

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580019236.9

[51] Int. Cl.

A61K 38/38 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 6 月 13 日

[11] 公开号 CN 1980688A

[22] 申请日 2005.4.20

[21] 申请号 200580019236.9

[30] 优先权

[32] 2004.4.20 [33] GB [31] 0408752.4

[86] 国际申请 PCT/IB2005/001255 2005.4.20

[87] 国际公布 WO2005/102382 英 2005.11.3

[85] 进入国家阶段日期 2006.12.12

[71] 申请人 哈姆雷特药品公司

地址 瑞典隆德

[72] 发明人 C·斯范博格

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘 冬 刘 玥

权利要求书 2 页 说明书 12 页

[54] 发明名称

使肿瘤细胞致死的人 α -乳清蛋白 (HAM-LET) 在治疗病毒感染中的应用

[57] 摘要

选自使肿瘤细胞致死的人 α -乳清蛋白 (HAM-LET) 或其生物活性修饰物或它们的生物活性片段的 α -乳清蛋白生物活性复合物在制备用于治疗病毒感染的药物中的用途。

1. 一种选自使肿瘤细胞致死的人 α -乳清蛋白(HAMLET)或其生物活性修饰物或它们的生物活性片段的 α -乳清蛋白生物活性复合物在制备用于治疗病毒感染的药物中的用途。

2. 权利要求 1 的用途, 其中所述病毒感染是呼吸道病毒感染、胃肠道病毒感染、免疫缺陷病毒感染和脑或其它内脏器官的病毒感染。

3. 权利要求 1 或 2 的用途, 其中所述生物活性复合物包括 α -乳清蛋白、或呈 apo 折叠状态的 α -乳清蛋白变体、或它们的任何片段以及使复合物稳定保持生物活性形式的辅因子, 前提条件是 α -乳清蛋白或其变异体的任何片段包含对应于在 α 和 β 结构域之间形成界面的 α -乳清蛋白区的区域。

4. 权利要求 3 的用途, 其中所述辅因子是顺式 C18:1:9 脂肪酸或顺式 C18:1:11 脂肪酸或具有类似构型的不同脂肪酸。

5. 权利要求 1-4 中任一项的用途, 其中所述生物活性复合物包含按下述方法获得的 HAMLET: 使乳汁的酪蛋白部分在 pH4.6 沉淀出来, 通过阴离子交换层析和凝胶层析进行分离; 或者在来自人乳酪蛋白并以 C18:1 脂肪酸为特征的辅因子存在下, 对 α -乳清蛋白进行离子交换层析。

6. 权利要求 1-4 中任一项的用途, 其中所述 α -乳清蛋白生物活性复合物包含:

(i) 顺式 C18:1:9 脂肪酸或顺式 C18:1:11 脂肪酸或具有类似构型的不同脂肪酸; 和

(ii) 已除去钙离子的 α -乳清蛋白, 或者已除去钙离子或没有功能性钙结合位点的 α -乳清蛋白变体; 或它们的任何片段, 前提条件是任何片段都包含对应于在 α 和 β 结构域之间形成界面的 α -乳清蛋白区的区域。

7. 权利要求 6 的用途, 其中所述生物活性复合物包括 α -乳清蛋白变异体, 其中所述钙结合位点已经被修饰, 使得对钙的亲合力降低, 或者不再具有功能。

8. 权利要求 7 的用途, 其中所述变异体在牛 α -乳清蛋白中的一个相当于 K79、D82、D84、D87 和 D88 的氨基酸上具有突变。

9. 权利要求 8 的用途, 其中所述修饰是在 D87 上, 所述修饰物包括具有 D87A 变异体或 D87N 变异体的 α -乳清蛋白变异体。

10. 权利要求 1-4 中任一项的用途, 其中所述生物活性复合物包含 α -乳清蛋白或其变异体的片段, 其中所述片段包含天然蛋白的氨基酸 34-86 的整个区。

11. 前述权利要求中任一项的用途, 其中所述 α -乳清蛋白是人 α -乳清蛋白或牛 α -乳清蛋白或它们的变异体。

12. 权利要求 11 的用途, 其中所述 α -乳清蛋白是人 α -乳清蛋白。

13. 权利要求 11 的用途, 其中所述 α -乳清蛋白是包含 S70R 突变的突变型牛 α -乳清蛋白。

14. 一种治疗病毒感染的方法, 所述方法包括给予有需要的患者选自以下的 α -乳清蛋白生物活性复合物: HAMLET 或其生物活性修饰物或它们的生物活性片段。

15. 权利要求 14 的方法, 所述方法用于治疗粘膜表面的病毒感染, 并且包括给予有需要的患者的所述表面选自以下的 α -乳清蛋白生物活性复合物: HAMLET 或其生物活性修饰物或它们的生物活性片段。

使肿瘤细胞致死的人 α -乳清蛋白(HAMLET)

在治疗病毒感染中的应用

本发明涉及病毒感染的治疗方法，并涉及生物活性复合物在制备用于治疗病毒感染的药物中的用途。

HAMLET (human α -lactalbumin made lethal to tumour cells, 使肿瘤细胞致死的人 α -乳清蛋白) (以前称为 MAL)是一种 α -乳清蛋白的活性折叠变异体，它在转化细胞中能诱导细胞凋亡，但却不损伤健康的分化细胞(M. Svensson 等, (2000) *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 4221-6)。已经知道，HAMLET 能与肿瘤细胞表面结合，易位到细胞质并聚集在细胞核内，在此引起DNA断裂(M. Svensson 等, (2000) *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 4221-6)。这类生物活性复合物得自乳汁，尤其是人乳，可用作抗细菌药物，参见例如 EP-0776214。

迄今为止，有关 HAMLET 的研究报道已经表明，转化细胞在体外对 HAMLET 敏感，这表明它可用于癌症治疗(参见例如 C. Svanborg 等, *Advances in Cancer Research*. United States, 25 2003, 88, 1-29)。也发现它具有抗菌效果，具体地讲，当进行体外试验时，它能抑制肺炎链球菌(*S. pneumoniae*)和流感嗜血杆菌(*H. influenzae*)附着到人呼吸道上皮细胞(WO96/04929)。相反，某些病毒(例如某些类型的腺病毒)看来却增加某些细菌的体外粘附力(A. Hakansson 等, *Infection and Immunity*, (1994) 第 62 卷, 7:2707-2714)。

本申请人已经发现了，HAMLET 和这类复合物当用于治疗病毒感染时，获得了预料不到的良好结果。

根据本发明，提供选自 HAMLET 或其生物活性修饰物或它们的生物活性片段的 α -乳清蛋白生物活性复合物在制备用于治疗病毒感染的药物中的用途。

看来, HAMLET 或其生物活性修饰物的作用是靶向特定细胞类型, 这其中除了包括以前已经报道过的肿瘤细胞之外, 还包括已经感染病毒的细胞。

因此, 这些复合物可用于治疗病毒感染。如果及时治疗的话, 在病毒有机会复制之前, HAMLET 就已导致含有病毒(例如逆转录病毒)的细胞死亡。结果限制了病毒的扩散。

各种各样的病毒都可采用这种方式进行治疗, 包括人类病毒和兽医病毒。这些病毒列表如下。

1. 腺病毒科(Adenoviridae), 包括哺乳动物腺病毒属(Mastadenovirus), 模式种: 人腺病毒 2 型(human adenovirus 2); 禽腺病毒属(Aviadenovirus), 模式种: 禽腺病毒 1 型(fowl adenovirus 1)和非洲猪热病样病毒(African swine fever-like viruses)。

2. 沙粒病毒科(Arenaviridae), 包括沙粒病毒属(Arenaviruses), 模式种: 淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(lymphocytic choriomeningitis virus); 动脉炎病毒属(Arterivirus), 模式种: 马动脉炎病毒(equine arteritis virus)。

3. 星状病毒科(Astroviridae), 包括星状病毒属(Astrovirus), 模式种: 人星状病毒 1 型(human astrovirus 1)。

4. 双节段双链 RNA 病毒科(Birnaviridae), 包括水生动物双节段双链 RNA 病毒属(Aquabirnavirus), 模式种: 传染性胰腺坏死病毒(infectious pancreatic necrosis virus); 禽双节段双链 RNA 病毒属(Avibirnavirus), 模式种: 传染性法氏囊病病毒(infectious bursal disease virus)。

5. 布尼亚病毒科(Bunyaviridae), 包括布尼亚病毒属(Bunyavirus), 模式种: 布尼安维拉病毒(Bunyamwera virus); 汉坦病毒属(Hantavirus), 模式种: 汉坦病毒(Hantaan virus); 内罗毕病毒属(Nairovirus), 模式种: 内罗毕绵羊病病毒(Nairobi sheep disease virus); 白蛉热病毒属(Phlebovirus), 模式种: 白蛉热西西里病毒(sandfly fever

Sicilian virus)。

6. 杯状病毒科(Caliciviridae), 包括杯状病毒属(Calicivirus), 模式种: 猪小泡疹病毒(vesicular exanthema of swine virus)。

7. 圆环病毒科(Circoviridae), 包括圆环病毒属(Circovirus), 模式种: 鸡贫血病毒(chicken anemia virus)。

8. 冠状病毒科(Coronaviridae), 包括冠状病毒属(Coronavirus), 模式种: 禽类传染性支气管炎病毒(avian infectious bronchitis virus); 环状病毒属(Torovirus), 模式种: 伯尔尼病毒(Berne virus); 丁型病毒属(Deltavirus), 模式种: 丁型肝炎病毒(hepatitis delta virus)。

9. 目: 单分子负链 RNA 病毒目(Mononegavirales), 包括丝状病毒科(Filoviridae), 包括丝状病毒属(Filovirus), 模式种: 马尔堡病毒(Marburg virus)。

10. 黄病毒科(Flaviviridae), 包括黄病毒属(Flavivirus), 模式种: 黄热病病毒(yellow fever virus); 虫媒病毒属(Pestivirus), 模式种: 牛腹泻病毒(diarrhea virus)和“丙型肝炎样病毒”属(Genus “Hepatitis C-like viruses”), 模式种: 丙型肝炎病毒(hepatitis C virus)。

11. 嗜肝 DNA 病毒科(Hepadnaviridae), 包括正嗜肝病毒属(Orthohepadnavirus), 模式种: 乙型肝炎病毒(hepatitis B virus); 禽嗜肝 DNA 病毒属(Avihepadnavirus), 模式种: 鸭乙型肝炎病毒(duck hepatitis B virus)。

12. 疱疹病毒科(Herpesviridae), 包括疱疹病毒亚科: 疱疹病毒甲亚科(Alphaherpesvirinae), 例如单纯疱疹病毒属(Simplexvirus), 模式种: 人疱疹病毒 1 型(human herpesvirus 1); 水痘病毒属(Varicellovirus), 模式种: 人疱疹病毒 3 型(human herpesvirus 3); 疱疹病毒乙亚科(Betaherpesvirinae), 包括巨细胞病毒属(Cytomegalovirus), 模式种: 人疱疹病毒 5 型(human herpesvirus 5); 鼠巨细胞病毒属(Muromegalovirus), 模式种: 小鼠巨细胞病毒 1 型(Mouse cytomegalovirus 1); 玫瑰疹病毒属(Roseolovirus), 模式种:

人疱疹病毒 6 型(human herpesvirus 6); 疱疹病毒丙亚科(Gammaherpesvirinae), 包括淋巴滤泡病毒属(Lymphocryptovirus), 模式种: 人疱疹病毒 4 型(human herpesvirus 4); 蛛猴疱疹病毒属(Rhadinovirus), 模式种: 蛛猴疱疹病毒 2 型(ateline herpesvirus 2)。

13. 虹彩病毒科(Iridoviridae), 包括蛙病毒属(Ranavirus), 模式种: 蛙病毒 3 型(frog virus 3); 淋巴囊肿病毒属(Lymphocystivirus), 模式种: flounder virus; “金鱼病毒样病毒”属(Genus “Goldfish virus-like viruses”), 模式种: 金鱼病毒 1 型(goldfish virus 1)。

14. 目: 单分子负链 RNA 病毒目(Mononegavirales), 包括丝状病毒科(Filoviridae)、副粘病毒科(Paramyxoviridae)、弹状病毒科(Rhabdoviridae)。

15. 正粘病毒科(Orthomyxoviridae), 包括甲型流感病毒属(Influenzavirus A)、乙型流感病毒属(Influenzavirus B), 模式种: 甲型流感病毒(influenza A virus); 丙型流感病毒属(Influenzavirus C), 模式种: 丙型流感病毒(influenza C virus); “托高土样病毒”属(Genus “Thogoto-Like viruses”), 模式种: 托高土病毒(Thogoto virus)。

16. 乳多空病毒科(Papovaviridae), 包括多瘤病毒属(Polyomavirus), 模式种: 鼠多瘤病毒(murine polyomavirus); 乳头瘤病毒属(Papillomavirus), 模式种: 棉尾兔乳头瘤病毒(cottontail rabbit papillomavirus) (Shope)。

17. 目: 单分子负链 RNA 病毒目(Mononegavirales), 包括副粘病毒科(Paramyxoviridae)及副粘病毒亚科(Paramyxovirinae), 包括副粘病毒属(Paramyxovirus), 模式种: 人副流感病毒 1 型(human parainfluenza virus 1); 麻疹病毒属(Morbillivirus), 模式种: 麻疹病毒(measles virus); 腮腺炎病毒属(Rubulavirus), 模式种: 腮腺炎病毒(mumps virus), 以及肺病毒亚科(Pneumovirinae), 包括肺病毒属(Pneumovirus), 模式种: 人呼吸道合胞病毒(human respiratory syncytial virus)。

18. 细小 DNA 病毒科(Parvoviridae), 包括细小 DNA 病毒亚科(Parvovirinae), 包括细小 DNA 病毒属(Parvovirus), 模式种: 小鼠细小病毒(mice minute virus); 红病毒属(Erythrovirus), 模式种: B19 病毒(B19 virus); 依赖病毒属(Dependovirus), 模式种: 腺伴随病毒 2 型(adeno-associated virus 2)。

19. 小 RNA 病毒科(Picornaviridae), 包括肠道病毒属(Enterovirus), 模式种: 脊髓灰质炎病毒 1 型(poliovirus 1); 鼻病毒属(Rhinovirus), 模式种: 人鼻病毒 1A 型(human rhinovirus 1A); 肝病毒属(Hepatovirus), 模式种: 甲型肝炎病毒(hepatitis A virus); 心脏病毒属(Cardiovirus), 模式种: 脑心肌炎病毒(encephalomyocarditis virus); 和口蹄疫病毒属(Aphthovirus), 模式种: 口蹄疫病毒 O 型(foot-and-mouth disease virus O)。

20. 痘病毒科(Poxviridae), 包括脊椎动物痘病毒亚科(Chordopoxvirinae), 包括正痘病毒属(Orthopoxvirus), 模式种: 痘苗病毒(vaccinia virus); 副痘病毒属(Parapoxvirus), 模式种: 口疮病毒(orf virus); 禽痘病毒属(Avipoxvirus), 模式种: 鸡痘病毒(fowlpox virus); 山羊痘病毒属(Capripoxvirus), 模式种: 羊痘病毒(sheepox virus); 野兔痘病毒属(Leporipoxvirus), 模式种: 粘液瘤病毒(myxoma virus); 猪痘病毒属(Suipoxvirus), 模式种: 猪痘病毒(swinepox virus); 软疣痘病毒属(Molluscipoxvirus), 模式种: 接触传染性软疣病毒(Molluscum contagiosum virus); 和亚塔痘病毒属(Yatapoxvirus), 模式种: 亚巴猴肿瘤病毒(Yaba monkey tumor virus)。

21. 呼肠孤病毒科(Reoviridae), 包括正呼肠孤病毒属(Orthoreovirus), 模式种: 呼肠孤病毒 3 型(reovirus 3); 环状病毒属(Orbivirus), 模式种: 蓝舌病毒 1 型(bluetongue virus 1); 轮状病毒属(Rotavirus), 模式种: 猿猴轮状病毒 SA11 (simian rotavirus SA11); Coltivirus 属, 模式种: 科罗拉多蜱传热病毒(Colorado tick fever virus); 和水生动物呼肠孤病毒属(Aquareovirus), 模式种: 金体美洲鳊鱼病

毒(golden shiner virus)。

22. 逆转录病毒科(Retroviridae), 包括“哺乳动物 B 型逆转录病毒”属(Genus “mammalian type B retroviruses”), 模式种: 小鼠乳腺癌病毒(mouse mammary tumor virus); “哺乳动物 C 型逆转录病毒”(Genus “mammalian type C retroviruses”), 模式种: 鼠白血病病毒(murine leukemia virus); “禽 C 型逆转录病毒”属(Genus “avian type C retroviruses”), 模式种: 禽白血病病毒(avian leukosis virus); “D 型逆转录病毒”属(Genus “type D retroviruses”), 模式种: Mason-Pfizer 猴病毒(Mason-Pfizer monkey virus); “blv-htlv 逆转录病毒”属(Genus “blv-htlv retroviruses”), 模式种: 牛白血病病毒(bovine leukemia virus); 慢病毒属(Lentivirus), 模式种: 人免疫缺陷病毒 1 型(human immunodeficiency virus 1); 和泡沫病毒属(Spumavirus), 模式种: 人泡沫病毒(human spumavirus)。

23. 目: 单分子负链 RNA 病毒目(Mononegavirales), 包括弹状病毒科(Rhabdoviridae), 包括水泡性病毒属(Vesiculovirus), 模式种: 水泡性口膜炎印地安那病毒(vesicular stomatitis Indiana virus); 狂犬病病毒属(Lyssavirus), 模式种: 狂犬病病毒(rabies virus); 和暂时热病毒属(Ephemerovirus), 模式种: 牛暂时热病毒(bovine ephemeral fever virus)。

24. 卫星病毒(Satellites), 包括 dsDNA 卫星病毒(dsDNA Satellites) 和 ssRNA 卫星病毒(ssRNA Satellites)。

25. 披膜病毒科(Togaviridae), 包括甲病毒属(Alphavirus), 模式种: 辛德比斯病毒(Sindbis virus); 和风疹病毒属(Rubivirus), 模式种: 风疹病毒(rubella virus)。

用所述生物复合物治疗的具体病毒包括呼吸道病毒、胃肠道病毒、免疫缺陷病毒(例如人免疫缺陷病毒(HIV))和脑病毒(例如病毒性脑膜炎病毒)或其它内脏器官病毒。

在性质(例如 pH 等)方面, 粘膜表面的情况相当独特。然而, 本

发明的复合物在这样的条件下仍能保持活性。尤其在以下部位中都存在有粘膜表面：鼻道、口腔、咽喉、食道、肺、胃、结肠、阴道和膀胱。尤其可以用本发明治疗的粘膜表面包括咽喉、肺、结肠和膀胱表面。本发明尤其适用于治疗影响这些部位的病毒，例如 HSV。

可按本发明治疗的具体的呼吸道病毒包括腺病毒、流感病毒、呼吸道合胞病毒(RSV)、副流感病毒、鼻病毒、冠状病毒。

本文所用的术语“HAMLET”是指 α -乳清蛋白的生物活性复合物，所述蛋白是按下述方法获得的：按照例如 EP-A-0776214 所述，使乳汁的酪蛋白部分在 pH4.6 沉淀出来，通过离子交换层析和凝胶层析进行分离；或者按照 WO99/26979 所述，在来自人乳酪蛋白的辅因子(以 C18:1 脂肪酸为特征)存在下，对 α -乳清蛋白进行离子交换层析。

α -乳清蛋白可得自不同来源的哺乳动物，包括人、牛、绵羊和山羊的乳汁，但是优选人乳或牛乳，最优选人乳。也可使用该蛋白的重组形式。

已经知道，其它试剂、尤其是脂质(例如油酸)可用于将人 α -乳清蛋白转化成 HAMLET。具体地讲，先前已报道，油酸(C18:1:9 顺式)是产生 HAMLET 所需要的(M. Svensson 等, (2000) *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 4221-6)。最近发现，其它脂肪酸也可以类似方式作为辅因子。将 α -乳清蛋白转化成 HAMLET 的最佳辅因子是 C18:1 脂肪酸，在 9 位或 11 位具有顺式构象的双键。

α -乳清蛋白是一种 14.2 kDa 的球状蛋白，带有 4 个 α -螺旋(残基 1-34, 86-123)和反平行 β -折叠(残基 38-82)，由 4 个二硫键(61-77; 73-91; 28-111 和 6-120)连接在一起(K. R. Acharya 等, (1991) *J Mol Biol*, 221, 571- 81)。 α -乳清蛋白的天然构象是由高亲和性 Ca^{2+} 结合位点限定，与 Asp82、Asp87 和 Asp88 的侧链羧基、Lys79 和 Asp84 的羧基氧和 2 个水分子配位(K. R. Acharya 等, (1991) *J Mol Biol*, 221, 571-81)。当暴露在低 pH 时，或者在螯合剂存在下，在 HAMLET 中发现

该蛋白质采用所谓的 apo-构象, 释放强结合的 Ca^{2+} 离子(D. A. Dolgikh 等, (1981) *FEBS Lett*, 136, 311-5; K. Kuwajima, (1996) *Faseb J*, 10, 102-09)。

为了形成生物活性复合物, α -乳清蛋白通常需要构象变化或折叠变化并需要脂质辅因子的存在。从 α -乳清蛋白上除去钙离子, 会适当影响构象变化。在一个优选的实施方案中, 采用没有功能性钙结合位点的 α -乳清蛋白变异体, 适当地简化了该过程。

含有所述变异体的生物活性复合物包括在本文所用的术语 HAMLET 的“修饰物”之内。然而, 申请人已经发现, 一旦形成了复合物, 功能性钙结合位点的存在和/或钙的存在, 就不会影响复合物的稳定性或生物活性。已经发现, 生物活性复合物保留对钙的亲合力, 同时也不丧失活性。因此, 本发明的复合物还可包含钙离子。

因此, 具体地讲, 本发明使用生物活性复合物, 所述复合物包括 α -乳清蛋白、或呈 apo 折叠状态的 α -乳清蛋白变异体、或它们的任何片段以及使复合物稳定保持生物活性形式的辅因子, 前提条件是 α -乳清蛋白或其变异体的任何片段包括对应于在 α 和 β 结构域之间形成界面的 α -乳清蛋白区的区域。

合适的辅因子是顺式 C18:1:9 脂肪酸或顺式 C18:1:11 脂肪酸或具有类似构型的不同脂肪酸。

在一个特别简便的实施方案中, 用于本发明的生物活性复合物包括(i)顺式 C18:1:9 脂肪酸或顺式 C18:1:11 脂肪酸或具有类似构型的不同脂肪酸; 和(ii)已除去钙离子的 α -乳清蛋白, 或者已释放钙离子或没有功能性钙结合位点的 α -乳清蛋白变异体; 或它们的任何片段, 前提条件是任何片段都包含对应于在 α 和 β 结构域之间形成界面的 α -乳清蛋白区的区域。

本文所用的术语“变异体”是指与基础蛋白(basic protein)同源的多肽或蛋白质, 它们适宜是人 α -乳清蛋白或牛 α -乳清蛋白, 但是它们所来源的碱基序列不同, 所述序列中一个或多个氨基酸被其它氨基

酸取代。氨基酸取代可被认为是“保守的”，其中一个氨基酸被具有大致相似特性的不同氨基酸取代。非保守取代则是氨基酸被不同类型的氨基酸取代。一般而言，少数非保守取代可能不会改变多肽的生物活性。合适的变异体可具有至少 60% 的同一性，优选至少 70%、甚至更优选 80% 或 85%、特别优选 90%、95% 或 98% 或更高同一性。

当为了确定同一性程度而对氨基酸序列进行比较时，可以使用例如 BESTFIT 和 GAP (都来自 Wisconsin Genetics Computer Group (GCG) 软件包) 等程序。例如，BESTFIT 比较两个序列并产生最相似区段的最佳比对。GAP 能通过在各序列中合适地插入空位，而比对序列的全长并找到最佳比对。在本发明的内容中，当讨论序列同一性时，适宜通过序列的全长比对而进行比较。

术语“其片段”是指给定氨基酸序列的任何部分，所述部分可形成具有与包括完整 α -乳清蛋白氨基酸序列的复合物类似活性的复合物。片段可包括不止一个来自全长蛋白质并连接在一起的部分。各部分适宜包括来自基础序列(basic sequence)的至少 5 个、优选至少 10 个连续氨基酸。合适的片段将是缺失突变体，其长度适宜包含至少 20 个氨基酸，更优选至少 100 个氨基酸。它们包含来自蛋白质或它们的组合的小区域。

在人 α -乳清蛋白中，在 α 和 β 结构域之间形成界面的区域限定在结构中的氨基酸 34-38 和 82-86。因此，合适片段包括这些区域，优选来自天然蛋白质的氨基酸 34-86 的整个区。

在一个具体的优选实施方案中，生物活性复合物包括 α -乳清蛋白变异体，其中钙结合位点已被修饰，使得对钙的亲合力降低，或者不再具有功能。

已经发现，在牛 α -乳清蛋白中，钙结合位点是与残基 K79、D82、D84、D87 和 D88 配位。因此在非牛 α -乳清蛋白中，对该位点或其等同位点的修饰(例如去除一个或多个酸性残基)可以使该位点对钙的亲合力降低，或者完全消除该功能，这类突变体是本发明的优选方面。

牛 α -乳清蛋白的 Ca^{2+} -结合位点是由 3_{10} 螺旋和 α -螺旋组成, 两个螺旋之间具有短转角区(Acharya K. R.等, (1991) *J Mol Biol* 221, 571-581)。它邻接两个二硫桥, 使分子的这一部分相当刚硬。与 Ca^{2+} 配位的 7 个氧基团中有 5 个是由 Asp82、87 和 88 的侧链羧基或 Lys79 和 Asp84 的羧基氧贡献出来的。两个水分子提供余下的两个氧(Acharya K. R.等, (1991) *J Mol Biol* 221, 571- 581)。

先前已经知道, 通过定点诱变将 87 位天冬氨酸变成丙氨酸(D87A), 能钝化强钙结合位点(Anderson P. J.等, (1997) *Biochemistry* 36, 11648-11654), 突变蛋白可采用 apo 构象。

因此, 在一个具体实施方案中, 在牛 α -乳清蛋白的蛋白质序列中 87 位氨基酸的天冬氨酸残基, 突变成非酸性残基, 尤其是非极性或不带电荷的极性侧链。

非极性侧链包括丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸或半胱氨酸。尤其优选的实例是丙氨酸。不带电荷的极性侧链包括天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸。

为了使突变蛋白的结构变形最小化, D87 也已被天冬酰胺(N)取代(Permyakov S. E.等, (2001) *Proteins Eng* 14, 785-789), 其缺乏非补偿的羧基负电荷, 但具有相同的侧链体积和几何结构。已经知道, 突变蛋白(D87N)以低亲和力结合钙($K_{\text{Ca}} 2 \times 10^5 \text{M}^{-1}$) (Permyakov S. E.等, (2001) *Proteins Eng* 14, 785-789)。在另一个本发明的优选实施方案中, 这样的突变体构成生物活性复合物的要素。

因此, 用于本发明复合物的特别优选的变异体是 α -乳清蛋白 D87A 变异体和 D87N 变异体, 或包含该突变的片段。牛蛋白和人蛋白分子的该区是不同的, 因为在牛 α -乳清蛋白中 3 个碱性氨基酸中有一个(R70)变成 S70, 因而消除了一个配位侧链。因此, 优选当牛 α -乳清蛋白用于本发明的复合物时, 采用 S70R 突变体。

在不同物种的 α -乳清蛋白中, Ca^{2+} 结合位点是 100%保守的

(Acharya K. R.等, (1991) *J Mol Biol* 221, 571-581), 说明该功能对蛋白质的重要性。它由 5 个不同氨基酸和 2 个水分子配位。D87 以及 D88 的侧链羧基最初减少了钙离子进入阳离子结合区, 并形成稳定其结构的内部氢键(Anderson P. J.等, (1997) *Biochemistry* 36, 11648-11654)。已经知道, D87 或 D88 的缺乏会削弱 Ca^{2+} 的结合, 并使分子稳定在部分未折叠状态中(Anderson P. J.等, (1997) *Biochemistry* 36, 11648-11654)。

此外, 也可使用在牛 α -乳清蛋白钙结合位点中具有两个不同点突变的突变蛋白。例如, 已经发现, 87 位的天冬氨酸被丙氨酸取代(D87A)完全消除了钙的结合并破坏蛋白质的三级结构。天冬氨酸被天冬酰胺取代, 蛋白质(D87N)仍能结合钙, 但亲和力较低, 并显示出丧失三级结构, 虽然不象 D87A 突变体那样明显(Permyakov S. E.等, (2001) *Proteins Eng* 14, 785-789)。突变蛋白在堆积体积(packing volume)上表现出最小变化, 因为两个氨基酸都具有相同的平均体积 $125\text{\AA}^3$, 天冬酰胺的羧基侧链允许蛋白质与钙配位, 但效果较差(Permyakov S. E.等, (2001) *Proteins Eng* 14, 785-789)。两个突变蛋白在生理温度下、在 apo 构象中是稳定的, 但是尽管有该构象变化, 它们仍是无生物活性的。结果证明, 仅有 apo 构象的构象变化并不足以诱导生物活性。

α -乳清蛋白的结构是本领域已知的, 本文所用残基的准确氨基酸编号可以根据以下文献所述的结构而确定: 例如 Anderson 等, 出处同上; Permyakov 等, 出处同上。

按照本发明制备的药物适宜是药物组合物, 其形式适于局部给予受病毒感染的特定部位。

例如, 对于呼吸道感染而言, 该组合物可适于吸入或吹入给予。口服组合物可用于治疗胃肠道病毒感染, 尤其是胃部感染。治疗其它粘膜表面的病毒感染, 例如阴道或结肠, 可用局部制剂(例如栓剂)进行治疗。

局部溶液剂或乳膏剂适宜含有用于蛋白质复合物的乳化剂以及稀释剂，或者乳膏基质可以更适用于粘膜表面的其它病毒感染。所述制剂可直接施用于粘膜表面。

另外，所述局部组合物可用于治疗皮肤病毒感染。

在另一个实例中，组合物的形式适于滴注到膀胱内，以治疗膀胱病毒。

累及内脏器官的其它病毒感染可通过输注到受累部位而进行治疗。所述部位可以包括脑、肝、肾、前列腺和卵巢。同样，免疫缺陷病毒可通过将复合物输注到负责免疫系统的器官(例如淋巴腺和骨髓)而进行治疗。

复合物适于用对流增强给药(CED)来输注。

组合物可包含公知的药学上可接受的载体、填充剂和/或赋形剂(expedient)。

例如，滴注或输注到膀胱或其它内脏器官的组合物包括活性剂用无菌水或盐水制成的溶液剂。

本发明的活性剂将会攻击受病毒感染的细胞，使它们死亡(可能是通过细胞凋亡)，但却不损伤健康细胞。结果阻止了病毒扩散。

活性化合物的日用量可以变化，这取决于正常临床实践中的患者、待治疗病毒的性质等。通常采用每天给予 200mg/剂至 1g/剂的生物活性复合物，每周期至少 3 天，优选至少 5 天。

在本发明的另一方面，提供病毒感染的治疗方法，所述方法包括给予有需要的患者选自以下的 α -乳清蛋白生物活性复合物：HAMLET 或其生物活性修饰物或它们的生物活性片段。

具体地讲，可以将复合物直接给予受病毒感染的细胞。例如，就治疗粘膜表面的病毒感染而言，可以将复合物以治疗有效量给予所述表面。

生物活性复合物的优选实例如上所述。优选以局部组合物的形式给予生物活性复合物，也同样如上所述。