



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 111875673 A

(43) 申请公布日 2020.11.03

(21) 申请号 202010762743.8

(22) 申请日 2020.07.31

(71) 申请人 江苏莱森生物科技研究院有限公司

地址 212004 江苏省镇江市京口区新区丁
卯经十五路99号30幢

(72) 发明人 刘晗青 屠志刚

(74) 专利代理机构 南京智造力知识产权代理有
限公司 32382

代理人 陈佳佳

(51) Int. Cl.

C07K 7/23 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

A61K 38/09 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

一种具有抗肿瘤活性的多肽及其用途

(57) 摘要

本发明属于生物技术领域,具体涉及一种具有抗肿瘤活性的多肽及其用途。本发明通过蛋白表达载体的构建、靶蛋白的表达和纯化、靶蛋白的验证、噬菌体展示淘选特异性结合靶蛋白的生物活性肽、多肽抗肿瘤作用体外检测实验等过程,最终筛选得到的具有抗肿瘤活性的多肽。本发明提供的多肽以黄体生成素释放激素受体(LHRHR)为靶分子,经三轮噬菌体展示技术淘选得到。所提供的多肽序列较短,易于合成和实现规模化生产,在抗肿瘤药物研发方面具有重要应用价值。

1. 一种具有抗肿瘤活性的多肽,其特征在于,所述多肽的氨基酸序列为:Ala Leu Gly Ile Ala His Tyr Lys Trp Gly Ala Val。
2. 根据权利要求1所述多肽的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:
 - (1) LHRHR的胞外片段目的基因导入原核表达载体pET-30a,构建靶蛋白表达载体pET-30a/(His)₆-LHRHR;
 - (2) IPTG诱导靶蛋白表达载体大量表达,亲和层析纯化得到重组蛋白(His)₆-LHRHR;
 - (3) 重组蛋白(His)₆-LHRHR包被固定后与十二肽噬菌体文库中噬菌体结合,淘选特异性结合靶蛋白的生物活性肽,得到抗肿瘤活性多肽。
3. 权利要求1所述的具有抗肿瘤活性的多肽用于制备抗肿瘤药物的用途。
4. 根据权利要求3所述的用途,其特征在于,所述肿瘤为卵巢癌。

一种具有抗肿瘤活性的多肽及其用途

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种具有抗肿瘤活性的多肽及其用途。

背景技术

[0002] 黄体生成素释放激素(LHRH)又称促性腺激素释放激素(GnRH),是由垂体分泌的一种去甲肽,对哺乳动物的生殖有重要作用。黄体生成素释放激素受体(LHRHR)是一种七种跨膜G蛋白-偶联蛋白,由GnRH结合后激活,经酪氨酸磷酸酶的刺激从垂体释放黄体生成激素(LH)。最近的研究表明,卵巢癌是一种LHRH依赖性肿瘤。LHRHR在卵巢癌细胞中的表达高于正常组织,LHRHR成为卵巢癌的一个有希望的治疗靶点。

[0003] 噬菌体展示技术是将外源蛋白或多肽的DNA序列插入到噬菌体外壳蛋白结构基因的适当位置,使外源基因随外壳蛋白的表达而表达,同时,外源蛋白随噬菌体的重新组装而展示到噬菌体表面的生物技术。噬菌体技术的优势在于它能够识别蛋白质和其他分子的相互作用区域,而不必事先对相互作用的性质有任何概念。近十年来,噬菌体展示技术的应用取得了长足的进步。不同的筛选方法已允许在体外、活细胞、动物和人类中分离和鉴定与分子结合的肽。但现有技术中尚缺少通过噬菌体展示技术对LHRHR进行靶向药物研究的报道。

发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明针对现有技术中存在的不足,本发明的主要目的是提供一种具有抗肿瘤活性的多肽及其用途。本发明利用噬菌体展示技术筛选出的多肽序列较短,具有显著的抗肿瘤活性,无急性或慢性毒性作用,具有广阔的临床应用价值和前景。

[0005] 本发明的上述目的通过如下技术方案得以实现:

一方面,本发明提供一种具有抗肿瘤活性的多肽,其氨基酸序列为:Ala Leu Gly Ile Ala His Tyr Lys Trp Gly Ala Val。

[0006] 另一方面,本发明还提供了一种具有抗肿瘤活性多肽的制备方法,包括以下步骤:

(1) LHRHR的胞外片段目的基因导入原核表达载体pET-30a,构建靶蛋白表达载体pET-30a/(His)₆-LHRHR;

(2) IPTG诱导靶蛋白表达载体大量表达,亲和层析纯化得到重组蛋白(His)₆-LHRHR;

(3) 重组蛋白(His)₆-LHRHR包被固定后与十二肽噬菌体文库中噬菌体结合,淘选特异性结合靶蛋白的生物活性肽,得到抗肿瘤活性多肽。

[0007] 另一方面,本发明还提供了前文所述具有抗肿瘤活性多肽在制备抗肿瘤药物中的用途。在某一优选实施方案中,所述的抗肿瘤为治疗卵巢癌。

[0008] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:

本发明利用噬菌体展示技术筛选出一种具有抗肿瘤活性的多肽。本发明多肽以黄体生成素释放激素受体(LHRHR)为靶分子,成功将靶标LHRHR的胞外片段的目的基因导入原核表达载体pET-30a,经IPTG诱导后,带有载体上标签的重组蛋白(His)₆-LHRHR大量表达。经两步亲和层析纯化后,得到较纯的重组蛋白(His)₆-LHRHR。经包被固定以后,随机十二肽噬

菌体文库中的噬菌体与之结合,经过3轮淘选,富集得到具有高亲和力的噬菌体。淘选到的单克隆噬菌体扩增提取之后,对其进行测序,并合成了出现频率最高的多肽。经验证,本发明所提供的多肽具有显著的抗肿瘤活性,没有急性或慢性毒性作用。本发明所提供的多肽序列较短,在体内容易运输;整个多肽生产过程耗时短、成本低、操作易行,易于实现规模化生产,在抗肿瘤药物研发方面具有重要应用价值,具有广阔的临床应用价值和前景。

附图说明

[0009] 图1是蛋白表达载体pET-30a/(His)₆-LHRHR的构建图;

图2是SDS-PAGE验证重组蛋白(His)₆-LHRHR的表达和纯化图;

图3是噬菌体淘选序列分布结果图。

具体实施方式

[0010] 本发明公开了一种具有抗肿瘤活性的多肽及其用途,本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和/或应用进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。以下实施例中的方法、设备、材料,如果未进行特别说明,均为本领域常规方法、设备和材料,均可由市场购得。

[0011] 试剂:BamHI、Hind III、T4 DNA连接酶、DH5 α 感受态细胞、BL21 (DE3) 菌株、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)均来自于上海生工生物工程公司,载体pET-30a来自于金斯瑞生物科技有限公司,Ni-NTA来自于李记生物科技有限公司。

[0012] 实施例1:pET-30a/(His)₆-LHRHR蛋白表达载体的构建

如图1所示构建pET-30a/(His)₆-LHRHR,从Genbank数据库查找LHRHR的基因序列(1-125AA, NM_000233.4),设计PCR引物,上游引物序列为:5'-CGGGATCCATGAAGCAGCGGTTCTCGGC-3'(BamHI),下游引物序列为:5'-CCAAGCTTGCTCCGGGCTCAATGTATCT-3'(HindIII),下划线部分为酶切位点序列。PCR产物和载体pET-30a经BamHI和Hind III 37 °C酶切3 h之后,用T4 DNA连接酶在16 °C连接12 h。将连接产物转化进入 DH5 α 感受态细胞,然后将转化产物涂布在卡那霉素抗性(50 μ g/ml)LB平板上培养直至单菌落长出,挑取单菌落,提取质粒进行酶切验证,将重组质粒测序,得到重组质粒pET-30a/(His)₆-LHRHR。

[0013] 实施例2:(His)₆-LHRHR的表达、纯化及验证

将实施例1中制备的将重组质粒pET-30a/(His)₆-LHRHR转化到BL21 (DE3) 菌株中,用卡那霉素抗性LB平板筛选重组质粒,于10 ml LB液体培养基(含50 μ M卡那霉素)中培养至OD₆₀₀约为0.5后将培养物以体积比1:10的比例接种于多瓶LB液体培养基中,37 °C剧烈震荡培养至OD₆₀₀约为0.5,加入终浓度为1 mM的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)于37 °C诱导10 h,得菌液。

[0014] 将菌液离心,去上清,以菌液:裂解液=20:1体积比的比例将细菌沉淀重悬于裂解液中(50 mM Tris-HCl,20 mM 咪唑,100 mM NaCl,10% 甘油,1% 曲拉通,1 mM 蛋白酶抑制剂PMSF,1 mg/ml溶菌酶,PH 8.0),在冰上放置30 min,超声,12000 g离心30 min收集上

清得到总蛋白。将总蛋白进行BCA定量后,以蛋白: Ni-NTA = 10 mg : 1 ml的比例在蛋白液中加入Ni-NTA,在4 °C下结合5 h,去上清;装柱,用裂解液平衡,5倍体积的裂解液洗柱,最后用10倍柱体积的洗脱液(250 mM 咪唑,其他组分与裂解液相同)收集洗脱下来的靶蛋白。

[0015] 使用SDS-PAGE验证靶蛋白的表达和纯化,将收集的靶蛋白样品用BCA方法定量后,按照每孔加入30~50 μg (纯化后蛋白为2~5 μg)的蛋白量上样。12%聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE) 100V恒压下电泳100 min分离蛋白,结果如图2所示,在27kD处有较明显的目的条带。。

[0016] 实施例3:噬菌体展示淘选特异性结合LHRHR的生物活性肽

(1) 固定靶蛋白:将600 μl 浓度为17 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的靶蛋白溶液(0.1 M的 NaHCO_3 pH 8.6)加入六孔板中,置于摇床上轻微振荡,4°C孵育过夜。用TBST(50 mM Tris-HCl pH 7.5,150 mM NaCl,0.1%[v/v] Tween-20)清洗6次后,用封阻液(0.1 M NaHCO_3 pH 8.6,5 mg/ml BSA,0.02% NaN_3)封闭1 h。

[0017] (2) 筛选特异性结合的噬菌体:用TBST清洗六孔板10次。扩增后的噬菌体用TBST稀释到拷贝数在 $10^9\sim 10^{11}$ 之间,将稀释好的噬菌体加入到六孔板上使之与靶蛋白结合,室温孵育约60 min。TBST清洗10次,每次清洗后拍干。加洗脱液,收集特异性结合靶蛋白的噬菌体。

[0018] (3) 单克隆噬菌体信息的提取:噬菌体扩增并再重复以上淘选2轮。3轮淘选后,将最后一轮洗脱下来的噬菌体感染宿主菌ER2738后铺在LB/IPTG/Xgal板上。12 h后,噬菌体蓝斑长成,挑取蓝斑并进行单克隆噬菌体扩增。以单克隆噬菌体为模板,设计PCR引物5' - TTATTCGCAATTCCTTTAG-3' 和5' -CCCTCATAGTTAGCGTAACG-3' 扩增随机多肽序列,对扩增产物进行测序并分析各种随机多肽所占比例。

[0019] 经三轮噬菌体淘选后,共挑取23个噬菌体蓝斑,对其分别进行扩增后收集噬菌体,设计引物对其随机多肽插入序列进行了PCR扩增,对得到的噬菌体随机多肽序列进行测序。图3是噬菌体淘选序列分布结果图,如图3所示,经3轮淘选之后,共得到了7种多肽序列,分别占比例72%,9%,7%,5%,4%,2%,1%,最终选择比例最高的多肽序列,其序列为:Ala Leu Gly Ile Ala His Tyr Lys Trp Gly Ala Val。

[0020] 实施例4:多肽抗肿瘤作用检测

本实施例采用MTT法检测实施例3中所筛选出来的多肽的抗肿瘤作用:分别培养常规养健康的SKOV3、OVCAR3、OVCAR8 和A2780细胞(均购自于中科院),胰酶消化后离心,进行细胞计数,使用96孔板,每孔90 μL RPMI1640培养基含2500个细胞。PBS稀释得到不同浓度的多肽,每孔加10 μL 不同浓度的多肽溶液,每组种3个复孔,在含有5% CO_2 、37 °C细胞培养箱中培养,72 h后待测。每个待检测孔加10 μL 5 mg/mL的MTT溶液,于培养箱中孵育1.5 h,显微镜下观察有蓝紫色甲瓞结晶,倒出上清液,每孔加100 μL DMSO溶解结晶,摇匀,最后用酶标仪在550 nm波长处测定每孔吸光值,计算细胞的相对存活率。

[0021] 表1. 卵巢癌细胞株的细胞存活率对照表。

	SKOV3	OVCAR3	OVCAR8	A2780
IC ₅₀ (μM)	4.79	12.11	9.31	5.37

[0022] 当IC₅₀(抑制率达到50%时的多肽的浓度)处在较低的浓度范围内时就能够很好的

抑制肿瘤细胞的增殖,由表1可见,本发明所筛选得到的多肽能够杀伤卵巢癌肿瘤细胞,尤其对OVCAR3细胞株具有良好的抑制作用,可以应用于卵巢癌治疗中的靶向药物研发。

[0023] 实施例5:多肽在体内对小鼠毒性作用观察

取6-8周昆明鼠,随机分为4组,其中三组分别为高中低剂量试验组,第四组为对照组(生理盐水),每组6只;将实施例3中得到的多肽用生理盐水分别稀释到200(低剂量组)、1000(中剂量组)、5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (高剂量组)后,尾静脉注射到小鼠体内。观察并记录小鼠的各种行为学指征变化。

[0024] 表2. 多肽在小鼠体内毒性作用的观察

	编号	饮水	摄食	排泄	运动	直立	动作协调性	一天内是否死亡	一周后是否死亡
对照组	1	-	-	-	-	-	-	否	否
	2	-	减少	-	-	-	-	否	否
	3	-	-	-	-	-	-	否	否
	4	-	-	-	-	-	-	否	否
	5	-	-	-	-	-	-	否	否
	6	减少	-	-	-	-	-	否	否
低剂量组	1	-	-	-	-	-	-	否	否
	2	-	-	-	-	-	-	否	否
	3	-	-	-	-	-	-	否	否
	4	-	减少	-	-	-	-	否	否
	5	-	-	-	-	-	-	否	否
	6	-	-	-	-	-	-	否	否
中剂量组	1	-	-	-	-	-	-	否	否
	2	-	-	-	-	-	-	否	否
	3	-	-	-	-	-	-	否	否
	4	减少	-	-	-	-	-	否	否
	5	-	-	-	-	-	-	否	否
	6	-	-	-	-	-	-	否	否
高剂量组	1	-	-	-	-	-	-	否	否
	2	-	-	-	-	-	-	否	否
	3	-	-	-	-	-	-	否	否
	4	-	-	-	-	-	-	否	否
	5	-	减少	-	-	-	-	否	否
	6	-	-	-	-	-	-	否	否

如表2所示,将本发明所提供的多肽分别按低中高剂量尾静脉注射入小鼠体内后,对小鼠的正常饮食、排泄与运动等因素均未见明显的影响,所记录各项行为学指征均正常,且在注射后一天及一周后均未发现小鼠死亡现象,说明本发明中的多肽进入小鼠体内对其没有明显的急性或慢性毒性作用。

[0025] 以上所述仅为本发明的实施方式,并非因此限制本发明的专利范围,凡是利用本发明说明书及附图内容所作的等效结构或等效流程变换,或直接或间接运用在其他相关的技术领域,均同理包括在本发明的专利保护范围内。

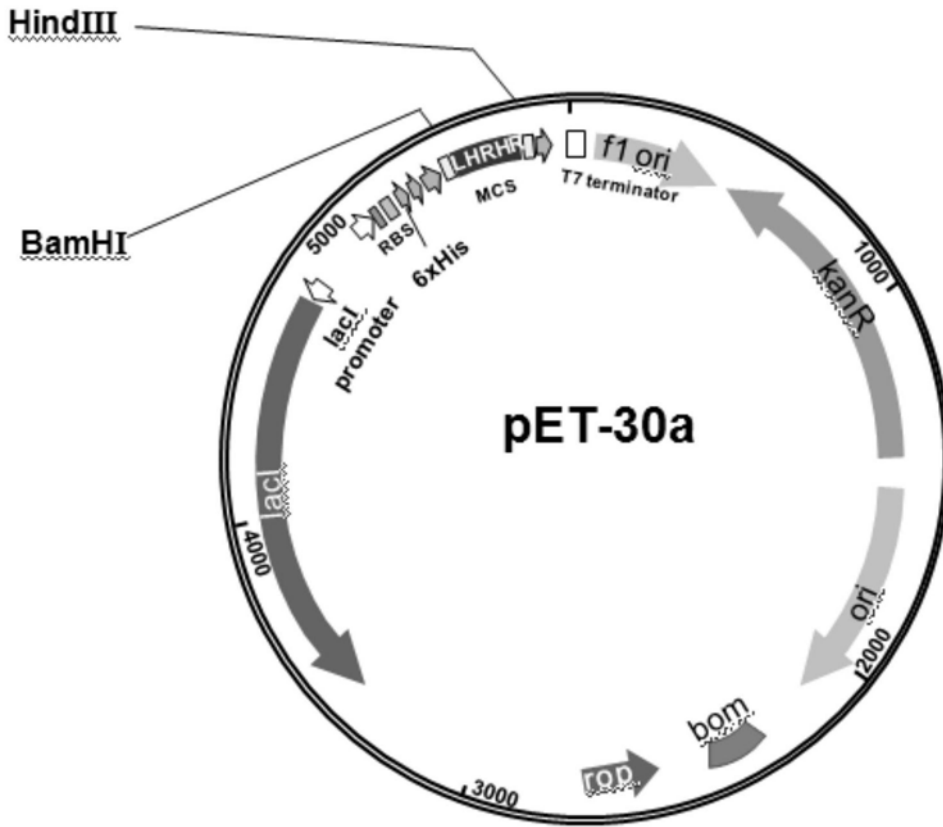


图1

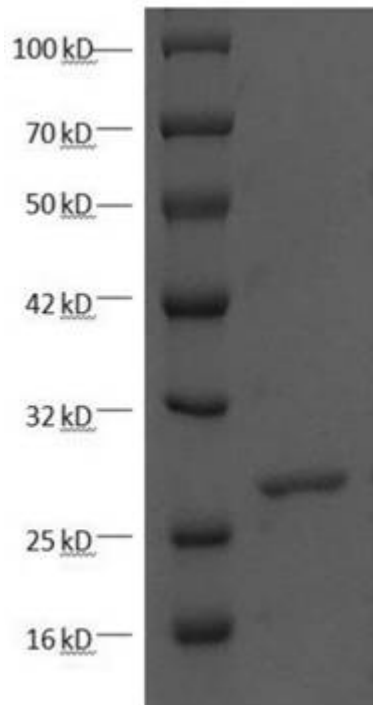


图2

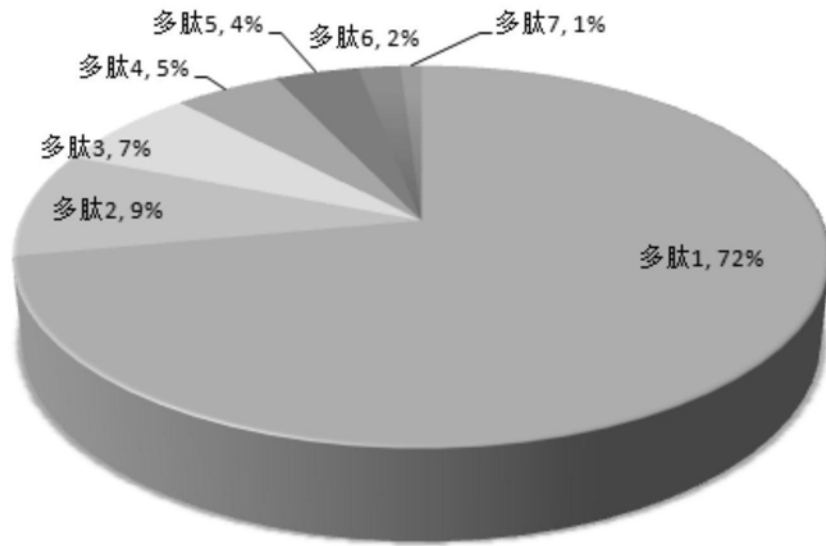


图3