



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102675423 B

(45) 授权公告日 2014. 02. 05

(21) 申请号 201110061855. 1

A61K 48/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2011. 03. 15

A61P 1/16 (2006. 01)

A61P 31/20 (2006. 01)

(73) 专利权人 天津托普泰克生物科技有限公司

地址 300457 天津市开发区洞庭路 220 号天
津市国际生物医药联合研究院实验楼
S1005

(56) 对比文件

Dupont, J. 等. Accession

No:AA027460. 1. 《Genbank》. 2003,

程朋, 等. TGF_1 与 Smad4 基因在肝细胞癌中的
表达及意义. 《临床肿瘤学杂志》. 2009, 第 14
卷 (第 7 期),

(72) 发明人 张晓东 叶丽虹

审查员 王颖

(74) 专利代理机构 北京泛诚知识产权代理有限
公司 11298

代理人 陈波 文琦

(51) Int. Cl.

C07K 7/08 (2006. 01)

C12N 15/11 (2006. 01)

C12N 15/63 (2006. 01)

C12N 5/10 (2006. 01)

C12N 1/15 (2006. 01)

C12N 1/19 (2006. 01)

C12N 1/21 (2006. 01)

A61K 38/10 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书23页

序列表4页 附图5页

(54) 发明名称

抗乙型肝炎病毒 X 蛋白多肽药物

(57) 摘要

本发明涉及多肽药物领域, 具体涉及抗乙型肝炎病毒 X 蛋白的多肽和编码此多肽的多核苷酸, 以及它们的应用。具体来说, 本发明涉及一种具有抑制乙型肝炎病毒 X 蛋白 (hepatitis B virus X protein, HBx) 功能活性的多肽, 其在分子水平、细胞水平和动物水平上具有抑制 HBx 的活性, 因而能抑制乙型肝炎病毒感染所造成的肝炎, 由肝炎反复发作引起的肝硬化, 以及在肝硬化基础上发生的肝癌。该多肽和它的肽模拟物, 包括它们的功能片段和功能变体, 以及编码这些多肽、肽模拟物或它们的功能片段、功能变体的基因, 可广泛用于防治乙型肝炎感染后的肝病, 包括肝炎、肝硬化和肝癌。

1. 分离的多肽,其氨基酸序列为如 SEQ ID NO:1-6 所示的任一种氨基酸序列,所述多肽具有抑制乙型肝炎病毒 X 蛋白的功能,并能抑制乙型肝炎病毒感染后的慢性肝病的发生和发展。

2. 权利要求 1 所述的多肽,所述乙型肝炎病毒感染后的慢性肝病包括肝炎、肝硬变和肝癌。

3. 分离的多核苷酸,所述多核苷酸为选自下组中的一种:

a) 编码 SEQ ID NO:1-6 所示的任一种氨基酸序列的多核苷酸;或者

b) 与多核苷酸 a) 互补的多核苷酸。

4. 重组表达载体,其包含如权利要求 3 所述的多核苷酸。

5. 包含如权利要求 4 所述的重组表达载体的宿主细胞。

6. 权利要求 1 中任一所述多肽在制造抗乙肝病毒感染后的慢性肝病的药物中的应用。

7. 权利要求 3 中任一所述多核苷酸在制造抗乙肝病毒感染后的慢性肝病的药物中的应用。

8. 权利要求 4 中所述重组表达载体在制造抗乙肝病毒感染后的慢性肝病的药物中的应用。

9. 权利要求 6-8 中的任一种应用,所述应用为制造抗乙型肝炎的治疗性疫苗。

10. 药物组合物,其包含权利要求 1 中任一所述的多肽,以及任选的药物载体。

11. 药物组合物,其包含权利要求 3 中任一所述的多核苷酸,以及任选的药物载体。

12. 药物组合物,其包含权利要求 4 中所述的重组表达载体,以及任选的药物载体。

抗乙型肝炎病毒 X 蛋白多肽药物

技术领域

[0001] 本发明涉及多肽药物领域,具体涉及抗乙型肝炎病毒 X 蛋白的多肽和编码此多肽的多核苷酸,以及它们的应用。

背景技术

[0002] 肝癌是导致病人死亡的恶性肿瘤之一,其恶性程度高,在我国肝癌死亡率仅次于胃癌,居我国恶性肿瘤死亡率第二位。据统计,我国每年新增肝癌人数 30 万人,而每年肝癌死亡人数达 11 万。乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染可导致肝炎、肝硬化和原发性肝癌的发生,在我国 80% 以上的肝癌患者为乙肝感染后肝癌,可称之为乙肝后肝癌。

[0003] HBV 为长约 3.2Kb 的 DNA 病毒,其开放阅读框表达乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg)、乙型肝炎病毒核心抗原 (HBcAg)、乙型肝炎病毒多聚酶和乙型肝炎病毒 X 抗原 (HBxAg) (或称之为乙型肝炎病毒 X 蛋白,即 HBx),其中 HBx 是 HBV DNA 复制所必须的因子。由于 HBx 是 HBV DNA 复制所必须的因子,因此抑制 HBx 的功能,意味着可抑制 HBV 的感染,以及由此导致的肝炎和肝硬化。

[0004] 另外,HBx 作为反式作用因子,促进肝癌的生长和增殖,称之为癌蛋白。在分子水平、细胞水平和动物水平的研究也发现,HBx 具有很强的促肝癌细胞增殖和迁移的作用。转基因鼠实验也证明 HBx 具有显著的促进肝癌发生的作用。大量研究结果显示,HBV 感染的持续存在可导致慢性肝病,包括慢性肝炎、慢性肝炎反复发作引起的肝组织中纤维结缔组织增生后发生的肝硬化,及大部分在肝硬化基础上发生的肝癌。在慢性肝病 (包括肝炎、肝硬化和肝癌) 的发生发展过程中,HBx 发挥了重要的作用。因此,HBx 是预防和治疗肝病的重要靶点。

[0005] 目前,肝癌的治疗以手术为主,辅以介入疗法,而化疗效果不理想。在临床手术的肝癌组织中 HBsAg 和 HBxAg 的表达阳性检出率高达 80% 甚至 90% 以上。因此,HBx 作为肝癌发生发展的重要致病因子,而发现其特异性抑制剂,则具有重要的理论意义和实际临床应用价值。然而,由于目前 HBx 的三维构象解析尚未完成,故难以通过 HBx 立体三维构象设计其化学抑制剂。

[0006] 多肽片段可作为药物,其在临床上已广为应用。例如,胸腺肽 (thymopeptide) 是从小牛胸腺中提取的胸腺五肽,具有促进淋巴细胞转化、增强巨噬细胞吞噬活性的作用,可用于治疗多种免疫缺陷病。多肽药物的特点是药理作用明确,安全性高,并易于生产。但是,多肽药物的发现难度大,其原因在于大部分的多肽片段在体内的半衰期短,直接影响药效学作用。

发明内容

[0007] 本发明涉及一种具有抑制乙型肝炎病毒 X 蛋白 (hepatitis B virus X protein, HBx) 功能活性的多肽,其在分子水平、细胞水平和动物水平上具有抑制 HBx 的活性,因而能抑制乙型肝炎病毒感染所造成的肝炎,由肝炎反复发作引起的肝硬化,以及在肝硬化基础

上发生的肝癌。该多肽和它的肽模拟物,包括它们的功能片段和功能变体,以及编码这些多肽、肽模拟物或它们的功能片段、功能变体的基因,可广泛用于防治乙型肝炎感染后的肝病,包括肝炎、肝硬变和肝癌。

[0008] 一方面,本发明提供了分离的多肽或肽模拟物,其包含如 SEQ ID NO :1 所示的氨基酸序列、或其功能片段或功能变体,所述多肽或肽模拟物具有抑制乙型肝炎病毒 X 蛋白的功能,并能抑制乙型肝炎病毒感染后的慢性肝病的发生和发展。所述乙肝病毒感染后的慢性肝病可以包括肝炎,由肝炎反复发作引起的肝硬变,以及在肝硬变基础上发生的肝癌。

[0009] 在本发明的一些具体实施例中,上述多肽或肽模拟物,其包含的氨基酸序列、其功能片段或功能变体可以具有与 SEQ ID NO :1 所示的氨基酸序列至少 70%,或者 80%,或者 90%,以及甚至更高的相同性。优选地,这些多肽或肽模拟物包含如 SEQ ID NOs :1-6 中所示的任一种氨基酸序列。

[0010] 另一方面,本发明提供分离的多核苷酸,所述多核苷酸包含编码如 SEQ ID NO :1 所示的氨基酸序列、其功能片段或功能变体的多核苷酸;或者是与包含编码如 SEQ ID NO :1 所示的氨基酸序列、其功能片段或功能变体的多核苷酸互补或严格杂交的多核苷酸。优选地,这些多核苷酸为编码 SEQ ID NOs :1-6 所示的氨基酸序列的多核苷酸,或者为与编码 SEQ ID NOs :1-6 所示的氨基酸序列的多核苷酸互补或严格杂交的多核苷酸。

[0011] 另一方面,本发明还提供含有外源多核苷酸的重组表达载体,其包含编码如 SEQ ID NO :1 所示的氨基酸序列、其功能片段或功能变体的多核苷酸;或者是与包含编码如 SEQ ID NO :1 所示的氨基酸序列、其功能片段或功能变体的多核苷酸互补或严格杂交的多核苷酸。优选地,这些重组表达载体权利包含编码 SEQ ID NOs :1-6 所示的氨基酸序列的多核苷酸,或者包含与编码 SEQ ID NOs :1-6 所示的氨基酸序列的多核苷酸互补或严格杂交的多核苷酸。本方明还提供包括上述重组表达载体的宿主细胞。

[0012] 此外,本发明也提供包括上述多肽或肽模拟物、核苷酸以及重组表达载体在制造抗乙肝病毒感染后的慢性肝病的药物中的应用。在一个具体实施例中,所述药物可为乙肝的治疗性疫苗。所述药物可以包含药物组合物,其可以包含任选的药物载体。

[0013] 本发明中,所述的多肽(包括其功能片段或变体)及其肽模拟物,作为 HBx 的有效抑制因子,具有抑制 HBx 的生物活性的能力,能抑制乙型肝炎病毒感染所造成的肝炎,由此引发的肝硬变和在肝硬变基础上发生的肝癌。值得强调的是,本发明提供的上述多肽具有明显的药效学作用,因此可以成为治疗由于乙肝病毒感染所导致的肝病的有效药物。

附图说明

[0014] 图 1:应用高压液相色谱(HPLC)对纯化后人工合成多肽 Anti-HBxP2# 的分析结果。

[0015] 图 2. 应用报告基因检测本发明的多肽基因质粒对表达 HBx 蛋白的肝癌细胞的影响。结果显示,p-Anti-HBxP2# 对 HepG2-X 细胞、L-02-X 细胞和 HepG2. 2. 15 细胞中 NF-B 启动子的活性具有抑制作用,呈剂量依赖性,而对无 HBx 的 HepG2 肝癌细胞和无 HBx 的 L-02 肝细胞无影响。相似地, p-Anti-HBxP2# 的 5 种功能变体基因(0.15 μ g/well)对 HepG2-X 细胞和 L-02-X 细胞中 NF-B 启动子的活性具有一定的抑制作用。*P < 0.05, **P < 0.01, 进行 Student's t test 统计学分析。

[0016] 图 3. 检测本发明的多肽在细胞水平对表达的 HBx 蛋白激活 NF-B 启动子的活性的影响。结果显示,人工合成的多肽 Anti-HBxP2# 对表达 HBx 蛋白的 HepG2-X 细胞、L-02-X 细胞和 HepG2. 2. 15 细胞中的 NF-B 启动子的活性具有抑制作用,且该抑制作用呈剂量依赖性,但对无 HBx 表达的 HepG2 肝癌细胞和 L-02 肝细胞则无此影响。 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, 进行 Student's t test 统计学分析。

[0017] 图 4. 应用 MTT 检测转染本发明的多肽基因质粒对表达 HBx 蛋白的肝癌细胞的影响。结果显示, p-Anti-HBxP2# 对 HepG2-X 细胞、L-02-X 细胞和 HepG2. 2. 15 细胞生长和增殖具有抑制作用,且其效果呈剂量依赖性,但对无 HBx 表达的 HepG2 肝癌细胞和 L-02 肝细胞则无影响。p-Anti-HBxP2# 的 5 种功能变体基因 ($0.15 \mu\text{g}/\text{well}$) 对 HepG2-X 细胞和 L-02-X 细胞的生长和增殖也具有抑制作用。p-Anti-HBxP2# 后 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, 进行 Student's t test 统计学分析。

[0018] 图 5. 应用 MTT 检测本发明的多肽对肝癌细胞的生长的影响。结果显示,应用人工合成的多肽 Anti-HBxP2# 对 HepG2-X 细胞、L-02-X 细胞和 HepG2. 2. 15 细胞生长和增殖具有抑制作用,且其作用呈剂量依赖性。而对无 HBx 表达的 HepG2 肝癌细胞和 L-02 肝细胞无影响。 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, 进行 Student's t test 统计学分析。

[0019] 图 6:人工合成的多肽 Anti-HBxP2# 对 HepG2-X 细胞的作用。裸鼠接种实验结果显示,应用人工合成的多肽 Anti-HBxP2# 对 HepG2-X 细胞生长和增殖具有明显的抑制作用。 $**P < 0.01$, Student's t test 统计学分析

[0020] 图 7. 人工合成的多肽 Anti-HBxP2# 对 HepG2. 2. 15 细胞的作用。裸鼠接种实验结果显示,应用人工合成的多肽 Anti-HBxP2# 对 HepG2. 2. 15 细胞生长和增殖具有明显的抑制作用。 $**P < 0.01$, Student's t test 统计学分析

[0021] 图 8. 构建多肽真核表达载体的连接示意图。

[0022] 具体实施方式

[0023] 本发明中,包括说明书和权利要求书,使用的下列术语除非特别说明,具有如下的含义:

[0024] “分离的”一词是指将物质从它原始的环境(例如,若是自然产生的就指其天然环境)分离出来。比如说,一个自然产生的多核苷酸或多肽存在于活动物中就是没有被分离出来,而同样的多核苷酸或多肽同一些或全部在自然系统中与之共存的物质分开就是分离的。这样的多核苷酸或多肽可以是某一载体的一部分,也可以是某一组合物的一部分。既然载体和组合物不是它的天然环境的成分,它们仍然是分离的。

[0025] “纯化的”一词意指已经在纯度上提高的。“纯度”在这这是相对术语,并不必要地解释为绝对纯度。例如,纯度可以是至少约 50%,或可以是大于 60%、70%、80%、90%、或可以是 100%。

[0026] 如本发明中所用,分离的物质是从其原始环境中分离出来。活体 细胞内的天然状态下的多核苷酸和多肽是没有分离的,但同样的多核苷酸和多肽如从天然状态中同存在的其他物质中分开,则为分离的,同时纯度上得到了提高,也因此是纯化的。

[0027] “核酸”、“核酸序列”或“碱基序列”是指核苷酸,寡核苷酸或多核苷酸及其片段或部分。本发明的核酸能够以 RNA(例如,mRNA)的形态、或 DNA 的形态(例如,cDNA 或基因组 DNA)存在。DNA 可以是双链,也可以是单链。单链 DNA 或 RNA 可以是编码链(有义链)、或

非编码链（反义链）中任一种。另外，本发明的多核苷酸也可以在其 5' 端或 3' 端融合编码标签标记（标签序列或标记物序列）的多核苷酸。它们可以是合成的或是从天然来源获得的（例如，分离和 / 或纯化），其可以包含天然的、非天然的或者修饰过的核苷酸，并且其可以包含天然的、非天然的或改变的核苷酸之间的键，诸如氨基磷酸酯键或硫代磷酸酯键，用来代替在未修饰的寡核苷酸中核苷酸之间存在的磷酸二酯键。

[0028] 所谓“氨基酸序列”或“多肽”是指肽、寡肽、多肽或蛋白质及其部分片段，其间以肽键相连接的氨基酸。当本发明中的“氨基酸序列”涉及一种天然存在的蛋白质分子的氨基酸序列时，这种“多肽”或“蛋白质”并不意味着将氨基酸序列限制为与所述蛋白质分子相关的完整的天然氨基酸序列。本发明的氨基酸序列可以含有附加的肽。作为附加的肽，如多组氨酸标签 (His-tag)、或 Myc、FLAG 等表位标记的肽为例。

[0029] “缺失”是指在氨基酸序列或核苷酸序列中一个或多个氨基酸或核苷酸的缺失。

[0030] “插入”或“添加”是指在氨基酸序列或核苷酸序列中的改变导致与天然存在或改变前的分子相比，一个或多个氨基酸或核苷酸的增加。

[0031] “置换”是指由不同的氨基酸或核苷酸替换一个或多个氨基酸或核苷酸。

[0032] “缺失、置换或添加一个或多个氨基酸或核苷酸”则是指，利用定位诱变法等公知的突变核酸或多肽的制作方法缺失、置换或添加能够缺失、置换或添加的程度的数目的氨基酸或核苷酸。上述突变不限于利用已知的定点突变法而人为诱导的突变，也可以是对天然存在的核酸或蛋白质的突变进行分离纯化而得到的。对氨基酸的突变可以包含有一个或多个氨基酸残基为构象为 D- 型的氨基酸，自然界存在的稀有氨基酸或人工修饰的氨基酸，这些氨基酸可以是也可以不是由遗传密码子编码的。与此相类似的，诱导核酸发生突变，可以包括自然界天然存在的核苷酸，也可以包括具有修饰的核苷酸。

[0033] 多肽的“功能片段”是指本发明的多肽的任何部分，所述部分保留其作为一部分的多肽（即“亲本”多肽）的基本相似或相同的生物学活性和功能。

[0034] 多肽的“功能变体”是指基本上保持如所述多肽或氨基酸序列相同或相似的生物学功能或活性的氨基酸序列，它们可以包括，例如，1) 原氨基酸序列中一个或多个氨基酸残基有缺失和 / 或一个或多个氨基酸残基被添加；或者 2) 原氨基酸序列中一个或多个氨基酸残基被保守或非保守氨基酸残基取代；或者 3) 原氨基酸序列中一个或多个氨基酸残基上的某个基团被其它基团取代；或者 4) 原氨基酸序列和另外的分子或化合物（比如糖、脂类、聚乙二醇等）的融合；或者 5) 原有的氨基酸序列与添加的氨基酸序列融合进而形成的多肽序列（如前导序列或分泌序列或用来纯化此多肽的序列等）；或者 6) 原氨基酸序列的逆反类似物；或者 7) 以上各种情况的混合。本发明中，氨基酸序列的功能变体，可以包含有一个或多个氨基酸残基为构象为 D- 型的氨基酸，自然界存在的稀有氨基酸或人工修饰的氨基酸，这些氨基酸可以是也可以不是由遗传密码子编码的。

[0035] 多肽的“逆反类似物”是指包括反转的亲本多肽氨基酸序列的多肽，以致所述逆反类似物的氨基酸序列（当从 N 端向 C 端读取时）与当从 C 端向 N 端读取时的亲本多肽的氨基酸序列相同；此外，逆反类似物中每一个氨基酸是该氨基酸的 D 异构体，D 异构体与 L 异构体相反。例如，三肽 Val-Ala-Gly 的逆反类似物具有氨基酸序列 Gly-Ala-Val，其中每个氨基酸是 D 异构体。

[0036] 本发明中，“肽模拟物”是指具有与相对应多肽基本相同的通用结构且具有，例如，

能增加其稳定性或生物学功能的修饰的化合物。肽模拟物包括,例如,包含与相对应多肽的相同氨基酸序列的那些化合物,但在其中两个或更多个氨基酸之间,肽模拟物具有改变的主链。所述肽模拟物可以包括合成的或非天然存在的氨基酸来代替天然存在的氨基酸。

[0037] 本发明中,核苷酸序列的“简并变异体”是这样的多核苷酸序列,其与亲本核苷酸序列有区别,但编码的蛋白质和多肽和亲本核苷酸序列所编码的蛋白质或多肽一样。

[0038] “核酸杂交”在本领域已公知(参见,例如, Sambrook 等, Molecular Cloning :A Laboratory Manual, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, 2001)。通常,温度越高,盐浓度越低,则严谨性变得越高(难以杂交),从而能够取得更加相同的多核苷酸。适合的杂交温度根据碱基序列或其碱基序列的长度而异。另外,本发明还涉及在“严格条件”下杂交。本发明中,“严格条件”是指,在较低离子强度和较高温度下的杂交和洗脱,例如, 42℃ 的条件下、在 (50% 甲酰胺、5×SSC (150mM NaCl、15mM 柠檬酸三钠)、50mM 的磷酸钠 (pH7.6)、5×Denhardt 溶液、10% 硫酸葡聚糖、和 20 μg/ml 的变性剪切鲑鱼精子 DNA) 中孵育过夜,然后在 65℃ 条件下用 0.1×SSC 洗脱。

[0039] “同源性”是指互补的程度,可以是部分同源,也可以是完全同源。“部分同源”是指一种部分互补的序列,其可部分抑制完全互补的序列与靶核酸的杂交。这种抑制可通过在严格性程度降低的条件下进行杂交 (Southern 印迹或 Northern 印迹等) 来检测。基本同源的序列或杂交探针可竞争和抑制完全互补的序列与靶序列在严格性程度降低的条件下的结合。当然,严格性降低的条件并非允许非特异性的结合,两条序列相互结合,仍然需要特异性或选择性的相互作用。

[0040] 氨基酸序列或核苷酸序列的“相同性”或“同一性”百分率是指在两种或多种氨基酸或核苷酸序列比较中,序列相同或相似的百分率。有很多本领域技术人员熟知的方法测定相同性百分率,如通过 MEGALIGN 程序 (Lasergene software package, DNASTAR, Inc., Madison, WI)。MEGALIGN 程序可根据不同的方法如 Cluster 法比较两种或多种序列(参见 Higgins & Sharp, Gene 73 :237-244, (1988)), Cluster 法通过检查所有配对之间的距离将各组序列排列成簇,然后将簇以成对或成组分配。两个氨基酸序列如序列 A 和序列 B 之间的相同性百分率可以通过下式计算:

[0041]
$$[(\text{序列 A 与序列 B 之间匹配的残基个数}) / (\text{序列 A 的残基数} - \text{序列 A 中间隔残基数} - \text{序列 B 中间隔残基数})] \times 100\%$$

[0042] 同理,也可以通过 Cluster 法或用本领域已知的方法,如 Jotun Hein 的方法(参见 Hein J., Methods in Enzymology 183 :625-645, 1990), 测定核酸序列的相同性百分率。

[0043] “重组表达载体”是指遗传修饰的寡核苷酸或多核苷酸重组体,该重组体克隆有编码 mRNA、蛋白、多肽、或肽的核苷酸序列,当该表达载体进入宿主细胞后可表达相应的 mRNA、蛋白、多肽、或肽。本发明中,重组表达载体可以包含任意类型的核苷酸序列,但不仅限于是 DNA 或 RNA,可为单链或双链、人工合成或来自天然,也可为非天然的或改变的核苷酸。核苷酸之间的键可以是天然存在的、也可以是非天然存在的或修饰的。

[0044] 本发明中,“乙肝病毒感染后的慢性肝病”是指乙型肝炎病毒感染后导致的肝病,包括慢性肝炎、慢性肝炎反复发作引起的肝组织中纤维结缔组织增生后发生的肝硬变,及大部分在肝硬变基础上发生的肝癌。肝癌的发生是乙型肝炎病毒持续感染的结果,这种肝癌可称之为乙肝后肝癌。

[0045] 本发明中,“治疗”和“预防”以及由它们派生的词语,但并不意味是 100% 的或完全的治疗或预防,可以认定为本领域技术人员所认同的治疗或预防程度。本发明中的“预防”可理解为延迟疾病、或其症状或病症的发作。

[0046] 多肽

[0047] 本发明提供分离或纯化的多肽。本发明涉及的多肽可以是包含、基本由、或由氨基酸序列 Pro-Asp-Leu-His-Lys-Asn-Glu-Leu-Lys-His-Val-Lys-Tyr (SEQ ID NO :1) 所组成的多肽。研究证实这些多肽可以明显抑制 HBx 的活性,具有明显抑制乙肝病毒感染后的慢性肝病的发生和发展的作用,更重要的是,这些多肽可以抑制感染有乙肝病毒的肝癌细胞的生长和增殖。

[0048] 所述抑制在分子水平、细胞水平和动物水平均有体现。如,所述多肽在分子水平上可以抑制由 HBx 激活的核因子 B (NF-B) 的启动子活性,从而体现所述多肽对 HBx 的有效抑制,且其抑制效果呈量效关系;所述多肽在细胞水平也体现出对含 HBx 基因的肝癌细胞的生长和增殖功能的有效抑制,且其抑制效果也呈量效关系;通过裸鼠接种方法显示,所述多肽在动物水平能有效抑制表达 HBx 的肝癌细胞的成瘤能力。然而,所述多肽对无表达 HBx 肝癌细胞中 NF-B 的启动子活性无影响,对无表达 HBx 肝癌细胞的生长和增殖也无影响。

[0049] 本发明还提供所述本发明多肽的各种功能片段。所述功能片段可以为本发明的多肽的连续氨基酸序列的任何片段,条件是其与亲本多肽相比,能以相似程度、相同程度、或更高程度保留亲本多肽的生物活性,例如,抑制 HBx 的活性。参照亲本多肽,所述功能片段可以包括,例如,亲本多肽的约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%、105%、110%、120%、150%、200% 或更高的活性。所述功能片段还可以在上述连续氨基酸序列片段的氨基或羧基端、或其氨基以及羧基两端,包含额外的氨基酸,例如,与亲本多肽的氨基酸序列中不同的氨基酸。如果所述额外的氨基酸不妨碍所述功能片段的生物学功能是理想的,例如,抑制 HBx 的活性,并有效地抑制癌细胞,优选是肝癌细胞,尤其是感染有乙肝病毒的肝癌细胞的生长和增殖。更为理想的是,当与所述亲本多肽的生物学活性相比较时,所述额外的氨基酸能够导致增强的生物学活性。本发明的多肽的功能片段包括与所述亲本多肽具有至少 70% 的序列同一性的氨基酸序列为优选序列。在一个具体的实施例中,本发明的功能片段包括在所述亲本多肽的 N 端和 / 或 C 端添加氨基酸,例如一个或两个氨基酸。

[0050] 另外,本发明的多肽及其功能片段的功能变体也包括在本发明范围之内。所述本发明的多肽及其功能片段的功能变体保留与所述亲本多肽或亲本功能片段基本相似或相同的生物活性,例如,抑制 HBx 的活性,以及有效地抑制肝癌细胞,尤其是感染有乙肝病毒的肝癌细胞的生长和增殖。参照所述亲本多肽或亲本功能片段,所述功能变体可以与所述亲本多肽或亲本功能片段的氨基酸序列至少有约 50%、60%、70%、80%、90%、95% 或 100% 的同一性。优选地,本发明的多肽及其功能片段的功能变体包含,与所述亲本多肽或亲本功能片段具有至少 70% 的序列同一性。更优选的,本发明的多肽及其功能片段的功能变体包含与所述亲本多肽或亲本功能片段只有 1-3 个氨基酸的区别。最优选地,本发明的多肽及其功能片段的功能变体包含与所述亲本多肽或亲本功能片段只有 1 个氨基酸的区别。

[0051] 所述本发明的多肽及其功能片段的功能变体可以包括,例如,包含具有至少一个

保守氨基酸置换的亲本多肽或亲本功能片段氨基酸序列。具体来说,所述本发明的多肽及其功能片段的功能变体可以包含具有2个、3个、4个、5个、或更多个保守氨基酸置换的亲本多肽或亲本功能片段的氨基酸序列。另外,所述本发明的多肽及其功能片段的功能变体也可以包括具有至少一个非保守氨基酸置换的亲本多肽或亲本功能片段的氨基酸序列。具体来说,可以包括具有2个、3个、4个、5个、或更多个非保守氨基酸置换的亲本多肽或亲本功能片段的氨基酸序列。在这些情形中,对于所述的氨基酸置换,优选的是不妨碍或抑制所述功能变体的生物学功能或活性。更优选地,所述氨基酸置换提高本发明的多肽及其功能片段的功能变体的生物学功能或活性,以致当与所述亲本多肽或亲本功能片段相比较时,所述功能变体的生物学功能或活性提高。

[0052] 优选地,本发明的多肽及其功能片段的功能变体包括一个或多个保守氨基酸置换。在本领域内,保守氨基酸置换是公知的,它指的是这样的氨基酸置换,即,其中一个具有某种物理和/或化学特性的氨基酸被换为另一个具有相同化学或物理特性的氨基酸。本领域技术人员了解,保守性的氨基酸置换可以不造成蛋白质的结构或功能的显著改变。典型的保守性置换包括,例如,用酸性氨基酸置换另一个酸性氨基酸(例如,Asp或Glu),用具有非极性侧链的氨基酸置换另一个具有非极性侧链的氨基酸(例如,Ala, Gly, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Val, 等),用碱性氨基酸置换另一个碱性氨基酸(Lys, Arg, 等),用具有极性侧链的氨基酸置换另一个具有极性侧链的氨基酸(Asn, Cys, Gln, Ser, Thr, Tyr, 等),用芳香氨基酸(Trp, Phe, Tyr, 等)置换另一个芳香氨基酸,等。

[0053] 另外,本发明的多肽及其功能片段的功能变体还可以包括本发明的任意多肽或功能片段的逆反类似物。本发明中,“逆反类似物”是指包括反转的亲本多肽氨基酸序列的多肽,以致所述逆反类似物的氨基酸序列(当从N端向C端读取时)与当从C端向N端读取时的亲本多肽的氨基酸序列相同。此外,关于逆反类似物,每一个氨基酸是该氨基酸的D异构体,D异构体与L异构体相反。例如,三肽Val-Ala-Gly的逆反类似物具有氨基酸序列Gly-Ala-Val,其中每个氨基酸是D异构体。本发明中,所述功能变体优选包括SEQ ID NO: 1的逆反类似物。

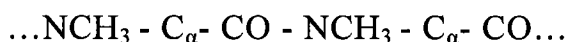
[0054] 本发明的多肽(包括功能片段)及其功能变体可以是任意长度的,即,可以包括任意数目的氨基酸,条件是所述多肽(包括功能片段)及其功能变体保留必要的生物学活性,例如,抑制HBx的活性,以及有效地抑制癌细胞,优选是肝癌细胞,尤其是感染有乙肝病毒的肝癌细胞。举例来说,本发明的多肽(包括功能片段和功能变体)可以是4-2000个氨基酸长,如长度为5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,18,20,25,30,40,50,60,70,80,90,100,125,150,175,200,300,400,500,700,800,1000或更多。优选地,本发明的多肽长度为6-20个氨基酸,并满足作为多肽药物的药效学和半衰期的要求。

[0055] 在一个实施例中,本发明的多肽及其功能片段的功能变体与亲本多肽SEQ ID NO: 1具有一个氨基酸的差别,其具有与亲本多肽SEQ ID NO: 1相似的生物学活性和功能,例如,抑制HBx的活性,以及有效地抑制癌细胞,优选是肝癌细胞,尤其是表达HBx的肝癌细胞。更具体地,本发明的多肽及其功能片段的功能变体包括SEQ ID NOs: 2-6。

[0056] 本发明还提供所述多肽(包括功能片段和功能变体)的肽模拟物。在一个优选的实施方案中,所述肽模拟物是拟肽。拟肽是指这样的肽模拟物,其中每个氨基酸的侧链粘附在氨基酸的氮原子上而不是 α 碳上。例如,拟肽可以被视为N-置换的甘氨酸,其具有

NRCH₂CO 通用结构的重复单位,并且其具有与相对应的多肽相同或基本相同的氨基酸序列。在另一个优选的实施方案中,所述肽模拟物包括改变的主链,其中在每个氨基酸之间的键是甲基化的。在这一点上,所述肽模拟物可以包括下述结构的甲基化肽主链:

[0057]



[0058] 本发明的多肽(包括功能片段和功能变体)以及肽模拟物中,可以包括用合成的氨基酸来置换天然存在的氨基酸。所述合成的氨基酸在本领域内是已知的,包括,例如,氨基环己烷羧酸、正亮氨酸、 α -氨基正癸酸、高丝氨酸、S-乙酰氨基甲基-半胱氨酸、反式-3-羟脯氨酸、反式-4-羟脯氨酸、4-氨基苯丙氨酸、4-苯甲酰苯丙氨酸、4-硝基苯丙氨酸、4-氯苯丙氨酸、4-羧基苯丙氨酸、 β -苯基丝氨酸、 β -羟基苯丙氨酸、苯基甘氨酸、 α -萘基丙氨酸、环己基丙氨酸、环己基甘氨酸、二氢吡啶-2-羧酸、1,2,3,4-四氢异哇琳-3-羧酸、氨基丙二酸、氨基丙二酸单酰胺、N'-苄基-N'-甲基-赖氨酸、N',N'-二苄基-赖氨酸、6-羟基赖氨酸、鸟氨酸、 α -氨基环戊烷羧酸、 α -氨基环己烷羧酸、 α -氨基环庚烷羧酸、 α -(2-氨基-2-降冰片烷)-羧酸、 α , γ -二氨基丁酸、 α , β -二氨基丙氨酸、高苯丙氨酸、和 α -叔-丁基甘氨酸。

[0059] 本文所述的本发明的多肽(包括功能片段和功能变体)以及肽模拟物还可以包含细胞-穿透肽(CPP)。所述CPP促进本发明多肽穿过细胞膜并且进入细胞内。CPPs在本领域中是已知的。参见,例如,Deshayes等,细胞分子生命科学(Cell.Mol.Life Sci.)62:1839-1849(2005);EI-Andaloussi等,现代药物设计(Curr.Pharm.Design.)11:3597-3611(2005)。所述CPP可以是本领域已知的那些中的任一种。

[0060] 本发明的多肽(包括功能片段和功能变体)以及肽模拟物还可以,例如,被脂化(例如,脂肪酸化)、糖基化、酰胺化、羧酸化、磷酸化、酯化、N-酰化、通过二硫键环化、转化成酸加成盐、二聚体化或多聚体化,和/或缀合化。

[0061] 举例来说,本发明所述多肽(包括功能片段和功能变体)以及肽模拟物可以是脂化衍生物。所含的脂质分子可以包括本领域已知的任何脂质,例如,脂肪酸,磷脂基团,糖磷脂酰肌醇,磷脂酰丝氨酸,磷脂酰乙醇胺,鞘磷脂,磷脂酰胆碱,心磷脂,磷脂酰肌醇,磷脂酸,溶血磷酸甘油酯,和胆固醇基团。优选地,所述脂化衍生物是脂肪酸衍生物,所述脂肪酸分子可以是任何C8-C20脂肪酸,例如,月桂酸、棕榈酸、肉豆蔻酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、亚麻酸、花生四烯酸、二十碳五烯酸、芥酸、或花生酸等。所述脂肪酸还可以在任意碳原子上任选地包含其他官能团,例如,一个或多个氨基。所述脂肪酸分子可以附着在本发明多肽(包括功能片段和功能变体)以及肽模拟物的任何适当的部分。例如,在本发明的多肽氨基端、羧基端、或氨基和羧基两端包括脂肪酸分子。脂肪酸分子可以直接或通过连接体附着到本发明的多肽(包括功能片段和功能变体)以及肽模拟物上。

[0062] 本发明的多肽(包括功能片段和功能变体)以及肽模拟物,包括其衍生物例如脂肪酸衍生物,还可以是单体肽、二聚肽或多聚肽。

[0063] 本发明的多肽(包括功能片段和功能变体)以及肽模拟物可以通过本领域技术人员已知的方法获得(参见,例如,Chan等,Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis,牛津大学

出版社,牛津,英国,2005;Reid,R.,Peptide and Protein Drug Analysis,Marcel Dekker Company,2000;以及美国专利号 5,449,752)。此外,也可由核酸重组方法生产多肽而得到(参见,例如,Sambrook等,分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual),第3版,冷泉港出版社(Cold Spring Harbor Press),冷泉港,纽约,2001)。此外,本发明的一些多肽(包括其功能片段以及功能变体)可以从如植物、细菌、昆虫、哺乳动物如大鼠、人等分离和/或纯化。分离和纯化的方法在本领域内也是公知的。备选地,本文所述的多肽(包括其功能片段以及功能变体)可以从商业公司合成后购买获得。

[0064] 多核苷酸

[0065] 本发明还提供编码任一种所述的本发明多肽(包括功能片段和功能变体)的分离的多核苷酸。所述多核苷酸包含编码任一种本发明多肽(包括功能片段和功能变体)编码序列,例如编码 SEQ ID NO:1 的核苷酸序列 SEQ ID NO:7,以及这些编码序列的任一种简并变异体;备选地,所述多核苷酸还可以包含附加编码序列和/或非编码序列。另一方面,本发明还提供包含这样的分离的多核苷酸或其片段,其所包含的核苷酸序列与本发明所述的任一种核酸的核苷酸序列互补或在严格条件下与本发明所述的任一种多核苷酸的核苷酸序列杂交。

[0066] 本发明还提供上述多核苷酸的变异体,其编码与本发明多肽(包括功能片段和功能变体)有相同的氨基酸序列的多肽或多肽的功能片段、功能变体。此多核苷酸的变异体可以是天然发生的等位变异体或非天然发生的变异体。这些核苷酸变异体包括取代变异体、缺失变异体和插入变异体。如本领域所知的,等位变异体是一个多核苷酸的替换形式,它可能是一个或多个核苷酸的取代、缺失或插入,但不会从实质上改变其编码的多肽的功能。

[0067] 本发明的多核苷酸可以是天然存在通过纯化而得到,也可以通过重组产生,或者可以基于化学合成/或酶连接反应,使用本领域已知的方法而构建。本发明的多核苷酸可以含有天然存在的核苷酸,也可以包含具有修饰的核苷酸。所述具有修饰的核苷酸设计成增加分子的生物学稳定性或增加在杂交时形成的双链体的物理稳定性(例如,硫代磷酸衍生物和吡啶置换的核苷酸),包括,例如,5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、4-乙酰胞嘧啶、5-(羧基羟甲基)尿嘧啶、5-甲氧基氨基甲基-2-硫尿嘧啶、尿嘧啶-5-羟基乙酸、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-硫胞嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、尿嘧啶-5-羟基乙酸甲基酯、3-(3-氨基-3-N-2-羧丙基)尿嘧啶、和 2,6-二氨基嘌呤等。并且,其可以包含天然的或改变的核苷酸之间的键,诸如氨基磷酸酯键或硫代磷酸酯键,用来代替天然存在的磷酸二酯键。优选的,本发明的核酸是重组产生的。

[0068] 重组表达载体

[0069] 本发明还提供包括任一种本发明多核苷酸的重组表达载体。所述重组表达载体可以是任何适当的重组表达载体,并且可以用于转化或转染任何适当的宿主细胞。适当的载体包括设计用于繁殖和扩增或用于表达,或同时用于二者,如质粒或病毒。所述载体可以通过下列自由组合:pUC 系列、pcDNA 系列,pBluescript、pET 系列、pGEX 系列和 pEX 系列。还可以使用噬菌体载体,诸如 λ GT10、 λ GT11、 λ ZapII、 λ EMBL4 等。植物表达载体可以包括 pBI01、pBI01.2、pBI01.3、pBI121 和 pBIN19。动物表达载体可以包括 pEUK-C1、pMAM 和 pMAMneo。优选地,本发明提供 pcDNA 系列的质粒。

[0070] 可以使用标准重组 DNA 技术制备本发明的重组表达载体。可以制备环形的或线性的表达载体构建体,以包含在原核或真核宿主细胞中起作用的复制系统。理想地,所述重组表达载体包括调控序列,诸如转录和翻译起始与终止密码子。所述调控序列对于所述载体所引入的宿主类型(例如,细菌、真菌、植物、或动物)是特异性的。

[0071] 所述重组表达载体可以包括一种或多种标记基因,其允许选择转化的或转染的宿主。标记基因包括对杀生物剂的抗性,例如,对抗生素、重金属等的抗性,在营养缺陷型宿主中互补以提供原养型,以及催化生物荧光等等。对于本发明表达载体合适的标记基因包括,例如,新霉素 /G418 抗性基因、荧光酶素报告基因、潮霉素抗性基因、组氨醇抗性基因、四环素抗性基因、和氨苄青霉素抗性基因。

[0072] 所述重组表达载体可以包括天然的或非天然的启动子。启动子的选择,例如,强、弱、诱导型、组织特异型和发育特异型的,在技术人员的普通技能之内。相似地,核苷酸序列与启动子的组合也在技术人员的技能之内。启动子可以是非病毒启动子或病毒启动子,例如,巨细胞病毒(CMV)启动子、SV40 启动子、RSV 启动子、以及在鼠干细胞病毒长末端重复中存在的启动子。本发明的重组表达载体可以设计用于瞬时表达、用于稳定表达、或用于二者。此外,所述重组表达载体可以制备成用于组成型表达或用于诱导型表达。

[0073] 此外,所述重组表达载体可以包括自杀基因。“自杀基因”是指在细胞中表达后导致细胞死亡的基因。自杀基因表达后可影响细胞对某种试剂如药物的敏感性,进而引起细胞死亡。自杀基因在本领域内是已知的(参见,例如,自杀基因治疗:方法和综述(Suicide Gene Therapy:Methods and Reviews),Springer, Caroline J. (Cancer Research UK Centre for Cancer Therapeutics at the Institute of Cancer Research, Sutton, Surrey, UK), Humana Press, 2004),例如单纯疱疹病毒(HSV)胸苷激酶(TK)基因和嘌呤核苷磷酸酶,以及硝基还原酶等。

[0074] 宿主细胞

[0075] 本发明还提供包括本文所述的任何一种重组表达载体的宿主细胞。宿主细胞是包含本发明重组表达载体的任何类型的细胞。宿主细胞可以是真核细胞,例如,植物、动物、真菌、或藻类,或者可以是原核细胞,例如,细菌或原生动物。宿主细胞可以是培养的细胞或原代细胞,即,直接从生物体如人分离的原代细胞。宿主细胞可以是贴壁细胞或悬浮的细胞,即,在混悬液中生长的细胞。适当的宿主细胞在本领域内是已知的,包括,例如,DH5 α 大肠杆菌细胞、中国仓鼠卵巢细胞、猴 VERO 细胞、COS 细胞、HEK293 细胞,等等。为了扩增或复制所述重组表达载体的目的,所述宿主细胞优选是原核细胞。为了产生重组修饰的多肽或蛋白的目的,宿主细胞优选是哺乳动物细胞。人源细胞为优选的宿主细胞。宿主细胞可以是任何细胞类型,可以来自任何类型的组织,并且可以是任何发育阶段的。

[0076] 本发明还提供包括至少一种本文所述的宿主细胞的细胞群体。所述细胞群体可以是异种群体,包括包含任一种所述重组表达载体的宿主细胞,以及至少一种其它细胞,例如,不包含任何所述重组表达载体的宿主细胞(例如,T 细胞),或除 T 细胞之外的细胞,例如,B 细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、红细胞、肝细胞、内皮细胞、上皮细胞、肌细胞、脑细胞,等等。备选地,所述细胞群体可以是基本同种群体,其中所述群体主要包括包含所述重组表达载体的宿主细胞(例如,主要由包含所述重组表达载体的宿主细胞组成)。所述群体还可以是细胞的克隆群体,其中所述群体的所有细胞是包含重组表达载体的单一宿主细胞的克

隆,以致该群体的所有细胞包含所述重组表达载体。在本发明的一个实施方案中,所述细胞群体是包括包含本文所述的重组表达载体的宿主细胞的克隆群体。

[0077] 缀合物

[0078] 本发明还包括缀合物,例如,生物缀合物,其包括本发明的多肽(包括功能片段和功能变体)以及肽模拟物、多核苷酸、重组表达载体、或宿主细胞中的任一种。缀合物,以及通常合成缀合物的方法在本领域内也是已知的(参见,例如, Hudecz, F., 分子生物学方法(Methods Mol. Biol.) 298:209-223(2005) 和 Kirin 等,无机化学(Inorg. Chem.) 44(15): 5405-5415(2005))。

[0079] 药物组合物

[0080] 本发明所提供的上述各种物质,包括多肽(包括功能片段和功能变体)以及肽模拟物、脂肪酸衍生物、多核苷酸、重组表达载体、以及宿主细胞(包括其群体)、缀合物等(笼统称为“本发明物质”)可以是分离的、纯化的、合成的、和/或重组的。

[0081] 本发明物质还可以配制成组合物,诸如药物组合物。在这一点上,本发明提供包括任意所述多肽(包括功能片段和功能变体)以及肽模拟物、脂肪酸衍生物、缀合物、核酸、重组表达载体和宿主细胞(包括其群体),以及药用载体的药物组合物。包含任意本发明物质的本发明药物组合物可以包括多于一种本发明物质,例如:多肽和核酸,或两种或更多不同的多肽。备选地,所述药物组合物可以包括与另一种或多种药物活性试剂或药物的组合。所述另一种或多种药物活性试剂或药物优选可以包括诸如化疗剂,例如,天冬酰胺酶,白消安,卡铂,顺铂,柔红霉素,多柔比星,氟尿嘧啶,吉西他滨,羟基脲,甲氨蝶呤,紫杉醇,利妥昔单抗,长春碱,长春新碱,等等。

[0082] 在本发明的一个优选实施方案中,所述药物组合物包括与脂质组合的本发明物质。所述脂质可以是任何脂质,包括脂肪酸、磷脂、固醇、鞘脂、萜、甘油酯、甘油磷酸酯、异戊烯醇酯、糖脂和聚酮化合物等。所述脂在本领域内是已知的。

[0083] 关于药物组合物,药用载体可以是任意常规所用的那些,它们可以仅通过化学物理因素,诸如溶解性和缺乏与活性化合物的反应性,以及通过施用的途径,并限定。本发明所述的药用载体,例如,媒介物、佐剂、赋形剂和稀释剂等,是本领域技术人员公知的,并且容易为公众所获得。优选地,所述药用载体对活性试剂是化学惰性的,在使用条件下不具有有害副作用或毒性。

[0084] 载体的选择应该由特定的本发明物质、以及由用于施用本发明物质的特定方法决定。因此,存在本发明药物组合物的多种适当制剂。下述用于口服、气雾剂、肠胃外、皮下、静脉内、肌内、动脉内、鞘内、腹膜内、直肠、和阴道施用的制剂是示例性的,并且不以任何方式限制。可以使用多于一种途径施用本发明物质,在特定情形中,特定的途径可以提供比另一种途径更直接和更有效的方法。

[0085] 在本发明的一个优选实施方案中,所述药物组合物是局部制剂、静脉内制剂、或皮下制剂。在本发明的一个优选实施方案中,所述药物组合是局部制剂。局部制剂是本领域技术人员公知的。在本发明施用到皮肤的情形中,所述制剂特别适合。本发明的局部制剂可以是,例如,膏剂、洗液、油膏、贴片、油、糊剂、喷雾剂,例如气雾剂、雾剂、凝胶、滚抹式的液体、固体棒等。优选地,本发明的局部制剂是膏剂、洗液、油膏、或贴片。

[0086] 适用于口服施用的制剂可以由下列各项组成:a) 液体溶液,诸如溶解在稀释剂如

水、盐水、或橙汁中的有效量的本发明物质 ;b) 胶囊、片剂、锭剂等,每一种包含预先确定量的,固体或颗粒状的活性成分 ;c) 粉剂 ;d) 在适当液体中的混悬液 ;和 e) 适当的乳剂。液体制剂可以包括稀释剂,诸如水和醇,例如,乙醇、苯甲醇、和聚乙二醇,可以添加或不添加药用表面活性剂。胶囊形式可以是普通的硬或软壳明胶型,其包含,例如,表面活性剂、润滑剂、和惰性填充剂诸如乳糖、蔗糖、磷酸钙、和玉米淀粉。片剂形式可以包括下列各项中的一种或多种 :乳糖、蔗糖、甘露醇、玉米淀粉、马铃薯淀粉、褐藻酸、微晶纤维素、阿拉伯树胶、明胶、瓜耳胶、胶状二氧化硅、滑石、硬脂酸镁、硬脂酸钙、硬脂酸锌、硬脂酸、和其它赋形剂、着色剂、稀释剂、缓冲剂、崩解剂、润湿剂、防腐剂、调味剂、和其它药物相容的赋形剂。锭剂形式可以包括处在调味剂通常是在蔗糖或阿拉伯树胶的本发明物质,以及包括处在惰性基质诸如明胶和甘油、或蔗糖和阿拉伯树胶中的本发明物质的软锭剂,另外包含本领域已知的赋形剂的乳剂、凝胶等。

[0087] 本发明物质,单独的或与其它适宜的成分组合,可以制成通过吸入来施用的气雾剂制剂。这些气雾剂制剂可以放置在加压可用的介质中,诸如二氯二氟甲烷、丙烷、氮等。它们还可以配制成非加压的制剂,如在喷雾器或雾化器中。所述喷雾制剂还可以用于向粘膜喷雾。

[0088] 适于肠胃外施用的制剂包括水性和非水性、等渗无菌注射液,其可以包含抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂、和使得所述制剂与预期接收者的血液等渗的溶质,以及水性和非水性无菌混悬液,其可以包括混悬剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂、和防腐剂。本发明物质可在药用载体中的生理用稀释剂中使用,诸如无菌液体或液体混合物,包括水、盐水、水性葡萄糖和相关的糖溶液、醇如乙醇或十六醇、二醇如丙二醇或聚乙二醇、二甲亚砜、甘油、缩酮如 2,2-二甲基-1,3-二氧戊环-4-甲醇、醚、油、脂肪酸、脂肪酸酯或甘油酯,或乙酰化的脂肪酸甘油酯,添加或不添加药用表面活性剂诸如皂或去污剂,混悬剂如果胶、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、或氮甲基纤维素,或乳化剂和其它药用佐剂。

[0089] 可以用在肠胃外制剂中的油包括石油、动物油、植物油、或合成油。油的具体实例包括花生油、大豆油、芝麻油、棉籽油、玉米油、橄榄油、石油和矿物油。用在肠胃外制剂中的适当的脂肪酸包括油酸、硬脂酸、和异硬脂酸。

[0090] 用在肠胃外制剂中的适当的皂包括脂肪碱金属和三乙醇胺盐等,并含有适当的去污剂,例如 a) 阳离子去污剂 :二甲基二烷基卤化铵和烷基卤化吡啶 ;b) 阴离子去污剂 :烷基、芳基、烯属磺酸酯、烷基、烯烃、醚、单甘油硫酸酯和磺基琥珀酸酯等 ;c) 非离子去污剂 :脂肪胺氧化物、脂肪酸链烷醇酰胺和聚氧乙烯聚丙烯共聚物等 ;d) 两性去污剂 :烷基- β -氨基丙酸酯和 2-烷基-咪唑啉季铵盐 ;e) 它们的混合物。

[0091] 所述肠胃外制剂可在溶液中含有大约为 0.5-25% (重量体积百分浓度) 的本发明物质。可以使用防腐剂和缓冲剂。为了最小化或消除在注射部位的刺激性,所述组合物可以包含一种或多种亲水性-亲脂性平衡 (HLB) 的非离子表面活性剂。在所述制剂中表面活性剂的用量约为 5-15% (重量体积百分浓度)。适当的表面活性剂包括聚乙二醇失水山梨糖醇脂肪酸酯和环氧乙烷与疏水基的高分子量加合物,所述加合物是通过缩合环氧丙烷和丙二醇而形成的。所述肠胃外制剂可以存在于单位剂量或多剂量密封容器中,并且可以保存在冷冻干燥 (冻干) 的条件下,仅需要在即将使用之前加入无菌液体赋形剂如水用于注射。可以由先前所述种类的无菌粉剂、颗粒剂、和片剂制备临时的注射溶液和混悬液。

[0092] 本发明物质或包括所述本发明物质的组合物还可以制成可注射制剂。可注射组合物对有效的药用载体的需要是本领域普通技术人员公知的。优选地,当施用于细胞例如树突细胞时,所述细胞通过注射施用。

[0093] 另外,本发明的发明物质,或包括所述发明物质的组合物,可以通过与各种基质如乳化基质或水溶性基质混合而制备成栓剂。适于例如阴道施用的制剂可以以阴道栓剂、卫生棉条、膏剂、凝胶、糊剂、泡沫剂、或喷雾制剂存在,除了其活性成分之外,还包含本领域中已知合适的那些载体。

[0094] 本领域技术人员应该了解,除了上述药物组合物之外,本发明的发明物质还可以配制为包含复合物,诸如环糊精包含复合物,或脂质体。

[0095] 为了达到本发明的目的,施用的本发明物质的量或剂量应该在合理时间范围内在受试者或动物内产生例如治疗或预防响应。例如,本发明物质的剂量应该足以在从施用时刻起约2小时以上如12-24小时或更长的时间期间内,抑制患病细胞的增殖,起到治疗或预防疾病(例如,肿瘤,癌症等)的作用。在某些实施方案中,所述时间期间甚至可以更长。剂量应该由特定的本发明物质的功效和待治疗的动物(例如,人)的状况,以及动物(例如,人)的体重所确定。确定施用剂量的许多测定方法是本领域内已知的。本发明物质的剂量还将通过施用特定的本发明物质可能伴随的任何副作用的存在、性质和程度而确定。

[0096] 本领域普通技术人员应该容易理解,本发明物质可以以任何方式修饰,以提高本发明物质的治疗或预防功效。例如,本发明物质可以直接或通过连接体间接与靶向的部分缀合。使化合物,例如,本发明物质,与靶向部分缀合的实践,在本领域内是公知的。如参见, Wadwa 等, 药物靶向杂志 (J. Drug Targeting), 3:111, (1995) 和美国专利号 5, 087, 616。再另一个实施方案中,本发明物质可以被修饰成贮存库形式,以便使本发明物质释放到其所施用的体内的方式在时间和体内部位方面受到控制(参见,例如,美国专利号 4, 450, 150)。本发明物质的贮存库形式可以是,例如,包括本发明物质和多孔或非多孔物质如聚合物的可植入组合物,其中本发明物质通过所述物质和/或所述非多孔物质的降解而扩散。然后,将贮存库植入体内的理想部位,并且本发明物质以预先确定的速率从所述植入物释放。

[0097] 本领域技术人员应该理解,本发明提供的防止和抑制癌细胞生长和增殖的方法,包括使患病细胞与具有有效抑制量的本发明所述的任意药物组合物接触。可以采用任意常规的方法将本发明所述药物组合物传递给癌细胞。在本发明方法的一个优选的实施方案中,将所述药物组合物通过局部施用给宿主。在另一个优选的实施方案中,所述药物组合物直接施用到癌细胞,例如,肿瘤内递送。

[0098] 本发明的药物组合物,包含多肽(包括功能片段和功能变体)以及肽模拟物、核酸、重组表达载体、和/或宿主细胞,可以用在防止和抑制乙型肝炎病毒感染诱发的慢性肝病,包括肝炎,以及由此产生的肝硬变和肝癌的方法中。本领域普通技术人员应该容易理解,本发明所述的由乙型肝炎病毒感染诱发的慢性肝病可以存在于任何宿主中。优选地,所述宿主是哺乳动物。特别优选地,所述宿主是人。

[0099] 下面结合具体实施例,对本发明作进一步的阐述说明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不在于限制本发明的范围。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法;所用的材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂公司购买得到的。

[0100] 实施例一：多肽的设计和制备

[0101] 人工合成多肽功能片段 anti-HBxP2#：

[0102] 本发明用人工合成的方法合成了氨基酸序列为 Pro-Asp-Leu-His-Lys-Asn-Glu-Leu-Lys-His-Val-Lys-Tyr (SEQ ID NO:1) 的多肽（以下称 Anti-HBxP2#）。该多肽的制备采用固相合成方法，如应用 AAPTECApex396 型多肽合成仪器（购自香港环球分析测试仪器有限公司），在密闭的防爆玻璃反应器中使氨基酸按 SEQ ID NO:1 所示的序列，从 C 端 - 羧基端向 N 端 - 氨基端，这是指第一个被加入到该氨基酸序列 Pro-Asp-Leu-His-Lys-Asn-Glu-Leu-Lys-His-Val-Lys-Tyr 的氨基酸单体是 C 末端的 Tyr，然后再是 Lys，再是 Val，一直到最后的 Asp 以及 N 末端的 Pro，不断添加、反应、合成，操作最终得到所要具有的氨基酸序列。固相合成法，大大的减轻了每步产品提纯的难度。为了防止副反应的发生，参加反应的氨基酸的侧链都是受保护的。羧基端是游离的，并且在反应之前必须活化。

[0103] 具体合成由下列几个循环组成：

[0104] 1) 去保护：Fmoc 保护的柱子和单体必须用一种碱性溶剂（piperidine）去除氨基的保护基团。

[0105] 2) 激活和交联：下一个氨基酸的羧基被一种活化剂所活化。活化的单体与游离的氨基反应交联，形成肽键。在此步骤使用大量的超浓度试剂驱使反应完成。循环：这两步反应反复循环直到合成完成。

[0106] 3) 洗脱和脱保护：多肽从柱上洗脱下来，其保护基团被一种脱保护剂（TFA）洗脱和脱保护。从 C 端（羧基端）向 N 端（氨基端）合成，把 C 端的第一个氨基酸 Tyr 固定在树脂上，脱去 Tyr 氨基酸的保护基团，并活化下一个氨基酸 Lys 的羧基端，使之发生缩和反应，以此类推到合成完最后一个氨基酸后，从树脂上切割下来，粗肽经 HPLC 纯化，获得 98% 纯度的 Anti-HBxP2#，最后通过质谱做进一步的鉴定，其分子量为 1622.2Kd。

[0107] 在固相合成中，肽链的延长是在不溶性的聚苯乙烯树脂载体上进行的。合成多肽的 C-末端先和氯甲基聚苯乙烯树脂（氯化苄酯树脂）反应形成苄酯，然后按肽链一级结构的顺序将氨基端已被保护的氨基酸逐个加上，使肽链延长。

[0108] 人工合成多肽 Anti-HBxP2# 用高压液相色谱（HPLC）（应用 PLC Agela C18 柱）分析，显示所获得的纯度为 98.997%（图 1）。

[0109] 实施例二：离体（in vitro）多肽的抗 HBx 活性

[0110] 采用两种方法检测离体情况下实施例一中的多肽的抗 HBx 的活性：第一种方法是采用分子克隆技术，将表达实施例一中的多肽的 cDNA 克隆在真核表达载体 pcDNA3.1(+) 上，通过基因转染，在肝癌细胞内实现表达所研究多肽的目的，进而观察所研究的多肽抑制 HBx 的效果；第二种方法是采用人工合成的多肽，直接加入到培养肝癌细胞的培养液中，观察多肽抑制 HBx 的效果。

[0111] 实验中采用的肝癌细胞有两种：一种为组成型表达 HBx 的肝癌 HepG2-X 细胞（稳定转染 HBx 的肝癌 HepG2 细胞）；一种为组成型表达乙肝病毒全基因的肝癌 HepG2.2.15 细胞（稳定转染 HBV 全基因的肝癌 HepG2 细胞）。由于 HBx 具有激活转录因子 NF- κ B 的作用，通过荧光素酶报告基因检测方法，在分子水平检测 HBx 是否受到抑制；由于 HBx 在肝癌细胞中具有促进肝癌细胞生长和增殖的作用，可以通过 3-(4,5-二甲基-2-噻唑)-2,5-二苯基四氮唑溴盐（MTT）检测实施例一中的多肽对上述 HepG2-X 细胞和 HepG2.2.15 细胞增

殖的影响。

[0112] A. 多肽真核表达载体的构建

[0113] 1. 主要材料：

[0114] 1) 菌株 :E. coli DH5 α (购自原平皓(天津)生物技术有限公司)

[0115] 质粒 :pcDNA3.1(+)(购自 Invitrogen), pEGFP-C2(购自 Invitrogen)

[0116] 2. 主要试剂

[0117]

试剂名称	来源
琼脂糖	Solarbio
质粒小提试剂盒	Transgen
氨苄青霉素	BBI
胰蛋白酶	BBI
胰蛋白胨	Promega
酵母提取物	Promega
EcoRI 内切酶	Takara
XhoI 内切酶	Takara
rTaq 酶	Takara
T4 DNA 连接酶	Takara
氯仿	BBI

[0118] 3. 主要溶液配制：

[0119] 1) LB 液体培养基

[0120] 胰化蛋白胨 2.0g

[0121] 酵母提取物 1.0g

[0122] NaCl 2.0g

[0123] 加双蒸水溶解定容至 200ml

[0124] 1.03 $\times 10^5$ Pa 蒸汽灭菌 20min。

[0125] 2) LB 固体培养基

[0126]

胰化蛋白胨	2.0g
酵母提取物	1.0g
NaCl	2.0g
琼脂粉	3.0g
双蒸水溶解定容至	200ml

[0127] 1.03 $\times 10^5$ Pa 蒸汽灭菌 20min。

[0128] 3) 10mg/ml 溴化乙锭

[0129] 溴化乙锭 0.2g

[0130] 双蒸水 20ml

[0131] 工作液 :0.5ug/ml

- [0132] 4) TBE 电泳缓冲液
- [0133] 5× 贮存液 :
- [0134] Tris 碱 54g
- [0135] 硼酸 27.5g
- [0136] 0.5mol/L EDTA (pH 8.0) 20ml
- [0137] 加双蒸水定容至 1000ml
- [0138] 4. 退火体系
- [0139]

试剂	加入量 (μl)
灭菌双蒸水	20
5 × Annealing Buffer	10
Forward DNA oligo (50 μM) (5'-AATTCATGTGGCCTGATCTTCACAAAAATGAA CTAAAACATGTTAAATATTGAC-3') (SEQ ID NO:13)	10
Reverse DNA oligo (50 μM) (5'-TCGAGTCAATATTTAACATGTTTTAGTTCATTTTT GTGAAGATCAGGCCACATG-3') (SEQ ID NO:14)	10

- [0140] 5. 退火条件 :95℃, 2 分钟 ;每 8 秒下降 0.1℃至 25℃, 90 分钟 ;4℃, ∞。
- [0141] 6. pcDNA3.1 (+) 空质粒载体的小量提取
- [0142] 将本实验室所保存的含有 pcDNA3.1 (+) 质粒的 DH5 α 菌株进行活化, 挑取单克隆, 加入 LB 液体培养基中 (含氨苄霉素 100mg/L) 37℃过夜培养。使用 TransGen 质粒小提试剂盒提取质粒。
- [0143] 7. 双酶切反应体系 :
- [0144]

试剂	加入量 (μl)
限制性内切酶 EcoR I	2
限制性内切酶 XhoI	2
10 × M buffer	4
DNA	小于 2 μg
ddH ₂ O	使总体积为 40 μl

- [0145] 混匀后, 37℃反应 3-6 小时。
- [0146] 8. 连接反应体系 :
- [0147]

试剂	加入量 (μl)
退火产物	0.3 pmol
质粒双酶切回收产物	0.03 pmol
10 × 连接缓冲液	2.5 μl
连接酶	1 μl
ddH ₂ O	使总体积为 25 μl

[0148] 混匀后 16℃ 反应过夜。合成碱基序列包括 cctgatcttc acaaaaatga actaaaacat gttaaatat (SEQ ID NO: 7), 连接示意图如图 8 所示。

[0149] 9. 转化步骤

[0150] 1) 将 DH5 α 感受态菌株 (购自 TianGen, 100 μl) 在冰上解冻;

[0151] 2) 在超净台中将步骤 8 中的 25 μl 连接产物全部加入含有感受态细菌的离心管中, 用枪头混匀, 冰上静置 30 分钟;

[0152] 3) 将离心管放入 42℃ 水浴中准确热激 90 秒;

[0153] 4) 立即放入冰上静置 2 分钟;

[0154] 5) 向离心管中加入 500 μl 无抗性 LB 液体培养基, 37℃ 预培养 45 分钟;

[0155] 6) 取 100 μl 菌液 (可根据形成克隆的密集程度做适度调整) 均匀涂布于 LB 固体培养板上 (含氨苄霉素 100mg/L), 待液体渗入培养基后, 倒置 37℃ 培养过夜;

[0156] 7) 待平板上长出清晰可见的单克隆菌斑之后, 用接菌针小心挑取独立的单克隆在 LB 液体培养基中 37℃ 培养过夜。

[0157] 10. 菌落 PCR 反应体系

[0158]

试剂	加入量(μl)
灭菌双蒸水	35.75
10 × buffer	5
dNTP (10mmol/L)	4
Forward Primer (20 μM)	1
5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' (SEQ ID NO: 15)	
Reverse Primer (20 μM)	1
5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3' (SEQ ID NO:16)	
模板 DNA (菌液)	3
Taq 酶	0.25

[0159] 11. 菌落 PCR 反应条件:

[0160]

94℃	10 分钟	
94℃	30 秒	35 个循环
53℃	30 秒	
72℃	15 秒	
72℃	10 分钟	
4℃	∞	

[0161] 反应完毕后取反应产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中进行电泳分析。将阳性克隆送交生物公司进行测序。并将该质粒命名为 p-Anti-HBxP2#。

[0162] B. 体外有效性实验

[0163] 1. 细胞系：

[0164] 表 1 实验中应用的细胞系

[0165]

细胞系名称	特性、用途及说明	来源
HepG2	肝癌细胞系	(购自上海劲马生物科技有限公司)
HepG2-X	HepG2 中稳定转染乙肝病毒 X 基因 Wang Q, et al. Neoplasia. 2010;12 (2): 103 -15.	自行构建并保存
HepG2.2.15	HepG2 中稳定转染 HBV 全基因组	(购自上海劲马生物科技有限公司)
L-O2	永生化的人正常肝细胞系	(购自南京凯基生物科技发展有限公司)
L-O2-X	L-O2 中稳定转染乙肝病毒 X 基因 Zhang WY, et al. Acta Pharmacol Sinica. 2009; 30(8):1153-61.	自行构建并保存

[0166] 2. 主要试剂

[0167]

试剂名称	来源
RPMI1640 培养液	Gibco
DMEM 培养液	Gibco
Lipofectamine 2000	Invitrogen
青链霉素	Solarbio
胰蛋白酶	BBi
胎牛血清	Hyclone

[0168] 3. 双荧光素酶报告基因分析

[0169] (1) 将对数生长期的细胞（为上述表 1 中列举的细胞）以 0.75×10^5 个 /ml 的密度接种于 24 孔细胞培养板，每孔接种 500 μ l 细胞，当细胞汇合至 90% 时进行基因转染。

[0170] (2) 启动子报告基因载体 (pGL3-NF- κ B, 0.3 μ g, 购自原平皓（天津）生物技术有限公司) 分别以脂质体法转染至细胞同时以海肾荧光素酶表达载体 (pRL-TK, 0.1 μ g, 可购自 Promega 公司) 为内参。同时转染 不同质量的由步骤 A 得到的多肽质粒 (0.25 μ g, 0.5 μ g 和 0.75 μ g) 或加入不同浓度的由实施例 1 获得的合成多肽 (0.1 μ M, 1 μ M, 10 μ M 和 100 μ M)，每个浓度重复 3 个孔。

[0171] (3) 在转染后 48 小时（或应用人工合成多肽 Anti-HBxP2# 作用后 24 小时），用 PBS 将细胞洗 3 次。

[0172] (4) 向每孔转染的细胞加入 100 μ l 1 $\times$ Passive Lysis Buffer (PLB)，于室温下作用 15min 使细胞充分裂解，用细胞刮子将细胞裂解物刮下来，转入 1.5ml Eppendorf (EP) 管中。

[0173] (5) 12,000rpm 离心 30min，将上清吸入新的 EP 管中。

[0174] (6) 向每个装有 100 μ l 荧光素酶测定缓冲液 (Luciferase Assay Buffer II, LARII) 的 EP 管中加入等量细胞裂解液，混匀。

[0175] (7) 立即将 EP 管放入生物化学发光检测仪 (Turner Biosystems 公司产品)，2sec 平衡后，测定 10sec 后的光输出。

[0176] (8) 加入 100 μ l 荧光淬灭剂 (Stop & Glo Buffer)，淬灭萤火虫荧光素酶同时启动海肾荧光素酶反应。

[0177] (9) 测定 10sec 后的光输出。

[0178] 第一次的荧光数值与第二次荧光数值的比值为相对活性。

[0179] 每组实验均作 3 次独立重复，以 Mean $\pm$ SD 作为统计依据，进行 Student's t test 统计学分析。

[0180] 如图 2 所示，p-Anti-HBxP2# 对 HepG2-X 细胞、L-02-X 细胞和 HepG2. 2. 15 细胞中 NF-B 启动子的活性具有抑制作用，其抑制作用呈剂量依赖性，而对无 HBx 表达的 HepG2 肝癌细胞和 L-02 肝细胞无影响。利用该实验进一步表明，含有 Anti-HBxP2# 的 5 种功能变体的基因对 HepG2-X 细胞和 L-02-X 细胞 NF-B 启动子的活性具有抑制作用。*P < 0.05，**P < 0.01，进行 Student's t test 统计学分析。

[0181] 如图 3 所示，应用人工合成的多肽 Anti-HBxP2#，对 HepG2-X 细胞、L-02-X 细胞和 HepG2. 2. 15 细胞中 NF-B 启动子的活性具有抑制作用，呈剂量依赖性。而对无 HBx 的 HepG2 肝癌细胞和无 HBx 的 L-02 肝细胞无影响。*P < 0.05，**P < 0.01，进行 Student's t test 统计学分析。

[0182] 4. MTT 检测

[0183] (1) 接种细胞：将对数生长期的细胞（为表 1 中列举的细胞）用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 或 DMEM 培养液配成单个细胞悬液，以每孔 4000-5000 个细胞接种到 96 孔细胞培养板中，每孔体积 100 μ l。

[0184] 培养细胞：待 12h 后细胞贴壁，转染不同质量的在本实施例的步骤 B 中所获得的多肽质粒 (0.05 μ g, 0.1 μ g 和 0.15 μ g) 或加入不同浓度的在实施例 1 中所获得的合成多肽 (0.1 μ M, 1 μ M, 10 μ M 和 100 μ M)，每个浓度重复 8 个孔，同一般培养条件，培养 48h。将

0.3 μ g pEGFP-C2 质粒与 1 μ g p-Anti-HBxP2# 混合后共转染,24 小时后在倒置荧光显微镜下观察绿色荧光,确定其转染效率可达到 70%。

[0185] (2) 呈色:每孔加 MTT 溶液 (5mg/ml 用 PBS<pH = 7.4> 配) 20 μ l。

[0186] (3) 继续孵育 4 小时,终止培养,小心吸弃孔内培养上清液。每孔加 150 μ l DMSO,振荡 10 分钟,使结晶物充分融解。

[0187] (4) 比色:选择 490nm 波长,在酶联免疫监测仪上测定各孔光吸收值,记录结果,进行 Student's t test 统计学分析。

[0188] 如图 4 所示,p-Anti-HBxP2# 对 HepG2-X 细胞、L-02-X 细胞和 HepG2. 2. 15 细胞生长和增殖具有抑制作用,呈其抑制作用呈剂量依赖性。而对无 HBx 的 HepG2 肝癌细胞和无 HBx 的 L-02 肝细胞则无影响。相似地,p-Anti-HBxP2# 的 5 种功能变体基因对 HepG2-X 细胞和 L-02-X 细胞的生长和增殖具有抑制作用。 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$,进行 Student's t test 统计学分析。

[0189] 如图 5 所示,MTT 检测,应用人工合成的多肽 Anti-HBxP2# 对 HepG2-X 细胞、L-02-X 细胞和 HepG2. 2. 15 细胞生长和增殖具有抑制作用,呈剂量依赖性。而对无 HBx 的 HepG2 肝癌细胞和无 HBx 的 L-02 肝细胞无影响。 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$,进行 Student's t test 统计学分析。

[0190] 实施例三:动物体内 (in vivo) 多肽有效性实验

[0191] 将对数生长期的 HepG2-X 细胞或 HepG2. 2. 15 细胞用胰酶消化制成细胞悬液,计算细胞数,用无菌的生理盐水细胞稀释至 1×10^7 个细胞 /ml,置冰水中存放。再取 12 只 4 到 6 周雌性 BALB/C 裸鼠,将小鼠随机分为 2 组:①对照组,在每只小鼠右前肢腋下皮下注射上述稀释后的细胞 0.2ml,仅注射 0.5ml 灭菌蒸馏水 (不含多肽药物);②实验组 (给药剂量为 10mg/kg 体重)。在每只小鼠右前肢腋下皮下注射上述稀释后的细胞 0.2ml,注射 7 天后,肿瘤体积 ($V = L \times W^2 \times 0.5$) 达到 100mm³,再分别皮下注射上述多肽药物 (用 0.5ml 灭菌蒸馏水溶解冻干的多肽药物),每两天注射一次,共注射 10 次,每次注射前测量肿瘤体积。末次给药 24 小时后,称量小鼠的体重,然后将小鼠脱颈椎处死,剥取瘤体组织称重,按下列公式计算抑瘤率。

[0192]

$$\text{抑瘤率} = \frac{\text{对照组平均瘤重} - \text{实验组平均瘤重}}{\text{对照组平均瘤重}} \times 100\%$$

[0193] 如表 1 和图 6 以及表 2 和图 7 所示,动物实验检测结果表明,应用人工合成的多肽 Anti-HBxP2# 对 HepG2-X 和 HepG2. 2. 15 细胞的生长和增殖具有抑制作用。 $**P < 0.01$,进行 Student's t test 统计学分析。

[0194] 表 1:人工合成的多肽 Anti-HBxP2# 对 HepG2-X 细胞的作用:

[0195]

组别	动物数 给药前/给药后	体重 ($X \pm S$, g)		瘤重 ($X \pm S$, g)	抑瘤率 (%)
		给药前	给药后		
对照组	6/6	15.25 $\pm$ 0.61	21.50 $\pm$ 0.84	0.93 $\pm$ 0.12	-
实验组	6/6	15.10 $\pm$ 0.38	21.33 $\pm$ 1.02	0.41 $\pm$ 0.18	55.91

[0196] 表 2 :人工合成的多肽 Anti-HBxP2# 对 HepG2. 2. 15 细胞的作用 :

[0197]

组别	动物数 给药前/给药后	体重 ($X \pm S$, g)		瘤重 ($X \pm S$, g)	抑瘤率 (%)
		给药前	给药后		
对照组	6/6	15.08 $\pm$ 0.92	20.92 $\pm$ 0.85	0.63 $\pm$ 0.17	-
实验组	6/6	15.00 $\pm$ 0.55	21.17 $\pm$ 1.32	0.36 $\pm$ 0.21	42.86

[0198] 实施例四 :多肽的功能片段及变体

[0199] 本发明还探讨了多肽及其功能片段的功能变体的作用。下表所示的序列为以 Anti-HBxP2# 为基础进行氨基酸添加 (例如,在端侧添加一个氨基酸) 或保守氨基酸置换 (例如,用一个氨基酸置换另一个相同类型的氨基酸) 而得到的。按照所述序列进行人工合成多肽片段 (方法如上), 然后, 采用上述报告基因和 MTT 的方法, 观察所得的多肽的作用的变化。

[0200]

合成多肽片断	氨基酸序列	SEQ ID NO.
anti-HBxP2#	Pro-Asp-Leu-His-Lys-Asn-Glu-Leu-Lys-His-Val-Lys-Tyr 或 P-D-L-H-K-N-E-L-K-H-V-K-Y	1
anti-HBxP2#-1	Ile-Pro-Asp-Leu-His-Lys-Asn-Glu-Leu-Lys-His-Val-Lys-Tyr 或 I-P-D-L-H-K-N-E-L-K-H-V-K-Y	2
anti-HBxP2#-2	Val-Pro-Asp-Leu-His-Lys-Asn-Glu-Leu-Lys-His-Val-Lys-Tyr 或 V-P-D-L-H-K-N-E-L-K-H-V-K-Y	3
anti-HBxP2#-3	Pro-Glu-Leu-His-Lys-Asn-Glu-Leu-Lys-His-Val-Lys-Tyr 或 P-E-L-H-K-N-E-L-K-H-V-K-Y	4
anti-HBxP2#-4	Pro-Asp-Leu-His-Arg-Asn-Glu-Leu-Lys-His-Val-Lys-Tyr 或 P-D-L-H-R-N-E-L-K-H-V-K-Y	5
anti-HBxP2#-5	Pro-Asp-Leu-His-Lys-Asn-Glu-Leu-Lys-His-Val-Arg-Tyr 或 P-D-L-H-K-N-E-L-K-H-V-R-Y	6
合成多肽片断	核苷酸序列	SEQ ID NO.
anti-HBxP2#	cctgatcttc acaaaaatga actaaaacat gttaaataat	7
anti-HBxP2#-1	atccctgatac ttcacaaaaa tgaactaaaa catgttaaata at	8
anti-HBxP2#-2	gtgcctgatac ttcacaaaaa tgaactaaaa catgttaaata at	9
anti-HBxP2#-3	cctgaacttc acaaaaatga actaaaacat gttaaataat	10
anti-HBxP2#-4	cctgatcttc accgcaatga actaaaacat gttaaataat	11
anti-HBxP2#-5	cctgatcttc acaaaaatga actaaaacat gttcgctat	12

[0201] 如图 2 所示,含有 Anti-HBxP2# 的 5 种功能变体的基因对 HepG2-X 细胞和 L-02-X 细胞 NF- κ B 启动子的活性具有一定的抑制作用。 $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$,进行 Student's t test 统计学分析。

[0202] 如图 4 所示,含有 Anti-HBxP2# 的 5 种功能变体的基因对 HepG2-X 细胞和 L-02-X 细胞的生长和增殖具有抑制作用。 $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$,进行 Student's t test 统计学分析。

[0203] 实施例五:多肽药物急性毒性试验

[0204] 取昆明小白鼠,每组 10 只,每组雌雄各 5 只。分实验组和对照组。实验组,以 1g/kg 的浓度从小鼠尾静脉单次注射多肽 Anti-HBxP2#(用 0.125ml 灭菌蒸馏水溶解冻干的 2.5mg 多肽);对照组注射 0.25ml 灭菌蒸馏水。注射后连续观察 24 小时。

[0205] 多肽药物急性毒性试验结果显示,小鼠无异常表现。与对照组相比体重无异常变化。

[0206] 本发明引用的所有参考文献,包括出版物、专利申请、和专利,通过引用结合于此,并且完全结合于此。本文提供的任何以及所有实施例,或示例性语言(例如、诸如等)仅意欲更好地阐述本发明,并不形成对本发明范围的限制,除非另外要求。本发明描述了优选实施方案,包括本发明人已知实施本发明的最佳模式。本发明包含这些优选实施方案可能的变化,本发明人意欲以这些与本文具体描述不同的方式实施本发明,同样,本领域普通技术

人员也清楚了解这些变化,并预期能熟练地利用所述变化。在法律所能允许的范围,本发明包括了在所附权利要求中引用的主题的所有修改和等价物,除非本文另外指明,或明显与上下文相抵触。

[0001]

序列表

<110> 天津托普泰克生物科技有限公司

<120> 抗乙型肝炎病毒 X 蛋白多肽药物

<130> SPI110182-80

<160> 16

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 13

<212> PRT

<213> 多肽

<400> 1

Pro Asp Leu His Lys Asn Glu Leu Lys His Val Lys Tyr
1 5 10

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> 多肽

<400> 2

Ile Pro Asp Leu His Lys Asn Glu Leu Lys His Val Lys Tyr
1 5 10

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> 多肽

<400> 3

Val Pro Asp Leu His Lys Asn Glu Leu Lys His Val Lys Tyr
1 5 10

<210> 4

<211> 13

<212> PRT

<213> 多肽

[0002]

<400> 4

Pro Glu Leu His Lys Asn Glu Leu Lys His Val Lys Tyr
1 5 10

<210> 5

<211> 13

<212> PRT

<213> 多肽

<400> 5

Pro Asp Leu His Arg Asn Glu Leu Lys His Val Lys Tyr
1 5 10

<210> 6

<211> 13

<212> PRT

<213> 多肽

<400> 6

Pro Asp Leu His Lys Asn Glu Leu Lys His Val Arg Tyr
1 5 10

<210> 7

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 7

cctgatcttc acaaaaatga actaaaacat gttaaata

39

<210> 8

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 8

atccctgatc ttcacaaaaa tgaactaaaa catgttaaat at

42

<210> 9

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列

[0003]

<400> 9	
gtgcctgatc ttcacaaaaa tgaactaaaa catgttaa at	42
<210> 10	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 10	
cctgaacttc acaaaaatga actaaaacat gttaa at	39
<210> 11	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 11	
cctgatcttc accgcaatga actaaaacat gttaa at	39
<210> 12	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 12	
cctgatcttc acaaaaatga actaaaacat gttcgtat	39
<210> 13	
<211> 54	
<212> DNA	
<213> forward DNA oligo	
<400> 13	
aattcatgtg gctgatctt cacaaaaatg aactaaaaca tgtaa at tgac	54
<210> 14	
<211> 54	
<212> DNA	
<213> reverse DNA oligo	
<400> 14	
tcgagtc aat attaacatg ttttagttca tttttgtgaa gatcaggcca catg	54
<210> 15	
<211> 20	

[0004]

<212>	DNA	
<213>	forward primer	
<400>	15	
	taatacgact cactataggg	20
<210>	16	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	reverse primer	
<400>	16	
	tagaaggcac agtcgagg	18

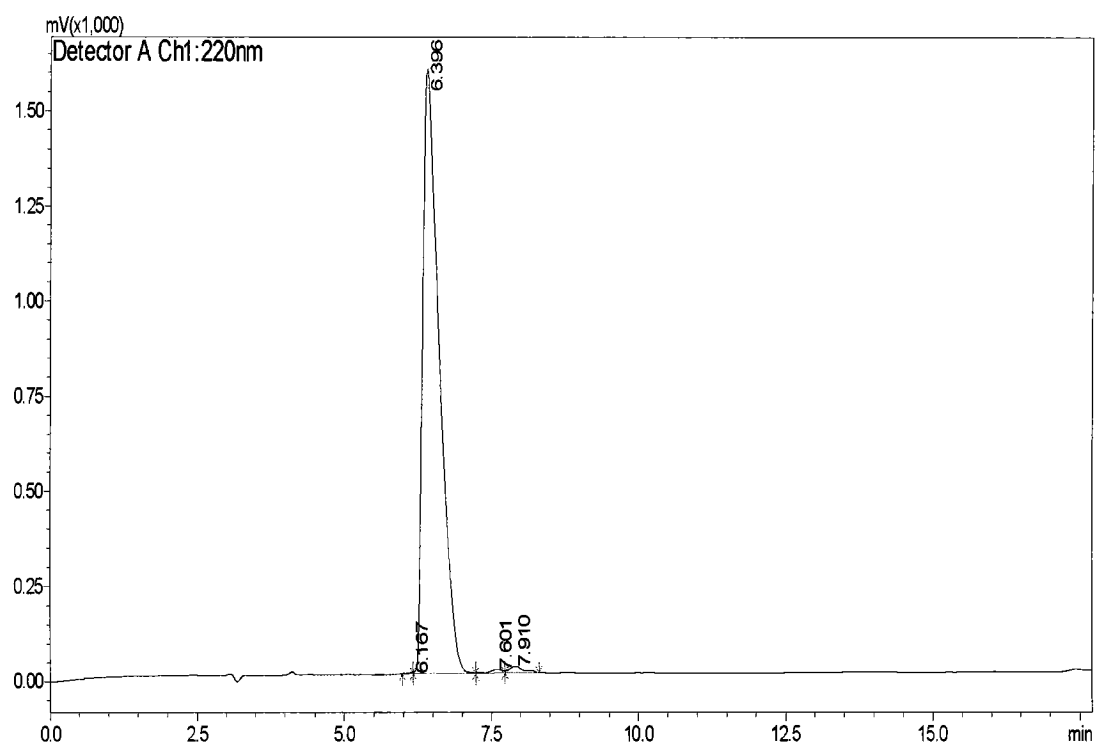


图 1

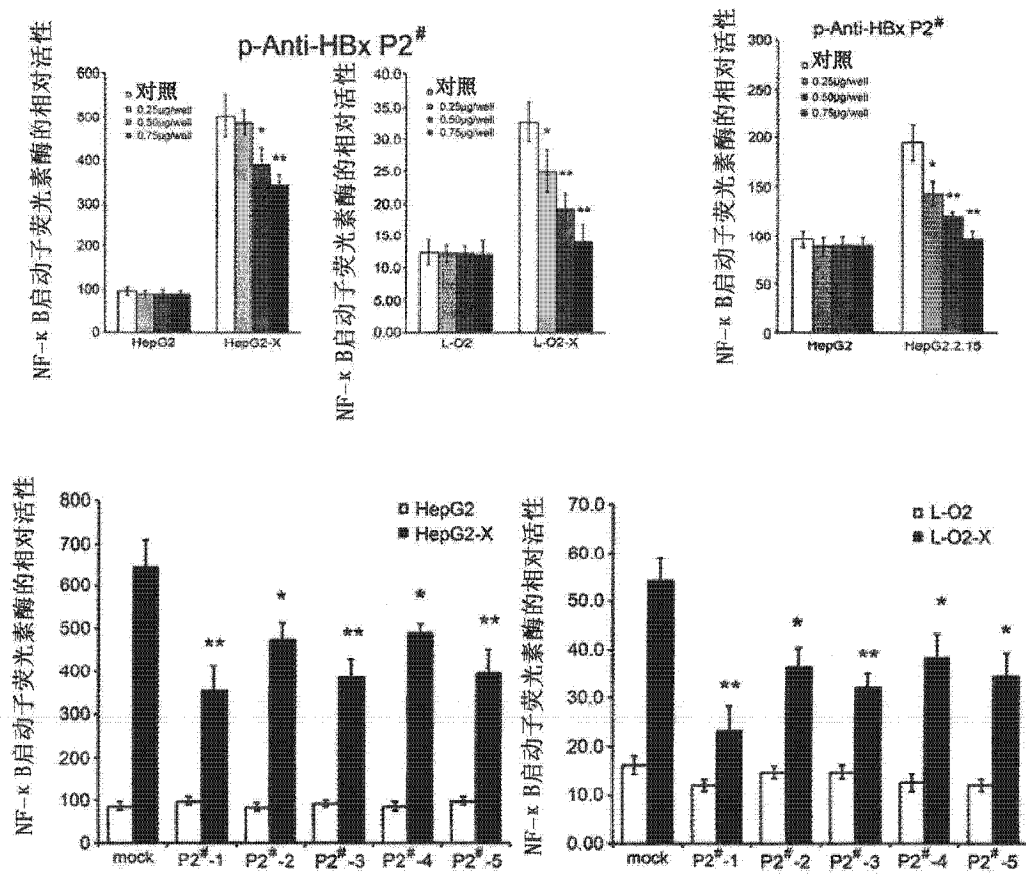


图 2

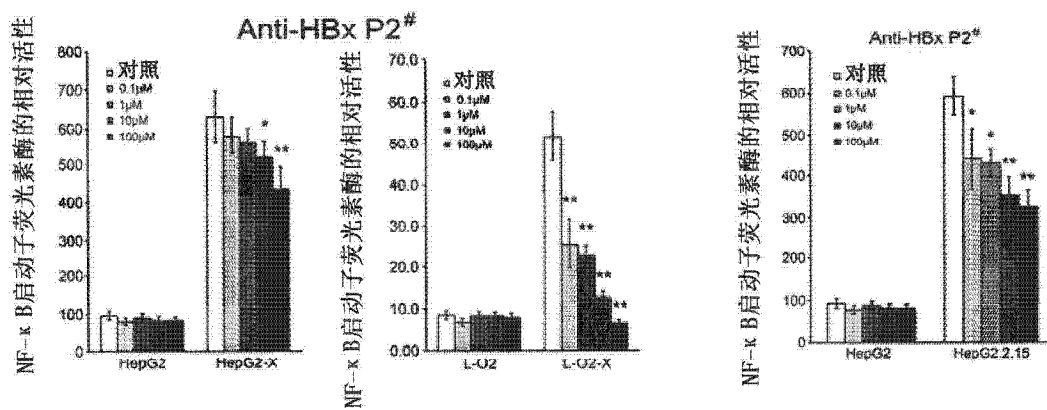


图 3

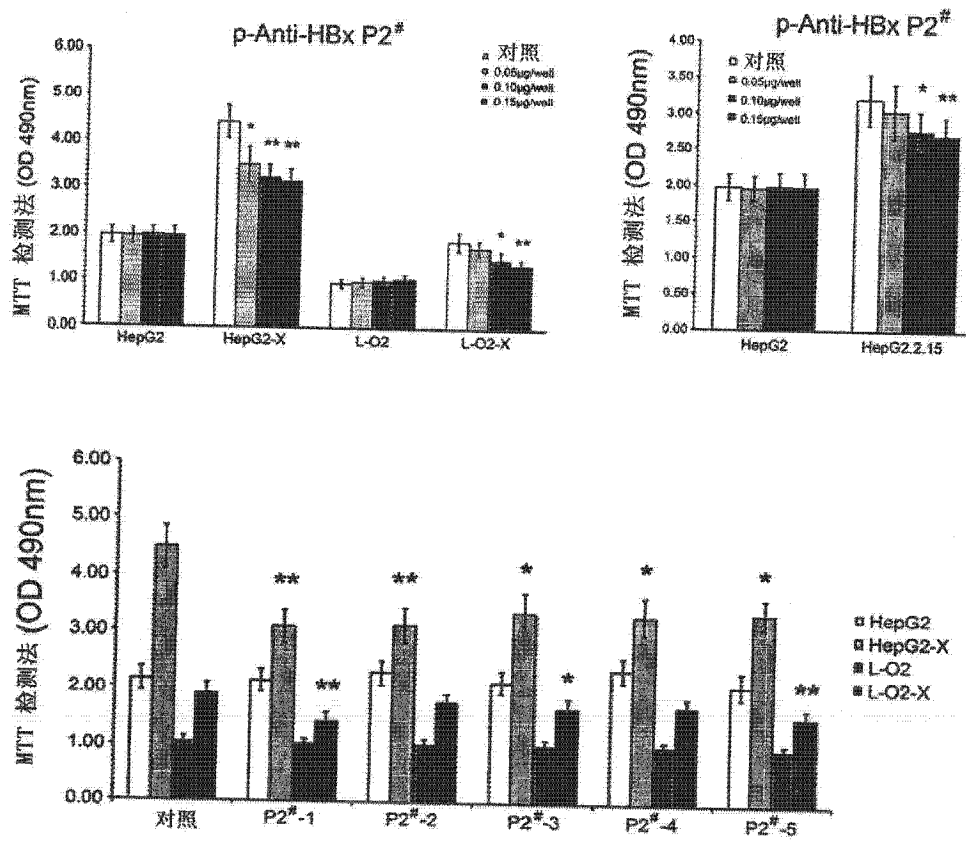


图 4

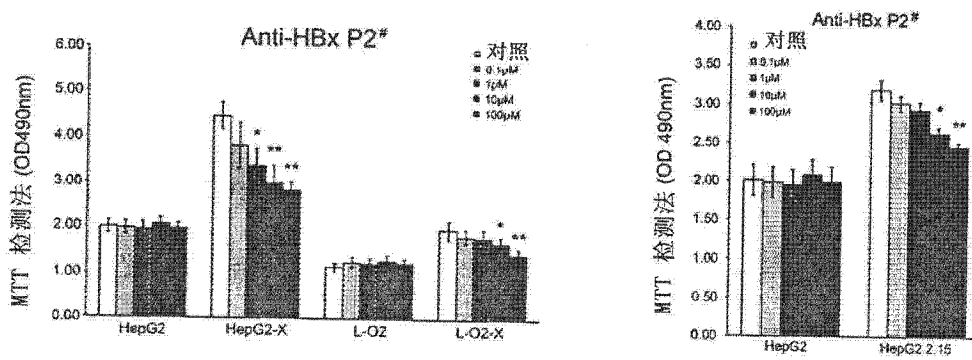


图 5

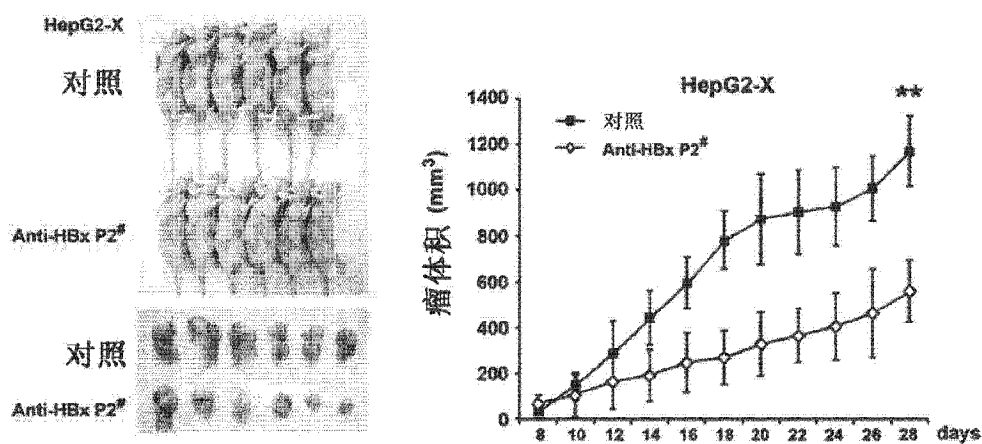


图 6

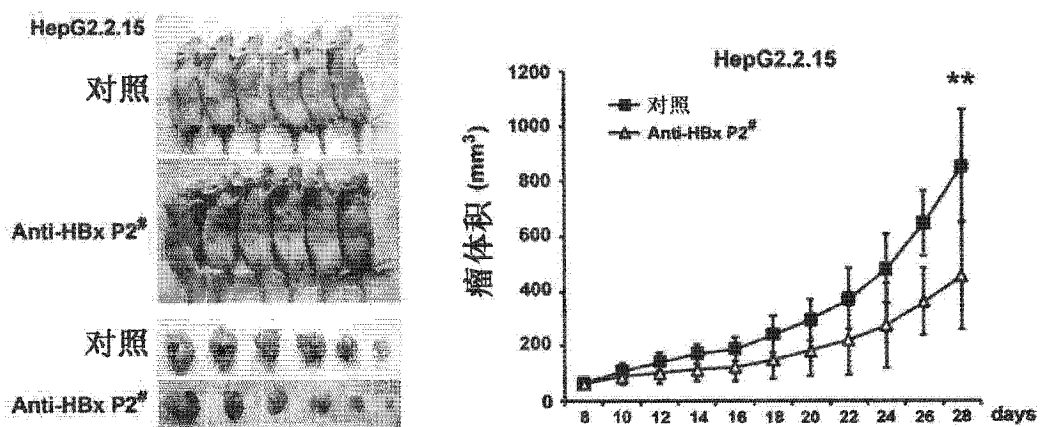


图 7

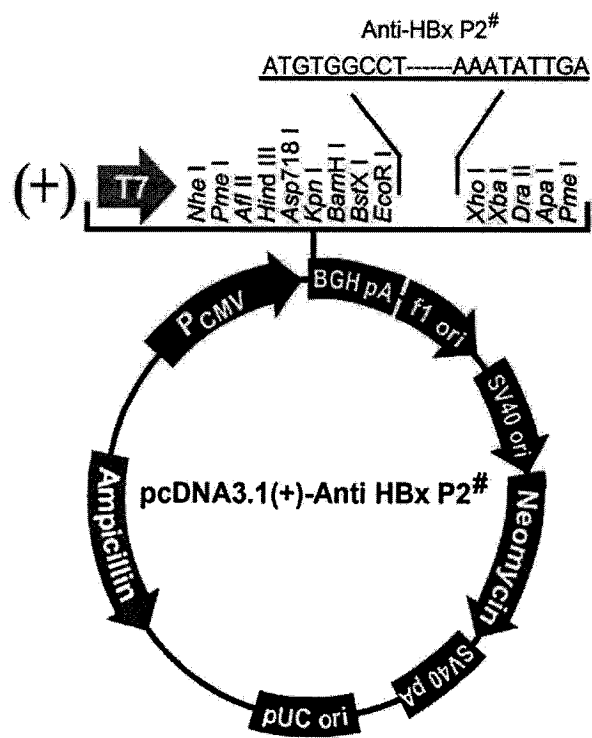


图 8