

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710024565.3

[51] Int. Cl.

C07K 7/06 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

[43] 公开日 2008年3月19日

[11] 公开号 CN 101143894A

[22] 申请日 2007.6.22

[21] 申请号 200710024565.3

[71] 申请人 中国药科大学

地址 211198 江苏省南京市江宁区龙眠大道
639号

[72] 发明人 徐寒梅 周 康

[74] 专利代理机构 南京知识律师事务所
代理人 高桂珍

权利要求书2页 说明书11页 附图2页

[54] 发明名称

高效抑制血管生成多肽及其物理化学修饰方法和应用

[57] 摘要

本发明属于生物工程制药技术领域或蛋白质多肽类药物领域，具体涉及高效血管生成抑制剂及其生产方法与应用。本发明设计了具有整合素亲和性的高效血管生成抑制剂 RGD-ED，该抑制剂含有血管生成抑制多肽异亮氨酸-缬氨酸-精氨酸-精氨酸-丙氨酸-天冬氨酸-精氨酸-丙氨酸-丙氨酸-缬氨酸-脯氨酸，在其一端或两端分别连接含有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸序列的多肽。本发明的 RGD-ED 可以合成。本发明还通过基因工程方法在大肠杆菌中或其它真核细胞中表达了其中一种 RGD-ED，进行包涵体蛋白分离、溶解和复性、离子交换层析分离纯化得到 RGD-ED。对本发明中的所有多肽序列进行聚乙二醇(PEG)修饰，肝素修饰，右旋糖苷修饰，聚乙烯吡咯烷酮(PVP)修饰，

聚乙二醇-聚氨基酸共聚物修饰，棕榈酸(palmitic acid)修饰，多聚唾液酸(colominic acid)修饰，脂质体修饰，其中包括脂质体(REV)、干脂质体(DRV)以及多室脂质体(Mvl)。本发明的合成多肽序列、基因工程产物和修饰产物在体内外实验中都能够显著提高现有血管生成抑制剂抑制内皮细胞生长、抑制新生血管生成和抗肿瘤效果，能够作为实体瘤、类风湿性关节炎治疗药物。

1. 一种具有整合素、肝素亲和性和结合能力的高效抑制血管生成的多肽，其特征在于在血管生成抑制多肽 Ile-Val-Arg-Arg-Ala-Asp-Arg-Ala-Ala-Val-Pro 的一端或另外一端连接对整合素家族具有亲和性和结合能力的多肽。
2. 根据权利要求 1 所述高效抑制血管生成多肽，其特征在于所述对整合素家族具有亲和性和结合能力的多肽为 Arg-Gly-Asp、Arg-Gly-Asp-Gly-Gly-Gly-Gly、Ala-Cys-Asp-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys-Gly-Gly-Gly-Gly 或 Ala-Cys-Asp-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys。
3. 根据权利要求 2 所描述高效抑制血管生成多肽的生产方法，其特征在于：构建编码含有 Arg-Gly-Asp、Arg-Gly-Asp-Gly-Gly-Gly-Gly、Ala-Cys-Asp-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys-Gly-Gly-Gly-Gly 或 Ala-Cys-Asp-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys 序列的 Ile-Val-Arg-Arg-Ala-Asp-Arg-Ala-Ala-Val-Pro 多肽的基因序列，进行基因工程表达，分离纯化重组蛋白质。
4. 根据权利要求 2 所述的高效抑制血管生成多肽的生产方法，其特征在于：采用多肽合成方法合成含有 Arg-Gly-Asp、Arg-Gly-Asp-Gly-Gly-Gly-Gly、Ala-Cys-Asp-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys-Gly-Gly-Gly-Gly 或 Ala-Cys-Asp-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys 序列的 Ile-Val-Arg-Arg-Ala-Asp-Arg-Ala-Ala-Val-Pro 多肽。
5. 根据权利要求 1 或 2 所述的血管生成抑制多肽的物理化学修饰方法，其特征在于：重量百分数为 1-20%的多肽，优选 1-12%，与 20%-95%的聚乙二醇或肝素或右旋糖苷或聚乙烯吡咯烷酮或聚乙二醇-聚氨基酸共聚物或棕榈酸或多聚唾液酸或脂质体溶液混合，优选 50-93%的上述修饰物，充分混匀，在 4℃-40℃，优选 25℃-37℃摇床中震荡反应 30min 以上，分离被修饰的产物。
6. 根据权利要求 5 方法所述的修饰产物，其特征是：采用聚乙二醇修饰，肝素修饰，右旋糖苷修饰，聚乙烯吡咯烷酮修饰，聚乙二醇-聚氨基酸共聚物修饰，棕榈酸修饰，多聚唾液酸修饰，脂质体修饰。
7. 根据权利要求 1 或 2 所述高效抑制血管生成多肽在治疗人类新生血管生成有

关疾病-实体瘤的药物中的应用。

- 8、根据权利要求 6 所述血管生成抑制多肽修饰产物在治疗人类新生血管生成有关疾病-实体瘤的药物中的应用。

高效抑制血管生成多肽及其物理化学修饰方法和应用

一. 技术领域：本发明属于生物工程制药技术领域或蛋白质多肽类药物领域。

二. 背景技术

肿瘤血管生成抑制剂是近年来在肿瘤治疗中引起重视的一类药物，这方面的研究已经取得一些进展，可望在今后成为一类新的有希望的肿瘤治疗药物。肿瘤新生血管形成的概念是 Algreza 在 1947 年提出的，他指出增长的肿瘤的一个重要特征是能够从宿主引发新的毛细血管内皮细胞形成。1971 年，Folkman 提出假设，认为肿瘤生长和转移依赖于新生血管生成，并认为实体瘤早期可分泌肿瘤血管生成因子，刺激宿主毛细血管增生。新生血管不仅可以提供肿瘤所需要的营养和氧气，排除代谢产物，而且是远处转移的途径(Folkman,J., J. Natl. Cancer Inst.1990;82:4-6)。因此，阻断新生血管形成可能成为阻止肿瘤生长和转移的手段，从而激发了对促血管生成分子和抗血管生成分子的广泛研究。在这些血管生成抑制剂中，尤其以血管抑素（angiostatin）和内皮抑素（endostatin）最引人注目，两者均已在美国进入临床试验，尽管这些血管抑制剂呈现出非常诱人的前景，但其缺陷也非常明显：迄今为止的血管生成药物，如内皮抑素、血管抑素等作用靶点不明确，它们对血管的专一性和选择性还不够好，效果有限，导致实验中用量很高，在小鼠动物模型实验时，血管抑素用量达数百毫克/公斤体重，内皮抑素达到数十毫克/公斤体重，当这些血管生成抑制剂在人体内使用时，使用剂量至少要达到几克/人的剂量。这样大的药物使用剂量势必增加日后该类药物毒副作用发生的可能性，造成该类药物质量控制难度加大、生产规模和生产成本增大、药物价格居高。

因此，一个好的抗血管生成药物应该有对新生血管的标记分子具有选择性，这样才能达到对新生血管的导向性作用，从整体上提高药物对血管生成的抑制作用：做到只使用很低剂量的药物，就能达到高效的抑制血管生成效果。

整合素是由 α 亚基和 β 亚基组成的跨膜蛋白异二聚体，研究表明，肿瘤细胞表面的整合素是肿瘤转移发生的关键所在，它们通过连接胞内细胞骨架蛋白和细

胞外基质分子的相互作用控制细胞的迁移、分化和增殖 (Schoenwaelder SM 等, *Curr Opin Cell Biol*, 1999; 274-286)。20 多种整合素中大多数都识别含 RGD(精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸)序列的细胞外基质配基 (Dennis MS 等, *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87: 2471-2475), 含有 RGD 序列的多肽具有整合素拮抗剂作用, 能减少细胞表面黏附分子的表达, 调节细胞内信号转导, 在肿瘤治疗中具有广阔的应用前景。

物理化学修饰是一个使多肽或蛋白质在治疗或生物技术方面的效力得以提高的重要过程。当修饰物以适当的方式连接在蛋白质或多肽上或对蛋白质多肽进行修饰时, 它能改变许多的特征, 而主要的生物活性功能, 如酶活性或特异结合位点, 可以保留下来。物理化学修饰通过如下几种途径改善药物的性能, 首先, 修饰物连接在蛋白质或多肽的表面上, 提高了它的分子大小, 并且它还能携带大量的水分子, 一种修饰物-蛋白质因而增大了 5~10 倍; 其次, 物理化学修饰使得以前不溶的蛋白质不仅容易溶解, 而且具有高度移动性; 此外, 对蛋白质多肽进行修饰可以减少肾脏对药物的滤过作用, 降低它的致热原性, 还可以减少蛋白酶对其的消解, 通过保护分子免受人体免疫系统的攻击来改善了它的输送; 同时, 因为它逃避了人体防御机构, 因而在作用部位停留的时间就长得多, 并使局部药物浓度增高。如目前在国外上市的 PEG-多肽(或 PEG-蛋白质)产品已有多个品种, 像世界头号生物技术公司 Amgen 公司开发的新药 SD/01, 就是用 PEG 修饰的粒细胞集落刺激因子 G-CSF, 是 Amgen 公司的早期产品 G-CSF 的长效型。而 G-CSF 的 99 年销售额是 12.2 亿美元, 2000 年是 12.6 亿美元, 这就可以看出修饰蛋白质多肽类产品的市场十分巨大。

三. 发明内容

目前发现, 有的编码血管生成抑制剂的小肽具有抑制血管生成和抗肿瘤效果, 本研究是将抑制血管生成的小肽两端加上不同的含有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸的序列, 构建了一种对整合素具有结合作用和亲和性的血管生成抑制剂。

本发明需要解决的问题是提供一种与整合素有亲和性或结合能力的高效血管生成抑制剂, 本发明的高效血管生成抑制剂可以合成。本发明还应用 PCR 扩增得到目的基因, 克隆于原核表达载体或真核表达载体, 用基因工程手段获得产物。本发明还应用多种修饰方法对血管生成抑制多肽进行修饰, 包括聚乙二醇修

饰，肝素修饰，右旋糖苷修饰，聚乙烯吡咯烷酮修饰，聚乙二醇-聚氨基酸共聚物修饰，棕榈酸修饰，多聚唾液酸修饰，脂质体修饰，获得了多种修饰产物。

本发明技术方案为：

(1) 在血管生成抑制多肽

Ile-Val-Arg-Arg-Ala-Asp-Arg-Ala-Ala-Val-Pro 的一端或另外一端分别连接含有 Arg-Gly-Asp 或 Arg-Gly-Asp-Gly-Gly-Gly-Gly 的序列，即多肽序列 Arg-Gly-Asp-Gly-Gly-Gly-Gly-Ile-Val-Arg-Arg-Ala-Asp-Arg-Ala-Ala-Val-Pro, Arg-Gly-Asp-Ile-Val-Arg-Arg-Ala-Asp-Arg-Ala-Ala-Val-Pro, Ile-Val-Arg-Arg-Ala-Asp-Arg-Ala-Ala-Val-Pro-Gly-Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp, Ile-Val-Arg-Arg-Ala-Asp-Arg-Ala-Ala-Val-Pro-Arg-Gly-Asp 序列。

(2) 在高效抑制血管生成多肽 Ile-Val-Arg-Arg-Ala-Asp-Arg-Ala-Ala-Val-Pro 的一端或另外一端连接含有

Ala-Cys-Asp-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys-Gly-Gly-Gly-Gly 或 Ala-Cys-Asp-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys 的多肽，即序列 Ala-Cys-Asp-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys-Gly-Gly-Gly-Gly-Ile-Val-Arg-Arg-Ala-Asp-Arg-Ala-Ala-Val-Pro, Ala-Cys-Asp-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys-Ile-Val-Arg-Arg-Ala-Asp-Arg-Ala-Ala-Val-Pro, Ile-Val-Arg-Arg-Ala-Asp-Arg-Ala-Ala-Val-Pro-Gly-Gly-Gly-Gly-Ala-Cys-Asp-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys, Ile-Val-Arg-Arg-Ala-Asp-Arg-Ala-Ala-Val-Pro-Ala-Cys-Asp-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys。

(3) 本发明的多肽序列及其编码此多肽序列的碱基序列可以直接进行合成。

(4) 合成含有 Arg-Gly-Asp 整合素结合序列肽段的血管生成抑制剂基因序列，以此序列为模板，设计上下游引物，在引物序列的 5'端和 3'端加上适合克隆的酶切位点，PCR 扩增，获得 RGD-ED 基因。将基因克隆于载体中，筛选阳性克隆，核苷酸序列分析鉴定。

(5) RGD-ED 基因与原核表达载体重组，形成表达质粒，转化大肠杆菌，IPTG 诱导表达 RGD-ED，表达产物以包涵体形式存在。

- (6) 进行包涵体蛋白分离、溶解和复性，并进行离子交换层析分离纯化 RGD-ED 蛋白产物，收集穿过液，冻干。
- (7) 对本发明中的所有 RGD-ED 基因与真核表达载体重组，形成表达质粒，转化真核细胞，诱导表达 RGD-ED，表达产物进行分离纯化。
- (8) 对本发明中的所有多肽序列进行聚乙二醇（PEG）修饰，采用的 PEG 分子量范围为具有线性（相对分子量 5000~30000D_a）或支化（相对分子量力 40000~60000D_a），其中包括：(1)PEG - 乙烯基磺酸 (PEG-Vinylsulphone)；(2) PEG - 碘乙酰胺 (PEG -Iodoacetamide)；(3)PEG -马来酰胺 (PEG -Maleimide)；(4) PEG -正吡啶二硫化物 (PEG -Orthopyridyldisulfide)；(5) SC-mPEG（单甲氧基聚乙二醇甲酰琥珀酰亚胺）或者 SS-PEG（琥珀酰胺类）或者 PEG -异氰酸酯 (PEG -Isocyanate)；(6) 单甲氧基聚乙二醇丙醛（mPEG-ALD）。
- (9) 对本发明中的所有多肽序列进行肝素修饰。
- (10) 对本发明中的所有多肽序列进行右旋糖苷修饰。
- (11) 对本发明中的所有多肽序列进行聚乙烯吡咯烷酮（PVP）修饰。
- (12) 对本发明中的所有多肽序列进行聚乙二醇-聚氨基酸共聚物修饰。
- (13) 对本发明中的所有多肽序列进行棕榈酸（palmitic acid）修饰。
- (14) 对本发明中的所有多肽序列进行多聚唾液酸（colominic acid）修饰。
- (15) 对本发明中的所有多肽序列进行脂质体修饰，其中包括脂质体(REV)、干脂质体(DRV)以及多室脂质体(Mvl)。
- (16) 进行内皮细胞增殖实验和鸡胚尿囊绒膜(CAM)分析、小鼠体内抗肿瘤实验。发现本发明产物在体内外实验中都能够大幅度改善和提高现有血管生成抑制剂抑制内皮细胞生长和抗肿瘤效果，并且用量小，降低了成本，说明本发明设计的高效血管生成抑制剂科学、合理、可行有效，能够作为肿瘤治疗药物。

本发明的有益效果是：

本发明所述高效抑制血管生成多肽及其物理化学修饰产物可制备成治疗人类新生血管生成有关疾病即实体瘤的药物。

所得产物与同类产品比较，具有高效、特异性抑制内皮细胞增殖和抗肿瘤效果，并且用量小，相应减少了药物治疗的副作用。

本发明还对多肽进行了多种修饰,这些修饰使本发明中的多肽延长了半衰期(T_{1/2})、增强了稳定性、降低免疫原性和抗原性、改变了分子结构从而改进了药物动力学和药效学的性质,提高了作用部位的血药浓度。同时,比未修饰的多肽表现出更好的耐受性,增加了今后的临床应用范围和疗效。

四.附图说明:

图1 HPLC 纯化 RGD-ED 分析结果

图2 鸡胚尿囊绒膜(CAM)分析 RGD-ED 抑制新生血管生成: A, 空白对照

B, C, D 分别为 0.05 μ g, 0.1 μ g 和 0.2 μ g 给药组

图3 RGD-ED 体内抑制肿瘤效果

图4 聚乙二醇(PEG)和脂质体修饰多肽体内抑制肿瘤效果: 1, 2, 3 分别为修饰前 RGD-ED, 脂质体修饰后和聚乙二醇修饰后的 RGD-ED 体内抑制人肝癌的作用效果

五.具体实施方式:

1. RGD-ED 基因的克隆及其原核表达载体的构建

合成编码 RGD-ED 多肽序列的碱基,作为模板;合成上游引物和下游引物,其中上游引物加入了 NdeI 酶切位点;下游引物含有 Arg-Gly-Asp 序列和 XhoI 位点。进行 PCR 扩增,扩增产物经过琼脂糖凝胶电泳回收、纯化后,进行 NdeI 和 XhoI 酶切,克隆到原核表达载体 pw, PCR 筛选阳性克隆,核苷酸序列分析证实序列发生了设计的突变。

合成的引物 1: 5' GGAATTCATATG ATCGTGCGCCGTGCCGACCGC3'

合成的引物 2: 5' CCGCTCGAGGCAGAAGCAGTCACCACGGCA3'

其中,引物 1 编码了 NdeI 位点和 Ile-Val-Arg-Arg-Ala-Asp-Arg-Ala-Ala-Val-Pro 的部分序列,引物 2 编码 XhoI 位点和含有 Arg-Gly-Asp 序列的基因。

为了比较本发明所设计的血管生成抑制剂 RGD-ED 的实际效果,本实例中我们同时委托公司合成了不含 Arg-Gly-Asp 序列的多肽

Ile-Val-Arg-Arg-Ala-Asp-Arg-Ala-Ala-Val-Pro (ED)。

3. 重组菌的诱导表达

将表达质粒转化大肠杆菌,重组菌经过 1mMIPTG 诱导表达 3 小时后,收获细胞并超声破菌,离心分离上清和沉淀, 15% SDS-PAGE 电泳分析,将考马斯

亮蓝染色的 SDS-PAGE 扫描 (UVP White/Ultraviolet transilluminator), 分析表达结果。

4. 包涵体的分离、溶解与复性

超声破菌, 离心分离, 将包涵体沉淀用 0.1M Tris 和脱氧胆酸钠洗涤, 沉淀溶解于月桂基肌氨酸钠 (SLS) 中, 4°C, 10000rpm 离心 5min, 上清液 4°C 透析, 透析液为 buffer A (10mM Tris-HCl, 0.1mM 氧化型谷胱甘肽和 1mM 还原型谷胱甘肽, pH7.4), 6-8h 换液一次, 共换液 3 次, 最后透析一次, 透析液为 buffer B (10mM Tris-HCl, pH7.4), 样品直接进行 SP-Sepharose Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech) 层析。柱床平衡洗涤均用 buffer B, 用 0.6M NaCl, Tris-HCl, pH7.4 和 1M NaCl, Tris-HCl, pH7.4 分步洗脱, 将洗脱液混合, buffer B 透析后冻干浓缩。层析结果如图 1 所示。

5. 内皮细胞增殖分析

培养 BCE 细胞和 NIH 3T3 细胞, 方法: 培养液 DMEM 含 10% 灭活小牛血清 (BCS), 1% 抗生素及 3ng/ml bFGF。细胞增殖分析方法如下: PBS 洗涤细胞, 胰蛋白酶消化, 加入培养液悬浮细胞并离心收集细胞, 调整细胞浓度至 25,000 cells/ml。将细胞移入 6 孔板 (0.5ml/well), 培养 24h., 更换培养基为 1ml DMEM, 5% BCS, 1% 抗生素, 1ng/ml bFGF, 每孔加入不同剂量的样品, 进一步培养 48h, 胰蛋白酶消化细胞, 重悬于 PBS, 用 70% 冰冷乙醇固定 30min, 7-AAD 染色, 用流式细胞仪进行分析。

结果显示: 重组 RGD-ED 能够特异性抑制内皮细胞- BCE 细胞的增殖, 而对非内皮细胞-NIH 3T3 则没有抑制作用。抑制 BCE 增殖的 ED₅₀ 大约为 0.1μg/ml, 而没有 RGD 序列的多肽 ED₅₀ 大约为 0.8μg/ml, 内皮抑素的 ED₅₀ 大约为 0.5μg/ml。以上实验说明本发明所设计的高效血管生成抑制剂确实显著提高了现有的血管生成的生物活性。

6. 鸡胚尿囊绒毛膜(CAM)分析

为了检测体内抗血管生成活性, 进行 CAM 分析。所有实验在超净台中进行无菌操作, 将消毒的 6 天的鸡胚在 37°C、90% 湿度下进行培养。两天后, 每个鸡蛋顶端打孔, 将试剂滴到灭菌的 Whatman 滤纸, 放入 CAMs 上血管密集区, 培养 48 小时后, 观察鸡胚和 CAMs 并拍照。

如图 2 所示, 为了评价 RGD-ED 体内抗新生血管生成活性, 采用了不同剂量的 RGD-ED 来进行 CAM 实验, 其中 0.05 μ g, 0.1 μ g 和 0.2 μ g 的 RGD-ED 都能够显著抑制新生血管和血管生成, 0.5 μ g RGD-ED 能够完全抑制血管生成并导致鸡胚死亡。RGD-ED 具有潜在的抑制血管生成的作用。

7、多肽的 PEG 修饰

7.1 N 端氨基酰化修饰

重量百分数大约为 1-20%的多肽, 优选大约 1-12%, 与大约 20%-95%的聚乙二醇 SC-mPEG (单甲氧基聚乙二醇甲酰琥珀酰亚胺, 平均分子量为 5000) 或者 SS-PEG (琥珀酰胺类) 或者 PEG -异氰酸酯 (PEG -Isocyanate) 溶液或者单甲氧基聚乙二醇丙醛 (mPEG-ALD) 溶液混合, 优选大约 50-93%的上述修饰物, 充分混匀, 在 4 $^{\circ}$ C-40 $^{\circ}$ C, 优选 25 $^{\circ}$ C-37 $^{\circ}$ C 摇床中震荡反应 30min 以上. 通过通过离子交换层析分离 N 端被修饰的产物。

7.2 羧基端修饰

重量百分数大约为 1-20%的多肽, 优选大约 1-12%, 与大约 20%-95%的 mPEG-NH₂ (平均分子量为 5000), 少量 DCCI (二环己基碳二亚胺) 溶液混合, 优选大约 50-93%的上述修饰物, 充分混匀, 在 4 $^{\circ}$ C-40 $^{\circ}$ C, 优选 22 $^{\circ}$ C-37 $^{\circ}$ C 摇床中震荡反应 30min 以上. 优选 90min, 羧基可与 mPEG-NH₂ 中的氨基结合, 形成酰胺键, RP-HPLC 分离得到 N 端被修饰的产物。

7.3 巯基端修饰

重量百分数大约为 1-20%的多肽, 优选大约 1-10%, 与大约 20%-95%的 mPEG-MAL (mPEG-马来酰亚胺, 平均分子量为 5000) 溶液混合, 优选大约 70-94%的上述修饰物, 充分混匀, 在 4 $^{\circ}$ C-40 $^{\circ}$ C, 优选 20 $^{\circ}$ C-37 $^{\circ}$ C 摇床中震荡反应 30min 以上. 优选 60min, 通过离子交换分离得到 N 端被修饰的产物。

8、其它修饰方法

其它修饰方法均参照 PEG 修饰, 其中最优修饰效果为 PEG 修饰和脂质体修饰 (见图 4)

7. 动物体内抗肿瘤实验

将培养的 B16F10 黑色素瘤细胞用 0.05%的胰蛋白酶消化, 1000 rpm 离心 5 min, 重悬于 PBS, 在 C57BL/6 小鼠 (6-8 周) 小鼠体侧皮下接种 5×10^5 细胞

0.1ml。当肿瘤平均体积达到 200mm^3 - 300mm^3 ,随机将小鼠分组,每组7只,其中一组接受 RGD-ED 治疗,一组用不含 RGD 的 ED 治疗,以上两组剂量均为 5mg/kg/d ,对照注射 PBS。治疗采用在接种肿瘤对侧皮下注射方法。每天用游标卡尺测量肿瘤大小,计算肿瘤体积,采用公式:肿瘤体积=长 \times 宽 $^2\times 0.52$,治疗效果用给定时间内的肿瘤抑制率表示: $(1 - T/C) \times 100\%$, T =治疗组肿瘤体积, C =对照组肿瘤体积。

如图3所示,结果表明,在第9天时, RGD-ED 的肿瘤抑制率为 58%,而没有 RGD 序列的多肽 ED 的肿瘤抑制率为 28%。以上实验说明本发明所设计的高效血管生成抑制剂能够显著抑制小鼠体内的肿瘤生长。

将培养的人肝癌 SGC7901 用 0.05% 的胰蛋白酶消化, 1000 rpm 离心 5 min, 重悬于 PBS, 在 6-8 周裸小鼠体侧皮下接种 5×10^5 细胞 0.1ml。当肿瘤平均体积达到 100mm^3 - 200mm^3 ,随机将小鼠分组,每组7只,其中一组接受 RGD-ED 治疗,一组用脂质体修饰的 RGD-ED 治疗,一组用聚乙二醇修饰的 RGD-ED 治疗,以上三组剂量均为 3mg/kg/d ,对照注射 PBS。治疗采用在接种肿瘤对侧皮下注射方法。每天用游标卡尺测量肿瘤大小,计算肿瘤体积,采用公式:肿瘤体积=长 \times 宽 $^2\times 0.52$,治疗效果用给定时间内的肿瘤抑制率表示: $(1 - T/C) \times 100\%$, T =治疗组肿瘤体积, C =对照组肿瘤体积。

如图4所示,结果表明,在第10天时, RGD-ED 的肿瘤抑制率为 68%,而脂质体修饰的 RGD-ED 的肿瘤抑制率为 72%,聚乙二醇修饰的 RGD-ED 的肿瘤抑制率为 78%,以上实验说明本发明所设计的修饰方法获得的修饰产物能够显著抑制小鼠体内的肿瘤生长。

高效抑制血管生成多肽序列表

<110>申请人姓名： 中国药科大学

<120>发明名称： 高效抑制血管生成多肽及其制备方法和应用

<160>序列表中序列的个数： 8

<210>序列相对应的序列标识符： 1

<211>序列长度： 25 个氨基酸

<212>序列的类型： PRT

<213>生物体： 人工序列

<400>序列标识符：

Ala-Cys-Asp-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys-Gly-Gly-Gly-Gly-Ile-Val-Arg-Arg-Ala

3 6 9 12 15 18

-Asp-Arg-Ala-Ala-Val-Pro

21 24

<210>序列相对应的序列标识符： 2

<211>序列长度： 21 个氨基酸

<212>序列的类型： 蛋白质

<213>生物体： 人工序列

<400>序列标识符：

Ala-Cys-Asp-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys-Ile-Val-Arg-Arg-Ala

3 6 9 12 15

-Asp-Arg-Ala-Ala-Val-Pro

18

<210>序列相对应的序列标识符： 3

<211>序列长度： 18 个氨基酸

<212>序列的类型： 蛋白质

<213>生物体： 人工序列

〈400〉 序列标识符:

Arg-Gly-Asp-Gly-Gly-Gly-Gly-Ile-Val-Arg-Arg-Ala-Asp-Arg-Ala-Ala-Val-Pro

3 6 9 12 15 18

〈210〉 序列相对应的序列标识符: 4

〈211〉 序列长度: 14 个氨基酸

〈212〉 序列的类型: 蛋白质

〈213〉 生物体: 人工序列

〈400〉 序列标识符:

Arg-Gly-Asp-Ile-Val-Arg-Arg-Ala-Asp-Arg-Ala-Ala-Val-Pro

3 6 9 12

〈210〉 序列相对应的序列标识符: 5

〈211〉 序列长度: 25 个氨基酸

〈212〉 序列的类型: 蛋白质

〈213〉 生物体: 人工序列

〈400〉 序列标识符:

Ile-Val-Arg-Arg-Ala-Asp-Arg-Ala-Ala-Val-Pro-Gly-Gly-Gly-Gly-

3 6 9 12 15

Ala-Cys-Asp-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys

18 21 24

〈210〉 序列相对应的序列标识符: 6

〈211〉 序列长度: 21 个氨基酸

〈212〉 序列的类型: 蛋白质

〈213〉 生物体: 人工序列

〈400〉 序列标识符:

Ile-Val-Arg-Arg-Ala-Asp-Arg-Ala-Ala-Val-Pro-Ala-Cys-Asp-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-

3 6 9 12 15 18

Phe-Cys

21

〈210〉 序列相对应的序列标识符： 7

〈211〉 序列长度： 18 个氨基酸

〈212〉 序列的类型： 蛋白质

〈213〉 生物体： 人工序列

〈400〉 序列标识符：

Ile-Val-Arg-Arg-Ala-Asp-Arg-Ala-Ala-Val-Pro-Gly-Gly-Gly-Gly- Arg-Gly-Asp

3 6 9 12 15 18

〈210〉 序列相对应的序列标识符： 8

〈211〉 序列长度： 14 个氨基酸

〈212〉 序列的类型： 蛋白质

〈213〉 生物体： 人工序列

〈400〉 序列标识符：

Ile-Val-Arg-Arg-Ala-Asp-Arg-Ala-Ala-Val-Pro- Arg-Gly-Asp

3 6 9 12

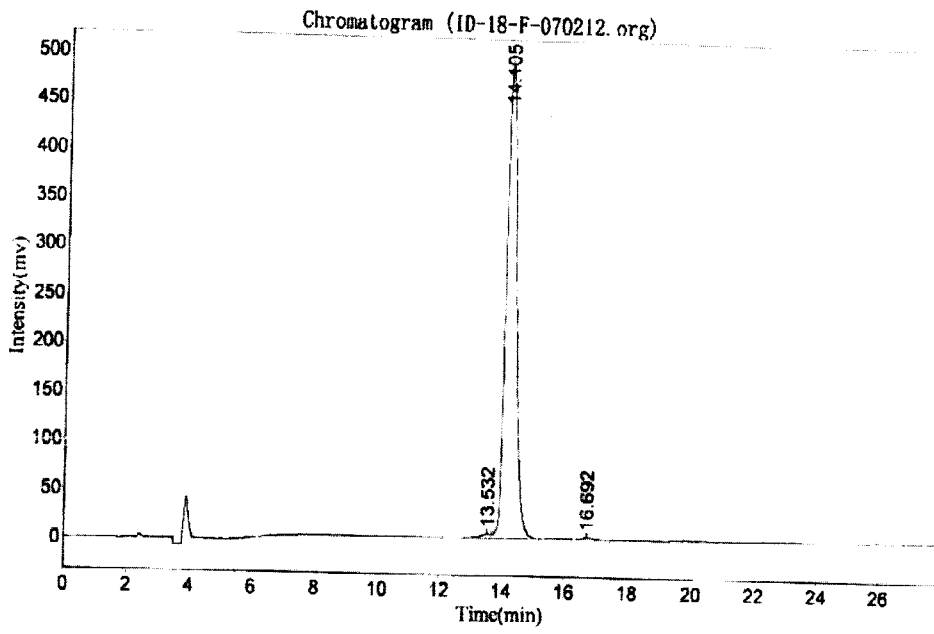


图 1

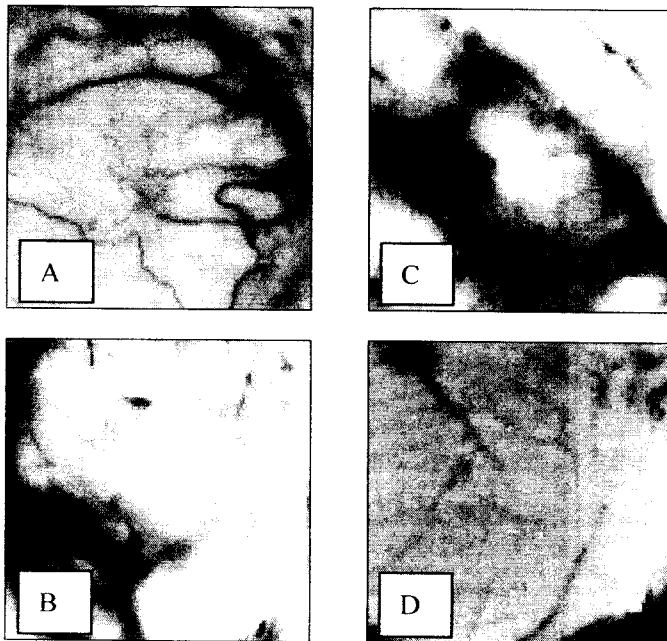


图 2

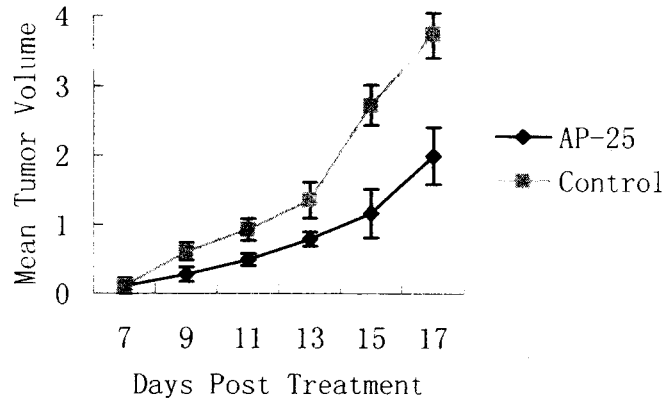


图 3

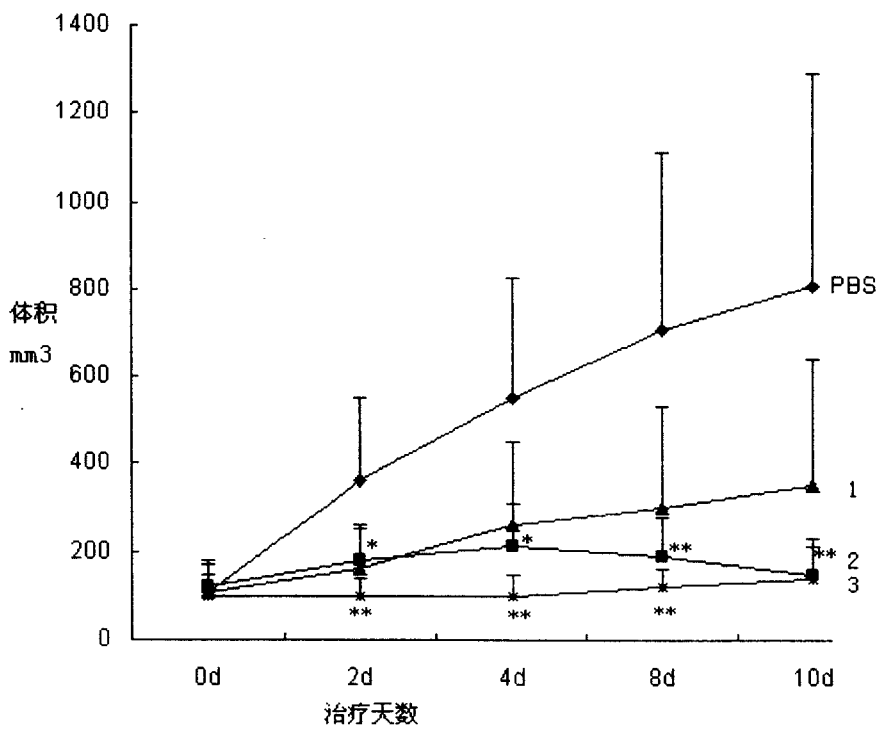


图 4