

(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
2014 年 10 月 2 日 (02.10.2014)



(10) 国际公布号
WO 2014/154134 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07K 14/165 (2006.01) *A61K 39/215* (2006.01)
C12N 15/50 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) *A61P 31/14* (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2014/074045
- (22) 国际申请日: 2014 年 3 月 25 日 (25.03.2014)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201310099025.7 2013 年 3 月 26 日 (26.03.2013) CN
- (71) 申请人: 复旦大学 (FUDAN UNIVERSITY) [CN/CN];
中国上海市杨浦区邯郸路 220 号, Shanghai 200000 (CN)。
- (72) 发明人: 姜世勃 (JIANG, Shibo); 中国上海市徐汇区
东安路 130 号 13 号楼 611, Shanghai 200032 (CN)。
陆路 (LU, Lu); 中国上海市徐汇区东安路 130 号 13
号楼 613, Shanghai 200032 (CN)。 刘奇 (LIU, Qi);
中国上海市徐汇区东安路 130 号 13 号楼 613,
Shanghai 200032 (CN)。
- (74) 代理人: 中国专利代理 (香港) 有限公司 (CHINA
PATENT AGENT (HK) LTD.); 中国香港特别行政区

湾仔港湾道 23 号鹰君中心 22 字楼, Hong Kong (CN)。

- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第 21 条(3))。
- 包括说明书序列表部分 (细则 5.2(a))。

(54) Title: POLYPEPTIDE HAVING INHIBITORY EFFECT AGAINST INFECTION BY NOVEL CORONAVIRUS HCoV-EMC 2012 AND APPLICATION OF THE POLYPEPTIDE

(54) 发明名称: 对新型冠状病毒 HCoV-EMC 2012 感染具有抑制作用的多肽及其应用

(57) Abstract: The present invention relates to the field of biopharmaceutics. Provided in the present invention is a polypeptide. The polypeptide contains a sequence as represented by SEQ ID NO 9 and has an inhibitory effect against infection by novel coronavirus HCoV-EMC 2012. Also provided in the present invention are a nucleic acid molecule for coding the polypeptide, a related recombinant protein, a nucleic acid molecule, an expression vector, and a recombinant cell. The polypeptide of the present invention can be prepared into a pharmaceutical agent with a medically often-acceptable carrier or excipient, is for use in the prevention or inhibition of infection by novel coronavirus HCoV-EMC 2012, and can be combined with other medicaments. The present invention provides a candidate polypeptide medicament for the prevention or treatment of infection by novel coronavirus HCoV-EMC 2012.

(57) 摘要: 本发明属于生物医药领域。本发明提供了一种多肽, 该多肽含有如 SEQ ID NO 9 所示的序列并且对新型冠状病毒 HCoV-EMC 2012 感染具有抑制作用。本发明还提供了编码该多肽的核酸分子、相关重组蛋白、核酸分子、表达载体和重组细胞。本发明的多肽可与医学上常可接受的载体或赋形剂等制成药剂, 用于预防和抑制新型冠状病毒 HCoV-EMC 2012 的感染, 也可以与其他药物组合。本发明为新型冠状病毒 HCoV-EMC 2012 感染的预防或治疗提供候选多肽类药物。

WO 2014/154134 A1

对新型冠状病毒 HCoV-EMC 2012 感染具有抑制作用的多肽及其应用

技术领域

本发明属于生物医药领域，涉及一组对新型冠状病毒 HCoV-EMC 2012 感染具有抑制能力的多肽，还涉及编码该多肽的核酸分子、相关重组蛋白、核酸分子、表达载体和重组细胞。

背景技术

2012 年，一种源自中东的新型冠状病毒 HCoV-EMC 2012，已经导致了多人死亡，并且死亡率高达 57%，其余患者也都患上了严重疾病。目前研究发现该新型冠状病毒 HCoV-EMC 2012 与 SARS 冠状病毒感染所用的受体不同，其受体为二肽基肽酶 4 (Dipeptidylpeptidase 4, DPP4)，一种分布广泛的人细胞受体，从而导致该病毒对人体细胞均有广泛的感染能力。另外，新型冠状病毒 HCoV-EMC 2012 能够感染多种动物，包括蝙蝠和猪，使其成为持续的感染源，这也意味着该病毒有从动物传播给人类的可能。并且，目前已发现该病毒可在家庭中进行传播，暗示了其具有了人传人的能力，加上其高死亡率、未知来源及传播途径引起了全球公共健康机构的高度关注。同时，针对新型冠状病毒 HCoV-EMC 2012 尚无有效的特异性药物，现有治疗措施仅是针对患者症状进行支持治疗。因此，急需一种针对 HCoV-EMC 的特异性治疗和预防性药物。

I 型包膜病毒，如艾滋病病毒 (HIV)、流感、SRAS 冠状病毒等，其包膜糖蛋白和相应受体介导的病毒融合和进入是该类病毒感染的第一个步骤，也是最关键的步骤之一。包膜糖蛋白与受体结合后，S2 蛋白 N 端的融合肽被暴露，使其能够插入靶细胞膜中。之后 S2 蛋白发生一系列构象改变，导致蛋白质成为其促进融合的状态 (fusogenic state)，使得病毒和靶细胞膜密切接近并促进膜融合。

进入抑制剂即是作用于病毒进入细胞阶段的药物。目前，进入抑制剂在艾滋病病毒 (HIV) 的治疗方面已起到重要的作用。例如，恩夫韦肽 (Enfuvirtide, Fuzeon, 又称 T20) 是美国 FDA 批准的国际上第一个多肽类 HIV 进入抑制剂，其目前被用于艾滋病的临床治疗，对那些已产生 HIV 逆转录酶抑制剂抗药性的病人有很好的疗效。本申请的发明人之一——姜世勃是 T20 前体药物 (多肽 637-666) 的发明人 (美国专利号：5,444,044)。

进入抑制剂多来源于病毒 S2 蛋白的 N-端序列 (NHR 或 HR1) 或 C-端重复序列 (CHR 或 HR2)。以 HIV 为例，其 gp41 的晶体学研究显示，CHR 能够与 NHR 相互作用，形成被称作“发

夹三聚体”或“六螺旋束”(6-HB)的构象,其中三个平行的 NHR 形成三聚体卷曲螺旋核心,三个 CHR 反向平行地包装成沿着内部卷曲螺旋表面的高度保守的疏水沟。源自 NHR 和 CHR 区的肽分别被称作 NHR-肽和 CHR-肽。大部分的 CHR-肽是有效的 HIV 融合抑制剂,它们主要是通过通过与病毒 gp41 内部 NHR 三聚体结合以干扰 6-HB 形成而发挥作用。

发明内容

本发明的目的是提供一组对新型冠状病毒 HCoV-EMC 2012 感染具有抑制功能的多肽片段。

本发明的另外一个目的是提供对新型冠状病毒 HCoV-EMC 2012 感染具有抑制功能的重组蛋白,该蛋白的核心区域是本申请中所涉及的具有抑制 HCoV-EMC 2012 病毒感染能力的多肽序列。

本发明经过一系列的筛选和验证确定了新型冠状病毒 HCoV-EMC 2012 S 蛋白的 S2 蛋白区域,通过同源性比较分析了 S2 蛋白的 N-端序列(HR1)和 C 端序列(HR2)。根据该序列设计了针对于新型冠状病毒 HCoV-EMC 2012 的进入抑制剂,为进一步研发新型冠状病毒 HCoV-EMC 2012 的预防和治疗药物提供重要的理论及应用基础,填补了本技术领域的空白。本发明以此为理论基础。

本发明提供了一种多肽,该多肽含有如 SEQ ID NO 9 所示的序列并且对新型冠状病毒 HCoV-EMC 2012 感染均具有抑制作用。

所述的多肽包括由如 SEQ ID NO 9 所示的多肽经过取代、缺失或添加一个或者多个氨基酸而构成并且能够抑制 HCoV-EMC 病毒感染的多肽。

在本发明的一个实施例中,所述的多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO 6、SEQ ID NO 7 或者 SEQ ID NO 8 所示。

上述多肽可以根据其氨基酸序列人工合成。

本发明还涉及了一组核酸分子,其编码本发明所述分离的肽。包括密码子优化衍生物。

本发明还涉及了一组表达载体,其包含本发明所述分离的核酸分子。

本发明还涉及了一组分离的重组细胞,其包含本发明所述的表达载体。

本发明还涉及了本发明所述的分离的肽、分离的核酸分子、表达载体或重组细胞作为药物的应用。

本发明还涉及了一组药物组合物,其包含本发明所述的多肽、核酸分子、表达载体和

/ 或重组细胞以及任选存在的药物可接受的载体或赋形剂。例如，其有效成分包含上述多肽、重组蛋白、核酸、表达载体或者重组细胞。

本发明还涉及了本发明所述的多肽、核酸分子、表达载体或重组细胞在制备用于抑制新型冠状病毒 HCoV-EMC 2012 感染药物组合物中的应用。

本发明还涉及了一种抑制或预防新型冠状病毒 HCoV-EMC 2012 感染的方法，包括给予被新型冠状病毒 HCoV-EMC 2012 感染或有被新型冠状病毒 HCoV-EMC 2012 感染风险的对象，例如体外培养的细胞等，施用本发明所述的多肽、核酸分子、表达载体、重组细胞或药物组合物。

本发明还涉及上述多肽在制备抗新型冠状病毒 HCoV-EMC 2012 感染药物中的应用。例如，将上述多肽用于预防新型冠状病毒 HCoV-EMC 2012 感染细胞。

新型冠状病毒 HCoV-EMC 2012 源自中东，至今已经导致了多人死亡，并且死亡率高达 57%。HCoV-EMC 2012 能够感染多种动物，包括蝙蝠和猪，使其成为持续的感染源，并且，目前已发现该病毒可在家庭中进行传播，暗示了其具有了人传人的能力，加上其高死亡率、未知来源及传播途径引起了全球公共健康机构的高度关注。由于新型冠状病毒 HCoV-EMC 2012 尚无有效的特异性药物，因此，急需一种针对 HCoV-EMC 的特异性治疗和预防性药物。

本发明提供了一组含有如 SEQ ID NO 9 所示序列的多肽，试验表明其对新型冠状病毒 HCoV-EMC 2012 感染具有抑制作用。与该多肽共同孵育的非洲绿猴肾细胞具有显著抗病毒活性，其 IC₅₀ 值甚至达到 nM 级。进一步试验表明，HR1-5 与 HR2-2 能相互结合，形成 hCoV-EMC 的融合六螺旋，因而推测 HR2 系列多肽能与病毒的 HR1 区域结合，从而干扰病毒与细胞膜之间的融合，阻断病毒感染。本发明的多肽可与医学上常可接受的载体或赋形剂等制成药剂，用于预防和抑制新型冠状病毒 HCoV-EMC 2012 的感染，也可以与其他药物组合。本发明为新型冠状病毒 HCoV-EMC 2012 感染的预防或治疗提供候选多肽类药物。

本发明获得了能够抑制新型冠状病毒 HCoV-EMC 2012 的感染的多肽抑制剂，为进一步研发新型冠状病毒 HCoV-EMC 2012 的预防和治疗药物提供重要的理论及应用基础，填补了国际空白。

附图说明

图 1、HCoV-EMC2012 S2 蛋白分子中的功能结构域以及多肽在该蛋白中的位置，其中，残基编号对应于其在 S 蛋白全长的位置；FP，融合肽；HR1，七肽重复序列 1；HR2，七肽重

复序列 2; TM, 跨膜结构域; CP, 胞质结构域。

图 2、显示 HR2 系列多肽对 HCoV-EMC 2012 的病毒抑制实验结果，

其中，a、b、c 分别为 HR2-1、HR2-2、HR2-3 多肽对 HCoV-EMC 2012 的病毒抑制实验结果。

图 3、显示 HR1 系列多肽对 HCoV-EMC 2012 的病毒抑制实验结果，其中，HR1-1、HR1-2、HR1-3、HR1-4 和 HR1-5 在 2-7 μM 均未显示明显的抑制活性。

图 4、显示 HR2 多肽的抗病毒作用机制。HR2 多肽与 HR1-5 结合。

图 5、显示 hCoV-EMC/2012 细胞融合模型的建立。293T/EGFP (图 A) or 293T/EMC/EGFP(图 B)与新型冠状病毒 hCoV-EMC/2012 的靶细胞 huh-7 共孵育 37°C, 4 h。293T/EGFP 不能与 huh-7 细胞发生融合，而 293T/EMC/EGFP 细胞与 huh-7 细胞将会发生融合；如果加入终浓度 10 μM 的 HR2-2，则该融合过程被抑制 (图 F)。图 B、D、F 分别为 A、C、E 在白光下的视野。

表 1、多肽序列及抑制活性。其中，IC₅₀ 即半数抑制浓度，是指抑制 50% HCoV-EMC 感染的药物浓度。

具体实施方式

本发明通过下述实施例进一步阐明，但任何实施例或其组合不应当理解为对本发明的范围或实施方式的限制。本发明的范围由所附权利要求书限定，结合本说明书和本领域一般常识，本领域普通技术人员可以清楚地明白权利要求书所限定的范围。在不偏离本发明的精神和范围的前提下，本领域技术人员可以对本发明的技术方案进行任何修改或改变，这种修改和改变也包含在本发明的范围内。

实验材料：

多肽：

发明人通过将新型冠状病毒 HCoV-EMC 2012 S 蛋白与已知 SARS 冠状病毒 S2 蛋白进行同源性比对和试验测定，确定了新型冠状病毒 HCoV-EMC 2012 S2 蛋白的 HR1 和 HR2 序列位置。选取来自 HR1 和 HR2 片段的 36-42 个氨基酸大小的多肽片段。共获的来自于 HR1 的 5 条多肽和来自于 HR2 的 3 条多肽，通过公司 (GL Biochem Shanghai Ltd) 进行合成及纯化，其纯度>99%。

实施例 1 多肽对新型冠状病毒 HCoV-EMC 2012 进入抑制实验

将多肽 HR1-1、HR1-2、HR1-3、HR1-4、HR1-5、HR2-1、HR2-2 和 HR2-3 (图 1 所示) 进行 4 倍梯度稀释; 每种样品取 100 μ l 加入预先铺有每孔 50,000 个非洲绿猴肾细胞 (Vero 细胞) 的 96 孔细胞培养板, 37°C 孵育 2 小时, 之后去除上清, 用 PBS 洗细胞 2 次, 加入 100 μ l 新型冠状病毒 HCoV-EMC 2012 (10TCID₅₀), 37°C 孵育 1 小时; 之后再将细胞用 PBS 洗 2 次。之后再将 100 μ l 样品/孔加入 96 孔板与细胞进一步作用。之后细胞在 37°C 培养 3 天。记录细胞病变效应 (CPE), 之后每孔加入 10 μ l MTT。37°C 孵育 4 小时; 每孔再加入 100 μ l 含有 1%SDS 的 0.01M HCl, 37°C 孵育过夜后于波长 570nm 测量吸光度。

抗病毒结果如图 2 所示, C-端 (HR2) 多肽中 HR2-1、HR2-2 和 HR2-3 均显示出了抗病毒活性, 其 IC₅₀ 分别为 1.82 μ M、0.62 μ M 和 0.43 μ M, 其中 HR2-1 的活性相对较弱, 而 HR2-2 和 HR2-3 的活性均在 nM 级。但 N-端 (HR1) 多肽, 如 HR1-1、HR1-2、HR1-3、HR1-4 和 HR1-5 在 2-7 μ M 均未显示明显的抑制活性 (图 3)。

表 1 是多肽序列及抑制 HCoV-EMC 感染的活性。

表 1

多肽 名称	序列	IC ₅₀ (μ M)
HR1-1	GITQQVLSENQKLIANKFNQALGAMQTGFTTTNEAFQK (SEQ ID NO 1)	>6.25
HR1-2	AMQTGFTTTNEAFQKVQDAVNNNAQALSKLASELSNTF (SEQ ID NO 2)	>6.25
HR1-3	AFQKVQDAVNNNAQALSKLASELSNTFGAISASIGDII (SEQ ID NO 3)	>6.25
HR1-4	SELSNTFGAISASIGDIIQRLDVLEQDAQIDRLINGRL (SEQ ID NO 4)	>6.25
HR1-5	ANKFNQALGAMQTGFTTTNEAFQKVQDAVNNNAQALSKLASE (SEQ ID NO 5)	>6.25
HR2-1	IPNFGSLTQINTTLLDLTYEMLSLQVVKALNESY (SEQ ID NO 6)	1.82
HR2-2	SLTQINTTLLDLTYEMLSLQVVKALNESYIDLKEL (SEQ ID NO 7)	0.62

HR2-3	LDLTYEMLSLQQVVKALNESYIDLKELGNYTYYNKW	0.43
-------	--------------------------------------	------

(SEQ ID NO 8)

实施例2 HR1-5 与 HR2-2 互作

本实验参照文献《Interaction between heptad repeat 1 and 2 regions in spike protein of SARS-associated coronavirus: implications for virus fusogenic mechanism and identification of fusion inhibitors.》(Liu, S.W. et al. Lancet 363, 938-947, 2004) 操作。

1、非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (N-PAGE)。将 HR1 系列多肽分别于 HR2 系列多肽混合 (终浓度各 30 μ M), 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。取 5 $\times$ 高 PH 值上样缓冲液, 与 4 倍体积的肽混合物混匀。然后点样 (每孔 25 μ l) 于 18% 非变性胶中 (北京天恩泽), 于室温下 125V 恒压电泳 2 小时。考马斯亮蓝染色。结果显示, HR1-5 在与 HR2 系列多肽混合以后, 均产生了一条新的多肽 (图 4A)。该条带即为 EMC 病毒融合活性六螺旋 (6-HB) 条带。

2、高效液相色谱检测分子量: 利用 GE 公司 superdex 75 10/300GL 柱进行分子筛 HPLC (SE-PAGE), 检测寡聚体的形成。以 HR1 的多肽 HR1-5 和 HR2 的多肽 HR2-2 为代表, 将其混合 (终浓度是 50 μ mol/L), 37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟, 100 μ L 样品注入与 HPLC 系统连接的色谱柱中。用 pH 7.2 的磷酸盐缓冲液作为流动相, 流速为 0.8 mL/min。GE 公司蛋白纯化系统记录 220 nm 的紫外吸光值。同时使用 HIV 多肽 N36, C34 以及其六螺旋产物作为本实验的分子量参照。

结果可见 (如图 4B 所示), HR1-5 和 HR2-2 混合之后, 发生了相互作用, 在单体主峰之前形成新的检测峰, 根据其位置可见, 其分子量略大于 HIV N36/C34 形成的六螺旋。符合 HR1-5/HR2-2 所形成的六螺旋大小 (25.8kD)。

3、圆二色谱测定多肽二级结构。用 50mmol/L、pH 7.2 的磷酸缓冲液将游离多肽或多肽混合物稀释到终浓度为 10 μ mol/L。使用分光偏振仪(J-815 型, JascoInc, Japan)测定圆二色谱。检测温度 4 $^{\circ}$ C, 带宽 5.0 nm, 解析度 0.1 nm, 光径 0.1 cm, 反应时间 4.0 s, 扫描速度 50 nm/min。在 222 nm 以 5 $^{\circ}$ C/min 的温度梯度变化监测多肽的热变性。减去缓冲溶液的空白对照来校正谱值。对熔解曲线进行平滑化处理, 并用 Jasco 计算热解离转变的中点温度, 即 T_m 值

结果显示, 以 HR1-5、HR2-2 为例可见(如图 4C 所示), 单独的 HR1-5 为无规则卷曲结构, 单独的 HR2-2 为低螺旋结构。当两者混合以后, 可见其混合物为高度的螺旋结构。结果符合六螺旋核心结构的 CD 光谱。而其 T_m 值约为 90 $^{\circ}$ C(如图 4D 所示)。

综上所述, HR1-5 与 HR2-2 能相互结合, 形成 hCoV-EMC 的融合六螺旋; 而 HR2 系列多肽则能与 HR1-5 相结合, 因而推测 HR2 系列多肽能与病毒的 HR1 区域结合, 从而干扰病毒与细胞膜之间的融合, 阻断病毒感染。

实施例 3: 对 HR2-2 多肽的改造

多肽:

发明人发现新型冠状病毒 HCoV-EMC/2012 S2 蛋白的多肽片段 HR2-2 具有较好的生物活性。然而尚不能完全满足生物医药领域的要求。因此, 发明人基于已有 HR2-2 多肽的氨基酸序列进行改造, 根据文献(Otaka, A *et al* Remodeling of gp41-C34 peptide leads to highly effective inhibitors of the fusion of HIV-1 with target cells *Angew Chem Int Ed Engl* **41**, 2937-2940 (2002)) 描述的方法, 在 HR2-2 多肽的内部引入谷氨酸(E)、赖氨酸(K)、精氨酸(R), 以增加 HR2-2 多肽内部的盐桥, 从而达到增加多肽溶解度、稳定性, 以及抗病毒活性的目的。序列见表 2, 其中氨基酸之间的连线代表两者之间形成的盐桥。多肽序列确定以后, 进行合成及纯化, 测定其纯度>99%。

实验方法及结果:

1 HR2-2 及突变体溶解度的检测:

将多肽加入 PBS (pH7.2) 以及 H₂O 中至过饱和。12000rpm 离心 10 分钟, 取上清, 使用 nanodrop 仪测定吸光度 A280。在 ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>) 网站

获取多肽相应的消光系数，将 A280 与消光系数代入公式 $C(\mu\text{M})=(A280/\text{消光系数})\times 10^6$ 中，计算多肽的摩尔数，即为该多肽的溶解度。

2 圆二色谱测定多肽二级结构。

具体方法见实施例 1。检测新合成的突变体多肽在 222nm 的 CD 值，依照 100% α -螺旋的 CD 值为 -33×10^3 ，计算相应多肽的 α -螺旋比例。同时检测多肽与 HR1-5 作用后，其复合物的 α -螺旋比例，以及 Tm 值。

3 细胞融合模型的构建，以及多肽抑制活性的检测。

发明人构建一种能够同时表达 hCoV-EMC/2012 S protein 以及 GFP 的表达质粒 (pAAV-EGFP-IRES-EMC-S)，转染 293T 细胞(293T/EMC/EGFP)。同时仅转染 pAAV-EGFP-IRES 的质粒作为阴性对照 (293T/EGFP)。由于在两端蛋白中间具有 IRES 序列，因此，293T/EMC/EGFP 将实现两个蛋白的的同时的、分别的表达，而不会相互干扰。其中 S 蛋白将递呈到细胞表面，介导转染的 293T(293T/EMC/EGFP)与靶细胞 Huh-7 的融合，GFP 可以用于观察转染效率。同时，由于融合后 GFP 将重新分布到靶细胞中，因此，融合细胞的荧光范围会更大、荧光更强（见图 5-C 中箭头指示细胞）。因此，可以将融合细胞与未融合的细胞进行区别并计算融合细胞的比率。体系中如果加入有效的多肽抑制剂如 HR2-2，即可阻止该融合过程（图 5-E）。

实验过程中，将受试多肽在 96 孔板中进行梯度稀释，与 1×10^4 个已经被转染 pAAV-hGFP-IRES-EMC-S 的 293T 细胞(293T/EMC/EGFP)进行混合，之后再与提前 5-9 小时铺在的 96 孔板的每孔 $5-10\times 10^4$ 靶细胞 huh-7 上，在 37℃ 下孵育 4 小时，观察多肽对细胞融合的抑制情况。计算多肽对细胞融合抑制的半数有效量 (IC50)。

结果：

结果如表 2。可见，在 HR2-2 多肽中引入 EK 突变后，进一步稳定了多肽自身的天然结构。同时，突变后的多肽与 HR1-5 形成的复合物的 α -螺旋度得以增加、Tm 上升。可见突变多肽与 HR1-5 所形成复合物的稳定性也得以提高。溶解度的结果也显示，突变后的多肽增加了在 PBS 以及 H₂O 中的溶解度，同时，从表 2 可看出突变后的多肽的 IC50 值减少，表明所述多肽提高了药效。

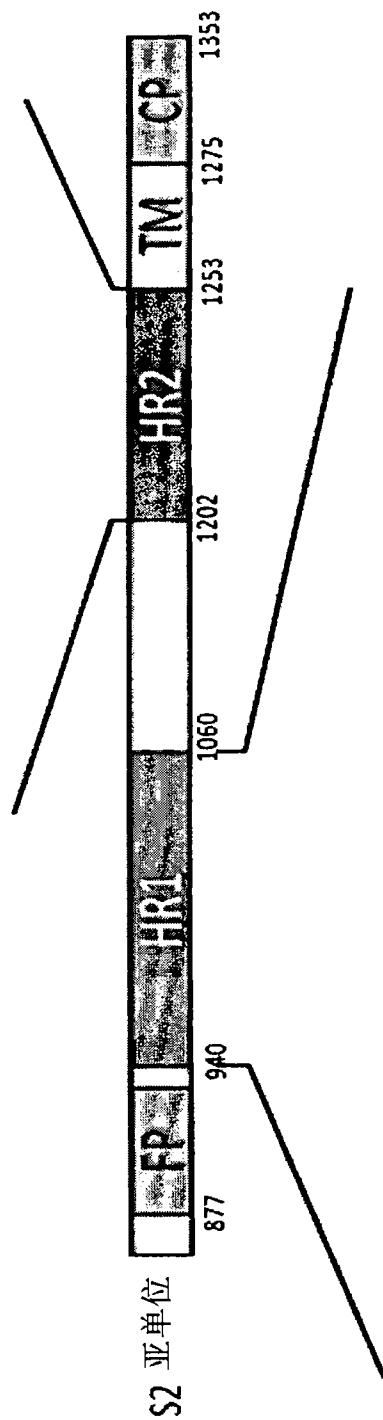
表 2、HR2-2 突变体的生物物理学特征及生物活性

多肽名	序列	α-螺旋		HR1-5/HR2-2 复合物		溶解度 (mg/ml)		IC ₅₀ (μM)
		比例	α-螺旋	T _m	PBS (pH 7.2)	H ₂ O		
HR2-2	SLTQINTTLLDLTYEMLSLQQVVKALNESYIDLKEL []	18.2%	71.8%	87.2	0.38±0.07	0.06±0.01	0.93±0.15	
HR2-2-M1	SLTQINTTLLDLEYEMRSLQQVVKALNESYIDLKEL [] (SEQ ID NO 10)	36.4%	74.0%	87.9	4.42±0.08	4.16±0.15	0.85±0.08	
HR2-2-M2	SLTQINTTLLDLEYEMKKLEEVVKKLEESYIDLKEL [] (SEQ ID NO 11)	42.4%	77.6%	91.5	3.71±0.22	107.21±5.57	0.55±0.04	

注：通过在 HR2-2 多肽序列中引入谷氨酸(E)、赖氨酸(K)、精氨酸(R)突变，以增加 HR2-2 多肽内部的盐桥，从而达到增加溶解度、多肽稳定性，以及抗病毒活性的目的。序列中突变的氨基酸加黑并用斜体标注。连线代表相应氨基酸位置的 E-K, E-R, K-E 形成的盐桥。IC50 是用指多肽抑制新型冠状病毒 S 蛋白介导的细胞融合的一半有效量。

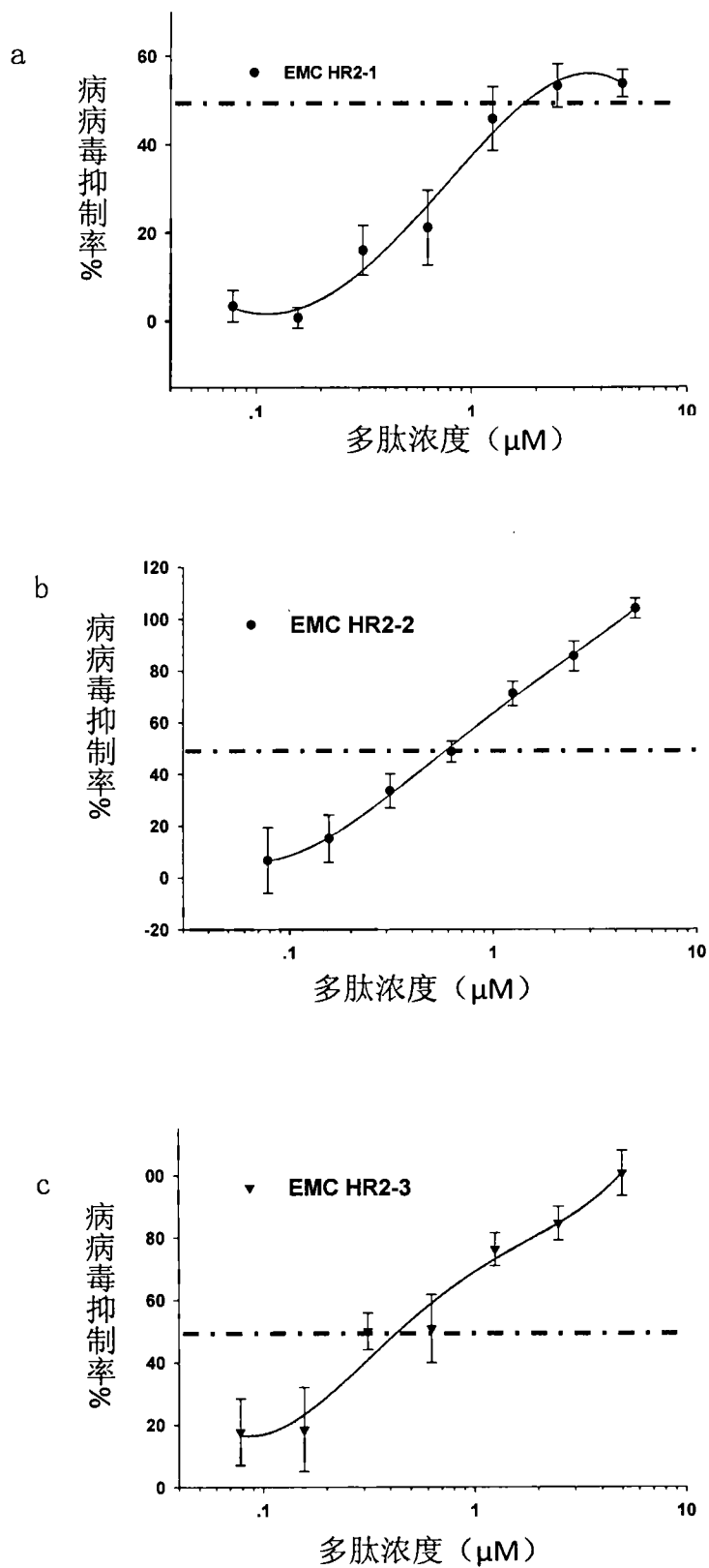
1. 一种对新型冠状病毒 HCoV-EMC 2012 感染均具有抑制作用的多肽，其特征在于，该多肽含有如 SEQ ID NO 9 所示的序列。
2. 如权利要求 1 所述的多肽，其特征在于，所述的多肽能够抑制 HCoV-EMC 病毒感染并且该多肽的氨基酸序列由如 SEQ ID NO 9 所示的多肽经过取代、缺失或添加一个或者多个氨基酸而构成。
3. 如权利要求 2 所述的多肽，其特征在于，所述的多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO 6、SEQ ID NO 7 或者 SEQ ID NO 8 所示。
4. 含有权利要求 1 所述的多肽的重组蛋白。
5. 一种核酸，其特征在于，所述的核酸编码权利要求 1 所述的多肽。
6. 一种表达载体，其特征在于，所述的表达载体包含权利要求 5 所述的核酸。
7. 一种重组细胞，其特征在于，所述的重组细胞含有权利要求 6 所述的表达载体。
8. 一种药物组合物，其特征在于，其有效成分包含权利要求 1 所述的多肽、权利要求 4 所述的重组蛋白、权利要求 5 所述的核酸、权利要求 6 所述的表达载体或者权利要求 7 所述的重组细胞。
9. 权利要求 1 所述的多肽在制备抗新型冠状病毒 HCoV-EMC 2012 感染药物中的应用。
10. 如权利要求 9 所述的应用，其特征在于，将权利要求 1 所述的多肽加入可能受到新型冠状病毒 HCoV-EMC 2012 感染的体外培养物。

HR2-3	LDLYEMLSLQQVVKALNESYIDLKELGNYYTYNKKW
HR2-2	SLTQINTLLDLYEMLSLQQVVKALNESYIDLKEL
HR2-1	IPNFGSLTQINTLLDLYEMLSLQQVVKALNESY
HR2	IPNFGSLTQINTLLDLYEMLSLQQVVKALNESYIDLKELGNYYTYNKKW



HR1	HR1-1	HR1-2	HR1-3	HR1-4	HR1-5
GITQQVLSENQKLIANKFNQALGAMQTGFTTTNEAFQKVQDAVNINNAQALSKLASELSNTTFGAISASIGDIIQRDLVLEQDAQIDRLINGRL TTLNAFVAQQLVRSESAALSAQLAKDKVN	GITQQVLSENQKLIANKFNQALGAMQTGFTTTNEAFQK AMQTGFTTTTNEAFQKVQDAVNINNAQALSKLASELSNTF AFQKVQDAVNINNAQALSKLASELSNTTFGAISASIGDII	SELSNTTFGAISASIGDIIQRDLVLEQDAQIDRLINGRL	ANKFNQALGAMQTGFTTTNEAFQKVQDAVNINNAQALSKLASE		

一
四



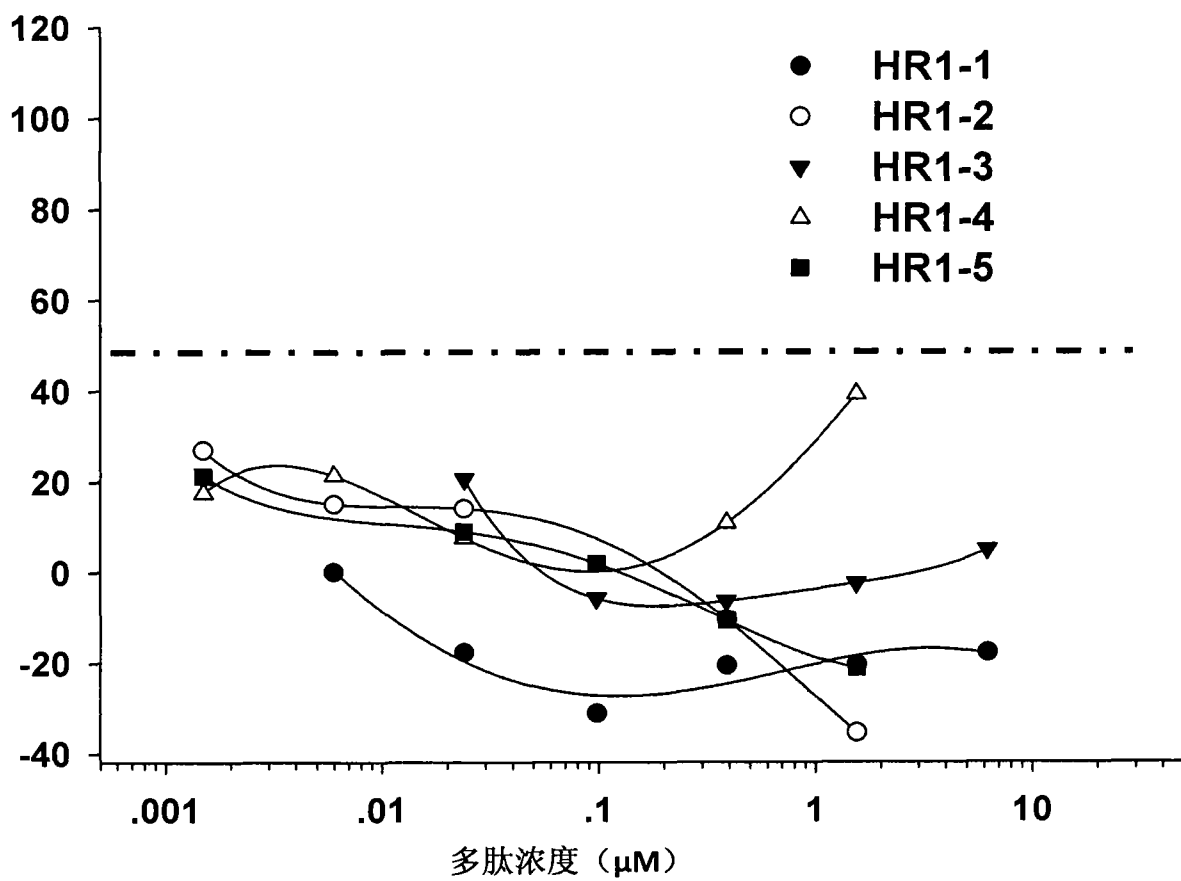


图 3

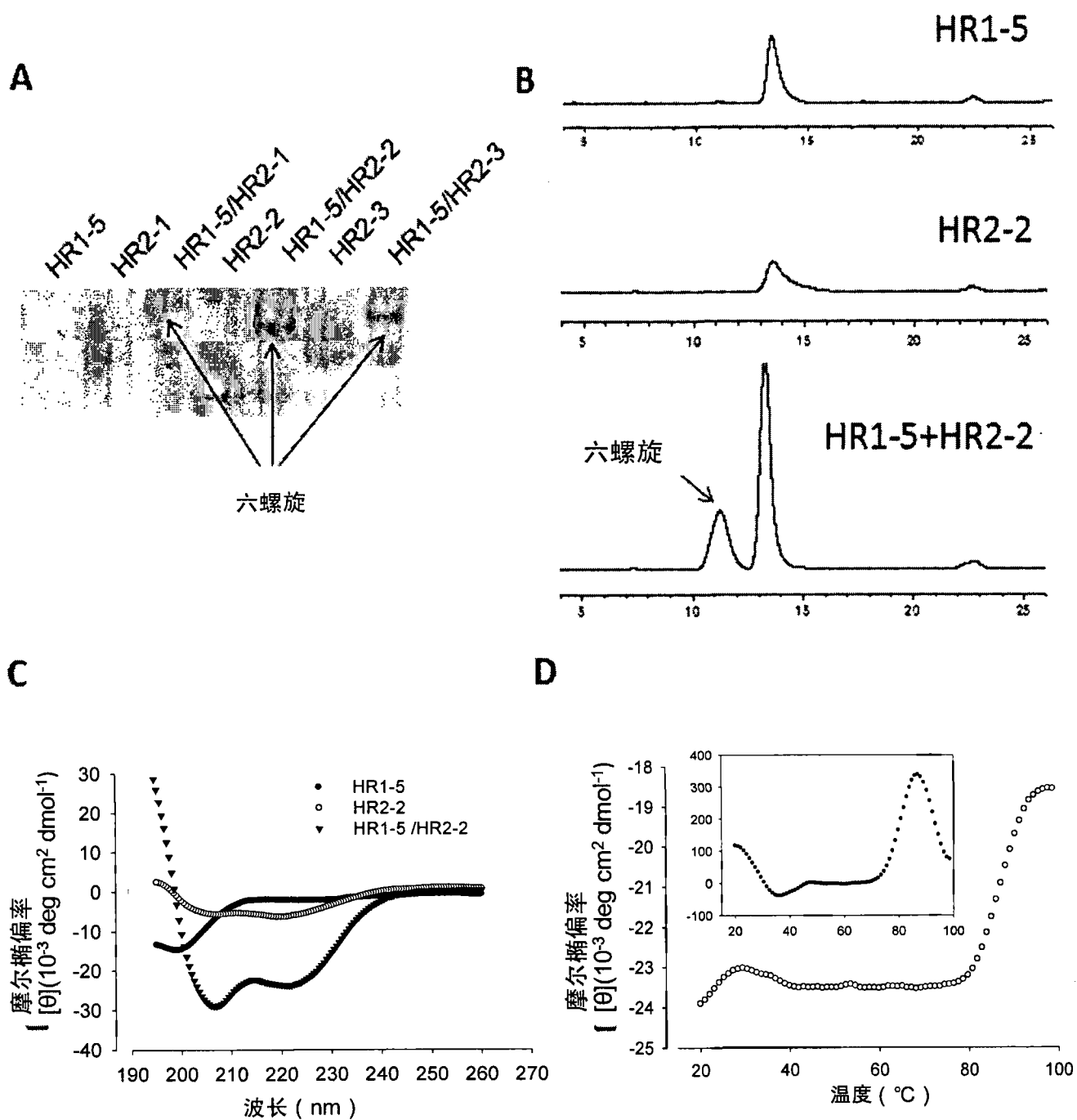


图 4

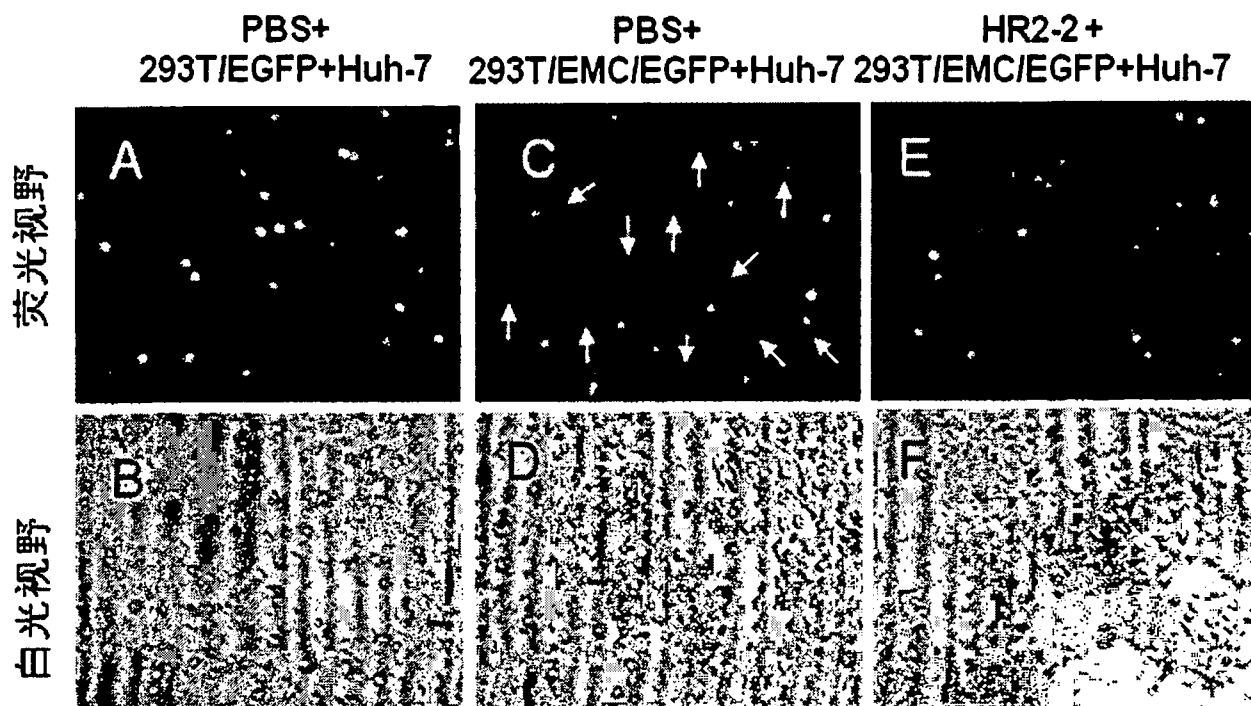


图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2014/074045

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/165 (2006.01) i; C12N 15/50 (2006.01) i; C12N 15/63 (2006.01) i; C12N 5/10 (2006.01) i; A61K 39/215 (2006.01) i; A61K 48/00 (2006.01) i; A61P 31/14 (2006.01) i

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)

C07K; C12N; A61K; C12N; A61P

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

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

CPRSABS; CNABS; CNKI; CNTXT and keywords: JIANG, Shibo; coronavirus, HCoV-EMC, suppression, S protein, etc.
VEN; MEDLINE; EPTXT; USTXT; WOTXT; JPTXT and keywords: Jiang shibo, +coronaviru+, HCoV-EMC, S protein?, suppress+, etc.

National Bio-sequence Database of Chinese Patent; Genbank; EMBL; STN and sequences searched: SEQ ID NOs: 7-9, etc.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VAN, B.S. et al., "Genomic Characterization of a Newly Discovered Coronavirus Associated with Acute Respiratory Distress Syndrome in Humans" MBIO, no. 6, vol. 3, 20 November 2012 (20.11.2012), see the whole document, particularly abstract, and page 2, left column, paragraph 2 to page 6, left column, paragraph 2	1, 2, 4-10
PX	LU, L. et al., "Structure-based Discovery of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Fusion Inhibitor" NATURE COMMUNICATIONS, 28 January 2014 (28.01.2014), see the whole document, particularly abstract, and page 2, left column, paragraph 5 to page 8, left column, paragraph 2	1-10
PX	GAO, J. et al., "Structure of the Fusion Core and Inhibition of Fusion by a Heptad Repeat Peptide Derived from the S Protein of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus" JOURNAL OF VIROLOGY, no. 24, vol. 87, 31 December 2013 (31.12.2013), see the whole document, particularly abstract, and page 13135, left column, paragraph 4 to page 13139, right column, paragraph 2	1-10
A	WO 2011004146 A1 (ANIMAL HEALTH INST et al.), 13 January 2011 (13.01.2011), the whole document	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 12 June 2014 (12.06.2014)	Date of mailing of the international search report 30 June 2014 (30.06.2014)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer WANG, Jinfeng Telephone No.: (86-10) 62412282

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2014/074045

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 1784422 A (CORONOVATIVE B.V.), 07 June 2006 (07.06.2006), the whole document	1-10
A	CN 101076591 A (THE UNIVERSITY OF HONG KONG), 21 November 2007 (21.11.2007), the whole document	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2014/074045

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2011004146 A1	13.01.2011	CN 102574897 A	11.07.2012
		EP 2451827 A1	16.05.2012
		US 2012177675 A1	12.07.2012
		GB 0911794 D0	19.08.2009
CN 1784422 A	07.06.2006	None	
CN 101076591 A	21.11.2007	US 2009305282 A1	10.12.2009
		US 2006018923 A1	26.01.2006
		US 7553944 B2	30.06.2009
		US 8092994 B2	10.01.2012

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2014/074045

A. 主题的分类

C07K 14/165(2006.01)i; C12N 15/50(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; A61K 39/215(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61P 31/14(2006.01)i

按照国际专利分类(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(标明分类系统和分类号)

C07K; C12N; A61K; C12N; A61P

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, 和使用的检索词(如使用))

CPRSABS; CNABS; CNKI; CNTXT和关键词: 姜世勃, 冠状病毒, HCoV-EMC, 抑制, S蛋白, 等; VEN; MEDLINE; EPTXT; USTXT; WOTXT; JPTXT和关键词: Jiang shibo, +coronaviru+, HCoV-EMC, S protein?, suppress+等; 中国专利生物序列检索系统; Genbank; EMBL; STN和检索的序列: SEQ ID NOs:7-9等。

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	VAN BOHEEMEN S等. "Genomic characterization of a newly discovered coronavirus associated with acute respiratory distress syndrome in humans" MBio, 第6期卷, 第3卷期, 2012年 11月 20日 (2012 - 11 - 20), 见全文, 特别是摘要及第2页左栏第2段至第6页左栏第2段	1、2、4-10
PX	LU L等. "Structure-based discovery of Middle East respiratory syndrome coronavirus fusion inhibitor" NATURE COMMUNICATIONS, 2014年 1月 28日 (2014 - 01 - 28), 见全文, 特别是摘要及第2页左栏第5段至第8页左栏第2段	1-10
PX	GAO J等. "Structure of the Fusion Core and Inhibition of Fusion by a Heptad Repeat Peptide Derived from the S Protein of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus" Journal of Virology, 第24期卷, 第87卷期, 2013年 12月 31日 (2013 - 12 - 31), 见全文, 特别是摘要及第13135页左栏第4段至第13139页右栏第2段	1-10
A	WO 2011004146A1 (ANIMAL HEALTH INST等) 2011年 1月 13日 (2011 - 01 - 13) 全文	1-10

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2014年 6月 12日

国际检索报告邮寄日期

2014年 6月 30日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
北京市海淀区蓟门桥西土城路6号
100088 中国

传真号 (86-10)62019451

授权官员

王金凤

电话号码 (86-10)62412282

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 1784422A (科罗诺瓦蒂夫股份有限公司) 2006年 6月 07日 (2006 - 06 - 07) 全文	1-10
A	CN 101076591A (香港大学) 2007年 11月 21日 (2007 - 11 - 21) 全文	1-10

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2014/074045

检索报告引用的专利文件		公布日 (年/月/日)	同族专利		公布日 (年/月/日)
WO	2011004146A1	2011年 1月 13日	CN	102574897A	2012年 7月 11日
			EP	2451827A1	2012年 5月 16日
			US	2012177675A1	2012年 7月 12日
			GB	0911794D0	2009年 8月 19日
CN	1784422A	2006年 6月 07日	无		
CN	101076591A	2007年 11月 21日	US	2009305282A1	2009年 12月 10日
			US	2006018923A1	2006年 1月 26日
			US	7553944B2	2009年 6月 30日
			US	8092994B2	2012年 1月 10日

表 PCT/ISA/210（同族专利附件）（2009年7月）