



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101235083 B

(45) 授权公告日 2012. 05. 23

(21) 申请号 200710037104. X

US 2005202043 A1, 2005. 09. 15, 全文.

(22) 申请日 2007. 02. 02

史卫国等. HIV 融合抑制剂的研究进展. 中国
新药杂志 15 17. 2006, 15(17), 第 1430 页表 1.

(73) 专利权人 同济大学

地址 200092 上海市杨浦区四平路 1239 号

审查员 王翔宇

(72) 发明人 汪世龙 史钧 孙晓宇 王玫

何娟娟 林楠 王渊

(74) 专利代理机构 上海光华专利事务所 31219

代理人 余明伟 沈其梅

(51) Int. Cl.

C07K 14/435 (2006. 01)

A61K 38/17 (2006. 01)

A61P 31/18 (2006. 01)

C12N 15/12 (2006. 01)

C12N 15/63 (2006. 01)

C07K 16/18 (2006. 01)

A61K 39/00 (2006. 01)

A61K 39/12 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1810830 A, 2006. 08. 02, 全文.

CN 1712416 A, 2005. 12. 28, 全文.

权利要求书 1 页 说明书 12 页

(54) 发明名称

抗 HIV-I 的多肽、其编码序列及其用途

(57) 摘要

本发明提供了抗 HIV-I 的多肽和组合多肽, 以及这些多肽和组合多肽的编码序列、表达载体、制备方法和用途。本发明的多肽和组合多肽是基因重组后表达或通过多肽合成仪合成, 工艺简单, 且可提高最终产率和抑制 HIV-I 的侵入效果, 适合工业化生产。

1. 一种组合多肽,其特征在于,该组合多肽的氨基酸序列为 SEQ ID NO:13。
2. 一种核酸,其特征在于,其编码权利要求 1 所述的组合多肽。
3. 权利要求 1 所述的组合多肽在制备预防或治疗 HIV 病毒感染的药物中的应用。
4. 一种载体,其特征在于,它含有权利要求 2 所述的编码序列。
5. 一种遗传工程化的宿主细胞,其特征在于,它是被权利要求 4 所述的载体转化或转导的宿主细胞。
6. 一种制备抑制 HIV 病毒的组合多肽的制备方法,其特征在于,该方法包含:
 - (a) 在适合表达抑制 HIV 病毒的组合多肽的条件下,培养权利要求 5 所述的宿主细胞;
 - (b) 从培养物中分离出抑制 HIV 病毒的组合多肽。
7. 一种 HIV 疫苗,其特征在于,所述疫苗包含权利要求 1 所述的组合多肽及药学上所允许的载体。

抗 HIV-I 的多肽、其编码序列及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及基因工程领域,更具体地,本发明涉及新的抗 HIV-I 的多肽、其编码序列及其用途。

背景技术

[0002] 人免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 引起获得性免疫缺陷综合征 (acquired immunodeficiency syndrome, AIDS), 即艾滋病。HIV 属 RNA 逆转录病毒科, 可分为 I 型 (HIV-I) 和 II 型 (HIV-II), 其中 HIV-I 感染率高、危害性大。感染者终生携带病毒, 在数年的潜伏期后发病, 全身免疫系统受到严重损害, 最终走向死亡。因目前对艾滋病仍缺乏有效的治疗手段, 自 1981 年在美国纽约发现了第一个艾滋病病例以来, 艾滋病已发展成一个全球性的流行病, 以其传播速度快、死亡率高和无法根治而严重影响了人类健康和社会发展, 受到了各国政府和国际社会的广泛重视。HIV-I 对细胞的入侵、细胞内复制、组装及释放等的全过程都是药物设计的靶点, 但现在仍然缺少既能长期有效又没有毒副作用的治疗药物, 随着研究的深入, 病毒对细胞的粘附和融合过程越来越受到研究者重视。

[0003] HIV-I 的锚定与侵入主要是膜融合的过程, 是由 HIV-I 外膜前体糖蛋白 gp160 的加工开始的, gp160 经前体加工酶水解成两个片段: 表面糖蛋白 gp120 和跨膜蛋白 gp41, 其中 gp120 不含有穿膜区, 它与 gp41 非共价键连接, gp41 与细胞受体结合后即导致 HIV-I 的感染, gp120 主要与细胞受体 CD4 结合后而造成感染, 因而对 gp160 的裂解, gp41 和 gp120 的结合位点以及与细胞受体相互作用的研究是了解 HIV-I 感染机理和研制抗感染药物的关键, 已引起了各国科学家的极大关注, 各方面的研究围绕此展开。

[0004] 1993 年, Jiang 等最早发现衍生于 gp41CHR 区域的具有融合抑制活性的 C-多肽 SJ-2176(630-659 残基) 在 nmol/L 水平可抑制 HIV-1 感染 [Jiang S et al. HIV-1 inhibition by a peptide [J]. Nature, 1993, 365(6442): 113.]。麻省理工大学的 Lu 等对 gp41 用蛋白酶进行了一系列的水解研究, 发现 C43(624 ~ 666)、C34(628 ~ 655)、C28(628 ~ 655) 等 C-多肽具有融合抑制活性 [Weissenhorn W, Dessen A, Harrison SC, et al, Atomic structure of ectodomain from HIV-1 gp41. Nature, 1997; 387: 426. Chan D C, Fass D, Berger JM, et al, Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. Cell, 1997, 89(2): 263-273]。1994 年, Wild 等又发现 gp41C 端多肽 DP-178(638-673 残基) 抑制 HIV-1 诱导合胞体形成的效率大幅度提高 [Wild CT, Shugars DC, Greenwell TK, et al, Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91(21): 9770-9774.]。Enfuvirtide (T-20) 是第一个阻断 HIV-1 侵入靶细胞的抗膜融合类新型抑制剂 [Jason LaBonte et al. Enfuvirtide, Nature reviews drug discovery, May 2003, volume 2, 345-346], 由 36 个氨基酸残基组成 [Wild CT et al. Peptides corresponding to a predictive α -helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are

potent inhibitors of virus infection. Medical Sciences, October 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 91, pp. 9770-9774.], 其结构模拟 HIV-1 跨膜蛋白 gp41 的 HR2 端, 能够有效地抑制 HIV-1 病毒。其抑制机理为人工模拟 HR2 合成的 T20 在病毒与靶细胞竞争结合 HR1 [Isabel Met al. Dilution of the Human Immunodeficiency Virus-1 Envelope Glycoprotein Fusion Pore Revealed by the Inhibitory Action of a Synthetic Peptide from gp41. The Journal of Cell Biology, Volume 140, Number 2, January 26, 1998, 315-323.], 从而从入口处切断病毒进入靶细胞。临床研究表明多肽 enfuvirtide 作为口服抑制剂并不可行, 但是可用作皮下注射。在一项对 78 例 HIV-1 病毒携带者进行的每 28 天一期的临床观察中发现, 传统的大剂量不是很有效, 但是可以通过减小剂量一日两次进行皮下注射 [Wheeler DA. et al. Safety, tolerability, and plasma pharmacokinetics of high-strength formulations of enfuvirtide (T-20) in treatment experienced HIV-1-infected patients. Journal of clinical virology 2004. 30 (2), 183-190]。药剂剂量与病毒负荷量相关, 但持续皮下注射受阻于技术问题。最大病毒减小率为 enfuvirtide 每日两次, 每次 100mg [Greenberg M et al. Enfuvirtide (T-20) and T-1249 resistance: observations from phase II clinical trials of enfuvirtide in combination with oral antiretrovirals and a phase I/II dose-ranging monotherapy trial of T-1249. Antiviral Ther 2002; 7: Suppl: S140. abstract.]。

[0005] T-1249 是在 T-20 的基础上发展的又一个抗膜融合多肽抑制剂, 其绑定区域与 T-20 绑定区域有部分重合, 但是比 T-20 更加深入 HR1 的疏水槽区域 [Greenberg ML et al. In vitro antiviral activity of T-1249, a second generation fusion inhibitor. Antiviral Ther 2002, 7 (Suppl 1): S10. abstract.]。这个六螺旋疏水区域在膜融合的过程中起着重要作用。T-1249 已经在 115 名 HIV-1 病毒携带者中进行了每 14 天一期的临床观察。T-1249 的服用剂量为 6. 25-200mg, 并且有些对照组每天一次皮下注射, 有些为两次, 最大病毒减小率为每日皮下注射 T-1249 总量 150-200mg [Eron J et al. A 14-day assessment of the safety, pharmacokinetics, and antiviral activity of T-1249, a peptide inhibitor of membrane fusion. In: Programs and abstracts of the Eighth Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Chicago, February 4-8, 2001. Alexandria, Va.: Foundation for Retrovirology and Human Health, 2001: 47. abstract.]。

[0006] 另外以 gp41 核心的 HR1 和 HR2 结构为基础, 经基因重组合成的 HR1-HR2 系列多肽, 可以形成一个稳定性较好的六螺旋束结构, 类似于 gp41 具有膜融合功能的核心区域。在 HR1-HR2 的 C 端加上一个 HR1 形成 HR121 结构, 或者在 N 端加上一个 HR2 形成 HR212 结构, 这两个融合多肽均具有较好的稳定性和溶解性, 用假病毒和 T 细胞体外融合实验表明, 融合多肽对 HIV-1 的膜融合作用有潜在的抑制效果 [Ling Ni et al. Rational design of highly potent HIV-1 fusion inhibitory proteins: Implication for developing antiviral therapeutics. Biochemical and Biophysical Research Communications 2005. 332: 831-836.]。

[0007] 申请人已申请过专利“抗 HIV-1 多肽 C22, 其编码序列及其制备方法”(公开号: CN 1810830A), 该申请提供了一种基于 gp41 C 端多肽序列的多肽抑制剂。

[0008] 目前 HIV 抑制剂药物存在的普遍问题在于,药物进入人体以后易于酶解,HIV 易对药物产生抗药性以及因药物分子量大而产生免疫原性,直接影响了药物的使用效果。本领域迫切需要开发出一种专一性强而又不易酶解的小分子量的新多肽抑制剂。

[0009] 发明内容

[0010] 本发明的第一个目的是提供一系列活性高的抗 HIV-1 抑制剂,包括多肽和组合多肽。

[0011] 本发明的第二个目的是提供一系列抗 HIV-I 抑制剂的编码序列。

[0012] 本发明的第三个目的是提供了本方面多肽和组合多肽的制备方法。

[0013] 本发明的第四个目的是提供所述抗 HIV-I 抑制剂的多肽和组合多肽的用途。

[0014] 本发明的第一方面,提供一种抑制 HIV 病毒的多肽,所述多肽含有 SEQ ID NO :1 所示的氨基酸序列 (C22 :ELDKWASLWNWF NITNWLWYIK)。在一实施例中,所述多肽为 SEQ ID NO :1 所示的多肽与 TrpLE 的融合蛋白。优选的,所述多肽具有 SEQ ID NO :1 所示的氨基酸序列。

[0015] 本发明的第二方面,提供一种抑制 HIV 病毒的多肽,所述多肽含有 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列 (M3)。在一实施例中,所述多肽为 SEQ ID NO :2 所示的多肽与 TrpLE 的融合蛋白。优选的,所述多肽具有 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列。

[0016] 本发明的第三方面,提供一种抑制 HIV 病毒的组合多肽,其特征在于,该组合多肽包括 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2 或 SEQ ID NO :3 (CD4M9) 所示的任意二条或三条氨基酸序列。优选的,所述组合多肽含有 SEQ ID NO :1 和 SEQ ID NO :2 的序列、SEQ ID NO :1 和 SEQ ID NO :3 的序列、SEQ ID NO :2 和 SEQ ID NO :3 的序列或 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2 和 SEQ ID NO :3 的序列,其连接方式可以有多种排列组合。更佳的,所述连接方式如 SEQ ID NO :13、SEQ ID NO :14、SEQ ID NO :15 或 SEQ ID NO :16 所示。

[0017] 本发明的第四方面,提供一种上述多肽的编码序列。优选的,所述编码序列选自下组中的一种:

[0018] (1)SEQ ID NO :4 所示的核苷酸序列;

[0019] (2)SEQ ID NO :7 所示的核苷酸序列。

[0020] 本发明的第五方面,提供一种编码上述组合多肽的编码序列。

[0021] 本发明的第六方面,提供一种上述多肽的应用,即上述多肽在制备预防或治疗 HIV 病毒感染的药物中的应用。较佳的,上述多肽用于制备预防 HIV 病毒感染的疫苗。

[0022] 本发明的第七方面,提供一种上述组合多肽的应用,即上述组合多肽在制备预防或治疗 HIV 病毒感染的药物中的应用。优选的,上述组合多肽用于制备预防 HIV 病毒感染的疫苗。

[0023] 本发明的第八方面,提供一种载体,所述载体含有编码上述多肽或组合多肽的序列。优选的,所述载体选自 pTMHa30-51 中的一种。

[0024] 本发明的第九方面,提供一种遗传工程化的宿主细胞,其特征在于,它是由上述载体转化或转导的宿主细胞。

[0025] 本发明的第十方面,提供一种制备抑制 HIV 病毒的多肽的制备方法,其特征在于,该方法包含:

[0026] (a) 在适合表达抑制 HIV 病毒的多肽的条件下,培养上述宿主细胞;

[0027] (b) 从培养物中分离出抑制 HIV 病毒的多肽。

[0028] 本发明的第十一方面,提供一种制备抑制 HIV 病毒的组合多肽的制备方法,其特征在于,该方法包含:

[0029] (a) 在适合表达抑制 HIV 病毒的组合多肽的条件下,培养上述宿主细胞;

[0030] (b) 从培养物中分离出抑制 HIV 病毒的组合多肽。

[0031] 本发明的第十二方面,提供一种能与上述多肽特异性结合的抗体。优选的,所述抗体为单克隆抗体。

[0032] 本发明的第十三方面,提供一种能与上述组合多肽特异性结合的抗体。优选的,所述抗体为单克隆抗体。

[0033] 本发明的第十四方面,提供一种 HIV 疫苗,所述疫苗包含上述任意一种或二种以上的多肽及药学上所允许的载体。较佳的,所述疫苗含有 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列、SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列、SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列、或者 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列。

[0034] 本发明的第十五方面,提供一种 HIV 疫苗,所述疫苗包含上述任意一种或二种以上的组合多肽及药学上所允许的载体。所述组合多肽的连接方式是很多的,在此不一一列举。较佳的,所述疫苗含有 SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15 或 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列,或者所述疫苗含有 SEQ ID NO:13、14、15 或 16 中任意二种、三种甚至四种组合多肽。

[0035] 具体实施方式

[0036] 本研究主要从阻止 HIV-I gp41 穿膜的三方面入手,获得各关键的多肽,通过鸡尾酒疗法将三个或两个多肽的活性中心组合成一个组合多肽,探讨其治疗 HIV-I 的效果和作用机理。近几年来本实验室以胰蛋白酶抑制剂 MBI 结构为基础,设计了一种多肽抑制剂 M3(SEQ ID NO:2),对 furin 酶(蛋白质前体加工酶)抑制活性 K_i 值达到 $3.26 \times 10^{-9}M$,抑制 HIV-I 的细胞实验效果也较好。以 gp41 核心结构的 C 端多肽分别与类 gp41 的核心蛋白结合的强弱进行比较,以最近本实验室制备的 C22 多肽对 HIV-I 有非常好的抑制效果,经过计算机模拟,设计出系列类 C22 多肽;针对 CD4 与 gp120 绑定的结构分析,从 CD4M3 ~ CD4M9 系列肽中,IC₅₀ 从 CD4M3 的 $40 \mu M$ 变为 CD4M9 的 $0.1 \sim 1.0 \mu M$,抑制效果得到很大的提高。本研究根据鸡尾酒疗法的原理,利用单一多肽来阻止膜融合是有一定的难度的,必须使用多种药物或具有多个活性中心的多肽方可使用,或者使用本发明多肽和其他药物组合,可提高治疗艾滋病的效果。综合分析上述三多肽活性中心,将这些三个或两个多肽活性中心组合成一个新的活性多肽,最后筛选出可用于 HIV-I 治疗的多肽或组合多肽药物。

[0037] 本发明人经过广泛而深入的研究,发现在用融合蛋白 pTMHa30-51 系统表达抗 HIV-I 组合多肽,可以大大简化抗 HIV-I 多肽的生产手段,提高多肽的得率。

[0038] 本发明的多肽可以是重组多肽或合成多肽,优选重组多肽。本发明的多肽可以是多肽合成仪合成的产物,或使用重组技术从原核或真核宿主(例如,细菌、酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞)产生。

[0039] 本发明的组合多肽的序列可以通过多肽合成仪合成或通过 PCR 技术将单个多肽的 DNA 序列连接在一起。本发明涉及一系列含制备本发明组合多肽的方法,其包括步骤:

- [0040] A. 表达载体的构建；
[0041] B. 培养宿主细胞，所述宿主细胞含有上述的组合多肽表达前体；
[0042] C. 分离纯化出所述的组合多肽融合蛋白；
[0043] D. 用化学裂解得到所述的组合多肽；
[0044] E. 分离出组合多肽。

[0045] 本发明中，抗 HIV-I 组合多肽的核苷酸序列可插入到重组表达载体中。术语“重组表达载体”指本领域熟知的细菌质粒、噬菌体、酵母质粒、植物细胞病毒、哺乳动物细胞病毒或其他载体。总之，只要能在宿主体内复制和稳定，任何质粒和载体都可以用。表达载体的一个重要特征是通常含有复制起点、启动子、标记基因和翻译控制元件。

[0046] 本领域的技术人员熟知的方法能用于构建含抗 HIV-I 组合多肽编码 DNA 序列和合适的转录 / 翻译控制信号的表达载体。这些方法包括体外重组 DNA 技术、DNA 合成技术、体内重组技术等。所述的 DNA 序列可有效连接到表达载体中的适当启动子上，以指导 mRNA 合成。这些启动子的代表性例子有：大肠杆菌的 lac 或 trp 启动子，真核启动子包括 CMV 早期启动子、HSV 胸腺激酶启动子、早期和晚期 SV40 启动子和其他一些已知的可控制基因在原核和真核细胞或其病毒中表达的启动子。表达载体还包括翻译起始用的核糖体结合位点和转录终止子。

[0047] 此外，表达载体优选包含一个或多个选择性标记基团，以提供用于选择转化的宿主细胞的表型性状，如真核细胞培养用的二氢叶酸还原酶、新霉素抗性以及绿色荧光蛋白 (GFP)，或用于大肠杆菌的四环素或卡那霉素抗性。

[0048] 包含上述的适当 DNA 序列以及适当启动子或者控制序列的载体，可以用于转化或转导到适当的宿主细胞，以使其能够表达蛋白质。

[0049] 宿主细胞可以是原核细胞，如细菌细胞；或是低等真核细胞，如酵母细胞；或是高等真核细胞，如哺乳动物细胞。代表性例子有：大肠杆菌，链霉菌属；真核细胞如酵母；植物细胞；果蝇 S2 或 Sf9 的昆虫细胞；CHO、COS 细胞等动物细胞。

[0050] 用重组 DNA 转化宿主细胞可用本领域技术人员熟知的常规技术进行。当宿主为原核生物如大肠杆菌时，能吸收 DNA 的感受态细胞可在指数生长期后收获，用 CaCl₂ 法处理，所用的步骤在本领域众所周知。另一种方法是使用 MgCl₂。如果需要，转化也可用电穿孔的方法进行。当宿主是真核生物，可选用如下的 DNA 转染方法：磷酸钙共沉淀法，常规机械方法如显微注射、电穿孔、脂质体包装等。

[0051] 获得的转化子可以用常规方法培养，表达本发明的编码序列所编码的多肽或组合多肽。根据所用的宿主细胞，培养中所用的培养基可选自各种常规培养基。在适于宿主细胞生长的条件下进行培养。当宿主细胞生长到适当的细胞密度后，用合适的方法（如温度转换或化学诱导）诱导选择的启动子，将细胞再培养一段时间。

[0052] 在上面的方法中的重组多肽可在细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞外。如果需要，可利用其物理的、化学的和其他特性通过各种分离方法分离和纯化蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但不限于：常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理（盐析方法）、离心、渗透破菌、超滤、超离心、分子筛层析（凝胶过滤）、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析 (HPLC) 和其他各种液相层析技术及这些方法的结合。

[0053] 在一优选例中，本发明的抗 HIV-I 组合多肽是以融合蛋白的形式表达，然后再经

化学裂解处理。最后用分子筛层析等方法分离产物,即可获得本发明的组合多肽。

[0054] 本发明不仅包括完整的单克隆或多克隆抗体,而且还包括具有免疫活性的抗体片段,如 Fab' 或 (Fab)₂ 片段;抗体重链;抗体轻链;或嵌合抗体,如具有鼠抗体结合特异性但仍保留来自人的抗体部分的抗体。

[0055] 本发明的抗体可以通过本领域内技术人员已知的各种技术进行制备。例如,纯化的本发明多肽或者组合多肽可被施用于动物以诱导多克隆抗体的产生。与之相似的,表达本发明多肽或者组合多肽的细胞可用来免疫动物来生产抗体。

[0056] 本发明的单克隆抗体可以利用杂交瘤技术来制备。本发明的各类抗体可以利用本发明多肽或者组合多肽,通过常规免疫技术获得。这些多肽或者组合多肽可以利用重组方法制备或利用多肽合成仪合成。与本发明多肽或者组合多肽的未修饰形式结合的抗体可以用原核细胞(例如 E. Coli)中生产的多肽或者组合多肽来免疫动物而产生;与翻译后修饰形式结合的抗体(如糖基化或磷酸化的多肽),可以用真核细胞(例如酵母或昆虫细胞)中产生的多肽或者组合多肽来免疫动物而获得。

[0057] 多克隆抗体的生产可用本发明多肽或者组合多肽免疫动物,如家兔,羊等。多种佐剂可用于增强免疫反应,包括但不限于弗氏佐剂等。

[0058] 本发明多肽、组合多肽或者本发明编码序列可用于制备检测、预防和/或治疗 HIV 病毒感染的药物。特别是用于制备预防和/或治疗 HIV 病毒感染的疫苗。

[0059] 本发明还提供了一种药物组合物,它含有安全有效量的本发明多肽或者组合多肽以及药学上可接受的载体或赋形剂。这类载体包括(但并不限于):盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。药物制剂应与给药方式相匹配。本发明的药物组合物可以被制成针剂形式,例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。诸如片剂和胶囊之类的药物组合物,可通过常规方法进行制备。药物组合物如针剂、溶液、片剂和胶囊宜在无菌条件下制造。活性成分的给药量是治疗有效量,每天约 5-90 微克/千克体重,较佳的,每天约 24 微克/千克体重。此外,本发明的多肽还可与其他治疗剂一起使用。当然,具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素,这些都是熟练医师技能范围之内的。

[0060] 本发明的优点在于:

[0061] (1) 本发明揭示的组合多肽是根据鸡尾酒疗法治疗 HIV-I 的原理,从 HIV-I 膜融的过程三个重要方面入手,将这三个关键点的活性中心合成多肽,使该多肽行使鸡尾酒疗法的功能,从而可以作为有效地抗 HIV-I 膜融合抑制剂。

[0062] (2) 本发明的多肽或组合多肽可以由表达的融合蛋白一步裂解就可以得到,或通过多肽合成仪合成得到,制备方法易操作。

[0063] (3) 本发明的多肽或组合多肽经过合理设计,具有较高的抑制 HIV 病毒的效价。

[0064] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,所用的试剂均可以在市场上购买到。

[0065] 实施例 1 组合多肽的基因合成

[0066] 参考大肠杆菌偏爱密码子,化学合成组合多肽 C22 单链核苷酸模板 (SEQ ID NO: 4) (5' GAA TTG GAT AAA TGG GCG TCG CTG TGG AAT TGG TTT AAT ATT ACC AAT TGG CTG

TGG TATATT AAA3')和正向引物(SEQ ID NO:5)(5'GCG AAG CTT ATG GAA TTG GAT AAA TGG GCG3')及反向引物(SEQ ID NO:6):5'GCG GGA TCC TTA TTT AAT ATA CCA CAG CCA 3',用PCR反应获得C22基因。C22-M3(SEQ ID NO:13)、C22-CD4M9(SEQ ID NO:14)、M3-CD4M9(SEQ ID NO:15)、C22-CD4M9-M3(SEQ ID NO:16)皆参照此原理进行基因合成,在每个组合多肽的正向引物引入限制性酶切位点HindIII,在反向引物中设计限制性酶切位点EcoI和终止密码子。M3单链核苷酸模板(SEQ ID NO:7)(CTT GGA GCA CTA CGA TCT TCA CTT ACCTTC TCT TCA TAT CGA GGA TTG ACG GTA CGA CGA TTG),正向引物(SEQ ID NO:8)(5'GCGAAG CTT ATG CTT GGA GCA CTA CGA TCT TCA CTT 3')及反向引物(SEQ ID NO:9):(5'GCG GGA TCC TTA CAA TCG TCG TAC CGT CTT TCC 3');CD4M9单链核苷酸模板(SEQ ID NO:10)(ACG TTG AAT CGA TCA ACG TTC AAT TCT ACG CTA TCA AAT CCG AAT AAT CAG TTC ACG CGACCG TCA CTT ACG CGA ACG CCG GGA),正向引物(SEQ ID NO:11)(5'GCG AAG CTT ATG ACGTTG AAT CGA TCA ACG TTC AAT 3')及反向引物(SEQ ID NO:12)(5'GCG GGA TCC TTATCC CGG CGT TCG CGT AAG TGA 3')。

[0067] PCR反应条件:在50 μ l反应体系中(50mM KCl,10mM Tris-HCl,pH8.3,2.0mM MgCl₂,200 μ M dNTPs)加入扩增引物各50pmol。充分混匀后开始PCR循环:95℃变性1分钟,94℃变性5分钟,53℃退火1分钟,72℃延伸1分钟,共进行30个循环。最后在72℃保温10分钟。PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳鉴定,回收后用于克隆。

[0068] 实施例2组合多肽质粒构建

[0069] 将实施例1中获得的PCR片段分别使用限制性内切酶HindIII和BamHI双酶切,与同样双酶切的载体pTMHa30(购自Amersham公司)连接,连接好的载体(50 μ l感受态细胞需25ngDNA)转化于感受态大肠杆菌BL21(DE3)中,体积不应超过感受态细胞的5%,轻轻旋转几次混匀内容物。冰浴30分钟;将管放入42℃水浴,定时90秒热休克;快速将管转移到冰浴90秒,使细胞冷却;每管加入800 μ l LB培养基,37℃缓摇45分钟,使细菌复苏并表达质粒编码的抗生素抗性标记基因;低速离心2分钟,去上清,留约100 μ l培养基在微量离心管内,重悬菌体;用玻璃铺菌器将菌液在琼脂板上铺匀;将平板倒置于37℃恒温培养箱,12-16小时后可出现菌落。涂板后挑取阳性克隆进行鉴定,结果显示质粒构建正确。

[0070] 实施例3:本发明组合多肽的表达

[0071] 将实施例2中获得的重组质粒分别转化至E. coli BL21(DE3)中,挑单菌落于37℃培养过夜,次日按1%转接于LB(含kana 10 μ g/ml)中,37℃培养至OD₆₀₀约为0.6~0.8时,加入终浓度为0.5mmol/L IPTG,继续培养3~4h,诱导目的蛋白表达,离心,收集菌体,超声破菌后,再离心,收集上清和沉淀,分别经SDS-PAGE(分离胶15%,堆积胶4.5%)分析目的蛋白的表达部位。结果表明表达产物在沉淀中。

[0072] 实施例4:本发明组合多肽的纯化

[0073] 将实施例3中收集的菌体用10mM Tris-HCl(pH=8.0)、1mM EDTA,10% sucrose超声洗涤两次,再用10mM Tris-HCl(pH=8.0)、1mM EDTA,1% TritonX-100超声洗涤一次,包涵体用buffer A(6M GuHCl,50mM phosphate buffer(pH=8.0),DTT)溶解后上预平衡的Ni柱,用buffer B(8M Urea,50mM phosphate buffer(pH=6.3))洗至基线,Buffer C洗脱(6M GuHCl,冰醋酸,pH=2.0),收集洗脱液,用水透析过夜。得蛋白,冻干后,用70%甲酸溶解,用CNBr裂解3小时后,水透析过夜。冻干后再次用buffer A溶解,上预平衡的Ni柱,并

用 buffer A 洗至基线,收集所有流出液,用氧化型谷胱苷肽氧化,水透析后,用反相 HPLC 分离目标蛋白(安捷伦公司 Agilent 1100 型 HPLC),分别获得 C22-M3、C22-CD4M9、M3-CD4M9 或 C22-CD4M9-M3 组合多肽。

[0074] 实施例 5:本发明组合多肽的细胞毒性及 HIV-1 进入抑制活性检测

[0075] 抗病毒活性试验

[0076] 取 10^5 MT-2 细胞包被接种在 96-孔细胞培养板内,加入连续 3 倍稀释的实验多肽(5, 1.67, 0.56, 0.19, 0.021, 0mg/ml, 每样作 2 孔平行试验)孵化 2 小时。用 100 半数致细胞病变滴度(TCID₅₀)的 HTLV-III_B(马里兰大学生物医学部提供)感染每孔细胞,5 天后收取细胞上清液,测定 HIV-1P24 抗原产量。

[0077] 细胞毒性试验

[0078] 10^5 MT-2 细胞接种在 96-孔细胞培养板内,加入不同稀释度的实验多肽(1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.064, 0.032, 0.016, 0mg/ml, 每样作 2 孔平行试验),培养 5 天后,加入 MTT 试剂,测定 OD 值。

[0079] 结果表明:C22-M3(SEQ ID NO:13)、C22-CD4M9(SEQ ID NO:14)、M3-CD4M9(SEQ ID NO:15)、C22-CD4M9-M3(SEQ ID NO:16)等组合多肽抑制 HIV-1 的 LD₅₀ 均达到和好于 0.11mM 水平。

[0080] 各组合多肽在使用浓度未显示任何毒性。

[0081] 实施例 6C22-M3 组合多肽兔源性多克隆抗体的制备

[0082] 按照分子克隆指南(Cold spring harbor laboratory edition, 1989),将实施例 4 中纯化得到的 C22-M3 组合多肽与福氏佐剂混合后免疫家兔,加强三次后取血,制得抗 C22-M3 组合多肽的兔源多克隆抗体抗血清。

[0083] 实施例 7 药物组合物的制备

[0084] 以生理盐水为溶剂制备药物针剂,每针剂的药物溶解量为 0.6 毫克。体重为 50 千克的病人,每天注射两次,每次一剂。

[0085] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0086] 序列表

[0087] <110> 同济大学

[0088] <120> 抗 HIV-I 的多肽、其编码序列及其用途

[0089] <130>PCNTJ061054

[0090] <160>16

[0091] <170>PatentIn version 3.1

[0092] <210>1

[0093] <211>22

[0094] <212>PRT

[0095] <213>C22

[0096] <400>1

[0097]	Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe Asn Ile Thr Asn	
[0098]	1 5 10 15	
[0099]	Trp Leu Trp Tyr Ile Lys	
[0100]	20	
[0101]	<210>2	
[0102]	<211>21	
[0103]	<212>PRT	
[0104]	<213>M3	
[0105]	<400>2	
[0106]	Glu Pro Ser Asp Ala Arg Ser Glu Cys Lys Arg Ser Ile Ala Pro Asn	
[0107]	1 5 10 15	
[0108]	Cys His Ala Ala Asn	
[0109]	20	
[0110]	<210>3	
[0111]	<211>28	
[0112]	<212>PRT	
[0113]	<213>CD4M9	
[0114]	<400>3	
[0115]	Cys Asn Leu Ala Ser Cys Asn Leu Arg Cys Asp Ser Leu Gly Leu Leu	
[0116]	1 5 10 15	
[0117]	Val Lys Cys Ala Gly Ser Glu Cys Ala Cys Gly Pro	
[0118]	20 25	
[0119]	<210>4	
[0120]	<211>66	
[0121]	<212>DNA	
[0122]	<213>C22 单链核苷酸	
[0123]	<400>4	
[0124]	gaattggata aatgggcgctc gctgtggaat tggtttaata ttaccaattg gctgtggtat	
	60	
[0125]	attaaa	66
[0126]	<210>5	
[0127]	<211>30	
[0128]	<212>DNA	
[0129]	<213> 正向引物	
[0130]	<220>	
[0131]	<221>misc_feature	
[0132]	<222>(1).. (31)	
[0133]	<223> 人工序列	
[0134]	<400>5	

[0135]	gcgaagctta tggaattgga taaatgggcg	30
[0136]	<210>6	
[0137]	<211>30	
[0138]	<212>DNA	
[0139]	<213> 反向引物	
[0140]	<220>	
[0141]	<221>misc_feature	
[0142]	<222>(1)..(30)	
[0143]	<223> 人工序列	
[0144]	<400>6	
[0145]	gcgggacacct tatttaatat accacagcca	30
[0146]	<210>7	
[0147]	<211>63	
[0148]	<212>DNA	
[0149]	<213>M3 单链核苷酸	
[0150]	<400>7	
[0151]	cttggagcac tacgatcttc acttacgttc tcttcataac gaggattgac ggtacgacga	60
[0152]	ttg	63
[0153]	<210>8	
[0154]	<211>36	
[0155]	<212>DNA	
[0156]	<213> 正向引物	
[0157]	<400>8	
[0158]	gcgaagctta tgcttggagc actacgatct tcactt	36
[0159]	<210>9	
[0160]	<211>33	
[0161]	<212>DNA	
[0162]	<213> 反向引物	
[0163]	<400>9	
[0164]	gcgggacacct tacaatcgtc gtaccgtctt tcc	33
[0165]	<210>10	
[0166]	<211>84	
[0167]	<212>DNA	
[0168]	<213>CD4M9 单链核苷酸	
[0169]	<400>10	
[0170]	acgttgaac gatcaacgtt caattctacg ctatcaaate cgaataatca gttcacgcga	60
[0171]	ccgtcactta cgcgaacgcc ggga	84
[0172]	<210>11	
[0173]	<211>36	

[0174]	<212>DNA	
[0175]	<213> 正向引物	
[0176]	<220>	
[0177]	<221>misc_feature	
[0178]	<222>(1)..(36)	
[0179]	<223> 人工序列	
[0180]	<400>11	
[0181]	gcgaagctta tgacgttgaa tcgatcaacg ttcaat	36
[0182]	<210>12	
[0183]	<211>33	
[0184]	<212>DNA	
[0185]	<213> 反向引物	
[0186]	<220>	
[0187]	<221>misc_feature	
[0188]	<222>(1)..(33)	
[0189]	<223> 人工序列	
[0190]	<400>12	
[0191]	gcgggacacct tatcccggcg ttgcgctaag tga	33
[0192]	<210>13	
[0193]	<211>43	
[0194]	<212>PRT	
[0195]	<213>C22-M3	
[0196]	<400>13	
[0197]	Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe Asn Ile Thr Asn	
[0198]	1 5 10 15	
[0199]	Trp Leu Trp Tyr Ile Lys Glu Pro Ser Asp Ala Arg Ser Glu Cys Lys	
[0200]	20 25 30	
[0201]	Arg Ser Ile Ala Pro Asn Cys His Ala Ala Asn	
[0202]	35 40	
[0203]	<210>14	
[0204]	<211>50	
[0205]	<212>PRT	
[0206]	<213>C22-CD4M9	
[0207]	<400>14	
[0208]	Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe Asn Ile Thr Asn	
[0209]	1 5 10 15	
[0210]	Trp Leu Trp Tyr Ile Lys Cys Asn Leu Ala Ser Cys Asn Leu Arg Cys	
[0211]	20 25 30	
[0212]	Asp Ser Leu Gly Leu Leu Val Lys Cys Ala Gly Ser Glu Cys Ala Cys	

[0213]	35	40	45
[0214]	Gly Pro		
[0215]	50		
[0216]	<210>15		
[0217]	<211>49		
[0218]	<212>PRT		
[0219]	<213>M3-CD4M9		
[0220]	<400>15		
[0221]	Glu Pro Ser Asp Ala Arg Ser Glu Cys Lys Arg Ser Ile Ala Pro Asn		
[0222]	1	5	10 15
[0223]	Cys His Ala Ala Asn Cys Asn Leu Ala Ser Cys Asn Leu Arg Cys Asp		
[0224]	20	25	30
[0225]	Ser Leu Gly Leu Leu Val Lys Cys Ala Gly Ser Glu Cys Ala Cys Gly		
[0226]	35	40	45
[0227]	Pro		
[0228]	<210>16		
[0229]	<211>71		
[0230]	<212>PRT		
[0231]	<213>C22-CD4M9-M3		
[0232]	<400>16		
[0233]	Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe Asn Ile Thr Asn		
[0234]	1	5	10 15
[0235]	Trp Leu Trp Tyr Ile Lys Cys Asn Leu Ala Ser Cys Asn Leu Arg Cys		
[0236]	20	25	30
[0237]	Asp Ser Leu Gly Leu Leu Val Lys Cys Ala Gly Ser Glu Cys Ala Cys		
[0238]	35	40	45
[0239]	Gly Pro Glu Pro Ser Asp Ala Arg Ser Glu Cys Lys Arg Ser Ile Ala		
[0240]	50	55	60
[0241]	Pro Asn Cys His Ala Ala Asn		
[0242]	65	70	