



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113784974 A

(43) 申请公布日 2021.12.10

(21) 申请号 202080033170.3

(22) 申请日 2020.04.29

(30) 优先权数据

62/842,155 2019.05.02 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.11.02

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2020/005759 2020.04.29

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2020/222559 KO 2020.11.05

(71) 申请人 L基础有限公司

地址 韩国首尔

(72) 发明人 全道龙 禹相赫 文昌训 郑至恩

辛贤熙 李慧琳 李智英

(74) 专利代理机构 上海胜康律师事务所 31263

代理人 李献忠 张华

(51) Int.Cl.

C07K 7/06 (2006.01)

A61K 38/08 (2019.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

权利要求书2页 说明书10页

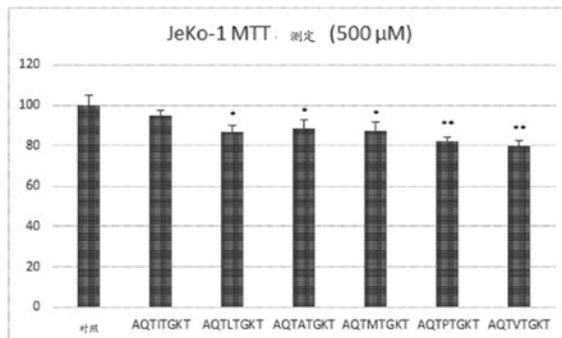
序列表2页 附图7页

(54) 发明名称

新型寡肽和包含该寡肽作为活性成分的用于预防或治疗癌症的药物组合物

(57) 摘要

本发明涉及一种新型寡肽,以及一种包含该寡肽作为活性成分的用于预防或治疗癌症的药物组合物。本发明的寡肽的优点在于其分子量小于抗体的分子量,因此免疫反应的风险低,并且其易于渗透到组织中。该寡肽可通过选择性作用于癌细胞或癌组织而表现出抑制恶性肿瘤增殖的效果。



1. 一种由以下通式表示的寡肽：

[通式]

A-Q-T-X-T-G-K-T

在通式中，

A是丙氨酸；Q是谷氨酰胺；T是苏氨酸；G是甘氨酸；以及K是赖氨酸；并且

X是选自由异亮氨酸、亮氨酸、丙氨酸、蛋氨酸、脯氨酸和缬氨酸组成的群组中的一种或多种。

2. 一种用于预防或治疗癌症的药物组合物，其包含由以下通式表示的寡肽作为活性成分：

[通式]

A-Q-T-X-T-G-K-T

在通式中，

A是丙氨酸；Q是谷氨酰胺；T是苏氨酸；G是甘氨酸；以及K是赖氨酸；并且

X是选自由异亮氨酸、亮氨酸、丙氨酸、蛋氨酸、脯氨酸和缬氨酸组成的群组中的一种或多种。

3. 如权利要求2所述的药物组合物，其中所述癌症是选自由以下项组成的群组中的癌症：肺癌、乳腺癌、血癌、结直肠癌、胰腺癌及其组合。

4. 如权利要求3所述的药物组合物，其中所述肺癌为非小细胞肺癌。

5. 如权利要求3所述的药物组合物，其中所述乳腺癌是三阴性乳腺癌。

6. 如权利要求3所述的药物组合物，其中所述血癌是选自由以下项组成的群组中的血癌：白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤及其组合。

7. 如权利要求2所述的药物组合物，其中X是选自由丙氨酸、蛋氨酸、脯氨酸和缬氨酸组成的群组中的一种或多种，并且所述癌症是肺癌。

8. 如权利要求2所述的药物组合物，其中X是选自由异亮氨酸、亮氨酸、丙氨酸和缬氨酸组成的群组中的一种或多种，并且所述癌症是乳腺癌。

9. 如权利要求2所述的药物组合物，其中X是选自由异亮氨酸、亮氨酸、丙氨酸、蛋氨酸、脯氨酸和缬氨酸组成的群组中的一种或多种，并且所述癌症是血癌。

10. 一种用于预防或治疗癌症的方法，所述方法包括将包含由以下通式表示的寡肽作为活性成分的组合物施用于个体：

[通式]

A-Q-T-X-T-G-K-T

在通式中，

A是丙氨酸；Q是谷氨酰胺；T是苏氨酸；G是甘氨酸；以及K是赖氨酸；并且

X是选自由异亮氨酸、亮氨酸、丙氨酸、蛋氨酸、脯氨酸和缬氨酸组成的群组中的一种或多种。

11. 一种用于增强抗癌药物活性的方法，所述方法包括将包含由以下通式表示的寡肽作为活性成分的组合物施用于个体：

[通式]

A-Q-T-X-T-G-K-T

在通式中，

A是丙氨酸；Q是谷氨酰胺；T是苏氨酸；G是甘氨酸；以及K是赖氨酸；并且

X是选自由异亮氨酸、亮氨酸、丙氨酸、蛋氨酸、脯氨酸和缬氨酸组成的群组中的一种或多种。

12. 由以下通式表示的寡肽用于预防、减轻或治疗癌症的用途：

[通式]

A-Q-T-X-T-G-K-T

在通式中，

A是丙氨酸；Q是谷氨酰胺；T是苏氨酸；G是甘氨酸；以及K是赖氨酸；并且

X是选自由异亮氨酸、亮氨酸、丙氨酸、蛋氨酸、脯氨酸和缬氨酸组成的群组中的一种或多种。

13. 由以下通式表示的寡肽用于制备用于癌症的药物的用途：

[通式]

A-Q-T-X-T-G-K-T

在通式中，

A是丙氨酸；Q是谷氨酰胺；T是苏氨酸；G是甘氨酸；以及K是赖氨酸；并且

X是选自由异亮氨酸、亮氨酸、丙氨酸、蛋氨酸、脯氨酸和缬氨酸组成的群组中的一种或多种。

## 新型寡肽和包含该寡肽作为活性成分的用于预防或治疗癌症的药物组合物

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种新型寡肽、包含该寡肽作为活性成分的用于预防或治疗癌症的药物组合物及其制备方法。

[0002] 本申请要求于2019年5月2日提交的美国临时申请号62/842,155的优先权,并且该申请的说明书和附图中公开的全部内容通过引用整体并入。

### 背景技术

[0003] 目前,尽管由于癌症早期诊断方法的发展和抗癌新疗法的不断发展,癌症的治疗效果正在提高,但癌症仍然是一种重要的疾病,在韩国死亡原因中占第一二位。目前使用的大多抗癌药以化学疗法为基础,药理作用因癌症的种类而异,并且其毒性引起的副作用也各不相同,这被指出是癌症治疗中的一个问题。

[0004] 由于现有的抗癌药物不仅渗透癌细胞,而且渗透正常组织并破坏正常细胞的功能和活性,因此现有的抗癌药物还可能引起骨髓功能障碍、胃肠道紊乱、脱发等副作用,并且表现出癌症治疗方面的重大问题,例如通过长期化学疗法表现出对抗癌药物的多重耐药性。因此,正在积极研究开发能够解决现有抗癌药物的这些严重问题的创新抗癌药物。

[0005] 同时,尽管已经开发出靶向肿瘤细胞的特定肿瘤抗原的抗体,但抗体仍具有免疫反应方面的顾虑和渗透到组织的效率低等问题。相比之下,与抗体不同,肽具有免疫反应方面的顾虑少并且由于其分子量小容易渗透到组织中的优点,并且靶向肿瘤抗原的基于肽的抗癌药物可以选择性地作用于肿瘤,从而预计对正常细胞的损伤等副作用将较少。

### 发明内容

[0006] [技术问题]

[0007] 本发明是为解决上述相关技术中存在的问题而做出的,并证实了具有共同序列的六种寡肽可以通过抑制癌细胞的增殖和诱导细胞凋亡来有效治疗癌症,由此完成本发明。

[0008] 因此,本发明的一个目的是提供一种由以下通式表示的寡肽:

[通式]

A-Q-T-X-T-G-K-T

[0009] 在通式中,

A是丙氨酸;Q是谷氨酰胺;T是苏氨酸;G是甘氨酸;以及K是赖氨酸;并且

X是选自由异亮氨酸、亮氨酸、丙氨酸、蛋氨酸、脯氨酸和缬氨酸组成的群组中的一种或多种。

[0010] 本发明的另一个目的是提供一种用于预防或治疗癌症的药物组合物,其包含由通式表示的寡肽作为活性成分。

[0011] 然而,本发明所要解决的技术问题不限于上述已经提到的技术问题,并且本发明所属领域的普通技术人员将从以下描述中清楚地理解其他没有提到的技术问题。

[0012] [技术方案]

[0013] 为了实现本发明的上述目的,本发明提供了一种由以下通式表示的寡肽:

[通式]

A-Q-T-X-T-G-K-T

[0014] 在通式中,

A是丙氨酸;Q是谷氨酰胺;T是苏氨酸;G是甘氨酸;以及K是赖氨酸;并且

X是选自由异亮氨酸、亮氨酸、丙氨酸、蛋氨酸、脯氨酸和缬氨酸组成的群组中的一种或多种。

[0015] 此外,本发明提供一种用于预防或治疗癌症的药物组合物,其包含由以下通式表示的寡肽作为活性成分:

[通式]

A-Q-T-X-T-G-K-T

[0016] 在通式中,

A是丙氨酸;Q是谷氨酰胺;T是苏氨酸;G是甘氨酸;以及K是赖氨酸;并且

X是选自由异亮氨酸、亮氨酸、丙氨酸、蛋氨酸、脯氨酸和缬氨酸组成的群组中的一种或多种。

[0017] 此外,本发明提供一种用于预防或治疗癌症的方法,该方法包括将包含由通式表示的寡肽作为活性成分的组合物流用于个体。

[0018] 此外,本发明提供一种用于增强抗癌药物活性的方法,该方法包括将包含由通式表示的寡肽作为活性成分的组合物流用于个体。

[0019] 此外,本发明提供由通式表示的寡肽用于预防、减轻或治疗癌症的用途。

[0020] 此外,本发明提供了由通式表示的寡肽用于制备用于癌症的药物的用途。

[0021] 在本发明的示例性实施方案中,癌症可以是选自由以下项组成的群组的癌症:肺癌、乳腺癌、血癌、结直肠癌、胰腺癌及其组合,但不限于此。

[0022] 在本发明的另一示例性实施方案中,肺癌可以是非小细胞肺癌,但不限于此。

[0023] 在本发明的又一示例性实施方案中,乳腺癌可以是三阴性乳腺癌,但不限于此。

[0024] 在又一个示例性实施方案中,血癌可以是选自由以下项组成的群组的血癌:白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤及其组合,但不限于此。

[0025] 在本发明的又一示例性实施方案中,X可以是选自由以下项组成的群组的一种或多种:丙氨酸、蛋氨酸、脯氨酸和缬氨酸,并且癌症可以是肺癌,但X和癌症不限于此。

[0026] 在本发明的又一示例性实施方案中,X可以是选自由以下项组成的群组的一种或多种:异亮氨酸、亮氨酸、丙氨酸和缬氨酸,并且癌症可以是乳腺癌,但X和癌症不限于此。

[0027] 在本发明的又一个示例性实施方案中,X是选自由以下项组成的群组的一种或多种:异亮氨酸、亮氨酸、丙氨酸、蛋氨酸、脯氨酸和缬氨酸,并且癌症可以是血癌,但X和癌症不限于此。

[0028] [优势效果]

[0029] 本发明涉及一种新型寡肽和包含该寡肽作为活性成分的用于预防或治疗癌症的药物组合物,并且该药物组合物表现出抑制癌细胞增殖并诱导细胞凋亡的效果,并因此可作为用于治疗癌症的有用的抗癌药物。本发明的药物组合物包含六种寡肽中的一种或多种

作为活性成分,与抗体相比,寡肽具有免疫反应方面的顾虑少并且由于其分子量小而易于渗透到组织中的优点,以及可以选择性地作用于癌细胞或癌组织,并因此有望能够有效地缓解现有抗癌药物的副作用问题。

### 附图说明

[0030] 图1示出了MTT测定的结果,其显示了根据本发明的寡肽对肺癌细胞系A549的增殖抑制效果(\* $p < 0.05$ )。

[0031] 图2示出了MTT测定的结果,其显示了根据本发明的寡肽对肺癌细胞系H1650的增殖抑制效果(\* $p < 0.05$ )。

[0032] 图3示出了克隆形成测定的结果,其显示了根据本发明的寡肽对肺癌细胞系H1975的集落形成抑制效果(\*\* $p < 0.01$ )。

[0033] 图4示出了克隆形成测定的结果,其显示了根据本发明的寡肽对乳腺癌细胞系MDA-MB-231的集落形成抑制效果。

[0034] 图5示出了CellTiter-Glo发光(CTG)测定的结果,其显示了根据本发明的寡肽对乳腺癌细胞系HCC70的细胞活性抑制效果(\* $p < 0.05$ )。

[0035] 图6示出了MTT测定的结果,其显示了根据本发明的寡肽对血癌细胞系JeKo-1的增殖抑制效果(\* $p < 0.05$ ,\*\* $p < 0.01$ )。

[0036] 图7示出了MTT测定的结果,其显示了根据本发明的寡肽对血癌细胞系Z-138的增殖抑制效果(\* $p < 0.05$ ,\*\* $p < 0.01$ )。

### 具体实施方式

[0037] 本发明人新合成了具有A-Q-T-X-T-G-K-T的共同氨基酸序列的六种寡肽,并证实了该寡肽对肺癌、乳腺癌、血癌、结直肠癌和胰腺癌具有优异的抗癌效果,由此完成了本发明。

[0038] 因此,本发明可以提供由以下通式表示的寡肽:

[通式]

A-Q-T-X-T-G-K-T

[0039] 在通式中,

A是丙氨酸;Q是谷氨酰胺;T是苏氨酸;G是甘氨酸;以及K是赖氨酸;并且

X是选自由以下项组成的群组的一种或多种:异亮氨酸、亮氨酸、丙氨酸、蛋氨酸、脯氨酸和缬氨酸。

[0040] 作为本发明的另一方面,本发明可以提供一种用于预防或治疗癌症的药物组合,其包含由以下通式表示的寡肽作为活性成分:

[通式]

A-Q-T-X-T-G-K-T

[0041] 在通式中,

A是丙氨酸;Q是谷氨酰胺;T是苏氨酸;G是甘氨酸;以及K是赖氨酸;并且

X是选自由以下项组成的群组的一种或多种:异亮氨酸、亮氨酸、丙氨酸、蛋氨酸、脯氨酸和缬氨酸。

[0042] 作为本发明的又一方面,本发明可以提供一种用于预防或治疗癌症的方法,该方法包括将包含由通式表示的寡肽作为活性成分的组合物流用于个体。

[0043] 作为本发明的又一方面,本发明可提供由通式表示的寡肽用于预防、减轻或治疗癌症的用途。

[0044] 作为本发明的又一方面,本发明可以提供由通式表示的寡肽用于制备用于癌症的药物的用途。

[0045] 如本文所用,术语“预防”是指通过施用根据本发明的组合物来阻断、抑制或延迟由癌症引起的症状的所有作用。

[0046] 如本文所用,术语“治疗”是指通过施用根据本发明的组合物来改善或有益地改变由癌症引起的症状的所有行为。

[0047] 如本文所用,术语“个体”是指需要预防或治疗疾病的受试者。例如,个体可以是人或哺乳动物,包括非人灵长类动物、小鼠、狗、猫、马、羊和牛。

[0048] 如本文所用,术语“寡肽”是指通过肽键将氨基酸残基彼此结合形成的线性分子。寡肽可以通过本领域已知的化学合成方法(例如固相合成技术)连同分子生物学方法(Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-54 (1963); Stewart, 等人, Solid Phase Peptide Synthesis, 第2版, Pierce Chem. Co.: Rockford, 111 (1984)) 制备。

[0049] 根据本发明的化合物的范围还可以包括其药学上可接受的盐。如本文所用,术语“药学上可接受的”是指适合用于与受试者(例如:人)的组织接触并且在合理医学判断范围内的化合物,因为其益处/风险比是合理的而没有过度的毒性、刺激、过敏反应或其他问题或并发症。药学上可接受的盐包括例如由药学上可接受的游离酸和药学上可接受的金属盐形成的酸加成盐。

[0050] 此外,根据本发明的化合物的范围可以包括具有施加与本发明化合物等效的生物活性的氨基酸序列变化的生物功能等效物。氨基酸序列的此类变化可基于氨基酸侧链取代基的相对相似性,例如疏水性、亲水性、电荷和大小。通过分析氨基酸侧链取代基的大小、形状和类型,可以看出丙氨酸和甘氨酸的大小相似;赖氨酸是带正电荷的残基;并且谷氨酰胺和苏氨酸不带电。因此,基于这些考虑,丙氨酸和甘氨酸;谷氨酰胺和苏氨酸是生物学功能等效物。

[0051] 在引入变化时,可以考虑氨基酸的亲水指数。根据其疏水性和电荷,每个氨基酸被指定如下亲水指数:异亮氨酸(+4.5);缬氨酸(+4.2);亮氨酸(+3.8);苯丙氨酸(+2.8);半胱氨酸(+2.5);蛋氨酸(+1.9);丙氨酸(+1.8);甘氨酸(-0.4);苏氨酸(-0.7);丝氨酸(-0.8);色氨酸(-0.9);酪氨酸(-1.3);脯氨酸(-1.6);组氨酸(-3.2);谷氨酸(-3.5);谷氨酰胺(-3.5);天冬氨酸(-3.5);天冬酰胺(-3.5);赖氨酸(-3.9);以及精氨酸(-4.5)。

[0052] 氨基酸的亲水指数对于赋予蛋白质的相互作用生物学功能非常重要。已知用具有相似亲水指数的氨基酸取代可保持相似的生物活性。当参照亲水指数引入变化时,在显示亲水指数差异(优选在 $\pm 2$ 内,更优选在 $\pm 1$ 内,甚至更优选在 $\pm 0.5$ 内)的氨基酸之间进行取代。

[0053] 同时,还众所周知的是,具有相似亲水性值的氨基酸之间的取代产生具有相同生物活性的蛋白质。如美国专利号4,554,101中所公开的,以下亲水性值被指定给每个氨基酸残基:精氨酸(+3.0);赖氨酸(+3.0);天冬氨酸(+3.0 $\pm$ 1);谷氨酸(+3.0 $\pm$ 1);丝氨酸(+

0.3);天冬酰胺(+0.2);谷氨酰胺(+0.2);甘氨酸0);苏氨酸(-0.4);脯氨酸(-0.5±1);丙氨酸(-0.5);组氨酸(-0.5);半胱氨酸(-1.0);蛋氨酸(-1.3);缬氨酸(-1.5);亮氨酸(-1.8);异亮氨酸(-1.8);酪氨酸(-2.3);苯丙氨酸(-2.5);色氨酸(-3.4)。

[0054] 当参考亲水性值引入变化时,在显示亲水性值差异(优选在±2内,更优选在±1内,甚至更优选在±0.5内)的氨基酸之间进行取代。

[0055] 不完全改变分子活性的蛋白质中的氨基酸交换是本领域已知的(H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979)。最常发生的交换是氨基酸残基Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, 以及Asp/Gly之间的交换。

[0056] 考虑到具有上述生物等效活性的变化,由本发明的通式(AQXTGKT)表示的氨基酸序列的寡肽也被解释为包括显示基本同一性的序列。上述基本同一性是指当序列比对以尽可能多地对应于本发明的序列时,该序列显示出与本发明的序列至少62.5%的同源性,更优选75%或更高的同源性,最优选87.5%或更高的同源性,并且使用本领域通常使用的算法分析比对的序列。用于序列比较的比对方法是本领域已知的。

[0057] 本发明的药物组合物用于预防或治疗癌症。可以使用本发明的药物组合物的癌症可以是选自由以下项组成的群组的癌症:肺癌、乳腺癌、血癌、结直肠癌、胰腺癌及其组合,但不限于此。

[0058] 在本发明中,肺癌可以是非小细胞肺癌,但不限于此。

[0059] 此外,乳腺癌可以是三阴性乳腺癌,但不限于此。

[0060] 此外,虽然血癌可以是选自由以下项组成的群组的血癌:白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤及其组合,但淋巴瘤可以是非霍奇金淋巴瘤,但不限于此。

[0061] 在本发明的示例性实施方案中,证实了根据本发明的药物组合物对肺癌、乳腺癌和血癌表现出优异的抗癌活性(见实施例2)。

[0062] 在本发明中,当药物组合物用于预防或治疗肺癌时,药物组合物包含由通式AQXTGKT表示的寡肽作为活性成分,并且在这种情况下,X可以是选自由以下项组成的群组的一种或多种:异亮氨酸、亮氨酸、丙氨酸、蛋氨酸、脯氨酸和缬氨酸,但不限于此。

[0063] 另外,在本发明中,当药物组合物用于预防或治疗肺癌时,药物组合物包括由通式AQXTGKT表示的寡肽作为活性成分,并且在这种情况下,X可以是选自由以下项组成的群组的一种或多种:丙氨酸、蛋氨酸、脯氨酸和缬氨酸,但不限于此。

[0064] 此外,在本发明中,当药物组合物用于预防或治疗乳腺癌时,药物组合物包括由通式AQXTGKT表示的寡肽作为活性成分,并且在这种情况下,X可以是选自由以下项组成的群组的一种或多种:异亮氨酸、亮氨酸、丙氨酸、蛋氨酸、脯氨酸和缬氨酸,但不限于此。

[0065] 此外,在本发明中,当药物组合物用于预防或治疗乳腺癌时,药物组合物包括由通式AQXTGKT表示的寡肽作为活性成分,并且在这种情况下,X可以是选自由以下项组成的群组的一种或多种:异亮氨酸、亮氨酸、丙氨酸和缬氨酸,但不限于此。

[0066] 此外,在本发明中,当药物组合物用于预防或治疗血癌时,药物组合物包括由通式AQXTGKT表示的寡肽作为活性成分,并且在这种情况下,X可以是选自由以下项组成的群组的一种或多种:异亮氨酸、亮氨酸、丙氨酸、蛋氨酸、脯氨酸和缬氨酸,但不限于此。

[0067] 作为本发明的又一方面,本发明可以提供一种用于增强抗癌药物活性的方法,该方法包括将包含由通式表示的寡肽作为活性成分的组合物施用于个体。

[0068] 在本发明中,该组合物可以通过降低癌组织或癌细胞对抗癌药物的抗性或耐受性来增强抗癌药物的抗癌活性。

[0069] 同时,除了活性成分之外,根据本发明的药物组合物还可包括通常用于制备为药物组合物的合适的载体、赋形剂和/或稀释剂。此外,该药物组合物可以通过根据典型的方法配制成诸如粉末、颗粒、片剂、胶囊、混悬液、乳剂、糖浆和气雾剂之类的口服制剂、外用制剂、栓剂和无菌注射液的形式来使用。

[0070] 可包含在该组合物中的载体、赋形剂和稀释剂的实例包括乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露糖醇、木糖醇、赤藓糖醇、麦芽糖醇、淀粉、阿拉伯胶、藻酸盐、明胶、磷酸钙、硅酸钙、纤维素、甲基纤维素、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、水、羧基苯甲酸甲酯、羧基苯甲酸丙酯、滑石、硬脂酸镁、矿物油等。当制备该组合物时,该组合物可以使用常用的稀释剂或赋形剂(例如填充剂、增量剂、粘合剂、润湿剂、崩解剂和表面活性剂)制备。

[0071] 根据本发明的药物组合物以药学有效量施用。在本发明中,药学有效量是指在适用于医学治疗的合理益处/风险比下足以治疗疾病的量,并且有效剂量水平可根据包括各个因素(包括患者疾病类型、病情严重程度、药物的活性、对药物的敏感性、施用时间、施用途径、排泄率、治疗周期、同时使用的药物以及医学领域熟知的其他因素)确定。本发明的制剂的优选剂量可根据个体的状况和体重、疾病的程度、药物的形式、施用途径和持续时间来选择。作为具体实例,药物组合物可以按0.001至1000mg/kg,0.01至100mg/kg,0.01至10mg/kg,0.1至10mg/kg或0.1至1mg/kg的量每天施用一次或数次。

[0072] 考虑到所有上述因素,以可以获得最大效果且没有任何副作用的最小量施用该组合物是重要的,并且该量可由本领域技术人员确定。具体地,根据本发明的药物组合物的有效量可根据患者的年龄、性别、状况和体重、活性成分在体内的吸收率、失活率和排泄率、疾病的类型,以及要联合使用的药物而变化。

[0073] 本发明的药物组合物可以经由各种途径施用于个体。例如,药物组合物可以例如通过口服施用、鼻内施用、经气管施用、动脉注射、静脉内注射、皮下注射、肌肉注射或腹膜内注射来施用。日剂量可以每天施用一次或分几个剂量施用。

[0074] 说明书和权利要求书中使用的术语或词语不应被解释为仅限于典型或字典含义,而应基于以下原则以符合本发明技术精神的含义和概念来解释:发明人可以适当地定义术语的概念以使用最好的方法描述他/她自己的发明。

[0075] 以下,将提出有助于理解本发明的优选实施例。然而,以下实施例仅为了更容易理解本发明而提供,并且本发明的内容不受以下实施例的限制。

#### 实施例

##### [0076] 实验方法

[0077] 1. CellTiter-Glo发光(CTG)测定

[0078] 癌细胞系用六种寡核苷酸AQTITGKT、AQTLTGKT、AQTATGKT、AQTMTGKT、AQTPTGKT和AQTVTGTGKT处理后,通过CTG测定法测量细胞增殖的程度。

[0079] 具体地,将细胞以每个孔 $5 \times 10^3$ 个细胞/100 $\mu$ l接种在96孔板上,培养24小时,然后用根据本发明的六种寡肽转染。作为对照,未用寡核苷酸转染的细胞在相同条件下培养。72

小时后,将CellTiter-Glo (Promega Co.,USA) 试剂与细胞培养基等量混合,并允许在定轨振荡器中反应2分钟。在室温下反应10分钟后,使用光度计 (GloMax Promega) 测量发光信号。

#### [0080] 2. 克隆形成测定

[0081] 对于克隆形成测定,先前传代培养的癌细胞系在培养皿中生长至约80至90%,然后使用胰蛋白酶/EDTA从培养皿中剥离。将剥离的细胞悬浮于50ml管中,充分混合,然后用台盼蓝稀释2倍以进行细胞计数。将细胞接种在6孔板 (SPL#30006,平底) 上,以便使每孔具有 $1.7 \times 10^5$ 个细胞/2ml。将细胞培养24小时,然后分别用根据本发明的六种寡肽转染。作为对照,未用寡核苷酸转染的细胞在相同条件下培养。

[0082] 更具体地,将寡肽加入200 $\mu$ l的jetPrime缓冲液中至100 $\mu$ M的浓度,充分混合,然后离心。在室温下反应10分钟后,将200 $\mu$ l的培养细胞加入每个孔并在5%CO<sub>2</sub>和37°C下培养。24小时后,以 $1 \times 10^3$ 个细胞/ml将细胞加入每个孔,并且转染14天后,将细胞染色并观察。

#### [0083] 3. 四唑 (MTT) 测定

[0084] 在用根据本发明的6种寡肽处理癌细胞系后,测量细胞增殖的程度。具体地,以每个孔 $5 \times 10^3$ 个细胞/100 $\mu$ l将细胞分配到96孔板中,培养24小时,然后分别引入根据本发明的寡肽AQTITGKT、AQTLTGKT、AQTATGKT、AQTMTGKT、AQTPTGKT和AQTVTGKT。作为对照,未用寡核苷酸转染的细胞在相同条件下培养。72小时后,将10 $\mu$ l的CellTiter-96 (Promega Co.,USA) 试剂添加到每个孔中,并允许在5%CO<sub>2</sub>和37°C下反应。3小时后,使用分光光度计 (SPECTROstar<sup>Nano</sup>, BMG) 在490nm处测量吸光度。

#### 实施例1:寡肽的制备

##### [0085] 1.1. 一般反应

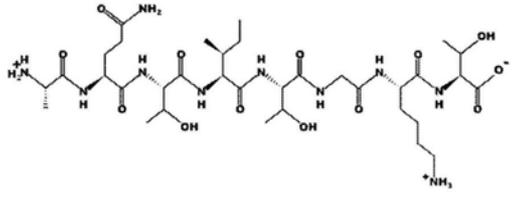
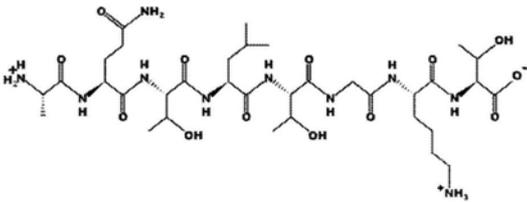
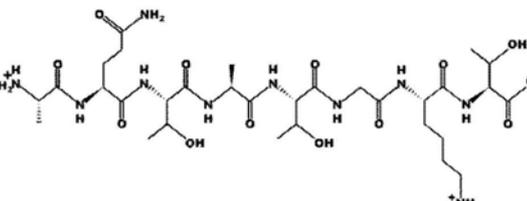
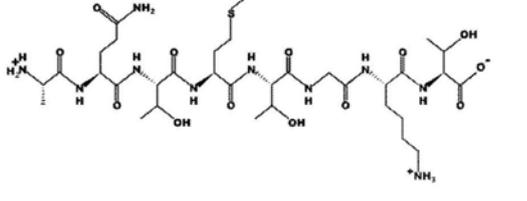
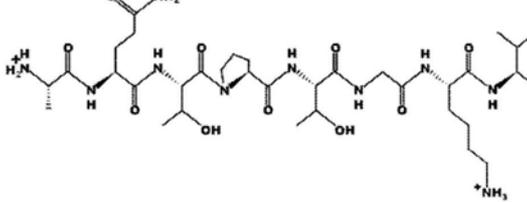
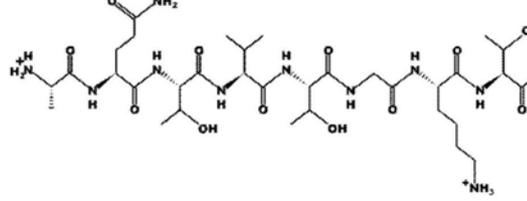
[0086] 除非另有说明,否则所有反应均使用市售材料和试剂进行,而没有额外的反应。所有寡肽产品均使用液相色谱串联质谱 (LC-MS/MS)、高效液相色谱 (HPLC) 和/或测序来指定。

[0087] 具体地,LC-MS/MS和从头测序使用LTQ XL MS/MSn光谱仪 (Thermo Fisher Scientific,USA) 和Discoverer 2.3 (Thermo Fisher Scientific) 进行。HPLC使用Agilent 1100HPLC系统 (检测器,VWD检测器,220nm;柱,Waters XBridge<sup>®</sup>C18,4.6mm i.d.X 250mm,5 $\mu$ m;A,含于水的0.1%TFA;B,含于ACN的0.1%TFA,v/v;流速,1mL/min;梯度,B:5%-35%,5分钟内,B:35%-65%,15分钟内) 进行。所有分析均通过委托SEWON BIOTECH进行。

##### [0088] 1.2.6种寡肽的合成与确认

[0089] 合成了具有下表1所示氨基酸序列和结构的寡肽。寡肽通过委托SEWON BIOTECH合成,对通过LC-MS/MS方法和氨基酸序列分析合成的寡肽进行鉴定,并且通过HPLC法证实纯度为95%或更多 (见下表2)。

[0090] [表1]

SEQ ID NO	氨基酸序列	化学结构
SEQ ID NO: 1 (寡肽#1)	AQTITGKT	
SEQ ID NO: 2 (寡肽#2)	AQTLTGKT	
SEQ ID NO: 3 (寡肽#3)	AQTATGKT	
SEQ ID NO: 4 (寡肽#4)	AQTM TGKT	
SEQ ID NO: 5 (寡肽#5)	AQTPTGKT	
SEQ ID NO: 6 (寡肽#6)	AQTVT GKT	

[0091] [表2]

寡肽	纯度 (纯度; 通过分析型 HPLC)	同一性 (同一性; 通过 LC-MS/MS 和 序列分析)
AQTITGKT (SEQ ID NO: 1)	97.6%	100%
AQTLTGKT (SEQ ID NO: 2)	97.36%	100%
AQTATGKT (SEQ ID NO: 3)	97.8%	100%
AQTMTGKT (SEQ ID NO: 4)	96.5%	100%
AQTPTGKT (SEQ ID NO: 5)	97.6%	100%
AQTVTGKT (SEQ ID NO: 6)	97.6%	100 %

[0092] 具体地,通过固相合成方法使用苄基甲氧羰基(Fmoc)/t-Bu合成SEQ ID NO:1至6的寡肽。使用24排肽自动合成仪Syro-I(瑞典的Biotage)合成寡肽,并使用2-氯三苯甲基树脂。C端处的第一个氨基酸被单独引入并连接到合成物上。

[0093] 使用二异丙基碳二亚胺/1-羟基苯并三唑/二异丙基乙胺(DIC/HOBT/DIPEA)条件引入Fmoc-氨基酸,并使用20%哌啶-DMF溶液去除N-氨基基团的保护基团Fmoc。

[0094] 通过用基于三氟乙酸(TFA)的溶液[TFA:三异丙基硅烷(TIS):水=95:2.5:2.5]处理从树脂中分离肽,然后使用过量的乙醚获得作为沉淀物的肽混合物。

[0095] 使用HPLC(美国的Agilent1100)和LC/MS(美国的Thermo Scientific LTQ XL™ IonTrap质谱仪)对肽混合物进行分析,并使用制备型HPLC(美国的Waters 2998)进行纯化,并使用冻干机浓缩纯化的肽溶液。通过将冻干的肽溶解在乙酸溶液中并允许溶解的溶液通过阴离子交换树脂(Dowex 1X8氯化物形式,100至200目),将肽用乙酸盐取代,并且最终将所得产物干燥以获得肽粉。

[0096] 通过HPLC分析肽的纯度,通过LCMS进行质谱分析,并使用Thermo Xcalibur Qual Browser程序通过从头序列分析方法进行序列分析。

#### 实施例2:寡肽抗癌效果的确认

[0097] 2.1. 抑制肺癌细胞增殖及抑制集落形成的效果

[0098] 在通过实验方法中描述的MTT测定和克隆形成测定用根据本发明的寡肽AQTITGKT、AQTLTGKT、AQTATGKT、AQTMTGKT、AQTPTGKT或AQTVTGKT以100μM或500μM的浓度分别对非小细胞肺癌细胞系A549、H1650和H1975进行处理后,测量癌细胞的集落形成程度或比较细胞毒性。

[0099] 结果,如图1至3所示,当用AQTATGKT、AQTMTGKT、AQTPTGKT或AQTVTGKT处理细胞系时,与对照相比观察到统计学上显著的细胞毒性和集落形成抑制效果。这种结果表明,根据本发明的寡肽具有能够抑制肺癌细胞生长和增殖的抗癌能力。

[0100] 2.2. 抑制乳腺癌细胞增殖能力和抑制活性的效果

[0101] 在通过实验方法中描述的克隆形成测定和CTG测定用根据本发明的寡肽AQTITGKT、AQTLTGKT、AQTATGKT、AQTMTGKT、AQTPTGKT或AQTVTGKT以100μM或500μM的浓度对乳腺癌细胞系MDA-MB-231和HCC70分别进行处理后,通过测量癌细胞集落形成的程度或测量细胞中ATP的量以比较细胞的活性来比较和分析抗癌效果。

[0102] 结果,如图4至5所示,当用AQTITGKT, AQTLTGKT, AQTATGKT或AQTVTGKT处理细胞系时,与对照相比,观察到细胞集落形成抑制和癌细胞活性抑制的统计学显著效果。这种结果表明,根据本发明的寡肽具有能够抑制乳腺癌细胞生长和增殖的抗癌能力。

[0103] 2.3.抑制血癌细胞生长和增殖能力的效果

[0104] 通过经由实验方法中描述的MTT测定方法用根据本发明的寡肽AQTITGKT、AQTLTGKT、AQTATGKT、AQTMTGKT、AQTPTGKT或AQTVTGKT以100 $\mu$ M或500 $\mu$ M的浓度分别处理每个血液癌细胞系Z-128和JeKo-1来比较细胞毒性。

[0105] 结果,如图6和7所示,所有6种寡肽均显示出细胞毒性效果。上述结果表明,根据本发明的寡肽(特别是对血癌细胞)具有优异的抗癌效果。

[0106] 提供本发明的上述描述是为了说明的目的,本发明所属领域的技术人员将理解,在不改变本发明的技术精神或基本特征的情况下,本发明可以容易地修改为其他具体形式。因此,应当理解,上述实施方案在各个方面都只是示例性的而并非限制性的。

#### 工业适用性

[0107] 根据本发明的寡肽和包含该寡肽作为活性成分的药物组合物表现出抑制癌细胞增殖和诱导细胞凋亡的效果,因此可用作治疗癌症的有用抗癌药物。本发明的药物组合物包括寡肽作为活性成分,并且与抗体相比,寡肽具有免疫反应方面的顾虑少并且由于其分子量小而易渗透到组织中的优点,以及可选择性作用于癌细胞或癌组织,并因此有望能够有效缓解现有抗癌药物的副作用问题。





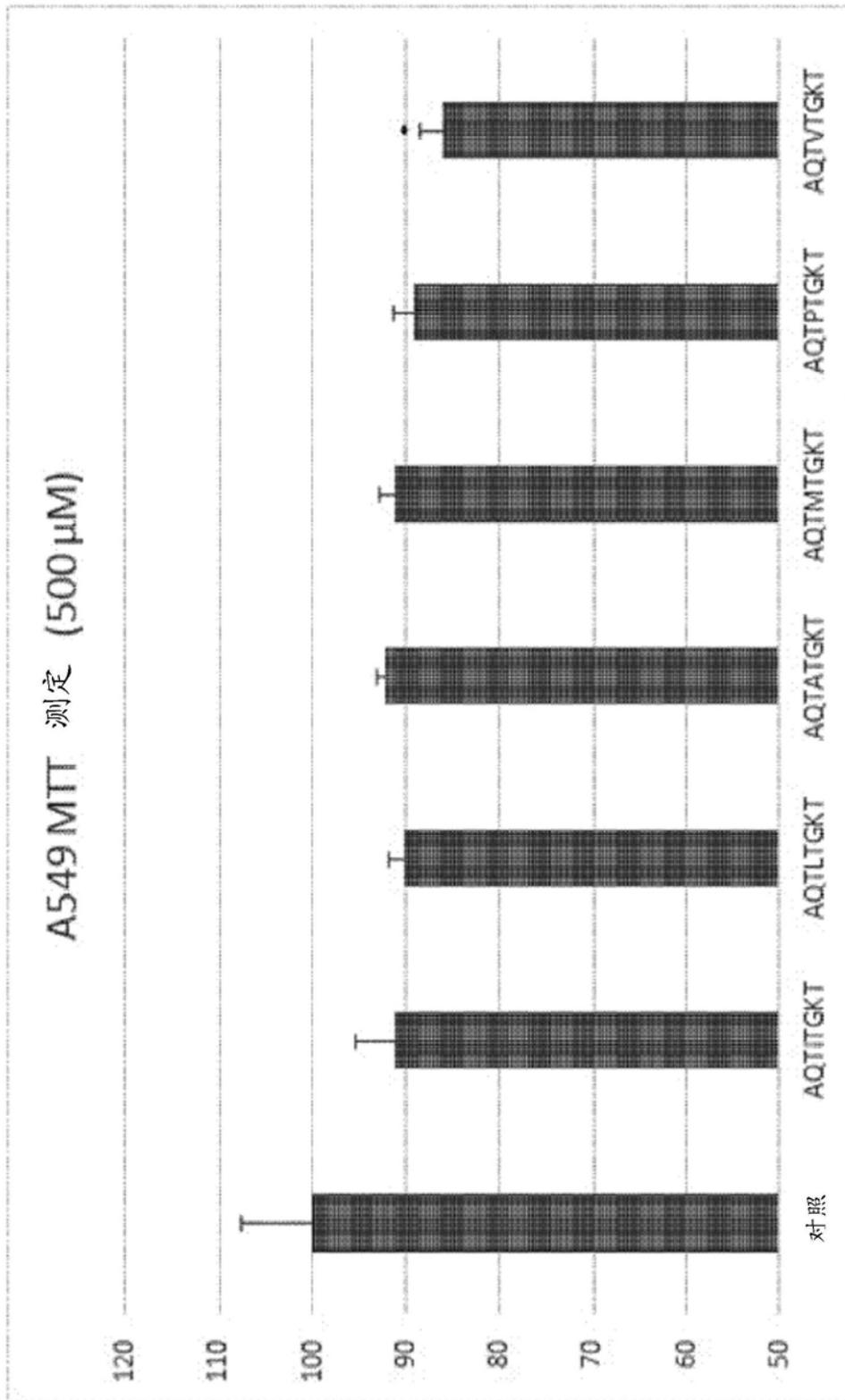


图1

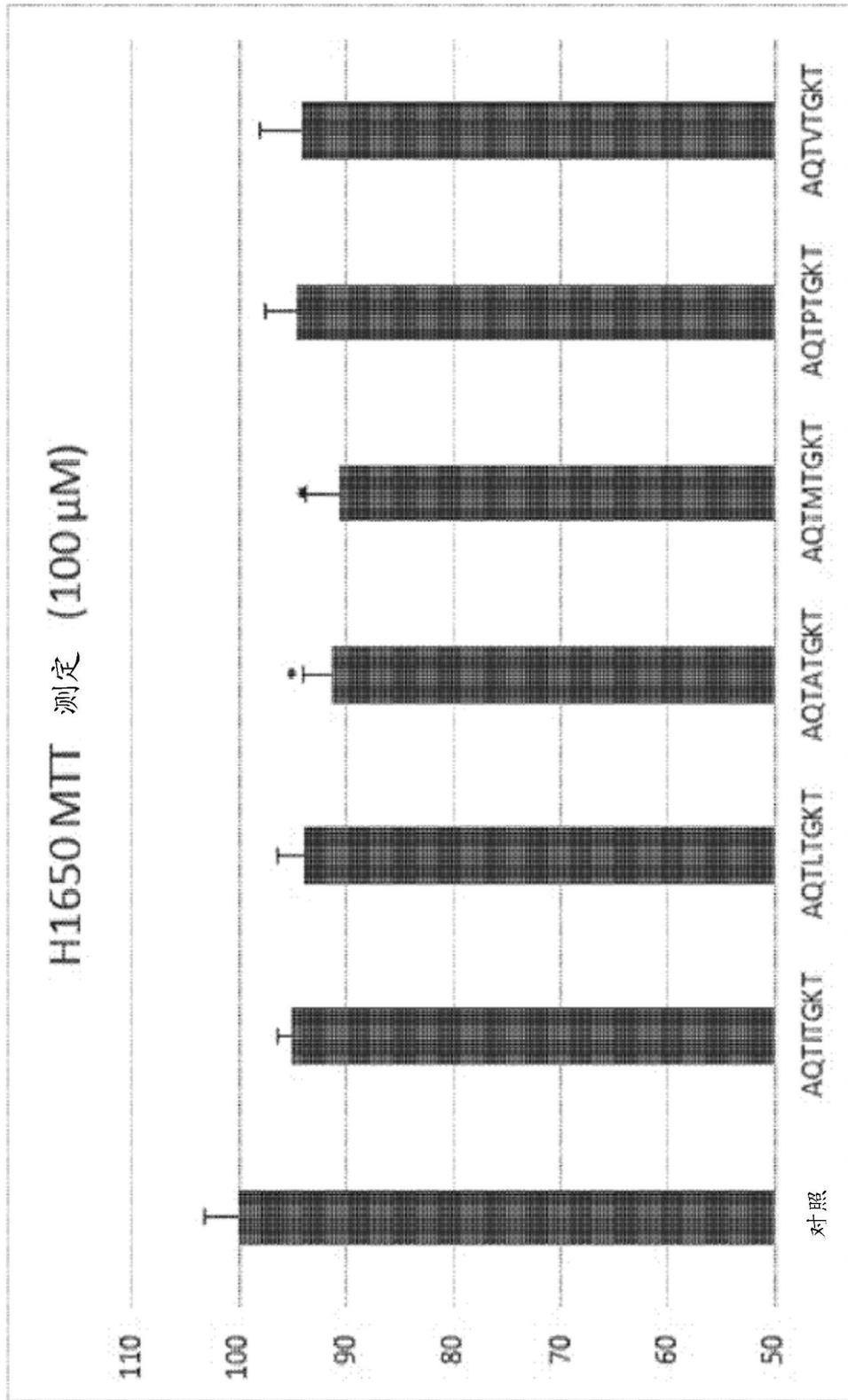


图2

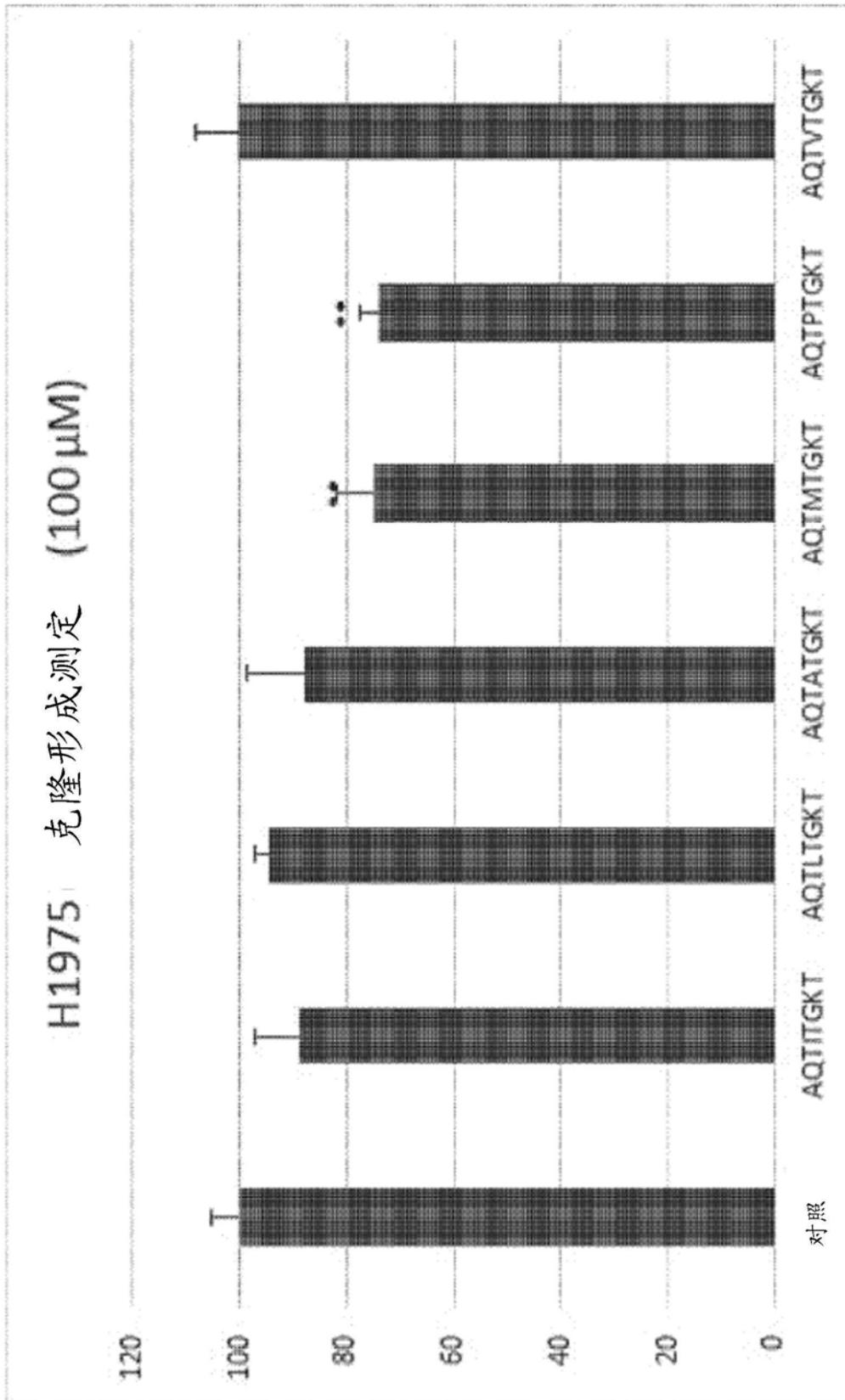


图3

### MDA-MB-231 克隆形成测定 (100 $\mu$ M)

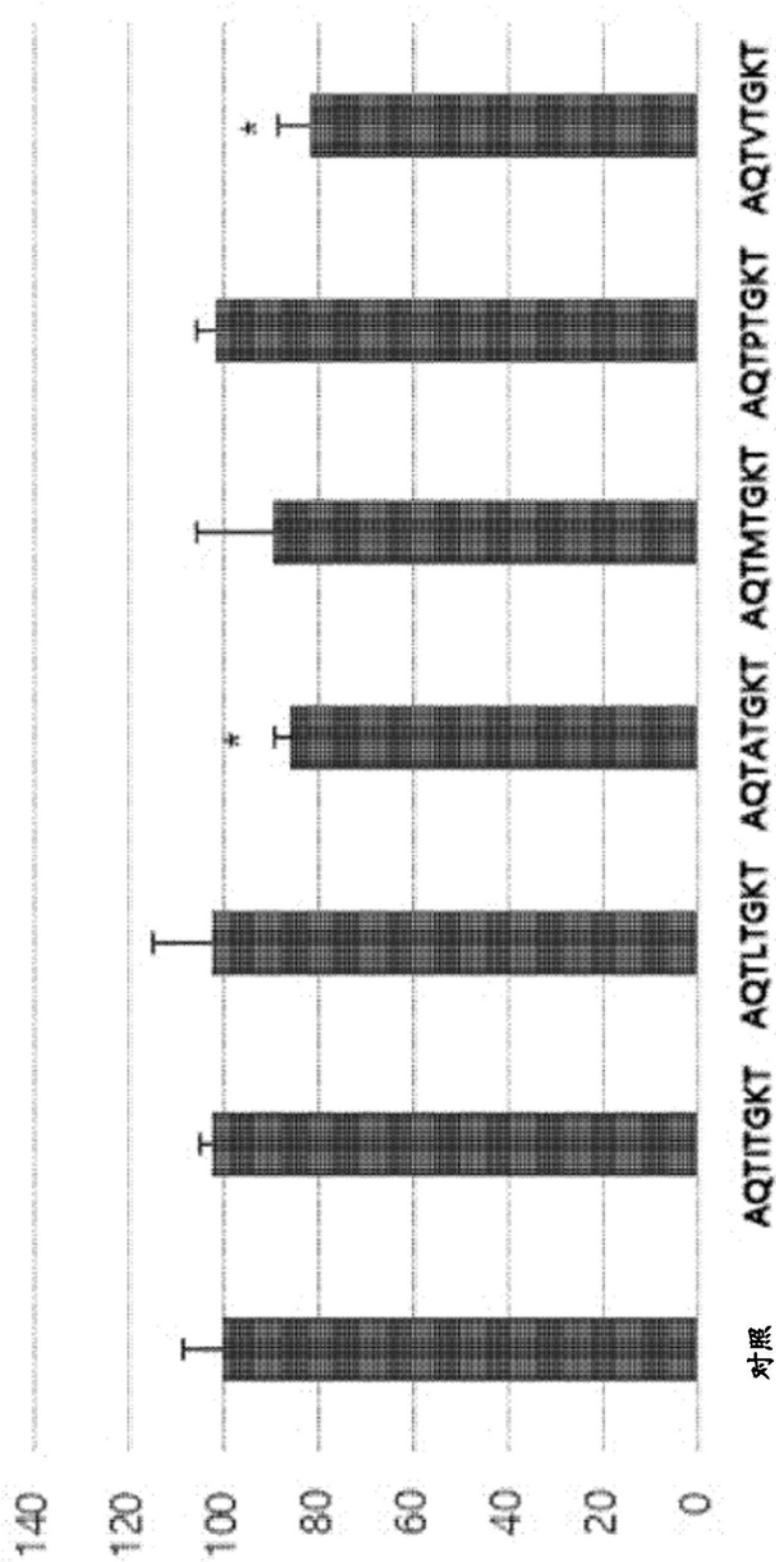


图4

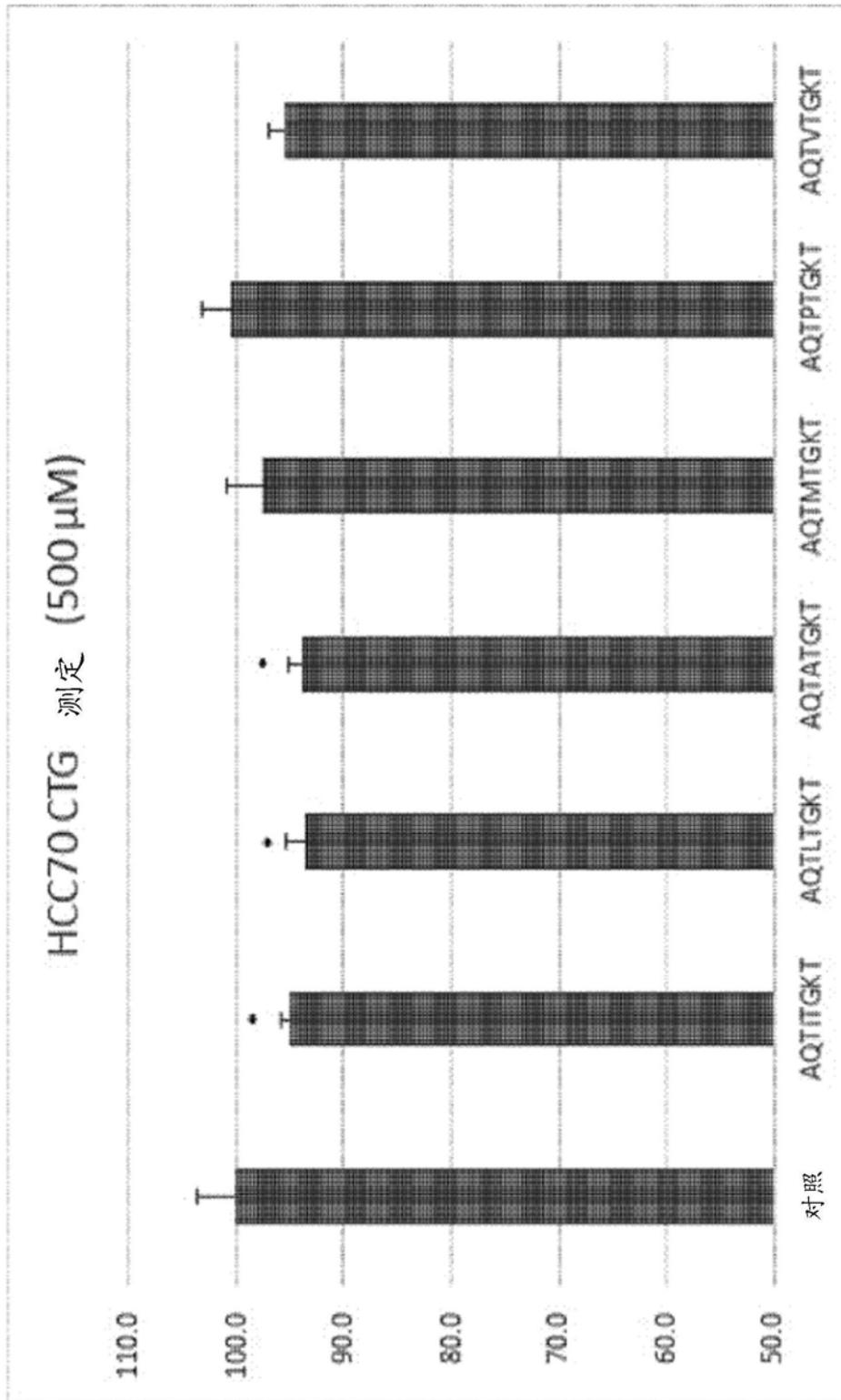


图5

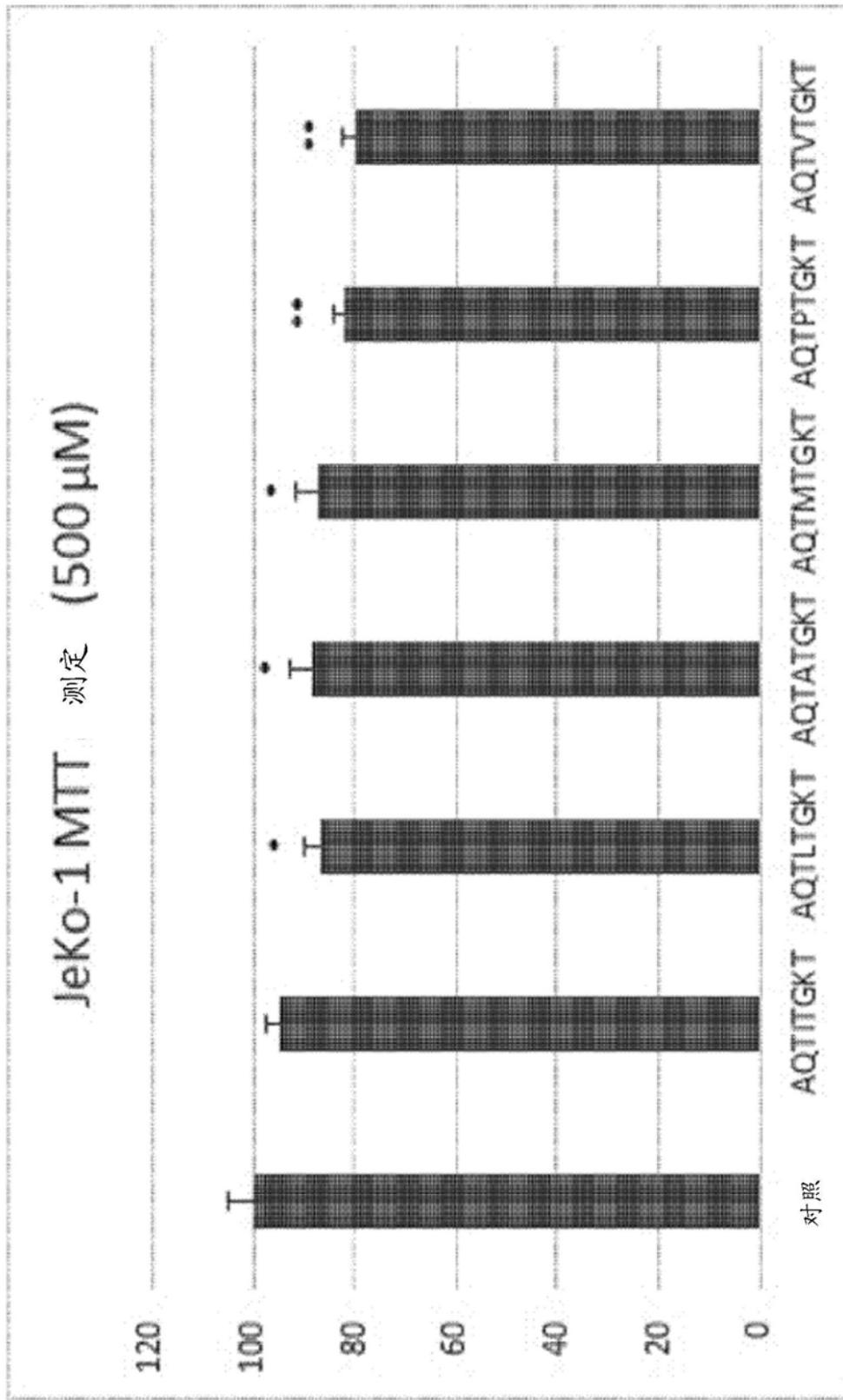


图6

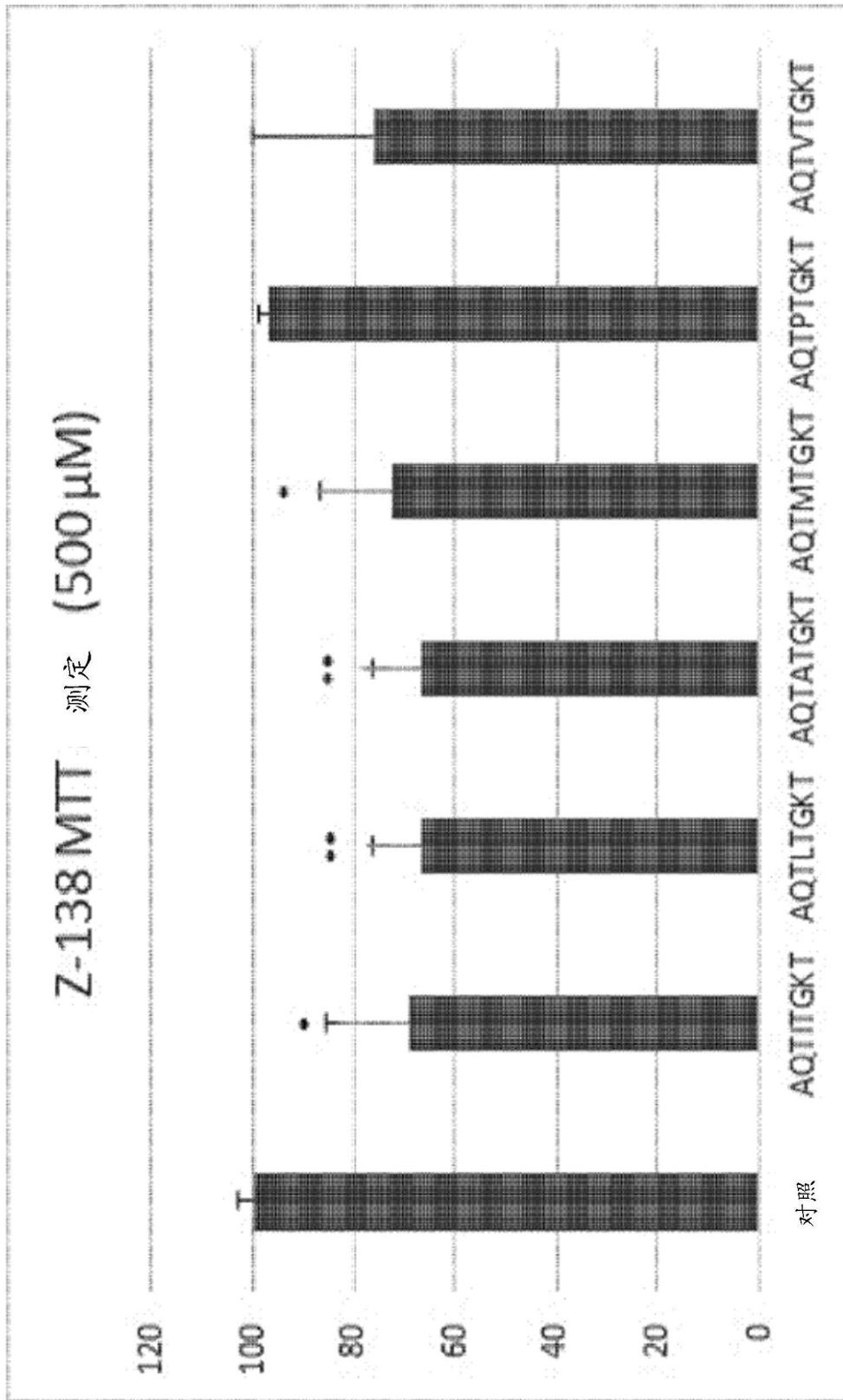


图7