



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114644687 B

(45) 授权公告日 2023. 06. 27

(21) 申请号 202210361381.0

(22) 申请日 2022.04.07

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114644687 A

(43) 申请公布日 2022.06.21

(73) 专利权人 华中科技大学同济医学院附属协和医院

地址 430022 湖北省武汉市江汉区解放大道1277号

(72) 发明人 陈莉娟 韩志强 胡彬 刘伟
朱建华 周浩

(74) 专利代理机构 北京东方盛凡知识产权代理有限公司 11562

专利代理师 营士腾

(51) Int.Cl.

C07K 14/00 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 47/64 (2017.01)

A61P 15/00 (2006.01)

(56) 对比文件

颜林志;曹丹;王乐丹;李文桔;吕杰强. 子宫内膜异位症细胞表面特异性结合肽的筛选. 温州医科大学学报. 2018, (10), 10-13.

审查员 润顺琪

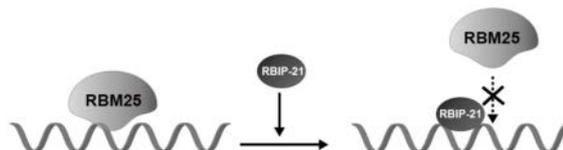
权利要求书1页 说明书5页
序列表1页 附图5页

(54) 发明名称

一种可拮抗RBM25蛋白RNA结合活性的多肽RBIP-21及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种可拮抗RBM25蛋白RNA结合活性的多肽RBIP-21及其应用,属于分子生物技术领域,该多肽RBIP-21带有针对过度增殖内异症间质细胞的杀伤结构域和穿膜结构域,其中,内异症间质细胞杀伤结构域的氨基酸序列如SEQ ID No.1所示,穿膜结构域的氨基酸序列如SEQ ID No.2所示。本发明的抗内异症多肽的穿膜结构域本身没有细胞毒性,但连接内异症间质细胞杀伤结构域后,有明显的抑制内异症间质细胞增殖、细胞浸润以及克隆形成的效应。本发明的抗内异症间质细胞多肽,不仅可以单独作为抗内异症间质细胞的生物治疗药物,还有望结合其他治疗方式来抑制内异症间质细胞的无序过度增殖和肌层浸润。



1. 一种抗子宫内膜异位症多肽,其特征在于,包括子宫内膜异位症间质细胞杀伤结构域和穿膜结构域,其中,所述子宫内膜异位症间质细胞杀伤结构域的氨基酸序列如SEQ ID No .1所示。

2. 根据权利要求1所述的抗子宫内膜异位症多肽,其特征在于,所述穿膜结构域的氨基酸序列如SEQ ID No .2所示。

3. 根据权利要求1或2所述的抗子宫内膜异位症多肽,其特征在于,所述穿膜结构域连接于所述子宫内膜异位症间质细胞杀伤结构域的N端。

4. 一种权利要求1-3任一项所述的抗子宫内膜异位症多肽在制备抗子宫内膜异位症药物中的应用。

5. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于,所述药物通过如下一种或多种途径治疗子宫内膜异位症:

- (1) 抑制子宫内膜异位症间质细胞的生长;
- (2) 抑制子宫内膜异位症间质细胞的增殖活性;
- (3) 抑制子宫内膜异位症间质细胞的浸润能力。

一种可拮抗RBM25蛋白RNA结合活性的多肽RBIP-21及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物技术领域,特别是涉及一种可拮抗RBM25蛋白RNA结合活性的多肽RBIP-21及其应用。

背景技术

[0002] 子宫内膜异位症(内异症)是指子宫内膜组织(腺体和间质)在子宫腔被覆内膜及子宫以外的部位出现、生长、浸润,反复出血,继而引发疼痛、不孕及结节或包块等。内异症是生育年龄妇女的多发病、常见病。内异症病变广泛、形态多样、极具侵袭性和复发性,具有性激素依赖的特点。约10%的育龄期女性受到该疾病的困扰,在临床诊疗中我们发现该疾病在不孕女性中约占20%-50%,在慢性盆腔痛的育龄期女性中可高达90%。据2018年的一项权威统计,全世界约有176,000,000育龄期女性被确诊为内异症。内异症的具体发病机制尚未完全阐明,目前的主要学说认为异位内膜于宫腔外种植可能与粘附侵袭、新生血管形成、微环境免疫异常、炎症等生物学过程有关。其中子宫内膜异位症间质细胞的无序过度增殖和肌层浸润是导致内异症反复发作,逐渐进展的关键因素。目前已有的抗内异症方法虽有一定疗效,但仍存在疗效低、选择性差、毒副作用大、易产生耐药等问题。因此,寻找新型高效低毒的抗内异症药物一直是国内外医药研发的热点。

[0003] 抗内异症的靶向治疗是指在分子水平上,通过药物靶向作用于无序过度增殖和肌层浸润的内异症间质细胞,使其生长显著抑制,而不影响正常组织细胞。与传统细胞毒性药物治疗不一样,抗内异症分子靶向治疗具有特异性抗内异症作用,且毒性明显减少。靶向治疗的发展使得人类对内异症的治疗更加精准。近十年来,抗内异症靶向药物的研发已经有了长足的发展,在既往非靶向抗内异症药物非甾体类抗炎药(NSAID)、口服避孕药的基础上,新型的具有靶向性的高效孕激素、雄激素衍生物以及促性腺激素释放激素激动剂(GnRH-a)占到抗内异症药物研发中的70%。

[0004] 靶向多肽由于易于合成、免疫原性低、活性高、不良反应轻和来源广泛等优点,已应用于药物研究。抗细胞过度增殖性多肽通过与特定位点的结合,发挥抑制细胞无序过度增殖过程的发生和发展的作用。因此,越来越多的多肽药物被开发并应用于临床。迄今在生物体内发现的多肽已达数万种,广泛参与调节机体内各系统、器官、组织和细胞的功能活动,在生命活动中发挥重要作用。近年来,利用现代生物技术合成的多肽药物已成为药物研发的热点之一。

[0005] 但是针对内异症的靶向多肽面临靶点寻找困难等问题,所以有必要积极研究针对内异症的靶向多肽的靶点,并给予相应的靶向多肽干预。

[0006] RBM25(RNA binding motif 25,RNA结合基序25)是一种RNA结合蛋白,在真核细胞谱系中广泛保守。它包含一个N端RNA结合基序结构域(RRM)、一个中央富含谷氨酸/精氨酸的序列(ER-rich结构域)和一个C端PWI结构域。在酵母中,RBM25同源物是U1小核核糖核蛋白的组成成员,而在人类中,它与完整的剪接体结合并可以被共同纯化。据报道,人RBM25通过调节BCL2L1基因的促凋亡和抗凋亡转录物的平衡来调节HeLa细胞的凋亡,也可以导致心

力衰竭期间SCN5A编码的心脏电压门控Na⁺通道截断。总的来说,这些研究表明人类RBM25作为一个RNA剪接因子起作用。已知RBM25与多种良恶性细胞的无序增殖有着密切的联系,新近发现RBM25与子宫内膜异位症间质细胞的无序过度增殖和肌层浸润密切相关,RBM25在子宫内膜异位症疾病的发生发展中均起到促进作用。目前,RBM25特异性抑制剂尚未见报道。

发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一种可拮抗RBM25蛋白RNA结合活性的多肽RBIP-21及其应用,以解决上述现有技术存在的问题,本发明通过设计靶向多肽,针对RBM25的作用位点,从而阻断RBM25的促子宫内膜异位症效应,最终抑制子宫内膜异位症的发生发展;并且将该多肽与细胞穿膜肽通过共价键连接起来,达到既有靶向包括内膜异位症在内的无序增殖细胞,又具有高效入胞的效果。

[0008] 为实现上述目的,本发明提供了如下方案:

[0009] 本发明提供一种可拮抗RBM25蛋白RNA结合活性的多肽,所述多肽的氨基酸序列如SEQ ID No.1所示。实验证明,该多肽可竞争性拮抗内异症促无序增殖基因RBM25与RNA的结合,并在细胞水平表现出明显的抑制无序增殖和抑制浸润的作用。

[0010] 本发明还提供一种多肽在拮抗RBM25蛋白RNA结合活性中的应用,所述多肽的氨基酸序列如SEQ ID No.1所示。

[0011] 本发明还提供一种多肽在制备抗子宫内膜异位症药物中的应用,所述多肽的氨基酸序列如SEQ ID No.1所示。

[0012] 本发明还提供一种抗子宫内膜异位症多肽,包括子宫内膜异位症间质细胞杀伤结构域和穿膜结构域,其中,所述子宫内膜异位症间质细胞杀伤结构域的氨基酸序列如SEQ ID No.1所示。

[0013] 进一步地,所述穿膜结构域的氨基酸序列如SEQ ID No.2所示。

[0014] 进一步地,所述穿膜结构域连接于所述子宫内膜异位症间质细胞杀伤结构域的N端。

[0015] 本发明还提供一种如上所述的抗子宫内膜异位症多肽在制备抗子宫内膜异位症药物中的应用。

[0016] 进一步地,所述药物通过如下一种或多种途径治疗子宫内膜异位症:

[0017] (1)抑制子宫内膜异位症间质细胞的生长;

[0018] (2)抑制子宫内膜异位症间质细胞的增殖活性;

[0019] (3)抑制子宫内膜异位症间质细胞的浸润能力。

[0020] 本发明公开了以下技术效果:

[0021] 本发明设计的多肽,通过特异性、竞争性抑制RBM25和RNA的结合,从而阻遏两者相互作用带来的生物学效应,发挥抑制内异症的作用。此外,可在该多肽N端添加了穿膜肽以提高其进入细胞的效率。加入生物素标记,使得其更方便的在细胞水平中进行应用,实验通过生物素富集相关的分子,从而进行下一步的机制研究。加入异硫氰酸荧光素(FITC)标记使其可通过荧光共聚焦显微镜观察该多肽分子在细胞中的定位,明确其发挥作用的区域。

[0022] 本发明的抗内异症多肽的穿膜结构域本身没有细胞毒性,但连接内异症间质细胞杀伤结构域后,有明显的抑制内异症间质细胞增殖、克隆形成、细胞浸润的效应。本发明的

抗内异症多肽,不仅可以单独作为抗内异症的生物治疗药物,还有望结合其他治疗方式来抑制内异症。

附图说明

[0023] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0024] 图1为RBM25蛋白的结构域示意图;

[0025] 图2为RBIP-21竞争性拮抗RBM25蛋白与RNA相互作用的原理示意图;

[0026] 图3为RBIP-21多肽被细胞摄取效率图;

[0027] 图4为不同浓度RBIP-21多肽对内异症间质细胞的增殖能力的影响;

[0028] 图5为不同时间RBIP-21多肽对内异症间质细胞的增殖能力的影响;

[0029] 图6为RBIP-21克隆形成实验的染色图;

[0030] 图7为RBIP-21克隆形成实验的结果图;

[0031] 图8为RBIP-21对内异症间质细胞的浸润能力影响的染色图;

[0032] 图9为RBIP-21对内异症间质细胞的浸润能力影响的结果图;

[0033] 图10为RBIP-21和对照肽处理的小鼠内异症模型中内异症移植物大小比较结果图;

[0034] 图11为对照肽和RBIP-21处理的内异症移植物中CCND1基因的mRNA表达情况统计图。

具体实施方式

[0035] 现详细说明本发明的多种示例性实施方式,该详细说明不应认为是对本发明的限制,而应理解为是对本发明的某些方面、特性和实施方案的更详细的描述。

[0036] 应理解本发明中所述的术语仅仅是为描述特别的实施方式,并非用于限制本发明。另外,对于本发明中的数值范围,应理解为还具体公开了该范围的上限和下限之间的每个中间值。在任何陈述值或陈述范围内的中间值以及任何其他陈述值或在所述范围内的中间值之间的每个较小的范围也包括在本发明内。这些较小范围的上限和下限可独立地包括或排除在范围内。

[0037] 除非另有说明,否则本文使用的所有技术和科学术语具有本发明所述领域的常规技术人员通常理解的含义。虽然本发明仅描述了优选的方法和材料,但是在本发明的实施或测试中也可以使用与本文所述相似或等同的任何方法和材料。本说明书中提到的所有文献通过引用并入,用以公开和描述与本发明相关的技术和/或材料。在与任何并入的文献冲突时,以本说明书的内容为准。

[0038] 在不背离本发明的范围或精神的情况下,可对本发明说明书的具体实施方式做多种改进和变化,这对本领域技术人员而言是显而易见的。由本发明的说明书得到的其他实施方式对技术人员而言是显而易见的。本发明说明书和实施例仅是示例性的。

[0039] 关于本文中所使用的“包含”、“包括”、“具有”、“含有”等等,均为开放性的用语,即

意指包含但不限于。

[0040] 实施例1抗内异症多肽的合成

[0041] 通过固相合成法合成一种抗内异症多肽,其包括一个内异症细胞杀伤结构域和一个穿膜结构域,其中内异症细胞杀伤结构域序列为RQLLAKCGLVLSWKRVQGASG (SEQ ID No.1),穿膜结构域序列为YGRKKRRQRRR (SEQ ID No.2),穿膜结构域连接于内异症细胞杀伤结构域的N端,所得到的序列为:氨基酸序列为YGRKKRRQRRR-RQLLAKCGLVLSWKRVQGASG (SEQ ID No.3),命名为RBIP-21。为了研究方便,我们在抗内异症多肽的C端连接异硫氰酸荧光素标记FITC,N端连接生物素标记Biotin。

[0042] 生物公司合成的抑癌多肽RBIP-21经过高效液相色谱法(HPLC)检测证实纯度达到97.2%。将多肽溶于无菌PBS缓冲液,储存浓度为1mmol/L,分装于1.5ml的避光EP管中,终浓度为200 μ mol/L,均存避光冻存于-80 $^{\circ}$ C备用。

[0043] RBM25蛋白的结构域示意图如图1所示。

[0044] RBIP-21竞争性拮抗RBM25蛋白与RNA相互作用的原理如图2所示。

[0045] 实施例2RBIP-21的细胞定位检测

[0046] 取对数生长期的内异症间质细胞,用含有RBIP-21的培养基(DMEM/F12培养基,HyClone公司)孵育培养。利用激光共聚焦显微镜动态观察该多肽被细胞摄取的情况,结果如图3所示:由于多肽3'-端带有FITC基团,可以此观察多肽进入细胞的情况,发现在加入多肽48小时后,该多肽被细胞摄取率达90%,此外我们利用DAPI (Sigma公司)染色观察细胞核,从而客观简明区分细胞核与细胞浆,更清晰的观察多肽进入细胞的情况,发现该多肽RBIP-21定位于细胞核内,与RBM25分子的定位相同。可见,该多肽能高效进入细胞,并定位于RBM25相同的细胞核内。

[0047] 实施例3MTT比色法分析检测RBIP-21对内异症间质细胞生长的抑制作用

[0048] 取对数生长期的内异症间质细胞,用含有RBIP-21的培养基孵育培养。进行MTT实验, $lgIC_{50} = X_m - I(P - (3 - P_m - P_n) / 4)$,其中, $X_m = lg$ 最大剂量, $I = lg$ (最大剂量/相临剂量), $P =$ 阳性反应率之和, $P_m =$ 最大阳性反应率, $P_n =$ 最小阳性反应率。由此计算得到该多肽RBIP-21的 IC_{50} 为25 μ mol/L。

[0049] 以上述实验得到的 IC_{50} 为基础,进一步进行MTT实验,在不同时间、多肽浓度的情况下检测该多肽对内异症间质细胞(本实验中利用的体外纯化培养的内异症间质细胞)的增殖能力的影响。

[0050] 结果如图4和5所示,与对照组多肽(本实验中,以与RBIP-21多肽相同组成的氨基酸随机重新排列后的错序肽作为对照肽)相比,RBIP-21多肽处理的内异症细胞的活力显著降低,且该作用呈时间和剂量依赖性,说明该新型多肽可有效降低内异症细胞的细胞活力;当处理细胞时间相同时,多肽浓度为20-30 μ mol/L的细胞活力抑制率较高;当处理细胞浓度相同时,多肽处理时间为48-72小时的细胞活力抑制率较高。

[0051] 实施例4克隆形成实验检测RBIP-21对内异症细胞增殖活性的抑制作用

[0052] 取对数生长期的细胞接种于6孔板中,细胞密度约1000个/孔,第二天根据前期得到的 IC_{50} ,在细胞中加入适当的RBIP-21和对照肽,继续培养细胞,不断观察细胞的生长情况,当培养皿中出现肉眼可见的克隆时,终止培养,结晶紫(0.1%,碧云天公司)染色并在光镜下拍照。

[0053] 实验结果如图6和7所示,与对照组多肽相比, RBIP-21多肽处理的内异症细胞的克隆集落形成显著降低,并且该作用呈剂量依赖性,说明该新型多肽可有效抑制内异症细胞的增殖能力。

[0054] 实施例5Transwell实验检测RBIP-21对内异症细胞浸润能力的抑制作用

[0055] 取对数生长期的细胞,将 1.0×10^5 /mL的细胞200 μ L置入Transwell小室侵袭模型,在细胞中加入适当的RBIP-21和对照肽,培养48h观察细胞在穿透基质凝胶多空滤膜的细胞数。结晶紫(0.1%)染色并在光镜下拍照。

[0056] 实验结果如图8和9所示,与对照组多肽相比, RBIP-21多肽处理的内异症细胞的浸润能力显著降低,说明该新型多肽可有效抑制内异症细胞的组织浸润能力。

[0057] 实施例6小鼠体内实验检测RBIP-21对内异症的治疗作用

[0058] 动物实验在SPF级别的动物实验室(华中科技大学同济医学院实验动物中心)进行,实验获得华中科技大学同济医学院伦理委员会批准。实验对象为6-8周龄的免疫缺陷NOD-SCID小鼠(购自北京维通利华实验动物技术有限公司)。将NOD-SCID小鼠固定在无菌操作台上,腹部酒精常规消毒后用16号针头于小鼠下腹正中行腹腔穿刺,注入含内异症患者子宫内膜碎片的PBS液0.2ml,注射结束后压迫穿刺点,观察无出血。在注射后第8天后开始,每间隔4天(共5次)进行腹腔注射,按照实验分组的组别分别给予RBIP-21(4mg/kg)或对照肽。第28天小鼠安乐死处理后,手术取出腹膜上生长的内异症移植物。对比观察形成内异症移植物的尺寸。

[0059] 实验结果如图10所示,与对照组多肽相比, RBIP-21多肽处理的小鼠,内异症细胞的生长能力显著降低,说明该新型多肽可有效抑制内异症细胞的增殖能力。图11为内异症移植物进行RT-PCR检测(大连宝生物RT-PCR试剂盒),对比反映细胞增殖能力的CCND1基因的mRNA表达情况。其中CCND1基因的引物序列为:Forward5'-GCTGCGAAGTGAAACCATC-3', Reverse 5'-CCTCCTTCTGCACACATTTGAA-3'。该结果也证实RBIP-21多肽处理的小鼠,内异症细胞的生长能力显著降低。

[0060] 以上所述的实施例仅是对本发明的优选方式进行描述,并非对本发明的范围进行限定,在不脱离本发明设计精神的前提下,本领域普通技术人员对本发明的技术方案做出的各种变形和改进,均应落入本发明权利要求书确定的保护范围内。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 华中科技大学同济医学院附属协和医院
- [0003] <120> 一种可拮抗RBM25蛋白RNA结合活性的多肽RBIP-21及其应用
- [0004] <160> 3
- [0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 21
- [0008] <212> PRT
- [0009] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0010] <400> 1
- [0011] Arg Gln Leu Leu Ala Lys Cys Gly Leu Val Leu Ser Trp Lys Arg Val
- [0012] 1 5 10 15
- [0013] Gln Gly Ala Ser Gly
- [0014] 20
- [0015] <210> 2
- [0016] <211> 11
- [0017] <212> PRT
- [0018] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0019] <400> 2
- [0020] Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
- [0021] 1 5 10
- [0022] <210> 3
- [0023] <211> 32
- [0024] <212> PRT
- [0025] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0026] <400> 3
- [0027] Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Arg Gln Leu Leu Ala
- [0028] 1 5 10 15
- [0029] Lys Cys Gly Leu Val Leu Ser Trp Lys Arg Val Gln Gly Ala Ser Gly
- [0030] 20 25 30



图1



图2

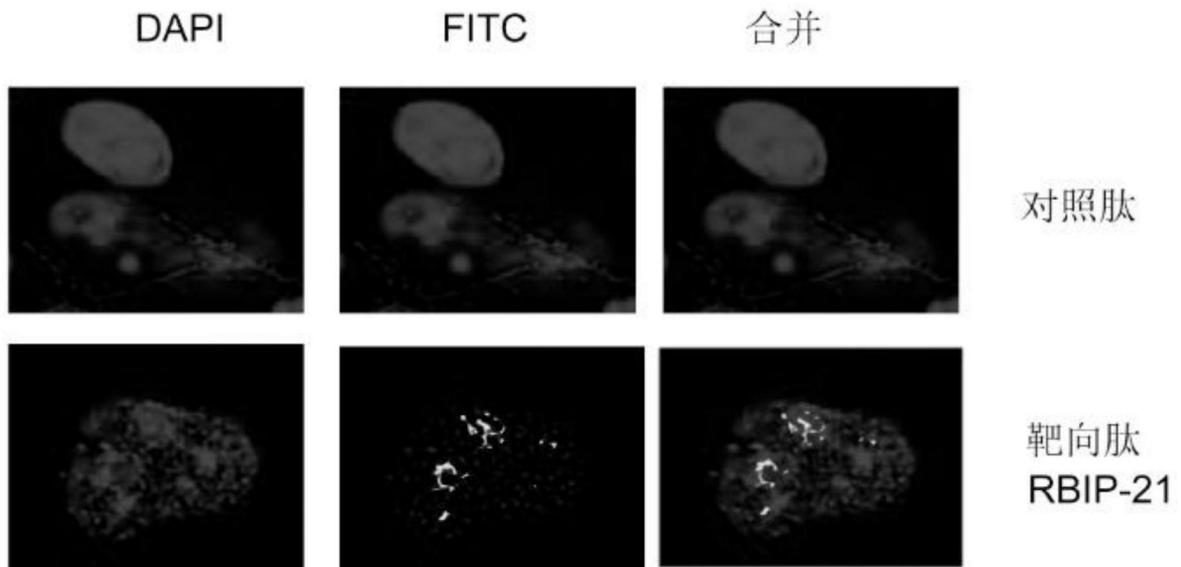


图3

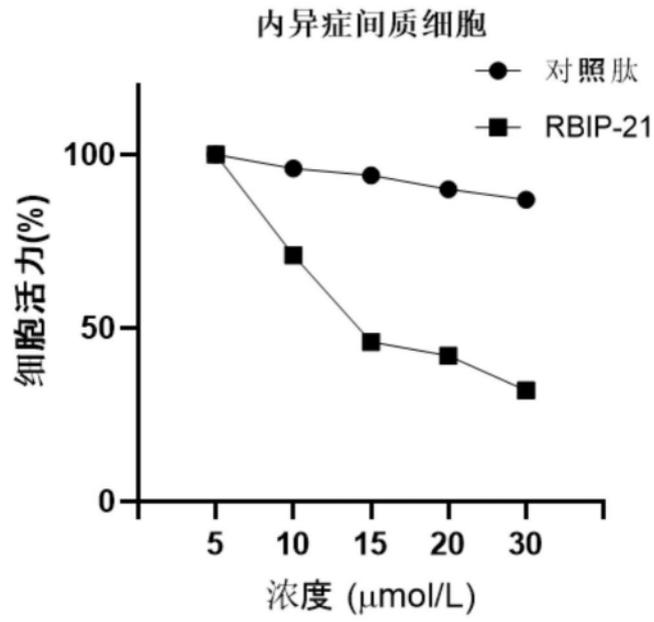


图4

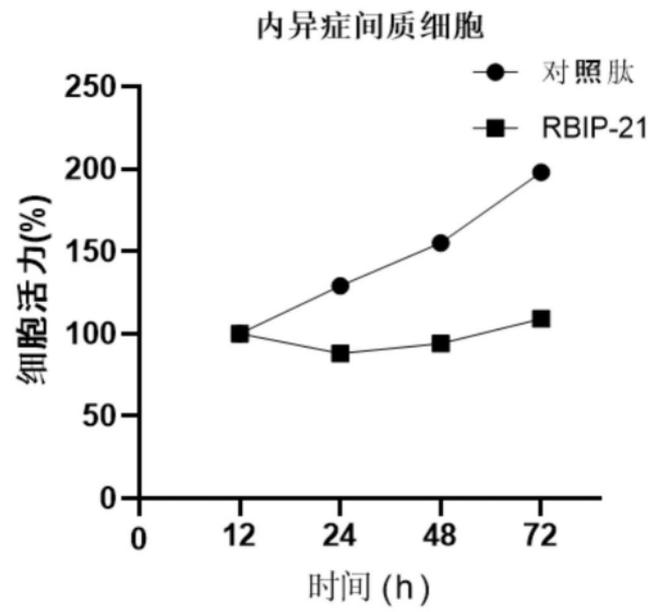


图5

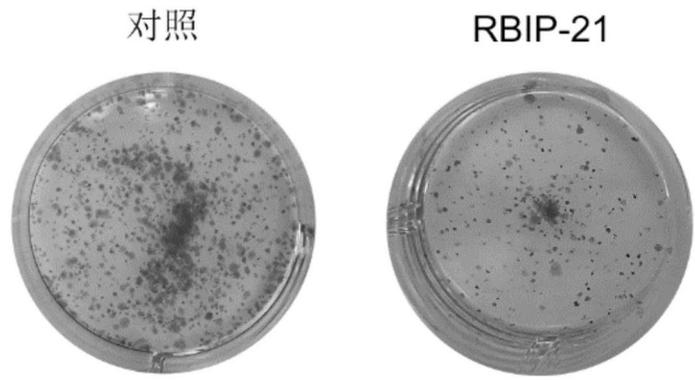


图6

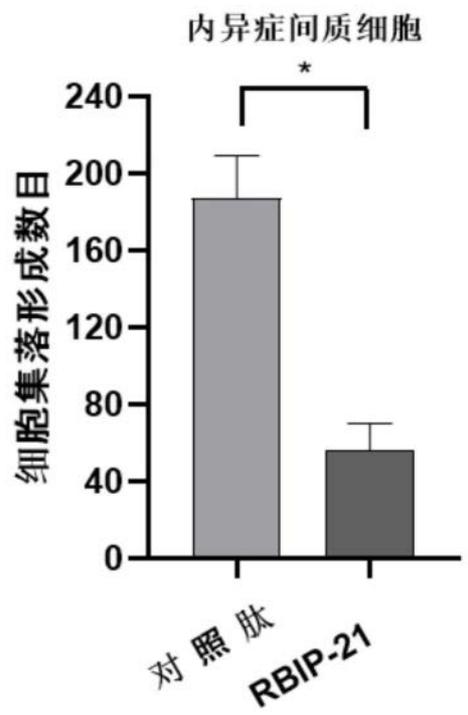


图7

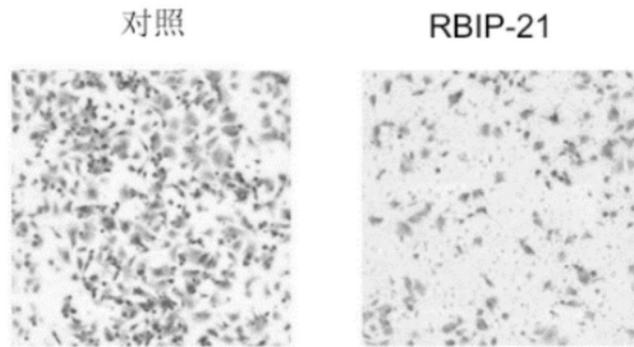


图8

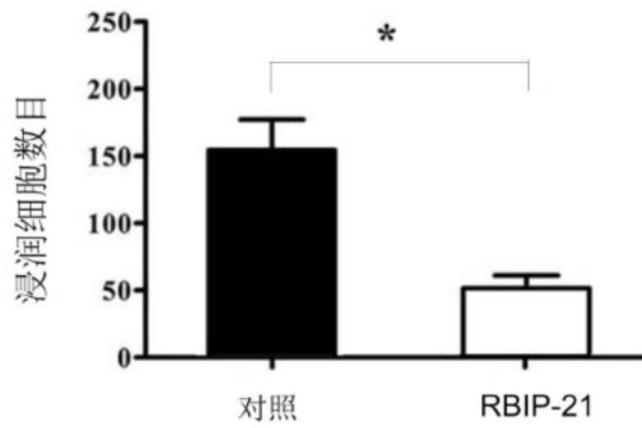


图9

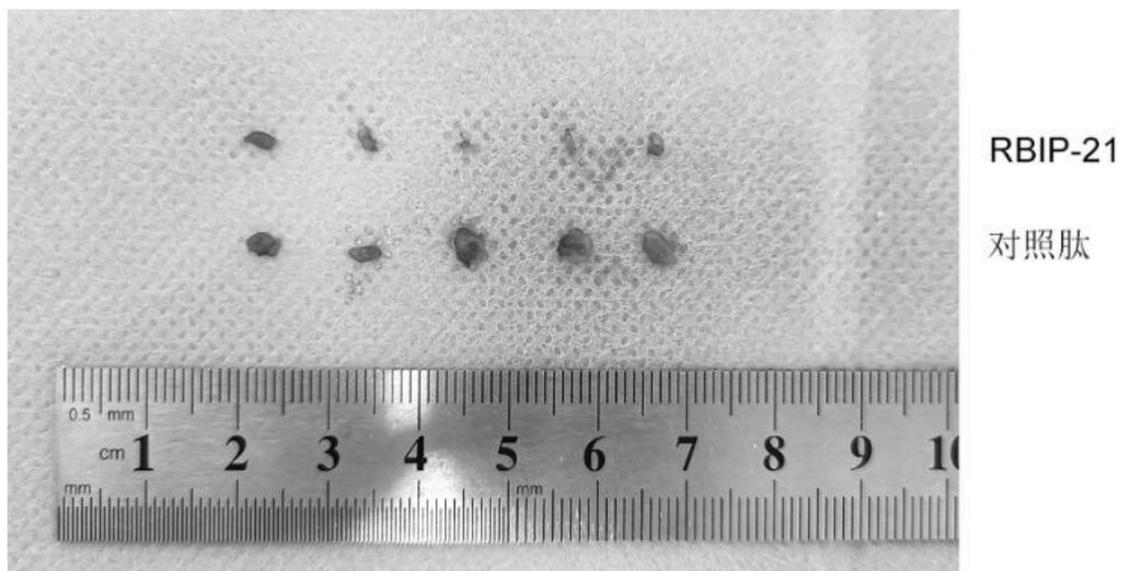


图10

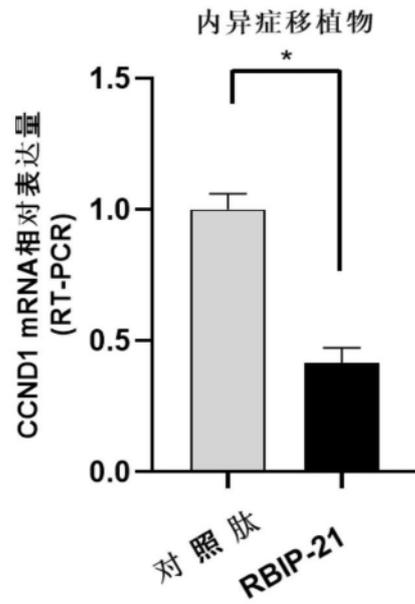


图11