



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116444624 A

(43) 申请公布日 2023. 07. 18

(21) 申请号 202310649119.0

(22) 申请日 2023.06.02

(71) 申请人 安徽金百奥生物科技有限公司

地址 230601 安徽省合肥市蜀山区芙蓉路  
268号合肥创新创业园

(72) 发明人 尚玉花 赵丹

(74) 专利代理机构 合肥和瑞知识产权代理事务  
所(普通合伙) 34118

专利代理师 王挺

(51) Int. Cl.

C07K 14/00 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

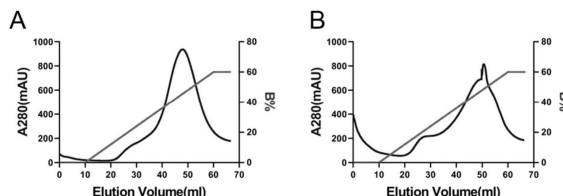
权利要求书1页 说明书3页  
序列表(电子公布) 附图2页

(54) 发明名称

一种用于制备三聚体融合蛋白的三聚体标签及其应用

(57) 摘要

本发明涉及生物制药技术领域,尤其涉及一种用于制备三聚体融合蛋白的三聚体标签及其应用。所述标签为Ebola virus GP或Monofoil-4P,所述Ebola virus GP的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示,所述Monofoil-4P的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。实验证明,本发明提供的两个三聚体标签均能够将目的蛋白三聚体化,从而可以靶向天然依赖蛋白质三聚体化功能的一些靶点或者用于制备新型疫苗,具有广阔的应用前景。



1. 一种用于制备三聚体融合蛋白的三聚体标签,其特征在于,所述标签为Ebola virus GP或Monofoil-4P,所述Ebola virus GP的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示,所述Monofoil-4P的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

2. 一种多核苷酸,其编码如权利要求1所述的三聚体标签Ebola virus GP或编码三聚体标签Monofoil-4P;编码所述三聚体标签Ebola virus GP的多核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示,编码所述三聚体标签Monofoil-4P的多核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示。

3. 一种表达载体,其包含如权利要求2所述的任一种多核苷酸。

4. 一种宿主细胞,其包含如权利要求3所述的表达载体。

5. 如权利要求4所述的宿主细胞,其特征在于,所述宿主细胞为表达外源蛋白的宿主细胞,其选自细菌、酵母、昆虫细胞或哺乳动物细胞中的任意一种。

6. 一种融合蛋白,其包含如权利要求1所述的Ebola virus GP或Monofoil-4P任一项三聚体标签,以及连接在所述Ebola virus GP或Monofoil-4P氨基酸序列N端的MBP标签。

7. 如权利要求1所述的三聚体标签Ebola virus GP或Monofoil-4P在制备三聚体化目的蛋白中的应用。

8. 如权利要求1所述的三聚体标签Ebola virus GP或Monofoil-4P在制备三聚体重组蛋白疫苗中的应用。

## 一种用于制备三聚体融合蛋白的三聚体标签及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物制药技术领域,尤其涉及一种用于制备三聚体融合蛋白的三聚体标签及其应用。

### 技术背景

[0002] Trimer-Tag(蛋白质三聚体化)技术可以将任意目的蛋白三聚体化,从而可以靶向天然依赖蛋白质三聚体化功能的一些靶点或者用于制备新型疫苗。使用Trimer-Tag技术平台能够获得稳定的共价连接的三聚体病毒抗原蛋白或者配体蛋白,但是Trimer-Tag三聚化蛋白主要针对一些天然构象为三聚化的目的蛋白,包括一些病毒蛋白(新冠S蛋白、呼吸合胞病毒和流感病毒等)和疾病生物学靶点(OX40、TNFSF和TL1A/DR3等),目前其研发管线包括六种Trimer-Tag<sup>TM</sup>亚单位候选疫苗、四种Trimer-Tag<sup>TM</sup>肿瘤治疗候选产品以及三种Fc融合蛋白候选产品。该技术开发的三聚体化蛋白对三聚体依赖性疾病靶点具有很强的有效性及良好的安全性,目前三聚体蛋白高度依赖Trimer-Tag技术,制备三聚体融合蛋白难以脱离该技术平台。

[0003] 寻找新的三聚体标签用于三聚体蛋白,摆脱对Trimer-Tag的技术依赖,具有重要的研究价值。

### 发明内容

[0004] 为了解决现有技术中的问题,本发明的目的之一在于提供一种用于制备三聚体融合蛋白的三聚体标签,所述标签为Ebola virus GP或Monofoil-4P,所述Ebola virus GP的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示,所述Monofoil-4P的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0005] 本发明还提供一种多核苷酸,其编码如上所述的三聚体标签Ebola virus GP或编码三聚体标签Monofoil-4P。

[0006] 一种表达载体,其包含如上所述的多核苷酸。

[0007] 一种宿主细胞,其包含如上所述的表达载体。

[0008] 优选的,所述宿主细胞为表达外源蛋白的宿主细胞,如细菌、酵母、昆虫细胞或哺乳动物细胞等。

[0009] 本发明还提供一种融合蛋白,其包括如上所述的Ebola virus GP或Monofoil-4P任一项三聚体标签,以及连接在所述Ebola virus GP或Monofoil-4P氨基酸序列N端的MBP标签。

[0010] 本发明还提供三聚体标签Ebola virus GP或Monofoil-4P在制备三聚体化目的蛋白中的应用或在制备三聚体重组蛋白疫苗中的应用。

[0011] 本发明的有益效果在于:

[0012] 本发明提供的两个三聚体标签Ebola virus GP和Monofoil-4P,Ebola virus GP是针对埃博拉病毒GP2蛋白设计的一个n-三聚体肽,Monofoil-4P是从头设计的一个蛋白,晶体结构显示其为三聚体形式。实验证明,两个三聚体标签均能够将目的蛋白三聚体化,从而

可以靶向天然依赖蛋白质三聚体化功能的一些靶点或者用于制备新型疫苗。

### 附图说明

[0013] 图1为Ebola virus GP和Monofoil-4P镍柱纯化结果。图中A为MBP-Ebola virus GP Prehairpin Intermediate Mimic蛋白纯化镍柱纯化结果图;B为MBP-Monofoil-4P homotrimer蛋白镍柱纯化结果图。

[0014] 图2为MBP-Ebola virus GP(图中A)及MBP-Monofoil-4P(图中B)的Q柱纯化结果图。

[0015] 图3为MBP-Ebola virus GP(图中A)及MBP-Monofoil-4P(图中B)的分子筛鉴定结果图。

[0016] 图4为MBP-Ebola virus GP(图中A)及MBP-Monofoil-4P(图中B)的蛋白质交联(crosslink)鉴定结果图。

### 具体实施方式

[0017] 为了便于理解,下面结合试验对本发明的技术方案做出更为具体的说明:

[0018] 1.设计MBP-Ebola virus GP及MBP-Monofoil-4P序列

[0019] 设计引物,将麦芽糖结合蛋白(MBP)、Ebola virus GP、Monofoil-4P的基因序列插入到大肠杆菌表达载体PET30a中,MBP分别连接Ebola virus GP和Monofoil-4P的N端,Ebola virus GP的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示,Mono foil-4P的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。构建好的质粒经测序后保存。

[0020] 2.MBP-Ebola virus GP及MBP-Monofoil-4P融合蛋白的表达和纯化

[0021] 将上述测序成功的载体转化到感受态Rosetta中,大规模培养大肠杆菌,通过IPTG诱导目的蛋白的表达,诱导表达过夜后收集菌体,通过超声破碎的方法裂解菌体,然后采用镍柱对上清中的融合蛋白进行纯化,纯化图如图1所示。

[0022] 随后对目的蛋白再采用Q柱进行进一步纯化,结果如图2所示。从上清中,我们获得了高纯度MBP-Ebola virus GP及MBP-Monofoil-4P蛋白。

[0023] 3.融合蛋白蛋白状态分析

[0024] 1)分子筛分析:分子筛是根据分子大小进行分离的方法,其中的填料是一种聚糖的均匀介质,当大小不同的混合物进入分子筛柱时,大的分子因为路径短而先出来,而小分子在柱中的路径长而后出来。通过此方法主要用于区分蛋白的状态,蛋白形成聚合体时分子量大而在分子筛中先出来。

[0025] 取1mg MBP-Ebola virus GP及MBP-Monofoil-4P融合蛋白,通过loop注入分子筛柱中,在AKTA(蛋白纯化系统)中运行程序,纯化图如图3所示。分子筛结果表明,获得的融合蛋白是较为单一状态的MBP-Ebola virus GP和MBP-Monofoil-4P三聚体蛋白。

[0026] 2)蛋白质交联(crosslink)分析:蛋白质交联技术是一个常用的检测蛋白质相互作用的技术。本实验中使用DSS(双琥珀酰亚胺辛二酸酯)作为交联剂,DSS分子是一个不可裂解的膜可穿透性交联剂,在8个碳原子间隔臂的每个末端有一个胺反应性N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)酯。当蛋白形成三聚体后,其距离会很近,DSS可以与蛋白的primary amines(比如赖氨酸的残基末端)形成共价键,然后通过梯度变性胶来检测。

[0027] 具体实验步骤如下:首先测量融合蛋白的浓度,根据其分子量计算摩尔浓度,加入

10倍摩尔的DSS。混匀后在冰上放置2个小时。然后加入终止液(1M Tris-PH7.0),室温放置15分钟,接下来加入SDS-loading buffer,金属浴中100℃加热10分钟。最后将样本跑梯度胶,以三叶草平台的Collagen-trimer作为对照,结果图如图4所示。

[0028] 从图4的蛋白质交联(crosslink)图中可以看出,本实验获得的融合蛋白MBP-Ebolavirus GP和MBP-Monofoil-4P为稳定的三聚体蛋白,表明本发明提供的Ebolavirus GP及Monofoil-4P标签均能很好地实现目的蛋白的三聚体化。

[0029] 以上实施方式仅用以说明本发明的技术方案,而并非对本发明的限制;尽管参照前述实施方式对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:凡在本发明创造的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明创造的保护范围之内。

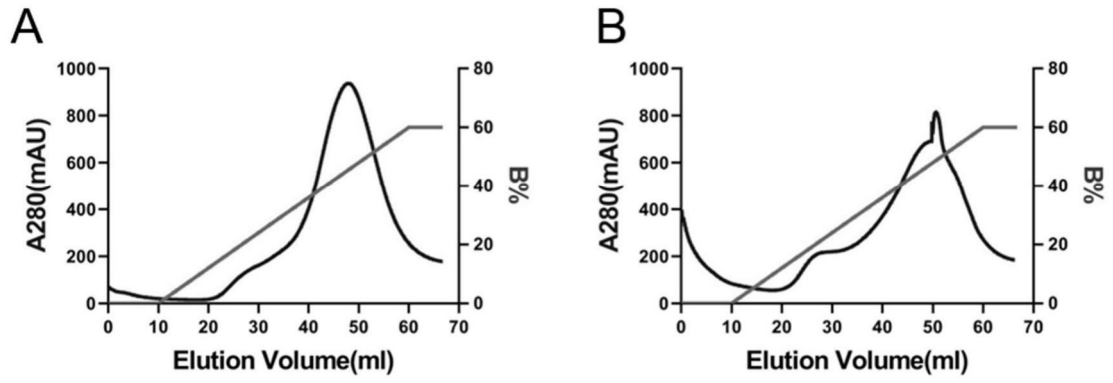


图1

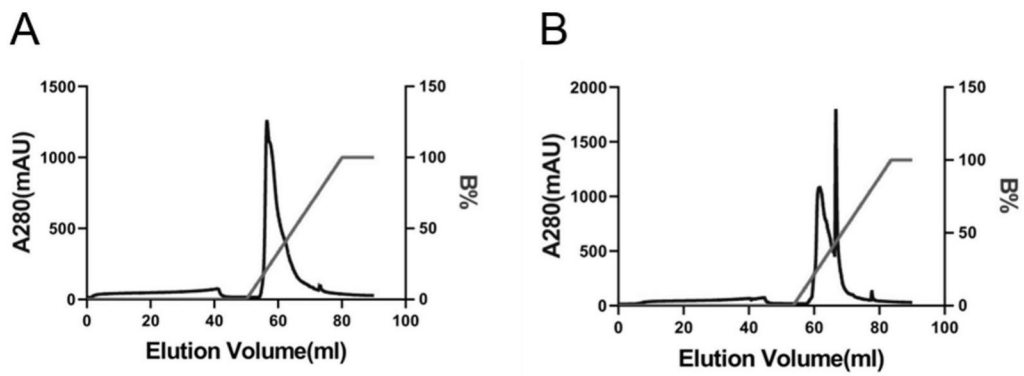


图2

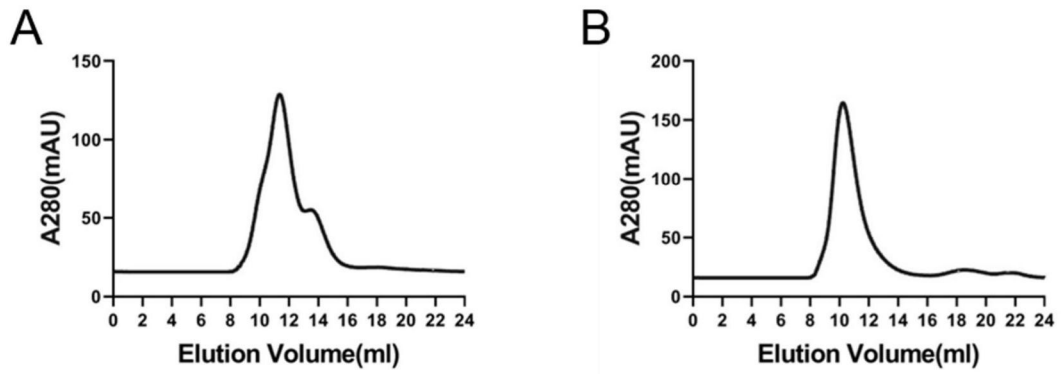


图3

|                 |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Collagen-Trimer | - | - | - | - | + | + | - | - |
| Ebolavirus GP   | + | + | - | - | - | - | - | - |
| Monofoil-4P     | - | - | + | + | - | - | - | - |
| MBP             | - | - | - | - | - | - | + | + |
| DSS             | - | + | - | + | - | + | - | + |

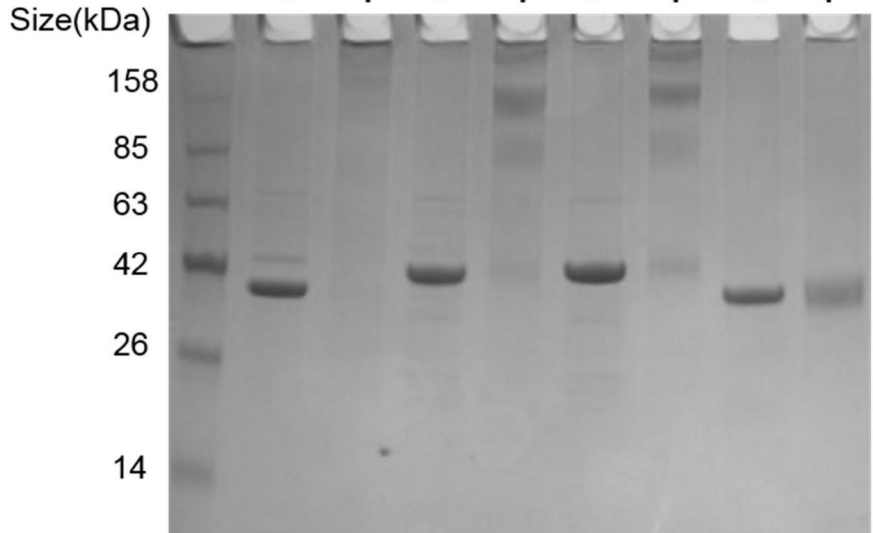


图4