



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 106543273 A

(43) 申请公布日 2017.03.29

(21) 申请号 201510600252.2

(22) 申请日 2015.09.20

(71) 申请人 复旦大学

地址 200433 上海市杨浦区邯郸路 220 号

申请人 中国科学院生物物理研究所

(72) 发明人 姜世勃 陆路 苏珊 张荣光

叶盛 朱贇

(74) 专利代理机构 上海元一成知识产权代理事

务所(普通合伙) 31268

代理人 吴桂琴

(51) Int. Cl.

C07K 14/16(2006.01)

A61K 38/16(2006.01)

A61P 31/18(2006.01)

C12N 15/49(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页

序列表3页 附图3页

(54) 发明名称

用于抑制 HIV 感染的多肽及其药物用途

(57) 摘要

本发明属于生物医药领域,涉及一种抗 HIV 感染多肽,具体涉及式 1:CP-I(L)-D-I(L),式 1 所示的多肽、其衍生物、其立体异构体、或其无生理毒性的盐。式 1 中 CP 为来源于 HIV-1 gp41 的具有抑制 HIV-1 活性的 C 端多肽,L 为亮氨酸,I 为异亮氨酸,D 为天冬氨酸。本发明中将可变的氨基酸加入到传统的具有抑制 HIV-1 活性的 C 端多肽的碳端,得到的更长的多肽,使其具有显著增强的抗病毒活性;本发明还涉及含有上述的式 1 多肽、其衍生物、其立体异构体、或其无生理毒性的盐的药物组合物,以及在制备治疗或预防 HIV 感染所导致相关疾病尤其是获得性免疫缺陷综合症的药物中的用途。

1. 式 1 所示的多肽、其衍生物、其立体异构体、或其无生理毒性的盐，
CP—I(L)—D—I(L) 式 1

其中，CP 为来源于 HIV-1gp41 的具有抑制 HIV-1 活性的 C 端多肽，L 为亮氨酸，I 为异亮氨酸，D 为天冬氨酸。

2. 根据权利要求 1 所述的式 1 多肽、其衍生物、其立体异构体、或其无生理毒性的盐，其特征在于，所述的 I(L)—D—I(L) 四组氨基酸在特定的位置接入 CP 多肽的 C 末端，使其所述氨基酸对应的氨基酸残基序号，以 HIVHXB2 病毒 CHR 结构域为准，为：I(L)654—D655—I(L)656，或者写作：

654IDI656 (SEQ ID NO:1)；

654IDL656 (SEQ ID NO:2)；

654LDI656 (SEQ ID NO:3)；

654LDL656 (SEQ ID NO:4)。

3. 一种药物组合物，其含有至少一种权利要求 1-2 中任一项所述的式 1 多肽、其衍生物、其立体异构体、或其无生理毒性的盐，以及药学上可接受的载体或辅料。

4. 一种用于以下任一所述的用途的 HIV 抑制剂，其含有至少一种权利要求 1-2 中任一项所述的式 1 多肽、其衍生物、其立体异构体、或其无生理毒性的盐：

治疗和 / 或预防和 / 或辅助治疗 HIV 感染所致疾病（如艾滋病）；

抑制 HIV 介导的细胞融合；

抑制 HIV 侵入细胞；

抑制 HIV 复制；

制备具有体外抑制 HIV 感染活性的生物制剂。

5. 一种核酸编码，其用于编码至少一种权利要求 1-2 中任一项所述的式 1 多肽或其衍生物；以及含有这些核酸分子的表达和重组载体、重组细胞或者重组病毒等生物材料。

6. 含有权利要求 5 所述核酸分子的表达盒、重组载体、重组细胞或重组蛋白。

7. 一种产品的制备方法，其特征在于，其包括：

化学合成权利要求 1-2 中所述任一多肽、其衍生物、其立体异构体、或其无生理毒性的盐的步骤；

生物表达权利要求 1-2 中所述任一多肽、其衍生物、其立体异构体、或其无生理毒性的盐的步骤。

用于抑制 HIV 感染的多肽及其药物用途

技术领域

[0001] 本发明属生物医药领域,涉及抗 HIV 感染多肽;具体涉及式 1:CP—I(L)—D—I(L),式 1 所示的多肽、其衍生物、其立体异构体、或其无生理毒性的盐。所述多肽可以显著提高原 C 端多肽抑制 HIV 感染的活性。本发明还涉及含有上述的式 1 多肽、其衍生物、其立体异构体、或其无生理毒性的盐的药物组合物,以及式 1 多肽、其衍生物、其立体异构体、或其无生理毒性的盐在治疗或预防 HIV 感染所导致相关疾病尤其是获得性免疫缺陷综合症(艾滋病)的用途。

背景技术

[0002] 据报道,人类获得性免疫缺陷综合症,即艾滋病(AIDS),一直是国际医学领域的关注热点。现有技术公开了该病由人感染人类免疫缺陷病毒(HIV)引起,据研究显示,目前我国临床病例多是感染的 1 型 HIV。据联合国艾滋病规划署(UNAIDS)提供的资料显示,从上世纪 80 年代被发现以来,HIV 已经造成了累计超过七千万人被感染以及超过两千万人死亡,资料显示每年仍有约两百万的新增感染病例出现。迄今为止仍没有有效的疫苗面世,所以艾滋病仍然是人类公共卫生领域的重大威胁。

[0003] 有研究显示 HIV 表面糖蛋白 gp41 在 HIV-1 与靶细胞发生膜融合并最终进入细胞的过程中起着至关重要的作用,也是该领域新发现的融合抑制的作用靶点。gp41 的组成包括融合多肽(Fusion Peptide, FP)、胞外段、跨膜区段等,其上对病毒细胞发生膜融合不可或缺的两个螺旋结构位于胞外段,为 N 末端重复序列(N-terminal heptad repeat, HR1 或 NHR, aa:542-592)和 C 末端重复序列(C-terminal heptad repeat, HR2 或 CHR, aa:623-665)。1992 年,Wild 教授团队首先报道发现多肽 DP107,该多肽来源于 HIV-1 表面糖蛋白 gp41 的 N 端序列,具有毫摩尔级别的抗 HIV-1 的活性。1993 年,姜世勃教授和其同事报道了多肽 SJ-2176,该多肽来源于 gp41 的 C 端序列,具有纳摩尔级别的抗病毒活性。所述两个多肽的发现引发了学术界对融合抑制剂的探索,开启了一个抗艾滋病药物的新领域。1997 年,有科学家发现了 gp41 的晶体结构,发现 gp41 在 HIV 入侵靶细胞的过程中会发生折叠,其 CHR 和 NHR 会形成发夹样的 6 螺旋束结构,该发现,使本领域研究人员更细致地了解了 HIV 进入靶细胞的过程:在 HIV 入侵靶细胞的过程中,其表面糖蛋白 gp120 先与靶细胞上的 CD4 受体以及辅助受体 CXCR4 或者 CCR5 结合,进而触发 gp41 构型的变化,发夹样结构拉近了 HIV 与靶细胞的距离,促进其发生膜融合;所以,融合抑制剂是作用在这个阶段;在 gp41 蛋白 N 端插入靶细胞细胞膜之后,来源于其 N 端(或 C 端)的多肽与 gp41C 端(或 N 端)结合,阻止其六螺旋结构(6-HB)的形成,进而阻断其发生膜融合的过程,进而达到治疗艾滋病的效果。

[0004] 基于融合抑制剂的作用原理,本领域研究者开始关注并期望能设计出与 HIV gp41C 端或者 N 端具有更高亲和性的多肽,那将能使得该多肽药物具有更好的抗病毒活性,进而使其被开发为药物后使用剂量减小,减低用药成本。本申请的发明人拟提供一种显著增强现有 HIV-1 进入抑制多肽的活性的方法,为进一步优化治疗艾滋病的融合抑制剂提供

新的参考及依据。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于基于现有技术融合抑制剂中存在的缺陷,提供新的用于抑制 HIV 感染的多肽及其药物用途。

[0006] 本发明的一个方面涉及式 1 所示的多肽、其衍生物、其立体异构体、或其无生理毒性的盐。

[0007] CP—I(L)—D—I(L) 式 1

[0008] 其中, CP 为来源于 HIV-1gp41 的具有抑制 HIV-1 活性的 C 端多肽, L 为亮氨酸, I 为异亮氨酸, D 为天冬氨酸。

[0009] 本发明中,将三个可变的氨基酸(亮氨酸或异亮氨酸-天冬氨酸-亮氨酸或异亮氨酸)加入到传统的具有抑制 HIV-1 活性的 C 端多肽的碳端,得到的更长的多肽,使其具有显著增强的抗病毒活性;本发明的上述技术方案,有助于进一步开发研制出用量更少且成本更低的艾滋病药物。

[0010] 在本发明的一个实施方案中, I(L)—D—I(L) 这四组氨基酸在特定的位置接入 CP 多肽的 C 末端,从而使这四组氨基酸所对应的氨基酸残基序号(以 HIV_{HXB2}病毒 CHR 结构域为准)为: I(L)⁶⁵⁴—D⁶⁵⁵—I(L)⁶⁵⁶, 或者写作:

[0011] ⁶⁵⁴IDI⁶⁵⁶ (SEQ ID NO:1);

[0012] ⁶⁵⁴IDL⁶⁵⁶ (SEQ ID NO:2);

[0013] ⁶⁵⁴LDI⁶⁵⁶ (SEQ ID NO:3);

[0014] ⁶⁵⁴LDL⁶⁵⁶ (SEQ ID NO:4);

[0015] 采用上述技术方案,将传统的抑制 HIV-1 活性的 C 端多肽从 643 位的氨基酸(通常情况下是 Q⁶⁴³)后面截断,接入 I(L)—D—I(L) 三组氨基酸;实验证实,该种接入方法获得的多肽具有更强的抑制 HIV 感染的活性。

[0016] 在本发明的另一个实施方案中,根据式 1 设计得到了如下所示 5 个多肽, JLS1-JLS5:

[0017] 1) JLS1 :N 端 -WEEWDKKIEEYTKKIEELIKKSQNQQIDI-C 端 (SEQ ID NO:5);

[0018] 2) JLS2 :N 端 -WEEWDKKIEEYTKKIEELIKKSQNQQIDL-C 端 (SEQ ID NO:6)

[0019] 3) JLS3 :N 端 -WEEWDKKIEEYTKKIEELIKKSQNQQLDI-C 端 (SEQ ID NO:7);

[0020] 4) JLS4 :N 端 -WEEWDKKIEEYTKKIEELIKKSQNQQLDL-C 端 (SEQ ID NO:8);

[0021] 5) JLS5 :N 端 -MTWEEWDKKIEEYTKKIEELIKKSQNQQIDL-C 端 (SEQ ID NO:9);

[0022] 其中, JLS1-JLS4 的特征在于:在 WEEWDKKIEEYTKKIEELIKKSQNQQ(名称:SC26EK)序列的羧基端分别加上本发明提出的 I(L)—D—I(L) 这四组氨基酸,实验证实,所得到的衍生多肽均具有极强的、广谱的抗病毒活性;其中, JLS5 则是在 JLS2 的基础上在其氨基端也添加了 MT 的增强序列,两端同时存在的增强序列显著提高了其抗病毒活性;

[0023] 其中氨基酸缩写具有本领域公知的含义:W 为色氨酸、E 为谷氨酸、D 为天冬氨酸、K 为赖氨酸、I 为异亮氨酸、Y 为酪氨酸、T 为苏氨酸、L 为亮氨酸、S 为丝氨酸、Q 为谷氨酰胺、N 为天冬酰胺、M 为甲硫酰胺。

[0024] 本发明中,经过对 JLS1-JLS5 的一系列结构与功能的检测之后,结果显示,根据式

1 设计的多肽序列,在碳端加上⁶⁵⁴IDI⁶⁵⁶,⁶⁵⁴IDL⁶⁵⁶,⁶⁵⁴LDI⁶⁵⁶,⁶⁵⁴LDL⁶⁵⁶这样的四组氨基酸形式,使得其与 NHR 的亲合力更好,进而使得其抗病毒活性显著提高。

[0025] 本发明中,通过对 JLS2 结合 gp41 的 NHR 形成的复合物进行晶体结构的解析,结果显示,与现在其它螺旋态的 HIV-1 进入抑制剂相比,JLS2 的 IDL 尾部功能区呈现出伸展的线性构象,更加紧密的结合 gp41 的 N 端区域(如图 4 所示),例如,I654 结合 L544,D655 结合 N553,L656 结合 S546;该种新颖的结合方式证明 IDL 这种尾部修饰方法能拓展原有 CP 抑制剂的结合区域,进一步增强抑制剂与靶点的亲合力,从而增强其抗病毒活性。

[0026] 本发明中,还公开了一种核酸编码,其用于编码所述的式 1 多肽或其衍生物;以及含有这些核酸分子的表达和重组载体、重组细胞或者重组病毒等生物材料,以及含有所述核酸分子的表达盒、重组载体、重组细胞或重组蛋白。

[0027] 本发明中,所述的 JLS1-JLS5 具有以下优点:

[0028] 1) 含有 29 个 /31 个氨基酸,明显短于现在广泛使用的多肽:T20(36 个氨基酸)、T1249(39 个氨基酸)、C34(34 个氨基酸)等,进而能显著节省合成成本。

[0029] 2) 相比其他多肽,序列上更为精简的同时抗病毒活性却明显提高。

[0030] 3) 目前 FDA 唯一批准的进入抑制剂是 T20,但是在临床上已发现多种 T20 耐药株,本发明的多肽对耐药株仍然有效。

[0031] 4) 序列中大量引入了极性氨基酸(E、K 等),使得其与靶序列结合更牢固的同时,水溶性也大大提高,利于进一步开发出药物。

[0032] 本发明的另一个方面涉及式 1 所示的多肽、其衍生物、其立体异构体、或其无生理毒性的盐形成的多聚物以及药物组合。其特征在于:

[0033] 1) 上述任一种多肽的氨基端和 / 或羧基端连接保护基所得到的连接物,氨基端保护基可为乙酰基、氨基、马来酰基、琥珀酰基、叔丁氧羰基、或苄基或其他疏水基团,羧基端保护基可为 NH₂、羧基、酰胺基、叔丁氧羰基或其他疏水性基团;

[0034] 2) 如将衍生多肽用构象为 D- 型的氨基酸,人工修饰的氨基酸以及自然界存在的稀有氨基酸等进行替换,以提高多肽的生物利用度、稳定性和 / 或抗病毒活性也属于本申请范围;

[0035] 3) 上述任一种多肽的氨基端和 / 或羧基端连接寡肽或亲脂性基团或胆固醇得到的连接物,寡肽可由 2-10 个氨基酸构成,亲脂性基团可含有 3-20 个碳原子的脂肪酸链;

[0036] 4) 上述任一种多肽被蛋白质、聚乙二醇、马来酰亚胺修饰得到的产物。

[0037] 本发明中还涉及含有所述的式 1 多肽、其衍生物、其立体异构体、或其无生理毒性的盐,以及药学上可接受的载体或辅料的药物组合物。

[0038] 本发明中还涉及含有所述的式 1 多肽、其衍生物、其立体异构体、或其无生理毒性的盐的 HIV 抑制剂,其可用于,

[0039] 治疗和 / 或预防和 / 或辅助治疗 HIV 感染所致疾病(如艾滋病);

[0040] 抑制 HIV 介导的细胞融合;

[0041] 抑制 HIV 侵入细胞;

[0042] 抑制 HIV 复制;

[0043] 制备具有体外抑制 HIV 感染活性的生物制剂。

[0044] 本发明包含的多肽及其衍生物以及药用盐可单独或者作为组合物应用于 HIV 感

染者的治疗。实际应用中可与各种适宜的载体材料或赋形剂混合,可制成多种剂型。可以是普通制剂,控释制剂,缓释制剂以及各种微粒给药系统。可以与逆转录酶抑制剂、蛋白酶抑制剂等抗 HIV 药物一起应用于艾滋病的治疗。

[0045] 本发明为进一步研发艾滋病治疗和预防药物提供了新的参考思路及依据。

[0046] 为了更清楚地阐释本发明,以下结合具体图例和实施例进行说明。特别指出说明的是,具体实例仅仅只是展示了本申请所做的工作,如果本领域其他人员根据在本发明范围内对本发明进行修正和改变,其也纳入本发明范围内。另外,下列实例中未注明具体实验方法的均可按照常规方法进行,如参照《分子克隆实验指南》,所用试剂或仪器未注明生产商的均为可以市购的常规产品。

附图说明

[0047] 图 1 为通过 P24-based ELISA,用 MT-2 细胞检测 JLS1-JLS5 针对 X4 型病毒株 IIIB 的抑制能力,结果显示 JLS1-JLS5 均具有较好的抑制 HIV IIIB 病毒的活性。

[0048] 图 2 为通过 P24-based ELISA,用 M7 细胞检测 JLS1-JLS5 针对 R5 型病毒株 Ba1 的抑制能力,结果显示 JLS1-JLS5 均具有较好的抑制 HIV Ba1 病毒的活性。

[0049] 图 3 为 JLS1-JLS5 与来源于 gp41N 末端序列的多肽 N36 相互作用的圆二色谱分析。

[0050] 图 4 为 JLS2 的晶体结构,与现在其它螺旋态的 HIV-1 进入抑制剂(蓝色)相比,JLS2 的 IDL 尾部功能区(紫色)呈现出伸展的线性构象,更加紧密地结合 gp41 的 N 端区域。

具体实施方式

[0051] 实施例 1:多肽的制备

[0052] 合成多肽 JLS1-JLS5(本实施例中,由 SynPeptide Co Ltd 公司合成),用高效液相色谱(HPLC)和质谱(PerSeptive Biosystems, Framingham, MA)对其进行纯化和鉴定,显示序列正确,纯度大于 98%;本发明多肽的分子量和纯度如表 1 所示

[0053] 表 1. 多肽的分子量和纯度

[0054]

序列号	多肽名称	理论分子量	实际分子量	纯度(%)
5	JLS1	3693.1	3734.25	99
6	JLS2	3693.1	3734.25	99
7	JLS3	3693.1	3734.25	99
8	JLS4	3693.1	3734.25	99
9	JLS5	3925.4	3966.55	99

[0055]

[0056] 实施例 2:多肽抑制 HIV 感染细胞

[0057] 2.1 实验材料与方法

[0058] 2.1.1 检测 C 多肽抑制 HIV-1X4 株 IIIB 感染 MT-2 细胞的活性的方法如下:96 孔板中每孔加入 50 μ L IIIB 病毒(用无血清 1640 稀释)以及 50 μ L 按倍比稀释(4 倍)的

C 多肽 (用无血清 1640 稀释), 37°C 孵育 30 分钟, 再加入 100 μ L 细胞 (10^5 个 /ml, 用加入 10% 血清的 1640 培养液稀释), 以只加了同等终浓度的 MT-2 细胞的孔作为阴性对照, 以加入了同等终浓度的 IIIB 病毒和 MT-2 细胞, 未加入药物的孔为阳性对照; 第二天每孔吸走上清 150 μ L, 加入 150 μ L 新鲜的含 10% 血清的 1640 培养液; 第五天收取上清 50 μ L, 并在上清中加入 50 μ L 含 5% triton 的 PBS, 混合后 4°C 放置过夜; 用 ELISA 检测上清中 P24 的含量来定量 HIV-1 感染 MT-2 的情况; 检测 P24 需要在前一天晚上将半区 96 孔板 (Corning) 包被上 HIV IgG (5 μ g/ml, PBS 稀释), 4°C 放置 12 个小时, 洗板后加入 2% 的 PBS 溶牛奶进行封闭, 37°C 放置 2 小时, 洗板后加入 10 μ L 收取的上清与加入了 triton 的 PBS 的混合物, 再加入 40 μ L PBS, 37°C 放置 1 小时, 洗板后加入一抗 (1.5 μ g/ml, 实验室自行提取的 183 抗体) 50 μ L, 37°C 放置一小时, 洗板后加入二抗 (稀释 3000 倍, Dako Denmark 兔抗鼠单抗) 50 μ L, 37°C 放置一小时, 洗板后加入显色液, 待 3-5 分钟, 加入硫酸终止反应; 用酶标仪 (TECAN infinite M200pro) 检测每孔的 OD450, 得出数据; 按下式计算每一浓度样品抑制率 (抑制率 = $\frac{\text{阳性孔 OD 值} - \text{待测样品孔 OD 值}}{\text{阳性孔 OD 值} - \text{阴性孔 OD 值}} * 100\%$) 以及有效抑制剂量 (IC50 值)。

抑制率 (抑制率 = $\frac{\text{阳性孔 OD 值} - \text{待测样品孔 OD 值}}{\text{阳性孔 OD 值} - \text{阴性孔 OD 值}} * 100\%$) 以及有效抑制剂量 (IC50 值)。

2.1.2 检测 C 多肽抑制 HIV-1R5 株 Ba1 感染 M7 细胞的活性的方法如下: 96 孔板中每孔加入 50 μ L Ba1 病毒 (用无血清 1640 稀释) 以及 50 μ L 按倍比稀释 (4 倍) 的 C 多肽 (用无血清 1640 稀释), 37°C 孵育 30 分钟, 再加入 100 μ L 细胞 (10^5 个 /ml, 用加入 10% 血清的 1640 培养液稀释), 以只加了同等终浓度的 M7 细胞的孔作为阴性对照, 以加入了同等终浓度的 Ba1 病毒和 M7 细胞, 未加入药物的孔为阳性对照; 第二天每孔吸走上清 150 μ L, 加入 150 μ L 新鲜的含 10% 血清的 1640 培养液, 第五天收取上清 50 μ L, 并在上清中加入 50 μ L 含 5% triton 的 PBS, 混合后 4°C 放置过夜, 用 ELISA 检测上清中 P24 的含量来定量 HIV-1 感染 M7 的情况, 检测 P24 需要在前一天晚上将半区 96 孔板 (Corning) 包被上 HIV IgG (5 μ g/ml, PBS 稀释), 4°C 放置 12 个小时, 洗板后加入 2% 的 PBS 溶牛奶进行封闭, 37°C 放置 2 小时。洗板后加入 10 μ L 收取的上清与加入了 triton 的 PBS 的混合物, 再加入 40 μ L PBS, 37°C 放置 1 小时, 洗板后加入一抗 (1.5 μ g/ml, 实验室自行提取的 183 抗体) 50 μ L, 37°C 放置一小时, 洗板后加入二抗 (稀释 3000 倍, Dako Denmark 兔抗鼠单抗) 50 μ L, 37°C 放置一小时, 洗板后加入显色液, 待 3-5 分钟, 加入硫酸终止反应, 用酶标仪 (TECAN infinite M200pro) 检测每孔的 OD450, 得出数据; 依前述方法, 计算每一浓度样品的抑制率和有效抑制浓度;

[0059] 2.2 实验结果及分析

[0060] 无论是针对 CXCR4 共受体还是 CCR5 共受体介导的 HIV-1 感染靶细胞的过程, SC26EK 抑制该过程的能力均较弱; 本实施例中通过计算机模拟发现如果在 C 多肽的 C 末端加上 $^{654}\text{IDI}^{656}$, $^{654}\text{IDL}^{656}$, $^{654}\text{LDI}^{656}$, $^{654}\text{LDL}^{656}$ 这样的四组氨基酸, 均能形成更稳定的结构, 将多肽绑定到 gp41N 端序列的沟槽里, 检测其抗病毒活性均提高 16-45 倍; 如果再在 JLS2 的基础上加上 N 端的 MT 的增强序列, 则抗病毒活性进一步增强, 达到 0.3nM。

[0061] 表 2. JLS1-JLS5 的抗病毒感染能力

[0062]

名称	序列	IC ₅₀ (nM)	
		抑制 HIV-1 III _B	抑制 HIV-1 Bal
SC26EK	WEEWDKKIEEYTKKIEELIKKSQNQQ	89.6	98.6
JLS1	WEEWDKKIEEYTKKIEELIKKSQNQQIDI	3.77	1.54
JLS2	WEEWDKKIEEYTKKIEELIKKSQNQQIDL	1.41	2.34
JLS3	WEEWDKKIEEYTKKIEELIKKSQNQQLDI	3.63	3.13
JLS4	WEEWDKKIEEYTKKIEELIKKSQNQQLDL	4.21	1.62
JLS5	MTWEEWDKKIEEYTKKIEELIKKSQNQQIDL	0.33	0.55

[0063] 实施例 3. JLS2 和 JLS5 的广谱抗 HIV 作用

[0064] 针对 HIV 的逆转录病毒容易发生基因组突变的情况, 本发明选择对实验室适应株有较好效果的 JLS2 和 JLS5, 并检测了其对一系列临床株的抗病毒活性; 临床株可分为多种亚型, 包括 A-D, F-H, J 和 K 亚型等, 本实验以 SC26EK 为对照, 观察其 N 末端和 C 末端加上增强序列后的效果, 同时还选择目前唯一上市的融合抑制剂 T20 以及现在报道的抗病毒活性最高的融合抑制剂 HP23 作为阳性对照;

[0065] 按如下方法: 96 孔板中每孔加入 50 μ L HIV 病毒 (用无血清 1640 稀释) 以及 50 μ L 按倍比稀释 (4 倍) 的 C 多肽 (用无血清 1640 稀释), 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟, 再加入 100 μ L 细胞 (10^5 个 /ml, 用加入 10% 血清的 1640 培养液稀释), 以只加了同等终浓度的 M7 细胞的孔作为阴性对照, 以加入了同等终浓度的 HIV 病毒和 M7 细胞, 未加入药物的孔为阳性对照; 第二天每孔吸走上清 150 μ L, 加入 150 μ L 新鲜的含 10% 血清的 1640 培养液, 第五天收取上清 50 μ L, 并在上清中加入 50 μ L 含 5% triton 的 PBS, 混合后 4 $^{\circ}$ C 放置过夜; 用 ELISA 检测上清中 P24 的含量用以定量 HIV-1 感染 M7 的情况; 检测 P24 需要在前一天晚上将半区 96 孔板 (Corning) 包被上 HIV IgG (5 μ g/ml, PBS 稀释), 4 $^{\circ}$ C 放置 12 个小时, 洗板后加入 2% 的 PBS 溶牛奶进行封闭, 37 $^{\circ}$ C 放置 2 小时。洗板后加入 10 μ L 收取的上清与加入了 triton 的 PBS 的混合物, 再加入 40 μ L PBS, 37 $^{\circ}$ C 放置 1 小时, 洗板后加入一抗 (1.5 μ g/ml, 实验室自行提取的 183 抗体) 50 μ L, 37 $^{\circ}$ C 放置一小时, 洗板后加入二抗 (稀释 3000 倍, Dako Denmark 兔抗鼠单抗) 50 μ L, 37 $^{\circ}$ C 放置一小时, 洗板后加入显色液, 待 3-5 分钟, 加入硫酸终止反应, 用酶标仪 (TECAN infinite M200pro) 检测每孔的 OD₄₅₀, 得出数据; 依前述方法, 计算每一浓度样品的抑制率和有效抑制浓度; 实验结果如表 3 所示, 对于 A、B、D、F、O 等各种亚型的临床株和在中国流行占主导地位的重组 A/E 病毒株, JLS2 和 JLS5 均具有较好的抑制活性, 且相对 SC26EK 活性均大幅度提高, 甚至优于 HP23, 说明本发明所述的这两个增强序列的有效性。

[0066] 表 3. JLS2, JLS5 对不同临床株的抑制活性。

[0067]

病毒株	IC50 (nM)				
	SC26EK	JLS2	JLS5	T20	HP23
92UG024(D,X4)	207.344	2.697	2.287	45.904	7.373
92UG029(A,X4)	62.938	3.007	0.946	45.485	2.084
93BR020(F,X4 and R5)	326.531	4.126	0.882	37.194	5.482
92TH009(A/E,R5)	283.587	2.654	4.762	9.733	5.622
BCF02(O,R5)	17.883	6.877	6.970	19.2	3.176
US4GS007(B,R5)	>500	46.897	17.250	157.37	44.542

[0068] 实施例 4. JLS2, JLS5 对 HIV T-20 抗性株的抑制作用

[0069] T20 是目前唯一批准用于临床的融合抑制剂,但其很容易诱导耐药突变,导致疗效的降低;本发明针对目前临床上迫切需要解决的问题,即开发出能抑制 T-20 抗性株的新型融合抑制剂,实验中以 SC26EK 为对照,观察在其 N 末端和 C 末端加上增强序列后的效果;选择了唯一上市的融合抑制剂 T20 以及现在报道的抗病毒活性最高的融合抑制剂 HP23 作为阳性对照,检测 JLS2 和 JLS5 对 T20 抗性株的抑制活性,实验方法如前所述,实验结果如表 4 所示, JLS2, JLS5 对 T-20 抗性株均展现出良好的活性,其中, JLS5 对 9488、9489、9496 和 9498 株的抑制作用甚至优于 HP23。

[0070] 表 4. JLS2, JLS5 对 HIV T-20 抗性株的抑制活性

[0071]

病毒株	IC50 (nM)				
	SC26EK	JLS2	JLS5	T20	HP23
9488	34.877	2.949	0.953	>500	1.707
9489	160.855	6.854	2.177	25.328	4.375
9490	433.055	21.993	4.412	>500	2.294
9491	>500	>500	16.980	>500	3.639
9496	65.2	1.64	0.27	>500	1.616
9498	118	7.52	0.11	>500	4.735

[0072] 实施例 5. 圆二色谱 (CD) 技术研究 JLS1-JLS5 的二级结构

[0073] 圆二色谱分析 (Circular dichroism analysis) :

[0074] 将 C 多肽与来源于 gp41N 末端序列的 N46 等摩尔浓度地混合,终浓度均为 10 μ M (溶于 PBS),将其在 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟, CD 检测使用的是日本分光公司的分光偏振计 (model J-815 ;Jasco, Inc., Easton, MD),采用 1 纳米的带宽,在室温下检测其在光波长从

195 纳米到 260 纳米变化下其吸光度的变化,以 PBS 在同一条件下的吸光系数作为空白校正,此时样品与 N36 的螺旋含量由其 222 纳米处的摩尔椭圆率可以大概推知,而变温实验则是在温控装置将温度从 4℃变化到 99℃期间检测样品在 222 纳米处的摩尔椭圆率的变化,温度变化率为 1.2℃/min;数据是在 1 纳米带宽,0.25Hz 频率,222 纳米波长的光照下得到的,变温情况下的曲线平滑,随着温度上升,样品解螺旋,曲线上升的中点温度即为样品在 222 纳米光照下的最大溶解温度 (T_m);

[0075] 实验结果与分析:

[0076] 来源于 HIV gp41 的 CHR 区的抗病毒多肽主要是通过与其 NHR 区的靶序列相互作用而阻断 6-HB 结构的形成,继而达到抑制 HIV 侵入靶细胞的作用;CD 结果如表 5 所示,SC26EK 和 JLS1-JLS5 在与 N46 孵育后均能形成典型的螺旋结构,表现为在 -208 和 -222 呈现典型的吸收峰(如图 3 所示),其中,将 222nm 波长处值除以 -33(理论上达到 100%螺旋度时的吸收峰值),以此表示该 C 多肽与 N46 形成的复合物的螺旋度,越大表示 CHR 和 NHR 多肽螺旋复合物的 α 螺旋含量越高;依本领域共识,螺旋度越高就意味着 CHR 与 NHR 亲和力越好,抑制 HIV 感染的活性也越好;实验结果显示,JLS1-JLS4 的螺旋含量相比 SC26EK 明显提升,JLS5 螺旋含量高达 91%, T_m 值表示的是 C 多肽与 NHR 复合物的温度稳定性,以其结果表明,JLS1-JLS4 的热稳定性相比 SC26EK 明显提升,JLS5 的热稳定性更是相较于其他 5 个多肽显著提升,热稳定性较好;以上结果表明,JLS1-JLS5 的抑制活性与其形成的异源 6 螺旋束的螺旋度和热稳定性相关。

[0077] 表 5. JLS1-JLS5 的圆二色谱分析

[0078]

名称	二级结构	
	螺旋度 (%)	T_m (°C)
SC26EK	70.19%	63 °C
JLS1	83.87%	82 °C
JLS2	87.72%	82 °C
JLS3	86.06%	81 °C
JLS4	89.25%	81 °C
JLS5	90.05%	91 °C

SEQUENCE LISTING

- <110> 复旦大学,中国科学院生物物理研究所
<120> 用于抑制 HIV 感染的多肽及其药物用途
<130> 1
<160> 9
<170> PatentIn version 3.3
<210> 1
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 1
Ile Asp Ile
1
<210> 2
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 2
Ile Asp Leu
1
<210> 3
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 3
Leu Asp Ile
1
<210> 4
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 4
Leu Asp Leu
1
<210> 5
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 5

Trp Glu Glu Trp Asp Lys Lys Ile Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Ile Glu

1 5 10 15

Glu Leu Ile Lys Lys Ser Gln Asn Gln Gln Ile Asp Ile

 20 25

<210> 6

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 6

Trp Glu Glu Trp Asp Lys Lys Ile Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Ile Glu

1 5 10 15

Glu Leu Ile Lys Lys Ser Gln Asn Gln Gln Ile Asp Leu

 20 25

<210> 7

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 7

Trp Glu Glu Trp Asp Lys Lys Ile Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Ile Glu

1 5 10 15

Glu Leu Ile Lys Lys Ser Gln Asn Gln Gln Leu Asp Ile

 20 25

<210> 8

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 8

Trp Glu Glu Trp Asp Lys Lys Ile Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Ile Glu

1 5 10 15

Glu Leu Ile Lys Lys Ser Gln Asn Gln Gln Leu Asp Leu

 20 25

<210> 9

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 9

Met Thr Trp Glu Glu Trp Asp Lys Lys Ile Glu Glu Tyr Thr Lys Lys

1 5 10 15

Ile Glu Glu Leu Ile Lys Lys Ser Gln Asn Gln Gln Ile Asp Leu
20 25 30

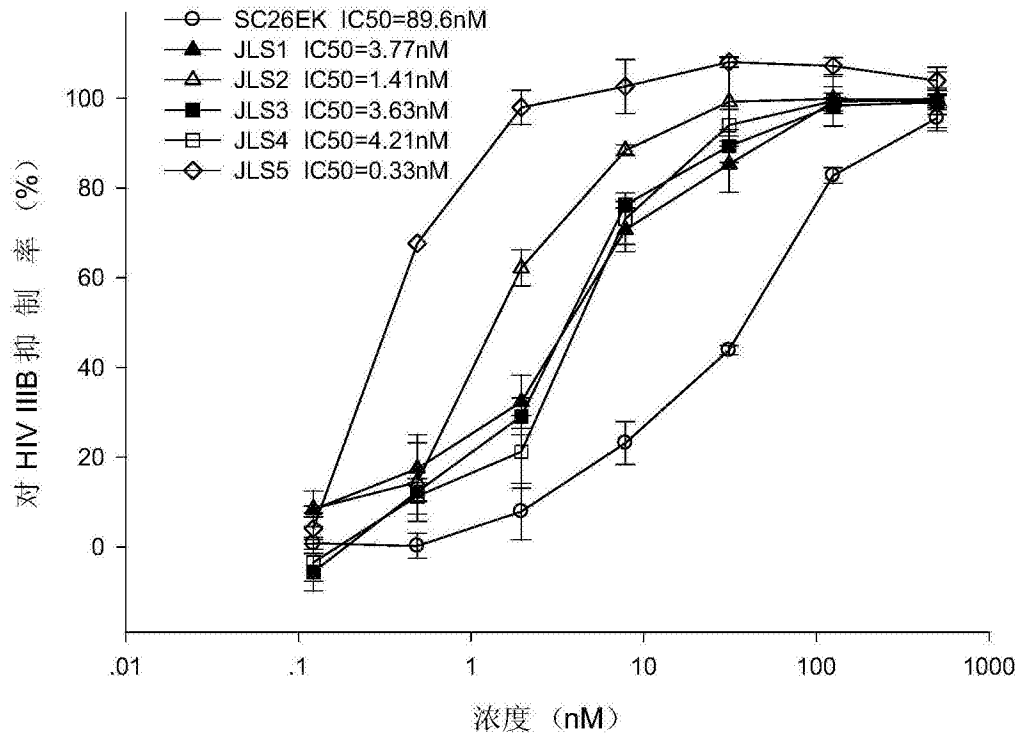


图 1

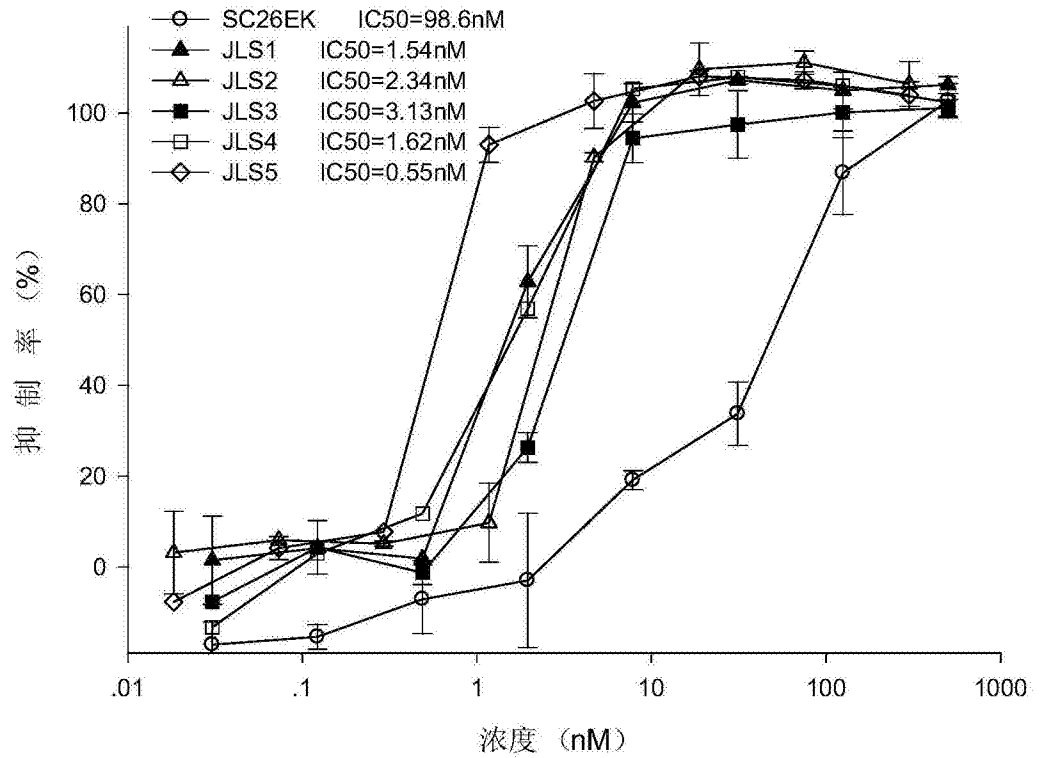


图 2

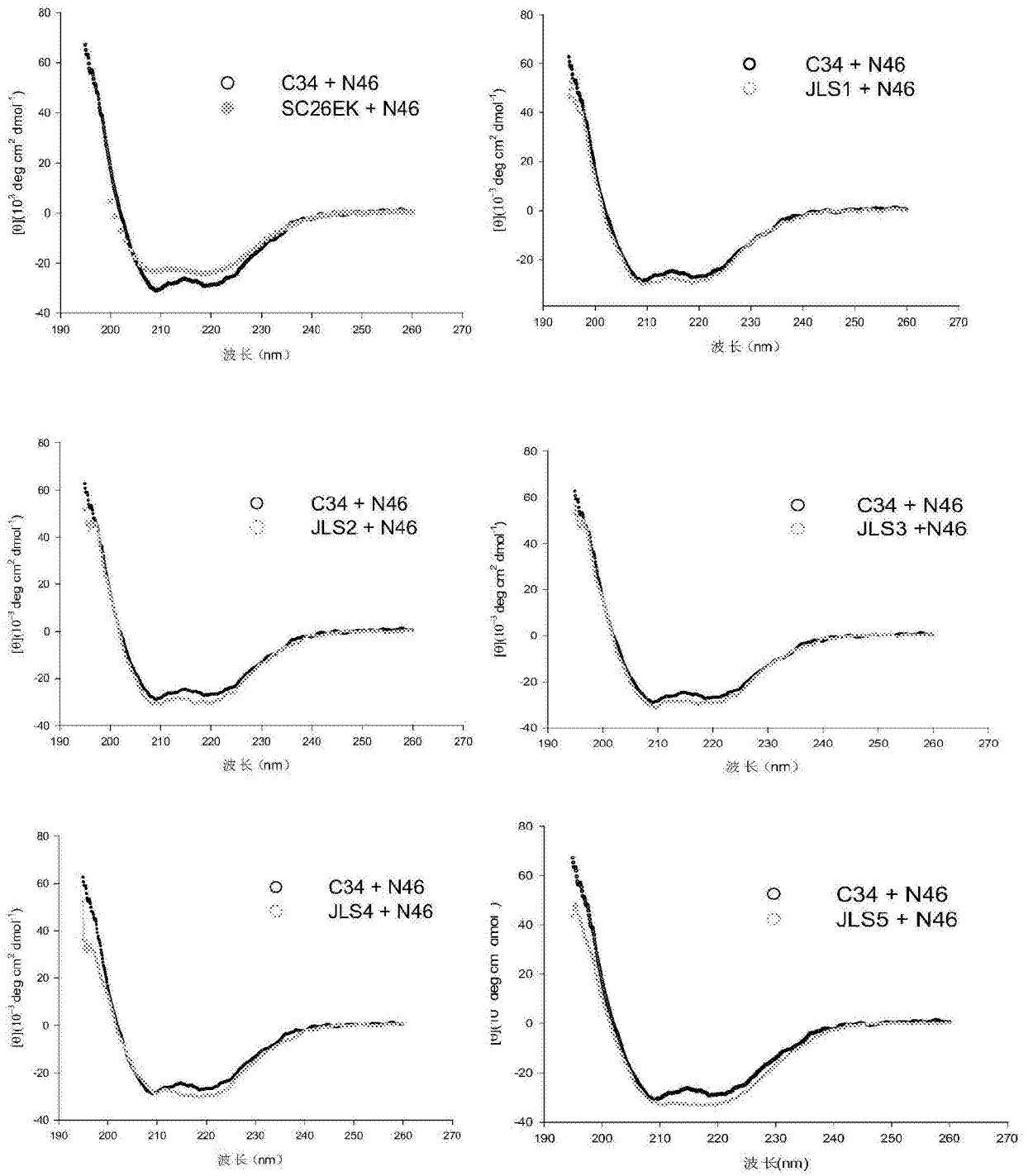


图 3

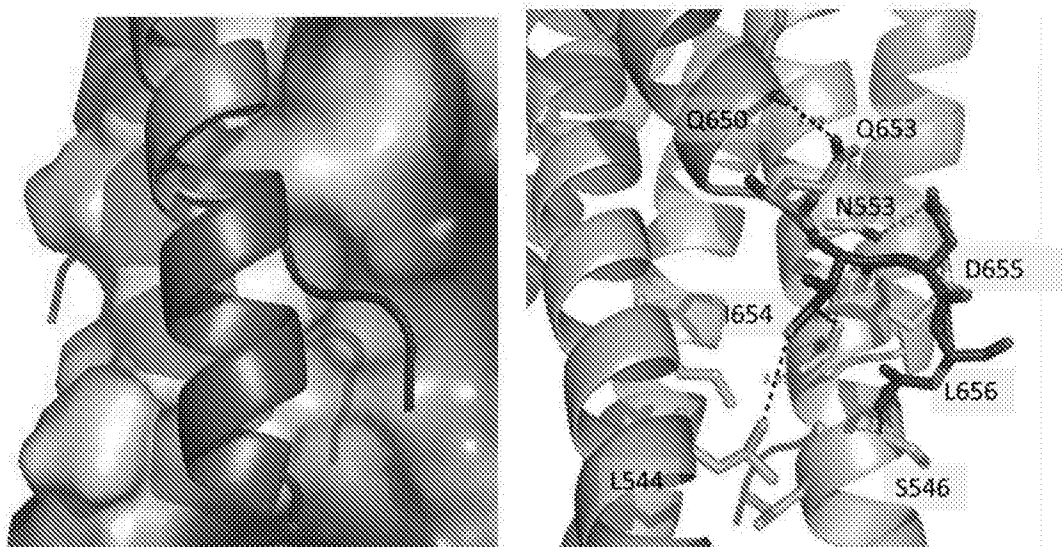


图 4