



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104277113 B

(45)授权公告日 2017.09.26

(21)申请号 201310283591.3

A61K 38/16(2006.01)

(22)申请日 2013.07.08

A61K 38/10(2006.01)

A61P 31/18(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104277113 A

(43)申请公布日 2015.01.14

(73)专利权人 中国人民解放军军事医学科学院
毒物药物研究所

地址 100850 北京市海淀区太平路27号

(72)发明人 刘克良 凌彦博 姜喜凤 薛慧芳
王昆 蔡利锋

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038

代理人 李帆

(51)Int.Cl.

C07K 19/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 101993485 A,2011.03.30,权利要求1-7,说明书第42-43段.

CN 101993485 A,2011.03.30,权利要求1-7,说明书第42-43段.

EP 2377880 A2,2011.10.19,摘要,表1.

Junpeng Xiao et al..Synthesis of N-terminally linked protein and peptide dimers by native chemical ligation.《Bioconjugate Chem.》.2010,第21卷(第11期),1943-1947.

审查员 郭婷婷

权利要求书1页 说明书9页
序列表12页

(54)发明名称

抑制HIV感染的二价多肽

(57)摘要

本发明属于生物医药领域,涉及一种抗HIV感染的多肽,具体地,涉及式I或式II所示的二价多肽、其衍生物、立体异构体、或药学上可接受的盐。本发明还涉及含有式I或式II所示二价多肽、其衍生物、立体异构体、或药学上可接受的盐的药物组合物,以及式I或式II所示二价多肽、其衍生物、立体异构体、或药学上可接受的盐在制备治疗或预防HIV感染所致相关疾病尤其是获得性免疫缺陷综合征(艾滋病)的药物中的用途。(C-L₁-Z)₂式I;(Z-L₁-C)₂式II。

1. 一种二价多肽、其立体异构体或药学上可接受的盐,其选自:
(C- β Ala-WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELL)₂ (SEQ ID NO:9);
(C-Aca-YTSLIHSIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF)₂ (SEQ ID NO:11);
(C-Aca-WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKN)₂ (SEQ ID NO:12);
(C-Teg-WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKN)₂ (SEQ ID NO:15);
(C-Aca-WEEWDKKIEEYTKKIEELIKKS)₂ (SEQ ID NO:18);
(C-Teg-WEEWDKKIEEYTKKIEELIKKS)₂ (SEQ ID NO:19);
(C-Teg- β Ala-WEEWDKKIEEYTKKIEELIKKS)₂ (SEQ ID NO:20);
(WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELL-C)₂ (SEQ ID NO:23);
(YTSLIHSIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF-Aca-C)₂ (SEQ ID NO:27);

其中

C为L型或D型的半胱氨酸;

两条单价多肽链之间采用二硫键连接。

2. 药物组合物,其含有至少一种权利要求1所述的二价多肽、其立体异构体或药学上可接受的盐,以及任选的药学上可接受的载体或赋形剂。

3. 权利要求1所述的二价多肽、其立体异构体或药学上可接受的盐在制备用于治疗或预防HIV感染相关疾病的药物中的用途。

4. 权利要求3的用途,其中,所述HIV感染相关疾病为艾滋病。

5. 权利要求1所述的二价多肽、其立体异构体或药学上可接受的盐在制备HIV融合抑制剂中的用途。

6. HIV融合抑制剂,其含有至少一种权利要求1所述的二价多肽、其立体异构体或药学上可接受的盐。

抑制HIV感染的二价多肽

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,涉及一种抗HIV感染的多肽,具体地,本发明涉及如式I或式II所示的二价多肽、其衍生物、其立体异构体、或其无生理毒性的盐。本发明还涉及含有式I或式II所述的二价多肽、其衍生物、其立体异构体、或其无生理毒性的盐的药物组合物,以及式I或式II所示二价多肽、其衍生物、其立体异构体、或其无生理毒性的盐在制备治疗或预防HIV感染所致相关疾病尤其是获得性免疫缺陷综合征(Acquired Immune Deficiency Syndrome,AIDS)的药物中的用途。

背景技术

[0002] 人类免疫缺陷病毒(Human Immunodeficiency Virus,HIV)是一种感染人类免疫系统细胞的慢病毒(Lentivirus),属反转录病毒的一种。普遍认为,人类免疫缺陷病毒的感染导致艾滋病(AIDS,Acquired Immune Deficiency Syndrome,获得性免疫缺乏综合症,或译作“艾滋病”),艾滋病是由后天性细胞免疫功能出现缺陷而导致严重随机感染或继发肿瘤并致命的一种疾病。而根据联合国艾滋病规划署和世界卫生组织统计,自1981年首度证实以来,AIDS已夺取超过3,000万人的性命,使它成为史上最具破坏力的流行病之一,截至2011年6月底世界上约有6,400万人感染HIV。HIV病毒分为两种:HIV-1,HIV-2。HIV-1是其中较为流行的一种。HIV-1病毒对人体宿主细胞的感染需要经历病毒膜与靶细胞膜融合的过程。而这样一个过程需要由病毒包膜糖蛋白介导(envelope glycoprotein,Env)。Env由两部分构成,识别与宿主细胞起结合作用的表面亚基gp120,和与宿主发生结合作用来介导膜融合的跨膜亚基gp41。Gp41通过其氨基端融合肽插入到宿主细胞,促进病毒膜与靶细胞膜的融合过程。而融合状态的完成需要病毒gp41N末端重复序列(N-HR)与C末端重复序列(C-HR)折叠形成六螺旋束(6-HB)。作用于HIV-1病毒表面糖蛋白gp41的抑制剂亦被称为融合抑制剂,其中T-20是目前唯一应用于临床的多肽类HIV融合抑制剂。这一融合环节的多肽或者小分子融合抑制剂,竞争性地结合这一过程中暴露的gp41靶标,以抑制病毒自身6-HB的形成,从而达到抑制病毒入侵人体免疫细胞的目的。

[0003] 近年来,由于HIV疫苗研究进展缓慢以及耐药性问题日益明显,研发新型抗HIV药物仍是当务之急。相比单受体-单配体的单价相互作用,基于高亲和力的,以生物多价相互作用为基础的多价抑制剂,正成为一种设计受体抑制剂的高效策略。Tolbert等人报道的以PEG作为连接臂的二价HIV抑制剂,其细胞融合IC₅₀值达到了2.3nm(J.Xiao,B.S.Hamilton,T.J.Tolbert,Bioconjugate Chem.2010,21,1943-1947.)。Hirokazu等人所设计的,以C34为起始序列的三价HIV抑制剂,其细胞融合IC₅₀值达到了1.3nm,相对于起始序列,活性提高了约34倍(W.Nomura,C.Hashimoto,A.Ohya,K.Miyauchi,E.Urano,T.Tanaka,T.Narumi,T.Nakahara,J.a.Komano,N.Yamamoto,H.Tamamura,ChemMedChem2012,7,205-208.)。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于寻找以较短序列为起始序列的,具有较高生物活性的二价抗

HIV的物质。

[0005] 发明人经研究发现式I或式II所示二价多肽或其衍生物,其立体异构体或其药用盐,具有良好的抑制HIV感染靶细胞的活性,因此可作为药物治疗或预防HIV感染,由此完成了本发明。

[0006] 本发明第一方面涉及式I或式II所示的二价多肽,其衍生物、立体异构体或药学上可接受的盐:

[0007] (C-L₁-Z)₂

[0008] 式I

[0009] (Z-L₁-C)₂

[0010] 式II

[0011] 其中

[0012] C为L型或D型的半胱氨酸;

[0013] L₁是连接多肽与半胱氨酸间的连接臂,由1~10个、例如1~6个、例如1~4个天然或非天然的氨基酸组成,或者L₁缺失;L₁能够保持二价多肽的空间灵活性,更利于二价多肽与靶蛋白或靶标结合;

[0014] Z为L型或D型的多肽序列;

[0015] 两条单价多肽链之间采用二硫键连接。

[0016] 在本发明的实施方案中,所述组成L₁的非天然氨基酸选自β-丙氨酸(BA1a),6-氨基己酸(Aca)以及一端为氨基、一端为羧基的三缩四乙二醇(Teg, NH₂-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-COOH)中的一种、两种或三种。

[0017] 在本发明的实施方案中,Z选自以下多肽:

[0018] 1) WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELL (SEQ ID NO:1);

[0019] 2) WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKN (SEQ ID NO:2);

[0020] 3) YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF (SEQ ID NO:3);

[0021] 4) WMEWDREINNYTSLIHSLIEES (SEQ ID NO:4);

[0022] 5) WEEWDKKIEEYTKKIEELIKKS (SEQ ID NO:5);

[0023] 6) IEALIRAAEQQEKNEAALREL (SEQ ID NO:6);

[0024] 7) WEEWDKKIEEYTKKI (SEQ ID NO:7)。

[0025] 在本发明的实施方案中,所述式I或式II二价多肽选自如下的化合物:

[0026] (1) (C-Aca-WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELL)₂ (SEQ ID NO:8);

[0027] (2) (C-βA1a-WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELL)₂ (SEQ ID NO:9);

[0028] (3) (C-βA1a-Aca-WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELL)₂ (SEQ ID NO:10);

[0029] (4) (C-Aca-YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF)₂ (SEQ ID NO:11);

[0030] (5) (C-Aca-WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKN)₂ (SEQ ID NO:12);

[0031] (6) (C-WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKN)₂ (SEQ ID NO:13);

[0032] (7) (C-βA1a-WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKN)₂ (SEQ ID NO:14);

[0033] (8) (C-Teg-WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKN)₂ (SEQ ID NO:15);

[0034] (9) (C-Teg-βA1a-WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKN)₂ (SEQ ID NO:16);

[0035] (10) (C-Aca-WMEWDREINNYTSLIHSLIEES)₂ (SEQ ID NO:17);

- [0036] (11) (C-Aca-WEEWDKKIEEYTKKIEELIKKS)₂(SEQ ID NO:18);
 [0037] (12) (C-Teg-WEEWDKKIEEYTKKIEELIKKS)₂(SEQ ID NO:19);
 [0038] (13) (C-Teg-βAla-WEEWDKKIEEYTKKIEELIKKS)₂(SEQ ID NO:20);
 [0039] (14) (C-Aca-IEALIRAAEQQEKNEAALREL)₂(SEQ ID NO:21);
 [0040] (15) (C-Aca-WEEWDKKIEEYTKKI)₂(SEQ ID NO:22);
 [0041] (16) (WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELL-C)₂(SEQ ID NO:23);
 [0042] (17) (WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELL-R-C)₂(SEQ ID NO:24);
 [0043] (18) (WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELL-Aca-C)₂(SEQ ID NO:25);
 [0044] (19) (WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELL-GGSTeg-C)₂(SEQ ID NO:26);
 [0045] (20) (YTSLIHSIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF-Aca-C)₂(SEQ ID NO:27);
 [0046] (21) (WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKN-Aca-C)₂(SEQ ID NO:28);
 [0047] (22) (WMEWDREINNYTSLIHSLIEES-Aca-C)₂(SEQ ID NO:29)。

[0048] 在本发明中,所述天然氨基酸包括丙氨酸(Ala)、缬氨酸(Val)、亮氨酸(Leu)、异亮氨酸(Ile)、脯氨酸(Pro)、苯丙氨酸(Phe)、色氨酸(Trp)、蛋氨酸(Met)、甘氨酸(Gly)、丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)、半胱氨酸(Cys)、酪氨酸(Tyr)、天冬酰胺(Asn)、谷氨酰胺(Gln)、赖氨酸(Lys)、精氨酸(Arg)、组氨酸(His)、天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)。

[0049] 在本发明中,所述GGSTeg是指甘氨酸甘氨酸苏氨酸再加上Teg。

[0050] 在本发明的实施方案中,以上化合物的编号即代表该化合物(二价多肽)。

[0051] 本发明的另一方面涉及一种药物组合物,其含有至少一种本发明第一方面的式I或式II所示的二价多肽、其衍生物、立体异构体、或药学上可接受的盐,以及任选的,药学上可接受的载体或赋形剂。

[0052] 本发明的还一方面涉及本发明的式I或式II所示的二价多肽、其衍生物、立体异构体、或药学上可接受的盐在制备HIV融合抑制剂中的用途。

[0053] 本发明的还一方面涉及一种HIV融合抑制剂,其含有至少一种本发明的式I或式II所示的二价多肽、其衍生物、立体异构体、或药学上可接受的盐。

[0054] 本发明的还一方面涉及本发明的式I或式II所示的二价多肽、其衍生物、立体异构体、或药学上可接受的盐在制备用于治疗或预防HIV感染相关疾病尤其是艾滋病的药物中的用途。

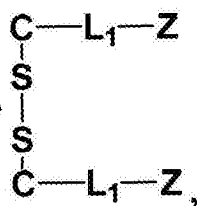
[0055] 本发明的还一方面涉及一种治疗或预防HIV感染相关疾病尤其是艾滋病的方法,所述的方法包括给予接受治疗或者预防的对象有效量的本发明的式I或式II所示的二价多肽、其衍生物、立体异构体、或药学上可接受的盐。

[0056] 在本发明中,所述HIV是指HIV-1或HIV-2,优选HIV-1。

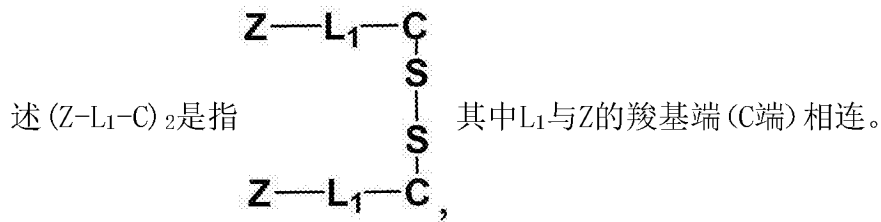
[0057] 在本发明中,所述单价多肽和二价多肽的单体是同一含义,是指C-L₁-Z或Z-L₁-C。

[0058] 在本发明中,所述二硫键是指-S-S-。

[0059] 在本发明中,所述(C-L₁-Z)₂是指



其中L₁与Z的氨基端(N端)相连,所



[0060] 发明的有益效果

[0061] 本发明人将具有一定活性的多肽序列,通过一定方法合成二价多肽,二价分子的两条多肽链之间采用二硫键的连接方式,使两条多肽序列发挥协同作用,提高对靶标的抑制活性,设计出高活性HIV融合抑制剂,探索出了抑制HIV感染的新思路。

具体实施方式

[0062] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述,但是本领域技术人员将会理解,下列实施例仅用于说明本发明,而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品。

[0063] 在本发明中使用的缩写具有下面的含义:

| | | |
|--------|--|------------|
| [0064] | AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) | 艾滋病, |
| [0065] | | 获得性免疫缺陷综合征 |
| [0066] | Ala (Alanine, A) | 丙氨酸 |
| [0067] | Asn (Asparagine, N) | 天冬酰胺 |
| [0068] | Arg (Arginine, R) | 精酰胺 |
| [0069] | Asp (Aspartic acid, D) | 天冬氨酸 |
| [0070] | Cys (Cysteine, C) | 半胱氨酸 |
| [0071] | DCM (Dichloromethane) | 二氯甲烷 |
| [0072] | DMF (N,N-Dimethyl malonate) | 二甲基甲酰胺 |
| [0073] | Env (Envelope glycoprotein) | 包膜糖蛋白 |
| [0074] | Fmoc (Fluorenylmethoxycarbonyl) | 芴甲氧羰基 |
| [0075] | Gln (Glutamine, Q) | 谷氨酰胺 |
| [0076] | Glu (Glutamic acid, E) | 谷氨酸 |
| [0077] | 6-HB (six-helix bundle) | 六螺旋体 |
| [0078] | HIV (Human Immunodeficiency Virus) | 人免疫缺陷病毒 |
| [0079] | HIV-1 | 人免疫缺陷病毒I型 |
| [0080] | His (Histidine, H) | 组氨酸 |
| [0081] | Ile (Isoleucine, I) | 异亮氨酸 |
| [0082] | Leu (Leucine, L) | 亮氨酸 |
| [0083] | Lys (Lysine, K) | 赖氨酸 |
| [0084] | Met (Methionine, M) | 甲硫氨酸 |
| [0085] | Ser (Serine, S) | 丝氨酸 |
| [0086] | TFA (trifluoroacetic acid) | 三氟乙酸 |

| | | |
|--------|---------------------|-----|
| [0087] | Thr (threonine, T) | 苏氨酸 |
| [0088] | Trp (Tryptophan, W) | 色氨酸 |
| [0089] | Tyr (Tyrosine, Y) | 酪氨酸 |

[0090] 实施例

[0091] 下面的实例及生物活性实验进一步说明本发明,但这并不意味着对本发明的任何限制。

[0092] 实施例所用固相合成载体Rink-amide树脂为天津南开合成责任有限公司产品; HBTU、HOBt、DIEA以及Fmoc保护的天然氨基酸为上海吉尔生化公司以及成都诚诺新技术有限责任公司产品。三氟乙酸(TFA)、DMF、DCM为北京博迈杰科技有限公司产品;色谱纯乙腈为Fisher公司产品。其它试剂如无说明均为国产分析纯产品。

[0093] 以下化合物的编号与发明内容部分一致。

[0094] 1: 化合物(1) - (22)的合成

[0095] 多肽单体的合成:多肽合成采用标准的Fmoc固相方法。选用Rink-Amide树脂,肽链由C端向N端延长。缩合剂为HBTU/HOBt/DIEA。脱保护剂为哌啶/DMF溶液。裂解剂为三氟乙酸(TFA),粗肽水溶解后冻干保存。用中压液相色谱法或高压液相色谱法(HPLC)进行分离纯化,纯肽含量>95%。基质辅助激光解析飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)确定肽序列分子量。

[0096] 称取Rink Amide树脂0.51g(0.233mmol)置入CS Bio136多肽合成仪反应器中,然后将氨基酸,活化剂,活化碱,脱保护试剂,封闭试剂按浓度(保护氨基酸:0.25M的DMF溶液,活化剂:0.2M HBTU/HOBt的DMF溶液,活化碱:0.4M DIEA的DMF溶液,脱保护剂:20%v/v,哌啶的DMF溶液,封闭试剂:20%v/v,乙酸酐的DMF溶液)配置好后,用CS Bio136多肽合成仪进行合成。完成后肽树脂用DCM洗涤3遍后用无水甲醇收缩,室温真空干燥,得肽树脂2.11g。将干燥的多肽放入500ml茄形瓶,按每克树脂加入10ml比例加入裂解剂(v/v,三氟乙酸:乙二硫醇:间甲酚:水=82.5:10:5:2.5)。冰浴搅拌条件下,反应2小时后,向反应器中加入无水乙醚充分搅拌30分钟,沉淀出现粗肽,G4漏斗过滤。乙醚多次洗涤。弃去乙醚,更换滤瓶。向砂心漏斗中加入30%乙酸水溶液,充分浸泡、洗涤固体混合物数次,直到粗肽产品全部溶解并转移到抽滤瓶汇中。合并乙酸溶液,加入乙醚萃取,弃去乙醚层,保留乙酸溶液,减压蒸去乙酸水溶液中残余乙醚。经冷冻干燥得到白色粉末。经RP-HPLC纯化得到化合物(1)的单体纯品。多肽单体的鉴定通过MALDI-TOF质谱进行鉴定。

[0097] 二价多肽(1)的合成:将冻干的单体纯品加入含20%DMSO的磷酸盐缓冲液(0.01M $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$, pH=7.2),使得多肽浓度为2mg/ml, 37℃孵育, HPLC检测反应进程。产物经过HPLC纯化,冻干后得到二价多肽(1)即化合物(1)纯品。二价多肽的鉴定通过MALDI-TOF质谱进行鉴定。

[0098] 按照上述方法合成化合物(2) - (22),同时按照上述方法合成T20和C34。各二价多肽及多肽单体的分子量如表1所示。表1测定的多肽分子量

[0099]

| 化合物编号 | 测定分子量 |
|-------|---------|
| T20 | 4492.73 |
| C34 | 4290.38 |
| (1) | 9010.76 |

| | |
|---------|----------|
| (1)的单体 | 4506.70 |
| (2) | 8925.12 |
| (2)的单体 | 4464.12 |
| (3) | 9152.43 |
| (3)的单体 | 4576.40 |
| (4) | 9439.27 |
| (4)的单体 | 4707.92 |
| (5) | 77782.31 |
| (5)的单体 | 3383.01 |
| (6) | 7555.10 |
| (6)的单体 | 3780.00 |
| (7) | 7701.30 |
| (7)的单体 | 3851.90 |
| (8) | 7938.94 |
| (8)的单体 | 3969.23 |
| (9) | 8079.62 |
| (9)的单体 | 4038.75 |
| (10) | 6046.17 |
| (10)的单体 | 3023.76 |
| (11) | 6222.81 |
| (11)的单体 | 3111.04 |
| (12) | 6372.98 |
| (12)的单体 | 3187.29 |
| (13) | 6443.27 |

[0100]

| | |
|---------|---------|
| (13)的单体 | 3220.50 |
| (14) | 5341.54 |
| (14)的单体 | 2671.28 |
| (15) | 4338.1 |
| (15)的单体 | 2169.48 |
| (16) | 8760.24 |
| (16)的单体 | 4393.09 |
| (17) | 4550.21 |
| (17)的单体 | 9097.22 |
| (18) | 4505.80 |
| (18)的单体 | 9010.76 |
| (19) | 9564.23 |
| (19)的单体 | 4782.10 |
| (20) | 9412.08 |

| | |
|---------|---------|
| (20)的单体 | 4706.98 |
| (21) | 7782.31 |
| (21)的单体 | 3892.91 |
| (22) | 6046.17 |
| (22)的单体 | 3023.00 |

[0101] 实施例2:抑制HIV-1介导的细胞-细胞融合活性评价(IC₅₀)

[0102] 荧光素酶报告基因表达法检测HIV-1介导的细胞-细胞融合(H.Nishikawa, S.Oishi, M.Fujita, K.Watanabe, R.Tokiwa, H.Ohno, E.Kodama, K.Izumi, K.Kajiwara, T.Naitoh, M.Matsuoka, A.Otaka, N.Fujii, Bioorg. Med. Chem. 2008, 16, 9184-9187):在96孔板上,取含有CD4受体和CXCR4辅助受体的TZM-b1靶细胞(来自纽约血液中心)悬浮液稀释至50万/ml,铺入96孔细胞培养板,50 μ l/孔,培养24h。取待测化合物,(1-10)列依次稀释四倍,起始浓度为1 μ M,11列和12列为空白溶剂;DMSO含量 \leq 6%。取HL2/3细胞(来自纽约血液中心)悬浮液稀释至100万/ml,加入细胞板的(1-11) \times (A-H),50 μ l/孔,第12 \times (A-H)补加50 μ l/孔培养基。立即取20 μ l/孔待测IC₅₀的样品加入细胞板,加入顺序依次为HL2/3细胞,待测化合物,TZM-b1细胞,培养6h。去除细胞板中每孔中的培养基(120 μ l/孔),以PBS洗2次,150 μ l/次。加入稀释后的裂解液(1 \times)(Promega, Fitchburg, WI, USA),50 μ l/孔,裂解5min。取20 μ l/孔细胞裂解液铺在96孔磷光板上。将融化后的luciferase assay缓冲液(Promega, Fitchburg, WI, USA)加入luciferase assay底物(Promega, Fitchburg, WI, USA)中混匀,加40 μ l/孔于96孔磷光板中。立即在酶标仪上检测发光。计算IC₅₀值。

[0103] 按照上述方法,活性测定结果见下面的表2。

[0104] 表2:抑制HIV-1介导的细胞融合活性(IC₅₀)

[0105]

| 化合物编号 | 抑制活性(IC ₅₀) (nM) |
|--------|------------------------------|
| T20 | 1.65 \pm 0.22 |
| C34 | 1.11 \pm 0.14 |
| (1) | 1.79 \pm 1.00 |
| (1)的单体 | 1.47 \pm 0.97 |
| (2) | 6.4 \pm 2.1 |
| (2)的单体 | 43.7 \pm 2.2 |
| (3) | 27.9 \pm 3.5 |
| (3)的单体 | 127 \pm 17 |
| (4) | 1.92 \pm 0.26 |
| (4)的单体 | 13.56 \pm 2.00 |
| (5) | 5.71 \pm 1.45 |
| (5)的单体 | 49.02 \pm 2.91 |
| (6) | 14.63 \pm 2.60 |
| (6)的单体 | 41.65 \pm 3.28 |
| (7) | 8.95 \pm 1.72 |
| (7)的单体 | 19.7 \pm 1.8 |

| | |
|--------|------------------|
| (8) | 2.54 ± 0.58 |
| (8)的单体 | 15.41 ± 2.76 |
| (9) | 3.08 ± 0.89 |
| (9)的单体 | 14.67 ± 2.31 |
| (10) | 279 ± 102 |

[0106]

| | |
|---------|--------------------|
| (10)的单体 | 561 ± 122 |
| (11) | 4.9 ± 3.9 |
| (11)的单体 | 38.6 ± 4.1 |
| (12) | 3.8 ± 1.5 |
| (12)的单体 | 214 ± 23 |
| (13) | 5.4 ± 0.6 |
| (13)的单体 | 41.4 ± 7.2 |
| (14) | 38.5 ± 4.5 |
| (14)的单体 | 35.0 ± 12.4 |
| (15) | 9550 ± 1279 |
| (15)的单体 | 9721 ± 1146 |
| (16) | 1.98 ± 0.14 |
| (16)的单体 | 11.25 ± 0.25 |
| (17) | 1.53 ± 0.18 |
| (17)的单体 | 3.97 ± 0.24 |
| (18) | 1.46 ± 0.15 |
| (18)的单体 | 3.25 ± 0.65 |
| (19) | 12.4 ± 2.7 |
| (19)的单体 | 3.9 ± 1.2 |
| (20) | 5.77 ± 0.41 |
| (20)的单体 | 41.79 ± 3.28 |
| (21) | 250.38 ± 57.96 |
| (21)的单体 | 202.72 ± 21.95 |
| (22) | 167 ± 162 |
| (22)的单体 | 179 ± 98 |

[0107] 其中,化合物(1)-(22)分别与本发明实施例及发明内容中化合物编号相对应,T20和C34是对照药物。C34的结构为

[0108] WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELL,T20(Fuzeon或称enfuvirtide)的结构为

[0109] YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF。

[0110] 实验结果表明,本发明的大部分化合物与它们的单体相比,能够更有效地抑制HIV-1介导的细胞融合。

[0111] 尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述,本领域技术人员将会理解。根据已经公开的所有教导,可以对那些细节进行各种修改和替换,这些改变均在本发明的保

护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

序列表

<110> 中国人民解放军军事医学科学院毒物药物研究所
 <120> 抑制HIV感染的二价多肽
 <130> IDC130055
 <160> 29
 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 1
 Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile His
 1 5 10 15
 Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu
 20 25 30
 Leu Leu

<210> 2
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 2
 Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile His
 1 5 10 15
 Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn
 20 25

[0001] <210> 3
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 3
 Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln
 1 5 10 15
 Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu
 20 25 30
 Trp Asn Trp Phe
 35

<210> 4
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 4
 Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile His
 1 5 10 15
 Ser Leu Ile Glu Glu Ser
 20

<210> 5
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 5
 Trp Glu Glu Trp Asp Lys Lys Ile Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Ile Glu
 1 5 10 15
 Glu Leu Ile Lys Lys Ser

20

<210> 6
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 6
 Ile Glu Ala Leu Ile Arg Ala Ala Glu Gln Gln Glu Lys Asn Glu Ala
 1 5 10 15
 Ala Leu Arg Glu Leu
 20

<210> 7
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 7
 Trp Glu Glu Trp Asp Lys Lys Ile Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Ile
 1 5 10 15

<210> 8
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa can be Aca
 <220>
 <221> DISULFID
 <222> (37)..(37)
 <223> Xaa can be S S
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (39)..(39)
 <223> Xaa can be Aca
 <400> 8

[0002]

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

<210> 9
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa can be hAla
 <220>
 <221> DISULFID

<222> (37).. (37)
 <223> Xaa can be -S-S-
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (39).. (39)
 <223> Xaa can be bAla
 <400> 9
 Cys Xaa Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu
 1 5 10 15
 Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu
 20 25 30
 Gln Glu Leu Leu Xaa Cys Xaa Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn
 35 40 45
 Asn Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln
 50 55 60
 Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu
 65 70

<210> 10
 <211> 75
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2).. (2)
 <223> Xaa can be bAla
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3).. (3)
 <223> Xaa can be Aca
 <220>
 <221> DISULFID
 <222> (38).. (38)
 <223> Xaa can be -S-S-
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (40).. (40)
 <223> Xaa can be bAla
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (41).. (41)
 <223> Xaa can be Aca
 <400> 10

[0003]

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

<210> 11
 <211> 75
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa can be Aca
 <220>
 <221> DISULFID
 <222> (38)..(38)
 <223> Xaa can be -S-S-
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (40)..(40)
 <223> Xaa can be Aca
 <400> 11
 Cys Xaa Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln
 1 5 10 15
 Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser
 20 25 30
 Leu Trp Asn Trp Phe Xaa Cys Xaa Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser Ile
 35 40 45
 Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu
 50 55 60
 Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe
 65 70 75

<210> 12
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa can be Aca
 <220>
 <221> DISULFID
 <222> (32)..(32)
 <223> Xaa can be -S-S-
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (34)..(34)
 <223> Xaa can be Aca
 <400> 12
 Cys Xaa Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu
 1 5 10 15
 Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Xaa
 20 25 30
 Cys Xaa Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu
 35 40 45
 Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn
 50 55 60

<210> 13
 <211> 61
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> DISULFID
 <222> (31)..(31)
 <223> Xaa can be -S-S-

[0004]

<400> 13
 Cys Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile
 1 5 10 15
 His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Xaa Cys
 20 25 30
 Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile His
 35 40 45
 Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn
 50 55 60

<210> 14
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (2).. (2)
 <223> Xaa can be bAla
 <220>
 <221> DISULFID
 <222> (32).. (32)
 <223> Xaa can be -S-S-
 <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (34).. (34)
 <223> Xaa can be bAla

[0005]

<400> 14
 Cys Xaa Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu
 1 5 10 15
 Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Xaa
 20 25 30
 Cys Xaa Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu
 35 40 45
 Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn
 50 55 60

<210> 15
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (2).. (2)
 <223> Xaa can be Teg
 <220>
 <221> DISULFID
 <222> (32).. (32)
 <223> Xaa can be -S-S-
 <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (34).. (34)
 <223> Xaa can be Teg

<400> 15
 Cys Xaa Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu
 1 5 10 15
 Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Xaa
 20 25 30
 Cys Xaa Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu

Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn
 35 40 45
 50 55 60

- <210> 16
- <211> 65
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (2)..(2)
- <223> Xaa can be Teg
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (3)..(3)
- <223> Xaa can be bAla
- <220>
- <221> DISULFID
- <222> (33)..(33)
- <223> Xaa can be -S-S-
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (35)..(35)
- <223> Xaa can be Teg
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (36)..(36)
- <223> Xaa can be bAla
- <400> 16

[0006]

Cys Xaa Xaa Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser
 1 5 10 15
 Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn
 20 25 30
 Xaa Cys Xaa Xaa Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr
 35 40 45
 Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys
 50 55 60
 Asn
 65

- <210> 17
- <211> 49
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (2)..(2)
- <223> Xaa can be Aca
- <220>
- <221> DISULFID
- <222> (25)..(25)
- <223> Xaa can be -S-S-
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (27)..(27)
- <223> Xaa can be Aca
- <400> 17

Cys Xaa Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu

```

1           5           10           15
Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Xaa Cys Xaa Trp Met Glu Trp Asp
                20           25           30
Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu
                35           40           45
Ser

<210> 18
<211> 49
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa can be Aca
<220>
<221> DISULFID
<222> (25)..(25)
<223> Xaa can be -S-S-
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (27)..(27)
<223> Xaa can be Aca
<400> 18
Cys Xaa Trp Glu Glu Trp Asp Lys Lys Ile Glu Glu Tyr Thr Lys Lys
1           5           10           15
Ile Glu Glu Leu Ile Lys Lys Ser Xaa Cys Xaa Trp Glu Glu Trp Asp
                20           25           30
Lys Lys Ile Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Ile Glu Glu Leu Ile Lys Lys
                35           40           45
Ser

<210> 19
<211> 49
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa can be Teg
<220>
<221> DISULFID
<222> (25)..(25)
<223> Xaa can be -S-S-
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (27)..(27)
<223> Xaa can be Teg
<400> 19
Cys Xaa Trp Glu Glu Trp Asp Lys Lys Ile Glu Glu Tyr Thr Lys Lys
1           5           10           15
Ile Glu Glu Leu Ile Lys Lys Ser Xaa Cys Xaa Trp Glu Glu Trp Asp
                20           25           30
Lys Lys Ile Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Ile Glu Glu Leu Ile Lys Lys
                35           40           45
Ser

<210> 20

```

[0007]

<211> 51
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa can be Teg
 <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa can be bAla
 <220>
 <221> DISULFID
 <222> (26)..(26)
 <223> Xaa can be -S-S-
 <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (28)..(28)
 <223> Xaa can be Teg
 <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa can be bAla
 <400> 20
 Cys Xaa Xaa Trp Glu Glu Trp Asp Lys Lys Ile Glu Glu Tyr Thr Lys
 1 5 10 15
 Lys Ile Glu Glu Leu Ile Lys Lys Ser Xaa Cys Xaa Xaa Trp Glu Glu
 20 25 30
 [0008] Trp Asp Lys Lys Ile Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Ile Glu Glu Leu Ile
 35 40 45
 Lys Lys Ser
 50

<210> 21
 <211> 47
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa can be Aca
 <220>
 <221> DISULFID
 <222> (24)..(24)
 <223> Xaa can be -S-S-
 <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (26)..(26)
 <223> Xaa can be Aca
 <400> 21
 Cys Xaa Ile Glu Ala Leu Ile Arg Ala Ala Glu Gln Gln Glu Lys Asn
 1 5 10 15
 Glu Ala Ala Leu Arg Glu Leu Xaa Cys Xaa Ile Glu Ala Leu Ile Arg
 20 25 30
 Ala Ala Glu Gln Gln Glu Lys Asn Glu Ala Ala Leu Arg Glu Leu
 35 40 45
 <210> 22

<211> 35
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2).. (2)
 <223> Xaa can be Aca
 <220>
 <221> DISULFID
 <222> (18).. (18)
 <223> Xaa can be -S-S-
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (20).. (20)
 <223> Xaa can be Aca
 <400> 22
 Cys Xaa Trp Glu Glu Trp Asp Lys Lys Ile Glu Glu Tyr Thr Lys Lys
 1 5 10 15
 Ile Xaa Cys Xaa Trp Glu Glu Trp Asp Lys Lys Ile Glu Glu Tyr Thr
 20 25 30
 Lys Lys Ile
 35

[0009]

<210> 23
 <211> 71
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> DISULFID
 <222> (36).. (36)
 <223> Xaa can be -S-S-
 <400> 23
 Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile His
 1 5 10 15
 Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu
 20 25 30
 Leu Leu Cys Xaa Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr
 35 40 45
 Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys
 50 55 60
 Asn Glu Gln Glu Leu Leu Cys
 65 70

<210> 24
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> DISULFID
 <222> (37).. (37)
 <223> Xaa can be -S-S-
 <400> 24
 Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile His
 1 5 10 15
 Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu
 20 25 30
 Leu Leu Arg Cys Xaa Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr
 35 40 45

Thr Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu
 50 55 60
 Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Arg Cys
 65 70

<210> 25
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (35).. (35)
 <223> Xaa can be Aca
 <220>
 <221> DISULFID
 <222> (37).. (37)
 <223> Xaa can be -S-S-
 <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (72).. (72)
 <223> Xaa can be Aca
 <400> 25

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

[0010]

<210> 26
 <211> 79
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (38).. (38)
 <223> Xaa can be Teg
 <220>
 <221> DISULFID
 <222> (40).. (40)
 <223> Xaa can be -S-S-
 <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (78).. (78)
 <223> Xaa can be Teg
 <400> 26

Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile His
 1 5 10 15
 Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu
 20 25 30
 Leu Leu Gly Gly Ser Xaa Cys Xaa Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile
 35 40 45
 Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn
 50 55 60

Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Gly Gly Ser Xaa Cys
 65 70 75

- <210> 27
- <211> 75
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (36)..(36)
- <223> Xaa can be Aca

- <220>
- <221> DISULFID
- <222> (38)..(38)
- <223> Xaa can be -S-S-
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (74)..(74)
- <223> Xaa can be Aca

<400> 27
 Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu
 1 5 10 15
 Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp
 20 25 30
 Asn Trp Phe Xaa Cys Xaa Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser Ile Glu Glu
 35 40 45
 Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp
 50 55 60
 Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe Xaa Cys
 65 70 75

[0011]

- <210> 28
- <211> 63
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (30)..(30)
- <223> Xaa can be Aca
- <220>
- <221> DISULFID
- <222> (32)..(32)
- <223> Xaa can be -S-S-
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (62)..(62)
- <223> Xaa can be Aca
- <400> 28

Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile His
 1 5 10 15
 Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Xaa Cys Xaa
 20 25 30
 Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile His
 35 40 45
 Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Xaa Cys
 50 55 60

<210> 29
 <211> 49
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (23).. (23)
 <223> Xaa can be Aca
 <220>
 <221> DISULFID
 <222> (25).. (25)
 <223> Xaa can be -S-S-
 [0012] <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (48).. (48)
 <223> Xaa can be Aca
 <400> 29
 Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile His
 1 5 10 15
 Ser Leu Ile Glu Glu Ser Xaa Cys Xaa Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu
 20 25 30
 Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Xaa
 35 40 45
 Cys