



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 601 30 641 T2 2008.06.26

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 272 510 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 601 30 641.4

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US01/03813

(96) Europäisches Aktenzeichen: 01 908 880.6

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2001/057072

(86) PCT-Anmeldetag: 06.02.2001

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 09.08.2001

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 08.01.2003

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 26.09.2007

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 26.06.2008

(51) Int Cl.⁸: C07K 14/00 (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

180823 P 07.02.2000 US

184057 P 22.02.2000 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR

(73) Patentinhaber:

Wisconsin Alumni Research Foundation,
Madison, Wis., US

(72) Erfinder:

BRANDT, Curtis, Stoughton, WI 53589, US;
BULTMANN, Hermann, Madison, WI 53704, US

(74) Vertreter:

LOUIS, PÖHLAU, LOHRENTZ, 90409 Nürnberg

(54) Bezeichnung: PHARMAKOLOGISCH AKTIVE ANTIVIRALE PEPTIDE UND METHODEN ZU IHRER ANWENDUNG

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung**GEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Diese Erfindung betrifft Peptide mit antiviralen Eigenschaften. Spezifischer betrifft die Erfindung Peptide, die Aktivität gegenüber einem breiten Spektrum von Viren zeigen, pharmazeutische Zusammensetzungen, die die Peptide umfassen, und die Verwendung der Peptide bei der Herstellung von Medikamenten zum Verhindern und/oder Behandeln viraler Infektionen.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] In den letzten Jahren sind verschiedene Gruppen von Peptidderivaten mit Aktivität gegen Viren offenbart worden. Beispiele dieser Peptide sind offenbart worden im US-Patent Nr. 5,700,780, erteilt an Beaulieu et al.; im US-Patent Nr. 5,104,854, erteilt an Schlesinger et al.; im US-Patent Nr. 4,814,432, erteilt an Freidinger et al., in Dutia et al., *Nature* 321:439 (1986); und in Cohen et al., *Nature* 321:441 (1986). Jedoch sind viele der bekannten antiviralen Peptide, die in der Technik bekannt sind, extrem hydrophob und sind daher nicht sehr gut bioverfügbar. Darüber hinaus zeigen viele dieser bekannten antiviralen Peptide aufgrund ihrer speziellen Wirkungsmechanismen Aktivität nur gegen wenige Typen von Viren. Zusätzlich sind viele dieser synthetischen Peptide nicht wirkungsvoll dabei, eine anfängliche virale Infektion zu verhindern, oder sie sind nicht funktionell, wenn sie topisch appliziert werden.

[0003] O'Brien et al. (*J. Virology*, 1996, Band 70, S. 2825–2831), offenbaren Anti-HIV-1-Aktivität für eine oligokationische Peptidverbindung. Die US 5,877,282 offenbart neue Polypeptidinhibitoren der Kerntranslokation von zytoplasmatischem Protein, welche eine Signalsequenz und wenigstens zwei Kernlokalisationssequenzen umfassen. Die Polypeptide sind nützlich als immunsuppressive Mittel, antivirale Mittel und Antitumor-Mittel. Die WO 99/64449 offenbart Verfahren zur Auslieferung von Molekülen in eine Zelle durch die Verwendung eines modifizierten Signalpeptids, an das eine Peptid-Nukleinsäure gebunden ist. Das Signalpartikel wird wenigstens einen positiv geladenen Aminosäurerest oder ein funktionelles Äquivalent davon umfassen. Die Erweiterung des Signalpeptids durch die Anfügung einzelner oder mehrerer geladener Reste oder Analoga wird die Signalpeptidauslieferung modifizieren und verbessern, indem sie die Löslichkeits- und Zellpermeabilitätseigenschaften des Signalpeptids erhöht.

[0004] Eines der erfolgreichsten Nukleosidanaloge, die bislang als antivirales Mittel entwickelt wurden, ist Acyclovir. Acyclovir ist ein synthetisches Purin-Nukleosid-Analogon mit inhibitorischer *in vitro*- und *in vivo*-Aktivität gegen Herpes simplex Virus Typ I (HSV-1), Herpes simplex Virus Typ II (HSV-2) und Varicella zoster Virus (VZV). In Zellkultur richtet sich die höchste antivirale Aktivität von Acyclovir gegen HSV-1, gefolgt von, in abnehmender Reihenfolge der Wirkungsstärke, der Aktivität gegen HSV-2 und VZV. Jedoch kann die Verwendung von Acyclovir kontraindiziert sein. Darüber hinaus sind einige Herpes simplex-Viren resistent gegenüber Acyclovir geworden.

[0005] In jüngster Zeit hat es beträchtliche Forschung im Hinblick auf antivirale Verbindungen gegeben, die in topische Viruzide und Kondom-Gleitmittel eingebaut werden können, um dabei zu helfen, die Ausbreitung von humanem Immunschwächevirus (HIV) einzudämmen. Der Bedarf für ein solches Produkt ist hoch; die geeignete antivirale und/oder viruzide Verbindung, die die HIV-Infektion verhindert, wäre von großem Nutzen sowohl in entwickelten als auch in nicht entwickelten Nationen.

[0006] Daher verbleibt eine Notwendigkeit für antivirale Mittel, die eine hohe Aktivität gegen ein breites Spektrum von Viren zeigen. Es verbleibt auch eine Notwendigkeit für antivirale Mittel, die topisch appliziert werden können, und die wirkungsvoll beim Verhindern viraler Infektion sind.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0007] Die Erfindung stellt eine Zusammensetzung, insbesondere eine pharmazeutische Zusammensetzung, bereit, umfassend ein antivirales Peptid, wobei das antivirale Peptid aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus SEQ ID NOS: 1–4, SEQ ID NOS: 14–15 und SEQ ID NOS: 18–30 besteht, wobei dann, wenn es sich beim antiviralen Peptid um SEQ ID NO: 14 handelt, X1 und X2 aus einem oder mehreren positiv geladenen Aminosäureresten ausgewählt sind, so dass jedes X1 und jedes X2 den gleichen oder einen unterschiedlichen, positiv geladenen Aminosäurerest bedeuten kann, n einen Wert von 0 oder 3–10 hat, m einen Wert von 0 oder 3–10 hat, und wobei dann, wenn m = 0, n einen Wert von 4 bis 10 hat, und, wenn n = 0, m einen Wert von 4 bis 10 hat, oder entweder m = 0 oder n = 0;

dann, wenn es sich beim antiviralen Peptid um SEQ ID NO: 15 handelt, X1 und X2 aus einem oder mehreren, positiv geladenen Aminosäureresten ausgewählt sind, so dass jedes X1 und jedes X2 den gleichen oder einen unterschiedlichen, positiv geladenen Aminosäurerest bedeuten kann, und wobei ferner n einen Wert von 0 oder 3–10 hat und m einen Wert von 0 oder 3–10 hat; und wobei ferner das antivirale Peptid in einer Menge vorhanden ist, die ausreicht, eine Wirkung gegen einen viralen Organismus bei der Verwendung in der Therapie oder Prophylaxe einer viralen Infektion zu erzielen.

[0008] Die Erfindung stellt ferner die Verwendung solcher antiviralen Peptide bei der Herstellung eines Medikaments bereit, wobei das Medikament bei der Behandlung einer viralen Infektion zu verabreichen ist.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0009] Die [Fig. 1A–Fig. 1C](#) und [Fig. 1E](#) sind graphische Darstellungen, die die Dosis-abhängige Inhibition von HSV-1 durch antivirale Peptide der vorliegenden Erfindung (SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 und SEQ ID NO: 4) im Vergleich zu Kontrollpeptiden (SEQ ID NO: 16 und SEQ ID NO: 17) zeigen. [Fig. 1C](#) zeigt die zytotoxischen Wirkungen von SEQ ID NO: 1 und SEQ ID NO: 17.

[0010] [Fig. 2](#) ist eine graphische Darstellung, die die virale Inhibition durch ein biotinyliertes antivirales Peptid der vorliegenden Erfindung (SEQ ID NO: 2) zeigt.

[0011] [Fig. 3](#) ist eine graphische Darstellung, die die dosisabhängige Inhibition der HSV-1-Bildung durch ein antivirales Peptid der vorliegenden Erfindung (SEQ ID NO: 1) im Vergleich zu Acyclovir zeigt.

[0012] Die [Fig. 4A](#) und [Fig. 4B](#) sind Graphen bzw. Diagramme, die zeigen, dass ein antivirales Peptid der vorliegenden Erfindung (SEQ ID NO: 1) ein frühes Stadium der Virusinfektion und die virale Ausbreitung inhibiert.

[0013] [Fig. 5](#) ist ein Graph, der zeigt, dass die antivirale Aktivität eines antiviralen Peptids der vorliegenden Erfindung (SEQ ID NO: 1) von dem Virus-Input abhängig ist.

[0014] Die [Fig. 6A](#) und [Fig. 6B](#) sind Graphen, die die das Blockieren des Viruseintritts in die Zellen durch ein antivirales Peptid der vorliegenden Erfindung (SEQ ID NO: 1) zeigen.

[0015] Die [Fig. 7A](#) und [Fig. 7B](#) sind Graphen, die die Eintrittsphase und Dosisantwort eines antiviralen Peptids der vorliegenden Erfindung (SEQ ID NO: 1) zeigen.

[0016] Die [Fig. 8A](#) und [Fig. 8B](#) sind Graphen, die die viruzide Aktivität eines antiviralen Peptids der vorliegenden Erfindung (SEQ ID NO: 1) zeigen.

[0017] Die [Fig. 9A](#) und [Fig. 9B](#) sind Graphen, die die in vivo-Aktivität eines antiviralen Peptids der vorliegenden Erfindung (SEQ ID NO: 1) zeigen.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0018] In der folgenden Beschreibung wird eine Reihe von Begriffen in ausgedehnter Weise verwendet. Es werden hier Definitionen bereitgestellt, um das Verständnis der Erfindung zu erleichtern.

Antivirales Peptid:

[0019] Das antivirale Peptid umfasst wenigstens teilweise ein Membranüberschreitendes Peptid oder ein Fragment oder Derivat hiervon, das ein pharmakologisch wirksames antivirales Mittel darstellt, wenn es in einer wirksamen Menge verabreicht wird.

Wirksame Menge:

[0020] Eine vorab bestimmte Menge des antiviralen Peptids, d. h. eine Menge des Peptids, die hinreichend ist, gegen die viralen Organismen in vivo oder topisch für die Behandlung oder einen prophylaktischen Effekt wirksam zu sein.

Membran-überschreitendes Peptid (Membran-überschreitendes Motiv):

[0021] Ein Peptid, das eine Sequenz von Aminosäuren aufweist, die dem Peptid die Fähigkeit verleihen, Lipid-Doppelschicht-Membranen zu überschreiten, um in Zellen oder in subzelluläre Kompartimente einzutreten.

Pharmazeutisch verträglicher Träger:

[0022] Ein verträgliches „kosmetisches“ Vehikel zur Verabreichung antiviraler Peptide an Säuger, umfassend einen oder mehrere nicht-toxische Hilfsstoffe, die nicht mit dem enthaltenen pharmakologisch aktiven antiviralen Peptid reagieren oder dessen Wirksamkeit nicht reduzieren.

Löslichkeits-Anhängsel (Löslichkeits-Tag):

[0023] Eine kurze Peptidsequenz, zusammengesetzt aus geladenen Aminosäuren, die, wenn sie an einen terminalen Rest einer längeren unlöslichen Peptidsequenz angeheftet sind, die Löslichkeit in einem wässrigen Medium verbessern.

[0024] In dieser Anmeldung sind die Standardnamen mit Einbuchstababkürzungen für die Aminosäuren durchgehend verwendet. Siehe Lehninger et al., „Principles of Biochemistry“, Worth Publishers (New York), S. 113 (1983). Alle Aminosäuresequenzen in dieser Anmeldung sind unter Verwendung der Standardnomenklatur dargestellt, wobei der äußerst linksständige Aminosäurerest am Ende jeder Sequenz der aminoterminale Rest ist und der Rest am rechten Ende jeder Sequenz der carboxyterminale Rest. Die Aminosäuren der hier beschriebenen Peptide können entweder Levo-Aminosäuren oder Dextro-Aminosäuren sein, wie mit l oder d vor der Peptidsequenz angegeben (siehe Tabelle 1).

[0025] Die vorliegende Erfindung betrifft neuartige antivirale Peptide, die auf Membran-überschreitenden Peptiden basieren. Es sind verschiedene Membran-überschreitende Peptide in der Technik wohlbekannt. Es ist überraschender und unerwarteter Weise entdeckt worden, dass Membran-überschreitende Peptide ein breites Spektrum antiviraler Aktivität zeigen, einschließlich solcher Aktivität, wenn sie topisch appliziert oder in vivo verabreicht werden. Beispielhafte antivirale Peptide der vorliegenden Erfindung, die von Membran-überschreitenden Peptiden abgeleitet sind, sind unten in Tabelle 1 beschrieben, wie SEQ ID NOS 1–4.

TABELLE 1 – Antivirale Peptide

Peptid	SEQUENZ ID NUMMER	Sequenz
EB	SEQ ID NO:1	NH ₂ - RRKKA VALLPAVLLALLAP-COOH
bEB	SEQ ID NO:2	b - RRKKA VALLPAVLLALLAP-COOH
EBPP	SEQ ID NO:3	NH ₂ - RRKKA VALLAVLLALLAPP-COOH
LALA	SEQ ID NO:4	NH ₂ - RRKKPA VLLALLA-COOH
bKLA	SEQ ID NO:5*	b - KLALKLALKALKAA ALKLA-Amid
bKLAd _{11,12}	SEQ ID NO:6*	b - KLALKLALKALKAA ALKLA-Amid
bHOM-9	SEQ ID NO:7*	b - RQIKIWF PNRRMKWKK-9
bHOMd	SEQ ID NO:8*	b - RQIKIWF PNRRMKWKK-Amid
bHOMFF	SEQ ID NO:9*	b - RQIKI F FPNRRMK F KK-Amid
bTAT-9	SEQ ID NO: 10*	b - YGRKKRQR ₉ RRR-9
bTAT-9x	SEQ ID NO:11*	b - YGRKKRQR ₉ RRR-9x
N ^{E13} - Biotinyl transportan	SEQ ID NO:12*	GWTLNSAGYLLGKINL KALAALAKKIL b
VT5	SEQ ID NO: 13*	Fluor- DPKGDPKGVTVTVTVTGKGDPKPD

Reste, die in Fettschrift angezeigt sind, sind positiv geladene Reste

b = Biotin-aminoxyloxy

d = Peptid, das aus reinen D-Aminosäureresten zusammengesetzt ist

Fluor = fluoreszente Markierung

-9 = PGYAGAVVNDL-COOH

-9x = PGDVYANGLVA-COOH

* Zu Vergleichszwecken angegeben

[0026] Die antiviralen Peptide der vorliegenden Erfindung können alleine in einer wirksamen Menge verwendet werden. Obwohl die meisten Membran-überschreitenden Peptide löslich sind, sind es einige nicht, obwohl unlösliche Membran-überschreitende Motive durch das folgende Verfahren in antiviralen Peptiden verwendet werden können. Wenn das antivirale Peptid in einem wässrigen pharmazeutisch verträglichen Träger unlöslich ist, so kann ein Löslichkeits-Tag an das antivirale Peptid angefügt werden.

[0027] Wie in Tabelle 1 gezeigt ist, besitzen die SEQ ID NOs: 1–4 einen kovalent angehefteten Löslichkeits-Tag. Die vorliegende Erfindung betrifft solche neuen antiviralen Peptide, die teilweise einen kovalent angehefteten Löslichkeits-Tag umfassen und die folgende Sequenz besitzen: (X1)_n-A-A-V-A-L-L-P-A-V-L-L-A-L-L-A-P-(X2)_m (SEQ ID NO: 14) oder (X1)_n-P-A-V-L-L-A-L-L-A-(X2)_m (SEQ ID NO: 15), wobei X1 und X2 ausgewählt sind aus einem oder mehreren positiv geladenen Aminosäureresten (z. B. K, R), wobei jedes X1 und jedes X2 den gleichen oder einen unterschiedlichen positiv geladenen Aminosäurerest bedeuten kann; und wobei n einen Wert von 0 oder 3–10 besitzt und m einen Wert von 0 oder 3–10 besitzt, wobei bei einer Ausführungsform entweder m = 0 oder n = 0. Ein Beispiel für einen Löslichkeits-Tag ist R-R-K-K (SEQ ID NO: 16). Entsprechend sind alle geladenen Aminosäurereste des Löslichkeits-Tags positiv geladene Aminosäurereste. Die Erfinder haben überraschender und unerwarteter Weise entdeckt, dass unlösliche Membran-überschreitende Peptide, wenn sie an einen Löslichkeits-Tag gekoppelt werden, antivirale Peptide hervorbringen, die eine starke antivirale Aktivität gegen ein breites Spektrum von Viren zeigen.

[0028] Viele Membran-überschreitende Peptide können als antivirale Peptide der vorliegenden Erfindung fun-

gieren, ohne dass die Notwendigkeit von Löslichkeits-Tags besteht (siehe Tabelle 1). Darüber hinaus, obwohl Löslichkeits-Tags die Löslichkeit einiger Membran-überschreitender Peptide verbessern können, können diese speziellen Membran-überschreitenden Peptide auch ohne den Einbau von Löslichkeits-Tags als antivirale Peptide geeignet sein.

[0029] Die antiviralen Peptide der vorliegenden Erfindung können verschiedene reaktive Tags besitzen, die an ihren terminalen Aminosäureresten angeheftet sind. Solche Tags können bei der Detektion/Entfernung von synthetischen Peptiden der vorliegenden Erfindung nützlich sein. Solche Tags können – rein beispielhaft – Biotin und ebenso beliebige andere in der Technik wohlbekannte Tags beinhalten. Die SEQ ID NO: 2 und Beispiel 2 zeigen die Einbeziehung solcher reaktiven Tags.

[0030] Beispiel 2 zeigt, dass antivirale Peptide, die substituierte Membran-überschreitende Motive enthalten, antivirale Aktivität beibehalten, wie gezeigt durch SEQ ID NO: 3, beschrieben in Tabelle 1. Dieses Derivat unterscheidet sich von SEQ ID NO: 1 nur dadurch, dass beide Prolin-Aminosäurereste an den Carboxy-Terminus des Peptids gesetzt wurden. Tabelle 2 listet potentiell aktive Fragmente eines antiviralen Peptids gemäß der vorliegenden Erfindung auf.

TABELLE 2 – Potentiell aktive Fragmente antiviraler Peptide

Peptid	Sequenz	Zweck
P11 (SEQ ID NO:18)	RRKKAAVALLP	Aktivität der N-terminalen Hälfte
P12 (SEQ ID NO:19)	RRKKAVAVAVPAVLLALLAP	Anordnung/Abstand des LLA-Motivs
Peptide zum Test der Rolle des LLA-Motivs		
P13 (SEQ ID NO:20)	RRKKPAVLLA	Ein LLA
P14 (SEQ ID NO:21)	RRKKPAVLLALLA	Zwei LLAs
P15 (SEQ ID NO:22)	RRKKPAVLLALLALLA	Drei LLAs
Peptide zum Test der sequentiellen Entfernung von AS-Triplets		
P16 (SEQ ID NO:23)	RRKKALLPAVLLALLAP	-3N-Terminus
P17 (SEQ ID NO:24)	RRKKPAVLLALLAP	-6N-Terminus
P18 (SEQ ID NO:25)	RRKKLLALLAP	-9N-Terminus
P19 (SEQ ID NO:26)	RRKKLLAP	-12N-Terminus
P20 (SEQ ID NO:27)	RRKKAAVALLPAVLLAL	-3C-Terminus
P21 (SEQ ID NO:28)	RRKKAAVAVVPAVL	-6C-Terminus
P22 (SEQ ID NO:29)	RRKKAAVAVVP	-9C-Terminus
P23 (SEQ ID NO:30)	RRKKAAVA	-12C-Terminus

[0031] Solche Derivate und Fragmente liegen im Schutzmfang der vorliegenden Erfindung.

[0032] Die Peptide der vorliegenden Erfindung können durch Prozesse hergestellt werden, die Verfahren einbeziehen, die gebräuchlicherweise bei der Peptidsynthese verwendet werden, wie etwa die klassische Lösungskopplung von Aminosäureresten und/oder Peptidfragmenten, und, wenn gewünscht, Festphasentechniken. Solche Verfahren sind in den folgenden Beispielen beschrieben.

[0033] Jedes in der Technik wohlbekannte Verfahren der Peptidsynthese kann verwendet werden, z. B. Schroeder und Lubke, in "The Peptides", Band 1, Academic Press, New York, New York, S. 2–128 (1965); "The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology", (E. Gross et al., Herausgeber), Academic Press, New York, New York, Band 1–8, (1979–1987); Stewart und Young, in "Solid Phase Peptide Synthesis", 2. Auflage, Pierce Chem. Co., Rockford, IL (1984); Wild et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 10537 (1992); und Rimsky et al., J. Virol, 72: 986 (1998).

[0034] Wie in den folgenden Beispielen gezeigt, zeigen die antiviralen Peptide der vorliegenden Erfindung antivirale Aktivität gegen ein weites Spektrum umhüllter und nicht-umhüllter Viren. Beispiele solcher umhüllter Viren beinhalten, ohne hierauf beschränkt zu sein, humanes Immunschwächevirus (HIV), Vesiculovirus (VSV), Herpes simplex Viren (HSV-1 und HSV-2) und andere Herpesviren, z. B. Varicella-zoster-Virus (VZV), EBV, equines Herpes Virus (EHV) und humanes Cytomegalievirus (HCMV). Beispiele nicht umhüllter Viren beinhalten, ohne hierauf beschränkt zu sein, humanes Papillomavirus (HPV) und Adenoviren.

[0035] Ein Verfahren, um die inhibitorische Wirkung der antiviralen Peptide der vorliegenden Erfindung auf die virale Replikation zu zeigen, ist die wohlbekannte Zellkulturtechnik, wie sie in den folgenden Beispielen beschrieben ist. Solche Verfahren sind in der Technik wohlbekannt. Siehe Wild et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 10537 (1992).

[0036] Die therapeutische Wirksamkeit der antiviralen Peptide als antivirale Mittel kann an Versuchstieren gezeigt werden, z. B. unter Verwendung eines Mausmodells, wie in Beispiel 10 gezeigt.

[0037] Zusätzlich kann die therapeutische Wirkung der pharmakologisch aktiven Peptide der vorliegenden Erfindung über in der Technik wohlbekannte Techniken an Menschen gezeigt werden. Siehe z. B. Kilby et al., Nature Medicine 4: 1302 (1998).

[0038] Ein antivirales Peptid der vorliegenden Erfindung würde als ein antivirales Mittel verwendet, indem man das Peptid topisch an ein warmblütiges Tier verabreicht, z. B. an Menschen, Pferde, andere Säuger, etc. Das Peptid kann in einem Vehikel verabreicht werden, das einen oder mehrere pharmazeutisch verträgliche Träger umfasst, deren Anteil durch die Löslichkeit bezogen auf die chemische Natur des Peptids, die gewählte Verabreichungsroute und die biologische Standardverabreichung bestimmt wird. Geeignete Vehikel oder Träger für die Formulierungen des Peptids sind in pharmazeutischen Standardtexten beschrieben. Siehe "Remington's Pharmaceutical Sciences", 18. Auflage, Mack Publishing Company, Esston, PA (1990).

[0039] Für die topische Verabreichung kann das antivirale Peptid in einem pharmazeutisch verträglichen Vehikel formuliert werden, das eine wirksame Menge des antiviralen Peptids enthält, typischerweise 0,1 bis 10%, bevorzugt 5% des antiviralen Peptids. Solche Formulierungen können in Form einer Lösung, Creme oder Lotion vorliegen. Die antiviralen Peptide der vorliegenden Erfindung können auch verwendet werden, um virale Infektionen der Haut oder eines Teils der Mundhöhle oder Genitalhöhle zu behandeln. Die antiviralen Peptide können einzeln oder in Kombination verwendet werden, um ein breiteres Spektrum von Viren zu behandeln. Solche topischen Applikationen könnten auf Barrierematerialien appliziert werden, um den Träger zu schützen, wie etwa auf Handschuhe, Kondome und andere in der Technik bekannte Barrieren.

[0040] Für die systemische Verabreichung können die antiviralen Peptide der vorliegenden Erfindung entweder durch intravenöse, subkutane oder intramuskuläre Injektion verabreicht werden, und zwar alleine oder in Zusammensetzungen mit pharmazeutisch verträglichen Vehikeln oder Trägern. Für die Verabreichung durch Injektion ist es bevorzugt, das antivirale Peptid in einer Lösung in einem sterilen wässrigen Vehikel zu verwenden, das auch andere gelöste Stoffe enthalten kann, wie etwa Puffer oder Konservierungsstoffe, ebenso wie hinreichende Mengen an pharmazeutisch verträglichen Salzen oder an Glukose, um die Lösung isotonisch zu machen. Die antiviralen Peptide der vorliegenden Erfindung können in Form therapeutisch verträglicher Salze, die in der Technik wohlbekannt sind, erhalten werden.

[0041] Die Dosierung der antiviralen Peptide der vorliegenden Erfindung wird mit der Form der Verabreichung variieren und sie wird von dem/den speziellen antiviralen Peptid(en) abhängen, die für die Kombination ausgewählt wurden. Weiterhin wird sie mit dem speziellen behandelten Wirt variieren. Im allgemeinen werden die antiviralen Peptide am erstrebenswertesten auf einem Konzentrationsniveau verabreicht, das allgemein wirksame antivirale Resultate gegen das/die ausgewählte(n) Virus/Viren erbringen wird, ohne irgendwelchen schädlichen oder schädigenden Nebenwirkungen zu verursachen.

[0042] Die vorliegende Erfindung wird weiterhin unter Bezugnahme auf die folgenden illustrierten Beispiele

beschrieben. Solange nicht anders definiert, haben alle technischen und wissenschaftlichen Ausdrücke, die hier verwendet werden, die gleiche Bedeutung, mit der sie gebräuchlicherweise vom Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet der Erfindung dargestellt würden. Obwohl beliebige Verfahren und Materialien, die ähnlich oder äquivalent zu den hier beschriebenen sind, bei der praktischen Durchführung der Erfindung verwendet werden können, sind die bevorzugten Verfahren und Materialien beschrieben worden.

[0043] Solange nicht anders erwähnt, sind die hier verwendeten oder ins Auge gefassten Techniken Standardmethodiken, die dem Durchschnittsfachmann wohlbekannt sind. Die Materialien, Verfahren und Beispiele sind rein beschreibend und nicht einschränkend. Alle hier zitierten Literaturstellen werden durch Referenz in Bezug genommen.

Beispiel 1 – Protokolle und Materialien

Zellkultur und Virus:

[0044] Es wurden die Prozeduren zum Anzüchten von Vero-Zellen und die Herstellung hohe Titer aufweisen der Stammansätze von HSV-1 KOS, wie beschrieben in Grau et al., Invest. Ophthal. and Vis. Sci. 30: 2474 (1989)), verwendet. Die Vero-Zellen wurden in Carbonat-gepuffertem DMEM gehalten, das mit 5% Kälberse- rum und 5% fötalem Rinderserum supplementiert war (Regulärmedium). Für einige Studien wurden die Zellen auf Serum-freies DMEM umgestellt, das mit 25 mM Hepes (pH 7,4) gepuffert war, und man ließ sie sich für 30 min an dieses Medium anpassen, bevor die experimentellen Behandlungen erfolgten. Die Vero-Zellen wurden in Wells (0,28 cm²) von Mikrotiterplatten ausgesät, entweder mit $3,5 \times 10^4$ Zellen/Well für die Verwendung 1 Tag später (8×10^4 Zellen/Well) oder mit 1×10^4 Zellen/Well für die Verwendung 3 Tage später (2×10^5 Zel- len/Well).

Plaque-Reduktions-Assay:

[0045] Konfluente Vero-Zell-Kulturen in Mikrotiterplatten wurden für 1 Stunde bei 37°C in 40 µl Medium infiziert. Sofern nicht anders angegeben, dauerten die Peptidbehandlungen in 40 µl Medium von 1 Stunde vor bis 1 Stunde nach der Infektion. Am Ende der Adsorptionsphase wurden die Kulturen erneut mit 100 µl Regulär- medium gefüttert. Die Plaquebildung wurde zwei Tage später ausgewertet, und die Anzahl der Plaques, die pro Well ausgezählt wurde, wurde im Bezug auf die Anzahl normalisiert, die in Abwesenheit des Peptids ge- zählt wurde. Unter Verwendung eines Okularmikrometers wurde die Plaquegröße bestimmt ($\pi/2 \times L \times S$), in- dem man den größten Plaque-Durchmesser (L) und den Durchmesser in einem 90°-Winkel hierzu (S) ausmaß. Es wurde die Größe jedes der ersten 40 ausgezählten Plaques gemessen, außer wenn ein Plaque weniger als 10 abgerundete Zellen enthielt oder den Rand des Wells berührte.

Ausbeute-Reduktions-Assay:

[0046] Drei Tage nach der Infektion wurden die Vero-Zell-Kulturen in den Mikrotiterplatten dreimal gefroren (–80°C) und aufgetaut (37°C). Die Zellen wurden durch wiederholtes Pipettieren suspendiert, und die Mikroti- terplatten wurden für 10 Minuten bei 700 × g in einer Beckman Modell TJ-6 Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Virus enthaltenden Überstände wurden seriell in Regulärmedium verdünnt und auf Vero-Zellen titriert. Die Plaques wurden ausgezählt, nachdem die Monolayer mit Kristallviolett angefärbt worden waren, wie von Grau et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 30: 2474 (1989) beschrieben.

Anheftungs-Assay:

[0047] HSV-1 KOS wurde mit [³²P]-Orthophosphat mit einer spezifischen Aktivität von 0,01 cpm/pfu markiert. Kurz dargestellt, wurden Vero-Zellen mit einer MOI von 5,0 infiziert, und 6 Stunden nach der Infektion wurde [³²P]-Orthophosphat (0,5 mCi/ml) hinzugefügt. 18 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen und das Kul- turmedium separat geerntet. Die Zellen wurden 3 Gefrier-Auftau-Zyklen unterworfen, und die Zelltrümmer wur- den durch Zentrifugation bei 2000 × g für 10 min pelletiert. Der Gefrier-Auftau-Überstand wurde mit dem Me- dium vereint, und das Virus wurde durch die Zentrifugation durch ein 26%iges Sucrose-Gradienten-Kissen pel- letiert, wie von Visalli et al., Virus Res. 29: 167 (1993) beschrieben. Das Virus-Pellet wurde für die Verwendung in PBS resuspendiert. Konfluente Vero-Zell-Kulturen in Mikrotiterplatten wurden auf Serum-freies DMEM um- gestellt, auf Eis abgekühlt und auf 4°C gehalten. Nach 30 Minuten wurden die Peptide hinzugefügt, und 60 min später wurden die Zellen für 2 Stunden mit ³²P-Virus (2×10^4 cpm/Well) inkubiert. Nach dem Markieren wurden die Zellen mit eiskaltem Medium gespült. Das gebundene ³²P wurden dann mit 1% SDS und 1% Triton X100 in PBS quantitativ extrahiert und in einem Beckman LS5801 Flüssig-Szintillationszähler ausgezählt.

LacZ+ Virus (hrR3) Eintritts-Assay:

[0048] Konfluente Vero-Zell-Kulturen in 96-Well-Mikrotiterplatten wurden auf Hepes-gepuffertes, Serum-freies DMEM umgestellt, 30 Minuten lang auf Eis auf 4°C abgekühlt und mit hrR3 für 1 Stunde bei 4°C in 40 µl Medium infiziert. Nicht angeheftetes Virus wurde durch Spülen mit eiskaltem Medium entfernt. Die Behandlungen mit antiviralem Peptid SEQ ID NO: 1, bezeichnet als EB, oder mit einem Kontrollpeptid, umfassend das Tetrapeptid RRKK (SEQ ID NO: 16), angeheftet an eine durcheinander gebrachte Version des Membran-überschreitenden Peptids R-R-K-K-L-A-A-L-P-L-V-L-A-A-P-L-A-V-L-A (SEQ ID NO: 17) (bezeichnet als EBX), oder Scheinbehandlungen mit Peptid-freiem Medium wurden in Serum-freiem DMEM durchgeführt wie angezeigt. Der Virus-Eintritt wurde durch Umstellen der Kulturen auf 37°C gestartet. Um jedwedes verbleibende extrazelluläre Virus zu inaktivieren, wurden die Kulturen mit PBS gespült und Citratpuffer mit niedrigem pH ausgesetzt (40 mM Citronensäure, 10 mM KCl, 135 mM NaCl, pH 3,0), und zwar gemäß Highlander et al., J. Virol. 61: 3356 (1987) für 1 min bei 23°C. Das Citrat wurde dann mit PBS abgespült, und die Kulturen wurden in Serum-supplementiertem DMEM gehalten, bis sie mit 0,5% Glutaraldehyd in 5 × PBS für 30 min bei 23°C fixiert wurden und für 1 Stunde oder übernacht bei 23°C mit X-Gal (Fisher Biotech; BP1615-1) in 1 × PBS, enthaltend 2 µM MgCl₂, 1,3 mM K₄Fe(CN)₆ und 1,3 mM K₃Fe(CN)₆, auf β-Galaktosidaseaktivität angefärbt und im Hinblick auf die Gegenwart blauer lacZ⁺-Zellen ausgezählt wurden.

Viruziditäts-Assay:

[0049] HrR3 ($1,2 \times 10^6$ pfu/ml) wurde mit verschiedenen Konzentrationen an EB oder EBX für 1 Stunde bei 37°C in 70 µl Serum-freiem DMEM (pH 7,4) inkubiert. Das behandelte Virus wurde 200-fach mit Serum-supplementiertem DMEM verdünnt und etwa 1 Stunde später in Mikrotiter-Wells, die einen Tag zuvor mit Vero-Zellen ($3,5 \times 10^4$ Zellen/Well) inkuliert worden waren, auf Infektivität hin getestet. Es wurden Volumina von 40 oder 100 Mikroliter an verdünntem Virus für 1 oder 2 h bei 37°C adsorbiert, und die lacZ⁺-Zellen wurden 8 Stunden später ausgezählt. Bei einigen Versuchen wurden Aliquots von verdünntem Virus zunächst übernacht bei 4°C gegen ein 60-faches Überschussvolumen von Hepes-gepuffertem, Serum-supplementiertem DMEM dialysiert (Spectra/Por; MWCO 12–14.000) oder über eine Spritze durch 0,22 µm-Membranen (Millex-GV, Millipore) getrieben, bevor das verbleibende infektiöse Virus getestet wurde.

Trypan-Blau-Ausschluss-Assay:

[0050] Nicht-infizierte Vero-Zellen in Serum-freiem oder Serum-supplementiertem DMEM wurden für 1 Stunde bei 37°C mit dem antiviralen Peptid SEQ ID NO: 1 oder mit dem Kontroll-Peptid EBX (SEQ ID NO: 17) behandelt, mit PBS gespült, für 5 min bei 23°C mit 0,4% Trypan-Blau in PBS angefärbt, erneut mit PBS gespült und an der Luft getrocknet.

Elektronen-Mikroskope:

[0051] Gereinigte HSV-1 KOS Virionen ($2,5 \times 10^7$ pfu/ml) gemäß Visalli et al., Virus Res. 29: 167 (1993) wurden mit 25 µM antiviralem Peptid SEQ ID NO: 1 oder mit dem Kontroll-Peptid EBX (SEQ ID NO: 17) in 40 µl Serum-freiem DMEM, gepuffert mit 25 mM Hepes (pH 7,4), für 5 bis 60 min bei 4 oder 23°C behandelt. Es wurden Aliquots (10 µl) für 5 min bei 23°C an mit poly-L-Lysin-beschichtete Pioloform-Gitterchen adsorbiert. Die Gitterchen wurden mit PBS gespült, mit 2% Phosphowolframsäure (PTA) in Wasser, eingestellt auf pH ~6, angefärbt und an der Luft getrocknet. Alternativ wurde das Virus an den Gitterchen prä-adsorbiert und danach mit Peptiden behandelt. Es wurde eine Gesamtheit von 4×10^9 pfu/ml an gereinigtem HSV-1 KOS in 5 µl PBS für 5 min bei 23°C auf die beschichteten Gitterchen appliziert, und die Gitterchen wurden einmal mit Serum-freiem DMEM, gepuffert mit 25 mM Hepes (pH 7,4), gespült, und mit 15 µl an 5 mM EB oder EBX im gleichen Medium für 30 min bei 37°C behandelt. Der pH der hochkonzentrierten Lösungen von antiviralem Peptid SEQ ID NO: 1 und von EBX wurde vor der Verwendung mit NaOH erneut auf 7,4 eingestellt. Um eine Verdunstung der Peptid-enthaltenden Lösungen zu verhindern, wurde jedes Gitterchen in einer flexiblen Hiraoka-Färbeplatte gehalten und durch ein Miniatur-Glockengefäß bedeckt, das aus einem 0,5 ml Polypropylen-Mikrozentrifugenröhrchen hergestellt wurde, klein genug, damit die 15 µl die Hälfte des Glockengefäßes füllen, das die beschichtete Oberfläche des Gitterchens einfassst. Der Gesamtaufbau wurde dann in einer feuchten Kammer für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach der Behandlung wurden die Gitterchen zweimal mit DMEM und einmal mit PBS gespült, bevor sie mit PTA gefärbt und getrocknet wurden. Die Gitterchen wurden in einem JEOL JEM-1200EX Elektronenmikroskop bei Vergrößerungen von 15.000 und 40.000x überprüft.

Peptidsynthese:

[0052] Die Synthese und Analyse von Peptiden erfolgte am Biotechnology Center der Universität von Wisconsin-Madison. Die Synthese erfolgte in einem Größenmaßstab von 25 pmol unter Verwendung eines automatisierten Synthesegeräts (Applied Biosystems Modell 432A „Synergy“), indem man den Prinzipien folgte, die zunächst von Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 7129 (1963) beschrieben wurden, mit Modifikationen gemäß Meienhofer et al., Int. J. Peptide Protein Res. 13: 35 (1979) und Fields et al., Peptide Res. 4: 95 (1991). Die abgespaltenen Peptide wurden mit kaltem t-Butylmethylether präzipitiert, in Wasser gelöst und mittels analytischer HPLC (Reinheit) und Elektrospray-Ionisations-Massenspektroskopie (Molekülmasse, siehe Tabelle 1) untersucht. Die Peptidkonzentrationen in Lösung wurden mittels Extinktions-Ablesungen bei 215 und 225 nm bestimmt, wie beschrieben durch Segel, Biochemical Calculations, 2. Auflage, John Wiley & Sons, Inc., New York, NY (1976).

Beispiel 2 – Antivirale Aktivität von antiviralen Peptiden

[0053] Das antivirale Peptid EB (SEQ ID NO: 1) war ein wirkungsvolles antivirales Mittel, wenn es während der Infektion von Vero-Zell-Kulturen mit HSV-1 KOS anwesend war, wobei es die Plaque-Bildung blockiert, wie in den [Fig. 1A](#) (•), [Fig. 1B](#) (•) und [Fig. 1D](#) (o) gezeigt, dies unter Reduzierung der Virusausbeuten um bis zu acht Größenordnungen in Abhängigkeit von der Konzentration (siehe [Fig. 1E](#)). Im Vergleich zu einem Kontrollpeptid ([Fig. 1A](#) (o) und [Fig. 1B](#) (o)), EBX, war das antivirale Peptid EB ein weit wirkungsvoller antivirales Mittel, wobei es Infektionen in Abhängigkeit von der Anwesenheit ([Fig. 1A](#)) oder Abwesenheit ([Fig. 1B](#)) von Serum bei 10-fach oder 100-fach niedrigeren Konzentrationen blockierte.

[0054] Die zytotoxischen Wirkungen des antiviralen Peptids EB, wie gemessen durch Trypanblau-Ausschluss in Abwesenheit von Serum wurden erst bei Konzentrationen beobachtet, die 100-fach höher waren ([Fig. 1C](#), (•); $IC_{50} = 68 \mu M$) als die antiviralen Konzentrationen ([Fig. 1B](#), (•); $IC_{50} = 0,7 \mu M$). In Anwesenheit von Serum wurden zytotoxische Effekte erst bei 200 μM EB beobachtet ([Fig. 1C](#), (Δ)). Es waren keine zytotoxischen Wirkungen mit dem Kontrollpeptid EBX (SEQ ID NO: 17) assoziiert ([Fig. 1C](#), (o)).

[0055] Das geladene aminoterminale R-R-K-K-Tetramer wurde als nützlich zur Steigerung der Löslichkeit des ansonsten hydrophoben antiviralen Peptids EB ermittelt, besitzt jedoch selber keinerlei wesentliche antivirale Aktivität. In Anwesenheit von Serum war keine antivirale Aktivität mit dem freien R-R-K-K-Tetramer (SEQ ID NO: 16) bei Konzentrationen von immerhin 200 μM assoziiert ([Fig. 1A](#), (Δ)).

[0056] In getrennten Versuchen wurde entdeckt, dass das freie R-R-K-K-Tetramer (SEQ ID NO: 16) die hrR3-Infektion von Vero-Zellen unter serumfreien Bedingungen mit einem IC_{50} -Wert von 1,3 mM inhibierte (Daten nicht gezeigt). Wir fanden außerdem heraus, dass hohe (bis zu 100-facher molarer Überschuss), jedoch nicht-antivirale Konzentrationen des freien R-R-K-K-Peptids (SEQ ID NO: 16) nicht mit der Aktivität des antiviralen Peptids EB konkurrierten und die Inhibition der hrR3-Infektionen durch das antivirale Peptid EB nicht mindern konnten (Daten nicht gezeigt).

[0057] Um zu untersuchen, ob Derivate einer Membran-überschreitenden Proteinsequenz antivirale Aktivität zeigten, testeten wir ein modifiziertes antivirales Peptid (SEQ ID NO: 3), das als EBPP bezeichnet wird, und bei dem der zentrale Prolinrest an das Carboxy-terminale Ende verschoben war. Dieses EBPP-Peptid (Tabelle 1) war zweimal so aktiv wie das ursprüngliche EB-Peptid, und zwar sowohl im Plaque-Assay ([Fig. 1D](#)) als auch im Ausbeute-Reduktions-Assay (Daten nicht gezeigt).

[0058] Das EB-Peptid wurde modifiziert, um Biotin zu tragen (SEQ ID NO: 2) und auf seine Aktivität hin getestet, wie oben beschrieben. Wie in [Fig. 2](#) gezeigt, war das biotinierte EB im wesentlichen ebenso wirksam wie EB. Somit besaß die Biotinylierung des Peptids einen vernachlässigbaren Effekt im Bezug auf die Aktivität.

[0059] Die antivirale Aktivität einer Anzahl anderer antiviraler Peptide und Kontrollen gemäß der vorliegenden Erfindung wurde bestimmt wie oben beschrieben. Die Ergebnisse sind unten in Tabelle 3 gezeigt. Wie in [Fig. 1E](#) dargestellt, zeigt das antivirale Peptid SEQ ID NO: 4, das als „LALA“ bezeichnet wird, eine ähnliche antivirale Aktivität wie EB.

TABELLE 3 – Antivirale Aktivität von antiviralen Peptiden

Peptid	Eintrittsblockierende Aktivität ¹	Viruzide Aktivität ¹		Gegen freies Virus gerichtete Aktivität ¹	Zytotoxizität ¹
		37°C	4°C		
EB (SEQ ID NO: 1)	15–26	44	89		
bEB (SEQ ID NO: 2)	15	35	110	21	100
EBX (SEQ ED-NO: 17)	Keine	Keine	Keine		
bKLA (SEQ ID NO: 5)*	11	15	45	4.5	15
bKLAd _{11,12} (SEQ ID NO: 6)*	23	61	300		
bHOM-9 (SEQ ID NO: 7)*	9–12	115	Keine	6	50
bHOMd (SEQ ID NO: 8)*	7	115	Keine		
bHOMFF (SEQ ID NO: 9)*	40	Keine	Keine	34	>> 100
bTAT-9 (SEQ ID NO: 10)*	26	Keine	Keine	8	~200
bTAT-9x (SEQ ID NO: 12)*	67	Keine	Keine		

¹IC₅₀-Werte für alle Peptide

*Zitiert zu Vergleichszwecken

Beispiel 3 – Vergleich antiviraler Aktivität antiviraler Peptide im Bezug zu Acyclovir

[0060] Vero-Zell-Kulturen, die wie in Beispiel 1 hergestellt wurden, wurden mit HSV-1 infiziert und auf Virusproduktion hin untersucht wie in Beispiel 1 beschrieben. Die antivirale Aktivität eines antiviralen Peptids gemäß der vorliegenden Erfindung, EB (SEQ ID NO: 1), wurde mit der antiviralen Aktivität des derzeitigen antiviralen HSV-Nukleosid-Standardmittels Acyclovir verglichen. Die zwei Peptide wurden eine Stunde vor der Infektion mit HSV zu den Vero-Zellen hinzugegeben. Wie [Fig. 3](#) darstellt, zeigte EB, obwohl Acyclovir die höchste antivirale Aktivität bei niedrigen Dosen aufwies, bei hohen Konzentrationen, d. h. solchen, die 10 µM an Wirkstoff überschreiten, die größte antivirale Aktivität.

Beispiel 4 – Frühe Wirkungen und Wirkungen auf die Zell-Zell-Ausbreitung

[0061] Es wurde bestimmt, dass antivirale Peptide gemäß der vorliegenden Erfindung früh im viralen Lebenszyklus wirken. Wie in [Fig. 4A](#) gezeigt, war EB wesentlich wirksamer, wenn es während der Infektion und 1 Stunde vor und nach der Infektion anwesend war, als wenn es kontinuierlich, beginnend 1 Stunde nach der Infektion, anwesend war (IC₅₀ = 5,5 µM, (o) gegenüber IC₅₀ = 24, (•)). Weiterhin, wenn es vor und während der Adsorption anwesend war, hatte EB keine Wirkung auf die Plaquegröße. Wenn das EB-Peptid kontinuierlich nach der Infektion vorhanden war, so wurde die Ausdehnung der Plaques in einer dosisabhängigen Weise inhibiert ([Fig. 4A](#), (Δ); IC₅₀ = 12 µM). Um sicherzustellen, dass einzelne Plaques verlässlich gemessen wurden, wurden die Zellkulturen mit sehr geringer Multiplizität infiziert (MOI < 0,01), und die Plaquegrößen wurden mikroskopisch sehr früh gemessen (1 Tag nach der Infektion). Wie in [Fig. 4B](#) gezeigt, war die Plaquegröße in unbehandelten Kontroll-Wellen breit verteilt (schwarze Balken; Mittelwert: 66.000 ± 6200 µm²), wogegen die Zugehörigkeit zu steigender Konzentrationen an EB 1 Stunde nach der Infektion die Verteilung progressiv in Richtung kleinerer Größenklassen verschob (z. B. führten 25 µM EB zu einer signifikanten Reduktion der mittleren Plaquegröße um 70% auf 6900 ± 2600 µm²; t = 6,88; schattierte Balken). Im Gegensatz dazu besaß die Anwesenheit von EB bis zu 1 Stunde nach der Infektion keine Auswirkung auf die Plaquegröße, auch wenn die Anzahl der Plaques im Vergleich zur Behandlung nach der Infektion stark reduziert wurde. Somit war die kombinierte mittlere Plaquegröße nach transienten Behandlungen mit 6 und 12 µM EB (68.000 ± 11.000 µm²) nicht unterscheidbar von den Kontrollen. EB schien in einem frühen Stadium der viralen Infektion zu wirken und reduzierte

die Plaquegröße, wenn es nach der Infektion zugegeben wurde.

Beispiel 5 – Aggregation von Virus durch antivirales Peptid

[0062] Es wurde für die antiviralen Peptide der vorliegenden Erfindung mittels Elektronenmikroskopie gezeigt, dass sie Virus aggregieren. Gereinigte Viruspartikel bei hohen Konzentrationen, wie erforderlich für eine effiziente Sichtbarmachung, wurden mit 25 μ M EB inkubiert, an beschichtete Gitterchen adsorbiert und mit PTA angefärbt. Die Ergebnisse zeigten, dass nahezu alle Partikel in relativ wenigen großen Aggregaten zu sehen waren. Im Gegensatz dazu waren unbehandeltes Virus oder Viruspartikel, die mit 25 μ M EBX behandelt wurden, nahezu alle einzeln und gleichmäßig verstreut auf der Gitteroberfläche zu finden. Die einzelnen mit PTA gefärbten Viruspartikel in den Aggregaten waren praktisch nicht von den Kontrollpartikeln unterscheidbar, was anzeigt, dass EB keine großen strukturellen Abnormitäten bei den Viruspartikeln induzierte. Die EB-induzierten Aggregate wurden rasch ausgebildet (< 5 min), bei Raumtemperatur ebenso wie bei 4°C.

Beispiel 6 – Antivirale Aktivität von antiviralem Peptid im Hinblick auf die Virus-Zufuhr

[0063] Es wurden Kulturen bei Zufuhren von 19, 210 und 5700 pfu/Well in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von EB mit hrR3 infiziert und 8 Stunden später auf lacZ⁺-Zellen hin ausgezählt, wobei die erhaltenen IC₅₀-Werte 0,66, 1,2 bzw. 11 μ M betragen, wie in [Fig. 5](#) gezeigt.

[0064] Signifikanter Weise gab es oberhalb der mittleren Zufuhr von 210 pfu/Well eine größere Steigerung bei der IC₅₀ mit zunehmendem Virustiter als unterhalb dieser Zufuhr, wie gezeigt in der Einfügung in [Fig. 5](#). Es würde eine umgekehrte Beziehung zwischen der IC₅₀ und dem Virustiter erwartet, wenn EB lediglich als ein Aggregationsmittel wirken würde, das bei höherer Viruszufuhr effizienter, d. h. mit niedrigerem IC₅₀ arbeiten sollte. Somit leistet die virale Aggregation bei diesen Versuchen keinerlei wesentlichen Beitrag zur antiviralen Aktivität von EB. Weiterhin deutet die Tatsache, dass die antivirale Aktivität von EB stark von der Viruskonzentration abhängt, darauf hin, dass die antiviralen Peptide der vorliegenden Erfindung mit viralen Komponenten interagieren.

Beispiel 7 – Inhibition des Viruseintritts

[0065] Zusätzliche Studien mit prä-adsorbiertem hrR3-Virus zeigten, dass die antivirale Wirkung oder Wirkungen eines antiviralen Peptids der vorliegenden Erfindung weder mit der Virus-Adsorption noch mit der Virus-Aggregation in Beziehung stehen, sondern vielmehr mit der Inhibition des Viruseintritts. Bei diesen Studien wurde das hrR3-Virus für 1 Stunde bei 4°C an die Zellen prä-adsorbiert, bevor eiskaltes 25 μ M EB oder EBX in serumfreiem DMEM hinzugegeben wurden. Nach einer weiteren Stunde bei 4°C wurden die Kulturen auf 37°C umgestellt, um den Viruseintritt zu starten. In 15-Minuten-Intervallen nach der Temperaturverschiebung wurde sämtliches Virus, das außerhalb der Zellen verblieb, inaktiviert, indem man die Kulturen mit Citratpuffer von niedrigem pH wusch. Die Kulturen wurden dann gespült und wieder auf Peptid-freies, mit Serum supplementiertes DMEM zurückgebracht, bis sie 8 Stunden nach der Temperaturverschiebung fixiert und auf β -Galaktosidase hin angefärbt wurden.

[0066] Wie in [Fig. 6A](#) gezeigt, wurde der Virus-Eintritt in scheinbehandelte Kontrollkulturen (o) 15–30 min nach der Überführung auf 37°C gestartet und nach etwa 60 Minuten bei einem Niveau von etwa 340 lacZ⁺-Zellen pro 6,5 mm² (oder 1450 lacZ⁺-Zellen/Well) abgeschlossen. Bei den Kulturen, die mit dem EB-Peptid behandelt wurden, war die Anzahl der lacZ⁺-Zellen um > 90% reduziert (•). Das EBX-Peptid führte zu keiner signifikanten Reduzierung der Anzahl der lacZ⁺-Zellen (▲). Es wurden im wesentlichen die gleichen Ergebnisse erhalten, wenn EB und EBX vor der Virus-Adsorption hinzugegeben wurden (Daten nicht gezeigt). Wenn das Peptid unmittelbar nach jeder Citratbehandlung hinzugegeben wurde, besaß EB nicht länger irgendeine Wirkung auf die Entwicklung der lacZ⁺-Zellen ([Fig. 6B](#), (•); cf. [Fig. 6A](#), (o)). EBX bewirkte ebenfalls keine signifikante Inhibition der Entwicklung der lacZ⁺-Zellen, wenn es direkt nach den Citratbehandlungen hinzugegeben wurde ([Fig. 6B](#), (▲)). Somit besaß EB keine Wirkung auf die Expression des lacZ-Gens von dem frühen ICP6-Promotor, sondern blockierte selektiv den Viruseintritt.

[0067] Diese Schlussfolgerung wird durch die Entdeckung bestärkt, dass die EB-empfindliche Phase der Infektion mit prä-adsorbiertem Virus klar der Expression der lacZ-Gene in mit hrR3 infizierten Zellen vorangeht ([Fig. 7A](#)). Wiederum wurde hrR3 für 1 h bei 4°C an Zellen prä-adsorbiert, nicht angeheftetes Virus wurde abgespült, und die Zellen wurden für eine weitere Stunde bei 4°C gehalten. Die Kulturen wurden dann für 30 Minuten auf 23°C überführt, bevor sie auf 37°C umgestellt wurden. Dieser graduellere Wechsel zu 37°C erlaubte es den Zellschichten, durch nachfolgende häufige Mediumwechsel hindurch intakt zu bleiben. Unmittelbar

nach der viralen Adsorption wurden die Zellen für 1-Stunden-Zeitspannen mit nachfolgenden 1-stündigen Intervallen mit 50 μ M EB behandelt. Zwischen 1 und 4 Stunden nach der Infektion wurde der Viruseintritt um 70–80% inhibiert. Danach wurde die Infektion nicht länger in signifikantem Maße inhibiert (Fig. 7B, (•)). Parallel Kulturen wurden unmittelbar nach den Scheinbehandlungen fixiert und mit X-Gal gefärbt. Bei diesen Kulturen erschienen blaue (lacZ^+)-Zellen zum ersten Mal 7 Stunden nach der Infektion, und ihre Anzahl stieg nahezu linear für die nächsten drei Stunden an (Fig. 7A, (o)). Nach etwa 7 Stunden nach der Infektion hörte EB auf, inhibitorisch zu sein. Somit blockierte EB nur den Viruseintritt während einer frühen kurzen empfindlichen Zeitspanne und hatte keine Wirkung auf die Expression des lacZ -Gens und die Entwicklung von β -Galaktosidase-Aktivität, sobald das Virus in die Zelle eingetreten war. Wie in Fig. 7B gezeigt, inhibierte EB den Eintritt von prä-adsorbiertem Virus in einer dosisabhängigen Weise mit einer $\text{IC}_{50} = 15 \mu\text{M}$ (•), wogegen EBX weniger wirksam war ($\text{IC}_{50} \sim 100 \mu\text{M}$; (o)).

Beispiel 8 – Viruzide Wirkungen von antiviralem Peptid

[0068] Es wurde herausgefunden, dass die Bindung antiviraler Peptide der vorliegenden Erfindung an Viruspartikel zu irreversibler Virusinaktivierung führt. Es wurden Viruziditäts-Assays mit hrR3 durchgeführt. Beim ersten Versuch (Fig. 8A) inhibierte EB die Infektivität von Virionen in einer konzentrationsabhängigen Weise mit einer $\text{IC}_{50} = 44 \mu\text{M}$ (•), wogegen EBX keine inhibitorische Wirkung besaß (o). Beim zweiten Versuch, bei dem geringfügig höhere Konzentrationen von EB benötigt wurden, um Inhibition zu erreichen (Fig. 10B, (•); $\text{IC}_{50} = 69 \mu\text{M}$), fanden wir ebenfalls heraus, dass die behandelten Virionen irreversibel inaktiviert wurden. Das heißt, Aliquots von mit EB behandelten und dann verdünnten Virionen konnten während einer Übernacht-Dialyse gegen Serum-enthaltendes Medium, die das gesamte reversibel gebundene EB hätte einfangen können, nicht reaktiviert werden (cf. Fig. 1, (•); A gegenüber B). Stattdessen blieben die Virionen, die nach der Dialyse wiedergewonnen wurden (31% bei jeder EB-Konzentration) genauso inaktiviert wie die nicht dialysierten Kontrollen (Fig. 8B, (Δ) gegenüber (•)).

[0069] Um die möglichen Beiträge viraler Aggregation zur viralen Inaktivierung zu bestimmen, wurden zusätzliche Aliquots von EB-behandelten und nachfolgend verdünnten Virionen durch 0,22 μm -Membranen gefiltert, bevor sie auf die verbleibende Infektivität getestet wurden. In Abwesenheit von oder bei niedrigen Konzentrationen von EB ($\leq 3 \mu\text{M}$) wurden 80–85% der Virionen auf den Membranen gefangen. Die verbleibenden Virionen jedoch wurden nur zurückgehalten, sobald sie höheren EB-Konzentrationen ausgesetzt waren, die die Membranhaftung steigerten und/oder virale Aggregation bewirkten (Fig. 8B, (▲)). Solche Veränderungen in den Adhäsionseigenschaften von Virionen wurden klar unterhalb von EB-Konzentrationen induziert, die für die Virusinaktivierung benötigt wurden (Fig. 8B, (▲) gegenüber (•), (Δ)).

[0070] Die Wirkungen der schwersten EB-Behandlungen wurden durch die Elektronenmikroskopie von PTA-gefärbten Virionen, die zuvor an Gitterchen adsorbiert (um Aggregation zu vermeiden) und 5 mM an Peptid ausgesetzt worden waren, untersucht. Die mit EB behandelten Virionen sahen im wesentlichen gleich aus wie die scheinbehandelten Virionen, mit der Ausnahme dass die Konturen der viralen Hüllen bei den EB-behandelten Partikeln weniger pleomorph waren, was EB-stabilisierte Virionen nahelegt. Bei 5 mM hatte EBX die gleiche Wirkung wie EB.

Beispiel 9 – In vivo-Aktivität von antiviralem Peptid

[0071] Die antiviralen Peptide gemäß der vorliegenden Erfindung zeigen in vivo-Aktivität, wenn sie topisch appliziert werden. Der HSV-1-Stamm KOS wurde für 1 Stunde entweder mit dem EB-Peptid oder mit dem EBX-Peptid bei einer Konzentration von 25 μM bei Raumtemperatur in PBS inkubiert. Gruppen von jeweils zehn Mäusen wurden dann über Hornhaut-Anritzen mit $5,0 \times 10^5$ Plaque-bildenden Einheiten infiziert, wie wir zuvor beschrieben haben (Brandt et al., J. Virol. Meth. 36: 209 (1992)).

[0072] Kurz dargestellt, wurden die Mäuse mit Halothan betäubt, die Hornhaut wurde 3-mal horizontal und 3-mal vertikal eingeritzt, und ein 5 μl Tropfen, der Virus enthielt, wurde auf die Hornhaut aufgebracht. Die Mäuse wurden dann zur Erholung in ihre Käfige zurückgesetzt. Eine Kontrollgruppe, die mit KOS infiziert wurde, jedoch keinem Peptid ausgesetzt wurde, wurde ebenfalls einbezogen. Die Mäuse wurden nach der Infektion nicht mit Peptid behandelt.

[0073] Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion wurde der Schweregrad der Augenerkrankung gemessen, wie wir zuvor beschrieben haben (gleiche Referenzstelle). Kurz dargestellt, wurde die Vaskularisierung bewertet: 0, keine Vaskularisierung; 1 + < 25% der Hornhaut betroffen; 2 + 25–50% betroffen; und 3 + > 50% betroffen. Es wurde die Keratitis bewertet: 0 keine Hornhauttrübung; 1 + Trübung, einige Iris-Details sicht-

bar; 2 + trübe, Iris-Detail verschleiert; 3 + Hornhaut vollständig opak; 4 + Hornhaut perforiert und trübe. Die Daten werden als mittlere Krankheitswerte an jedem Tag für jede der drei Gruppen beschrieben. Die Ergebnisse sind in **Fig. 9** dargestellt.

[0074] Die folgenden Literaturstellen werden zusätzlich durch Referenz in Bezug genommen:

1. Aldrian-Herrada, G., M. G. Desarménien, H. Orcel, L. Boissin-Agasse, J. Méry, J. Brugidou, und A. Rabié. 1998. A peptide nucleic acid (PNA) is more rapidly internalized in cultured neurons when coupled to a retro-inverso delivery peptide. The antisense activity depresses the target mRNA and protein in magnocellular oxytocin neurons. *Nucleic Acids Res.* 26: 4910–4916.
2. Banfield, B. W., Y. Leduc, L. Esford, R. J. Visalli, C. R. Brandt, und F. Tufaro. 1995. Evidence for an interaction of herpes simplex virus with chondroitin sulfate proteoglycans during infection. *Virology* 208: 531–539.
3. Berkowitz, B. A., C. L. Bevins, und M. A. Zasloff. Magainins: A new family of membrane-active host defense peptides. *Biochem. Pharmacol.* 39: 625–629, 1990.
4. Cal, W., B. Gu, und S. Person. 1988. Role of glycoprotein B of herpes simplex virus type I in viral entry and fusion. *J. Virol.* 62: 2596–2604.
5. Campadelli-Fiume, G., D. Stirpe, A. Boscano, E. Avitabile, L. Foa-Tomasi, D. Barker, und B. Roizman. 1990. Glycoprotein C-dependent attachment of herpes simplex virus to susceptible cells leading to productive infection. *Virology* 178: 213–222.
6. Chou, P. Y. und G. D. Fasman. 1978. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv. Enzymol. Related Areas Mol. Biol.* 47: 45–147.
7. Cockrell, A. S., und M. I. Muggeridge. 1998. Herpes simplex virus type 2 UL45 is a type II membrane protein. *J. Virol.* 72: 4430–4433.
8. Coen, D. M., D. P. Aschman, P. T. Gelep, M. J. Retondo, S. K. Weller, und P. A. Schaffer. 1984. Fine mapping and molecular cloning of mutations in the herpes simplex virus DNA polymerase locus. *J. Virol.* 49: 236–247.
9. Derossi, D., A. H. Joliot, G. Chassaing, und A. Prochiantz. 1994. The third helix of the antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol. Chem.* 269: 1044–1050.
10. Desai, P. J., P. A. Schaffer, und A. C. Minson. 1988. Excretion of non-infectious virus particles lacking gH by a temperature-sensitive mutant of herpes simplex virus type I: Evidence that gH is essential for virion infectivity. *J. Gen. Virol.* 69: 1147–1156.
11. Fawell, S., J. Seery, Y. Daikh, C. Moore, L. L. Chen, B. Pepinsky, und J. Barsoum. 1994. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 664–668.
12. Fields, C. G., D. H. Lloyd, R. L. Macdonald, K. M. Otteson, und R. L. Noble. 1991. HBTU activation for automated Fmoc solid-phase peptide synthesis. *Peptide Res.* 4: 95–101.
13. Fuller, A. D., und P. G. Spear. 1987. Anti-glycoprotein D antibodies that permit adsorption but block infection by herpes simplex virus 1 prevent virion-cell fusion at the cell surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5454–5458.
14. Fuller, A. O., und W. -C. Lee. 1992. Herpes simplex virus type I entry through a cascade of virus-cell interactions requires different roles of gD and gH in penetration. *J. Virol.* 66: 5002–5012.
15. Geraghty, R. J., C. Krummenacher, G. Cohen, R. J. Eisenberg, und P. G. Spear. 1998. Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor related protein 1 and poliovirus receptor. *Science* 280: 1618–1620.
16. Gibbs, J. S., H. C. Chiou, J. D. Hall, D. W. Mount, M. J. Retondo, S. K. Weller, und D. M. Coen. 1985. Sequence and mapping analysis of the herpes simplex virus DNA polymerase gene predicts a c-terminal substrate binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 7969–7973.
17. Grau, D. R., R. J. Visalli, und C. R. Brandt. 1989. Herpes simplex virus stromal keratitis is not titer-dependent and does not correlate with neurovirulence. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 30: 2474–2480.
18. Haanes, E. J., C. M. Nelson, C. L. Soule, und J. L. Goodman. 1994. The UL45 gene product is required for herpes simplex virus type 1 glycoprotein B-induced fusion. *J. Virol.* 68: 5825–5834.
19. Hall, J. D., und S. Woodward. 1989. Aphidicolin resistance in herpes simplex virus type 1 appears to alter substrate specificity in the DNA polymerase. *J. Virol.* 63: 2874–2876.
20. Handler, C. G., G. Cohen, und R. J. Eisenberg. 1996. Cross-linking of glycoprotein oligomers during herpes simplex virus type 1 entry. *J. Virol.* 70: 6076–6082.
21. Herold, B. C., D. WuDunn, N. Soltus, und P. G. Spear. 1991. Glycoprotein C of herpes simplex virus type 1 plays a principal role in the adsorption of virus to cells and in infectivity. *J. Virol.* 65: 1090–1098.
22. Herold, B. C., R. J. Visalli, N. Susmarski, C. R. Brandt, und P. G. Spear. 1994. Glycoprotein C-independent binding of herpes simplex virus to cells requires cell surface heparan sulphate and glycoprotein B. *J. Gen. Virol.* 75: 1211–1222.
23. Herold, B. C., S. I. Gerber, B. J. Belval, A. M. Siston, und N. Shulman. 1996. Differences in the susceptibility of Herpes simplex virus types 1 and 2 to modified heparan compounds suggest serotype differences in viral entry. *J. Virol.* 70: 3461–3469.
24. Highlander S, Sutherland SL, Gage PJ, D. C. Johnson, M. Levine, und J. C. Glorioso. 1987. Neutralizing

- monoclonal antibodies specific for herpes simplex virus glycoprotein D inhibit virus penetration. *J. Virol.* 61: 3356–3364.
25. Hutchinson, L., L. K. Goldsmith, H. Browne, V. Wargent, N. Davis-Poynter, S. Primorac, K. Goldsmith, A. C. Minson, und D. C. Johnson. 1992. A novel herpes simplex virus type 1 glycoprotein forms a complex with glycoprotein H (gH) and affects normal folding and surface expression of gH. *J. Virol.* 66: 2240–2250.
 26. Johnson, D. C., und P. G. Spear. 1989. Herpes simplex virus glycoprotein D mediates interference with herpes simplex virus infection. *J. Virol.* 63: 819–827.
 27. Kilby, M. J., S. Hopkins, T. M. Venetta, B. DiMassimo, G. A. Cloud, J. Y. Lee, L. Alldredge, E. Hunter, D. Lambert, D. Bolognesi, T. Matthews, M. R. Johnson, M. A. Nowak, G. M. Shaw, und M. S. Saag. 1998. Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nature Med.* 11: 1302–1307.
 28. Knopf, C. W. 1987. The herpes simplex virus type 1 DNA polymerase gene: Site of phosphonoacetic acid resistance mutation in strain Angelotti is highly conserved. *J. Gen. Virol.* 68: 1429–1433.
 29. Krummenacher, C., A. V. Nicola, J. C. Whitbeck, H. Lou, W. Hou, J. D. Lambris, R. J. Geraghty, P. G. Spear, G. H. Cohen, und R. J. Eisenberg. 1998. Herpes simplex virus glycoprotein D can bind to poliovirus receptor-related protein 1 or herpesvirus entry mediator, two structurally unrelated mediators of virus entry. *J. Virol.* 72: 7064–7074.
 30. Laquerre, S., R. Argnani, D. B. Anderson, S. Zucchini, R. Manservigi, und J. C. Glorioso. 1998. Heparan sulfate proteoglycan binding by herpes simplex virus type 1 glycoproteins B and C, which differ in their contributions to virus attachment, penetration, and cell to cell spread. *J. Virol.* 72: 6119–6130.
 31. Ligas, M. W., und D. C. Johnson. 1988. A herpes simplex virus mutant in which glycoprotein D sequences are replaced by β -galactosidase sequences binds to, but is unable to penetrate into cells. *J. Virol.* 62: 1486–1494.
 32. Lin, Y. -Z., S. -Y. Yao, R. A. Veach, T. R. Torgerson, und J. Hawiger. 1995. Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF- κ B by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence. *J. Biol. Chem.* 270: 14255–14258.
 33. Lycke, E., M. Johansson, B. Svennerholm, und U. Lindahl. 1991. Binding of herpes simplex virus to cellular heparan sulfate, an initial step in the adsorption process. *J. Gen. Virol.* 72: 1131–1137.
 34. Manservigi, R., P. G. Spear, und A. Buchan. 1977. Cell fusion induced by herpes simplex virus is promoted and suppressed by different viral glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 3913–3917.
 35. Matthews, J. T., B. J. Terry, und A. K. Field. 1993. The structure and function of the HSV DNA replication proteins: Defining novel antiviral targets. *Antiviral Res.* 20: 89–114.
 36. Meienhofer, J., M. Waki, E. P. Heimer, T. J. Lambros, R. C. Makofske, und C. D. Chang. 1979. Solid phase synthesis without repetitive acidolysis: Preparation of leucyl-alanyl-glycyl-valine using 9-fluorenylmethoxy-carbonylamino acids. *Int. J. Peptide Protein Res.* 13: 35–42.
 37. Merrifield, R. B. 1963. Solid phase peptide synthesis I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* 85: 7129–7133.
 38. Minson, A. C., T. C. Hodgman, P. Digard, D. C. Hancock, S. E. Bell, und E. A. Buckmaster. 1986. An analysis of the biological properties of monoclonal antibodies against glycoprotein D of herpes simplex virus and identification of amino acid substitutions that confer resistance to neutralization. *J. Gen. Virol.* 67: 1001–1013.
 39. Montgomery, R. I., M. S. Warner, B. J. Lum, und P. G. Spear. 1996. Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* 87: 427–436.
 40. Nicola, A. V., S. H. Willis, N. Naidoo, R. J. Eisenberg, und G. Cohen. 1996. Structure function analysis of soluble forms of herpes simplex virus glycoprotein D. *J. Virol.* 70: 3815–3822.
 41. Nicola, A. V., M. Ponce de Leon, R. Xu, W. Hou, J. C. Whitbeck, C. Krummenacher, R. I. Montgomery, P. G. Spear, R. J. Eisenberg, und G. H. Cohen. 1998. Monoclonal antibodies to distinct sites on herpes simplex virus (HSV) glycoprotein D block HSV binding to HVEM. *J. Virol.* 72: 3595–3601.
 42. Nisole, S., B. Krust, C. Callebaut, G. Guichard, S. Muller, J. -P. Briand, und A. G. Hovanessian. The anti-HIV pseudopeptide HB-19 forms a complex with the cell-surface-expressed nucleolin independent of heparan sulfate proteoglycans. *J. Biol. Chem.* 274: 27875–27884.
 43. Oehlke, J., E. Krause, B. Wiesner, M. Beyermann, und M. Bienert. 1996. Nonendocytic, amphipathicity dependent cellular uptake of helical model peptides. *Protein Peptide Lett.* 3: 393–398.
 44. Oehlke, J., E. Krause, B. Wiesner, M. Beyermann, und M. Bienert. 1997. Extensive cellular uptake into endothelial cells of an amphipathic β -sheet forming peptide. *FEBS Lett.* 415: 196–199.
 45. Pooga, M., M. Hällbrink, M. Zorko, und Ü Langel. 1998. Cell penetration by transportan. *FASEB J.* 12: 67–77.
 46. Rimsky, L. T., D. C. Shugars, T. J. Matthews. 1998. Determinants of human immunodeficiency virus type 1 resistance to gp41-derived inhibitory peptides. *J. Virol.* 72: 986–993.
 47. Roop, C., L. Hutchinson, und D. C. Johnson. 1993. A mutant herpes simplex virus type 1 unable to express glycoprotein L cannot enter cells and its particles lack glycoprotein H. *J. Virol.* 67: 2285–2297.

48. Sasadeusz, J. J., F. Tufaro, S. Safrin, K. Schubert, M. M. Hubinette, P. K. Cheung, und S. L. Sacks. 1997. Homopolymer mutational hot spots mediate herpes simplex virus resistance to acyclovir. *J. Virol.* 71: 3872–3878.
49. Schwarze, S. R., A. Ho, A. Vocero-Akbani, und S. F. Dowdy. 1999. In vivo protein transduction: Delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* 285: 1569–1572.
50. Sears, A. E., B. S. McGwire, und B. Roizman. 1991. Infection of polarized MDCK cells with herpes simplex virus 1: Two asymmetrically distributed cell receptors interact with different viral proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 5087–5091.
51. Segel, I. H. 1976. *Biochemical Calculations*, 2. Auflage, John Wiley & Sons, Inc., New York, NY.
52. Shieh, M. T., D. WuDunn, R. I. Montgomery, J. D. Esko, und P. G. Spear. 1992. Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparan sulfate proteoglycans. *J. Cell Biol.* 116: 1273–1281.
53. Shieh, M. T., und P. G. Spear. 1994. Herpes virus-induced cell fusion that is dependent on cell surface heparan sulfate or soluble heparan. *J. Virol.* 68: 1224–1228.
54. Spear, P. G. 1993. Entry of alphaherpesviruses into cells. *Sem. Virol.* 4: 167–180.
55. Srinivas, R. V., B. Birkedal, R. J. Owens, G. M. Anantharamaiah, J. P. Segrest, und R. W. Compans. 1990. Antiviral effects of apolipoprotein A-I and its synthetic amphipathic peptide analogs. *Virology* 176: 48–57.
56. Srinivas, S. K., R. V. Srinivas, G. M. Anantharamaiah, J. P. Segrest, und R. W. Compans. 1992. Membrane interactions of synthetic peptides corresponding to amphipathic helical segments of the human immunodeficiency virus type-1 envelope glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 267: 7121–7127.
57. Tal-Singer, R., C. Peng, M. Ponce de Leon, W. R. Abrams, B. W. Banfield, F. Tufaro, G. H. Cohen, und R. J. Eisenberg. 1995. Interaction of herpes simplex virus glycoprotein C with mammalian cell surface molecules. *J. Virol.* 69: 4471–4483.
58. Théodore, L., D. Derossi, G. Chassaing, B. Llirbat, M. Kubes, P. Jordan, H. Chneiweiss, P. Godement, und A. Prochiantz. 1995. Intraneuronal delivery of protein kinase C pseudosubstrate leads to growth cone collapse. *J. Neurosci.* 15: 7158–7167.
59. Turner, A., B. Bruun, T. Minson, und H. Browne. 1998. Glycoproteins gB, gD, and gHgL of herpes simplex virus type I are necessary and sufficient to mediate membrane fusion in a Cos cell transfection system. *J. Virol.* 72: 873–875.
60. Visalli, R. J., und C. R. Brandt. 1993. The HSV-1 UL45 18 kDa gene product is a true late protein and a component of the virion. *Virus Res.* 29: 167–178.
61. Vivès, E., P. Brodin, und B. Lebleu. 1997. A truncated HIV-1 tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J. Biol. Chem.* 272: 16010–16017.
62. Westra, D. F., K. L. Glazenburg, M. C. Harmsen, A. Tiran, A. Jan Scheffer, G. W. Welling, T. Hauw The, und S. Welling-Wester. 1997. Glycoprotein H of herpes simplex virus type 1 requires glycoprotein L for transport to the surfaces of insect cells. *J. Virol.* 71: 2285–2291.
63. Whitbeck, J. C., C. Peng, H. Lou, R. Xu, S. H. Willis, M. Ponce de Leon, T. Peng, A. V. Nicola, R. I. Montgomery, M. S. Warner, A. M. Soulka, L. A. Spruce, W. T. Moore, J. D. Lambris, P. G. Spear, G. H. Cohen, und R. J. Eisenberg. 1997. Glycoprotein D of herpes simplex virus (HSV) binds directly to HVEM, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily and a mediator of HSV entry. *J. Virol.* 71: 6083–6093.
64. White, J. 1992. Membrane fusion. *Science* 258: 917–923.
65. Whitley, R. J. 1982. Epidemiology of herpes simplex viruses, S. 1–44. In B. Roizman, (Herausgeber), *The Herpesviruses*, Band 3. Plenum Press, New York, NY.
66. Wild C, T. Oas, C. McDanal, D. Bolognesi, und T. Matthews. 1992. A synthetic peptide inhibitor of human immunodeficiency virus replication: Correlation between solution structure and viral inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10537–10541.
67. WuDunn, D., und P. G. Spear. 1989. Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. *J. Virol.* 63: 52–58.
68. Yao, Q und R. W. Compans. 1996. Peptides corresponding to the heptad repeat sequence of human parainfluenza virus fusion protein are potent inhibitors of virus infection. *Virology* 223: 103–112.

ANHANG

SEQUENZLISTE

<110> WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION
<120> PHARMAKOLOGISCH AKTIVE ANTIVIRALE PEPTIDE UND DEREN
VERWENDUNG
<130> 032021/0571
<140> PCT/US01/03813
<141> 2001-02-06
<150> US 60/184,057
<151> 2000-02-22
<150> US 60/180,823
<151> 2000-02-07
<160> 30
<170> PatentIn Version 3.0
<210> 1
<211> 20
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> synthetisches Konstrukt
<400> 1

Arg Arg Lys Lys Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala
1 5 10 15
Leu Leu Ala Pro
20

<210> 2
<211> 20
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<221> misc_feature
<222> () .. ()
<223> synthetisches Konstrukt

<400> 2

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

Leu Leu Ala Pro
20

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> misc_feature

<222> ()..()

<223> synthetisches Konstrukt

<400> 3

Arg Arg Lys Lys Ala Ala Val Ala Leu Leu Ala Val Leu Leu Ala Leu
1 5 10 15

Leu Ala Pro Pro
20

<210> 4

<211> 13

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> misc_feature

<222> ()..()

<223> synthetisches Konstrukt

<400> 4

Arg Arg Lys Lys Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala
1 5 10

<210> 5

<211> 18

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> misc_feature

<222> ()..()

<223> synthetisches Konstrukt

<400> 5

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

Leu Ala

<210> 6

<211> 18

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> misc_feature

<222> () .. ()

<223> synthetisches Konstrukt

<400> 6

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

Leu Ala

<210> 7

<211> 16

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> misc_feature

<222> ()..()

<223> synthetisches Konstrukt

<400> 7

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Pro Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

<210> 8

<211> 16

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> misc_feature

<222> ()..()

<223> synthetisches Konstrukt

<400> 8

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Pro Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

<210> 9

<211> 16

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> misc_feature

<222> ()..()

<223> synthetisches Konstrukt

<400> 9

Arg Gln Ile Lys Ile Phe Phe Pro Asn Arg Arg Met Lys Phe Lys Lys
1 5 10 15

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> misc_feature

<222> ()..()

<223> synthetisches Konstrukt

<400> 10

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> misc_feature

<222> ()..()

<223> synthetisches Konstrukt

<400> 11

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 12
<211> 27
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> synthetisches Konstrukt
<400> 12

Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu
1 5 10 15
Lys Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys Lys Ile Leu
20 25

<210> 13
<211> 26
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<221> misc_feature
<222> () .. ()
<223> synthetisches Konstrukt
<400> 13

Asp Pro Lys Gly Asp Pro Lys Gly Val Thr Val Thr Val Thr Val Thr
1 5 10 15
Val Thr Gly Lys Gly Asp Pro Lys Pro Asp
20 25

<210> 14
<211> 18
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> synthetisches Konstrukt
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)

<223> Xaa an Position 1 kann ein beliebiger geladener Aminosäurerest sein

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa an Position 1 kann 0 bis 10 Mal vorkommen

<220>

<221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> Xaa an Position 18 kann ein beliebiger geladener Aminosäurerest sein

<220>

<221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> Xaa an Position 18 kann 0 bis 10 Mal vorkommen

<400> 14

Xaa Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala
1 5 10 15

Pro Xaa

<210> 15

<211> 11

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> misc_feature

<222> ()..()

<223> synthetisches Konstrukt

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa an Position 1 kann ein beliebiger geladener Aminosäurerest sein

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (1)

<223> Xaa an Position 1 kann 0 bis 10 Mal vorkommen

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> Xaa an Position 11 kann ein beliebiger geladener Aminosäurerest sein

<220>

<221> misc_feature

<222> (11) .. (11)

<223> Xaa an Position 11 kann 0 bis 10 Mal vorkommen

<400> 15

Xaa Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Xaa
1 5 10

<210> 16

<211> 4

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> misc_feature

<222> ()..()

<223> synthetisches Konstrukt

<400> 16

Arg Arg Lys Lys
1

<210> 17

<211> 20

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> misc_feature

<222> ()..()

<223> synthetisches Konstrukt

<400> 17

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

Ala Val Leu Ala
20

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> misc_feature

<222> ()..()

<223> synthetisches Konstrukt

<400> 18

Arg Arg Lys Lys Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro
1 5 10

<210> 19

<211> 20

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> misc_feature

<222> ()..()

<223> synthetisches Konstrukt

<400> 19

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

Leu Leu Ala Pro
20

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> misc_feature

<222> ()..()

<223> synthetisches Konstrukt

<400> 20

Arg Arg Lys Lys Pro Ala Val Leu Leu Ala
1 5 10

<210> 21

<211> 13

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> synthetisches Konstrukt
<400> 21

Arg Arg Lys Lys Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala
1 5 10

<210> 22
<211> 16
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> synthetisches Konstrukt
<400> 22

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

<210> 23
<211> 17
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> synthetisches Konstrukt
<400> 23

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

Pro

<210> 24
<211> 14
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<221> misc_feature

<222> ()..()

<223> synthetisches Konstrukt

<400> 24

Arg Arg Lys Lys Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Ala Pro
1 5 10

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> misc_feature

<222> ()..()

<223> synthetisches Konstrukt

<400> 25

Arg Arg Lys Lys Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro
1 5 10

<210> 26

<211> 8

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> misc_feature

<222> ()..()

<223> synthetisches Konstrukt

<400> 26

Arg Arg Lys Lys Leu Leu Ala Pro
1 5

<210> 27

<211> 17

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> misc_feature

<222> ()..()

<223> synthetisches Konstrukt

<400> 27

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

Leu

<210> 28

<211> 14

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> misc_feature

<222> ()...()

<223> synthetisches Konstrukt

<400> 28

Arg Arg Lys Lys Ala Ala Val Ala Val Val Pro Ala Val Leu
1 5 10

<210> 29

<211> 11

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> misc_feature

<222> ()...()

<223> synthetisches Konstrukt

<400> 29

Arg Arg Lys Lys Ala Ala Val Ala Val Val Pro
1 5 10

<210> 30

<211> 8

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> misc_feature

<222> ()...()

<223> synthetisches Konstrukt

<400> 30

Arg Arg Lys Lys Ala Ala Val Ala
1 5

Patentansprüche

1. Zusammensetzung, umfassend ein antivirales Peptid, wobei das antivirale Peptid aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus SEQ ID NOS: 1–4, SEQ ID NOS: 14–15 und SEQ ID NOS: 18–30 besteht, wobei dann, wenn es sich beim antiviralen Peptid um SEQ ID NO: 14 handelt, X1 und X2 aus einem oder mehreren positiv geladenen Aminosäureresten ausgewählt sind, so dass jedes X1 und jedes X2 den gleichen oder einen unterschiedlichen, positiv geladenen Aminosäurerest bedeuten kann, n einen Wert von 0 oder 3–10 hat, m einen Wert von 0 oder 3–10 hat und wobei dann, wenn m = 0, n einen Wert von 4 bis 10 hat, und, wenn n = 0, m einen Wert von 4 bis 10 hat;
 dann, wenn es sich beim antiviralen Peptid um SEQ ID NO: 15 handelt, X1 und X2 aus einem oder mehreren, positiv geladenen Aminosäureresten ausgewählt sind, so dass jedes X1 und jedes X2 den gleichen oder einen unterschiedlichen, positiv geladenen Aminosäurerest bedeuten kann, und wobei ferner n einen Wert von 0 oder 3–10 hat und m einen Wert von 0 oder 3–10 hat; und
 wobei ferner das antivirale Peptid in einer Menge vorhanden ist, die ausreicht, eine Wirkung gegen einen viralen Organismus bei der Therapie oder Prophylaxe einer viralen Infektion zu erzielen.

2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei das antivirale Peptid aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus SEQ ID NOS: 1–4 besteht.

3. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei das antivirale Peptid aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus SEQ ID NOS: 14–15 besteht.

4. Zusammensetzung nach Anspruch 3, wobei es sich beim antiviralen Peptid um SEQ ID NO: 14 handelt, wobei entweder m = 0 oder n = 0, wobei dann, wenn m = 0, n einen Wert von 4 bis 10 hat, und dann, wenn n = 0, m einen Wert von 4–10 hat.

5. Zusammensetzung nach Anspruch 3, wobei es sich beim antiviralen Peptid um SEQ ID NO: 15 handelt, wobei entweder m = 0 oder n = 0.

6. Zusammensetzung nach einem der vorstehenden Ansprüche, umfassend einen pharmazeutisch verträglichen Träger, wobei die Zusammensetzung zur Therapie oder Prophylaxe einer viralen Infektion in einem Säugetierwirt wirksam ist.

7. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 6, wobei die Zusammensetzung bei der Therapie oder Prophylaxe von Infektionen durch Viren mit einer Hülle wirksam ist.

8. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 7, wobei die Zusammensetzung bei der Therapie oder Prophylaxe von Infektionen durch einen oder mehrere Viren wirksam ist, die aus der Gruppe ausgewählt sind, die aus humanem Immunschwächevirus, Herpes-Simplex-Viren und Cytomegalovirus besteht.

9. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 8, wobei die Zusammensetzung bei der Therapie oder Prophylaxe von Infektionen durch einen oder mehrere Herpes-Simplex-Viren wirksam ist.

10. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 6, wobei die Zusammensetzung bei der Therapie oder Prophylaxe von Infektionen durch Viren ohne Hülle wirksam ist.

11. Verwendung eines antiviralen Peptids zur Herstellung eines Arzneimittels, wobei das Arzneimittel bei der Behandlung einer viralen Infektion zu verabreichen ist, wobei das antivirale Peptid aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus SEQ ID NOS: 1–4, SEQ ID NOS: 14–15 und SEQ ID NOS: 18–30 besteht, wobei dann, wenn es sich beim antiviralen Peptid um SEQ ID NO: 14 handelt, X1 und X2 aus einem oder mehreren positiv geladenen Aminosäureresten ausgewählt sind, so dass jedes X1 und jedes X2 den gleichen oder einen unterschiedlichen, positiv geladenen Aminosäurerest bedeuten kann, n einen Wert von 0 oder 3–10 hat, m einen Wert von 0 oder 3–10 hat und wobei dann, wenn m = 0, n einen Wert von 4 bis 10 hat, und, wenn n = 0, m einen Wert von 4 bis 10 hat;

dann, wenn es sich beim antiviralen Peptid um SEQ ID NO: 15 handelt, X1 und X2 aus einem oder mehreren, positiv geladenen Aminosäureresten ausgewählt sind, so dass jedes X1 und jedes X2 den gleichen oder einen unterschiedlichen, positiv geladenen Aminosäurerest bedeuten kann, und wobei ferner n einen Wert von 0 oder 3–10 hat und m einen Wert von 0 oder 3–10 hat; und

wobei ferner das antivirale Peptid in einer wirksamen Menge vorhanden ist.

Es folgen 11 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

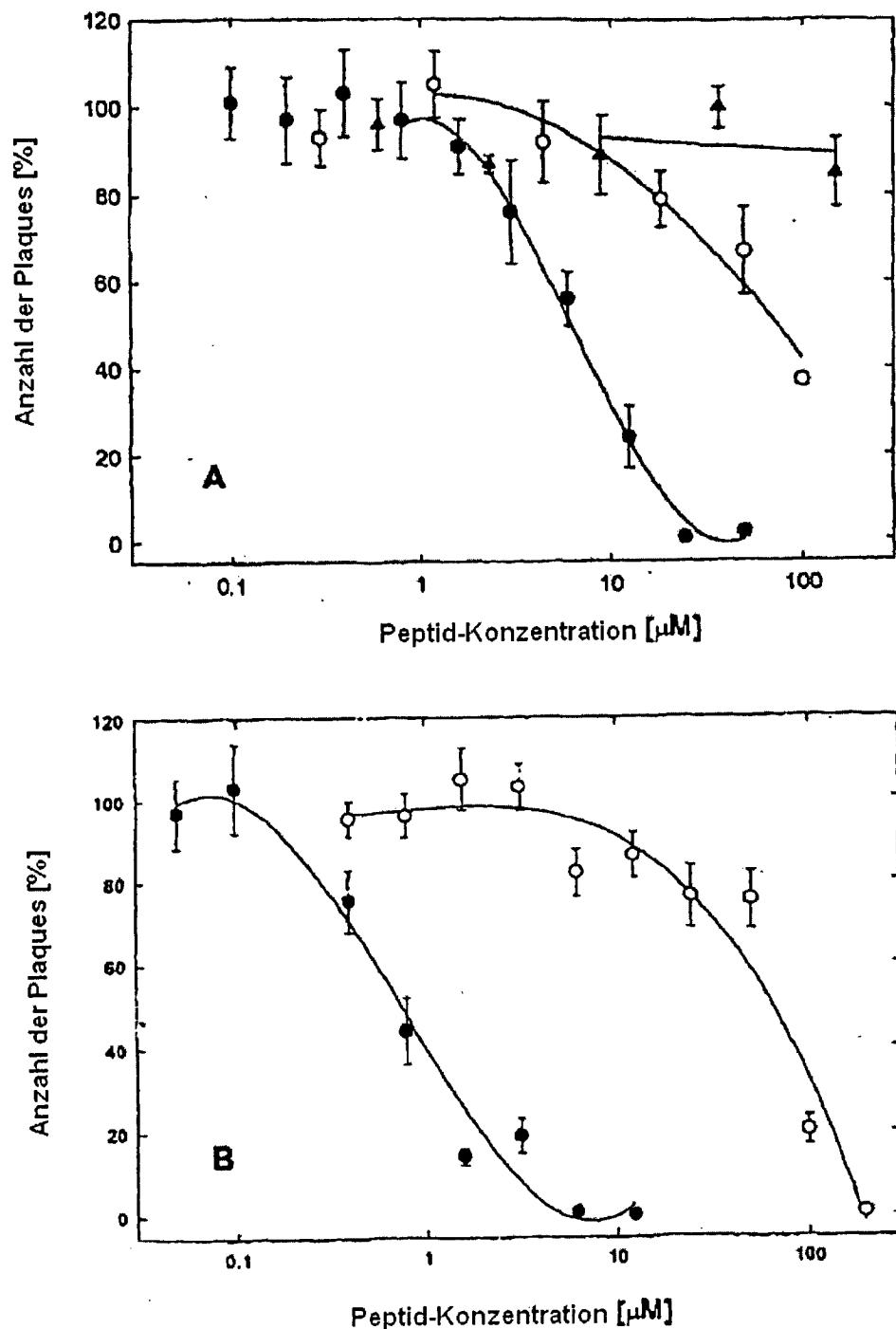


Fig. 1A & 1B

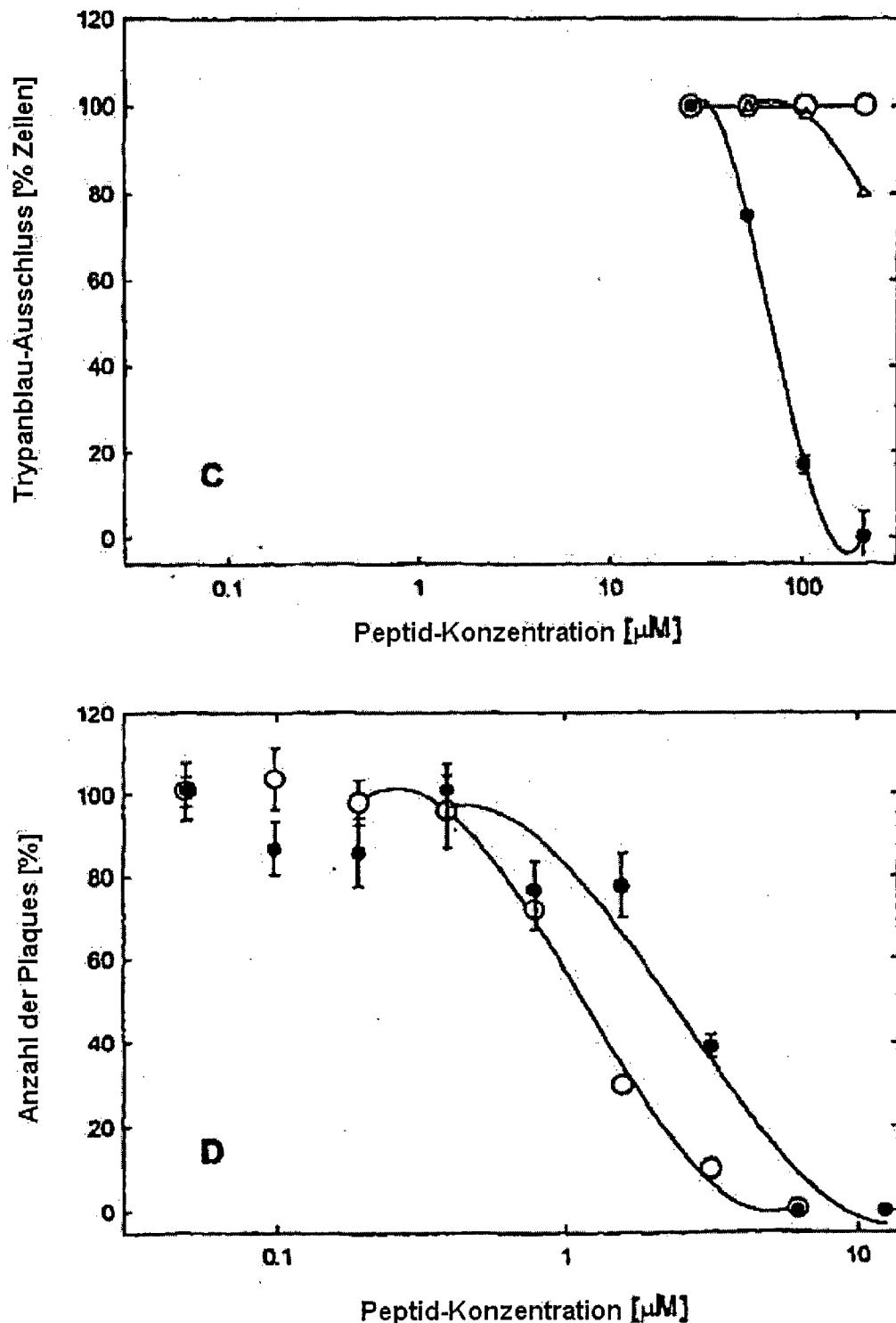


Fig. 1C & 1D

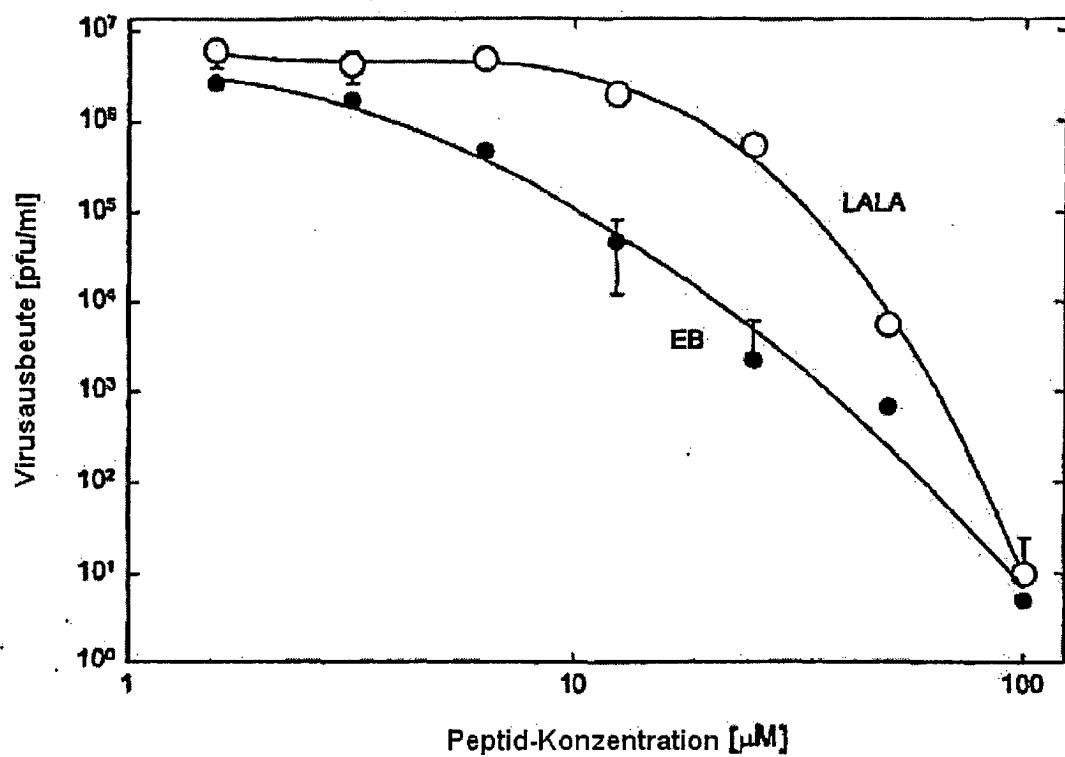


Fig. 1E

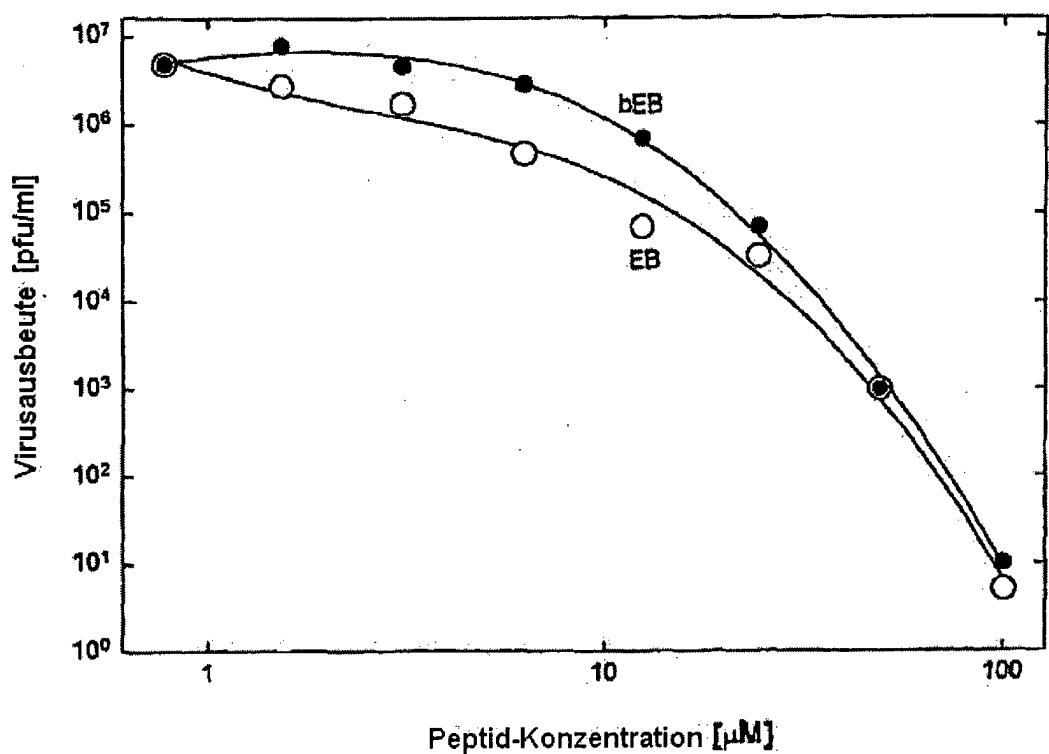


Fig. 2

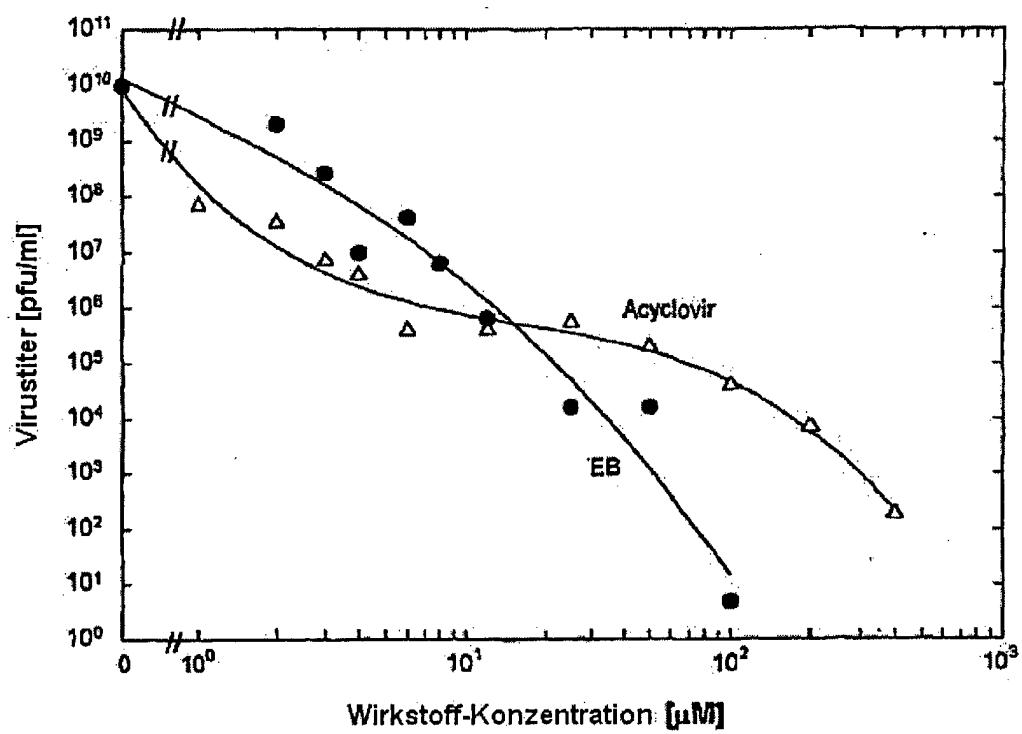


Fig. 3

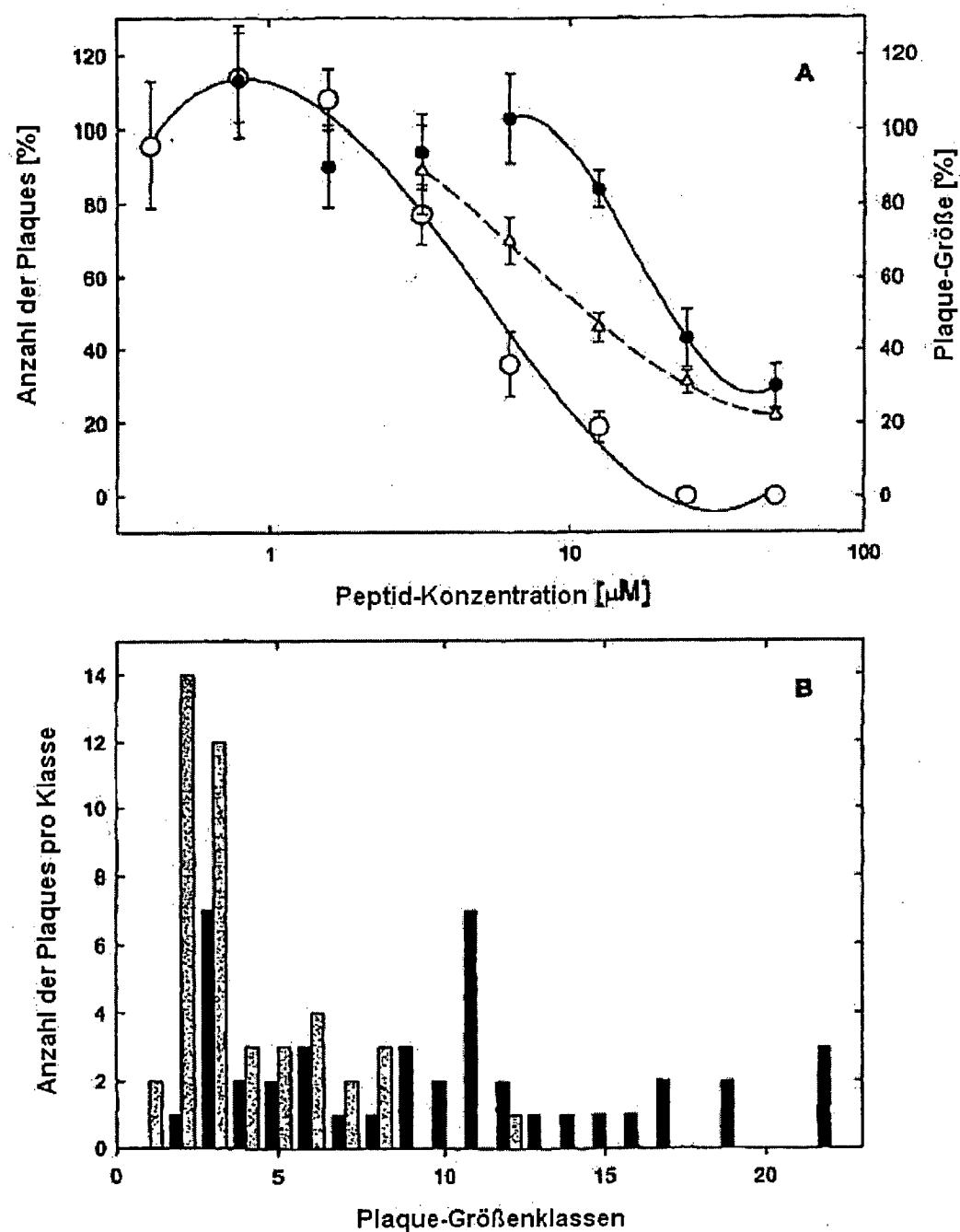


Fig. 4A & 4B

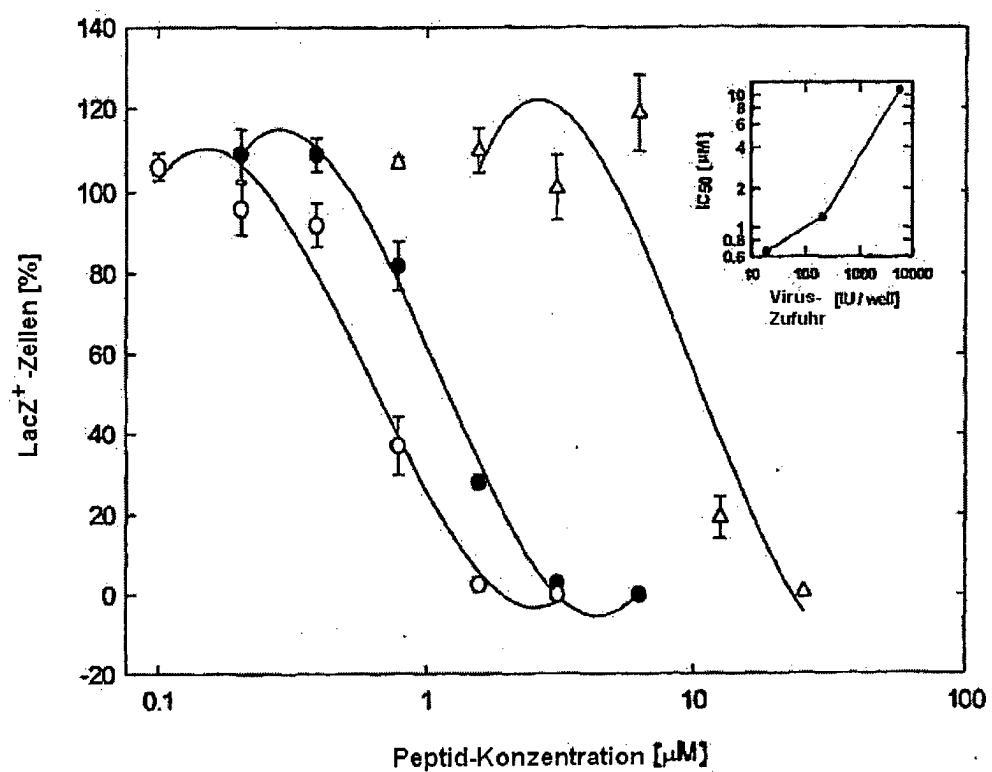


Fig. 5

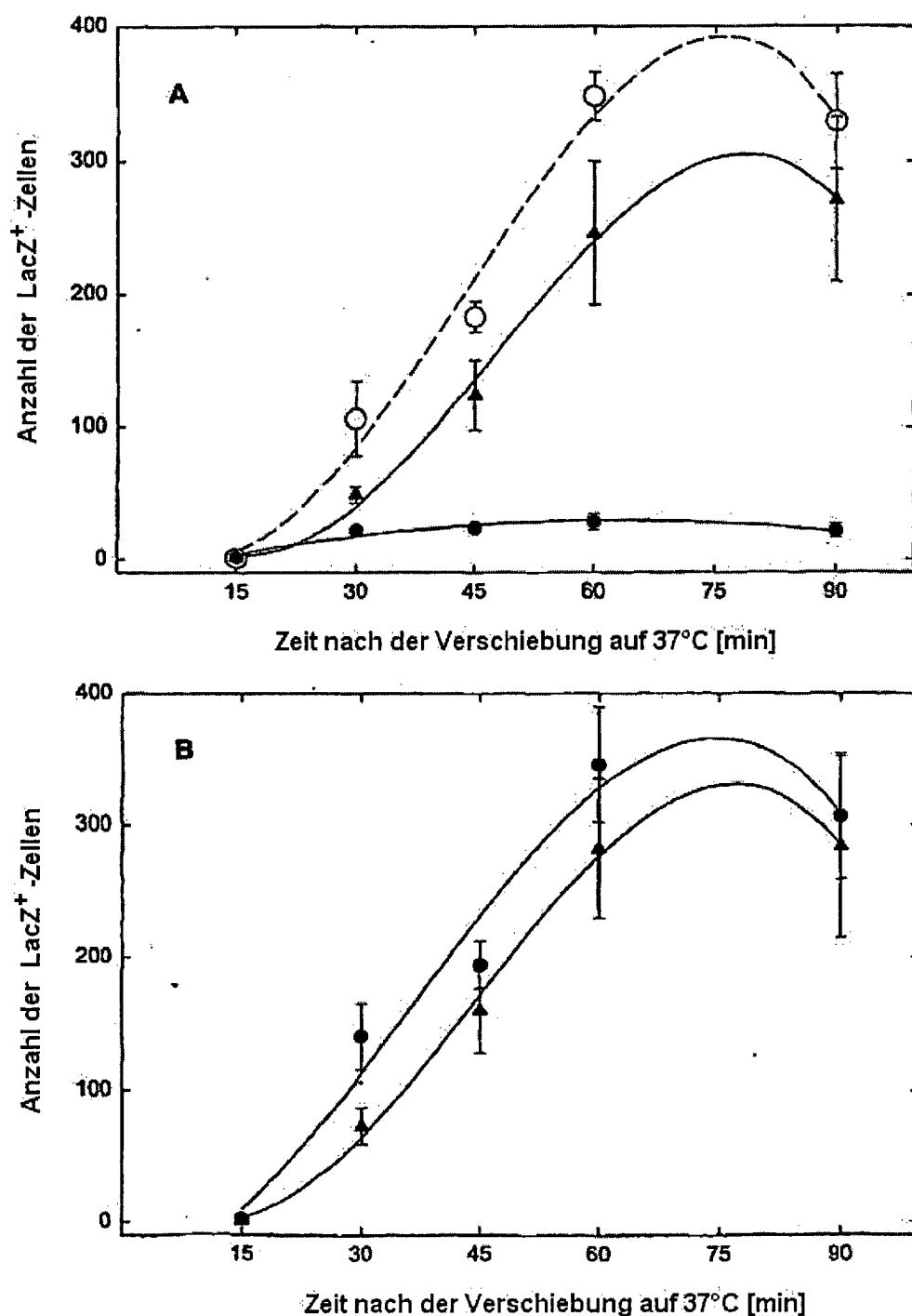


Fig. 6A & 6B

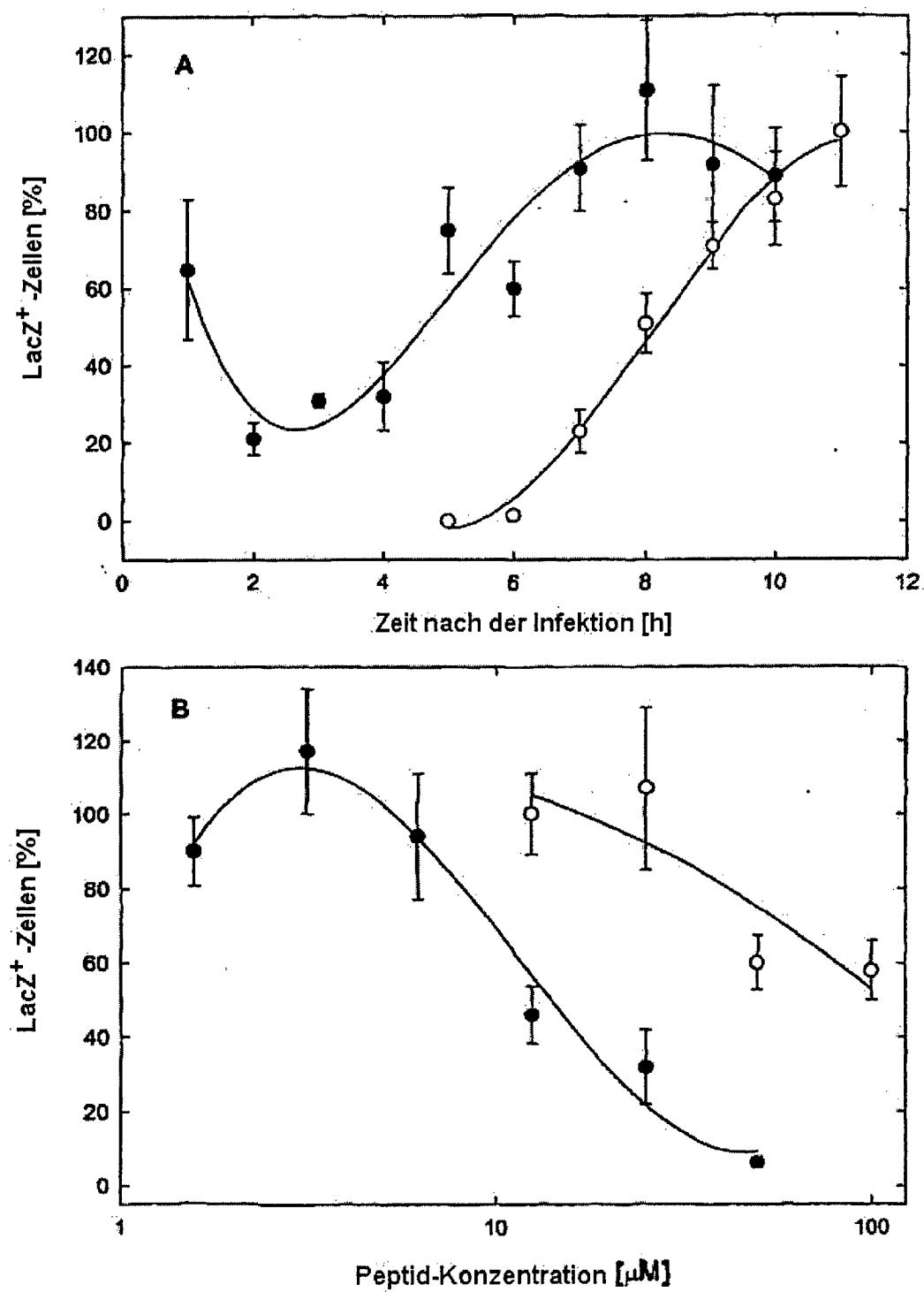


Fig. 7A & 7B

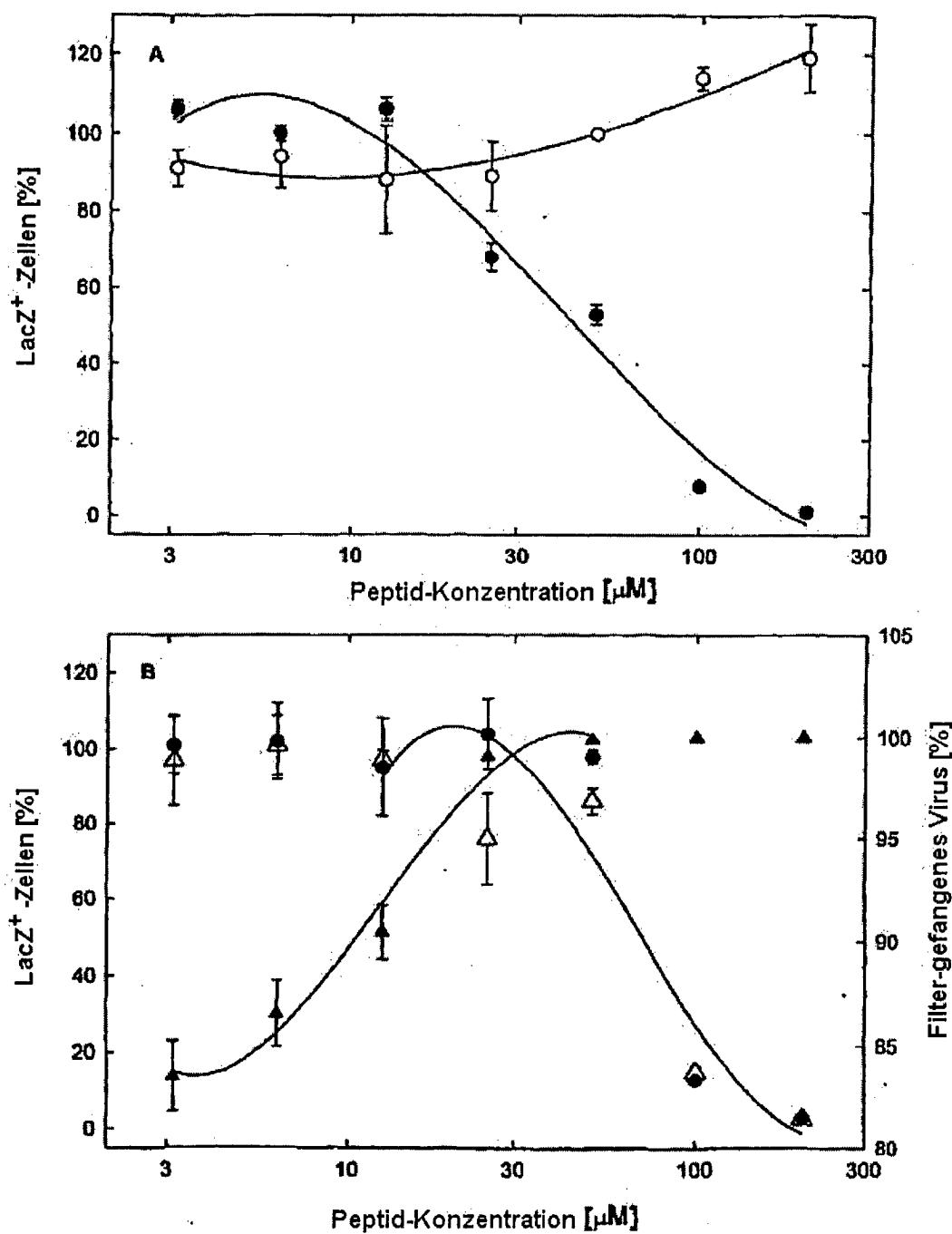


Fig. 8A & 8B

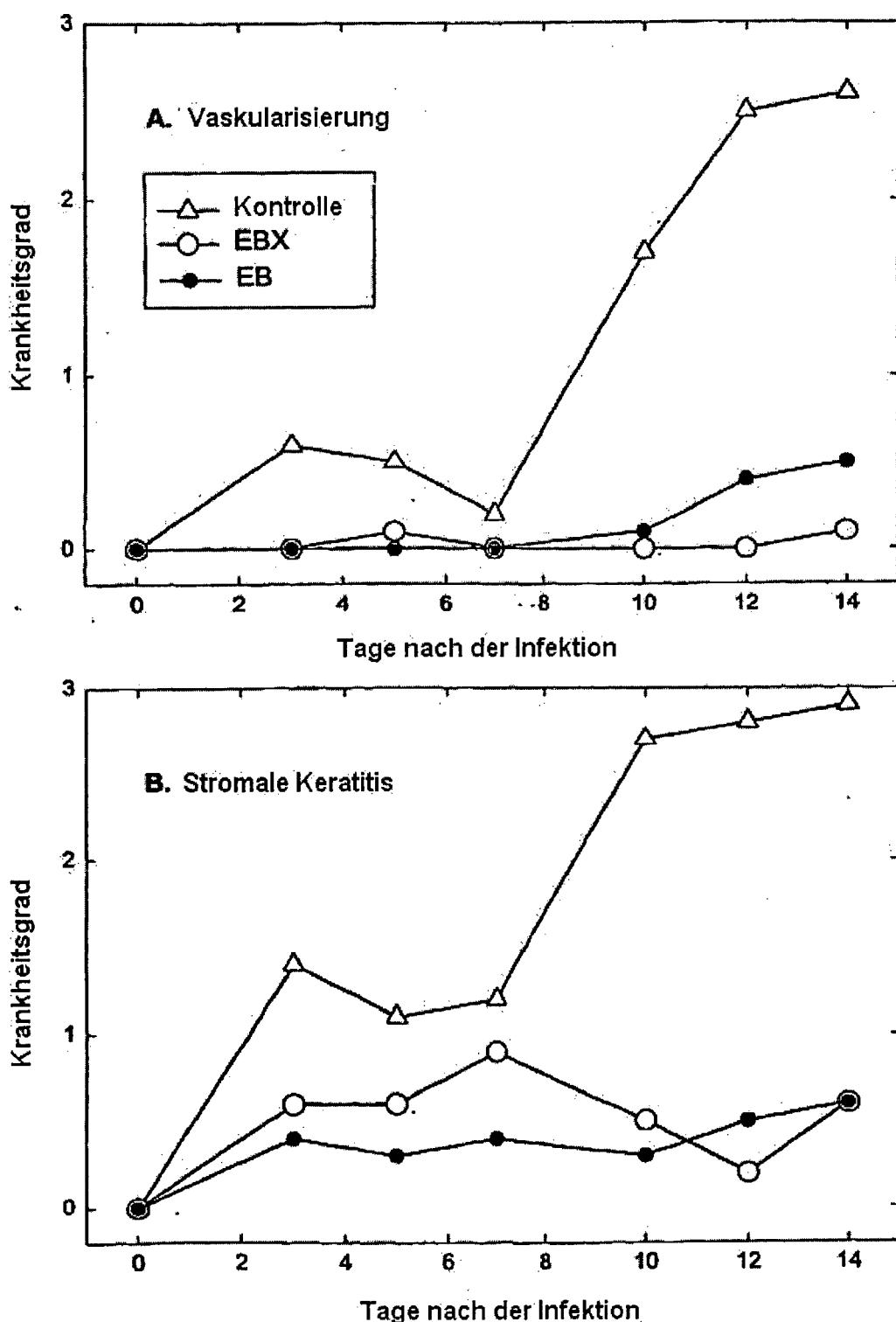


Fig. 9A & 9B