



# (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104342444 B

(45)授权公告日 2017. 11. 17

(21)申请号 201410350752.0  
 (22)申请日 2014.07.23  
 (65)同一申请的已公布的文献号  
 申请公布号 CN 104342444 A  
 (43)申请公布日 2015.02.11  
 (66)本国优先权数据  
 201310311376.X 2013.07.23 CN  
 (73)专利权人 四川大学华西医院  
 地址 610041 四川省成都市武侯区国学巷  
 37号  
 (72)发明人 卢晓风 杨浩 贾殿隆 万琳  
 程惊秋  
 (74)专利代理机构 成都高远知识产权代理事务  
 所(普通合伙) 51222  
 代理人 李高峡 张娟  
 (51)Int. Cl.  
 C12N 15/13(2006.01)

C12N 15/70(2006.01)  
 C12N 1/21(2006.01)  
 C07K 14/705(2006.01)  
 C07K 1/113(2006.01)  
 C12P 21/02(2006.01)  
 A61K 38/17(2006.01)  
 A61K 47/60(2017.01)  
 A61P 35/00(2006.01)  
 A61K 31/69(2006.01)  
 A61K 38/05(2006.01)

### (56)对比文件

CN 102936281 A, 2013.02.20,  
 CN 103408654 A, 2013.11.27,  
 范开等. 肿瘤坏死因子诱导凋亡配体TRAIL  
 研究进展.《重庆理工大学学报(自然科学)》  
 .2011, 第25卷(第2期), 第47-52、67页.

审查员 姚进孝

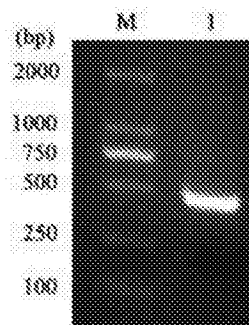
权利要求书1页 说明书9页  
 序列表2页 附图10页

### (54)发明名称

一种重组TRAIL蛋白及其制备方法和用途

### (57)摘要

本发明公开了一种核酸片段,其核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示。本发明公开了前述核酸片段编码的重组蛋白及其制备方法和用途。本发明还公开PEG修饰重组蛋白的结合物及其制备方法和用途。本发明重组蛋白的抗肿瘤效果明显,与蛋白酶体抑制剂联合使用更可以发挥协同增效租用,经PEG修饰后,在保留抗肿瘤药效果的同时,稳定性提高,半衰期延长,应用前景良好。



1. 氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示的蛋白质与蛋白酶体抑制剂在制备治疗肿瘤的联合用药物中的用途;所述蛋白酶体抑制剂是Bortezomib;所述药物是治疗结肠癌、脑星形胶质母细胞瘤、肝癌或肺癌的药物。

2. 根据权利要求1所述的用途,其特征在于:所述蛋白质与蛋白酶体抑制剂的摩尔比为:蛋白质 0.1~100份,蛋白酶体抑制剂5~50份。

3. 根据权利要求2所述的用途,其特征在于:所述蛋白质与蛋白酶体抑制剂的摩尔比为:蛋白质 0.5~100份,蛋白酶体抑制剂25~50份。

4. 一种联合用药物,其特征在于:它包含不同规格的单位制剂,用于同时、分别或者依次给氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示的蛋白质与蛋白酶体抑制剂,以及药学上可接受的载体;所述蛋白酶体抑制剂是Bortezomib;所述药物是治疗结肠癌、脑星形胶质母细胞瘤、肝癌或肺癌的药物。

5. 根据权利要求4所述的联合用药物,其特征在于:所述蛋白质与蛋白酶体抑制剂的摩尔比为:蛋白质 0.1~100份,蛋白酶体抑制剂5~50份。

6. 根据权利要求5所述的联合用药物,其特征在于:所述蛋白质与蛋白酶体抑制剂的摩尔比为:蛋白质 0.5~100份,蛋白酶体抑制剂25~50份。

7. 一种蛋白聚乙二醇结合物,其特征在于:它由聚乙二醇对氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示蛋白进行单点修饰得到,其中,每个蛋白分子上共价结合一个聚乙二醇分子,聚乙二醇分子的分子量为5000~20000Da;

所述结合物按照如下方法制备:

1) 取氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示蛋白,制成浓度为5.5mg/ml的蛋白溶液,透析于包含50mM NaAc-HAc和40 $\mu$ M硫酸锌的醋酸盐缓冲液中,所述缓冲液的pH为5.0,透析过夜后加入2M硼氢化钠溶液至终浓度为20mM;

2) 加入聚乙二醇,所述聚乙二醇的量为蛋白摩尔量的5倍,反应12h,反应温度为4 $^{\circ}$ C;

3) 分离纯化,即可;

步骤(2)中,所述聚乙二醇为mPEG-丁醛;

步骤(3)中,采用阳离子交换柱分离纯化。

8. 根据权利要求7所述结合物,其特征在于:所述聚乙二醇分子的分子量为10000~20000Da。

9. 一种制备权利要求7或8所述蛋白聚乙二醇结合物的方法,其特征在于:包括如下步骤:

1) 取氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示蛋白,制成浓度为5.5mg/ml的蛋白溶液,透析于包含50mM NaAc-HAc和40 $\mu$ M硫酸锌的醋酸盐缓冲液中,所述缓冲液的pH为5.0,透析过夜后加入2M硼氢化钠溶液至终浓度为20mM;

2) 加入聚乙二醇,所述聚乙二醇的量为蛋白摩尔量的5倍,反应12h,反应温度为4 $^{\circ}$ C;

3) 分离纯化,即可;

步骤(2)中,所述聚乙二醇为mPEG-丁醛;

步骤(3)中,采用阳离子交换柱分离纯化。

10. 权利要求7或8所述蛋白聚乙二醇结合物在制备治疗肿瘤的药物中的用途;所述治疗肿瘤的药物是治疗结肠癌、脑星形胶质母细胞瘤、肝癌或肺癌的药物。

## 一种重组TRAIL蛋白及其制备方法和用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种重组TRAIL蛋白及其制备方法和用途。

### 背景技术

[0002] 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TNF related apoptosis-inducing ligand, TRAIL), 又称凋亡素2配体, 是近几年发现的可诱导肿瘤细胞凋亡的TNF家族成员, 其通过与不同受体的结合, 发挥对肿瘤细胞的选择性杀伤作用。TRAIL的膜受体共有四类, 包括DR4、DR5、DcR1和DcR2, 其中, DR4和DR5是死亡受体(death receptor), 高表达于肿瘤细胞, 其分子内含有死亡结构域, 当TRAIL与其结合后, 会通过其死亡结构域传递信号而诱导细胞凋亡; DcR1和DcR2为诱骗受体(decoy receptor), 高表达于正常细胞, 其同样具有结合TRAIL的能力, 但分子内不含死亡结构域, TRAIL与其结合后不能够向胞内传递死亡信号而诱导细胞凋亡。因此, TRAIL具有对肿瘤的选择性杀伤作用, 是一种优良的抗肿瘤药物。

[0003] 目前, 已有关于重组TRAIL的研究, 但是它们存在不稳定、半衰期短的问题。

### 发明内容

[0004] 为了解决上述问题, 本发明提供了一种新的重组恒河猴TRAIL蛋白(mmTRAIL)及其PEG修饰结合物。

[0005] 本发明核酸片段, 其核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示。

[0006] 本发明重组载体, 它包含核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示的核酸片段。优选地, 所述的重组载体是重组pQE30质粒。

[0007] 本发明重组菌, 它包含前述重组载体。优选地, 所述的重组菌为重组大肠杆菌。

[0008] 本发明蛋白质, 它由核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示核酸片段编码。

[0009] 其中, 其氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0010] 本发明种制备前述蛋白质的方法, 其特征在于: 包含如下步骤:

[0011] i、取前述的重组菌, 接种到培养基上培养至菌液 $OD_{600}=0.1\sim 1$ ;

[0012] ii、加入诱导剂, 诱导培养6~20h, 离心, 收集菌体, 裂解, 收集上清, 分离纯化, 即可。

[0013] 步骤i中, 所述培养基为LB培养基; 培养的温度为 $37^{\circ}\text{C}$ ; 接种后, 培养至菌液 $OD_{600}=0.5$ 。

[0014] 步骤ii中, 所述诱导剂为 $0.05\sim 0.15\text{mM}$  IPTG以及 $100\sim 300\mu\text{M}$ 的 $\text{ZnSO}_4$ ; 所述诱导培养的温度为 $28^{\circ}\text{C}$ 。优选地, 步骤ii中, 所述诱导剂为 $0.1\text{mM}$  IPTG以及 $200\mu\text{M}$ 的 $\text{ZnSO}_4$ 。

[0015] 步骤ii中, 所述分离纯化采用凝胶层析, 其中, 洗涤液是含有 $300\text{mM}$  NaCl、和 $40\text{mM}$ 咪唑的溶液, 洗脱液是含有 $300\text{mM}$  NaCl和 $300\text{mM}$ 咪唑的溶液。

[0016] 本发明提供了前述的蛋白质在制备治疗肿瘤的药物中的用途。

[0017] 其中, 所述治疗肿瘤的药物是治疗结肠癌、脑星形胶质母细胞瘤、肝癌或肺癌的药物。

[0018] 本发明还提供了前述的蛋白质与蛋白酶体抑制剂在制备治疗肿瘤的联合用药物中的用途。

[0019] 其中,所述蛋白酶体抑制剂是Bortezomib。

[0020] 蛋白酶体(proteasomes)是在真核生物和古菌中普遍存在的,在一些原核生物中也存在的一种巨型蛋白质复合物,主要作用是降解细胞不需要的或受到损伤的蛋白质,而蛋白酶体抑制剂即与蛋白酶体结合使其失去活性的物质。

[0021] Bortezomib是一种蛋白酶体抑制剂。

[0022] 所述蛋白质与蛋白酶体抑制剂的摩尔比为:蛋白质0.1~100份,蛋白酶体抑制剂5~50份。优选地,所述蛋白质与蛋白酶体抑制剂的摩尔比为:蛋白质0.5~100份,蛋白酶体抑制剂25~50份。

[0023] 本发明联合用药物,它包含不同规格的单位制剂,用于同时、分别或者依次给前述的蛋白质与蛋白酶体抑制剂,以及药学上可接受的载体。

[0024] 其中,所述蛋白酶体抑制剂是Bortezomib。

[0025] 其中,所述蛋白质与蛋白酶体抑制剂的摩尔比为:蛋白质0.1~100份,蛋白酶体抑制剂5~50份。优选地,所述蛋白质与蛋白酶体抑制剂的摩尔比为:蛋白质0.5~100份,蛋白酶体抑制剂25~50份。

[0026] 一种蛋白聚乙二醇结合物,它由聚乙二醇对前述蛋白进行单点修饰得到,其中,每个蛋白分子上共价结合一个聚乙二醇分子,聚乙二醇分子的分子量为5000~20000Da。

[0027] 所述聚乙二醇为mPEG-丁醛。

[0028] 所述聚乙二醇分子的分子量为10000~20000Da。

[0029] 一种制备前述蛋白聚乙二醇结合物的方法,其特征在于:包括如下步骤:

[0030] 1)取前述蛋白,制成浓度为1~10mg/ml的蛋白溶液,透析于包含50mMNaAc-HAc、30%(v/v)甘油和40 $\mu$ M硫酸锌的醋酸盐缓冲液中,所述缓冲液的pH为5.0,透析过夜后加入2M硼氢化钠溶液至终浓度为20mM;

[0031] 2)加入聚乙二醇,所述聚乙二醇的量为蛋白摩尔量的1~10倍,反应6~18h,反应温度为2~10 $^{\circ}$ C;

[0032] 3)分离纯化,即可。

[0033] 步骤(1)中,所述蛋白溶液的浓度为5.5mg/ml。

[0034] 步骤(2)中,所述聚乙二醇为mPEG-丁醛;所述蛋白与聚乙二醇摩尔比为1:5;所述反应的时间为12h,反应温度为4 $^{\circ}$ C。

[0035] 步骤(3)中,采用阳离子交换柱分离纯化。

[0036] 本发明还提供了前述蛋白聚乙二醇结合物在制备治疗肿瘤的药物中的用途。其中,所述治疗肿瘤的药物是治疗结肠癌、脑星形胶质母细胞瘤、肝癌或肺癌的药物。

[0037] 本发明重组蛋白抗肿瘤效果明显,其与蛋白酶体抑制剂联合使用可以发挥协同增效的作用,治疗肿瘤的效果优良,同时,其经PEG修饰得到单点修饰的PEG结合物,抗肿瘤活性高,稳定性强,体内半衰期长,既能方便使用,降低使用成本,也提高了使用安全性,具有极好的市场前景。

## 附图说明

- [0038] 图1mmTRAIL基因扩增。(M:DNA分子量标准1:mmTRAIL PCR产物)
- [0039] 图2pQE30-mmTRAIL质粒的双酶切鉴定。(M:DNA分子量标准;1:质粒酶切产物)
- [0040] 图3mmTRAIL在大肠杆菌M15中的诱导表达及纯化。
- [0041] (M:蛋白分子量标准;1:诱导前细菌总蛋白;2:诱导后细菌总蛋白;3:破菌上清蛋白;4:破菌沉淀蛋白;5:纯化后蛋白;6:Western blot。
- [0042] 图4 mmTRAIL蛋白凝胶过滤层析
- [0043] 图5 mmTRAIL对肿瘤细胞和正常细胞的杀伤作用比较
- [0044] 图6 mmTRAIL与Bortizomib对肿瘤细胞杀伤的协同作用
- [0045] 图7 Annexin V/PI检测细胞细胞凋亡(图中数字为阳性细胞百分率)
- [0046] 图8 Caspase抑制剂对mmTRAIL和hTRAIL杀伤活性的抑制
- [0047] 图9 mmTRAIL瘤内注射抗肿瘤效果
- [0048] 图10静脉注射和腹腔注射mmTRAIL的抗肿瘤效果比较
- [0049] 图11不同剂量mmTRAIL抗肿瘤效果比较
- [0050] 图12 SDS-PAGE (A) 和HPLC (B) 分析不同PEG修饰mmTRAIL的分子量
- [0051] 图13 PEG修饰对mmTRAIL活性和稳定性的影响
- [0052] 图14 PEG修饰对mmTRAIL药代动力学的影响
- [0053] 图15不同PEG修饰mmTRAIL抗肿瘤效果比较
- [0054] 图16 mmTRAIL-10K抗肿瘤作用的剂量依赖性

### 具体实施方式

[0055] 以下通过实施例形式的具体实施方式,对本发明的上述内容作进一步的详细说明。但不应将此理解为本发明上述主题的范围仅限于以下的实施例。凡基于本发明上述内容所实现的技术均属于本发明的范围。

[0056] 实施例1mmTRAIL蛋白编码基因的克隆

[0057] 1) 恒河猴RNA的提取

[0058] 抽取健康恒河猴静脉血,加入装有适量密度梯度分离液的离心管中,室温400g离心30min。将外周血单个核细胞收集于新离心管中,再加入0.83%NH<sub>4</sub>Cl,室温静置5min,去除残留的红细胞。细胞用磷酸盐缓冲液(50mM,pH7.4)洗涤两次,悬浮于含有100U/ml青霉素,100mg/ml链霉素,10%胎牛血清的1640培养基,使其细胞密度为10<sup>6</sup>个/毫升。向细胞中加入5μg/ml的ConA刺激培养2天。收集细胞,向10<sup>7</sup>个细胞中加入1~2ml的RNAiso Plus裂解液。待细胞充分裂解后,12,000g4℃离心5min,弃沉淀。上清中加入RNAiso Plus液1/5体积的氯仿,剧烈振荡15秒。待溶液充分乳化后,室温静置5分钟,12,000g4℃离心15分钟。上清中再加入等体积的异丙醇,颠倒混匀,室温静置10min,12,000g4℃离心10min,收集沉淀并用1ml75%乙醇洗涤。12,000g4℃离心5min收集沉淀,室温干燥2~5分钟,再加入适量RNase-free水溶解,即获得总RNA。

[0059] 2) RT-PCR扩增

[0060] 以总RNA为模板,用Promega公司提供的PrimeScript II1st Strand cDNA Synthesis Kit合成cDNA。用Vector NTI Suite6软件根据Genbank提供的mmTRAIL基因序列(XM\_001084768)设计引物。为方便将基因克隆入表达载体pQE30,引物中添加相应酶切位

点。

[0061] 上游引物序列为：

[0062] 5'-ATCAGGATCCGTGAGAGAAAGAGGTCCTCAGAGAGTAGCA-3' (含BamH I酶切位点)。

[0063] 下游引物序列为：

[0064] 5'-CATCGGTACCTTAGCCAACCAAAAAAGGCCCGAAAAAGCTG-3' (含KpnI酶切位点)。

[0065] 以合成的cDNA为模板,用高保真Pfx DNA聚合酶进行PCR扩增。首先在94℃预变性10min,再经过30个循环扩增,其中每一个循环包括94℃变性30s、55℃退火30s、以及72℃延伸30s,最后在72℃延伸10min。PCR扩增产物用2%琼脂糖凝胶电泳检测(图1)。

[0066] PCR产物经BamHI/KpnI I双酶切,然后用琼脂糖胶回收试剂盒回收DNA片段,再与经同样双酶切的pQE30质粒载体连接,连接产物转化大肠杆菌Top10菌株。通过氨苄西林(100μg/ml)抗性筛选和质粒双酶切鉴定(图2),阳性克隆进一步通过DNA序列分析进行验证。序列正确的质粒命名为pQE30-mmTRAIL。该质粒框架下表达的mmTRAIL含有6His-Tag。

[0067] mmTRAIL的核酸编码序列(SEQ ID NO:1)：

[0068] 5'-gtgagagaaagaggtcctcagagagtagcagctcacataactgggaccagaggaagaagcaacacattgtcttctccaaactccaagaatgaaaaggctctgggcccgaataaactcctgggaatcatcaaggagtgggcaattcattcctgagcaacttgcaacttgaggaatggcgaactggtcatccaagaaaagggttttactacatctattccc aaacatactttcgatttcaggaggaaataaaagaaaacacaaagaacgacaacaaatggtccaatatatttacaatacacaagttatcctgaccctatactgctgatgaaaagcgtagaaaagtgttggtctaaagatgcagaatacggactctattccatctatcaagggggattatttgagcttaagaaagatgacagaatTTTTGTTTCTGTAACAAATGAGC acttgatagacatggaccatgaagccagctTTTTCGGGCCTTTTGGTTGGC-3'

[0069] 实施例2mmTRAIL蛋白的重组表达和分离纯化

[0070] 1、制备方法

[0071] 提取实施例1制备的pQE30-mmTRAIL质粒,加入大肠杆菌M15感受态细胞中,用热冲击法进行转化,转化产物用含氨苄西林(100μg/ml)和卡那霉素(30μg/ml)的LB固体平板进行筛选。挑取阳性克隆接种于5ml LB液体培养基(含氨苄西林100μg/mL,卡那霉素30μg/ml)中,37℃震荡培养过夜。过夜培养菌按照1:1000比例接种到新鲜的LB培养液中,继续培养至菌液A<sub>600</sub>达到0.5左右,加入0.1mM IPTG,200μM ZnSO<sub>4</sub>于28℃诱导过夜。

[0072] 7000g离心10min收集菌体,每升发酵液获得的菌体用20-30ml裂解液(50mM磷酸盐缓冲液,pH8.0,300mM NaCl,20mM咪唑)重悬,再加入1mM PMSF,10mMβ-巯基乙醇。冰浴条件超声破菌(功率300-400W,工作10s间隔50s)。超声过程中,不定时取样观察破菌液浊度变化,直至A<sub>600</sub>基本不变为止。超声破菌完成后,样品于4℃,20000g离心15min,共4次,收集破菌上清。将适量Ni-NTA凝胶加入上清液中,4℃缓慢振荡结合3h。然后将凝胶装柱,再用洗涤液(50mM磷酸盐,pH8.0,300mM NaCl,40mM咪唑)冲洗30倍柱体积以上,再用洗脱液(50mM磷酸盐,pH8.0,300mM NaCl,300mM咪唑)洗脱,按1ml每管进行收集。纯化后的mmTRAIL,用透析液(137mM NaCl,10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,2.68mM KCl,2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,20μM ZnSO<sub>4</sub>)按1:100体积比于4℃透析过夜。

[0073] 2、检测方法

[0074] 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳及Western blot为常规方法,具体方法参考Wan等的描述(Wan L,Zhu S,Li Y,Liu S,Yang H,Li S,Li Y,Cheng J,Lu X..Appl

Microbiol Biotechnol.2011;91(3):543-51);高效液相色谱凝胶过滤柱superdex G7510/300GL(GE Healthcare)用平衡液(68.4mM NaCl,1.4mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,68mM KCl,20mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,20uM ZnSO<sub>4</sub>,pH7.6)平衡,然后将蛋白样品进行分析。

[0075] 3、检测结果

[0076] 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测显示,纯化获得的蛋白分子量大约为20KD,与mmTRAIL理论分子量一致。由于在pQE30-mmTRAIL质粒上表达的mmTRAIL含有His-Tag,因此,用抗His-Tag抗体western blot可判断表达蛋白是否为目的蛋白。Western blot显示的条带与SDS-PAGE显示的条带相同,进一步证明该蛋白为mmTRAIL(图3),说明本发明获得了mmTRAIL;

[0077] 高效液相色谱凝胶过滤柱结果显示,mmTRAIL在凝胶过滤柱上显示为单峰(图4),说明获得了mmTRAIL蛋白纯品。

[0078] mmTRAIL的氨基酸序列(SEQ ID NO:2):

[0079] NH<sub>2</sub>-VRERGPQRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFLSNLHLRNGELVIQE KGFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIQGGLFELKKDDR IFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVG-COOH

[0080] 实施例3mmTRAIL蛋白体外对肿瘤细胞的杀伤作用

[0081] 肿瘤细胞株:

[0082] Colo205细胞:结肠癌细胞;U87细胞:脑星形胶质母细胞瘤细胞;Jurkat细胞:外周血白血病T细胞;SMC-7721细胞:肝癌细胞;M14:黑色素瘤细胞;SW620细胞:结肠癌细胞;PLC细胞:肝癌细胞;A549:肺腺癌细胞;HEP3B细胞:肝癌细胞。

[0083] 1)mmTRAIL单独使用对敏感肿瘤细胞的杀伤作用

[0084] 实验方法:

[0085] 细胞培养在含10%小牛血清、2mM L-谷氨酰胺、100μg/ml链霉素和100U/ml青霉素的RPMI1640中于37℃,5%CO<sub>2</sub>条件下培养。将1×10<sup>4</sup>个细胞(100μl)接种于96孔板中贴壁过夜,然后将培养基换为含2%小牛血清的1640培养基,同时加入不同浓度(0、0.1、0.25、0.5、1、2.5、5、10和25nM)实施例2获得的mmTRAIL蛋白,作用过夜后,加入10μl CCK-8溶液,反应2-4h后用酶标仪测定495nm吸光值。以未经蛋白处理的细胞存活率为100%来计算蛋白处理组细胞存活率。对于非贴壁细胞,将50μl细胞(10<sup>4</sup>个)接种于96孔板中,再加入50μl不同浓度(0、0.2、0.5、1、2、5、10、20和50nM)的mmTRAIL蛋白,作用过夜后用CCK-8测定细胞存活率。

[0086] 实验结果:

[0087] 结果如图5所示,随着蛋白浓度提高,mmTRAIL对肿瘤细胞的毒性逐渐增强,细胞存活率降低,其中,Colo205、U87和Jurkat三种细胞对mmTRAIL蛋白均较敏感,1nM蛋白显示的杀伤率达到90%以上,其它肿瘤细胞,如SMC-7721、M14对蛋白的敏感性略低,但5-10nM蛋白的杀伤率也可以达到70-90%。而正常人支气管上皮细胞(Bea-2b)对蛋白不敏感。即便当蛋白浓度高达100nM,细胞的死亡率也只有10%左右。

[0088] 这些结果表明,mmTRAIL可以选择性杀伤肿瘤细胞,如,结肠癌、脑星形胶质母细胞瘤、肝癌或肺癌,而不影响正常细胞。

[0089] 2)mmTRAIL蛋白与Bortezomib联合使用对抗性肿瘤细胞的杀伤作用

[0090] 实验方法:

[0091] 将SW620,PLC,A549,HEP3B置于含10%小牛血清、100U/ml青霉素、100g/ml链霉素的RPMI1640培养液中,在37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下培养。1×10<sup>4</sup>个细胞接种于96孔板中贴壁过夜后,用含有不同浓度(0、5、12.5、25、50nM)的Bortezomib和不同浓度的(0、0.1、0.5、1、10、50、100nM)mmTRAIL联合作用过夜,用CCK-8测定细胞存活率。

[0092] 实验结果:

[0093] 结果如图6所示:

[0094] 单独的mmTRAIL对这些细胞的杀伤作用均较弱,最高浓度(100nM)蛋白的细胞杀伤率低于30%;而单独的Bortezomib在浓度低于50nM条件下对这些细胞也无明显杀伤作用,致死率在20%以内。

[0095] 但是,当Bortezomib和mmTRAIL联合使用时,对SW620、A549、PLC和HEP3B细胞的杀伤率显著增加,其中,mmTRAIL浓度为0.5~100nM,Bortezomib浓度为25~50nM时,效果较佳。

[0096] 实验结果说明,mmTRAIL与Bortezomib联合使用,可以发挥协同增效的作用,治疗肿瘤的效果优良。

[0097] 综上,本发明mmTRAIL蛋白可以在体外有效抑制肿瘤细胞的增殖,可以制备成为抗肿瘤药物,同时,与Bortezomib联合使用具有协同增效的作用,二者可以制备成为联合用药物。

[0098] 实施例4mmTRAIL(实施例2制备)体外杀伤肿瘤细胞的机制

[0099] 1) Annexin V/PI染色显示和检测细胞凋亡

[0100] Colo205细胞经5nM mmTRAIL处理2h并用Annexin V/PI双染色。根据着色原理,Annexin V+PI-显示凋亡早期细胞,Annexin V+PI+显示凋亡晚期或坏死细胞,Annexin V-PI-细胞则被认为是活细胞。流式细胞术分析发现,随着蛋白浓度增加,凋亡早期细胞逐渐增多,而凋亡晚期/坏死细胞(Annexin V+PI+)变化不明显。

[0101] 细胞经0,1,2.5,10nM mmTRAIL处理后,凋亡早期和凋亡晚期细胞百分比分别为4.37/1.23,17.21/1.95,69.4/0.91,84.66/3.36(图7)。结果说明,mmTRAIL的主要作用是诱导细胞凋亡。

[0102] 2) Caspase在mmTRAIL诱导细胞凋亡中的作用

[0103] Z-VAD-FMK是一种具有细胞通透性的广谱Caspase抑制剂,以不可逆的形式与活化的Caspase结合。如果Caspase参与了mmTRAIL诱导的细胞凋亡,在杀伤体系中添加Caspase抑制剂可能阻断细胞凋亡。本实验先用不同浓度(0-25μM)的Z-VAD-FMK与Colo205细胞孵育2h,再加入0.25nM的mmTRAIL,继续作用20h后,用CCK-8测定细胞存活率。

[0104] 结果如图8A所示,在无Z-VAD-FMK抑制剂的情况下,0.25nM mmTRAIL作用后的细胞存活率仅为15%左右。随着Caspase抑制剂浓度的增高,细胞存活率逐渐增加。当Caspase抑制剂浓度提高到25μM时,细胞存活率达到90%以上。这说明Caspase参与了mmTRAIL诱导的肿瘤细胞凋亡。

[0105] 为进一步确定哪些种类的Caspase参与mmTRAIL诱导的细胞凋亡,我们进一步用特异底物检测了蛋白处理Colo205后Caspase3、8和9活性的变化。结果如图8B所示,用2.5nM的mmTRAIL处理细胞2h后,三种Caspase酶活性均有所增强。结果,三种Caspase均参与了mmTRAIL诱导的细胞凋亡。



[0106] 实验结果说明,mmTRAIL可以通过诱导肿瘤细胞凋亡,治疗肿瘤疾病。

[0107] 实施例5mmTRAIL蛋白(实施例2制备)体内抗肿瘤效果

[0108] 1) 瘤内注射mmTRAIL的抗肿瘤作用

[0109] 体内实验使用的蛋白均通过金斯瑞公司的去内毒素试剂盒去除内毒素。将 $1.5 \times 10^6$ 个结肠癌细胞Co1o205接种于裸鼠(BALB/c nu/nu mice,雌性)右侧后肢皮下,共24只,随机平均分成3组。待肿瘤平均体积达到 $150\text{mm}^3$ 时,实验组通过瘤内注射分别给予 $15\text{mg/kg}$ 和 $30\text{mg/kg}$  mmTRAIL蛋白,连续给药5天。对照组给予相同体积的磷酸盐缓冲液PBS( $50\text{mM}$ 磷酸盐, $150\text{mM}$ NaCl,pH7.4)。给药后定期用游标卡尺测量肿瘤的长短径,按体积=长径 $\times$ 短径 $\times$ 短径 $\times 0.5$ 计算瘤体大小。

[0110] 结果如图9所示,PBS对照组的肿瘤生长快速,细胞接种后20天,肿瘤平均体积为 $815 \pm 182\text{mm}^3$ 。此后,对照组裸鼠陆续死亡或因肿瘤溃烂而被处死。而给与蛋白的两组裸鼠肿瘤生长迅速受到抑制,体积逐渐变小,到第20天时所有裸鼠的瘤体消失(肉眼未观察到皮下突起)。直至第49天时, $15\text{mg/kg}$ 蛋白处理组共有两只裸鼠再次发生肿瘤,但肿瘤生长缓慢;而 $30\text{mg/kg}$ 处理组所有裸鼠一直维持无瘤状态。结果表明,瘤内注射mmTRAIL具有抗肿瘤作用。

[0111] 2) 腹腔和静脉注射mmTRAIL的抗肿瘤效果

[0112] 将约 $1.5 \times 10^6$ 个Co1o205细胞( $100\mu\text{l}$ )接种于裸鼠右后肢皮下,共24只,随机平均分成3组。接种后第二天通过腹腔或静脉注射给药,剂量为 $40\text{mg/kg}$ ,连续给药4次,间隔两天之后再连续给药4次。对照组给予相同体积的PBS。每两天测量肿瘤大小,统计肿瘤发生率并记录肿瘤生长状况。

[0113] 结果如图10所示,PBS组裸鼠肿瘤生长迅速,接种5天后全部成瘤,第24天时肿瘤平均体积为 $1106 \pm 303\text{mm}^3$ 。而腹腔和静脉注射mmTRAIL组裸鼠肿瘤的生长受到明显抑制。腹腔注射组5天时有3只发生肿瘤,但随着给药次数增多,这些肿瘤逐渐消失。30天以后,肿瘤开始复发。到实验结束是共有6只发生肿瘤。但瘤体生长缓慢,到第70天时,该组瘤体平均大小为 $170 \pm 158\text{mm}^3$ 。而尾静脉给药组仅有一只裸鼠观察结束时发生肿瘤。结果表明,尾静脉注射mmTRAIL治疗效果优于腹腔给药。

[0114] 3) 静脉注射不同剂量mmTRAIL的抗肿瘤作用

[0115] 将约 $5 \times 10^5$ 个Co1o205细胞( $100\mu\text{l}$ )接种于裸鼠右侧后肢皮下,共24只,随机平均分为3组。接种后第二天开始,静脉注射给予 $10\text{mg/kg}$ 和 $20\text{mg/kg}$ mmTRAIL进行治疗,连续给药4次。对照组给予相同体积的PBS。

[0116] 结果如图11所示,肿瘤发生率的统计发现,接种后9天,PBS对照组裸鼠全部成瘤。而不同剂量蛋白治疗组均只有1只裸鼠发生肿瘤。随着时间推移,蛋白处理组肿瘤发生率逐渐增加。但 $20\text{mg/kg}$ 处理组肿瘤发生时间晚于 $10\text{mg/kg}$ 蛋白处理组。PBS对照组肿瘤生长迅速,接种后42天,平均体积达到 $817 \pm 158\text{mm}^3$ 。蛋白处理组中, $20\text{mg/kg}$ 组肿瘤生长速度低于 $10\text{mg/kg}$ 组。接种后42天,两组肿瘤平均体积分别为 $236 \pm 88\text{mm}^3$ 和 $356 \pm 188\text{mm}^3$ 。结果说明,静脉注射给予 $20\text{mg/kg}$ 和 $10\text{mg/kg}$  mmTRAIL均显示抗肿瘤作用,蛋白剂量越大,抑制肿瘤的效果越好。

[0117] 综上,本发明mmTRAIL蛋白可以在体内有效抑制肿瘤的生长,具有良好的抑瘤效果,可以制备成为抗肿瘤药物。

[0118] 实施例6PEG修饰对mmTRAIL蛋白(实施例2制备)体内半衰期和抗肿瘤效果的影响

[0119] 1) mmTRAIL蛋白的PEG修饰

[0120] 将mmTRAIL蛋白(5.5mg/ml)透析于醋酸盐缓冲液(50mM NaAc-HAc, 30%甘油, 40 $\mu$ M硫酸锌, pH5.0), 透析过夜后加入2M硼氢化钠溶液至终浓度为20mM, 再按蛋白与PEG摩尔比1:5分别加入不同分子量(5KD, 10KD, 20KD)的mPEG-丁醛, 于4 $^{\circ}$ C轻微震荡反应12h。反应结束后, 再利用阳离子交换柱(SP Sepharose Fast Flow)吸附回收蛋白, 未偶联的PEG不能被吸附而被去除。

[0121] SDS-PAGE电泳(图12A)和HPLC凝胶过滤层析(图12B)显示, 与未经PEG修饰的mmTRAIL相比, 修饰后的mmTRAIL分子量明显增大, 且不同PEG修饰的mmTRAIL分子量明显不同。而且, 被修饰的mmTRAIL分子量均一, 提示利用mPEG-丁醛成功实现了mmTRAIL的定点修饰。为叙述方便, 本专利中将5KD, 10KD, 20KD PEG修饰的mmTRAIL分别命名为mmTRAIL-5K, mmTRAIL-10K和mmTRAIL-20K。

[0122] 2) PEG修饰对mmTRAIL体外活性和稳定性的影响

[0123] 将结肠癌细胞Co1o205细胞按每孔 $2 \times 10^4$ 个接种于96孔板中, 分别用不同浓度的mmTRAIL, mmTRAIL-5K, mmTRAIL-10K或mmTRAIL-20K作用24h, CCK-8检测并比较各组细胞存活率。

[0124] 结果如图13A所示: mmTRAIL-10K处理后的细胞, 存活曲线与mmTRAIL组几乎一致, 表明利用分子量为10KD的PEG修饰对mmTRAIL的活性几乎无影响; mmTRAIL-5K的活性比mmTRAIL略有增强, 而mmTRAIL-20K比mmTRAIL活性有所减弱, 提示20KD PEG修饰对mmTRAIL活性有不利影响。

[0125] 将mmTRAIL和mmTRAIL-10K蛋白分别用PBS稀释至100nM, 37 $^{\circ}$ C孵育, 一定时间取出样品稀释至不同浓度与细胞作用, 通过杀伤活性的变化比较蛋白的稳定性。

[0126] 结果如图13B所示, 随着孵育时间的延长, 两种蛋白活性均逐渐下降。但是, 将孵育后的蛋白稀释至2.5nM测定活性发现, mmTRAIL孵育3h, 杀伤率剩下20%。而孵育24h, 2.5nM mmTRAIL-10K的杀伤效率还有60%左右。孵育12h, 10nM mmTRAIL完全丧失活性。而孵育24h, 10nM mmTRAIL-10K还能杀伤90%的细胞。

[0127] 结果表明, PEG修饰增强了mmTRAIL的热稳定性。

[0128] 3) PEG修饰对mmTRAIL半衰期的影响

[0129] 将BALB/c小鼠分为四组, 按10mg/kg分别尾静脉注射mmTRAIL, mmTRAIL-5K, mmTRAIL-10K和mmTRAIL-20K蛋白, 相应时间点眼球取血, 肝素钠抗凝, 离心得小鼠血浆。利用含抗人TRAIL抗体的ELISA试剂盒定量测定血浆中mmTRAIL的含量。同时, 将血浆稀释不同的倍数, 用肿瘤细胞测试血浆中mmTRAIL的活性。

[0130] 结果如图14A所示, ELISA法测定显示, mmTRAIL体内半衰期介于10-15min之间。mmTRAIL-5K半衰期mmTRAIL相比, 延长1倍左右。而mmTRAIL-10K和mmTRAIL-20K半衰期没有明显差异, 是mmTRAIL半衰期的6-7倍。

[0131] 不同时间点取血浆, 稀释不同倍数后用结肠癌Co1o205细胞测定活性并绘制活性变化曲线。

[0132] 结果如图14B所示, mmTRAIL-5K活性降低速度比mmTRAIL略慢, 但差异不显著。而mmTRAIL-10K和mmTRAIL-20K的活性下降明显比mmTRAIL延缓。

[0133] 结果表明,PEG修饰可有效延长mmTRAIL体内代谢时间,其中,分子量为10KD和20KD的PEG修饰可显著延长mmTRAIL体内代谢时间。

[0134] 4) 不同PEG修饰对mmTRAIL体内抗肿瘤活性的影响

[0135] 将 $5 \times 10^5$ 个Co1o205细胞( $100\mu\text{l}$ )接种于裸鼠右后肢皮下,共40只,随机平均分为5组。接种后第6天,静脉注射给予 $10\text{mg}/\text{kg}$ 的mmTRAIL,mmTRAIL-5K,mmTRAIL-10K和mmTRAIL-20K蛋白进行治疗,只给药1次。对照组给予相同体积的PBS。

[0136] 结果如图15所示,PBS对照组肿瘤生长迅速,而各蛋白治疗组肿瘤生长均受到不同程度的明显抑制。细胞接种30天后,PBS对照组肿瘤平均体积 $958 \pm 154\text{mm}^3$ 。而mmTRAIL和mmTRAIL-5K蛋白治疗效果相似,肿瘤平均体积分别为 $208 \pm 94\text{mm}^3$ 和 $223 \pm 109\text{mm}^3$ 。mmTRAIL-20K和mmTRAIL-10K治疗组肿瘤更小,平均体积分别为 $112 \pm 98\text{mm}^3$ 和 $25.8 \pm 27\text{mm}^3$ 。蛋白治疗组延长观察至第43天,mmTRAIL和mmTRAIL-5K蛋白治疗组肿瘤平均大小分别为 $449 \pm 116\text{mm}^3$ 和 $490 \pm 110\text{mm}^3$ 。mmTRAIL-20K和mmTRAIL-10K治疗组肿瘤平均体积分别为 $318 \pm 166\text{mm}^3$ 和 $62 \pm 68\text{mm}^3$ 。

[0137] 结果表明,PEG修饰可以提高mmTRAIL的体内抗肿瘤效果,其中,10KD和20KD PEG修饰时较为显著,10KD PEG修饰的抗肿瘤效果最好。

[0138] 5) mmTRAIL-10K抗肿瘤作用的剂量依赖性

[0139] 将约 $5 \times 10^5$ 个Co1o205细胞( $100\mu\text{l}$ )接种于裸鼠右侧后肢皮下,共42只,随机平均分为6组。接种后第6天,静脉注射给予 $10\text{mg}/\text{kg}$ 的mmTRAIL或 $5\text{mg}/\text{kg}$ , $2\text{mg}/\text{kg}$ , $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 的mmTRAIL-10K蛋白进行治疗,共给药1次。对照组给予相同体积的PBS。定时测量瘤体大小并绘制肿瘤生长曲线。

[0140] 结果如图16所示,细胞接种31天后,PBS对照组和 $10\text{mg}/\text{kg}$  mmTRAIL治疗组的肿瘤平均体积分别为 $782 \pm 164\text{mm}^3$ 和 $327 \pm 183\text{mm}^3$ 。而 $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 、 $2\text{mg}/\text{kg}$ 、 $5\text{mg}/\text{kg}$ 和 $10\text{mg}/\text{kg}$  mmTRAIL-10K治疗组瘤体平均体积分别为 $851 \pm 134\text{mm}^3$ 、 $643 \pm 152\text{mm}^3$ 、 $173 \pm 71\text{mm}^3$ 和 $25 \pm 27\text{mm}^3$ 。

[0141] 结果表明, $5\text{mg}/\text{kg}$  mmTRAIL-10K的治疗效果优于 $10\text{mg}/\text{kg}$  mmTRAIL。进一步证明PEG修饰可增强mmTRAIL抗肿瘤效果。

[0142] 本发明制备分别制备得到了经5KD,10KD,20KD PEG修饰的mmTRAIL结合物,与mmTRAIL相比,它们的稳定性更强,半衰期更长,体内抑瘤效果更好,其中,以10KD和20KD PEG的修饰产物较佳。

[0143] 综上,本发明制备得到了重组蛋白mmTRAIL,其抗肿瘤效果明显,与蛋白酶体抑制剂联合使用可以发挥协同增效的作用,治疗肿瘤的效果优良,经PEG修饰得到单点修饰的PEG结合物,抗肿瘤活性高,稳定性强,体内半衰期长,既能方便使用,降低使用成本,也提高了使用安全性,应用前景良好。

[0001]

Untitled4\_ST25.txt  
SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; 四川大学华西医院

&lt;120&gt; 一种重组TRAIL蛋白及其制备方法和用途

&lt;130&gt; GY026-14P1234

&lt;150&gt; 201310311376. X

&lt;151&gt; 2013-07-23

&lt;160&gt; 4

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 504

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; mmTRAIL的核酸编码序列

&lt;400&gt; 1

```
gtgagagaaa gaggtcctca gagagtagca gctcacataa ctgggaccag aggaagaagc      60
aacacattgt cttctccaaa ctccaagaat gaaaaggctc tgggccgcaa aataaactcc      120
tgggaatcat caaggagtgg gcattcattc ctgagcaact tgcaettgag gaatggcgaa      180
ctggteatec aagaaaaggg gttttactac atctatteecc aaacatactt tegatttccag      240
gaggaaataa aagaaaacac aaagaacgac aaacaaatgg tccaatatat ttacaaatac      300
acaagttatc ctgacctat actgctgatg aaaagcgcta gaaatagttg ttggtctaaa      360
gatgcagaat acggacteta ttccatctat caagggggat tatttgagct taagaaagat      420
gacagaattt ttgtttctgt aacaaatgag cacttgatag acatggacca tgaagccagc      480
tttttcgggg cctttttggt tggc                                             504
```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 168

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; mmTRAIL的氨基酸序列

&lt;400&gt; 2

```
Val Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr
1           5           10           15
```

```
Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys
                20           25           30
```

```
Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His
```

[0002]

35

40

45

Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile Gln  
50 55 60

Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln  
65 70 75 80

Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr  
85 90 95

Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser  
100 105 110

Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser  
115 120 125

Ile Tyr Gln Gly Gly Leu Phe Glu Leu Lys Lys Asp Asp Arg Ile Phe  
130 135 140

Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser  
145 150 155 160

Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly  
165

- <210> 3
- <211> 40
- <212> DNA
- <213> PCR扩增上游引物

<400> 3  
atcaggatcc gtgagagaaa gaggtcctca gagagtagca 40

- <210> 4
- <211> 41
- <212> DNA
- <213> PCR扩增下游引物

<400> 4  
catcggtagc ttagccaacc aaaaaggecc cgaaaaagct g 41

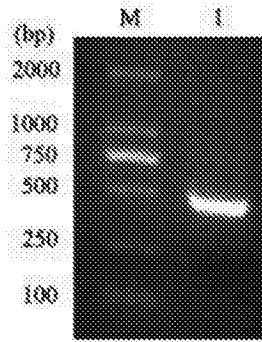


图1

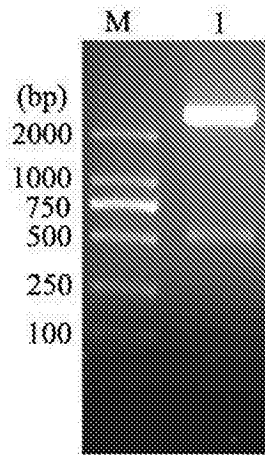


图2

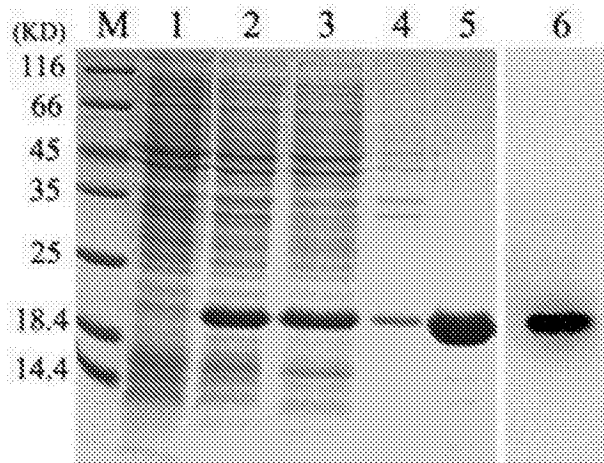


图3

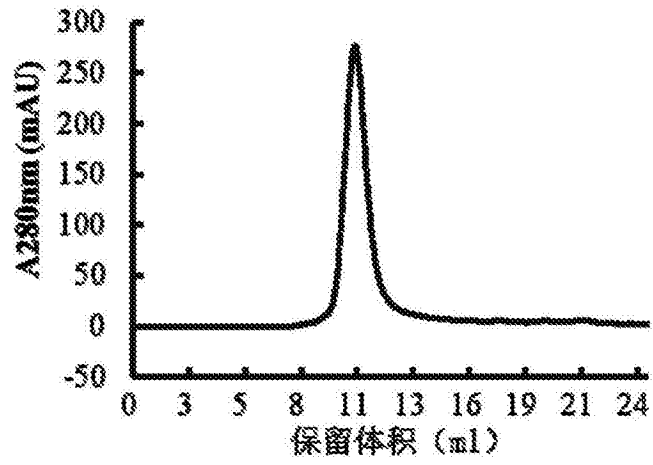
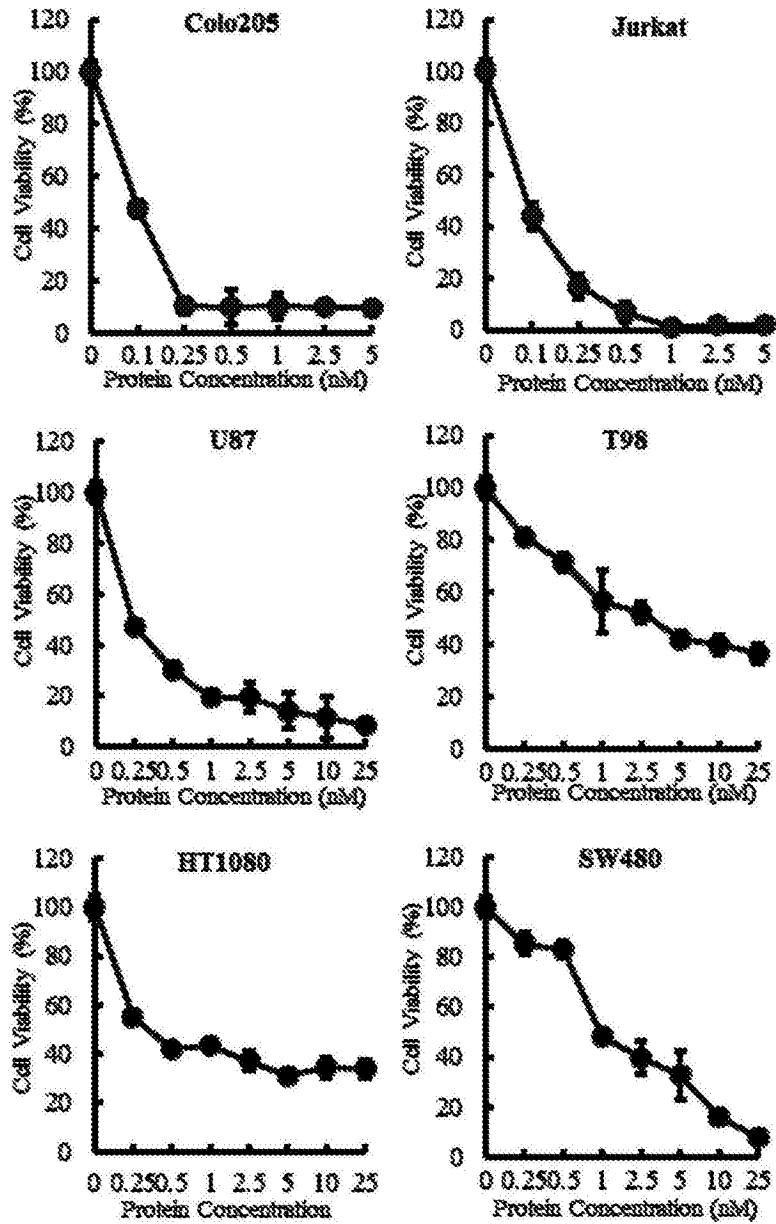


图4





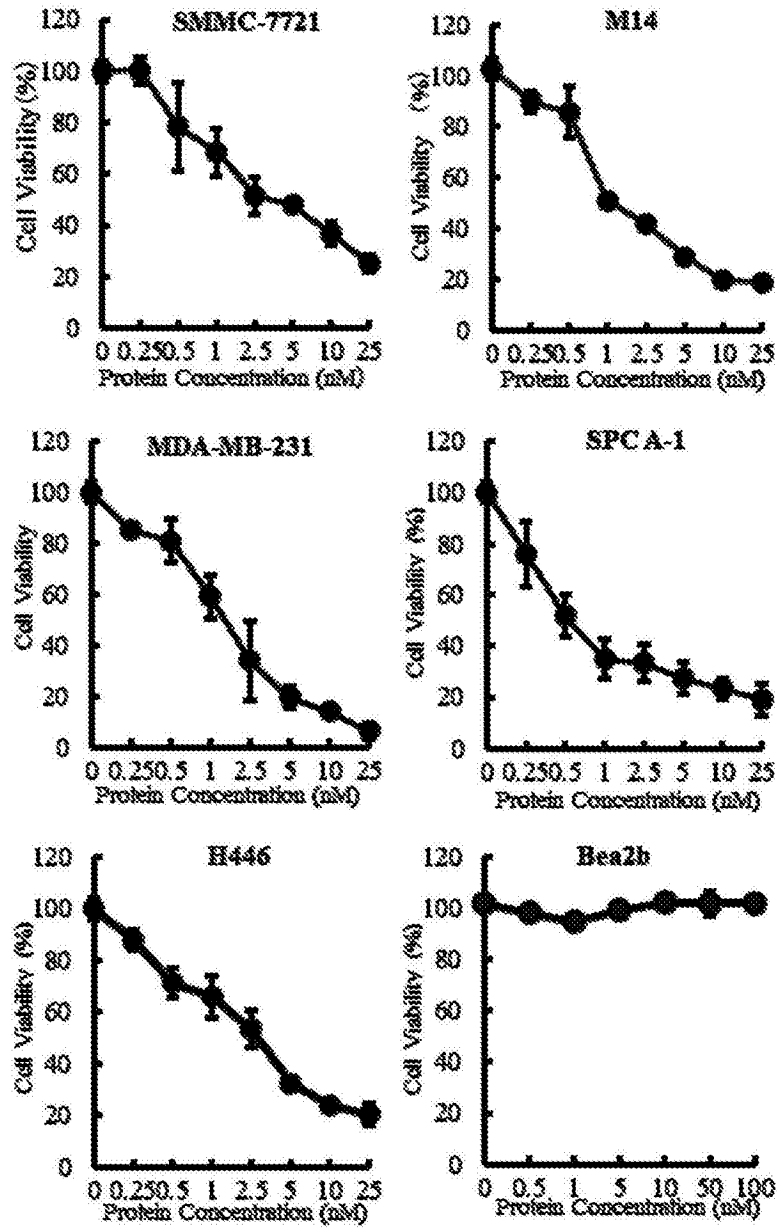


图5

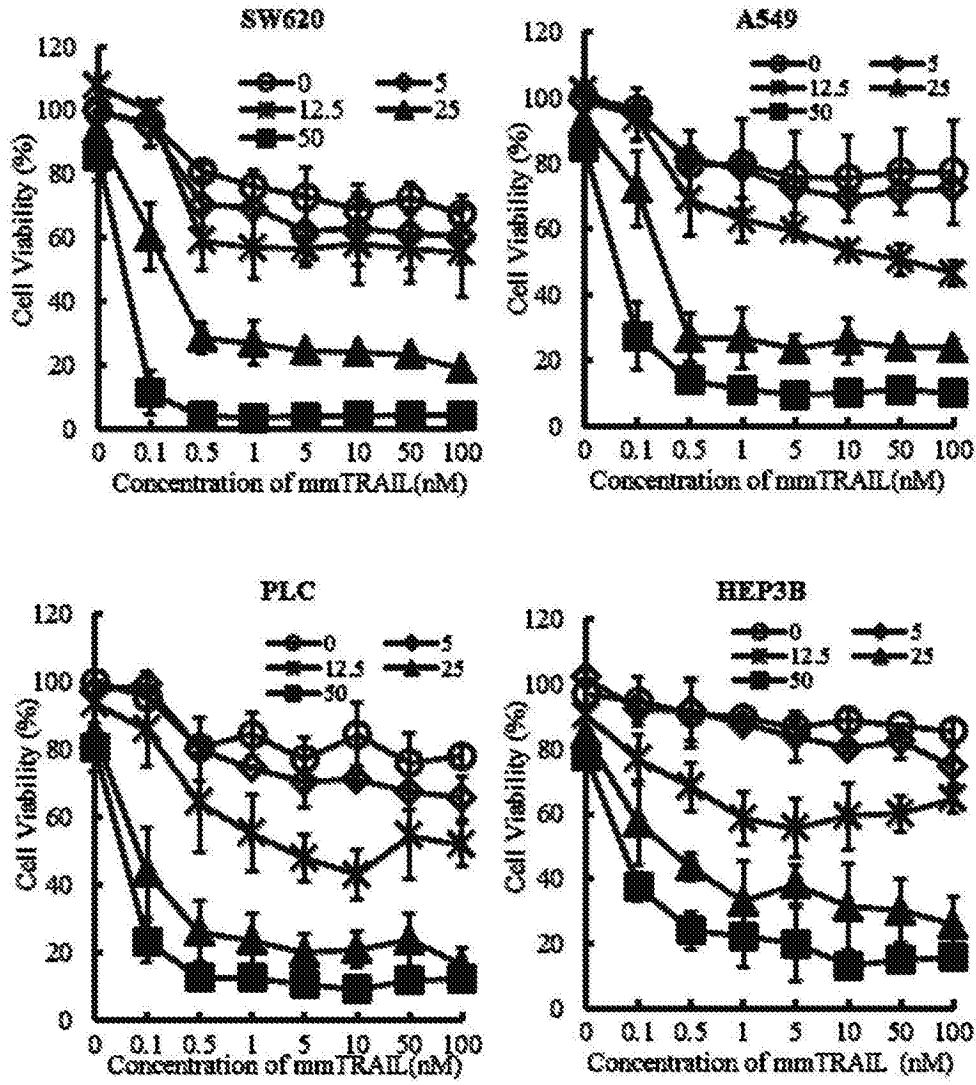


图6

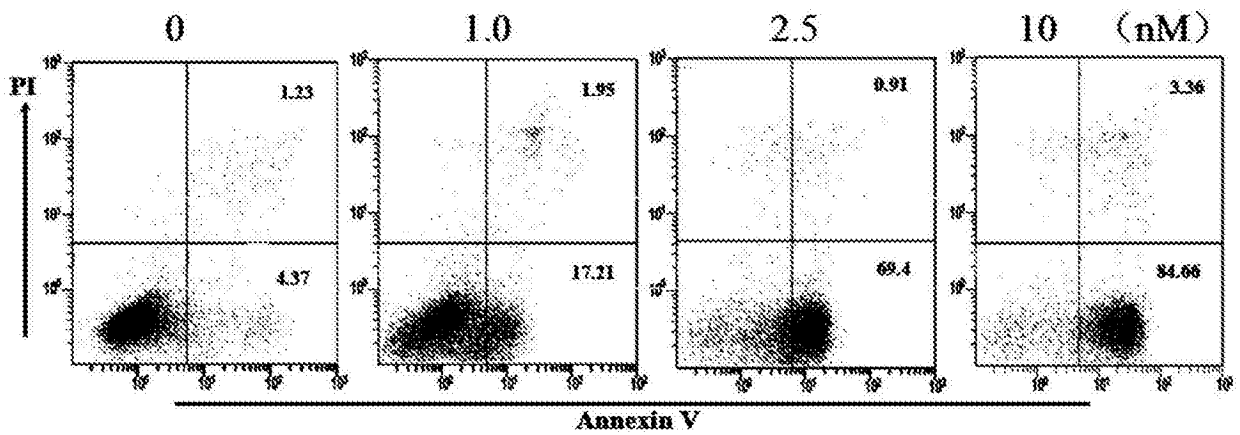


图7

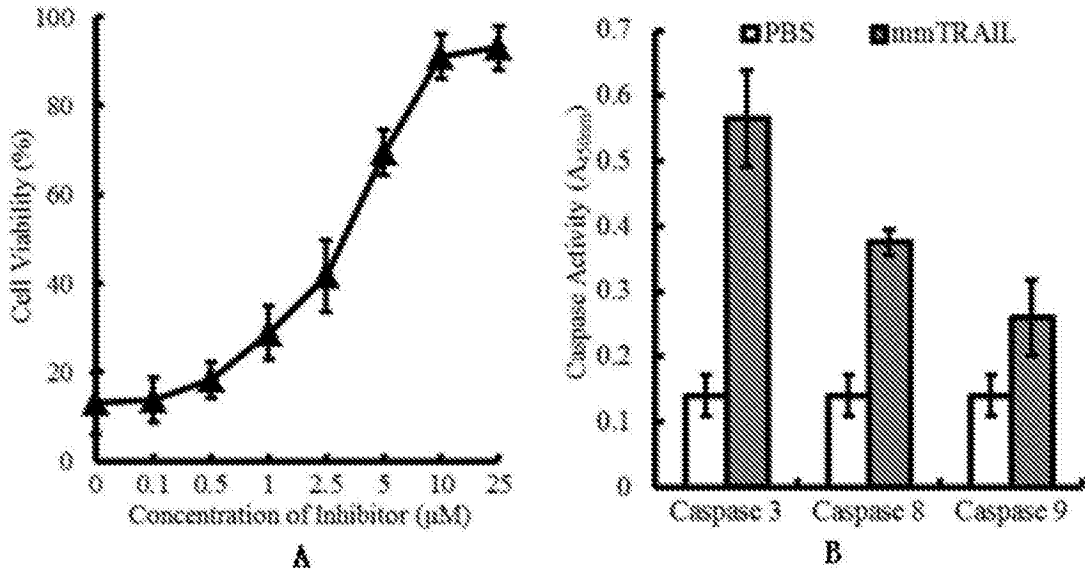


图8

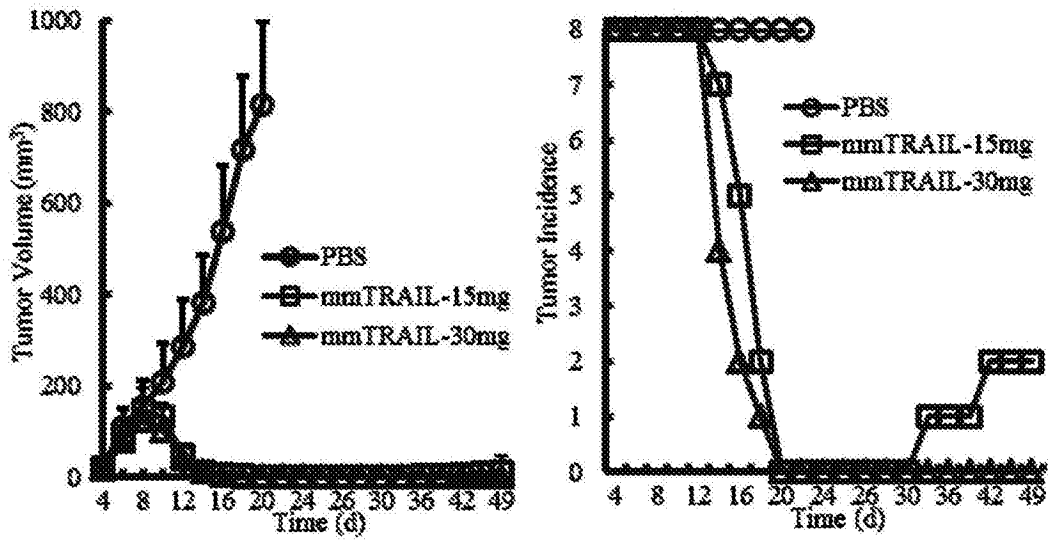


图9

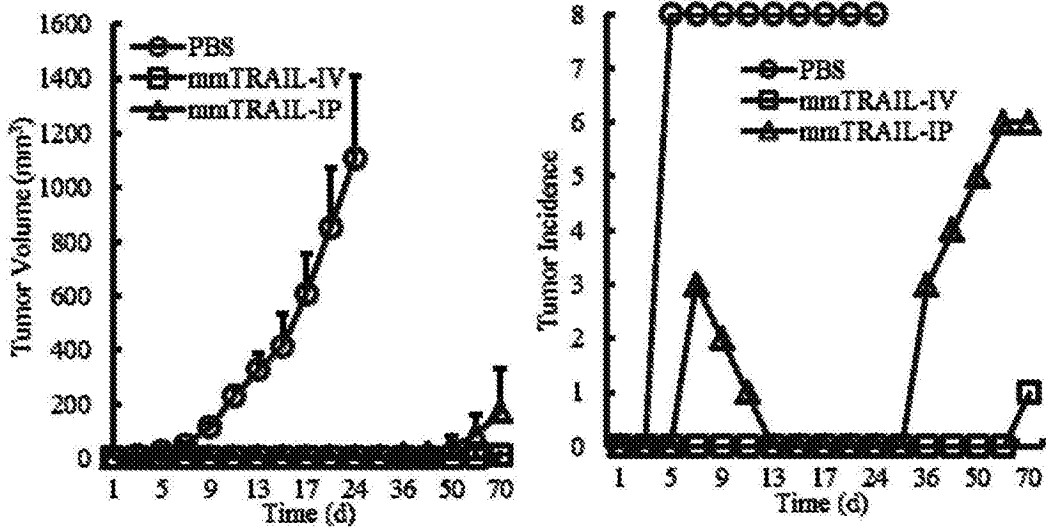


图10

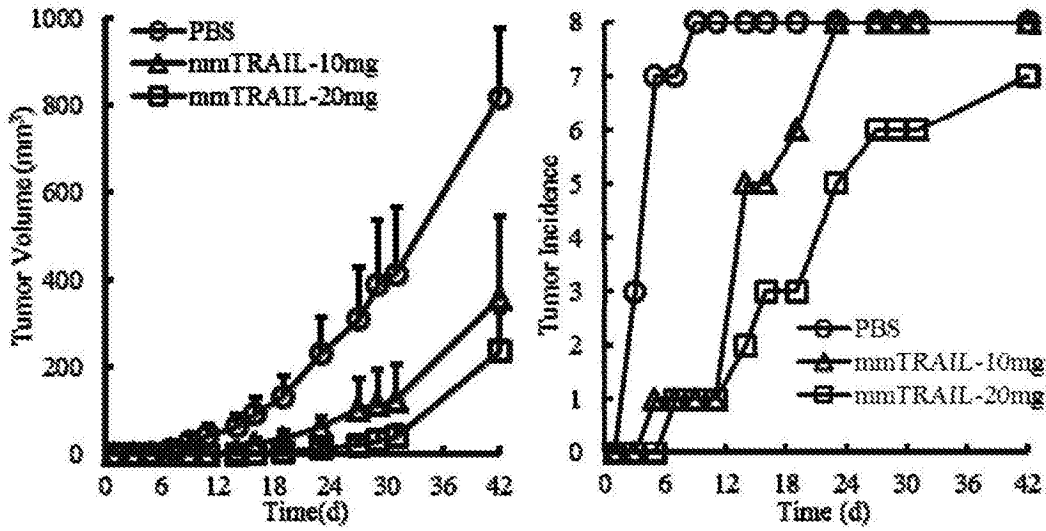


图11

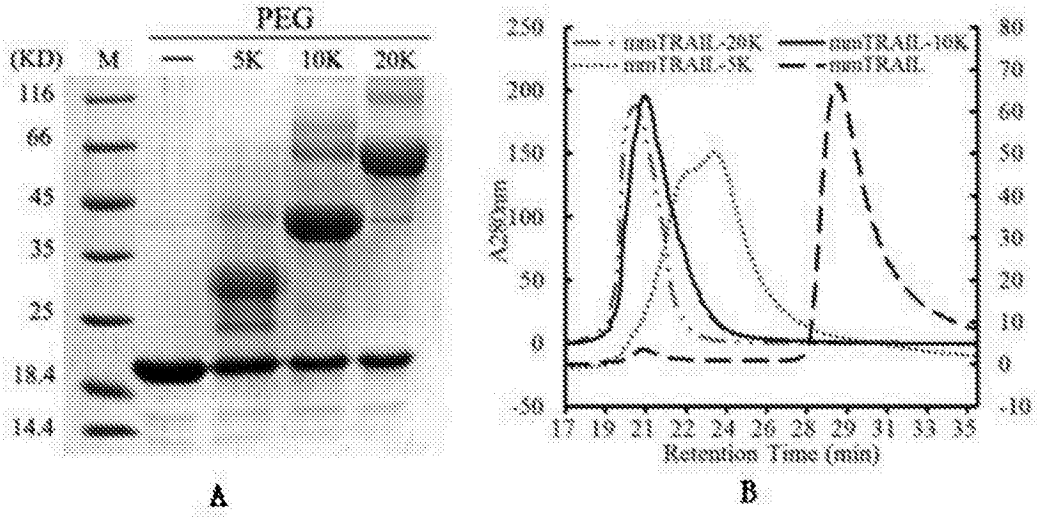


图12

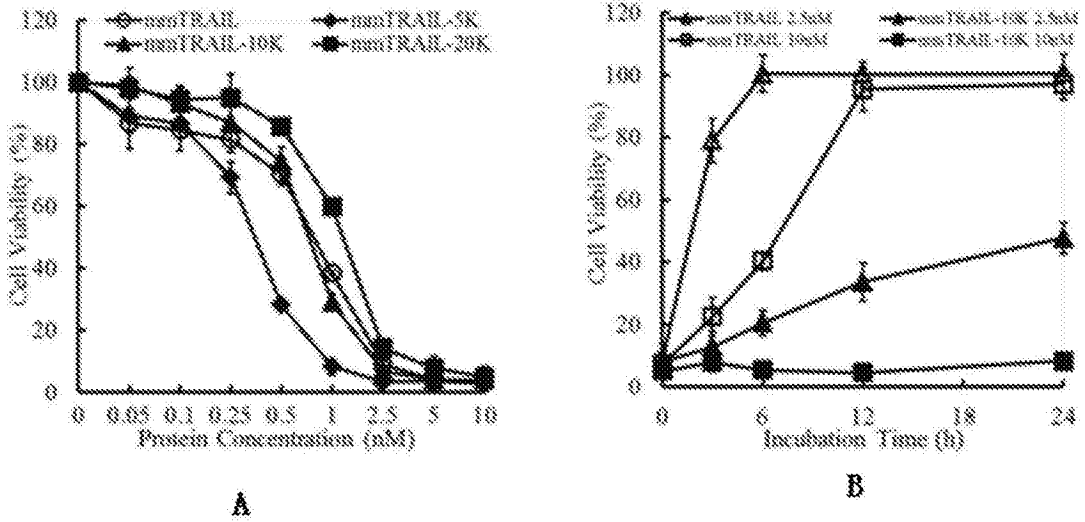


图13

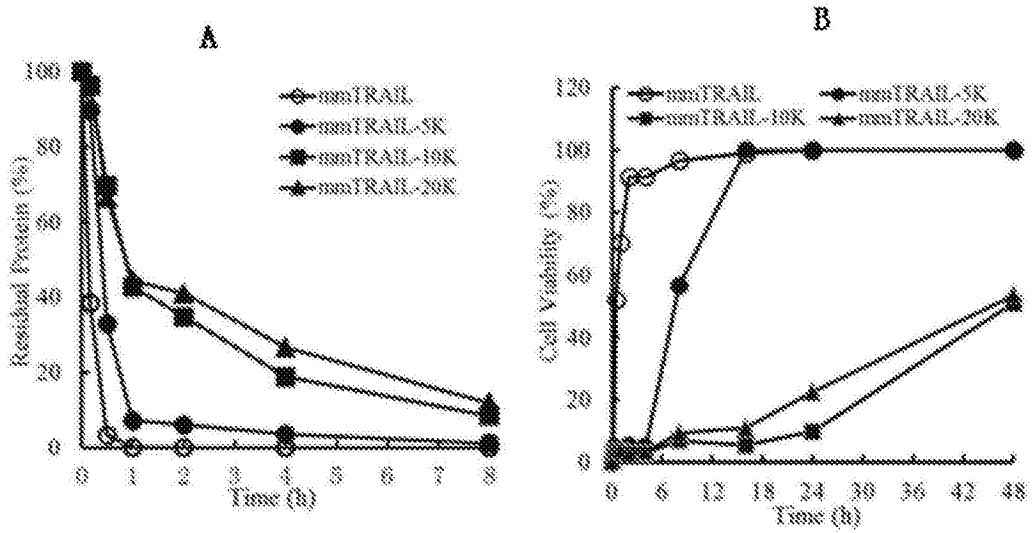


图14

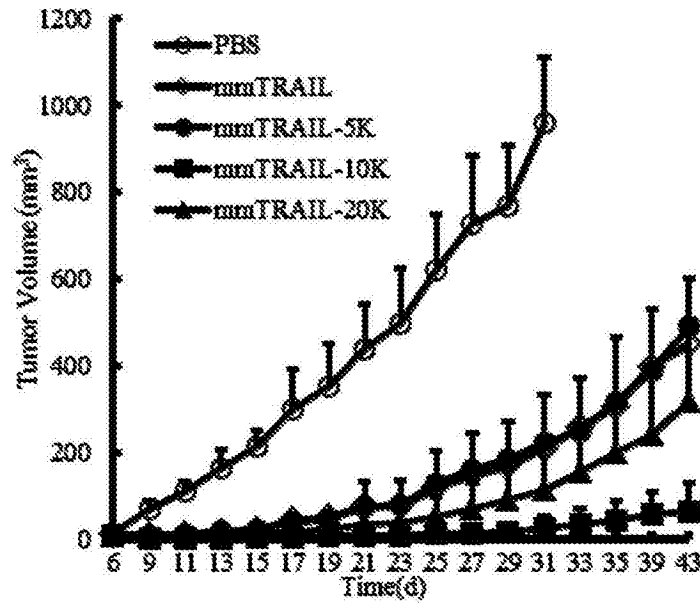


图15

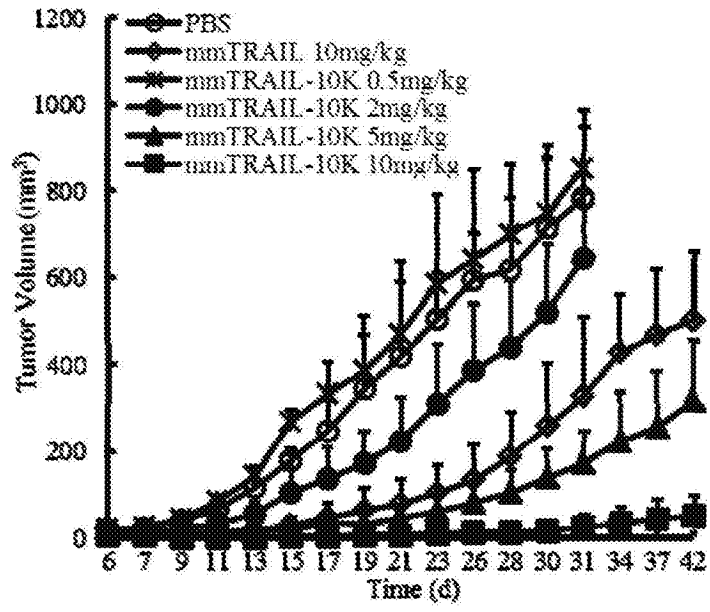


图16