

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102653553 A

(43) 申请公布日 2012. 09. 05

(21) 申请号 201110050878. 2

(22) 申请日 2011. 03. 03

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所  
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 江涛 毕利军 张先恩 桂文君  
林世强 陈媛媛

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任  
公司 11021

代理人 王旭

(51) Int. Cl.

*C07K 7/08* (2006. 01)

*A61K 38/10* (2006. 01)

*A61P 31/06* (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 3 页

序列表 3 页 附图 1 页

### (54) 发明名称

与结核分枝杆菌  $\beta$  clamp 有高亲和力的多肽

### (57) 摘要

本发明涉及生物医药工程技术领域, 具体涉及一种能与结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) DNA 聚合酶持续合成因子  $\beta$  clamp 有高亲和力的多肽结构。它由一段  $\alpha$  螺旋结构和保守的 LF 氨基酸组成,  $\alpha$  螺旋结构的存在能明显提高多肽与  $\beta$  clamp 的亲合力。本发明提供上述小肽序列的筛选方法及它在制备抗结核治疗药物方面的用途。

1. 一种能与结核分枝杆菌DNA聚合酶持续合成因子 $\beta$  clamp有高亲和力的低分子量多肽序列,其特征在于它是由一段N-端 $\alpha$ 螺旋结构和保守的LF氨基酸组成。
2. 权利要求1所述的多肽序列,其中所述 $\alpha$ 螺旋为GTKKAEA序列。
3. 权利要求1所述的多肽序列,其针对的 $\beta$  clamp蛋白的氨基酸序列为SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。
4. 权利要求1所述的多肽序列,其氨基酸序列为SEQ ID NO:1GTKKAEALGQFDLFGS。
5. 权利要求1-4中任一项所述的多肽序列在制备抗结核分枝杆菌治疗药物中的用途。
6. 权利要求5的用途,其中所述结核分枝杆菌为H37Rv菌株。

## 与结核分枝杆菌 $\beta$ clamp 有高亲和力的多肽

### 背景技术：

[0001] 结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 是一类非常重要的人类病原体。属于放线菌目分枝杆菌科分枝杆菌属,是一种抗酸革兰氏阳性菌。它可侵犯全身各器官,尤其是肺部,导致肺结核。结核病是一个重大的健康问题,尤其是亚洲和非洲。目前,结核病是全球传染病中造成成人死亡的第二大元凶。鉴于全球化、跨国移民和旅游的上升趋势,所有国家都是耐多药结核病疫情的可能发生地。因为结核菌的分裂周期长,生长繁殖缓慢,杀灭很困难。现在常规的治疗方法需要花六到九个月。

[0002] 结核分枝杆菌中最广泛存在的 H37Rv 菌株的全基因组含有 4,411,529 对碱基。其中有生物功能的基因约 4000 个。其中 polymerase III 的  $\beta$  亚基,也称为  $\beta$  clamp,是一个环绕 DNA 的环形结构,它可以结合聚合酶的 clamp loader,也可以结合 polymerase 的核心酶。它们环绕到 DNA 上后,会高速的滑动,并带动结合在上面的 polymerase 核心酶沿着 DNA 高速运动,从而使复制可以快速的进行,是 DNA 复制的关键因子。因此寻找与  $\beta$  clamp 结合的多肽以阻止结核分枝杆菌的基因组 DNA 复制,是结核分枝杆菌防治的一项新策略。

[0003] 表面等离子共振 (surface plasmon resonance, SPR) 技术是目前国际上广泛用于研究两种分子相互作用的手段。这种方法检测生物分子的相互作用时,无需对生物分子进行标记,只需将一种生物分子固定在传感器芯片表面,将与之相互作用的分子的溶液流过芯片表面,就可以检测两种分子的结合、解离全过程。这种方法适用于多种生物体系,包括小分子化合物、多肽、蛋白质、寡核苷酸、寡聚糖、病毒、细胞等等。

[0004] 目前的研究认为保守的 LF 氨基酸残基是与  $\beta$  clamp 蛋白相互作用的关键位点。

### 发明内容：

[0005] 本发明利用 SPR 技术研究了来源于结核分枝杆菌 H37Rv 菌株的  $\beta$  clamp 蛋白与多种多肽之间的相互作用,得到了一段与  $\beta$  clamp 蛋白有高亲和力的多肽,其序列为:GTKKAEALGQFDLFGS (SEQ ID NO :1),其与  $\beta$  clamp 蛋白的  $K_D$  值为  $16.0 \mu M$ ,其中 GTKKAEA 是一段  $\alpha$  螺旋,LF 是传统认为对于结合  $\beta$  clamp 蛋白很重要的保守氨基酸。本发明在找到了与  $\beta$  clamp 蛋白有高亲和力的多肽后,比较了保守 LF 氨基酸 N 端有  $\alpha$  螺旋的多肽与 LF 氨基酸前没有完整  $\alpha$  螺旋的多肽,发现完整的  $\alpha$  螺旋的存在能明显提高多肽与  $\beta$  clamp 蛋白的亲和力,因此这个 LF 氨基酸 N 端的完整  $\alpha$  螺旋结构对于多肽与  $\beta$  clamp 蛋白的结合非常重要。

[0006] 在本发明中提供下列：

[0007] 1、一种能与结核分枝杆菌 DNA 聚合酶持续合成因子  $\beta$  clamp 有高亲和力的低分子量多肽序列,其特征在于它是由一段 N-端  $\alpha$  螺旋结构和保守的 LF 氨基酸组成。

[0008] 2、1 所述的多肽序列,其中所述  $\alpha$  螺旋为 GTKKAEA 序列。

[0009] 3、1 所述的多肽序列,其针对的  $\beta$  clamp 蛋白的氨基酸序列为 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列。

[0010] 4、1 所述的多肽序列,其氨基酸序列为 GTKKAEALGQFDLFGS (SEQ ID NO :1)。

- [0011] 5、4 所述的多肽序列,其与  $\beta$  clamp 蛋白的  $K_D$  值为  $16.0 \mu M$ 。
- [0012] 6、权利要求 1-5 中任一项所述的多肽序列在制备抗结核分枝杆菌治疗药物中的用途。
- [0013] 7、权利要求 6 的用途,其中所述结核分枝杆菌为 H37Rv 菌株。
- [0014] 附图简述:
- [0015] 图 1 是结核分枝杆菌 H37Rv 的 DNA 聚合酶持续合成因子  $\beta$  clamp 的氨基酸序列 (SEQ ID NO :2)。它的 NCBI Accession No. 为 :NP\_214516。对应的基因名称为 dnaN。
- [0016] 图 2 :多肽 1、多肽 2、多肽 3 与  $\beta$  clamp 蛋白相互作用的 SPR 分析结果。
- [0017] 图 3 :多肽 1 与  $\beta$  clamp 蛋白相互作用的  $K_D$  值分析。

### 具体实施方式

- [0018] 实施例 1
- [0019] 本发明提供上述多肽的实验方法:
- [0020] 1、结核分枝杆菌 H37Rv 的  $\beta$  clamp 蛋白的表达和纯化。
- [0021] 结核分枝杆菌  $\beta$  clamp 蛋白的全长基因 dnaN (SEQ ID NO :2) 被克隆在载体 pQE30 (购于 Qiagen 公司) 上,使用大肠杆菌表达菌株 BL21 (购于 Merck 公司) 表达。
- [0022] 挑取单克隆,在含  $50 \mu g/ml$  Amp 的 5ml LB 中  $37^\circ C$  振摇过夜后,取 2ml 接种到含  $50 \mu g/ml$  Amp 的 200ml LB 中摇至 OD600 约为 0.6,再转接至 8 瓶含  $50 \mu g/ml$  Amp 的 750ml LB 中摇至 OD600 约为 0.6,加入终浓度为 0.4mM 的 IPTG,  $16^\circ C$  诱导 18h,离心收集菌体。
- [0023] 将收集的菌体超声破碎,  $4^\circ C$  16000rpm 离心 30min,取上清过用 loading buffer (20mM Tris-Cl pH7.9, 500mM NaCl, 5mM 咪唑) 平衡好的 Ni-NTA 柱,用 loading buffer 继续冲洗,直到紫外检测仪上面的 OD280 走平为止。然后用 wash buffer (20mM Tris-Cl pH7.9, 500mM NaCl, 100mM 咪唑) 洗杂蛋白,最后用 elution buffer (20mM Tris-Cl pH7.9, 500mM NaCl, 250mM 咪唑) 洗脱目的蛋白。
- [0024] 将得到的  $\beta$  clamp 蛋白超滤浓缩,换至低盐 buffer (20mM Tris-Cl pH7.9, 20mM NaCl), 过 HitrapQ 预装柱 (GE healthcare), 高盐 buffer 为 :20mM Tris-Cl pH7.9, 1M NaCl。收集主峰,超滤浓缩。以同样的条件过 MonoQ 预装柱 (GE healthcare)。
- [0025] 将得到的蛋白超滤浓缩,换至凝胶过滤层析 buffer (20mM Tris-Cl pH7.9, 100mM NaCl), 过 Superdex 200 10/300GL 柱,收集主峰,浓缩至约 3mg/ml,液氮速冻,存  $-80^\circ C$  冰箱。
- [0026] 2、多肽的合成。
- [0027] 合成下列三种多肽并在其 N 端连接上 biotin 标记 (由上海强耀生物科技有限公司合成并标记)。
- [0028] 1) 多肽序列 :GTKKAEALGQFDLFGS (SEQ ID NO :1), 其中 GTKKAEA 为  $\alpha$  螺旋;
- [0029] 2) 多肽序列 1) 的截短体 :LGQFDLFGS (SEQ ID NO :3), 含有 LF 保守氨基酸,不含有完整的  $\alpha$  螺旋;
- [0030] 3) 随机序列 :LMGDLKELLGPGCLGS (SEQ ID NO :4), 其中 LMGDLKE 为  $\alpha$  螺旋。
- [0031] 3、SPR 实验分析多肽与结核分枝杆菌  $\beta$  clamp 蛋白的亲合力。
- [0032] 使用 GE 公司的 Biocore 3000 仪器进行 SPR 实验分析。当光线从高折射率的介质

进入低折射率的介质时,一部分光线会在接触面上被反射。当入射角大于临界角的时候,光线会发生全反射。但是,当玻璃的表面覆盖一层薄的惰性金属膜(如金)时,金属膜表面的等离子体(plasma)发生振动,一部分光会“损失”在金属膜上。当入射光的波矢量与表面等离子体振子的频率一致的时候,电子发生“共振”,这种现象被称为表面等离子共振(surface plasmon resonance)。当反射光的强度达到最小值时的入射角,被称为表面等离子共振角( $\theta_{spr}$ , surface plasmon resonance angle)。SPR随金属膜表面介质的折射率变化而变化,而折射率的变化则与结合在金属表面的分子质量成正比。因此,我们可以通过观察表面等离子共振角,来分析生物分子之间的相互作用。结果描绘为RU(resonance unit)对时间的图。

[0033] 将结核分枝杆菌  $\beta$  clamp 蛋白和上述三种合成的多肽(SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4)溶解在 buffer(20mM Tris-Cl pH7.5,150mMNaCl,1mM EDTA,0.005% 表面活性剂 P20)(多肽的浓度约为 30nM)中,将上述三种多肽固定(三种多肽各自的固定量约为 600RU)在 SA 芯片(购于 GE 公司)上,使  $\beta$  clamp 蛋白(终浓度为 4  $\mu$ M)流过所述 SA 芯片,测量其响应值(RU)。结果见图 2。在图 2 中,三条曲线依次表示多肽序列 GTKKAEALGQFDLFGS(SEQ ID NO:1)、多肽序列 LGQFDLFGS(SEQ ID NO:3)、随机序列 LMGDLKELLGPGCLGS(SEQ ID NO:4)与结核分枝杆菌  $\beta$  clamp 蛋白相互作用的 SPR 响应值曲线。由此,得到亲和力最高的多肽序列为:GTKKAEALGQFDLFGS。

[0034] 使不同浓度的结核分枝杆菌  $\beta$  clamp 蛋白(0,1  $\mu$ M,2  $\mu$ M,4  $\mu$ M,8  $\mu$ M,16  $\mu$ M,32  $\mu$ M,64  $\mu$ M)分别流过固定了多肽序列:GTKKAEALGQFDLFGS 的 SA 芯片(购自 GE 公司)(固定量约为 600RU),见图 3a,用软件 Bioevaluation 分析其动力学常数,得到  $\beta$  clamp 蛋白与该多肽的  $K_D$  值为 16.0  $\mu$ M,见图 3b。

[0035] 鉴于结核分枝杆菌  $\beta$  clamp 蛋白是结核分枝杆菌 DNA 复制系统的关键因子,DNA 聚合酶的核心酶只有与  $\beta$  clamp 蛋白结合以后,才能被  $\beta$  clamp 蛋白带动,在 DNA 上高速滑动,从而催化 DNA 的快速复制。因此,多肽 GTKKAEALGQFDLFGS 与  $\beta$  clamp 蛋白的高效结合将阻止结核分枝杆菌的基因组 DNA 复制,从而起到抑制结核杆菌的作用。此外,相对于其它结合于  $\beta$  clamp 蛋白的多肽而言,多肽 GTKKAEALGQFDLFGS 作为一种小分子量多肽,价格上比较经济,而且由于分子量小,比较容易将其传递到靶标,从而提高抑制效率。

[0001]

IB110426 序列表

序列表

&lt;110&gt; 中国科学院生物物理研究所

<120> 与结核分枝杆菌  $\beta$  clamp 有高亲和力的多肽

&lt;130&gt; IB110426

&lt;160&gt; 4

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工的

&lt;400&gt; 1

Gly Thr Lys Lys Ala Glu Ala Leu Gly Gln Phe Asp Leu Phe Gly Ser  
 1 5 10 15

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 402

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 结核分枝杆菌H37Rv

&lt;400&gt; 2

Met Asp Ala Ala Thr Thr Arg Val Gly Leu Thr Asp Leu Thr Phe Arg  
 1 5 10 15

Leu Leu Arg Glu Ser Phe Ala Asp Ala Val Ser Trp Val Ala Lys Asn  
 20 25 30

Leu Pro Ala Arg Pro Ala Val Pro Val Leu Ser Gly Val Leu Leu Thr  
 35 40 45

Gly Ser Asp Asn Gly Leu Thr Ile Ser Gly Phe Asp Tyr Glu Val Ser  
 50 55 60

Ala Glu Ala Gln Val Gly Ala Glu Ile Val Ser Pro Gly Ser Val Leu  
 65 70 75 80

Val Ser Gly Arg Leu Leu Ser Asp Ile Thr Arg Ala Leu Pro Asn Lys  
 85 90 95

Pro Val Asp Val His Val Glu Gly Asn Arg Val Ala Leu Thr Cys Gly  
 100 105 110

[0002]

IB110426 序列表

Asn Ala Arg Phe Ser Leu Pro Thr Met Pro Val Glu Asp Tyr Pro Thr  
115 120 125

Leu Pro Thr Leu Pro Glu Glu Thr Gly Leu Leu Pro Ala Glu Leu Phe  
130 135 140

Ala Glu Ala Ile Ser Gln Val Ala Ile Ala Ala Gly Arg Asp Asp Thr  
145 150 155 160

Leu Pro Met Leu Thr Gly Ile Arg Val Glu Ile Leu Gly Glu Thr Val  
165 170 175

Val Leu Ala Ala Thr Asp Arg Phe Arg Leu Ala Val Arg Glu Leu Lys  
180 185 190

Trp Ser Ala Ser Ser Pro Asp Ile Glu Ala Ala Val Leu Val Pro Ala  
195 200 205

Lys Thr Leu Ala Glu Ala Ala Lys Ala Gly Ile Gly Gly Ser Asp Val  
210 215 220

Arg Leu Ser Leu Gly Thr Gly Pro Gly Val Gly Lys Asp Gly Leu Leu  
225 230 235 240

Gly Ile Ser Gly Asn Gly Lys Arg Ser Thr Thr Arg Leu Leu Asp Ala  
245 250 255

Glu Phe Pro Lys Phe Arg Gln Leu Leu Pro Thr Glu His Thr Ala Val  
260 265 270

Ala Thr Met Asp Val Ala Glu Leu Ile Glu Ala Ile Lys Leu Val Ala  
275 280 285

Leu Val Ala Asp Arg Gly Ala Gln Val Arg Met Glu Phe Ala Asp Gly  
290 295 300

Ser Val Arg Leu Ser Ala Gly Ala Asp Asp Val Gly Arg Ala Glu Glu  
305 310 315 320

Asp Leu Val Val Asp Tyr Ala Gly Glu Pro Leu Thr Ile Ala Phe Asn  
325 330 335

Pro Thr Tyr Leu Thr Asp Gly Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Arg Val  
340 345 350

Ser Phe Gly Phe Thr Thr Ala Gly Lys Pro Ala Leu Leu Arg Pro Val  
355 360 365

Ser Gly Asp Asp Arg Pro Val Ala Gly Leu Asn Gly Asn Gly Pro Phe  
370 375 380

Pro Ala Val Ser Thr Asp Tyr Val Tyr Leu Leu Met Pro Val Arg Leu  
385 390 395 400

Pro Gly

[0003]

IB110426 序列表

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工的

&lt;400&gt; 3

Leu Gly Gln Phe Asp Leu Phe Gly Ser  
1 5

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工的

&lt;400&gt; 4

Leu Met Gly Asp Leu Lys Glu Leu Leu Gly Pro Gly Cys Leu Gly Ser  
1 5 10 15



1 mdaattrvgl tdltrllre sfadavswva knlparpavp vlsgvlltgs dngltisgfd  
 61 yevsaeaqvg acivspgsvl vsgrllsdit ralpnkpv dv hvegnrvalt cgnarfsplt  
 121 mpvedyptlp tlpeetgllp aelfaeaisq vaiaagrddt lpmltgirve ilgetvvlaa  
 181 tdrfrlavre lkwsasspdi eaavlpakt laeaakagig gsdvrlslgt gpgvgkdgll  
 241 gisgngkrst trlldaefpk frllphte avatmdva elieaiklvalv adrgaqvrme  
 301 fadgsvrlsa gaddvgrae dlvvdyagep ltiafnptyl tdglsslrse rvsfgfttag  
 361 kpallrpvsg ddrpvagl ng ngpfpavstd yvylmpvrl pg

图 1

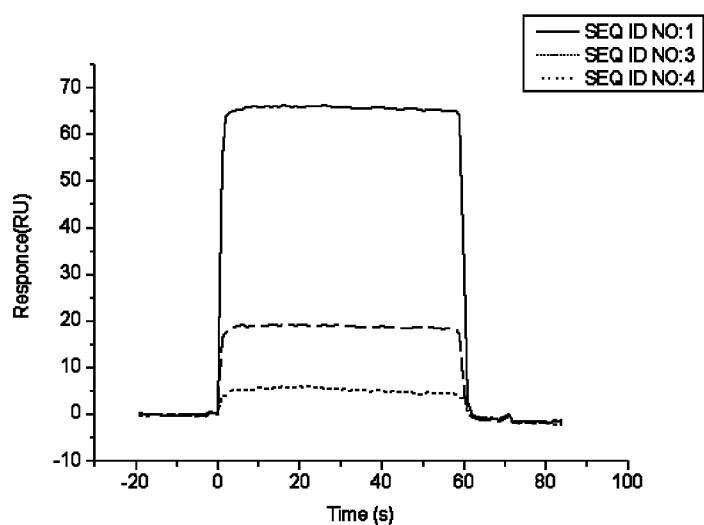


图 2

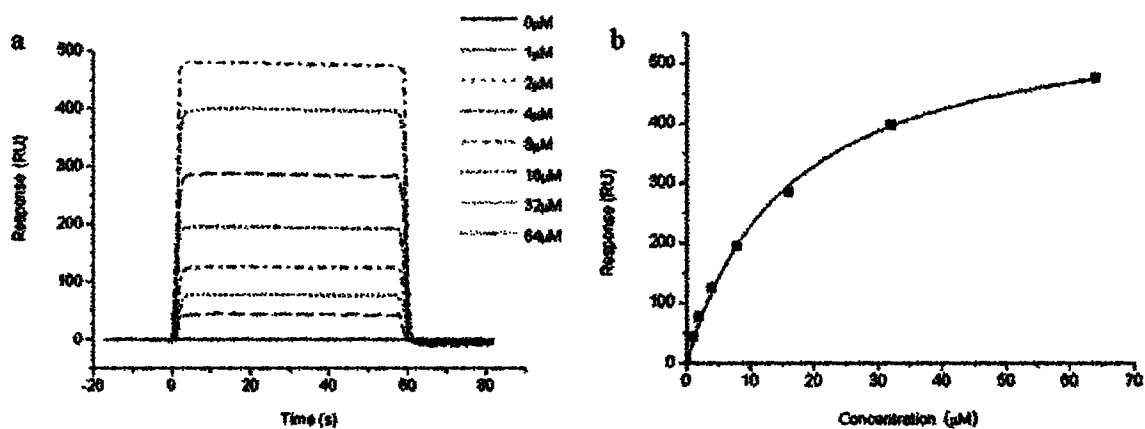


图 3