



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113227128 B

(45) 授权公告日 2024.06.21

(21) 申请号 201980061420.1

(22) 申请日 2019.07.19

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113227128 A

(43) 申请公布日 2021.08.06

(30) 优先权数据
62/700,957 2018.07.20 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.03.19

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2019/056215 2019.07.19

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/016855 EN 2020.01.23

(73) 专利权人 香港理工大学
地址 中国香港九龙红磡
专利权人 皇家进修学院/麦吉尔大学

(72) 发明人 朱雪臻 陈友维 陈德恒 周铭祥

(74) 专利代理机构 北京华科联合专利事务所
(普通合伙) 11130

专利代理师 王为

(51) Int.Cl.
C07K 14/715 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
C07K 9/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 101878223 A, 2010.11.03
Yasuhiro Funahashi et al..A Notch1 Ectodomain Construct Inhibits Endothelial Notch Signaling, Tumor Growth, and Angiogenesis.Cancer Res.2008,第68卷(第12期),4727-4735.

审查员 刘宁伟

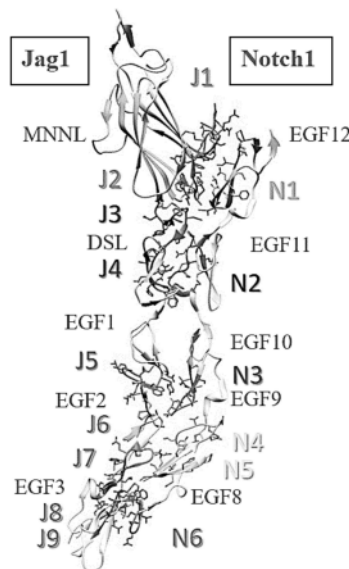
权利要求书1页 说明书12页
序列表12页 附图16页

(54) 发明名称

针对抑制JAG1-NOTCH1信号通路的肽

(57) 摘要

Notch配体(如Jag1)和Notch受体(如Notch1)之间的异常串扰与结肠中的肿瘤发生有关联。因此,抑制Notch通路是治疗具有Jag1上调疾病(如大肠癌(CRC))的吸引方法。为抑制Notch及其下游事件已开发泛Notch抑制剂如 γ -分泌酶抑制剂(GSI)。但是,严重的胃肠道毒性反应阻碍了GSI的临床发展。本发明研发出新颖的寡肽,其可以在不干扰DLL1-Notch1或DLL4-Notch1的情况下特异性地抑制Jag1-Notch1通路,展现出相对于泛Notch抑制剂的明显优势。



1. 一种具有Z₁-CLDQIGEFQCI-Z序列的合成肽，
所述Z₁选自氢、F、I、L、W或Y；
所述Z是-OH或SEQ ID NO:41，或SEQ ID NO:42，其特征在于：所述合成肽序列选自SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34。
2. 根据权利要求1所述的合成肽，其特征在于：所述合成肽对Jag1的MNNL结构域具有亲和性。
3. 一种组合物，其特征在于：所述组合物包括权利要求1中所述的合成肽。
4. 根据权利要求3所述的组合物，其特征在于：所述组合物进一步包括岩藻糖和/或抗癌药。
5. 根据权利要求4所述的组合物，其特征在于：所述抗癌药选自托泊替康、5-氟尿嘧啶、卡培他滨、伊立替康、奥沙利铂、阿霉素、紫杉醇、卡莫司汀、贝伐珠单抗、洛莫司汀或替莫唑胺。
6. 权利要求1所述的合成肽在制备药物中的应用，所述药物用于治疗患有对Jag1-Notch1信号传导抑制有反应的疾病的受试者，其特征在于：所述疾病选自淋巴瘤，大肠癌或胶质母细胞瘤。

针对抑制JAG1-NOTCH1信号通路的肽

技术领域

[0001] 本发明涉及Jag1-Notch1信号通路的抑制剂。

背景技术

[0002] Notch信号通路是一种在进化上保守的通路,其有助于多种组织和器官的发育。Notch信号传导涉及的细胞间通讯需要信号发送细胞与信号接收细胞并列,前者上的的一个膜束缚蛋白Notch配体结合到后者上的一个跨膜Notch受体。哺乳动物有5种Notch配体(Delta-like: DLL1、DLL3、DLL4及Jagged: Jag1、Jag2)以及4种Notch受体(Notch1到4)。Notch受体属于单程跨膜蛋白。细胞外结构域由29至36个EGF样重复序列连接负调控区域(NRR)组成。配体-受体二元复合物的形成引致一系列蛋白水解事件,包括 γ -分泌酶依赖性切割中释放Notch细胞内结构域(NICD)的最后步骤。NICD将易位进细胞核中,并与DNA结合蛋白CSL/CBF1和Mastermind-like蛋白(MAML)相互作用,引致包括Hes1及Hey1的下游靶基因的转录。

[0003] Notch通路的失调与包括常染色体显性遗传脑动脉病(CADASIL)、阿拉吉欧综合征和癌症等多种异常及疾病相关。Notch的致癌作用首先在人类的T-ALL中发现,当中染色体易位产生了长期活跃性的NICD[1]。

[0004] Notch信号传导通过调节细胞凋亡、血管生成、细胞迁移和细胞增殖来调节大肠癌的肿瘤发生。Notch1和Notch4在癌干细胞中观察到被上调。Jag1似乎是驱动癌干细胞中的Notch信号传导的主要Notch配体。Notch1以及其靶标Hes1与肿瘤分级有所相关[2],而Hes1在原发性结肠癌组织中过表达[3]。Jag1沉寂可抑制大肠癌的生长[4]。Notch1和Jag1在人类结肠腺癌中共同上调[5]。有建议认为Jag1是结肠癌中Wnt和Notch通路的连结[6]。

[0005] 为抑制Notch信号传导从而达到治疗效果的多种策略已被探索。抑制蛋白水解切割和激活Notch受体是一类重要的Notch抑制剂。首先,在黑腹果蝇中针对Notch受体的弗林蛋白酶转化酶依赖性切位点1(S1)并未能成功[7]。此外,弗林蛋白酶转化酶还具有其他靶蛋白,包括TGF β 、胰岛素生长因子受体、粘附分子和基质金属蛋白酶。抑制弗林蛋白酶转化酶可能会产生脱靶效应。第二,针对Notch受体的金属蛋白酶ADAM10-或ADAM17-依赖性切位点2(S2)也可能有出现脱靶效应的风险,因为ADAMS还涉及到肿瘤坏死因子(TNF)和白细胞介素-6受体(IL-6R)的处理。第三,针对Notch受体的 γ -分泌酶依赖性S3切位点已被证明在抑制所有Notch受体方面非常有效[8,9]。

[0006] 使用 γ -分泌酶抑制剂(GSI)抑制Notch通路以治疗癌症已被广泛研究。在多项临床试验中,GSI已与抗癌药物结合使用。虽然GSI在抑制Notch通路方面非常有效,但它们并不能专门针对个别的Notch通路,即它们是泛-Notch抑制剂。除了抑制Notch信号传导外,GSI还可以不加选择地阻断 γ -分泌酶下游的其他信号通路。这种对Notch和非Notch通路的非特异性抑制导致在动物和人类临床试验中均发现严重的胃肠道毒性,从而导致肠道干细胞转化成其他细胞[10]。目前,尚没有可以专门针对个别Notch通路的GSI。通过使用Notch1或Notch2特异性中和抗体证明了特异性抑制Notch通路有降低胃肠道毒性的可能性

[11,12]。

[0007] Notch信号传导也可在NICD易位进细胞核后通过破坏CSL-NICD-MAML转录复合物抑制。专门针对此通路的订书肽在实验动物中可有效治疗T-ALL[13]。尽管订书肽在一个相关的T-ALL小鼠模型中展示出有效,订书肽作为治疗剂的潜力仍需要进一步的充分评估。对于抑制CSL-NICD-MAML通路,订书肽必须克服质膜和核膜的屏障。除订书肽外,靶向三元转录复合物的小分子也已被报道[14]。

[0008] Notch受体的EGF重复序列11和12分别与Notch配体上的DSL和MNNL结构域之间的相互作用对Notch信号传导起到关键作用。DLL4-Notch1[15]和Jag1-Notch1细胞外结构域[16]的共晶体结构说明了上述相互作用的重要性。在2017年,Lucca等人[16]解释了一种二元复合物的共晶体结构,该复合物包含Notch1细胞外结构域的一部分(EGF样重复序列8-12;如图1所示)和Jag1细胞外结构域的一部分(MNNL、DSL和EGF样重复序列1-3;如图1所示)。上述相互作用是通过在Notch1和Jag1细胞外结构域之间延伸出120Å长度的反平行界面进行。该界面包括两个单独的相互作用位点,其中位点1包括Notch1的EGF重复序列11-12和Jag1的MNNL-DSL结构域,而位点2包括Notch1的EGF重复序列8-10和Jag1的EGF重复序列1-3。该复合物还揭示了一个O连接岩藻糖与Notch1的EGF重复序列12中T467处的关键相互作用。

[0009] 调节细胞外配体-受体相互作用是具有前景的靶向Notch信号传导策略。靶向Notch1和Notch2受体的EGF重复序列11-12的抗体可以阻断配体-受体相互作用并减少Notch信号传导[17]。就靶向Notch配体而言,DLL4抗体显示出对于抑制血管生成的巨大潜力[18],不过临床研究也指出靶向DLL4具有严重的毒性问题[19,20]。使用专门靶向Notch1或Notch2NRR区域的中和抗体也能有效抑制Notch信号传导。由于它们仅专门抑制一种类型的Notch受体,这些特异性Notch抗体在减少胃肠道(GI)毒性问题方面比泛Notch抑制剂(如GSI)具有明显的优势[21]。Jag1是Notch信号传导中有前景的治疗靶标[22],但是,靶向Jag1相互作用的策略仍然有限。除了上述的大肠癌以外,Jag1-Notch1抑制剂有望在其他Jag1经常上调的淋巴瘤和胶质母细胞瘤中有效[23]。

发明内容

[0010] 针对上述所讨论,本公开的目的是利用Jag1-Notch1二元复合物的最新X射线结构[16],提供靶向Jag1-Notch1相互作用的新颖配体或受体特异性剂。

[0011] 本发明制造的寡肽专门抑制Jag1-Notch1通路而不干扰DLL1-Notch1或DLL4-Notch1。由于Notch1和Notch2的双重抑制会引起肠道毒性,因此上述肽对Notch1的选择性抑制对比泛Notch抑制剂具有明显的优势。最有效的肽能够以亚微摩尔水平的半抑制浓度(IC₅₀)抑制结肠癌S1-M1-80细胞的增殖。在体外克隆形成实验中,Jag1-Notch1的阻断显著地抑制了人类结肠癌细胞的增殖。从机理上的角度,相关的肽直接与Notch配体Jagged1结合,以阻断Jag1-Notch1相互作用。

[0012] 本领域技术人员将理解除了本文所公开的具体描述外还可以进行变化和修改。

[0013] 本领域技术人员通过阅读以下描述将毫无疑问地理解本公开的其他层面和优点对于。

[0014] 本公开的以上和其他目的及特征根据本公开的以下描述再结合上附图将变得显

而易见。

附图说明

[0015] 图1显示肽的设计。(A)取自[16]的Jag1和Notch1的部分细胞外结构域的二元复合物共晶体结构。突出显示的是用于破坏Jag1-Notch1相互作用的肽,其中J1至J9(SEQ ID NO:1至9)衍生自Jag1,而N1至N6(SEQ ID NO:10至15)衍生自Notch1。(B)肽N1(SEQ ID NO:10)透过L468、D469、I477和P480与Jag1的MNNL相互作用。此处显示N1(SEQ ID NO:10)肽(Notch1的C467-G481)的4个残基在Jag1的MNNL结构域3Angstrom内。L468与Jag1的F126、P129和F94相互作用;D469与Jag1的A127相互作用。I477与Jag1的S93、E81和F94相互作用;P480与Jag1的R87相互作用。(C)Notch1的EGF样重复序列12上的4个重要残基L468、D469、I477和P480与Jag1的MNNL结构域中的相应残基的相互作用。图中显示该5个重要残基及其在MNNL中的相应残基之间的距离(P480:3.7Å;I477:3.5Å、3.1Å、3.8Å、3.8Å;L468:3.9Å、4.0Å、4.0Å、4.1Å;D469:4.0 Å)。这些残基将被突变以使其更接近Jag1中的相互作用残基。(D)用于体外研究Notch配体-受体相互作用的细胞共培养测定的示意图。

[0016] 图2显示肽的筛选。用表达Jag1细胞(+Jag1)诱导的Notch1信号传导的共培养测定。-Jag1,无诱导的对照实验;50μM DAPT在DMSO中;肽[J1至J9(SEQ ID NO:1至9)和N1至N6(SEQ ID NO:10至15)],100μM在H₂O中;数值代表相对于对照报告基因的Notch报告基因表达,已用-Jag1值归一化。测试肽(100μM)对人类结肠癌细胞系HCT-116(B)和HCT-15(C)的细胞毒性以及下调HCT-116(D)和HCT-15(E)中NICD1的能力。以γ-分泌酶抑制剂DAPT处理的细胞用作阳性对照。

[0017] 图3显示肽N1(SEQ ID NO:10)特异性破坏Jag1-Notch1相互作用。(A)N1(SEQ ID NO:10)肽以剂量依赖性方式抑制Jag1诱导的Notch1信号传导。在50至100μM之间达到了半抑制。N1(SEQ ID NO:10)肽不能抑制DLL1-Notch1(B)或DLL4-Notch1信号传导(C)。N1(SEQ ID NO:10)有效抑制Notch1信号传导,但不影响Notch2信号传导。N1(SEQ ID NO:10)肽(50μM)处理显著降低Jag1诱导的NICD1水平(D),但对DLL1诱导的NICD1水平(E)或DLL4诱导的NICD1水平(F)没有影响。DAPT作为泛Notch抑制剂可以抑制所有Jag1-Notch1、DLL1-Notch1和DLL4-Notch1信号传导。N1(SEQ ID NO:10)肽通过与Jag1结合来抑制信号传导。来自HEK293T-Jagged1细胞的Jag1可以被生物素化的N1(SEQ ID NO:10)肽免疫沉淀,但不能被NP(无肽)或CP(对照无关肽)免疫沉淀(G)。

[0018] 图4显示基于阻断Jag1-Notch1信号传导能力筛选N1(SEQ ID NO:10)肽衍生物。(A)Jag1-Notch1信号传导的共培养测定。50μM DAPT在DMSO中;肽,25μM在H₂O中;数值代表相对于对照报告基因的Notch报告基因表达,已用-JAG1值归一化。N102_{M479E}(SEQ ID NO:34)(B)、N102_{M479D}(SEQ ID NO:33)(C)和N1_{T466L}(SEQ ID NO:30)(D)以剂量依赖性方式抑制Jag1诱导的Notch信号传导。DAPT(50μM在DMSO中)用作阳性对照。N102_{M479E}(SEQ ID NO:34)(E)、N102_{M479D}(SEQ ID NO:33)(F)和N1_{T466L}(SEQ ID NO:30)(G)均显著降低了NICD1的表达水平。

[0019] 图5显示肽N1(SEQ ID NO:10)衍生物在阻断Jag1-Notch1相互作用中具特异性。N102_{M479E}(SEQ ID NO:34)(A&D)、N102_{M479D}(SEQ ID NO:33)(B&E)和N1_{T466L}(SEQ ID NO:30)(C&F)对DLL1(A、B和C)或DLL4诱导的(D、E和F)Notch信号传导没有抑制效果。DAPT(50μM在DMSO中)用作阳性对照。

[0020] 图6显示N102_{M479E} (SEQ ID NO:34) 肽抑制人类结肠癌细胞系增殖。N1 (SEQ ID NO:10) 以剂量依赖性方式降低了S1-M1-80细胞中的集落形成活性(A)。在10 μ M浓度,N102_{M479E} (SEQ ID NO:34) 完全消除了集落的形成。量化以DAPT或N102_{M479E} (SEQ ID NO:34) 处理S1-M1-80细胞的集落形成(B)。N102_{M479E} (SEQ ID NO:34) 能有效下调S1-M1-80细胞中NICD1的表达(C)。

[0021] 图7显示N102_{M479E} 肽(SEQ ID NO:34) 与托泊替康对S1-M1-80细胞的集落形成活性具有协同作用。

具体实施方式

[0022] 本发明的范围不受本文描述的任何具体实施例所限制。以下提出的实施例仅作为示例。

[0023] 实验结果

[0024] 设计破坏Jag1-Notch1的肽

[0025] 哺乳动物有5个Notch配体(Jag1, Jag2, DLL1, DLL3和DLL4) 和4个Notch受体(Notch 1-4)。配体-受体相互作用涉及细胞外区域中的多个EGF样重复序列。配体-受体相互作用的分子细节有助于我们设计靶向配体-受体相互作用的新抑制剂。配体-受体二元复合物的两个最新共晶体结构的详细相互作用于2017年被揭示(Jag1-Notch1)。该结构揭示了EGF样重复序列12和Notch1的T466处的O连接岩藻糖以及Jag1的MNNL结构域之间的关键相互作用的分子细节(图1A)。

[0026] 由于根据共晶体结构Jag1-Notch相互作用发生在位点S1和S2,原因是衍生自这些相互作用位点的肽可以充当“诱饵”并阻止Jag1-Notch1相互作用。Notch1衍生的诱饵肽曾用于破坏Notch配体DLL4,从而抑制表达Notch4的内皮细胞的形态发生[24]。可溶性Jag1肽可以抑制Jag1介导的Notch信号传导;抑制下游CSL依赖性转录[25]。由此可推测,从Jag1或Notch1侧设计的肽在破坏相互作用方面会更有效且更具特异性。

[0027] 根据Jag1设计了9种肽[J1至J9(SEQ ID NO:1至9)],以及根据Notch1设计了6种肽[N1至N6(SEQ ID NO:10至15)]。图1A显示它们在Jag1和Notch 1中的位置,而表1列出它们相应的肽序列。相互作用位点S1和S2上的接触残基是重点。例如,Notch1的EGF重复序列12上的五个残基(L468、D469、Q470、I477、P480) 与Jag1的MNNL的多个残基接触。由此设计出包含上述相互作用残基的线性肽N1(SEQ ID NO:10) (Notch1的EGF重复序列12的C467至G481) (图1B和C)。依此方法根据Jag1[J1-J9(SEQ ID NO:1至9)]或Notch1[N1-N6(SEQ ID NO:10至15)]生成两组肽。在相互作用区域涉及半胱氨酸S-S二硫键的情况下,肽亦将会设计成具有S-S二硫键。

[0028] 表1. 肽及其位置的概述

肽编号	肽序列	位置		肽序列	肽编号
		Jag1	Notch1		
[0029] J1 (SEQ ID No: 1)	CLKEYQSRVTAGGPCSF (S-S)	MNNL	EGF12	CLDQIGEFQCICMPG	N1 (SEQ ID No: 10)
J2 (SEQ ID No: 2)	FSFAWPRSY				
J3 (SEQ ID No: 3)	FCRPRDDFFGHYAC (S-S)	DSL	EGF11	CSLGANPCEHAGKC	N2 (SEQ ID No: 11)
J4 (SEQ ID No: 4)	CDDYYYGFGCN (S-S)				
J5 (SEQ ID No: 5)	CQYGWQGLYC (S-S)	EGF1	EGF10	CDTNPVNGKAIC	N3 (SEQ ID No: 12)
J6 (SEQ ID No: 6)	CETNWGGQLC (S-S)	EGF2	EGF9	CHDRVASFYC	N4 (SEQ ID No: 13)
J7 (SEQ ID No: 7)	YCDKCIPHP	EGF2	EGF9	CPHGRTGLLC (S-S)	N5 (SEQ ID No: 14)
J8 (SEQ ID No: 8)	DLNYC	EGF3			
J9 (SEQ ID No: 9)	CSNTGPKYQC	EGF3	EGF8	CVNGWTGEDC (S-S)	N6 (SEQ ID No: 15)

[0030] 筛选破坏Jag1-Notch1相互作用的肽

[0031] Jag1-Notch相互作用是通过以一种表达Notch配体Jagged1 (Jag1) 及另一种表达Notch (Notch1或Notch2) 的细胞系共培养测定。将具有12个上游CBF-1结合位点的萤火虫萤光素酶报告质粒转染到信号接收细胞中,以报告Notch信号传导(图1D)。对肽在抑制Jag1诱导的Notch信号传导中的活性进行了测试。完全抑制是等效于无诱导时看到的背景信号(-Jag1)。在9种Jag1的肽[J1-J9(SEQ ID NO:1至9)]和6种Notch1的肽[N1-N6(SEQ ID NO:10至15)]之中,只有N1(SEQ ID NO:10)能破坏Jag1-Notch1信号传导(图2A)。N1(SEQ ID NO:10)是衍生自Notch1(C467-G481)EGF样重复序列12的15聚体肽。这与Notch1的EGF样重复序列12位于Jag1的MNNL结构域附近的结构信息一致(图1B和C)。

[0032] 该组肽对两种人类大肠细胞系(HCT-116和HCT-15)的细胞毒活性也进行了测试。N1(SEQ ID NO:10)是唯一在100 μ M的浓度下对HCT-116和HCT-15细胞具有细胞毒性的肽(图2B和C)。Notch信号传导导致NICD1从膜结合的Notch受体释放。N1(SEQ ID NO:10)也被证明是唯一能在HCT-116(图2D)或HCT-15细胞系(图2E)中抑制NICD1形成的肽。N1(SEQ ID NO:10)和阳性对照DAPT(一种 γ -分泌酶抑制剂)的诱导均可以几乎完全消除NICD1(图2D和2E)。

[0033] N1(SEQ ID NO:10)肽在抑制Jag1-Notch1信号传导中具特异性

[0034] 使用体外共培养测定对N1(SEQ ID NO:10)肽在抑制不同的Notch配体诱导的Notch信号传导中的特异性进行了研究。将表达Notch配体(Jag1、DLL1或DLL4)的HEK293T或CHO细胞与表达Notch1或Notch2的细胞共培养。Notch1和Notch2信号传导可通过萤光素酶报告基因测定或NICD1和NICD2的形成来测量。N1(SEQ ID NO:10)肽以剂量依赖性方式抑制了Jag1诱导的Notch1信号传导(图3A)。在50至100 μ M浓度之间达到了半抑制。N1(SEQ ID NO:10)肽不能抑制DLL1-Notch1(图3B)或DLL4-Notch1信号传导(图3C),而DAPT则能抑制所有信号传导(图3A、3B和3C)。N1(SEQ ID NO:10)虽然通过抑制NICD1形成而抑制Notch1信号传导,但却不影响NICD2形成(图3D)。DAPT对抑制NICD1和NICD2有同等效用(图3D)。同样地, N1(SEQ ID NO:10)肽对DLL1诱导的NICD1(图3E)或DLL4诱导的NICD1水平(图3F)没有影响,而DAPT作为泛Notch抑制剂却可以抑制这两者(图3E和3F)。这些数据证明N1(SEQ ID NO:

10) 特异性地破坏Jag1-Notch1的相互作用,而没有影响DLL1-Notch1、DLL4-Notch1或Jag1-Notch2。这与影响上述所有相互作用的DAPT相反。另外,使用免疫沉淀法证明了N1 (SEQ ID NO:10) 肽直接结合到Jag1的能力(图3G)。

[0035] N1 (SEQ ID NO:10) 肽的优化

[0036] 为提高N1 (SEQ ID NO:10) 肽的活性,对N1 (SEQ ID NO:10) 中相互作用的残基进行了系统突变。优化的策略是改变N1 (SEQ ID NO:10) 肽中相互作用的残基,使其与Jag1的相互作用更紧密或更强。图1B显示N1 (SEQ ID NO:10) 肽序列和4个与Jag1的MNNL结构域相互作用的残基。根据以下优化策略生成N1 (SEQ ID NO:10) 肽衍生物:(1) 优化N1 (SEQ ID NO:10) 肽的第一步是确定能破坏Jag1-Notch1相互作用所需的最短肽长度。对N1 (SEQ ID NO:10) 肽的长度从N和C末端每次减少一个残基,以确定保持活性所需的最短长度。较短的肽有可能提供后续动物实验所需的更佳溶解性。因此,产生了截短形式的N1 (SEQ ID NO:10) 肽N101 (SEQ ID NO:17) 至N112 (SEQ ID NO:28)。(2) 由于P480与Jag1的MNNL的R87接触,N1 (SEQ ID NO:10) 在M479处的截短可以推断将有助于将C末端置于与侧链R87形成静电作用良好的位置。M479也可以突变为酸性残基(D或E)。因此,合成了N102 (SEQ ID NO:18)、N102_{M479E} (SEQ ID NO:34) 和N102_{M479D} (SEQ ID NO:33)。(3) 由于I471对Jag1的MNNL的结合没有贡献。可以推断将其突变为另一个大疏水残基W将有助于改善肽与Jag1的结合。建模还显示,W471可能与P30、L32和S125形成新的接触(数据未显示)。因此,合成了N102_{I471W} (SEQ ID NO:35)。(4) T466-岩藻糖(最初来自Notch1的EGF重复序列)与Jag1的MNNL的Y82的主链羰基形成了氢键。Notch1的T466的O连接岩藻糖对于维持Jag1和Notch1的细胞外结构域之间的共晶体结构中的接触至关重要[16]。N1 (SEQ ID NO:10) 延伸至N1_{T466} (SEQ ID NO:29),并用具有长侧链(作为间隔基团)的残基取代T466,该残基带正电荷[N1_{T466K} (SEQ ID NO:31)],或者可以形成氢键[N1_{T466Q} (SEQ ID NO:32)],或者是疏水的[N1_{T466L} (SEQ ID NO:30)]。

[0037] N1 (SEQ ID NO:10) 衍生物在破坏Jag1-Notch1信号传导中的表征

[0038] 对上述N1 (SEQ ID NO:10) 肽衍生物抑制Jag1诱导的Notch信号传导中的活性进行了共培养测定。这些肽一般在抑制Jag1诱导的Notch信号传导中显示出不同水平的活性。对于截短的N1 (SEQ ID NO:10) 肽衍生物,N102 (SEQ ID NO:18) 和N104 (SEQ ID NO:20) 显示出比N1 (SEQ ID NO:10) 更强的抑制作用。N105 (SEQ ID NO:21) 至N112 (SEQ ID NO:28) 几乎失去了阻断Jag1-Notch1信号传导的活性。N1_{T466} (SEQ ID NO:29)、N1_{T466K} (SEQ ID NO:31)、N1_{T466Q} (SEQ ID NO:32)、N102_{I471W} (SEQ ID NO:35) 对抑制Notch信号传导表现出轻微的改善。N1_{T466L} (SEQ ID NO:30)、N102_{M479E} (SEQ ID NO:34) 和N102_{M479D} (SEQ ID NO:33) 展示出最大的改进(图4A)。根据Notch报告基因测定(图4B、C、D) 或NICD1的形成(图4E、F、G) 测量,N1_{T466L} (SEQ ID NO:30)、N102_{M479E} (SEQ ID NO:34) 和N102_{M479D} (SEQ ID NO:33) 通过剂量依赖性方式抑制了Jag1诱导的Notch1信号传导。为研究这三种具活性的肽N1_{T466L} (SEQ ID NO:30)、N102_{M479E} (SEQ ID NO:34) 和N102_{M479D} (SEQ ID NO:33) 的特异性,对其干扰DLL1-Notch1和DLL4-Notch1的信号传导进行测试。这些肽并不会干扰DLL1-Notch1(图5A、B、C) 或DLL4-Notch1(图5D、E、F) 信号传导,意味它们对Jag1-Notch1具有特异性。

[0039] N102_{M479E} (SEQ ID NO:34) 有效抑制人类结肠癌细胞系的增殖

[0040] N1 (SEQ ID NO:10) 肽以100 μ M浓度抑制了人类结肠癌细胞系HCT-116(图2B) 和HCT-15(图2C) 的增殖。N1 (SEQ ID NO:10) 也以剂量依赖性方式降低HCT-116和HCT-15细胞

的集落形成活性(数据未显示)。

[0041] 从所有N1(SEQ ID NO:10)肽衍生物中选择了活性最高的N102_{M479E}(SEQ ID NO:34)以进一步研究其对S1-M1-80细胞系集落形成的影响。N102_{M479E}(SEQ ID NO:34)以剂量依赖性方式有效减少S1-M1-80的集落形成。在1 μ M浓度时,集落形成可减少一半。在5 μ M浓度时,N102_{M479E}(SEQ ID NO:34)几乎消除了所有集落的形成(图6A和B)。N102_{M479E}(SEQ ID NO:34)可以在10 μ M的浓度完全抑制S1-M1-80细胞中NICD1的形成(图6C)。

[0042] 肽的细胞毒性表征

[0043] 为确定肽对人类结肠癌细胞系的抗增殖作用。以结肠癌细胞系HCT-116和S1-M1-80进行所有肽的细胞毒性测试(表2)。肽对结肠癌细胞的细胞毒性与破坏Jag1-Notch1相互作用的活性有关联。那些具有阻断Jag1-Notch1相互作用活性的肽还可以抑制HCT-116和S1-M1-80细胞的增殖。N1(SEQ ID NO:10)肽及其衍生物,包括N1_{T466L}(SEQ ID NO:30)、N102_{M479E}(SEQ ID NO:34)、N102_{M479D}(SEQ ID NO:33)、N102_{T466L-M479E}(SEQ ID NO:36)、N102_{T466I-M479E}(SEQ ID NO:37)、N102_{T466W-M479E}(SEQ ID NO:38)、N102_{T466F-M479E}(SEQ ID NO:39)、N102_{T466Y-M479E}(SEQ ID NO:40)有效抑制HCT-116和S1-M1-80的增殖。它们的IC₅₀值的范围是由3.9 \pm 0.3 μ M至47.3 \pm 3.1 μ M,其效价几乎与托泊替康可比(表2)。就肽本身对正常细胞的细胞毒性而言,大多数活性肽[N1_{T466L}(SEQ ID NO:30)、N102_{M479E}(SEQ ID NO:34)、N102_{M479D}(SEQ ID NO:33)、N102_{T466L-M479E}(SEQ ID NO:36)、N102_{T466I-M479E}(SEQ ID NO:37)、N102_{T466W-M479E}(SEQ ID NO:38)、N102_{T466F-M479E}(SEQ ID NO:39)、N102_{T466Y-M479E}(SEQ ID NO:40)]对小鼠成纤维细胞L929细胞或HEK-293T-Jagged-1细胞的IC₅₀值高于100 μ M因此无毒性,鉴于其对正常细胞的低毒性这些活性肽有潜力作为抗癌候选药物。以上数据证明N102_{M479E}(SEQ ID NO:34)有潜力成为用于治疗大肠癌的候选者,并且值得以体内功效实验作进一步的研究。

[0044] 与抗癌药的协同作用

[0045] 本发明的肽被证明与现有的抗癌药具有协同作用。托泊替康(TPT)和N102_{M479E}(SEQ ID NO:34)被选择作为说明本发明这一面的实例。S1-M1-80是TPT抗性细胞系(集落形成=每孔集落数1641),S1-M1-80细胞的集落形成活性用作测量协同作用。

[0046] 以1 μ M浓度的TPT处理能稍微降低集落形成(每孔集落数:1263)。1 μ M浓度TPT与1 μ M浓度DAPT的组合可将其进一步减少每孔集落数至1074。10 μ M浓度DAPT的处理可将其减少每孔集落数至717。

[0047] 用1 μ M浓度N102_{M479E}(SEQ ID NO:34)处理可将集落形成减少每孔集落数至925,表明N102_{M479E}(SEQ ID NO:34)的效价比DAPT高14%。1 μ M浓度TPT与N102_{M479E}的组合可将其进一步减少每孔集落数至581,比TPT-DAPT组合的效价提高19%。10 μ M浓度N102_{M479E}(SEQ ID NO:34)的治疗非常有效(每孔集落数:84),比DAPT的效价提高约88%。

[0048] 以上结果表明,TPT和N102_{M479E}(SEQ ID NO:34)在减少S1-M1-80的集落形成方面具有协同作用,与TPT-DAPT组合相比,效价提高了19%。单独使用N102_{M479E}(SEQ ID NO:34)的效价比DAPT高88%。

[0049] 表2. 肽序列和细胞毒性的概述

SEQ ID NO	托泊替康 DAPT	序列	IC ₅₀ (μM)		HEK293T- Jagged-1
			S1	S1-M1-80	
		-	0.19 ± 0.05	14.9 ± 0.1	ND
		-	>100	17.1 ± 0.4	ND
1	J1	CLKEYQSRVTAGGPCSF (S-S)	ND	ND	ND
2	J2	FSFAWPRSY	ND	ND	ND
3	J3	FCRPRDDFFGHYAC (S-S)	ND	ND	ND
4	J4	CDDYYYGFGCN (S-S)	ND	ND	ND
5	J5	CQYGWQGLYC (S-S)	ND	ND	ND
6	J6	CETNWWGGQLC (S-S)	ND	ND	ND
7	J7	YCDKCIHPH	ND	ND	ND
8	J8	DLNYC	ND	ND	ND
9	J9	CSNTGPKDYQC	ND	ND	ND
10	N1	CLDQIGEFQCICMPG	>50	16.3 ± 0.6	ND
11	N2	CSLGANPCEHAGKC	ND	ND	ND
12	N3	CDTNPVNGKAIC	ND	ND	ND
13	N4	CHDRVASFYC	ND	ND	ND
14	N5	CPHGRTGLLC (S-S)	ND	ND	ND
15	N6	CVNGWTGEDC (S-S)	ND	ND	ND
16	N1SC	QPGHICDMQFLGCC	ND	ND	ND
[0050] 17	N101	CLDQIGEFQCICMP	>50	14.1 ± 0.7	ND
18	N102	CLDQIGEFQCICM	>50	10.2 ± 0.4	ND
19	N103	CLDQIGEFQCIC	>100	>50	ND
20	N104	CLDQIGEFQCI	>50	28.4 ± 0.6	ND
21	N105	CLDQIGEFQC	>100	>100	ND
22	N106	CLDQIGEFQ	>100	>100	ND
23	N107	CLDQIGEF	>100	>100	ND
24	N108	CLDQIGE	>100	>100	ND
25	N109	CLDQIG	>100	>100	ND
26	N110	CLDQI	>100	>100	ND
27	N111	CLDQ	>100	>100	ND
28	N112	IGEFQCICMPG	>100	>100	ND
29	N1 _{T466}	TCLDQIGEFQCICMPG	>100	>50	ND
30	N1 _{T466L}	LCLDQIGEFQCICMPG	>50	8.2 ± 0.3	>100
31	N1 _{T466K}	KCLDQIGEFQCICMPG	>100	>50	ND
32	N1 _{T466Q}	QCLDQIGEFQCICMPG	>100	>50	ND
33	N102 _{M479D}	CLDQIGEFQCICD	>50	5.8 ± 0.2	>100
34	N102 _{M479E}	CLDQIGEFQCICE	>30	4.9 ± 0.2	>100
35	N102 _{I471W}	CLDQWGEFQCICM	>100	>50	ND
36	N102 _{T466L-M479E}	LCLDQIGEFQCICE	ND	5.4 ± 1.2	>100
37	N102 _{T466L-M479E}	ICLDQIGEFQCICE	ND	15.2 ± 4.2	>100
38	N102 _{T466W-M479E}	WCLDQIGEFQCICE	ND	54.3 ± 5.2	>100
39	N102 _{T466F-M479E}	FCLDQIGEFQCICE	ND	43.9 ± 3.4	>100
40	N102 _{T466Y-M479E}	YCLDQIGEFQCICE	ND	14.9 ± 4.8	>100

[0051] 如材料和方法部分所述,以托泊替康、DAPT和肽接触HCT-116、S1-M1-80、HEK293T-Jagged1和L929细胞确定IC₅₀值。N=1-3个独立实验,数值以平均值±平均值标准误差表达。ND=未确定。

[0052] 本发明提供了一种用于特异性抑制Jag1-Notch1信号传导的合成肽。在一个实施例,所述合成肽具有序列Z₁-CLDQIGEFQCI-Z,所述Z₁选自氢、F、I、L、W或Y;所述Z为-OH或一个由至多5个选自D、E、G、M或P氨基酸所组成的序列(SEQ ID NO:41),或一个由至多5个以C为首随后为至少一个选自M、P、D、E或G氨基酸所组成的序列(SEQ ID NO:42)。

[0053] 在一个实施例,所述序列选自N1(SEQ ID NO:10)、N101(SEQ ID NO:17)、N102(SEQ ID NO:18)、N104(SEQ ID NO:20)、N1_{T466L}(SEQ ID NO:30)、N102_{M479D}(SEQ ID NO:33)、N102_{M479E}(SEQ ID NO:34)、N102_{T466L-M479E}(SEQ ID NO:36)、N102_{T466I-M479E}(SEQ ID NO:37)、N102_{T466W-M479E}(SEQ ID NO:38)、N102_{T466F-M479E}(SEQ ID NO:39)或N102_{T466Y-M479E}(SEQ ID NO:

40)。

[0054] 在一个实施例,所述合成肽具有一个于T466与其结合的岩藻糖。

[0055] 在一个实施例,所述序列是Z₁-CLDQIGEFQCIC-Z₂,其中Z₂是带负电荷的氨基酸(SEQ ID NO:43)。

[0056] 在一个实施例,上述合成肽对Jag1的MNNL结构域具有亲和性。

[0057] 本发明进一步提供了一种包含上述任何合成肽的组合物。在一个实施例,所述组合物进一步包含岩藻糖和/或抗癌药。在一个实施例,所述抗癌药选自托泊替康、5-氟尿嘧啶、卡培他滨、伊立替康、奥沙利铂、阿霉素、紫杉醇、卡莫司汀、贝伐珠单抗、洛莫司汀或替莫唑胺。

[0058] 本发明还提供本文所述的合成肽用于制备一种药物的用途,以治疗患有对Jag1-Notch1信号传导抑制有反应的疾病的受试者,其中所述疾病选自淋巴瘤、大肠癌和胶质母细胞瘤。

[0059] 本发明进一步提供本文所述的任何合成肽在治疗患有对Jag1-Notch1信号传导抑制有反应的疾病的受试者的用途,所述疾病选自淋巴瘤、大肠癌和胶质母细胞瘤。在一个实施例,合成肽的用途还包括共同施用岩藻糖和/或抗癌药。在另一个实施例,所述抗癌药选自托泊替康、5-氟尿嘧啶、卡培他滨、伊立替康、奥沙利铂、阿霉素、紫杉醇、卡莫司汀、贝伐珠单抗、洛莫司汀或替莫唑胺。

[0060] 本发明还提供了一种破坏信号发送细胞和信号接收细胞之间的Jag1-Notch1信号传导的方法,该方法包括以本文所述的任何合成肽接触所述信号发送细胞。在一个实施例,所述方法还包括共同施用岩藻糖。在另一个实施例,所述合成肽接触所述信号发送细胞的Jag1。在一个进一步的实施例,所述细胞是肿瘤细胞。在另一个实施例,所述肿瘤细胞源自淋巴瘤、胶质母细胞瘤或大肠癌肿瘤。

[0061] 本发明进一步提供了一种治疗患有对Jag1-Notch1信号传导抑制有反应的疾病的受试者的方法,包括对所述受试者施用有效量的本文所述的任何合成肽,所述疾病选自淋巴瘤、大肠癌或胶质母细胞瘤。

[0062] 实施例

[0063] 材料和方法

[0064] 化学品和抑制剂

[0065] 本研究使用的所有化学品均为市面有售的粉末形式纯化合物。白色粉末形式的N-[N-(3,5-二氟苯乙酰基)-L-丙氨酰]-S-苯基甘氨酸叔丁基酯(DAPT)购自中国上海的TCI(上海)。托泊替康(粉末,纯度>98%)购自中国上海的TCI(上海)。DMEM培养基、RPMI-1640培养基、胰蛋白酶/乙二胺四乙酸和青霉素/链霉素(P/S)购自Gibco。胎牛血清(FBS)取自HyClone。所有其他常用试剂均购自Sigma-Aldrich。

[0066] 肽库

[0067] 寡肽衍生自细胞外结构域的Jag1-Notch1二元复合物。每个肽在细胞外结构域上代表着一个独特的结合位点。它们的序列长度为5至17个氨基酸,范围从Jag-1 MNNL到EGF样3以及Notch-1 EGF样8-12。肽库由线性肽和二硫键环肽组成。所有使用的合成肽都是通过传统的Fmoc固相合成法合成。本研究中使用的肽由中国武汉的MingHao合成。将肽溶解在去离子水或1×PBS中,使浓度达到5mM。用于拉下实验的生物素化肽也购自同一供应商。

[0068] 细胞系和细胞培养

[0069] 本研究中使用的所有细胞系均在解冻后传的5到10代。本研究的实验使用人类结肠癌细胞系HCT-116 (ATCC®CCL-247™) 和HCT-15 (ATCC®CCL-225™)、HEK293T-Jagged-1、CHO-DLL4、CHO-DLL1、S1-M1-80、小鼠L929纤维母细胞细胞系。稳定表达人类全长Jagged-1 (HEK293T-Jagged-1) 的人胚胎肾细胞293T是由Urban Lendahl教授(瑞典卡罗林斯卡学院) 善意提供。稳定表达人类全长DLL1 (CHO-DLL1) 的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞和稳定表达人类全长DLL4 (CHO-DLL4) 的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞是由Achim Gossler教授(德国汉诺威医学院) 善意提供。由S1以米托蒽醌所衍生的人类结肠癌细胞系S1-M1-80是由Kenneth To教授(香港中文大学) 善意提供。

[0070] L929和HEK293T-Jagged-1细胞系在补充了10%热灭活的FBS和青霉素(100U/mL) 的DMEM培养基中培养。HCT-116、HCT-15在补充了10%热灭活的FBS和青霉素(100U/mL) 的RPMI培养基中培养。S1-M1-80细胞系在补充了10%热灭活的FBS和青霉素(100U/mL) 的MEM培养基中培养。所有细胞在保持37和5%CO₂的潮湿培养箱中培养。

[0071] 质粒

[0072] 本研究使用具有12×野生型CBF1结合位点的萤光素酶报告基因质粒和pTK-海肾萤光素酶质粒。12×CSL-萤火虫萤光素酶质粒是Urban Lendahl教授(瑞典卡罗林斯卡学院) 提供的礼物。海肾萤光素酶质粒购自Promega Corporation。

[0073] 细胞共培养测定

[0074] 每个样品组将HEK-293T-Jagged-1细胞一式三份接种于24孔板中,并将人类HCT-116细胞接种于一个60mm培养皿内。让细胞沉降,并于第二天更换为不含抗生素的培养基后进行转染。根据制造商的说明使用Lipofectamine®3000 (Invitrogen™) 将HCT-116细胞以12×CSL-萤光素酶和海肾萤光素酶转染。24小时后,刮擦HCT-116细胞,并向两个24孔板的每个孔中添加 2.5×10^4 个在1mL完全培养基中的细胞。使用所需浓度的肽处理细胞。以N-[N-(3,5-二氟苯乙酰基)-L-丙氨酸]-S-苯基甘氨酸叔丁酯(DAPT) 用作阳性对照。将细胞共培养12小时,然后测量萤光素酶活性。细胞培养后,将细胞用萤光素酶裂解缓冲液裂解。使用Dual-Luciferase® 双萤光素酶报告基因检测系统(Promega),通过萤光素酶测定来测量表达12×CSL-萤光素酶报告基因构建物的细胞中的Notch活性。

[0075] 细胞增殖测定

[0076] 向96孔板的每个孔中接种HCT-116、HCT-15、S1-M1-80、S1、L929、HEK293T-Jagged-1加入一系列浓度(从1000μM到0.5μM的连续稀释液)的肽或包括DAPT、托泊替康的药物,并在37°C和5%CO₂的潮湿培养箱中放置3天。如上所述,通过MTS测定确定了存活的百分比。

[0077] 体外拉下实验

[0078] 以1×RIPA裂解缓冲液(20mM三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(pH 7.5) 150mM氯化钠、1mM乙二胺四乙酸二钠、1mM乙二醇双氨乙基醚四乙酸、1%NP-40、1%脱氧胆酸钠、2.5mM焦磷酸钠、1mMβ-甘油磷酸酯、1mM正钒酸钠) 裂解HEK293T-Jagged1细胞。使用一微克生物素标记的肽以及与链霉亲和素偶联的磁珠(Promega) 拉下人类Jag1。以上获得的蛋白质在十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳上分离,并以抗Jagged1抗体检测。

[0079] 抗体

[0080] 以1:1000稀释度的切割Notch1 (Val1744) (D3B8) 兔单克隆抗体(CST) 和Notch2(切

割A1a1734) 兔单克隆抗体分别检测人类Notch1细胞内结构域(NICD1)和Notch2细胞内结构域(NICD2)。以1:3000稀释度的小鼠单克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology)检测 β -肌动蛋白。

[0081] 克隆形成实验

[0082] 集落形成测定的程序包括以下步骤。将适当数量的细胞一式两份接种在6孔板的每个孔上。接种细胞的数量应与处理的积极性有关联。将细胞在37°C的CO₂培养箱中培养12小时,并使细胞附着在板上。用肽或(DAPT)处理细胞至所需浓度。将细胞在37°C的CO₂培养箱中培养约10天,直到对照孔中的细胞已形成良好尺寸的集落(至少每个集落100个细胞)。培养完毕后,除去培养基,并用5ml 1×PBS(磷酸盐缓冲生理盐水,pH 7.2)冲洗细胞。然后,将细胞在室温下用1ml甲醇固定10分钟。固定后,用0.5%结晶紫溶液将细胞染色,并在室温下培养1小时。染色后,将板浸入去离子水中以冲洗掉结晶紫,并在室温下风干过夜。使用扫描仪为已干孔板照相。以细胞计数仪软件对每个孔中的集落数量进行计数。

[0083] 参考文献

[0084] 1.Ellisen,L.W.,et al.,TAN-1,the human homolog of the Drosophila Notch gene,is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms.Cell,1991.66(4):p.649-661.

[0085] 2.Reedijk,M.,et al.,Activation of Notch signaling in human colon adenocarcinoma.Int J Oncol,2008.33(6):p.1223-9.

[0086] 3.Veenendaal,L.M.,et al.,Differential Notch and TGFbeta signaling in primary colorectal tumors and their corresponding metastases.Cell Oncol,2008.30(1):p.1-11.

[0087] 4.Dai,Y.,et al.,Silencing of Jagged1 inhibits cell growth and invasion in colorectal cancer.Cell Death Dis,2014.5:p.e1170.

[0088] 5.Gao,J.,et al.,Up-regulated expression of Notch1 and Jagged1 in human colon adenocarcinoma.Pathol Biol(Paris),2011.59(6):p.298-302.

[0089] 6.Rodilla,V.,et al.,Jagged1 is the pathological link between Wnt and Notch pathways in colorectal cancer.Proc Natl Acad Sci U S A,2009.106(15):p.6315-20.

[0090] 7.Kidd,S.and T.Lieber,Furin cleavage is not a requirement for Drosophila Notch function.Mechanisms of development,2002.115(1):p.41-51.

[0091] 8.De Strooper,B.,et al.,A presenilin-1-dependent γ -secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain.1999.398:p.518.

[0092] 9.Struhl,G.and I.Greenwald,Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in Drosophila.1999.398:p.522.

[0093] 10.van Es,J.H.,et al.,Notch/ γ -secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells.Nature,2005.435:p.959.

[0094] 11.Wu,Y.,et al.,Therapeutic antibody targeting of individual Notch receptors.Nature,2010.464:p.1052.

- [0095] 12.Riccio,O.,et al.,Loss of intestinal crypt progenitor cells owing to inactivation of both Notch1 andNotch2 is accompanied by derepression of CDK inhibitors p27Kip1 and p57Kip2.EMBO Rep,2008.9(4):p.377-83.
- [0096] 13.Moellering,R.E.,et al.,Direct inhibition of the NOTCH transcription factor complex.2009.462:p.182.
- [0097] 14.Astudillo,L.,et al.,The Small Molecule IMR-1 Inhibits the Notch Transcriptional ActivationComplex to Suppress Tumorigenesis.Cancer Research, 2016.76(12):p.3593.
- [0098] 15.Luca,V.C.,et al.,Structural biology.Structural basis for Notch1 engagement of Delta-like 4.Science,2015.347(6224):p.847-53.
- [0099] 16.Luca,V.C.,et al.,Notch-Jagged complex structure implicates a catch bond in tuning ligandsensitivity.Science,2017.355(6331):p.1320-1324.
- [0100] 17.Falk,R.,et al.,Generation of anti-Notch antibodies and their application in blocking Notch signallingin neural stem cells.Methods,2012.58(1):p.69-78.
- [0101] 18.Ridgway,J.,et al.,Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis.Nature,2006.444:p.1083.
- [0102] 19.Yan,M.,et al.,Chronic DLL4 blockade induces vascular neoplasms.Nature,2010.463:p.E6.
- [0103] 20.Couch,J.A.,et al.,Balancing Efficacy and Safety of an Anti-DLL4 Antibody throughPharmacokinetic Modulation.Clinical Cancer Research,2016.22(6):p.1469.
- [0104] 21.Wu,Y.,et al.,Therapeutic antibody targeting of individual Notch receptors.Nature,2010.464(7291):p.1052-7.
- [0105] 22.Dai,Y.,et al.,Silencing of Jagged1 inhibits cell growth and invasion in colorectal cancer.Cell Death&Disease,2014.5:p.e1170.
- [0106] 23.Jundt,F.,et al.,Activated Notch1 signaling promotes tumor cell proliferation and survival inHodgkin and anaplastic large cell lymphoma.Blood,2002.99(9):p.3398-403.
- [0107] 24.Funahashi,Y.,et al.,A Notch1 ectodomain construct inhibits endothelial Notch signaling,tumorgrowth,and angiogenesis.Cancer Research, 2008.68(12):p.4727-4735.
- [0108] 25.Small,D.,et al.,Soluble jagged 1 represses the function of its transmembrane form to induce theformation of the Src-dependent chord-like phenotype.Journal of Biological Chemistry,2001.276(34):p.32022-32030.

[0001]		序列表		
[0002]	<110>	香港理工大学		
[0003]		皇家进修学院/麦吉尔大学		
[0004]	<120>	针对抑制JAG1-NOTCH1信号通路的肽		
[0005]	<130>	2877-A-PCT-CN		
[0006]	<150>	PCT/IB2019/056215		
[0007]	<151>	2019-07-19		
[0008]	<150>	US62/700,957		
[0009]	<151>	2018-07-20		
[0010]	<160>	43		
[0011]	<170>	PatentIn version 3.5		
[0012]	<210>	1		
[0013]	<211>	17		
[0014]	<212>	PRT		
[0015]	<213>	人工序列		
[0016]	<220>			
[0017]	<223>	由Jag1设计的肽		
[0018]	<400>	1		
[0019]		Cys Leu Lys Glu Tyr Gln Ser Arg Val Thr Ala Gly Gly Pro Cys Ser		
[0020]		1 5 10 15		
[0021]		Phe		
[0022]	<210>	2		
[0023]	<211>	9		
[0024]	<212>	PRT		
[0025]	<213>	人工序列		
[0026]	<220>			
[0027]	<223>	由Jag1设计的肽		
[0028]	<400>	2		
[0029]		Phe Ser Phe Ala Trp Pro Arg Ser Tyr		
[0030]		1 5		
[0031]	<210>	3		
[0032]	<211>	14		
[0033]	<212>	PRT		
[0034]	<213>	人工序列		
[0035]	<220>			
[0036]	<223>	由Jag1设计的肽		
[0037]	<400>	3		
[0038]		Phe Cys Arg Pro Arg Asp Asp Phe Phe Gly His Tyr Ala Cys		

[0039]	1	5	10
[0040]	<210>	4	
[0041]	<211>	11	
[0042]	<212>	PRT	
[0043]	<213>	人工序列	
[0044]	<220>		
[0045]	<223>	由Jag1设计的肽	
[0046]	<400>	4	
[0047]	Cys Asp Asp Tyr Tyr Tyr Gly Phe Gly Cys Asn		
[0048]	1	5	10
[0049]	<210>	5	
[0050]	<211>	10	
[0051]	<212>	PRT	
[0052]	<213>	人工序列	
[0053]	<220>		
[0054]	<223>	由Jag1设计的肽	
[0055]	<400>	5	
[0056]	Cys Gln Tyr Gly Trp Gln Gly Leu Tyr Cys		
[0057]	1	5	10
[0058]	<210>	6	
[0059]	<211>	10	
[0060]	<212>	PRT	
[0061]	<213>	人工序列	
[0062]	<220>		
[0063]	<223>	由Jag1设计的肽	
[0064]	<400>	6	
[0065]	Cys Glu Thr Asn Trp Gly Gly Gln Leu Cys		
[0066]	1	5	10
[0067]	<210>	7	
[0068]	<211>	9	
[0069]	<212>	PRT	
[0070]	<213>	人工序列	
[0071]	<220>		
[0072]	<223>	由Jag1设计的肽	
[0073]	<400>	7	
[0074]	Tyr Cys Asp Lys Cys Ile Pro His Pro		
[0075]	1	5	
[0076]	<210>	8	
[0077]	<211>	5	

[0078]	<212>	PRT
[0079]	<213>	人工序列
[0080]	<220>	
[0081]	<223>	由Jag1设计的肽
[0082]	<400>	8
[0083]		Asp Leu Asn Tyr Cys
[0084]	1	5
[0085]	<210>	9
[0086]	<211>	11
[0087]	<212>	PRT
[0088]	<213>	人工序列
[0089]	<220>	
[0090]	<223>	由Jag1设计的肽
[0091]	<400>	9
[0092]		Cys Ser Asn Thr Gly Pro Asp Lys Tyr Gln Cys
[0093]	1	5 10
[0094]	<210>	10
[0095]	<211>	15
[0096]	<212>	PRT
[0097]	<213>	人工序列
[0098]	<220>	
[0099]	<223>	由Notch1设计的肽
[0100]	<400>	10
[0101]		Cys Leu Asp Gln Ile Gly Glu Phe Gln Cys Ile Cys Met Pro Gly
[0102]	1	5 10 15
[0103]	<210>	11
[0104]	<211>	14
[0105]	<212>	PRT
[0106]	<213>	人工序列
[0107]	<220>	
[0108]	<223>	由Notch1设计的肽
[0109]	<400>	11
[0110]		Cys Ser Leu Gly Ala Asn Pro Cys Glu His Ala Gly Lys Cys
[0111]	1	5 10
[0112]	<210>	12
[0113]	<211>	12
[0114]	<212>	PRT
[0115]	<213>	人工序列
[0116]	<220>	

[0117]	<223>	由Notch1设计的肽
[0118]	<400>	12
[0119]		Cys Asp Thr Asn Pro Val Asn Gly Lys Ala Ile Cys
[0120]	1	5 10
[0121]	<210>	13
[0122]	<211>	10
[0123]	<212>	PRT
[0124]	<213>	人工序列
[0125]	<220>	
[0126]	<223>	由Notch1设计的肽
[0127]	<400>	13
[0128]		Cys His Asp Arg Val Ala Ser Phe Tyr Cys
[0129]	1	5 10
[0130]	<210>	14
[0131]	<211>	10
[0132]	<212>	PRT
[0133]	<213>	人工序列
[0134]	<220>	
[0135]	<223>	由Notch1设计的肽
[0136]	<400>	14
[0137]		Cys Pro His Gly Arg Thr Gly Leu Leu Cys
[0138]	1	5 10
[0139]	<210>	15
[0140]	<211>	10
[0141]	<212>	PRT
[0142]	<213>	人工序列
[0143]	<220>	
[0144]	<223>	由Notch1设计的肽
[0145]	<400>	15
[0146]		Cys Val Asn Gly Trp Thr Gly Glu Asp Cys
[0147]	1	5 10
[0148]	<210>	16
[0149]	<211>	15
[0150]	<212>	PRT
[0151]	<213>	人工序列
[0152]	<220>	
[0153]	<223>	由Notch1设计的肽
[0154]	<400>	16
[0155]		Gln Pro Gly Ile Ile Cys Asp Met Gln Phe Leu Gly Cys Cys Glu

[0156]	1	5	10	15
[0157]	<210>	17		
[0158]	<211>	14		
[0159]	<212>	PRT		
[0160]	<213>	人工序列		
[0161]	<220>			
[0162]	<223>	由Notch1设计的肽		
[0163]	<400>	17		
[0164]	Cys Leu Asp Gln Ile Gly Glu Phe Gln Cys Ile Cys Met Pro			
[0165]	1	5	10	
[0166]	<210>	18		
[0167]	<211>	13		
[0168]	<212>	PRT		
[0169]	<213>	人工序列		
[0170]	<220>			
[0171]	<223>	由Notch1设计的肽		
[0172]	<400>	18		
[0173]	Cys Leu Asp Gln Ile Gly Glu Phe Gln Cys Ile Cys Met			
[0174]	1	5	10	
[0175]	<210>	19		
[0176]	<211>	12		
[0177]	<212>	PRT		
[0178]	<213>	人工序列		
[0179]	<220>			
[0180]	<223>	由Notch1设计的肽		
[0181]	<400>	19		
[0182]	Cys Leu Asp Gln Ile Gly Glu Phe Gln Cys Ile Cys			
[0183]	1	5	10	
[0184]	<210>	20		
[0185]	<211>	11		
[0186]	<212>	PRT		
[0187]	<213>	人工序列		
[0188]	<220>			
[0189]	<223>	由Notch1设计的肽		
[0190]	<400>	20		
[0191]	Cys Leu Asp Gln Ile Gly Glu Phe Gln Cys Ile			
[0192]	1	5	10	
[0193]	<210>	21		
[0194]	<211>	10		

[0195]	<212>	PRT
[0196]	<213>	人工序列
[0197]	<220>	
[0198]	<223>	由Notch1设计的肽
[0199]	<400>	21
[0200]		Cys Leu Asp Gln Ile Gly Glu Phe Gln Cys
[0201]	1	5 10
[0202]	<210>	22
[0203]	<211>	9
[0204]	<212>	PRT
[0205]	<213>	人工序列
[0206]	<220>	
[0207]	<223>	由Notch1设计的肽
[0208]	<400>	22
[0209]		Cys Leu Asp Gln Ile Gly Glu Phe Gln
[0210]	1	5
[0211]	<210>	23
[0212]	<211>	8
[0213]	<212>	PRT
[0214]	<213>	人工序列
[0215]	<220>	
[0216]	<223>	由Notch1设计的肽
[0217]	<400>	23
[0218]		Cys Leu Asp Gln Ile Gly Glu Phe
[0219]	1	5
[0220]	<210>	24
[0221]	<211>	7
[0222]	<212>	PRT
[0223]	<213>	人工序列
[0224]	<220>	
[0225]	<223>	由Notch1设计的肽
[0226]	<400>	24
[0227]		Cys Leu Asp Gln Ile Gly Glu
[0228]	1	5
[0229]	<210>	25
[0230]	<211>	6
[0231]	<212>	PRT
[0232]	<213>	人工序列
[0233]	<220>	

- [0234] <223> 由Notch1设计的肽
[0235] <400> 25
[0236] Cys Leu Asp Gln Ile Gly
[0237] 1 5
[0238] <210> 26
[0239] <211> 5
[0240] <212> PRT
[0241] <213> 人工序列
[0242] <220>
[0243] <223> 由Notch1设计的肽
[0244] <400> 26
[0245] Cys Leu Asp Gln Ile
[0246] 1 5
[0247] <210> 27
[0248] <211> 4
[0249] <212> PRT
[0250] <213> 人工序列
[0251] <220>
[0252] <223> 由Notch1设计的肽
[0253] <400> 27
[0254] Cys Leu Asp Gln
[0255] 1
[0256] <210> 28
[0257] <211> 11
[0258] <212> PRT
[0259] <213> 人工序列
[0260] <220>
[0261] <223> 由Notch1设计的肽
[0262] <400> 28
[0263] Ile Gly Glu Phe Gln Cys Ile Cys Met Pro Gly
[0264] 1 5 10
[0265] <210> 29
[0266] <211> 16
[0267] <212> PRT
[0268] <213> 人工序列
[0269] <220>
[0270] <223> 由Notch1设计的肽
[0271] <400> 29
[0272] Thr Cys Leu Asp Gln Ile Gly Glu Phe Gln Cys Ile Cys Met Pro Gly

[0273]	1	5	10	15
[0274]	<210>	30		
[0275]	<211>	16		
[0276]	<212>	PRT		
[0277]	<213>	人工序列		
[0278]	<220>			
[0279]	<223>	由Notch1设计的肽		
[0280]	<400>	30		
[0281]	Leu Cys Leu Asp Gln Ile Gly Glu Phe Gln Cys Ile Cys Met Pro Gly			
[0282]	1	5	10	15
[0283]	<210>	31		
[0284]	<211>	16		
[0285]	<212>	PRT		
[0286]	<213>	人工序列		
[0287]	<220>			
[0288]	<223>	由Notch1设计的肽		
[0289]	<400>	31		
[0290]	Lys Cys Leu Asp Gln Ile Gly Glu Phe Gln Cys Ile Cys Met Pro Gly			
[0291]	1	5	10	15
[0292]	<210>	32		
[0293]	<211>	16		
[0294]	<212>	PRT		
[0295]	<213>	人工序列		
[0296]	<220>			
[0297]	<223>	由Notch1设计的肽		
[0298]	<400>	32		
[0299]	Gln Cys Leu Asp Gln Ile Gly Glu Phe Gln Cys Ile Cys Met Pro Gly			
[0300]	1	5	10	15
[0301]	<210>	33		
[0302]	<211>	13		
[0303]	<212>	PRT		
[0304]	<213>	人工序列		
[0305]	<220>			
[0306]	<223>	由Notch1设计的肽		
[0307]	<400>	33		
[0308]	Cys Leu Asp Gln Ile Gly Glu Phe Gln Cys Ile Cys Asp			
[0309]	1	5	10	
[0310]	<210>	34		
[0311]	<211>	13		

- [0312] <212> PRT
- [0313] <213> 人工序列
- [0314] <220>
- [0315] <223> 由Notch1设计的肽
- [0316] <400> 34
- [0317] Cys Leu Asp Gln Ile Gly Glu Phe Gln Cys Ile Cys Glu
- [0318] 1 5 10
- [0319] <210> 35
- [0320] <211> 13
- [0321] <212> PRT
- [0322] <213> 人工序列
- [0323] <220>
- [0324] <223> 由Notch1设计的肽
- [0325] <400> 35
- [0326] Cys Leu Asp Gln Trp Gly Glu Phe Gln Cys Ile Cys Met
- [0327] 1 5 10
- [0328] <210> 36
- [0329] <211> 14
- [0330] <212> PRT
- [0331] <213> 人工序列
- [0332] <220>
- [0333] <223> 由Notch1设计的肽
- [0334] <400> 36
- [0335] Leu Cys Leu Asp Gln Ile Gly Glu Phe Gln Cys Ile Cys Glu
- [0336] 1 5 10
- [0337] <210> 37
- [0338] <211> 14
- [0339] <212> PRT
- [0340] <213> 人工序列
- [0341] <220>
- [0342] <223> 由Notch1设计的肽
- [0343] <400> 37
- [0344] Ile Cys Leu Asp Gln Ile Gly Glu Phe Gln Cys Ile Cys Glu
- [0345] 1 5 10
- [0346] <210> 38
- [0347] <211> 14
- [0348] <212> PRT
- [0349] <213> 人工序列
- [0350] <220>

[0351]	<223>	由Notch1设计的肽
[0352]	<400>	38
[0353]		Trp Cys Leu Asp Gln Ile Gly Glu Phe Gln Cys Ile Cys Glu
[0354]	1	5 10
[0355]	<210>	39
[0356]	<211>	14
[0357]	<212>	PRT
[0358]	<213>	人工序列
[0359]	<220>	
[0360]	<223>	由Notch1设计的肽
[0361]	<400>	39
[0362]		Phe Cys Leu Asp Gln Ile Gly Glu Phe Gln Cys Ile Cys Glu
[0363]	1	5 10
[0364]	<210>	40
[0365]	<211>	14
[0366]	<212>	PRT
[0367]	<213>	人工序列
[0368]	<220>	
[0369]	<223>	由Notch1设计的肽
[0370]	<400>	40
[0371]		Tyr Cys Leu Asp Gln Ile Gly Glu Phe Gln Cys Ile Cys Glu
[0372]	1	5 10
[0373]	<210>	41
[0374]	<211>	17
[0375]	<212>	PRT
[0376]	<213>	人工序列
[0377]	<220>	
[0378]	<223>	用作抑制Jag1-Notch1的肽
[0379]	<220>	
[0380]	<221>	MISC_FEATURE
[0381]	<222>	(1) .. (1)
[0382]	<223>	Phe, Ile, Leu, Trp, Tyr 或无
[0383]	<220>	
[0384]	<221>	MISC_FEATURE
[0385]	<222>	(13) .. (13)
[0386]	<223>	Asp, Glu, Gly, Met, Pro 或无
[0387]	<220>	
[0388]	<221>	MISC_FEATURE
[0389]	<222>	(14) .. (14)

- [0390] <223> Asp, Glu, Gly, Met, Pro 或无
 [0391] <220>
 [0392] <221> MISC_FEATURE
 [0393] <222> (15) .. (15)
 [0394] <223> Asp, Glu, Gly, Met, Pro 或无
 [0395] <220>
 [0396] <221> MISC_FEATURE
 [0397] <222> (16) .. (16)
 [0398] <223> Asp, Glu, Gly, Met, Pro 或无
 [0399] <220>
 [0400] <221> MISC_FEATURE
 [0401] <222> (17) .. (17)
 [0402] <223> Asp, Glu, Gly, Met, Pro 或无
 [0403] <400> 41
 [0404] Xaa Cys Leu Asp Gln Ile Gly Glu Phe Gln Cys Ile Xaa Xaa Xaa Xaa
 [0405] 1 5 10 15
 [0406] Xaa
 [0407] <210> 42
 [0408] <211> 17
 [0409] <212> PRT
 [0410] <213> 人工序列
 [0411] <220>
 [0412] <223> 用作抑制Jag1-Notch1的肽
 [0413] <220>
 [0414] <221> MISC_FEATURE
 [0415] <222> (1) .. (1)
 [0416] <223> Phe, Ile, Leu, Trp, Tyr 或无
 [0417] <220>
 [0418] <221> MISC_FEATURE
 [0419] <222> (14) .. (14)
 [0420] <223> Asp, Glu, Gly, Met 或 Pro
 [0421] <220>
 [0422] <221> MISC_FEATURE
 [0423] <222> (15) .. (15)
 [0424] <223> Asp, Glu, Gly, Met, Pro 或无
 [0425] <220>
 [0426] <221> MISC_FEATURE
 [0427] <222> (16) .. (16)
 [0428] <223> Asp, Glu, Gly, Met, Pro 或无

[0429]	<220>			
[0430]	<221>	MISC_FEATURE		
[0431]	<222>	(17) .. (17)		
[0432]	<223>	Asp, Glu, Gly, Met, Pro 或无		
[0433]	<400>	42		
[0434]		Xaa Cys Leu Asp Gln Ile Gly Glu Phe Gln Cys Ile Cys Xaa Xaa Xaa		
[0435]		1	5	10 15
[0436]		Xaa		
[0437]	<210>	43		
[0438]	<211>	14		
[0439]	<212>	PRT		
[0440]	<213>	人工序列		
[0441]	<220>			
[0442]	<223>	用作抑制Jag1-Notch1的肽		
[0443]	<220>			
[0444]	<221>	MISC_FEATURE		
[0445]	<222>	(1) .. (1)		
[0446]	<223>	Phe, Ile, Leu, Trp, Tyr 或无		
[0447]	<220>			
[0448]	<221>	MISC_FEATURE		
[0449]	<222>	(14) .. (14)		
[0450]	<223>	Asp 或 Glu		
[0451]	<400>	43		
[0452]		Xaa Cys Leu Asp Gln Ile Gly Glu Phe Gln Cys Ile Cys Xaa		
[0453]		1	5	10

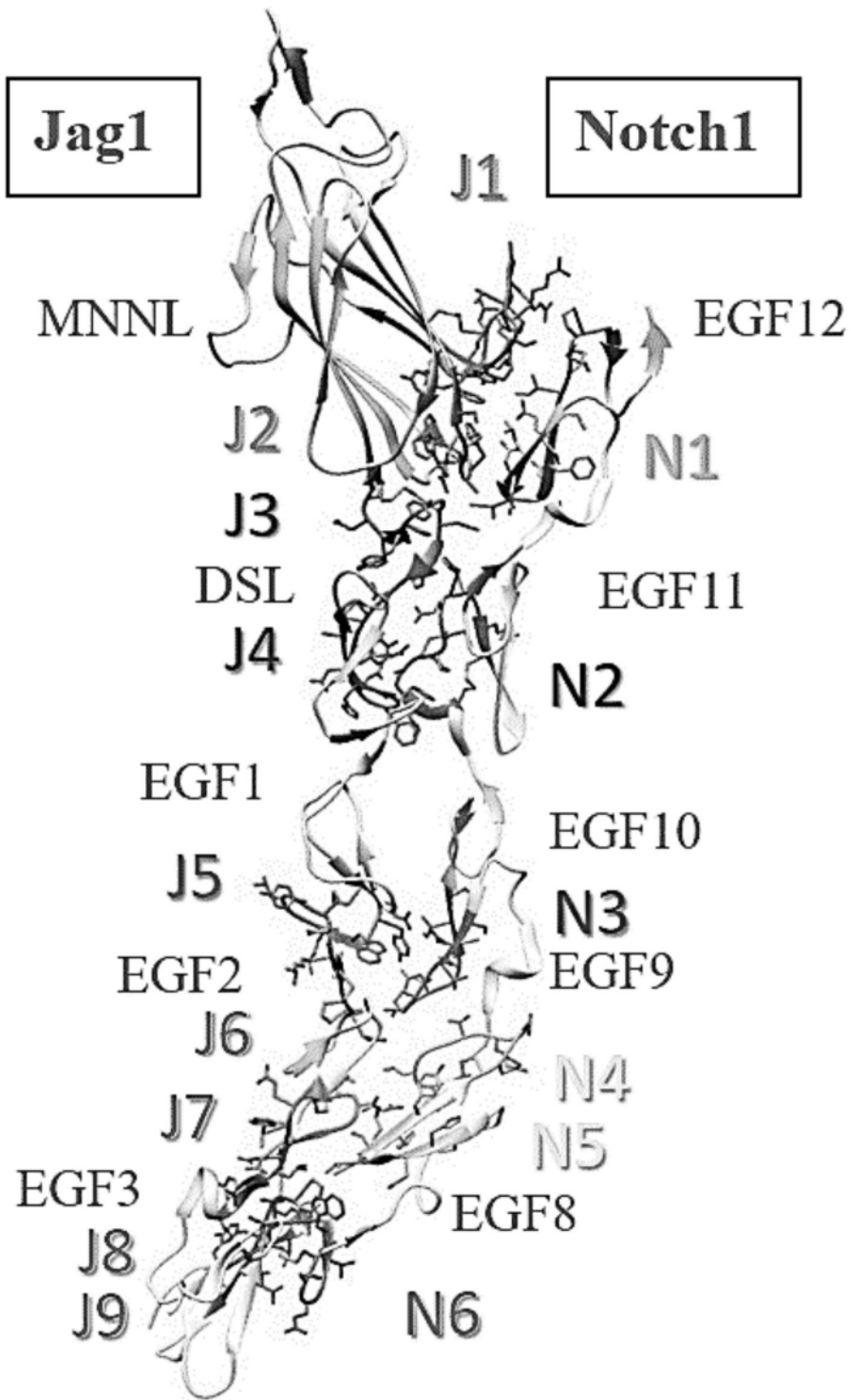


图1A

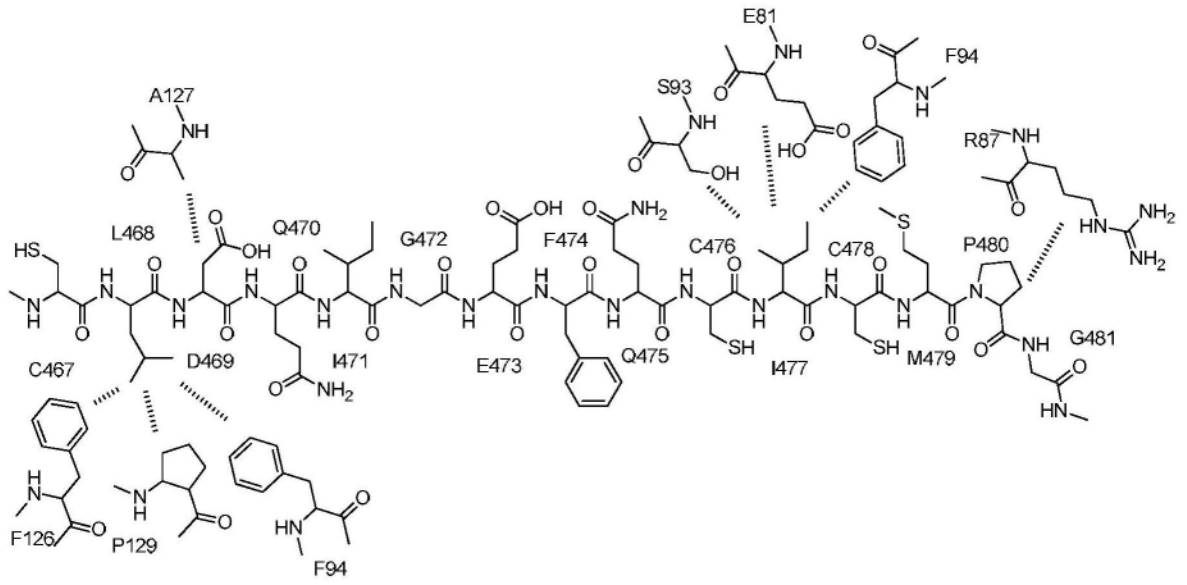


图1B

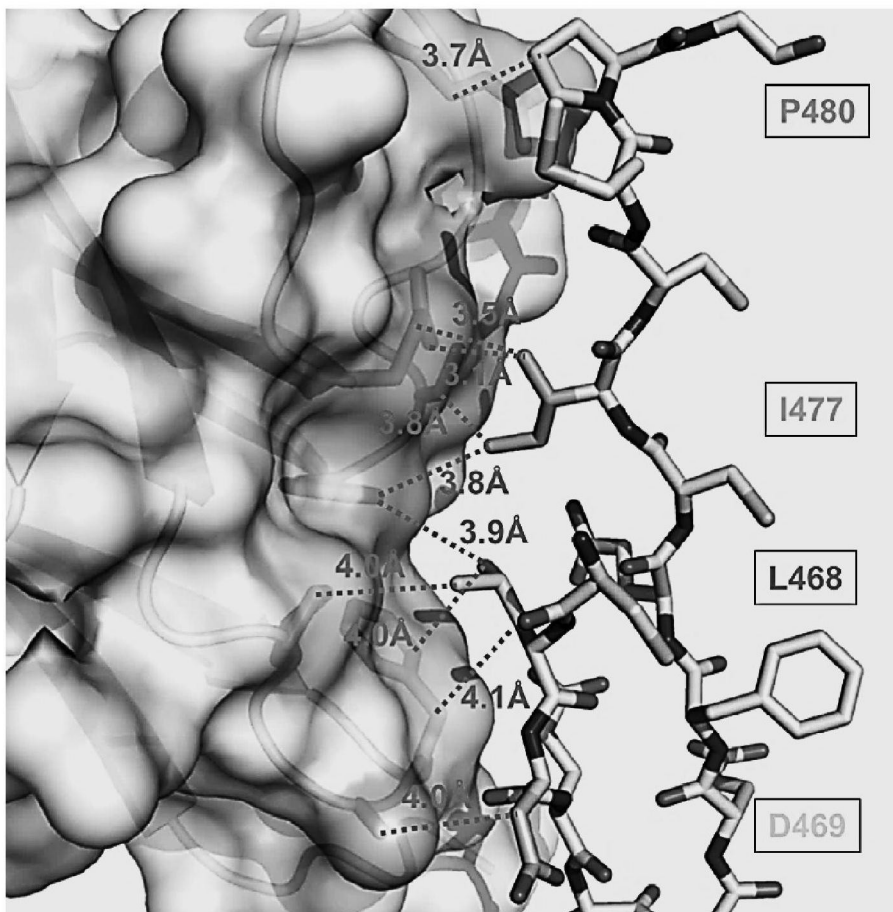


图1C

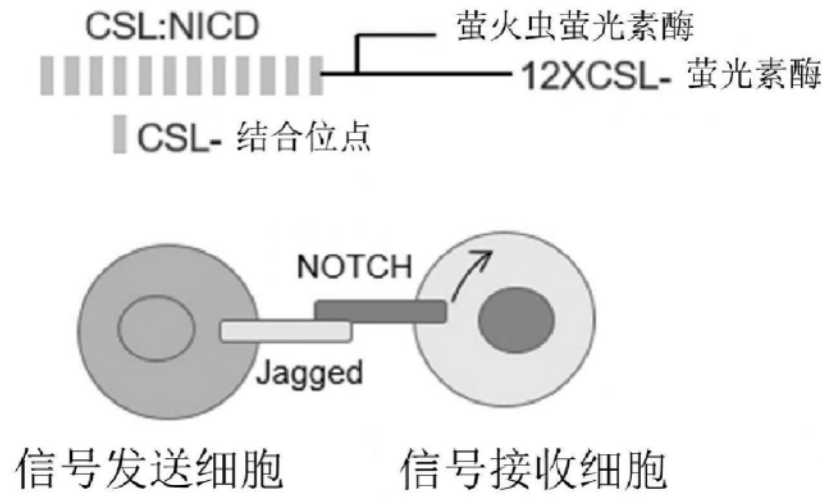


图1D

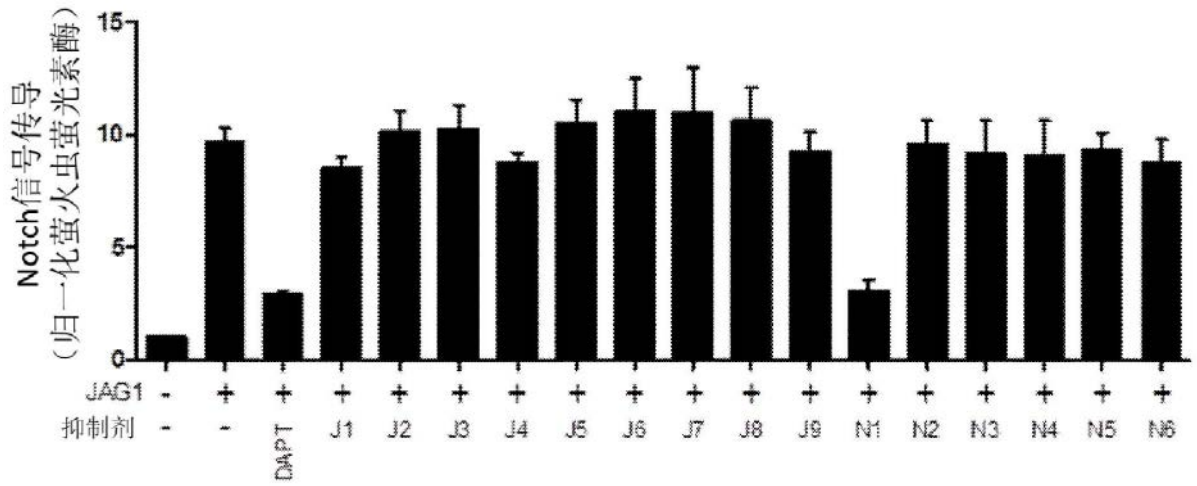


图2A

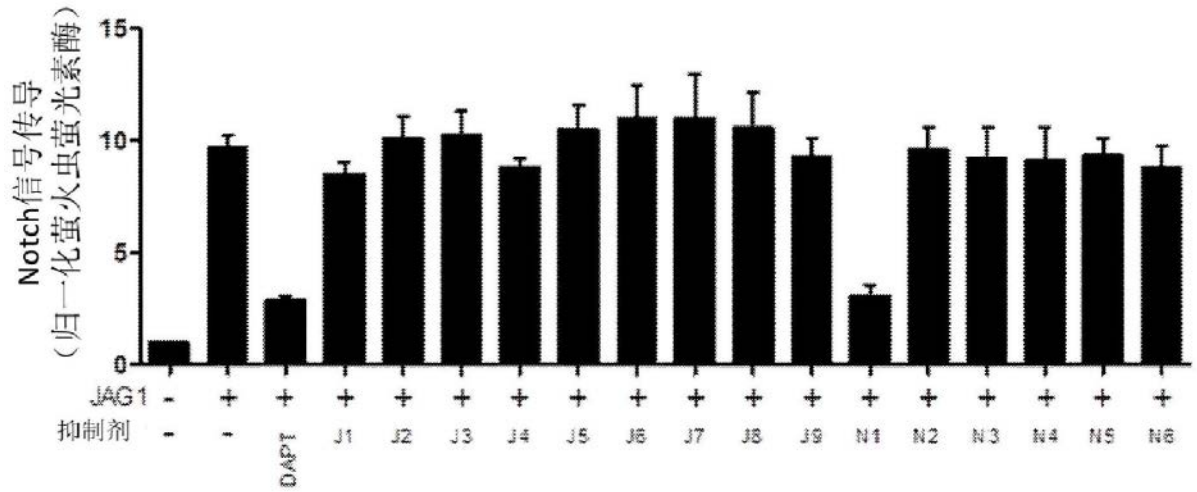


图2B

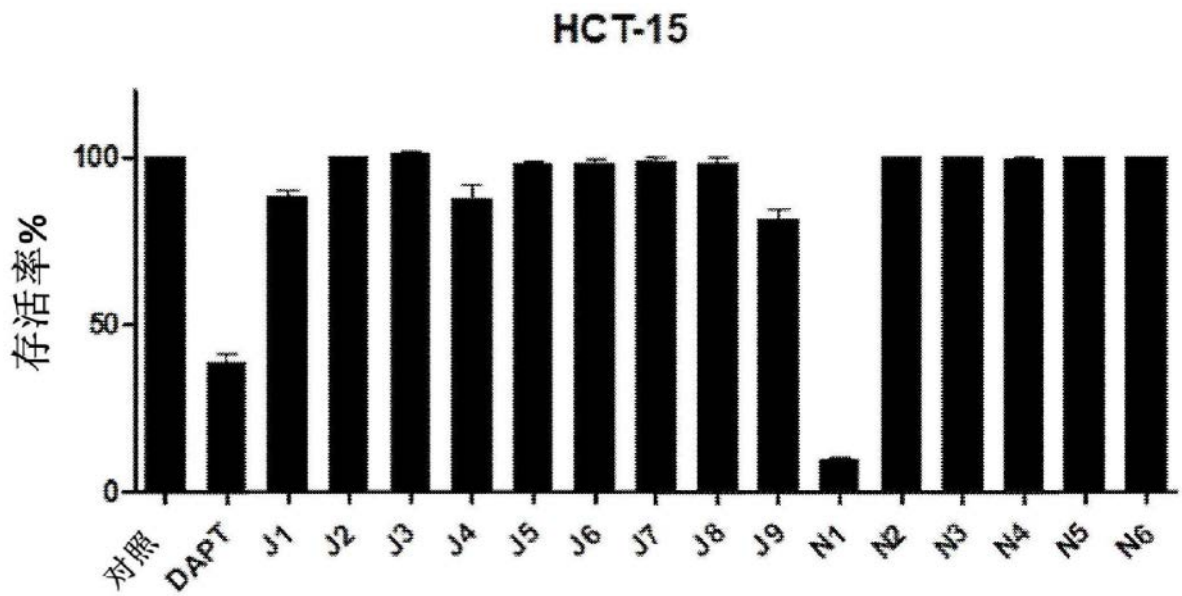


图2C

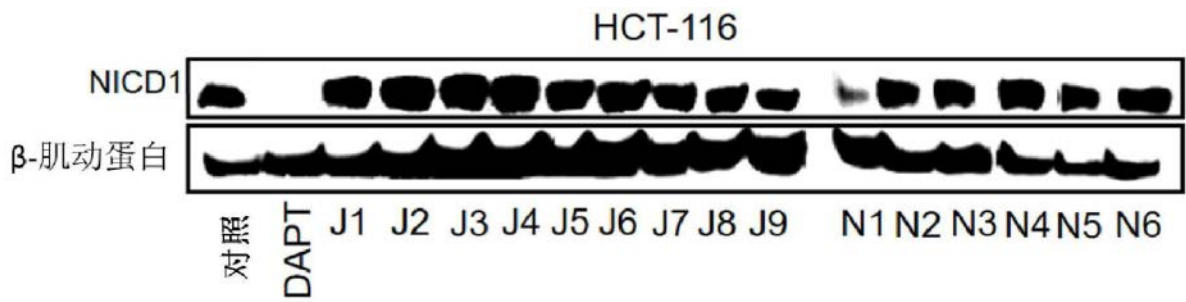


图2D

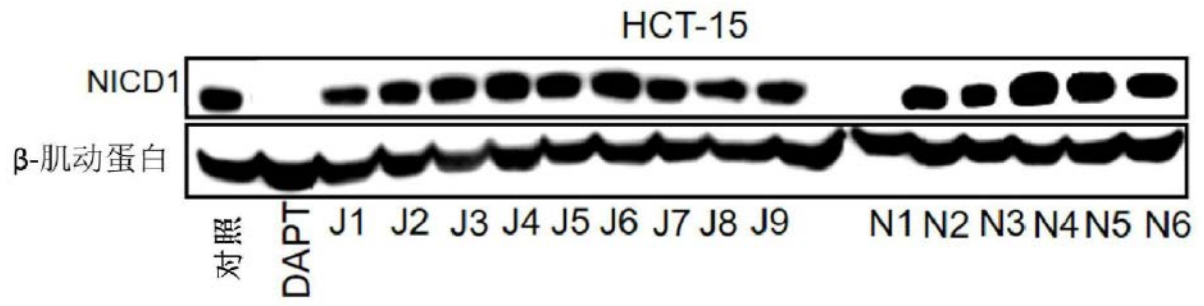


图2E

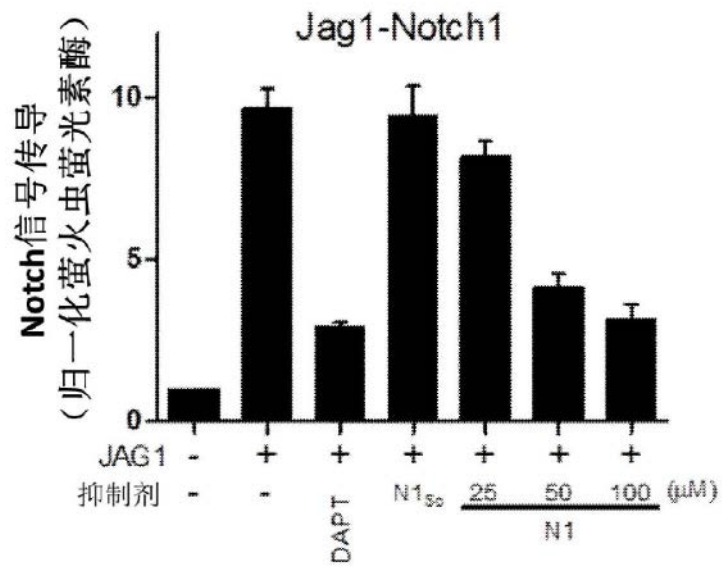


图3A

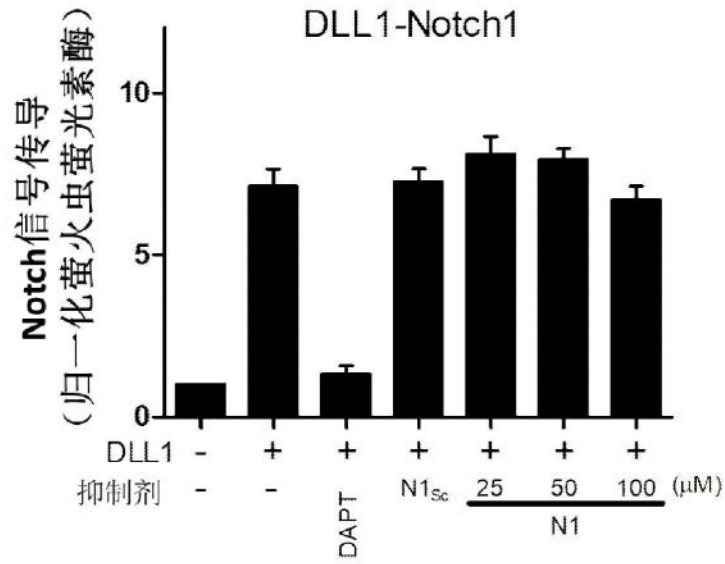


图3B

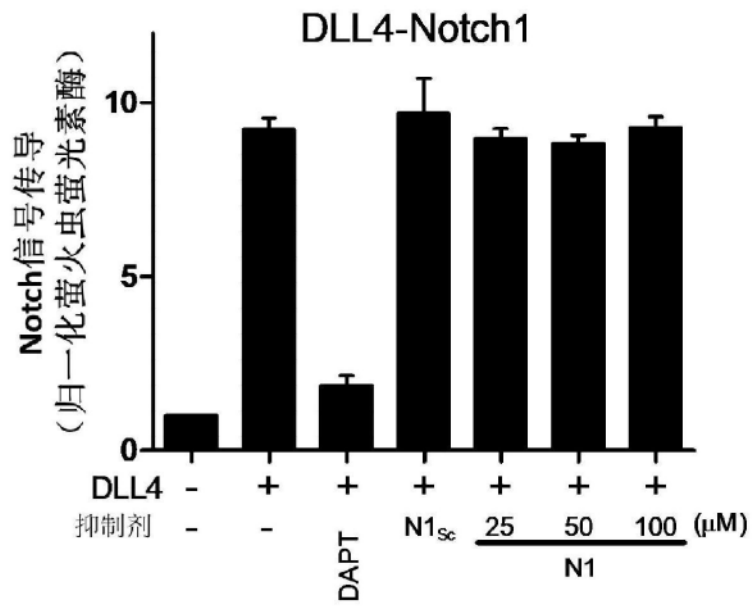


图3C

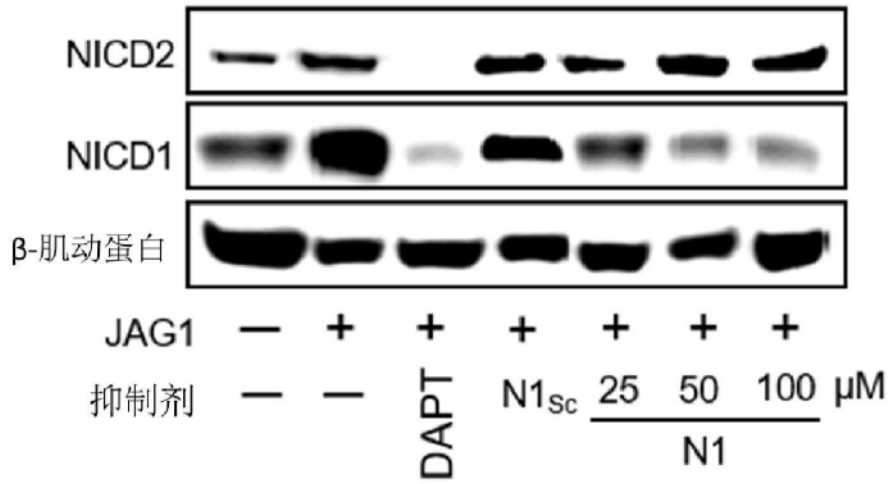


图3D

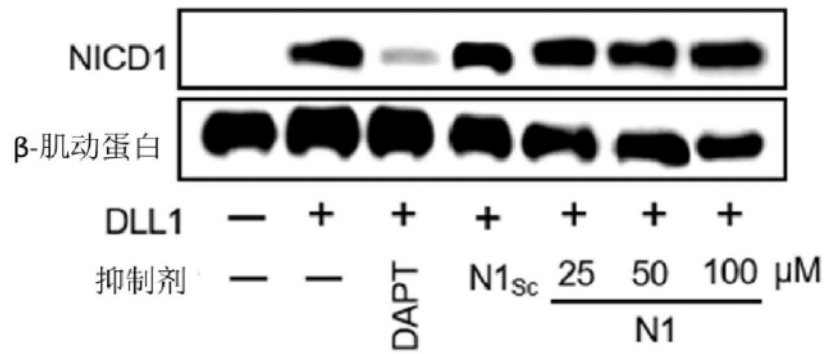


图3E

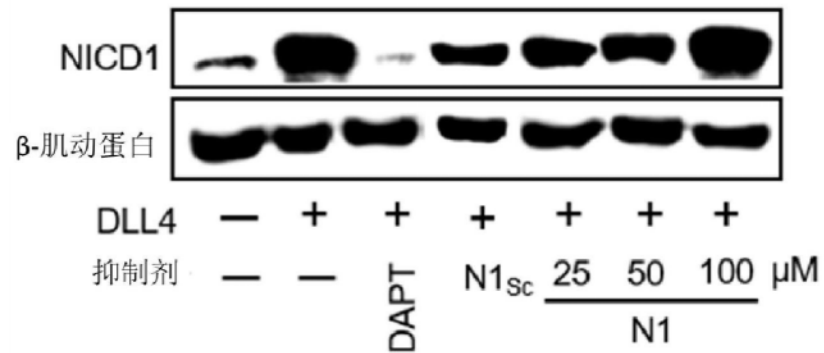


图3F

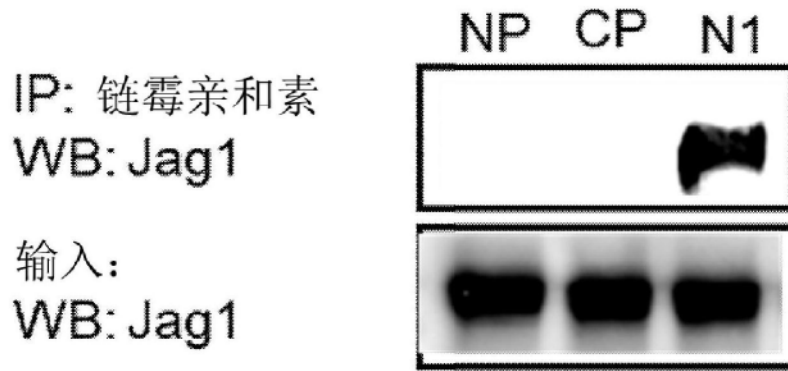


图3G

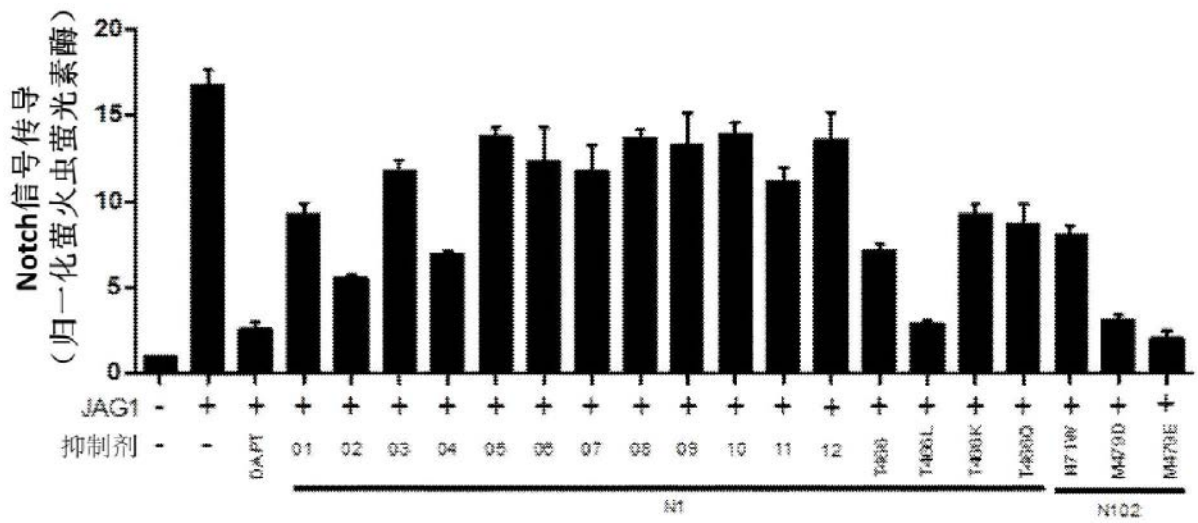


图4A

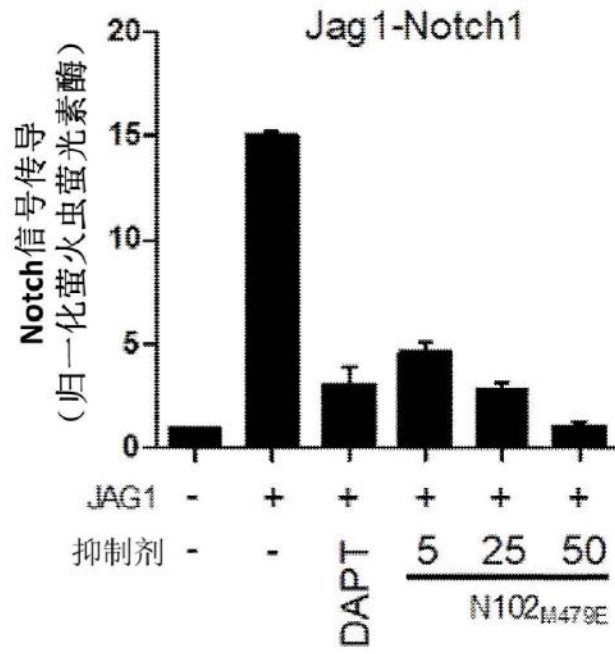


图4B

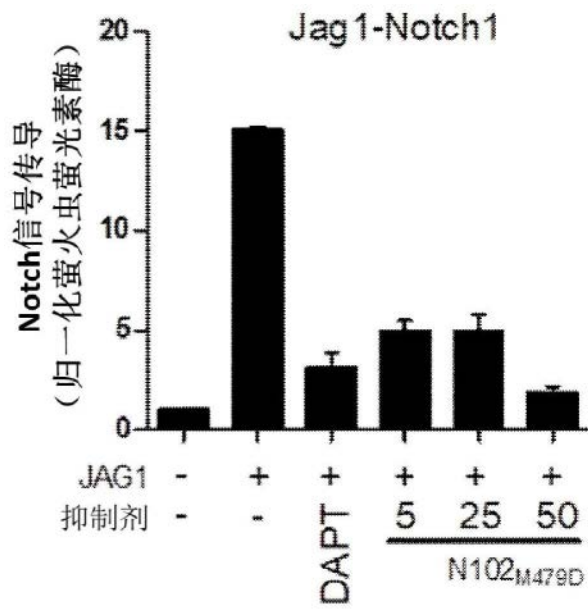


图4C

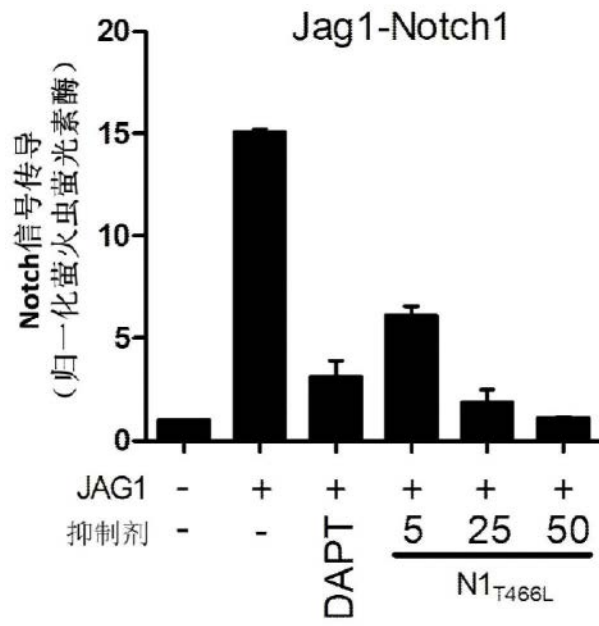


图4D

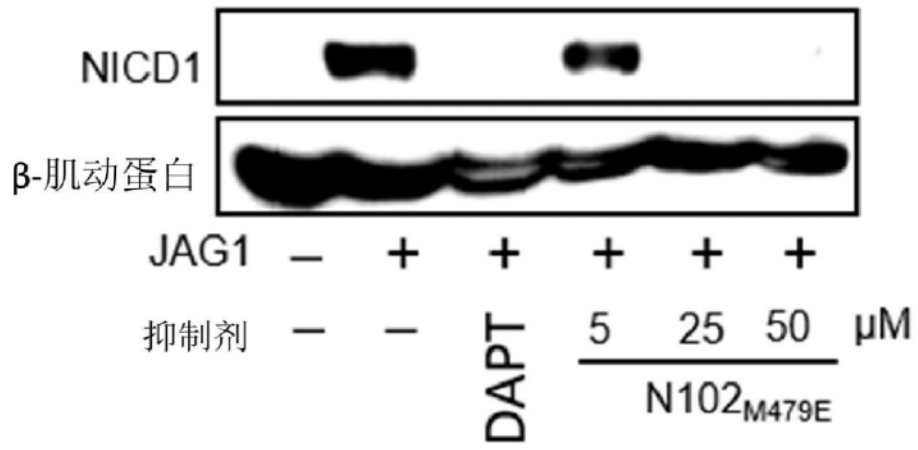


图4E

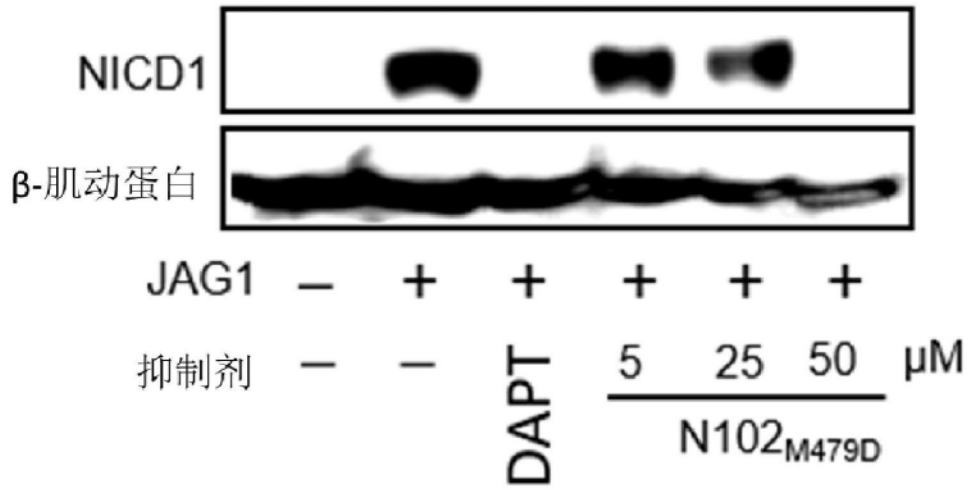


图4F

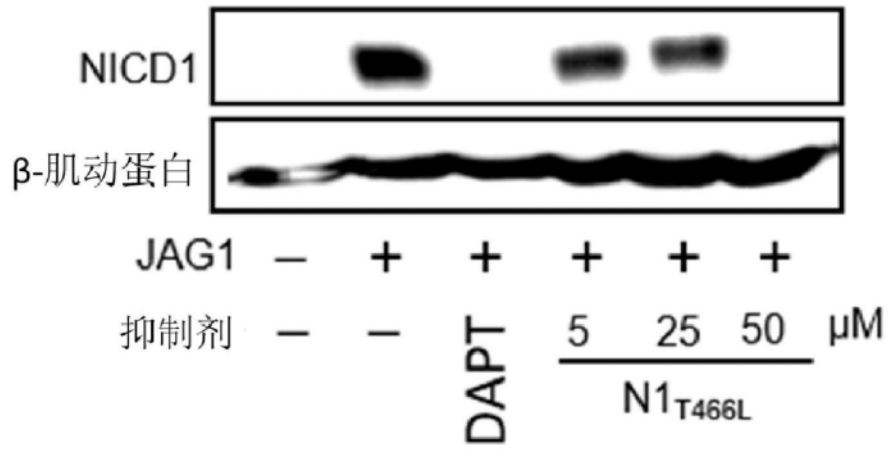


图4G

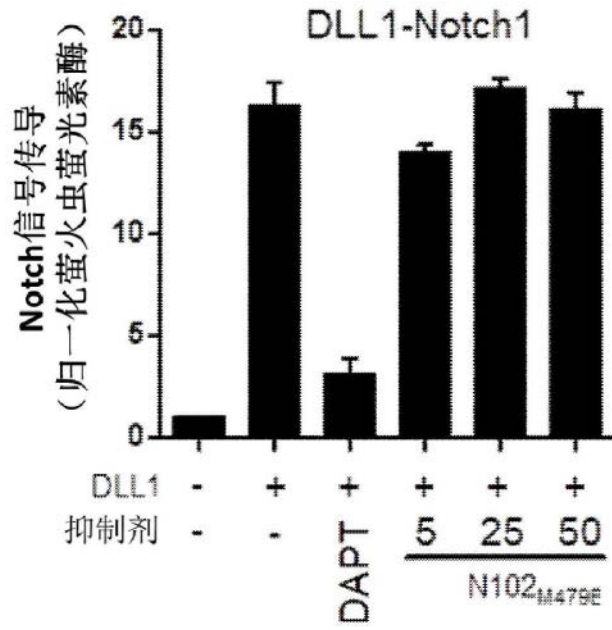


图5A

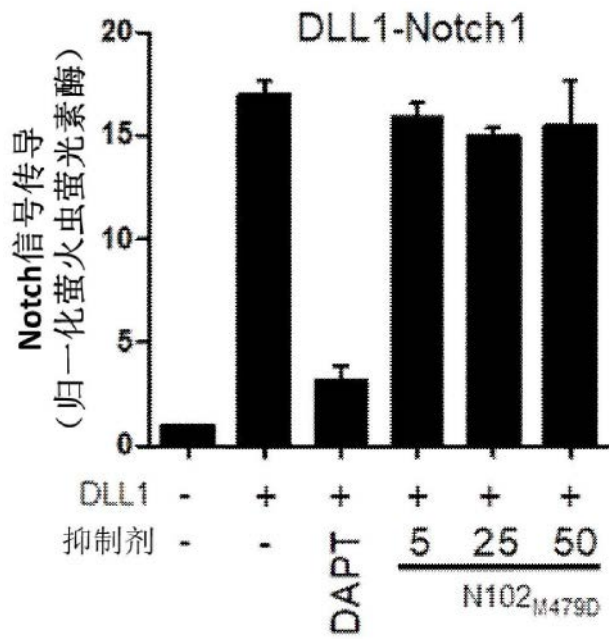


图5B

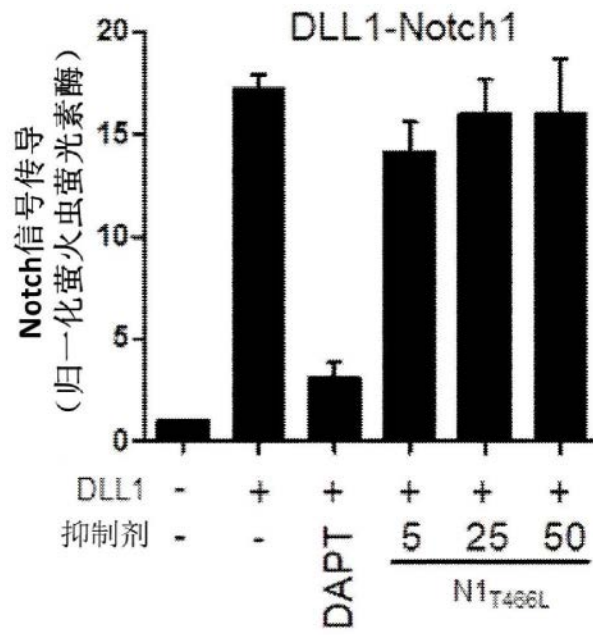


图5C

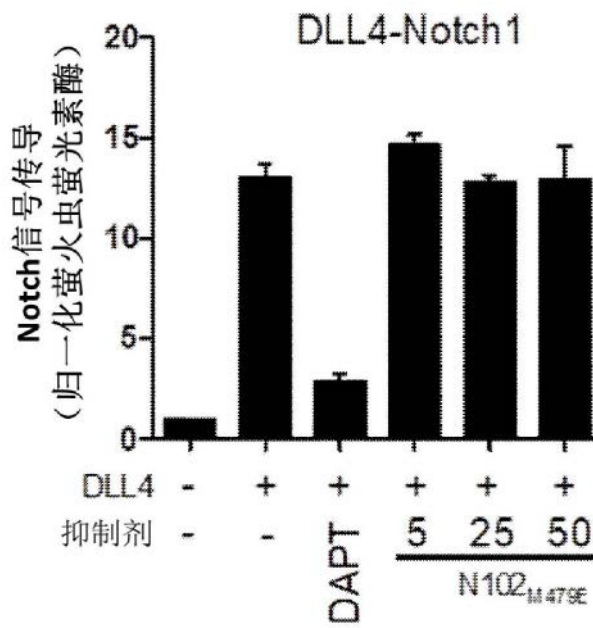


图5D

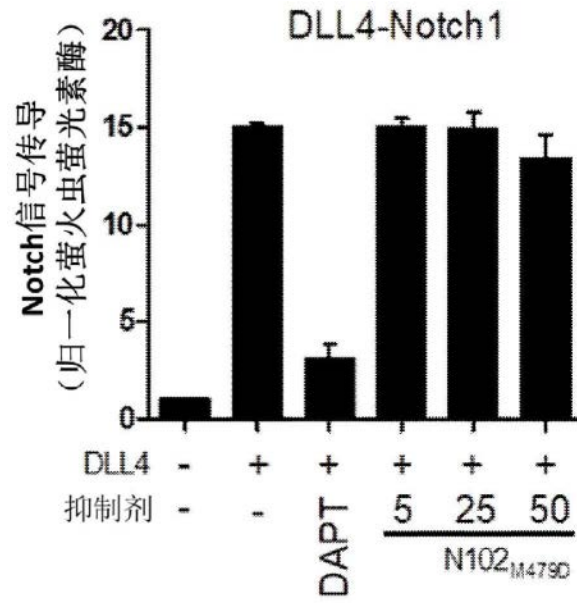


图5E

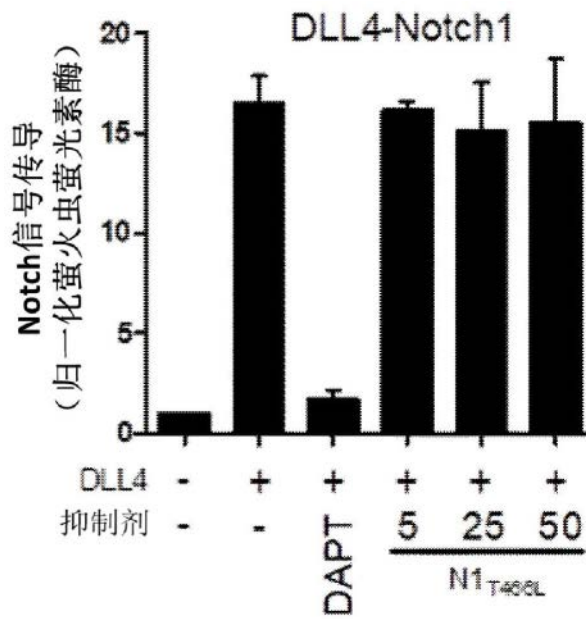


图5F

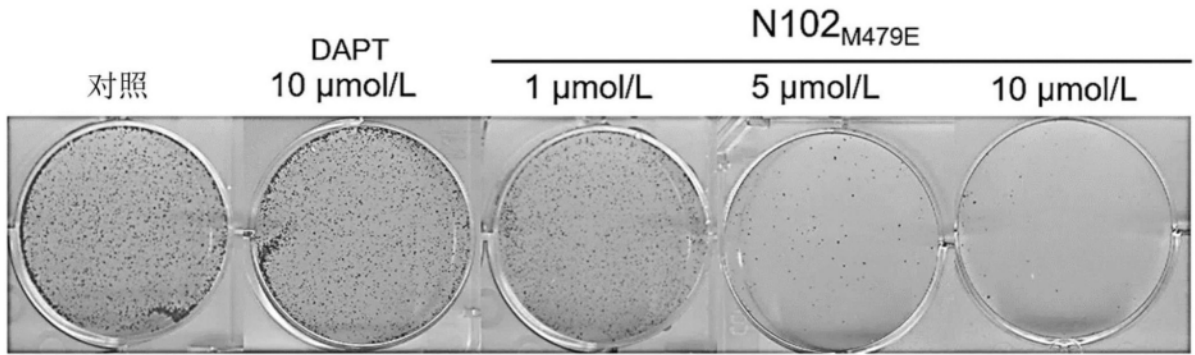


图6A

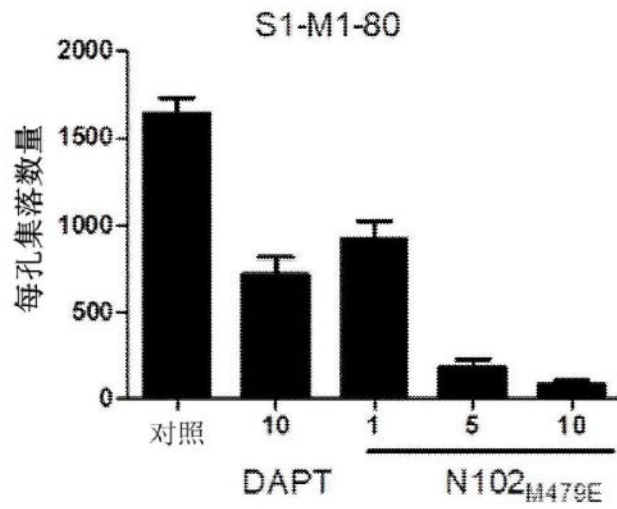


图6B

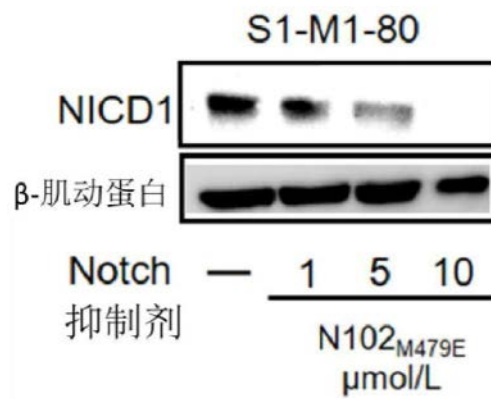


图6C

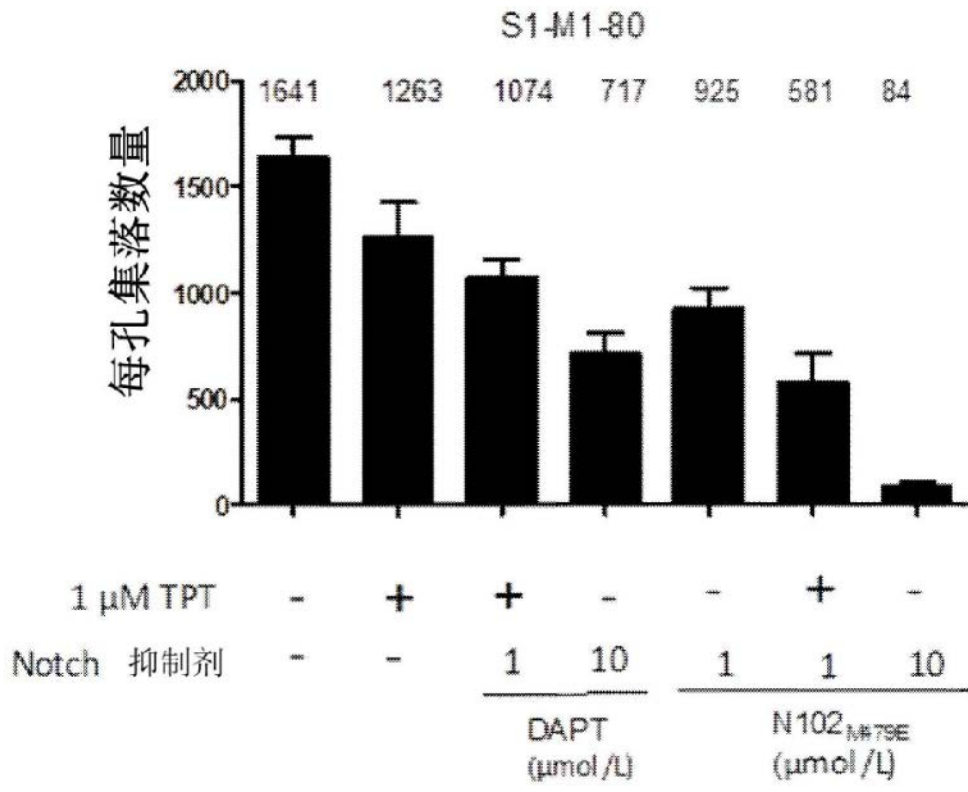


图7