



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108503691 A

(43)申请公布日 2018.09.07

(21)申请号 201710105087.2

G01N 33/68(2006.01)

(22)申请日 2017.02.25

(71)申请人 复旦大学

地址 200433 上海市杨浦区邯郸路220号

(72)发明人 朱乃硕 刘宝修

(74)专利代理机构 上海正旦专利代理有限公司

31200

代理人 陆飞 陆尤

(51)Int.Cl.

C07K 7/08(2006.01)

C07K 14/00(2006.01)

C12N 15/11(2006.01)

A61K 38/10(2006.01)

A61K 38/16(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

序列表2页 附图2页

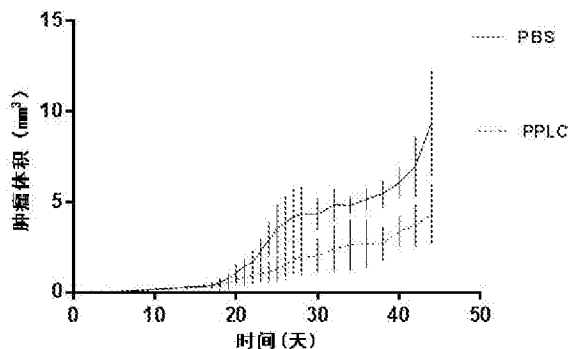
(54)发明名称

一种人PD-L1蛋白高亲和性肽及其应用

(57)摘要

本发明属于生物技术领域,具体为一种人PD-L1蛋白亲和多肽及其应用。本发明肽的氨基酸序列为SEQ.ID.NO.1,SEQ.ID.NO.3和SEQ.ID.NO.4所示,或者为SEQ.ID.NO.1,SEQ.ID.NO.3和SEQ.ID.NO.4单次重复或多次重复的串联或分支的肽分子序列,其氨基酸序列为SEQ.ID.NO.5所示;该肽对人PD-L1蛋白具有高亲和性,可以竞争性的阻断PD-1/PD-L1蛋白的亲合,阻断人体肿瘤的负调控耐受通路,活化免疫,提高T细胞对肿瘤细胞的杀伤力,达到治疗肿瘤的目的。本发明的肽在经过一定的修饰后可以作为药物,应用于肿瘤的治疗;同时也可作为检测试剂,用于定量、定性和定位检测各种生物样品和细胞PD-L1蛋白的表达或存在。

PPLC



1. 一种人PD-L1蛋白高亲和性肽,其特征在于,氨基酸序列为SEQ.ID.NO.1, SEQ.ID.NO.3和SEQ.ID.NO.4之一;或者为SEQ.ID.NO.1,SEQ.ID.NO.3和SEQ.ID.NO.4单次重复或多次重复的串联或分支的肽分子序列,其氨基酸序列为SEQ.ID.NO.5。

2. 一种编码如权利要求1所述PD-L1蛋白高亲和性肽的编码基因,其特征在于,核苷酸序列为SEQ.ID.NO.2。

3. 一种经过生物和化学基团修饰的肽,其特征在于,含有如权利要求1所述PD-L1蛋白高亲和性肽作为核心序列的C端,或N端,或侧链基团上加PEG修饰或其他分子基团共价修饰的结构特征分子。

4. 一种经过修饰的多肽,其特征在于,如权利要求1所述PD-L1蛋白高亲和性肽的加FITC等荧光基团修饰、同位素标记、化学发光基团或酶标试剂修饰的分子,可用于检测PD-L1蛋白。

5. 如权利要求1所述的人PD-L1蛋白高亲和性肽在制备PD-L1蛋白拮抗药物中的应用。

6. 如权利要求1所述的人PD-L1蛋白高亲和性肽在制备PD-L1蛋白表达检测物和临床检测物中的应用。

7. 如权利要求2所述的PD-L1蛋白高亲和性肽的编码基因在制备表达PD-L1蛋白拮抗药物和示踪检测物中的应用。

一种人PD-L1蛋白高亲和性肽及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种人PD-L1蛋白高亲和性肽及其应用。

背景技术

[0002] 肿瘤是威胁人类健康的一种比较严重的疾病,且难以有效的预防。目前治疗肿瘤的方法主要有放疗、化疗和手术治疗等,但效果一般,手术后的5年生存率较低。开发出一种有效的治疗肿瘤的药物是当前肿瘤研究的热门课题。以抗PD-1/PD-L1为代表的免疫检测点疗法是近年来兴起的一种肿瘤治疗的全新手段,目前已经被FDA批准用于临床治疗的PD-1/PD-L1抗体类药物有三个,虽然都在一定程度上有效果,但也伴随着效率低、副作用及脱靶的表现。因此开发出一种高效、持久、具有广泛治疗作用的药物迫在眉睫。

[0003] 采用化学的方法合成、纯化后得到目的多肽。采用ELISA的方法检测多肽与PD-L1蛋白的解离常数,并检测该多肽对PD-1/PD-L1信号通路的体外阻断作用;用流式细胞仪检测该多肽对肿瘤细胞表面表达PD-L1蛋白的亲合作用;最后再注射小鼠肿瘤动物模型,通过观察小鼠肿瘤大小的变化及生存时间的变化推断该多肽治疗肿瘤的潜在价值。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种人PD-L1蛋白高亲和性肽及其在治疗肿瘤方面的应用。

[0005] 本发明提供的人PD-L1蛋白高亲和性肽(记为PPLC),其氨基酸序列为SEQ. ID. NO. 1所示,具有如下功能特征:①可与人PD-L1蛋白,测得解离常数可达 $0.75\mu\text{M}$ (解离常数表示一半受体被配体结合时配体的浓度,Kd值越小代表受体与配体的亲和性越高);②可有效阻断PD-1/PD-L1蛋白的亲合;③可有效的和细胞表面表达的PD-L1蛋白结合;④注射接种肿瘤的动物,可有效抑制肿瘤的生长,延长动物生存时间。

[0006] 本发明还提供编码所述人PD-L1蛋白高亲和性肽的基因(由相应氨基酸各简并密码子构成),其核苷酸序列为SEQ. ID. NO. 2所示。

[0007] 通过生物技术改造,本发明还获得了一系列序列不同,但是具有SEQ. ID. NO. 1所示肽相同功能的肽序列,其序列主要包括:SEQ. ID. NO. 3、SEQ. ID. NO. 4。

[0008] 本发明还提供一种同时含有PD-L1蛋白高亲和性肽氨基酸序列的SEQ. ID. NO. 1,氨基酸序列为SEQ. ID. NO. 3和氨基酸序列为SEQ. ID. NO. 4的肽序列,为单次重复或多次重复的串联或分支的肽分子序列,及含有这些核心序列特征(同源性在70%以上)的分子,其肽氨基酸序列为SEQ. ID. NO. 5所示。

[0009] 本发明还提供一种经过生物和化学基团修饰的肽,其含有PD-L1蛋白高亲和性肽SEQ. ID. NO. 1,SEQ. ID. NO. 3和SEQ. ID. NO. 4作为核心序列的C端(或N端,或侧链)基团上加抗原或药物或PEG修饰或其他分子基团共价修饰的结构特征分子。

[0010] 本发明还提供一种经过修饰的肽,包括上述各种PD-L1蛋白高亲和性肽,其PD-L1蛋白高亲和性肽的加FITC等荧光基团修饰、同位素标记、化学发光基团或酶标试剂修饰的分子,用于检测PD-L1蛋白。

[0011] 本发明还提供上述各种PD-L1蛋白高亲和性肽,在制备PD-L1蛋白拮抗剂中的应用。

[0012] 本发明还提供上述各种PD-L1蛋白高亲和性肽,在制备PD-L1蛋白表达检测物和临床检测物中的应用。

[0013] 本发明还提供如核苷酸序列为SEQ. ID. NO. 2的肽基因在制备表达PD-L1蛋白拮抗剂中的应用和在示踪检测中的应用。

[0014] 本发明的氨基酸序列为SEQ. ID. NO. 1的肽可作为PD-L1蛋白的拮抗药物。该肽与PD-L1蛋白具有较强的亲和性,可以阻断人体免疫的负调控信号通路PD-1/PD-L1,从而活化免疫,启动T细胞对肿瘤的杀伤,可作为潜在的肿瘤靶向治疗的药物。本发明的氨基酸序列为SEQ. ID. NO. 3、SEQ. ID. NO. 4的肽同样可以作为PD-L1蛋白的拮抗药物。这两条肽同样与PD-L1蛋白具有较强的亲和性,并且可阻断PD-1/PD-L1的亲合,启动免疫对肿瘤细胞的杀伤。

[0015] 该肽与PD-L1蛋白亲和性实验结果:将2 μ g/ml的PD-L1蛋白4 $^{\circ}$ C过夜包被96孔酶标版上,加入不同浓度的带有FITC标记的PPLC肽共孵育1h,加入HRP标记的抗FITC的抗体孵育1h,然后加入ABTS显色液,通过M5酶标仪读取OD410数值,GraphPad Prism 6作图并分析。结果证实PPLC与PD-L1蛋白具有极强的亲和力,解离常数为0.75 μ M(图1)。

[0016] 该肽与PD-1竞争性结合PD-L1蛋白的实验结果:将2 μ g/ml的PD-L1蛋白4 $^{\circ}$ C过夜包被96孔酶标版上,将不同浓度的PPLC和1 μ g/ml的PD-1蛋白混合,孵育后加入兔抗人PD-1的单抗作为一抗,HRP标记的羊抗兔IgG的单抗作为二抗,ABTS显色后用M5酶标仪读取OD410,GraphPad Prism 6作图并分析。结果显示PPLC可有效阻断PD-1/PD-L1的结合(图2)。

[0017] 该肽与细胞表面表达的PD-L1蛋白结合的实验结果:将重组人PD-L1蛋白重组质粒转染CHO细胞株,培养36小时后,加入PD-L1蛋白单抗或带有FITC标记的PPLC肽,4 $^{\circ}$ C孵育30分钟,跑流式细胞仪检测(图3);转染质粒后继续培养36小时,加入带有FITC标记的PPLC肽37 $^{\circ}$ C孵育30分钟,荧光共聚焦检测(图4)。结果显示PPLC肽可以有效和细胞表面表达的PD-L1蛋白结合(图3/图4)。

[0018] 该肽对肿瘤动物模型肿瘤体积大小的影响:将实验动物分为PBS组和PPLC组,对6周大的雌性Ba1b/c皮下接种肿瘤,两周后待肿瘤达到100mm³时,进行PPLC药物治疗。每天量取小鼠肿瘤的大小,并记录差异。结果发现该肽可以显著的降低小鼠肿瘤的生长速度(图5),延长小鼠的生存时间(图6)。

[0019] 由此可见,该肽对PD-L1蛋白具有极强的亲和性,利用该肽可以阻断人体内的PD-1/PD-L1蛋白的亲合,从而打破肿瘤的免疫耐受,活化免疫,启动T细胞对肿瘤的杀伤,达到治疗肿瘤的目的。因此,可将该肽作为一种肿瘤靶向治疗的药物。由于PPLC肽具有与PD-L1蛋白的高亲和特性,可以用于制备检测PD-L1蛋白的探针,当将PPLC肽用FITC等荧光基团修饰、同位素标记、化学发光基团或酶标试剂修饰的分子,可用于定量、定性和定位检测各种生物样品和细胞PD-L1蛋白的存在。

附图说明

[0020] 图1 为PPLC对PD-L1蛋白的亲和性。

[0021] 图2为PPLC阻断PD-1/PD-L1蛋白的结合。

[0022] 图3为流式细胞实验结果。其中,左图为PD-L1单抗(PD-L1-Ab)检测结果,右图为多肽PL-C检测结果。灰色阴影为PD-L1阴性对照细胞,红色和蓝色的线为PD-L1阳性的CHO-PDL1表达细胞。

[0023] 图4为荧光共聚焦实验结果。其中,右上图显示FITC标记的PPLC肽与CHO细胞表面表达的PD-L1高度亲和而用共聚焦显微镜观察检测的结果。

[0024] 图5为 PPLC抑制小鼠肿瘤的生长。

[0025] 图6为 PPLC延长小鼠生存时间。

具体实施方式

[0026] 一、多肽序列的获得与改造

通过化学的方法人工合成所需的多肽序列,序列具有与PD-L1蛋白亲和的作用,并且能够阻断PD-1/PD-L1蛋白的亲和。

[0027] 二、多肽的合成与纯化

Lys(Dde)-WangResin用DCM浸泡10min后抽干DCM,然后加入树脂体积三倍的25%哌啶(哌啶/DMF),用氮气鼓吹20min后抽干哌啶。加入DMF鼓吹1min,循环6次后抽干,取树脂茚三酮检测呈蓝色。产物为:H-Lys(Dde)-WangResin。加入树脂3倍当量的Fmoc-Val-OH,HATU,DIEA在DMF中。用氮气鼓吹20min后抽干DMF反应液,加入DMF用氮气鼓吹1min后抽干,循环3次,茚三酮检测树脂呈透明。产品为:Fmoc-Val-Lys(Dde)-WangResin,依次类推,得到粗产品。用乙腈、Milli-Q水通过汉邦YCM C18柱子进行纯化。从而获得高特异性、高活性的目的多肽。

[0028] 三、PPLC对PD-L1蛋白的亲亲和动物实验结果

1、该肽与PD-L1蛋白亲和性实验结果:将2 μ g/ml的PD-L1蛋白4 $^{\circ}$ C过夜包被96孔酶标版上,加入不同浓度的带有FITC标记的PPLC肽共孵育1h,加入HRP标记的抗FITC的抗体孵育1h,然后加入ABTS显色液,通过M5酶标仪读取OD410数值,GraphPad Prism 6作图并分析。结果证实PPLC与PD-L1蛋白具有极强的亲和力,解离常数为0.75 μ M。

[0029] 2、该肽与PD-1竞争性结合PD-L1蛋白的实验结果:将2 μ g/ml的PD-L1蛋白4 $^{\circ}$ C过夜包被96孔酶标版上,将不同浓度的PPLC和1 μ g/ml的PD-1蛋白混合,孵育后加入兔抗人PD-1的单抗作为一抗,HRP标记的羊抗兔IgG的单抗作为二抗,ABTS显色后用M5酶标仪读取OD410,GraphPad Prism 6作图并分析。结果显示PPLC可有效阻断PD-1/PD-L1的结合。

[0030] 3、该肽与细胞表面表达的PD-L1蛋白结合的实验结果:将重组人PD-L1蛋白重组质粒转染CHO细胞株,培养36小时后,加入PD-L1蛋白单抗或带有FITC标记的PPLC肽,4 $^{\circ}$ C孵育30分钟,跑流式细胞仪检测;转染质粒后继续培养36小时,加入带有FITC标记的PPLC肽37 $^{\circ}$ C孵育30分钟,荧光共聚焦检测。结果显示PPLC肽可以有效和细胞表面表达的PD-L1蛋白结合。

[0031] 4、该肽对肿瘤动物模型肿瘤体积大小的影响:将实验动物分为PBS组和PPLC组,对雌性Ba1b/c皮下接种肿瘤,两周后待肿瘤达到100mm³时,进行PPLC药物治疗。每天量取小鼠肿瘤的大小,并记录差异。结果发现该肽可以显著的降低小鼠肿瘤的生长速度,延长小鼠的生存时间。

[0032] 结果(如图1-图6)发现,PPLC与PD-L1蛋白具有极强的亲和作用,并且能在分子水

平上阻断PD-1/PD-L1蛋白的亲合。动物实验结果表明,经PPLC肽治疗后的小鼠肿瘤体积显著的小于对照组。以上结果说明PPLC可以打破肿瘤免疫耐受,通过提高T细胞对肿瘤细胞的杀伤,达到治疗肿瘤的目的。

[0033] 四、具体应用

肿瘤免疫疗法是近年来兴起的一种治疗肿瘤的新的手段,以PD-1/PD-L1蛋白为代表的免疫检测点阻断治疗是其中重要的组成部分。目前已经有PD-1/PD-L1抗体类药物通过了美国食品与药品监督管理局的批准,在临床使用当中,并且在黑色素瘤等疾病当中表现出了较好的效果。但是于此同时,抗体治疗也面临免疫原性较高、费用昂贵、副作用大以及脱靶等较多的问题。开发一种既具有靶向、又具有较小免疫原性的抗肿瘤药物是当今免疫学发展的一个重要方向。本发明提供的人PD-L1蛋白高亲和性肽可阻断PD-1/PD-L1蛋白的结合,打破肿瘤的免疫耐受,显著的抑制肿瘤细胞的生长,因此可作为潜在的肿瘤靶向治疗的药物。另外经过修饰的PPLC肽,可以检测人PD-L1蛋白的表达,作为检测试剂使用。

SEQUENCE LISTING

<110> 复旦大学

<120> 一种人PD-L1蛋白高亲和性肽及其应用

<130> 001

<160> 5

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213>

<400> 1

Val Ser Val Ser His Phe Gln Lys Val Trp Val Val

1 5 10

<210> 2

<211> 45

<212> DNA

<213>

<400> 2

gtgagtgtgt cgcattttca gaaggtttgg gttgtgggtg gaggt

45

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213>

<400> 3

His Glu Ser Trp Leu Pro Ala Tyr Val Leu Gly Ser

1 5 10

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213>

<400> 4

His Thr Ser Trp Ile Leu Tyr Gly Glu Thr Gly Trp

1 5 10

<210> 5

<211> 40

<212> PRT

<213>

<400> 5

Val Ser Val Ser His Phe Gln Lys Val Trp Val Val Asp Met His Glu
1 5 10 15
Ser Trp Leu Pro Ala Tyr Val Leu Gly Ser Asp Met His Thr Ser Trp
 20 25 30
Ile Leu Tyr Gly Glu Thr Gly Trp
 35 40

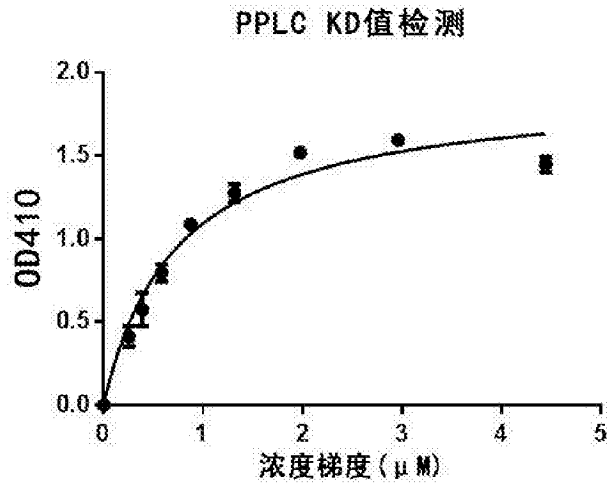


图1

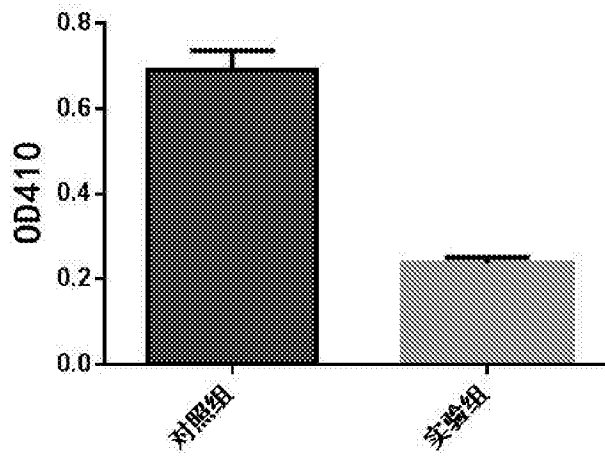


图2

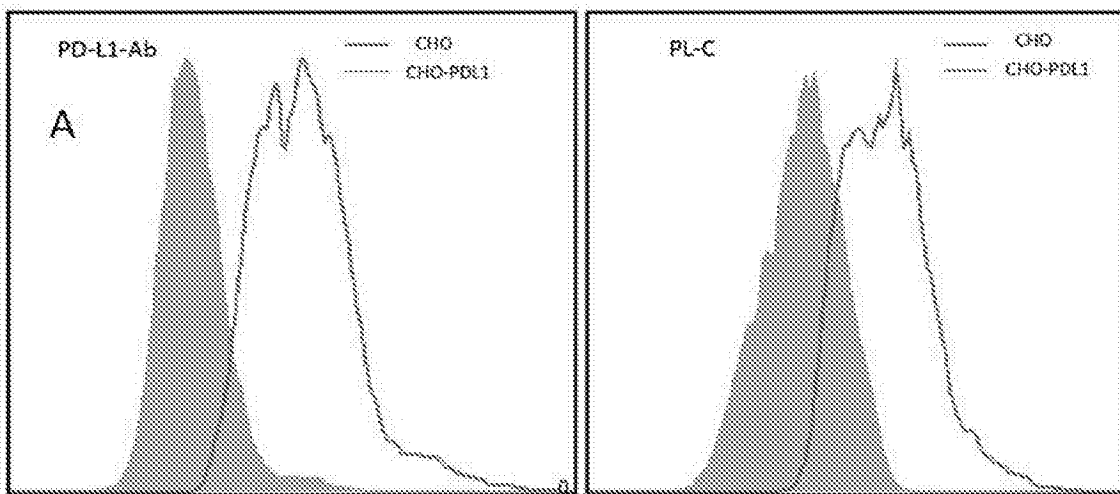


图3

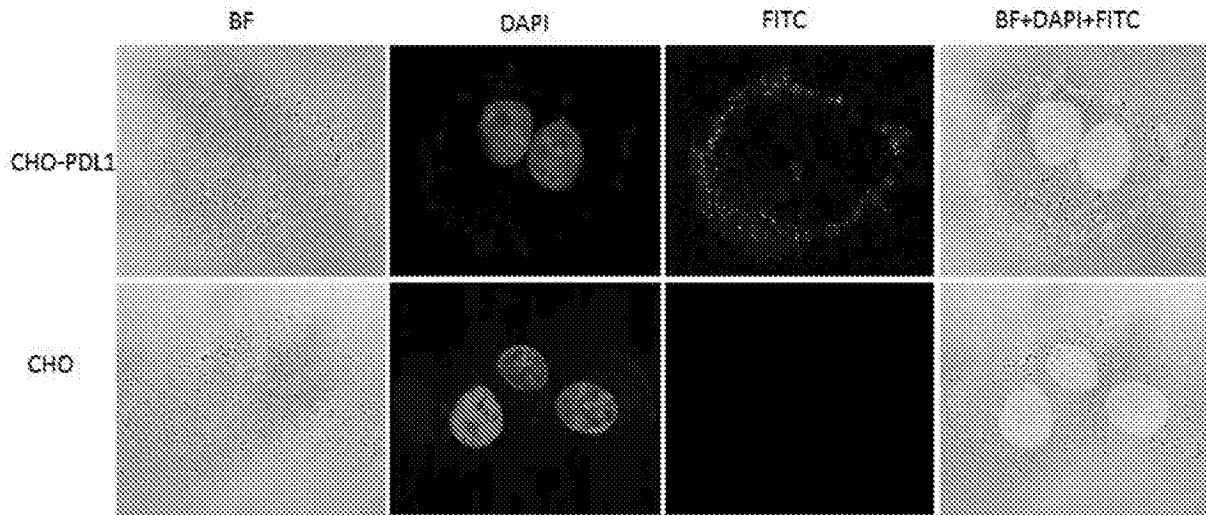


图4

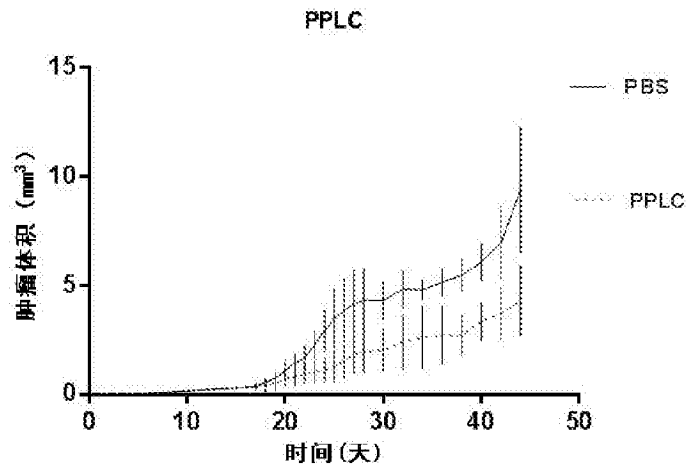


图5

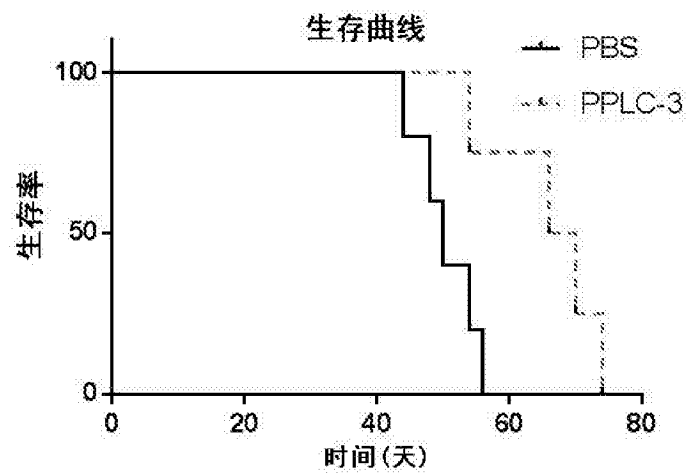


图6