

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910025742.9

[51] Int. Cl.

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

[43] 公开日 2009年9月9日

[11] 公开号 CN 101524528A

[22] 申请日 2009.3.9

[21] 申请号 200910025742.9

[71] 申请人 中国药科大学

地址 210009 江苏省南京市童家巷24号

[72] 发明人 奚涛 杨家森 邹佳宁 那广水
邢莹莹

权利要求书1页 说明书5页 附图4页

[54] 发明名称

重组 NuBCP - 9 和 Tumstatin (74 - 98) 抗肿瘤
融合多肽

[57] 摘要

本发明涉及 NuBCP - 9 和 Tumstatin (74 - 98) 融合基因工程抗肿瘤肽。该杂合肽根据大肠杆菌偏爱密码子设计合成引物，用 SOE 法 PCR 出以柔性肽 (G₄S)₃ 连接的 NuBCP - 9 和 Tumstatin (74 - 98) 融合肽基因序列，同载体 pET32a(+) 连接后，构建重组表达质粒，转入大肠杆菌 BL21 进行可溶高效表达，纯化并酶切出目的肽。该融合肽对人脐静脉内皮细胞增殖和人肺癌细胞都有很好的抑制作用，初步显示了多靶点抗肿瘤效果，将有很好的临床应用前景。

1. 重组 NuBCP-9 和 Tumstatin(74-98)抗肿瘤融合多肽药物, 其特征在于它是用原核细胞表达的由柔韧性好的(G₄S)₃肽连接的 NuBCP-9(9 个氨基酸)和 Tumstatin74-98(25 个氨基酸)组成的 49 个氨基酸肽。
2. 按照权力要求 1 所述的融合肽, 其分子量为 4.984kDa, 等电点 6.97, 该肽具有趋向肿瘤、抑制血管内皮细胞和诱导细胞凋亡的不同抗肿瘤特征。
3. 按照权力要求 1 和 2 所述的融合肽, 其前端与 pET32a(+)载体上的硫氧环蛋白(TrxA)融合表达, 并用蛋白酶因子 Xa 连接, 其基因序列以大肠杆菌偏爱密码子设计, 并根据 SOE 法 PCR 引物要求进行适当调整。SOE 法 PCR 扩增得到融合肽基因全长, 插入到 pET32a(+)构建出重组载体。
4. 按照权力要求 3 所述的融合肽重组质粒, 转化大肠杆菌 BL21 细胞, 并经 IPTG 诱导后表达出 Trx-NuBCP-9-Tumstatin(74-98)融合蛋白, 经镍柱纯化融合蛋白后用蛋白酶因子 Xa 酶切得到目的融合肽, 进一步镍柱和超滤膜纯化得到纯度为 96.1%的融合肽。
5. 按照权力要求 4 所述得到的融合肽, 其特征在于具有抑制血管内皮细胞和诱导细胞凋亡的不同抗肿瘤特征, 可以开发为很好的抗肿瘤药物。

重组 NuBCP-9 和 Tumstatin(74-98)抗肿瘤融合多肽

技术领域：

本发明 NuBCP-9/Tumstatin(74-98)融合基因工程抗肿瘤肽，属于生物制药工业中的基因工程生产疫苗药物的技术领域。具体涉及 NuBCP-9 和 Tumstatin(74-98)融合肽设计、表达载体的构建、转化、表达、纯化及功能验证。

背景技术：

肿瘤系统生物学认为肿瘤是一个多基因合作多信号途径参与的过程，单一的分子靶向治疗逐渐显现其弊端，因此联合不同作用机制的药物进行多靶点抗肿瘤治疗能起到更好的作用。目前已有的抗肿瘤药物虽对大多数肿瘤有一定疗效，但仍存在着治疗有效率低、选择性差、毒副反应大、易产生瘤细胞耐药等问题。因此，从不同途径寻找高效、低毒、特异性强的抗肿瘤药物仍是药物治疗的当务之急。多肽类药物因其分子量小、无免疫原性、结构简单、副作用小，其抗肿瘤活性的研究正在引起国内外学者的广泛关注并取得了一定进展。生物活性肽的抗肿瘤机制包括抑制肿瘤 DNA 合成、阻止肿瘤新生血管生成和转移、诱导肿瘤细胞凋亡等，但具体机制较为复杂，不同的活性肽对不同肿瘤的作用不同，多种生物活性肽联合应用，可能会增强抗肿瘤效果。

Bcl-2(B cell lymphoma/leukemia-2)基因是一种原癌基因，它具有抑制凋亡的作用，可增强细胞对大多数 DNA 损伤因子的抵抗性，抑制大多数化疗药物所引起的靶细胞凋亡，在大多数肿瘤细胞中高效表达，因此很多药物都以此为靶点进行筛选。目前以 Bcl-2 为靶标的药物多数是反义核酸来抑制 Bcl-2 的表达，或者是 BH3(Bcl-2 homology3)肽及类似物结合与 Bcl-2 的 BH3 结合袋处来消除它的活性。激活蛋白 Nur77(nuclear receptor77)在受到凋亡刺激时能从细胞核迁移到线粒体，与 Bcl-2 相互作用并成为 Bcl-2 死亡构象的一种转换器，NuBCP-9(Nur77-derived Bcl-2-converting peptide with 9 amino acids)是受体 Nur77 蛋白上的一段短的序列，同样能够直接作用于 Bcl-2，使 Bcl-2 从一种保护癌细胞免受程序性死亡调控的蛋白转变为一种能够杀死癌细胞的蛋白，在体内外都显示了很好的诱导肿瘤细胞凋亡活性。

肿瘤的生长和转移也离不开新生血管的生成，肿瘤抑素是一种来源于基膜胶原 IV(Col IV)的蛋白片断，具有抗肿瘤新生血管生成和抑制肿瘤细胞增殖的双重活性，能特异性地抑制肿瘤血管内皮细胞蛋白的合成。Maeshima 等人通过缺失突变的方法证明肿瘤抑素的抗肿瘤新生血管生成活性位于被称为 Tum5 的 54—132 位氨基酸。进一步研究证明，抗肿瘤新生血管生成活性区被定位于被称为 T7 片断的 74—98 位氨基酸，它具有与全长肿瘤抑素相同的抗血管生成活性。以非 RGD(Arg-Gly-Asp)序列结合于整合素 $\alpha_v\beta_3$ ，能有效抑制内皮细胞蛋白质合成，抑制内皮细胞增殖，诱导内皮细胞凋亡，进而特异地抑制肿瘤细胞的增殖，而对于生理性血管生成（包括发育和修复相关的血管生成）没有影响。

在抗肿瘤药物的研究过程中越来越趋向于肿瘤的靶向和综合性治疗，把具有不同抗肿瘤作用机制的活

性肽利用基因重组的方法连接起来,进行大规模发酵生产不失为明智之举。我们按照细菌密码子的偏爱优化了 NuBCP-9 和 Tumstatin(74-98)的编码序列,用柔性肽(G₄S)₃连接并构建大肠杆菌表达载体,采用 BL21(DE3)作为表达菌株,使其得到了高效表达。本实验对重组蛋白在大肠杆菌中的 IPTG 诱导表达条件进行了优化并对表达蛋白的活性进行了分析。NuBCP-9 和 Tumstatin(74-98)都属于内源性蛋白小片断,降低了免疫排斥反应,通常不会产生毒性。它们的作用靶点都是细胞相对稳定的基因,产生耐药的机会较少。

发明内容:

本发明的首要目的在于利用柔性肽(G₄S)₃将不同抗肿瘤机制的活性肽 NuBCP-9 和 Tumstatin(74-98)连接起来,达到抑制血管生成、诱导细胞凋亡双重抗肿瘤功能,获得一种多靶点抗肿瘤基因工程药物。

本发明的另一个目的提供抗肿瘤基因工程融合肽的制备方法(包括核酸序列设计、表达载体构建、目的产物的表达及纯化)。

利用基因融合的方法表达融合肽已有报道,但多数是在抗菌肽方面,在肿瘤治疗方面很少有报道。本发明将不同作用机制抗肿瘤活性肽用柔性肽编码序列连接起来,用 SOE 法 PCR 出融合基因全长,克隆至大肠杆菌表达载体 pET32a(+),构建了新的表达质粒 pET32a(+)-PT7-TrxA-6×His-NuBCP9-Tumstatin(74-98),其中 PT7 是所述质粒 pET32a(+)的启动子; TrxA 是硫氧环蛋白; 6×His 是组氨酸纯化标签。通过热激法将重组质粒转化到大肠杆菌 BL21(DE3)细胞中, IPTG 诱导融合蛋白表达,对表达、酶切及纯化条件进行摸索,建立了融合肽在大肠杆菌中高效表达、酶切及纯化体系。通过体外细胞实验表明,融合肽具有良好的抗肿瘤活性。

附图说明:

图 1.融合肽的氨基酸和核苷酸序列(单线,双线,方框和间断线分别为蛋白酶 Factor Xa 酶切位点, NuBCP9, 连接肽和 Tumstatin(74-98))

图 2.MOE 预测融合肽的空间结构(A, NuBCP-9; B: Tumstatin(74-98); C: (G₄S)₃肽)

图 3.SOE 法 PCR 出的融合基因全长电泳图(M: DL2000 DNA Marker; PCR: 扩增的目的片段)

图 4.重组载体的构建示意图

图 5.重组载体的测序图(单线划线为 *EcoR* I 和 *Hind*III 酶切位点,双下划线为蛋白酶 Factor Xa 酶切位点)

图 6.融合蛋白随时间诱导情况(1-7:分别为诱导 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 小时蛋白表达情况)

图 7.融合蛋白镍柱纯化情况(M: 蛋白质 Marker; 1: 菌体可溶性总蛋白; 2: 镍柱穿透蛋白; 3: 50mM 咪唑洗脱情况; 4: 100mM 咪唑洗脱情况; 5: 200mM 咪唑洗脱情况; 6: 300mM 咪唑洗脱情况)

图 8.融合肽的酶切纯化图(M: 蛋白质 Marker; 1: 镍柱纯化的 TrxA-NT; 2: 纯化的融合肽 NT)

图 9.融合肽的活性情况

具体实施方式:

下面结合附图, 通过实施方式对本发明作进一步详细说明

材料

(1)菌株与质粒

大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5a, *Escherichia coli* BL21(DE3), 载体 PET32a(+)均为本实验室保存。

(2)细胞

细胞株 Human lung adenocarcinoma A549, Human umbilical vein vascular endothelial cells ECV304 均为本实验室保存。

(3)工具酶

Taq DNA 聚合酶购自上海生工; 限制性内切酶 *EcoR* I、*Hind*III及 DNA 连接酶购自 MBI Fermentas 公司; 蛋白酶 Factor Xa 购自 NEB 公司。

实施例1. 融合肽序列设计及空间结构预测

根据 NuBCP-9 和 Tumstatin(74-98)氨基酸序列, 其间用柔性肽(G₄S)₃ 连接, 对照大肠杆菌偏爱密码子设计出核酸序列, 并根据 PCR 引物设计原则进行适当调整(图 1)。为了确定连接后的空间结构是否会影
响各自肽段功能的发挥, 我们用分子模拟软件 MOE (molecular operating environment)对融合肽进行了同源建模预测, 以 PDB 编号为 1F3R.B 的蛋白作为模版。空间模拟采用的环境是生理 pH 值水相, 其他设置为默认状态。预测结果如图 2, 从图中可以看出, 其空间结构能够很好的保持, 符合设计要求。

实施例2. 高效表达载体的构建

(1)以 NuBCP-9 和 Tumstatin(74-98)氨基酸序列, 对照大肠杆菌偏爱密码子设计出核酸序列, 并根据 PCR 引物设计原则进行适当调整, 设计了四条引物, 分别为

P1f: GACGAATTCATTGAGGGTCGCTTTAGCCGTAGCCTGCATAGCCTGCTGGGCGGTGGTGG

P2f: CCTGCTGGGCGGTGGTGGCAGCGGTGGCGGTGGCTCTGGTGGCGGTGGCAGCACCATGC

P3r: GCAAATTGCACACATCATTACATTGCAAACAGAAACGGCATGGTGCTGCCACCGCC

P4r: CGCAAGCTTTTACAGCCAATAGCTATAATCATTACGGCTCGCAAATTGCACACATCAT

同时引入限制酶位点 *EcoR* I 和 *Hind*III, 以及蛋白酶 Factor Xa 位点序列。

(2)进行 SOE 法两步扩增出 NuBCP-9 /Tumstatin(74-98) 融合肽基因。

第一步 PCR: 以 P2f 和 P3r 互为模板, 加入 Taq 酶及相关反应体系, 94°C 3min; 55°C 2min; 72°C 10min 获得双链片段。

第二步 PCR: 以第一次 PCR 产物为模板, 加入引物 P1f 和 P4r, 按下列条件进行 PCR 扩增: 94°C 4min; 94°C 50sec; 55°C 50sec; 72°C 1min, 循环 29 次后 72°C 延伸 10min。反应产物电泳(附图 3)后用 DNA Gel

Extraction Kit (Qiagen 公司)回收, 具体操作步骤按说明书进行。

(3)PCR 产物回收后用 EcoR I 和 HindIII双酶切, 用同样的内切酶双酶切 pET32a(+), 分别回收酶切后产物, 连接后转化大肠杆菌 DH5 α , 用含 Amp(100mg/L)的平板筛选出阳性克隆, PCR 及酶切初步验证后, 送 Invitrogen 公司测序进一步证实(附图 5)。

结果表明, 融合肽编码序列的插入位点、拼接顺序及编码碱基与设计相符, 能够按照预期的读码方式翻译出目的融合肽。

实施例3. 融合肽 NuBCP-9 /Tumstatin(74-98)的表达、纯化

(1)将测序正确的阳性克隆质粒转化大肠杆菌表达菌株 BL21(DE3), 得到的转化子接入到 LB 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 次日以 1:50 稀释 37 $^{\circ}$ C 扩培 3h 后, 加入 0.5mM IPTG 30 $^{\circ}$ C 诱导表达 (附图 6), 经 12%SDS-PAGE 分析表达形式, 同时用电子扫描分析表达量。

(2)融合蛋白 TrxA-NuBCP-9 /Tumstatin(74-98)以可溶形式表达, 大量表达后离心收集菌体, 并用 NTA-Resin Buffer 重悬, 反复冻溶后超声破碎仪破碎细胞, 离心收集上清。

(3)纯化获得融合蛋白

上清用亲和层析柱 NTA Resin 分离纯化得到融合蛋白 TrxA-NuBCP-9 /Tumstatin(74-98)。具体步骤是: 将上清用 0.45 μ m 滤膜过滤, 按照说明书步骤上柱, 并分别用 50 mM 咪唑、100 mM 咪唑、200 mM 咪唑和 300 mM 咪唑进行梯度洗脱, 12% SDS-PAGE 检测融合蛋白的纯化效果(附图 7)。

(4)制备融合肽

融合蛋白 TrxA-NuBCP-9/Tumstatin(74-98)用 Factor Xa 蛋白酶酶切。每毫克融合蛋白加 1.5 个单位的蛋白酶, 在裂解液 (50mM Tris-HCl, PH 8.0, 0.1 M NaCl, 5 mM CaCl $_2$) 中 21 $^{\circ}$ C 孵育 3-6h。酶切产物用 10KD 的超滤膜将蛋白酶、TrxA 及未切开的融合蛋白去除, 再用 G25 除盐, 冻干即可得到高纯度的融合肽(附图 8)。

结果表明, 转化菌在 0.5mM IPTG 诱导 4 小时, 其表达量约占菌体总蛋白量的 25%, 4 小时后表达量增加不再明显; 经镍柱纯化的融合蛋白, 其纯度高达 99%; 酶切纯化后融合肽的纯度 96.1%。

实施例4. 融合肽的活性情况分析

(1) 融合肽对人脐静脉内皮细胞 ECV304 的影响

a. 细胞培养

人脐静脉内皮细胞系(ECV304 细胞)用含 10 %小牛血清(FCS) 、100U/ ml 青霉素及 100 U/ ml 链霉素的 DMEM 培养基, 在 37 $^{\circ}$ C、5 %CO $_2$ 、饱和湿度的 CO $_2$ 培养箱中培养, 2~3 天传代 1 次, 取对数生长期细胞用于实验。

b. MTT 比色法测定融合肽对人脐静脉内皮细胞 ECV304 增殖的影响

取对数生长期细胞, 以每孔 1×10^4 个细胞接种于 96 孔培养板中, 每孔加入细胞悬液 180 μ l, 在细

胞培养箱中培养 4 h, 待细胞贴壁后加入 20 μ l 不同浓度的融合肽,使其终浓度分别为 1, 5, 10, 15, 20 μ M, 阳性对照为 15 μ M 恩度, 负对照组加入相同体积 PBS, 每组设 3 个复孔, 分别处理 48h。培养结束前 4h 于 96 孔培养板中每孔吸出培养基 120 μ l 培养基, 并加入 5 g/L 的 MTT 液 20 μ l, 置培养箱中继续培养 4h 后轻轻吸去培养基, 然后每孔加入 DMSO 150 μ l, 震荡 10 min 使紫蓝色沉淀充分溶解; 用酶标仪 (ELX - 800 型) 570nm 和 630nm 双波长测定吸光度(A 值)。以上实验重复 3 次。

(2) 融合肽对人肺癌细胞 A549 的影响

a. 细胞培养

人肺癌细胞 A549 用含 10 %小牛血清(FCS) 、100U/ml 青霉素及 100 U/ml 链霉素的 1640 培养基, 在 37 $^{\circ}$ C、5 %CO₂ 、饱和湿度的 CO₂ 培养箱中培养, 2~3 天传代 1 次, 取对数生长期细胞用于实验。

b. MTT 比色法测定融合肽对人肺癌细胞 A549 增殖的影响

取对数生长期细胞, 以每孔 1×10^4 个细胞接种于 96 孔培养板中, 每孔加入细胞悬液 180 μ l, 在细胞培养箱中培养 4 h, 待细胞贴壁后加入 20 μ l 不同浓度的融合肽,使其终浓度分别为 1, 5, 10, 15, 20 μ M, 阳性对照药为 5 μ M 顺铂, 负对照组加入相同体积 PBS, 每组设 3 个复孔, 分别处理 48 h。培养结束前 4h 于 96 孔培养板中每孔吸出培养基 120 μ l 培养基, 并加入 5 g/L 的 MTT 液 20 μ l, 置培养箱中继续培养 4h 后轻轻吸去培养基, 然后每孔加入 DMSO 150 μ l, 震荡 10 min 使紫蓝色沉淀充分溶解; 用酶标仪 (ELX - 800 型) 570nm 和 630nm 双波长测定吸光度(A 值)。以上实验重复 3 次。抑制率的计算方法是: 抑制率(%) = [(A 空白对照 - A 实验组) / A 空白对照] \times 100%。

结果表明, 融合肽 NuBCP-9/Tumstatin(74-98)对人脐静脉内皮细胞增殖和人肺癌细胞的抑制都显示出良好的抑制作用, 并呈剂量依赖性(附图 9)。在浓度 20 μ M 时, 抑制率相对空白分别达到 60.8%和 65.2%。

I	E	G	R	F	S	R	S	L	H
att	gag	ggt	egc	ttt	age	egt	age	ctg	cat
S	L	L	G	G	G	G	S	G	G
age	ctg	ctg	ggc	ggt	ggt	ggc	age	ggt	ggc
G	G	S	G	G	G	G	S	T	M
ggt	ggc	tct	ggt	ggc	ggt	ggc	age	acc	atg
P	F	L	F	C	N	V	N	D	V
cag	ttt	ctg	ttt	tgc	aat	gtg	aat	gat	gtg
C	N	F	A	S	R	N	D	Y	S
tgc	aat	ttt	gcg	age	egt	aat	gat	tat	age
Y	W	L	*						
tat	tgg	ctg	taa						

图 1

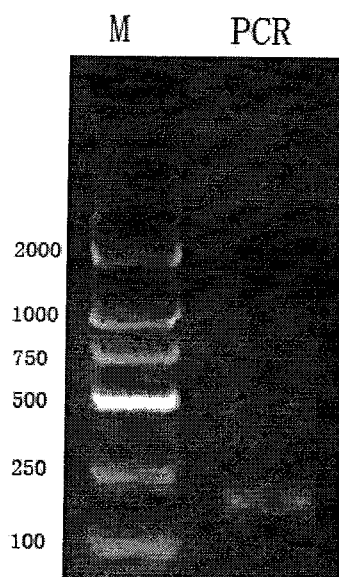


图. 3

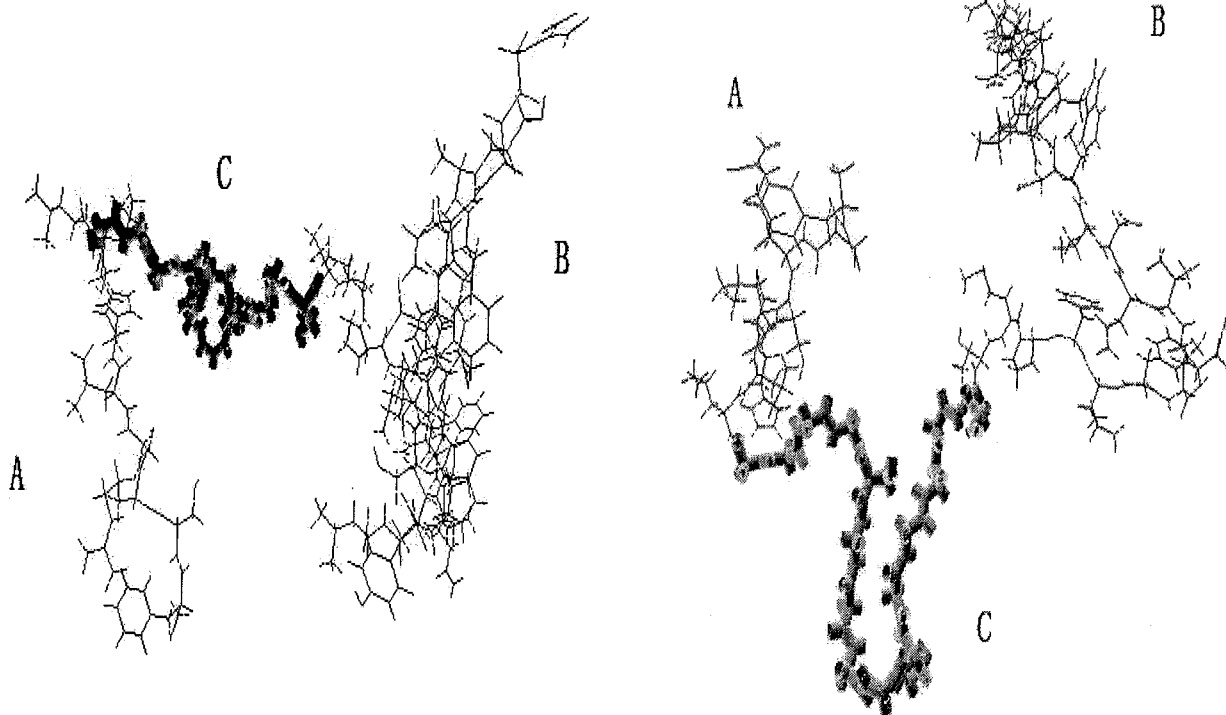


图 2

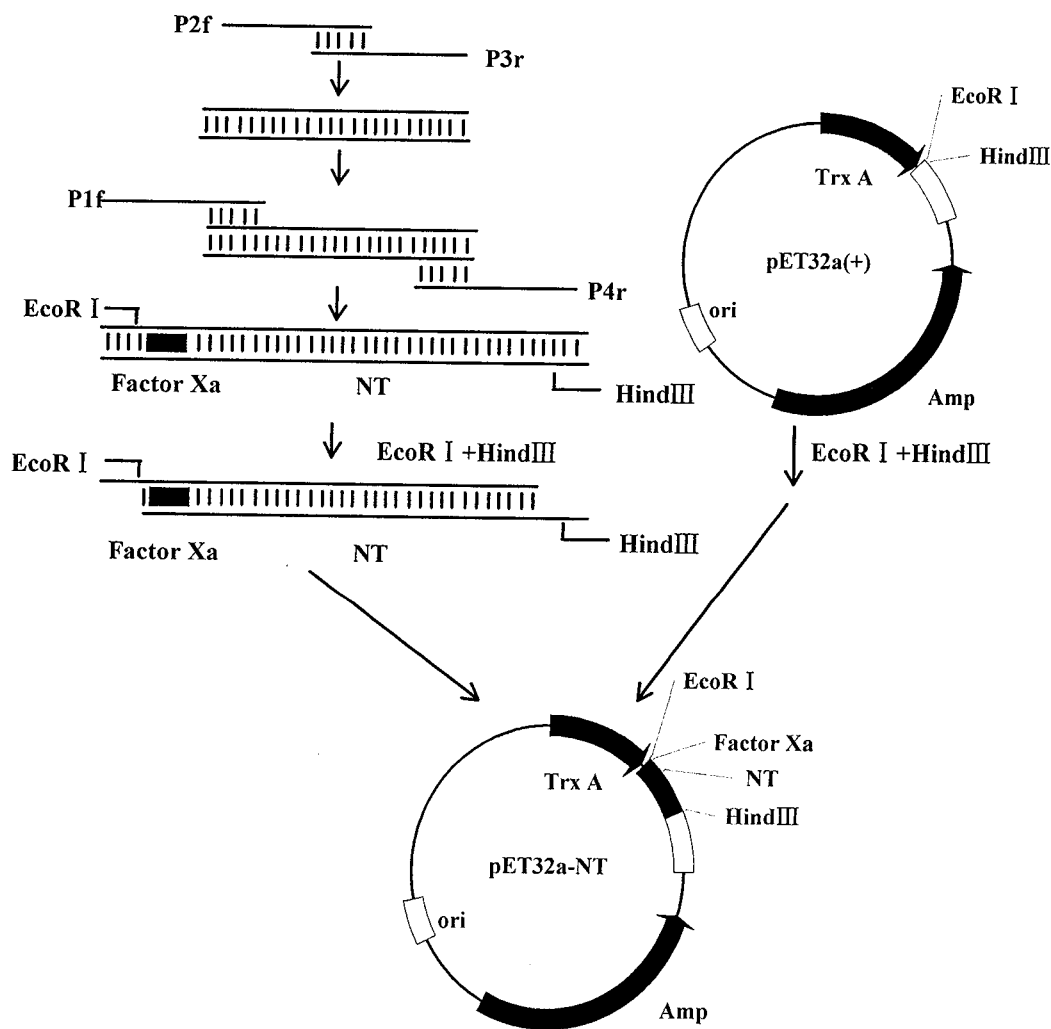


图 4

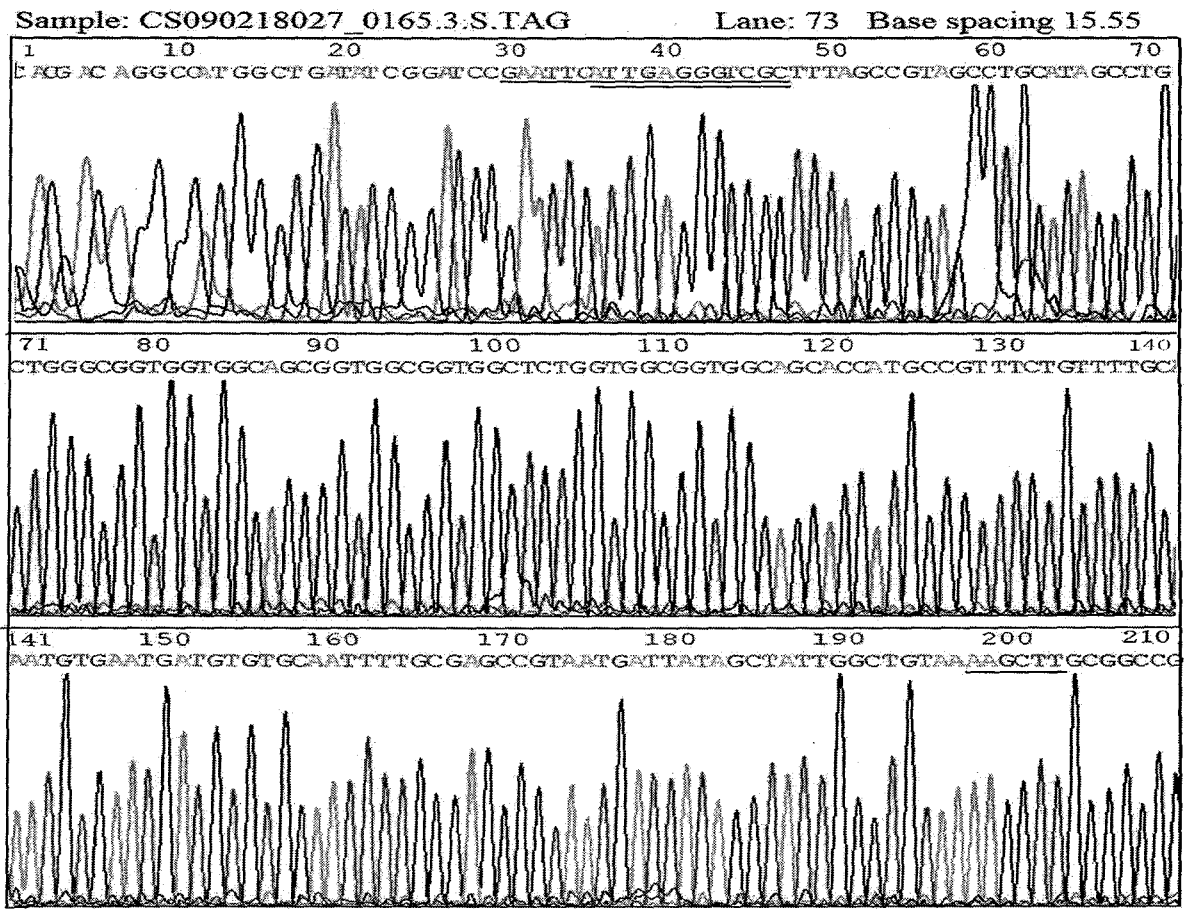


图 5.

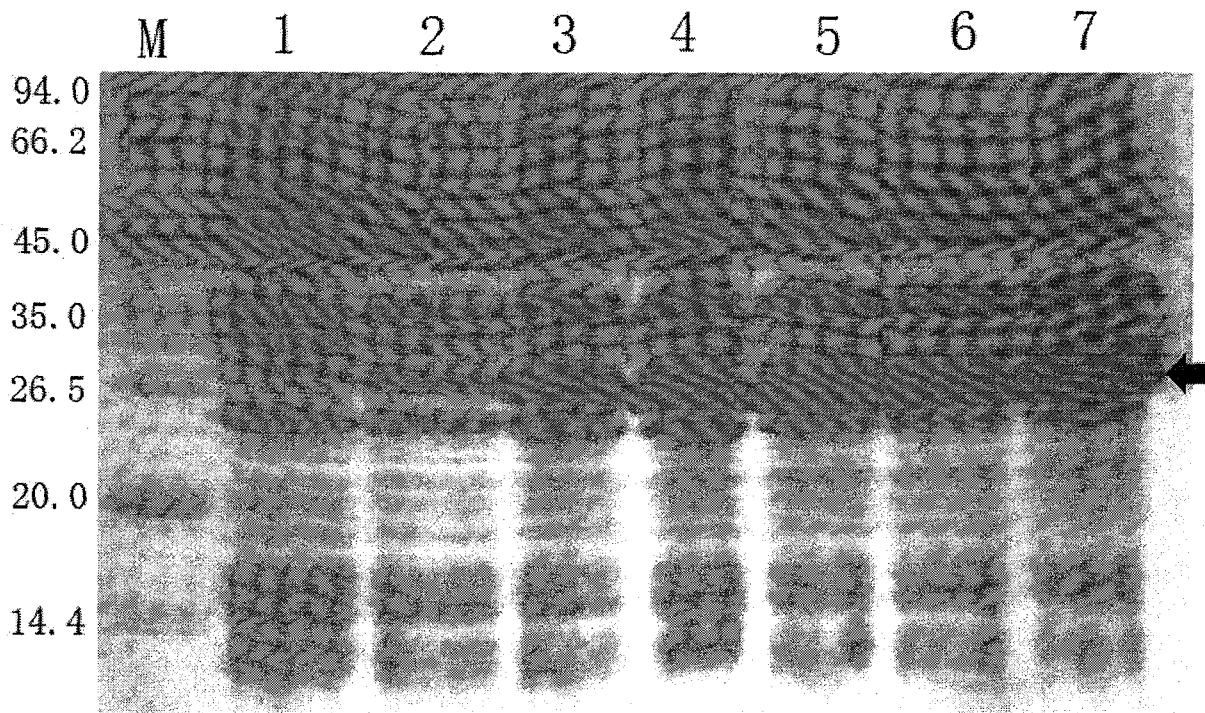


图 6.

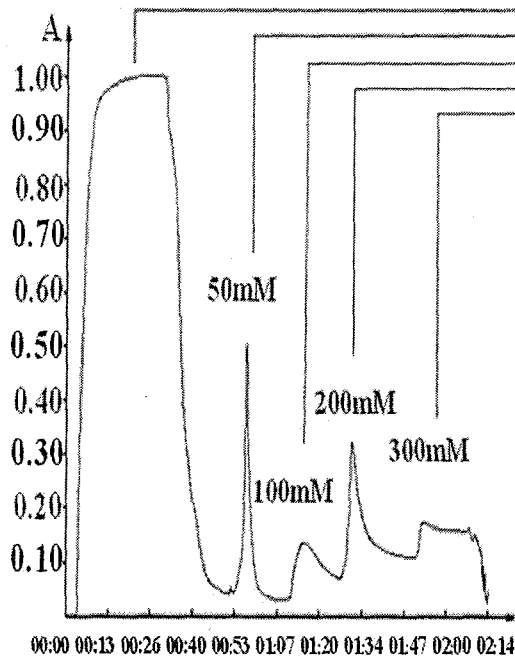


图 7

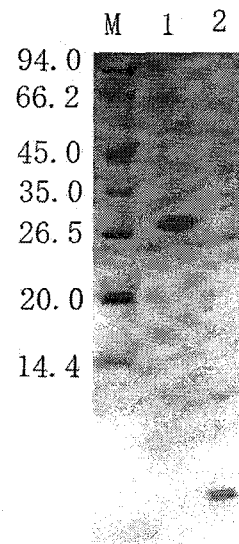
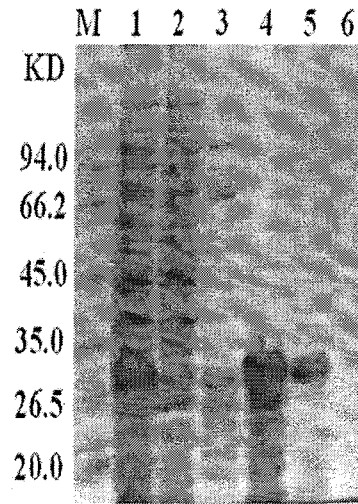


图 8

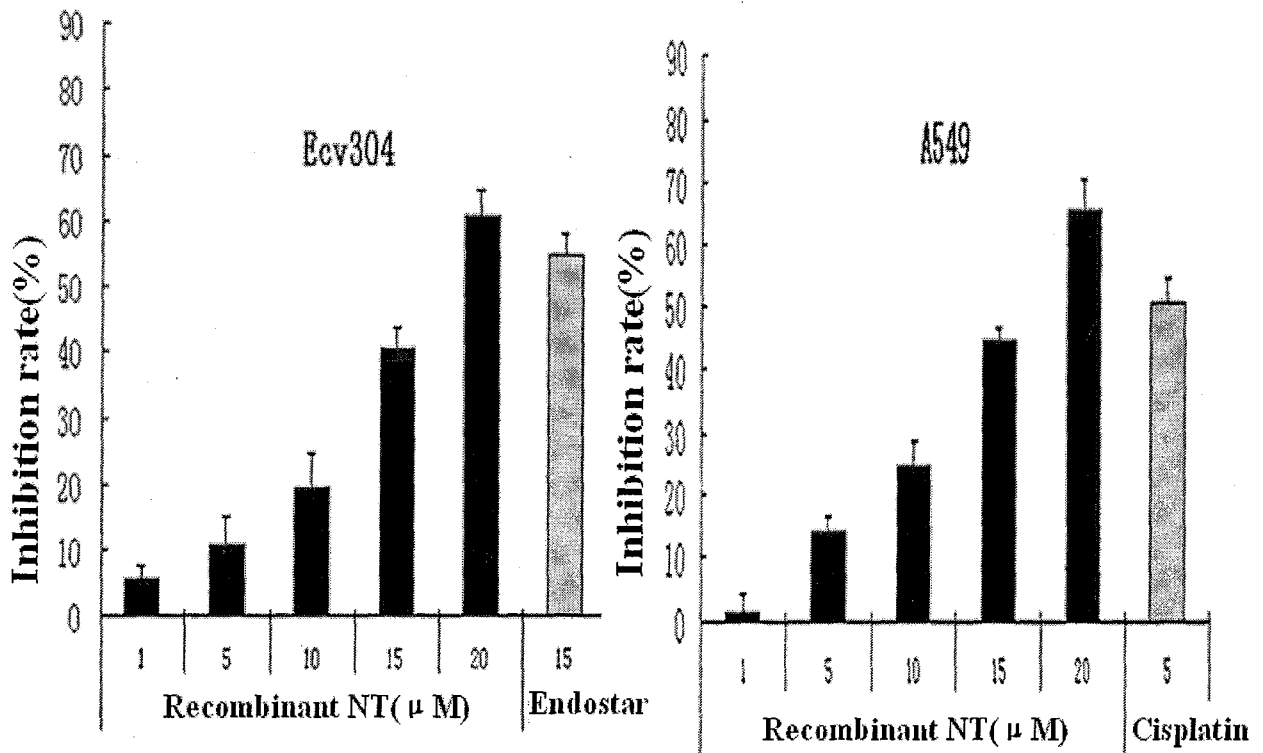


图 9.