[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C07K 7/06 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200480032406.2

[45] 授权公告日 2008 年 11 月 19 日

[11] 授权公告号 CN 100434437C

[22] 申请日 2004.11.18
[21] 申请号 200480032406.2
[30] 优先权
[32] 2003.11.19 [33] US [31] 60/523,837
[86] 国际申请 PCT/GB2004/004877 2004.11.18
[87] 国际公布 WO2005/051981 英 2005.6.9
[85] 进入国家阶段日期 2006.4.30
[73] 专利权人 康哲医药研究(深圳)有限公司
地址 518000 中国深圳市高新区中区高新中一道生物孵化器大楼 2 -413
[72] 发明人 王伟明 林 刚
[56] 参考文献
WO 0175067 A 2001.10.11

Effect of low molecular weight glycoproteins in chronichepatitis B. VASSILEV MILEN ET AL. HEPATO. GASTROENTEROLOGY, Vol. 43 No. 10. 1996
审查员 杨振宇
[74] 专利代理机构 深圳鼎合诚知识产权代理有限公司
代理人 罗 瑶

权利要求书 1 页 说明书 36 页 附图 5 页

[54] 发明名称

包含异亮氨酰 - 缬氨酰 - 苏氨酰 - 天冬酰胺酰 - 苏氨酰 - 苏氨酸的生物活性肽

[57] 摘要

本发明公开了异亮氨酰 - 缬氨酰 - 苏氨酰 - 天冬酰胺酰 - 苏氨酰 - 苏氨酸肽及其作为药物组合物的用途。 同时还公开了制备药物组合物的方法，所述方法包括提供异亮氨酰 - 缬氨酰 - 苏氨酰 - 天冬酰胺酰 - 苏氨酰 - 苏氨酸肽并将其与药学上可接受的载体混合。

1. 一种分离或纯化的肽，所述肽包含异亮氨酰-缬氨酰-苏氨酰-天冬酰胺酰-苏氨酰-苏氨酸肽。

2. 根据权利要求 1 所述的分离或纯化的肽，所述肽基本上由异亮氨酰-缬氨酰-苏氨酰-天冬酰胺酰-苏氨酰-苏氨酸肽组成。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的肽，其中所述肽是 L-异亮氨酰-L-缬氨酰-L-苏氨酰-L-天冬酰胺酰-L-苏氨酰-L-苏氨酸。

4. 根据权利要求 3 所述的肽，其中所述肽的纯度至少为 90%。

5. 一种药物组合物，所述药物组合物包含异亮氨酰-缬氨酰-苏氨酰-天冬酰胺酰-苏氨酰-苏氨酸肽。

6. 根据权利要求 5 所述的药物组合物，所述药物组合物包含 L-异亮氨酰-L-缬氨酰-L-苏氨酰-L-天冬酰胺酰-L-苏氨酰-L-苏氨酸。

7. 一种制备药物组合物的方法，所述方法包括提供异亮氨酰-缬氨酰-苏氨酰-天冬酰胺酰-苏氨酰-苏氨酸肽，并将所述肽与药学上可接受的载体混合。

8. 异亮氨酰-缬氨酰-苏氨酰-天冬酰胺酰-苏氨酰-苏氨酸肽在制备药用化合物中的应用。

9. 根据权利要求 8 所述的应用，其中所述制备药用化合物中的应用是指用于制备治疗病毒性疾病的药物中的应用。

10. 根据权利要求 9 所述的应用，其中所述病毒性疾病是乙型肝炎感染。

11. 异亮氨酰-缬氨酰-苏氨酰-天冬酰胺酰-苏氨酰-苏氨酸肽在制备免疫刺激剂中的应用。

12. 异亮氨酰-缬氨酰-苏氨酰-天冬酰胺酰-苏氨酰-苏氨酸肽作为营养增补剂的用途。

13. 一种包含异亮氨酰-缬氨酰-苏氨酰-天冬酰胺酰-苏氨酰-苏氨酸肽的增强衍生物的分子，所述增强衍生物包括可操作地连接在所述异亮氨酰-缬氨酰-苏氨酰-天冬酰胺酰-苏氨酰-苏氨酸肽上的增强分子，所述增强分子增强所述肽的疗效。

包含异亮氨酰-缬氨酰-苏氨酰-天冬酰胺酰-苏氨酰-苏氨酸的生物活性肽

发明背景

技术领域

本发明涉及短肽及其用途。特别的，本发明涉及具有生物学活性的短肽。

相关背景技术描述

在本领域中，已知肽用于治疗疾病并作为药物组合物。例如，美国第6,191,113号专利公开了一种对平滑肌细胞生长具有抑制活性的肽，这种肽因此可用于预防及治疗与平滑肌细胞生长相关的疾病，例如动脉硬化、血管成形术之后的再狭窄、血管移植后的管腔狭窄和平滑肌肉瘤。美国第6,184,208号专利公开了另一种肽，其被发现可调节一些生理过程，例如上皮生长带以及毛发生长的重量增加活性。另外，PCT出版物WO03/006492和美国专利申请第10/237,405号揭示了某些肽以及它们的药物组合物具有生物学活性并能够调节免疫反应。

因此，本发明的一个目的在于提供具有生物学活性的一种或多种短肽。

发明概述

本发明的一个方面涉及六肽CMS017，异亮氨酰-缬氨酰-苏氨酰-天冬酰胺酰-苏氨酰-苏氨酸(IVTNTT)，其被发现具有生物学活性。为了测试目的，使用肽L-异亮氨酰-L-缬氨酰-L-苏氨酰-L-天冬酰胺酰-L-苏氨酰-L-苏氨酸。本发明的其它方面包括分离的或纯化的肽，所述肽包含异亮氨酰-缬氨酰-苏氨酰-天冬酰胺酰-苏氨酰-苏氨酸、基本上由异亮氨酰-缬氨酰-苏氨酰-天冬酰胺酰-苏氨酰-苏氨酸组成、或者由异亮氨酰-缬氨酰-苏氨酰-天冬酰胺酰-苏氨酰-苏氨酸组成。另一方面涉及基本上纯化的IVTNTT

（CMS017）肽。

本发明的再一方面包括一种分离的或纯化的肽，所述肽基本上由IVTNTT肽（CMS017）所组成。在一个具体的实施方式中，所述肽具有免疫调节和抗病毒活性。

本发明的其它方面包括药物组合物，所述药物组合物包含IVTNTT肽（CMS017）、基本上由IVTNTT肽所组成、或者由IVTNTT肽所组成。本发明的另外方面涉及药物组合物，所述药物组合物包含IVTNTT肽的功能衍生物、基本上由IVTNTT肽的功能衍生物所组成、或者由IVTNTT肽的功能衍生物所组成。

本发明的另一方面涉及一种制备药物组合物的方法，包括提供IVTNTT肽（CMS017），并将所述肽与一种药学上可接受的载体混合。

本发明的另一方面涉及一种减轻免疫抑制或病毒性疾病的影响的方法，包括给人体施用药物学有效剂量的IVTNTT肽（CMS017）。在本发明的进一方面中，所述病毒性疾病是乙型肝炎感染。

本发明的另一方面涉及IVTNTT肽（CMS017）作为药物组合物的用途。此外，所述六肽可用于治疗免疫失调或病毒性疾病。在本发明的特定的方面，可治疗乙型肝炎感染。

本发明的再一方面涉及含有IVTNTT肽（CMS017）的一种营养组合物及其在生产营养补充剂中的应用。

本发明的再一方面，提供了CMS017肽（IVTNTT）及其功能衍生物的增强衍生物。IVTNTT肽（CMS017）的增强衍生物包含一种增强分子，该增强分子可操作地连接到IVTNTT肽（CMS017）上，并以此方式来改善或增大所述肽的治疗效力。所述增强作用可以是延长的作用、缩短的作用、延迟发作的作用、加速发作的作用、强度增加的作用、强度降低的作用、副作用的减少、产生一种或多种作用、延迟衰退的作用、加速衰退的作用以及将所述肽定位于个体内不连续的位置。这种增强分子和增强衍生物的实例见下文所描述。在本发明的一些方面中，所述增强分子可以治疗或预防，但不限于治疗或预防病毒性感染和免疫失调。本发明的再一些方面包括增

强肽治疗效果的方法，包括将所述肽可操作地连接到可增强其治疗效果的分子上，所述肽包含选自 IVTNTT（CMS017）及其衍生物的肽，基本上由选自 IVTNTT（CMS017）及其衍生物的肽组成、或者由选自 IVTNTT（CMS017）及其衍生物的肽组成。在本发明的一些方面，所述增强治疗效果的可操作地连接的分子，并不是一种在天然存在的肽中与选自 IVTNTT（CMS017）及其衍生物的肽相接近的肽。在本发明的其他方面包括药物组合物，所述药物组合物包含肽的增强衍生物、基本上由肽的增强衍生物组成或者由肽的增强衍生物组成，所述肽选自 IVTNTT（CMS017）及其功能衍生物。

本发明的一个方面涉及一种基本上纯化的肽，所述肽选自 IVTNTT（CMS017）及其功能衍生物，如上文所揭示的所述功能衍生物与增强其治疗效力的分子可操作地连接，该分子在此处也被称为“增强分子”。这种分子可根据如下美国临时专利申请No.60/435,796所述的任何方式制备及应用，该专利申请名称为“生物活性肽结合物”（英文名称：Biologically active peptide conjugates），于2002年12月18日提交申请，其内容在此以其全文并入参考。可操作地与所述肽连接的候选分子及进行这种连接的方式是本领域技术人员所熟知的。可以与选自 IVTNTT（CMS017）及其功能衍生物的肽可操作地连接的一些分子包括但不限于有机化合物、碳水化合物、糖、多糖、氨基酸、氨基酸聚合物、肽、类固醇、蛋白质、蛋白质分离的结构域、半抗原、抗原、脂质分子、脂肪酸、胆汁酸、聚胺、蛋白酶抑制剂、硅酸盐及前述任何分子的组合。本发明也涉及到一种基本上纯化的肽，所述肽选自上述的 IVTNTT（CMS017）及其功能衍生物，所述功能衍生物与增强其治疗效力的分子可操作地连接，其中所述可操作地连接的分子并不是一种在天然存在的肽中与上文揭示的肽相接近的肽。在本发明的另一方面，选自 IVTNTT（CMS017）及其功能衍生物的基本上纯化的肽可治疗和/或预防，但不限于治疗和/或预防免疫失调或病毒性感染，例如乙型肝炎感染。所述分子可通过共价联接或非共价相互作用而与本发明的肽可操作地连接。

在具体的实施方式中，生物活性分子，当与选自 IVTNTT（CMS017）

及其功能衍生物的肽可操作地连接时，可通过为所述肽赋予作为连接分子一部分的特性而改变所述肽的药物动力学。所述可操作地连接的分子赋予肽的一些特性包括但不限于：将肽传递到体内分散的区域；将肽的活性集中于体内所需的位置，而降低其在其他位置的作用；减少用肽治疗的副作用；改变肽的渗透性；改变肽传递给机体的生物利用度或速度；改变用肽治疗的效果的时间长短；改变肽的稳定性；改变肽作用起始和衰退的速度；通过使肽具有某种效果而提供一种允许作用。

本发明的另一方面涉及基本上纯化的肽，所述肽包含选自 IVTNTT（CMS017）及其功能衍生物的肽、基本上由选自 IVTNTT（CMS017）及其功能衍生物的肽组成、或者由选自 IVTNTT（CMS017）及其功能衍生物的肽组成，所述功能衍生物与能增强其治疗效力的分子可操作地连接，其中所述可操作地连接的分子并不是一种在天然存在的肽中与选自 IVTNTT（CMS017）及其功能衍生物的肽相接近的肽。可以与选自 IVTNTT（CMS017）及其功能衍生物的肽可操作地连接的一些分子包括但不限于有机化合物、碳水化合物、糖、多糖、氨基酸、氨基酸聚合物、肽、类固醇、蛋白质、蛋白质分离的结构域、半抗原、抗原、脂质分子、脂肪酸、胆汁酸、聚胺、蛋白酶抑制剂、硅酸盐及前述任何分子的组合。本发明的其他方面包括基本上纯化的肽，所述肽包含选自 IVTNTT（CMS017）及其功能衍生物的肽、基本上由选自 IVTNTT（CMS017）及其功能衍生物的肽组成、或者由选自 IVTNTT（CMS017）及其功能衍生物的肽组成，所述功能衍生物与能增强其治疗效力的分子可操作地连接，所述肽可治疗和/或预防，但不限于治疗和/或预防免疫失调或病毒性感染，例如乙型肝炎感染。所述分子可通过共价键或非共价相互作用而与本发明的肽可操作地连接。所述基本上纯化的肽与增强其治疗效力的分子之间的可操作的连接的作用包括但不限于：将肽传递到体内分散的区域；将肽的活性集中于体内所需的位置，而降低其在其他位置的作用；减少用肽治疗的副作用；改变肽的渗透性；改变肽传递给机体的生物利用度或速度；改变用肽治疗的效果的时间长短；改变肽的稳定性；改变肽作用起始和衰退的速度；通过使肽具有某种效果而提

供一种允许作用。

本发明的另一方面涉及杂合肽（hybrid peptides），所述杂合肽含有包含选自 IVTNTT（CMS017）及其功能衍生物的肽以及额外附着的肽序列的肽，所述额外附着的序列不是一种在天然存在的肽中被发现与上述公开的肽相接近的肽。在具体的实施例中，上面所述的杂合肽可治疗和/或预防，但不限于治疗和/或预防免疫失调或病毒性感染例如乙型肝炎感染。在特定的实施例中，这些额外附着的肽序列，其并未发现在天然存在的肽中与选自 IVTNTT（CMS017）及其衍生物的肽相接近，可通过将杂合分子的部分性能赋予所述肽而改变本发明上述实施方案中的肽的药物动力学。可操作地连接的分子赋予选自 IVTNTT（CMS017）及其功能衍生物的肽的一些性能包括但不限于：将肽传递到体内分散的区域；将肽的活性集中于体内所需的位置，而降低其在其他位置的作用；减少用肽治疗的副作用；改变肽的渗透性；改变肽传递给机体的生物利用度或速度；改变用肽治疗的效果的时间长短；改变肽的稳定性；改变肽作用起始和衰退的速度；通过使肽具有某种效果而提供一种允许作用。

本发明的另一方面涉及基因载体，所述基因载体包括编码一种肽的第一核苷酸序列、基本上由编码一种肽的第一核苷酸序列组成、或者由编码一种肽的第一核苷酸序列组成，所述肽包含选自 IVTNN（CMS017）及其功能衍生物，所述第一核苷酸序列在框架内与第二核苷酸序列融合，所述第二核苷酸序列编码增强上述肽的疗效的肽，所述第二核苷酸序列编码的肽不是在天然存在的肽中与所述选自 IVTNTT（CMS017）或其功能衍生物的肽相接近的肽。本发明还涉及一种基因载体，所述基因载体包括编码一种肽的第一核苷酸序列、基本上由编码一种肽的第一核苷酸序列组成、或由编码一种肽的第一核苷酸序列组成，所述肽基本上由选自 IVTNTT（CMS017）及其功能衍生物的肽组成，所述第一核苷酸序列在框架内与第二核苷酸序列融合，所述第二核苷酸序列编码增强前述肽的疗效的肽，所述第二核苷酸序列编码的肽不是在天然存在的肽中与所述选自 IVTNTT（CMS017）或其功能衍生物的肽相接近的肽。本发明进一步涉及一种基因载体，所述基因

载体包括编码一种肽的第一核苷酸序列、基本上由编码一种肽的第一核苷酸序列组成、或者由编码一种肽的第一核苷酸序列组成，所述肽由选自IVTNTT（CMS017）及其功能衍生物的肽的氨基酸序列组成，所述第一核苷酸序列在框架内与第二核苷酸序列融合，所述第二核苷酸序列编码增强上述肽的疗效的肽，所述第二核苷酸序列编码的肽不是在天然存在的肽中与所述选自 IVTNTT（CMS017）及其功能衍生物的肽相接近的肽。在具体的实施例中，所述选自 IVTNTT（CMS017）及其功能衍生物的肽可治疗和/或预防，但不限于治疗和/或预防免疫失调或病毒性感染，例如乙型肝炎感染。可操作地连接的分子能够赋予所述选自 IVTNTT（CMS017）及其功能衍生物的肽的一些性能包括但不限于：将肽传递到体内分散的区域；将肽的活性集中于体内所需的位置，而降低其在其他位置的作用；减少用肽治疗的副作用；改变肽的渗透性；改变肽传递给机体的生物利用度或速度；改变用肽治疗的效果的时间长短；改变肽的稳定性；改变肽作用起始和衰退的速度；通过使肽具有某种效果而提供一种允许作用。本发明的另一方面涉及微生物，其包含选自以下的核酸序列：上述载体的核苷酸序列；包括编码一种肽的第一核苷酸序列的核苷酸序列，所述肽包含选自 IVTNTT（CMS017）及其功能衍生物的肽的氨基酸序列，所述第一核苷酸序列在框架内与第二核苷酸序列融合，所述第二核苷酸序列编码一种不是在天然存在的肽中与所述选自 IVTNTT（CMS017）及其功能衍生物的肽相接近的肽。

就上述核酸序列而言，由这些核酸序列表达的肽和/或杂合肽可治疗和/或预防，但不限于治疗和/或预防免疫失调或病毒性疾病，例如乙型肝炎感染。

本发明的进一方面涉及一种制备药物组合物的方法，包括提供与增强其治疗作用的分子可操作地连接的选自 IVTNTT（CMS017）及其功能衍生物的肽；将与所述分子可操作地连接的所述肽与一种药物可接受的载体一起调配。本发明还涉及所述的方法，其中所述肽可治疗和/或预防，但不限于治疗和/或预防免疫失调或病毒性疾病，例如乙型肝炎感染。可附着于所述选自 IVTNTT（CMS017）及其功能衍生物的肽的生物有效分子的一些实

例包括但不限于：有机化合物、碳水化合物、糖、多糖、氨基酸、氨基酸聚合物、肽、类固醇、蛋白质、分离的蛋白质结构域、半抗原、抗原、脂类分子、脂肪酸、胆汁酸、聚胺、蛋白酶抑制剂、硅酸盐以及前述分子的任何组合。本发明还涉及一种制备包含一种肽的药物的方法，所述肽包含所述选自 IVTNTT (CMS017)及其功能衍生物的肽，所述方法包括将所述肽可操作地连接到增强所述疗效的分子上，其中所述分子不是在天然存在的肽中与所述选自 IVTNTT (CMS017)及其功能衍生物的肽相接近的肽。所述分子可通过共价键或非共价作用与本发明的肽可操作地连接。在一个具体的实施方案中，所述连接的分子可赋予所述肽以增强其疗效的性能包括但不限于：将肽传递到体内分散的区域；将肽的活性集中于体内所需的位置，而降低其在其他位置的作用；减少用肽治疗的副作用；改变肽的渗透性；改变肽传递给机体的生物利用度或速度；改变用肽治疗的效果的时间长短；改变肽的稳定性；改变肽作用起始和衰退的速度；通过使肽具有某种效果而提供一种允许作用。本发明还涉及一种制备药物组合物的方法，所述方法包括提供基本纯化的肽，所述肽基本上由连接在能增强其疗效的分子上的选自 IVTNTT (CMS017)及其功能衍生物的肽的氨基酸序列组成；将所述连接在所述分子上的肽与药学上可接受的载体一起调配。本发明还涉及一种制备药物组合物的方法，所述方法包括提供基本纯化的肽，所述肽由连接在能增强其疗效的分子上的选自 IVTNTT (CMS017)及其功能衍生物的肽组成；将所述连接在所述分子上的肽与药学上可接受的载体一起调配。

本发明的还一个方面是涉及一种治疗人的方法，所述方法包括给予人药学有效剂量的基本纯化的肽，所述肽是选自 IVTNTT (CMS017)及其功能衍生物的肽，所述肽连接在能够增强其疗效的分子上。可与所述选自 IVTNTT (CMS017)及其功能衍生物的肽可操作地连接的生物学有效分子的一些实例包括但不限于有机化合物、碳水化合物、糖、多糖、氨基酸、氨基酸聚合物、肽、类固醇、蛋白质、分离的蛋白质结构域、半抗原、抗原、脂类分子、脂肪酸、胆汁酸、聚胺、蛋白酶抑制剂、硅酸盐以及前述分子

的任何组合。在一些实施方案中，所述可操作地连接的分子可赋予所述肽以增强其疗效的性能包括但不限于：将肽传递到体内分散的区域；将肽的活性集中于体内所需的位置，而降低其在其他位置的作用；减少用肽治疗的副作用；改变肽的渗透性；改变肽传递给机体的生物利用度或速度；改变用肽治疗的效果的时间长短；改变肽的稳定性；改变肽作用起始和衰退的速度；通过使肽具有某种效果而提供一种允许作用。

在特别的实施方式中，上述用于治疗人的肽可被用于治疗和/或预防，但不限于治疗和/或预防免疫失调或病毒性疾病，例如乙型肝炎感染。

本发明其他方面包括药物组合物，所述药物组合物，包括与能增强其疗效的分子可操作地连接的选自 IVTNTT (CMS017)及其功能衍生物的肽以及一种药学上可接受的载体、或者基本上由与能增强其疗效的分子可操作地连接的选自 IVTNTT (CMS017)及其功能衍生物的肽以及药学上可接受的载体组成、或者由与能增强其疗效的分子可操作地连接的选自 IVTNTT (CMS017)及其功能衍生物的肽以及药学上可接受的载体组成。本发明还涉及所述增强的选自 IVTNTT (CMS017)及其功能衍生物的肽，其中所述肽可治疗和/或预防，但不限于治疗和/或预防免疫失调或病毒性疾病，例如乙型肝炎感染。可与所述选自 IVTNTT (CMS017)及其功能衍生物的肽可操作地连接的生物学有效分子的一些实例包括但不限于有机化合物、碳水化合物、糖、多糖、氨基酸、氨基酸聚合物、肽、类固醇、蛋白质、分离的蛋白质结构域、半抗原、抗原、脂类分子、脂肪酸、胆汁酸、聚胺、蛋白酶抑制剂、硅酸盐以及前述分子的任何组合。在一些实施方案中，所述可操作地连接的分子可赋予所述肽以增强其疗效的性能包括但不限于：将肽传递到体内分散的区域；将肽的活性集中于体内所需的位置，而降低其在其他位置的作用；减少用肽治疗的副作用；改变肽的渗透性；改变肽传递给机体的生物利用度或速度；改变用肽治疗的效果的时间长短；改变肽的稳定性；改变肽作用起始和衰退的速度；通过使肽具有某种效果而提供一种允许作用。

附图概述

如下五幅附图分别举例说明了将肽连接到类固醇分子的化学反应。

图 1 显示了将肽通过共价键连接到雌酮分子上的一系列化学反应。

图 2 显示了用于创建图 1 所示相同连接的第二种可选的系列反应。

图 3 包含设计用于将肽通过共价键连接到雌二醇分子上的一系列化学反应。

图 4 包含用于创建图 3 所示相同连接键第二种系列化学反应。

图 5 说明了将肽通过共价键连接到氢化可的松的方法。

优选实施方案的详细描述

先前有报道猪脾的肽抽提物对人的乙型肝炎感染具有疗效(Jurin, M. , et al. Effects of low molecular weight glycoproteins in chronic hepatitis B. Hepatogastroenterology. 1996; 43 (10): 882-886)。然而，活性组分的分子类型及其药理学都是未知的。原抽提物被报道是糖肽的混合物，抗 HBV 活性被假定为通过刺激免疫系统而被介导。由于是不确定的分子成分的混合物，因此不可能将混合物中单个活性成分的治疗作用进行优化。而且，由于抽提物来源于动物，未知的动物疾病传播给人体的可能性无法排除。为了挑选出活性成分并优化其治疗作用，并最终达到通过化学方法合成单个活性成分的目的，对抽提物的分子成分进行分析，并检测了每种成分的治疗活性。抽提物中的许多肽被发现具有抗 HBV 活性，CMS017 是体外最有效的 HBV 抑制剂，如下文实施例 1 所报道。CMS017 也被发现具有免疫刺激特性，如下文实施例 2 所揭示。CMS017 具有 IVTNTT 的序列，利用 L-氨基酸合成。CMS017 具抗病毒与免疫刺激特性的研究揭示了 IVTNTT 分子、含有该分子的更大分子（包括更大的肽以及在其序列中含有该肽的序列的肽）以及 IVTNTT 的功能衍生物，可被用做增强免疫系统、抗病毒试剂、药物及食品增补剂的化合物。

应理解可以将其他氨基酸加至选自 IVTNTT（CMS017）及其功能衍生物的肽的氨基端或羧基端而作为实施本发明的另一种方法。在这样的实施方案中，选自 IVTNTT（CMS017）及其功能衍生物的肽保持本文所描述的一种或多种治疗或功能特性。例如，在一些实施方式中，在所述肽中增加一

个或两个氨基酸而并未使其生物功能受到影响。在进一步的实施例中，也可以增加三或四个氨基酸而仍保持选自 IVTNTT（CMS017）及其功能衍生物的肽的功能。这些均称为该肽的变异体。另外，肽的衍生物，如将一个氨基酸用相同功能类别的另一个氨基酸保守置换，也可用于实施本发明的另一方面。例如，具有非极性端或称疏水侧链的肽可以被取代一个侧基而其生物学功能并不减弱。作为进一步的例子，接头/间隔可被插入肽形成变体，但这些变体仍保持本研究中所用的原始肽的活性部分。这些被视为本发明肽的变体。本文所用术语肽类似物包括具有模拟天然氨基酸结构的氨基酸分子的肽，例如具有不同主链结构或 D-氨基酸取代的类似物。作为进一步的例子，尽管用于合成肽的氨基酸是其 L-光学异构形式，但是序列中一或多个氨基酸被 D-型取代的肽可具有类似的生物活性。本申请权利要求中所用术语“功能性衍生物”涵盖本发明肽的片段、变体、类似物或化学衍生物。

“基本上纯化的肽”是指纯度至少为 10%（w/w）的肽，优选纯度为 20%，更优选为 40%，更加优选为 60%，进一步优选为大于 90%。在最优选的实施方案中，纯度大于 99%。如下文所述，基本上纯化的肽可做为混合物中的部分成分进行药物或营养配方的制备。

选自 IVTNTT（CMS017）及其功能衍生物的肽用在药物配方中可用于治疗免疫失调或病毒性疾病。这些配方可能含有选自 IVTNTT（CMS017）及其功能衍生物的肽与其它活性或非活性成分的混合，包括其他肽，例如两个或若干个（例如 3-5 个）肽可以加到同一配方中，可伴有或不伴有其它成分。或者，选自 IVTNTT（CMS017）及其功能衍生物的肽可以与这里未列出的肽一起用于制备配方。此类配方可以经静脉、肌肉、皮内、皮下或真皮内给药。给药模式也可以是经动脉注射直接作用于问题器官。给药的其他模式还可以以粉末、喷雾的方式经皮吸收，经呼吸道吸入，以及本领域已知的其它形式。配方还可以口服，并可含有可用于在口服后防止肽被胃消化的载体，或本领域已知的任何其它载体（对于经皮吸收的载体，如脂质体）。

本文所用术语“杂合肽”是指含有插入具有上述序列的原始生物活性肽或其功能衍生物中的额外肽但仍保持基本类似的活性的肽。额外肽包括前导肽，其含有例如由一或多个原核或真核细胞识别作为将该杂合肽分泌至细胞外或细胞内的信号的氨基酸序列。分泌可以是直接分泌，或通过分泌小泡间接分泌。

这里所用的术语“基本上由……组成”是指这样的一种肽或多肽，其包括选自 IVTNTT（CMS017）以及在其羧基和/或氨基末端具有额外氨基酸的功能衍生物的肽的氨基酸序列，并且所述功能衍生物保持本文所提供的所述肽的活性。因此，作为非限定性实例，在该实例中选自 IVTNTT(CMS017)及其功能衍生物的肽的活性可治疗和/或预防免疫失调或病毒感染，“基本由”选自 IVTNTT（CMS017）及其功能衍生物的肽所组成的肽或多肽将具有本文提供的与该肽有关的治疗和/或预防感染的活性，并且不具有在其内部和其自身的(即在连接到生物活性分子而进行修饰前)实质上降低肽或多肽治疗免疫失调和/或预防病毒感染的能力或构成对该肽作为上述失调或疾病的治疗剂和/或预防剂这一基本新特征的实质改变的任何特征。因此，在前述实例中，其主要活性不是治疗和/或预防病毒感染，并且在其中的某处含有选自 IVTNTT（CMS017）及其功能衍生物的肽的氨基酸序列的全长天然存在的多肽将不构成这样的肽或多肽，该肽或多肽“基本由”所述选自 IVTNTT（CMS017）及其功能衍生物的肽（其序列包含在全长天然存在的多肽中）组成。同样，在前述实例中，其主要活性不是治疗免疫失调和/或预防病毒性感染，但在其中的某处含有选自 IVTNTT（CMS017）及其功能衍生物的肽的氨基酸序列的基因工程化肽或多肽将不构成这样的肽或多肽，该肽或多肽“基本由”所述选自 IVTNTT（CMS017）及其功能衍生物的肽（其序列包含在基因工程化肽或多肽中）组成。

通过使用本文提供的针对所述 IVTNTT (CMS017)肽的检测治疗免疫失调和/或预防病毒感染的分析来测定肽或多肽的活性，本领域技术人员可容易地确定肽或多肽是否符合前述定义的基本上由选自 IVTNTT (CMS017)及其功能衍生物的肽组成。

在优选的实施方案中，术语“基本上由…组成”也可以指除了选自IVTNTT (CMS017)及其功能衍生物的肽之外另外还有少于 5 个氨基酸残基的肽和多肽。在更优选的实施方案中，该术语是指除了选自 IVTNTT (CMS017)及其功能衍生物的肽之外另外还有 2 个氨基酸残基的肽。在进一步优选的实施方案中，该术语是指除了选自 IVTNTT (CMS017)及其功能衍生物的肽之外另外还有 1 个氨基酸残基的肽。

药物制剂可包括任何已知的药物载体。合适的载体的实例包括本领域技术人员已知的标准药学上可接受的任何载体。这些载体包括但不限于生理盐水、水、乳液(包括油水混合物或甘油三酸酯乳液)及其他类型的试剂、填料、包衣片剂和胶囊。可根据药物组合物的给药方式选择合适的载体。

选自 IVTNTT (CMS017)及其功能衍生物的肽可经静脉注射、肌肉内注射、腹膜内注射、皮下注射以及皮下植入给药。所述肽还可以任一口服给药形式如片剂、胶囊、悬液、溶液等，以未经修饰的常用形式或缓释形式或胃肠道保护或不保护形式给药。所述肽可进一步以任何局部应用的形式如软膏、乳液、凝胶等经过或不经过皮促进装置（transdermal facilitating device）给药。所述肽也可以自身或者组合其它肽序列来翻译为其遗传序列并克隆进表达系统，以产生肽分子而利用本文所述肽的活性。

每种肽的剂量可以是 1ng—10g/kg 体重。注射用给药的优选的剂量可以是 10ng—10mg/kg，更优选 1μg—1mg/kg。然而，药物的起效剂量可以低至 1ng/kg 体重，这可通过一个或多个肽与受体结合诱导一系列正常机体反应而起效。或者，一个或多个肽直接诱导引起全系列反应。对于口服，给药剂量可以是 1ng—10g/kg 体重/天，优选 0.1μg—1g/kg 体重/天，更优选是 1μg—10mg/天。

II. 基因治疗及治疗方法

基于上述肽序列的基因疗法是通过设计编码这些肽之一的核酸序列而进行。核酸可化学合成并与启动子有效连接而克隆到表达载体内。表达载体随后以基因治疗的形式给予人体，以在人体细胞内表达。本文所采用

的“基因载体”一词包括这些表达载体。可以用于基因治疗的载体包括腺相关病毒（Mizuno,M 等（1998），Jpn J Cancer Res 89，76-80）、LNSX 载体（Miller,A.D.等（1993）Methods Enzymol 217,581-599）和慢病毒（Goldman,M.J.等（1997）Hum Gene Ther 8,2261-2268）。

用于肽输送的其它载体包括可在宿主生物体中复制的生物中的编码所需肽的表达载体，该宿主生物体希望被给予该肽而不明显影响该宿主生物体的健康。例如，表达载体可以被转移至对希望被给予该肽的宿主生物体是非致病性的生物体中。在某些实施方案中，表达载体在一种对希望被给予该肽的宿主生物体的健康没有明显有害作用的细菌或真菌生物中以产生所需的肽。例如，编码所需的肽的表达载体可以是在如乳酸菌、大肠杆菌或酵母的生物体中产生所需的肽的表达载体。在一个实施方案中，表达载体在一种哺乳动物消化道中天然存在的微生物或哺乳动物消化道耐受的微生物中产生所需的肽。可以表达所需的肽的一些微生物物种包括但不限于乳杆菌菌种，如嗜酸乳杆菌（*L.acidophilus*），食淀粉乳杆菌（*L.amylovorus*），干酪乳杆菌（*L.casei*），卷曲乳杆菌（*L.crispatus*），鸡乳杆菌（*L.gallinarum*），加氏乳杆菌（*L.gasseri*），约氏乳杆菌（*L.johnsonii*），类干酪乳杆菌（*L.paracasei*），植物乳杆菌（*L.plantarum*），路氏乳杆菌（*L.reuteri*），鼠李糖乳杆菌（*L.rhamnosus*）等；双歧杆菌菌种，如青春双歧杆菌（*B.adolescentis*），动物双歧杆菌（*B.animalus*），双歧双歧杆菌（*B.bifidum*），短双歧杆菌（*B.breve*），婴儿双歧杆菌（*B.infantis*），乳酸双歧杆菌（*B.lactis*），长双歧杆菌（*B.longum*）等；粪肠球菌（*Enterococcus faecalis*）或屎肠球菌（*Ent.facium*）；菊糖芽孢乳杆菌（*Sporolactobacillus inulinus*）；枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）或蜡状芽孢杆菌（*Bacillus cereus*）；大肠杆菌（*Escherichia coli*）；费氏丙酸杆菌（*Propionibacterium freudenreichii*）；或酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）或酵母益生菌（*Saccharomyces boulardii*）。

化学合成的或以其它方式包括但不限于将 mRNA 逆转录产生 cDNA 分子

而产生的编码本发明肽的核酸序列被掺入表达载体中，以通过本领域已知的基因工程方法基因转移进所希望的宿主中。表达载体可以是 DNA 载体或 RNA 载体。例如，表达载体可以基于质粒或病毒遗传因子。表达载体可以是染色体外复制的载体或者整合进染色体的载体。

表达载体包括与编码本发明肽的核酸可操作地连接的启动子。启动子可以是可调控的启动子，如诱导型启动子或组成型启动子。在一些实施方案中，可以选择启动子以提供所需水平的肽表达。另外，如果需要，表达载体可以包括其它序列以促进肽的产生、呈递和/或分泌。在一些实施方案中，编码本发明肽的核酸与指导肽分泌的核酸序列可操作地连接。例如，编码本发明肽的核酸可以与编码信号肽的核酸序列可操作地连接。

在一些实施方案中，被工程化以编码本发明肽的表达载体可以是适于在组成哺乳动物正常消化道菌群的细菌菌种如乳杆菌菌种和枯草芽孢杆菌中表达本发明肽的表达载体。这种表达载体的例子可参见 Casas 的美国专利 6,100,388 和 Bellini 的美国专利 5,728,571。这些文献以其全文引入本文作参考。应理解的是促进本发明肽在不损害希望给予该肽的宿主生物体的健康的生物体中的表达的任何表达载体均可使用。

在一些实施方案中，被工程化以编码本发明肽的表达载体可以是适于在被哺乳动物消化道耐受的酵母菌种如酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）或更优选地酵母益生菌（*Saccaromyces boulardii*）（其可在人消化道中寄居并用于治疗某些形式的腹泻）中表达本发明肽的表达载体。组成性表达异源蛋白和肽的酵母表达载体可以使用，因为其非常稳定，因此在有丝分裂和减数分裂过程中可以传递至子代，所述载体可包括指导重组蛋白高水平分泌的信号肽编码序列。这种酵母载体的例子参见 Jang 等的美国专利 6,391,585，该文献引入本文作参考。

编码本发明肽的表达载体可以经本领域已知技术导入欲表达该肽的生物体中。这些技术包括转化细菌、酵母或其它微生物的传统方法，例如经使用化学感受态细菌细胞、电穿孔或乙酸锂转化（用于酵母），以及用这些程序无效的一些细菌菌种的转化方法的最近进展。在一些实施方案

中，表达载体用 Leer 等（WO95/35389）公开的方法导入已知不能转化的乳酸菌中（该文献引入本文作参考）。导入的序列可以掺入微生物染色体 DNA 中或保持染色体外 DNA 元件的形式。

含有表达载体的这一基因工程微生物随后可以接种消化道、阴道、气管等以实现持久的免疫治疗。在一些实施方案中，表达本发明肽的生物体以无活性形式摄入，或者优选地，以活性形式摄入。在消化道中，这些微生物产生所述肽，通过分泌或微生物的裂解将其释放进腔内，或以其它方式将肽呈递给宿主，由此肽产生其对宿主生物体的预期作用。在其它实施方案中，在鼻通道、阴道或小肠粘膜处将肽呈递给宿主生物体。

另一种治疗方法是使用脂质体作为输送特异核酸至人体细胞的方式。核酸（如含有编码选自 IVTNTT(CMS017)及其功能衍生物的肽的核酸序列的表达载体）在有利于细胞吸收和染色体掺入的环境中被输送，如 Gao, X. 和 Huang，L.(1995)，Gene Ther 2，710-722 和美国专利 6,207,456 所述。或者，使用 US6,245,427 的方法，肽本身可包在脂质体中并直接输送。上述所有科学出版物和专利均引入本文作参考。

可用于上述基因治疗和治疗方法的核酸序列包括编码这些肽及其功能衍生物的序列。基于简并密码子系统，许多核酸序列中的任何一种均可用于编码这些肽及其衍生物。

下述参考文献引入本文作参考：

1. 新药（西药）临床前研究指导原则。中华人民共和国卫生部药政局。1993,7:134_135

2. 徐叔云，卞如濂，陈修主编。药理实验方法学。1991,1221-1234

3. 新药（西药）临床前研究指导原则。中华人民共和国卫生部药政局。1993,7:140

4. 何金生，李瑞珠，宗庭益。MTT 还原法检测 NK 细胞活性的方法学研究。中国免疫学杂志，1996;1(6)356-358

5. 汪谦. 现代医学实验方法。人民卫生出版社。1998,482-483

6. 新药（西药）临床前研究指导原则。中华人民共和国卫生部药政

局。1993,7:141

7. 新药（西药）临床前研究指导原则。中华人民共和国卫生部药政局。1993,7:132-133

8. 新药（西药）临床前研究指导原则。中华人民共和国卫生部药政局。1993,7:128-129

9. 章元沛，苏怀德. 药理学实验（第二版）. 人民卫生出版社. 1998,137-138

10. 李家泰. 临床药理学（第二版）. 人民卫生出版社. 1998,1338-1339

III. 肽与 IVTNTT(CMS017)及其衍生物的结合及配方

本发明的生物活性肽可与其它具生物学效应或作用的分子相结合，以提供额外的效果或作用，或者增强它们的治疗效力。许多可能的结合分子，它们的生物学作用以及与肽相结合的方法在本领域内是熟知的。对于其它候选的结合物而言，结合到肽的化学反应可由本领域的技术人员无需经过过度实验而推导出。效应分子（effective molecule）会在下文描述。具体的例子中描述了本发明的各种肽如何与它们的效应分子相结合，以及作为结果的结合产物的特性。可以理解的是，本发明的其它肽也可在类似的反应中被结合。

肽 IVTNTT(CMS017)及其功能衍生物在特定的细胞或组织类型中具有独特的医疗效力。将分子结合到肽药物的一个重要目的是为了将肽定位于被治疗个体体内的特定位置或区室。在这种方式中，肽药物及其效应分子可被集中在细胞或组织类型的特定区域，在所述的特定区域中，药物具有预期的治疗效果。这样能增加相同摩尔数量的、游离的、非结合的肽可能具有的效果。相反地，被定位在其治疗活性位点的结合肽药物的剂量可以显著的低于为取得相同治疗效果所需要的、游离的、非结合形式药物的剂量。

将肽药物定位在最容易发挥其活性的位点的另一个有益效果在于，减

少了不必要的副作用。给予的肽药物是为了在特定细胞或组织类型中实现一种变化，但是所给予的肽药物在个体体内也会在其它部位发挥作用，有时带来有害的结果。通过与一个定位分子结合而将肽定位在所需要的活性位点，可以减少在该个体中其它部位的所述肽的浓度以及带来的副作用。

包含选自 IVTNTT(CMS017)及其功能衍生物的肽的肽、基本由选自 IVTNTT(CMS017)及其功能衍生物的肽组成的肽、或者由选自 IVTNTT(CMS017)及其功能衍生物的肽组成的肽，为了定位到个体体内全身的不同部位，可与不同的分子相结合。下文所描述的将肽定位到所需位置的任何结合技术，以及本领域技术人员所熟知的其他结合技术，可被应用于本发明的任意的肽。例如，文献公开了抗乙型肝炎的药物的选择性传递到肝细胞(Fiumeetal., Ital J Gastroenterol Hepatol, 29 (3): 275, 1997, which is incorporated herein by reference in its entirety)。在该项研究中，研究者将单磷酸阿糖腺苷（ara-AMP），一种抗乙型肝炎病毒活性的磷酸化核苷类似物，结合到乳糖胺化的人白蛋白，一种末端为半乳糖基的高分子。肝细胞表达一种能与末端的半乳糖残基起高亲和力反应的受体蛋白。通过结合在该受体上，结合药物能够被肝细胞选择性的吸收。吸收以后，结合药物被运输到溶酶体，在那儿，结合药物两种成分之间的连接被断开，以其活性形式释放 ara-AMP。在上述所引用的研究中，结合药物在治疗慢性乙肝感染的病人时，与游离的 ara-AMP 具有同样的效果，但不会导致临床副作用，例如施用游离的 ara-AMP 所导致的神经毒性。这样的途径可用于本发明的任意的肽。

在与上述相关的一个研究中，同一个研究团队（Di Stefanoet al., Biochem. Pharmacol. , 61 (4): 459, 2001）将一种抗癌的化学疗法试剂，5-氟-2 脱氧尿苷(FUdR)，结合到乳糖胺化的聚 L-赖氨酸(lactosaminated poly-L-lysine）上，以达到将化合物定位在肝以及治疗肝残留癌肿的微小转移。药物被肝细胞选择性吸收，并打断 FUdR 与定位分子之间的连接。然后，部分游离的 FUdR 脱离肝细胞，产生抗癌试剂的局部治疗浓度。这种浓度对于渗透到肝脏中的转移细胞的药理学活性是足够的。由于这种结

合药物是选择性集中在肝脏中，因此其剂量与游离的、非结合化合物的最小药理学活性剂量相比，显著降低。这种策略可应用到本发明的任意的肽。例如，乳糖胺化的聚 L-赖氨酸与选自 IVTNTT(CMS017)及其功能衍生物的肽的结合可以显著的减少为治疗病毒感染（包括肝组织）的必需的剂量。

将化合物定位在体内特定组织或细胞类型已成功应用于大量的不同组织或细胞类型中。例如，肿瘤细胞常常在其表面表达非正常高水平的肽激素受体，比如铃蟾肽（bombesin）、促黄体生成素释放激素及生长激素抑制素。在一项研究中，抗癌化合物太平洋紫杉醇（紫杉醇）通过与奥曲肽（一种生长激素抑制素类似物）相结合，被选择性定位到分泌激素的肿瘤细胞，这种肿瘤细胞高密度地表达生长激素抑制素受体。结合奥曲肽的紫杉醇与游离的紫杉醇具有相同的效果，但能减少对正常细胞的毒性(Huang et al., Chem. Biol. , 7 (7): 453, 2000)。利用 Huang 等人的技术，将本发明的肽与肽激素受体拮抗剂的类似物相结合，可以构建一种治疗方案，特别是针对高水平表达那种特定肽激素受体的细胞。这种途径可适用于过量表达任何数量肽激素受体的靶细胞。在另一个将药物定位到特定组织类型的例子中，聚 L-天门冬氨酸被用来作为一种载体分子，特异性地将药物定位运送到结肠细胞(Leopold et al., J. Pharmacokinet. Biopharm. , 23 (4): 397,1995)。

除了肽药物到特定细胞或组织类型的特异性定位以外，肽与载体分子的结合可以提供增强肽药物的运输的其它方式，从而增加或从另一方面改善它们的治疗效果，所述肽包含选自 IVTNTT(CMS017)及其功能衍生物的肽、基本由选自 IVTNTT(CMS017)及其功能衍生物的肽组成或者由选自 IVTNTT(CMS017)及其功能衍生物的肽组成。下文描述的任一结合技术以及本领域技术人员所熟悉的其它技术，可被用于本发明的任意的肽。如果化合物不能被高效地运送到其目标位置，任何药物的效力都将会受到限制。药物必须在不存在由于新陈代谢过程或降解造成实质上的活性降低的情况下才能被积极地转运到其活性位点。肽药物受肽酶活性的支配，并且，作为高度极性分子，难于完成跨脂质细胞膜及内皮细胞的运输，例如血脑

屏障。与其他分子的结合提供了一种保护肽避免降解，以及增强肽药物进入细胞或机体内区室的方式，而通常情况下，细胞或机体内区室会排斥该化合物。

通过允许肽进入到体内特定区域（而通常情况下，在这些区域中，肽会被排斥），结合技术开启了给药的新途径。在 Patel 等, Bioconjugate Chem. , 8 (3): 434, 1997，研究者将一种已知作为有效止痛剂的肽药物，七肽 δ 啡肽，与一种有机分子相结合，该有机分子经过特殊设计以允许肽穿过血脑屏障，该文章中的化学过程在下文实施例5中进行了详细描述，并在此处作为参考全文引用。这样，药物可通过静脉给药，而不用通过脑室注射。

Patel 等人研究中的载体分子被设计来特异性针对那些含有血脑屏障的内皮细胞，同时也允许肽穿越这些屏障。遍及全身的内皮细胞膜，包括血脑屏障，对于表达在其表面的膜结合肽链内切酶的序列特异性及浓度是不同的。分子的设计利用这种特性来使载体分子及其运载物的定位成为可能。该分子含有三条游离端标记了二肽 Arg-Pro 的脂肪酸链，其与血脑屏障的肽链内切酶优先结合。亲脂性的脂肪酸链使极性的肽药物分子的转运成为可能。从而，标记二肽的甘油三酸酯分子既可实现定位也可实现跨血脑屏障的转运。

结合方法也可增强肽药物活性的动力学。下文所描述的用于增强肽活性动力学的任何结合技术，以及本领域技术人员所熟知的其它结合技术都可用于包含选自 FEE、FE 及其功能衍生物的肽的肽、基本由选自 FEE、FE 及其功能衍生物的肽组成的肽、或者由选自 IVTNTT(CMS017)及其功能衍生物的肽组成的肽。Patel 等人发现止痛剂肽的结合形式不仅能够从血流中进入脑，而且与游离肽相比较具有持续作用。比之颅内注射游离肽的效果，静脉给药的药物需要更长时间来发挥治疗效果，但是效果的持续时间更长，减少得更慢。研究者们发现结合肽分子在血清中非常稳定，但注射入脑室中却无效果，显示出载体分子可能是在从血流转运到脑的过程中被降解和移除。他们猜测，转运结合物及降解载体分子所需要的时间是导致动

力学改变的原因。不考虑延迟的机制，在临床应用中，结合肽分子的静脉稳定性、药物作用的发生和活性的延迟意味着它可以不用频繁地给药。更低的频率以及更方便的剂量方案增强了这种药物作为可选治疗方案的应用价值。

对于本领域技术人员显然的是，Patel 等人的技术和过程可以容易的适用于任何落入到有限大小范围的肽的运送，包括本发明的任意的肽。例如，本发明的一种肽，其治疗和/或预防免疫失调或病毒感染，例如 IVTNTT(CMS017)，能够与 Patel 等人所用的同样的分子相结合。在一个带有影响脑的感染的个体的治疗中，结合分子可允许 IVTNTT(CMS017)从血流中进入脑，并允许 IVTNTT(CMS017)在脑内的细胞或组织中发挥作用。该技术人员也熟知改变载体分子的定位的修饰。载体分子的定位特性是在脂肪酸链末端含有二肽修饰的两种氨基酸的特点的作用。Arg-Pro 二肽与发现位于血脑屏障的内皮膜表面的一批膜结合肽链内切酶优先相互作用。其他的内皮细胞和膜可能通过其它二肽组合被定位。

研究者们也利用结合状态来制造可通过消化道或者透皮被有效吸收的肽药物。下文所描述的用于增强吸收的任何结合技术，以及本领域技术人员所熟知的其它结合技术，都可被用来增强肽的吸收，所述肽包含选自 IVTNTT(CMS017)及其功能衍生物的肽、基本由选自 IVTNTT(CMS017)及其功能衍生物的肽组成、或者由选自 IVTNTT(CMS017)及其功能衍生物的肽组成。Kramer 等人描述了一种将肽药物结合到胆汁酸的过程。化合物口服给药之后的结合分子的吸收速度与单独的肽相比显著增强（J. Biol. Chem., 269 (14) : 10621, 1994）。Toth 等人（J. Med. Chem. , 42 (19) : 4010, 1999）描述了将具有抗肿瘤特性的肽药物与脂氨基酸（LAA）或脂多糖（LS）的结合，目的是为了增加吸收速度以及增强抗癌肽到其活性位点的递送。在他们的研究中，生长激素抑制素的一种衍生物与 LAA 或 LS 中的任一个相结合，这种衍生物显示出很强的抗增殖特性，但具有削弱的药代动力学。得到的结合药物具有跨皮肤和消化道上皮的改善的吸收谱，增加了抗降解的能力，并依然具有抗肿瘤细胞活性。这些技术与本发明的任意的肽相结

合后将非常有用。通过增加分子的跨肠道上皮细胞的吸收速度，更多的肽可被运送到血液中并发挥其对被治疗个体的作用。

结合也可被用来提供肽药物的持续的释放。用于提供持续释放的任何结合技术，以及本领域技术人员所熟知的其他结合技术，都可用于提供肽的持续释放，所述肽包含选自 IVTNTT(CMS017)及其功能衍生物的肽、基本由选自 IVTNTT(CMS017)及其功能衍生物的肽组成、或者由选自 IVTNTT(CMS017)及其功能衍生物的肽组成。如上文 Patel 等人的工作中所看到的，肽药物的持续的递送可通过结合方法达到。另一个例子是 Kim 等人的工作（Biomaterials, 23: 2311, 2002），在他们的工作中，重组人表皮生长因子（rhEGF）在被装入生物可降解的聚乳酸聚甘醇酸（poly(lactic-co-glycolic acid)，PLGA）微球体胶囊以前，与聚乙二醇（PEG）相结合。装入 PLGA 微胶囊被好几个小组用于递送不同的生长因子和形态发生蛋白（Meinel 等, J. Controlled Rel., 70: 193,2001）。与非结合的游离 rhEGF 相比较，通过与 PEG 结合，rhEGF 可避免形成不溶于水的聚合体形式以及在与 PLGA 形成胶囊过程中吸附在水-有机相分界面。与游离的激素相比较，具有结合激素的配方所表现出的药代动力学得到改善，显示出更持久、更稳定，以及全面增强的药物活性，研究者们推测，这是由于与 PEG 结合的激素具有增强的生理稳定性。类似的策略可以应用来制备本发明的任意肽的持续释放的配方。例如，由下文实施例 1 可看出，IVTNTT(CMS017)显示出有效的抗病毒能力。通过将 PEG 结合到这种肽并将结合药物加入到 PLGA 微球体中，随着药物的剂量给药，以及随着它从 PEG 结合物中释放出来，IVTNTT(CMS017)的抗病毒能力可持续更长，更稳定，更一致，并且确保肽药物到感染位点的更持续的递送。

肽药物的延长释放可显著增强其活性。下文所描述的任何用于提供肽的延长释放的结合技术，以及本领域技术人员所熟知的其它结合技术，都可用于提供肽的延长释放，所述肽包含选自 IVTNTT(CMS017)及其功能衍生物的肽、基本由选自 IVTNTT(CMS017)及其功能衍生物的肽组成、或者由选自 IVTNTT(CMS017)及其功能衍生物的肽组成。Oldham 等人（Int. J.

Oncology, 16: 125,2000）比较了抗癌试剂太平洋紫杉醇与该药物的一种新形式，太平洋紫杉醇结合到聚 L-谷氨酸（PG-TXL）。PG-TXL 相比较游离的太平洋紫杉醇，显示出具有较高的抗癌活性，提示该药物具有较好的药代动力学特性或者甚至具有更优的作用方法。然而，研究人员发现 PG-TXL 通过与游离药物相同的作用机理来发挥作用，通过打乱微管亚单位的聚合来诱导细胞周期停滞。证据显示，与游离肽给药相比，结合药物的更好的抗癌活性来自于游离药物从结合物中的持续并稳定的释放，并更长时间地维持其治疗浓度。本发明的具有抗感染特性的肽，其所增加的聚 L-谷氨酸尾端也能够增强那些特性。

在一些例子中，肽的酶降解可能会降低肽作为药物的效力。下文所描述的减少肽的酶降解的任何结合技术，以及本领域技术人员所熟知的其它结合技术，可用于减少肽的酶降解，所述肽包含选自 IVTNTT(CMS017)及其功能衍生物的肽、基本由选自 IVTNTT(CMS017)及其功能衍生物的肽组成、或者由选自 IVTNTT(CMS017)及其功能衍生物的肽组成。研究者们已开发出很多方法来保护肽免受消化道中腔体分泌的蛋白酶以及结合到膜上的肽酶的降解。后者被发现位于所有粘膜组织的表面，而跨越粘膜组织经常是肽药物的进入路线。Bernkop-Schurch 等人（J. Drug Target. , 7: 55,1999），报道了含有胃蛋白酶抑制剂的肽药物配方的构建。一种胃酶抑素的类似物共价结合在粘膜附着聚合体（mucoadhesive polymer）上；这种新的胃蛋白酶抑制剂包含在含有胰蛋白酶的药片中。在模拟消化过程的实验室条件下的培养之后，对照药片的所有的胰蛋白酶都被代谢，然而在含有这种抑制剂的药片中大约 50%的胰蛋白酶被保护不受降解。在另一项研究中，同一个研究小组利用蛋白酶抑制剂在通常会导致毒副作用的剂量下来抑制生物活性肽的降解（Bernkop-Schnurch etal., Adv. Drug Del. Rev. , 52: 127,2001）。该方法利用壳聚糖，一种从壳质中提取的与纤维素相关的氨基多糖，在甲壳类和其他生物体中发现的一种主要的结构多糖。通过将蛋白酶抑制剂结合到壳聚糖，以及在肽药物配方中包括这种结合分子，发现消化道蛋白酶的显著的抑制，增加了肽的生物利用率，并且

没有在给予游离的蛋白酶抑制剂时可预见的副作用。在该研究中，各种蛋白酶抑制剂被单独以及联合使用来与壳聚糖载体相结合。壳聚糖-EDTA 结合物同样通过结合某些蛋白酶发挥活性所必需的无机辅助因子来抑制内源性蛋白酶。对于本领域技术人员显而易见的，载体分子与效应部分之间的大量的可能的组合可以被构建来为肽配方提供有益的特性，它们中的任何一种均可容易地适用于本发明的肽。利用连接在壳聚糖的蛋白酶抑制剂，通过构建肽的口服给药配方，本发明的肽的口服给药可被用来代替肌肉注射。这种方法并没有排除在配方中使用更容易被吸收的选自 IVTNTT(CMS017)及其功能衍生物的肽的结合形式（在上文中论述）来构建这种肽及其衍生物的更高水平的生物利用度。

除了被另一个分子定位在特定区域，肽自身可作为定位分子。下文所描述的任何利用肽来将分子定位到所希望区域的结合技术，以及本领域技术人员所熟知的其它定位技术，均可用于这样的肽，该肽包含选自 IVTNTT(CMS017)及其功能衍生物的肽、基本由选自 IVTNTT(CMS017)及其功能衍生物的肽组成、或者由选自 IVTNTT(CMS017)及其功能衍生物的肽组成。例如，研究者们已使用抗癌药物二氟甲基鸟氨酸（DFMO），并为了定位将其结合到肽上。DFMO 是一种高效的细胞毒素试剂，它可有效地杀伤多种类型的癌细胞。然而，由于它会很快地从体内被清除，它的治疗价值受到限制。在该项研究中，将 DFMO 结合到α促黑细胞激素的一个特殊片段或含有两种氨基酸取代基的类似片段，其显示出能优先结合到人类黑素瘤细胞系上的促黑细胞激素受体（Suli-Vargha et al., J. Pharm. Sci., 86: 997, 1997）。为使 DFMO 从肽片断中通过氨基肽酶方便释放，药物被结合到肽的 N 末端。研究者们发现结合药物在杀伤黑素瘤细胞时比单独的非结合药物更有效。

本发明的肽的作用可部分的归因于肽自身的内在的定位能力。例如，与α促黑细胞激素片段类似，本发明的一种特定的肽可联结到某一受体，该受体被发现位于一种独特类型细胞的表面。通过使用该肽作为结合体，药物可被定位在用该药物治疗的个体体内的那些细胞的特定区域。

作为结合物的肽可发挥除定位以外的其它功能。下文所描述的任何提高肽的治疗效果的结合技术，以及本领域技术人员所熟知的其他结合技术，均可用于增强肽的治疗效果，所述肽包含选自 IVTNTT(CMS017)及其功能衍生物的肽、基本由选自 IVTNTT(CMS017)及其功能衍生物的肽组成、或者由选自 IVTNTT(CMS017)及其功能衍生物的肽组成。Fitzpatrick 等人通过在两个分子之间使用肽间隔(spacer)，改进了结合抗癌试剂（Anticancer Drug Design, 10: 1,1995）。已将甲氨蝶呤与人血清蛋白（HSA）相结合，来增加被肿瘤细胞吸收以及抗肿瘤细胞的能力。一旦被细胞吸收，一些甲氨蝶呤被溶酶体中的酶从结合物中释放，并可发挥其细胞毒素作用。通过在甲氨蝶呤与容易被溶酶体酶消化的 HAS 之间插入一个四氨基酸的连接(linker)肽，增加了细胞内由结合分子产生的活性甲氨蝶呤的数量。本发明的肽可通过与特殊的酶的特异性相互作用来发挥它们的作用。通过在结合分子内掺入本发明的一种肽作为药物与其载体分子之间的连接片段，或者增加另一个连接片段，药物动力学可被改变。这能够构建一种对蛋白酶的活性更具抗性或更敏感，并且随后降低或提高药物分子从结合物中的释放速度的前体药物。就像上文中结合的化学治疗试剂的例子那样，药物分子递送速度的改变可大大增强药物的作用效果。

药物对于一个特定细胞的作用可根据其它因素而被改变，例如细胞的活化状态，或者细胞周围或细胞内其它分子信号的存在情况。在一些实例中，为了药物能够发挥作用，另一个分子或信号必须存在。Damjancic 等人（Exp. Clin. Endocrin. , 95:315, 1990）研究了人心房钠尿肽(hANP)对患者内源糖皮质激素合成缺陷的影响。肽在糖皮质激素治疗的停药期间或随后使用地塞米松进行继续治疗期间给予患者。患者只有在伴随的地塞米松治疗期间给予肽激素时，才对 hANP 起反应并且增加利尿与钠排泄。在糖皮质激素治疗的停药期间用 hANP 处理无效果。协同给予类固醇激素的作用也能增强肽的活性。在 Zhu 等人的报道中(Acta Pharm. Sinica, 28: 166,1993)，止痛剂肽京都啡肽（kyotorphin，简称 KTP）经由一个短连接片段结合到氢化可的松，其活性与单独肽的活性相比较显著增强。单独给

予氢化可的松无效果。

这些研究的结果表明，类固醇激素作为结合分子的能力或者作为配方中的成分可实现或增强生物活性肽的活性。本发明的任意的肽也可通过与类固醇激素结合或共同应用被调节或活化。Zhu 等人的技术可容易的适用于类固醇分子与本发明的肽的结合。图 1 至 5 也提供了连接类固醇激素到本发明的任意的肽的逐步合成反应示例。

上述所举的例子提供了增加本发明的任意的肽的有效性及活性的典型方式。在这一领域中进一步的发展将有助于克服障碍来构建基于肽的有效的临床治疗。对于本领域技术人员显然的，开发用于肽生物化学、制药研究及临床检测的技术、试剂以及实验规程，都可容易地应用于本发明的任意的肽。

实施方式

实施例 1

CMS017 的体外研究

CMS017 具有序列 IVTNTT，并利用 L-氨基酸进行合成。CMS017 对于转染了乙型肝炎病毒的细胞的治疗作用在本实施例中进行检测。

1. 材料

CMS017 通过 American Peptide Company, Inc., USA 定制合成（使用 L-氨基酸），并用常规的生理盐水调至所需浓度。transfected

转染了乙型肝炎病毒（HBV）的 hepG 2 2.2.15 细胞系，由国家新药筛选中心（中国上海）及北京大学附属第一医院传染病科提供。

细胞培养基（MEM）由 GIBCO 公司制造。

HBsAg 与 HBeAg 的 ELISA 试剂盒购自上海实业科华生物技术公司。

测定 HBV-DNA 的荧光定量 PCR 试剂盒购自中山医科大学达安基因公司。

2. 方法

a. 体外 CMS017 在最大无毒性浓度下对 HBsAg 和 HBeAg 的抑制作用

收集处于对数生长期的 2.2.15 细胞，并在 MEM 培养基（含 10%小牛血

清，100mg/ml 青霉素，及 100U/ml 链霉素）中重悬浮成 2×10^6/ml 的细胞悬液。悬液被接种到 24 孔细胞培养板，每孔 1.5ml，并在 37℃、5%CO_2 条件下培养 48 小时。测试物质 CMS017 被稀释并加入到 2.2.15 培养物至终浓度为 0、50、100、200、400、800μg/ml，每个浓度作三个平行试样。然后将细胞于 37℃，5%CO_2 条件下培养。在第 3 和第 6 天更新上清液。在第八天通过 MTT 染色观察 CMS017 对于 2.2.15 细胞培养物的细胞毒性，并确定 CMS017 的最大无毒性浓度。

在所确定的 CMS017 最大无毒性浓度下，按上面的方法重复进行细胞悬液的制备和培养，并作平行的阴性和阳性对照（与 CMS017 相同浓度的拉米夫定作为阳性对照）。在第 8 天，通过使用试剂盒厂商提供的条件，用 ELISA[1,2]测定细胞培养物上清液中 HBsAg 与 HBeAg 的滴度。每个测试物质的抑制率按下面所示的公式进行计算。

抑制率（%）=（空白对照-试样）/空白对照×100

细胞存活率（%）=试样（A_{595}-A_{650}）/空白对照（A_{595}-A_{650}）×100

b. CMS017 在体外对 HBV-DNA 的抑制作用

按上文所描述的方法 1 制备并培养细胞悬液。在这个实验中，一磷酸阿糖腺苷（Ara-AMP）作为阳性对照物质。测试物质（CMS017 或 Ara-AMP）被稀释并加入到活性细胞培养物中至终浓度为 0、20、40、80、160、320μg/ml，每个浓度作 3 个平行试样。加入了测试物质的培养基，在第 3 天和第 6 天进行更换。在第 8 天，收集细胞培养物的上清液用于测定 HBV-DNA 浓度，测定 HBV-DNA 浓度是按照试剂盒厂商提供的方法，通过荧光定量 PCR 进行。培养的细胞被用于每种测试物质的细胞毒性分析。药物的抑制率按照以下方式计算：

抑制率（%）=（空白对照-试样）/空白对照×100

细胞存活率（%）=试样（A_{595}-A_{650}）/空白对照（A_{595}-A_{650}）×100

TC_{50} 被定义为测试组中的细胞存活率为对照组中细胞存活率的 50%的时候的测试物质浓度。IC_{50} 是测试组中 HBV-DNA 浓度减少的百分率与对照组的 HBV-DNA 浓度减少的百分率之比为 50%时候的测试物质浓度。这些参

数通过将相应的百分率对测试物质浓度进行绘图确定。选择性指数（selection index，SI）由 TC_{50}/IC_{50} 计算得到。SI 的值越大，测试物质的抑制活性越高，且细胞毒性越低。

利用 t-检验并使用 SPSS 软件分析统计学意义。

3. 结果

a. CMS017 对 HBsAg 及 HBeAg 的抑制作用

CMS017 的最大无毒性浓度为 400μg/ml。表 1 显示了在这一最大无毒性浓度下计算出的抑制率。

表 1. CMS017 在 400μg/ml 时对 HBsAg 与 HBeAg 的抑制作用

测试物质	HBsAg 的抑制率	HBeAg 的抑制率
CMS017	68.6%*	62.2%*
拉米夫定	29.6%*	35.4%*

* 与阴性对照相比 $p<0.01$

b. CMS017 对 HBV-DNA 的抑制作用

表 2 显示了测试物质的 TC_{50}，IC_{50} 及 SI，表 3 显示了测试物质的抑制率。

表 2. 药物对 HBV-DNA 的抑制作用

药物	TC_{50}（μg/ml）	IC_{50}（μg/ml）	SI
CMS017	1332.5	2.3	577.7
Ara-AMP	64.2	11.4	5.6

表 3. 在 160μg/ml 浓度下药物对上清 HBV-DNA 的抑制率

	CMS017	Ara-AMP
抑制率	90.8%*	89.1%*

* 与阴性对照相比 $p<0.01$

4. 结论

据报道，猪脾糖肽对人乙型肝炎感染具有治疗作用。然而，并不清楚

活性成分的分子类型。为了确定有关的活性成分，并为了最终能够进行化学合成，优化其治疗方式，以及消除由其它共存的污染成分导致的不必要的副作用，对猪脾抽提物进行分子水平的分析（利用耶鲁大学的 Keck 设备）。然后进行单个肽成分的化学合成，并且这些肽中的每一个进行抗病毒活性的筛选。大量肽被观察到在体外具有不同水平的抗病毒活性。在这其中，CMS017 是在体外具有最强的抗病毒活性的肽中的一个。

在这项研究中，CMS017 在体外能够抑制 HBV-DNA 的水平，并具有统计学意义。50%抑制浓度（IC_{50}）为 2.3μg/ml，在 160μg/ml 浓度下 HBV-DNA 抑制率为 90.8%。由此表明 CMS017 在体外是一种抗病毒试剂，可被用于开发为治疗病毒感染例如乙型肝炎的抗病毒治疗药物。

5. 参考文献

1. 张在和，张胜权，吴庆. 硫代反义寡聚脱氧核苷酸体外对乙型肝炎病毒基因表达的抑制作用. 安徽医科大学学报. 2001；36(6)：434-437

2. 李淑莉，曾令兰，高勇，等. 乙型肝炎病毒(HBV)反基因与 HBV 的结合及对 HBV 复制的影响. 中华内科杂志. 2001；40(4)：243-246.

3. Ausubel FM, 等. 分子生物学纲要(Short Protocols in Molecular Biology). 科学出版社. 北京，1998 年第 1 版（译文）. P596-598

4. 王宁，高建英，田华，等. FQ-PCR 检测乙型肝炎患者血清 HBV DNA. 上海医学检验杂志. 2001；16(6)：363-364

实施例 2

CMS017 的体内研究

使用以下动物实验观察 CMS017 对 ConA 诱导的小鼠 T 淋巴细胞转化的影响。

1. 材料

a. 实验动物

BALB/c 小鼠，18-22g，雄性，由中国北京 VITAL RIVER 公司提供。

b. 试剂

CMS017：由美国 CS Bio 定制合成

胎牛血清和 RPMI-1640 细胞培养基：GIBCO，USA

MTT 和 ConA：Sigma，USA

rhIL-2：中国上海华新生物技术公司

2. 方法

a. 分组与给药

BALB/c 小鼠被随机分成 CMS017 剂量 I 组（200μg/kg/d），CMS017 剂量 II 组（50μg/kg/d），重组人 IL(rhIL)-2 组（3×10^5IU/kg/d），以及生理盐水组（0.5ml/d）。每组 12 只小鼠。

测试物质均溶于生理盐水中，腹腔注射，每天一次，0.5ml/d，连续 28 天。

b. 肽对细胞免疫功能的影响

i. 脾细胞悬液的制备[1,2]

给药结束后次日，颈椎脱臼处死小鼠。无菌分离小鼠脾脏，注射器吸取预冷 D-Hank’s 液冲刷脾脏，分离脾细胞。使用 100 目直径 150μm 的不锈钢滤网进一步过滤分散的细胞悬液。在 200g 离心 10 分钟后，弃上清。10 倍体积的 Tris－NH_4Cl 缓冲液重悬细胞沉淀，室温培养 10 分钟。150g 离心 10 分钟收集悬浮的细胞。再按上面描述的方法使用冷 D-Hank’s 溶液洗涤细胞 2-4 次。用含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基稀释脾细胞至所需细胞浓度。

ii. 肽对于 T 淋巴细胞转化[1,2]的影响

将浓度为 4×10^6/ml 的脾细胞接种于 96 孔细胞培养板中，100μl/孔，每只小鼠设 3 个平行实验孔与 3 个平行对照孔。在实验孔中加入 100μl 含有 5μg/ml ConA 的 RPMI-1640，对照孔加入 100μl RPMI-1640。37℃、5%CO_2条件下培养细胞 68 小时。然后 150g 离心 10 分钟沉淀细胞。弃去上清，每孔细胞沉淀中加入 100μl 含有 0.5mg/ml MTT 的 RPMI-1640，振荡 2 分钟使细胞重新悬浮。继续培养 4 小时。150g 离心 10 分钟弃去上清，每孔加入 100μl 的 HCL-异丙醇（1：1），振荡 3 分钟。ELISA reader 上

测定每孔吸光度(OD 值)，测定波长 570nm，参考波长 630nm。

2. 计算

每只小鼠均包含三个实验孔与三个对照孔。刺激指数（The Stimulation Index，SI)计算如下：SI(%)=（实验孔平均 OD 值/对照孔平均 OD 值）×100%

3. 结果

CMS017 在 50μg/kg/d 剂量时可以增强 T 淋巴细胞转化，与生理盐水对照组相比具统计学意义的差异（$P<0.05$），如下表所示。

CMS017 对 T 淋巴细胞转化的影响

分组	剂量	N	X±SD(刺激性指数)
CMS017	200μg/kg/d	12	2.65±0.51
CMS017	50μg/kg/d	12	2.82±0.41*
IL-2	3×10^5IU/kg/d	11	2.71±0.35*
生理盐水	0.5ml/d	11	2.50±0.23

*与生理盐水对照组相比 $P<0.05$

4. 结论

肽 CMS017 在体内能够增强 T 淋巴细胞转化，提示 CMS017 可能对实验动物具有免疫刺激作用。

5. 参考文献

1. 中华人民共和国卫生部药政局. 新药临床前研究指导原则. 1993 年出版，第 134-135 页

2. 徐叔云，卞如濂，陈修,主编. 药理实验方法学. 人民卫生出版社，1991 年出版，第 1221-1234 页

实施例 3

经基因工程乳杆菌菌种输送肽

以下提供了将本发明肽输送至如上所述宿主中的一个举例方法。编码选自 IVTNTT(CMS017)及其功能衍生物的肽的 DNA 序列经化学方法合成，并用本领域技术人员熟知的标准基因工程技术将这一 DNA 序列导入一表达载体中。所选的表达载体含有在乳杆菌中有功能的组成型启动子，一个用于以特异的 5’至 3’方向异入 DNA 序列的多克隆位点，以及一个赋予对抗生素的抗性的选择标记基因（以辅助克隆程序），并且还可含有有助于肽的产生和/或分泌的其它序列，如信号肽序列。这种载体的一个例子参见 Pavla 的美国专利 5,592,908，其引入本文作参考。简要地，该专利讨论了在乳杆菌菌种中有功能的若干已知启动子，以及在所述细菌中发现新启动子的方法，这些启动子的任一种均可与编码本发明肽的核酸可操作地连接以在乳杆菌中表达所述肽。编码信号肽如美国专利 5,592,908 所述的在乳酸乳杆菌中有活性的由 16-35 个多数为疏水的氨基酸组成的肽的核酸被插入启动子和编码本发明肽的核酸之间，从而编码信号肽的核酸与编码本发明肽的核酸同框。

除了肽的编码序列之外，合成的 DNA 序列还可包括有助于将所述 DNA 连接并克隆进表达载体的序列。例如，与在所述载体多克隆位点中发现的识别位点相应的限制酶识别位点可以掺入合成的 DNA 序列的 5’和 3’末端，从而所述序列可以正确方向克隆进载体中。载体和合成 DNA 用特定限制酶消化，然后纯化。载体和合成 DNA 连接反应后转化进大肠杆菌合适菌株中。转化的细菌在含有载体赋予抗性的抗生素的培养基上铺板。选择转化细菌的菌落进行生长培养和质粒制备，证实存在正确方向的合成 DNA。

然后将表达载体转化进乳杆菌菌种如嗜酸乳杆菌的细菌宿主细胞中。通过载体序列中的选择标记选择转化的细胞，肽的分泌可通过进行 Western 印迹、进行存在于培养基中的肽的凝胶电泳和其它标准技术证实。选择细菌转化菌落并用于制备基因工程菌的大规模培养物。培养表达所需肽的基因工程菌的培养物并将其至少一部分给予宿主生物体的消化道、阴

道、气管或该细菌可在其中复制的其它区域。如果需要，可以各种方式处理细菌培养物以产生由宿主肠道吸收的补剂。这些处理包括冻干或其它保存细菌的方法，另外可将细菌与载体试剂如溶液、溶剂、分散介质、缓释剂、乳液等组合。这些试剂制备补剂的用途是本领域熟知的。例如，细菌可用于制备酸奶产品或其它食品供人类消费，从而表达肽的微生物寄居在人消化道中。将乳酸菌的特殊菌株掺入食品如酸奶、泡菜、乳酪和奶油的各种不同方法参见美国专利 6，036，952，其引入本文作参考。通过任一种途径摄入细菌后，工程菌可寄居在消化道中使得经消化道的粘膜层呈递和/或吸收本发明肽。

实施例 4

经基因工程形式的枯草芽孢杆菌输送肽

以下提供了将本发明肽输送至如上所述宿主中的一个举例方法。编码选自 IVTNTT(CMS017)及其功能衍生物的肽的 DNA 序列经化学方法合成，并用本领域技术人员熟知的标准基因工程技术将这一 DNA 序列导入一表达载体中。所选的表达载体包括穿梭载体，如 pTZ18R(Pharmacia, Piscataway, NJ)，其在大肠杆菌和枯草芽孢杆菌中均能繁殖并含有抗生素抗性基因以选择转化菌落。这一载体可以含有在枯草芽孢杆菌中有活性的启动子，如衍生自枯草芽孢杆菌 SacB 基因的启动子，以及编码在枯草芽孢杆菌中有活性的信号或前导肽的核苷酸序列，该信号或前导肽指导表达的异源蛋白从细菌细胞中有效输出。这种载体的一个例子参见 Fahnestock 的美国专利 6,268,169，其引入本文作参考。简要地，如上所述，以本领域熟知的技术合成具有限制酶位点和/或促进 DNA 克隆的其它序列的编码本发明肽的 DNA。在转化进大肠杆菌、铺板、选择和繁殖质粒产生质粒原液后，将质粒转化进枯草芽孢杆菌，并根据对铺板培养基中的抗生素的抗性选择转化子。

在遗传工程化的枯草芽孢杆菌中产生及从中分泌的肽使用本领域熟知的技术验证，如在 SDS-PAGE 分析或 Western 印迹之后，将肽放射标记以进行放射自显影检测。

培养表达所需肽的基因工程菌的培养物并将其至少一部分给予宿主生物体的消化道、阴道、气管或该细菌可在其中复制的其它区域。

实施例 5

经基因工程糖酵母菌种输送肽

以下提供了将本发明肽输送至如上所述宿主中的一个举例方法。选自IVTNTT(CMS017)及其功能衍生物的肽的 DNA 序列经化学方法合成，并用本领域技术人员熟知的标准基因工程技术将这一 DNA 序列导入一表达载体中。所选的表达载体包括一稳定维持的酵母蛋白表达载体，包括组成型酵母启动子如 pADH1，使载体在酵母和大肠杆菌中均能复制的位点，赋予营养缺陷型酵母突变体以原养型的用于选择目的的一个或多个基因，多克隆位点（MCS），以及如果需要的编码信号肽的序列。这种载体是市售的并是本领域熟知的或者可用标准技术构建。在将合成 DNA 插入酵母载体、转化进大肠杆菌、在选择培养基上铺板转化的大肠杆菌、选择转化的细菌菌落并从所述菌落的细菌培养物中制备质粒 DNA 后，将载体经熟知技术如乙酸锂转化或电穿孔转化进酿酒酵母。选择用于转化的酿酒酵母菌株是突变的营养缺陷型菌株，其需要质粒上的一种基因以在基本培养基上生长。通过将酵母在缺少该载体上提供的基因的培养基上铺板而选择转化的酵母菌落。只有接受的载体及其选择基因并表达该基因产物的酵母可在基本培养基上生长成菌落。通过进行 Western 印迹、存在于培养基中的肽的凝胶电泳或其它标准技术可以证实肽的表达。

选择酵母转化菌落并用于制备大规模培养物。培养表达所需肽的基因工程酵母的培养物并将其至少一部分给予宿主生物体的消化道、阴道、气管或该酵母可在其中复制的其它区域。如果需要，可以各种方式处理酵母培养物以产生由宿主肠道吸收的补剂。这些处理包括冻干或其它保存酵母的方法，另外可将酵母与载体试剂如溶液、溶剂、分散介质、缓释剂、乳液等组合。这些试剂制备补剂的用途是本领域熟知的。在另一实施方案中，转化的酵母可用本领域已知技术制备食品如发酵奶制品如酸奶和酸乳酒。与这些食品中的活乳酸菌培养物一样，转化的酵母至少短时寄居在消化道

中，并经消化道腔将肽提供给宿主。

实施例 6

将肽定位到特定的区域

下文提供了一种选择性地将本发明的肽递送到特定区室、器官、细胞类型或体内特定区域的示范方法。在这一例子中，通过将选自IVTNTT(CMS017)及其功能衍生物的肽定位到个体的肾脏内组织来治疗感染。例如，IVTNTT(CMS017)经由本领域所公知的化学反应通过共价键与低分子量（LMW）溶菌酶——一种特异地集中在肾脏组织的可通过商业途径获得的蛋白部分——相连。实现分子与 LMW 溶菌酶结合的技术已有文献公开（Folgert 等, Br. J.Pharmcology, 136: 1107,2002)。将蛋白或肽与另一种蛋白质或肽相结合的一般技术在所属领域的文献中也已公开（Fischer 等, Bioconj. Chem. , 12: 825,2001)。然后，新构建的结合肽样品通过层析方法如阳离子交换FPLC和/或梯度离心法从连接过程中所使用的化学试剂中被纯化。一旦被纯化，该结合肽给予需要治疗肾炎的个体。对于抗病毒活性，依靠 IVTNTT(CMS017)与 LMW 溶菌酶之间的连接，其会被选择性集中在肾脏组织中（依靠 LMW 溶菌酶对于肾的近端小管细胞的亲和力)，IVTNTT(CMS017)被优先定位到肾脏组织。与相同摩尔数量的IVTNTT(CMS017)自身相比较，这种优先递送形成更强的抗肾炎作用。相反地，这能减少为达到抗肾炎活性的某一水平的肽药物的量。

实施例 7

增强肽到其活性位点的递送

下文提供了一种增强神经活性肽递送到脑的典型的方法。通过本领域技术人员所熟知的化学方法合成本发明的一种肽，其在由脑的神经细胞所表达的受体上发挥作用。或者，它也可由工程微生物表达并从这些生物体的培养物中回收得到，如上文实施例中所描述的那样。一旦以纯化的形式获得，这种肽被用于一系列的有机化学反应，来构建一个甘油三酸酯结合部分，连接到该肽。该结合部分由一个季碳中心组成，所述碳中心通过一个酰胺键连接到肽的末端羧基碳而与本发明的肽相连接。附着在季碳中心

的另外三个基团由与 16 碳脂肪酸链的碳酯联接组成。脂肪酸链自身末端带有被认为是肽修饰(mask)的二肽基团，其增加了链的亲水性并将它们特异性地定位于血脑屏障的内皮细胞膜。这一合成过程在 Patel 等., Bioconjugate Chem. , 8 (3): 434,1997 中进行了详细说明，并利用了本领域技术人员所熟悉的常用试剂与设备。

一旦在外部导入到个体，该化合物经由循环系统在全身转运，与血脑屏障的内皮细胞膜相互作用。在分子跨越血脑屏障的上皮层的运输过程中，二肽修饰及脂链的逐步降解导致本发明的肽释放到脑区室中。在那里，肽可与神经细胞表面的受体相互作用来发挥其对脑功能的影响作用。药物到达血脑屏障以及被运输到脑所需的时间，以及伴随载体部分的降解，改变了药物活力的动力学，与游离肽的脑室注射相比较，形成一个更稳定持续时间更长的效果。

实施例 8

构建抗酶降解的肽配方

下文提供了一种构建用于口服给药的生物活性肽的配方的典型方法，其可抗在消化道表面内部以及沿着消化道表面所发现的蛋白酶及肽酶活性。在这个例子中，选自 IVTNTT(CMS017)及其功能衍生物的肽被用于制备对病人进行口服形式给药的药物配方。如 Larionova 等人所描述的那样（Int. J. Pharma., 189 : 171,1999)，肽被用于与可溶性淀粉以及蛋白酶抑制剂----抑酶肽（aprotinin)，一起制备微粒，抑酶肽是一种由细胞腔分泌以及刷状缘（brush border）膜结合的多种蛋白酶的强烈的抑制剂。简单地说，可溶性淀粉，蛋白酶抑制剂抑酶肽以及本发明的肽溶解在一缓冲液中。可溶性淀粉，抑酶肽和肽的比例可根据本领域技术人员所熟悉的实验方法确定，例如，Larionova 等人利用体外模拟消化试验来决定对他们研究中所用的肽最有效的比例以及制备条件。水溶液在含有 5% Span-80（一种非离子型表面活性剂）的环已烷中（比例 1：3，v/v)，在机械振动的条件下被乳化。对苯二酰氯的氯仿溶液被加入到乳化液中，持续搅拌 30 分钟，在这期间淀粉分子与抑酶肽以及所述肽发生交联。在上述过程中所

制备的微粒用环已烷、具有 2% v/vTween85 去污剂的 95%乙醇溶液、95%乙醇及水依次洗涤。微粒在水中重悬浮并冻干。冻干的化合物可被置于明胶胶囊中，用于需要治疗的个体的口服给药。

一旦被消化吸收后，化合物随着明胶胶囊的溶解被释放。微粒在小肠中通过α淀粉酶对淀粉分子的作用而被分解，导致抑酶肽以及本发明的肽的逐步释放。有效的蛋白酶抑制剂抑酶肽在与肽相同的时间和位置协同释放，减少了肽的酶降解，并增加了从肠膜吸收获得完整肽的比例

虽然本发明用上述的方法和数据以及一些实例中的 CMS017 肽(IVTNTT)的特定的实施例来描述，但可以理解的是，这仅仅是举例而不能作为对本发明的限制。同样可被理解的是 IVTNTT(CMS017)代表了本发明的一种实施方式，本发明的相同的原则也可应用于 IVTNTT(CMS017)的被修饰但未影响生物学功能的其它功能等同的肽。例如，IVTNTT(CMS017)的等同肽包括那些具有保守的氨基酸取代基（即，I、V、N 和或 T 中的一个被具有处于同样的生化类型的另一个氨基酸残基所置换，例如疏水性、亲水性，正电或负电基团的）。IVTNTT(CMS017)等同肽的另一个例子是一个更长一些的肽，比如长一个或两个氨基酸，能保持同样的生物学活性。此外，对于 IVTNTT 的医学应用，虽然上文所描述的的疾病或失调指的是免疫失调和/或病毒感染，但这些医学应用仅作为非限制性的例子而不能用于限制权利要求的范围。清楚地，IVTNTT 及其功能衍生物具有其他可能/预期的应用，例如用于增强或促进正常人或感染病人的免疫系统的保健食品增补剂。任何此类的应用均落入本发明的范围之内。

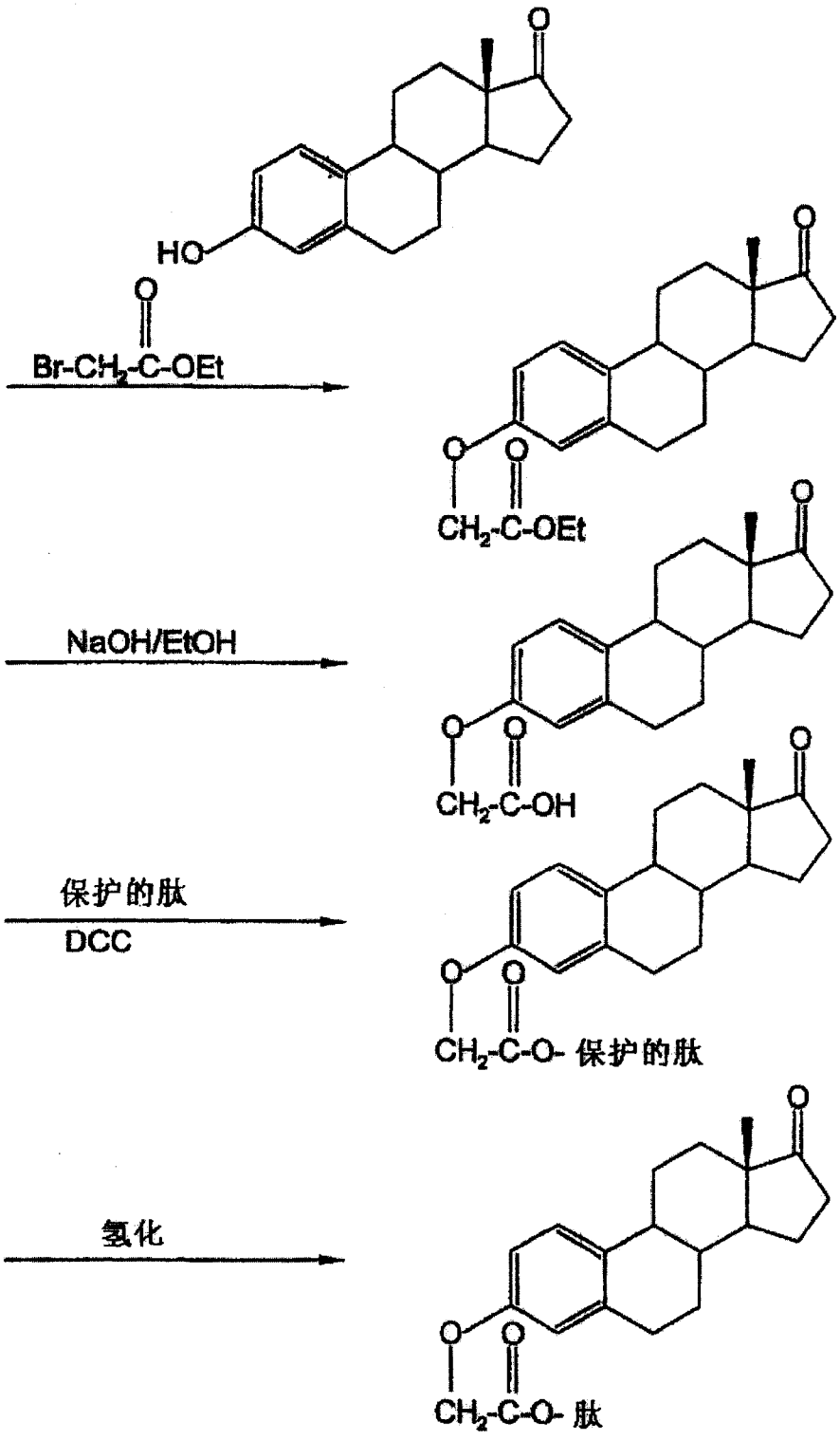

HO
Br-CH2-C-OEt
CH2-C-OEt
NaOH/EtOH
CH2-C-OH
保护的肽
DCC
CH2-C-O- 保护的肽
氢化
CH2-C-O- 肽

图 1

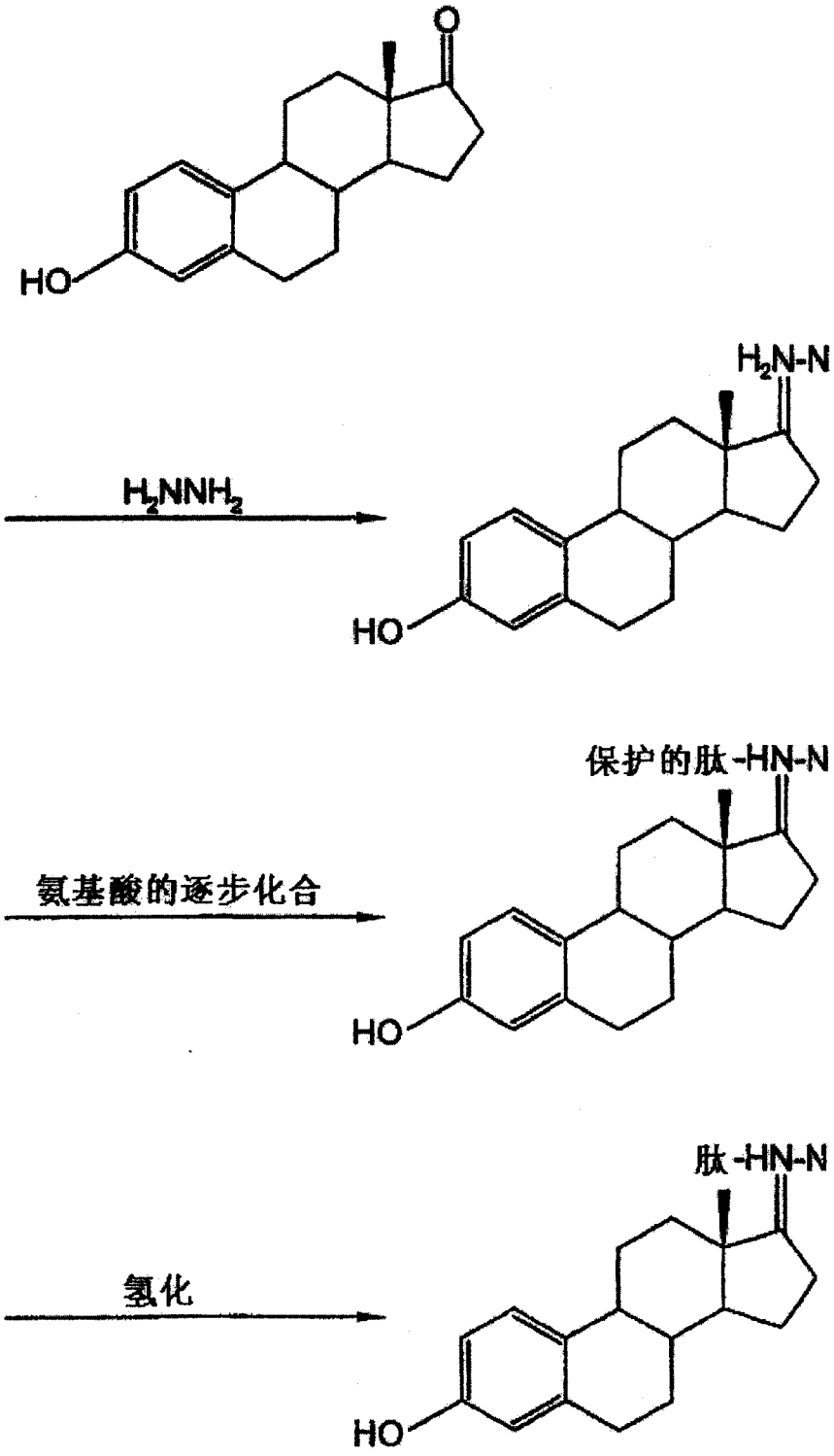


图 2

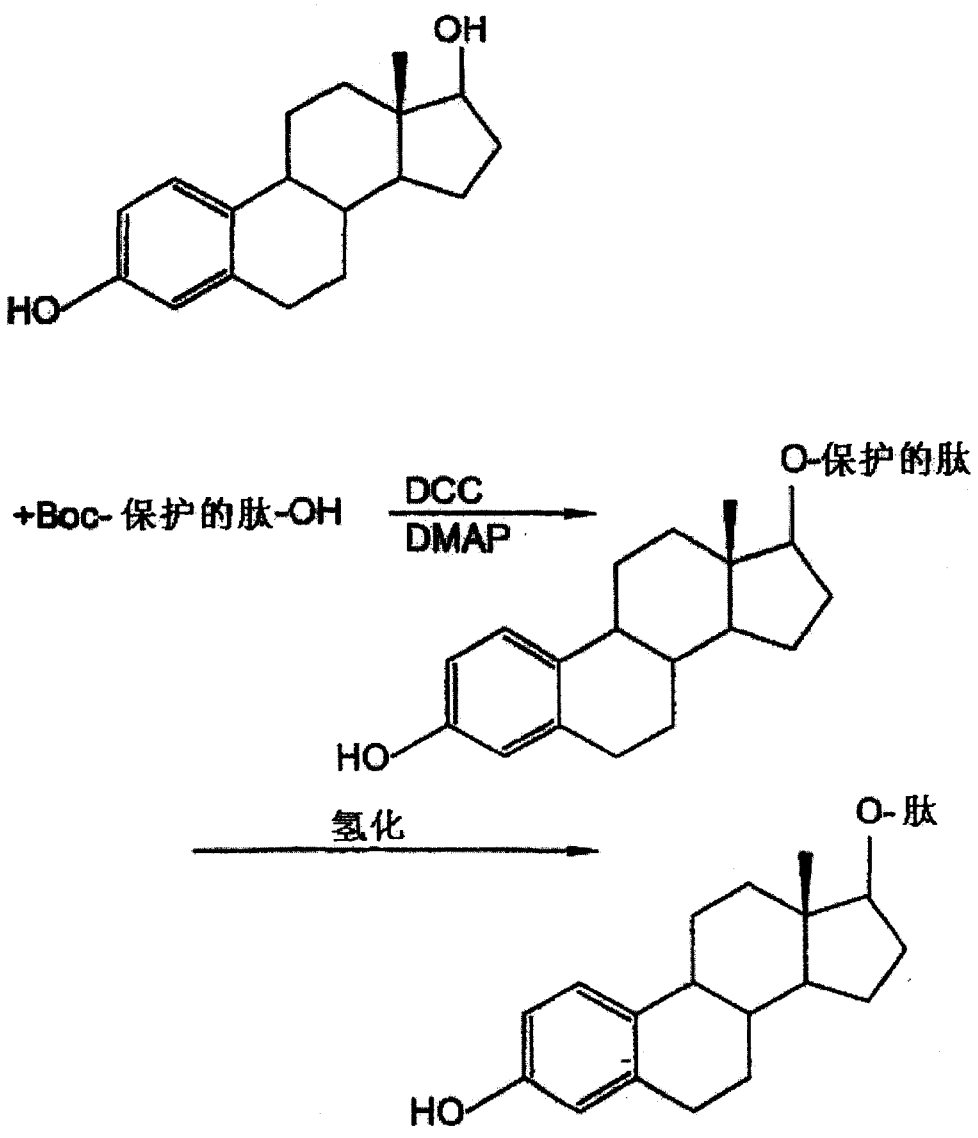


图 3

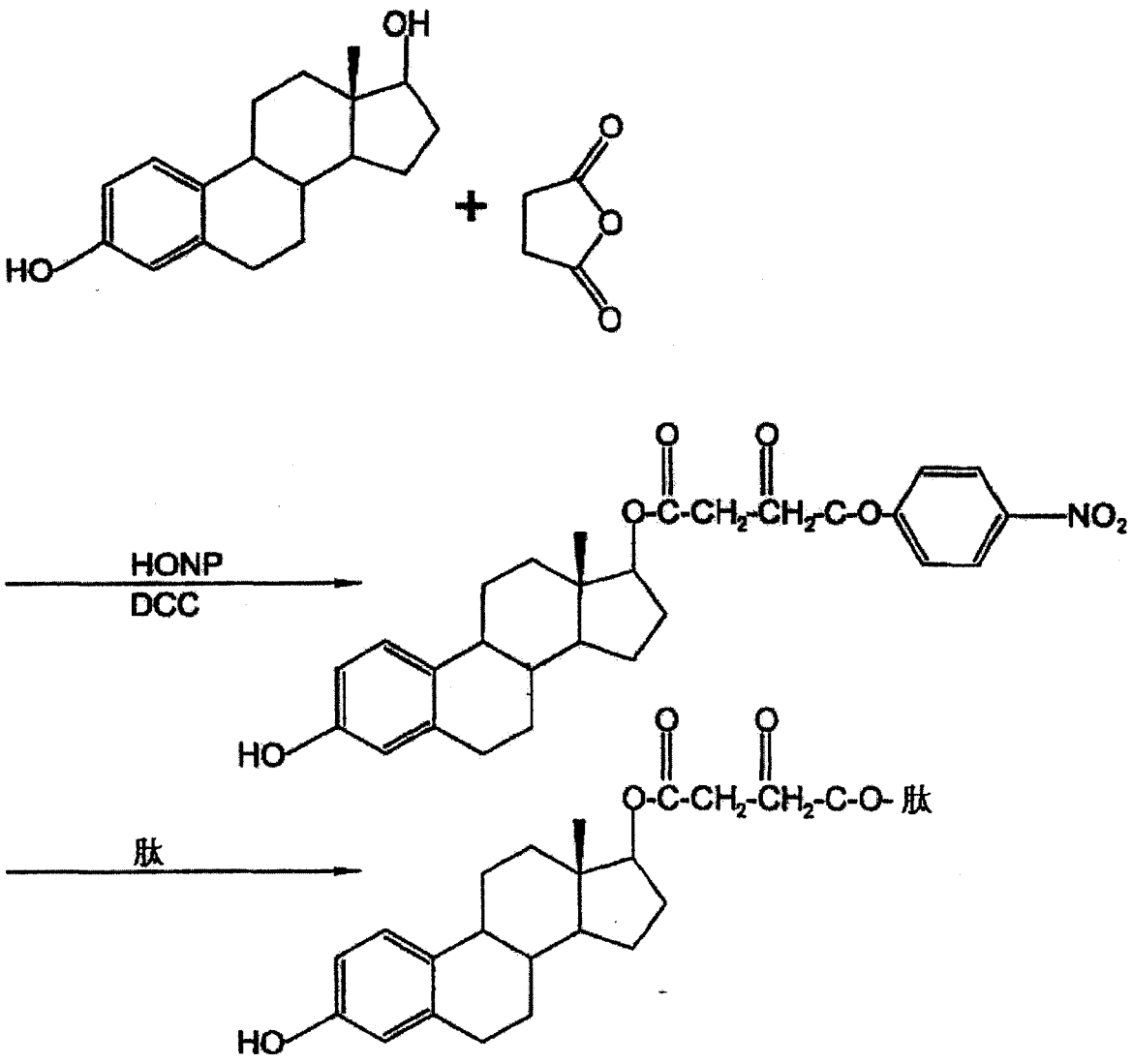


图 4

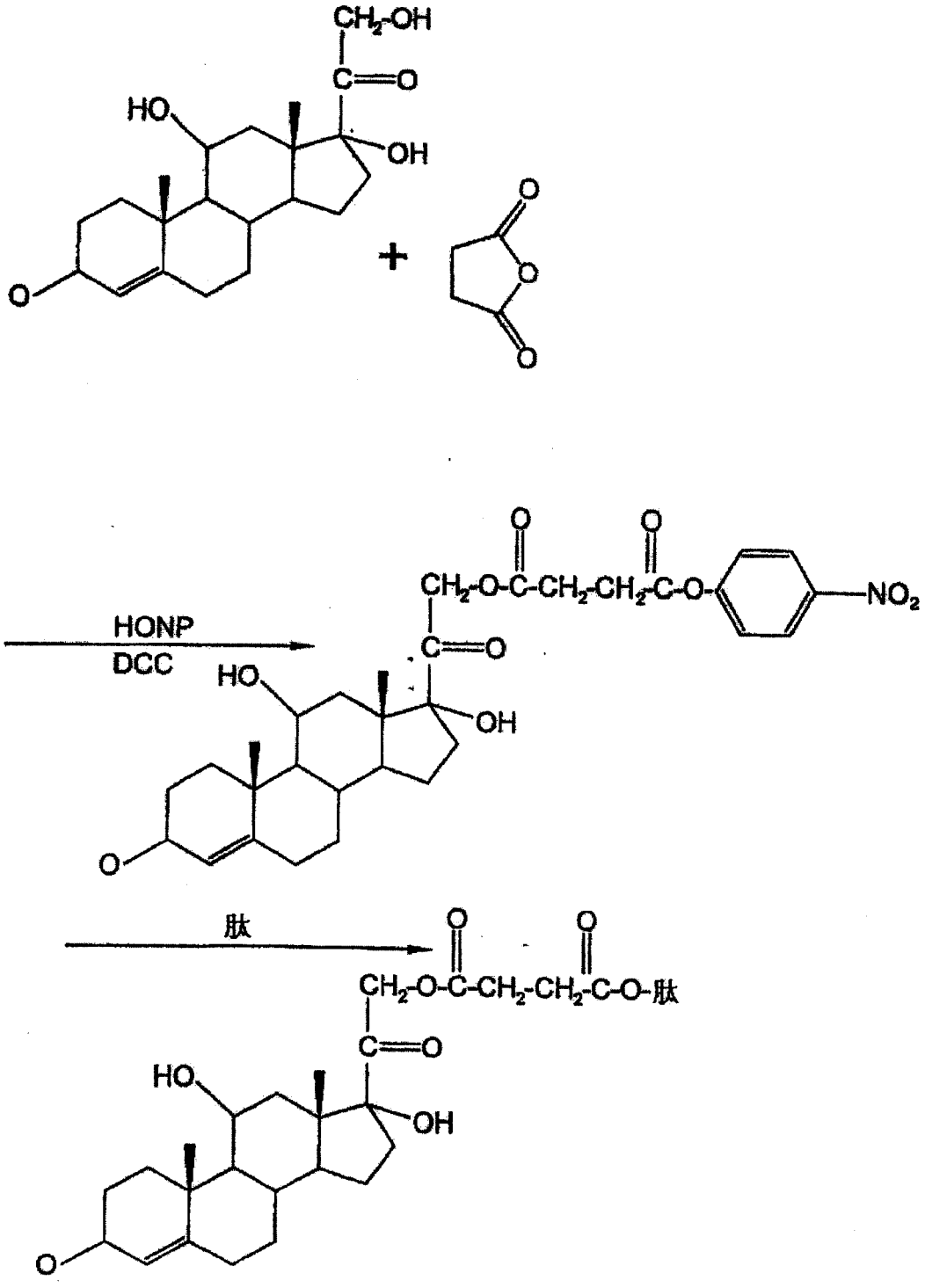

CH2-OH
C=O
HO
OH
O
O
O
O
HONP
DCC
CH2-O-C-CH2-CH2-C-O-
NO2
肽
CH2-O-C-CH2-CH2-C-O-肽

图 5