

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日:
2003年3月6日(06.03.2003)

PCT

(10) 国际公布号:
WO 03/018045 A1

- (51) 国际分类号⁷: A61K 38/16, C07K 14/01
- (21) 国际申请号: PCT/CN02/00405
- (22) 国际申请日: 2002年6月6日(06.06.2002)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
01130985.7 2001年8月29日(29.08.2001) CN
- (71)(72) 发明人/申请人: 周根发(ZHOU, Genfa) [CN/CN];
中国天津市天津大学新园村16楼3门202, Tianjin
300072 (CN)。
- (72) 发明人;及
- (75) 发明人/申请人(仅对美国): 田望霓(TIAN, Wangni)
[CN/CN]; 中国吉林省长春市清明街重庆胡同30号-
402, Jilin 130041 (CN)。
- (74) 代理人: 北京市中咨律师事务所(ZHONGZI LAW
OFFICE); 中国北京市海淀区三里河路甲11号, 中国
建材大厦C座三层, Beijing 100037 (CN)。
- (81) 指定国(国家): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG,
MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT,
RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW
- (84) 指定国(地区): ARIPO专利(GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI专利(BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG)
- 本国际公布:
— 包括国际检索报告。
- 所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期
PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: A PHARMACEUTICAL BEING USED FOR TREATING HIV INFECTION, THE COMPOSITION AND USES THEREOF

(54) 发明名称: 用于治疗HIV感染的药物、其组合物及其用途

(57) Abstract: A pharmaceutical being used for treating HIV infection is provided which has the following peptide sequence: X-SWETWEREIEINYTKQIYKILEESQQDRNEKDRNEKDLLE-Z, where S is Serine, W is Tryptophan, E is Glutamate, T is Threonine, R is Arginine, I is Isoleucine, N is Asparagine, Y is Tyrosine, K is Lysine, Q is Glutamine, L is Leucine, D is Aspartic acid, X is amino group, acetyl-hydrophobic group, or macromolecule carrier group, Z is carboxyl group, amino group, amido group, tert-nutyloxycarbonyl group, hydrophobic group, or macromolecule carrier group. The drug inhibits strongly the infection of HIV.

(57) 摘要

一种用于治疗 HIV 感染的药物, 它具有下述肽链序列:
X-SWETWEREIEINYTKQIYKILEESQQDRNEKDLLE-Z, 在上述肽链中, S 为
丝氨酸, W 为色氨酸, E 为谷氨酸, T 为苏氨酸, R 为精氨酸, I 为异亮
氨酸, N 为天门冬酰胺, Y 为酪氨酸, K 为赖氨酸, Q 为谷氨酰胺, L 为
亮氨酸, D 为天门冬氨酸; X 为氨基、乙酰基、疏水基团或大分子载体
基团; Z 为羧基、氨基、酰氨基、叔丁氧羰基, 疏水基团或大分子载体
基团。该药物对 HIV 病毒感染具有很强的抑制作用。

用于治疗 HIV 感染的药物、其组合物及其用途

技术领域

本发明涉及医药领域，更具体地说，涉及一种用于治疗 HIV 感染的药物、其组合物及其用途。

背景技术

1. 人免疫缺陷病毒和艾滋病的流行

人免疫缺陷病毒 (HIV) 可引起致病性逆转录病毒感染，并引起获得性免疫缺陷综合病 (AIDS, 即艾滋病) (Barre-Sinossi, F. et al., 1983, 科学 (Science) 220: 868-870)。虽然巨噬细胞、神经细胞及各种其它细胞也可被 HIV 感染 (Maddon et al., 1986, 细胞 (Cell) 47: 333-48), HIV 对 CD4+ 细胞表面的 CD4 分子有亲和性, 所以 CD4+ T 淋巴细胞是 HIV 的主要靶细胞 (Dalglish, A. et al., 1984, 自然 (Nature) 312: 767-8)。人被 HIV 感染后, CD4+ T 淋巴细胞被大量破坏, 以至丧失机体免疫机能。所以艾滋病患者极易患机遇性感染、神经系统功能紊乱、肿瘤等, 最终百病丛生, 衰竭而死 (Levy, J. A. 编辑: 急性 HIV 感染和易感细胞, 美国出版 2000 年, 63-78 页)。

艾滋病这一症状严重、死亡率极高的流行性传染病已成为威胁人类健康的主要死因之一。全球累计已有五千七百九十万人感染 HIV。十年来, 已有二千一百八十万人死于艾滋病。仅 2000 年, 又有五百三十万人新感染上 HIV。在中国, HIV 感染蔓延迅速。专家估计: 2000 年中国实际感染 HIV 的人数已超过八十万——一百万。它所危及的对象不仅是 20-49 岁的青壮年, 而且还有许多是儿童 (世界卫生组织报告 (WHO Report) 2000, UNAIDS and WHO)。

目前发现的 HIV 类型至少有两种: HIV-1 (Gallo, R. et al., 1984, 科学 (Science) 224: 500-503) 和 HIV-2 (Clavel, F. et al., 1986,

科学 (Science) 223: 343-346)。这两种类型病毒中的每一型又都存在着许多遗传异质性。仅 HIV-1 就存在着至少 11 种不同的序列基因型(A-J 和 O 亚型) (Jonassen, T. O. et al., 1997, 病毒学(Virol.) 231: 43-47)。其中 HIV-1 的 E 亚型主要分布于中非、泰国、印度、越南、柬埔寨、马来西亚、缅甸、中国、以及西半球(世界卫生组织报告(WHO Report) 1996)。在中国的 HIV 亚型主要有 B、E、C 亚型(Yu, E. S. et al., 1996, 美国公共卫生杂志(American J. Public Health) 86(8 Pt1): 1116-22)。

HIV 的繁殖周期包括以下重要步骤。首先, 病毒外包膜的糖蛋白 gp120 与 T₄ 淋巴细胞表面的 CD4 分子发生特异性的结合, 吸附于细胞膜上。在一组化学趋化因子受体的协助下, 病毒包膜与宿主细胞膜融合(Berger, E. A., et al., 1999, 免疫学年度综述(Annu. Rev. Immunol.) 17: 657-700)。融合后, 包装在核衣壳里 HIV 毒粒进入细胞, 脱去衣壳, 裸露出病毒核酸。病毒逆转录酶催化由 HIV 单股 RNA 转录成单股 DNA, 再在细胞聚合酶的催化下成为双股 DNA。HIV 的双股 DNA 可以以自由形式存在于胞浆中, 也可在病毒整合酶的催化下, 以双股 DNA 前病毒的形式整合于宿主染色体 DNA 内, 从而形成 HIV 的潜伏感染(Roe, T. et al., 1997, 病毒学杂志(J. Virol.) 71(2): 1334-40)。前病毒在宿主染色体中是稳定的, 不会被切除。前病毒能随染色体的复制而遗传。在 HIV 的 mRNA 翻译出大的聚蛋白后, 病毒蛋白酶切断并加工聚蛋白, 形成成熟的病毒结构蛋白(Xiang, Y. 和 Leis, J., 1997, 病毒学杂志(J. Virol.) 71(3): 2083-91)。最后, HIV 核酸和这些结构蛋白结合, 装配出新的病毒颗粒, 并以出芽的方式释放到细胞外(Kiss-Lazozlo, Hohn, T., 1996, 微生物学新动向(Trends in Microbiology) 4(12): 480-5)。

从 HIV 的复制周期可以看出: HIV 复制的关键阶段是 1) 病毒吸附并通过融合进入细胞; 2) 逆转录与整合; 3) 蛋白翻译与加工; 4) 病毒

的装配和释放。

2. 对 HIV 感染的治疗

多年来,为了设计有效的治疗药物和预防措施,医药界作出了许多尝试。但时至今日,还没有有效的预防疫苗和能够治愈艾滋病的药物。

理想的疫苗应当是无毒,能诱导中和抗体,并能在粘膜部位和血液中诱导持久的免疫应答 (Levy, J. A. 和 Levy, J. A., 1988, 医学动向综述 (Trends Med. Rev.) 2: 265-71)。目前,世界上研制出的多种 HIV 疫苗大部分还在动物实验阶段。对抗 HIV 膜蛋白 gp160 或 gp120 的疫苗早已进入一、二、三期临床试验,但效果却令人失望。该疫苗仅对实验室里的 HIV 有效,对绝大部分病人的 HIV 无效 (McElrath, M. J. et al., 1996, 美国国家科学院学报 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 93: 3972-77)。HIV 疫苗的研究进展缓慢,主要原因是该病毒的遗传物质具有高度的复杂性和变异性 (Bloom, B. R., 1996, 科学 (Science) 272: 1888-1900)。

世界上已批准使用的艾滋病药物主要为两大类: HIV 逆转录酶抑制剂 (Charles, C. J., et al., 1996, 美国医学协会杂志 (JAMA) 276: 146) 和 HIV 蛋白酶抑制剂 (Miles, S. A. et al., 美国国际艾滋病协会 (International AIDS Society USA) 4 (3): 15)。这两类药都作用在 HIV 感染宿主细胞的后期——转录及组合新病毒的过程。‘鸡尾酒疗法’就是将此两类抑制剂的联合使用 (Lafeuillade, A., et al., 1997, 传染病杂志 (J. Infect. Dis.) 175: 1051-55)。

逆转录酶抑制剂包括 AZT、ddI、ddC、3TC 及 d4T 等。用逆转录酶抑制剂治疗 HIV 感染迟早会产生病毒对药物的耐受,即病毒对药物的敏感性降低,药物抑制病毒的有效浓度上升几倍甚至几十倍 (Vella, S. 和 Floridia, M., 1996, 美国国际艾滋病协会 (International AIDS Society USA) 4 (3): 15)。抗药性与 HIV 的高突变率有关。在人体内, HIV 每天可产生 10^8 — 10^{10} 个新颗粒,而突变率为每复制周期 3×10^5 核

昔。调控基因和包膜蛋白中可能出现大量影响氨基酸表达的错意突变，一些毒株在某些基因的氨基酸序列能出现近 40% 的突变 (Myers, G and Montaner, J. G., 1992, 逆转录病毒 (The Retroviridae) vol. 1. Plenum Press, New York 51-105)。虽然逆转录酶抑制剂能抑制敏感病毒株，但却使原已存在的和变异后产生的耐受毒株大量繁殖，从而导致耐药性。

几种逆转录酶抑制剂都有与剂量相关的特异性毒性，包括骨髓抑制、呕吐、肝功能异常、外周神经疾病、肌无力及胰腺炎。许多病人不能忍受这些毒副作用，不得不中途停药 (Fischl, M. A., et al., 1987, 新英格兰医学杂志 (N. Engl. J. Med.) 317: 185-91; Lenderking, W. R., et al., 1994, 新英格兰医学杂志 (N. Engl. J. Med.) 330: 738-43)。

蛋白酶抑制剂也存在耐药性的问题。病毒蛋白酶基因的突变已使目前应用的所有蛋白酶抑制剂类药物都产生了耐药性 (Condra, J. H. et al., 1995, 自然 (Nature) 374: 569-71)。蛋白酶抑制剂的毒副作用包括肝功能异常、胃肠不适、肾结石、口周围麻木、脂类异常及意识混乱 (Deeks, et al., 1997, 美国医学协会杂志 (JAMA) 277: 145-53)。

综上所述，目前应用的大多数抗 HIV 药物毒性高，又有耐药性。因此，治疗 HIV 感染存在着很大问题。显而易见，高效、低毒的新药是治疗 HIV 感染的需要。

针对 HIV 复制周期不同阶段，可选择抗 HIV 的新靶点来开发新药。近年来，基于对 HIV 传播艾滋病的深入研究，医学界发现了一些新机理的抗艾滋病药，这些包括一些新 HIV 逆转录酶抑制剂和 HIV 蛋白酶抑制剂，以及下列一些针对不同靶点的抗 HIV 治疗剂 (De, C. E., 2000, 医用病毒学综述 (Rev. Med. Virol.) 10 (4): 255-77)：

1. 利用多聚阴离子基团来干扰 HIV 包膜的 gp120 与淋巴细胞结合的病毒吸附剂，如硫酸月桂钠、硫酸右旋糖或肝素等。其缺点是特异性差，毒性

- 大, 有的甚至增加病毒载量 (Baba, M., et al., 1988, 美国国家科学院学报 (Pro. Natl. Acad. Sci. USA.) 85: 6132-6);
2. 利用可溶性 CD4 来抑制 HIV 的 gp120 与细胞结合。一些重组可溶性 CD4 能在病毒颗粒遇到细胞膜上的 CD4 分子之前与之结合, 从而阻断 HIV 的感染性。但重组可溶性 CD4 对某些从病人分离出的 HIV-1 毒株无明显抑制作用。临床试验也未发现可靠的抗病毒活性 (Gomatos, P.J. et al., 1990, 免疫学杂志 (J. Immunol) 144: 4183-8);
 3. 利用包括趋化因子 (Chemokine) 本身及类似物来阻断 HIV 进入细胞。这些包括与 CCR5 结合的 RANTES, MIP-1 α 及 MIP-1 β , 与 CXCR4 结合的 SDF 等。它们不仅竞争性地阻断 HIV 的 gp120 与细胞趋化因子受体嵌合, 还降低该共受体在细胞上的表达, 从而限制 HIV 的入侵点。最新的趋化因子受体阻断剂还有带正电荷的小肽 ALX40-4C、T22 以及化合物 AMD3100、TAK-779 和天花粉蛋白;
 4. 虽然可溶性 CD4-IgG 能抑制体外 HIV 的复制, 在临床试验中却无可靠的抗病毒活性;
 5. 通过与 NCp7 锌指区的作用来阻断病毒的安装及分解, 如 2,2'-dithiobisbenzamides (DIBAs) 和 azadicarbonamide (ADA);
 6. 用 gp41 的片段及其类似物作为融合抑制剂, 如 T-20 可阻断病毒进入细胞 (Jiang, S. et al., 1993, 自然 (Nature) 365: 113);
 7. 病毒 mRNA 转录酶抑制剂, 如 CGP64222、fluoroquinolone K-12、EM2487;
 8. 整合酶抑制剂: 如 Carbonyl J [N,N'-bis (2-(5-hydroxy-7-naphthalenesulfonic acid) urea)] 衍生物在试管里能遏制 HIV 将其基因组整合到淋巴细胞 (Maurer K, et al., 2000, 生物有机化学 (Bioorg Chem) 28 (3): 140-155)。

3. 阻断病毒进入细胞的融合抑制剂

许多生物学过程都涉及融合。在真核细胞中，连续不断地发生着细胞膜之间的融合，包括胞吞、分泌、膜成分的回收等(White, J.M., 1992, 科学(Science) 258: 917-24)。在某些特殊细胞内发生融合的例子有：受调节的融合激素、酶、神经介质的分泌。较突出的细胞间融合的例子有：精子和卵子的融合及肌细胞的融合。

本发明涉及的“抗融合”和“抗膜融合”指一种物质抑制或降低两个或两个以上生物体膜间的融合程度。上述两个或两个以上生物体可以是细胞或病毒结构，如细胞膜和病毒包膜等。本发明涉及的“抗病毒”指一种化合物抑制病毒感染细胞，如抑制游离病毒与细胞融合，或通过抑制细胞间的融合。本发明所涉及的“感染”可能与膜的融合有关，如包膜病毒感染细胞的过程，及其它与病毒结构和细胞结构类似的融合过程(如细菌结合时所发生的融合)。

综上所述，融合是包膜病毒攻击并穿透宿主细胞的关键过程(Weissenhorn, W., et al., 1997, 自然(Nature) 387: 426-30)。本发明所涉及的抗 HIV 药——Fusonex 及其衍生物为阻止病毒进入宿主细胞的融合阻断剂。

HIV 包膜上的糖蛋白复合物控制病毒包膜与细胞膜的融合过程。最初，这些糖蛋白复合物为含多糖基的前体蛋白 gp160。在病毒繁殖期间，一种宿主蛋白酶将 gp160 水解成两种糖蛋白亚基：包膜外表面的 gp120 和跨膜的 gp41。水解后的 gp120 和 gp41 仍以非共价键结合，并以三聚体的方式聚合在病毒粒表面。外部呈高度螺旋结构的 gp41 穿膜区具有高效率的膜融合起始机制。由于直接参与和细胞膜的融合过程，gp41 被称为“打开细胞大门的关键分子”(Ferrer, M., et al., 1999, 自然-结构生物学(Nat. Struct. Biol.) 6(10): 953-60; Zhou, G., et al., 2000, 1: 生物有机医用化学(Bioorg. Med. Chem.) 8(9): 2219-27)。

晶体衍射分析已经证实：在病毒与细胞发生融合时，gp41 的核心由 6 条螺旋束组成，其中 N-端和 C-端的螺旋排列成 3 个“发针”，将 HIV 包膜与细胞膜别在一起。gp41 三聚体可能形成融合孔，使病毒侵入宿主细胞 (Chan, D. C., et al., 1997, 细胞 (Cell) 89: 263-73)。但是在刚从被感染细胞芽殖后的游离病毒粒表面，gp41 则以不稳定的天然非融合构象存在。由于 C-端螺旋包绕着 N-端螺旋，gp41 的 N-端融合域被隐藏起来。在病毒表面的 gp120 与细胞膜上的 CD4 及趋化因子受体结合后，gp41 即发生受体激活的构象变化。gp41 的 N-端从病毒表面延伸出来，插入宿主细胞膜。此时，gp41 从不稳定的天然非融合构象转变成“发针前”中间体构象。当 gp41 的 C-端与 N-端两肽链区结合在一起时，三聚体结构的疏水 N-端核心暴露出来，“发针前”中间体转变成能量上更稳定的“发针”状态，病毒包膜就与细胞膜融合在一起了 (Jones, P. L., et al., 1998, 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.) 273: 404-09)。

最早被发现的融合抑制剂是从 gp41 C-端 (127——162) 衍生而来的含 36 个氨基酸的多肽——T-20，它的结构为：
X-YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF-Z。

与 gp41 C-端的结构类似性使 T-20 能与 gp41 的 C-端肽链竞争与 N-端融合域的结合。在 T-细胞上，极低浓度的 T-20 就能阻断 HIV 的 gp41 与宿主细胞膜的融合 (IC_{50} 在 nM 范围内) (Jiang, S., et al., 1993, 自然 (Nature) 365: 113; Wild, C. T. et al., 1994, 美国国家科学院学报 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 91: 9770-74)。在持续许多分钟的“发针前”状态，T-20 能有效地抑制 gp41 的 C-端肽链与其 N-端融合域相结合，使病毒包膜与细胞膜之间的“发针”无法形成 (Kliger, Y 和 Shai, Y., 2000, 分子生物学杂志 (J. Mol. Biol.) 295: 163-8)。

由于融合抑制剂的作用部位在细胞膜，所以它不必被释放到细胞内就能发挥作用。相比之下，现在临床所使用的抗 HIV 药物都作用在病毒感染宿

主细胞的后期，它们必须首先被释放到细胞内，然后才能对已侵入细胞的 HIV 发挥其遏制繁殖的作用。而且，疏水性 gp41 核心部位氨基酸序列的高度守恒性提示：病毒将不大可能对融合抑制剂产生耐药性。体外实验证明 T-20 能特异性地阻断 HIV 侵入细胞。一、二期临床试验表明 AIDS 患者都能很好地耐受 T-20。T-20 无骨髓毒性，常见的副作用均为轻度到中度。每天注射 200mg T-20 能显著降低多数病人的 HIV

载量；其中 30%病人的 HIV 载量降低到不可检测的水平（低于 400 个/ml）。而且，T-20 对目前已产生耐药性的 HIV 也仍然有效。一些病人的 CD4+ 细胞也有所增加（Kilby, J.M. et al., 1998, 自然-医学 (Nat. Med.) 4: 1302-1307）。原来，人们曾担心长期用 T-20 可能使人体产生特异性的抗 T-20 抗体，使艾滋病人对 T-20 产生耐药性。然而在长达几十周的试验中，T-20 始终有抗病毒作用（Pilcher, C.D. et al., 1999, 艾滋病 (AIDS) 13(15): 2171-4）。

与目前临床上应用的 HIV 逆转录酶抑制剂和 HIV 蛋白酶抑制剂相比，融合抑制剂 T-20 的优越性为高效、低毒、无耐药性。然而，T-20 的临床用药量高达 200mg/日，提示其稳定性较差，抗融合的效价还不够高。并且，由于剂量较大，T-20 还在部分病人中产生一定的局部反应（Kilby, J.M. et al., 1998, 自然-医学 (Nat. Med.) 4: 1302-1307）。

发明内容

鉴于上述 T-20 所存在的缺点和不足，本发明的目的是：提供一种高稳定性、高效价的用于治疗 HIV 感染的药物，其组合物，其制造方法及其用途。这种药物应当在提高药物有效性的同时，还能降低给药剂量，从而达到提高疗效、降低毒副作用的目的。

本发明者们经过深入的研究后发现，通过将 36 个氨基酸残基按特定的次序排列以形成肽链，再在该肽链的两端加上封端基团即能达到上述本发明

的目的，至此便完成了本发明。

本发明提供了下述的技术方案：

一种用于治疗 HIV 感染的药物，该药物是从 HIV 跨膜糖蛋白 gp41 中衍生出的一段肽链，根据本发明，该肽链具有如下氨基酸序列：

X-SWETWEREIEINYTKQIYKILEESQEQQDRNEKDLLE-Z

在上述肽链（下文将其称为本发明药物或优索耐克斯（Fusonex））中，各个字母符号代表的氨基酸残基的定义如下：S 为丝氨酸、W 为色氨酸、E 为谷氨酸、T 为苏氨酸、R 为精氨酸、I 为异亮氨酸、N 为天门冬酰胺、Y 为酪氨酸、K 为赖氨酸、Q 为谷氨酰胺、L 为亮氨酸、D 为天门冬氨酸；

其中，X 的组成为选自氨基、乙酰基、疏水基团和大分子载体基团中的任一个基团；上述的疏水基团优选为苄氧羰基、丹酰基、叔丁氧羰基、9-苄基甲氧羰基中的任一个基团；上述的大分子载体基团为脂质-脂肪酸轭合物、聚乙二醇和碳水化合物中的任一个基团；

Z 的组成为选自羧基、氨基、酰氨基、叔丁氧羰基、疏水基团和大分子载体基团的任一个基团。

优选是在上述 X 组成和 Z 组成中的疏水基团皆为选自苄氧羰基、丹酰基、叔丁氧羰基、9-苄基甲氧羰基中的任一个基团；在上述 X 组成和 Z 组成中的大分子载体基团皆为选自脂质-脂肪酸轭合物、聚乙二醇和碳水化合物的任一个基团。

更优选是上述的 X 为乙酰基，Z 为酰氨基。

一种用于治疗 HIV 感染的药物组合物，根据本发明，该药物组合物含有有效量的上述本发明药物（Fusonex）作为有效成分，另外还含有作为辅助成分的选自逆转录酶抑制剂、病毒蛋白酶抑制剂、糖苷酶抑制剂、病毒 mRNA 封端抑制剂，两性霉 B、具有抗 HIV 活性的脂键结合分子维栗精胺、羟基脲、 α 干扰素、 β 干扰素和 γ 干扰素中的一种或多种。

优选是在上述的药物组合物中，其中所述的逆转录酶抑制剂为选自 AZT

(3'-叠氮基-2', 3'-二脱氧胞苷)、ddI (2', 3'-二脱氧肌苷)、ddC (2', 3'-二脱氧胞苷)、ddA (2', 3'-二脱氧腺苷)、d4T (2', 3'-二脱氧-二脱氧胸苷)、3TC (立咪呋叮, Lamivudine)、Nevirapine、Atevirapine、Delavirdine、PMEA、PMPA、loviride 中的一种或多种; 病毒蛋白酶抑制剂为选自 Saquinavir、Ritonavir、Nelfinavir、VX-478 中的一种或多种; 糖苷酶抑制剂为选自 SC-48334、MDL-28574 中的一种或多种; 病毒 mRNA 封端抑制剂为病毒唑。

本发明还提供了将本发明的药物 (Fusonex) 用于制成治疗 HIV 感染的针剂、口服剂、直肠给药剂和皮肤吸收剂型制剂的用途; 以及,

将本发明的药物组合物用于制成治疗 HIV 感染的针剂、口服剂、直肠给药剂和皮肤吸收剂型制剂的用途。

另外, 本发明者们经过研究后发现, 本发明的药物 (Fusonex) 只须使用本领域熟知的技术和方法即可制备。例如, 短肽可在一种载体上或溶液中合成。较长的肽可用重组 DNA 的技术制备, 或分几段合成后再连接在一起。编码本发明肽的核苷系列可用该领域内普通技术人员所熟知的技术来合成, 和/或克隆并表达。

本发明的药物 Fusonex 可用一个或多个联接肽的氨基酸残基的键为非肽键替换合成。这些替换的非肽键反应为该领域技术人员所公知, 且可包括 (但不限于) 亚氨基、酯、酰胺、氨基脲及偶氮键等。也可利用存在于其氨基和/或羧基端的其它化学基团来合成, 从而增加肽的稳定性、生物利用率和/或抑制活性等。例如, 疏水基团像苄氧羰基、丹酰、或 T-丁氧羰基可被加到肽的氨基端上。同样, 乙酰基或 9-芴基甲氧羰基也可被置于肽的氨基端上。另外, 所述的疏水基团, T-丁氧羰基, 或氨基也可被加到肽的羧基端。而且, 本发明的肽也可通过改变其空间构型来合成。例如, 可使用肽的一个或多个氨基酸残基的 D-异构体, 而非通常的 L-异构体。而且, 本发明的肽的至少一个氨基酸残基可用一

个已知的非自然存在的氨基酸残基所取代,以便增加本发明所述肽的稳定性、生物利用率和/或抑制融合活性。

此外,上述的任何肽可有一个共价连接在其氨基和/或羧基端上的非肽大分子载体基。

这些大分子载体基可包括(但不限于)脂质-脂肪酸衍合物、聚乙二醇或碳水化合物。

下面对本发明进行详细的描述。基于对 gp41 三维结构的研究,本发明设计了一个新的融合阻断剂——Fusonex。以下为本发明所涉及的抗病毒肽的详细描述:

1. Fusonex 为一个含 36 个氨基酸的多肽。Fusonex (SEQ ID: 1) 衍生于 HIV-1 (E 亚型) 的跨膜蛋白 gp41 C 端氨基酸序列的周边区域(从第 117 到 151 的氨基酸序列)(SEQ ID: 2), 其氨基酸序列如下:
WIEWEREI SNYTNQIYEILTESQNQQDRNEKDLLE (SEQ ID: 2)
2. 将 S(丝氨酸)加在 N-端。因为丝氨酸一般是被加在 α -螺旋的 N-端。
3. 将 E(谷氨酸)替换 118 位的 I(异亮氨酸) [I118E]; 以便与 122 位上的 R(精氨酸)形成电荷之间的相互作用,从而稳定 α -螺旋。
4. 将 T(苏氨酸)替换 119 位的 E(谷氨酸) [E119T]; 目的是覆盖由 W(色氨酸) 117, W120 和 W60 形成的疏水性口袋。
5. 将 E(谷氨酸)替换 125 位的 S(丝氨酸) [S125E]; 以便与 129 位上的 K(赖氨酸)形成电荷之间的相互作用,从而稳定 α -螺旋。
6. 将 K(赖氨酸)替换 129 位的 N(天门冬氨酸) [N129K]; 以便与 125 位上的 E(谷氨酸)形成电荷之间的相互作用,从而稳定 α -螺旋。
7. 将 K(赖氨酸)替换 133 位的 E(谷氨酸) [E133K]; 以便与 136 和 137 位上的 E(谷氨酸)形成电荷之间的相互作用,从而稳定 α -螺旋。
8. 将 E(谷氨酸)替换 136 位的 T(苏氨酸) [T136E]; 以便与 133 位上的 K(赖氨酸)形成电荷之间的相互作用,从而稳定 α -螺旋。

9. 将 E (谷氨酸) 替换 140 位的 N (天门冬酰胺) [N140E]; 以便与 144 位上的 R (精氨酸) 形成电荷之间的相互作用, 从而稳定 α -螺旋。

经上述改造过的新病毒融合阻断剂 Fusonex 的氨基酸序列为:

SWETWEREIEINYTKQIYKILEESQEQQDRNEKDLLE (SEQ ID: 1)

本发明首先涉及一个具有高效价抗病毒活性的肽——Fusonex。Fusonex 含 36 个氨基酸, 其结构衍生于 HIV-1 (E 亚型) 的跨膜糖蛋白 gp41 的 C 端氨基酸序列 (117 至 151)。本发明涉及的多肽 Fusonex 能以极低的浓度抑制病毒与细胞融合, 以及抑制病毒诱发的被感染细胞与未被感染细胞相融合。通过抑制融合, Fusonex 能有效地阻止病毒侵入细胞, 并能有效地阻止病毒从被感染细胞向未感染细胞传播。

在 HIV 引起的融合实验中, Fusonex 抑制融合的浓度比 T-20 低 20 倍。因此, 本发明的肽将应能在抗 HIV 感染方面提高疗效、降低毒副作用。与 T-20 相比, 本发明的肽——Fusonex 具有稳定性高、效价高等优点, 为一个更优越的新病毒融合抑制剂。

Fusonex 的抗病毒活性包括 (但不限于) 抑制 HIV 向未感染的 CD4+ 细胞和其它细胞的传播。此外, 本发明所涉及的 Fusonex 抑制病毒融合的抗病毒活性仅要求 Fusonex 的存在, 并不要求激活宿主对 Fusonex 产生的免疫反应。

本发明涉及的 Fusonex 可用于抑制一切与膜融合有关的生物学领域, 包括抑制人类或非人类的逆转录病毒 (特别是 HIV) 向未感染细胞传播。本发明还涉及使用 Fusonex 及其衍生物作为逆转录病毒 (特别是 HIV) 向未感染的人或非人细胞传播的抑制剂。

本发明涉及的 Fusonex 还可能调节细胞内与蛋白盘管状螺旋的二级结构有关的生物学过程。本文的“调节”指本发明涉及的肽对细胞内某种生物活性的水平或程度产生激活或抑制效果 (与不存在本发明涉及的肽相比)。

本发明涉及的 Fusonex 还可用于鉴别可能抑制病毒融合的化合物、抗病毒化合物、或细胞内有调节活性的化合物。此外，本发明涉及的 Fusonex 还可以用于生物、病毒类型和/或病毒亚型特异性的诊断。

本发明还涉及新病毒融合抑制剂——Fusonex 及其衍生物，Fusonex 及其衍生物和其它治疗剂，特别是至少一种其它抗病毒剂在联合用药中的合并使用，以治疗或预防人或其它哺乳动物的病毒性感染，尤其是 HIV 感染。这些药物可以与病毒融合抑制剂有相同或不同的作用部位或作用机理。药物联合使用的结果可能产生协同作用或增效作用。

更准确地说，本发明涉及下述一切联合用药给药中应用 Fusonex 或其衍生物，包括（但不限于）：同时给药、按先后次序给药、周期性给药、周期疗法（如在一段时间内给第一种抗病毒化合物，然后再给第二种抗病毒化合物，然后重复此种给药顺序（即周期），以降低抗病毒疗法可能产生的耐药性。

本发明涉及的 Fusonex 及其衍生物与其它抗病毒剂的组合提供了一种新的治疗手段。它可以减少其它抗病毒治疗剂的有效剂量，从而降低毒性。更重要的是，药物组合可以通过多种机制遏止病毒对宿主细胞的感染，增强抗病毒的疗效，并防止病毒对单一疗法产生耐药性的手段，从而增加了治疗成功的可能性。

本发明还包括治疗或预防病毒（尤其是 HIV）感染的药用组合物和制剂，其中所述的组合物包括有效量的 Fusonex，或其衍生物和至少一种其它治疗剂和/或一种药学上可接受的载体。

与 Fusonex 或其衍生物联合使用的治疗剂包括：各种已知的和正在实验的药物。但最好的组合是将 Fusonex 与另一种具有不同机理的治疗剂合用。这些治疗剂包括（但不限于）：抗病毒剂，如细胞活素（Cytokines）包括 $rIFN\alpha$ 、 $rIFN\beta$ 、 $rIFN\gamma$ ；逆转录酶抑制剂，如 AZT、3TC、ddI、ddC、Nevirapine、Atevirapine、Delavirdine、PMEA、PMPA、

Loviride 和其它双脱氧核苷或双脱氧氟代核苷；病毒蛋白酶抑制剂 Saquinavir、Ritonavir、Indinavir、Nelfinavir、VX-478；羟基脲；病毒 mRNA 封端 (capping) 抑制剂如病毒唑；两性霉素 B；有抗 HIV 活性的脂键结合分子维栗精胺 (castanospermine)，糖蛋白加工抑制剂；糖苷酶抑制剂 SC-48334、MDL-28574；病毒吸附剂；CD4 受体阻断剂；趋化因子受体抑制剂；中和性抗体；整合酶抑制剂及其它融合抑制剂。

因此，本发明提供了一种改进的抗病毒药物，用于治疗广谱病毒（包括 HIV）的感染。此外，本发明也提供了旨在增加疗效的联合用药。本发明所提供的包括 Fusonex 及其衍生物和至少一种其它治疗剂或/和一种药学上可接受的载体的联合用药，可能减轻药物毒性，提高治疗指数，并防止病毒对单一疗法产生耐药性。

本申请使用的“病毒性感染”指病毒侵入细胞的一种疾病状态。病毒侵入健康细胞后，利用宿主细胞的生殖机制进行繁殖，导致该细胞的死亡。病毒颗粒从细胞芽植后，又通过新产生的子代病毒感染其它细胞。某些病毒基因也可能以前病毒的形式整合于宿主染色体 DNA 内，形成潜伏感染。前病毒能不断地随染色体的复制而遗传，并随时可被体内外的各种因素激活而使感染者发病。

本申请使用的术语“治疗或预防病毒性感染”指抑制特定病毒的复制和传播，预防病毒在宿主中的自我安置，改善或减轻病毒感染引起的症状。治疗有效的标准包括：病毒负载的减轻、死亡率和/或发病率的降低等。

本申请使用的术语“衍生物”指与 Fusonex 肽相应的任何含 Fusonex 序列、同系物、类似物或片断，含一个或多个氨基酸的取代物、插入物和/或缺失物的肽。

本申请使用的术语“治疗剂”指有助于治疗病毒性感染或由此引起的疾病的任何分子、化合物或药物，尤指抗病毒剂。

本申请使用的术语“协同作用”涉及一种联合用药，它比单纯使用任何两种或多种单一治疗剂所产生的加合作用更有效。本文使用的“协同效果”涉及用较低剂量的单一疗法治疗或预防病毒感染。协同效果能增强抗病毒药物的疗效，并避免或减轻病毒对任何单一疗法产生的耐药性。

本申请涉及的肽的定义为由肽键结合的两个或多个氨基酸组成的化合物。肽的命名与其所构成的氨基酸的数量有关，如：二肽含有两个氨基酸残基，三肽含有三个；等等。含10个或10个以下氨基酸的肽可称为寡肽，含10个以上氨基酸残基的肽可称为多肽。

本文定义的肽序列用代表氨基酸残基的单字母符号表示如下：

A（丙氨酸）

R（精氨酸）

N（天门冬酰胺）

D（天门冬氨酸）

C（半胱氨酸）

Q（谷氨酰胺）

E（谷氨酸）

G（甘氨酸）

H（组氨酸）

I（异亮氨酸）

L（亮氨酸）

K（赖氨酸）

M（蛋氨酸）

F（苯丙氨酸）

P（脯氨酸）

S（丝氨酸）

T (苏氨酸)

W (色氨酸)

Y (酪氨酸)

V (缬氨酸)

下面描述用 Fusonex 治疗 HIV 及其它病毒感染。

Fusonex 为一具有抗病毒活性的多肽。本发明的肽包括 Fusonex (一种从 gp41 衍化而来的 36 氨基酸肽)、它的片断和/或类似物、及与 Fusonex 类似的肽。这些肽也存在于其它包膜病毒蛋白中。本发明的肽能抑制人及其它哺乳动物的逆转录病毒的传播，特别是抑制 HIV 的传播。

本发明人相信 HIV 及其它病毒从感染细胞之日起，就每天 24 小时不停地复制。因此，有必要在病毒感染的不同阶段采用抗病毒剂治疗。本发明还涉及将抑制病毒与细胞融合及抑制病毒在细胞间传播的肽与另一种治疗剂的联合使用。

下面描述用包括 Fusonex 在内的联合用药治疗 HIV 感染。

Fusonex 的作用部位在病毒表面的糖蛋白 gp41。Fusonex 的作用机理是通过抑制融合来防止从已感染细胞中芽殖的游离病毒感染其它细胞，以及防止已感染细胞通过融合的方式向其它细胞传播病毒。

本申请人相信：当 Fusonex 与一种或多种有不同作用靶点的药物联合使用，可能提供相加作用或协同作用。本发明涉及包括 Fusonex 及其衍生物在内的联合用药。联合用药不仅可减少所需的抗病毒药物的有效剂量，从而降低其毒性，而且还可以通过多种机制攻击病毒，以提高其抗病毒的疗效。最后，本发明的联合用药也可防止或减轻产生病毒耐药性的机会。

本发明涉及对人及其它哺乳动物 HIV 感染的治疗手段，该手段包括给予有效量的 Fusonex 或其衍生物和至少一种其它治疗剂。这种治疗剂

最好是另一种抗病毒剂。

本发明为治疗病毒性感染（特别是 HIV 感染）提供了一种改良手段。本发明还提供了一种治疗 HIV 感染的协同组合，它包括有效量的 Fusonex 或其衍生物，和至少另一种抗病毒化合物。Fusonex 或其衍生物最好与逆转录病毒抑制剂、病毒蛋白酶抑制剂、细胞活素或细胞活素抑制剂、或其它病毒融合抑制剂合用。本发明的联合用药将更有效地抑制病毒的复制和传播。

本发明的方法包括单独应用 Fusonex 或其衍生物，以及包括 Fusonex 在内的联合用药，即 Fusonex 和至少一种其它治疗剂，或同时使用（如作为混合物，或分开但却同时使用）；或者按先后次序使用（包括周期疗法）。周期疗法涉及在一段时间内给病人第一种抗病毒化合物，随后在另一段时间内给病人第二种抗病毒化合物，并重复这种给药次序（即周期），以减轻对所述疗法之一产生的毒副作用及耐药性。

本发明还涉及另一种周期疗法。该疗法包括给予本发明的肽之后，再给予另一种抗病毒剂，然后再给予本发明的肽或另一种病毒融合抑制剂等等，即把所述的病毒融合剂或其衍生物与其它抗病毒剂联合使用。

“联合用药”既包括两种或两种以上的治疗剂作为一种治疗混合物一起使用，也包括两种或两种以上治疗剂分开给予但同时使用，如经不同的静脉进入同一个体。“联合用药”还包括按一定次序分开给药，即先给一种药物，再给第二种药物。

与 Fusonex 联合使用的优选治疗剂包括（但不限于）下列不同的攻击病毒的模式：抑制逆转录酶，抑制病毒 mRNA 封端，抑制 HIV 蛋白酶，抑制蛋白糖基化，抑制整合酶，及抑制病毒融合。采用这些攻击模式的药物包括（但不限于）：抗病毒剂，如细胞活素，如 $rIFN\alpha$ 、 $rIFN\beta$ 、 $rIFN\gamma$ ；细胞活素抑制剂；逆转录酶抑制剂，如 AZT、3TC、ddI、ddC、d4T、Nevirapine、Atevirapine、Delavirdine、PMEA、PMPA、Lodoviride 和

其它双脱氧核苷或双脱氧氟代核苷；病毒蛋白酶抑制剂，如 Saquinavir、Ritonavir、Indinavir、Nelfinavir、VX-478；糖苷酶抑制剂，如 SC-48334、MDL-28574；病毒 mRNA 封端 (capping) 抑制剂如病毒唑；两性霉素 B；有抗 HIV 活性的脂键结合分子维栗精胺 (castanospermine)；羟基脲；糖蛋白加工抑制剂；病毒吸附剂；CD4 受体阻断剂；趋化因子受体抑制剂；中和性抗体；整合酶抑制剂及其它融合抑制剂。

下面描述 Fusonex 的多肽结构。

Fusonex 肽为一种抗 HIV 感染的高效抑制剂。这可能与和病毒包膜的 gp41 形成复合物并干扰病毒融合的过程有关。例如在病毒蛋白 gp41 由天然结构向融合结构转换的过程中，Fusonex 可竞争其在病毒 gp41 上的结合部位，从而破坏病毒与细胞的融合过程。

本发明的 Fusonex 肽从 HIV-1 的跨膜蛋白 gp41 的氨基酸残基 117-151 衍生而来，由 36 个氨基酸组成(从氨基端到羧基端读出如下)：

X-SWETWEREIEINYTKQIYKILBESQEQQDRNEKDLLE-Z (SEQ ID: 1)

除了全长 Fusonex (SEQ ID: 1) 36 链节，本发明所述的肽还包括显示抗病毒活性的 Fusonex 肽 (SEQ ID: 1) 的截断部分。这种截断的 Fusonex 肽可包括含 4~36 个氨基酸残基的肽 (即从四肽至 36 链节多肽之间)。

“X”可代表氨基，疏水基团，包括 (但不限于) 苄氧羰基，丹酰，或 T-丁氧羰基，乙酰基，9-苄基甲氧羰基 (FMOC)，共价键连结大分子载体基包括 (但不限于) 脂质-脂肪酸衍合物，聚乙二醇或碳水化合物。

“Z”可代表羧基，氨基，T-丁氧羰基，大分子载体基包括 (但不限于) 脂质-脂肪酸衍合物，聚乙二醇或碳水化合物。

本发明的抗病毒肽除包括 Fusonex 截断部分以外，还包括 (但不限于) 含有 Fusonex (SEQ ID: 1) 的序列，含有一个或多个氨基酸的取

代物、插入物和/或缺失物的肽。氨基酸插入物可由单个氨基酸残基或由 2~15 个氨基酸长度的残基段组成。一个或多个插入物可以被导入 Fusonex、Fusonex 片断、类似物和/或 Fusonex 同系物中。

本发明的肽还进一步包括 Fusonex (SEQ ID: 1) 的同系物, Fusonex 同系物的类似物, 和/或表现出抗病毒活性的 Fusonex 截断物。本发明包含 Fusonex、Fusonex 片断、类似物和/或 Fusonex 同系物的缺失物。这类缺失物由 Fusonex 肽序列中除去 1 个或多个氨基酸所组成, 而生成的肽序列长度的下限为 4-6 个氨基酸。这类缺失物可能涉及所述肽序列的单个相邻部分或多个独立部分。

氨基酸取代物具有保护或非保护性质。保护性氨基酸取代物由具有类似电荷、大小、和/或疏水特性的氨基酸来取代 Fusonex (SEQ ID: 1) 肽序列的一个或多个氨基酸所组成。

下面描述与 Fusonex 联合使用的抗病毒剂。

本发明所述的病毒融合抑制剂可与其它治疗剂联合使用, 以增强其抗病毒效果。优选将 Fusonex 与其它抗病毒剂结合使用。可与 Fusonex 一起使用的其它抗病毒剂包括(但不限于)作用于病毒复制过程中不同靶点的药物, 如逆转录酶抑制剂, 病毒蛋白酶抑制剂, 糖基化抑制剂等; 作用于病毒传播过程中不同靶点的抗病毒剂; 作用于同一分子不同位点的抗病毒剂; 以及预防或降低病毒耐药性发生的抗病毒剂。本领域的科技人员都了解上述各种抗病毒治疗剂的作用机理及联合应用的益处。

所述的 Fusonex 或其衍生物可与逆转录病毒抑制剂, 包括(但不限于)与核苷衍生物联合使用。核苷衍生物为嘌呤和嘧啶核苷的改良型衍生物, 其作用机理均为阻断 RNA 和 DNA 的构成。这些新核苷衍生物缺乏能结合到核苷上的 3' 取代基, 抑制逆转录酶引起的 cDNA 合成, 从而终止病毒 DNA 的复制, 成为抗 HIV 治疗剂。如 AZT 和 ddI 在体内外均抑制 HIV-1 的复制, 早已被批准治疗 HIV 感染和 AIDS。然而, 用这类药

治疗可导致耐药 HIV 株的大量繁殖，而且还有许多毒副作用。

所述的 Fusonex 或其衍生物可与核苷衍生物和非核苷衍生物联合使用。这些核苷衍生物包括(但不限于)2', 3'-二脱氧腺苷(ddA); 2', 3'-二脱氧鸟苷(ddG); 2', 3'-二脱氧肌苷(ddI); 2', 3'-二脱氧胞苷(ddC); 2', 3'-二脱氧胸苷(ddT); 2', 3'-二脱氧-二脱氧胸苷(d4T)和 3'-叠氮基 2', 3'-二脱氧胞苷(AZT)。另外也可选择使用卤代核苷衍生物, 优选 2', 3'-二脱氧-2'-氟代核苷类, 包括(但不限于): 2', 3'-二脱氧-2'-氟代腺苷; 2', 3'-二脱氧-2'-氟代肌苷; 2', 3'-二脱氧-2'-氟代胸苷; 2', 3'-二脱氧-2'-氟代胞苷; 和 2', 3'-二脱氧-2', 3'-二脱氢-2'-氟代核苷类包括(但不限于): 2', 3'-二脱氧-2', 3'-二脱氢-2'-氟代胸苷(Fd4T)。本发明优选 2', 3'-二脱氧-2'-氟代核苷为氟键在 β 构型上的核苷类, 包括(但不限于): 2', 3'-二脱氧-2' β -氟代腺苷(F-ddA), 2', 3'-二脱氧-2' β -氟代肌苷(F-ddI), 及 2', 3'-二脱氧-2' β -氟代胞苷(F-ddC)。联合用药可降低所用的核苷衍生物的剂量, 在不失去其抗病毒活性的基础上, 降低其毒性, 并且将降低或避免病毒产生耐药性。

本发明范围内的抗病毒肽和核苷衍生物的优选组合包括: 有效量的 Fusonex 或其衍生物和有效量的 AZT、ddC 和/或 d4T 等, 以治疗 HIV 感染。更优选的药物组合包括(但不限于): 使用有效量的 Fusonex 或其衍生物和有效量的 ddI; 和/或有效量的 3TC、Viramune、Rescriptor、Sustiva、Loviride、Nevirapine、Ateviridine。

Fusonex 或其衍生物, 也可与尿苷磷酸化酶抑制剂联合使用。这类抑制剂包括(但不限于)无环尿苷化合物, 包括苄基无环尿苷(BAU); 苄氧基苄基无环尿苷(BBAU); 氮甲基苄基无环尿苷(AMBAU); 氮甲基苄氧基苄基无环尿苷(AMB-BAU); 羟甲基苄基无环尿苷(HMBAU); 及羟甲基苄氧基苄基无环尿苷(HMBBAU)。

Fusonex 或其衍生物也可与细胞活素或细胞活素抑制剂联合使用, 包括(但不限于): rIFN α 、rIFN β 、rIFN γ ; TNF α 抑制剂, MNX-160, 人 r 干扰素 α A、人 r 干扰素 β 和 r 干扰素 γ 。更优选的联合用药包括: 有效量的 Fusonex 或其衍生物和有效量的 β 干扰素。

蛋白酶抑制剂主要是在病毒装配期或装配后(即病毒芽生)起作用, 以抑制病毒发育至成熟。蛋白酶抑制剂在体内体外都显示出抗病毒活性。AIDS 患者用蛋白酶抑制剂后, 血浆 HIV-1 水平呈指数下降, CD4 淋巴细胞计数升高(Deeks, et al., 1997, 美国医学协会杂志(JAMA) 277:145-53)。病毒蛋白酶抑制剂与融合抑制剂 Fusonex 的联合使用可能产生协同作用并取得显著的临床效果。在治疗 HIV 感染的方法中, 联合用药包括使用有效量的 Fusonex 或其衍生物和一种有效量的蛋白酶抑制剂联合使用, 包括(但不限于): Indinavir, Invirase, Norvir, Viracept, Agenerase。

Fusonex 或其衍生物也可与干扰 5' -mRNA 过程的抗 HIV 药物, 如病毒唑(Virazole)联合使用。病毒唑作用机制不明, 据推测它可能在形成 mRNA 封端结构方面与鸟嘌呤竞争, 和/或干扰这些分子的甲基化。Fusonex 和病毒唑可能有抗 HIV 的协同作用。

此外, 本发明所述的 Fusonex 或其衍生物可与两性霉素 B 联合使用。两性霉素 B 为一种多烯类抗真菌抗生素, 它与甾醇相互作用并与其发生不可逆性结合。两性霉素 B 及其甲酯对多种脂包膜病毒, 包括 HIV 有抑制作用。两性霉素 B 对人体有严重毒性, 但其甲酯对细胞的毒性较低。因此, 两性霉素 B 或其甲酯可与 Fusonex 或其衍生物联合使用。这种联合用药可能产生抗 HIV 的协同作用, 从而允许临床医生使用较低剂量的两性霉素 B 或其甲酯, 而又不必顾虑丧失其抗病毒活性。

本发明所述的 Fusonex 或其衍生物也可与糖蛋白加工抑制剂锥栗精胺联合使用。锥栗精胺为一种抑制糖蛋白加工的植物生物碱。HIV 包膜

上含两个大糖基化蛋白 gp120 和 gp41, 蛋白的糖基化在 gp120 与 CD4 的相互作用方面起重要作用。在锥栗精胺存在下合成的子代病毒的感染性减弱。Fusonex 或其衍生物与锥栗精胺合用可能产生协同作用。

有关 Fusonex 或其衍生物与上述抗病毒治疗剂联合使用的治疗效果, 可用本领域内普遍应用的方法来评价。例如, 可用多种体外实验来测试 Fusonex 和 AZT 联合使用的效果, 如: 抑制 HIV 对细胞毒性, 抑制合胞体形成, 抑制逆转录酶活性, 或抑制病毒 RNA 或蛋白合成的能力, 等等。

下面说明药物制剂、剂量和给药形式。首先说明药用组合物。

本发明的抗病毒肽 Fusonex 或其衍生物和至少一种其它治疗剂的药用组合物, 可用于治疗或预防人或非人的病毒性感染。本发明的所述的联合用药可产生加合/协同效果。

优选药用组合物含有 Fusonex 或其衍生物, 并含有至少一种其它抗病毒剂如逆转录酶抑制剂、蛋白酶抑制剂、mRNA 加工的抑制剂、蛋白糖基化抑制剂、病毒吸附剂、CD4 受体阻断剂、趋化因子受体抑制剂、中和性抗体、整合酶抑制剂及其它融合抑制剂。这类治疗剂包括(但不限于)核苷类似物或链终止剂; 趋化因子受体抑制剂 AMD-3100 (Tremblay, C. L. et al., 2000, 艾滋病杂志 (J. AIDS) 1: 25 (2) 99-10)。

在本发明范围内, 可与 Fusonex 或其衍生物联合使用的其它治疗剂包括(但不限于): 2-脱氧-D-葡萄糖 (2dGlc)、脱氧野尻霉素无环鸟苷、病毒唑 (virazole)、利福平 (rifadin), 金刚烷胺、利福布丁 (rifabutine), 更普洛韦 (ganciclover、DHPG)、法昔洛韦 (Famciclover)、布普洛韦 (Buciclover、DHBG)、氟化碘化阿糖胞胞嘧啶 (fluoriodoaracytosine)、碘苷、三氟胸腺嘧啶核苷、阿糖腺苷 (ara-A)、ara-AMP、溴乙烯基去氧尿苷、溴乙烯阿糖尿嘧啶 (BV-araU)、1-b-D-阿糖呋喃糖苷-E-5-[2-溴乙烯基]尿嘧啶、金刚乙胺, 羟基脲,

苯乙庚二酮、二芳基脒、(S)-(对硝基苄基)-6-硫代肌昔和膦酰基甲酸盐。本发明包括含有 Fusonex 或其衍生物和任何上述其它化合物的药用组合物。

此外，所述的肽也可作为一种预防性措施，用于先前未曾感染但急性暴露于 HIV 的个体。所述肽的这种预防性使用的实例包括（但不限于）：病毒经母婴传播的预防；其它可能传播 HIV 的固定场所，如在医疗部门的意外事故中，医护人员不慎暴露于 HIV 污染的血液、血制品及体液。在此情况下，本发明的肽可起到预防性疫苗的作用。给药后，宿主将产生针对本发明肽的抗体，从而抑制 HIV 的进一步感染并中和 HIV 病毒。

本发明的肽用作预防性疫苗的实施方案包括：给予宿主一定浓度的有效肽以产生足够中和 HIV 的免疫应答，如抑制 HIV 感染细胞的能力。可使用该领域内普通技术人员熟知的标准技术来测定免疫应答的产生。用作疫苗的肽通常肌注给药。

为增强免疫应答，所述的肽可和适当的添加剂配在一起。这类添加剂包括（但不限于）矿物质凝胶如氢氧化铝；表面活性物质如溶血卵磷脂；Puronic 多元醇，聚阴离子；其它肽类；油乳剂；以及其它潜在的人用添加剂如卡介苗（BCG）和小棒状杆菌。给予所述疫苗制剂的途径包括（但不限于）口服、皮内、肌内、腹膜内、静脉、皮下和鼻内。

下面说明 Fusonex 的剂量。

在治疗急性病毒感染的哺乳动物（包括人）时，须给予足以抑制病毒复制的有效量的 Fusonex 或其衍生物。给予本发明肽的有效剂量可用该领域内技术人员所周知的方法来确定，如设置生物半衰期，生物利用率及毒性等参数。例如，可按约每天 0.2-10.0 mg/kg 的剂量输注 Fusonex，持续 4~52 周。优选剂量为 20mg~200mg/天。最优选的剂量约为 30mg——80mg/天；大约持续 52 周。Fusonex 或其衍生物的给药间

隔约为每两天一次到每天四次，最好是每天 1—2 次。最佳剂量是使 Fusonex 或其衍生物的血浆峰浓度达到 1mg/ml—10mg/ml。可先用适宜缓冲盐水配制 20% 的 Fusonex 无菌注射液，连续输注，再通过 HPLC 测血浓度，再确定所用 Fusonex 的量是否可以维持所需的血浓度。

与 Fusonex 或其衍生物联合使用的治疗剂（如抗病毒剂）的有效剂量的确定以该领域技术人员所熟知的各种抗病毒剂的推荐剂量为基础。联合用药的剂量优选比文献所推荐的单独应用的剂量约低 10—50%。医护人员须注意出现毒性反应的剂量。当出现骨髓、肝、肾功能不全或严重药物相互作用时，医生应知道如何终止及何时终止、及时中断或调整药物至较低剂量。反之，如未达到临床治疗效果，医生也应知道如何提高剂量。

有效治疗剂量指该组合物足以改善病人症状或延长病人存活期的用量。这类化合物的毒性和治疗效果可按标准药学程序经细胞培养或动物实验来确定。如确定半数致死量 LD_{50} （实验群体中有 50% 致死的剂量）和半数有效量 ED_{50} （实验群体中 50% 达到治疗效果的剂量）。毒性和治疗有效剂量的比率叫做治疗指数，可用 LD_{50}/ED_{50} 的比率来表示。治疗指数越大的化合物越好。从细胞实验和动物实验获得的数据可推测人的剂量范围。这类化合物的剂量最好在一定血药浓度范围内，即包括 ED_{50} 且无毒性或毒性很低，然后再根据所采用的剂型和给药途径来调整剂量。从这些资料可以较精确地确定人的使用剂量。血浆中的药物浓度可用高效液相色谱（HPLC）来测定。

下面说明药物制剂和给药途径。

将含有 Fusonex 或其衍生物的药组合物直接给予病人，或将含有 Fusonex 或其衍生物的药组合物与适宜的载体或赋形剂混合，以达到治疗病毒感染、特别是 HIV 感染的剂量。本申请的化合物制剂和给药技术为本领域技术人员所熟知。

本发明的肽的抗病毒活性可表现出一种亚型特异性，即特异的肽仅对特异性的病毒有抑制作用。本发明的肽对 HIV-1 最敏感，这种优点可体现在诊断试剂领域。如：可利用本发明的肽的抗 HIV-1 特异性来鉴别某一病毒分离株的类型（HIV-1 或 HIV-2）。例如：在 Fusonex 肽存在的条件下，用一未知病毒株感染所分离的未感染的 CD4+细胞，然后继续培养。并对细胞上清液的逆转录病毒活性进行测定。如果逆转录病毒活性几乎完全被抑制，则该病毒分离株含 HIV-1。如果病毒活性未被抑制或仅有少量抑制，该病毒分离株可能不含 HIV-1。

本发明还包括使用药学上可接受的载体，按本文公开的多肽和/或药用组合物配制成适宜的剂型，用于全身给药。正确地选用载体和适当的生产工艺，可使本发明的组合物，特别是配成溶液的组合物通过胃肠外途径给药，包括（但不限于）静脉注射。所述的化合物还可采用该领域熟知的并且药学上可接受的载体配成适宜于口服给药的剂型。这类载体能将本发明的化合物配制成片、丸、胶囊、液体、凝胶、糖浆、淤浆和混悬等剂型。

本发明的肽及上述药用组合物可用本领域技术人员所熟知的途径给药。给药途径可包括口腔、直肠、透膜或肠道给药；胃肠外给药包括肌肉、皮下、髓内注射、鞘内、直接心室内、静脉内、腹膜内、鼻内或眼内注射；透皮、局部用药、阴道用药等。剂型包括（但不限于）片剂、锭剂、散剂、悬浮剂、栓剂、溶液、胶囊、霜剂、贴剂、微泵剂。

为了方便起见，本发明涉及的药用组合物可使用一种或多种生理学可接受的载体，并以常规方式配制成药学上可接受的任何制剂。本发明涉及的药用组合物可含一种或多种赋形剂和便于加工活性化合物的辅助剂。合适的制剂取决于所选的给药途径。为了方便注射，可将本发明的治疗剂配成水溶液，如生理盐水。对透膜给药，制剂中应使用利于透过屏障的渗透剂，这些渗透剂是该领域内普遍熟知的。

本发明涉及的多肽及其药用组合物的口服制剂可用固体赋形剂磨碎成均匀的混合物，再加工成颗粒，必要时加入适宜的辅助剂，制成片剂或糖衣片的片芯。适宜的赋形剂及填料如糖；包括乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨糖醇；纤维素制品剂如玉米淀粉、小麦淀粉、米淀粉、马铃薯淀粉、明胶、西黄耆胶、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和/或聚乙烯吡咯烷酮。如果必要，可以加入崩解剂，如交联聚乙烯吡咯烷酮，琼脂，或藻酸或其盐类如藻酸钠。糖衣片芯应提供适当包衣。可采用浓缩糖溶液，溶液中可含阿拉伯树胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、carbopol 凝胶、聚乙二醇、二氧化钛、硝基纤维素溶液及适当的有机溶剂或溶剂混合物。为了区别或标示活性化合物，可将不同组合的染料或食用色素加到片剂或糖衣片的包衣中。

用于口服的药用组合物包括由明胶制成的装填式胶囊，以及由明胶和一种增塑剂如甘油或山梨醇制成的密封软胶囊。装填式胶囊含有填充剂如乳糖、粘合剂如淀粉，和/或润滑剂如滑石或硬脂酸盐。也可用稳定剂来稳定活性成分。在软胶囊中，活性化合物可溶解或悬浮于适当的液体中，如脂肪油、液体石蜡或液状聚乙二醇。此外，还可加入稳定剂。口服的所有制剂都应是方便病人服用的合适剂型。对于口腔给药而言，所述组合物可采用片剂或锭剂等方便的形式配制。

对于吸入给药，本发明使用的化合物可用气雾剂喷射的形式很方便地释放出来。可通过高压包或喷雾器，或使用某种合适的抛射剂如二氯二氟甲烷，三氯氟代甲烷，二氯四氟乙烷，二氧化碳或其它适合的气体来实现。在高压气雾剂的情况下，剂量单位可通过一个阀的计量释放来确定。用作吸入器或吹气器的明胶胶囊和药筒可制成含有所述的肽和一种合适的粉末基质（如乳糖或淀粉）的混合物。

可将所述的肽配制成便于胃肠外给药的剂型，如注射，包括集合药团注射或连续静脉滴注。便于注射的制剂可包装成单位剂量形式，如安

瓶。多剂量的制剂可包装成单位剂量形式，如安瓶或多剂量容器，并加入保存剂。所述组合物也可采用混悬液、溶液或以油或水为介质的乳剂形式，且可含有一定的配方剂如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。

用于胃肠外给药的药用组合物包括活性物质的水溶液，即水溶形式。活性物质的悬浮液也可制成适宜的油状注射悬浮液。合适的亲油溶剂或载体包括脂肪油如芝麻油、或合成的脂肪酸酯，如油酸乙酯或甘油三酯，或脂质体。水性注射悬浮液可含有增加悬浮液粘度的物质，如羧甲基纤维素钠、山梨醇或葡聚糖。所述悬浮液也可选择性地包含合适的稳定剂或增加化合物溶解度的物质，以制备高浓度的溶液。粉针剂的活性成分可与适当的溶媒，如无菌去热源注射用水配合，然后使用。

所述的化合物也可配制成直肠给药制剂如栓剂或滞留灌肠剂。可用常规基质如可可脂或其它甘油酯配制。

除了已描述过的制剂外，还可将所述的肽或药用组合物配成长效制剂。这种长效制剂可采用皮下或肌肉植入法或肌注给药。因此，所述肽及其衍生物或药用组合物可用合适的聚合物或疏水物质（如油乳剂）或离子交换树脂、或微溶的衍生物如微溶盐来配制。

本发明的疏水化合物的药物载体为含苺醇，非极性表面活性剂，与水混溶的有机聚合物和水相的共溶体系。该共溶体系可为 VPD 共溶体系。VPD 是一种由 3%（重量/容量 W/V）苺醇溶液，8%（W/V）的非极性表面活性剂多乙氧基醚，及 65%（W/V）的聚乙二醇 300 在无水乙醇中组成的溶液。而 VPD 共溶体系（VPD: 5W）由 1: 1 稀释的 VPD 与 5% 的葡萄糖在水溶液中配成。这种共溶体系能较好地溶解疏水性化合物，而体系本身对全身给药的毒性很低。在不破坏其溶解度和毒性的情况下，共溶体系的比例可有较大的变化。而且，共溶成份的同一性也可以变化，如可用其它低毒性的非极性表面活性剂来取代多乙氧基醚；聚乙二醇的所占比例也可改变；其它生物相容的聚合物也可取代聚乙二醇，

如聚乙烯吡咯烷酮；其它糖或多糖可代替葡萄糖。

所述的药用组合物也可包括适当的固相或凝胶相载体式赋形剂。这类载体或赋形剂包括（但不限于）碳酸钙、磷酸钙、各种糖、淀粉、纤维素衍生物、明胶及聚合物如聚乙二醇。适于本发明的药用组合物也包括为达到治疗目的所用的有效量的活性成分的组合。有效量的确定方法为本领域技术人员所熟知。

下面总括地说明本发明肽的用途。

本发明所述的 Fusonex (SEQ ID: 1) 肽表现出有效的抗病毒活性。因此，所述的肽及其衍生物可用作人和非人逆转录病毒抑制剂，特别是 HIV 抑制剂，从而遏止病毒对未感染细胞的传播。

用本发明的肽可抑制人逆转录病毒的传播，包括（但不限于）HIV-1 和 HIV-2 的所有病毒株以及人 T-淋巴细胞病毒（HTLV-I 和 II）。本发明的肽还可抑制非人逆转录病毒的传播，包括（但不限于）牛造白细胞组织增生病毒、猫肉瘤和白血病毒、猴免疫缺陷症、肉瘤和白血病毒及羊进行性肺炎病毒。

本发明的肽还可能抑制其它逆转录病毒和/或非逆转录病毒的传播，包括（但不限于）人呼吸道合胞病毒，犬瘟热病毒，新城病病毒，人副流感病毒及流感病毒。

本发明还进一步包括在联合用药中使用所述的肽来治疗上述逆转录病毒和非逆转录病毒引起的疾病。

下面总括地说明联合用药抑制 HIV 的用途。

可根据本发明进行包括 Fusonex 和其它治疗剂的联合用药。上述联合用药在体内的使用可以防止合胞体的形成及 HIV 的复制，从而抑制患者体内 HIV 的繁殖。本发明的联合用药也适用于缓解或治疗与 HIV 感染有关的免疫抑制疾病。例如，抗病毒肽 Fusonex 或其衍生物与抗真菌剂、抗菌素或其它抗病毒剂合用，可抑制 HB、EBV、CMV，及其它机遇性感

染（包括 TB）。

本发明的抗病毒肽 Fusonex 或其衍生物的最佳用途是抑制 HIV 感染。联合用药的有效剂量可参照下文所述的方法。如：在适宜的药物载体中配制并按任何适宜的途径给药，包括（但不限于）：注射（如静脉注射、腹膜注射、肌肉注射、皮下注射等）；上皮或粘膜内吸收（如口腔粘膜，直肠和阴道上皮，鼻咽部粘膜，肠道粘膜等）；口服；透皮或任何其它药学领域可使用的给药途径。

与本领域的同类现有技术相比，本发明的药物 (Fusonex) 具有如下有益效果：对病毒，特别是对 HIV 病毒的融合抑制效果明显增高，稳定性好，效价高，能在提高药物有效性的同时，降低给药剂量，因此既能提高疗效，又可降低毒副作用。

对附图的简要说明

图 1 是本发明药物 Fusonex 的氨基酸序列图，其中，Fusonex (SEQ ID: 1) 是一个含 36 个氨基酸的多肽。Fusonex (SEQ ID: 1) 是由相应于 HIV-1 (E 亚型) 的 gp41 C 端的氨基酸序列 (117-151) (SEQ ID: 2) 衍生出来的。所有的图均采用上述单字母氨基酸码。图 2 是 Fusonex 及 Fusonex 与 gp41 的 N 端 (35-70) 肽形成的复合物从 Superdex 色谱分离柱洗脱的特征峰图。

图 3 是 Fusonex 与 gp41 的 N 端 (35-70) 肽形成的复合物的大分子二级结构的二向色性图谱 (CD 图谱)。

图 4 是 Fusonex 和 T-20 的稳定性对比曲线图。右侧的曲线 (实心圆) 为 Fusonex 的熔融曲线；左侧的曲线 (空心圆) 为 T-20 的熔融曲线。

图 5 是 Fusonex 和 T-20 对病毒诱发的融合的抑制曲线图。本实验用荧光素酶活性来定量测试 Fusonex (圆圈) 和 T-20 (方块) 抑制 HIV-1 的 gp160_{HXB} 诱发的细胞融合。当表达 gp160_{HXB} 基因和 T7 多聚酶基因的效应细胞与表达 CD4 基因和荧光素酶报告基因的靶细胞融合后，荧光素酶

基因被表达而发出化学荧光。此实验以不含任何融合抑制剂的对照组的荧光素酶活性为 100%。

从图 4 可以看出, 在 35-80°C 的范围内, 当温度相同时, 本发明药物 (Fusonex) 的稳定性要比 T-20 好得多。

从图 5 可以看出, 在药物浓度相同的条件下, 按照对 HIV-1 的 gp160_{HB} 诱发的细胞融合所产生的抑制作用相比较, 本发明药物 (Fusonex) 的抑制作用比 T-20 要好得多。

具体实施方式

下面通过实施例来具体地说明本发明。

实施例 1 - 本发明药物 Fusonex 的制造和纯化。

Fusonex 的合成是在型号为 431A 的生物系统多肽合成仪上进行的。合成使用了 Fast Moc 化学方法, 并应用了 9-苄基甲氧羰基 (FMOC) 氨基酸保护的标准固相合成技术。所用的试剂有: 三氟乙酸 (TFA)、水、5%茴香硫醚、2.5%乙二硫醇和 0.8M 结晶苯酚。

为了增强 Fusonex 的生物半衰期, 将其氨基端乙酰化, 羧基端酰胺化。在仪器上自动从树脂上解离肽及移去侧链阻碍基团。从树脂上解离后, 用 4 倍体积的冷乙醚将 Fusonex 粗肽沉降 20 分钟, 离心后再用冷乙醚洗 2 次, 然后在真空下干燥 24 小时。

2. Fusonex 粗肽的提纯用反相高效液相色谱法 (HPLC) 进行。在 C18 柱 (15 μ m 球形填料) 上, 用含 0.1% TFA 的水/乙腈作线性梯度洗脱。纯化后的 Fusonex 肽用分析型 HPLC 检测, 纯度大于 95%。最后, 经氨基酸测序及用电子喷射质谱证明 Fusonex 的结构。所测定的纯化后的 Fusonex 分子量为 4641.24。所获产品的氨基酸序列为: X-SWETWEREIEINYTKQIYKILEESQEQQDRNEKDLLE-Z, 其中的 X 为乙酰基, Z 为酰氨基。

实施例 2 - 本发明药物 Fusonex 的洗脱试验

对 Fusonex 的洗脱试验方法如下:

在 Superdex 75 色谱分离柱上,洗脱过量的 Fusonex 以及 Fusonex 和 gp41 的 N 端 (35-70) 肽形成的复合物。洗脱液为磷酸缓冲盐水。曲线的总收集体积为 30 ml。根据所获结果制成洗脱曲线 (图 2)。从图 2 可以看出, Fusonex 与 gp41 N 端 (35-70) 肽形成的复合物的洗脱峰出现在 13.2 ml 处。过量的 Fusonex 的洗脱峰出现在 17.3 ml 处。

实施例 3 - Fusonex 结构的测定

使用二向色性图谱 (CD) 来测定 Fusonex, 首先用 0.1M 氯化钠/10mM 磷酸钾溶液将样品稀释至 25 μ M, pH 7.4。然后通过 CD 图谱来确定 Fusonex 肽的二级结构。测定是在 Aviv 62A DS 圆二向色性图谱仪上进行的。在 200—260nm 波长范围内测试含 Fusonex 和 gp41 N 端 (35-70) 的肽溶液。

收集 CD 谱图的条件为: 20°C, 圆偏振光宽度 1.5 nm, 每步 0.5 nm, 时间常数 2.0 秒, 光池长度 10 mm。用三级多项式作空白数据校正。用热电支持物保持样品温度, 精确至 1°C 以内。

根据的获结果制成二向色性 (CD、) 图谱 (图 3)。从图 3 可以看出, 在 25°C 下, CD 图谱所测定的 Fusonex 和 gp41 N 端 (35-70) 复合物的二级结构为 100%的 α 螺旋。图谱纵轴的椭圆率以度的单位 (θ) 来表示, 在 222 nm 椭圆率 θ 约为 -40, 000/deg $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ (图 3)。

实施例 4 - Fusonex 和 T-20 稳定性的测定

本实验通过测定不同温度下多肽的熔融曲线来观察其稳定性。测定是在 Aviv 62A DS 圆二向色性图谱仪上进行的。加热多肽溶液的温度范围为 20°C—95°C。

本实验用在不同温度下的熔融曲线来测定多肽的稳定性。Fusonex (右侧的曲线, 以实心圆表示) 的 50%熔融温度为 70°C; T-20 (左侧的曲线, 以空心圆表示) 的 50%熔融温度为 51°C。在其它试验条件相同的

情况下，需要较高的温度才能使 Fusonex 熔融。

根据所获结果制成 Fusonex 和 T-20 的熔融曲线图（图 4）。从图 4 可以看出，Fusonex 的稳定性要比 T-20 好得多。

实施例 5 - Fusonex 对 HIV-1 感染的抑制试验

在本实施例中，通过抑制 HIV 诱发的细胞间的融合实验，证明了 Fusonex 能有效地抗病毒感染。在同样条件下进行的融合测定实验中，Fusonex 的 IC_{50} 为 1.2 ± 0.2 nM，而 T-20 的 IC_{50} 为 23 ± 6 nM。Fusonex 的 50% 抑制浓度（ IC_{50} ）约为 T-20 的 1/20。Fusonex 的高效价说明它能更有效地阻止 HIV 与人体细胞融合，以及阻止 HIV 诱发的细胞间的融合，从而更有效地阻断病毒侵入未感染细胞。

下面详细说明细胞融合实施的方法。

Fusonex 的抗病毒活性可用体外测定法测出。本发明用荧光素酶实验来定量测试 Fusonex 抑制 HIV-1 的 gp160_{HXB} 诱发的合胞体形成的能力。

具体实验方法如下：将 T7 启动子插入克隆部位的 pSP64 上游区，以组装荧光素酶报道基因质粒—Pst71uc。将脑心肌炎病毒（CMCV）的内核糖体进入部位（IRES）联接到荧光素酶基因的 5' 端和 T7 启动子的下游区。将 CD4 基因、T7 多聚酶基因和 HIV-1 的 gp160_{HXB} 基因次级克隆到哺乳细胞表达质粒—PMT3。

在 10cm 的培养皿中，用磷酸钙法转染 293T 细胞。用等量 gp160_{HXB} 基因和 T7 多聚酶基因转染效应细胞，用 pSP64 和 CD4 基因转染靶细胞。用不含 gp160_{HXB} 的基因或不含 CD4 基因的 PMT3 质粒作阴性对照。

在加入 DNA 沉淀后，用不含血清的 DMEM 冲洗细胞。将细胞在 37°C、9ml/碟的无血清 DMEM 中培养 30 分钟~40 分钟。然后，用移液管轻轻将细胞从培养皿中上下吸动起来，再通过离心来收集管底的细胞。将每碟细胞重新悬浮在 3ml~4 ml 含 10% FBS 的 DMEM 中。然后，在 96 穴培养板中将效应细胞和靶细胞（各 45 μ l）混合均匀。

先将 Fusonex 或 T-20 溶解在 DMSO 中, 在 PBS 中稀释 20 倍后配成储备液。临用前在培养基中进行连续稀释。每穴加 10 μ l 培养基或 PBS, 或从 0 到连续增高浓度的 Fusonex 或 T-20 稀释液。迅速搅动靶细胞、效应细胞和融合抑制剂的混合物后, 在 37°C 下培养 8 小时。在分析荧光素酶基因前, 先吸干穴内的培养基, 再用 60 μ l 1 倍浓度的溶细胞缓冲液溶解细胞。取 40 μ l 被溶解的细胞液, 分别转移到黑色 96 穴培养板中, 每穴加 100 μ l 萤虫素和辅酶 A。对每个浓度点重复 3 个样本。在将荧光素酶底物加到黑色 96 穴培养板后的 2 分钟后, 用 Spex fluorolog-3 荧光计测量化学荧光强度, 发射波长 552 nm, 狭缝宽度 7mm。作图时, 从每个浓度点的 3 份数据计算出平均值及标准差。

将实验所得的抑制数据与简单亲和平衡公式 ($\% \text{ 荧光素酶活性} = 100 / (1 + (C / IC_{50}))$) 拟合, 然后估算出 IC_{50} 值。将所获结果制成 Fusonex 和 T-20 抑制病毒融合的曲线图 (图 5)。从图 5 可以看出, 在 HIV-1 的糖蛋白 gp160_{HXB} 诱发的细胞融合实验中, Fusonex (圆圈) 的 50% 抑制浓度 (IC_{50}) 约为 T-20 (方块) 的 1/20。Fusonex 的 IC_{50} 为 1.2 ± 0.2 nM; 而 T-20 的 IC_{50} 为 23 ± 6 nM。也就是说, Fusonex 抑制融合的效价约比 T-20 高 20 倍。

工业实用性

与本领域的同类现有技术相比, 本发明的药物 Fusonex 及其组合物对 HIV 病毒的感染具有强得多的抑制作用, 并且稳定性好, 效价高, 能在提高药物有效性的同时, 降低给药剂量。因此既能提高疗效, 又可降低毒副作用。

权 利 要 求

1. 一种用于治疗 HIV 感染的药物,该药物是从 HIV 跨膜糖蛋白 gp41 中衍生出的一段肽链,其特征在于,该肽链具有如下氨基酸序列:
X-SWETWEREIEINYTKQIYKILEESQEQQDRNEKDLLE-Z

上述肽链中单字母符号代表的氨基酸残基的定义如下: S 为丝氨酸, W 为色氨酸, E 为谷氨酸, T 为苏氨酸, R 为精氨酸, I 为异亮氨酸, N 为天门冬酰胺, Y 为酪氨酸, K 为赖氨酸, Q 为谷氨酰胺, L 为亮氨酸, D 为天门冬氨酸;

其中, X 的组成为选自氨基、乙酰基、疏水基团和大分子载体基团中的任一个基团;

Z 的组成为选自羧基、氨基、酰氨基、叔丁氧羰基、疏水基团和大分子载体基团中的任一个基团。

2. 如权利要求 1 所述的用于治疗 HIV 感染的药物, 其特征在于,

在其 X 组成和 Z 组成中的疏水基团皆为选自苄氧羰基、丹酰基、叔丁氧羰基、9-芴基甲氧羰基中的任一个基团, 在其 X 组成和 Z 组成中的大分子载体基团皆为选自脂质-脂肪酸衍合物、聚乙二醇和碳水化合物中的任一个基团。

3. 如权利要求 1 所述的用于治疗 HIV 感染的药物, 其特征在于, 其中的 X 为乙酰基, Z 为酰氨基。

4. 一种用于治疗 HIV 感染的药物组合物, 其特征在于, 该药物组合物含有有效量的权利要求 1 至 3 任一项所述的药物作为有效成分, 另外还含有作为辅助成分的选自逆转录酶抑制剂、病毒蛋白酶抑制剂、糖苷酶抑制剂、病毒 mRNA 封端抑制剂、两性霉素 B、具有抗 HIV 活性的脂键结合分子维栗精胺、羟基脲、 α 干扰素、 β 干扰素和 γ 干扰素中的一种或多种。

5. 如权利要求 4 所述的药物组合物, 其特征在于, 其中所述的逆转录酶抑制剂为选自 AZT、ddI、ddC、ddA、d4T、3TC、Nevirapine、Atevirapine、Delavirdine、PMEA、PMPA、Loviride 中的一种或多种; 病毒蛋白酶抑制剂为选自 Saquinavir、Ritonavir、Indinavir、Nelfinavir、VX-478 中的一种或多种; 糖苷酶抑制剂为选自 SC-48334、MDL-28574 中的一种或多种; 病毒 mPNA 封端抑制剂为病毒唑。

6. 权利要求 1 所述的药物用于制成治疗 HIV 感染的针剂、口服剂、直肠给药剂和皮肤吸收剂型制剂的用途。

7. 权利要求 4 所述的药物组合物用于制成治疗 HIV 感染的针剂、口服剂、直肠给药剂和皮肤吸收剂型制剂的用途。

图 1: Fusonex 的氨基酸序列

注: 氨基酸序列采用上述单字母氨基酸码。

- 1、Fusonex (SEQ ID: 1) 是一个含 36 个氨基酸的多肽。

SWETWEREIEINYTKQIYKILEESQEQQDRNEKDLLE (SEQ ID: 1)

- 2、HIV-1 (E 亚型) gp41 C 端的氨基酸序列 (117-151) (SEQ ID: 2)。

WIEWEREISNYTNQIYEILTESQNQQDRNEKDLLE (SEQ ID: 2)

图 2. 从 Superdex-75 柱上的洗脱

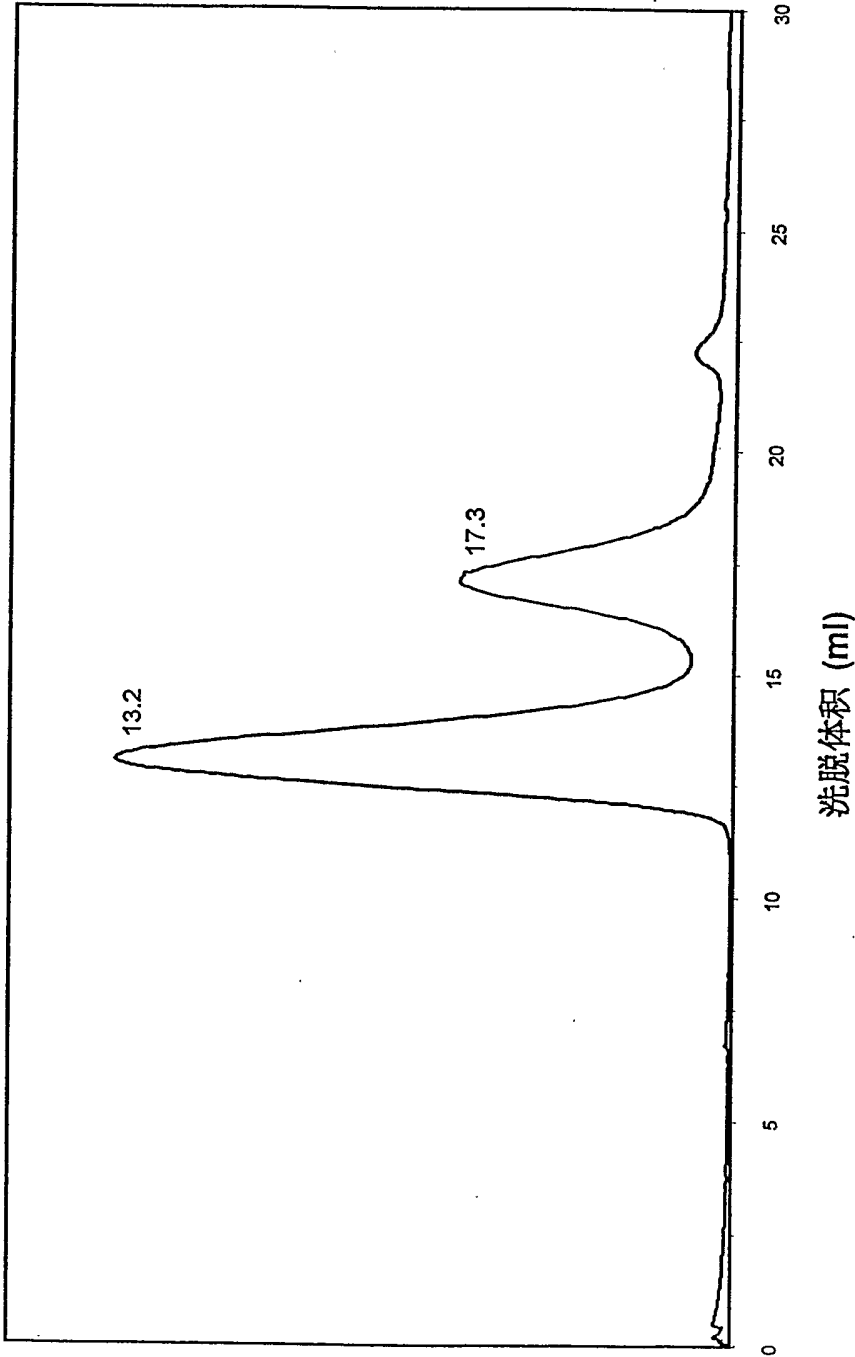


图 3. 二向色性 (CD) 图谱

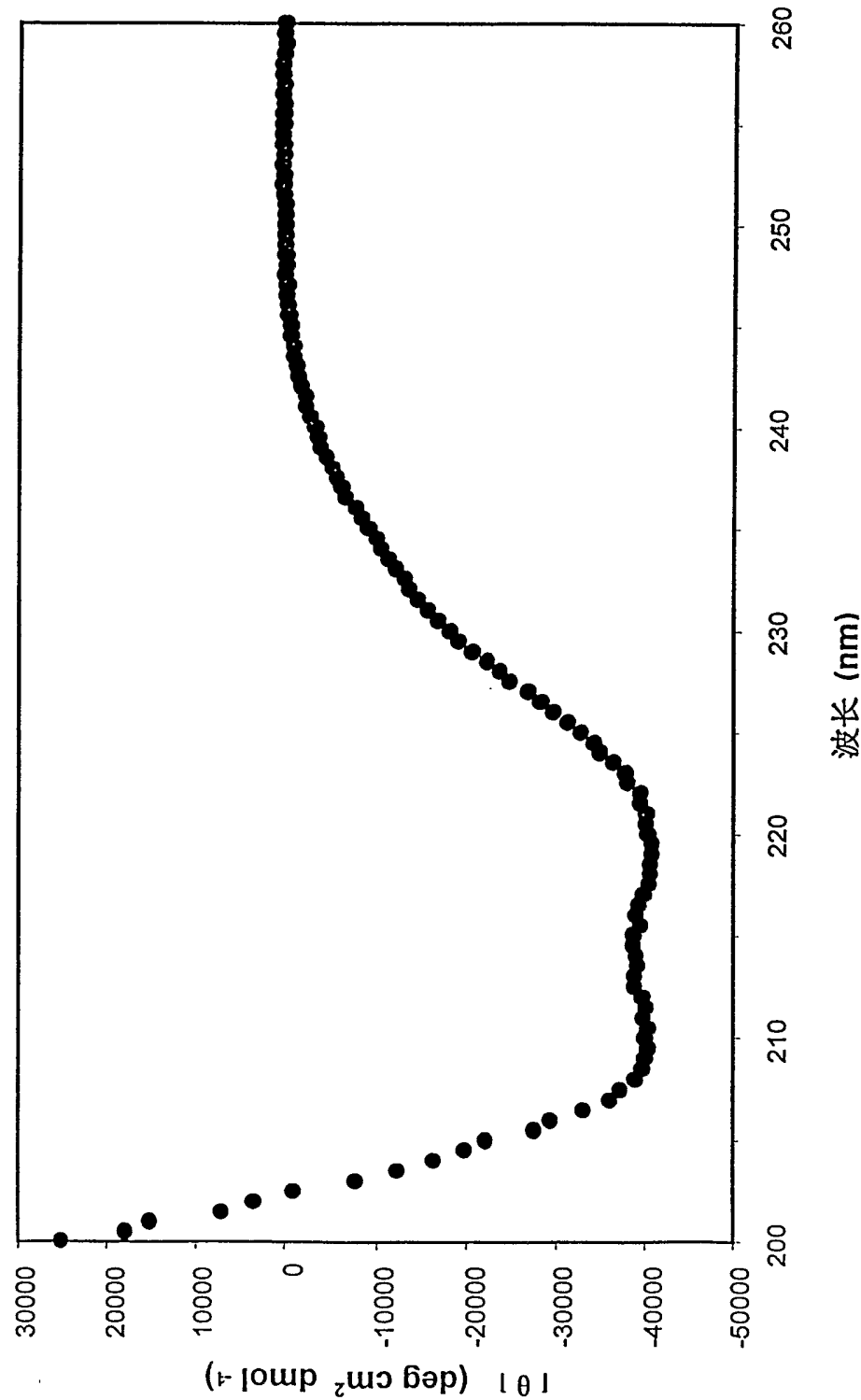


图 4. 熔融曲线

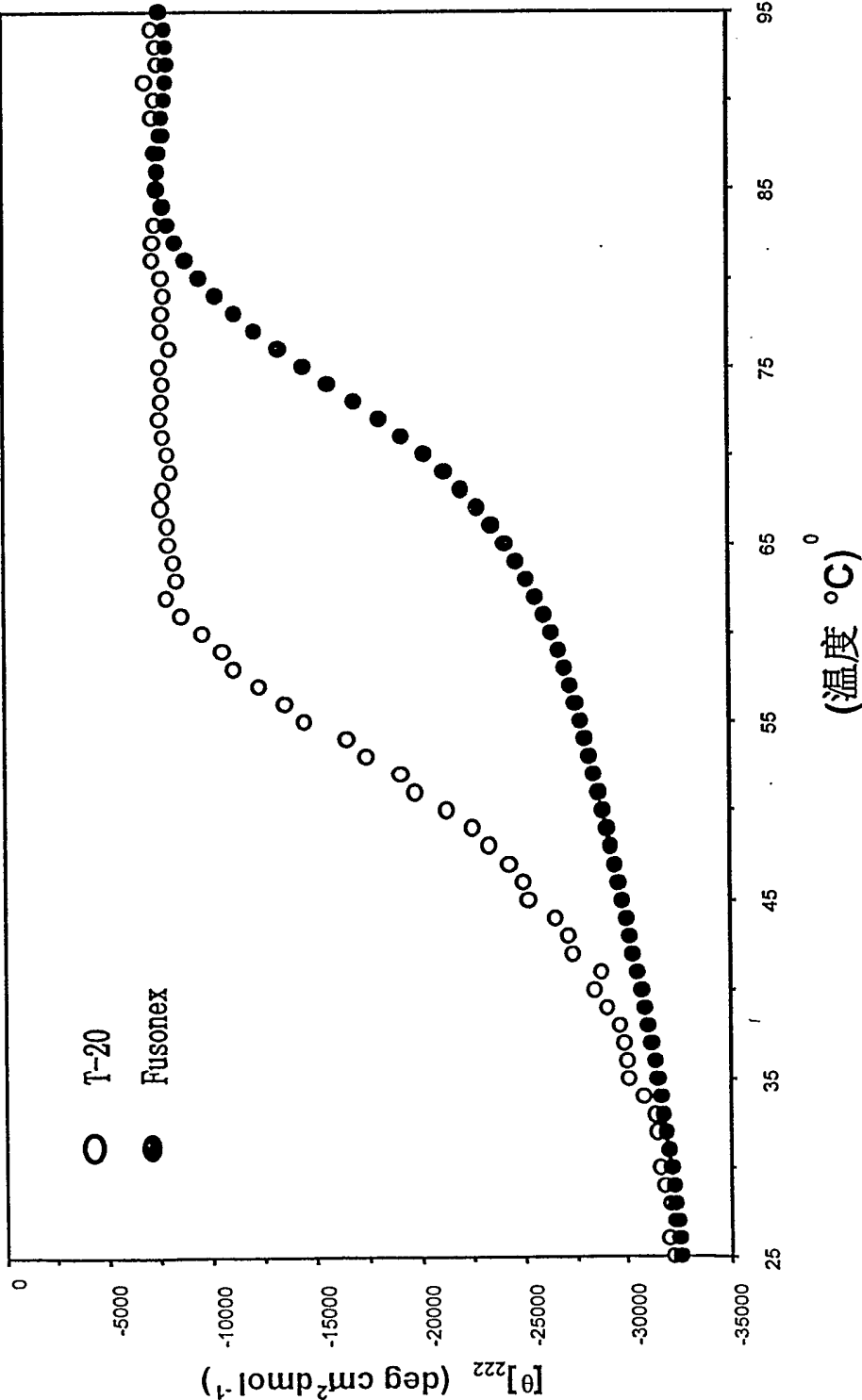
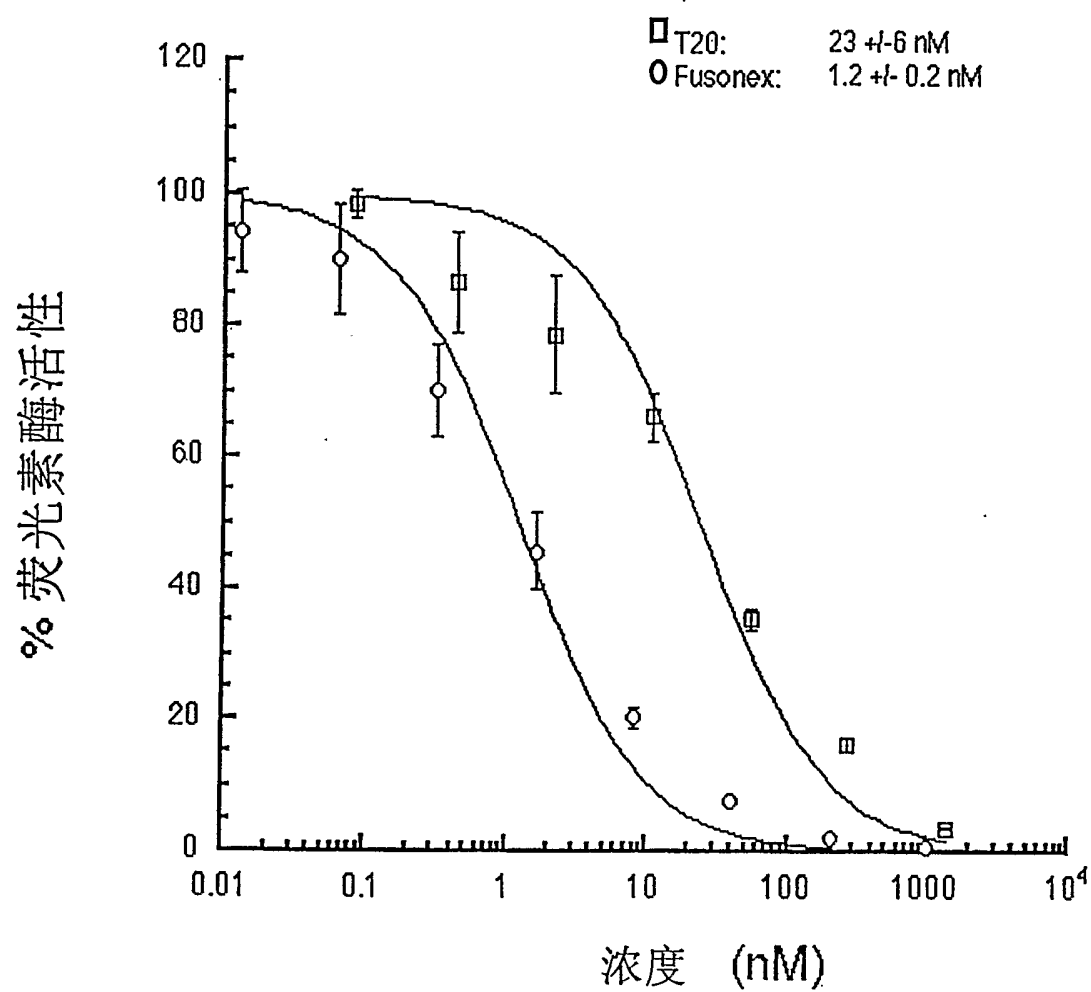


图5、细胞融合抑制实验



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN02/00405

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁷ A61K38/16, C07K14/01

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched(classification system followed by classification symbols)

IPC⁷ A61K38/16, C07K14/01

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the field searched

Electronic data base consulted during the international search(name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT, EPOQUE(WPI), NCBI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant claim No.
X	WO, A1, 9402505(MATTHEWS THOMAS J ; UNIV DUKE) 03.Febuary 1994, See the whole document	1-7
X	WO, A2, 9962945 (PEPTIDE SOLUTIONS INC) 09.December 1999, See the whole document	1-7
X	WO, A1, 0006599 (WHITEHEAD INST BIOMEDICAL RES) 10. Febuary 2000, See the whole document	1-7



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A"document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E"earlier document but published on or after the international filing date

"L"document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason(as specified)

"O"document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P"document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

09 October 2002(09.10.02)

Date of mailing of the international search report

21 NOV 2002 (21.11.02)

Name and mailing address of the ISA/

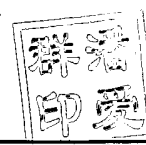
The Chinese Patent Office
6, Xitucheng Road, Haidian District,
Beijing, 100088, China

Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer

PAN, aiquan

Telephone No. 86-10-62093906



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interna application No.
PCT/CN02/00405

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members	Publication date
WO-A1-9402505	03-02-94	AU-A-4683793	14-02-94
WO-A2-9962945	09-12-99	AU-A-4546399	23-05-01
WO-A1-0006599	10-02-00	EP-A1-1100818	20-12-99

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN02/00405

A. 主题的分类

Int.Cl⁷: A61K38/16, C07K14/01

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)

Int.Cl⁷: A61K38/16, C07K14/01

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)

WPI,CNPT, BIOSIS,CA

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 包括相关段落的说明	相关的权利要求编号
X	WO, A, 9402505(MATTHEWS THOMAS J; DUKE 大学等) 03.2 月 1994, 参见全文	1—7
X	WO, A2, 9962945 (肽溶液公司) 09.12 月 1999, 参见全文	1—7
X	WO, A1, 0006599 (WHITEHEAD 生物医学研究) 10.2 月 2000, 参见全文	1—7

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的专用类型:

“A” 明确表示了一般现有技术、不认为是特别相关的文件

“E” 在先文件, 但是在国际申请日的同一日或之后公布的

“L”对优先权要求可能产生怀疑或者用来确定另一篇引用文件的公布日期或其它特殊理由而引用的文件(如详细说明)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他手段的文件

“P” 在国际申请日之前但迟于所要求的优先权日公布的文件

“T”在国际申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理

“X”特别相关的文件; 当该文件被单独使用时, 要求保护的发明不能认为是新颖的或不能认为具有创造性

“Y”特别相关的文件; 当该文件与其他一篇或多篇这类文件结合在一起, 这种结合对本领域技术人员是显而易见的, 要求保护的发明不能认为具有创造性

“&” 同族专利成员的文件

国际检索实际完成的日期

09.10 月 2002(09.10.02)

国际检索报告邮寄日期

21.11月 2002(21.11.02)

国际检索单位名称和邮寄地址

中国专利局

中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088)

传真号:

86-010-62019451

受权官员:

潘爱群

电话号码: 86-10-62093906



国际申请号
PCT/CN02/00405

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利成员	公布日期
WO-A1-9402505	03-02-94	AU-A-4683793	14-02-94
WO-A2-9962945	09-12-99	AU-A-4546399	23-05-01
WO-A1-0006599	10-02-00	EP-A1-1100818	20-12-99