

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 14/00

C07K 14/435 A61K 38/17



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01123840.2

[43] 公开日 2003 年 3 月 5 日

[11] 公开号 CN 1400219A

[22] 申请日 2001.8.2 [21] 申请号 01123840.2

[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 韩学海

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公
司

代理人 姜兆元

权利要求书 1 页 说明书 7 页

[54] 发明名称 一种具有强插膜能力的氨基酸多肽

[57] 摘要

本发明涉及一特定氨基酸序列的多肽，包含 22 个氨基酸残基以下列顺序 NH₂ - LENPKKYIPGTKMI-FAGIKKKC - COOH (氨基酸的单字母符号表示) 由氨基端向羧基端排列。其功能是很强的从水相自发插入含酸性磷脂的人工及天然细胞膜的能力，并可抑制细胞色素 c 的前体脱辅基细胞色素 c 与线粒体的结合，将该肽的以上特性应用于靶向药物的设计中，可将化合物或蛋白质通过共价结合或构建包含该序列的融合蛋白质使它们进入或穿越细胞膜到达作用位点。

1、一种具有强插膜能力的多肽，该多肽的氨基酸组成，由下式所示
5 的单字母表示的氨基酸残基组成：



2、一种根据权利要求1所述多肽的衍生序列如下式所示：



U代表Y或MY或LMY或TLMY；

10 X代表Q或T；

Z代表A或G或S。

3、一种根据权利要求1或2所示的多肽，是其中羧基COOH被药物
取代的多肽衍生物。

4、根据权利要求3所述的COOH被药物取代的多肽衍生物，优选磺
15 胺，青霉素，链霉素以及抗菌肽取代羧基共价所形成的多肽衍生物。

5、人为构建的含权利要求1或2多肽序列的嵌合蛋白，如下式所示：



其中J为权利要求1或2中的多肽， α 、 β 为其它蛋白

6、根据权利要求1或2所述的具有强插膜能力的多肽或权利要求3
20 或4或5的该肽的衍生物，任选一项在制备靶向药物中的应用。

一种具有强插膜能力的氨基酸多肽

5

一、技术领域

本发明属于细胞生物学和蛋白质多肽技术领域，与药物设计及药物合成密切相关。具体地说是利用化学合成法或基因工程方法制备 22 个氨基酸残基多肽，其序列源于鸡细胞色素 c 一级序列中的 68—88 部分，其氨基酸序列为：NH₂—LENPKKYIPGTKMIFAGIKKKC—COOH（氨基酸的单字母符号）。其特点是具有很强的自发插入人工或天然细胞膜的能力，而其氨基酸序列不同于已存在的具有插膜能力的多肽；另一方面，它可抑制细胞色素 c (简称 Cyt.c)前体脱辅基细胞色素 c (简称 apocyt.c)与线粒体的结合；该肽可直接作为以细胞内分子为靶点的功能药物，也可以利用该肽作为载体或靶向引导分子构建融合蛋白质或通过共价结合化合物制备出的药物可定位于或穿越细胞膜到达作用位点。

10

15

二、技术背景：

本发明源于我们实验室对细胞色素 c 前体脱辅基细胞色素 c 的跨人工脂双层膜和线粒体外膜的研究。Apocyt.c 是第一个被证明的、存在于细胞质中的线粒体前体蛋白，它由核基因编码在细胞质中的游离核糖体上合成后，跨过线粒体外膜在细胞色素 c 血红素裂解酶（CCHL）的催化作用下偶联血红素，形成完整的细胞色素 c 并定位于内膜的外侧，与线粒体内膜其它组分一起构成电子传递链，为细胞的新陈代谢提供能量。但是，Cyt.c 的前体 apocyt.c 输入线粒体的分子机制特别是如何穿越外膜仍很不清楚，对此研究的重要性的目的在于：

20

25

1、Cyt.c 为什么在进化过程中获得了既与其它膜间隙细胞色素蛋白（如 Cyt.c₁，Cyt.b₂）截然不同的、也与原核和叶绿体体系中 Cyt.c 转运都不同的转运机制？

30

2、Cyt.c 从线粒体释放到胞浆中会引发细胞凋亡。作为电子传递中间体的 Cyt.c 在线粒体的能量产生与转化的过程中起不可缺少作用的、为什

么在细胞程序性死亡（细胞凋亡）中也扮演重要角色？

3、线粒体结构和功能的异常与许多疾病相关。

自 1988 年致病性线粒体的核酸 mtDNA 突变第一次被鉴定出来之后，线粒体相关的疾病症候不断被报道出来，它们主要集中在神经、视觉系
5 统和肌肉系统。临床表现为神经调节紊乱，运动失调，视网膜色素沉着，肌肉萎缩，心肌肥大等。现已发现脑脊髓炎（MELAS, MERFF, KSS/CPEO, NARP/MILS）、癫痫、帕金森病(Parkinson's disease)、阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease)、利伯氏病(Lebel's disease)、母系遗传性糖尿病、耳聋(MIDD)以及进行性肾病和肝衰竭等，它们都与线粒体结构和功能变化
10 有关。

4、决定细胞色素 c 转运信号的研究及信号的发现对于控制细胞的生长、凋亡具有重要意义，据此原理设计的靶向药物对以上疾病的预防、
治疗和抗癌药物的设计提供了一种新的方法。

15 Apocyt.c 输入线粒体的途径是所有线粒体蛋白质前体的跨膜转运中最特殊的。不同于其它大多数线粒体的前体蛋白，它不带有可剪切的 N 端导肽。输入线粒体不需要 ATP、跨膜电位提供能量。至今尚未在线粒体外膜上发现有特异识别 apocyt.c 的受体或其它蛋白性成分参与其输入过程，也未明确脂在 apocyt.c 转运中的作用。

20 Neupert 等用基因融合的方法将细胞色素 c1 导肽部分中的导向基质部分信号序列接在去掉 6 个氨基酸的 apocyt.c 的 N 端，形成的杂交蛋白既可以像 Cyt.c1 一样进入基质，也可以像 apocyt.c 一样进入膜间隙，而且其进入基质不需要 Cyt.c1 的受体和 GIP，表明 apocyt.c 的自发插膜能力可以绕过这一步骤，但需要一个跨内膜电势差。若将 Cyt.c1 的完整导肽接
25 在 apocyt.c 的 N 端，得到的杂交蛋白就可以通过两条途径到达膜间隙，即 Cyt.c 途径或 Cyt.c1 的途径，即常规的保守定向从内外膜接触位点进入线粒体基质，经基质中的导肽酶处理后再插入内膜或内外膜间隙[1]。这一实验表明 apocyt.c 跨膜转运的特殊性在于线粒体的外膜上不存在 apocyt.c 的特异的受体；因此，apocyt.c 高的膜表面活性可使它自发地
30 插入线粒体的外膜替代大部分线粒体前体蛋白受体介导的跨越外膜自发地

插入外膜，但是由于无法在线粒体水平检测 apocyt.c 插膜能力，所以，还没有直接的实验证据。

另一个关键问题是 apocyt.c 序列中是否存在这样的片段，哪一部分的片段承担其高膜表面活性，该片段的位置、长度以及氨基酸序列特征是什么？该片段是否也负责 apocyt.c 对线粒体的识别和结合？

三、发明内容：

本发明始于我们实验室对 apocyt.c 与磷脂的相互作用的研究，apocyt.c 的高自发插膜能力通过与磷脂的相互作用表现出来，我们的研究策略是选定 apocyt.c 分子内的一些潜在的插膜片段，通过 DNA 突变技术缺失这些片段，若 apocyt.c 在模型膜上插膜能力、转运能力和在线粒体上结合随这些片段的缺失下降或消失就证明特定片段的重要性，之后合成与这些片段相关的肽段，在模型膜和线粒体上检定它们的确切作用就可以回答 104 个残基的 apocyt.c 的哪段或哪几段甚至哪几个残基对其插膜、转运起决定性作用。其中的关键是必须将 apocyt.c 在线粒体上的结合、转运和它与模型膜的作用的研究结合起来，克服了在细胞和亚细胞水平实验时无法检测样品插膜能力这一缺陷，同时利用化学合成法获取多肽克服了化学裂解法中位点的限制。

用突变方法从 apocyt.c 中缺失掉一个片段 28-39 或 61-66 或 72-86 或两个片段 28-39 和 72-86，并通过在大肠杆菌中表达和纯化步骤，我们获得了高度纯化的缺失突变体，对它们在脂质体上的转运研究结果显示在缺失的几个片段中只有 72-86 段的缺失会极大地降低 apocyt.c 的插膜及转运能力，提示这一段在 apocyt.c 跨脂双层转运中可能起决定性作用[2,3]。为进一步确认，我们合成了一段含 22 个氨基酸残基的覆盖 72-86 片段的多肽，单分子层插膜、与脂质体、线粒体的结合能力以及对 ³⁵S-*apocyt.c* 与线粒体结合的竞争性抑制实验表明，此肽的插膜能力与完整蛋白相当，并可抑制 apocyt.c 与线粒体的结合[4]。

综合以上 72-86 片段缺失后 apocyt.c 在单分子层插膜、跨脂质体运送以及与线粒体结合的下降和化学合成的 68-88 肽段的功能替代表明 apocyt.c 中的 68-88 肽段起着关键作用，它是决定 apocyt.c 唯一的、独立的和最强的插膜片段，也是 apocyt.c 导向线粒体的内在信号肽之一。

本发明的意义在于：

1、 细胞色素 c 的进、出线粒体决定着细胞的生存和死亡。细胞新陈代谢所需的能量由线粒体提供，而 Cyt.c 是线粒体电子传递链上的重要组
5 分之一，控制其前体的输入是调控线粒体功能的途径之一。

2、 很多药物的靶位点是细胞的胞质区或胞质内的细胞器，由于胞质被质膜包围，一些药物并不能自发跨越质膜屏障，因此，找出可引导特定药物穿越质膜的分子或化合物是靶向药物设计中的关键问题之一。我们合成的多肽具有高插膜能力并兼有对线粒体的结合能力，所以，存在
10 很好的应用前景和经济效益。目前还没有发现利用我们发现的序列进行药物设计的报道。

四、具体实施方式

1、 含有本发明所设计的 22 个氨基酸、按 NH_2 -
15 LENPKKYIPGTKMIFAGIKKKK-COOH 序列的多肽就具有含 104 个氨基酸残基的 apocyt.c 的插膜作用，并且具有很好的水溶性。一些天然的或人工合成的化合物包括多肽和蛋白质的插膜是许多生理现象和药物作用模型的分子基础，如蛋白质的跨膜运送，天然毒素（细菌、植物毒素等）的毒杀宿主，抗生素的杀菌等，但分子量一般均很大。

20 2、 本发明 LENPKKYIPGTKMIFAGIKKKK 的序列是具有插膜功能的最小长度之一，所以长于此长度的氨基酸序列同样具有相同的功能如在 N 端增加 1 至 4 个氨基酸残基。另一方面，由于本发明包括 Cyt.c 中最保守的 10 个氨基酸以外的序列，因此，对个别氨基酸残基的替换或保守替换不影响其功能，如：本发明中的 C 端半胱氨酸残基（C）用丙氨酸（A）
25 或甘氨酸（G）或丝氨酸（S）替换，谷氨酸（E）用谷氨酰胺（Q）或苏氨酸（T）替代。

3、 含有如上所述的 22 个氨基酸序列的多肽很容易利用化学合成法或基因工程法等获得。（1）固相或液相氨基酸化学合成法按 NH_2 -
30 LENPKKYIPGTKM IFAGIKKKK 序列合成获得；（2）从 DNA 碱基序列翻译表达纯化后获得，具体步骤和方法可参见 J.Sambrook 等编写的《分

子克隆实验指南》。编码该氨基酸序列的 DNA 碱基序列可以从编码细胞色素 c 的 DNA 序列中亚克隆或用 PCR 扩增或按能编码该氨基酸序列的 DNA 碱基序列化学合成获得，插入真核或原核表达质粒的多克隆位点构建出表达质粒，然后根据质粒的特性选择适当的载体细胞（大肠杆菌、酵母、昆虫细胞或哺乳动物细胞）转化，再经细胞培养、分离纯化获得[5]；

5 (3) 用化学或酶降解方法由细胞色素 c 或脱辅基细胞色素 c 直接获得包含该序列的片段。

4、该肽插膜后呈特殊的构象。在众多具有自发插膜能力的氨基酸多肽中，典型的序列特征是较多的疏水氨基酸残基和部分碱性氨基酸残基在按序列排布的螺旋图上呈两侧或两端分布，插膜后的多肽多呈螺旋构象，而本发明中的插膜多肽在膜中的构象与此不同。

该氨基酸多肽可以用如下方法获得：(1) 固相或液相氨基酸化学合成法按 $\text{NH}_2\text{-LENPKKYIPGTKM IFAGIKKKC}$ 序列合成获得；(2) 从 DNA 碱基序列翻译表达纯化后获得，具体步骤和方法可参见 J. Sambrook 等编写的《分子克隆实验指南》。编码该氨基酸序列的 DNA 碱基序列可以从编码细胞色素 c 的 DNA 序列中亚克隆或用 PCR 扩增或按能编码该氨基酸序列的 DNA 碱基序列化学合成获得，插入真核或原核表达质粒的多克隆位点构建出表达质粒，然后根据质粒的特性选择适当的载体细胞（大肠杆菌、酵母、昆虫细胞或哺乳动物细胞）转化，再经细胞培养、分离纯化获得[5]；(3) 用化学或酶降解方法由细胞色素 c 或脱辅基细胞色素 c 直接获得包含该序列的片段。

对以上应用模式的实施方案

按照此序列 $\text{LENPKKYIPGTKM IFAGIKKKC}$ 模式的插膜多肽的设计（直接效果和间接应用）；

25 该插膜多肽与其它化合物形成的产物。例如，该肽的羧基端与磺胺，或青霉素，或链霉素以及抗菌肽共价形成的产物；

利用该肽作导向的融合蛋白。利用分子遗传学方法中的 DNA 操作将编码 $\text{LENPKKYIPGTKM IFAGIKKKC}$ 氨基酸序列的核苷酸序列与编码其它蛋白的核苷酸序列剪接，在蛋白质水平表达出人为构建的嵌合蛋白，其模式为： $\alpha\text{-J}$ ，或 $\text{J-}\beta$ 或 $\alpha\text{-J-}\beta$ ，其中 J 代表本发明的多肽， α 、 β 代表其

它蛋白，或一个蛋白的两部分。这样，本发明中的插膜多肽接在其它蛋白 β 的 N 端或 α 的 C 端或嵌合在分子内，这种分子嵌合体在胞内表达后将被引导至线粒体。

5 利用本发明设计的多肽或该多肽的衍生物，其中含有导向分子的化合物或抗菌素及其它药物的多肽衍生物可以在制备有关药物中应用。

参考文献:

1. Stuart RA., Nicholson DW., Neupert W. (1991) Early steps
5 in mitochondrial protein import: receptor functions can be
substituted by the membrane insertion activity of
apocytochrome c. Cell 60, 1, 31-43
2. 贾松涛, 硕士学位论文, 1997.7, 中国科学院生物物理研究所。
3. 韩学海, 贾松涛, 杨福愉, 中国科协第三届青年学术年会论文集(生命科
10 学与生物技术) 分子内的片段缺失对脱血红素细胞色素 c 跨脂双层膜转运能力的
影响, 43, 中国科学技术出版社 1998 北京 .
4. 王小平, 韩学海, 杨福愉, 脱血红素细胞色素 c 的 68—88 肽段在插膜、
转运及与线粒体结合中起关键性作用, 中国科学(投稿中)。
5. J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯著《分子克隆实验指
15 南》科学出版社出版 1986 (ISBN 7-03-002808-2/Q.372)。