTSVITIELSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKY
	YTSVITIELSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYK
	YTSVITIELSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKN
10	YTSVITIELSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNA
	YTSVITIELSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAV
	YTSVITIELSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAV
	YTSVITIELSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTE
	YTSVITIELSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTEL
15	YTSVITIELSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQ
	YTSVITIELSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQL
	YTSVITIELSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQI.L
	YTSVITIELSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLL
	M
20	YTSVITIELSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLL
	MQ
	YTSVITIELSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLL
	MQS
	YTSVITIELSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLL
25	MQST

采用表 1 的单字母氨基酸编码

表 9

	呼吸道合胞病毒 (RSV) DP107
	F2 区类似物氨基端平截
5	QST
	MQST
	LMQST
	LLMQST
10	QLLMQST
	LQLLMQST
	ELQLLMQST
	TELQLLMQST
	VTELQLLMQST
15	AVTELQLLMQST
	NAVTELQLLMQST
	KNAVTELQLLMQST
	YKNAVTELQLLMQST
	KYKNAVTELQLLMQST
20	DKYKNAVTELQLLMQST
	LDKYKNAVTELQLLMQST
	ELDKYKNAVTELQLLMQST
	QELDKYKNAVTELQLLMQST
	KQELDKYKNAVTELQLLMQST
25	IKQELDKYKNAVTELQLLMQST
	LIKQELDKYKNAVTELQLLMQST
	KLIKQELDKYKNAVTELQLLMQST
	VKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQST
	KVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQST
30	AKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQST

DAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQST
 TDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQST
 GTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQST
 NGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQST
 5 CNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQST
 KCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQST
 NKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQST
 KENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQST
 IKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQST
 10 NIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQST
 SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQST
 LSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQST
 ELSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQST
 IELSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQST
 15 TIELSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQST
 ITIELSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQST
 VITIELSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQ
 ST
 SVITIELSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLM
 20 QST
 TSVITIELSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLM
 QST

采用表 1 的单字母氨基酸编码

表 10

呼吸道合胞病毒（RSV）F1 DP178 区
类似物羧基端平截

5	FYD
	FYDP
	FYDPL
	FYDPLV
10	FYDPLVF
	FYDPLVFP
	FYDPLVFPS
	FYDPLVFPSD
	FYDPLVFPSDE
15	FYDPLVFPSDEF
	FYDPLVFPSDEFD
	FYDPLVFPSDEFDA
	FYDPLVFPSDEFDAS
	FYDPLVFPSDEFDASI
20	FYDPLVFPSDEFDASIS
	FYDPLVFPSDEFDASISQ
	FYDPLVFPSDEFDASISQV
	FYDPLVFPSDEFDASISQVN
	FYDPLVFPSDEFDASISQVNE
25	FYDPLVFPSDEFDASISQVNEK
	FYDPLVFPSDEFDASISQVNEKI
	FYDPLVFPSDEFDASISQVNEKIN
	FYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQ
	FYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQS
30	FYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSL

	FYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLA
	FYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAF
	FYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFI
	FYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIR
5	FYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRK
	FYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKS
	FYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSD
	FYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDE
	FYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEL
10	FYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELL

采用表 1 的单字母氨基酸编码

表 11

	呼吸道合胞病毒（RSV）F1 DP178 区 类似物氨基端平截
5	DELL SDELL KSDELL RKSDDELL
10	IRKSDELL FIRKSDELL AFIRKSDELL LAFIRKSDELL SLAFIRKSDELL
15	QSLAFIRKSDELL NQLAFIRKSDELL INQLAFIRKSDELL KINQLAFIRKSDELL EKINQLAFIRKSDELL
20	NEKINQLAFIRKSDELL VNEKINQLAFIRKSDELL QVNEKINQLAFIRKSDELL SQVNEKINQLAFIRKSDELL ISQVNEKINQLAFIRKSDELL
25	SISQVNEKINQLAFIRKSDELL ASISQVNEKINQLAFIRKSDELL DASISQVNEKINQLAFIRKSDELL FDASISQVNEKINQLAFIRKSDELL EFDASISQVNEKINQLAFIRKSDELL
30	DEFDASISQVNEKINQLAFIRKSDELL

5 SDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELL
 PSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELL
 FPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELL
 VFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELL
 LVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELL
 PLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELL
 DPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELL
 YDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELL

10 采用表 1 的单字母氨基酸编码

表 12

	人副流感病毒 3 (HPV3) F1 区
	DP178 类似物羧基端平截
5	ITL
	ITLN
	ITLNN
	ITLNNS
10	ITLNNSV
	ITLNNSVA
	ITLNNSVAL
	ITLNNSVALD
	ITLNNSVALDP
15	ITLNNSVALDPI
	ITLNNSVALDPID
	ITLNNSVALDPIDI
	ITLNNSVALDPIDIS
	ITLNNSVALDPIDISI
20	ITLNNSVALDPIDISIE
	ITLNNSVALDPIDISIEL
	ITLNNSVALDPIDISIELN
	ITLNNSVALDPIDISIELNK
	ITLNNSVALDPIDISIELNKA
25	ITLNNSVALDPIDISIELNKAK
	ITLNNSVALDPIDISIELNKAKS
	ITLNNSVALDPIDISIELNKAKSD
	ITLNNSVALDPIDISIELNKAKSDL
	ITLNNSVALDPIDISIELNKAKSDLE
30	ITLNNSVALDPIDISIELNKAKSDLEE

ITLNNSVALDPIDISIELNKA₁SDLEES
ITLNNSVALDPIDISIELNKA₂SDLEESK
ITLNNSVALDPIDISIELNKA₃SDLEESKE
ITLNNSVALDPIDISIELNKA₄SDLEESKEW
5 ITLNNSVALDPIDISIELNKA₅SDLEESKEWI
ITLNNSVALDPIDISIELNKA₆SDLEESKEWIR
ITLNNSVALDPIDISIELNKA₇SDLEESKEWIRR
ITLNNSVALDPIDISIELNKA₈SDLEESKEWIRRS

10 采用表 1 的单字母氨基酸编码

表 13

	人副流感病毒 3 (HPV3) F1 区
	DP178 类似物氨基端平截
5	RRS
	IRRS
	WIRRS
	EWIRRS
10	KEWIRRS
	SKEWIRRS
	ESKEWIRRS
	EESKEWIRRS
	LEESKEWIRRS
15	DLEESKEWIRRS
	SDLEESKEWIRRS
	KSDLEESKEWIRRS
	AKSDLEESKEWIRRS
	KAKSDLEESKEWIRRS
20	NKAKSDLEESKEWIRRS
	LNKAKSDLEESKEWIRRS
	ELNKAKSDLEESKEWIRRS
	IELNKAKSDLEESKEWIRRS
	SIELNKAKSDLEESKEWIRRS
25	ISIELNKAKSDLEESKEWIRRS
	DISIELNKAKSDLEESKEWIRRS
	IDISIELNKAKSDLEESKEWIRRS
	PIDISIELNKAKSDLEESKEWIRRS
	DPIDISIELNKAKSDLEESKEWIRRS
30	LDPIDISIELNKAKSDLEESKEWIRRS

	ALDPIDISIELNKA	AKSDLEESKEWIRRS
	VALDPIDISIELNKA	AKSDLEESKEWIRRS
	SVALDPIDISIELNKA	AKSDLEESKEWIRRS
	NSVALDPIDISIELNKA	AKSDLEESKEWIRRS
5	NNSVALDPIDISIELNKA	AKSDLEESKEWIRRS
	LNNSVALDPIDISIELNKA	AKSDLEESKEWIRRS
	TLNNSVALDPIDISIELNKA	AKSDLEESKEWIRRS

采用表 1 的单字母氨基酸编码

表 14

人副流感病毒 3 (HPV3) F1 区
DP107 类似物羧基端平截

5	ALG
	ALGV
	ALGVA
	ALGVAT
10	ALGVATS
	ALGVATSA
	ALGVATSAQ
	ALGVATSAQI
	ALGVATSAQIT
15	ALGVATSAQITA
	ALGVATSAQITAA
	ALGVATSAQITAAV
	ALGVATSAQITAAVA
	ALGVATSAQITAVAL
20	ALGVATSAQITAVALV
	ALGVATSAQITAVALVE
	ALGVATSAQITAVALVEA
	ALGVATSAQITAVALVEAK
	ALGVATSAQITAVALVEAKQ
25	ALGVATSAQITAVALVEAKQA
	ALGVATSAQITAVALVEAKQAR
	ALGVATSAQITAVALVEAKQARS
	ALGVATSAQITAVALVEAKQARSD
	ALGVATSAQITAVALVEAKQARSDI
30	ALGVATSAQITAVALVEAKQARSDIE

5

ALGVATSAQITA A VALVEAKQARSDIEK
ALGVATSAQITA A VALVEAKQARSDIEKL
ALGVATSAQITA A VALVEAKQARSDIEKLK
ALGVATSAQITA A VALVEAKQARSDIEKLKE
ALGVATSAQITA A VALVEAKQARSDIEKLKEA
ALGVATSAQITA A VALVEAKQARSDIEKLKEAI
ALGVATSAQITA A VALVEAKQARSDIEKLKEAIR

采用表 1 的单字母氨基酸编码

表 15

	人副流感病毒 3 (HPV3) F1 区
	DP107 类似物氨基端平截
5	IRD
	AIRD
	EAIRD
	KEAIRD
10	LKEAIRD
	KLKEAIRD
	EKLKEAIRD
	IEKLKEAIRD
	DIEKLKEAIRD
15	SDIEKLKEAIRD
	RSDIEKLKEAIRD
	ARSDIEKLKEAIRD
	QARSDIEKLKEAIRD
	KQARSDIEKLKEAIRD
20	AKQARSDIEKLKEAIRD
	EAKQARSDIEKLKEAIRD
	VEAKQARSDIEKLKEAIRD
	LVEAKQARSDIEKLKEAIRD
	ALVEAKQARSDIEKLKEAIRD
25	VALVEAKQARSDIEKLKEAIRD
	AVALVEAKQARSDIEKLKEAIRD
	AAVALVEAKQARSDIEKLKEAIRD
	TAAVALVEAKQARSDIEKLKEAIRD
	ITAAVALVEAKQARSDIEKLKEAIRD
30	QITAAVALVEAKQARSDIEKLKEAIRD

5 AQITA A VALVEAKQARSDIEKLKEAIRD
 SAQITA A VALVEAKQARSDIEKLKEAIRD
 TSAQITA A VALVEAKQARSDIEKLKEAIRD
 ATSAQITA A VALVEAKQARSDIEKLKEAIRD
 VATSAQITA A VALVEAKQARSDIEKLKEAIRD
 GVATSAQITA A VALVEAKQARSDIEKLKEAIRD
 LGVATSAQITA A VALVEAKQARSDIEKLKEAIRD

采用表 1 的单字母氨基酸编码

表 16

抗呼吸道合胞病毒（RSV）肽

5	TSVITIELSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKN SVITIELSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNA VITIELSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAV VAVSKVLHLEGEVNKIALSTNKAVVSLSNQVSV AVSKVLHLEGEVNKIALSTNKAVVSLSNQVSV
10	VSKVLHLEGEVNKIALSTNKAVVSLSNQVSVL SKVLHLEGEVNKIALSTNKAVVSLSNQVSVLT KVLHLEGEVNKIALSTNKAVVSLSNQVSVLTS LEGEVNKIALSTNKAVVSLSNQVSVLTSKVLD GEVNKIALSTNKAVVSLSNQVSVLTSKVLDLK
15	EVNKIALSTNKAVVSLSNQVSVLTSKVLDLKN VNKIALSTNKAVVSLSNQVSVLTSKVLDLKNY NKIALSTNKAVVSLSNQVSVLTSKVLDLKNYI KIALSTNKAVVSLSNQVSVLTSKVLDLKNYID IALSTNKAVVSLSNQVSVLTSKVLDLKNYIDK
20	ALLSTNKAVVSLSNQVSVLTSKVLDLKNYIDKQ VAVSKVLHLEGEVNKIALSTNKAVVSLSNQVSV AVSKVLHLEGEVNKIALSTNKAVVSLSNQVSV VSKVLHLEGEVNKIALSTNKAVVSLSNQVSVL SKVLHLEGEVNKIALSTNKAVVSLSNQVSVLT
25	KVLHLEGEVNKIALSTNKAVVSLSNQVSVLTS LEGEVNKIALSTNKAVVSLSNQVSVLTSKVLD GEVNKIALSTNKAVVSLSNQVSVLTSKVLDLK EVNKIALSTNKAVVSLSNQVSVLTSKVLDLKN VNKIALSTNKAVVSLSNQVSVLTSKVLDLKNY
30	NKIALSTNKAVVSLSNQVSVLTSKVLDLKNYI

KIALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYID
IALSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDK
ALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQ

5 采用表 1 的单字母氨基酸编码

表 17

抗人副流感病毒 3 (HPV3) 肽

5	TLNNSVALDPIDISIELNKA	SDLEESKEWIRRSN
	LNNSVALDPIDISIELNKA	SDLEESKEWIRRSNQ
	NNSVALDPIDISIELNKA	SDLEESKEWIRRSNQK
	NSVALDPIDISIELNKA	SDLEESKEWIRRSNQKL
	SVALDPIDISIELNKA	SDLEESKEWIRRSNQKLD
10	VALDPIDISIELNKA	SDLEESKEWIRRSNQKLDS
	ALDPIDISIELNKA	SDLEESKEWIRRSNQKLDSI
	LDPIDISIELNKA	SDLEESKEWIRRSNQKLDSIG
	DPIDISIELNKA	SDLEESKEWIRRSNQKLDSIGN
	PIDISIELNKA	SDLEESKEWIRRSNQKLDSIGNW
15	IDISIELNKA	SDLEESKEWIRRSNQKLDSIGNWH
	DISIELNKA	SDLEESKEWIRRSNQKLDSIGNWHQ
	ISIELNKA	SDLEESKEWIRRSNQKLDSIGNWHQS
	SIELNKA	SDLEESKEWIRRSNQKLDSIGNWHQSS
	IELNKA	SDLEESKEWIRRSNQKLDSIGNWHQSST
20	ELNKA	SDLEESKEWIRRSNQKLDSIGNWHQSSTT
	TAAVALVEAKQARSDIEKLKEA	IRDTNKAVQSVQVS
	AVALVEAKQARSDIEKLKEA	IRDTNKAVQSVQSSI
	LVEAKQARSDIEKLKEA	IRDTNKAVQSVQSSIGNL
	VEAKQARSDIEKLKEA	IRDTNKAVQSVQSSIGNLI
25	EAKQARSDIEKLKEA	IRDTNKAVQSVQSSIGNLIV
	AKQARSDIEKLKEA	IRDTNKAVQSVQSSIGNLIVA
	KQARSDIEKLKEA	IRDTNKAVQSVQSSIGNLIVAI
	QARSDIEKLKEA	IRDTNKAVQSVQSSIGNLIVAIK
	ARSDIEKLKEA	IRDTNKAVQSVQSSIGNLIVAIKS
30	RSDIEKLKEA	IRDTNKAVQSVQSSIGNLIVAIKSV

SDIEKLKEAIRD TNKAVQSVQSSIGNLIVA IKS VQ
KLKEAIRD TNKAVQSVQSSIGNLIVA IKS VQDYVN
LKEAIRD TNKAVQSVQSSIGNLIVA IKS VQDYV NK
AIRD TNKAVQSVQSSIGNLIVA IKS VQDYV NK EIV

5

采用表 1 的单字母氨基酸编码

表 18

抗猿猴免疫缺陷病毒（SIV）肽

5	WQEWERKVDLFLEENITALLEEAIQQEKNMYELQK
	QEWERKVDLFLEENITALLEEAIQQEKNMYELQKL
	EWERKVDLFLEENITALLEEAIQQEKNMYELQKLN
	WERKVDLFLEENITALLEEAIQQEKNMYELQKLNS
	ERKVDLFLEENITALLEEAIQQEKNMYELQKLNSW
10	RKVDLFLEENITALLEEAIQQEKNMYELQKLNSWD
	KVDLFLEENITALLEEAIQQEKNMYELQKLNSWDV
	VDFLEENITALLEEAIQQEKNMYELQKLNSWDVF
	DFLEENITALLEEAIQQEKNMYELQKLNSWDVFG
	FLEENITALLEEAIQQEKNMYELQKLNSWDVFGN

15

采用表 1 的单字母氨基酸编码

表 19

抗麻疹病毒 (MeV) 肽

5	LHRIDLGPPISLERLDVGTNLGNIAIAKLEAKELL HRIDLGPPISLERLDVGTNLGNIAIAKLEAKELLE RIDLGPPISLERLDVGTNLGNIAIAKLEAKELLES IDLGPPISLERLDVGTNLGNIAIAKLEAKELLESS DLGPPISLERLDVGTNLGNIAIAKLEAKELLESSD
10	LGPPISLERLDVGTNLGNIAIAKLEAKELLESSDQ GPPISLERLDVGTNLGNIAIAKLEAKELLESSDQI PPISLERLDVGTNLGNIAIAKLEAKELLESSDQIL PISLERLDVGTNLGNIAIAKLEAKELLESSDQILR SLERLDVGTNLGNIAIAKLEAKELLESSDQILRSM
15	LERLDVGTNLGNIAIAKLEAKELLESSDQILRSMK

采用表 1 的单字母氨基酸编码

序列表

<110> 康久化学公司

<120> 病毒感染的长效融合肽抑制剂

<130> SPI050371-47

<140>

<141>

<150> US 60/134,406

<151> 1999-05-17

<150> US 60/153,406

<151> 1999-09-10

<160> 86

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 36

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 1

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> 2

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 2

Asn Asn Leu Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu
1 5 10 15

Thr Val Trp Gln Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala Val Glu
20 25 30

Arg Tyr Leu Lys Asp Gln
35

<210> 3

<211> 36

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 3

Tyr Thr Asn Thr Ile Tyr Thr Leu Leu 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> 4

<211> 36

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 4

Tyr Thr Gly Ile Ile Tyr Asn Leu Leu 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 Asn Leu
20 25 30

Trp Asn Trp Phe
35

<210> 5

<211> 36

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 5

Tyr Thr Ser Leu Ile Tyr Ser Leu Leu Glu Lys Ser Gln Thr 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> 6

<211> 36

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 6

Leu Glu Ala Asn Ile Ser Lys Ser Leu Glu Gln Ala Gln Ile Gln Gln
1 5 10 15

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

Gly Asn Trp Phe
35

<210> 7

<211> 36

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 7

Leu Glu Ala Asn Ile Ser Gln Ser Leu Glu Gln Ala Gln Ile Gln Gln
1 5 10 15

Glu Lys Asn Met Tyr Glu Leu Gln Lys Leu Asn Ser Trp Asp Val Phe
20 25 30

Thr Asn Trp Leu
35

<210> 8

<211> 41

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 8

Cys Gly Gly Asn Asn Leu Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu
1 5 10 15

Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Ile Leu

	20	25	30
Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln			
	35	40	

<210> 9
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 9
 Gln Gln Leu Leu Asp Val Val Lys Arg Gln Gln Glu Met Leu Arg Leu
 1 5 10 15
 Thr Val Trp Gly Thr Lys Asn Leu Gln Ala Arg Val Thr Ala Ile Glu
 20 25 30
 Lys Tyr Leu Lys Asp Gln
 35

<210> 10
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 10
 Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile Lys Glu Asn Lys
 1 5 10 15
 Cys Asn Gly Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys Gln Glu Leu Asp Lys Tyr
 20 25 30
 Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu Met Gln Ser Thr
 35 40 45

<210> 11

<211> 54

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 11

Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu Glu Gly Glu Val
1 5 10 15

Asn Lys Ile Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser
20 25 30

Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn Tyr
35 40 45

Ile Asp Lys Gln Leu Leu
50

<210> 12

<211> 53

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 12

Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp
1 5 10 15

Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser
20 25 30

Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu Leu His Asn Val Asn Ala
35 40 45

Gly Lys Ser Thr Thr
50

<210> 13

<211> 48

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 13

Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile Lys Glu Asn Lys
1 5 10 15

Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys Gln Glu Leu Asp
20 25 30

Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu Met Gln Ser Thr
35 40 45

<210> 14

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 14

Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile Lys Glu Asn Lys
1 5 10 15

Cys Asn Gly Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys Gln Glu Leu Asp Lys
20 25 30

Tyr Lys

<210> 15

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 15

Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile Lys Glu Asn Lys Cys
1 5 10 15

Asn Gly Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys Gln Glu Leu Asp Lys Tyr
20 25 30

Lys Asn

<210> 16

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 16

Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly
1 5 10 15

Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn
20 25 30

Ala Val

<210> 17

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 17

Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile Lys Glu Asn Lys Met Asn Gly
1 5 10 15

Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn
20 25 30

Ala Val

<210> 18

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 18

Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile
1 5 10 15

Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val
20 25 30

Ser

<210> 19

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 19

Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Ala
1 5 10 15

Leu Leu Ser Thr Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser
20 25 30

Val

<210> 20

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 20

Val Ser Lys Val Leu His Leu Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Ala Leu
1 5 10 15

Leu Ser Thr Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val
20 25 30

Leu

<210> 21

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 21

Ser Lys Val Leu His Leu Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Ala Leu Leu
1 5 10 15

Ser Thr Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu
20 25 30

Thr

<210> 22

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 22

Lys Val Leu His Leu Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Ala Leu Leu Ser
1 5 10 15

Thr Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr
20 25 30

Ser

<210> 23

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 23

Leu Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys Ala
1 5 10 15

Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val Leu
 20 25 30

Asp

<210> 24

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 24

Gly Glu Val Asn Lys Ile Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys Ala Val Val
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val Leu Asp Leu
 20 25 30

Lys

<210> 25

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 25

Glu Val Asn Lys Ile Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys Ala Val Val Ser
 1 5 10 15

Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val Leu Asp Leu Lys
 20 25 30

Asn

<210> 26

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 26

Val Asn Lys Ile Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys Ala Val Val Ser Leu
1 5 10 15

Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn
20 25 30

Tyr

<210> 27

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 27

Asn Lys Ile Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser
1 5 10 15

Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn Tyr
20 25 30

Ile

<210> 28

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 28

Lys Ile Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser Asn
1 5 10 15

Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile
20 25 30

Asp

<210> 29

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 29

Ile Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly
1 5 10 15

Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp
20 25 30

Lys

<210> 30

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 30

Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val
1 5 10 15

Ser Val Leu Thr Ser Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys
20 25 30

Gln

<210> 31

<211> 70

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 31

Gly Thr Ile Ala Leu Gly Val Ala Thr Ser Ala Gln Ile Thr Ala Ala
1 5 10 15

Val Ala Leu Val Glu Ala Lys Gln Ala Arg Ser Asp Ile Glu Lys Leu
20 25 30

Lys Glu Ala Ile Arg Asp Thr Asn Lys Ala Val Gln Ser Val Gln Ser
35 40 45

Ser Ile Gly Asn Leu Ile Val Ala Ile Lys Ser Val Gln Asp Tyr Val
50 55 60

Asn Lys Glu Ile Val Pro
65 70

<210> 32

<211> 56

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 32

Tyr Thr Pro Asn Asp Ile Thr Leu Asn Asn Ser Val Ala Leu Asp Pro
1 5 10 15

Ile Asp Ile Ser Ile Glu Leu Asn Lys Ala Lys Ser Asp Leu Glu Glu
20 25 30

Ser Lys Glu Trp Ile Arg Arg Ser Asn Gln Lys Leu Asp Ser Ile Gly
35 40 45

Asn Trp His Gln Ser Ser Thr Thr
50 55

<210> 33

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 33

Thr Leu Asn Asn Ser Val Ala Leu Asp Pro Ile Asp Ile Ser Ile Glu
1 5 10 15

Leu Asn Lys Ala Lys Ser Asp Leu Glu Glu Ser Lys Glu Trp Ile Arg
20 25 30

Arg Ser Asn
35

<210> 34

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 34

Leu Asn Asn Ser Val Ala Leu Asp Pro Ile Asp Ile Ser Ile Glu Leu
1 5 10 15

Asn Lys Ala Lys Ser Asp Leu Glu Glu Ser Lys Glu Trp Ile Arg Arg
20 25 30

Ser Asn Gln
35

<210> 35

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 35

Asn Asn Ser Val Ala Leu Asp Pro Ile Asp Ile Ser Ile Glu Leu Asn
1 5 10 15

Lys Ala Lys Ser Asp Leu Glu Glu Ser Lys Glu Trp Ile Arg Arg Ser
20 25 30

Asn Gln Lys
35

<210> 36

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 36

Asn Ser Val Ala Leu Asp Pro Ile Asp Ile Ser Ile Glu Leu Asn Lys
1 5 10 15

Ala Lys Ser Asp Leu Glu Glu Ser Lys Glu Trp Ile Arg Arg Ser Asn
20 25 30

Gln Lys Leu
35

<210> 37

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 37

Ser Val Ala Leu Asp Pro Ile Asp Ile Ser Ile Glu Leu Asn Lys Ala
1 5 10 15

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

Lys Leu Asp
35

<210> 38

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 38

Val Ala Leu Asp Pro Ile Asp Ile Ser Ile Glu Leu Asn Lys Ala Lys
1 5 10 15

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

Leu Asp Ser
 35

<210> 39

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 39

Ala Leu Asp Pro Ile Asp Ile Ser Ile Glu Leu Asn Lys Ala Lys Ser
 1 5 10 15

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

Asp Ser Ile
 35

<210> 40

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 40

Leu Asp Pro Ile Asp Ile Ser Ile Glu Leu Asn Lys Ala Lys Ser Asp
 1 5 10 15

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

Ser Ile Gly
35

<210> 41
<211> 35
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 41
Asp Pro Ile Asp Ile Ser Ile Glu Leu Asn Lys Ala Lys Ser Asp Leu
1 5 10 15
Glu Glu Ser Lys Glu Trp Ile Arg Arg Ser Asn Gln Lys Leu Asp Ser
20 25 30

Ile Gly Asn
35

<210> 42
<211> 35
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 42
Pro Ile Asp Ile Ser Ile Glu Leu Asn Lys Ala Lys Ser Asp Leu Glu
1 5 10 15
Glu Ser Lys Glu Trp Ile Arg Arg Ser Asn Gln Lys Leu Asp Ser Ile
20 25 30

Gly Asn Trp
35

<210> 43
<211> 35
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 43
Ile Asp Ile Ser Ile Glu Leu Asn Lys Ala Lys Ser Asp Leu Glu Glu
1 5 10 15
Ser Lys Glu Trp Ile Arg Arg Ser Asn Gln Lys Leu Asp Ser Ile Gly
20 25 30
Asn Trp His
35

<210> 44
<211> 35
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 44
Asp Ile Ser Ile Glu Leu Asn Lys Ala Lys Ser Asp Leu Glu Glu Ser
1 5 10 15
Lys Glu Trp Ile Arg Arg Ser Asn Gln Lys Leu Asp Ser Ile Gly Asn
20 25 30
Trp His Gln
35

<210> 45
<211> 35
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 45

Ile Ser Ile Glu Leu Asn Lys Ala Lys Ser Asp Leu Glu Glu Ser Lys
1 5 10 15

Glu Trp Ile Arg Arg Ser Asn Gln Lys Leu Asp Ser Ile Gly Asn Trp
20 25 30

His Gln Ser
35

<210> 46

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 46

Ser Ile Glu Leu Asn Lys Ala Lys Ser Asp Leu Glu Glu Ser Lys Glu
1 5 10 15

Trp Ile Arg Arg Ser Asn Gln Lys Leu Asp Ser Ile Gly Asn Trp His
20 25 30

Gln Ser Ser
35

<210> 47

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 47

Ile Glu Leu Asn Lys Ala Lys Ser Asp Leu Glu Glu Ser Lys Glu Trp
1 5 10 15

Ile Arg Arg Ser Asn Gln Lys Leu Asp Ser Ile Gly Asn Trp His Gln
20 25 30

Ser Ser Thr
35

<210> 48

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 48

Glu Leu Asn Lys Ala Lys Ser Asp Leu Glu Glu Ser Lys Glu Trp Ile
1 5 10 15

Arg Arg Ser Asn Gln Lys Leu Asp Ser Ile Gly Asn Trp His Gln Ser
20 25 30

Ser Thr Thr
35

<210> 49

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 49

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

Glu Lys Leu Lys Glu Ala Ile Arg Asp Thr Asn Lys Ala Val Gln Ser
20 25 30

Val Gln Ser
35

<210> 50

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 50

Ala Val Ala Leu Val Glu Ala Lys Gln Ala Arg Ser Asp Ile Glu Lys
1 5 10 15

Leu Lys Glu Ala Ile Arg Asp Thr Asn Lys Ala Val Gln Ser Val Gln
20 25 30

Ser Ser Ile
35

<210> 51

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 51

Leu Val Glu Ala Lys Gln Ala Arg Ser Asp Ile Glu Lys Leu Lys Glu
1 5 10 15

Ala Ile Arg Asp Thr Asn Lys Ala Val Gln Ser Val Gln Ser Ser Ile
20 25 30

Gly Asn Leu
35

<210> 52
<211> 35
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 52
Val Glu Ala Lys Gln Ala Arg Ser Asp Ile Glu Lys Leu Lys Glu Ala
1 5 10 15
Ile Arg Asp Thr Asn Lys Ala Val Gln Ser Val Gln Ser Ser Ile Gly
20 25 30

Asn Leu Ile
35

<210> 53
<211> 35
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 53
Glu Ala Lys Gln Ala Arg Ser Asp Ile Glu Lys Leu Lys Glu Ala Ile
1 5 10 15
Arg Asp Thr Asn Lys Ala Val Gln Ser Val Gln Ser Ser Ile Gly Asn
20 25 30

Leu Ile Val
35

<210> 54

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 54

Ala Lys Gln Ala Arg Ser Asp Ile Glu Lys Leu Lys Glu Ala Ile Arg
1 5 10 15

Asp Thr Asn Lys Ala Val Gln Ser Val Gln Ser Ser Ile Gly Asn Leu
20 25 30

Ile Val Ala
35

<210> 55

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 55

Lys Gln Ala Arg Ser Asp Ile Glu Lys Leu Lys Glu Ala Ile Arg Asp
1 5 10 15

Thr Asn Lys Ala Val Gln Ser Val Gln Ser Ser Ile Gly Asn Leu Ile
20 25 30

Val Ala Ile
35

<210> 56

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 56

Gln Ala Arg Ser Asp Ile Glu Lys Leu Lys Glu Ala Ile Arg Asp Thr
1 5 10 15

Asn Lys Ala Val Gln Ser Val Gln Ser Ser Ile Gly Asn Leu Ile Val
20 25 30

Ala Ile Lys
35

<210> 57

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 57

Ala Arg Ser Asp Ile Glu Lys Leu Lys Glu Ala Ile Arg Asp Thr Asn
1 5 10 15

Lys Ala Val Gln Ser Val Gln Ser Ser Ile Gly Asn Leu Ile Val Ala
20 25 30

Ile Lys Ser
35

<210> 58

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 58

Arg Ser Asp Ile Glu Lys Leu Lys Glu Ala Ile Arg Asp Thr Asn Lys
1 5 10 15

Ala Val Gln Ser Val Gln Ser Ser Ile Gly Asn Leu Ile Val Ala Ile
20 25 30

Lys Ser Val
35

<210> 59

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 59

Ser Asp Ile Glu Lys Leu Lys Glu Ala Ile Arg Asp Thr Asn Lys Ala
1 5 10 15

Val Gln Ser Val Gln Ser Ser Ile Gly Asn Leu Ile Val Ala Ile Lys
20 25 30

Ser Val Gln
35

<210> 60

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 60

Lys Leu Lys Glu Ala Ile Arg Asp Thr Asn Lys Ala Val Gln Ser Val
1 5 10 15

Gln Ser Ser Ile Gly Asn Leu Ile Val Ala Ile Lys Ser Val Gln Asp
20 25 30

Tyr Val Asn
35

<210> 61

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 61

Leu Lys Glu Ala Ile Arg Asp Thr Asn Lys Ala Val Gln Ser Val Gln
1 5 10 15

Ser Ser Ile Gly Asn Leu Ile Val Ala Ile Lys Ser Val Gln Asp Tyr
20 25 30

Val Asn Lys
35

<210> 62

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 62

Ala Ile Arg Asp Thr Asn Lys Ala Val Gln Ser Val Gln Ser Ser Ile
1 5 10 15

Gly Asn Leu Ile Val Ala Ile Lys Ser Val Gln Asp Tyr Val Asn Lys
20 25 30

Glu Ile Val
35

<210> 63
<211> 47
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 63
Thr Trp Gln Glu Trp Glu Arg Lys Val Asp Phe Leu Glu Glu Asn Ile
1 5 10 15

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

Glu Leu Gln Lys Leu Asn Ser Trp Asp Val Phe Gly Asn Trp Phe
35 40 45

<210> 64
<211> 35
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 64
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 Lys
35

<210> 65
<211> 35
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 65
Gln Glu Trp Glu Arg Lys Val Asp Phe Leu Glu Glu Asn Ile Thr Ala
1 5 10 15
Leu Leu Glu Glu Ala Gln Ile Gln Gln Glu Lys Asn Met Tyr Glu Leu
20 25 30
Gln Lys Leu
35

<210> 66
<211> 35
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 66
Glu Trp Glu Arg Lys Val Asp Phe Leu Glu Glu Asn Ile Thr Ala Leu
1 5 10 15
Leu Glu Glu Ala Gln Ile Gln Gln Glu Lys Asn Met Tyr Glu Leu Gln
20 25 30
Lys Leu Asn
35

<210> 67
<211> 35
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 67

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

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

Leu Asn Ser
35

<210> 68

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 68

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

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

Asn Ser Trp
35

<210> 69

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 69

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

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

Ser Trp Asp
35

<210> 70

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 70

Lys Val Asp Phe Leu Glu Glu Asn Ile Thr Ala Leu Leu Glu Glu Ala
1 5 10 15

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

Trp Asp Val
35

<210> 71

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 71

Val Asp Phe Leu Glu Glu Asn Ile Thr Ala Leu Leu Glu Glu Ala Gln
1 5 10 15

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

Asp Val Phe
35

<210> 72

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 72

Asp Phe Leu Glu Glu Asn Ile Thr Ala Leu Leu Glu Glu Ala Gln Ile
1 5 10 15

Gln Gln Glu Lys Asn Met Tyr Glu Leu Gln Lys Leu Asn Ser Trp Asp
20 25 30

Val Phe Gly
35

<210> 73

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 73

Phe Leu Glu Glu Asn Ile Thr Ala Leu Leu Glu Glu Ala Gln Ile Gln
1 5 10 15

Gln Glu Lys Asn Met Tyr Glu Leu Gln Lys Leu Asn Ser Trp Asp Val
20 25 30

Phe Gly Asn
35

<210> 74

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 74

Pro Asp Ala Val Tyr Leu His Arg Ile Asp Leu Gly Pro Pro Ile Ser

1 5 10 15

Leu Glu Arg Leu Asp Val Gly Thr Asn Leu Gly Asn Ala Ile Ala Lys

20 25 30

Leu Glu Asp

35

<210> 75

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 75

Leu Glu Arg Leu Asp Val Gly Thr Asn Leu Gly Asn Ala Ile Ala Lys

1 5 10 15

Leu Glu Ala Lys Glu Leu Leu Glu Ser Ser Asp Gln Ile Leu Arg Ser

20 25 30

Met Lys

<210> 76

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 76

Leu His Arg Ile Asp Leu Gly Pro Pro Ile Ser Leu Glu Arg Leu Asp
1 5 10 15

Val Gly Thr Asn Leu Gly Asn Ala Ile Ala Lys Leu Glu Ala Lys Glu
20 25 30

Leu Leu

<210> 77

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 77

His Arg Ile Asp Leu Gly Pro Pro Ile Ser Leu Glu Arg Leu Asp Val
1 5 10 15

Gly Thr Asn Leu Gly Asn Ala Ile Ala Lys Leu Glu Ala Lys Glu Leu
20 25 30

Leu Glu

<210> 78

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 78

Arg Ile Asp Leu Gly Pro Pro Ile Ser Leu Glu Arg Leu Asp Val Gly
1 5 10 15

Thr Asn Leu Gly Asn Ala Ile Ala Lys Leu Glu Ala Lys Glu Leu Leu
20 25 30

Glu Ser

<210> 79

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 79

Ile Asp Leu Gly Pro Pro Ile Ser Leu Glu Arg Leu Asp Val Gly Thr
1 5 10 15

Asn Leu Gly Asn Ala Ile Ala Lys Leu Glu Ala Lys Glu Leu Leu Glu
20 25 30

Ser Ser

<210> 80

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 80

Asp Leu Gly Pro Pro Ile Ser Leu Glu Arg Leu Asp Val Gly Thr Asn
1 5 10 15

Leu Gly Asn Ala Ile Ala Lys Leu Glu Ala Lys Glu Leu Leu Glu Ser
20 25 30

Ser Asp

<210> 81

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 81

Leu Gly Pro Pro Ile Ser Leu Glu Arg Leu Asp Val Gly Thr Asn Leu
1 5 10 15

Gly Asn Ala Ile Ala Lys Leu Glu Ala Lys Glu Leu Leu Glu Ser Ser
20 25 30

Asp Gln

<210> 82

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 82

Gly Pro Pro Ile Ser Leu Glu Arg Leu Asp Val Gly Thr Asn Leu Gly
1 5 10 15

Asn Ala Ile Ala Lys Leu Glu Ala Lys Glu Leu Leu Glu Ser Ser Asp
20 25 30

Gln Ile

<210> 83

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 83

Pro Pro Ile Ser Leu Glu Arg Leu Asp Val Gly Thr Asn Leu Gly Asn
1 5 10 15

Ala Ile Ala Lys Leu Glu Ala Lys Glu Leu Leu Glu Ser Ser Asp Gln
20 25 30

Ile Leu

<210> 84

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 84

Pro Ile Ser Leu Glu Arg Leu Asp Val Gly Thr Asn Leu Gly Asn Ala
1 5 10 15

Ile Ala Lys Leu Glu Ala Lys Glu Leu Leu Glu Ser Ser Asp Gln Ile
20 25 30

Leu Arg

<210> 85

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 85

Ser Leu Glu Arg Leu Asp Val Gly Thr Asn Leu Gly Asn Ala Ile Ala
1 5 10 15

Lys Leu Glu Ala Lys Glu Leu Leu Glu Ser Ser Asp Gln Ile Leu Arg
20 25 30

Ser Met

<210> 86

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 86

Leu Glu Arg Leu Asp Val Gly Thr Asn Leu Gly Asn Ala Ile Ala Lys
1 5 10 15

Leu Glu Ala Lys Glu Leu Leu Glu Ser Ser Asp Gln Ile Leu Arg Ser
20 25 30

Met Lys