



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114605501 A

(43) 申请公布日 2022.06.10

(21) 申请号 202210361663.0

A61P 35/02 (2006.01)

(22) 申请日 2022.04.07

(71) 申请人 华中科技大学同济医学院附属协和医院

地址 430022 湖北省武汉市江汉区解放大道1277号

(72) 发明人 周浩 朱建华 刘伟 陈雪星

(74) 专利代理机构 北京东方盛凡知识产权代理事务所(普通合伙) 11562

专利代理师 营士腾

(51) Int. Cl.

C07K 14/00 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书4页
序列表1页 附图3页

(54) 发明名称

一种可拮抗FUS蛋白RNA结合活性的多肽FIP-21及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种可拮抗FUS蛋白RNA结合活性的多肽FIP-21及其应用,属于分子生物技术领域,该多肽FIP-21肿瘤细胞杀伤结构域和穿膜结构域,其中,肿瘤细胞杀伤结构域的氨基酸序列如SEQ ID No.1所示,穿膜结构域的氨基酸序列如SEQ IDNo.2所示。本发明的抗白血病多肽的穿膜结构域本身没有细胞毒性,但连接白血病细胞杀伤结构域后,有明显的抑制白血病细胞增殖、克隆形成的效应。本发明的抗肿瘤多肽,不仅可以单独作为抗白血病的生物治疗药物,还有望结合其他治疗方式来抑制白血病。



1. 一种可拮抗FUS蛋白RNA结合活性的多肽,其特征在于,所述多肽的氨基酸序列如SEQ ID No.1所示。

2. 一种多肽在拮抗FUS蛋白RNA结合活性中的应用,其特征在于,所述多肽的氨基酸序列如SEQ ID No.1所示。

3. 一种多肽在制备抗肿瘤药物中的应用,其特征在于,所述多肽的氨基酸序列如SEQ ID No.1所示。

4. 一种抗肿瘤多肽,其特征在于,包括肿瘤细胞杀伤结构域和穿膜结构域,其中,所述肿瘤细胞杀伤结构域的氨基酸序列如SEQ ID No.1所示。

5. 根据权利要求4所述的抗肿瘤多肽,其特征在于,所述穿膜结构域的氨基酸序列如SEQ ID No.2所示。

6. 根据权利要求4或5所述的抗肿瘤多肽,其特征在于,所述穿膜结构域连接于所述肿瘤细胞杀伤结构域的N端。

7. 一种权利要求4-6任一项所述的抗肿瘤多肽在制备抗肿瘤药物中的应用。

一种可拮抗FUS蛋白RNA结合活性的多肽FIP-21及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物技术领域,特别是涉及一种可拮抗FUS蛋白RNA结合活性的多肽FIP-21及其应用。

背景技术

[0002] 白血病是一类造血干细胞恶性克隆性疾病。克隆性白血病细胞因为增殖失控、分化障碍、凋亡受阻等机制在骨髓和其他造血组织中大量增殖累积,并浸润其他非造血组织和器官,同时抑制正常造血功能。白血病严重影响着人类的健康,目前已有的抗白血病方法虽有一定疗效,但仍存在疗效低、选择性差、毒副反应大、易产生耐药等问题。因此,寻找新型高效低毒的抗白血病药物一直是国内外医药研发的热点。

[0003] 白血病靶向治疗是指在分子水平上,通过药物靶向作用于白血病细胞,使其特异性死亡,而不影响正常组织细胞。与传统细胞毒化疗不一样,白血病分子靶向治疗具有特异性抗肿瘤作用,且毒性明显减少。靶向治疗的发展使得人类对癌症的治疗更加精准。近十年来,抗肿瘤靶向药物的研发已经占到肿瘤药物研发中的80%,包括小分子抑制剂、单克隆抗体等。

[0004] 靶向多肽由于易于合成、免疫原性低、活性高、不良反应轻和来源广泛等优点,已应用于抗肿瘤药物研究。抗癌性多肽通过与特定位点的结合,发挥抑制肿瘤发生、发展的作用。因此,越来越多的多肽药物被开发并应用于临床。迄今在生物体内发现的多肽已达数万种,广泛参与调节机体内各系统、器官、组织和细胞的功能活动,在生命活动中发挥重要作用。近年来,利用现代生物技术合成的多肽药物已成为药物研发的热点之一。

[0005] 但是针对白血病的靶向多肽面临靶点寻找困难等问题,所以有必要积极研究针对白血病的靶向多肽的靶点,并给予相应的靶向多肽干预。

[0006] FUS(全称为fused in sarcoma/translocated in liposarcoma,FUS/TLS)是一个多功能的DNA/RNA结合蛋白,主要定位于细胞核,且可以在细胞核与细胞质间穿梭。FUS蛋白在RNA的转录、RNA的剪接和microRNA的加工等过程中发挥重要作用。FUS蛋白包括N-端转录激活结构域、C-端RNA结合结构域,研究发现其在白血病中高表达,促进白血病发展。已知FUS与多种肿瘤之间有着密切的联系,比如前列腺癌、急性白血病、肺癌等,FUS在这些肿瘤的发生、发展中均起到促进作用。目前,FUS特异性抑制剂尚未见报道。

发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一种可拮抗FUS蛋白RNA结合活性的多肽FIP-21及其应用,以解决上述现有技术存在的问题,本发明通过设计靶向多肽,针对FUS的作用位点,从而阻断FUS的促癌效应,最终抑制肿瘤的发生发展;并且将该多肽与细胞穿膜肽通过共价键连接起来,达到既有靶向包括白血病在内的多种肿瘤细胞,又具有高效入胞的效果。

[0008] 为实现上述目的,本发明提供了如下方案:

[0009] 本发明提供一种可拮抗FUS蛋白RNA结合活性的多肽,所述多肽的氨基酸序列如

SEQ ID No.1所示。实验证明,该多肽可竞争性拮抗促癌基因FUS与RNA的结合,并在细胞水平表现出明显的肿瘤抑制作用。

[0010] 本发明还提供一种多肽在拮抗FUS蛋白RNA结合活性中的应用,所述多肽的氨基酸序列如SEQ ID No.1所示。

[0011] 本发明还提供一种多肽在制备抗肿瘤药物中的应用,所述多肽的氨基酸序列如SEQ ID No.1所示。

[0012] 本发明还提供一种抗肿瘤多肽,包括肿瘤细胞杀伤结构域和穿膜结构域,其中,所述肿瘤细胞杀伤结构域的氨基酸序列如SEQ ID No.1所示。

[0013] 进一步地,所述穿膜结构域的氨基酸序列如SEQ ID No.2所示。

[0014] 进一步地,所述穿膜结构域连接于所述肿瘤细胞杀伤结构域的N端。

[0015] 本发明还提供一种如上所述的抗肿瘤多肽在制备抗肿瘤药物中的应用。

[0016] 本发明公开了以下技术效果:

[0017] 本发明设计的多肽,通过特异性、竞争性抑制FUS和RNA的结合,从而阻遏两者相互作用带来的生物学效应,发挥抑制肿瘤的作用。此外,可在该多肽N端添加了穿膜肽以提高其进入细胞的效率。加入生物素标记,使得其更方便的在细胞水平中进行应用,实验通过生物素富集相关的分子,从而进行下一步的机制研究。加入异硫氰酸荧光素(FITC)标记使其可通过荧光共聚焦显微镜观察该多肽分子在细胞中的定位,明确其发挥作用的区域。

[0018] 本发明的抗白血病多肽的穿膜结构域本身没有细胞毒性,但连接白血病细胞杀伤结构域后,有明显的抑制白血病细胞增殖、克隆形成的效应。本发明的抗肿瘤多肽,不仅可以单独作为抗白血病的生物治疗药物,还有望结合其他治疗方式来抑制白血病。

附图说明

[0019] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0020] 图1为FUS蛋白的结构域示意图;

[0021] 图2为FIP-21竞争性拮抗FUS蛋白与RNA相互作用的原理示意图;

[0022] 图3为FIP-21多肽被细胞摄取效率图;

[0023] 图4为不同浓度FIP-21多肽对肿瘤细胞的增殖能力的影响;

[0024] 图5为不同时间FIP-21多肽对肿瘤细胞的增殖能力的影响;

[0025] 图6为FIP-21克隆形成实验的染色图;

[0026] 图7为FIP-21克隆形成实验的结果图。

具体实施方式

[0027] 现详细说明本发明的多种示例性实施方式,该详细说明不应认为是对本发明的限制,而应理解为是对本发明的某些方面、特性和实施方案的更详细的描述。

[0028] 应理解本发明中所述的术语仅仅是为描述特别的实施方式,并非用于限制本发明。另外,对于本发明中的数值范围,应理解为还具体公开了该范围的上限和下限之间的每

个中间值。在任何陈述值或陈述范围内的中间值以及任何其他陈述值或在所述范围内的中间值之间的每个较小的范围也包括在本发明内。这些较小范围的上限和下限可独立地包括或排除在范围内。

[0029] 除非另有说明,否则本文使用的所有技术和科学术语具有本发明所述领域的常规技术人员通常理解的含义。虽然本发明仅描述了优选的方法和材料,但是在本发明的实施或测试中也可以使用与本文所述相似或等同的任何方法和材料。本说明书中提到的所有文献通过引用并入,用以公开和描述与本发明所述文献相关的方法和/或材料。在与任何并入的文献冲突时,以本说明书的内容为准。

[0030] 在不背离本发明的范围或精神的情况下,可对本发明说明书的具体实施方式做多种改进和变化,这对本领域技术人员而言是显而易见的。由本发明的说明书得到的其他实施方式对技术人员而言是显而易见的。本发明说明书和实施例仅是示例性的。

[0031] 关于本文中所使用的“包含”、“包括”、“具有”、“含有”等等,均为开放性的用语,即意指包含但不限于。

[0032] 实施例1抗肿瘤多肽的合成

[0033] 通过固相合成法合成一种抗肿瘤多肽,其包括一个肿瘤细胞杀伤结构域和一个穿膜结构域,其中肿瘤细胞杀伤结构域序列为EATVSFDDPPSAKAAIDWFDG (SEQ ID No.1),穿膜结构域序列为YGRKKRRQRRR (SEQ ID No.2),穿膜结构域连接于肿瘤细胞杀伤结构域的N端,所得到的序列为:氨基酸序列为YGRKKRRQRRR-EATVSFDDPPSAKAAIDWFDG (SEQ ID No.3),命名为FIP-21。为了研究方便,我们在抗肿瘤多肽的C端连接异硫氰酸荧光素标记FITC,N端连接生物素标记Biotin。

[0034] 生物公司合成的抑癌多肽FIP-21经过高效液相色谱法(High Performance Liquid Chromatography-HPLC)检测证实纯度达到97%。将多肽溶于无菌PBS缓冲液,储存浓度为1mmol/L,分装于1.5ml的避光EP管中,终浓度为200 μ mol/L,均存避光冻存于-80 $^{\circ}$ C备用。

[0035] FUS蛋白的结构域示意图如图1所示。

[0036] FIP-21竞争性拮抗FUS蛋白与RNA相互作用的原理如图2所示。

[0037] 实施例2FIP-21的细胞定位检测

[0038] 取对数生长期的白血病U937细胞,用含有FIP-21的培养基孵育培养。利用激光共聚焦显微镜动态观察该多肽被细胞摄取的情况,结果如图3所示:由于多肽3'-端带有FITC基团,可以此观察多肽进入细胞的情况,发现在加入多肽48小时后,该多肽被细胞摄取率达90%,此外我们利用DAPI染色观察细胞核,从而客观简明区分细胞核与细胞浆,更清晰的观察多肽进入细胞的情况,发现该多肽FIP-21定位于细胞核内,与FUS分子的定位相同。可见,该多肽能高效进入细胞,并定位于FUS相同的细胞核内。

[0039] 实施例3MTT比色法分析检测FIP-21对白血病细胞生长的抑制作用

[0040] 取对数生长期的U937细胞,用含有FIP-21的培养基孵育培养。进行MTT实验, $lgIC_{50} = X_m - I(P - (3 - P_m - P_n) / 4)$,其中, $X_m = lg$ 最大剂量, $I = lg$ (最大剂量/相临剂量), $P =$ 阳性反应率之和, $P_m =$ 最大阳性反应率, $P_n =$ 最小阳性反应率。由此计算得到该多肽FIP-21的 IC_{50} 为25 μ mol/L。

[0041] 以上述实验得到的 IC_{50} 为基础,进一步进行MTT实验,在不同时间、多肽浓度的情

况下检测该多肽对肿瘤细胞(本实验中利用的U937细胞)的增殖能力的影响。

[0042] 结果如图4和5所示,与对照组多肽相比,FIP-21多肽处理的肿瘤细胞的活力显著降低,且该作用呈时间和剂量依赖性,说明该新型多肽可有效降低肿瘤细胞的细胞活力;当处理细胞时间相同时,多肽浓度为20-30 $\mu\text{mol/L}$ 的细胞活力抑制率较高;当处理细胞浓度相同时,多肽处理时间为48-72小时的细胞活力抑制率较高。

[0043] 实施例4克隆形成实验检测FIP-21对肿瘤细胞增殖活性的抑制作用

[0044] 取对数生长期的细胞接种于6孔板中,细胞密度约1000个/孔,第二天根据前期得到的IC₅₀,在细胞中加入适当的FIP-21和对照肽,继续培养细胞,不断观察细胞的生长情况,当培养皿中出现肉眼可见的克隆时,终止培养,考马斯兰染色并在光镜下拍照。

[0045] 实验结果如图6和7所示,与对照组多肽相比,FIP-21多肽处理的肿瘤细胞的克隆集落形成显著降低,并且该作用呈剂量依赖性,说明该新型多肽可有效抑制白血病细胞的增殖能力。

[0046] 以上所述的实施例仅是对本发明的优选方式进行描述,并非对本发明的范围进行限定,在不脱离本发明设计精神的前提下,本领域普通技术人员对本发明的技术方案做出的各种变形和改进,均应落入本发明权利要求书确定的保护范围内。

序列表

<110> 华中科技大学同济医学院附属协和医院

<120> 一种可拮抗FUS蛋白RNA结合活性的多肽FIP-21及其应用

<160> 3

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

Glu Ala Thr Val Ser Phe Asp Asp Pro Pro Ser Ala Lys Ala Ala Ile

1 5 10 15

Asp Trp Phe Asp Gly

20

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 3

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Glu Ala Thr Val Ser

1 5 10 15

Phe Asp Asp Pro Pro Ser Ala Lys Ala Ala Ile Asp Trp Phe Asp Gly

20

25

30

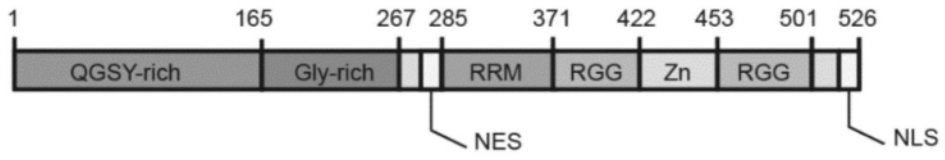


图1



图2

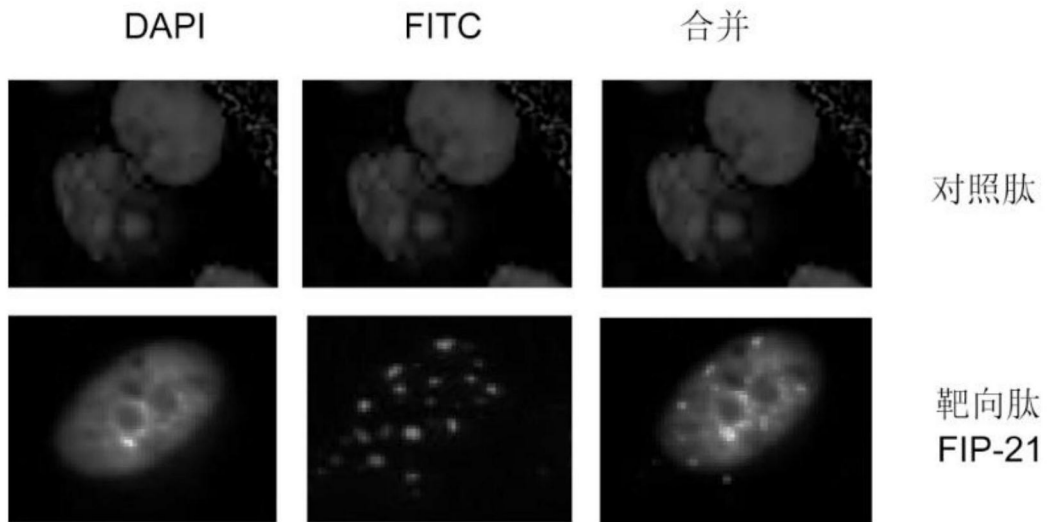


图3

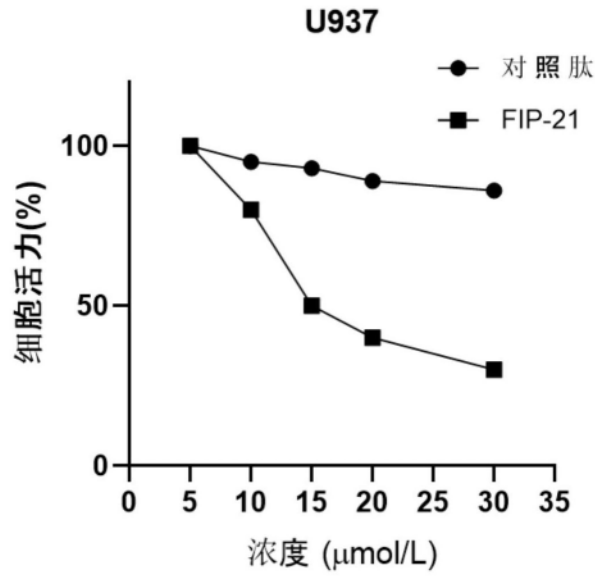


图4

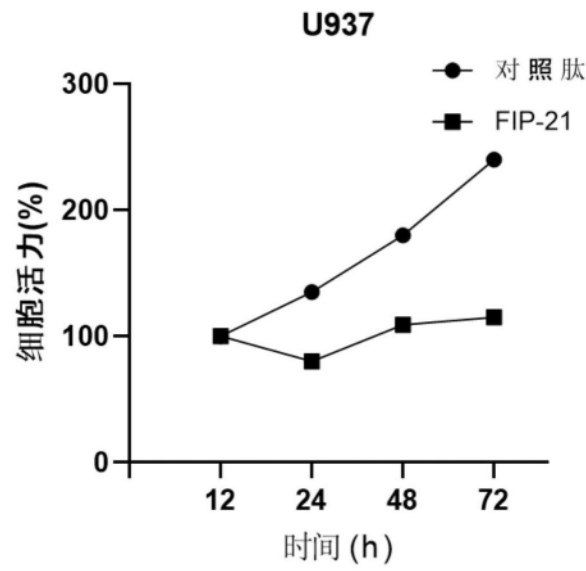


图5

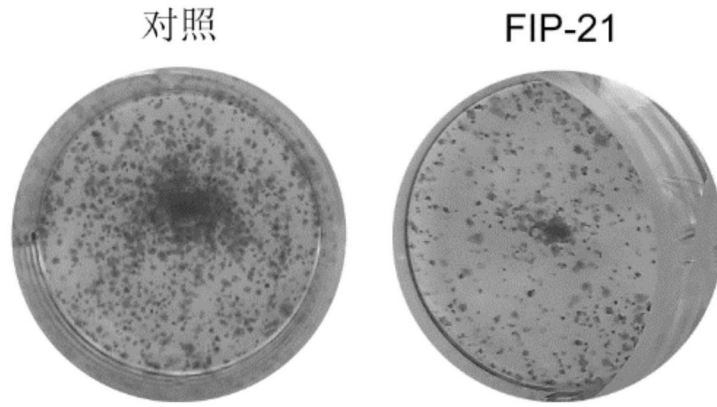


图6

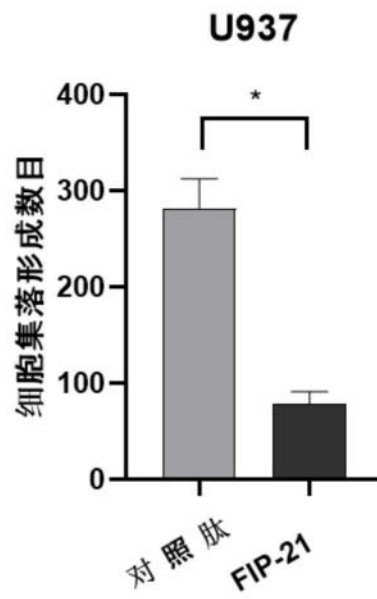


图7