(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119390818 A
(43)申请公布日 2025.02.07

(21)申请号 202411463562.X
(22)申请日 2024.10.18
(71)申请人 山西锦波生物医药股份有限公司
地址 030032 山西省太原市综改示范区太原唐槐园区锦波街18号
(72)发明人 杨霞 花晨 兰小宾 于玉凤 王建 何振瑞
(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
专利代理师 郦伟翔
(51)Int.Cl.
C07K 14/78(2006.01)
C12N 15/12(2006.01)
C12N 15/70(2006.01)
C12N 1/21(2006.01)
C12R 1/19(2006.01)

权利要求书2页 说明书10页
序列表（电子公布） 附图2页

(54)发明名称

生物合成人体结构性材料VI型胶原蛋白的方法

(57)摘要

提供了生物合成人体结构性材料VI型胶原蛋白的方法。本申请的胶原蛋白包含以SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列或者该氨基酸序列经过突变后的变体氨基酸序列,该变体氨基酸序列保留以SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的功能。本申请的胶原蛋白能够促进细胞黏附,并且具有三螺旋结构。

CN 119390818 A

1.胶原蛋白,其包含多个重复单元,重复单元包含以SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列或以SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列中进行了一个或多个氨基酸残基的突变的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％序列同一性的氨基酸序列;重复单元的数目是10-20、12-18或13-16;各重复单元直接连接或通过一个氨基酸或多个氨基酸的接头连接;

优选地,突变是取代、插入、缺失或添加;优选地,取代为保守氨基酸取代;

优选地,所述胶原蛋白来源于人;

优选地,所述胶原蛋白具有三螺旋结构或是三螺旋结构形式的胶原蛋白;

优选地,所述胶原蛋白具有细胞黏附功效

优选地,所述胶原蛋白是重组胶原蛋白、重组人源化胶原蛋白或重组人源化VI型胶原蛋白。

2.根据权利要求1的胶原蛋白,其包含以下氨基酸序列:

(1)以SEQ ID NO:2和4-7中任一项所示的氨基酸序列;

(2)与以SEQ ID NO:2和4-7中任一项所示的氨基酸序列具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％序列同一性的氨基酸序列;或

(3)以SEQ ID NO:2和4-7中任一项所示的氨基酸序列中进行了一个或多个氨基酸残基的突变的氨基酸序列;优选地,突变是取代、插入、缺失或添加;优选地,取代为保守氨基酸取代。

3.核酸,其编码根据权利要求1或2所述的胶原蛋白;优选地,其中所述核酸具有以SEQ ID NO:3所示的核苷酸序列。

4.载体,其包含根据权利要求3所述的核酸,任选地,所述载体包含编码纯化标签的核苷酸、编码前导物的核苷酸和/或调节元件;

优选地,纯化标签选自His标签、GST标签、MBP标签、SUMO标签或NusA标签;

优选地,调节元件选自启动子、终止子和/或增强子。

5.宿主细胞,其包含根据权利要求3所述的核酸或根据权利要求4所述的载体;其中优选地,宿主细胞是真核细胞或原核细胞;其中优选地,真核细胞是酵母细胞、动物细胞和/或昆虫细胞,和/或原核细胞是大肠杆菌细胞,例如大肠杆菌BL21。

6.生产胶原蛋白的方法,其包括:

(1)在合适的培养条件下培养根据权利要求5所述的宿主细胞;

(2)收获包含胶原蛋白的宿主细胞和/或培养基;和

(3)纯化胶原蛋白,例如包括(1)在Ni亲和层析柱上粗纯胶原蛋白;(2)添加胶原工具酶切;和/或(3)离子交换柱精纯胶原蛋白。

7.组合物,其包含根据权利要求1或2所述的胶原蛋白、根据权利要求3所述的核酸、根据权利要求4所述的载体和/或根据权利要求5所述的宿主细胞;

优选地,组合物是药物组合物、食品组合物或化妆品组合物,

优选地,组合物是生物敷料、人体仿生材料、整形美容材料、类器官培养材料、心血管支架材料、涂层材料、组织注射填充材料、眼科材料、妇产科生物材料、神经修复再生材料、肝

脏组织材料及血管修复再生材料、3D打印人造器官生物材料、化妆品原料、药用辅料和食品添加剂中的一种或多种;

优选地,组合物包含药学和/或化妆品可接受的载体;

优选地,组合物为固体、液体或凝胶组合物;

优选地,组合物为口服和/或局部施用的组合物,优选涂抹组合物;

优选地,组合物为试剂盒;

优选地,组合物为液体配制剂,其包含根据权利要求1或2所述的胶原蛋白和药学和/或化妆品可接受的载体;优选地,载体是缓冲剂,例如D-PBS缓冲剂或PBS缓冲剂。

8.促进细胞黏附或贴壁的方法,所述方法包括使细胞与根据权利要求1或2所述的胶原蛋白和/或根据权利要求7的组合物接触。

9.根据权利要求1或2所述的胶原蛋白、根据权利要求3所述的核酸、根据权利要求4所述的载体、根据权利要求5所述的宿主细胞和/或根据权利要求7的组合物在生物敷料、人体仿生材料、涂层材料、类器官培养材料或3D打印人造器官生物材料中的用途,或者在整形美容材料、类器官培养材料、心血管支架材料、组织注射填充材料、眼科材料、妇产科生物材料、神经修复再生材料、肝脏组织材料或血管修复再生材料中的用途。

10.根据权利要求1或2所述的胶原蛋白和/或根据权利要求7的组合物在制备用于促进细胞黏附或贴壁的药物或试剂盒的用途。

生物合成人体结构性材料VI型胶原蛋白的方法

技术领域

[0001] 本申请涉及蛋白质或多肽领域,具体地涉及胶原蛋白、其制备方法和用途。

背景技术

[0002] 胶原蛋白是广泛分布于人体结缔组织的一类蛋白质,也是人体含量最多的蛋白质,可以占到蛋白质总量的25%～35%。它的主要功能体现在维护细胞外环境,维持组织器官的正常生理功能,修复肌体损伤等方面。胶原蛋白是天然的生物资源,具有其它高分子材料所望尘莫及的生物组织相容性,对细胞的支撑弹性和可降解性。因此,胶原蛋白可以广泛的应用在医药和化妆品等行业中。

[0003] 近年来随着基因工程技术的广泛应用,研发人员创造出各种类型的重组胶原蛋白,例如可以通过选择来自天然人胶原蛋白的短氨基酸序列来构建重组胶原蛋白,这样构建的重组胶原蛋白具有例如免疫原性低、生物活性高、稳定性好等优点。理论上,这种重组胶原蛋白的氨基酸序列越短,透皮吸收性能越好,但是氨基酸序列不是越短越好。如何设计短氨基酸序列,才能使得构建的重组胶原蛋白具有更好的透皮吸收性能,现有技术中没有任何的理论可以作为指导。

[0004] VI型胶原蛋白是几乎所有结缔组织(包括软骨、骨骼、肌腱、肌肉和角膜)的细胞外基质的组成部分,在那里它形成丰富且结构独特的微纤维,组织成不同的结构组件。VI型胶原的缺失会影响纤连蛋白在细胞外基质中的排列。IV型胶原α1链的非三螺旋形式抑制血管内皮-钙粘蛋白介导的细胞间连接。

[0005] 本领域中需要新的VI型胶原蛋白以及其制备方法。

发明内容

[0006] 针对目前的需要,发明人提供了新的VI型胶原蛋白。本文的VI型胶原蛋白能够使用工程菌种进行表达。本发明还提供了生物合成人体结构性材料VI型胶原蛋白的方法。

[0007] 在第一方面,提供了胶原蛋白,其包含多个重复单元,重复单元包含以SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列或以SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列中进行了一个或多个氨基酸残基的突变的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的氨基酸序列;重复单元的数目是10-20、12-18或13-16。

[0008] 在一个实施方案中,重复单元的数目是10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20。

[0009] 在一个实施方案中,各重复单元直接连接或通过一个氨基酸或多个氨基酸残基的接头连接。在一个实施方案中,接头包含2、3、4、5、6、7或8个氨基酸残基。

[0010] 在一个实施方案中,突变是取代、插入、缺失或添加。在一个实施方案中,取代为保守氨基酸取代。

[0011] 在一个实施方案中,胶原蛋白来源于人。在一个实施方案中,胶原蛋白具有三螺旋结构。在一个实施方案中,胶原蛋白具有细胞黏附功效。在一个实施方案中,胶原蛋白是重

组胶原蛋白、重组人源化胶原蛋白或重组人源化VI型胶原蛋白。

[0012] 在一个实施方案中,胶原蛋白包含以下氨基酸序列:

[0013] (1)以SEQ ID NO:2和4-7中任一项所示的氨基酸序列;

[0014] (2)与以SEQ ID NO:2和4-7中任一项所示的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的氨基酸序列;或

[0015] (3)以SEQ ID NO:2和4-7中任一项所示的氨基酸序列中进行了一个或多个氨基酸残基的突变的氨基酸序列。

[0016] 在一个实施方案中,突变是取代、插入、缺失或添加。在一个实施方案中,取代为保守氨基酸取代。

[0017] 在第二方面,提供了核酸,其编码本文所述的胶原蛋白。

[0018] 在一个实施方案中,核酸具有以SEQ ID NO:3所示的核苷酸序列。

[0019] 在第三方面,提供了载体,其包含根据本文所述的核酸。在一个实施方案中,载体包含编码纯化标签的核苷酸、编码前导物的核苷酸和/或调节元件。

[0020] 在一个实施方案中,纯化标签选自His标签、GST标签、MBP标签、SUMO标签或NusA标签。

[0021] 在一个实施方案中,调节元件选自启动子、终止子和/或增强子。

[0022] 在第四方面,提供了宿主细胞,其包含本文所述的核酸或本文所述的载体。

[0023] 在一个实施方案中,宿主细胞是真核细胞或原核细胞。在一个实施方案中,真核细胞是酵母细胞、动物细胞和/或昆虫细胞,和/或原核细胞是大肠杆菌细胞,例如大肠杆菌BL21。

[0024] 在第五方面,提供了生产胶原蛋白的方法,其包括:

[0025] (1)在合适的培养条件下培养本文所述的宿主细胞;

[0026] (2)收获包含胶原蛋白的宿主细胞和/或培养基;和

[0027] (3)纯化胶原蛋白,例如包括(1)在Ni亲和层析柱上粗纯胶原蛋白;(2)添加胶原工具酶切;和/或(3)离子交换柱精纯胶原蛋白。

[0028] 在第六方面,提供了组合物,其包含本文所述的胶原蛋白、核酸、载体和/或宿主细胞。

[0029] 在一个实施方案中,组合物是药物组合物或化妆品组合物。

[0030] 在一个实施方案中,组合物是生物敷料、人体仿生材料、整形美容材料、类器官培养材料、心血管支架材料、涂层材料、组织注射填充材料、眼科材料、妇产科生物材料、神经修复再生材料、肝脏组织材料及血管修复再生材料、3D打印人造器官生物材料、化妆品原料、药用辅料和食品添加剂中的一种或多种。

[0031] 在一个实施方案中,组合物包含药学和/或化妆品可接受的载体。

[0032] 在一个实施方案中,组合物为固体、液体或凝胶组合物。

[0033] 在一个实施方案中,组合物为口服和/或局部施用的组合物,优选涂抹组合物。

[0034] 在一个实施方案中,组合物为试剂盒。

[0035] 在一个实施方案中,组合物为液体配制剂,其包含本文所述的胶原蛋白和药学和/或化妆品可接受的载体。

[0036] 在一个实施方案中,载体是缓冲剂,例如D-PBS缓冲剂或PBS缓冲剂。

[0037] 在第七方面,提供了促进细胞黏附或贴壁的方法,所述方法包括使细胞与本文的胶原蛋白和/或组合物接触。

[0038] 在第八方面,提供了本文所述的胶原蛋白、核酸、载体、宿主细胞和/或组合物在生物敷料、人体仿生材料、整形美容材料、类器官培养材料、心血管支架材料、涂层材料、组织注射填充材料、眼科材料、妇产科生物材料、神经修复再生材料、肝脏组织材料及血管修复再生材料或3D打印人造器官生物材料中的用途。

[0039] 在第九方面,提供了本文所述的胶原蛋白和/或组合物在制备用于促进细胞黏附或贴壁的药物或试剂盒的用途。

[0040] 本发明的优点包括:本文所述的胶原蛋白是新的人源化VI型胶原蛋白,其具有促进细胞黏附的功效并且具有三螺旋结构;本文的重组人源化胶原蛋白C6A1具有比牛I型胶原蛋白具有更高(2倍以上)的细胞黏附活性,取得了出乎意料的技术效果。

附图说明

[0041] 图1显示了重组人源化VI型胶原蛋白的电泳图。

[0042] 图2显示了重组人源化VI型胶原蛋白的细胞粘附活性。

具体实施方式

[0043] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将结合本发明的实施例,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0044] 如本文中所用,重组人源化胶原蛋白是由DNA重组技术制备的人胶原蛋白特定性别基因编码的全长或部分氨基酸序列片段,或是含人胶原蛋白功能片段的组合。在本文中,重组人源化胶原蛋白是重组人源化VI型胶原蛋白,其是通过肽键连接的多个氨基酸残基的肽或多肽。

[0045] 如本文中所用,术语“和/或”应视为对两个指定特征或部件中的每一个的具体公开,包括或不包括另一个。因此,如本文中在诸如“A和/或B”的短语中使用的术语“和/或”旨在包括A和B、A或B、A(单独)以及B(单独)。同样地,如在诸如“A、B和/或C”的短语中使用的术语“和/或”旨在涵盖以下方面中的每一个:A、B和C;A、B或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);和C(单独)。

[0046] 如本文中所用,“一个或多个”可以是任何合适的整数。在胶原蛋白突变(例如取代、缺失、插入或添加)的情况下,“一个或多个”是本领域技术人员容易确定的数目,例如1-90以及其间的任何整数和范围,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38或39等。

[0047] 如本文中所用,“核酸”是指通过核苷酸间连接的多个核苷酸。核苷酸间连接可以是例如磷酸二酯键。本文中的核酸可以包含编码本发明的多肽的多核苷酸。为了便于多肽后续处理,本发明的核酸还可以包含编码纯化标签,例如His标签、GST标签、MBP标签、SUMO标签或NusA标签的核苷酸,以及当需要时编码前导序列的核苷酸序列。

[0048] 如本文中所用,术语“载体”是可将多核苷酸插入其中的一种核酸运载工具。当载体能使插入的多核苷酸编码的蛋白质获得表达时,载体称为表达载体。载体可以通过转化,转导或者转染导入宿主细胞,使其携带的遗传物质元件在宿主细胞中获得表达。载体是本领域技术人员公知的,包括但不限于:质粒;噬菌粒;柯斯质粒;人工染色体,例如酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或P1来源的人工染色体(PAC);噬菌体如λ噬菌体或M13噬菌体及动物病毒等。载体可以含有多种控制表达的元件,包括但不限于启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外,载体还可含有复制起始位点。载体可以包含本发明的核酸以便于导入细胞进行表达。载体可以包含与所述核酸可操作连接的表达控制元件,如启动子、终止子和/或增强子。

[0049] 如本文中所用,术语“宿主细胞”是已经通过分子生物学技术将核酸分子引入的细胞。这些技术包括转染病毒载体,用质粒载体转化,以及通过电穿孔、脂转染、和粒子枪加速引入裸DNA。宿主细胞可以是真核细胞或原核细胞。例如,真核细胞是酵母细胞、动物细胞和/或昆虫细胞。原核细胞可以是大肠杆菌细胞。

[0050] 如本文中所用,“生物敷料”是一种新型的医疗敷料,可以用于创口的修复和治疗。它是由专业制作人员用生物材料制成,并与药物或其他治疗物质结合而成的一种特殊的医用材料。生物敷料中的胶原蛋白会在创面上形成一层保护层,促进细胞增生和再生,加速伤口愈合。

[0051] 如本文中所用,“仿生材料”是指模仿生物的各种特点或特性而研制开发的材料。通常把仿照生命系统的运行模式和生物材料的结构规律而设计制造的人工材料称为仿生材料。“人体仿生材料”是指模仿人体的各种特点或特性而研制开发的材料。通常把仿照生命系统的运行模式和生物材料的结构规律而设计制造的人工材料称为仿生材料。

[0052] 如本文中所用,“类器官培养材料”是指用于培养和构建具有类器官功能的人工材料以解决器官移植和替代的需求。

[0053] 如本文中所用,“生物材料”是指能与生命体组织相容的材料,它通常被用于制造人造器官或替代组织。“3D打印人造器官生物材料”是指在3D打印人造器官中采用的生物材料。

[0054] 如本文中所用,两个氨基酸序列之间或两个核苷酸序列之间的关联度通过参数“序列同一性”来描述。出于本发明的目的,使用如在EMBOSS软件包(EMBOSS:欧洲分子生物学开放软件套件,Rice等人,2000,Trends Genet.[遗传学趋势]16:276-277)(优选5.0.0版或更新版本)的尼德尔程序所实施的尼德曼-翁施算法(Needleman和Wunsch,1970,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]48:443-453)来确定两个氨基酸序列之间的序列同一性。使用的参数是空位开放罚分10、空位延伸罚分0.5以及EBLOSUM62(BLOSUM62的EMBOSS版本)取代矩阵。将标记为“最长同一性”的尼德尔的输出(使用非简化选项获得)用作同一性百分比并且计算如下:

[0055] (相同的残基×100)/(比对长度-比对中的空位总数)

[0056] 出于本发明的目的,使用如在EMBOSS软件包(EMBOSS:欧洲分子生物学开放软件套件,Rice等人,2000,同上)(优选5.0.0版本或更新版本)的尼德尔程序所实施的尼德曼-翁施算法(Needleman和Wunsch,1970,同上)来确定两个脱氧核苷酸序列之间的序列同一性。所使用的参数是空位开放罚分10、空位延伸罚分0.5、和EDNAFULL(NCBI NUC4.4的EMBOSS

版)取代矩阵。将标记为“最长同一性”的尼德尔的输出(使用非简化选项获得)用作同一性百分比并且计算如下：

[0057] (相同的脱氧核糖核苷酸x 100)/(比对长度-比对中的空位总数)

[0058] 在本发明的上下文中,保守氨基酸取代或保守取代可由在一个或多个下表中反映的氨基酸类别内的取代定义：

[0059] 保守类别的氨基酸残基：

[0060]

酸性残基	D和E
碱性残基	K、R,和H
亲水的不带电残基	S、T、N和Q
脂族不带电残基	G、A、V、L和I
非极性不带电残基	C、M和P
芳族残基	F、Y和W

[0061] 备选的氨基酸残基的物理和功能分类：

[0062]

含醇基残基	S和T
脂族残基	I、L、V和M
环烯基相关残基	F、H、W和Y
疏水的残基	A、C、F、G、H、I、L、M、R、T、V、W和Y
带负电残基	D和E
极性残基	C、D、E、H、K、N、Q、R、S和T
带正电残基	H、K和R
小残基	A、C、D、G、N、P、S、T和V
极小残基	A、G和S
参与转角形成的残基	A、C、D、E、G、H、K、N、Q、R、S、P和T
柔性残基	Q、T、K、S、G、P、D、E和R

[0063] 如本文中所用,术语“三螺旋”蛋白理解为提及包含至少一个“三螺旋结构域”的同源三聚体或异源三聚体蛋白质。该术语涵盖三螺旋蛋白的变体和片段和其功能等效物和衍生物,优选保留(Gly-X-Y)n序列。术语“三螺旋结构”指包含通式(Gly-X-Y)n的蛋白质,其中Gly为甘氨酸,X和Y表示相同或不同的氨基酸(其具体情况可在不同Gly-X-Y三联体的范围内变化),其中n可在2与300之间。三螺旋结构域由三个链组成,链的特征在于折叠为三螺旋蛋白构象的重复(Gly-X-Y)n基序。

[0064] 重组人源化VI型胶原蛋白

[0065] 在本文中,本发明的重组人源化VI型胶原蛋白可以存在一定的突变。例如,这些部分中的一个或多个的氨基酸序列可以存在氨基酸残基的取代、缺失、添加或插入。也就是说,本发明可以使用变体,只要变体保留促进细胞黏附和/或增殖的活性。具体而言,变体可以与指定的序列具备一定的百分比同一性,例如至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％同一性,或者它们之间的任何数值范围。指定的序列可以是本发明的任何序列,例如SEQ ID NO:1或2或4-7中任一项,但是优选的是这些变体保留本发明的重组人源化VI型胶原蛋白的功能。本发明的重组人源化VI型胶原蛋白可以具有良好的细胞黏附功效并且具有三螺旋结

构。

[0066] 本发明的重组人源化VI型胶原蛋白可以通过任何合适的方式进行制备,例如可以通过合成制备。优选地,本发明的重组人源化VI型胶原蛋白可以通过重组方式制备。

[0067] 本发明的胶原蛋白可以具有三螺旋结构区,即三螺旋结构形式的胶原蛋白,即具有三条相同的胶原蛋白链。例如,胶原蛋白具有柔性三螺旋结构区。本发明的胶原蛋白可以形成三螺旋结构。经过测定,本发明的重组人源化VI型胶原蛋白C6A1可以形成三螺旋结构。胶原蛋白的三螺旋结构是由三个多肽链相互缠绕而成的。每个多肽链由许多氨基酸相连而成,其中甘氨酸、脯氨酸和羟脯氨酸等氨基酸在胶原蛋白的结构中尤为重要。这些氨基酸中的每一种都能够形成氢键,这种氢键可以将三个多肽链相联结结合成三个螺旋结构。在这个过程中,每个多肽链都按照同样的方式与另外两个多肽链相交织。研究表明,胶原蛋白的三螺旋结构对其热稳定性起着至关重要的作用。多肽链通过氢键相互缠绕时形成的三维结构是非常稳定的。大量的实验结果表明,要破坏胶原蛋白的三螺旋结构需要很高的温度或者酸碱度。在生物体内,胶原蛋白的热稳定性能够带来许多好处。例如,由于热稳定性较高,胶原蛋白能够在人体中长期保持稳定性并发挥自身的作用。这种稳定性也为胶原蛋白提供了耐受力,能够经受住日常的身体运动和机体代谢过程中产生的压力而不出现断裂或分解的情况。

[0068] 如本文中所用,重组人源化胶原蛋白是由DNA重组技术制备的人胶原蛋白特定性别基因编码的全长或部分氨基酸序列片段,或是含人胶原蛋白功能片段的组合。在本文中,重组人源化胶原蛋白是重组人源化VI等胶原蛋白型别,其是通过肽键连接的多个氨基酸残基的肽或多肽。重组人源化胶原蛋白可以是多个重复单元串联重复形成的重组人源化胶原蛋白。通过串联重复策略制备重组人源化胶原蛋白的方法是本领域技术人员已知的。重复单元的数目的选择对于本领域技术人员而言是常规的。例如,重组人源化胶原蛋白可以具有2-50个重复单元,例如2-10。应当理解,在该范围内的重复单元形成的重组人源化胶原蛋白具备相似的功能。现有技术文献报道了重组胶原蛋白可以通过重复单元的串联重复构建得到。重复单元的数目可以存在一定变化。例如Chen Hua等人Biochemical and Biophysical Research Communications 508(2019)1018e1023公开了可以GERGAPGFRGPAGPNGIPGEKGPAGERGAP重复单元以及该重复单元的16个串联重复的T16均具备细胞粘附活性,并且认为含有多个串联重复的三螺旋片段的重组蛋白可以具有更稳定的螺旋构象或更有利的配体结合构型以促进细胞膜附着和粘附。R.Strawn等人,Biopolymers 109(2018),e23226证明了具有多个以串联重复方式排列的相同三螺旋肽单元的重组胶原样蛋白可以自组装成微纤维用于生物药物和工业领域。J.Yao等人,J.Biochem.136(2004)643e649报道了含有I型胶原肽的串联重复的重组胶原蛋白样蛋白显示高细胞粘附活性。

[0069] 组合物

[0070] 本发明的重组人源化VI型胶原蛋白可以制备为组合物。组合物可以包含本文所述的重组人源化VI型胶原蛋白、核酸、载体和/或宿主细胞。组合物还可以包含药学和/或化妆品可接受的载体或溶剂。组合物可以是药物组合物或化妆品组合物,用于药品和/或化妆品的目的。例如,组合物是生物敷料、人体仿生材料、整形美容材料、类器官培养材料、心血管支架材料、涂层材料、组织注射填充材料、眼科材料、妇产科生物材料、神经修复再生材料、肝脏组织材料及血管修复再生材料、3D打印人造器官生物材料、化妆品原料、药用辅料和食

品添加剂中的一种或多种。

[0071] 化妆品组合物应用的部分没有特别限制,可以是脸部、手部、腿部、躯干等。组合物的形式没有特别限制,只要可以实现预期的功能。例如,组合物为固体、液体或凝胶组合物。

[0072] 组合物可以以任何合适的方式应用,例如为口服和/或局部施用的组合物。组合物也可以制备为试剂盒。试剂盒可以包含另外的成分,例如辅助成分,如缓冲剂,并且包含使用说明书。特别地,组合物可以配制成合适的配制剂,如液体配制剂。配制剂可以包含缓冲剂,例如D-PBS缓冲剂或PBS缓冲剂。

[0073] 方法和用途

[0074] 本文提供了使细胞黏附或贴壁的方法,所述方法包括使细胞与本文所述的重组人源化VI型胶原蛋白、组合物和/或液体配制剂接触。本发明的方法可以在体外进行,以增加细胞对培养容器的黏附。或者,本发明的方法也可以在体内进行。本发明还提供了文所述的重组人源化VI型胶原蛋白、组合物和/或液体配制剂在制备药物和/或试剂盒中的用途,所述药物或试剂盒用于增加细胞黏附。除了本文所述的胶原蛋白外,试剂盒还可以包含合适的载体、稀释剂或赋形剂等,以及包含使用胶原蛋白的用法说明。

[0075] 实施例

[0076] 提供以下实施例来阐述本发明。本领域技术人员应当理解实施例仅仅是例示性的,而非限制性的。本发明仅仅由所附权利要求书的范围限定。

[0077] 实施例1:人源化VI型胶原蛋白片段的构建、表达和筛选

[0078] 1.进行大规模功能区筛选,得到以下人源化VI型胶原蛋白的目的基因功能区。

[0079] C6A1氨基酸序列:ENLYFQ

[0080] Gppgekgeagdegnpgpdgapgerggpger

[0081] Gppgekgeagdegnpgpdgapgerggpger

[0082] Gppgekgeagdegnpgpdgapgerggpger

[0083] Gppgekgeagdegnpgpdgapgerggpger

[0084] (SEQ ID NO:2;重复单元为Gppgekgeagdegnpgpdgapgerggpger,SEQ ID NO:1)。

[0085] 发明人针对C6A1氨基酸序列设计出C6A1核苷酸序列。

[0086] C6A1核苷酸序列:

[0087] GGATCCGAAAATCTGTATTTTCAGGGTCCGCCGGGTGAAAAAGGTGAAGCAGGTGATGAAGGTAATCCGGGTCCGGATGGTGCACCGGGTGAACGTGGTGGTCCTGGTGAACGTGGTCCGCCTGGTGAAAAAGGTGAAGCAGGTGATGAAGGTAATCCGGGTCCGGATGGTGCACCGGGTGAACGTGGTGGTCCTGGTGAACGTGGTCCGCCTGGTGAAAAAGGTGAAGCAGGTGATGAAGGTAATCCGGGTCCGGATGGTGCACCGGGTGAACGTGGTGGTCCTGGTGAACGTGGTCCGCCTGGTGAAAAAGGTGAAGCAGGTGATGAAGGTAATCCGGGTCCGGATGGTGCACCGGGTGAACGTGGTGGTCCTGGTGAACGTTAAAAGCTT(SEQ ID NO:3)。

[0088] 2.大肠杆菌基因工程菌的构建

[0089] 将C6A1核苷酸序列克隆进入表达载体,然后将表达载体转入大肠杆菌表达菌株中,筛选得到大肠杆菌基因工程菌。

[0090] 具体而言,根据C6A1的氨基酸序列(SEQ ID NO:2),优化选择其大肠杆菌偏好的密码子基因SEQ ID NO:3。合成SEQ ID NO:3的核苷酸序列。将C6A1基因片段通过Kpn I(NEB公司货号:R0136L)和Xho I(NEB公司,货号:R0146L)的酶切位点插入pET-32a表达载体(北京

六合华大基因科技有限公司),构建得到pET-32a-C6A1表达载体。将表达载体导入大肠杆菌BL21(DE3)中,筛选得到阳性大肠杆菌基因工程菌。以上操作委托北京六合华大基因科技有限公司进行。

[0091] 3.大肠杆菌基因工程菌的发酵培养

[0092] 将构建成功的表达质粒转化大肠杆菌感受态细胞BL21(DE3)。具体过程为:

[0093] (1).在超低温冰箱中取出大肠杆菌感受态细胞BL21(DE3)置于冰上,取2μl待转化的质粒加入感受态细胞BL21(DE3)中,稍微混匀2-3次。

[0094] (2).将混合物置于冰上冰浴30min,然后于42℃水浴热激45-90s,取出后置于冰上冰浴2min。

[0095] (3).转移至生物安全柜中,并加入700μl液体LB培养基,然后于37℃、220rpm条件下培养60min。

[0096] (4).取200μl的菌液均匀涂布在含有氨苄西林钠LB平板上。

[0097] (5).将平板在37℃的培养箱中培养15-17h,待其长出大小均匀的菌落。

[0098] (6).从转化好的LB平板中挑取5-6个单菌落于含有抗生素储液的LB培养基的摇瓶中,在220rpm,37℃恒温摇床中7h。再将培养后的摇瓶降温至16℃,添加IPTG诱导表达一段时间后,将菌液分装于离心瓶中,于8000rpm、4℃离心10min,收集菌体,并记录菌体重量,取样进行电泳检测。

[0099] (7).将收集的菌体用平衡工作液(200mM氯化钠、25mM Tris、20mM咪唑,pH8.0)重悬,将菌液降温至≤15℃,进行均质,高压均质两次,完成后收集菌液。将均质后的菌液分装至离心瓶中,于17000rpm、4℃离心30min,收集上清液,取上清液和沉淀进行电泳检测。

[0100] (8).将C6A1进行纯化和酶切,具体过程是:(1)粗纯:a.水洗柱材(Ni6FF,Cytiva),5个CV。b.平衡液(200mM氯化钠、25mM Tris、20mM咪唑,pH8.0)平衡柱材,5个CV。c.上样:将离心后的上清液加入柱材中,直至液体流完后,取流穿进行电泳检验。d.清洗杂蛋白:添加洗杂液25mL(200mM氯化钠,25mM Tris,20mM咪唑)至液体流完,并取洗杂流穿进行电泳检验。e.收集目的蛋白:添加20mL洗脱液(200mM氯化钠、25mM Tris、250mM咪唑,pH8.0),并收集流穿液,检测蛋白浓度计算蛋白量,并进行电泳检测。f.用1M咪唑工作液清洗柱材。g.纯化水清洗柱材。(2)酶切:按蛋白总量与TEV酶总量比为50:1,添加TEV酶,16℃酶切4h,取样进行电泳检测。将酶切后的蛋白液放入透析袋,于4℃透析2h,再转移至新的透析液中4℃过夜透析。(3)精纯:a.平衡柱材(Ni6FF,Cytiva):使用A液(20mM Tris,20mM氯化钠,pH8.0)将柱材平衡,流速为10ml/min。b.上样:流速为5ml/min,上样并收集流穿,并进行电泳检测。c.梯度洗脱:分别设置0-15% B液(20mM Tris,1M氯化钠,pH8.0)2min然后保持3个CV、15-30% B液2min然后保持3个CV、30-50% B液2min然后保持3个CV、50-100% B液2min然后保持3个CV,出峰收集并进行电泳检测(为精纯蛋白)。d.清洗柱材。将蛋白储存在4℃环境中。

[0101] 浓度检测精确量取适量样品,用洗脱液稀释10-50倍,用玻璃棒充分搅拌均匀。使用紫外可见分光光度计在280nm处测定吸光度,根据公式C(mg/ml)＝A280x吸光系数x稀释倍数,计算蛋白浓度(注:吸光度值需在0.1-1)。

[0102] 电泳检测具体过程为:取样品液40μl,加入10μl 5x的蛋白上样缓冲液(250mM的Tris-HCl(pH:6.8),10% SDS,0.5%溴酚蓝,50%甘油,5%β-巯基乙醇),置于100℃沸水中煮10min,然后每孔10μl加入SDS-PAGE蛋白胶中,电压80V跑2h后,用考马斯亮蓝染色液

(0.1％考马斯亮蓝R-250,25％异丙醇,10％冰醋酸)进行蛋白染色20min,再利用蛋白脱色液(10％醋酸,5％乙醇)进行脱色。实验结果见图1。根据图1可知,分离得到分子量为29.6kDa的蛋白质,其与人源化VI型胶原蛋白C6A1的预测分子量(29647.20)相符,表明C6A1得到正确表达。

[0103] 通过与上述方法相同的方法,构建了以下重组胶原蛋白:

[0104] C6A2:Gppgekgeagdegnpgpdgapgerggpger(SEQ ID NO:4)

[0105] C6A3:Gppgekgeagdegnpgpdgapgerggpger Gppgekgeagdegnpgpdgapgerggpger(SEQ ID NO:5)

[0106] C6A4:Gppgekgeagdegnpgpdgapgerggpger Gppgekgeagdegnpgpdgapgerggpger

[0107] Gppgekgeagdegnpgpdgapgerggpger(SEQ ID NO:6)

[0108] C6A5:Gppgekgeagdegnpgpdgapgerggpger Gppgekgeagdegnpgpdgapgerggpger Gppgekgeagdegnpgpdgapgerggpger Gppgekgeagdegnpgpdgapgerggpger Gppgekgeagdegnpgpdgapgerggpger Gppgekgeagdegnpgpdgapgerggpger Gppgekgeagdegnpgpdgapgerggpger(SEQ ID NO:7)。通过上述方法对C6A2-C6A5进行分离和电泳检测,证明了C6A2-C6A5的实际分子量与预期分子量相符,这些重组胶原蛋白得到正确表达。

[0109] 实施例2:重组人源化胶原蛋白的生物活性检测

[0110] 重组人源化胶原蛋白的黏附活性检测方法可以参考文献Juming Yao,Satoshi Yanagisawa,Tetsuo Asakura,Design,Expression and Characterization of Collagen-Like Proteins Based on the Cell Adhesive and Crosslinking Sequences Derived from Native Collagens,J Biochem.136,643-649(2004)。具体实施方法如下:

[0111] (1)利用紫外吸收法检测待测蛋白样品的浓度,包括牛I型胶原蛋白(中国食品药品检定研究院,编号:380002)、本发明提供的重组人源化胶原蛋白C6A1。具体为分别测定样品在215nm和225nm下的紫外光吸收,利用经验公式C(μg/mL)＝144×(A215-A225)计算蛋白质浓度,注意需在A215<1.5的情况下检测。该方法的原理是:测定肽键在远紫外光下的特征吸收,不受生色团含量的影响,干扰物质少,操作简便,适合检测考马斯亮蓝不显色的人胶原蛋白及其类似物。(参考文献为Walker JM.The Protein Protocols Handbook,second edition.Humana Press.43-45)。检测完蛋白浓度后,用PBS将所有待测蛋白浓度调整到0.5mg/mL。

[0112] (2)向96孔板中加入100μL各种蛋白溶液(牛I型胶原蛋白或重组人源化胶原蛋白C17T15)或D-PBS溶液(空白对照组)。

[0113] (3)每孔中加入10^5个培养状态良好的3T3细胞,37℃孵育60min。

[0114] (4)每孔用PBS清洗4次。

[0115] (5)用LDH检测试剂盒(Roche,04744926001)检测OD492nm的吸光度。根据空白对照的数值,可以计算出细胞的贴壁率。计算公式如下

[0116] $$p=\frac{OD_1-OD_0}{OD_2-OD_0}$$

[0117] 式中:

[0118] P:相对细胞粘附性比值;

[0119] OD_1:测试胶原蛋白样品各复孔在OD492nm处的吸光度平均值;

[0120] OD_2:对照胶原蛋白样品各复孔在OD492nm处的吸光度平均值;

[0121] OD_0:空白对照组各复孔在OD492nm处的吸光度平均值。

[0122] 细胞的贴壁率即可以反映各蛋白的黏附活性。蛋白的活性越高,越能在短时间给细胞提供优质的外环境,帮助细胞贴壁。

[0123] 图2实验结果表明,相比于牛I型胶原蛋白(PC组,0.5mg/ml),本发明的重组胶原蛋白C6A1具有更加优秀的生物黏附活性。同样地,可以预期C6A2-C6A5也具备生物黏附活性。

[0124] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

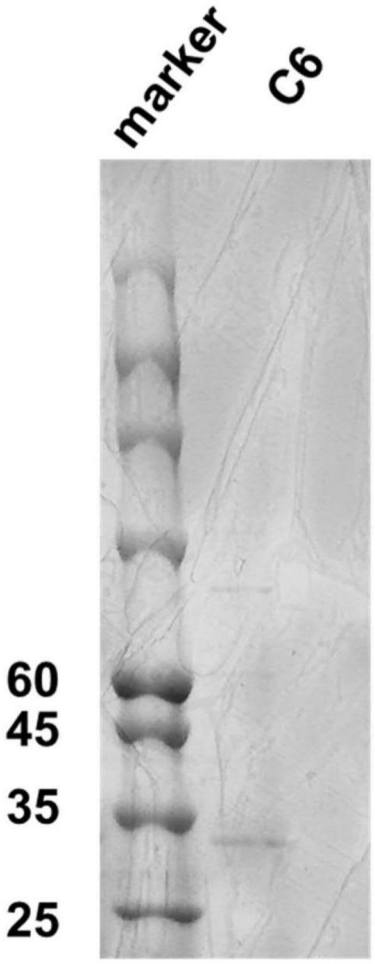

图1

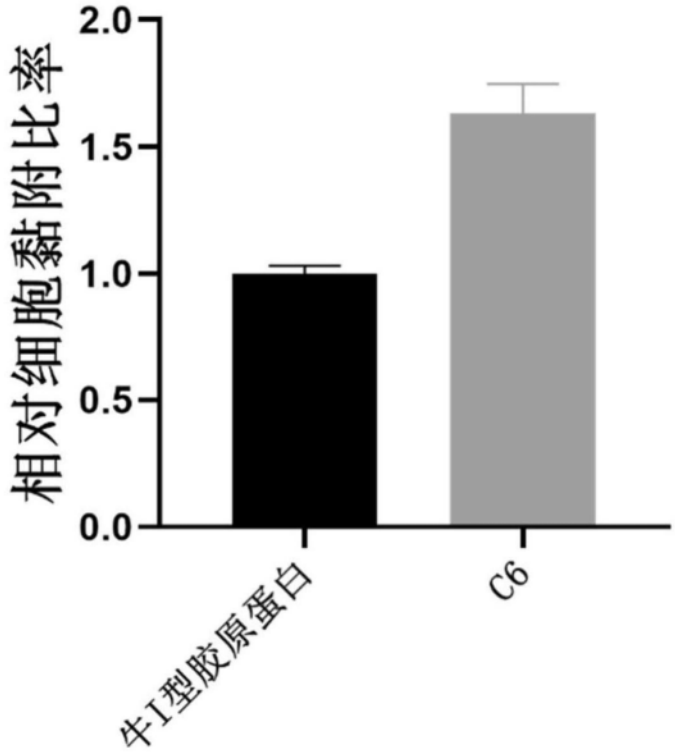

图2