



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111358935 A

(43)申请公布日 2020.07.03

(21)申请号 202010126307.1

(22)申请日 2020.02.27

(71)申请人 广州领晟医疗科技有限公司
地址 510000 广东省广州市广州高新技术产业开发区科学城科学大道162号创意大厦B3栋第六层601单元

(72)发明人 宋燕 许元生 王华 李天然

(74)专利代理机构 广州三环专利商标代理有限公司 44202

代理人 颜希文

(51)Int.Cl.

A61K 38/16(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 35/04(2006.01)

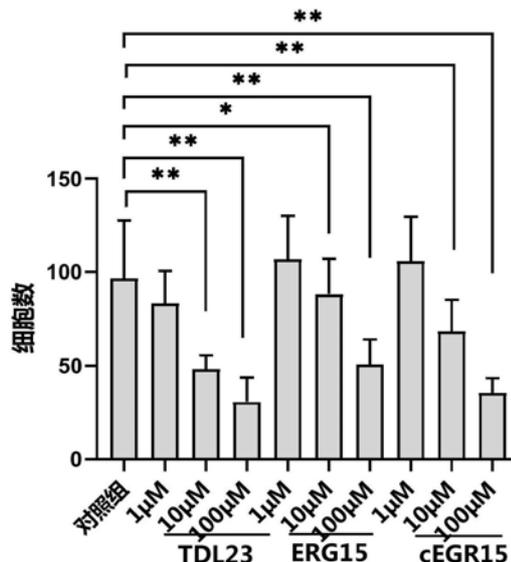
权利要求书1页 说明书4页
序列表1页 附图3页

(54)发明名称

多肽在制备抗肿瘤和/或抑制肿瘤转移药物中的用途及药物

(57)摘要

本发明公开了MEPE衍生多肽在制备抗肿瘤和/或抑制肿瘤转移药物中的用途及药物,所述MEPE衍生多肽为:SEQ ID NO:1所示的多肽或SEQ ID NO:1所示多肽的氨基酸序列中第5-19位氨基酸组成的多肽或SEQ ID NO:1所示多肽的氨基酸序列中第5-19位的氨基酸组成的多肽N末端和C末端分别添加一个Cys经环化得到的环肽。本发明提供的具有抗肿瘤和抑制肿瘤转移的多肽具有分子量小、易于合成、免疫原性低等优点,对肿瘤和肿瘤的转移具有良好的治疗效果。



1. MEPE衍生多肽在制备抗肿瘤和/或抑制肿瘤转移药物中的用途,其特征在于,所述MEPE衍生多肽为:

- a) SEQ ID NO:1所示的多肽;或
- b) SEQ ID NO:1所示多肽的氨基酸序列中第5-19位氨基酸组成的多肽;或
- c) SEQ ID NO:1所示多肽的氨基酸序列中第5-19位的氨基酸组成的多肽N末端和C末端分别添加一个Cys经环化得到的环肽。

2. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,b)所述多肽具有如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。

3. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,c)所述多肽具有如SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列。

4. 如权利要求1~3任一所述的用途,其特征在于,所述药物为液体剂型或冻干粉剂。

5. 如权利要求1~3任一所述的用途,其特征在于,所述肿瘤为肝癌、肺癌、食管癌、乳腺癌、胰腺癌、皮肤癌、子宫癌和直肠癌中的一种。

6. 如权利要求5所述的用途,其特征在于,所述肿瘤为肝癌。

7. 一种抗肿瘤和/或抑制肿瘤转移的药物,其特征在于,含有如权利要求1~7任一所述的MEPE衍生多肽。

8. 如权利要求7所述的药物,其特征在于,所述MEPE衍生多肽是所述药物中唯一或主要的有效成分。

9. 如权利要求7或8所述的药物,其特征在于,所述药物为液体剂型或冻干粉剂。

多肽在制备抗肿瘤和/或抑制肿瘤转移药物中的用途及药物

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,具体涉及MEPE衍生多肽在制备抗肿瘤和/或抑制肿瘤转移药物中的用途及药物。

背景技术

[0002] TDL23为衍生自细胞外基质磷酸糖蛋白 (MEPE) 的含23个氨基酸的肽,有报道显示,TDL23可以促进骨、软骨、牙骨的生成,可用于治疗骨与软骨相关疾病(参见专利文献1、2;非专利文献1、2、3),但尚未见TDL23用于抗肿瘤和/或抑制肿瘤转移的报道。ERG15为衍生自TDL23的多肽,由TDL23的第5-19位氨基酸组成,而cERG15是在ERG15的N末端和C末端分别添加一个Cys环化而成,同样未见ERG15和cERG15用于抗肿瘤和/或抑制肿瘤转移的报道。

[0003] 现有技术文献

[0004] 专利文献

[0005] 专利文献1:W02008091632A2

[0006] 专利文献2:CN1458935A

[0007] 非专利文献

[0008] 非专利文献1:Hayashibara等人,A synthetic peptide fragment of human MEPE stimulates new bone formation in vitro and in vivo.J Bone Miner Res.2004Mar;19 (3) :455-62.

[0009] 非专利文献2:Liu H等人,Dentonin,a fragment of MEPE,enhanced dental pulp stem cell proliferation.J Dent Res.2004Jun;83 (6) :496-9.

[0010] 非专利文献3:Sprowson AP等人,ASARM-truncated MEPE and TDL23enhance osteogenesis by promoting osteoprogenitoradhesion.J Orthop Res.2008Sep;26 (9) :1256-62.

发明内容

[0011] 基于此,针对上述技术问题,本发明的发明人通过对现有技术存的大量多肽进行筛选,意外地发现了MEPE衍生多肽SEQ ID NO:1~3所示的多肽(分别命名为TDL23、ERG15、cERG15)不仅能够抗肿瘤,而且可以抑制肿瘤的转移。

[0012] 为了实现上述发明目的,本发明采用的技术方案为:MEPE衍生多肽在抗肿瘤和/或抑制肿瘤转移药物中的用途,所述MEPE衍生多肽为:

[0013] a) SEQ ID NO:1所示的多肽,命名为TDL23;或

[0014] b) SEQ ID NO:1所示多肽的氨基酸序列中第5-19位氨基酸组成的多肽,命名为ERG15;或

[0015] c) SEQ ID NO:1所示多肽的氨基酸序列中第5-19位的氨基酸组成的多肽经末端修饰得到的多肽,命名为cERG15。

[0016] 进一步地,所述多肽ERG15具有如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。

- [0017] 进一步地,所述多肽cERG15具有如SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列。
- [0018] 进一步地,所述药物为液体剂型或冻干粉剂。
- [0019] 进一步地,所述肿瘤为肝癌、肺癌、食管癌、乳腺癌、胰腺癌、皮肤癌、子宫癌、直肠癌中的一种。
- [0020] 进一步地,所述肿瘤为肝癌。
- [0021] 本发明还提供了一种抗肿瘤和/或抑制肿瘤转移的药物,含有上述的MEPE衍生多肽。
- [0022] 进一步地,所述MEPE衍生多肽是所述药物中唯一或主要的有效成分。为了实现更好的治疗效果,可将本发明MEPE衍生多肽与现有技术常用的抗肿瘤药物联用,常用的抗肿瘤药物包括但不限于顺铂、紫杉醇、吉西他滨等。
- [0023] 进一步地,所述药物为液体剂型或冻干粉剂。
- [0024] 进一步地,所述药物还包括药学上可接受的载体。本领域的技术人员可根据药物的剂型等对药学上可接受的载体进行常规选择。
- [0025] 进一步地,所述药物中MEPE衍生多肽的有效量为0.01wt%~99.99wt%,当该药物被制成液体剂型时,优选溶剂为生理盐水。
- [0026] 本发明的发明人通过体外细胞实验证实,本发明SEQ ID NO:1~3所示的多肽在Transwell迁移试验和抗肿瘤和肿瘤转移试验中,表现出明显的抑制肝癌细胞HCCLM3的迁移,降低肝癌细胞HCCLM3转移至肺组织的病灶数量及降低肿瘤体积的作用,因此,可用于治疗肿瘤和对抗肿瘤的转移。
- [0027] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:
- [0028] 本发明提供了具有抗肿瘤和抑制肿瘤转移的多肽TDL23、ERG15、cERG15,其具有分子量小、易于合成、免疫原性低等优点,对肿瘤和肿瘤的转移具有良好的治疗效果。

附图说明

- [0029] 图1为本发明多肽的HPLC图谱,其中图1A为TDL23,图1B为ERG15,图1C为cERG15;
- [0030] 图2为本发明多肽降低肝癌细胞HCCLM3细胞迁移数量的结果图;
- [0031] 图3为本发明多肽降低肝癌细胞HCCLM3细胞迁移率的结果图;
- [0032] 图4为本发明多肽降低肿瘤体积的结果图;
- [0033] 图5为本发明多肽降低肺转移病灶数量的结果图。

具体实施方式

- [0034] 以下通过实施例形式的具体实施方式,对本发明的上述内容作进一步的详细说明。但不应将此理解为本发明上述主题的范围仅限于以下实施例。
- [0035] 实施例中,所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法,所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。
- [0036] 实施例一、多肽的合成
- [0037] 本发明多肽TDL23、ERG15和cERG15采用固相合成工艺合成,纯度>95%,TDL23、ERG15和cERG15的HPLC图谱分别为图1A、图1B和图1C,合成500mg。
- [0038] 实施例二、Transwell迁移试验

- [0039] 人高转移性肝癌细胞HCCLM3购自ATCC。
- [0040] 试验方法:将冻存的HCCLM3肝癌细胞复苏,加入含适量血清的新鲜MEM培养基,37℃、CO₂培养箱培养并传代备用。
- [0041] 收集对数生长期的HCCLM3肝癌细胞,进行药物处理:对照组用无血清RMPI-1640培养基培养;实验组分别用含不同浓度(1、10、100μM) TDL23、ERG15、cERG15的无血清RMPI-1640培养基进行处理,每组处理12小时。
- [0042] 收集各处理组细胞,计数 1×10^5 个细胞,用100μl无血清培养基重悬,加入Transwell细胞培养板的小室上室,在下室加入600μl完全培养基。
- [0043] 37℃、5%CO₂孵育24小时后,取出小室,用棉签擦去上室的细胞,4%多聚甲醛固定20min,PBS洗涤1次,结晶紫染色10min,PBS洗涤1次,显微镜下观察细胞是否穿过小孔,如有穿过终止其他实验组,并拍照统计穿过的细胞数。
- [0044] 试验结果:与对照组相比,TDL23、ERG15、cERG15均可抑制肝癌细胞HCCLM3的迁移,表现为迁移的细胞数量降低,并且呈现明显的剂量依赖性(见图2)。其中,TDL23、cERG15的中、高剂量组和ERG15的高剂量组的抑制作用具有非常显著的统计学意义($P < 0.01$),ERG15的中剂量组的抑制作用具有显著的统计学意义($P < 0.05$)。
- [0045] 划痕试验
- [0046] 6孔板中加入浓度为10μg/ml的纤维连接蛋白(fibronectin, FN) 50μl,置于4℃冰箱过夜,次日加含10%FBS的RPMI-1640培养液于紫外线下灭菌2小时备用。
- [0047] 将处于对数生长期的浓度约为 1×10^6 /ml人高转移性肝癌细胞HCCLM3制成悬液均匀接种于6孔培养板中,置于37℃、5%CO₂培养箱中常规培养。
- [0048] 倒置显微镜下观察细胞长成单层后,用丝裂霉素处理1小时,抑制细胞的分裂。用10μl无菌微量移液枪头在细胞板上划痕,划痕尽量笔直。PBS液冲洗2-3次以去除被刮下的细胞,加入无血清培养基。
- [0049] 对照组用无血清RMPI-1640培养基培养;实验组分别用含不同浓度(1、10、100μM) TDL23、ERG15、cERG15的无血清RMPI-1640培养基进行处理。置入37℃5%CO₂培养箱中继续培养,于给药处理后24小时取样,拍照。在倒置显微镜下观察划痕愈合情况。
- [0050] Image Pro-Plus 6.0软件测量各组细胞划痕任意3个部位划痕宽度,计算细胞迁移率=(0h划痕宽度-24h划痕宽度)/0h划痕宽度,以反映各组肿瘤细胞运动迁移能力,并对数据进行统计分析。
- [0051] 试验结果:与对照组相比,TDL23、ERG15、cERG15均可降低肝癌细胞HCCLM3的划痕的宽度,从而降低HCCLM3细胞的迁移率,并且呈现明显的剂量依赖性(见图3)。其中,TDL23、cERG15的中、高剂量组和ERG15的高剂量组对肝癌细胞HCCLM3迁移率的降低作用具有非常显著的统计学意义($P < 0.01$),ERG15的中剂量组对肝癌细胞HCCLM3迁移率的降低作用具有显著的统计学意义($P < 0.05$)。
- [0052] 实施例三、抗肿瘤及抗肿瘤转移作用
- [0053] 取7-8周龄雌性Balb/c裸鼠,右侧皮下接种HCCLM3细胞(5×10^6 /只)。接种后1周后,将肿瘤体积均匀的小鼠随机分为4组,分别为溶媒对照组,TDL23低、中、高剂量组,每组15只。
- [0054] 每组小鼠静脉注射给予相应的药物(生理盐水、1、3、10mg/kg的TDL23),每周两次。

隔天用卡尺测量1次肿瘤的长径和短径,并计算肿瘤体积。肿瘤体积用以下公式计算:肿瘤体积(mm^3) = 长径 \times (短径)²/2。

[0055] 治疗10周后处死动物,采集肺组织,在4℃下立即固定在4%多聚甲醛中过夜,然后进行石蜡包埋,切片,请进行用苏木精和伊红(HE)染色。显微镜下进行肺转移灶的计数。

[0056] 试验结果:与溶媒对照组相比,不同剂量的TDL23治疗均可降低肿瘤体积。治疗50天后,TDL23低、中、高剂量组的肿瘤体积分别抑制35.3%、55.8%、64.8%(见图4),其中中、高剂量组降低肿瘤体积具有非常显著的统计学意义($P < 0.01$)。

[0057] 与对照组相比,TDL23治疗可降低肝癌细胞HCCLM3转移至肺组织的病灶数量,并且呈现明显的剂量依赖性(见图5)。其中,中、高剂量组抑制肺转移灶数量的作用具有非常显著的统计学意义($P < 0.01$)。

[0058] 上述实施例仅例示性说明本发明的原理及其功效,而非用于限制本发明。任何熟悉此技术的人士皆可在不违背本发明的精神及范畴下,对上述实施例进行修饰或改变。因此,举凡所述技术领域中具有通常知识者在未脱离本发明所揭示的精神与技术思想下所完成的一切等效修饰或改变,仍应由本发明的权利要求所涵盖。

序列表

<110> 广州领晟医疗科技有限公司

<120> 多肽在制备抗肿瘤和/或抑制肿瘤转移药物中的用途及药物

<160> 3

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 1

Thr Asp Leu Gln Glu Arg Gly Asp Asn Asp Ile Ser Pro Phe Ser Gly

1 5 10 15

Asp Gly Gln Pro Phe Lys Asp

20

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 2

Glu Arg Gly Asp Asn Asp Ile Ser Pro Phe Ser Gly Asp Gly Gln

1 5 10 15

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> DISULFID

<222> (1) .. (17)

<400> 3

Cys Glu Arg Gly Asp Asn Asp Ile Ser Pro Phe Ser Gly Asp Gly Gln

1 5 10 15

Cys

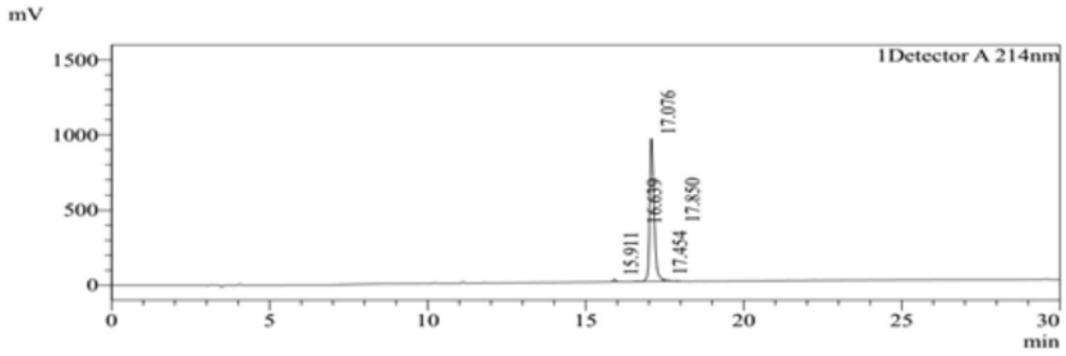


图1A

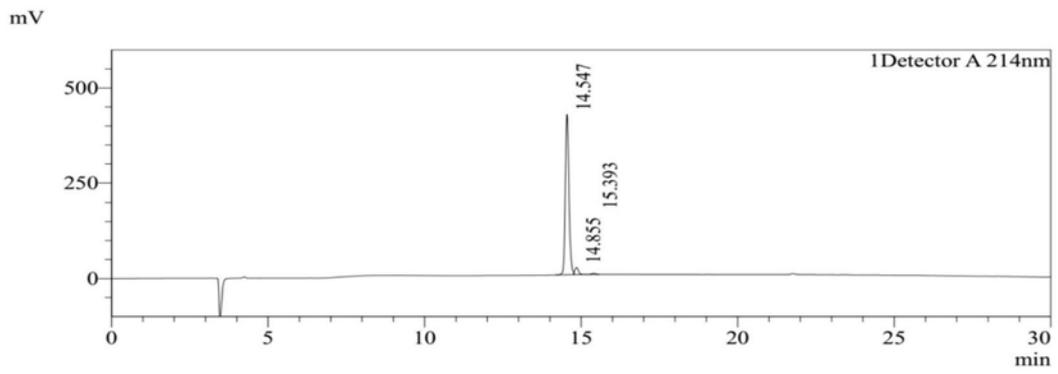


图1B

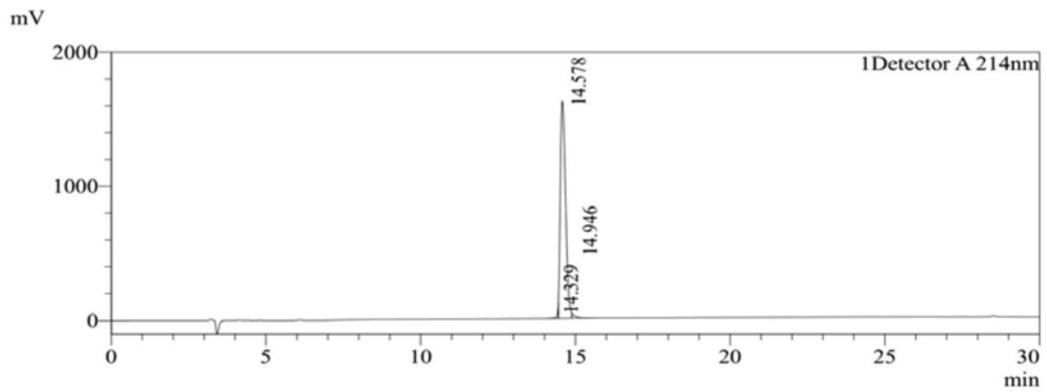


图1C

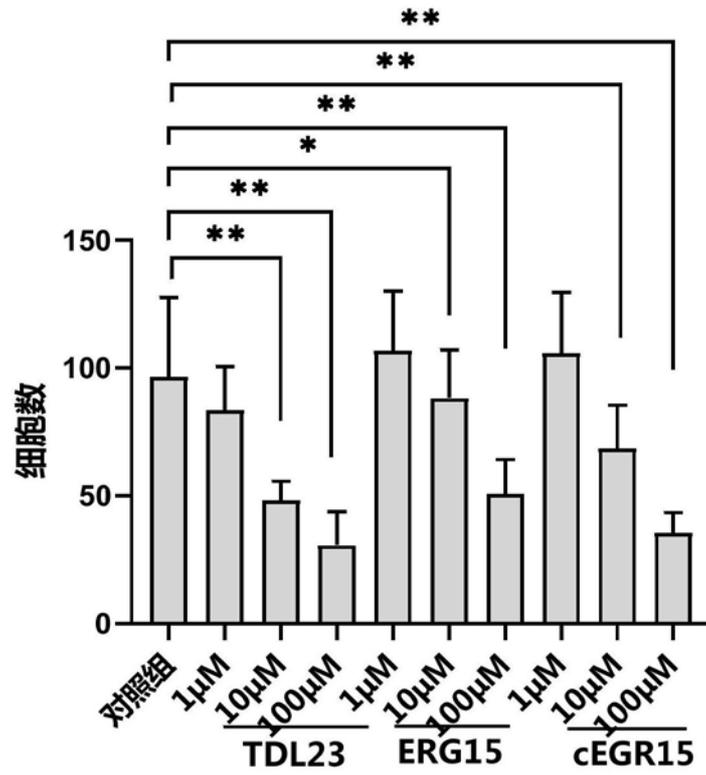


图2

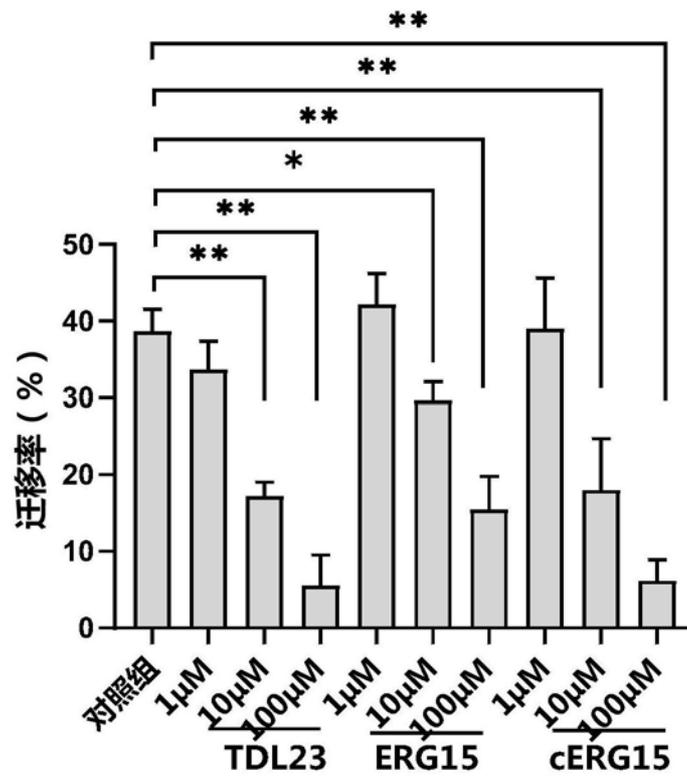


图3

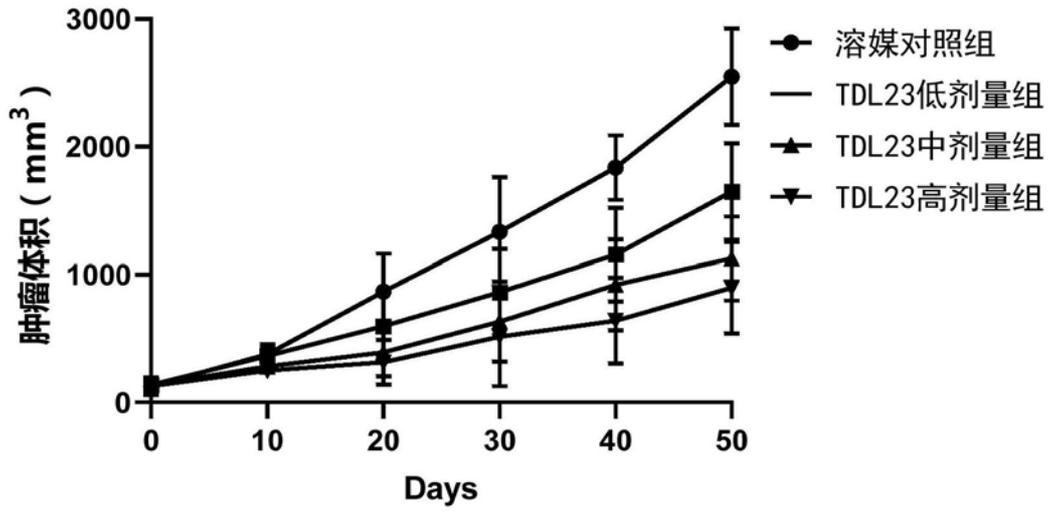


图4

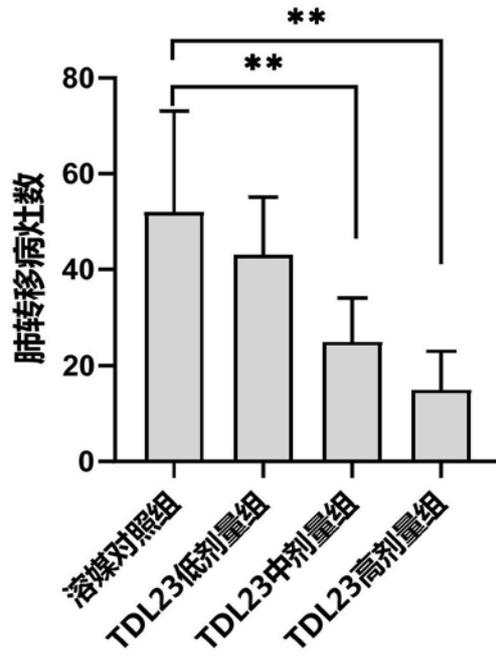


图5