



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117756893 A

(43) 申请公布日 2024. 03. 26

(21) 申请号 202311794031.4

(22) 申请日 2023.12.22

(71) 申请人 无锡市人民医院

地址 214000 江苏省无锡市梁溪区清扬路  
与金城路交界口

(72) 发明人 邹健 张博 汪京京 黄紫旋  
王艳茹

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569  
专利代理师 翟羽晨

(51) Int. Cl.

C07K 14/00 (2006.01)

C07K 1/04 (2006.01)

C07K 1/06 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

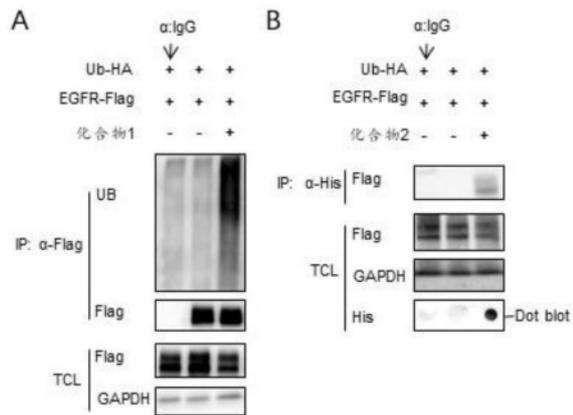
权利要求书1页 说明书7页  
序列表(电子公布) 附图1页

(54) 发明名称

一种EGFR抑制多肽化合物及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明提供一种EGFR抑制多肽化合物及其制备方法和应用,属于生物医药技术领域。本发明所述EGFR抑制多肽化合物如通式I所示,其中Xaa1为-OH或-NH<sub>2</sub>或-His-His-His-His-His-His-OH或-His-His-His-His-His-His-NH<sub>2</sub>。本发明提供的EGFR抑制多肽化合物,具有优异的EGFR亲和性,能够与肿瘤细胞中高表达的EGFR相结合,促进肿瘤细胞凋亡,抑制增殖和迁移,而且对正常细胞毒性较小,具有特异的选择性。因此所述EGFR抑制多肽化合物及其可药用盐可以潜在的用于抗肿瘤的临床治疗中,具有广阔的开发前景。



1. 一种EGFR抑制多肽化合物及其药学上可接受的盐,其特征在于,所述EGFR抑制多肽化合物如通式I所示;

通式I:Pro-Ser-Ser-Pro-Leu-Gly-Glu-Trp-Thr-Asp-Pro-Ala-Leu-Pro-Leu-Glu-Asn-Gln-Val-Trp-Tyr-His-Gly-Ala-Ile-Ser-Arg-Thr-Asp-Ala-Glu-Asn-Leu-Leu-Arg-Leu-Cys-Lys-Glu-Xaa1;

其中Xaa1为-OH或-NH<sub>2</sub>或-His-His-His-His-His-His-OH或-His-His-His-His-His-His-NH<sub>2</sub>。

2. 根据权利要求1所述EGFR抑制多肽化合物及其药学上可接受的盐,其特征在于,所述Xaa1为-OH或-His-His-His-His-His-His-OH。

3. 一种如权利要求1或2所述EGFR抑制多肽化合物的制备方法,其特征在于:采用微波促进Fmoc/tBu正交保护固相合成法制备多肽-树脂复合物,将所述多肽-树脂复合物经裂解剂裂解得到粗品,将所述粗品经过纯化得到EGFR抑制多肽化合物。

4. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于,所述固相合成法制备多肽-树脂复合物为在载体树脂上通过固相偶联合成法依次接入保护氨基酸。

5. 一种药物组合物,其特征在于,所述药物组合物包括如权利要求1或2所述的EGFR抑制多肽化合物和/或所述的EGFR抑制多肽化合物药学上可接受的盐。

6. 根据权利要求5所述的药物组合物,其特征在于,所述药物组合物还包括药学上可接受的载体。

7. 根据权利要求5所述的药物组合物,其特征在于,所述药物组合物的剂型包括片剂、胶囊剂、酏剂、糖浆、锭剂、吸入剂、喷雾剂、注射剂、膜剂、贴剂、散剂、颗粒剂、块剂、乳剂、栓剂或者复方制剂。

8. 如权利要求1或2所述的EGFR抑制多肽化合物或如权利要求3~4任意一项所述的制备方法获得的EGFR抑制多肽化合物在制备抗肿瘤药物中的应用。

9. 如权利要求1或2所述的EGFR抑制多肽化合物药学上可接受的盐在制备抗肿瘤药物中的应用。

## 一种EGFR抑制多肽化合物及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,具体涉及一种EGFR抑制多肽化合物及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 恶性肿瘤作为严重威胁人类健康的常见病和多发病,已经成为仅次于心血管疾病的第二大疾病。化学药物治疗作为一种全身性的肿瘤治疗手段,已经成为肿瘤治疗的主要策略。导致细胞癌变的根本原因是基因突变,近年来随着肿瘤生物学及其相关学科的发展,深入了解肿瘤发生发展及预后的分子机制有助于靶向治疗的认知和临床决策。其中,包括表皮生长因子受体(Epidermal growth factor receptor, EGFR)在内的蛋白激酶异常激活或抑制与肿瘤的发生发展关系密切,蛋白激酶相关的抑制剂或激动剂是肿瘤靶向治疗的主流选择。开发安全有效的蛋白激酶相关的抑制剂或激动剂已成为目前抗肿瘤药物研发的热点。

[0003] EGFR是表皮生长因子受体家族成员之一,广泛分布于人体各组织的细胞膜上,由胞外配体结合区、跨膜区和胞内区构成。在正常生理情况下,EGFR与其配体结合后诱导EGFR胞内酪氨酸位点发生自磷酸化而活化,发挥促进细胞增殖,细胞迁移,细胞侵袭和血管生成等功能。然而在肿瘤细胞中,EGFR过表达、突变及异常激活会导致胞内区RTK自磷酸化,激活下游一系列级联信号转导系统,如RAS/RAF/MAPK, PI3K/AKT/mTOR和STAT等转录因子的活性,继而导致RTK活性持续增强,细胞表型转化,促进了肿瘤组织的发生发展,通过抑制EGFR活性,可以有效的达到抗肿瘤的目的。因此,研究以EGFR为靶点,抑制EGFR活性的肿瘤分子靶向药物具有重要的临床意义和广阔的应用前景。

[0004] 目前,针对EGFR的靶向药物主要基于小分子酪氨酸激酶抑制剂(TKIs)和单克隆抗体(mAbs)。其中,虽然第一代至第三代TKIs已被广泛应用于EGFR激活突变的非小细胞肺癌的治疗,然而相对于EGFR激活突变的患者,大多数携带野生型EGFR的癌症患者获益有限。同时,EGFR相关mAbs则因为与EGFR结合的位点选择性导致对不同癌症的适应性,且继发耐药非常常见。因此,目前靶向EGFR的抗肿瘤药物在肿瘤特别是转移性肿瘤治疗中仍有很大的局限性。大量研究表明,EGFR空间分布和稳定性也是调节癌症进展的关键决定因素,促进EGFR降解是靶向EGFR相关癌症的一种非常有潜力的替代策略。在野生或突变EGFR驱动的肿瘤中,多数存在EGFR降解和再循环失调,进而导致下游通路持续激活,促进肿瘤得发生发展。因此,促进EGFR降解和抑制循环再利用是近年来靶向野生型和突变EGFR研究的热点。然而达到促进EGFR降解和抑制循环再利用的相关药物并未见相关报道。

### 发明内容

[0005] 本发明提供了一种EGFR抑制多肽化合物及其制备方法和应用,本发明提出的EGFR抑制多肽化合物能显著促进肿瘤细胞凋亡、抑制增殖和迁移,而且对正常细胞毒性较小,具有良好的选择性。

[0006] 为解决上述技术问题,本发明提供了以下技术方案:

[0007] 本发明提供一种EGFR抑制多肽化合物及其药学上可接受的盐,所述EGFR抑制多肽化合物如通式I所示;所述通式I:Pro-Ser-Ser-Pro-Leu-Gly-Glu-Trp-Thr-Asp-Pro-Ala-Leu-Pro-Leu-Glu-Asn-Gln-Val-Trp-Tyr-His-Gly-Ala-Ile-Ser-Arg-Thr-Asp-Ala-Glu-Asn-Leu-Leu-Arg-Leu-Cys-Lys-Glu-Xaa1;其中Xaa1为-OH或-NH<sub>2</sub>或-His-His-His-His-His-His-OH或-His-His-His-His-His-His-NH<sub>2</sub>。

[0008] 优选的,所述Xaa1为-OH或-His-His-His-His-His-His-OH。

[0009] 本发明提供一种所述EGFR抑制多肽化合物的制备方法,采用微波促进Fmoc/tBu正交保护固相合成法制备多肽-树脂复合物,将所述多肽-树脂复合物经裂解剂裂解得到粗品,将所述粗品经过纯化得到EGFR抑制多肽化合物。

[0010] 优选的,所述固相合成法制备多肽-树脂复合物为在载体树脂上通过固相偶联合成法依次接入保护氨基酸。

[0011] 本发明提供一种药物组合物,所述药物组合物包括所述的EGFR抑制多肽化合物和/或所述的EGFR抑制多肽化合物药学上可接受的盐。

[0012] 优选的,所述药物组合物还包括药学上可接受的载体。

[0013] 优选的,所述药物组合物的剂型包括片剂、胶囊剂、酞剂、糖浆、锭剂、吸入剂、喷雾剂、注射剂、膜剂、贴剂、散剂、颗粒剂、块剂、乳剂、栓剂或者复方制剂。

[0014] 本发明提供一种所述EGFR抑制多肽化合物或所述的制备方法获得的EGFR抑制多肽化合物在制备抗肿瘤药物中的应用。

[0015] 本发明提供一种所述EGFR抑制多肽化合物药学上可接受的盐在制备抗肿瘤药物中的应用。

[0016] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0017] (1) 本发明提出一种新型EGFR抑制多肽化合物,具有优异的EGFR亲和性,能够与肿瘤细胞中高表达的EGFR相结合,以配体依赖形式结合并诱导EGFR的Tyr1045位点自磷酸化,招募c-Cbl促进EGFR的泛素化降解进而抑制后者循环再利用,促进肿瘤细胞凋亡,抑制增殖和迁移,而且正常细胞毒性较小,具有良好的选择性,同时对EGFR的突变体EGFRvIII也有相同的作用,在一定程度上缓解继发耐药的发生。因此所述EGFR抑制多肽及其可药用盐可以潜在的用于抗肿瘤的临床治疗中,具有广阔的开发前景。

[0018] (2) 本发明利用微波促进固相合成新型EGFR抑制多肽大大的提高了偶合反应速率。常规固相合成方法充分偶合一个氨基酸到树脂上去,往往需要2h~20h,甚至更长,而微波平均只需要10min左右;常规固相合成方法脱Fmoc保护基,往往需要30min~1h,而微波平均只需要5min左右,这极大的提高了多肽合成的效率,缩短了合成周期。

[0019] (3) 本发明利用微波促进固相合成新型EGFR抑制多肽的粗品纯度大于80%,较常规固相合成方法大大提高,这方便了后续的纯化工作。

[0020] (4) 本发明利用微波促进固相方法合成新型EGFR抑制多肽,其成本低,由于偶合效率较高,所需要保护氨基酸平均只需要2倍过量,较常规固相合成方法需要4到5倍过量大为降低。该方法易于实现自动化、大规模化,这使其更适合工业化生产。

## 附图说明

[0021] 图1EGFR抑制多肽化合物与EGFR相结合并促进其降解结果,其中A:EGFR抑制多肽化合物1促进EGFR的泛素化水平结果,B:EGFR抑制多肽化合物2结合EGFR并促进其降解结果。

[0022] 图2EGFR抑制多肽化合物与EGFRVIII相结合并促进其降解结果,其中A:EGFR抑制多肽化合物1促进EGFR的泛素化水平结果;B:EGFR抑制多肽化合物2结合EGFR并促进其降解结果。

## 具体实施方式

[0023] 本发明提供一种EGFR抑制多肽化合物及其药学上可接受的盐,所述EGFR抑制多肽化合物如通式I所示;所述通式I为Pro-Ser-Ser-Pro-Leu-Gly-Glu-Trp-Thr-Asp-Pro-Ala-Leu-Pro-Leu-Glu-Asn-Gln-Val-Trp-Tyr-His-Gly-Ala-Ile-Ser-Arg-Thr-Asp-Ala-Glu-Asn-Leu-Leu-Arg-Leu-Cys-Lys-Glu-Xaa1,其中Xaa1为-OH或-NH<sub>2</sub>或-His-His-His-His-His-His-OH或-His-His-His-His-His-His-NH<sub>2</sub>。本发明所述EGFR抑制多肽化合物中的多肽氨基酸酸序列为Pro-Ser-Ser-Pro-Leu-Gly-Glu-Trp-Thr-Asp-Pro-Ala-Leu-Pro-Leu-Glu-Asn-Gln-Val-Trp-Tyr-His-Gly-Ala-Ile-Ser-Arg-Thr-Asp-Ala-Glu-Asn-Leu-Leu-Arg-Leu-Cys-Lys-Glu,氨基酸简称序列为PSSPLGEWTDPALPLENQVWYHGAI SRTDAENLL RLCKE (SEQ ID NO.1)。

[0024] 在本发明中,在一个实施方案中,所述EGFR抑制多肽化合物优选为Pro-Ser-Ser-Pro-Leu-Gly-Glu-Trp-Thr-Asp-Pro-Ala-Leu-Pro-Leu-Glu-Asn-Gln-Val-Trp-Tyr-His-Gly-Ala-Ile-Ser-Arg-Thr-Asp-Ala-Glu-Asn-Leu-Leu-Arg-Leu-Cys-Lys-Glu-OH(EGFR抑制多肽化合物1)。本发明在该实施例方案中所述EGFR抑制多肽化合物中的多肽氨基酸酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0025] 在本发明中,在另一个实施方案中,所述EGFR抑制多肽化合物优选为Pro-Ser-Ser-Pro-Leu-Gly-Glu-Trp-Thr-Asp-Pro-Ala-Leu-Pro-Leu-Glu-Asn-Gln-Val-Trp-Tyr-His-Gly-Ala-Ile-Ser-Arg-Thr-Asp-Ala-Glu-Asn-Leu-Leu-Arg-Leu-Cys-Lys-Glu-His-His-His-His-His-His-OH(EGFR抑制多肽化合物2)。本发明在该实施例方案中所述EGFR抑制多肽化合物中的多肽氨基酸酸序列为Pro-Ser-Ser-Pro-Leu-Gly-Glu-Trp-Thr-Asp-Pro-Ala-Leu-Pro-Leu-Glu-Asn-Gln-Val-Trp-Tyr-His-Gly-Ala-Ile-Ser-Arg-Thr-Asp-Ala-Glu-Asn-Leu-Leu-Arg-Leu-Cys-Lys-Glu-His-His-His-His-His-His,所述氨基酸简称序列为PSSPLGEWTDPALPLENQVWYHGAI SRTDAENLLRLCKEHHHHHHH (SEQ ID NO.2)。

[0026] 本发明提供一种所述EGFR抑制多肽化合物的制备方法,采用微波促进Fmoc/tBu正交保护固相合成法制备多肽-树脂复合物,将所述多肽-树脂复合物经裂解剂裂解得到粗品,将所述粗品经过纯化得到EGFR抑制多肽化合物。本发明所述固相合成法制备多肽-树脂复合物为在载体树脂上通过固相偶联合成法依次接入保护氨基酸。本发明在接入保护氨基酸之前,需用茚三酮法或者溴酚兰法定性检测树脂的偶合效率,显色反应为阴性即可进入下一个偶合循环接入保护氨基酸。

[0027] 本发明提供一种药物组合物,所述药物组合物包括所述的EGFR抑制多肽化合物和/或所述的EGFR抑制多肽化合物药学上可接受的盐,还包括药学上可接受的载体。本发明

所述载体包括但不限于粘合剂、润滑剂、崩解剂、分散剂、稳定剂、悬浮剂、着色剂、调味剂、缓冲剂、增溶剂、等渗剂中的一种或多种。本发明所述药物组合物的剂型包括但不限于片剂、胶囊剂、酏剂、糖浆、锭剂、吸入剂、喷雾剂、注射剂、膜剂、贴剂、散剂、颗粒剂、块剂、乳剂、栓剂或者复方制剂。

[0028] 本发明还提供一种所述的EGFR抑制多肽化合物和/或其药学上可接受的盐或所述制备方法获得的EGFR抑制多肽化合物在制备抗肿瘤药物中的应用。本发明所述肿瘤选自胶质瘤、宫颈癌、结肠癌、肺腺癌、乳腺癌或前列腺癌。

[0029] 在本发明中,涉及的英文缩写所对应的中文名称如表1所示:

[0030] 表1英文缩写与对应的中文名称

英文缩写	中文名称	英文缩写	中文名称
NMP	甲基吡咯烷酮	Gln	谷氨酰胺
KCN	氰化钾	Ser	丝氨酸
TFA	三氟乙酸	Ala	丙氨酸
DCM	二氯甲烷	Val	缬氨酸
Fmoc	N-9-芴甲氧羰基	Ile	异亮氨酸
HBTU	苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯	Leu	亮氨酸
HOBt	1-羟基-苯并三氮唑	Tyr	酪氨酸
ESI-MS	电喷雾质谱	His	组氨酸
Gly	甘氨酸	Pro	脯氨酸
Trp	色氨酸	Met	蛋氨酸
Thr	苏氨酸	Glu	谷氨酸
Asp	天冬氨酸	Lys	赖氨酸
Asn	天冬酰胺	Arg	精氨酸

[0033] 在本发明中,若无特殊说明,所有的原料、试剂均为本领域技术人员熟知的市售商品。

[0034] 下面将结合本发明中的实施例,对本发明中的技术方案进行清楚、完整地描述。显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0035] 实施例1

[0036] Pro-Ser-Ser-Pro-Leu-Gly-Glu-Trp-Thr-Asp-Pro-Ala-Leu-Pro-Leu-Glu-Asn-Gln-Val-Trp-Tyr-His-Gly-Ala-Ile-Ser-Arg-Thr-Asp-Ala-Glu-Asn-Leu-Leu-Arg-Leu-Cys-Lys-Glu-OH(EGFR抑制多肽化合物1)的微波促进固相合成。

[0037] (1) 树脂的溶胀:称取Wang Resin50 mg(取代量0.4mmol/g),经7mL DCM溶胀

30min,抽滤去DCM,再用10mLNMP溶胀30min,最后分别用NMP,DCM,NMP 7mL冲洗干净。

[0038] (2)微波促进Fmoc保护基的脱除:将溶胀好的树脂放入反应器中,加入7mL含0.1M HOBT的25%哌啶/NMP(V/V)溶液,在微波反应器中反应1min,微波功率为15W,反应温度控制在50℃以内,使用空气压缩机压缩空气冷却,反应结束后滤去溶液;再加入7mL含0.1M HOBT的25%哌啶/NMP(V/V)溶液在微波反应器中再反应4min,微波功率为25W,反应温度控制在50℃,使用空气压缩机压缩空气冷却。反应结束后滤去溶液,用NMP洗涤干净。得到脱去初始连接的Fmoc保护基的树脂。

[0039] (3)微波促进Fmoc-Glu(tBu)-Rink amide-MBHA Resin的合成:将Fmoc-Glu(OtBu)-OH(0.04mmol),HBTU(0.04mmol),HOBT(0.04mmol)和DIPEA(0.08mmol)溶于10mLNMP中,再将此溶液加入上面的树脂中,在微波反应器中反应7min,微波功率为25W,反应温度控制在50℃,使用空气压缩机压缩空气冷却。反应结束后滤除反应液,用DCM和NMP各7mL洗涤树脂3次。

[0040] (4)偶合效率的检测:用茚三酮法或者溴酚兰法定性检测树脂的偶合效率,显色反应为阴性即可进入下一个偶合循环。

[0041] 茚三酮法:取少量树脂颗粒用乙醇洗涤,放入透明小瓶中加入5%茚三酮乙醇、KCN吡啶溶液(2ml 0.001M KCN稀释于98ml吡啶中)、80%苯酚乙醇溶液各2滴,于100℃加热5分钟,如果树脂显蓝色即为阳性。

[0042] 溴酚兰法:取少量树脂颗粒用二甲酰乙酰胺洗涤,放入透明小瓶中加入3滴1%的溴酚蓝二甲酰乙酰胺溶液,常温下振摇3分钟,如果树脂显蓝色即为阳性。

[0043] (5)肽链的延长:按照化合物肽链的顺序,依次从C-端到N-端重复以上脱保护和偶合的步骤连接上相应的氨基酸,偶合微波促进反应时间5~20min不等,得到多肽-树脂复合物。

[0044] (6)树脂上多肽的裂解:将上述得到的多肽-树脂复合物放入反应瓶中,各加入裂解剂Reagent K(TFA/苯甲硫醚/水/苯酚/EDT,82.5:5:5:5:2.5,V/V)10mL,先在0℃下振摇30min,再在常温下反应3h。反应结束后抽滤,加少量TFA和DCM洗涤三次,合并滤液。将滤液加入大量的冰乙醚中析出白色絮状沉淀,冷冻离心得到目标多肽的粗品。最终得到目标化合物粗品65.1mg,收率为94.5%。

[0045] (7)多肽的纯化:将粗品多肽溶于50%的乙腈/水中,使用制备液相色谱纯化,色谱条件为:C18反相柱(320mm×28mm,5μm);流动相A:0.1%TFA/水(V/V),流动相B:0.1%TFA/乙腈(V/V);流动相梯度:流动相B 40%~90%,20min;流速为6mL/min检测波长为214nm。收集的溶液冻干得纯品30mg。理论相对分子质量为4407.93。ESI-MS m/z:found[M+4H]<sup>4+</sup>1102.94,[M+5H]<sup>5+</sup>882.55,[M+6H]<sup>6+</sup>735.63;calu[M+4H]<sup>4+</sup>1102.98,[M+5H]<sup>5+</sup>882.59,[M+6H]<sup>6+</sup>735.66。

[0046] 实施例2

[0047] Pro-Ser-Ser-Pro-Leu-Gly-Glu-Trp-Thr-Asp-Pro-Ala-Leu-Pro-Leu-Glu-Asn-Gln-Val-Trp-Tyr-His-Gly-Ala-Ile-Ser-Arg-Thr-Asp-Ala-Glu-Asn-Leu-Leu-Arg-Leu-Cys-Lys-Glu-His-His-His-His-His-His-OH(EGFR抑制多肽化合物2)的微波促进固相合成。

[0048] 根据实施例1所述的一般性方法,根据相应的序列合成得到该实施例所述的新型

EGFR抑制多肽化合物,通过电喷雾质谱(ESI-MS)确证各自的分子量。理论相对分子质量为5230.79。ESI-MS  $m/z$ :found  $[M+4H]^{4+}$ 1308.68,  $[M+5H]^{5+}$ 1047.14,  $[M+6H]^{6+}$ 872.78;calu  $[M+4H]^{4+}$ 1308.70,  $[M+5H]^{5+}$ 1047.16,  $[M+6H]^{6+}$ 872.80。

[0049] 实施例3EGFR抑制多肽化合物体外抗肿瘤活性验证

[0050] (1) 实施例1和实施例2制备的EGFR抑制多肽化合物对EGFR和其突变体EGFRVIII有显著靶向亲和性

[0051] 使用免疫共沉淀实验测定上述制备的化合物对EGFR有显著靶向亲和性:分别将Ub-HA和GV141/Flag-EGFR及Ub-HA和GV141/Flag-EGFRVIII通过脂质体转染试剂转染HEK293细胞,并分别加入20 $\mu$ M上述EGFR抑制多肽化合物,处理24小时后再加入10 $\mu$ M MG132处理4小时后收集蛋白后加入Anti-His-tag mAb-Magnetic Beads(购自MBL公司,化合物对EGFR结合实验加入)或Anti-DDDDK-tag mAb-Magnetic Beads(购自MBL公司,化合物对突变体EGFRVIII结合实验加入),4 $^{\circ}$ C过夜后收集磁珠上的蛋白并通过Westernblot检测各个蛋白的表达。其中,所述Ub-HA、GV141/Flag-EGFR、GV141/Flag-EGFRVIII载体通过如下步骤构建得到:商用GV219载体和商用GV141载体使用XhoI和KpnI线性化,委托上海吉凯基因化学技术化学合成Ub、EGFR和EGFRVIII基因序列并在序列两端分别引入XhoI和KpnI内切酶位点,将合成的Ub与线性化GV219载体连接后挑选重组克隆进行酶切和测序鉴定得到Ub-HA载体;将合成的EGFR和EGFRVIII基因序列与线性化GV141载体连接后挑选重组克隆进行酶切和测序鉴定得到GV141/Flag-EGFR、GV141/Flag-EGFRVIII载体。

[0052] 结果如图1和图2所示,实施例1和实施例2制备的EGFR抑制多肽化合物对EGFR及其突变体EGFRVIII均有显著靶向亲和性,可以与EGFR及其突变体EGFRVII相结合,并促进其降解。

[0053] (2) 实施例1和实施例2制备的EGFR抑制多肽化合物的体外抗肿瘤活性

[0054] 使用体外细胞增殖实验测定实施例化合物的体外抗肿瘤活性:取处于对数生长期状态良好的人胶质瘤细胞U87,人宫颈癌HeLa,人结肠癌HCT116和COLO320,人肺癌A549和NCIH2170、人乳腺癌MDAMB231,人前列腺癌PC3,人胃粘膜上皮细胞GES-1、人脐静脉内皮细胞HUVEC,分别以 $1 \times 10^5$ /ml密度接种于96孔培养板中培养24h后,加入不同浓度梯度的实施例化合物孵育48h。孵育结束后,每孔加入20 $\mu$ l CCK-8溶液,继续孵育2h后通过酶标仪检测其在450nm波长下的OD值,最后通过GraphPadPrism 7.0计算待测化合物的IC<sub>50</sub>值。

[0055] 表2实施例化合物的体外细胞毒性(IC<sub>50</sub>值/ $\mu$ mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>) (一)

组别	U87	Hela	HCT116	A549	MDAMB231
[0056] 化合物 1	5.1 $\pm$ 1.1	3.6 $\pm$ 0.7	5.7 $\pm$ 1.3	4.1 $\pm$ 1.1	2.9 $\pm$ 0.6
化合物 2	7.3 $\pm$ 1.3	5.7 $\pm$ 1.5	8.2 $\pm$ 2.3	6.3 $\pm$ 1.7	4.3 $\pm$ 1.7

[0057] 表3实施例化合物的体外细胞毒性(IC<sub>50</sub>值/ $\mu$ mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>) (二)

组别	PC3	COLO320	NCIH2170	GES-1	HUVEC
[0058] 化合物 1	4.5 $\pm$ 1.1	37.6 $\pm$ 5.3	43.5 $\pm$ 5.9	71.3 $\pm$ 8.4	68.7 $\pm$ 7.2
化合物 2	4.1 $\pm$ 1.3	39.2 $\pm$ 5.3	49.3 $\pm$ 6.5	63.6 $\pm$ 6.1	69.2 $\pm$ 6.5

[0059] 如表2和表3所示,相对于正常细胞GES-1,HUVEC和低表达EGFR的肿瘤细胞COLO320和NCIH2170,实施例化合物对EGFR高表达的肿瘤细胞U87,HeLa,HCT116,A549,MDAMB231和

PC3均有明显的细胞毒性。表明实施例1-2制备的EGFR抑制多肽具有良好的广谱抗肿瘤活性,对正常细胞毒性较小,具有良好的选择性。

[0060] 实施例4EGFR抑制多肽化合物体内抗肿瘤活性验证

[0061] 使用裸鼠荷瘤实验测定实施例1-2制备的EGFR抑制多肽化合物的体内抗肿瘤活性:将U87细胞分别接种于ba1b/c裸鼠的右侧腋窝皮下,待肿瘤生长至100mm<sup>3</sup>后将动物随机分组,分为空白对照组和给药组,每2天静脉给药1次,给药组分别静脉注射实施例1-2制备的EGFR抑制多肽化合物,空白对照组静脉注射等体积的生理盐水,给药后每日测量小鼠体重和肿瘤体积,动态观察化合物的抗肿瘤效应。给药6次后,处死小鼠,手术剥取瘤块称重并计算相对肿瘤体积V(mm<sup>3</sup>)。

[0062] 表4U87体内肿瘤体积(mm<sup>3</sup>)

	组别	1d	3d	5d	7d	9d	11d
[0063]	生理盐水	103.1±11.7	145.9±20.5	220.9±44.5	312.7±60.7	460.2±107.5	735.2±200.2
	化合物 1	109.3±13.8	126.7±20.6	159.5±19.7*	167.7±41.7**	170.3±47.1**	228.2±72.1**
	化合物 2	103.6±17.0	131.4±19.8	156.9±19.2*	181.6±37.9*	204.3±54.2**	249.8±96.9**

[0064] 注:\*P≤0.05及\*\*P≤0.01为相对于生理盐水对照组的Student's t检验结果。

[0065] 表5U87体内肿瘤重量(g)

	生理盐水	化合物 1	化合物 2
[0066]	1.72±0.17	0.25±0.07**	0.33±0.06**

[0067] 注:\*P≤0.05及\*\*P≤0.01为相对于生理盐水对照组的Student's t检验结果。

[0068] 如表4和表5所示,实施例1-2制备的EGFR抑制多肽化合物能够有效的抑制裸鼠体内U87的生长,具有良好的体内抗肿瘤活性。

[0069] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

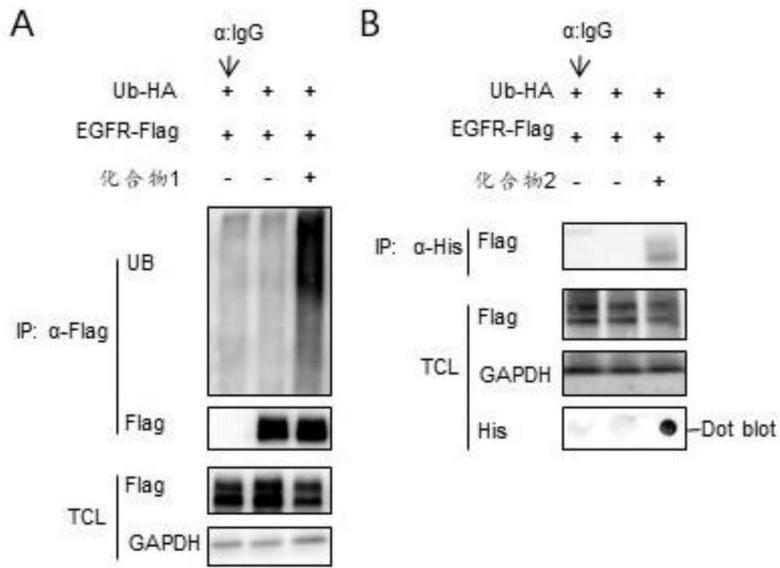


图1

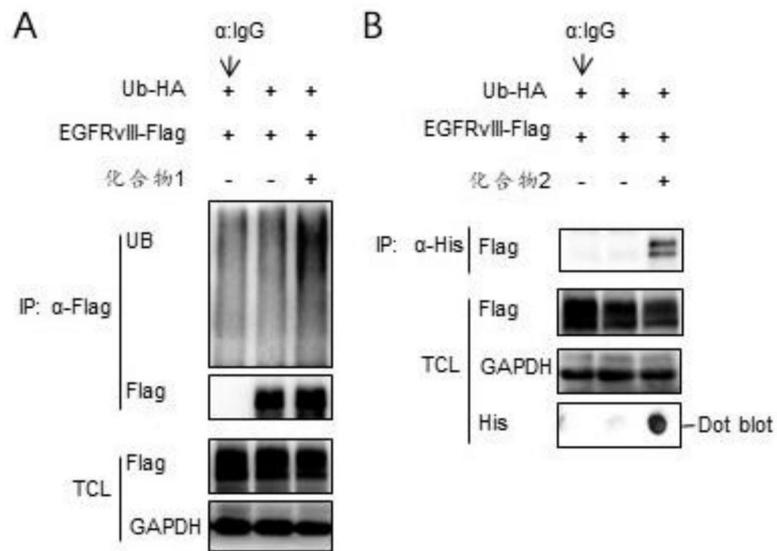


图2