(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102209522 B
(45)授权公告日 2016.04.06

(21)申请号 200980144906.8
(22)申请日 2009.09.08
(30)优先权数据
0816507.8 2008.09.10 GB
0908498.9 2009.05.18 GB
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2011.05.10
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/GB2009/051139 2009.09.08
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2010/029343 EN 2010.03.18
(73)专利权人 布拉德福德大学
地址 英国布拉德福德
(72)发明人 休曼·库马·辛格
德斯蒙德·约翰·托宾
(74)专利代理机构 北京德恒律师事务所 11306
代理人 陆鑫 高雪琴
(51)Int.Cl.
C12N 5/00(2006.01)

(56)对比文件
WO 03086313 A2,2003.10.23,
WO 2008082525 A1,2008.07.10,
WO 03086313 A2,2003.10.23,

审查员 贾涛

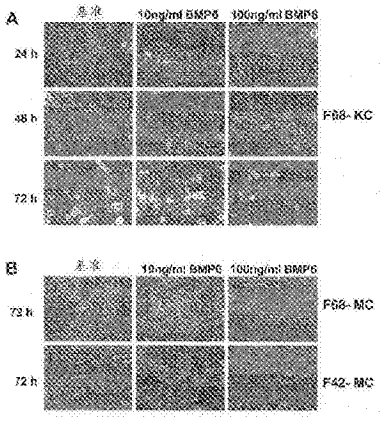
权利要求书1页 说明书18页
序列表7页 附图10页

(54)发明名称

调节皮肤色素沉着的组合物和方法

(57)摘要

本发明涉及对研究或调节黑色素在皮肤中的色素沉着有用的组合物和方法。具体地说，本发明涉及包括能够调节ALK6(SEQ ID 2)或Cdc42的活性或表达从而能够对黑色素从黑素细胞到角化细胞以及潜在地从角化细胞到角化细胞的转移进行调节的物质的组合物。本发明也涉及鉴定这种组合物的试验，以及调节皮肤色素沉着的方法。



CN 102209522 B

1. 一种评估物质调节黑色素从黑素细胞转移到角化细胞的能力的非治疗目的方法，所述方法包括以下步骤：

—提供测试物质；以及

—通过确定所述测试物质对 Cdc42 的表达或活化的影响来确定所述测试物质与 ALK6 相互作用的能力。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，包括提供表达 ALK6 的细胞和通过确定所述测试物质对 Cdc42 的表达或活化的影响来确定所述测试物质与所述细胞表达的 ALK6 相互作用的能力。

3. 根据权利要求 1 或 2 中任意一项所述的方法，其中所述表达 ALK6 的细胞是黑素细胞。

4. 根据权利要求 1 所述的方法，包括确定所述测试物质调节 ALK6 活性的能力。

5. 根据权利要求 4 所述的方法，其中确定了所述测试物质活化 ALK6 的能力。

6. 根据权利要求 4 所述的方法，其中确定了所述测试物质使 ALK6 失活的能力。

7. 一种评估物质调节黑色素从黑素细胞转移到角化细胞的能力的非治疗目的方法，所述方法包括以下步骤：

- 提供测试物质；

- 提供表达 Cdc42 的细胞；以及

- 确定所述测试物质调节 Cdc42 的活性和 / 或表达的能力。

8. 根据权利要求 7 所述的方法，其中所述表达 Cdc42 的细胞是黑素细胞或角化细胞。

9. 根据权利要求 7 所述的方法，包括将所述测试物质处理过的细胞中的 Cdc42 的活性和 / 或表达与对照细胞中 Cdc42 的活性和 / 或表达进行比较。

10. 一种增加受体的皮肤和 / 或头发的黑色素沉着的非治疗目的方法，所述方法包括对受体施用组合物，所述组合物包括 BMP6 前体蛋白或 BMP6 的片段，其中，所述片段包括选自由 SEQ ID NO :1 的氨基酸 374-513、SEQ ID NO :1 的氨基酸 382-513、SEQ ID NO :1 的氨基酸 388-513 和 SEQ ID NO :1 的氨基酸 412-513 组成的组中的氨基酸。

11. 根据权利要求 10 所述的方法，其中包括将所述组合物应用到受体的皮肤和 / 或头发的外表面上。

12. 根据权利要求 10 所述的方法，其中所述物质能够相对于正常生理水平增加 ALK6 的活性。

13. 一种调节受体的皮肤和 / 或头发的黑色素沉着的非治疗目的方法，所述方法包括对受体施用组合物，所述组合物包括核酸，所述核酸能够通过与编码 Cdc42 或其功能部分的 DNA 或 RNA 的相互作用而调节 Cdc42 的表达。

14. 根据权利要求 13 所述的方法，其中所述核酸是 RNA 分子。

15. 根据权利要求 13 所述的方法，其中所述核酸是能够对编码 Cdc42 的 mRNA 进行针对性的反义作用或 RNA 干扰的 RNA 分子。

16. 根据权利要求 13 所述的方法，其中所述核酸是用于通过 RNAi 靶向 Cdc42mRNA 的 RNA 分子，所述 RNAi 具有序列 5’-GAUAACUCACCACUGUCCATT-3’ 和 5’-UGGACAGUGGUGAGUUAUCTT-3’ 寡核糖核苷酸；或 5’-GACUCCUUUCUUGCUUGUUTT-3’ 和 5’-AACAAGCAAGAAAGGAGUCTT-3’ 寡核糖核苷酸。

调节皮肤色素沉着的组合物和方法

技术领域

[0001] 本发明涉及对研究或调节黑色素在皮肤中的色素沉着有用的组合物和方法。具体但是不独占地说，本发明涉及能够对黑色素从黑素细胞到角化细胞以及潜在地从角化细胞到角化细胞的转移进行调节的组合物，鉴定这种组合物的试验，以及调节皮肤色素沉着的方法。

背景技术

[0002] 黑素细胞是沿着表皮和毛球的基底层分布的神经嵴源性细胞。这些细胞在称为黑素体的黑素细胞特异性细胞器内部合成黑色素。对于色素沉着的皮肤和头发，这种黑素素必须从黑素细胞转移到相邻的角化细胞。在涉及大量步骤被一系列分子和化合物在多个控制点上控制的过程中，黑色素的数量和质量（棕 / 黑真色素或红 / 黄褐黑素）决定哺乳动物的皮肤和头发 / 羊毛 / 毛皮的颜色。在过去的二十年里，人类在理解黑色素合成和黑素体生源 / 成熟的分子控制方面取得了很多进步。然而，人类知识的显著空白集中在黑色素转移是怎样被控制的一主要的临床 / 化妆品兴趣点，因为这个过程最终控制在皮肤表面和沿着毛发纤维所察觉到的色素沉着水平。

[0003] 在本申请中描述了一种控制黑色素从人体皮肤黑素细胞转移到人体皮肤角化细胞的新机制。该机制涉及 BMP6 的行为，其以剂量依赖的方式激发该过程。

[0004] 骨形态发生蛋白 (BMPs) 是属于 TGF-β 超家族的分泌的信号分子。它们在细胞增殖，细胞分化，细胞运动，细胞黏着和细胞死亡方面发挥重要作用 (Hogan 1996)。迄今为止，已经描述了 20 个以上不同的 BMP 家族成员，而且每个都通过与特异性 BMP 受体的相互作用发挥其生物活性 (Wozney 等，1988)。BMP 信号在多个水平上运行取决于 BMP 类型，拮抗剂的存在，靶组织的发展阶段，以及靶细胞受体类型 (Botchkarev 2003)。 BMPs 结合两个跨膜受体家族，多重 BMP 受体 (BMPR)I 和单个 BMPRII(Hogan 1996)。有趣地是，为了启动信号，BMP 必须结合两个受体，通过 BMP-R II 诱导 BMPR I 中细胞内域的磷酸化并且活化细胞内信号转导。

[0005] BMPs 是皮肤发展的有力监管者，而且它们也在调控表皮动态平衡，毛囊生长，和正常产后皮肤中黑素生成方面发挥重要作用 (Botchkarev 2003)。黑素细胞是在胚胎形成过程中迁移至表皮和毛囊的而且随后合成黑色素和将黑色素分配给周围角化细胞的神经嵴源性细胞 (Halaban 等 2003)。有趣地是，有许多 BMPR I 受体，BMPR I A(ALK3 ;Seq ID 4)，BMPR I B(ALK6 ;Seq ID 2)，和 ActR-I(ALK2)(Kawabata 等，1998) 而且通过 ALK3 诱导它们的增殖同时通过 ALK6 诱导它们的分化在神经前体细胞中发信号 (Panchision 等，2001)，这表明受体表达决定 BMP 对细胞的作用。

[0006] Gilchrest 小组首先在研究中示出 BMP4 在黑素细胞生物学中的作用，该研究表明特定的 BMP 家族成员通过抑制黑素细胞中的限速酶（酪氨酸酶）的表达和活性而扮演正常人体黑素细胞中的黑素生成自分泌抑制剂的角色 (Yaar 等，2006)。

[0007] 然而，至今还没有报道其他 BMP 蛋白质与黑素细胞生物学（例如黑素生成和 / 或

黑色素转移）有关。虽然已经对黑素细胞中黑素生成（即黑色素合成）的调控了解很多，但是我们关于黑素体怎样从黑素细胞转移到角化细胞的知识还很有限。除了细胞质－吞噬作用，越来越多的证据支持黑素体通过可以与角化细胞质膜相互作用的丝状伪足转移的观点 (Scott 等，2002，Singh 等，2008)。重要地是，与由黑素细胞树突的侧面和末梢引起的并且在其内腔中包含黑素体的丝状伪足一致的结构已经在 human skin in situ as well as in vitro(Scott 等，2002) 中进行了报道。

发明内容

[0008] 根据本发明的第一方面，提供了一种对受体的皮肤和／或头发的黑色素色素沉着进行调节的方法，方法包括给受体服用组合物，该组合物包括可 以对 ALK6(SEQ ID 2) 或 Cdc42 的活性或表达进行调节的物质。

[0009] 在本发明优选的实施例中，物质通过调节 ALK6 的活性调节 Cdc42 的表达。

[0010] 在本发明优选的实施例中，方法包括将组合物涂在受体的皮肤和／或头发的外表面上。

[0011] 为了调节皮肤的色素沉着，有两个方法：调节黑素生成和调节黑色素的转移。本发明可以包括这些方法的一个，另一个或两个方法都包括。然而，本发明的发明人尤其对调节黑色素转移的方法感兴趣，因为发明人已经发现可以有效地以黑色素转移为目标。假设黑色素转移是比黑素生成更“下游”的过程，那么在避免副作用方面，黑色素转移是更有吸引力的目标。

[0012] 合适地是，该方法是化妆品的方法，其在用化妆品调节皮肤和／或头发的黑色素色素沉着水平使皮肤和／或头发颜色变淡或变深方面有用。

[0013] 可选地，该方法可以用于为受体提供一定程度的光保护。众所周知黑色素保护皮肤免受紫外线照射的许多有害作用。因此，增加受体的皮肤中的黑色素量可以显著地降低阳光诱发的损伤，例如细胞的突变潜在地导致癌症或早熟衰老症。

[0014] 在另一个可替换实施例中，该方法可以用于治疗与皮肤的非正常色素沉着相关的疾病。这种治疗可以是治愈的，或可能是用于缓解症状。与皮肤的变异色素沉着相关的可以治疗的疾病或医疗疾病包括色素沉着过度（例如黑斑病，黄褐病，衰老性着色斑，日光性着色斑，雀斑，炎症后色素沉着过度）和色素减退（例如，白癜风，和炎症后色素减退）和皮肤损伤带来的色素沉着减少。

[0015] 在一个实施例中，物质可以增加与正常生理水平相比的 ALK6 的活性或表达，即 ALK6 激动剂。在特定的实施例中，物质可以以增加黑色素转移的方式增加 ALK6 的活性或表达。ALK6 的活性的增加将使皮肤和／或头发中的黑色素增加。

[0016] 在另一个实施例中，物质可以降低与正常生理水平相比的 ALK6 的活性或表达，即 ALK6 拮抗剂。在特定的实施例中，物质可以以降低黑色素 转移的方式降低 ALK6 的活性或表达。ALK6 的活性的降低将使皮肤和／或头发中的黑色素降低。

[0017] 在一个实施例中，本发明的方法涉及包含 BMP6 多肽（编号 NM_001718；Seq ID 1）或片段或其变体的组合物的应用，其中所述片段或变体是功能活性的。

[0018] 以野生型 BMP6 至少 50％的活性活化 ALK6 的片段或变体可以称为是功能活性的，尽管较低的活性水平可能也是有用的。更优选的这种片段或变体的活性应该是野生型 BMP6

的活性的至少 75%，尤其优选是野生型 BMP6 的活性的 90%。具体地说，本文中的“活性”可以在以下描述的试验中表示激发黑色素从黑素细胞转移到角化细胞的能力。

[0019] 正如使用以下将要描述的实验所确定的，“功能活性的”BMP6 片段或变体表现出增加黑素生成或黑色素转移的能力。BMP6 蛋白质，变体，和片段的功能活性可以通过本领域技术人员已知的各种方法进行检验 (Current Protocols in Protein Science(1998)Coligan 等，eds.，John Wiley&Son，Inc.，Somerset，New Jersey) 而且在以下进一步描述。

[0020] 为了本文的目的，功能活性的片段可以包括那些包含 BMP6 的一个或多个结构域的片段，例如结合域，因为所述域具有所需的活性。可以使用 PFAM 程序鉴别蛋白质域 (Bateman A.，等，Nucleic Acids Res，1999，27 :260-2)。在一些实施例中，优选的片段是功能活性的，域包含片段包括至少 25 个连续的氨基酸，优选至少 50，更优选 75，而且最优选 BMP6 有效域的至少 100 个连续的氨基酸。在更优选的实施例中，片段包括整个功能性的有效域。

[0021] 功能性的活性片段或变体包括重组 BMP6 多肽及其功能活性片段或变体，包括被 BMP6- 编码核酸编码的那些。

[0022] 功能性的活性 BMP6 多肽可以理论上包括 BMP6 前体蛋白质（编号 P22004)（序列号 1)。据相信，成熟的 BMP6 多肽包括相同的氨基酸 374-513。

[0023] 功能性的活性片段可以包括多肽，该多肽包括 BMP6 前体（序列号 1）的氨基酸 382-513，388-513 和 412-513。

[0024] 术语“BMP6- 编码核酸”是指编码 BMP6 多肽的 DNA 或 RNA 分子。

[0025] 优选地是，BMP6 多肽或核酸或变体或其片段来自人体，但是也可以是其同源物或衍生物。

[0026] 优选所述变体或其片段具有与人类 BMP6 或序列编码 BMP6(NM001718) 至少 70%的序列一致性，优选至少 80%，更优选 85%，进一步优选 90%，和最优选至少 95%的序列一致性。

[0027] 如本文中所使用的，关于目标序列或目标序列的特定部分的“百分比（%）序列一致性”被定义成候选衍生序列中的核苷酸或氨基酸与目标序列（或其特定部分）中的核苷酸或氨基酸的百分比，在对齐序列和引入间隙之后，如果需要获得最大的百分比序列一致性，如通过所有检索参数设定在缺省值的程序 WU-BLAST-2.0a19(Altschul 等，J.Mol.Biol.(1997)215 :403-410) 所产生的。HSP S 和 HSP S2 参数是动态值并且通过程序建立，程序本身取决于具体序列的组成和搜索所需序列的特定数据库的组成。A%一致性值由匹配的相同核苷酸或氨基酸的数量决定，核苷酸或氨基酸是由被报告百分比一致性的序列长度所分割的。确定“百分比（%）氨基酸序列相似性“的计算与确定%氨基酸序列一致性的计算相同，但是在计算中除了相同氨基酸以外还包括保守氨基酸取代物。

[0028] 保守氨基酸取代物是指其中的氨基酸被具有相似性质的另一个氨基酸取代使得蛋白质的折叠或活性不受到显著的影响。可以互相取代的芳香族氨基酸是苯丙氨酸，色氨酸，和酪氨酸 ；可以互换的疏水氨基酸是亮氨酸，异亮氨酸，蛋氨酸，和缬氨酸 ；可以互换的极性氨基酸是谷氨酰胺，赖氨酸和组氨酸 ；可以互换的酸性氨基酸是天冬氨酸和谷氨酸 ；和可以互换的小氨基酸是丙胺酸，丝氨酸，苏氨酸，半胱氨酸和甘氨酸。

[0029] 可选地，Smith 和 Waterman 的局部同源性算法提供了核酸序列的对齐方式

(Smith 和 Waterman,1981,Advance in Applied Mathematics 2:482-489;数据库:European Bioinformatics Institute;Smith 和 Waterman,1981,J.of Molec.Biol.,147:195-197;Nicholas 等,1998,"A Tutorial on Searching Sequence Databases and Sequence Scoring Methods"(www.psc.edu) 和其中引用的参考文献;W.R.Pearson,1991,Genomics 11:635-650)。通过使用 Dayhoff(Dayhoff:Atlas of Protein Sequences and Structure,M.O.Dayhoff ed.,5suppl.3:353-358,National Biomedical Research Foundation,Washington,D.C.,USA) 开发的和 Gribskov(Gribskov 1986 Nucl.Acids Res.14(6):6745-6763) 标准化的计分矩阵可以将算法应用到氨基酸序列上。可以使用 Smith-Waterman 算法,其中使用缺省参数计数(例如,12 的比较结果中一个空隙的罚分,2 的比较结果中一个空隙每延长一碱基的罚分)。从产生的数据,"匹配"值反映"序列一致性"。

[0030] 目标核酸分子的衍生核酸分子包括与编码 BMP6 的核酸序列杂交的序列。在杂交和清洗过程中,温度,离子强度,pH,和变性剂例如甲酰胺的存在可以控制杂交的严格。用容易获得的过程文本阐述通常使用的条件(例如 Current Protocol in Molecular Biology,Vol.1,Chap.2.10,John Wiley&Sons,Publishers(1994);Sambrook 等,Molecular Cloning,Cold Spring Harbor(1989))。

[0031] 在一些实施例中,本发明的核酸分子可以与包含 BMP6 的核苷酸序列的核酸分子在高严格杂化条件下杂化:在包含 6× 单强度柠檬酸 (SSC)(1×SSC 是 0.15M NaCl,0.015M 柠檬酸钠;pH7.0),5×Denhardt's 溶液,0.05%焦磷酸钠和 100g/ml 鲱鱼精 DNA 的溶液中,含有核酸的过滤器在 65℃下预杂化 8 小时到过夜;在含有 6×SSC,1×Denhardt's 溶液,100μg/ml 酵母 tRNA 和 0.05%焦磷酸钠的溶液中,在 65℃下杂化 18-20 小时;在 65℃下然后在含有 0.1×SSC 和 0.1% SDS(十二烷基硫酸钠)的溶液中清洗过滤器 1 小时。

[0032] 在其他实施例中,使用的中等严格的水解条件是:在包含 35%甲酰胺,5×SSC,50mM Tris-HCl(pH7.5),5mM EDTA,0.1% PVP,0.1% Ficoll,1% BSA,和 500μg/ml 变性的鲑精 DNA 的溶液中,含有核酸的过滤器在 40℃下预处理 6 小时;在含有 35%甲酰胺,5×SSC,50mM Tris-HCl(pH7.5),5mM EDTA,0.02% PVP,0.02% Ficoll,0.2% BSA,100μg/ml 变性的鲑精 DNA,和 10% (wt/vol) 右旋糖酐硫酸酯的溶液中,在 40℃下杂化 18-20 小时;然后在 55℃下在含有 2×SSC 和 0.1% SDS 的溶液中分两次清洗 1 小时。

[0033] 可选地,可以使用的低严格条件是:在含有 20%甲酰胺,5×SSC,50mM 磷酸钠 (pH7.6),5×Denhardt's 溶液,10%右旋糖酐硫酸酯,和 20μg/ml 变性的被修饰的鲑精 DNA 的溶液中在 37℃下孵化 8 小时;在相同的缓冲液中杂化 18 到 20 小时;然后在约 37℃条件下在 1×SSC 中清洗滤器 1 小时。

[0034] 在另一个实施例中,方法包括组合物的应用,该组合物包括可以与 BMP6 键合并且使 BMP6 失活的化合物。因此,本发明可以与 BMP6 的拮抗剂相关。例如,化合物可以是能够与 BMP6 键合的抗体或其片段。

[0035] 可以使用已知的方法产生与 BMP6 多肽特异性键合的抗体。优选对 BMP6 多肽的哺乳动物直系同源特异的抗体,而且更优选对人类 BMP6 特异的抗体。抗体可以是多克隆的,单克隆的 (mAbs),人源化抗体或嵌合抗体,单链抗体,Fab 片段,$F(ab')_2$片段,由 FAb 表达文库产生的片段,抗独特性(抗 -Id) 抗体,和以上任何的表面抗原结合片段。可以选

择特别抗原性的 BMP6 表面抗原，例如为了抗原性的 BMP6 多肽的常规筛选或为了选择蛋白质的抗原区域通过施加理论方法给 BMP6 的氨基酸序列 (Hopp 和 Wood(1981)，Procc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78 :3824-28 ;Hopp 和 Wood(1983)Mol. Immunol. 20 :483-89 ;Sutcliffe 等，(1983)Science 219 :660-66)。通过上述标准程序可以制造相似性是 $10^{8}M^{1}$，优选 $10^{9}M^{1}$ 到 $10^{10}M^{1}$，或更强的单克隆抗体 (Harlow 和 Lane，supra ;Goding(1986)Monoclonal Antibodies :Principles and Practice(2d ed)Academic Press，纽约；和美国专利第 4,381,292 号；和 4,618,577 号)。

[0036] 抗体可以针对 BMP6 的粗细胞提取物或其基本纯化的片段产生。如果使用 BMP6 片段，它们优选包括至少 10 个，和更优选，至少 20 个 BMP6 蛋白质的连续氨基酸。BMP6- 特异的抗原和 / 或免疫原可以与激发免疫应答的载体蛋白连接。例如，目标多肽与锁孔血蓝蛋白 (KLH) 的载体共价连接，而且共轭物在费式完全佐剂中乳化，其提高了免疫应答。根据传统的实验方案使合适的免疫系统例如实验室兔或实验小鼠免疫。

[0037] 通过合适的实验例如使用固定的相应 BMP6 多肽的固相酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检验 BMP6- 特异性抗体的存在。也可以使用其他试验例如放射性免疫测定或荧光测定。

[0038] 可以将 BMP6 多肽特异的嵌合抗体制造成包含来自不同动物种族的不同部分。例如，免疫球蛋白恒定区可以与鼠科 mAb 的各种区域连接，使得抗体从人类抗体衍生出生物活性，和从鼠科片段衍生出键合特异性。将基因拼接在一起产生嵌合抗体，该基因对来自各个种族的合适区域进行编码 (Morrison 等，Proc. Natl. Acad. Sci. (1984)81 :6851-6855 ; Neuberger 等，Nature(1984)312 :604-608 ;Takeda 等，Nature(1985)31 :452-454)。

[0039] 人源化抗体（嵌合抗体的一种形式）可以通过借助重组 DNA 技术将小鼠抗体的互补决定区 (CDRs)(Carlos，T. M.，J. M. Harlan. 1994. Blood 84 :2068-2101) 移植到人类的框架区域和恒定区域的背景中产生 (RiechmannLM 等，1988 Nature 323 :323-327)。人源化抗体包含鼠科序列和人类序列，从而进一步降低或消除免疫抗原性，而同时保留抗体特异性 (Co MS，和 Queen C. 1991 Nature 351 :501-501 ;Morrison SL. 1992Ann. Rev. Immun. 10 : 239-265)。人源化抗体及其产生方法是本领域公知的（美国专利第 5,530,101，5,585,089，5,693,762，和 6,180,370 号）。

[0040] 可以通过本领域公知的方法产生重组的 BMP6- 特异性单链抗体，通过使 Fv 区域的重和轻链片段借助氨基酸桥连接形成的单链多肽（美国专利第 4,946,778 ; Bird，Science(1988)242 :423-426 ;Huston 等，Proc. Natl. Acad. Sci. 美 国 (1988)85 : 5879-5883 ；和 Ward 等，Nature(1989)334 :544-546)。

[0041] 用于抗体产生的其他合适技术包括淋巴细胞暴露给抗原性多肽或可选地暴露给噬菌体载体或类似载体中的抗体库的选择 (Huse 等，Science (1989)246 :1275-1281)。

[0042] 本发明的多肽和抗体可以改性使用或不改性使用。通常，抗体通过连接物质进行标记（共价的或非共价的），该物质提供可检测的信号，或是对表达目标蛋白的细胞有毒的物质 (Menard S 等，Int J. Biol Markers(1989)4 :131-134)。大量的标记和共轭技术都是公知的而且在科学和专利文献中都有广泛报道。合适的标记包括放射性核素、酶、酶作用物、辅因子、抑制剂、荧光部分、荧光发光镧系金属，化学发光部分，生物发光部分，磁性粒子等（美国专利第 3,817,837 ;3,850,752 ;3,939,350，;3,996,345 ;4,277,437 ;4,275,149 ;

和 4,366,241)。同样,可以产生重组的免疫球蛋白 (美国专利第 4,816,567 号)。可以传输细胞质多肽的抗体而且抗体通过与膜穿透毒蛋白结合到达它们的靶点(美国专利第 6,086,900)。

[0043] 在另一个实施例中,方法涉及包括化合物的组合物的应用,该化合物可以与 ALK6 键合并且活化或阻滞 ALK6 的活性。例如,这种化合物可以是可以与 ALK6 键合的抗体或其片段。因此,本发明可以包括 ALK6 的激动剂或拮抗剂。例如,抗体可以键合 ALK6 和阻止 BMP6 的键合,从而防止 BMP6 活化 ALK6 和驱动黑素生成或黑色素转移。以上列举了抗体产生的公知技术的细节。

[0044] 在另一个实施例中,方法涉及包括核酸的组合物的应用,该核酸能够通过与 DNA 或 RNA 的相互作用调节 ALK6 或 Cdc42 的表达,DNA 或 RNA 为 ALK6 或 Cdc42 或其功能部分编码。在优选的实施例中,核酸是 RNA 分子,尤其是可以对 mRNA 编码 ALK6 或 Cdc42 进行针对性的反义核酸相互作用或 RNA 干扰的 RNA 分子。例如,用于靶向 Cdc42mRNA 的合适 RNAi 分子可以是 5′ -GAUAACUCACCACUGUCCATT-3′ 和 5′ -UGGACAGUGGUGAGUUAUCTT-3′ 寡核糖核苷酸;或可以用于抑制 Cdc42 的 5′ -GACUCCUUUCUUGCUUGUUTT-3′ 和 5′ -AACAAGCAAGAAAGGAGUCTT-3′ 寡核糖核苷酸,或其他这种合适的和特异性的序列。其在本领域技术人员确定其他合适的序列的技能范围内,该序列可以表现出针对 ALk6 或 Cdc42mRNA 的 RNAi。

[0045] RNAi 是序列特异性的转录后基因在动植物中沉默的方法,由与沉默的基因序列同源的双链 RNA(dsRNA) 激发。关于 RNAi 在 C.elegans, Drosophila,植物,和人类的沉默基因中的应用的方法是本领域公知的 (Fire A 等,1998Nature 391 :806-811 ;Fire,A. Trends Genet. 15,358-363(1999) ;Sharp, P. A. RNA 干扰 2001。Genes Dev。15,485-490(2001) ; Hammond, S. M. 等, Nature Rev. Genet. 2,110-1119(2001) ;Tuschl, T. Chem. Biochem. 2, 239-245(2001) ;Hamilton, A 等, Science 286,950-952(1999) ;Hammond, S. M. 等, Nature 404,293-296(2000) ;Zamore, P. D. 等, Cell 101,25-33(2000) ;Bernstein, E 等, Nature 409,363-366(2001) ;Elbashir, S. M. 等, Gene Dev. 15,188-200(2001) ;W00129058 ; W09932619 ;Elbashir SM 等,2001 Nature 411 :494-498 ;Novina CD 和 Sharp P。2004Nature 430 :161-164 ;Soutschek J 等 2004Nature 432 :173-178)。

[0046] 核酸调节剂通常用作研究试剂,诊断法,和治疗法。例如,可以以强特异性抑制基因表达的反义寡核苷酸通常用于阐明特定基因的功能(参考例如美国专利 6,165,790)。核酸调节剂通常用于例如区分生物途径的各个成员的功能。例如,反义低聚物已经用于动物和人类的疾病状态中的治疗部分而且已经证明在许多临床试验中是安全和有效的 (Milligan JF 等, Current Concepts in Antisense Drug Design, J Med Chem. (1993)36 :1923-1937 ;Tonkinson JL等,Antisense Oligodeoxynucleotides as Clinical Therapeutic Agents, Cancer Invest。(1996)14 :54-65)。

[0047] 在一个实施例中,方法包括确定组合物的方法的应用,该确定组合物的方法是确定以下列举的影响 ALK6 或 Cdc42 的物质的方法。

[0048] 在本发明优选的实施例中,物质是 ALK6 的拮抗剂。适合用于本发明的一些 ALK6 拮抗剂包括硬化蛋白,腱蛋白样蛋白质和卵泡抑素相关蛋白 (FSRP)。在特别优选的实施例中拮抗剂是硬化蛋白 (SEQ ID3)。

[0049] 通常优选小分子调节具有酶功能和 / 或包含蛋白质作用域的蛋白质的功能。在本领域称为“小分子”化合物的化学试剂是典型的有机，非肽类分子，具有大于 10,000 的分子量，优选大于 5,000，更优选大于 1,000，和最优选大于 500 道尔顿。这类调节剂包括化学合成的分子，例如来自组合化学库的化合物。合成化合物可以是基于 ALK6 已知的或推断的性质设计或确定的或可以是通过筛选化合物库确定的。可选的合适的这一类调节剂是天然化合物，尤其是来自有机体例如植物或真菌的次生代谢产物，其也可以由于 ALK6- 调节活性而被筛选化合物库确定。产生和获得化合物的方法是本领域公知的 (Schreiber SL, Science(2000)151 :1964-1969 ;Radmann J 和 Gunther J, Science(2000)151 :1947-1948)。

[0050] 由筛选试验确定的小分子化合物调节剂，如以下描述的，可以用作先导化合物，候选的临床化合物可以从先导化合物设计，优化，和合成。候选小分子调节剂的活性可以通过迭代二级功能验证（如以下进一步描述的），结构确定，和候选调节剂改性和测试而改进几倍。另外，产生具有 特定临床和药理性质的候选临床化合物。例如，试药可以进行衍生化和使用体外和体内试验再筛选从而为药物开发优化活性和降低毒性。

[0051] ALK6 的拮抗剂可以抑制黑色素从黑素细胞转移到角化细胞，从而降低皮肤和 / 或头发色素沉着。另一方面，ALK6 的激动剂可以促进黑色素从黑素细胞转移到角化细胞，从而增加皮肤和头发色素沉着。从美容的角度看这两种效果都是需要的，另外这种效果可以带来医疗好处。例如为了美容，目前在西欧和美国（和其他地方）需要被太阳晒黑的外表。在一些亚洲国家，为了美容，需要具有相对白皙的外表。另外，从保护的角度看，由于黑色素可以保护皮肤免受太阳的伤害作用，可能需要增加皮肤中的黑色素含量。

[0052] 受体优选是哺乳动物，优选是灵长类和尤其是人类。

[0053] 本发明的另一个方面提供了一种组合物，该组合物包括可以调节 ALK6 或 Cdc42 的活性或表达的物质，用于调节受体的皮肤和 / 或头发的色素沉着。以上提供了合适的物质的细节，而且调节的目的可以是美容或治疗方面的。

[0054] 特别优选的物质包括 BMP6 或功能活性的变体或其片段，和硬化蛋白。

[0055] 本发明的另一个方面提供了包括可以调节 ALK6 或 Cdc42 的活性或表达的物质的组合物在生产药物方面的用途，该药物是用于治疗与皮肤的反常色素沉着相关的的疾病。这种治疗可以是治愈作用的，或可以是为了缓解症状。

[0056] 通常需要根据本发明的组合物是适合皮肤外敷剂的。可以使用任何常用的外用剂型例如溶液，悬浮剂，凝胶，乳霜，软膏或油膏等。这种外用剂型的制备在制药配方领域作为例子进行描述，例如，Gennaro 等 (1995)Remington′ s Pharmaceutical Science, Mack Publishing 中描述的。对于外敷剂，组合物也可以作为粉末或喷雾给药，尤其是以气溶胶的形式。

[0057] 根据本发明的又一方面，提供了一种评估物质调节黑色素从黑素细胞转移到角化细胞或潜在地从角化细胞转移到角化细胞的能力的方法，该方法包括以下步骤 :

[0058] - 提供测试物质 ;以及

[0059] - 确定测试物质与 ALK6 相互作用的能力。

[0060] 在一些实施例中，方法包括确定物质与 ALK6 键合的能力。ALK6 可以在细胞上，或可以提供在支架上。

[0061] 方法优选包括提供细胞表达 ALK6 和确定测试物质与被所述细胞表达的 ALK6 相互

作用的能力，尤其是在细胞的表面上表达的 ALK6。

[0062] 优选表达 ALK6 的细胞是黑素细胞。

[0063] 通过确定测试物质与 ALK6 相互作用的能力，可以确定有潜力在调节黑素转移或黑素生成方面具有活性的物质。

[0064] 本发明的方法优选包括确定测试物质调节 ALK6 的活性和 / 或表达的能力。

[0065] 在一个实施例中，方法可以包括确定测试物质活化 ALK6 的能力，即确定测试物质是否是 ALK6 的激动剂。

[0066] 在可选的实施例中，方法可以包括确定测试物质使 ALK6 失活的能力，即确定测试物质是否是 ALK6 的拮抗剂。

[0067] 本领域的技术人员有许多方法可以确定测试物质是否可以调节 ALK6 的活性。例如，可以确定测试物质对下游信号分子的影响，下游信号分子受到 ALK6 活性化的影响。可选地，可以确定测试物质对 mRNAs 或蛋白质的表达的影响，mRNAs 或蛋白质的表达受到 ALK6 活性化的影响。这可以包括确定，例如 a)R-Smads 的补充（受体调节的 Smads，Smad-1，-5，-8）以及在与 ALK6 键合的时候 R-Smads 随后的磷酸化；b) 通过抑制剂 Smads(I-Smads) 阻断 R-Smads 的活性化，例如 Smad6 和 7；或 c) 通过 Smurfs 使 ALK6 选择性地降解 (Smad 泛素化调节因子）。

[0068] 本领域的技术人员有许多方法可以确定测试物质增加 ALK6 表达的能力。例如，本领域的技术人员可以定量地确定细胞中的 ALK6mRNA 水平（例如，使用定量的 rtPCR），或可以定量地确定细胞表面上的蛋白质表达（例如使用免疫荧光技术，ELISA，二维电泳法或质谱法）。

[0069] 在一个实施例中，方法可以包括通过测试物质对 Cdc42 的表达或活性化的影响（优选是 Cdc42 的表达）来确定测试物质与 ALK6 相互作用能力的步骤。确定 Cdc42 的表达的方法包括测量细胞中或细胞上的 Cdc42 的数量，或确定合成 Cdc42 蛋白质的前体的数量，例如为 Cdc42 编码的 mRNA。 确定 Cdc42 蛋白质表达水平或 Cdc42mRNA 水平所需的技术对本领域技术人员来说是显而易见的。确定蛋白质水平的技术可以包括免疫染色（例如免疫荧光，西方墨点法），ELISA，二维电泳法或质谱法。确定 mRNA 水平的技术可以包括北方墨点法，逆转录酶 PCR，定量 PCR，微阵列或 Affymetrix® 芯片。

[0070] 特别地，本发明关注可以以影响黑素生成或黑色素转移的方式与 ALK6 相互作用物质。因此，尤其需要确定测试物质对黑素生成或黑色素转移的影响。在本申请中详细列举了实现这一目的的方法，例如确定物质对从黑素细胞转移到角化细胞或潜在地从角化细胞转移到角化细胞的黑素体的数量的影响。这可以使用本申请中描述的荧光染色技术实现。

[0071] 本发明的方法可以包括提供 BMP6 的步骤。通过在方法中提供 BMP6，可以确定测试物质调节 ALK6 的活性的能力是其生物向心配合体的存在。这种方法可能与生理条件更相关，因为这种方法评估化合物在与 BMP6 的竞争中与 ALK6 相互作用的能力。

[0072] 本发明的又一个方面提供了一种评估物质调节黑色素从黑素细胞转移到角化细胞，或潜在地从角化细胞转移到角化细胞的能力的方法，该方法包括以下步骤：

[0073] - 提供测试物质；

[0074] - 提供表达 Cdc42 的细胞；以及

[0075] - 确定测试物质调节 Cdc42 的活性和 / 或表达的能力。

[0076] 优选表达 Cdc42 的细胞是黑素细胞或角化细胞，更优选是黑素细胞。

[0077] 方法可以包括将被测试物质处理过的细胞中的 Cdc42 的活性和 / 或表达与对照细胞中的 Cdc42 的活性和 / 或表达进行比较。

[0078] 可以使用许多对于本领域技术人员来说显而易见的方法确定 Cdc42 的表达水平。在本发明的实施例中，可以使用免疫荧光，西方墨点法或通过确定 Cdc42mRNA 的水平来确定表达。如上所述，其他合适的方法对于本领域的技术人员来说可能是显而易见的。

附图说明

[0079] 现参考附图，仅仅通过实例的方式描述本发明的实施例，其中：

[0080] - 图 1 的 A 和 B 示出表皮角化细胞和表皮黑素细胞细胞毒性对 BMP6 体外孵化的评估结果。

[0081] A. 用 10ng/ml 和 100ng/ml 的 BMP6 处理正常人类表皮角化细胞培养（女性 -68；p2)24h，48h 和 72h。

[0082] B. 用 10ng/ml 和 100ng/ml 的 BMP6 处理正常人类表皮黑素细胞培养 (i) 女性 -68；p4 和 (ii) 女性 -42 ；p372h。通过细胞凋亡和细胞病理学改变评估细胞毒性。未发现细胞毒性效应。

[0083] - 图 2 的 A 和 B 示出正常人类表皮黑素细胞中 BMP6 和 ALK6 蛋白质表达的检测结果。

[0084] A.(i)BMP6（绿色）的双荧光标记；(ii) 酪氨酸酶（红色）和 (iii)BMP6 和酪氨酸酶的合并图像，证实人类表皮黑素细胞 (F39-MC) 中的 BMP6 蛋白质表达。(iv) 示出相应的亮视场像。

[0085] B.(i)BMP6（绿色），(ii)ALK6（红色）的双荧光标记以及 (iii) 示出人类表皮黑素细胞 (F39-MC) 中 BMP6 和 ALK6（黄色）的共定位。(iv) 示出相应的亮视场像。

[0086] - 图 3 的 A 和 B 示出表皮黑素细胞 - 角化细胞共培养中，剂量依赖型的 BMP-6 激发的黑素体转移的定量分析结果。

[0087] A. 对匹配的黑素细胞 - 角化细胞共培养 (F39MC-KC) 实施双免疫荧光法，由 BMP-6 不断增加的浓度 (1，10，50，100 和 500ng/ml) 激发黑素细胞 - 角化细胞共培养 24h。使用抗 -gp100 抗体（绿色）和抗细胞角蛋白抗体（红色）的双荧光标记示出转移到角化细胞的荧光斑点的数量的明显剂量依赖型增加。细胞核用 DAPI 染色。

[0088] B. 对于每个不同的处理组在五个随机选择的微观领域（每个领域总共有 20 个细胞）中的转移的黑素体的量化。数值表达为与未激发的对照水平相比每个角化细胞的 gp-100 阳性斑点数量的百分比增加。具有 * = $P < 0.05$，** = $P < 0.01$，和 *** = $P < 0.001$ 的三个独立实验的装置是 ±SEM。

[0089] - 图 4 的 A 和 B 示出是否 BMP6 向上调节 Cdc42 和 ALK6(BMP6 受 体）在表皮黑素细胞中的表达。正常人类表皮黑素细胞培养（女性 39y-MC) 中 Cdc42mRNA 表达的 RT-PCR 分析。

[0090] A. 指定时间内的 100ng/ml BMP6 处理

[0091] B. 以指定的剂量进行 BMP6 处理 2h。通过 RT-PCR 检测 Cdc42mRNA。GAPDH 用作可比较负载的内部对照。

[0092] C. 使用或不使用 100ng/ml BMP6 处理正常人类表皮黑素细胞培养（女性 42y-EM）。对 ALK6 进行荧光标记（绿色）并且示出与 (i) 未处理的对照试验相比在 (ii)BMP6 的影响下 ALK6 的表达增加。相应的亮视场像（下方处的画面）。

[0093] - 图 5 的 A 和 B，以及补充 -1 示出实验的结果，表明 Cdc42 表达的诱导增加背部丝状伪足形成和黑素体转移。

[0094] A. FM55 细胞的背表面被 (ii) 组成型活化 (CA) 人类 GFP-Cdc42(61L) 转染而导致背部丝状伪足数量的大量增加而且与只有 (i)GFP 存在下的丝状伪足相比，被 (iii) 显性阴性 (DN) 人类 GFP-Cdc42(15A) 转染的细胞抑制背部丝状伪足。方框区域的更高功率图（下方的画面）。使用场发射 SEM(FEI，Quanta 400) 以 10kev 的加速电压产生的 SEM 图像。

[0095] B.（左边的画面）对转染的 FM55 细胞 - 角化细胞共培养实施双免疫荧光法。(i) 只有 GFP 在 FM55 和角化细胞中 (ii) 组成型活化 (CA) 人类 GFP-Cdc42(61L) 在 FM55 和角化细胞中 (iii) 显性阴性 (DN) 人类 GFP-Cdc42(15A) 在 FM55 和角化细胞共培养中。用抗 -gp 100 抗体（绿色）和抗细胞角蛋白抗体（红色）的双荧光标记揭示在不同构成的存在下转移到角化细胞的荧光斑点的数量明显增加。细胞核用 DAPI 染色。

[0096] B.（右边的画面）对于每个不同的处理组在五个随机选择的微观领域（每个领域总共有 20 个细胞）中的转移的黑素体的量化。数值表达为与未激发的对照水平相比每个角化细胞的 gp-100 阳性斑点数量的百分比增加。具有 *** ＝ P ＜ 0.001 的三个独立实验的装置是 ±SEM。

[0097] 补充 -1 :通过 GFP 表达（绿色）证实 FM55 细胞的选择。为了证实黑素细胞的身份，用黑素细胞特异性的抗 -HMB-45/gp100（红色）对转染的细 胞进行荧光标记。细胞核用 DAPI 染色。

[0098] - 图 6 的 A 和 B 示出表明使用选择性的 BMP6 拮抗剂（硬化蛋白）抑制 BMP6 诱导的黑素体转移的实验结果。

[0099] A 在加入或不加入其选择性拮抗剂，重组人类硬化蛋白 (400ng/ml) 的重组人类 BMP6(100ng/ml) 的存在或不存在情况下，对匹配的黑素细胞 - 角化细胞共培养 (F36y MC-KC) 实施双免疫荧光法 24h。使用抗 -gp100 抗体（绿色）和抗细胞角蛋白抗体（红色）的双荧光标记揭示出与基线水平相比在 BMP6 的存在下转移到角化细胞的荧光斑点的数量的明显增加，当向共培养中加入选择性拮抗剂硬化蛋白时，转移到角化细胞的荧光斑点的数量明显减少。细胞核用 DAPI 染色。

[0100] B. 对于每个不同的处理组在五个随机选择的微观领域（每个领域总共有 20 个细胞）中的转移的黑素体的量化。数值表达为与未激发的对照水平相比每个角化细胞的 gp-100 阳性斑点数量的百分比增加。具有 ** ＝ P ＜ 0.01，*** ＝ P ＜ 0.001 的三个独立实验的装置是 ±SEM。

[0101] 图 7 的 A 和 B 示出表明使用选择性的 BMP6 拮抗剂（硬化蛋白）抑制 BMP6 诱导的 Cdc42 和 ALK6 受体的表达的实验结果。

[0102] A. Cdc42mRNA 表达的 RT-PCR 分析 :

[0103] 在加入或不加入其选择性拮抗剂，重组人类硬化蛋白 (400ng/ml) 的重组人类 BMP6(100ng/ml) 的存在或不存在情况下，培养正常人类表皮黑素细胞（女性 42y-EM)2h。通过 RT-PCR 检测 Cdc42mRNA。GAPDH 用作可比较负载的内部对照。

[0104] B. 在加入或不加入其选择性拮抗剂，重组人类硬化蛋白 (400ng/ml) 的重组人类 BMP6(100ng/ml) 的存在或不存在情况下，培养正常人类表皮黑素细胞 (女性 42y-EM)12h。对 ALK6 进行荧光标记 (绿色) 并且示出在硬化蛋白的影响下 BMP6 诱导的 ALK6 表达的抑制。相应的亮视场像 (下方的画面)。

[0105] - 图 8 示出实验结果，结果表明使用选择性的 BMP6 拮抗剂 (硬化蛋白) 抑制 BMP6 诱导的丝状伪足形成。在加入或不加入其选择性拮抗剂，重组人类硬化蛋白 (400ng/ml) 的重组人类 BMP6(100ng/ml) 的存在或不 存在情况下，培养正常人类表皮黑素细胞 (女性 42y-EM)72h。使用场发射 SEM(FEI，Quanta 400) 以 10kev 的加速电压产生的 SEM 图像。

[0106] - 图 9 的 A，B 和 C 示出表明 BMP6 对人类表皮黑素生成，酪氨酸酶活性和酪氨酸酶在 mRNA 和蛋白质水平的表达的影响的实验结果。

[0107] A. 在加入或不加入其选择性拮抗剂，重组人类硬化蛋白 (400ng/ml) 的重组人类 BMP6(100ng/ml) 的存在或不存在情况下，处理正常人类表皮黑素细胞 (F62 ;p4)72h。在使用不同药物处理之后，细胞表现出明显的黑色素水平的变化。氢氧化钠溶解之后通过分光光度法 (475nm) 确定黑色素含量。结果表达为与未激发的对照水平相比黑色素含量 (Pg/ 细胞) 的变化。具有 * = P < 0.05，* = P < 0.01 的三个独立实验的装置是 ±SEM。

[0108] B. 在加入或不加入其选择性拮抗剂，重组人类硬化蛋白 (400ng/ml) 的重组人类 BMP6(100ng/ml) 的存在或不存在情况下，处理正常人类表皮黑素细胞 (F62y ;p4)72h。(下方处的画面) 为了评估酪氨酸酶的活性，电转染蛋白质提取物以及用 L-DOPA 染色细胞膜。(上方处的画面) 与未激发的对照水平相比，谱带强度的光密度扫描和值表达为成倍增加。具有 * = P < 0.01 的三个独立实验的装置是 ±SEM。

[0109] C. 在加入或不加入其选择性拮抗剂，重组人类硬化蛋白 (400ng/ml) 的重组人类 BMP6(100ng/ml) 的存在或不存在情况下，处理正常人类表皮黑素细胞 (F62y ;p4)72h。上方处的画面 :通过 RT-PCR 检测酪氨酸酶 mRNA 以及 GAPDH 用作可比较负载的内部对照。下方处的画面 :通过西方墨点法检测酪氨酸酶蛋白质以及肌动蛋白用作可比较负载的内部对照。

具体实施方式

[0110] 引言

[0111] 在黑色素转移生物学的研究中，本发明者们研究了骨形态发生蛋白 (BMP) 家族成员在该过程中的潜在作用。在本申请中描述了一种控制黑色素从人类皮肤黑素细胞转移到人类皮肤角化细胞的新机理。这包括 BMP6 的作用，BMP6 可以以剂量依赖的形式激发该过程。而且，选择性 BMP6 拮抗剂 (硬化蛋白) 抑制 BMP6- 诱导的黑素体转移，以及阻挡 BMP6- 诱导 的纳米细管 (称为丝状伪足) 的产生，如对人类黑素细胞进行的扫描电子显微镜 (SEM) 分析所证明的。仔细分析 BMP6 诱导丝状伪足形成的分子机理，使用逆转录分析发现 BMP6 在人类黑素细胞中以剂量依赖的方式激发 (细胞增殖周期 42)Cdc42 的表达。对具有转染组成型活性 (CA)Cdc42 和显性 - 阴性 Cdc42 的 FM55 细胞进行 SEM 分析，证实黑素细胞中的丝状伪足形成和黑素体转移需要 Cdc42。CA-Cdc42 诱导背部丝状伪足的形成而 DN-Cdc42 抑制背部丝状伪足。

[0112] 预测 BMP6 作为前体分子合成，该前体分子被分割成产生一个具有大约 15kd 的计

算分子量的 132 个氨基酸成熟多肽。BMP6（前体）是 57kD 蛋白质，长度为 513 个氨基酸，局部化为人体的染色体 6p24。BMP6 的成熟形态的每个多肽链包含三个潜在的 N- 连接糖基化位置。活性的 BMP-6 蛋白质分子可能是二聚体。用与加工相关蛋白质 TGF β (Gentry 等，Mol. cell. Biol. 8 :4162(1988) 类似的方法将 BMP6 加工成成熟形态，包括二聚化和移除 N- 封端区域。GenBank 数据库（编号 -P22004) 中提供了人类 BMP6 前体并且整合到 UniprotKB/Swiss-Prot（参考 SEQ ID NO :1) 中。据相信成熟多肽包括 SEQ ID NO :1 的氨基酸 374-513。其他活性 BMP-6 多肽包括包含 SEQ ID NO :1 的氨基酸 382-513，388-513 和 412-513 的多肽。

[0113] BMPs 通过与几乎所有正常细胞上发现的受体复合物结合而发挥作用，受体复合物由型 I 受体和型 II 受体组成。当作为单体存在时，BMPR-I 以低亲和力与 BMP 结合。然而，当 BMPR-I 和 BMPR-II 作为异质二聚体存在时，它们与 BMP 的亲和力大体上增加 (Hogan 1996)。一旦分泌，BMP 二聚体通过协同地与型 I 受体和型 II 受体都结合而激发信号。BMP6 的每个单体都可以与型 I 受体和型 II 受体都连接。因此四聚受体复合物的组合体对于传导信号到细胞中是必要的。

[0114] 型 II 受体是组成型 - 活性激酶，其基于配体结合使型 I 受体转磷酸化。然而，型 I 受体通过磷酸化活化细胞内基质，因此决定细胞内信号的特异性。包括 BMP6 的 BMPs 可以与 2 个型 I 受体结合，包括 BMPR-IA(ALK-3 ;Seq ID 4)，和 BMPR-I B(ALK6 ;Seq ID 2)。虽然 BMPR-I A 和 BMP-I B 结构上相似但是它们变现出不同的空间和时间表达模式。

[0115] 也已经发现 BMP6 诱导其本身的同源受体 ALK6（编号 O00238) 的表达。选择性的 BMP6 拮抗剂硬化蛋白抑制 BMP6- 诱导的 ALK6 表达以及黑素细胞中 Cdc42 的表达，表明 Cdc42 参与为了 BMP6 信号的可能的扩增循环。同时这些发现表明发射至黑素细胞 BMP 受体的 Cdc42 信号参与丝状伪足形成从而控制黑素体转移至角化细胞。

[0116] GenBank 数据库（编号 -Q9BQB4) 中提供硬化蛋白 (SOST) 的氨基酸序列并且整合到 UniprotKB/Swiss-Prot（参考 SEQ ID NO :3) 中。SOST 的 C- 封端区域 (SEQ ID 3 的氨基酸 169-203) 在 SOST 二聚化中发挥作用。SOST 的 N- 封端区域 (SEQ ID 3 的氨基酸 23-58) 与 BMP6 上的型 I 受体和型 II 受体结合位点都相互作用，而且一部分核区域 (SEQ ID 3 的氨基酸 134-166) 可以与型 II 受体结合位点相互作用使得这些 SOST 区域特异的抗体可以阻挡或削弱 BMP 与 SOST 的结合。

[0117] 最后，也已经表明 BMP6 可以通过激发黑素细胞中限速酶（酪氨酸酶）的表达和活性而诱导黑素生成。

[0118] 在本申请中，已经第一次表明 BMP6 可以控制黑色素在黑素细胞和角化细胞之间转移，而且潜在地从角化细胞转移到角化细胞。这至少部分地通过 Cdc42 的作用而发生。BMP 拮抗剂以及基于它们的结构和作用的分子可以用作哺乳动物的皮肤和头发色素沉着的新调节剂。

[0119] 材料 & 方法

[0120] 细胞培养 :分离和培养匹配的表皮角化细胞和表皮黑素细胞。

[0121] 在知情同意和当地的研究伦理委员会同意的情况下，正常人类腹部皮肤由具有皮肤光 - 型 II（女性 68y，39y，36y) 和皮肤光 - 型 VI（女性 42y) 的正常健康白种人捐献者在选择整形手术之后提供。

[0122] 所有的细胞培养试剂都来自 Invitrogen 公司（佩斯里，苏格兰）除非另有说明。在 RPMI1640 培养基中收集皮肤样品并且在 5h 的手术内加工处理皮肤样品。按照以上所述 (Kauser 等，2003) 建立表皮黑素细胞培养然后表皮黑素细胞培养在 K-SFM 和 Eagle's 最低必须培养基 (EMEM) 的混合物中生长，Eagle's 最低必须培养基中添加了 1％ FBS，1× 浓缩的非必需氨基酸混合物，青霉素 (100U/ml)/ 链霉素 (100μg/ml)，2mM L- 谷氨酸盐， 5ng/ml 碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)，和 5ng/ml 内皮素 -1(Sigma，Poole，Dorset，UK)。按照以上所述 (Kauser 等，2003) 建立完全匹配的表面角化细胞（即来自同样的皮肤样本）然后在无血清培养基 (K-SFM) 中生长，无血清培养基中添加了 25μg/ml 牛垂体提取物 (BPE)，0.2ng/mlrEGF，青霉素 (100U/ml)/ 链霉素 (100μg/ml)，以及 2mM L- 谷氨酸盐。每两天补充一次培养基。使用分别抗 gp100 的抗 - 角化蛋白抗体 (Abcam，Cambridge，UK) 和黑素细胞 - 特异性的 NKI/beteb 抗体 (Monosan，Uden，Netherlands) 鉴定角化细胞和黑素细胞的原代培养。

[0123] 对于共培养，将黑素细胞（第 4 代）和角化细胞（第二代）接种到 8 孔 Lab-Tek® 腔室载玻片系统 (ICN Biomedicals，Aurora 公司，OH，USA) 上，细胞密度是 1×10^4 细胞 / 孔，以及比例是 1 个黑素细胞对 10 个角化细胞。共培养物在 K-SFM 和 MEM 的混合物（共培养培养基）中保存整夜 (16h) 从而使细胞附着，然后补充培养基再保存 24h。

[0124] 在评估 100ng/ml 重组人类 BMP-6(R&D 系统，牛津郡，UK) 和 400ng/ml 重组人类硬化蛋白 (R&D 系统，牛津郡，UK) 的作用之前，共培养在血清 - 缺乏的培养基（即缺少优级胎牛血清和牛垂体提取物）中孵化 16h 以移除生长因子的外因来源。

[0125] BMP-6 剂量的评估：

[0126] 表皮黑素细胞 (MC) 和表皮角化细胞 (KC) 被接种到 6 孔板的血清补充充足的 MEM 黑素体和 K-SFM 角化细胞培养基中 24h。将细胞转移到添加了 10ng/ml 和 100ng/mlBMP-6 的无血清（所谓缺乏的）培养基中保持 24h，48h 和 72h。通过形态学中的细胞凋亡和细胞病理学改变评估细胞毒性。

[0127] 将大约 1×10^4MC 接种到 Lab-tek® 8 孔腔室载玻片系统的每个孔中然后使 MC 附着 24h。然后使用无菌 PBS 冲洗细胞 3 次以及添加 350μl 缺乏的无血清黑素细胞培养基然后在 37℃和 5％ CO_2 条件下孵化 24h。然后使用无菌 PBS 冲洗细胞 3 次以及用或不用 100ng/ml BMP-6 孵化 12h。然后使用无菌 PBS 轻轻地冲洗细胞三次以及在 20℃下将细胞混合在冰冷的甲醇中 10 分钟。将载玻片保存在 -20℃直到实施免疫细胞化学法。

[0128] 西方墨点分析：

[0129] 在合流 T225 烧瓶中使 MC 受到胰蛋白酶作用并且接种到装满培养基的 T25 烧瓶中而且使其附着整夜。在处理前 24h，用少量的培养基替换培养基 24h。使用无菌 PBS 冲洗细胞 3 次，然后只在少量培养基中孵化或在带有 100ng/mlBMP-6 的少量培养基中孵化不同的时间段 (1-24h)。在不同的实验中，用不同浓度的 BMP-6 处理细胞 12h。

[0130] 使来自细胞提取物的 40mg 总蛋白质在还原的 SDS-8％ -PAGE 中电泳和在 PVDF 膜 (Millipore 公司，Bedford，MA) 上涂污。在室温下用 5％的牛奶 PBS/0.075％ Tween 20 阻挡膜 2h 以及在 4℃下用一代抗体探测整夜。分子量阶梯 (Magik Marker，Invitrogen) 在 5％的牛奶 PBS/0.075％ Tween 20 中孵化而且胶片带用 1ml5％的牛奶 PBS/0.075％ Tween-20（阴性对照），或 1ml 的兔抗酪氨酸酶（在 5％的牛奶 PBS/0.075％ Tween 20 中的 1 ： 200 多克

隆抗体）和 1ml 羊抗肌动蛋白（在 5％的牛奶 PBS/0.075％ Tween 20 中的 1 ： 1000 多克隆抗体）在摇摆平台上在 4℃下孵化整夜。大量冲洗之后，用与二代抗体结合的三葵过氧化物孵化墨点 2h。然后用 1ml 稀释在 5％的牛奶 PBS/0.075％ Tween-20 中的 HRP- 羊抗人类 lgG(H+L)(Zymed,USA)(1 ： 500) 孵化分子量阶梯而且胶片带用 1ml 抗兔 lgG，与整个抗体 (HRP) 二代抗体 (Amersham Biosciences，UK)(1 ： 700 稀释在 5％的牛奶 PBS/0.075％ Tween 20 中）连接的三葵过氧化物在摇摆平台上在室温下孵化 2h。重复冲洗程序而且胶片带在 LumiGLOR 试剂和 Peroxide(BioLab Ltd，UK) 中在室温下孵化 2 分钟。通过在各个曝光时间将墨点带置于 KodakXRA X- 射线胶片 (kodak,UK) 下检测化学发光信号，然后在显影液 (kodak，UK) 中显影直到谱带出现，用自来水漂洗，在定影液 (kodak，UK) 中定影直到胶片变成蓝色，然后用自来水冲洗，然后晾干。然后标记膜并且为光密度分析进行扫描，使用分析软件 (Image Master Total lab version 1.11) 对蛋白质的表达水平进行半定量评估。

[0131] 免疫荧光染色

[0132] 用 PBS 冲洗被冰冷的甲醇凝结的细胞，然后用 10％驴血清阻滞以检测蛋白质表达。对于双标记实验，第一代原始抗体，BMP-6(Abcam，剑桥， 英国），BMPR-IB/ALK-6(R&D 系统，牛津郡，英国）或 Nki/beteb(1 ： 30)(Monosan,Uden，荷兰）在 4℃下被作用整夜，然后在室温下用 FITC- 结合的二代抗体孵化 1h。二代原始抗体，cytokeratin(1 ： 100)(Abcam，剑桥，英国）或 β -Actin(1 ： 100)(Santa Cruz,USA) 在室温下作用 1h，然后是 TRITC- 结合的二代抗体 (1 ： 100)(Jackson Immunoresearch Laboratories 公司，West Grove，美国）。使用 DAPI(Vector Laboratories,Burlingame,CA) 将细胞核染色。借助使用 100× 或 40× 物镜的冷却的 Hamamatsu 数码相机捕集图像并且使用 Paint Shop Pro(Jasc Software Ver.7.CA,USA) 后处理。阴性对照包括省略原始抗体和用来自二代抗体宿主的非免疫血清替代和包括二代抗体。

[0133] 黑素细胞转移的定量分析 ：

[0134] 用不同剂量的 BMP-6 刺激匹配的黑素细胞 - 角化细胞共培养并且与未刺激的细胞进行比较。通过计算在 3 个独立实验中每个孔被放大 100× 的 5 个随机显微镜视野中（油浸法）受体角化细胞内的荧光 gp100- 阳性斑点的数量对黑素细胞转移进行评估。为了避免计算可能仍然与黑素细胞相关的黑色素小颗粒，我们只计算不与黑素细胞直接接触的角化细胞内的 gp100- 阳性斑点。

[0135] 逆转录 - 聚合酶链反应 (RT-PCR)

[0136] 用 1-，10-，50-，100- 和 500ng/ml 的 BMP6 处理从 1×10^6 黑素细胞得到的总 RNA4h 或用 100ng/ml 的 BMP6 处理一段指定的时间（图 4A)。对于一些实施例，在 100ng/mlBMP6 的存在或不存在下，使用或不使用 400ng/ml 的硬化蛋白处理黑素细胞。用脱氧核糖核酸酶 (QIAGEN，UK) 处理 RNA 样品，然后确定浓度。然后使用用于逆转录试剂盒的 SuperscriptIIIFirst-Strand 合成方法来合成第一链 cDNA。对于所有样品，反应中的 RNA 的最终浓度是 1μg/100μl。在生产者描述的条件下用 QIAGENFast Cycling PCR 试剂盒 (QIAGEN，UK) 实施 PCR。简单地说，使用以下循环条件 :95℃下 15 分钟（阶段 1) ;96。℃下 15s ;引物退火 15s（对于 Cdc 是 42-65℃，酪氨酸酶 -58℃以及 GAPDH-60℃）;72。℃下 25s（阶段 2)×30 个周期。表 1 示出了用于 RT-PCR 反应的引物而且该引物来自 Sigma

Genosys，英国。PCR 产品在 1×TAE 缓冲液中分离在琼脂糖凝胶上并且用溴化乙锭染色。1KbDNA 加 DNA 阶梯（Invitrogen，加利福利亚）用作 DNA 的标记。

[0137] 表 1. 半定量 RT-PCR 的引物

[0138]

	基因	正向引物	反向引物	产品长度（bp）
1	Cdc42	GCCCGTGACCTGAAGGCTGTCA	TGCTTTTAGTATGATGCCGACACCA	195
2	酪氨酸酶	CACCCCACAAATCCTAAC	CCTACTCTATTGCCTAAGCC	1600
3	GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTACA	TTGTTTTGGAGGGATCTCG	160

[0139] 转染

[0140] 显性－阴性人类 GFP-Cdc42(15A) 和组成型活性 GFP-Cdc42(61L) 以及 pEGFP-C3 中的 GFP 是 Richard E. Cheney(University of North Carolina, Chapel Hill) 的重要成果。载体包括证实对遗传霉素 (G418) 有抵抗力的新霉素基因。在转录之前，在带有 10% FBS 的 RPMI 培养基中使大约 5×10^5 的中等色素沉着的 FM55 细胞在六孔板中生长 16h 达到 70-80％融合。使用 Lipfectamine2000 转染试剂 (Invitrogen, Carlabad, CA, USA) 转染 F55 细胞。简单地说，在 1.6ml 的 Opti-MEM 还原血清培养基中使 3.2μgcDNA 组织与 8μlLipfectamine2000 转染试剂混合。用转染混合物孵化细胞 12h，用 1×PBS 冲洗三次，在包含 10% FBS 的新鲜 RPMI 中孵化 48h。使用 1.6mg/mlG418 选择转染的细胞 15 天。然后 1×10^4 稳定的转染细胞在带有 10% FBS 的 RPMI 培养基的存在下在 8 孔 Lab-Tek® 腔室载玻片系统中培养 24h。24 小时之后，为了保留 FM55 细胞的形状构型（包括丝状伪足）立即将稳定转染的细胞混合到用 0.1M 的二甲胂酸钠 (Agar，英国）缓冲的 1％戊二醛 (Sigma，英国）中然后为 SEM 分析加工处理。为了进行 gp 100 免 疫荧光研究以证实转染和选择（补充-1），在 -20℃下，将 8-孔 Lab-Tek® 腔室载玻片系统上的平行细胞混合在冰冷的甲醇中 10 分钟，在 PBS 中冲洗然后用 10％的驴血清阻滞。为了共培养研究，将稳定转染的 FM55 细胞和角化细胞 (2 代）接种到 8 孔 Lab-Tek® 腔室载玻片系统中，细胞密度是 1×10^4 细胞 / 孔而且比值是 1 个 FM55 对 10 个角化细胞。在 K-SFM 和 MEM 的混合物（共培养培养基）中保持共培养整夜 (16h) 以使细胞附着，然后补充培养基之后再保持 24h。为了进行 gp100 和细胞角蛋白双免疫荧光研究以测试黑素体转移效率，在 -20℃下，将细胞混合在冰冷的甲醇中 10 分钟，在 PBS 中冲洗然后用 10％的驴血清阻滞。

[0141] 细胞形态学的扫描电子显微镜评估

[0142] 在 100ng/mlBMP6 的存在或不存在下使用或不使用 400ng/ml 的硬化蛋白处理表皮

黑素细胞 72h，然后在 37℃下，将稳定选择的转染 FM55 细胞混合到用 0.1M 的二甲胂酸钠（Agar，英国）缓冲的 1％戊二醛（Sigma，英国）中。然后将细胞后固定到 1％的四氧化锇（Agar，英国）和用作媒染剂的 1％单宁酸（Agar，英国）中，通过一系列从 20％到 70％的醇脱水，在 0.5％的乙酸铀酰中染色，然后进一步在 90％和 100％乙醇中脱水。在六甲基－二硅氮烷（Sigma，UK）中进行最终的脱水，然后使空气干燥。一旦干燥，在镀金机（EMITECH，K550）（Blazer 20mA）中给样品镀金 10 分钟。在场发射 SEM（FEI，Quanta400）下以 10keV 的加速电压观察样本。

[0143] 黑色素试验

[0144] 在 1M 氢氧化钠（NaOH）（BOH Ltd，英国）中制备 500μg/ml 合成的黑色素（Sigma，英国）然后在超声波水浴中溶解 20 分钟。从该贮备溶液制备 1MNaOH 中的从 100μg/ml 到 1μg/ml 的各种黑色素标准品。将黑色素标准品移液到 96 孔板中以产生评估测试样品中黑色素含量的校准曲线。向每个细胞颗粒中加入 400μl 的 1MNaOH 并且在微量恒温仪（100℃）中溶解 15 分钟。颗粒急剧地涡旋而且将溶解的颗粒移液到相同的 96 孔板中。用 DYNEX REVELATION 4.02 程序在 495nm 读取样品的光密度。从校准曲线读取每个测试样品的黑色素含量。

[0145] 用于评估酪氨酸酶活性的使用非变性 SDS-PAGE 的 DOPA 氧化酶检测

[0146] 大约 1×10^6 的表皮黑素细胞被接种到三个 T75 烧瓶中而且在 37℃和 5％ CO_2 条件下孵化整夜。为 SDS-PAGE 制备细胞并且将细胞转印到 PVDF 细胞膜上。将没有沸腾的非还原蛋白质提取物 70μg 移液到具有 8％ SDS-PAGE 凝胶的合适孔中。包含分离的蛋白质的 PVDF 细胞膜在 1×PBS 中冲洗一次然后在 RT 上在 5mM L-DOPA 的 0.1M 磷酸钠缓冲液中孵化 3 小时，其中更换 L-DOPA 三次。通过在蒸馏水中冲洗细胞膜停止 L-DOPA 反应然后扫描细胞膜。

[0147] 统计分析：

[0148] 使用 1-way ANOVA 和利用 Prism v.4.00（GraphPad Software Chicago，IL，USA）的 Dunnett's 后测评估组和处理之间的统计显著性。用星号表示统计上的显著性差异：** ＝ $P<0.01$，*** ＝ $P<0.001$。

[0149] 结果和讨论

[0150] BMP6（10 和 100ng/ml）没有表现出对正常人类表皮黑素细胞和角化细胞的细胞毒性

[0151] 为了排除 BMP6 对黑素细胞或角化细胞有毒的可能性，细胞在 10ng/ml 和 100ng/ml 的存在下保存 24h，48h 和 72h。BMP6 的这两个剂量都与改变的细胞生长或黑素细胞和角化细胞的形态学无关（图 1A，1B）。

[0152] 正常人类表皮黑素细胞表达 BMP6 蛋白质和受体 ALK6

[0153] 通过抗－酪氨酸酶抗体（红色，Aii）对抗 -BMP6（绿色，Ai）的双荧光标记（黄色－橙色，Aiii）证实 BMP6 在正常人类黑素细胞中的表达（图 2A）。抗 -BMP6（绿色，Bi）和抗 -ALK6（红色，Bii）抗体对黑素细胞的双荧光标记揭示出在整个细胞中 BMP6 和 ALK6 共定位（黄色，Biii）（图 2B）。

[0154] 剂量依赖型的 BMP6- 刺激的黑素体转移的定量分析

[0155] ALK6 受体是功能性的，因为对黑素细胞－角化细胞共培养的 BMP6 处理刺激黑素体

以剂量依赖的方式从黑素细胞转移到角化细胞（图 3A,B)。因此,这是第一次报道 BMP6 对黑素细胞－角化细胞共培养系统中黑素体转移的作用。可以包括自分泌作用和旁分泌作用两者。

[0156] BMP6 上调 Cdc42 在人类表皮黑素细胞中的信息表达

[0157] 为了更好地理解 BMP6 在黑素体转移中的机械作用,我们研究了 Cdc42 的表达；Cdc42 是人类黑素细胞中丝状伪足形成的主要调节者 (Scott 等,2002)。RT-PCR 分析表明与未处理对照中 Cdc42mRNA 的基准水平表达相比,在 100ng/mlBMP6 处理之后的 Cdc42 最大感应发生在 2-4h 然后稍微降低但是保持升高到 12h（图 4A)。Cdc42mRNA 对 BMP6 的感应以剂量依赖的形式发生（图 4B)。与正常人类表皮黑素细胞中 ALK6 表达的正常基准水平（图 Ci）相比,BMP6 也刺激 BMP6 受体 ALK6 的表达（绿色,图 4Cii)（图 4C)。

[0158] 需要 Cdc42 从而通过诱导背部丝状伪足来激发黑素体转移

[0159] 广泛地使用两种 Rho 蛋白质突变体以分析它们的功能；活化突变体,其是组合型 GTP- 结合,因为 GTP 酶活化蛋白质 (GAPs) 被抑制；而且显性－阴性突变体通过滴定出鸟苷酸交换因子 (GEFs) 而发挥作用 (Feig1999)。我们发现与对照载体相比,组合型活性 Cdc42 诱导背部丝状伪足以及显性－阴性 Cdc42 压制 FM55 人类黑素体的背部丝状伪足（图 5A)。

[0160] 下一步我们迫切想要确定的是 Cdc42 蛋白质的过度表达是否也可以影响黑素体转移。为了试验这些过渡表达的蛋白质参与到黑色素转移中,使用转染的 FM55 细胞建立 FM55 黑色素瘤－角化细胞共培养 24h。使用抗 -gp100 抗体（绿色）的共培养荧光标记示出转移到角化细胞（白色箭头）的荧光斑点的数量的明显改变（图 5B,左边的画面)。与 GFP 对照载体相比,组合型活性 GFP-Cdc42 诱导黑素体转移而显性－阴性 GFP-Cdc42 抑制黑素体转移（图 5B,右边的画面)。Cdc42 的过度表达或抑制对黑素体转移的控制进一步表明黑素体转移中丝状伪足的有力参与。由于 BMP6 可以上调 Cdc42 的表达,这表明黑素体转移的与 BMP6 相关的刺激可以包括 Cdc42 作为其下游靶点。为了试验这个我们利用了 DN-Cdc42 对丝状伪足形成和黑素体转移的抑制作用。这也可以通过使用对抗人类 Cdc42 的 siRNA 击倒人类黑素细胞的内源 Cdc42 表达来类似地实现。

[0161] 使用选择性 BMP6 拮抗剂（硬化蛋白）抑制 BMP6- 诱导的黑素体转移

[0162] 为了试验硬化蛋白（选择性 BMP6 拮抗剂）是否抑制 BMP6 诱导的黑素体转移,我们测试了在正常人类表皮黑素细胞－角化细胞共培养中的这种拮抗剂。加入硬化蛋白本身抑制黑素体从黑素细胞转移到角化细胞的基准 水平（图 6A,B)。再者,硬化蛋白抑制人类表皮黑素细胞－角化细胞共培养中 BMP6 诱导的黑素体转移表明硬化蛋白可以用作哺乳动物皮肤和头发色素沉着的新调节剂（图 6A,B)。

[0163] 使用选择性 BMP6 拮抗剂（硬化蛋白）抑制 BMP6- 诱导的 Cdc42 和 ALK6 受体表达

[0164] 我们第一次示出 Cdc42 作为从黑素细胞到角化细胞的黑素体转移调节剂的生理作用（图 5B)。硬化蛋白抑制 BMP6 诱导的黑素体转移的能力表明硬化蛋白可能阻滞人类黑素细胞中 Cdc42 的 BMP6 诱导的表达。使用 RT-PCR 对人类黑素细胞进行分析,我们终于发现硬化蛋白下调 Cdc42 的 BMP6 诱导的表达（图 7A)。使用免疫荧光研究我们也发现硬化蛋白下调 ALK6（绿色）的,BMP6 受体的 BMP6 诱导的表达（图 7B)。该发现表明 Cdc42 参与用于 BMP6 发信号的可能的放大环。

[0165] 使用选择性 BMP6 拮抗剂（硬化蛋白）抑制 BMP6- 诱导的丝状伪足形成

[0166] 黑素细胞的 SEM 分析显示与未处理的对照相比，BMP6 处理激发大量的背部丝状伪足（图 8iii）。用硬化蛋白处理的黑素细胞表现出背部丝状伪足形成的降低，其中在硬化蛋白的存在下，用 BMP6 处理过的细胞不诱导丝状伪足形成（图 8ii，iv）。这些数据有利地支持为了在人类黑素细胞中激发背部丝状伪足形成而对 BMP6 的需求。

[0167] 硬化蛋白对 BMP6 诱导的黑素体转移的抑制（图 6），对 Cdc42 和 ALK6 受体表达的抑制（图 7）和对丝状伪足形成的抑制（图 8）表明从黑素细胞 BMP 受体传出的 Cdc42 信号参与丝状伪足的形成，丝状伪足控制黑素体转移到角化细胞。

[0168] BMP6 对人类表皮黑素细胞中黑素生成的影响

[0169] BMP6 增加体外人类表皮黑素细胞中的黑色素含量（72h 之后增加大约 32±9％）（图 9A）。选择性的 BMP6 拮抗剂硬化蛋白抑制人类表皮黑素细胞中 BMP6 诱导的黑色素含量（抑制 15±3％）（图 9A）。BMP6 也激发酪氨酸酶活性（黑色素合成潜力的指示剂）而硬化蛋白抑制 BMP6 诱导的酪氨酸酶活性的增加（图 9B）。

[0170] 总结：对诱导黑素细胞中黑素生成的信号机制的研究表明通过蛋白质激酶 A 发挥作用的 cAMP 提升剂通过增加酪氨酸酶的表达诱导黑素细胞中黑素生成（Bertolotto 等，1998）。除了这个简化的方案之外，也表明通过 MSH，UV 光或人类胎盘鞘脂的处理，p38MARK 串联参与黑素细胞中的黑素生成（Galibert 等，2001；Smalley 和 Eisen，2000；Singh 等，2005）。最近 BMPs 也表现为黑素生成的有力调节剂（Botchkarev 2003；Yaar 等，2006）。已经发现 BMP6 作为正常人类黑素细胞中黑素生成的自分泌抑制剂通过抑制黑素细胞中的限速酶（酪氨酸酶）的表达和活性发挥作用（Yaar 等，2006）。在我们的研究中，我们已经发现 BMP6 作为黑素生成的激发剂通过激发酪氨酸酶在蛋白质和基因水平的表达发挥作用（图 9C）。而硬化蛋白在蛋白质和基因水平上都抑制人类表皮黑素细胞中的 BMP6- 诱导的酪氨酸酶表达（图 9C）。

[0001]

序列表.txt

序列表

<110> 布拉德福特大学

<120> 调节皮肤色素沉着的组合物和方法

<130> P110175

<150> GB0816507.8
<151> 2008-09-10

<150> GB0908498.9
<151> 2009-05-18

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 513
<212> PRT
<213> 智人

<400> 1

Met Pro Gly Leu Gly Arg Arg Ala Gln Trp Leu Cys Trp Trp Trp Gly
1 5 10 15

Leu Leu Cys Ser Cys Cys Gly Pro Pro Pro Leu Arg Pro Pro Leu Pro
20 25 30

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gln Leu Leu Gly Asp Gly Gly
35 40 45

Ser Pro Gly Arg Thr Glu Gln Pro Pro Pro Ser Pro Gln Ser Ser Ser
50 55 60

Gly Phe Leu Tyr Arg Arg Leu Lys Thr Gln Glu Lys Arg Glu Met Gln
65 70 75 80

Lys Glu Ile Leu Ser Val Leu Gly Leu Pro His Arg Pro Arg Pro Leu
85 90 95

His Gly Leu Gln Gln Pro Gln Pro Pro Ala Leu Arg Gln Gln Glu Glu
100 105 110

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Leu Pro Arg Gly Glu Pro Pro Pro Gly Arg
115 120 125

Leu Lys Ser Ala Pro Leu Phe Met Leu Asp Leu Tyr Asn Ala Leu Ser
130 135 140

Ala Asp Asn Asp Glu Asp Gly Ala Ser Glu Gly Glu Arg Gln Gln Ser
145 150 155 160

Trp Pro His Glu Ala Ala Ser Ser Ser Gln Arg Arg Gln Pro Pro Pro
165 170 175

Gly Ala Ala His Pro Leu Asn Arg Lys Ser Leu Leu Ala Pro Gly Ser
180 185 190

Gly Ser Gly Gly Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ala Gln Asp Ser Ala Phe
195 200 205

[0002]

Leu Asn Asp Ala Asp Met Val Met Ser Phe Val Asn Leu Val Glu Tyr
210 215 220

Asp Lys Glu Phe Ser Pro Arg Gln Arg His His Lys Glu Phe Lys Phe
225 230 235 240

Asn Leu Ser Gln Ile Pro Glu Gly Glu Val Val Thr Ala Ala Glu Phe
245 250 255

Arg Ile Tyr Lys Asp Cys Val Met Gly Ser Phe Lys Asn Gln Thr Phe
260 265 270

Leu Ile Ser Ile Tyr Gln Val Leu Gln Glu His Gln His Arg Asp Ser
275 280 285

Asp Leu Phe Leu Leu Asp Thr Arg Val Val Trp Ala Ser Glu Glu Gly
290 295 300

Trp Leu Glu Phe Asp Ile Thr Ala Thr Ser Asn Leu Trp Val Val Thr
305 310 315 320

Pro Gln His Asn Met Gly Leu Gln Leu Ser Val Val Thr Arg Asp Gly
325 330 335

Val His Val His Pro Arg Ala Ala Gly Leu Val Gly Arg Asp Gly Pro
340 345 350

Tyr Asp Lys Gln Pro Phe Met Val Ala Phe Phe Lys Val Ser Glu Val
355 360 365

His Val Arg Thr Thr Arg Ser Ala Ser Ser Arg Arg Arg Gln Gln Ser
370 375 380

Arg Asn Arg Ser Thr Gln Ser Gln Asp Val Ala Arg Val Ser Ser Ala
385 390 395 400

Ser Asp Tyr Asn Ser Ser Glu Leu Lys Thr Ala Cys Arg Lys His Glu
405 410 415

Leu Tyr Val Ser Phe Gln Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala
420 425 430

Pro Lys Gly Tyr Ala Ala Asn Tyr Cys Asp Gly Glu Cys Ser Phe Pro
435 440 445

Leu Asn Ala His Met Asn Ala Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu
450 455 460

Val His Leu Met Asn Pro Glu Tyr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro
465 470 475 480

Thr Lys Leu Asn Ala Ile Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Asn Ser Asn
485 490 495

Val Ile Leu Lys Lys Tyr Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys

[0003]

500 505 510

His

<210> 2
<211> 502
<212> PRT
<213> 智人

<400> 2

Met Leu Leu Arg Ser Ala Gly Lys Leu Asn Val Gly Thr Lys Lys Glu
1 5 10 15

Asp Gly Glu Ser Thr Ala Pro Thr Pro Arg Pro Lys Val Leu Arg Cys
20 25 30

Lys Cys His His His Cys Pro Glu Asp Ser Val Asn Asn Ile Cys Ser
35 40 45

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

Pro Val Val Thr Ser Gly Cys Leu Gly Leu Glu Gly Ser Asp Phe Gln
65 70 75 80

Cys Arg Asp Thr Pro Ile Pro His Gln Arg Arg Ser Ile Glu Cys Cys
85 90 95

Thr Glu Arg Asn Glu Cys Asn Lys Asp Leu His Pro Thr Leu Pro Pro
100 105 110

Leu Lys Asn Arg Asp Phe Val Asp Gly Pro Ile His His Arg Ala Leu
115 120 125

Leu Ile Ser Val Thr Val Cys Ser Leu Leu Leu Val Leu Ile Ile Leu
130 135 140

Phe Cys Tyr Phe Arg Tyr Lys Arg Gln Glu Thr Arg Pro Arg Tyr Ser
145 150 155 160

Ile Gly Leu Glu Gln Asp Glu Thr Tyr Ile Pro Pro Gly Glu Ser Leu
165 170 175

Arg Asp Leu Ile Glu Gln Ser Gln Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gly Leu
180 185 190

Pro Leu Leu Val Gln Arg Thr Ile Ala Lys Gln Ile Gln Met Val Lys
195 200 205

Gln Ile Gly Lys Gly Arg Tyr Gly Glu Val Trp Met Gly Lys Trp Arg
210 215 220

Gly Glu Lys Val Ala Val Lys Val Phe Phe Thr Thr Glu Glu Ala Ser
225 230 235 240

Trp Phe Arg Glu Thr Glu Ile Tyr Gln Thr Val Leu Met Arg His Glu

[0004]

245 250 255

Asn Ile Leu Gly Phe Ile Ala Ala Asp Ile Lys Gly Thr Gly Ser Trp
260 265 270

Thr Gln Leu Tyr Leu Ile Thr Asp Tyr His Glu Asn Gly Ser Leu Tyr
275 280 285

Asp Tyr Leu Lys Ser Thr Thr Leu Asp Ala Lys Ser Met Leu Lys Leu
290 295 300

Ala Tyr Ser Ser Val Ser Gly Leu Cys His Leu His Thr Glu Ile Phe
305 310 315 320

Ser Thr Gln Gly Lys Pro Ala Ile Ala His Arg Asp Leu Lys Ser Lys
325 330 335

Asn Ile Leu Val Lys Lys Asn Gly Thr Cys Cys Ile Ala Asp Leu Gly
340 345 350

Leu Ala Val Lys Phe Ile Ser Asp Thr Asn Glu Val Asp Ile Pro Pro
355 360 365

Asn Thr Arg Val Gly Thr Lys Arg Tyr Met Pro Pro Glu Val Leu Asp
370 375 380

Glu Ser Leu Asn Arg Asn His Phe Gln Ser Tyr Ile Met Ala Asp Met
385 390 395 400

Tyr Ser Phe Gly Leu Ile Leu Trp Glu Val Ala Arg Arg Cys Val Ser
405 410 415

Gly Gly Ile Val Glu Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr His Asp Leu Val Pro
420 425 430

Ser Asp Pro Ser Tyr Glu Asp Met Arg Glu Ile Val Cys Ile Lys Lys
435 440 445

Leu Arg Pro Ser Phe Pro Asn Arg Trp Ser Ser Asp Glu Cys Leu Arg
450 455 460

Gln Met Gly Lys Leu Met Thr Glu Cys Trp Ala His Asn Pro Ala Ser
465 470 475 480

Arg Leu Thr Ala Leu Arg Val Lys Lys Thr Leu Ala Lys Met Ser Glu
485 490 495

Ser Gln Asp Ile Lys Leu
500

<210> 3
<211> 213
<212> PRT
<213> 智人

<400> 3

Met Gln Leu Pro Leu Ala Leu Cys Leu Val Cys Leu Leu Val His Thr

[0005]

1 5 10 15

Ala Phe Arg Val Val Glu Gly Gln Gly Trp Gln Ala Phe Lys Asn Asp
20 25 30

Ala Thr Glu Ile Ile Pro Glu Leu Gly Glu Tyr Pro Glu Pro Pro Pro
35 40 45

Glu Leu Glu Asn Asn Lys Thr Met Asn Arg Ala Glu Asn Gly Gly Arg
50 55 60

Pro Pro His His Pro Phe Glu Thr Lys Asp Val Ser Glu Tyr Ser Cys
65 70 75 80

Arg Glu Leu His Phe Thr Arg Tyr Val Thr Asp Gly Pro Cys Arg Ser
85 90 95

Ala Lys Pro Val Thr Glu Leu Val Cys Ser Gly Gln Cys Gly Pro Ala
100 105 110

Arg Leu Leu Pro Asn Ala Ile Gly Arg Gly Lys Trp Trp Arg Pro Ser
115 120 125

Gly Pro Asp Phe Arg Cys Ile Pro Asp Arg Tyr Arg Ala Gln Arg Val
130 135 140

Gln Leu Leu Cys Pro Gly Gly Glu Ala Pro Arg Ala Arg Lys Val Arg
145 150 155 160

Leu Val Ala Ser Cys Lys Cys Lys Arg Leu Thr Arg Phe His Asn Gln
165 170 175

Ser Glu Leu Lys Asp Phe Gly Thr Glu Ala Ala Arg Pro Gln Lys Gly
180 185 190

Arg Lys Pro Arg Pro Arg Ala Arg Ser Ala Lys Ala Asn Gln Ala Glu
195 200 205

Leu Glu Asn Ala Tyr
210

<210> 4
<211> 532
<212> PRT
<213> 智人

<400> 4

Met Pro Gln Leu Tyr Ile Tyr Ile Arg Leu Leu Gly Ala Tyr Leu Phe
1 5 10 15

Ile Ile Ser Arg Val Gln Gly Gln Asn Leu Asp Ser Met Leu His Gly
20 25 30

Thr Gly Met Lys Ser Asp Ser Asp Gln Lys Lys Ser Glu Asn Gly Val
35 40 45

Thr Leu Ala Pro Glu Asp Thr Leu Pro Phe Leu Lys Cys Tyr Cys Ser

[0006]

50 55 60

Gly His Cys Pro Asp Asp Ala Ile Asn Asn Thr Cys Ile Thr Asn Gly
65 70 75 80

His Cys Phe Ala Ile Ile Glu Glu Asp Asp Gln Gly Glu Thr Thr Leu
85 90 95

Ala Ser Gly Cys Met Lys Tyr Glu Gly Ser Asp Phe Gln Cys Lys Asp
100 105 110

Ser Pro Lys Ala Gln Leu Arg Arg Thr Ile Glu Cys Cys Arg Thr Asn
115 120 125

Leu Cys Asn Gln Tyr Leu Gln Pro Thr Leu Pro Pro Val Val Ile Gly
130 135 140

Pro Phe Phe Asp Gly Ser Ile Arg Trp Leu Val Leu Leu Ile Ser Met
145 150 155 160

Ala Val Cys Ile Ile Ala Met Ile Ile Phe Ser Ser Cys Phe Cys Tyr
165 170 175

Lys His Tyr Cys Lys Ser Ile Ser Ser Arg Arg Arg Tyr Asn Arg Asp
180 185 190

Leu Glu Gln Asp Glu Ala Phe Ile Pro Val Gly Glu Ser Leu Lys Asp
195 200 205

Leu Ile Asp Gln Ser Gln Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gly Leu Pro Leu
210 215 220

Leu Val Gln Arg Thr Ile Ala Lys Gln Ile Gln Met Val Arg Gln Val
225 230 235 240

Gly Lys Gly Arg Tyr Gly Glu Val Trp Met Gly Lys Trp Arg Gly Glu
245 250 255

Lys Val Ala Val Lys Val Phe Phe Thr Thr Glu Glu Ala Ser Trp Phe
260 265 270

Arg Glu Thr Glu Ile Tyr Gln Thr Val Leu Met Arg His Glu Asn Ile
275 280 285

Leu Gly Phe Ile Ala Ala Asp Ile Lys Gly Thr Gly Ser Trp Thr Gln
290 295 300

Leu Tyr Leu Ile Thr Asp Tyr His Glu Asn Gly Ser Leu Tyr Asp Phe
305 310 315 320

Leu Lys Cys Ala Thr Leu Asp Thr Arg Ala Leu Leu Lys Leu Ala Tyr
325 330 335

Ser Ala Ala Cys Gly Leu Cys His Leu His Thr Glu Ile Tyr Gly Thr
340 345 350

[0007]

Gln Gly Lys Pro Ala Ile Ala His Arg Asp Leu Lys Ser Lys Asn Ile
355 360 365

Leu Ile Lys Lys Asn Gly Ser Cys Cys Ile Ala Asp Leu Gly Leu Ala
370 375 380

Val Lys Phe Asn Ser Asp Thr Asn Glu Val Asp Val Pro Leu Asn Thr
385 390 395 400

Arg Val Gly Thr Lys Arg Tyr Met Ala Pro Glu Val Leu Asp Glu Ser
405 410 415

Leu Asn Lys Asn His Phe Gln Pro Tyr Ile Met Ala Asp Ile Tyr Ser
420 425 430

Phe Gly Leu Ile Ile Trp Glu Met Ala Arg Arg Cys Ile Thr Gly Gly
435 440 445

Ile Val Glu Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr Tyr Asn Met Val Pro Ser Asp
450 455 460

Pro Ser Tyr Glu Asp Met Arg Glu Val Val Cys Val Lys Arg Leu Arg
465 470 475 480

Pro Ile Val Ser Asn Arg Trp Asn Ser Asp Glu Cys Leu Arg Ala Val
485 490 495

Leu Lys Leu Met Ser Glu Cys Trp Ala His Asn Pro Ala Ser Arg Leu
500 505 510

Thr Ala Leu Arg Ile Lys Lys Thr Leu Ala Lys Met Val Glu Ser Gln
515 520 525

Asp Val Lys Ile
530

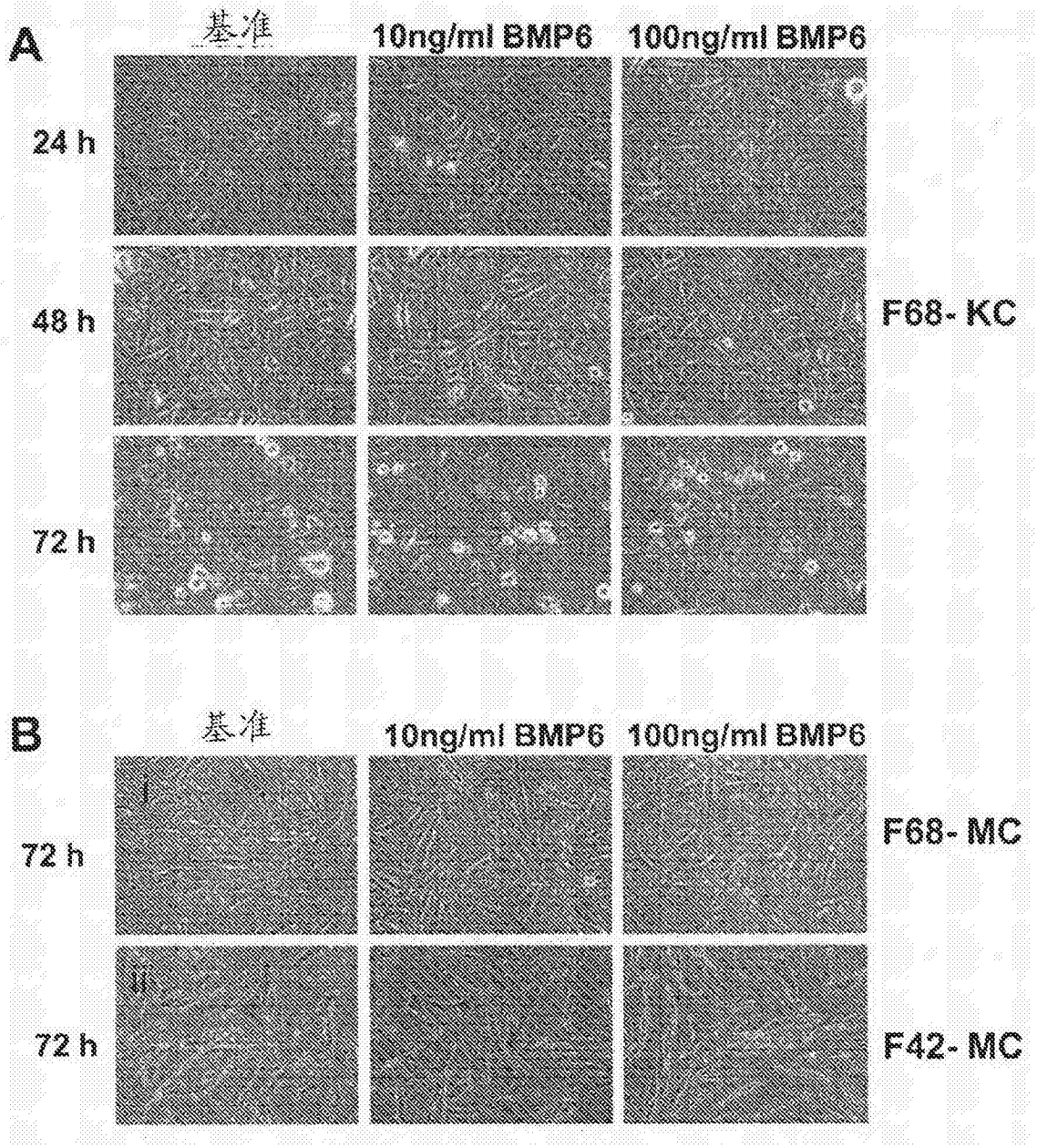

A
基准
10ng/ml BMP6
100ng/ml BMP6
24 h
48 h
72 h
F68- KC
B
基准
10ng/ml BMP6
100ng/ml BMP6
72 h
F68- MC
72 h
F42- MC

图 1

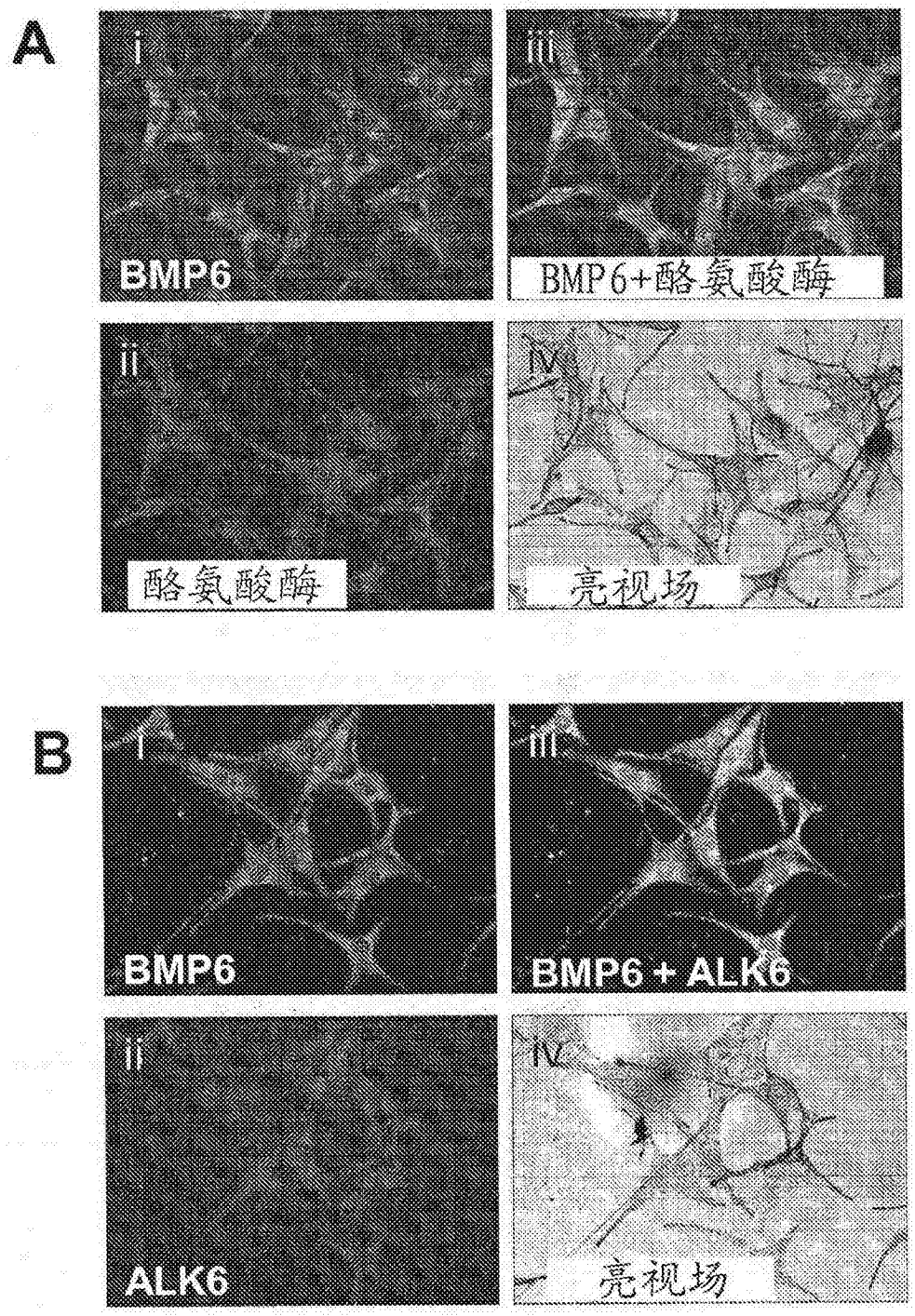
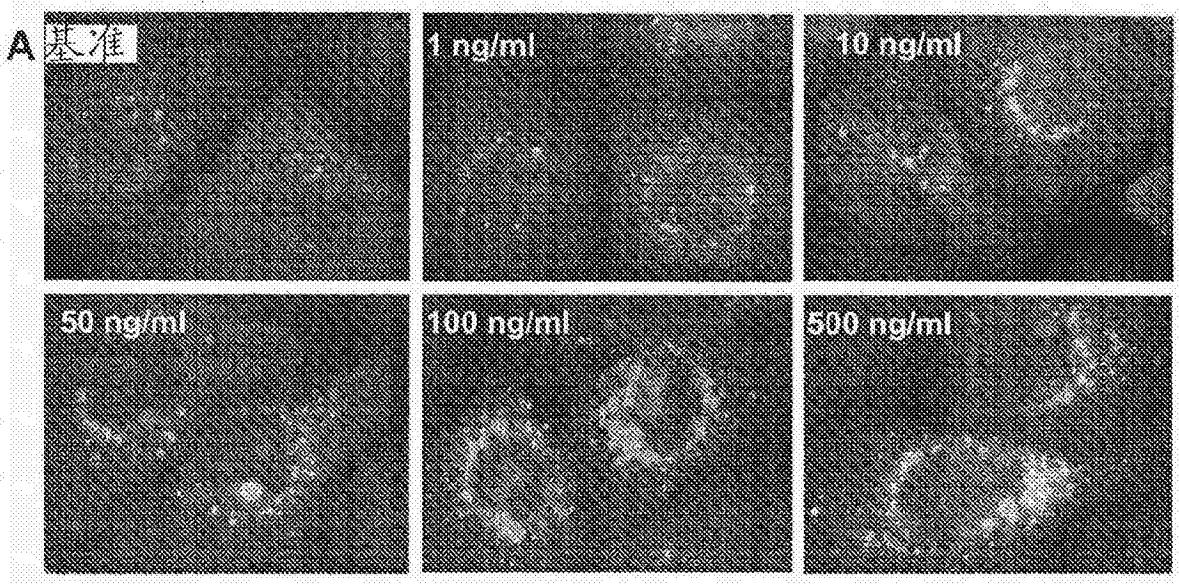
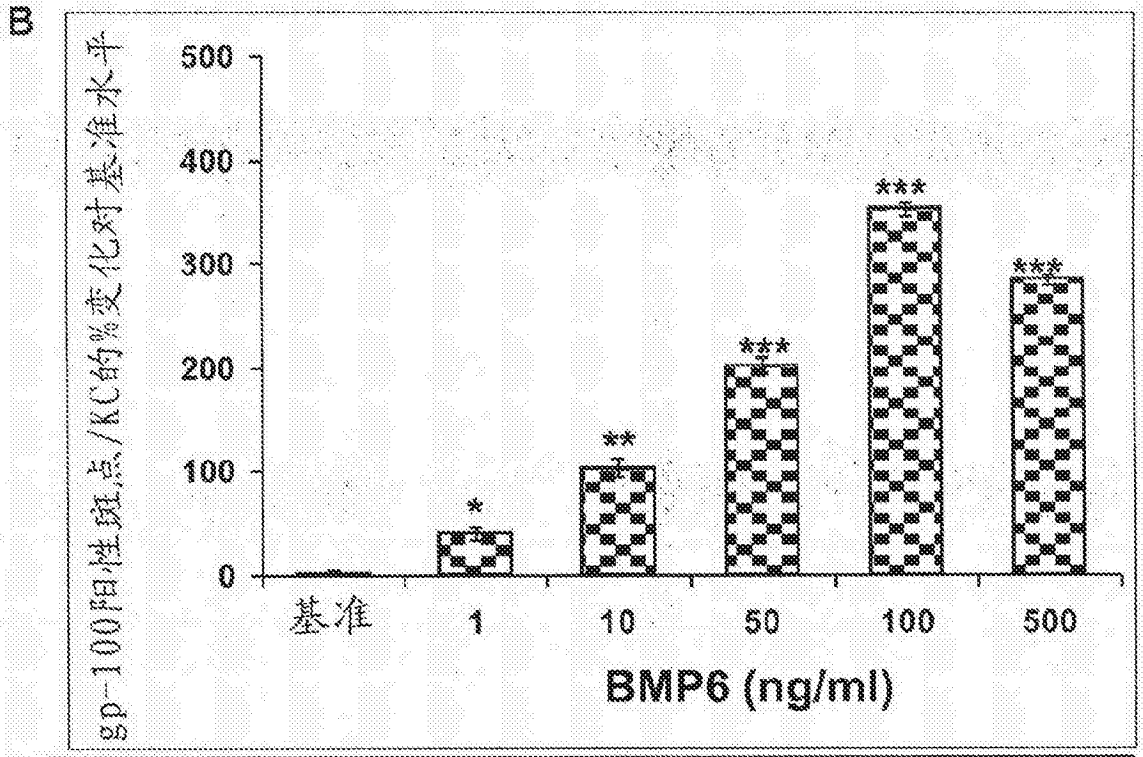

A
i
BMP6
iii
BMP6+酪氨酸酶
ii
酪氨酸酶
iv
亮视场
B
i
BMP6
iii
BMP6 + ALK6
ii
ALK6
iv
亮视场

图 2





gp100+斑点/KC	27.3 ± 1.6	38.4 ± 1.47	55.2 ± 2.8	64.6 ± 2.5	124.2 ± 3.9	105.4 ± 1.6

*P< 0.05, **P<0.01, ***P<0.001

图 3

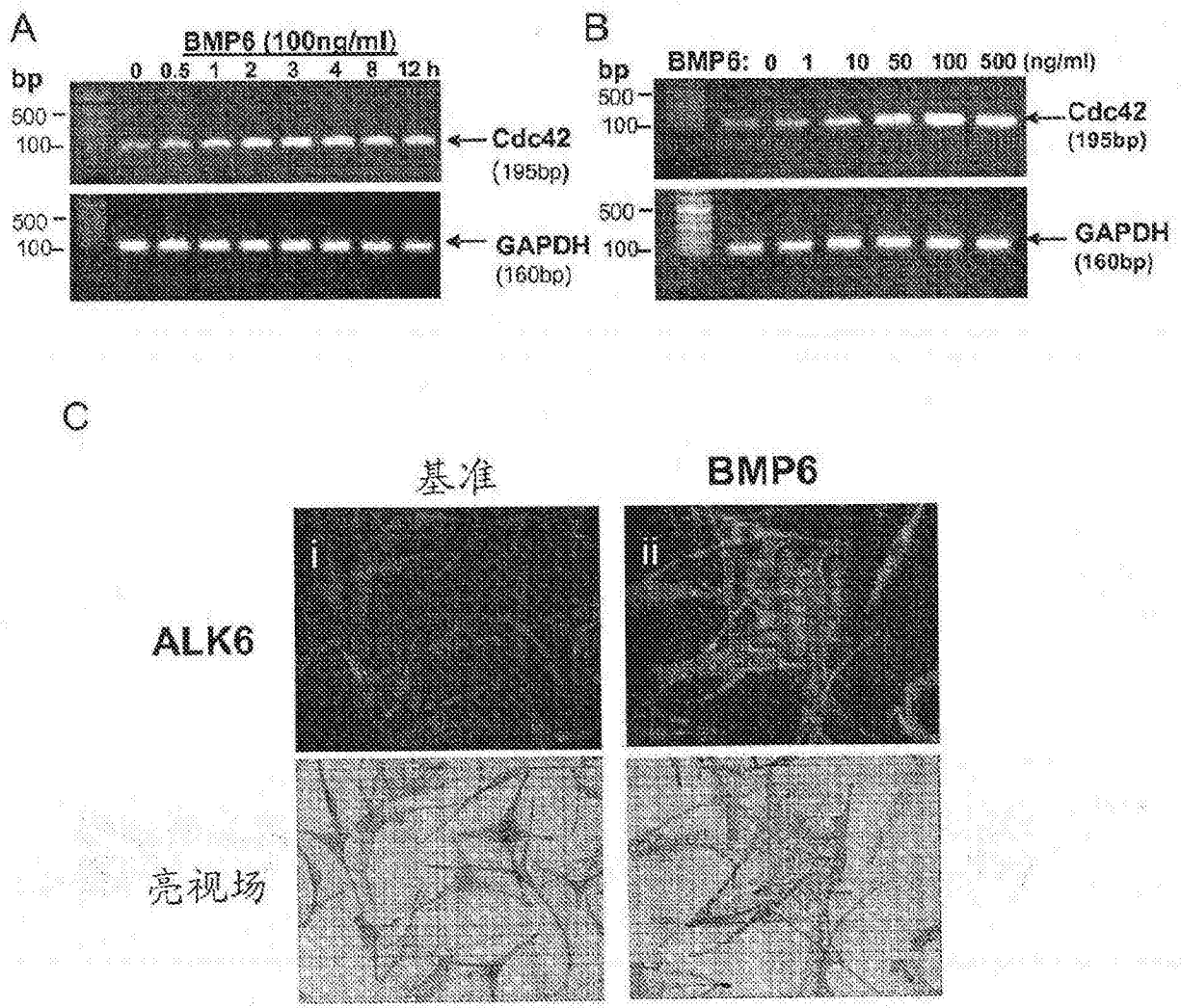

A
BMP6 (100ng/ml)
0 0.5 1 2 3 4 8 12 h
bp
500
100
Cdc42
(195bp)
GAPDH
(160bp)
B
BMP6: 0 1 10 50 100 500 (ng/ml)
bp
500
100
Cdc42
(195bp)
GAPDH
(160bp)
C
基准
BMP6
i
ii
ALK6
亮视场

图 4

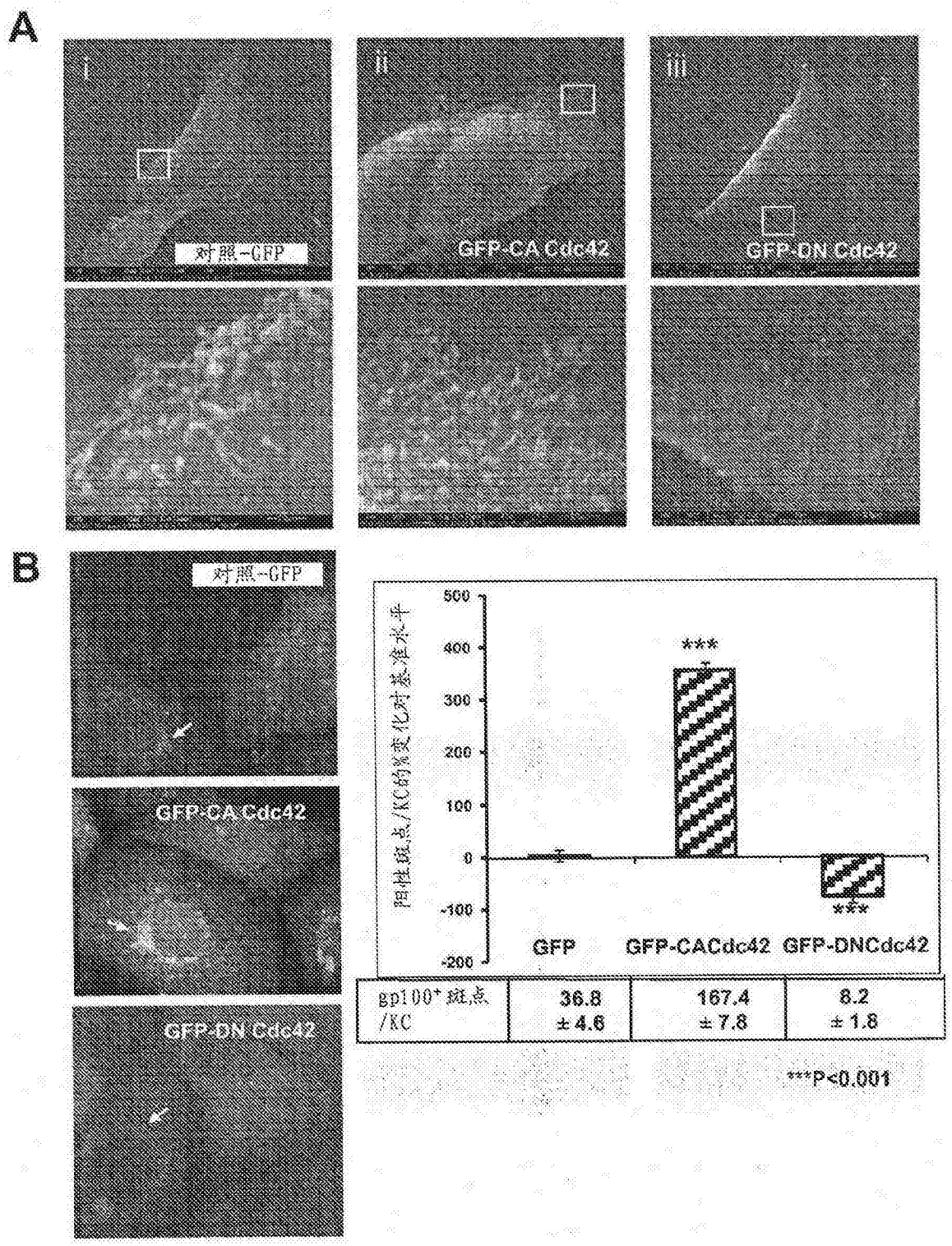

A
i
对照-GFP
ii
GFP-CA Cdc42
iii
GFP-DN Cdc42
B
对照-GFP
GFP-CA Cdc42
GFP-DN Cdc42
阳性斑点/KC的%变化对基准水平
500
400
300
200
100
0
-100
-200
***
***
GFP
GFP-CACdc42
GFP-DNCdc42
gp100+斑点/KC
36.8 ± 4.6
167.4 ± 7.8
8.2 ± 1.8
***P<0.001

图 5

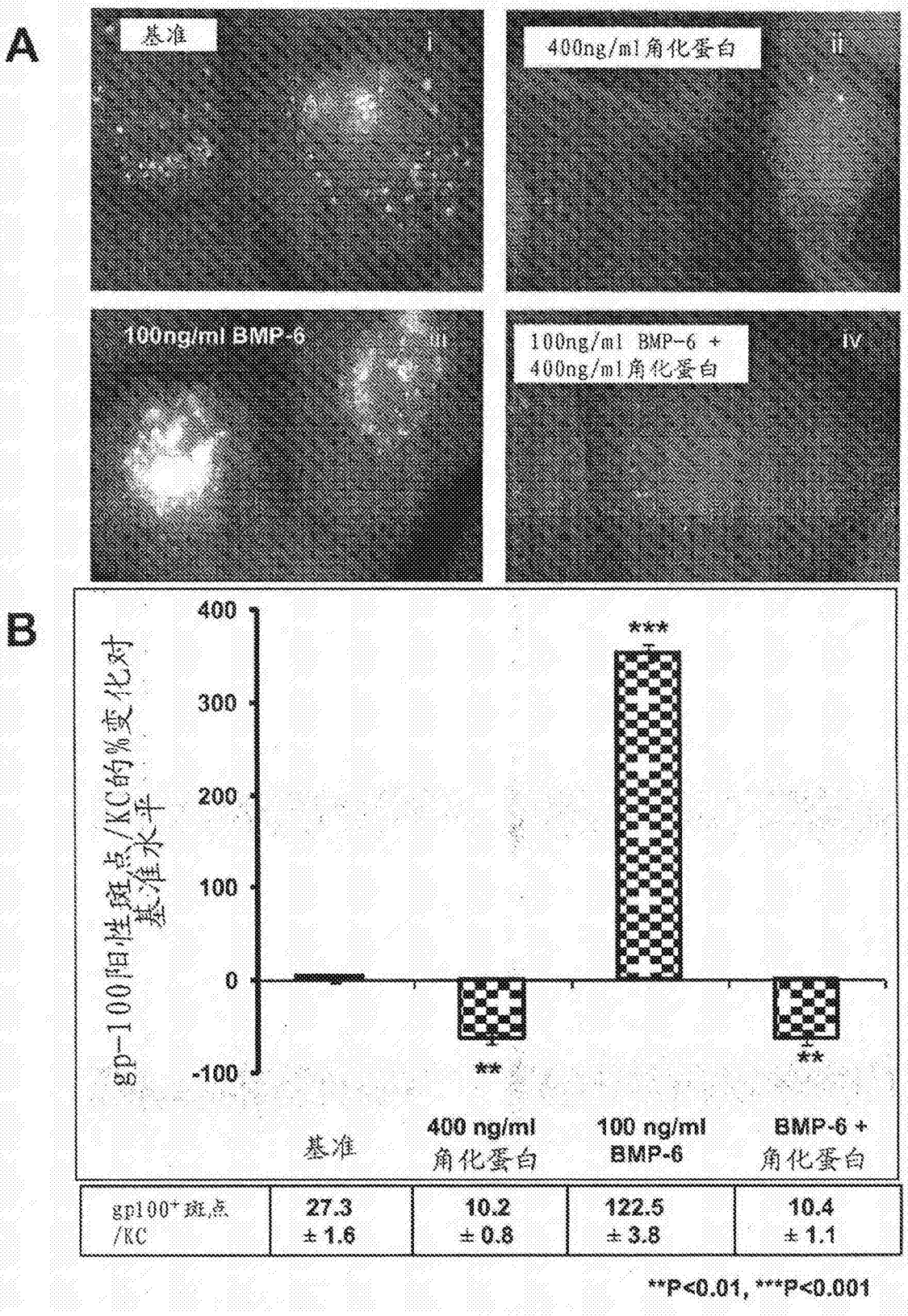

A
基准
i
400ng/ml角化蛋白
ii
100ng/ml BMP-6
iii
100ng/ml BMP-6 +
400ng/ml角化蛋白
iv
B
gp-100阳性斑点/KC的%变化对
基准水平
400
300
200
100
0
-100
***
**
**
基准
400 ng/ml
角化蛋白
100 ng/ml
BMP-6
BMP-6 +
角化蛋白
gp100+斑点
/KC
27.3
± 1.6
10.2
± 0.8
122.5
± 3.8
10.4
± 1.1
**P<0.01, ***P<0.001

图 6

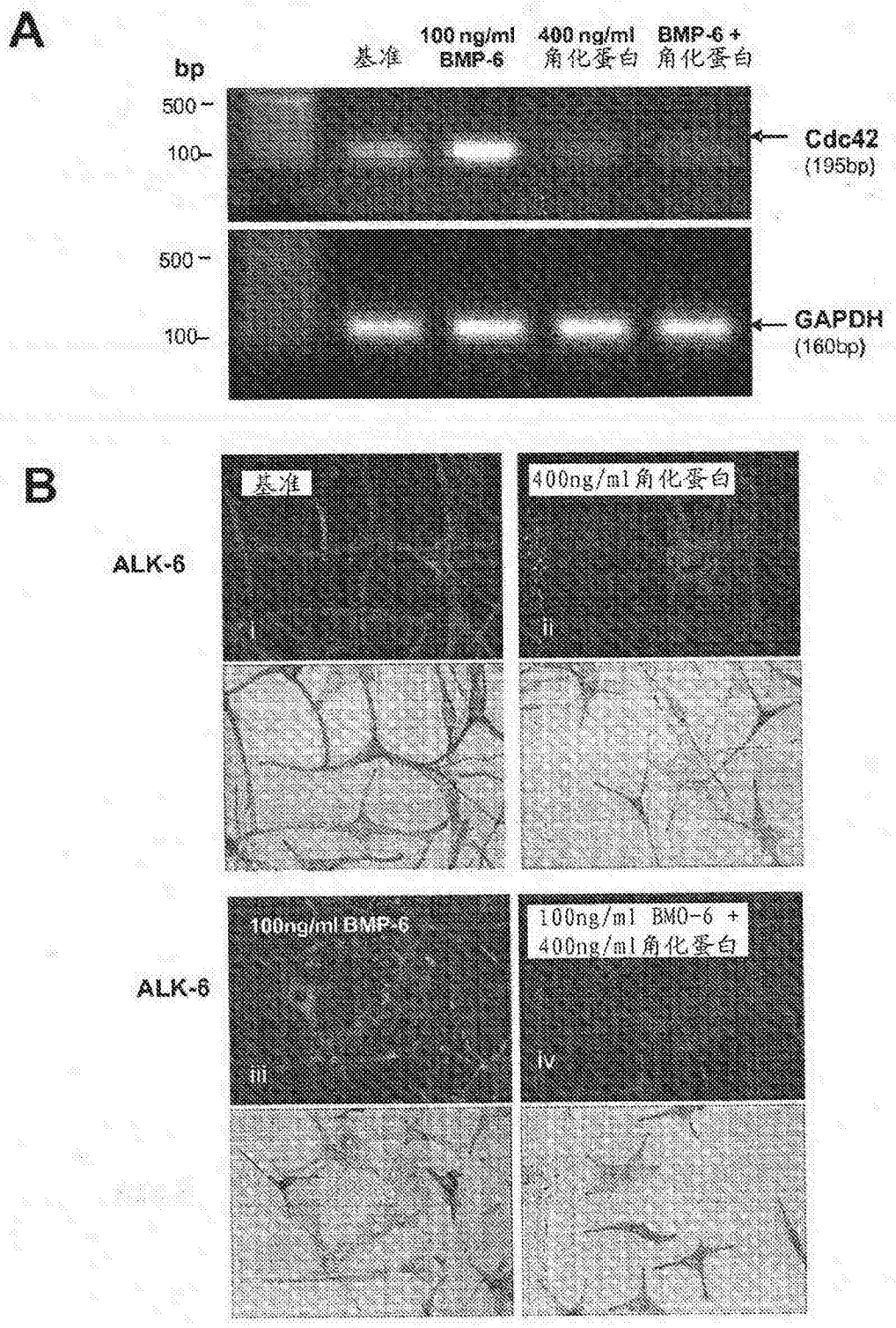

A
基准
100 ng/ml BMP-6
400 ng/ml 角化蛋白
BMP-6 + 角化蛋白
bp
500
100
Cdc42
(195bp)
500
100
GAPDH
(160bp)
B
ALK-6
基准
400ng/ml角化蛋白
i
ii
ALK-6
100ng/ml BMP-6
100ng/ml BMO-6 + 400ng/ml角化蛋白
iii
iv

图 7

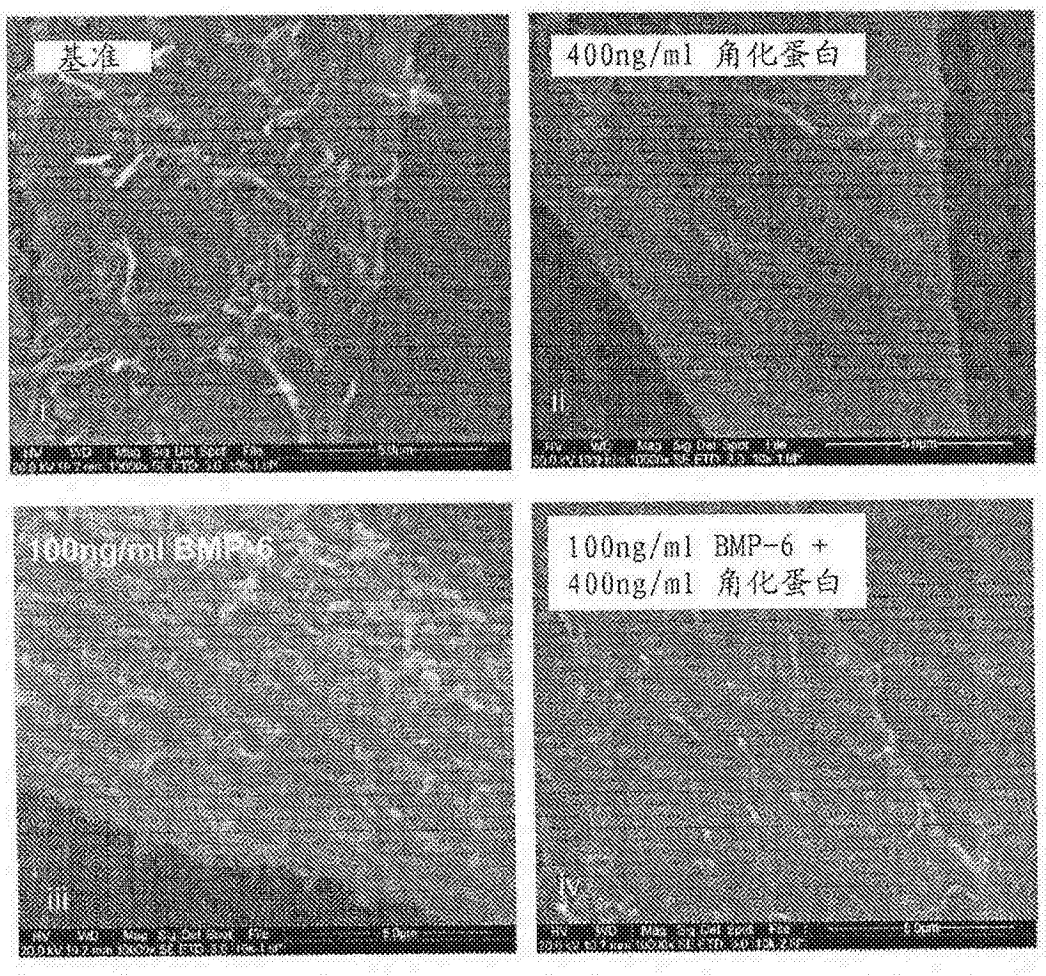


图 8

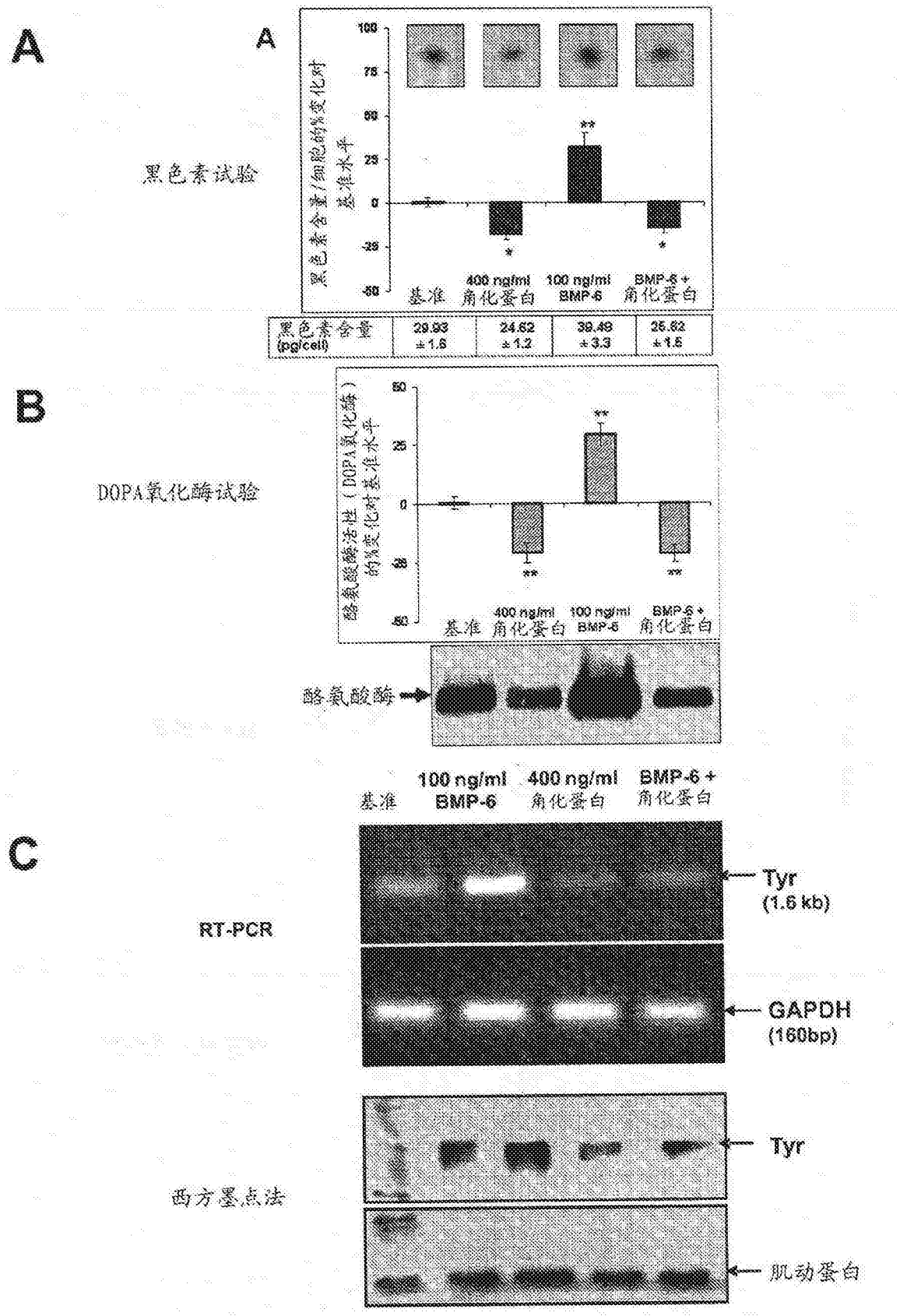
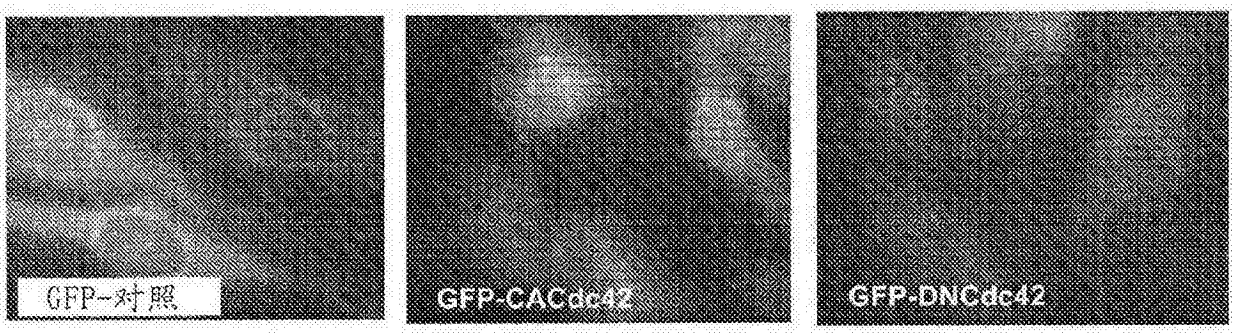

A
A
黑色素试验
黑色素含量/细胞的%变化对基准水平
100
75
50
25
0
-25
-50
基准
400 ng/ml 角化蛋白
100 ng/ml BMP-6
BMP-6 + 角化蛋白
黑色素含量 (pg/cell)
29.93 ±1.6
24.62 ±1.2
39.49 ±3.3
25.62 ±1.5
B
DOPA氧化酶试验
酪氨酸酶活性（DOPA氧化酶）的%变化对基准水平
50
25
0
-25
-50
基准
400 ng/ml 角化蛋白
100 ng/ml BMP-6
BMP-6 + 角化蛋白
酪氨酸酶
C
RT-PCR
基准
100 ng/ml BMP-6
400 ng/ml 角化蛋白
BMP-6 + 角化蛋白
Tyr (1.6 kb)
GAPDH (160bp)
西方墨点法
Tyr
肌动蛋白

图 9



补充-1