



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111440227 A

(43)申请公布日 2020.07.24

(21)申请号 201910044856.1

A61P 35/00(2006.01)

(22)申请日 2019.01.17

G01N 33/68(2006.01)

(71)申请人 中国科学院上海营养与健康研究所
地址 200031 上海市徐汇区岳阳路319号

(72)发明人 胡国宏 连丞 彭方理 李晓逊

(74)专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266

代理人 王正君 徐迅

(51)Int.Cl.

C07K 7/06(2006.01)

C07K 19/00(2006.01)

A61K 38/08(2019.01)

A61K 47/64(2017.01)

A61K 47/68(2017.01)

A61P 35/04(2006.01)

权利要求书2页 说明书20页
序列表4页 附图5页

(54)发明名称

一种抑制肿瘤转移及骨肿瘤的多肽及其应用

(57)摘要

本发明涉及一种抑制肿瘤转移及骨肿瘤的多肽及其应用,具体地,本发明的多肽或其药学上可接受的盐具有式I或式III结构,本发明的多肽或其药学上可接受的盐可显著(a)抑制肿瘤转移;和/或(b)抑制骨肿瘤;和/或(c)抑制破骨细胞分化成熟。

1. 一种分离的多肽或其药学上可接受的盐,其特征在于,所述多肽或其药学上可接受的盐具有式I所示的结构:

X1-QLVAG-X2 式I

式中,

X1为无或任意的肽段;

X2为无或任意的肽段;

其中,所述多肽或其药学上可接受的盐的长度 $\leq 100\text{aa}$,较佳地 $\leq 70\text{aa}$,更佳地 $\leq 50\text{aa}$,更佳地, $\leq 40\text{aa}$,更佳地, $\leq 30\text{aa}$,更佳地, $\leq 20\text{aa}$;

并且所述的多肽或其药学上可接受的盐具有(a)抑制肿瘤转移;和/或(b)抑制骨肿瘤;和/或(c)抑制破骨细胞分化成熟的活性。

2. 如权利要求1所述的多肽或其药学上可接受的盐,其特征在于,所述肿瘤选自下组:乳腺癌、肺癌、胃癌、肝癌、结肠癌、多发性骨髓瘤、肾癌、胰腺癌、黑色素瘤、淋巴瘤、甲状腺癌、或其组合。

3. 如权利要求1所述的多肽或其药学上可接受的盐,其特征在于,所述肿瘤转移选自下组:乳腺癌骨转移、肺癌骨转移、胃癌骨转移、肝癌骨转移、结肠癌骨转移、多发性骨髓瘤骨转移、肾癌骨转移、胰腺癌骨转移、黑色素瘤骨转移、淋巴瘤骨转移、甲状腺癌骨转移、或其组合。

4. 如权利要求1所述的多肽或其药学上可接受的盐,其特征在于,所述多肽或其药学上可接受的盐具有式III结构:

X1a-X2a-X3a-X4a-X5a-X6a-X7a-X8a-X9a-QLVAG-X1b-X2b-X3b-X4b-X5b-X6b (III);

其中,

X1a为无或D;

X2a为无或T或I;

X3a为无或H或K或T;

X4a为无或I或V;

X5a为无或I或L;

X6a为无或K或D或R;

X7a为无或A;

X8a为无或Q或K或H;

X9a为无或S或Y或C;

X1b为无或I;

X2b为无或K;

X3b为无或Y;

X4b为无或F或Y;

X5b为无或L或M;

X6b为无或T;

其中,所述多肽或其药学上可接受的盐的长度 $\leq 100\text{aa}$,较佳地 $\leq 70\text{aa}$,更佳地 $\leq 50\text{aa}$,更佳地, $\leq 40\text{aa}$,更佳地, $\leq 30\text{aa}$,更佳地, $\leq 20\text{aa}$;

并且所述的多肽或其药学上可接受的盐具有 (a) 抑制肿瘤转移;和/或 (b) 抑制骨肿瘤;和/或 (c) 抑制破骨细胞分化成熟的活性。

5. 一种融合蛋白,其特征在于,包括:

(a) 权利要求1所述的多肽或其药学上可接受的盐;

(b) 与权利要求1所述的多肽或其药学上可接受的盐融合的肽段。

6. 一种分离的核酸,其特征在于,所述核酸编码权利要求1所述的多肽或其药学上可接受的盐。

7. 一种药物组合物,其特征在于,包括:

(a) 治疗有效量的权利要求1所述的多肽或其药学上可接受的盐;和

(b) 药学上可接受的载体或赋形剂。

8. 一种权利要求1所述的多肽或其药学上可接受的盐的用途,其特征在于,用于制备组合物或制剂,所述组合物或制剂用于 (a) 抑制肿瘤转移;和/或 (b) 抑制骨肿瘤;和/或 (c) 抑制破骨细胞分化成熟。

9. 一种筛选 (a) 抑制肿瘤转移;和/或 (b) 抑制骨肿瘤;和/或 (c) 抑制破骨细胞分化成熟活性的候选物质的方法,其特征在于,包括步骤:

(a) 将CTSB蛋白与待测物质混合,测定待测物质与所述CTSB蛋白的结合情况;

其中,如果所述待测物质与所述CTSB蛋白有结合,则表明所述与CTSB蛋白结合的待测物质为候选物质。

10. 一种 (a) 抑制肿瘤转移;和/或 (b) 抑制骨肿瘤;和/或 (c) 抑制破骨细胞分化成熟的方法,其特征在于,包括步骤:向需要的对象施用治疗有效量的权利要求1所述的多肽或其药学上可接受的盐、和/或权利要求5所述的融合蛋白、和/或权利要求7所述的药物组合物。

一种抑制肿瘤转移及骨肿瘤的多肽及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药领域,具体地,涉及一种抑制肿瘤转移及骨肿瘤的多肽及其应用。

背景技术

[0002] 据英国《癌症和骨骼》杂志统计,每年全世界有超过25万人死于乳腺癌。肿瘤转移是导致肿瘤患者死亡的主要临床挑战。乳腺癌骨转移造成患者骨质破坏,高钙血症,骨折,神经压迫综合征,疼痛等给病人带来较大的痛苦。

[0003] 目前临床上用于治疗骨转移的药物主要有双膦酸盐类、中和性抗体和小分子抑制剂,其作用均是通过抑制破骨细胞的分化成熟达到治疗效果。双膦酸盐类药物虽然可以减少骨痛,但是对于治疗的持续时间不明确并且没有证据证实对于延长患者寿命有帮助。中和性抗体类药物包括抑制RANKL的狄诺塞麦(Denosumab)。中和性抗体及小分子抑制剂因价格昂贵较难普及。因此,开发出低价、安全、高效的药物具有非常重要的意义。

[0004] 骨巨细胞瘤占有原发性骨肿瘤的6%左右,发病年龄在20-40岁,女性的发病率高于男性,同时亚洲国家的发病率高于欧美等国家。骨巨细胞瘤起源于骨髓内间叶组织,主要由三种细胞类型组成,分别为:梭形基质细胞、单核细胞和多核巨细胞。多核巨细胞具有很多类似于破骨细胞的性质,被认为造成溶骨的主要效应细胞。因此骨巨细胞瘤是一种溶骨性肿瘤,与乳腺癌等肿瘤的溶骨性转移灶具有类似的由破骨细胞导致的溶骨现象和症状。与骨转移类似,目前骨巨细胞瘤的治疗药物主要有双膦酸盐类及狄诺塞麦。

[0005] 因此,本领域迫切需要开发一种安全有效的多肽药物。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种安全有效的多肽药物。

[0007] 在本发明的第一方面,提供了一种分离的多肽或其药学上可接受的盐,其特征在于,所述多肽或其药学上可接受的盐具有式I所示的结构:

[0008] X1-QLVAG-X2 式I

[0009] 式中,

[0010] X1为无或任意的肽段;

[0011] X2为无或任意的肽段;

[0012] 其中,所述多肽或其药学上可接受的盐的长度 ≤ 100 aa,较佳地 ≤ 70 aa,更佳地 ≤ 50 aa,更佳地, ≤ 40 aa,更佳地, ≤ 30 aa,更佳地, ≤ 20 aa;更佳地,为5aa、6aa、7aa、8aa、9aa、10aa、11aa、12aa、13aa、14aa、15aa、16aa、17aa、18aa、19aa、或20aa。

[0013] 并且所述的多肽或其药学上可接受的盐具有(a)抑制肿瘤转移;和/或(b)抑制骨肿瘤;和/或(c)抑制破骨细胞分化成熟的活性。

[0014] 在另一优选例中,所述肿瘤选自下组:乳腺癌、肺癌、胃癌、肝癌、结肠癌、多发性骨髓瘤、肾癌、胰腺癌、黑色素瘤、淋巴瘤、甲状腺癌、或其组合。

[0015] 在另一优选例中,所述肿瘤转移选自下组:乳腺癌骨转移、肺癌骨转移、胃癌骨转移、肝癌骨转移、结肠癌骨转移、多发性骨髓瘤骨转移、肾癌骨转移、胰腺癌骨转移、黑色素瘤骨转移、淋巴瘤骨转移、甲状腺癌骨转移、或其组合。

[0016] 在另一优选例中,所述骨肿瘤选自下组:破骨性骨肿瘤、骨巨细胞瘤、动脉瘤性骨囊肿、骨纤维异常增生症、或其组合。

[0017] 在另一优选例中,所述肽段包括标签蛋白。

[0018] 在另一优选例中,所述X1的长度为1-80aa,较佳地,1-30aa,更佳地,1-20aa,更佳地,1-10aa。

[0019] 在另一优选例中,所述X2的长度为1-65aa,较佳地,1-30aa,更佳地,1-20aa,更佳地,1-10aa。

[0020] 在另一优选例中,所述的X1或X2包括天然或非天然氨基酸。

[0021] 在另一优选例中,所述多肽具有细胞穿透元件。

[0022] 在另一优选例中,所述的细胞穿透元件的长度为4-20个氨基酸,较佳地为5-15个氨基酸。

[0023] 在另一优选例中,所述X1和X2之间形成环肽。

[0024] 在另一优选例中,所述X1和X2之间任意的形成至少一对二硫键。

[0025] 在另一优选例中,所述多肽为N聚体。

[0026] 在另一优选例中,所述N聚体具有如下式II结构:

[0027] $-(X1-QLVAG-X2-L1)_n-$ (II);

[0028] 其中,X1、X2的定义如上所述;L1为无或连接肽;n为1-10,较佳地,1-7,更佳地,1-5;各“-”独立地为连接肽或肽键。

[0029] 在另一优选例中,所述L1的长度为1-30aa,较佳地,1-20aa,更佳地,1-10aa。

[0030] 在另一优选例中,所述多肽或其药学上可接受的盐具有式III结构:

[0031] X1a-X2a-X3a-X4a-X5a-X6a-X7a-X8a-X9a-QLVAG-X1b-X2b-X3b-X4b-X5b-X6b (III);

[0032] 其中,

[0033] X1a为无或D;

[0034] X2a为无或T或I;

[0035] X3a为无或H或K或T;

[0036] X4a为无或I或V;

[0037] X5a为无或I或L;

[0038] X6a为无或K或D或R;

[0039] X7a为无或A;

[0040] X8a为无或Q或K或H;

[0041] X9a为无或S或Y或C;

[0042] X1b为无或I;

[0043] X2b为无或K;

[0044] X3b为无或Y;

[0045] X4b为无或F或Y;

[0046] X5b为无或L或M;

[0047] X6b为无或T;

[0048] 其中,所述多肽或其药学上可接受的盐的长度 ≤ 100 aa,较佳地 ≤ 70 aa,更佳地 ≤ 50 aa,更佳地, ≤ 40 aa,更佳地, ≤ 30 aa,更佳地, ≤ 20 aa;更佳地,为5aa、6aa、7aa、8aa、9aa、10aa、11aa、12aa、13aa、14aa、15aa、16aa、17aa、18aa、19aa、或20aa。

[0049] 并且所述的多肽或其药学上可接受的盐具有(a)抑制肿瘤转移;和/或(b)抑制骨肿瘤;和/或(c)抑制破骨细胞分化成熟的活性。

[0050] 在另一优选例中,所述多肽的序列如SEQ ID NO.:1-8所示。

[0051] 在另一优选例中,所述式I或式III所示的多肽与SEQ ID NO.:1-8所示多肽相比,具有 $\geq 50\%$, $\geq 60\%$, $\geq 70\%$, $\geq 80\%$, $\geq 90\%$ 的相同性(或同源性)。

[0052] 在另一优选例中,所述式I或式III所示的多肽保留了SEQ ID No.:1-8所示多肽的生物活性的至少 $\geq 50\%$, $\geq 60\%$, $\geq 70\%$, $\geq 80\%$, $\geq 90\%$ 、 $\geq 100\%$,例如80-500%,较佳地100-400%。

[0053] 在另一优选例中,所述生物活性指(a)抑制肿瘤转移;和/或(b)抑制骨肿瘤;和/或(c)抑制破骨细胞分化成熟的活性。

[0054] 在另一优选例中,所述多肽是人工合成的。

[0055] 在另一优选例中,所述多肽不是SEQ ID NO.:1-8所示的多肽。

[0056] 在另一优选例中,所述多肽选自下组:

[0057] (a) 具有SEQ ID NO:1-8所示氨基酸序列的多肽;

[0058] (b) 将SEQ ID NO:1-8所示氨基酸序列经过1-5个(较佳地1-3,更佳地1-2个)氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的,且具有(a)抑制肿瘤转移;和/或(b)抑制骨肿瘤;和/或(c)抑制破骨细胞分化成熟的活性的由(a)衍生的多肽。

[0059] 在另一优选例中,所述的多肽是由SEQ ID NO.:1-8所示的多肽经过1-3个较佳地1-2个,更佳地1个氨基酸取代、缺失;和/或

[0060] 经过1-5,较佳地1-4个,更佳地1-3个,最佳地1-2个氨基酸的添加形成的。

[0061] 在另一优选例中,所述的多肽的长度为5-150个氨基酸,较佳地,5-100aa,更佳地,5-90个,更佳地,5-40个,更佳地,5-25个,更佳地,5-20个,更佳地,5-15个,更佳地,5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个。

[0062] 在另一优选例中,所述的衍生多肽保留了 $\geq 50\%$, $\geq 60\%$, $\geq 70\%$, $\geq 80\%$, $\geq 90\%$ 、 $\geq 100\%$,例如80-500%,较佳地100-400%的SEQ ID NO:1-8任一所示多肽的(a)抑制肿瘤转移;和/或(b)抑制骨肿瘤;和/或(c)抑制破骨细胞分化成熟的活性。

[0063] 在另一优选例中,所述的衍生多肽与SEQ ID NO:1-8的相同性 $\geq 50\%$,较佳地, $\geq 60\%$,更佳地, $\geq 70\%$,更佳地, $\geq 80\%$,更佳地, $\geq 90\%$ 。

[0064] 本发明还提供了(a)抑制肿瘤转移;和/或(b)抑制骨肿瘤;和/或(c)抑制破骨细胞分化成熟活性、式I或式III所示多肽的二聚体和多聚体形式,且所述二聚体和多聚体形式具有(a)抑制肿瘤转移;和/或(b)抑制骨肿瘤;和/或(c)抑制破骨细胞分化成熟的活性。

[0065] 在本发明第二方面,提供了一种融合蛋白,包括:

[0066] (a) 本发明第一方面所述的多肽或其药学上可接受的盐;

[0067] (b) 与本发明第一方面所述的多肽或其药学上可接受的盐融合的肽段。

- [0068] 在另一优选例中,所述肽段包括载体蛋白。
- [0069] 在另一优选例中,所述载体蛋白选自下组:Fc片段、人血清白蛋白(HSA)、CTP、转铁蛋白、或其组合。
- [0070] 在另一优选例中,所述肽段经过修饰。
- [0071] 在另一优选例中,所述修饰包括聚乙二醇(PEG)修饰。
- [0072] 在本发明第三方面,提供了一种分离的核酸,所述核酸编码本发明第一方面所述的多肽或其药学上可接受的盐。
- [0073] 在本发明第四方面,提供了一种药物组合物,包括:
- [0074] (a) 治疗有效量的本发明第一方面所述的多肽或其药学上可接受的盐;和
- [0075] (b) 药学上可接受的载体或赋形剂。
- [0076] 在另一优选例中,所述的多肽保留了 $\geq 70\%$ 、 75% 、 70% 、 75% 、 80% 、 85% 、 90% 、 95% 、 100% 、 105% 、 110% 、 115% 、 120% 、 125% 、 130% 、 135% 、 140% 、 145% 、 150% 、 155% 、 160% 、 165% 、 170% 、 175% 、 180% 、 185% 、 190% 、 195% 、或 200% 的SEQ ID NO:1-8任一所示多肽的(a)抑制肿瘤转移;和/或(b)抑制骨肿瘤;和/或(c)抑制破骨细胞分化成熟的活性。
- [0077] 在另一优选例中,所述的药物通过选自下组的用药方式进行给药:静脉内、瘤内、腔内、皮下或肝动脉给药(如注射、滴注等)。
- [0078] 在另一优选例中,所述的药物的制剂选自下组:片剂、胶囊剂、注射剂、颗粒剂、喷雾剂、冻干剂。
- [0079] 在另一优选例中,所述的药物制剂为注射剂。
- [0080] 在另一优选例中,所述的多肽以 $0.01-100\text{mg}/\text{kg}$ 体重的剂量(每次或每天)施用于哺乳动物。
- [0081] 在本发明第五方面,提供了一种本发明第一方面所述的多肽或其药学上可接受的盐的用途,用于制备组合物或制剂,所述组合物或制剂用于(a)抑制肿瘤转移;和/或(b)抑制骨肿瘤;和/或(c)抑制破骨细胞分化成熟。
- [0082] 在另一优选例中,所述组合物包括药物组合物。
- [0083] 在另一优选例中,所述肿瘤选自下组:乳腺癌、肺癌、胃癌、肝癌、结肠癌、多发性骨髓瘤、肾癌、胰腺癌、黑色素瘤、淋巴瘤、甲状腺癌、或其组合。
- [0084] 在另一优选例中,所述肿瘤转移选自下组:乳腺癌骨转移、肺癌骨转移、胃癌骨转移、肝癌骨转移、结肠癌骨转移、多发性骨髓瘤骨转移、肾癌骨转移、胰腺癌骨转移、黑色素瘤骨转移、淋巴瘤骨转移、甲状腺癌骨转移、或其组合。
- [0085] 在另一优选例中,所述骨肿瘤选自下组:破骨性骨肿瘤、骨巨细胞瘤、动脉瘤性骨囊肿、骨纤维异常增生症、或其组合。
- [0086] 在本发明第六方面,提供了一种筛选(a)抑制肿瘤转移;和/或(b)抑制骨肿瘤;和/或(c)抑制破骨细胞分化成熟活性的候选物质的方法,包括步骤:
- [0087] (a) 将CTSB蛋白与待测物质混合,测定待测物质与所述CTSB蛋白的结合情况;
- [0088] 其中,如果所述待测物质与所述CTSB蛋白有结合,则表明所述与CTSB蛋白结合的待测物质为候选物质。
- [0089] 在另一优选例中,所述方法还包括步骤(b):将步骤(a)中所确定的候选物质施用

于非人哺乳动物,测定其对非人哺乳动物的(a)肿瘤转移;和/或(b)骨肿瘤;和/或(c)破骨细胞分化成熟的抑制或治疗作用。

[0090] 在另一优选例中,所述肿瘤转移选自下组:乳腺癌骨转移、肺癌骨转移、胃癌骨转移、肝癌骨转移、结肠癌骨转移、多发性骨髓瘤骨转移、肾癌骨转移、胰腺癌骨转移、黑色素瘤骨转移、淋巴瘤骨转移、甲状腺癌骨转移、或其组合。

[0091] 在另一优选例中,所述骨肿瘤选自下组:破骨性骨肿瘤、骨巨细胞瘤、动脉瘤性骨囊肿、骨纤维异常增生症、或其组合。

[0092] 在另一优选例中,所述的方法是非诊断和非治疗性的。

[0093] 在另一优选例中,所述待测物质选自下组:多肽、化合物、或其组合。

[0094] 在本发明第七方面,提供了一种(a)抑制肿瘤转移;和/或(b)抑制骨肿瘤;和/或(c)抑制破骨细胞分化成熟的方法,包括步骤:向需要的对象施用治疗有效量的本发明第一方面所述的多肽或其药学上可接受的盐、和/或本发明第二方面所述的融合蛋白、和/或本发明第四方面所述的药物组合物。

[0095] 在另一优选例中,所述的对象是人或非人哺乳动物。

[0096] 在另一优选例中,所述非人哺乳动物包括啮齿动物(如小鼠、大鼠、兔)、灵长类动物(如猴)。

[0097] 在另一优选例中,所述的方法是非诊断和非治疗性的。

[0098] 在本发明第八方面,提供了一种治疗骨肿瘤的方法,包括步骤:向需要的对象施用治疗有效量的本发明第一方面所述的多肽或其药学上可接受的盐、和/或本发明第二方面所述的融合蛋白、和/或本发明第四方面所述的药物组合物。

[0099] 在另一优选例中,所述的对象是人或非人哺乳动物。

[0100] 在另一优选例中,所述非人哺乳动物包括啮齿动物(如小鼠、大鼠、兔)、灵长类动物(如猴)。

[0101] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

附图说明

[0102] 下列附图用于说明本发明的具体实施方案,而不用于限定由权利要求书所界定的本发明范围。

[0103] 图1:显示CST6(也称为Cystatin E/M)及相关多肽,以及CST6与其下游靶蛋白酶CTSB结合的相关结构示意图。

[0104] 图1A.半胱氨酸蛋白酶抑制剂Cystatin E/M(CST6)及其有效截短体GQ86、DQ51、GM-30、AY-11和截短体阴性对照DR-9的结构示意图,其中CST6、GQ86及DQ51通过原核表达纯化得到;DR-9、GM-30及AY-11通过人工合成(吉尔生化公司)获得。

[0105] 图1B.CST6部分序列在哺乳动物中的比对。黄色部分为保守的序列,红框部分为发挥功能关键QLVAG位点。人CST6蛋白在Genbank序号为AAH31334.1,其他序号均已表示。

[0106] 图1C.CST6蛋白结构图。与CST6靶蛋白CTSB结合的关键位点QLVAG显示为红色。W135位点显示为粉色。

[0107] 图1D.CTSB与CST6同家族蛋白CSTA结合的结构图。CTSB蛋白(左上)活性裂隙位点显示为紫色。CSTA(右下)与CST6的QLVAG同源区域显示为红色;与CST6的W135同源位点显示为粉色。

[0108] 图1E.CTSB与其抑制剂CA-074结合结构图。CA-974显示为红色。

[0109] 图2:显示CST6通过抑制下游CTSB发挥功能。

[0110] 图2A.Cathepsin L (CTSL) 的抑制剂Z-FY (t-Bu) -DMK (简称为FY) 抑制了破骨细胞前体细胞Raw264.7的CTSL的酶活。CTSL酶活通过BioVision公司试剂盒 (Catalog#K142-100) 进行检测。

[0111] 图2B.CTSL的抑制剂Z-FY (t-Bu) -DMK (简称为FY) 不能抑制Raw264.7向成熟破骨细胞分化。在Raw264.7细胞培养基中加入Z-FY (t-Bu) -DMK或其溶剂对照DMSO,然后通过TRAP染色观察破骨细胞分化。多核巨大TRAP+阳性细胞为成熟破骨细胞。

[0112] 图2C.CTSB的抑制剂CA-074 Me抑制了破骨细胞前体细胞中CTSB的酶活。CTSB酶活通过BioVision公司试剂盒 (Catalog#K140-100) 进行检测。

[0113] 图2D.Cathepsin B的抑制剂CA-074 Me可以抑制破骨细胞分化。在Raw264.7细胞培养基中加入CA-074 Me或其溶剂对照DMSO,然后通过TRAP染色观察破骨细胞分化。多核巨大TRAP+阳性细胞为成熟破骨细胞。

[0114] 图3:显示CST6重组蛋白和GQ86多肽具有抑制CTSB酶活的功能。

[0115] 图3A.免疫印迹实验鉴定重组表达的CST6野生型与突变型(与CTSB结合关键位点的突变)蛋白及GQ86、DQ51多肽。蛋白及多肽均带6个串联His标记。使用His抗体进行免疫印迹实验。

[0116] 图3B.考马斯亮蓝染色实验鉴定重组表达的CST6野生型与突变型(与CTSB结合关键位点的突变)蛋白及GQ86、DQ51多肽。

[0117] 图3C.重组表达的CST6蛋白及多肽GQ86可以抑制CTSB的酶活。

[0118] 图4:显示CST6重组蛋白和GQ86、DQ51多肽具有抑制破骨细胞分化成熟的功能,但CST6突变蛋白不能抑制破骨细胞分化。

[0119] 图4A.原代小鼠骨髓细胞体外诱导生成破骨细胞的试验。分别将CST6突变蛋白(CST6-mutant)、CST6重组蛋白、GQ86、DQ51以8nM、16nM、32nM的浓度加入到原代小鼠骨髓细胞内,诱导分化7天后TRAP染色。黑色箭头所指酒红色多核细胞且核数量超过三个的细胞为一个成熟的破骨细胞。比例尺,100 μ m。

[0120] 图4B.相对应的成熟破骨细胞计数。

[0121] 图5:显示人工合成的含有活性位点短肽GM-30和AY-11能抑制体外破骨细胞分化,但不包含活性位点的短肽DR-9不能抑制破骨细胞分化。

[0122] 图5A.原代小鼠骨髓细胞体外诱导生成破骨细胞试验。分别将GQ86、DR-9、GM-30及AY-11以32nM的浓度加入到原代小鼠骨髓细胞内,诱导分化7天后TRAP染色结果,黑色箭头所指酒红色多核细胞且核数量超过三个的细胞为一个成熟的破骨细胞。比例尺,100 μ m。

[0123] 图5B.相对应的成熟破骨细胞计数。*, $p < 0.05$ 。

[0124] 图6:显示CST6重组蛋白和GQ86、DQ51多肽抑制小鼠体内乳腺癌肿瘤的骨转移,但CST6突变蛋白不能抑制骨转移。通过小鼠左心室注射乳腺癌细胞系SCP2构建骨转移小鼠模型。SCP2细胞被F-Luciferase所标记,可通过生物发光活体成像定量骨转移。蛋白及多肽给

药浓度1mg/kg/天,给药方式为尾静脉注射。

[0125] 图6A.生物发光活体成像(上)及X-ray(下)分析对照及CST6或GQ86给药后的骨转移情况。白色箭头所指为骨损失位点。

[0126] 图6B.对照及CST6和GQ86给药小鼠四周内的骨转移信号定量。*, $p<0.05$ 。

[0127] 图6C.对照及CST6和GQ86给药小鼠第一周和第四周的体重变化。ns,统计差异不显著;*, $p<0.05$ 。

[0128] 图6D.对照及CST6和GQ86给药小鼠38天内的小鼠生存曲线。*,与对照相比 $p<0.05$ 。

[0129] 图6E.生物发光活体成像(上)及X-ray与micro-CT(下)分析对照及CST6突变蛋白(mutant)、GQ86和DQ51给药小鼠第五周的骨转移情况。白色箭头所指为骨损失位点。

[0130] 图6F.CST6-Mutant、GQ86和DQ51给药小鼠四周内的骨转移信号定量。ns,统计差异不显著;**, $p<0.01$ 。

[0131] 图6G.CST6-Mutant、GQ86和DQ51给药小鼠第一周和第四周的体重变化。ns,统计差异不显著;*, $p<0.05$ 。

[0132] 图6H.CST6-Mutant、GQ86和DQ51给药小鼠38天内的生存曲线。*,与对照相比 $p<0.05$ 。

[0133] 图7.CST6&GQ86急性毒理实验。其中, $n=2$,用改良寇氏法算得CST6半数致死量(LD50)为126.61mg/kg,GQ86半数致死量(LD50)为142.23mg/kg。

[0134] 图8:显示CST6、GQ86、DQ51及GM30对骨巨细胞瘤的治疗作用。将骨巨细胞瘤病人原代细胞样本的条件性培养液及相应蛋白或多肽药物加入原代小鼠骨髓体外培养,分析骨巨细胞瘤样本诱导生成破骨细胞的能力。

[0135] 图8A.骨巨细胞瘤2号病人样本细胞诱导原代小鼠骨髓生成破骨细胞的实验。在加入骨巨细胞瘤细胞条件性培养液的同时,分别加入32nM的CST6、GQ86及GM30,诱导分化7天后TRAP染色结果,黑色箭头所指酒红色多核细胞为成熟破骨细胞。CST6、GQ86及GM30均有抑制骨巨细胞瘤细胞诱导的破骨分化。比例尺,100 μ m。

[0136] 图8B.图8A相对应的成熟破骨细胞计数。

[0137] 图8C.骨巨细胞瘤4号病人样本细胞诱导原代小鼠骨髓生成破骨细胞的实验。实验方法同图8A。

[0138] 图8D.图8C相对应的成熟破骨细胞计数。

具体实施方式

[0139] 本发明人经过广泛而深入的研究,首次制备了一类源自CST6蛋白的、具有(a)抑制肿瘤转移(如乳腺癌骨转移);和/或(b)抑制骨肿瘤(如骨巨细胞瘤);和/或(c)抑制破骨细胞分化成熟的活性的,分子量小于16kD(如6kD或者3kD)的小分子多肽(如肽DQ51、GM30等)。具体地,本发明综合了蛋白多肽生产技术等多种不同技术,成功开发了能够有效(a)抑制肿瘤转移(如乳腺癌骨转移);和/或(b)抑制骨肿瘤(如骨巨细胞瘤);和/或(c)抑制破骨细胞分化成熟的多肽,并且本发明的多肽安全性好,对生物组织毒副作用小。在此基础上,本发明人完成了本发明。

[0140] CST6蛋白

[0141] CST6又称Cystatin E/M,属于半胱氨酸蛋白酶抑制剂超家族的一员,从结构与功

能上来看,它与Cystatin II型的蛋白有较大的相似性,也是一种紧密结合的半胱氨酸蛋白酶抑制剂,人CST6发挥着蛋白酶抑制剂的作用,存在于人各种体液和外泌体中,由CST6基因编码表达。与大多数胱抑素基因一样,人CST6基因的三个外显子,被两个内含子分开。外显子1长294bp,包含编码序列的5' -非翻译区(5' -UTR)和起始ATG密码子。外显子2长126bp。外显子3长188bp,包含一个TGA终止密码子、3' -UTR以及一个典型的aataaa多聚腺苷酸化信号,后接20bp。内含子1和内含子2的长度分别为541和365bp。人CST6基因被转录成一个包含607个核苷酸(nt)的信使RNA(mRNA),没有其他转录产物。转录物由53个nt的5' -UTR、447个nt的编码序列和107个nt的3' -UTR组成。

[0142] 野生型的人CST6蛋白的基因序列的登录号为NM_001323,其蛋白序列的登录号为NP_001314。

[0143] 并且,野生型的小鼠CST6蛋白的基因序列的登录号为NM_028623,与野生型的人CST6蛋白的基因序列的同源性为85%,其蛋白序列的登录号为NP_082899,与野生型人CST6蛋白的蛋白序列的同源性为70%。

[0144] 活性多肽

[0145] 在本发明中,术语“本发明多肽”、“本发明小肽”、“短肽CST6”或“肽CST6”可互换使用,都指具有(a)抑制肿瘤转移;和/或(b)抑制骨肿瘤;和/或(c)抑制破骨细胞分化成熟的活性的氨基酸序列(式I、式III)的蛋白或多肽。此外,所述术语还包括具有CTSB抑制活性的符合式I、式III的变异形式。这些变异形式包括(但并不限于):在N末端添加一个或数个(通常为5个以内,较佳地为3个以内,更佳地为2个以内)氨基酸。例如,在本领域中,用性能相近或相似的氨基酸进行取代时,通常不会改变蛋白质的功能。在N末端添加一个或数个氨基酸通常也不会改变蛋白质的结构和功能。此外,所述术语还包括单体和多聚体形式的本发明多肽或其药学上可接受的盐。

[0146] 本发明还包括本发明多肽的活性片段、衍生物和类似物。如本文所用,术语“片段”、“衍生物”和“类似物”是指基本上保持抑制CTSB蛋白活性的多肽。本发明的多肽片段、衍生物或类似物可以是(i)有一个或多个保守或非保守性氨基酸残基(优选保守性氨基酸残基)被取代的多肽,或(ii)在一个或多个氨基酸残基中具有取代基团的多肽,或(iii)本发明多肽与另一个化合物(比如延长多肽半衰期的化合物,例如聚乙二醇)融合所形成的多肽,或(iv)附加的氨基酸序列融合于此多肽序列而形成的多肽(与前导序列、分泌序列或6His等标签序列融合而形成的然后蛋白)。根据本文的教导,这些片段、衍生物和类似物属于本领域熟练技术人员公知的范围。

[0147] 一类优选的活性衍生物指与式I、III的氨基酸序列相比,有至多5个,较佳地至多3个,更佳地至多2个,最佳地1个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成多肽。这些保守性变异多肽最好根据表1a进行氨基酸替换而产生。

[0148] 表1a

最初的残基	代表性的取代	优选的取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
[0149] Gly (G)	Pro; Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe	Leu
Leu (L)	Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
[0150] Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala	Leu

[0151] 发明还提供本发明多肽的类似物。这些类似物与天然本发明多肽的差别可以是氨基酸序列上的差异,也可以是不影响序列的修饰形式上的差异,或者兼而有之。类似物还包括具有不同于天然L-氨基酸的残基(如D-氨基酸)的类似物,以及具有非天然存在的或合成的氨基酸(如 β 、 γ -氨基酸)的类似物。例如,Cys可与非天然的Hcy形成二硫键。应理解,本发明的多肽并不限于上述例举的代表性的多肽。

[0152] 一些常用的非天然氨基酸列于下表1b。

[0153] 表1b

名称	缩写	分子式	残基分子式
a-氨基丁酸 (Aminobutyric acid)	Abu	C ₄ H ₉ NO ₂	C ₁₅ H ₁₃ NO
a, γ-二氨基丁酸 (Diaminobutyric acid)	Dab	C ₄ H ₁₀ N ₂ O ₂	C ₄ H ₈ N ₂ O
正亮氨酸 (Norleucine)	Nle	C ₆ H ₁₃ NO ₂	C ₆ H ₁₁ NO
[0154] 鸟氨酸 (Ornithine)	Orn	C ₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	C ₅ H ₁ ON ₂ O
羟基脯氨酸 (Hydroxy-proline)	Hyp	C ₅ H ₉ NO ₃	C ₅ H ₇ NO ₂
同型半胱氨酸 (Homocysteine)	Hcy	C ₄ H ₉ NO ₂ S	C ₄ H ₇ NOS
6-羟基-赖氨酸 (6-Hydroxy-lysine)	Hyl	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₃	C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₂
高精氨酸 (Homoarginine)	Har	C ₇ H ₁₆ N ₄ O ₂	C ₇ H ₁₄ N ₄ O
氯苯丙氨酸 (Chlorophenylalanine)	(Cl-)F	C ₉ H ₁₀ ClNO ₂	C ₉ H ₈ ClNO
[0155] (Chlorophenylalanine)			

[0156] 修饰(通常不改变一级结构)形式包括:体内或体外的多肽的化学衍生形式如乙酰化或羧基化。修饰还包括糖基化,如那些在多肽的合成和加工中或进一步加工步骤中进行糖基化修饰而产生的多肽。这种修饰可以通过将多肽暴露于进行糖基化的酶(如哺乳动物的糖基化酶或去糖基化酶)而完成。修饰形式还包括具有磷酸化氨基酸残基(如磷酸酪氨酸,磷酸丝氨酸,磷酸苏氨酸)的序列。还包括被修饰从而提高了其抗蛋白水解性能或优化了溶解性能的多肽。

[0157] 在优选例中,本发明多肽具有至少一个内部的二硫键(引入的链内二硫键)。令人意外的是,该内部二硫键的存在不仅不影响其抑制活性,而且有助于延长半衰期和提高抑制活性。通常,可用本领域常规的方法来形成,例如使半胱氨酸或同型半胱氨酸巯基在氧化条件下结合形成二硫键。

[0158] 一种优选的本发明多肽包括SEQ ID NO.:1-8。

[0159] 本发明的多肽还包括对SEQ ID NO.:1-8所示多肽进行改造后的多肽。

[0160] 本发明多肽还可以以由药学上或生理学可接受的酸或碱衍生的盐形式使用。这些盐包括(但不限于)与如下酸形成的盐:氢氯酸、氢溴酸、硫酸、柠檬酸、酒石酸、磷酸、乳酸、丙酮酸、乙酸、琥珀酸、草酸、富马酸、马来酸、草酰乙酸、甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸、或羟乙磺酸。其他盐包括:与碱金属或碱土金属(如钠、钾、钙或镁)形成的盐,以及以酯、氨基甲酸酯

或其他常规的“前体药物”的形式。

[0161] 编码序列

[0162] 本发明还涉及编码本发明多肽的多核苷酸。本发明的多核苷酸可以是DNA形式或RNA形式。DNA可以是编码链或非编码链。编码成熟多肽的编码区序列可以与编码区序列相同或者是简并的变体。本发明的多肽的核苷酸全长序列或其片段通常可以用PCR扩增法、重组法或人工合成的方法获得。目前,已经可以完全通过化学合成来得到编码本发明多肽(或其片段,或其衍生物)的DNA序列。然后可将该DNA序列引入本领域中已知的各种现有的DNA分子(或如载体)和细胞中。

[0163] 本发明也涉及包含本发明的多核苷酸的载体,以及用本发明的载体或本发明多肽编码序列经基因工程产生的宿主细胞。

[0164] 另一方面,本发明还包括对本发明多肽具有特异性的多克隆抗体和单克隆抗体或抗体片段,尤其是单克隆抗体。

[0165] 在两个核酸或多肽的背景下,当进行最大相符性序列比较和比对时,术语“基本相同”是指两个或多个序列或亚序列,其具有至少约80%,例如至少约85%、约90%、约95%、约98%或约99%的核苷酸或氨基酸残基与特定的参考序列具有同一性,如使用以下序列比较方法和/或通过肉眼检查所测定。

[0166] 制备方法

[0167] 本发明多肽可以是重组多肽或合成多肽。本发明的多肽可以是化学合成的,或重组的。相应地,本发明多肽可用常规方法人工合成,也可用重组方法生产。

[0168] 一种优选的方法是使用液相合成技术或固相合成技术,如Boc固相法、Fmoc固相法或是两种方法联合使用。固相合成可快速获得样品,可根据目的肽的序列特征选用适当的树脂载体及合成系统。例如,Fmoc系统中优选的固相载体如连接有肽中C端氨基酸的Wang树脂,Wang树脂结构为聚苯乙烯,与氨基酸间的手臂是4-烷氧基苄醇;用25%六氢吡啶/二甲基甲酰胺室温处理20分钟,以除去Fmoc保护基团,并按照给定的氨基酸序列由C端逐个向N端延伸。合成完成后,用含4%对甲基苯酚的三氟乙酸将合成的胰岛素原相关肽从树脂上切割下来并除去保护基,可过滤除树脂后乙醚沉淀分离得到粗肽。将所得产物的溶液冻干后,用凝胶过滤和反相高压液相层析法纯化所需的肽。当使用Boc系统进行固相合成时,优选树脂为连接有肽中C端氨基酸的PAM树脂,PAM树脂结构为聚苯乙烯,与氨基酸间的手臂是4-羟甲基苯乙酰胺;在Boc合成系统中,在去保护、中和、偶联的循环中,用TFA/二氯甲烷(DCM)除去保护基团Boc并用二异丙基乙胺(DIEA/二氯甲烷中和。肽链缩合完成后,用含对甲苯酚(5-10%)的氟化氢(HF),在0℃下处理1小时,将肽链从树脂上切下,同时除去保护基团。以50-80%乙酸(含少量巯基乙醇)抽提肽,溶液冻干后进一步用分子筛Sephadex G10或Tsk-40f分离纯化,然后再经高压液相纯化得到所需的肽。可以使用肽化学领域内已知的各种偶联剂和偶联方法偶联各氨基酸残基,例如可使用二环己基碳二亚胺(DCC),羟基苯并三氮唑(HOBt)或1,1,3,3-四脲六氟磷酸酯(HBTU)进行直接偶联。对于合成得到的短肽,其纯度与结构可用反相高效液相和质谱分析进行确证。

[0169] 在一优选例中,本发明多肽,按其序列,采用固相合成的方法制备,行高效液相色谱纯化,获得高纯度目的肽冻干粉,-20℃贮存。

[0170] 另一种方法是用重组技术产生本发明多肽通过常规的重组DNA技术,可利用本发

明的多核苷酸可用来表达或生产重组的本发明多肽。一般来说有以下步骤：

[0171] (1). 用本发明的编码本发明多肽的多核苷酸(或变异体), 或用含有该多核苷酸的重组表达载体转化或转导合适的宿主细胞;

[0172] (2). 在合适的培养基中培养的宿主细胞;

[0173] (3). 从培养基或细胞中分离、纯化蛋白质。

[0174] 重组多肽可在细胞内或在细胞膜上表达或分泌到细胞外。如果需要, 可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但并不限于: 常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理(盐析方法)、离心、渗透破菌、超处理、超离心、分子筛层析(凝胶过滤)、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析(HPLC)和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

[0175] 由于本发明多肽较短, 因此可以考虑将多个多肽串联在一起, 重组表达后获得多聚体形式的表达产物, 然后通过酶切等方法形成所需的小肽。

[0176] 细胞穿透元件

[0177] 如本文所用, 术语“细胞穿透元件”、“细胞穿透肽”可互换使用, 均指在对细胞无任何破坏的情况下, 能将抑制多肽有效地渗透进细胞内且不影响抑制多肽活性的小肽段。

[0178] 药物组合物和施用方法

[0179] 另一方面, 本发明还提供了一种药物组合物, 它含有(a) 安全有效量的本发明多肽或其药学上可接受的盐; 以及(b) 药学上可接受的载体或赋形剂。本发明多肽或其药学上可接受的盐的数量通常为10微克-100毫克/剂, 较佳地为100-1000微克/剂。

[0180] 为了本发明的目的, 有效的剂量为给予个体约0.01毫克/千克至50毫克/千克, 较佳地0.05毫克/千克至10毫克/千克体重的本发明多肽或其药学上可接受的盐。此外, 本发明的多肽或其药学上可接受的盐可以单用, 也可与其他治疗剂一起使用(如配制在同一药物组合物中)。

[0181] 药物组合物还可含有药学上可接受的载体。术语“药学上可接受的载体”指用于治疗剂给药的载体。该术语指这样一些药剂载体: 它们本身不诱导产生对接受该组合物的个体有害的抗体, 且给药后没有过分的毒性。这些载体是本领域普通技术人员所熟知的。在 Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub.Co., N.J. 1991) 中可找到关于药学上可接受的赋形剂的充分讨论。这类载体包括(但并不限于): 盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、佐剂及其组合。

[0182] 治疗性组合物中药学上可接受的载体可含有液体, 如水、盐水、甘油和乙醇。另外, 这些载体中还可能存在辅助性的物质, 如润湿剂或乳化剂、pH缓冲物质等。

[0183] 通常, 可将治疗性组合物制成可注射剂, 例如液体溶液或悬液; 还可制成在注射前适合配入溶液或悬液中、液体载体的固体形式。

[0184] 一旦配成本发明的组合物, 可将其通过常规途径进行给药, 其中包括(但并不限于): 瘤内、肌内、静脉内、皮下、皮内、或局部给药。待预防或治疗的对象可以是动物; 尤其是人。

[0185] 当本发明的药物组合物被用于实际治疗时, 可根据使用情况而采用各种不同剂型的药物组合物。较佳地为静脉用药制剂或瘤内用药注射剂。

[0186] 这些药物组合物可根据常规方法通过混合、稀释或溶解而进行配制, 并且偶尔添

加合适的药物添加剂,如赋形剂、崩解剂、粘合剂、润滑剂、稀释剂、缓冲剂、等渗剂(isotonicities)、防腐剂、润湿剂、乳化剂、分散剂、稳定剂和助溶剂,而且该配制过程可根据剂型用惯常方式进行。

[0187] 例如,眼部滴眼液的配制可这样进行:将本发明多肽或其药学上可接受的盐与基本物质一起溶解于无菌水(在无菌水中溶解有表面活性剂)中,调节渗透压和酸碱度至生理状态,并可任意地加入合适的药物添加剂如防腐剂、稳定剂、缓冲剂、等渗剂、抗氧化剂和增粘剂,然后使其完全溶解。

[0188] 本发明的药物组合物还可以缓释剂形式给药。例如,本发明多肽或其药学上可接受的盐可被掺入以缓释聚合物为载体的药丸或微囊中,然后将该药丸或微囊通过手术植入待治疗的组织。作为缓释聚合物的例子,可例举的有乙烯-乙烯基乙酸酯共聚物、聚羟基甲基丙烯酸酯(polyhydrometaacrylate)、聚丙烯酰胺、聚乙烯吡咯烷酮、甲基纤维素、乳酸聚合物、乳酸-乙醇酸共聚物等,较佳地可例举的是可生物降解的聚合物如乳酸聚合物和乳酸-乙醇酸共聚物。

[0189] 当本发明的药物组合物被用于实际治疗时,作为活性成分的本发明多肽或其药学上可接受的盐的剂量,可根据待治疗的每个病人的体重、年龄、性别、症状程度而合理地加以确定。

[0190] 本发明的主要优点包括:

[0191] (a) 本发明多肽及其衍生多肽的分子量小、对生物组织毒副作用小、安全性高。

[0192] (b) 本发明多肽可有效抑制肿瘤转移;和/或骨肿瘤;和/或破骨细胞分化成熟。

[0193] (c) 可通过固相合成的方法制备,纯度高,产量大,成本低。

[0194] (d) 本发明多肽的稳定性好。

[0195] (e) 本发明多肽的特异性高。

[0196] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件如Sambrook等人,分子克隆:实验室手册(New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。

[0197] 如无特别说明,本发明实施例中所用的试剂或材料均为市售产品。

[0198] 多肽筛选的方法:

[0199] 通过ExPASy服务器免费web界面(<http://swissmodel.expasy.org>)的SWISS-MODLE同源建模方法,将CTSB或CTSL与CST6结合的晶体结构分析所得到的结合区域作为各自酶的活性口袋,并以此区域为基础通过分子对接软件(如Zdock,参考文献:PLoS One.2011;6(9):e24657;surflex,参考文献:J.Med.Chem.2003;46(4):499-511)筛选出具有活性口袋高亲和性的多肽片段。

[0200] 筛选所得到的多肽序列如下表所示:

[0201]

SEQ ID NO. :	序列
1	DTHI IKAQSQLVAGIKYFLTMEMG
2	DTKVIDAKYQLVAGIKYYLTLDIE
3	DTKVIDAKCQLVAGIKYYMTVDIE
4	DITILRAHSQLVAGIKYYLTVDMG
5	GELRDLSPDDPQVQKAAQAAVASYNMGSNSIYYFRDTHI IKAQSQLVAGIKYFLTM EMGSTDCRKTRVTGDHVDLTTCPAAGAQQ
6	DTHI IKAQSQLVAGIKYFLTMEMGSTDCRKTRVTGDHVDLTTCPAAGAQQ

[0202]

7	GSNSIYYFRDTHI IKAQSQLVAGIKYFLTM
8	AQSQLVAGIKY

[0203] 实施例1

[0204] CST6 (Cystatin E/M)、GQ86和DQ51基因的克隆及其原核表达系统的构建

[0205] 1. 引物设计: 根据NCBI提供的人CST6的cDNA序列按照一般引物的设计原则和pET28a(+)克隆的要求, 采用primer5.0以编码区为模板设计RT-PCR引物CST6-F和CST6-R, 直接扩增CST6成熟肽编码序列。

[0206] 所述人CST6基因cDNA序列的5'-末端引物(CST6-F)(用以克隆人CST6基因成熟肽编码序列):

[0207] 5'-CATGCCATGGCGGTTCTGAACCTCC-3'(SEQ ID NO.:9); 其中5'-端具有NcoI酶切位点;

[0208] 所述人CST6基因cDNA序列的3'-末端引物(CST6-R)(用以克隆人CST6基因成熟肽编码序列):

[0209] 5'-CCGCTCGAGCATCTGCACACAGTTGTGC-3'(SEQ ID NO.:10); 所述引物含有酶切位点XhoI和终止密码子。

[0210] 2. 总RNA的提取: 将人乳腺癌细胞系MDA-MB-231从培养皿中用胰酶消化, 收集细胞于1.5ml EP管内, 再用1ml Trizol裂解。震荡30s。加0.2ml氯仿, 剧烈摇动30s, 室温2min。以13000-13300rpm于4℃离心15min。吸上层无色水相, 移入另一EP管中。加入等体积异丙醇, 于-20℃放置30min。以13000-13300rpm于4℃离心10min。弃上清, 加75%乙醇1ml, 振荡。以13000-13300rpm于4℃离心5min。弃上清, 吸尽残留液体, 室温干燥5min。沉淀溶于40-100μL DEPC水。取出1μL测其OD260/OD280。提取的RNA置-80℃冰箱保存。

[0211] 3. 反转录合成单链cDNA: 单链cDNA的合成使用Takara (D2680A) 反转录PCR试剂盒,

PCR反应体系和程序如下：

[0212]	反转录 PCR 体系	总体积 20
		μl
	5×PrimeScript Buffer	4 μl
	dNTP Mixture (2.5 mM each)	4 μl
	Random 6 mers (100 μM)	1 μl
[0213]	Oligo dT Primer (50 μM)	1 μl
	PrimeScript Reverse Transcriptase (200 U/ μl)	0.5 μl
	RNase Inhibitor (40 U/ μl)	0.5 μl
	Total RNA	1 μg
	RNase Free dH ₂ O up to	20 μl

[0214] 反转录PCR程序如下：

[0215] 42°C 10min

[0216] 95°C 2min

[0217] 4.CST6的PCR扩增

[0218] 利用引物CST6-F和CST6-R以反转录合成的单链cDNA为模版，Q5酶扩增目的基因片段，扩增体系和程序如下：

	PCR 体系	总体积 50 μl
	5X Reaction buffer	10 μl
	dNTPs (10 mM)	1 μl
[0219]	上游引物 (10 μM)	2.5 μl
	下游引物 (10 μM)	2.5 μl
	cDNA 模版	1 μl
	Q5 聚合酶	0.5 μl
	ddH ₂ O	32.5 μl

[0220] PCR程序：

	98°C	30 s	} 35 个循环
	98°C	10 s	
[0221]	55-72°C	30 s	
	72°C	30 s/kb	
	72°C	2 min	

[0222] 5. CST6产物回收

[0223] 配制1%琼脂糖凝胶大孔胶,将CST6的PCR产物加入胶槽进行电泳检测,电压120V; 15-30min后,在割胶仪下割胶回收目的片段,使用普通琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒(天根生化科技公司)回收产物;使用NEB公司生产的限制性内切酶进行酶切,水浴37°C过夜或者酶切两小时,根据酶的特性,参照NEB网站酶切指导方案;酶切完成之后使用PCR产物回收试剂盒(天根生化科技公司)纯化回收。CST6产物和pET28a (+) 质粒均进行双酶切

[0224] 酶切体系如下表:

酶切体系		总体积 50 μ l
	DNA	X μ l (2 μ g)
	dH ₂ O	41-X μ l
[0225]	10 x CutSmart	5 μ l
	Buffer	
	NcoI, 10U/ μ l	2 μ l
	XhoI, 10U/ μ l	2 μ l

[0226] 6. CST6的PCR产物和pET28a (+) 连接

[0227] 使用T4连接酶(NEB)将酶切纯化之后的载体DNA和插入片段DNA按照分子数量1:10的比例进行连接16°C过夜。

[0228] 连接体系如下表

连接体系		总体积 20 μ l
	10 \times T4 DNA Ligase Buffer	2 μ l
	pET28a (+) 质粒, 100ng/ μ l	50 ng (0.025 pmol)
[0229]	PCR 产物, 30-50 ng/ μ l	50 ng (0.076 pmol)
	T4 DNA 连接酶	1 μ l
	Nuclease-free water	to 20 μ l

[0230] 7. 感受态细菌转化、挑取单克隆

- [0231] 1) 50 μ l的DH5 α 感受态细菌,冰上放置融化10min。
 [0232] 2) 将20 μ l的连接产物加入50 μ l的DH5 α 感受态细菌,在冰上孵育30min。
 [0233] 3) 水浴锅预先打开到42 $^{\circ}$ C,将孵育好的感受态细菌混合物放入水浴锅热激90s,之后立即放在冰上放置2min。
 [0234] 4) 将400 μ l不含抗生素的LB液体培养基加入放置好的感受态细菌中,37 $^{\circ}$ C恒温摇床中摇菌45min。
 [0235] 5) 菌液1000g离心5min后,将上清吸掉,留下50-100 μ l菌液,将其吹打均匀之后用涂布棒均匀涂到卡那抗性的LB固体平板上。
 [0236] 6) LB的配制见下表

LB	1 L
胰蛋白胨	10 g
[0237] 酵母提取物	5 g
氯化钠	10 g
琼脂(用于平板)	30 g
50 mg/ml 卡那霉素	1 ml

- [0238] 7) 待平板上的菌落长成肉眼可见约0.5mm直径大小,用小枪头挑取单克隆菌落,吹打入预先加入400 μ l卡那抗性LB液体培养基的EP管中。
 [0239] 8) 37 $^{\circ}$ C 250rpm恒温摇床中摇菌2hr。
 [0240] 8. 菌液鉴定、保存及质粒的抽取
 [0241] 1) 菌检使用实验室自制pTaq酶,PCR程序与基因片段扩增时相同,PCR体系如下:

PCR 体系	总体积 10 μ l
菌液模版	1 μ l
10XNEB stand buffer	1 μ l
[0242] dNTP mix (2.5 mM)	0.8 μ l
上游引物 (10 μ M)	0.5 μ l
下游引物 (10 μ M)	0.5 μ l
pTaq 酶	1 μ l
ddH ₂ O	5.2 μ l

- [0243] 2) PCR产物1%琼脂糖凝胶电泳,紫外DNA成像后取阳性克隆对应菌液100 μ l送测序。
 [0244] 3) 测序正确的菌液加入到5ml卡那抗性LB培养基的离心管中,37 $^{\circ}$ C恒温摇床中摇菌过夜。

[0245] 4) 第二天,取500 μ l菌液利用50%甘油保存,放置在-80 $^{\circ}$ C冰箱中保存。

[0246] 5) 余下菌液用少量质粒抽提试剂盒提取质粒,并用nanodrop测定浓度。

[0247] 9. GQ86和DQ51使用与CST6同样的方法构建GQ86/pET28a (+) 和DQ51/pET28a (+) 质粒(图1A)。唯一不同的是使用不同的引物,其中所述引物GQ86-F:

[0248] 5'-CATGCCATGGGAGAACTCCGGGACCTGTCG-3' (SEQ ID NO.:11);其中5'-端具有NcoI酶切位点;

[0249] 所述引物GQ86-R:

[0250] 5'-GCCTCGAGCTGCTGCGCCCCTGCTG-3' (SEQ ID NO.:12);所述引物含有酶切位点XhoI和终止密码子。

[0251] 所述引物DQ51-F:

[0252] 5'-CATGCCATGGACACGCACATCATCAAGGCG-3'; (SEQ ID NO.:13) 其中5'-端具有NcoI酶切位点;

[0253] 所述引物DQ51-R:

[0254] 5'-GCCTCGAGCTGCTGCGCCCCTGCTG-3' (SEQ ID NO.:14);所述引物含有酶切位点XhoI和终止密码子。

[0255] 实施例2

[0256] CST6/pET28a (+)、GQ86/pET28a (+) 和DQ51/pET28a (+) 重组质粒的原核表达和纯化

[0257] 1. 经过验证的CST6/pET28a (+)、GQ86/pET28a (+) 和DQ51/pET28a (+) 重组质粒约200ng分别加入50 μ l感受态大肠杆菌BL21 (DE3) 细胞中,在冰上孵育30min。水浴锅预先打开到42 $^{\circ}$ C,将孵育好的感受态细菌混合物放入水浴锅热激90s,之后立即放在冰上放置2min。将400 μ l不含抗生素的LB液体培养基加入放置好的感受态细菌中,37 $^{\circ}$ C恒温摇床中摇菌45min。菌液1000g离心5min后,将上清吸掉,留下50-100 μ l菌液,将其吹打均匀之后用涂布棒均匀涂到卡那抗性的LB固体平板上。待平板上的菌落长成肉眼可见约0.5mm直径大小,用小枪头挑取单克隆菌落,吹打入预先加入400 μ l卡那抗性LB液体培养基的EP管中。37 $^{\circ}$ C,250rpm恒温摇床中摇菌2hr。

[0258] 2. 将400 μ l菌液转接到500ml的LB液体培养基(含50mg/ml卡那霉素)37 $^{\circ}$ C震荡培养,当OD₆₀₀=0.5时,分别加入终浓度1mM的IPTG18 $^{\circ}$ C诱导表达10hr,10000 \times g离心10min收获菌体。然后按照Novagen pET系统说明书(TB055)和His融合标签蛋白纯化试剂盒说明书(TB054)包涵体法纯化蛋白。透析3h一次,2到3次;透析缓冲液为TGE buffer(50mM Tris-HCl;0.5mM EDTA;50mM NaCl;5-50%甘油;PH 8.0)。蛋白用免疫印迹试验His抗体检测是否含有目的蛋白(图3A),全蛋白检测采用考马斯亮蓝染色(图3B),纯化蛋白浓度检测采用BCA检测。最后用内毒素高效去除纯化树脂(翌圣生物,20518ES10)去除内毒素,存储于-80 $^{\circ}$ C备用。

[0259] 实施例3

[0260] 1、活性位点同源性分析

[0261] 使用MEGA软件将CST6的序列在部分哺乳动物中进行比对。CST6关键功能位点QLVAG在哺乳动物中非常保守(图1B)。

[0262] 2、蛋白功能结合预测

[0263] 使用PDB公共Web网页(<https://www.rcsb.org/>)的ProteinWorkshop工具分析蛋

白结构及蛋白-蛋白、蛋白-小分子相互作用结构,可发现CST6蛋白中关键位点QLVAG形成突出环状结构(图1C),其在同家族蛋白CSTA上的同源位点可与CTSB活性裂隙位点对接(图1D),且CTSB抑制剂CA-074能与CSTB的同一活性裂隙位点形成类似对接(图1E)。

[0264] 实施例4

[0265] 1、酶活性检测

[0266] CTSB酶活通过BioVision公司试剂盒(Catalog#K140-100)进行检测。CTSL酶活通过BioVision公司试剂盒(Catalog#K142-100)进行检测(图2A、2C)。显示抑制CTSB酶活,而不是CTSL酶活后可抑制破骨细胞分化成熟(图2B、2D)。结合图3C的实验,证实CTS6通过其关键活性位点抑制下游CTSB发挥功能。

[0267] 实施例5

[0268] 1. 破骨细胞分化成熟实验

[0269] 1) 4周-6周BALB/c小鼠处死后取股骨和胫骨,PBS冲洗三次。

[0270] 2) 剪断后肢骨两端,用胰岛素注射器吸取 α -MEM培养液,冲出后肢骨中的骨髓细胞。

[0271] 3) 用40 μ m滤网过滤骨髓细胞悬液,1500g 4 $^{\circ}$ C离心5min,移除上清液,加入适量培养液中和后,加入红细胞裂解液裂红细胞10min。

[0272] 4) 1500g 4 $^{\circ}$ C离心5min,将细胞移入培养皿中,用 α -MEM培养液(Invitrogen, A1049001)(含20%FBS)常规培养过夜。

[0273] 5) 在24孔板中铺上无菌玻璃片,培养过夜的悬浮骨髓细胞计数铺24孔板,100万细胞每孔。加入 α -MEM培养液(含20%FBS,RANKL 50-100ng/ml,M-CSF 25ng/ml),以及骨巨细胞瘤病人原代培养细胞的培养液(终浓度为10-20%)。

[0274] 6) 细胞三天换一次液,第六天实验结束。使用的培养液与之前相同。

[0275] 7) TRAP染色参照相关试剂盒说明书(Sigma,387A-1KT),爬片晾干后用中性树脂封片。

[0276] 8) 观察爬片上呈酒红色且细胞核个数大于等于三的细胞(图4A、图5A、图8A和图8C)并计数(图4B、图5B、图8B和图8D)。不论加入自己纯化的蛋白(图4(4A-4B))还是人工合成(图5(5A-5B))的含有QLVAG序列的多肽均有抑制破骨细胞分化成熟的能力,并且对于临床两例产生溶骨的骨巨细胞瘤样本同样具有抑制破骨细胞分化成熟的能力(图8(8A-8D))。

[0277] 实施例6

[0278] 1. 小鼠左心室注射

[0279] 1) 麻醉:1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,每只裸鼠按30-40mg/kg的量分别计算所需的麻醉药剂量。75%酒精前胸壁消毒,用手触及心尖搏动最明显处,约于胸骨左旁3mm第二肋间,瞄准正中与身体呈45度进针,若能看到有鲜红的血液喷出,则表示针已进入左心室,将细胞悬液慢慢推入后,迅速拔针。

[0280] 2) 注射细胞量为:以 5.0×10^5 细胞/ml的浓度,以0.1ml/只的体积注射。按0.1ml/只的剂量底注射5mg/ml的D-Luciferin(裸鼠静脉注射与此相同),每周Berthold Imaging System成像(图6A、图6E),拍照。注射后继续饲养,自由进食,观察裸鼠生活状态及一般情况;注射后24小时内严密观察裸鼠的生命体征和状态。

[0281] 2. 给药

[0282] 以1mg/kg的浓度通过尾静脉注射方式分别给药CST6、GQ86和DQ51,给药周期为每天一次。实验结果分两次呈现,第一次分别给药TGE buffer-Control、CST6和GQ86(图6A-6D);第二次分别给药TGE buffer-Control、CST6-Mutant、GQ86和DQ51(图6E-6H)。每周Berthold Imaging System成像(图6A、图6E),拍照,用自带软件Indigo2.0进行荧光信号定量(图6B、图6F),称取其体重(图6C、图6G),最终统计40天内生存曲线(图6D、图6H)。可以发现,在给药含有QLVAG序列的多肽后,乳腺癌骨转移的信号明显减弱,对应实验动物的体重和生存曲线均有一定的作用,可以抑制乳腺癌的骨转移。

[0283] 实施例7

[0284] 急性毒理学实验

[0285] 取10只BALB/c小鼠,以2只为一组分为5组,雌雄各一半。通过尾静脉注射分别给药CST6和GQ86,浓度分别为25mg/kg、50mg/kg、90mg/kg、120mg/kg和200mg/kg。一次给药后观察24小时内实验动物出现的症状并记录死亡数。最后用改良寇氏法算得CST6半数致死量(LD50)为126.61mg/kg,GQ86半数致死量(LD50)为142.23mg/kg(图7)。

[0286] 结果表明,本发明的多肽的毒性低,安全性好。

[0287] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

序列表

<110> 中国科学院上海生命科学研究院

<120> 一种抑制肿瘤转移及骨肿瘤的多肽及其应用

<130> P2018-2536

<160> 14

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<400> 1

Asp Thr His Ile Ile Lys Ala Gln Ser Gln Leu Val Ala Gly Ile Lys

1 5 10 15

Tyr Phe Leu Thr Met Glu Met Gly

20

<210> 2

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<400> 2

Asp Thr Lys Val Ile Asp Ala Lys Tyr Gln Leu Val Ala Gly Ile Lys

1 5 10 15

Tyr Tyr Leu Thr Leu Asp Ile Glu

20

<210> 3

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<400> 3

Asp Thr Lys Val Ile Asp Ala Lys Cys Gln Leu Val Ala Gly Ile Lys

1 5 10 15

Tyr Tyr Met Thr Val Asp Ile Glu

20

<210> 4

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<400> 4

Asp Ile Thr Ile Leu Arg Ala His Ser Gln Leu Val Ala Gly Ile Lys
 1 5 10 15

Tyr Tyr Leu Thr Val Asp Met Gly
 20

<210> 5

<211> 86

<212> PRT

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<400> 5

Gly Glu Leu Arg Asp Leu Ser Pro Asp Asp Pro Gln Val Gln Lys Ala
 1 5 10 15

Ala Gln Ala Ala Val Ala Ser Tyr Asn Met Gly Ser Asn Ser Ile Tyr
 20 25 30

Tyr Phe Arg Asp Thr His Ile Ile Lys Ala Gln Ser Gln Leu Val Ala
 35 40 45

Gly Ile Lys Tyr Phe Leu Thr Met Glu Met Gly Ser Thr Asp Cys Arg
 50 55 60

Lys Thr Arg Val Thr Gly Asp His Val Asp Leu Thr Thr Cys Pro Leu
 65 70 75 80

Ala Ala Gly Ala Gln Gln
 85

<210> 6

<211> 51

<212> PRT

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<400> 6

Asp Thr His Ile Ile Lys Ala Gln Ser Gln Leu Val Ala Gly Ile Lys
 1 5 10 15

Tyr Phe Leu Thr Met Glu Met Gly Ser Thr Asp Cys Arg Lys Thr Arg
 20 25 30

Val Thr Gly Asp His Val Asp Leu Thr Thr Cys Pro Leu Ala Ala Gly
 35 40 45

Ala Gln Gln
 50

<210> 7

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<400> 7

Gly Ser Asn Ser Ile Tyr Tyr Phe Arg Asp Thr His Ile Ile Lys Ala
 1 5 10 15

Gln Ser Gln Leu Val Ala Gly Ile Lys Tyr Phe Leu Thr Met
 20 25 30

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<400> 8

Ala Gln Ser Gln Leu Val Ala Gly Ile Lys Tyr
 1 5 10

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<400> 9

catgcatgg cgcgttcgaa cctcc 25

<210> 10

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<400> 10

ccgctcgagc atctgcacac agttgtgc 28

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<400> 11

catgcatgg gagaactccg ggacctgtcg 30

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<400> 12

gcctcgagct gctgcgcccc tgctg 25

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<400> 13
catgccatgg acacgcacat catcaaggcg 30
<210> 14
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列 (artificial sequence)
<400> 14
gcctcgagct gctgcgcccc tgctg 25

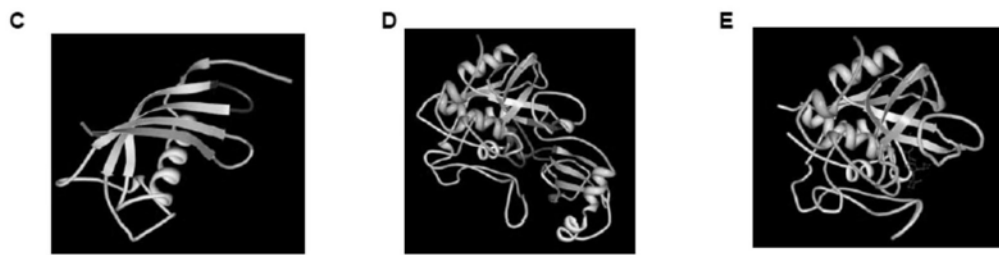
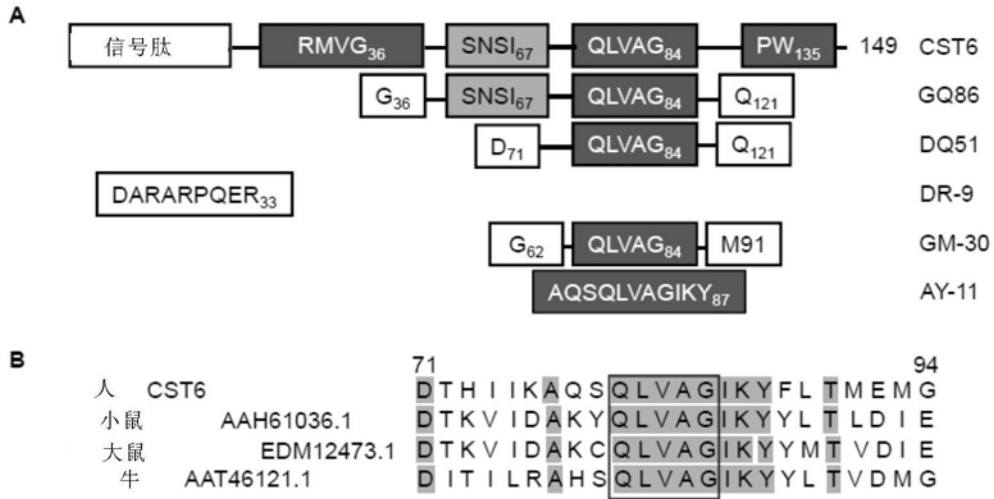


图1

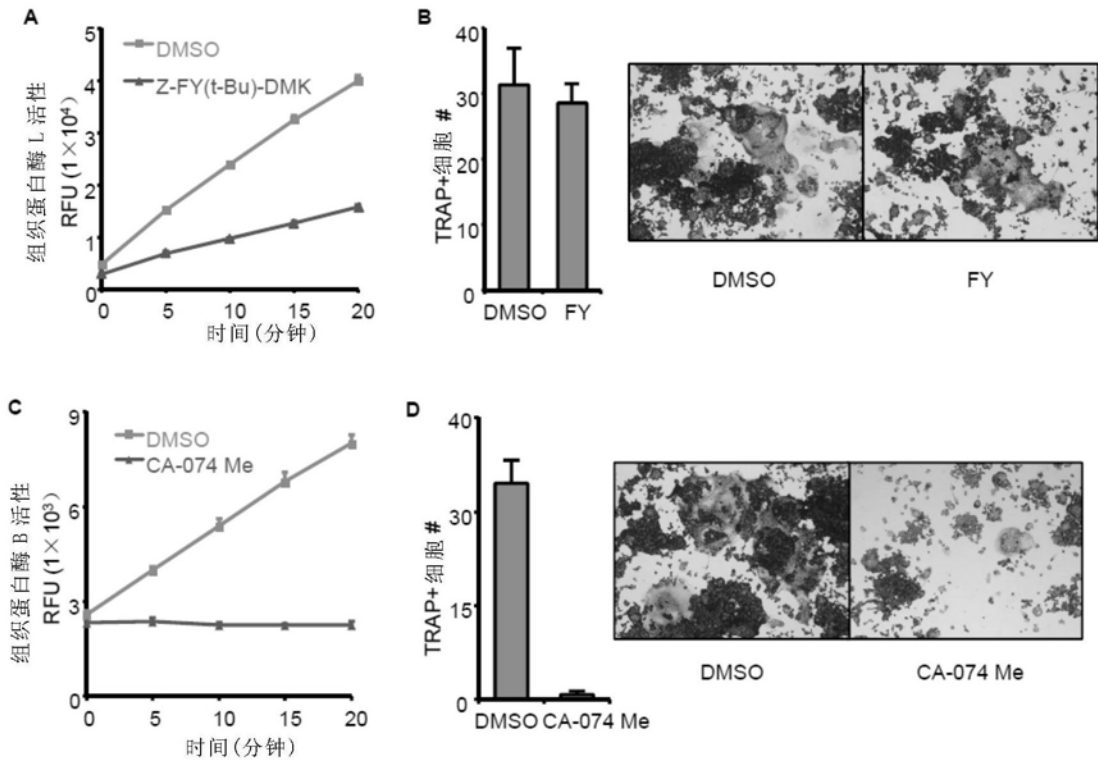


图2

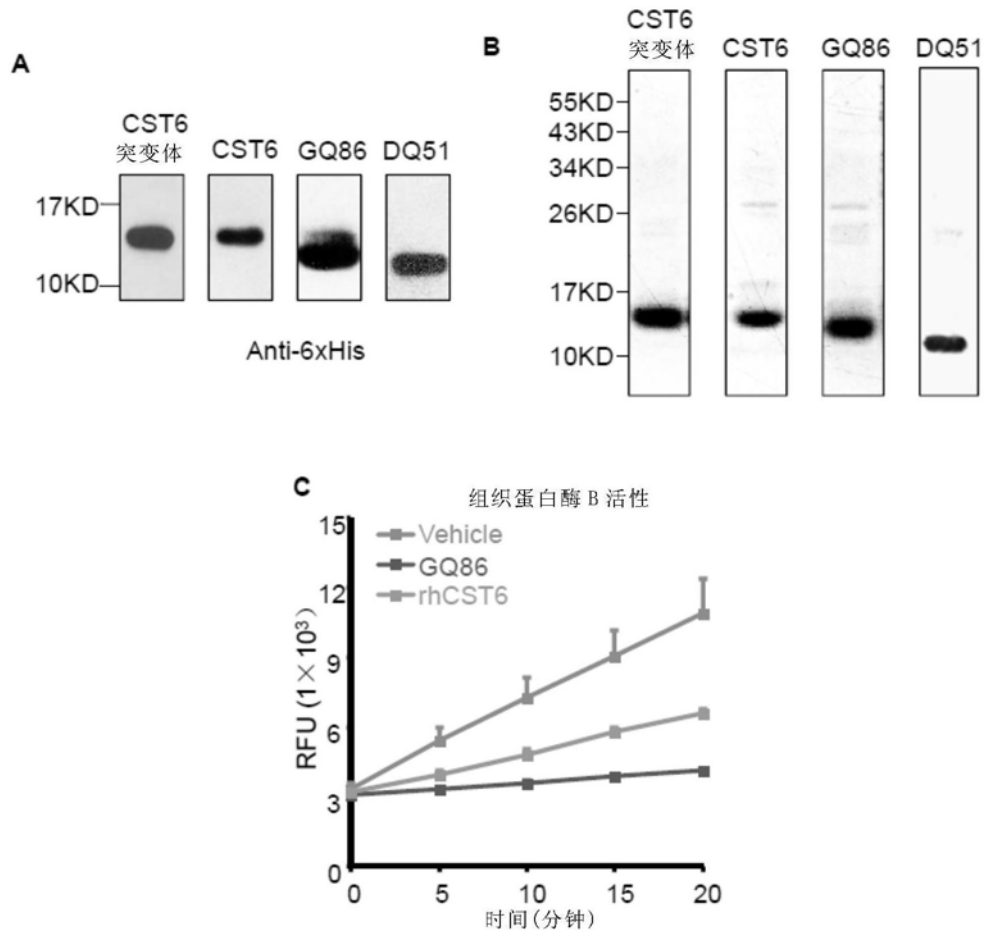


图3

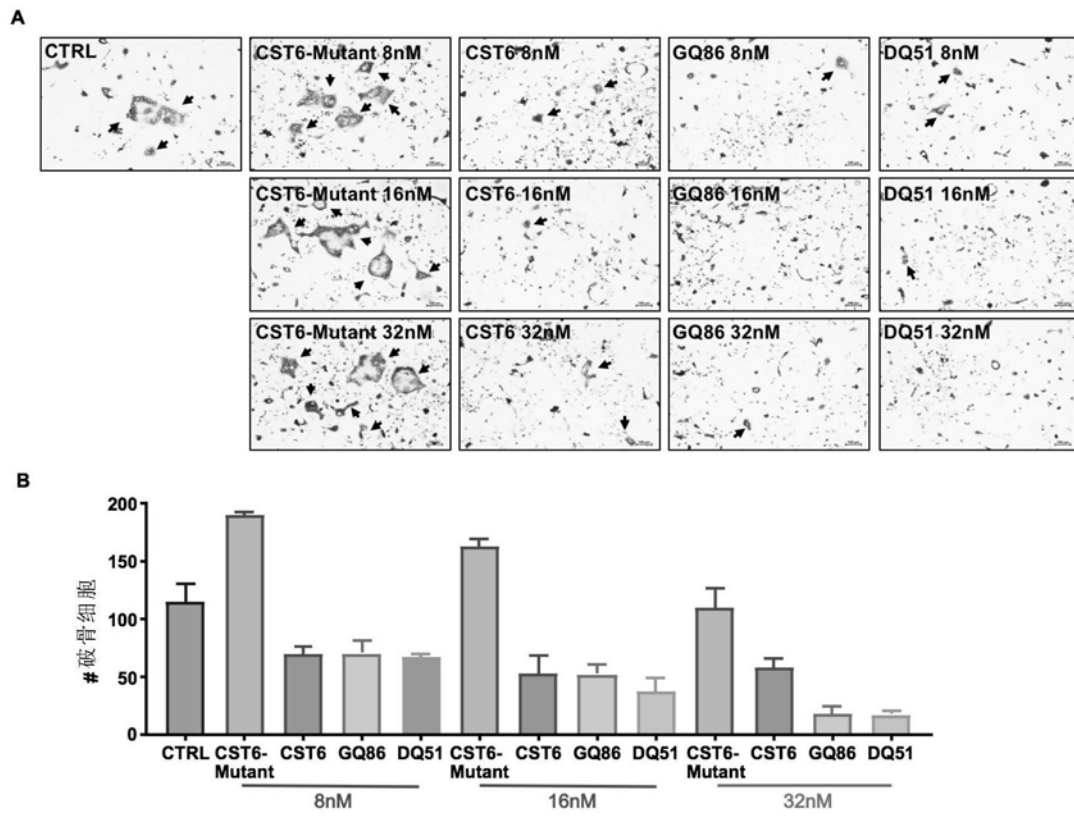


图4

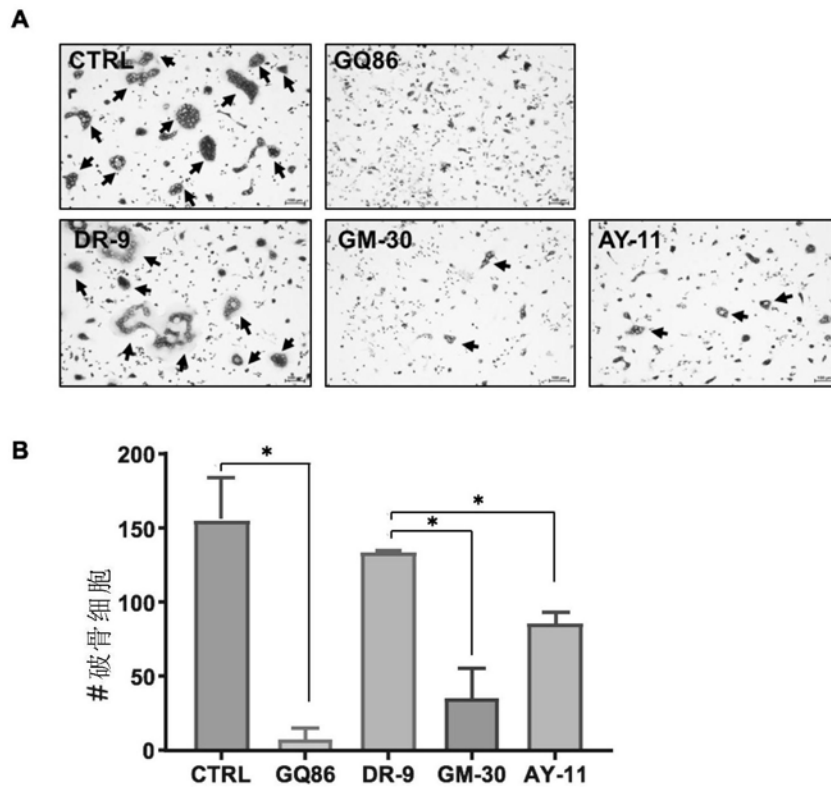


图5

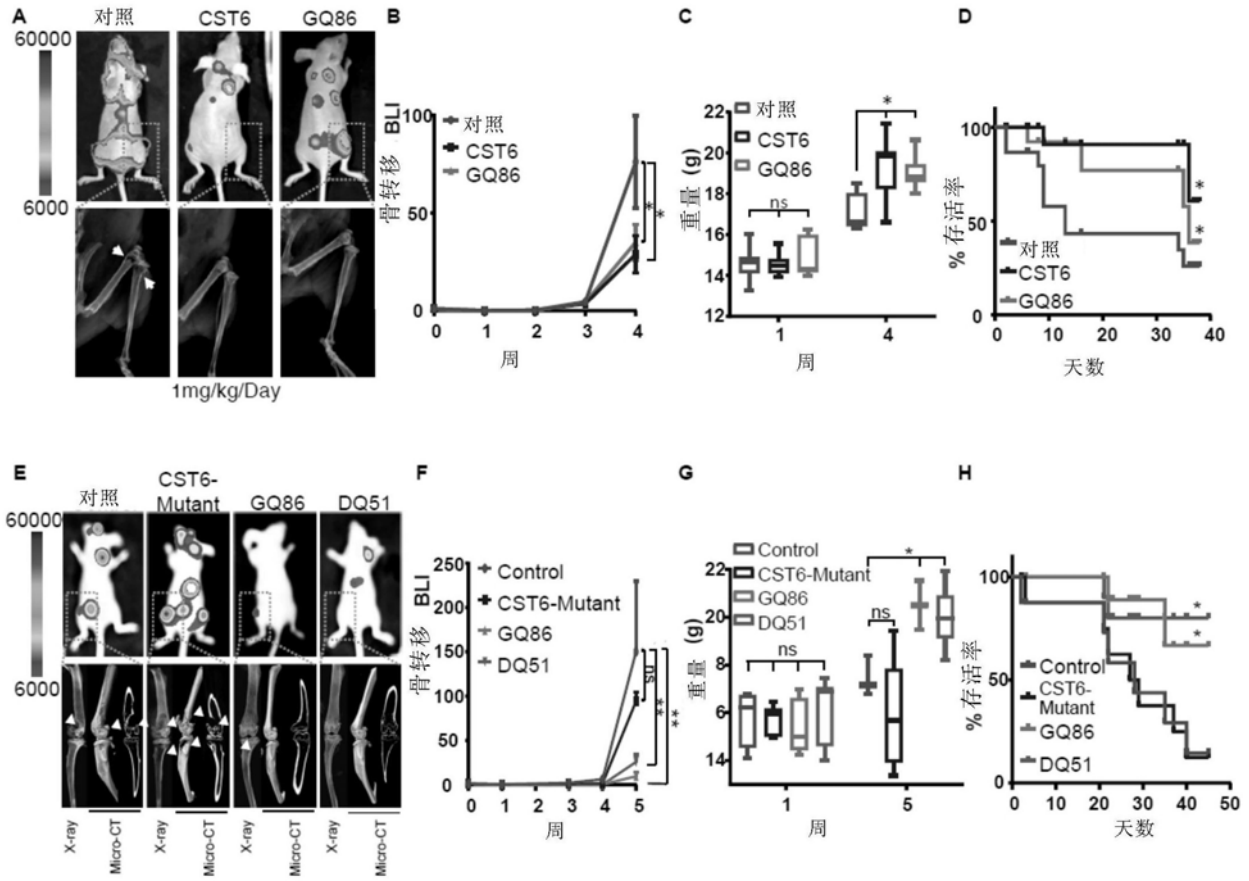


图6

组别	CST6	CST6	CST6	CST6	CST6	GQ86	GQ86	GQ86	GQ86	GQ86
剂量 mg/kg	200	120	90	50	25	210	140	100	50	40
动物死亡数量	2	1	0	0	0	2	1	0	0	0

图7

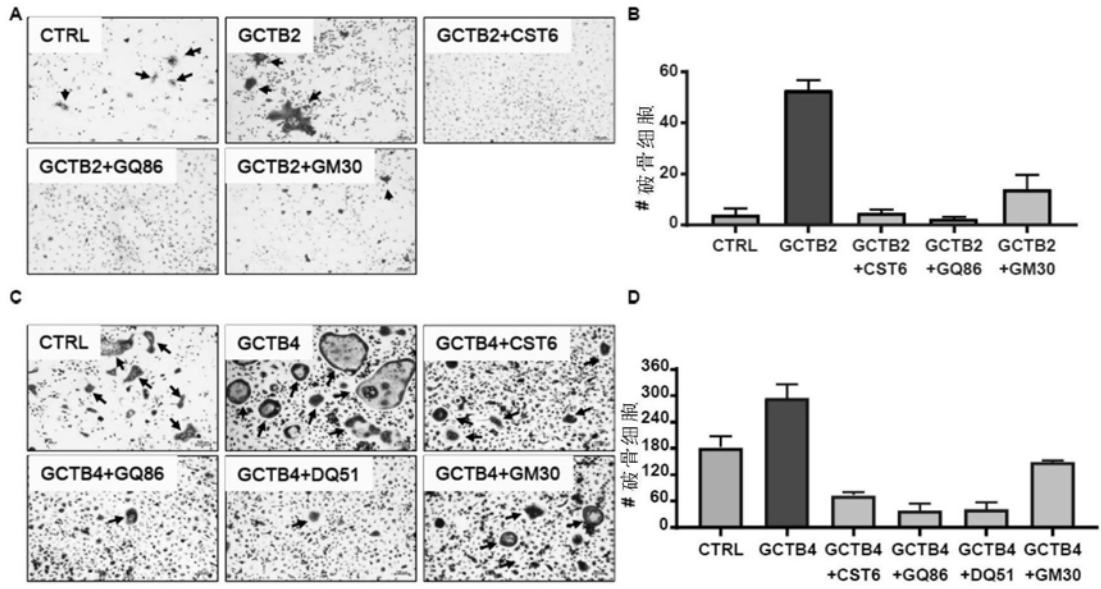


图8