

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

A61K 38/06

C12Q 1/70 C07K 5/08

A61P 31/00 G01N 33/50

G01N 33/569

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00813616.5

[43]公开日 2002年10月30日

[11]公开号 CN 1377275A

[22]申请日 2000.6.29 [21]申请号 00813616.5

[30]优先权

[32]1999.8.9 [33]US [31]09/370,368

[86]国际申请 PCT/IB00/00961 2000.6.29

[87]国际公布 WO01/10456 英 2001.2.15

[85]进入国家阶段日期 2002.3.29

[71]申请人 特里帕普股份公司

地址 瑞典胡丁厄

[72]发明人 A·瓦赫尼

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所

代理人 唐伟杰

权利要求书5页 说明书54页 附图页数10页

[54]发明名称 抑制病毒感染的肽及其使用方法

[57]摘要

本发明公开了酰胺形式的肽抑制病毒感染,包括人类免疫缺陷病毒(HIV)感染的发现。还公开了肽的使用方法,包括在治疗和预防病毒感染,例如 HIV 感染的药物中的应用。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权利要求书

1. 在病毒感染的宿主细胞中抑制病毒复制的组合物，包含有效量的具有式 $X_1X_2X_3-NH_2$ 的酰胺形式的肽，其中 X_1 , X_2 , 和 X_3 是任意氨基酸且所述的肽不是 Gly-Pro-Gly-NH₂，而且其中所述的组合物通过阻碍病毒衣壳装配抑制病毒复制。

2. 权利要求 1 的组合物，其中肽选自具有式 Gly-Lys-Gly-NH₂, Arg-Gln-Gly-NH₂, Cys-Gln-Gly-NH₂, Lys-Gln-Gly-NH₂, Ala-Leu-Gly-NH₂, Gly-Val-Gly-NH₂, Val-Gly-Gly-NH₂, Ala-Ser-Gly-NH₂, Ser-Leu-Gly-NH₂ 和 Ser-Pro-Thr-NH₂ 的肽。

3. 权利要求 1 的组合物，其中 X_3 是甘氨酸。

4. 权利要求 1 的组合物，其中酰胺形式的肽具有式 $X_4X_5 X_1X_2X_3-NH_2$ ，其中 X_4 和 X_5 是任意氨基酸且其中任意 1 个或 2 个氨基酸不存在。

5. 权利要求 1 的组合物，其中三肽 $X_1X_2X_3$ 在病毒衣壳蛋白的氨基酸序列中存在。

6. 权利要求 1 的组合物，其中肽与支持物连接。

7. 权利要求 1 的组合物，其中肽掺入含有药用上可接受的载体的药剂中。

8. 具有式 Gly-Lys-Gly-NH₂ 的酰胺形式的肽。

9. 与支持物连接的权利要求 8 的肽。

10. 具有式 Arg-Gln-Gly-NH₂ 的酰胺形式的肽。

11. 与支持物连接的权利要求 10 的肽。

12. 具有式 Cys-Gln-Gly-NH₂ 的酰胺形式的肽。

13. 与支持物连接的权利要求 12 的肽。

14. 具有式 Lys-Gln-Gly-NH₂ 的酰胺形式的肽。

15. 与支持物连接的权利要求 14 的肽。

16. 具有式 Ala-Leu-Gly-NH₂ 的酰胺形式的肽。

17. 与支持物连接的权利要求 16 的肽。

18. 具有式 Ser-Leu-Gly-NH₂ 的酰胺形式的肽。

19. 与支持物连接的权利要求 18 的肽。

20. 在宿主细胞中抑制 HIV 复制的方法，包括：

给所述细胞施用有效量的具有式 $X_1X_2X_3-NH_2$ 的酰胺形式的肽，其中 X_1 , X_2 , 和 X_3 是任意氨基酸且所述的肽不是 Gly-Pro-Gly- NH_2 。

21. 权利要求 20 的方法，其中肽选自具有式 Gly-Lys-Gly- NH_2 , Arg-Gln-Gly- NH_2 , Cys-Gln-Gly- NH_2 , Lys-Gln-Gly- NH_2 , Ala-Leu-Gly- NH_2 , Gly-Val-Gly- NH_2 , Val-Gly-Gly- NH_2 , Ala-Ser-Gly- NH_2 , Ser-Leu-Gly- NH_2 和 Ser-Pro-Thr- NH_2 的肽。

22. 权利要求 20 的方法，进一步包括进行选自核苷类似物逆转录酶抑制剂，核苷酸类似物逆转录酶抑制剂，非核苷逆转录酶抑制剂和蛋白酶抑制剂的抗病毒治疗的给药步骤。

23. 权利要求 20 的方法，其中肽与支持物相连。

24. 权利要求 20 的方法，其中肽在含有药用上可接受的载体的药剂中给药。

25. 抑制宿主细胞中 HIV 复制的组合物，包含有效量的具有式 $X_1X_2X_3-NH_2$ 的酰胺形式的肽，其中 X_1 , X_2 , 和 X_3 是任意氨基酸且所述的肽不是 Gly-Pro-Gly- NH_2 ，并且其中所述的组合物通过阻碍衣壳装配抑制 HIV 复制。

26. 权利要求 25 的组合物，其中肽选自具有式 Gly-Lys-Gly- NH_2 , Arg-Gln-Gly- NH_2 , Cys-Gln-Gly- NH_2 , Lys-Gln-Gly- NH_2 , Ala-Leu-Gly- NH_2 , Gly-Val-Gly- NH_2 , Val-Gly-Gly- NH_2 , Ala-Ser-Gly- NH_2 , Ser-Leu-Gly- NH_2 和 Ser-Pro-Thr- NH_2 的肽。

27. 权利要求 25 的组合物，其中 X_3 是甘氨酸。

28. 权利要求 25 的组合物，其中所述的酰胺形式的肽具有式 $X_4X_5X_1X_2X_3-NH_2$ ，其中 X_4 和 X_5 是氨基酸且其中任意 1 个或 2 个氨基酸不存在。

29. 权利要求 25 的组合物，其中三肽 $X_1X_2X_3$ 在 HIV 衣壳蛋白的氨基酸序列中存在。

30. 权利要求 25 的组合物，其中肽与支持物连接。

31. 权利要求 25 的组合物，其中肽掺入含有药用上可接受的载体的

药剂中。

32. 在宿主细胞中抑制病毒复制的方法，包括：

给所述细胞施用有效量的具有式 $X_1X_2X_3-NH_2$ 的酰胺形式的肽，其中 X_1 , X_2 , 和 X_3 是任意氨基酸且所述的肽不是 Gly-Pro-Gly- NH_2 。

33. 权利要求 32 的方法，其中肽选自具有式 Gly-Lys-Gly- NH_2 , Arg-Gln-Gly- NH_2 , Cys-Gln-Gly- NH_2 , Lys-Gln-Gly- NH_2 , Ala-Leu-Gly- NH_2 , Gly-Val-Gly- NH_2 , Val-Gly-Gly- NH_2 , Ala-Ser-Gly- NH_2 , Ser-Leu-Gly- NH_2 和 Ser-Pro-Thr- NH_2 的肽。

34. 权利要求 32 的方法，进一步包括进行选自核苷类似物逆转录酶抑制剂，核苷酸类似物逆转录酶抑制剂，非核苷逆转录酶抑制剂和蛋白酶抑制剂的抗病毒治疗的给药步骤。

35. 权利要求 32 的方法，其中肽与支持物相连。

36. 权利要求 32 的方法，其中肽在含有药用上可接受的载体的药剂中给药。

37. 阻碍病毒衣壳装配的方法，包括：

将细胞与有效量的具有式 $X_1X_2X_3-NH_2$ 的酰胺形式的肽接触，其中 X_1 , X_2 , 和 X_3 是任意氨基酸且所述的肽不是 Gly-Pro-Gly- NH_2 。

38. 权利要求 37 的方法，其中肽选自具有式 Gly-Lys-Gly- NH_2 , Arg-Gln-Gly- NH_2 , Cys-Gln-Gly- NH_2 , Lys-Gln-Gly- NH_2 , Ala-Leu-Gly- NH_2 , Gly-Val-Gly- NH_2 , Val-Gly-Gly- NH_2 , Ala-Ser-Gly- NH_2 , Ser-Leu-Gly- NH_2 和 Ser-Pro-Thr- NH_2 的肽。

39. 权利要求 37 的方法，其中 X_3 是甘氨酸。

40. 权利要求 37 的方法，其中所述的酰胺形式的肽具有式 $X_4X_5X_1X_2X_3-NH_2$ ，其中 X_4 和 X_5 是氨基酸且其中任意 1 个或 2 个氨基酸不存在。

41 权利要求 37 的方法，其中三肽 $X_1X_2X_3$ 在病毒蛋白质的氨基酸序列中存在。

42. 权利要求 37 的方法，其中肽与支持物连接。

43. 鉴定用于掺入抗病毒药剂中的肽试剂的方法，包括：

将多个感染病毒的细胞与有效量的肽试剂接触，其中所述的肽不是

Gly-Pro-Gly-NH₂;

分析病毒的不完整衣壳形成; 和
选择诱导不完整衣壳形成的肽试剂。

44. 权利要求 43 的方法, 其中衣壳形成的分析采用显微镜检术。

45. 权利要求 43 的方法, 其中病毒选自 HIV-1, HIV-2, 和 SIV。

46. 权利要求 43 的方法, 其中肽试剂选自三肽, 寡肽和肽模拟物。

47. 权利要求 43 的方法, 其中肽试剂选自具有式 Gly-Lys-Gly-NH₂,
Arg-Gln-Gly-NH₂ , Cys-Gln-Gly-NH₂ , Lys-Gln-Gly-NH₂ ,
Ala-Leu-Gly-NH₂ , Gly-Val-Gly-NH₂ , Val-Gly-Gly-NH₂ ,
Ala-Ser-Gly-NH₂, Ser-Leu-Gly-NH₂ 和 Ser-Pro-Thr-NH₂ 的肽。

48. 权利要求 43 的方法, 其中肽试剂含有相应于 p24 的氨基酸序列
的氨基酸序列。

49. 鉴定与病毒蛋白结合的肽试剂的方法, 包括:

提供病毒蛋白;

将该病毒蛋白与有效量的肽试剂接触, 其中所述的肽试剂不是
Gly-Pro-Gly-NH₂; 和

检测含有病毒蛋白和肽试剂的复合物的形成。

50. 权利要求 49 的方法, 其中病毒蛋白来自选自 HIV-1, HIV-2, 和
SIV 的病毒。

51. 权利要求 50 的方法, 其中肽试剂选自三肽, 寡肽和肽模拟物。

52. 权利要求 50 的方法, 其中肽试剂选自具有式 Gly-Lys-Gly-NH₂,
Arg-Gln-Gly-NH₂ , Cys-Gln-Gly-NH₂ , Lys-Gln-Gly-NH₂ ,
Ala-Leu-Gly-NH₂ , Gly-Val-Gly-NH₂ , Val-Gly-Gly-NH₂ ,
Ala-Ser-Gly-NH₂, Ser-Leu-Gly-NH₂ 和 Ser-Pro-Thr-NH₂ 的肽。

53. 制备药剂的方法, 其包括在药剂中掺入权利要求 49 中鉴定的肽
试剂。

54. 制备药剂的方法, 包括:

给细胞施用有效量的具有式 X₁X₂X₃-NH₂ 的酰胺形式的肽, 其中 X₁, X₂,
和 X₃ 是任意氨基酸且所述的肽不是 Gly-Pro-Gly-NH₂;

检测细胞中病毒复制的抑制；和
将引起病毒复制抑制的肽掺入药剂中。

55. 权利要求 54 的方法，其中肽选自具有式 Gly-Lys-Gly-NH₂，
Arg-Gln-Gly-NH₂， Cys-Gln-Gly-NH₂， Lys-Gln-Gly-NH₂，
Ala-Leu-Gly-NH₂， Gly-Val-Gly-NH₂， Val-Gly-Gly-NH₂，
Ala-Ser-Gly-NH₂， Ser-Leu-Gly-NH₂ 和 Ser-Pro-Thr-NH₂ 的肽。

56. 权利要求 54 的方法，进一步包括将选自核苷类似物逆转录酶抑制剂，核苷酸类似物逆转录酶抑制剂，非核苷逆转录酶抑制剂和蛋白酶抑制剂的抗病毒化合物掺入药剂中的步骤。

57. 权利要求 54 的方法，进一步包括将载体掺入药剂中的步骤。

58. 在病毒感染的宿主细胞中抑制病毒复制的组合物，包含有效量的具有式 X₁X₂X₃-R 的肽，其中 X₁，X₂，和 X₃ 是任意氨基酸且所述的肽不是 Gly-Pro-Gly-NH₂，其中 R 是附着到所述肽羧基末端上的调节基团且 R 包含酰胺基团或具有相似电荷和空间形状的其他部分，其中所述的组合物通过阻碍病毒衣壳装配来抑制病毒复制。

59. 权利要求 58 的组合物，其中肽选自具有式 Gly-Lys-Gly-NH₂，
Arg-Gln-Gly-NH₂， Cys-Gln-Gly-NH₂， Lys-Gln-Gly-NH₂，
Ala-Leu-Gly-NH₂， Gly-Val-Gly-NH₂， Val-Gly-Gly-NH₂，
Ala-Ser-Gly-NH₂， Ser-Leu-Gly-NH₂ 和 Ser-Pro-Thr-NH₂ 的肽。

60. 权利要求 58 的组合物，其中 X₃ 是甘氨酸。

61. 权利要求 58 的组合物，其中肽具有式 X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀ X₁X₂X₃-R，
其中 X₄，X₅，X₆，X₇，X₈，X₉，和 X₁₀ 是任意氨基酸且其中任意 1，2，3，
4，5，6 或 7 个氨基酸不存在，其中 R 是附着到所述肽羧基末端上的调节基团且 R 包含酰胺基团或具有相似电荷和空间形状的其他部分。

62. 权利要求 58 的组合物，其中肽 X₁X₂X₃ 在病毒衣壳蛋白的氨基酸序列中存在。

说明书

抑制病毒感染的肽及其使用方法

本发明领域

本发明涉及发现了抑制病毒感染，包括人类免疫缺陷病毒（HIV）感染的肽。更具体的说，公开了含有各种小肽的药物（medicaments）用于治疗 and 预防病毒感染，例如 HIV 感染。

本发明背景

所有病毒都由蛋白质外壳包围含有核酸的核心组成。直接包围病毒核酸的蛋白质外壳称为衣壳，而具有衣壳和核酸的完整全蛋白质-核酸复合物称为核壳。沙粒病毒，轮状病毒，环状病毒，逆转录病毒（包括慢病毒），乳头瘤病毒，腺病毒，疱疹病毒，副粘病毒，粘液病毒和嗜肝 DNA 病毒都表现出这些一般性结构特征。（病毒学（Virology），Fields 编辑，第 3 版，Lippencott-Raven 出版，第 1513, 1645, 1778, 2047, 2113, 2221 和 2717 页（1996））。

衣壳由许多亚基（壳粒）组成且壳粒由一些蛋白质的同型或异型-多聚体形成。在病毒装配中壳粒之间的非共价键与稳定折叠的蛋白质结构域的那些种类相同。两个亚基之间的界面看起来非常类似于单个结构域，氨基酸侧链被另一氨基酸紧密包裹。分析的大多数病毒结构的共同特征是一个壳粒的多肽链延伸到邻近壳粒的结构域之下或之上的方式。这些延伸的多肽臂与另一多肽臂缠结并经过起疏水相互作用，氢键，和盐桥帮助稳定衣壳。单个壳粒之间的接触，对于一些病毒来说也与核心蛋白的接触，决定了总体衣壳结构，如果包含许多相同的壳粒，则发生重复接触且所得的结构是对称的。（病毒学，Fields 编辑，第 3 版，Lippencott-Raven 出版，第 62 页（1996））。

一些简单的病毒从其分离的组分自发形成，而其它病毒需要酶催化壳粒的修饰以触发装配。病毒自我装配由在有利于缔合的条件下蛋白质亚基

之间的相互作用的稳定性驱动。更复杂的病毒通常从经过自我装配过程的亚组装件构建。（病毒学，Fields 编辑，第 3 版，Lippencott-Raven 出版，第 62，70，1646 和 1888 页（1996））。尽管许多病毒的衣壳于蛋白质组成上不同，但已进化了以聚合的壳粒为特征的一般病毒结构设计，而壳粒由一些蛋白质的同型或异型多聚体组成。

HIV 是给予感染人类且引起获得性免疫缺陷综合症（AIDS）的慢病毒的名称。来自人类的慢病毒分离物根据血清学特性和分子克隆的病毒基因组的序列分析分组进两种类型（HIV-1 和 HIV-2）中的一种。从一些非人灵长类，包括非洲绿猴，sooty magabeys，狒狒，黑猩猩和 sykes 获得了遗传上不同的慢病毒。来自非人灵长类的慢病毒分离物统称为 SIV。序列分析揭示了一些 SIV 株和 HIV-1 和 HIV-2 株的基因组表现出高度同源性。另外，电子显微镜检揭示了 HIV-1 和 HIV-2 的超微结构是相似的，两者都具有直径大约 110nm 的病毒体，带有被脂双层膜包围的锥形核壳，脂双层膜上含有被膜糖蛋白刺突。（病毒学，Fields 编辑，第 3 版，Lippencott-Raven 出版，第 1882 - 1883 页（1996））。

HIV 是含有至少 7 个基因的复杂逆转录病毒。称为 gag, pol, 和 env 的病毒结构基因分别编码病毒核心蛋白，逆转录酶和病毒被膜糖蛋白。剩下的 HIV 基因是涉及病毒复制的辅助基因。gag 和 env 基因编码多蛋白，即，从这些基因中的每一个合成的蛋白质翻译后裂解成一些更小的蛋白质。

尽管 HIV 和 SIV 病毒体的总体形状是球形的，但核壳是不对称的，具有大约 100nm 的长度，宽末端大约 40 - 60nm，窄端宽大约 20nm。各成熟病毒体内的核壳由从 Gag 前体多肽裂解加工的蛋白质包裹的两分子的病毒单链 RNA 基因组组成。gag 基因多蛋白 Pr55^{gag} 被病毒编码的蛋白酶 (PR) 裂解产生成熟衣壳蛋白。这些 gag 基因产物是据认为位于核壳和病毒体被膜之间的基质蛋白质 (p17)；形成衣壳的主要衣壳蛋白 (p24)；和与病毒 RNA 基因组结合的核壳蛋白 (p9)。在感染细胞中的这种蛋白裂解加工与病毒体形态发生相联系。（病毒学，Fields 编辑，第 3 版，Lippencott-Raven 出版，第 1886 - 1887 页（1996））。

主要衣壳蛋白 p24 (也称为 CA) 含有大约 240 个氨基酸且表现出 24 - 27kD 的分子量。蛋白质 p24 自我缔合形成二聚体和大到十二聚体的寡聚体复合物。用 HIV-1 gag 多蛋白中的突变进行的遗传试验鉴定了 p24 蛋白质中的一些功能域, 包括分子的 C 末端一半和在各种逆转录病毒的 P24 蛋白中保守的跨越 20 个氨基酸的主要同源性区域 (MHR)。这些突变似乎影响前体核壳装配。(病毒学, Fields 编辑, 第 3 版, Lippencott-Raven 出版, 第 1888 - 1889 页 (1996))。

由于发现 HIV-1 是 AIDS 的病原体, 在对该病毒引起疾病的机理的了解中已取得了显著的进展。尽管已开发了许多诊断试验, 但主要由于该病毒的异质特性和缺乏合适的动物模型而在 HIV 疫苗疗法方面进展缓慢。(参见, 例如, Martin, 自然 (Nature), 345: 572 - 573 (1990))。

已使用各种药用试剂尝试治疗 AIDS。然而, 这些药品中的许多 (如果不是全部) 产生严重的副作用, 极大地限制了其作为治疗剂的使用。HIV 逆转录酶由于其在病毒复制中的关键作用而成为一个药品靶。已发现一些核苷衍生物抑制 HIV 逆转录酶, 包括叠氮胸苷 (AZT, zidovudine[®])。AZT 引起严重的副作用以致许多病人不能耐受其给药。已发现抑制 HIV 逆转录酶的其它核苷类似物引起比 AZT 更大的副作用。另一药品靶是对病毒形成关键的 HIV 蛋白酶 (PR)。PR 是天冬氨酸蛋白酶且可被合成的化合物抑制。(Richards, FEBS Lett., 253: 214 - 216 (1989))。蛋白酶抑制剂比逆转录酶抑制剂更有效地抑制 HIV 的生长, 但延长治疗与诸如脂营养障碍, 高脂血症, 和胰岛素抗性代谢性疾病相关。

另外, HIV 迅速形成对核苷/核苷酸类似物逆转录酶抑制剂和蛋白酶抑制剂的抗性。这些抗性也在病人之间传播。例如, 研究显示, 最近被 HIV 感染的个体十分之一已形成对 AZT 的抗性, 很可能是因为他们被传播时携带 AZT 抗性病毒的病人传染。

拥有引起很小副作用 (如果有的话) 的特异性和选择性治疗剂在包括 HIV 和 SIV 的病毒感染的治疗和预防中将是有益的。

本发明概述

本发明涉及抑制病毒感染性的小肽(二到十个氨基酸长)。完整的衣壳结构对于病毒体的感染性是至关重要的。对于其感染性依赖于二,三,四或多聚化的衣壳蛋白大分子,破坏其装配的一种方法是构建影响该蛋白质-蛋白质相互作用的小分子。发现羧基末端的羟基被酰胺基团取代的小肽对衣壳蛋白相互作用具有这种抑制影响。因此,本发明的方面涉及影响病毒衣壳装配的修饰小肽。

在合适的实施方案中,短肽与涉及 HIV-1 和 HIV-2, 和 SIV 的壳粒组织和衣壳装配的蛋白质结合,从而抑制和/或防止正确的衣壳装配及由此产生的病毒感染。小肽 Gly-Pro-Gly-NH₂ (GPG-NH₂), Gly-Lys-Gly-NH₂ (GKG-NH₂), Cys-Gln-Gly-NH₂ (CQG-NH₂), Arg-Gln-Gly-NH₂ (RQG-NH₂), Lys-Gln-Gly-NH₂ (KQG-NH₂), Ala-Leu-Gly-NH₂ (ALG-NH₂), Gly-Val-Gly-NH₂ (GVG-NH₂), Val-Gly-Gly-NH₂ (VGG-NH₂), Ala-Ser-Gly-NH₂ (ASG-NH₂), Ser-Leu-Gly-NH₂ (SLG-NH₂) 和 Ser-Pro-Thr-NH₂ (SPT-NH₂) 是优选的种类。这些小肽和类似于其结构的肽模拟物(peptidomimetics)(统称为“肽试剂”(“peptide agents”))以单体或多聚体形式使用。本发明的肽试剂适合于在遭受病毒感染的包括人类在内的哺乳动物中的治疗和预防应用。

在一个实施方案中,用于在病毒感染的宿主细胞中抑制病毒复制的组合物具有有效量的具有式 X₁X₂X₃-NH₂ 的酰胺形式的肽,其中 X₁, X₂, 和 X₃ 是任意氨基酸且所述的肽不是 Gly-Pro-Gly-NH₂, 而且其中所述的组合物通过阻碍病毒衣壳装配抑制病毒复制。合适的是,这些肽的 X₃ 是甘氨酸。另外,上述的组合物可包括酰胺形式的肽,该肽选自具有式 Gly-Lys-Gly-NH₂, Arg-Gln-Gly-NH₂, Cys-Gln-Gly-NH₂, Lys-Gln-Gly-NH₂, Ala-Leu-Gly-NH₂, Gly-Val-Gly-NH₂, Val-Gly-Gly-NH₂, Ala-Ser-Gly-NH₂, Ser-Leu-Gly-NH₂ 和 Ser-Pro-Thr-NH₂ 的肽。

在另一有关实施方案中,上述组合物是具有式 X₄X₅X₁X₂X₃-NH₂ 的酰胺形式的肽,其中 X₄ 和 X₅ 是任意氨基酸且任何一个或两个氨基酸可以不存在。该实施方案可以是具有式 X₁X₂X₃ 的三肽,其中该序列在病毒衣壳蛋白的氨

氨基酸序列中发现。

在一些实施方案中，上述组合物与支持物相连，且在另一实施方案中，上述组合物掺入具有药用上可接受的载体的药剂（pharmaceutical）中。例如，酰胺形式的肽具有式 Gly-Lys-Gly-NH₂ 且可与支持物相连。

另外，酰胺形式的肽可具有诸如 Arg-Gln-Gly-NH₂，Cys-Gln-Gly-NH₂，Lys-Gln-Gly-NH₂，Ala-Leu-Gly-NH₂，或 Ser-Leu-Gly-NH₂ 的式子。这些肽也可与支持物相连。

在宿主细胞中抑制 HIV 复制的方法也是实施方案。例如，一个方法涉及给细胞施用有效量的具有式 X₁X₂X₃-NH₂ 的酰胺形式的肽，其中 X₁，X₂，和 X₃ 是任意氨基酸且所述的肽不是 Gly-Pro-Gly-NH₂。因此，上述肽可选自具有式 Gly-Lys-Gly-NH₂，Arg-Gln-Gly-NH₂，Cys-Gln-Gly-NH₂，Lys-Gln-Gly-NH₂，Ala-Leu-Gly-NH₂，Gly-Val-Gly-NH₂，Val-Gly-Gly-NH₂，Ala-Ser-Gly-NH₂，Ser-Leu-Gly-NH₂ 和 Ser-Pro-Thr-NH₂ 的肽。上述方法还可包括进行选自核苷类似物逆转录酶抑制剂，核苷酸类似物逆转录酶抑制剂，非核苷逆转录酶抑制剂和蛋白酶抑制剂的抗病毒治疗的给药步骤。在上述方法中使用的肽可与支持物相连或者可在含有药用上可接受的载体的药剂中给药。

在另一实施方案中，用于在宿主细胞中抑制 HIV 复制的组合物包括有效量的具有式 X₁X₂X₃-NH₂ 的酰胺形式的肽，其中 X₁，X₂，和 X₃ 是任意氨基酸且所述的肽不是 Gly-Pro-Gly-NH₂，其中所述的组合物通过阻碍衣壳装配抑制 HIV 复制。合适的是，该实施方案的肽中 X₃ 是甘氨酸。优选的是，该实施方案的肽选自具有式 Gly-Lys-Gly-NH₂，Arg-Gln-Gly-NH₂，Cys-Gln-Gly-NH₂，Lys-Gln-Gly-NH₂，Ala-Leu-Gly-NH₂，Gly-Val-Gly-NH₂，Val-Gly-Gly-NH₂，Ala-Ser-Gly-NH₂，Ser-Leu-Gly-NH₂ 和 Ser-Pro-Thr-NH₂ 的肽。另外，上述酰胺形式的肽可具有式 X₄X₅X₁X₂X₃-NH₂，其中 X₄ 和 X₅ 是任意氨基酸且其中任何一个或两个氨基酸可以不存在。这些组合物可以具有三肽 X₁X₂X₃，该三肽在，例如，HIV 衣壳蛋白的氨基酸序列中发现。在一些实施方案中，这些肽与支持物相连，且在另一实施方案中，这些肽掺入含有药用上可接受的载体的药剂

中。

在另一方法中，提供了在宿主细胞中抑制病毒复制的方法，涉及给所述细胞施用有效量的具有式 $X_1X_2X_3-NH_2$ 的酰胺形式的肽，其中 X_1 , X_2 , 和 X_3 是任意氨基酸且所述的肽不是 Gly-Pro-Gly- NH_2 。在该方法中，肽可选自具有式 Gly-Lys-Gly- NH_2 , Arg-Gln-Gly- NH_2 , Cys-Gln-Gly- NH_2 , Lys-Gln-Gly- NH_2 , Ala-Leu-Gly- NH_2 , Gly-Val-Gly- NH_2 , Val-Gly-Gly- NH_2 , Ala-Ser-Gly- NH_2 , Ser-Leu-Gly- NH_2 和 Ser-Pro-Thr- NH_2 的肽。该方法还可包括进行选自核苷类似物逆转录酶抑制剂，核苷酸类似物逆转录酶抑制剂，非核苷逆转录酶抑制剂和蛋白酶抑制剂的抗病毒治疗的给药步骤。另外，在该方法中使用的肽可与支持物相连或者可在含有药用上可接受的载体的药剂中给药。

在另一方法中，提供了阻碍病毒衣壳装配的方法。该方法涉及将细胞与有效量的具有式 $X_1X_2X_3-NH_2$ 的酰胺形式的肽接触，其中 X_1 , X_2 , 和 X_3 是任意氨基酸且所述的肽不是 Gly-Pro-Gly- NH_2 。合适的是，该方法中所用的肽是选自具有式 Gly-Lys-Gly- NH_2 , Arg-Gln-Gly- NH_2 , Cys-Gln-Gly- NH_2 , Lys-Gln-Gly- NH_2 , Ala-Leu-Gly- NH_2 , Gly-Val-Gly- NH_2 , Val-Gly-Gly- NH_2 , Ala-Ser-Gly- NH_2 , Ser-Leu-Gly- NH_2 和 Ser-Pro-Thr- NH_2 的肽。在一些实施方案中，在该方法使用的肽中 X_3 是甘氨酸。

在其它实施方案中，该方法采用具有式 $X_4X_5X_1X_2X_3-NH_2$ 的酰胺形式的肽，其中 X_4 和 X_5 是氨基酸且其中任何一个或两个氨基酸不存在。另外，该方法可涉及使用在病毒蛋白的氨基酸序列中发现的三肽 $X_1X_2X_3$ 。

通常，该方法的肽与支持物相连或掺入药剂中。

还提供了肽试剂的鉴定方法。例如，在一个方法中，通过将病毒感染的多个细胞与有效量的肽试剂接触，其中所述的肽不是 Gly-Pro-Gly- NH_2 ，分析病毒的不完全衣壳形成，并选择诱导不完全衣壳形成的肽试剂来鉴定用于掺入进抗病毒药剂的肽试剂。该方法涉及采用显微镜术分析衣壳形成且该病毒选自 HIV-1, HIV-2, 和 SIV。另外，鉴定的肽试剂可选自三肽，寡肽和肽模拟物。例如，上述肽试剂可选自具有式 Gly-Lys-Gly- NH_2 ,

Arg-Gln-Gly-NH₂ , Cys-Gln-Gly-NH₂ , Lys-Gln-Gly-NH₂ ,
Ala-Leu-Gly-NH₂ , Gly-Val-Gly-NH₂ , Val-Gly-Gly-NH₂ ,
Ala-Ser-Gly-NH₂, Ser-Leu-Gly-NH₂和 Ser-Pro-Thr-NH₂的肽。在一个
优选的实施方案中,上述方法中使用的肽试剂具有相应于 p24 的氨基酸序
列的氨基酸序列。

在另一实施方案中,提供了结合病毒蛋白的肽试剂的鉴定方法,包括
提供病毒蛋白质,将病毒蛋白质与有效量的肽试剂接触,其中所述的肽试
剂不是 Gly-Pro-Gly-NH₂,并检测含有病毒蛋白和肽试剂的复合物的形成。
如上所述,该方法涉及使用选自 HIV-1, HIV-2, 和 SIV 的病毒的病毒蛋
白。另外,在一些方面,肽试剂可选自三肽,寡肽和肽模拟物。合适的是,
上述方法采用的肽试剂可选自具有式 Gly-Lys-Gly-NH₂ ,
Arg-Gln-Gly-NH₂ , Cys-Gln-Gly-NH₂ , Lys-Gln-Gly-NH₂ ,
Ala-Leu-Gly-NH₂ , Gly-Val-Gly-NH₂ , Val-Gly-Gly-NH₂ ,
Ala-Ser-Gly-NH₂, Ser-Leu-Gly-NH₂和 Ser-Pro-Thr-NH₂的肽。另外,
提供了制备药剂的方法,其中将以上述方法鉴定的肽试剂掺入药剂中。

还提供了另一制备药剂的方法,它涉及给细胞施用有效量的具有式
X₁X₂X₃-NH₂的酰胺形式的肽,其中 X₁, X₂, 和 X₃是任意氨基酸且所述的肽不
是 Gly-Pro-Gly-NH₂,检测细胞中病毒复制的抑制,并将引起病毒复制受
抑制的肽掺入药剂中。该方法可涉及使用选自具有式 Gly-Lys-Gly-NH₂,
Arg-Gln-Gly-NH₂ , Cys-Gln-Gly-NH₂ , Lys-Gln-Gly-NH₂ ,
Ala-Leu-Gly-NH₂ , Gly-Val-Gly-NH₂ , Val-Gly-Gly-NH₂ ,
Ala-Ser-Gly-NH₂, Ser-Leu-Gly-NH₂和 Ser-Pro-Thr-NH₂的肽的肽。另
外,上述方法可包括将选自核苷类似物逆转录酶抑制剂,核苷酸类似物逆
转录酶抑制剂,非核苷逆转录酶抑制剂和蛋白酶抑制剂的抗病毒化合物掺
入药剂中的步骤。另外,上述方法可涉及将载体掺入药剂中的步骤。

在另一实施方案中,在病毒感染的宿主细胞中抑制病毒复制的组
合物,包括有效量的具有式 X₁X₂X₃-R 的肽,其中 X₁, X₂, 和 X₃是任意氨基酸
且所述的肽不是 Gly-Pro-Gly-NH₂,其中 R 是附着到所述肽羧基末端上的
调节基团且 R 包含酰胺基团或具有相似电荷和空间形状 (steric bulk)

的其它部分,而且其中所述的组合物通过阻碍病毒衣壳装配来抑制病毒复制。该组合物可以是选自具有式 Gly-Lys-Gly-NH₂, Arg-Gln-Gly-NH₂, Cys-Gln-Gly-NH₂, Lys-Gln-Gly-NH₂, Ala-Leu-Gly-NH₂, Gly-Val-Gly-NH₂, Val-Gly-Gly-NH₂, Ala-Ser-Gly-NH₂, Ser-Leu-Gly-NH₂和 Ser-Pro-Thr-NH₂的肽的肽。合适的是,在这些实施方案中 X₃是甘氨酸。

另外,上述组合物可包括具有式 X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀ X₁X₂X₃-R 的肽,其中 X₄, X₅, X₆, X₇, X₈, X₉, 和 X₁₀是任意氨基酸且其中任意 1, 2, 3, 4, 5, 6 或 7 个氨基酸不存在,其中 R 是附着到所述肽羧基末端上的调节基团且 R 包含酰胺基团或具有相似电荷和空间形状的其他部分。

优选的是,上述组合物包括在病毒衣壳蛋白的氨基酸序列中发现的肽 X₁X₂X₃。

附图的简要描述

图 1 是表示在 HUT78 细胞中 HIV 感染性试验的结果的图示。

图 2 是未处理的 HIV 颗粒的电子显微照片的组合。

图 3 是与蛋白酶抑制剂 Ritonavir 接触过的 HIV 颗粒的电子显微照片的组合。

图 4 是与 GPG-NH₂接触过的 HIV 颗粒的电子显微照片的组合。

图 5 显示了相应于 HIV-1 p24 蛋白质羧基末端的蛋白质序列(残基 146-231)和 HIV-2, SIV, 劳斯肉瘤病毒(RSV), 人 T 细胞白血病病毒-1 型(HTLV-1), 小鼠乳腺癌病毒(MMTV), Mason-Pfizer 猴病毒(MPMV), 和莫洛尼鼠类白血病病毒(MMLV)的蛋白质序列的序列对比。线段代表主要同源性区域(MHR)。

图 6 是在 GPG-NH₂, Ritonavir (Rito), AZT, 或这些试剂的组合存在和不存在时培养的 HIV 感染的细胞上清中检测到的 p24 (pg/ml) 的图示。

图 7 显示了薄层色谱支持物,它具有从其上分离的来自口服喂食 ¹⁴C-GPG-NH₂ 后取样的大鼠尿和大鼠血浆(rp), 以及用 ¹⁴C-GPG-NH₂ 培养的

人血浆 (Hp) 的非蛋白质结合的放射性标记化合物; 后缀是取样次数且 R1-R13 用于表示鉴定的放射性化合物位置。

图 8 是具有从其上分离的用 0.1N HCl 和 50mM KCl 处理且在 24 小时期间内取样的 ^{14}C - GPG-NH₂ 的薄层色谱支持物; 数字代表酸接触的时间, R 用于表示鉴定的 ^{14}C - GPG-NH₂ 的位置。

图 9 是大鼠血液中 ^{14}C - GPG-NH₂ 和其代谢物的分布图。

图 10 是口服喂食 ^{14}C - GPG-NH₂ 的大鼠血浆组分放射性的消除图。

图 11 显示了在 10% SDS/PAGE 上分离的粗制和分级分离的大鼠血浆蛋白质; 8-f3 指在施用 ^{14}C - GPG-NH₂ 后 8 小时从样品中取出的第 3 个馏分, 8-f1 指在施用 ^{14}C - GPG-NH₂ 后 8 小时从样品中取出的第 1 个馏分, 4-f3 指在施用 ^{14}C - GPG-NH₂ 后 4 小时从样品中取出的第 3 个馏分, 4-f1 指在施用 ^{14}C - GPG-NH₂ 后 4 小时从样品中取出的第 1 个馏分, 8h, 4h, 2h, 和 1h 指在施用 ^{14}C - GPG-NH₂ 后取样的时间, B1-B4 用于表示鉴定的蛋白质的位置。

优选实施方案的详细描述

本发明人发现具有相应于病毒衣壳蛋白的序列的修饰小肽可通过阻碍正确的核壳形成来预防和/或抑制病毒感染。该肽用于特别是在患有 HIV/AIDS 的受试者中治疗病毒性疾病, 以及作为用于有病毒感染, 特别是 HIV 感染风险的患者的预防剂, 和用于有明显有接触病毒风险的医疗装置。

在下面的说明书中, 本发明人经过监测培养物上清中存在的衣壳蛋白或逆转录酶活性量的病毒感染性试验进行的测量证实, 具有相应于病毒蛋白序列的酰胺形式的小肽, 例如 GPG-NH₂, GKG-NH₂, CQG-NH₂, RQG-NH₂, KQG-NH₂, ALG-NH₂, GVG-NH₂, VGG-NH₂, ASG-NH₂, SLG-NH₂ 和 SPT-NH₂ 抑制诸如 HIV-1, HIV-2 和 SIV 等病毒复制。另外, 本发明人证明在 DNA, RNA, 和蛋白质合成之后的阶段通过 V3 环独立的机制这些小肽抑制病毒感染性。

用小肽处理的 HIV 颗粒的电子显微镜成像揭示了该新型抗病毒剂以

不同于蛋白酶抑制剂的方式阻碍正确的衣壳装配。另外，体外结合试验揭示了此类小肽与 HIV-1 的主要衣壳蛋白质 (p24) 结合。由于一些病毒衣壳蛋白的序列是已知的，例如，沙粒病毒，轮状病毒，环状病毒，逆转录病毒，乳头瘤病毒，腺病毒，疱疹病毒，副粘病毒，粘液病毒和嗜肝 DNA 病毒科的成员，可选择相应于这些序列的一些小肽，并通过使用本文所述的病毒感染试验，或电子显微镜检技术或两者，或者在本说明书的教导下对本领域的技术人员显而易见的这些试验的改良形式，迅速筛选以鉴定有效抑制和/或防止病毒感染的那些肽试剂。

下面提供了制备含有相应于病毒衣壳蛋白序列的小肽和肽模拟物(统称为“肽试剂”)的生物技术工具和药用组合物的一些方法。尽管优选的肽试剂是在其羧基末端具有酰胺基的三肽，例如，GPG-NH₂，GKG-NH₂，CQG-NH₂，RQG-NH₂，KQG-NH₂，ALG-NH₂，GVG-NH₂，VGG-NH₂，ASG-NH₂，SLG-NH₂和 SPT-NH₂，但本发明人还提供了抑制宿主细胞中病毒复制(包括宿主细胞中 HIV 复制)的组合物和方法，其包含具有式 X₁, X₂, X₃-NH₂ 或式 X₄, X₅, X₁, X₂, X₃-NH₂ 的酰胺形式的肽，其中 X₁, X₂, X₃, X₄ 和 X₅ 是任意氨基酸且其中可缺少任意一个或两个氨基酸。在优选的实施方案中 X₃ 是甘氨酸残基。在一些实施方案中，肽试剂以单体的形式提供；在其它实施方案中，肽试剂以多聚体的形式 (multimeric form) 或多聚化的形式 (multimerized form) 提供。在一些实施方案中也使用与支持物结合的肽试剂。含有肽试剂的药用组合物可作为治疗剂或预防剂或两者进行给药用于治疗 and/或预防病毒性疾病，优选 HIV 感染。在一些实施方案中，含有肽试剂的药用组合物可与包括核苷类似物逆转录酶抑制剂，核苷酸类似物逆转录酶抑制剂，非核苷逆转录酶抑制剂和蛋白酶抑制剂的其它抗病毒治疗结合给药。本发明人还提供了小肽抗酸水解，给试验受试者用药时显著量的小肽有效传递到血液，血浆和器官组织，以及给试验受试者施用大剂量的小肽相对无毒性的证据。

另外，本发明人公开了抑制或防止病毒复制或阻碍病毒衣壳装配或两者的肽试剂的一些鉴定方法。在一种方法中，将有效量的肽试剂与病毒感染的细胞接触并分析细胞的病毒复制或病毒产物的存在。另外，经过使用

电子显微镜检，容易测定肽试剂阻碍衣壳装配的能力。此外，还公开了结合衣壳蛋白（例如，p24）和由此阻碍衣壳装配且因此阻碍病毒复制的肽试剂的鉴定方法。因此，将衣壳蛋白（例如，p24）与肽试剂接触，例如，具有式 X_1, X_2, X_3 的酰胺形式的肽，其中 $X_1, X_2,$ 和 X_3 是任意氨基酸，鉴定含有与肽试剂结合的衣壳蛋白（例如，p24）的复合物。本说明书还教导了具有病毒蛋白（例如，p24）和肽试剂的反应混合物和具有与肽试剂连接的病毒蛋白（例如，p24）的生物分子复合物。

试验了下面表 1 中所列的小肽的酰胺形式。选择并合成许多这些小肽，因为它们完全或部分相应于 HIV 和/或 SIV 病毒蛋白的序列。按照下面实施例 1 公开的方法合成表 1 的小肽，当然也可使用本领域已知的任何方法合成。

表 1
所试验的肽的氨基酸序列

Leu-Lys-Ala (LKA)	Arg-Gln-Gly (RQG)
Iso-Leu-Lys (ILK)	Lys-Gln-Gly (KQG)
Gly-Pro-Gln (GPQ)	Ala-Leu-Gly (ALG)
Gly-His-Lys (GHK)	Gly-Val-Gly (GVG)
Gly-Lys-Gly (GKG)	Val-Gly-Gly (VGG)
Ala-Cys-Gln (ACQ)	Ala-Ser-Gly (ASG)
Cys-Gln-Gly (COG)	Ser-Leu-Gly (SLG)
Ala-Arg-Val (ARV)	Ser-Pro-Thr (SPT)
Lys-Ala-Arg (KAR)	Gly-Ala-Thr (GAT)
His-Lys-Ala (HKA)	Lys-Ala-Leu (KAL)
Gly-Pro-Gly (GPG)	

所用的缩写:

Leu-亮氨酸

Lys-赖氨酸

Gln-谷氨酰胺

Ala-丙氨酸

His-组氨酸	Ileu-异亮氨酸
Cys-半胱氨酸	Gly-甘氨酸
Pro-脯氨酸	Arg-精氨酸
Val-缬氨酸	Thr-苏氨酸
Ser-丝氨酸	

实施例 1

在本实施例中，公开了用于获得上面所列小肽的方法。用自动肽合成仪 (Syro, MultisynTech, Tubingen, 德国) 化学合成一些三肽。按照标准方法使用 9-芴基甲氧羰基 (fmoc) 保护的氨基酸 (Milligen, Bedford, MA) 进行合成。冻干所有的肽，然后以适当的浓度溶于磷酸盐缓冲的盐水 (PBS) 中。使用 PepS-15 C18 柱 (Pharmacia, Uppsala, 瑞典) 经过反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 分析肽。

在许多实施方案中，使用具有附着到肽羧基末端上的调节基团的肽 (“修饰的肽”)。在有些情况下，经过用氨基取代正常情况下存在于肽末端羧基上的羟基产生修饰的肽。即，末端不是 COOH，合成肽具有 CO-NH₂。例如，优选的小肽包括甘氨酸-赖氨酸-甘氨酸 (GKG-NH₂)，半胱氨酸-谷氨酰胺-甘氨酸 (CQG-NH₂)，甘氨酸-脯氨酸-甘氨酸 (GPG-NH₂)，精氨酸-谷氨酰胺-甘氨酸 (RQG-NH₂)，赖氨酸-谷氨酰胺-甘氨酸 (KQG-NH₂)，丙氨酸-亮氨酸-甘氨酸 (ALG-NH₂)，甘氨酸-缬氨酸-甘氨酸 (GVG-NH₂)，缬氨酸-甘氨酸-甘氨酸 (VGG-NH₂)，丙氨酸-丝氨酸-甘氨酸 (ASG-NH₂)，丝氨酸-亮氨酸-甘氨酸 (SLG-NH₂)，和丝氨酸-脯氨酸-苏氨酸 (SPT-NH₂)。除了合成的那些外，许多三肽也可从瑞士 Bachem AG 购买，包括但不限于 GKG-NH₂，CQG-NH₂ 和 GPG-NH₂。

在毒理学实验和评估小肽治疗与常规抗病毒疗法结合的效力的实验中，按如下获得肽。对于起始实验，使用应用生物系统 430A (Applied Biosystems 430A) 肽合成仪 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 进行固相肽合成。每次合成使用对甲基苄基羟基胺

(p-methylbenzylhydrilamine) 固相支持树脂 (Peptide International , Louisville, KY) , 当经过酸水解从固相支持物裂解下肽时产生羧基末端酰胺。用于合成的所有氨基酸含有保护 α -NH₂基团的 t-丁基羧基且可从瑞士 Novabiochem AG 获得。经过用三氟甲烷磺酸处理从固相支持物树脂上裂解的合成肽去掉保护基团, 产生在羧基末端用氨基 (-NH₂) 调节基团代替羟基 (-OH) 的肽。使用前, 用反相高效液相色谱纯化肽并在应用生物系统 473A 肽测序仪上测序。另外, 从瑞士 Bachem AG 买到具有酰胺 (CO-NH₂; GPG-NH₂) 或羧基 (COOH; GPG-OH) 末端的三肽 GPG。

在下面的说明书中, 描述了用于鉴定抑制 HIV-1, HIV-2, 和 SIV 感染的小肽的一些试验。

HIV 和 SIV 感染性试验

按实施例 1 制备的肽用于一些 HIV-1, HIV-2, 和 SIV 感染试验。以逆转录酶活性, 细胞上清中的 p24 蛋白质浓度, 和以 HIV-1 合胞体形成的显微镜评估来监测 HIV-1, HIV-2, 和 SIV 感染的效力。

在起始实验中, 筛选一些能抑制 H9 细胞中 HIV-1, HIV-2, 和 SIV 感染的三肽。一旦鉴定了抑制性三肽, 进行更特异性的试验以测定各种浓度的选定三肽和组合处理 (例如, 使用一种以上三肽的组合) 的效果。

在下面实施例中, 公开了一种用于筛选一些能抑制 HIV-1, HIV-2, 和 SIV 感染的三肽的方法。

实施例 2

在本实施例中, 公开了用于分析各种三肽抑制 HIV-1, HIV-2, 和 SIV 复制的能力的方法。在实验 1 和 2 中, 用 HIV-1, HIV-2 或 SIV 以 25 TCID₅₀ 感染大约 200,000 个 H9 细胞以试验下列合成三肽 LKA-NH₂, ILK-NH₂, GPQ-NH₂, GHK-NH₂, GKG-NH₂, ACQ-NH₂, CQG-NH₂, ARV-NH₂, KAR-NH₂, HKA-NH₂, GAT-NH₂, KAL-NH₂, 和 GPG-NH₂ 的抑制效力。因此, 将 H9 细胞重悬于含有或不含有不同肽 (大约 100 μ M) 的补充了 10% (v/v) 加热灭活的胎牛血清 (FBS), 青霉素 (100u/ml) 和链霉素 (100u/ml) (均从 GIBCO 获得), 和 Polybrene (g/ml) (可从 Sigma 获得) 的 1ml RPMI 1640 培养基中。

随后，在 20-30 μ l 体积中以 25 TCID₅₀ 加入病毒。细胞与病毒在 37 $^{\circ}$ C 下培养 1 小时，然后以 170xg 沉淀 7 分钟。在不含肽的 RPMI 培养基中室温下洗涤细胞 3 次并按上述以 170xg 沉淀 7 分钟。最后一次洗涤后，将细胞重悬于 24 孔板（Costar 公司）的含肽的 RPMI 培养基中并在 37 $^{\circ}$ C 下潮湿的 5% CO₂ 中维持。

当在感染后 4, 7, 10 和 14 天更换培养基时收集并分析培养上清。为了监测病毒复制，使用商业上可获得的 Lenti-RT 活性试剂盒（Cavidi Tech, Uppsala, 瑞典）试验上清中的逆转录酶（RT）活性。借助于标准的回归线测定 RT 的量。结果表示为吸光度值（OD）且吸光度越高表示蛋白质浓度越高和病毒感染越强。也经过显微镜检查监测合胞体的形成。表 2 和 3 分别显示了实验 1 和 2 的细胞培养物上清的吸光度值。

在实验 3 中（表 4），用 HIV-1, HIV-2 或 SIV 以 25 TCID₅₀ 感染大约 200,000 个 H9 细胞以试验不同浓度的肽 GPG-NH₂, GKG-NH₂ 和 CQG-NH₂ 及这些肽的组合（所示的浓度相应于各三肽的浓度）的抑制效力。如上所述，将 H9 细胞重悬于含有或不含各种浓度的不同肽的补充了 10%（v/v）加热灭活的胎牛血清（FBS），青霉素（100u/ml）和链霉素（100u/ml），和 Polybrene（g/ml）的 1ml RPMI 1640 培养基中。随后，在 20-30 μ l 体积中以 25 TCID₅₀ 加入病毒。细胞与所示病毒在 37 $^{\circ}$ C 下培养 1 小时，然后以 170xg 沉淀 7 分钟。在不含肽的 RPMI 培养基中室温下洗涤细胞 3 次并按上述以 170xg 沉淀 7 分钟。最后一次洗涤后，将细胞重悬于 24 孔板（Costar 公司）的含有肽的 RPMI 培养基中并在 37 $^{\circ}$ C 下潮湿的 5% CO₂ 中维持。

当在感染后 4, 7, 和 11 天更换培养基时收集培养物上清。如上所述，通过使用 Lenti-RT 活性试剂盒（Cavidi Tech）检测上清中的逆转录酶（RT）活性来监测各病毒的复制。借助于标准的回归线测定 RT 的量。结果表示为吸光度值（OD）且吸光度越高表示蛋白质浓度越高和病毒感染越强。表 4 显示了实验 3 的细胞培养物上清的吸光度值。

在实验 4 中（表 5）中，用 HIV-1 以 25 TCID₅₀ 感染大约 200,000 个 H9 细胞以试验不同浓度的肽 GPG-NH₂, GKG-NH₂ 和 CQG-NH₂ 及这些肽的组合

(所示的浓度相应于三肽的总浓度)的抑制效力。如上所述,将 H9 细胞重悬于含有或不含有各种浓度的不同肽的补充了 10% (v/v) 加热灭活的胎牛血清 (FBS), 青霉素 (100u/ml) 和链霉素 (100u/ml), 和 Polybrene (g/ml) 的 1ml RPMI 1640 培养基中。随后,在 20-30 μ l 体积中以 25 TCID₅₀ 加入病毒。细胞与所示病毒在 37 $^{\circ}$ C 下培养 1 小时,然后以 170xg 沉淀 7 分钟。在不含肽的 RPMI 培养基中室温下洗涤细胞 3 次并按上述以 170xg 沉淀 7 分钟。最后一次洗涤后,将细胞重悬于 24 孔板 (Costar 公司) 的含有肽的 RPMI 培养基中并在 37 $^{\circ}$ C 下潮湿的 5% CO₂ 中维持。

当在感染后 4, 7, 和 11 天更换培养基时收集培养物上清。如上所述,通过使用 Lenti-RT 活性试剂盒 (Cavidi Tech) 检测上清中的逆转录酶 (RT) 活性来监测各病毒的复制。借助于标准的回归线测定 RT 的量。结果表示为吸光度值 (OD) 且吸光度越高表示蛋白质浓度越高和病毒感染越强。表 5 显示了实验 4 的细胞培养物上清的吸光度值。将第 11 天分析的上清稀释 5 倍以便检测可以更精确地测定。

在实验 5 中 (表 6), 用 HIV-1 以 25 TCID₅₀ 感染大约 200,000 个 H9 细胞以试验不同浓度的肽 GPG-NH₂, GKG-NH₂ 和 CQG-NH₂ 及这些肽的组合的抑制效力。如上所述,将 H9 细胞重悬于含有或不含有各种浓度的不同肽的补充了 10% (v/v) 加热灭活的胎牛血清 (FBS), 青霉素 (100u/ml), 链霉素 (100u/ml), 和 Polybrene (g/ml) 的 1ml RPMI 1640 培养基中。随后,在 20-30 μ l 体积中以 25 TCID₅₀ 加入病毒。细胞与所示病毒在 37 $^{\circ}$ C 下培养 1 小时,然后以 170xg 沉淀 7 分钟。在不含肽的 RPMI 培养基中室温下洗涤细胞 3 次并按上述以 170xg 沉淀 7 分钟。最后一次洗涤后,将细胞重悬于 24 孔板 (Costar 公司) 的含有肽的 RPMI 培养基中并在 37 $^{\circ}$ C 下潮湿的 5% CO₂ 中维持。

当在感染后 4, 7, 和 14 天更换培养基时收集培养物上清。经过检测上清中 p24 的存在来监测各病毒的复制。使用商业上可获得的 HIV p24 抗原检测试剂盒 (Abbott) 测定 HIV p24 抗原。结果表示为吸光度值 (OD) 且吸光度越高表示蛋白质浓度越高和病毒感染越强。在有些情况下,制备上清的系列稀释液以便更精确地检测 p24 的浓度。表 6 显示了实验 5 的细

胞培养物上清的吸光度值。正如下面更详细讨论的，发现三肽 GPG-NH₂，GKG-NH₂ 和 CQG-NH₂ 及这些肽的组合有效抑制 HIV-1，HIV-2，和 SIV 感染。

在实验 6 中(表 7 和图 1)，用 HIV-1 以 25 TCID₅₀ 感染大约 200,000 个 HUT78 细胞以试验 GPG-NH₂，RQG-NH₂，KQG-NH₂，ALG-NH₂，GVG-NH₂，VGG-NH₂，ASG-NH₂，SLG-NH₂，和 SPT-NH₂ 的抑制效力。将 HUT 细胞重悬于含有或不含上述不同小肽(大约 100μM)的补充了 10% (v/v) 加热灭活的胎牛血清(FBS, GIBCO)，青霉素(100u/ml)，链霉素(100u/ml)和 Polybrene (Sigma, 2μg/ml) 的 1ml RPMI 1640 培养基中。随后，在 20μl 体积中以 25 TCID₅₀ 加入 HIV-1 病毒。细胞与病毒在 37℃ 下培养 1 小时，随后以 170xg 沉淀细胞 7 分钟。按上述经过以 170xg 沉淀细胞 7 分钟在不含肽的 RPMI 培养基中室温下洗涤细胞 3 次。最后一次洗涤后，将细胞重悬于 24 孔板 (Costar 公司) 的含有肽的 RPMI 培养基中并在 37℃ 下潮湿的 5% CO₂ 中维持。当在感染后 4, 7, 和 11 天更换培养基时收集培养物上清并使用 HIV-1 p24 ELISA 试剂盒 (Abbott 实验室, North Chicago, USA) 监测病毒 p24 产生。正如下面所讨论的，发现小肽 RQG-NH₂，KQG-NH₂，ALG-NH₂，GVG-NH₂，VGG-NH₂，ASG-NH₂，SLG-NH₂，和 SPT-NH₂ 有效抑制 HIV-1 感染。

表 2

实验 1 - (现制的肽)

第 7 天的 RT

第 10 天的 RT

三肽 (100 M)	HIV-1	HIV-2	SIV	HIV-1	HIV-2	SIV	HIV-1 合胞体
LKA-NH ₂	0.568*	3.649	3.577	2.429	2.769	2.452	阳性
ILK-NH ₂	0.365	3.467	3.180	2.033	2.791	2.255	阳性
GPD-NH ₂	0.204	3.692	1.542	1.965	2.734	2.176	阳性
GHK-NH ₂	0.289	3.522	0.097	2.151	2.931	2.384	阳性
GKG-NH ₂	0.080	0.160	0.421	0.074	0.147	0.099	阴性
ACQ-NH ₂	0.117	3.418	1.241	0.904	2.753	2.746	阳性
CDG-NH ₂	0.091	0.217	0.747	0.108	0.296	0.110	阴性
ARV-NH ₂	0.156	3.380	0.210	1.528	3.003	1.172	阳性
KAR-NH ₂	0.380	3.419	0.266	2.779	2.640	1.722	阳性
HKA-NH ₂	0.312	3.408	0.416	2.546	2.669	2.520	阳性
GAT-NH ₂	0.116	3.461	0.892	1.565	2.835	2.343	阳性
KAL-NH ₂	0.246	3.372	1.091	1.995	2.749	2.524	阳性
GPG-NH ₂	0.068	0.735	0.138	0.074	0.145	0.103	阴性
不含肽的 对照	0.251	1.675	1.227	2.217	2.657	3.030	阳性

*值代表光密度 (OD)

表 3

实验 2 - (现制的肽)

第 7 天的 RT

第 10 天的 RT

三肽 (100 M)	HIV-1	HIV-2	SIV	HIV-1	HIV-2	SIV	HIV-1 合胞体
LKA-NH ₂	0.894*	1.689	0.724	2.989	2.637	2.797	阳性
ILK-NH ₂	0.581	1.692	0.515	2.950	2.557	2.632	阳性
GPQ-NH ₂	0.884	1.511	0.574	2.848	2.382	2.319	阳性
GHK-NH ₂	0.829	1.936	0.396	3.013	2.418	2.394	阳性
GKG-NH ₂	0.145	0.283	0.116	0.345	1.637	0.204	阴性
ACQ-NH ₂	0.606	1.661	0.612	2.831	2.505	2.606	阳性
CQG-NH ₂	0.143	1.241	0.120	1.546	2.501	1.761	阴性
ARV-NH ₂	0.618	2.237	0.212	2.829	2.628	3.004	阳性
KAR-NH ₂	0.753	1.904	1.034	2.928	2.742	2.672	阳性
HKA-NH ₂	1.081	1.678	0.455	2.794	2.560	2.623	阳性
GAT-NH ₂	0.776	1.707	0.572	2.800	2.565	2.776	阳性
KAL-NH ₂	0.999	1.757	0.511	2.791	2.383	2.663	阳性
GPG-NH ₂	0.090	0.093	0.067	0.143	0.575	0.139	阴性
不含肽的 对照	0.809	1.774	0.578	2.711	2.528	2.911	阳性

*值代表光密度 (OD)

表 4

实验 3 - (从 Bachem 获得的肽)

第 7 天的 RT

第 10 天的 RT

三肽	HIV-1	HIV-2	SIV	HIV-1	HIV-2	SIV
不含肽的对照	1.558*	1.718	1.527	2.521	2.716	2.091
GPG-NH ₂ 5μM	1.527	1.735	0.753	2.398	2.329	2.201
GPG-NH ₂ 20μM	0.239	0.252	0.197	0.692	1.305	0.779
GKG-NH ₂ 5μM	1.587	1.769	0.271	1.683	2.510	1.709
GKG-NH ₂ 20μM	1.616	1.759	1.531	2.036	2.646	2.482
GKG-NH ₂ 100μM	0.823	0.828	1.005	1.520	1.947	1.382
CQG-NH ₂ 5μM	1.547	1.760	1.159	2.028	2.466	2.821
CQG-NH ₂ 20μM	1.578	1.748	0.615	1.484	2.721	2.158
CQG-NH ₂ 100μM	1.520	1.715	0.795	2.014	2.815	2.286
GPG-NH ₂ + GKG-NH ₂ 5μM	1.430	1.738	1.131	1.998	2.770	2.131
GPG-NH ₂ + GKG-NH ₂ 20μM	0.129	0.244	0.123	0.164	1.110	0.309
GPG-NH ₂ + CQG-NH ₂ 5μM	1.605	1.749	1.737	1.866	2.814	2.206
GPG-NH ₂ + CQG-NH ₂ 20μM	0.212	0.194	0.523	0.397	1.172	0.910
GKG-NH ₂ + CQG-NH ₂ 5μM	1.684	1.717	1.725	1.848	2.778	2.949
GKG-NH ₂ + CQG-NH ₂ 20μM	1.490	1.792	1.670	1.891	2.799	2.889
GPG-NH ₂ + GKG-NH ₂ 5μM	1.652	1.743	1.628	1.999	2.777	2.659
GPG-NH ₂ + GKG-NH ₂ 20μM	0.165	0.119	0.317	0.307	0.447	0.389

*值代表光密度 (OD)

表 5

实验 4- (从 Bachem 获得的肽)

第 7 天的 RT 第 10 天的 RT

三肽	HIV-1	HIV-1 (1:5)
不含肽的对照	3.288*	1.681
GPG 5 μ M	2.970	1.107
GPG 15 μ M	0.894	0.095
GPG 45 μ M	0.177	0.034
GPG 100 μ M	0.150	0.033
GKG 5 μ M	3.303	1.287
GKG 15 μ M	3.551	1.530
GKG 45 μ M	3.126	0.410
COG 5 μ M	2.991	1.459
COG 15 μ M	2.726	1.413
COG 45 μ M	3.124	1.364
GPG-NH ₂ + GKG-NH ₂ 5 μ M	2.266	0.438
GPG-NH ₂ + GKG-NH ₂ 15 μ M	0.216	0.044
GPG-NH ₂ + COG-NH ₂ 5 μ M	2.793	0.752
GPG-NH ₂ + COG-NH ₂ 15 μ M	0.934	0.110
GKG-NH ₂ + COG-NH ₂ 5 μ M	3.534	1.305
GKG-NH ₂ + COG-NH ₂ 15 μ M	3.355	2.013
GPG-NH ₂ + GKG-NH ₂ + COG-NH ₂ 5 μ M	2.005	0.545
GPG-NH ₂ + GKG-NH ₂ + COG-NH ₂ 15 μ M	0.851	0.110

*值代表光密度 (OD)

表 6

实验 5 - (现制备的肽)

三肽 (μM)	p24 (OD)	p24 (pg/ml)	降低 (%)
第 7 天 HIV-1			
不含肽的对照	1.093×10^2	3.94×10^4	0
GPG-NH ₂ (20)	1.159	4.21×10^2	99
GPG-NH ₂ (100)	0.508	1.60×10^2	100
GPG-NH ₂ (300)	0.557	1.80×10^2	100
GKG-NH ₂ (100)	0.566×10^1	1.83×10^3	95
GKG-NH ₂ (300)	1.08	3.88×10^2	99
GKG-NH ₂ (1000)	0.79	2.73×10^2	100
CQG-NH ₂ (100)	1.51×10^1	5.62×10^3	86
CQG-NH ₂ (300)	0.59×10^1	1.92×10^3	95
CQG-NH ₂ (1000)	0.91	3.20×10^2	99
组合的*	0.65	2.17×10^2	100
第 14 天 HIV-1			
不含肽的对照	0.46×10^4	1.41×10^6	0
GPG-NH ₂ (20)	1.12×10^2	4.06×10^4	97
GPG-NH ₂ (100)	1.76	6.63×10^2	100
GPG-NH ₂ (300)	1.35	4.98×10^2	100
GKG-NH ₂ (100)	1.48×10^3	5.51×10^5	61
GKG-NH ₂ (300)	0.33×10^1	8.70×10^2	100
GKG-NH ₂ (1000)	0.11×10^1	2.40×10^2	100
CQG-NH ₂ (100)	0.48×10^4	1.47×10^6	0
CQG-NH ₂ (300)	0.11×10^2	2.40×10^3	100
CQG-NH ₂ (1000)	0.13×10^1	2.80×10^2	100
组合的*	1.01	3.61×10^2	100

*100 μM GPG-NH₂ + GKG-NH₂ + CQG-NH₂

*值代表光密度 (OD)

表 7

实验 6 - (现制的肽)

三肽 (100 μ M)		p24 (pg/ml)	降低 (%)
第 7 天	HIV-1		
	不含肽的对照	2.0×10^4	0
	GPG-NH ₂	5.6×10^2	97
	RQG-NH ₂	1.13×10^2	99
	KQG-NH ₂	1.54×10^2	99
	ALG-NH ₂	0.42×10^2	100
	GVG-NH ₂	1.5×10^4	25
	VGG-NH ₂	1.0×10^4	50
	ASG-NH ₂	1.5×10^4	25
	SLG-NH ₂	1.14×10^2	99
	SPT-NH ₂	1.5×10^4	25

小肽抑制和/或防止 HIV-1, HIV-2, 和 SIV 感染

在表 1 所列的小肽中, GPG-NH₂, GKG-NH₂, CQG-NH₂, RQG-NH₂, KQG-NH₂, ALG-NH₂, GVG-NH₂, VGG-NH₂, ASG-NH₂, SLG-NH₂ 和 SPT-NH₂ 抑制和/或防止 HIV-1 感染, GKG-NH₂, CQG-NH₂ 和 GPG-NH₂ 也显示出抑制或防止 HIV-2 和 SIV 感染。应明白, 尽管没有分析小肽 RQG-NH₂, KQG-NH₂, ALG-NH₂, GVG-NH₂, VGG-NH₂, ASG-NH₂, SLG-NH₂ 和 SPT-NH₂ 防止或抑制 HIV-2 和 SIV 感染的能力, 但由于 HIV-2 和 SIV 在小肽 GPG-NH₂, GKG-NH₂, CQG-NH₂, RQG-NH₂, KQG-NH₂, ALG-NH₂, GVG-NH₂, VGG-NH₂, ASG-NH₂, SLG-NH₂ 和 SPT-NH₂ 所相应的区域的衣壳蛋白质结构上共有明显的同源性的事实, 预期其抑制或防止 HIV-2 或 SIV 感染。

实验 1-6 的结果 (在表 2-7 和图 1 中显示) 证实相应于病毒衣壳蛋白序列、具有甘氨酸作为羧基末端氨基酸的酰胺形式的小肽 GPG-NH₂, GKG-NH₂, CQG-NH₂, RQG-NH₂, KQG-NH₂, ALG-NH₂, GVG-NH₂, VGG-NH₂, ASG-NH₂, 和 SLG-NH₂ 抑制或防止 HIV 感染。含羧基末端丙氨酸残基 (Leu-Lys-Ala

(LKA) 和 His-Lys-Ala (HKA)) 或羧基末端谷氨酰胺残基 (Gly-Pro-Gln (GPQ) 和 Ala-Cys-Gln (ACQ)) 的肽不能防止 HIV 感染。然而, 在氨基末端的甘氨酸不是抑制因子, 因为具有氨基末端甘氨酸残基的肽 Gly-Pro-Gln (GPQ), Gly-His-Lys (GHK) 和 Gly-Ala-Thr (GAT) 不能防止感染和 HIV-1 合胞体形成。另外, 具有其它不带电极性侧链 (如: Gly-Pro-Gln (GPQ), Ala-Cys-Gln (ACQ) 和 Gly-Ala-Thr (GAT)) 或在羧基末端具有非极性侧链 (例如 Ala-Arg-Val (ARV), His-Lys-Ala (HKA), Lys-Ala-Leu (KAL) 和 Leu-Lys-Ala (LKA)) 的肽不能防止感染。尽管在羧基末端的甘氨酸残基似乎与抑制 HIV 和 SIV 感染相联系, 但小肽羧基末端的其它氨基酸残基或修饰的氨基酸残基也抑制 HIV 和 SIV 感染。例如, 已显示 Ser-Pro-Thr (SPT) 抑制或防止 HIV-1 感染。

在一些实验中, 似乎小肽对 HIV-1, HIV-2 和 SIV 感染的效力具有浓度和时间依赖性。低到 5 μ M 和 20 μ M 的 GKG-NH₂, CQG-NH₂, 和 GPG-NH₂ 和其组合的浓度显示出可有效降低 HIV-1, HIV-2 和 SIV 感染。然而, 100 μ M 或更大浓度的三肽 GKG-NH₂, CQG-NH₂, 和 GPG-NH₂ 和其组合可更有效地抑制 HIV-1, HIV-2 和 SIV 感染。如表 6 所示, 以细胞上清中的 p24 抗原检测到 300 μ M 的 GKG-NH₂ 和 CQG-NH₂ 降低 HIV-1 感染性几乎 100%。表 6 中列出的降低百分数是通过将在肽处理的样品中检测到的 p24 抗原的量除以在对照样品中检测到的 p24 抗原的量, 将该被除数乘以 100 以获得百分数, 并用 100% 减去该被除数百分数计算的。例如, GPG-NH₂ 表现出的降低百分数为:

$$\frac{5.6 \times 10^2}{2.0 \times 10^4} \times 100 = 3\% \quad \text{且} \quad 100\% - 3\% = 97\%$$

在前 5 个实验 (表 2-6) 中, 显示了等于或大于 5 μ M 浓度的三肽 GKG-NH₂, CQG-NH₂, 和 GPG-NH₂ 和其组合抑制 HIV-1, HIV-2 和 SIV 感染。

在第 6 个实验 (表 7 和图 1) 中, 显示小肽 RQG-NH₂, KQG-NH₂, ALG-NH₂, GVG-NH₂, VGG-NH₂, ASG-NH₂, SLG-NH₂ 和 SPT-NH₂ 以 100 μ M 有效抑制和/或防止 HIV-1 感染。如表 7 中所示, 在上清中以衣壳蛋白 p24 的量进行

测量时,用小肽 RQG-NH₂, KQG-NH₂, ALG-NH₂, 和 SLG-NH₂ 可实现几乎 100% 的病毒降低。表 7 中所示的 p24 降低百分数按上面表 6 中所述计算。尽管 GVG-NH₂, VGG-NH₂, ASG-NH₂, 和 SPT-NH₂ 在 100 μ M 时抑制或防止 HIV-1 感染的效力较小,但相信在较高浓度时该三肽更有效。表 2-7 和图 1 所示的实验 1-6 提供的数据证实相应于病毒衣壳蛋白序列的小肽在大范围的浓度内是有效的抗病毒剂。

为了更好地了解小肽介导的病毒抑制,对 DNA 合成, RNA 合成, 和蛋白质表达进行了一些试验。这些实验在下面讨论。

小肽在 DNA 合成, RNA 合成, 和蛋白质表达之后的阶段抑制病毒感染

为了研究原病毒 DNA 和病毒 RNA 合成,在各种时间点(0-48h)制备小肽存在的条件下培养的 HIV-1 感染 H-9 细胞的 DNA 和 RNA。Southern 印迹分析揭示了在 GPG-NH₂ 存在的条件下合成 HIV-1 DNA 且在前 24 小时期间在各种浓度(0-2,000 μ M)的小肽存在的条件下原病毒 DNA 的量几乎相等。这些结果证实诸如 GPG-NH₂ 等小肽对 HIV-1 进入和 DNA 合成没有抑制效应,且与小肽不抑制 HIV-1 逆转录酶活性的发现一致。

经过 Northern 印迹分析,在感染后 24-48 小时检测到三条 RNA 带(9.2, 4.3, 2.0kb)。9.2kb RNA 既充当基因组 RNA,又充当 gag 和 pol 基因的 mRNA。4.3kb 单次剪接的 RNA 代表至少有 env 基因,多次剪接的 2kb RNA 编码调控基因。20 μ M 的 GPG-NH₂ 在感染后达 48h 对这些 RNA 的表达没有抑制效应。200 μ M 和 2000 μ M 时,感染后 48h 注意到 HIV-1 RNA 的减少,这很可能反映了对第二个复制循环的抑制。这些结果支持小肽在转录步骤时不能抑制 HIV-1 复制,也不能影响转录子的剪接。

在设计用于测定在小肽存在时 HIV-1 是否正确表达蛋白质的实验中,观察到对蛋白质表达或修饰没有明显影响。然而,在一个实验中,观察到 gp160/gp120 在聚丙烯酰胺凝胶上的异常迁移。在 GPG-NH₂ 存在时(20 μ M 或更大),观察到 gp160 和/或 gp120 在聚丙烯酰胺凝胶上的电泳位置代表略小于 120,000Da 的分子量。该结果不可重复且在 gag-蛋白质 p17 或 p24 的迁移中没有观察到变化。在 GPG-NH₂ 存在时分析病毒蛋白质糖基化的试验显示对 N-或 O-连接的糖基化没有影响。另外,对重组(在痘苗病

毒中)产生的 gp160 的糖基化不受 GPG-NH₂ 的影响。而且,发现 GPG-NH₂ 不影响 HIV-1 特异性蛋白酶的活性。

在上述实验中,证实了小肽在 HIV 复制循环的晚期干扰 HIV 的感染性。GPG-NH₂ 不能破坏 DNA 合成, RNA 合成, 蛋白质合成和蛋白质糖基化。在下面说明书中,公开了诸如 GPG-NH₂, GKG-NH₂, CQG-NH₂, RQG-NH₂, KQG-NH₂, ALG-NH₂, GVG-NH₂, VGG-NH₂, ASG-NH₂, SLG-NH₂ 和 SPT-NH₂ 等小肽在复制循环晚期抑制病毒感染的更多证据,且在广义上提供了用于筛选其它小肽和其衍生物抑制诸如 HIV 或 SIV 感染等病毒感染的能力的另一技术。因此,下面讨论了一些电子显微镜检实验,其中在含有和不含小肽的条件下培养 HIV-1 感染的细胞。

小肽干扰核壳的装配

一旦发现了小肽 GPG-NH₂, GKG-NH₂, CQG-NH₂, RQG-NH₂, KQG-NH₂, ALG-NH₂, GVG-NH₂, VGG-NH₂, ASG-NH₂, SLG-NH₂ 和 SPT-NH₂ 抑制 HIV 感染,可使用电子显微镜检术进一步分析用小肽培养的 HIV 感染的细胞。(见附图 2, 3, 和 4)。如图 4 所示,电子显微镜分析揭示了与 GPG-NH₂ 接触阻碍了正确的病毒核壳形成。

在这组实验中,用 HIV-1 SF-2 病毒以 300TCID₅₀ 在 37℃ 下感染 HUT78 细胞 1 小时。随后,按实施例 2 所述,洗涤和沉淀感染细胞 3 次。之后,细胞重悬于补充了 10% FBS, 抗生素(100u/ml)和 polybrene(3.2μg/ml)的 RPMI 培养基中。在感染后 3, 5 或 7 天以 1μM 或 10μM 的浓度向细胞培养物中加入 GPG-NH₂。对样品施加 0.5μM Ritonavir(蛋白酶抑制剂)。

培养细胞到第 14 天,此时,细胞用常规方法在 2.5%戊二醛中固定。然后将固定的细胞在 1% OsO₄ 中后固定并脱水,用环氧树脂包埋,使包埋块聚合。制备大约 60-80nm 厚的病毒感染细胞的环氧树脂切片以容纳核壳宽度。切片固定在载网上,用 1.0%乙酸双氧铀染色并以 80kV 的加速电压在 Zeiss CEM 902 显微镜中分析。显微镜装配有分光计以提高成像质量,使用液氮冷却井以减少光束损伤。在一些双盲试验中检查具有对照和 GPG-NH₂ 培养的细胞的切片的载网。

对未处理的 HIV 颗粒的电子显微镜检揭示了特征性圆锥形核壳和在

核壳长度内伸展的被包围的均匀染色的 RNA。（见图 2）。相反，图 3 提供了两个电子显微照片，显示了在病毒蛋白酶抑制剂 Ritonavir 存在下产生的一些 HIV-1 颗粒。用 Ritonavir 处理的感染细胞表现出没有可分辨的核壳的畸形结构，与预期一样。（见图 3）。图 4 提供的电子显微照片显示了在 GPG-NH₂ 存在下产生的病毒颗粒。用 GPG-NH₂ 处理的具有 HIV-1 颗粒的细胞表现出具有可分辨的衣壳结构的 HIV-1 颗粒，不同于 Ritonavir 处理的颗粒。更具体地说，在一些三肽处理的病毒颗粒中，圆锥形衣壳结构似乎相当完整，但 RNA 以球形形状积累在衣壳外部或在衣壳顶部（宽末端）。另外，一些衣壳观察到具有形态很少或不类似于正常核壳的畸形结构，可见 RNA 在结构外部或在结构内部的一端。从这些试验可清楚地知道小肽干扰核壳的正确形成和在不同于蛋白酶抑制剂 Ritonavir 作用的阶段发生衣壳形成的抑制。

当用 p24 作为靶生物分子进行结合试验时揭示了诸如 GPG-NH₂, GKG-NH₂, CQG-NH₂, RQG-NH₂, KQG-NH₂, ALG-NH₂, GVG-NH₂, VGG-NH₂, ASG-NH₂, SLG-NH₂ 和 SPT-NH₂ 的酰胺形式的三肽干扰衣壳装配的更多证据。下面提供了 p24 结合试验的详情。

小肽结合主要衣壳蛋白质 (p24)

进行实验直接研究小肽是否具有与成熟衣壳蛋白 (CA) 或 p24 相互作用并因此干扰核壳形成的能力。在这组实验中，进行 p24 结合试验评估放射标记的 GPG-NH₂ 结合 p24 的能力。

使用具有小于 10kD 孔径的透析膜进行基于透析的结合试验。（Slide-A-Lyzer, Pierce）。将 50 微升 10 μ M 的重组蛋白质 p24 和 gp120（AIDS 计划，NCIB 惠赠）和 BSA（Sigma）贮液导入分开的透析膜中，用由 150mM NaCl 和 50mM Tris-HCl, pH7.4 缓冲液，和 27.5M 的 ¹⁴C-GPG-NH₂（Amersham Ltd. UK）组成的 500ml 溶液 4 $^{\circ}$ C 下透析蛋白质 2 天。随后，取出 10 或 5 微升等分试样的透析 p24, gp120 和 BSA 并与在闪烁瓶中的 3ml ReadySafe（Beckman）混合。然后经过闪烁计数检测 C¹⁴。

在表 8 中，提供了代表性的透析实验的结果。值得注意的是，在透析平衡时观察到 p24 与 GPG-NH₂ 缔合。与 p24 缔合的放射性 GPG-NH₂ 的量比

缓冲液中大约 7.5 倍。相反，相对于在透析缓冲液中存在的量，没有可注意量的放射性 GPG-NH₂ 与 gp120 或 BSA 结合。这些结果证明了诸如 GPG-NH₂ 等小肽与 p24 结合且通过这种相互作用阻碍正常的核壳形成。

表 8

样品	透析缓冲液	p24	gp120	BSA
μCi/ml	1.816	13.712	1.745	1.674
缓冲液倍数	1.000	7.551	0.961	0.922

在下面的说明书中，提供了诸如 GPG-NH₂, GKG-NH₂, CQG-NH₂, RQG-NH₂, KQG-NH₂, ALG-NH₂, GVG-NH₂, VGG-NH₂, ASG-NH₂, SLG-NH₂ 和 SPT-NH₂ 等小肽以不同于 AZT 或 Ritonavir 抑制这些病毒的方式的机制抑制 HIV 和 SIV 感染的进一步证据。

小肽抑制对 AZT 或 Ritonavir 有抗性的 HIV-1 株

小肽具有抑制对核苷类似物 AZT 或蛋白酶抑制剂 Ritonavir 有抗性的 HIV-1 株的能力。在外周血单核细胞 (PBMC) 中培养 HIV-1 抗性分离物并收集上清作为病毒原种。在 PBMC 上进行 TCID₅₀ (50% 组织培养物感染剂量) 滴定且按照 Reed 和 Muench 的公式计算滴度。经过在 37°C 吸附 1 小时用 25 TCID₅₀ 的这些病毒 (HIV-1 SF162 用作对照) 感染 400,000 个 PBMC, 然后洗涤三次。细胞重悬于不含药品 (drug) 或者含有 GPG-NH₂ (100 μM), AZT (5 μM), 或 Ritonavir (0.1 μM) 的培养基中并在 37°C, 潮湿的 CO₂ 中培养。每 4 天更换培养基且以 ELISA 监测上清中的 HIV-1 p24 抗原蛋白质 (表 9)。

如表 9 所示, GPG-NH₂ 对 AZT 或 Ritonavir 抗性 HIV 株具有有效的抗病毒效应。该实验中的结果证实了上面提供的数据且证明小肽在不同于 AZT 和 Ritonavir 的阶段抑制 HIV 复制。另外, 按 Vahlne 等的美国专利号 5627035 所公开的方法 (本文引用其全文作为参考) 用 GPG-NH₂ 进行对 HIV “街道病毒株” 的治疗。由于也来自 HIV 病毒蛋白的序列, 因此肽 GKG-NH₂, CQG-NH₂, RQG-NH₂, KQG-NH₂, ALG-NH₂, GVG-NH₂, VGG-NH₂, ASG-NH₂, SLG-NH₂ 和 SPT-NH₂ 在 AZT 和 Ritonavir 抗性 HIV 感染, 以及 HIV 街道病

毒株的治疗中都是有用的。

表 9

类型	编号	对照 (%)	GPG 100 μ M (降低%)	AZT 5 μ M (降低%)	Rito ^b 0.1 μ M (降低%)
低 AZT	p7261	130000* (0)	< 500 (100%)	< 500 (100%)	nt
中 AZT	p7163	107000 (0)	< 500 (100%)	22200 (79%)	nt
高 AZT	p7227	114000 (0)	< 500 (100%)	68000 (40%)	nt
低 PI	p7300	146000 (0)	< 500 (100%)	nt ^a	64000 (56%)
高 PI	p7141	114000 (0)	< 500 (100%)	nt	98000 (14%)

*HIV-1 p24 值以 pg/ml 表示且是感染后 14 天进行的双份实验的平均值。

^a 未检测

^bRitonavir

低 AZT: 具有对 AZT 低抗性的分离物。

中 AZT: 具有对 AZT 中等抗性的分离物。

高 AZT: 具有对 AZT 高抗性的分离物。

低 PI: 具有对蛋白酶抑制剂低抗性的分离物。

高 PI: 具有对蛋白酶抑制剂高抗性的分离物。

为了进一步支持上面提供的数据, 对在其 V3 环缺乏 GPG-基序的 HIV-1 突变体进行一些 HIV-1 感染性实验。下面详细描述的这些实验支持 GPG-NH₂ 介导的 HIV-1 抑制以不依赖 V3 环的方式发生。HIV-1 env 糖蛋白 gp120 的 V3 环在可能涉及病毒复制的环顶端含有保守的 GPG 序列。为了

确定 GPG-NH₂ 是否经过扰乱 V3 环相互作用来抑制 HIV-1 感染, 构建了 V3 环 HIV-1 突变的原病毒。试验了这种不含 GPG 结构域的突变原病毒在感染性试验中感染细胞的能力并经过免疫细胞化学和电子显微镜检术进行分析。下面的实施例描述了突变原病毒的构建, HIV-1 感染性的试验, 以免疫细胞化学和电子显微镜检术对突变病毒颗粒的结构测定, 和 GPG-NH₂ 抑制突变病毒颗粒感染的发现。

实施例 3

使用分子生物学的常规技术构建基于感染性克隆 pBRu-2 的 GPG-缺失的原病毒。使用大肠杆菌 DH5 α 和 NM522 mutS 用于亚克隆, 诱变和质粒 DNA 的扩增。puc 18 质粒用作亚克隆的载体, 含有全长有复制能力的 HIV-1/Bru 克隆 (也称为 LAV, LAI) 的 HIV-1 原病毒克隆 pBRu-2 用于产生突变病毒。

编码 env 基因的来自 pBRu-2 的 2.7-kb SalI 至 BamHI 片断亚克隆进 puc18 载体的 SalI 和 BamHI 位点。使用 U. S. E. 诱变试剂盒 (Pharmacia) 经过定点诱变实现 GPG 缺失。需要两个寡核苷酸。诱变寡核苷酸是 5' 磷酸化的 CGT ATC CAG AGG AGA GCA TTT GTT ACA ATA GG-3' (从瑞典 Scandinavian Gene Synthesis AB, Stockholm 获得)。选择性寡核苷酸是 5' 磷酸化的 GTG CCA CCT GTC GAC TAA GAA ACC AT-3' 且设计为在 puc18 载体中去掉单一限制性位点 AatII。因此, 经过用相应的核酸内切酶 AatII 消化从野生型和突变 DNA 的混合物中选择性清除野生型 DNA。诱变反应产物转化进大肠杆菌中以扩增质粒 DNA。使用自动激光荧光 ALFTM DNA 测序仪 (Pharmacia) 经过 DNA 的聚合酶链式反应 (PCR) 测序证实突变。然后将编码 GPG 的寡核苷酸缺失的 SalI-BamHI 片断克隆进 pBRu-2 以产生原病毒质粒。扩增一些细菌菌落的突变 DNA 并使用 QIAGEN 质粒试剂盒纯化。将其中的两个, mp8 和 mp10 的 DNA 转染进细胞。

使用 DEAE-葡聚糖方法将野生型 DNA 和突变型 DNA, mp8 和 mp10 转染进 Hela, HUT₇₈ 或 MT-2 细胞中。(Palmer 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:1932-1936(1988))。简单地说, 转染前 24 小时制备 10⁶ 个细胞。然后,

取出培养基并用预温的磷酸盐缓冲的盐水 (PBS) 洗涤一次并用 TBS-D (Tris 缓冲的盐水 - 0.1%葡萄糖) 洗涤一次。将大约 0.5 μ g DNA 与 TBS-D/DEAE-葡聚糖混合并加入细胞中, 随后在 37 $^{\circ}$ C 下培养 30 分钟。然后取出溶液并用 TBS-D 洗涤细胞一次和用 PBS 洗涤一次。细胞与 5ml 补充了 10% 血清和 5 μ g 氯奎二磷酸的预温的培养基混合并在 37 $^{\circ}$ C 下培养 1 小时, 接着用无血清培养基洗涤三次。最后, 细胞在 10ml 培养基中维持并在 37 $^{\circ}$ C 下培养 4 天。

收集含病毒的上清, 通过 0.45 μ m 孔径过滤器过滤以去除任何细胞, 分成等分试样并在 -70 $^{\circ}$ C 作为病毒原种保存。经过用病毒的系列稀释液感染 MT-2 细胞进行病毒的滴定。100 微升的病毒上清的各 5 倍系列稀释液用作 200,000 个 MT2 细胞的接种物。吸附 16 小时后, 洗涤细胞 5 次并重悬于 24 孔板 (Costar 公司) 的 1.5ml 培养基中。在感染后 4, 7, 和 11 天更换培养基并在第 14 天试验上清中的 p24 生产。按照 Reed-Muench 的公式计算 50% 的组织培养物感染剂量 (TCID₅₀) 终点。(Reed 和 Muench, 美国卫生学杂志 (Am. J. Hygiene), 27: 493 - 497 (1938))。

繁殖 CD4⁺ T-细胞系 MT-2, C91-PL, C8166, CEM, HUT₇₈, H9, Jurkat 和 Molt-3, 单核细胞细胞系 U937, 和 THP-1 并在补充了 10% (v/v) 加热灭活的胎牛血清 (GIBCO), 青霉素 (100u/ml) 和链霉素 (100u/ml) 的 RPMI1640 培养基 (GIBCO) 中维持。Hela 细胞在补充了 2% FBS, 0.8% 葡萄糖和抗生素的含 Hank's 盐的培养基 199 中生长。

经过 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心纯化外周血单核细胞 (PBMC) 并在感染前用植物凝集素 (KEBO Lab) 在按上述添加的 RPMI1640 培养基中刺激 3 天。从按 Rormanani 等, 实验医学杂志 (J. Exp. Med.), 180: 83 - 93 (1994) 所述经过附着到塑料上从单核细胞分级分离物中纯化血液单核细胞, 从单核细胞产生树突细胞 (DC)。简单地说, 按上述纯化血液单核细胞, 在 RPMI 培养基中进行向组织培养瓶的贴壁 2 小时, 然后用 PBS 洗去未贴壁的细胞。在含有 GM-CSF (25u/ml) 和 IL-4 (4.5u/ml) 的培养基中培养贴壁细胞 7 天, 然后用病毒感染。

对细胞系 MT-2, C91-PL, C8166, CEM, HUT₇₈, H9, Jurkat, Molt-3,

U937, THP-1, PBMC 和树突细胞 (DC) 进行感染。对于 CD4⁺ 细胞系, 用野生型或突变型病毒以 100 TCID₅₀ 在 37℃ 下培养 200,000 个细胞 16 小时, 然后洗涤 5 次, 重悬于补充了 10% FBS, 抗生素和 Polybrene (Sigma, 2μg/ml) 的 1.5ml 新鲜 RPMI 培养基中并在 24 孔板中在 37℃ 下潮湿的 5% CO₂ 中培养。对于 PBMC, 使用 500,000 个细胞并在补充了 proleukin (Eurocetus, 150u/ml), 氢化可的松 (Sigma, 5μg/ml) 和 Polybrene (Sigma, 2μg/ml) 的 RPMI 培养基中培养。对于 DC, 800,000 个细胞与病毒接触 1, 16 和 48 小时, 分别在接触之后在 PBS 中洗涤 3 次并在 0.05% 胰酶中 37℃ 下温和处理 5 分钟以去掉任何表面结合的病毒, 如 Grannelli-Piperno 等, 实验医学杂志, 184: 2433-2438 (1996) 所述。作为对照, PBMC 以相同的方式与 mp8 接触。洗涤, 收集细胞并裂解以使用酚/氯仿提取法分离 DNA, 然后进行半定量 PCR 检测 LTR 序列。对 DNA 制备 10 倍系列稀释液并按以前所述使用三引物“嵌套式”构型进行 LTR PCR 40 个循环。(Hwang 等, 科学, 253: 71-74 (1991))。对于 DC-PBMC 共培养和 DC-MT-2 共培养实验, 将 250,000 个 DC 与病毒接触 16 小时, 随后洗涤 5 次直到检测不到 p24 (小于 5pg/ml)。然后用 0.05% 胰酶温和处理细胞以破坏 CD4 上的 HIV-1 结合表位并去掉任何表面结合的病毒。洗涤后, 细胞重悬于与 200,000 个 PBMC 细胞或 100,000 个 MT-2 细胞混合的 RPMI 培养基中。

对于感染实验, 在感染后 4, 7, 11, 14 和 17 天更换培养基并使用 HIV-1 p24 ELISA 试剂盒 (Abbott Laboratories, North Chicago, USA) 以 p24 水平测定病毒生长。使用 p24 测定的 ELISA 定量法在各病毒样品中定量 p24 的水平, 该测定法在每毫升 20pg 至 640pg p24 的范围内具有线性剂量反应。以多份稀释液测定所有的病毒样品并借助于回归线测定 p24 的量。从感染后培养 17 天的细胞分离 DNA 并对这些 DNA 进行 V3 区的直接测序以证实突变。

按以前 Kowalski 等, 科学, 237: 1351-1355 (1987) 所述以 APAAP (碱性磷酸酶抗碱性磷酸酶免疫复合物) 夹心技术对感染和未感染的 MT-2 细胞也进行免疫细胞化学分析。细胞在 PBS 中洗涤两次并在载玻片

上用丙酮固定 15 分钟。然后连续用第一抗体小鼠抗-HIV-1 p24, 第二抗体兔抗小鼠免疫球蛋白, 和小鼠 APAAP 单克隆抗体 (DAKO) 在 37℃ 下在潮湿培养箱中分别孵育细胞 30 分钟, 随后在 PBS 中洗涤 5 分钟。加入显色底物并在室温下培养 20 分钟后, 在 H₂O 中洗涤载玻片, 在甘油中固定并在显微镜 (放大倍数 X100) 下观察。单克隆抗体 (Mabs) 小鼠抗-HIV-1 p24 (DAKO, 1: 20 稀释), 兔抗小鼠免疫球蛋白 (1: 25 稀释), 和抗小牛肠碱性磷酸酶的小鼠 Mab 和小牛肠碱性磷酸酶的复合物 (APAAP, 1: 20 稀释) 用于免疫细胞化学试验。

另外, 对感染的细胞进行电子显微镜检。在第 7 天用 2.5% 戊二醛固定新感染的细胞并在 1% OsO₄ 中后固定。细胞进行脱水, 用环氧树脂包埋并用 1% 乙酸双氧铀染色。制备 60-80nm 厚的病毒感染细胞的环氧树脂切片。样品以 80kV 的加速电压在 Zeiss CEM 902 中分析, 该显微镜装配有分光计以提高成像质量。使用液氮冷却并以减少光束损伤。

在另一组实验中, 获得了 GPG-NH₂ 以非 V3 环抑制机制抑制 HIV-1 感染的更多证据。因此, 测定了 GPG-NH₂ 在 MT-2 细胞中抑制野生型和 V3 环缺失突变型 (GPG 域) 的感染性的能力。在这些实验中, 用 HIV-1_{bru} 野生型和 GPG-缺失突变型 mp8 和 mp10 以 25 TCID₅₀ 感染大约 200,000 个 MT-2 细胞以试验 GPG-NH₂ 的抑制效力。将 MT-2 细胞重悬于含有或不含 20μM 和 100μM 浓度的 GPG-NH₂ 且补充了 10% (v/v) 加热灭活的胎牛血清 (FBS, GIBCO), 青霉素 (100u/ml), 链霉素 (100u/ml) 和 Polybrene (Sigma, 2μg/ml) 的 1ml RPMI 1640 培养基中。随后, 在 20-30μl 体积中以 25 TCID₅₀ 加入病毒。细胞与病毒在 37℃ 下培养 16 小时, 随后以 170xg 离心 7 分钟松散沉淀。然后按上述经过以 170xg 沉淀细胞 7 分钟在不含肽的 RPMI 培养基中室温下洗涤细胞 3 次。最后一次洗涤后, 将细胞重悬于 24 孔板 (Costar 公司) 的 RPMI 培养基中并在 37℃ 下潮湿的 5% CO₂ 中维持。当在感染后 4, 7, 11 和 14 天更换培养基时收集培养物上清。为了监测病毒复制, 使用 ELISA 试剂盒 (Abbott 实验室) 测定第 7 和 14 天的上清中的 HIV-1 p24 抗原蛋白质, 其中该试剂盒在每毫升 20pg 至 640pg p24 的范围内具有线性剂量反应, 且借助于回归线可测定 p24 的量。

该实施例所述实验的、且在下面将更详细讨论的结果证实了 GPG-NH₂ 以不依赖 V3 环的方式抑制 HIV-1 感染。

小肽以不依赖 V3 环的方式抑制 HIV-1 感染

为了确定 V3 环中 GPG 缺失是否影响病毒生产, 将原病毒质粒 DNA(野生型和突变型) 转染进 CD4 阴性细胞系 Hela, 以及 CD4 阳性细胞系 MT-2 和 HUT₇₈。每天收集培养物上清并通过测量 p24 水平监测病毒生产。在 6 天时间内, 对于来自 Hela 转染的野生型病毒(WT) 和突变型观察到相似的生长方式。p24 水平保持增长直到第 4 天, 然后保持在一个平台上。因此, 突变型和野生型原病毒 DNA 在这些细胞中同等正常表达。从 HUT₇₈ 获得了相似的结果, 在这些转染的 HUT₇₈ 细胞中观察到转染子和合胞体。然而来自 MT-2 转染的 p24 生产方式明显不同于在 Hela 和 HUT₇₈ 细胞中观察到的结果。在第 4 天后 p24 生产水平仍然保持增长, 尽管用突变型病毒的原病毒 DNA 转染的细胞的 p24 生产比用野生型病毒的原病毒 DNA 转染的要低。在转染后的第 6 天, 野生型产生 1,380ng/ml p24 而 mp8 和 mp10 的 p24 生产分别是 15.8ng/ml 和 13.7ng/ml。这些结果证实产生 GPG-缺失突变体的子代病毒且可感染未转染的 CD4 + MT-2 细胞, 尽管明显不如野生型子代有效。测序来自这些转染细胞的 DNA 且证实了 mp8 和 mp10 子代都具有 GPG 缺失。

接着, 进一步分析了突变的分子克隆产生能形成感染的病毒颗粒的能力。用原病毒 DNA 转染 Hela 细胞和 MT-2 细胞并在转染 4 天后收集培养物上清, 过滤, 测定 p24 水平且将等分试样在 -70℃ 冷冻作为病毒原种。在 MT-2 细胞上进行病毒滴定(TCID₅₀)。将来自 MT-2 转染子的上清调节到含有相同量的 p24, 野生型病毒产生 83,300 TCID₅₀/ml 而突变体 mp8 和 mp10 分别生产 16,700 和 25,000 TCID₅₀/ml, 比野生型病毒获得的少大约 5 倍。与 Hela 转染子上清 p24 生产较低一致, 它们产生的滴度也低得多, 野生型和突变型分别是 70 和 10 TCID₅₀/ml。因此, 尽管突变病毒仍具有感染性, 但 V3 中 GPG 基序的缺失降低了在这些细胞中的病毒毒力。通过感染 MT-2 细胞并监测子代病毒的产生进一步检验了这一点。来自 Hela 和 MT-2 转染的病毒原种用于感染 MT-2 细胞(来自 MT-2 转染子上清

的 100 TCID₅₀ 野生型或突变型病毒，来自 Hela 转染子原种的 5 TCID₅₀ 病毒)。细胞与病毒培养 16 小时，然后洗涤。随后，重悬细胞并在 37℃ 下培养。经过测量 p24 水平和致细胞病变效应监测病毒复制。对于来自 MT-2 转染子的病毒，野生型 (WT) 以及突变型病毒 (mp8 和 mp10)，都以 p24 生产显示出病毒复制。野生型在感染后第 11 天达到 2,150ng/ml 的 p24 峰值水平，而突变型病毒表现出延迟大约 4 天，对于 mp8 和 mp10 分别在感染后第 14 天达到 1,580ng/ml 和 1,760ng/ml 的 p24 峰值。用来自 Hela 转染子的病毒感染的 MT-2 细胞 (5 TCID₅₀) 也出现 WT 和突变型 p24 的生产，相似于用 MT-2 细胞产生的病毒获得的生长动力学。从所有感染的细胞分离 DNA 且经过 V3 测序证实突变，表明突变体病毒的生长不是由于回复成野生型序列或吸收了野生型序列。

在 WT 和突变体感染的 MT-2 细胞中也观察到合胞体形成。细胞培养物在感染 7 天后固定并用于使用 APAAP 夹心技术进行免疫细胞化学。感染的细胞被免疫染色并产生红色。在 WT 和突变体病毒感染的 MT-2 细胞中都观察到合胞体，尽管 WT 诱导的合胞体 (感染 4 天后) 比突变体 (感染 6 天后) 更早。电子显微镜检 (EM) 进一步揭示，突变病毒感染的 MT-2 细胞产生 HIV-1 颗粒。可见具有特征性锥形核心的 HIV-1 颗粒。这些数据证实 GPG 缺失的突变体病毒在 MT-2 细胞中有感染性。

当进行评估 GPG-NH₂ 在 MT-2 细胞中抑制野生型和 V3 环缺失突变型 (GPG 域) 感染性的能力的实验时，获得了 GPG-NH₂ 以不同于 V3 环相互作用的机制抑制病毒感染的结论性证据。在感染后第 7 天和 14 天，可见野生型和突变型病毒感染大量下降。见表 10。在 20μM 和 100μM 时，GPG-NH₂ 有效降低野生型感染和用 GPG 缺失构建体 mp8 和 mp10 介导的感染。事实上，在感染后第 7 天和 100μM GPG-NH₂ 时，对于野生型，mp8 和 mp10 观察到同样的病毒感染性的完全降低。这些结果表明 GPG-NH₂ 以不依赖于与 V3 环 GPG 域相互作用的机制抑制 HIV-1 感染。

表 10

第 7 天					
	p24 pg/ml				
	对照	GPG 20 μ M	下降%	GPG 100 μ M	下降%
WT	33800	23900	29	3390	90
mp8	3170	2420	24	208	93
mp10	3120	1560	50	173	94
第 14 天					
WT	357000	223000	38	181000	49
mp8	148000	69100	53	7410	95
mp10	470000	51500	89	47700	90

本文提供的数据表明具有修饰羧基末端的小肽抑制病毒感染（例如，HIV-1, HIV-2 和 SIV 感染），结合 p24，且阻碍正常衣壳装配。上面详细描述了许多试验可用于鉴定任何小肽，修饰的小肽，寡肽或肽模拟物预防或抑制 HIV 或 SIV 感染的的能力。相似的技术可用于鉴定任何小肽，修饰的小肽，寡肽或肽模拟物预防或抑制其它病毒感染的的能力。

由于已知一些病毒衣壳蛋白的序列，因此设计，生产和鉴定防止不同病毒衣壳正确装配的酰胺形式的小肽是容易的。例如，一些病毒衣壳蛋白含有 20 个氨基酸长的同源性区域，称为主要同源性区域（MHR），它存在于许多癌病毒和慢病毒的羧基末端域内。（见图 5）。图 5 显示了 HIV-1 的羧基末端域（残基 146-231）且比较了该序列与其它病毒的衣壳蛋白序列，其中的一些病毒感染鸟类，小鼠和猴。值得注意的是，发现在这些病毒衣壳蛋白的序列中有相当大的同源性。研究者观察到羧基末端域是 HIV-1 中衣壳二聚体化和病毒装配所必需的。（Gamble 等，科学 278: 849 (1997)，本文引用以供参考）。尽管在本说明书中描述的试验中表现出抗病毒活性的小肽全部或部分相应于 HIV-1, HIV-2 或 SIV 羧基末端域的区域，但病毒 N-末端域的区域对于衣壳装配也是重要的，因此设计和合成全部或部分相应于病毒衣壳蛋白 N-末端区域的氨基酸的小肽也是本发明的合适的实施方案。然而，使用全部或部分相应于病毒衣壳蛋

白 MHR 区域和羧基末端域内的氨基酸的小肽是本发明优选的实施方案。

本发明人已显示了全部或部分相应于三种不同病毒衣壳蛋白序列的酰胺形式的一些新型小肽有效抑制和/或预防这些病毒的感染。本文采用的策略可用于产生全部或部分相应于其它病毒衣壳蛋白序列的酰胺形式的其它小肽。例如,通过设计和生产相应于图 5 中公开的序列区域的小肽,寡肽,和/或肽模拟物,可使用上面讨论的筛选技术或本领域技术人员显而易见的这些试验的改良形式迅速鉴定抑制 HIV, SIV, RSV, HTLV-1, MMTV, MPMV 和 MMLV 感染的新分子。另外,许多其它病毒衣壳蛋白的序列是已知的,例如,沙粒病毒,轮状病毒,环状病毒,逆转录病毒,乳头瘤病毒,腺病毒,疱疹病毒,副粘病毒,粘液病毒和嗜肝 DNA 病毒科的成员。可选择全部或部分相应于这些序列的一些小肽,寡肽,和/或肽模拟物并通过使用本文所述的病毒感染试验和/或电子显微镜检技术,或者在本说明书的教导下对本领域的技术人员显而易见的这些试验的改良形式迅速筛选以鉴定有效抑制和/或预防病毒感染的那些肽试剂。

合适的实施方案是包括具有修饰羧基末端,用于阻碍衣壳装配和抑制病毒感染的小肽(大于一个氨基酸且小于或等于 10 个氨基酸长)。优选的是,使用具有在 HIV 或 SIV 衣壳中发现的序列的二肽,三肽,寡肽和相应的肽模拟物。例如,本发明的寡肽可具有 4 个氨基酸,5 个氨基酸,6 个氨基酸,7 个氨基酸,8 个,9 个或 10 个氨基酸且本发明的肽模拟物可具有类似于 4 个,5 个,6 个,7 个,8 个,9 个或 10 个氨基酸的结构。合适的寡肽也可包括在三肽 GPG-NH₂, GKG-NH₂, CQG-NH₂, RQG-NH₂, KQG-NH₂, ALG-NH₂, GVG-NH₂, VGG-NH₂, ASG-NH₂, SLG-NH₂ 和 SPT-NH₂ 中发现的全部或部分序列。优选的是,类似于二肽,三肽和寡肽的肽模拟物也相应于在 GPG-NH₂, GKG-NH₂, CQG-NH₂, RQG-NH₂, KQG-NH₂, ALG-NH₂, GVG-NH₂, VGG-NH₂, ASG-NH₂, SLG-NH₂ 和 SPT-NH₂ 中发现的序列。优选的是小肽在其羧基末端(CO-NH₂)具有调节基团(例如,酰胺基)而不是羧基(COOH)。也可使用在其羧基末端具有其它调节基团的小肽,但合适的是,附着的调节基团与酰胺基团具有相同的电荷和立体行为。(参见 Vahlne 等的美国专利号 5,627,035,比较羧基末端具有不同取代基的肽的试验)。在一些实施方

案中，在小肽的任一端加上乙酰基或甲基以提高小肽的摄取或防止外切蛋白酶消化或同时实现这两者是合适的。

在下面说明书中，提供了制备含有二肽，三肽，小于或等于 10 个氨基酸的寡肽和类似于三肽和小于或等于 10 个氨基酸的寡肽的肽模拟物（统称为“肽试剂”）的生物技术工具和药用组合物的一些方法。应注意术语“肽试剂”包括二肽，三肽，和小于或等于 10 个氨基酸的寡肽。例如，“肽试剂”是 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 或 10 个氨基酸的肽和类似于 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 或 10 个氨基酸的肽的肽模拟物。另外，“肽试剂”是如下所述作为多聚体或多聚化试剂提供的 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 或 10 个氨基酸的肽或类似于 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 或 10 个氨基酸的肽模拟物。

合适的生物技术工具或预防剂或治疗剂的组分以获得对诸如 HIV-1, HIV-2 或 SIV 的病毒有足够亲和力或抑制的形式或方式提供肽试剂。尽管天然单体肽试剂（例如，表现为各携带仅一个结合表位的肽试剂的分离单位）足以结合壳粒蛋白，例如 p24，和/或干扰衣壳装配和/或防止诸如 HIV-1, HIV-2, 或 SIV 感染等病毒感染，但合成配体或多聚体配体（例如，表现为具有一些结合表位的肽试剂的多个单位）具有大得多的结合壳粒蛋白，例如 p24，和/或干扰衣壳装配和/或防止诸如 HIV-1, HIV-2, 或 SIV 感染等病毒感染的能力。应注意术语“多聚体 (multimeric)”是指存在一个以上单位的配体，例如一些单个分子的三肽，寡肽，或肽模拟物，它不同于术语“多聚化 (multimerized)”，多聚化是指存在连接成单个分离单元的一个以上的配体，例如，串联连接的一些三肽，寡肽或肽模拟物分子。

多聚体支持物和多聚化配体的制备

通过将三肽，寡肽或肽模拟物偶连到大分子支持物上可获得结合壳粒蛋白，例如 p24，和/或干扰衣壳装配和/或抑制诸如 HIV-1, HIV-2, 或 SIV 感染等感染的多聚体试剂（合成的或天然的）。本文使用的术语“支持物”包括载体，树脂或用于附着，固定或稳定肽试剂的任何大分子结构。固体支持物包括，但不限于，反应盘的孔壁，试管，聚苯乙烯珠，磁珠，

硝酸纤维素条，膜，微粒例如乳胶颗粒，绵羊（或其它动物）红血细胞，人工细胞和其它。术语支持物也包括载体，可理解为药剂制备中的该术语。

大分子支持物可具有疏水表面，它以疏水非共价相互作用与肽试剂的一部分相互作用。支持物的疏水表面也可以是聚合物，例如塑料或连接了疏水基团的任何其它聚合物，例如，聚苯乙烯，聚乙烯或聚乙烯类。作为替代，肽试剂可共价结合到包括蛋白质和寡聚/多聚糖（例如，纤维素，淀粉，糖原，脱乙酰壳多糖或胺化 sepharose）的载体上。在后面这些实施方案中，可使用诸如羟基或氨基等肽试剂上的反应基团与载体上的反应基团连接以产生共价键。支持物也可以具有与肽试剂相互作用的带电表面。另外，支持物可具有能被化学激活的其它反应基团以便附着肽试剂。例如，溴化氰活化的基质，环氧活化的基质，硫和硫丙基凝胶，氯甲酸硝基苯基酯和 N-羟基琥珀酰亚胺氯甲酸键接，和环氧乙烷丙烯酸支持物在本领域中是常用的。

支持物也可包含无机载体，例如，硅氧化物材料（例如，硅胶，沸石，硅藻土或胺化玻璃），肽试剂通过羟基，羧基或氨基和载体上的反应基团共价连接到其上。而且，在一些实施方案中，脂质体或脂双层（天然的或合成的）预期可作为支持物，肽试剂以脂质体工程技术附着到膜表面或掺入膜中。在一种方法中，脂质体多聚体支持物含有暴露在双层表面的肽试剂和将肽试剂锚着到脂双层上的第二域。锚着点可由疏水氨基酸残基组成，类似于已知的跨膜域，或可包含以常规技术附着到第一域上的神经酰胺。

用于身体的支持物或载体（即，用于预防或治疗应用）是生理学上合适的，无毒的，且优选无免疫反应性。用于身体的预期载体包括多聚-L-赖氨酸，多聚-D, L-丙氨酸，脂质体和 Chromosorb®（Johns-Manville Products, Denver Co.）。已在人体中试验了配体连接的 Chromosorb®（Synsorb-Pk）对溶血性尿毒症综合征的预防且报道为不出现副反应。（Armstrong 等，传染病杂志（J. Infectious Diseases），171: 1042 - 1045（1995））。对于有些实施方案，本发明人预期施用具有附着受试者身体内的肽试剂的能力的“裸露”载体（即，不含附着的肽试剂）。

在该方法中，预期进行“前药型”疗法，其中与肽试剂分开施用裸露载体，一旦两者均存在于受试者身体中，载体和肽试剂装配成多聚体复合物。

预期也可在肽试剂和支持物之间插入适当长度的接头，例如 λ 接头，以便肽试剂具有更大的灵活度，从而克服由支持物产生的任何空间障碍。通过在本说明书中详细描述试验中筛选有各种接头的肽试剂可确定允许最佳结合壳粒蛋白，例如 p24，和/或干扰衣壳装配和/或抑制诸如 HIV-1, HIV-2, 或 SIV 感染等病毒感染的接头的合适长度。

含有一个以上类型的肽试剂的复合支持物也是一个实施方案。“复合支持物”可以是载体，树脂，或用于附着或固定两个或多个不同如下肽试剂的任何大分子结构，所述的肽试剂与诸如 p24 等壳粒蛋白结合，和/或干扰衣壳装配和/或抑制病毒感染，例如 HIV 或 SIV 感染。在一些实施方案中，预期脂质体或脂双层（天然的或合成的）用于构建复合支持物且使用脂质体工程技术将肽试剂附着到膜表面或掺入膜中。

如上所述，预期也可在肽试剂和支持物之间插入适当长度的接头，例如 λ 接头，以便在分子中具有更大的灵活度，从而克服可能产生的任何空间障碍。经过在本说明书中详细描述试验中筛选有各种接头的配体可确定允许最佳结合壳粒蛋白，例如 p24，和/或干扰衣壳装配和/或抑制诸如 HIV 或 SIV 感染等病毒感染的接头的合适长度。

在本发明的其它实施方案中，上面讨论的多聚体和复合支持物可附着到多聚化的配体上以便分别产生“多聚化-多聚体支持物”和“多聚化-复合支持物”。例如，可经过使用分子生物学的常规技术串联偶连两个或多个肽试剂获得多聚化的配体。配体的多聚化形式对于许多应用是具有优势的，因为可获得具有与诸如 p24 等壳粒蛋白结合，和/或干扰衣壳装配和/或抑制病毒感染，例如 HIV 或 SIV 感染的更好能力的试剂。另外，在组成多聚化试剂的各个域之间插入诸如柔性 λ 接头等接头或间隔子是具有优势的实施方案。例如，在蛋白质结合域之间插入适当长度的 λ 接头可使得在分子中具有更大的柔性且可克服空间障碍。类似地，在多聚化配体和支持物之间插入接头可促进柔性更大且限制由支持物产生的空间障碍。通过在本说明书中详细描述试验中筛选有各种接头的配体可确定允许最

佳结合 p24 和/或干扰衣壳装配和/或抑制 HIV 或 SIV 感染的接头的合适长度。

在优选的实施方案中，使用三肽 GPG-NH₂, GKG-NH₂, CQG-NH₂, RQG-NH₂, KQG-NH₂, ALG-NH₂, GVG-NH₂, VGG-NH₂, ASG-NH₂, SLG-NH₂ 和 SPT-NH₂ 产生上述各种类型的支持物。也优选使用三肽 GPG-NH₂, GKG-NH₂, CQG-NH₂, RQG-NH₂, KQG-NH₂, ALG-NH₂, GVG-NH₂, VGG-NH₂, ASG-NH₂, SLG-NH₂ 和 SPT-NH₂ 构建统称为“支持物结合的试剂”的多聚体支持物，复合支持物，多聚化-多聚体支持物，或多聚化-复合支持物。

在下面的讨论中，描述了具有治疗和/或预防应用的本发明的一些实施方案。

治疗和预防应用

本文描述的单体和多聚体肽试剂适合于作为避免诸如 HIV 或 SIV 感染等病毒感染的预防措施或作为治疗已被诸如 HIV 或 SIV 等病毒感染的受试者的治疗剂来治疗受试者。尽管可用该肽作为预防剂治疗任何人，但最合适的受试者是存在病毒感染风险的人。该受试者包括，但不限于，同性恋者，妓女，静脉内药物使用者，血友病人，感染病毒的母亲出生的儿童，和那些与病人或生物学样品接触的医学职业的人员。

可按照盖仑药剂学的常规方法加工药理学上有活性的本发明的化合物以产生药用剂用于给患者，例如包括人类的哺乳动物给药。肽试剂可经过和不经修饰掺入药用制品中。另外，生产按一些途径递送肽试剂或编码小肽的核酸序列的药剂或治疗剂是一个实施方案。例如，但不用作限制，具有通过阻碍衣壳装配来抑制病毒复制的小肽的编码序列的 DNA, RNA, 和病毒载体是可预期的。编码所需肽试剂的核酸可单独或与肽试剂组合给药。

可采用与常规赋形剂混合的本文所述的化合物，即，赋形剂是适合于肠胃外，肠道（例如，口服）或局部应用的与肽试剂无有害反应的药用上可接受的有机或无机载体物质。合适的药用上可接受的载体包括，但不限于，水，盐溶液，乙醇，阿拉伯胶，植物油，苯甲醇，聚乙二醇，明胶，糖类（例如乳糖，直链淀粉或淀粉），硬脂酸镁，滑石，硅酸，粘性石蜡，

香料油，脂肪酸甘油单酯和甘油二酯，季戊四醇脂肪酸酯，羟基甲基纤维素，聚乙烯吡咯烷酮，等。可灭菌药用制品且如果需要，与例如润滑剂，保存剂，稳定剂，润湿剂，乳化剂，用于影响渗透压的盐，缓冲液，染色，调味和/或芳香物质等与活性化合物无有害反应的辅剂混合。如果需要，它们也可与其它活性试剂，例如，维生素组合。

在一些实施方案中，含有肽试剂的治疗剂与治疗病毒感染，例如 HIV 感染的其它治疗剂结合用药，以便获得更好的病毒反应。目前，有 4 种不同类型的药品在临床上用于人类 HIV-1 感染的抗病毒治疗。它们是 (i) 核苷类似物逆转录酶抑制剂 (NRTIs)，例如齐多夫定，拉米夫定，双脱氧胸苷，去羟肌苷，abacavir，和扎西他滨；(ii) 核苷酸类似物逆转录酶抑制剂，例如 adetovir 和 pivaxir；(iii) 非核苷逆转录酶抑制剂 (NNRTIs)，例如，efavirenz，奈韦拉平，和 delavirdine；和 (iv) 蛋白酶抑制剂，例如 indinavir，nelfinavir，ritonavir，沙奎那韦，和 amprenavir。通过同时使用 2，3，或 4 种不同类型的药品结合肽试剂的给药，HIV 形成抗性的可能性较小，因为克服不同类型的药品和肽试剂的多重突变在同一病毒颗粒中出现的可能性较小。

因此本发明优选的实施方案是肽试剂与核苷类似物逆转录酶抑制剂，核苷酸类似物逆转录酶抑制剂，非核苷逆转录酶抑制剂和蛋白酶抑制剂以本领域的技术人员已知的剂量和方法结合给药。含有本发明的肽试剂和核苷类似物逆转录酶抑制剂，核苷酸类似物逆转录酶抑制剂，非核苷逆转录酶抑制剂和蛋白酶抑制剂的药物也是本发明的实施方案。

在下面提供的实施例中可发现用 GPG-NH₂ 与常规抗病毒剂结合治疗 HIV 感染的效果的研究。

实施例 4

在本实施例中，提供了试验酰胺形式的小肽与 AZT 的不同组合以确定两种化合物是否能互补抑制 HIV-1 复制的实验。(见图 6)。因此，用 HIV-1 SF-2 病毒以 25 TCID₅₀ 在含有或不含有不同浓度的 GPG-NH₂，AZT 或 Ritonavir(“Rito”)及这些化合物的组合的条件下感染 200,000 个 HUT₇₈

细胞。图 6 所示的数字代表抑制化合物的微摩尔浓度。用病毒与各种抑制剂在 37℃ 下培养细胞 1 小时，随后洗涤 3 次。接着，细胞重悬于含有抗病毒剂和/或肽且补充了 10% (v/v) 加热灭活的胎牛血清 (FBS, GIBCO)，青霉素 (100u/ml)，链霉素 (100u/ml) 和 Polybrene (Sigma, 2μg/ml) 的 RPMI 1640 培养基中并在 24 孔板 (Costar 公司) 中 37℃ 下潮湿的 5% CO₂ 中培养。每 4 天收集培养物上清并更换培养基直到感染后第 14 天。为了监测病毒复制，使用商业上可获得的试剂盒 (Abbott) 测定上清中的 HIV-1 p24 抗原蛋白质。

观察到在 AZT 存在下 GPG-NH₂ 协同增强对 HIV-1 复制的抑制，而该小肽仅表现出与蛋白酶抑制剂 Ritonavir 的抗病毒效力叠加。尽管如此，这些实验证实了上面提供的数据，即小肽以不同于核苷类似物和蛋白酶抑制剂干扰病毒复制的方式的机制抑制 HIV-1。另外，这些实验证实了包含小肽和 AZT 和/或 Ritonavir 的针对 HIV-1 感染的新治疗方法是有效的。

在下面的说明书中，提供了给药的剂量和方法。

给药的剂量和方法

具体肽试剂制剂用药的有效剂量和方法根据不同患者和疾病的阶段，以及本领域的技术人员已知的其它因素进行变化。用细胞培养物或实验动物中的标准药理学方法可测定该化合物的治疗效果和毒性，例如 ED₅₀ (在群体的 50% 中治疗上有效的剂量) 和 LD₅₀ (对群体的 50% 的致死剂量)。毒性与治疗效果的剂量比是治疗指数，可表示为 LD₅₀/ED₅₀ 比。优选表现出较大治疗指数的药用组合物。从细胞培养试验和动物试验获得的数据用于配制一定范围的剂量用于人类用途。该化合物的剂量优选位于包括具有很小或无毒性的 ED₅₀ 的循环浓度范围内。该剂量依赖于采用的剂量形式，患者的敏感性和用药途径在该范围内变动。

由不同医生根据所要治疗的病人来选择精确剂量。可调节剂量和给药以提供足够水平的活性部分或维持所需效力。可考虑的其它因素包括疾病症状的严重性，患者的年龄，体重和性别；饮食，给药时间和频率，药品组合，反应敏感性，和对治疗的耐受性/反应。短期作用药物组合物可每天给药，而长效药用组合物可每 2, 3 到 4 天，每周，或每 2 周一次给药。

根据具体制剂的半寿期和清除速率，本发明的药用组合物可每天给药一次，两次，3，4，5，6，7，8，9，10或更多次。

正常剂量依赖于给药途径可从大约1到100,000微克，直到大约10克总剂量之间变动。合适的剂量包括250 μ g, 500 μ g, 1mg, 50mg, 100mg, 150mg, 200mg, 250mg, 300mg, 350mg, 400mg, 450mg, 500mg, 550mg, 600mg, 650mg, 700mg, 750mg, 800mg, 850mg, 900mg, 1g, 1.1g, 1.2g, 1.3g, 1.4g, 1.5g, 1.6g, 1.7g, 1.8g, 1.9g, 2g, 3g, 4g, 5g, 6g, 7g, 8g, 9g 和 10g。另外，在以局部形式施用肽试剂的实施方案中肽试剂的浓度可以很高。在一些实施方案中可以使用肽试剂的摩尔浓度。局部用药和/或覆盖医疗设备的合适浓度范围为从100 μ M到800mM。这些实施方案中优选的浓度范围为从500 μ M到500mM。例如，用于局部用药和/或覆盖医疗设备的优选浓度包括500 μ M, 550 μ M, 600 μ M, 650 μ M, 700 μ M, 750 μ M, 800 μ M, 850 μ M, 900 μ M, 1mM, 5mM, 10mM, 15mM, 20mM, 25mM, 30mM, 35mM, 40mM, 45mM, 50mM, 60mM, 70mM, 80mM, 90mM, 100mM, 120mM, 130mM, 140mM, 150mM, 160mM, 170mM, 180mM, 190mM, 200mM, 300mM, 325mM, 350mM, 375mM, 400mM, 425mM, 450mM, 475mM, 和 500mM。在文献(参见, 例如, 美国专利号 4, 657, 760; 5, 206, 344; 或 5, 225, 212)和下文中提供了关于具体剂量和传递方法的指南。

更具体的说，本文所述的肽试剂的剂量是提供足够肽试剂以达到包括结合诸如p24等壳粒蛋白，和/或干扰衣壳装配和/或抑制诸如HIV和SIV感染等病毒感染在内的所需效果的剂量。因此，肽试剂的剂量优选产生大约0.1 μ M到500mM的组织或血液浓度或两者。合适的剂量产生大约1到800 μ M的组织或血液浓度或两者。优选的剂量产生大于大约10 μ M到大约500 μ M的组织或血液浓度。例如，优选的剂量是实现10 μ M, 15 μ M, 20 μ M, 25 μ M, 30 μ M, 35 μ M, 40 μ M, 45 μ M, 50 μ M, 55 μ M, 60 μ M, 65 μ M, 70 μ M, 75 μ M, 80 μ M, 85 μ M, 90 μ M, 95 μ M, 100 μ M, 110 μ M, 120 μ M, 130 μ M, 140 μ M, 145 μ M, 150 μ M, 160 μ M, 170 μ M, 180 μ M, 190 μ M, 200 μ M, 220 μ M, 240 μ M, 250 μ M, 260 μ M, 280 μ M, 300 μ M, 320 μ M, 340 μ M, 360 μ M, 380 μ M, 400 μ M, 420 μ M, 440 μ M, 460 μ M, 480 μ M, 和 500 μ M的组织或血液浓度所需要的小

肽量。尽管产生大于 800 μ M 的组织浓度的剂量不是优选的，但它们可用于本发明的一些实施方案中。也可提供肽的连续输注以维持按血液水平测量的组织中的稳定浓度。

由于肽的低毒性可维持更高的组织浓度而无损害。选择小肽抗性 HIV-1 株（例如，GPG-NH₂ 抗性株）的尝试至今没有成功。在 GPG-NH₂ 的系列稀释液（限制性稀释）存在的条件下传代 HIV-1 株 HTLV-IIIIB 超过 6 个月没有形成体外抗性的明显迹象。

肽试剂的给药途径包括，但不限于，局部，经皮肤，肠胃外，胃肠道，经支气管，和经肺泡用药。通过局部施用含有肽的乳剂，凝胶，漂洗液等可实现局部给药。通过施用能使得肽试剂穿透皮肤并进入血流的乳剂，漂洗液，凝胶等可实现经皮肤给药。肠胃外给药途径包括，但不限于，电的或直接注射，例如直接注射进中央静脉管中，静脉内，肌肉内，腹膜内或皮下注射。胃肠道给药途径包括，但不限于，吞食和直肠给药。经支气管和经肺泡给药途径包括，但不限于，经口腔或鼻内吸入。

适合于局部应用的含肽试剂化合物的组合物包括，但不限于，生理学上可接受的植入物，软膏，乳剂，漂洗液，和凝胶。肽至少最低限度可溶于其中的任何液体，凝胶，或固体，药用上可接受的基质都适合于本发明的局部使用。局部应用的组合物在性交期间防止 HIV 传播时特别有用。用于该用途的合适的组合物包括，但不限于阴道或肛门栓剂，乳剂和灌洗液。

适合于经皮肤给药的肽试剂的组合物包括，但不限于直接施用到皮肤上或掺入诸如经皮肤装置（“经皮肤的膏药”）等保护性载体上的药用上可接受的悬液，油，乳剂，和软膏。合适的乳剂，软膏等的例子可参见例如《医生桌面参考书》（Physician's Desk Reference）且在本领域是已知的。合适的经皮肤装置的例子在，例如，Chinen 等的 1989 年 4 月 4 日出版的美国专利号 4,818,540 中描述，本文引用以供参考。

适合于肠胃外给药的肽试剂的组合物包括，但不限于药用上可接受的无菌等渗溶液。该溶液包括但不限于用于注射进中央静脉管，静脉内，肌肉内，腹膜内或皮下注射肽试剂的盐水和磷酸盐缓冲盐水。

适合于经支气管和经肺泡给药的肽试剂的组合物包括，但不限于用于

吸入的各种类型的气雾剂。例如，戊烷眯经气雾剂鼻内施用给 AIDS 病人以防止由 *pneumocystis carinii* 引起的肺炎。适合于经支气管和经肺泡施用肽试剂的装置也是实施方案。该装置包括但不限于喷雾器和汽化器。容易改装各种形式的通常可获得的喷雾器和汽化器用于传递肽试剂。

适合于胃肠道给药的肽试剂的组合物包括，但不限于用于吞食的药用上可接受的粉末，丸剂或液体和用于直肠给药的栓剂。由于是 HIV 感染最常用的途径且使用方便，因此胃肠道给药，特别是口服是本发明优选的实施方案。已制备具有三肽 (GPG-NH₂) 的 500 毫克胶囊且发现贮存于 4℃ 时最少 12 个月是稳定的。正如以前在其它病毒-宿主系统中所显示的，小肽的特异性抗病毒活性可在口服用药后在血清中检测。(Miller 等，应用微生物学，16: 1489 (1968))。由于小肽明显可避免被病人消化系统降解，因此口服给药是理想的。

该肽试剂也适合于用于预防 HIV 感染较重要的情况。例如，医护人员经常接触 HIV 阳性病人和其分泌物及体液含 HIV 病毒的病人。另外，肽试剂可配制成在性交期间使用以防止 HIV 传播的抗病毒组合物。该组合物在本领域中是已知的且也在 Modak 等的 1990 年 5 月 3 日以 PCT 公开号 W090/04390 公开的国际申请中进行了描述，本文引用其全文以供参考。

本发明的方面还包括覆盖医用装备，例如手套，被单，和工作台面防止 HIV 传播。作为替代，肽试剂可浸渍进聚合医用装置中。特别优选的是用作医用手套和避孕套的覆盖物。以含有肽的粉末或以肽试剂悬浮于其中的聚合覆盖物提供适用于医疗装置的覆盖物。用于覆盖物或装置的合适的聚合材料是生理学上可接受的材料且通过该材料可扩散治疗有效量的肽试剂。合适的聚合物包括，但不限于，聚氨基甲酸酯，聚甲基丙烯酸酯，聚酰胺，聚酯，聚乙烯，聚丙烯，聚苯乙烯，聚四氟乙烯，聚氯乙烯，乙酸纤维素，硅弹性体，胶原蛋白，丝等。例如，该覆盖物在 Fox 等的 1986 年 9 月 16 日出版的美国专利号 4,612,337 中进行了描述，本文引用其全文以供参考。

在下面的说明书中，提供了对小肽的一些毒理学试验且公开了试验其它肽试剂毒性的方法。

小肽的毒理学试验

已进行了对 GPG-NH₂ 的一些毒理学试验且可使用更多肽（例如，GKG-NH₂, CQG-NH₂, RQG-NH₂, KQG-NH₂, ALG-NH₂, GVG-NH₂, VGG-NH₂, ASG-NH₂, SLG-NH₂ 和 SPT-NH₂）重复这些试验。（参见，例如，Vahlne 等的美国专利号 5, 627, 035）。下面的实施例提供了 GPG-NH₂ 对培养的淋巴细胞的影响。

实施例 5

在本实施例中，提供了描述小肽对培养的淋巴细胞的影响的一些毒理学试验。一般来说，以细胞形态学外观，锥虫蓝染色和细胞生长确定，在 HIV-1 病毒抑制试验中使用的且以达到 2mM 的浓度试验的肽中对所用的细胞没有一个表现出任何毒性效应。在 (i) 噬斑减少试验和 (ii) HSV-1 产量抑制试验中进一步试验了 GPG-NH₂ 的毒性。GPG-NH₂ 在浓度达到 1mM 时不能减少 HSV-1 复制，这不仅证实了其缺乏毒性，而且证实了小肽选择性抑制 HIV 相关病毒。GPG-NH₂ 也不能抑制流感病毒或脊髓灰质炎病毒的结果证实了这一点。

接着，检查了对正常人淋巴单核细胞 (PBMC) 的毒性。以高到 2mM 的剂量且接触长达 4 天时，GPG-NH₂ 对培养的单核细胞和淋巴细胞的活力没有可觉察到的影响。还试验了 GPG-NH₂ 对人单核细胞的体外增殖反应的影响。以 20 μ M 的剂量时 GPG-NH₂ 表现出对 T 细胞勉强的（如果有的话）直接抗增殖特性且不影响副卫细胞（例如，单核细胞和树突细胞）的功能。

还测定了各种细胞系的体外 50% 细胞毒性的浓度 (CC₅₀)。因此，将高达 40mM 的不同浓度的 GPG-NH₂ 加入 T-细胞系 HUT₇₈, H9, CEM-SS, MT-2 和（非）诱导的 ACH-2, 以及巨噬细胞衍生的细胞系 Jurkat-tat III, THP-1 和（非）诱导的 U-1 细胞的培养基中。培养 3 天后计数细胞数。HUT₇₈, MT-2 和 Jurkat-tat III 的锥虫蓝染料排斥和细胞计数显示出存在 40mM GPG-NH₂ 时 3 天的培养物的细胞生长有大约 40% 抑制。在该 GPG-NH₂ 浓度时，H9, CEM-SS, 和 THP-1 显示出细胞数减少不超过 20%。因此，体外 CC₅₀/IC₅₀ 比率 > 10⁴。上面提供的毒理学实验证明小肽即使在高浓度时也只

具有对淋巴细胞的低毒性。

还分析了大剂量的小肽对啮齿类的影响，这些实验在下一个实施例中提供。

实施例 6

在本实施例中，提供了给啮齿类大剂量施用小肽的一些体内毒理学试验的结果。在第一个实验中，将大剂量的小肽单次递送给小鼠并分析毒性效应。以高达每千克体重 1g 的浓度在成年小鼠尾静脉进行静脉内注射 GPG-NH₂ 对动物不产生明显的毒性效应。在第二个实验中，将一些剂量的各种量的小肽在几乎三周内递送给小鼠。小鼠组（每组 5 只小鼠）在 6 日龄开始接受 GPG-NH₂（分别为每千克体重每天 0.01, 0.1 和 1g）的腹膜内注射。每天注射持续 18 天。与对照相比，GPG-NH₂ 对小鼠没有明显的影响。在类似实验中，通过丹麦 Scantox A/S 进行 GPG-NH₂ 的 4 周毒理学试验。以每千克体重每天达到 1g 的剂量给大鼠口服施用 GPG-NH₂ 28 天。观察到对动物没有毒性迹象。这些体内毒理学实验证实本文所述的小肽对哺乳动物具有低毒性且可以安全地大剂量提供。

在进一步的研究中，分析了小肽在人血液和血浆中的稳定性。下面的实施例描述了这些实验。

实施例 7

本实施例描述了在人血液和血浆中进行小肽稳定性评估的一些试验。因此，新鲜抽取人血清并用 EDTA 处理。经过以 2,500rpm 离心 20 分钟分离血浆。向血液或血浆中以 10mM 或 50mM 的浓度加入 GPG-NH₂，接着在 37℃ 下分别孵育 1, 2 和 4 小时。作为对照，将 GPG-NH₂ 加入补充了 10% (v/v) 加热灭活的胎牛血清 (FBS, GIBCO)，青霉素 (100u/ml)，链霉素 (100u/ml) 和 Polybrene (Sigma, 2μg/ml) 的 RPMI 1640 培养基中并以相同的方式孵育。37℃ 培养后，以 2,500rpm 离心含有 GPG-NH₂ 的血液 20 分钟以分离血浆。用 5mM 浓度的 CaCl₂ 37℃ 处理一些血浆样品 10 分钟，随后以 13,000rpm 离心 30 分钟且上清称为 CaCl₂ 处理的血浆。然后所有含有

GPG-NH₂的血浆样品在 RPMI 培养基中稀释以产生 20μM 或 100μM GPG-NH₂ (500 倍稀释) 的终浓度, 然后用于 HIV-1 复制试验。

复制试验在 HUT₇₈ 细胞上进行且使用 HIV-1 SF-2 病毒株。简单的说, 将大约 200,000 个细胞重悬于含有稀释的 GPG-酰胺的培养基, 血浆, 或来自血液的血浆中。含有 GPG-NH₂ 的培养基, 血浆, 或来自血液的血浆与细胞在 37°C 下培养 1 小时, 2 小时或 4 小时。随后, 以 25 TCID₅₀ 加入 SF-2 病毒。吸附 1 小时后, 在 RPMI 培养基中洗涤细胞 3 次, 然后重悬于合适的含有 GPG-酰胺的血浆中并在 37°C 下潮湿的 5% CO₂ 中培养。每 4 天收集培养物上清且直到感染后第 14 天更换培养基。为了监测病毒复制, 使用商业上可获得的试剂盒 (Abbott) 测定上清中的 HIV-1 p24 抗原蛋白。对来自感染后第 7 天和第 14 天的上清进行 HIV-1 p24 测定。观察到含有 GPG-NH₂ 的培养基, 血浆, 或来自血液的血浆抑制 HIV-1 的能力没有明显的区别。

以薄层色谱法 (TLC) 化学测定了人血浆中 GPG-NH₂ 的稳定性。(见图 7)。在该实验中, ¹⁴C GPG-NH₂ 与人血浆在 37°C 下培养 30 分钟, 2 小时, 或 8 小时, 然后以 TLC 分离蛋白质并经过将色谱对放射自显影胶片曝光来进行观察。如图 7 所示 (泳道 Hp0, Hp0.5, Hp2 和 Hp8), 观察到小肽迁移率略有改变。尽管在人血浆中 37°C 孵育 30 分钟后小肽的迁移率有些增加, 但在达到 8 小时时观察到迁移率不再改变。对 TLC 斑的质谱分析 (电喷射分析) 证实, 包括迁移率提高的斑点的所有斑点都是 GPG-NH₂。上述实验证明本文所述的小肽在人血液和血浆中稳定; 它们保持其抗病毒特性, 且不被血浆蛋白酶降解。

在下面的说明书中, 提供了小肽的吸收, 分布, 和代谢的一些实验。

小肽的吸收, 分布, 和代谢

由于需要口服施用含有小肽的药剂, 因此通过将 ¹⁴C-标记的 GPG-NH₂ 在 50mM KCl 和 0.1M HCl 的溶液中孵育不同时间期限来评估小肽的酸稳定性。酸水解后, 以薄层色谱法 (TLC) 分析放射标记的三肽, HPTLC 板用 25% 甲醇: 25% 异丙醇: 15% 丁醇: 35% (0.1N HOAc 和 0.1N NaOAc) 走色谱。如图 8 中所见, 孵育三肽达 24 小时不影响迁移率, 因此不影响

GPG-NH₂ 的分子结构。该结果证实小肽在相似于胃中所见的酸性条件下存活。

另外, 在一系列实验中研究了培养基中的小肽体外摄取进细胞。因此, 用 165nCi (相当于 0.7 μ M 的 GPG-NH₂) 的 ¹⁴C-标记的 GPG-NH₂ 培养 HUT₇₈, Jurkat-tat III, 和 MT-2 细胞。观察小肽的摄取, 且 8% (Jurkat-tat III 细胞) 和 20% (HUT₇₈ 细胞) 之间的 GPG-NH₂ 掺入细胞。该结果证实了小肽掺入一些细胞类型中是有效的。

另外, 在大鼠中分析了小肽的体内吸收。大鼠喂食 ¹⁴C GPG-NH₂ 且在各时间点后从动物收集血液, 尿和组织样品。喂食 8 小时后的尿样和喂食 30 分钟, 2 小时和 8 小时后取出的大鼠血浆在 TLC 板上分离, 如图 7 所示 (因此命名为尿 8, rp0.5, rp2, 和 rp8)。进行试验前尸体剖检后的所有组织在 -20 $^{\circ}$ C 保存。从分析的各器官的三个不同位置收集 10 至 30 微克的组织样品, 随后器官组织在 250 μ l 的组织溶解剂 (OptiSolv, LKB-Wallac) 中 45 $^{\circ}$ C 溶解 4 至 6 小时。经过加入 50 μ l 30% H₂O₂ 和 100 μ l 异丙醇脱色匀浆的组织溶液, 之后加入 3ml 0.05M HCl 酸化的闪烁混合物 (Luma Gel, Lumac/3M)。用 β 闪烁计数器 (LKB-Wallac 1218 Rack Beta) 测定放射性。经过用一份血浆和两份乙醇沉淀, 接着在 -70 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时并在 4 $^{\circ}$ C 下以 20,000xg 离心 15 分钟收集血浆中游离/未结合的 GPG-NH₂。血细胞样品用 PBS 稀释 (以 2 份血细胞与 1 份 PBS 的比率), 之后取样 10 μ l 混合物并作为组织样品进行分析。定量前将 5 到 20 μ l 的血浆和尿样与 3ml Ready Safe (Beckman) 液体直接混和。表 10 和 11 显示了分布的结果和最大吸收计算的基础。值以 nCi 表示。

表 11

动物号*	1	2	3	4	5	平均
nCi/ml 或 g 组织						
脑	48	34	31	30	33	35
肾	450	491	467	446	477	466
肝脏	599	413	454	507	503	495
脾	383	428	414	195	413	366
胸腺	366	288	290	338	372	331
血细胞	90	81	99	95	101	93
血浆	140	126	121	142	124	130
尿	5,846	5,068	6,841	4,557	5,986	5,660
总尿	7,016	7,096	3,284	283	2,395	4,015

*动物 4 小时后处死。

表 12

动物号*	6	7	8	9	10	平均
脑	43	27	28	25	29	30
肾	255	488	461	401	468	415
肝脏	537	419	478	458	578	494
脾	307	281	257	336	285	293
胸腺	340	350	323	349	311	334
血细胞	51	72	87	71	108	78
血浆	138	123	135	129	148	135
尿	2,992	5,040	3,121	4,297	2,175	3,525
总尿	6,463	6,653	11,173	10,227	7,613	8,426

*动物 8 小时后处死。

按如下确定最大吸收的计算值。总喂食是 $800\mu\text{Ci}/\text{kg}$ 大鼠体重(每只动物总共 $160\mu\text{Ci}$)。假定 GPG-NH_2 和其代谢物在体内均匀分布, 组织中

存在的 GPG-NH₂ 是所试验动物总数的不同组织的平均计数/g 除以动物总数且乘以体重和系数 0.9。该系数用于删除血液体积，因为估计血液体积大约是平均体重的 10%。例如（来自动物 1-5 的数据），如果 5 只大鼠的总体重是 207g 且从各种组织检测到的放射性是（35 + 466 + 495 + 366 + 331）或 1,693nCi，从血液检测到的放射性是（93 + 130）或 223 nCi，在尿中检测到的放射性是 4,015nCi，小肽的最大吸收计算为：

组织：（35 + 466 + 495 + 366 + 331）/5*207*0.9=63,240 nCi

体液：血液（93 + 130）*207*0.1=4,642nCi

尿：4,015nCi

总计：（63.24+4.642+4.015）/800*0.207=0.4342，或 43% 最大吸收。

观察到在取样组织中滞留/固定的 GPG-NH₂ 及其代谢产物的相对分布在肝脏中最高，接着是肾，接着是脾，接着是胸腺，接着是脑。观察到在尿中的放射性在 4 和 8 小时之间增加了一倍。对来自 TLC 板的尿放射性斑的质谱术数据（电喷射质谱仪）表明尿中只有小部分的放射性是完整的 GPG-NH₂。（见图 7）。上面体内试验的结果证明显著量的小肽有效递送到血液，血浆和一些不同的组织。

另外，如图 9 和 10 所示，显著量的小肽在长时间内滞留在血浆成份中。在图 9 中，显示了放射性在血细胞，血浆蛋白结合的以及蛋白未结合的（游离）血浆之间的分布。图 10 中显示了从血浆成份中清除放射性。三肽 GPG-NH₂ 具有 86.5 分钟的半寿期。用两份 99.5% 的乙醇沉淀后测定蛋白质结合的放射性。从吸收和分布数据和上述 TLC 数据，计算了从血浆回收的完整 GPG-NH₂ 的最小吸收，在喂食大鼠 1 小时后，至少 1% 喂食的 GPG-NH₂ 可作为血浆中游离于蛋白质的 GPG-NH₂ 回收。

为了评估喂食了小肽的动物血浆中的生物学活性 GPG-NH₂，从进行了 4 周毒理学试验的大鼠在最后一次喂食的那天获得的血液制备血浆样品。血浆样品在 RPMI 培养基中以 1/5 稀释并施用给按上述用 HIV-1 的 SF162 株感染的 PBMC。然后经过使用商业上可获得的检测试验（Abbott）检测上清中 p24 的量监测在感染后 7, 11, 和 14 天的病毒感染性。如表 12 所

示，从用小肽处理的大鼠获得的血清保持抑制病毒感染性的能力。在一些情况下，施用少到 $10\mu\text{M}$ 的 GPG-NH₂ 在血浆中足以提供能抑制 HIV-1 复制的小肽浓度。按表 6 中计算下降百分数。这些实验的结果证实本文所述的小肽可在动物体内维持有效抑制 HIV 复制的浓度。

表 13

动物号	喂食 GPG (mg/ml)	p24 (pg/ml)	% 下降
实验 1 第 7 天			
14	0	543.0	0
34	10	93.3	82.8
53	30	24.0	95.6
73	100	174.7	67.8
第 14 天			
14	0	22678	0
34	10	1636	92.8
53	30	938	95.9
73	100	9211	59.4
实验 2 第 7 天			
16	0	321.8	0
36	10	219.2	31.9
56	30	194.3	39.6
76	100	173.5	46.1
第 14 天			
16	0	4075.4	0
36	10	4760.8	0
56	30	3574.4	12.3
76	100	2203.7	45.9
实验 3 第 7 天			
18	0	183.9	0
38	10	255.6	0
58	30	107.3	41.7
78	100	96.9	47.3
第 14 天			
18	0	7578.4	0
38	10	6700.6	11.6
58	30	6893.0	9.1
78	100	7578.4	0
实验 4 第 11 天			
13	0	242	0
33	10	170	29.8
52	30	487.4	0
71	100	51.7	78.6
实验 5 第 7 天			
15	0	304.8	0
35	10	79.6	73.9
55	30	439.3	0
75	100	60	80.3

还以柱层析分析了全血浆的蛋白质，以十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶（10%）电泳（SDS/PAGE）分离了分级分离的和粗制的蛋白质。大鼠血浆样品用大小排阻（Sephacrose G-50, Pharmacia）色谱（0.4x6cm）在10mM Tris-HCl pH8.3和50mM KCl的缓冲液中部分纯化。然后，洗脱液使用在10mM Tris-HCl pH8.3的缓冲液中逐渐递增的NaCl梯度经过阴离子交换层析分离（Sephacrose CL-6B DEAE, 0.4x6cm）。监测洗脱液并根据放射性进行合并（Ready Safe, Beckman; LKB1218, 瑞典）。具有强信号的蛋白质组分在10% SDS-PAGE上分离且随后印迹到PVDF（聚偏二氟乙烯，BioRad）膜上，接着进行Edman N-末端氨基酸测序（美国应用生物系统Procise测序仪）。

如图11所示，在喂食动物后60分钟很少观察到与蛋白质共价结合的放射性。测序标记为B1-B4的蛋白质且确定是 α -1抗胰蛋白酶（B1），pentaxin（B-2），C-反应性蛋白质（B-3），B-4不能鉴定。这些蛋白质都是在肝脏中合成的。一种解释是水解的GPG-NH₂在肝脏蛋白质合成中被再利用。这些实验证实小肽中体内被代谢掉，因为鉴定的有关蛋白质（B-1, B-2和B-3）都在肝脏中合成且在肝脏中发生小肽的水解和再利用。

尽管参照某些实施方案和实施例描述了本发明，应明白可作出各种修改而不偏离本发明的精神。因此，本发明仅受到下面权利要求书的限制。

说明书附图

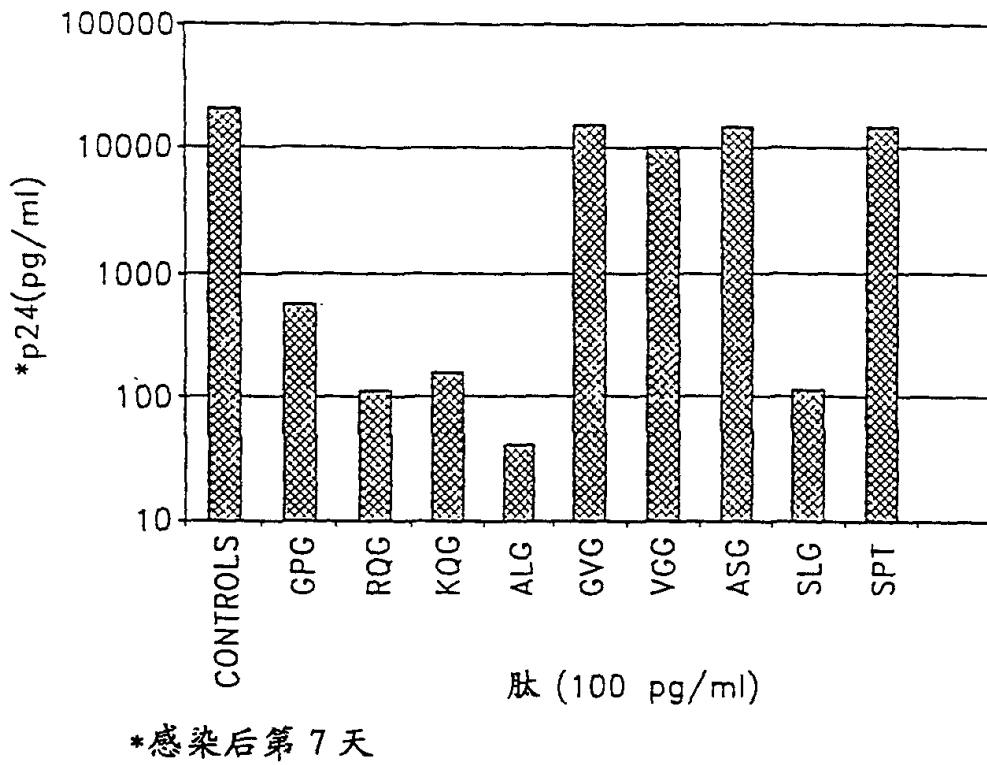


图 1

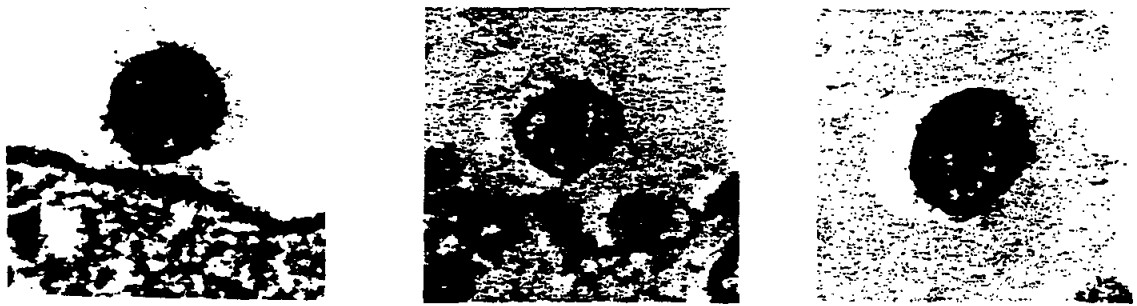


图 2

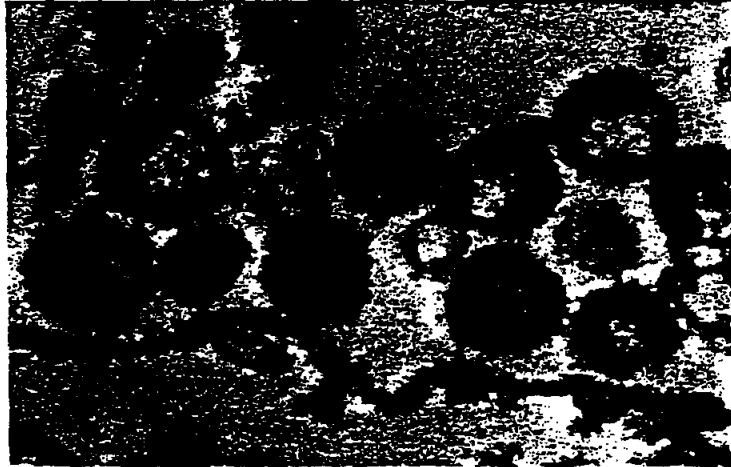


图 3



图 4

感染后第 14 天

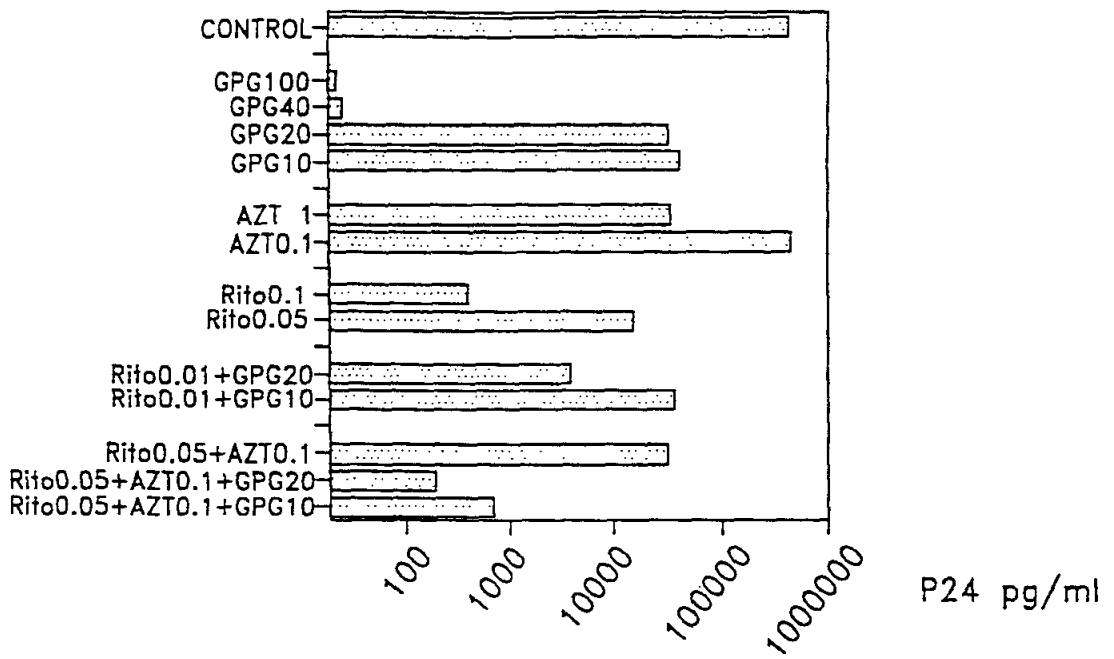


图 6

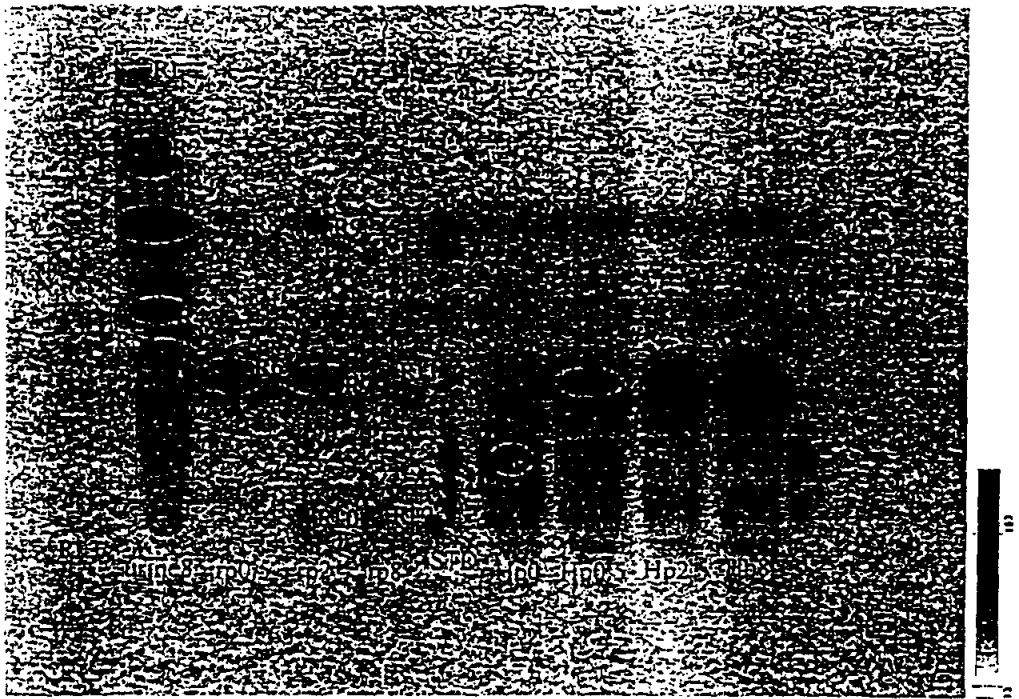


图 7

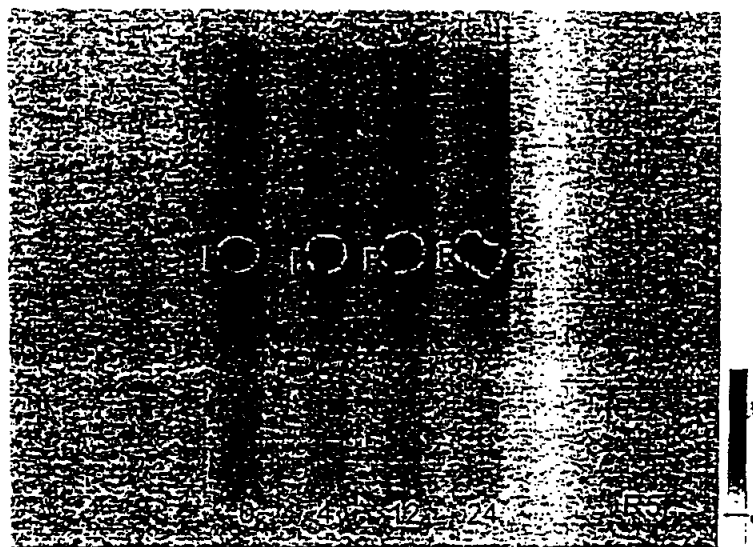


图 8

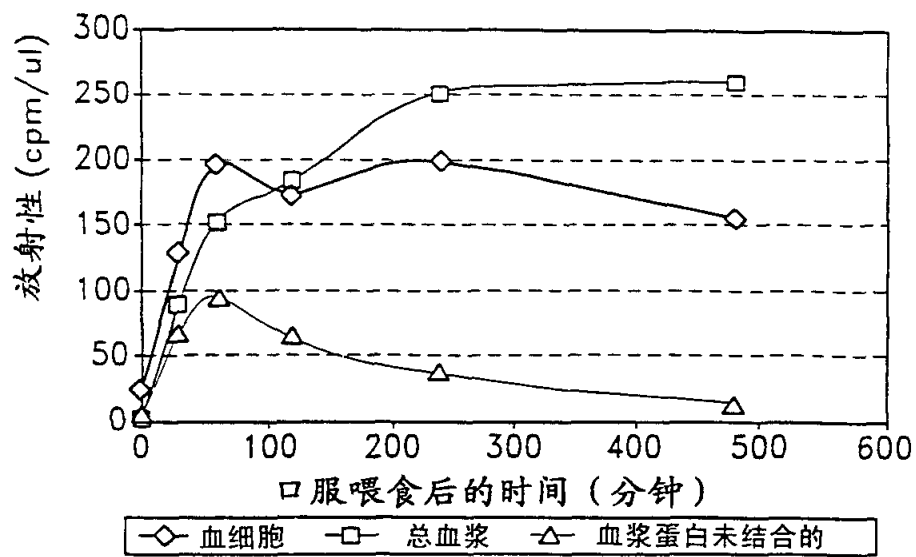


图 9

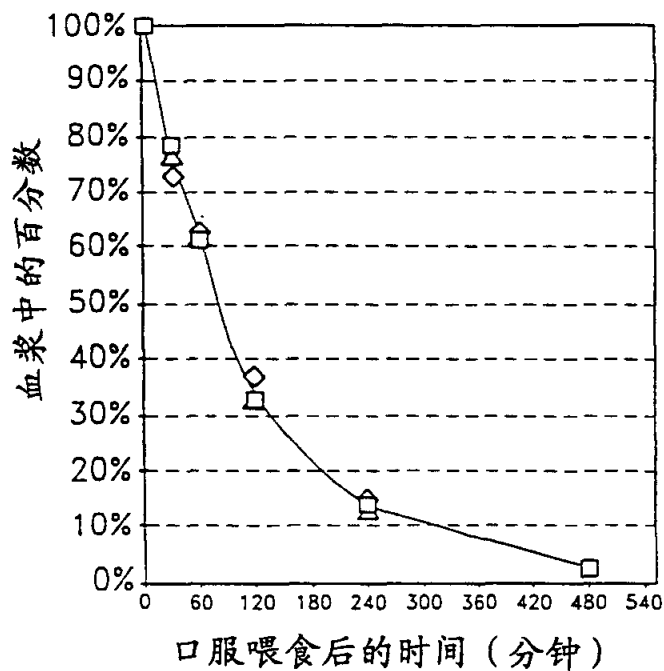


图 10

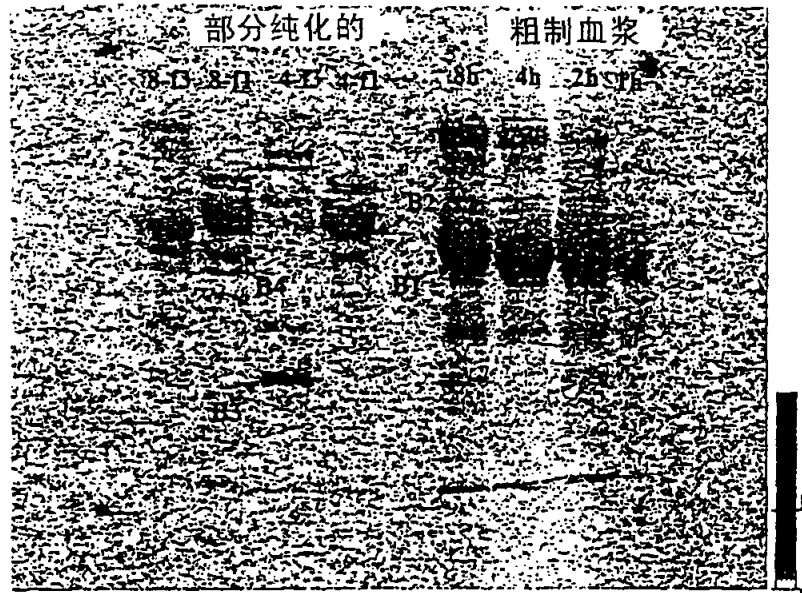


图 11

专利名称(译)	抑制病毒感染的肽及其使用方法		
公开(公告)号	CN1377275A	公开(公告)日	2002-10-30
申请号	CN00813616.5	申请日	2000-06-29
[标]发明人	A瓦赫尼		
发明人	A·瓦赫尼		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K38/06 A61K45/00 A61P31/00 A61P31/12 A61P31/18 C07K5/08 C07K14/155 C07K14/16 C12Q1/02 C12Q1/70 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/569		
CPC分类号	A61K38/00 C07K14/005 C12N2740/15022 C12N2740/16122 Y10S977/916		
代理人(译)	唐伟杰		
优先权	09/370368 1999-08-09 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了酰胺形式的肽抑制病毒感染,包括人类免疫缺陷病毒(HIV)感染的发现。还公开了肽的使用方法,包括在治疗和预防病毒感染,例如HIV感染的药物中的应用。

