



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115724917 A

(43) 申请公布日 2023. 03. 03

(21) 申请号 202211407327.1

(22) 申请日 2022.11.10

(71) 申请人 武汉大学中南医院

地址 430071 湖北省武汉市武昌区东湖路
169号

(72) 发明人 戴梦源 刘淼 时玉颖 姚时婕

王华 高阳 何灿 刘雪莲

王安瑾 蔡红兵

(74) 专利代理机构 武汉科皓知识产权代理事务

所(特殊普通合伙) 42222

专利代理师 齐晨涵

(51) Int. Cl.

C07K 14/00 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

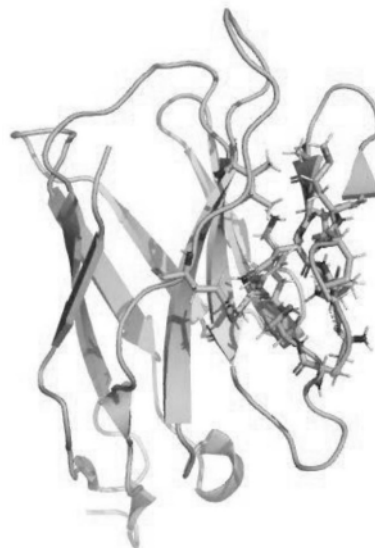
权利要求书1页 说明书5页
序列表(电子公布) 附图6页

(54) 发明名称

靶向PD-1的多肽-PROTAC及其应用

(57) 摘要

本发明公开一种靶向PD-1的多肽-PROTAC及其应用,属于抗肿瘤药物技术领域。PD-1靶向降解多肽-PROTAC包含跨膜肽序列、Linker序列、E3招募肽序列及靶向PD-1蛋白识别肽序列,所述多肽-PROTAC的氨基酸序列如SEQ ID No:1所示。多肽-PROTAC能靶向结合PD-1蛋白导致PD-1蛋白降解并阻断PD-1/PD-L1信号通路,消除免疫抑制作用,从而特异性杀灭PD-1阳性细胞,为肿瘤免疫治疗提供有效解决方案。



1. 一种PD-1靶向降解多肽-PROTAC,其特征在于:所述PD-1靶向降解多肽-PROTAC的氨基酸序列如SEQ ID No:1所示。
2. 根据权利要求1所述的PD-1靶向降解多肽-PROTAC,其特征在于:所述多肽-PROTAC的分子结构式为:SKSYGESQGKEILHK-GSGS-ALAPYIP-RRRRRRRR。
3. 根据权利要求2所述的PD-1靶向降解多肽-PROTAC,其特征在于:所述多肽-PROTAC能专一性与PD-1结合,并特异性与PD-1结合,诱导PD-1降解,抑制PD-1下游信号通路。
4. 一种如权利要求1至3中任一所述PD-1靶向降解多肽-PROTAC在筛选/制备治疗宫颈癌药物中的应用。
5. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于:所述多肽-PROTAC通过阻断PD-1的信号通路抑制肿瘤细胞增殖,其能作为PD-1结合位点的生物类降解药物,用于治疗肿瘤。
6. 一种多聚核苷酸,其特征在于:其编码如权利要求1至3中任一所述的靶向PD-1降解多肽。

靶向PD-1的多肽-PROTAC及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及抗肿瘤药物技术领域,具体涉及一种靶向PD-1的多肽-PROTAC及其应用。

背景技术

[0002] PD-1/PD-L1作为参与机体肿瘤免疫调节过程的重要组成标志物,在多种肿瘤中发挥了重要作用,作为调节T淋巴细胞效应功能的免疫抑制位点,以共抑制分子形式存在于肿瘤免疫全过程,当T淋巴细胞接受肿瘤细胞表面PD-1配体PD-L1发出的刺激信号后与PD-1结合,立即在免疫环境中发挥监测标志物的功能,帮助肿瘤细胞躲避免疫监视。阻断PD-1/PD-L1信号通路,恢复T细胞的免疫杀伤力,能有效的杀灭肿瘤细胞。

[0003] 随着生物技术的快速发展,新药的设计和发展速度大大提升,但是体内用药时,药物的多器官分布仍然是许多药物由实验室进入临床的一大难题。药物在其他组织或器官的非特异性分布不仅增大了体内用药的剂量,使药物成本提高,同时也对正常组织和器官造成损害,引发毒副作用。

[0004] PROTAC (proteolysis-targeting chimeras) 是一种利用泛素-蛋白酶体系统 (Ubiquitin-Proteasome System, UPS) 对靶蛋白进行降解的药物开发技术。在结构上, PROTAC包括三个部分: (1) E3泛素连接酶配体; (2) 和一个靶蛋白配体; (3) 连接两个配体的连接体。最终形成了三联体的“PROTAC”的活性形式。PROTACs通过劫持E3泛素连接酶的活性进行靶蛋白泛素化并随后被26S蛋白酶体降解来介导所需靶蛋白质的降解。蛋白质与泛素 (一种小的蛋白质修饰剂) 的结合对于26S蛋白酶体调节蛋白质降解是必不可少的。

[0005] 作为一项新的有前途的技术, PROTAC在以下方面展现出巨大的机会。首先, PROTAC对耐药性靶标具有特殊的敏感性。从传统意义上讲, 化疗是癌症治疗的主要方法。获得化学疗法药物耐药性阻碍了临床应用, 并导致疾病复发。随着新目标和新药物发现技术的进展, 另一个强大的策略是直接通过小分子抑制致癌物或受体的功能。激酶抑制剂的发现不能解决癌症治疗的问题, 并且消除整个靶标的PROTAC。此外, PROTAC对增加靶表达和靶蛋白突变不敏感, 因为它们具有催化作用, 因此只需要低剂量的PROTAC就能发挥良好的作用

发明内容:

[0006] 针对现有技术的不足, 本发明的目的是提供一种靶向PD-1的多肽-PROTAC及其应用。

[0007] 为实现上述目的, 本发明的技术方案如下:

[0008] 第一方面, 本发明提供一种PD-1靶向降解多肽-PROTAC, 其特征在于: 所述PD-1靶向降解多肽-PROTAC的氨基酸序列如SEQ ID No:1所示。

[0009] 作为优选方案, 所述多肽-PROTAC的分子结构式为:

[0010] SKSYGESQGKEILHK-GSGS-ALAPYIP-RRRRRRRR。

[0011] 进一步地, 所述多肽-PROTAC能专一性与PD-1结合, 并特异性与PD-1结合, 诱导PD-

1降解,抑制PD-1下游信号通路。

[0012] 第二方面,本发明提供一种如上任一所述PD-1靶向降解多肽-PROTAC在筛选/制备治疗宫颈癌药物中的应用。

[0013] 作为优选方案,所述多肽-PROTAC通过阻断PD-1的信号通路抑制肿瘤细胞增殖,其能作为PD-1结合位点的生物类降解药物,用于治疗肿瘤。

[0014] 第三方面,本发明提供一种多聚核苷酸,其特征在于:其编码如上中任一所述的靶向PD-1降解多肽。

[0015] 特别地,本发明靶向降解PD-1多肽-PROTAC,其包括上述的PD-1降解多肽和药物。还包括连接基团的linker,所述连接基团linker将上述的PD-1降解多肽和药物进行连接。

[0016] 上述靶向降解PD-1多肽-PROTAC的获得,采用现有技术中的公知方法进行,既可以用多肽自动合成仪进行化学合成;通过短肽序列推导出核苷酸序列,然后克隆到载体中进行生物合成,然后再和药物连接;也可以从现有的生物体内进行大量提取和纯化,然后进行药物连接。

[0017] 本发明的化合物在制备抗肿瘤药物中的应用,指靶向PD-1降解小分子多肽-PROTAC在制备抑制高表达PD-1的肿瘤细胞增殖,促进细胞凋亡的药物中的应用。

[0018] 本发明所述高表达PD-1的肿瘤以宫颈癌为例。药物组合物,包含上述的靶向PD-1降解多肽-PROTAC;还含有一种或者多种药学上可以接受的载体。

[0019] 上述药学上可以接受的载体包括稀释剂、赋形剂、填充剂、粘合剂、湿润剂、崩解剂、吸收促进剂、吸附载体剂、表面活性剂或润滑剂等。

[0020] 上述药物组合可以制成片剂、粒剂、胶囊、口服液或注射剂等多种形式,各剂型的药物可以按照药学领域的常规方法制备。

[0021] 本发明的优点及有益效果如下:

[0022] 本发明的靶向PD-1的多肽-PROTAC,当PD-1靶向降解多肽-PROTAC与PD-1结合后能阻止PD-1与其他蛋白或基因的结合并诱导PD-1蛋白降解进而影响下游相关基因及信号通路,该PD-1靶向降解多肽-PROTAC在靶向抑制肿瘤细胞增殖、促进肿瘤细胞凋亡等方面具有重要意义

[0023] 本发明提供了靶向降解PD-1的多肽-PROTAC可以通过阻断PD-1的信号通路抑制肿瘤细胞增殖,可以作为PD-1结合位点的生物类降解小分子药物,可用于制备治疗肿瘤。能够在医学和生物学领域得到广泛的应用,并产生巨大的社会效益。

附图说明

[0024] 图1为蛋白配体的结合强度预测结果;

[0025] 图2中为蛋白结构预测可视化结果。

[0026] 图3为多肽-PROTAC的氨基酸结构。

[0027] 图4为目标蛋白及肽段的定量信息;

[0028] 图5、图6为外源添加peptide1的IP组与未添加多肽的对照组信号差异。

[0029] 图7、图8、图9均为目标蛋白及肽段的积分峰面积。

[0030] 图10为不同多肽-PROTAC浓度对PD-1的降解结果;

[0031] 图11为不同多肽-PROTAC作用时间对PD-1的降解结果。

- [0032] 图12为不同多肽-PROTAC浓度观察多肽-PROTAC入胞情况的流式细胞术结果；
- [0033] 图13为不同多肽-PROTAC作用时间观察多肽-PROTAC入胞情况的流式细胞术结果。
- [0034] 图14为多肽-PROTAC诱导PD-1蛋白降解的免疫荧光结果。
- [0035] 图15为多肽-PROTAC作用于细胞的Ki-67染色结果。
- [0036] 图16为多肽-PROTAC作用于细胞的TUNEL结果。

具体实施方式

- [0037] 以下结合附图和具体实施例对本发明的技术方案作进一步地详细阐述。
- [0038] 实施例仅用于解释而不以任何方式限制本发明。
- [0039] 实施例中,各原始试剂材料均可商购获得,未注明具体条件的实验方法为各领域熟知的常规方法和条件,或按照仪器制造商所建议的条件。
- [0040] 本发明以下实施例中靶向降解PD-1的多肽-PROTAC序列为SEQ ID No:1。
- [0041] 本发明中SEQ ID NO:1:SKSYGESQGKEILHK-GSGS-RRRG-RRRRRRRR
- [0042] 本发明中,多肽-PROTAC的氨基酸结构如图1所示。
- [0043] 实施例1多肽-PROTAC的设计。
- [0044] 使用Alphafold 2和Robetta结合深度学习方法构建开源蛋白结构预测工具进行PD-1靶点结构分析,使用AI药物筛选软件SWISS-Mode进行同源建模及计算机虚拟筛选,筛选得到与PD-1高亲和力的多肽片段。运用Maesrto 11.1分子对接软件进行蛋白配体的结合强度和结构预测的虚拟筛选,可视化结果如图2。
- [0045] 实施例2多肽-PROTAC的合成。
- [0046] 首先,合成获得包含跨肽序列、Linker序列、E3招募肽序列与已知靶向蛋白识别肽序列连接,最后形成高纯度的靶向PD-1的多肽-PROTAC。多肽-PROTAC的氨基酸结构如图3所示。
- [0047] 实施例3PRM法检测多肽与蛋白质的相互作用。
- [0048] 1) 免疫沉淀:
- [0049] 1.1在微量离心管中加入10-50 μ g细胞裂解液和合适量的抗体。将样品与抗体混合,置于磁力旋转器上旋转孵育10小时,温度设置为4 $^{\circ}$ C。准备琼脂糖珠。粉末状珠子先在1mL0.1MPBS中孵育100mg,再洗涤1小时,离心去除上清液。在上述沉淀中加入1mLPBS配制的0.1%BSA,使用旋转器混合1小时,然后在PBS中冲洗两次。去除上清液,加入400 μ L用蛋白酶抑制剂制成的缓冲液(与裂解缓冲液相同)。制成4 $^{\circ}$ C可保存的样品液;将珠子长时间保存在含0.02%叠氮化物的PBS中。
- [0050] 1.2将样品液充分混合,并在每个样品中加入80 μ L的珠子。将裂解珠混合物在4 $^{\circ}$ C下旋转搅拌孵育4小时。取出离心管,从珠子中吸出上清液并丢弃。用洗涤缓冲液或裂解缓冲液洗涤磁珠3次以去除非特异性结合。每次洗涤时,将磁珠与洗涤缓冲液轻轻混合,在4 $^{\circ}$ C下离心并弃去上清液。小心地从珠子中去除尽可能多的洗涤缓冲液。
- [0051] 1.3使用含有0.1-0.2M甘氨酸缓冲液通过酸化将复合物从珠子上洗脱下来。依靠甘氨酸的低pH值削弱抗体之间的相互作用。珠子回收。洗脱的样品立即用Tris中和。用3x50 μ L0.2M甘氨酸洗脱珠子(50 μ L),具体方法是在将样品孵育10分钟并频繁搅拌然后低速离心。合并洗脱液并加入等体积的Tris(pH 8.0)进行中和。重复洗脱与中和一次。用150 μ L裂

解缓冲液洗涤2遍。凝胶电泳来检测蛋白质的沉淀。

[0052] 2) 样品处理:

[0053] 2.1向样品中加入反应液(1%SDC/100mM Tris-HClpH=8.5/10mM TCEP/40mM CAA),60℃孵育1h一步法进行蛋白变性、还原和烷基化。加入等体积超纯水稀释后,按照酶与蛋白1:50的质量比加入胰蛋白酶,37℃孵育振荡过夜进行酶切。

[0054] 2.2第二天加入TFA终止酶切,16000g离心取上清以自制SDB脱盐柱进行脱盐。抽干后-20℃冻存待用。

[0055] 3) 质谱检测:

[0056] 3.1质谱分析使用Thermo公司的Exploris 480液质联用系统进行。肽段样品通过自动进样器吸入后结合至C18捕获柱,接着被洗脱至分析柱(75μm×250mm,3μm particle size,100 Å pore size,Acclaim PepMap C18 column,Thermo)进行分离。利用两个流动相(流动相A:0.1%formic acid和流动相B:80%ACN,0.1%formic acid)建立60分钟的分析梯度。

[0057] 3.2液相的流速设置为300nL/min。质谱PRM模式分析时,每个扫描循环中包含一个MS全扫描(R=60K,AGC=3e6,max IT=50ms,scan range=300-1200m/z),以及若干个针对选定肽段的PRM MS2扫描(R=15K,AGC=2e5,max IT=50ms)。HCD碰撞能量设置为28。四级杆的筛选窗口设置为1.6Da。

[0058] 4) 数据分析:

[0059] 4.1PRM方法建立和蛋白定量使用Skyline软件进行,得到目标蛋白及肽段的定量信息。

[0060] 4.2蛋白的定量值来自于多个肽段母离子(precursor),precursor的定量信息来自于3~5个子离子的积分峰面积的累加如图7、图8、图9所示。

[0061] 4.3得到的蛋白定量值经过不同样品之间TIC总信号的归一化后,用于后续的定量比较。定量信息如图4所示,外源添加peptide1的IP组与未添加多肽的对照组信号有显著差异,如图5、图6所示,提示外源添加多肽与PD-1蛋白具有相互作用关系。

[0062] 实施例4多肽-PROTAC降解PD-1测定

[0063] 1.1将MOLT-4细胞以 5×10^5 个/孔接种于6孔细胞培养板中,每孔培养基体积为2mL,培养24h;加入不同浓度梯度(0μM,2μM,5μM,10μM,20μM,30μM,50μM)的多肽培养16小时,收集细胞,加入裂解液收集蛋白;加入相同浓度梯度(20μM)的多肽培养不同时间(0h,2h,4h,8h,12h,24h),收集细胞,加入裂解液收集蛋白;

[0064] 1.2按照雅酶制胶试剂盒准备10%浓度的SDS-PAGE胶;在收集的蛋白样品中加入SDS-PAGE蛋白上样缓冲液5X sample bf.混合。蛋白样品与sample bf混匀,离心,转速为12000rpm,室温下离心10s。将蛋白混合液置于水浴锅中,温度为100℃,水浴5-10分钟,使蛋白充分变性。将上述裂解后蛋白离心,转速为12000rpm,室温离心60s,置于室温中冷却。冷却到室温后,把蛋白样品直接上样到SDS-PAGE胶加样孔内。按设计顺序对准上样槽缓缓加入样品和预染蛋白Marker。电泳时溴酚蓝到达胶的底端处附近即可停止电泳。准备盒子并装甲醇,transfer bf,从电泳装置上卸下凝胶玻璃板。取出胶,用刀片切除浓缩胶和下端溴酚蓝。用尺子量准胶的长和宽度。裁减两张同尺寸的滤纸和一张PVDF膜。膜先用甲醇处理震荡1分钟,然后用R0水洗5次,1分钟/1次。再用transferbf泡10分钟以上。滤纸和胶也泡在

transferbf里。转膜器内棉块清洗干净,烘干,用transfer bf沾湿,转膜器黑板对自己,按“海绵—滤纸—凝胶—PVDF膜—滤纸—海绵”的顺序装置好。用涂抹棒或15ml的玻璃离心管来回在上面轻轻滚动即可赶出气泡。260mA电压100min。用镊子取出膜,蛋白面朝上,在5%的脱脂奶粉封闭液中进行封闭90min。参考一抗的说明书,选择杂交体系为10mL。将膜置于摇床中孵育,温度为4℃,过夜。用TBST洗3次,5min/次,在摇床上缓慢摇动洗涤。参考二抗的说明书,按照适当比例稀释二抗。在摇床上缓慢摇动孵育一小时。用TBST洗5次,5min/次,在摇床上缓慢摇动洗涤。

[0065] 1.3使用ECLWestern荧光检测试剂来检测蛋白。如图10、图11所示,随着时间的延长多肽对PD-1的降解越多,并且在相同时间内,多肽浓度越高对PD-1的降解越多。

[0066] 实施例4流式细胞术观察多肽-PROTAC入胞情况

[0067] 将MOLT-4细胞与罗丹明标记的药物以不同浓度和不同时间梯度进行处理。接着用PBS洗细胞2遍,再用0.25%胰蛋白酶消化细胞,使用流式细胞仪计数荧光细胞。结果如图12、图13所示,随着处理时间的延长,浓度梯度的增加,荧光细胞逐渐增加。说明药物进入细胞的量呈现时间依赖和浓度依赖关系。

[0068] 实施例5多肽-PROTAC诱导PD-1蛋白降解的机制

[0069] 1.1在不使用/使用蛋白酶体抑制剂的情况下,观察PD1蛋白的降解情况。药物本身带有罗丹明红色荧光标签,并通过免疫荧光染色定位靶蛋白。实验过程注意避光。将细胞在4%多聚甲醛中室温固定15分钟,用0.3%Triton-X100渗透性固定15分钟。1%牛血清白蛋白(BSA)孵育30min后,细胞在室温下与一抗PD-1(1:500)一起孵育2小时。PBS多次冲洗后,细胞与1%BSA二抗在室温下孵育1小时,用DAPI复染细胞核。

[0070] 1.2载玻片用抗荧光猝灭片封片。使用共聚焦显微镜对细胞进行观察和成像。结果发现蛋白酶抑制剂可以阻止多肽介导的PD-1降解,如图14所示。

[0071] 实施例6多肽-PROTAC增加宫颈癌细胞的顺铂敏感性。

[0072] 1) KI67检测细胞增殖

[0073] 首先将铺满细胞的爬片PBS洗涤2次,4%甲醛固定15min,PBS洗涤。加入0.3% Triton X-100反应15分钟,37℃下用BSA孵育30分钟。37℃温箱中与抗ki67抗体(1:100)孵育过夜。PBS洗涤2次后,用Cy3偶联山羊抗兔抗体孵育,用DAPI复染细胞核。载玻片用抗荧光猝灭片封片。荧光显微镜下观察荧光信号。如图15所示,顺铂可以抑制肿瘤细胞C33a增殖,促进凋亡,并且多肽-PROTAC可以促进这一作用,提示多肽-PROTAC可以增强肿瘤细胞对顺铂的敏感性。

[0074] 2) TUNEL检测细胞凋亡

[0075] 将铺满细胞的爬片PBS洗涤2次,4%甲醛固定15min,PBS洗涤。根据制造商说明书,使用一步法TUNEL凋亡检测试剂盒对宫颈癌细胞进行TUNEL检测。样品与TUNEL反应混合液在37℃暗处孵育1h,然后用PBS洗涤2次。在200倍显微镜下观察到凋亡细胞的浓缩或碎裂的细胞核。如图16所示,顺铂可以促进C33a凋亡,细胞碎片增加,并且多肽-PROTAC可以促进这一作用,进一步提示多肽-PROTAC可以增强肿瘤细胞对顺铂的敏感性。

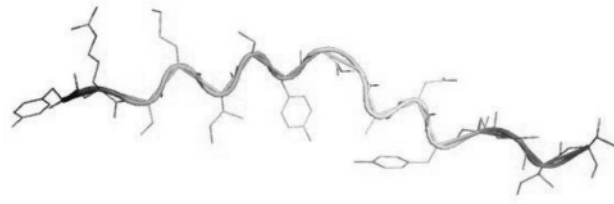


图1

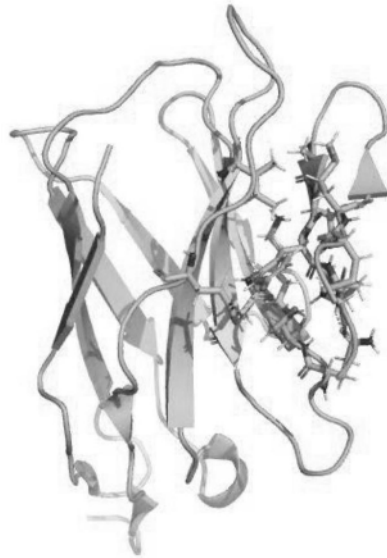


图2



图3

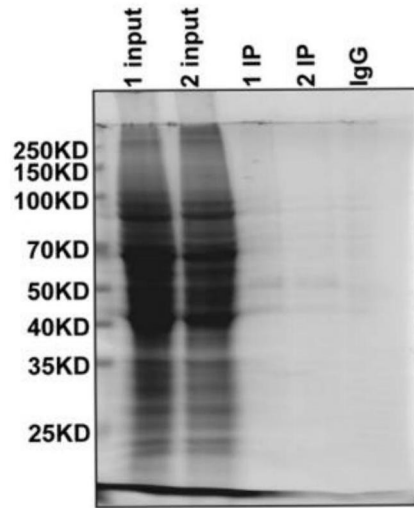


图4

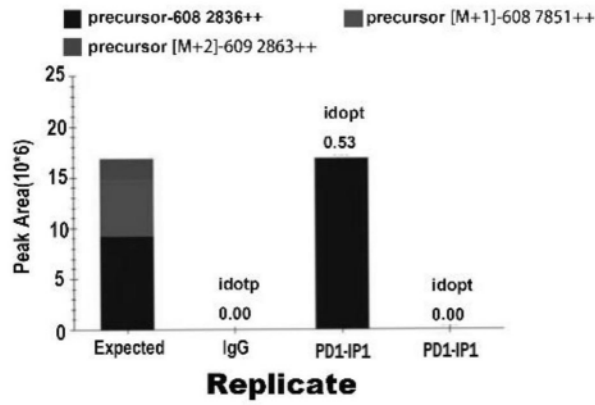


图5

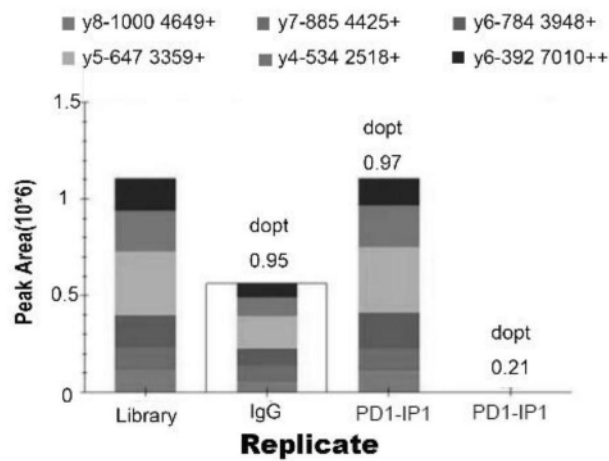


图6

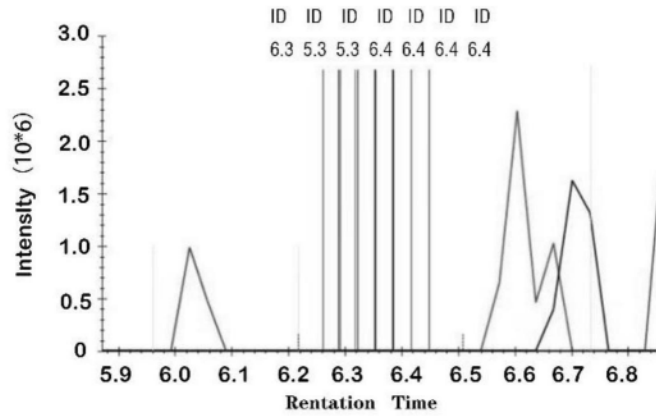


图7

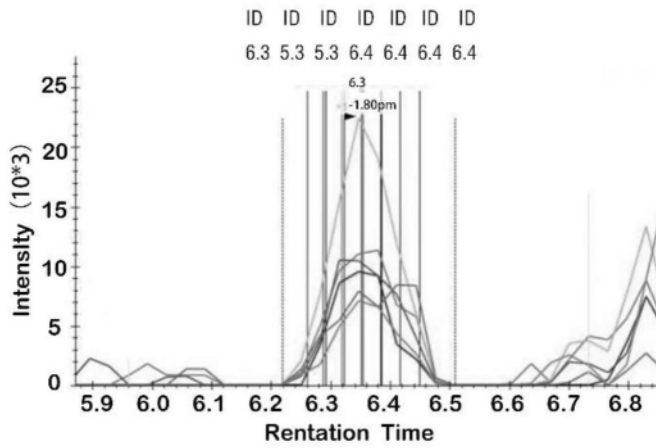


图8

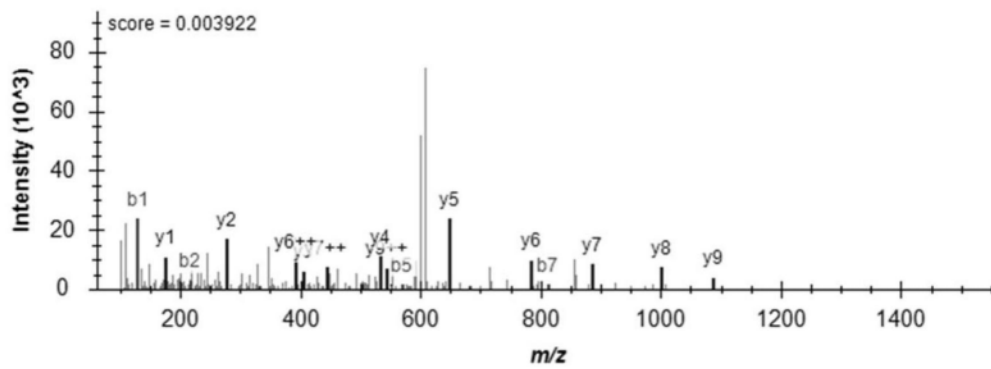


图9

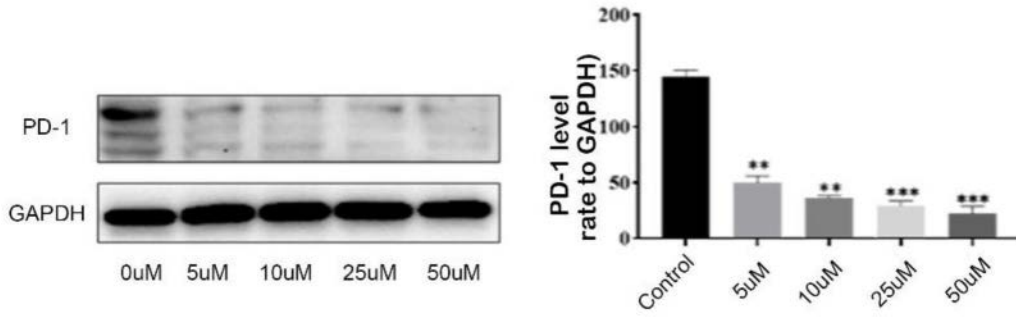


图10

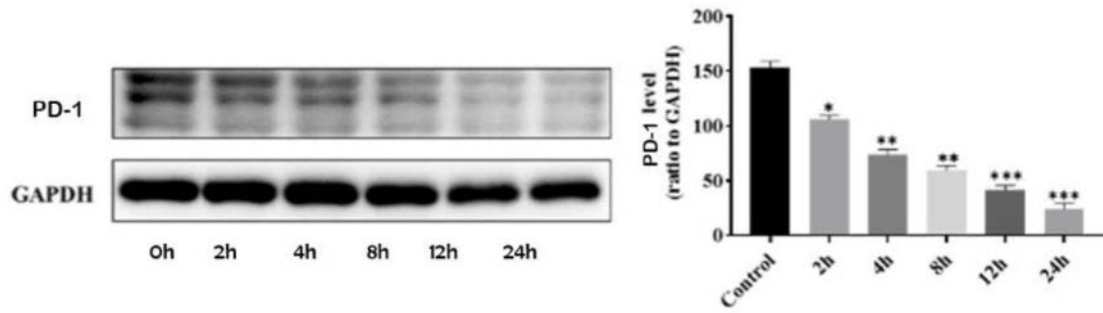


图11

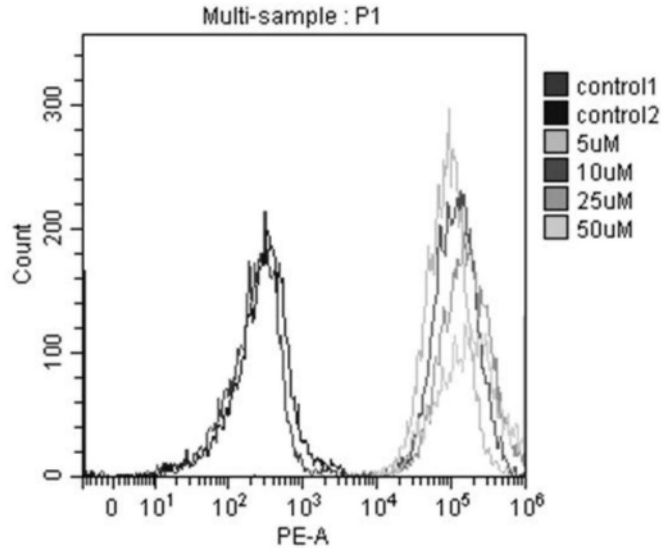


图12

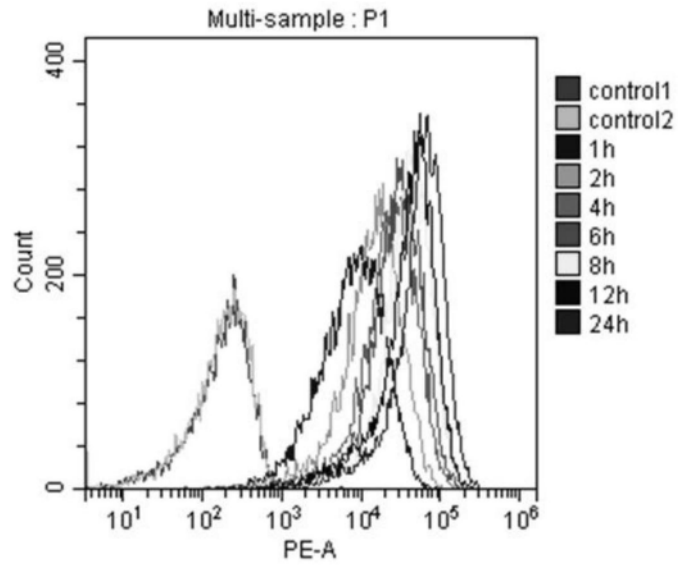


图13

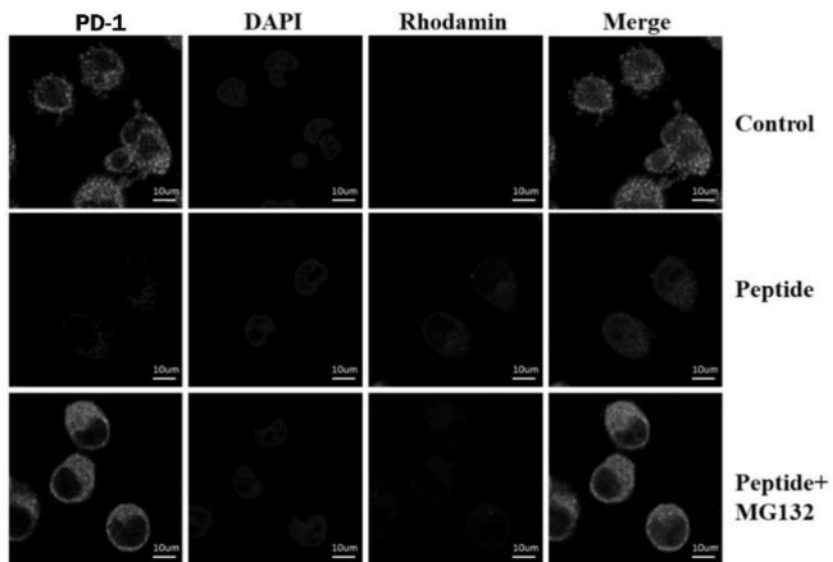


图14

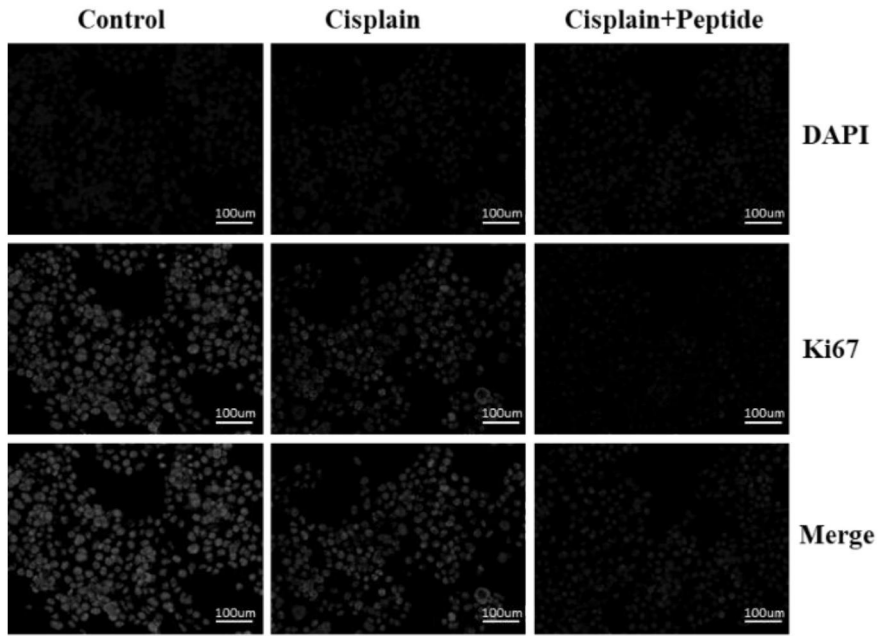


图15

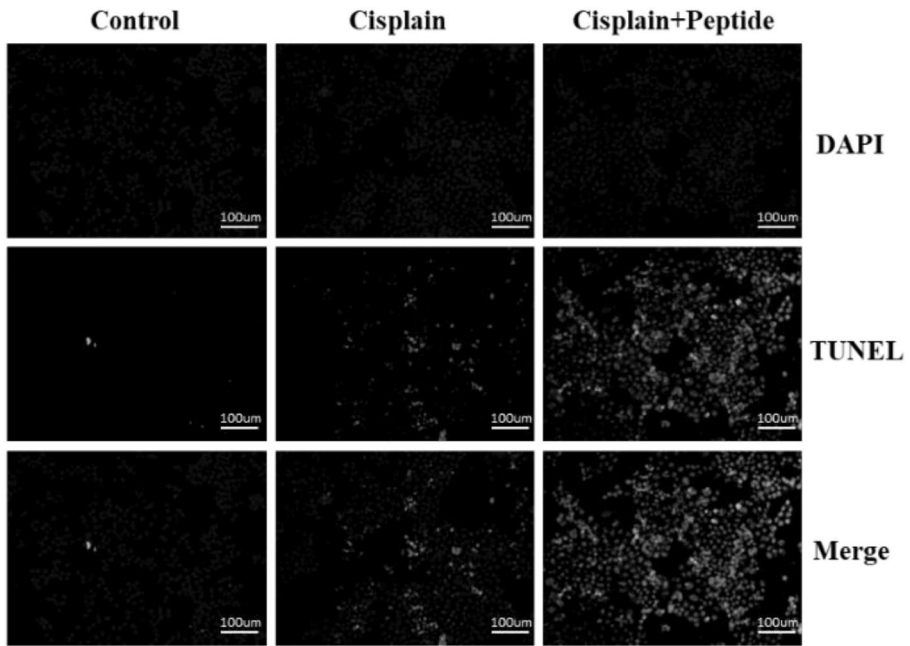


图16