

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2017 年 1 月 19 日 (19.01.2017)



(10) 国际公布号
WO 2017/008375 A1

- (51) 国际专利分类号:
A61K 38/17 (2006.01) A61P 19/08 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2015/088432
- (22) 国际申请日: 2015 年 8 月 28 日 (28.08.2015)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201510420589.5 2015 年 7 月 16 日 (16.07.2015) CN
- (71) 申请人: 中山大学深圳研究院 (RESEARCH INSTITUTE OF SUN YAT-SEN UNIVERSITY IN SHENZHEN) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区科技园虚拟大学园大楼 A610 室, Guangdong 518000 (CN)。 中山大学 (SUN YAT-SEN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国广东省广州市海珠区新港西路 135 号, Guangdong 510000 (CN)。
- (72) 发明人: 苏薇薇 (SU, Weiwei); 中国广东省广州市海珠区新港西路 135 号中山大学, Guangdong 510000 (CN)。 李沛波 (LI, Peibo); 中国广东省广州市海珠区新港西路 135 号中山大学, Guangdong 510000 (CN)。 邵鹏柱 (SHAW, Pang Chui); 中国广东省广州市海珠区新港西路 135 号中山大学, Guangdong 510000 (CN)。 王永刚 (WANG, Yonggang); 中国广东省广州市海珠区新港西路 135 号中山大学, Guangdong 510000 (CN)。 彭维 (PENG, Wei); 中国广东省广州市海珠区新港西路 135 号中山大学, Guangdong 510000 (CN)。 马结仪 (MA, Jieyi); 中国

广东省广州市海珠区新港西路 135 号中山大学, Guangdong 510000 (CN)。 吴忠 (WU, Zhong); 中国广东省广州市海珠区新港西路 135 号中山大学, Guangdong 510000 (CN)。

- (74) 代理人: 广州番禺容大专利代理事务所 (普通合伙) (GUANGZHOU PANYU RONDA PATENT AGENCY); 中国广东省广州市越秀区东风中路 300 号之一金安大厦 14 楼 B 室, Guangdong 510030 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

[见续页]

- (54) Title: APPLICATION OF NACRE PROTEIN N16 IN PREPARING DRUG FOR INHIBITING OSTEOCLAST ACTIVITY
- (54) 发明名称: 珍珠母蛋白 N16 在制备抑制破骨活性药物中的应用

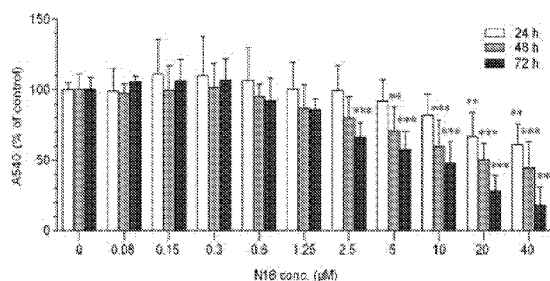


图2

(57) Abstract: The present invention discloses a new use of a nacre protein N16 in the field of pharmaceutical drug production, and in particular, an application of the nacre protein N16 in preparing a drug for inhibiting osteoclast activity.

(57) 摘要: 本发明公开了珍珠母蛋白 N16 在制药领域中的一种新用途, 具体为公开了珍珠母蛋白 N16 在制备抑制破骨活性药物中的应用。

WO 2017/008375 A1

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

珍珠母蛋白 N16 在制备抑制破骨活性药物中的应用

技术邻域

本发明涉及珍珠母蛋白 N16 在制药领域中的一种新用途。

背景技术

在人的骨头里，有成骨细胞和破骨细胞。成骨细胞是促进新骨的形成，破骨细胞则是消化旧骨。但当骨细胞间的平衡发生变化，破骨细胞活性大于成骨细胞功能时，骨量就会加速丢失，骨质也就变得日渐疏松。破骨细胞活性增强可导致骨质脱钙、骨脆性增加、生长受抑、长骨变粗及骨关节疼痛。背景技术

研究报道，珍珠母蛋白具有促进成骨活性，能促进骨损伤修复，显着提高去卵巢大鼠的骨密度，提高新生鼠颅骨的原代培养细胞和 MRC-5（人类胎儿成纤维细胞系）细胞的碱性磷酸酶活性，刺激成骨细胞的分化和产生矿化结节，促进骨形成。珍珠母蛋白具有良好的生物相容性，安全性高。在国内外，珍珠母粉被认为是一种良好的骨组织替代材料。珍珠母移植或透皮注射到动物体内无免疫排斥反应或明显毒副作用。

珍珠母蛋白 N16 是属于珍珠母蛋白，分子量为 16 kDa，在 1999 年由 Samata 等人在珍珠母不溶于水的组分中发现。研究表明，N16 能影响碳酸钙结晶的形状。但珍珠母蛋白 N16 抑制破骨活性的作用，尚未见文献报道。发明内容

发明内容

本发明的目的是为制备抑制破骨活性药物提供一种新途径，即提供珍珠母蛋白 N16 在制备抑制破骨活性药物中的应用。

所述抑制破骨活性药物可以制成任何临床上适用的药物制剂，如片剂、胶囊剂、颗粒剂、注射剂等。

本发明是首次将珍珠母蛋白 N16 应用于抑制破骨活性药物中。为抑制破骨活性药物提供了一种全新的选择和思路，拓宽了抑制破骨活性药物的选择领域。

附图说明

图 1 为本发明中基因重组的珍珠母蛋白 N16 的 15% SDS-PAGE 图；

图 2 为珍珠母蛋白 N16 抑制前体破骨细胞 RAW 264.7 的增殖结果图；

图 3 为 N16 抑制前体破骨细胞 RAW 264.7 分化实验的结果；

图 4 为珍珠母蛋白 N16 抑制破骨细胞 actin ring 的形成结果。

具体实施方式

以下通过具体的实施例进一步说明本发明的技术方案。

各实施例中所涉及的固体混合物中之固体，液体中之液体，以及液体中之固体的百分比分别是以 wt/wt、vol/vol、wt/vol 计算，除非另有说明。

实施例 1：珍珠母蛋白 N16 的制备

珍珠母蛋白 N16 的制备方法，具体包括以下步骤：

从马氏珠母贝 *Pinctada fucata* 中提取总 mRNA，经逆转录，产生单链 cDNA。根据 NCBI 数据库珍珠母蛋白 N16 的基因序列，设计引物珍珠母蛋白 N16F (5'-GGAATTCCCATATGGCTGT CCAT TATAAGTGC-3') 和珍珠母蛋白 N16R (5'-CGGGATCCTTAATTGTCAAACCGTTC-3')，其中下划线部位碱基分别为 *Nde*I 和 *Bam*HI 限制性内切酶位点。利用 PCR 法扩增珍珠母蛋白 N16 基因，反应程序设为 95℃ 1 分钟，50℃ 20 秒，72℃ 1 分钟，共 25 个循环，最后 72℃ 10 分钟。扩增所得珍珠母蛋白 N16 基因连接到表达载体 pET3 α 上，并导入 BL21 (DE3) plysS competent *Escherichia coli*，用于表达 N16 蛋白。当 BL21 (DE3) plysS competent *Escherichia coli* 生长到对数期，加入 0.4 mM IPTG，37℃ 诱导珍珠母蛋白 N16 的表达。16 h 后，收集菌体。

珍珠母蛋白 N16 的纯化：将表达菌体分散在 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) 中，超声破碎，离心，弃上清。不溶物以 washing buffer (2 M urea, 20 mM Tris, 0.1% Tween 20, pH 7.0) 超声溶解。离心，收集不溶物，再以 solubilizing buffer (8 M urea, 20 mM Tris, 40 mM beta-mercaptoethanol, pH 7.0) 室温溶解过夜。离心，取上清，0.45 μm 滤膜过滤。以 DEAE 柱子对 N16 进行初步纯化以及浓缩，其中，上样缓冲液为 8 M urea, 20 mM Tris, 40 mM beta-mercaptoethanol, pH 7.0，洗脱液为 8 M urea, 20 mM Tris, 40 mM beta-mercaptoethanol, 1 M NaCl, pH 7.0，洗脱方式为梯度洗脱。15% SDS-PAGE 检测珍珠母蛋白 N16。收集含珍珠母蛋白 N16 的洗脱液，超滤浓缩，以 Superdex 75 柱子进行凝胶排阻层析，分离纯化珍珠母蛋白 N16。15% SDS-PAGE 检测珍珠母蛋白 N16 的纯度。

结果见图 1。重组表达所得到的珍珠母蛋白 N16，分子量约为 16kDa，与预测结果相吻合。纯度高，无明显可见杂蛋白条带，可用于后续实验。

实施例 2：珍珠母蛋白 N16 抑制前体破骨细胞增殖

采用小鼠前体破骨细胞株 RAW 264.7, 于 100U/mL 青霉素, 100g/mL 链霉素的 DMEM 培养液中培养, 培养细胞置于 37℃、饱和湿度 5% CO₂ 浓度下, 2~3 天换液 1 次。取对数生长期生长状态良好的细胞以 $3\sim 5\times 10^3$ 个/孔接种于 96 孔培养板, 每孔 180 μ l。37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 24 小时。细胞贴壁生长后, 实验组加入不同浓度的珍珠母蛋白 N16, 每个浓度设 4 个复孔。同时设阴性对照组 (N16=0 μ M)。继续培养 24、48、72 小时。MTT 法检测细胞增殖情况。

结果见图 2。图 2 中设阴性对照组 (珍珠母蛋白 N16=0 μ M) 增殖率为 100%。(One-way ANOVA, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$, 与阴性对照组比较。)

珍珠母蛋白 N16 能抑制前体破骨细胞 RAW 264.7 细胞的增殖, 其抑制作用具有时间依赖性和浓度依赖性。作用 48 小时和 72 小时, 珍珠母蛋白 N16 对 RAW 264.7 细胞增殖半数抑制率的浓度分别约为 20 μ M 和 12 μ M。

实施例 3: 珍珠母蛋白 N16 抑制 RANKL 诱导 RAW 264.7 细胞向破骨细胞分化

采用对数生长期生长状态良好的 RAW264.7 细胞, 以 $1\sim 3\times 10^3$ 个/孔接种于 96 孔培养板, 每孔 180 μ l。37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 24 小时。细胞贴壁生长后, 弃去原培养基, 更换为含 50ng/ml RANKL 的 α -MEM 培养基。实验组加入不同浓度的珍珠母蛋白 N16, 每个浓度设 4 个复孔。同时设阴性对照组 (含 50ng/ml RANKL, 不含珍珠母蛋白 N16) 和正常对照组 (不含 50ng/ml RANKL)。继续培养 72 小时。酸性磷酸酶染色法检测破骨细胞, 酸性磷酸酶活性测定试剂盒测定 TRAP 活性, phalloidin-FITC 荧光染色法测定破骨细胞 actin ring 的形成。

结果见图 3、图 4。图 3 中, A 为 TRAP 染色结果。B 为多核破骨细胞数目统计结果。C 为 TRAP 活性测定结果。黑色箭头所示为多核破骨细胞。标尺为 200 μ m。(Non-paired Student's t-test, #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$, ###: $P<0.001$, 阴性对照组 (RANKL) 与空白对照组 (RANKL-) 比较; One-way ANOVA, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$, 与阴性对照组 (RANKL) 比较。

图 3A 为 TRAP 染色结果。RAW 264.7 细胞在 RANKL 的诱导下, 能分化成为多核破骨细胞 (核数目 >3), 细胞体积增大, TRAP 表达增多, TRAP 染色呈紫红色。珍珠母蛋白 N16 能抑制 RANKL 诱导 RAW 264.7 细胞分化成为成熟的破骨细胞。统计每组多核破骨细胞的数目并比较每组差异, 统计结果见图 3B。可见珍珠母蛋白 N16 对多核破骨细胞形成的抑制作用具有浓度依赖性 ($IC_{50}=0.5$ μ M)。TRAP 是破骨细胞分化的标志性酶。测定 TRAP 活性, 结果见图 3C。珍珠母蛋白 N16 抑

制 RAW 264.7 细胞 TRAP 的活性 ($IC_{50}=0.6 \mu M$), 该抑制作用具有浓度依赖性。Actin ring 是破骨细胞吞噬旧骨时所必需形成的结构, 对破骨细胞的进行骨吸收具有重要意义。phalloidin-FITC 荧光染色结果显示, 在不含珍珠母蛋白 N16 的 RANKL 诱导的 RAW 264.7 细胞中形成了明显的 actin ring。珍珠母蛋白 N16 抑制 actin ring 的形成。在含珍珠母蛋白 N16 的实验组中, actin ring 形成的数目减少, 体积变小。上述实验表明, 珍珠母蛋白 N16 对破骨细胞的分化具有抑制作用。图 4 中, 白色箭头所示为 actin ring。标尺为 $200 \mu m$ 。

实施例 4: 珍珠母蛋白 N16 抑制破骨细胞分化相关基因的表达

采用对数生长期生长状态良好的 RAW264.7 细胞, 以 $3\sim 5\times 10^4$ 个/孔接种于 6 孔培养板。37℃、5% CO_2 培养箱中孵育 24 小时。细胞贴壁生长后, 弃去原培养基, 更换为含 50ng/ml RANKL 的 α -MEM 培养基。实验组加入不同浓度的珍珠母蛋白 N16。同时设阴性对照组 (含 50ng/ml RANKL, 不含珍珠母蛋白 N16) 和空白对照组 (不含 50 ng/ml RANKL)。继续培养 72 小时。弃去原培养基, Trizol 法提取 mRNA, 逆转录得 cDNA, 实时定量 PCR 法 (qPCR) 测定破骨细胞分化相关基因的表达情况。

表 1 实施例 2 中所用到的引物

Gene name	Forward	Reverse
TRAP	ACACAGTGATGCTGTGTGGCAACTC	CCAGAGGCTTCCACATATATGATGG
NFATc1	F:GGGTCAGTGTGACCGAAGAT	R:GGAAGTCAGAAGTGGGTGGA
c-Src	CCAGGCTGAGGAGTGGTACT	CAGCTTGCGGATCTTGTAGT
Cathepsin K	GGCCAACTCAAGAAGAAAAC	GTGCTTGCTTCCCTTCTGG
GAPDH	AACTTTGGCATTGTGGAAGG	ACACATTGGGGGTAGGAACA

TRAP、c-Src、Cathepsin K 和转录因子 NFATc1 与破骨细胞分化相关。TRAP 是破骨细胞分化标志性酶, 缺乏 c-Src、Cathepsin K 会损伤破骨细胞的骨吸收功能。转录因子 NFATc1 是 RANKL 诱导破骨细胞成熟通路中的重要因子。RANKL 通过 MAPK 细胞信号通路, 激活转录因子 NFATc1, 从而引起一系列下游破骨细胞分化相关因子的表达, 从而诱导破骨细胞分化成熟。表 2 中的数据为实验组与空白对照组相应基因表达量比较的倍数。阴性对照组中, TRAP、c-Src、Cathepsin K 和转录因子 NFATc1 在 RANKL 的诱导下, 表达量增高。加入珍珠母蛋白 N16 后, 能抑制 TRAP、c-Src、Cathepsin K 和转录因子 NFATc1 的表达, 表明珍珠母蛋白 N16 能抑制破骨细胞的分化成熟。

表 2 N16 对破骨细胞分化相关基因的表达影响 (mean $\pm$ SD)

	TRAP	c-Src	Cathepsin K	NFATc1
RANKL (阴性对照组)	450.76 $\pm$ 269.70	20.10 $\pm$ 1.39	231.90 $\pm$ 149.7	13.79 $\pm$ 5.25
RANKL+ N16 (0.08 μ M)	165.93 $\pm$ 91.92	9.07 $\pm$ 2.46***	57.25 $\pm$ 7.71	7.76 $\pm$ 4.95
RANKL+ N16 (0.3 μ M)	17.81 $\pm$ 14.91*	3.69 $\pm$ 2.71 ***	8.29 $\pm$ 5.59*	3.03 $\pm$ 0.44*
RANKL+ N16 (1.25 μ M)	1.85 $\pm$ 1.70*	2.81 $\pm$ 0.84 ***	1.41 $\pm$ 1.15*	0.72 $\pm$ 0.18**

(One-way ANOVA, *: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001 , 与阴性对照组比较).

权利要求书

- 1、珍珠母蛋白 N16 在制备抑制破骨活性药物中的应用。
- 2、如权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述药物的剂型是片剂、胶囊剂、颗粒剂、注射剂或鼻吸入剂。

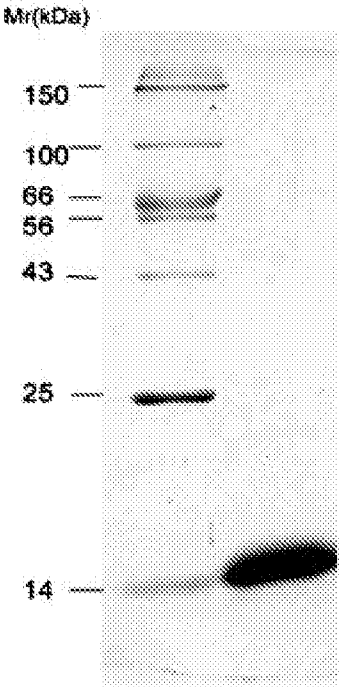


图1

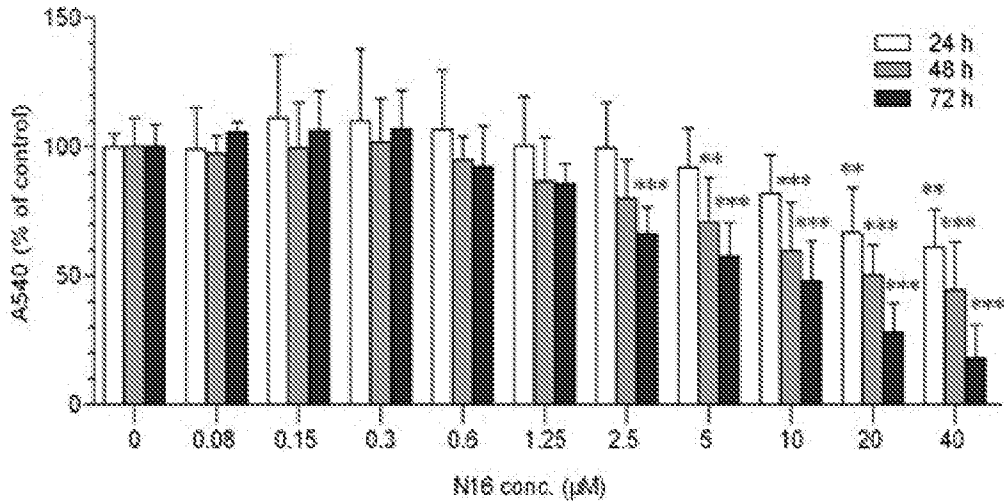


图2

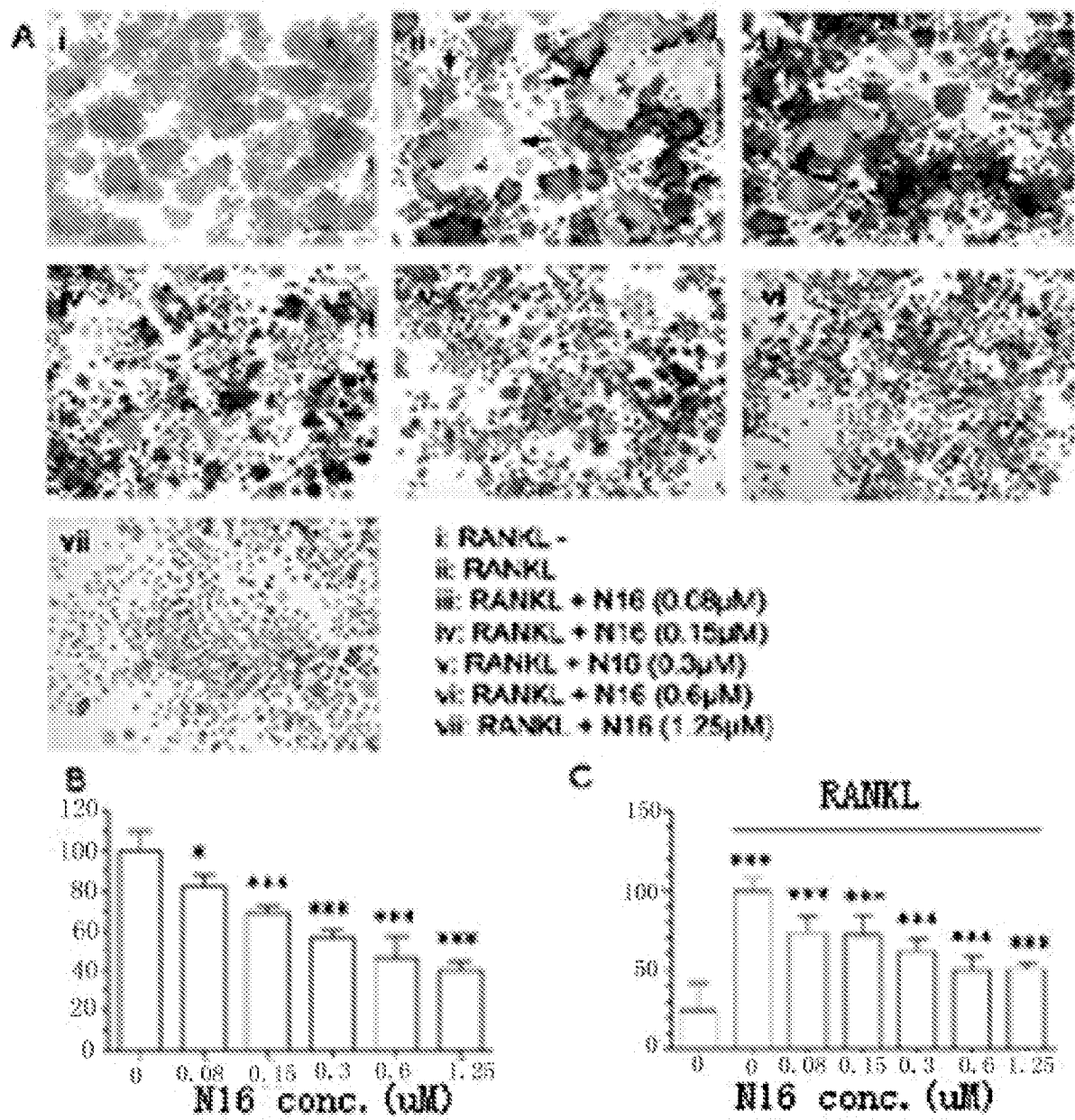


图3

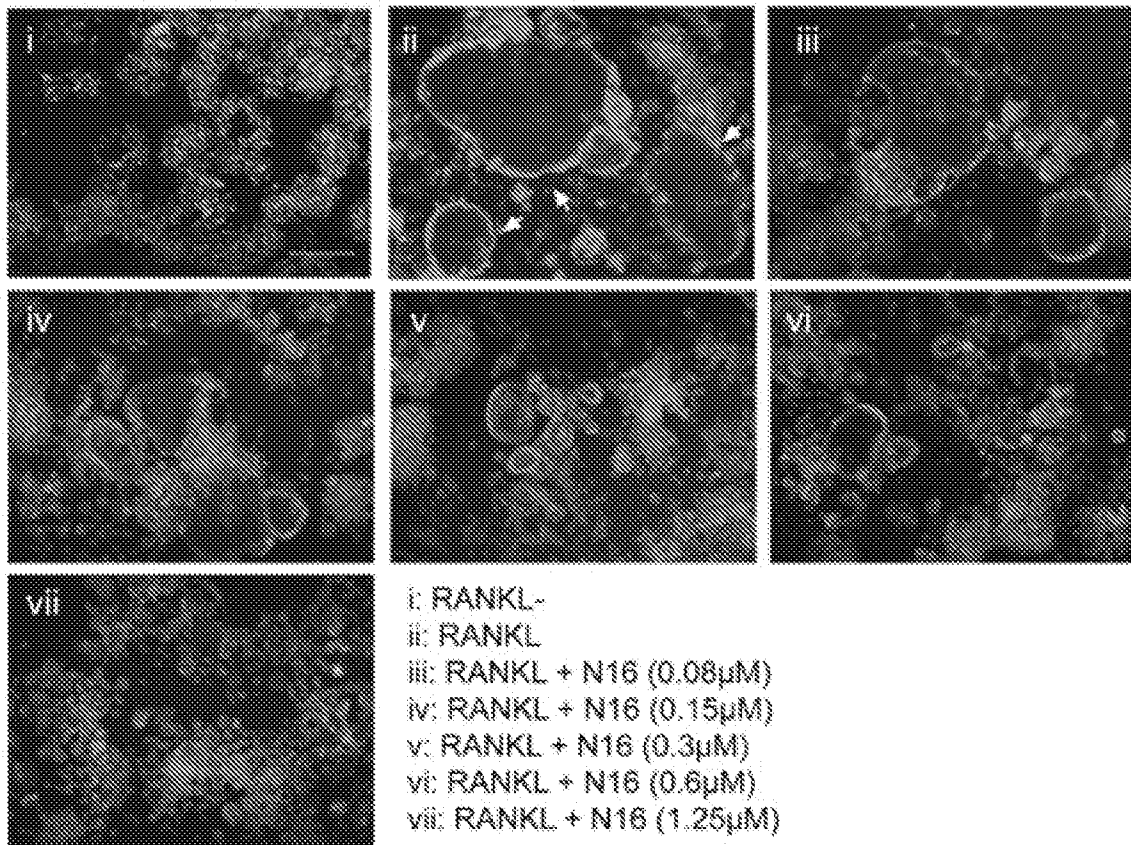


图4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2015/088432

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/17 (2006.01) i; A61P 19/08 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT, CNTXT, CPRSABS, CNABS, DWPI, SIPOABS, VEN, CJFD, CNKI, ISI Web of Knowledge, PUBMED: nacre protein, N16, osteoclast, Pearl

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 103131714 A (SUN YAT-SEN UNIVERSITY; GUANGZHOU ZHONGTIAN KANGSHUN BIOLOGICAL PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 05 June 2013 (05.06.2013), abstract, and claims 1-6	1, 2

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“&” document member of the same patent family
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 24 March 2016 (24.03.2016)	Date of mailing of the international search report 01 April 2016 (01.04.2016)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer ZHANG, Yanxia Telephone No.: (86-10) 62089438

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2015/088432

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 103131714 A	05 June 2013	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2015/088432

A. 主题的分类

A61K 38/17 (2006.01) i; A61P 19/08 (2006.01) i

按照国际专利分类 (IPC) 或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献 (标明分类系统和分类号)

A61K, A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库 (数据库的名称, 和使用的检索词 (如使用))

CNPAT, CNTXT, CPRSABS, CNABS, DWPI, SIPOABS, VEN, CJFD, CNKI, ISI Web of Knowledge, PUBMED: 破骨, 珍珠母蛋白, N16, osteoclast, Pearl

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 103131714 A (中山大学, 广州中天康顺生物医药有限公司) 2013年 6月 5日 (2013 - 06 - 05) 摘要, 权利要求1-6	1, 2

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2016年 3月 24日

国际检索报告邮寄日期

2016年 4月 1日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局 (ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10) 62019451

授权官员

张艳霞

电话号码 (86-10) 62089438

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2015/088432

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN 103131714 A	2013年 6月 5日	无	