

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510131580.9

[51] Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

[43] 公开日 2006年8月9日

[11] 公开号 CN 1815234A

[22] 申请日 2005.11.22

[21] 申请号 200510131580.9

[30] 优先权

[32] 2004.11.22 [33] US [31] 60/630334

[71] 申请人 香港大学

地址 香港薄扶林道

[72] 发明人 郑伯建 管轶 黄建东 何明亮

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 李波 王景朝

权利要求书 2 页 说明书 22 页 附图 12 页

[54] 发明名称

靶向引起病毒感染的 SARS 相关冠状病毒刺突蛋白上的关键位点的合成肽及其使用方法

[57] 摘要

本发明提供了, 用于定位 SARS 相关冠状病毒 (SARS - CoV) 的刺突蛋白 (S 蛋白) 上的关键部分或位点的方法, 所述部分或位点引起导致严重的急性呼吸综合征 (SARS) 的病毒感染。本发明还提供了靶向这种 SARS - CoV 的 S 蛋白的关键部分或位点的新的合成肽, 用于在受试者中预防或治疗 SARS - CoV 感染。本发明进一步提供了利用实时定量 PCR 测试抗病毒剂发挥的抗病毒活性的方法。

- 1、定位细胞中导致病毒感染的 SARS-CoV S 蛋白的位点的方法，包括在病毒感染之前用具有式：X-PTTFMLKYDENGTTTDAVDC-Z (SEQ ID NO: 2)；
- 5 X-YQDVNCTDVSTAIHADQLTP-Z (SEQ ID NO : 6) ； X-QYGSFCTQLNRALSGIAAEQ-Z (SEQ ID NO : 8) ； X-IQKEIDRLNEVAKNLNESLI-Z (SEQ ID NO: 10) 的肽或其组合接触细胞。
- 2、权利要求 1 的方法，其中所述肽是 SEQ ID NO: 6 和 SEQ ID NO: 8 的组合。
- 10 3、权利要求 1 的方法，其中所述肽位于 SARS-CoV S 蛋白氨基酸残基 259—278、598—617、737—756，或 1161—1180。
- 4、权利要求 1 的方法，其中所述肽结合于或邻近于 SARS-CoV S 糖蛋白的 ACE2 结合区域或 S1 和 S2 结构域。
- 5、权利要求 4 的方法，其中所述肽预防、抑制或减少 SARS-CoV 感染。
- 15 6、权利要求 5 的方法，其中所述肽是 SEQ ID NO: 2 并干扰 ACE2 结合位点构象变化。
- 7、权利要求 5 的方法，其中所述肽是 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8 或 SEQ ID NO: 10，并且所述肽通过模拟在 ACE2 结合诱导的构象变化之后暴露出的区域竞争性地结合到 S 蛋白单体上，来干扰包膜粒功能。
- 20 8、权利要求 7 的方法，其中所述肽在 SARS-CoV S 蛋白氨基酸残基 259—278、598—617、737—756，或 1161—1180 与 SARS-CoV S 蛋白结合。
- 9、权利要求 1 的方法，其中所述细胞来自灵长类或人类。
- 10、预防或抑制受试者中 SARS-CoV 感染的方法，包括向受试者施用有效量的药物组合物，所述药物组合物包含 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 6、SEQ
- 25 ID NO: 8、SEQ ID NO: 10，或其组合，和药学上可接受的载体。
- 11、权利要求 10 的方法，其中所述药物组合物包含 SEQ ID NO: 6 和 SEQ ID NO: 8 的组合。
- 12、权利要求 10 的方法，其中所述受试者是牛、马、羊、猪、狗、猫、啮齿动物、鸡或灵长类。
- 30 13、权利要求 10 的方法，其中所述受试者是人。

-
- 14、通过实时定量 PCR 用特异性正向引物、反向引物和荧光标记的探针来测试抗病毒剂的抗病毒活性的方法。
- 15、权利要求 14 的方法，进一步包括硫酸盐探针。
- 16、权利要求 15 的方法，其中所述硫酸盐探针是 SEQ ID NO: 15。
- 5 17、权利要求 14 的方法，其中正向引物是 SARS-CoV S 蛋白基因的 DNA 序列的片段。
- 18、权利要求 17 的方法，其中所述正向引物是 SEQ ID NO: 11。
- 19、权利要求 14 的方法，其中反向引物是 SARS-CoV S 蛋白基因的 DNA 序列的片段。
- 10 20、权利要求 19 的方法，其中所述反向引物是 SEQ ID NO: 12。
- 21、权利要求 14 的方法，其中所述荧光标记的探针是 SEQ ID NO: 13。
- 22、权利要求 14 的方法，其中所述荧光标记的探针被作为任何实时 PCR 检测系统中的报道分子的任何荧光物质标记。
- 23、权利要求 22 的方法，其中所述荧光标记的探针是 SEQ ID NO: 14。

靶向引起病毒感染的 SARS 相关冠状病毒
毒刺突蛋白上的关键位点的合成肽及其使用方法

5

本申请是 2004 年 11 月 22 日提交的美国系列号 60/630,334 的部分继续申请，并要求享有它的优先权，在此引入该申请的内容作为参考。

在本申请中，利用带括号的阿拉伯数字引用了一些出版物。由带括号的阿拉伯数字引用的参考文献的所有出处，可以在说明书的结尾、权利要求书之前
10 找到。通过这些参考文献的公开内容整体引入本申请中作为参考，来更完整地描述本发明所属领域的技术状态。

技术领域

本申请涉及定位和靶向 SARS 相关冠状病毒 (“SARS-CoV”) 的刺突蛋白 (spike protein) (“S 蛋白”) 上的关键部分或位点，所述部分或位点引起导致
15 严重的急性呼吸综合征 (Severe Acute Respiratory Syndrome, “SARS”) 的病毒感染。本发明还涉及用于预防和治疗 SARS 的新的合成肽。本发明进一步涉及利用实时定量 PCR 测试抗病毒剂发挥的抗病毒活性。

背景技术

2003 年 SARS 蔓延到 30 余个国家。超过 8000 人受感染，800 人失去了生命。随后鉴定出新的 SARS-CoV 是 SARS 的病原体 (1-3)，进一步证实该病毒会在猕猴 (cynomolgus macaques) 中导致类似的疾病 (4)。尽管似乎已经成功地控制了 SARS，但这种危及生命的疾病的再度出现仍有很大的可能性。近来在新加坡、台湾地区和中国已经报道了三个实验室获得的和四个社区获得的
20 SARS 病例 (40)。因此，急需针对该疾病的有效疫苗或抗病毒药物。

已经从小型哺乳动物例如灵猫和狸中分离出并鉴定出 SARS-CoV 样病毒，意味着这些动物可能是 SARS 的来源 (5)。与动物来源的新传染病的出现有关的重要因素包括广泛的接触和快速的病毒进化 (6)。系统发生分析已经显示，尽管人 SARS-CoV 和动物 SARS-CoV 样病毒与先前发现的三种冠状病毒群体有关，但它们的不同之处足以使之成为独立的第四种群体，其可能是在野生动物中存在的
25 的一个巨大家族。过去 15 年来在中国广东对野生/饲养动物的消费需

求的增加，已经提供了一种繁育环境，使种间病毒便于从野生/饲养动物向家养动物和人类传播。由于在新宿主中的新的选择压力，在种间转移的病毒中突变率将增加。

在 SARS-CoV 感染中，刺突蛋白（“S 蛋白”）识别并结合到宿主细胞受体上，然后在 S 蛋白中诱导出的构象变化将便于病毒包膜与宿主细胞膜的融合。早先的研究已经清楚地确定，在编码 S 蛋白的区域中有显著的序列变异，带有 12 个显著的氨基酸替换改变（5）。这些替换可能是理解在近期的暴发中病毒为什么和如何跨越了从动物到人的物种障碍的关键。在近期的 SARS 监视研究中进一步阐明了这些位点的快速突变。通过比较 2003 年 5 月分离的动物 SARS-CoV 样病毒（5）和那些在 2003 年 10 月之后分离的病毒（数据未公开），鉴定出了这些位点中的进一步的变异，其与 2003 年 12 月在广州从病人分离出的人 SARS-CoV 完全相同（7）（表 1）。在这些位点中的快速突变暗示，这些突变中的至少一些突变在跨越从动物到人的物种障碍的病毒传播中起到了重要的作用。猜测干扰这些蛋白结构域或与这些蛋白结构域竞争性结合的药剂，将能通过破坏 S 蛋白的功能来抑制 SARS-CoV 感染。为了证实这一猜测，合成了十种跨这些可变区的肽，研究了它们在细胞培养系统中的抗病毒效果。

表 1—在动物和人 SARS-CoV 之间 S 蛋白的氨基酸变异

取 样	病毒	P1		P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8		P9	P10
		227	239							743	754		
动物 (2003 年 5 月) (5)	SZ1	K	L	K	S	K	I	P	L	A	V	A	E
	SZ3	K	L	K	S	K	F	P	L	A	V	A	E
	SZ16	K	L	K	S	K	I	P	L	A	V	A	E
动物 (2003 年 10 月) *	Hc/SZ/266/03	N	S	T	S	N	F	S	S	R	A	T	E
动物 (2003 年 11 月) *	Hc/SZ/DMI/03	N	S	T	S	N	F	S	S	R	A	T	E
动物 (2003 年 12 月) *	Hc/GZ/32/03	N	S	T	S	R	F	S	S	R	A	T	E
	Hc/GZ/81/03	N	S	T	S	N	F	S	S	R	A	T	E
	Hc/SZ/61/03	K	S	T	S	R	F	S	S	R	A	T	E
	Hc/SZ/79/03	N	S	T	S	R	F	S	S	R	A	T	E
	CFb/SZ/94/03	N	S	T	S	R	F	S	S	R	A	T	E
人 (2003 年 12 月) (7)	Hu/Gz/1/04	N	S	T	S	N	F	S	S	R	A	T	E
人 (2003 年 2 月) (13)	GZ01	N	L	T	F	N	F	S	S	T	A	T	K
	GZ43	N	L	T	F	N	F	S	S	T	A	T	K
	GZ50	N	S	T	F	N	F	S	S	T	A	T	K
	GZ60	N	L	T	F	N	F	S	S	T	A	T	K

* 未公开的数据

使用的缩写: 人 (“Hu”); 喜马拉雅灵猫 (“Hc”); 中国雪貂獾 (“CFB”); 广州 (“GZ”); 深圳 (“SZ”)。

P1-P10 分别是 SEQ ID NO: 1—10。

已经证实了靶向 HIV-1 (8, 9)、猫免疫缺陷病毒 (FIV) 的 gp40 (10) 和 1 型人 T 细胞白血病病毒 (HTLV-1) 的卷曲螺旋结构域 (11) 的抗病毒肽是这些病毒感染的有效抑制物, 在治疗这些病毒性疾病方面具有潜在的治疗价值。这些合成肽的抑制效果通过阻断病毒蛋白与它们的细胞受体的相互作用, 5 或另外, 通过阻止膜融合来介导。基于这些发现, 近期的研究已经证实靶向 SARS-CoV S 蛋白的七重复 2 区域的肽在微摩尔范围抑制病毒感染 (12)。

在本发明中, 合成和鉴别了靶向 S 蛋白的四个区域的肽, 在猴肾 (FRhK-4) 细胞系中有效地抑制 SARS-CoV 感染。当在感染前用两种或三种这样的肽的组合处理细胞时, 观察到了协同的抗病毒效果。3D 模型表明, 抗病毒多肽 10 中的三种肽作图于据推测对三聚体包膜粒的正确装配极为重要的亚单位界面。这些结果表明了一种不同于先前报道的抗 SARS-CoV 肽的新型抑制机制, 先前报道的抗 SARS-CoV 肽破坏七重复 1—七重复 2 (“HR1-HR2”) 相互作用。

定义

在此描述的“包膜粒”是指围绕着具有管状核衣壳的动物病毒的衣壳的蛋 15 白层。包膜具有脂质和病毒特定蛋白的内层, 病毒特定蛋白也称膜蛋白或基质蛋白。外层具有一种或多种类型的形态学的亚单位, 称为包膜粒, 其从病毒包膜上突起, 该层通常由糖蛋白组成。

“患者”应指任何动物, 例如哺乳动物或鸟类, 包括, 但不限于, 牛、马、羊、猪、狗、猫、啮齿动物例如小鼠或大鼠、火鸡、鸡和灵长类。在优选的实 20 施方式中, 患者是人。

“药学上可接受的载体”应指本领域技术人员已知的各种运载体或载体。例如, 药学上可接受的载体包括但不限于 0.01-0.1M 和优选的 0.05M 磷酸缓冲液或 0.8% 盐水。另外, 这种药学上可接受的载体可以是水性的或非水性的溶 25 液、悬浮液或乳液。非水性溶剂的实例是丙二醇、聚乙二醇、植物油例如橄榄油、和可注射的有机酯例如油酸乙酯。水性载体包括水、酒精/水溶液、乳液和悬浮液, 包括盐和缓冲介质。胃肠外运载体包括氯化钠溶液、Ringer's 葡萄糖、葡萄糖和氯化钠、乳酸化的 Ringer's 溶液和固定油。静脉内运载体包括体液和营养补充物、电解质补充物例如那些基于 Ringer's 葡萄糖的补充物等。也可以存在防腐剂和其他添加剂, 例如抗菌剂、抗氧化剂、螯合剂、惰性气体等。

30 在此描述的肽由如下氨基酸残基的“单字母符号”来表示:

	A	Ala	丙氨酸
	R	Arg	精氨酸
	N	Asn	天冬酰胺
	D	Asp	天冬氨酸
5	B	Asx	天冬酰胺或天冬氨酸
	C	Cys	半胱氨酸
	Q	Gln	谷氨酰胺
	E	Glu	谷氨酸
	Z	Glx	谷氨酰胺或谷氨酸
10	G	Gly	甘氨酸
	H	His	组氨酸
	I	Ile	异亮氨酸
	L	Leu	亮氨酸
	K	Lys	赖氨酸
15	M	Met	甲硫氨酸
	F	Phe	苯丙氨酸
	P	Pro	脯氨酸
	S	Ser	丝氨酸
	T	Thr	苏氨酸
20	W	Trp	色氨酸
	Y	Tyr	酪氨酸
	V	Val	缬氨酸

发明内容

本发明的目标是开发干扰 SARS-CoV 的 S 蛋白上的变异位点或与之竞争性结合的药剂。本发明的另一个目的是利用这些药剂鉴定对包膜粒功能很重要的 SARS-CoV 的 S 蛋白的区域。本发明的又一个目的是使用这些药剂通过破坏 S 蛋白的功能来抑制 SARS-CoV 感染。此处描述的药剂是 20 肽，被设计以跨 S 基因的十二个鉴定出的变异，所述鉴定是根据人 SARS-CoV 和动物 SARS-CoV 样病毒分离物之间的基因组序列。本发明的肽用下式表示 (SEQ ID

30 NO: 1-10):

	SEQ ID NO: 1	X-FKLPLGINITNFRAILTAFS-Z;
	SEQ ID NO: 2	X-PTTFMLKYDENGTTTDAVDC-Z;
	SEQ ID NO: 3	X-VLYNSTFFSTFKCYGVSATK-Z;
	SEQ ID NO: 4	X-PALNCYWPLNDYGFYTTSGI-Z;
5	SEQ ID NO: 5	X-RDVSDFTDSVRDPKTSEILD-Z;
	SEQ ID NO: 6	X-YQDVNCTDVSTAIHADQLTP-Z;
	SEQ ID NO: 7	X-SNNTIAIPTNFSISITTEVM-Z;
	SEQ ID NO: 8	X-QYGSFCTQLNRALSGIAAEQ-Z;
	SEQ ID NO: 9	X-GIGVTQNVLYENQKQIANQF-Z; 和
10	SEQ ID NO: 10	X-IQKEIDRLNEVAKNLNESLI-Z。

其中氨基酸残基用单字母符号表示，其中 X 是氨基、乙酰基、9-苄基甲氧基-羰基、或疏水基团，Z 是羧基、酰氨基、或疏水基团。

本发明提供定位细胞中导致病毒感染的 SARS-CoV S 蛋白的位点的方法，包括在 SARS-CoV 感染之前用具有式：X-PTTFMLKYDENGTTTDAVDC-Z (SEQ ID NO: 2)；X-YQDVNCTDVSTAIHADQLTP-Z (SEQ ID NO: 6)；X-QYGSFCTQLNRALSGIAAEQ-Z (SEQ ID NO: 8)；X-IQKEIDRLNEVAKNLNESLI-Z (SEQ ID NO: 10) 的肽或其组合接触细胞。

本发明进一步提供预防或抑制患者中的 SARS-CoV 感染的方法，包括向患者施用有效量的药物组合物，所述药物组合物包含 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10，或其组合，和药学上可接受的载体。

本发明还提供通过实时定量 PCR 用特异性正向引物、反向引物和荧光标记的探针来测试抗病毒剂发挥的抗病毒活性的方法。

附图的简要说明

该专利或申请文件包含至少一幅彩色绘制的附图。具有彩色附图的本专利或专利申请出版物的副本在请求和支付了必需费用之后将由官方提供。

根据附随的“发明的详细说明”和此节中描述的附图，将更好地理解本发明的前述和额外的特征和优点。

图1 SARS-CoV 基因组和合成肽的位置的图表

SARS-CoV 的 S 蛋白包括 1255 个氨基酸残基。根据假设，即在人 SARS-

CoV 和动物 SARS-CoV 样病毒之间的残基变异可能决定了病毒在人和动物之间的感染优先，设计 10 条肽 (P1—P10 (分别为 SEQ ID NO: 16—25)) 来阻断病毒侵入。在每条肽中的氨基酸变异用斜体来突出显示，从哺乳动物 SARS-CoV 样病毒鉴定的替代的氨基酸在表 1 中显示。箭头表示每个肽在 S 蛋白中的位置。具有强的抗 SARS-CoV 活性的肽在 SEQ ID NO: 17 (“P2”)、SEQ ID NO: 21 (“P6”)、SEQ ID NO: 23 (“P8”) 和 SEQ ID NO: 25 (“P10”) 中显示。使用的缩写：血管收缩素—转化酶 2 结合区 (“ACE2”)；七重复 (“HR1” 和 “HR2”)；可读框 (“ORF”)、和跨膜结构域 (“T”)。还列出了 ELM 和卷曲螺旋预测分析的结果。

10 图 2A—2F 通过 SARS-CoV 感染的细胞病变效果确定的肽介导的抗病毒效果

病毒感染前在存在 (图 2A、2C、2D 和 2F) 或不存在 (图 2B 和 2E) 肽的情况下温育 FRhK-4 细胞一小时。感染后 36 小时，利用相差显微镜拍照显示细胞形态 (图 2A—2D, 400X)，或用电子显微镜拍照显示病毒形态 (图 2E 和 15 2F)。细胞与肽一同温育，没有显示细胞毒效果 (图 2A)，而未处理的细胞在用 SARS-CoV 感染后显示了典型的 CPE (图 2B)。当用 SEQ ID NO: 8 以 50 μ g/ml 处理细胞没有可见的 CPE 出现 (图 2C)，或通过 SEQ ID NO: 8 以 25 μ g/ml 处理后 CPE 显著地降低了 (图 2D)。电子显微镜显示了感染的细胞中典型的 SARS-CoV 形态 (通过箭头指出) (图 2E)，相比之下在用 SEQ ID NO: 20 8 以 100 μ g/ml 保护的细胞中没有可见的病毒 (图 2F)。

图 3A 和 3B 由单个有效肽介导的确定的抗病毒效果

有效肽 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8 和 SEQ ID NO: 10 的抗病毒活性通过测量培养基中的病毒滴度 (图 3A) 和细胞中的病毒 RNA 拷贝数 (图 3B) 来确定。用不同浓度的肽 (即，分别为 100 μ g/ml、50 μ g/ml 25 和 25 μ g/ml) 预先温育 FRhK4 细胞。感染后 36 小时，在培养基中产生的相关病毒通过 TCID₅₀ 滴定，在用肽预处理过的组和未预处理过的组之间比较 (图 3A)；细胞中的相关病毒基因组拷贝数通过实时定量 RT-PCR 来确定，进行三份，图示出标准差 (图 3B)。对照的相关病毒滴度或 RNA 拷贝数被定为 100%。该实验重复了至少两次。

30 图 4 活性肽抑制病毒侵入细胞

表示出了在感染后的不同时间通过 Q-RT-PCR 确定的病毒 RNA 拷贝数。未用肽处理的细胞，作为病毒对照 (“VC”)，与其他细胞一样，用相同剂量的病毒感染。未感染的细胞 (标为 “UIC”) 用 SEQ ID NO: 8 处理，作为阴性对照。

5 *图5A 和5B 组合两种活性肽而介导的协同抗病毒效果*

在病毒感染之前，将 FRhK-4 细胞与不同浓度的两种肽的混合物一同温育一小时。在每个实验中，混合等量 (重量) 的两种肽，使用的总肽终浓度分别是 100 μ g/ml、50 μ g/ml 和 25 μ g/ml。非活性肽 SEQ ID NO: 9 和活性肽 SEQ ID NO: 8 的组合用作对照。如图 3A 和 3B 中描述的通过滴定培养基中产生的病毒 (图 5A) 和测量细胞内病毒 RNA 拷贝数 (图 5B) 来确定抗病毒效果。

10 *图6A 和6B 组合三种有效肽而介导的协同抗病毒效果*

在 SARS-CoV 感染之前，将 FRhK-4 细胞与不同浓度的三种肽的混合物一同温育一小时。在每个实验中，使用等量 (重量) 的三种肽，使用的总肽终浓度在图 6A 和 6B 中表示。如图 3A 和 3B 中描述的通过滴定培养基中释放的病毒 (图 6A) 和测量细胞内病毒 RNA 拷贝数 (图 6B) 来确定协同抗病毒效果。

15 *图7A 和7B 比较人病毒衍生的肽和动物病毒衍生的肽之间的抗人病毒效果*

在 SARS-CoV 感染之前，将 FRhK-4 细胞与 100 μ g 和 50 μ g 人或动物衍生的肽一同温育一小时。如图 3A 和 3B 中描述的通过滴定培养基中释放的病毒 (图 7A) 和测量细胞内的病毒 RNA 拷贝数 (图 7B) 来评估抗病毒效果。使用的缩写：病毒对照 (“VC”)。

20 *图8A-8F 肽位置的模拟*

图 8A 显示了 S1 和 S2 亚单位的带状表示：在 1-1020 模拟的区域中用不同的颜色显示了八个肽，SEQ ID NO: 10 (“P10”) 处于球状结构域中，其相应于 1021-1195 区域，被独立地模拟。图 8B-8E 显示了四个 S 糖蛋白片段的放大的视图，分别相应于活性肽 SEQ ID NO: 2 (“P2”)、SEQ ID NO: 6 (“P6”)、SEQ ID NO: 8 (“P8”) 和 SEQ ID NO: 10 (“P10”)，也以同样的颜色显示。由于在模拟的区域之外，SEQ ID NO: 7 无法被显示。图 8F 显示了单体之一的主链，对 S1 和 S2 分别用橙色和绿色突出显示。SEQ ID NO: 6 (“P6”)、SEQ ID NO: 8 (“P8”) 和 SEQ ID NO: 9 (“P9”) 的位置用粗线突出显示。

图9A-9C 提议的肽抑制模型

图9A显示了 SARS-CoV 进入宿主细胞所需的未鉴定出的共受体。合成肽可能通过与共受体结合来阻断病毒侵入。图9B显示了在结合到受体（ACE2）之后，每个S蛋白单体的蛋白水解位点被暴露。然后未鉴定的蛋白酶将S蛋白处理成S1和S2结构域，其触发了构象改变和膜融合。抑制肽可以与S蛋白单体结合并阻断蛋白酶的作用。图9C显示了在融合步骤之前病毒包膜粒插入宿主细胞膜所需的构象改变。合成肽可以与包膜粒结合并改变它的病毒入侵所必需的构象。

发明的详细描述

此处描述的是展现出强烈的抗病毒活性的肽。这些肽包括 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8 和 SEQ ID NO: 10，靶向引起病毒感染的 SARS-CoV 的 S 蛋白上的特定位点。此处还描述了用于测试这种肽的抗病毒活性的分析法。最后，本发明涉及将这些肽和靶向描述的关键位点的其他合成肽作为治疗 SARS 中的 SARS-CoV 感染抑制物的用途。

本发明提供了对 SARS-CoV S 蛋白的重要功能区域的认识，并提供了基于预防和抑制 SARS-CoV 感染的治疗方法。已经报道了血管收缩素一转化酶 2（“ACE2”）是 SARS-CoV 的受体，并且已经阐明了与 ACE2 结合的 S 蛋白的区域（23、24、27、33）。也已经证实 HR1 和 HR2 的相互作用对于病毒包膜与宿主细胞膜的融合很重要（12）。然而，S 蛋白中与病毒感染有关的其他功能区域还没有被阐释。

在另一个实施方式中，利用基于一种猜测设计的十个肽，即 SEQ ID NO: 1—10 探察了 S 蛋白的关键区域，所述猜测是 S 蛋白上的快速突变位点在跨越从动物到人的物种障碍中起到了重要的作用。

根据人 SARS-CoV 和动物 SARS-CoV 样病毒分离物之间的基因组序列(5)设计出跨 S 基因的 12 个鉴定的变异的十种肽。结合 ELM 和卷曲螺旋预测分析来设计肽（图 1）。已经证实 S1 结构域（残基 12—672）引起受体结合（23、24），S2 结构域（残基 673—1255）参与病毒—宿主细胞融合（25、26）。人和动物病毒的序列对比显示在 S1 结构域发生了七个变异，在 S2 结构域发生了五个变异（表 1 和图 1）。在设计抗病毒肽时用六个靶向 S1 区域的肽，即，SEQ ID NO: 1—6 和四个靶向 S2 区域的肽，即，SEQ ID NO: 7—10 覆盖了所有这些变异。

位于鉴定出的病毒受体（血管收缩素—转化酶 2，ACE2）结合区（23、27）的变异 F360S 和 N479K（人到动物）被肽 SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 4 覆盖。肽 8 和 SEQ ID NO: 10 覆盖了变异 T894A 和 K1163E，分别位于病毒 S 蛋白的七重复 1（“HR1”，残基 892—1013）和 2（“HR2”，残基 1153—1198）区域（12）。其他 6 个肽衍生自未确定的区域（图 1）。

本发明的肽由 Invitrogen（Carlsbad, CA, USA）合成。序列如下（SEQ ID NO: 1—10）：

SEQ ID NO.:1	X-FKLPLGINITNFRAILTAFS-Z
SEQ ID NO.:2	X-PTTFMLKYDENGTTITDAVDC-Z
SEQ ID NO.:3	X-VLYNSTFFSTFKCYGVSATK-Z
SEQ ID NO.:4	X-PALNCYWPLNDYGFYTTSGI-Z
SEQ ID NO.:5	X-RDVSDFTDSVRDPKTSEILD-Z
SEQ ID NO.:6	X-YQDVNCTDVSTAIHADQLTP-Z
SEQ ID NO.:7	X-SNNTIAIPTNFSISITTEVM-Z
SEQ ID NO.:8	X-QYGSFCTQLNRALSGIAAEQ-Z
SEQ ID NO.:9	X-GIGVTQNVLYENQKQIANQF-Z
SEQ ID NO.:10	X-IQKEIDRLNEVAKNLNESLI-Z

- 10 本发明提供了定位细胞中导致病毒感染的 SARS-CoV S 蛋白的位点的方法，包括在 SARS-CoV 感染之前，用具有式：X-PTTFMLKYDENGTTITDAVDC-Z（SEQ ID NO: 2）；X-YQDVNCTDVSTAIHADQLTP-Z（SEQ ID NO: 6）；X-QYGSFCTQLNRALSGIAAEQ-Z（SEQ ID NO: 8）；X-IQKEIDRLNEVAKNLNESLI-Z（SEQ ID NO: 10）的肽或其组合接触细胞。
- 15 肽可以是两种肽的组合（例如，SEQ ID NO: 6+SEQ ID NO: 8）。肽可以位于 SARS-CoV S 蛋白氨基酸残基 259—278、氨基酸残基 598—617、氨基酸残基 737—756，或氨基酸残基 1161—1180。肽结合位于或邻近于 SARS-CoV S 糖蛋白的 ACE2 结合区域或 S1 和 S2 结构域。在该方法中，肽有助于阻止、抑制或减少 SARS-CoV 感染。

在以上的方法中，细胞可以来自灵长类、猴细胞系（例如，FRhK-4 和 VeroE6）、人类、或人类细胞系（例如，Caco2、Huh7、CNE1 和 CNE2）。

在一个实施方式中，肽是 SEQ ID NO: 2，并且干扰 ACE2 结合位点的构象变化。

- 5 在另一个实施方式中，肽是 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8 或 SEQ ID NO: 10，肽通过模拟 ACE2 结合诱导的构象变化之后暴露出的区域，与 S 蛋白单体竞争性结合，来干扰包膜粒功能。影响的位点优选是 S 蛋白氨基酸残基 259—278、589—617、737—756 或 1161—1180。

- 10 本发明还提供在患者中预防或抑制 SARS-CoV 感染的方法，包括向患者施用有效量的药物组合物，所述药物组合物包含 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10，或其组合，和药学上可接受的载体。该药物组合物可包含单个肽（例如，SEQ ID NO: 8）、双肽（例如，SEQ ID NO: 6+SEQ ID NO: 8），或其组合。在优选的实施方式中，患者是人。

- 15 以下送递系统，其应用了一些常规使用的药学上可接受的载体，仅仅是预想用于施用上述药物组合物的许多实施方式的代表。

可注射的药物送递系统包括溶液、悬浮液、凝胶、微球体和聚合的可注射物质，并且可以包含赋形剂例如溶解度改变剂（例如，乙醇、丙二醇和蔗糖）和聚合物（例如，polycaprylactones 和 PLGA）。可植入系统包括棒和圆片，可包含赋形剂例如 PLGA 和 polycaprylactone。

- 20 口服送递系统包括片剂和胶囊剂。这些可包含赋形剂例如粘合剂（例如，羟丙基甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、其他纤维素物质和淀粉）、稀释剂（例如，乳糖和其他糖、淀粉、磷酸二钙和纤维素物质），崩解剂（例如，淀粉聚合物和纤维素物质）和润滑剂（例如，硬脂酸盐和滑石）。

- 25 经粘膜送递系统包括贴剂、片剂、栓剂、阴道药栓、凝胶和药膏，可包含赋形剂例如增溶剂和增强剂（例如，丙二醇、胆盐和氨基酸），和其他运载体（例如，丙二醇、脂肪酸酯、和衍生物、和亲水聚合物例如羟丙基甲基纤维素和透明质酸）。

- 30 皮肤送递系统包括，例如，水性和非水性凝胶、膏、多乳剂、微乳剂、脂质体、油膏、水性和非水性溶液、洗剂、气雾剂、碳氢化合物基质和粉末，可包含赋形剂例如增溶剂、增透剂（例如，脂肪酸、脂肪酸酯、脂肪醇和氨基酸），

和亲水聚合物（例如，polycarbohil 和聚乙烯吡咯烷酮）。在一个实施方式中，药学上可接受的载体是脂质体或透皮增强剂。

用于可重构递送系统的溶液、悬浮液和粉末包括运载体例如悬浮剂（例如，树胶、zanthans、纤维素和糖）、湿润剂（例如，山梨醇）、增溶剂（例如，乙醇、水、PEG 和丙二醇）、表面活性剂（例如，十二烷基硫酸钠、Spans、Tweens 和十六烷基吡啶）、防腐剂和抗氧化剂（例如，对羟基苯甲酸酯类、维生素 E 和 C、和抗坏血酸）、防结块剂、包埋剂和螯合剂（例如，EDTA）。

本发明进一步提供通过实时定量 PCR 用特异性正向引物、反向引物和荧光标记的探针来测试抗病毒剂发挥的抗病毒活性的方法。正向引物可以是 SARS-CoV S 蛋白基因的 DNA 序列的片段，例如 5'-GCTTAGGCCCTTTGAGAGAGACA-3' (SEQ ID NO: 11)。反向引物可以是 SARS-CoV S 蛋白基因的 DNA 序列的片段，例如 5'-GCCAATGCCAGTAGTGGTGTA-3' (SEQ ID NO: 12)。荧光标记的探针，例如 5'-CCTGATGGCAAACCTTGCAC-3' (SEQ ID NO: 13)，也可用任何荧光物质来标记作为在任何实时 PCR 检测系统中的报道分子，例如 5'-(TET)CTAATGTGCCTTTCTCCCCTGATGGCA (TAMRA) -3' (SEQ ID NO: 14)。除了特异性正向引物、反向引物和荧光标记的探针之外，磷酸盐探针，例如 5'-(LC640)CACCTGCTCTTAATTGTTATTGGCC-3' (SEQ ID NO: 15) 也可用于利用实时定量 PCR 测试抗病毒剂发挥的抗病毒活性。

从以下的“实验部分”可以更好地理解本发明。然而，本领域的技术人员将很容易地意识到，讨论的特定方法和结果仅仅是对本发明的说明，在随后的权利要求中将更完整地描述。

具体实施方式

实验部分

25 细胞培养物和病毒株

按以下的描述在胎儿猕猴肾 (FRhK-4) 细胞培养物中测试上述肽。

在含有 10% 胎儿牛血清的 MEM 培养基 (10%-MEM, Invitrogen, USA) 中在 37°C、5%CO₂ 下培养和维持胎儿猕猴肾 (FRhK-4) 细胞。SARS-CoV 毒株 GZ50 分离自 2003 年 2 月中国广州 SARS 病人的鼻咽部洗出液，在 FRhK-4 细胞中维持 (13, 14)。在 FRhK-4 细胞中 GZ50 毒株的连续传代持续性地产生

细胞病变效果 (CPEs), 滴度为 10^7 TCID₅₀/ml。基因组测序 (登记号 AY304495) 和系统发生分析显示 GZ50 处于报道的香港毒株以及加拿大和美国毒株之间 (15)。

肽接种和病毒感染

- 5 在 96 孔板上的 10%-MEM 中以约 5,000 FRhK-4 细胞每孔接种, 培养过夜。用 PBS 洗涤细胞 2 次后, 向培养物中添加用 MEM (0% FBS) 稀释到不同浓度的肽, 在 37°C 温育 1 小时。然后用 SARS-CoV GZ50 毒株以 0.05 的感染复数 (MOI) 感染培养物。感染后约 36 小时出现 CPE, 在约 72 小时达到顶峰。所有实验进行三份并重复至少三次。

10 定量 RT-PCR

- 通过实时 PCR 评估存在十种 20 肽的情况下 SARS-CoV 对 FRhK-4 细胞的感染力。用 PBS 洗涤细胞两次, 根据厂家的说明利用 RNase Mini 试剂盒 (Qiagen, Hilden, Germany) 提取总 RNA。利用无规六聚物用 ThermoScript RT 系统 (Invitrogen, CA) 进行逆转录。利用正向引物 5'-
15 GCTTAGGCCCTTTGAGAGAGACA-3' (SEQ ID NO: 11) 和反向引物 5'-GCCAATGCCAGTAGTGGTGTA-3' (SEQ ID NO: 12) (终浓度 200 nM)、荧光标记的探针 5'-CCTGATGGCAAACCTTGAC-3' (SEQ ID NO: 13) 和磷酸盐探针 5'- (LC640) CACCTGCTCTTAATTGTTATTGGCC-3' (SEQ ID NO:
20 15) (终浓度 800 nM) 利用定量 RT-PCR (Q-RT-PCR) (13, 16, 17) 对细胞内病毒 RNA 进行定量。利用 LC Faststart DNA Master Hyb Probes 和 LightCycler (Roche Diagnostics, Branchburg, NJ, USA) 进行实时定量。应用的 PCR 条件是 95°C 10 分钟, 然后 95°C 10 秒、60°C 5 秒、72°C 5 秒和 40°C 30 秒进行 50 个循环。使用从 1.5 pg/ml 到 1.5×10^6 pg/ml 质粒的 10 倍连续稀释作为标准, 管家基因 β -肌动蛋白用作内源对照来标准化总 RNA 数量的样品间变异。

25 病毒滴度的确定和具有抗病毒性质的肽的鉴别

- 另外, 通过利用基于 CPE 的 TCID₅₀ 测试对释放到培养基中的病毒颗粒进行量化 (17, 18) 来评估存在十种 20 肽的情况下 SARS-CoV 对 FRhK-4 细胞的感染力。病毒感染后 36 小时从 SARS-CoV 感染的细胞中收集培养物上清液, 用 1%-MEM 以 10 倍系列稀释, 接种到 96 孔板中的 FRhK-4 细胞, 96 孔板在
30 用 SARS-CoV 以 0.05 MOI 感染前与 25、50 和 100 μ g/ml 的每种肽温育 1 小时。

感染后 36 小时确定 CPE，来评估肽介导的对病毒感染的保护作用。

培养 3 天后在相差显微镜下评估结果，计算病毒滴度。在测试浓度下 10 种肽处理的细胞都没有表现出细胞毒性效果，如图 2A 中 SEQ ID NO: 8 所表示。在未处理的细胞中，36 小时后观察到的 CPEs 是典型的，表现为细胞变圆
5 和脱附（图 2B）。对于肽 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8 或 SEQ ID NO: 10 观察到了显著的抗病毒效果。最有效的肽 SEQ ID NO: 8 在 100 和 50 μ g/ml 有效保护细胞免于 CPEs（图 2C），在 25 μ g/ml 显著地减少 CPEs（图 2D）。类似地，SEQ ID NO: 10 在 100 和 50 μ g/ml，以及 SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 6 在 100 μ g/ml 观察到了显著的保护作用，而其他六种肽没有
10 可检测性地降低 CPEs 水平，即使是在 100 μ g/ml 的浓度下（表 2）。

表 2—由 CPE 确定的肽的抗病毒活性

肽	肽浓度(μ g/ml)				
	100 μ g	50 μ g	25 μ g	12.5 μ g	0 μ g
P1*	+	+	+	+	+
P2	—	±	+	+	+
P3	+	+	+	+	+
P4	+	+	+	+	+
P5	+	+	+	+	+
P6	—	±	+	+	+
P7	+	+	+	+	+
P8	—	—	±	+	+
P9	+	+	+	+	+
P10	—	—	+	+	+

*P1-P10 分别是 SEQ ID NO: 1—10。

此外，通过电子显微镜观察进一步说明使 FRhK-4 细胞免于 SARS-CoV 感染的肽介导的保护作用，收获有或没有 SARS-CoV 感染的 FRhK-4 细胞，并在
15 2.5%戊二醛（Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, USA）中固定 4

小时, 在 1%四氧化锇中后期固定 1 小时。然后将细胞转移到 1.5ml 试管中, 1,000rpm 离心 10 分钟。除去上清液, 向细胞沉淀中添加液化的琼脂糖溶液(2%, 55-60°C; Sigma, St. Louis, MO, USA)。在凝胶固化后, 切下包含细胞沉淀的约 1 mm³ 立方体, 在梯度的乙醇中脱水。然后将立方体包埋入环氧树脂(Polysciences, 5 Warrington, PA, USA) 中。制备 70 nm 厚度的超薄切片, 用乙酸铀酯 (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, USA) 和柠檬酸铅(Leica Microsystem 5, Vienna, Austria) 染色。在 80kV 在 Philips EM208S 电子显微镜下检查切片, 用 100 nm 的刻度条标记图象。结果显示了在未用肽处理的细胞中 SARS-CoV 感染的典型形态学 (图 2E), 而在 SEQ ID NO: 8 处理的细胞中没有病毒可见 (图 10 2F)。

由于分别覆盖了 F360S 和 N479K(人到动物)变异的 SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 4 如所描述的位于鉴定的病毒受体 (ACE2) 结合区域 (23, 27); 并且结果显示在本发明中肽 SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 4 是没有活性的, 表明要么这两个特定位点没有活跃参与刺突-ACE2 结合, 要么肽不能与 S 蛋白竞争结合 ACE2。活性 SEQ ID NO: 10 (残基 1161-1180) 来自 S 蛋白的 HR2 15 区域 (残基 1153-1198)。与 HIV-1 gp41 类似, SARS-CoV S 蛋白的 S2 区域包含 HR1 和 HR2 序列, 据信其形成了对于病毒-宿主膜融合很重要的卷曲螺旋结构 (12, 34)。SEQ ID NO: 10 介导的抗病毒活性可能由于肽阻断了 HR1 和 HR2 的相互作用, 从而阻断了膜融合。这与 Liu 等 (12) 和 Tripet 等 (34) 20 的报道一致。然而, 来自 HR1 区域 (残基 892-1013) 的 SEQ ID NO: 9 (残基 890-909) 没有显示出抗病毒活性。其他活性肽 SEQ ID NO: 2 (残基 259-278)、SEQ ID NO: 6 (残基 598-617) 和 SEQ ID NO: 8 (残基 737-756) 既不位于 S1-ACE2 结合位点 (318-510) (24) 也不位于 HR1 和 HR2 区域中。

活性肽降低病毒滴度以及细胞内病毒 RNA 水平

25 利用 TCID₅₀ 分析细胞培养基中释放的病毒滴度, 和通过 Q-RT-PCR 来定量感染后 36 小时收获的样品中细胞质病毒 RNA 水平, 来进一步研究四种活性肽的抗病毒效果。如图 3A 所示, 活性肽以依赖于剂量的方式降低了传染性毒粒的数目。通过用肽 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 6 以 100 μg/ml 处理, 释放的病毒滴度都降低了超过 5 倍 (相对于未处理的对照的 18%), 以 50 μg/ml 30 处理降低了约一半, 然而, 在 25 μg/ml 没有检测到抗病毒效果。肽 SEQ ID: 10

在 100 μ g/ml 降低病毒滴度超过 15 倍（相对于对照的 6%），在 50 μ g/ml 降低 10 倍，在 25 μ g/ml 降低一半。肽 SEQ ID NO: 8 展现了最强的抗病毒活性，在 100、50 和 25 μ g/ml 分别降低病毒滴度 50 倍（相对于对照的 2%）、15 倍和 10 倍。计算了这些肽的 90%抑制浓度 (IC_{90})，在表 3 中显示。肽 SEQ ID NO: 8 的抗病毒效果是最高的，由最低的 IC_{90} 值表明，其比 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 6 的 IC_{90} 值低 4.5 倍以上，比 SEQ ID NO: 10 的 IC_{90} 值低 3 倍。图 3B 显示了在用肽 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8 和 SEQ ID NO: 10 处理后细胞内病毒 RNA 水平也降低了。与病毒滴度分析的结果一致，SEQ ID NO: 8 显示了最高的抗病毒效能。

10 表3—由 IC_{90} 评估的肽的抗病毒效果

肽	IC_{90} (μ g/ml \pm SD)	肽组合	IC_{90} (μ g/ml \pm SD)
P1*	>500	P2+P6	59.1 \pm 13.5
P2	112.5 \pm 26.3	P2+P8	15.7 \pm 3.2
P3	>500	P2+P10	40.3 \pm 12.8
P4	>500	P6+P8	9.6 \pm 1.9
P5	>500	P6+P10	9.9 \pm 1.2
P6	113.0 \pm 27.6	P8+P10	15.9 \pm 4.6
P7	>500	P2+P6+P8	7.5 \pm 0.9
P8	24.9 \pm 6.2	P2+P6+P10	8.7 \pm 1.1
P9	>500	P2+P8+P10	1.6 \pm 0.6
P10	73.5 \pm 15.7	P6+P8+P10	0.9 \pm 0.2

*P1-P10 分别是 SEQ ID NO: 1—10。

IC_{90} 值被定义为相对于未处理的对照使病毒滴度降低 90%的肽浓度（ \pm 标准差（“SD”））。 IC_{90} 值通过拟合对数方程于对每个肽浓度确定的数据（进行三份）来计算。在肽组合中，每个肽是等量的（重量）。

15 活性肽抑制 SARS-CoV 侵入细胞

为了检测肽是否阻断 SARS-CoV 侵入细胞，在病毒接种之前一小时开始肽温育。在培养基中和细胞中的病毒 RNA 拷贝数在感染后的不同时点通过 Q-

RT-PCR 确定。如图 4 所示, 与未经肽处理的培养物 (标为病毒对照 (“VC”)) 相比, 在感染后 1 小时 (1h-S) 在肽处理的培养物的培养基中病毒 RNA 拷贝数较高, 但在那些在感染后不同时点收获的细胞中较低。在处理的培养物中病毒生长曲线类似于病毒对照中的曲线, 但它们处于较低的水平。此外, 当在病毒接种 1 小时后将活性肽施加到培养物中, 并与感染后 6 和 12 小时未处理的病毒培养物的病毒 RNA 拷贝数 (数据未显示) 对比, 这些活性肽没有显示抗病毒效果。该结果说明活性肽能阻断病毒侵入细胞, 但不能抑制病毒复制。

肽组合介导的协同抗病毒效果

还研究了展现出协同抗病毒效果的靶向不同结构域的肽的组合。在感染前一小时用两种活性肽的混合物预处理 FRhK-4 细胞, 每种肽是等量的, 总肽浓度分别为 100、50 和 25 $\mu\text{g/ml}$ 。感染后 36 小时收集样品确定病毒滴度 (图 5A) 和病毒 RNA 定量 (图 5B)。滴定实验显示肽 SEQ ID NO: 2 与 SEQ ID NO: 6 组合, 在 100 $\mu\text{g/ml}$ 降低了病毒滴度 1,000 倍 (相对于对照的 0.1%), 在 50 $\mu\text{g/ml}$ 降低了 10 倍。尽管在 25 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度下, 每个肽单独地都没有观察到抗病毒活性 (图 3A), 但双肽处理还是降低了病毒滴度 3 倍 (相对于对照的 32%)。SEQ ID NO: 6 与 SEQ ID NO: 8 组合在 100 $\mu\text{g/ml}$ 降低了病毒滴度 10,000 倍。SEQ ID NO: 6+SEQ ID NO: 8 的 IC_{50} , 与单独的 SEQ ID NO: 6 相比降低了约 12 倍 (IC_{50} 9.6 $\mu\text{g/ml}$ 对 IC_{50} 113.0 $\mu\text{g/ml}$), 与单独的 SEQ ID NO: 8 相比降低了 2.5 倍 (IC_{50} 9.6 $\mu\text{g/ml}$ 对 IC_{50} 24.9 $\mu\text{g/ml}$) (表 3)。对于其他活性肽组合也观察到了显著的协同效果, 但在活性肽加非活性肽的组合 (例如, SEQ ID NO: 8 +SEQ ID NO: 9) 中没能观察到, 在计算的 IC_{50} 值 (表 3) 和相对病毒滴度 (图 5A) 中都显示了这一点。这些结果进一步被 Q-RT-PCR 分析证实 (图 5B)。

通过在病毒接种前一小时用包含等量的三种肽的混合物温育细胞, 研究了协同抗病毒效果。有趣的是, 所有的肽组合都展现了大大增强的抗病毒能力 (表 3), 在释放的病毒的水平 (图 6A) 和细胞内病毒 RNA 量 (图 6B) 中都有反映。在用三种肽混合物以 50 和 25 $\mu\text{g/ml}$ 的总浓度预处理之后, 基本上完全抑制了 SARS-CoV 感染。SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 6 作图于参与结合宿主受体 ACE2 的 S1 结构域 (24, 39), 同时 SEQ ID NO: 8 和 SEQ ID NO: 10 作图于在病毒粒子-膜融合中起作用的 S2 区域 (25, 26), 这些结果清楚地说明, 靶向病毒 S 蛋白中不同区域的肽的组合显著地增强了抗病毒效果。

来自动物病毒序列的肽的抗病毒效果

为了确定来自动物 SARS-CoV 样病毒的序列的肽是否也能抑制人 SARS-CoV 感染，合成了来自动物病毒的肽，用于在用人 SARS-CoV 攻击细胞前处理 FRhK-4 细胞。测量上清液中的病毒滴度（图 7A）和细胞中的病毒 RNA（图 5 7B），并且与用来自人病毒的肽处理的对照相比。在用动物肽处理的样品中观察到了比对照高的病毒滴度和 RNA 水平，表明动物肽与人肽相比对抗人 SARS-CoV 的能力较低。在 SEQ ID NO: 6 上观察到了最显著的抗病毒能力的降低，动物 SEQ ID NO: 6 的抗病毒效力比人 SEQ ID NO: 6 的效力低 2 到 4 倍（图 7）。

10 包膜粒模型构建和活性肽的推定的 3D 位置

为了探索上述的活性肽如何抑制病毒感染，在图 8A—8F 中示出在其包膜粒四级装配物中的 S 糖蛋白的分子模拟，其在蛋白质数据库（“PDB”）ID 编号为 1T7G，该分子模型用于发现与活性肽的活性相关的潜在机制。

从 PDB 中检索出 SARS-CoV S 蛋白的 S1 和 S2 结构域的结构（19），ID 15 编号分别是 1Q4Z 和 1Q4Y。手工进行两个结构域的对接，并通过利用 Gromacs 的动力学模拟（20）进行积极的优化。利用 Prosa II 软件包（21）评估每个可能的包膜粒装配的可靠性。利用程序 MOLMOL（22）进行包膜粒图象构建和暴露的表面积（“ESA”）的计算。S 糖蛋白的预测的包膜粒装配保藏在 PDB 中，ID 标号 1T7G（39）。

20 在模型中，发现 SEQ ID NO: 2（“P2”）位于 S 蛋白的表面，与 ACE2 结合区相邻（图 8A）。这表明 SEQ ID NO: 2 不直接竞争 ACE2 结合，但其可能妨碍结合位点构象变化。其他三个活性肽（SEQ ID NO: 6（“P6”）、SEQ ID NO: 8（“P8”）、和 SEQ ID NO: 10（“P10”）位于 S 糖蛋白的 S1 和 S2 结构域的表面，表现出环形构象（图 8A）。由于这些肽占据了 S 糖蛋白的单体—单体界面 25 区域，这些肽可能通过模拟在 ACE2 结合诱导的构象变化之后暴露的区域，通过竞争性结合 S 蛋白单体，来干扰包膜粒功能。这些区域可能充当共受体结合位点、蛋白酶剪切位点，和/或毒粒—细胞膜结合位点。因此这些肽可以与包膜粒竞争病毒—细胞膜相互作用（图 9A—9C）。

30 SEQ ID NO: 8（残基 737—756），靶向 S2 结构域的未知功能区域（残基 673—892），展现出对病毒感染的最高抑制活性。有趣的是，它非常接近 Ho 等

预测的推断的受体结合位点（残基 757—761）（35）。通过考虑 HIV-1 和 SARS-CoV 之间感染进程的相似性（感染进程包括病毒蛋白—受体结合）、病毒蛋白构象变化和病毒—细胞膜融合，残基 737—756 可能是未被确定的共受体（类似于 HIV-1 的 CCR5 和 CXCR4）结合位点。SEQ ID NO: 8 可能与包膜粒竞争共受体相互作用（图 9A）。这也得到了结果的支持，该结果表明当与其他活性多肽组合时 SEQ ID NO: 8 也表现出发挥了最高的协同抗病毒效果（表 3）。

对其他冠状病毒的研究已经阐明，S1 与可溶性病毒受体的结合、或暴露于 37°C 和升高的 pH 值（pH 8.0），可以诱导伴随着 S1 和 S2 的剪切的构象变化，这可能涉及触发病毒—细胞膜融合（36-38）。活性肽 SEQ ID NO: 6（残基 598—617）位于 S1 结构域的表面，接近 S1-S2 连接位点（图 8A 和 8F）。其抗病毒活性可能是由于 SEQ ID NO: 6 与 S 蛋白单体的结合干扰了对 S1 和 S2 的剪切，导致随后在病毒包膜和宿主细胞膜之间的融合的失败（图 9B）。

两种和三种肽的组合的协同效果表明，可通过同时阻断多个蛋白—蛋白或蛋白—膜相互作用位点来实现对包膜粒功能的更多的破坏。这些肽可通过竞争性地结合到 S 蛋白单体上而破坏包膜粒装配或构象失常（图 9C）。

发现了与活性肽（SEQ ID NO: 6, 8 和 10）相关联的两个共同特征。首先，它们位于 S1 和 S2 结构域的表面，单体在这里相互接触。其次，这些活性肽展现出环形构象。与此相反，非活性肽位于暴露的包膜粒表面（SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 4，未示出），展现出螺旋结构（SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7 和 SEQ ID NO: 9）。活性肽仅仅是那些展现出环形构象的肽，表明环形构象是肽易于接近 S 蛋白单体或共受体所必需的。与这个模型一致的是，非活性肽属于包膜粒的暴露的表面区（SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 4），和/或展现了螺旋构象（SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7 和 SEQ ID NO: 9）。

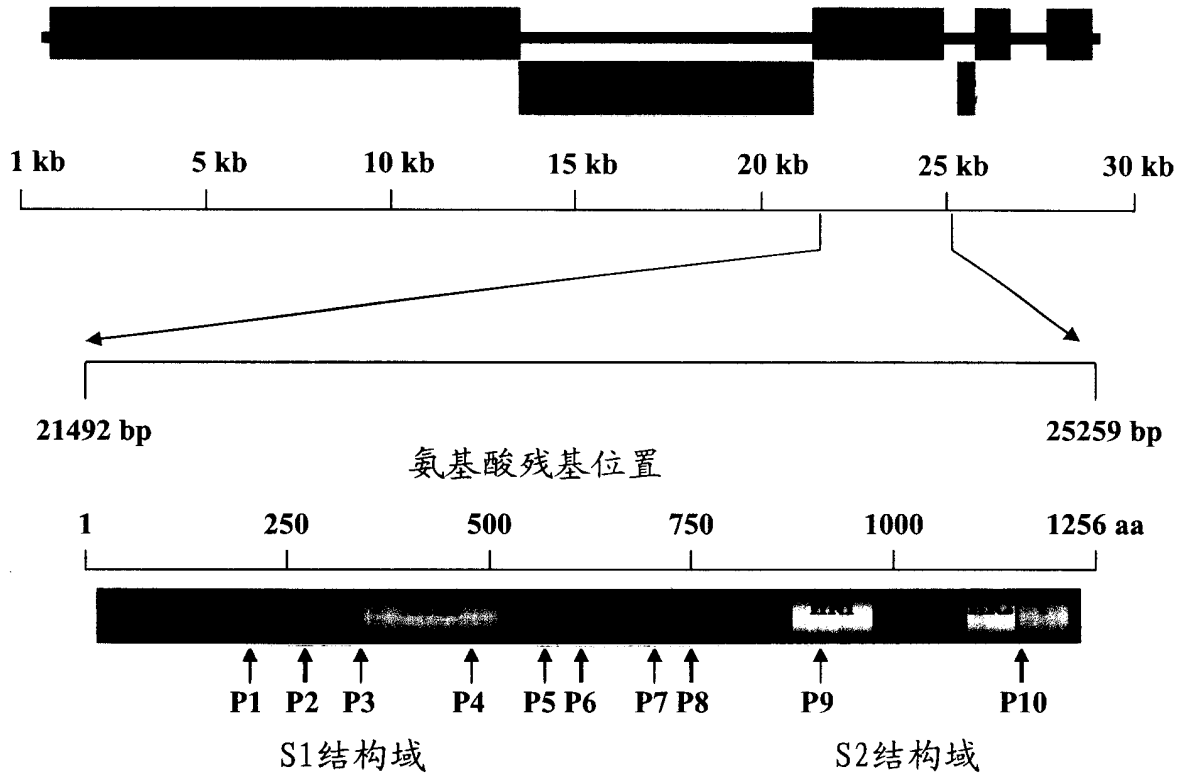
再现了包膜粒的环形构象的仅有的肽 SEQ ID NO: 6、8 和 10，是能通过竞争性结合 S 蛋白单体更容易地干扰包膜粒装配的肽。更为有序的二级结构元件，例如由 SEQ ID NO: 1、3、4、5、7 和 9 形成的所提及的螺旋，没有抗病毒活性。再现包膜粒的暴露的表面区域的肽（SEQ ID NO: 1、3 和 4）完全没

有活性，因为它们的存在没能诱导对包膜粒四级结构稳定性的干扰。因而，活性肽在构象变化的关键区域上与包膜粒结合，构象变化是膜融合过程所必需的。

参考文献

1. Peiris, J. S., et al., *Lancet* **361**, 1319-1325 (2003).
2. Rota, P. A., et al., *Science* **300**, 1394-1399 (2003).
3. Marra, M. A., et al., *Science* **300**, 1399-1404 (2003).
4. Fouchier, R. A., et al., *Nature* **423**, 240 (2003).
5. Guan, Y., et al., *Science* **302**, 276-278 (2003).
6. Holland, J.J., et al., *J. Virol.* **65**, 2960-2967 (1991).
7. "The Chinese SARS Molecular Epidemiology Consortium," *Science* **303**, 1666-1669 (2004).
8. Derdeyn, C. A., et al., *J. Virol.* **75**, 8605-8614 (2001).
9. Sia, S. K., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 14664-14669 (2002).
10. Medinas, R. J., et al., *J Virol* **76**, 9079-9086 (2002).
11. Pinon, J. D., et al., *J. Virol.* **77**, 3281-3290 (2003).
12. Liu, S., et al., *Lancet.* **363**, 938-947 (2004).
13. He, M. L., et al., *JAMA* **290**, 2665-2666 (2003).
14. Zhong, N. S., et al., *Lancet* **362**, 1353-1358 (2003).
15. Guan, Y., et al., *Lancet.* **363**, 99-104 (2004).
16. He, M. L., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **297**, 185-192 (2002).
17. He, M. L., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **295**, 1102-1107 (2002).
18. Zheng, B., et al., *Emerg. Infect. Dis.* **10**, 176-178 (2004).
19. Berman, H. M., et al., *Nucleic Acids Research* **28**, 235-242 (2000).
20. Berendsen, H.J.C., et al., *Comp. Phys. Comm.* **91**, 43-56 (1995).
21. Sippl, M. J. **17**, 355-362 (1993).
22. Koradi, R., et al., *J. Mol. Graph.* **14**, 51-55 (1996).
23. Li, W., et al., *Nature* **426**, 450-454 (2003).

24. Wong, S. K., et al., *J. Biol. Chem.* **279**, 3197-3201 (2004).
25. Matsuyama, S. and Taguchi, F., *Virology* **295**,160–171 (2002).
26. Taguchi, F. and Shimazaki, Y. K., *J. Gen. Virol.* **81**, 2867–2871 (2000).
27. Sui, J., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 2536-2541 (2004).
28. Spiga, O., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **310**, 78-83 (2003).
29. Delmas, B. and Laude, H., *J. Virol.* **64**, 5367-5375 (1990).
30. Lewicki, D. N. and Gallagher, T. M., *J. Biol. Chem.* **277**,19727-19734 (2002).
31. Sauter, N. K., et al., *Biochemistry* **31**, 9609-9621 (1992).
32. Lin, Y., et al., *Antiviral Therapy* **9**, 287–289 (2004).
33. Babcock, G. J., et al., *J. Virol.* **78**, 4552-4560 (2004).
34. Tripet, B., et al., *J. Biol. Chem.* **279**, 20836-20849 (2004).
35. Ho, T. Y., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **313**, 938-947 (2004).
36. Gallagher, T. M., *J. Virol.* **71**, 3129–3137 (1997).
37. Holmes, K. V., et al., *Adv. Exp. Med. Biol.* **494**, 193–198 (2001).
38. Sturman, L. S., et al., *J. Virol.* **64**, 3042–3050 (1990).
39. Bernini, A, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **325**, 1210-1214 (2004).
40. World Health Organization (“WHO”), *Communicable Disease Surveillance & Response (CSR): Severe Acute Respiratory Syndrome.* www.who.int/csr/sars/en.



No.	序列	位置
P1	FKLPLGIN(K)ITNFRAILTAFS(L)	220-239
P2	PTT(K)FMLKYDENGTTITDAVDC	259-278
P3	VLYNSTF(S)FSTFKCYGVSATK	354-373
P4	PALNCYWPLN(K)DYGFYTTSGI	470-489
P5	RDVSD <i>F</i> (I)TDSVRDPKTSEILD	553-572
P6	YQDVNCTDVS(P)TAIHADQLTP	598-617
P7	SNNTIAIPTNFS(L)ISITTEVM	690-709
P8	QYGSFCT(A)QLNRALSGIAA(V)EQ	737-756
P9	GIGVT(A)QNVLYENQKQIANQF	890-909
P10	IQK(E)EIDRLNEVAKNLNESLI	1161-1180

图 1

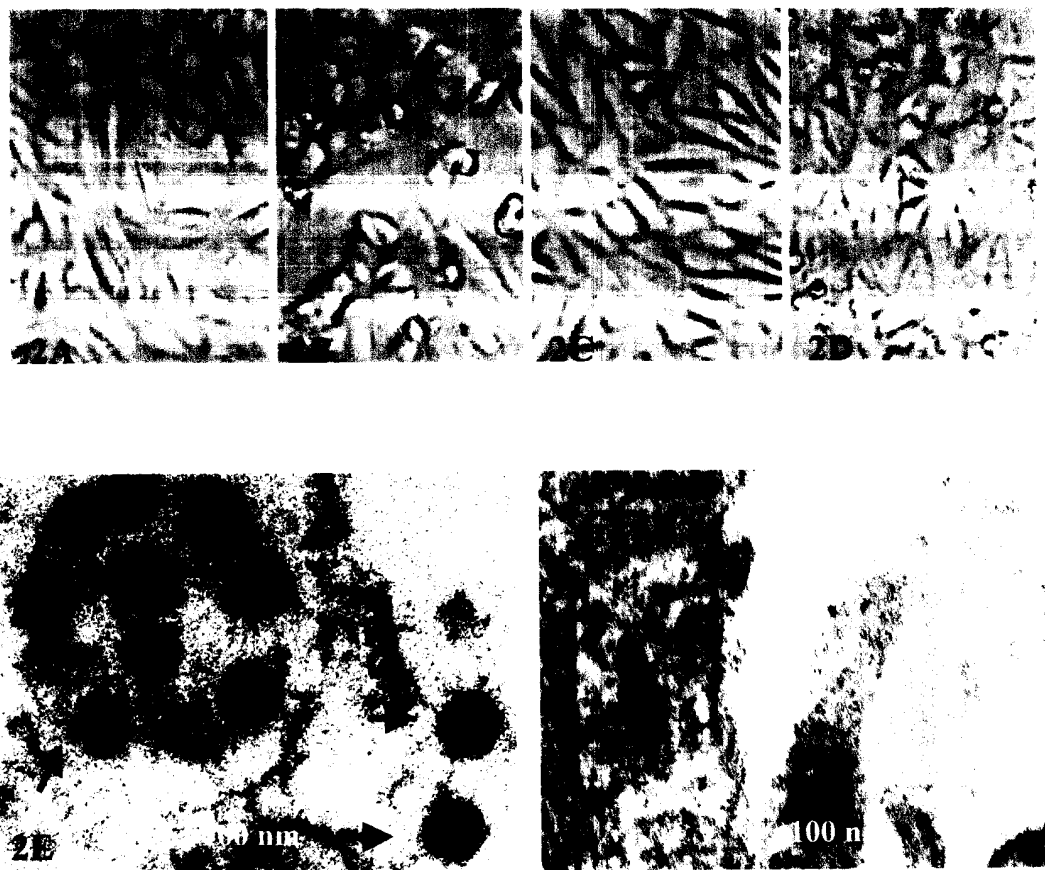


图 2A-2F

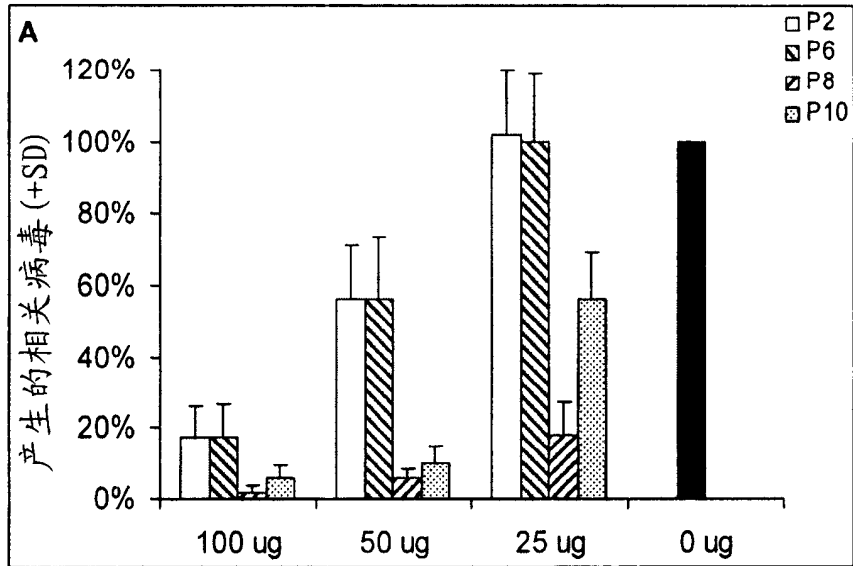


图 3A

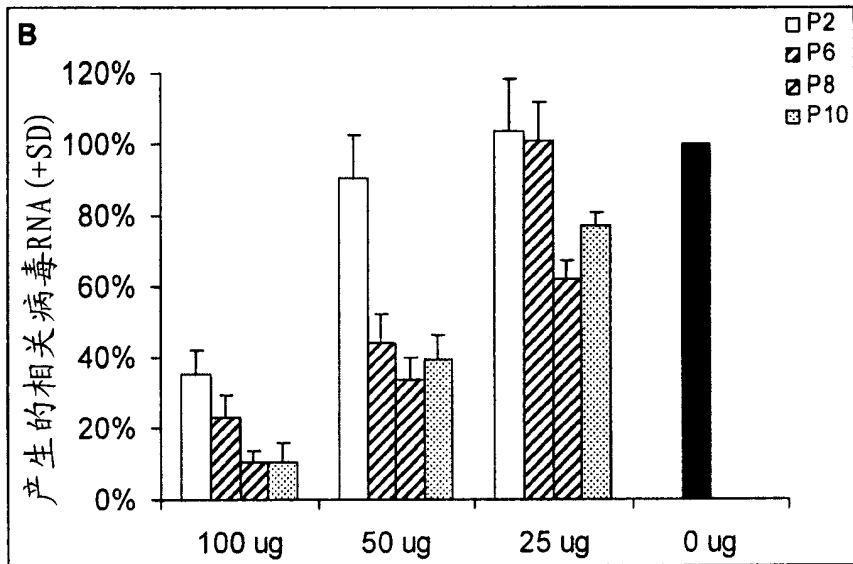


图 3B

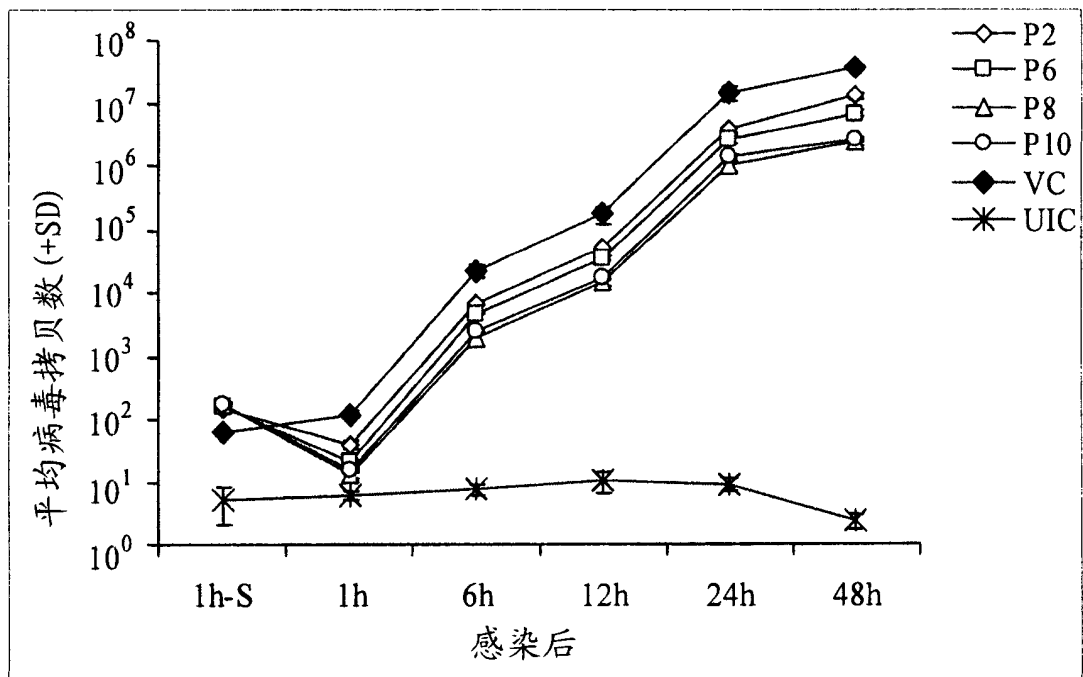


图 4

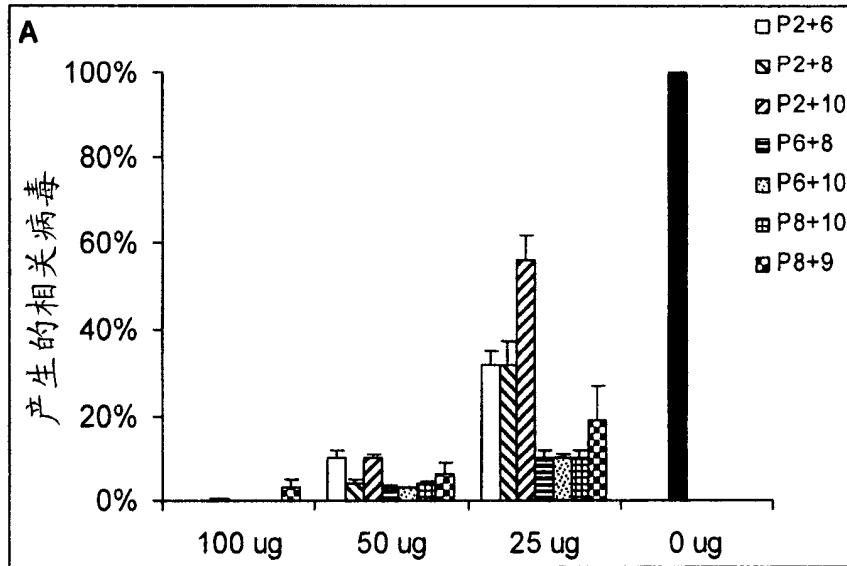


图 5A

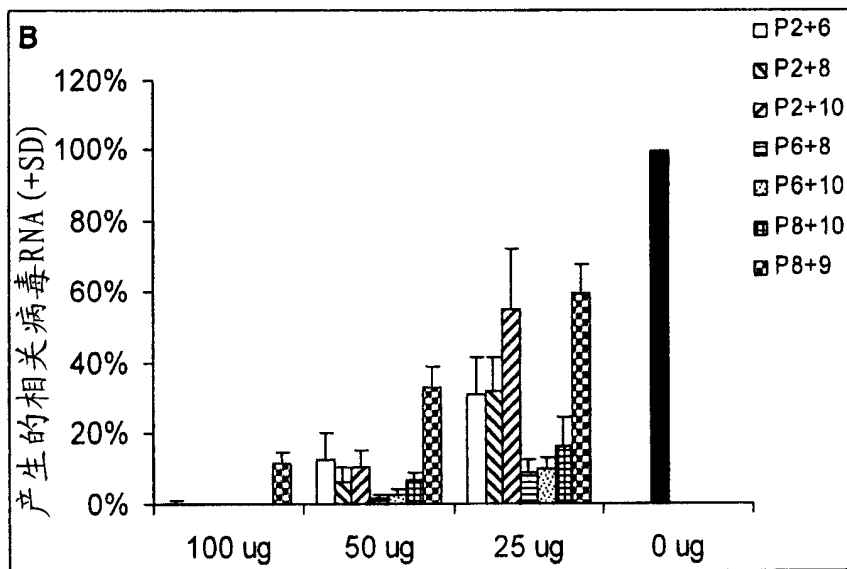


图 5B

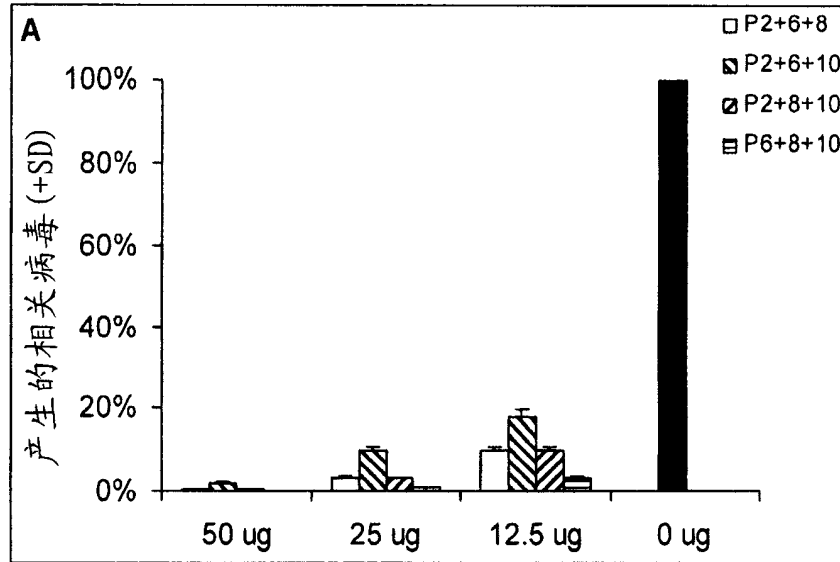


图 6A

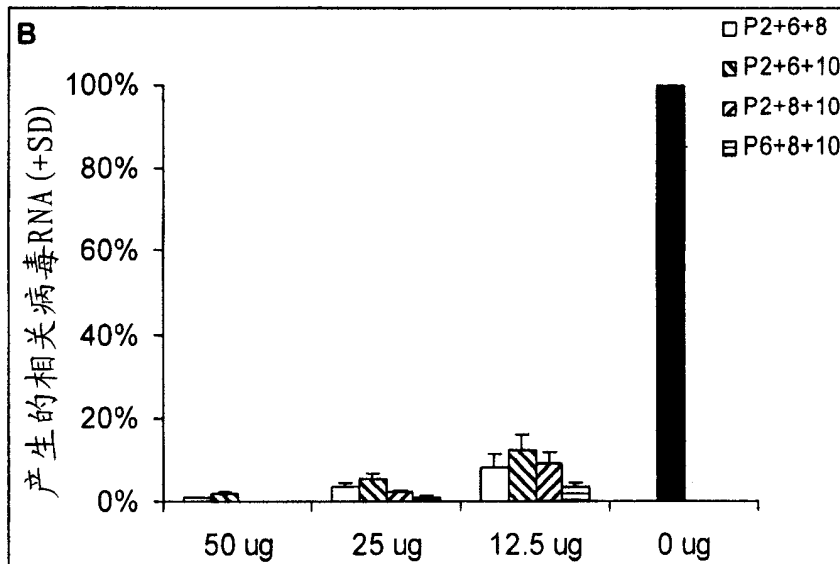


图 6B

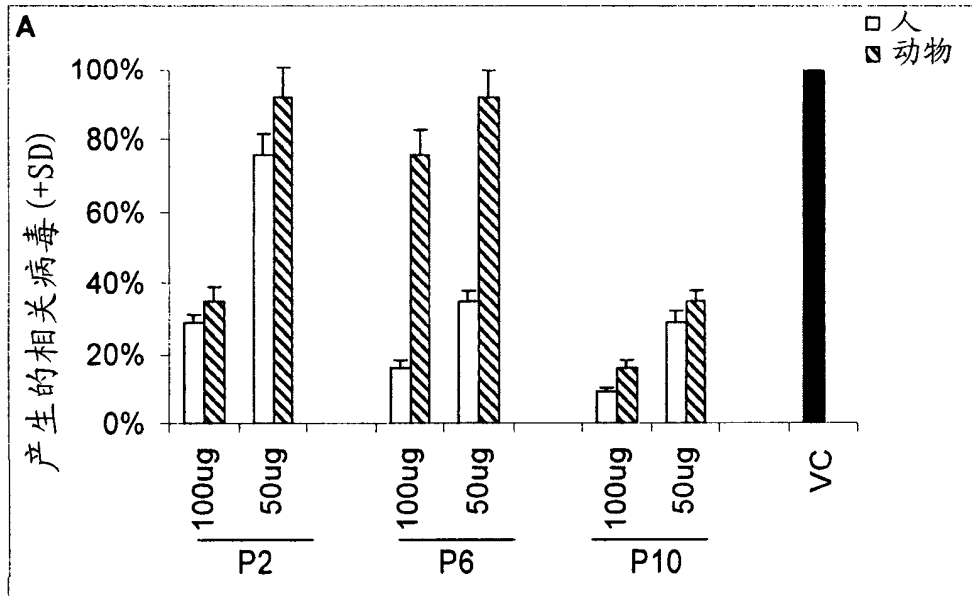


图 7A

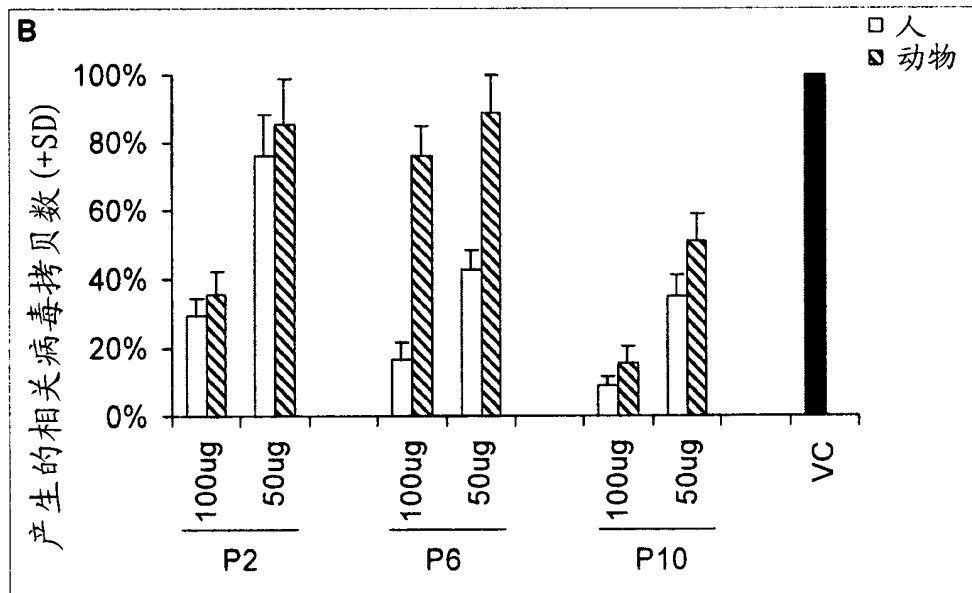


图 7B

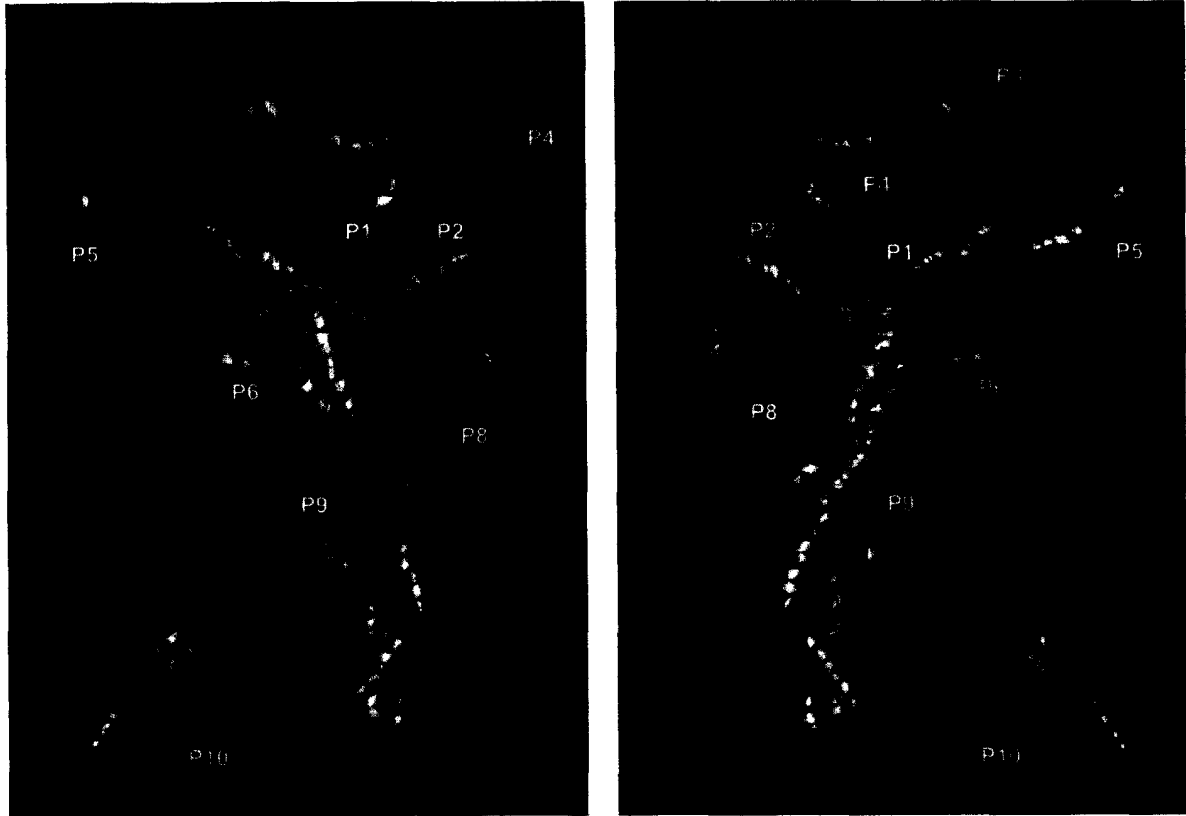


图 8A

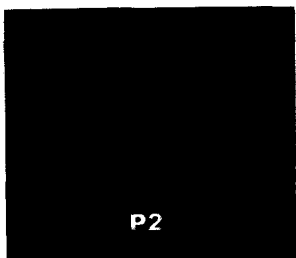


图 8B

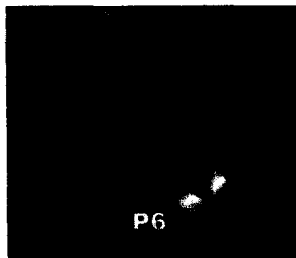


图 8C

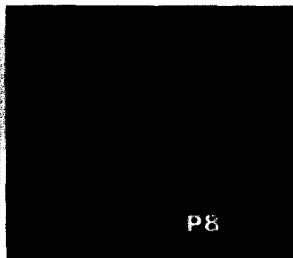


图 8D

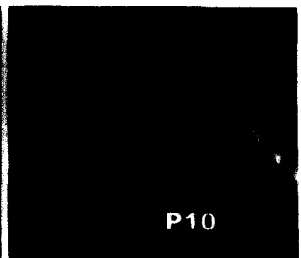


图 8E

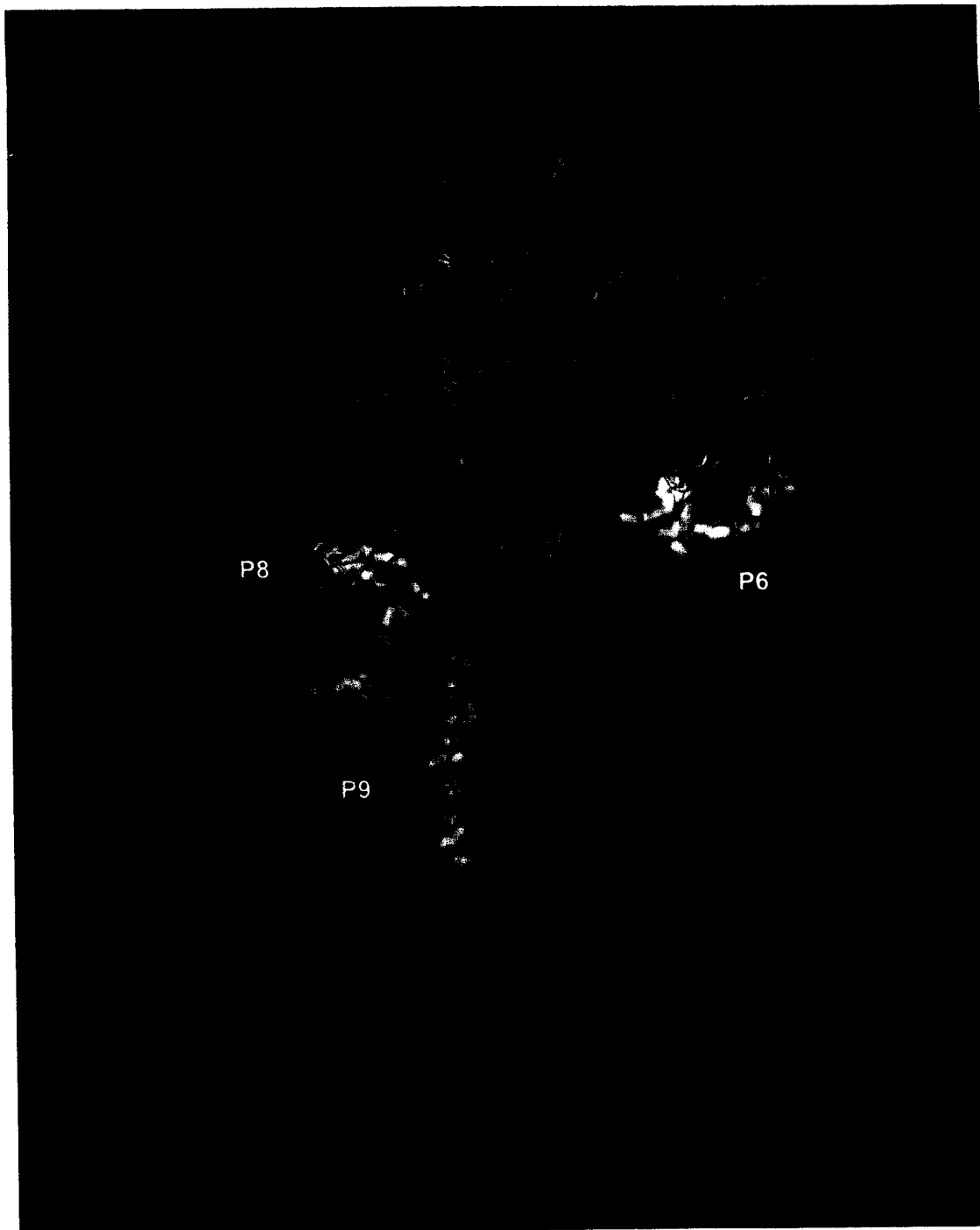


图 8F

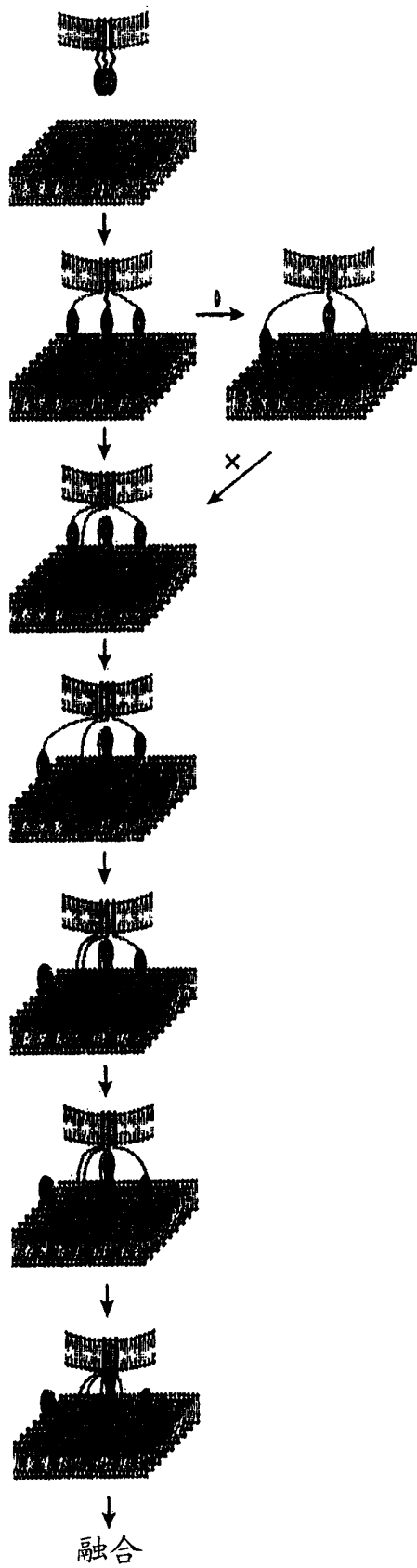


图 9A

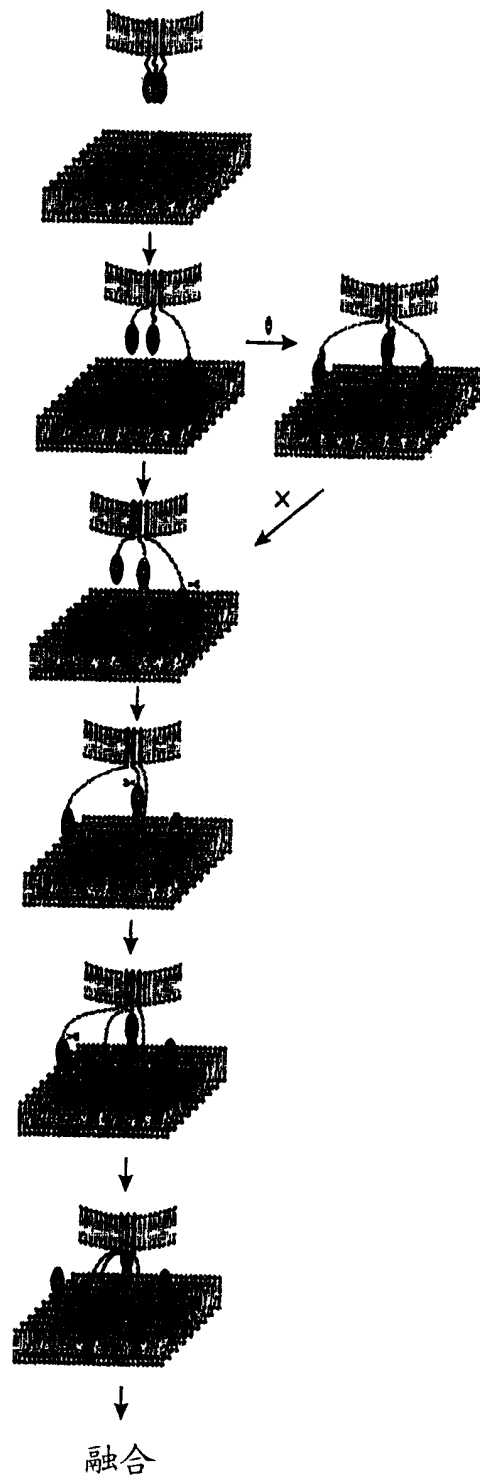


图 9B

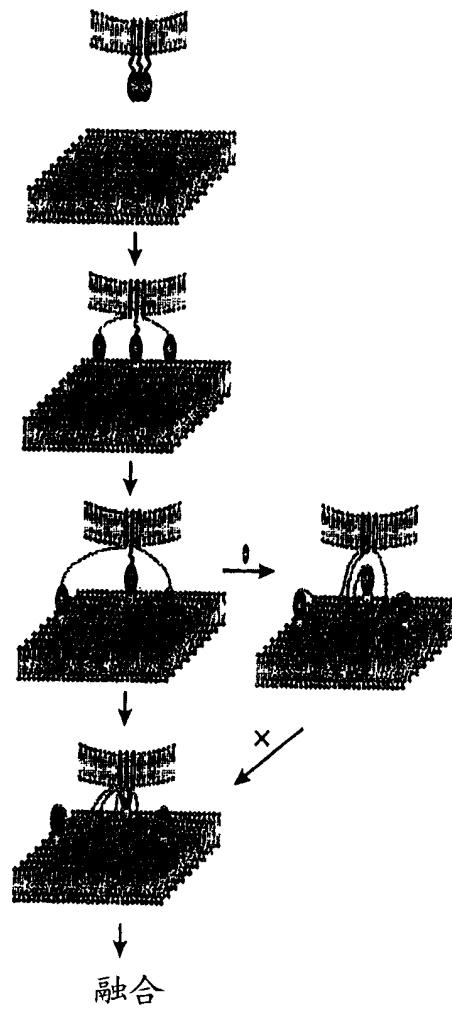


图 9C