

(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
2013 年 11 月 14 日 (14.11.2013)



(10) 国际公布号
WO 2013/166944 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07K 7/06 (2006.01) *A61K 38/08* (2006.01)
C07K 7/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2013/075186
- (22) 国际申请日: 2013 年 5 月 6 日 (06.05.2013)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
2012101411103.0 2012 年 5 月 8 日 (08.05.2012) CN
201210141116.8 2012 年 5 月 8 日 (08.05.2012) CN
201310136244.8 2013 年 4 月 18 日 (18.04.2013) CN
- (71) 申请人: 复旦大学 (FUDAN UNIVERSITY) [CN/CN];
中国上海市杨浦区邯郸路 220 号, Shanghai 200433 (CN)。
- (72) 发明人: 余龙 (YU, Long); 中国上海市杨浦区邯郸路 220 号, Shanghai 200433 (CN)。 唐丽莎 (TANG, Lisha); 中国上海市杨浦区邯郸路 220 号, Shanghai 200433 (CN)。 季国庆 (JI, Guoqing); 中国上海市杨浦区邯郸路 220 号, Shanghai 200433 (CN)。 吴燕华 (WU, Yanhua); 中国上海市杨浦区邯郸路 220 号,

Shanghai 200433 (CN)。 韩丁丁 (HAN, Dingding); 中国上海市杨浦区邯郸路 220 号, Shanghai 200433 (CN)。

(74) 代理人: 上海光华专利事务所 (J.Z.M.C. PATENT AND TRADEMARK LAW OFFICE); 中国上海市杨浦区国定路 335 号 5022 室余明伟, Shanghai 200433 (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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, 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, 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,

[见续页]

(54) Title: RTN4B-RELATED POLYPEPTIDE, AND, PREPARATION AND APPLICATIONS THEREOF

(54) 发明名称: 一种 RTN4B 相关多肽及其制备与应用

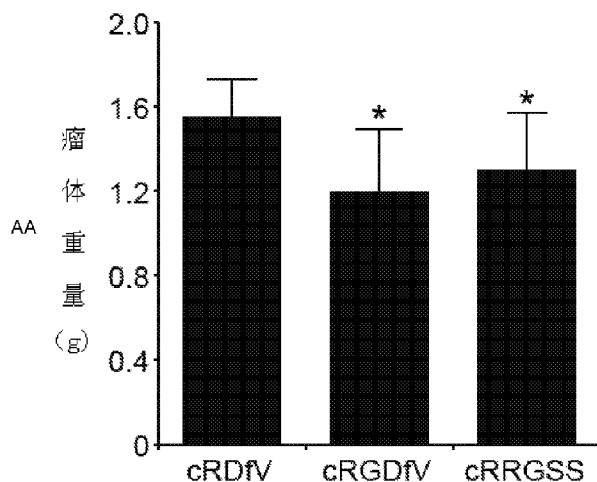


图 2 / Fig.2

AA Tumor weight (g)

(57) Abstract: The present invention relates to an RTN4B-related polypeptide, and, preparation and applications thereof. The RTN4B-related polypeptide of the present invention contains the amino acid sequence as expressed by SEQ ID NO. 1. Further disclosed are a chemical synthesis-based preparation method for the RTN4B-related polypeptide and a use of the RTN4B-related polypeptide. The RTN4B-related polypeptide of the present invention is capable of *in vitro* inhibition of the biological activity of RTN4B and of *in vivo* inhibition of tumor cell growth.

(57) 摘要: 本发明涉及一种 RTN4B 相关多肽及其制备与应用。本发明的 RTN4B 相关多肽, 含有 SEQ ID NO.1 所示的氨基酸序列。本发明还进一步公开了所述 RTN4B 相关多肽基于化学合成法的制备方法以及所述 RTN4B 相关多肽的用途。本发明的 RTN4B 相关多肽能够在体外抑制 RTN4B 的生物学活性, 在体内抑制肿瘤细胞的生长。



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, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

一种 RTN4B 相关多肽及其制备与应用

技术领域

本发明涉及生物技术领域，具体涉及一种 RTN4B 相关多肽及其制备与应用。

背景技术

RTN4B 属于 reticolum 家族 (RTNs)，因含有特殊的内质网定位而得名，具有保守的 RHD 结构框 (reticolum-homology domain)。该家族含有四个基因，RTN1、RTN2、RTN3 和 RTN4，其中关于 RTN4 的研究报道较多。RTN4 (又名 Nogo/ASY/RTN-X) 基因有多个可变剪接本，主要编码 RTN4A (GenBank 登录号 AF148537)，RTN4B (GenBank 登录号 AF148538) 和 RTN4C (GenBank 登录号 AF087901) 三种蛋白，其它一些剪接本多在睾丸中特异性表达 [Oertle T, Schwab ME. Nogo and its paRTNers. *Trends Cell Biol.* 2003 Apr;13(4):187-94.]。

RTN4B 在除了肝脏以外的其他所有正常组织中广谱表达，前人的研究工作提示 RTN4B 参与调控细胞凋亡和肿瘤生长。Tsujimoto 等人发现 RTN4B 能够和 Bcl-2、Bcl-xL 相互作用并将 Bcl-XL 及 Bcl-2 招募到内质网上，逆转 Bcl-XL 及 Bcl-2 的凋亡抑制作用 [Tagami S, Eguchi Y, Kinoshita M, Takeda M, Tsujimoto Y. A novel protein, RTN-XS, interacts with both Bcl-XL and Bcl-2 on endoplasmic reticulum and reduces their anti-apoptotic activity. *Oncogene.* 2000 Nov 23;19(50):5736-46.]。Yutsudo 等人发现 RTN4B 在小细胞肺癌的样本中出现转录抑制，而过量表达 RTN4B 可以显著促进肿瘤细胞的凋亡 [Li Q, Qi B, Oka K, Shimakage M, Yoshioka N, Inoue H, Hakura A, Kodama K, Stanbridge EJ, Yutsudo M. Link of a new type of apoptosis-inducing gene ASY/Nogo-B to human cancer. *Oncogene.* 2001 Jul 5;20(30):3929-36.]。但是，Schwab 小组指出 RTN4B 的表达在很多肿瘤组织来源的 EST 数据库中都有支持，而且 RTN4B 在 SaOS-2 或 CHO 细胞中没有促进细胞凋亡的迹象 [Oertle T, Merkler D, Schwab ME. Do cancer cells die because of Nogo-B? *Oncogene.* 2003 Mar 6;22(9):1390-9.]。因此，RTN4B 调控肿瘤生长的机制是否与细胞凋亡有关还尚无定论。但是，近年来的研究进一步发现 RTN4B 很可能与血管重建、甚至血管新生有关。2004 年，Acevedo 等人发现 RTN4B 在哺乳动物血管内皮

细胞和平滑肌细胞中都有表达。RTN4B 重组蛋白可以促进血管内皮细胞的迁移并抑制平滑肌细胞的迁移。RTN4A/B 基因敲除小鼠在血管损伤后出现了异常加厚的血管壁，血管内腔缩小，通过腺病毒载体将 RTN4B 重新导入到小鼠体内，这种异常增厚的血管壁又能够恢复正常的形态 [Acevedo L, Yu J, Erdjument-Bromage H, Miao RQ, Kim JE, Fulton D, Tempst P, Strittmatter SM, Sessa WC. A new role for Nogo as a regulator of vascular remodeling. *Nat Med.* 2004 Apr;10(4):382-8.]. 随后，Miao 等人筛选到了 RTN4B 在血管内皮细胞表面的受体分子 NgBR [Miao RQ, Gao Y, Harrison KD, Prendergast J, Acevedo LM, Yu J, Hu F, Strittmatter SM, Sessa WC. Identification of a receptor necessary for Nogo-B stimulated chemotaxis and morphogenesis of endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Jul 18;103(29):10997-1002.]. 敲减实验证明 RTN4B 和 NgBR 之间的相互作用是 VEGF 血管源性分子诱导血管新生所必需的。在斑马鱼模式生物中发现，RTN4B-NgBR 的相互作用能够通过激活细胞内的 Akt 通路调控血管新生 [Zhao B, Chun C, Liu Z, Horswill MA, Pramanik K, Wilkinson GA, Ramchandran R, Miao RQ. Nogo-B receptor is essential for angiogenesis in zebrafish via Akt pathway. *Blood.* 2010 Dec 9;116(24):5423-33.]。

本发明的申请人最早克隆了人 *RTN4* 基因，并在前期的研究工作中对肿瘤细胞表达的 RTN4B 进行了深入的功能分析，已经申请专利“一种人蛋白和编码序列、及其制法和用途”[授权公告号：CN 1137383C]，其中涉及到了 RTN4B 蛋白的合成及其在肝癌诊断试剂盒中的应用。

RTN4B 与肿瘤的相关性已在多篇研究中报道，并为本发明的发明人的前期研究工作所证实。RTN4B 的表达变化不仅与肿瘤发生发展密切相关，且 RTN4B 可以参与调节肿瘤生长：过量表达 RTN4B 可以促进肿瘤细胞在体内生长，而消减 RTN4B 可以抑制肿瘤细胞在体内的生长。

但是，关于 RTN4B 如何调节肿瘤生长，利用 RTN4B 作为分子靶标如何实现肿瘤生长抑制的作用仍是亟待解决的科学问题。本领域迫切需要在深入阐述 RTN4B 调节肿瘤生长的机制的基础上，以 RTN4B 为分子靶标，探索新颖有效的抗肿瘤药物。

发明内容

本发明的目的是公开一种 RTN4B 相关多肽及其制备与应用。

本发明第一方面，公开了一种 RTN4B 相关多肽，其含有 SEQ ID NO.1 所示的氨基酸序列或其保守性变异多肽。

SEQ ID NO:1: RRGSS。

本发明的 RTN4B 相关多肽可以是合成多肽或重组多肽。

本发明的 RTN4B 相关多肽可以是经修饰的或未经修饰的多肽。

所述修饰是指在分子水平上对蛋白质进行改造，通常不改变一级结构。即在体外将蛋白质的侧链基团通过人工方法，与一些天然或合成的基团特别是具有生物相容性的大分子进行共价连接，从而改变蛋白质的性质如提高了其抗蛋白水解性能、优化了溶解性能、增加半衰期、或更易于纯化等等。具体的，这些修饰可以是糖基化、PEG 化、标签抗体等。

所述标签抗体是指是抗原分子中决定抗原特异性的特殊区域或基团，是与抗体特异性结合的结构或序列。可用于 DNA 重组技术构建包含目的基因以及表位标记的融合蛋白，进而通过特异性标签抗体对其鉴定与纯化，以达到研究的需求。常用的标签抗体包括但不限于：myc、HA、Flag、His、GST 等。

经试验证实，本发明的 RTN4B 相关多肽能体外抑制 RTN4B 的生物学活性。

所述 RTN4B 相关多肽能体外抑制 RTN4B 的生物学活性是指 RTN4B 相关多肽具有体外抑制 RTN4B 调节细胞黏附能力。

较优的，所述 RTN4B 相关多肽的氨基酸序列为 SEQ ID NO.1。

本发明的 RTN4B 相关多肽可以为线性多肽或环肽。

本发明第二方面，公开了所述 RTN4B 相关多肽的制备方法，包括采用化学合成法获得所述 RTN4B 相关多肽的线性多肽。

获得线性多肽后，还可进一步将所述线性多肽首尾环化获得环肽。

在本发明的一个实施例中，是以固相树脂载体、氨基酸为材料，利用肽键的缩合反应人工合成多肽链，它包括步骤：

- (a)将肽链的羧基端氨基酸首先共价连接到固相载体上；
- (b)经过脱氨基保护基，与过量的活化羧基的下一个氨基酸缩合反应，从而延长肽链；
- (c)循环步骤 b 依次连接序列中的氨基酸直至延长到肽链氨基末端；

(d) 从固相载体上切割肽链并脱去侧链保护基，经纯化获得线性多肽。

上述各步骤所采用的条件和试剂均为多肽合成中的常规。

进一步的，在制备环肽时，所述步骤 d 为：从固相载体上切割肽链，环化后脱去侧链保护基，经纯化获得环肽。

本发明的 RTN4B 相关多肽也可以采用重组技术从原核或真核宿主中产生。

本发明第三方面，公开了一种分离的多核苷酸，它包含一核苷酸序列，该核苷酸序列选自下组：(a) 编码所述 RTN4B 相关多肽的多核苷酸；(b) 与多核苷酸 (a) 互补的多核苷酸。

本发明的多核苷酸可以是 DNA 形式或 RNA 形式。DNA 可以是单链的或是双链的。

本发明的多核苷酸可用于构建表达本发明的 RTN4B 相关多肽的重组表达载体。重组表达载体指本领域熟知的细菌质粒、噬菌体、酵母质粒、植物细胞病毒、哺乳动物细胞病毒如腺病毒、逆转录病毒或其他载体。在本发明中适用的载体包括但不限于：在细菌中表达的基于 T7 的表达载体(Rosenberg, et al. Gene, 1987,56.125); 在哺乳动物细胞中表达的 pMSXND 表达载体(Lee and Nathans, J Bio Chem. 263:3521,1988)和在昆虫细胞中表达的来源于杆状病毒的载体。总之，只要能在宿主体内复制和稳定，任何质粒和载体都可以用。表达载体的一个重要特征是通常含有复制起点、启动子、标记基因和翻译控制元件。为了方便重组表达载体的纯化，还可以进一步在构建重组表达载体时，在 RTN4B 相关多肽编码基因的一端增加标签抗体的编码序列以方便纯化。

本发明第四方面，公开了所述 RTN4B 相关多肽在制备抑制 RTN4B 的生物学活性的药物或制剂中的用途。

进一步的，所述抑制 RTN4B 的生物学活性的药物或制剂为抑制 RTN4B 调节细胞黏附能力的药物或制剂。

现有技术已报道了 RTN4B 的多种功能，如与肿瘤细胞的凋亡、血管重建、血管新生、黏附、迁移等相关。本发明所述的 RTN4B 相关多肽可以抑制 RTN4B 的生物学活性，意味着其潜在的药用价值。

本发明第五方面，公开了所述 RTN4B 相关多肽在制备治疗或预防肿瘤的药物中的用途。

在本发明的一个实施例中，具体列举了本发明的 RTN4B 相关多肽对肝癌的抑

制作用，这意味着本发明的 RTN4B 相关多肽有望成为抗癌药物。实施例的方法是通过腹腔注射多肽，抑制腋下肿瘤细胞移植瘤的生长。它包括步骤：(a)将肿瘤细胞移植到裸鼠腋下；(b)通过腹腔给药的方式将多肽注入裸鼠体内；(c)记录裸鼠移植瘤的生长速率并通过免疫组化分析瘤体内的细胞生长和血管生长状况[技术参考：Yamada S, Bu XY, Khankaldyyan V, Gonzales-Gomez I, McComb JG, Laug WE. Effect of the angiogenesis inhibitor Cilengitide (EMD 121974) on glioblastoma growth in nude mice. *Neurosurgery*. 2006 Dec;59(6):1304-12]。结果证实本发明的 RTN4B 相关多肽能够通过抑制血管内皮细胞黏附的能力实现肿瘤生长抑制。

本发明第五方面，还公开了一种治疗或预防肿瘤的方法，为向对象施用所述 RNT4B 相关多肽。

所述肿瘤选自其生长或增殖与 RNT4B 蛋白的表达或活性相关的肿瘤。

进一步的，所述肿瘤为肝癌。

本发明第六方面，公开了所述 RTN4B 相关多肽在制备抑制血管内皮细胞黏附的药物或制剂中的应用。

在本发明的一个实施例中，该方法是通过将多肽与肿瘤细胞孵育后，抑制肿瘤细胞在 RTN4B 表面的黏附能力，它包括步骤：(a)将血管内皮细胞与多肽孵育；(b)用 RTN4B 蛋白包被细胞培养皿；(c)将血管内皮细胞接种到培养皿中；(d)检测 1 小时内血管内皮细胞在 RTN4B 表面黏附的比例[技术参考：Gonzalez AM, Gonzales M, Herron GS, Nagavarapu U, Hopkinson SB, Tsuruta D, Jones JC. Complex interactions between the laminin alpha 4 subunit and integrins regulate endothelial cell behavior in vitro and angiogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Dec 10;99(25):16075-80.]。

本发明第七方面，公开了一种药物或制剂，其活性成分含有所述 RTN4B 相关多肽。

所述药物可为用于抑制 RTN4B 的生物学活性作用的药物或制剂；或者为，用于治疗或预防肿瘤的药物；或者为，用于抑制血管内皮细胞黏附的药物或制剂。

所述药物或制剂中，还可包括药用辅料。

所述药用辅料是为解决制剂的成型性、有效性、稳定性、安全性、提高活性或生物有效性、在口服的情况下产生可接受的口感或气味等制剂相关问题而加入处方中除主药以外的药用物料。

药用辅料可以是各种载体、稀释剂、填充剂、结合剂及其它赋形剂，这依赖于给药方式及所设计的剂量形式。各种防腐剂、润滑剂、分散剂、矫味剂、保湿剂、抗氧化剂、甜味剂、着色剂、稳定剂也可加入其中。具体的，所述药用辅料可包括但不限于糖类（如：乳糖、葡萄糖、蔗糖）、淀粉（如玉米淀粉和土豆淀粉）、纤维素及其衍生物（如羟甲基纤维素钠、乙基纤维素、甲基纤维素、微晶纤维素）、西黄蓍胶粉末、麦芽、明胶、滑石、固体润滑剂（如硬脂酸和硬脂酸镁）、硫酸钙、植物油（如花生油、棉籽油、芝麻油、橄榄油、玉米油和可可油）、蜡、脂肪、乙醇、多元醇（如丙二醇、甘油、山梨糖醇、甘露糖醇和聚乙二醇）、聚乙烯吡咯烷酮、海藻酸、乳化剂（如 Tween）、润湿剂（如月桂基硫酸钠）、着色剂、调味剂（如甜味剂）、压片剂、稳定剂、抗氧化剂、防腐剂（如羟基苯甲酸甲酯和丙酯）、无热原水、等渗盐溶液、缓冲液（如磷酸盐缓冲液）中的一种或多种的组合。

选药用辅料时，应当选择与本发明的 RTN4B 相关多肽相容，即能与其共混而不会在通常情况下大幅度降低药物组合物的效果的辅料。

本发明的药物或制剂可以是片剂、丸剂、粉剂、溶液剂、糖浆剂、灭菌注射溶液等。本发明的药物组合物可以被制成针剂形式，例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅料的水溶液通过常规方法进行制备。诸如片剂和胶囊之类的药物组合物，可通过常规方法进行制备。药物宜在无菌条件下制造。

配制好的药物或制剂可以通过常规途径进行给药，其中包括（但并不限于）：肌内、腹膜内、静脉内、皮下、皮内、或局部给药。使用药物时，是将安全有效量的本发明融合蛋白或其抗体施用于对象。例如每天约 50 微克/千克体重—约 500 毫克/千克体重。此外，本发明的多肽还可与其他治疗剂一起使用。

本发明根据 RTN4B 的生物学活性及作用途径设计了靶向 RTN4B 的短肽分子。经试验证明，本发明的 RTN4B 相关多肽能够在体外抑制 RTN4B 的生物学活性、抑制血管内皮细胞黏附，在体内抑制肿瘤细胞的生长，从而实现对肿瘤生长的控制，具有被开发成抗癌药物的潜力。

附图说明

图 1 多肽对 RTN4B 调节细胞黏附能力的抑制作用试验。

纵坐标：相对细胞黏附率

横坐标：

NT: BSA 对照孔

P4+PBS: 添加 RTN4B-P4 及对照 PBS 的孔

P4+138: 添加 RTN4B-P4 及本发明多肽的孔

图 2 多肽对肿瘤细胞生长抑制作用试验。

横坐标:

cRDfV: 对照环肽 cRDfV 组

cRGDfV: 阳性对照 cRGDfV 组

cRRGSS: 本发明环肽组

具体实施方式

本发明通过固相合成的方法获得所述短肽时, 利用 HPLC 技术进行纯化, 并利用质谱分析其纯度, 获得了高纯度的短肽。

本发明在体外血管内皮细胞黏附实验中进行了短肽应用, 发现了该短肽能够很好地抑制血管内皮细胞的黏附。RTN4B 的研究报道和我们的工作均发现 RTN4B 能够促进血管内皮细胞 (如 HUVEC) 的黏附, 并很可能通过介导黏附这一事件调节肿瘤微环境中血管内皮细胞的活性, 促进肿瘤血管新生 (图 1)。利用本发明的短肽与血管内皮细胞孵育后, RTN4B 对血管内皮细胞的黏附能力的调节作用被显著抑制 (图 2)。

在进一步描述本发明具体实施方式之前, 应理解, 本发明的保护范围不局限于下述特定的具体实施方案; 还应当理解, 本发明实施例中使用的术语是为了描述特定的具体实施方案, 而不是为了限制本发明的保护范围。

当实施例给出数值范围时, 应理解, 除非本发明另有说明, 每个数值范围的两个端点以及两个端点之间任何一个数值均可选用。除非另外定义, 本发明中使用的所有技术和科学术语与本技术领域技术人员通常理解的意义相同。除实施例中使用的具体方法、设备、材料外, 根据本技术领域的技术人员对现有技术的掌握及本发明的记载, 还可以使用与本发明实施例中所述的方法、设备、材料相似或等同的现有技术的任何方法、设备和材料来实现本发明。试验中未说明的百分比均为重量百

分比。

除非另外说明，本发明中所公开的实验方法、检测方法、制备方法均采用本技术领域常规的分子生物学、生物化学、染色质结构和分析、分析化学、细胞培养、重组DNA技术及相关领域的常规技术。这些技术在现有文献中已有完善说明，具体可参见Sambrook等MOLECULAR CLONING : A LABORATORY MANUAL, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 and Third edition, 2001 ; Ausubel 等, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, 1987 and periodic updates ; the series METHODS IN ENZYMOLOGY, Academic Press, San Diego ; Wolffe, CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION, Third edition, Academic Press, San Diego, 1998 ; METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol.304, Chromatin (P.M.Wassarman and A.P.Wolffe, eds.), Academic Press, San Diego, 1999 ; 和METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol.119, Chromatin Protocols(P.B.Becker, ed.)Humana Press, Totowa, 1999等。

实施例 1 本发明多肽的固相合成

合成原料及相关试剂:

(1)保护氨基酸原料: Fmoc-L-Cys(Trt)-OH 等(苄氧羰基-S-三苯甲基-L-半胱氨酸) (苏州天马医药集团精细化学品有限公司);

(2)缩合试剂和荧光, 生物素原料: HBTU (苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐) (苏州天马医药集团精细化学品有限公司), HOBT (1-羟基苯并三氮唑) (苏州天马医药集团精细化学品有限公司), DIEA (N,N-二异丙基乙胺) (国药集团上海化学试剂公司), FITC (异硫氰酸荧光素) (SIGMA), D-BIOTIN (D-生物素) (SIGMA);

(3)溶剂: DMF(二甲基甲酰胺) (Dikma), DCM(二氯甲烷) (Dikma), 乙腈 (Fisher);

(4)树脂: 2-chlorotrityl chloride resin(2-氯三苯甲基氯树脂) (天津市南开合成科技有限公司)

(5)脱保护试剂: 哌啶 (国药集团上海化学试剂公司);

(6)切割试剂: TFA (三氟乙酸) (J.T.Baker), TIS(三异丙基硅烷) (ALDRICH), EDT(1,2-乙二硫醇);

(7)氮气(上海比欧气体工业公司);

(8)无水乙醚(上海试一化学试剂有限公司); (9)精密电子天平(北京赛多利斯天平有限公司)。

仪器设备:

(1) SYMPHONY 型 12 通道多肽合成仪(型号: SYMPHONY, 软件: Version.201 厂家: Protein Technologies.Inc);

(2) SHIMADZU 高效液相色谱仪(型号: 制备型, 分析型, 软件: Class-VP. Seival System, 厂商: SHIMADZU);

(3) LABCONCO 冻干机(型号: Freezone. Plus. 6, 厂商: LABCONCO;

(4) 离心机(上海安亭科学仪器厂 型号: TDL-40B)。

合成过程:

线性多肽的制备:

(1) 树脂溶胀: 将 2-chlorotrityl chloride resin 放入反应管中, 加 DMF(15ml/g), 振荡 30min。

(2) 接第一个氨基酸: 通过沙芯抽滤掉溶剂, 加入 3 倍摩尔过量的 Fmoc-L-Cys(Trt)-OH 氨基酸, 再加入 10 倍摩尔过量的 DIEA, 最后加入 DMF 溶解, 振荡 30min。

(3) 脱保护: 去掉 DMF, 加 20%哌啶 DMF 溶液(15ml/g), 5min, 去掉再加 20%哌啶 DMF 溶液(15ml/g), 15min。

(4) 检测: 抽掉哌啶溶液, 取十几粒树脂, 用乙醇洗三次, 加入茚三酮, KCN, 苯酚溶液各一滴, 105℃—110℃加热 5min, 变深蓝色为阳性反应。

(5) 洗涤: DMF(10ml/g)两次, 甲醇(10ml/g)两次, DMF(10ml/g)两次。

(6) 缩合: 保护氨基酸(Fmoc-L-Cys(Trt)-OH)三倍过量, HBTU 三倍过量, 均用尽量少 DMF 溶解, 加入反应管, 立刻加入 NMM(N-甲基吗啉)十倍过量, 反应 30min。

(7) 洗涤: DMF(10ml/g)一次, 甲醇(10ml/g)两次, DMF(10ml/g)两次。

(8) 重复 2-7 步操作, 从右到左依次连接序列中的氨基酸。

(9) 抽干, 按照下列方法洗树脂。DMF(10ml/g)两次, 甲醇(10ml/g)两次, DMF(10ml/g)两次, DCM(10ml/g)两次, 抽干 10min。

(10) 从树脂上切割并脱去侧链保护基: 配制切割液(10mL/g) TFA 94.5%; 水 2.5%; EDT 2.5%; TIS 1%, 切割时间 120min。

(11) 吹干洗涤：将裂解液用氮气尽量吹干，用乙醚洗六次，然后常温挥干。

(12) 用 HPLC 纯化多肽：将粗肽用纯水或者加少量乙腈溶解，按照下列条件纯化：

泵 A：0.1%三氟乙酸纯水溶液；泵 B：0.1%三氟乙酸纯乙腈溶液；总流量：

1.0ml/min；体积：30ul；波长：220nm；

梯度：	Time（单位：分钟）	A	B
	05.00	90%	10%
	30.00	20%	80%
	30.10	停止	

<检测器 A>

柱：Venusi MRC-ODS C18 30x250mm

(13) 最后将纯化后的溶液冻干，既得到序列为 RRGSS 的线性多肽成品。

环肽的制备：

步骤（1）-（9），（11）-（14）与线性多肽制备一致获得序列为 RRGSS 的环肽成品，其中步骤 10 采用以下三个步骤替代：

（101）从树脂上切割多肽：配制切割液：TFA 1%；DCM 99%。切割液用量是每 1 克树脂肽加 10ml 的切割液，反应时间是 2h，室温密封切割。

（102）环化：切割液用氮气吹干，加入 HBTU 三倍过量，用尽量少 DMF 溶解，加入反应管，立刻加入 NMM 十倍过量，反应 30min。

（103）脱去侧链保护基：配制切割液（10mL/g）TFA 94.5%；水 2.5%；EDT 2.5%；TIS 1%，切割时间 120min。

鉴定：分别取少量的线性多肽及环肽成品，做 MS 的分子量鉴定符合预期，测序鉴定，序列符合预期，HPLC 分析纯度为 95%，MS 方法鉴定结构符合预期。

实施例 2 本发明多肽在体外细胞黏附中的应用

原料及相关试剂：磷酸缓冲液，胰酶（invitrogen 公司），M200 培养基及 LSGS 血清（cascade biologics 公司），牛血清白蛋白（上海生工生物工程技术服务有限公司），MTS/PMS 试剂盒（Promega 公司），人 HUVEC 细胞（ScienCell 公司）。

仪器设备：细胞培养箱（Heraeus 公司），倒置显微镜（Leica 公司），水平离心机（Eppendorf 离心机），酶标仪（Bio-Rad 公司）。

实验过程:

(1) 孔板准备: PBS 稀释 RTN4B-P4 蛋白 (为 ZL00111791.2 公开的 RTN4B 蛋白的部分胞外区段, 具有促进细胞黏附的活性, 可经多肽合成), 包被 96 孔板, 每孔 100 μ L。4 $^{\circ}$ C 过夜。次日 PBS 洗涤一遍后, 加入 1%BSA 进行封闭, 每孔 150 μ L。37 $^{\circ}$ C 放置 1h, 再用预热的无血清培养基洗涤一遍后可用于细胞接种。

RTN4B-P4 蛋白氨基酸序列(SEQ ID NO :2):

SPQAEPVWTPPAPAPAAPPSTPAAPKRRRGSSGSVVVDLLYWRDIKKTGVV。

RTN4B-P4 蛋白采用多肽合成的方法制备获得。

(2) 细胞接种: 当细胞在培养瓶中增殖至 90%的汇合度时更换成无血清培养基继续培养 16h 后可进行消化收获。弃去细胞原培养基, 先用数毫升 1 $\times$ PBS 洗涤细胞一遍, 然后加入 1-2mL 胰蛋白酶消化液, 摇晃均匀后弃去消化液, 仅留 0.5 mL 左右于瓶内, 将培养瓶置 37 $^{\circ}$ C 培养箱中消化 1-2min 左右, 待细胞变圆, 可从瓶壁脱离时, 加入含血清的培养基终止胰酶消化, 吹散细胞, 转入无菌离心管内, 1000 rpm 离心 5 min。弃去离心上清后, 用含 0.1% BSA 的无血清培养基将细胞调整至 5 $\times 10^5$ /mL 的密度。

(3) 封阻结合: 将稀释后的细胞悬液与实施例 1 制备的线性多肽在 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min, 工作浓度为 20mM, 然后将细胞悬液接种到 96 孔板中, 每孔 100 μ L。对照组加入相同体积的 PBS。

(4) 洗板和显色: 细胞接种后 1h, 吸去培养基。保留三个平行孔作为全细胞孔。其余各孔用预热的无血清培养剂或 PBS 洗涤, 重复洗涤三次直至未黏附细胞被完全洗去。剩余细胞用 MTS 试剂盒显色计算细胞数。相对细胞黏附率的计算方法是实验孔的 OD 值除以全细胞孔的 OD 值后的商。

试验结果: 如图 1 所示, 与对照 NT 组相比, RTN4B-P4 (P4+PBS 组) 能够促进细胞黏附。但是, 当内皮细胞与本发明制备的多肽孵育之后, 内皮细胞在 P4 表面的黏附能力显著下降 (P4+138 组)。

结果显示, 多肽能够抑制 RTN4B 调节细胞黏附能力。由于线性环肽能够抑制 RTN4B 调节细胞黏附能力, 环肽与之序列一致, 因此认为也具有抑制 RTN4B 调节细胞黏附能力。

实施例 3 本发明多肽在体内细胞生长中的应用

原料及相关试剂：磷酸缓冲液，胰酶（invitrogen 公司），DMEM 培养基和胎牛血清（Gibco 公司），3-4 周龄的裸鼠（上海斯莱克公司），肿瘤细胞株 SMMC-7721 等。

仪器设备：细胞培养箱（Heraeus 公司），倒置显微镜（Leica 公司），水平离心机（Eppendorf 离心机），SPF 动物室。

实验过程：

1. 将环肽用 PBS 稀释，配置成 5mg/mL 的母液，PH 值调整至 7.4。
2. 饲养裸鼠（3-4 周龄）。
3. 培养 SMMC7721 肝癌细胞，收集细胞，用无血清培养基重悬至 2×10^7 /mL。
4. 将细胞悬液接种到裸鼠皮下，每只小鼠 200 μ L，共 40 只小鼠。
5. 细胞注射 4 天后，将 40 只小鼠等分为 4 组，进行瘤内多肽注射，每只小鼠 200 μ L。连续注射 13 天。
6. 停药后第 3 天取瘤。
7. 进行瘤体重量分析，每组去掉最大及最小值。

空白对照：等体积的 PBS。

对照环肽组：cRDfV，采用多肽合成并参考实施例 1 的环化方法制备获得。

阳性对照组：cRGDfV（已经进入临床 III 期的 RGD 环肽，采用多肽合成并参考实施例 1 的环化方法制备获得。

试验环肽组：采用实施例 1 制备的环肽。

（4）瘤体记录：每两天测量一次瘤体大小，并按照 $a \times b^2$ 计算瘤体大小。

（5）最后一次注射后两天取瘤，瘤体称重并拍照。

结果：如图 2 所示，和对照环肽相比，cRRGSS（试验环肽组）和 cRGDfV（阳性对照组）都有抑制瘤体生长的作用，结果表明，本发明的环肽能够抑制肿瘤细胞的生长。由于本发明的线性肽与之序列一致，因此认为线性肽也具有抑制肿瘤细胞的生长的作用。

权利要求书

1. 一种 RTN4B 相关多肽, 含有 SEQ ID NO. 1 所示的氨基酸序列或其保守性变异多肽。
2. 如权利要求 1 所述 RTN4B 相关多肽, 所述 RTN4B 相关多肽为环肽或线性多肽。
3. 如权利要求 1 所述 RTN4B 相关多肽, 其特征在于, 所述 RTN4B 相关多肽能体外抑制 RTN4B 的生物学活性。
4. 如权利要求 3 所述 RTN4B 相关多肽, 其特征在于, 所述 RTN4B 相关多肽能体外抑制 RTN4B 的生物学活性是指 RTN4B 相关多肽能体外抑制 RTN4B 调节细胞黏附能力。
5. 如权利要求 1-4 任一所述 RTN4B 相关多肽的制备方法, 包括采用化学合成法获得所述 RTN4B 相关多肽的线性多肽。
6. 如权利要求 5 所述 RTN4B 相关多肽的制备方法, 其特征在于, 还包括将所述线性多肽首尾环化获得环肽。
7. 如权利要求 5 所述 RTN4B 相关多肽的制备方法, 其特征在于, 包括下列步骤:
 - (a) 将肽链的羧基端氨基酸首先共价连接到固相载体上;
 - (b) 经过脱氨基保护基, 与过量的活化羧基的下一个氨基酸缩合反应, 从而延长肽链;
 - (c) 循环步骤 b 依次连接序列中的氨基酸直至延长到肽链氨基末端;
 - (d) 从固相载体上切割肽链并脱去侧链保护基, 经纯化获得线性多肽。
8. 如权利要求 7 所述 RTN4B 相关多肽的制备方法, 其特征在于, 步骤 d 为: 从固相载体上切割肽链, 环化后脱去侧链保护基, 经纯化获得环肽。
9. 一种分离的多核苷酸, 它包含一核苷酸序列, 该核苷酸序列选自下组: (a) 编码权利要求 1-4 任一权利要求所述 RTN4B 相关多肽的多核苷酸; (b) 与多核苷酸 (a) 互补的多核苷酸。
10. 如权利要求 1-4 任一权利要求所述 RTN4B 相关多肽在制备抑制 RTN4B 的生物学活性的药物或制剂中的用途。
11. 如权利要求 1-4 任一权利要求所述的用途, 其特征在于, 所述抑制 RTN4B 的生物学活性的药物或制剂为抑制 RTN4B 调节细胞黏附能力的药物或制剂。

12. 如权利要求 1-4 任一权利要求所述 RTN4B 相关多肽在制备治疗或预防肿瘤的药物中的用途。
13. 如权利要求 12 所述 RTN4B 相关多肽的用途，其特征在于，所述肿瘤选自其生长或增殖与 RNT4B 蛋白的表达或活性相关的肿瘤。
14. 如权利要求 12 所述 RTN4B 相关多肽的用途，其特征在于，所述肿瘤为肝癌。
15. 权利要求 1-4 任一权利要求所述 RTN4B 相关多肽在制备抑制血管内皮细胞黏附的药物或制剂中的应用。
16. 一种药物或制剂，其活性成分含有权利要求 1-4 任一所述 RTN4B 相关多肽。

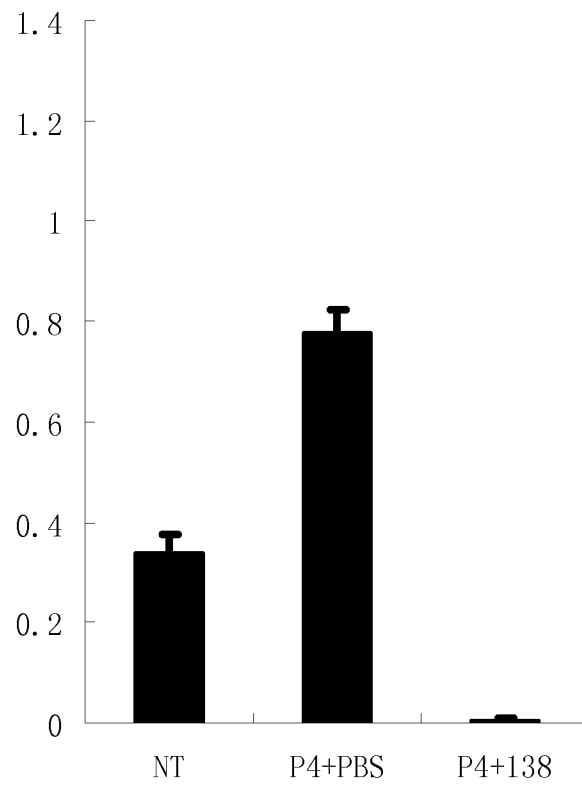


图 1

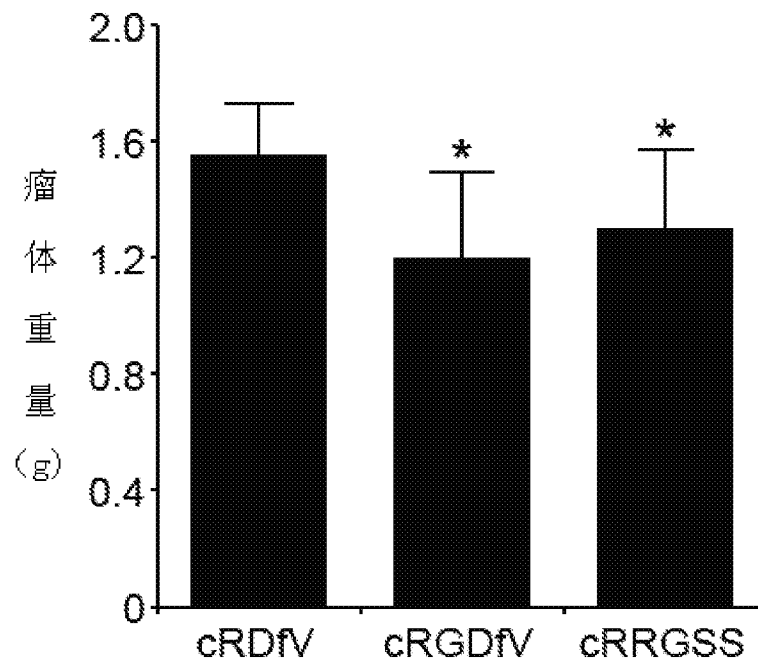


图 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2013/075186

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

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)

IPC: C07K 7/-; C12P 21/-; A61K 38/-; A61P 35/-

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)

WPI, EPODOC, CNPAT, CNKI, Wanfang, google, ISI web of Knowledge, Elsevier Science Direct, GenBank, EBI, National Bio-sequence Database of Chinese Patent: RNT4B, Nogo-B, NogoB, reticulon, reticulon, peptide, cancer, tumor, cell adhesion, adhesion, inhibition, SEQ ID NOS: 1-2

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NAM, M.H. et al. Comparative proteomic analysis of early salt stress-responsive proteins in roots of SnRK2 transgenic rice, PROTEOME SCIENCE, 31 March 2012 (31.03.2012), vol. 10, 25 th article, pages 1-19, particularly page 11, table 2	1-9, 16
X	LI, Q. et al. Link of a new type of apoptosis-inducing gene ASY/Nogo-B to human cancer, ONCOGENE. 05 July 2001 (05.07.2001), vol. 20, no. 30, pages 3929-3936, particularly page 3929, abstract, page 3930, figure 1, page 3935, left column, paragraph 2	1-2, 5-9, 12-14, 16
X	CN 101015683 A (FUDAN UNIVERSITY), 15 August 2007 (15.08.2007), description, page 2, paragraphs 3-4	1-2, 5-9, 16

☒ 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 July 2013 (24.07.2013)	Date of mailing of the international search report 15 August 2013 (15.08.2013)
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 CHEN, Zhongwei Telephone No.: (86-10) 62414097

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2013/075186**C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZHOU, Y. et al. reticulon 4b [Homo sapiens], 09 September 2000 (09.09.2000), GenBank registry number: AAG12177.1, <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAG12177 >	1-2, 5-9, 16
X	CN 1311439 A (FUDAN UNIVERSITY), 05 September 2001 (05.09.2001), description, page 2, lines 26-28	1-2, 5-9, 16
X	GLASS, D.B. et al. Synthetic peptides corresponding to the site phosphorylated in 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase as substrates of cyclic nucleotide-dependent protein kinases. J. BIOL. CHEM. 25 February 1986 (25.02.1986), vol. 261, no. 6, pages 2987-2993, particularly page 2988, table 1	1-2, 5-9, 16
A	CN 1745094 A (SINGAPORE GENERAL HOSPITAL PTE LTD.), 08 March 2006 (08.03.2006), the whole document	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2013/075186

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101015683 A	15.08.2007	CN 101015683 B	21.07.2010
CN 1311439 A	05.09.2001	CN 1137383 C	04.02.2004
CN 1745094 A	08.03.2006	WO 2004/052922 A2	24.06.2004
		WO 2004/052922 A3	28.10.2004
		CA 2508847 A1	24.06.2004
		AU 2003288434 A1	30.06.2004
		AU 2003288434 B2	17.03.2011
		EP 1567545 A2	31.08.2005
		EP 1567545 B1	05.05.2010
		KR 20050092366 A	21.09.2005
		US 2006/0205668 A1	14.09.2006
		US 7408028 B2	05.08.2008
		JP 2006526382 A	24.11.2006
		AT 466870 T	15.05.2010
		DE 60332481 E	17.06.2010

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2013/075186

CONTINUATION OF SECOND SHEET: A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:

C07K 7/06 (2006.01) i

C07K 7/00 (2006.01) i

C12P 21/00 (2006.01) i

A61K 38/08 (2006.01) i

A61P 35/00 (2006.01) i

A. 主题的分类

见附加页

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)

IPC: C07K 7/-;C12P 21/-;A61K 38/-;A61P 35/-

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))

WPI,EPODOC,CNPAT,CNKI,万方,google,ISI web of Knowledge,Elsevier Science Direct,GenBank,EBI,中国专利
生物序列数据库: RNT4B,Nogo-B,NogoB,reticulon,reticolon,peptide,cancer,tumor,cell adhesion,肿瘤,癌,粘附,黏附,
抑制, SEQ ID NO:1-2

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	NAM,M.H. et al. Comparative proteomic analysis of early salt stress-responsive proteins in roots of SnRK2 transgenic rice. Proteome Science. 31.3 月 2012 (31.03.2012), 第 10 卷, 第 25 篇文章, 第 1-19 页, 尤其第 11 页表 2	1-9, 16
X	LI,Q. et al. Link of a new type of apoptosis-inducing gene ASY/Nogo-B to human cancer. Oncogene. 05.7 月 2001 (05.07.2001), 第 20 卷, 第 30 期, 第 3929-3936 页, 尤其第 3929 页摘要, 第 3930 页图 1, 第 3935 页左栏第 2 段	1-2,5-9,12-14,16
X	CN 101015683 A (复旦大学) 15.8 月 2007 (15.08.2007), 说明书第 2 页第 3-4 段	1-2,5-9,16

☒ 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

24.7 月 2013 (24.07.2013)

国际检索报告邮寄日期

15.8 月 2013 (15.08.2013)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:

中华人民共和国国家知识产权局

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

陈中伟

电话号码: (86-10) 62414097

C(续). 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	ZHOU,Y. et al. reticulon 4b [Homo sapiens]. 09.9 月 2000 (09.09.2000), GenBank 登录号:AAG12177.1 , <URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAG12177>	1-2,5-9,16
X	CN 1311439 A (复旦大学) 05.9 月 2001 (05.09.2001), 说明书第 2 页 第 26-28 行	1-2,5-9,16
X	GLASS, D.B. et al. Synthetic peptides corresponding to the site phosphorylated in 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase as substrates of cyclic nucleotide-dependent protein kinases. J. Biol. Chem. 25.2 月 1986 (25.02.1986), 第 261 卷, 第 6 期, 第 2987-2993 页, 尤其第 2988 页表 1	1-2,5-9,16
A	CN 1745094 A (新加坡综合医院有限公司) 08.3 月 2006 (08.03.2006), 全文	1-16

国际检索报告

关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2013/075186

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN 101015683 A	15.08.2007	CN 101015683 B	21.07.2010
CN 1311439 A	05.09.2001	CN 1137383 C	04.02.2004
CN 1745094 A	08.03.2006	WO 2004/052922 A2	24.06.2004
		WO 2004/052922 A3	28.10.2004
		CA 2508847 A1	24.06.2004
		AU 2003288434 A1	30.06.2004
		AU 2003288434 B2	17.03.2011
		EP 1567545 A2	31.08.2005
		EP 1567545 B1	05.05.2010
		KR 20050092366 A	21.09.2005
		US 2006/0205668 A1	14.09.2006
		US 7408028 B2	05.08.2008
		JP 2006526382 A	24.11.2006
		AT 466870 T	15.05.2010
		DE 60332481 E	17.06.2010

续：第 2 页：A. 主题的分类：

C07K 7/06 (2006.01) i

C07K 7/00 (2006.01) i

C12P 21/00 (2006.01) i

A61K 38/08 (2006.01) i

A61P 35/00 (2006.01) i