

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200880002505.4

[51] Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

[43] 公开日 2010 年 2 月 10 日

[11] 公开号 CN 101646944A

[22] 申请日 2008.1.17

[21] 申请号 200880002505.4

[30] 优先权

[32] 2007.1.17 [33] FI [31] 20075028

[32] 2007.1.17 [33] US [31] 60/885,352

[86] 国际申请 PCT/FI2008/050012 2008.1.17

[87] 国际公布 WO2008/087254 英 2008.7.24

[85] 进入国家阶段日期 2009.7.17

[71] 申请人 奈克斯特生物医学技术公司

地址 芬兰赫尔辛基

[72] 发明人 卡尔·萨克西拉

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 闵 丹

权利要求书 3 页 说明书 7 页 序列表 4 页
附图 1 页

[54] 发明名称

检测人免疫缺陷病毒的方法

[57] 摘要

本发明涉及利用生物工程化高亲和力多肽检测人免疫缺陷病毒的方法。

1.用于检测生物学样品中的人免疫缺陷病毒(HIV)的存在的方法,该方法包括:

a)使所述样品或其级分与生物工程化高亲和力多肽(BHAP)接触,该BHAP合理靶向结合p24抗原中的保守结构决定簇(COPOS),该COPOS由短肽区,通常是少于10个残基的区域,中至少两个或三个氨基酸残基或更多氨基酸残基的主链和侧链原子形成;并

b)检测所述生物工程化高亲和力多肽与p24或其片段的复合物,所述存在复合物表明所述样品中存在HIV。

2.依照权利要求1的方法,其中所述COPOS结合决定簇位于HIV p24抗原中的下列保守5-9肽内:

R T L N A W V K (SEQ ID NO: 1),
V G G H Q A A M Q (SEQ ID NO: 2),
W D R L H P (SEQ ID NO: 3),
P R G S D I A G (SEQ ID NO: 4),
G L N K I V (SEQ ID NO: 5),
V R M Y S P (SEQ ID NO: 6),
Q G P K E (SEQ ID NO: 7),
F R D Y V D R F (SEQ ID NO: 8),
L R A E Q (SEQ ID NO: 9),
W M T E T L L (SEQ ID NO: 10),
W M T D T L L (SEQ ID NO: 11),
Q N A N P D C (SEQ ID NO: 12),
E E M M T A C (SEQ ID NO: 13), 和
A C Q G V G G P (SEQ ID NO: 14)。

3.依照权利要求1的方法,其中所述COPOS结合决定簇由2-3个、2-4个、2-5个、2-6个、3-4个、3-5个、3-6个、2-7个、或3-7个相邻的或不相邻氨基酸残基组成。

4.依照权利要求3的方法,其中所述COPOS结合决定簇由2个、3个、4个、5个、6个、或7个相邻或不相邻的氨基酸残基组成。

5.依照权利要求1的方法,其中在实施步骤a)之前使样品或其级分的多肽变性。

6.依照权利要求1的方法,其中所述生物工程化高亲和力多肽具有 10^{-10} 至 10^{-15} M的对所述表位的亲和力。

7.依照权利要求1的方法,其中所述生物工程化高亲和力多肽是单链抗体或其衍生物。

8.依照权利要求1的方法,其中所述生物工程化高亲和力多肽是scFv或其衍生物。

9.依照权利要求1的方法,其中所述生物工程化高亲和力多肽是通过结合多肽进行连续多轮生物淘选而得到的。

10.依照权利要求9的方法,其中所述生物淘选是基于噬菌体展示系统的。

11.依照权利要求1的方法,其中所述表位没有免疫原性。

12.依照权利要求1的方法,其中所述样品是血液样品。

13.依照权利要求1要求的方法,其中所述生物工程化高亲和力多肽带有标记。

14.用于生成能够特异性结合HIV p24抗原的保守区中长至少两个至三个相邻或不相邻氨基酸的表位的生物工程化高亲和力多肽的方法,该方法包括以下步骤:

a) 通过对p24抗原的已知氨基酸序列进行计算分析,选择p24抗原中长至少2个氨基酸的保守区;

b) 制备基于p24抗原中选定的保守区的肽;

c) 使表达结合蛋白质的微粒文库接触所述肽;

d) 分离那些表达具有对所述肽的结合活性的结合蛋白质的微粒;

e) 对自步骤d)中分离出的微粒获得或衍生的核酸进行诱变;

f) 基于自步骤e)获得的微粒,制备表达结合蛋白质的微粒的文库;

g) 使自步骤f)获得的文库接触所述肽或其片段;

h) 分离那些表达具有改善的对所述肽或其片段的结合活性的结合蛋白质的微粒;

i) 将步骤e)至h)重复一次或多次;

j) 自步骤i)获得的微粒获得能够特异性结合HIV p24抗原的保守区中长至少2个至3个相邻或不相邻氨基酸的表位的生物工程化高亲和力多肽。

15.依照权利要求14的方法,其中所述文库是单链抗体的噬菌体文库。

16.依照权利要求14的方法,其中所述生物工程化高亲和力多肽具有 10^{-12} 至 10^{-15} M的对所述表位的亲和力。

17.依照权利要求14的方法,其中所述肽选自下组:

R T L N A W V K(SEQ ID NO: 1),

V G G H Q A A M Q(SEQ ID NO: 2),

W D R L H P(SEQ ID NO: 3),

P R G S D I A G(SEQ ID NO: 4),

G L N K I V(SEQ ID NO: 5),

V R M Y S P(SEQ ID NO: 6),

Q G P K E(SEQ ID NO: 7),

F R D Y V D R F(SEQ ID NO: 8),

L R A E Q(SEQ ID NO: 9),

W M T E T L L(SEQ ID NO: 10),

W M T D T L L(SEQ ID NO: 11),

Q N A N P D C(SEQ ID NO: 12),

E E M M T A C(SEQ ID NO: 13), 和

A C Q G V G G P(SEQ ID NO: 14)。

18.依照权利要求17的方法,其中所述表位由2-3个、2-4个、2-5个、2-6个、2-7个、3-4个、3-5个、3-6个、或3-7个相邻或不相邻的氨基酸残基组成。

19.依照权利要求17的方法,其中所述表位由2个、3个、4个、5个、6个、或7个相邻或不相邻的氨基酸残基组成。

20.生物工程化高亲和力多肽(BHAP),通过权利要求14的方法得到。

21.权利要求20的生物工程化高亲和力多肽(BHAP)用于检测生物学样品中的p24抗原的用途。

检测人免疫缺陷病毒的方法

发明领域

本发明涉及人免疫缺陷病毒感染的诊断和临床管理。

发明背景

尽管事实是，人免疫缺陷病毒不含有足够保守以致于容许由抗体介导进行可靠且定量的检测的抗体表位(即具有足够长度和免疫原性的肽段)，但是临床使用的诊断测试仍涉及人免疫缺陷病毒HIV-1/2壳体蛋白的免疫学检测。现有技术的问题是，所有全球流动的病毒株以及在单个受感染个体内的准种(quasispecies)都未检测到。另一个问题是，当前的免疫测定法不能对任何来源的、具有相同亲和力的病毒都按照所得结合信号与病毒丰度成正比的方式来检测。此外，用于检测HIV抗原的传统抗体(参见例如US 6,432,633)的结合亲和力不够高，导致无法开发可用于在HIV感染个体中诊断HIV感染或监测抗逆转录病毒疗法随访期间病毒载量的足够灵敏的测定法。尽管HIV抗原检测在理论上可以是针对这些诊断需求的较好解决办法，但由于上述局限，目前在这方面使用的是基于PCR的方法或血清学检测(单独或与现有亚最佳抗原检测技术联合)。本文所述发明对现有免疫学方法固有的诊断性检测病毒体结合型HIV蛋白中的限制提供了解决方案。

Schupbach等(Journal of Medical Virology, 2001, 65: 225-232)披露了热变性的、扩增强化的p24抗原可替代HIV RNA测试来监测HIV感染的治疗。Respass等(Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43(1): 506-508)和Knuchel等(Journal of Clinical Virology, 2006, 36: 64-67)也披露了超灵敏的p24抗原测定法，作为HIV RNA测试的替代。

Boder等(PNAS, 2000, 97(20): 10701-10705)披露了具有单价飞(10^{-15})摩尔抗原结合亲和力的抗体片段的定向进化。Holliger和Hudson(Nature Biotechnology, 2005, 23(9): 1126-1136)综述了工程化抗体片段。Nygren和Uhlen(Current Opinion in Structural Biology, 1997, 7: 463-469)及Hosse等(Protein Science, 2006, 15: 14-27)综述了用于分子识别的蛋白质展示支架的工程化。

Binz等(Nature Biotechnology, 2005, 23(10): 1257-1268)和Hey等(Trends in Biotechnology, 2005, 23(10): 514-422)综述了来自非免疫球蛋白结构域的新结合蛋白质的工程化。

然而,上文所述现有技术出版物或其组合无一披露本发明所提供的设计用于结合p24抗原的长至少两个或三个氨基酸残基的保守表位的生物工程化高亲和力多肽、所述多肽的生产及所述多肽在HIV测定法中的用途。

附图简述

图1. 一个代表性HIV-I株的p24蛋白的氨基酸序列。该图显示p24的多个残基在进化枝A-K、HIV-1主要流行性M型的各种循环重组病毒、以及O型和N型病毒和相关黑猩猩SIV病毒间的相对保守性。得分1指示超过99.75%的保守性,得分2指示>99.50%的保守性,得分3指示>99.00%的保守性,得分4指示>98.00%的保守性,而得分5指示>97.00%的保守性(得分显示在每一个残基的上方)。X指示在此位置有两种可选残基是>99.75%保守的。小于97%保守的残基没有给分。得分为1或2的残基以粗体显示。潜在的BHAP靶标有下划线。注意,下划线肽区域中所有氨基酸的侧链对BHAP识别的贡献可能不相等或根本没有贡献。因此,具体BHAP的识别基序例如可以是WDRxHP。

发明详述

说明书中使用的一些术语定义如下。

“抗体”的各种文法形式在本文中统指一群免疫球蛋白分子和/或免疫球蛋白分子的免疫学活性部分,即含有抗原结合位点或互补位的分子。

“抗原结合位点”、“互补位”指抗体分子中特异性结合抗原的结构部分。

“单链抗体”(scFv)用于定义一种分子,其由单一mRNA分子(转录物)合成的、其中的抗体重链可变区和轻链可变区通过接头肽连成连续氨基酸链。

“免疫测定法”指利用一种或多种抗体对其抗原的反应来测量生物学液体(通常是血清、血浆、尿液、或其它体液)中的底物水平的生物化学测试。该测定法利用抗体对其抗原的特异性结合。常常使用单克隆抗体,因为它们通常结合待检测分子上的单一位点,并因此提供更加特异性的和精确的测试,其不受样品中其它分子的干扰。所使用的抗体必须具有对抗原的高亲和力。可以在例如传染病的诊断中通过检测微生物特异性的分子结构来测量抗原的存在。可以通过多种方法来实现抗原数量的检测。最常用的技术之一是

标记抗原或抗体。标记物可以由酶(酶免疫测定法, EIA)、荧光(FIA)、化学发光(luminescence, LIA)组成, 或者它们可以基于凝集、浊度法(nephelometry)、比浊法(trubidimetry)或免疫印迹(Western印迹)。

免疫测定法可以是竞争性或非竞争性的, 而且可以是均质(homogeneous)或异质(heterogeneous)的。在竞争性测定法中, 样品中的抗原与标记抗原竞争结合抗体。然后测量结合至抗体位点的标记抗原的量。这种响应与样品中的抗原浓度成反比, 因为响应最大, 能与标记抗原竞争的样品中抗原就越少。

在非竞争性免疫测定法(常常称作“三明治式测定法”)中, 使样品中的抗原结合“捕捉”抗体, 并测量这种位点上标记抗体的量。与竞争性测定法的情况不同, 该结果与抗原的浓度成正比。

异质免疫测定法要求额外包括从所述位点(通常使用固相材料)清除未结合的抗体或抗原的步骤。均质测定法不要求有分离阶段来清除未结合的抗体或抗原分子。免疫测定法在HIV的诊断中具有特别重要的作用。

缩写“BHAP”指“生物工程化高亲和力多肽”, 其是用重组DNA方法生成并优化、且具有结合配体的能力的分子。例如, 单链抗体及其衍生物可充当BHAP。

缩写“COPOS”指“保守多肽结构”, 其是通常由两个或更多个甚至在其它高度可变的蛋白质(诸如多种病毒蛋白)中都趋于恒定且能充当BHAP配体的氨基酸残基形成的结构。COPOS可以与抗原性表位交叠, 但是可以不成传统抗体的靶。

在用于本文时, 术语“特异性结合”、或“特异性识别”、或表述“具有对表位的结合特异性”指BHAP或其片段或衍生物与其靶分子之间的低背景、高亲和力结合(即无非特异性结合)。换言之, 这些术语(及等同短语)指, 在有多种蛋白质和其它生物制品的异质群存在的情况中, 结合模块(binding moiety)(例如受体、抗体、配体或抗配体)优先结合特定靶分子(例如配体或抗原)的能力(即未显著结合测试样品中的其它成分)。通常, 两个实体(诸如配体与受体)间的特异性结合是指结合亲和力至少约 10^6 M^{-1} , 更优选至少约 10^7 、 10^8 、 10^9 、或 10^{10} M^{-1} , 更优选至少约 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 、或 10^{15} M^{-1} 。

术语“生物淘选”和“噬菌体展示库”在本文中是与US专利申请No. 2005/0074747(Arap等)中相同的方式使用。

另外, 抗原的经典定义是, 引入易感动物的组织后能引发免疫应答(例

如生成特异性抗体分子)、且能与所生成的特异性抗体结合的“任何外来物质”。抗原一般具有高分子量,而且通常是蛋白质或多糖。多肽、脂质、核酸和许多其它物质也能发挥抗原的功能。更小的称作半抗原的物质,若与较大的载体蛋白(如牛血清清蛋白、匙孔蛾血蓝蛋白(KLH)或其它合成基质(matrices))化学偶联,也可以产生免疫应答。多种分子(诸如药物、简单的糖(simple sugar)、氨基酸、小肽、磷脂、或甘油三酯)可发挥半抗原的功能。因此,只要时间足够,几乎任何外来物质都会被免疫系统识别,并激发产生特异性抗体。然而,这种特异性免疫应答是高度可变的、很大程度上依赖于抗原的大小/尺寸、结构和组成。引发强免疫应答的抗原被称为强免疫原性。

优质抗原的特征包括:

- 在该分子内具有结构稳定且化学性质复杂的区域。
- 有重大区段不存在大范围重复单元。
- 最小分子量8,000-10,000道尔顿,但是在有载体蛋白的情况也用过分子量低至200 Da的半抗原。
- 能被免疫系统处理。
- 有抗体生成机制可及的免疫原性区域。
- 充分区别于宿主的结构元件。
- 对于肽抗原,多个区域含有至少30%的免疫原性氨基酸: K、R、E、D、Q、N。
- 对于肽抗原,有显著亲水性的或带电荷的残基。

在检测人免疫缺陷病毒(HIV)的情况中,问题在于病毒的抗原位点总是快速变化。本发明的解决方案是,提供手段(means)来制备生物工程化高亲和力多肽(BHAP),其特异性结合至p24多肽的长至少两个或三个氨基酸残基的表位,而这是常规抗体很难或不能检测到的。如此得到的BHAP可以在检测方法中按照抗体使用,因此可用于检测生物样品中人免疫缺陷病毒的存在。

本发明提供了用于检测生物学样品中人免疫缺陷病毒的存在的方法,该方法包括:

- a) 使所述样品或其级分接触生物工程化高亲和力多肽(BHAP),该BHAP合理靶向(rationally targeted)结合HIV的p24多肽中的保守结构决定簇(COPOS),该COPOS由短肽区(通常少于10个残基的区域)中至少两个或三个氨基酸残基或更多氨基酸残基的主链和侧链原子形成。

b) 检测所述生物工程化高亲和力多肽与p24或其片段的复合物, 所述复合物的存在指示所述样品中存在HIV。

COPOS结合决定簇优选位于HIV的p24多肽的下列保守性5-9肽内:

R T L N A W V K (SEQ ID NO: 1),

V G G H Q A A M Q (SEQ ID NO: 2),

W D R L H P (SEQ ID NO: 3),

P R G S D I A G (SEQ ID NO: 4),

G L N K I V (SEQ ID NO: 5),

V R M Y S P (SEQ ID NO: 6),

Q G P K E (SEQ ID NO: 7),

F R D Y V D R F (SEQ ID NO: 8),

L R A E Q (SEQ ID NO: 9),

W M T E T L L (SEQ ID NO: 10),

W M T D T L L (SEQ ID NO: 11),

Q N A N P D C (SEQ ID NO: 12),

E E M M T A C (SEQ ID NO: 13), 和

A C Q G V G G P (SEQ ID NO: 14)。

然而, 本发明不限于上文这些肽, 因为对本领域技术人员显而易见的是, 通过对已知的p24序列或将要发现的序列的进一步计算分析, 可发现自HIV的p24多肽衍生的且在本发明中有用的其它表位。可以使用氨基酸或核苷酸序列比较算法, 诸如本领域技术人员知道的那些, 来进行计算序列同一性比较。例如, 可使用BLASTN算法。

优选的是, COPOS结合决定簇由2-3个、2-4个、2-5个、2-6个、3-4个、3-5个、3-6个、2-7个、或3-7个相邻的或不相邻的氨基酸残基组成。更优选的是, COPOS结合决定簇由2个、3个、4个、5个、6个、或7个相邻的或不相邻的氨基酸残基组成。

要测试的生物学样品优选是血液样品。所述样品或其级分优选在实施上述方法步骤a)之前处在使样品中的多肽变性的条件下。

另外, 本发明提供了用于生成生物工程化高亲和力多肽(BHAP)的方法, 该BHAP能够特异性结合HIV的p24抗原的保守区中长至少两个至三个相邻或不相邻氨基酸的表位, 该方法包括以下步骤:

- a) 通过p24抗原的已知氨基酸序列的计算分析,选择p24抗原中长至少2个氨基酸的保守区;
- b) 制备基于p24抗原中选定的保守区的肽;
- c) 使所述肽与表达结合蛋白质的微粒文库接触,优选该文库是单链抗体的噬菌体文库;
- d) 分离那些表达具有对所述肽的结合活性的结合蛋白质的微粒;
- e) 对自步骤d)中分离出的微粒获得或衍生的核酸进行诱变;
- f) 基于自步骤e)获得的微粒,制备表达结合蛋白质的微粒的文库;
- g) 使自步骤f)获得的文库接触所述肽或其片段;
- h) 分离表达结合蛋白质的微粒,所述结合蛋白对所述肽或其片段的结合活性被改善;这种改善的结合活性例如是更高的亲和力或更好的特异性;
- i) 将步骤e)至h)重复一次或多次;
- j) 自步骤i)获得的微粒获得能够特异性结合HIV的p24抗原的保守区中长至少2个至3个相邻或不相邻氨基酸的表位的生物工程化高亲和力多肽。

本发明还提供了通过上文所述方法获得的生物工程化高亲和力多肽(BHAP)。

本文中用于阐明本发明背景,特别是提供关于本发明实施的额外详情的出版物和其它材料,都收入本文做参考。本发明在以下实施例中进一步描述,但这些实施例并非意图限制本发明的范围。

实施例

实施例1

为了鉴定HIV p24中的COPOS决定簇,将公用数据库(诸如<http://www.hiv.lanl.gov/content/index>)中可得的许多氨基酸序列彼此比对,评价每一氨基酸残基的相对保守性。基于此分析,选出通常短于10个残基且含有至少2个在超过99%的序列中保守的氨基酸的肽用于进一步分析(见图1)。

通过例如筛选scFv噬菌体文库(筛选重组抗体文库的基本原理综述于Hoogenboom, Nature Biotechnology 23(9): 1105- 1116),生成与这些肽结合的潜在BHAP分子,之后,使用肽阵列技术鉴定负责此结合的残基。然后将由HIV p24残基的高度保守集合组成的BHAP识别基序视为COPOS决定簇。此类集合通常由2个至5个残基组成,它们在HIV 24多肽链中相邻或不相邻。如此,上文所列肽序列(SEQ ID NO: 1-14)内两个或更多个残基的任何组合

都是将用于HIV p24检测的潜在COPOS。

实施例2

使用基于亲和力的选择方法,用含有一个或多个潜在COPOS决定簇的合成肽来筛选能充当BHAP前体的大型多肽文库。例如,在Neri及其同事(Proteomics 5: 2340-2350, 2005)构建的、含有30亿种(three billion)重组抗体克隆的ETH-2-Gold噬菌体展示库中,筛选能与含COPOS的肽发生特异性相互作用的多肽。基于非Ig衍生的多肽的、含有潜在配体结合多肽的文库已有多(参见例如Nature Biotechnology 23: 1257-1268, 2005),也可以从头设计,并用这样的文库筛选多肽,以开发BHAP。除了用合成肽筛选此类BHAP前体文库之外,在亲和力选择中,还使用含有一个或多个潜在COPOS决定簇的重组蛋白、以及变性的HIV壳体蛋白质(p24)作为配体。

选出与变性p24以及含指定COPOS的肽都结合的BHAP前体用于进一步开发。首先,使用肽阵列技术(如JPT Peptide Technologies GmbH的PepSpot™肽膜),阐明BHAP前体的含COPOS的靶肽中结合决定簇的细节,选出与这些肽中的最保守结构(=真实的COPOS元件)结合的BHAP前体用于进行生物工程改造。经反复的诱变和亲和选择,如发明人在他们先前涉及SCA工程的研究中所描述的(Biochemistry 41: 12729-12738, 2003),使这些前-BHAP的结合亲和力最大化,并且在必要时使它们的结合特异性进一步偏向p24中最保守的分子决定簇(见图1)。对BHAP中的结合表面进行随机诱变、靶向诱变、以及两种诱变的组合,所述随机诱变利用上述Biochemistry论文所述易错PCR或其它类似技术进行。用基于M13衍生性噬菌粒的传统噬菌体展示方法加辅助噬菌体介导方法来对改良的BHAP分子进行亲和选择和扩增,但是也可使用其它相关筛选方法。

然后详细表征结合亲和力和其它突出特征。能直接使用、或以各种融合蛋白衍生物的形式用于建立新的p24测定法的最佳BHAP的特征包括: 1)对热变性的HIV p24蛋白有高亲和力,优选解离常数低于 10^{-12} M, 2)同族(cognate) COPOS决定簇在99%以上的相关病毒株中绝对保守,和3)溶解度好、且易于大规模重组生产。

<110> 奈克斯特生物医学技术公司 (Next Biomed Technologies NBT Oy)

<120> 检测人免疫缺陷病毒的方法

<130> 46069

<160> 15

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 1

Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys
1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 2

Val Gly Gly His Gln Ala Ala Met Gln
1 5

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 3

Trp Asp Arg Leu His Pro
1 5

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 4

Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly
1 5

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 5

Gly Leu Asn Lys Ile Val

1 5

<210> 6

<211> 6

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 6

Val Arg Met Tyr Ser Pro

1 5

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 7

Gln Gly Pro Lys Glu

1 5

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 8

Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe

1 5

<210> 9

<211> 5

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 9

Leu Arg Ala Glu Gln

1 5

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 10

Trp Met Thr Glu Thr Leu Leu
1 5

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 11

Trp Met Thr Asp Thr Leu Leu
1 5

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 12

Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys
1 5

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 13

Glu Glu Met Met Thr Ala Cys
1 5

<210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 14

Ala Cys Gln Gly Val Gly Gly Pro
1 5

<210> 15

<211> 231

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 15

Pro Ile Val Gln Asn Leu Gln Gly Gln Met Val His Gln Ala Ile Ser

1	5	10	15
Pro Arg Thr	Leu Asn Ala	Trp Val Lys Val Val	Glu Glu Lys Ala Phe
	20	25	30
Ser Pro Glu	Val Ile Pro Met	Phe Ser Ala Leu Ser	Glu Gly Ala Thr
	35	40	45
Pro Gln Asp	Leu Asn Thr Met	Leu Asn Thr Val	Gly Gly His Gln Ala
	50	55	60
Ala Met Gln	Met Leu Lys Glu	Thr Ile Asn Glu	Glu Ala Ala Glu Trp
65	70	75	80
Asp Arg Leu	His Pro Val His	Ala Gly Pro Ile	Ala Pro Gly Gln Met
	85	90	95
Arg Glu Pro	Arg Gly Ser Asp	Ile Ala Gly Thr	Thr Ser Thr Leu Gln
	100	105	110
Glu Gln Ile	Gly Trp Met Thr	His Asn Pro Pro	Ile Pro Val Gly Glu
	115	120	125
Ile Tyr Lys	Arg Trp Ile Ile	Leu Gly Leu Asn	Lys Ile Val Arg Met
	130	135	140
Tyr Ser Pro	Thr Ser Ile Leu	Asp Ile Arg Gln	Gly Pro Lys Glu Pro
145	150	155	160
Phe Arg Asp	Tyr Val Asp Arg	Phe Tyr Lys Thr	Leu Arg Ala Glu Gln
	165	170	175
Ala Ser Gln	Glu Val Lys Asn	Trp Met Thr Glu	Thr Leu Leu Val Gln
	180	185	190
Asn Ala Asn	Pro Asp Cys Glu	Thr Ile Leu Lys	Ala Leu Gly Pro Gly
	195	200	205
Ala Thr Leu	Glu Glu Met Met	Thr Ala Cys Gln	Gly Val Gly Gly Pro
	210	215	220
Gly His Lys	Ala Arg Val Leu		
225	230		

3 5 5 5 3 4 4 4 2 1 3 1 1 2 2 1 3 3 5 3 3 2
 PIVQNLQGQMVHQAI SPRTLNAWVKVVEEKAFSPEVIPM
 3 4 3 5 2 3 4 3 3 4 3 2 2 3 4 4 1 5 1 3 2
 FSALSEGATPQDLNTMLNTVGGHQAAAMQMLKETINEEAA
 1 1 3 2 1 2 2 5 4 1 2 3 5 2 2 1 1 2 3 4 5 3 2 2
 EWDRLHPVHAGPIAPGQMREPRGSDIAGTTSTLQEQIGW
 4 1 4 4 5 2 1 2 3 2 x x 1 3 x x 1 2 2 3 5 x 2 2 4 2 5 1 1 4 2 x 1 3
 MTHNPPIPVGEIYKRWIILGLNKIVRMYSPTSILDIRQG
 2 2 4 2 2 3 2 2 3 4 2 x x 3 1 2 1 2 x 3 2 3 2 2 2 2 2 2 2 2 2
 PKEPFRDYVDRFYKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQNAN
 1 2 1 3 1 x 3 2 2 x x 2 2 1 2 4 2 2 2 3 2 2 2 2 2 3 1 2 4 2
PDCETILKALGPGATLEEMMTACQGVGGPGHKARVL

SEQ ID NO:15

图 1