

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510042989.3

[51] Int. Cl.

C12N 15/79 (2006.01)

C12N 15/66 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 11 月 7 日

[11] 授权公告号 CN 100347307C

[22] 申请日 2005.7.25

[21] 申请号 200510042989.3

[73] 专利权人 中国人民解放军第四军医大学
地址 710032 陕西省西安市长乐西路 17 号

[72] 发明人 李霞 张璟 刘新平 药立波

[56] 参考文献

WO0073326A3 2000.12.7

WO0236142A2 2002.5.10

JP2003-70479A 2003.3.11

WO0027865A1 2000.5.18

WO0242457A1 2002.5.3

c - Cbl Is a Suppressor of the Neu Oncogene.
Gil Levkowitz, et al. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Vol. 275 No. 45. 2000

人 cbl 基因真核表达载体的构建及表达.
李霞, 等. 第四军医大学学报, 第 25 卷第 24 期. 2004

以 EGFR 家族受体酪氨酸激酶为靶点的抗肿瘤治疗研究进展. 孔维佳, 将建东, 将建东. 中国药理学通报, 第 19 卷第 8 期. 2003

审查员 辜学英

[74] 专利代理机构 西安通大专利代理有限责任公司

代理人 李郑建

权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 2 页

[54] 发明名称

重组嵌合分子 Cb1 - Grb2 (SH2) - RING 真核表达质粒及抗肿瘤基因药物用途

[57] 摘要

本发明公开了重组嵌合 Cb1 泛素连接酶 Cb1 - Grb2 (SH2) - RING 真核表达载体的构建方法, 所构建的表达质粒 pcDNA3.1 (+) - Cb1 - Grb7 (SH2) - RING 能够作为抗 HER2 阳性肿瘤的基因药物。经实验证明: 重组嵌合分子 Cb1 - Grb2 (SH2) - RING 真核表达质粒转染 HER2 阳性乳腺癌细胞系 SK - BR - 3 后, 通过与 HER2 蛋白结合并促进其泛素化、下调, 能够有效抑制与 HER2 过度活化有关的细胞的增殖, 因而具有抗 HER2 阳性肿瘤的用途。

1. 重组嵌合分子 Cbl-Grb2 (SH2) -RING 真核表达载体的构建方法, 其特征在于:

首先将 *BamH I* 引入 Cbl N 基因的 SH2 N 端, 获得 CblN (*BamH I*); 以 Cbl N (*BamH I*) 为模板, 同法将 *EcoR V* 引入 Cbl N 基因的 SH2 C 端获得 CblN (*BamH I*+ *EcoR V*);

将 CblN (*BamH I*+ *EcoR V*) 克隆入 pGEM-T easy 载体进行测序, 测序正确后利用 *KpnI/XhoI* 酶切并将其插入到 pcDNA3.1 (+) 真核表达载体的 *KpnI/XhoI* 酶切位点之间, 即得到 pcDNA3.1(+)-CblN (*BamH I*+ *EcoR V*);

再以 SK-BR-3 细胞的 cDNA 为模板, 设计引物扩增得到 Grb2 SH2 基因片段并克隆到 pGEM-T easy 载体中, 酶切鉴定及测序证实序列正确后, 以 *BamH I* 和 *EcoR v* 双酶切将 Grb2 SH2 基因片段切出, 并将经同样酶切的 pcDNA3.1(+)-CblN (*BamH I*+ *EcoR v*) 载体片断分别回收, 两片段经 T4 连接酶进行连接反应, 连接产物转化感受态细胞 DH5 α , 挑取单克隆培养过夜, 提取质粒, 经 *BamH I* 和 *EcoR v* 双酶切鉴定后, 对获得预期大小的插入片段的载体再进行测序证实, 命名为 pcDNA3.1(+)-Cbl-Grb2(SH2)-RING, 即为重组嵌合分子 Cbl-Grb2(SH2)-RING 的真核表达质粒。

2. 权利要求 1 所述的重组嵌合分子 Cbl-Grb2 (SH2) -RING 真核表达载体的构建方法所得到的重组嵌合分子 Cbl-Grb2 (SH2) -RING 的真核表达质粒 pcDNA3.1(+)-Cbl-Grb2(SH2)-RING 用于制备抗 HER2 阳性肿瘤的基因药物的用途。

3. 如权利要求 2 所述的用途, 其特征在于, 重组嵌合分子 Cbl-Grb2(SH2) -RING 真核表达质粒 pcDNA3.1(+)-Cbl-Grb2(SH2)-RING 转染 HER2 阳性乳腺癌细胞系 SK-BR-3 后, 通过与 HER2 蛋白结合并促进其泛素化、下调, 抑制与 HER2 过度活化有关的细胞的增殖。

重组嵌合分子 Cbl-Grb2 (SH2) -RING 真核表达质粒 及抗肿瘤基因药物用途

技术领域

本发明属于肿瘤基因治疗领域,涉及重组嵌合 Cbl 泛素连接酶 Cbl-Grb2 (SH2) -RING 真核表达载体的构建及其用于抗 HER2 阳性肿瘤的基因药物的用途。

背景技术

Cbl(Casitas B-lineage lymphoma)是一类进化上保守的、广泛分布的胞浆蛋白,由 906 个氨基酸组成,包含有多个不同的结构域,可以介导与不同的细胞内分子结合,因此在细胞活化过程中可作为接头分子或支架分子参与信号转导;同时分子内的 RING 结构域赋予 Cbl 泛素连接酶的功能,促进其结合的靶分子发生泛素化、下调,从而参与细胞内信号转导的负调控机制。Cbl 突变或功能异常可以导致细胞发生转化或者免疫功能失调。

1. Cbl 的结构及功能

(1) Cbl 含有多个蛋白-蛋白结合结构域以及一个 RING 结构域

Cbl 蛋白由 N 末端开始分别含有酪氨酸激酶结合结构域(TKB)、Linker、RING 结构域、富含脯氨酸区、C 末端几个酪氨酸磷酸化位点及亮氨酸拉链。其中 TKB 结构域由 4H、EF 及变异的 SH2 构成,识别和结合活化蛋白酪氨酸激酶 PTK。RING 介导与泛素结合酶 E2 结合。Linker 对于保持 Cbl 分子上结合的底物、RING 及 E2 三者之间形成的最佳空间位置具有重要作用。C 端的脯氨酸富含区及酪氨酸位点分别介导 Cbl 分子与其它含 SH3 或含 SH2 的蛋白结合。

(2) Cbl 作为泛素连接酶促进多种蛋白酪氨酸激酶泛素化、下调,参与细胞内信号转导的负向调控

Cbl分子的多价结合能力一方面决定了它作为一种多价接头分子参与信号转导途径。另一方面, RING赋予了Cbl蛋白在本质上是一种泛素连接酶, 分子中的TKB及其他结构域可以识别并结合靶蛋白, RING负责募集泛素结合酶E2并将结合在E2上的泛素转移至其所结合的底物分子上, 从而启动泛素化降解途径。以这种方式Cbl蛋白促进多种受体型蛋白酪氨酸激酶(RTK)如EGFR、PDGFR α 、 β 、CSF-1R、Met、Hck等发生配体诱导的泛素化、随后降解, 参与细胞内信号转导的负向调控, 这对于维持细胞的内稳态具有重要意义。并且对于许多蛋白酪氨酸激酶如EGFR、Syk等而言, Cbl N端截短体(包含N末端到RING)便足以促使底物发生泛素化。Cbl突变后可成为癌蛋白; 许多致癌性RTK如EGFRvV、CSF-1R、HER2等发生突变后能够逃逸Cbl的负调控作用。这些现象提示, 加强或重建Cbl的负调控作用, 或许能够抑制某些肿瘤细胞增殖。

2. 重组嵌合泛素连接酶的应用

在泛素化过程中泛素连接酶E3负责特异性识别与结合底物。近年来多个研究组应用重组技术构建重组嵌合泛素连接酶, 成功降解正常情况下并非泛素化系统天然底物的某些蛋白。例如通过修饰泛素连接酶复合物Skp1-Cullin1-F-box (SCF)的底物结合亚单位F-box构成的嵌合F-box蛋白CFP, 可靶向性降解pRB和 β -catenin。将分别来自BRCA1和BARD的两个RING与增殖细胞核抗原PCNA进行重组后, 该重组分子以蛋白酶体依赖的方式降低p57蛋白的水平, 并且下调其功能。这些研究表明利用重组的泛素连接酶, 可靶向性地降解一些疾病相关分子。但目前还没有应用重组Cbl泛素连接酶进行基因治疗研究的相关报道。

发明内容

鉴于Cbl细胞内蛋白的SH2负责识别和结合多种活化的蛋白酪氨酸激酶, 为了靶向性地降解致癌相关蛋白HER2, 本发明的目的在于, 构建能够

靶向性降解致癌相关蛋白 HER2 的重组嵌合 Cbl 泛素连接酶真核表达质粒，并应用于制备抗 HER2 阳性肿瘤的基因药物。

本发明将 Cbl 蛋白 N 端部分的 SH2 置换为能够结合并且介导 HER2 活化信号的下游信号分子 Grb2 的 SH2，构建重组嵌合分子 Cbl-Grb2 (SH2)-RING，其中置换的 SH2 结构域负责对 HER2 靶向性结合，RING 负责将泛素分子连接至底物以促进其发生泛素化、降解。

为了实现上述目的，本发明采取的技术解决方案是：

1) 将 *BamH I* 和 *EcoR v* 引入 Cbl N 端编码基因 SH2 的两端，构建 **pcDNA3.1(+)-CblN(*BamH I*+ *EcoR V*)**

本发明利用 PCR 及重叠延伸技术，分别设计 3 对引物，进行 3 轮 PCR 反应，首先将 *BamH I* 引入 CblN 基因的 SH2 N 端即获得 CblN (*BamH I*)。以 CblN (*BamH I*) 为模板，同法将 *EcoR V* 引入 CblN 基因的 SH2 C 端获得 CblN (*BamH I*+ *EcoR V*)。将其克隆入 pGEM-T easy 载体进行测序，测序正确后利用 *KpnI/XhoI* 酶切将其插入到 pcDNA3.1(+)-真核表达载体的 *KpnI/XhoI* 酶切位点之间，即得到 pcDNA3.1(+)-CblN(*BamH I*+ *EcoR V*)。

2) 扩增 Grb2 的 SH2 基因片段并置换入 pcDNA3.1(+)-CblN(*BamH I*+ *EcoR v*)，获得重组嵌合分子 Cbl-Grb2(SH2)-RING 的真核表达质粒 **pcDNA3.1(+)-Cbl-Grb2(SH2)-RING**

以 SK-BR-3 细胞的 cDNA 为模板，设计引物扩增得到 Grb2SH2 基因片段并克隆到 pGEM-T easy 载体中，酶切鉴定及测序证实序列正确后，以 *BamH I* 和 *EcoR v* 双酶切将 Grb2SH2 基因片段切出，并将经同样酶切的 pcDNA3.1(+)-CblN (*BamH I*+ *EcoR v*) 载体片断分别回收，两片段经 T4 连接酶进行连接反应，连接产物转化感受态细胞 DH5 α ，挑取单克隆培养过夜，提取质粒，经 *BamH I* 和 *EcoR v* 双酶切鉴定后，对获得预期大小的插入片段的载体再进行测序证实，命名为 pcDNA3.1(+)-Cbl-Grb2(SH2)-RING，此即为

重组嵌合分子Cbl-Grb2(SH2)-RING的真核表达质粒。

3) Cbl-Grb2(SH2)-RING 促进 HER2 泛素化和下调、抑制 HER2 阳性肿瘤细胞增殖

将构建成功的质粒 pcDNA3.1(+)-Cbl-Grb2(SH2)-RING 稳定转染 HER2 阳性的乳腺癌细胞系 SK-BR-3 细胞, 通过免疫印迹、流式细胞仪和细胞实验证实其通过下调 HER2 水平, 有效抑制了与 HER2 过度活化有关的肿瘤细胞增殖。进一步通过体内结合实验及泛素化实验证实重组嵌合分子 Cbl-Grb2(SH2)-RING 能够结合靶蛋白 HER2 并促进其泛素化程度增加。

附图说明

图 1 是 pcDNA3.1(+)载体质粒图;

图2是对pcDNA3.1(+)-CblN(*Bam*H I+*Eco*R V) 载体的酶切鉴定; 其中:

1: pcDNA3.1(+)-CblN(*Bam*H I+*Eco*R V) 以*Kpn*I 和 *Xho*I 双酶切;

2: pcDNA3.1(+)-CblN 以*Kpn*I 和 *Xho*I 双酶切;

3: pcDNA3.1(+)-CblN(*Bam*H I+*Eco*R V) 以 *Bam*H I 和 *Eco*R V 双酶切;

4: pcDNA3.1(+)-CblN 以 *Bam*H I 和 *Eco*R V 双酶切;

M: 已知分子量标准品。

图3是对pcDNA3.1(+)-Cbl-Grb2(SH2)-RING载体的酶切鉴定, 其中:

1: pcDNA3.1(+)-CblN(*Bam*H I+*Eco*R V) 以 *Bam*H I 和 *Eco*R V 双酶切;

2: pcDNA3.1(+)-Cbl-Grb2(SH2)-RING 以 *Bam*H I 和 *Eco*R V 双酶切;

M: 已知分子量标准品。

图 4 是 pcDNA3.1(+)-Cbl-Grb2(SH2)-RING 重组质粒对 HER2 的下调作用。稳定转染了 pcDNA3.1(+)空质粒 (vector)、pcDNA3.1(+)-CblN(简称为 CblN) 以及 pcDNA3.1(+)-Cbl-Grb2(SH2)-RING(简写成 CblN/Grb2) 的 SK-BR-3 细胞株细胞提取物分别利用抗 HER2 和 ACTIN 的抗体进行免疫印迹分析。CblN/Grb2 能够下调 HER2 蛋白。

图5是 Cbl-Grb2(SH2)-RING 对 HER2 阳性的乳腺癌细胞系 SK-BR-3 的增殖抑制作用。稳定转染了 pcDNA3.1(+)空质粒(control)和 CblN/Grb2 的 SK-BR-3 细胞株,以 200 个细胞数接种于 60mm 培养皿培养 14 天,计算克隆形成率。CblN/Grb2 能够抑制 SK-BR-3 细胞的克隆增殖能力。

图6是 Cbl-Grb2(SH2)-RING 促进 HER2 阳性的乳腺癌细胞系 SK-BR-3 中 HER2 泛素化程度增加。稳定转染了 pcDNA3.1(+)空质粒(vector)、CblN/Grb2 和 pcDNA3.1(+)-CHIP(此处作为阳性对照,简称为CHIP)的 SK-BR-3 细胞株分别瞬时转染 pcDNA3.1(+)-3×HA-Ub 并给予 25 μM MG-132 处理 4h。取 1.5 mg 细胞提取物以抗 HER2 抗体进行免疫沉淀,以抗 HA 抗体(图 6 上)或抗 HER2 抗体(图 6 下)进行免疫印迹分析。CblN/Grb2 能够促进 HER2 泛素化程度增加。

下面结合附图和实验对本发明作进一步的详细说明。

具体实施方式

以下是发明人给出的重组嵌合 Cbl 泛素连接酶 Cbl-Grb2(SH2)-RING 真核表达质粒(pcDNA3.1(+)-Cbl-Grb2(SH2)-RING)的构建与鉴定及该质粒对 HER2 阳性的肿瘤细胞生长的抑制作用。

1. 重组嵌合 Cbl 泛素连接酶 Cbl-Grb2(SH2)-RING 真核表达质粒的构建

1.1 实验材料

限制性内切酶、T4 连接酶均购于大连宝生生物有限公司,真核细胞表达质粒 pcDNA3.1(+)购于 Invitrogen 公司,pcDNA3.1(+)质粒图参见图 1。

图中, P_{CMV}: CMV 启动子, 232-819 位碱基, T7: T7 启动子/引物位点, 863-882 位碱基; 多克隆酶切位点: 895-1010 位碱基, BGHpA: 牛生长激素多腺苷酸化序列, 1028-1252 位碱基, fl ori: fl 起始位点, 1296-1726 位碱基, SV40 ori: SV40 起始位点, 1731-2074 位碱基, Neomycin: 新霉素抗药性基因, 2136-2930 位碱基, SV40pA: SV40 多腺苷酸化信号, 3104-3234

位碱基, pUC ori: pUC 起始位点, 3617-4287 位碱基, Amipicilin: 氨苄青霉素抗药性基因, 4432-5428 位碱基。

1.2 重组嵌合分子 Cbl-Grb2 (SH2) -RING 真核表达质粒 (pcDNA3.1(+)-Cbl-Grb2(SH2)-RING)的构建过程

首先利用 PCR 及重叠延伸技术, 将 *Bam*H I 和 *Eco*R v 引入 Cbl N 端编码基因 SH2 的两端, 将其克隆入 pGEM-T easy 载体进行测序, 测序正确后利用 *Kpn*I/*Xho*I 酶切将其插入到 pcDNA3.1(+)-真核表达载体的 *Kpn*I/*Xho*I 酶切位点之间, 即 pcDNA3.1(+)-CblN (*Bam*H I+ *Eco*R V)。利用 PCR 得到 Grb2 SH2 基因片段并克隆到 pGEM-T easy 载体中, 酶切鉴定及测序证实序列正确后, 以 *Bam*H I 和 *Eco*R v 双酶切将 Grb2 SH2 基因片段切出, 并与经同样酶切的 pcDNA3.1(+)-CblN (*Bam*H I+ *Eco*R v) 载体片断分别回收后进行连接反应, 连接产物转化感受态细胞 DH5 α , 挑取单克隆培养过夜, 提取质粒, 经 *Bam*H I 和 *Eco*R v 双酶切鉴定后, 对获得预期大小的插入片段的载体再进行测序证实, 命名为 pcDNA3.1(+)-Cbl-Grb2(SH2)-RING, 此即为重组嵌合分子 Cbl-Grb2(SH2)-RING 的真核表达质粒。

2. 重组嵌合 Cbl 泛素连接酶 Cbl-Grb2 (SH2) -RING 真核表达质粒稳定转染 HER2 阳性乳腺癌细胞系 SK-BR-3 后对细胞增殖的影响

将对数生长期的 SK-BR-3 细胞以每孔 2×10^5 细胞接种于 6 孔培养板内, 培养液均为 DMEM (GIBCO Co), 10% 小牛血清 (杭州四季青生物制品厂), 在二氧化碳培养箱 (37 $^{\circ}$ C) 中培养。次日当细胞生长至 90-95% 时, 按照 LipofectamineTM2000 说明书进行脂质体转染。于转染后 24h 按照 1:10 传代, 48h 开始以 400 μ g/mL 的 G418 进行筛选, 获得稳定转染的细胞株。对照细胞以同样的方法转染空质粒 pcDNA3.1(+) 并筛选稳定细胞株。通过免疫印迹、流式细胞仪以及细胞实验检测 Cbl-Grb2(SH2)-RING 的表达对 HER2 蛋白水平、细胞增殖的影响。进一步通过体内结合实验及泛素化实验检测该重

组嵌合分子是否能够结合靶蛋白 HER2 并促进其泛素化。

在实际应用到肿瘤病人时，拟将该质粒以脂质体包裹后行局部瘤体注射；或者进一步将 Cbl-Grb2(SH2)-RING 构建到腺病毒载体中，获得 Cbl-Grb2(SH2)-RING 重组腺病毒后利用适当滴度的重组腺病毒进行局部瘤体注射。

本发明的技术效果是：

1. 构建了重组嵌合分子 Cbl-Grb2(SH2)-RING 的真核表达质粒 pcDNA3.1(+)-Cbl-Grb2(SH2)-RING，经酶切鉴定（图 2、3）和 DNA 序列测定证明，序列完全正确。

2. 重组嵌合 Cbl 泛素连接酶 Cbl-Grb2(SH2)-RING 对 HER2 阳性的乳腺癌细胞系 SK-BR-3 细胞增殖的影响

2.1 下调 SK-BR-3 细胞中 HER2 蛋白

免疫印迹分析显示，与稳定转染了 pcDNA3.1(+)空质粒(vector)及 CblN 的对照细胞株比较，稳定表达 Cbl-Grb2(SH2)-RING (CblN/Grb2)的 SK-BR-3 细胞中 HER2 发生下调（图 4）。间接免疫荧光染色及流式细胞仪分析细胞表面 HER2 表达情况也证明后者 HER2 阳性率降低至 28.4% (转染了空载体的对照细胞株为 89.6%)。

2.2 抑制 SK-BR-3 稳定转染细胞株的增殖

克隆形成实验表明，与稳定转染 pcDNA3.1(+)的对照细胞株 (control) 比较，稳定表达 Cbl-Grb2(SH2)-RING (CblN/Grb2) 的 SK-BR-3 克隆形成率降低 66% (图 5)。

2.3 结合并促进 HER2 泛素化

体内结合实验表明，SK-BR-3 细胞中过表达的嵌合重组分子 Cbl-Grb2(SH2)-RING 与 HER2 具有相互作用，表明该嵌合重组分子能够在体内结合 HER2。稳定表达嵌合重组分子 Cbl-Grb2(SH2)-RING 的 SK-BR-3

细胞以及稳定转染了 pcDNA3.1(+) 的对照细胞株分别瞬时转染 pcDNA3.1(+)-3×HA-Ub, 并给予 MG-132 处理以抑制蛋白降解, 细胞裂解液用抗 HER2 的抗体进行免疫沉淀, 以抗 HA 的抗体进行免疫印迹检测, 结果表明稳定表达重组分子 Cbl-Grb2(SH2)-RING 的 SK-BR-3 细胞中 HER2 泛素化较对照细胞明显增加。(图 5)。

经上述实验证明: 本发明构建的重组嵌合 Cbl 泛素连接酶 Cbl-Grb2 (SH2) -RING 真核表达质粒 pcDNA3.1(+)-Cbl-Grb2(SH2)-RING, 转染 HER2 阳性乳腺癌细胞系 SK-BR-3 后, 通过与 HER2 蛋白结合并促进其泛素化、下调, 能够有效抑制与 HER2 过度活化有关的细胞的增殖, 因而具有抗 HER2 阳性肿瘤的用途。

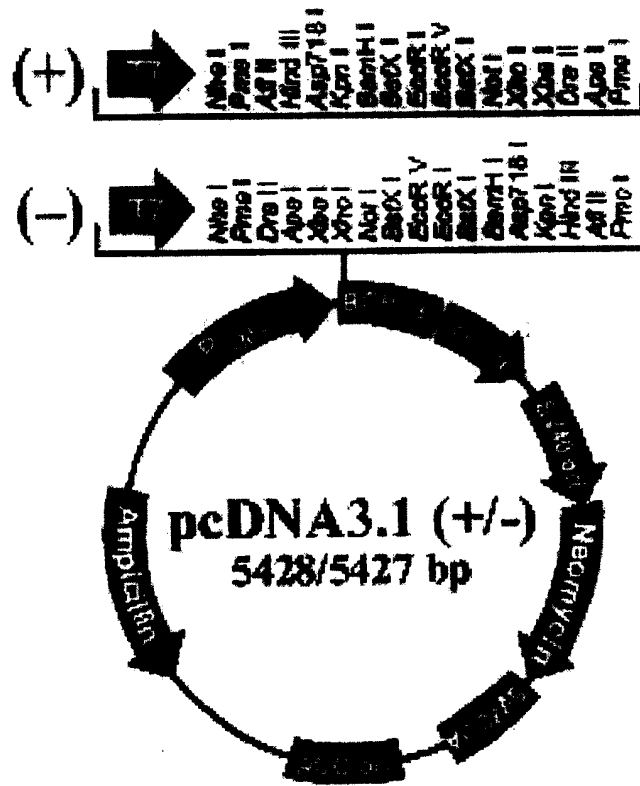


图1

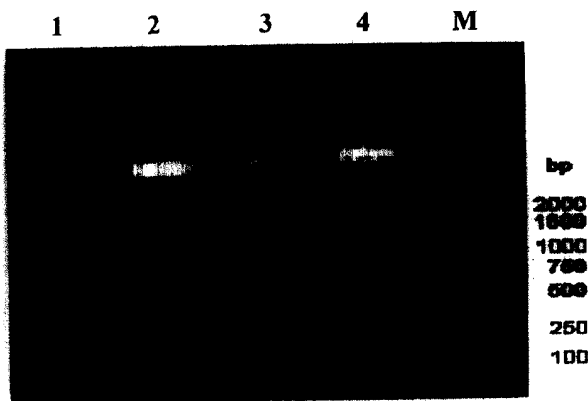


图2

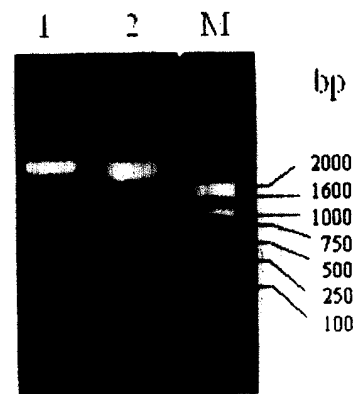


图3

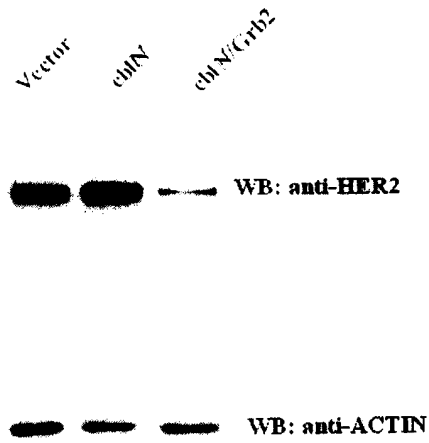


图 4

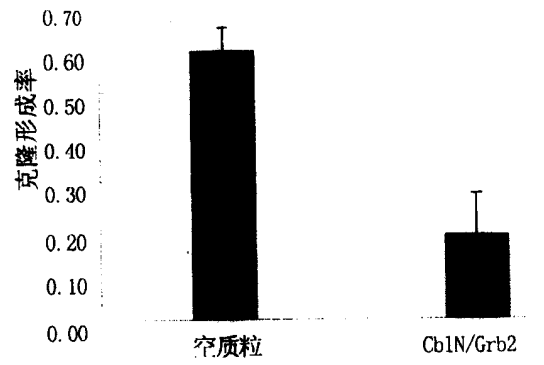


图 5

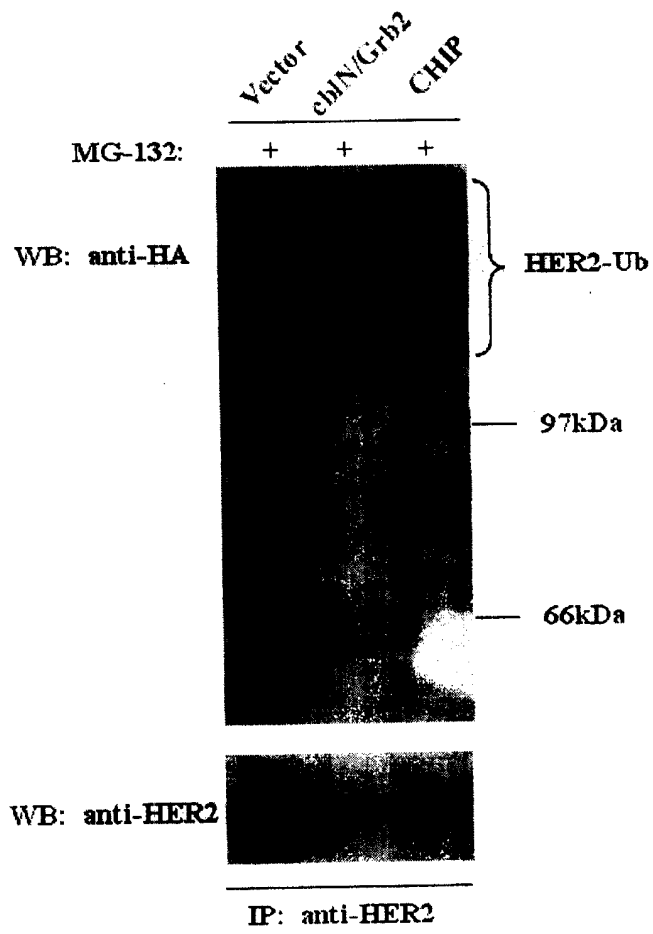


图 6