



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103159843 A

(43) 申请公布日 2013.06.19

(21) 申请号 201110427988.6

(22) 申请日 2011.12.19

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 江涛 唐捷 童琼 周洪哲
孙含丽

(74) 专利代理机构 北京市汉信律师事务所
11373

代理人 王文生

(51) Int. Cl.

C07K 14/48 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书8页

序列表2页 附图2页

(54) 发明名称

具有低免疫副作用的神经生长因子突变体的
制备方法及其药物应用价值

(57) 摘要

本发明涉及生物医药工程技术领域,具体涉及鼠源神经生长因子(mNGF)与脂类小分子lysoPS复合物的晶体结构以及复合物的细胞生物学效应。通过晶体结构分析确定了mNGF结合lysoPS的关键氨基酸,即,第88位赖氨酸,随后利用定点突变技术突变该位点,制备突变体蛋白并开展细胞实验。研究表明,mNGF突变体蛋白结合lysoPS的能力明显下降,其对细胞的毒副作用也明显降低。本发明提供上述复合物的晶体结构,脂类小分子lysoPS的结构特点,mNGF突变体蛋白的制备方法以及其在调控免疫系统和神经系统药物方面的用途。

1. 鼠源神经生长因子 mNGF 与脂类小分子 lysoPS 复合物的晶体结构,其中每两个 mNGF 组成一个双体分子,每个双体分子中夹有一个 lysoPS 分子。
2. 鼠源神经生长因子 mNGF 突变体蛋白,其氨基酸序列为 SEQ IDNO :2,其中第 88 位氨基酸由 K 突变为 L,将其称为 K88L mNGF。
3. 权利要求 2 的鼠源神经生长因子 mNGF 突变体蛋白用于制备低免疫副作用的神经生长因子替代药物的应用。
4. 一种低免疫副作用的神经生长因子替代药物,其包含治疗有效量的权利要求 2 所述的鼠源神经生长因子 mNGF 突变体蛋白。

具有低免疫副作用的神经生长因子突变体的制备方法及其 药物应用价值

发明领域：

[0001] 本发明涉及生物医药工程技术领域，具体涉及鼠源神经生长因子 (mNGF) 与脂类小分子 lysoPS 复合物的晶体结构以及复合物的细胞生物学效应。具体地，本发明通过晶体结构分析确定了 mNGF 结合 lysoPS 的关键氨基酸，即第 88 位赖氨酸，随后利用定点突变技术突变该位点，制备突变体蛋白并开展细胞实验。研究表明，mNGF 突变体蛋白结合 lysoPS 的能力明显下降，其对细胞的毒副作用也明显降低。本发明提供上述复合物的晶体结构，脂类小分子 lysoPS 的结构特点，mNGF 突变体蛋白的制备方法以及其在调控免疫系统和神经系统药物方面的用途。

背景技术：

[0002] 神经生长因子 (NGF) 在人体中广泛分布，是一个有着复杂功能的生物活性蛋白。学者们对 NGF 的研究遍及 NGF 提取纯化、基因定位、家族成员、膜受体，到它的转运、膜内信号传导和调控机制，还有 NGF 的三维结构以及与受体复合物的三维结构。成熟的有生物活性的 NGF 以同源二聚体的形式存在于生物体中，其单体是含有 120 个氨基酸的多肽，分子量约为 13kD。两个单体的折叠片以广泛的疏水作用形成稳定非共价的活性双体形式。

[0003] NGF 具有神经元营养和促进突起生长双重生物学功能，对种属和周围神经元的生长、发育、分化、正常状态的维持、凋亡、损伤后的保护和轴突的有效再生都有着重要作用。研究表明，NGF 在神经系统以外表现出非常活跃的生物学功能，主要表现在影响免疫细胞的活性，进而调节免疫系统功能，在免疫系统炎症疾病中扮演了非常重要的角色。但是 NGF 在免疫系统微环境中的作用到目前研究得还不是很透彻，还有很多问题有待解决。

[0004] NGF 是一个功能多样的生物活性分子，它与不同的受体识别传递不同的信号，引导细胞回馈不同的反应，它与不同细胞上的同种受体识别后也会产生不同的效应。NGF 通过两种受体不仅调控细胞内相关蛋白激酶和效应蛋白的活性和分布，诱导细胞做出各种抉择，还可以诱导细胞膜上和细胞内脂类分子的合成和降解，调控它们的分布，激活脂分子下游的效应蛋白，发挥复杂的功能。胞内的这些蛋白和脂分子在 NGF 的调控下协同作用或相互制约。

[0005] 在这些研究中经常可以注意到一些脂类分子的存在，这些脂类分子或是与其受体偶联的信号通路相关，或是与调节 NGF 的受体表达水平相关，或是被 NGF 调节等等。长久以来，科学家们都是在 NGF 周边间接地研究这些脂分子与 NGF 相关的生物功能，也很少有学者直接的将 NGF 与脂分子联系起来。例如，从蛇毒和大鼠颌下腺中提取的 NGF 与 lysoPS 可以共同诱导肥大细胞的脱颗粒反应，释放出多种炎症介质：如 5-羟色胺 (5-HT)、组胺 (histamine) 和白介素等，而二者单独作用并不能诱发此效应，但是其机理至今仍然不清楚。

[0006] 脂类是一类低溶于水却易溶于非极性溶剂的生物有机分子。脂类是富含能量的营养素，是生物体中能量的一种储存形式，脂类也是组成生物膜的重要组分，为保持膜的完整

性和流动性提供支持。脂类还作为一些物质的前体形式存在。近年来研究表明脂类也参与了细胞信号传导,有一些非常重要的脂类被定义为第二信使,发挥传递信号的中介功能,调控生命活动。

[0007] 来自鼠的 NGF 近几年已经作为国家一类新药上市,是有效的治疗神经系统疾病的新型生物制剂,适用于神经内科、神经外科和创伤等病症。但是由于 NGF 生物功能的多样性,其作为药物应用的同时可能会带来潜在的副作用,其分子生物学机制还在不断深入研究中。

[0008] 表面等离子共振 (surface plasmon resonance, SPR) 技术是目前国际上广泛用于研究两种分子相互作用的手段。这种方法检测生物分子的相互作用时,无需对生物分子进行标记,只需将一种生物分子固定在传感器芯片表面,将与之相互作用的分子的溶液流过芯片表面,就可以检测两种分子的结合、解离全过程。这种方法适用于多种生物体系,包括小分子化合物、多肽、蛋白质、寡核苷酸、寡聚糖、病毒、细胞等等。

[0009] 实验中使用的传感器芯片是 GE 公司生产的 CM5 芯片,传感片 CM5 表面覆盖了一层葡聚糖。带有化学基团如 $-NH_2$, $-SH$, $-CHO$, $-OH$, $-COOH$ 的生物分子可通过化学反应,以共价键耦联的方式与葡聚糖上的羧基耦联,从而使生物分子不可逆的耦联到传感片表面。我们的目的蛋白鼠源 NGF 是天然提取的,没有任何标签,所以我们选了 CM5 传感片。

发明内容:

[0010] 本发明利用结构生物学方法解析了蛇毒神经生长因子 cNGF 的晶体结构,第一次在 NGF 双体的疏水通道中发现了脂类分子的存在。由一级序列比对及三级结构的保守性分析,我们推测其它来源的神经生长因子也具有结合脂类分子的能力。根据 cNGF 中发现的脂类小分子的结构特点,我们选取了多种具有类似结构特征的脂类小分子,利用 SPR 技术研究了它们与鼠源神经生长因子 mNGF 之间的相互作用,得到了 mNGF 结合脂类分子的结构特点。能够与 mNGF 形成较高亲和力复合物的脂类小分子其结构特征为:具有一个极性头部,如磷酸基团或糖基修饰,结构式中有一条或两条由 40 个左右碳原子组成的疏水碳链,具有一定的可溶性。随后利用结构生物学方法解析了鼠源神经生长因子 mNGF 与脂类小分子 1ysoPS 复合物的晶体结构。

[0011] 通过 mNGF 与 1ysoPS 复合物晶体结构分析,我们找到了 mNGF 结合 1ysoPS 分子头部磷酸基团的关键氨基酸,即,第 88 位赖氨酸,利用定点突变技术突变该位点并制备突变体蛋白,随后开展细胞实验。研究结果表明 mNGF 与特定的脂类小分子形成的高亲和力复合物具有不同于 mNGF 本身的重要的细胞生物学功能,具体表现在 mNGF 与 1ysoPS 共同刺激小鼠肥大细胞瘤细胞可以诱导其释放组胺。mNGF 双体中的某些关键氨基酸对于脂类分子的结合进而对复合物功能的发挥具有非常重要的作用。我们有理由推测 mNGF 与脂类分子的结合可能是 mNGF 作为药物应用时产生副作用的潜在因素。通过 SPR 实验证明突变体蛋白结合脂类分子的能力明显下降,而其刺激小鼠肥大细胞瘤细胞时组胺释放水平也明显下降。因此 mNGF 突变体蛋白可以作为一种具有低免疫副作用的 NGF 药物替代品。

[0012] 在本发明中提供下列:

[0013] 1. 鼠源神经生长因子 mNGF 与脂类小分子 1ysoPS 复合物的晶体结构,其中每两个 mNGF 组成一个双体分子,每个双体分子中夹有一个 1ysoPS 分子。

[0014] 2. 鼠源神经生长因子 mNGF 突变体蛋白,其氨基酸序列为 SEQ ID NO :2,将其称为 K88L mNGF,即将 mNGF 的第 88 位氨基酸由带电荷的赖氨酸突变为不带电荷的侧链长度相近的中性氨基酸亮氨酸。

[0015] 3. 第 2 项的鼠源神经生长因子 mNGF 突变体蛋白用于制备低免疫副作用的神经生长因子替代药物的应用。

[0016] 4. 一种低免疫副作用的神经生长因子替代药物,其包含治疗有效量的第 2 项所述的鼠源神经生长因子 mNGF 突变体蛋白。

[0017] 附图简述:

[0018] 图 1 是 mNGF 及其突变体 K88L mNGF 与 lysoPS 复合物的小鼠肥大细胞瘤细胞组胺释放实验。相比 mNGF,突变体 K88L mNGF 所引起的组胺释放效应明显降低。

[0019] 图 2 是 mNGF 与 lysoPS 复合物的晶体结构。在双体结合面的疏水通道中夹着一个 lysoPS 分子。

[0020] 图 3 是鼠源神经生长因子 mNGF 的氨基酸序列 (SEQ ID NO :1)。

[0021] 图 4 是鼠源神经生长因子第 88 位突变体蛋白 K88LmNGF 的氨基酸序列 (SEQ ID NO :2)。

具体实施方式

[0022] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限制本发明。

[0023] 本领域技术人员应该理解,实施例中所用的试剂除特别说明外均为市售分析纯级别的试剂。

[0024] 实施例 1

[0025] 1、SPR 实验分析鼠源神经生长因子 (mNGF) 与多种脂类小分子的亲和力

[0026] 本实施例所用的脂类小分子购买自 avanti polar lipids, Inc.

[0027] 使用 GE 公司的 Biocore 3000 仪器进行 SPR 实验分析。当光线从高折射率的介质进入低折射率的介质时,一部分光线会在接触面上被反射。当入射角大于临界角的时候,光线会发生全反射。但是,当玻璃的表面覆盖一层薄的惰性金属膜(如金)时,金属膜表面的等离子体(plasma)发生振动,一部分光会“损失”在金属膜上。当入射光的波矢量与表面等离子体振子的频率一致的时候,电子发生“共振”,这种现象被称为表面等离子共振(surface plasmon resonance)。当反射光的强度达到最小值时的入射角,被称为表面等离子共振角(θ_{spr} , surface plasmon resonance angle)。SPR 随金属膜表面介质的折射率变化而变化,而折射率的变化则与结合在金属表面的分子质量成正比。因此,我们可以通过观察表面等离子共振角,来分析生物分子之间的相互作用。结果描绘为 RU(resonance unit)对时间的图。

[0028] 实验流程:

[0029] 首先选取合适的 PH 值将目的蛋白固定到 CM5 芯片表面,一般是 PH4.5 到 5.5 之间的醋酸钠溶液,NGF 在酸性溶液中表现稳定,选取 PH5.5 的醋酸钠溶液按标准化流程固定目标蛋白(即, mNGF),用流动相溶液 50mM 磷酸钠缓冲液 pH 6.5 将小分子分别稀释到终浓度为 10ug/ml-300ug/ml 之间,通过芯片。以 30ul/min 的流速注射,持续注射时间为 1min,并记录相应曲线。使用 BIAcore3000 自行携带软件 BIAevaluation 4.1 版进行数据分析。

[0030] 在 BIAcore 实验中,我们测试了 13 种小分子(如表 1 所示)与 mNGF 的结合能力。在这部分实验中,我们只是定性的分析了小分子能否与 mNGF 结合,并没有测试他们之间的亲和力。

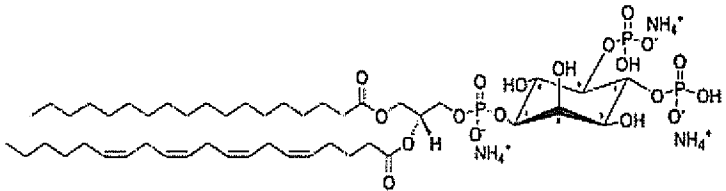
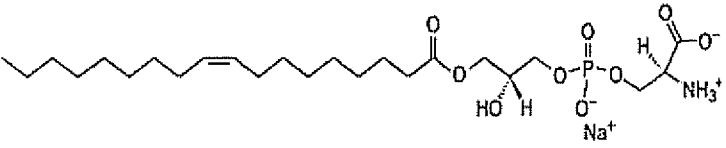
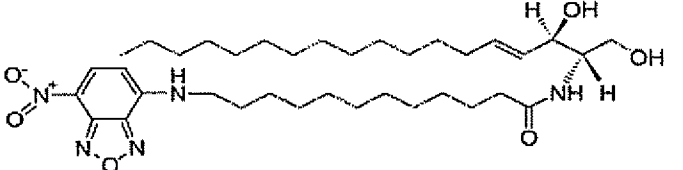
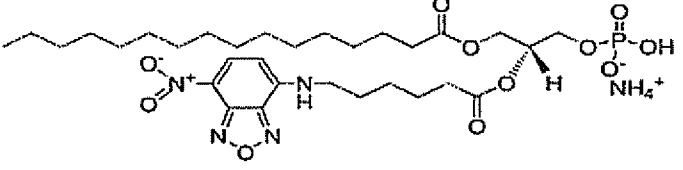
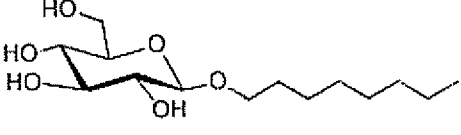
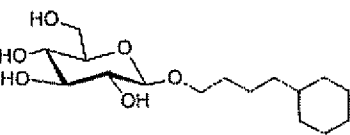
[0031] 结果显示有 3 种小分子与 mNGF 有相互作用,分别是 PA、PIP2、lysoPS,它们的分子式和结构式见表 1。

[0032] 表 1 选取的脂类分子名称和结构信息表

[0033]

序号	名称简写	全称	分子量(单位: dalton)	结构式
I	PS	L- α -phosphatidylserine	Brain PS 812.041	
II	PAF	1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine	PAF (from Heart PC) 523.683	
III	GS	D-glucosyl- β -1'-1'-D-erythro-sphingosine	Glucosyl(β) Sphingosine (d18:1) 461.335	
IV	LS	D-lactosyl- β -1'-1'-D-erythro-sphingosine	Lactosyl(β) Sphingosine (d18:1) 623.773	
V	G-C8	D-glucosyl- β -1,1'-N-octanoyl-D-erythro-sphingosine	C8 Glucosyl(β) Ceramide (d18:1/8:0) 587.829	
VI	S-1-P	D-erythro-sphingosine-1-phosphate	Sphingosine-1-Phosphate (d18:1) 379.249	
VII	PA	L- α -phosphatidic acid	Egg PA 696.910	

[0034]

VIII	PIP2	L- α -phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate Brain PI(4,5)P2 1.098.179 
IX	Lyso PS	1-oleoyl-2-hydroxy- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-L-serine 18:1LysoPS 545.579 
X	C12-NBD Cer	N-[12-((7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino)lauroyl]-D-erythro-sphingosine C12-NBD Ceramide 643.9 
XI	NBD PA	1-acyl-2-(6-((7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino)hexano- <i>sn</i> -glycero-3-phosphate Acyl 06:0 NBD PA 703.76 
XII	β -OG	n-OCTYL-D-GLUCOPYRANOSIDE 292.4 
XIII	CYGLU	4-Cyclohexyl-1-butyl- β -D-glucoside 318.4 

[0035] 2、mNGF 突变体蛋白的表达和纯化

[0036] 鼠源 proNGF 基因购买自 ATCC 公司 (<http://www.atcc.org>), 基因库号为: BC011123。使用 Stratagene 公司的试剂盒 QuikChange Site-directed Mutagenesis kit 进行单点突变 (将第 88 位的赖氨酸突变为亮氨酸)。突变体基因被克隆在载体 pET-28a (购

于 Qiagen 公司) 上,使用大肠杆菌表达菌株 BL21(购于 Merck 公司)表达。

[0037] 挑取单克隆,在含 50 μ g/ml kana 的 5ml LB 中 37 $^{\circ}$ C 振摇过夜后,取 2ml 接种到含 50 μ g/ml kana 的 200ml LB 中摇至 OD600 约为 0.6,再转接至 6 瓶含 50 μ g/ml kana 的 1.5L LB 中摇至 OD600 约为 0.8,加入终浓度为 0.5mM 的 IPTG,37 $^{\circ}$ C 诱导 6h,离心收集菌体。

[0038] 将收集的菌体超声破碎,4 $^{\circ}$ C 16000rpm 离心 30min,取包涵体沉淀用溶液 2M 盐酸胍,100mM Tris-HCl pH 8.0,0.5mM NaCl,2% Triton X-100 洗 5 次。然后用含 7M 盐酸胍的溶液溶解包涵体,并在溶液 0.7M Arg,100mM Tris-HCl pH 9.5,0.5mM NaCl,5mM GSH,0.5mM GSSG 中稀释复性。。将此溶液于 4 $^{\circ}$ C 放置一周以上,等待二硫键正确配对。蛋白复性后透析:

[0039] 透析溶液:

[0040] 第一步溶液:50mM Tris-HCl pH 9.5,0.5mM NaCl,

[0041] 5mM EDTA,10%甘油

[0042] 第二步溶液:PBS pH 7.4,0.3mM NaCl,

[0043] 5mM EDTA,10%甘油

[0044] 第三步溶液:50mM 磷酸钠缓冲液 pH 6.0,0.5mM NaCl,

[0045] 5mM EDTA,5%甘油

[0046] 将含蛋白的复性溶液装在透析袋中,在第一步溶液中透析 6 小时以上后,换第二步溶液透析 6 小时以上后,再换第三步溶液透析 6 小时以上,根据具体情况可以再透析一次第三步溶液 6 小时。

[0047] 收集透析后蛋白酶解:将结束透析后溶液高速离心,16000rpm \times 30min,收集上清。此时折叠好的蛋白即在上清中。浓缩,换成无甘油的 50mM 磷酸钠缓冲液 pH 6.0 溶液。用胰蛋白酶对目的蛋白进行酶切处理,除去 pro 部分,形成成熟的 NGF 蛋白。酶切后的蛋白,加入商业的混合蛋白酶抑制剂 cocktail (CALBIOCHEM, Protease Inhibitor Cocktail Set III)。酶切后的蛋白换为 50mM 醋酸钠 pH 5.3 140mM 氯化钠溶液,用凝胶排阻 superdex 75(GE) 分离纯化,去除杂蛋白,取得比较纯的目的蛋白。

[0048] 3、mNGF 及其突变体与 lysoPS 复合物的小鼠肥大细胞瘤细胞组胺释放实验

[0049] 细胞实验内容:mNGF,mNGF 突变体工作浓度均为 200ng/ml,将上述 NGF 与表 1 所示的脂类小分子共同孵育约 10 分钟,刺激时细胞培养液为 5% FBS(胎牛血清)DMEM。实验中 NGF、脂类分子均用添加了 0.5mM CaCl₂ 的 50mM Na₂Ac 稀释。

[0050] 细胞实验结果:相比 mNGF 单独作用,mNGF 与 lysoPS 共同刺激时,肥大细胞释放组胺的量明显增加,突变 mNGF 中与 lysoPS 相互作用的关键氨基酸第 88 位赖氨酸后,二者共同孵育刺激肥大细胞其组胺释放量明显降低。

[0051] 上述实验结果说明第 88 位赖氨酸确实如复合物晶体结构中所显示的一样,是 mNGF 结合 lysoPS 脂分子的关键氨基酸,将其突变为不带电荷的亮氨酸后,mNGF 结合 lysoPS 脂分子的能力下降,从而当二者共同刺激肥大细胞瘤细胞时组胺释放效应显著降低。据此可以应用 88 位突变体 mMGF 作为 mNGF 的替代药物,降低对细胞的毒副作用。

[0052] 4、mNGF 与 lysoPS 复合物的结晶及结构解析

[0053] 我们尝试了商业晶体试剂盒,它们是 hampton 公司的 PEG/ion,QIAGEN 公司出品的 NeXtal Tubes Classics Suite 和 NeXtal Tubes PEGsSuite。经过筛选后,NGF 与 lysoPS

共晶在多个条件都出现了微晶。对 pH 值范围、沉淀剂浓度、蛋白浓度、蛋白与小分子比例还有温度都细化筛选,最终得到了衍射良好的晶体。

[0054] 经过脱水处理后的晶体在上海同步辐射 (Shanghai Synchrotron Radiation Facility, SSRF) 进行数据收集,晶体衍射分辨率达到 $2.1\text{\AA}\sim 2.3\text{\AA}$ 。

[0055] 晶体结构研究表明,每两个 mNGF 组成一个双体分子,每个双体分子中夹有一个 lysoPS 分子。

[0056] 应该理解,尽管参考其示例性的实施方案,已经对本发明进行具体地显示和描述,但是本领域的普通技术人员应该理解,在不背离由后附的权利要求所定义的本发明的精神和范围的条件下,可以在其中进行各种形式和细节的变化,可以进行各种实施方案的任意组合。

[0001]

IB117673序列表

序列表

- <110> 中国科学院生物物理所
- <120> 具有低免疫副作用的神经生长因子突变体的制备方法及其药物应用价值
- <130> IB117673
- <160> 2
- <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
- <211> 120
- <212> PRT
- <213> 鼠源神经生长因子mNGF的氨基酸序列（野生型）
- <400> 1
- Ser Ser Thr His Pro Val Phe His Met Gly Glu Phe Ser Val Cys Asp
1 5 10 15
- Ser Val Ser Val Trp Val Gly Asp Lys Thr Thr Ala Thr Asp Ile Lys
20 25 30
- Gly Lys Glu Val Thr Val Leu Ala Glu Val Asn Ile Asn Asn Ser Val
35 40 45
- Phe Arg Gln Tyr Phe Phe Glu Thr Lys Cys Arg Ala Ser Asn Pro Val
50 55 60
- Glu Ser Gly Cys Arg Gly Ile Asp Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr Cys
65 70 75 80
- Thr Thr Thr His Thr Phe Val Lys Ala Leu Thr Thr Asp Glu Lys Gln
85 90 95
- Ala Ala Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ala Cys Val Cys Val Leu
100 105 110
- Ser Arg Lys Ala Thr Arg Arg Gly
115 120
- <210> 2
- <211> 120
- <212> PRT
- <213> 突变体K88LmNGF的氨基酸序列, 其中第88位氨基酸由K突变为L

[0002]

IB117673序列表

<400> 2

Ser Ser Thr His Pro Val Phe His Met Gly Glu Phe Ser Val Cys Asp
 1 5 10 15

Ser Val Ser Val Trp Val Gly Asp Lys Thr Thr Ala Thr Asp Ile Lys
 20 25 30

Gly Lys Glu Val Thr Val Leu Ala Glu Val Asn Ile Asn Asn Ser Val
 35 40 45

Phe Arg Gln Tyr Phe Phe Glu Thr Lys Cys Arg Ala Ser Asn Pro Val
 50 55 60

Glu Ser Gly Cys Arg Gly Ile Asp Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr Cys
 65 70 75 80

Thr Thr Thr His Thr Phe Val Leu Ala Leu Thr Thr Asp Glu Lys Gln
 85 90 95

Ala Ala Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ala Cys Val Cys Val Leu
 100 105 110

Ser Arg Lys Ala Thr Arg Arg Gly
 115 120

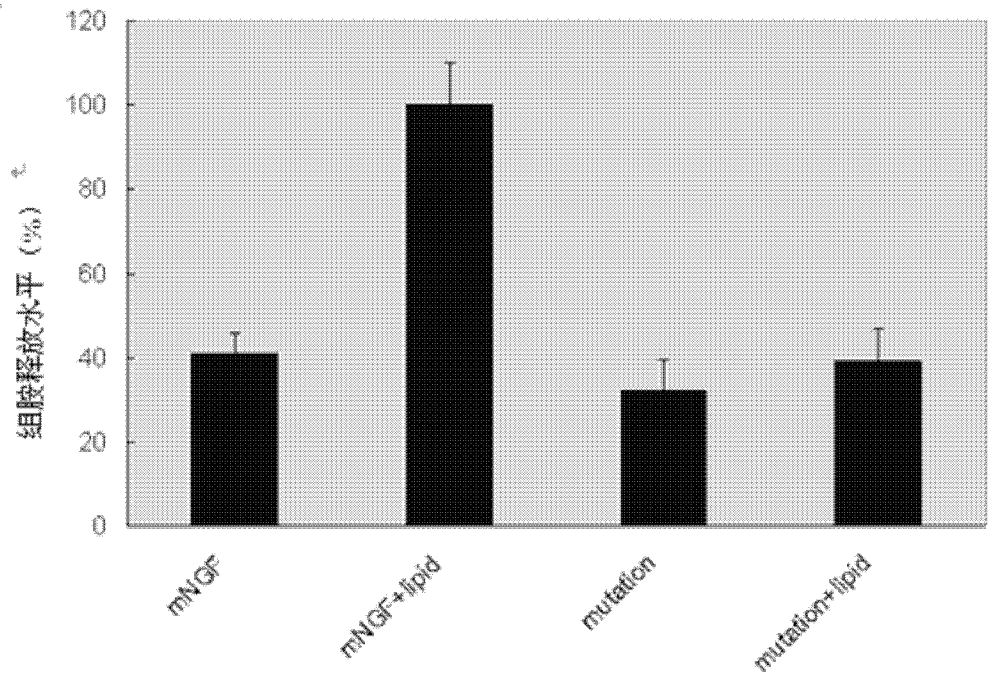


图 1

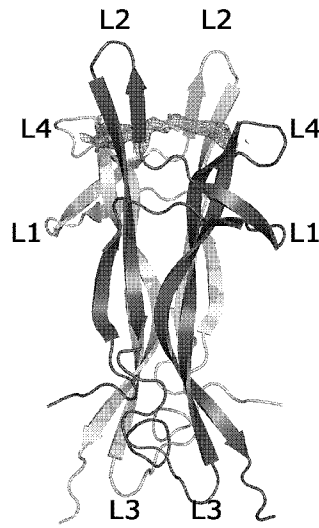


图 2

IB117673

mNGF 氨基酸序列 (SEQ ID NO:1):

SSTHPVFHMGFEFSVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVTVLAEVNINNSV
FRQYFFETKCRASNPVESGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTTDEKQ
AAWRFIRIDTACVCVLSRKATTRG

图 3

突变体 K88LmNGF 氨基酸序列 (SEQ ID NO:2):

SSTHPVFHMGFEFSVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVTVLAEVNINNSV
FRQYFFETKCRASNPVESGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVLALTTDEKQ
AAWRFIRIDTACVCVLSRKATTRG

图 4