



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113713092 A

(43) 申请公布日 2021. 11. 30

(21) 申请号 202110894682.5 *C07K 14/715* (2006.01)
(22) 申请日 2021.08.05 *C07K 1/04* (2006.01)
(71) 申请人 齐鲁工业大学 *C07K 1/06* (2006.01)
地址 250353 山东省济南市长清区大学路 *C07K 1/107* (2006.01)
3501号
申请人 山东优检生物技术有限公司
(72) 发明人 黄晓文 林惠超 张太毅 宋佳澳
(74) 专利代理机构 济南金迪知识产权代理有限公司
公司 37219
代理人 陈桂玲
(51) Int. Cl.
A61K 39/385 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

趋化因子受体CCR6在制备抗肿瘤药物中的应用

(57) 摘要

本发明涉及趋化因子受体CCR6在制备抗肿瘤药物中的应用。本发明中以趋化因子受体CCR6作为肿瘤免疫治疗靶标。所述趋化因子受体CCR6为：修饰有Tn糖修饰的糖氨酸结构单元并连接有破伤风毒素蛋白辅助T细胞部分表位序列(TT₉₄₇₋₉₆₇)的趋化因子受体CCR6。本发明首次公开了以趋化因子受体CCR6作为肿瘤免疫治疗靶标，可有效活化机体免疫系统并产生抗体，引起特异性抗肿瘤应答，实现肿瘤高效治疗，能够应用于肺癌、结直肠癌、肝癌、胃癌、乳腺癌、胰腺癌等不同抗肿瘤药物的制备，具有广泛的应用及产业化前景。

1. 趋化因子受体CCR6在制备抗肿瘤药物中的应用,其特征在于,所述趋化因子受体CCR6的氨基酸序列如下:

Met-Ser-Gly-Glu-Ser-Met-Asn-Phe-Ser-Asp-Val-Phe-Asp-Ser-Ser-Glu-Asp-Tyr。

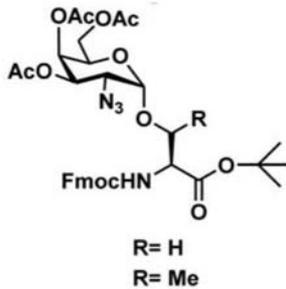
2. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述趋化因子受体CCR6为:修饰有Tn糖修饰的糖氨酸结构单元并连接有破伤风毒素蛋白辅助T细胞部分表位序列(TT₉₄₇₋₉₆₇)的趋化因子受体CCR6;

所述破伤风毒素蛋白辅助T细胞部分表位序列(TT₉₄₇₋₉₆₇)的氨基酸序列如下:

Phe-Asn-Asn-Phe-Thr-Val-Ser-Phe-Trp-Leu-Arg-Val-Pro-Lys-Val-Ser-Ala-Ser-His-Leu-Glu。

3. 如权利要求2所述的应用,其特征在于,所述Tn糖修饰的糖氨酸结构单元的制备方法如下:

以AgClO₄和Ag₂CO₃为混合催化剂,在严格无水条件下将糖基供体与糖基受体反应形成中间产物1;然后中间产物1在活化锌粉及乙酸酐作用下,C2位叠氮基被转化为N-乙酰氨基,再用三氟乙酸将羧基的保护基-叔丁酯切除,得到具有Tn糖修饰的糖氨酸结构单元;



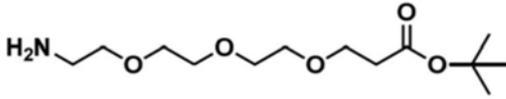
中间产物 1。

4. 如权利要求3所述的应用,其特征在于,所述糖基供体为3,4,6-三-O-乙酰基-2-叠氮-2-脱氧- α -D-半乳糖基溴,所述糖基受体为N-(9H-苄-9-基)甲氧羰基-L-丝氨酸叔丁基酯或N-(9H-苄-9-基)甲氧羰基-L-苏氨酸叔丁基酯。

5. 如权利要求2所述的应用,其特征在于,所述破伤风毒素蛋白辅助T细胞部分表位序列(TT₉₄₇₋₉₆₇)是通过三聚乙二醇氨酸连接臂连接至趋化因子受体CCR6。

6. 如权利要求5所述的应用,其特征在于,所述三聚乙二醇氨酸连接臂的制备方法如下:

以三聚乙二醇为起始原料,通过控制反应用量及滴加速度,使三聚乙二醇在金属钠催化下与丙烯酸叔丁酯发生Michael加成反应,然后通过甲磺酰氯将三聚乙二醇另一端羟基活化,并直接与叠氮化钠发生取代反应得到含叠氮基修饰的化合物,继续加入Pd/C催化剂同时通入氢气进行催化氢化反应将叠氮基还原为氨基,得到中间产物2,并进一步用Fmoc基团保护中间产物2的氨基;最后利用三氟乙酸脱除羧基的保护基叔丁酯,得到三聚乙二醇氨酸连接臂;



中间产物 2。

7. 如权利要求2所述的应用,所述修饰有Tn糖修饰的糖氨酸结构单元并连接有破伤风毒素蛋白辅助T细胞部分表位序列(TT₉₄₇₋₉₆₇)的趋化因子受体CCR6,即为TT-CCR6糖肽,制备方法如下:

以预先负载有氨基酸的Wang树脂为起始物,采用标准Fmoc多肽固相合成法合成CCR6多肽,接着用Tn糖修饰的糖氨酸结构单元对CCR6多肽进行糖基化修饰,得到CCR6糖肽;再通过三聚乙二醇氨酸连接臂将破伤风毒素蛋白的一段辅助T细胞表位序列(TT₉₄₇₋₉₆₇)与CCR6糖肽进行连接,得到TT-CCR6糖肽。

8. 一种抗肿瘤疫苗,其特征在于,所述抗肿瘤疫苗包括权利要求1所述趋化因子受体CCR6或权利要求2所述修饰有Tn糖修饰的糖氨酸结构单元并连接有破伤风毒素蛋白辅助T细胞部分表位序列(TT₉₄₇₋₉₆₇)的趋化因子受体CCR6。

9. 如权利要求8所述的抗肿瘤疫苗,其特征在于,所述抗肿瘤疫苗还包括佐剂;所述佐剂为壳聚糖/聚谷氨酸纳米颗粒。

10. 如权利要求8所述的抗肿瘤疫苗,其特征在于,所述抗肿瘤疫苗的制备方法如下:

(1) 将壳聚糖溶解于乙酸中,配置成浓度为0.5~1.5mg/mL的壳聚糖溶液,调节pH为4-6,在不断搅拌的条件下,向壳聚糖溶液中缓慢加入聚谷氨酸溶液,使溶液中正负电荷比为(2~10):1,得到壳聚糖/聚谷氨酸纳米颗粒悬浊液,将悬浊液于4000~6000rpm下离心35~45min,去除上清液,并将沉淀物重悬在等量的双蒸水中,得到壳聚糖/聚谷氨酸纳米颗粒溶液;

(2) 将趋化因子受体CCR6或TT-CCR6糖肽配置成1-5mg/mL的溶液,然后与步骤(1)制备的壳聚糖/聚谷氨酸纳米颗粒溶液混合均匀,得到壳聚糖纳米颗粒CCR6糖肽肿瘤疫苗;

其中,趋化因子受体CCR6溶液或TT-CCR6糖肽溶液与壳聚糖/聚谷氨酸纳米颗粒溶液的体积比为1:(8~10)。

趋化因子受体CCR6在制备抗肿瘤药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及趋化因子受体CCR6在制备抗肿瘤药物中的应用,属于生物医药技术领域。

背景技术

[0002] 受社会人口老龄化加重,人们生活方式改变和生态环境恶化等多重因素影响,肿瘤的发病率逐年上升,目前已经成为严重威胁人类健康的主要疾病。肿瘤治疗的理想方法是特异性杀伤体内肿瘤细胞而又不损伤正常细胞。相比于手术治疗、化学治疗、放射治疗等传统肿瘤治疗方式,肿瘤免疫疗法具有特异性强、副作用小、安全性高等优点,因此,目前在世界范围内肿瘤免疫治疗已经成为最先进、最热门的肿瘤治疗方法之一。

[0003] 肿瘤疫苗是肿瘤免疫治疗不容忽视的重要分支,传统疫苗主要包括热灭活或化学灭活病毒疫苗、减毒疫苗、类毒素疫苗、亚单位疫苗等。相比较传统疫苗,采用化学法合成疫苗是一种新型疫苗制备策略,通过化学合成方法将不同功能的免疫活性组分共价偶联可形成有效疫苗结构,具有组分明确、功能明确、纯度高、副作用小等优点,目前被广泛用于各种不同疾病的防治,在肿瘤防治方面也得到了广泛应用。

[0004] 肿瘤相关抗原可被机体免疫系统识别引起免疫反应,被广泛用于肿瘤早期检测、诊断和肿瘤免疫治疗靶标,然而现有的肿瘤相关抗原的免疫原性较低,机体难以引起强烈的抗肿瘤免疫反应。因此,寻找新的免疫治疗靶标十分迫切。根据诸多临床前研究,趋化因子受体CCR6高表达于T细胞和B细胞表面,参与多种炎症反应,此外,CCR6在肝癌、原发性胃癌、胰腺癌和结直肠癌等多种肿瘤细胞表面表达均有明显上调。但是尚未发现利用趋化因子受体CCR6实现免疫肿瘤治疗的报道。总而言之,针对趋化因子受体CCR6的抗肿瘤研究较少,尚未成熟,趋化因子受体CCR6的抗肿瘤药物和产品极具发展前景。

发明内容

[0005] 针对现有技术的不足,本发明提供趋化因子受体CCR6在制备抗肿瘤药物中的应用。

[0006] 本发明的技术方案如下:

[0007] 趋化因子受体CCR6在制备抗肿瘤药物中的应用,其特征在于,所述趋化因子受体CCR6的氨基酸序列如下:

[0008] Met-Ser-Gly-Glu-Ser-Met-Asn-Phe-Ser-Asp-Val-Phe-Asp-Ser-Ser-Glu-Asp-Tyr。

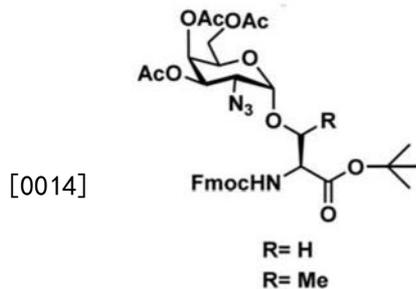
[0009] 根据本发明优选的,所述趋化因子受体CCR6为:修饰有Tn糖修饰的糖氨酸结构单元并连接有破伤风毒素蛋白辅助T细胞部分表位序列(TT₉₄₇₋₉₆₇)的趋化因子受体CCR6;

[0010] 所述破伤风毒素蛋白辅助T细胞部分表位序列(TT₉₄₇₋₉₆₇)的氨基酸序列如下:

[0011] Phe-Asn-Asn-Phe-Thr-Val-Ser-Phe-Trp-Leu-Arg-Val-Pro-Lys-Val-Ser-Ala-Ser-His-Leu-Glu。

[0012] 根据本发明优选的,所述Tn糖修饰的糖氨酸结构单元的制备方法如下:

[0013] 以 AgClO_4 和 Ag_2CO_3 为混合催化剂,在严格无水条件下将糖基供体与糖基受体反应形成中间产物1;然后中间产物1在活化锌粉及乙酸酐作用下,C2位叠氮基被转化为N-乙酰氨基,再用三氟乙酸将羧基的保护基-叔丁酯切除,得到具有Tn糖修饰的糖氨酸结构单元;



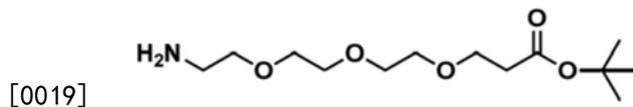
中间产物 1。

[0015] 根据本发明优选的,所述糖基供体为3,4,6-三-O-乙酰基-2-叠氮-2-脱氧- α -D-半乳吡喃糖基溴,所述糖基受体为N-(9H-芴-9-基)甲氧羰基-L-丝氨酸叔丁基酯或N-(9H-芴-9-基)甲氧羰基-L-苏氨酸叔丁基酯。

[0016] 根据本发明优选的,所述破伤风毒素蛋白辅助T细胞部分表位序列(TT₉₄₇₋₉₆₇)是通过三聚乙二醇氨酸连接臂连接至趋化因子受体CCR6。

[0017] 根据本发明优选的,所述三聚乙二醇氨酸连接臂的制备方法如下:

[0018] 以三聚乙二醇为起始原料,通过控制反应用量及滴加速度,使三聚乙二醇在金属钠催化下与丙烯酸叔丁酯发生Michael加成反应,然后通过甲磺酰氯将三聚乙二醇另一端羟基活化,并直接与叠氮化钠发生取代反应得到含叠氮基修饰的化合物,继续加入Pd/C催化剂同时通入氢气进行催化氢化反应将叠氮基还原为氨基,得到中间产物2,并进一步用Fmoc基团保护中间产物2的氨基;最后利用三氟乙酸脱除羧基的保护基叔丁酯,得到三聚乙二醇氨酸连接臂;



中间产物 2。

[0020] 根据本发明优选的,所述修饰有Tn糖修饰的糖氨酸结构单元并连接有破伤风毒素蛋白辅助T细胞部分表位序列(TT₉₄₇₋₉₆₇)的趋化因子受体CCR6,即为TT-CCR6糖肽,制备方法如下:

[0021] 以预先负载有氨基酸的Wang树脂为起始物,采用标准Fmoc多肽固相合成法合成CCR6多肽,接着用Tn糖修饰的糖氨酸结构单元对CCR6多肽进行糖基化修饰,得到CCR6糖肽;再通过三聚乙二醇氨酸连接臂将破伤风毒素蛋白的一段辅助T细胞表位序列(TT₉₄₇₋₉₆₇)与CCR6糖肽进行连接,得到TT-CCR6糖肽。

[0022] 根据本发明优选的,所述肿瘤为肺癌、结直肠癌、肝癌、胃癌、乳腺癌或胰腺癌。

[0023] 本发明还提供一种抗肿瘤疫苗,包括上述趋化因子受体CCR6或TT-CCR6糖肽。

[0024] 根据本发明优选的,所述疫苗还包括佐剂;所述佐剂为壳聚糖/聚谷氨酸纳米颗粒。

[0025] 根据本发明优选的,所述抗肿瘤疫苗的制备方法如下:

[0026] (1) 将壳聚糖溶解于乙酸中,配置成浓度为0.5~1.5mg/mL的壳聚糖溶液,调节pH为4-6,在不断搅拌的条件下,向壳聚糖溶液中缓慢加入聚谷氨酸溶液,使溶液中正负电荷比为(2~10):1,得到壳聚糖/聚谷氨酸纳米颗粒悬浊液,将悬浊液于4000~6000rpm下离心35~45min,去除上清液,并将沉淀物重悬在等量的双蒸水中,得到壳聚糖/聚谷氨酸纳米颗粒溶液;

[0027] (2) 将趋化因子受体CCR6或TT-CCR6糖肽配置成1~5mg/mL的溶液,然后与步骤(1)制备的壳聚糖/聚谷氨酸纳米颗粒溶液混合均匀,得到壳聚糖纳米颗粒CCR6糖肽肿瘤疫苗;

[0028] 其中,趋化因子受体CCR6溶液或TT-CCR6糖肽溶液与壳聚糖/聚谷氨酸纳米颗粒溶液的体积比为1:(8~10)。

[0029] 本发明的有益效果在于:

[0030] 1、本发明首次公开了以趋化因子受体CCR6作为肿瘤免疫治疗靶标,可有效活化机体免疫系统并产生抗体,引起特异性抗肿瘤应答,实现肿瘤高效治疗,能够应用于肺癌、结直肠癌、肝癌、胃癌、乳腺癌、胰腺癌等不同抗肿瘤药物的制备,具有广泛的应用及产业化前景。

[0031] 2、本发明提供的抗肿瘤疫苗首先以趋化因子受体CCR6作为肿瘤免疫治疗靶标,并用Tn糖修饰的糖氨酸结构单元对趋化因子受体CCR6进行糖基化修饰,得到CCR6糖肽;其次,为增强CCR6糖肽的免疫原性,通过化学法将破伤风毒素蛋白辅助T细胞表位序列(TT₉₄₇₋₉₆₇)与CCR6糖肽偶联,得到TT-CCR6糖肽;随后,利用聚电解质复合物法制备壳聚糖/聚谷氨酸(CS/ γ -PGA)纳米颗粒作为佐剂;最后,将壳聚糖/聚谷氨酸纳米颗粒与TT-CCR6糖肽进行物理混合,制成壳聚糖纳米颗粒CCR6糖肽肿瘤疫苗。通过修饰和构筑多价结构来增强趋化因子受体CCR6免疫原性,增强特异性免疫应答,增强抗体的滴度。

附图说明

[0032] 图1为TT-CCR6糖肽结构示意图。

[0033] 图2为小鼠血清中抗体滴度分析图。

具体实施方式

[0034] 下面通过具体实施例和附图对本发明方案做进一步说明,但不是限制本发明的要求保护的范

[0035] 实施例中所用原料均为常规原料,所用设备均为常规设备,均可从市售购买获得。

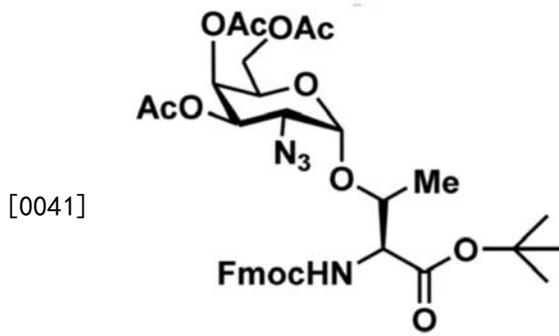
[0036] 以下实施例中的3,4,6-三-O-乙酰基-2-叠氮-2-脱氧- α -D-半乳糖基溴是以D-(+)-半乳糖分子为起始原料制备得到。

[0037] 实施例1

[0038] 利用趋化因子受体CCR6制备抗肿瘤疫苗,具体包括步骤如下:

[0039] (1) 含Tn糖修饰的糖氨酸结构单元的合成

[0040] 以AgClO₄和Ag₂CO₃为混合催化剂,在严格无水条件下将糖基供体与糖基受体反应形成中间产物1;然后中间产物1在活化锌粉及乙酸酐作用下,C2位叠氮基被转化为N-乙酰氨基,再用三氟乙酸将羧基的保护基-叔丁酯切除,得到具有Tn糖修饰的糖氨酸结构单元;

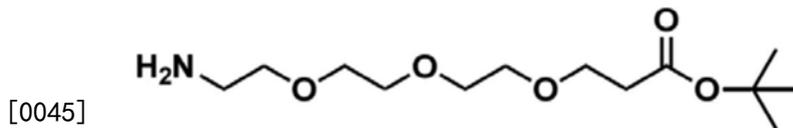


中间产物 1

[0042] 所述糖基供体为3,4,6-三-O-乙酰基-2-叠氮-2-脱氧- α -D-半乳吡喃糖基溴,所述糖基受体为N-(9H-芴-9-基)甲氧羰基-L-丝氨酸叔丁基酯或N-(9H-芴-9-基)甲氧羰基-L-苏氨酸叔丁基酯;

[0043] (2) 三聚乙二醇氨酸连接臂的合成

[0044] 以三聚乙二醇为起始原料,通过控制反应用量及滴加速度,使三聚乙二醇在金属钠催化下与丙烯酸叔丁酯发生Michael加成反应,然后通过甲磺酰氯将三聚乙二醇另一端羟基活化,并直接与叠氮化钠发生取代反应得到含叠氮基修饰的化合物,继续加入Pd/C催化剂同时通入氢气进行催化氢化反应将叠氮基还原为氨基,得到中间产物2,并进一步用Fmoc基团保护中间产物2的氨基;最后利用三氟乙酸脱除羧基的保护基叔丁酯,得到三聚乙二醇氨酸连接臂;



中间产物 2

[0046] (3) TT-CCR6糖肽的合成

[0047] 以预先负载有氨基酸的Wang树脂为起始物,采用标准Fmoc多肽固相合成法合成趋化因子受体CCR6,接着将步骤(1)制备的Tn糖修饰的糖氨酸结构单元对趋化因子受体CCR6进行糖基化修饰,得到CCR6糖肽;再通过步骤(2)制备的三聚乙二醇氨酸连接臂将破伤风毒素蛋白辅助T细胞表位序列(TT₉₄₇₋₉₆₇)与CCR6糖肽进行连接,得到TT-CCR6糖肽;具体结构如图1所示;

[0048] 其中,趋化因子受体CCR6的氨基酸序列如下:

[0049] Met-Ser-Gly-Glu-Ser-Met-Asn-Phe-Ser-Asp-Val-Phe-Asp-Ser-Ser-Glu-Asp-Tyr;

[0050] 破伤风毒素蛋白辅助T细胞表位序列(TT₉₄₇₋₉₆₇)的核苷酸序列如下:

[0051] Phe-Asn-Asn-Phe-Thr-Val-Ser-Phe-Trp-Leu-Arg-Val-Pro-Lys-Val-Ser-Ala-Ser-His-Leu-Glu;

[0052] (4) 壳聚糖/聚谷氨酸纳米颗粒的制备

[0053] 将0.01g壳聚糖溶解于10mL乙酸中,调节pH为5,在不断搅拌的条件下,向壳聚糖溶液中缓慢加入聚谷氨酸溶液,使溶液中正负电荷比为2:1,得到壳聚糖/聚谷氨酸纳米颗粒

悬浊液,将悬浊液于5000rpm下离心40min,去除上清液,并将沉淀物重悬在等量的双蒸水中,得到纯净的壳聚糖/聚谷氨酸纳米颗粒溶液;

[0054] (5)壳聚糖纳米颗粒CCR6糖肽肿瘤疫苗的制备

[0055] 将步骤(3)制备的TT-CCR6糖肽配置成1mg/mL的溶液,然后在900 μ L步骤(4)制备的壳聚糖/聚谷氨酸纳米颗粒溶液中加入100 μ L TT-CCR6糖肽溶液,混合均匀,TT-CCR6糖肽通过静电相互作用与壳聚糖/聚谷氨酸纳米颗粒结合,得到壳聚糖纳米颗粒CCR6糖肽肿瘤疫苗。

[0056] 实施例2

[0057] 利用趋化因子受体CCR6制备抗肿瘤疫苗,具体步骤同实施例1所述,不同之处在于,步骤(5)中,将TT-CCR6糖肽配置成2mg/mL的溶液。

[0058] 实施例3

[0059] 利用趋化因子受体CCR6制备抗肿瘤疫苗,具体同实施例1所述,不同之处在于,步骤(4)中,在不断搅拌的条件下,向壳聚糖溶液中缓慢加入聚谷氨酸溶液,使溶液中正负电荷比为10:1。

[0060] 实施例4

[0061] 利用趋化因子受体CCR6制备抗肿瘤疫苗,具体同实施例1所述,不同之处在于,不对趋化因子受体CCR6进行修饰和连接,直接将趋化因子受体CCR6配置成1mg/mL的溶液,然后与壳聚糖/聚谷氨酸纳米颗粒溶液按照1:9的体积比混合,得到壳聚糖纳米颗粒CCR6多肽肿瘤疫苗。

[0062] 试验例

[0063] 取6-8周大的雌性BALB/c小鼠16只,分为实验组A、实验组B、实验组C和对照组,每组4只小鼠,实验组A在每只小鼠腹腔中注射未经修饰的趋化因子受体CCR6,实验组B在每只小鼠腹腔中注射实施例4制备的壳聚糖纳米颗粒CCR6多肽肿瘤疫苗,实验组C在每只小鼠腹腔中注射本发明实施例1制备的壳聚糖纳米颗粒CCR6糖肽肿瘤疫苗,对照组在每只小鼠腹腔中注射无菌PBS,除免疫原成分不同,其余条件均保持一致。

[0064] 每只小鼠共免疫5次,采取隔周免疫。在第五次免疫一周后,小鼠脸颊取血,采用间接ELISA法对血清中IgG抗体的滴度进行测定,测定结果如图2所示。

[0065] 由图2可知,实验组A中的趋化因子受体CCR6可以作为肿瘤免疫治疗靶标,可有效活化机体免疫系统并产生抗体,引起特异性抗肿瘤应答,能够应用于制备抗肿瘤药物中,特别是应用于肿瘤疫苗中,有望应用于肺癌、结直肠癌、肝癌、胃癌、乳腺癌、胰腺癌等不同肿瘤疾病的治疗,具有广泛的应用及产业化前景。然后以壳聚糖纳米颗粒作为佐剂与趋化因子受体CCR6配合使用,能够提高血清中IgG抗体的滴度,本发明进一步的将免疫刺激组分TT₉₄₇₋₉₆₇引入到肿瘤疫苗体系中,通过修饰和构筑多价结构来增强趋化因子受体CCR6免疫原性,使得实施例1制备的壳聚糖纳米颗粒CCR6糖肽肿瘤疫苗与趋化因子受体CCR6相比,血清中IgG抗体滴度提升了10倍以上;与实施例4制备的壳聚糖纳米颗粒CCR6多肽肿瘤疫苗相比,血清中IgG抗体滴度提升了2~2.5倍,免疫原性得到明显增强。

