

(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
2015 年 12 月 23 日 (23.12.2015)



(10) 国际公布号
WO 2015/192589 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07K 7/06 (2006.01) *G06F 19/16* (2011.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2014/090715
- (22) 国际申请日: 2014 年 11 月 10 日 (10.11.2014)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201410276200X 2014 年 6 月 19 日 (19.06.2014) CN
- (71) 申请人: 天津大学 (TIANJIN UNIVERSITY)
[CN/CN]; 中国天津市南开区卫津路 92 号, Tianjin 300072 (CN)。
- (72) 发明人: 张麟 (ZHANG, Lin); 中国天津市南开区卫津路 92 号天津大学, Tianjin 300072 (CN)。董晓燕 (DONG, Xiaoyan); 中国天津市南开区卫津路 92 号天津大学, Tianjin 300072 (CN)。李艳英 (LI, Yanying); 中国天津市南开区卫津路 92 号天津大学, Tianjin 300072 (CN)。刘晓丹 (LIU, Xiaodan); 中国天津市南开区卫津路 92 号天津大学, Tianjin 300072 (CN)。孙彦 (SUN, Yan); 中国天津市南开区卫津路 92 号天津大学, Tianjin 300072 (CN)。
- (74) 代理人: 北京三聚阳光知识产权代理有限公司 (SUNSHINE INTELLECTUAL PROPERTY INTERNATIONAL CO., LTD.); 中国北京市海淀区海淀南

路甲 21 号中关村知识产权大厦 A 座 503 室, Beijing 100080 (CN)。

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

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

根据细则 4.17 的声明:

— 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))。

(54) Title: AFFINITY PEPTIDE LIGAND OF MOUSE POLYOMAVIRUS CAPSOMER AND DESIGNED SCREENING METHOD THEREOF

(54) 发明名称: 鼠多瘤病毒衣壳粒的亲肽配基及其设计筛选方法

(57) Abstract: Provided are affinity peptide ligands of mouse polyomavirus capsomers and designed screening method thereof. The affinity peptide ligands can be used for separation and purification of the capsomers.

(57) 摘要: 提供了鼠多瘤病毒衣壳粒的亲肽配基及其设计筛选方法。所述亲和肽配基可用于所述衣壳粒的分离纯化。



WO 2015/192589 A1

鼠多瘤病毒衣壳粒的亲肽配基及其设计筛选方法

技术领域

本发明涉及利用计算机模拟设计目标蛋白质的亲和肽配基技术，以及利用亲和色谱技术纯化目标蛋白质，属于生物技术中的计算机模拟和蛋白质分离纯化技术领域。

背景技术

鼠多瘤病毒样颗粒（Virus-Like Particles, VLP）是由主要衣壳结构蛋白 VP1（42 kDa）自组装而形成的空心纳米颗粒，在疫苗、基因治疗、药物载体和材料科学等领域具有广阔的应用前景。鼠多瘤病毒 VLP 包含 72 个向右歪斜的呈 T=7d 排布的衣壳粒，每个衣壳粒由 5 个 VP1 组成。

VP1 在原核细胞中表达纯化后以衣壳粒形态存在，在体外适宜条件下能组装成形态均一、结构稳定的 VLP。这种体外生产 VLP 的方法简单、高效，具有广阔的应用前景。目前，利用高细胞密度、pH 控制流加培养可制备 N 端带有 GST 标签的 VP1，其产量能够达到 4.38 g L^{-1} 。其中，GST 标签既能够促进 VP1 蛋白的可溶性表达，又利于带标签前体的纯化。然而在纯化后处理时，需要昂贵的凝血酶切割使 GST 标签脱落，且脱落的 GST 标签还需要额外的分离纯化步骤从反应体系中去除。因而导致操作繁琐、成本增大，不利于生产扩大，限制鼠多瘤病毒样颗粒的应用。

亲和色谱利用生物大分子和特异性配基间的相互作用分离纯化目标分子，具有高选择性、高效率、操作条件温和等优点。亲和色谱的实现取决于目标分子与配基之间的特异性识别，因此配基是亲和色谱的核心。其中，小分子肽配基具有高亲和性高、高稳定性、不易降解及制备简便等优点，具有重要的开发前景。而近年来随着分子模拟技术的飞速发展，通过模拟自然界已存在的目标蛋白-配体之间的相互作用以设计筛选高特异性亲和肽配基成为可能，有助于提高亲和肽配基的筛选效率及准确性。

鼠多瘤病毒衣壳粒和次要衣壳结构蛋白 VP2（35 kDa）复合物是天然存在的衣壳粒-配体结合物，其中，VP2 的 C 端（VP2-C）通过疏水作用以一种特殊的发卡结构形态结合到衣壳粒的内表面，可作为衣壳粒的亲肽配基的设计基础。

发明内容

本发明的目的在于提出鼠多瘤病毒衣壳粒新型亲和配基设计及筛选方法的应用。本发明所述的衣壳粒亲和肽配基的仿生设计流程是首次建立的，并经验证是有效的。所述的亲和肽配基具有特异性强、稳定性好和操作简便等优点。

本发明的技术方案如下：

鼠多瘤病毒衣壳粒的新型亲和肽配基：DWDLRLLY、DWDLRLIY、DWNLRILIY、DWFLNLFY、DWSLKLVY、DWSLRLKY 和 DWNLHLPY。

本发明的鼠多瘤病毒衣壳粒的新型亲和肽配基及其设计筛选方法，是依据天然存在的衣壳粒和次要衣壳结构蛋白 VP2-C 复合物晶体结构，构建衣壳粒的新型肽配基库，特征序列为 DWXLXLXY，其中 X 代表除去半胱氨酸以外的 19 种氨基酸；见核苷酸序列表。

利用分子动力学模拟/泊松-波尔兹曼溶剂可及表面积计算解析 VP2-C 与衣壳粒复合物的分子作用机理，确定疏水作用占主导，而 VP2-C 中对结合起重要贡献的关键残基为 V283、P285、D286、W287、L289、L293 和 Y296。

多肽库构建依据为 VP2-C 中 5 个关键残基：D286、W287、L289、L293 和 Y296；在肽库的范围内，利用氨基酸定位法构建候选多肽分子库。

通过分子对接筛选、均方根偏差比较以及分子动力学模拟结合自由能计算，进行鼠多瘤病毒衣壳粒的高亲和性肽配基的筛选。

利用 VINA 分子对接软件将肽配基库中的肽配基依次与鼠多瘤病毒衣壳粒进行对接，选取结合自由能低于 -6.5 kcal/mol 的肽配基，共计 1158 条。

利用 GROMACS 分子模拟软件自带的 g_rms 程序计算 VINA 对接得到的 1158 个肽配基与 VP2-C 中相应的关键残基之间的均方根偏差，选择 334 个肽配基进行研究。

根据 C 末端方向对 334 个肽配基继续筛选，选取 C 末端方向与 VP2-C 一致的 227 个肽配基进行 ROSETTA FlexPepDock 对接实验复筛，选取最优的 10 条肽配基进行 MD 模拟。

对筛选得到的 10 条肽配基与鼠多瘤病毒衣壳粒的复合物进行 MD 模拟，并利用 MM/PBSA 方法进行自由能计算和分解，进一步评价肽配基的亲亲和性和特异性，得到具有较高亲和性的 7 条肽配基：DWDLRLLY、DWDLRLIY、DWNLRILIY、DWFLNLFY、DWSLKLVY、DWSLRLKY 和 DWNLHLPY。

本发明所述的：1) 特征序列为 DWXLXLXY，其中 X 代表除去半胱氨酸以外的 19 种氨基酸多肽库、和 2) 依据为 VP2-C 中 5 个关键残基：D286、W287、L289、L293 和 Y296 在肽库的范围内，利用氨基酸定位法构建候选多肽分子库；对其修饰改造策略包括：在其 N 端添加 1 或多个氨基酸残基；在其 C 端添加 1 或多个氨基酸残基；在多肽相邻残基之间添加 1 或多个氨基酸残基；将多肽中的某一个或某几个残基替换成其他氨基酸残基。

详细说明如下：

本发明基于 VP2-C 亲和模型构建衣壳粒新型亲和肽配基库，其依据为 VP2-C 中 5 个关键残基：D286、W287、L289、L293 和 Y296。该多肽库序列特征为：DWXLXLXY，其中 X 代表除去半胱氨酸以外的 19 种氨基酸。

将多肽库依次进行 VINA 对接、均方根偏差比较、C 端比较、ROSETTA FlexPepDock 对接以及分子动力学模拟结合自由能计算复筛，获得与衣壳粒具有较高亲和性的七条肽配基：DWDLRLLY、DWDLRLIY、DWNLRILIY、DWFLNLFY、DWSLKLVY、DWSLRLKY 和 DWNLHLPY。其中筛选排名第一的 DWDLRLLY 经实验验证是衣壳粒的有效亲和配基。

值得指出的是，虽然虚拟筛选能够快速精确的富集和筛选具有较高亲和性的多肽，但是由于计算机模拟的局限性（如利用不同软件或采用不同参数可能产生不同结果），对生物分子间的相互作用预测还不能达到与实际情况完全相同，在实际筛选过程中可能会造成具有较高亲和性和特异性的多肽被漏筛，因此不排除多肽库中其余的 6852 条多肽分子也可能是衣壳粒的多肽亲和配基。

本发明利用分子模拟和色谱实验获得衣壳粒亲和肽配基的方法，如图 1 所示，其特征在于包括以下过程：

1. 应用分子动力学模拟 / 泊松 - 波尔兹曼溶剂可及表面积 (molecular mechanics-Poisson-Boltzmann surface area, MM/PBSA) 方法计算 VP2-C 与衣壳粒复合物（晶体结构取自 PDB: 1CN3）的相对结合自由能。利用自由能分解方法解析 VP2-C 与衣壳粒的结合机理，分析确定 VP2-C 的热点残基。基于上述解析获得的分子机理和残基的空间排布特点，构建 VP2-C 的简化亲和结合模型。

2. 根据 VP2-C 中位于 α -螺旋上的 5 个热点残基 (D286、W287、L289、L293 和 Y296) 的构象和相对位置，利用氨基酸定位法，确定多肽序列模式为 DWXLXLXY（其中 X 代表除去半胱氨酸以外的 19 种氨基酸）；利用 perl 脚本调用 CHARMM 软件构建含有 6859 条序列的多肽库。

3. 利用 VINA 对接软件将多肽库中 6859 条肽配基依次与衣壳粒内腔表面结合域进行对接。然后根据打分分数的分布，选取结合自由能（打分分数）低于 -6.5 kcal/mol 的多肽分子，共计 1158 个多肽。利用 GROMACS 4.5.3 软件包自带的 g_rms 程序计算 VP2-C 中 5 个热点残基与对接得到的 1158 条多肽序列中相应热点残基之间的均方根偏差 (RMSD)，据此比较 VINA 对接后多肽中的热点残基与 VP2-C 中的热点残基构象之间的差异。RMSD 值越小表示多肽包含的热点残基的对接构象与 VP2-C 中热点残基构象越接近。根据 RMSD 数值的分布，选择 RMSD < 0.4 nm 的 334 个多肽做进一步分析。在 VP2-C 与衣壳粒复合物的晶体结构中，VP2-C 的 C 末端位于衣壳粒底部，因此候选多肽如果 C 端朝向与 VP2-C 不一致，即 N 端位于衣壳粒底部则不予考虑。由此得到 227 个多肽，再利用 ROSETTA FlexPepDock 进行对接实验复筛。对接实验在 ROSETTA FlexPepDock 服务器上 (<http://flexpepdock.furmanlab.cs.huji.ac.il/>)，对接参数为默认参数，每条多肽与衣壳粒的复合物一共产生 200 个构象。选取对接打分分数（结合界面能量分数，I_sc）前十位的多肽进行下一步研究。

4. 将步骤 3 中利用 ROSETTA FlexPepDock 对接获得的十条多肽与衣壳粒复合物的构象作为初始构象，利用 GROMACS 4.5.3 软件包，选用 CHARMM27 力场。将多肽与衣壳粒复合物置于 12.16×12.16×12.16 nm³ 的盒子中；水分子模型选择 TIP 3P 模型；然后加入平衡系统净电荷以及稳定缓冲液（200 mM NaCl）溶液所需的 Na⁺和 Cl⁻；之后进行能量最小化，去除体系中的原子间的碰撞和不正确的几何构型；接下来依次进行 200 ps 的正则 (NVT) 系综和 200 ps 的等温等压 (NPT) 系综下的限制动力学平衡，最后进行 20 ns 的无限制 MD 模拟，比较十条多肽在模拟前后构象的变化。模拟结束后，选取最后 3 ns 提取构象，利用

MM/PBSA 方法进行自由能计算和分解,进一步评价多肽的亲亲和性和特异性。其中七条肽配基具有较高亲和性:DWDLRLLY、DWDLRLIY、DWNLRILIY、DWFLNLFY、DWSLKLVY、DWSLRLKY 和 DWNLHLPY。

5 选取筛选排名第一的多肽 DWDLRLLY,固定到 Thiopropyl Sepharose 6B 色谱介质上制成亲和介质,然后通过蛋白静态吸附、亲和色谱、聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)等一系列实验方法,确证 DWDLRLLY 是衣壳粒的有效亲和配基。

本方法首先利用分子动力学模拟和 MM/PBSA 自由能计算方法获得 VP2-C 中与衣壳粒具有高亲和性的热点残基,确定 VP2-C 与衣壳粒作用的简化亲和模型,藉此构建衣壳粒的亲亲和肽配基库。通过分子对接、分子动力学模拟和自由能计算进行配基筛选,获得与衣壳粒具有较高亲和性的肽配基。进而通过静态吸附、亲和色谱、SDS-PAGE 等一系列实验方法验证所得配基对衣壳粒的分离纯化效能。其中,筛选排名第一的 DWDLRLLY 已经确证能有效分离纯化衣壳粒,且具有特异性强、稳定性高和操作简便等优点,证实本发明所述亲和肽配基的仿生设计流程的可行性。然而,实际使用中也发现 DWDLRLLY 存在疏水性过强等问题,在后续实验中还需对该多肽以及多肽库中其他多肽进行改造,以期获得具有更高亲和性和特异性的配基。改造方法包括在多肽 N 端或 C 端添加 1 个或多个氨基酸;在多肽内部相邻残基之间添加一个或多个氨基酸;将多肽中某个或某几个残基替换成其他氨基酸等。

附图说明

图 1 为鼠多瘤病毒衣壳粒的新型亲和肽配基设计及筛选策略。

具体实施方式

下面结合具体实施例对本发明作进一步的说明。

实施例 1 VP2-C 与衣壳粒亲和作用机理解析及 VP2-C 简化亲和结合模型的构建

本研究采用的 VP2-C 与衣壳粒复合物晶体结构来自 PDB 数据库(<http://www.rcsb.org/pdb/>,编号:1CN3),其中衣壳粒包含 5 条 VP1 (34-316 号残基),VP2-C 上包含 19 个残基(279-297 号残基)。分子动力学模拟采用 GROMACS 4.5.3 以及 CHARMM27 全原子立场。首先采用 TIP3P 水分子模型将 VP2-C 与衣壳粒复合物溶解于正方体盒子中(12.163×12.163×12.163 nm)。添加 225 个 Na⁺和 190 个 Cl⁻。体系经能量最小化后,依次进行 200 ps 的正则(NVT)系综和 200 ps 的等温等压(NPT)系综下的限制动力学平衡,体系温度设为 298.15 K,采用 V-rescale 法维持恒温,所有的模拟都采用周期性边界条件。计算非键作用时采用 1.2 nm 的距离截断,采用 PME 计算长程静电作用,采用 Lincs 用于限制所有氢原子,时间步长为 2 fs。模拟时间为 20 ns。

模拟结果显示在 5 ns 处复合物的均方根偏差(RMSD)出现平台,且势能基本趋于稳定。因此对复合物的 17-20 ns 的轨迹以 40 ps 的间隔取样,得到 75 帧构象供自由能计算分析。计算得到 VP2-C 与衣壳粒复合物的疏水作用贡献为-79 kcal/mol,而静电作用贡献为 3 kcal/mol,因此衣壳粒与 VP2-C 之间的亲和力主要以疏水作用为驱动力,这与 X 射线晶体衍射结构的结

论一致。对于静电作用，绝大部分对分子结合有利的分子间静电作用贡献 (-171 kcal/mol) 被不利的静电溶剂化作用能 (177 kcal/mol) 抵消，而导致总的静电作用能相对很小。

对 VP2-C 与衣壳粒复合物中 VP2-C 进行自由能分解来确定热点残基。热点残基被定义为对结合自由能贡献较大的残基以及参与形成重要分子间作用以补偿不利的溶剂化作用的残基。采用 ± 2.5 kcal/mol 的标准来识别对自由能贡献较大的残基。计算得到 VP2-C 中的六个热点残基，分别是 V283、P285、D286、W287、L289 和 Y296。L293 对自由能的贡献虽然不符合热点残基的标准，但是有文献报道 SV40 病毒中 VP3 上的 L181E 会导致 VP3 与衣壳粒的结合能力下降 33%，而 L181 恰好对应鼠多瘤病毒 VP2 的 L293。考虑到该段序列是多瘤病毒的高度保守区，因此推断认为 L293 对 VP2 与衣壳粒的结合同样发挥重要作用，所以 L293 在构建简化亲和模型的过程中予以保留。最后根据 VP2-C 与衣壳粒的亲合机理和 VP2-C 的热点残基分布，构造了一个 VP2-C 的亲合简化模型，包含 V283、P285、D286、W287、L289、L293 和 Y296。

实施例 2 多肽库的构建

选取距离衣壳粒底部最近的五个关键残基 D286、W287、L289、L293 和 Y296 作为多肽构建的起始点，能最大限度的避免实际操作中存在的空间位阻效应。W287、L289、L293 和 Y296 几乎位于同一直线上的特点，也有利于短肽配基设计，且不需考虑 VP2 的空间构象。已知肽键的长度 $\approx 1.33 \text{ \AA}$ ；氨基酸主链长度 $\approx 2.78 \text{ \AA}$ ；插入一个氨基酸残基需 2 个肽键长度和一个氨基酸的主链长度 $\approx 2 \times 1.33 + 2.78 = 5.44 \text{ \AA}$ ；利用 VMD 计算得到 $W287-L289 = 5.42 \text{ \AA}$ ， $L289-L293 = 5.72 \text{ \AA}$ ， $L293-Y296 = 5.61 \text{ \AA}$ 。因此每两个相邻热点残基之间可各插入一个氨基酸。最后得到的多肽构建模式为八肽库：DWXLXLXY (X 为不包含 Cys 的残基)。利用 perl 脚本调用 CHARMM 软件构建多肽库，总共包含 6859 条序列，每条序列都包含上述 5 个热点残基。

实施例 3 多肽与衣壳粒的对接

1. VINA 对接

利用 VINA 软件，分别将 6859 条多肽对接到衣壳粒内腔表面的结合域上，所有多肽的打分分数在 -4~-8 kcal/mol 之间，此范围符合亲和配基的适中亲和力要求（结合常数在 $10^4 \sim 10^8 \text{ M}^{-1}$ 之间）。筛选时为避免漏选，根据经验值和分布结果，选取结合自由能低于 -6.5 kcal/mol 的多肽，共计 1158 条。

2. RMSD 计算

本研究利用 GROMACS 4.5.3 软件包自带的 g_rms 程序计算 VINA 对接得到的 1158 条多肽序列热点残基与衣壳粒中相应的热点残基之间的 RMSD。RMSD 值越小，表示多肽包含的热点残基的对接构象与 VP2-C 中相应热点残基的构象越接近。结果表明，RMSD 值分布在 0.3~0.6 nm 之间。选择 RMSD < 0.4 nm 的 334 个多肽序列作下一步分析。

3. C 端朝向比较。

在 VP2-C 与衣壳粒复合物中, VP2-C 从衣壳粒底部由下而上进入内腔, 因此其 C 端位于衣壳粒的底部。对于朝向与 VP2-C 不一致的多肽, 即 N 端朝向衣壳粒底部, 则不在考虑范围。最终筛选出 227 条多肽作进一步筛选。

4. FlexPepDock 复筛候选多肽

利用 ROSETTA FlexPepDock 网站服务器进行多肽复筛。Flexpepdock 主要包含两个模块, 分别用于优化肽骨架和刚体方向。初始结构通过 200 轮独立的 Flexpepdock 模拟进行优化。其中 100 轮是严格利用高分辨率模式模拟, 另 100 轮先是通过低分辨率的预优化再进行高分辨率优化的模式模拟。总共产生 200 个模型结构, 然后再根据 generic full-atom energy score 进行打分, 每条多肽得到最优的 10 个构象。最终筛选出的前十名多肽, 按照打分函数高低依次为 DWDLRLLY、DWDLRLIY、DWGLRLKY、DWSLKLVY、DWFLNLFY、DWSLDLWY、DWGLKLIY、DWNLRILIY、DWSLRLKY、DWNLHLPY。

实施例 4 分子动力学(MD)模拟和 MM/PBSA 自由能计算

为了更加精确的利用计算机辅助配基设计预测衣壳粒与肽配基复合物之间的亲和作用力, 接下来利用精度更高但也更耗时的分子动力学模拟结合自由能计算的方法考察复合物的亲和力大小。分子动力学模拟参数同实例 1。利用 VMD 作图比较模拟前后多肽的构象变化。结果发现除了 DWGLKLIY、DWGLRLKY 和 DWSLDLWY, 其余七条多肽 (DWDLRLLY、DWDLRLIY、DWSLKLVY、DWFLNLFY、DWNLRILIY、DWSLRLKY 和 DWNLHLPY) 与衣壳粒在模拟过程中均表现出了稳定的结合构象, 说明这七条多肽可能是衣壳粒的有效亲和配基。

利用 MM/PBSA 方法计算这些肽配基与衣壳粒内表面的结合自由能。模拟结果排名由高到低依次为 DWDLRLLY、DWDLRLIY、DWNLRILIY、DWFLNLFY、DWSLKLVY、DWSLRLKY、DWNLHLPY、DWSLDLWY、DWGLRLKY、DWGLKLIY。排名最后的三条多肽是分子动力学模拟中与衣壳粒构象结合不稳定的三条配基。自由能计算结果表明该十条多肽与衣壳粒的结合都是以疏水作用为主导, 这与初始设计思路相一致, 表明理性设计的精确性。自由能计算最优的多肽为 DWDLRLLY, 它与衣壳粒的结合自由能为 -61 kcal/mol, 而 VP2-C 与衣壳粒的结合自由能为 -76 kcal/mol, 两者亲和力接近。因此 DWDLRLLY 可能是衣壳粒的高特异性亲和配基。

实施例 5 亲和色谱实验验证

1. DWDLRLLY-6B 亲和介质的制备以及大肠杆菌裂解液的制备

将 Thiopropyl Sepharose 6B (GE Healthcare) 介质用过膜水清洗后再用交联缓冲液 (0.5 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 M PBS, pH 6.5,) 预平衡 12 h, 抽干后称取 1g 湿介质加入到含有 2.57 mg 多肽和 10 mL 交联缓冲液的锥形瓶中, 充分混合, 25°C 170 rpm 水浴摇床反应 2 小时。最终得到配基密度为 2 μ M/(g 抽干湿介质) 的亲和多肽介质 (命名为 DWDLRLLY-6B)。

构建 pGEX-Ssp DnaB-Ser-VP1 质粒, 导入大肠杆菌 BL21(DE3)后, 接种于 25 mL TB 培养基[100 mg/L 氨苄青霉素, 12 g/L 蛋白胨, 24 g/L 酵母提取物, 0.4%(v/v) glycerol, 2.31 g/L KH_2PO_4 , 12.54 g/L K_2HPO_4]中, 37°C, 170 rpm 培养过夜。将上述菌液按照 1: 1000 比例接种至 250 mL 的 TB 培养基中, 170 rpm, 37°C 培养至 $\text{OD}_{600} \approx 0.5-0.6$ 时, 加入终浓度为 0.3 mM 的异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 (IPTG), 26°C, 170 rpm 诱导培养 24 h。收集菌体, 重悬, 冰上超声破碎, 离心收集大肠杆菌裂解上清液。

2、亲和介质与衣壳粒的静态吸附实验

将 DWDLRLLY-6B 介质用平衡缓冲液 (50 mM PBS, 200 mM NaCl, pH 6.0)平衡 12 h 后抽干, 准确称取 0.1 g 介质置于 25 mL 锥形瓶中, 加入 5 mL 裂解上清液, 将锥形瓶置于水浴摇床中, 25°C, 170 rpm 振荡 24 h, 取出 10,000rpm 离心 1 min, 取上清液进行 SDS-PAGE 分析。结果表明亲和多肽介质几乎吸附了裂解上清液中全部的衣壳粒, 而对照中的空白介质则不吸附。同时, 大部分杂蛋白都被保留到上清液中, 表明该亲和多肽介质能特异性识别衣壳粒。值得提出的是, 吸附是在较高盐浓度下 (200 mM) 进行的, 表明 DWDLRLLY 与衣壳粒之间是以疏水作用为驱动力的, 这与模拟结果相一致。

3. 色谱分离纯化实验

采用重力沉降法将 DWDLRLLY-6B 亲和介质装入 1 mL Tricorn5×5 柱中, 用平衡缓冲液 (50 mM PBS, 200 mM NaCl, pH 7.0) 冲洗色谱至基线平。上样 200 μL 裂解上清液, 再用平衡缓冲液冲洗色谱柱至基线平。然后用洗脱缓冲液(50 mM 醋酸盐缓冲液, pH3.0) 冲洗 5-10 个柱体积。待洗脱峰完全分离后, 用 2-5 个柱体积再生缓冲液 (100 mM Gly-HCl, pH2.4) 进行亲和介质再生。平衡、清洗、洗脱和再生的流速均为 0.5 mL/min, 上样流速为 0.2 mL/min。对分离大肠杆菌裂解上清液中的流出峰和洗脱峰组分进行 SDS-PAGE 电泳分析。利用 Gel-Pro 分析软件计算 VP1 的纯度。结果表明, 通过一步亲和色谱纯化, 大肠杆菌裂解上清液中 VP1 的纯度能够从最初的 15.6%提高到 70.1%。

因此, 实验表明, 亲和肽配基 DWDLRLLY 能够有效纯化目标蛋白, 是鼠多瘤病毒衣壳粒的高亲和性肽配基。此外, 值得提出的是, 肽配基库中的全部 6859 个序列具有相同的设计思路 (VP2-C 的关键残基: D286、W287、L289、L293 和 Y296) 和结构特征, 理论上都有可能是衣壳粒的亲和肽配基, 已取得的实验数据表明肽库中的亲和肽配基是鼠多瘤病毒衣壳粒的有效亲和配基。

本发明提出鼠多瘤病毒衣壳粒的新型亲和肽配基及其设计筛选方法。筛选所得排名第一的亲和肽配基 DWDLRLLY, 经实验验证是衣壳粒的有效亲和配基, 能够从大肠杆菌裂解上清液中一步分离纯化衣壳粒, 在病毒样颗粒的制备中具有广阔的应用前景。尽管如此, DWDLRLLY 仍存在诸多问题, 如疏水性过强等。在后续实验中还需对该多肽以及多肽库中其他多肽进行修饰改造, 以期获得具有更高亲和性和特异性的配基。改造方法包括在多肽 N 端或 C 端添加 1 个或多个氨基酸; 在多肽内部相邻残基之间添加一个或多个氨基酸; 将多肽中某个或某几个残基替换成其他氨基酸等。

- 1、鼠多瘤病毒衣壳粒的新型亲和肽配基，其特征为：DWDLRLLY、DWDLRLIY、DWNLRILIY、DWFLNLIFY、DWSLKLVIY、DWSLRLKIY 和 DWNLHLPIY。
- 2、权利要求 1 的鼠多瘤病毒衣壳粒的新型亲和肽配基的设计筛选方法，其特征是依据天然存在的衣壳粒和次要衣壳结构蛋白 VP2-C 复合物晶体结构，构建衣壳粒的新型肽配基库，特征序列为 DWXLXLXY，其中 X 代表除去半胱氨酸以外的 19 种氨基酸。
- 3、如权利要求 2 所述的设计筛选方法，其特征是利用分子动力学模拟/泊松-波尔兹曼溶剂可及表面积计算解析 VP2-C 与衣壳粒复合物的分子作用机理，确定疏水作用占主导，而 VP2-C 中对结合起重要贡献的关键残基为 V283、P285、D286、W287、L289、L293 和 Y296。
- 4、如权利要求 2 所述的设计筛选方法，其特征是多肽库构建依据为 VP2-C 中 5 个关键残基：D286、W287、L289、L293 和 Y296；在肽库的范围内，利用氨基酸定位法构建候选多肽分子库。
- 5、如权利要求 2 所述的设计筛选方法，其特征是通过分子对接筛选、均方根偏差比较以及分子动力学模拟结合自由能计算，进行鼠多瘤病毒衣壳粒的高亲和性肽配基的筛选。
- 6、如权利要求 5 所述的设计筛选方法，其特征是利用 VINA 分子对接软件将肽配基库中的肽配基依次与鼠多瘤病毒衣壳粒进行对接，选取结合自由能低于 -6.5 kcal/mol 的肽配基，共计 1158 条。
- 7、如权利要求 5 所述的设计筛选方法，其特征是利用 GROMACS 分子模拟软件自带的 g_rms 程序计算 VINA 对接得到的 1158 个肽配基与 VP2-C 中相应的关键残基之间的均方根偏差，选择 334 个肽配基进行研究。
- 8、如权利要求 5 所述的设计筛选方法，其特征是根据 C 末端方向对 334 个肽配基继续筛选，选取 C 末端方向与 VP2-C 一致的 227 个肽配基进行 ROSETTA FlexPepDock 对接实验复筛，选取最优的 10 条肽配基进行 MD 模拟。
- 9、如权利要求 5 所述的设计筛选方法，其特征是对筛选得到的 10 条肽配基与鼠多瘤病毒衣壳粒的复合物进行 MD 模拟，并利用 MM/PBSA 方法进行自由能计算和分解，进一步评价肽配基的亲和性和特异性，得到具有较高亲和性的 7 条肽配基：DWDLRLLY、DWDLRLIY、DWNLRILIY、DWFLNLIFY、DWSLKLVIY、DWSLRLKIY 和 DWNLHLPIY。
- 10、如权利要求 2、5 所述的设计筛选方法的应用，其特征是所述的多肽库对其修饰改造策略包括：在其 N 端添加 1 或多个氨基酸残基；在其 C 端添加 1 或多个氨基酸残基；在多肽相邻残基之间添加 1 或多个氨基酸残基；将多肽中的某一个或某几个残基替换成其他氨基酸残基。

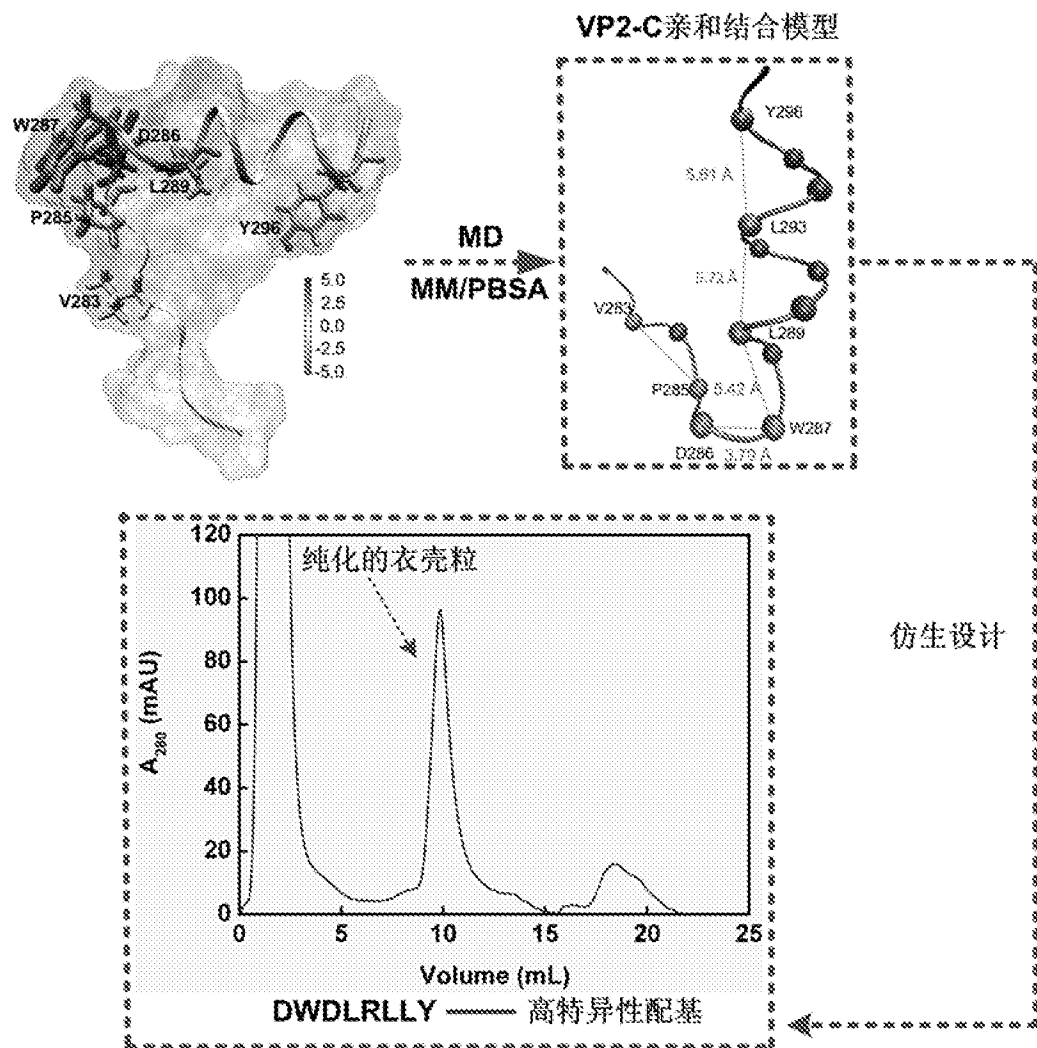


图 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2014/090715

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 7/06 (2006.01) i; G06F 19/16 (2011.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; G06F

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

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

CPRSABS; CNKI; CNTXT; DWPI; SIPOABS; EPTXT; USTXT; WOTXT; JPTXT; ELSEVIER; CA and search terms: murine polyomavirus, capsid particle, affinity peptide, ligand, design, VP1, VP2, VLP, VINA, GROMACS, etc.

Retrieving System for Biological Sequence of Chinese Patent; Genbank; EMBL; STN and search

sequences: DWDLRLLY, DWDLRLIY, DWNLRILIY, DWFLNLFY, DWSLKLVIY, DWSLRLKY, DWNLHLPY, etc.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 104031118 A (UNIV TIANJIN) 10 September 2014 (10.09.2014) see claims 1-10	1-9
PX	Li, Y.Y. et.al. "Biomimetic Design of Affinity Peptide Ligand for Capsomere of Virus-Like Particle" Langmuir, vol.30, no.28, 29 June 2014 (29.06.2014) see the abstract, table 2, page 8502, left column, paragraph 2 to page 8503, left column, the fourth paragraph	1-9

☐ 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 17 March 2015	Date of mailing of the international search report 27 March 2015
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer HE, Rui Telephone No. (86-10) 62411106

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/CN2014/090715

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 101812129 A (ABMAX BIOTECHNOLOGY CO LTD) 25 August 2010 (25.08.2010) see the whole document	1-9
A	CN 103145804 A (UNIV NORTHEAST AGRIC) 12 June 2013 (12.06.2013) see the whole document	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2014/090715

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 10
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
[I] Claim 10 claims the use of the design and screening methods of claims 2 and 5, but it does not clearly describe the “use”, hence a skilled person in the art could not determine the scope of the “use”. Therefore, the scope of claim 10 is not clear, and does not meet the requirements of PCT Article 6.
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2014/090715

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 104031118 A	10 September 2014	None	
CN 101812129 A	25 August 2010	CN 101812129 B	18 July 2012
CN 103145804 A	12 June 2013	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2014/090715

A. 主题的分类 C07K 7/06(2006.01)i; G06F 19/16(2011.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类																	
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C07K, G06F 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CPRSABS; CNKI; CNTXT和检索词: 鼠多瘤病毒, 衣壳粒, 亲和肽, 配基, 设计, VP1, VP2, VLP, VINA, GROMACS等; DWPI; SIPOABS; EPTXT; USTXT; WOTXT; JPTXT; ELSEVIER; CA和检索词: murine polyomavirus, capsid particle, affinity peptide, ligand, design, VP1, VP2, VLP, VINA, GROMACS等; 中国专利生物序列检索系统; Genbank; EMBL; STN和检索的序列: DWDLRLLY, DWDLRLIY, DWNRLIY, DWFLNLFY, DWSLKLKY, DWSLRLKY, DWNLHLPY等																	
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>CN 104031118 A (天津大学) 2014年 9月 10日 (2014 - 09 - 10) 参见权利要求1-10</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>Li, Y.Y. 等. "Biomimetic Design of Affinity Peptide Ligand for Capsomere of Virus-Like Particle" Langmuir, 第30卷, 第28期, 2014年 6月 29日 (2014 - 06 - 29), 参见摘要, 表2, 第8502页左栏第2段至第8503页左栏第4段</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 101812129 A (京天成生物技术北京有限公司) 2010年 8月 25日 (2010 - 08 - 25) 参见全文</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 103145804 A (东北农业大学) 2013年 6月 12日 (2013 - 06 - 12) 参见全文</td> <td>1-9</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	CN 104031118 A (天津大学) 2014年 9月 10日 (2014 - 09 - 10) 参见权利要求1-10	1-9	PX	Li, Y.Y. 等. "Biomimetic Design of Affinity Peptide Ligand for Capsomere of Virus-Like Particle" Langmuir, 第30卷, 第28期, 2014年 6月 29日 (2014 - 06 - 29), 参见摘要, 表2, 第8502页左栏第2段至第8503页左栏第4段	1-9	A	CN 101812129 A (京天成生物技术北京有限公司) 2010年 8月 25日 (2010 - 08 - 25) 参见全文	1-9	A	CN 103145804 A (东北农业大学) 2013年 6月 12日 (2013 - 06 - 12) 参见全文	1-9
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
PX	CN 104031118 A (天津大学) 2014年 9月 10日 (2014 - 09 - 10) 参见权利要求1-10	1-9															
PX	Li, Y.Y. 等. "Biomimetic Design of Affinity Peptide Ligand for Capsomere of Virus-Like Particle" Langmuir, 第30卷, 第28期, 2014年 6月 29日 (2014 - 06 - 29), 参见摘要, 表2, 第8502页左栏第2段至第8503页左栏第4段	1-9															
A	CN 101812129 A (京天成生物技术北京有限公司) 2010年 8月 25日 (2010 - 08 - 25) 参见全文	1-9															
A	CN 103145804 A (东北农业大学) 2013年 6月 12日 (2013 - 06 - 12) 参见全文	1-9															
☐ 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 2015年 3月 17日		国际检索报告邮寄日期 2015年 3月 27日															
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 中国 传真号 (86-10)62019451		受权官员 何睿 电话号码 (86-10)62411106															

第II栏

某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☐ 权利要求：
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
2. ☒ 权利要求： 10
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
[1] 权利要求10要求保护如权利要求2、5所述的设计筛选方法的应用，但其并未对所述“应用”进行清楚的描述，本领域技术人员无法确定所述“应用”的范围，这导致权利要求10保护范围不清楚，不符合PCT条约第6条的规定。
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2014/090715

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	104031118	A	2014年 9月 10日	无	
CN	101812129	A	2010年 8月 25日	CN 101812129	B 2012年 7月 18日
CN	103145804	A	2013年 6月 12日	无	