

## (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2018年11月15日(15.11.2018)



(10) 国际公布号  
WO 2018/205622 A1

(51) 国际专利分类号:  
C07K 14/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)  
A61K 38/16 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2017/116865

(22) 国际申请日: 2017年12月18日(18.12.2017)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:  
201710333079.3 2017年5月12日(12.05.2017) CN

(71) 申请人: 北京康明海慧生物科技有限公司(BEIJING COMINGHEALTH BIO TEC CO., LTD)  
[CN/CN]; 中国北京市朝阳区北辰西路8号北辰世纪中心A座952, Beijing 100101 (CN)。

(72) 发明人: 胡俊(HU, Jun); 中国北京市朝阳区北辰西路1号院3号, Beijing 100101 (CN)。 孟颂东(MENG, Songdong); 中国北京市朝阳区北辰西路1号院3号, Beijing 100101 (CN)。 杨哲(YANG, Zhe); 中国北京市朝阳区北辰西路8号北辰世纪中心A座952, Beijing 100101 (CN)。 杨博(YANG, Bo); 中国北京市朝阳区北辰西路8号北辰世纪中心A座952, Beijing 100101 (CN)。 吴飏(WU, Biao); 中国北京市朝阳区北辰西路8号北辰世纪中心A座952, Beijing 100101 (CN)。 丁筠(DING, Yun); 中国北京市朝阳区北辰西路1号院3号, Beijing 100101 (CN)。

(74) 代理人: 北京纪凯知识产权代理有限公司(JEEKAI & PARTNERS); 中国北京市丰台区广安路9号国投广场5号楼15A, Beijing 100055 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(54) Title: PEGYLATED POLYPEPTIDE HAVING TUMOR INHIBITION FUNCTION, PREPARATION METHOD THEREFOR AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 具有抑制肿瘤功能的PEG化多肽及其制备方法与应用

(57) Abstract: The present invention provides a PEGylated polypeptide having a tumor inhibition function, a preparation method therefor and application thereof. The PEGylated polypeptide is obtained by modifying a PIBC polypeptide (SEQ ID NO:1) with PEG. The modification is implemented by forming a carbon-sulfur single bond by subjecting a first compound and a second compound to Michael addition reaction. The first compound is PEG having one end modified with maleimide, and the second compound is a PIBC having an N-end or C-end into which a cysteine residue containing sulfydryl is introduced; the Michael addition reaction occurs between the maleimide and the sulfydryl. The PEGylated polypeptide of the present invention not only remains the PIBC to inhibit the activity of heat shock protein gp96, but also extends the in vivo half-life of the PIBC.

(57) 摘要: 本发明提供了一种具有抑制肿瘤活性的PEG化多肽及其制备方法与应用。所述的PEG化多肽利用PEG修饰PIBC多肽(SEQ ID NO: 1)而得到, 该修饰通过利用化合物甲与化合物乙进行Michael加成反应形成碳硫单键实现, 化合物甲为一端修饰有马来酰亚胺的PEG, 化合物乙为N端或C端引入含有巯基的半胱氨酸残基的PIBC; Michael加成反应发生在马来酰亚胺与巯基间。本发明的PEG化多肽在保留了PIBC抑制热休克蛋白gp96活性的同时, 延长了PIBC的体内半衰期。

WO 2018/205622 A1

## 具有抑制肿瘤功能的 PEG 化多肽及其制备方法与应用

### 技术领域

5 本发明涉及生物技术领域中，具有抑制肿瘤功能的PEG化多肽及其制备方法与应用。

### 背景技术

10 根据全国肿瘤登记中心发表的《2015 中国癌症统计数据报告》显示，乳腺癌是中国女性发病率最高的癌症类型，其发病率正以每年 3%的速度递增，成为城市中死亡率增长最快的癌症。目前乳腺癌主要治疗方法包括手术、化疗、内分泌以及靶向治疗。靶向治疗具有定位准确，针对性强，毒副反应小等特点，能够明显地延长患者的生存期，提高患者的生存质量，尤其适于晚期病人或无法耐受放、化疗的患者。现有的乳腺癌的靶向治疗主要针对的是 HER2 阳性乳腺癌，其靶向药物 Trastuzumab（即赫塞汀）是一种人源化的 HER2 单克隆抗体，对 HER2 基因扩增和过表达的乳腺癌病人，trastuzumab 单独应用或与其它药物  
15 联合应用有效率可分别达到 25%或 50%，赫塞汀目前已成为乳腺癌等治疗的一线药物，销售额位居肿瘤生物治疗药物前列。而 HER2 阳性的乳腺癌患者仅占乳腺癌患者总数的 20%左右，因此急需寻找新的乳腺癌靶点，开发出更为广谱的抗乳腺癌靶向药物。

20 热休克蛋白 gp96 属于 HSP90 家族的成员，在正常生理条件下定位于细胞内质网中，与细胞质 HSP90 高度同源。与其它热休克蛋白一样，gp96 的主要生物学功能是分子伴侣。它参与新生蛋白的折叠，转运，降解及多聚体的组装，抑制错误折叠蛋白的分泌等。与其他分子伴侣不同，gp96 能结合的蛋白、多肽链种类有限，更具选择性。目前已经报道的已有 20 多种蛋白的成熟需要 gp96 的参与，这些研究揭示 gp96 作为分子伴侣的调控作用，与多个客户蛋白形成蛋白质复合物，其介导的调控网络对于多个肿瘤蛋白发挥功能至关重要。除了定位  
25 于内质网中，gp96 蛋白还存在于某些细胞表面。越来越多的研究发现，gp96 在多种癌细胞的膜表面有过表达现象，暗示着其与癌症的发生发展存在某种联系。孟颂东等研究发现内质网中的 gp96 位移至细胞膜上发挥核心脚手架蛋白的调控作用，与多个客户蛋白形成蛋白质机器复合物，对于多个肿瘤蛋白发挥功能至关重要，与乳腺癌的恶性程度与不良预后密切相关。细胞膜上 gp96 可能是乳腺癌治疗的新靶点。  
30

中国专利 ZL 201110159487.4 基于热休克蛋白 gp96 氨基酸序列及空间构象，通过一系列技术分析和手段，设计开发含有  $\alpha$ -螺旋序列的多肽 PIBC（Peptide Inhibitor for Breast Cancer），该多肽能与热休克蛋白 gp96 结合，干扰 gp96  
35 与肿瘤相关受体 HER-2 的相互作用并降低其稳定性、促进 HER-2 在肿瘤细胞中的降解，该多肽能够降低乳腺癌患者的肿瘤组织中 HER2、uPAR、ER- $\alpha$ 36 的蛋白含量，从而实现抗乳腺癌的临床疗效。

虽然多肽类药物的作用位点专一、疗效确切，但溶解度低、免疫原性高、易被蛋白酶降解和被肾脏清除等缺陷严重地制约了其临床应用。

**发明公开**

本发明所要解决的技术问题是如何抑制肿瘤，尤其是乳腺癌肿瘤。

5 为解决上述技术问题，本发明首先提供了具有抑制肿瘤功能的 PEG 化多肽。  
 本发明所提供的 PEG 化多肽，为利用 PEG 修饰名称为 PIBC 的多肽得到的化合物；

PIBC 为 A1) 或 A2) 所述的多肽：A1) 序列表中 SEQ ID No. 1 所示多肽；A2) 将序列表中的 SEQ ID NO. 1 中的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代  
 10 和/或缺失和/或添加且具有相同功能的由 A1) 衍生的多肽。

上述 PEG 化多肽中，所述修饰可通过利用化合物甲与化合物乙进行 Michael 加成反应形成碳硫单键实现；

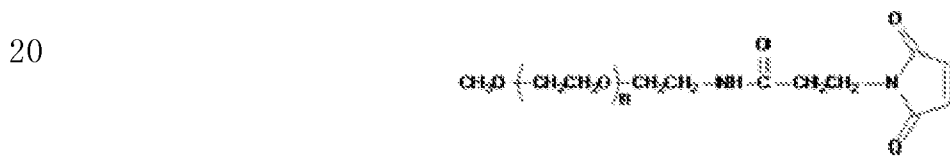
所述化合物甲为一端修饰有马来酰亚胺的 PEG；

所述化合物乙为 N 端或 C 端引入含有巯基氨基酸残基的 PIBC；

15 所述 Michael 加成反应发生在马来酰亚胺与巯基间。

所述化合物甲中，PEG 的另一端（即非连接马来酰亚胺的一端）可连接有甲氧基。所述含有巯基氨基酸残基可为半胱氨酸残基。

所述化合物甲可如式 V 所示；

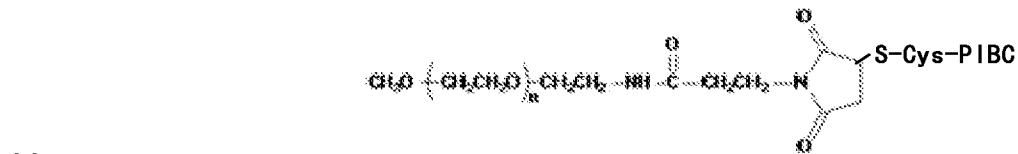


式 V ;

式 V 中，n 为非零自然数。

25 所述化合物乙可为 SEQ ID NO. 2 或 SEQ ID NO. 3 所示的多肽。

所述 PEG 化多肽具体可为式 I 所示化合物：



式 I

式 I 中，n 为非零自然数；

Cys 与 PIBC 通过 Cys 的羧基与 PIBC 的 N 末端氨基形成的肽键或通过 Cys 的氨基与 PIBC 的 C 末端羧基形成的肽键相连。

PEG 的分子式为  $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$ , PEG 的分子量为 2000~5000, 式 V 和式 I 中的  $n$  与 PEG 分子式中的  $n$  的定义相同, 即  $n$  满足使 PEG 的分子量为 2000~5000 的条件。

所述化合物甲具体可为北京键凯科技有限公司产品。

5 为解决上述技术问题, 本发明还提供了所述 PEG 化多肽的制备方法。

本发明所提供的 PEG 化多肽的制备方法, 包括: 利用所述化合物甲与所述化合物乙进行 Michael 加成反应得到所述 PEG 化多肽;

所述 Michael 加成反应发生在马来酰亚胺与巯基间。

为解决上述技术问题, 本发明还提供了所述 PEG 化多肽的下述任一应用:

10 M1) 在制备与 gp96 蛋白结合的产品中的应用;

M2) 在制备治疗和/或预防 gp96 蛋白所致疾病产品中的应用;

M3) 在制备抑制肿瘤细胞增殖和/或生长和/或侵袭产品中的应用;

M4) 在制备促进肿瘤细胞凋亡产品中的应用;

M5) 在制备抑制肿瘤生长产品中的应用。

15 上述应用中, 所述 gp96 蛋白可为下述 B1) 或 B2):

B1) 序列表中 SEQ ID No. 4 所示多肽;

B2) 将序列表中的 SEQ ID NO. 4 中的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加且具有相同功能的由 B1) 衍生的多肽。

M2) 中所述 gp96 蛋白所致疾病为肿瘤。

20 上述应用中, M2) 中所述 gp96 蛋白所致疾病可为乳腺癌。M3) 和 M4) 中所述肿瘤细胞均可可为乳腺癌肿瘤细胞, M5) 中所述肿瘤可为乳腺癌。

为解决上述技术问题, 本发明还提供了具有如下 N1) - N3) 中任一功能的产品, 所述产品含有所述 PEG 化多肽;

N1) 抑制肿瘤细胞增殖和/或生长和/或侵袭;

25 N2) 促进肿瘤细胞凋亡;

N3) 抑制肿瘤生长。

上述产品中, N1) 和 N2) 中所述肿瘤细胞均可可为乳腺癌肿瘤细胞。N3) 中所述肿瘤可为乳腺癌。

30 本发明中, 所述乳腺癌细胞均可可为乳腺癌细胞 SKBr3。所述肿瘤均可可为乳腺癌细胞 MDA-MB-231 引发的肿瘤。

### 附图说明

图 1 为 PEG 化多肽 mPEG<sub>2000</sub>CY 的质谱鉴定结果图。

图 2 为 PEG 化多肽 mPEG<sub>5000</sub>CY 的质谱鉴定结果图。

图 3 为 PEG 化多肽 mPEG<sub>2000</sub>LC 的质谱鉴定结果图。

图 4 为 PEG 化多肽 mPEG<sub>5000</sub>LC 的质谱鉴定结果图。

图 5 为昆虫细胞表达系统表达的分泌型人热休克蛋白 gp96 的鉴定图谱；1：分子量标准；2：纯化后的 gp96 蛋白；3：gp96 蛋白的 western blot 结果。

图 6 为 PIBC 及 mPEG<sub>2000</sub>CY 处理组的肿瘤抑制率。

5 **实施发明的最佳方式**

下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细描述，给出的实施例仅为了阐明本发明，而不是为了限制本发明的范围。下述实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法。下述实施例中所用的材料、试剂、仪器等，如无特殊说明，均可从商业途径得到。以下实施例中的定量试验，均设置三次重复实验，  
10 结果取平均值。

PBS缓冲液：8g NaCl、0.2g KCl、3.625g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O、0.24g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，加水至1L，调pH7.3。5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>：1.7907g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O，用去离子水定容至1L。  
5mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>：0.78g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O，用去离子水定容至1L。

质谱采用VG PLATFORM 质谱仪，用MALDI-TOF 技术进样。

15 下述实施例中如无特殊说明，所述液体与液体的比值为体积与体积比；所述固体与液体的比值为物质的量与体积比，所述物质的量以mmol 计，所述体积以ml 计；所述固体与固体的比值为质量与质量比。

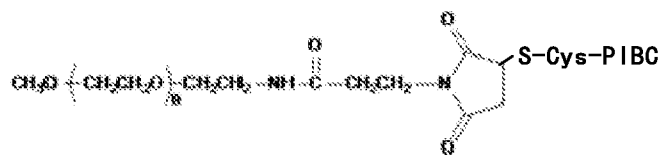
下述实施例中如无特殊说明，所述室温反应具体为将反应温度控制在20-30℃范围内，包括20℃和30℃。

20

本发明的具有抑制肿瘤功能的化合物，为利用 PEG 修饰名称为 PIBC 的多肽得到的 PEG 化多肽，该修饰通过利用化合物甲与化合物乙进行 Michael 加成反应形成碳硫单键实现，化合物甲为一端连接有马来酰亚胺的 PEG，化合物乙为 N 端或 C 端引入含有巯基氨基酸残基的 PIBC，PIBC 为序列表中 SEQ ID No.1 所示多肽，SEQ ID NO.1 的第 1 位为 PIBC 的 N 端氨基酸残基；Michael 加成反应发生在马来酰亚胺与巯基间；  
25 发生在马来酰亚胺与巯基间；

本发明的 PEG 化多肽的结构式为式 I：

30



式 I

式 I 中，n 为非零自然数；PEG 的分子量为 2000~5000，PEG 的分子式为 HO(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>H；

35 Cys 与 PIBC 通过 Cys 的羧基与 PIBC 的 N 端氨基形成的肽键或通过 Cys 的氨基与 PIBC 的 C 端羧基形成的肽键相连。

下面具体以 PEG 的分子量为 2000 和 5000 为例，具体阐述本发明的 PEG 化多肽的制备方法和功能。

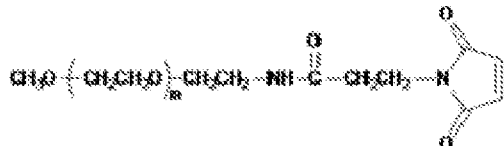
#### 实施例1、PEG化多肽mPEG<sub>2000</sub>CY 的制备

##### 5 (一) 多肽的获得

将在序列表中SEQ ID NO. 1所示PIBC的N端添加半胱氨酸得到的多肽记为CY，CY的氨基酸序列如序列表中SEQ ID NO. 2 所示，由吉尔生化（上海）有限公司合成SEQ ID NO. 2所示的多肽CY。

##### 10 (二) 多肽的PEG化修饰

原料：mPEG<sub>x</sub>Mal（甲氧基聚乙二醇马来酰亚胺，x为PEG的平均分子量；Mal表示马来酰亚胺，马来酰亚胺修饰在PEG的一端；m表示甲氧基，甲氧基连接在PEG的另一端）。其化学结构式如式V所示：



15

式V

PEG的分子式为HO(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>H，式I、式V的n与PEG分子式中的n的定义均相同。将mPEG<sub>x</sub>Mal（x=2000，即PEG的平均分子量为2000，mPEG<sub>2000</sub>Mal，北京键凯科技有限公司产品）通过化学选择性极高的Michael加成反应与多肽CY的N端氨基酸半胱氨酸的巯基进行加成反应，得到mPEG<sub>2000</sub>CY。

20

##### 1、mPEG<sub>2000</sub>CY的合成：

20 毫克(0.01 mmol)mPEG<sub>2000</sub>Mal与10 毫克(0.002 mmol)多肽CY 的混合物溶于10 毫升5 mM 的NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>缓冲溶液中，用5mM 的Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>溶液调节反应溶液pH值至7.2，HPLC监测反应，直至多肽反应完全。

25

##### 2、PEG 化多肽mPEG<sub>2000</sub>CY 的纯化及表征

采用HiTrap SP FF（1ml）大量纯化mPEG<sub>2000</sub>CY，洗脱液为流动相A1液和流动相B1液，A1液由溶质和溶剂组成，溶剂为20 mM Tris-HCl（pH7.4），溶质及其浓度为1 mM EDTA·2Na 和0.01%（质量百分比浓度）NaN<sub>3</sub>；B1液由溶质和溶剂组成，溶剂为20 mM Tris-HCl（pH7.4），溶质及其浓度为1000 mM NaCl、1 mM EDTA·2Na 和0.01%（质量百分比浓度）NaN<sub>3</sub>。洗脱条件为：先用A1液和B1液的体积比分别为80%和20%的混合液冲平，再用A1液和B1液的体积比分别为67%和33%的混合液洗脱收集样品。当吸光值开始升高时则开始收集样品。将收集到的样品用Millipore超滤离心管（3KDa）4℃，3500r/min离心浓缩至500微升。浓缩后的样本用HiTrap Desalting（5ml）进行脱盐处理。冻干溶剂后得到的蓬松状态的PEG化多肽mPEG<sub>2000</sub>CY纯品。

35

mPEG<sub>2000</sub>CY化学结构由MALDI-TOF质谱进行表征，mPEG<sub>2000</sub>CY的质谱表征结果见

图1。mPEG<sub>2000</sub>CY的结构式如式I所示。此时，式I中Cys与PIBC通过Cys的羧基与PIBC的N端氨基酸残基的氨基形成的肽键相连。

mPEG<sub>2000</sub>CY纯度由分析型高效液相色谱仪（流速：1ml/min）给出。分析型高效液相色谱仪的型号：安捷伦1200，所采用色谱柱的型号：Agilent Eclipse XDB-C18 Analytical, 5 μm, 4.6×150006Dm。色谱操作条件：线性梯度洗脱，  
5 洗脱液由流动相A2液和流动相B2液组成。流动相A2液为三氟乙酸体积百分浓度为0.1%的三氟乙酸水溶液，流动相B2液为三氟乙酸体积百分浓度为0.1%的三氟乙酸乙腈溶液。线性梯度洗脱B2液的体积百分比由40%匀速升至65%，A2液的体积百分比由60%匀速降至35%，洗脱时间11分钟，洗脱流速为每分钟1 毫升，紫  
10 外检测波长220 纳米。分析型高效液相色谱仪检测结果显示，所得mPEG<sub>2000</sub>CY的纯度为93.4%。

### 实施例2、PEG 化多肽mPEG<sub>5000</sub>CY的制备

将mPEG<sub>x</sub>Mal（x=5000，即PEG的平均分子量为5000，mPEG<sub>5000</sub>Mal，北京键凯  
15 科技有限公司产品）通过化学选择性极高的Michael加成反应与多肽CY的N端氨基酸半胱氨酸的巯基进行加成反应，得到mPEG<sub>5000</sub>CY。

mPEG<sub>5000</sub>CY按照实施例1中步骤（二）中1的方法制备，将mPEG<sub>2000</sub>Mal替换为  
mPEG<sub>5000</sub>Mal，进行反应，直至多肽反应完全。

采用安捷伦1200 反相高效液相色谱仪对按照上述步骤所得的反应产物进  
20 行纯化。色谱柱型号：Agilent Eclipse XDB-C18 Semi-Prep, 5 μm, 9.4×250mm。色谱操作条件：线性梯度洗脱，洗脱液由实施例1的A2液和B2液组成。线性梯度洗脱B2液的体积百分比由30%匀速升至52%B，A2液的体积百分比由70%匀速降至48%，洗脱时间11 分钟，洗脱流速为每分钟2.5毫升，紫外检测波长220 纳米。冻干溶剂后得到的蓬松状态的PEG化多肽mPEG<sub>5000</sub>CY纯品。

mPEG<sub>5000</sub>CY的MALDI-TOF 质谱表征结果见图2。mPEG<sub>5000</sub>CY的结构式如式I所示。  
25 此时，式I中Cys与PIBC通过Cys的羧基与PIBC的N端氨基酸残基的氨基形成的肽键相连。

mPEG<sub>5000</sub>CY纯度分析同实施例1所述，不同的是线性梯度洗脱B2液的体积百分比由20%匀速升至100%，A2液的体积百分比由80%匀速降至0，洗脱时间25 分钟。  
30 分析型高效液相色谱仪检测结果显示，所得mPEG<sub>5000</sub>CY的纯度为95.3%。

### 实施例3、PEG 化多肽mPEG<sub>2000</sub>LC 的制备

将在序列表中SEQ ID NO. 1所示PIBC的C端添加半胱氨酸得到的多肽记为LC，  
LC的氨基酸序列如序列表中SEQ ID NO. 3所示，由吉尔生化（上海）有限公司合  
35 成SEQ ID NO. 3所示的多肽LC。

将mPEG<sub>x</sub>Mal（x=2000，即PEG的平均分子量为2000，mPEG<sub>2000</sub>Mal，北京键凯  
科技有限公司产品）通过化学选择性极高的Michael 加成反应与多肽LC 的C端

氨基酸半胱氨酸的巯基进行加成反应，即得到mPEG<sub>2000</sub>LC，mPEG<sub>2000</sub>LC的制备、纯化和表征的具体过程同实施例1中步骤（二）所述，不同的是将实施例1中的多肽CY换成多肽LC，得到蓬松状态的PEG化多肽mPEG<sub>2000</sub>LC。mPEG<sub>2000</sub>LC的MALDI-TOF质谱表征结果见图3。分析型高效液相色谱仪检测结果显示，所得mPEG<sub>2000</sub>LC的纯度为94.7%。mPEG<sub>2000</sub>LC的结构式如式I所示。此时，式I中Cys与PIBC通过Cys的氨基与PIBC的C端氨基酸残基的羧基形成的肽键相连。

#### 实施例4、PEG化多肽mPEG<sub>5000</sub>LC的制备

将mPEG<sub>x</sub>Ma1（x=5000）（北京键凯科技有限公司）通过化学选择性极高的Michael加成反应与多肽LC的C端氨基酸半胱氨酸的巯基进行加成反应，即得PEG化多肽mPEG<sub>5000</sub>LC，mPEG<sub>5000</sub>LC的制备、纯化和表征的具体过程同实施例1中步骤（二）所述，不同的是将实施例1中的mPEG<sub>x</sub>Ma1（x=2000）换成mPEG<sub>x</sub>Ma1（x=5000），多肽CY换成多肽LC，得到蓬松状态的PEG化多肽mPEG<sub>5000</sub>LC。mPEG<sub>5000</sub>LC的MALDI-TOF质谱表征结果见图4。分析型高效液相色谱仪检测结果显示，所得PEG5KDYC的纯度为92.2%。mPEG<sub>5000</sub>LC的结构式如式I所示。此时，式I中Cys与PIBC通过Cys的氨基与PIBC的C端氨基酸残基的羧基形成的肽键相连。

#### 实施例5、gp96蛋白与PEG化多肽的相互作用

gp96蛋白（人热休克蛋白；GENBANK ACCESSION NO. AY040226）的氨基酸序列如序列表的SEQ ID NO. 4所示，其编码序列如SEQ ID NO. 5所示。

##### 一、pFastBac<sup>™</sup>1-gp96质粒的构建

1、gp96引物的设计与合成：以GenBank中人gp96基因的序列为模板，在gp96基因5'端加入BamHI酶切位点，3'端加入XbaI酶切位点。正向引物序列为：5'-CGggattcATGGACGATGAAGTTGATGTGGAT-3'；反向引物序列为：5'-GCTCTAGATTAGAATTCATCTTTTCAGCTG-3'。

2、提取人肝癌细胞HepG2的mRNA，反转录合成cDNA。

3、以步骤1.2中获取的cDNA为模板，采用步骤1设计的引物通过聚合酶链式反应（PCR）扩增目的基因，得到PCR产物，即为gp96基因。

4、用EcoRI和XbaI双酶切步骤3获得的PCR产物，回收大小约为2400 bp的酶切产物。

5、用EcoRI和XbaI双酶切pFastBac<sup>™</sup>1空载质粒（Invitrogen，产品目录号为10359-016），回收回收得到大小约为4700 bp的骨架载体。

6、将步骤4获得的大小约为2400 bp的酶切产物和步骤5获得的大小约为4700 bp的载体骨架连接，得到重组载体，将序列正确的重组载体命名为pFastBac<sup>™</sup>1-gp96。重组载体pFastBac<sup>™</sup>1-gp96为将pFastBac<sup>™</sup>1载体的EcoRI和XbaI识别序列间的DNA片段替换为序列表中序列2所示的DNA分子，且保持pFastBac<sup>™</sup>1载体的其他序列不变得到的载体。重组质粒pFastBac<sup>™</sup>1-gp96表达



gp96蛋白，gp96蛋白的氨基酸序列如序列表中SEQ ID NO. 4所示。

## 二、昆虫细胞表达gp96重组蛋白及gp96蛋白的纯化

利用Cellfectin II reagent(Life technologies, 货号: 10362-100)将步骤一的pFastBac™1-gp96转染到Sf9细胞(Invitrogen, 产品目录号为11496-015)中。将转染阳性质粒的Sf9细胞培养72h, 通过细胞病变情况表明含有重组的一代杆状病毒(P1)已经释放到培养基中, 收取细胞上清获得P1毒。加适量P1到Sf9单层( $1 \times 10^6$ 细胞/mL)细胞中, 27°C, 培养72h, 4000 rpm离心5min, 收取上清获得二代毒(P2)。将适量P2毒加到100ml Sf9 ( $1.6 \times 10^6$ 细胞/mL)的悬浮细胞中27°C, 100-120 rpm/min培养72h, 扩增获得三代毒(P3)。将P3毒利用大鼠抗gp96抗体(santa cruz, 产品号sc-56399)作为一抗进行western blotting, 结果表明gp96蛋白在Sf9细胞中表达。

随后, 在新鲜的Sf9细胞( $1.5 \times 10^6$ 细胞/mL, 300ml)中加入适量P3毒, 27°C, 100-120 rpm/min 在Insect-XPRESS™ Protein-free Insect Cells medium with L-Glutamine(Catalog No:12-730Q)培养基中进行悬浮培养。72小时后, 将悬浮培养的培养液7000 rpm离心20分钟得到清澈的上清液, 将上清液经过0.22 mm滤膜滤过后, 经过HiTrap Q HP柱, Superdex 200 10/300 GL离子柱纯化后得到纯化产物。将纯化产物经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和Western blot免疫印迹试验(所用一抗为大鼠抗gp96抗体(santa cruz, 产品号sc-56399))进行鉴定(图5), 确定纯化产物中含有高纯度的gp96蛋白。利用超滤管将上述纯化产物中溶剂替换为PBS缓冲液, 并浓缩, 采用BCA法测定蛋白浓度, 最后将蛋白分装, 贮存于-80°C。

## 三、gp96蛋白与PEG化多肽片段的相互作用

通过Biacore方法分别检测实施例1-4制备的PEG化多肽片段与gp96蛋白之间的相互作用。检测所用仪器为Biacore3000系统, 使用CM5传感芯片, 按说明书将步骤二的gp96蛋白通过氨基偶联固化在CM5传感芯片上, 具体方法如下: 采用过滤并除气的HBS缓冲盐溶液(10mmol/L HEPES, 0.15mol/L NaCl, 3.4mol/L EDTA, 0.05%P-20; pH7.4)作为流动相溶液, 将CM5传感器芯片模块嵌入BIAcore系统; 设定流过流动池的流速为5 $\mu$ L/min; 用0.2mol/L的N-乙基-N-二甲基-氨基丙基碳二亚胺和0.05mol/L的N-羟基琥珀酰亚胺等体积混合溶液活化CM5传感芯片表面7min; 注射35 $\mu$ L 1mg/mL的gp96蛋白到活化表面, 使之与CM5传感芯片表面结合; 注射35 $\mu$ L乙醇胺使过量的反应基团失活; 快速注射10 $\mu$ L 20mmol/L的HCl, 然后用Extraclean除去非共价结合型材料; 通过在开始注射gp96蛋白前放置第1个基线报道点, 并在注射20mmol/L HCl结束后2min放置第2个报道点, 来测定结合gp96蛋白的水平; 设定结合gp96的流通池为检测通道, 未结合gp96蛋白的流通池为参比通道, HBS缓冲溶液为流动相, 流通池的流速为10 $\mu$ L/min; 同时将待测物注入gp96蛋白流通池和参比流通池, 使结合反应在22-24°C, pH7.4的条件下进行; 注射10 $\mu$ l 实施例1-4中

的一种 PEG 化多肽片段或 PIBC(使用含 1mg/mL 羧甲基葡聚糖的 HBS 缓冲液稀释)检测;快速注射 10 μL 20 mmol/L 的 HCl,用 Extraclean 再生 gp96 蛋白表面;再次注射 10 μL PEG 化多肽片段,重复此循环,以测定其结合到 gp96 蛋白表面的重现性。按上述步骤,分别检测不同浓度级别(156, 312, 625, 1250, 2500 nmol/L)的多肽片段,每一浓度级别重复测定 1 次。

实施例 1-4 的 PEG 化多肽片段与 gp96 蛋白的结合系数  $K_D$ (mM/L)见表 1。

表 1 PEG 化多肽与 gp96 结合反应的系数

多肽	结合系数 $K_D$ (mM/L)
PIBC	0.633
mPEG <sub>2000</sub> CY	0.690
mPEG <sub>5000</sub> CY	0.732
mPEG <sub>2000</sub> LC	0.754
mPEG <sub>5000</sub> LC	0.823

结果表明,实施例 1-4 的 PEG 化多肽与 gp96 蛋白均有亲和力,其中 mPEG<sub>2000</sub>CY 结合能力最强。

实施例 6、PEG 化多肽对乳腺癌细胞 SKBr3 的作用效果

乳腺癌细胞 SKBr3: ATCC (American type culture collection)产品,产品号为 HTB-30。分别将实施例 1-4 制备的 PEG 化多肽片段进行如下实验:

一、PEG 化多肽抑制乳腺癌细胞 SKBr3 增殖

通过 CCK-8 试剂盒(日本同仁化学研究所,货号 CK04-05)分别检测各个 PEG 化多肽片段对乳腺癌细胞 SKBr3 增殖的抑制作用。具体操作步骤如下:

- 1、将 SKBr3 细胞铺到 96 孔板中,汇合度为 50%左右。每组细胞设三个复孔。
- 2、待细胞贴壁后,加入 PEG 化多肽(终浓度 6μM)做为实验组,设三个不加多肽的孔为对照组。
- 3、在不同的时间检测点(0, 3, 6, 12 小时),每孔中加入 CCK-8 检测试剂 10μl, 37℃孵育 2 小时。
- 4、测定 490nm 的 OD 值。

细胞生长抑制率计算公式为: (对照组 OD<sub>490</sub> 平均值-实验组 OD<sub>490</sub> 平均值) / 对照组 OD<sub>490</sub> × 100%。各个 PEG 化多肽片段处理组的细胞生长抑制率(平均值)见表 2。

表 2 PEG 化多肽处理的细胞生长抑制率

多肽	抑制率
----	-----

PIBC	72%
mPEG <sub>2000</sub> CY	61%
mPEG <sub>5000</sub> CY	32%
mPEG <sub>2000</sub> LC	46%
mPEG <sub>5000</sub> LC	23%

结果表明，实施例 1-4 的 PEG 化多肽能显著抑制乳腺癌细胞 SKBr3 增殖（生长），其中 mPEG<sub>2000</sub>CY 抑制效果最明显。

二、PEG 化多肽抑制乳腺癌细胞 SKBr3 的侵袭力

利用 Transwell plate (Corning 公司, 产品号 # 3422) 和 Matrigel (BD 公司, 产品号 354234) 分别检测实施例 1-4 的 PEG 化多肽对乳腺癌细胞 SKBr3 侵袭能力的影响。细胞侵袭实验根据 Transwell 和 Matrigel 说明书进行操作。主要操作步骤如下：

1、实验前一天在冰上过夜冻融 Matrigel，在 Transwell 上层小室中加入 60 μl 的 Matrigel，37℃ 包被 1 小时，PBS 缓冲液洗涤 2 次。

2、将已消化计数好的乳腺癌细胞 SKBr3 用 PIBC 及实施例 1-4 的 PEG 化多肽的无血清培养液（终浓度为 6 μM）稀释到 40 万/ml，取 100 μl 加入 Transwell 上层小室，Transwell 下层小室加入 600 μl 完全细胞培养液，作为实验组；用无血清培养液代替含多肽片段的无血清培养液，作为阴性对照组。

3、在 CO<sub>2</sub> 孵箱中 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 继续培养 24 小时，用棉签刮去上层 Transwell 小室中的细胞，50%甲醇/50%丙酮固定 15 分钟后，再用 PBS 缓冲液洗 3 次，DAPI 封片，荧光显微镜下计数侵袭的细胞数。

侵袭抑制率的计算公式为：（阴性对照组中侵袭的细胞数-实验组中侵袭的细胞数）/阴性对照组中侵袭的细胞数×100%。

各个 PEG 化多肽片段处理组相对阴性对照组对 SKBr3 的侵袭抑制率（平均值）见表 3。

表 3 PEG 化多肽处理组相对阴性对照组对 SKBr3 侵袭的抑制率

多肽	抑制率
PIBC	61.3%
mPEG <sub>2000</sub> CY	53.8%
mPEG <sub>5000</sub> CY	41.2%
mPEG <sub>2000</sub> LC	36.3%
mPEG <sub>5000</sub> LC	28.5%

结果表明，实施例 1-4 的 PEG 化多肽能显著抑制乳腺癌细胞 SKBr3 侵袭功能，其中 mPEG<sub>2000</sub>CY 抑制效果最明显。

三、PEG 化多肽促进乳腺癌细胞 SKBr3 的凋亡

分别检测实施例 1-4 的 PEG 化多肽对乳腺癌细胞 SKBr3 凋亡的促进作用。具体步骤如下：

- 1、乳腺癌细胞 SKBr3 接种于 6 孔细胞培养板，20 万细胞/孔；
  - 2、待细胞贴壁后，加入 PIBC 及实施例 1-4 的 PEG 化多肽（终浓度 6 $\mu$ M）继续培养 24 小时，作为实验组；将加入 PBS 溶液的作为阴性对照组。
  - 3、运用 Invitrogen 公司生产的试剂盒 Vybrant® Apoptosis Assay kit 对细胞染色后通过流式细胞仪分析结果，具体的操作步骤如下：
    - （1）用胰酶常规消化细胞，PBS 缓冲液洗两遍（细胞数量一般为 6 孔板的四分之一或一个 24 孔板的数量为宜）。
    - （2）用 20 $\mu$ l 1x Annexin V Buffer 将细胞轻轻悬起来，加入 1 $\mu$ l 的 FITC annexin V 后轻轻混匀，室温避光染色 15 分钟。
    - （3）向反应管中加入 1x Annexin V Buffer 使终体积为 200  $\mu$ l。
    - （4）加入浓度为 100  $\mu$ g/ml 的 PI，使其终浓度为 1  $\mu$ g/ml，室温避光染色 3 分钟左右即可上机检测。
- 实施例 1-4 的 PEG 化多肽处理组相比阴性对照组增加的细胞凋亡率(平均值)见表 4。

表 4 PEG 化多肽处理组比阴性对照组增加的细胞凋亡率

多肽	凋亡率
PIBC	55.5%
mPEG <sub>2000</sub> CY	44.3%
mPEG <sub>5000</sub> CY	37.3%
mPEG <sub>2000</sub> LC	36.4%
mPEG <sub>5000</sub> LC	28.8%

结果表明，实施例 1-4 的 PEG 化多肽能明显促进乳腺癌细胞 SKBr3 细胞凋亡。其中 mPEG<sub>2000</sub>CY 促进效果最明显。

#### 四、mPEG<sub>2000</sub>CY 抑制乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的移植瘤生长

检测 mPEG<sub>2000</sub>CY 对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的移植瘤生长的抑制作用。具体步骤如下：

- 1、将培养至对数生长期的乳腺癌细胞 MDA-MB-231 皮下接种 BALB/c 裸鼠(北京维通利华实验动物技术有限公司)，每只接种 1000 万细胞，建立移植瘤模型，之后在裸鼠体内经过 3 次传代用于接瘤实验。

2、等到肿瘤生长到 100mm<sup>3</sup>时将 BALB/c 裸鼠随机分为 3 组，每组 5 只，分别进行如下治疗处理，第 1 次处理当天记为第 1 天：

PIBC 组：用 PIBC 溶液（多肽溶于 0.9%的生理盐水）进行皮下注射治疗，

每次注射剂量为  $5\mu\text{m}/\text{kg}$ ，每周治疗 3 次（分别于该周的第一天、第三天和第六天）；

mPEG<sub>2000</sub>CY 组：用 mPEG<sub>2000</sub>CY 溶液（mPEG<sub>2000</sub>CY 溶于 0.9% 的生理盐水）进行皮下注射治疗，每次注射剂量为  $5\mu\text{m}/\text{kg}$ ，注射体积同 PIBC 治疗组，每周治疗 3 次（分别于该周的第一天、第三天和第六天）；

对照组：用 PBS 缓冲液进行皮下注射治疗，注射体积同 PIBC 治疗组，每周治疗 3 次（分别于该周的第一天、第三天和第六天）；

3、每周检测二次肿瘤体积，治疗 1 个月后处死裸鼠，称取肿瘤重量并计算肿瘤抑制率。

10 肿瘤抑制率的计算公式如下：（对照组小鼠的肿瘤体积-多肽组小鼠肿瘤的体积）/对照组小鼠的肿瘤体积 $\times 100\%$ 。

PIBC 及 mPEG<sub>2000</sub>CY 治疗组的肿瘤抑制率结果如图 6 所示。结果表明 PIBC 及 mPEG<sub>2000</sub>CY 均能有效抑制乳腺癌细胞 MDA-MB-231 引起的乳腺癌肿瘤生长，且 mPEG<sub>2000</sub>CY 组比 PIBC 抑制效果更明显，两组之间具有显著性差异。

15

实施例 7、PEG 化多肽的 SD 大鼠体内血浆半衰期评价

供试多肽：PIBC、mPEG<sub>2000</sub>CY

1. 标准曲线的制作：用硼砂缓冲液（PH 9.5）配制各供试多肽浓度为  $1\text{mg}/\text{mL}$  的储备液。取该储备液适量用乙腈体积百分比为 50% 的乙腈水溶液配制成多肽浓度为 25、37.5、50、75、100、150、250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准曲线工作液。取准备好的标准曲线工作液  $20\mu\text{l}$ ，加入空白鼠血浆  $80\mu\text{l}$ ，配制多肽浓度为 5、7.5、10、15、20、30、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准曲线样品，标准曲线样品中加入  $20\mu\text{l}$  20%（质量百分比）磷酸溶液和  $300\mu\text{l}$  甲醇-乙腈（甲醇与乙腈的体积比为 1:1），涡旋混匀约 2 min；4000 rmp/min 离心 10 分钟，取上清液上样分析，得各供试药物的标准曲线，并依该方法配置质控样品检测其精密度。

25

2. 实验过程

药物配置：给药前配置，将供试多肽用等体积的 0.9% 氯化钠注射液和  $5\text{mM}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  溶解成均一透明溶液，PIBC、mPEG<sub>2000</sub>CY 的终浓度分别为  $8\text{mg}/\text{ml}$  和  $12\text{mg}/\text{ml}$ ，用于皮下给药。

30 试验动物：雌雄 SD 大鼠，体重 160~180 克，来源：北京华阜康生物科技股份有限公司。

动物实验：给药：每种多肽处理四只 SD 大鼠，雌雄各两只。给药前称定体重，给药剂量为  $8\text{mg}/\text{kg}$ 。

35 样品采集：给药时记为零时刻，分别在零时刻和给药后 30min、1h、2h、4h、6h、10h、12h、24h 通过尾静脉取血  $0.3\text{ml}$  于装有  $6\mu\text{l}$  抑肽酶和  $5\mu\text{l}$  肝素钠的离心管中，4500rmp/min 离心 5min 分离上层血浆置于  $-80^\circ\text{C}$  冰箱保存。

样品处理：取  $100\mu\text{l}$  待测样本的血浆，加入  $20\mu\text{l}$  20%磷酸溶液、 $20\mu\text{l}$  50%

乙腈水溶液和 300  $\mu$ l 甲醇-乙腈 (1:1) 溶液, 涡旋混匀约 2 min, 4000 rpm/min 离心 10 分钟, 取上清液上样分析。

5 色谱条件: 色谱柱: XSELECT CSH C18, 4.6 $\times$ 150mm, 5  $\mu$ m, 流动相: A 相: 0.1% (体积百分比) TFA 水溶液, B 相: 0.1% (体积百分比) TFA 乙腈溶液, 洗脱液由 A 相和 B 相组成, 洗脱液中 B 相的体积百分比由 20% 匀速升至 35%, A 相的体积百分比 80% 匀速降至 65%, 洗脱时间 10 分钟, 洗脱流速为每分钟 1 毫升, 紫外检测波长: 220nm, 进样体积: 20  $\mu$  L。

### 3. 实验结果

10 1) 由药物 PIBC、mPEG<sub>2000</sub>CY 的标准曲线所得的药物浓度与峰面积的关系式分别为  $y=3.916x+8.23$  ( $R=0.995$ )、 $y=4.205x+1.23$  ( $R=0.994$ )。其中  $y$  为峰面积,  $x$  为药物浓度。

2) 各时间点各药物浓度依据标准曲线得到, 药动学参数由 WinNonlin 药动学软件中的非房室模型计算得出, 结果见表 5。

15

表 5 药动学参数

多肽	$T_{1/2}$ (h)	$T_{max}$ (h)	$C_{max}$ ( $\mu$ g/mL)	AUC <sub>last</sub> (h* $\mu$ g/mL)	AUC <sub>INF obs</sub> (h* $\mu$ g/mL)	$V_z F_{obs}$ (ml/kg)	$Cl F_{obs}$ (ml/kg)	MRT <sub>last</sub> (h)
PIBC	1.04 $\pm$	0.94 $\pm$	91.64 $\pm$	289.61 $\pm$	322.05 $\pm$	925.26 $\pm$	430.66 $\pm$	1.89 $\pm$
	0.13	0.17	26.18	59.84	67.91	133.21	78.13	0.31
mPEG <sub>2000</sub> CY	11.9 $\pm$	1.78 $\pm$	79.41 $\pm$	781.20 $\pm$	1135.10 $\pm$	3462.61 $\pm$	145.31 $\pm$	8.45 $\pm$ 2.74
	2.59	0.29	19.53	79.23	89.32	212.59	23.15	

表 5 的结果表明:

1) mPEG<sub>2000</sub>CY 在动物体内的末端消除半衰期 ( $T_{1/2}$ ) 明显延长。

2) mPEG<sub>2000</sub>CY 的清除率 ( $Cl F_{obs}$ ) 显著低于多肽 PIBC, 平均滞留时间 (MRT<sub>last</sub>) 显著延长。

20 以上结果可说明 PEG 化多肽 mPEG<sub>2000</sub>CY 在动物体的消除要比多肽 PIBC 慢。这种结构修饰除了能显著增强其水溶性外, 还能达到延长药物作用时间的目的。  
工业应用

25 实验证明, 本发明的具有抑制肿瘤功能的 PEG 化多肽与 gp96 蛋白具有亲和力, 能显著抑制肿瘤细胞增殖 (生长), 能显著抑制肿瘤细胞侵袭功能, 能明显促进肿瘤细胞凋亡, 还能有效抑制肿瘤细胞引起的肿瘤生长, 且 mPEG<sub>2000</sub>CY 比 PIBC 抑制效果更显著。另外, 本发明的 PEG 化多肽在动物体内的末端消除半衰期 ( $T_{1/2}$ ) 明显延长, 清除率 ( $Cl F_{obs}$ ) 显著低于多肽 PIBC, 平均滞留时间 (MRT<sub>last</sub>) 显著延长。表明, 本发明的具有抑制肿瘤功能的 PEG 化多肽可用于治疗肿瘤。

30

权利要求

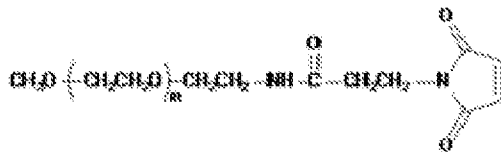
1、PEG 化多肽，为利用 PEG 修饰名称为 PIBC 的多肽得到的化合物；  
 PIBC 为 A1) 或 A2) 所述的多肽：A1) 序列表中 SEQ ID No. 1 所示多肽；A2)  
 5 将序列表中的 SEQ ID NO. 1 中的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代  
 和/或缺失和/或添加且具有相同功能的由 A1) 衍生的多肽。

2、根据权利要求 1 所述的 PEG 化多肽，其特征在于：所述修饰通过利用化  
 合物甲与化合物乙进行 Michael 加成反应形成实现；  
 所述化合物甲为一端修饰有马来酰亚胺的 PEG；  
 10 所述化合物乙为 N 端或 C 端引入含有巯基氨基酸残基的 PIBC。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的 PEG 化多肽，其特征在于：所述化合物甲中，  
 PEG 的另一端连接有甲氧基；和/或，所述含有巯基氨基酸残基为半胱氨酸残基。

4、根据权利要求 3 所述的 PEG 化多肽，其特征在于：所述化合物甲的结构  
 式如式 V 所示；

15

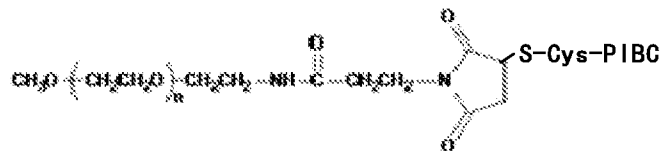


式 V ;

式 V 中，n 为非零自然数；  
 20 和/或，所述化合物乙为 SEQ ID NO. 2 或 SEQ ID NO. 3 所示的多肽。

5、根据权利要求 1-4 中任一所述的 PEG 化多肽，其特征在于：所述 PEG 化  
 多肽的结构式如式 I 所示：

25



式 I

式 I 中，n 为非零自然数；  
 30 进一步，PEG 的分子式为 HO(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>H，PEG 的的分子量为 2000~5000，  
 式 V 和式 I 中的 n 与 PEG 分子式中的 n 的定义相同。

6、权利要求 1-5 中任一所述 PEG 化多肽的制备方法，包括：利用化合物甲  
 与化合物乙进行 Michael 加成反应得到所述 PEG 化多肽；  
 所述化合物甲为一端连接有马来酰亚胺的 PEG；  
 35 所述化合物乙为 N 端或 C 端引入含有巯基氨基酸残基的 PIBC。

7、权利要求 1-5 中任一所述 PEG 化多肽的下述任一应用：

- M1) 在制备与 gp96 蛋白结合的产品中的应用；  
M2) 在制备治疗和/或预防 gp96 蛋白所致疾病产品中的应用；  
M3) 在制备抑制肿瘤细胞增殖和/或生长和/或侵袭产品中的应用；  
M4) 在制备促进肿瘤细胞凋亡产品中的应用；  
5 M5) 在制备抑制肿瘤生长产品中的应用。
- 8、根据权利要求 7 所述的应用，其特征在于：所述 gp96 蛋白为下述 B1) 或 B2)：
- B1) 序列表中 SEQ ID No. 4 所示多肽；  
B2) 将序列表中的 SEQ ID NO. 4 中的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残  
10 基的取代和/或缺失和/或添加且具有相同功能的由 B1) 衍生的多肽；  
和/或，M2) 中所述 gp96 蛋白所致疾病为肿瘤。
- 9、具有如下 N1) - N3) 中任一功能的产品，含有权利要求 1-5 中任一所述 PEG 化多肽；
- N1) 抑制肿瘤细胞增殖和/或生长和/或侵袭；  
15 N2) 促进肿瘤细胞凋亡；  
N3) 抑制肿瘤生长。
- 10、根据权利要求 7 或 8 所述的应用或权利要求 9 所述的产品，其特征在于：权利要求 7 或 8 中，M2) 中所述 gp96 蛋白所致疾病为乳腺癌；M3) 和 M4) 中所述肿瘤细胞均为乳腺癌肿瘤细胞；M5) 中所述肿瘤为乳腺癌；  
20 权利要求 9 中，N1) 和 N2) 中所述肿瘤细胞均为乳腺癌肿瘤细胞；N3) 中所述肿瘤为乳腺癌。



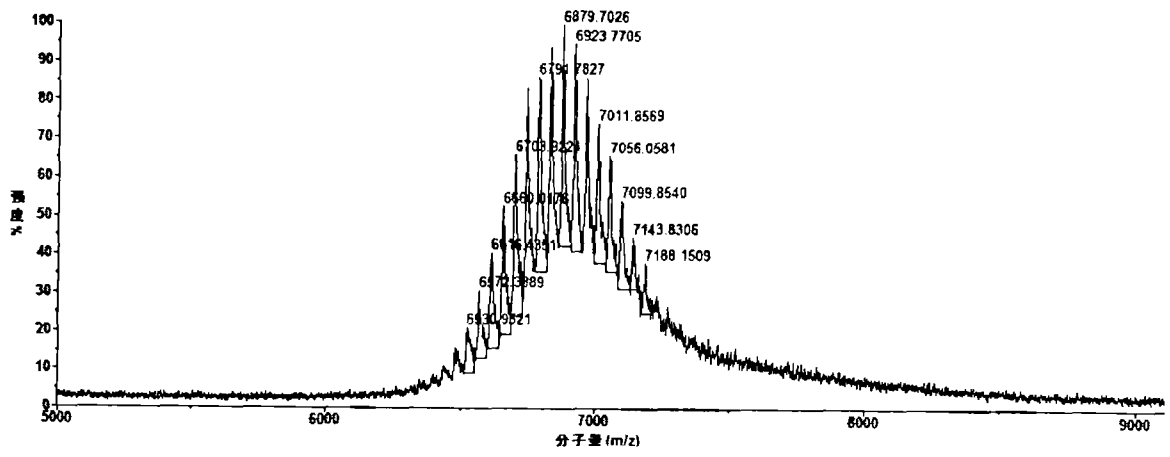


图 1

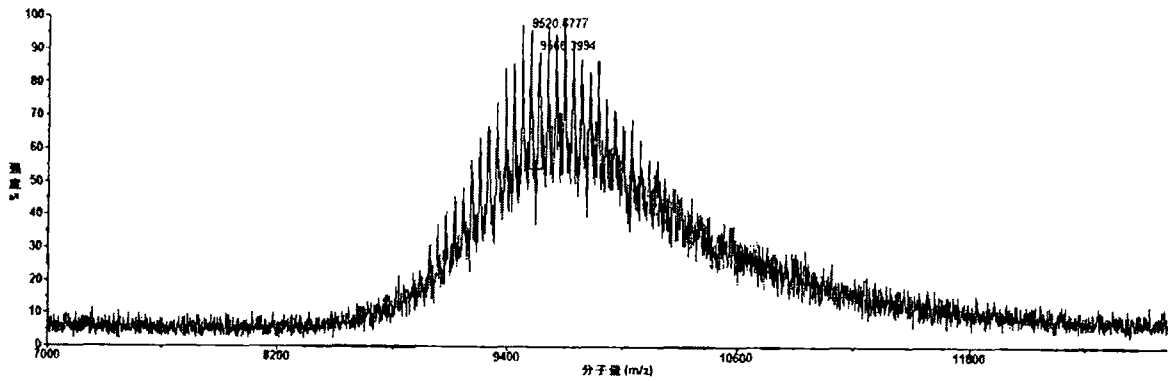


图 2

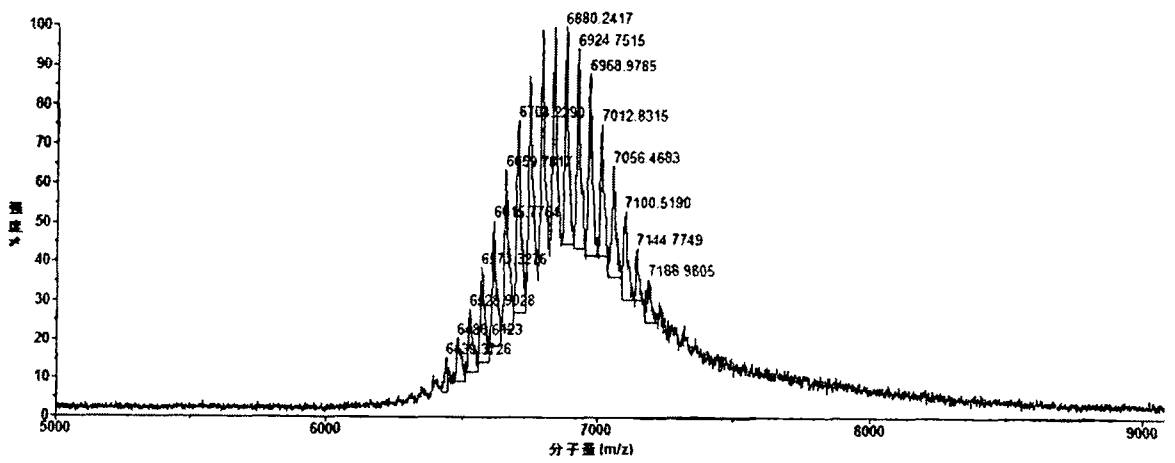


图 3

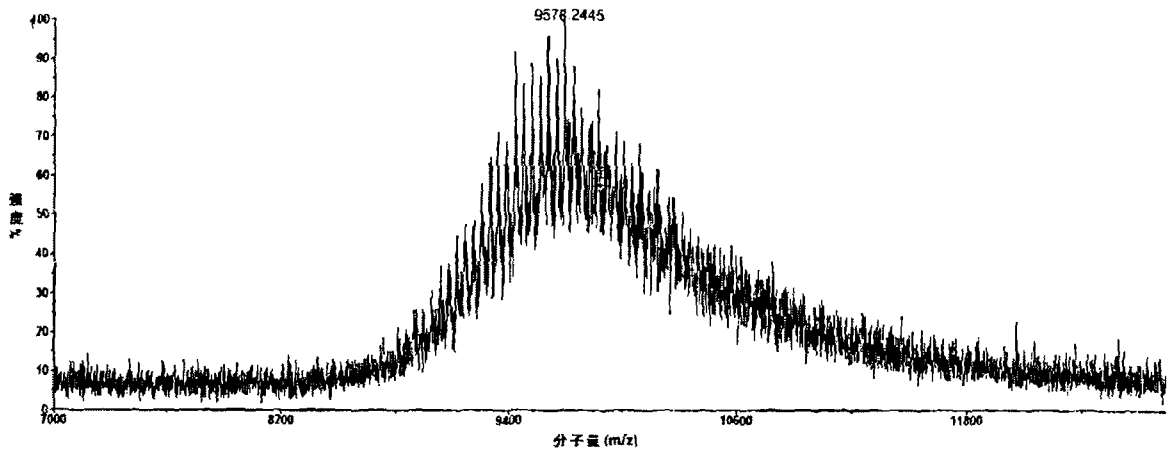


图 4

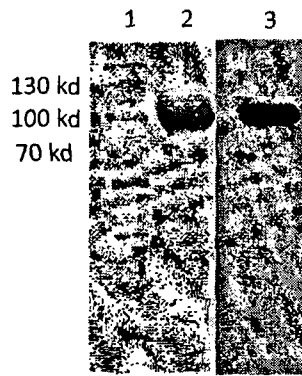


图 5

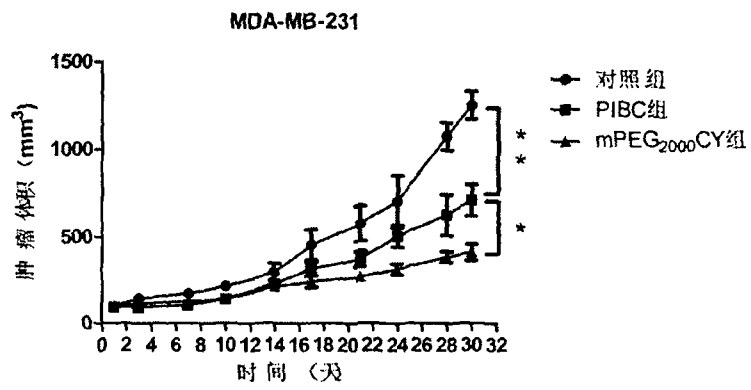


图 6

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/CN2017/116865

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/00 (2006.01) i; A61K 38/16 (2006.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS; CPRSABS; CNTXT; DWPI; SIPOABS; EPTXT; WOTXT; USTXT; JPTXT; CNKI; PUBMED and key words: PEG, PIBC, 多肽, Mi-chael 加成反应, 马来酰亚胺, 巯基, 乳腺癌, 肿瘤, 癌, 热休克蛋白, gp96, HSP90, polyethylene glycol, peptide inhibitor for breast cancer, peptide, Michael addition reaction, maleimide, thiol, sulfhydryl, hydrosu-lphonyl, mammary cancer, tumour, cancer, heat shock protein et al.;

NATIONAL BIO-SEQUENCE DATABASE OF CHINESE PATENT; Genbank; EMBL and the sequence searched: SEQ ID NOs: 1-5.

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 102827257 A (INSTITUTE OF MICROBIOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES), 19 December 2012 (19.12.2012), see the abstract, sequence listing, and claims 1-6	1-10
Y	WO 2016054315 A1 (MEDIMMUNE LLC), 07 April 2016 (07.04.2016), see claims 1-36, and description, page 1, paragraph 1	1-10
A	CN 104684546 A (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE), 03 June 2015 (03.06.2015), see entire document	1-10
A	CN 102573913 A (ASCENDIS PHARMA A/S), 11 July 2012 (11.07.2012), see entire document	1-10

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&amp;” document member of the same patent family</p>
---	---

<p>Date of the actual completion of the international search</p> <p style="text-align: center;">07 March 2018</p>	<p>Date of mailing of the international search report</p> <p style="text-align: center;">20 March 2018</p>
<p>Name and mailing address of the ISA</p> <p>State Intellectual Property Office of the P. R. China</p> <p>No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao</p> <p>Haidian District, Beijing 100088, China</p> <p>Facsimile No. (86-10) 62019451</p>	<p>Authorized officer</p> <p style="text-align: center;">WANG, Ying</p> <p>Telephone No. (86-10) 62412197</p>

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/CN2017/116865

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 102827257 A	19 December 2012	CN 102827257 B	23 October 2013
WO 2016054315 A1	07 April 2016	AU 2015324924 A1	18 May 2017
		US 2017304460 A1	26 October 2017
		JP 2017535526 A	30 November 2017
		CA 2962783 A1	07 April 2016
		CN 106922129 A	04 July 2017
		EP 3200829 A1	09 August 2017
CN 104684546 A	03 June 2015	US 2015147276 A1	28 May 2015
		HK 1209021 A1	24 March 2016
		WO 2013185032 A1	12 December 2013
		EP 2858630 A1	15 April 2015
		JP 2015520194 A	16 July 2015
		CA 2876139 A1	12 December 2013
		EP 2858630 A4	24 February 2016
CN 102573913 A	11 July 2012	CA 2769162 C	05 December 2017
		ZA 201200686 B	31 October 2012
		MX 343925 B	29 November 2016
		CA 2769162 A1	03 February 2011
		US 2012156259 A1	21 June 2012
		SG 177761 A1	29 March 2012
		RU 2554854 C2	27 June 2015
		MY 156872 A	15 April 2016
		IL 217743 D0	29 March 2012
		NZ 597960 A	26 July 2013
		KR 101770844 B1	23 August 2017
		RU 2012107137 A	10 September 2013
		AU 2010277556 A1	02 February 2012
		KR 20120090039 A	16 August 2012
		WO 2011012715 A1	03 February 2011
		RU 2554854 C9	03 February 2017
		CN 102573913 B	18 June 2014
		JP 2013500950 A	10 January 2013
		IL 217743 A	31 January 2017
		JP 5904941 B2	20 April 2016
		BR 112012002280 A2	14 June 2016
		EP 2459220 A1	06 June 2012
		MX 2012001061 A	26 March 2012
		HK 1173082 A1	30 January 2015
		AU 2010277556 B2	09 October 2014

<p><b>A. 主题的分类</b></p> <p>C07K 14/00(2006.01)i; A61K 38/16(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																	
<p><b>B. 检索领域</b></p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07K; A61K; A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS; CPRSABS; CNTXT; DWPI; SIPOABS; EPTXT; WOTXT; USTXT; JPTXT; CNKI; PUBMED 和关键词: PEG, PIBC, 多肽, Michael加成反应, 马来酰亚胺, 巯基, 乳腺癌, 肿瘤, 癌, 热休克蛋白, gp96, HSP90, polyethylene glycol, peptide inhibitor for breast cancer, peptide, Michael addition reaction, maleimide, thiol, sulfydryl, hydrosulphonyl, mammary cancer, tumour, cancer, heat shock protein等; 中国专利生物序列检索系统; Genbank; EMBL和检索的序列: SEQ ID NOs:1-5。</p>																	
<p><b>C. 相关文件</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>CN 102827257 A (中国科学院微生物研究所) 2012年 12月 19日 (2012 - 12 - 19) 见摘要, 序列表, 权利要求1-6</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2016054315 A1 (MEDIMMUNE LLC) 2016年 4月 7日 (2016 - 04 - 07) 见权利要求1-36, 说明书第1页第1段</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 104684546 A (哈佛大学校长及研究员协会) 2015年 6月 3日 (2015 - 06 - 03) 见全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 102573913 A (阿森迪斯药物股份有限公司) 2012年 7月 11日 (2012 - 07 - 11) 见全文</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	Y	CN 102827257 A (中国科学院微生物研究所) 2012年 12月 19日 (2012 - 12 - 19) 见摘要, 序列表, 权利要求1-6	1-10	Y	WO 2016054315 A1 (MEDIMMUNE LLC) 2016年 4月 7日 (2016 - 04 - 07) 见权利要求1-36, 说明书第1页第1段	1-10	A	CN 104684546 A (哈佛大学校长及研究员协会) 2015年 6月 3日 (2015 - 06 - 03) 见全文	1-10	A	CN 102573913 A (阿森迪斯药物股份有限公司) 2012年 7月 11日 (2012 - 07 - 11) 见全文	1-10
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
Y	CN 102827257 A (中国科学院微生物研究所) 2012年 12月 19日 (2012 - 12 - 19) 见摘要, 序列表, 权利要求1-6	1-10															
Y	WO 2016054315 A1 (MEDIMMUNE LLC) 2016年 4月 7日 (2016 - 04 - 07) 见权利要求1-36, 说明书第1页第1段	1-10															
A	CN 104684546 A (哈佛大学校长及研究员协会) 2015年 6月 3日 (2015 - 06 - 03) 见全文	1-10															
A	CN 102573913 A (阿森迪斯药物股份有限公司) 2012年 7月 11日 (2012 - 07 - 11) 见全文	1-10															
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																	
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&amp;” 同族专利的文件</p>																	
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2018年 3月 7日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2018年 3月 20日</p>															
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>受权官员</p> <p>王颖</p> <p>电话号码 (86-10)62412197</p>															

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/116865

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	102827257	A	2012年 12月 19日	CN	102827257	B	2013年 10月 23日
WO	2016054315	A1	2016年 4月 7日	AU	2015324924	A1	2017年 5月 18日
				US	2017304460	A1	2017年 10月 26日
				JP	2017535526	A	2017年 11月 30日
				CA	2962783	A1	2016年 4月 7日
				CN	106922129	A	2017年 7月 4日
				EP	3200829	A1	2017年 8月 9日
CN	104684546	A	2015年 6月 3日	US	2015147276	A1	2015年 5月 28日
				HK	1209021	A1	2016年 3月 24日
				WO	2013185032	A1	2013年 12月 12日
				EP	2858630	A1	2015年 4月 15日
				JP	2015520194	A	2015年 7月 16日
				CA	2876139	A1	2013年 12月 12日
				EP	2858630	A4	2016年 2月 24日
CN	102573913	A	2012年 7月 11日	CA	2769162	C	2017年 12月 5日
				ZA	201200686	B	2012年 10月 31日
				MX	343925	B	2016年 11月 29日
				CA	2769162	A1	2011年 2月 3日
				US	2012156259	A1	2012年 6月 21日
				SG	177761	A1	2012年 3月 29日
				RU	2554854	C2	2015年 6月 27日
				MY	156872	A	2016年 4月 15日
				IL	217743	D0	2012年 3月 29日
				NZ	597960	A	2013年 7月 26日
				KR	101770844	B1	2017年 8月 23日
				RU	2012107137	A	2013年 9月 10日
				AU	2010277556	A1	2012年 2月 2日
				KR	20120090039	A	2012年 8月 16日
				WO	2011012715	A1	2011年 2月 3日
				RU	2554854	C9	2017年 2月 3日
				CN	102573913	B	2014年 6月 18日
				JP	2013500950	A	2013年 1月 10日
				IL	217743	A	2017年 1月 31日
				JP	5904941	B2	2016年 4月 20日
				BR	112012002280	A2	2016年 6月 14日
				EP	2459220	A1	2012年 6月 6日
				MX	2012001061	A	2012年 3月 26日
				HK	1173082	A1	2015年 1月 30日
				AU	2010277556	B2	2014年 10月 9日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)