说明书

抗EB病毒诱发的肿瘤的融合多肽和大肠菌素Ia突变体

技术领域

本发明涉及抗肿瘤药物领域，特别涉及一种新型抗 EB 病毒所致肿瘤多肽及其应用与制备方法。

背景技术

在抗生素研究领域，人们一直在致力于开发模仿同种异株细菌之间互相杀伤的工作方式来开发新型抗生素，自然界中有不少细菌毒素直接在细菌胞膜上形成离子通道来杀死细菌，其模式标本就是大肠杆菌分泌的一种细菌毒素－大肠菌素。其中大肠菌素 Ia 自 1952 年被 Jacob 发现之后，经过数代人的努力，1996 年 Qiu et al（Major transmemebrane movement soociated with colicin Ia channel gating. J. Gen. Physiology, 107:313-328 (1996)）终于揭示了大肠菌素 Ia 在人工脂质双分子膜上所形成离子通道开放和关闭时的跨膜立体结构，为在分子水平上设计和制备新型的抗菌素奠定了理论基础。并相继有大肠菌素多肽与白色连珠球菌信息素、葡萄球菌信息素等信号肽分子连接而成的多肽分子能够通过信息素识别靶细菌细胞，将大肠菌素引导到靶细菌细胞膜上形成跨膜离子通道导致胞容物外泄致死细胞。

恶性肿瘤是对人类健康的巨大威胁。全世界每年死于恶性肿瘤的患者约有七百万人，其中中国就占有六分之一，恶性肿瘤已是我国第二位的死亡原因。由于其病因、发病机制、临床表现尚未阐明，故防治效果不理想。现有抗肿瘤药物在肿瘤治疗中占重要地位，虽然对一些肿瘤已取得一定的疗效，但仍存在着对肿瘤细胞的选择性差，免疫抑制及不良反应多而严重，产生耐药性等缺陷。

EB 病毒所致的非洲儿童恶性淋巴肉瘤，Hodgkin's 淋巴肉瘤和鼻咽癌细胞表面均带有特异的 EB 病毒表面抗原，因此，EB 病毒表面抗原可以认为是该类肿瘤细胞的一种特异性标志物。在 EB 病毒所致的肿瘤药物上，专利号为 ZL200410081446.8 的发明，公开了大肠菌素与识别 EB 病毒表面抗原的模拟抗体结合形成的抗肿瘤多肽，能够特异性杀死机体中的 EB 病毒所致癌细胞，而对正常细胞没有伤害，杀伤力是其他抗癌药物的若干倍，克服了近年来使用的抗肿瘤

药物中存在的药物选择性差、产生耐药性、杀死癌细胞的同时正常组织也受到严重损伤等问题，Xiao-Qing Qiu 等，2007 的文章中对比了一系列结构的模拟抗体与大肠菌素构成的抗肿瘤多肽的杀肿瘤的能力，发现 V_HCDR1- V_HFR$_2$-V_LCDR3 及 V_LCDR1- V_HFR$_2$-V_HCDR3 两种结构的模拟抗体与大肠菌素构成的抗肿瘤多肽具有较好的杀伤能力（Xiao-Qing Qiu et al., 2007,Small antibody mimetics comprising two complementarity-determining regions and a framework region for tumor targeting，*Nature Biotechnology* 25, 921–929, 1 August 2007）,这为进一步制备抗 EB 病毒所致肿瘤多肽提供了更多的候选模拟抗体。

但是在上述抗肿瘤多肽中，由于大肠菌素多肽的熟睡端存在较易引起超敏反应的氨基酸残基，有可能导致含有大肠杆菌多肽的药物较易引起机体异常的免疫应答；有研究报道，很多癌症患者由于其代谢机制受到癌细胞干扰而不正常，对多肽类药物容易产生过敏反应，而导致不能用药，因此有必要对大肠菌素多肽进行改进，以获得更安全适合更多患者的抗癌药物。

发明内容

本发明根据上述领域存在的不足，提供一种新型抗 EB 病毒所致肿瘤多肽及其应用与制备方法。为治疗 EB 病毒所致肿瘤提供高杀伤力、高特异性，且致敏可能性较低的药物。

一种新型抗 EB 病毒所致肿瘤多肽，由可形成离子通道的大肠菌素变构多肽与抗 EB 病毒抗体多肽或者抗 EB 病毒抗体的模拟抗体多肽可操作地连接构成，所述可形成离子通道的大肠菌素变构多肽由野生型大肠菌素 E1、Ia、Ib、A、B、N 或其水性孔道结构域的肽链突变了氨基酸残基 G11A、H22G、A26G、V31L 和 H40D 而获得，所述抗 EB 病毒抗体多肽的氨基酸序列与 ATCC HB-168 杂交瘤分泌的抗体多肽相同。

所述模拟抗体多肽指所述抗 EB 病毒抗体的重链 CDR1 区、重链 CDR1-CDR2 连接肽段和轻链 CDR3 的连接肽。

所述可形成离子通道的大肠菌素变构多肽由野生型大肠菌素 Ia 突变而来。

所述新型抗 EB 病毒所致肿瘤多肽，具有如 SEQ ID NO.29 所示的氨基酸序列。

编码所述新型抗 EB 病毒所致肿瘤多肽的基因。

所述基因，具有如 SEQ ID NO.30 所示的核苷酸序列。

含有上述基因的重组质粒。

上述新型抗 EB 病毒所致肿瘤多肽的制备方法，步骤如下：将上述重组质粒转化到表达系统中进行表达，分离纯化表达的多肽。

上述新型抗 EB 病毒所致肿瘤多肽在制备治疗和预防 EB 病毒所致肿瘤的药物中的应用。

一种大肠菌素 Ia 的变构多肽，其氨基酸序列如 SEQ ID NO.24 所示。

编码大肠菌素 Ia 的变构多肽的基因。

所述基因在制备多肽药物中的应用，指将所述基因与诱导多肽的基因可操作地连接并克隆到表达载体中，然后将表达载体转化到表达系统中，分离纯化表达的多肽

本发明提供的新型抗 EB 病毒所致肿瘤多肽，由可形成离子通道的大肠菌素变构多肽与抗 EB 病毒的抗体多肽或者抗 EB 病毒的抗体的模拟抗体多肽构成。由于野生大肠菌素多肽分子中存在容易引起超敏反应的氨基酸残基，本发明在可形成离子通道结构的大肠菌素的多肽分子中，选择性地突变了疏水区段部分容易引起机体超敏反应的氨基酸残基，如本发明的一个优选实施例中，大肠菌素 Ia 的多肽突变位置为：G11A、H22G、A26G、V31L 和 H40D，实验数据表明，采用大肠菌素 Ia 多肽和变构的 Ia 多肽分别注射免疫小鼠，注射变构的 Ia 的小鼠产生的血清效价要比前者低 1~2 个数量级，即免疫应答水平较低，证明变构的多肽降低了引起机体过敏的可能性；同时变构多肽仍然保留了在细胞膜上形成跨膜离子通道的功能，实验证明，本发明的重组多肽对肿瘤细胞的杀伤能力未受影响，说明突变的氨基酸残基没有影响大肠菌素形成离子通道的功能。本发明提供的新型抗 EB 病毒所致肿瘤多肽中，抗 EB 病毒的抗体多肽或者抗 EB 病毒的抗体的模拟多肽通过与 EB 病毒所致的肿瘤细胞的表面特异性抗原识别，大肠菌素变构多肽引导至靶细胞膜上，大肠菌素变构多肽的跨膜离子通道结构域疏水区段插入肿瘤细胞膜中，进而形成离子通道，靶肿瘤细胞因内容物泄漏而被致死；抗 EB 病毒的抗体多肽的氨基酸序列完全参照 ATCC HB-168 杂交瘤细胞分泌单克隆抗体的多肽的氨基酸序列。

本发明的实施例中优选采用上述抗 EB 病毒抗体的模拟抗体多肽可操作地连

接在大肠菌素变构多肽的羧基端而获得分子量较小的本发明的抗肿瘤多肽，即这些小分子模拟多肽仅包括该抗 EB 病毒的抗体多肽的 V_HCDR1 区、V_LCDR3 区，V_HCDR1-V_HCDR2 连接肽段和轻链 V_LCDR3 区连接的肽链 V_HCDR1- V_HFR$_2$-V_LCDR3 得到氨基酸序列如 SEQ ID NO.25 所示的新型抗肿瘤多肽 1 的模拟抗体，模拟抗体仅包含不到 30 个氨基酸，在分子量上远远小于天然抗体 150 个氨基酸，既达到了对抗原识别能力的要求又大幅度消减了抗肿瘤多肽的分子量，有利于提高本发明抗肿瘤多肽在组织中的穿透能力。

本发明的另一目的是提供编码本发明所述抗肿瘤多肽的基因序列。本发明抗肿瘤多肽的基因由编码大肠菌素变构多肽的基因与编码抗 EB 病毒的抗体多肽的基因或者其模拟抗体多肽的基因可操作地连接构成，其中大肠菌素多肽和抗 EB 病毒抗体的基因序列是已知的，大肠菌素变构多肽的基因是在大肠菌素多肽基因的相应密码子上进行如下点突变而得：G11A、H22G、A26G、V31L 和 H40D。由于密码子的兼并性，本领域技术人员可在不改变氨基酸序列的前提下对编码本发明所述的抗肿瘤多肽的核苷酸序列进行调整。

本发明所述的重组质粒，是指将装载了野生大肠菌素基因的原始载体进行双链核苷酸点突变，在目标突变位置上插入突变密码子，获得含有大肠菌素变构多肽的基因的突变载体，相同的点突变技术将编码抗 EB 病毒的抗体的模拟抗体基因经插入到大肠菌素变构多肽基因的羧基端，得到本发明的重组质粒。原始载体 pSELECT^{TM}-1 购于 Promega 公司，其中装载了大肠菌素 Ia 和 Immunity 蛋白基因，点突变操作按照 Strategene 公司试剂盒说明书；本发明针对点突变制备大肠菌素变构多肽，其中突变了 5 个密码子，因此设计了 5 对引物序列（Seq ID No.1~10 ）；本发明实施例中针对模拟抗体基因设计了 6 对引物序列（Seq ID No.11~22 ）。

本发明还提供了制备本发明所述抗肿瘤多肽的方法，是将上述获得的重组质粒转染入大肠杆菌 BL21(DE3)工程菌中，筛选出阳性克隆，分离纯化阳性克隆表达的蛋白即能得到为本发明新型抗 EB 病毒所致肿瘤多肽。

本发明提供的新型抗 EB 病毒所致肿瘤多肽，可在制备治疗或预防 EB 病毒所致肿瘤的药物中应用。可以通过将本发明中获得的新型抗生素的多肽添加到药学上可接受的载体或者赋形剂或可选的其它成分而制成临床上适用的药物组合

物。

本发明还提供了大肠菌素 Ia 变构多肽的氨基酸序列和基因序列，该变构多肽不仅可用于本发明中，还可以与其他引导多肽构成抗体多肽，本发明实施例 3 的实验数据一方面证明了含有该变构多肽的多肽药物具有较低的抗原性，也证明该变构多肽与其他引导多肽构成抗体多肽具有杀菌能力，而制备方法是本领域的常规实验操作。

本发明提供的新型抗肿瘤多肽，具有专利号 ZL200410081446.8 的发明所公开的抗肿瘤多肽的优点，即高特异性的靶向性和对正常细胞的安全性，不易产生耐药性等优点，同时本发明的抗肿瘤多肽通过对大肠菌素多肽中易引起超敏反应的氨基酸残基进行了突变，降低了含该变构多肽的抗肿瘤多肽的免疫原性，即降低了引起过敏反应的可能性，改进了现有该类多肽的药物使用安全性和杀肿瘤效果，还为其他含大肠菌素多肽的药物提供了改进的参考。

附图说明

图 1.含有模拟抗体多肽 V_HCDR1- V_HFR$_2$- V_LCDR3 的基因和大肠菌素 Ia 变构多肽基因的重组质粒 pCHCEB11 的结构示意图

图 2.含有模拟抗体多肽 V_HCDR1- V_HFR$_2$-（Rev）V_LCDR3 的基因和大肠菌素 Ia 变构多肽基因的重组质粒 pCHCEB22 的结构示意图

图 3 .大肠菌素 Ia 变构多肽的致敏效果实验 1

（A）昆明小鼠腹腔注射致死剂量的耐甲氧西林金葡菌（ATCC BAA42），随机分组为（1）对照组，（2）氨苄青霉素组，（3）抗金葡菌多肽(ZL 01128836.1)组，（4）抗金葡菌多肽 1 组。

(B) 14 天后，再取昆明小鼠一批作为对照和氨苄青霉素组，抗金葡菌多肽组及抗金葡菌多肽 1 组存活鼠作为抗金葡菌多肽组及抗金葡菌多肽 1 组重复上述试验。

(C) 41 天后，再取昆明小鼠一批作为 (1) 对照组、(2) 左氧氟沙星组和 (3) 头孢曲松钠组，(4) 抗金葡菌多肽组及 (5) 抗金葡菌多肽 1 组存活鼠作为抗绿脓杆菌多肽 2 组及抗绿脓杆菌多肽 1 组。。

图 4.大肠菌素 Ia 变构多肽的低致敏效果实验 2

(A) 抗金葡菌多肽/抗绿脓杆菌多肽 2 组血清，1:50,000 滴度；

(B) 抗金葡菌多肽 1/抗绿脓杆菌多肽 1 组血清，1:50,000 滴度。

（1）第一周，（2）第二周，（3）第 7 周血清。（4）阴性对照。

图 5. 新型抗肿瘤多肽对 EB 病毒所致人恶性淋巴肉瘤(Burkitt's lymphoma)体外杀伤效果比较

(A) 对照组，(B) 新型抗肿瘤多肽 1 处理组，(C) 新型抗肿瘤多肽 2 处理组。

图 6. 新型抗肿瘤多肽对 EB 病毒所致 Burkitt's 人恶性淋巴肉瘤细胞和其它肿瘤细胞的体外杀伤作用

(A) EBV 病毒阳性的 Burkitt's 人恶性淋巴肉瘤细胞，

(B) EBV 病毒阴性的 Burkitt's 人恶性淋巴肉瘤细胞，

(C) EBV 病毒阳性的爱滋病人（AIDS）恶性淋巴肉瘤细胞。

（1）对照组，（2）新型抗肿瘤多肽 1 处理组。。

图 7 新型抗肿瘤多肽对 EB 病毒所致 Burkitt's 人恶性淋巴肉瘤细胞种植到裸鼠体内生长出的实体肿瘤的杀伤作用

(A)对照组 。

(B) 新型抗肿瘤多肽 1 处理组的 SCID 免疫缺陷鼠，鼠双腋下均接种 Burkitt's 人恶性淋巴肉瘤细胞。左边箭头，EBV 病毒阴性的淋巴肉瘤，右边箭头，EBV 病毒阳性的淋巴肉瘤。

图 8 新型抗肿瘤多肽对 EB 病毒所致 Burkitt's 人恶性淋巴肉瘤细胞种植到裸鼠体内生长出的实体肿瘤的杀伤作用

(A)对照鼠 EBV 病毒阴性的淋巴肉瘤切片，(B) 对照鼠 EBV 病毒阳性的淋巴肉瘤切片，(C) 新型抗肿瘤多肽 1 处理鼠 EBV 病毒阴性的淋巴肉瘤切片，(D) 新型抗肿瘤多肽 1 处理鼠 EBV 病毒阳性的淋巴肉瘤切片。

具体实施方式

结合附图，通过对本发明较佳实施例的描述具体说明本发明。

本发明所用的原始质粒：pSELECT^{TM}-1 购于 Promega 公司。

工程菌：*E.coli* BL-21(DE3) 工程菌，购于 Novagen 公司。

实施例 1. 构建含编码突变大肠菌素 Ia 的基因的重组质粒

原始质粒为原始质粒为装载了大肠菌素多肽 Ia 和 immunity 蛋白基因的 pSELECT^{TM}-1 质粒（8.3 kb）(购于 Promega 公司)，经双链寡聚核苷酸点突变技术（QuickChange^{TM} Kit，Strategene 公司）分别将编码突变氨基酸的基因如：SEQ ID NO 1 ~10 所示的寡聚核苷酸引物序列与野生型大肠菌素 Ia 的基因可操作地连接，获得如 SEQ ID NO.23 所示编码大肠菌素 Ia 变构多肽的基因，同时得到突变质粒；再将编码模拟抗体的基因 SEQ ID NO.26 或 SEQ ID NO.28 插入到突变质粒中大肠菌素 Ia 变构多肽的基因的 I626 位密码子之后，制备出到新型抗 EB 病毒所致肿瘤多肽的两种重组质粒 pCHCEB11（如图 1 所示），pCHCEB22（如图 2 所示），为制备重组质粒中编码抗 EB 病毒抗体的模拟抗体基因所设计的 6 条寡聚核苷酸引物序列如 SEQ ID NO11~22 所示。重组质粒转染入 *E.coli* BL21(DE3) 工程菌（购于 Novagen 公司）里制备多肽，获得序列表中 SEQ ID NO.25（在后面的实施例中称为“新型抗肿瘤多肽 1”）和 SEQ ID NO.27（在后面的实施例中称为“新型抗肿瘤多肽 2”）所示。

双链寡聚核苷酸点突变程序按 Strategene QuickChang Site-Directed Mutagenesis Kit(catalog#200518)试剂盒进行。

1．准备点突变反应物：

5ul 10X buffer

2ul (10 ng) 装载了野生型大肠菌素变构多肽和 immunity 蛋白基因的原始质粒 pSELECT^{TM}-1。

1.25 ul (125 ng)设计的 5’-3’寡聚核苷酸引物

1.25 ul (125 ng)设计的 3’-5’寡聚核苷酸引物

1 ul dNTP

双蒸水 50 ul

1 ul pfu

(除质粒、引物和双蒸水外，均为试剂盒所备试剂)

2． 进行 PCR 扩增，扩增条件：变性 95°C, 35 秒，退火 53 °C, 70 秒，延伸 68

℃, 17 分，共 20 个循环；

3．加入 Dpn 1 内切酶 1 ul 消化母体 DNA 链（37℃, 1 小时），取 1 ul 反应物与 XL1-Blue 感受态细胞 50 ul 冰孵 30 分钟，热冲击 42 ℃， 45 秒，再置入冰中 2 分钟；

4．加入 NZY 培基 0.5 ml, 220 rpm, 37℃ 摇菌 1 小时，取 50-100 ul 反应物铺板（LB 培基加 1％琼脂加 50 ug/ml 氨苄青霉素，37℃ 过夜）；

5．18 小时后挑菌，提取质粒后测序确定突变成功；

6．将完成多个位点突变的最终获得的重组质粒 50 ng 与制备的 *E.coli* BL-21(DE3)工程菌感受态细胞 40 ul 冰孵 5 分钟，42℃ 热冲击 30 秒，再置入冰中 2 分钟， 加入 Novagen 公司 SOC 培养液 160 ul 后 220 rpm, 37 ℃ 摇菌 1 小时后铺板（LB 培基加 1％琼脂，加 50 ug/ml 氨苄青霉素）37 ℃ 过夜。

7. 挑取单克隆菌落大量增菌，8-16 升 FB 培基，250 rpm, 30℃，4-5 小时, 热冲击 250 rpm, 42℃, 30 分钟，250 rpm, 37℃, 2 小时；离心沉淀菌体，4℃，6000g，20 分钟，取 4℃，50mM 硼酸缓冲液（2mM EDTA +2mM DTT）50-80ml 悬浮菌体，加入 0.2M PMSF 250 毫升后，使用超声破碎（4℃，400W， 2 分钟，），高速离心沉淀破碎的菌体（4℃，75,000g，90 分钟），取上清加入硫酸链霉素 500 万单位沉淀 DNA， 15000g, 4 ℃，10 分钟离心沉淀后，取上清装入分子量 15,000 透析袋于 4℃，50 mM 硼酸缓冲液 4 升透析过夜后，再次 15000g, 4 ℃，10 分钟离心沉淀，取上清上样于 CM 离子交换柱，经 0.1-0.3 M NaCl + 50 mM 硼酸缓冲液梯度洗脱即可得到重组抗肿瘤多肽。

点突变设计的引物序列如下：

Seq ID NO.1 突变大肠菌素基因中 G11A 所设计的寡聚引物 5’-3’
cgt att aca aat ccc GCA gca gaa tcg ctg ggg
Seq ID NO.2 突变大肠菌素基因中 G11A 所设计的寡聚引物 3’-5’
ccc cag cga ttc tgc TGC ggg att tgt aat acg
Seq ID NO.3 突变大肠菌素基因中 H22G 所设计的寡聚引物 5’-3’
gat tca gat ggc GGT aaa tta tgg gtg
Seq ID NO.4 突变大肠菌素基因中 H22G 所设计的寡聚引物 3’-5’
cac cca taa ttt ACC gcc atc tga atc
Seq ID NO.5 突变大肠菌素基因中 A26G 所设计的寡聚引物 5’-3’
gaaa ttatgGGTgt tgatatttat
Seq ID NO.6 突变大肠菌素基因中 A26G 所设计的寡聚引物 3’-5’

ataaatatacaacACCcataatttc

Seq ID NO.7 突变大肠菌素基因中 V31L 所设计的寡聚引物 5’-3’

gt tgatatttat CTC aaccctc cacgtgtc

Seq ID NO.8 突变大肠菌素基因中 V31L 所设计的寡聚引物 3’-5’

gacacgtggagggttGAGataaatatcaac

Seq ID NO.9 突变大肠菌素基因中 H40D 所设计的寡聚引物 5’-3’

cgtgtcga tgtctttGATggtaccccgc ctgcat

Seq ID NO.10 突变大肠菌素基因中 H40D 所设计的寡聚引物 3’-5’

atgcaggcggggtaccATCaaagacatcgacacg

Seq ID NO.11 重组质粒 pCHCEB11 中 V_HCDR1 基因引物 5’-3’

gcg aat aag ttc tgg ggt att TCC TTC GGT ATG CAT TGG GTG CGTCAGtaa ata aaa tat aag aca ggc

Seq ID NO.12 重组质粒 pCHCEB11 中 V_HCDR1 基因引物 3’-5’

gcc tgt ctt ata ttt tat tta CTG ACG CAC CCA ATG CAT ACC GAA GGA aat acc cca gaa ctt att cgc

Seq ID NO.13 重组质粒 pCHCEB11 中 V_HFR_2基因引物 5’-3’

ggt atg cat tgg gtg cgt cag GCC CCC GAG AAA GGT CTG GAG TGG GTG GCC taa ata aaa tat aag aca ggc

Seq ID NO.14 重组质粒 pCHCEB11 中 V_HFR_2基因引物 3’-5’

gcc tgt ctt ata ttt tat tta GGC CAC CCA CTC CAG ACCT TTT CTC GGG GGC ctg acg cac cca atg cat acc

Seq ID NO.15 重组质粒 pCHCEB11 中（Rev）V_LCDR3 基因引物 5’-3’

aaa ggt ctg gag tgg gtg gcc ACC TAC CCC TAC TCC TAC GGT CAG GGT taa ata aaa tat aag aca ggc

Seq ID NO.16 重组质粒 pCHCEB11 中（Rev）V_LCDR3 基因引物 3’-5’

gcc tgt ctt ata ttt tat tta ACC CTG ACC GTA GGA GTA GGG GGT ggc cac cca ctc cag acc ttt

Seq ID NO.17 重组质粒 pCHCEB22 中 V_HCDR1 基因引物 5’-3’

gcg aat aag ttc tgg ggt att TCC TTC GGT ATG CAT TGG GTG CGT CAG taa ata aaa tat aag aca ggc

Seq ID NO.18 重组质粒 pCHCEB22 中 V_HCDR1 基因引物 3’-5’

gcc tgt ctt ata ttt tat tta CTG ACG CAC CCA ATG CAT ACC GAA GGA aat acc cca gaa ctt att cgc

Seq ID NO.19 重组质粒 pCHCEB22 中 V_HFR_2基因引物 5’-3’

ggt atg cat tgg gtg cgt cag GCC CCC GAG AAA GGT CTG GAG TGG GTG GCC taa ataaaa tat aag aca ggc

Seq ID NO.20 重组质粒 pCHCEB22 中 V_HFR_2基因引物 3’-5’

gcc tgt ctt ata ttt tat tta GGC CAC CCA CTC CAG ACCT TTT CTC GGG GGC ctg acg cac cca atg cat acc

Seq ID NO.21 重组质粒 pCHCEB22 中 V_LCDR3 基因引物 5’-3’

aaa ggt ctg gag tgg gtg gcc GGT CAG GGT TAC TCC TAC CCC TAC ACC taa ata aaa tat aag aca ggc

Seq ID NO.22 重组质粒 pCHCEB22 中 V_LCDR3 基因引物 3’-5’

gcc tgt ctt ata ttt tat tta GGT GTA GGG GTA GGA GTA ACC CTG ACC ggc

cac cca ctc cag acc ttt

实施例 2.重组质粒 pCHCEB11、pCHCEB22 制备的新型抗肿瘤多肽的免疫效果观察

取实施例 1 制备获得重组质粒 pCHCEB11、 pCHCEB22 制备得到的新型抗肿瘤多肽 1，新型抗肿瘤多肽 2，发明人的前期专利中的抗肿瘤多肽 1、抗肿瘤多肽 2（ZL200410081446.8）各一份免疫小鼠：上述各蛋白与佐剂混合后，基础量和追加量为腹腔注射每只 50 μg （0.5 ml）1 次。间隔两周，免疫 5 针。ELISA 间接法检测小鼠血清效价，本发明制得的新型抗肿瘤多肽 1 和 2 所免疫小鼠血清效价为 10^{-3} 至 10^{-4} 而抗肿瘤多肽 1、抗肿瘤多肽 2 所免疫小鼠的血清效价为 10^{-4} 至 10^{-5}。

可见本发明新型抗肿瘤多肽造成宿主致敏反应的可能性要比含野生型大肠菌素 Ia 的抗肿瘤多肽造成宿主致敏反应的可能性低一至两个数量级。

实施例 3.构成新型抗肿瘤多肽的大肠菌素 Ia 变构多肽的低致敏效果实验

取实施例 1 中大肠菌素 Ia 变构多肽（其水性孔道结构域的肽链中突变了氨基酸残基 G11A、H22G、A26G、V31L 和 H40D）的突变质粒，在其氨基端或羧基端可操作地连接金黄色葡萄球菌信息素 AgrD1(YSTCDFIM)，制备出两种抗菌多肽。AgrD1 连接在变构的大肠菌素 Ia 羧基端制备而得的多肽命名为抗金葡多肽 1，AgrD1 连接在变构的大肠菌素 Ia 氨基端制备而得的多肽命名为抗绿脓杆菌多肽 1。取野生型大肠菌素 Ia 的质粒，在其氨基端连接金黄色葡萄球菌信息素 AgrD1 制备出抗绿脓杆菌多肽 2。

实验 1：取昆明小鼠一批，腹腔注射致死剂量耐甲氧西林金葡菌（ATCC BAA42），随机分组为（1）对照组，（2）氨苄青霉素组，（3）抗金葡菌多肽组，（4）抗金葡菌多肽 1 组。每组小鼠均为 10 只。

处理方法：

腹腔注射致死剂量耐甲氧西林金葡菌（ATCC BAA42）一小时后，

对照组：尾静脉注射 0.5 毫升 0.3 M NaCl + 50 mM 硼酸缓冲液一次；

氨苄青霉素组：尾静脉注射氨苄青霉素 2.5 mg/kg 一次；

抗金葡菌多肽组：尾静脉注射发明人发明的抗金葡菌多肽（ZL 01128836.1）

6 mg/kg 一次；

抗金葡菌多肽 1 组：尾静脉注射抗金葡菌多肽 1　6 mg/kg 一次。

结果：　对照组及氨苄青霉素组鼠在两天内全部死亡。抗金葡菌多肽组及抗金葡菌多肽 1 组有 85％的鼠存活。

实验 2：实验 1 的第 14 天后，再取昆明小鼠一批作为对照和氨苄青霉素组，抗金葡菌多肽组及抗金葡菌多肽 1 组存活鼠作为抗金葡菌多肽组及抗金葡菌多肽 1 组重复上述试验。对照组及氨苄青霉素组鼠在两天内全部死亡。抗金葡菌多肽组有 75％的鼠存活，抗金葡菌多肽 1 组有 90％的鼠存活。

实验 3：实验 1 的 41 天后，再取昆明小鼠一批作为对照组、左氧氟沙星组和头孢曲松钠组，抗金葡菌多肽组及抗金葡菌多肽 1 组存活鼠作为抗绿脓杆菌多肽 2 组及抗绿脓杆菌多肽 1 组。

小鼠腹腔注射致死剂量多重耐药绿脓杆菌（四川大学华西医院试验医学系临床分离株 13578）一小时后，

对照组尾静脉注射 0.5 毫升 0.3 M NaCl + 50 mM 硼酸缓冲液一次，

左氧氟沙星组尾静脉注射左氧氟沙星 5 mg/kg 一次,

头孢曲松钠组尾静脉注射头孢曲松钠 30 mg/kg 一次,

抗绿脓杆菌多肽 2 组尾静脉注射绿脓杆菌多肽 2　8 mg/kg 一次,

抗绿脓杆菌多肽 1 组尾静脉注射抗绿脓杆菌多肽 1 8 mg/kg 一次。　对照组和左氧氟沙星组鼠在一天内全部死亡。头孢曲松钠组有 25％的鼠存活。抗绿脓杆菌多肽 2 组有 60％的鼠存活。抗绿脓杆菌多肽 1 组鼠全部存活，说明宿主抗体对变构多肽杀伤效用的干扰比对野生型多肽的干扰要低。

见附图 3 。

在试验第一周、第二周和第 7 周分别采取上述抗金葡菌多肽/抗绿脓杆菌多肽 2 组和抗金葡菌多肽 1/抗绿脓杆菌多肽 1 组存活鼠的血清进行 ELISA 间接法检测其血中的抗体，酶标板的孔中分别包被野生型大肠菌素 Ia 和大肠菌素 Ia 变构多肽，　100 ng/ well, 一抗分别为抗金葡菌多肽/抗绿脓杆菌多肽 2 组和抗金葡菌多肽 1/抗绿脓杆菌多肽 1 组存活鼠血清，2 抗为山羊抗小鼠标记抗体，阴性对照以 5%牛奶-PBS 为一抗，　1:50,000 滴度的所得结果如下 (见附图 4)

	A（抗金葡多肽/抗绿脓多肽 2 组）	（抗金葡多肽 1/抗绿脓多肽 1）

1（第 1 周）	0.914	0.254
2（第 2 周）	1.623	0.598
3（第 7 周）	2.911	1.41
4（对照）	0.065	0.069

可见本发明所制备的大肠菌素 Ia 变构多肽造成宿主致敏反应的可能性要比野生型大肠菌素 Ia 造成宿主致敏反应的可能性低；

实施例 4 新型抗肿瘤多肽对 EBV 所致人恶性淋巴肉瘤(Burkitt's lymphoma)体外杀伤效果

EB 病毒阳性及阴性细胞株：为美国 ATCC 标准细胞株。

细胞培养：取出0.1 ml复苏培养的Raji细胞悬浮液，缓缓加入含3 ml 1640液体培养基(加10%血清)的培养皿中(稀释比例为1:30)，混合均匀，放入37℃ CO_2 培养箱中培养。实验使用一株EB病毒阳性细胞株：ATCC CCL-86（即全世界细胞培养室使用的标准人Burkitt's恶性淋巴肉瘤细胞, Raji 细胞, 1963年分离自12岁非洲男性患儿）。

受试细胞共分3组，第一组为空白组，即加入抗肿瘤多肽空白保存液(10mMPB+0.2M NaCI磷酸盐缓冲液（pH7.4）)。

第二组为加入200μg/ml的新型抗肿瘤多肽1 (质粒为pCHCEB11, 保存液为10mMPB + 0.2M NaCI磷酸缓冲液pH7.4)。

第三组为加入200μg/ml的新型抗肿瘤多肽2（质粒为pCHCEB22, 保存液为10mMPB + 0.2M NaCI磷酸缓冲液pH7.4）。

细胞在培养 24 小时后，分别加入上述各组处理物于培养皿中，在加入处理物后的第 72 小时加入 100 uMol 碘化丙啶（Propidium Iodide, PI） 20 ul, 10 分钟后在荧光显微镜下观察。结果显示空白组细胞生长良好，唯新型抗肿瘤多肽 1 组中绝大部分细胞被 PI 染成了红色，提示这些细胞膜已被抗肿瘤多肽破坏,造成肿瘤细胞死亡。 从细胞死亡数量来比较，两种新型抗肿瘤多肽中新型抗肿瘤多肽 2 效果较差，见附图 5。

实施例 5. 新型抗肿瘤多肽对 EB 病毒所致 Burkitt's 人恶性淋巴肉瘤细胞和其它肿瘤细胞的体外杀伤作用之多重荧光染色观察。

细胞培养条件同实施例 2。实验共使用三株细胞，EB病毒阳性细胞株：ATCC CCL-86（Raji 细胞, Burkitt's 恶性淋巴肉瘤细胞）； ATCC CRL-2230，46岁男性爱滋病人（AIDS）恶性淋巴肉瘤细胞株, EB病毒和Kaposi肉瘤病毒 (HHV8) 均阳性；EB病毒阴性细胞株：ATCC CRL-1648（CA-46, 细胞分离自美国型Burkitt's 恶性淋巴肉瘤病人的腹水）。

每株细胞分为二个实验组，第一组为加入新型抗肿瘤多肽空白保存液 (10mMPB+0.2M NaCI磷酸盐缓冲液（pH7.4））。第二组为加入200μg/ml的新型抗肿瘤多肽1(质粒为pCHCEB11)，保存液为10mMPB + 0.2M NaCI磷酸缓冲液 pH7.4。

细胞在培养 24 小时后，分别加入上述各组处理物于培养皿中，在加入处理物后的第 72 小时分别加入 50 uMol FITC 20ul 及 50 uMol Rodamin-123 20ul 两种荧光染料。10 分钟后在 Olympus IX-71 荧光显微镜下观察。

结果显示：EB 病毒阴性的肿瘤细胞株被新型抗肿瘤多肽 1 处理后仍生长良好。而 EB 病毒阳性的各肿瘤细胞株被新型抗肿瘤多肽 1 处理后，绝大多数细胞出现线粒体及胞核结构消失，明显肿胀和坏死，细胞几乎全部死亡。显然多重荧光染色的结果比实施例 4 碘化丙啶染色的结果更为精确的展示了新型抗肿瘤多肽 1 对 EB 病毒阳性肿瘤细胞的强大杀伤作用，见图 6。

EB 病毒阴性的肿瘤细胞生长良好，表明新型抗肿瘤多肽并不攻击细胞膜上不带有 EB 病毒表面抗原的细胞。这提示本发明新型抗肿瘤多肽具有理想的靶向特异性和安全性。

实施例 6.新型抗肿瘤多肽对 EB 病毒所致 Burkitt's 人恶性淋巴肉瘤细胞种植到裸鼠体内生长出的实体肿瘤的杀伤作用

SCID 免疫缺陷小鼠购自中国科学院上海实验动物中心,鼠喂养按标准饲养要求，水、垫草和饲料均经高温或紫外线灭菌。在相对无菌条件下饲养一周，无异常后进行接种实验。

收集指数生长期的 Raji (ATCC CCL-86) 和 1648（ATCC CRL-1648）细胞悬液于 50 毫升离心管中，4℃离心，弃上清后，用 1640 液体培养基（加小牛血清）重悬细胞，使之达到 1.0×10^7/ml 个细胞。在鼠左腋处皮下注射 Raji 细胞悬液

0.1ml，在鼠右腋处皮下注射 1648 细胞悬液 0.1ml 。

注射细胞后 3—4 日肿瘤即长到约 2 x 2 mm，将荷瘤裸鼠随机分为：

（A 组）抗肿瘤多肽空白保存液(10mM PBS+0.2M NaCI 磷酸盐缓冲液（pH7.4）)为对照组；

（B 组）新型抗肿瘤多肽 1(质粒为 pCHCEB11)治疗组，300 μg /鼠(以 25 克重计算)/日, 连续 20 日；

每组 10 只荷瘤鼠，给药方式为腹腔注射，每天注射 2 次，每次 0.5 ml ，连续给药 20 天。。每天观察鼠活动情况，并作记录，隔天精确测量肿瘤大小并照相。

结果显示：（见图 7）B 组新型抗肿瘤多肽组的鼠肿瘤生长明显受到抑制，其中 7 只鼠的瘤块消失，其余 3 只的瘤块明显小于对照组。新型抗肿瘤多肽在鼠体内可以有效地抑制 EBV 病毒阳性淋巴肉瘤细胞所致的实体瘤块生长。但对同体鼠内接种的 EBV 病毒阴性淋巴肉瘤细胞所致的实体瘤块却无抑制作用。

实施例 7.体内实体肿瘤消除实验的病理观察.

瘤体病理组织学观察：实施例 6 实验到期后处死小鼠，取出瘤体于 10％福尔马林中固定，石蜡切片，HE 染色常规光镜观察。

镜下观察对照组鼠的实体肿瘤增殖旺盛；新型抗肿瘤多肽组鼠的 EBV 病毒阳性实体肿瘤细胞显著减小，标本中缩小的肿瘤细胞团中几乎均为坏死的肿瘤细胞，周边可见大量淋巴细胞浸润。病理组织学结果提示在 20 日处理期限中，新型抗肿瘤多肽几乎杀灭了实体肿瘤中的所有肿瘤细胞（见图 8、D）。

权利要求书

1 一种新型抗 EB 病毒所致肿瘤多肽，由可形成离子通道的大肠菌素变构多肽与抗 EB 病毒抗体多肽或者抗 EB 病毒抗体的模拟抗体多肽可操作地连接构成，所述可形成离子通道的大肠菌素变构多肽由野生型大肠菌素 E1、Ia、Ib、A、B、N 或其水性孔道结构域的肽链突变了氨基酸残基 G11A、H22G、A26G、V31L 和 H40D 而获得，所述抗 EB 病毒抗体的氨基酸序列与 ATCC HB-168 杂交瘤分泌的单克隆抗体相同。

2.根据权利要求 1 所述的新型抗 EB 病毒所致肿瘤多肽，所述模拟抗体多肽指所述抗 EB 病毒抗体的重链 CDR1 区、重链 CDR1-CDR2 连接肽段和轻链 CDR3 的连接肽。

3.根据权利要求 2 所述的新型抗 EB 病毒所致肿瘤多肽，所述可形成离子通道的大肠菌素变构多肽由野生型大肠菌素 Ia 突变而来。

4 根据权利要求 3 所述的新型抗 EB 病毒所致肿瘤多肽，所述新型抗 EB 病毒所致肿瘤的多肽，具有如 SEQ ID NO.29 所示的氨基酸序列。

5.编码权利要求 1~4 任一所述新型抗 EB 病毒所致肿瘤多肽的基因。

6. 根据权利要求 5 所述的基因，具有如 SEQ ID NO.30 所示的核苷酸序列。

7.含有权利要求 5 所述基因的重组质粒。

8.权利要求 1~4 任一所述新型抗 EB 病毒所致肿瘤多肽的制备方法，步骤如下：将权利要求 7 所述的重组质粒转化到表达系统中进行表达，分离纯化表达的多肽。

9.权利要求 1~4 任一所述新型抗 EB 病毒所致肿瘤多肽在制备治疗和预防 EB 病毒所致肿瘤的药物中的应用。

10.一种大肠菌素 Ia 的变构多肽，其氨基酸序列如 SEQ ID NO.24 所示。

11.编码权利要求 10 所述的大肠菌素 Ia 的变构多肽的基因。

12. 权利要求 11 所述的基因在制备多肽药物中的应用，指将所述基因与诱导多肽的基因可操作地连接并克隆到表达载体中，然后将表达载体转化到表达系统中，分离纯化表达的多肽。