



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102516370 A

(43) 申请公布日 2012.06.27

(21) 申请号 201110421989.X

A61P 31/18(2006.01)

(22) 申请日 2011.12.16

(71) 申请人 吉林大学第一医院

地址 130021 吉林省长春市东民主大街 519 号

(72) 发明人 于晓方 张文艳 杜娟

(74) 专利代理机构 吉林长春新纪元专利代理有
限责任公司 22100

代理人 陈宏伟

(51) Int. Cl.

C07K 14/155(2006.01)

C07K 14/47(2006.01)

C07K 16/10(2006.01)

C07K 16/06(2006.01)

C12Q 1/70(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

A61K 45/00(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 3 页

(54) 发明名称

抗 HIV 的药物靶点及其在制药中的用途

(57) 摘要

本发明公开了一种抗 HIV 的药物靶点及其在制药中的用途,该药物靶点针对病毒的 Vif 蛋白与宿主细胞 CBF β 蛋白之间的相互结合位点;该结合位点包括 CBF β 的 Helix4 和 Loop3,以及 Vif 的 N 端的前 98 个氨基酸以及第 144,145,146 位(SLQ)氨基酸。利用该靶点设计筛选出了潜在的新型 HIV 病毒抑制剂。提供了利用该药物靶点的单克隆抗体和多克隆抗体及其制备方法。用于 HIV 的治疗,使克服 HIV 治疗的耐药性成为可能,为 HIV 的治疗提供了新的方向,具有重大意义。

1. 一种 HIV 病毒药物靶点,其特征在于,该药物靶点针对病毒的 Vif 蛋白与宿主细胞 CBF β 蛋白之间的相互结合位点;该结合位点包括 CBF β 的 Helix4 和 Loop3,以及 Vif 的 N 端的前 98 个氨基酸以及第 144,145,146 位(SLQ)氨基酸。

2. 根据权利要求 1 所述的 HIV 病毒药物靶点,其特征在于:优选位点是 Vif 第 21 位氨基酸或第 38 位氨基酸。

3. 一种抗 HIV-1 病毒的多克隆抗体,其特征于是以 Vif N 端前 98 个氨基酸范围内的多肽或针对 SLQ 位点为抗原表位的多克隆抗体,具有抑制 HIV-1 Vif 和 CBF β 结合的能力。

4. 权利要求 3 所述抗 HIV-1 病毒的多克隆抗体的制备方法,步骤包括:

1) 提供序列在 Vif N 端前 98 个氨基酸范围内的多肽或序列以 SLQ 位点为抗原表位的多肽;

2) 将多肽与载体蛋白偶联,并与佐剂一起免疫动物;

3) 取动物的抗血清,经过抗原偶联的亲和层析柱纯化,即得所述多克隆抗体。

5. 一种抗 HIV-1 病毒的单克隆抗体,其特征于是以 Vif N 端前 98 个氨基酸范围内的多肽或针对 SLQ 位点为抗原表位的单克隆抗体,具有抑制 HIV-1 Vif 和 CBF β 结合的能力。

6. 权利要求 5 所述抗 HIV-1 病毒的单克隆抗体的制备方法,步骤包括:

1) 提供序列在 Vif N 端前 98 个氨基酸范围内的多肽或序列以 SLQ 位点为抗原表位的多肽;

2) 将多肽与载体蛋白偶联,并与佐剂一起免疫小鼠;

3) 分离小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞株融合;

4) 加入小鼠腹腔饲养细胞与融合细胞共培养,并筛选阳性株;

5) 克隆化筛选,即可获得单克隆抗体细胞株。

7. 一种 HIV 病毒抑制剂,该病毒抑制剂能够有效阻止 Vif - CBF β 相互结合,从而抑制 HIV 病毒复制。

8. 权利要求 7 所述 HIV 病毒抑制剂的筛选方法,包括以下步骤:

1) 通过生物信息学手段模拟 Vif 和 CBF β 的结合界面,根据模拟信息建立结合界面的模型,并以此模型为限制条件从 MDDR, NCI, ACD 等数据库中筛选得到符合模型的小分子;最后通过 DOCK 对接以及手动筛选,根据结合模式,结构合理性,可获得性得到最终的候选分子进行生物学筛选;

2) 生物学筛选包括以下几方面:

A) 免疫共沉淀检测候选分子对 Vif - CBF β 相互结合的干扰能力;

B) Magi 方法验证药物抑制 HIV 的能力;

C) MTT 法检测药物毒性;

D) 得到能够有效阻止 Vif - CBF β 相互结合的抗 HIV 病毒抑制剂。

9. 权利要求 1 或 2 所述的 HIV-1 Vif 和 CBF β 结合位点为靶点的抗 HIV 药物可以是小分子化合物、中药、植物药提取物、有效部位或有效成分、核酸类如 RNAi、多肽类或蛋白质类药物。

抗 HIV 的药物靶点及其在制药中的用途

技术领域

[0001] 本发明公开了一种抗 HIV 的药物靶点,同时还提供了该药物靶点在制药中的用途,属于生物制药技术领域。

背景技术

[0002] 治疗艾滋病的药物目前临床上市的药物根据药物作用靶点可分为以下几类:病毒的吸附融合、逆转录酶、整合酶、蛋白酶已成为筛选和制备抗 AIDS 药物的主要靶点,近十多年来的研制以及临床治疗主要是针对这几个位点进行的。令人遗憾的是,虽然这些药物可以抑制相应病毒蛋白的活性,但是在临床治疗中都存在种种不利因素如:用药周期持久、长期使用后出现耐药性、毒副作用、病患难以忍受疼痛、停药后的病毒重活化(reactivation)、药价昂贵、检测技术和设备有限等。这些问题使通常使用的抗艾滋病药物在治疗过程中会受到不同程度的制约,而无法广泛的应用。

[0003] 对于 HIV 药物的诸多缺陷,耐药性是主要问题之一,即病毒可发生多次氨基酸突变而产生交叉耐药导致抗病毒治疗失败。1996 年,科研人员对此提出了“鸡尾酒疗法”(HAART,高效抗逆转录疗法)的策略,即采用三种联合用药的方式治疗 AIDS。这种方法可以同时抑制 HIV 复制过程的多个环节,最大限度的降低耐药性,降低 HIV 感染者发生 AIDS 的发病率和死亡率,在极大程度上改善了患者的预后生活质量。虽然数年的临床治疗后发现这种方法也存在一些不足如:药物之间的相互作用、毒性的相加、产生 HIV 交叉抗药性、用药剂量大而且复杂、药物对潜伏 HIV 无效等,但是 HAART 方法无疑是目前为止最为有效的 AIDS 治疗手段,因此很多研究者已经开始着手解决其使用中存在的局限性。以长远的战略性眼光来看,最好的解决途径就是彻底了解 HIV-1 病毒学特性和免疫机理,加速新型药物及靶标的研制与开发,增添鸡尾酒疗法的配方,这也是未来艾滋病治疗研究的一个主要方向与手段。

[0004] APOBEC3G 蛋白是最新被发现的人体细胞内天然抗病毒因子,但是其抗病毒功能却被 HIV-1 Vif 蛋白所拮抗。Vif 能够与宿主细胞内多种蛋白形成一个具有泛素蛋白连接酶功能的 ECS 复合物,导致 APOBEC3G 的泛素化并最终被体内蛋白酶体识别、降解,从而无法发挥抗病毒功能。探讨 Vif 蛋白的作用机理对于设计抗艾滋病药物具有重要的研究意义。

发明内容

[0005] 本发明公开了一种抗 HIV 的药物靶点,利用该靶点设计筛选出新的治疗 HIV 的药物。

[0006] 本发明还提供了该药物靶点在制药中的用途,该药物靶点的单克隆抗体和多克隆抗体及其制备方法以及潜在的新型病毒抑制剂。

[0007] 本发明的技术解决方案如下:

通过分子克隆手段删除了 CBF β 的 Helix4 和 Loop3,以及 Vif 的 N 端,或者是突变了 Vif 的第 21 位或 Vif 的第 38 位以及 Vif 第 145、146 及 147 位的氨基酸位点,通过免疫共沉

淀方法检测 CBF β 和 Vif 结合能力明显下降。

[0008] 上述的 HIV 病毒药物靶点的另一种优选方式为,通过分子克隆手段删除了 CBF β 的 Helix4 和 Loop3,以及 Vif 的 N 端,或者是突变了 Vif 第 21 位氨基酸或 Vif 第 38 位以及 Vif 第 145、146 及 147 位的氨基酸位点, HIV-1Vif 降解 APOBEC3G 的能力下降。

[0009] 本发明提供的 HIV 药物靶点,其特征在于:

该药物靶点针对病毒的 Vif 蛋白与宿主细胞 CBF β 蛋白之间的相互结合位点;该结合位点包括 CBF β 的 Helix4 和 Loop3,以及 Vif 的 N 端。

[0010] 所述的 HIV 病毒药物靶点,优选位点是 Vif 第 21 位氨基酸或 Vif 第 38 位氨基酸。

[0011] 本发明提供一种抗 HIV-1 病毒的多克隆抗体,其特征是以 Vif N 端前 98 个氨基酸范围内的多肽为抗原表位的多克隆抗体,具有抑制 HIV-1 Vif 和 CBF β 结合的能力。

[0012] 所述抗 HIV-1 病毒的多克隆抗体的制备方法,步骤包括:

1)提供序列在 Vif N 端前 98 个氨基酸范围内的多肽或序列以 SLQ 位点为抗原表位的多肽;

2)将多肽与载体蛋白偶联,并与佐剂一起免疫动物;

3)取动物的抗血清,经过抗原偶联的亲和层析柱纯化,即得所述多克隆抗体。

[0013] 上述的这些抗体制备步骤并不是一成不变的,本领域的普通技术人员可以根据实际情况进行合理的修改使之符合应用要求。比如是否采用与载体蛋白偶联,是否用亲和层析方法纯化等等。

[0014] 本发明提供一种抗 HIV-1 病毒的单克隆抗体,其特征是以 Vif N 端前 97 个氨基酸范围内的多肽为抗原表位的单克隆抗体,具有抑制 HIV-1 Vif 和 CBF β 结合的能力。

[0015] 所述抗 HIV-1 病毒的单克隆抗体的制备方法,步骤包括:

1)提供序列在 Vif N 端前 98 个氨基酸范围内的多肽或序列以 SLQ 位点为抗原表位的多肽;

2)将多肽与载体蛋白偶联,并与佐剂一起免疫小鼠;

3)分离小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞株融合;

4)加入小鼠腹腔饲养细胞与融合细胞共培养,并筛选阳性株;

5)克隆化筛选,即可获得单克隆抗体细胞株。

[0016] 同样,这些步骤也并不是一成不变的,本领域的普通技术人员可以根据实际情况进行合理的修改使之符合应用要求。比如是否使用佐剂,以及选择不同的骨髓瘤细胞株等等。

[0017] 本发明的一种 HIV 病毒抑制剂,该病毒抑制剂能够有效阻止 Vif - CBF β 相互结合,从而抑制 HIV 病毒复制。

[0018] 本发明的一种 HIV 病毒抑制剂的设计筛选方法,包括以下步骤:

1)通过生物信息学手段模拟 Vif 和 CBF β 的结合界面,根据模拟信息建立结合界面的模型,并以此模型为限制条件从 MDDR, NCI, ACD 等数据库中筛选得到符合模型的小分子。最后通过 DOCK 对接以及手动筛选,根据结合模式,结构合理性,可获得性得到最终的候选分子进行生物学筛选。

[0019] 2)生物学筛选包括以下几方面:

A)免疫共沉淀检测候选分子对 Vif - CBF β 相互结合的干扰能力;

B) Magi 方法验证药物抑制 HIV 的能力；

C) MTT 法检测药物毒性；

D) 得到能够有效阻止 Vif — CBF β 相互结合的抗 HIV 病毒抑制剂。

[0020] 根据药物作用机理为理论推导, HIV-1 Vif 和 CBF β 结合位点为靶点的抗 HIV 药物可以是小分子化合物、中药、植物药提取物、有效部位或有效成分、核酸类如 RNAi、多肽类或蛋白质类药物。

[0021] 本发明的积极效果在于:公开了一种抗 HIV 的药物靶点。利用该靶点设计筛选出了潜在的新型 HIV 病毒抑制剂。提供了利用该药物靶点的单克隆抗体和多克隆抗体及其制备方法。用于 HIV 的治疗,使克服 HIV 治疗的耐药性成为可能,为 HIV 的治疗提供了新的方向,具有重大意义。

附图说明

[0022] 图 1 为 FRET 实验证明 Vif 和 CBF β 是通过直接结合而相互作用的；

图 2 为 Vif 介导 APOBEC3G 的降解需要 CBF β ；

图 3 为 CBF β 上与 Vif 结合的重要位点的鉴别；

图 4 为 Vif 上与 CBF β 结合的重要位点的鉴别；

图 5 为药物靶点潜在的新型小分子病毒抑制剂筛选图；

图 6 为 Vif L145A 突变体与 CBF β 的结合能力检测图。

具体实施方式

[0023] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明并不用于限制本发明的范围。此外应理解,在阅读了本发明讲授的内容之后,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。

[0024] 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,或按照制造厂商所建议的条件。

[0025] 实施例 1:CBF β 上与 Vif 结合的重要位点确认

FRET 实验证明 Vif 和 CBF β 结合关系

构建 YFP-Vif 和 CFP-CBF β 表达载体,用 Lipofectamine2000 将上述表达载体共转染入 293T 细胞。转染细胞于 37 度培养 24 — 36h 后通过 Zeiss LSM510-Meta 共聚焦成像系统观察,并使用 Zen2009 软件对成像进行分析和修改。利用受体光淬灭技术进行荧光共振能量转移(FRET)分析:对 YFP-Vif 融合蛋白进行光淬灭 5s,随后对供体的淬灭水平进行测量,并与淬灭前进行比较。FRET 有效率通过使用 LSM 成像软件中的 FRET 宏进行计算。结果显示 YFP-Vif 和 CFP-CBF β 是通过直接结合的方式相互作用的。(图 1)

根据 CBF β 晶体结构,构建 CBF β 的 6 个突变体,分别为: $\Delta 1(2-14)$, $\Delta 2(2-30)$, $\Delta 3(2-50)$, $\Delta 4(59-68)$, $\Delta 5(69-90)$, $\Delta 6(129-140)$ 。

[0026] 向 293T 细胞中分别与 Vif-HA 共同转染上述 6 种 CBF β 突变表达载体。48h 后收取细胞,进行裂解。采用免疫共沉淀方法,检测不同突变体与 Vif-HA 的结合能力。实验结果表明, $\Delta 5(69-90)$ 基本上与 Vif 失去了结合能力,说明此区域对二者结合非常重要。

[0027] 结合位点包括 CBF β 的 Helix4 和 Loop3(参见图 3), 图中, (a) CBF β 突变体图谱; (b), (c) 免疫共沉淀方法检测 Vif 蛋白与 CBF β 突变体的结合能力; (d) CBF β 结构示意图; 针对 Vif 结构, 构建 Vif 的 N 端缺失突变体, 优选位点是 Vif 第 21 位或 Vif 第 38 位氨基酸位点(参见图 4), 以及 Vif 第 145 位氨基酸(SLQ 中一点)的突变(参见图 6)。图 4 中通过免疫共沉淀检测, (a) Vif Δ N 图谱及 Vif 重要位点标示; (b) Vif N 端缺失突变体(Vif Δ N) 与 CBF β 的结合能力明显下降; (c) VifW21A 或 VifW38A 突变体与 CBF β 的结合能力明显下降。图 6 中 Vif L145A 突变体与 CBF β 的结合能力明显下降。

[0028] 实施例 2: Vif 介导的 APOBEC3G 的降解需要 CBF β

利用 RNA 干扰技术敲除 293T 细胞中的内源性 CBF β , 并通过筛选建立稳定表达细胞系。向缺失 CBF β 的 293T 细胞中共转染 Vif 和 APOBEC3G 表达质粒, 并以 APOBEC3G 共转 VR1012 为实验对照组。转染 48 小时后, 收取细胞, 裂解, 进行 western 检测。实验证明在没有 CBF β 存在的情况下, 有无 Vif 对细胞内 APOBEC3G 的量没有影响。参见图 2: a) 细胞中 CBF β 对 Vif 介导的 APOBEC3G 降解的影响; b) CBF β 对 APOBEC3G 包装进入病毒的影响。

[0029] 实施例 3

抗 HIV-1 病毒的单克隆抗体, 其特征在于是以 Vif N 端前 98 个氨基酸范围内的多肽为抗原表位的单克隆抗体, 具有抑制 HIV-1 Vif 和 CBF β 结合的能力。

[0030] 所述抗 HIV-1 病毒的单克隆抗体的制备方法, 步骤包括:

1) 抗原的选择及获得: 提供序列在 Vif N 端前 98 个氨基酸范围内的多肽; 进行抗原免疫原性的比较, 选择免疫原性强并且水溶性较好的小肽序列作为抗原。将选择的小肽对应核算序列加入 His 标签, 构建入原核表达载体 pET28a 中。将该小肽的表达载体转化入大肠杆菌 BL21 中进行表达, 对可溶性蛋白上清用镍柱进行纯化。测量纯化后获得的小肽浓度, 并用 His 抗体对小肽进行 western 检测。western 检测阳性, 准备免疫小鼠。

[0031] 2) 小鼠的免疫: 纯种 BALB/C 小鼠, 鼠龄 6 ~ 8 周。初次免疫, 皮下多点注射, 免疫原剂量 50ug/ 只, 注射量为 800ul, 福氏完全佐剂与免疫原溶液体积比为 1:1。三周后, 以腹腔注射方式注入相同量的抗原, 选用福氏不完全佐剂。2 ~ 3 周后, 加强免疫, 采用肌肉注射方式, 注射抗原量为 200ug/ 只, 选用福氏不完全佐剂。将免疫过程中的小鼠割尾取血, 用 western 检测小鼠血清中抗体表达情况, 从而判断小鼠的免疫效果。

[0032] 3) 与 SP2/0 骨髓瘤细胞株融合: 将免疫好的小鼠处死, 取脾细胞。将骨髓瘤细胞 SP2/0 与小鼠脾细胞以 1:10 混合在一起, 采用 PEG4000 作为融合剂融合。

[0033] 4) 融合后的细胞以有限稀释的方式接种到 96 孔板中, 在 HAT 培养基中筛选。

[0034] 5) 收取细胞上清, western 检测不同的单克隆细胞群分泌抗体的能力。

[0035] 实施例 4: 一种抗 HIV-1 病毒的多克隆抗体

以 Vif N 端前 98 个氨基酸范围内的多肽为抗原表位的多克隆抗体, 具有抑制 HIV-1 Vif 和 CBF β 结合的能力。

[0036] 所述抗 HIV-1 病毒的多克隆抗体的制备方法:

1) 抗原的选择及获得过程与实施例 3 一致。

[0037] 2) 免疫动物: 选择新西兰兔两只, 每次免疫 200ug 免疫原, 初期使用福氏完全佐剂, 后期使用不完全佐剂。分别在第 0, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 星期进行免疫, 从第 5 星期开始, 静脉取血跟踪检测免疫效果。

[0038] 3) 取动物的抗血清, 经过抗原偶联的亲和层析柱纯化, 即得所述多克隆抗体。

[0039] 实施例 5 : 该药物靶点的潜在的新型病毒抑制剂筛选。

[0040] 将 HIV-1 表达载体瞬时转染入 293T 细胞中, 24 小时后, 将细胞用胰酶消化下来, 均分入 12 孔板中, 每孔含有 1ml 培养基约 1.0×10^5 个细胞, 加入药物, 使药物作用浓度为 10uM/ml。药物作用 24h 后, 收取病毒上清用于做 Magi 感染实验; 收取细胞 western 检测细胞内病毒蛋白表达情况以及药物的细胞毒性 (参见图 5b, 图中根据 p55 可判断药物对细胞内蛋白表达影响; actin 初步判断药物对细胞的毒性)。

[0041] Magi 感染实验: 在感染前 24h, 将 MAGI-CCR5 细胞悬浮于 D-10 培养基中, 于 6 孔细胞培养板上培养, 使细胞密度在感染时达到 30-40%。感染前, 取出孔内的培养液, 将不同稀释度的病毒加入 500 μ l 含有终浓度 20 μ g/ml DEAE-dextran 的 DMEM 培养基中, 混合后加至孔中, 在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中培养两小时后, 补加 2ml 正常的 D-10 培养基, 同样条件下培养 48h。吸出培养上清, 培养板每孔加入 1ml 的固定液, 室温下放置 5 分钟, 弃去固定液, 用 PBS 洗涤 2 次, 加入 0.6ml 显色液, 放在 37 $^{\circ}$ C 无 CO₂ 培养箱中 16-20h, 显微镜下观察蓝色斑点, 如果清晰可见, 终止显色反应, 倒掉显色液, 用 PBS 彻底漂洗 2 次, 最终加入蒸馏水, 在显微镜下记数, 计算药物对病毒的抑制率 (参见图 5a, 柱形图表示加入不同药物后病毒的相对感染能力)。

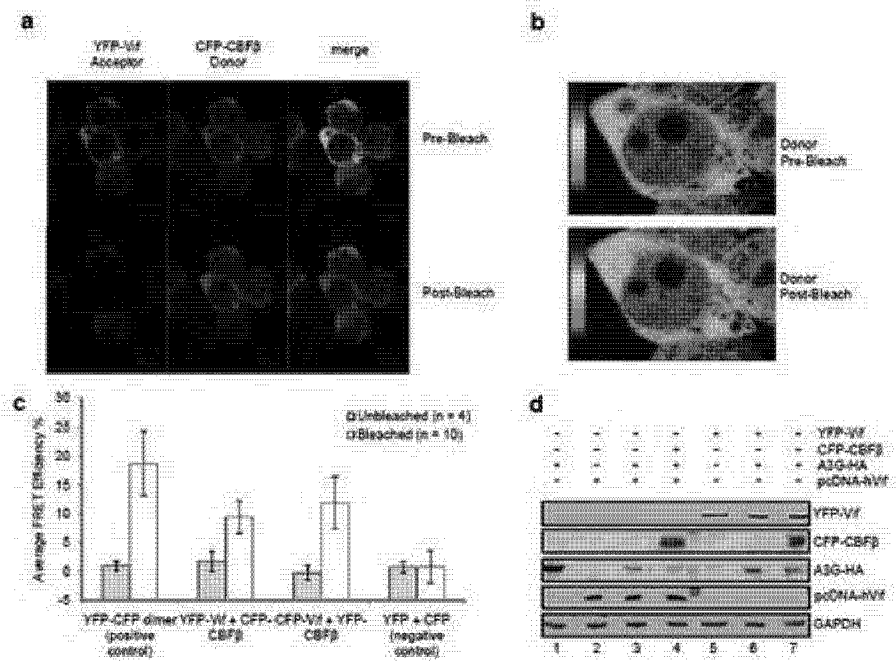


图 1

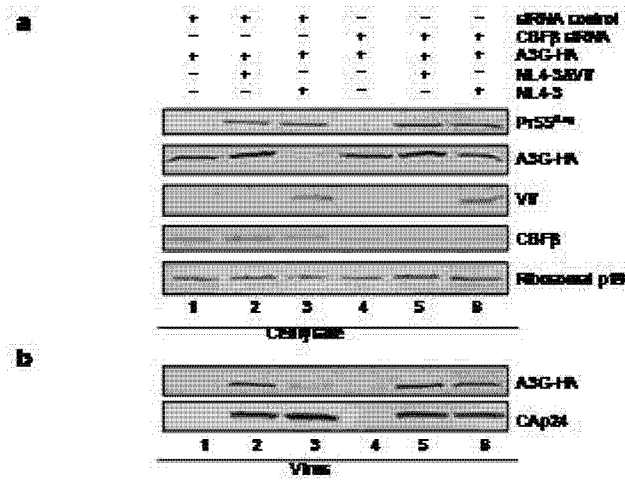


图 2

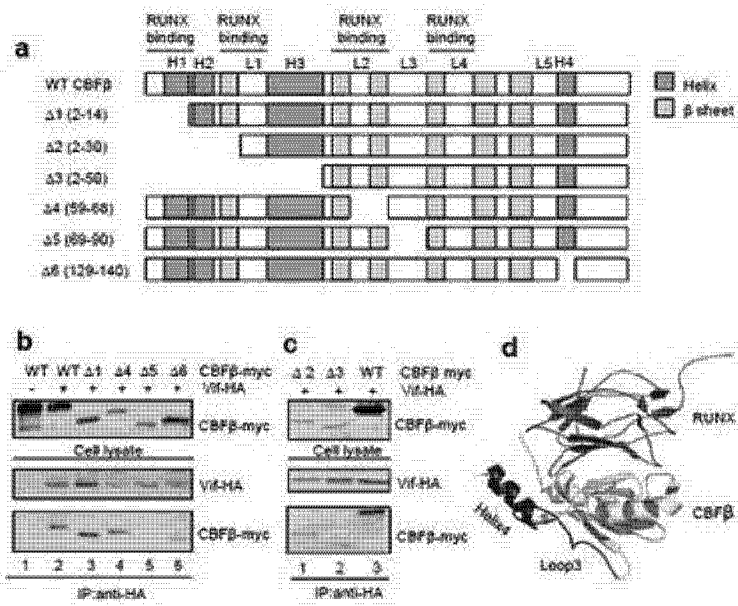


图 3

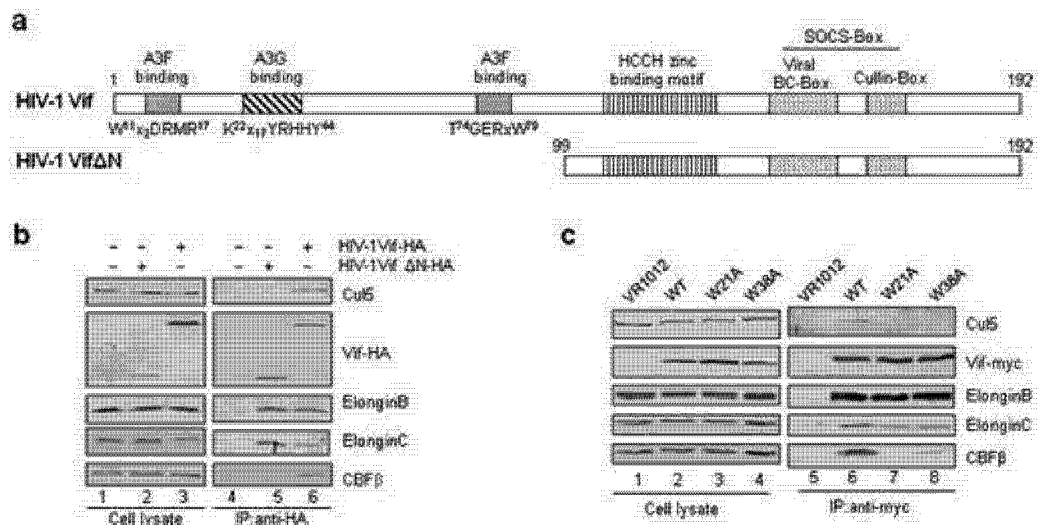


图 4

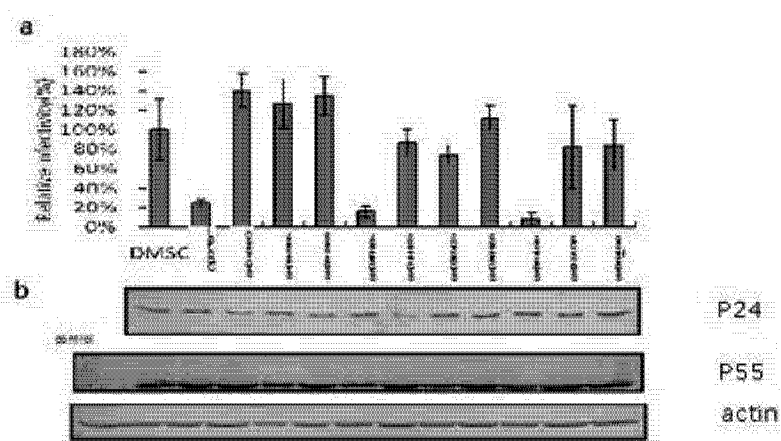


图 5

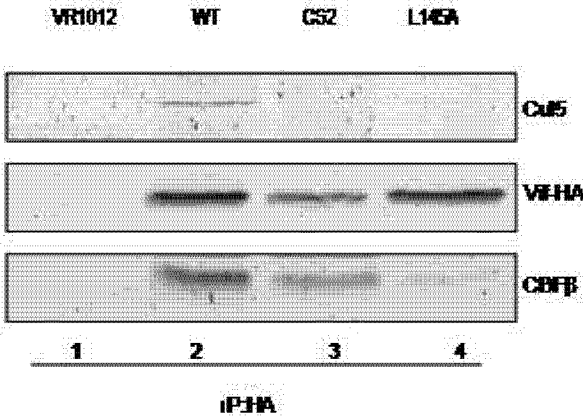


图 6

专利名称(译)	抗HIV的药物靶点及其在制药中的用途		
公开(公告)号	CN102516370A	公开(公告)日	2012-06-27
申请号	CN201110421989.X	申请日	2011-12-16
[标]申请(专利权)人(译)	吉林大学第一医院		
申请(专利权)人(译)	吉林大学第一医院		
当前申请(专利权)人(译)	吉林大学第一医院		
[标]发明人	于晓方 张文艳 杜娟		
发明人	于晓方 张文艳 杜娟		
IPC分类号	C07K14/155 C07K14/47 C07K16/10 C07K16/06 C12Q1/70 G01N33/53 A61K45/00 A61P31/18		
代理人(译)	陈宏伟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种抗HIV的药物靶点及其在制药中的用途，该药物靶点针对病毒的Vif蛋白与宿主细胞CBFβ蛋白之间的相互结合位点；该结合位点包括CBFβ的Helix4和Loop3，以及Vif的N端的前98个氨基酸以及第144，145，146位（SLQ）氨基酸。利用该靶点设计筛选出新的潜在的新型HIV病毒抑制剂。提供了利用该药物靶点的单克隆抗体和多克隆抗体及其制备方法。用于HIV的治疗，使克服HIV治疗的耐药性成为可能，为HIV的治疗提供了新的方向，具有重大意义。

