



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1908015 B

(45) 授权公告日 2010.09.08

(21) 申请号 200610007523.4

(22) 申请日 2006.02.14

(66) 本国优先权数据

200510109109.X 2005.10.18 CN

(73) 专利权人 中国人民解放军军事医学科学院  
基础医学研究所

地址 100850 北京市海淀区太平路 27 号

(72) 发明人 郭宁 王嘉宁 冯健男 沈倍奋

(74) 专利代理机构 北京众合诚成知识产权代理  
有限公司 11246

代理人 李光松

(56) 对比文件

CN 1334343 A, 2002.02.06, 全文.

US 20040248151 A1, 2004.12.09, 全文.

WO 2005003156 A1, 2005.01.13, 全文.

王嘉宁综述, 郭宁审校. 抗 HER2 抗体的  
作用机制研究进展. 国外医学药学分册 30  
5. 2003, 30(5), 264-268.

钱露综述, 郭宁审阅. 原癌基因 HER2 转录  
调控的研究进展. 中国肿瘤生物治疗杂志 12  
3. 2005, 12(3), 225-228.

审查员 姜涛

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

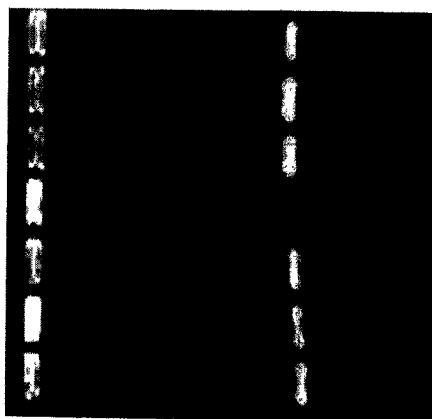
权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 3 页

(54) 发明名称

能抑制 HER2 高表达肿瘤细胞增殖的稳定的  
小分子多肽

(57) 摘要

本发明公开了属于生物医学中生物治疗范围  
的一种能抑制 HER2 高表达肿瘤细胞增殖的稳定的  
小分子多肽 PL45。该小分子多肽 PL45 为自行  
设计的靶向 HER2S1-L2 功能域的拮抗分子, 由全  
合成的基因编码, 克隆入表达质粒 pET-22b ; 同时  
将 TrxA 插入 pET-22b, 以辅助 PL45 折叠, 实现可  
溶性共表达。用表达载体转化 BL21/DE3 宿主菌,  
在 LB 培养基中培养, 1mmol · L<sup>-1</sup> IPTG 诱导表达, 破  
菌取上清, 应用 Ni 离子亲和层析柱纯化, 咪唑缓  
冲液洗脱而获得纯化蛋白。本发明采用人细胞中  
天然存在的跨膜蛋白为骨架, 应用原核表达体系  
制备, 不仅大大地提高了表达量, 而且克服了小分  
子多肽半寿期短、作用弱的缺陷。



1. 一种能抑制 HER2 高表达肿瘤细胞增殖的稳定的小分子多肽,其特征在于:所述小分子多肽是自行设计的靶向 HER2 受体分子的小分子拮抗肽,采用人细胞中天然存在的跨膜蛋白为骨架,与拮抗肽相融合,其编码基因经重叠 PCR 拼接合成,插入表达质粒 pET-22b;应用 Ni 离子亲和层析柱纯化,咪唑缓冲液洗脱获得纯化蛋白,命名为 PL45,其氨基酸序列为:

MNTSGDTGFDGYSGQNSGGGSMIDLAPQMLRELQETNAALQDVRELLRQQVKEITFLKNTVMECDAC。

2. 权利要求 1 的能抑制 HER2 高表达肿瘤细胞增殖的稳定的小分子多肽,其特征在于:基因表达的全长氨基酸序列为:

MELMNTSGDTGFDGYSGQNSGGGSMIDLAPQMLRELQETNAALQDVRELLRQQVKEITFLKNTVMECDACKLAAALE。

3. 权利要求 1 的能抑制 HER2 高表达肿瘤细胞增殖的稳定的小分子多肽,其特征在于:单体分子量为 9kDa。

4. 权利要求 1 的能抑制 HER2 高表达肿瘤细胞增殖的稳定的小分子多肽,其特征在于:所述小分子多肽形成五聚体,分子量为 45kDa。

5. 权利要求 1 的能抑制 HER2 高表达肿瘤细胞增殖的稳定的小分子多肽,其特征在于:目的基因分 7 段合成,经重叠 PCR 法拼接;通过限制性内切酶 Sac I 和 HindIII 双切后插入 pET-22b 质粒。

6. 权利要求 1 的能抑制 HER2 高表达肿瘤细胞增殖的稳定的小分子多肽,其特征在于:所述表达质粒的转化细胞为大肠杆菌 BL21/DE3。

7. 权利要求 1 的能抑制 HER2 高表达肿瘤细胞增殖的稳定的小分子多肽,其特征在于:通过原核表达系统表达。

## 能抑制 HER2 高表达肿瘤细胞增殖的稳定的小分子多肽

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医学中生物治疗药物范围,特别涉及一种能抑制 HER2 高表达肿瘤细胞增殖的稳定的小分子多肽。

### 背景技术

[0002] HER2(c-erbB2 或 HER2/neu,人表皮生长因子受体家族成员 2) 是 I 型跨膜酪氨酸激酶受体家族的成员。该家族通过与各种配体相互反应及家族成员间的相互作用介导细胞信号的转导。迄今为止,尚未发现能与 HER2 高亲和力结合的特异性配体,但 HER 受体家族其他成员及配体可与 HER2 形成复合物,介导细胞的信号转导。在文献“Wang S, Saboorian MH, Frenkel E, et al. Laboratory assessment of the status of HER-2/neu protein and oncogene in breast cancer specimens: comparison of immunohistochemistry assay with fluorescence insitu hybridisation assays[J]. J Clin Pathol, 2000, 53(5) :374-381”、“Scheurle D, Jahanzeb M, Aronsohn RS, et al. HER-2/neu expression in archival non-small cell lung carcinomas using FDA-approved Hercep test[J]. Anticancer Res, 2000, 20(6) :2091-2096.” 和“Seliger B, Rongcun Y, Atkins D, et al. HER-2/neu is expressed in human renal cell carcinoma at heterogeneous levels independently of tumor grading and staging and can be recognized by HLA-A2.1-restricted cytotoxic T lymphocytes[J]. Int J Cancer, 2000, 87(3) : 349-359.” 中报道, HER2 在许多上皮来源的恶性肿瘤中过表达,如乳腺癌(25%~30%)、卵巢癌(25%~32%)、原发性肾细胞癌(30%~40%)等。免疫组化染色可见乳腺癌细胞的 HER2 水平较正常乳腺细胞高 10~100 倍,使 HER2 成为理想的抗肿瘤免疫治疗的靶标。1998 年,美国 Genentech 公司开发的靶向 HER2 的治疗性抗体 Herceptin(trastuzumab, 人源化单克隆抗体)已被 FDA 批准上市,应用于 HER2 过表达的乳腺癌患者的临床治疗(Ross JS, Gray K, Gray GS, et al. Anticancer antibodies. Am J Clin Pathol, 2003, 119(4) : 472-485.)。临床试验结果表明,单独应用 Herceptin 的总反应率为 11.6-16%,而与化疗药物联合治疗的总反应率可达 50%。与单独化疗相比,抗体与化疗联合治疗使进展期复发乳腺癌患者的生存期延长,死亡率降低。目前,研究者正在拓展 Herceptin 的应用范围,尝试将其用于其他 HER2 过表达肿瘤的临床治疗,探索新的联合治疗方案(Schneider JW, Chang AY, Garratt A, et al. Trastuzumab cardio-toxicity: speculations regarding pathophysiology and targets for further study. Semin Oncol, 2002, 29(3 suppl 11) : 22-28. Jahanzeb M. Trastuzumab-based combinations in metastatic breast cancer: how to make a choice. Clin Breast Cancer. 2003, 4(1) :28-38.)。

[0003] 表 1 应用 Herceptin 临床治疗的观察结果

[0004]

	生存期 (月)	一年死亡率 (%)	总反应率 (%)	反应持续时间 (月)	疾病进展时间 (月)
化疗	20.3	33	32	6.1	4.6
化疗+抗体	25.1	22	50	9.1	7.4

[0005] 但是, Herceptin 为完整抗体, 分子量高达 150kDa, 不能通过血脑屏障, 更难以穿透肿瘤组织, 深入瘤体内部发挥作用。因此, 单独应用 Herceptin 治疗的有效率十分有限。此外, 全抗体的生产必须采用哺乳动物细胞表达系统, 而我国应用哺乳动物细胞表达重组蛋白的技术水平较低, 因而生产成本高。目前, 国内治疗性抗体的大规模生产正面临重重困难。

[0006] 为克服大分子抗体组织渗透性差的缺陷, 为绕开哺乳动物细胞表达的技术瓶颈, 国内外正在开发各种靶向 HER2 的小分子多肽类抑制剂。这些小分子抑制剂虽然副作用小, 但由于半寿期短, 发挥有效作用的时间很短暂, 因而需要重复给药, 用药剂量较大, 难免给患者带来经济上的负担。

[0007] 本发明试图研制开发靶向 HER2 的新型小分子多肽。该多肽分子具有如下特点: 1、分子量小, 穿透性能好; 2、可在原核表达系统中表达, 生产成本低; 3、具有很好的稳定性, 能在一定范围内耐受酸碱度及温度的变化。

### 发明内容

[0008] 本发明的目的是提供一种能抑制 HER2 高表达肿瘤细胞增殖的稳定的小分子多肽。其特征在于: 所述小分子多肽是自行设计的靶向 HER2 受体分子的小分子拮抗肽, 并采用人细胞中天然存在的跨膜蛋白为骨架, 与拮抗肽相融合, 应用原核表达体系表达; 所述小分子多肽由自行设计的基因编码, 经聚合酶链反应 (PCR) 合成后插入表达质粒 pET-22b (Novagen 公司); 同时将 TrxA 基因 (编码硫氧还蛋白, Genbank) 插入 pET-22b, 以辅助目的蛋白折叠, 实现可溶性共表达。将表达载体转入大肠杆菌 BL21/DE3 (Novagen 公司), 在含有  $1\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  IPTG (异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷) 的 LB 培养基中培养,  $25\text{-}28^{\circ}\text{C}$  下诱导表达。破菌取上清, 应用 Ni 离子亲和层析柱纯化, 咪唑缓冲液洗脱获得纯化的目的蛋白, 命名为 PL45; 其序列为:

[0009] MNTSGDTGFDGYSGQNSGGGSGMDLAPQMLRELQETNAALQDVRELLRQQVKE ITFLKNTVMECDAC。

[0010] 本发明的有益效果是通过体外实验证实: 1. 采用人细胞中天然存在的跨膜结构域蛋白作为骨架, 显著提高了小分子多肽的稳定性; 2. 所产生的小分子肽在骨架蛋白的作用下, 可形成五聚体, 与线性肽相比, 抑制高表达 HER2 的肿瘤细胞生长的作用明显增强, 其作用具有特异性。3. 由于采用的是人源天然结构域蛋白作为骨架, 该小分子肽将不会导致异源性; 4. 该小分子多肽可应用原核表达体系制备, 可极大地提高表达量, 从而大大降低成本。

[0011] 附图说明图 1 为重叠 PCR 合成 PL45 基因。图 2 为含有目的基因的表达载体的鉴定。图 3 SDS-PAGE 电泳分析见纯化蛋白为单一条带, 还原条件下分子量为 9kDa。

[0012] 图 4 在不同温度及 pH 变化的条件下, PL45 的性质十分稳定, 不发生解聚。

[0013] 图 5 在  $37^{\circ}\text{C}$  下孵育, 随时间的延长, PL45 的聚合状态不变。

[0014] 图 6 示 PL45 能特异性地抑制 HER2 过表达的 SKBR3 细胞增殖,而对低表达 HER2 的 MCF7 细胞则无明显抑制作用。

[0015] 图 7 荧光标记的 PL45 与高表达 HER2 的 SKBR3 细胞结合活性较强,而与低表达 HER2 的 MCF7 细胞结合较弱。

[0016] 图 8 为采用重迭延伸拼接法重叠 PCR 合成 PL45 基因示意图。

[0017] 图 9 为 PCR 反应条件示意图。

### 具体实施方式

[0018] 本发明提供一种能抑制 HER2 高表达肿瘤细胞增殖的稳定的小分子多肽。所述小分子多肽由自行设计的基因编码,经聚合酶链反应 (PCR) 合成后插入表达质粒 pET-22b(Novagen 公司);同时将 TrxA 基因(编码硫氧还蛋白, Genbank) 插入 pET-22b, 以辅助目的蛋白折叠,实现可溶性共表达。将表达载体转入大肠杆菌 BL21/DE3(Novagen 公司),在含有  $1\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  IPTG(异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷)的 LB 培养基中培养,25-28°C 下诱导表达。破菌取上清,应用 Ni 离子亲和层析柱纯化,咪唑缓冲液洗脱获得纯化的目的蛋白,命名为 PL45;其序列为

[0019] MNTSGDTGFDGYSQNSGGGSM DLAPQMLRELQETNAALQDVRELLRQQVKEITFLKNTVMECDAC。

[0020] 具体构建如下:

[0021] 1. 表达载体的构建

[0022] 目的基因分 7 段由赛百盛公司合成,经重叠 PCR 法拼接;通过限制性内切酶 Sac I 和 HindIII 双酶切后,插入 pET-22b 质粒 (Novagen),见图 1。构建的表达载体经酶切鉴定正确(见图 2),基因序列送上海申能博彩生物技术公司测序鉴定。

[0023] 2. 在大肠杆菌中诱导表达

[0024] 转化大肠杆菌 BL21/DE3,挑取单菌落接种于含 100mg/L 氨卞青霉素的 LB 培养基中,37°C 震荡培养至  $\text{OD}_{600}$  约为 0.4,加入 IPTG  $1\text{mmol/L}$ ,在 25-28°C 下,130r/min,继续培养 8h 诱导表达。

[0025] 3. 纯化

[0026] 收集转化菌,重悬于磷酸盐缓冲液,超声破菌获取上清,应用 Ni 离子亲和层析柱(本元正阳公司)纯化蛋白,咪唑(北京化学试剂公司)缓冲液洗脱,经 SDS-PAGE 电泳分析,所获目的蛋白的纯度超过 90%,分子量为 9kDa,见图 3。

[0027] 4. 纯化蛋白的鉴定

[0028] 委托国家生物医学分析测试中心色谱室完成纯化 PL45 的 N 端测序,证实氨基酸序列与设计的相符。

[0029] 5. 稳定性

[0030] 常规 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳时,PL45 表现为分子量为 9kDa 的单一一条带;而在不含 SDS 的条件下,分子量为 45kDa,表明 PL45 在溶液中是以五聚体的形式存在。将样品分别置于 pH 6.4、pH 7.4、pH 8.4 的缓冲液中,36°C、39°C、42°C 下孵育 8 小时以及 37°C 下孵育 4 小时、8 小时、12 小时、24 小时、36 小时、72 小时、96 小时后取出, PAGE 电泳分析,可见 PL45 分子量仍为 45kDa,表明其在温度及酸碱度变化的一定范围内,性质十分稳定,无解聚现象(见图 4、图 5)。

[0031] 6. 功能试验

[0032] 样品透析除去咪唑后,经孔径 0.22  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜过滤除菌,BCA 法定量。选用过表达 HER2 的乳腺癌细胞系 SKBR3 细胞作为靶细胞,用低表达 HER2 抗原的乳腺癌细胞系 MCF7 细胞作为对照细胞,接种于 96 孔培养板(每孔  $4 \times 10^3$  个细胞),接种的同时加入纯化的 PL45(浓度分别为 10 和 40  $\mu\text{g/ml}$ ),给药后分别于 24 小时、48 小时、72 小时、96 小时加入 MTT 10  $\mu\text{l}$  (5mg/ml),孵育 4 小时后,加入 120  $\mu\text{l}$  DMSO,振荡 20 分钟后,测 A570。结果显示,PL45 具有抑制 HER2 过表达的 SKBR3 细胞增殖的作用,而对低表达 HER2 的 MCF7 细胞则无明显的细胞毒性(见图 6)。

[0033] 7. 与 HER2 分子的结合活性

[0034] FITC 标记纯化的 PL45,应用流式细胞仪检测 PL45 与高表达 HER2 分子的 SKBR3 细胞的结合活性。图 7 显示,荧光标记的 PL45 可以与 SKBR3 细胞结合,而与低表达 HER2 的乳腺癌细胞系 MDA231 细胞的结合活性较弱。

[0035] 本发明的重要意义在于:1、采用人细胞中天然存在的跨膜结构域蛋白作为骨架,显著提高了小分子多肽的稳定性;2、所产生的小分子肽在骨架蛋白的作用下,可形成五聚体,与线性肽相比,抑瘤作用明显增强。3、由于采用的是人源天然结构域蛋白作为骨架,该小分子肽将不会导致异源性;4、该小分子多肽可应用原核表达体系制备,可极大地提高表达量,从而大大地降低成本。

[0036] 实施例

[0037] 1 材料

[0038] E. coli JM109、E. coli BL21/DE3 工程菌株为本室冻存;T4DNA 连接酶为 Gibco BRL 公司产品;限制性内切酶为 Biolab 公司产品;Taq DNA 聚合酶、克隆载体 pGEM-T Easy 为 Promega 公司产品;Ex Taq DNA 聚合酶为 TaKaRa 公司产品;表达载体 pET-22b(Novagen 公司)由军事医学科学院八所赵志虎博士惠赠;质粒提取试剂盒、DNA 片段回收试剂盒购自北京博大泰克生物技术公司;IPTG(异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷)为 Calbiochem 公司产品;Ni 离子亲和层析介质购自本元正阳公司;咪唑购自北京化学试剂公司;胎牛血清(FCS)、DMEM 培养基、1640 培养基为 HyClone 公司产品;MTT(四噻唑蓝)为 Sigma 公司产品。

[0039] 2 方法

[0040] 2.1 表达载体的构建

[0041] 基因片段由赛百盛公司合成,七段序列如下:

[0042] [1]5' cgagctcatgaacacctctggtgacaccggtttcgac

[0043] [2]5' gtgacaccggtttcgacggttactctggtcagaactc

[0044] [3]5' tactctggtcagaactctggtggtggtggttctatggatctggctcct

[0045] [4]5' ctgaaggctactctacaggctctggtggtccgatggatctggctcct caaatg

[0046] [5]5' gctcctcaaatgcttcgtgagcttcaggaaaccaatgctgctctgca ggacgt

[0047] [6]5' tctgcaggacggttcgtgaactgctgcgtcagcaggttaaagaaatca ccttcc

[0048] [7]5' cccaagcttgaagcgtcgcattccataacggtgtttttcaggaaggt gattt

[0049] 用  $\text{H}_2\text{O}$  将各引物稀释至终浓度为 20mM 的工作液。各片段之间有部分重复序列,以引物 [7] 为 3' 端引物,采用重迭延伸拼接法(Splicing by overlap extension, SOE),第一次 PCR 将 [6] 与 [7] 拼接起来,产物作为第二次 PCR 反应的模板;第二次 PCR 仍以 [7] 为

3'端引物,将 [5] 加入,产物作为第三次 PCR 反应的模板,依次类推。使用保真性能好的 Ex Taq DNA 聚合酶,经六次 PCR 拼接而成目的基因(见图 8);PCR 反应条件(如图 9 所示)。

[0050] PCR 反应体系为:

[0051] H<sub>2</sub>O 37 μ l

[0052] Ex Taq Buffer(10×) 5 μ l

[0053] dNTP(2.5mM) 4 μ l

[0054] primer 5' 2 μ l

[0055] primer 3' 2 μ l

[0056] Ex TaqDNA 聚合酶 0.25 μ l

[0057] 终产物全长 217bp,序列为:

[0058] cgagctcatgaacacctctggtgacaccggtttcgacggttactctggtcagaactctggtggtggtgg

[0059] ttctatggacctggctccgcagatgctgcgtgaactgcaggaaaccaacgctgctctgcaggacgttcg

[0060] tgaactgctgcgtcagcaggttaaagaaatcaccttcctgaaaaacaccgttatggaatgcgacgcttg

[0061] caagcttggg

[0062] 在基因片段两端设计了 Sac I(gagctc) 和 HindIII(aagctt) 两个限制性酶切位点,双酶切连入 pET-22b 质粒。

[0063] 连接体系为:

[0064] H<sub>2</sub>O 3 μ l

[0065] Buffer(2×) 7.5 μ l

[0066] Fragment 3 μ l

[0067] pGEM-T Easy 0.8 μ l

[0068] 连接酶 0.7 μ l

[0069] 另设对照组,不加 Fragment,以 H<sub>2</sub>O 补足体积。16℃水浴过夜。

[0070] 用连接产物转化 JM109 感受态菌。转化步骤为:

[0071] 1) 100 μ l 感受态菌置于冰水,加入 DNA 0.5 μ l,静置 30 分钟;

[0072] 2) 42℃水浴 2 分钟;

[0073] 3) 冰浴 5 分钟;

[0074] 4) 加入不含抗生素的 LB 培养基,37℃下,150rpm 振荡培养 50 分钟。

[0075] 5) 将转化菌接种于含氨苄青霉素的 LB 琼脂平板,置 37℃孵箱培养过夜。

[0076] 6) 挑选阳性克隆 4 个,分别接种于 LB 液体培养基,置 37℃摇床震荡培养。

[0077] 2.2 载体的鉴定

[0078] 1) 用试剂盒提取阳性克隆质粒 DNA。

[0079] 2) 用 Sac I 和 HindIII 双酶切鉴定质粒 DNA,送上海申能博彩生物技术公司测序。

[0080] 双酶切体系为:H<sub>2</sub>O 18 μ l

[0081] Buffer(10×) 4 μ l

[0082] DNA 16 μ l

[0083] Sac I 1 μ l

[0084] HindIII 0.9 μ l。

[0085] 37℃水浴 4 小时。

[0086] 2.3 诱导表达

[0087] 将测序结果正确的菌株扩增,提取质粒 DNA,转化 BL21/DE3 菌。在含氨苄青霉素的 LB 培养基中培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.4-0.6 时,加入 IPTG,将摇床转速降至约 130rpm,诱导 8 小时。

[0088] 2.4 表达产物的鉴定

[0089] 将诱导后的菌液收集至离心管,4℃,6000rpm 离心 5 分钟,弃上清。以原菌液 15% 体积的冷 PBS(磷酸盐)缓冲液重悬沉淀,置于液氮中速冻,然后取出在室温下融化。反复冻融 9 次后,在 4℃下、12000rpm 离心 10 分钟,分别收集上清和沉淀。

[0090] 在沉淀和上清中加入 SDS-PAGE 的上样缓冲液,煮沸 10 分钟后,15% SDS-PAGE 电泳,常规考马斯亮蓝染色。

[0091] 2.5 纯化

[0092] 应用 Ni 离子亲和层析柱纯化,咪唑缓冲液洗脱。纯化中使用了平衡缓冲液(A)和系列浓度梯度的洗脱缓冲液(B)。

[0093] A 液 :0.15mol/L NaCl

[0094] 0.09mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

[0095] 0.01mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

[0096] 在 A 液中加入不同浓度的咪唑即配成不同浓度的 B 液,系列为 :B20(20mmol/L 咪唑);B50(50mmol/L 咪唑);B100(100mmol/L 咪唑);B170(170mmol/L 咪唑);B300(300mmol/L 咪唑);B500(500mmol/L 咪唑)。所有液体均用 HCl/NaOH 调至 pH 7.8。

[0097] 纯化步骤如下:

[0098] 1). 用 A 液重悬菌体沉淀,冻融破菌。

[0099] 2). 10000g×10min、4℃下离心,去除沉淀,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

[0100] 3). 用 A 液平衡亲和层析柱,以 60ml/h 速度上样;用 A 液充分洗柱再平衡至检测器指示平稳。

[0101] 4). B 液梯度洗脱结合蛋白,分别收集洗脱液。B20 和 B50 洗下大量蛋白,B100 和 B170 洗脱的蛋白很少,B300 和 B500 再次洗下较多蛋白。各浓度 B 液均使用 5 倍柱床体积。

[0102] 纯化产物经 Tris-Tricine-PAGE 电泳,考马斯亮蓝染色检测,所获目的蛋白分子量正确,纯度超过 90%。

[0103] 2.6 鉴定

[0104] 委托国家生物医学分析中心色谱室完成目的蛋白的 N 端测序,由 N 端 11 个氨基酸残基的测序结果知表达正确。完整表达的产物全长序列应为:

[0105] MELMNTSGDTGFDGYSGQNSGGGSM DLAPQMLRELQETNAALQDVRELLRQQVKEITFLKNTVMECDACKLAAALEHHHHHHH

[0106] 2.7 稳定性试验

[0107] 2.7.1 聚合性

[0108] 1) 非变性电泳:可见表达产物为单一条带,分子量为 45kDa,而常规 SDS-聚丙烯酰胺变性凝胶电泳时亦为单一条带,其分子量为 9kDa。

[0109] 2) 质谱分析:委托国家生物医学分析中心质谱室完成。MALDI-TOF-MS 结果显示,溶液中单体、二聚体、三聚体、四聚体和五聚体同时存在,但占优势的组分的分子量为 45kDa,质谱分析时的电离过程可能影响蛋白的结构。

[0110] 3) 目的蛋白不能通过孔径为 10kDa 的超滤膜。

[0111] 2.7.2 热、酸、碱稳定性

[0112] 目的蛋白在含咪唑的磷酸盐溶液中表现出了极强的稳定性。在 37℃ 水浴时, 分别于 4 小时、8 小时、12 小时、24 小时、36 小时、48 小时、72 小时及 96 小时后取出, 电泳分析各组与对照组 (4℃) 几乎无差别, 即蛋白不发生解聚。再设多个不同温度组, 8 小时后电泳分析发现, 各组与对照组 (4℃) 几乎无差别。耐酸、碱实验设不同 pH 组, 8 小时后电泳分析, 各组蛋白仍以五聚体形式存在。

[0113] 2.8 功能实验

[0114] 纯化后的蛋白经透析除去咪唑, 正压超滤浓缩后, 经孔径 0.22 μm 的 HT 微孔滤膜过滤除菌。BCA 法定量。MTT 法验证其抑制肿瘤细胞增殖的作用。

[0115] 1) 选用过表达 HER2 抗原的乳腺癌细胞系 SKBR3 细胞作为靶细胞, 用低表达 HER2 抗原的乳腺癌细胞系 MCF7 细胞及低表达 HER2 抗原的鼠成纤维细胞系 NIH3T3 和 L929 作为对照细胞。

[0116] 2) 使用源自相同表达体系的 TrxA 作为阴性对照蛋白, 治疗性抗体 Herceptin 作为阳性对照蛋白, 实验组为 PL45, 设  $4 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  (五聚分子  $100\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和  $40 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  ( $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 两个剂量组, 另设不经处理的细胞对照组。

[0117] 3) 细胞生长状态良好时接种 96 孔培养板, 每孔  $4-5 \times 10^3$  个细胞, 接种的同时给药, 置于 37℃ 孵箱, 5%  $\text{CO}_2$  条件下培养。

[0118] 4) 给药后分别于 24 小时、48 小时、72 小时、96 小时加入 MTT ( $5\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ )  $10 \mu\text{l}$ , 孵育 7 小时后拍干, 加入  $120 \mu\text{l}$  DMSO, 振荡 20 分钟后测  $A_{570}$ 。

[0119] 实验证实, PL45 具有类似 Herceptin 的抑制过表达 HER2 的 SKBR3 细胞增殖的作用, 且其作用特异, 对于多种低表达或不表达 HER2 的细胞 (MCF7、NIH3T3、L929) 无明显的细胞毒性。

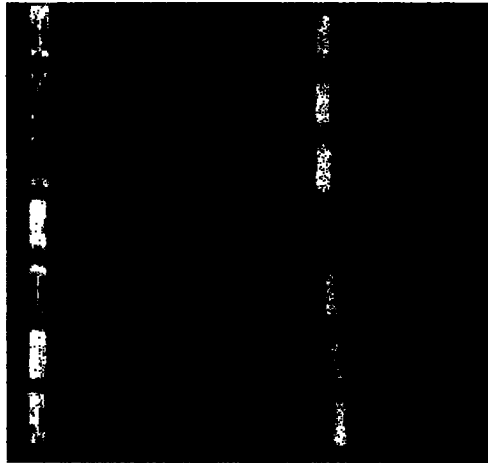


图 1



图 2



图 3

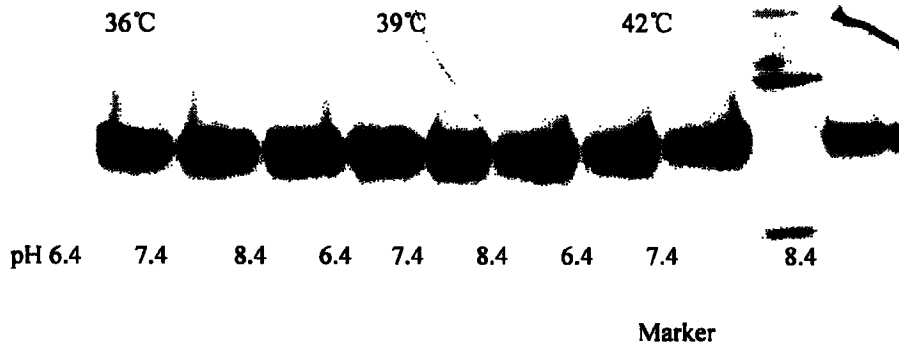


图 4

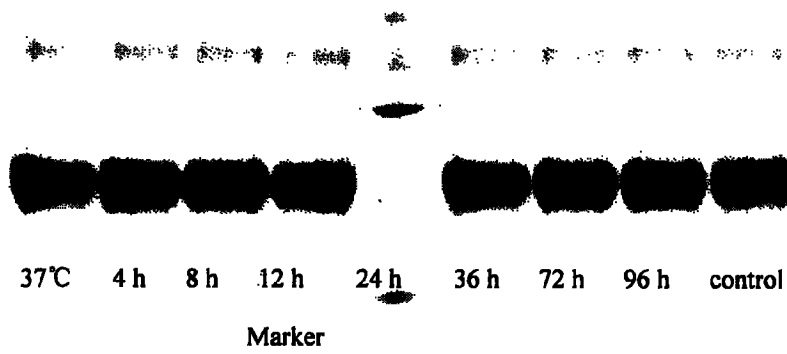


图 5

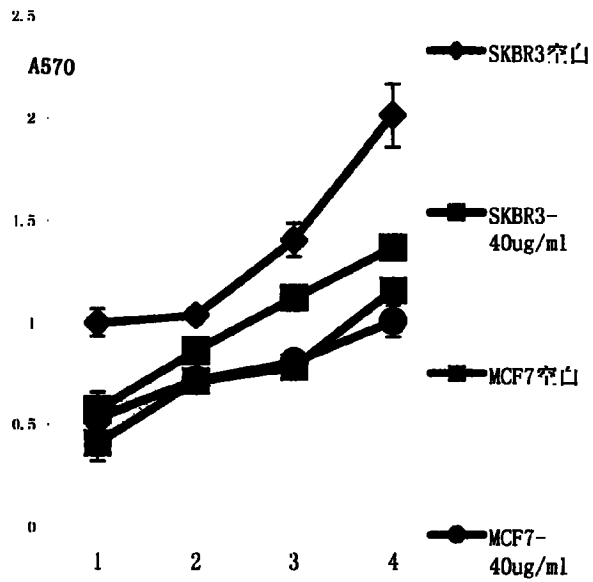
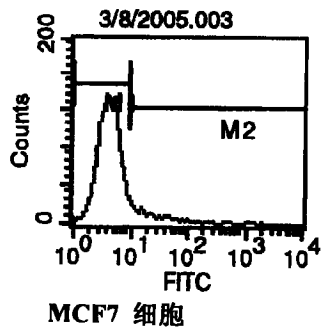
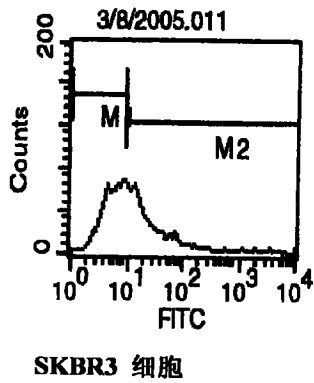


图 6



File: 3/8/2005.003 Gate: G1

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean
All	1, 9910	13691	100.00	80.22	7.40
M1	1, 10	12685	92.65	74.32	4.32
M2	10, 9910	1022	7.46	5.99	45.71



File: 3/8/2005.011 Gate: G1

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean
All	1, 9910	12415	100.00	74.16	42.87
M1	1, 10	6533	52.62	39.03	5.83
M2	10, 9910	5944	47.88	35.51	83.24

图 7

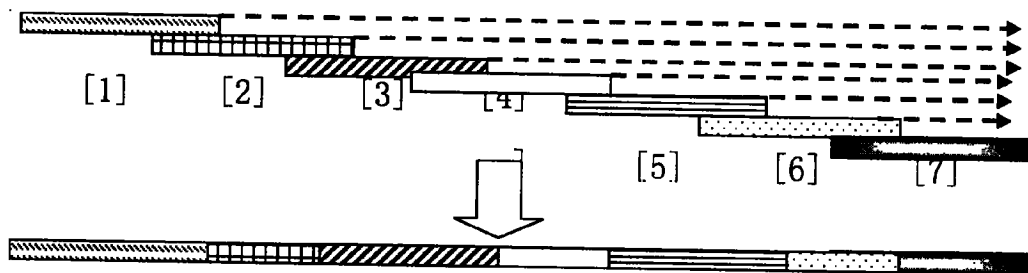


图 8

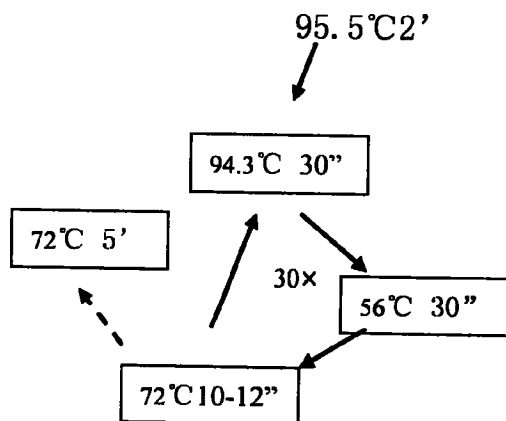


图 9