(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115996944 A
(43)申请公布日 2023.04.21

(21)申请号 202180035631.5

(22)申请日 2021.05.18

(30)优先权数据
20315243.4 2020.05.18 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.11.15

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2021/063109 2021.05.18

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/233896 EN 2021.11.25

(71)申请人 洛林大学
地址 法国南锡
申请人 国家科学研究中心
南锡大学医疗中心

(72)发明人 弗里德里克·凯洛托
马里恩·克劳德尔
克里斯托夫·查尔伦
让-伊夫斯·朱泽奥

(74)专利代理机构 北京派特恩知识产权代理有限公司 11270
专利代理师 王子晔 李维凤

(51)Int.Cl.
C07K 14/47(2006.01)

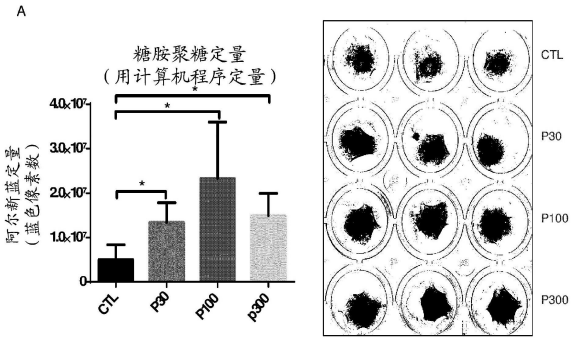
权利要求书1页 说明书13页
序列表3页 附图30页

(54)发明名称

来自FRZB蛋白的“NETRIN样”结构域的肽的治疗潜力

(57)摘要

本发明涉及衍生自所述FRZB蛋白的netrin样结构域的新肽,所述新肽可用于所述预防或治疗Wnt/β-连环蛋白和/或Hippo/YAP/TAZ途径相关的疾病,特别是骨关节炎。



CN 115996944 A

1.16到50个氨基酸的肽,所述肽包含具有以下序列的肽:

$DRX_3GKKVKRWDMKX_{14}RH$(SEQ ID NO:1)

其中X_3和X_{14}彼此独立地为任何氨基酸。

2.根据权利要求1所述的肽,其中X_3和X_{14}彼此独立地是丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸或丝氨酸。

3.根据权利要求1或权利要求2所述的肽,所述肽包含以下序列:SEQ ID NO:2(DRLGKKVKRWDMKLRH)、SEQ ID NO:3(DRAGKKVKRWDMKARH)、SEQ ID NO:9(DRIGKKVKRWDMKIRH)或SEQ ID NO:10(DRSGKKVKRWDMKSRH)。

4.根据权利要求1至权利要求3中任一项所述的肽,所述肽用作药物。

5.药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求1至权利要求3中任一项所述的肽、以及一种或多种药学上可接受的赋形剂。

6.根据权利要求1至权利要求3中任一项所述的肽或根据权利要求5所述的药物组合物,所述肽或药物组合物用于所述预防或治疗选自以下的Wnt/β-连环蛋白和/或Hippo/YAP/TAZ途径相关的疾病:骨关节炎、骨质疏松症、癌症。

7.根据权利要求6所述的用于所述用途的肽或药物组合物,所述肽或药物组合物用于预防或治疗骨关节炎。

来自FRZB蛋白的“NETRIN样”结构域的肽的治疗潜力

技术领域

[0001] 本发明涉及衍生自FRZB蛋白的netrin样结构域的新肽，该新肽可用于预防或治疗Wnt/β-连环蛋白和/或Hippo/YAP/TAZ途径相关的疾病，特别是骨关节炎。

[0002] 在下文描述中，方括号([])中的参考文献是指本文结束时参考文献列表。

现有技术

[0003] 滑膜关节是连接骨骼和支撑移动的特定结构，同时限制不同骨骼元件之间的运动范围。在这些特定的器官状结构中，骨轴承用薄层透明软骨或关节软骨封盖。关节腔用滑膜来内衬。这些不同的组织一起允许在关节表面之间具有极低摩擦和足够润滑的平滑移动。关节的稳态，特别是关节软骨和软骨下骨，对于维持关节功能是至关重要的，并且非常依赖于合成代谢和分解代谢信号转导途径之间的平衡(Lories和Luyten,2011)[1]。稳态需要维持表征关节软骨的稳定软骨细胞表型，其由可溶性因子和细胞外基质(ECM)以完整蛋白或裂解蛋白的形式控制。图1描绘了OA过程中的主要表型变化。

[0004] 稳态的丧失引起软骨质量的逐渐恶化和软骨下骨变厚、以及低度到中度的滑膜炎症，导致骨关节炎(OA)。OA疾病是一组病症，特征在于关节疼痛和在无慢性自身免疫机制的情况下的功能丧失。OA的患病率随年龄而增加，并形成巨大的社会经济挑战，全球有数百万人受到影响(Hunter和Felson,2006)[2]。人口老化和流行病增加了一些风险因素如肥胖症，表明OA相关的问题和对其无能为力只会提高其对社会的影响。当今的药物治疗选项仍然非常有限，包括止痛药和非甾体抗炎药。对于重度OA，通常需要进行关节假体手术(Hunter和Felson,2006)[2]。

[0005] 流行病学和临床数据支持以下观点：OA是具有复杂病因的疾病，其由遗传和后天或环境因素导致(Valdes和Spector,2008)[3]。这些因素相互作用并决定疾病的发作、进展和结果。与OA相关的遗传因子的识别还传达关于对骨骼发育或对在成人关节组织中维持稳态重要的途径的重要信息，并且识别治疗靶标以维持关节稳态。易感性基因的多态性与OA相关，而不会导致明显的骨骼异常。这些关联性包括从其在骨骼发育中的作用已知的基因中的多态性，诸如分泌型卷曲相关蛋白(SFRP)3，最初命名为FRZB，一种天然Wnt调节子。FRZB含有两个显著的结构域，涉及与Wnt配体的相互作用的富含半胱氨酸结构域(CRD_{FRZB})、以及Netrin样结构域(NTN_{FRZB})。来自Pr.Lories实验室的工作已经证明，不同小鼠模型中FRZB缺陷导致OA(Lories等人,2007)[4]。然后，在此实验室中表明，对缺乏FRZB的小鼠的转录组进行显著修饰，提高了典型Wnt途径的活性(Lodewyckx等人,2012)[5]。此外，Dickopf相关蛋白-1(Dkk1，一种Wnt拮抗剂)的浓度增加已经与关节空间变窄的风险降低相关联，在人OA中关节空间变窄经确认作为关节软骨丧失的标志物的放射照相标志(Lane等人,2007)[6]。

[0006] 此外，涉及β-连环蛋白激活的典型Wnt途径有助于控制软骨稳态。一方面，一些研究表明β-连环蛋白可以保持关节软骨的完整性。例如，最新研究表明，β-连环蛋白的激活预防了成熟关节软骨中的hedgehog诱导的软骨降解(Rockel等人,2016)[7]。此外，来自Di

Chen的团队表明,表达β-连环蛋白和T细胞因子的抑制剂(调节Wnt典型途径的转录因子)的转基因小鼠特异性地在关节软骨(在Col2a1启动子的控制下)中产生比对照更显著的软骨破坏(Zhu等人,2008)[8]。另一方面,若干研究提出了β-连环蛋白激活的有害影响,其过量激活导致软骨降解(Tamamura等人,2005)[9]。此外,同样来自Di Chen团队,得自成年小鼠的关节软骨细胞中的β-连环蛋白的组成性激活(在Col2a1启动子的控制下敲入组成性激活的β-连环蛋白)导致OA样特征,包括高MMP-13、X型胶原和骨钙素表达(Zhu等人,2009)[10]。

[0007] 另一种信号转导途径,Hippo/YAP/TAZ途径,也与OA的病理生理学相关(Gong等人,2019)[11]。在此工作中,使用siRNA(靶向YAP)阻断YAP途径使得病变小鼠模型中的体内OA进展减少。最近,使用Verteporfin(一种YAP抑制剂)使得小鼠OA模型中保持了软骨稳态(Zhang等人,2020)[12]。

[0008] 虽然Calmodulin-Kinase II(CamkII)的激活显示在生长板软骨细胞中触发肥大(Li等人,2011)[13],但这种效果需要同时激活β-连环蛋白。此外,在2016年,在骨关节炎的世界大会中显示,CamkII激活的选择性拮抗作用恶化小鼠模型中OA的发作和进展(Nalesso等人,2016)[14]。最后,近来表明,仅含有Netrin样结构域(NTN_{FRZB})的截短形式的FRZB能够强烈激活非典型Wnt途径(通过激活CamKII),同时抑制典型途径。这在成骨(Thysen等人,2014)[15]和软骨形成模型(Thysen等人,2014)[16]中显示,两者均由Wnt信号紧密控制,导致该情况增加了早期的软骨形成过程(II型胶原和软骨蛋白聚糖增加)。

[0009] 非常有趣的是,Wnt/β-连环蛋白(Cui等人,2018)[17]和Hippo/YAP/TAZ(Zheng等人,2019)[18]途径两者均被广泛描述为癌症发作和/或进展的重要原因。因此,此类途径的抑制剂可以提供癌症治疗领域的潜在关注点。

[0010] 已经显示在调节涉及骨关节炎的信号转导途径中有效的全蛋白FRZB(以及其仅含有netrin样结构域的截短形式)的大小为34kDa。由于其尺寸较大,这种蛋白质或其截短形式可以在体内实验中为致免疫的。这就是以下做法受关注的原因:从具有与完整蛋白相同或相似的特性(生物活性)的蛋白FRZB中衍生肽,从而降低免疫系统反应的风险。

具体实施方式

[0011] 发明人已经出乎意料地鉴定出衍生自FRZB蛋白的netrin样结构域的新肽,其能够减少在骨关节炎中过表达的Wnt/β-连环蛋白典型途径的表达、能够减少与骨关节炎的病理生理学相关的Hippo/YAP/TAZ途径的表达、并且增加具有对关节的保护作用的非典型CamKII途径的表达。

[0012] 该肽最初的设计思路为在FRZB蛋白的netrin样结构域的序列中,可能存在显示α-螺旋结构的元件,从而允许所述结构域与其他伙伴蛋白的相互作用。因此,已经测试了两个肽序列PEP12(ATQKTYFRNNYN,SEQ ID NO:4)和PEP16(DRLGKKVKRWDMKLRH,SEQ ID NO:2),它们衍生自netrin样结构域并且对应于此准则。然而,结果是PEP12尽管由计算机预测选择以具有类似于PEP16的二级α-螺旋构象,但在下面描述的测试系统中是完全无效的,这与PEP16不同。然后,看起来从FRZB蛋白的netrin样结构域衍生的活性肽不如预期的那样明显。

[0013] PEP16是预测具有形成α-螺旋的倾向的序列的肽,并且其在典型(Wnt/β-连环蛋白)和非典型(CamKII)Wnt途径的调节中具有作用:其减少了在骨关节炎中过度表达的典型

途径的激活并且增加了对关节具有保护作用的非典型途径的激活。另外,PEP16能够显著减少涉及骨关节炎的生理病理学的Hippo/YAP/TAZ途径的激活。为了特异性地靶向骨关节炎软骨,PEP16能够用寻址序列进行载体化(vectorised),从而特异性的结合到胶原2a1(col2a1)上。

[0014] 考虑到α-螺旋构象对PEP16的活性是必不可少的,发明人然后从PEP16肽衍生突变序列以促进此α-螺旋构象。发明人还已经在测试的五个序列中包含了不具有色氨酸残基的突变序列,其可能与PEP16的活性(结合)强相关。然后,该突变序列可以构成活性的阴性对照,因为该序列的空间位阻可以通过色氨酸残基构成更具有选择性的结合。在这些突变序列中,疏水性氨基酸变为丙氨酸的突变使其可能遵守预测的螺旋形状,同时有利于螺旋的转弯,因为丙氨酸具有这种结构特性,因此潜在地提高了螺旋的刚性。此外,赖氨酸与精氨酸的倒置允许保留肽的电荷特性及其总电荷,同时改变其主要序列,以说明将仅由电荷引起的可能效果。五个突变序列如下(以粗体显示PEP16的变化):

[0015] DRAGKKVKRWDMKARH(SEQ ID NO:3)

[0016] DRLGKKVKAWDMKLRH(SEQ ID NO:5)

[0017] DKLGRRVRKWDMRLKH(SEQ ID NO:6)

[0018] DRAGKKAKRWDMKARH(SEQ ID NO:7)

[0019] DRLGKKVKRADMKLRH(SEQ ID NO:8)

[0020] 其中一个序列(PEP16bis:DRAGKKVKRWDMKARH,SEQ ID NO:3)是特别感兴趣的,因为其具有与Super TOPflash典型Wnt途径的报告系统中的初始序列PEP16非常相似的特性(生物活性)。

[0021] 其他突变是本发明的部分,在位点3和14中的亮氨酸残基变为异亮氨酸(I)或丝氨酸(S)残基(以粗体表示PEP16的变化):

[0022] DRIGKKVKRWDMKIRH(SEQ ID NO:9)

[0023] DRSGKKVKRWDMKSRH(SEQ ID NO:10)

[0024] 因此,本发明的目的涉及16至50个氨基酸的肽,该肽包含具有以下序列的肽:

[0025] $DRX_3GKKVKRWDMKX_{14}RH$(SEQ ID NO:1)

[0026] 其中X_3和X_{14}彼此独立地为任何氨基酸。

[0027] 根据本发明的肽的具体实施方案,X_3和X_{14}彼此独立地是丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸或丝氨酸。例如,本发明的肽包含以下序列或由以下序列组成:SEQ ID NO:2(DRLGKKVKRWDMKLRH)、序列SEQ ID NO:3(DRAGKKVKRWDMKARH)、DRIGKKVKRWDMKIRH(SEQ ID NO:9)或DRSGKKVKRWDMKSRH(SEQ ID NO:10)。

[0028] 本发明的另一个目的涉及用作药物的本发明的肽。

[0029] 本发明的另一个目的涉及包含本发明的肽和一种或多种药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

[0030] 本发明的另一个目的涉及本发明的肽或药物组合物,该肽或药物组合物用于预防或治疗选自以下的Wnt/β-连环蛋白和/或Hippo/YAP/TAZ途径相关的疾病:骨关节炎、骨质疏松症、和癌症。优选地,它涉及用于预防或治疗骨关节炎的本发明的肽或药物组合物。

附图说明

[0031] 图1表示OA期间关节软骨细胞表型的改变。在细胞周围指示表型生物标志物，并且在细胞内部指示表型的主要调节子。+:刺激效应，-:抑制效应。

[0032] 图2示出与未经处理的对照(CTL)对比，用30、100、300ng/mL的PEP16(分别为P30、P100和P300)处理的ATDC5微团中的(A)软骨蛋白聚糖、(B)col2a1、(C)ctgf、(D)mmp3和(E)mmp13在第1天、第7天、第14天、第21天和第28天的相对表达水平。结果用管家基因ppia进行归一化。*P<0.05。结果代表3个实验。

[0033] 图3示出与未经处理的对照(CTL)对比，用300ng/mL的PEP16和PEP16bis处理的ATDC5微团中的(A)软骨蛋白聚糖、(B)col2a1、(C)mmp3、(D)mmp13和(E)ankrd在第1天、第21天和第28天的相对表达水平。结果用管家基因ppia进行归一化。*P<0.05。结果代表2个实验(在(E)中为3个实验)。

[0034] 图4示出用300ng/mL的PEP16和PEP16bis处理并与未经处理的对照(CTL)对比，在ATDC5微团中的糖胺聚糖定量。在第28天已经进行了阿尔新蓝染色。结果在生物化学定量后以吸光度(650nm)表示。*P<0.05。结果代表2个实验。

[0035] 图5示出使用含有萤火虫荧光素酶基因的构建体评估的感兴趣启动子的转录活性，其受到以下元件的控制：(A)在转染一天后用300ng/mL的PEP16或PEP16bis并同时用100ng/mL的Wnt3a处理24小时的ATDC5微团中的7X TCF/LEF响应元件(Super 8x TOPFlash报告基因)，(B)8X YAP响应元件(8x GTIIC报告基因)或(C)在转染一天后用3、30、100、300ng/mL的PEP16(分别为P3、P30、P100和P300)并同时用100ng/mL的Wnt3a处理24小时的ATDC5微团中的7X TCF/LEF响应元件(Super 8x TOPFlash报告基因)。使用海肾荧光素酶，在酪氨酸激酶启动子(TK-RL)的控制下对数据进行归一化。结果表示为萤火虫/海肾荧光素酶活性的比率。NSC668036(NSC，Wnt/β-连环蛋白信号转导的广泛抑制剂)用作Wnt3a拮抗作用的阳性对照。*P<0.05。结果代表2个实验。

[0036] 图6示出与未经处理的对照(CTL)对比，用30、100和300ng/mL(分别为P30、P100和P300)的PEP16处理并培养28天的ATDC5微团中的(A)用计算机程序定量(蓝色像素定量)(B)用生物化学定量(染料溶解在6M盐酸胍中)的糖胺聚糖定量。在第28天进行阿尔新蓝染色。*P<0.05。结果代表3个实验。

[0037] 图7示出研究与未经处理的对照(CT或CTL)对比，用100和300ng/mL的PEP16处理后，在第1天、第7天、第14天和第21天，在ATDC5微团中的(A)Wnt/β-连环蛋白途径激活(B)CamkII途径激活的蛋白质印迹。结果以相比总蛋白形式的活性蛋白形式表达。结果代表3个实验。

[0038] 图8示出研究与未经处理的对照(CT或CTL)对比，用300ng/mL的PEP16或PEP16bis处理后，在第21天和第28天，在ATDC5微团中的(A)Wnt/β-连环蛋白途径激活(B)CamKII途径激活的蛋白质印迹。结果以相比总蛋白形式的活性蛋白形式(即，(B)的P-CamKII)表达。结果代表3个实验。

[0039] 图9示出在24小时内用300ng/mL PEP16和/或100pg/mL的IL1β处理并与未经处理的对照(CTL)对比的小鼠关节软骨细胞的培养上清液中的MMP13酶活性。IL1β用作MMP13活性的阳性对照。*P<0.05。

[0040] 图10示出与未经处理的对照(CTL)对比，用300ng/mL的PEP16和/或100ng/mL的

wnt3a处理的小鼠关节软骨细胞中的(A)软骨蛋白聚糖、(B)col2a1在24小时和48小时的相对表达水平。结果用管家基因ppia进行归一化。结果代表3个实验。

[0041] 图11示出与未经处理的对照(CTL)对比，用300ng/mL的PEP16或PEP16bis和/或100、50、30ng/mL的wnt3a处理的小鼠关节软骨细胞中的(A,B)mmp3和(C)ankrd的相对表达水平。结果用管家基因ppia进行归一化。*P<0.05。在刺激24小时后监测Mmp3的表达，同时在刺激12小时后监测ankrd的表达。结果代表3个实验。

[0042] 图12示出用300ng/mL的PEP16处理7天(在7天中刺激3次)并与未经处理的对照(CTL)进行比较的人关节软骨外植体(来自患有末期骨关节炎，然后进行了全膝关节置换术的3名患者)的培养上清液中的MMP13酶活性。*P<0.05。(N＝3名患者)

[0043] 图13表示PEP16对成骨分化的影响。用不同浓度的PEP16刺激MC3T3-E1细胞21天，并与未经处理的对照进行对比。结果用管家基因S29进行归一化。*P<0.05。研究(A)骨钙素和osterix的相对表达水平，以及(B)研究Wnt/β-连环蛋白途径和CamKII途径激活的蛋白印迹，以及(C)在分化培养21天后的矿化水平。结果代表3个实验。

[0044] 图14示出样品3的结果：在第1天(D1)和第21天(D21)的a)CTL、PEP12300ng/ml和PEP12 1000ng/ml的细胞外基质矿化的生物化学定量(吸光度：405nm)，以及b)浓度为300ng/ml、1000ng/ml或无任何肽刺激(CTL)的PEP16和PEP12的特定碱性磷酸酶活性(μmol对硝基苯酚/分钟/mg蛋白)。

[0045] 图15示出在D1和D14对如实施例4所述培养的ATDC5细胞的II型胶原和软骨蛋白聚糖、CTGF和MMP3进行的qPCR分析(针对PPIA管家基因进行归一化)，肽PEP16、PEP I或PEP s的浓度为300ng/ml或无任何肽刺激(CTL)。*指示与D14对照(CTL)对比，p值<0.05，并且£指示与D1 CTL对比，p值<0.05(ANOVA)。

[0046] 图16示出用于PEP16、PEP I和PEP s的生物化学阿尔新蓝定量(在溶解在6M盐酸胍中后，在650nm处的吸光度读数)，如实施例4所述。*指示与D14对照(CTL)对比，p值<0.05。

[0047] 图17示出在D1和D14对如实施例5所述培养的ATDC5细胞的II型胶原和软骨蛋白聚糖、CTGF和MMP3进行的qPCR分析(针对PPIA管家基因进行归一化)，PEP16或PEP50的浓度为300ng/ml、或1000ng/ml(PEP50摩尔浓度条件)、或无任何肽刺激(CTL)。*指示与D14对照(CTL)对比，p值<0.05，并且£指示与D1 CTL对比，p值<0.05(ANOVA)。

[0048] 图18示出用于PEP16、PEP50或PEP50摩尔浓度条件的生物化学阿尔新蓝定量(在溶解在6M盐酸胍中后，在650nm处的吸光度读数)，如实施例4所述。*指示与D14对照(CTL)对比，p值<0.05。

[0049] 图19示出如实施例6所述的FRZB实验产生的蛋白质印迹膜和SDS PAGE。

[0050] 图20示出如实施例6所述的NTN实验产生的蛋白质印迹膜和SDS PAGE。

[0051] 图21示出对用浓度为300ng/ml的PEP16处理过的MC3T3-E1细胞或稳定过表达NTN结构域的MC3T3-E1细胞，在D1和D14对ANKRD(YAP/TAZ靶基因，途径活性的指标)进行的qPCR分析。将经处理的细胞和NTN过表达细胞与对照细胞(CTL)进行比较。*指示与D14对照(CTL)对比，p值<0.05，并且£指示与D1 CTL对比，p值<0.05(ANOVA)。

[0052] 实施例

[0053] 实施例1:材料&方法

[0054] ATDC5微团培养

[0055] 在维持培养基中培养小鼠软骨ATDC5细胞(软骨特异性软骨形成细胞株)直至汇合,该维持培养基含有1:1的杜尔贝科改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium,DMEM):Ham's F-12混合物(Gibco),其补充有1%抗生素(AB,青霉素-链霉素,Gibco),5%胎牛血清(FBS)(Gibco),并富含10μg/ml人转铁蛋白(Sigma)和30nM亚硒酸钠(Sigma)。将细胞用胰蛋白酶处理、洗涤、并以2.10^7个细胞/mL重悬于软骨细胞培养基中,该培养基由富含1X ITS预混物(具有10μg/ml胰岛素,10μg/ml人转铁蛋白,和30nM亚硒酸钠)(Life technologies)的维持培养基制成。将一小滴细胞悬浮液(10μl)置于24孔板的每个孔的中心。使细胞在37℃下附着2小时,然后加入500μL补充的软骨细胞培养基。在整个培养期间,在不存在或存在不同浓度(30ng/mL、100ng/mL和/或300ng/mL)的PEP16(SEQ ID NO:2)和/或PEP16bis(SEQ ID NO:3)的情况下培养细胞。在14天后,通过由含有1% AB、5% FBS、5μg/ml人转铁蛋白、1X ITS预混物、50μg/ml抗坏血酸-2-磷酸(AA)(Sigma)和10mMβ-甘油磷酸盐(BGP)(Sigma)的α-MEM培养基(Gibco)制成的矿化培养基来诱导肥大分化和矿化。将细胞在37℃下维持在5% CO2的加湿大气环境中。在第1天、第7天、第14天、第21天和第28天的时间点收集微团。每个时间点以三个技术重复来处理。每隔一天更换培养基。读数包括蛋白聚糖含量、信号转导途径激活状态和感兴趣的基因评估。感兴趣的基因是关节软骨细胞标志物(软骨蛋白聚糖,2型胶原(col2a1))、YAP/TAZ靶基因(ctgf,ankrd)和涉及OA的病理生理学的分解代谢酶原(mmp3,mmp13)。

[0056] MC3T3-E1单层培养物

[0057] 在维持培养基中培养小鼠成骨MC3T3-E1细胞(骨特异性骨原细胞株)直至汇合,该维持培养基含有补充有1% AB(Gibco)、10% FBS(Gibco)并富含1%丙酮酸钠(Gibco)的杜尔贝科改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium,DMEM)(Gibco)。将细胞用胰蛋白酶处理、洗涤、然后以2600个细胞/cm^2接种在6孔板中。通过在补充有10% FBS、1% AB、1%丙酮酸钠、10mM BGP和50μg/ml AA的α-最小必需培养基(α-MEM,Gibco)中培养细胞21天,在(D1)之后的次日开始诱导MC3T3-E1分化。

[0058] 在整个培养期间,在不存在或存在不同浓度(100ng/mL、300ng/mL和/或1000ng/ml)的PEP16(SEQ ID NO:2)的情况下培养细胞。将细胞在37℃下维持在5% CO2的加湿大气环境中。在第1天、第7天、第14天、第21天的时间点收集细胞。每个时间点以三个技术重复来处理。每两天更换培养基。读数包括矿物含量、信号转导途径激活状态和感兴趣的基因评估。感兴趣的基因是骨分化标志物(骨钙素,osterix)。

[0059] 小鼠关节软骨细胞培养

[0060] 小鼠关节软骨细胞(MAC)通过用酶消化全股骨头帽而从股骨头中分离。将样本在1% AB/磷酸盐缓冲盐水(PBS)中洗涤三次,并在37℃下与2mg/ml链霉蛋白酶(Roche)/DMEM-F12一起在100rpm的缓慢旋转下孵育1小时,然后在37℃下与1,5mg/ml胶原酶B(Roche)/DMEM-F12一起孵育3小时。将细胞以1x10^6个细胞/75mm^2接种,并在生长培养基DMEM-F12中培养7至14天,该生长培养基含有1% AB(Gibco)、10% FBS(Gibco)和5% L-谷氨酰胺(Thermoscientific)。利用通道1的细胞进行实验。然后收获培养上清液以进行MMP13酶活性测定。感兴趣的基因表达评估包括关节软骨细胞标志物(软骨蛋白聚糖,2型胶原(col2a1))、YAP/TAZ靶基因(ankrd)和涉及OA的病理生理学的分解代谢酶原(mmp3)。

[0061] 病人的关节软骨的外植体培养

[0062] 从来自CHRU of Nancy(Pr.Didier Mainard)的骨外科的全膝关节置换术中获得人关节软骨的外植体。将样本在1％ AB/PBS中洗涤三次,并在生长培养基中孵育24小时(生长培养基为DMEM-F12,含有1％ AB(Gibco)、10％FBS(Gibco)和5％ L-谷氨酰胺(Thermoscientific)。然后在7天期间用浓度为300ng/ml的PEP16刺激外植体。然后收获培养上清液以进行MMP13酶活性测定。

[0063] 启动子激活测定

[0064] 用YAP/TAZ萤火虫荧光素酶报告质粒(8x GTIIC,质粒#34615,Addgene)、β-连环蛋白途径报告质粒(Super 8x TOPFlash,质粒#12456,Addgene)或非活性β-连环蛋白控制报告质粒(Super 8x TOPFlash,#12457,Addgene)转染ATDC5细胞。通过用酪氨酸激酶-海肾荧光素酶质粒(Promega)与上文质粒中的每一种进行共转染来对结果进行归一化。使用Dharmafect kb转染试剂(Fisher Scientific)进行转染。简而言之,在无血清培养基中稀释报告质粒和转染试剂,然后将稀释的Dharmafect kb在室温下加到质粒中以孵育10分钟。在此期间,用PBS冲洗细胞并将其置于新的维持培养基中。当孵育结束时,在每个孔中分配转染试剂-质粒的混合物。次日(用Wnt3a和/或PEP16和/或PEP16bis)进行刺激。

[0065] RNA提取、cDNA合成和定量实时聚合酶链式反应(qRT-PCR)(以查看健康和高营养软骨细胞标志物的表达)

[0066] 使用Nucleospin RNA II试剂盒(Macherey-Nagel)分离总RNA,并使用MMLV逆转录酶(Thermo Fisher Scientific)按照制造商说明书逆转录。iTaq SYBR绿色荧光qPCR主混合物(BioRad)用于评估感兴趣的目标基因的mRNA表达。引物序列可以在需要时提供。使用以下PCR条件:在95℃下1分钟,在95℃下15秒变性,然后在60℃下进行1分钟的退火延伸的40个循环。进行熔融曲线分析以测定特定产物的扩增。使用相对阈值方法表达结果,并将其归一化为ATDC5细胞和MAC的管家基因PPIA(肽酰脯氨酰异构酶A)的mRNA水平、或归一化为MC3T3-E1细胞的管家基因S29(核糖体蛋白S29)的mRNA水平。使用Via7实时PCR系统(Thermo Fisher Scientific)进行qRT-PCR测量。

[0067] 蛋白聚糖形成的定量

[0068] 用PBS洗涤微团,并用95％的冰冷乙醇在4℃下固定30分钟,用于染色。用蒸馏水进行洗涤后,用阿尔新蓝(0.1％阿尔新蓝8GX,(Sigma))对微团进行染色,用蒸馏水洗涤三次以去除未结合的染料并风干。通过使用ImageJ软件(NIH Image,National Institutes of Health,Bethesda,MD,USA)进行蓝色像素定量、然后通过用6M Guanidine-HCl(Sigma)溶解微团并通过用分光光度计(Varioskan Flash,Thermo Fisher Scientific)测量在650nm的吸光度,进行染色定量。

[0069] 矿化形成的定量

[0070] 用PBS洗涤细胞,并用95％的冰冷乙醇在4℃下固定30分钟,用于染色。用蒸馏水进行洗涤后,用茜素红(1％茜素红S(Sigma))对细胞进行染色,用蒸馏水洗涤三次以去除未结合的染料并风干。通过将矿物内容物溶解在800μL 10％乙酸中30分钟来进行染色的定量。然后刮擦孔,在单独的管中收获每个孔的内容物并涡旋30秒。将每个管在85℃下加热10分钟,然后置于冰上5分钟。最后,在13000rpm下将管离心15分钟,收集液相并与100μl的10％氢氧化铵混合。用分光光度计(Varioskan Flash,Thermo Fisher Scientific)测量405nm处的吸光度。

[0071] 蛋白质提取和蛋白质印迹分析(以查看典型和非典型Wnt途径的激活)

[0072] 使用1x Laemmli缓冲液(2% SDS,10%甘油,5%2-β-巯基乙醇,0.002%溴酚蓝,125mM Tris HCl(pH 6.8))从微团中分离蛋白。将样本在95℃下变性5分钟,在冰上冷却,并且在Tris-甘氨酸扩展梯度凝胶4-20%(Biorad)上,使用含有192mM甘氨酸、20mM Tris Base、0,1% SDS的迁移缓冲液通过电泳进行分离。(Invitrogen)。然后,在7分钟内,使用Trans-blot turbo系统(BioRad)将蛋白质转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。在室温下置于封闭缓冲液(补充有5%无脂干乳的TBS-0.1% Tween(TBST))中2小时后,将膜在TBST中洗涤三次,并在4℃下与一种主要抗体一起在TBST-5%牛血清白蛋白中孵育过夜,该抗体抗活性β-连环蛋白、总β-连环蛋白、磷酸化CamKII或总CamKII。用TBST洗涤三次后,将每个印迹在室温下用与辣根过氧化物酶(Jackson ImmunoResearch Laboratories)缀合的抗兔或抗小鼠抗体在封闭缓冲液中孵育1小时。根据制造商的推荐,使用Clarity Western ECL底物(BioRad)可视化印迹。用ChemiDoc XRS CCD相机系统(BioRad)获取图像。使用ImageJ软件(NIH Image,National Institutes of Health,Bethesda,MD,USA)进行密度测定分析。结果表示为活性(磷)蛋白形式/总蛋白形式的比率。

[0073] MMP13酶活性测定

[0074] 使用MMP13荧光底物(Merck Millipore)评估MMP13酶活性。简而言之,将在不同实验结束时收获的培养上清液与1.5mM 4-乙酸汞基苯胺混合,并在37℃下孵育1小时,以便将每个基质金属蛋白酶原(pro-MMP)转变成活性MMP。然后,添加荧光底物,并将混合物在37℃下孵育3小时。在Varioskan Flash装置(Thermo Fisher Scientific)上使用以下参数:激发波长325nm和发射波长393nm,来评估荧光。重组人MMP13用作阳性对照(Merck Millipore)。在生长培养基中包含阴性对照。

[0075] 统计分析

[0076] 使用GraphPrism v 6.0进行统计分析。进行ANOVA以评估在对照组(不存在Wnt3a、IL1β或PEP16的细胞)和处理组(单独的Wnt3a、单独的IL1β、单独的PEP16或单独的PEP16bis(SEQ ID NO:3))之间的差异、并且还评估在Wnt3a处理组与Wnt3a+PEP16、Wnt3a+PEP16bis组之间的差异。

[0077] 实施例2:结果

[0078] 用30、100、300ng/mL(分别为P30、P100和P300)的PEP16处理ATDC5细胞系

[0079] 在图2中示出用30、100、300ng/mL的PEP16处理的ATDC5微团中的(A)软骨蛋白聚糖、(B)col2a1、(C)ctgf、(D)mmp3和(E)mmp13在第1天、第7天、第14天、第21天和第28天的相对表达水平的结果。

[0080] 在图6中示出用30、100和300ng/mL(分别为P30、P100和P300)的PEP16处理并培养28天的ATDC5微团中的(A)用计算机程序定量(蓝色像素定量)(B)用生物化学定量(染料溶解在6M盐酸胍中)的糖胺聚糖定量结果。

[0081] 在图7中示出研究用100和300ng/mL的PEP16处理后,在第1天、第7天、第14天、第21天和第28天,在ATDC5微团中的(A)Wnt/β-连环蛋白途径激活(B)CamkII途径激活的蛋白质印迹结果。

[0082] 所获得的结果表明,PEP16在ATDC5软骨形成期间显著增强了健康关节软骨表型的标志物表达的诱导(软骨蛋白聚糖和2型胶原)。此外,PEP16有效减少了骨关节炎相关的MMP

的表达(即,MMP3和MMP13)、以及Ctgf的表达,Ctgf为Hippo/YAP/TAZ途径的靶基因。此外,PEP16在软骨形成期间,在细胞外基质中显著增加糖胺聚糖的积累。最后,PEP16增强了在软骨形成的预矿化阶段中CamKII途径的激活(D14),同时它减少了在软骨形成期间Wnt/β-连环蛋白途径的激活。

[0083] 用300ng/mL的PEP16和PEP16bis处理ATDC5细胞系

[0084] 在图3中示出用300ng/mL的PEP16或PEP16bis处理的ATDC5微团中的(A)软骨蛋白聚糖、(B)col2a1、(C)mmp3、(D)mmp13和(E)ankrd在第1天、第21天和第28天的相对表达水平的结果。

[0085] 在图4中示出用300ng/mL的PEP16或PEP16bis处理的ATDC5微团在第28天的糖胺聚糖定量的结果。

[0086] 图5示出使用含有萤火虫荧光素酶基因的构建体转染的ATDC5细胞的启动子激活测定的结果,其受到以下元件的控制:(A)在转染一天后用300ng/mL的PEP16或PEP16bis并用10ng/mL的Wnt3a处理24小时的ATDC5微团中的7X TCF/LEF响应元件(Super 8x TOPFlash报告基因),(B)8X YAP响应元件(8x GTIIC报告基因)或(C)在一天后用3、30、100、300ng/mL的PEP16 PEP16(分别为P3、P30、P100和P300)并用100ng/mL的Wnt3a处理24小时的ATDC5微团中的7X TCF/LEF响应元件(Super 8x TOPFlash报告基因)。

[0087] 在图8中示出研究用300ng/mL的PEP16或PEP16bis处理后,在第21天和第28天,在ATDC5微团中的(A)Wnt/β-连环蛋白途径激活(B)CamkII途径激活的蛋白质印迹结果。

[0088] 所获得的结果表明,PEP16bis也在ATDC5软骨形成期间有利于健康关节软骨表型的标志物表达的诱导(软骨蛋白聚糖和2型胶原)。此外,PEP16bis有效减少了骨关节炎相关的MMP的表达(即,MMP3和MMP13)、以及Ctgf的表达,Ctgf为Hippo/YAP/TAZ途径的靶基因。此外,PEP16bis在软骨形成期间,在细胞外基质中显著增加糖胺聚糖的积累。此外,300ng/mL的PEP16和PEP16bis能够显著降低Super TOPFlash荧光素酶报告系统(用报告质粒转染、并用激活系统的10或100ng/mL重组Wnt3a蛋白刺激的ATDC5细胞)的典型途径的活性,而其他四个序列不能如此。类似地,30ng/ml的PEP16显著降低了荧光素酶类型报告系统(用YAP途径的报告质粒转染的ATDC5细胞,该YAP途径在与质粒接触时自动激活)的Hippo/YAP/TAZ途径的活性。最后,PEP16bis增强了CamKII途径的激活,同时它减少了在软骨形成期间Wnt/β-连环蛋白途径的激活。

[0089] 用300ng/mL的PEP16或PEP16bis处理小鼠关节软骨细胞培养物

[0090] 图9示出在24小时内用300ng/mL PEP16和/或100pg/mL的IL1β(作为MMP13活性的阳性对照)处理的小鼠关节软骨细胞的培养上清液中的MMP13酶活性的结果。

[0091] 图10示出用300ng/mL的PEP16和/或100ng/mL的wnt3a处理的小鼠关节软骨细胞在24小时和48小时的(A)软骨蛋白聚糖、(B)col2a1的相对表达水平的结果。

[0092] 图11示出用300ng/mL的PEP16或PEP16bis和/或100、50、30ng/mL的wnt3a处理的小鼠关节软骨细胞的(A,B)mmp3和(C)ankrd的相对表达水平的结果。

[0093] 所获得的结果示出了待测肽的保护作用。PEP16显著降低了在小鼠关节软骨细胞的培养上清液中测量的IL1β诱导的MMP13活性。此外,PEP16具有抵消Wnt3a的β-连环蛋白激活对减少健康关节软骨表型的标志物(软骨蛋白聚糖和2型胶原)、以及对增加NGF(疼痛,数据未显示)的有害作用的趋势。待测肽还能够抵消由使用重组Wnt3a诱导的有害作用,特别

是PEP16抵消Wnt3a对MMP3表达的诱导效应。另外,PEP16和PEP16bis能够减少Ankrd的表达,Ankrd是该原代培养系统中Hippo/YAP/TAZ途径的靶基因。观察到Cyr61和Ctgf的类似趋势,Cyr61和Ctgf是Hippo/YAP/TAZ途径的其他两个靶基因。

[0094] 用300ng/mL的PEP16处理病人的关节软骨外植体(骨关节炎)

[0095] 图12示出用300ng/mL的PEP16处理7天(在7天中刺激3次)的人关节软骨外植体(来自患有末期骨关节炎,然后进行了全膝关节置换术的3名患者)的培养上清液中的MMP13酶活性的结果。

[0096] 所获得的结果表明,PEP16能够降低在人软骨外植体的培养上清液中测量的MMP13的酶活性。

[0097] 用PEP16处理MC3T3-E1细胞系

[0098] 图13A示出用100ng/mL或300ng/mL的PEP16(分别为P100和P300)处理的MC3T3-E1细胞中的骨钙素和osterix在第7天、第14天和第21天的相对表达水平的结果。在图13B中示出研究用300ng/mL或1000ng/mL的PEP16(分别为P300和P1000)处理后,在第7天、第14天和第21天,在MC3T3-E1细胞中Wnt/β-连环蛋白途径和CamkII途径激活的蛋白质印迹结果。图13C示出用100ng/mL或300ng/mL的PEP16处理的MC3T3-E1细胞在第21天的矿化定量结果。

[0099] 所获得的结果表明,PEP16在MC3T3-E1成骨分化期间有利于了成骨标志物(骨钙素和osterix)表达的诱导。此外,PEP16有效地增强了在早期成骨阶段的CamKII途径的激活,同时它减少了在成骨期间Wnt/β-连环蛋白途径的激活。此外,PEP16显著增加细胞外基质中的矿物含量的积聚。这些结果有利于使用PEP16来预防或治疗骨质疏松,尽管它是非常反直觉的。实际上,在这种疾病中,通常尝试增强Wnt/β-连环蛋白途径,特别是抗硬骨素抗体。

[0100] 实施例3:与PEP16对比,PEP12不具有生物活性

[0101] 下文描述了PEP12在MC3T3-E1模型中的影响,并且添加了已有的PEP16(碱性磷酸酶活性)的一部分数据集。

[0102] 如前所述,在21天期间分化MC3T3-E1细胞。使用浓度为300ng/ml的不同的肽(PEP12或PEP16)并在每次更换培养基时将其加入(每两天)。将经处理的细胞与无任何肽刺激的细胞(CTL)进行比较。

[0103] 通过如先前在分化培养21天后描述的生物化学测定来评估矿化水平。结果代表3个实验。

[0104] 另外评估了特异性碱性磷酸酶活性(μmol对硝基苯酚/分钟/mg蛋白)。为此目标,使用含有0.2M Tris-Base,pH 8.1的1.6mM $MgCl_2$和1% Triton X-100的300μl缓冲液来裂解细胞。然后将样本放入管中并放置在冰上30分钟。在此期间,交替进行涡旋30秒和置于冰上5分钟。然后,将样本超声处理,并在4℃下以13000g离心15分钟。收集上清液,并且使用二喹啉甲酸测定来评估总蛋白浓度。

[0105] 通过将收获的上清液置于对硝基苯基磷酸酯(pNPP)溶液中来测量碱性磷酸酶的活性。碱性磷酸酶将裂解该底物并产生对硝基苯酚(pNP)。

[0106] 在缓冲液A(pH 10.5的0.1M甘氨酸,0.11%(m/v)乙酸锌和0.011%氯化镁(m/v))中制备4mg/mL pNPP的溶液。用缓冲液B(在缓冲液A中制备的0.24%(m/v)氯化钴)稀释此溶液½(2mg/ml pNPP)。使用在缓冲液A中稀释为1/20(0.5mM pNP)的10mM pNP的商业制备物来制备pNP的标准曲线:0;0.01;0.02;0.04;0.05;0.075;0.1和0.2mM。

[0107] 将体积为50μl的样本添加到1mL pNPP中并加入50μl超纯水。然后，将样本在37℃下孵育30分钟。通过加入0.1mM的100μl EDTA和0.04M的5mL NaOH来停止反应。在Varioskan Flash设备上读取410nm处的吸光度。基于标准曲线(方程A_{410}＝a x量$_{(pNP)}$+b)，用下式:活性＝((A(410nm)-b)x反应体积)/(a x样本体积x反应时间)来计算碱性磷酸酶活性

[0108] 结果代表PEP12的1个实验和PEP16的2个实验。

[0109] 总体而言，PEP12不能增加成骨期间的细胞外基质矿化，并且不能增加碱性磷酸酶活性。PEP16趋于增加碱性磷酸酶活性(参见图14)。

[0110] 实施例4:PEP16中的取代:L取代为I并且L取代为S

[0111] 测试具有两个取代的PEP16的肽序列(类似PEP16bis，其中两个L(位点3和14)变为A)，即，PEP i，其中位点3和14中的L变为异亮氨酸(I)(对应于SEQ ID NO:9)，以及PEP s，其中位点3和14中的L变为丝氨酸(S)(对应于SEQ ID NO:10)。

[0112] 将ATDC5细胞作为微团培养，并且使用如前文所提及的ITS在14天内进行分化。使用浓度为300ng/ml的不同的肽(PEP16、PEP I或PEP s)并在每次更换培养基时将其加入(每天)。将经处理的细胞与无任何肽刺激的细胞(CTL)进行比较。分离RNA并且对不同的靶基因进行qPCR，即，II型胶原和软骨蛋白聚糖(关节软骨细胞外基质)、CTGF(YAP/TAZ靶基因，途径活性的指标)和MMP3(骨关节炎期间增加的软骨降解酶)(图15)。对微团培养物进行阿尔新蓝染色，并且如前文所述进行生物化学定量(图16)。

[0113] 结果描述如下。*指示与D14对照(CTL)对比，p值<0.05，并且£指示与D1 CTL对比，p值<0.05(ANOVA)。

[0114] 总体而言，PEP s和PEP i提供与由PEP16产生的那些结果非常相似的结果，即，关节软骨细胞外基质基因的显著增加，以及YAP/TAZ靶基因和MMP3的显著减少。与对照细胞对比，每种肽能够显著增加细胞外基质中的蛋白聚糖沉积。

[0115] 实施例5:PEP16与50AA长的肽(PEP50)的比较

[0116] 测试50个氨基酸长度的肽(PEP50)以评估其与PEP16对比的效力。当肽更长时，使用浓度为300ng/ml的如PEP16导致肽的摩尔浓度发生变化。在300ng/ml下使用的PEP16的摩尔浓度为约145nM，而300ng/ml的PEP50产生约48nM的摩尔浓度。为了挑战具有相同摩尔浓度的细胞，增加一个实验条件，即，PEP50摩尔浓度，其中使用145nM的PEP50(其转化为约1000ng/ml)。因此，可以将300ng/ml的PEP50或145nM的PEP50摩尔浓度直接与300ng/ml⇔145nM的PEP16进行对比。

[0117] 将ATDC5细胞作为微团培养，并且使用如前文所提及的ITS在14天内进行分化。使用浓度为300ng/ml的PEP16或PEP50、或1000ng/ml(PEP50摩尔浓度条件)并在每次更换培养基时将其加入(每天)。将经处理的细胞与无任何肽刺激的细胞(CTL)进行比较。分离RNA并且对不同的靶基因进行qPCR，即，II型胶原和软骨蛋白聚糖(关节软骨细胞外基质)、CTGF(YAP/TAZ靶基因，途径活性的指标)和MMP3(骨关节炎期间增加的软骨降解酶)(图17)。对微团培养物进行阿尔新蓝染色，并且如前文所述进行生物化学定量(图18)。

[0118] 结果描述如下。*指示与D14对照(CTL)对比，p值<0.05，并且£指示与D1 CTL对比，p值<0.05(ANOVA)。

[0119] 总体而言，PEP 50条件产生与使用PEP16获得的那些结果非常相似的结果，即，关节软骨细胞外基质基因的增加，以及YAP/TAZ靶基因和MMP3的显著减少。PEP50摩尔浓度条

件表明,当以与PEP16相同的摩尔浓度使用时,PEP50显著减少关节软骨细胞外基质的基因表达。然而,它保持其显著减少MMP3和CTGF表达的能力。每种肽能够增加细胞外基质中的蛋白聚糖沉积。

[0120] 实施例6:FRZB的NETRIN样(NTN)结构域的细菌生产实验

[0121] 在细菌中进行FRZB全长蛋白和Netrin样结构域(NTN)的生产。这使用专利n°EP3455246B1进行,其导致产生碳水化合物识别结构域(CRD)标记的重组蛋白。

[0122] 使用针对纯化标签CRD的抗体进行蛋白质印迹分析。

[0123] 虽然成功地在亲和色谱(乳糖-琼脂糖)的洗脱液中产生少量重组FRZB(图19),但无法产生任何可用量的重组NTN蛋白(图20)。

[0124] 实施例7:NTN结构域过表达不能模拟调节YAP/TAZ途径的PEP16

[0125] 为了评估与NTN结构域对比,PEP16是否能够产生新活性,使用MC3T3-E1系统,其中PEP16能够展示其功效,并且其中NTN结构域显示出类似的性质(Thysen等人,Lab Invest,2016[15])。

[0126] 简而言之,如前所述,在14天期间分化MC3T3-E1细胞。使用浓度为300ng/ml的PEP16并在每次更换培养基时将其加入(每两天)。在相同实验中,还使用稳定过表达NTN结构域的MC3T3-E1细胞。将经处理的细胞和NTN过表达细胞与对照细胞(CTL)进行比较。

[0127] 分离RNA并对ANKRD(YAP/TAZ靶基因,途径活性的指标)进行qPCR(图21)。

[0128] 结果描述如下。*指示与D14对照(CTL)对比,p值<0.05,并且£指示与D1 CTL对比,p值<0.05(ANOVA)。

[0129] 总体而言,NTN不能显著减少YAP/TAZ靶基因,而PEP16设计为能减少YAP/TAZ靶基因。

[0130] 参考文献列表

[0131] 1.Lories和Luyten,Nat Rev Rheumatol,7(1):第43-9页,2011

[0132] 2.Hunter和Felson,BMJ,332(7542):第639-42页,2006

[0133] 3.Valdes和Spector,Rheum Dis Clin North Am,34(3):第581-603页,2008

[0134] 4.Lories等人,Arthritis Rheum,56(12):第4095-103页,2007

[0135] 5.Lodewyckx等人,Arthritis Res Ther,14(1):R16,2012

[0136] 6.Lane等人,Arthritis Rheum,56(10):第3319-25页,2007

[0137] 7.Rockel等人,J Clin Invest,126(5):第1649-63页,2016

[0138] 8.Zhu等人,Arthritis Rheum,58(7):第2053-2064页,2008

[0139] 9.Tamamura等人,J Biol Chem,280(19):第19185-95页,2005

[0140] 10.Zhu等人,J Bone Miner Res,24(1):第12-21页,2009

[0141] 11.Gong等人,J Mol Med,97(1):103-114.doi:10.1007/s00109-018-1705-y,2019

[0142] 12.Zhang等人,Biomaterials,232:119724.doi:10.1016/j.biomaterials.2019.119724,2020

[0143] 13.Li等人,Development,2011;138(2):第359-70页。

[0144] 14.Nalesso等人,Osteoarthritis Cartilage,24增刊1:S149,2016

[0145] 15.Thysen等人,Lab Invest,96(5):第570-80页,2016

[0146] 16.Thysen等人,Ann Rheum Dis,73增刊1:A67-8,2014

[0147] 17.Cui等人,Trends Biochem Sci,43(8):第623-634页,2018

[0148] 18.Zheng和Pan,Dev Cell,50(3):第264-282页,2019。

序列表

<110> 弗里德里克·凯洛托

马里恩·克劳德尔

克里斯托夫·查尔伦

让-伊夫斯·朱泽奥

<120> 来自FRZB蛋白的“NETRIN样”结构域的肽的治疗潜力

<130> BNT226529PC00

<160> 10

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 共有序列PEP

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa是任何氨基酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(14)

<223> Xaa是任何氨基酸

<400> 1

Asp Arg Xaa Gly Lys Lys Val Lys Arg Trp Asp Met Lys Xaa Arg His
1 5 10 15

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> PEP16

<400> 2

Asp Arg Leu Gly Lys Lys Val Lys Arg Trp Asp Met Lys Leu Arg His
1 5 10 15

<210> 3

<211> 16

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> PEP16bis
<400> 3
Asp Arg Ala Gly Lys Lys Val Lys Arg Trp Asp Met Lys Ala Arg His
1 5 10 15
<210> 4
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> PEP12
<400> 4
Ala Thr Gln Lys Thr Tyr Phe Arg Asn Asn Tyr Asn
1 5 10
<210> 5
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> PEP16突变体
<400> 5
Asp Arg Leu Gly Lys Lys Val Lys Ala Trp Asp Met Lys Leu Arg His
1 5 10 15
<210> 6
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> PEP16突变体
<400> 6
Asp Lys Leu Gly Arg Arg Val Arg Lys Trp Asp Met Arg Leu Lys His
1 5 10 15
<210> 7
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> PEP16突变体
<400> 7
Asp Arg Ala Gly Lys Lys Ala Lys Arg Trp Asp Met Lys Ala Arg His
1 5 10 15
<210> 8
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> PEP16突变体
<400> 8
Asp Arg Leu Gly Lys Lys Val Lys Arg Ala Asp Met Lys Leu Arg His
1 5 10 15
<210> 9
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> PEP i
<400> 9
Asp Arg Ile Gly Lys Lys Val Lys Arg Trp Asp Met Lys Ile Arg His
1 5 10 15
<210> 10
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> PEP s
<400> 10
Asp Arg Ser Gly Lys Lys Val Lys Arg Trp Asp Met Lys Ser Arg His
1 5 10 15

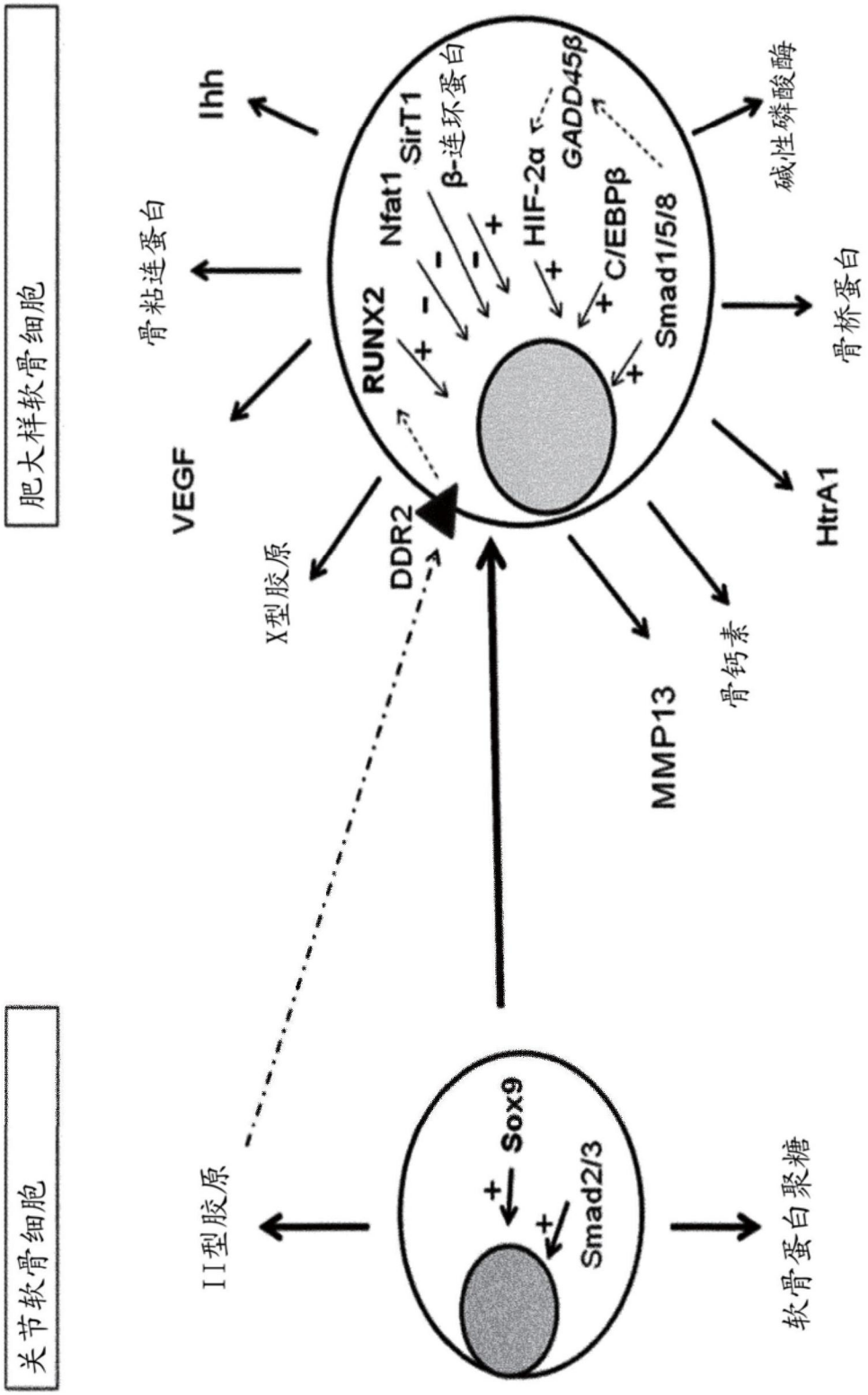

肥大样软骨细胞
关节软骨细胞
Ihh
骨粘连蛋白
VEGF
X型胶原
DDR2
II型胶原
RUNX2
Nfat1
SirT1
β-连环蛋白
HIF-2α
GADD45β
C/EBPβ
Smad1/5/8
碱性磷酸酶
骨桥蛋白
HtrA1
骨钙素
MMP13
Sox9
Smad2/3
软骨蛋白聚糖

图1

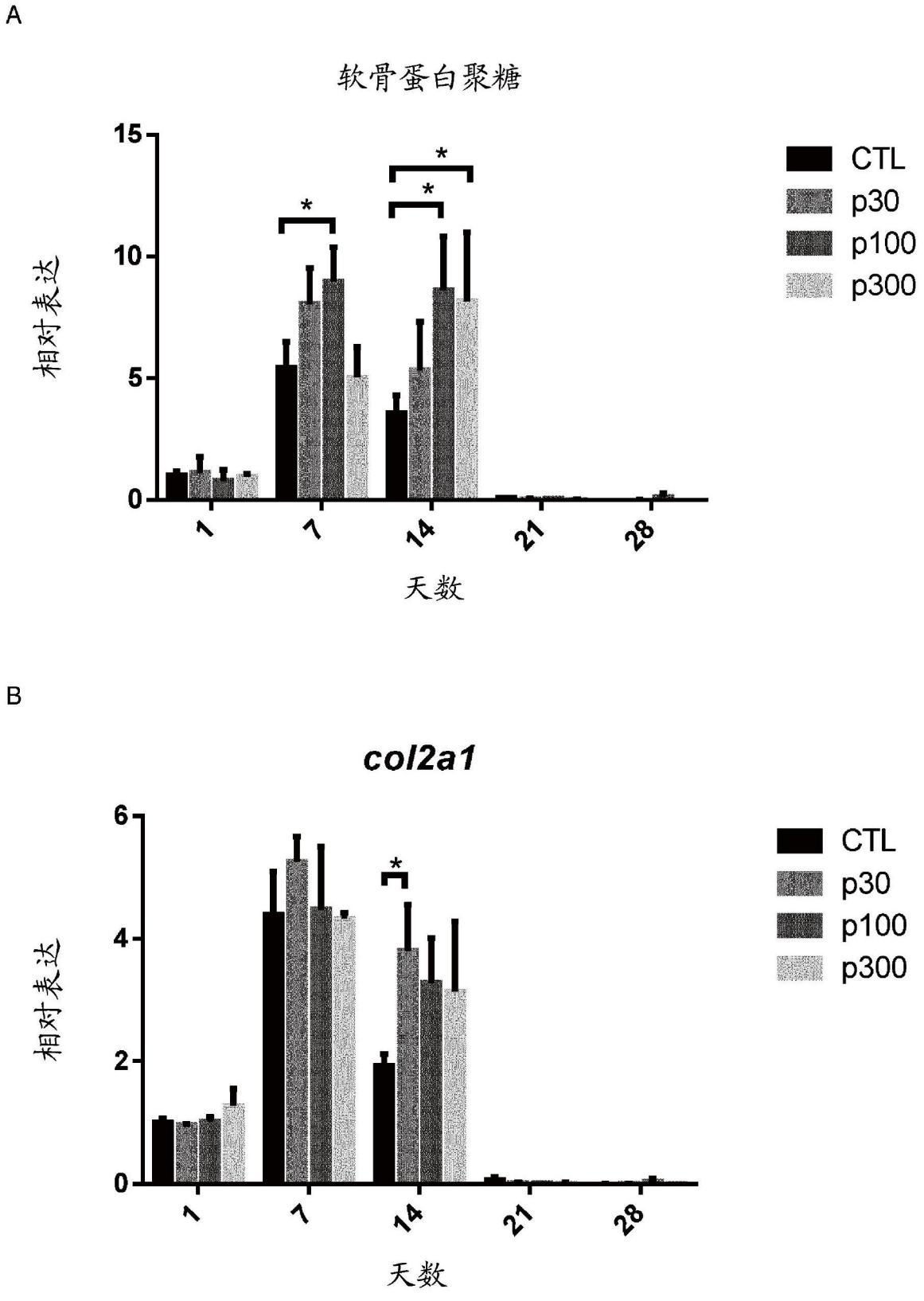
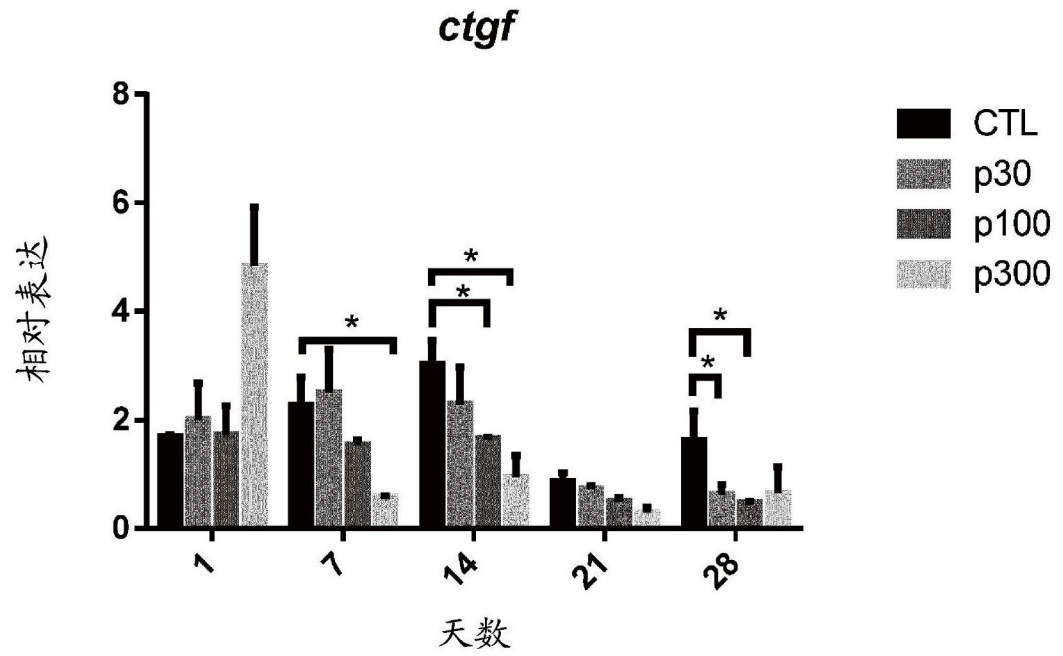

A
软骨蛋白聚糖
相对表达
15
10
5
0
*
*
*
1
7
14
21
28
天数
CTL
p30
p100
p300
B
col2a1
相对表达
6
4
2
0
*
1
7
14
21
28
天数
CTL
p30
p100
p300

图2

C


ctgf
相对表达
8
6
4
2
0
1
7
14
21
28
天数
CTL
p30
p100
p300
*
*
*
*
*

D

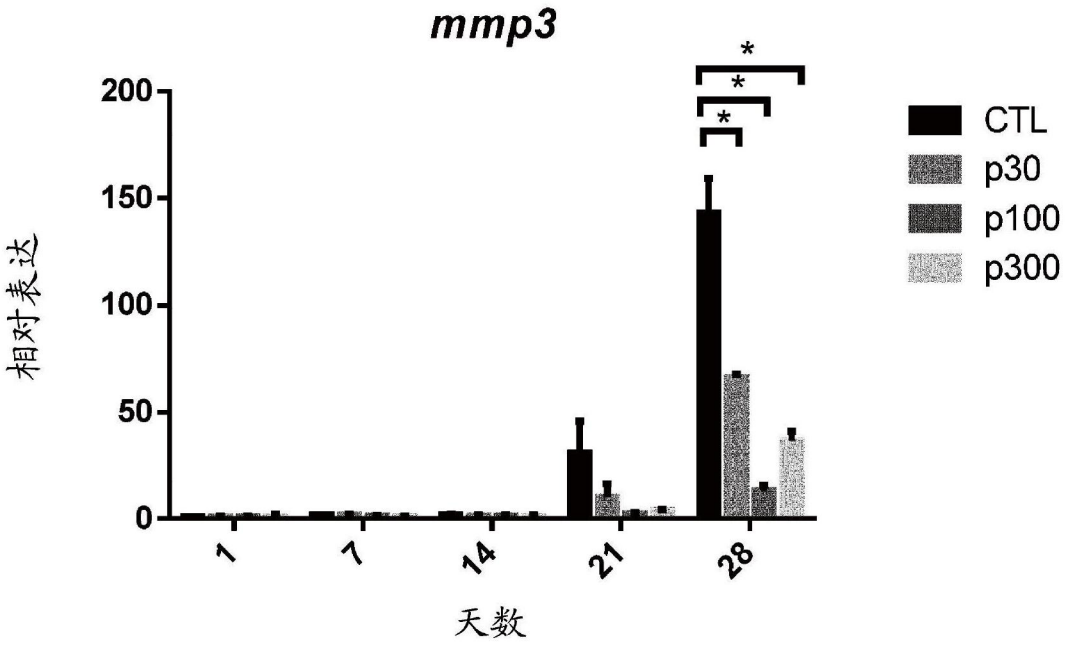

mmp3
相对表达
200
150
100
50
0
1
7
14
21
28
天数
CTL
p30
p100
p300
*
*
*

图2(续)

E

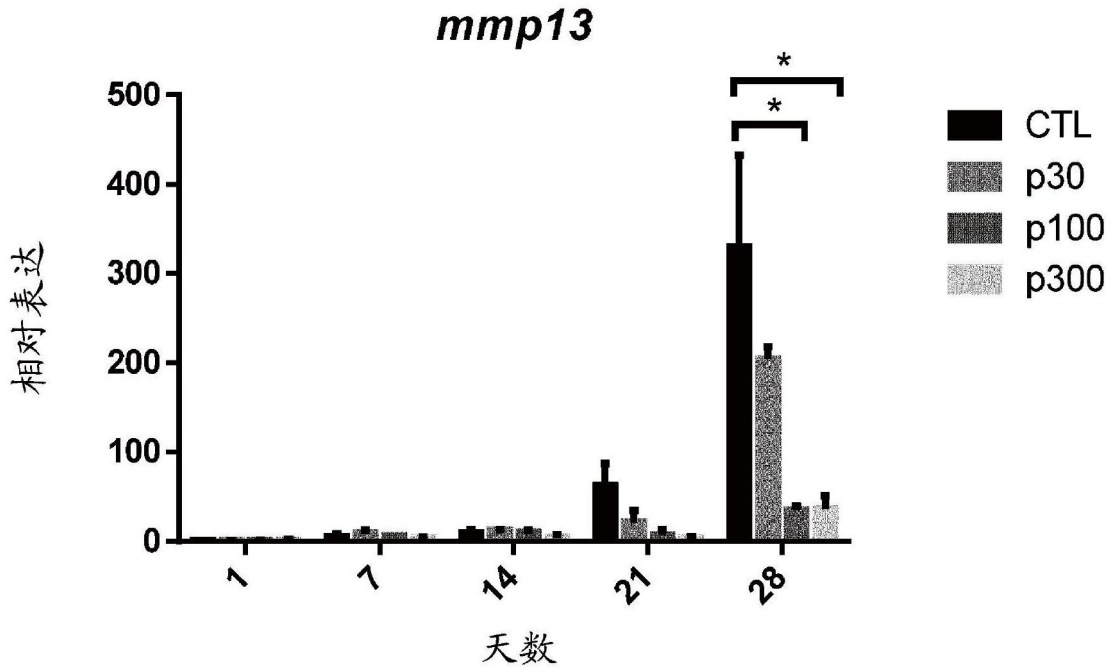

mmp13
相对表达
500
400
300
200
100
0
*
*
1
7
14
21
28
天数
CTL
p30
p100
p300

图2(结束)

A

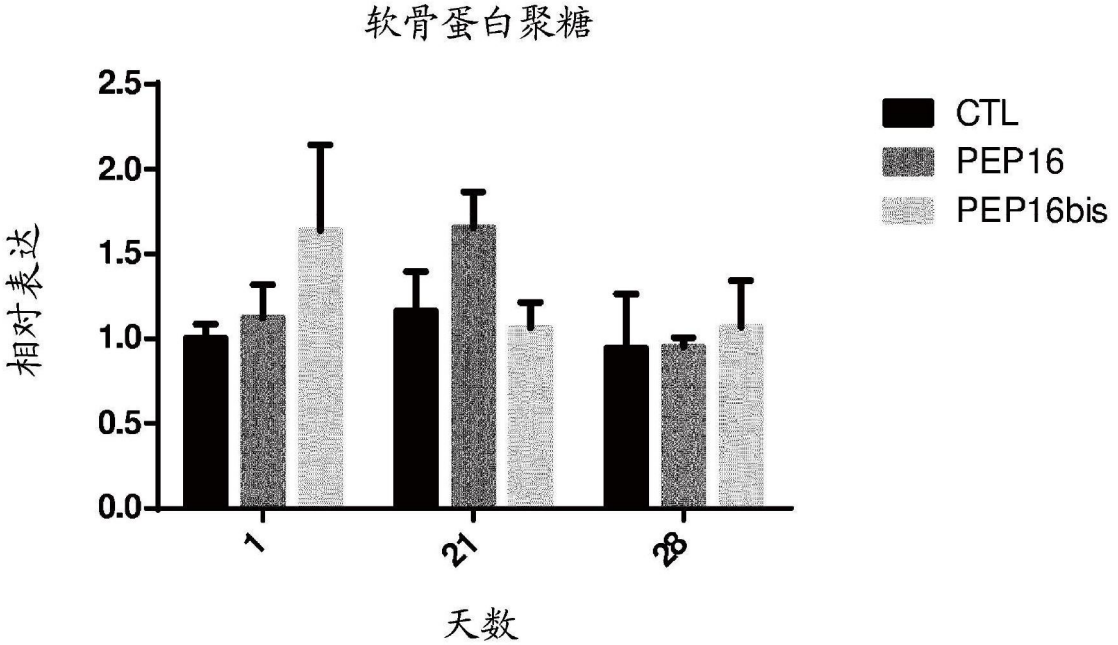
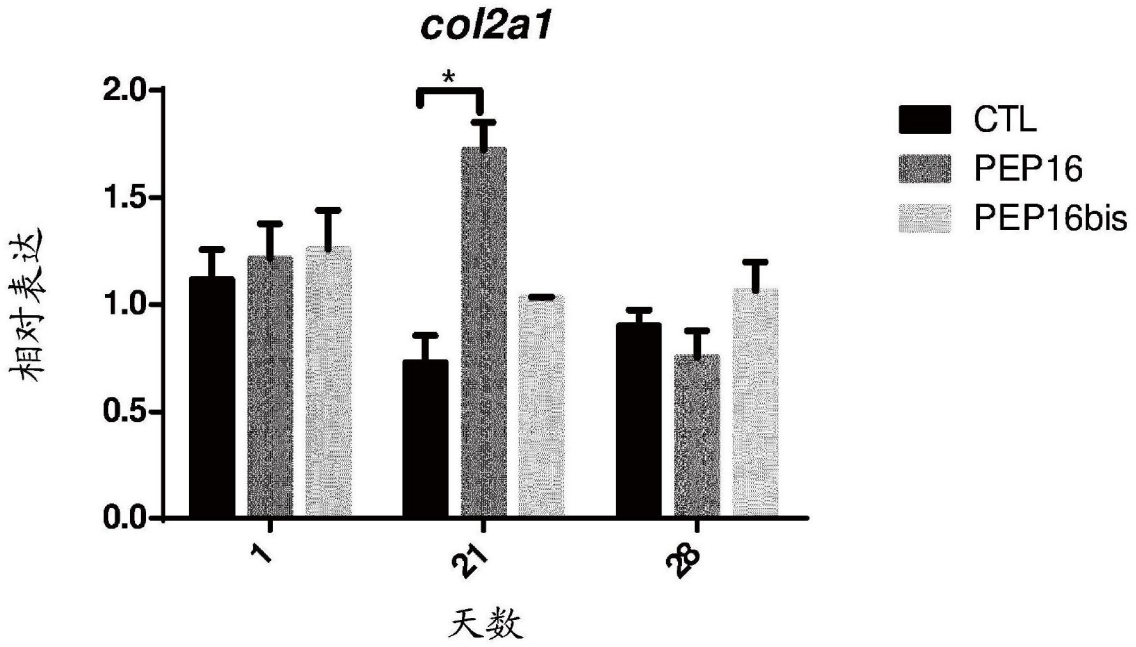

软骨蛋白聚糖
相对表达
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
1
21
28
天数
CTL
PEP16
PEP16bis

图3

B


col2a1
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
相对表达
*
1
21
28
天数
CTL
PEP16
PEP16bis

C

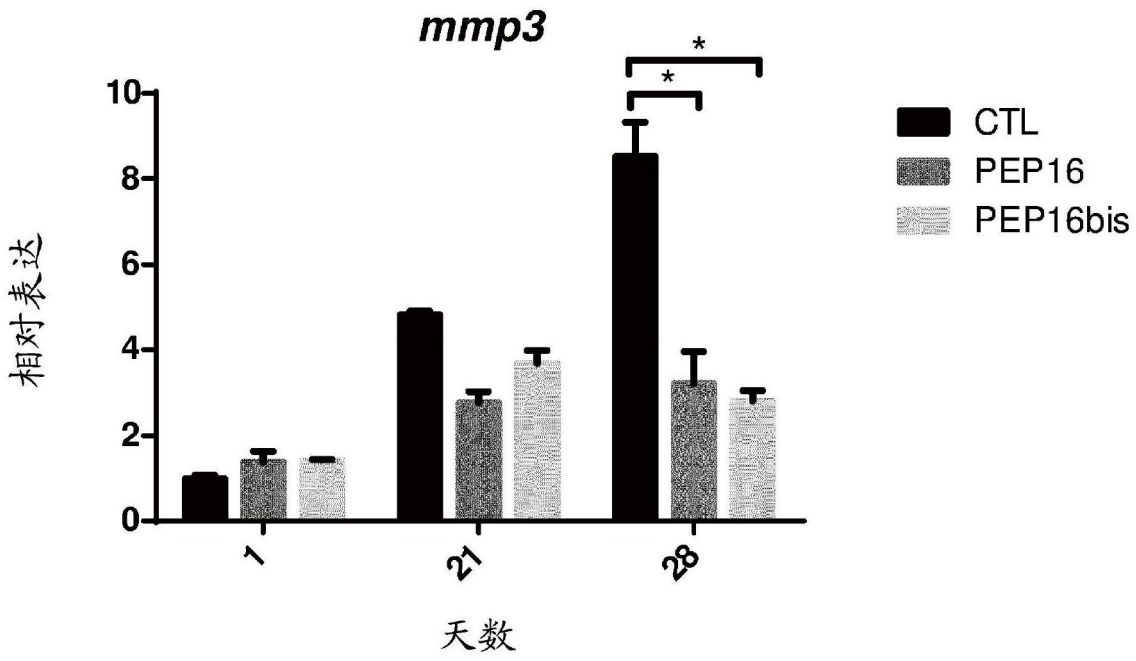
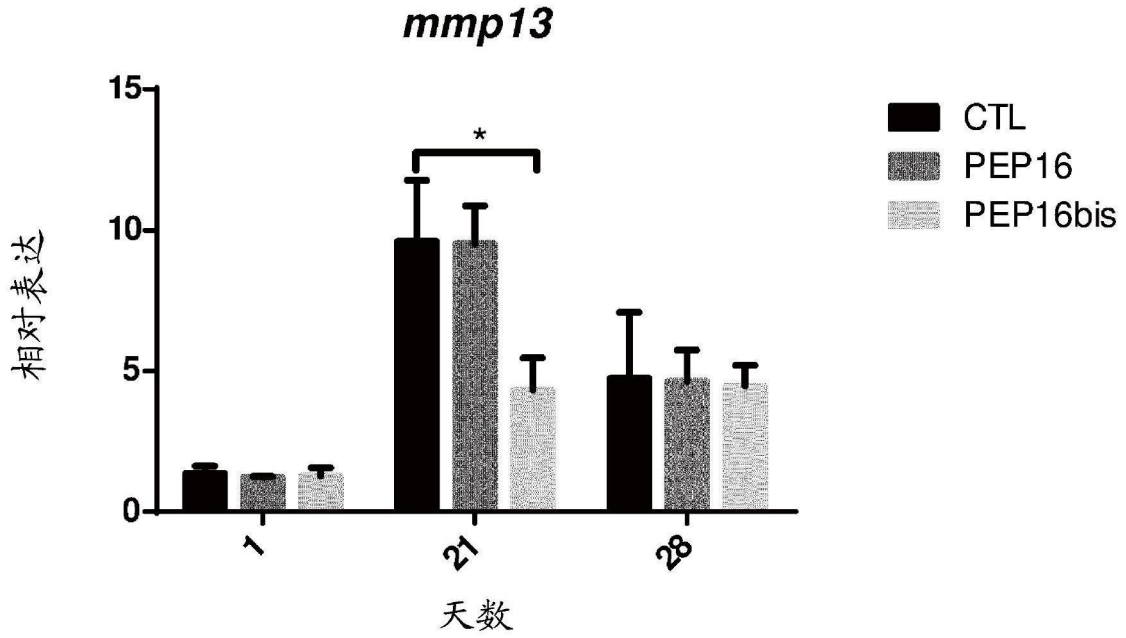

mmp3
10
8
6
4
2
0
相对表达
*
*
1
21
28
天数
CTL
PEP16
PEP16bis

图3(续)

D


mmp13
15
10
5
0
相对表达
*
1
21
28
天数
CTL
PEP16
PEP16bis

E

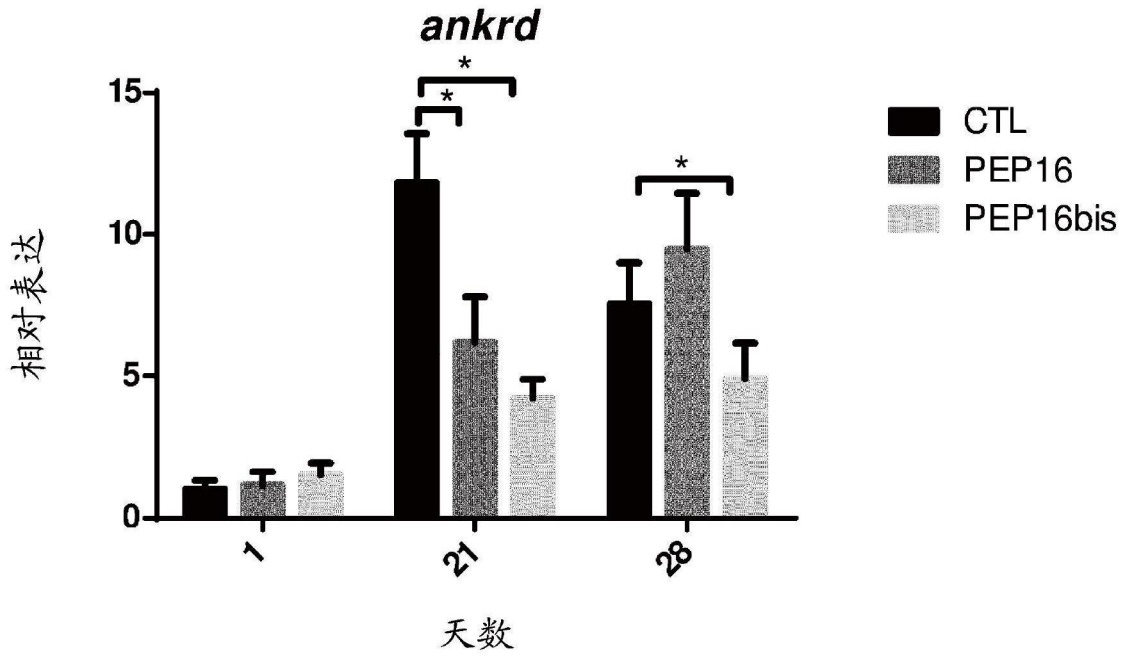

ankrd
15
10
5
0
相对表达
*
*
*
1
21
28
天数
CTL
PEP16
PEP16bis

图3(结束)

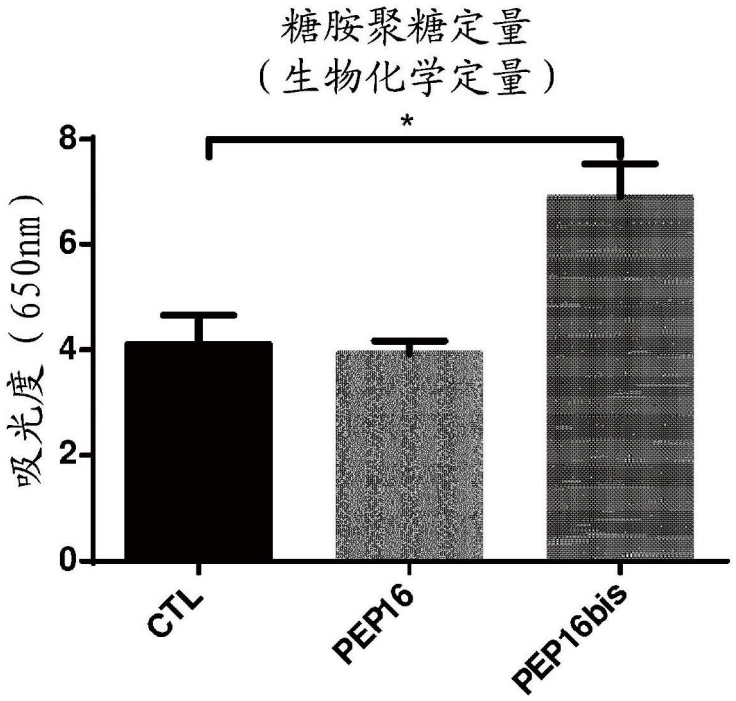

糖胺聚糖定量
（生物化学定量）
吸光度（650nm）
8
6
4
2
0
*
CTL
PEP16
PEP16bis

图4

A

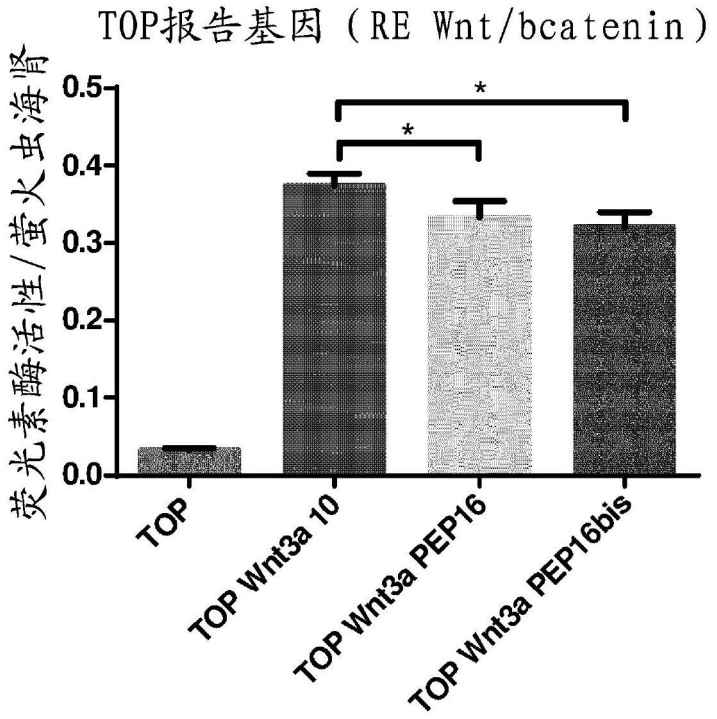
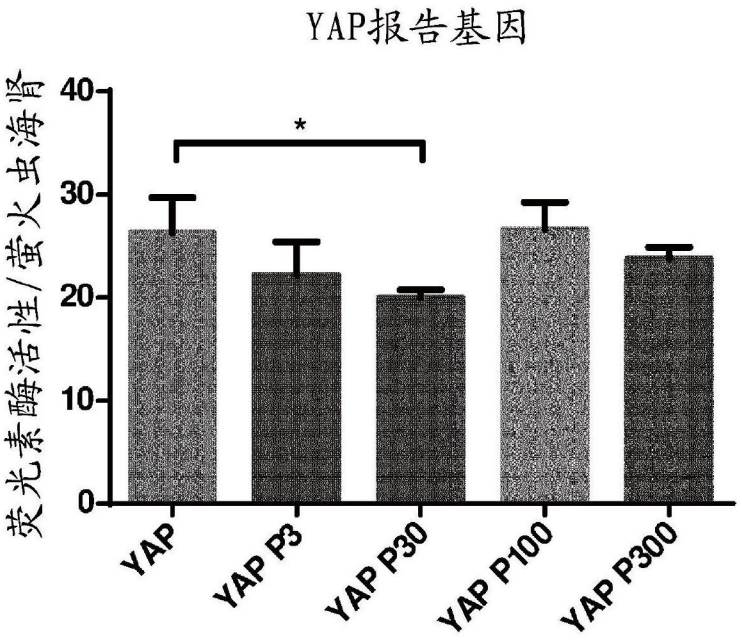

TOP报告基因（RE Wnt/bcatenin）
荧光素酶活性/萤火虫海肾
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
*
*
TOP
TOP Wnt3a 10
TOP Wnt3a PEP16
TOP Wnt3a PEP16bis

图5

B


YAP报告基因
荧光素酶活性/萤火虫海肾
40
30
20
10
0
*
YAP
YAP P3
YAP P30
YAP P100
YAP P300

C

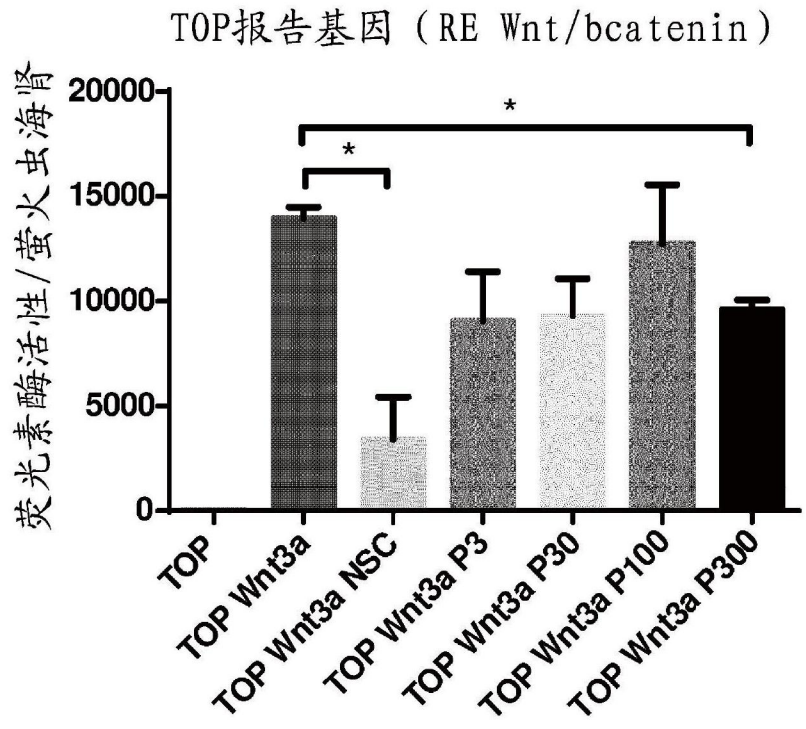

TOP报告基因（RE Wnt/bcatenin）
荧光素酶活性/萤火虫海肾
20000
15000
10000
5000
0
*
*
TOP
TOP Wnt3a
TOP Wnt3a NSC
TOP Wnt3a P3
TOP Wnt3a P30
TOP Wnt3a P100
TOP Wnt3a P300

图5(结束)

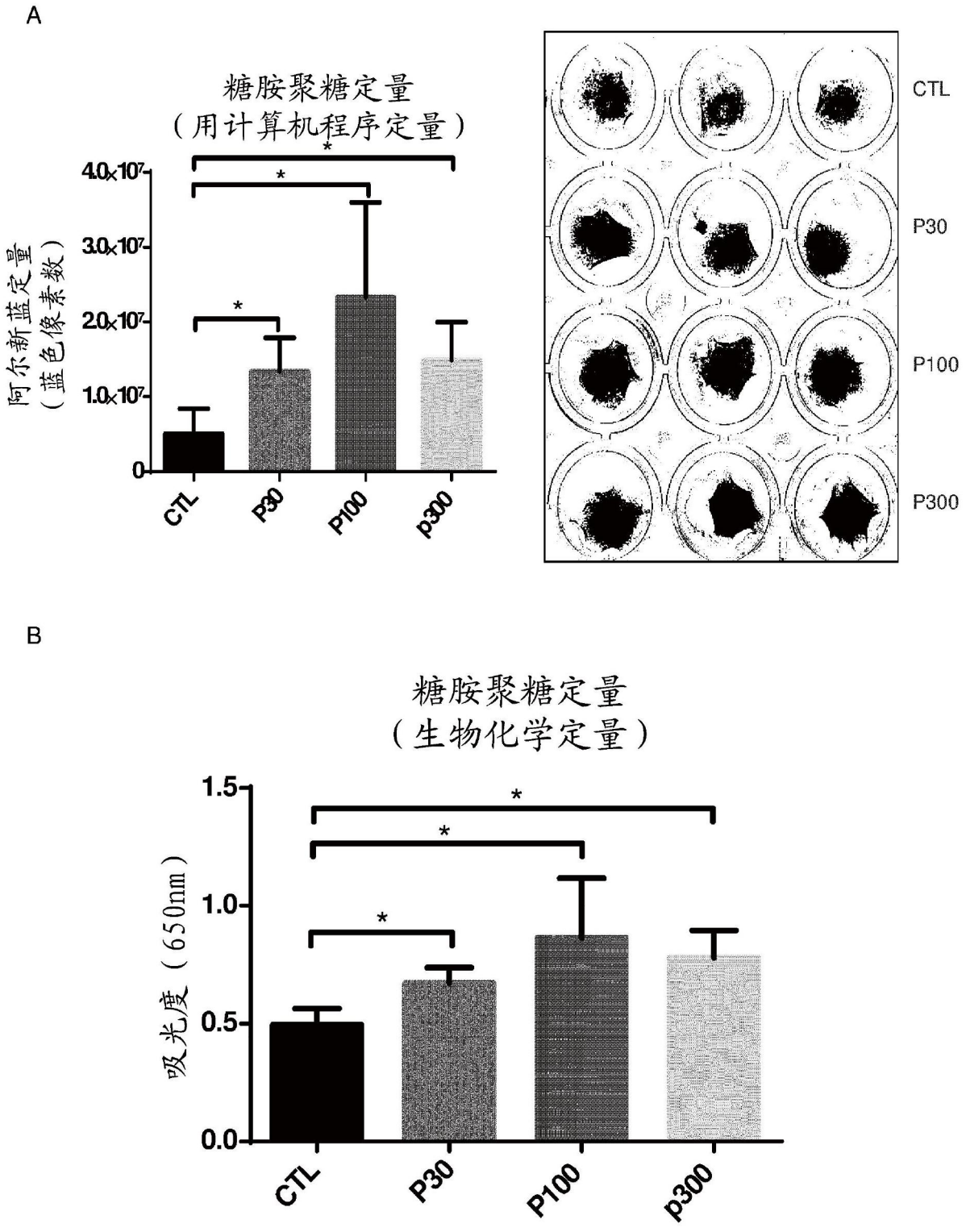
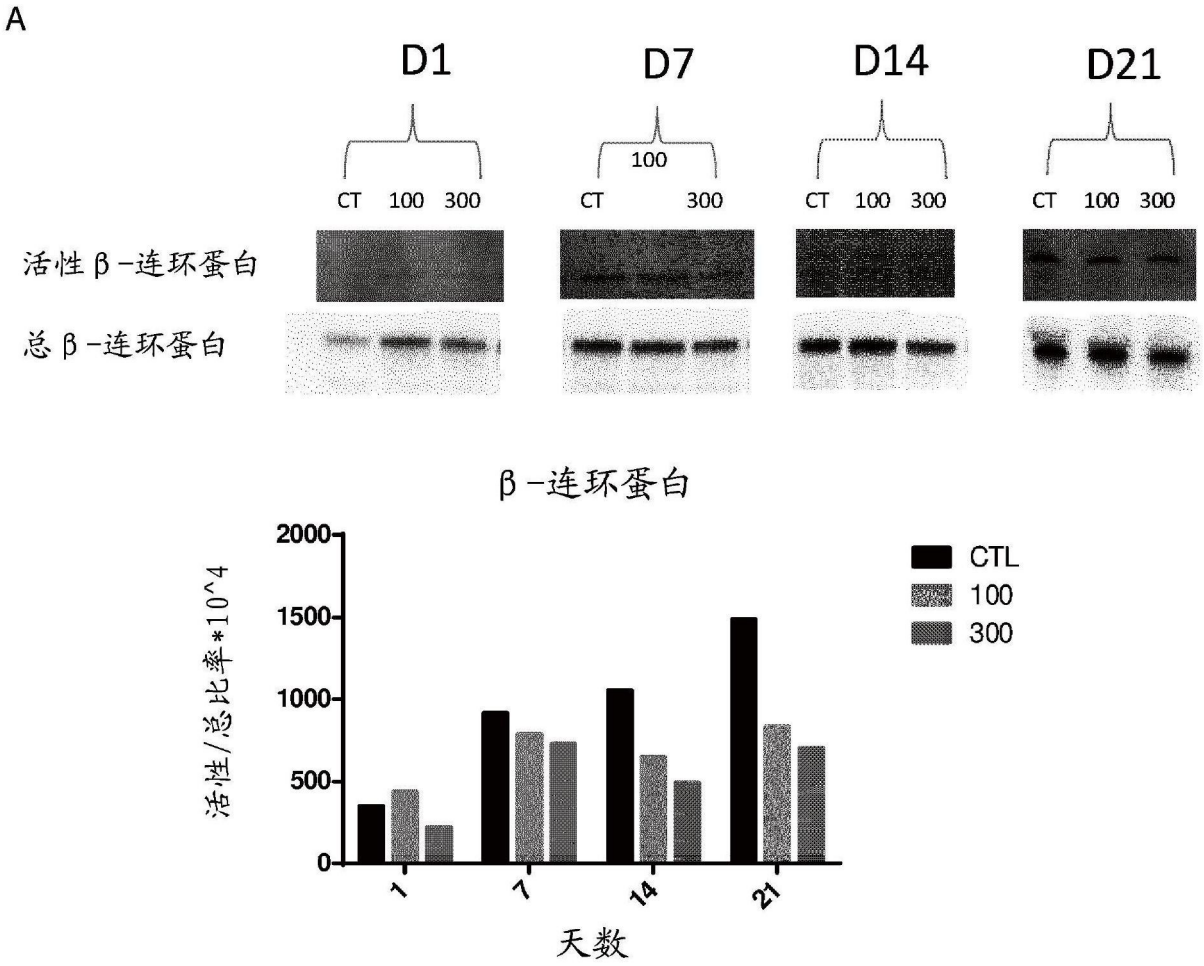

A
糖胺聚糖定量
（用计算机程序定量）
阿尔新蓝定量
（蓝色像素数）
4.0x10⁷
3.0x10⁷
2.0x10⁷
1.0x10⁷
0
CTL
P30
P100
p300
*
CTL
P30
P100
P300
B
糖胺聚糖定量
（生物化学定量）
吸光度（650nm）
1.5
1.0
0.5
0.0
CTL
P30
P100
p300
*

图6


A
D1
D7
D14
D21
CT 100 300
100
CT 300
CT 100 300
CT 100 300
活性β-连环蛋白
总β-连环蛋白
β-连环蛋白
活性/总比率*10^4
2000
1500
1000
500
0
1
7
14
21
天数
CTL
100
300

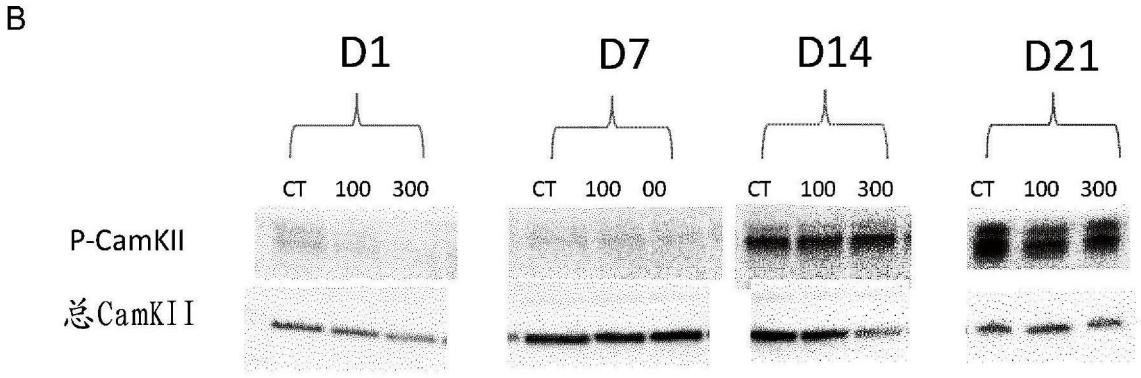

B
D1
D7
D14
D21
CT 100 300
CT 100 00
CT 100 300
CT 100 300
P-CamKII
总CamKII

图7

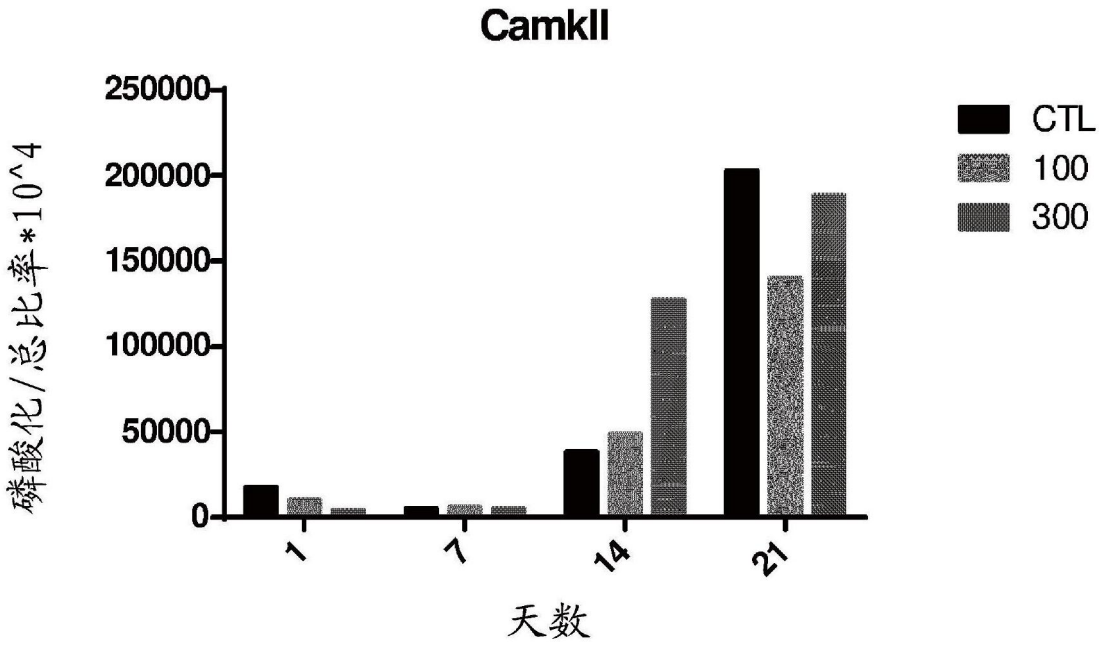

CamkII
250000
200000
150000
100000
50000
0
磷酸化/总比率*10^4
1
7
14
21
天数
CTL
100
300

图7(结束)

A

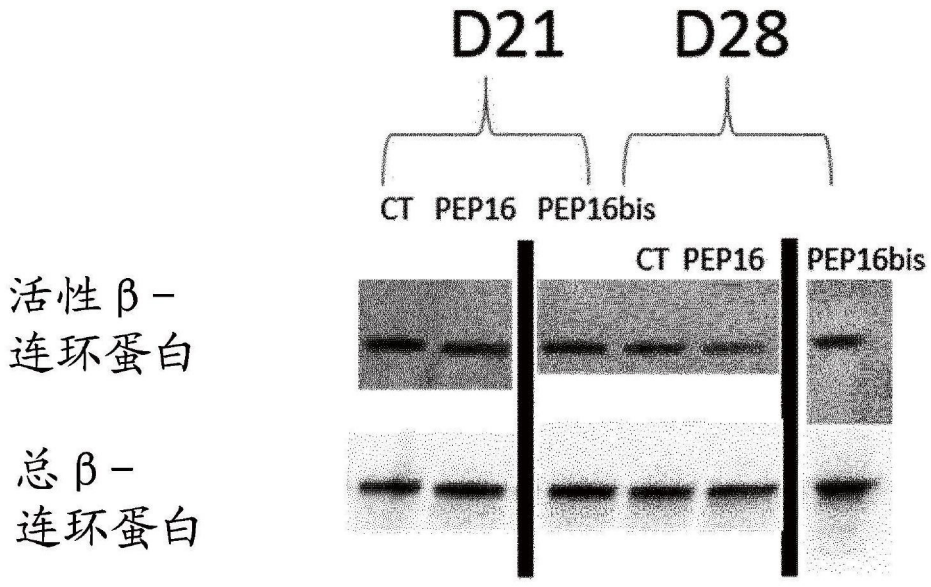
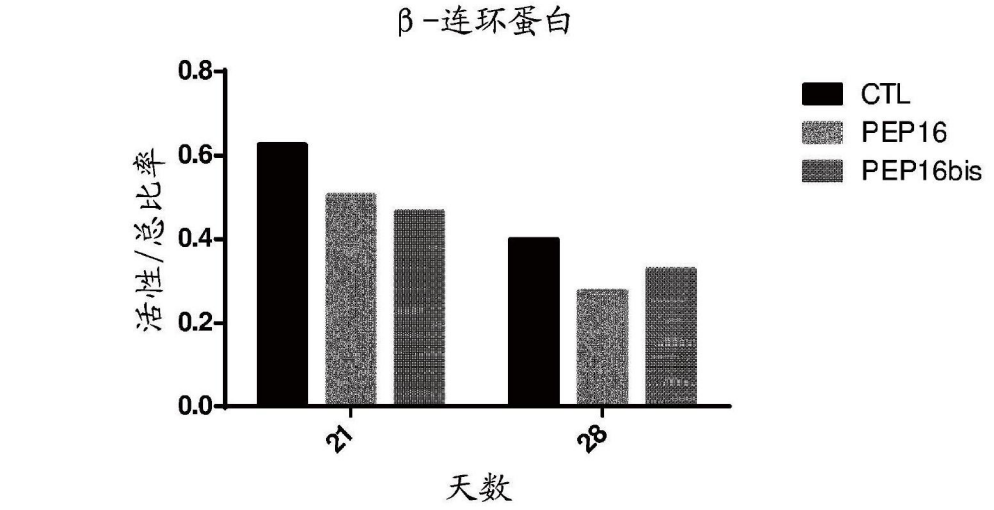

D21
D28
CT PEP16 PEP16bis
CT PEP16 PEP16bis
活性β-
连环蛋白
总β-
连环蛋白

图8


β-连环蛋白
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
活性/总比率
21
28
天数
CTL
PEP16
PEP16bis

B

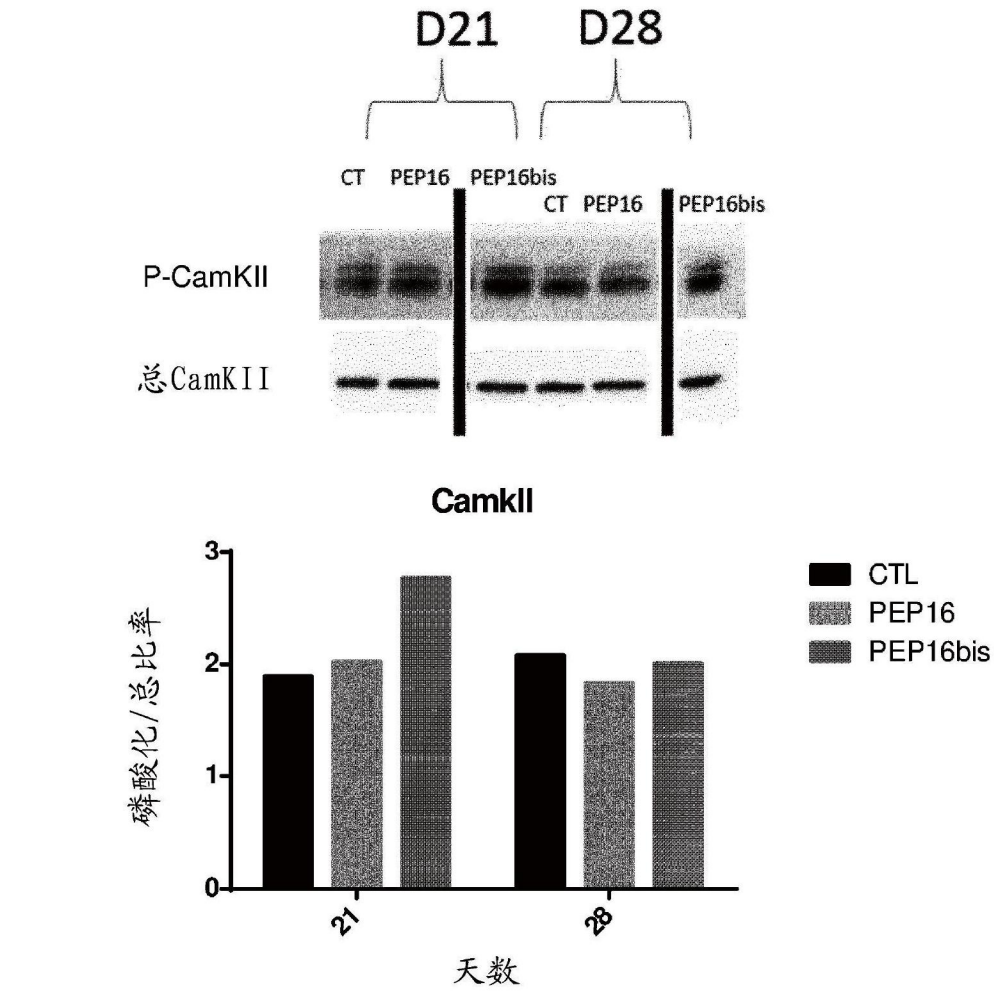

D21
D28
CT
PEP16
PEP16bis
CT
PEP16
PEP16bis
P-CamKII
总CamKII
CamkII
3
2
1
0
磷酸化/总比率
21
28
天数
CTL
PEP16
PEP16bis

图8(结束)

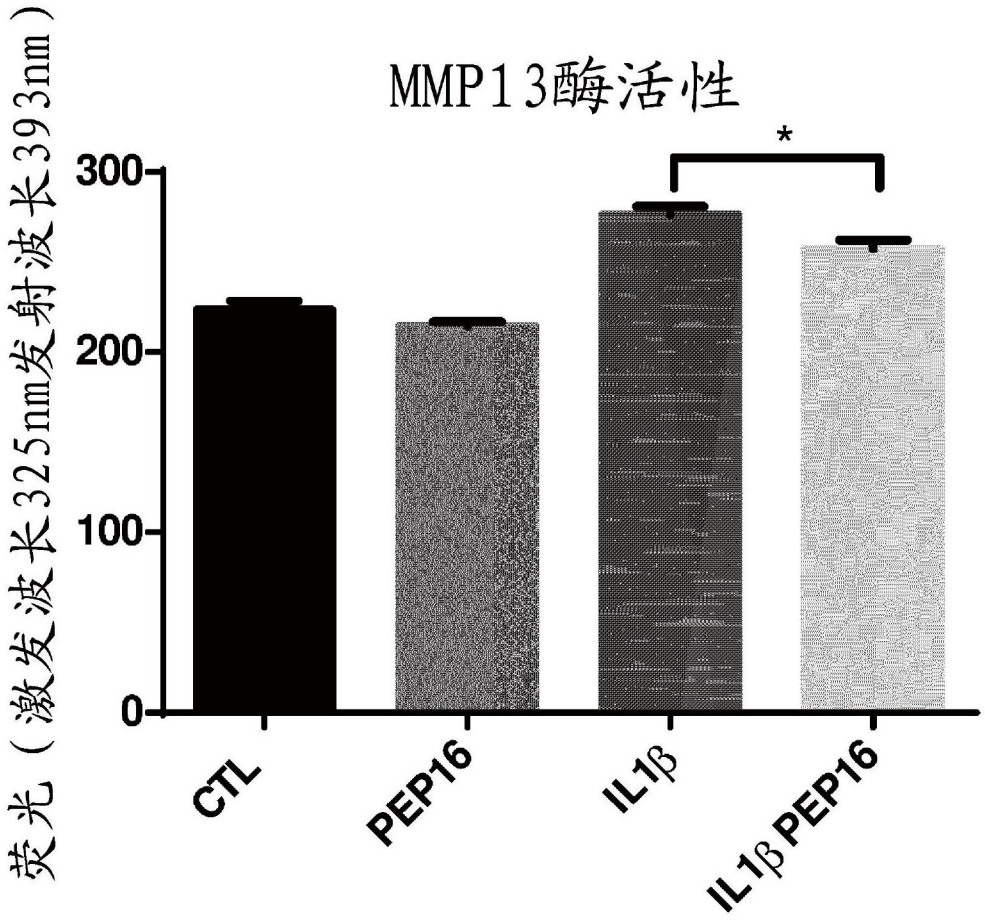

MMP13酶活性
荧光（激发波长325nm发射波长393nm）
300
200
100
0
*
CTL
PEP16
IL1β
IL1β PEP16

图9

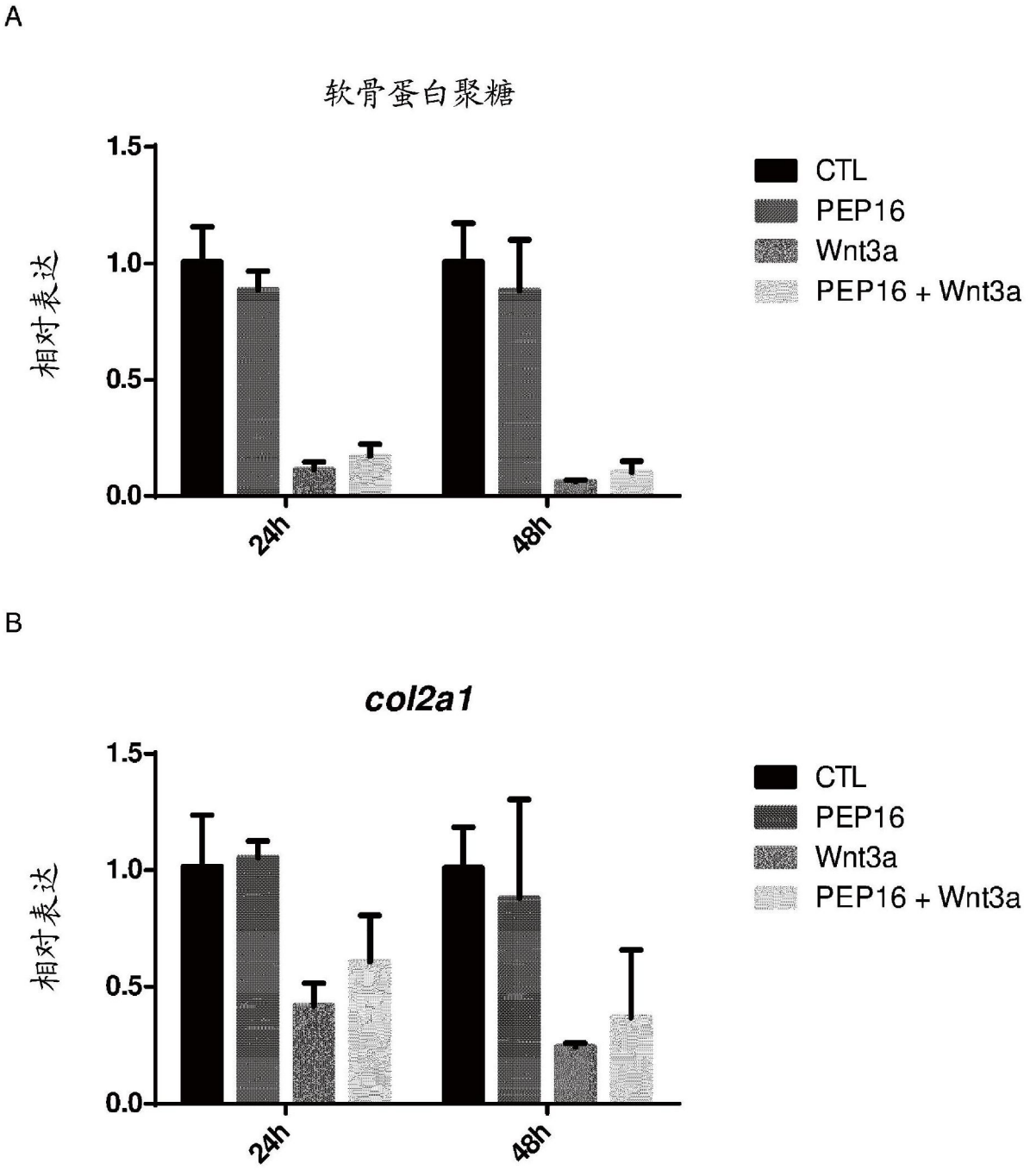
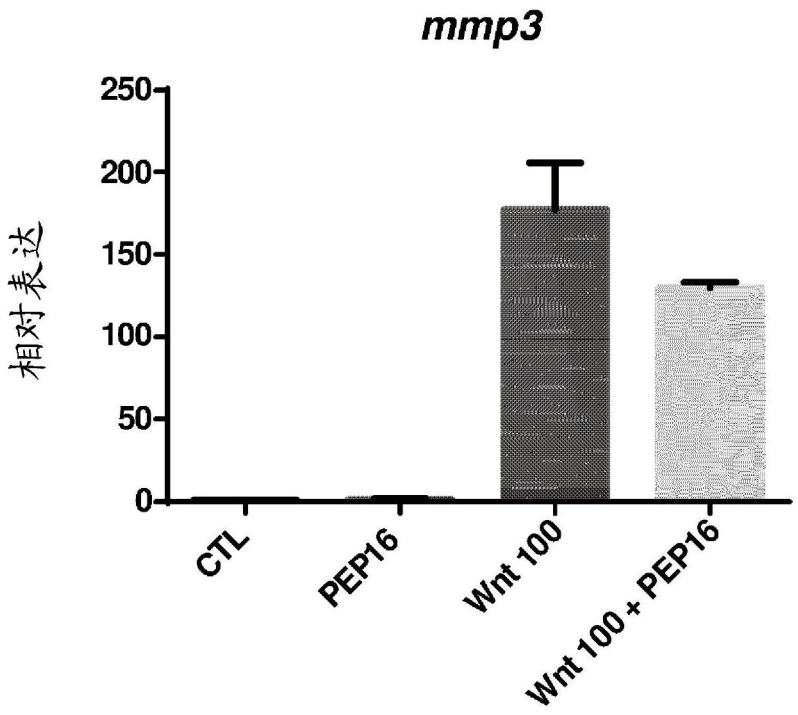

A
软骨蛋白聚糖
相对表达
1.5
1.0
0.5
0.0
24h
48h
CTL
PEP16
Wnt3a
PEP16 + Wnt3a
B
col2a1
相对表达
1.5
1.0
0.5
0.0
24h
48h
CTL
PEP16
Wnt3a
PEP16 + Wnt3a

图10

A


mmp3
相对表达
250
200
150
100
50
0
CTL
PEP16
Wnt 100
Wnt 100 + PEP16

B

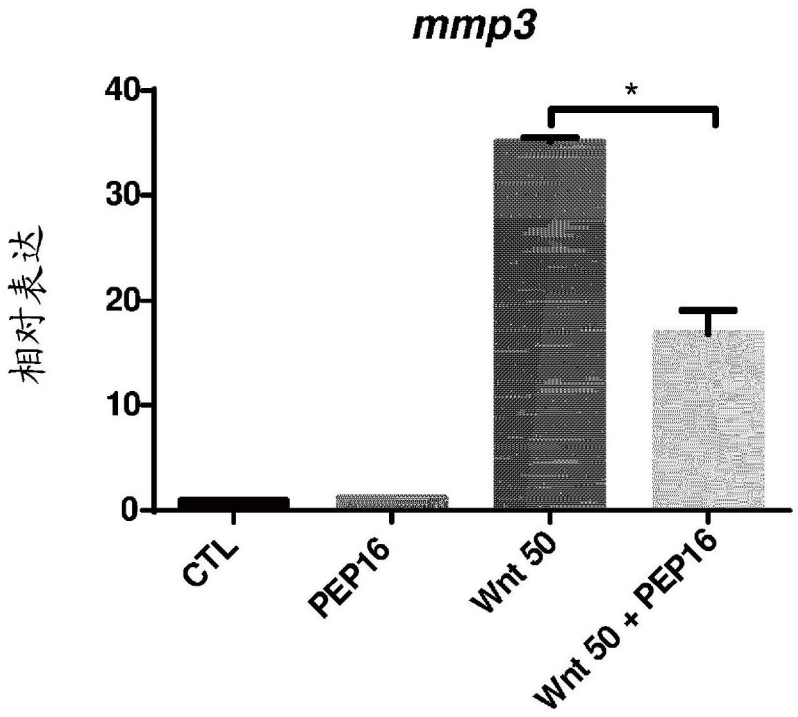

mmp3
相对表达
40
30
20
10
0
*
CTL
PEP16
Wnt 50
Wnt 50 + PEP16

图11

C

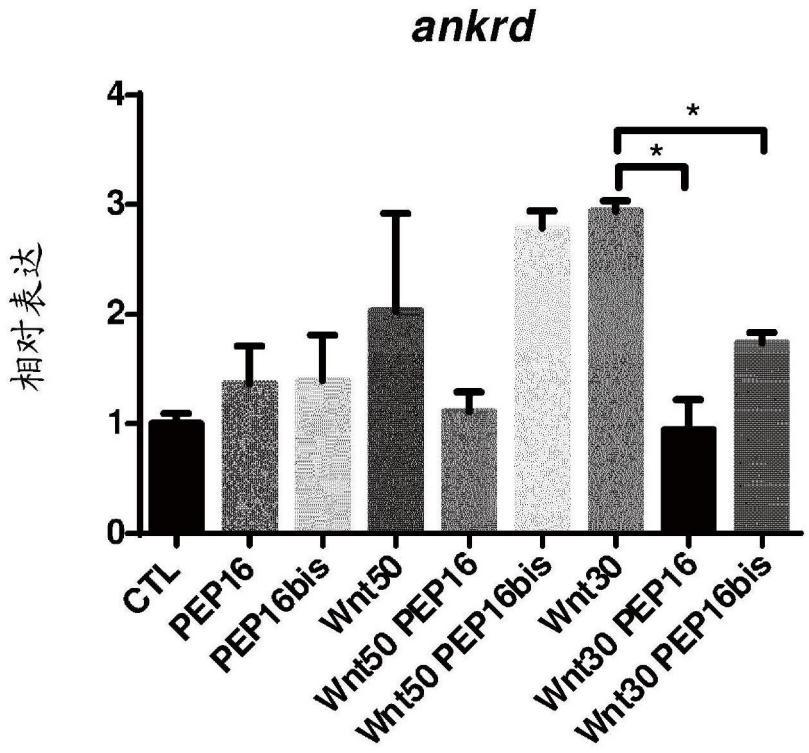

ankrd
相对表达
4
3
2
1
0
*
*
CTL
PEP16
PEP16bis
Wnt50
Wnt50 PEP16
Wnt50 PEP16bis
Wnt30
Wnt30 PEP16
Wnt30 PEP16bis

图11(结束)

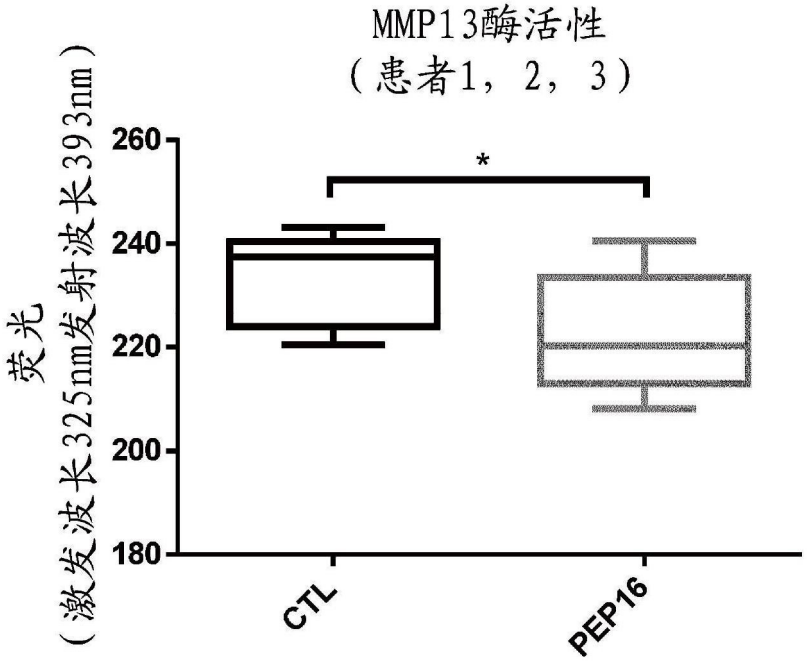

MMP13酶活性
(患者1，2，3)
荧光
(激发波长325nm发射波长393nm)
260
240
220
200
180
*
CTL
PEP16

图12

A

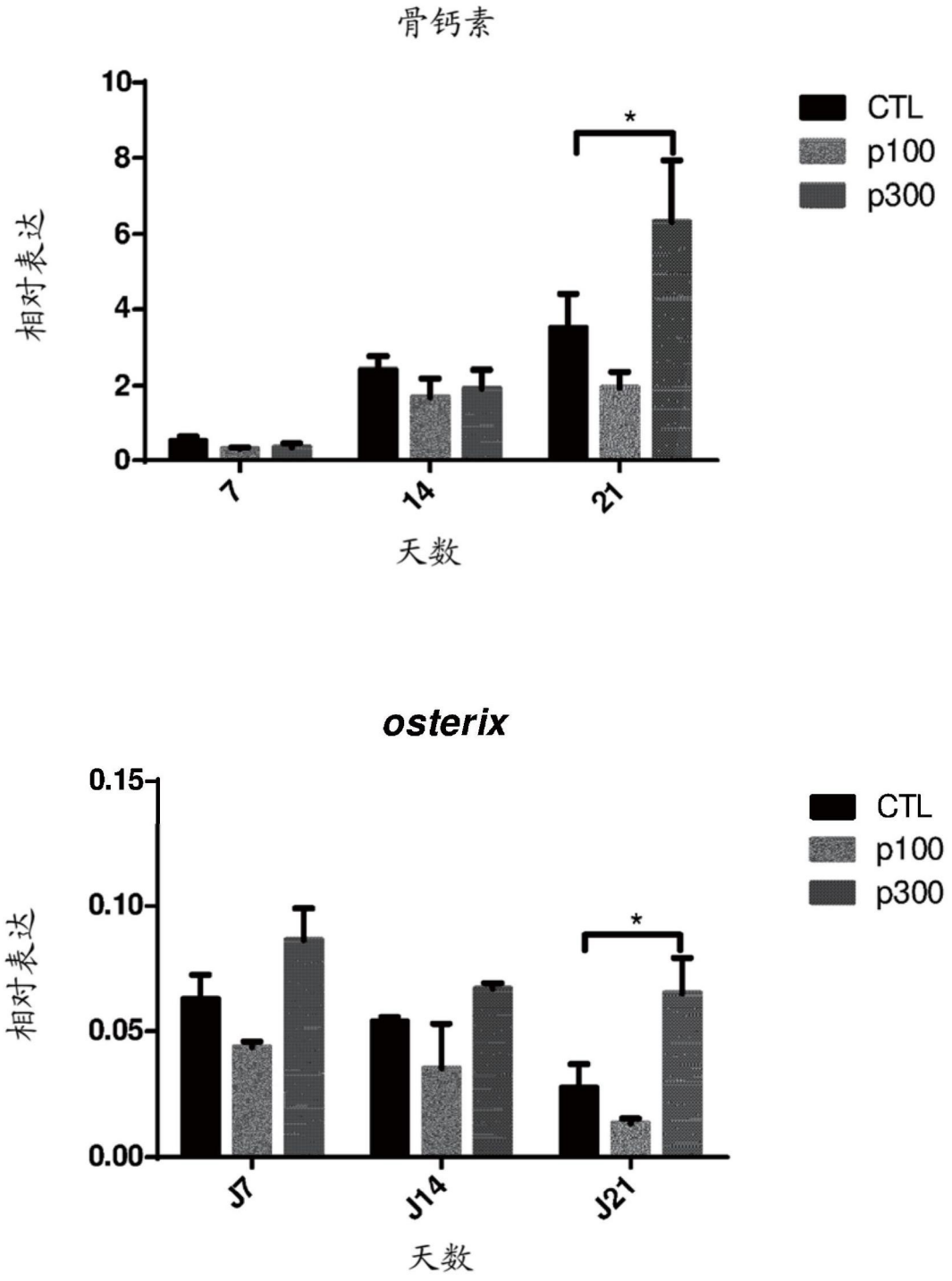
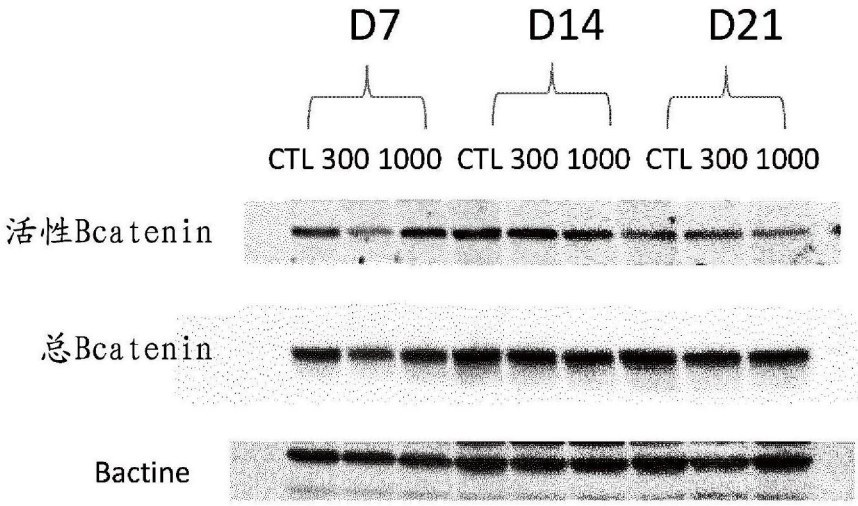

骨钙素
10
8
6
4
2
0
相对表达
*
CTL
p100
p300
7
14
21
天数
osterix
0.15
0.10
0.05
0.00
相对表达
*
CTL
p100
p300
J7
J14
J21
天数

图13

B


D7
D14
D21
CTL 300 1000 CTL 300 1000 CTL 300 1000
活性Bcatenin
总Bcatenin
Bactine

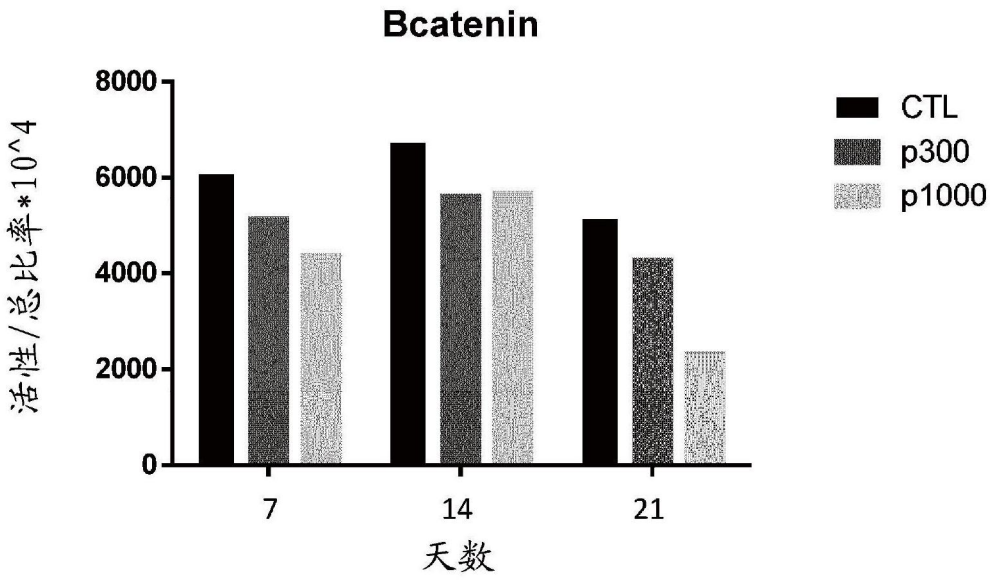

Bcatenin
活性/总比率*10^4
8000
6000
4000
2000
0
7
14
21
天数
CTL
p300
p1000

图13(续)

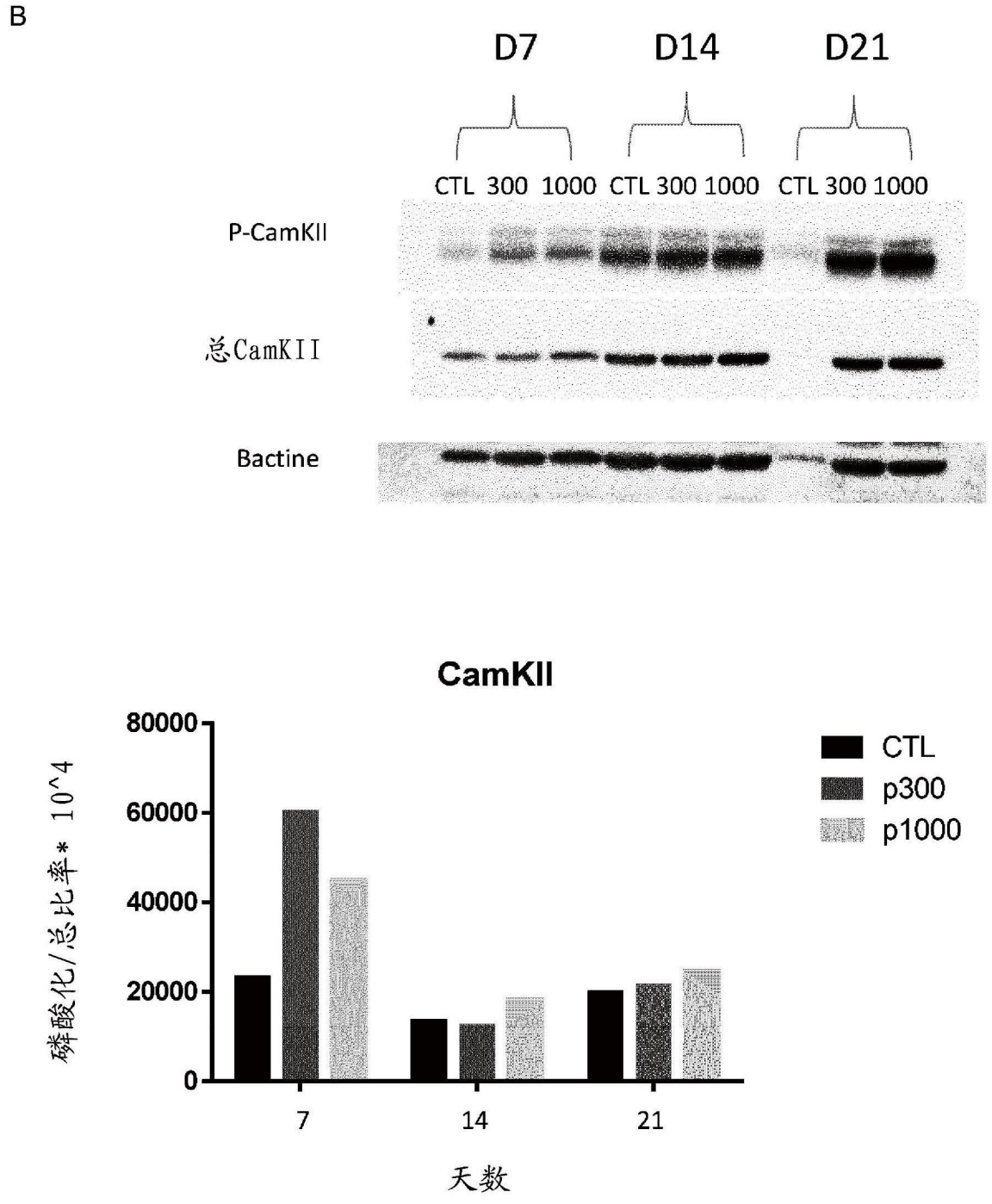
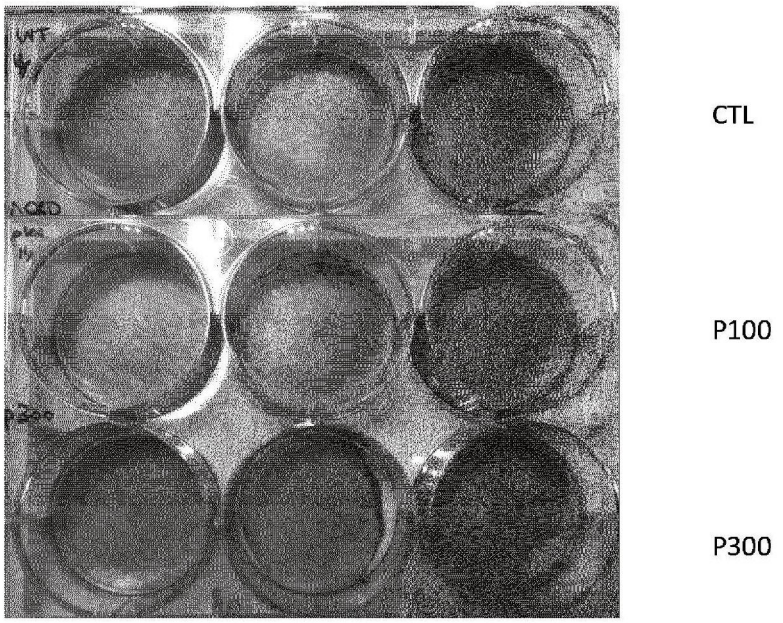

B
D7
D14
D21
CTL 300 1000 CTL 300 1000 CTL 300 1000
P-CamKII
总CamKII
Bactine
CamKII
磷酸化/总比率* 10^4
80000
60000
40000
20000
0
7
14
21
天数
CTL
p300
p1000

图13(续)

C


CTL
P100
P300

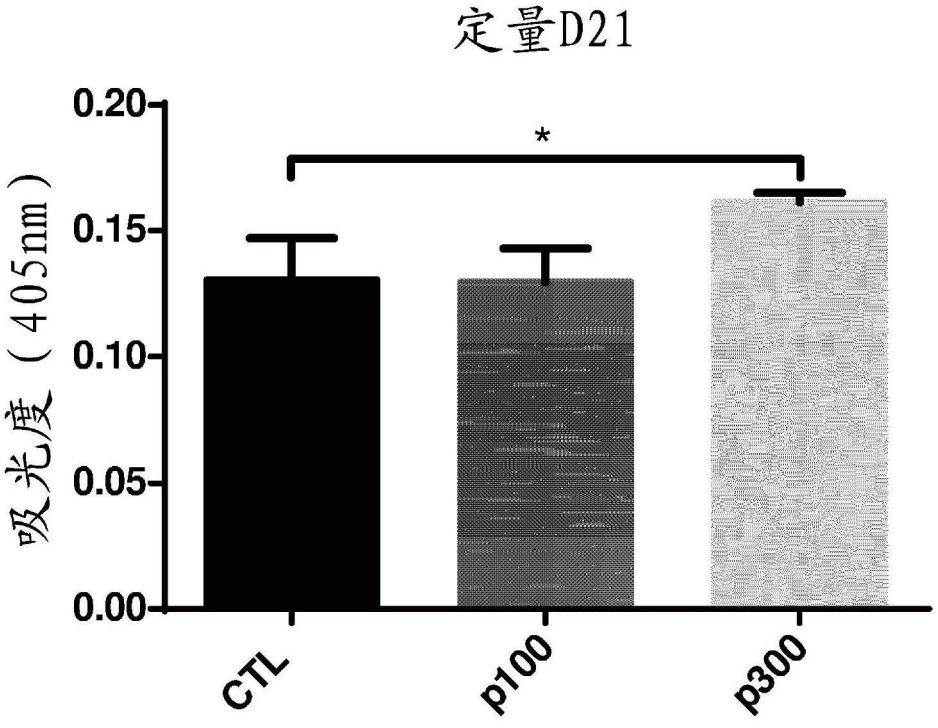
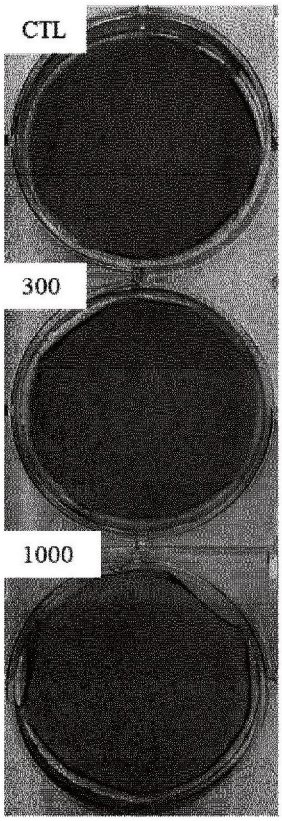
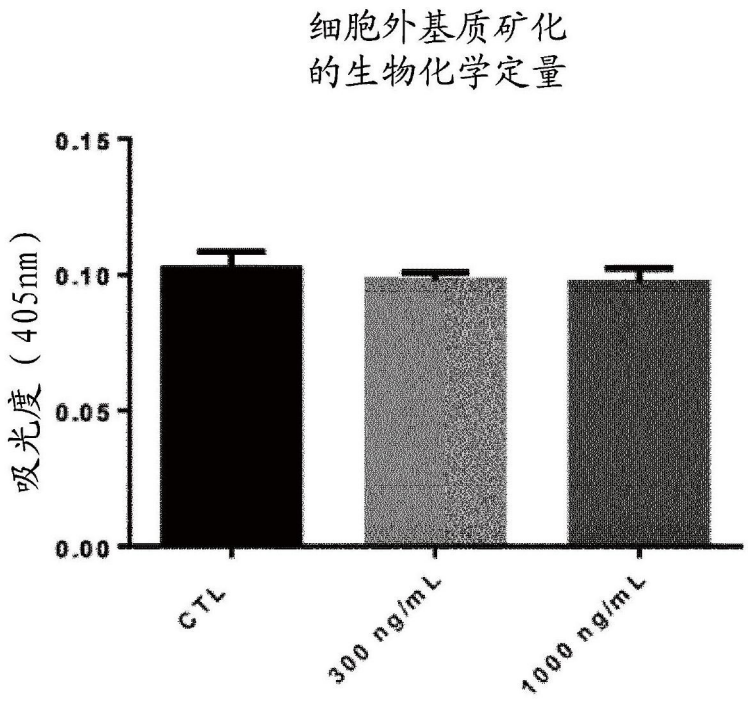

定量D21
吸光度（405nm）
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
*
CTL
p100
p300

图13(结束)



PEP12



PEP16

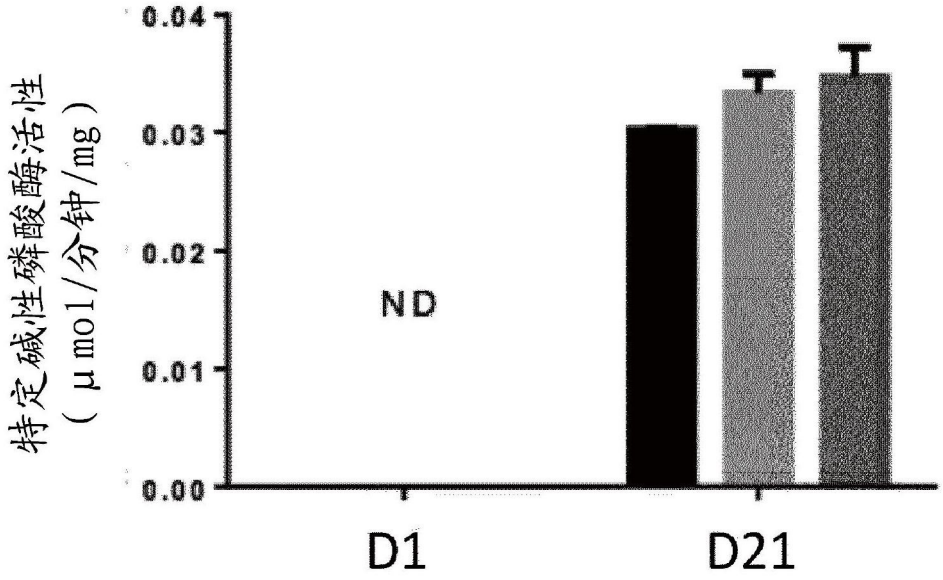


图14

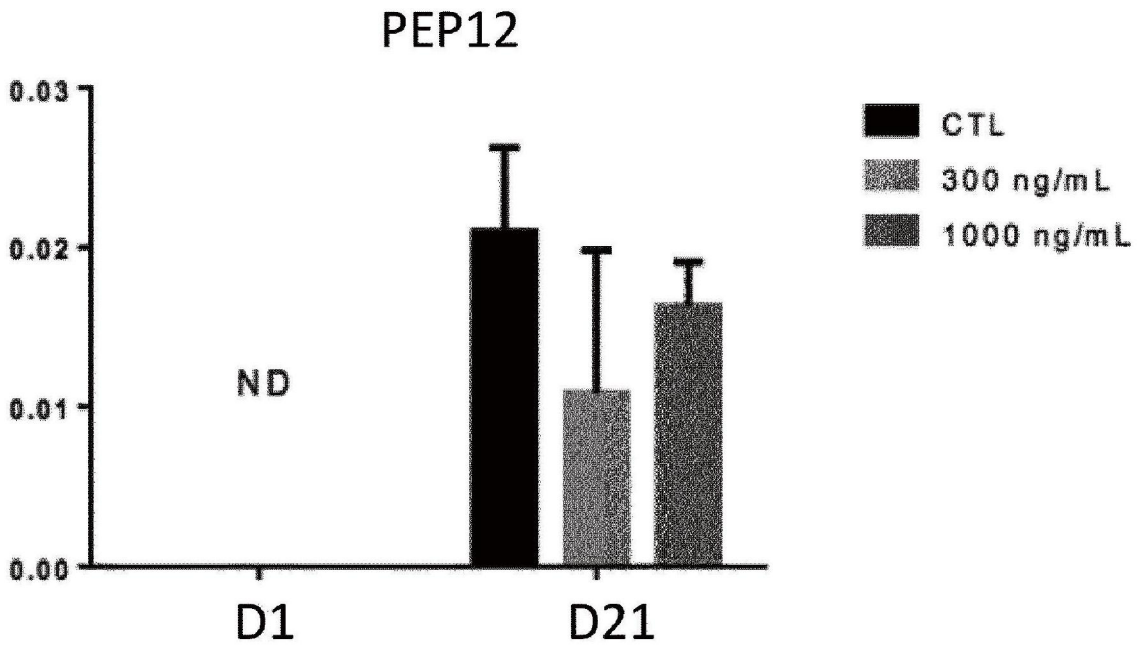

PEP12
0.03
0.02
0.01
0.00
ND
D1
D21
CTL
300 ng/mL
1000 ng/mL

图14(结束)

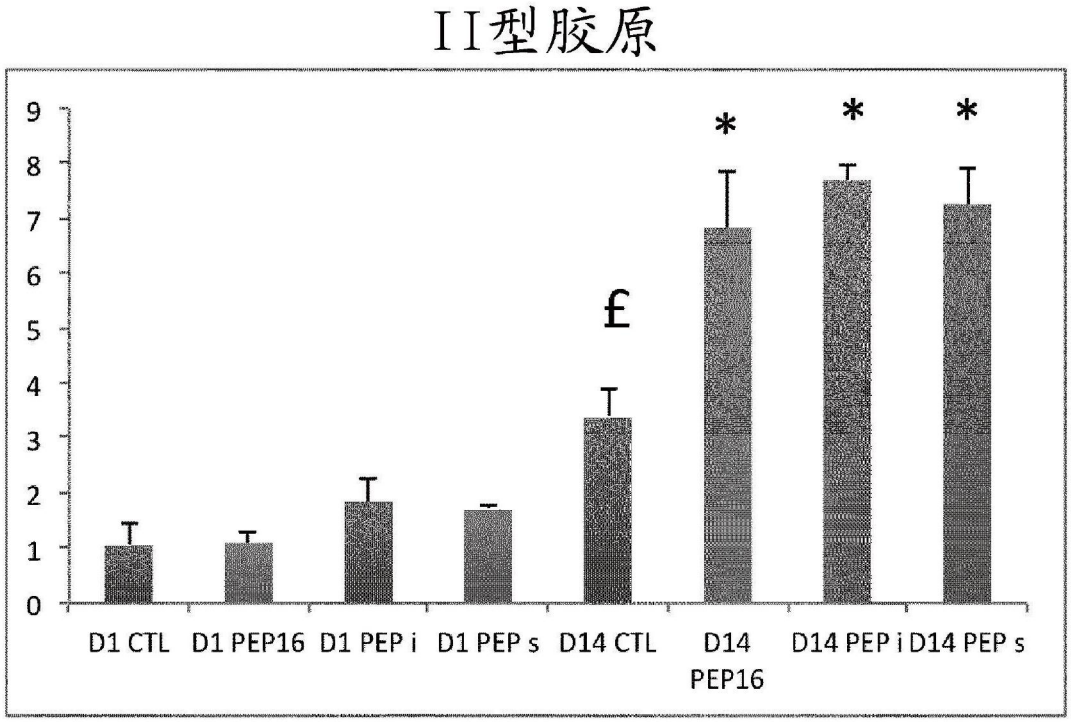
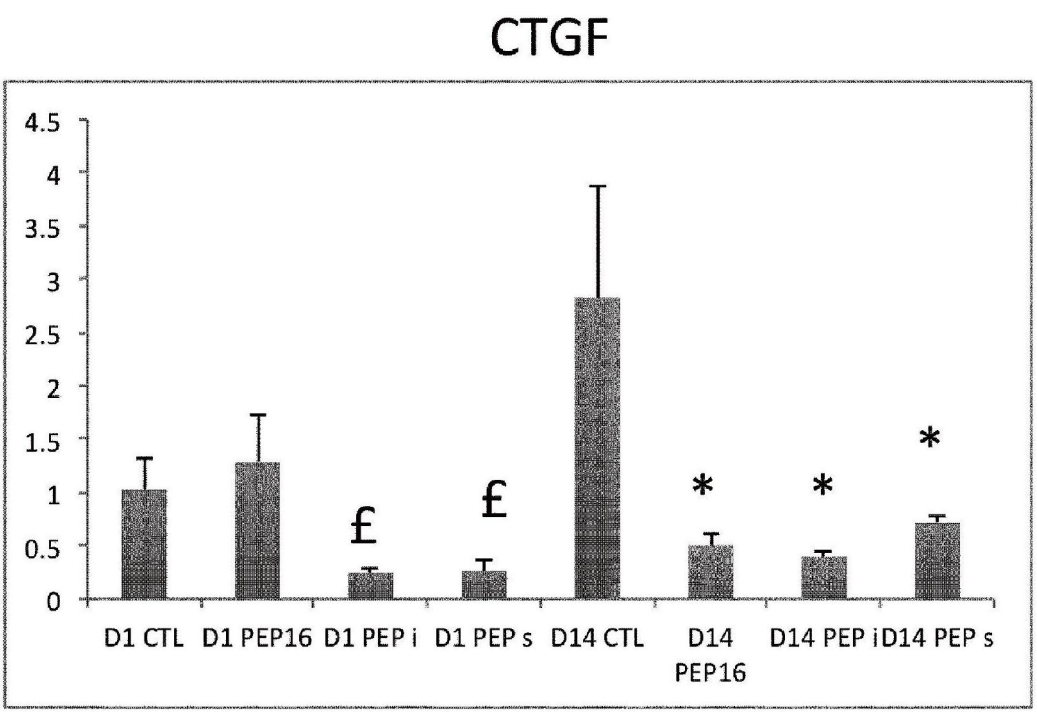

II型胶原
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
£
*
*
*
D1 CTL
D1 PEP16
D1 PEP i
D1 PEP s
D14 CTL
D14 PEP16
D14 PEP i
D14 PEP s

图15


CTGF
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
£
£
*
*
*
D1 CTL
D1 PEP16
D1 PEP i
D1 PEP s
D14 CTL
D14 PEP16
D14 PEP i
D14 PEP s

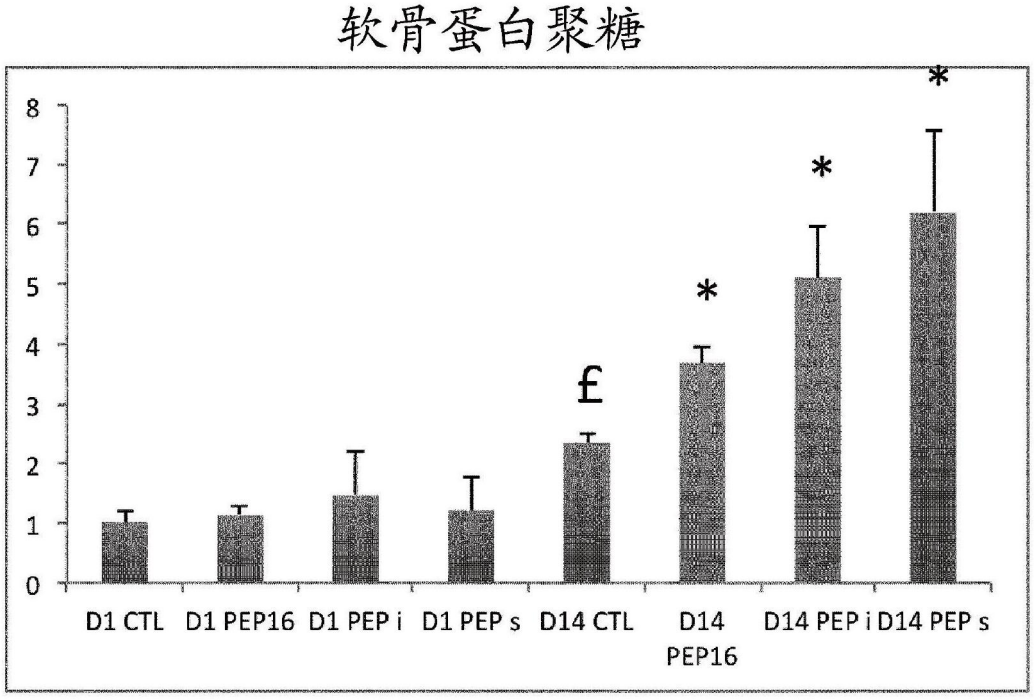

软骨蛋白聚糖
8
7
6
5
4
3
2
1
0
£
*
*
*
D1 CTL
D1 PEP16
D1 PEP i
D1 PEP s
D14 CTL
D14 PEP16
D14 PEP i
D14 PEP s

图15(续)

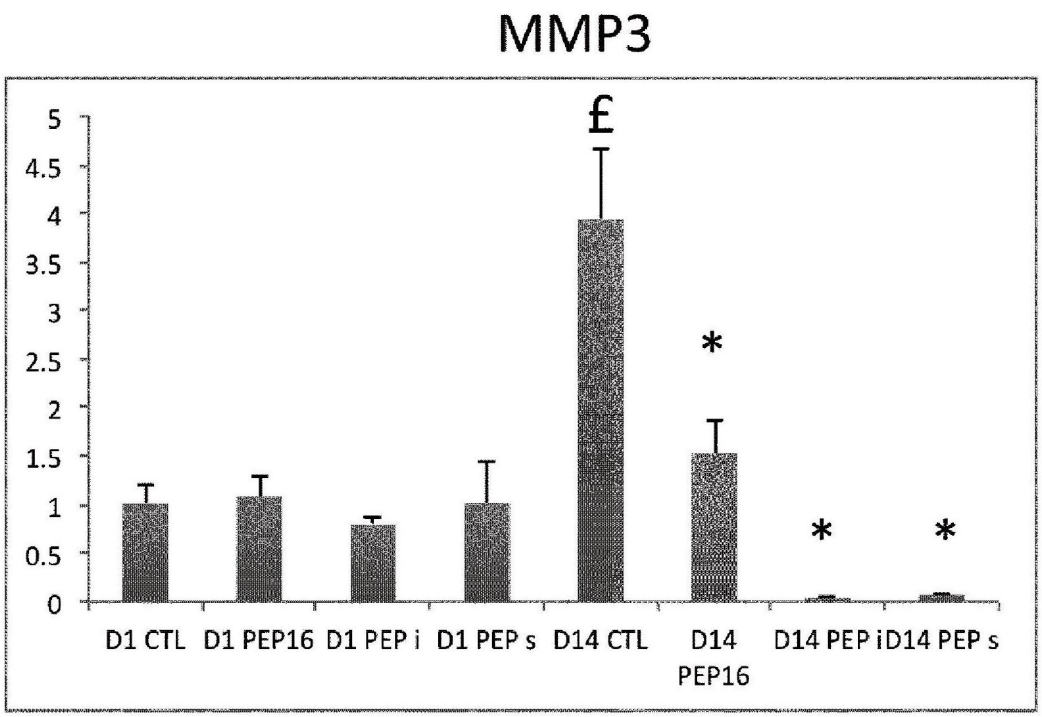

MMP3
5
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
£
*
*
*
D1 CTL
D1 PEP16
D1 PEP i
D1 PEP s
D14 CTL
D14 PEP16
D14 PEP i
D14 PEP s

图15(结束)

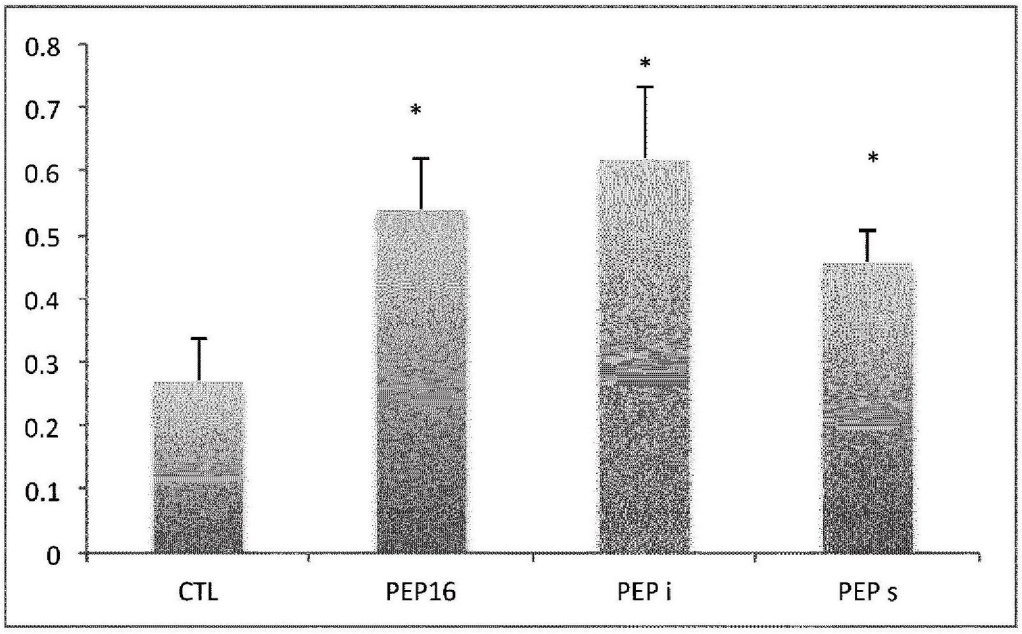
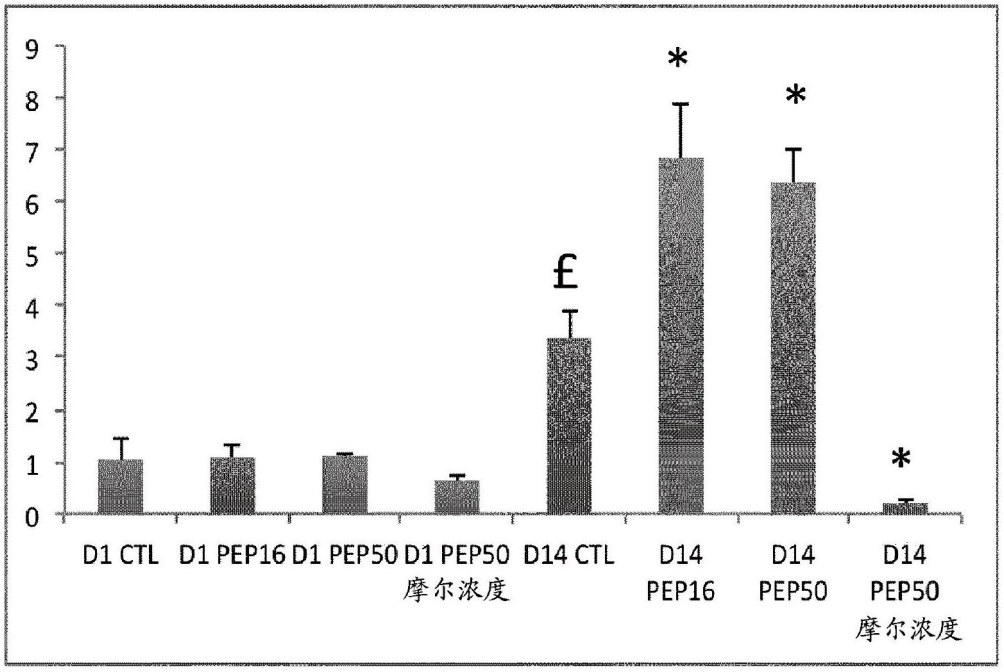

0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
*
*
*
CTL
PEP16
PEP i
PEP s

图16

II型胶原



CTGF

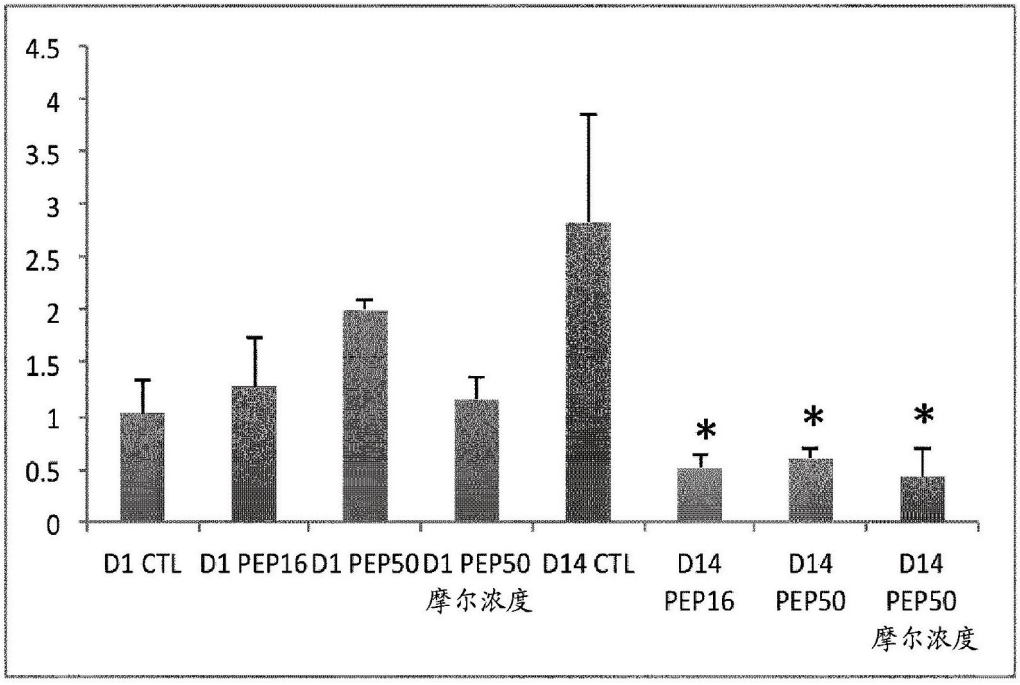
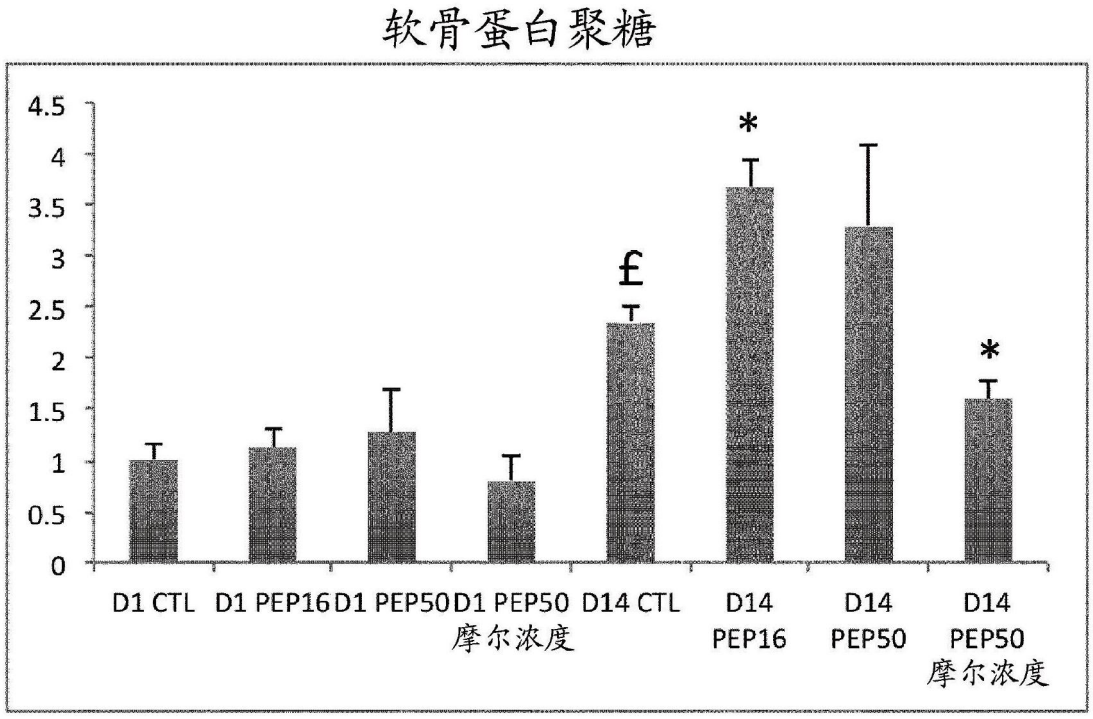


图17


软骨蛋白聚糖
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
£
*
*
D1 CTL
D1 PEP16
D1 PEP50
D1 PEP50
摩尔浓度
D14 CTL
D14 PEP16
D14 PEP50
D14 PEP50 摩尔浓度

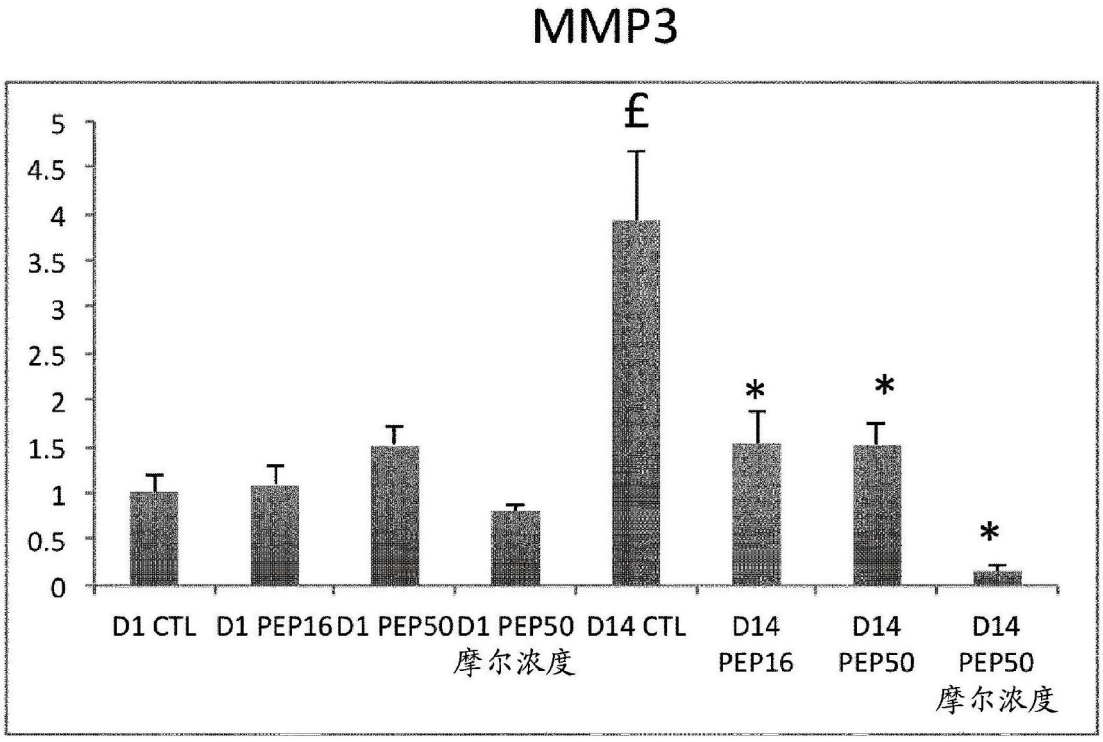

MMP3
5
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
£
*
*
*
D1 CTL
D1 PEP16
D1 PEP50
D1 PEP50
摩尔浓度
D14 CTL
D14 PEP16
D14 PEP50
D14 PEP50 摩尔浓度

图17(结束)

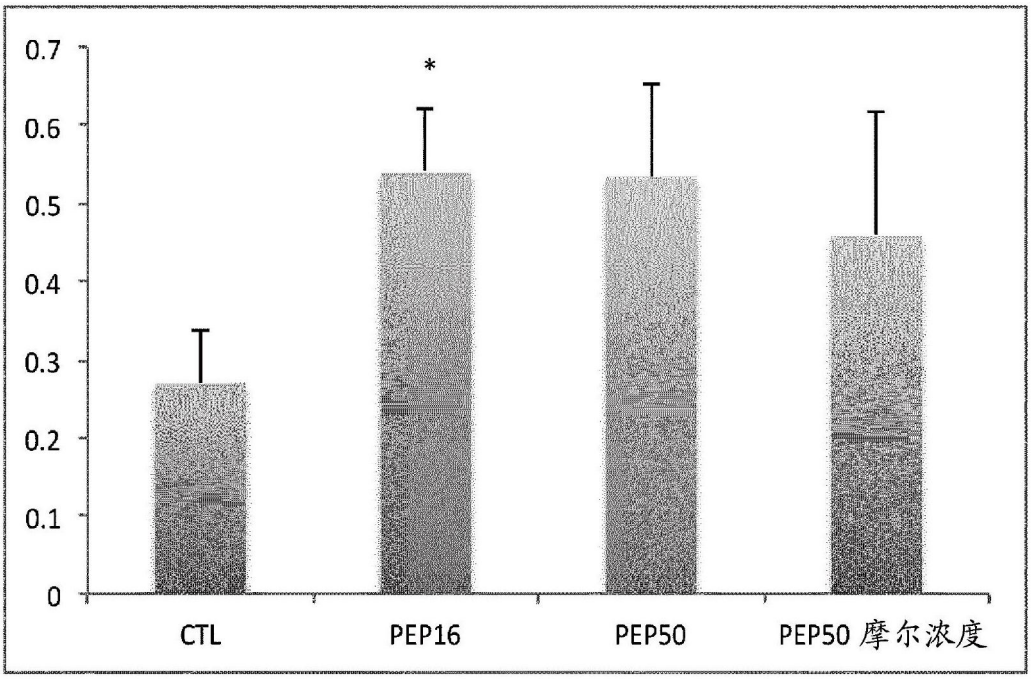


图18

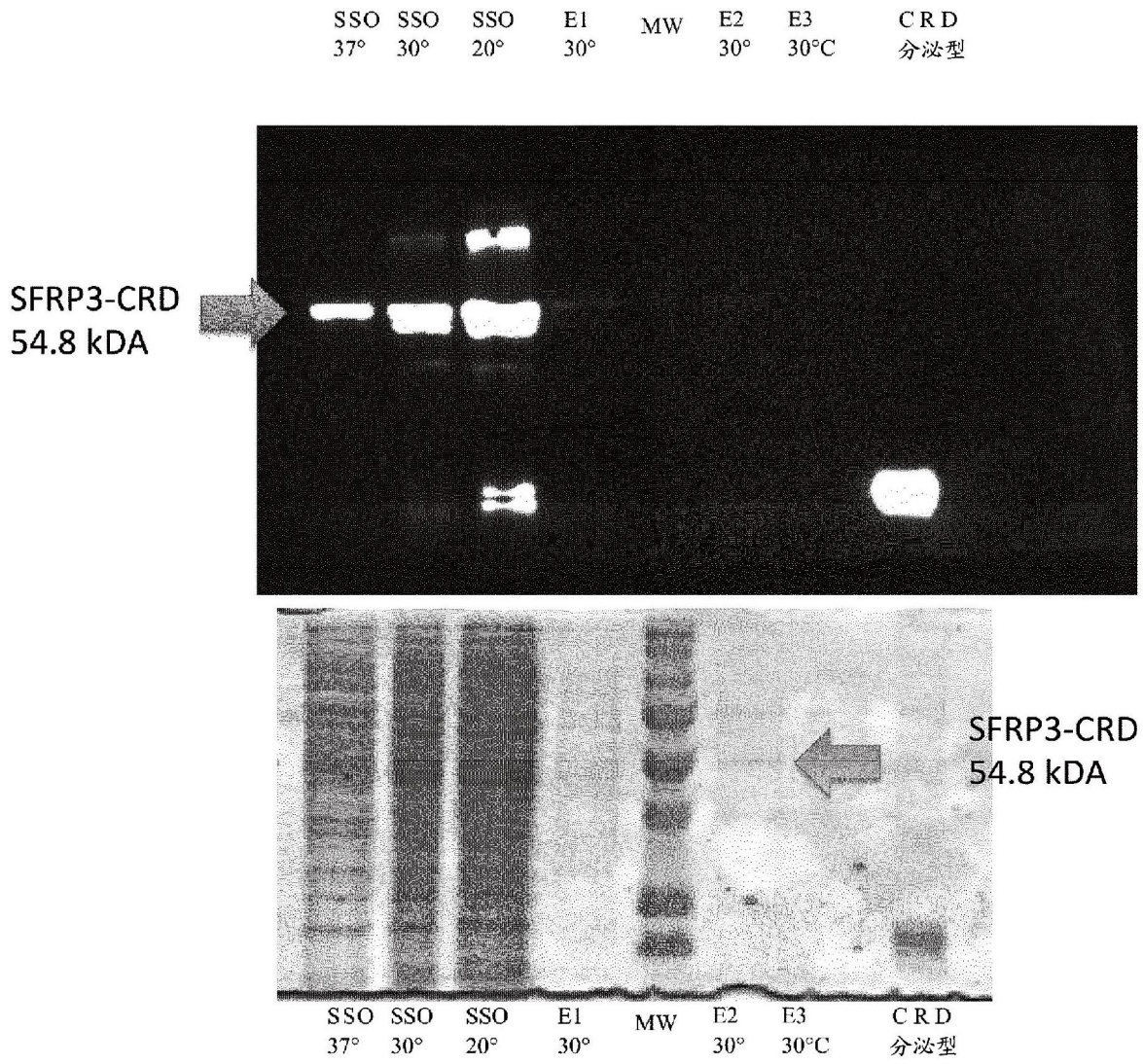

SSO 37°
SSO 30°
SSO 20°
E1 30°
MW
E2 30°
E3 30°C
C R D 分泌型
SFRP3-CRD
54.8 kDA
SFRP3-CRD
54.8 kDA
SSO 37°
SSO 30°
SSO 20°
E1 30°
MW
E2 30°
E3 30°C
C R D 分泌型

图19

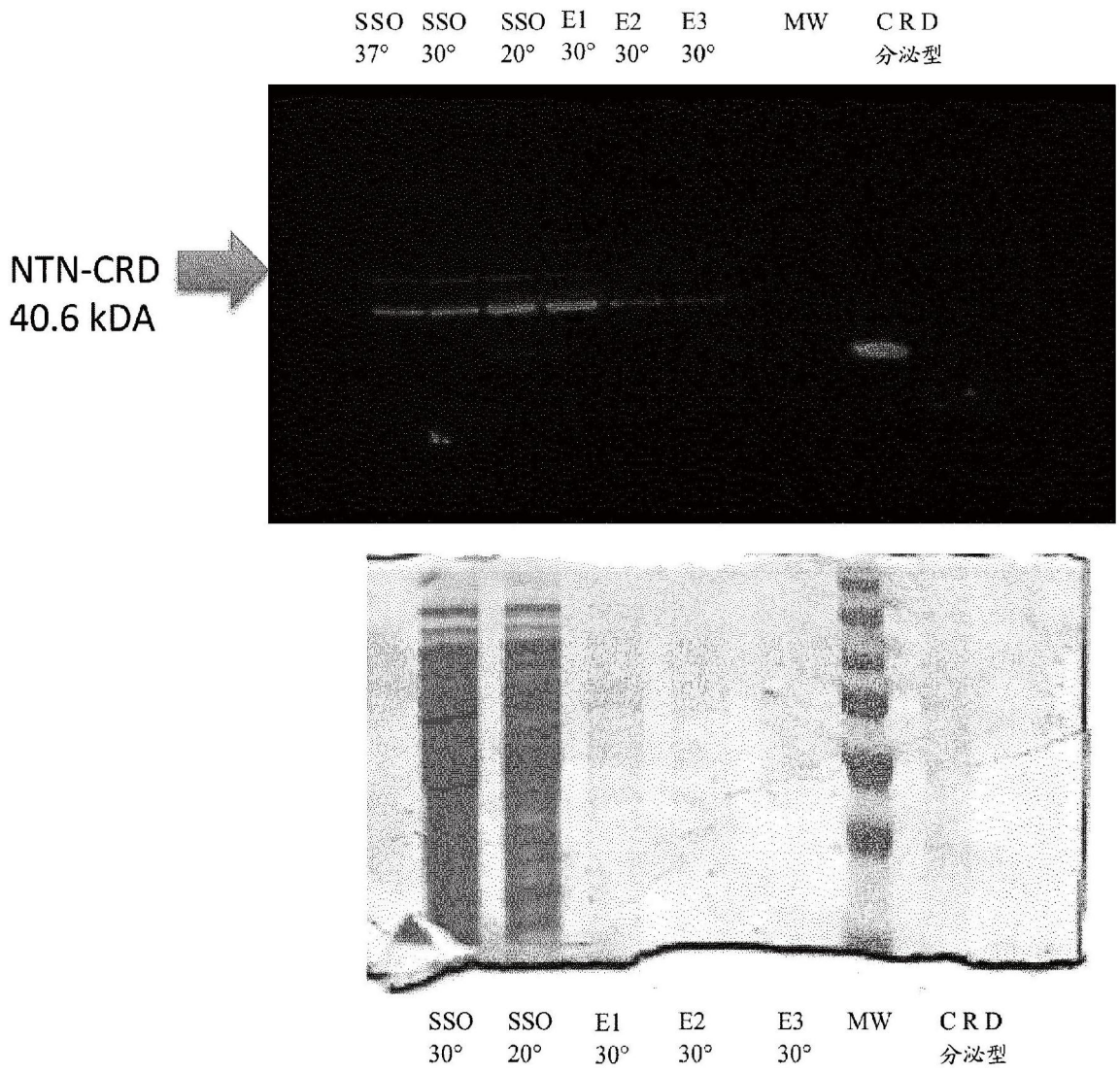

SSO 37°
SSO 30°
SSO 20°
E1 30°
E2 30°
E3 30°
MW
CRD 分泌型
NTN-CRD
40.6 kDA
SSO 30°
SSO 20°
E1 30°
E2 30°
E3 30°
MW
CRD 分泌型

图20

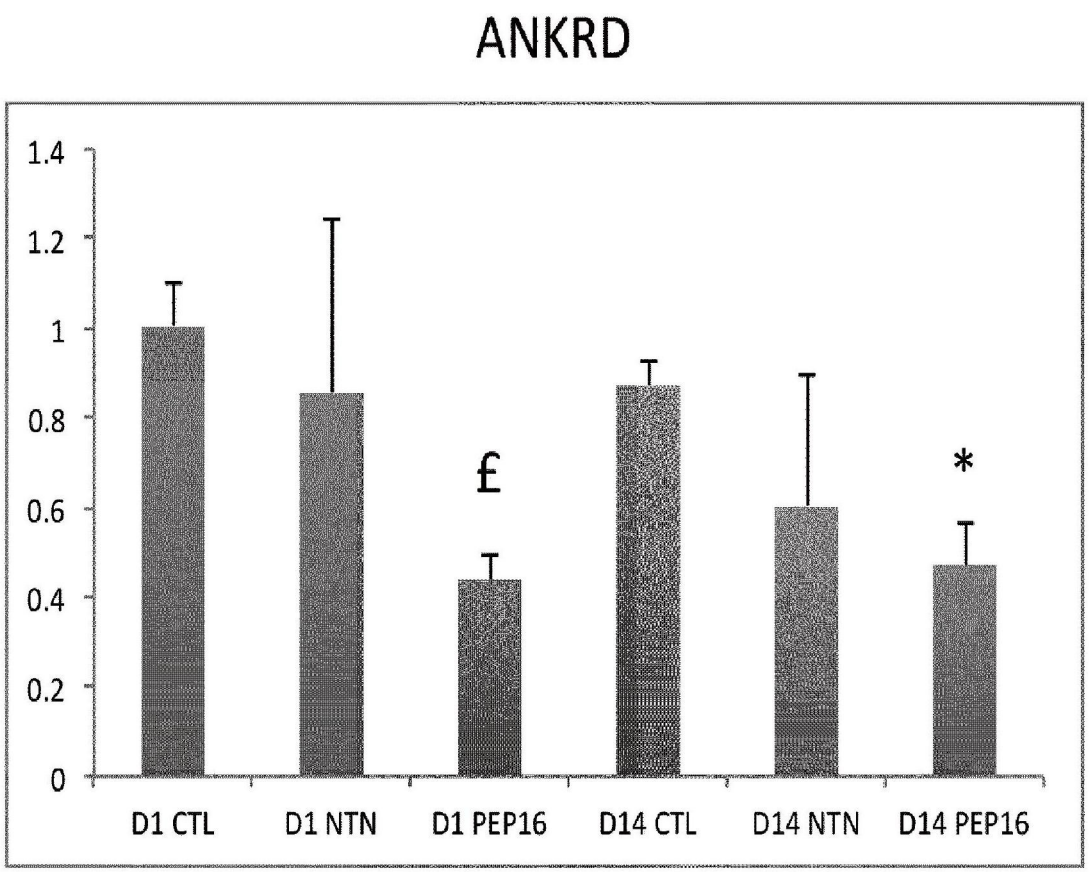

ANKRD
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
£
*
D1 CTL
D1 NTN
D1 PEP16
D14 CTL
D14 NTN
D14 PEP16

图21