



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102015753 A

(43) 申请公布日 2011. 04. 13

(21) 申请号 200980112506. 9

(22) 申请日 2009. 01. 26

(30) 优先权数据

61/062347 2008. 01. 25 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 09. 26

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2009/000477 2009. 01. 26

(87) PCT申请的公布数据

W02009/092612 EN 2009. 07. 30

(71) 申请人 海德堡吕布莱希特 - 卡尔斯大学

地址 德国海德堡

(72) 发明人 W · 米尔 U · 哈伯科恩 S · 乌尔班

(74) 专利代理机构 中国专利代理 (香港) 有限公
司 72001

代理人 李进 刘健

(51) Int. Cl.

C07K 14/02 (2006. 01)

A61P 33/02 (2006. 01)

A61P 31/20 (2006. 01)

A61P 35/04 (2006. 01)

A61K 38/00 (2006. 01)

权利要求书 5 页 说明书 29 页 序列表 17 页
附图 19 页

(54) 发明名称

乙型肝炎病毒 (HBV) 的疏水性修饰的 preS- 衍生肽及其作为载体将化合物特异性递送到肝脏的用途

(57) 摘要

本发明涉及乙型肝炎病毒 (HBV) 的疏水性修饰的 preS- 衍生肽,所述肽是多用途载体,用于在体外和体内将化合物特异性递送到肝脏,优选递送到肝细胞。任何类型的化合物,除了特定药物 (例如干扰素、病毒逆转录酶抑制剂或核心装配抑制剂和 / 或标记) 之外,都可特异性靶向肝脏并因此在肝脏中富集。这种肝脏靶向还可用于靶向的诊断、预防和 / 或治疗肝脏疾病或病症 (例如肝炎、疟疾、肝细胞癌 (HCC)), 以及用于预防 HAV、HBV、HCV 和 / 或 HDV 的感染。本发明涉及药物组合物,所述组合物包含所述疏水性修饰的 preS- 衍生肽和特异性递送到肝脏的化合物。本发明还涉及用于联合治疗肝脏疾病以及预防 HAV、HBV、HCV 和 / 或 HDV 感染的方法。本发明还涉及 preS- 衍生肽在基因治疗和免疫原性表位的递送中的用途,所述表位用于肝细胞介导的抗原呈递,以活化肝脏定向的免疫应答。

1. 下式的乙肝病毒 (HBV) 的疏水性修饰的 preS- 衍生肽,

$[H_m-P-R_n]A_o$.

其中

P 是所述 preS- 衍生肽, 所述肽包含:

SEQ ID NO.1 所示的 HBV preS 共有序列的氨基酸序列或其变体,

其中变体优选选自 SEQ ID NO.1 的至少 14 个连续氨基酸的 N- 端截短的和 / 或 C- 端截短的变体; 氨基酸取代或缺失变体; 含有修饰氨基酸、非天然氨基酸或肽模拟物的变体;

H 是所述 preS- 衍生肽 P 的所述疏水性修饰, 所述修饰是

P 的 N- 端并选自

酰化,

优选与羧酸、脂肪酸、C8-C22 脂肪酸、具有亲脂性侧链的氨基酸的酰化,

和添加选自以下的疏水性部分:

胆固醇、胆固醇衍生物、磷脂、糖脂、甘油酯、类固醇、神经酰胺、异戊二烯衍生物、金刚烷、法尼醇、脂族基团、聚芳族化合物,

m 为至少 1,

R 是所述 preS- 衍生肽 P 的 C- 端修饰,

所述修饰优选是选自以下的针对降解的保护部分: 酰胺、D- 氨基酸、修饰的氨基酸、环状氨基酸、白蛋白、天然和合成聚合物例如 PEG、聚糖,

n 为 0 或至少 1,

A 是锚定基团,

优选选自酯、醚、二硫化物、酰胺、硫醇、硫酯,

o 为 0 或至少 1。

2. 权利要求 1 的疏水性修饰的 preS- 衍生肽, 其中 H 是通过选自用豆蔻酰基 (C14)、棕榈酰基 (C16) 或硬脂酰基 (C18) 来酰化的疏水性修饰。

3. 权利要求 1 或 2 的疏水性修饰的 preS- 衍生肽, 其中 H 和 / 或 R 通过接头或间隔物与 P 连接。

4. 权利要求 1-3 中任一项的疏水性修饰的 preS- 衍生肽, 其中 P 包括 SEQ ID NO.1 的至少 20 个连续氨基酸的 N- 端截短的和 / 或 C- 端截短的变体。

5. 权利要求 1-4 中任一项的疏水性修饰的 preS- 衍生肽, 其中 P 包括具有选自 SEQ ID NO.1 所示的 HBV preS 共有序列的氨基酸残基 2-48、残基 2-21、残基 2-20 或残基 9-15 的氨基酸序列的 SEQ ID NO.1 变体。

6. 权利要求 1-5 中任一项的疏水性修饰的 preS- 衍生肽, 其中 P 不包含在 SEQ ID NO.1 残基 9-15 的氨基酸取代和 / 或缺失, 优选不包含在 SEQ ID NO.1 残基 9-22 的氨基酸取代和 / 或缺失。

7. 权利要求 1-6 中任一项的疏水性修饰的 preS- 衍生肽, 其中 P 包含具有不同病毒种、株或亚型的氨基酸序列的 SEQ ID NO.1 变体, 优选具有 HBV 基因型或卷毛猴 HBV (WMHBV) 或其变体的氨基酸序列的 SEQ ID NO.1 变体。

8. 权利要求 7 的疏水性修饰的 preS- 衍生肽, 其中 P 包括选自 SEQ ID NO.2-10 的氨基

酸序列或其变体。

9. 权利要求 1-8 中任一项的疏水性修饰的 preS- 衍生肽，其中 P 包括选自 SEQ ID NO.11-30 和 38 的氨基酸序列或其变体。

10. 权利要求 1-9 中任一项的疏水性修饰的 preS- 衍生肽，其中优选通过氨基酸取代来修饰 SEQ ID NO.1 的氨基酸残基 20-23，和 / 或优选通过氨基酸取代来修饰氨基酸残基 26-32。

11. 权利要求 10 的疏水性修饰的 preS- 衍生肽，其中通过丙氨酸氨基酸取代来修饰 SEQ ID NO.1 的氨基酸残基 20-23，优选修饰成基序 APAF。

12. 权利要求 10 或 11 的疏水性修饰的 preS- 衍生肽，其中通过丙氨酸氨基酸取代来修饰 SEQ ID NO.1 的氨基酸残基 26-32，优选修饰成基序 NANAPDW 或 NAAAPDW。

13. 权利要求 10-12 中任一项的疏水性修饰的 preS- 衍生肽，其中 P 包括选自 SEQ ID NO.31-37 的氨基酸序列或其变体。

14. 权利要求 1-13 中任一项的疏水性修饰的 preS- 衍生肽，其中 P 包括选自 SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.12、SEQ ID NO.13、SEQ ID NO.16、SEQ ID NO.23、SEQ ID NO.26、SEQ ID NO.31 和 SEQ ID NO.38 的氨基酸序列。

15. 权利要求 14 的疏水性修饰的 preS- 衍生肽，其中 H 是通过用硬脂酰基 (C18) 来酰化的疏水性修饰。

16. 权利要求 14 的疏水性修饰的 preS- 衍生肽，其中 H 是通过用豆蔻酰基 (C14) 来酰化的疏水性修饰。

17. 权利要求 1-16 中任一项的疏水性修饰的 preS- 衍生肽，所述肽还包括选自以下的化合物：药物；前药；标记；重组病毒或其衍生物；用于药物、前药或标记的载体或贮库制剂；免疫原性表位。

18. 权利要求 17 的疏水性修饰的 preS- 衍生肽，其中所述化合物选自药物，优选干扰素，例如 IFN α ；

病毒逆转录酶抑制剂；

病毒 RNA 聚合酶抑制剂；

病毒核心装配抑制剂或病毒核壳抑制剂；

激酶抑制剂，例如 Raf 激酶抑制剂；

核苷类似物；

蛋白酶抑制剂；

蛋白酶体抑制剂；

抗体或其片段；

siRNA 或其前体；

法尼基化抑制剂；例如法尼基转移酶抑制剂 (FTI)；

醇脱氢酶 (ADH) 或其激活剂；

胆固醇生物合成抑制剂；

病毒或非病毒性病原体的肝脏期抑制剂；

抗生素。

19. 权利要求 18 的疏水性修饰的 preS- 衍生肽，其中所述药物呈前药的形式。

20. 权利要求 18 或 19 的疏水性修饰的 preS- 衍生肽，其中所述化合物是干扰素，例如 IFN- α 并且 P 优选包括 SEQ ID NO.23 或 SEQ IDNO.38 的氨基酸序列。

21. 权利要求 20 的疏水性修饰的 preS- 衍生肽，其中 H 是通过酰化、优选用豆蔻酰基 (C14) 来酰化的疏水性修饰。

22. 权利要求 17-21 中任一项的疏水性修饰的 preS- 衍生肽，其中所述化合物是选自荧光染料、放射性同位素和造影剂的标记。

23. 权利要求 1-21 中任一项的疏水性修饰的 preS- 衍生肽，其中所述化合物与所述 HBV 的疏水性修饰的 preS- 衍生肽形成缀合物。

24. 权利要求 23 的疏水性修饰的 preS- 衍生肽，其中所述缀合物是通过共价连接或通过形成复合物来形成。

25. 权利要求 24 的疏水性修饰的 preS- 衍生肽，其中所述缀合物通过将化合物与锚定基团 A 共价连接来形成。

26. 权利要求 1-25 中任一项的疏水性修饰的 preS- 衍生肽，其中锚定基团 A 还包含间隔物或接头。

27. 权利要求 26 的疏水性修饰的 preS- 衍生肽，其中所述间隔物或接头包含识别位点，所述位点优选被肝脏蛋白识别，所述肝脏蛋白优选是肝细胞蛋白，更优选是肝细胞蛋白水解酶或细胞色素。

28. 包含以下的药物组合物：

至少一种权利要求 1-16、26 和 27 中任一项的 HBV 的疏水性修饰的 preS- 衍生肽；

至少一种优选如权利要求 17-22 中任一项所限定的待特异性递送到肝脏、优选递送到肝细胞的化合物；

或权利要求 23-25 中任一项所限定的缀合物；和

任选药学上可接受的载体和 / 或赋形剂。

29. 权利要求 1-27 中任一项的疏水性修饰的 preS- 衍生肽作为载体用于将化合物特异性递送到肝脏的用途。

30. 权利要求 29 的用途，其中所述化合物是权利要求 17-21 中任一项所限定的化合物。

31. 权利要求 29 或 30 的用途，其中将化合物特异性递送到肝脏是将所述化合物特异性递送到肝细胞。

32. 权利要求 29-31 中任一项的用途，其中将所述化合物特异性递送到动物、优选哺乳动物或人、或鸟的肝脏。

33. 权利要求 29-32 中任一项的用途，其中所述化合物在肝脏内富集。

34. 权利要求 29-33 中任一项的用途，其中通过肝脏蛋白、优选肝细胞蛋白、更优选肝细胞蛋白水解酶或细胞色素，自 HBV 的疏水性修饰的 preS- 衍生肽的共价缀合物中将所述化合物切离。

35. 用于诊断、预防和 / 或治疗肝脏疾病或病症的权利要求 1-27 中任一项的疏水性修饰的 preS- 衍生肽或权利要求 28 的药物组合物。

36. 权利要求 35 的疏水性修饰的 preS- 衍生肽，其中所述肝脏疾病或病症选自肝炎、肝硬化、血色病，优选由肝炎 A、B、C、D、E、F、G 和 H 型病毒引起的肝炎或由病毒

引起的并发性肝炎。

37. 权利要求 35 或 36 的疏水性修饰的 preS- 衍生肽，其中所述肝脏疾病或病症是涉及病毒或非病毒性病原体的肝脏期的疾病。

38. 权利要求 37 的疏水性修饰的 preS- 衍生肽，其中所述肝脏疾病或病症是热带病、疟疾、血吸虫病和利什曼病。

39. 权利要求 35 的疏水性修饰的 preS- 衍生肽，其中所述肝脏疾病或病症是肝脏肿瘤，优选肝细胞癌（HCC）。

40. 权利要求 35 的疏水性修饰的 preS- 衍生肽，其中所述肝脏疾病或病症是代谢疾病，优选肥胖症、代谢综合征、非酒精性脂肪性肝炎（NASH）。

41. 用于调节肝功能的权利要求 1-27 中任一项的疏水性修饰的 preS- 衍生肽或权利要求 28 的药物组合物。

42. 用于肝细胞-介导的抗原呈递和肝脏定向的免疫应答的活化的权利要求 1-27 和 41 中任一项的疏水性修饰的 preS- 衍生肽或权利要求 28 的药物组合物。

43. 用于预防 HBV 和 / 或 HDV 感染、优选用作疫苗的权利要求 1-27 和 35-42 中任一项的疏水性修饰的 preS- 衍生肽或权利要求 28 的药物组合物。

44. 用于联合诊断、预防和 / 或治疗肝脏疾病或病症并预防 HBV 和 / 或 HDV 感染的权利要求 1-25 和 29-43 中任一项的疏水性修饰的 preS- 衍生肽或权利要求 28 的药物组合物。

45. 权利要求 1-27 中任一项的疏水性修饰的 preS- 衍生肽或权利要求 28 的药物组合物在制备用于诊断、预防和 / 或治疗肝脏疾病或病症的药物中的用途。

46. 用于联合诊断、预防和 / 或治疗肝脏疾病或病症并预防 HBV 和 / 或 HDV 感染的方法，所述方法包括：

给予受试者治疗有效量的：

(a) 包含权利要求 1-16、26 和 27 中任一项所限定的疏水性修饰的 preS- 衍生肽和至少一种权利要求 17-22 中任一项所限定的化合物的缀合物，其中所述缀合物如权利要求 23-25 中任一项所限定；或

(b) 权利要求 28 的药物组合物。

47. 权利要求 46 的方法，其中给药途径选自皮下、静脉内、口服、鼻内、肌内、经皮、吸入、通过栓剂。

48. 权利要求 46 或 47 的方法，其中所述治疗有效量范围是每千克体重 10 μ g 至 1mg。

49. 用于肝脏疾病或病症的基因治疗的包含编码权利要求 1-15 中任一项所限定的 preS- 衍生肽 P 的核酸的病毒载体。

50. 权利要求 49 的病毒载体，其中所述病毒载体是复制缺陷型的，优选是腺伴随病毒载体。

51. 权利要求 49 或 50 的病毒载体，其中所述病毒载体还包含待在肝脏中表达的异源序列。

52. 用于鉴定 HBV 受体的方法，所述方法包括使用：

(a) 包含权利要求 1-16、26 和 27 中任一项所限定的疏水性修饰的 preS- 衍生肽和至少一种权利要求 17-22 中任一项所限定的化合物的缀合物，其中所述缀合物如权利要求

23-25 中任一项所限定；或

(b) 权利要求 28 的药物组合物。

乙肝病毒 (HBV) 的疏水性修饰的 preS- 衍生肽及其作为载体将化合物特异性递送到肝脏的用途

[0001] 本发明涉及乙肝病毒 (HBV) 的疏水性修饰的 preS- 衍生肽 (preS-derived peptide), 所述肽是多用途载体, 用于在体外和体内将化合物特异性递送到肝脏, 优选递送到肝细胞。任何类型的化合物, 除了特定药物 (例如干扰素、病毒逆转录酶抑制剂或核心装配抑制剂和 / 或标记) 之外, 都可特异性靶向肝脏并因此在肝脏中富集。这种肝脏靶向还可用于靶向的诊断、预防和 / 或治疗肝脏疾病或病症 (例如肝炎、疟疾、肝细胞癌 (HCC)), 以及用于预防 HAV、HBV、HCV 和 / 或 HDV 的感染。本发明涉及药物组合物, 所述组合物包含所述疏水性修饰的 preS- 衍生肽和待特异性递送到肝脏的化合物。本发明还涉及用于联合治疗肝脏疾病以及预防 HAV、HBV、HCV 和 / 或 HDV 感染的方法。本发明还涉及 preS- 衍生肽在基因治疗和免疫原性表位的递送中的用途, 所述表位用于肝细胞介导的抗原呈递, 以活化肝脏定向的免疫应答。

[0002] 发明背景

[0003] 肝脏是存在于脊椎动物和其它动物中的一种器官, 在代谢中起到主要作用并在体内具有大量功能, 包括糖原贮存、红细胞分解、血浆蛋白质合成和解毒。肝脏也是人体内最大的腺体。它位于胸腹部的横膈膜下方。它产生胆汁, 这是通过脂肪乳化而有助于消化的一种碱性化合物。它也执行和调节需要特定组织的各种各样高容量的生化反应。

[0004] 肝细胞构成肝脏胞质团的 70-80%。肝细胞参与蛋白质合成, 蛋白质贮存和糖类转化, 胆固醇、胆汁盐和磷脂的合成, 并对外源性和内源性物质进行解毒、修饰和分泌。肝细胞还起始胆汁的形成和分泌。

[0005] 有各种各样的已知肝脏疾病, 例如:

[0006] • 肝炎: 肝脏炎症, 主要是由各种病毒引起, 还可由某些毒物、自身免疫或遗传性病症引起;

[0007] • 肝硬化: 肝脏内形成纤维组织, 取代死亡肝细胞。肝细胞的死亡可以由例如病毒性肝炎、酒精中毒或接触其它肝脏毒性化学物而引起的;

[0008] • 血色病: 造成铁在体内贮积的一种遗传性疾病, 最终导致肝脏损伤;

[0009] • 肝癌: 原发性肝细胞癌 (HCC) 或胆管癌和转移性癌, 通常来自胃肠道的其它部分;

[0010] • 威尔逊病 (Wilson's disease): 引起机体保留铜的一种遗传性疾病;

[0011] • 原发性硬化性胆管炎: 胆管炎性疾病, 本质上是自身免疫。

[0012] • 原发性胆汁性肝硬变: 小胆管的自身免疫性疾病;

[0013] • 巴希综合征 (Budd-Chiari syndrome): 肝静脉阻塞;

[0014] • 吉尔伯综合征 (Gilbert's syndrome): 胆红素代谢遗传病症, 在约 5% 的人群中存在;

[0015] • II 型糖原贮积病: 糖原的贮积引起全身进行性肌无力 (肌病) 并影响各种机体组织, 尤其是在心脏、骨骼肌、肝脏和神经系统。

[0016] 还有多种儿科肝脏疾病，例如胆道闭锁、 α -1-抗胰蛋白酶缺乏、alagille 综合征和进行性家族性肝内胆汁淤积；以及代谢疾病。

[0017] 此外，若干病原体 and 寄生虫，尤其是热带病，在其生命周期期间具有肝脏期。

[0018] 例如疟疾就是一种最常见的传染病和重大公共卫生问题。疟疾由原生动物疟原虫属 (*Plasmodium*) 的寄生虫引起。该病的最严重形式由恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*) 和间日疟原虫 (*Plasmodium vivax*) 引起，但是其它相关物种 (蛋形疟原虫 (*Plasmodium ovale*)、三日疟原虫 (*Plasmodium malariae*) 和有时是诺氏疟原虫 (*Plasmodium knowlesi*)) 也可感染人类。这一类人类病原性疟原虫种类通常称为疟疾寄生虫。疟疾寄生虫由雌性按蚊 (*Anopheles*) 传播。人体内的疟疾发育经过两个时期：红细胞外期 (肝时期或“肝阶段”) 和红细胞内期。当受感染的蚊刺穿人的皮肤吸血时，蚊唾液中的孢子就进入血流并迁移至肝脏。在进入人宿主约 30 分钟内，它们感染肝细胞，进行无性和无症状的繁殖，为期 6-15 天。一旦这些生物体在肝内分化而产生数以千计的裂殖子，其随后使其宿主细胞破裂，逃逸到血液中并感染红细胞，由此开始生命周期的红细胞内期。这种寄生虫从肝脏逃逸时，其自身包裹在受感染的宿主肝细胞的细胞膜中而不会被检测到。这种寄生虫对机体免疫系统的攻击具有相应保护作用，因为对于它在人体内的大部分生命周期而言，它都驻留在肝脏和血细胞内并能相对躲避免疫监视。人们在开发特异性针对疟疾寄生虫的特定肝阶段从而阻止血液阶段发育的药物 (例如伯氨喹 (primaquin)) 上的兴趣不断增加。

[0019] 另一个实例是血吸虫病或裂体吸虫病，这是由几种扁形动物引起的寄生虫病。尽管血吸虫病死亡率低，但它可使人非常衰弱。它是由寄生性扁形动物 (血吸虫) 感染血液引起的一种常见慢性病。它使人虚弱并引起肝肠损害。它在亚洲、非洲和南美洲最常见，尤其是在水体被含有该寄生虫的淡水螺污染的地区。

[0020] 引起乙肝的乙肝病毒 (HBV) 是哺乳动物和鸟类的小的包膜 DNA 病毒家族的原型 (1)。HBV 包膜包含 3 种蛋白质，称为 L- (大)、M- (中) 和 S- (小) (图 1A)。它们共享具有 4 个跨膜区的 C- 端 S- 区。M- 蛋白和 L- 蛋白携带 55 个氨基酸以及随基因型而异的 107 个或 118 个氨基酸 (preS2- 和 preS1) 的额外的 N- 端突出端 (图 1B)。在病毒颗粒中，L、M 和 S 的化学计量比为约 1 : 1 : 4，而更丰富分泌的非感染性亚病毒颗粒 (SVP) 含有几乎全部是 S- 蛋白和仅痕量的 L- 蛋白 (2)。合成期间，L 的 preS1- 结构域被豆蔻酰化并且在 HBV 生命周期的某点通过 ER- 衍生膜而易位。这种修饰对于感染性而言是必不可少的 (3, 4)。HBV 及其它嗜肝病毒具有肝脏趋向性，即肝脏是特异性支持 HBV 生长的组织。

[0021] 药物的特异性靶向旨在改善治疗功效。在 1906 年，Paul Ehrlich 引入“魔弹 (magic bullet)”一词，用于研究最佳治疗策略。从此，在药物靶向方面的研究就一直集中在开发载体系统上，所述系统增加了靶组织 (例如肿瘤或病原体) 中的药物治疗浓度并因此减少对生物体整体的副作用。理想的是，药物靶向应当满足下列标准：1) 将药物特异性地转移至所需作用部位；2) 对其它组织的作用最小化；3) 药理学惰性载体的使用。

[0022] 为了将药物携带至特定组织，研究了不同策略。这些策略是例如使用前药，所述前药在靶组织中通过组织特异性酶释放出药理学活性部分。再一种可能性是将有效的、非组织特异性药物与组织特异性的、但药理学上惰性的载体系统 (例如受体-亲和肽

或胶体颗粒)偶联。

[0023] 各种药物载体已经用于增强药物的肝脏靶向。一个直接的方法是基于通过递送在特定载体(例如脂质体和微球体)中的药物并通过肝脏中的网状内皮系统的活性吞噬作用。例如,已经证明在静脉注射之后,掺有药物的颗粒载体主要由肝脏中的网状内皮系统捕获,导致药物对肝脏的靶向(5)。另一方面,带正电荷的水溶性聚合物的药物对肝脏的靶向是基于来自肝脏血管系统的大部分水溶性物质的自由溢出以及肝细胞表面的负电荷(6)。因此,根据这样的肝脏解剖特征和生化特征,聚合物已经用作载体,以允许药物靶向肝脏。已经试图通过使用肝细胞的去唾液酸糖蛋白受体,进行更特异性的药物对肝脏的靶向。去唾液酸糖蛋白受体(半乳糖受体)以高密度存在于肝细胞上。另外,一旦配体与半乳糖受体结合,配体-受体复合物就会内在化,允许细胞摄取半乳糖基化配体(7)。

[0024] US 7,001,760 B2 公开了源自乙肝病毒(HBV)的重组载体,其可用于基因治疗,例如将治疗用基因递送到肝细胞并在肝细胞内表达异源基因。然而,HBV 载体对于包装基因而言具有有限容量。

[0025] 然而,迄今为止,还没有特异性靶向动物(尤其是人)或鸟类的肝脏器官并同时所需化合物或药物特异性递送到肝脏的通用诊断、治疗和/或预防方法。

[0026] 因此,需要在受试者中特异性靶向肝脏器官并将所需化合物或药物特异性递送到肝脏的通用诊断、治疗和/或预防方法。

[0027] 此外,还没有在受试者中特异性靶向肝脏器官并将所需化合物或药物特异性递送到肝脏且同时阻止乙肝病毒和丁肝病毒侵入肝细胞的通用诊断、治疗和/或预防方法。

[0028] 此外,需要用抗原性表位对肝脏进行特异性靶向,以触发免疫系统,例如用于免疫接种。

[0029] 因此,本发明旨在提供用于有效的特异性靶向的肝脏疾病诊断、预防和/或治疗和肝功能调节的工具(means)和方法。

[0030] 发明概述

[0031] 依照本发明,通过提供 HBV 的疏水性修饰的 preS- 衍生肽来解决该目的。

[0032] 所述疏水性修饰的 preS- 衍生肽具有以下通式:

[0033] $[H_m-P-R_n]A_o$ 。

[0034] P 是所述 preS- 衍生肽并包含“HBV 共有序列”或其变体的氨基酸序列。

[0035] H 是 preS- 衍生肽 P 的所述疏水性修饰,所述修饰是 P 的 N- 端修饰并选自酰化和添加疏水性部分;其中 m 为至少 1。

[0036] R 是所述 preS- 衍生肽 P 的任选的 C- 端修饰(即 n 为 0 或至少 1)。

[0037] A 是任选的锚定基团(即 o 为 0 或至少 1),所述基团适于所述化合物的共价连接并连接 H、P 和/或 R。

[0038] 依照本发明,还通过提供药物组合物来解决该目的,所述组合物包含至少一种本文所定义的 HBV 的疏水性修饰的 preS- 衍生肽和至少一种本文所定义的待特异性递送到肝脏、优选递送到肝细胞的化合物和任选的药学上可接受的载体和/或赋形剂。

[0039] 依照本发明,还通过使用 HBV 的疏水性修饰的 preS- 衍生肽作为载体或穿梭物

(shuttle)，用于将化合物特异性递送到肝脏，来解决该目的。

[0040] 依照本发明，还通过提供 HBV 的疏水性修饰的 preS- 衍生肽或本发明的药物组合物，用于诊断、预防和 / 或治疗肝脏疾病或病症或者用于调节肝功能，来解决该目的。

[0041] 依照本发明，还通过使用 HBV 的疏水性修饰的 preS- 衍生肽或本发明的药物组合物，用于制备诊断、预防和 / 或治疗肝脏疾病或病症的药物，来解决该目的。

[0042] 依照本发明，还通过用于诊断、预防和 / 或治疗肝脏疾病或病症的方法，通过使用 HBV 的疏水性修饰的 preS- 衍生肽或本发明的药物组合物，来解决该目的。

[0043] 依照本发明，还通过提供用于联合诊断、预防和 / 或治疗肝脏疾病或病症以及预防 HBV 和 / 或 HDV 感染的方法，通过给予受试者本文所定义的缀合物或药物组合物，来解决该目的；所述缀合物包含 HBV 的疏水性修饰的 preS- 衍生肽和化合物。

[0044] 依照本发明，还通过提供包含编码本文所定义的 preS- 衍生肽 P 的核酸的病毒载体用于肝脏疾病或病症的基因治疗的应用，来解决该目的。

[0045] 本发明优选实施方案的描述

[0046] 在更详细地描述本发明之前，应当知道，本发明并不限于本文所述的具体方法、方案和试剂，因为它们可能不同。也应当知道，本文所用的术语仅仅用于描述具体实施方案的目的，不得视为限制仅由所附权利要求限定的本发明的范围。除非另有说明，否则本文所用的所有科技术语都具有本领域普通技术人员公知的含义。为了本发明的目的，本文所引用的所有参考文献都通过引用全部结合到本文中。

[0047] HBV 的疏水性修饰的 preS- 衍生肽

[0048] 如上所述，本发明提供乙肝病毒 (HBV) 的疏水性修饰的 preS- 衍生肽。

[0049] HBV 包膜包含 3 种蛋白质，称为 L(大)、M(中)和 S(小)(参见图 1A)。它们共享具有 4 个跨膜区的 C- 端 S- 区。M- 蛋白和 L- 蛋白携带 55 个氨基酸以及随基因型而异的 107 个或 118 个氨基酸 (preS2- 和 preS1) 的额外的 N- 端突出端 (参见图 1B)。

[0050] 因此，本发明的 HBV 的术语 “preS- 衍生” 肽是指具有以下氨基酸序列的肽，所述序列对应于 HBV 的 L- 蛋白 N- 端突出端 preS1，优选对应于种 (species) 和基因型 A-H 的共有序列以及卷毛猴 (woolly monkey) (WMHBV)、黑猩猩和大猩猩 (gorilla) 的乙肝病毒的共有序列，但它也指其变体，优选 N- 端截短的和 / 或 C- 端截短的变体、氨基酸取代变体。

[0051] SEQ ID NO.1 表示种和基因型 A-H 以及卷毛猴 (WMHBV) 的 HBV preS 共有氨基酸序列。

[0052] 参见图 2 中的比对，显示 HBV preS 共有序列 (共有) 和 8 个 HBV 基因型 (A-H) 以及包含氨基酸 2-48 的卷毛猴 HBV (WMHBV) preS 序列。注意基因型 A、B、C、E、F、G 和 H 在其 N- 端具有至多 11 个额外氨基酸。

[0053] 在本申请中，HBV “基因型 C” 的氨基酸序列是指人工序列，其对应于 HBV 基因型 C 或与其相同，例如示于 Genbank ABV02850.1，除了位置 46 (按照下述编号) 在本发明基因型 C 中是 Lys(K) 而不是 Genbank 序列中的 Gln(Q) 之外；本申请的 HBV 基因型 C 序列也可称为 “HBV 基因型 C Q46K”。另见 SEQ ID NO.4、12、21-27。

[0054] 图 2 也显示 HBV preS 共有序列的氨基酸残基编号，所述编号将在整篇说明书中

引用。

[0055] 氨基酸残基号 1 是基因型 D (先前描述为亚型 ayw, 另见 SEQ ID NO.5) 的甲硫氨酸 (Met1), 而氨基酸残基号 (-11) 是基因型 C (SEQ ID NO.4) 的甲硫氨酸 (Met(-11))。体内 Met1 或 Met(-11) 分别被细胞甲硫氨酰氨肽酶切除并在随后通过 N-豆蔻酰基转移酶使豆蔻酰基从豆蔻酰-CoA 中分别转移给氨基酸残基号 2 甘氨酸 (Gly2) 或氨基酸残基号 (-10) 甘氨酸 (Gly(-10)) 而得以修饰。基因型 D 的 N-端氨基酸残基是天然氨基酸甘氨酸 (Gly2) 并且按照来自 L 的潜在的 (underlying) 可读框密码子的相应编号而编号为 2 (或者例如基因型 C 的 Gly(-10))。

[0056] HBV preS 共有序列还包括基因型 A、B、C、E、F、G 和 H 的额外 N-端氨基酸 (指定为 “-” 位)。因此, HBV preS 共有序列总共包括位置 (-11) 至 48。

[0057] 因此, 上述编号与例如 SEQ ID NO.1 中的氨基酸的实际编列之间有差异。

[0058] Met(-11), 残基号 (-11), 编列为 SEQ ID NO.1 的氨基酸残基 1;

[0059] Gly(-10), 残基号 (-10), 编列为 SEQ ID NO.1 的氨基酸残基 2;

[0060] Met 1, 残基号 1, 编列为 SEQ ID NO.1 的氨基酸残基 12;

[0061] Gly 2, 残基号 2, 编列为 SEQ ID NO.1 的氨基酸残基 13;

[0062] Gly 48, 残基号 48, 编列为 SEQ ID NO.1 的氨基酸残基 58。

[0063] SEQ ID NO : 1HBV preS 共有序列 (位置 (-11)-48)

[0064] (-11)-M GGWSS TPRKG MGTNL SVPNP LGFFP DHQLDPAFRA NSNNP
DWDFN PNKDH WPEAN KVG-48

[0065] SEQ ID NO : 2HBV 基因型 A

[0066] (-11)-M GGWSS KPRKG MGTNL SVPNP LGFFP DHQLDPAFGA NSNNP
DWDFN PVKDD WPAAN QVG-48

[0067] SEQ ID NO : 3HBV 基因型 B

[0068] (-11)-M GGWSS KPRKG MGTNL SVPNP LGFFP DHQLDPAFKA NSENP
DWDLN PHKDN WPDAN KVG-48

[0069] SEQ ID NO : 4 人工氨基酸序列, 其对应于 HBV 基因型 C, 除了位置 46 是 Lys(K) 而不是 Gln(Q) 之外; Q46K

[0070] (-11)-M GGWSS KPRQG MGTNL SVPNP LGFFP DHQLDPAFGA NSNNP
DWDFN PNKDH WPEAN KVG-48

[0071] SEQ ID NO : 5HBV 基因型 D

[0072] 1-MGQNL STSNP LGFFP DHQLD PAFRA NTANP DWDFNPNKDT WPDAN
KVG-48

[0073] SEQ ID NO : 6HBV 基因型 E

[0074] (-10)-MGLSW TVPLE WGKNI STTNP LGFFP DHQLDPAFRA NTRNP DWHDN
PNKDH WTEAN KVG-48

[0075] SEQ ID NO : 7HBV 基因型 F

[0076] (-11)-M GAPLS TTRRG MGQNL SVPNP LGFFP DHQLDPLFRA NSSSP
DWDFN TNKDS WPMAN KVG-48

[0077] SEQ ID NO : 8HBV 基因型 G

[0078] (-10)-MGLSW TVPLE WGKNL SASNP LGFLP DHQLDPAFRA NTNPN DWDFN
PKKDP WPEAN KVG-48

[0079] SEQ ID NO : 9HBV 基因型 H

[0080] (-11)-M GAPLS TARRG MGQNL SVPNP LGFFP DHQLDPLFRA NSSSP
DWDFN TNKDN WPMAN KVG-48

[0081] SEQ ID NO : 10WMHBV

[0082] 1-MGLNQ STFNP LGFFP SHQLD PLFKA NAGSA DWDKNPNKDPWPQAH
DTA-48

[0083] 对于 SEQ ID NO.2-10, 另见 Genbank 检索号 :

[0084] HBV 基因型 A Genbank AAT28684.1

[0085] HBV 基因型 B Genbank AAU01950.1

[0086] HBV 基因型 C Genbank ABV02850.1 (其中位置 46 是 Lys(K) (在 SEQ ID NO.4
中) 而不是 Gln(Q) (在 ABV02850.1 中)

[0087] HBV 基因型 D Genbank AAR19337.1

[0088] HBV 基因型 E Genbank ABS31101.1

[0089] HBV 基因型 F Genbank ABK19774.1

[0090] HBV 基因型 G Genbank AAF34735.1/AF1605013

[0091] HBV 基因型 H Genbank AAM09052.1

[0092] WMHBV Genbank AAC16905.1

[0093] 本发明 HBV 的疏水性修饰的 preS- 衍生肽具有下式 :

[0094] $[H_m-P-R_n]A_o$

[0095] 其中

[0096] P 是所述 preS- 衍生肽 ;

[0097] H 是 P 的所述疏水性修饰 ;

[0098] R 是 P 的 C- 端修饰 ;

[0099] A 是锚定基团 ;

[0100] m 为至少 1 ;

[0101] n 为 0 或至少 1 ;

[0102] o 为 0 或至少 1。

[0103] 优选地, n 和 o 不同时为 0。

[0104] 本发明的 HBV 的 preS- 衍生肽 P 包括 :

[0105] -HBV preS 共有序列的氨基酸序列, 示于 SEQ ID NO.1 或

[0106] - 其变体。

[0107] “变体” 优选为 N- 端截短的和 / 或 C- 端截短的变体、氨基酸取代或缺失变体、
或延长变体。变体还包括含有修饰氨基酸、非天然氨基酸或肽模拟物或可模拟肽主链 /
结构的另外的化合物的氨基酸序列。

[0108] 优选地, 变体选自 SEQ ID NO.1 的 N- 端截短的和 / 或 C- 端截短的变体 ; 氨基
酸取代或缺失变体 ; 含有修饰氨基酸、非天然氨基酸或肽模拟物或可模拟肽主链 / 结构
的另外的化合物的氨基酸序列的变体。

[0109] 依照本发明，疏水性修饰的 preS- 衍生肽的变体含有 SEQ ID NO.1 的至少 10 个或 20 个连续氨基酸并且可由 SEQ ID NO.1 或其变体的 11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48 个或更多个氨基酸组成。

[0110] N- 端截短的和 / 或 C- 端截短的变体包括 SEQ ID NO.1 的优选至少 14 个连续氨基酸（例如残基 5-18），更优选至少 19 个连续氨基酸（例如残基 2-20），甚至更优选至少 20 个连续氨基酸（例如残基 2-21）。

[0111] 术语“变体”也指在嗜肝 DNA 病毒属的不同病毒种、株或亚型中发现的同源序列，例如 HBV α 1 株、HBV LSH 株（黑猩猩分离物）、卷毛猴 HBV (WMHBV)、或选自 HBV 基因型 A-H 的毒株、以及本文所定义的 HBV 基因型 C 即 Q46K（例如 SEQ ID NO.4）。

[0112] 术语“变体”也指与 SEQ ID NO.1 或本文所公开的任何其它氨基酸序列具有至少 50% 序列同一性、优选 70%、更优选 80%、甚至更优选 90% 或 95% 序列同一性的同源序列。

[0113] 因此，在本发明优选的疏水性修饰的 preS- 衍生肽中，P 包括具有不同病毒种、株或亚型（优选 HBV 基因型或卷毛猴 HBV (WMHBV) 或其变体）的氨基酸序列的 SEQ ID NO.1 变体。

[0114] 优选地，P 包括选自 SEQ ID NO.2-10 或其变体的氨基酸序列（另见图 2）。

[0115] 在一个优选的实施方案中，在本发明的疏水性修饰的 preS- 衍生肽中，P 包括具有选自 SEQ ID NO.1 所示的 HBV preS 共有序列的以下氨基酸序列的 SEQ ID NO.1 变体：

[0116] 氨基酸残基 2-48 [SEQ ID NO.11]

[0117] 氨基酸残基 2-20

[0118] 氨基酸残基 2-21 [SEQ ID NO.12]

[0119] 氨基酸残基 9-15 [SEQ ID NO.21]。

[0120] 更优选地，P 不包含在 SEQ ID NO.1 残基 9-22 的氨基酸取代和 / 或缺失，例如缺失残基 17-21。

[0121] 更优选地，P 不包含在 SEQ ID NO.1 残基 9-15 的氨基酸取代和 / 或缺失。

[0122] 更优选地，序列基序 NPLGFFP（对应于 SEQ ID NO.1 残基 9-15）不被中断或不被例如由 D- 氨基酸置换残基 11-15 来修饰。

[0123] 本发明人已经证明，这些氨基酸残基对于 HBV 的疏水性修饰的 preS- 衍生肽的肝脏趋向性而言是重要的，如下所述。

[0124] 更优选地，在本发明的疏水性修饰的 preS- 衍生肽中，P 包括具有选自以下氨基酸序列的 SEQ ID NO.1 变体：

[0125] 共有序列的氨基酸残基 2-48 [SEQ ID NO.11]；

[0126] 共有序列的氨基酸残基 2-21 [SEQ ID NO.12]；

[0127] 基因型 C 的氨基酸残基 2-48 [SEQ ID NO.13]；

[0128] 基因型 C 的氨基酸残基 5-48 [SEQ ID NO.14]；

[0129] 基因型 C 的氨基酸残基 9-48 [SEQ ID NO.15]；

[0130] 基因型 C 的氨基酸残基 2-21 [SEQ ID NO.16]；

- [0131] 基因型 C 的氨基酸残基 5-21 [SEQ ID NO.17] ;
- [0132] 基因型 C 的氨基酸残基 9-21 [SEQ ID NO.18] ;
- [0133] 基因型 C 的氨基酸残基 2-15 [SEQ ID NO.19] ;
- [0134] 基因型 C 的氨基酸残基 5-15 [SEQ ID NO.20] ;
- [0135] 基因型 C 的氨基酸残基 9-15 [SEQ ID NO.21] ;
- [0136] 基因型 D 的氨基酸残基 2-48 [SEQ ID NO.23] ;
- [0137] 基因型 D 的氨基酸残基 5-48 [SEQ ID NO.24] ;
- [0138] 基因型 D 的氨基酸残基 9-48 [SEQ ID NO.25] ;
- [0139] 基因型 D 的氨基酸残基 2-21 [SEQ ID NO.26] ;
- [0140] 基因型 D 的氨基酸残基 5-21 [SEQ ID NO.27] ;
- [0141] 基因型 D 的氨基酸残基 9-21 [SEQ ID NO.28] ;
- [0142] 基因型 D 的氨基酸残基 2-20 [SEQ ID NO.38] ;
- [0143] 基因型 D 的氨基酸残基 2-15 [SEQ ID NO.29] ;
- [0144] 基因型 D 的氨基酸残基 5-15 [SEQ ID NO.30] ;
- [0145] 基因型 D 的氨基酸残基 9-15 [SEQ ID NO.21]。
- [0146] 因此, 优选地, P 包括选自 SEQ ID NO.11-30 和 38 或其变体的氨基酸序列。
- [0147] SEQ ID NO.1 的“变体”也包括这样的变体或“类似物”: 其包含氨基酸缺失、氨基酸取代(例如被其它氨基酸或被等构物(修饰的氨基酸, 其具有与蛋白质氨基酸接近的结构和空间相似性)保守取代或非保守取代)、氨基酸添加或等构物添加, 只要序列仍具有肝脏趋向性, 优选在 1 小时后大于 10% 注射剂量 /g 肝脏组织即可。
- [0148] 保守氨基酸取代通常涉及同类型氨基酸之间的取代。 这些类型包括例如:
- [0149] - 具有不带电荷的极性侧链的氨基酸, 例如天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸;
- [0150] - 具有碱性侧链的氨基酸, 例如赖氨酸、精氨酸和组氨酸;
- [0151] - 具有酸性侧链的氨基酸, 例如天冬氨酸和谷氨酸; 和
- [0152] - 具有非极性侧链的氨基酸, 例如甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸和半胱氨酸。
- [0153] 优选地, 对本发明的疏水性修饰的 preS- 衍生肽进行修饰以降低其免疫原性。
- [0154] 因此, 待通过取代和 / 或缺失而修饰的优选的序列基序是负责免疫原性的序列, 例如 B 细胞表位和 / 或 T 细胞表位。
- [0155] HBV 的 B 细胞表位优选为 SEQ ID NO.1 的氨基酸残基 20-23(基序 DPAF) 和共有序列 (SEQ ID NO.1) 和基因型 C (SEQ ID NO.4) 的氨基酸残基 26-32(基序 NSNNPDW) 或基因型 D (SEQ ID NO.5) 的氨基酸残基 26-32(基序 NTANPDW)。
- [0156] 在一个优选的实施方案中, 优选通过氨基酸取代来修饰 SEQ ID NO.1 的氨基酸残基 20-23, 和 / 或优选通过氨基酸取代来修饰氨基酸残基 26-32。
- [0157] 优选地, 通过丙氨酸氨基酸取代来修饰 SEQ ID NO.1 的氨基酸残基 20-23(基序 DPAF), 优选修饰成基序 APAF。
- [0158] 优选地, 通过丙氨酸氨基酸取代来修饰 SEQ ID NO.1 的氨基酸残基 26-32, 优选修饰成基序 NANAPDW 或 NAAAPDW。

[0159] 待通过取代和 / 或缺失来修饰的其它优选序列基序是作为抗体识别基序的序列。

[0160] 对于负责免疫原性的序列 (例如 B 细胞表位) 的修饰, 一个优选的目标就是降低本发明疏水性修饰的 preS- 衍生肽的免疫原性。本领域技术人员知道该目标及其有点和缺点。重要的是, 在降低本发明疏水性修饰的 preS- 衍生肽的免疫原性的同时, 也得考虑所需的肝脏靶向 / 趋向性特性。可重复给予不诱导免疫应答的穿梭肽 (shuttle peptide), 而该肽不会从体液免疫应答中系统地除去 (systemic removal)。

[0161] 因此, 在一个优选的实施方案中, P 不包含在 SEQ ID NO.1 残基 9-15 处的氨基酸取代和 / 或缺失, 以保持肝脏靶向 / 趋向性。

[0162] 本发明的更优选的疏水性修饰的 preS- 衍生肽表现出高肝脏靶向 / 趋向性和低或无免疫原性。

[0163] 在一个优选的实施方案中, P 包含选自 SEQ ID NO.31-37 的氨基酸序列或其变体。

[0164] 另见表和相应的附图和实施例。

[0165] 在一个更优选的实施方案中, P 包含选自以下的氨基酸序列:

[0166] SEQ ID NO.11 (共有序列的残基 2-48),

[0167] SEQ ID NO.12 (共有序列的残基 2-21),

[0168] SEQ ID NO.13 (基因型 C 的残基 2-48),

[0169] SEQ ID NO.16 (基因型 C 的残基 2-21),

[0170] SEQ ID NO.23 (基因型 D 的残基 2-48),

[0171] SEQ ID NO.26 (基因型 D 的残基 2-21),

[0172] SEQ ID NO.38 (基因型 D 的残基 2-20), 和

[0173] SEQ ID NO.31 (基因型 C 的残基 2-48 和在位置 21、23、29 和 30 的 Ala 突变)。

[0174] 以上是优选的氨基酸序列, 所述序列符合所需特性的优选组合: 短氨基酸序列、低或无免疫原性以及有效的肝脏靶向。

[0175] preS- 衍生肽 P 的疏水性修饰 (H) 是 P 的 N- 端。

[0176] “N- 端” 是指在 N- 端 (即相应的第一个氨基酸残基 (例如 Gly2)) 的疏水性修饰, 但也包括接近 N- 端的疏水性修饰, 例如相应的氨基酸残基 (-4)、(-3)、(-2)、(-1)、1、2 或 3 或 4。因此, 还可通过将疏水性部分在接近 P 的 N- 端位置处连接来得到疏水性修饰。

[0177] 本发明 HBV 的所述 preS- 衍生肽的疏水性修饰将疏水性部分添加到所述肽上。

[0178] 此外, m 为至少 1, 即用至少一个疏水性部分或基团来修饰。

[0179] 在本发明的优选实施方案中, m 为 1、2、3、4 或更大。也就是说, 可用不止 1 个 (例如 2 个) 疏水性部分或基团来修饰 P。疏水性部分或基团可以彼此相同或不同。

[0180] 本发明 HBV 的所述 preS- 衍生肽的疏水性修饰选自:

[0181] - 酰化;

[0182] - 添加疏水性部分。

[0183] 酰化优选选自用羧酸、脂肪酸、具有亲脂性侧链的氨基酸来酰化。

[0184] 优选的脂肪酸是饱和或不饱和的脂肪酸、支链或非支链的脂肪酸, 优选具有

8-22 个碳原子 (C8-C22)。

[0185] 更优选地, 通过酰化的疏水性修饰选自用豆蔻酰基 (C14)、棕榈酰基 (C16) 或硬脂酰基 (C18) 来酰化。

[0186] 在体内和医学应用上优选豆蔻酰化修饰, 因其安全性较高, 例如没有硬脂酰基的不良反应 (先天免疫应答 (innate immune response) 等)。

[0187] 疏水性部分的添加优选选自添加胆固醇、胆固醇衍生物、磷脂、糖脂、甘油酯、类固醇、神经酰胺 (ceramids)、异戊二烯衍生物、金刚烷、法尼醇、脂族基团、聚芳族化合物。

[0188] 疏水性部分的连接优选通过共价结合, 其可通过氨基甲酸酯、酰胺、醚、二硫化物或本领域技术人员技术之内的任何其它连接来实现。

[0189] 因此, 本发明的疏水性修饰的、优选酰化的 preS- 衍生肽优选是脂肽, 这是由于其 N- 端亲脂性或疏水性基团 / 部分。

[0190] 所述 preS- 衍生肽 P 的 C- 端修饰 (R) 优选是用针对降解 (例如体内降解) 的保护部分来修饰。

[0191] “C- 端” 是指在 C- 端 (即在相应的最后氨基酸残基) 处的修饰, 但也包括接近 C- 端的修饰, 例如倒数第一个氨基酸残基、倒数第二个氨基酸残基或更前的氨基酸残基 (例如引入一个 D- 氨基酸, 其可保护载体免遭羧肽酶作用而导致的酶促降解)。

[0192] 技术人员将根据相应的应用来选择相应的合适的部分。

[0193] 优选的针对降解的保护部分选自酰胺、D- 氨基酸、修饰氨基酸、环状氨基酸、白蛋白、天然和合成聚合物 (例如 PEG、聚糖 (glycane))。

[0194] 此外, n 为 0 或至少 1, 即 C- 端修饰 (R) 是任选的。

[0195] 优选地, n 为 1。

[0196] 在本发明的进一步的实施方案中, n 为 1、2、3、4 或更大。也就是说, 可用不止 1 个 (例如 2 个) 部分或基团来修饰 P 的 C- 端或其附近。所述部分或基团可以彼此相同或不同。

[0197] 在本发明的一个实施方案中, H 和 / 或 R 通过接头或间隔物与 P 连接。

[0198] 接头或间隔物是技术人员已知的, 例如聚丙氨酸、聚甘氨酸 (polyglycin)、糖类、(CH₂)_n 基团。

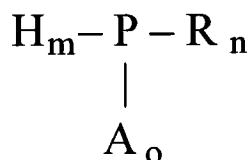
[0199] 因此, 技术人员将能够根据相应的应用来选择相应的合适接头或间隔物。

[0200] 锚定基团 (A) 可作为化合物、标签、标记的连接点。

[0201] 在一个优选的实施方案中, 锚定基团是 P 的 “C- 端”, 其中 “C- 端” 是指在 C- 端 (即在相应的最后氨基酸残基) 处的修饰, 但也包括接近 C- 端的修饰, 例如倒数第一个氨基酸残基、倒数第二个氨基酸残基或更前的氨基酸残基。在此情况下, n 可以是 0, 因此, 没有其它 C- 端修饰 R。

[0202] 在该实施方案中, HBV 的疏水性修饰的 preS- 衍生肽可具有以下通式:

[0203]



[0204] 锚定基团 A 可以在 preS- 衍生肽 P 的氨基酸侧链上或者就是 preS- 衍生肽 P 的氨基酸侧链本身, 即 A 可以是侧链本身或修饰的侧链。

[0205] 锚定基团也可以是修饰的氨基酸残基, 其中将所述残基引入 P 的氨基酸序列作为锚定基团。

[0206] 在本发明的其它实施方案中, 锚定基团 A 与疏水性修饰 H 和 / 或 C- 端修饰 R 连接。

[0207] 优选的锚定基团选自酯、醚、二硫化物、酰胺、硫醇、硫酯。

[0208] 技术人员将会根据待连接的相应化合物、标签、标记等来选择相应的合适锚定基团。

[0209] 锚定基团还可适用于连接形成复合物的组分, 例如生物素 / 抗生物素蛋白、聚精氨酸 / 寡核苷酸 (例如 siRNA) 复合物。

[0210] 此外, o 为 0 或至少 1, 即锚定基团 (R) 是任选的。

[0211] 优选地, o 为 1。

[0212] 在本发明的进一步的实施方案中, o 为 1、2、3、4 或更大。也就是说, 有不止 1 个 (例如 2 个) 锚定基团。锚定基团可以彼此相同或不同, 允许几种化合物 (例如药物和标记或不同药物) 的连接。

[0213] 对于优选的疏水性修饰的 preS- 衍生肽, 另见表 1 和表 2。

[0214] 本发明更优选的疏水性修饰的 preS- 衍生肽如下:

[0215] -P 包括选自以下的氨基酸序列: SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.12、SEQ ID NO.13、SEQ ID NO.16、SEQ ID NO.23、SEQ ID NO.26、SEQ ID NO.31 和 SEQ ID NO.38, 和

[0216] -H 是通过用硬脂酰基 (C18) 或豆蔻酰基 (C14) 酰化的疏水性修饰。

[0217] 因此, 本发明更优选的疏水性修饰的 preS- 衍生肽是:

[0218]

肽的名称	氨基酸序列	疏水性修饰
HBVpreS/2-48 ^{硬脂酰基} (共有序列)	SEQ ID NO. 11	硬脂酰基(C18)
HBVpreS/2-48 ^{硬脂酰基} (共有序列)	SEQ ID NO. 12	硬脂酰基(C18)
HBVpreS/2-48 ^{硬脂酰基} (C)	SEQ ID NO. 13	硬脂酰基(C18)
HBVpreS/2-48 ^{硬脂酰基} (C)	SEQ ID NO. 16	硬脂酰基(C18)
HBVpreS/2-48 ^{硬脂酰基} (C)	SEQ ID NO. 13	豆蔻酰基(C14)
HBVpreS/2-48 ^{myr} (D)	SEQ ID NO. 23	豆蔻酰基(C14)
HBVpreS/2-21 ^{硬脂酰基} (D)	SEQ ID NO. 26	硬脂酰基(C18)
HBVpreS/2-20 ^{myr} (D)	SEQ ID NO. 38	豆蔻酰基(C14)
HBVpreS/2-48 ^{硬脂酰基} -Ala ^{21,23,29,30} (C)	SEQ ID NO. 31	硬脂酰基(C18)

[0219] 其中 (C) 是指 HBV 基因型 C Q46K。

[0220] 可通过本领域技术人员已知的多种方法来制备本发明的肽, 通常通过合成化学方法和 / 或基因工程方法。

[0221] 合成化学方法更具体而言包括固相序列和嵌段合成 (Erickson 和 Merrifield, 1976)。可使用已经建立的自动化方法, 例如通过使用自动化肽合成仪, 来进行固相序列法。在该方法中, 将 α -氨基保护的氨基酸与树脂支持物结合。所用树脂支持物可以是本领域常规用于(多)肽固相制备的任何合适的树脂, 优选聚苯乙烯, 其已经与聚氧乙烯共聚, 以提供位置用于与先前引入的 α -氨基保护的氨基酸的酯形成。本发明人使用的这个优化方法已经有明确描述(参见例如 12)。一个接一个地(逐步)引入氨基酸。与引入一个氨基酸相应的每个合成循环包括脱保护步骤、连续洗涤步骤、用氨基酸活化的偶联步骤和后续洗涤步骤。这些步骤中的每一个之后都进行过滤。偶联反应剂是用于(多)肽合成的传统反应试剂, 例如二环己基碳二亚胺、羟基苯并三唑、苯并三唑 (benzotriazol)-1-基氧基三(二甲基氨基)磷鎓六氟磷酸盐和二苯基磷酰叠氮化物。在树脂上合成多肽之后, 通过用强酸例如三氟乙酸处理, 在茴香醚 (anisole)、乙二硫醇或 2-甲基咪唑存在下, 使多肽与树脂分离。然后通过传统纯化技术, 尤其是通过 HPLC 方法, 纯化化合物。

[0222] 也可通过使选择性保护的(多)肽片段偶联来获取本发明的肽, 这样的偶联可在例如溶液中进行。

[0223] 还可通过技术人员已知的基因工程技术来产生所述肽。真核表达系统, 例如杆状病毒系统, 是特别合适的。根据该方法, 蛋白质在感染了含有编码异源蛋白和调节核酸序列例如启动子的核酸序列的重组杆状病毒的昆虫细胞中表达。若干细胞系可用于重组杆状病毒感染, 例如细胞系 Sf-9, 可得自美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection) (CRL 1711)。在原核表达系统(例如大肠杆菌 (E.coli) 中的表达也是特别合适的。

[0224] 通过本领域技术人员已知的各种方法, 包括合成方法和基因工程方法, 可将疏水性部分引入所述肽。

[0225] 或者, 可通过稳定转染的真核细胞系, 例如 CHO 和本领域已知并常用于产生疫苗的其它细胞系等等, 产生所述肽和/或融合肽(即疏水性修饰的肽)。因为 N-端 47-preS1 氨基酸促进豆蔻酰化蛋白/肽分泌的固有特性, 可从细胞培养上清液中提取生物活性疏水性修饰的肽。

[0226] 用于肝脏靶向的载体和穿梭物

[0227] 如上所述, 本发明提供 HBV 的疏水性修饰的 preS- 衍生肽作为载体或穿梭物, 用于将化合物特异性递送到肝脏的用途。

[0228] 本发明的用于将化合物特异性递送到肝脏的“载体”或“穿梭物”是指本发明人发现的并在本文中描述的 HBV 的疏水性修饰的 preS- 衍生肽的肝脏趋向性或趋肝性 (hepatotropism), 即指它们在肝脏内选择性贮积的能力, 优选指在肝细胞质膜选择性贮积以及选择性进入肝细胞。

[0229] 本发明是基于本发明人对高度特异性肝脏贮积的发现并基于对 HBV 的 preS1 序列中 HBV 的肝脏趋向性决定子 (determinant) 的鉴定。因此, 本发明利用有关肝脏趋向性决定子的知识, 用于设计多用途载体或穿梭物, 分别用于特异性肝脏靶向或递送。

[0230] 本发明的疏水性修饰的 preS- 衍生肽是多用途载体或穿梭物, 用于将化合物特异性递送到肝脏。

- [0231] 优选地，将化合物特异性递送到肝脏是将化合物特异性递送到肝细胞。
- [0232] 此外，可在体外及体内将化合物特异性递送到肝细胞。
- [0233] 优选将化合物特异性递送到动物、优选哺乳动物或人、或鸟的肝脏。
- [0234] 待递送的化合物
- [0235] 本发明的待特异性递送到肝脏的“化合物”可以是任何类型的化合物。
- [0236] 优选的化合物是药物和 / 或标记。
- [0237] 药物可以呈前药或原前药 (preprodrug) 的形式。
- [0238] 化合物也可以是病毒或其衍生物，例如复制缺陷型或复制型重组病毒 (例如腺病毒或腺伴随病毒)，其可经化学修饰或遗传修饰，以将靶向序列暴露在其表面并因此而重新定向，以感染肝细胞。这些病毒将会适用于肝细胞特异性基因递送。
- [0239] 在本发明的一个优选的实施方案中，待特异性递送到肝细胞的化合物是药物 (或呈前药形式的药物) 并且优选选自
- [0240]

药物类型	实例
干扰素	IFN α
病毒逆转录酶抑制剂	拉米夫定(Lamivudine)、阿德福韦(Adefovir)、恩替卡韦(Entecavir)
病毒 RNA 聚合酶抑制剂	HCV NS5B 聚合酶抑制剂
病毒核心装配抑制剂或病毒核壳抑制剂	针对嗜肝病毒 例如二氢芳基嘧啶-衍生的 HBV 衣壳装配抑制剂
激酶抑制剂	Raf 激酶抑制剂 索拉非尼(Sorafenib) (BAY 43-9006)
核苷类似物	
蛋白酶抑制剂 - 病毒的或通用蛋白酶抑制剂	HCV NS3 蛋白酶抑制剂、BILN-2061、VX950
蛋白酶体抑制剂	MG132、硼替佐米(bortezomib)
抗体或其片段	中和抗-HCV E2 抗体
siRNA 或其前体	HBV、HCV、HDV-特异性 siRNA 及其修饰；靶向其它序列(包括细胞序列)的 siRNA
法尼基化抑制剂；例如法尼基转移酶抑制剂(FTI)	
醇脱氢酶(ADH)或其激活剂	
胆固醇生物合成抑制剂， 例如 HMD-CoA-还原酶抑制剂	Mevinacor/洛伐他汀(lovastatin)
病毒或非病毒性病原体的肝脏期抑制剂	伯氨喹
例如疟疾、血吸虫病(裂体吸虫	

[0241]

病)、利什曼病

偶然感染肝脏的其它病毒的抑制 例如用于治疗疱疹病毒感染的
剂 Zovirax

特异性作用于肝脏的抗生素

[0242] 所述化合物优选选自批准用于临床的药物。

[0243] 在一个实施方案中,待递送的化合物是 IFN- α 。

[0244] 用于所述实施方案的疏水性修饰的 preS1- 衍生肽可以是 HBVpreS/2-20^{myr}(D)、HBVpreS/2-48^{myr}(D)、HBVpreS/2-20^{硬脂酰基}(D)、HBVpreS/2-48^{硬脂酰基}(D)(另见图 14)。使用杆状病毒表达系统,通过在昆虫细胞中重组表达,可得到具有小鼠干扰素- α 的融合蛋白或构建体。

[0245] 另见图 14 和图 15 以及实施例。

[0246] 在本发明的一个优选实施方案中,待特异性递送到肝细胞的化合物是标记并且优选选自荧光染料、放射性同位素和造影剂。

[0247] 优选的放射性同位素是 ¹³¹I、¹²⁵I、^{99m}Tc、¹⁸F、⁶⁸Ga、¹¹¹In、⁹⁰Y 和 ¹⁷⁷Lu。

[0248] 优选的荧光染料是 Alexa 染料、罗丹明和荧光素的衍生物、Cy- 染料、FITC。

[0249] 优选的造影剂是钆(Gd)络合物、超磁性铁(Fe)络合物和颗粒、含有高原子序数原子(即用于计算层析 X 射线照相术(CT)的碘)的化合物、微泡和载体(例如含有这些造影剂的脂质体)。

[0250] 在本发明进一步优选的实施方案中,化合物也可被标记,即携带本文所定义的标记。

[0251] 在优选的实施方案中,化合物是呈贮库制剂(depot)或载体形式,其例如携带药物、前药或标记。所述贮库制剂或载体是本领域已知的,例如纳米粒、脂质体、微泡、气体乳剂(gas emulsion)。

[0252] 在本发明的其它实施方案中,待递送到肝脏的化合物选自免疫原性表位。当递送到肝脏时,优选的免疫原性表位用于肝细胞-介导的抗原呈递,以活化肝脏定向的免疫应答。

[0253] 在一个优选的实施方案中,所述化合物与 HBV 的疏水性修饰的 preS- 衍生肽形成缀合物。

[0254] 优选地,通过共价连接或通过复合物形成,来形成化合物与疏水性修饰的 preS- 衍生肽的缀合物。

[0255] 优选地,在缀合物中,所述化合物与疏水性修饰的 preS- 衍生肽共价连接,优选通过使化合物与锚定基团 A 连接。连接形式取决于化合物类型。本领域技术人员将能够确定合适的锚定基团,用于形成合适的缀合物。

[0256] 优选地, A 还包含间隔物或接头。

[0257] 间隔物或接头优选包含用于肝细胞特异性活化的识别位点,其优选被肝脏蛋白识别。

[0258] 识别位点优选是蛋白水解的切割位点。因此，所述肝脏蛋白优选是肝细胞蛋白，更优选是肝细胞蛋白水解酶。因此，缀合物可给予受试者并且将会通过机体例如在体液中转运，而不会被切割。然而，一旦缀合物到达其靶标（肝脏或肝细胞），肝脏蛋白例如肝细胞蛋白水解酶将相应地切割该蛋白水解位点并从其穿梭物中释放出化合物，即疏水性修饰的 preS- 衍生肽。

[0259] 进一步优选的肝脏蛋白是细胞色素，例如细胞色素 P450。用于阿德福韦或普雷福韦 (Pradevofir) 的 HepDirect® 技术 (Metabasis Technologies, Inc.) 也适用于本发明。

[0260] 在一个实施方案中，通过形成复合物，来形成化合物与疏水性修饰的 preS- 衍生肽的缀合物。用于本发明的优选复合物是生物素 / 抗生物素蛋白、聚精氨酸 / 寡核苷酸（例如 siRNA）。技术人员将能够确定合适的复合物组分并由此来设计化合物和疏水性修饰的 preS- 衍生肽。

[0261] 疏水性修饰的 preS- 衍生肽，尤其是本发明的缀合物，优选用于在肝脏内富集化合物，也就是说穿梭到肝脏。

[0262] 优选地，由肝脏蛋白，优选肝细胞蛋白水解酶，尤其在体内在肝脏中，自 HBV 的疏水性修饰的 preS- 衍生肽的缀合物中将化合物切离。

[0263] 肝脏疾病的诊断、预防和 / 或治疗

[0264] 在本发明的一个优选的实施方案中，提供上述疏水性修饰的 preS- 衍生肽，尤其是其与化合物的缀合物，用于肝脏疾病或病症的诊断、预防和 / 或治疗。

[0265] 根据所诊断、预防和 / 或治疗的肝脏疾病或病症，选择相应的化合物并将其选择性、特异性地递送到肝脏。

[0266] 本发明的“肝脏疾病”或“肝脏病症”是指影响或涉及肝脏器官、肝脏组织或肝细胞的任何疾病或病症。

[0267] 肝脏疾病的实例是：

[0268] • 肝炎：肝脏炎症，主要是由各种病毒引起，但也可由某些毒物、自身免疫或遗传性病症引起；

[0269] • 肝硬化：肝脏内形成纤维组织，取代死亡肝细胞。肝细胞的死亡可以例如由病毒性肝炎、酒精中毒或接触其它肝脏毒性化学物而引起的；

[0270] • 血色病：造成铁在体内贮积的一种遗传性疾病，最终导致肝脏损伤；

[0271] • 肝癌：原发性肝细胞癌 (HCC) 或胆管癌和转移性癌，通常来自胃肠道的其它部分；

[0272] • 威尔逊病：引起机体保留铜的一种遗传性疾病；

[0273] • 原发性硬化性胆管炎：胆管炎性疾病，本质上是自身免疫。

[0274] • 原发性胆汁性肝硬变：小胆管的自身免疫性疾病；

[0275] • 巴希综合征：肝静脉阻塞；

[0276] • 吉尔伯综合征：胆红素代谢遗传病症，在约 5% 的人群中存在；

[0277] • II 型糖原贮积病：糖原的贮积引起全身进行性肌无力（肌病）并影响各种机体组织，尤其是在心脏、骨骼肌、肝脏和神经系统；

[0278] • 儿科肝脏疾病，例如胆道闭锁、 α -1- 抗胰蛋白酶缺乏、alagille 惹综合征和进行性家族性肝内胆汁淤积；

[0279] • 代谢疾病。

[0280] 此外，还包括动物（例如宠物或家畜）的肝脏疾病，尤其是可传播给人类的疾病，例如弓形虫病。

[0281] 待诊断、预防和 / 或治疗的肝脏疾病或病症优选选自肝炎、肝硬化、血色病，优选由肝炎 A、B、C、D、E、F、G 和 H 型病毒引起的肝炎。

[0282] 待诊断、预防和 / 或治疗的肝脏疾病或病症也可以是病毒引起的并发性肝炎 (concomitant hepatitis)，所述病毒例如疱疹病毒科 (Herpesviridae) 病毒例如疱疹病毒，巨细胞病毒 (cytomegalie virus, CMV)，也可以是水痘带状疱疹病毒 (VZV)、埃巴病毒 (Epstein Barr virus, EBV)、柯萨奇病毒、黄热病病毒、登革热病毒。

[0283] 待诊断、预防和 / 或治疗的肝脏疾病或病症也可以是涉及病毒或非病毒性病原体的肝脏期 (liver stadium) 的疾病，例如许多热带病。因为某些病原体的肝脏期是早期，所以在这样的早期可以对相应感染进行选择性和特异性治疗。

[0284] 这样的病毒是肝炎 A、B、C、D、E、F、G 和 H 型病毒、疱疹病毒。

[0285] 这样的非病毒性病原体是细菌、寄生虫和 / 或蠕虫。

[0286] 寄生虫是例如引起疟疾的疟原虫属的原生动物寄生虫，例如恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*)、间日疟原虫和相关物种（例如蛋形疟原虫 (*Plasmodium ovale*)、三日疟原虫 (*Plasmodium malariae*) 和诺氏疟原虫 (*Plasmodium knowlesi*)）。

[0287] 这样的蠕虫是例如引起血吸虫病或裂体吸虫病的血吸虫属 (*Schistosoma*) 的扁形动物，例如曼氏血吸虫 (*Schistosoma mansoni*)、间插血吸虫 (*Schistosoma intercalatum*)、埃及血吸虫 (*Schistosoma haematobium*)、日本血吸虫 (*Schistosoma japonicum*) 和湄公血吸虫 (*Schistosoma mekongi*)。

[0288] 这样的寄生虫还是例如导致利什曼病的原生动物白蛉属 (*Phlebotomus*) 和罗蛉属 (*Lutzomyia*) 的利什曼锥虫。

[0289] 因此，疟疾、血吸虫病（裂体吸虫病）和 / 或利什曼病可以通过本发明的方法来诊断、预防和 / 或治疗。

[0290] 因此，某些热带病可以通过本发明的方法来诊断、预防和 / 或治疗。

[0291] 待诊断、预防和 / 或治疗的肝脏疾病或病症优选是肝脏肿瘤，优选肝细胞癌 (HCC)。

[0292] 待诊断、预防和 / 或治疗的肝脏疾病或病症也可以是代谢疾病，例如糖尿病、高脂血症、代谢综合征和肥胖症、慢性高血糖症、代谢综合征、非酒精性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH) (另见 (9))。

[0293] 在本发明的一个优选的实施方案中，提供上述疏水性修饰的 preS- 衍生肽，尤其是其与化合物的缀合物，用于调节肝功能。

[0294] 优选的是它们用于肝细胞 - 介导的抗原呈递和肝脏定向的免疫应答的活化的用途。在这种情况下，待递送到肝脏的化合物优选是免疫原性表位。

[0295] 在本发明的一个优选的实施方案中，上述疏水性修饰的 preS- 衍生肽，尤其是其与化合物的缀合物，也适用于预防 HBV 和 / 或 HDV 感染。这可能是因为上述疏水性修饰的 preS- 衍生肽不仅靶向肝脏（趋肝性）、而且还作为 HBV 和 / 或 HDV 的病毒侵入抑制剂而起作用，其可参见例如图 9。因此，上述疏水性修饰的 preS- 衍生肽是合适的

HBV 和 / 或 HDV 的疫苗。（另见本发明人的相应 PCT 专利申请，名称为“Hydrophobic modified preS-derived peptides of hepatitis B virus (HBV) and their use as HBV and HDV entry inhibitors (乙肝病毒 (HBV) 疏水性修饰的 preS- 衍生肽及其作为 HBV 和 HDV 侵入抑制剂的用途)”，其在同一天提出申请)。

[0296] 因此，可提供上述酰化 preS- 衍生肽，尤其是其与化合物的缀合物，用于联合诊断、预防和 / 或治疗肝脏疾病或病症并预防 HBV 和 / 或 HDV 感染。

[0297] 在本发明的一个优选的实施方案中，上述酰化 preS- 衍生肽，尤其是其与化合物的缀合物，可用于制备用于诊断、预防和 / 或治疗肝脏疾病或病症的药物。

[0298] 药物组合物

[0299] 如上所述，本发明提供药物组合物，所述组合物包含至少一种本文所定义的 HBV 的疏水性修饰的 preS- 衍生肽和至少一种本文所定义的待特异性递送到肝脏的化合物和任选的药学上可接受的载体和 / 或赋形剂。

[0300] 本发明的药物组合物包含：

[0301] - 至少一种上文所定义的 HBV 的疏水性修饰的 preS- 衍生肽；

[0302] - 至少一种上文所定义的待特异性递送到肝脏（优选肝细胞）的化合物；

[0303] 或

[0304] - 本文所定义的缀合物；

[0305] 和

[0306] - 任选的药学上可接受的载体和 / 或赋形剂。

[0307] 本发明的药物组合物非常适用于本文所述的所有用途和方法。

[0308] “药学上可接受的载体或赋形剂”是指这样的任何载体：本发明的药物组合物或疫苗组合物可配制在其中或与其一起配制。它包括盐水溶液，例如磷酸盐缓冲液。一般而言，根据给药方式和途径以及标准药学实践来选择稀释剂或载体。

[0309] 治疗方法

[0310] 此外，和如上所述，本发明还提供通过使用 HBV 的疏水性修饰的 preS- 衍生肽或本发明的药物组合物，用于诊断、预防和 / 或治疗肝脏疾病或病症的方法。

[0311] 本发明还提供用于联合诊断、预防和 / 或治疗肝脏疾病或病症并预防 HBV 和 / 或 HDV 感染的方法，即通过给予受试者本文所定义的缀合物或本文所定义的药物组合物，所述缀合物包含 HBV 的疏水性修饰的 preS- 衍生肽和化合物。

[0312] 本发明的用于联合诊断、预防和 / 或治疗肝脏疾病或病症并预防 HBV 和 / 或 HDV 感染的方法包括

[0313] 给予受试者治疗有效量的以下组分：

[0314] (a) 包含上文所定义的疏水性修饰的 preS- 衍生肽和至少一种上文所定义的化合物的缀合物，其中所述缀合物如上文所定义；或

[0315] (b) 如上文所定义的药物组合物。

[0316] 给药途径

[0317] 优选地，本发明的缀合物或药物组合物的给药途径，尤其是在治疗方法中的给药途径，选自皮下、静脉内、口服、鼻内、肌内、经皮、吸入 (inhalative)、通过栓剂。

[0318] 鼻腔给药或应用的一个优选的实施方案是鼻腔喷雾。

[0319] 治疗有效量

[0320] 本发明的缀合物或药物组合物的“治疗有效量”是指足以诊断、预防和/或治疗相应肝脏疾病或病症和/或预防 HBV 和/或 HDV 感染的量。

[0321] 优选的治疗有效量范围是每千克体重 10 μ g 至 1mg。

[0322] 对于本发明疏水性修饰的 preS- 衍生肽作为疫苗的用途而言，优选的治疗有效量范围是每千克体重 10 μ g 至 1mg。

[0323] 对于使用约 10nM 疏水性修饰的 preS- 衍生肽的 IC₅₀ 值而言，优选的治疗有效量是每千克体重 100 μ g 或范围是每个患者 1-5mg。

[0324] 优选的治疗有效量取决于所递送的相应化合物及其相应的治疗有效量。

[0325] 技术人员将能确定合适的治疗有效量。

[0326] 基因治疗应用

[0327] 在基因治疗方法中，本发明还提供 preS- 衍生肽，即编码它们的核酸。

[0328] 提供病毒载体，所述载体包含本文所定义的 preS- 衍生肽 P 的编码核酸，用于肝脏疾病或病症的基因治疗。所述核酸编码 preS- 衍生肽 P 的氨基酸序列，这是对于完成肝脏靶向而言是必需的和足够的。

[0329] 优选地，病毒载体是复制缺陷型的，优选是腺伴随病毒载体。

[0330] 在一个实施方案中，病毒载体还包含待在肝脏中表达的异源序列。

[0331] 病毒载体优选是基因治疗用的合适载体，这是技术人员已知的。

[0332] HBV 受体的鉴定

[0333] 本发明还涉及用于在体外和/或体内鉴定涉及 HBV 的连接和/或侵入的肝细胞受体和/或定量测定所述受体表达的方法，所述方法包括使用如上所述的疏水性修饰的 preS- 衍生肽。

[0334] 可在哺乳动物或相应的动物模型中，优选在小鼠或人中鉴定所述肝细胞受体。

[0335] 具体地讲，所述方法包括以下步骤：

[0336] - 在足以允许本发明的疏水性修饰的 preS- 衍生肽与肝细胞表面表达的受体特异性结合的条件下和时间段内，使肝脏活体切片或肝细胞与所述肽接触；

[0337] - 检测所述肽与受体的结合；和

[0338] - 鉴定所述受体。

[0339] 用于鉴定 HBV 受体的方法，包括使用

[0340] (a) 包含本文所定义的疏水性修饰的 preS- 衍生肽和至少一种本文所定义的化合物的缀合物，其中所述缀合物如本文所定义；或

[0341] (b) 本文所定义的药物组合物。

[0342] 按照本领域技术人员众所周知的传统方法可达到这一点。例如，这可包括对本发明的疏水性修饰的 preS- 衍生肽进行放射性标记、酶标记或荧光标记，然后用合适方法来检测。多种荧光材料是已知的并可用作标记。这些材料包括例如荧光素、罗丹明、金胺、德克萨斯红 (Texas Red)。酶标记包括酶与目标分子（例如多肽）缀合，然后可通过比色技术、分光光度技术或荧光分光光度技术来检测。

[0343] 人乙肝病毒 (HBV) 是肝细胞癌的最重要的病因。HBV 感染的特点是显著的体内功效和明显的趋肝性。后者可能是 3 种 HBV 表面蛋白之一与循环系统中的肝脏相关受

体或肝脏 – 靶向因子特异性相互作用的结果。

[0344] 根据目前对 HBV 侵入途径的分子细节的理解以及对负责肝细胞结合和肝脏趋向性的 HBV 表面蛋白结构域的鉴定，本发明导致靶向肝脏疾病（例如 HCC）并任选干扰 HBV 和 HDV 感染的新型肽 – 药物缀合物的开发。

[0345] 本发明人鉴定了在体外和体内能有效阻止 HBV 侵入的 HBV-preS1- 表面蛋白 – 衍生脂肽。本发明对这些抑制性肽的生物分布研究表明，它们在肝脏中选择性贮积，其中它们与肝细胞结合并推测它们侵入肝细胞内。这种趋肝性需要肽的 N- 端酰化并依赖于 N- 端 47preS1 氨基酸内（即在氨基酸残基 2-21 或氨基酸残基 2-20（或优选残基 9-15 的最小序列）内）的某种 HBV preS- 序列基序。本发明人观察到这种肽序列还额外携带膜易位信号，所述信号有助于甚至是完全融合蛋白的跨越质膜的转运（未公开的结果），这样的观察结果提供了将任何种类的药物特异性递送到肝细胞质膜或者甚至选择性进入该细胞的可能性。

[0346] 本发明人已经证明，非常低剂量的 HBV preS1- 衍生脂肽在移植的 uPA-RAG-1 小鼠模型中能够完全阻止 HBV 感染。对这些 HBVpreS- 衍生的侵入抑制剂的药代动力学（Pharmakokinetic）研究表明显著的趋肝性以及非常高的血清稳定性（ $t_{1/2}$ 约为 60h）和在靶器官中的长半衰期（ $t_{1/2}$ 约 24h）。所述肽的 N- 端酰化以及某种氨基酸序列的完整性都是必需的（即在氨基酸残基 2-21（或优选残基 9-15 的最小序列）内）。所述肽可用作多用途载体，用于肝脏特异性药物靶向，以征服肝细胞感染或治疗肝细胞癌。

[0347] 本发明人还证明了这一原理：在体内，通过皮下施用 HBV 包膜蛋白 – 衍生肽可有效阻止 WMHBV 感染。这为急性 HBV- 感染的预防和慢性乙肝的治疗选择提供了新观点。因为所用的 uPA/RAG-2/Pfp 小鼠缺乏 B 细胞、T 细胞和 NK 细胞，所以假设所述肽对敏感性肝细胞具有直接抑制作用。以下证据支持了这一点：酰化 preS- 衍生肽在肝脏中的有效贮积，然后可能通过胆途径而被缓慢清除。这两个特性允许以非常低剂量和低频次进行皮下施用。已知在 5 天内给予 0.2mg/kgHBV/preS2-48^{myr} 的 5 次注射可预防 WMHBV 感染的建立，当每天给予 1 次或每 2 天给予 1 次时，以低于 7 μ g/kg $\approx$ 13nmol/kg 的剂量，连续给予约 30 倍以上的活性肽 HBV/preS2-48^{硬脂酰基}可能是有效的。考虑到在小鼠中得到的有效药理学剂量/体重，应当经校正，按照约 10 倍的量用于人 (8)，每个人的有效剂量预期低于 100 μ g/ 天。

[0348] 本发明人也证明了

[0349] – 本发明的 HBV preS1- 衍生脂肽与原代人肝细胞 (PHH) 结合而且这样的结合是豆蔻酰基依赖性的和序列特异性的（另见图 10），

[0350] – 本发明的 HBV preS1- 衍生脂肽的结合不限于 HBV 敏感性肝细胞（另见图 11），

[0351] – 本发明的 HBV preS1- 衍生脂肽的结合取决于细胞分化状态并且它们仅与分化的肝细胞 (differentiated hypocyte) 结合（参见图 12），

[0352] – 本发明的 HBV preS1- 衍生脂肽不与其它肝细胞瘤细胞系和非肝细胞瘤细胞系结合，

[0353] – 对于 Hep G2 细胞、Hep G2.215 细胞、HuH 7 细胞和 CHO K1 细胞，没有观察到结合（数据未显示）。

[0354] 因此,所述肽所寻址(adress)的细胞因素取决于分化状态。但是这些对于病毒的限制性宿主范围并非关键的。

[0355] 表 1 优选的疏水性修饰的 preS- 衍生肽

[0356]

肽的名称		氨基酸序列	
HBVpreS/(-11)-48(共有)	共有	SEQ ID NO. 1	
HBVpreS/2-48 ^{myr} (共有)		SEQ ID NO. 11	
HBVpreS/2-48 ^{硬脂酰基} (共有)			
HBVpreS/2-21 ^{myr} (共有)		SEQ ID NO. 12	
HBVpreS/2-21 ^{硬脂酰基} (共有)			
基因型 C 肽			
*HBVpreS/(-11)-48 ^{myr} (C)	天然	SEQ ID NO. 4	
*HBVpreS/(-11)-48 ^{硬脂酰基} (C)			
*HBVpreS/2-48 ^{myr} (C)		SEQ ID NO. 13	
*HBVpreS/2-48 ^{硬脂酰基} (C)			
HBVpreS/5-48 ^{myr} (C)	截短的	N-端	SEQ ID NO. 14
HBVpreS/5-48 ^{硬脂酰基} (C)			
HBVpreS/9-48 ^{myr} (C)			SEQ ID NO. 15
HBVpreS/9-48 ^{硬脂酰基} (C)			
HBVpreS/2-21 ^{myr} (C)	截短的	N- 和 / 或 C-端	SEQ ID NO. 16
HBVpreS/2-21 ^{硬脂酰基} (C)			
HBVpreS/5-21 ^{myr} (C)			SEQ ID NO. 17
HBVpreS/5-21 ^{硬脂酰基} (C)			
HBVpreS/9-21 ^{myr} (C)			SEQ ID NO. 18
HBVpreS/9-21 ^{硬脂酰基} (C)			
HBVpreS/2-15 ^{myr} (C)			SEQ ID NO. 19
HBVpreS/2-15 ^{硬脂酰基} (C)			
HBVpreS/5-15 ^{myr} (C)			SEQ ID NO. 20
HBVpreS/5-15 ^{硬脂酰基} (C)			
HBVpreS/9-15 ^{myr} (C)**			SEQ ID NO. 21
HBVpreS/9-15 ^{硬脂酰基} (C)**			

[0357]

HBVpreS/(-2)-20 ^{palm} (C)			SEQ ID NO. 22
基因型 D 肽			
HBVpreS/1-48 ^{myr} (D)	天然		SEQ ID NO. 5
HBVpreS/2-48 ^{myr} (D)			SEQ ID NO. 23
HBVpreS/2-48 ^{硬脂酰基} (D)			
HBVpreS/5-48 ^{myr} (D)	截短的	N-端	SEQ ID NO. 24
HBVpreS/5-48 ^{硬脂酰基} (D)			
HBVpreS/9-48 ^{myr} (D)			SEQ ID NO. 25
HBVpreS/9-48 ^{硬脂酰基} (D)			
HBVpreS/2-21 ^{myr} (D)		N-端和 /或 C-端	SEQ ID NO. 26
HBVpreS/2-21 ^{硬脂酰基} (D)			
HBVpreS/5-21 ^{myr} (D)			SEQ ID NO. 27
HBVpreS/5-21 ^{硬脂酰基} (D)			
HBVpreS/9-21 ^{myr} (D)			SEQ ID NO. 28
HBVpreS/9-21 ^{硬脂酰基} (D)			
HBVpreS/2-20 ^{myr} (D)			SEQ ID NO. 38
HBVpreS/2-20 ^{硬脂酰基} (D)			
HBVpreS/2-15 ^{myr} (D)			SEQ ID NO. 29
HBVpreS/2-15 ^{硬脂酰基} (D)			
HBVpreS/5-15 ^{myr} (D)			SEQ ID NO. 30
HBVpreS/5-15 ^{硬脂酰基} (D)			
HBVpreS/9-15 ^{myr} (D)**			SEQ ID NO. 21
HBVpreS/9-15 ^{硬脂酰基} (D)**			

[0358] myr 是指 N- 端的豆蔻酰化；

[0359] palm 是指 N- 端的棕榈酰化；

[0360] 硬脂酰基 是指 N- 端的硬脂酰化；

[0361] (C) 是指基因型 C (具有 Q46K, 示于 SEQ ID NO.4)；

[0362] (D) 是指基因型 D；

[0363] ** 最小序列。

[0364] 表 2 优选的免疫原性表位有变化的疏水性修饰的 preS- 衍生肽

肽的名称	氨基酸序列
HBVpreS/2-48 ^{myr} -Ala ^{21,23,29,30} (C)	SEQ ID NO. 31
HBVpreS/2-48 ^{硬脂酰基} -Ala ^{21,23,29,30} (C)	
HBVpreS/(-11)-48 ^{myr} -D20A(C)	SEQ ID NO. 32
HBVpreS/(-11)-48 ^{硬脂酰基} -D20A(C)	
HBVpreS/2-48 ^{myr} -D20A(C)	SEQ ID NO. 33
HBVpreS/2-48 ^{硬脂酰基} -D20A(C)	
HBVpreS/(-11)-48 ^{myr} -SNN(27-29)ANA(C)	SEQ ID NO. 34
HBVpreS/(-11)-48 ^{硬脂酰基} -SNN(27-29)ANA(C)	
[0365] HBVpreS/2-48 ^{myr} -SNN(27-29)ANA(C)	SEQ ID NO. 35
HBVpreS/2-48 ^{硬脂酰基} -SNN(27-29)ANA(C)	
HBVpreS/(-11)-48 ^{myr} -D20A SNN(27-29)ANA(C)	SEQ ID NO. 36
HBVpreS/(-11)-48 ^{硬脂酰基} -D20A SNN(27-29)ANA(C)	
HBVpreS/2-48 ^{myr} -D20A SNN(27-29)ANA(C)	SEQ ID NO. 37
HBVpreS/2-48 ^{硬脂酰基} -D20A SNN(27-29)ANA(C)	

[0366] myr 是指 N- 端的豆蔻酰化；

[0367] 硬脂酰基 是指 N- 端的硬脂酰化；

[0368] (C) 是指基因型 C (具有 Q46K, 在 SEQ ID NO.4 中)；

[0369] 下列实施例和附图说明了本发明, 但不得视为对本发明的限制。

[0370] 附图简述

[0371] 图 1.HBV 颗粒和 HBV L- 蛋白、M- 蛋白和 S- 蛋白的示意图。

[0372] (A) 部分双链 DNA 与病毒聚合酶复合物共价缔合, 所述酶复合物由末端蛋白 (TP)、逆转录酶 (RT) 和 RNA 酶 H 组成。基因组被 20 面体衣壳包裹, 后者由 120 个核心蛋白二聚体构成。3 种 HBV 表面蛋白 L- 蛋白、M- 蛋白和 S- 蛋白镶嵌在 ER- 衍生的脂质双层中。L- 蛋白和 M- 蛋白含有完整 S- 结构域, 起到膜锚定的作用。

[0373] (B) 3 种 HBV 表面蛋白 L- 蛋白、M- 蛋白和 S- 蛋白的结构域结构。

[0374] L- 蛋白含有 N- 端豆蔻酰化的 107 个氨基酸的 preS1- 结构域、55 个氨基酸的 preS2- 结构域和含有 4 个跨膜区段 (I-IV) 的 S- 结构域。

[0375] 图 2.HBV preS1 共有序列。

[0376] 在上方：显示了 HBV L- 蛋白及其 preS1、preS2 和 S- 结构域。N- 端被豆蔻酰化。

[0377] 下面的比对显示：共有序列（共有）和 8 种 HBV 基因型（A-H）以及包含氨基酸 2-48 的卷毛猴 HBV (WMHBV) preS 序列。注意基因型 A、B、C、E、G 和 H 在其 N 端具有 11 个额外氨基酸，基因型 F 具有 10 个额外氨基酸残基。在下方，显示已知功能性亚结构域 (subdomain)。

[0378] 请注意 HBV 基因型 C 是指 HBV 基因型 C Q46K。

[0379] 图 3. 在皮下施用之后，HBVpreS- 衍生脂肽的生物分布和肝脏稳定性。

[0380] (A) 在雄性 NMRI 小鼠皮下注射之后，豆蔻酰化 (C_{14}) 与硬脂酰化 (C_{18}) 的 HBV preS/2-48 (D) 肽的肝脏特异性贮积，与对照 **Fuzeon®** (T-20) 相比。对每只动物经皮下注射约 $2.25 \mu g^{131}I$ - 标记的肽。在指定时间点处死动物并测定肝脏特异性肽贮积 (% ID/g)。

[0381] (B) 纯 ^{131}I - 标记的 HBVpreS/2-48^{myr} (D) (褐色曲线) 的反相 HPLC，与用相同肽经皮下注射到 uPA+/-/RAG-2-/-Pfp-/- 小鼠后 24 小时而得到的肝脏提取物 (橙色曲线) 进行比较。注意，在流分 13 洗脱出 50% 可检测活性。因为疏水性豆蔻酰残基位于 N- 端，而碘化 Tyr- 残基位于 C- 端，所以流分 13 代表未改变的全长肽。

[0382] 图 4. 皮下施用于 NMRI 小鼠之后，HBVpreS/2-48^{myr} (D) 的生物分布。

[0383] 每时间点将 $2.25 \mu g^{131}I$ - 标记的 HBVpreS/2-48^{myr} (D) 经皮下注射到 NMRI 小鼠 (N = 3) 中。注射后 10 分钟、1 小时、4 小时和 24 小时处死动物并测定器官特异性 (血、肺、心、脾、肝、肾和肌肉) 肽的贮积 (% ID/g)。注意大部分肽都贮积在肝脏内，并注意到 Y- 轴波动 (jolt)，用于更好分辨在其它器官中的分布。

[0384] 图 5. 皮下施用于 uPA+/-/RAG-2-/-Pfp-/- 小鼠之后，HBVpreS/2-48^{myr} (D) 的生物分布。

[0385] 每时间点将 $2.25 \mu g^{131}I$ - 标记的 HBVpreS/2-48^{myr} (D) 经皮下注射 (N = 3)。注射后 10 分钟、1 小时、4 小时和 24 小时处死动物并测定器官特异性 (肝、脾、肾、血、肺、肠、心、肌肉和脑) 肽的贮积 (% ID/g)。注意，正如在 NMRI 小鼠中一样，大部分肽都贮积在肝脏内。

[0386] 图 6. 皮下注射小鼠之后， ^{125}I - 标记的 HBVpreS/2-48^{硬脂酰基} (D) 的闪烁图。

[0387] 在右腿附近皮下注射之后， ^{125}I - 标记的 HBVpreS/2-48^{硬脂酰基} (D) 在小鼠肝脏内特异性贮积；肝脏出现在中间的左侧。注意头部附近发出的信号是甲状腺并可能代表所述肽脱碘之后的游离碘。

[0388] 图 7. 肝脏趋向性是序列特异性的并且需要 N- 端疏水性修饰。

[0389] A 和 B. preS 肽的生物分布，其中 N- 端未经疏水性修饰，与随机 (“scrambled”) 序列比较。注意 HBVpreS/1-48Tyr 及其随机形式都位于肾脏。

[0390] A : HBVpreS/1-48Tyr (D) 在小鼠体内的生物分布。

[0391] B : HBVpreS/scrambled 1-48Tyr (D) 在小鼠体内的生物分布。

[0392] C 和 D. 疏水性修饰的 preS 肽的生物分布，与随机 (“scrambled”) 序列比较。

仅 HBVpreS/2-48Tyr^{硬脂酰基} (D) 转运到肝脏，其中其随机形式均匀分布。

[0393] C : HBVpreS/2-48Tyr^{硬脂酰基} (D) 在小鼠内的生物分布。

[0394] D : HBVpreS/2-48Tyr(scrambled) 硬脂酰基 (D) 在小鼠内的生物分布。

[0395] 图 8. 疏水性修饰的 preS 肽的变体的生物分布, 其中所述变体是 N- 端截短的和 / 或 C- 端截短的以及是经过点突变的。

[0396] 截短的变体 HBVpreS/5-48D-Tyr^{硬脂酰基} (D)、HBVpreS/2-33-D Tyr^{硬脂酰基} (D) 以及 HBVpreS/2-21D-Tyr^{硬脂酰基} (D), 都显示出肝脏趋向性, 而在位置 12(G12E) 具有点突变的变体却没有。

[0397] A : HBVpreS/5-48D-Tyr^{硬脂酰基} (D) 在小鼠内的生物分布。

[0398] B : HBVpreS/2-33-D Tyr^{硬脂酰基} (D) 在小鼠内的生物分布。

[0399] C : HBVpreS/2-48(G12E)D-Tyr^{硬脂酰基} (D) 在小鼠内的生物分布。

[0400] D : HBVpreS/2-21D-Tyr^{硬脂酰基} (D) 在小鼠内的生物分布。

[0401] 图 9. 本发明疏水性修饰的 HBVpreS- 衍生肽对 HBV 感染的抑制。

[0402] A : HBVpreS/2-48^{myr} (D)、HBVpreS/2-48^{myr} (C)、HBVpreS/(-11)-48^{myr} (C)、HBVpreS/2-48^{硬脂酰基} (C) 和 HBVpreS/(-11)-48^{硬脂酰基} (C) 对 HBV 感染的抑制。

[0403] B : HBVpreS/2-48^{硬脂酰基} (D)、HBVpreS/2-15^{硬脂酰基} (D)、HBVpreS/2-21^{硬脂酰基} (D)、HBVpreS/2-26^{硬脂酰基} (D) 和 HBVpreS/2-33^{硬脂酰基} (D) 对 HBV 感染的抑制。

[0404] 在相应的本发明疏水性修饰的 HBVpreS- 衍生肽不存在 (0nM) 或存在 (1、5、25、100 和 1000nM) 下, 感染 HepaRG 细胞。将感染性接种物 (HBV 的基因型 D) 和所述肽一起孵育过夜。洗涤之后, 将细胞再维持 12 天, 让病毒基因表达。收集第 8-12 天的细胞培养上清液并用定量的市售 ELISA 分析所分泌的 HBSAg。将相应的未完成感染的 HbsAg 值设定为 100%, 感染的抑制程度用未完成感染%来表示。

[0405] 其中 (C) 或基因型 C 是指 HBV 基因型 C Q46K。

[0406] 图 10. 本发明疏水性修饰的 HBVpreS- 衍生肽与原代人肝细胞 (PHH) 的结合是豆蔻酰依赖性的和序列特异性的。

[0407] 免疫荧光, 显示共焦图像, 蓝色 : dapi ; 绿色 : FITC。

[0408] 在含有 400nM 肽或不含肽情况下, 将原代人肝细胞 (PHH) 孵育 4 小时 :

[0409] A 不含肽

[0410] B 含有 wt myr-FITC

[0411] C 含有 mut myr-FITC

[0412] D 含有 wt myr(-)-FITC

[0413] 亮 (绿) 点表示细胞的自身荧光 (A、C 和 D), 而仅在 B 中, 才可见所述肽与细胞的结合。

[0414] wt myr-FITC 是指在 C- 端具有赖氨酸 (K) 的 HBVpreS/2-48^{myr} (C)-FITC[SEQ ID NO.39], 其用荧光团 (FITC) 标记,

[0415] 在位置 L11 和 F13 具有 2 个氨基酸取代 (其中所述氨基酸被相应的 D 氨基酸残基 (D-Leu 和 D-Phe) 取代) 的 mut myr-FITCHBVpreS/2-48^{myr} (C)-FITC[SEQ ID NO.40], 其用荧光团 (FITC) 标记,

[0416] wt myr(-)-FITC 是指没有豆蔻酰化的 HBVpreS/2-48 (C)-FITC[SEQ ID NO.39], 其用荧光团 (FITC) 标记,

[0417] 荧光团 FITC 与另外的 Lys 的侧链 (NH₂ 基团) 连接。

- [0418] 图 11. 本发明疏水性修饰的 HBVpreS- 衍生肽的结合不限于 HBV 敏感性肝细胞。
- [0419] 免疫荧光, 显示共焦图像, 蓝色: dapi; 绿色: FITC。
- [0420] 在含有 400nM 肽或不含肽情况下, 将细胞在 37℃ 孵育 4 小时:
- [0421] A(上图) 分化的 HepaRG 细胞
- [0422] B(下图) 原代小鼠肝细胞 (PMH)
- [0423] 仅 wt myr-FITC 与细胞结合。亮 (绿) 点表示细胞的自身荧光。
- [0424] wt myr-FITC 是指在 C- 端具有赖氨酸 (K) 的 HBVpreS/2-48^{myr}(C)-FITC[SEQ ID NO.39], 其用与另外的 Lys 的侧链 (NH₂ 基团) 连接的荧光团 (FITC) 标记,
- [0425] 在位置 L11 和 F13 具有 2 个氨基酸取代 (其中所述氨基酸被相应的 D 氨基酸残基 (D-Leu 和 D-Phe) 取代) 的 mut myr-FITCHBVpreS/2-48^{myr}(C)-FITC[SEQ ID NO.40], 其用荧光团 (FITC) 标记,
- [0426] wt myr(-)-FITC 是指没有豆蔻酰化的 HBVpreS/2-48(C)-FITC[SEQ ID NO.39], 其用荧光团 (FITC) 标记,
- [0427] 荧光团 FITC 与另外的 Lys 的侧链 (NH₂ 基团) 连接。
- [0428] 图 12. 本发明疏水性修饰的 HBVpreS- 衍生肽的结合依赖于细胞的分化状态。所述肽仅与分化肝细胞结合。
- [0429] 免疫荧光, 显示共焦图像, 蓝色: dapi; 绿色: FITC。
- [0430] 在含有 400nM 肽或不含肽情况下, 将细胞在 37℃ 孵育 4 小时:
- [0431] A(上图) 比较分化的和未分化的 HepaRG 细胞
- [0432] B(下图) 比较分化的和去分化的原代小鼠肝细胞 (PMH)
- [0433] wt myr-FITC 仅与分化细胞结合。亮 (绿) 点表示细胞的自身荧光。
- [0434] wt myr-FITC 是指在 C- 端具有赖氨酸 (K) 的 HBVpreS/2-48^{myr}(C)-FITC[SEQ ID NO.39], 其用荧光团 (FITC) 标记,
- [0435] 荧光团 FITC 与另外的 Lys 的侧链 (NH₂ 基团) 连接。
- [0436] 图 13. 本发明疏水性修饰的 HBVpreS- 衍生肽与原代小鼠肝细胞 (PMH) 结合的 FACS 分析。
- [0437] A 显示 FACS 分析的方案
- [0438] B 显示 FACS 分析的结果 (与免疫荧光结果进行比较)。仅 wtmyr-FITC 与细胞结合。
- [0439] wt myr-FITC 是指在 C- 端具有赖氨酸 (K) 的 HBVpreS/2-48^{myr}(C)-FITC[SEQ ID NO.41], 其用荧光团 (FITC) 标记,
- [0440] 在位置 L11 和 F13 具有 2 个氨基酸取代 (其中所述氨基酸被相应的 D 氨基酸残基 (D-Leu 和 D-Phe) 取代) 的 mut myr-FITCHBVpreS/2-48^{myr}(C)-FITC[SEQ ID NO.42], 其用荧光团 (FITC) 标记,
- [0441] 荧光团 FITC 与另外的 Lys 的侧链 (NH₂ 基团) 连接。
- [0442] 图 14. HBVpreS- 衍生肽与小鼠干扰素 α 的融合构建体。
- [0443] 图 15. HBVpreS/2-20^{myr}(D)-IFN α 的纯化和活性试验。
- [0444] 从感染了重组杆状病毒的昆虫细胞上清液中纯化融合蛋白 HBVpreS/2-20^{myr}(D)- 小鼠干扰素 α 2。

- [0445] A 第一色谱步骤：通过 His- 标签，使用 Ni- 琼脂糖，进行色谱纯化，因为 HBVpreS/2-20^{myr}(D)-IFN α 构建体携带 C- 端 His- 标签。
- [0446] B 第二色谱步骤：凝胶过滤色谱 (S75)。
- [0447] C 对第一色谱步骤的洗脱流分测定 IFN。
- [0448] 另见实施例。
- [0449] 对于 HBVpreS/2-20(D) 的氨基酸序列，参见 SEQ ID NO.38。

实施例

- [0450] 疏水性修饰的 PRES- 衍生肽的合成
- [0451] 按照例如 (10) 所述，进行合成。
- [0452] 疏水性修饰的 preS- 衍生肽的生物分布
- [0453] 在雄性 NMRI 小鼠中研究疏水性修饰的 preS- 衍生肽的生物分布。所有实验都依照德国法律进行。通过氯胺-T 方法，将 C- 端含有另外的 Tyr 残基的肽用 ¹³¹I (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany) 标记并通过 HPLC 进行纯化。标记的肽的 50% DMSO 溶液经皮下注射而给予。在所选时间处死小鼠并在 γ - 计数器 (Canberra Packard, Rüsselsheim, Germany) 中测定血、心、肺、脾、肝、肾、肌肉和脑内所含有的放射性并表示为每克组织中注射剂量的 % (% ID/g)。
- [0454] 对从肝脏中提取之后的疏水性修饰的 preS- 衍生肽的稳定性评价
- [0455] 为了测定所述肽在肝脏中的稳定性，在皮下注射后 24 小时，从一叶肝脏中提取 ¹³¹I 标记的 HBVpreS/2-48^{myr}(D)。为了该目的，按照每克冷冻肝组织加 1ml 水至样品中。匀浆后，加入等体积乙腈并重复匀浆。离心 (2 $\times$ 10min, 在 4000xg) 后，将该溶液在反相 HPLC 柱上分离并在 γ - 计数器中定量测定各流分的放射性。
- [0456] 细胞系和原代细胞培养。
- [0457] 将 HepaRG 细胞在补充了以下组分的 William' s E 培养基中培养：10% 胎牛血清 (FCS)、100 单位 /ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素、5 μ g/ml 胰岛素和 5 $\times$ 10⁻⁵M 氢化可的松半琥珀酯 (hydrocortisone hemisuccinate) (10)。每 2 周通过胰蛋白酶处理，将细胞传代 1/5。在感染前 2-3 周，通过将 2% DMSO 加入到维持培养基中，诱导细胞分化。每隔 2-3 天更换一次培养基。
- [0458] 感染竞争测定。
- [0459] 作为感染性接种物，采用 HepG2 克隆 2.2.15(11) 细胞的 50 倍浓缩的培养上清液，这是因为无限供应和质量恒定。它可通过在 6% 聚乙二醇 (PEG)8000 存在下沉淀病毒颗粒，从新鲜收集的上清液中制备而成。将沉淀物重悬于含有 25% FCS 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 中。将等分试样贮存于 -80 $^{\circ}$ C。在 37 $^{\circ}$ C，将分化的 HepaRG 细胞或 PHH 与浓缩的感染源 (10 倍稀释在补充了 4% PEG 8000 (Sigma) 培养基中) 一起孵育 20 小时。在孵育结束时，细胞用培养基洗涤 3 次并在 2% DMSO 和 5 $\times$ 10⁻⁵M 氢化可的松半琥珀酯存在下维持，然后在指定时间收获。
- [0460] 竞争实验在 12 孔板中进行。首先将约 1 $\times$ 10⁶ 细胞与化学合成的 HBV 衍生肽预孵育 30 分钟，再将细胞与肽和病毒共同孵育 20 小时。所有竞争系列都进行至少 2 次并在各情况下显示一个代表性实验的结果 (参见图 3 至图 7)。

[0461] 在相应的本发明肽不存在 (0nM) 或存在 (1、5、25、100 和 2000nM) 下, 感染 HepaRG 细胞。将感染性接种物 (HBV 的基因型 D) 和所述肽一起孵育过夜。洗涤之后, 将细胞再维持 12 天, 让病毒基因表达。收集第 8-12 天的细胞培养上清液并用定量的市售 ELISA 分析所分泌的 HBSAg。将相应的未完成感染的 HbsAg 值设定为 100%, 感染的抑制程度用未完成感染%来表示。

[0462] 免疫荧光实验 / 显微镜检查

[0463] 将生长在盖玻片上的原代肝细胞与 200nM 相应肽一起在无血清细胞培养基中孵育。在 37°C 孵育 1 小时后, 固定细胞并用 DAPI 对核进行染色。在转盘共聚焦显微镜 (Spinning Disk Confocal Microscope) 上, 进行荧光显微镜检查, 放大倍数为 600x。

[0464] FACS 分析

[0465] 将冷冻保藏的原代肝细胞解冻并用无血清培养基洗涤。在每次反应中, 将 4×10^5 细胞 / ml 与浓度为 200nM 的相应肽一起在无血清细胞培养基中孵育。染色在室温下进行 30 分钟, 同时频繁地混合。然后, 细胞经充分洗涤并重悬于 PBS 中, 进行 FACS 分析。

[0466] 结果见图。

[0467] HBVpreS1-肽与小鼠干扰素 α 的融合构建体 - 产生、纯化和活性测定

[0468] 使用杆状病毒表达系统, 让 HBVpreS1-肽 - 小鼠干扰素 α 融合蛋白 (参见图 14) 在 Hi5- 昆虫细胞中表达。在感染后第 5 天收获分泌在细胞上清液中的融合蛋白并在第一步骤中通过亲和色谱纯化在 C-端融合 preS1-干扰素的 His- 标签 (His-tag fused C-terminally to the preS1-interferon)。测定洗脱流分中 preS1-干扰素蛋白的活性, 即通过测定它们抑制新城鸡瘟病毒介导的细胞死亡的能力来测定其活性。通过在 S75-琼脂糖柱上的凝胶过滤色谱, 用 1M 尿素 -PBS 缓冲液, 进一步纯化含有功能性 preS1-干扰素蛋白的洗脱流分 (参见图 15)。

[0469] 在以上说明书、权利要求书和 / 或附图中公开的特征, 无论是单独的还是以任何组合形式, 都是用于以不同形式实现本发明所必需的。

[0470] 参考文献

[0471] 1.Seeger, C.& Mason, W.S.Hepatitis B virus biology (乙肝病毒生物学).Microbiol Mol Biol Rev 64, 51-68 (2000).

[0472] 2.Nassal, M.Hepatitis B virus morphogenesis (乙肝病毒的形态发生).Curr Top Microbiol Immunol 214, 297-337 (1996).

[0473] 3.Gripon, P., Le Seyec, J., Rumin, S.& Guguen-Guillouzo, C.Myristylation of the hepatitis B virus large surface protein is essential for viral infectivity (乙肝病毒大表面蛋白豆蔻酰化是病毒感染性必不可少的).Virology 213, 292-299 (1995).

[0474] 4.Le Seyec, J., Chouteau, P., Cannie, I., Guguen-Guillouzo, C.&Gripon, P.Infection process of the hepatitis B virus depends on the presence of a defied sequence in the pre-S1 domain (乙肝病毒的感染过程取决于 pre-S1 区中特定序列的存在).J Virol 73, 2052-2057 (1999).

[0475] 5.Juliano RL (1988) Factors affecting the clearance kinetics and tissue distribution of liposomes, microspheres, and emulsions (影响脂质体、微球体和乳剂的清除动力学和组织

分布的因素).Adv Drug DelivRev 2 : 31-54.

[0476] 6.Hashida M and Takakura Y(1994)Pharmacokinetics in design of polymeric drug delivery systems(聚合药物递送系统设计中的药代动力学).J Control Release 31 : 163-171.

[0477] 7.Lu, X.M., Fischman, A.J., Jyawook, S.L., Hendricks, K., Tompkins, R.G.and Yarmush, M.L.(1994)Antisense DNA delivery in vivo : liver targeting by receptor-mediated uptake(反义 DNA 的体内递送 : 通过受体 - 介导摄取的肝脏靶向).J.Nucl.Med.35, 269-275.

[0478] 8.Freireich, E.J., Gehan, E.A., Rall, D.P., Schmidt, L.H.& Skipper, H.E.Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey, and man(在小鼠、大鼠、仓鼠、狗、猴和人体内抗癌剂毒性的定量比较).Cancer Chemother Rep 50, 219-244(1966).

[0479] 9.Erion, M.D.Prodrugs for liver-targeted drug delivery(用于肝脏靶向药物递送的前药).541-572.Biotechnology : Pharmaceutical Aspects. 第 V 卷, 第 II 部分, Prodrugs. Springer New York, 2007.

[0480] 10.Gripon, P., Cannie, I.& Urban, S.Efficient inhibition of hepatitis B virus infection by acylated peptides derived from the large viral surfaceprotein(源自大病毒表面蛋白的酰化肽对乙肝病毒感染的有效抑制).JViro1 79, 1613-1622(2005).

[0481] 11.Glebe D, Urban S, Knoop EV, Cag N, Krass P, Grun S, Bulavaite A, Sasnauskas K, Gerlich WH.Mapping of the hepatitis B virus attachment site by use of infection-inhibiting preS1 lipopeptides and tupaia hepatocytes(通过使用感染 - 抑制性 preS1 脂肽和 tupaia 肝细胞, 对乙肝病毒连接位点作图).Gastroenterology 129, 234-245(2005).

[0001]

序 列 表

<110> 海德堡吕布莱希特—卡尔斯大学

<120> 乙肝病毒 (HBV) 的疏水性修饰的 preS-衍生肽及其作为载体将化合物特异性递送到肝脏的用途

<130> U30197PCT

<150> US 61/062, 347

<151> 2008-01-25

<160> 42

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 59

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> HBV preS1 共有序列(位置(-11)至 48)

<400> 1

Met Gly Gly Trp Ser Ser Thr Pro Arg Lys Gly Met Gly Thr Asn Leu
1 5 10 15

Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro
20 25 30

Ala Phe Arg Ala Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Asn
35 40 45

Lys Asp His Trp Pro Glu Ala Asn Lys Val Gly
50 55

<210> 2

<211> 59

<212> PRT

<213> 乙肝病毒

[0002]

<400> 2

Met Gly Gly Trp Ser Ser Lys Pro Arg Lys Gly Met Gly Thr Asn Leu
1 5 10 15

Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro
20 25 30

Ala Phe Gly Ala Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Val
35 40 45

Lys Asp Asp Trp Pro Ala Ala Asn Gln Val Gly
50 55

<210> 3

<211> 59

<212> PRT

<213> 乙肝病毒

<400> 3

Met Gly Gly Trp Ser Ser Lys Pro Arg Lys Gly Met Gly Thr Asn Leu
1 5 10 15

Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro
20 25 30

Ala Phe Lys Ala Asn Ser Glu Asn Pro Asp Trp Asp Leu Asn Pro His
35 40 45

Lys Asp Asn Trp Pro Asp Ala Asn Lys Val Gly
50 55

<210> 4

<211> 59

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> HBV preS1 序列位置(-11)至 48, 对应于 HBV 基因型 C, 但 Q46K

[0003]

<400> 4

Met Gly Gly Trp Ser Ser Lys Pro Arg Gln Gly Met Gly Thr Asn Leu
1 5 10 15

Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro
20 25 30

Ala Phe Gly Ala Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Asn
35 40 45

Lys Asp His Trp Pro Glu Ala Asn Lys Val Gly
50 55

<210> 5

<211> 48

<212> PRT

<213> 乙肝病毒

<400> 5

Met Gly Gln Asn Leu Ser Thr Ser Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp
1 5 10 15

His Gln Leu Asp Pro Ala Phe Arg Ala Asn Thr Ala Asn Pro Asp Trp
20 25 30

Asp Phe Asn Pro Asn Lys Asp Thr Trp Pro Asp Ala Asn Lys Val Gly
35 40 45

<210> 6

<211> 58

<212> PRT

<213> 乙肝病毒

<400> 6

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

Thr Thr Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro Ala

[0004]

20

25

30

Phe Arg Ala Asn Thr Arg Asn Pro Asp Trp Asp His Asn Pro Asn Lys
35 40 45

Asp His Trp Thr Glu Ala Asn Lys Val Gly
50 55

<210> 7
<211> 59
<212> PRT
<213> 乙肝病毒

<400> 7

Met Gly Ala Pro Leu Ser Thr Thr Arg Arg Gly Met Gly Gln Asn Leu
1 5 10 15

Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro
20 25 30

Leu Phe Arg Ala Asn Ser Ser Ser Pro Asp Trp Asp Phe Asn Thr Asn
35 40 45

Lys Asp Ser Trp Pro Met Ala Asn Lys Val Gly
50 55

<210> 8
<211> 58
<212> PRT
<213> 乙肝病毒

<400> 8

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

Ala Ser Asn Pro Leu Gly Phe Leu Pro Asp His Gln Leu Asp Pro Ala
20 25 30

[0005]

Phe Arg Ala Asn Thr Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Lys Lys
35 40 45

Asp Pro Trp Pro Glu Ala Asn Lys Val Gly
50 55

<210> 9
<211> 59
<212> PRT
<213> 乙肝病毒

<400> 9

Met Gly Ala Pro Leu Ser Thr Ala Arg Arg Gly Met Gly Gln Asn Leu
1 5 10 15

Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro
20 25 30

Leu Phe Arg Ala Asn Ser Ser Ser Pro Asp Trp Asp Phe Asn Thr Asn
35 40 45

Lys Asp Asn Trp Pro Met Ala Asn Lys Val Gly
50 55

<210> 10
<211> 48
<212> PRT
<213> 卷毛猴乙肝病毒

<400> 10

Met Gly Leu Asn Gln Ser Thr Phe Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Ser
1 5 10 15

His Gln Leu Asp Pro Leu Phe Lys Ala Asn Ala Gly Ser Ala Asp Trp
20 25 30

Asp Lys Asn Pro Asn Lys Asp Pro Trp Pro Gln Ala His Asp Thr Ala
35 40 45

[0006]

<210> 11
<211> 47
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> HBV preS1 共有序列(位置 2 至 48)

<400> 11

Gly Thr Asn Leu Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His
1 5 10 15

Gln Leu Asp Pro Ala Phe Arg Ala Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp
20 25 30

Phe Asn Pro Asn Lys Asp His Trp Pro Glu Ala Asn Lys Val Gly
35 40 45

<210> 12
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> HBV preS1 共有序列(位置 2 至 21)

<400> 12

Gly Thr Asn Leu Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His
1 5 10 15

Gln Leu Asp Pro
20

<210> 13
<211> 47
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> HBV preS1 序列位置 2 至 48, 对应于 HBV 基因型 C, 但 Q46K

[0007]

<400> 13

Gly Thr Asn Leu Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His
1 5 10 15

Gln Leu Asp Pro Ala Phe Gly Ala Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp
20 25 30

Phe Asn Pro Asn Lys Asp His Trp Pro Glu Ala Asn Lys Val Gly
35 40 45

<210> 14

<211> 44

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> HBV preS1 序列位置 5 至 48, 对应于 HBV 基因型 C, 但 Q46K

<400> 14

Leu Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp
1 5 10 15

Pro Ala Phe Gly Ala Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro
20 25 30

Asn Lys Asp His Trp Pro Glu Ala Asn Lys Val Gly
35 40

<210> 15

<211> 40

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> HBV preS1 序列位置 9 至 48, 对应于 HBV 基因型 C, 但 Q46K

<400> 15

Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro Ala Phe Gly
1 5 10 15

[0008]

Ala Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Asn Lys Asp His
20 25 30

Trp Pro Glu Ala Asn Lys Val Gly
35 40

<210> 16

<211> 20

<212> PRT

<213> 乙肝病毒(位置 2 至 21, 基因型 C)

<400> 16

Gly Thr Asn Leu Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His
1 5 10 15

Gln Leu Asp Pro
20

<210> 17

<211> 17

<212> PRT

<213> 乙肝病毒(位置 5 至 21, 基因型 C)

<400> 17

Leu Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp
1 5 10 15

Pro

<210> 18

<211> 13

<212> PRT

<213> 乙肝病毒(位置 9 至 21, 基因型 C)

<400> 18

Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro
1 5 10

[0009]

<210> 19
<211> 14
<212> PRT
<213> 乙肝病毒(位置 2 至 15, 基因型 C)

<400> 19

Gly Thr Asn Leu Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro
1 5 10

<210> 20
<211> 11
<212> PRT
<213> 乙肝病毒(位置 5 至 15, 基因型 C)

<400> 20

Leu Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro
1 5 10

<210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> 乙肝病毒(位置 9 至 15)

<400> 21

Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro
1 5

<210> 22
<211> 22
<212> PRT
<213> 乙肝病毒(位置(-2)至 20, 基因型 C)

<400> 22

Gln Gly Met Gly Thr Asn Leu Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe
1 5 10 15

Pro Asp His Gln Leu Asp
20

[0010]

<210> 23
<211> 47
<212> PRT
<213> 乙肝病毒(位置 2 至 48, 基因型 D)

<400> 23

Gly Gln Asn Leu Ser Thr Ser Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His
1 5 10 15

Gln Leu Asp Pro Ala Phe Arg Ala Asn Thr Ala Asn Pro Asp Trp Asp
20 25 30

Phe Asn Pro Asn Lys Asp Thr Trp Pro Asp Ala Asn Lys Val Gly
35 40 45

<210> 24
<211> 44
<212> PRT
<213> 乙肝病毒(位置 5 至 48, 基因型 D)

<400> 24

Leu Ser Thr Ser Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp
1 5 10 15

Pro Ala Phe Arg Ala Asn Thr Ala Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro
20 25 30

Asn Lys Asp Thr Trp Pro Asp Ala Asn Lys Val Gly
35 40

<210> 25
<211> 40
<212> PRT
<213> 乙肝病毒(位置 9 至 48, 基因型 D)

<400> 25

Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro Ala Phe Arg
1 5 10 15

[0011]

Ala Asn Thr Ala Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Asn Lys Asp Thr
20 25 30

Trp Pro Asp Ala Asn Lys Val Gly
35 40

<210> 26
<211> 20
<212> PRT
<213> 乙肝病毒(位置 2 至 21, 基因型 D)

<400> 26

Gly Gln Asn Leu Ser Thr Ser Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His
1 5 10 15

Gln Leu Asp Pro
20

<210> 27
<211> 17
<212> PRT
<213> 乙肝病毒(位置 5 至 21, 基因型 D)

<400> 27

Leu Ser Thr Ser Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp
1 5 10 15

Pro

<210> 28
<211> 13
<212> PRT
<213> 乙肝病毒(位置 9 至 21, 基因型 D)

<400> 28

Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro
1 5 10

[0012]

<210> 29
<211> 14
<212> PRT
<213> 乙肝病毒(位置 2 至 15, 基因型 D)

<400> 29

Gly Gln Asn Leu Ser Thr Ser Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro
1 5 10

<210> 30
<211> 11
<212> PRT
<213> 乙肝病毒(位置 5 至 15, 基因型 D)

<400> 30

Leu Ser Thr Ser Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro
1 5 10

<210> 31
<211> 47
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> HBV preS1 序列位置 2 至 48, 对应于基因型 C(但 Q46K), 在位置 21、23、29、30 具有 Ala 取代

<400> 31

Gly Thr Asn Leu Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His
1 5 10 15

Gln Leu Asp Ala Ala Ala Gly Ala Asn Ser Asn Ala Ala Asp Trp Asp
20 25 30

Phe Asn Pro Asn Lys Asp His Trp Pro Glu Ala Asn Lys Val Gly
35 40 45

<210> 32
<211> 59
<212> PRT
<213> 人工

[0013]

<220>

<223> HBV preS1 序列位置(-11)至 48, 对应于基因型 C (但 Q46K), D20A

<400> 32

Met Gly Gly Trp Ser Ser Lys Pro Arg Gln Gly Met Gly Thr Asn Leu
1 5 10 15

Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Ala Pro
20 25 30

Ala Phe Gly Ala Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Asn
35 40 45

Lys Asp His Trp Pro Glu Ala Asn Lys Val Gly
50 55

<210> 33

<211> 47

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> HBV preS1 序列位置 2 至 48, 对应于基因型 C (但 Q46K), D20A

<400> 33

Gly Thr Asn Leu Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His
1 5 10 15

Gln Leu Ala Pro Ala Phe Gly Ala Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp
20 25 30

Phe Asn Pro Asn Lys Asp His Trp Pro Glu Ala Asn Lys Val Gly
35 40 45

<210> 34

<211> 59

<212> PRT

<213> 人工

[0014]

<220>

<223> HBV preS1 序列位置(-11)至 48, 对应于基因型 C (但 Q46K), S27A, N29A

<400> 34

Met Gly Gly Trp Ser Ser Lys Pro Arg Gln Gly Met Gly Thr Asn Leu
1 5 10 15

Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro
20 25 30

Ala Phe Gly Ala Asn Ala Asn Ala Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Asn
35 40 45

Lys Asp His Trp Pro Glu Ala Asn Lys Val Gly
50 55

<210> 35

<211> 47

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> HBV preS1 序列位置 2 至 48, 对应于基因型 C (但 Q46K), S27A, N29A

<400> 35

Gly Thr Asn Leu Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His
1 5 10 15

Gln Leu Asp Pro Ala Phe Gly Ala Asn Ala Asn Ala Pro Asp Trp Asp
20 25 30

Phe Asn Pro Asn Lys Asp His Trp Pro Glu Ala Asn Lys Val Gly
35 40 45

<210> 36

<211> 59

<212> PRT

<213> 人工

<220>

[0015]

<223> HBV preS1 序列位置(-11)至 48, 对应于基因型 C (但 Q46K), D20A, S27A, N29A

<400> 36

Met Gly Gly Trp Ser Ser Lys Pro Arg Gln Gly Met Gly Thr Asn Leu
1 5 10 15

Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Ala Pro
20 25 30

Ala Phe Gly Ala Asn Ala Asn Ala Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Asn
35 40 45

Lys Asp His Trp Pro Glu Ala Asn Lys Val Gly
50 55

<210> 37

<211> 47

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> HBV preS1 序列位置 2 至 48, 对应于基因型 C (但 Q46K), D20A, S27A, N29A

<400> 37

Gly Thr Asn Leu Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His
1 5 10 15

Gln Leu Ala Pro Ala Phe Gly Ala Asn Ala Asn Ala Pro Asp Trp Asp
20 25 30

Phe Asn Pro Asn Lys Asp His Trp Pro Glu Ala Asn Lys Val Gly
35 40 45

<210> 38

<211> 19

<212> PRT

<213> 乙肝病毒(位置 2 至 20, 基因型 D)

<400> 38

[0016]

Gly Thr Asn Leu Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His
1 5 10 15

Gln Leu Asp

<210> 39
<211> 48
<212> PRT
<213> 人工

<220>

<223> HBV preS1 序列位置 2 至 48, 基因型 C, 在位置 49 加上 K

<400> 39

Gly Thr Asn Leu Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His
1 5 10 15

Gln Leu Asp Pro Ala Phe Gly Ala Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp
20 25 30

Phe Asn Pro Asn Lys Asp His Trp Pro Glu Ala Asn Gln Val Gly Lys
35 40 45

<210> 40
<211> 48
<212> PRT
<213> 人工

<220>

<223> HBV preS1 序列位置 2 至 48, 基因型 C, 在位置 49 加上 K, 位置 L11 和 F13 为 D-氨基酸

<400> 40

Gly Thr Asn Leu Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His
1 5 10 15

Gln Leu Asp Pro Ala Phe Gly Ala Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp
20 25 30

[0017]

Phe Asn Pro Asn Lys Asp His Trp Pro Glu Ala Asn Gln Val Gly Lys
35 40 45

<210> 41

<211> 48

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> HBV preS1 序列位置 2 至 48, 对应于基因型 C (但 Q46K), 在位置 49 加上 K

<400> 41

Gly Thr Asn Leu Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His
1 5 10 15

Gln Leu Asp Pro Ala Phe Gly Ala Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp
20 25 30

Phe Asn Pro Asn Lys Asp His Trp Pro Glu Ala Asn Lys Val Gly Lys
35 40 45

<210> 42

<211> 48

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> HBV preS1 序列位置 2 至 48, 对应于基因型 C (但 Q46K), 在位置 49 加上 K, 位置 L11 和 F13 为 D-氨基酸

<400> 42

Gly Thr Asn Leu Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His
1 5 10 15

Gln Leu Asp Pro Ala Phe Gly Ala Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp
20 25 30

Phe Asn Pro Asn Lys Asp His Trp Pro Glu Ala Asn Lys Val Gly Lys
35 40 45

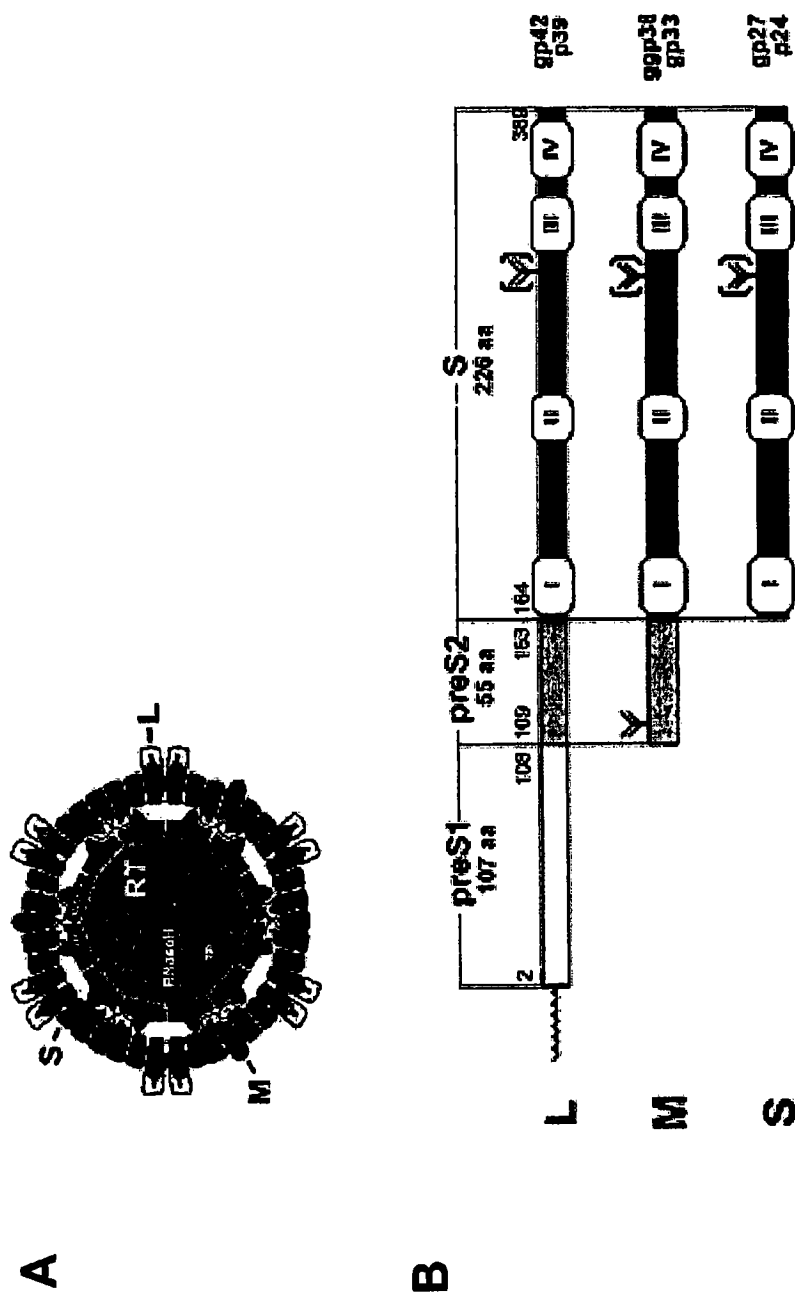


图 1

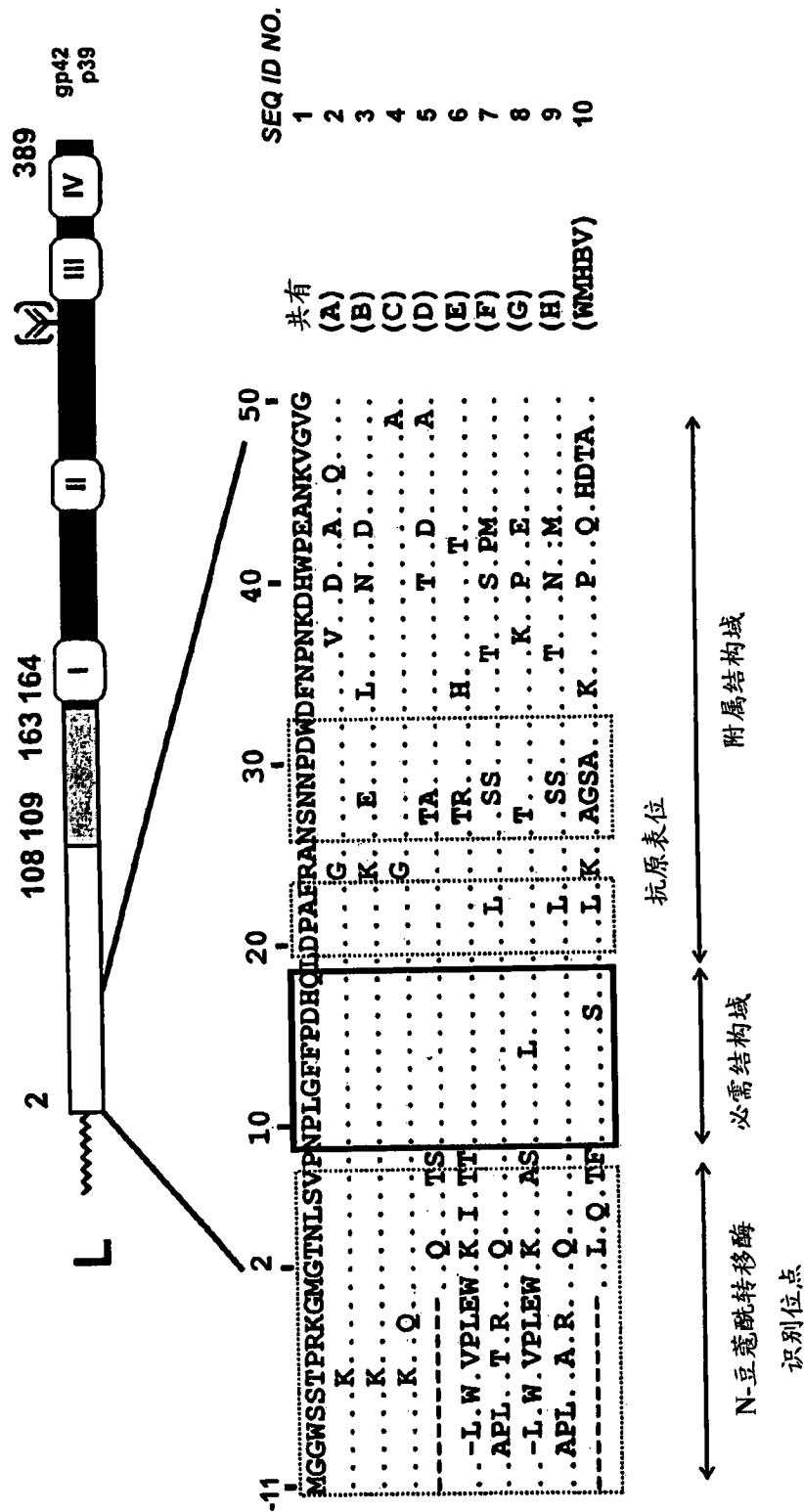


图 2

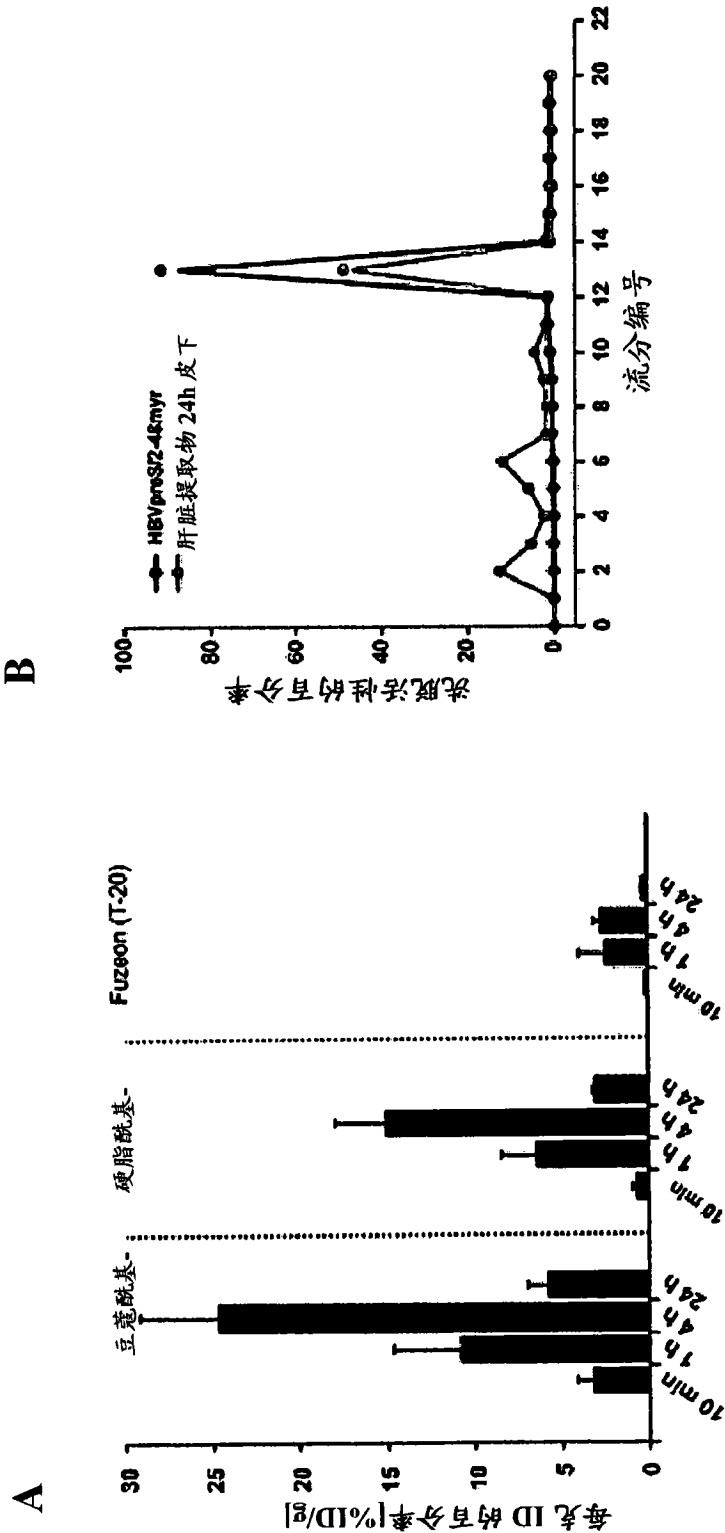


图 3

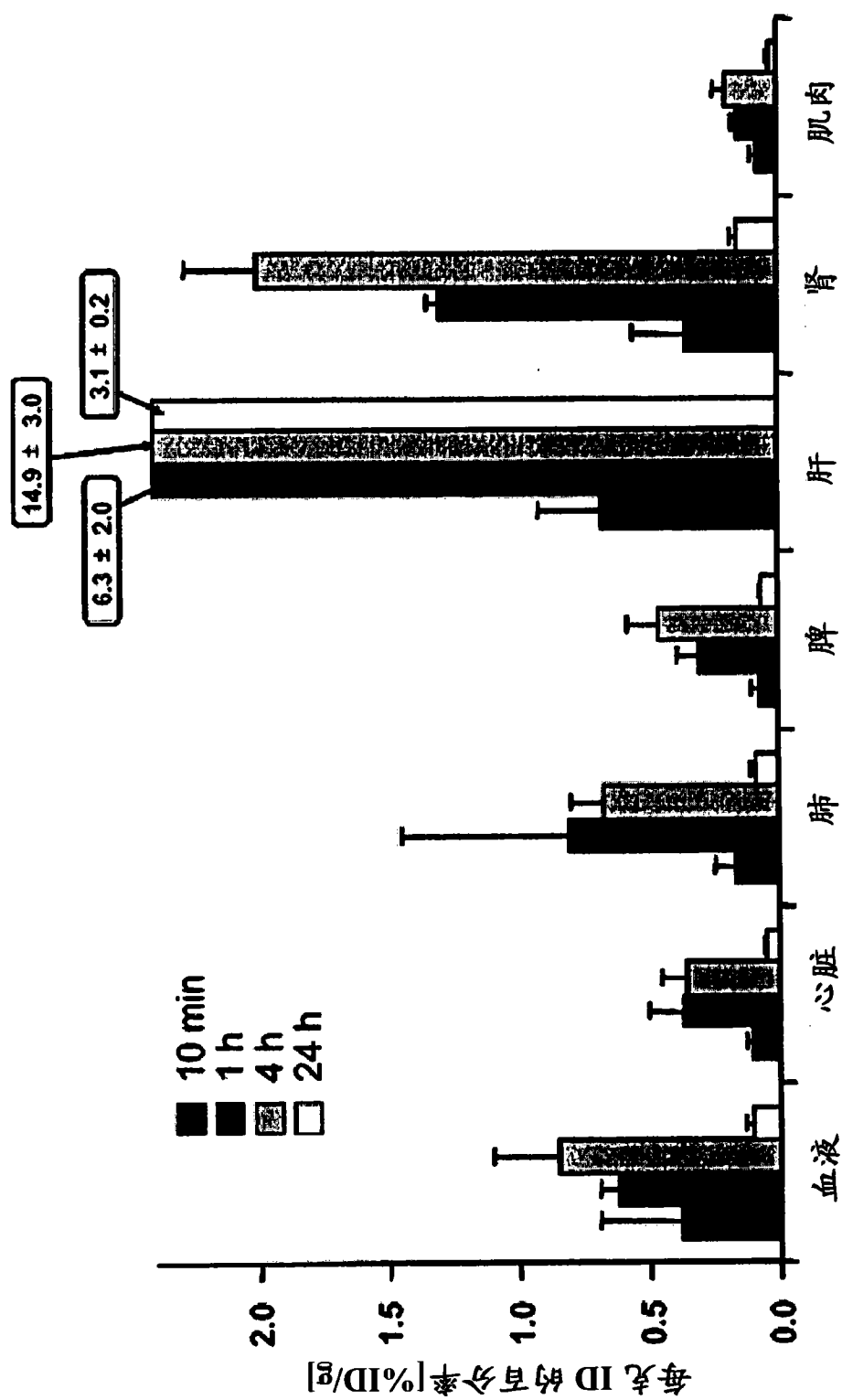


图 4

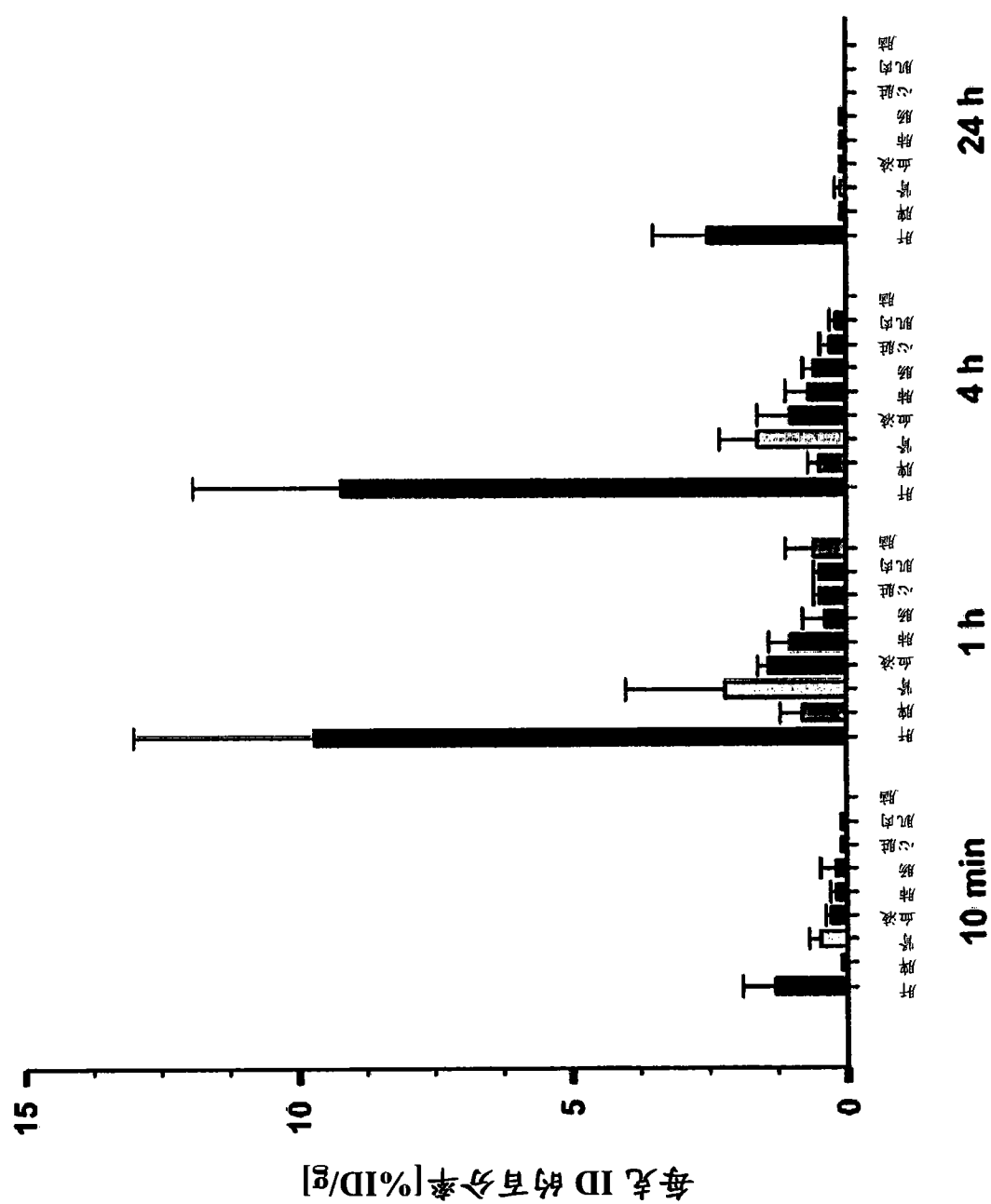


图 5

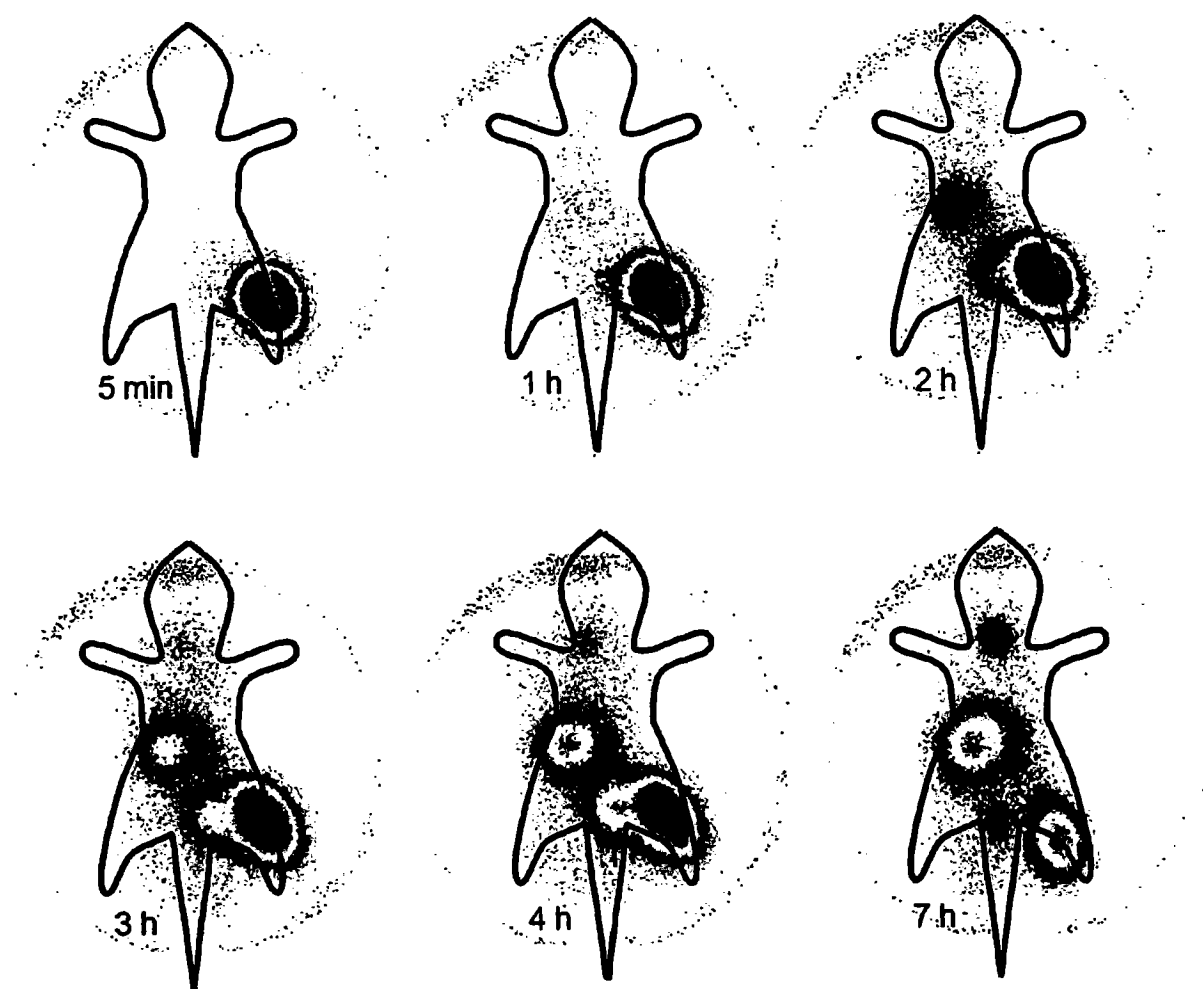


图 6

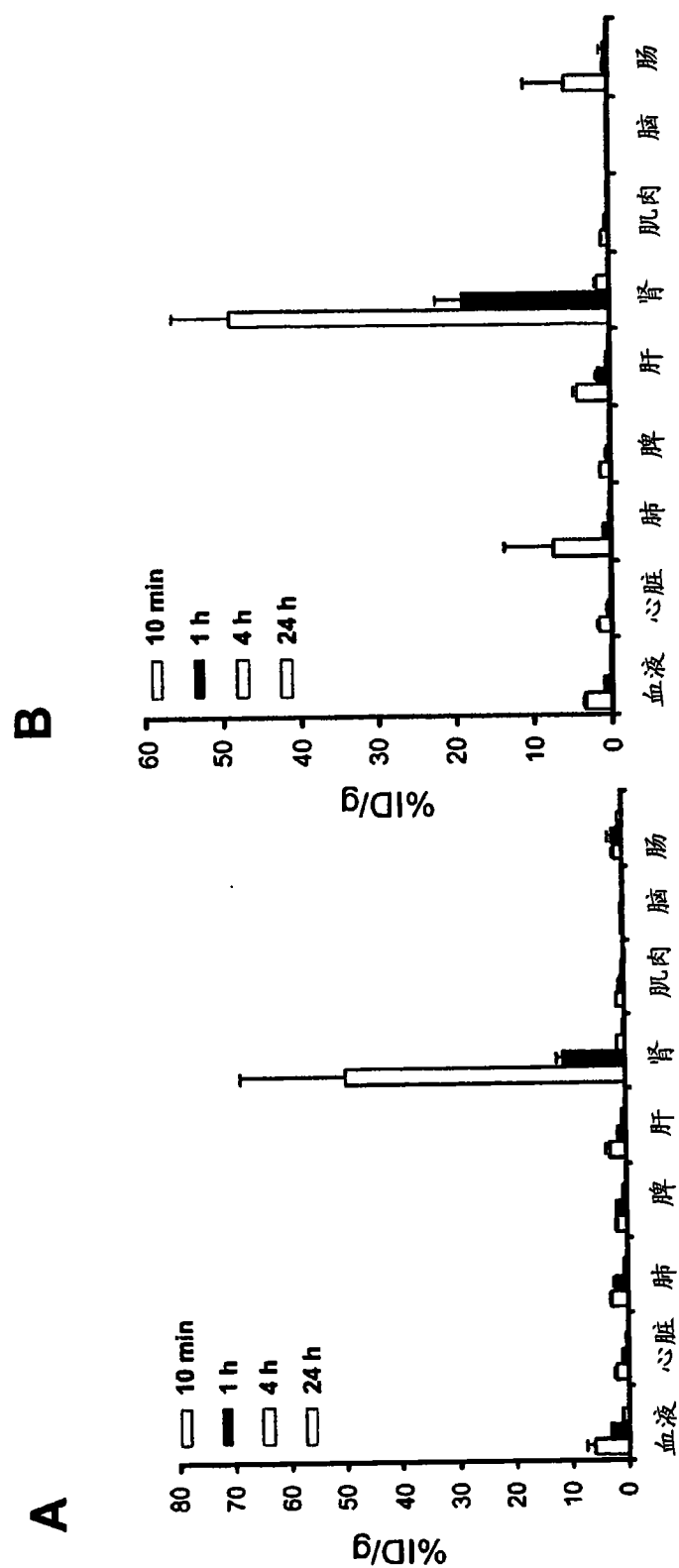


图 7

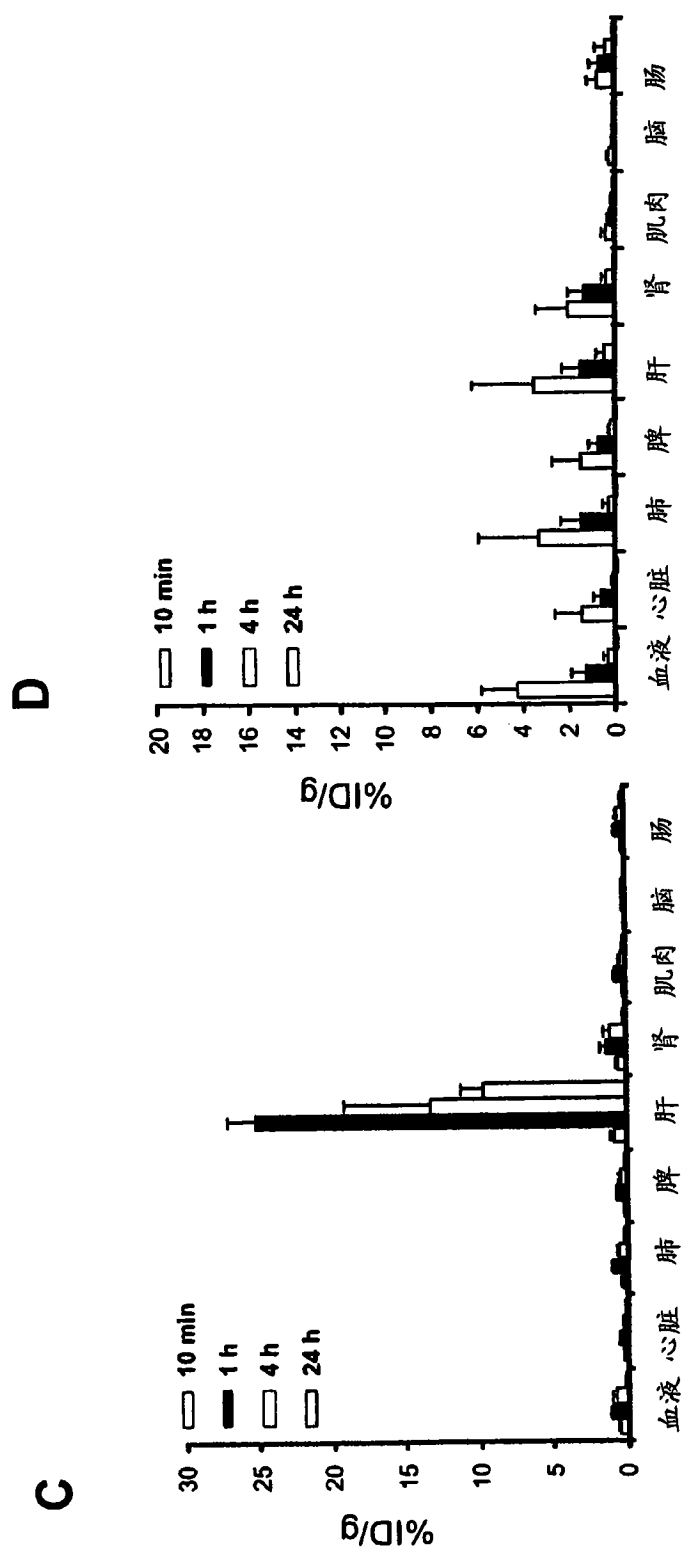


图 7

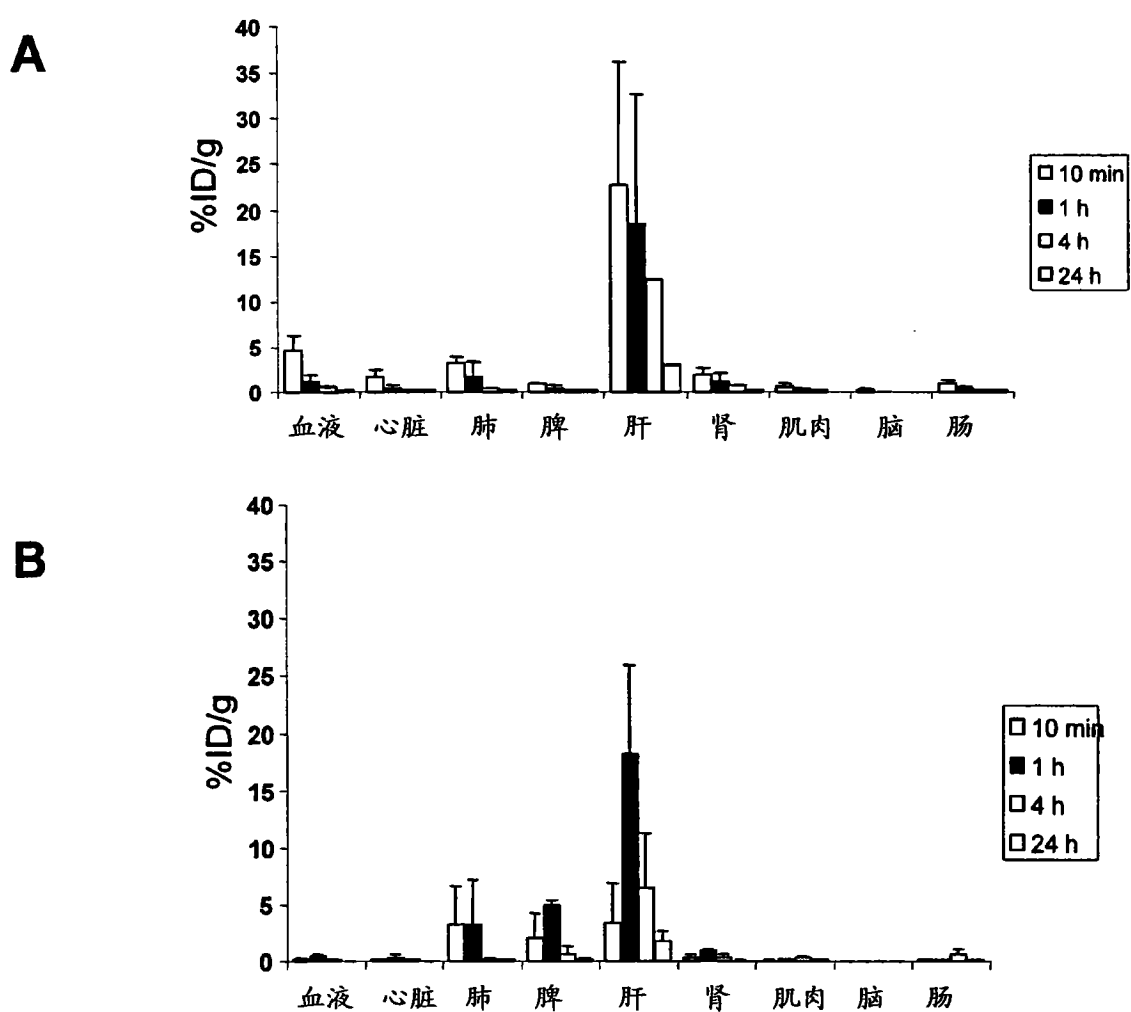


图 8

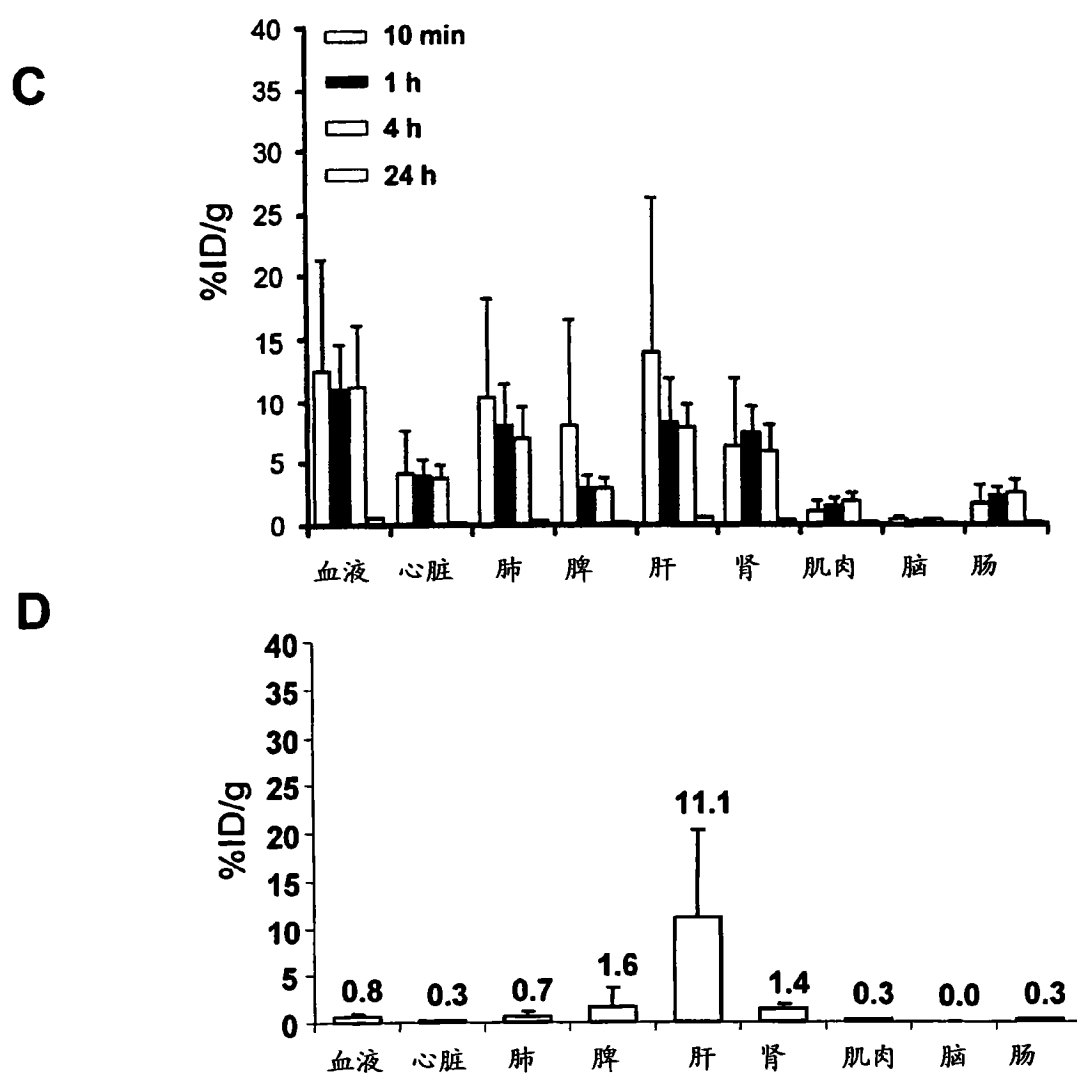


图 8

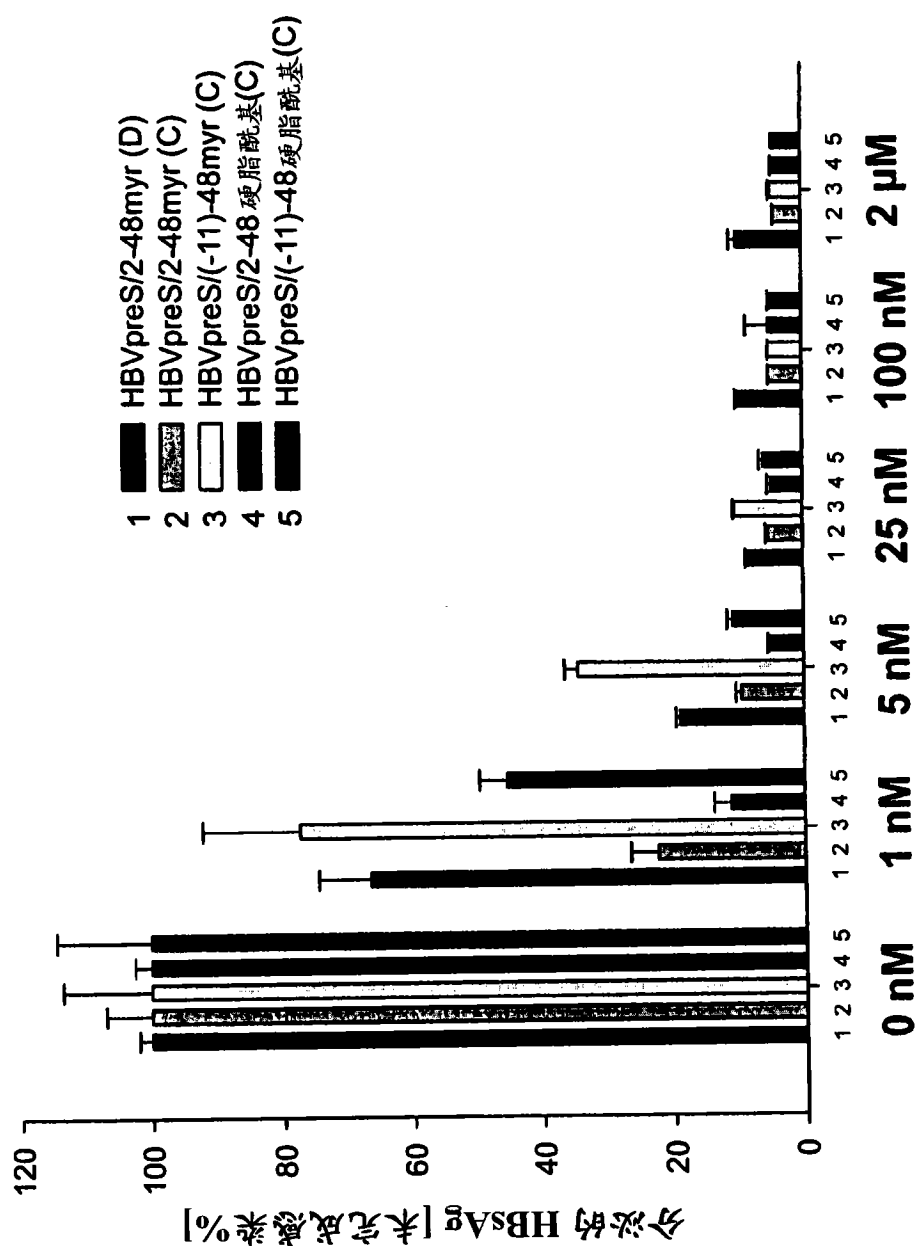


图 9A

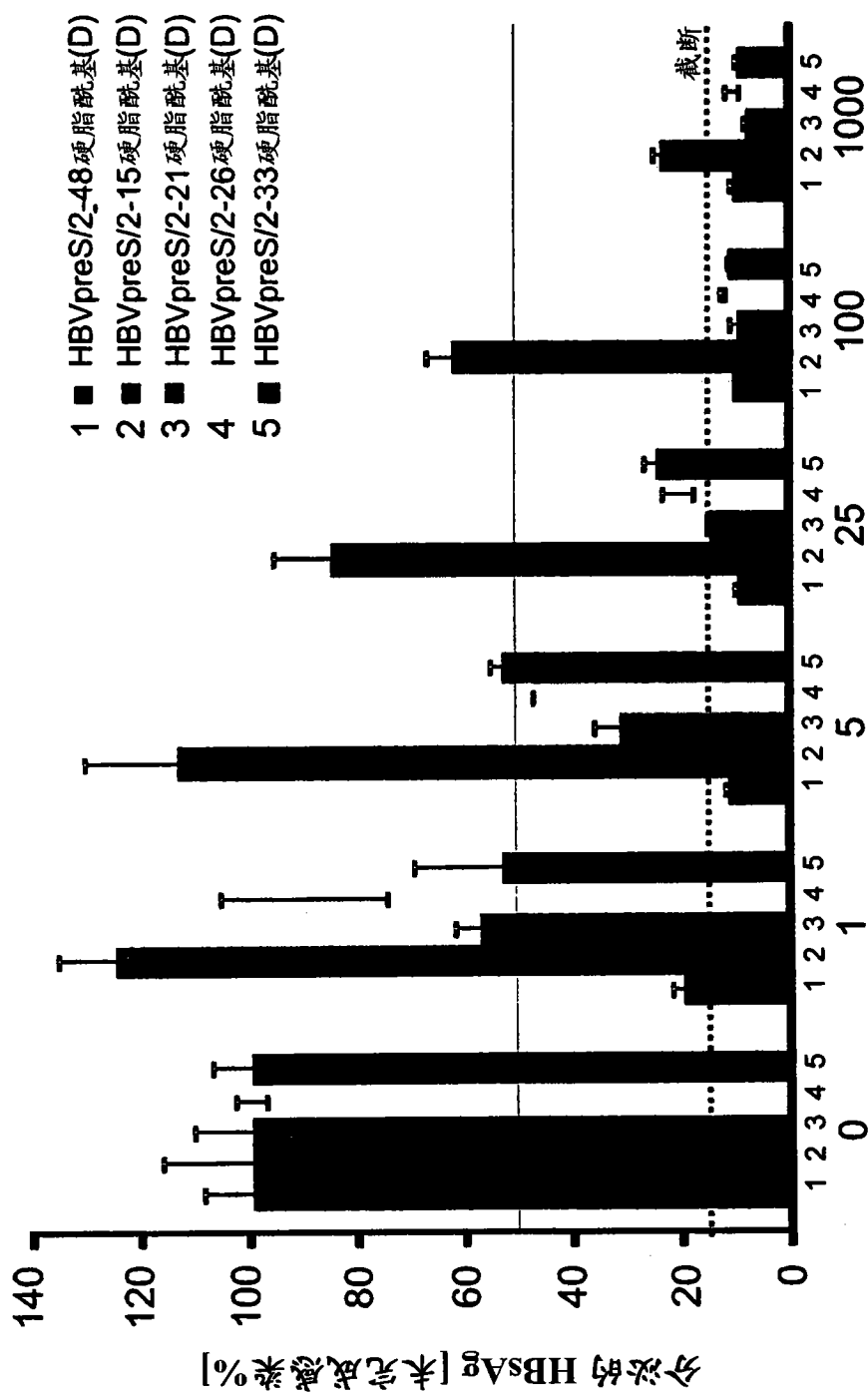


图 9B

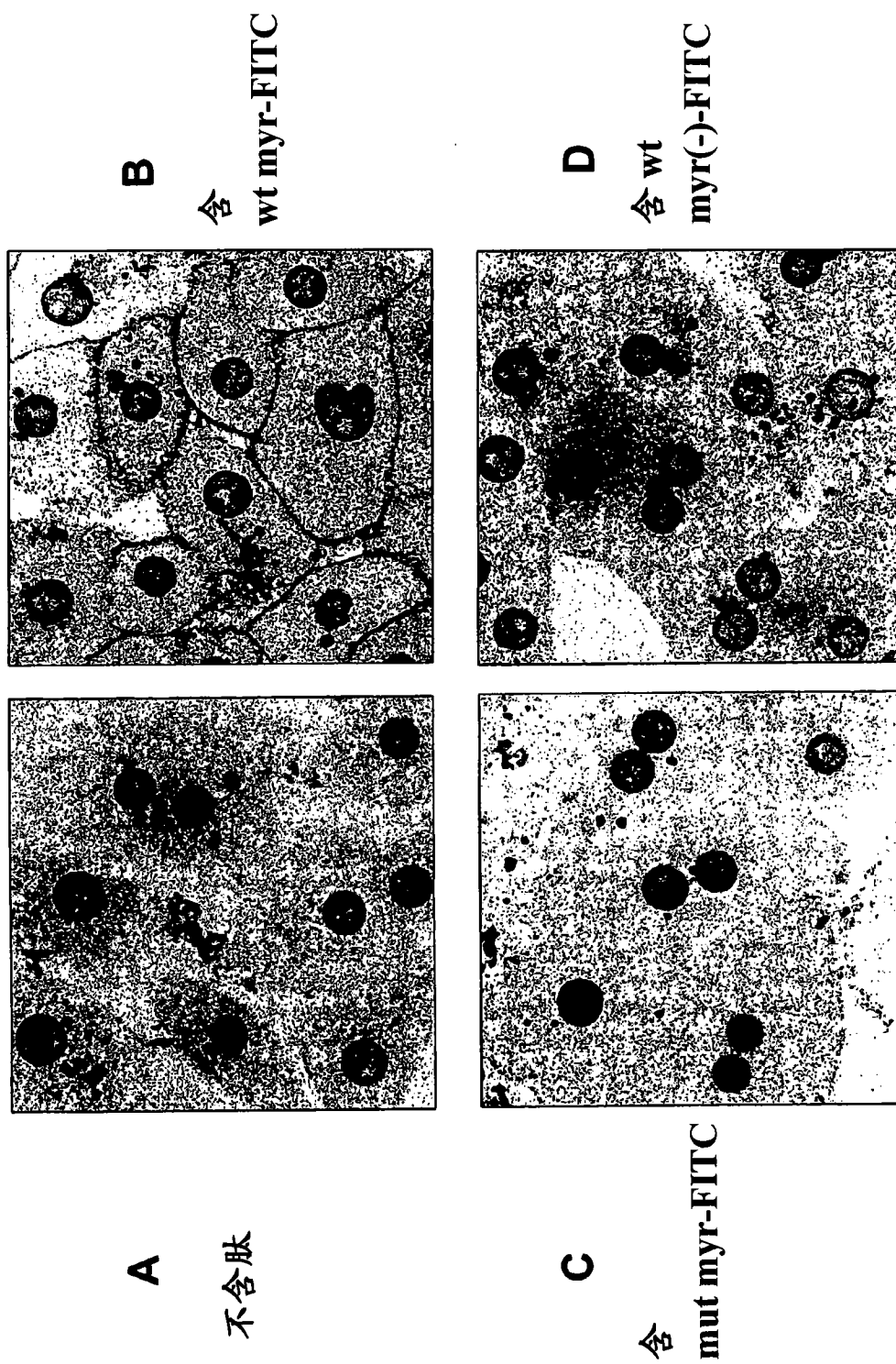


图 10

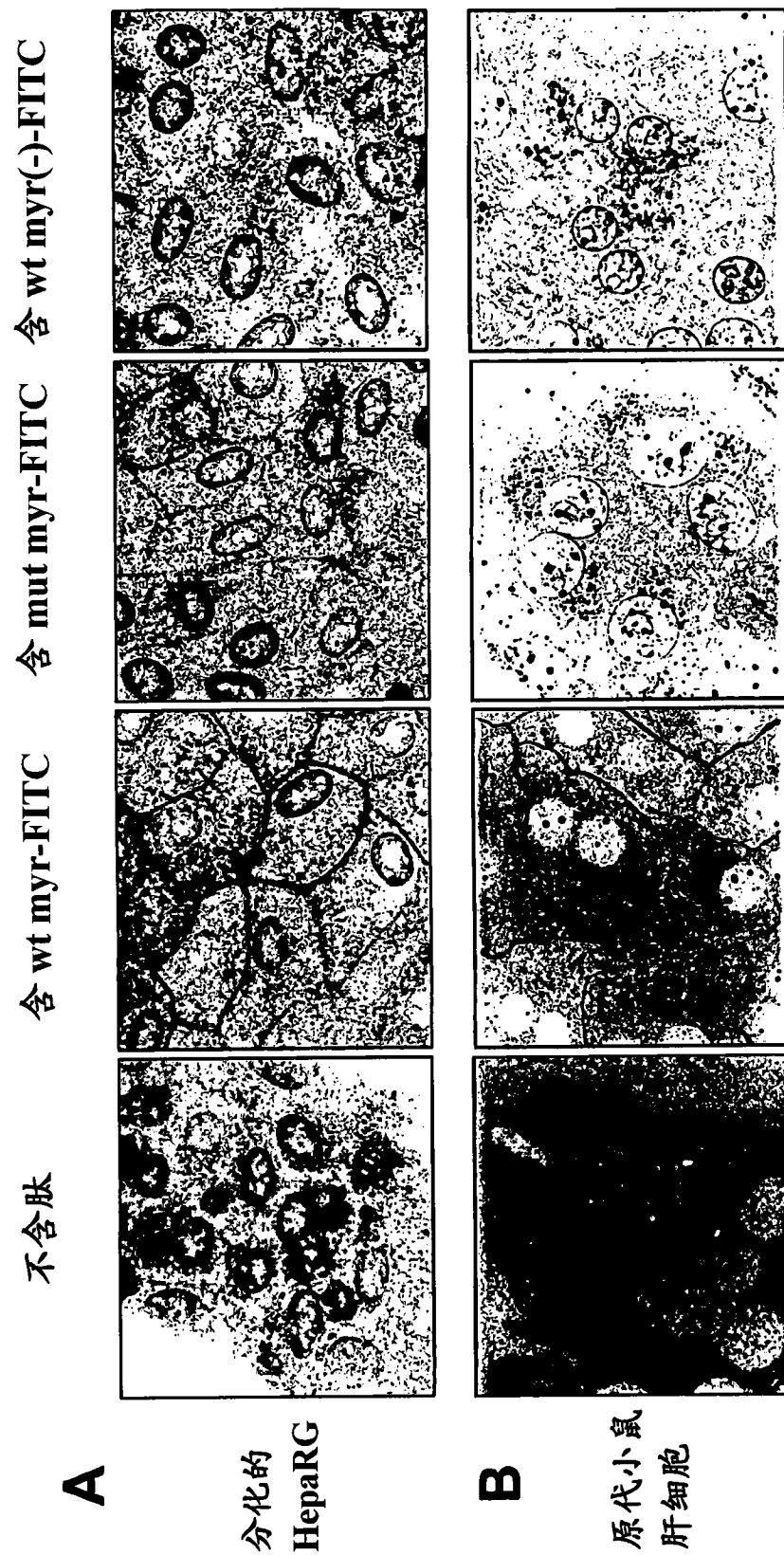


图 11

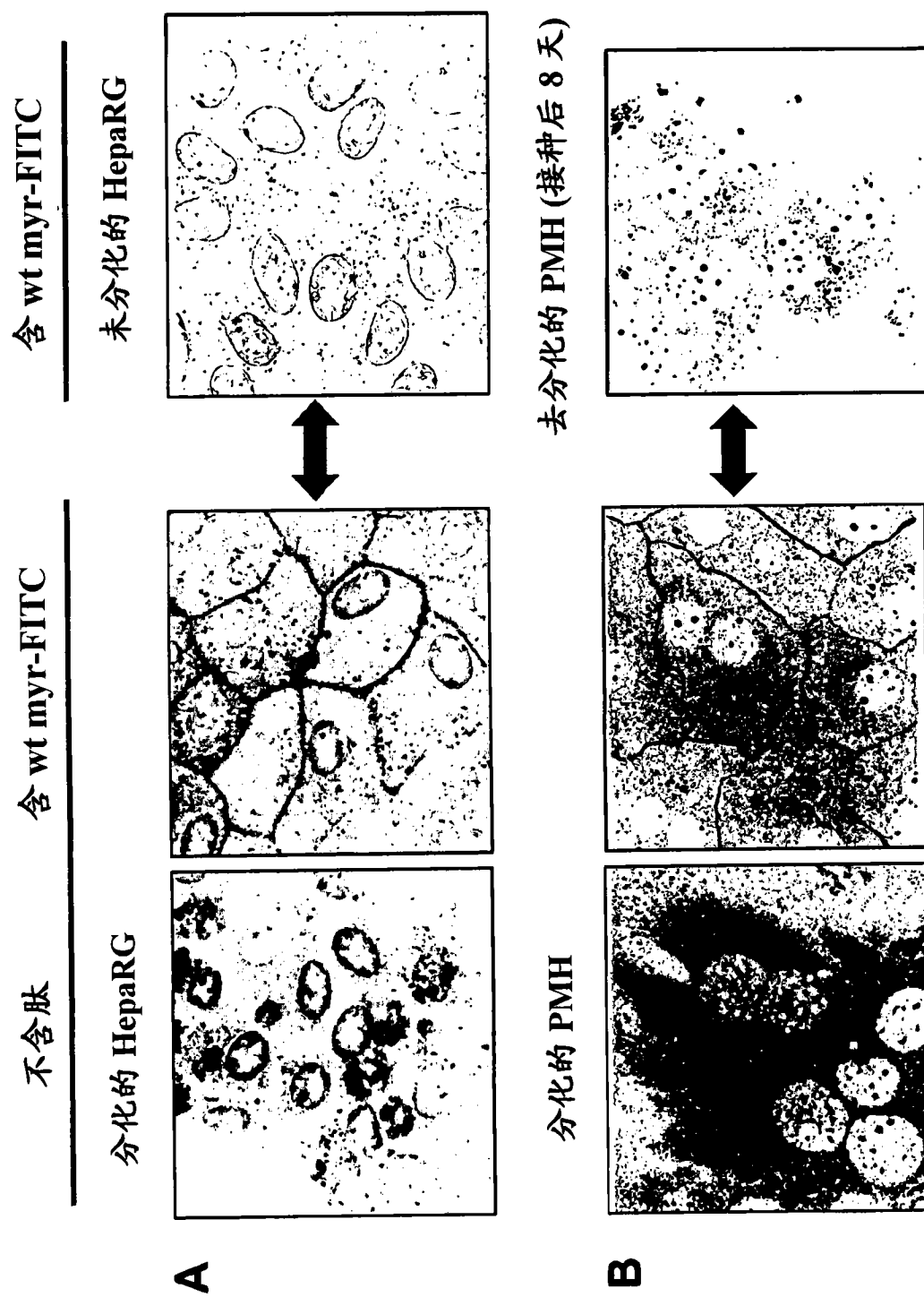


图 12

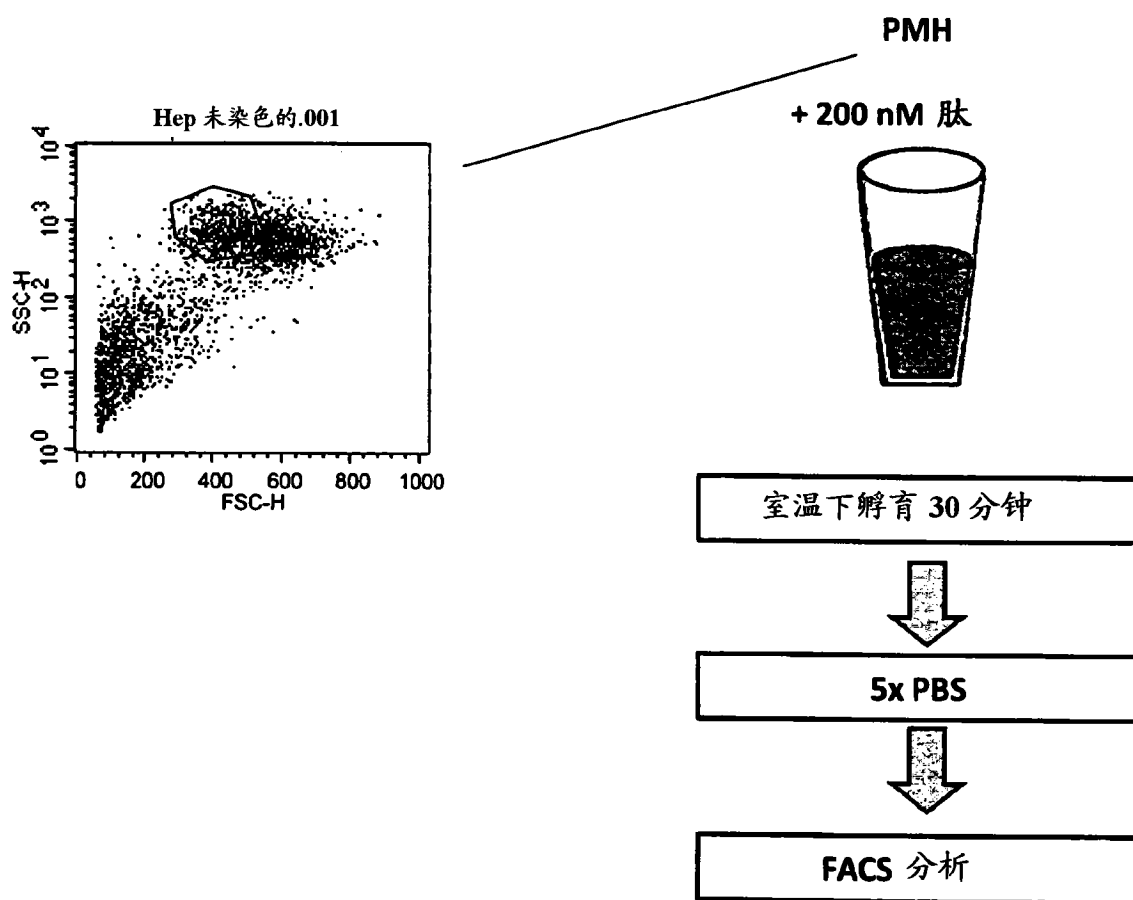


图 13A

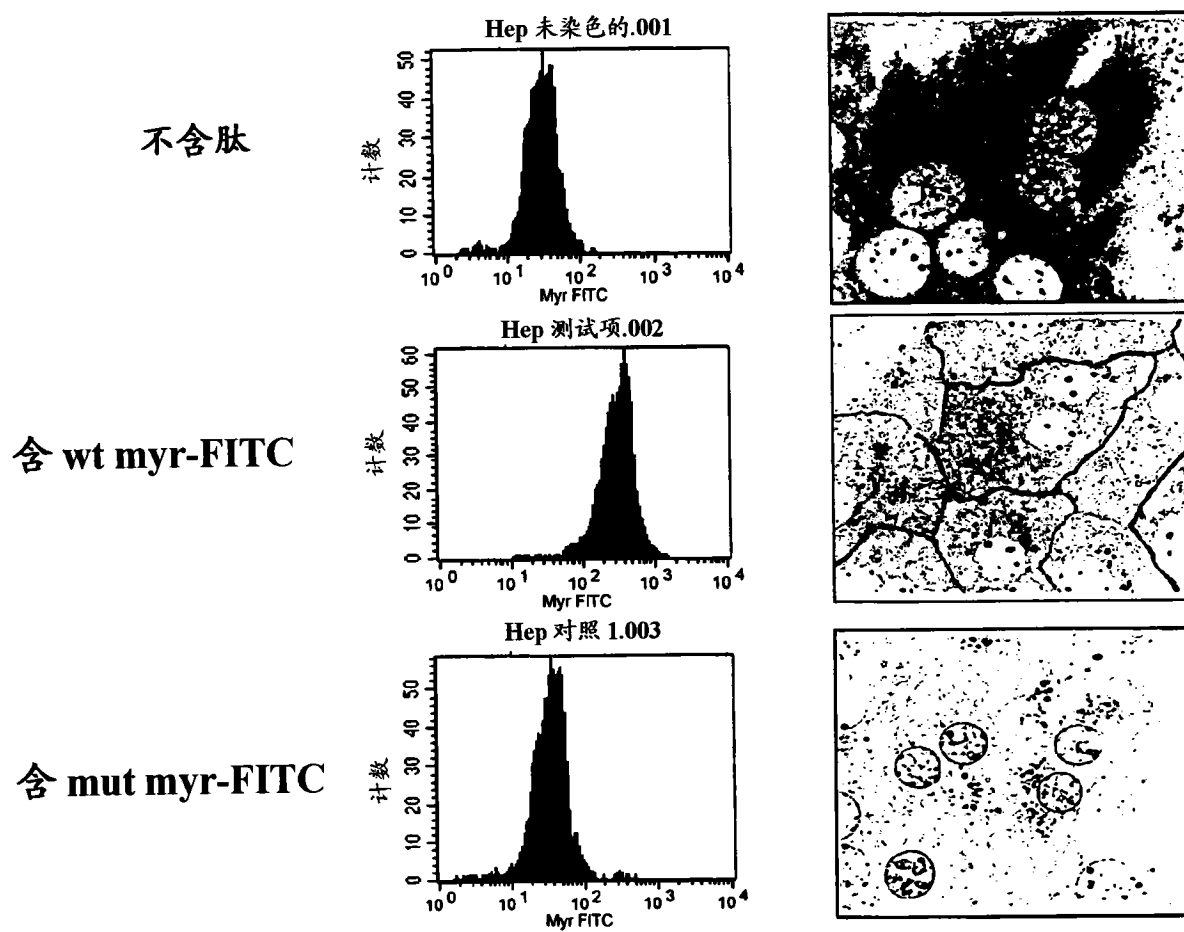


图 13B

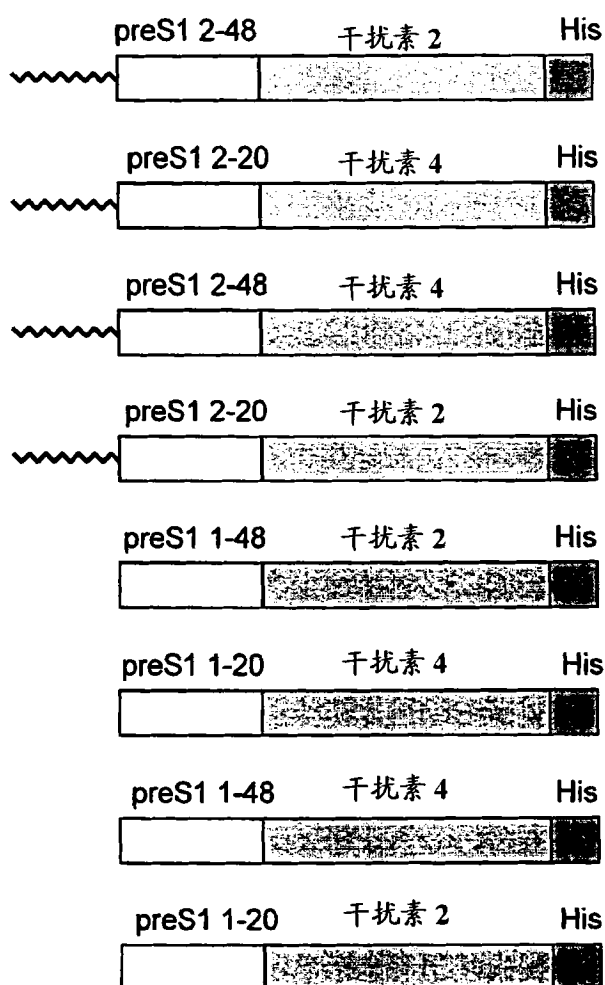


图 14

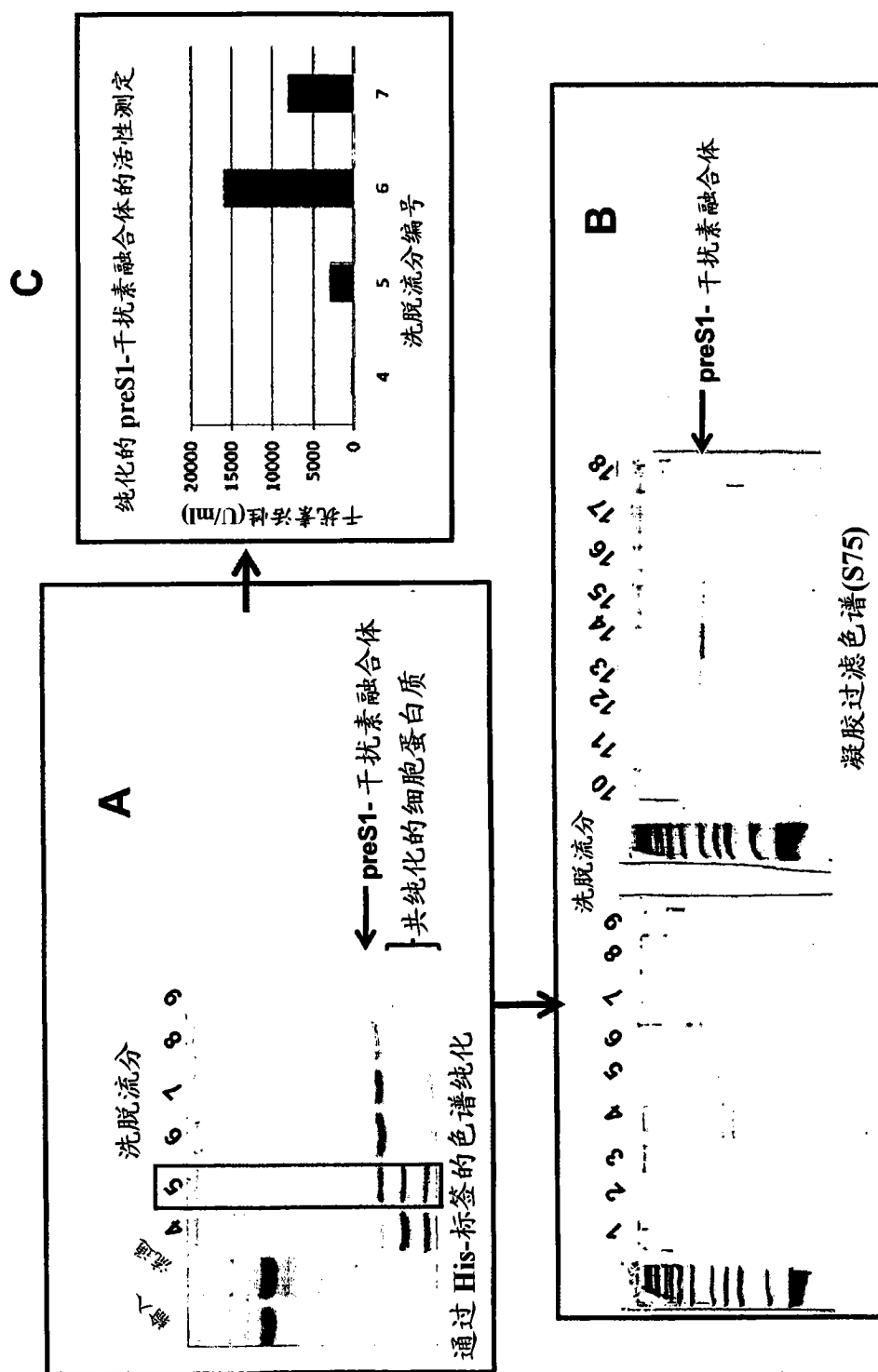


图 15