



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101117635 B

(45) 授权公告日 2013.07.31

(21) 申请号 200610110123.6

CN 1919873, 2007.02.28, 全文.

(22) 申请日 2006.07.31

Hiroshi Harada ET AL. Antitumor

(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

effect of TAT-oxygen-dependent
degradation-caspase-3 fusion protein
specifically stabilized and activated
in hypoxic tumor cells. 《cancer
research》. 2002, 2013-2018.

地址 100850 北京市海淀区太平路 27 号

(72) 发明人 王玉霞 吴少平 武军华 贾培媛
孙曼霁

审查员 滕文静

(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 程泳

(51) Int. Cl.

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1380392, 2002.11.20, 全文.

CN 1679641, 2005.10.12, 全文.

权利要求书1页 说明书9页 附图1页

(54) 发明名称

PTD、HIF 的 ODD 与肿瘤抑制基因的融合表达
及其应用

(57) 摘要

本发明提供蛋白转导域 (PTD)、缺氧诱导因子 (HIF) 的氧依赖性蛋白降解结构域 (ODD) 和人肿瘤抑制基因的融合体, 其表达产物为一个重组融合蛋白。该重组融合蛋白可以抑制肿瘤细胞的生长, 在正常细胞中快速代谢, 在肿瘤细胞中代谢缓慢, 发挥抗肿瘤作用。本发明还提供所述重组融合蛋白的生产方法。

1. 一种基因融合体,其由蛋白转导域、缺氧诱导因子 HIF-1 的氧依赖性蛋白降解结构域、人肿瘤抑制基因组成,其如 SEQ ID NO :1 的序列所示。
2. 由权利要求 1 的基因融合体编码的融合蛋白。
3. 权利要求 2 的融合蛋白,其如 SEQ ID NO :2 的序列所示。
4. 一种基因构建体,其含有权利要求 1 的基因融合体,以及表达载体。
5. 权利要求 4 的基因构建体,其中所述表达载体为原核表达载体。
6. 权利要求 4 的基因构建体,其中所述表达载体为 pET28a。
7. 权利要求 4、5 或 6 的基因构建体,其中基因融合体的上游为真核细胞启动子、原核细胞启动子或病毒启动子。
8. 一种药物组合物,含有权利要求 2 或 3 的融合蛋白。

PTD、HIF 的 ODD 与肿瘤抑制基因的融合表达及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及基因工程和药学领域,具体涉及利用基因工程技术表达人类肿瘤抑制基因 p53 与转导肽和氧依赖性蛋白降解结构域的融合蛋白。

背景技术

[0002] 作为肿瘤抑制基因, p53 参与负调节细胞生长,诱导细胞凋亡。p53 以四聚体的形式参与凋亡、细胞周期抑制、DNA 损伤与修复及衰老等过程。P53 蛋白通过诱导编码三个跨膜蛋白 Fas、DR5 和 PERP,形成死亡诱导信号复合物激活 caspases,导致凋亡发生,形成外部凋亡信号途径。内部凋亡信号途径与线粒体去极化和释放细胞色素 c 有关,主要由 Bcl-2 家族蛋白完成。Bcl-2 家族包括 Bcl-2、Bax、Noxa、PUMA、Bid 等,它控制着线粒体细胞色素 C 的释放。

[0003] 由于 p53 在机体的生长、发育、分化中的重要作用, p53 失活将严重影响细胞基因组的稳定,而基因突变是 p53 失活的最重要机制,人类恶性肿瘤中至少 50% 发生了 p53 基因改变,如:肺癌,食管癌,胃癌,肝癌,结直肠癌,乳腺癌,卵巢癌等,据统计约 80% 为错义突变,6% 为无义突变,10% 为缺失和插入,细胞不能合成正确的 p53 蛋白,丧失原有的生物学功能。绝大多数的 p53 误义突变位于其 DNA 结合域,可导致 p53 丧失与 DNA 结合的能力,并且对常规治疗产生抵抗作用。此外,突变的 p53 蛋白 (mutant type p53, mt p53) 还可能获得新的功能,如能与 Daxx 结合抑制 Fas 诱导的凋亡途径;与醌氧化还原酶 1 牢固结合,从而抑制泛素化非依赖的降解作用。

[0004] p53 基因突变的研究为 p53 基因治疗提供了基础,以 p53 功能为基础的肿瘤药物研究成为多年来的研究热点。例如:应用腺病毒载体进行 p53 基因治疗,在动物实验和临床研究中都取得了肯定性的抗肿瘤药效。但是使用载体的安全性、基因表达水平的调控及其对病人毒性作用等问题还没有完全解决。导入 wt p53 蛋白是在肿瘤细胞中重建 p53 功能最直接的手段。

[0005] p53 蛋白均可进行原核表达制备,外源性补充野生型 p53 蛋白或其活性调节分子,可直接发挥它们的肿瘤抑制作用。此方法避免了基因治疗的载体安全性问题,剂量可调,也同样能达到体内表达 p53 基因的抗肿瘤,增加放、化疗效果的目的。然而, p53 发挥作用的部位在细胞内,如何将 p53 转导进入肿瘤细胞,以及如何避免其对正常细胞的毒性,相对延长它们在肿瘤细胞内的半衰期成为 p53 靶向性发挥其抗肿瘤作用的关键。

[0006] 蛋白转导域 (protein transduction domain, PTD) 是近年来发现的一种能高效穿过生物膜的结构域,称为转导肽。1988 年 Green 和 Franke1 首次报道了 HIV-1 的反式激活蛋白 TAT 能够跨膜导入细胞内部,进一步发现其 aa47-57 作为 PTD 在蛋白转导过程中发挥主要作用。已经发现的 PTD 主要来源于病毒蛋白,如 VP22 和 TAT 等,被广泛地应用于多种生物分子的转运,如抗原肽,肽核酸,反义寡核苷酸,全长蛋白,甚至纳米粒和脂质体。

[0007] 转导肽可以有效地将多种生物分子转导进入靶细胞却是不容争议的事实。原核表达的蛋白质多为变性蛋白,可以大量制备、易于纯化和储存,而且变性的蛋白分子所具有的

松散、不固定空间结构反而有利于蛋白转导肽将其转导进入细胞。已有结果显示转导肽 TAT 转导变性蛋白的效率要明显高于活性蛋白,且非活性蛋白进入细胞以后可以通过细胞内的纠错机制而复性。

[0008] 利用 PTD 的跨膜转导特点,将原核表达 PTD-P53 融合蛋白转导进入肿瘤细胞,增强或重建的 P53 功能即可发挥调节细胞周期、诱导肿瘤细胞凋亡的作用。我们在细胞实验中也证实了 PTD 与 P53 融合蛋白可诱发肿瘤细胞凋亡。然而,PTD 转运蛋白高效进入细胞的同时,缺乏进入细胞的选择性,P53 在杀伤肿瘤细胞的同时,也可能对正常细胞造成伤害。

[0009] 实体瘤细胞恶性增殖与血液供应失衡的一个重要病理特征是缺氧,临床上已有许多证据表明,在缺氧环境下肿瘤细胞发生一系列适应性变化,同时使放射线的间接杀伤作用减弱,使之对放疗、化疗耐受,而且使肿瘤更具有侵袭性,容易发生远处转移。缺氧诱导因子 1(hypoxia inducible factor 1, HIF-1) 是细胞适应缺氧的重要转录因子,参与缺氧时相应靶基因的调控。可被 HIF-1 转录激活的靶基因均含有一个低氧反应元件(hypoxia reactive element, HRE) 及 Cis 作用调节序列,在人类肿瘤中可以发现这些基因产物大大增加。HIF-1 在其中的功能可分为以下几种:①促进糖酵解;②促进血管生成;③与瘤细胞增殖有关。

[0010] HIF-1 属于 bHLH PAS 蛋白族,由 HIF-1 α 和 HIF-1 β 各两个亚单位组成的杂四聚体蛋白,两个亚单位的分子量分别为 120ku 和 91-94ku。HIF-1 α 对氧的依赖性较强,当周围环境的氧浓度下降时,HIF-1 α 表达增加。不缺氧时 HIF-1 α 蛋白容易降解,其半衰期小于 5 分钟,而缺氧可以增加 HIF-1 α 蛋白的稳定性,HIF-1 α 蛋白的降解阻止。亚单位 HIF-1 β 对氧的依赖性较弱,在 HIF-1 中也必不可少,因为只有两个亚单位聚合并且发生适应性变化后,与其要调节的下游因子或酶(如 VEGF、P53 和 EPO) 的 HRE 结合,才能发挥调节作用。

[0011] 在研究 HIF-1 的降解调控时发现,HIF-1 α 的氧依赖性蛋白降解结构域(oxygen-dependent degradation domain, ODD) 是 HIF-1 α 稳定的重要元件,非缺氧状态时,HIF-1 多聚羟化酶(HIF-1prolyhydroxylase, HIF PH) 羟化 ODD 核心脯氨酸(Pro 564),使得 pVHL(von Hippel-Lindau tumor suppressor gene product) 与 HIF-1 α 亚基结合,进而多聚遍在蛋白化 HIF-1 α ,最终使其被蛋白酶降解,而在缺氧条件下,由于缺少氧原子(必需来自氧分子)使 HIF PH 失活,以上的反应过程被阻断。

[0012] HIF-1 α 的 ODD 含有 203 个氨基酸残基,Harada 等发现 ODD 的 aa548-603 可以发挥对其融合蛋白的降解调控作用,其中 aa557-574 含调节融合蛋白降解所必需的最小核心成分,可使 TAT-ODD-Gal 在移植了人胰癌 CF/PAC-1 的裸鼠瘤体内的 Gal 活性明显增高,而正常组织内几乎检测不到 Gal 的活性,说明 ODD 发挥了氧诱导作用,加速了外来蛋白在正常组织内的降解,其融合蛋白在发挥抗肿瘤作用的同时,可最大限度地减少对正常组织的伤害。

[0013] 肿瘤靶向治疗是抗癌药物研究中的重要内容,本发明从肿瘤细胞的特点入手,在 TAT 和 p53 融合蛋白中引入 ODD,加速融合蛋白在正常细胞内的降解,相对延长其在肿瘤细胞内的半衰期达到 P53 蛋白靶向抗肿瘤的目的。

发明内容

[0014] 本发明旨在将具有潜在治疗作用的基因与可以转导蛋白进入细胞的蛋白转导域、

加速融合蛋白在正常组织中代谢的氧依赖性蛋白降解结构域进行有机的融合,通过原核表达载体表达融合蛋白,经过蛋白的纯化和复性,提供一种可以进入肿瘤细胞,在正常组织中快速代谢,而在缺氧的实体瘤组织中诱导细胞凋亡的融合蛋白,达到预防或 / 和治疗肿瘤的目的。

[0015] 为实现上述目的,本发明提供一种蛋白转导域、氧依赖性蛋白降解结构域和人肿瘤抑制基因的融合体。所述人肿瘤抑制基因可以是具有对肿瘤抑制作用的基因中的任一种,其最优选基因为 p53 基因。在优选的实施方案中,该融合体定义为 PTD-ODD-p53,其序列为:

[0016] ATGTACGGCCGTAAAAAGAGACGCCAACGTAGACGTATGAACCCATTTTCTACTCAGGACACAGATTTAGACTTGAGATGTTAGCTCCCTATATCCCAATGGATGATGACTTCCAGTTACGTTCCCTTCGATCAGTTGTCACCA TTAGAAAGCAGTTCCGCAAGCCCTGAAAGCGCAAGTCCTCAAAGCACAGTTACAGTATTCCAGATGGAGGAGCCG CAGTCAGATCCTAGCGTCGAGCCCCCTCTGAGTCAGGAAACATTTTCAGACCTATGGAACTACTTCCCTGAAAAC AACGTTCTGTCCCCCTTGCCGTCCCAAGCAATGGATGATTTGATGCTGTCCCCGGACGATATTGAACAATGGTTC ACTGAAGACCCAGGTCCAGATGAAGCTCCCAGAAATGCCAGAGGCTGCTCCCCGCGTGGCCCCCTGCACCAGCAGCT CCTACACCGGCGGCCCTGCACCA GCCCCTCTGGCCCCTGTCATCTTCTGTCCCTTCCCAGAAAACCTACCAG GGCAGCTACGGTTTCCGTCTGGGCTTCTTGCACTCTGGGACAGCCAAGTCTGTGACTTGCACGTACTCCCCTGCCC TCAACAAGATGTTTTGCCAACTGGCCAAGACCTGCCCTGTGCAGCTGTGGGTTGATTCACACCCCCCGCCGGCAC CCGCGTCCGCGCCATGGCCATCTACAAGCAGTCACAGCACATGACGGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCACCATGAG CGCTGCTCAGATAGCGATGGTCTGGCCCCCTCAGCATCTTATCCGAGTGAAGGAAATTTGCGTGTGGAGTATTT GGATGACAGAAACACTTTTCGACATAGTGTGGTGGTGCCTATGAGCCGCCTGAGGTTGGCTCTGACTGTACCACCA TCCACTACAACACTACATGTGTAACAGTTCCTGCATGGGCGGCATGAACCGGAGGCCATCCTCACCATCATCACACTG GAAGACTCCAGTGGTAATCTACTGGGACGGAACAGCTTTGAGGTGCGTGTGTTGTGCCTGTCTGGGAGAGACCGGCG CACAGAGGAAGAGAATCTCCGCAAGAAAAGGGAGCCTCACCACGAGCTGCCCCAGGGAGCACTAAGCGAGCACTGC CCAACAACACCAGCTCCTCTCCCCAGCCAAAAGAAAACCACTGGATGGAGAATATTTACCCTTCAGATCCGTGGG CGTGAGCGCTTCGAGATGTTCCGAGAGCTGAATGAGGCCCTTGGAACTCAAGGATGCCAGGCTGGGAAGGAGCCAGG GGGGAGCAGGGCTCACTCCAGCCACCTGAAGTCCAAAAGGGTCACTCTACCTCCCGCCATAAAAACTCATGTTC AAGACAGAAGGGCCTGACTCAGACTAA (SEQ ID NO :1), 其中:残基 1-36 为 HIV-1 的反式激活蛋白的 47-57 位肽 (TAT); 残基 37-207 为缺氧诱导因子序列; 残基 208-1386 为 p53 基因序列; 残基 1387-1389 为终止密码子序列。

[0017] 上述融合体编码的融合蛋白为:

[0018] MYGRKKRRQRRRMNPFSQDQDLDLEMLAPYIPMDDDFQLRSFDQLSPLESSSASPESASPSTVTVF QMEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLLPENNVLSPLPSQAMDDLMLSPDDIEQWFTEDEPGPDEAPRMPEAAPRVAP APAAPTPAAPAPAPSWPLSSSVPSQKTYQGSYGFRLGFLHSGTAKSVTCTYSPALNKMFCQLAKTQPVQLWVDST PPPGTRVRAMAIYKQSQHMTEVVRRCPPHHERCSDSDGLAPPQHLIRVEGNLRVEYLDDRNTFRHSVVVPYEPPEV GSDCTTIHNYMNCSSCMGMNRRPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPRDRRTEENLRKKGEPHHELP PGSTKRALPNNTSSSPQPKKPLDGEYFTLQIRGRERFEMFRELNEALELKDAQAGKEPGGSAHSSHLKSKKGQ STSRHKKLMFKTEGPDS (SEQ IDNO :2), 其中:残基 1-12 为 HIV-1 的反式激活蛋白的 47-57 位肽 (TAT); 残基 13-69 为缺氧诱导因子依赖性蛋白降解结构域序列; 残基 70-462 为 p53 蛋白序列。

[0019] 本发明还将所述融合体插入表达载体中。该表达载体是将由 DNA 克隆技术构建的原核表达载体与上述融合蛋白基因表达盒相结合,构建成一个能在原核细胞中扩增、繁殖,表达的肿瘤抑制蛋白的融合序列。

[0020] 该表达载体可以是原核表达载体的任一种,其优选载体为 pET28a。在一个优选实施方案中,本发明的融合体插入载体后得到 pET-PTD-ODD-P53。

[0021] 本发明还涉及所述融合蛋白的表达、纯化及复性方法,包括:将编码所述融合蛋白和 His 标签的质粒,如 pET 质粒,转化宿主菌 BL21 (DE3),培养在 25℃~42℃,取出活化菌液,以 5%~20%的比例在新鲜培养基中培养至 OD600 值为 0.5~2.0,加入浓度为 0.4~1mM 的诱导剂 IPTG,诱导时间为 3~24h,收集诱导表达的菌体,PBS 洗净,用 pH8.5~11.5 的 10mmol/L Tris 缓冲液重悬菌体,振荡混匀,置冰上超声 10~15min 破菌,然后回收包涵体。用 6-10M 尿素溶解,用镍柱或层析柱纯化包涵体。采用连续梯度法复性目的蛋白。

[0022] 还在另一方面,本发明提供了所述融合蛋白用于制备治疗实体瘤的药物中的用途。本发明特别涉及含有所述融合蛋白的药物组合物,为选自适于静脉注射、动脉注射、瘤内注射、肌肉注射、皮下注射、器官注射和胸腔、腹腔内注射的剂型。

附图说明

[0023] 图 1 :pET-PTD-ODD-P53 构建示意图 ;

[0024] 图 2 :pET-PTD-ODD-P53 经 EcoR I 和 SaI I 双酶切鉴定,其中

[0025] 标签 1, pET-P53 ;2, pET-PTD-P53 ;3, pET-PTD-ODD-P53

[0026] M, DNA Marker 分别为 500, 1000, 2000, 3500, 5500, 7000bp ;

[0027] 图 3 :pET-PTD-ODD-P53 表达结果,其中标签 1, 含 pET28a 菌 ;2, , 标准蛋白分子量 ;

[0028] 图 4 :PTD-ODD-P53 Western 结果,其中 TOP 为 PTD-ODD-P53, TP 为 PTD-P53。

[0029] 实施例

[0030] 本发明将通过下列实施例得到更清楚的说明。这些实施例只是说明性的,不应当理解成限制本发明的范围。

[0031] 实施例 1 制备 p53 基因

[0032] 取人胎总 RNA 1 μ g,按 cDNA synthesis system 操作指南依次加入反应成分。反应总体积 20 μ l,42℃反应 15min 后,95℃灭活 5min,作为 PCR 模板。以 P7 :GAGAATTCATGGAGGAGCCGAGTC (SEQ ID NO :3) ;P4 :CCGTCGACTTAGTCTGAGTCAGGC (SEQ ID NO :4) 为引物,PCR 人全长 p53 基因。

[0033] 分别取载体 pET28a 和 p53 PCR 片段,用 EcoR I 和 SaI I 进行双酶切,37℃ 3h 再用凝胶回收试剂盒回收。pET 载体片段与 p53 片段以 1 : 3 的比例混合,加 3U 的 T4 连接酶,16℃反应 16h,将反应产物转化于感受态大肠杆菌 DH5a 中,挑取转化成功的菌落,提质粒 PCR 鉴定。阳性克隆命名为 pET-p53。将 pET-p53 质粒转化于感受态大肠杆菌 BL21 中。

[0034] 实施例 2 制备 PTD-ODD-P53 基因

[0035] 以实施例 1 中 p53 PCR 片段为模板,以 P8 :GAGAATTCATGTACGGCCGTA AAAAGAGACGCC AACGTAGACGTGCTATGGAGGAGCC (SEQ ID NO :5) ;P4 为引物进行 PCR,经 1%电泳后凝胶回收片段 (PTD-P53)。

[0036] 用 EcoR I 和 SaI I 双酶切片段 PTD-P53,37℃ 3h 后用凝胶回收试剂盒回收。EcoR

I 和 Sal I 双酶切的 pET 载体片段与 PTD-P53 片段以 1 : 3 的比例混合,加 T4 连接酶,16℃ 反应 16h,将反应产物转化于感受态大肠杆菌 DH5a 中,挑取转化成功的菌落,提质粒 PCR 鉴定。阳性克隆命名为 pET-PTD-P53。将 pET-PTD-P53 质粒转化于感受态大肠杆菌 BL21 中。

[0037] 采用重叠延伸法构建 PTD-ODD-P53 基因

[0038] 将 P1 :GAGAATTCATGTACGGCCGTA AAAAGAGACGCCAACGTAGACG (SEQ ID NO :6) ;P2 :TCATCATCCATTGGGATATAGGGAGCTAACATCTCCAAGTCTAAAGCACGTCTACGTTGGCG (SEQ ID NO :7) 等量混合,加入 PCR 反应体系,反应 30 次,经 2% 电泳后凝胶回收片段 (P1+P2)。

[0039] 以实施例 1 中 p53 PCR 片段为模板,以 P3 :TCCCAATGGATGATGACTTCCAGTTAGCTATGGAGGAGCCGCAGTC (SEQ ID NO :8) ;P4 为引物进行 PCR,经 1% 电泳后凝胶回收片段 (P3+p53)。

[0040] 将片段 (P1+P2) 与片段 (P3+p53) 等量混合,以 P1、P4 为引物进行 PCR,经 1% 电泳后凝胶回收片段 (PTD-ODD-P53)。

[0041] 用 EcoR I 和 Sal I 双酶切片段 PTD-ODD-P53,37℃ 3h 后用凝胶回收试剂盒回收。EcoR I 和 Sal I 双酶切的 pET 载体片段与 PTD-ODD-P53 片段以 1 : 3 的比例混合,加 T4 连接酶,16℃ 反应 16h,将反应产物转化于感受态大肠杆菌 DH5a 中,挑取转化成功的菌落,提质粒 PCR 鉴定 (图 1、图 2)。阳性克隆命名为 pET-PTD-ODD-P53,其中 PTD-ODD-P53 的序列如 SEQ ID NO :1 所示。将 pET-PTD-ODD-P53 质粒转化于感受态大肠杆菌 BL21 中。

[0042] 实施例 3. 制备 PTD-ODD-P53 融合蛋白

[0043] 1. PTD-ODD-P53 的表达

[0044] 分别挑取转化 pET-PTD-ODD-P53 的阳性菌落置 LB 培养液中 (含卡拉霉素 60g/ml) 活化,再按 5~20% 接种于 2YT 培养液中,培养至 OD600 为 0.5 ~ 2.0 时,加入 0.4 ~ 1mM IPTG 诱导表达 (图 3)。收集诱导表达 3 ~ 24h 的菌体,PBS 洗净。

[0045] 2. PTD-ODD-P53 的 Western 鉴定

[0046] 经诱导表达获得的融合蛋白经聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析表明:沉淀中有目的蛋白,其分子量与理论值相符。经 Western 印迹,用 P53 单克隆抗体鉴定分析为 PTD-ODD-P53 (图 4)。测序表明其具有 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列。

[0047] 3. 包涵体洗涤

[0048] 用磷酸缓冲液 (pH 7.6) 重悬,超声破菌,4℃ 10000rpm 离心,沉淀部分用 0.5-4M 尿素,100mmol/L NaCl,20mmol/L Tris-HCl (pH8.0) 洗涤 4℃ 过夜。

[0049] 4. 包涵体溶解及复性

[0050] 以 10000 转 / 分离心 15 分钟,收集沉淀,用 6-10mol/L 尿素 (溶于 20mmol/L 三羟甲基胺基甲烷缓冲液 pH 8.0-12.0) 溶解,缓慢加入等体积复性液 (含 20mmol/L Tris, 1mmol/L EDTA,0.1mmol/L GSH;0.01mol/L GSSG),12000 转 / 分离心 15 分钟,取上清装入 8000-12000 透析袋,置 4-12℃ 中采用连续梯度透析法透析至复性液,用生理盐水透析 3 次。

[0051] 实施例 4. PTD-ODD-P53 活性测定

[0052] 1) PTD-ODD-P53 过细胞膜试验

[0053] 将实施例 3 获得的 PTD-ODD-P53 融合蛋白加入 SW480 中,2h 后以抗 P53 单克隆抗体为一抗做免疫组织化学检测,对照组分别用 PTD-P53、P53 加入 SW480 中,结果表明,PTD-ODD-P53、PTD-P53 能进入细胞内,并以细胞核中分布为主。

[0054] 还研究了常氧条件下 PTD-ODD-P53 对细胞的影响,乏氧条件下 PTD-ODD-P53 对细

胞的影响,以及 PTD-ODD-P53 对荷瘤动物的影响。

[0055] 发明效果

[0056] 利用基因工程、蛋白质纯化等手段,制备出具有穿膜活性、在缺氧环境中稳定及其他生物学活性的多重活性肽,并指导制备出具有药用价值的生物载体药物,PTD-ODD-P53 在体外缺氧环境可以抑制肿瘤细胞生长,在体内可以抑制移植瘤在小鼠体内的生长,延长小鼠的存活时间。用于人类多种实体瘤的治疗,具有重要的医学研究及临床使用价值。

[0057]

序列表

[0058]

<110> 中国人民解放军军事医学科学院毒物药物研究所
 <120> PTD、HIF 的 ODD 与肿瘤抑制基因的融合表达及其应用
 <160> 8

<210> 1

<211> 1389

<212> DNA

<213> 基因融合体 PTD-ODD-p53 的序列

<400> 1

ATGTACGGCC GTAAAAAGAG ACGCCAACGT AGACGTATGA ACCCATTTTC TACTCAGGAC
 ACAGATTTAG ACTTGGAGAT GTTAGCTCCC TATATCCCAA TGGATGATGA CTTCCAGTTA
 CGTTCCTTCG ATCAGTTGTC ACCATTAGAA AGCAGTCCG CAAGCCCTGA AAGCGCAAGT
 CCTCAAAGCA CAGTTACAGT ATTCCAGATG GAGGAGCCGC AGTCAGATCC TAGCGTCGAG
 CCCCCTCTGA GTCAGGAAAC ATTTTCAGAC CTATGGAAAC TACTTCCTGA AAACAACGTT
 CTGTCCCCTT TGCCGTCCCA AGCAATGGAT GATTTGATGC TGTCCCCTGA CGATATTGAA
 CAATGGTTCA CTGAAGACCC AGGTCCAGAT GAAGCTCCCA GAATGCCAGA GGCTGCTCCC
 CGCGTGGCCC CTGCACCAGC AGCTCCTACA CCGGCGGCCC CTGCACCAGC CCCCTCCTGG
 CCCCTGTCAT CTTCTGTCCC TTCCCAGAAA ACCTACCAGG GCAGCTACGG TTTCCGTCTG
 GGCTTCTTGC ATTCTGGGAC AGCCAAGTCT GTGACTTGCA CGTACTCCCC TGCCCTCAAC
 AAGATGTTTT GCCAACTGGC CAAGACCTGC CCTGTGCAGC TGTGGGTTGA TTCCACACCC
 CCGCCCGGCA CCCGCGTCCG CGCCATGGCC ATCTACAAGC AGTCACAGCA CATGACGGAG
 GTTGTGAGGC GCTGCCCCCA CCATGAGCGC TGCTCAGATA GCGATGGTCT GGCCCTCCT
 CAGCATCTTA TCCGAGTGGA AGGAAATTTG CGTGTGGAGT ATTTGGATGA CAGAAACACT
 TTTTCGACATA GTGTGGTGGT GCCCTATGAG CCGCCTGAGG TTGGCTCTGA CTGTACCACC
 ATCCACTACA ACTACATGTG TAACAGTTCC TGCATGGGCG GCATGAACCG GAGGCCCATC
 CTCACCATCA TCACACTGGA AACTCCAGT GGTAATCTAC TGGGACGGAA CAGCTTTGAG
 GTGCGTGTTC GTGCCTGTCC TGGGAGAGAC CCGCGCACAG AGGAAGAGAA TCTCCGCAAG
 AAAGGGGAGC CTCACCACGA GCTGCCCCCA GGGAGCACTA AGCGAGCACT GCCCAACAAC
 ACCAGCTCCT CTCCCAGCC AAAGAAGAAA CCACTGGATG GAGAATATTT CACCCTTCAG
 ATCCGTGGGC GTGAGCGCTT CGAGATGTTT CGAGAGCTGA ATGAGGCCTT GGAACCTAAG
 GATGCCAGG CTGGGAAGGA GCCAGGGGGG AGCAGGGGCTC ACTCCAGCCA CCTGAAGTCC
 AAAAAGGGTC AGTCTACCTC CCGCCATAAA AAATCATGT TCAAGACAGA AGGGCCTGAC
 TCAGACTAA

1389

<210> 2

<211> 462

<212> 氨基酸序列

<213> PTD-ODD-p53 编码的融合蛋白

<400> 2

MYGRKKRRQR RRMNPFSTQD TDLDLEMLAP YIPMDDDFQL RSFDQLSPLE SSSASPESAS
 PQSTVTVFQM EEPQSDPSVE PPLSQETFSD LWKLLPENNV LSPLPSQAMD DLMLSPDDIE

[0059]

QWFTEDPGPD EAPRMPEAAP RVAPAPAAPT PAAPAPAPSW PLSSSVPSQK TYQGSYGFRL
 GFLHSGTAKS VTCTYSPALN KMFCQLAKTC PVQLWVDSTP PPGTRVRAMA IYKQSQHMT
 VVRRCPHHER CSDSDGLAPP QHLIRVEGNL RVEYLDDRNT FRHSVVVPYE PPEVGSDCCT
 IHNYMCNSS CMGGMNRRPI LTIITLEDSS GNLLGRNSFE VRVCACPGRD RRTEENLRK
 KGEPHHELPP GSTKRALPNN TSSSPQPKK PLDGEYFTLQ IRGRERFEMF RELNEALELK
 DAQAGKEPGG SRAHSSHLKS KKGQSTRHK KLMFKTEGPD SD 462

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> 引物 P7

<400> 3

GAGAATTCAT GGAGGAGCCG CAGTC 25

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> 引物 P4

<400> 4

CCGTCGACTT AGTCTGAGTC AGGC 24

<210> 5

<211> 58

<212> DNA

<213> 引物 P8

<400> 5

GAGAATTCAT GTACGGCCGT AAAAAGAGAC GCCAACGTAG ACGTGCTATG GAGGAGCC 58

<210> 6

<211> 43

<212> DNA

<213> 引物 P1

<400> 6

GAGAATTCAT GTACGGCCGT AAAAAGAGAC GCCAACGTAG ACG
 188 43

<210> 7

<211> 62

<212> DNA

<213> 引物 P2

<400> 7

TCATCATCCA TTGGGATATA GGGAGCTAAC ATCTCCAAGT CTAAGCAGC TCTACGTTGG
 CG 62

[0060]

<210> 8

<211> 46

<212> DNA

<213> 引物 P3

<400> 8

TCCCAATGGA TGATGACTTC CAGTTAGCTA TGGAGGAGCC GCAGTC

46

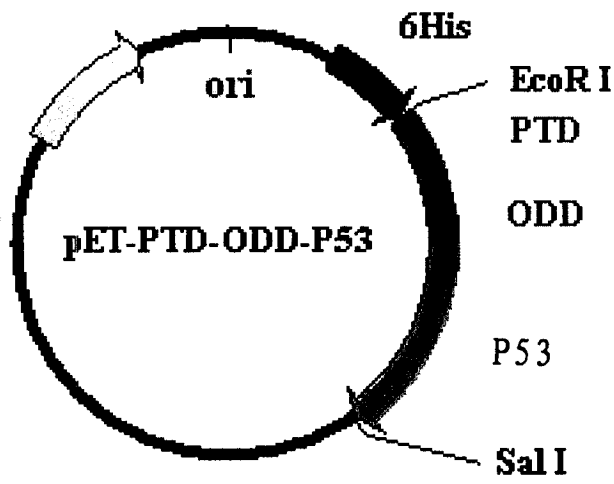


图 1

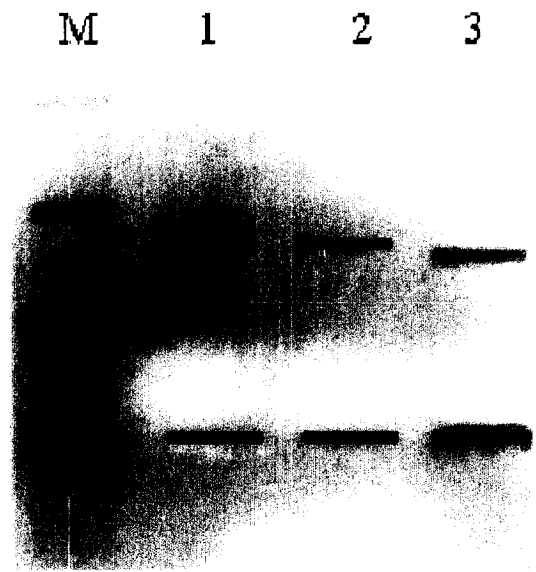


图 2

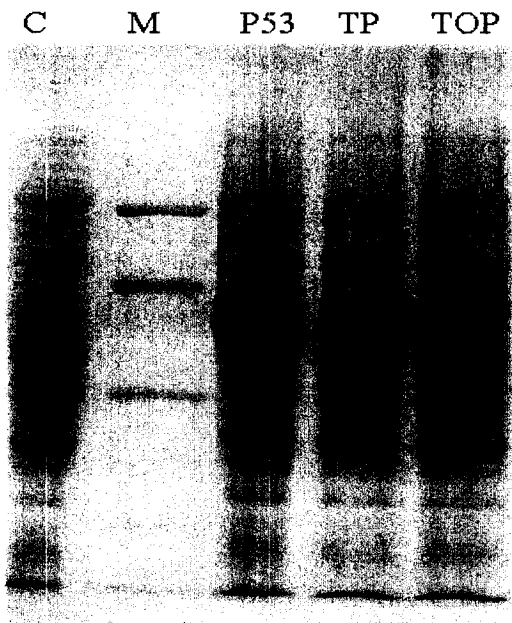


图 3

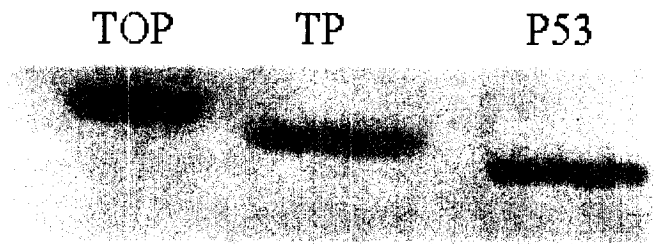


图 4