



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101492505 B

(45) 授权公告日 2011. 11. 23

(21) 申请号 200810220336. 3

(22) 申请日 2008. 12. 24

(73) 专利权人 广东药学院

地址 510006 广东省广州市广州大学城外环
280 号

(72) 发明人 臧林泉 石磊 郭姣 潘雪刁
潘琴 巫玮

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限
公司 44102

代理人 陈卫

(56) 对比文件

CN 1397345 A, 2003. 02. 19,

CN 101033251 A, 2007. 09. 12,

WO 03/072599 A2, 2003. 09. 04,

审查员 潘天耀

(51) Int. Cl.

C07K 16/18 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

A61K 39/395 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

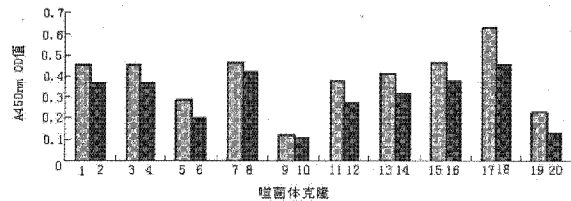
权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种肺癌特异性结合多肽及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开一种可与肺癌细胞特异性结合的多肽及其制备方法和应用,该肺癌细胞特异性结合多肽是通过噬菌体展示肽库减性筛选,获得肺癌特异性的噬菌体克隆,再经过 Elisa、免疫组织化学方法鉴定出与肺癌具有较强亲和力的噬菌体克隆,送去测序得到一条 12 多肽,其氨基酸序列如 SEQ ID NO :1 所示。本发明筛选得到的 12 多肽不但具有传统抗体分子优点,而且分子量小、穿透力强、容易到达肿瘤组织、具有良好的肿瘤靶向作用、诊断肿瘤更加灵敏,可用于制备诊断肿瘤的试剂盒,以及治疗肿瘤的药物。



1. 氨基酸序列如 SEQ ID NO :1 所示的肺癌特异性结合多肽在制备肺癌诊断试剂盒中的应用。

一种肺癌特异性结合多肽及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于蛋白质多肽技术领域,具体涉及一种可与肺癌细胞特异性结合的多肽及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 肺癌是世界范围内最常见、致死人数最多的恶性肿瘤之一,其发病率增长速度亦高居各恶性肿瘤之首。由于肺癌起病隐匿,目前仍缺乏有效的筛查和早期诊断方法,患者出现症状时多为晚期,预后较差,总的五年生存率不超过 15%,有症状者 $\leq 10\%$ 。目前,我国肿瘤患者的 5 年生存率(临床治愈率)大约在 20% -30%左右,其中肺癌仅 10%,肝癌 3%左右,长期以来,恶性肿瘤的治疗是一个世界性的难题。

[0003] 但是,在早期诊断的肺癌患者中,手术治疗的预后较中晚期肺癌明显改善,其生存率可达 70%。临床上传统的诊断方法如胸片、支气管镜、痰细胞学检查等方法,缺乏足够的特异性和敏感性,大多数肺癌患者确诊时已为晚期,因此,临床上急需一种能够早期诊断肺癌的方法。

[0004] 近年来,在肺癌的辅助诊断方面,肿瘤标志物(tumor marker, TM)的研究十分活跃。肿瘤标志物是指在肿瘤发生和增殖过程中,由肿瘤细胞所产生或分泌并释放到血液、细胞、体液中,反映肿瘤存在和生长的一类物质。它具有高效、高灵敏、方便、标本易获取及创伤小等优点,因此检测、筛选及鉴定肿瘤标志物一直是肺癌早期诊断研究的重点。

[0005] 肿瘤标志物对肺癌诊断的价值已经受到广泛的重视,目前尚未发现肺癌特异性抗原,用于检测的肺癌标志物均为肿瘤相关物质。

[0006] 目前,比较有代表意义的肺癌肿瘤标志物主要可以分为以下几类:①胚胎抗原:如癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA);②糖蛋白类抗原:主要有糖类抗原 19-9(carbohydrate antigen 19-9, CA19-9)、糖类抗原 15-3(carbohydrate antigen 15-3, CA15-3)、鳞状细胞抗原(squamous cell carcinoma antigen, SCC-Ag)等;③角蛋白类抗原:包括细胞角蛋白 19 片段抗原(cytokeratin fragment antigen 21-1, CYFRA21-1)、组织多肽特异性抗原(tissue polypeptide specific antigen, TPS)等。④酶类抗原:主要包括同工酶类,如胃泌素释放肽前体(Pro-gastrin peptide, ProGRP)、乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH)、谷胱甘肽转氨酶(glutathione transferase, GST)和基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)等。

[0007] 这些标志物有一定的代表性,但缺点是特异性不高,如在胚胎性肿瘤组织外,在成人胃肠、肺、乳腺等腺癌组织中均有表达癌胚抗原 CEA。因此 CEA 对恶性肿瘤的诊断,缺乏特异性,只有参考价值。

[0008] 因此,开发新的特异、灵敏的肺癌肿瘤标志物作为诊断肺癌的方法和新靶点,迫在眉睫。

[0009] 近十几年来,肿瘤的诊断与治疗已经取得了巨大的进步,尤其是各种图像分析仪和高灵敏度免疫学技术的应用,使得早期诊断、早期治疗由可能变为现实,但是仍不容乐

观。实践证明,抗体芯片技术将为肿瘤的早期诊断、肿瘤标志物的筛选与鉴定、药物治疗等提供新的平台,尤其在肿瘤标志物的筛选和鉴定检测中运用最广泛。

[0010] 邓安梅等(邓安梅,仲人前,陈孙孝,周晔,孔宪涛.用蛋白质芯片联合检测肺癌患者血清中的肿瘤标志物.中国免疫学杂志,2002)利用肿瘤标志物抗体芯片对肺癌患者、正常人及良性肿瘤血清的 CEA, NSE, CA242, CA153 等肿瘤标志物进行检测,阳性率分别为 80%, 3.3%, 6.6%, 另外,采用常规检测仪器定量与抗体芯片检测作比较,表明抗体芯片的反应强度与血标本中含量具有较好的相关性。以上均说明用肿瘤标志物抗体芯片可对肺癌的临床诊治提供有价值的依据。

[0011] 肺癌的发生与发展具有十分复杂的机制,在致癌因素的作用下患者体内可表达多种粘附分子及其受体或配体,在肿瘤发展的不同时期其释放标志物含量也不一样,这些指标绝大多数是非特异性的,尚无一种对各组织类型均具有高敏感性及高特异性的标志物,而只反映了疾病某些侧面的变化,单一标志物检测对肺癌的价值有限。

[0012] 目前国内外倾向于筛选有价值的肿瘤标志物进行联合检测,弥补了单项标志物对各病理组织类型肺癌敏感性不同的缺点,提高了肺癌诊断的敏感性和特异性,有一定的临床鉴别诊断价值。

[0013] 当前,抗体药物的研究与开发已成为生物技术药物领域的热点。目前处于临床前期、临床 I 期与临床 II 期研究与开发的各类生物技术药物中,抗体药物的品种数量位居前列。至今全球已报道的抗体有 10 多万种,其中基因工程抗体有 1000 多种,人源化抗体有 200 多种。

[0014] 目前,国际上已有 500 多种抗体用于诊断与治疗,美国食品药品监督管理局 (FDA) 至今已批准 18 个抗体上市,其中有 8 个是用于肿瘤治疗的靶向抗体。自 1997 年以来,美国 FDA 已先后批准 8 种用于治疗肿瘤的抗体药物,包括 Rituximab (Rituxan, 1997)、Trastuzumab (Herceptin, 1998)、Gemtuzumab (Mylotarg, 2000)、Alemtuzumab (Campath, 2001)、Ibritumomab (Zevalin, 2002)、Tositumomab (Bexxer, 2003)、Bevacizumab (Avastin, 2004) 和 Cetuximab (Erbix, 2004)。其中,Edrecolomab (Panorex, 1995) 在欧洲获批准。

[0015] 2005 年我国 SFDA 批准用于肿瘤的抗体药物有两种,即 hR-3 (泰欣生) 和 Licartin (Anti-Hab18G/CD147)。在上述的抗体药物中,Rituxan 和 Cetuximab 为嵌合抗体,Herceptin、Mylotarg、Campath、Avastin 和 hR-3 为人源化抗体,Panorex、Zevalin 和 Bexxer 为鼠源性抗体。Mylotarg 是抗体与抗肿瘤抗生素 calicheamicin 的偶联物。Zevalin 是抗体与放射性核素 ^{90}Y 的偶联物;Bexxer 和 Licartin 则是抗体与放射性核素 ^{131}I 的偶联物。

[0016] 目前美国 CeMines 公司已研制开发了 CellCorrect LAb 检测试剂盒,CellMines 公司声称,更进一步的研究证实作为鉴别肺癌的生物标志物的特定抗体具有特异性和一致性,能够作为癌症的诊断检测试验。

[0017] 四川绵阳高新区丽欧生物基因有限公司研究开发了不均一核糖核蛋白 B1 (HnRNP B1) 肺癌诊断试剂盒。主要用于肺癌高危人群的普查及肺癌的早期临床诊断。

[0018] 重庆瑞康生物制药有限公司研制的早期肺癌诊断试剂盒,采用抗肺癌表面抗原和特异性很高的单克隆抗体来诊断早期肺癌,大大提高了准确性。临床诊断时,只要抽取患者少量痰液进行检查,数十分钟就可以得出数据。这一诊断方法能减少因操作人员、诊断时间和地点的不同而产生的误差。

[0019] 专利 CN1405184 提供一种抗小细胞肺癌多肽混合物,该抗小细胞肺癌多肽混合物是一种抗小细胞肺癌P物质类似物的多肽混合物,有三种形式:SPDD多肽混合物、SPDD结构趋同化组合的多肽文库的多肽混合物以及前两者混合的多肽混合物,可用于制备抗小细胞肺癌的多肽药物。

[0020] 专利 CN1526725 抗肿瘤多肽及其应用,是人工合成了一种具有抗肿瘤作用的多肽,定名为ND100,是由1Ala、1Glu、1Gly、1Leu、2Pro、1Thr、1Tyr组成的八肽,分子量为846.9,可用于治疗肿瘤。

[0021] 专利 CN1883709 导向双功能抗肿瘤多肽及其应用,利用一个载体分子聚乙二醇把两个不同功能的多肽连接在一起,其中一个多肽为细胞粘附肽,另一个为抗肿瘤寡肽,合成的杂合分子称导向双功能抗肿瘤多肽,它具有抑制肿瘤细胞生长和转移的功能,可在制备治疗肿瘤药物中应用。

[0022] 发明 CN1552727 一种肝癌肿瘤血管特异性靶向多肽,该发明采用噬菌体随机肽库体内展示技术和激光纤维切割技术在高转移人肝癌裸鼠模型上筛选出与肝癌肿瘤血管内皮特异结合的靶向多肽LCI-X₇肽,该多肽可与大部分人体肝癌肿瘤血管特异结合,可用于肝癌转移复发诊断和靶向治疗。

[0023] 专利 CN 101033251A 以肝癌细胞 BEL-7404 作为筛选靶细胞,对噬菌体展示随机12肽库进行亲和淘选,经过三轮淘选,随机挑选20个噬菌斑进行扩增和测序,并经过细胞ELISA、免疫荧光等方法进一步鉴定噬菌体克隆与肝癌细胞的结合力以及内在化效果,通过对阳性克隆的测序和序列比较分析,得到4种不同的序列,都有良好的与肝癌细胞的结合力,可用于肝癌的治疗。

[0024] 专利 CN 101143895A 通过应用表达 10^8 不同序列蛋白多肽的pC89噬菌体肽库与人乳腺癌细胞株MDA-MB-231反复共培养多次;筛选出具有肿瘤靶向性的多肽,其氨基酸序列为:GASPSGALRSC或CFVPGHDLVC或CFSVPGHDIVC或CTPMSLSLSEC或CYTYPLGWHIC,该多肽可作为乳腺癌靶向性基因治疗的特异性载体,还可以为其他种类的恶性肿瘤细胞株和特异性多肽的筛选提供强有力的技术支持。

发明内容

[0025] 本发明的目的是针对现有技术的不足,筛选出一种不但具有传统抗体分子优点,而且分子量小,容易到达肿瘤组织部位,并与肺癌细胞具有高亲和力和特异性的多肽。

[0026] 本发明的另一个目的是提供上述多肽的制备方法。

[0027] 本发明的另一个目的是提供上述多肽在制备肺癌诊断试剂盒中的应用。

[0028] 本发明的另一个目的是提供上述多肽在制备用于治疗肺癌药物中的应用。

[0029] 本发明的上述目的是通过如下方案予以实现的:

[0030] 用噬菌体展示肽库减性筛选肿瘤细胞特异性结合多肽或靶肽的方法为:通常用两个细胞系进行筛选,将噬菌体展示随机肽库先通过不含靶抗原的正常细胞筛选,未结合的上清再通过含靶抗原的细胞,筛选出噬菌体扩增后进行下一轮筛选,最终得到特异性结合肽。

[0031] 本发明既是采用上述噬菌体展示肽库减性筛选技术,以肺癌细胞作为靶细胞,肺正常细胞为吸附细胞,对纽英伦生物技术有限公司(NEW ENGLANDBiolabs)的Ph.D.-7™

Phage Display Peptide Library Kit 进行多轮体外筛选,通过逐轮增强洗涤力度,获得了肺癌特异性的噬菌体克隆,为了提高所得多肽对肺癌细胞的亲和力和特异性,本发明又对上述得到的肺癌特异性噬菌体克隆进行了 Elisa、免疫组织化学等检测,从而鉴定出 1 个与肺癌具有较强的亲和力的噬菌体克隆,将该噬菌体克隆送去测序,并命名为 ZS 9,测序结果证实 ZS 9 是一条 12 肽,其氨基酸序列如 SEQ ID NO :1 所示。

[0032] 本发明筛选得到的 12 肽 ZS 9 是对肺癌有特异性、亲和力的多肽,而且经过生物信息学分析比对发现,该多肽 ZS 9 与美国国立生物技术信息中心 (NCBI) GenBank DNA 序列数据库和 Swiss-Prot 蛋白数据库中的已知基因和蛋白无同源性,且国内外文献也均未见报道,由此可以得出本发明的多肽 ZS 9 是一个新的治疗 / 诊断肺癌的标志物。

[0033] 本发明筛选得到的多肽 ZS 9 可用于制备检测方便、易行、可靠的肺癌诊断试剂盒,所述试剂盒能针对早期肺癌进行诊断和普查,以及针对中晚期肺癌进行体内示踪、预后判断或转归等。

[0034] 本发明筛选得到的多肽 ZS 9 可用于制备治疗肺癌的药物,该药物可作为肺癌靶向治疗的载体对肺癌进行治疗,也可以直接用于治疗肺癌。

[0035] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0036] 1. 本发明筛选得到的多肽 ZS 9 为小分子抗体,它除了具有传统抗体药物的优点外,还具有抗体分子量小,穿透力强,容易到达肿瘤组织,能更加灵敏的诊断肿瘤等特点,可用于肿瘤的诊断;

[0037] 2. 本发明筛选得到的多肽 ZS 9 具有良好的肿瘤靶向作用,可以作为靶向治疗或者作为靶向治疗的载体;

[0038] 3. 本发明制备多肽 ZS 9 的方法,不但操作简单,成本低廉,而且在噬菌体展示肽库减性筛选后又采用了 Elisa、免疫组织化学等检测,从而使得所筛选得到的多肽,其对肺癌细胞的亲和力和特异性较强;

[0039] 4. 本发明筛选得到的多肽 ZS 9 可用于制备肺癌诊断试剂药盒,该试剂盒诊断灵敏度高、特异性高,可用于肺癌高危人群的普查及肺癌的早期临床诊断、以及治疗效果的评价与病人病情转归、预后的判断,具有非常广阔的应用前景。

附图说明

[0040] 图 1 为 Elisa 检测第三轮筛选噬菌体克隆与 NCI-H1299 和 A549 的亲和力对比柱状图;

[0041] 其中,1、3、5、7、9、11、13、15 和 17 为 zs 1 ~ 9 这 9 个噬菌体单克隆分别对 NCI-H1299 的亲和力,2、4、6、8、10、12、14、16 和 18 为 zs 1 ~ 9 这 9 个噬菌体单克隆分别对 A549 的亲和力,19 为原库随机噬菌体克隆对 NCI-H1299 的亲和力,20 为原库随机噬菌体克隆对 A549 的亲和力;

[0042] 图 2 为异硫氰酸荧光素 FITC 标记的多肽 ZS 9 与 A549 结合的细胞免疫荧光鉴定显微镜图 (×200);

[0043] 图 3 为异硫氰酸荧光素 FITC 标记的多肽 ZS 9 与 NCI-H1299 结合的细胞免疫荧光鉴定显微镜图 (×200);

[0044] 图 4 为异硫氰酸荧光素 FITC 标记的多肽 ZS 9 与 MRC-5 结合的细胞免疫荧光鉴定

显微镜图 ($\times 200$)。

具体实施方式

[0045] 实施例 1 与肺癌细胞特异性结合多肽的筛选

[0046] 本实施例采用噬菌体展示随机 12 肽库减性筛选与肺癌细胞特异性结合的多肽, 其具体步骤如下:

[0047] 用胰酶消化人肺癌细胞 (NCI-H1299) 和人胚肺成纤维细胞 (MRC-5) 后, 调整细胞密度, 接种于预先包被多聚赖氨酸的 $60 \times 15 \text{mm}^2$ 培养皿中, 待细胞长至 80% -90% 融合度时, 用于筛选。

[0048] 取上述 NCI-H1299 细胞, 用无血清 DMEM 培养后, 加入牛血清白蛋白 BSA 封闭, 再加入 $10 \mu\text{l}$ 噬菌体肽库 (NEW ENGLAND Biolabs 的 Ph.D. -7™ Phage Display Peptide Library Kit 噬菌体原库), 孵育 1h 后, 去上清, 用洗涤液 TBST (Tween-20 浓度为 0.1 体积%) 冲洗 3 次, 加甘氨酸洗脱缓冲液 (0.2M Glycine-HCl, pH 2.2) 1ml, 吸出洗脱液, 加入 $150 \mu\text{l}$ Tris-HCl (1M Tris-HCl, pH 9.1) 中和后, 将洗脱液转至 MRC-5 细胞中 (该 MRC-5 细胞已用无血清 MEM 培养 2h, 并用 BSA 封闭), 孵育 1h 后, 收集上清, 即为第一轮筛选得到的噬菌体, 将得到的噬菌体取少量利用大肠杆菌 ER2738 通过滴定法确定噬菌体的浓度 (也就是测定滴度), 其余的噬菌体感染大肠杆菌 ER2738 进行扩增, 用于下一轮的筛选。

[0049] 第二轮筛选时, 洗涤液 TBST 中 Tween-20 浓度提高至 0.5%, NCI-H1299 孵育时间减少至 45min, 洗涤次数增加至 6 次, 其余条件、步骤与第一轮相同。

[0050] 第三轮筛选时, 洗涤液 TBST 中 Tween-20 浓度提高至 1%, 与 NCI-H1299 孵育时间减少至 30min, 并且洗涤次数增加至 8 次, 其余条件、步骤与第一轮相同。

[0051] 测定第三轮筛选获得的噬菌体的滴度后, 在 IPTG/Xgal 琼脂板上随机挑取蓝色噬菌斑, 制备噬菌体单克隆用于鉴定。

[0052] 本实施例中, 所用无血清 DMEM, 无血清 MEM 均为本领域通用牛血清培养基, 如 Invitrogene、siga 的产品都可选用。

[0053] 实施例 2 噬菌体滴度的测定

[0054] 将实施例 1 中, 每轮筛选获得的噬菌体用 LB 培养基进行 100 倍比稀释后, 取 $10 \mu\text{L}$ 稀释后噬菌体与 $200 \mu\text{L}$ 对数生长早期的大肠杆菌 ER2738 菌液混匀, 加入至于 45°C 保温的 LB 顶层琼脂 (顶层琼脂: 每升含 10g Bacto-Tryptone, 5g yeast extract, 5g NaCl, 1g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 7g 琼脂粉, 高压灭菌后分装成 3ml/管, 用时加热融化) 后迅速倾倒入含有 IPTG/Xgal 的 LB 固体平板, 过夜, 计数蓝色噬菌斑。

[0055] 计算公式: 噬菌体效价 (pfu/ $10 \mu\text{L}$) = 噬斑数 \times 稀释倍数, 即每 $10 \mu\text{L}$ 的噬菌体形成单位。

[0056] 肺癌细胞特异结合的噬菌体多肽的富集: 如表 1 所示, 与 NCI-H1299 结合的阳性噬菌体克隆经 3 轮筛选后有大约 10^2 倍的富集现象。

[0057] 表 1 差减筛选对阳性噬菌体克隆的富集效应

[0058]

轮次	加入噬菌体滴度 (cpu)	回收噬菌体滴度 (cpu)	噬菌体回收率
1	1.5×10^{11}	1.5×10^3	1×10^{-8}
2	10^{12}	10^5	10^{-7}
3	10^{12}	10^6	10^{-6}

[0059] 实施例 3 噬菌体多肽的 ELISA 鉴定

[0060] 肺癌细胞特异结合的噬菌体多肽阳性克隆鉴定：实施例 1 中，噬菌体肽库经过连续三轮减性筛选后，随机挑选 9 个噬菌体克隆，利用本领域的常规方法 -ELISA 法初步鉴定噬菌体克隆对 NCI-H1299、A549 的亲合力。

[0061] 将 NCI-H1299、人肺腺癌细胞 (A549) 按 1×10^4 /孔的密度接种于 96 孔板，置 CO₂ 培养箱培养 24h 后，对细胞进行无血清处理 1h，清洗细胞，再用多聚甲醛固定，PBS 稍洗，triton X-100 处理，PBS-BSA 封闭，加入实施例 1 的噬菌体单克隆，孵育 2h；加 HRP-anti M13 抗体，37℃ 孵育 1h；用 TMB 显色（每孔 50 μl TMB，显色 8 ~ 15 分钟），加入等体积的 1N HCl 或 2N H₂SO₄ 来终止反应，酶标孔中反应液从蓝色变为黄色，酶标仪 450nm 处读数。随机挑取噬菌体原库蓝斑作为对照，P/N > 2 为阳性。

[0062] 结果如图 1 所示，图中 1 ~ 18 为 zs 1 ~ 9 这 9 个噬菌体单克隆分别对 NCI-H1299、A549 的亲合力检测结果，19 和 20 作为对照组，是随即挑取的原库噬菌体克隆对 NCI-H1299、A549 的亲合力检测结果。从图 1 中可以很清楚地看出，zs 1 ~ 9 这 9 个噬菌体单克隆对 NCI-H1299 的亲合力均高于 A549，其中第 9 号克隆对 NCI-H1299 细胞亲合力最强，命名为 Phage zs 9。

[0063] 本实施例中所用的溶液配方如下：

[0064] PBS : 8g NaCl、0.2g KCl、1.44g Na₂HPO₄ 和 0.24g KH₂PO₄；

[0065] 聚乙二醇辛基苯基醚 (triton X-100) : 用 PBS 配制为 0.1% 的 triton X-100；

[0066] PBS-BSA : 用 PBS 配制 2% BSA；

[0067] TMB 配方 : A 液 : TMB 1mg/ml DMSO ; B 液 : 1.02g/100ml 柠檬酸，NaHPO₄-12H₂O 3.68g/100ml, PH : 5.0 ~ 5.4 (一般配制后 PH = 5.0) ; C 液 : 30% 过氧化氢 ; 将 A、B 和 C 溶液按照 A : B : C = 100 : 900 : 1 的体积比混合即得。

[0068] 实施例 4 质粒提取及测序

[0069] 在实施例 3 中，经 ELISA 初步检测从第三轮筛选的噬菌体库中挑选的 9 个噬菌体克隆，其中克隆 Phage zs 9 对 NCI-H1299 和 A549 亲合力最强，为阳性克隆。

[0070] 扩增上述阳性克隆，并取该阳性克隆噬菌体扩增液加 200 μl 20% PEG/NaCl (聚乙二醇 PEG 与 NaCl 的体积比为 1 : 4)，混匀，室温放置 15min，10000rpm 离心 10min，取沉淀；用 100 μl TE (PH = 8.0) 溶解沉淀，加 100 μl Tris 饱和酚，上下颠倒 1min，再静置 1min，再上下颠倒约 1min 混匀；10000rpm 离心 5min，取上层加入 300 μl 3mol/L 乙酸钠：无水乙

醇(1 : 25) 沉淀 DNA, 混匀后静置约 30min, 10000rpm 离心 10min, 去上清, 加 100 μ L 700ml/L 乙醇洗一次, 风干残余乙醇, 用 40 μ L TE (PH = 8.0) 溶解, 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

[0071] 用肽库自带测序引物送上海英俊生物技术有限公司测序, 测序引物为 :5' -CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3', 距目的片段相距 96bp, 测序结果为一条 12 多肽, 其氨基酸序列如 SEQ ID NO :1 所示。

[0072] 肺癌细胞特异结合多肽序列的生物信息学分析 :测序结果在美国国立生物技术信息中心 (NCBI) GenBank DNA 序列数据库和 Swiss-Prot 蛋白数据库进行生物信息学分析, 查询同源序列。发现该十二肽序列与 NCBI GenebankDNA 序列数据库和 Swiss-Prot 蛋白质数据库中的已知基因和蛋白无同源性, 且国内外文献均未见报道, 由此证明本发明筛选到一新的肺癌表面相关抗原的配体。

[0073] 实施例 5 多肽 ZS 9 的细胞免疫荧光鉴定

[0074] 在实例 4 中, 由噬菌体阳性克隆 Phage zs 9 测序结果推测, 多肽 ZS 9 的序列为 LLADTTHRPWT。合成并用异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记多肽 ZS 9, 通过 HPLC 及质谱纯化和鉴定该多肽纯度 > 95%。

[0075] 在实施例 3 中, 经 ELISA 初步鉴定 Phage zs 9 对 NCI-H1299 有较高亲和力, 合成并用异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记多肽 ZS 9, 进一步鉴定多肽 ZS 9 与 NCI-H1299 的亲和力和特异性。

[0076] FITC 标记的多肽 ZS 9 用灭菌水溶解, 浓度为 25 μ M. L⁻¹, 将 NCI-H1299、A549 及 MRC-5 以 1 \times 10⁴/孔的密度接种于 96 孔板中, 过夜培养, 无血清处理 1h, 再用 40g/L 多聚甲醛固定 20min, 1ml/L triton X-100 处理 10min, 0.5ml/L PBST 洗 3 次 1min/次 ; 含 20g/L BSA 的 PBS 封闭 1h 后, 每孔加入 50 μ l FITC 标记的多肽, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, PBS 洗 6 次, 荧光倒置显微镜下观察。

[0077] 结果如图 2、3 和 4 所示 :通过显微镜观察染色结果可见, 图 2 为多肽 ZS9 与 A549 结合, 有较强绿色荧光, 图 3 为多肽 ZS 9 与 NCI-H1299 结合绿色荧光最强, 图 4 为多肽 ZS 9 与正常细胞 MRC-5 结合, 绿色荧光很弱。

[0078] 由此说明多肽 ZS 9 对正常细胞 MRC-5 亲和力很弱, 而对 NCI-H1299 和 A549 亲和力较强, 且对 NCI-H1299 亲和力强于 A549, 可见本发明的 12 多肽 ZS 9 对肺癌细胞具有高亲和力和特异性。

[0079] 本实施例的细胞免疫荧光鉴定是采用的本领域通用方法, 试验中所涉及到的试剂和反应条件也是本领域技术人员所共知的。

[0080] 一种肺癌特异性结合多肽及其制备方法和应用 序列表

[0081] SEQUENCE LISTING

[0082] <110> 广东药学院

[0083] <120> 一种肺癌特异性结合多肽及其制备方法和应用

[0084] <130>

[0085] <160>1

[0086] <170>PatentIn version 3.5

[0087] <210>1

[0088] <211>12

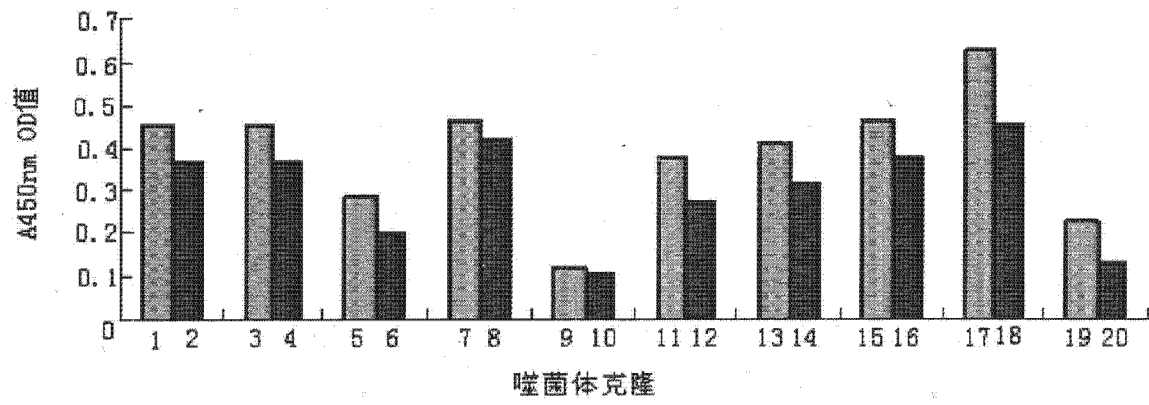


图 1



图 2

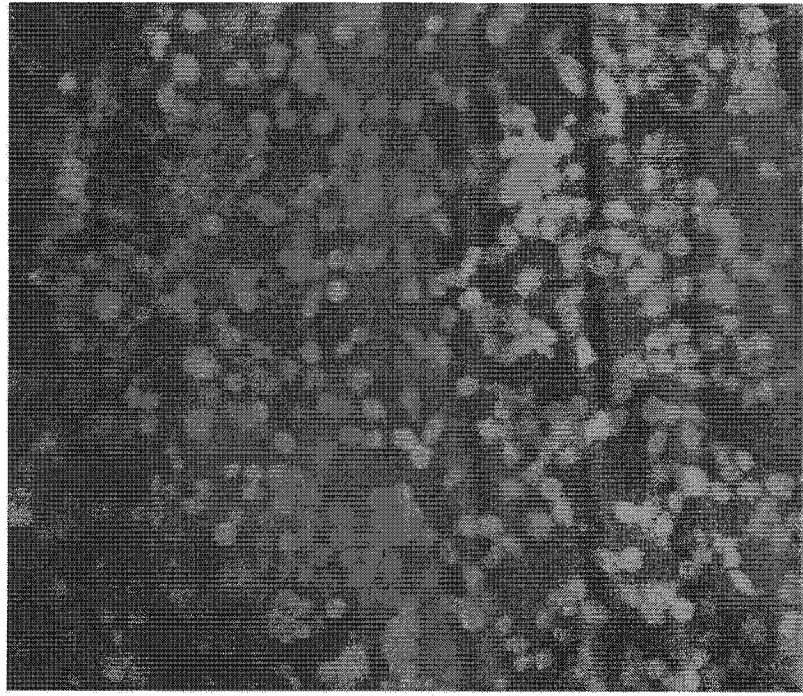


图 3



图 4

专利名称(译)	一种肺癌特异性结合多肽及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN101492505B	公开(公告)日	2011-11-23
申请号	CN200810220336.3	申请日	2008-12-24
[标]申请(专利权)人(译)	广东药科大学		
申请(专利权)人(译)	广东药学院		
当前申请(专利权)人(译)	广东药学院		
[标]发明人	臧林泉 石磊 郭姣 潘雪刁 潘琴 巫玮		
发明人	臧林泉 石磊 郭姣 潘雪刁 潘琴 巫玮		
IPC分类号	C07K16/18 G01N33/53 A61K39/395 A61P35/00		
代理人(译)	陈卫		
其他公开文献	CN101492505A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种可与肺癌细胞特异性结合的多肽及其制备方法和应用，该肺癌细胞特异性结合多肽是通过噬菌体展示肽库减性筛选，获得肺癌特异性的噬菌体克隆，再经过Elisa、免疫组织化学方法鉴定出与肺癌具有较强亲和力的噬菌体克隆，送去测序得到一条12多肽，其氨基酸序列如SEQ ID NO：1所示。本发明筛选得到的12多肽不但具有传统抗体分子优点，而且分子量小、穿透力强、容易到达肿瘤组织、具有良好的肿瘤靶向作用、诊断肿瘤更加灵敏，可用于制备诊断肿瘤的试剂盒，以及治疗肿瘤的药物。

