

(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
2011 年 3 月 10 日 (10.03.2011)

PCT

(10) 国际公布号
WO 2011/026351 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07K 14/405 (2006.01) A61K 38/16 (2006.01)
C12N 15/31 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) A61P 31/18 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) C12R 1/89 (2006.01)
C07K 17/08 (2006.01) C12R 1/19 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2010/073124
- (22) 国际申请日: 2010 年 5 月 24 日 (24.05.2010)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
200910192063.0 2009 年 9 月 4 日 (04.09.2009) CN
- (71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 暨南大学
(JINAN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国广东省广州市
黄埔大道西 601 号, Guangdong 510632 (CN).
- (72) 发明人: 及
(75) 发明人/申请人 (仅对美国): 熊盛 (XIONG, Sheng)
[CN/CN]; 中国广东省广州市黄埔大道西 601 号,
Guangdong 510632 (CN)。 陈伟 (CHEN, Wei) [CN/
CN]; 中国广东省广州市黄埔大道西 601 号, Guang-
dong 510632 (CN)。 钱垂文 (QIAN, Chuiwen) [CN/
CN]; 中国广东省广州市黄埔大道西 601 号, Guang-
dong 510632 (CN)。 王一飞 (WANG, Yifei)
[CN/CN]; 中国广东省广州市黄埔大道西 601 号,
Guangdong 510632 (CN)。 北里·海雄 (KITAZATO,
Kaio) [CN/CN]; 中国广东省广州市黄埔大道西 601
号, Guangdong 510632 (CN)。
- (74) 代理人: 广州市华学知识产权代理有限公司
(GUANGZHOU HUAXUE INTELLECTUAL PROP-
ERTY AGENCY CO., LTD.); 中国广东省广州市天
河区五山华南理工大学科技园 1 号楼 N201-N202
室, Guangdong 510640 (CN)。

[见续页]

(54) Title: A CYANOVIRIN N MUTANT, MODIFIED DERIVATIVE AND USES THEREOF

(54) 发明名称: 一种蓝藻病毒蛋白 N 突变体、其修饰衍生物及应用

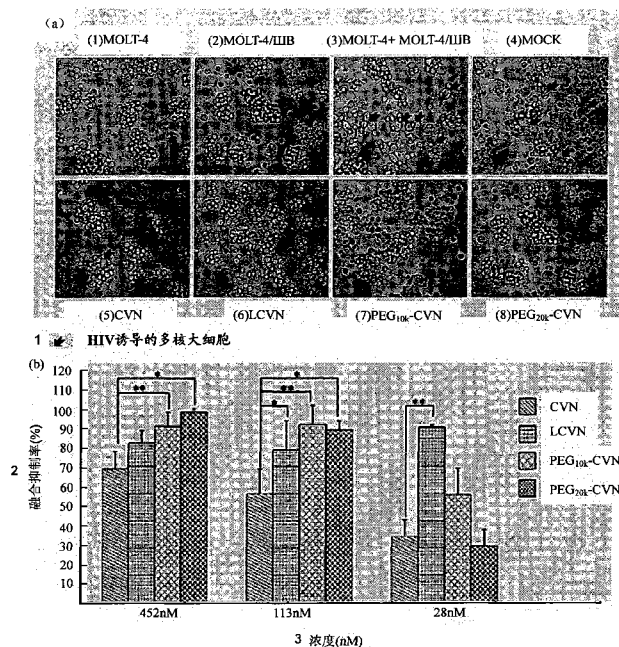


图 18 / Fig. 18

1 HIV INDUCED MULTINUCLEATE GIANT CELLS
2 FUSION INHIBITION RATE
3 CONCENTRATION

(57) Abstract: A cyanovirin N (CVN) mutant, its PEG modified derivative and their uses in preparing drugs. The said cyanovirin N mutant is composed of sequence A and sequence B: sequence A is a linker peptide with hydrophilicity and flexibility, sequence B is a codon optimized sequence of cyanovirin N. The cyanovirin N mutant is modified by PEG to obtain derivative. The mutant and the derivative both exhibit good anti-HIV activities, and have prospect of being used in preparing drugs for anti-HIV and other viral microorganism.

[见续页]



(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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则 4.17 的声明:

- 关于发明人身份(细则 4.17(i))
- 关于申请人有权申请并被授予专利(细则 4.17(ii))
- 关于申请人有权要求在先申请的优先权(细则 4.17(iii))
- 发明人资格(细则 4.17(iv))

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))。

(57) 摘要:

一种蓝藻病毒蛋白 N 突变体、其 PEG 修饰衍生物和它们在制药中的应用。所述蓝藻病毒蛋白 N 突变体由 A 序列和 B 序列组成, A 是具有亲水柔性的连接肽, B 为蓝藻病毒蛋白 N 经过密码子优化的序列。该蓝藻病毒蛋白 N 突变体经过 PEG 修饰得到衍生物。该突变体及其衍生物均显示了较好的抗 HIV 活性, 具有应用于制备抗 HIV 或其他病毒微生物的药物的前景。

说明书

发明名称：一种 蓝藻病毒蛋白N 突变体、其修饰衍生物及应用

- [1] 技术领域
- [2] 本发明属于生物医药领域，具体涉及一种 蓝藻病毒蛋白 N （ CVN ） 突变体、其PEG修饰衍生物和它们在制药中的应用。
- [3] 背景技术
- [4] 蓝藻抗病毒蛋白 N （ Cyanovirin-N ， CVN ） 是美国科学家 BOYD 等人从蓝藻可提取的一种具有抗 HIV 活性的蛋白。 CVN 能特异地、高亲合性地结合在人免疫缺陷病毒 HIV-1 的衣壳蛋白 gp120 上从而发挥抗病毒活性，这一特点使它可以不受病毒变异的干扰，同时它还具有抗病毒谱广，性质稳定等特点，这使得 CVN 蛋白成为一种很有价值的抗病毒药物 [BOYD M R, GUSTAFSON K R, MCMAHON J B, et al. Discovery of cyanovirin-N, a novel human immunodeficiency virus-inactivating protein that binds viral surface envelope glycoprotein gp120: Potential applications to microbicide development [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1997, 41 （ 7 ） : 1521-30.]。但因为该蛋白分子量较小，且分子中有二个二硫键，使得该蛋白在大肠杆菌中表达困难，产量低。同时作为一种原核生物来源的小分子蛋白类药物，它存在半衰期短、细胞毒性及引起免疫应答等缺点。
- [5] 聚乙二醇（ PEG ） 是一种无毒、无免疫原性的水溶性高分子物质，可以通过共价结合方式修饰蛋白质，聚乙二醇修饰是用来解决或缓解蛋白和多肽在药用过程中存在的稳定性差，半衰期短等问题的有效途径（ IANG Z Y, XU S W, WANG Y Q. Chemistry for pegylation of protein and peptide molecules [J]. Chinese Journal of Organic Chemistry, 2003, 23 （ 12 ） : 1340-7. ） 利用 PEG- 马来酰亚胺在酸性条件下修饰 CVN 已有文献报道， Zappe 等人选择了 62 位谷氨酰胺被半光氨酸替代的突变体 (CVN(Q62C)) 用 mPEG- 马来酰亚胺 (mPEG-MAL) 在中性 PH 条件下对其进行修饰，在有效改善了其成药性（ ZAPPE H, SNELL M E, BOSSARD M J. PEGylation of cyanovirin-N, an entry inhibitor of HIV [J]. Advanced

Drug Delivery Reviews, 2008, 60 (1) : 79-87.) 。

- [6] Zappe 等人具体的修饰策略是：选择 62 和 14 位谷氨酰胺被半光氨酸替代的突变体分子量分别为 20KD 和 30KD 的 mPEG- 马来酰亚胺 (mPEG-MAL) 在中性 PH 和偏碱性 PH 条件下对其进行修饰，结果 14 位谷氨酰胺被半光氨酸替代的突变体 (CVN(Q14C)) 的修饰效率非常底，而 62 位谷氨酰胺被半光氨酸替代的突变体 (CVN(Q62C)) 在中性 PH、 CVN 突变体与 mPEG-MAL 摩尔比为 1： 3 的条件下修饰率较高。但是 CVN(Q62C) 抗 HIV 的活性较未突变的 CVN 要低，并且由于选择的修饰位点是在 CVN 的内部，所以经过 mPEG- 马来酰亚胺 30KDa (mPEG-MAL-30KDa) 修饰的体变体抗 HIV 的活性几乎丧失。
- [7] 发明内容
- [8] 针对现有技术存在的缺点和不足之处，本发明的目的首先是提供一种 CVN 突变体，其更容易在宿主中表达，更易于纯化，并且有利于进一步的修饰。
- [9] 本发明的另一目的是提供上述 CVN 突变体的修饰衍生物，以降低蛋白本身的细胞毒性和免疫原性，使其更适于应用。
- [10] 本发明的再一目的则是将上述突变体和修饰衍生物用于 制备预防和 / 或治疗艾滋病的药物。
- [11] 为实现上述目的，本发明提供以下技术方案：
- [12] 一种蓝藻病毒蛋白 N 突变体，其氨基酸序列由序列 A 和序列 B 组成，序列 A 位于序列 B 的 N 端，
- [13] 序列 A 如下述之一：
- [14] a. 列表中的 SEQ ID NO: 1 ；
- [15] b. 将列表中的 SEQ ID NO: 1 的氨基酸残基序列经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸，其具有亲水柔性的特点；
- [16] 序列 B 如下述之一：
- [17] c. 列表中的 SEQ ID NO: 2 ；
- [18] d. 将列表中的 SEQ ID NO: 2 的氨基酸残基序列经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸，但不改变其 N 端的前三个残基，且其具有特异性地抗 HIV 病毒活性；

- [19] 本发明还提供了蓝藻病毒蛋白 N 突变体的编码核苷酸序列。
- [20] 优选地，上述编码核苷酸序列包括下述序列之一：
- [21] e. 序列表中的 SEQ ID NO: 3 ；
- [22] f. 在高严谨条件下可与序列表中 SEQ ID NO: 3 限定的 DNA 序列杂交的核苷酸序列。
- [23] 这里的高严谨条件是指，低盐高温的杂交条件，如 $0.1 \times \text{SSC}$ ，0.1%SDS 和 65 °C 温度。
- [24] 上述核苷酸序列主要可用于在宿主中表达目标蛋白，含有上述核苷酸序列的表达载体，细胞系，宿主菌等均可以通过常规的技术手段得到。蛋白质从宿主中纯化过程也可采用常规的方法。
- [25] 在得到纯化蛋白的基础上，本发明还提供了 CVN 突变体修饰衍生物，是将上述 CVN 突变体的 N 末端进行 PEG 修饰，修饰位点一般是针对 N 末端甘氨酸残基的 α - 氨基。
- [26] 优选地，所述 PEG 修饰的修饰剂使用 mPEG-ALD（单甲氧基醚 PEG- 丙醛），所述 mPEG-ALD 的分子量优选为 10KD-20KD。
- [27] 上述突变体和 修饰衍生物均可用于在制备预防和 / 或治疗艾滋病的药物中的应用，基于相同的抗病毒机理，本发明的 突变体和 修饰衍生物可以应用于制备预防和 / 或治疗其他病毒微生物所致疾病的药物。
- [28] 相对于现有技术，本发明具有如下有益效果：
- [29] 本发明提供的 CVN 突变体及其修饰衍生物是为了更好的实现体外重组 CVN 的抗病毒功能，改造后的 L-CVN 抗 HIV 活性增强（WST 法和细胞融合法）。由于本发明制备的 LCVN 末端引入了亲水柔性的多肽序列，因此可以进行 N 端的定点氨基修饰。我们的实验结果证明，LCVN 经 N 端定点氨基修饰后，不仅可以获得有活性的修饰产物，并且修饰产物的抗病毒活性进一步增强。
- [30] 附图说明
- [31] 图 1 是 pET3c-6His-SUMO-LCVN 重组 质粒图。
- [32] 图 2 是重组 pET3C-6His-SUMO-LCVN 质粒 限制酶和 PCR 分析，其中 M: DL2000 DNA marker ；泳道 1: pET3C-6His-SUMO-LCVN / *Nde* I+*Bam*HI ；泳道

2: PCR。

[33] 图 3 是 SDS-PAGE 电泳分析 BL21/pET3c-6His-SUMO-LCVN 蛋白表达特性, 其中: 由左至右, 各泳道依次为未加 IPTG 诱导、IPTG 诱导 20h、诱导表达破碎离心上清、诱导表达破碎离心沉淀。

[34] 图 4 是纯化目的蛋白 LCVN, 其中: 由左至右, 各泳道依次为 Sumo-LCVN 融合蛋白、Sumo-LCVN 融合蛋白经 Sumo 蛋白酶酶切的混合物、LCVN 蛋白。

[35] (*) 表示 Sumo-LCVN 融合蛋白

[36] (**) 表示 LCVN 蛋白。

[37] 图 5 是 RP-HPL 分析重组 LCVN 的纯度。

[38] 图 6 是不同 pH 及投料比条件下 10K mPEG-ALD 修饰 LCVN 的 Tricine-SDS-PAGE 电泳图, 其中: 从左至右, 泳道 1 是蛋白 Maker, 泳道 2、3、4 分别是 PH3.5, LCVN 与 10K mPEG-ALD 摩尔比分别为 1:1、1:3、1:5 时的修饰产物电泳条带; 泳道 5、6、7 分别是 PH4.0, LCVN 与 10K mPEG-ALD 摩尔比分别为 1:1、1:3、1:5 时的修饰产物电泳条带; 泳道 8、9、10 分别是 PH5.0, LCVN 与 10K mPEG-ALD 摩尔比分别为 1:1、1:3、1:5 时的修饰产物电泳条带; 泳道 11、12、13 分别是 PH6.0, LCVN 与 10K mPEG-ALD 摩尔比分别为 1:1、1:3、1:5 时的修饰产物电泳条带; 泳道 14、15、16 分别是 PH7.0, LCVN 与 10K mPEG-ALD 摩尔比分别为 1:1、1:3、1:5 时的修饰产物电泳条带。

[39] 图 7 是不同 PH 及投料比条件下 10K mPEG-ALD 修饰 LCVN 的修饰率比较图。

[40] 图 8 是不同 PH 及投料比条件下 20K mPEG-ALD 修饰 LCVN 的 Tricine-SDS-PAGE 电泳图, 其中: 从左至右, 泳道 1 是蛋白 Maker, 泳道 2、3、4 分别是 PH3.5, LCVN 与 20K mPEG-ALD 摩尔比分别为 1:1、1:3、1:5 时的修饰产物电泳条带; 泳道 5、6、7 分别是 PH4.0, LCVN 与 20K mPEG-ALD 摩尔比分别为 1:1、1:3、1:5 时的修饰产物电泳条带; 泳道 8、9、10 分别是 PH5.0, LCVN 与 20K mPEG-ALD 摩尔比分别为 1:1、1:3、1:5 时的修饰产物电泳条带; 泳道 11、12、13 分别是 PH6.0, LCVN 与 20K

mPEG-ALD 摩尔比分别为 1:1、1:3、1:5 时的修饰产物电泳条带；泳道 14、15、16 分别是 PH7.0，LCVN 与 20K mPEG-ALD 摩尔比分别为 1:1、1:3、1:5 时的修饰产物电泳条带。

[41] 图 9 是不同 PH 及投料比条件下 20K mPEG-ALD 修饰 LCVN 的修饰率比较图。

[42] 图 10 是不同时间下，10K mPEG-ALD 修饰 LCVN 的 Tricine-SDS-PAGE 电泳图，其中：泳道 1 是蛋白 Maker，泳道 2-8 分别是反应 1h、3h、5h、7h、9h、12h 和 24h 后的样品电泳结果，泳道 9 是未修饰的 LCVN。

[43] 图 11 是不同时间下，20K mPEG-ALD 修饰 LCVN 的 Tricine-SDS-PAGE 电泳图，其中：泳道 1 是蛋白 Maker，泳道 2-8 分别是反应 1h、3h、5h、7h、9h、12h 和 24h 后的样品电泳结果，泳道 9 是未修饰的 LCVN。

[44] 图 12 是 10K mPEG-ALD 修饰 LCVN 经 SP-Sepharose 分离纯化的洗脱曲线。

[45] 图 13 是 10K mPEG-ALD 修饰 LCVN 经 SP-Sepharose 分离纯化各组分的 Tricine-SDS-PAGE 电泳图，其中：泳道 1 是蛋白 Maker，泳道 2-5 是修饰反应的混合物、上样穿透峰、含有 80mM NaCl 的 buffer A 的洗脱峰；含有 400mM NaCl 的 buffer A 的洗脱峰。

[46] 图 14 是 20K mPEG-ALD 修饰 LCVN 经 SP-Sepharose 分离纯化的洗脱曲线。

[47] 图 15 是 20K mPEG-ALD 修饰 LCVN 经 SP-Sepharose 分离纯化各组分的 Tricine-SDS-PAGE 电泳图，其中：泳道 1 是蛋白 Maker，泳道 2-5 是修饰反应的混合物、上样穿透峰、含有 70mM NaCl 的 buffer A 的洗脱峰；含有 400mM NaCl 的 buffer A 的洗脱峰。

[48] 图 16 是 MT-4 经不同浓度 LCVN 及其修饰产物处理后的细胞存活率（%）。

[49] 图 17 是 CVN 和 LCVN 对 HIV-1/IIIB 增殖的抑制率（%）。

[50] 图 18 是 LCVN 及其 PEG 修饰产物的抗人类免疫缺陷病毒活性，其中，图（a）相差显微镜下观察培养 24h 后的 (1)MOLT-4 细胞、(2) MOLT-4/IIIB 细胞、(3) 共培养后的细胞、(4) 假处理的共培养后的细胞、（5-8）浓度为 113nM 的 CVN/LCVN/10kPEG-LCVN/20kPEG-LCVN 处理后的共培养细胞，黑色箭头所示处为融合的巨大细胞。图 (b) CNV、LCVN、10kPEG-LCVN、20kPEG-LCVN

的融合抑制活性，所有实验至少是 3 次独立实验后的统计学处理结果。

[51] 图 19 是 LCVN 及其 PEG 修饰产物抗 HSV-1 活性的 CPE 观察结果。其中：

[52] A、正常对照；B、病毒对照；C、阳性药物 ACV 对照（1 μ g/ml）；D、L-CVN 样品（1.562 μ g/ml）；E、SUMO-L-CVN 样品（3.125 μ g/ml）；F、mPEG-ALD-10kDa-L-CVN（3.125 μ g/ml）；G、mPEG-ALD-20kDa-L-CVN（3.125 μ g/ml）。

[53] 具体实施方式

[54] 以下列举一些本发明优选的实施例，以助于进一步理解本发明，但本发明的实施方式不限于此。

[55] 本发明实施例涉及的主要材料如下：宿主菌大肠杆菌 BL21(DE3)（购自 Novagen 公司）、质粒 pET3c（购自 Novagen 公司）、pET3c-SUMO-CVN 由本室保存（其构建方法已申请专利“重组蓝藻抗病毒蛋白的制备方法及应用，申请号：200810198926.0”，质粒的构建亦可采用公知的基因工程方法，基本思路是首先通过 PCR 的方法得到 SUMO-CVN 融合序列，再连入 pET3c 载体即可得到质粒 pET3c-SUMO-CVN）；SUMO 蛋白酶（购自海基生物有限公司）；Taq 酶、T4 DNA 连接酶、DNA 分子量标准、各种限制性内切酶购自大连宝生物公司；蛋白质分子量标准品（购自聚研生物科技有限公司）、引物购自上海生工生物公司；Ni²⁺ Sepharose Fast Flow、SP Sepharose Fast Flow 购自 GE Healthcare 公司；MTT、WST 购自美国 SIGMA 公司；单纯疱疹病毒 1 型（HSV-1）F 株来自武汉大学病毒研究所（CGMCC No.0396）；Vero 细胞（CCL-81TM）、MOLT-4 细胞（CRL-1582TM）、MT-4 细胞（CRL-1942TM）、HIV-I/IIIB 病毒（CRL-1973TM）等来自美国典型菌种保藏中心（ATCC）；mPEG-ALD(10K) 和 mPEG-ALD(20K) 购自北京凯正生物工程发展有限公司。

[56] NTA-0 buffer（20mmol/L Tris-HCl，pH 8.0，0.15mol/L NaCl，），NTA-20 buffer（20mmol/L Tris-HCl，pH 8.0，0.15mol/L NaCl，20mmol/L 咪唑），NTA-250 buffer（20mmol/L Tris-HCl，pH 8.0，0.15mol/L NaCl，250mmol/L 咪唑），酶切缓冲液（20mmol/L Tris-HCl，pH 8.0，0.15mol/L NaCl），bufferA（20mmol/L NaAc-Ac，pH 4.0）。

[57] 实施例

[58] 1、构建重组质粒 **pET3c-6His-SUMO-LCVN**

[59] SUMO-L-CVN 基因的构建合成分两步进行，首先通过两次 PCR 合成 L-CVN 基因，第一次 PCR 以 pET3c-SUMO-CVN 质粒为模板，以 F1-CVN、R-CVN 为上下游引物。反应体系为模板 1ng，上下游引物各 1μM，20μl Taq PCR MasterMix，加水至 40μl，反应混合物 94℃ 变性 1min，退火至 55℃，保持 1 min，72℃ 延伸 1min，进行 29 个循环。反应产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳，胶回收目的片段，作为下一轮 PCR 的模板。第二次 PCR 以上一轮 PCR 产物为模板，F2-CVN、R-CVN 为上下游引物对（其中 F2-CVN 引物中含有编码 15 个氨基酸残基的柔性多肽），合成 L-CVN 全长序列。SUMO 全长序列通过 PCR 方法从 pET3c-SUMO-CVN 中合成。利用 SUMO 序列末端与 L-CVN 序列前端的 26bp 重叠互补序列进行 PCR：以 SUMO 序列和 L-CVN 序列为延伸模板，F-SUMO，R-CVN 为上下游引物，在常规的 PCR 条件下进行反应，反应产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳，并做胶回收，得到 SUMO-L-CVN 全长序列。

[60] 将质粒 pET3C 和 6His-SUMO-LCVN 全长序列分别用 *Nde* I 和与 *Bam*H I 双酶切，酶切产物 1% 琼脂糖凝胶电泳，回收酶切产物，T₄DNA 连接酶，连接产物转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞，涂布于含氨苄青霉素的 LB 平板上，37℃ 培养过夜，提取质粒，PCR 扩增及 *Nde* I 与 *Bam*H I 双酶切鉴定，阳性质粒送往英骏公司测序。

[61] 表 1 用于合成 SUMO-LCVN 全长序列的引物

引物名称	序列
F2-CVN	5' -CAGATTGGTGGTGGTGGCGGAGGGAGCGGTGGAGGG GGCAGTGGCGGAG-3'
F1-CVN	5' -GGAGGGGGCAGTGGCGGAGGAGGTAGCCTTGGTAAA TTCTCCCAG-3'
R-CVN	5' -AGA <u>GGATCC</u> TCATCATTCGTATTTTCAGGGTAC-3'
F-SUMO	5' -CAG <u>CATATG</u> CATCATCATCATC-3'
R-SUMO	5' -CTCCCTCCGCCACCACCACCAATCTGTTCTCTG-3'

[62] **2、LCVN 工程菌的摇瓶培养、蛋白纯化和纯度测定**

[63] 测序正确的质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3)，得工程菌

BL21[pET3c-6His-SUMO-LCVN]，挑选单克隆进行培养并诱导表达，收集菌体蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分析。结果表明 BL21 [pET3c-6His-SUMO-LCVN] 阳性克隆菌株经诱导后会表达大小约为 28kDa 的融合蛋白，未诱导对照组在相应位置无肉眼可见表达，经超声破碎菌体后，发现融合蛋白位于上清中，为可溶性表达，经凝胶光密度扫描，可溶性目的蛋白占上清总蛋白的 $28.3 \pm 3.4\%$ （图 3）。

[64] 选取高表达菌株接种到 1L 含氨苄青霉素（100 mg/L）的 LB 培养基中，37℃，180 rpm 培养至 $OD_{600} = 0.6 \sim 1.0$ 时，降温至 20℃ 加 IPTG 至终浓度 0.5mM 诱导表达 24h。4℃、6000×g、10min 离心收集菌体，冻融一次，然后将菌体沉淀以 1：10 比例重新悬浮于 NTA-10 buffer，超声破碎（工作时间 5s、间歇时间 5s，99 次，重复 3 遍），4℃、25000×g、30min 离心收集上清。

[65] 上清液上样柱床体积为 20ml 的 Ni-NTA 亲和层析柱，流速 0.6ml/min，NTA-0 buffer 洗回基线，流速为 1ml/min，NTA-20 buffer 洗杂蛋白，NTA-250 buffer 洗脱目的蛋白。纯化后的目的蛋白 6His-SUMO-LCVN 经 Sephadex G-25 分子筛脱

咪唑后进行 SUMO 蛋白酶酶切，除去 SUMO 融合蛋白。

[66] 6His-SUMO-LCVN 调整浓度至 1mg/ml，加入 1 U SUMO 蛋白酶 /mg 融合蛋白，30℃ 酶切 1h。因 6His-SUMO 标签、SUMO 蛋白酶均含有 6×His 标签，酶切后的样品再次上样 Ni-NTA 亲和层柱进行纯化，除去带 6His 标签的 SUMO、未酶切的 6His-SUMO-LCVN 和 SUMO 蛋白酶，得到非融合的目的蛋白 LCVN，经 G-25 分子筛柱脱盐后冷冻干燥，得 LCVN 制品，供后续理化性质测定、活性测定或 PEG 修饰用。

[67] 图 3 是工程菌 BL21[pET3c-6His-SUMO-LCVN] 经 IPTG 诱导后的蛋白表达图谱，可见经诱导后，在分子量 28kD 处出现明显增粗的蛋白带（泳道 3），与 6His-SUMO-LCVN 的理论分子量相符，超声破碎后，目的蛋白位于菌体破碎后的上清中，含量占菌体可溶性蛋白的 40%（泳道 2）。图 4 是 SDS-PAGE 分析 LCVN 纯化过程，其中 * 所示处为 6His-SUMO-LCVN 融合蛋白，** 所示处为 LCVN 蛋白。图 5 是 LCVN 制品的反向高效液相色谱（RP-HPLC）纯度分析结果，柱型是 C-18 反向柱，检测器波长为 280nm，流动相 A：含 0.1 % 三氟乙酸（TFA）的超纯水，流动相 B：乙腈，经 40 % -60 % 的 B 进行梯度洗脱，保留时间在 4-6min 之间出现 LCVN 的洗脱峰。

[68] **3、LCVN 工程菌的中试发酵和蛋白制备**

[69] 工程菌 BL21[pET3c-6His-SUMO-LCVN]，挑选单克隆进行培养并在试管中诱导表达，选取高表达菌株进行中试发酵。分别在锥形瓶中培养一级和二级种子，培养二级种子至合适浓度，以 10 % 接种量接种到 15L 的发酵培养基中。自动控制温度为 37℃，适时调整转速和通气量以保持合适的溶氧水平，NaOH 和 HCl 调节 PH 为 7.0 ~ 7.2。当菌体密度（OD₆₀₀）为 12 左右时，温度降至 20℃，加 IPTG 至终浓度 0.5mM 诱导表达 20h。100ml/min，9000g，连续流离心收集菌体，15L 的发酵培养基可以收获约 550g 的湿菌体，收集的菌体于 -20℃ 冰箱保存。

[70] 菌体沉淀以 1 : 10 比例悬浮于 NTA-0 buffer，超声破碎（工作时间 5s、间歇时间 5s，99 次，重复 3 遍），4℃、25000×g、30min 离心收集上清。柱床体积为 20ml 的 Ni-NTA 填料上样量为 250ml 上清，流速 1ml/min，NTA-0 buffer 洗

回基线；流速为 1ml/min, NTA-20 buffer 洗杂蛋白，NTA-250 buffer 洗脱目的蛋白。纯化后的目的蛋白 6His-SUMO-LCVN 经 Sephadex G-25 分子筛脱咪唑后进行 SUMO 蛋白酶酶切，除去 SUMO 融合蛋白。

- [71] 6His-SUMO-LCVN 调整浓度至 1mg/ml，加入 1 U SUMO 蛋白酶 /mg 融合蛋白，30°C 酶切 1h。因 6His-SUMO 标签、SUMO 蛋白酶均含有 6×His 标签，酶切后的样品再次上样 Ni-NTA 亲和层柱进行纯化，除去带 6His 标签的 SUMO、未酶切的 6His-SUMO-LCVN 和 SUMO 蛋白酶，得到非融合的目的蛋白 LCVN，经 G-25 分子筛柱更换缓冲液，再用截留量 3KD 的超滤管浓缩 LCVN 蛋白，供后续理化性质测定、活性测定或 PEG 修饰用。

[72] **4、LCVN 蛋白的 PEG 修饰**

- [73] 对药用蛋白进行 PEG 修饰是改善其药代特性、稳定性和免疫原性等多种成药性质的有效方法。蛋白质可供 PEG 修饰的位点包括侧链氨基、N 端氨基、侧链羧基、C 端羧基、侧链巯基等多种。现有的羧基修饰技术容易产生非特异性交联反应，因此氨基修饰更为常用，技术发展也更为成熟。Zappe 等的研究结果表明，对野生型 CVN 的侧链氨基或 N 端氨基的修饰都会破坏该蛋白的活性，因此，作者首先对 CVN 进行定点突变，获得 Q62C 突变体，然后对 62 位引入的 Cys 进行侧链巯基修饰，获得了有活性的蛋白。由于天然 CVN 中已有的 4 个 Cys 残基之间形成 2 对二硫键，并且在溶液中，蛋白质的二硫键处在动态异构和平衡状态，因此引入 Q62C 突变后，很难避免引入的 Cys 不干扰二硫键的正确搭配，或者非 62 位的 Cys 修饰，作者最后的实验结果也证明，CVN Q62C 突变体及其修饰产物的活性均低于野生型 CVN。

- [74] 由于本发明制备的 LCVN 末端引入了亲水柔性的 15 肽序列，因此可以尝试进行 N 端的定点氨基修饰。我们的实验结果证明，LCVN 经 N 端定点氨基修饰后，不仅可以获得有活性的修饰产物，并且修饰产物的抗病毒活性进一步增强。

- [75] 对氨基的 PEG 修饰方法很多，可供选择的修饰剂也很多，本发明选择 mPEG-ALD(10K) 和 mPEG-ALD(20K) 作为修饰剂，从底物：修饰剂比例、修饰 pH、修饰反应时间等 3 个方面，筛选了 LCVN 的最佳 PEG 修饰条件。

- [76] 选择 pH 为 3.5，4.0，5.0，6.0，7.0，离子强度为 20mM 的 Na-Ac 缓冲液

，反应体系中 LCVN 的浓度为 5mg/ml，LCVN 与 mPEG-ALD(10K) 的摩尔比分别选择为 1:1，1:3，1:5；NaCNBH₃ 的终浓度为 5mg/ml。室温下，振荡器上摇动反应，在反应 3h 后取样，电泳鉴定修饰反应的效果。mPEG-ALD(10K) 修饰 LCVN 的单修饰产物在 SDS-PAGE 上的表观分子量约 30KD，SDS-PAGE 分析结果表明，在 pH4.0，LCVN 与 mPEG-ALD(10K) 的摩尔比为 1:3 的条件下，单修饰率最高（图 6）。

[77] 类似方法，研究 mPEG-ALD(20K) 修饰 LCVN 的最佳修饰 pH 和投料比。mPEG-ALD(20K) 修饰 LCVN 后，单修饰产物在 SDS-PAGE 上的表观分子量约 50KD，实验结果表明：在 pH5.0，LCVN 与 mPEG-ALD(20K) 的摩尔比为 1:1 的条件下，单修饰率最高（图 18）。

[78] 在确定了最佳的修饰 pH 和投料比下，mPEG-ALD(10K) 和 mPEG-ALD(20K) 修饰 LCVN 分别在反应 1h、3h、5h、7h、9h、12h 和 24h 取样，Tricine-SDS-PAGE 电泳鉴定最佳的反应时间。SDS-PAGE 分析结果表明：反应时间对 mPEG-ALD(10K) 和 mPEG-ALD(20K) 修饰 LCVN 的反应没有显著影响，综合考虑时间成本，优选最佳修饰反应时间为室温振荡反应 2h（图 10 和图 11）。

[79] **5、LCVN 的 PEG 修饰产物的分离纯化**

[80] LCVN 经 PEG-ALD 修饰后，反应混合物中主要有未修饰的 LCVN，剩余的 PEG，PEG 多修饰的 LCVN，PEG 单修饰的 LCVN。采用 AKTA prime plus 分离纯化系统，SP sepharose 层析柱分离纯化单修饰的 mPEG-ALD-LCVN，流动相为 20mM 的 Na-Ac 缓冲液（buffer A），上样前先用 5 倍柱体积的 bufferA 平衡柱子，上样后收集穿透峰，然后用含有不同浓度 NaCl 的 bufferA 进行洗脱，收集各个洗脱峰。流速是 1ml/min，检测波长是 280nm。收集到的样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳检测。

[81] mPEG-ALD（10K）修饰 LCVN 的混合物，经 SP sepharose 阳离子层析纯化之后，修饰剂 mPEG-ALD 和多修饰产物不与 SP sepharose 结合而被穿透，含有 80mM NaCl 的 buffer A 洗脱产物为单修饰的 mPEG-ALD_(10K)-LCVN；含有 400mM NaCl 的 buffer A 洗脱产物是未修饰的 LCVN。图 12 为 mPEG-ALD_(10K)

-LCVN 分离纯化的洗脱曲线，峰 1 为修饰剂和多修饰产物，峰 2 为单修饰产物，峰 3 为未修饰底物。图 13 为 SDS-PAGE 分析各洗脱组份，泳道 M 为蛋白质分子量标准；泳道 A 为上样样品，可见未修饰底物、单修饰产物和多修饰产物；泳道 1 是穿透峰；泳道 2 是单修饰产物，也就是目的蛋白 mPEG-ALD_(10K)-LCVN；泳道 3 为未修饰产物。

[82] mPEG-ALD (20K) 修饰 LCVN 的混合物，经 SP sepharose 阳离子层析纯化之后，修饰剂 mPEG-ALD 和多修饰产物也存在于上样穿透峰中，含有 70mM NaCl 的 buffer A 洗脱产物为单修饰的 mPEG-ALD_(20K)-LCVN；含有 400mM NaCl 的 buffer A 洗脱产物是未修饰的 LCVN。

[83] 图 14 为 mPEG-ALD_(20K)-LCVN 分离纯化的洗脱曲线，峰 1 为修饰剂和多修饰产物，峰 2 为单修饰产物，峰 3 为未修饰底物。图 15 为 SDS-PAGE 分析各洗脱组份，泳道 M 为蛋白质分子量标准；泳道 A 为上样样品，可见未修饰底物、单修饰产物和多修饰产物；泳道 1 是穿透峰；泳道 2 是单修饰产物，也就是目的蛋白 mPEG-ALD_(10K)-LCVN；泳道 3 为 400mM NaCl 洗脱组份，可见未修饰产物，但也含

[84] 有部分单修饰产物。

[85] 应用实施例 1 WST 法测定 LCVN 对 T 细胞的细胞毒性

[86] CVN、LCVN 及 PEG 修饰产物以 RPMI-1640 培养液作 5 倍系列稀释，加至 96 孔细胞培养板中，每孔 50 μ l，CVN 和 LCVN 稀释范围为 10 μ g/ml 至 0.04 μ g/ml，PEG 修饰 LCVN 的稀释范围为 50 μ g/ml 至 0.19 μ g/ml。MT-4 细胞调整浓度至 1×10^5 /ml，每孔 100 μ l，混匀，置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养，同时设细胞对照和阳性药物对照（63nM 叠氮胸苷，AZT），每个样品均平行测定 3 个复孔。4 天后培养板中每孔加入 10 μ l WST-1（水溶性四氮唑，5mmol/L）溶液，继续培养 4 小时，置读板仪上读取吸光值（A），波长 450/650nm，计算细胞存活率（Relative percentage, RP，%），并根据 RP 计算 50% 毒性浓度（CC₅₀）。

[87] 细胞存活率（Relative percentage, %）= 药物处理组 A 值 / 细胞对照组 A 值 $\times 100\%$ 。

[88] 图 16 是不同浓度 CVN、LCVN 及其修饰产物等 4 种蛋白处理 MT-4 后的细胞存活率，图中 N.C. 指未处理的细胞对照，以细胞对照的密度为 100%。AZT 为阳性对照药物，63nM 叠氮胸苷。经计算后的 50% 毒性浓度如表 2 所示。

[89] 表 2 LCVN 及其 PEG 修饰产物的 50% 毒性浓度

Sample	Cytotoxicity (CC50, μ M)
AZT	> 4.482
CVN	0.160 $\pm$ 0.009
LCVN	0.658 $\pm$ 0.277
mPEG-ALD _(10K) -LCVN	4.519 $\pm$ 0.191
mPEG-ALD _(20K) -LCVN	3.629 $\pm$ 0.137

[90] 应用实施例 2 WST 法测定 LCVN 的抗人类免疫缺陷病毒活性

[91] CVN、LCVN 及 PEG 修饰产物以 RPMI-1640 培养液作 5 倍系列稀释，加至 96 孔细胞培养板中，每孔 50 μ l。MT-4 细胞调整浓度至 1×10^5 /ml，每孔 100 μ l，混匀，然后加入 HIV-1/IIIB 病毒悬液 50 μ l，滴度为 100TCID₅₀。置 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养，同时设细胞对照、病毒对照和阳性药物对照（叠氮胸苷，AZT），每个样品均平行测定 3 个复孔。4 天后培养板中每孔加入 10 μ l WST-1（水溶性四氮唑，5mmol/L）溶液，继续培养 4 小时，置读板仪上读取吸光值（A），波长 450/650nm。

[92] 细胞存活率（Relative percentage, %）= 药物处理组 A 值 / 细胞对照组 A 值 $\times 100\%$ 。

[93] 病毒抑制率（%）=（药物处理组 A_{450/650}-病毒对照组 A_{450/650}）/（细胞对照组 A_{450/650}-病毒对照组 A_{450/650}） $\times 100\%$

[94] Reed-Muench 法计算 50% 抑制浓度（IC₅₀），并根据实施例 x 的 50% 毒性浓度（CC₅₀），并算选择指数（TI），TI=CC₅₀/IC₅₀。

[95] 由表 3 可以看出，对于阳性药物 AZT 而言，CVN、LCVN 对 HIV-1/IIIB 增殖的抑制活性更强。

[96] 表 3 CVN 和 LCVN 对 HIV-1/IIIB 增殖的抑制活性

Sample	IC50 (nM)	CC50 (μM)	SI
AZT	36.55±5.64	> 4.482	122
CVN	21.83±2.79	0.160±0.009	7.3
LCVN	14.17±6.43	0.658±0.277	46.4

- [97] 应用实施例 3 融合抑制法测定 LCVN 及其 PEG 修饰产物的抗人类免疫缺陷病毒活性
- [98] 现有研究表明, HIV 在 T 细胞之间的传播主要是通过感染细胞表面表达的 gp120 的介导, 而与未感染的细胞上的受体结合, 形成融合细胞而发生。CVN 可以特异性结合 gp120 而抑制感染细胞与正常细胞之间的融合而阻断病毒的传播, 因此, 我们应用细胞融合抑制模型测定 LCVN 及其衍生物的抗病毒活性 [Tochikura TS, Nakashima H, Tanabe A, Yamamoto N. Human immunodeficiency virus (HIV)-induced cell fusion: quantification and its application for the simple and rapid screening of anti-HIV substances in vitro. Virology, 1988, 164(2): 542-546]。
- [99] 生长至对数期的 MOLT-4 细胞和 MOLT-4/IIIB 细胞调整密度至 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 各取 250μl 细胞悬液, 等体积混合, 加至 24 孔细胞培养板中 (细胞总数为 $5 \times 10^5/500\mu\text{l}$ 孔); CVN、LCVN 及其 PEG 修饰产物以含胎牛血清和抗生素的 RPMI-1640 培养基作 4 倍系列稀释, 每种受试药物选择 3 个浓度 (452nM, 113nM, 28nM), 等体积加至细胞悬液中, 同时设置各种对照组, 所有样品平行 2 个复孔, 37℃、5%CO₂ 培养 24 小时。24h 后取细胞悬液, 台盼蓝染色后充入细胞计数池, 显微镜下计数存活的 MOLT-4 细胞数目。由于 MOLT-4/IIIB 细胞能不断产生 HIV-I/IIIB 病毒颗粒, 并且通过与正常 MOLT-4 细胞的融合, 形成大的多核细胞 (合胞体) 而感染正常宿主细胞, 在细胞计数时, 融合细胞无法进入计数池, 因此, 计数细胞计数池中正常大小 MOLT-4 或 MOLT-4/IIIB 细胞数, 可以推算形成合胞体的细胞数目, 比较给药共培养组的细胞数和未进行共培养组的 MOLT-4 细胞数, 计算融合指数 (FI, fusion index) :
- [100]
$$FI = 1 - (\text{共培养细胞孔的细胞数} \div \text{只含 MOLT-4 细胞的对照孔中的细胞数})$$

[101] 比较给药共培养细胞和未给药共培养细胞的融合指数，计算融合抑制率（FIR， fusion inhibition rate）：

[102] $FIR(\%) = [1 - (FI_T / FI_C)] \times 100$ ，其中 FI_T 是给药样品的融合指数， FI_C 是未给药共培养细胞的融合指数。

[103] 表 4 LCVN 及其 PEG 修饰产物对细胞的融合抑制率 (%)

	融合抑制率 (452nM)	融合抑制率 (113nM)	融合抑制率 (28nM)
CVN	69.97 ± 8.70	56.80 ± 12.79	34.54 ± 8.48
L-CVN	83.18 ± 6.27	79.43 ± 15.40	91.70 ± 1.45
PEG10K-LCVN	91.67 ± 7.66	92.77 ± 10.06	56.03 ± 13.96
PEG20K-LCVN	99.12 ± 2.17	89.90 ± 4.72	29.27 ± 8.51

[104] 表 4 可以看出，LCVN 对 HIV-1/IIIB 的融合抑制活性不论在何剂量组中，均明显高于 CVN；另外，在中剂量和高剂量时，LCVN 的 PEG 修饰产物的活性要高于未修饰的 LCVN。

[105] 图 18 (a) 是相差显微镜下观察培养 24h 后的 (1)MOLT-4 细胞、(2) MOLT-4/IIIB 细胞、(3) 共培养后的细胞、(4) 假处理的共培养后的细胞、(5-8) 浓度为 113nM 的 CVN/LCVN/10kPEG-LCVN/20kPEG-LCVN 处理后的共培养细胞，黑色箭头所示处为融合的巨大细胞，可见未共培养组中无融合细胞，共培养组中出现典型融合细胞，而给药组基本看不到融合细胞。

[106] 图 18 (b) 是 CNV、LCVN、10kPEG-LCVN、20kPEG-LCVN 的融合抑制活性，所有实验至少是 3 次独立实验后的统计学处理结果。可见 LCVN 对 HIV-1/IIIB 的融合抑制活性不论在何剂量组中，均明显高于 CVN；另外，在中剂量和高剂量时，LCVN 的 PEG 修饰产物随着分子量的增大，活性逐步增强，但在低剂量组中，PEG 修饰产物的活性随分子量增大而逐步降低。

[107] 应用实施例 4 MTT 法测定 LCVN 的抗单纯疱疹病毒（HSV-1）活性

[108] 单纯疱疹病毒 I 型 (HSV-I) 是一种在人群中引起广泛感染的 DNA 病毒，人类是其唯一的宿主，健康成人中约有 90% 感染 HSV-1。HSV-I 可引起唇疱疹、疱

疹性角膜结膜炎、新生儿脑炎等多种疾病，由于 HSV-I 可在神经节内潜伏感染，故症状易复发。本实验用 MTT 法测定重组 LCVN 及其修饰产物、野生型 CVN 对 Vero 细胞的毒性；CPE 法观察药物对细胞的活性。

- [109] 单层 Vero 细胞中，加入不同稀释度的受试药物和 100TCID₅₀ 的 HSV-1 病毒液各 50 μ l，同时设正常细胞对照及病毒对照组。5% CO₂ 培养 48h，每孔加入 5mg/ml MTT 10 μ l，5% CO₂ 继续培养 4h，弃上清液，每孔加入 200 μ l DMSO，室温避光放置 30min，振摇培养板 10min 左右，酶标读数仪比色（波长 570nm，参比波长 630nm），测定吸光度并计算样品的 50% 毒性浓度（50% cytotoxic concentration, CC₅₀）。
- [110] 图 19 是一次典型实验后细胞在相差显微镜下的形态，可见病毒对细胞所致的细胞病变效应，以及药物对细胞的保护效应。结果表明，LCVN 及其修饰产物均具有良好的抗 HSV-1 活性，在质量浓度接近、摩尔浓度更低的条件下，LCVN 及其 PEG 修饰产物表现出与阳性对照药物 ACV 基本接近的抗病毒活性。毒性测定结果表明，PEG 修饰后的 LCVN 对 Vero 细胞的毒性也明显降低。
- [111] 上述实施例为本发明较佳的实施方式，但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制，其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化，均应为等效的置换方式，都包含在本发明的保护范围之内。

权利要求书

- [权利要求 1] 一种蓝藻病毒蛋白N突变体，其特征在于：其氨基酸序列由序列A和序列B组成，序列A位于序列B的N端，序列A如下述之一：
- a. 序列表中的SEQ ID NO: 1;
 - b. 将序列表中的SEQ ID NO: 1的氨基酸残基序列经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸，其具有亲水柔性的特点；
- 序列B如下述之一：
- c. 序列表中的SEQ ID NO: 2;
 - d. 将序列表中的SEQ ID NO: 2的氨基酸残基序列经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸，但不改变其N端的前三个残基，且其具有特异性地抗HIV病毒活性。
- [权利要求 2] 权利要求1所述蓝藻病毒蛋白N突变体的编码核苷酸序列。
- [权利要求 3] 据权利要求2所述蓝藻病毒蛋白N突变体的编码核苷酸序列，其特征在于：包括下述序列之一：
- e. 序列表中的SEQ ID NO: 3;
 - f. 在高严谨条件下可与序列表中SEQ ID NO: 3限定的DNA序列杂交的核苷酸序列。
- [权利要求 4] 一种表达载体，其特征在于：含有权利要求2或3所述的核苷酸序列。
- [权利要求 5] 一种宿主菌，其特征在于：含有权利要求2或3所述的核苷酸序列。
- [权利要求 6] 一种蓝藻病毒蛋白N突变体修饰衍生物，其特征在于：是将权利要求1所述蓝藻病毒蛋白N突变体的N末端进行PEG修饰。
- [权利要求 7] 根据权利要求6所述蓝藻病毒蛋白N突变体修饰衍生物，其特征在于：所述PEG修饰的修饰剂使用单甲氧基醚PEG-丙醛。
- [权利要求 8] 根据权利要求6所述蓝藻病毒蛋白N突变体修饰衍生物，其特征在于：所述mPEG-ALD的分子量为10KD-20KD。

- [权利要求 9] 权利要求1所述蓝藻病毒蛋白N突变体在制备预防和/或治疗艾滋病的药物中的应用。
- [权利要求 10] 权利要求6-8中任一项所述蓝藻病毒蛋白N突变体的修饰衍生物在制备预防和/或治疗艾滋病的药物中的应用。

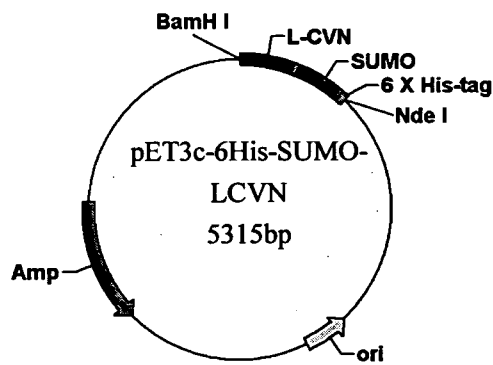


图 1

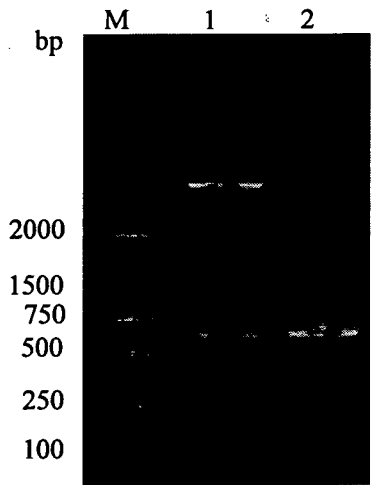


图 2

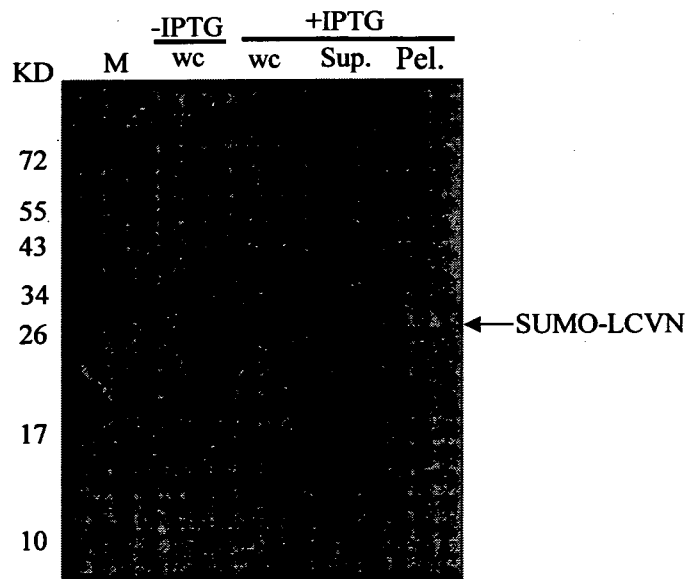


图 3

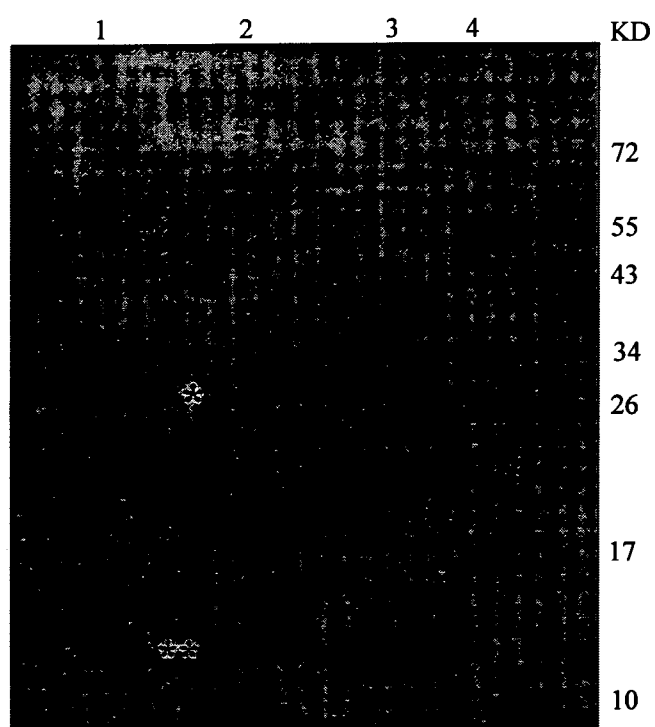


图 4

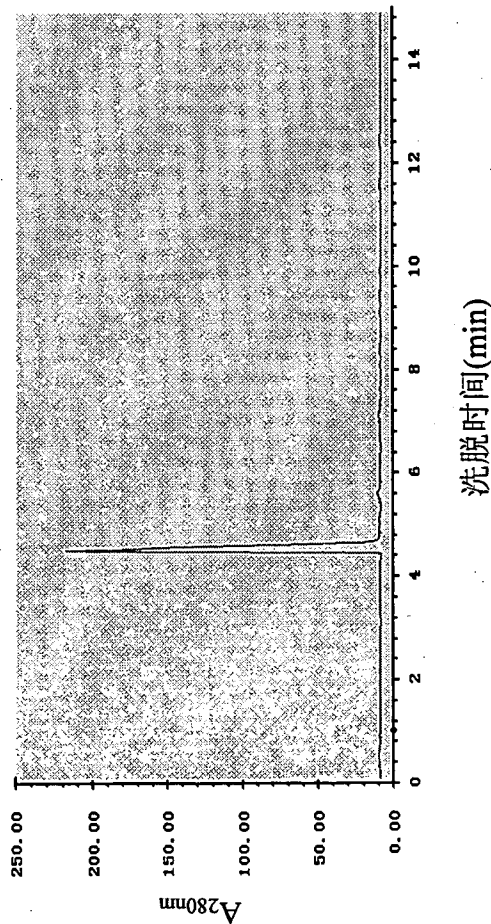


图 5

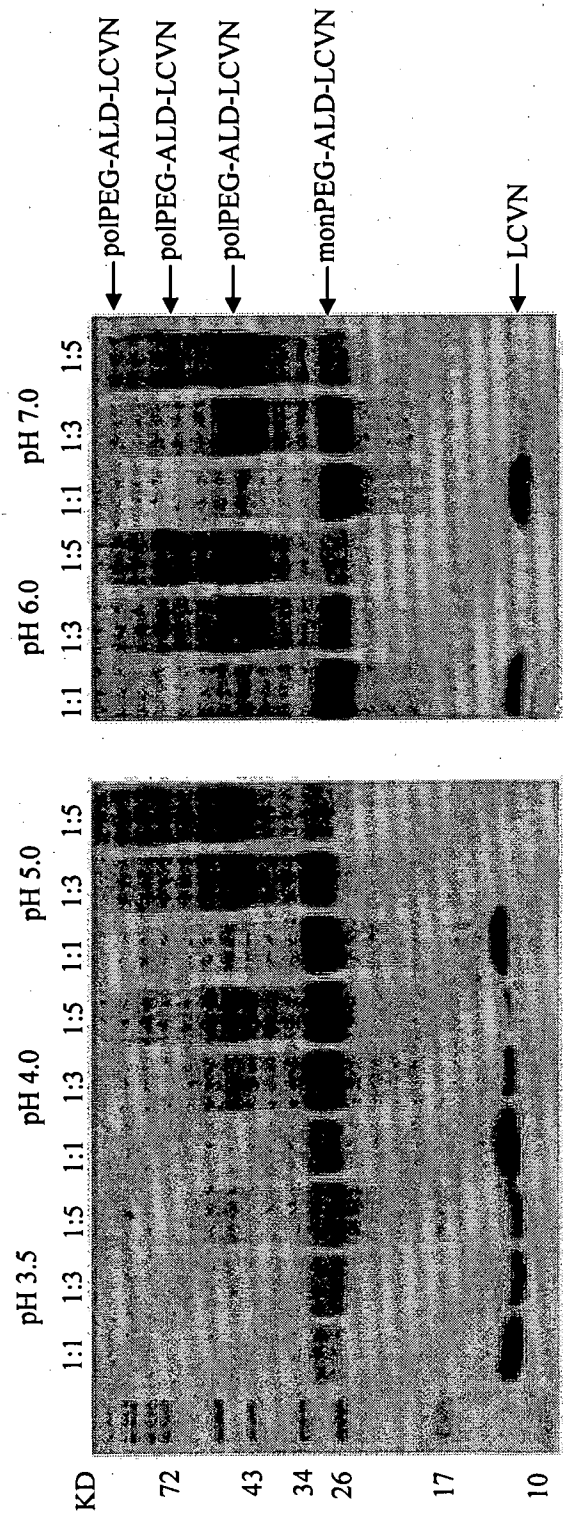


图 6

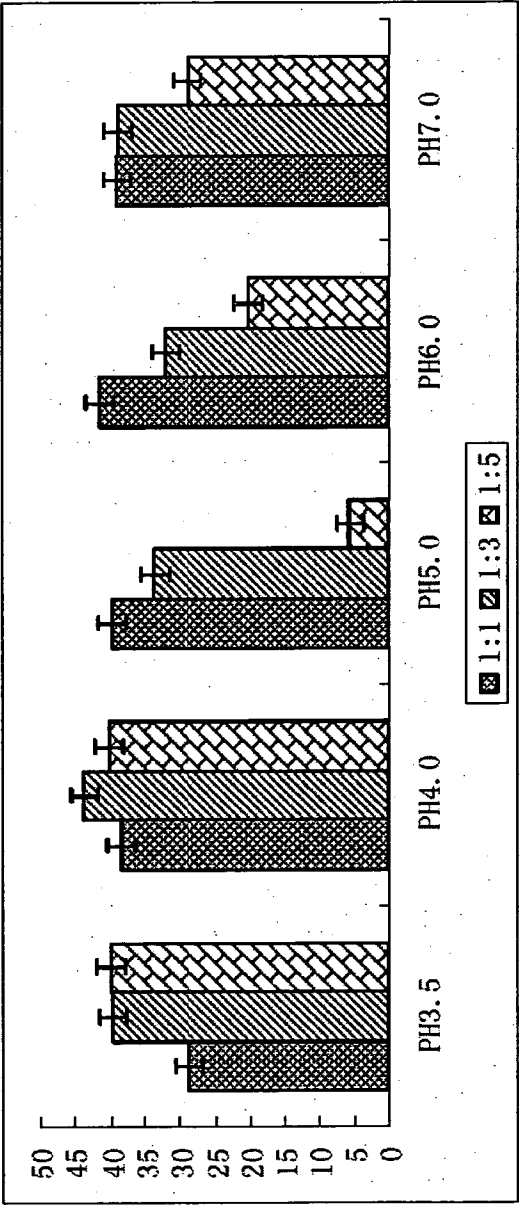


图 7

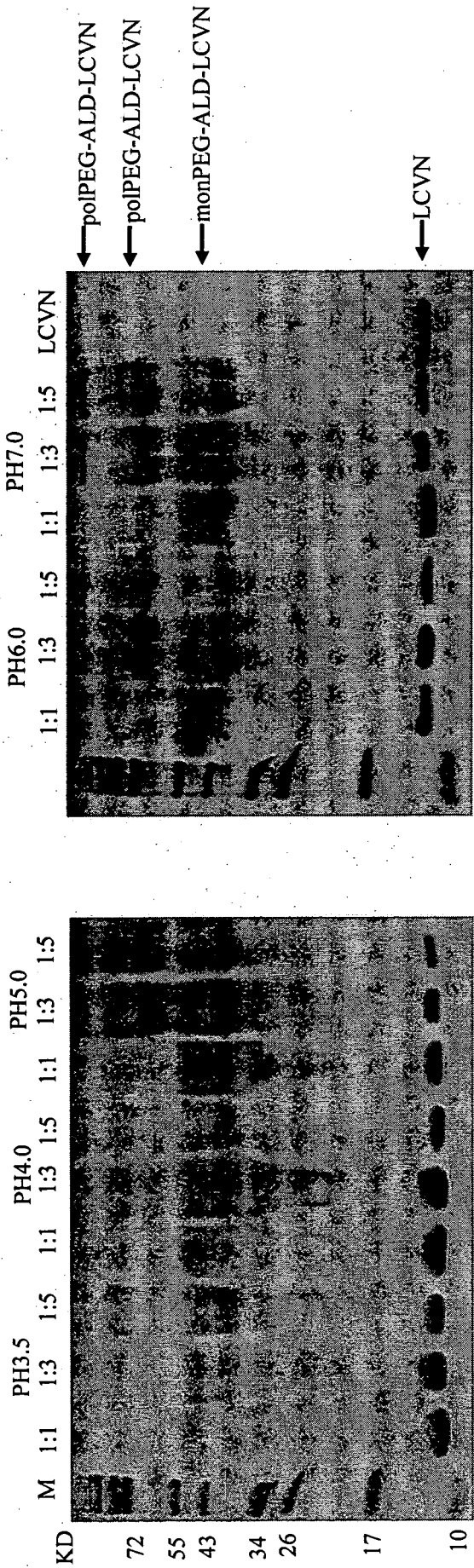


图 8

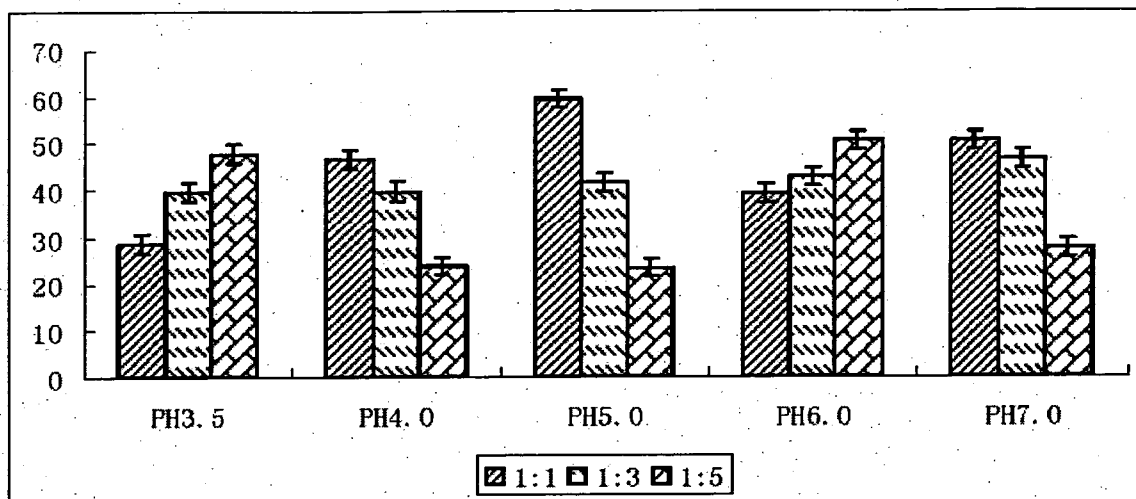


图 9

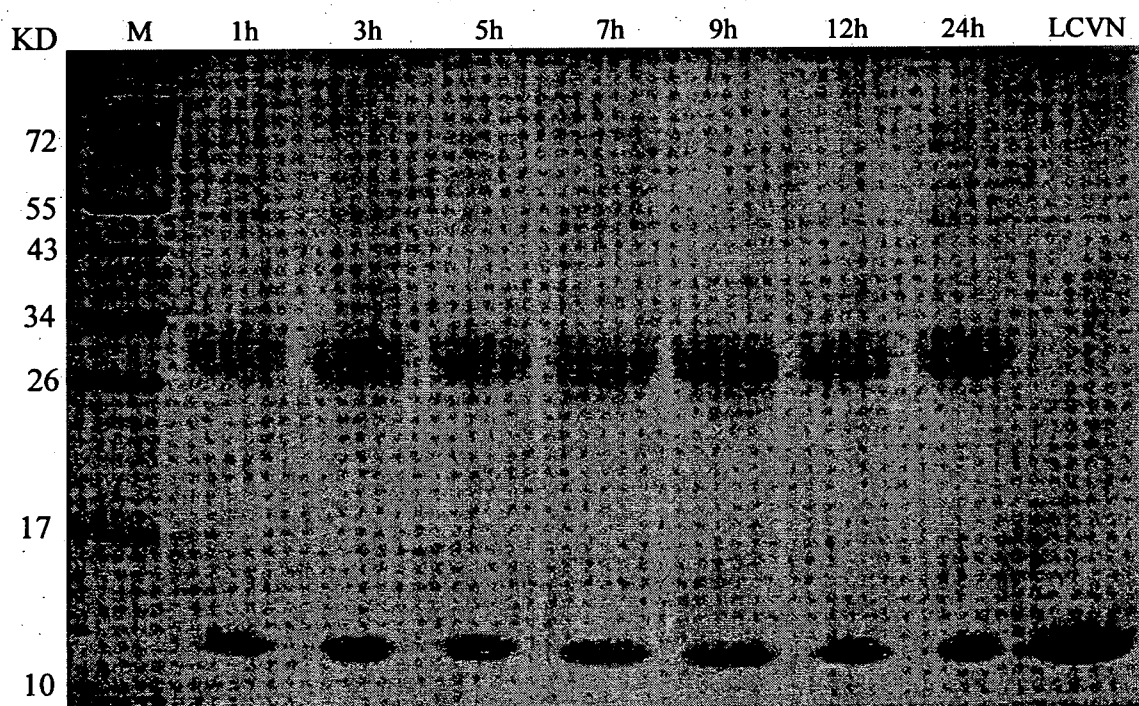


图 10

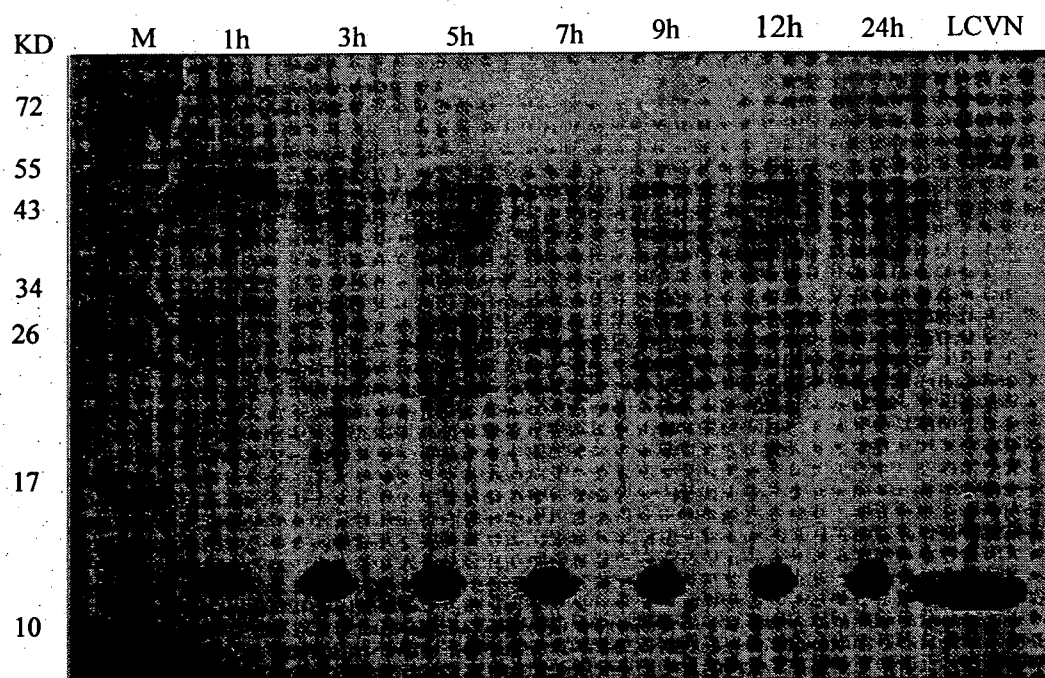


图 11

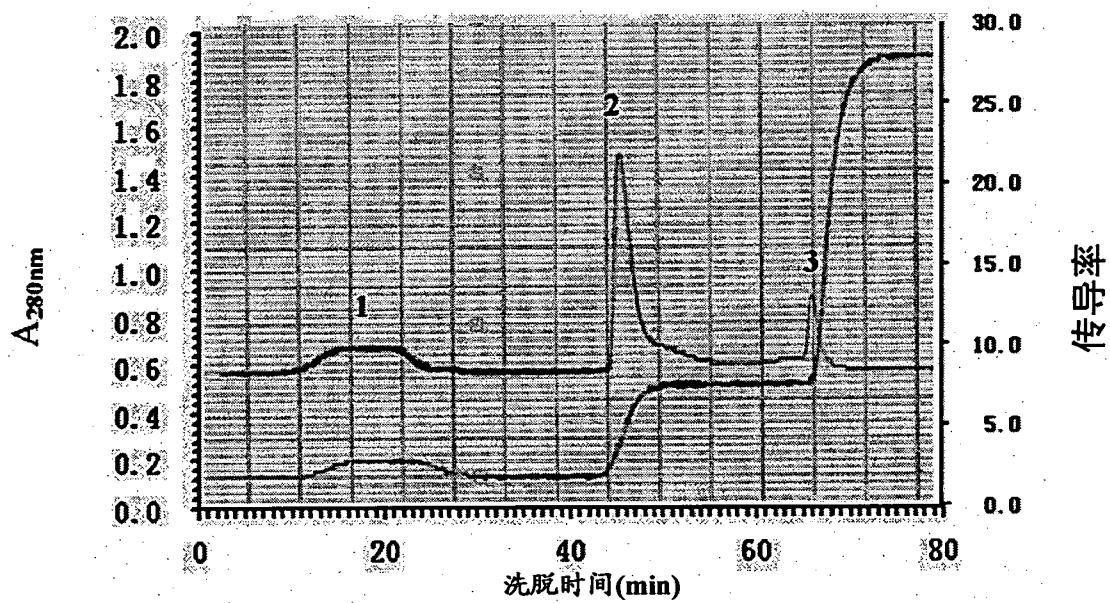


图 12

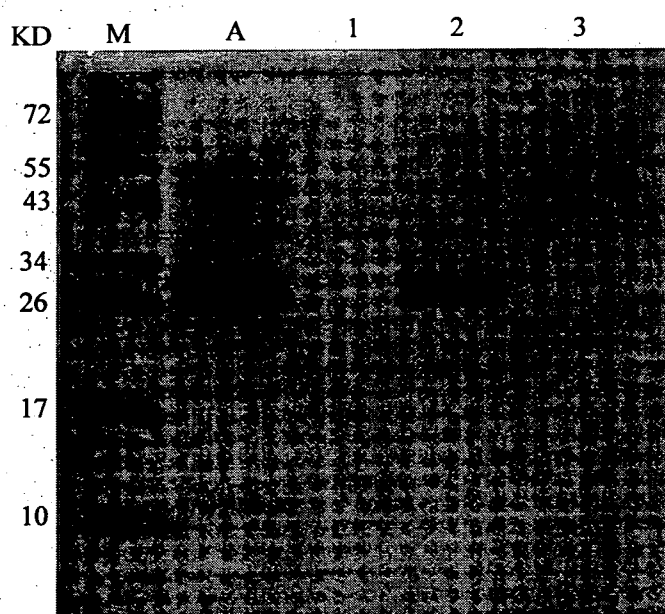


图 13

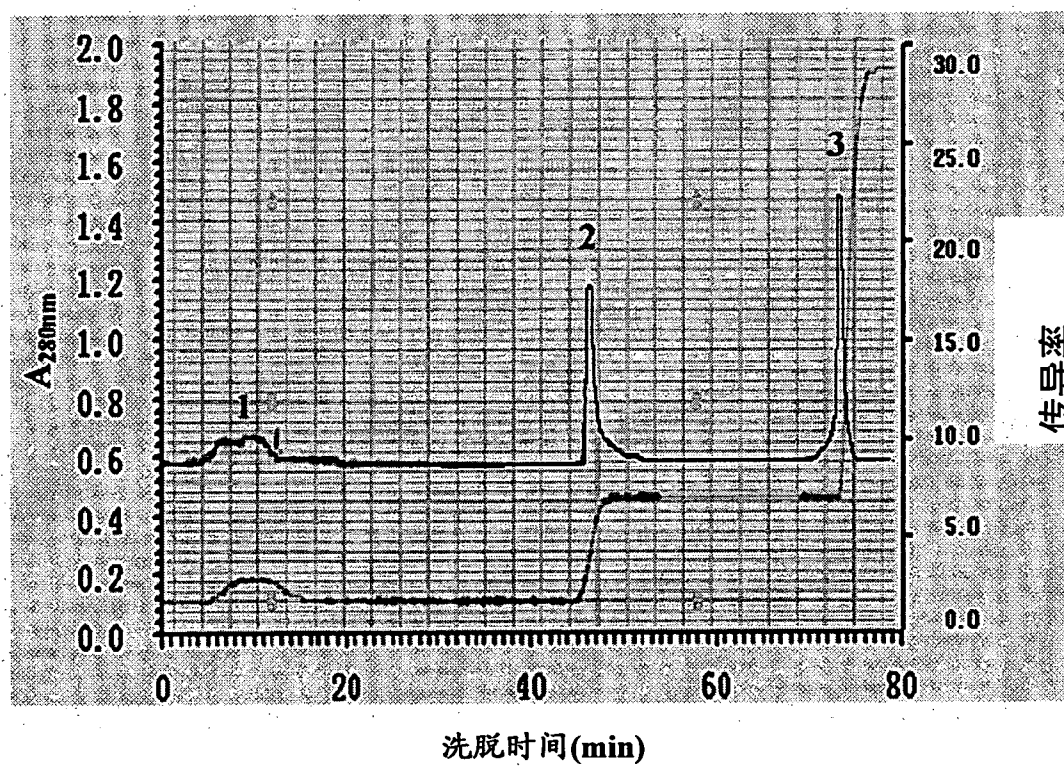


图 14

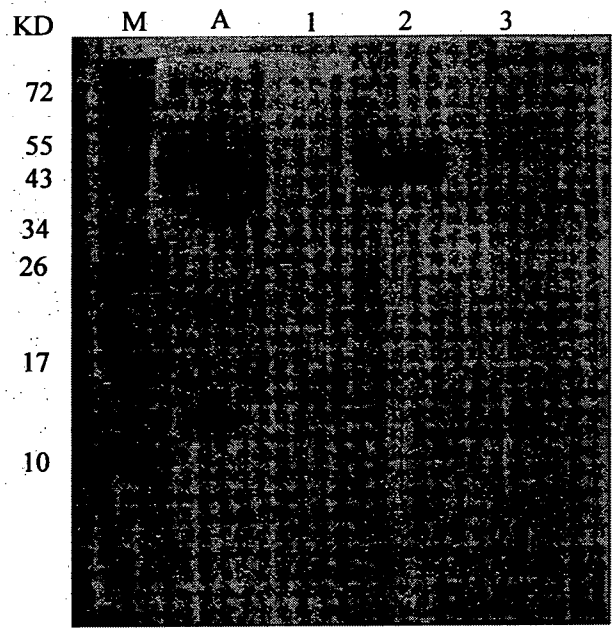


图 15

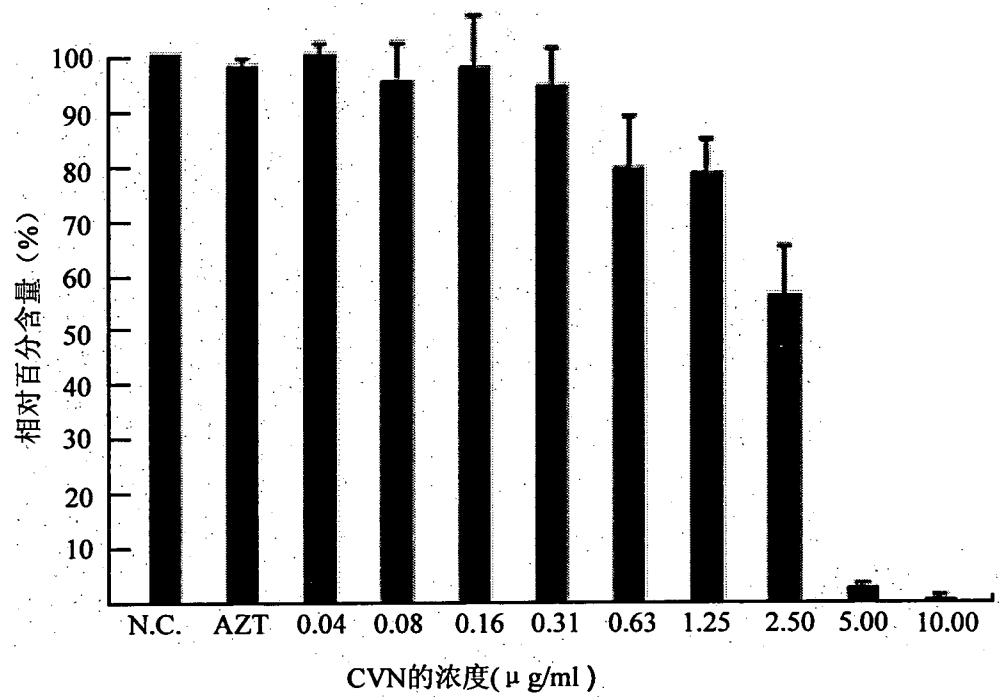


图 16 (a)

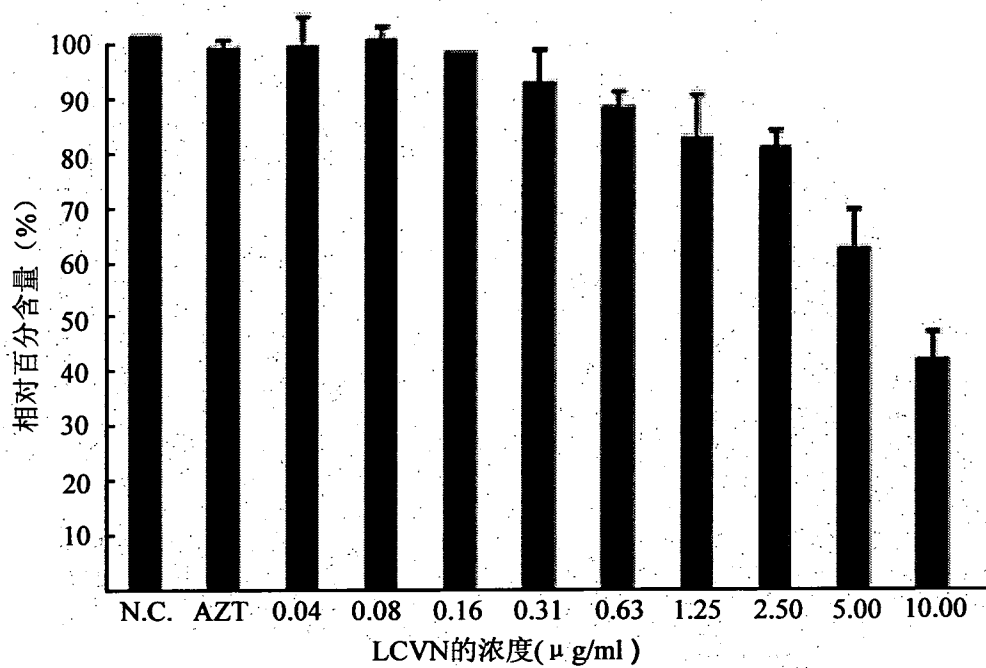


图 16(b)

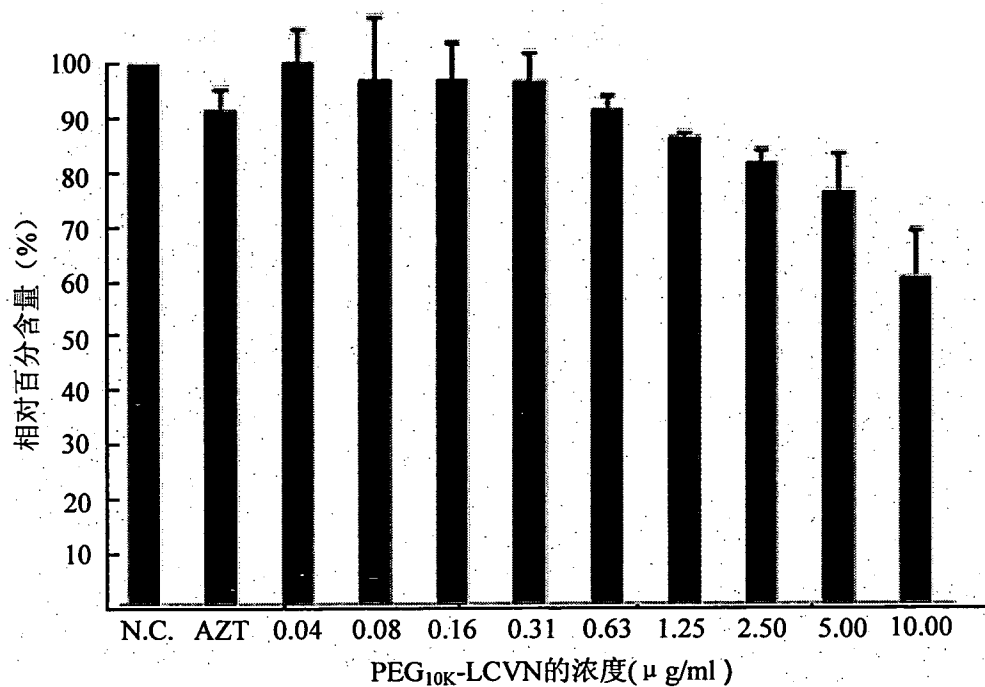


图 16 (c)

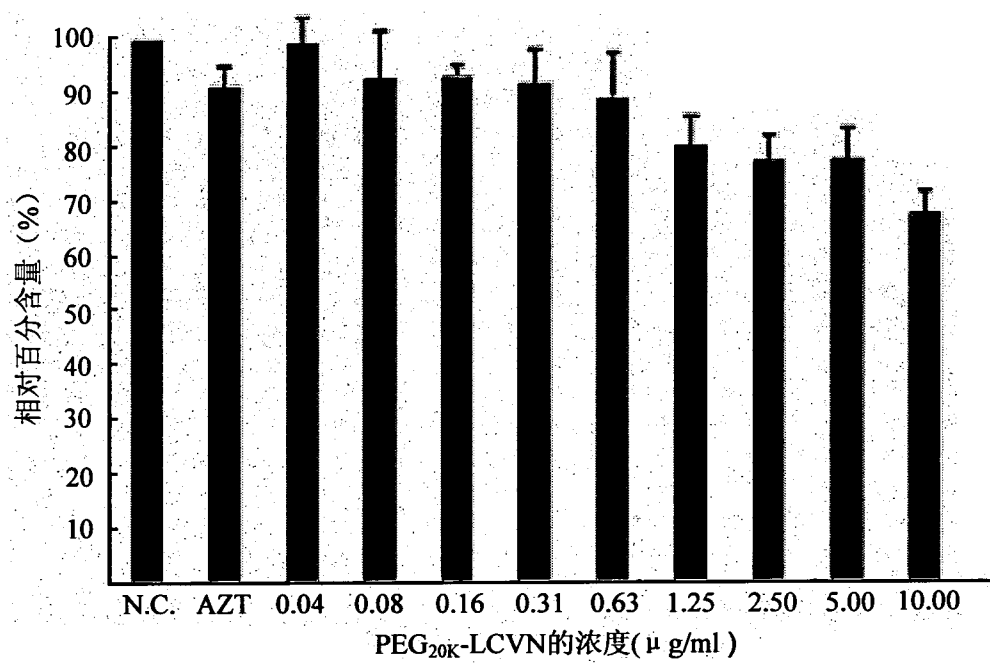


图 16(d)

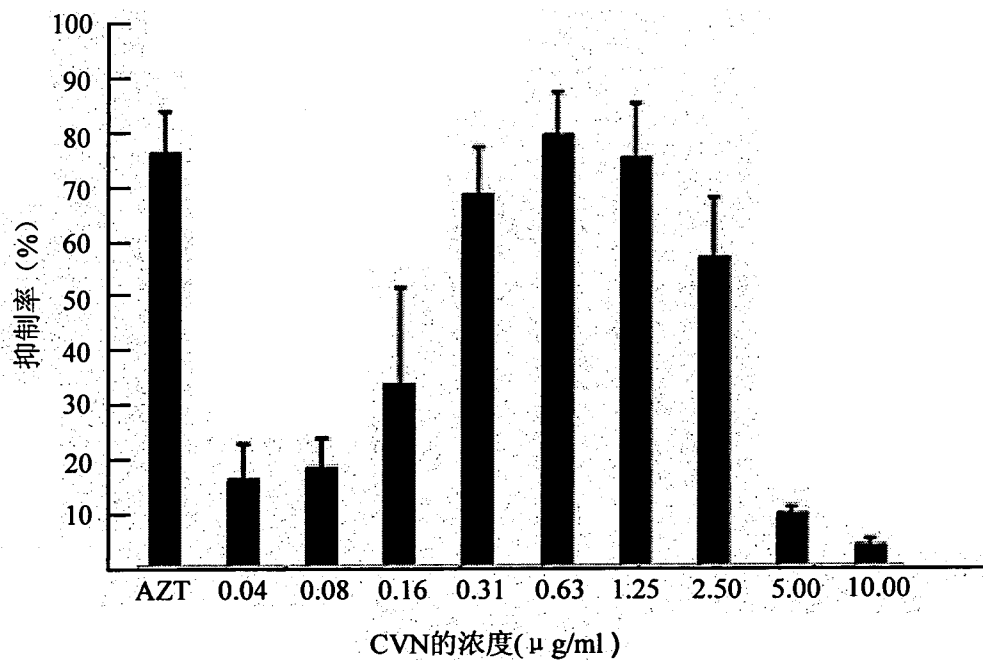


图 17(a)

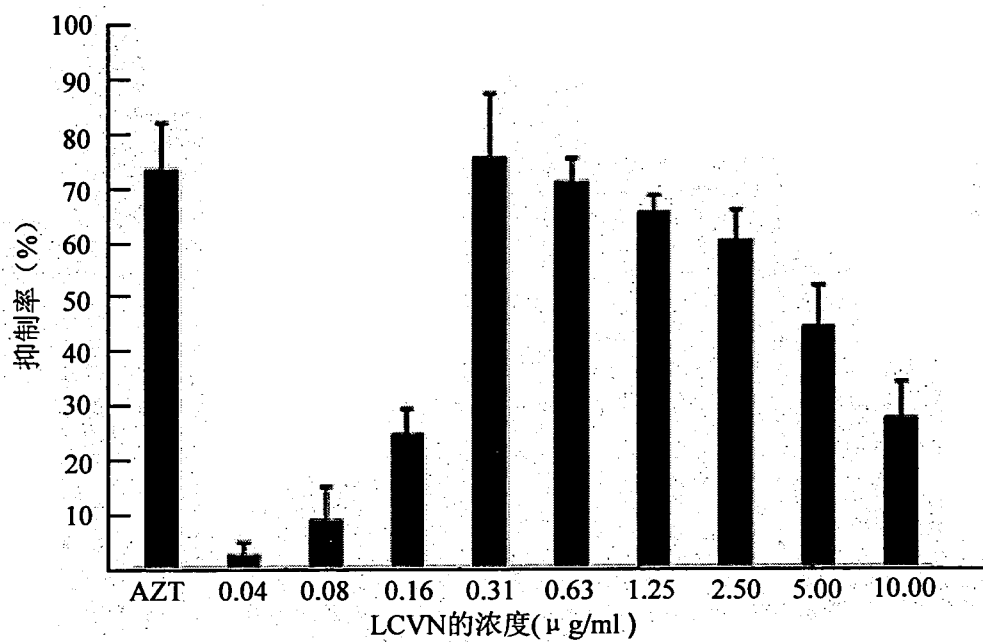


图 17 (b)

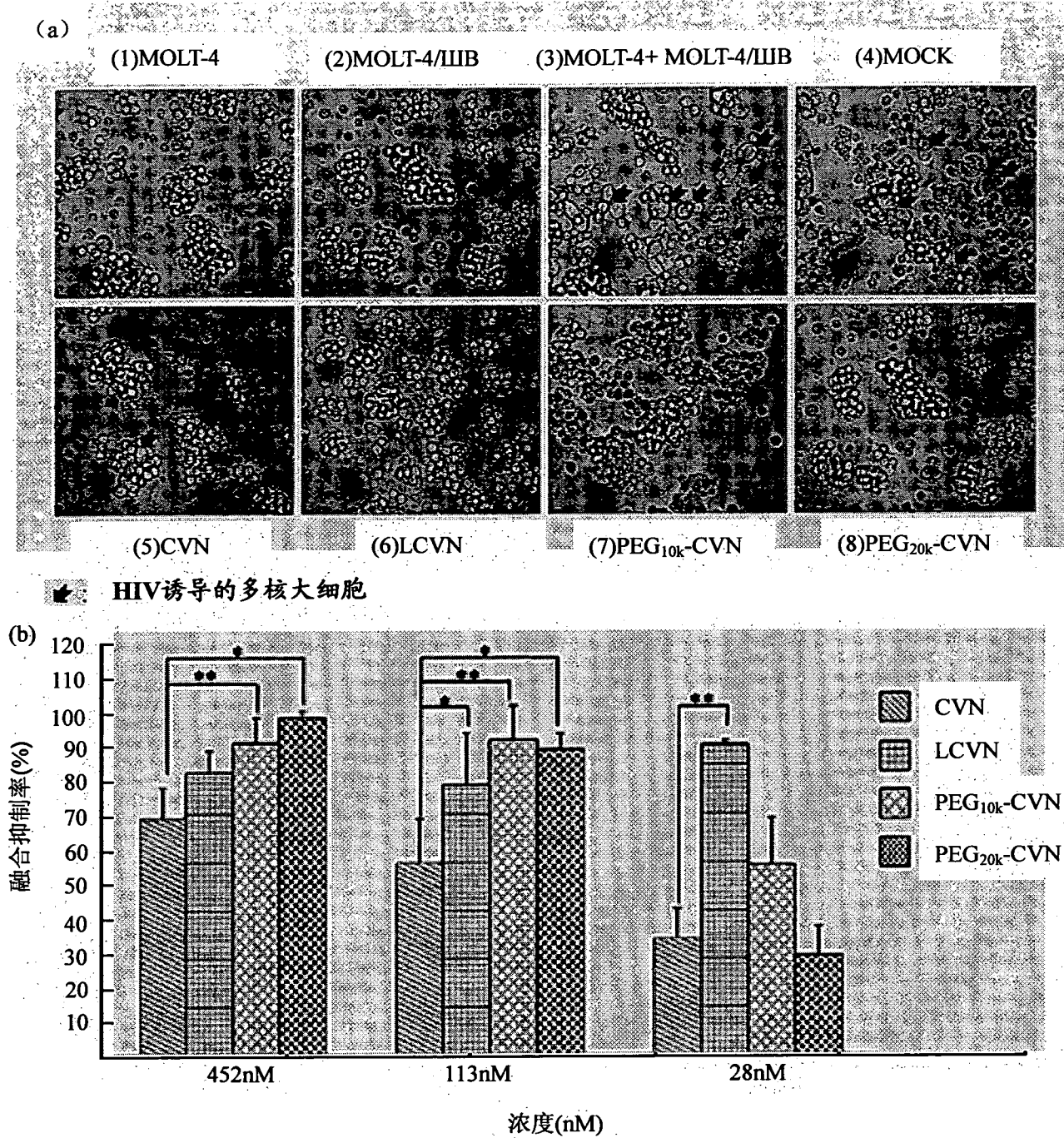


图 18

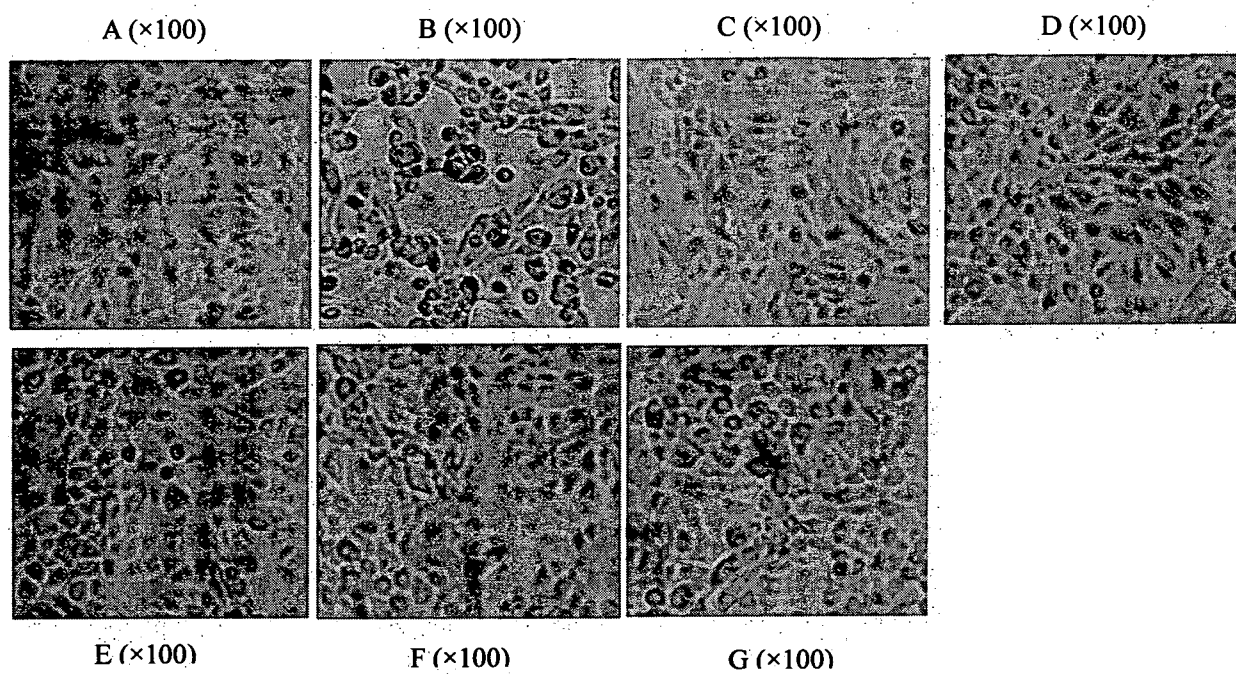


图 19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/073124

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

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)

IPC:C07K, C12N, A61K, 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)

Database: EPODOC, WPI, CNPAT, ISI WEB OF KNOWLEDGE (BIOSIS, EMBASE), CNKI, GENBANK + DDBJ + EMBL

Search terms: cyanovirin, CVN, PEG, small ubiquitin related modifier, small ubiquitin like modifier sumo, blue green algae virus, sequence search on SEQ ID NO:1-3

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN101638435A (UNIV JINAN), 03 Feb.2010(03.02.2010), see claims 1-10	1-10
PA	CN101705241A (UNIV JINAN), 12 May 2010(12.05.2010), see the whole document	1-10
Y	US7267941B2 (NEKTAR THERAPEUTICS AL CORP et al), 11 Sep.2007(11.09.2007), see claims 1-38, SEQ ID NO:1	1-6,9-10
A		7-8
Y	Chen Quan et al, "Progress in SUMO modification research", Chinese Bulletin of Life Sciences, ISSN 1004-0374, Vol 16, No 1, p1-6, 30 Feb.2004(30.02.2004), see pages3-5	1-6,9-10

☒ 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 10 Aug. 2010(10.08.2010)	Date of mailing of the international search report 02 Sep. 2010 (02.09.2010)
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451	Authorized officer WANG Huimei Telephone No. (86-10)62411090

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/073124

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	H.Zappe et al, "PEGylation of cyanovirin-N, an entry inhibitor of HIV" , Advanced Drug Delivery Reviews, Vol 60, p79-87, 31 Dec.2008(31.12.2008), see the whole document	1-10
A	LI Qi-yuan et al, "Advanced in research of cyanovirin N, a HIV-inactivating protein", Chin J New Drugs Clin Rem, ISSN 1007-7669, Vol 22, No 6, p371-375, 30 June 2003 (30.06.2003), see the whole document	1-10
A	WU Jie et al, "PEG modification of protein drug", Progress in Pharmaceutical Sciences, ISSN 1001-5094, Vol 26, No 2, p146-151, 31 Dec.2002(31.12.2002), see the whole document	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2010/073124

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN101638435A	03.02.2010	None	
CN101705241A	12.05.2010	None	
US7267941B2	11.09.2007	WO2004056852A	08.07.2004
		AU2003301122A1	14.07.2004
		US2004258706A1	23.12.2004
		EP1620129A2	01.02.2006
		MXPA05006688A	01.02.2006
		JP2006517400T	27.07.2006
		KR20050084433A	26.08.2005
		US7267941B2	11.09.2007
		US2008015151A1	17.01.2008
		EP1620129B1	18.03.2009
		DE60326774E	30.04.2009
		US7547509B2	16.06.2009
		MX265551B	01.04.2009
		AU2003301122BB2	26.11.2009

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/073124

Continuation of Box A:

IPC:

C07K14/405(2006.01)i

C12N15/31(2006.01)i

C12N15/63(2006.01)i

C12N1/21(2006.01)i

C07K17/08(2006.01)i

A61K38/16(2006.01)i

A61K47/48(2006.01)i

A61P31/18(2006.01)i

C12R1/89(2006.01)n

C12R1/19(2006.01)n

A. 主题的分类

参见附加页

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)

IPC:C07K, C12N, A61K, 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))

数据库: EPODOC, WPI, CNPAT, ISI WEB OF KNOWLEDGE(BIOSIS, EMBASE), CNKI, GENBANK+DDBJ+EMBL

检索词: cyanovirin, CVN, PEG, small ubiquitin related modifier, small ubiquitin like modifier sumo, blue green algae virus, 蓝藻抗病毒蛋白, 蓝藻病毒蛋白, 蓝藻病毒, 小泛素相关修饰物, 小泛素样修饰物, 关于 SEQ ID NO:1-3 的检索

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
PX	CN101638435A (暨南大学), 03.02 月 2010 (03.02.2010), 参见权利要求 1-10	1-10
PA	CN101705241A (暨南大学), 12.05 月 2010 (12.05.2010), 参见全文	1-10
Y	US7267941B2 (NEKTAR THERAPEUTICS AL CORP 等), 11.09 月 2007 (11.09.2007), 参见权利要求 1-38, SEQ ID NO:1	1-6, 9-10
A		7-8

☒ 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

10.08 月 2010 (10.08.2010)

国际检索报告邮寄日期

02.9 月 2010 (02.09.2010)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:

中华人民共和国国家知识产权局

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员

王慧梅

电话号码: (86-10) 62411090

C(续). 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
Y	陈泉等, “小泛素相关修饰物 SUMO 研究进展”, 生命科学, ISSN 1004-0374, 第 16 卷, 第 1 期, p1-6, 30.02 月 2004 (30.02.2004), 参见第 3-5 页	1-6,9-10
A	H.Zappe 等, “PEGylation of cyanovirin-N, an entry inhibitor of HIV”, Advanced Drug Delivery Reviews, 第 60 卷, p79-87, 31.12 月 2008 (31.12.2008), 参见全文	1-10
A	李奇渊等, “抗人类免疫缺陷病毒蓝藻蛋白-N 研究进展”, 中国新药临床杂志, ISSN 1007-7669, 第 22 卷, 第 6 期, p371-375, 30.06 月 2003 (30.06.2003), 参见全文	1-10
A	吴洁等, “蛋白质药物的聚乙二醇修饰”, 药学进展, ISSN 1001-5094, 第 26 卷, 第 2 期, p146-151, 31.12 月 2002 (31.12.2002), 参见全文	1-10

国际检索报告

关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2010/073124

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN101638435A	03.02.2010	无	
CN101705241A	12.05.2010	无	
US7267941B2	11.09.2007	WO2004056852A	08.07.2004
		AU2003301122A1	14.07.2004
		US2004258706A1	23.12.2004
		EP1620129A2	01.02.2006
		MXPA05006688A	01.02.2006
		JP2006517400T	27.07.2006
		KR20050084433A	26.08.2005
		US7267941B2	11.09.2007
		US2008015151A1	17.01.2008
		EP1620129B1	18.03.2009
		DE60326774E	30.04.2009
		US7547509B2	16.06.2009
		MX265551B	01.04.2009
		AU2003301122BB2	26.11.2009

A 栏的续页:

IPC:

C07K14/405(2006.01)i

C12N15/31(2006.01)i

C12N15/63(2006.01)i

C12N1/21(2006.01)i

C07K17/08(2006.01)i

A61K38/16(2006.01)i

A61K47/48(2006.01)i

A61P31/18(2006.01)i

C12R1/89(2006.01)n

C12R1/19(2006.01)n