



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117683094 A

(43) 申请公布日 2024. 03. 12

(21) 申请号 202311450219.7

(22) 申请日 2023.11.02

(71) 申请人 上海市同济医院

地址 200333 上海市普陀区新村路389号

(72) 发明人 宣淼 薛莹 方萍 宋利格 刘琦

谢壮丽 李颖

(74) 专利代理机构 上海申新律师事务所 31272

专利代理师 刘娇

(51) Int. Cl.

C07K 7/64 (2006.01)

A61K 38/12 (2006.01)

A61P 19/10 (2006.01)

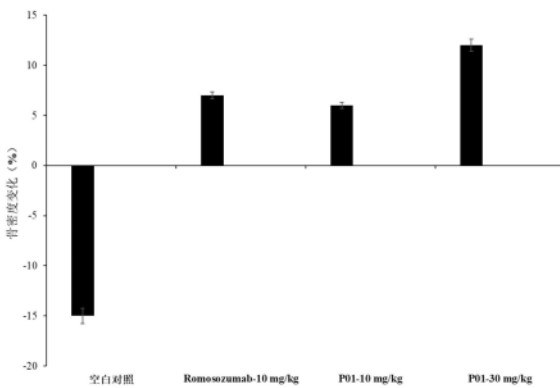
权利要求书1页 说明书4页
序列表（电子公布） 附图1页

(54) 发明名称

一种硬骨素结合环肽及其应用

(57) 摘要

本发明提供了一种硬骨素结合环肽及其应用。该硬骨素结合环肽的结构简式为 $^D\text{PX}_1\text{X}_2\text{QDYX}_3\text{X}_4\text{PX}_5\text{X}_6^L\text{P}$, 其中 ^DP 和 ^LP 通过氨基酸的脱水缩合反应进行环合; X_1 为苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸; X_2 为丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、甲硫氨酸或半胱氨酸; X_3 为丝氨酸、苏氨酸或半胱氨酸; X_4 为甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸、缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸; X_5 为丝氨酸、苏氨酸、精氨酸、赖氨酸或组氨酸。该环肽能够以纳摩尔级别的亲和力与硬骨素结合, 从而阻断硬骨素与LRP-6的结合, 且显示出优秀的提升骨密度能力。同时环肽相对于单抗来说, 不存在免疫风险, 安全性和经济性更为优秀。因此该硬骨素结合环肽具有治疗骨质疏松相关适应症的潜力。



1. 一种硬骨素结合环肽, 其特征在于, 所述硬骨素结合环肽的结构简式如下式I:
$$^D\text{P}X_1X_2\text{QDYX}_3X_4\text{PX}_5^L\text{P(I)}$$

其中:

^DP 和 ^LP 通过氨基酸的脱水缩合反应进行环合;

X_1 为苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸;

X_2 为丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、甲硫氨酸或半胱氨酸;

X_3 为丝氨酸、苏氨酸或半胱氨酸;

X_4 为甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸、缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸;

X_5 为丝氨酸、苏氨酸、精氨酸、赖氨酸或组氨酸。

2. 根据权利要求1所述的硬骨素结合环肽, 其特征在于, X_1 为苯丙氨酸。

3. 根据权利要求1所述的硬骨素结合环肽, 其特征在于, X_2 为谷氨酰胺、天冬氨酸或半胱氨酸, 优选为谷氨酰胺。

4. 根据权利要求1所述的硬骨素结合环肽, 其特征在于, X_3 为丝氨酸或苏氨酸, 优选为苏氨酸。

5. 根据权利要求1所述的硬骨素结合环肽, 其特征在于, X_4 为缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸, 优选为缬氨酸。

6. 根据权利要求1所述的硬骨素结合环肽, 其特征在于, X_5 为丝氨酸或苏氨酸, 优选为苏氨酸。

7. 根据权利要求1所述的硬骨素结合环肽, 其特征在于, 所述硬骨素结合环肽的氨基酸序列选自SEQ ID NO:1~4中的一条, 优选为SEQ ID NO:1。

8. 如权利要求1-7任一项所述硬骨素结合环肽在制备治疗骨质疏松药物中的应用, 其特征在于, 所述药物包括硬骨素结合环肽作为有效活性成分。

9. 根据权利要求8所述的应用, 其特征在于, 所述药物还包括药学上可接受的载体或赋形剂。

10. 一种治疗骨质疏松的药物或药物组合物, 其特征在于, 包括如权利要求1-7任一项所述的硬骨素结合环肽作为有效活性成分。

一种硬骨素结合环肽及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药技术领域,具体涉及一种硬骨素结合环肽及其应用。

背景技术

[0002] 在我国,50%的绝经后妇女和60%的60岁以上老年人的骨量低下、骨微结构损坏,从而造成骨强度下降、骨脆性增加、容易发生骨折等全身性骨代谢障碍性疾病,即骨质疏松症(Eastell R.et al.Nat.Rev.Dis.Primers,2016,2,16069;Black DM.et al,N.Engl.J.Med.2016,374,354-262)。根据流行病学调查显示,我国50岁以上人群中骨质疏松的发病率为19.2%,其中女性为32.1%、男性为6.9%;65岁以上人群中骨质疏松的发病率为32%,其中女性为51.6%、男性为10.7%(《中国骨质疏松症流行病调查结果》,国家卫生健康委,2018)。

[0003] 硬骨素是由SOST基因编码的分泌糖蛋白,可以调节成骨细胞合成和代谢,是一种骨形成的负调控因子。有研究表明SOST基因表达低或者缺乏SOST基因表达会导致硬化性骨化病(Balemans et al.,Human Mol.Genet.,2001,10,547-543;Brunkow et al.,Am.J.Human Genet.,2001,68,577-589)。硬骨素可以与骨形态发生蛋白BMP以及低密度脂蛋白受体LRP5/6结合,从而抑制Wnt信号通路并控制骨生成(Winkler et al.EMBO J.,2003,22,6267-6276;Li X.et al.,J.Biol.Chem.2005,280,19883-19887)。因此,硬骨素已经成为治疗骨质疏松的生物靶点。

[0004] Romosozumab是由Amgen和优时比公司共同开发的靶向硬骨素的人源化IgG2抗体,于2019年4月在美国获批上市用于治疗高骨折风险绝经妇女和高骨折风险男性的骨质疏松症。临床试验表明,Romosozumab单独使用,每月给药一次,一年后可以使患者骨密度增加5-13%,发生椎骨骨折的风险降低73%;与阿仑膦酸钠相比,Romosozumab可以使患者骨密度增加3-8%,发生椎骨骨折的风险降低50%(Cosman F.et al.,N.Engl.J.Med.2016,375,1532-1543;Saag KG et al.,N.Engl.J.Med.2017,377,1417-1427;Langdahl BL,et al.,Lancet 2017,390,1585-1594)。此外,Lilly、Novartis和恒瑞医药等公司分别推出了硬骨素单抗药物,目前处于临床2-3期阶段。

[0005] 但是这些单抗药物的使用会带来免疫反应的风险,比如急性过敏反应、血清病和抗抗体的产生等。以前述的Romosozumab为例,其常见的不良事件有关节痛,头痛,肌肉痉挛,外围水肿,乏力,颈部疼痛,失眠,皮肤感觉异常等。此外Romosozumab的说明书中还有黑框警告,该药可能会增加心肌梗死、中风和心血管死亡的风险,在一年内心脏病发作或中风的患者不能使用该药。相比于单克隆抗体,多肽药物的免疫风险较低,安全性更加出色。但目前用于治疗骨质疏松症的有效多肽药物较少。

发明内容

[0006] 为了克服现有技术中的缺陷,本发明提供了一种硬骨素结合环肽,其能够以高亲和力和硬骨素结合,从而阻断硬骨素与低密度脂蛋白受体LRP6的结合。

- [0007] 为实现上述目的,本发明采用如下技术方案:
- [0008] 本发明的第一方面是提供一种硬骨素结合环肽,其结构简式如下式I:
- [0009] ${}^D\text{PX}_1\text{X}_2\text{QDYX}_3\text{X}_3\text{PX}_4\text{X}_5\text{L}^{\text{P}}$ (I)
- [0010] 其中:
- [0011] ${}^D\text{P}$ 和 ${}^L\text{P}$ 通过氨基酸的脱水缩合反应进行环合;
- [0012] X_1 为苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸;
- [0013] X_2 为丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、甲硫氨酸或半胱氨酸;
- [0014] X_3 为丝氨酸、苏氨酸或半胱氨酸;
- [0015] X_4 为甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸、缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸;
- [0016] X_5 为丝氨酸、苏氨酸、精氨酸、赖氨酸或组氨酸。
- [0017] 进一步地, X_1 为苯丙氨酸。
- [0018] 进一步地, X_2 为谷氨酰胺、天冬氨酸或半胱氨酸,优选为谷氨酰胺。
- [0019] 进一步地, X_3 为丝氨酸或苏氨酸,优选为苏氨酸。
- [0020] 进一步地, X_4 为缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸,优选为缬氨酸。
- [0021] 进一步地, X_5 为丝氨酸或苏氨酸,优选为苏氨酸。
- [0022] 进一步地,该硬骨素结合环肽的氨基酸序列选自SEQ ID NO:1~4中的一条,优选为SEQ ID NO:1。
- [0023] 本发明的第二方面是提供上述硬骨素结合环肽在制备治疗骨质疏松药物中的应用,该药物包括硬骨素结合环肽作为有效活性成分。
- [0024] 进一步地,上述药物还包括药学上可接受的载体或赋形剂。
- [0025] 本发明的第三方面是提供一种治疗骨质疏松的药物或药物组合物,其包括硬骨素结合环肽作为有效活性成分。
- [0026] 进一步地,上述药物或药物组合物还包括药学上可接受的载体或赋形剂。
- [0027] 本发明采用以上技术方案,与现有技术相比,具有如下技术效果:
- [0028] 本发明提供的硬骨素结合环肽能够以纳摩尔级别的亲和力与硬骨素结合,从而阻断硬骨素与LRP-6的结合。环肽P01与硬骨素的亲和力与硬骨素单抗Romosozumab相似,且体外对于硬骨素与LRP-6结合的抑制能力略优于硬骨素单抗Romosozumab,环肽P01在小鼠体内的药效评价中显示出优秀的提升骨密度能力。同时环肽相对于单抗来说,不存在免疫风险,安全性和经济性更为优秀。因此该硬骨素结合环肽具有治疗骨质疏松相关适应症的潜力。

附图说明

- [0029] 图1显示了本发明一实施例中环肽P01和Romosozumab给药处理后小鼠的骨密度的变化。

具体实施方式

- [0030] 下面通过具体实施例和附图对本发明进行详细和具体的介绍,以使更好的理解本发明,但是下述实施例并不限制本发明范围。
- [0031] 实施例中方法如无特殊说明的采用常规方法,使用的试剂如无特殊说明的使用常

规市售试剂或按常规方法配制的试剂。

[0032] 实施例1

[0033] 本实施例提供了四组硬骨素结合环肽,其氨基酸序列如下表1所示,其中^DP和^LP通过氨基酸的脱水缩合反应进行环合。

[0034] 表1.硬骨素结合环肽的氨基酸序列

名称	氨基酸序列	SEQ ID NO:
P01	^D PFQQDYTTPVS ^L P	1
P02	^D PYQQDYSSPVS ^L P	2
P03	^D PFNQDYSSPLS ^L P	3
P04	^D PYCQDYTTPIS ^L P	4

[0036] 实施例2硬骨素结合力测试

[0037] 将实施例1提供的硬骨素结合环肽P01-04共价偶联于CM5芯片 (Cat. BR-1000-12, GE) 上,将一系列浓度梯度下的人硬骨素 (由序列为SEQ ID NO:5的核酸编码纯化而得) 和小鼠硬骨素 (由序列为SEQ ID NO:6的核酸编码纯化而得) 流经CM5芯片,利用Biacore X100实时检测反应信号并获得结合和解离曲线,在每个循环解离完成后,用缓冲液A (0.01M HEPES ph 7.4, 0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.005% v/v P20) 洗净再生。实验数据用BIAevaluation version 4.1进行分析和拟合获得亲和力数值,结果如下表2所示。

[0038] 带Flag标签的人硬骨素DNA序列:

[0039] ATGGACATGAGGGTGCTGCCCAACTGCTGGGCTGTTGTTGCTTTGGTTCCCCGGAAGCAGGTGCCTCATCACCACCATCATCAGGGCTGGCAGGCCTTCAAGAACGACGCAACCGAGATTATCCCCGAAGTGGGCGAATAGGCAGACCCCCCATCATGCCGAGCCCCCTCCAGAGCTGGAGAATAACAAGACGAGAACCCAGGTACGTGACCGATGGCCCCTGGCCGAACGCTATCAGGAGACAGGTACCGCGCTCAGAGAGTGCCAGTTGTAAGTGCAAGAGGCTGGGGGGA

[0040] 带Flag标签的小鼠硬骨素DNA序列:

[0041] ATGGACATGAGGGTGCTGCCCAACGGTTCCCCGGAAGCAGGTGCCAGGGCTGGCAGGCCTTCAGGAACGACGCAACCGAGGTGATCCCCGACTGGGCGAATATCCCAGCCCCCTCCAGAGAATAACCAGACCATGAACAGGGCCGAGAACGGCGGCAGACACGACGCTAAAGGCGTGAGCGAGTACAGCTGCAGGGAGCTGCATTACACAGGTTCCTGACCGATGGCCCCCTGTAGGAGCGCCAAGCCCGTGACTGAACTGCCAGACTGCTGCCGAACGCTATCGGCAGGGTCAAGTGGTGGAGGCCAACGGGTGTGCAGCGGCTGTGTCCTGGGGGCGCCGCTCCGATGACCAGGTTCCACAACCAGAGCGAGCTGAAGGGAGCAGGCCAGGAGCACGAGGAGCCAAAGCCAATCAGGCAGAGCTCGAGAATGCCTACGACTACAAGGATGACGACGACAAGTGA (SEQ ID NO:6)

[0042] 表2.环肽对于人硬骨素和小鼠硬骨素的亲和力

测试环肽或抗体	人硬骨素K _D (nM)	小鼠硬骨素K _D (nM)
P01	3.15	4.50
P02	57.4	71.6
P03	105	>300
P04	87.2	118
Romosozumab	0.85	1.23

[0044] 由表2可知,环肽P01显示出较高的人硬骨素和小鼠硬骨素亲和力,与抗体Romosozumab的亲和力在同一数量级。此外环肽P02和P04也具备良好的人硬骨素和小鼠硬骨素亲和力。

[0045] 实施例3硬骨素-LRP-6结合阻断的能力评估

[0046] 在96孔板中每个孔加入50 μ g人LRP-6-Fc融合蛋白(R&D System,Cat.1505-LRP-025)于37 $^{\circ}$ C孵育2小时,将生物素化的人硬骨素蛋白(Abbkine,Cat.PRP100151)和测试物(环肽P01-04和Romosozumab)于37 $^{\circ}$ C共孵育2小时,弃反应液并洗板后将混合液加入酶标板于4 $^{\circ}$ C放置过夜,加入Streptavidin-peroxidase polymer(Sigma,Cat.S2438-250UG)于37 $^{\circ}$ C孵育2小时,加入TMB显色底物并室温孵育10分钟后终止反应,用酶标仪在450nm处读取吸收值并计算硬骨素与LRP-6结合阻断的IC₅₀值。

[0047] 表3.环肽P01对于硬骨素与LRP-6结合的阻断活性

[0048]	测试环肽或抗体	人硬骨素 IC ₅₀ (nM)
	P01	24.1
	Romosozumab	30.0

[0049] 实验结果如表3所示,环肽P01对于硬骨素与LRP-6结合的阻断活性略优于单抗Romosozumab。

[0050] 实施例4环肽P01小鼠体内药效评价

[0051] 将C57BL/6雌性小鼠的卵巢切除,每周2次给小鼠静脉注射环肽P01(10mg/kg或30mg/kg)或Romosozumab(10mg/kg),持续给药4周将小鼠安乐死,采血并做胫骨骨矿密度,计算百分比改变。空白对照组为卵巢切除后正常饲养小鼠(n=5)。

[0052] 实验结果如图1所示,卵巢切除后4周小鼠的骨密度下降了14%,经过每周2次静脉注射10mg/kg的Romosozumab治疗,小鼠的骨密度上升了7%,而经过每周2次静脉注射10mg/kg的环肽P01治疗,小鼠的骨密度上升了6%,与Romosozumab相似,但是经过每周2次静脉注射30mg/kg的环肽P01治疗,小鼠的骨密度上升了12%。

[0053] 综上所述,环肽P01在小鼠体内能够显著性的提升骨密度,具备治疗骨质疏松的潜质。

[0054] 以上对本发明的具体实施例进行了详细描述,但其只作为范例,本发明并不限制于以上描述的具体实施例。对于本领域技术人员而言,任何对本发明进行等同修改和替代也都在本发明的范畴之中。因此,在不脱离本发明精神和范围下所作的均等变换和修改,都应涵盖在本发明的范围内。

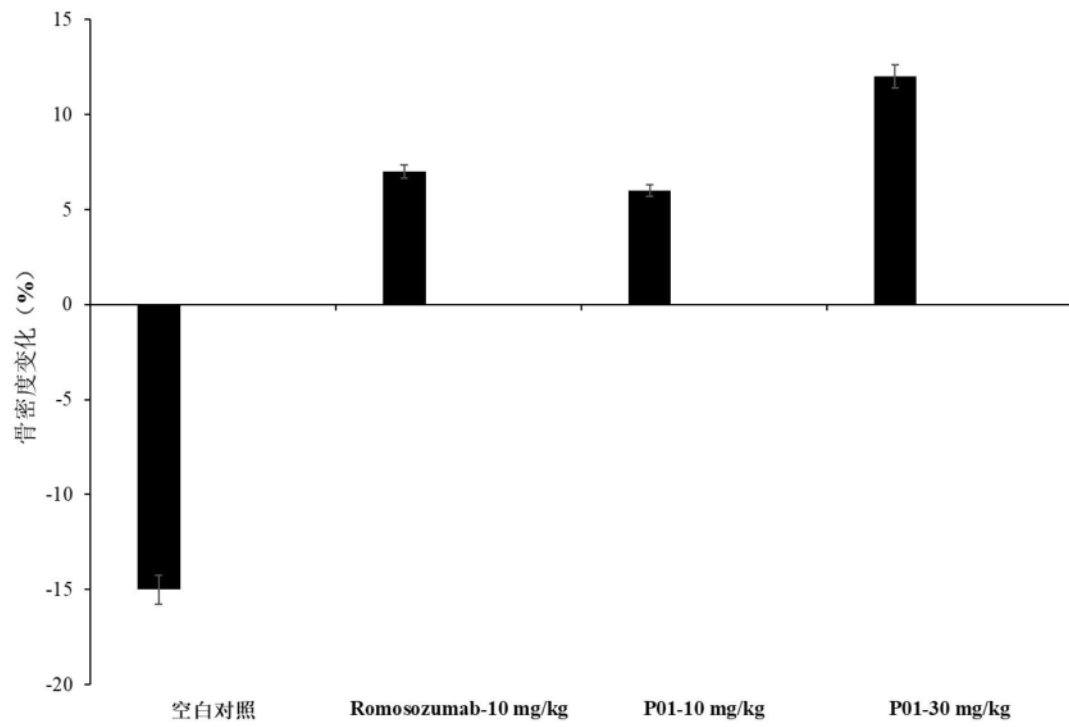


图1