



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104203276 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 10

(21) 申请号 201380015435. 7

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 03. 15

A61K 39/21 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C12N 7/00 (2006. 01)

61/613264 2012. 03. 20 US

G01N 33/53 (2006. 01)

A61K 38/00 (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 09. 19

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/031831 2013. 03. 15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/142298 EN 2013. 09. 26

(71) 申请人 默沙东公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 J. G. 乔伊斯 C. 吴 E. A. 奥蒂格尔

V. 加斯基

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 李波 万雪松

权利要求书2页 说明书38页

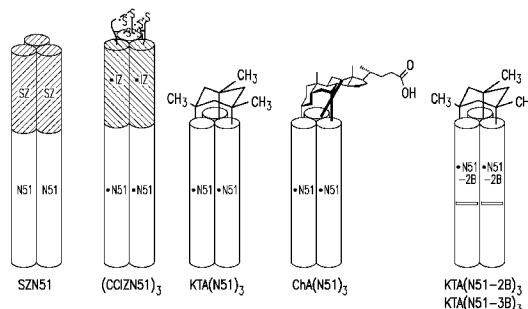
序列表15页 附图14页

(54) 发明名称

HIV-1 GP41 前发夹中间物的稳定肽模拟物

(57) 摘要

本发明涉及在化学支架上具有三个 gp41N- 肽的 gp41 三价肽模拟物,其在构象上将 N- 肽限制为三聚体卷曲螺旋,以模拟 gp41 呈现。本发明还涉及具有整个 HIVgp41NH<sub>2</sub>- 末端七肽重复区域,并且能够形成 gp41 肽模拟物的 N- 肽。HIV-1gp41 前发夹中间物的此类肽模拟物可以用于疫苗中,用于通过引发中和抗体治疗或预防 HIV-1 感染。



1. 一种包含支架核心的 gp41 肽模拟物, 所述支架核心连接至三个 N- 肽, 其中每个 N- 肽包括包含 N36 (SGIVQQQNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARIL; SEQ ID NO:1) 的氨基酸序列或其修饰形式, 其中所述三个 N- 肽彼此相互作用以形成三聚卷曲螺旋, 其模拟 HIV gp41 的前发夹构象, 条件是所述 gp41 肽模拟物不是 (CCIZN36)<sub>3</sub>。

2. 权利要求 1 的 gp41 肽模拟物, 其中所述三个肽的每一个在不同连接点共价连接至所述支架核心。

3. 权利要求 1 的 gp41 肽模拟物, 其中所述支架核心包含下述或由下述组成: 三 (2- 羧乙基) 膦酸盐; 三琥珀酰亚胺氨基三乙酸酯; 三-(2- 马来酰亚胺乙基) 胺; KTA- 溴化物或胆酸。

4. 权利要求 3 的 gp41 肽模拟物, 其中所述支架核心是 KTA- 溴化物或胆酸。

5. 权利要求 1 的 gp41 肽模拟物, 其中所述支架核心是包含三个官能化残基的线性多肽链, 所述三个官能化残基允许三个 N- 肽的连接。

6. 权利要求 5 的 gp41 肽模拟物, 其中所述支架核心包含:

- a) CH<sub>3</sub>CO-Ava-Lys-Ava-Lys-Ava-Lys-Ava-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 41)
- b) CH<sub>3</sub>CO-Arg-Lys-Arg-Lys-Arg-Lys-Arg-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 42);
- c) CH<sub>3</sub>CO-Glu-Lys-Glu-Lys-Glu-Lys-Glu-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 43);
- d) CH<sub>3</sub>CO-Cys-Arg-Lys-Arg-Lys-Arg-Lys-Arg-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 44);

或

- e) CH<sub>3</sub>CO-Cys-Glu-Lys-Glu-Lys-Glu-Lys-Glu-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 45)。

7. 权利要求 2 的 gp41 肽模拟物, 其中所述支架核心是包含环己烷、环庚烷或环辛烷的碳环支架。

8. 权利要求 2 的 gp41 肽模拟物, 其中所述支架核心是包含吡咯烷、氧杂环戊烷、硫杂环戊烷、哌啶、噁烷、硫杂环己烷、氮杂环庚烷、氧杂环己烷、硫杂环庚烷、哌嗪、吗啉或硫代吗啉的杂环支架。

9. 权利要求 1 的 gp41 肽模拟物, 其中一个或多个 N- 肽包含 N51

(QARQLLSGIVQQQNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAVERYLKDQ (SEQ ID NO:4; N51-2B

(QIRELISKIVEQINNILRAIEAQQHALQLTVWGIKQLQARILAVERYLKDQ (SEQ ID NO:8)或 N51-3B

(QARQLLSGIVQQQNLLRAIEAQQHALQLTVWGIKQLQARILAVERYLKDQ (SEQ ID NO:9)。

10. 权利要求 1 的 gp41 肽模拟物, 其中每个 N- 肽由 N51

(QARQLLSGIVQQQNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAVERYLKDQ (SEQ ID NO:4)组成。

11. 权利要求 1 的 gp41 肽模拟物, 其中所述 N- 肽包含相同或不同氨基酸序列。

12. 权利要求 1 的 gp41 肽模拟物,其中所述 N- 肽由相同的氨基酸序列组成。
13. 权利要求 1 的 gp41 肽模拟物,其中一个或多个 N- 肽是嵌合 N- 肽,其包含:
- 包含能够形成三聚卷曲螺旋的可溶性  $\alpha$  螺旋区域的支架部分;和
  - 包含 HIV gp41 NH<sub>2</sub>- 末端七肽重复区域的全部或部分的 N- 肽部分,
- 其中所述支架部分在螺旋相中与所述 N- 肽部分融合,形成  $\alpha$  螺旋结构域,并且其中所述三个 N- 肽彼此相互作用以形成三聚卷曲螺旋。
14. 权利要求 13 的 gp41 肽模拟物,其中所述嵌合 N- 肽的 N- 肽部分在螺旋相中与所述嵌合 N- 肽的支架部分的 COOH- 末端融合。
15. 权利要求 13 的 gp41 肽模拟物,其中所述嵌合 N- 肽的支架部分包含:
- Suzuki-IZ 卷曲螺旋基序(YGGIEKKIEAIEKKIEAIEKKIEAIEKKIEA (SEQ ID NO:31));
- ;
- IZ 卷曲螺旋基序(IKKEIEAIKKEQEAIKKKIEAIEK (SEQ ID NO:34); 或
  - EZ 卷曲螺旋基序(IEKKIEEIEKKIEEIEKKIEEIEK (SEQ ID NO:37)。
16. 一种 gp41 肽模拟物,其为:
- KTA(N51)<sub>3</sub>;
  - KTA(N51-2B)<sub>3</sub>;
  - KTA(N51-3B)<sub>3</sub>;
  - chA(N51)<sub>3</sub>;
  - (CCIZN51)<sub>3</sub> 或
  - SZN51。
17. 权利要求 16 的 gp41 肽模拟物,其为 KTA(N51)<sub>3</sub>。
18. 一种免疫原性组合物,其包含权利要求 1 的 gp41 肽模拟物和药学可接受的载体。
19. 一种在哺乳动物宿主中引发免疫应答的方法,其包括将预防有效量的权利要求 18 的免疫原性组合物引入所述哺乳动物宿主内。
20. 权利要求 19 的方法,其中所述哺乳动物宿主是人。

## HIV-1 GP41 前发夹中间物的稳定肽模拟物

### 发明领域

[0001] 本发明涉及构象受限的三价 gp41 肽模拟物及其作为免疫原引发针对 HIV 的中和抗体的用途。本发明还涉及具有整个 HIV gp41 NH<sub>2</sub> 末端七肽重复区域或其修饰形式,并且能够形成 gp41 肽模拟物的 N 肽。

### [0002] 发明背景

人免疫缺陷病毒 (HIV) 是获得性免疫缺陷综合征 (AIDS) 和相关病症的致病因子。虽然 AIDS 的有效治疗是可获得的,但用于预防 HIV-1 感染的有效预防疫苗的开发已由于不能鉴定并优化免疫原而被阻碍,所述免疫原能够诱导广泛中和抗体以预防病毒进入。

[0003] 已进行相当大的研究量,以评估 HIV-1 包膜糖蛋白作为免疫原的用途。HIV-1 包膜糖蛋白作为 160 kDa 前体合成,其由宿主细胞蛋白酶切割成 120 kDa 受体结合亚基 (gp120) 和 41 kDa 膜锚定亚基 (gp41)。在 gp120 与 CD4 以及容许细胞上的相关 CXCR4 或 CCR5 趋化因子共受体的序贯结合后,在包膜糖蛋白亚基中发生广泛构象变化,从而使得先前埋入的三聚 gp41 核心瞬时暴露,并最终导致病毒和细胞膜的融合以及病毒内容物插入宿主细胞的细胞质内。

[0004] 在 gp41 插入靶宿主细胞膜内后,为广泛的重排,其中 gp41 的两亲 C 末端七肽重复 (CHR) 区域以反向平行方式塞入由三聚体的 N 末端七肽重复 (NHR) 部分形成的疏水口袋内,以形成 6 螺旋“发夹三聚体”结构。发夹三聚体结构是六个  $\alpha$  螺旋的束:以针对中心反向平行方式塞入的三个  $\alpha$  螺旋(由来自三个 gp41 胞外域的 C 螺旋区域形成)、三链卷曲螺旋(由来自三个 gp41 胞外域的 N 螺旋区域形成)。该重排提供了必要几何形状和能量以使病毒和细胞膜达到并列 (apposition),其随后为脂质混合和膜融合。

[0005] 已发现合成的 NHR 和 CHR 肽展示有效的抗病毒活性并且被认为通过显性失活机制起作用,其中它们与新生融合中间物结合,并且阻断融合活性 6 螺旋束的形成。前发夹中间物的可溶性三聚肽模拟物已通过使衍生自酵母转录因子 GCN4 的异源三聚结构域与不同残基长度的 gp41 NHR 融合进行制备。此类构建体在美国专利号 7,960,504 和 7,811,577 以及美国专利申请公开号 20100092505 中描述。类似地,通过在细菌中的重组表达产生的重组 5 螺旋肽,由通过短接头分开的交替 NHR 和 CHR 序列组成的单链多肽由美国专利号 7,053,179 和 7,504,224 描述。用于使这些肽稳定的一种方法是通过使用半胱氨酸残基。参见美国专利号 7,811,577; Bianchi 等人,2009, Adv Exp Med Biol 611:121-3; Bianchi 等人,2010, Proc Natl Acad Sci USA 107:10655-10660; 和 Bianchi 等人,2005, Proc Natl Acad Sci USA 120:12903-12908。用于使 gp41 肽稳定的其他方法包括美国专利号 7,728,106 和 7,604,804 中描述的那些。

### [0006] 发明概述

本发明涉及构象受限的三价 gp41 肽模拟物及其作为免疫原引发针对 HIV 的中和抗体的用途。gp41 肽模拟物呈现为结构稳定形式的完整 HIV-1 gp41 N-七肽重复 (NHR) 区域的全部或一部分,其模拟天然前发夹融合中间物,并且引发能够中和 HIV-1 病毒的免疫应答。

[0007] 相应地,本发明涉及包含连接至三个 N-肽的支

架核心的 gp41 肽模拟物, 其中每个 N- 肽包括包含 N36 (SGIVQQQNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARIL; SEQ ID NO:1) 的氨基酸序列或其修饰形式, 其中三个 N- 肽彼此相互作用以形成三聚卷曲螺旋, 其模拟 HIV gp41 的前发夹构象, 条件是 gp41 肽模拟物不是 (CCIZN36)<sub>3</sub>。在特定实施方案中, 三个肽各自在不同连接点共价连接至支架核心。

[0008] 在某些实施方案中, gp41 肽模拟物包含支架核心, 所述支架核心包含三 (2- 羧乙基) 膦酸盐; 三琥珀酰亚胺氨基三乙酸酯; 三-(2- 马来酰亚胺乙基) 胺; KTA- 溴化物或胆酸。在特定实施方案中, 支架核心是 KTA- 溴化物或胆酸。

[0009] 在其他实施方案中, gp41 肽模拟物包含支架核心, 所述支架核心是包含三个官能化残基的线性多肽链, 所述三个官能化残基允许三个 N- 肽的连接。在特定实施方案中, 所述支架核心包含:

- a) CH<sub>3</sub>CO-Ava-Lys-Ava-Lys-Ava-Lys-Ava-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:41);
- b) CH<sub>3</sub>CO-Arg-Lys-Arg-Lys-Arg-Lys-Arg-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:42);
- c) CH<sub>3</sub>CO-Glu-Lys-Glu-Lys-Glu-Lys-Glu-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:43);
- d) CH<sub>3</sub>CO-Cys-Arg-Lys-Arg-Lys-Arg-Lys-Arg-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:44); 或
- e) CH<sub>3</sub>CO-Cys-Glu-Lys-Glu-Lys-Glu-Lys-Glu-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:45)。

[0010] 在另外其他实施方案中, gp41 肽模拟物包含支架核心, 所述支架核心是包含环己烷、环庚烷或环辛烷的碳环支架。在另外其他实施方案中, gp41 肽模拟物包含支架核心, 所述支架核心是包含吡咯烷、氧杂环戊烷、硫杂环戊烷、哌啶、噁烷、硫杂环己烷 (thiane)、氮杂环庚烷、氧杂环己烷 (oxepane)、硫杂环庚烷 (thiepane)、哌嗪、吗啉或硫代吗啉的杂环支架。

[0011] 在本发明的某些实施方案中, N- 肽包含 N51

(QARQLLSGIVQQQNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAVERYLKDQ (SEQ ID NO:4); N51-2B

(QIRELISKIVEQINNILRAIEAQQHALQLTVWGIKQLQARILAVERYLKDQ (SEQ ID NO:8) 或 N51-3B

(QARQLLSGIVQQQNLLRAIEAQQHALQLTVWGIKQLQARILAVERYLKDQ (SEQ ID NO:9)。在特定实施方案中, N- 肽由 N51

(QARQLLSGIVQQQNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAVERYLKDQ (SEQ ID NO:4) 组成。

[0012] 在某些实施方案中, N- 肽可以包含相同或不同氨基酸序列。在特定实施方案中, N- 肽由相同氨基酸序列组成。

[0013] 在某些实施方案中, 一个或多个 N- 肽是嵌合 N- 肽, 其包含:

- a) 包含能够形成三聚卷曲螺旋的可溶性  $\alpha$ -螺旋区域的支架部分; 和
- b) 包含 HIV gp41 NH<sub>2</sub>- 末端七肽重复区域的全部或部分的 N- 肽部分, 其中支架部分在螺旋相中与 N- 肽部分融合, 形成  $\alpha$  螺旋结构域, 并且其中三个 N- 肽

彼此相互作用以形成三聚卷曲螺旋。在这个实施方案的某些方面,嵌合 N- 肽的 N- 肽部分在螺旋相中与嵌合 N- 肽的支架部分的 COOH 末端融合。在这个实施方案的特定方面,所述嵌合 N- 肽的支架部分包含:

a) S u z u k i - I Z 卷 曲 螺 旋 基 序  
(YGGIEKKIEAIEKKIEAIEKKIEAIEKKIEA (SEQ ID NO:31);

b) IZ 卷曲螺旋基序 (IKKEIEAIKKEQEAIKKKIEAIEK (SEQ ID NO:34); 或

c) EZ 卷曲螺旋基序 (IEKKIEEIEKKIEEIEKKIEEIEK (SEQ ID NO:37)。

[0014] 本发明还涉及 gp41 肽模拟物,其为:

a) KTA(N51)<sub>3</sub>;

b) KTA(N51-2B)<sub>3</sub>;

c) KTA(N51-3B)<sub>3</sub>;

d) chA(N51)<sub>3</sub>;

e) (CCIZN51)<sub>3</sub> 或

f) SZN51。

[0015] 在特定实施方案中,所述 gp41 肽模拟物是 KTA(N51)<sub>3</sub>。

[0016] 本发明还涉及包含本发明的 gp41 肽模拟物和药学可接受的载体的免疫原性组合物。

[0017] 本发明还涉及在哺乳动物宿主中引发免疫应答的方法,其包括将预防有效量的本发明的免疫原性组合物引入所述哺乳动物宿主内。在某些实施方案中,哺乳动物宿主是人。

[0018] 附图简述

图 1A-B。HIV-1 gp41 肽模拟物的图解表示:A) 示意性结构,其中两亲卷曲螺旋式的螺旋 HIV-1 N- 肽和 SZ 或 IZ 三聚结构域描述为不同阴影的圆柱体。描述了多种化学支架核心的结构;B) 化学结构,描述了基于 CCIZ、KTA 和胆酸支架的三聚策略并显示了肽序列的连接。

[0019] 图 2。对于在豚鼠研究 HIV-350 和 HIV-365 中的动物个体的中和抗体滴度。测定是使用病毒毒株 V570A 测试的 p4/2R5。结果对于取血前 (T=0) 显示为空心圆圈并且对于剂量 3 后取血 (T= 11 周) 显示为实心圆圈。组几何平均值由横杠指示。测定的定量极限由虚线显示。

[0020] 图 3。对于 NHP 研究 HIV-360,动物个体的 ELISA 应答。箭头指示在 0、4、8 和 34 周时用 (CCIZN36)<sub>3</sub>,以及在 62 和 66 周时用同源或异源抗原进行相应免疫接种后的取血日期。曲线是●, (CCIZN36)<sub>3</sub> 同源的;○, (CCIZN36)<sub>3</sub> / KTA(N51)<sub>3</sub> / 5-螺旋;▲, (CCIZN36)<sub>3</sub> / 5-螺旋 / KTA(N51)<sub>3</sub>。

[0021] 图 4。对于 NHP 研究 HIV-360,动物个体的 DCBA 应答。箭头指示在 0、4、8 和 34 周时用 (CCIZN36)<sub>3</sub>,以及在 62 和 66 周时用同源或异源抗原进行相应免疫接种后的取血日期。曲线是●, (CCIZN36)<sub>3</sub> 同源的;○, (CCIZN36)<sub>3</sub> / KTA(N51)<sub>3</sub> / 5-螺旋;▲, (CCIZN36)<sub>3</sub> / 5-螺旋 / KTA(N51)<sub>3</sub>。测定的定量极限由虚线显示。

[0022] 图 5A-B。对于 NHP 研究 HIV-360 中的动物个体的中和抗体滴度。结果显示对于

在最后一次免疫接种后两周 (T=68 周) 收集的的血样, 通过中和测定和病毒测试的结果。小图 A, 使用病毒 V570A 和 HXB2 的 P4/2R5 测定。小图 B, 使用病毒 9020. A13 和 SC22. 3C2 的 A3R5 测定。组几何平均值由实心横杠指示。测定的定量极限由虚线显示。括号指示通过 Tukey 检验在组间的显著性。为了简化轴标记, 免疫原缩写为 "N36", (CCIZN36)<sub>3</sub>; "N51", KTA(N51)<sub>3</sub>; 和 "5H", 5-螺旋。

[0023] 图 6。对于 NHP 研究 HIV-360 中的动物个体的中和抗体宽度。结果对于在最后一次免疫接种后两周 (T=68 周) 收集的的血样, 按动物个体和组显示。所有结果均来自 A3R5 测定。测定的定量极限由虚线显示。病毒进化枝和层 (Tier) 名称在图例中指示。为了简化轴标记, 免疫原缩写为 "N36", (CCIZN36)<sub>3</sub>; "N51", KTA(N51)<sub>3</sub>; 和 "5H", 5-螺旋。

[0024] 图 7A-B。按照在 NHP 研究 HIV-360 中的研究期, 对于动物个体的比较中和抗体滴度。对于研究分部 (arms) 的 1 期 (小图 A: 同源的 (CCIZN36)<sub>3</sub> 给药方案) 和 2 期 (小图 B: 异源抗原施用), 结果按动物个体和组显示。所有结果均来自 P4/2R5 测定。在 T=36 或 T=68 周时的组几何平均值由横杠指示。测定的定量极限由虚线显示。小图 A, 直到 1 期结束的中和结果。T=0, 取血前; T=13, 剂量 3 后 5 周; T=36, 剂量 4 后 2 周; 小图 B, 直到 2 期结束的中和结果。T=62, 在同源相对于异源比较起始前收集的的血样; T=68, 最后一次剂量后 2 周。

[0025] 图 8A-B。对于在 NHP 研究 HIV-366 中的最后一次免疫接种后 2 周 (T=38 周) 收集的的血样, 通过 P4/2R5 和 TZM-b1 测定来测定的对于动物个体的中和抗体滴度。结果对于动物个体, 按组显示。所有结果均使用病毒 V570A\_HXB2 病毒测量, 在小图 A 中为 P4/2R5 测定, 或在图 B 中为 TZM-b1 测定。组几何平均值由实心横杠指示。测定的定量极限由虚线显示。括号指示通过 Tukey 检验在组间的显著性。为了简化轴标记, 免疫原缩写为 "N36", (CCIZN36)<sub>3</sub>; "N51", KTA(N51)<sub>3</sub>; 和 "5H", 5-螺旋。

[0026] 图 9A-B。通过 A3R5 测定来测定的对于动物个体的中和抗体滴度。小图 A, 针对病毒 Ce0393 测试的在最后一次免疫接种后 2 周 (T=38 周) 收集的的血样。小图 B, 针对病毒 MW965 测试的在第三次剂量免疫接种后 2 周 (T=26 周) 收集的的血样。组几何平均值由实心横杠指示。测定的定量极限由虚线显示。括号指示通过 Tukey 检验在组间的显著性。为了简化轴标记, 免疫原缩写为 "N36", (CCIZN36)<sub>3</sub>; "N51", KTA(N51)<sub>3</sub>; 和 "5H", 5-螺旋。

[0027] 发明详述

在一个方面, 本发明涉及包含借助于支架, 在构象限制为三聚卷曲螺旋的三个 gp41 肽的 gp41 肽模拟物。特别地, 本发明的这个方面涉及包含支架核心的 gp41 肽模拟物, 所述支架核心与三个 N-肽连接, 其中每个 N-肽包括包含 (SGIVQQQNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARIL (SEQ ID NO:1) 或其修饰形式的 N-肽部分, 其中三个 N-肽彼此相互作用, 以形成模拟 HIV gp41 的前发夹构象的三聚卷曲螺旋。

[0028] 在另一个方面, 本发明涉及具有整个 HIV gp41 NH<sub>2</sub>-末端七肽重复区域, 即 N51

(QARQLLSGIVQQQNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAVERYLKDQ (SEQ

ID NO:4)) 或其修饰形式, 并且能够形成 gp41 肽模拟物的 N-肽, 以及由其形成的 gp41 肽模拟物。

[0029] 本发明部分基于本申请人的下述观察: 如实施例中所举例说明的, 在啮齿类、豚鼠和

非人灵长类免疫原性研究中,构象受限的 KTA(N51)<sub>3</sub> 在引发针对一组病毒分离物的中和抗体应答中优于重组 5 螺旋肽和 (CCIZN36)<sub>3</sub>。

[0030] 虽然不希望受任何理论束缚,认为本发明指导在接种疫苗的哺乳动物中的免疫应答,以集中于高度保守的 gp41 前发夹构象中间物,其含有特异性 D5 表位中和组分。这通过使用支架核心在构象上限制 gp41 肽模拟物来实现,以稳定三聚卷曲螺旋中的中和表位的呈现。在一些实施方案中,这些构象上稳定、可溶性 gp41 肽模拟物潜在提供了不同于 D5 表位的另外中和表位。

[0031] 如本文使用的,“嵌合 N 肽”或“嵌合肽”定义为这样的肽,所述肽包含融合至能够获得三聚卷曲螺旋构象的  $\alpha$  螺旋支架蛋白质的, gp41 的 NH<sub>2</sub> 末端七肽重复结构域 (NHR) 的全部或部分(一般至少 N17 或 N36),或其修饰形式。支架蛋白质是非 HIV 序列。

[0032] 如本文使用的,术语“表位”涉及能够与抗体特异性结合的蛋白质决定簇。众所周知表位通常由化学活性的分子表面分组例如氨基酸或糖侧链组成,并且通常具有特异性三维结构特征,以及比电荷特征。构象和非构象表位区别在于前者而不是后者的结合在变性溶剂的存在下丧失。

[0033] 如本文使用的,在提及 N 肽构建体中的“异源的”意指在下述中不同的 N 肽构建体:(1) gp41 序列(长度和/或修饰),或(2) 任何支架结构域(例如 IZ、EZ、SZ) 的同一性或长度。

[0034] 如本文使用的,“HIV”意欲表示 HIV-1、HIV-2 或 HIV-1 和/或 HIV-2。

[0035] 如本文使用的,“N 肽”定义为这样的肽,其包含 gp41 的 NH<sub>2</sub> 末端七肽重复结构域 (NHR) 的全部或部分(一般至少 N17 或 N36),或其修饰形式,并且能够单独或通过使用支架结构域而获得三聚卷曲螺旋构象。

[0036] 如本文使用的,“中和”如本领域中用于指示抗体在体外基于细胞/病毒的测定例如实施例 1 和 2 中所述的那些中阻止或减少病毒感染的能力。中和活性可以定量测量为关于该特异性抗体的 IC<sub>50</sub> 值。“中和抗体”或“HIV 中和抗体”在领域公认的传染性测定中显示中和至少一种 HIV 分离物。

[0037] 如本文使用的,“支架核心”涉及如本文公开和/或描述的化学结构,其为具有至少三个部分的环状或线性化学化合物,所述部分各自可以直接或通过接头连接至 gp41 N 肽。

[0038] 本发明的 gp41 肽模拟物模拟在有包膜病毒膜融合蛋白的促融合构象内含有的内部、三聚卷曲螺旋基序,特别是 HIV gp41 胞外域的内部卷曲螺旋结构域。这些模拟物包含三个 N 肽,其可以是嵌合 N 肽,其一起形成 gp41 融合前中间物的三聚卷曲螺旋特征。在一些实施方案中, N 肽是嵌合 N 肽,其包含在螺旋相位中融合至 HIV gp41 的 N 螺旋的全部或部分的非 HIV、可溶性、三聚形式的卷曲螺旋,或其修饰形式。在本发明的某些方面,三个 N 肽通过使用支架核心在同源三聚或异源三聚卷曲螺旋结构中共价稳定,所述支架核心构象限制 N 肽。

[0039] 在某些实施方案中, N 肽包含 HIV gp41 NH<sub>2</sub> 末端七肽重复结构域的全部或部分,或其修饰形式。N 肽可以包含例如 N17、N36、N38、N44 或 N51。在其他实施方案中, N 肽是嵌合肽,其包含:1) 包含能够形成三聚卷曲螺旋的可溶性  $\alpha$  螺旋区域的支架部分;和 2) 包含 HIV gp41 NH<sub>2</sub> 末端七肽重复区域(例如 N17、N36 或 N51) 的全部或部分的 N 肽部分,和任选的,3) 包含至少两个半胱氨酸残基的半胱氨酸部分,其中支架部分在螺旋相位中融合

至 N 肽部分,形成  $\alpha$  螺旋结构域,并且所述半胱氨酸部分(如果存在的话)位于在  $\text{NH}_2$  或  $\text{COOH}$  末端的所述  $\alpha$  螺旋结构域的外部。半胱氨酸部分的存在帮助使嵌合肽共价限制为三聚形式。这些 N 肽的共价稳定允许呈现 HIV gp41 的中心、三聚、N 螺旋式卷曲螺旋的稳定、暴露部分。

[0040] gp41 肽模拟物包含 N 肽,所述 N 肽包含衍生自 HIV-1 gp41 的 N 七肽重复区域的全部或部分。HIV-1 gp41 胞外域代表大约 169 个氨基酸残基,如根据其在参考毒株 HXB2 的 HIV-1 gp160 包膜蛋白质中的位置编号的残基 512-681。在该胞外域中的是定位邻近预期为形成  $\alpha$  螺旋的胞外域的  $\text{NH}_2$  末端部分的 4-3 七肽重复区域。该 N 七肽重复分别定位在大约 gp160 的氨基酸位置 541-592(参见例如 Caffrey 等人,1998, *EMBO J.* 17:4572-4584)。

[0041] 本发明的所述肽模拟物的 N 肽结构域包含足够量的 gp41 的 N 螺旋区域,以与由糖蛋白的 C 螺旋结构域形成的  $\alpha$  螺旋结合。通常,来自 N 螺旋结构域的 17 个或更多个、或者 36 个或更多个氨基酸残基,直到并包括所述结构域的所有 51 个残基,可以包含 N 肽的 HIV gp41 组分。可以使用在 N 肽区域内的任何序列,只要它呈现表位。然而,短于约 36、40、45 或 50 个氨基酸的序列可能需要提供支架结构域的另外肽序列,所述支架结构域将在下文更详细地讨论。

[0042] 在本发明的一个实施方案中,如本文描述的 N 肽包含位于 HIV-1 gp41 的 NHR 的  $\text{COOH}$  末端一半处的至少 36 个氨基酸,对应于 gp160 序列的残基 546 至 581 (SGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARIL (下文被称为“N36”; SEQ ID NO:1)。在某些实施方案中,N 肽包含下述、基本上由下述组成或由下述组成:gp41 残基 546 至 583 (SGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAG (下文被称为“N38”;SEQ ID NO:2))。在某些实施方案中,N 肽包含下述、基本上由下述组成或由下述组成:具有在  $\text{NH}_2$  末端处添加的六个氨基酸的 gp41 残基 546 至 583 (RGRGRGSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAG (下文被称为“N44”; SEQ ID NO:3))。在某些实施方案中,N 肽包含下述、基本上由下述组成或由下述组成:gp41 残基 540 至 590 (QARQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAVERYLKDQ (下文被称为“N51”;SEQ ID NO:4))。此类肽包含 HIV-1 gp41 N 七肽重复区域和 N 末端极性结构域的部分。在这些实施方案中,N 肽设计为允许在共价稳定的构象受限三聚体的背景下呈现全长 NHR。另外的 N 肽可以包括在 N36 和 N51 之间的任何序列。说明书自始至终提及 HIV gp160 序列的所有编号均基于 HIV-1 分离物 HXB2。

[0043] 在其他实施方案中,N 肽可以包含衍生自 gp41 蛋白质内的 NHR 直接上游或直接下游的序列的另外 HIV 序列。例如,嵌合肽可以包含 gp41 残基 528 至 590(下文被称为“N63”

STMGAASMTLTVQARQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAV  
ERYLKDQ (SEQ ID NO:5)。

[0044] N 肽还可以是野生型 HIV N 螺旋七肽结构域的修饰形式,条件是所得到的肽是如本文描述的哺乳动物细胞的 HIV 感染的抑制剂,和 / 或能够生成靶向融合中间物的构象表位的中和抗体。具有在天然 NHR 中制备的修饰的 N 肽必须维持 HIV N 肽结构域在三聚能力和表面结构。例如,非中和、免疫优势区域(即最容易由免疫系统识别并因此最影响诱导抗体的特异性的抗原决定簇亚基)可以存在于用于生成 N 肽的 N 肽序列内。NHR(N36 或 N51,

如适用的)的修饰形式可以具有从来自 HIV 毒株 HXB2 的天然 gp160 序列的 1 个氨基酸变化、直到两个氨基酸变化、直到三个氨基酸变化、直到四个氨基酸变化、直到五个氨基酸变化、直到六个氨基酸变化、直到七个氨基酸变化或直到八个氨基酸变化。修饰可以包括氨基酸插入、缺失和 / 或取代。尽管一般地,为了维持适当定位,修饰是取代。

[0045] NHR 的丙氨酸扫描已鉴定免疫优势区域。该免疫优势区域生成非中和抗体,位于极端 COOH 末端部分中。氨基酸残基精氨酸 579 (R579) 看起来对于非中和单克隆抗体结合是关键;并且残基谷氨酰胺 577 (Q577) 和亮氨酸 581 (L581) 也参与结合,但取决于测试的单克隆而显示可变贡献。涉及小鼠单克隆抗体结合的这些残基在分子底部处形成环,其可能代表在 NHR 中的免疫优势表位。有趣的是,内衬在三聚、N 螺旋式卷曲螺旋的疏水口袋的氨基酸残基位于该假定免疫优势表位的进一步 NH<sub>2</sub> 末端。疏水口袋已鉴定为包含与新近鉴定的 HIV 中和抗体 D5 IgG 结合的结构域;因此,疏水口袋被认为含有假定的中和构象表位(参见美国专利号 7,744,887)。因此,用于生成 N 肽的 N 肽结构域可以在使所述鉴定的非中和免疫优势结构域的抗原应答降到最低的尝试中进行修饰或缩短,使免疫应答借助于疏水口袋内的假定中和表位。例如,在 N36 或 N51 的修饰形式,N36 的极端 COOH 末端部分可以在下述残基中的任何一个或多个处突变:亮氨酸 581 (L581)、精氨酸 579 (R579)、谷氨酰胺 577 (Q577) 和 / 或谷氨酰胺 575 (Q575)。优选每个残基突变为丙氨酸 (A) 氨基酸,因为丙氨酸可以参与  $\alpha$  螺旋形成,并且因此将不破坏肽的卷曲螺旋结构。另外,丙氨酸具有小侧链,并且因此将显示对于抗体最小的可能结合表面。甘氨酸或脯氨酸残基没有侧链并且可以视为用于这些突变的更佳选择;然而,所述氨基酸已知破坏  $\alpha$  螺旋构象。在本发明的一个实施方案中,N 肽包含在所有四个所述残基 (L581A、R579A、Q577A 和 Q575A) 处突变的序列,形成具有下述序列的指定为“N17A1a4”的 N 肽结构域:LLQLTVWGIKALAAAIA (SEQ ID NO:6)。突变的氨基酸是是有下划线的。

[0046] N 肽的 N 肽部分也可以进行修饰,以进一步使整体肽稳定。例如,N 肽结构域可以进行修饰,以将更稳定的异亮氨酸残基掺入序列内。因此,例如,在本发明的一个实施方案中,N 肽可以在“a”和“d”塞入位置处突变,以如下掺入所述异亮氨酸残基:LIQLIHWGIKQIQARIL (SEQ ID NO:7;指定“N17I1e”;突变的残基是是有下划线的)。

[0047] 其他修饰可以在 N 肽序列中作出,以便寻求在三聚体稳定和 / 或疏水口袋呈现和 / 或 D5 表位方面的优点。

[0048] 已制备 N51 序列的修饰形式,以增加所得到的三聚体的稳定性和 / 或减少聚集倾向。此类肽的例子包括 N51-2B 和 N51-3B。N51-2B 具有下述序列:

QIRELISKIVEQINNILRAIEAQQHALQLTVWGIKQLQARILAVERYLKDQ (SEQ ID NO:8)。N51-3B 具有下述序列:

QARQLLSGIVQQNNLLRAIEAQQHALQLTVWGIKQLQARILAVERYLKDQ (SEQ ID NO:9)。

[0049] N51 修饰形式的其他例子包括表 1 中的肽。

表1: N51修饰形式

N51m1	<u>N</u> IRQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAVERYLK <u>DQ</u>	10
N51m2	QARQL <u>I</u> SGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAVERYLK <u>DQ</u>	11
N51m3	Q <u>I</u> RQL <u>I</u> SGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAVERYLK <u>DQ</u>	12
N51m4	QARQLLS <u>A</u> IVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAVERYLK <u>DQ</u>	13
N51m5	Q <u>I</u> RQL <u>I</u> S <u>A</u> IVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAVERYLK <u>DQ</u>	14
N51m6	QARQLLSGIVQQ <u>I</u> NNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAVERYLK <u>DQ</u>	15
N51m7	<u>N</u> IRQL <u>I</u> S <u>A</u> IVQQ <u>I</u> NNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAVERYLK <u>DQ</u>	16
N51m8	QARQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQL <u>V</u> VWGIKQLQARILAVERYLK <u>DQ</u>	17
N51m9	QARQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQL <u>I</u> VW <u>G</u> VKQLQARILAVERYLK <u>DQ</u>	18
N51m10	QARQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQ <u>I</u> QARILAVERYLK <u>DQ</u>	19
N51m11	QARQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARIL <u>A</u> I <u>E</u> R <u>I</u> Y <u>I</u> K <u>D</u> <u>I</u>	20
N51m12	QARQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAVERYLK <u>D</u> <u>I</u>	21
N51m13	QARQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQL <u>I</u> VW <u>G</u> VKQ <u>I</u> QARIL <u>A</u> I <u>E</u> R <u>I</u> Y <u>I</u> K <u>D</u> <u>I</u>	22
N51m14	QARQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQL <u>V</u> VW <u>G</u> NKQLQAR <u>V</u> LAVERYLK <u>DQ</u>	23
N51m15	Q <u>I</u> RQL <u>I</u> SGIVQQ <u>I</u> NN <u>I</u> LRAIEAQQHLLQL <u>I</u> VWGIKQ <u>I</u> QARIL <u>A</u> I <u>E</u> R <u>I</u> Y <u>I</u> K <u>D</u> <u>I</u>	24

[0050] 应当理解如 N51 序列中例示的这些相同修饰同样可以应用于更短序列。

[0051] 因此,适用于本发明组合物的特异性修饰包括在下述位置(全部指 HXB2 中的位置)处的取代: Q540, A541, Q543, L545, G547, Q550, Q552, L555, L565, T569, I573, L576, I580,

V583, L587 或 Q590。特异性修饰包括下述取代: Q540N,

A541I, Q543E, L545I, G547A, G547K, Q550E, Q552I, L555I, L565A, L566I, T569V,

T569I, I573V, I573N, Q575A, L576I, Q577A, R579A, I580V, L581A, V583I, L587I 或

Q590I。

[0052] 用于生成 N 肽的 HIV gp41 的 N 螺旋部分可以从 HIV-1、HIV-2、另一种 HIV 毒株或来自另一个慢病毒物种(例如猿猴免疫缺陷病毒(SIV)、猫免疫缺陷病毒(FIV)或绵羊髓鞘脱落病毒)的毒株中分离。在相似的 HIV 毒株和/或其他物种的免疫缺陷病毒中的相应 N 肽序列可以容易地鉴定并且是本领域已知的。另外,  $\alpha$  螺旋、卷曲螺旋结构域已在其他有包膜病毒的膜融合蛋白质中鉴定(参见 Singh 等人, 1999, J Mol Biol. 290:1031-41)。

[0053] 此外,对于本文描述的肽序列中的每一种, N 肽结构域可以延长一至十二个氨基酸,其不是 gp41 序列的部分。例如, Weissenhom 等人(1997, Nature 387:426-430)使 N36 肽在 NH<sub>2</sub> 末端处延长五个氨基酸,并且在 N36 肽序列的 COOH 末端处延长七个氨基酸残基:

ARQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAVERYLK (SEQ ID

NO:25)。因此, N 肽可以进一步包含位于 N36 肽结构域的全部或 COOH 末端部分的 COOH 末端的七个另外氨基酸的全部或部分,具体地 AVERYLK (SEQ ID NO:26)。因此,在一个实

施方案中, N 肽包含指定为

(LLQLTVWGIKQLQARILAVERYLK (SEQ ID NO:27)), “N23+7”

(IEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAVERYLK (SEQ ID NO:28)), 或 “N36+7”

(SGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAVERYLK (SEQ ID NO:29))

的 N 肽结构域。另外, N 肽可以包含 N36 肽序列的全部或 NH<sub>2</sub> 末端部分加上位于所述 N 肽的 NH<sub>2</sub> 末端处的另外五个氨基酸, 使 N 肽区域进一步延长到 NH<sub>2</sub> 末端区域内。因此, N 肽可以进一步包含位于 N36 肽的 NH<sub>2</sub> 末端处的五个氨基酸的全部或部分, 具体地 ASQLL (SEQ ID NO:30)。

[0054] 在某些实施方案中, 可能需要基于肽的支架结构域, 以维持 N 肽区域的构象。支架结构域是非 HIV 氨基酸序列, 因此所得到的 N 肽是嵌合 N 肽。支架结构域包含能够形成三聚卷曲螺旋的可溶性  $\alpha$  螺旋结构域, 并且在螺旋相位中融合至 N 肽, 产生连续卷曲螺旋。

[0055] 卷曲螺旋是由在彼此周围由超螺旋扭曲包裹的两个或更多个  $\alpha$  螺旋组成的蛋白质结构基序。氨基酸残基的相似模式决定卷曲螺旋的折叠, 由通过字母“a”直到“g”指定的氨基酸的特征性七肽重复组成。已测定七肽重复的第一个和第四个位置, 分别为“a”和“d”位置, 形成卷曲螺旋的相互作用链的内部并且一般为疏水的。包含在嵌合 N 肽内的支架结构域形成在本发明的 gp41 肽模拟物内的三聚卷曲螺旋结构, 以便模拟通过三个 gp41 胞外域的 N 螺旋形成的前发夹和发夹三聚体结构中存在的内部三聚卷曲螺旋。

[0056] 在本发明的一个实施方案中, 支架结构域融合至 N 肽区域的 NH<sub>2</sub> 末端。在另一个实施方案中, 支架结构域融合至 N 肽区域的 COOH 末端。在再进一步的实施方案中, 支架结构域可以这样分开, 从而使得所述结构域的部分位于 N 肽区域的 NH<sub>2</sub> 和 COOH 末端处。

[0057] 可以使用已知三聚化以使 gp41 三聚体稳定的任何卷曲螺旋基序。卷曲螺旋基序可以选自多个来源。在本文描述的嵌合 N 肽内的支架结构域特别包括公开于 Suzuki 等人中的异亮氨酸拉链基序 (1998, *Protein Eng.* 11: 1051-1055; 下文“Suzuki-IZ”) 和公开于 Eckert 等人中的 GCN4-pI<sub>Q</sub>I 卷曲螺旋基序 (1998, *J. Mol. Biol.* 284:859-865 和国际专利申请公开号 W002/024735) 及其截短和 / 或修饰形式。

[0058] Suzuki-IZ 卷曲螺旋基序具有下述氨基酸序列:  
YGGIEKKIEAIEKKIEAIEKKIEAIEKKIEA (SEQ ID NO:31)。包含 Suzuki-IZ 基序  
([(IEKKIEA)<sub>n</sub>; (SEQ ID NO:32)]<sub>n</sub>) 的七肽重复的“a”位置是有下划线的。

[0059] GCN4-pI<sub>Q</sub>I 卷曲螺旋基序具有下述氨基酸序列:  
RMKQIEDKIEEILSKQYHIENEJARIKKLIGER (SEQ ID NO:33)。该螺旋基序的“a”位置也是  
有下划线的。

[0060] IZ 结构域 (IKKEIEAIKKEOEAIKKKIEAIEK (SEQ ID NO:34)) 是基于由 Suzuki 等人 (1998, *Protein Eng.* 11: 1051-1055) 描述的设计的修饰异亮氨酸赖氨酸, 其在溶液中是螺旋和三聚的。

[0061] Suzuki-IZ、GCN4-pI<sub>Q</sub>I 及其他支架结构域可以通过一个或多个氨基酸残基的添加、取代、修饰和 / 或缺失而改变。“Suzuki-IZ 样”和“GCN4-pI<sub>Q</sub>I 样”支架结构域在本文中定义为卷曲螺旋基序, 其分别包含“Suzuki-IZ”或“GCN4-pI<sub>Q</sub>I”卷曲螺旋的部分, 或者所述

各自卷曲螺旋的全部或部分的修饰形式。Suzuki-IZ 样和 GCN4-pI<sub>Q</sub>I 样支架结构域分别必须由 Suzuki-IZ 和 GCN4-pI<sub>Q</sub>I 三聚卷曲螺旋结构域或其修饰形式的足够部分（即足够长度）组成，从而使得它们形成可溶性、三聚（螺旋式）卷曲螺旋。对于支架结构域的氨基酸序列中的变化的耐受将取决于改变的氨基酸是否发挥结构和 / 或功能作用。因此，本文使用的突变或修饰的支架蛋白质必须保留形成三聚卷曲螺旋的能力。另外，本发明的 gp41 肽模拟物包含三个 N 肽，其中至少一个由突变 / 修饰的支架结构域生成，必须保留以例如至少低纳摩尔浓度范围例如 1-5 nM 中的效力抑制 HIV 传染性的能力，或结合识别位于 N 螺旋式卷曲螺旋中的构象表位的 gp41 特异性抗体的能力。支架蛋白质的修饰可以提供几个优点。例如，可以改变本发明的嵌合肽的外部表面，以增强生物利用度（例如增加肽的可溶性）、降低毒性并避免免疫清除。包含可替代支架的本发明的嵌合肽的多重形式的可用性将通过避免预存抗体帮助回避该问题。支架蛋白质还可以在使得嵌合肽的支架结构域更少免疫原性的尝试中，例如通过在其外表面上引入糖基化或聚乙二醇化位点进行修饰。此外，支架结构域可以进行修饰，以促进所述肽模拟物与免疫原性载体或亲和树脂的缀合。

[0062] 上文描述的 IZ 支架基序代表 Suzuki-IZ 卷曲螺旋基序的部分，其已在“e”和“g”位置中显著改变，并且具有在“a”位置处的异亮氨酸至谷氨酰胺（I → Q）取代（参见国际专利申请公开号 W002/024735）。“IZ”支架结构域的氨基酸序列是 IKKEIEAIKKEQEAIK<sub>a</sub>KKIEAIEK (SEQ ID NO:34; “a”位置是有下划线的)，其中 NH<sub>2</sub> 末端是乙酰化的，并且 COOH 末端是酰胺化的。

[0063] 还可以生成 IZ 支架结构域的缩短形式用于掺入肽模拟物内。缩短的 IZ 样结构域的具体例子代表 IZ 支架的 17 个氨基酸：IKKEIEAIKKEQEAIK<sub>a</sub>K (SEQ ID NO:35; 指定为“IZ17”；“a”位置是有下划线的)。

[0064] 当生成具有更长 HIV 序列区段的可替代肽模拟物时，为了维持适当螺旋结构，该“IZ”支架可能需要延长一至几个氨基酸，生成“IZ 样”支架结构域。例如，IZN23 和 IZN36 是还公开于 Eckert 等人，2001, *Proc Natl Acad Sci USA* 98:11187-11192 中的嵌合 N 肽。IZN36 的氨基酸序列分别为 IKKE

IEAIKKE QEAIK<sub>a</sub>KK IEAIEKE ISGIVQQ QNNLLRA IEAQQHL LQLTVWG IKQLQAR

IL (SEQ ID NO:36)。肽的“a”位置是有下划线的。例如，IZN36 的 IZ 样支架结构域可以延长一个或优选两个氨基酸。这可能是维持适当的“a”直到“g”间隔所需的，并且因此促进 α 螺旋构象的生成。选择为以这种方式延迟支架结构域的氨基酸应允许邻近螺旋之间的静电作用（参见 Suzuki 等人，1998, *Protein Eng.* 11: 1051-1055）。当生成待稳定的嵌合 N 肽时，本领域技术人员应当理解支架结构域可能需要最低限度改变，如对于 IZN36 可见的，以便维持所得到的肽的螺旋构象。可以对于其他支架作出类似改变。

[0065] 在另一个实施方案中，支架结构域包含修饰的 Suzuki-IZ 样结构域，指定为“EZ”支架，具有下述氨基酸序列：IKK IEEIEKK IEEIEKK IEEIEK (SEQ ID NO:37; “a”位置是有下划线的)。

[0066] 在另一个实施方案中，细菌噬菌体 T4 纤维蛋白 (fibritin) 三聚 (FT) 序列 YIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL (SEQ ID NO: 38) 的 26 氨基酸三聚基序用作支架结

构域。基于纤维蛋白的类似基序是本领域已知的。

[0067] 优选的嵌合 N 肽的一个例子是 SZN51

**IEKKIEAIEKKIEAIEKKIEAIEKKIEQARQLLSGIVQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWG  
IKQLQARILAVERYLKDQ (SEQ ID NO:39)。**

[0068] 如上所述,肽模拟物的支架结构域的氨基酸序列可以进行修饰和 / 或缩短;然而,在这样做时,所得到的嵌合肽必须保留形成三聚卷曲螺旋的能力,代表 gp41 的内部 N 螺旋式卷曲螺旋的稳定、可靠模拟物。

[0069] 在某些实施方案中,嵌合 N 肽是共价稳定的。肽模拟物可以包含在螺旋相位中融合至支架结构域的 N 肽,其中所述肽序列任选进一步包含位于 NH<sub>2</sub> 或 COOH 末端处,并且优选在嵌合肽的核心螺旋区域的外部的至少两个半胱氨酸残基。这些肽被称为 CC 嵌合 N 肽。在此类实施方案中,三个相同或基本上相似的含半胱氨酸嵌合肽随后经由分子间二硫键在同源三聚或异源三聚分子中共价稳定,所述分子间二硫键在氧化条件下在紧密结合的嵌合肽链上的并列半胱氨酸残基之间形成。通过使预形成的三聚卷曲螺旋暴露于氧化环境,或通过氧化条件下促进个别肽链结合成卷曲螺旋构象,形成共价稳定的同源三聚或异源三聚卷曲螺旋。添加的半胱氨酸残基位于嵌合肽的  $\alpha$  螺旋结构域的外部,确保高构象自由,并且任选通过接头或间隔区与核心、嵌合肽序列分开。参见美国专利号 7,811,577。

[0070] 本文描述的 CC 嵌合 N 肽中存在的半胱氨酸残基是连续氨基酸残基。因此,本文描述的 CC 嵌合 N 肽可以包含位于肽的 NH<sub>2</sub> 或 COOH 末端处,在嵌合肽的核心  $\alpha$  螺旋结构域的外部,并且任选通过接头 / 间隔区与核心  $\alpha$  螺旋结构域分开的至少两个连续半胱氨酸残基。本文描述的 CC 嵌合 N 肽还可以包含在肽的 NH<sub>2</sub> 或 COOH 末端处,在嵌合肽的核心  $\alpha$  螺旋结构域的外部,并且任选通过接头 / 间隔区与核心  $\alpha$  螺旋结构域分开的确切的至少两个连续半胱氨酸残基。本领域技术人员还可以设想本文描述的半胱氨酸残基不一定必须是连续残基,并且因此它能够包括在所述半胱氨酸残基之间的最低限度数目的氨基酸残基。然而,重要的是半胱氨酸残基不相隔足够远,以便允许相同多肽链上的半胱氨酸残基之间的分子内二硫键生成,使得它们不能在三聚卷曲螺旋构象中在个别 CC 嵌合 N 肽之间形成分子间二硫键。

[0071] 两个连续半胱氨酸残基参与与在肽氧化后形成的紧密结合的 CC 嵌合 N 肽上的并列半胱氨酸残基的二硫键连接。在实施方案中,当存在两个连续甘氨酸残基时,甘氨酸残基代表间隔区,使半胱氨酸残基与核心嵌合肽序列的  $\alpha$  螺旋结构域分开。甘氨酸间隔区确保半胱氨酸残基不卷入核心肽序列的螺旋二级结构中,帮助释放所述半胱氨酸以参与二硫键。个别蛋白质之间(即分子间)或单条多肽链内(即分子内)的共价交联可以通过半胱氨酸残基的氧化形成。二硫键通过半胱氨酸残基中的硫醇(-SH)基团的氧化形成。分子内二硫键使蛋白质的三级结构稳定,而分子间发生的那些涉及使涉及一种或多种多肽的蛋白质结构稳定。个别肽 / 蛋白质之间的共价交联还可以通过化学选择性反应(例如硫醚键的形成)形成,所述化学选择性反应通过将独特的相互反应基团掺入待共价连接的所述肽 / 蛋白质(每个区段内待连接的一个)内施加(Lemieux G. A. 和 Bertozzi C. R.,1998, *Trends Biotechnol.* 16:506-513;以及 Borgia, J. A. 和 Fields G. B.,2000, *Trends Biotechnol.* 15:243-251 中综述)。加入嵌合肽的核心  $\alpha$  螺旋结构域的半胱氨酸残基在氧化后产生二硫键,使通过三个相同的 CC 嵌合 N 肽形成的三聚结构共价稳定。

[0072] 本文描述的半胱氨酸残基可以加入核心嵌合 N 肽的 NH<sub>2</sub> 末端或 COOH 末端,以生成 CC 嵌合 N 肽。例如,两个半胱氨酸残基可以改造为占据在 CC 嵌合 N 肽的 NH<sub>2</sub> 末端处的前两个氨基酸残基,其中支架卷曲螺旋结构域位于嵌合肽的 NH<sub>2</sub> 末端一半中。该排列确保两个改造的半胱氨酸残基最不可能干扰嵌合肽的 N 肽部分的  $\alpha$  螺旋结构和 / 或所述 HIV 结构域的功能性,例如与 C 螺旋相互作用。可替代地,两个半胱氨酸氨基酸残基可以改造为占据在 CC 嵌合 N 肽的 COOH 末端处的最后两个氨基酸残基,其中支架;卷曲螺旋结构域位于嵌合肽的 NH<sub>2</sub> 末端一半中。如果由于定位邻近支架结构域的 Cys-Cys 序列的存在,经由嵌合肽的非 HIV 支架部分难以使 CC 嵌合 N 肽与免疫原性载体或亲和树脂缀合,则这可能是必要的。两个半胱氨酸残基还可以改造为占据在 CC 嵌合 N 肽的 NH<sub>2</sub> 末端处的前两个氨基酸残基,其中 N 肽结构域位于嵌合肽的 NH<sub>2</sub> 末端一半中。两个半胱氨酸残基可以改造为占据在 CC 嵌合 N 肽的 COOH 末端处的最后两个氨基酸残基,其中 N 肽结构域位于嵌合肽的 NH<sub>2</sub> 末端一半中。交换 N 肽和支架结构域的定向可以影响所得到的 CC 嵌合 N 肽抑制病毒宿主细胞膜融合的能力。

[0073] 优选的 CC 嵌合 N 肽是 CC1ZN51:

**CCGGIKKEIEAIKKEQEAIKKKIEAIEKEIVQARQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQHLLQ**  
**LTVWGIKQLQARILAVERYLKDQ (SEQ ID NO:40)。**

[0074] 在可替代实施方案中,稳定通过将亲电子部分掺入核心嵌合肽的任一末端而发生,分别用于参与使所述肽之间的二硫键和 / 或硫醚键稳定。所述亲电子部分任选通过接头或间隔区与嵌合肽的  $\alpha$  螺旋结构域分开。因此,所述结构可以通过三聚化和单个 CC 嵌合 N 肽与各自具有亲电子部分的两个衍生的嵌合 N 肽的共价稳定来获得,其中硫醚键在 CC 嵌合 N 肽的改造的半胱氨酸残基中存在的每个硫醇反应官能团和每个衍生的嵌合 N 肽的亲电子部分(例如烷基卤化物部分或 Michael 受体)之间形成。在嵌合肽之间的二硫键或化学选择性共价键连接确保肽单体(即,同源三聚或异源三聚卷曲螺旋结构的单一、嵌合肽亚基)即使在极低浓度下也不解离。

[0075] 在某些实施方案中,稳定通过掺入功能性而发生,所述功能性能够介导核心嵌合肽的任一末端的“点击(click)”化学偶联,用于参与稳定所述肽之间的共价键。所述“点击”部分任选通过接头或间隔区与嵌合肽的  $\alpha$  螺旋结构域分开。在此类实施方案中,稳定的三聚体可以通过单一 XX- 嵌合 N 肽与两个 Y 衍生的嵌合 N 肽的反应而形成,其中“X”和“Y”代表每个衍生的嵌合 N 肽的“点击”反应的同源部分(例如 Huisgen 1,3 偶极环化加成,其中“X”构成炔部分,并且“Y”构成叠氮化物部分)。嵌合肽之间的化学选择性共价键连接确保肽单体(即,同源三聚体或异源三聚卷曲螺旋结构的单一、嵌合肽亚基)即使在极低浓度下也不解离。

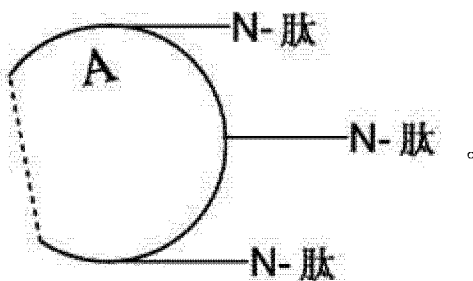
[0076] 可替代策略由 Louis 等人(2001, *J. Biol. Chem.* 276:29485-29489)用于生成在 N 螺旋结构域内的实际残基突变为半胱氨酸残基的 gp41 胞外域的内部、三聚卷曲螺旋,以通过分子间二硫桥稳定。通过使位于 N 螺旋区域内的 gp41 胞外域的残基 576-578 突变为半胱氨酸-半胱氨酸-甘氨酸(Cys-Cys-Gly),在掺入六螺旋束内的半胱氨酸残基之间生成二硫键。所述突变的氨基酸残基之一位于  $\alpha$  螺旋结构域的“d”位置中,已知为七肽重复的两个位置之一,形成卷曲螺旋的相互作用链的内部并且在 HIV-1 进化枝中也是高度保守

的 (Dong 等人, 2001, *Immunol. Lett.* 75:215-220)。

[0077] 使本文描述的 CC 嵌合 N 肽稳定的可替代方法是将半胱氨酸残基加入肽的相对末端。因此, 最初, 如果经由位于所述肽的一个末端处的半胱氨酸残基之间的二硫键稳定的, 由 CC 嵌合 N 肽形成的三聚卷曲螺旋不展示以高效力抑制 HIV 传染性的能力, 或结合识别位于 N 螺旋结构域中的构象表位的抗体的能力, 则本领域技术人员可以生成相似的共价稳定的三聚卷曲螺旋, 其具有稳定位于 CC 嵌合 N 肽的相对末端处的半胱氨酸残基的能力。

[0078] 当经由上文描述的任何方法使本发明的三聚卷曲螺旋稳定时, 重要的是在两个衍生的嵌合 N 肽内掺入的部分位于所述肽的相同末端处。随后可以测定稳定机制的位置是否影响共价稳定的嵌合肽的功能性。如果单体加入其中的末端比肽的相对末端更不稳定, 则使稳定机制移动到相反末端可以具有进一步的稳定影响。通常, 本文描述的嵌合 N 肽的 N 肽部分比肽的支架部分更不稳定。因此, 将稳定单位从肽的支架末端移动到 N 肽末端可以增加所得到的三聚卷曲螺旋的稳定性。

[0079] 模拟 D5 表位的三维结构并且由如本文描述, 通过限制 3 个 N- 肽形成的三聚卷曲螺旋构象而稳定该三维结构。在 CCIZ 方法的可替代策略中, 支架核心用于使 N- 肽偶联和定位, 以便使其以如下方式定位, 即它们自由地自结合, 并伴随三聚卷曲螺旋的形成。因此, 在某些实施方案中, 支架核心不包含两个邻近半胱氨酸残基 (即 CC)。支架核心含有用于 N- 肽的共价连接的最低限度三个位置。所述连接位置维持在与支架核心的其他结构元件的最佳间隔和距离处, 以促进 N- 肽的自结合以形成三聚卷曲螺旋。支架核心作为包含三个或更多个反应基团的线性或环状化合物, 由此肽可以是共价连接的。因此, 如本文使用的, 多价或更具体而言三价肽是包含共价连接至支架核心的三个肽的化合物。支架化的三价肽的一般结构表示为:



[0080] 支架化的肽的具体例子可以是含有半胱氨酸残基的任何 N- 肽, 所述半胱氨酸残基能够与存在于支架上的一个或多个连接点处的溴化物或马来酰亚胺部分反应, 并随后形成共价硫醚键。

[0081] 选择至少三个连接的位置, 从而使得所得到的 gp41 肽模拟物中的 D5 表位构象类似 gp41 中的所述表位的天然构象。本发明的 gp41 肽模拟物受使用的支架类型即它的结构影响, 因为支架的大小和形状将影响肽模拟物的总体结构。基于本文提供的指导, 本领域技术人员充分能够设计其构象紧密类似 gp41 的 D5 表位的天然构象的本发明肽模拟物。支架与 N 肽的连接点优选不位于 D5 表位内, 因为此类连接将破坏表位的构象和 / 或可接近性。例如能够产生在不同位置处具有连接的几种化合物, 并且在实验上测定所述化合物在竞争结合测定 (例如 DCBA) 中结合 D5 和 / 或抑制 D5 结合的能力作为适当表位呈递的度量。类似地, NHR 在适当的卷曲螺旋构象中的呈现可以通过所述化合物在基于病毒进入抑制的测

定中的效力进行评价。

[0082] 优选选择具有 NHR 构象和 / 或 D5 表位的最佳呈现的化合物。还能够产生在氨基酸序列的相同或不同位置处连接的具有不同种类支架的几种化合物, 并且实验上测定所得到的化合物的 NHR 构象和 / 或 D5 表位的存在。

[0083] 因此, N 肽直接或间接地经由接头或通过所述氨基酸序列内形成至少一个键而连接至支架。

[0084] 合适的分子支架核心包括具有高达 10 个碳的个别环结构的单和多碳环化合物, 或在环结构中具有除碳外的至少一个原子 (最通常为氮、氧或硫) 的杂环化合物。例子包括环丁烷、环戊烷、环己烷、环辛烷、吡喃、吡咯烷、氧杂环戊烷、硫杂环戊烷、哌啶、噁烷、硫化环戊烷、氮杂环庚烷、氧杂环己烷、硫杂环庚烷、哌嗪、吗啉、硫吗啉及其衍生物。

[0085] 碳环化学支架的一个例子是顺式, 顺式 -1, 3, 5- 三甲基环己烷 -1, 3, 5- 三羧酸 (坎普酸), 其中在羧酸官能团与二氨基乙烷衍生后引入硫醇反应性溴乙酰基团, 如 Xu 等人 (Xu, W. 等人, 2007 *Chem Biol Drug Des* 70: 319-328) 中所述。坎普酸呈现有利的椅构象, 其中在环己烷环上的三个羧基占据轴向位置, 并且因此提供了有利的三轴定向以装配 N 肽。

[0086] 在另一个实施方案中, N 肽偶联至基于多个稠环结构或由多个稠环结构组成的支架。共享碳 - 碳键的两个碳环或杂环被说成是稠合的。合适的支架可以包括本文描述的先前碳环或杂环化合物中的任一种的稠环衍生物。具体例子包括如美国专利号 7, 312, 246 中公开的胆固醇、胆酸及其衍生物和三联苯。

[0087] 化学支架的其他例子包括如美国专利号 7, 524, 821 中所述的基于碳水化合物和支架化的马来酰亚胺簇, 其用于多价肽和蛋白质装配。此类马来酰亚胺簇利用充分确定的、高度有效的硫醇基团与亲电子部分的迈克尔加成 (Kitagawa 等人, 1976, *J. Biochem. (Tokyo)*. 79:233-6 ;Peeters 等人, 1989, *J. Immunol. Methods*. 120:133-43)。因此, 多价肽的拓扑学可以通过在刚性支架核心上的马来酰亚胺官能团的限定空间定向控制。可以置换马来酰亚胺的可替代的硫醇反应化合物是碘乙酸、溴乙酸、碘乙酰胺和吡啶基二硫化物。由吡啶基二硫化物形成的二硫键可通过本领域众所周知的方法切割。

[0088] 本发明的优选实施方案是包含核心分子的马来酰亚胺簇, 其中三个或更多个马来酰亚胺各自连接至核心。本发明的另一个优选实施方案是包含碳水化合物核心的马来酰亚胺簇, 其中三个马来酰亚胺各自连接至核心。本发明的另外一个优选实施方案是包含碳水化合物核心的马来酰亚胺簇, 其中三、四、五或六个马来酰亚胺各自通过接头连接至核心。

[0089] 本发明的优选实施方案是包含胆酸核心的马来酰亚胺簇, 其中三、四、五个或更多个马来酰亚胺各自连接至核心。本发明的另一个优选实施方案是包含胆酸核心的马来酰亚胺簇, 其中三、四、五个或更多个马来酰亚胺各自通过接头连接至核心。

[0090] 本发明的优选实施方案是包含环糊精的马来酰亚胺簇, 其中三个或更多个马来酰亚胺各自通过接头连接至环糊精。本发明的优选实施方案是包含至少两个核心的马来酰亚胺簇, 其中每个核心含有一个或多个马来酰亚胺。本发明的另一个优选实施方案是包含多元醇核心的马来酰亚胺簇, 其中三个或更多个马来酰亚胺各自连接至核心。本发明的进一步优选的实施方案是包含多元醇核心的马来酰亚胺簇, 其中三个或更多个马来酰亚胺各自通过接头连接至核心。

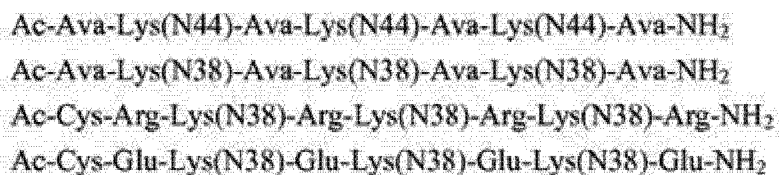
[0091] 支架还可以是单糖、多元醇和寡糖。可以充当本发明的支架的单糖包括但不限于二羟丙酮、R 和 L 对映体和异头物形式的甘油醛、苏糖、赤藓糖、赤藓酮糖、核糖、阿拉伯糖、木糖、来苏糖、核酮糖、木酮糖 (xylulolse)、阿洛糖、阿卓糖、葡萄糖、甘露糖、古洛糖、艾杜糖、半乳糖、塔罗糖、阿洛酮糖、果糖、山梨糖和塔格糖。可以充当支架化合物的多元醇或聚醇包括但不限于丙三醇 (glyceritol)、苏糖醇、赤藓醇、核糖醇、阿拉伯糖醇、木糖醇、阿糖醇 (lyxitol)、蒜糖醇、阿卓糖醇、葡糖醇、甘露醇、半乳糖醇、塔罗糖醇、山梨糖醇、艾杜糖醇、山梨糖醇、甘露醇、甘油、肌醇、麦芽糖醇、拉克替醇、卫矛醇和阿东糖醇。可以充当支架化合物的寡糖包括但不限于包含上文描述的单糖的任何组合的二糖和包含上文描述的单糖的环状寡糖。环糊精和环果聚糖 (cyclofructin) 是可以用于本发明的支架中的环状寡糖的例子。环糊精是环状 ( $\alpha$ -1,4)-连接的寡糖,并且包括但不限于 5-13  $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖、环甘露聚糖 (cyclomannin)、环阿卓糖 (cycloaltrin) 和 cyclogalactin。环糊精包含能够携带化合物的疏水核心。马来酰亚胺簇可以进一步包括包含反应性马来酰亚胺部分的几个连接的核心化合物。化学支架核心还可以基于胆酸、胆固醇、环肽、卟啉和杯 [4] 芳烃、碳水化合物和聚胺。具体聚胺应是三胺,例如二亚乙基三胺五乙酸、五甲基二乙烯三胺、三-2-氨基乙胺、二丙烯三胺等等。

[0092] 支架还可以是非环状或线性分子,其含有可以充当 N 肽连接点的最低限度三个官能团。这类支架的例子包括但不限于三 (2-羧乙基) 膦酸盐;三琥珀酰亚胺氨基三乙酸酯;三-(2-马来酰亚胺乙基) 胺;TRIS (Boc- $\beta$ -Ala-TRIS-(OH)<sub>3</sub>);和 TREN (三 (2-氨基乙基) 胺)。TRIS 支架在 Cai 等人,2007, Bioorganic Chemistry 35:327-337 中描述。TREN (三 (2-氨基乙基) 胺) 在 Kwak 等人,2002, J. Am. Chem. Soc. 124:14085-14091 中描述。作为支架核心适合的另外结构可以在美国专利号 7,604,804 中找到,所述专利整体引入作为参考。

[0093] 在本发明的另一个实施方案中, N 肽偶联至基于或包含含有侧链的氨基酸的线性支架,所述侧链能够衍生用于连接至活化的 N 肽。所述氨基酸残基包括 Lys、Arg、His、Glu、Asp、Cys、Sec 及其衍生物。所述氨基酸残基可以是多肽链的部分,所述多肽链含有至少三个反应基团,其中反应基团之间的间隔是合适的,以最佳限制形成三聚卷曲螺旋的 N 肽的构象。

[0094] 线性支架的一个例子包含肽 Ac-X-Lys-X-Lys-X-Lys-X-NH<sub>2</sub>, 其中三个同源或异源 N 肽可以连接至赖氨酸残基 (RNH<sub>2</sub>) 的  $\epsilon$  氨基酸侧链,并且其中 X 可以是任何氨基酸,其提供足够间隔用于 N 肽的适当定向或修饰支架的电荷、疏水性或其他物理参数。在本发明的优选实施方案中, X 是 5-氨基戊酸。在另一个优选实施方案中, X 是 Arg 或 Glu。

[0095] 由线性支架限制的肽的具体例子包括



其中 Ava 代表  $\delta$ -氨基戊酸。

[0096] 线性支架的例子包括:

$\text{CH}_3\text{CO-Ava-Lys-Ava-Lys-Ava-Lys-Ava-NH}_2$ ; SEQ ID NO: 41

$\text{CH}_3\text{CO-Arg-Lys-Arg-Lys-Arg-Lys-Arg-NH}_2$ ; SEQ ID NO: 42

$\text{CH}_3\text{CO-Glu-Lys-Glu-Lys-Glu-Lys-Glu-NH}_2$ ; SEQ ID NO: 43

$\text{CH}_3\text{CO-Cys-Arg-Lys-Arg-Lys-Arg-Lys-Arg-NH}_2$ ; SEQ ID NO: 44 或

$\text{CH}_3\text{CO-Cys-Glu-Lys-Glu-Lys-Glu-Lys-Glu-NH}_2$ ; SEQ ID NO: 45。

[0097] 本领域技术人员将认识到多种化学可以用于将 N 肽共价连接至支架核心上的反应官能团。在一个优选实施方案中,该连接包含在 N 肽上的硫醇基团和支架上的亲电子部分之间的硫醚键,因为所述键在水溶液中在中性或略碱性 pH 下容易形成,并且因为在 N 肽上的硫醇官能团可以作为半胱氨酸残基或作为硫醇衍生物在肽的任一末端上提供。对氨基酸序列内部的硫醚键的位置可以容易地通过调节游离半胱氨酸残基的位置进行调节。在特别优选的实施方案中,充当硫醇官能团的前体的硫代乙酰官能团位于氨基酸序列的第一个氨基酸位置的 N 末端或最后一个氨基酸位置的 C 末端处,以便最佳限制氨基酸序列的构象。

[0098] 其他种类的键也适合于限制本发明的免疫原性化合物的构象。例如,二硫键(也称为 SS-桥)可以在游离半胱氨酸残基之间选择性形成,而无需保护其他氨基酸侧链。此外,二硫键通过在碱性环境中温育容易地形成。优选地,二硫键在两个半胱氨酸残基之间形成,因为它们的硫氢基可容易地用于结合。在氨基酸序列内的 SS-桥的位置通过调节游离半胱氨酸残基的位置容易地调节。在特别优选的实施方案中,所述半胱氨酸位于氨基酸序列的第一个和最后一个氨基酸位置周围,以便最佳限制氨基酸序列的构象。

[0099] 在另一个实施方案中,可以使用 Se-Se 二硒键。二硒键的优点是这些键是还原不敏感的事实。因此,包含二硒键的肽模拟物在例如存在于动物体内的还原环境下能够更好地维持其构象。此外,当游离 SH 基团存在于肽模拟物内时,二硒键是优选的,所述 SH 基团例如用于与载体的后续偶联反应。此类游离 SH 基团不能与二硒键反应。

[0100] 在另一个实施方案中,使用复分解反应以便形成所述键。在复分解反应中,两个末端 CC 双键或三键借助于金属催化的重排反应连接。可接受的催化剂是 Schrock 钼(VI)或钨(VI)亚烷基或 Grubbs 钨卡宾。经由肽 NH 基团的烷基化例如烯丙基溴或炔丙基溴,或经由将具有含烯基或炔基侧链的非天然氨基酸掺入肽内,将该反应所需的末端 CC 双键或三键引入肽内。

[0101] 在优选实施方案中,N 肽和支架核心之间的键使用溴-硫醇偶联形成。例如,在支架核心上的溴乙酰部分偶联至游离半胱氨酸的硫氢基部分,所述游离半胱氨酸优选存在于肽的 N 末端处。可替代地,支架核心上的硫醇部分可以偶联至肽的  $\text{NH}_2$  末端上或赖氨酸残基( $\text{RNH}_2$ )的  $\epsilon$  氨基侧链上引入的溴乙酰部分,所述赖氨酸残基优选存在于肽的 N 末端处。

[0102] 在进一步的实施方案中,天冬氨酸盐或谷氨酸盐残基的  $\text{CO}_2\text{H}$  侧链偶联至胺官能团,以形成酰胺键。应认识到游离胺可以以多种方式引入支架核心内。例如,胺官能团可以构成线性多肽支架内的赖氨酸残基的  $\epsilon$ - $\text{NH}_2$  侧链。可替代地,肽的游离  $\text{CO}_2\text{H}$  末端可以偶联至胺官能团,例如肽支架的游离  $\text{NH}_2$  末端。在 N 肽的氨基酸序列内形成酰胺键的可替代方法是可获得的,所述方法是本领域已知的。

[0103] 原则上,N 肽和支架核心之间的键可以在免疫原性 N 肽氨基酸序列内的任何地方形成,只要目的表位的一级、二级和三级序列基本上得到维持。在一个优选实施方案中,连

接在氨基酸序列的十个 N 末端和十个 C 末端氨基酸残基的任何一个之间形成。优选地,连接在氨基酸序列的六个 N 末端和六个 C 末端氨基酸残基的任何一个之间形成,优选在氨基酸序列的四个 N 末端和四个 C 末端氨基酸残基的任何一个之间形成。当然,适合于形成内部键的位点取决于一个或多个目的表位的位置。在一个优选实施方案中,连接在免疫原性氨基酸序列的第一个和最后一个氨基酸残基之间形成。

[0104] 考虑到维持 N 肽组成成分的最佳间距以允许三聚体形成的上述重要性,应认识到对支架的连接点可以是直接的或可以通过添加接头分子进行修饰,所述接头分子增加 N 肽和支架的核心组成成分之间的距离。接头包含原子的任何组合,所述原子可以包括但不限于碳、氮、氧、磷和硫,长度高达 50 个原子。一般地,本发明的间隔物/接头可以包括任何分子,所述任何分子可以结合三个 N 肽并将三个 N 肽放置在足够距离处,以允许 N 肽的三聚化呈现 gp41 前发夹中间物的构象正确模拟物,并且呈现处于其天然构象的 D5 中和表位。

[0105] 接头可以是同双功能的,其中相同反应官能团存在于分子的两个末端处。例子包括但不限于 1,2 二氨基乙烷;1,3 二氨基丙烷;腐胺;尸胺;草酸、丙二酸、琥珀酸、肥酸、3,3'-二硫代双(磺基琥珀酰亚胺基丙酸酯);二琥珀酰亚胺辛二酸酯;乙二醇双(琥珀酰亚胺琥珀酸酯);己二酸二甲酯;二马来酰亚胺基己烷;1,5-二氟-2,4-二硝基苯;肥酸二酰肼;碳酰肼;和 N,N'-亚乙基-双(碘乙酰胺)。

[0106] 在本发明的优选实施方案中,坎普三酸支架的羧酸官能团通过与同双功能分子二氨基乙烷反应进行修饰,以增加与环己烷环和 N 肽的距离。

[0107] 可替代地,接头可以是异双功能的,其中不同反应官能团存在于分子的任一末端处。广泛多样的此类分子是可容易获得的,其种类包括胺/硫氢基反应性、羰基/硫氢基反应性、胺/光反应性、硫氢基/光反应性、羰基/光反应性及其他。具体例子包括但不限于磺基琥珀酰亚胺 4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羧酸酯;4-琥珀酰亚胺氧基羰基- $\alpha$ -甲基- $\alpha$ -(2-吡啶基二硫代)甲苯;m-马来酰亚胺苯甲酰-N-羟基琥珀酰亚胺酯;磺基琥珀酰亚胺 4-(碘乙酰基)-氨基苯甲酸酯;琥珀酰亚胺 4-(对马来酰亚胺苯基)丁酸酯;3-(2-吡啶基二硫代)丙酰肼;N-羟基琥珀酰亚胺-4-叠氮基水杨酸;二苯甲酮-4-碘乙酰胺;对叠氮基苯甲酰基酰肼;和 5-氨基戊基马来酰亚胺。还可以采用不同长度的异双功能聚乙二醇(PEG)接头,并且具体种类的例子包括但不限于 N-羟基琥珀酰亚胺-PEG<sub>(n)</sub>-马来酰亚胺;N-羟基琥珀酰亚胺-PEG<sub>(n)</sub>-叠氮化物;和 N-羟基琥珀酰亚胺-PEG<sub>(n)</sub>-炔丙基。

[0108] 在本发明的优选实施方案中,胆酸的烯丙型衍生物与 2-氨基乙硫醇反应并且随后与  $\gamma$ -马来酰亚胺丁酸反应,以增加与胆固醇环和 N 肽的距离。

[0109] 本文描述的肽模拟物的 N 肽部分可以通过多种方法产生。例如,它们可以是化学合成的。长肽可以在固相载体上合成,使用如由 Kent 等人,1985,“Modern Methods for the Chemical Synthesis of Biologically Active Peptides,” Alitalo 等人(编辑), *Synthetic Peptides in Biology and Medicine*, Elsevier 第 29-57 页描述的自动化肽合成仪。人工固相合成可以如例如 Merrifield,1963, *Am. Chem. Soc.* 85:2149 中所述或其已知改善执行。固相肽合成还可以通过 Fmoc 方法执行,所述 Fmoc 方法采用非常稀释的碱以去除 Fmoc 保护基团。液相合成通常仅对于所选更小的肽是可行的。关于制备紧密相关肽的混合物,参见例如 Houghton,1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

82:1242-1246。肽模拟物可以作为连续肽或在它们形成后连接或联系的组分产生。

[0110] 可替代地,本文描述的肽可以使用已知方法和表达系统通过表达嵌合肽编码 DNA 产生,所述嵌合肽编码 DNA 可以是编码整个嵌合肽的单一 DNA。嵌合肽基因可以通过分子克隆到表达载体(例如 pcDNA3. neo、pcDNA3. 1、pCR2. 1、pBlueBacHis2 或 pLITMUS28)内重组表达,所述表达载体含有合适的启动子和其他适当的转录调节元件,并且转移到原核或真核宿主细胞内以产生嵌合肽。表达载体在本文中定义为克隆 DNA 转录及其 mRNA 在适当宿主中翻译所需的 DNA 序列。此类载体可以用于在多种重组宿主细胞中表达重组 DNA,所述重组宿主细胞例如细菌、酵母、蓝绿藻、植物细胞、昆虫细胞和哺乳动物细胞。适当构建的表达载体应含有下述组分:用于在宿主细胞中自主复制的复制起点;可选标记;有限数目的有用限制性酶位点;和活性启动子。表达载体可以包括但不限于克隆载体、修饰的克隆载体、特别设计的质粒或病毒。商购可得的哺乳动物表达载体可以适合于重组肽表达。另外,多种商购可得的细菌、真菌细胞和昆虫细胞表达载体可以用于在各自的细胞类型中表达重组模拟位。启动子定义为指导 RNA 聚合酶以结合 DNA 并起始 RNA 合成的 DNA 序列。强启动子是促使 mRNA 以高频率起始的启动子。此类操作的技术可以在 Sambrook 等人,1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. 中找到,并且是本领域普通技术人员众所周知和可获得的。含有编码 N 肽的适当基因的表达载体可以经由许多技术中的任何一种引入宿主细胞内,所述技术包括但不限于转化、转染、原生质体融合和电穿孔。个别分析含表达载体的细胞,以测定它们是否产生目的肽。肽表达细胞的鉴定可以通过几种方法完成,所述方法包括但不限于与抗 HIV 肽抗体的免疫反应性。重组肽可以具有与相同有机合成的肽不共享的另外和期望的结构修饰,例如腺苷酰化、羧化、糖基化、羟化、甲基化、磷酸化或肉豆蔻酰化。这些添加的特征可以通过重组表达系统的适当选择加以选择或视情况而定是优选的。

[0111] 在宿主细胞中表达 N 肽基因后,可以回收 N 肽。几种蛋白质纯化操作是可获得的并适用的,包括通过下述的多种组合或个别应用,来自细胞裂解产物和提取物或条件化培养基的纯化:盐析、离子交换层析、反相层析、尺寸排阻层析、羟磷灰石吸附层析和疏水作用层析。另外,肽可以通过使用免疫亲和柱与其他细胞蛋白质分开,所述免疫亲和柱由对于肽特异性的单克隆或多克隆抗体制备。

[0112] 本文描述的某些肽包括 (CCIZN36)<sub>3</sub> 和 5 螺旋已得到公开。参见例如 Root 等人,2003, *Proc Natl Acad Sci USA* 100:5016-5021; Root 等人,2001, *Science* 291:884-888; Steger 等人,2006, *Journal Biol Chem* 281:25813-25821; Wang 等人,2009, *Sheng wu gong cheng xue bao = Chinese journal of biotechnology* 25:435-440; Bianchi 等人,2005, *Proc Natl Acad Sci USA* 102:12903-12908; Bianchi 等人,2009, *Advances in experimental medicine and biology* 611:121-123; Bianchi 等人, *Proc Natl Acad Sci USA* 107:10655-10660; Eckert 等人,2001, *Proc Natl Acad Sci USA* 98:11187-11192; Eckert 等人,2001, *Annual review of biochemistry* 70:777-810; Eckert 等人,1999, *Cell* 99:103-115; Hrin 等人,2008, *AIDS research and human retroviruses* 24:1537-1544; Luftig 等人,2006, *Nature structural & molecular biology* 13:740-747; 和 Montgomery 等人,2009, *mAbs* 1:462-474。许多出版物已得到鉴定,其描述了用于限制基于 NHR 的

肽作为用于反相改造的疫苗的基础的可替代方法。参见例如 Bomsel 等人, *Immunity* 34:269-280 ;Chen 等人, *J Biol Chem* 285:25506-25515 ;Corti 等人, *PLoS one* 5:e8805 ;de Rosny 等人, *J Virol* 75:8859-8863 ;Dwyer 等人, 2008, *Protein Sci* 17:633-643 ;Gokulan 等人, 1999, *DNA and cell biology* 18:623-630 ;Korazim 等人, 2006, *J Molec Biol* 364:1103-1117 ;Li 等人, 2009, *Immunobiology* 214:51-60 ;Louis 等人, 2001 ;*J Biol Chem* 276:29485-29489 ;Lu 等人, *J Pept Sci* 16:465-472 ;Nelson 等人, 2008, *Virology* 377:170-183 ;Pan 等人, *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi* 109:94-105 ;Qi 等人, *Biochem Biophys Res Comm* 398:506-512 ;Qiao 等人, 2005, *J Biol Chem* 280:23138-23146 ;Sabin 等人, *PLoS pathogens* 6:e1001195 ;Sadler 等人, 2008, *Biopolymers* 90:320-329 ;Schuy 等人, 2009, *J Structural Biol* 168:125-136 ;Wexler-Cohen 等人, 2009, *PLoS pathogens* 5:e1000509 ;Zhang 等人, 2009, *Vaccine* 27:857-863。

[0113] 考虑通过本文描述的方法生成的构象受限的卷曲螺旋结构包含同源三聚卷曲螺旋结构（即包含三个相同的 N 肽）或异源三聚卷曲螺旋结构（即包含不同，尽管基本上相似的三个 N 肽）。在一个实施方案中，本文描述的肽模拟物的异源三聚卷曲螺旋结构的异质性可以起因于位于包含卷曲螺旋结构的个别 N 肽的稳定区域中的氨基酸差异。本文描述的肽模拟物的异源三聚卷曲螺旋结构的异质性可以起因于位于卷曲螺旋内包含的个别 N 肽内的氨基酸差异。例如，异源三聚卷曲螺旋结构可以包含三个 N 肽，其中对于肽的三聚化能力重要的每个个别肽的七肽重复的“a”和“d”氨基酸位置是相同的，而对于疏水区外部的氨基酸位置（例如位置“f”）在三聚卷曲螺旋的个别肽中是不同的。重要的是，此类异源三聚结构仍可以鉴定为 HIV gp41 融合中间物的可靠模拟物，因为卷曲螺旋的功能类似于野生型结构的功能（例如抗病毒活性和 / 或可靠构象表位的生成）。

[0114] 代表性 gp41 肽模拟物的三聚结构示意图显示于图 1A-B 中。

[0115] 本领域技术人员可以例如通过测试其以高效力抑制 HIV 传染性的能力，或其结合识别位于 gp41 的 N 螺旋区域中的构象表位的抗体的能力，容易地测定当处于其三聚、共价稳定的构象时，所得到的 CC 嵌合 N 肽是否可靠展示 N 肽结构域。许多不同实验方法可以用于测定 gp41 肽模拟物是否可以形成所述内部卷曲螺旋的稳定、可靠模拟物。例如，可以执行设计为测量构象受限的 gp41 肽模拟物抑制 HIV 颗粒的传染性的能力的测定。在一个此类测定中，在不同浓度的 gp41 肽模拟物的存在下，由多种毒株的 HIV-1 感染 HeLa 细胞，所述 HeLa 细胞稳定表达人 CD4 和 CCR5 受体，并具有由 HIV-2 LTR 的 tat 应答片段驱动的  $\beta$  半乳糖苷酶报道基因。在使所述细胞温育特定时间段后，将细胞裂解并且定量  $\beta$  半乳糖苷酶活性。如果 gp41 肽模拟物保留通过干扰 gp41 融合中间物抑制 HIV 传染性的能力，则记录低  $\beta$  半乳糖苷酶活性。

[0116] 因为本文描述的 gp41 肽模拟物代表 gp41 的内部、N 螺旋式卷曲螺旋的稳定、可靠模拟物，所以它们被认为可用作免疫原，以产生靶向 HIV 融合中间物的抗体应答。当施用时，gp41 肽模拟物将可能对先前未感染的个体提供预防优点和 / 或通过减少受感染个体内的病毒载量水平提供疗效，因此延长 HIV 感染的无症状期。

[0117] 本文描述的肽模拟物可以通过多种途径中的一种或多种进行施用，所述途径例如经鼻、腹膜内、肌内、静脉内、经阴道或经直肠。在每个实施方案中，肽模拟物在适当载体中

或作为免疫原性组合物提供。例如，肽模拟物可以在适当缓冲液、盐水、水、凝胶、泡沫、乳膏或其他适当载体中施用。可以配制包含肽模拟物和一般的适当载体和任选组分（例如稳定剂、吸收或摄取增强剂和/或乳化剂）的免疫原性组合物，并以一个或多个预防有效剂量施用于个体（未感染的或由 HIV 感染的）。在一个实施方案中，肽模拟物可以作为杀微生物试剂施用（或应用）并且干扰病毒进入细胞内。例如，肽模拟物可以包括在组合物中，所述组合物应用于粘膜表面或与粘膜表面接触，所述粘膜表面例如阴道、直肠或口腔粘膜。除肽模拟物之外，组合物包含适合于应用于粘膜表面或避孕装置（例如避孕套、宫颈帽、避孕膜）表面的载体或基质（例如乳膏、泡沫、凝胶、足够粘稠以保持肽模拟物的其他物质、水、缓冲液）。肽模拟物可以例如通过应用泡沫、凝胶、乳膏、水或含有肽模拟物的其他载体而应用于粘膜表面。可替代地，它可以借助于阴道或直肠栓剂应用，所述阴道或直肠栓剂是含有肽模拟物的载体或基质，并且由在使用条件（例如阴道或直肠温度、pH、湿度条件）下释放或递送肽模拟物（例如通过降解、溶解、其他释放方式）的材料制成。在所有实施方案中，肽模拟物的控制或定时释放（逐步释放、在施用或插入后的特定时间释放）可以通过例如将肽模拟物掺入组合物内实现，所述组合物逐步地或在限定时间段后释放药物。可替代地，肽模拟物可以掺入在其施用或应用（例如进入阴道或直肠内）后立即或不久释放肽模拟物的组合物内。组合释放（在插入后立即或不久、以及随着时间过去和在插入后的特定时间释放一些药物）也可以是有效的（例如通过引入由两种或更多种材料组成的组合物：来自其的释放或递送在插入后立即或不久的一种和/或来自其的释放或递送是逐步的一种和/或来自其的释放在指定时期后发生的一种）。例如，肽模拟物可以掺入持续释放组合物内，例如美国专利号 4,707,362 中教导的那种。乳膏、泡沫、凝胶或栓剂可以是也用于节育目的（例如含有杀精子剂或其他避孕药）的那种，尽管它不是必要的（例如它可以单独或与另一种非避孕药例如抗菌或抗真菌药或润滑剂组合单独用于递送肽模拟物）。本发明的肽模拟物还可以通过使用避孕装置（例如避孕套、宫颈帽、避孕膜）施用于个体，所述避孕装置包被有肽模拟物或以允许在使用条件下释放的方式在其中掺入肽模拟物。如上所述，肽模拟物的释放可以立即、逐步或在指定时间发生。因此，它们与 HIV 接触并结合 HIV，并且减少或预防病毒进入细胞内。

[0118] 一般而言，关于本发明的免疫原性组合物的组分的适当“有效量”或剂量的选择也基于采用的一种或多种免疫原性组合物的肽模拟物的身份，以及受试者的身体状况，最尤其包括免疫接种受试者的一般健康、年龄和重量。使用方法和途径以及免疫原性组合物中的另外组分的存在还可以影响组合物的剂量和量。此类选择和有效剂量的向上或向下调整在本领域技术内。诱导免疫应答优选保护性应答，或在受试者中产生外源效应，而无显著不利副作用所需的组合物量，取决于这些因素而改变。本文描述的免疫原性组合物的合适剂量通过本领域技术人员容易地确定。足以减少 HIV 感染的 gp41 肽模拟物的剂量（“有效剂量”）以这样的方式（例如通过注射、局部施用、静脉内）施用，所述方式完全或部分抑制 HIV 进入细胞内。将 10  $\mu\text{g}$  - 1000  $\mu\text{g}$  的 gp41 肽模拟物、且优选 50  $\mu\text{g}$  - 300  $\mu\text{g}$  的肽模拟物的剂量施用于哺乳动物，以诱导抗 HIV 或 HIV 中和免疫应答。在一个实施方案中，肽模拟物应以 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  - 1  $\text{mg}/\text{ml}$ 、且优选 50 - 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  之间的浓度，以足以构成免疫功效所需的总量的体积肌内给予。

[0119] 在本发明的一些实施方案中，本发明的肽模拟物可以用于初免加强方案中。此类

方法的初免组分可以包括但不限于 DNA、遗传载体、肽或蛋白质。此类方案可以是同源或异源的。例如，在初始施用后约二至四周，可以施用加强剂量（无论是同源还是异源的），并且随后再次每当血清抗体滴度变小时。还可以使用多重初免施用，随后为最后一次初免施用后二至四周。异源加强可以涉及与用于初免的肽模拟物不同的肽模拟物。异源加强还可以涉及本领域已知的其他 HIV 预防剂，例如作为 DNA 或蛋白质组分施用的重组 gp120、gp140 和 gp160 分子。

[0120] 在本发明的一些实施方案中，本文描述的肽模拟物可以共价缀合至免疫原性载体蛋白质，例如以增强对肽模拟物的免疫应答。此类生物缀合方法是本领域技术人员众所周知的，并且将认识到可以采用多种载体蛋白质和缀合化学。

[0121] 适合于患者施用的免疫原性组合物将在制剂中含有有效量的肽模拟物，所述制剂保留生物活性，同时还促进在可接受的温度范围内的贮存过程中的最大稳定性。包含以依照本发明的初免或加强剂量的肽模拟物的免疫原性组合物可以含有生理学可接受的组分，例如缓冲液、生理盐水或磷酸盐缓冲盐水、蔗糖、其他盐和聚山梨醇酯。本领域技术人员应当理解还可以使用其他常规疫苗赋形剂，其制备制剂。

[0122] 佐剂可以在含有本文描述的肽模拟物的免疫原性组合物的制备过程中添加或不添加。例如，尤其以触变、粘稠和均质氢氧化铝凝胶的形式，铝是人疫苗中的典型和优选佐剂。

[0123] 这些肽模拟物可以与多种抗逆转录病毒剂组合使用，以抑制 HIV 复制和 / 或其他 HIV 蛋白质。可以与基于肽模拟物的组合物一起使用的抗逆转录病毒剂种类包括但不限于核苷逆转录酶抑制剂 (NRTI)、非核苷逆转录酶抑制剂 (NNRTI) 和蛋白酶抑制剂 (PI)。其他 HIV 蛋白质包括 gp120、gp140 和 gp160。编码 HIV 蛋白质的 DNA 载体也是合适的，并且可以编码 HIV 蛋白质包括但不限于 gp120、gp140 和 gp160 分子。

[0124] 在某些实施方案中，本发明提供了用于施用本文描述的方案的试剂盒。该试剂盒设计用于在哺乳动物或脊椎动物受试者中诱导免疫原性应答的方法中。该试剂盒含有包含本发明的 gp41 肽模拟物的免疫原性组合物。优选地，在试剂盒中提供免疫原性组合物的多重预包装剂量用于多重施用。

[0125] 该试剂盒还含有使用如本文描述的免疫原性组合物的说明书。该试剂盒还可以包括用于执行某些测定的说明书、上文描述的多种载体、赋形剂、稀释剂、佐剂等等，以及施用组合物的仪器例如注射器、喷雾装置等。在其他组合物中，其他组分可以包括一次性手套、去污说明书、敷药棒或容器。

[0126] 已参考附图描述本发明的优选实施方案，应当理解本发明并不限于这些精确实施方案，并且变化和修饰可以通过技术人员在其中实现，而不背离如所附权利要求中定义的本发明的精神或范围。

[0127] 呈现下述非限制性实施例以更好地举例说明本发明。

[0128] 实施例 1

免疫原产生和表征

免疫原产生：合成肽

1.  $(CCIZN36)_3$

肽

单

体

CCIZN36 (CCGGIKKEIEAIKKEQEAIKKKIEAIEKEISGIVQQNNLLRAIEAQHLLQLTVWGIK

QLQARIL (SEQ ID NO:46) 使用固相 Fmoc/t-Bu 化学在自动化肽合成仪上合成。使用的树脂是 H-Rink Amide ChemMatrix (Matrix-Innovation Inc., St. Hubert, Quebec, 加拿大)。用双重偶联进行酰化 30 分钟, 每个循环使用超过树脂游离氨基 5-10 倍过量的氨基酸。用等摩尔量的 HATU [2-(1H-9-氮杂苯并三唑-1-基)-1, 1, 3, 3-四甲基-脲(aminum) 六氟磷酸酯] 和 2 倍摩尔过量的 DIEA (N, N-二异丙基乙胺) 活化氨基酸。使用的侧链保护基团如下: 三苯甲基用于半胱氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺和组氨酸; 叔丁氧羰基用于赖氨酸和色氨酸; 叔丁基用于谷氨酸、苏氨酸和丝氨酸; 和 2, 2, 4, 6, 7-五甲基二氢苯并咪唑-5-磺酰用于精氨酸。在合成结束时, 通过用 90% 三氟乙酸、5% 三异丙基硅烷、2.5% 水和 2.5% 3, 6-二氧杂-1, 8-辛烷二硫醇在室温下处理 3 小时从树脂中切割肽。将肽溶液过滤并加入冷二乙醚以沉淀肽。沉淀的肽通过离心形成团块, 并且随后将团块用冷二乙醚洗涤两次, 以去除有机清除剂。将最终团块干燥, 重悬浮于 25% 乙酸水溶液中, 并且冻干。

[0129] 粗制肽通过反相 HPLC 进行纯化, 在 0.1% 三氟乙酸的存在下使用 Jupiter C18 柱 (250 x 30 mm, 10  $\mu$ , 300A, Phenomenex, Inc., Torrance, CA) 与水/乙腈梯度。纯化的肽通过电喷雾质谱测定法进行表征。对于纯化肽测定的单一同位素质量为 7541.22 Da (序列预测的质量为 7542.24 Da)。

[0130] 将纯化的 CCIZN36 (35 mg) 溶解于 30 ml 缓冲液 (pH 7.5) 中, 所述缓冲液含有 1 N 胍、0.2M HEPES、1 mM EDTA、1.5 mM 还原型谷胱甘肽和 0.75 mM 氧化型谷胱甘肽。在这些条件下, 使 CCIZN36 缓慢氧化为该分子的共价三聚体形式 (CCIZN36)<sub>3</sub>。通过 HPLC 监测氧化反应的进程, 并且在 24 小时后, 通过将 500  $\mu$ l 三氟乙酸加入反应混合物来终止反应, 所述反应混合物直接装载到 Vydac<sup>®</sup> 联苯基柱 (22 x 250 mm, 10-15  $\mu$ , Grace, Deerfield, IL) 上, 并且通过反相 HPLC 进行纯化, 使用在 0.1% 三氟乙酸的存在下的水/乙腈梯度, 流速 20 ml/分钟。通过 RP HPLC/质谱法分析级分。将对应于共价三聚体的级分合并用于进一步使用。对于纯化的三聚体测定的单一同位素质量为 22620.58Da (序列预测的质量为 22620.681 Da)。

[0131] 2. KTA(N51)<sub>3</sub>

通过在三价溴化物支架 KTA-Br 上连接三个带硫醇标签的单体 N51 肽 S-乙酰基乙醇酸 (acetylglycolic)-N51 来合成三聚肽复合物。

[0132] KTA-Br 是以坎普三酸 (Kemp's triacid) 为中心的对称三价支架。它根据 Xu 等人, 2007, *Chem Bio Drug Des* 70:319-328 中所述的方案合成, 伴随在最后酰化步骤过程中使用溴乙酸酐的修饰。

[0133] 肽 N51 使用 Fmoc/t-Bu 化学在自动化肽合成仪上通过固相合成。使用的树脂是 H-Rink Amide ChemMatrix (Matrix-Innovation Inc.), 100% PEG 树脂。用双重偶联进行酰化 30 分钟, 使用超过树脂游离氨基 5-10 倍过量的氨基酸。用等摩尔量的 HATU [2-(1H-9-氮杂苯并三唑-1-基)-1, 1, 3, 3-四甲基-脲六氟磷酸酯] 和 2 倍摩尔过量的 DIEA (N, N-二异丙基乙胺) 活化氨基酸。侧链保护基团如下: 三苯甲基用于谷氨酰胺、天冬酰胺和组氨酸; 叔丁氧羰基用于赖氨酸和色氨酸; 叔丁基用于谷氨酸、苏氨酸和丝氨酸; 和 2, 2, 4, 6, 7-五甲基二氢苯并咪唑-5-磺酰用于精氨酸。在序列装配结束时, 在等量 N-羟基苯并三唑的存

在下,通过 S-乙酰基巯基乙醇酸五氟苯酯 (SAMA-OPfp) 的手动偶联,将受保护的硫醇基引入肽 N 末端。保护硫醇的乙酰基可以在下一个连接步骤过程中通过羟胺容易地去除。在合成结束时,用切割混合物 (95% 三氟乙酸、2.5% 三异丙基硅烷、2.5% 水) 在室温下处理干燥肽树脂 3 小时。将树脂过滤并将溶液加入冷二乙醚,以便沉淀肽。在离心后,将肽团块用冷二乙醚洗涤两次,以去除有机清除剂。将最终团块干燥,重悬浮于 25% 乙酸水溶液中,并且冻干。

[0134] 粗制肽通过反相 HPLC 进行纯化,使用 Jupiter C18 柱 (250 x 30 mm, 10  $\mu$ , 300A) 和在 0.1% 三氟乙酸的存在下的水 / 乙腈梯度,流速 40 ml/分钟。在 Jupiter C18 柱 (150 x 4.6 mm, 5  $\mu$ , 300 A) 上执行分析型 HPLC。纯化的肽通过电喷雾质谱测定法进行表征。ESI 谱显示电荷状态 +4 至 +7。解卷积质量为 6051.6 Da (序列预测的质量为 6051 Da)。

[0135] 将纯化的肽前体 S-乙酰基乙醇酸-N51 (60 mg) 溶解于 8 ml pH 7-7.5 缓冲液中,所述缓冲液含有 6 N 胍、0.1 N 乙酸铵和 0.5 N 羟胺。使 1.7 mg KTA-Br<sub>3</sub> 溶解于 1 ml 三氟乙醇中,并且随后逐滴加入肽溶液中。通过 LC-MS 监测反应。在 5 小时后,通过将 500  $\mu$  l TFA 加入溶液中终止反应,并且将溶液直接装载到 Vydac<sup>®</sup> 联苯基柱 (22 x 250 mm, 10-15  $\mu$ ) 上,并且通过反相 HPLC 进行纯化,使用在 0.1% 三氟乙酸的存在下的水 / 乙腈梯度,流速 20 ml/分钟。通过质谱法进行进一步分析对应于共价三聚体的合并级分。ESI 谱显示电荷状态 +14 至 +18。解卷积质量为 18532.8 Da (序列预测的质量为 18532 Da)。

### [0136] 3. KTA (N51-2B)<sub>3</sub>

通过遵循如对于 KTA (N51)<sub>3</sub> 合成所述相同的方案,经由在三价溴化物支架 KTA-Br 上连接三个带硫醇标签的单体 N51-2B 肽 S-乙酰基乙醇酸-(N51-2B) 来合成三聚肽复合物。

[0137] 设计 N51-2B 序列以尝试产生更可溶和稳定的 N51 三聚体。Ile 残基在 "a" 和 "d" 位置处加入,以优化三聚体形成,并且在肽的 N 末端部分中的 "f" 和 "c" 位置处进行取代,以有助于可溶性。使疏水口袋附近的一个 Leu 残基变成 Ala 残基,但维持作为疏水口袋的部分的 Leu。

[0138] 肽 N51-2B 使用 Fmoc/t-Bu 化学在自动化肽合成仪上通过固相合成。使用的树脂是 H-Rink Amide MBHA resin LL (100-200 mesh, 0.36 mmol/g) (EMD Biosciences, San Diego, CA)。S-乙酰基乙醇酸-N51-2B 的合成、切割和纯化遵循如对于 S-乙酰基乙醇酸-N51 所述相同的方案。纯化的肽通过电喷雾质谱测定法进行表征。ESI 谱显示电荷状态 +4 至 +7。解卷积质量为 6109 Da (序列预测的质量为 6109 Da)。

[0139] 将纯化的肽前体 S-乙酰基乙醇酸-N51 (10 mg) 溶解于 1ml pH 7.3 缓冲液中,所述缓冲液含有 6 N 胍、0.1 N 乙酸铵和 0.5 N 羟胺。使 0.25 等量 KTA-Br<sub>3</sub> 溶解于三氟乙醇中,并且逐滴加入肽溶液中。通过 LC-MS 监测反应。在 4 小时后,终止反应,并且将溶液直接装载到 Vydac<sup>®</sup> C18 柱 (10 x 250 mm, 5  $\mu$ ) 上,并且通过反相 HPLC 进行纯化,使用在 0.1% 三氟乙酸的存在下的水 / 乙腈梯度,流速 5 ml/分钟。通过质谱法进行进一步分析对应于共价三聚体的合并级分。ESI 谱显示电荷状态 +14 至 +18。解卷积质量为 18708.8 Da (序列预测的质量为 18709 Da)。

### [0140] 4. KTA (N51-3B)<sub>3</sub>

通过遵循如对于 KTA (N51)<sub>3</sub> 合成所述相同的方案,经由在三价溴化物支架 KTA-Br 上连接三个带硫醇标签的单体 N51-3B 肽 S-乙酰基乙醇酸-(N51-3B) 来合成三聚肽复合物。

[0141] 设计 N51-3B 序列以尝试产生更可溶和稳定的 N51 三聚体。序列是对原始 N51 中的 Ala 的单一变化。

[0142] 肽 N51-3B 使用 Fmoc/t-Bu 化学在自动化肽合成仪上通过固相合成。使用的树脂是 H-Rink Amide MBHA resin LL(100-200 mesh, 0.36 mmol/g) (EMD Biosciences)。S-乙酰基乙醇酸-N51-3B 的合成、切割和纯化遵循如对于 S-乙酰基乙醇酸-N51 所述相同的方案。纯化的肽通过电喷雾质谱测定法进行表征。ESI 谱显示电荷状态 +4 至 +7。解卷积质量为 6007.8 Da (序列预测的质量为 6010 Da)。

[0143] 将纯化的肽前体 S-乙酰基乙醇酸-N51 (5 mg) 溶解于 1ml pH 7.3 缓冲液中, 所述缓冲液含有 6 N 胍、0.1 N 乙酸铵和 0.5 N 羟胺。使 0.25 等量 KTA-Br<sub>3</sub> 溶解于三氟乙醇中, 并且逐滴加入肽溶液中。通过 LC-MS 监测反应。在 4 小时后, 终止反应, 并且将溶液直接装载到 Vydac<sup>®</sup> C4 柱 (10 x 250 mm, 5 μ) 上, 并且通过反相 HPLC 进行纯化, 使用在 0.1% 三氟乙酸的存在下的水 / 乙腈梯度, 流速 5 ml/分钟。通过质谱法进行进一步分析对应于共价三聚体的合并级分。ESI 谱显示电荷状态 +14 至 +18。解卷积质量为 18405.4 Da (序列预测的质量为 18406 Da)。

#### [0144] 5. 胆酸 (N51)<sub>3</sub>

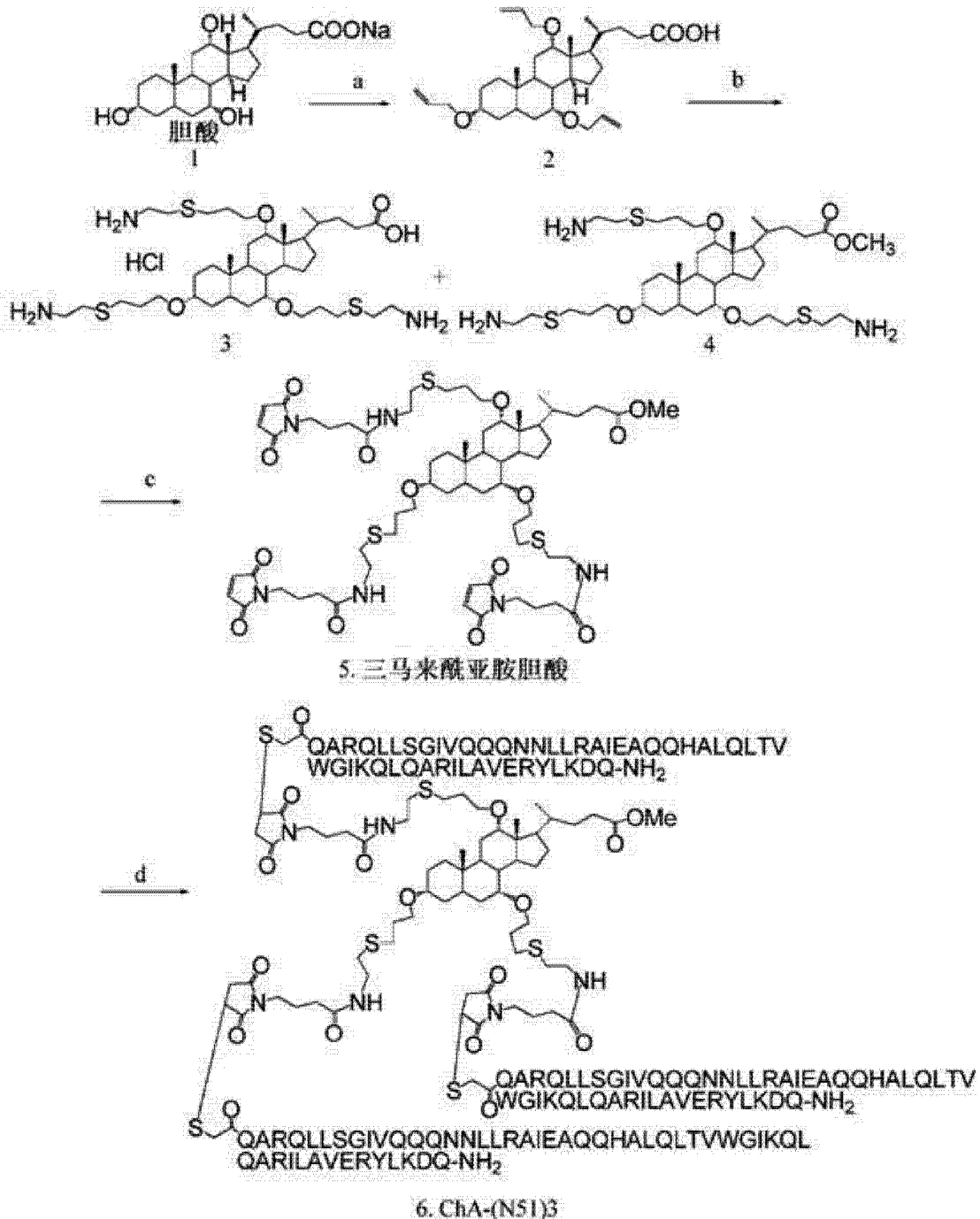
经由在三价三马来酰亚胺胆酸模板上连接三个带硫醇标签的单体 N51 肽 S-乙酰基乙醇酸-N51 来合成三聚肽复合物。

[0145] 将胆酸钠 1 (2 g, 4.65 mmole) 悬浮于 25 ml THF (四氢呋喃) 中。将烯丙基碘 (3.8 ml, 1 当量) 加入混合物中, 随后添加 2.2 g 氢化钠 (60%)。将所得到的混合物在 70°C 下搅拌过夜, 并且通过 TLC 和 LC-MS 进行监测。随后将水加入反应混合物和乙酸乙酯 / 1 N HCl 中。将产物提取到有机层内, 用盐水洗涤, 并且在无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 上干燥。所得的粗制品通过 LC-MS 进行表征, 并且证实主要组分是分子量 528.7 Da 的三价烯丙基胆酸 2。

[0146] 烯丙基胆酸 2 (300 mg, 0.8 mmole)、半胱胺盐酸盐和偶氮二异丁腈 (AIBN) (作为自由基引发剂) 与甲醇 (5 ml, 由氮脱气) 在光反应器中混合。将混合物用 UV 灯在 254 nm 波长下照射, 并且在室温下搅拌经过三天。通过 LC-MS 和 TLC 监测反应。化合物 3 (C<sub>39</sub>H<sub>73</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S<sub>3</sub>, MW=760.29) 及其甲酯 4 (C<sub>40</sub>H<sub>75</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S<sub>3</sub> MW=774.25) 的产物以 1:1 比获得。

[0147] 将化合物 4 (10 mg, 1 当量) 溶解于 1 ml DMF 中, 随后加入 γ-马来酰亚胺丁酸 (3.6 当量)、HATU (1 当量) 和三乙胺 (2 当量)。将反应搅拌 2 小时以完成。在蒸发后, 通过乙酸乙酯 / 1 N HCl、NaHCO<sub>3</sub> 和盐水提取残渣。有机层在 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 上干燥并过滤。将滤液浓缩, 随后纯化以获得分子量 1269.6 Da 的化合物 5; 其中发现的 (M<sup>+</sup>Na<sup>+</sup>) 峰为 1292.26 Da。

[0148] 将纯化的肽前体 S-乙酰基乙醇酸-N51 (4.8 mg) 溶解于 0.2 ml pH 7 缓冲液中, 所述缓冲液含有 20 mM Tris 和 0.5 N 羟胺。将 50 μg 三马来酰亚胺胆酸溶解于 50 μl DMF/TFE 中, 并且逐滴加入肽溶液中。通过 LC-MS 监测反应。在 2 小时后, 反应完全, 并且将混合物直接装载到 Jupiter C18 柱 (10 x 250 mm, 10 μ) 上, 并且通过反相 HPLC 进行纯化, 使用在 0.1% 三氟乙酸的存在下的水 / 乙腈梯度, 流速 5 ml/分钟。通过质谱法进行进一步分析对应于共价三聚体化合物 6 胆酸 (N51)<sub>3</sub> (ChA-(N51)<sub>3</sub>) 的合并级分。理论平均分子量为 19296 Da, 而发现的单一同位素峰为 19289.6 Da。



#### 胆酸(N51)<sub>3</sub>的合成

(a) 烯丙基碘, NaH/THF. (b) 硫代乙胺, AIBN, 甲醇, 在光反应器中,  $\lambda = 254 \text{ nm}$   
 (c)  $\gamma$ -马来酰亚胺丁酸 (d) 硫代乙酰-N51, pH 7缓冲液, 包含20mM Tris和0.5N 羟胺

[0149] 6. 具有用于缀合的硫醇的胆酸 (N51)<sub>3</sub>。

经由在具有掩蔽的硫醇基团的三马来酰亚胺胆酸模板上连接三个带硫醇标签的单体 N51 肽硫代丙酸酰基 -N51 来合成三聚肽复合物。在连接后, 去除掩蔽的硫醇以形成可缀合的胆酸-(N51)<sub>3</sub>。

[0150] 将半胱胺 (1.15 g) 和乙酰氨基甲醇 (1 g) 的混合物溶解于 TFA (三氟乙酸) 中, 并且在室温下搅拌 3 小时, 以获得分子量 148 Da 的 (S-乙酰氨基甲基) 半胱胺 7; 而发现的 (M+H) 离子峰为 149 Da。

[0151] 将烯丙基胆酸 2 (100 mg) 与 EDC (二氯化乙烯)、DIEPA (N,N-二异丙基乙胺) 一起在 DCM (二氯甲烷) 中混合, 随后添加溶解于 DCM 中的化合物 7 (56 mg)。通过 TLC 监测反应并且发现在 2 小时内完成。在反应混合物用 DCM 稀释后, 加入 1 N HCl, 并且将化合物提取到有机层内。将有机层在  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  上干燥, 并且浓缩以获得分子量 658.97 Da 的化合物 8; 而发现的 (M+H) 离子峰为 659 Da。

[0152] 将化合物 8 (500 mg)、半胱胺盐酸盐和偶氮二异丁腈 (AIBN) 与甲醇 (5 ml, 由氮脱气) 在光反应器中混合。将混合物用 UV 灯在 254 nm 下照射, 并且在室温下搅拌经过三天。通过 LC-MS 和 TLC 监测反应进展。在反应完成后, 将水加入反应混合物中, 随后为乙酸乙酯 / 1 N HCl (1:1), 以获得具有理论分子量 889.5 Da; 和观察到的分子量 890 Da ((M+H) 离子峰) 的产物三氨基胆酸 (化合物 9)。

[0153] 将化合物 9, (50 mg, 1 当量) 溶解于 2 ml DMF 中, 随后加入  $\gamma$ -马来酰亚胺丁酸 (4.5 当量)、HATU (4.5 当量) 和三乙胺 (9 当量)。将反应搅拌 2 小时以完成。在蒸发后, 用乙酸乙酯 / 1 N HCl、 $\text{NaHCO}_3$  和盐水提取残渣。有机层在  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  上干燥随后过滤。将滤液浓缩, 并且纯化以获得理论分子量 1384.6 Da 的化合物 10; 发现的 (M+H) 离子峰为 1385.6 Da。

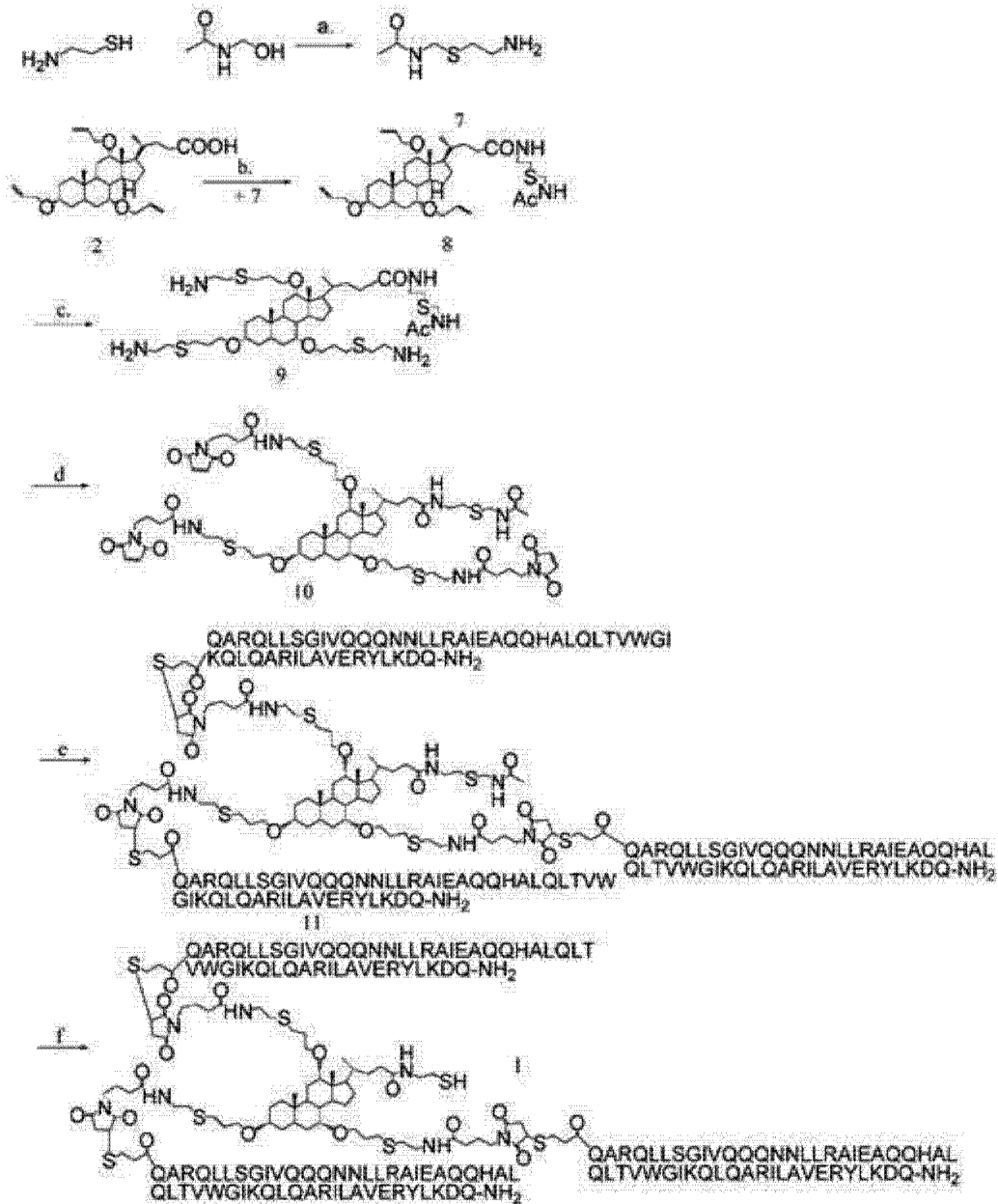
[0154] 肽 N51 使用 Fmoc/t-Bu 化学在自动化肽合成仪上通过固相合成。使用的树脂是 H-Rink Amide ChemMatrix (Matrix-Innovation Inc.)。用双重偶联进行酰化 30 分钟, 使用超过树脂游离氨基 5-10 倍过量的氨基酸。用等摩尔量的 HATU [2-(1H-9-氮杂苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基-脲六氟磷酸酯] 和 2 倍摩尔过量的 DIEA (N,N-二异丙基乙胺) 活化氨基酸。侧链保护基团如下: 三苯甲基用于谷氨酰胺、天冬酰胺和组氨酸; 叔丁氧羰基用于赖氨酸和色氨酸; 叔丁基用于谷氨酸、苏氨酸和丝氨酸; 和 2,2,4,6,7-五甲基二氢苯并呋喃-5-磺酰用于精氨酸。在序列装配后, 在 HATU 和三乙胺的存在下, 在肽树脂上的 N 末端氨基偶联至 DMF 中的 3-(三苯甲基) 丙酸。在合成结束时, 用切割混合物 (92.5% 三氟乙酸、2.5% 三异丙基硅烷、2.5% 水和 2.5% 3,6-二氧杂-1,8-辛烷二硫醇) 在室温下处理干燥肽树脂 2 小时。将树脂过滤并将溶液加入冷二乙醚, 以便沉淀肽。在离心后, 将肽团块用冷二乙醚洗涤两次, 以去除有机清除剂。将最终团块干燥, 重悬浮于 25% 乙酸水溶液中, 并且冻干。

[0155] 粗制肽通过反相 HPLC 进行纯化, 使用 Jupiter C18 柱 (250 x 30 mm, 10  $\mu$ , 300A)、在 0.1% 三氟乙酸的存在下的水 / 乙腈梯度, 流速 40 ml/分钟。在 Jupiter C18 柱 (150 x 4.6 mm, 5  $\mu$ , 300 A) 上执行分析型 HPLC。纯化的肽通过电喷雾质谱测定法进行表征。ESI 谱显示电荷状态 +4 至 +7。解卷积质量为 6022 Da (序列预测的质量为 6023 Da)。

[0156] 将纯化的肽硫代丙酸 N51 (15 mg) 溶解于 5 ml 20 mM Tris 缓冲液 (pH 7.0) 中。将溶解于 2 ml 乙腈溶液中的模板化合物 10 (1.05 mg) 加入肽溶液中。通过 HPLC 监测反应。在 1 小时后, 将所得到的混合物直接装载到 C18 柱上, 并且纯化以获得理论平均分子量 19455 Da 的产物 11。ESI 谱显示电荷状态 +13 至 +18。解卷积质量为 19451.5 Da。

[0157] 将化合物 11 (5 mg) 溶解于 5 ml pH 4 含有乙酸的水性缓冲液中。使乙酸汞 (2.1 mg) 溶解于 2 ml 乙腈中, 并且逐滴加入肽溶液中。通过 HPLC 监测反应。在 1 小时后, 将 12  $\mu$ l 2-巯基乙醇加入混合物中。将所得到的混合物在 50°C 下加热 3 小时, 随后使用 PD10 脱盐柱 (GE Healthcare Lifesciences, Piscataway, NJ) 纯化, 使用 5% 乙酸作为洗脱剂。ESI

谱显示电荷状态 +13 至 +19。解卷积质量为 19384 Da (序列预测的质量为 19384 Da)。



### 12. 带有硫醇柄的ChA-(N51)<sub>3</sub>

带有硫醇柄的ChA-(N51)<sub>3</sub>的合成

(a). TFA (b). (i) EDC, DCM中的DIEPA. (ii) 添加7 (c) 硫代乙胺, AIBN, 甲醇, 在光反应器中,  $\lambda = 254 \text{ nm}$  (d). HATU, 三乙胺,  $\gamma$ -马来酰亚胺丁酸 (e) 硫代丙酸-N51, pH 7缓冲液, 包含20mM Tris和0.5N 羟胺. (f). Hg(Oac)<sub>2</sub>,  $\beta$ -巯基乙醇, 在HOAc中(pH 4), 50°C, 进行3小时

[0158] 免疫原产生: 重组肽

#### 1. 重组 (CCIZN36)<sub>3</sub>

编码下文列出的肽序列的合成基因通过 GeneArt® (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA) 由合成寡核苷酸和 / 或 PCR 产物装配。使用 NdeI 和 BamHI 克隆位点, 将片段克隆到 pET20b\_A092 (EMD Biosciences, Gibbstown, NJ) 内。从经转化的细菌中纯化质粒, 并且通过 UV 光谱法测定浓度。通过测序验证最终产物。在使用的限制位点内的序列一致为 100%。质粒在使用前冻干。

**CCIZN36:**

CCGGIKKEIEAIKKEQEAIKKEIEAIKEKISGIVQOQNLLRAIEAQHLLQLTVWGIKQLO  
ARIL (SEQ ID NO:46)

[0159] 根据制造商的说明书,用编码 CCIZN36 的基因的质粒转化 BL21 (DE3) pLysS 感受态细胞 (Invitrogen™, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA)。将经转化的细胞在具有 50 μg/mL 氨苄青霉素和 34 μg/mL 氯霉素的 Luria-Bertani (LB) 琼脂上铺平板,并且在 37°C 下生长过夜。从板中挑选几个集落,并且用单一集落接种具有抗生素的 LB 培养基,并且在 37°C 下伴随在 225 rpm 下的振荡生长过夜。还对于来自过夜培养基的每个集落制备甘油原种,并且甘油原种用作未来按比例扩大表达实验的原材料。具有抗生素的新型 LB 培养基用过夜预培养物的 1:40 稀释物接种,直至在 600 nm 处的光密度达到 0.6-0.8。随后通过添加 0.5 mM 异丙基 -β-D- 半乳糖硫代吡喃糖苷 (IPTG) 诱导蛋白质表达。培养物在 37°C 下生长另外 3-4 小时,并且随后通过在 4°C 下以 10,000xg 离心 15 分钟收获细胞。将细胞团块贮存于 -20°C 下。

[0160] 将细胞重悬浮于裂解缓冲液 (50 mM Tris, pH 8.0, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 70 U/mL Benzonase® (EMD Biosciences, Gibbstown, NJ)、1X Roche Complete™ 蛋白酶抑制剂混合物 (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN)) 中,并且通过 3 次经过微射流机进行裂解。裂解产物随后通过离心得到澄清。SDS-PAGE 和蛋白质印迹分析证实大多数 CCIZN36 产物在不溶性级分中检测到。相应地,通过反复匀浆化和离心步骤由不溶性级分制备洗涤的包涵体。最终洗涤的包涵体通过离心形成团块并且在 -70°C 下冷冻。

[0161] 将纯化的包涵体 (2 g) 连同 200 mg TCEP [(三(2-羧乙基)膦)] 一起溶解于具有 0.1% TFA 的 50% 乙腈水溶液中。溶液在室温下维持过夜。第二天早晨,通过离心澄清剂。将含有重组肽的上清液装载到 Jupiter C18 柱 (250 x 30 mm, 10 μ, 300Å) 上,并且通过反相 HPLC 进行纯化,使用在 0.1% 三氟乙酸的存在下的水 / 乙腈梯度,流速 40 ml/分钟。在 Vydac® 联苯基柱 (150 x 4.6 mm) 上执行分析型 HPLC,并且肽通过电喷雾质谱测定法进行表征。ESI 谱显示电荷状态 +4 至 +11。解卷积质量为 7510.1 Da (序列预测的质量为 7506 Da)。

[0162] 将纯化的肽前体 (60 mg) 溶解于 80 ml 缓冲液 (pH 7.5) 中,所述缓冲液含有 1 N 胍、0.2 M HEPES、1 mM EDTA、1.5 mM 还原型谷胱甘肽和 0.75 mM 氧化型谷胱甘肽。通过 HPLC 监测氧化反应。在过夜后,通过将 500 μl TFA 加入溶液来终止反应,并且将溶液直接装载到 Vydac® 联苯基柱 (22 x 250 mm, 10-15 μ) 上,并且通过反相 HPLC 进行纯化,使用在流速 20 ml/分钟的 0.1% 三氟乙酸的存在下的水 / 乙腈梯度。分析型 HPLC 分析与上文描述的相同。通过高分辨率质谱法进一步分析对应于共价三聚体的合并级分。ESI 谱显示电荷状态 +12 至 +27。解卷积质量为 22524 Da (序列预测的质量为 22511 Da)。

[0163] 2. 重组 (CCIZN51),

编码下文列出的肽序列的合成基因通过 GeneArt® 由合成寡核苷酸和 / 或 PCR 产物装配。使用 NdeI 和 BamHI 克隆位点,将片段克隆到 pET20b\_A092 内。从经转化的细菌中纯化质粒,并且通过 UV 光谱法测定浓度。通过测序验证最终产物。在使用的限制位点内的序列一致为 100%。质粒在使用前冻干。

**CCIZN51:**

CCGGIKKEIEAIKKEQEAIKKKIEAIEKEIVQARQLLSGIVQQNNLLRAIEAQOHLQLTV  
WGIKQLQARILAVERYLKDQ (SEQ ID NO:40)

[0164] 根据制造商的说明书,用编码 CCIZN51 的基因的质粒转化 BL21 (DE3) pLysS 感受态细胞 (Invitrogen™)。将经转化的细胞在具有 50 μg/mL 氨苄青霉素和 34 μg/mL 氯霉素的 Luria-Bertani (LB) 琼脂上铺平板,并且在 37°C 下生长过夜。从板中挑选几个集落,并且用单一集落接种具有抗生素的 LB 培养基,并且在 37°C 下伴随在 225 rpm 下的振荡生长过夜。还对于来自过夜培养基的每个集落制备甘油原种,并且甘油原种用作未来按比例扩大表达实验的原材料。具有抗生素的新型 LB 培养基用过夜预培养物的 1:40 稀释物接种,直至 600 nm 处的光密度达到 0.6-0.8。随后通过添加 0.5 mM 异丙基 -β-D- 半乳糖硫代吡喃糖苷 (IPTG) 诱导蛋白质表达。培养物在 37°C 下生长另外 3-4 小时,并且随后通过在 4°C 下以 10,000 x g 离心 15 分钟收获细胞。将细胞团块贮存于 -20°C 下。

[0165] 将细胞重悬浮于裂解缓冲液中,并且通过 3 次经过微射流机进行裂解。裂解产物随后通过离心得到澄清。SDS-PAGE 和蛋白质印迹分析证实大多数 CCIZN51 产物在不溶性级分中检测到。相应地,通过反复匀浆化和离心步骤由不溶性级分制备洗涤的包涵体。最终洗涤的包涵体通过离心形成团块并且在 -70°C 下冷冻。

[0166] 将包涵体溶解于含有 4 M 尿素、20 mM HEPES 和 20 mM TCEP 的缓冲液中。溶液在室温下维持过夜。在离心后,将上清液装载到 Vydac® 联苯基柱 (22 x 250 mm, 10-15 μ) 上,并且通过反相 HPLC 进行纯化,使用在 0.1% 三氟乙酸的存在下的水 / 乙腈梯度,流速 20 ml/分钟。在 Vydac® 联苯基柱 (150 x 4.6 mm) 上执行分析型 HPLC。纯化的肽通过电喷雾质谱测定法进行表征。ESI 谱显示电荷状态 +6 至 +11。解卷积质量为 9419.4 Da (序列预测的质量为 9417 Da)。

[0167] 将纯化的肽前体 (20 mg) 溶解于 40 ml 缓冲液 (pH 7.5) 中,所述缓冲液含有 1 M 胍、0.2 M HEPES、1 mM EDTA、1.5 mM 还原型谷胱甘肽和 0.75 mM 氧化型谷胱甘肽。通过 HPLC 监测氧化反应。在过夜后,通过将 500 μl TFA 加入溶液来终止反应,并且将溶液直接装载到 Vydac® 联苯基柱 (22 x 250 mm, 10-15 μ) 上,并且通过 RP HPLC 进行纯化,使用在 0.1% 三氟乙酸的存在下的水 / 乙腈梯度,流速 20 ml/分钟。分析型 HPLC 分析与上文描述的相同。通过高分辨率质谱法进一步分析对应于共价三聚体的合并级分。ESI 谱显示电荷状态 +20 至 +27。解卷积质量为 28241.6 Da (序列预测的质量为 28248 Da)。

[0168] 3. 重组 SZN51

根据制造商的说明书,用编码 SZN51 的基因的质粒转化 BL21 (DE3) pLysS 感受态细胞 (Invitrogen)。将经转化的细胞在具有 50 μg/mL 氨苄青霉素和 34 μg/mL 氯霉素的 Luria-Bertani (LB) 琼脂上铺平板,并且在 37°C 下生长过夜。从板中挑选几个集落,并且用单一集落接种具有抗生素的 LB 培养基,并且在 37°C 下伴随在 225 rpm 下的振荡生长过夜。还对于来自过夜培养基的每个集落制备甘油原种,并且甘油原种用作未来按比例扩大表达实验的原材料。具有抗生素的新型 LB 培养基用过夜预培养物的 1:40 稀释物接种,直至 600 nm 处的光密度达到 0.6-0.8。随后通过添加 0.5 mM 异丙基 -β-D- 半乳糖硫代吡喃糖苷 (IPTG) 诱导蛋白质表达。培养物在 37°C 下生长另外 3-4 小时,并且随后通过在 4°C 下以 10,000 x g 离心 15 分钟收获细胞。将细胞团块贮存于 -20°C 下。

[0169] 将细胞重悬浮于裂解缓冲液中,并且通过 3 次经过微射流机进行裂解。裂解产物随后通过离心得到澄清。SDS-PAGE 和蛋白质印迹分析证实大多数 SZN51 产物在不溶性级分中检测到。相应地,通过反复匀浆化和离心步骤由不溶性级分制备洗涤的包涵体。最终洗涤的包涵体通过离心形成团块并且在  $-70^{\circ}\text{C}$  下冷冻。

[0170] 将洗涤的包涵体 (0.2 g) 溶解于含有具有 0.1% TFA 的 20 ml 15% 乙腈 / 水中。在通过 0.45 $\mu\text{m}$  PVDF 盘 (Whatman) 过滤后,将溶液直接装载到 Vydac<sup>®</sup> C4 柱 (22 x 250 mm, 300 $\text{\AA}$ ) 上,并且通过反相 HPLC 进行纯化,使用在流速 15 ml/ 分钟的 0.1% 三氟乙酸的存在下的水 / 乙腈梯度。在 Vydac<sup>®</sup> C4 柱 (150 x 4.6 mm) 上执行分析型 HPLC。纯化的肽通过电喷雾质谱测定法进行表征。ESI 谱显示电荷状态 +5 至 +12。解卷积质量为 9249.4 Da (序列预测的质量为 9243 Da)。

#### [0171] 4. 重组 5-螺旋

将表达 C 末端带组氨酸标签的 5-螺旋肽的冷冻重组大肠杆菌细胞解冻,并且重悬浮于 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 和 0.3 M NaCl 中。用微射流机 (两次经过 @  $\sim 18,000$  psi) 制备裂解产物。通过离心收集不溶性级分,并且弃去上清液。通过使用 50 mM Tris-HCl, pH 8.0、0.3 M NaCl 和 0.05% Triton X-100 的多轮重悬浮和离心来洗涤不溶性级分。将洗涤不溶性级分溶解于 8 M 盐酸胍 (Gd-HCl) 中。将胍可溶性提取物与 IMAC 树脂的浆混合,并且在  $65^{\circ}\text{C}$  下混合一小时。允许浆冷却并允许树脂通过重力沉降。将冷却的树脂转移至玻璃层析柱,并且用 50 mM 磷酸钠、20 mM 咪唑、0.3 M 氯化钠和 8 M Gd-HCl, pH 8.0 洗涤柱。用 50 mM 磷酸钠、300 mM 咪唑、0.3 M 氯化钠和 8 M Gd-HCl, pH 8.0, 从柱中洗脱 5 螺旋肽。将 IMAC 产物用三氟乙酸 (TFA) 和乙腈 (ACN) 分别掺料至 0.1% 和 5%, 并且在  $50^{\circ}\text{C}$  下通过反相层析进行纯化。用 5% 至 80% ACN 的 0.1% TFA 溶液的线性梯度,从柱中洗脱 5 螺旋肽。将含肽级分合并,并且通过在氮气流下的蒸发去除 ACN。使用 Superdex<sup>®</sup> 200 柱通过制备型尺寸排阻层析进一步纯化 5 螺旋肽,使用 50 mM Tris HCl, pH 8.0 和 150 mM NaCl 作为运行缓冲液。将含有单体 5-螺旋肽的级分合并,无菌过滤并且以小等分试样在液氮中速冻用于在  $-70^{\circ}\text{C}$  下的长期贮存。

#### [0172] 肽表征

##### 1. 圆二色性

所有测量均在 J-810 分光偏振计 (Jasco, Inc., Easton, MD) 上在  $20^{\circ}\text{C}$  下进行,使用 0.1 cm 径长的矩形石英试池。使用 1 秒时间应答和 100 nm/ 分钟扫描速度获得谱,并且对于五次采集求平均值。通过定量氨基酸分析测定原液浓度。对在乙酸钠 (25-50 mM)、NaCl (50-150 mM), pH 4-4.5 中的肽溶液执行标准测量。根据 Chen 等人, 1974, *Biochemistry* 13:3350-3359, 基于在 222 nm 下的摩尔椭圆率计算  $\alpha$  螺旋百分比。使用  $2^{\circ}\text{C}$  / 分钟增加,通过监测根据温度在 222 nm 下的 CD 信号中的变化测定热稳定性。由合作热解折叠过渡的中点测定解链温度 ( $T_m$ )。对于具有  $T_m > 90^{\circ}\text{C}$  的肽,还在 2 M 盐酸胍的存在下执行热变性实验。

##### [0173] 2. 分析超速离心

所有分析超速离心 (AU) 实验均用 XL-I 超速分析离心机 (Beckman Coulter, Inc., Indianapolis, IN) 在  $20^{\circ}\text{C}$  下执行。对于沉降速度分析,样品以 48,000 rpm 在  $20^{\circ}\text{C}$  下执行 5 小时,其中径向吸光度扫描大约每 4 分钟获得。g\*(s) 分析用程序 DCDT+, 版本 2.2.1 (John

Philo, Thousand Oaks, CA) 或 Optima XL-I 数据分析软件 (Beckman Coulter, Inc.) 执行。沉降平衡实验以三个不同装载浓度和三个不同转子速度 (16, 000、20, 000 和 30, 000) 进行。使用 Optima XL-I 数据分析软件或使用 Heteroanalysis 版本 1.1.33 (来自 Analytical Ultracentrifugation Facility, Biotechnology and Bioservices Center of the University of Connecticut) 计算分子量。

#### [0174] 3. D5/5 螺旋竞争结合测定 (DCBA)

如先前 Caulfield 等人, 2010, *J Biol Chem* 285:40604-40611 中描述的, 执行基于荧光共振能量转移 (FRET) 的体外结合测定。简言之, 测定使用缀合至钷穴 (Eu-D5) 和重组 gp41 模拟物 5 螺旋 (5H) 的生物素化衍生物 D5 IgG (参见美国专利号 7, 744, 887)。生物素-5H 与链霉抗生物素蛋白缀合的别藻蓝蛋白 (APC) 底物结合, 以形成 5H-SA-APC 复合物。Eu-D5 与 5H 的结合导致从 Eu 到 APC 的 FRET。当反应系统在 340 nm 的波长处激发时, 结合的 Eu-D5 量在 665 nm 的发射波长下进行测量, 并且总 Eu 在 620 nm 的发射波长下进行测量。数据报告为  $10000 \times$  在 665 nm 处的信号与在 620 nm 处的信号的比。与任一组分竞争结合的试剂引起比值中的降低。

#### [0175] 4. p4-2R5 中和测定

该中和测定如 Joyce 等人, 2002, *J Biol Chem* 277:45811-45820 中先前描述的, 执行, 伴随下述修饰: 将 HeLa P4R5 细胞以 1000 细胞 / 孔种植到 384 孔板中, 并且第二天在感染后 48 小时的免疫血清或分馏 IgG 的系列稀释物的存在下, 用适当的 HIV-1 或 SHIV 病毒以大约 0.01 的感染复数感染, 并且将细胞裂解并且使用化学发光底物 (GalScreen<sup>®</sup>, Applied Biosystems<sup>™</sup>, Life Technologies Corp., Carlsbad, CA) 测量  $\beta$ -半乳糖苷酶活性。对于纯化 IgG 的分析, 数据表示为  $IC_{50}$ , 定义为导致化学发光信号的 50% 减少的 IgG 浓度。对于血清分析,  $IC_{50}$  定义为导致 50% 减少的化学发光信号的血清稀释度倒数。

#### [0176] 结果

肽表征由通过 CD 光谱法进行二级结构评价和通过 AUC 进行低聚物状态的生物物理评价组成。D5 表位的完整性和呈现在 DCBA 和 P4/2R5 中和测定中进行评估, 以测量包含在前发夹中间物内的疏水口袋的适当呈现。

[0177] 表 2 概括了关于产生的肽构建体的数据。一般而言, 肽的可溶性在 3 至 5 的 pH 范围内是最佳的, 因此 CD 和 AUC 测定在其中 TFA 抗衡离子导致 pH  $\sim$ 3.5 的水中执行, 或在乙酸钠缓冲液 pH 4 中是最可靠的。在该 pH 范围内, 单体和三聚肽构建体显示高百分比的  $\alpha$  螺旋结构, 与预测一致。基于 NHR 的肽构建体显示随着 pH 增加, 特别是在 pH 6-8 的范围内, 朝向聚集和沉淀的渐增趋势。单体 N51、N51-2B 和 N51-3B 肽均显示出对于自结合的强优先度, 如从观察到的与预测的分子量的 AUC 比所证实的。然而, 大多数这些构建体在接近中性 pH 下是相对不稳定的, 并且显示出显著聚集。通过添加 SZ 三聚化结构域使 N51 稳定的早期尝试是部分成功的, 并且在溶液中该肽自装配以形成明显的三聚体-四聚体平衡。这些肽的螺旋性在全长 N51 背景下是最佳的, 因为 N51 和 SZN51 的 C 末端截短的  $\Delta$ 23 形式都显示减少的螺旋含量。通过在多个浓度和多个转子速度下的沉降平衡对 N51 和 SZN51 家族肽的 AUC 分析获得了变化相当大的计算的分子量值, 表明分析模型没有精确地拟合所有数据。最可能的解释是, 虽然这些肽显示自结合的倾向, 但该寡聚化是不受控制的, 并且随着时间过去形成多重形式的渐增高级寡聚体和聚集物。相比之下, 经由改造的二硫化物 (CCIZN51)<sub>3</sub>

的氧化或通过化学支架例如 KTA(N51)<sub>3</sub> 稳定的三聚 N51 肽显示极高程度的二级结构, 并且 AUC 具有接近统一的比例, 意味着几乎没有三聚体的明显聚集或自结合。

[0178] 通过测量其在 DCBA 测定中竞争结合 5-螺旋的能力, 来评价多种肽构建体对中和单克隆抗体 D5 呈现构象上正确的结合表位的能力。IC<sub>50</sub> 值跨越多种构建体是可比较的, 除了在 N51-2B 和 N51-3B 中使用的突变对 D5 结合具有明显的负面影响之外。尽管这些肽中的氨基酸取代都没有改变定义为 L568、W571、G572 和 K574 的关键 D5 接触残基, 但共同突变 L565A 与 L568 紧密接近, 并且可以对结合具有无法预测的作用。相比之下, 这些肽显示与天然 N51 可比较的对于病毒进入抑制的 IC<sub>50</sub> 值, 表明突变没有不利地影响疏水口袋结合 C-七肽重复肽的能力, 并且因此充当融合的显性失活抑制剂。一般而言, 跨越肽系列观察到的相对恒定的抗病毒活性提供了前发夹中间物结构的适当呈现得到维持的定性证据。值得注意的是在 KTA(N51)<sub>3</sub> 中实现了对 V570A 的抑制效力的大约 10 倍增强。

表2. 纯化的肽构建体的生物物理和功能评价

肽	CD			AUC				DCBA IC <sub>50</sub> (nM)	p42R5 IC <sub>50</sub> (nM)	
	%α螺旋	条件	Tm (-C)	预测的MW	观察到的MW	比	条件		V570A	HXB2
N51 (L587)	95	b	NA	5936	15490	2.6	a	110	20.2	104
KTA(N51) <sub>3</sub> (L990)	98	b	NA	18533	25200	1.4	a	88.3	1.49	151
[(CC)Z(N51) <sub>3</sub> ] (L316)	95	b	NA	28250	ppt (pH 7)	ND	NA	0.997	23.2	71.2
CHA(N51) <sub>3</sub>	NA		NA	19308	NA	NA	NA	92.8	56.4	194
N51-2B (L583)	97	a	NA	6036	22365	3.6	a	>300	33.4	80.9
N51-3B (L584)	105	a	NA	5936	20104	3.3	a	>300	49.3	107
KTA(N51-3B) <sub>3</sub> (L510)	86	c	NA	18407	ppt (pH 7)	ND	NA	38.4	29.1	79.4
[SZ(N51Δ23)]	129	e	NA	9244	34862	3.8	c		52.1	10.13
[SZ(N51Δ23)]	139	e	NA	6520	20755	3.2	c			154.4
SZ(N51Δ23)	72	f	NA	6389	NA					
N51Δ23	10	f	NA	3212	NA					
[(CC)SZ(N51) <sub>3</sub> ] (L928)	90	a	NA	29118	39562	1.4	b	ND	ND	ND
重组 5-螺旋	75		>90	25397	25014	0.96		1002	0.82	12.4
对照 D5								0.058	61.7	179
对照 T20								NA	8.66	8.25

CD条件:

- a: 50 mM 乙酸钠, 0.15 M NaCl, pH 4
- b: 水
- c: 25 mM 乙酸钠, pH 4
- d: 25 mM 乙酸钠, 0.05 M NaCl, pH 4
- e: 10 mM 磷酸钠, 0.05M NaCl, pH 7
- f: 10 mM 磷酸钠, pH 7

AUC条件:

- a: 25 mM 乙酸钠, 0.15 M NaCl, pH 4
- b: 25 mM 乙酸钠, 0.05 M NaCl, pH 4
- c: 50 mM HEPES, 0.05M NaCl, pH 7.3

[0179] 实施例 2

血清学

1. ELISA

通过针对直接加入链霉抗生物素蛋白包被的 96 孔板 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Pittsburg, PA) 的生物素化的肽测试免疫血清样品来测定血清终点稀释度。生物素化的肽以在 PBS 中的 4 μg/ml 浓度 / 孔在 4°C 下包被过夜。板用含有 0.05% Tween-20 的 PBS (PBST) 洗涤六次, 并且用含有 3% (v/v) 脱脂奶粉的 PBST (PBST-乳) 封闭。将测试样品、免疫前和免疫样品稀释, 以 1:100 开始, 并且系列稀释 4 倍, 在 100 μl / 孔的最终体积中八次。板在室温下温育 2 小时, 随后为用 PBST 的六次洗涤。五十微升 HRP 缀合的山羊抗豚鼠 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA) 或山羊抗人

(Invitrogen) 二抗在 PBST-乳中分别以 1:5000 或 1:2000 稀释,并且加入每个孔中,并且在室温下温育一小时。将板洗涤六次,随后添加以 100  $\mu$ l/孔的底物 (TMB;Virolabs, Inc., Chantilly, VA),并且在 3-5 分钟显色后用 TMB 停止液停止。抗体滴度测定为在 450 nm 下给出超过缀合对照孔的平均值加上 2 标准差的 OD 值的最高稀释度的倒数。

[0180] 2. D5/5 螺旋竞争结合测定 (DCBA)

如先前 Caulfield 等人,2010, *J Biol Chem* 285:40604-40611 中描述的,执行基于荧光共振能量转移 (FRET) 的体外结合测定。简言之,测定使用缀合至钬穴 (Eu-D5) 和重组 gp41 模拟物 5 螺旋 (5H) 的生物素化衍生物的 D5 IgG。生物素-5H 与链霉抗生物素蛋白缀合的别藻蓝蛋白 (APC) 底物结合,以形成 5H-SA-APC 复合物。Eu-D5 与 5H 的结合导致从 Eu 到 APC 的 FRET。当反应系统在 340 nm 的波长处激发时,结合的 Eu-D5 量在 665 nm 的发射波长下进行测量,并且总 Eu 在 620 nm 的发射波长下进行测量。数据报告为 10000 $\times$  在 665 nm 处的信号与在 620 nm 处的信号的比。与任一组分竞争结合的试剂引起比值中的降低。

[0181] 3. 中和测定

a. P4/2R5 测定

测定如 Joyce 等人,2002, *J Biol Chem* 277:45811-45820 中先前描述的执行,伴随下述修饰:将 HeLa P4R5 细胞以 1000 细胞/孔种植到 384 孔板中,并且第二天在免疫血清或分馏 IgG 的系列稀释物的存在下,用适当的 HIV-1 或 SHIV 病毒以大约 0.01 的感染复数感染。在感染后 48 小时,将细胞裂解并且使用化学发光底物 (GalScreen, Applied Biosystems) 测量  $\beta$ -半乳糖苷酶活性。对于纯化 IgG 的分析,数据表示为 IC<sub>50</sub>,定义为导致化学发光信号的 50% 减少的 IgG 浓度。对于血清分析,IC<sub>50</sub> 定义为导致 50% 减少的化学发光信号的血清稀释度倒数。

[0182] b. TZM-bl 测定

中和测量为在如先前描述的在 TZM-bl 细胞中的单轮感染后的萤光素酶报道基因表达中的减少。参见 Montefiori (2004) 于 *Current Protocols in Immunology* eds Coligan 等人 (John Wiley & Sons) 12.11.1-12.11.15 和 Li 等人,2005, *J Virol* 79:10108-10125。TZM-bl 细胞得自 NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, 如由 John Kappes and Xiaoyun Wu 投稿的。简言之,使 200 TCID<sub>50</sub> 病毒与一式两份的系列 3 倍稀释的测试样品一起在 150  $\mu$ l 的总体积中在 37 $^{\circ}$ C 下在 96 孔平底培养板中温育 1 小时。将新鲜的受胰蛋白酶作用的细胞 (在含有 75  $\mu$ g/ml DEAE 右旋糖酐的 100  $\mu$ l 生长培养基中的 10,000 个细胞) 加入每个孔中。一组对照孔接受细胞和病毒 (病毒对照),并且另一组仅接受细胞 (本底对照)。在 48 小时温育后,将 100  $\mu$ l 细胞转移到 96 孔黑色固体板 (Costar<sup>®</sup>),用于使用 Britelite Luminescence Reporter Gene Assay System (PerkinElmer Inc., Waltham, MA) 测量发光。中和滴度是在扣除本底 RLU 后,与病毒对照孔相比较,在其下相对发光单位 (RLU) 减少 50% 的稀释度。通过在 293T 细胞中的转染制备分子克隆的 ENV 假型病毒的测定原种,并且如 Li 等人,2005, *J Virol* 79:10108-10125 中所述在 TZM-bl 细胞中进行滴定。进化枝 A、B 和 C 参考 Env 克隆先前已得到描述。参见 Li 等人,2005, *J Virol* 79:10108-10125; Li 等人,2006, *J Virol* 80:11776-11790; 和 Blish 等人,2007, *AIDS* 21:693-702。

[0183] c. A3R5 测定

该测定根据萤光素酶报道基因表达中的减少,测量在 96 孔微量稀释板中的中和。A3R5 细胞 (A3.01/R5.6) 通过 US Medical HIV Research Program (MHRP 提供。这是人成淋巴细胞细胞系 CEM 的衍生物,其天然表达 CD4 和 CXCR4,并且在 MHRP 下改造为表达 CCR5。参见 Folks 等人,1985,*Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 82:4539-4543。细胞对通过大多数 HIV-1 毒株的感染是适当允许的。DEAE 右旋糖酐用于在中和测定过程中的培养基中,以增强传染性。因为细胞系不含报道基因,所以必须使用携带在病毒基因组中的报道基因的分子克隆的病毒。携带海肾萤光素酶报道基因 (Env. IMC. LucR 病毒) 的 Env 表达传染性分子克隆提供了用于中和测定的合适感染。报道基因的表达在感染后不久通过病毒 Tat 蛋白质反向诱导。萤光素酶活性通过发光进行定量,并且与初始接种物中存在的传染性病毒颗粒数目成正比。测定对于高流通容量在 96 孔培养板中执行。克隆细胞群体的使用提供了增强的精确度和均匀性。该测定已对于用通过在 293T 细胞中的转染产生的 Env. IMC. LucR 病毒的多轮感染进行标准化。

#### [0184] 实施例 3

##### HIV 350 和 365 :豚鼠免疫原性

在第 0、4 和 8 周时, Duncan-Hartley 豚鼠 (HIV-350, n=8/ 组 \*) 用 100 微克肽免疫原肌内免疫接种三次。在 20 mM HEPES 缓冲液,中性 pH 下重构的肽配制到 180  $\mu$ g 羟基磷酸铝硫酸盐 (Merck & Co., Inc.) 加上 40  $\mu$ g Iscomatrix Adjuvant™ (CSL, Inc.) / 剂量中。对于每只动物在第 7 和 1 周时在血清分离管中经由全血收集血清样品,以及在第一次免疫接种前 (取血前) 的几次血清收集。

[0185] 研究 HIV-350 已测试肽构建体 SZN51。表 3a 显示了在研究中用于该组的免疫接种方案。

[0186] 在第 0、4 和 8 周时, Duncan-Hartley 豚鼠 (HIV-365, n=6/ 组) 用 30  $\mu$ g 肽免疫原肌内免疫接种三次。在 20 mM HEPES 缓冲液,中性 pH 下重构的肽配制到 180  $\mu$ g 羟基磷酸铝硫酸盐 (Merck & Co., Inc.) 加上 40  $\mu$ g Iscomatrix Adjuvant™ (CSL, Inc.) / 剂量中。对于每只动物在第 3、7 和 1 周时在血清分离管中经由全血收集血清样品。血清学如实施例 2 中所述执行。

[0187] 研究 HIV-365 评价 (1) 由合成 KTA (N51)<sub>3</sub>、KTA (N51-2B)<sub>3</sub>、KTA (N51-3B)<sub>3</sub>、ChA (N51)<sub>3</sub> 和重组 (CCIZN51)<sub>3</sub> 组成的一系列受限和稳定的 N51 三聚肽;和 (2) 与 (CCIZN36)<sub>3</sub> 随后为 KTA (N51)<sub>3</sub> 和 5 螺旋的方案相比较的同源 (CCIZN36)<sub>3</sub> 免疫接种。表 3b 显示了关于研究的免疫接种方案和组指定。血清学使用 p4/2R5 中和测定并且使用 TZM-b1 测定 (病毒 V570A) 和 A3R5 测定执行。

表3a: HIV-350的免疫接种方案

组	剂量1	剂量2	剂量3
350-8	SZN51	SZN51	SZN51

表3b. HIV-365的免疫接种方案

组	剂量1	剂量2	剂量3
365-1	(CCIZN51) <sub>3</sub>	(CCIZN51) <sub>3</sub>	(CCIZN51) <sub>3</sub>
365-2	KTA(N51) <sub>3</sub>	KTA(N51) <sub>3</sub>	KTA(N51) <sub>3</sub>
365-3	KTA(N51-2B) <sub>3</sub>	KTA(N51-2B) <sub>3</sub>	KTA(N51-2B) <sub>3</sub>
365-4	KTA(N51-3B) <sub>3</sub>	KTA(N51-3B) <sub>3</sub>	KTA(N51-3B) <sub>3</sub>
365-5	ChA(N51) <sub>3</sub>	ChA(N51) <sub>3</sub>	ChA(N51) <sub>3</sub>

[0188] 结果

图 2 呈现了如在 p4/2R5 测定中针对病毒 V570A 测定的,关于 N51 肽系列的中和测定数据的总结。非共价受限的重组 SZN51 肽明确地在其引发中和抗体应答的能力方面次于所有剩余肽免疫原。这明确证实通过用 CCIZ 或化学支架核心的支架实现的 N 肽的共价稳定,对于引发所需功能免疫应答是关键的。

[0189] 表 4 呈现了如在 T=11 时间点 (对于两个动物个体在最后一次剂量后 3 周) 测定的中和抗体滴度和作为计算的几何平均值的总结。一致地,对于所测试的所有病毒毒株,含有与 (CCIZN36)<sub>3</sub> 或 5-螺旋组合的 N51 肽的组在引发更高的中和抗体滴度方面优于单独的 (CCIZN36)<sub>3</sub>。

表4. 关于豚鼠研究HIV-365的血清学概括

动物	抗原和 TZM-bl IC <sub>50</sub> (1/dil)			ADR5 IC <sub>50</sub> (1/dil)					
	V570A		HK62	9020.A13	SC22.3C2	RRPA	MW965.26	C-60393_C3	
	M	D	T=11	T=11	T=11	T=11	T=11	T=11	
组 7: 30mcg (ccIZN36) <sub>3</sub> 1X MAA + 40mcg IMX/剂									
1	256	288	10.2	167	23.0	21	20.0	151	
2	136	60	7.3	66	41.0	25	20.0	59	
3	1014	412	5.1	233	41.0	29	20.0	170	
4	94.1	293	5.8	157	24.0	20	25.0	161	
5	2557	103	11.9	80	28.0	20	20.0	72	
6	2299	103	5.7	87	30.0	20	20.0	54	
几何平均值		520	168	7	115	30	22	21	99
组 8: 30mcg (ccIZN36) <sub>3</sub> /KTA(N51) <sub>3</sub> /5-螺旋 (加强免疫) 1X MAA + 40mcg IMX/剂									
1	2557	924	10.2	539	71.0	39	46.0	378	
2	2557	527	6.2	407	94.0	53	61.0	371	
3	2420	478	49.4	221	59.0	45	36.0	204	
4	2557	512	8.0	211	56.0	33	30.0	128	
5	2009	1574	6.3	281	62.0	38	47.0	234	
6	1130	260	6.3	257	45.0	37	40.0	165	
几何平均值		2124	604	10	301	63	40	42	228

[0190] 实施例 4

HIV 360 :非人灵长类免疫原性

该 NHP 研究在两个阶段中进行,以 (1) 测试多次 (CCIZN36)<sub>3</sub> 免疫接种的给药效应,和 (2) 评价在用 (CCIZN36)<sub>3</sub> 初免的动物中的异源抗原施用的利益。

[0191] 恒河猴 (恒河猴 (*Macaca mulatta*)), 三只 / 组, 在 0、1 和 2 个月时用 100、300 或 1000  $\mu\text{g}$  (CCIZN36)<sub>3</sub> 进行免疫接种。在 34 周时, 所有组均用另外剂量的 100 微克 (CCIZN36)<sub>3</sub> 进行加强。在加强免疫接种后几个月, 将猴再分组, 从而使得所有组均具有所有 (CCIZN36)<sub>3</sub> 剂量的相等表示。每组以 4 周间隔用下述方案进行免疫接种: 组 1 给予 (CCIZN36)<sub>3</sub> 的两次免疫接种; 组 2 用 KTA(N51)<sub>3</sub> 和 5 螺旋序贯免疫接种; 并且组 3 用 5 螺旋和 KTA(N51)<sub>3</sub> 序贯免疫接种。在 20 mM HEPES 缓冲液, 中性 pH 中重构的肽或 5 螺旋在 180  $\mu\text{g}$  羟基磷酸铝硫酸盐 (Merck & Co., Inc.) 加上 40  $\mu\text{g}$  Iscomatrix Adjuvant™ (CSL, Inc.) / 剂量中配制。收集在所示时间点的全血用于血清并且用于血清学分析, 指示结合和病毒中和测定。

[0192] 表 5 总结了关于完整研究的方案。

表5. 关于非人灵长类研究HIV-360的免疫接种方案

组 #	T=0	T=4	T=8	T=34	T=62	T=66
1	0.1 mg (CCIZN36) <sub>3</sub>	0.1 mg (CCIZN36) <sub>3</sub>	0.1 mg (CCIZN36) <sub>3</sub>	0.1 mg (CCIZN36) <sub>3</sub>	0.1 mg (CCIZN36) <sub>3</sub>	0.1 mg (CCIZN36) <sub>3</sub>
2	0.3 mg (CCIZN36) <sub>3</sub>	0.3 mg (CCIZN36) <sub>3</sub>	0.3 mg (CCIZN36) <sub>3</sub>	0.1 mg (CCIZN36) <sub>3</sub>	0.1mg KTA(N51) <sub>3</sub>	0.1mg 5- 螺旋
3	1 mg (CCIZN36) <sub>3</sub>	1 mg (CCIZN36) <sub>3</sub>	1 mg (CCIZN36) <sub>3</sub>	0.1 mg (CCIZN36) <sub>3</sub>	0.1mg 5- 螺旋	0.1mg KTA(N51) <sub>3</sub>

2期(比较在第62直到66周时发生的同源相对于异源抗原施用)。

[0193] 结果

图 3 和 4 概括了关于整个研究的 ELISA 和 DCBA 测定结果。在第 11 周 (剂量 3 后 3 周) 时的 ELISA 和 DCBA 已显示良好应答, 但在 p4/2R5 测定中, 即便针对 D5 超敏 V570A\_HXB2 病毒的中和抗体滴度也是低的 (数据未示出)。所有动物随后在 34 周时施用第四个剂量的 100  $\mu\text{g}$  (CCIZN36)<sub>3</sub>。ELISA 和 DCBA 滴度在该 26 周休息期后下降, 并且如 T=36 周取血分析显示, 两者均得到加强。尽管 ELISA 滴度未达到先前峰水平 DCBA 滴度, 但功能 D5 样特异性的量度达到更高水平。然而, p4/2R5 中和抗体滴度再一次低于由先前豚鼠实验的预测, 其中免疫接种的动物发展可比较的 ELISA 和 DCBA 应答。在该点时, 将每组中的动物打乱, 以消除任何可能的偏差, 并且在另一个休息期后, 将异源抗原以序贯组合用于三个研究组中的两个。在这种情况下, 组 1 接受两个另外剂量的 (CCIZN36)<sub>3</sub>, 而组 2 接受 KTA(N51)<sub>3</sub> 随后为 5-螺旋, 并且组 3 接受 5-螺旋随后为 KTA(N51)<sub>3</sub>。ELISA 和 DCBA 滴度在 34 和 62 周之间的中间休息期过程中已显著下降, 但在免疫接种后得到加强。在接受异源抗原的组中明确观察到中和滴度中的重要差异, 如由图 5A-B 和 6 所见的。在 P4/2R5 和 A3R5 测定中测量的中和抗体应答的量级和宽度在组 2 和 3 中得到显著增强。

[0194] 图 7A-B 呈现了在研究的 1 期和 2 期过程中测定的 P4/2R5 中和抗体滴度的比较。针对 V570A\_HXB2 的应答在任一时期中未进行测量, 但针对 V570A 的应答在异源组中在响应动物数目和中和抗体滴度量级方面明确得到增强。

[0195] 实施例 5

**HIV-366:非人灵长类免疫原性**

该 NHP 研究的目的是扩展研究 HIV-360 的结果,并测定在异源组中观察到的增强是否可归于 KTA(N51)<sub>3</sub> 或 5-螺旋的添加或是否需要两者。

[0196] 恒河猴(恒河猴),六只/组,用 100 μg/剂量的配制抗原进行免疫接种。一组接受所有三种测试抗原以 100 μg/抗原的相等混合物的一系列四次同源免疫接种。免疫接种在 0、1、6 和 8 个月时给予。在 20 mM HEPES 缓冲液,中性 pH 中重构的肽或 5-螺旋在 180 μg 羟基磷酸铝硫酸盐(Merck & Co., Inc.)加上 40 μg Iscomatrix Adjuvant™ (CSL, Inc.) / 剂量中配制。收集在所示时间点的全血用于血清并且用于血清学分析,指示结合和病毒中和测定。

[0197] 表 6 概括了关于完整研究的方案。组 1 和 5 含有与 HIV-360 中测试的那些相同的抗原组合。另外,测试 KTA(N51)<sub>3</sub> 或 5-螺旋(组 2 和 3)同源施用的功效。组 4 测试序贯施用的 (CCIZN36)<sub>3</sub> 和 KTA(N51)<sub>3</sub> 的功效,而组 6 测试了其中所有免疫原在每个剂量时同时施用的多重抗原组合。

**表6. 关于非人灵长类研究HIV-366的免疫接种方案**

组 #	T=0	T=4	T=24	T=36
1	(ccIZN36) <sub>3</sub>	(ccIZN36) <sub>3</sub>	(ccIZN36) <sub>3</sub>	(ccIZN36) <sub>3</sub>
2	KTA(N51) <sub>3</sub>	KTA(N51) <sub>3</sub>	KTA(N51) <sub>3</sub>	KTA(N51) <sub>3</sub>
3	5-螺旋	5-螺旋	5-螺旋	5-螺旋
4	(ccIZN36) <sub>3</sub>	(ccIZN36) <sub>3</sub>	KTA(N51) <sub>3</sub>	KTA(N51) <sub>3</sub>
5	(ccIZN36) <sub>3</sub>	(ccIZN36) <sub>3</sub>	5-螺旋	KTA(N51) <sub>3</sub>

[0198] **结果**

图 8A-B 显示了在 P4/2R5 和 TZM-b1 测定中测定的,在最后一次免疫接种后两周收集的 T=38 周血样,针对病毒 V570A\_HXB2 的中和抗体滴度。在两个测定中最有效的中和滴度通过用单独的 KTA(N51)<sub>3</sub> 的同源免疫接种实现,尽管含有与 (CCIZN36)<sub>3</sub>, 或 (CCIZN36)<sub>3</sub> 和 5-螺旋二者组合的该肽的组趋于比单独的 (CCIZN36)<sub>3</sub> 更好的功效。三种免疫原的组合混合物看起来与序贯施用并无显著不同。

[0199] 在使用两个进化枝 C 层 1 病毒分离物 Ce0393 和 MW965 的 A3R5 测定中,独立地证实了对 V570A\_HXB2 的阳性中和结果,如图 9A-B 中所示。对 Ce0393 的结果使用在 38 周时的剂量 4 后两周血样生成,并且对于 Mw965 使用在 26 周时的剂量 3 后两周血样生成。如对于 V570A\_HXB2 超敏分离物观察到的,在同源 KTA(N51)<sub>3</sub> 组中观察到最有力的中和滴度,而含有该肽的其他组相对于单独的 (CCIZN36)<sub>3</sub> 或 5-螺旋趋于朝向更高的滴度。事实上,在所有测定中,单独的 5-螺旋在引发中和抗体滴度方面极弱,尽管如通过 ELISA 测定的,它在免疫方面是有力的(数据未示出)。此外,该分析提供了这些免疫原诱导跨-进化枝保护的能力的证据,因为数据显示了使用其序列衍生自进化枝 B 病毒分离物(HXB2)的肽,两个进化枝 C 病毒的阳性中和。

[0200] 表 7 呈现了关于所有组,在整个研究中收集的多个血样的中和滴度的几何平均值

概括。如预期的，中和滴度在剂量 3 和 4 之间的 12 周休息结束时的第 36 周时显著下降。对于所有其他时间点，相对于同源 (CCIZN36)<sub>3</sub> 或 5-螺旋 (组 2 和 3)，KTA(N51)<sub>3</sub> 组展示最高中和滴度，而含有 N51 的组也趋于比同源 (CCIZN36)<sub>3</sub> 或 5-螺旋更高。

表7. 在NHP研究HIV-366中的多个时间点，关于免疫原方案的中和抗体几何平均值滴度的比较。

组	中和抗体 IC <sub>50</sub> (1/稀释度)							
	p4/2R5		TZM-bl	ZM-bl(FcγR)	A3R5			
	V570A HIV-366	V570A HIV-360	V570A HIV-360	MW965 HIV-366	C60390 HIV-366	9020.A13 HIV-360	SC22.3C2 HIV-360	CH58 HIV-366
(ccIZN36) <sub>3</sub>	36	91	24	32	26	53	<20	20
(ccIZN36) <sub>3</sub> + KTA(N51) <sub>3</sub>	114	308	ND	53	45	ND	ND	22
(ccIZN36) <sub>3</sub> + 5-螺旋	28	152	ND	26	29	ND	ND	21
(ccIZN36) <sub>3</sub> + KTA(N51) <sub>3</sub> + 5-螺旋	NA	675	105	NA	NA	201	27	NA
(ccIZN36) <sub>3</sub> + 5-螺旋 + KTA(N51) <sub>3</sub>	NA	1348	87	NA	NA	250	28	NA

NA: 数据不可得  
ND: 未测定

[0201] 在聚集物中，来自研究 HIV-366 的结果提供了关于下述假设的强烈支持：在研究 HIV-360 中观察到的增强中和功效可归于 KTA(N51)<sub>3</sub>，而不是 5-螺旋的添加，并且直接支持受限的基于三聚 N51 的 N-肽从功能免疫角度来看是优良的主张。

[0001]

## 序列表

<110> MERCK SHARP & DOHME CORP.  
Joseph G. JOYCE  
Chengwei WU  
Elizabeth A. OTTINGER  
Victor GARSKY

<120> HIV-1 GP41前发夹中间物的稳定肽模拟物

<130> 23202

<150> 60/613, 264

<151> 2012-03-20

<160> 46

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 36

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> I型人免疫缺陷病毒

<400> 1

Ser	Gly	Ile	Val	Gln	Gln	Gln	Asn	Asn	Leu	Leu	Arg	Ala	Ile	Glu	Ala
1				5					10					15	
Gln	Gln	His	Leu	Gln	Leu	Thr	Val	Trp	Gly	Ile	Lys	Gln	Leu	Gln	
			20				25					30			
Ala	Arg	Ile	Leu												
			35												

<210> 2

<211> 51

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> I型人免疫缺陷病毒

<400> 2

Gln	Ala	Arg	Gln	Leu	Leu	Ser	Gly	Ile	Val	Gln	Gln	Gln	Asn	Asn	Leu
1				5					10					15	
Leu	Arg	Ala	Ile	Glu	Ala	Gln	Gln	His	Leu	Leu	Gln	Leu	Thr	Val	Trp
			20					25				30			
Gly	Ile	Lys	Gln	Leu	Gln	Ala	Arg	Ile	Leu	Ala	Val	Glu	Arg	Tyr	Leu
		35					40					45			
Lys	Asp	Gln													
		50													

[0002]

<210> 3  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 嵌合HIV-1 N38 GP41序列

<400> 3  
 Arg Gly Arg Gly Arg Gly Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp  
 20 25 30  
 Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala Gly  
 35 40

<210> 4  
 <211> 51  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> I型人免疫缺陷病毒

<400> 4  
 Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp  
 20 25 30  
 Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu  
 35 40 45  
 Lys Asp Gln  
 50

<210> 5  
 <211> 62  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> I型人免疫缺陷病毒

<400> 5  
 Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser Met Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln  
 1 5 10 15  
 Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu Leu Arg Ala Ile  
 20 25 30  
 Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln  
 35 40 45

[0003]

Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp  
 50 55 60

<210> 6  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 突变的N17 HIV-1 GP41序列

<400> 6  
 Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Ala Leu Ala Ala Ala Ile  
 1 5 10 15  
 Ala

<210> 7  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 突变的N17 HIV-1 GP41序列

<400> 7  
 Leu Ile Gln Leu Ile Trp Gly Ile Lys Gln Ile Gln Ala Arg Ile Leu  
 1 5 10 15

<210> 8  
 <211> 51  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 突变的N51 HIV1 GP41序列

<400> 8  
 Gln Ile Arg Glu Leu Ile Ser Lys Ile Val Glu Gln Ile Asn Asn Ile  
 1 5 10 15  
 Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Ala Leu Gln Leu Thr Val Trp  
 20 25 30  
 Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu  
 35 40 45  
 Lys Asp Gln  
 50

<210> 9  
 <211> 51  
 <212> PRT

[0004]

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变的N51 HIV-1 GP41序列

<400> 9

Gln	Ala	Arg	Gln	Leu	Leu	Ser	Gly	Ile	Val	Gln	Gln	Gln	Asn	Asn	Leu
1				5					10					15	
Leu	Arg	Ala	Ile	Glu	Ala	Gln	Gln	His	Ala	Leu	Gln	Leu	Thr	Val	Trp
			20					25					30		
Gly	Ile	Lys	Gln	Leu	Gln	Ala	Arg	Ile	Leu	Ala	Val	Glu	Arg	Tyr	Leu
		35					40					45			
Lys	Asp	Gln													
		50													

<210> 10

<211> 51

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变的N51 HIV-1 GP41序列

<400> 10

Asn	Ile	Arg	Gln	Leu	Leu	Ser	Gly	Ile	Val	Gln	Gln	Gln	Asn	Asn	Leu
1				5					10					15	
Leu	Arg	Ala	Ile	Glu	Ala	Gln	Gln	His	Leu	Leu	Gln	Leu	Thr	Val	Trp
			20					25					30		
Gly	Ile	Lys	Gln	Leu	Gln	Ala	Arg	Ile	Leu	Ala	Val	Glu	Arg	Tyr	Leu
		35					40					45			
Lys	Asp	Gln													
		50													

<210> 11

<211> 51

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变的N51 HIV-1 GP41序列

<400> 11

Gln	Ala	Arg	Gln	Leu	Ile	Ser	Gly	Ile	Val	Gln	Gln	Gln	Asn	Asn	Leu
1				5					10					15	
Leu	Arg	Ala	Ile	Glu	Ala	Gln	Gln	His	Leu	Leu	Gln	Leu	Thr	Val	Trp
			20					25					30		
Gly	Ile	Lys	Gln	Leu	Gln	Ala	Arg	Ile	Leu	Ala	Val	Glu	Arg	Tyr	Leu
		35					40					45			
Lys	Asp	Gln													
		50													

<210> 12

[0005]

<211> 51  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 突变的N51 HIV-1 GP41序列

<400> 12  
 Gln Ile Arg Gln Leu Ile Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp  
 20 25 30  
 Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu  
 35 40 45  
 Lys Asp Gln  
 50

<210> 13  
 <211> 51  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 突变的N51 HIV-1 GP41序列

<400> 13  
 Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser Ala Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp  
 20 25 30  
 Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu  
 35 40 45  
 Lys Asp Gln  
 50

<210> 14  
 <211> 51  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 突变的N51 HIV-1 GP41序列

<400> 14  
 Gln Ile Arg Gln Leu Ile Ser Ala Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp  
 20 25 30  
 Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu  
 35 40 45  
 Lys Asp Gln  
 50

[0006]

<210> 15  
 <211> 51  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 突变的N51 HIV-1 GP41序列

<400> 15  
 Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Ile Asn Asn Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp  
 20 25 30  
 Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu  
 35 40 45  
 Lys Asp Gln  
 50

<210> 16  
 <211> 51  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 突变的N51 HIV-1 GP41序列

<400> 16  
 Asn Ile Arg Gln Leu Ile Ser Ala Ile Val Gln Gln Ile Asn Asn Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp  
 20 25 30  
 Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu  
 35 40 45  
 Lys Asp Gln  
 50

<210> 17  
 <211> 51  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 突变的N51 HIV-1 GP41序列

<400> 17  
 Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Val Val Trp  
 20 25 30  
 Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu  
 35 40 45

[0007]

Lys Asp Gln  
50

<210> 18  
<211> 51  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 突变的N51 HIV-1 GP41序列

<400> 18  
Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu  
1 5 10 15  
Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Ile Val Trp  
20 25 30  
Gly Val Lys Gln Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu  
35 40 45  
Lys Asp Gln  
50

<210> 19  
<211> 51  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 突变的N51 HIV-1 GP41序列

<400> 19  
Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu  
1 5 10 15  
Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp  
20 25 30  
Gly Ile Lys Gln Ile Gln Ala Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu  
35 40 45  
Lys Asp Gln  
50

<210> 20  
<211> 51  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 突变的N51 HIV-1 GP41序列

<400> 20  
Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu  
1 5 10 15  
Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp

[0008]

Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala Ile Glu Arg Tyr Ile  
           20                                  25                                  30  
           35                                  40                                  45  
 Lys Asp Gln  
           50

<210> 21  
 <211> 51  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 突变的N51 HIV-1 GP41序列

<400> 21  
 Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu  
   1                                  5                                  10                                  15  
 Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp  
           20                                  25                                  30  
 Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu  
           35                                  40                                  45  
 Lys Asp Ile  
           50

<210> 22  
 <211> 51  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 突变的N51 HIV-1 GP41序列

<400> 22  
 Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu  
   1                                  5                                  10                                  15  
 Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Ile Val Trp  
           20                                  25                                  30  
 Gly Val Lys Gln Ile Gln Ala Arg Ile Leu Ala Ile Glu Arg Tyr Ile  
           35                                  40                                  45  
 Lys Asp Ile  
           50

<210> 23  
 <211> 51  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 突变的N51 HIV-1 GP41序列

<400> 23

[0009]

Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Val Val Trp  
 20 25 30  
 Gly Asn Lys Gln Leu Gln Ala Arg Val Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu  
 35 40 45  
 Lys Asp Gln  
 50

<210> 24  
 <211> 51  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 突变的N51 HIV-1 GP41序列

<400> 24  
 Gln Ile Arg Gln Leu Ile Ser Gly Ile Val Gln Gln Ile Asn Asn Ile  
 1 5 10 15  
 Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Ile Val Trp  
 20 25 30  
 Gly Ile Lys Gln Ile Gln Ala Arg Ile Leu Ala Ile Glu Arg Tyr Ile  
 35 40 45  
 Lys Asp Gln  
 50

<210> 25  
 <211> 48  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> I型HIV

<400> 25  
 Ala Arg Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly  
 20 25 30  
 Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys  
 35 40 45

<210> 26  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> I型HIV

[0010]

<400> 26  
Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys  
1 5

<210> 27  
<211> 24  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> I型HIV

<400> 27  
Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Ile  
1 5 10 15  
Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys  
20

<210> 28  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> I型HIV

<400> 28  
Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys  
1 5 10 15  
Gln Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys  
20 25 30

<210> 29  
<211> 43  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> I型HIV

<400> 29  
Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu Leu Arg Ala Ile Glu Ala  
1 5 10 15  
Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu Gln  
20 25 30  
Ala Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys  
35 40

<210> 30  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

[0011]

<220>

<223> I型HIV

<400> 30

Ala Ser Gln Leu Leu  
1 5

<210> 31

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Suzuki-1Z螺旋卷曲基序

<400> 31

Tyr Gly Gly Ile Glu Lys Lys Ile Glu Ala Ile Glu Lys Lys Ile Glu  
1 5 10 15  
Ala Ile Glu Lys Lys Ile Glu Ala Ile Glu Lys Lys Ile Glu Ala  
20 25 30

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Suzuki-1Z螺旋卷曲基序

<400> 32

Ile Glu Lys Lys Ile Glu Ala  
1 5

<210> 33

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1Z结构域

<400> 33

Arg Met Lys Gln Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Gln  
1 5 10 15  
Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu  
20 25 30  
Arg

[0012]

<210> 34  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 短的1Z-样结构域 1Z17

<400> 34  
 Ile Lys Lys Glu Ile Glu Ala Ile Lys Lys Glu Glu Ala Ile Lys Lys  
 1 5 10 15  
 Lys Ile Glu Ala Ile Glu Lys  
 20

<210> 35  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 嵌合N-肽1ZN36

<400> 35  
 Ile Lys Lys Glu Ile Glu Ala Ile Lys Lys Glu Gln Glu Ala Ile Lys  
 1 5 10 15  
 Lys

<210> 36  
 <211> 62  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> E7支架结构域

<400> 36  
 Ile Lys Lys Glu Ile Glu Ala Ile Lys Lys Glu Gln Glu Ala Ile Lys  
 1 5 10 15  
 Lys Lys Ile Glu Ala Ile Glu Lys Glu Ile Ser Gly Ile Val Gln Gln  
 20 25 30  
 Gln Asn Asn Leu Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln  
 35 40 45  
 Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Ile Leu  
 50 55 60

<210> 37  
 <211> 23  
 <212> PRT

[0013]

<213> 人工序列

<220>

<223> 细菌噬菌体T4纤维蛋白

<400> 37

```
Ile Lys Lys Ile Glu Glu Ile Glu Lys Lys Ile Glu Glu Ile Glu Lys
 1           5           10           15
Lys Ile Glu Glu Ile Glu Lys
                20
```

<210> 38

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 细菌噬菌体T4纤维蛋白

<400> 38

```
Tyr Ile Pro Glu Ala Pro Arg Asp Gly Gln Ala Tyr Val Arg Lys Asp
 1           5           10           15
Gly Glu Trp Val Leu Leu Ser Thr Phe Leu
                20           25
```

<210> 39

<211> 78

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合N-肽SZN51

<400> 39

```
Ile Glu Lys Lys Ile Glu Ala Ile Glu Lys Lys Ile Glu Ala Ile Glu
 1           5           10           15
Lys Lys Ile Glu Ala Ile Glu Lys Lys Ile Glu Gln Ala Arg Gln Leu
                20           25           30
Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu Leu Arg Ala Ile Glu
                35           40           45
Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu
                50           55           60
Gln Ala Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln
 65           70           75
```

<210> 40

<211> 82

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0014]

<223> CC-嵌合N-肽CC1ZN51

<400> 40

Cys	Cys	Gly	Gly	Ile	Lys	Lys	Glu	Ile	Glu	Ala	Ile	Lys	Lys	Glu	Gln
1				5					10					15	
Glu	Ala	Ile	Lys	Lys	Lys	Ile	Glu	Ala	Ile	Glu	Lys	Glu	Ile	Val	Gln
			20					25					30		
Ala	Arg	Gln	Leu	Leu	Ser	Gly	Ile	Val	Gln	Gln	Gln	Asn	Asn	Leu	Leu
		35					40					45			
Arg	Ala	Ile	Glu	Ala	Gln	Gln	His	Leu	Leu	Gln	Leu	Thr	Val	Trp	Gly
	50					55					60				
Ile	Lys	Gln	Leu	Gln	Ala	Arg	Ile	Leu	Ala	Val	Glu	Arg	Tyr	Leu	Lys
65					70					75				80	
Asp	Gln														

<210> 41

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 线性支架

<221> MOD\_RES

<222> 1, 3, 5, 7

<223> delta-氨基戊酸

<400> 41

Xaa	Lys	Xaa	Lys	Xaa	Lys	Xaa
1				5		

<210> 42

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 线性支架

<400> 42

Arg	Lys	Arg	Lys	Arg	Lys	Arg
1				5		

<210> 43

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 线性支架

[0015]

<400> 43

Glu Lys Glu Lys Glu Lys Glu  
1 5

<210> 44

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 线性支架

<400> 44

Cys His Cys Cys Arg Lys Arg Lys Arg Lys Arg Asn His  
1 5 10

<210> 45

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合N-肽CC1ZN36

<400> 45

Cys Glu Lys Glu Lys Glu Lys Glu  
1 5

<210> 46

<211> 66

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合N-肽CC1ZN36

<400> 46

Cys Cys Gly Gly Ile Lys Lys Glu Ile Glu Ala Ile Lys Lys Glu Gln  
1 5 10 15  
Glu Ala Ile Lys Lys Lys Ile Glu Ala Ile Glu Lys Glu Ile Ser Gly  
20 25 30  
Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln  
35 40 45  
His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg  
50 55 60  
Ile Leu  
65

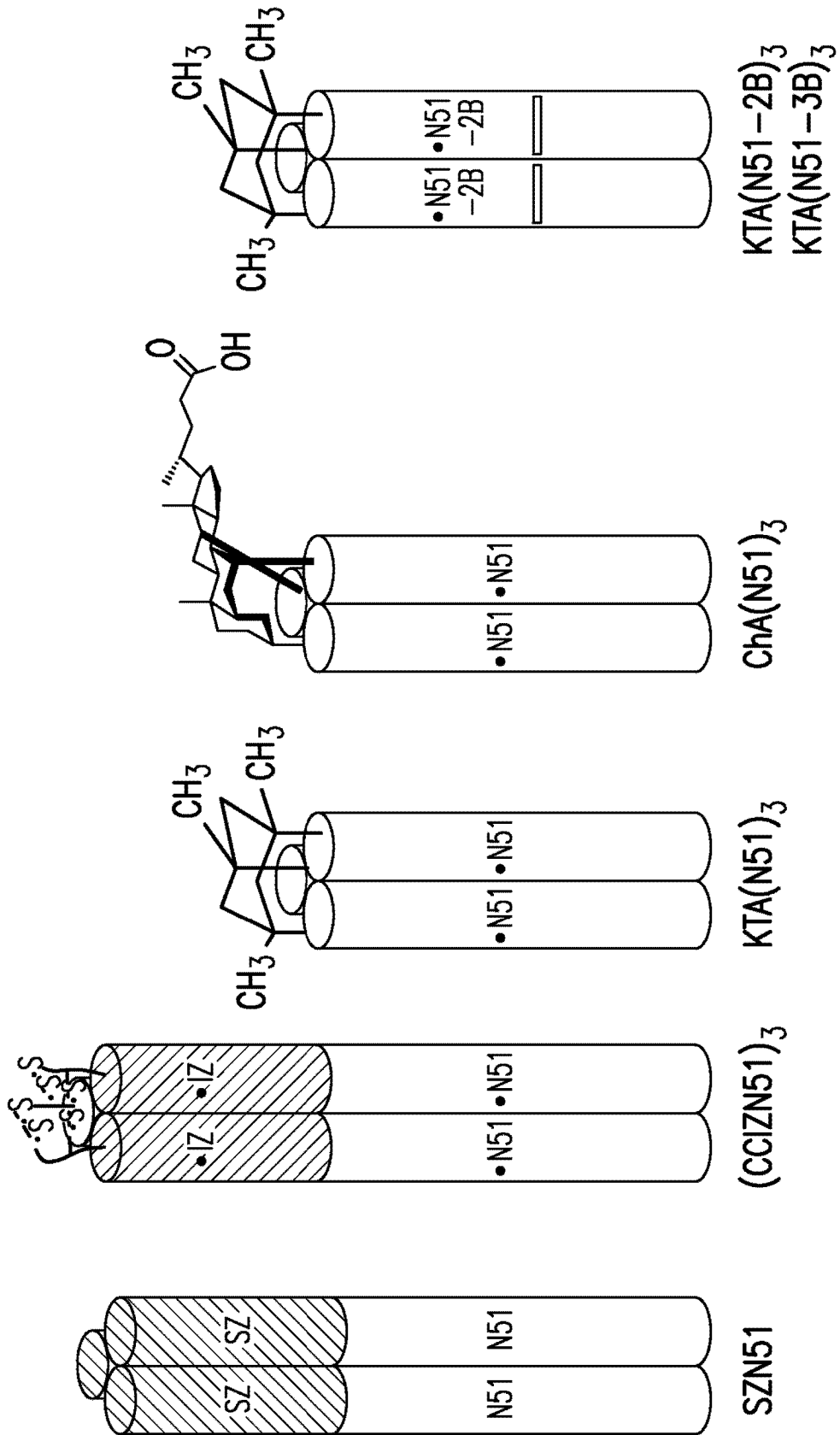
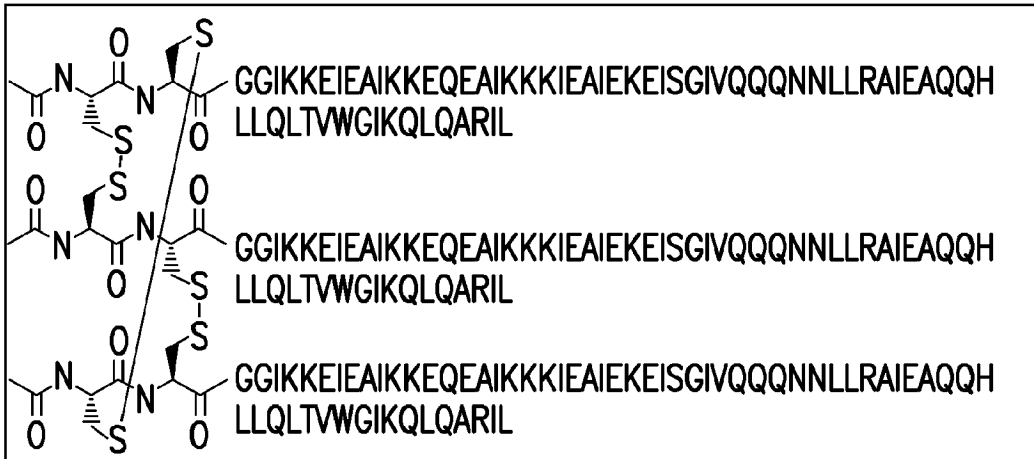
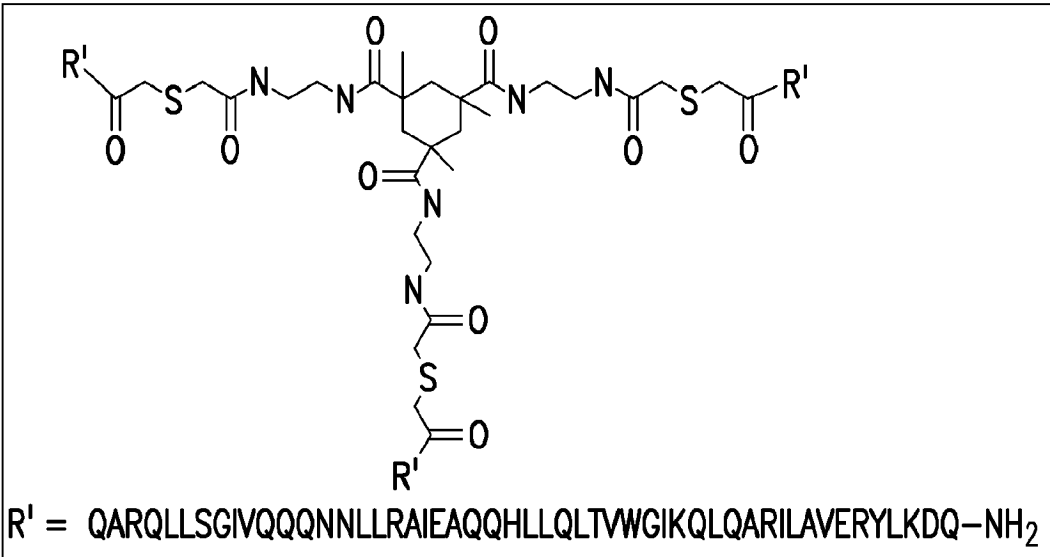


图 1A

(CCIZN36)<sub>3</sub>



KTA(N51)



ChA(N51)<sub>3</sub>

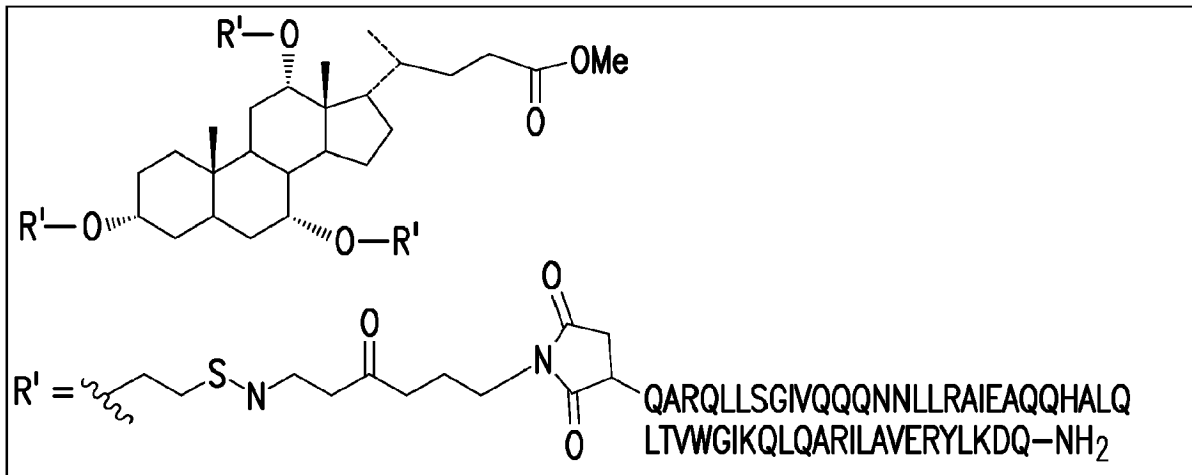
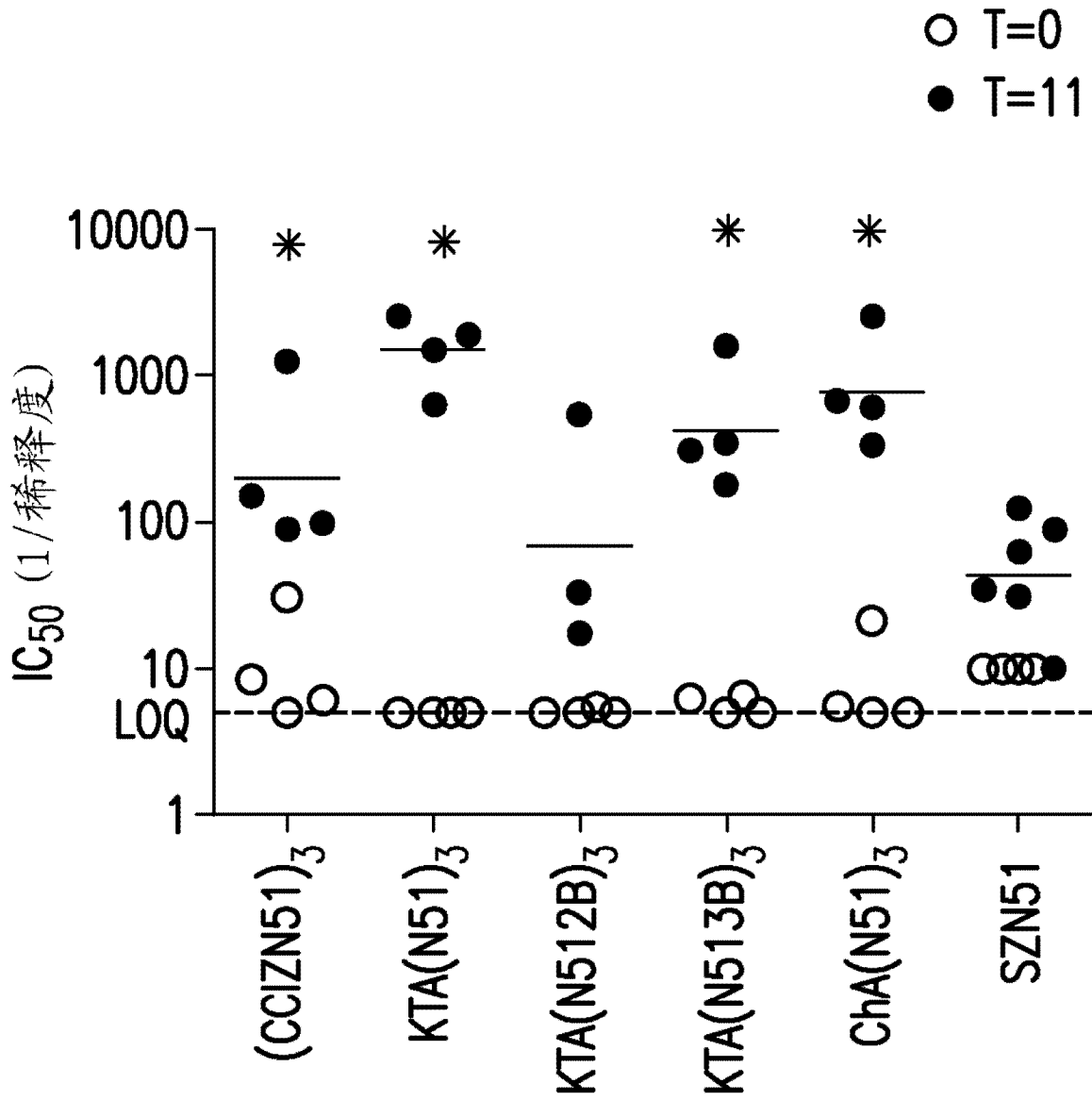


图 1B



\* 相比于SZN51的显著性 (Tukey检测, p<0.05)

图 2

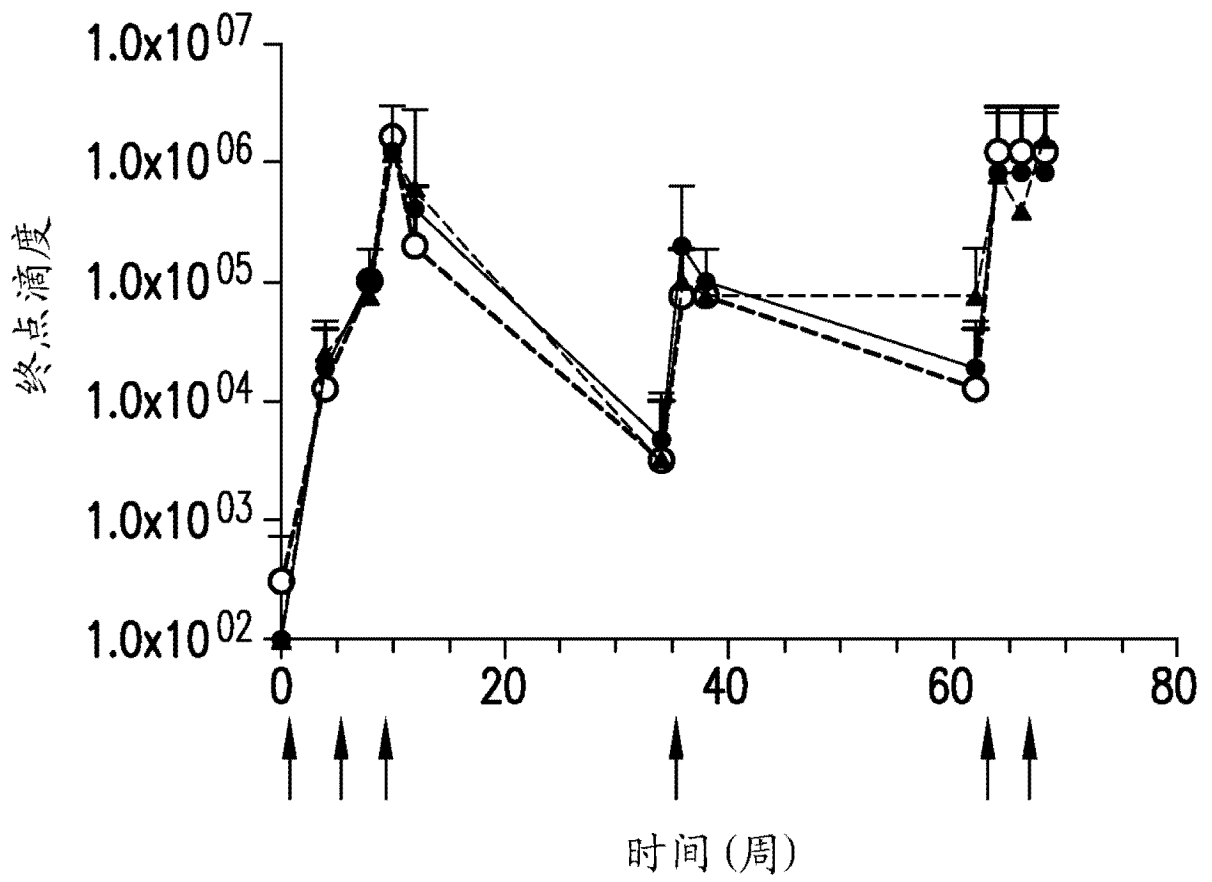


图 3

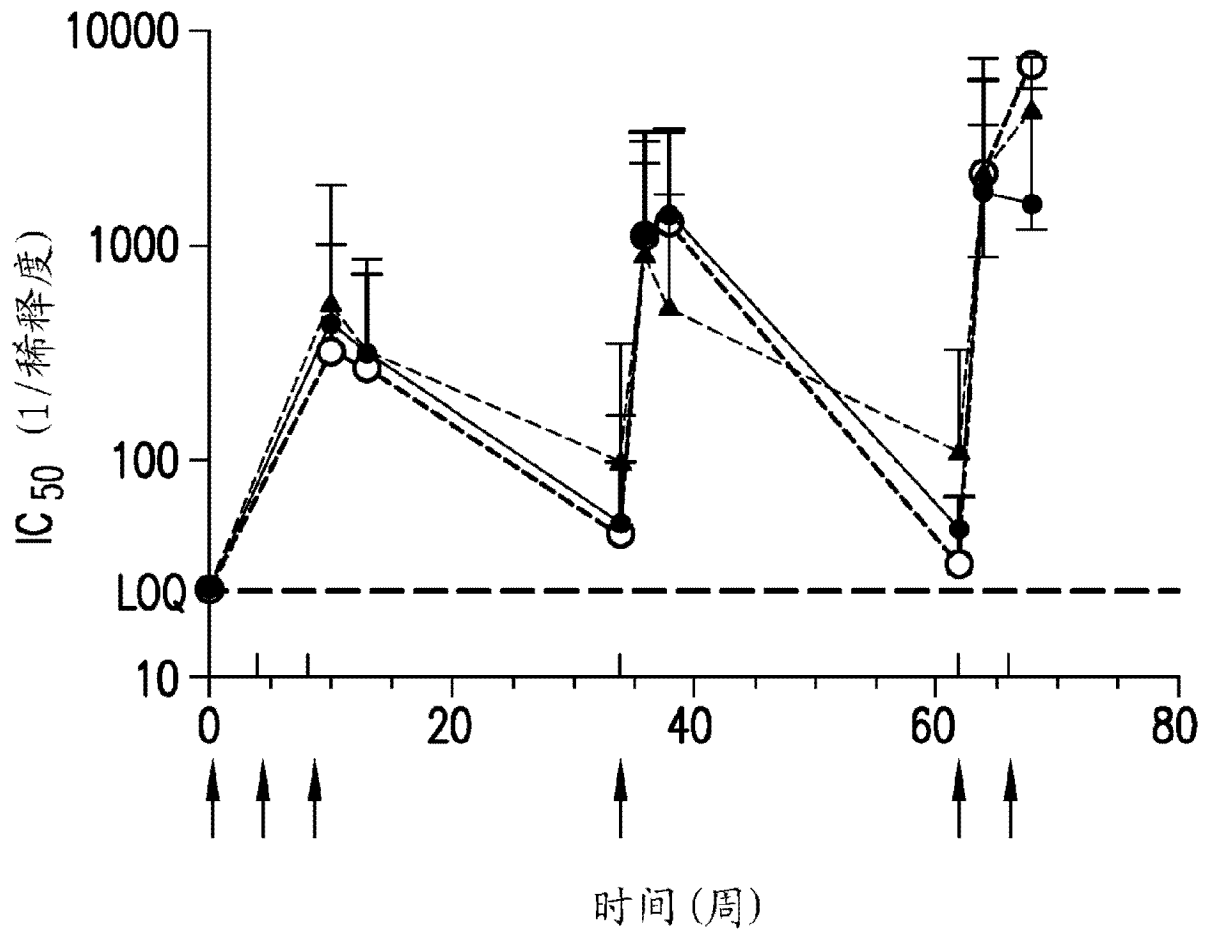


图 4

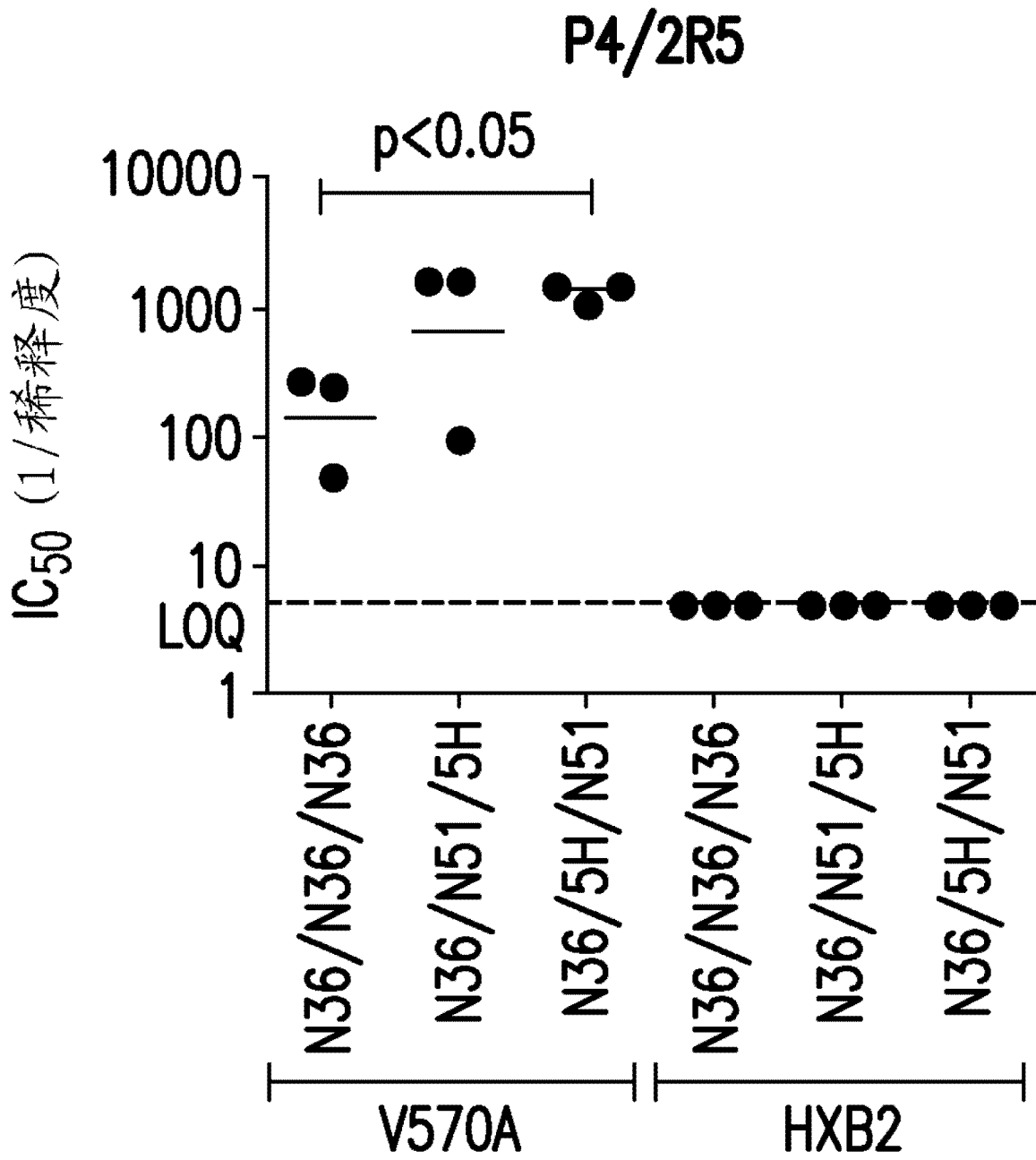


图 5A

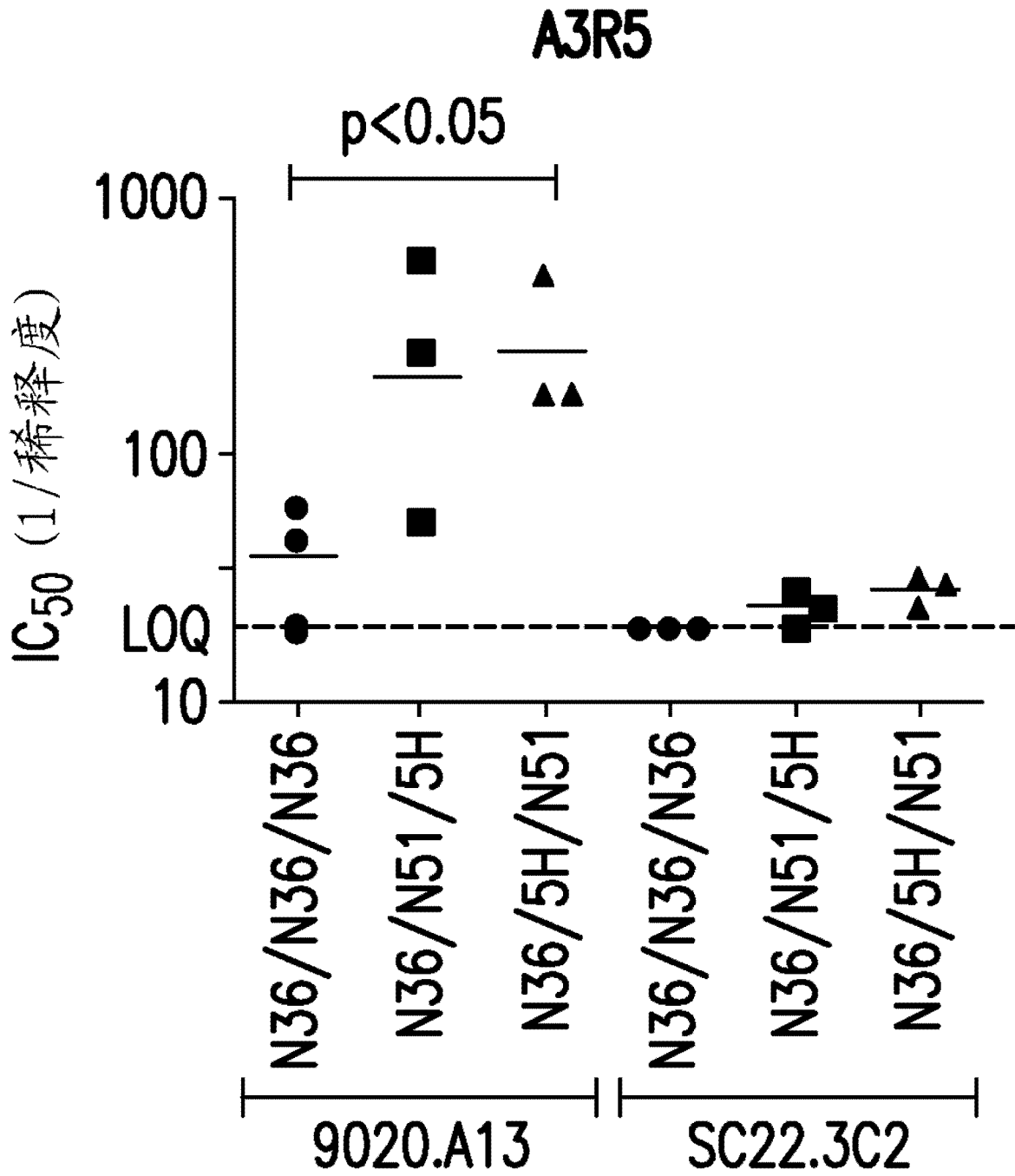


图 5B

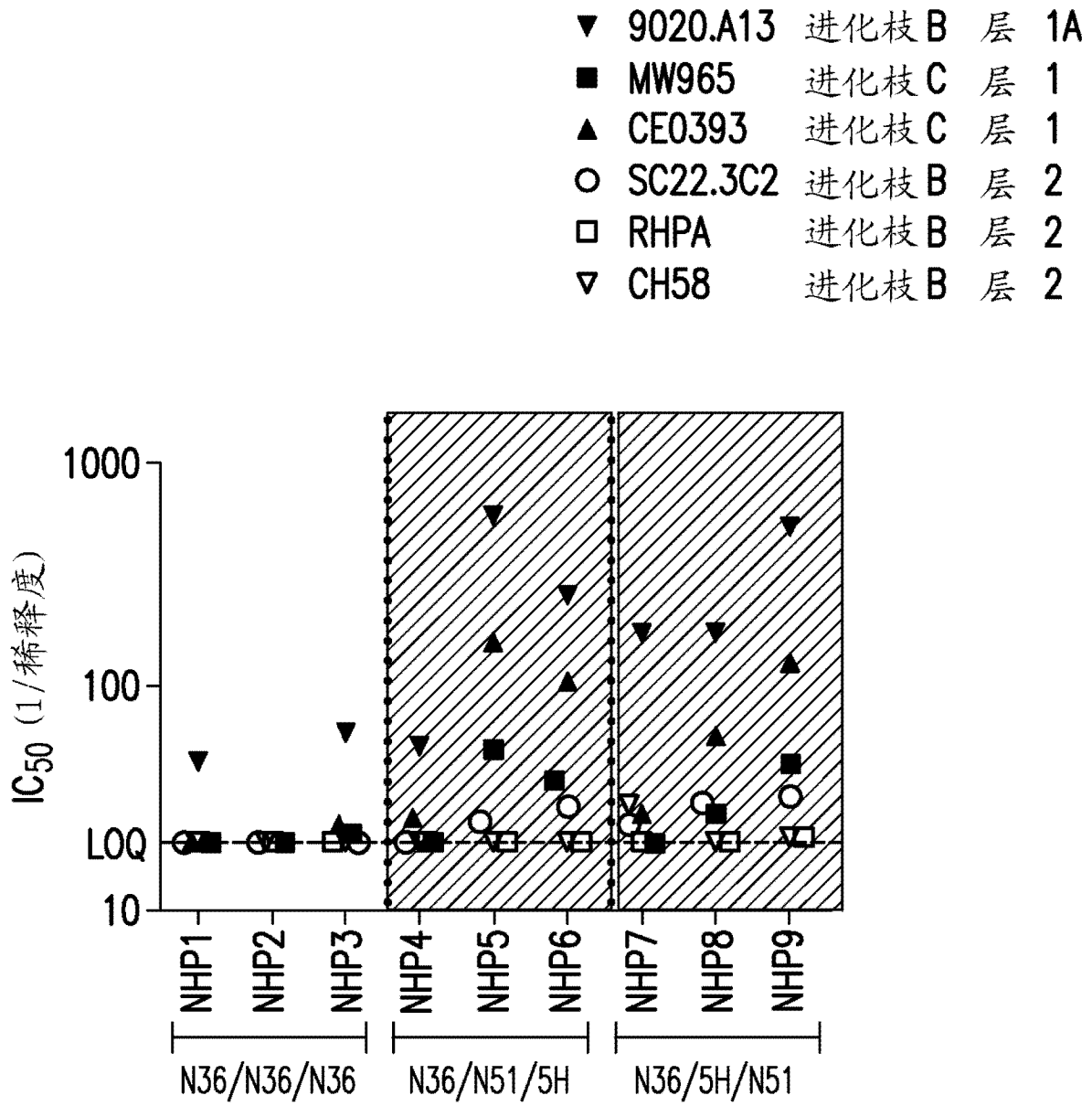


图 6

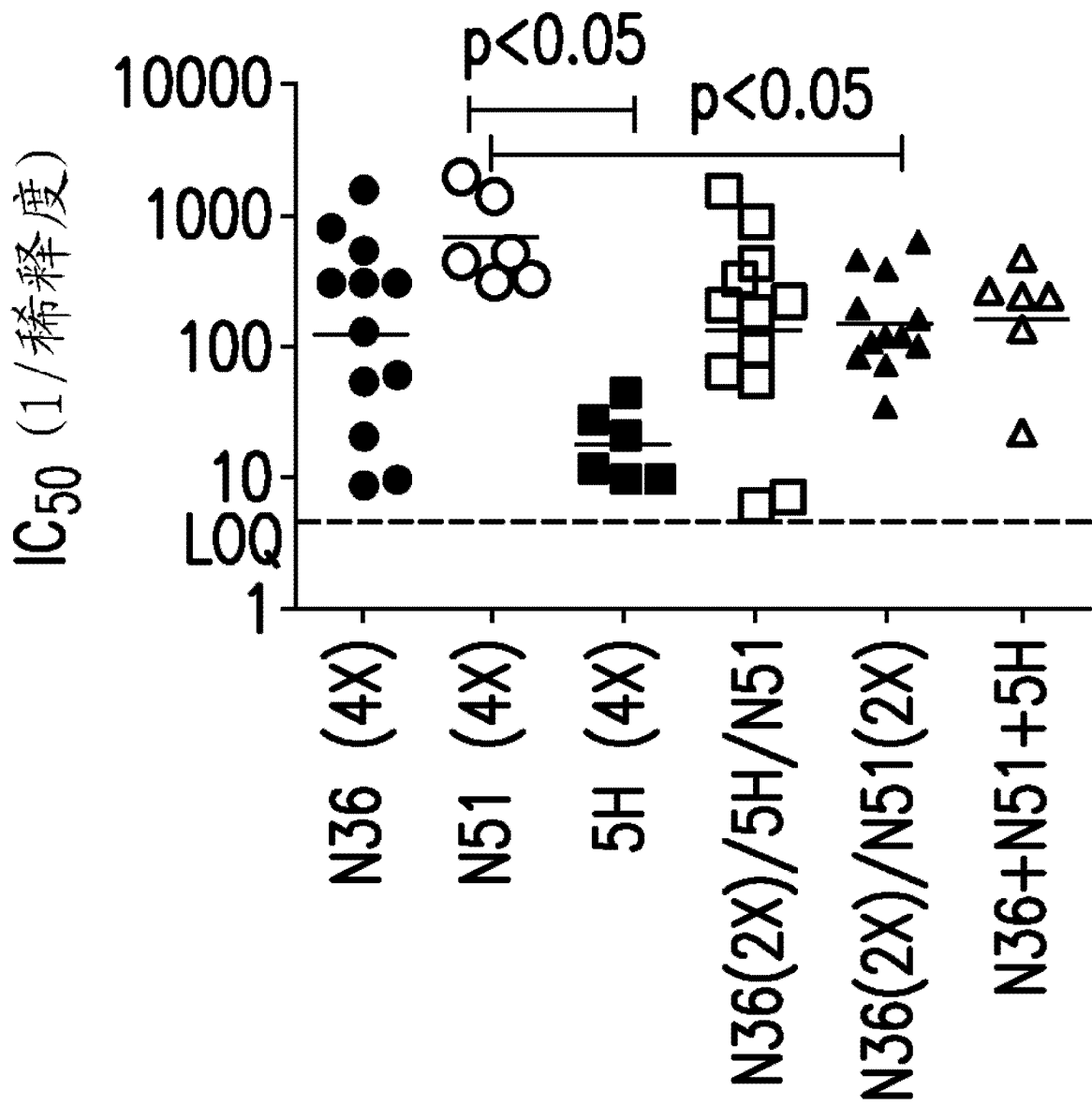


图 7A



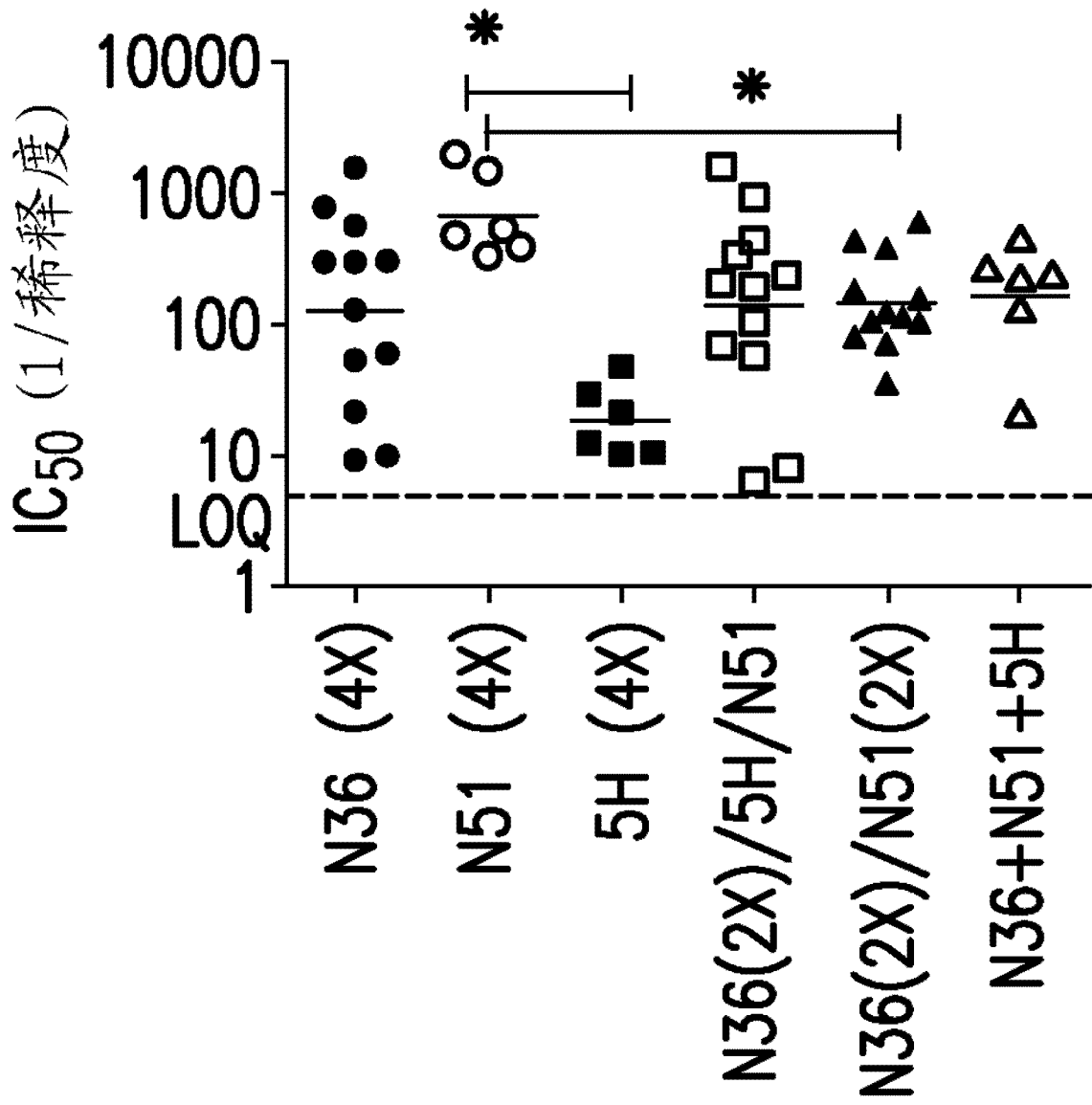


图 8A



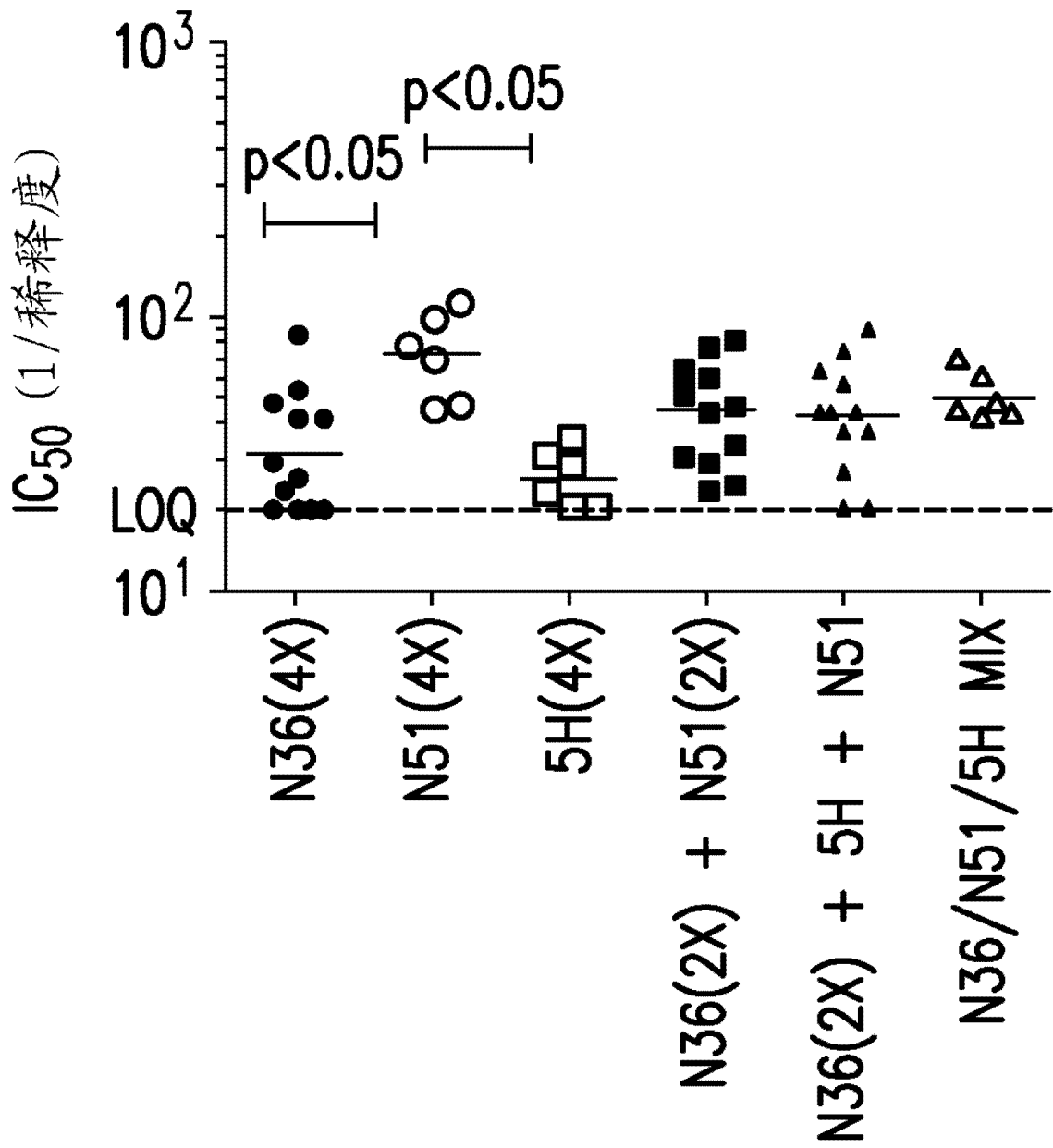


图 9A



专利名称(译)	HIV-1 GP41前发夹中间物的稳定肽模拟物		
公开(公告)号	<a href="#">CN104203276A</a>	公开(公告)日	2014-12-10
申请号	CN201380015435.7	申请日	2013-03-15
申请(专利权)人(译)	默沙东公司		
当前申请(专利权)人(译)	默沙东公司		
[标]发明人	J G 乔伊斯 C 吴 E A 奥蒂格尔 V 加斯基		
发明人	J.G.乔伊斯 C.吴 E.A.奥蒂格尔 V.加斯基		
IPC分类号	A61K39/21 C12N7/00 G01N33/53 A61K38/00		
CPC分类号	A61K2039/64 C12N2740/16134 A61K38/16 A61K39/12 C12N7/00 A61K38/00 A61K2039/55505 A61K2039/55577 A61K2039/70 A61P31/18 A61P37/04 A61K39/21 C07K14/005 C12N2740/16122		
代理人(译)	李波 万雪松		
优先权	61/613264 2012-03-20 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及在化学支架上具有三个gp41N-肽的gp41三价肽模拟物，其在构象上将N-肽限制为三聚体卷曲螺旋，以模拟gp41呈现。本发明还涉及具有整个HIVgp41NH2-末端七肽重复区域，并且能够形成gp41肽模拟物的N-肽。HIV-1gp41前发夹中间物的此类肽模拟物可以用于疫苗中，用于通过引发中和抗体治疗或预防HIV-1感染。

