



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111909254 B

(45) 授权公告日 2024.08.20

(21) 申请号 201910388587.0

C07K 1/20 (2006.01)

(22) 申请日 2019.05.10

C07K 1/107 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

C12N 15/11 (2006.01)

申请公布号 CN 111909254 A

A61K 38/16 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(43) 申请公布日 2020.11.10

(73) 专利权人 国家纳米科学中心

地址 100190 北京市海淀区中关村北一条11号

(72) 发明人 王琛 杨延莲 梁伟 李浩
方小翠

(74) 专利代理机构 北京市英智伟诚知识产权代
理事务所(普通合伙) 11521

专利代理师 刘丹妮

(51) Int. Cl.

C07K 14/47 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 106632601 A, 2017.05.10

杨亚楠. 双靶点 DNA 纳米治疗体系构建及其抗肿瘤作用研究. 中国硕士电子期刊医药卫生科技辑. 2019, (第1期), 6、13、44、45.

Rongjie Yu 等. The TAT peptide endows PACAP with an enhanced ability to traverse bio-barriers. Neuroscience Letters .2012, 第527卷1-5.

审查员 李小晶

权利要求书1页 说明书10页

序列表4页 附图6页

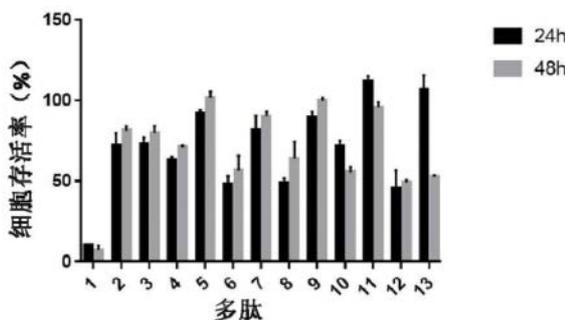
(54) 发明名称

抑制肿瘤活性的多肽及其应用

(57) 摘要

本发明提供了一种抑制肿瘤活性的多肽,所述多肽的氨基酸序列所述多肽的氨基酸序列为X-YGRKKRRQRRR,其中:其N末端X为10~50个、优选为15~30个、更优选为18~27个氨基酸的序列,且N末端可以被修饰或未修饰,还提供了所述多肽的应用。本发明所述的多肽能与p53野生型和突变型肿瘤细胞相互作用,增加肿瘤细胞膜的通透性,抑制肿瘤细胞的活性;本发明多肽具有作为治疗或辅助性治疗肿瘤的药物潜力,尤其是作为针对肺癌、乳腺癌、成骨肉瘤、卵巢癌和/或结肠癌等疾病的治疗或辅助性治疗药物。

A549



1. 一种抑制肿瘤活性的多肽,其特征在于,所述多肽的氨基酸序列选自:SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.14。
2. 根据权利要求1所述的多肽,其特征在于,所述多肽SEQ ID NO.14的N末端棕榈酸修饰的方法包括以下步骤:
 - (1) 将棕榈酸与多肽N末端裸露的氨基反应;
 - (2) 将反应终产物洗涤后,置于裂解液中裂解和沉降,得到棕榈酸修饰的多肽初产物;
 - (3) 利用高效液相色谱仪纯化得到高纯度的棕榈酸修饰的多肽。
3. 一种DNA片段,其特征在于,所述DNA片段包含编码权利要求1所述的多肽的核苷酸序列。
4. 一种重组载体,其特征在于,所述重组载体包含一个或多个权利要求3所述的DNA片段。
5. 一种重组细胞,其特征在于,所述重组细胞包含权利要求4所述的重组载体。
6. 一种药物组合物,其特征在于,所述药物组合物包括:
 - 权利要求1所述的多肽;
 - 权利要求3所述的DNA片段;
 - 权利要求4所述的重组载体;和/或
 - 权利要求5所述的重组细胞。
7. 权利要求1所述的多肽、权利要求3所述的DNA片段、权利要求4所述的重组载体、权利要求5所述的重组细胞和/或权利要求6所述的药物组合物在制备用于抑制p53野生型和/或突变型肿瘤细胞的活性的药物中的应用;其中:

所述肿瘤细胞选自以下一种或多种:肺癌细胞、乳腺癌细胞、成骨肉瘤细胞、卵巢癌细胞和/或结肠癌细胞。

抑制肿瘤活性的多肽及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于本发明涉及生物医药技术领域,具体而言,涉及抑制肿瘤活性的多肽及其应用,抑制p53野生型和突变型肿瘤细胞活性方面的应用。

背景技术

[0002] 肿瘤已成为全球范围内导致人类死亡的首要因素。据统计,截至2030年,全球将有2100多万肿瘤病人。研究表明,肿瘤抑制基因(抑癌基因)是一类存在于正常细胞内可抑制细胞生长并具有潜在抑癌作用的基因。抑癌基因与原癌基因相互制约,共同维持和调节细胞的生长、增殖及分化过程。当抑癌基因发生突变、缺失或失活时可引起细胞恶性转化而导致肿瘤的发生。迄今为止,人们已从细胞中分离鉴定出百余种抑癌基因,最常见的如Rb、p53、APC、nm23等基因,其中p53被发现是与人类肿瘤相关性最高的基因之一。

[0003] 野生型p53蛋白能够抑制肿瘤细胞增殖,使细胞分化停留在G1期检验点,诱导细胞凋亡。p53基因发生突变和缺失后会导致受损的DNA进入S期,引起基因突变以及肿瘤发生。由此可见,p53基因对肿瘤的发生、发展和调控起到重要作用,而且p53蛋白抑癌作用的发挥需要一些蛋白质共同协助完成,这一类蛋白质统称为p53调节蛋白,后者参与p53翻译、转录激活、磷酸化、乙酰化以及泛素化等过程。例如,作为p53的负性调节因子,鼠双微体(MDM)2能够泛素化降解p53蛋白并降低其活性,而p53则与MDM2的P2启动子序列结合,抑制其转录活性,降低其蛋白表达量,两者相互作用形成负反馈环,许多p53调节蛋白作用的发挥都是通过MDM2蛋白的介导来完成对p53的泛素化调控。总体来说,p53突变通过两方面促进肿瘤的发生、生长和侵袭:一种是原有抑癌活性的丧失;另一种是突变蛋白会产生新的致癌活性。研究发现,p53基因突变发生在50%左右的肿瘤患者中,因此,p53蛋白是肿瘤治疗中十分热门的靶点之一。然而p53抑癌基因的研究虽然较为深入,但由于其突变的复杂性,导致靶向p53药物的开发仍非常缓慢。目前,靶向p53的药物开发主要基于2种策略。第一种策略是直接作用于突变型p53,包括恢复野生型p53蛋白的活性以及诱导突变型p53蛋白的降解;另一种策略是间接作用于p53蛋白,这类药物通常采用合成致死策略,它们对表达野生型p53蛋白的细胞没有细胞毒性,但是会选择性的杀伤表达突变型p53蛋白的肿瘤细胞,这类化合物大多作用于一些关键的激酶信号通路或细胞周期信号通路。目前,绝大多数靶向p53的药物仍处在临床前或临床试验研究阶段,其中,伏立诺他是脱乙酰化酶6(HDAC6)抑制剂,可通过阻断热休克蛋白90(Hsp90)对突变型p53蛋白的稳定作用,降低突变型p53的表达量并增加其泛素化水平,目前已被美国食品药品监督管理局(FDA)批准用于临床。

[0004] 由于p53蛋白具有结构和功能的复杂性,在同一肿瘤类型中有多种不同的突变类型,每种突变体均会产生不同的蛋白生物学功能,为靶向p53蛋白的药物开发带来了非常大的困难,仍需研究开发特异性强、毒副作用小的作用于p53蛋白高表达的肿瘤细胞(p53蛋白野生型和突变型)的候选药物。由于多肽易于合成,在人体内易于代谢并且不会带来明显的毒副作用和严重的免疫反应,因此,研发一类与高表达p53蛋白的肿瘤细胞(p53蛋白野生型和突变型)相互作用的多肽,为肿瘤等疾病的研究和治疗提供可能的新技术和新方法,是目

前亟待解决的问题。

发明内容

[0005] 为克服现有技术的不足,本发明的目的在于提供抑制肿瘤活性的多肽及其应用,该多肽能够作用于p53野生型和突变型相关肿瘤细胞,引起肿瘤细胞膜通透性增加,从而抑制肿瘤细胞的活性。为实现上述目的,本发明的第一方面提供了一种抑制肿瘤活性的多肽,所述多肽的氨基酸序列为X-YGRKKRRQRRR,其中:其N末端X为10~50个、优选为15~30个、更优选为18~27个氨基酸的序列,且N末端可以被修饰或未修饰;

[0006] 优选地,所述X氨基酸序列中的氨基酸选自以下一种或多种:R,P,L,S,D,T,F,W,M,V,C,Y,N,G,K;和/或所述多肽N末端通过棕榈酸修饰;

[0007] 进一步优选地,所述多肽的氨基酸序列选自SEQ ID NO.1-4,6,8-10,12-14;

[0008] 最优选地,所述多肽的氨基酸序列为SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.14。

[0009] 根据本发明第一方面的多肽,其中,所述多肽的氨基酸序列为SEQ ID NO.5,7或11。

[0010] 根据本发明第一方面的多肽,其中,所述多肽N末端棕榈酸修饰的方法包括以下步骤:

[0011] (1) 将棕榈酸与多肽N末端裸露的氨基反应;

[0012] (2) 将反应终产物洗涤后,置于裂解液中裂解和沉降,得到棕榈酸修饰的多肽初产物;

[0013] (3) 利用高效液相色谱仪纯化得到高纯度的棕榈酸修饰的多肽。

[0014] 本发明的第二方面提供了一种DNA片段,所述DNA片段包含编码第一方面的多肽的核苷酸序列。

[0015] 本发明的第三方面提供了一种重组载体,所述重组载体包含一个或多个第二方面的DNA片段。

[0016] 本发明的第四方面提供了一种重组细胞,所述重组细胞包含第三方面的重组载体。

[0017] 本发明的第五方面提供了一种药物组合物,所述药物组合物包括:

[0018] 第一方面的多肽;

[0019] 第二方面的DNA片段;

[0020] 第三方面的重组载体;和/或

[0021] 第四方面的重组细胞。

[0022] 本发明的第六方面提供了第一方面的多肽、第二方面的DNA片段、第三方面的重组载体、第四方面的重组细胞和/或第五方面的药物组合物在制备用于抑制肿瘤细胞的活性的药物中的应用。

[0023] 根据本发明第六方面的应用,其中,所述肿瘤细胞为p53野生型和/或突变型肿瘤细胞。

[0024] 根据本发明第六方面的应用,其中,所述肿瘤细胞选自以下一种或多种:肺癌细胞、乳腺癌细胞、成骨肉瘤细胞、卵巢癌细胞和/或结肠癌细胞。

[0025] 本发明的提供了一种多肽,所述多肽的氨基酸序列为SEQ ID NO.1-14所示的氨基

酸序列：

[0026] 所述氨基酸序列如下：

[0027] SEQ ID NO.1(p53-1) :RPPLSQDTFSRLWDL LPRYGRKKRRQR RR

[0028] SEQ ID NO.2(p53-2) :DMTRVVDDCPRRDCSR SRYGRKKRRQR RR

[0029] SEQ ID NO.3(p53-3) :DMTRVVDDCPRRDCSR RRYGRKKRRQR RR

[0030] SEQ ID NO.4(p53-4) :DVRYLRRDNTFDD SVVVPYRPPRVGSRYG RKKRRQR RR

[0031] SEQ ID NO.5(p53-5) :DVRYLRRDNTFDD SVVVPYRRRRRRRR

[0032] SEQ ID NO.6(p53-6) :DGDRDFRMFDRLN RALRLDRYGRKKRRQ RRR

[0033] SEQ ID NO.7(p53-7) :SQIPASRQRTLGGDD LYRRDQQDIVYCSN R LLGR

[0034] SEQ ID NO.8(p53-8) :RGAVTTSQIPASRQ RTLVDPDYGRKKRRQ RRR

[0035] SEQ ID NO.9(p53-9) :DPDVLTRQRSAPIQ STTVAGRYGRKKRRQ RRR

[0036] SEQ ID NO.10(p53-10) :DRTYTM DRVLFYLGQYIMTDDYGRKK RRQR RR

[0037] SEQ ID NO.11(p53-11) :DRTYTM DRVLFYLGQYIMTDDRRRRDR RD

[0038] SEQ ID NO.12(p53-12) :RLLGRLFGVPSFSV KRDDDYGRKKRRQ RRR

[0039] SEQ ID NO.13(p53-13) :DRDDDIYTM IYDNLV VVNQQRYGRKK RRQR RR

[0040] SEQ ID NO.14(p53-14) :Pal-RPPLSQDTFSRLWDL LPRYGRKKRR QR RR (由于核苷酸或氨基酸序列表计算机可读载体无法识别棕榈酸修饰标记Pal-,SEQ ID NO.14以说明书中为准,其与SEQ ID NO.1的区别仅在于N末端进行了棕榈酸修饰)

[0041] 其中,SEQ ID NO.14为对SEQ ID NO.1的N末端进行棕榈酸修饰所得。

[0042] 本发明针对p53野生型和突变型肿瘤细胞,发现了一种多肽。该多肽能够引起肿瘤细胞膜通透性的增加,诱导肿瘤细胞释放乳酸脱氢酶(LDH),从而抑制肿瘤细胞的活性。值得注意的是,p53蛋白突变型肿瘤细胞的半数致死量(IC₅₀)要明显低于p53蛋白野生型肿瘤细胞。

[0043] 本发明还提供了一种DNA片段,其包含编码上述多肽的核苷酸序列。

[0044] 本发明还提供了一种重组载体,所述重组载体含有至少一个拷贝的上述DNA片段。

[0045] 本发明还提供了一种重组细胞,所述重组细胞含有上述的表达载体。

[0046] 本发明还提供了上述的多肽,核苷酸序列,重组载体或重组细胞在抑制肿瘤细胞活性的应用。

[0047] 优选地,所述肿瘤细胞为p53野生型和/或突变型肿瘤细胞。

[0048] 优选地,所述肿瘤细胞为肺癌细胞、乳腺癌细胞、成骨肉瘤细胞、卵巢癌细胞和/或结肠癌细胞。

[0049] 本发明提供了一种组合物,所述组合物包括上述多肽,核苷酸序列,重组载体或重组细胞。

[0050] 本方明还提供了上述的组合物在制备和治疗肿瘤相关药物中的应用。

[0051] 优选地,所述肿瘤为p53蛋白相关肿瘤。

[0052] 优选地,所述肿瘤为肺癌、乳腺癌、成骨肉瘤、卵巢癌和/或结肠癌。

[0053] 在本发明的一个具体实施例方式中,采用MTS法测定肿瘤细胞的活力。

[0054] 在本发明的一个具体实施例方式中,采用LDH检测试剂盒测定肿瘤细胞的胞外LDH释放量。

- [0055] 在本发明的一个具体实施例方式中,采用显微镜记录肿瘤细胞的形态。
- [0056] 在本发明的一个具体实施例方式中,采用游标卡尺测定荷瘤老鼠肿瘤体积的变化。
- [0057] 本发明的多肽可以具有但不限于以下有益效果:
- [0058] 本发明所述的多肽能与p53蛋白野生型和突变型肿瘤细胞相互作用,增加肿瘤细胞膜的通透性,抑制肿瘤细胞的活性;本发明多肽具有作为治疗或辅助性治疗肿瘤的药物潜力,尤其是作为针对肺癌、乳腺癌、成骨肉瘤、卵巢癌和/或结肠癌等疾病的治疗或辅助性治疗药物。

附图说明

- [0059] 以下,结合附图来详细说明本发明的实施方案,其中:
- [0060] 图1示出了本发明多肽SEQ ID NO:1-13 (p53-1 ~ p53-13)对p53野生型人源非小细胞肺癌细胞系A549的毒性研究。
- [0061] 图2示出了本发明多肽SEQ ID NO:1-13 (p53-1 ~ p53-13)对p53野生型人源乳腺癌细胞系MCR-7的毒性研究。
- [0062] 图3示出了本发明不同浓度多肽SEQ ID NO:1 (p53-1)对p53野生型人源乳腺癌细胞系MCR-7的毒性研究。
- [0063] 图4示出了本发明不同浓度多肽SEQ ID NO:1 (p53-1)对p53野生型人源非小细胞肺癌细胞系A549的毒性研究。
- [0064] 图5示出了本发明不同浓度多肽SEQ ID NO:1 (p53-1)对p53突变型人源成骨肉瘤细胞系SAOS-2的毒性研究。
- [0065] 图6示出了本发明不同浓度多肽SEQ ID NO:1 (p53-1)对p53突变型人源卵巢癌细胞系SKOV3的毒性研究。
- [0066] 图7示出了本发明不同浓度多肽SEQ ID NO:1 (p53-1)对鼠源肺癌细胞系TC-1的毒性研究。
- [0067] 图8示出了本发明不同浓度多肽SEQ ID NO:14 (p53-14, Pa1-p53-1)对鼠源结肠癌细胞系MC38的毒性研究。
- [0068] 图9示出了本发明不同浓度多肽SEQ ID NO:1 (p53-1)对正常人组织来源的胚肺成纤维细胞系MRC5的毒性研究。
- [0069] 图10示出了本发明多肽SEQ ID NO:1-1 (p53-1)对MCR-7肿瘤细胞的乳酸脱氢酶LDH的胞外释放量研究。
- [0070] 图11示出了本发明多肽SEQ ID NO:1-1 (p53-1)对A549肿瘤细胞的乳酸脱氢酶LDH的胞外释放量研究。
- [0071] 图12示出了本发明不同浓度多肽SEQ ID NO:14 (p53-14, Pa1-p53-1)对鼠源肺癌细胞系TC-1的细胞形态研究。
- [0072] 图13示出了本发明多肽SEQ ID NO:14 (p53-14, Pa1-p53-1)注射荷瘤C57小鼠后其体重变化曲线。
- [0073] 图14示出了本发明多肽SEQ ID NO:14 (p53-14, Pa1-p53-1)注射荷瘤C57小鼠后其瘤体积变化曲线。

[0074] 图15示出了本发明多肽SEQ ID NO:1 (p53-1) 注射荷瘤Balb/c小鼠后其瘤体积变化曲线。

具体实施方式

[0075] 下面通过具体的实施例进一步说明本发明,但是,应当理解为,这些实施例仅仅是用于更详细具体地说明之用,而不应理解为用于以任何形式限制本发明。

[0076] 本部分对本发明试验中所使用到的材料以及试验方法进行一般性的描述。虽然为实现本发明目的所使用的许多材料和操作方法是本领域公知的,但是本发明仍然在此作尽可能详细描述。本领域技术人员清楚,在上下文中,如果未特别说明,本发明所用材料和操作方法是本领域公知的。

[0077] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0078] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0079] 除非特别指明,以下实施例中所用的肺癌细胞系A549、TC-1,乳腺癌细胞系MCF-7、结肠癌细胞系MC38和CT26、成骨肉瘤细胞系SAOS-2、卵巢癌细胞系SKOV3均购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心。

[0080] 除非特别指明,下述实施例中所使用的多肽均购自安徽省国平药业有限公司,纯度为98%,所使用多肽均在实验前用先用0.5%的DMSO助溶,然后用无菌超纯水和细胞培养基配制成合适浓度的母液。

[0081] 除非特别指明,以下实施例中使用的试剂和仪器相关信息如下:

[0082] 所用水溶液的溶剂均为无菌超纯水溶液,水质参数为电阻率 $18.2\text{M}\Omega\cdot\text{cm}@25^\circ\text{C}$ 。

[0083] 细胞培养基(DMEM培养基、McCoy's5A培养基、RPMI 1640培养基)、胰酶、胎牛血清、PBS缓冲液、青链霉素双抗溶液均是购自Thermo Fisher Scientific公司。

[0084] 棕榈酸、二异丙基碳二亚胺(DIC)、HOBT、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、二氯甲烷(DCM)、乙醚、甲醇、乙腈溶液均购自北京华力德科技有限公司。

[0085] 细胞培养用的完全培养基中所含的10~15%胎牛血清和1%青链霉素均是指体积分数百分比。

[0086] 连续光谱多功能酶标仪,购自Tecan公司,型号Infinite M200。

[0087] 流式细胞仪购自Life Technologies,Carlsbad,CA,型号Attune® acoustic focusing cytometer,Applied Biosystems。

[0088] 离心机,购自北京雷勃尔离心机有限公司,型号LD5-2A。

[0089] 尼康倒置显微镜,购自冷泉科技有限公司,型号TS100。

[0090] 高效液相色谱仪,购自日本岛津公司,型号LCMS-20A。

[0091] 实验小鼠,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

[0092] 实施例1

[0093] 本实施例用于说明本发明棕榈酸修饰的多肽的制备方法。

[0094] 首先,将1mM棕榈酸、缩合剂二异丙基碳二亚胺(DIC,1mM)和消旋剂HOBT(2mM)溶于N,N-二甲基甲酰胺(DMF)溶液中,在37°C条件下与多肽N末端裸露的氨基混合反应1个小时。

[0095] 其次,在反应过程中每隔15分钟利用茚三酮检测法检测反应是否完全,具体方法包括:在EP管中加入20 μL 茚三酮试剂,用枪头蘸取一点树脂加入溶液中,将EP管放入100°C

水中,1min后观察溶液颜色变化,若溶液无颜色变化,则表明棕榈酸与多肽偶联成功。第三,将反应终产物用DMF、二氯甲烷(DCM)和甲醇溶液各洗涤3次后,得到棕榈酸修饰的多肽初产物。第四,配制裂解液,取棕色小玻璃瓶,在通风橱中加入裂解液和棕榈酸修饰的多肽初产物,室温摇床3h,随后以砂型漏洞过滤,分离树脂和棕榈酸-多肽;以配套圆底烧瓶收取棕榈酸-多肽,旋蒸,滴加冰无水乙醚,离心5min(转速3000rpm),倾倒乙醚,重复3次,将产物置于通风橱中,彻底风干。最后,利用高效液相色谱仪纯化得到高纯度的棕榈酸-多肽,冷冻干燥,得到棕榈酸-多肽粉末,用于下一步的细胞和动物实验。

[0096] 试验例1:不同序列多肽(p53-1~p53-13多肽)对A549肿瘤细胞系的毒性

[0097] 以A549作为研究p53野生型人源非小细胞肺癌细胞系的模型细胞。取对数生长期细胞,胰酶消化,细胞计数,用DMEM完全培养基(含10%胎牛血清FBS和1%青链霉素)将细胞稀释成 1×10^5 个细胞/mL培养基,在96孔板(Corning)中每孔加入100 μ L细胞悬液,即 1×10^4 个细胞/孔。将96孔板在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂条件的孵箱中预培养24h待细胞完全贴壁,向培养板中分别加入1-13号多肽(p53-1多肽~p53-13多肽)溶液,使多肽的最终浓度为100 μ M,空白对照组只加入PBS溶液。将培养板在孵箱中分别培养24h和48h后,弃掉原有培养基,每孔加入100 μ L MTT溶液(0.5mg/ml,PBS配置),37 $^{\circ}$ C孵育4h,弃去MTT溶液,每孔加入200 μ L DMSO,用酶标仪测定在590nm波长下的吸光度值(OD值),计算细胞存活率(细胞存活率=OD_{590nm}(多肽处理组)/(OD_{590nm}(空白对照)×100%)。该实验结果表明,如图1所示,与未经多肽处理的A549细胞相比,在A549细胞中加入不同序列的多肽孵育后,细胞存活率出现明显的差别。其中,在不同孵育时间下,第一条多肽(p53-1多肽)抗A549肿瘤细胞增殖活性最强,细胞存活率最低。

[0098] 试验例2:不同序列多肽(p53-1~p53-13多肽)对MCF-7肿瘤细胞系的毒性

[0099] 以MCF-7作为研究p53野生型人源乳腺癌细胞系的模型细胞。取对数生长期细胞,胰酶消化,细胞计数,用DMEM完全培养基(含10%胎牛血清FBS和1%青链霉素)将细胞稀释成 1×10^5 个细胞/mL培养基,在96孔板(Corning)中每孔加入100 μ L细胞悬液,即 1×10^4 个细胞/孔。将96孔板在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂条件的孵箱中预培养24h待细胞完全贴壁,向培养板中分别加入1-13号多肽(p53-1多肽~p53-13多肽)溶液,使多肽的最终浓度为100 μ M,空白对照组只加入PBS溶液。将培养板在孵箱中分别培养24h和48h后,弃掉原有培养基,每孔加入100 μ L MTT溶液,37 $^{\circ}$ C孵育4h,弃去MTT溶液,每孔加入200 μ L DMSO,用酶标仪测定在590nm波长下的吸光度值(OD值),计算细胞存活率。该实验结果表明,如图2所示,与未经多肽处理的MCF-7细胞相比,在MCF-7细胞中加入不同序列的多肽孵育后,细胞存活率出现明显的差别。其中,在不同孵育时间下,第一条多肽(p53-1多肽)抗MCF-7肿瘤细胞增殖活性最强,细胞存活率最低。

[0100] 试验例3:不同浓度p53-1多肽对MCF-7肿瘤细胞系的毒性

[0101] 考察不同浓度p53-1多肽对p53野生型人源乳腺癌细胞系MCF-7的细胞毒性。取对数生长期细胞,胰酶消化,细胞计数,在96孔板(Corning)中每孔接种 1×10^4 个细胞,在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂条件预培养24h待细胞完全贴壁,向培养板中分别加入含不同浓度p53-1多肽的培养基溶液,使多肽的最终浓度为5 μ M、10 μ M、20 μ M、40 μ M、80 μ M,空白对照组只加入PBS溶液,每个浓度设置3个复孔。将96孔板在孵箱中培养48h后,弃掉原有培养基,每孔加入100 μ L MTT溶液,37 $^{\circ}$ C孵育4h,弃去MTT溶液,每孔加入200 μ L DMSO,用酶标仪测定在590nm波长下的

吸光度值(OD值),计算细胞存活率。该实验结果表明,如图3所示,与未经多肽处理的MCF-7细胞相比,在MCF-7细胞中加入 $5\mu\text{M} \sim 80\mu\text{M}$ 的P53-1多肽后,随着多肽浓度增加,MCF-7细胞存活率逐渐降低,说明p53-1多肽能够显著抑制p53野生型乳腺癌细胞系MCF-7的生长,其半数致死率(IC_{50})浓度值为 $50\mu\text{M}$ 。

[0102] 试验例4:不同浓度p53-1多肽对A549肿瘤细胞系的毒性

[0103] 考察不同浓度p53-1多肽对p53野生型人源非小细胞肺癌细胞系A549的细胞毒性。取对数生长期细胞,胰酶消化,细胞计数,在96孔板(Corning)中每孔接种 1×10^4 个细胞,在 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 条件预培养24h待细胞完全贴壁,向培养板中分别加入含不同浓度P53-1多肽的培养基溶液,使多肽的最终浓度为 $2.5\mu\text{M}$ 、 $5\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$ 、 $20\mu\text{M}$ 、 $40\mu\text{M}$ 、 $80\mu\text{M}$,空白对照组只加入PBS溶液,每个浓度设置3个复孔。将96孔板在孵箱中培养72h后,弃掉原有培养基,每孔加入 $100\mu\text{L}$ MTT溶液, 37°C 孵育4h,弃去MTT溶液,每孔加入 $200\mu\text{L}$ DMSO,用酶标仪测定在 590nm 波长下的吸光度值(OD值),计算细胞存活率。该实验结果表明,如图4所示,与未经多肽处理的A549细胞相比,在A549细胞中加入 $2.5\mu\text{M} \sim 80\mu\text{M}$ 的p53-1多肽后,随着多肽浓度增加,A549细胞存活率逐渐降低,说明p53-1多肽能够显著抑制p53野生型人源非小细胞肺癌细胞系A549的生长,其半数致死率(IC_{50})浓度值为 $33.35\mu\text{M}$ 。

[0104] 试验例5:不同浓度p53-1多肽对SAOS-2肿瘤细胞系的毒性

[0105] 以SAOS-2作为研究p53突变型人源成骨肉瘤细胞系的模型细胞。取对数生长期细胞,胰酶消化,细胞计数,用McCoy's5A完全培养基(含 15% 胎牛血清FBS和 1% 青链霉素)将细胞接种在96孔板(Corning)中,每孔 1×10^4 个细胞。将96孔板在 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 条件的孵箱中预培养24h待细胞完全贴壁,加入含不同浓度p53-1多肽的培养基溶液,使多肽的最终浓度为 $3.125\mu\text{M}$ 、 $6.25\mu\text{M}$ 、 $12.5\mu\text{M}$ 、 $25\mu\text{M}$ 、 $50\mu\text{M}$ 、 $100\mu\text{M}$,空白对照组只加入PBS溶液,每个浓度设置3个复孔。将96孔板在孵箱中培养48h后,检测细胞存活率。该实验结果表明,如图5所示,与未经多肽处理的SAOS-2细胞相比,在SAOS-2细胞中加入 $3.125\mu\text{M} \sim 100\mu\text{M}$ 的p53-1多肽后,随着多肽浓度增加,SAOS-2细胞存活率逐渐降低,说明p53-1多肽能够显著抑制p53突变型人源成骨肉瘤细胞系SAOS-2的生长,其半数致死率(IC_{50})浓度值为 $15.6\mu\text{M}$ 。

[0106] 试验例6:不同浓度p53-1多肽对SKOV3肿瘤细胞系的毒性

[0107] 以SKOV3作为研究p53突变型人源卵巢癌细胞系的模型细胞。取对数生长期细胞,胰酶消化,细胞计数,用McCoy's5A完全培养基(含 10% 胎牛血清FBS和 1% 青链霉素)将细胞接种在96孔板(Corning)中, 1×10^4 个细胞/孔。将96孔板在 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 条件的孵箱中预培养24h待细胞完全贴壁,向培养板中分别加入含不同浓度p53-1多肽的培养基溶液,使多肽的最终浓度为 $3.125\mu\text{M}$ 、 $6.25\mu\text{M}$ 、 $12.5\mu\text{M}$ 、 $25\mu\text{M}$ 、 $50\mu\text{M}$ 、 $100\mu\text{M}$,空白对照组只加入PBS溶液,每个浓度设置3个复孔。将96孔板在孵箱中培养48h后,检测细胞存活率。该实验结果表明,如图6所示,与未经多肽处理的SKOV3细胞相比,在SKOV3细胞中加入 $3.125\mu\text{M} \sim 100\mu\text{M}$ 的p53-1多肽后,随着多肽浓度增加,SKOV3细胞存活率逐渐降低,说明p53-1多肽能够显著抑制p53突变型人源卵巢癌细胞系SKOV3的生长,其半数致死率(IC_{50})浓度值为 $12\mu\text{M}$ 。

[0108] 试验例7:不同浓度p53-1多肽对TC-1肿瘤细胞系的毒性

[0109] 以TC-1作为研究鼠源肺癌细胞系的模型细胞。取对数生长期细胞,胰酶消化,细胞计数,用RPMI 1640完全培养基(含 10% 胎牛血清FBS和 1% 青链霉素)将细胞接种在96孔板(Corning)中, 1×10^4 个细胞/孔。待细胞完全贴壁,向培养板中分别加入含不同浓度p53-1

多肽的培养基溶液,使多肽的最终浓度为3.125 μ M、6.25 μ M、12.5 μ M、25 μ M、37.5 μ M、50 μ M、75 μ M、100 μ M,空白对照组只加入PBS溶液,每个浓度设置3个复孔。将96孔板在孵箱中培养48h后,检测细胞存活率。该实验结果表明,如图7所示,与未经多肽处理的TC-1细胞相比,在TC-1细胞中加入3.125 μ M~100 μ M的p53-1多肽后,随着多肽浓度增加,TC-1细胞存活率逐渐降低,说明p53-1多肽能够显著抑制鼠源肺癌细胞系TC-1的生长,其半数致死率(IC₅₀)浓度值为18.71 μ M。

[0110] 试验例8:不同浓度p53-1多肽对MC38肿瘤细胞系的毒性

[0111] 以MC38作为研究鼠源结肠癌细胞系的模型细胞。取对数生长期细胞,胰酶消化,细胞计数,用DMEM完全培养基(含10%胎牛血清FBS和1%青链霉素)将细胞接种在96孔板(Corning)中,1 \times 10⁴个细胞/孔。待细胞完全贴壁,向培养板中分别加入含不同浓度棕榈酸修饰的p53-1多肽(Pa1-p53-1)的培养基溶液,使多肽的最终浓度为3.125 μ M、6.25 μ M、12.5 μ M、18.78 μ M、25 μ M、37.5 μ M、50 μ M、75 μ M、100 μ M,空白对照组只加入PBS溶液,每个浓度设置3个复孔。将96孔板在孵箱中培养48h后,检测细胞存活率。该实验结果表明,如图8所示,与未经Pa1-p53-1多肽处理的MC38细胞相比,在MC38细胞中加入3.125 μ M~100 μ M的Pa1-p53-1多肽后,随着多肽浓度增加,MC38细胞存活率逐渐降低,说明Pa1-p53-1多肽能够显著抑制鼠源结肠癌细胞系MC38生长,其半数致死率(IC₅₀)浓度值为22.5 μ M。

[0112] 试验例9:不同浓度p53-1多肽对MRC5正常细胞系的毒性

[0113] MRC5为人正常胚肺成纤维细胞系,作为研究正常人组织来源的模型细胞。取对数生长期细胞,胰酶消化,细胞计数,用MEM完全培养基(含10%胎牛血清FBS和1%青链霉素)将细胞接种在96孔板(Corning)中,1 \times 10⁴个细胞/孔。待细胞完全贴壁,向培养板中分别加入含不同浓度p53-1多肽的培养基溶液,使多肽的最终浓度为3.125 μ M、6.25 μ M、12.5 μ M、25 μ M、37.5 μ M、50 μ M、75 μ M、100 μ M,空白对照组只加入PBS溶液,每个浓度设置3个复孔。将96孔板在孵箱中培养48h后,检测细胞存活率。该实验结果表明,如图9所示,与未经多肽处理的MRC5细胞相比,在MRC5细胞中加入3.125 μ M~100 μ M的p53-1多肽后,当多肽浓度低于50 μ M,细胞存活状态与空白对照组基本一致,其存活率几乎为100%。随着多肽浓度继续增加,细胞存活率出现下降,在100 μ M范围内,其细胞存活率均高于65%,即表示其半数致死率(IC₅₀)大于100 μ M,显著高于试验例1~8中的p53野生型和突变缺失型肿瘤细胞系的IC₅₀。

[0114] 试验例10:p53-1多肽处理MCF-7肿瘤细胞后LDH相对释放量

[0115] 取对数生长期MCF-7细胞,胰酶消化,细胞计数,用DMEM完全培养基将细胞接种在96孔板(Corning)中,每孔加入5 \times 10⁴个细胞。待细胞完全贴壁,向培养板中分别加入不同浓度p53-1多肽溶液,使多肽的最终浓度为15 μ M和30 μ M,空白对照组只加入PBS溶液。将培养板在孵箱中分别培养4h后,用乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(Promega)检测胞外LDH含量。具体实验步骤包括:取50 μ L细胞培养上清液,加入50 μ L反应液,室温避光反应30min,然后加入50 μ L反应终止液,用酶标仪测定在490nm波长下的吸光度值(OD值)。该实验结果表明,如图10所示,与未经多肽处理的MCF-7细胞相比,在MCF-7细胞中加入不同浓度的多肽孵育后,胞外LDH的释放量是随着多肽浓度增加而增加的,说明p53-1多肽破坏了MCF-7细胞的细胞膜通透性。

[0116] 试验例11:p53-1多肽处理A549肿瘤细胞后LDH相对释放量

[0117] 取对数生长期A549细胞,胰酶消化,细胞计数,用DMEM完全培养基将细胞接种在96

孔板(Corning)中,每孔加入 5×10^4 个细胞。待细胞完全贴壁,向培养板中分别加入不同浓度p53-1多肽溶液,使多肽的最终浓度为 $15 \mu\text{M}$ 和 $30 \mu\text{M}$,空白对照组只加入PBS溶液。将培养板在孵箱中分别培养4h后,用LDH试剂盒(Promega)检测胞外LDH含量。该实验结果表明,如图11所示,与未经多肽处理的A549细胞相比,在A549细胞中加入不同浓度的p53-1多肽孵育后,胞外LDH的释放量是随着多肽浓度增加而增加的,说明p53-1多肽破坏了A549细胞的细胞膜通透性。

[0118] 试验例12:Pa1-p53-1多肽处理后的TC-1肿瘤细胞形态图

[0119] 以TC-1作为研究鼠源肺癌细胞系的模型细胞。取对数生长期细胞,胰酶消化,细胞计数,用RPMI 1640完全培养基(含10%胎牛血清FBS和1%青链霉素)将细胞接种在24孔板(Corning)中, 1×10^5 个细胞/孔,待细胞完全贴壁,向培养板中分别加入含不同浓度棕榈酸修饰的p53-1多肽(Pa1-p53-1)的培养基溶液,使多肽的最终浓度为 $7.25 \mu\text{M}$ 、 $15 \mu\text{M}$ 、 $30 \mu\text{M}$,空白对照组只加入PBS溶液,在不同时间点(0min、5min、0.5h、1h、2h、4h和6h)用尼康倒置显微镜对细胞进行拍照。如图12所示,未经多肽处理的TC-1细胞轮廓清晰,生长状态良好,随着加入Pa1-p53-1多肽浓度不断增加,与细胞孵育时间不断延长,细胞逐渐变圆,其细胞膜出现明显的缺陷,说明Pa1-p53-1多肽对TC-1细胞具有一定的毒性。

[0120] 试验例13:荷瘤C57小鼠的体重变化图

[0121] 取对数生长期TC-1细胞,胰酶消化后计数,皮下接种C57小鼠,每只老鼠接种 5×10^4 个细胞。当肿瘤体积生长到 30mm^3 ,开始给予棕榈酸修饰的p53-1多肽(Pa1-p53-1多肽)治疗,注射方式为瘤内注射,剂量为 $15 \text{mg}/\text{kg}$,隔天给药,连续给药5次。空白对照组瘤内注射生理盐水。从第一次给药时间记为Day 0,连续10天每天称量老鼠体重。从实验结果可以看出,如图13所示,相比于空白对照组,Pa1-p53-1多肽给药组老鼠的体重并没有发生明显的变化,该实验结果表明Pa1-p53-1多肽在C57小鼠体内具有较好的生物相容性。

[0122] 试验例14:荷瘤C57小鼠的瘤体积变化图

[0123] 取对数生长期TC-1细胞,胰酶消化后计数,皮下接种C57小鼠,每只老鼠接种 5×10^4 个细胞。当肿瘤体积生长到 30mm^3 ,开始给予棕榈酸修饰的P53-1多肽(Pa1-p53-1多肽)治疗,注射方式为瘤内注射,剂量为 $15 \text{mg}/\text{kg}$,隔天给药,连续给药5次。空白对照组瘤内注射生理盐水。从第一次给药时间记为Day 0,连续10天每天称量老鼠体重。从实验结果可以看出,如图14所示,相比于空白对照组,Pa1-p53-1多肽给药组的瘤体积明显降低,该实验结果表明Pa1-p53-1多肽能够显著抑制裸鼠肿瘤生长。

[0124] 试验例15:荷瘤Balb/c小鼠的瘤体积变化图

[0125] 取对数生长期CT26细胞,胰酶消化后计数,皮下接种Balb/c小鼠,每只老鼠接种 3×10^6 个细胞。从接种肿瘤细胞的时间记为Day 0,当肿瘤体积分别生长到 $40 \sim 50 \text{mm}^3$ (Day 9)和 $100 \sim 150 \text{mm}^3$ (Day 12)时,开始给予p53-1多肽治疗,注射方式为瘤内注射,剂量为 $15 \text{mg}/\text{kg}$,隔天给药,连续给药4次。空白对照组瘤内注射生理盐水。从Day 7开始,连续13天每天用游标卡尺量老鼠肿瘤的长度(l)和宽度(d),瘤体积(Tumor Volume) = $1/2 * l * d^2$ 。从实验结果可以看出,如图15所示,相比于空白对照组,p53-1多肽给药组的瘤体积明显降低,该实验结果表明p53-1多肽能够显著抑制Balb/c小鼠肿瘤生长。

[0126] 尽管本发明已进行了一定程度的描述,明显地,在不脱离本发明的精神和范围的条件下,可进行各个条件的适当变化。可以理解,本发明不限于所述实施方案,而归于权利

要求的范围,其包括所述每个因素的等同替换。

[0117]		20		25		30
[0118]	<210>	13				
[0119]	<211>	32				
[0120]	<212>	PRT				
[0121]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)				
[0122]	<400>	13				
[0123]	Asp Arg Asp Asp Asp Ile Tyr Thr Met Ile Tyr Asp Asn Leu Val Val					
[0124]	1	5		10		15
[0125]	Val Asn Gln Gln Arg Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg					
[0126]		20		25		30

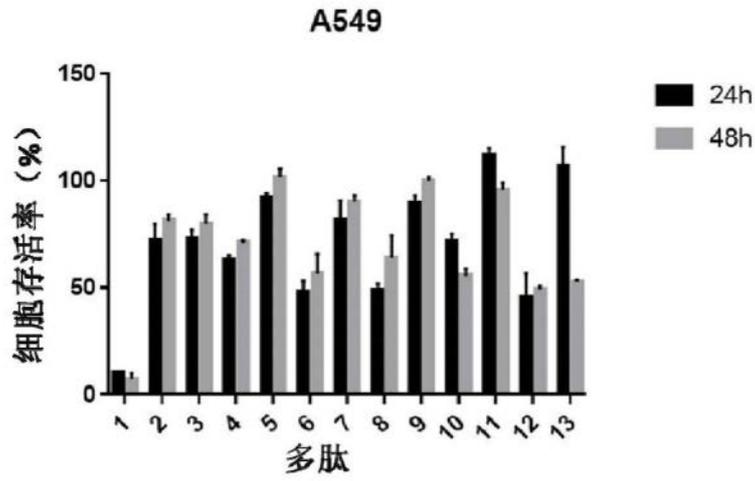


图1

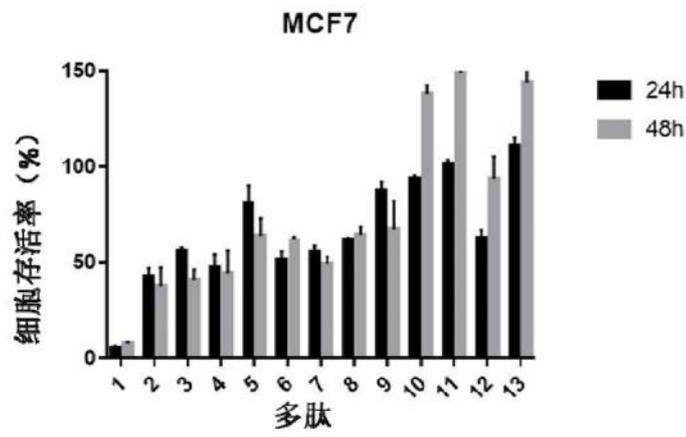


图2

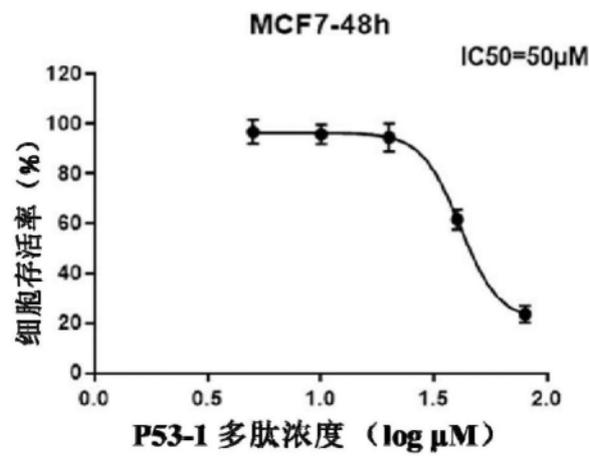


图3

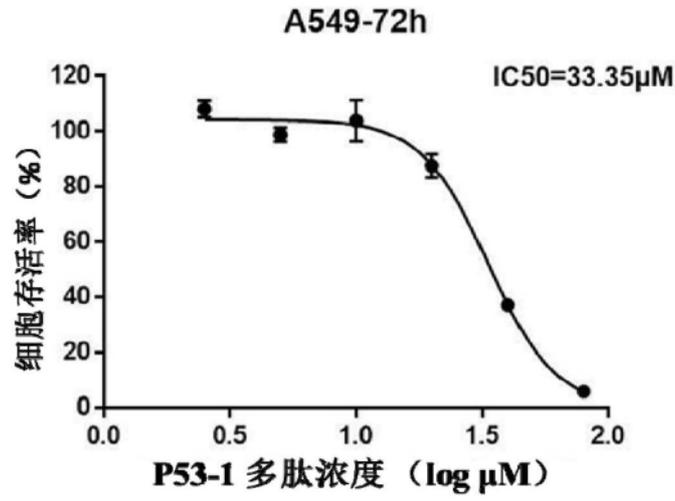


图4

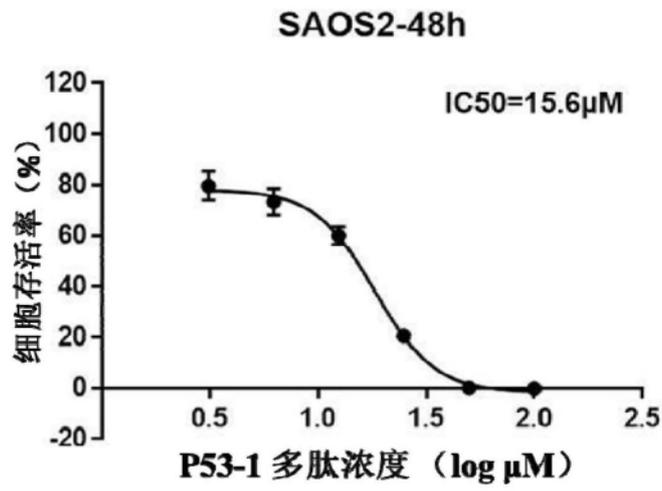


图5

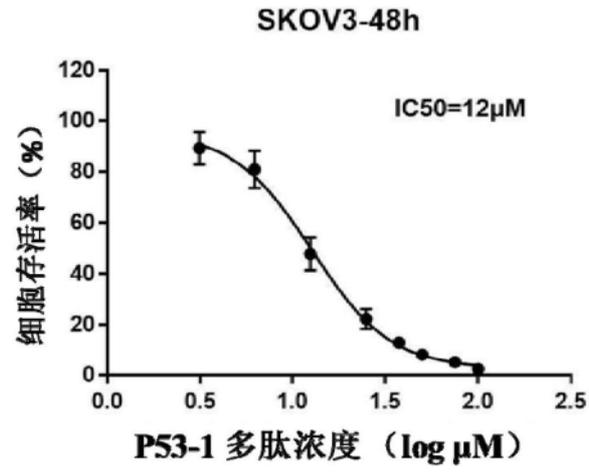


图6

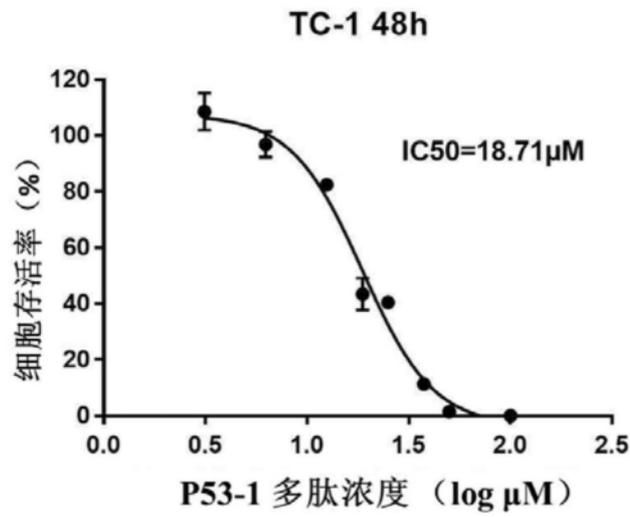


图7

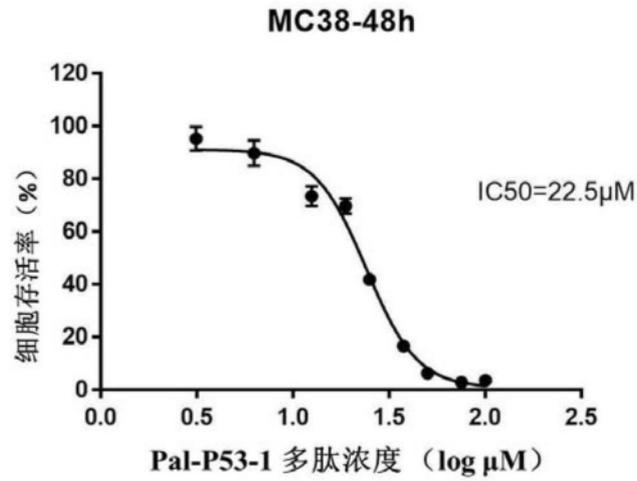


图8

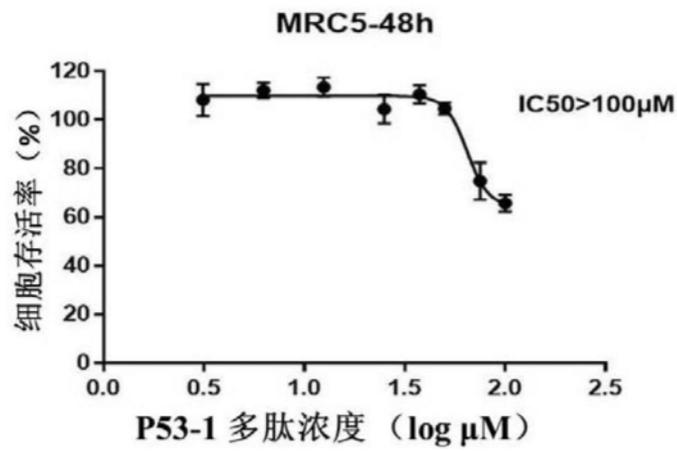


图9

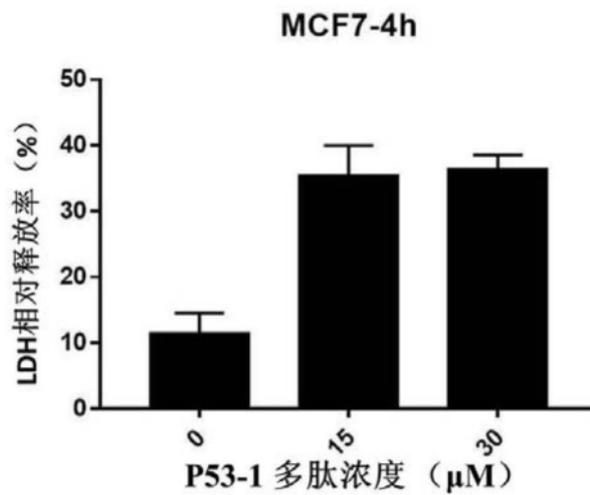


图10

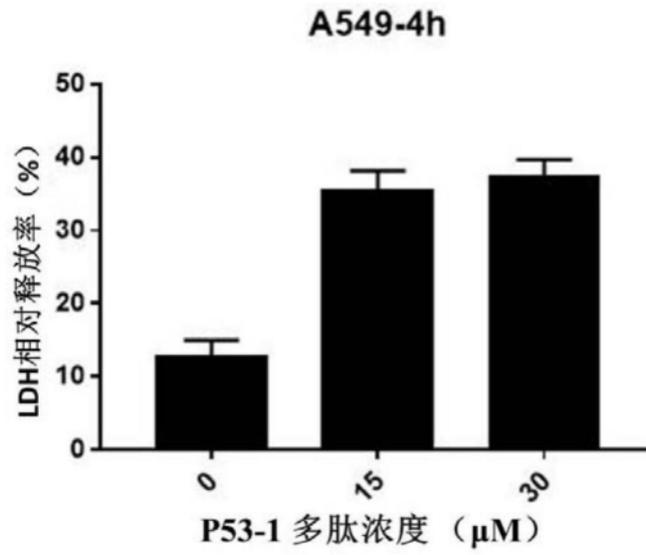


图11

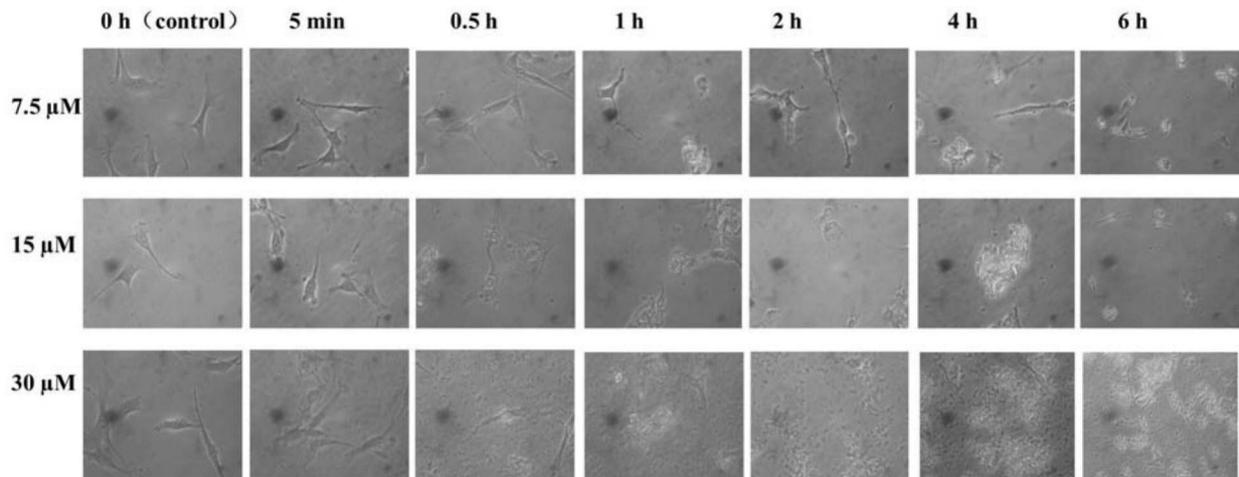


图12

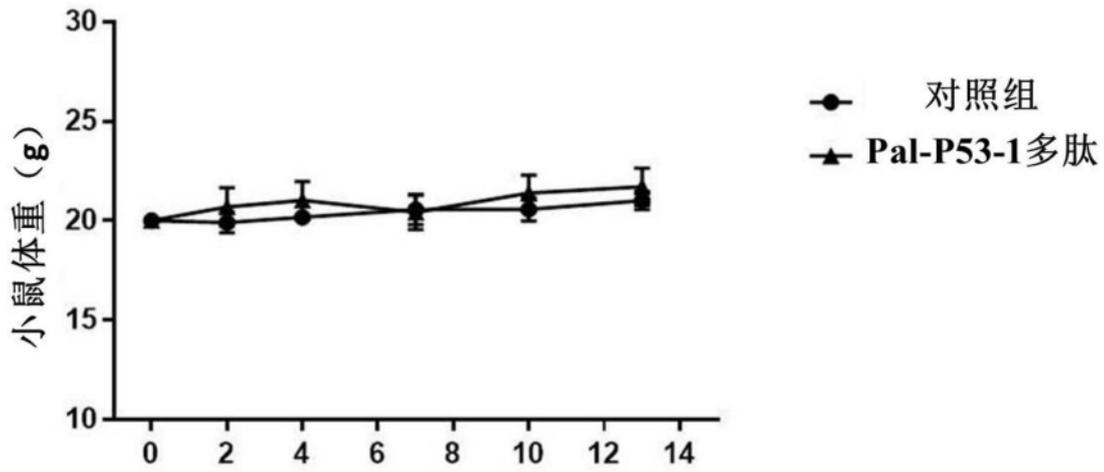


图13

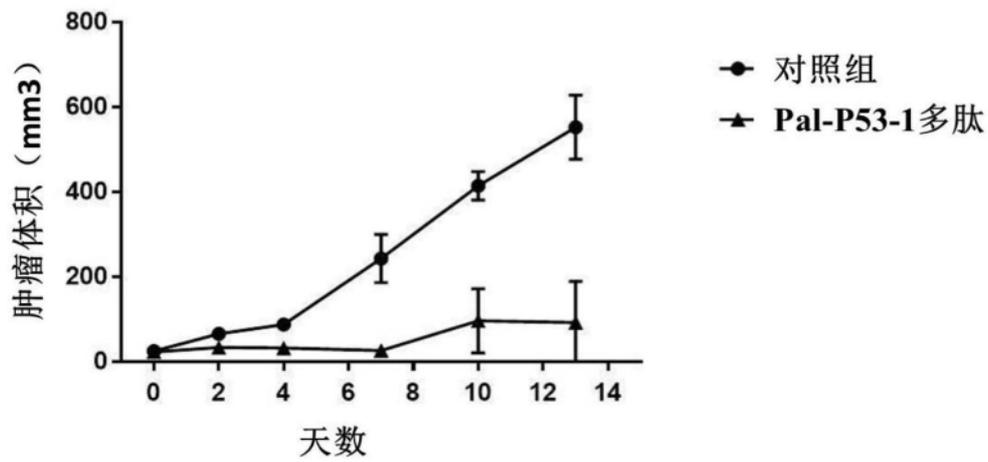


图14

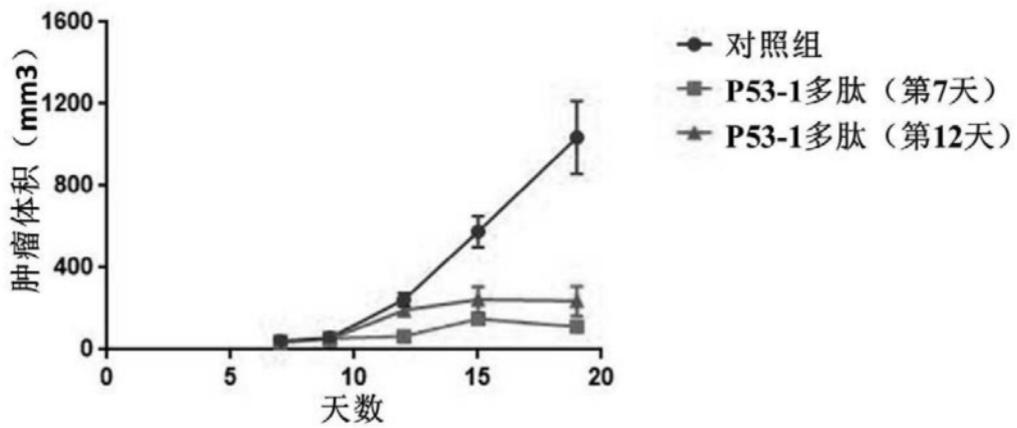


图15