



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108078958 A

(43)申请公布日 2018.05.29

(21)申请号 201711459089.8

(22)申请日 2017.12.28

(71)申请人 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 丁艳萍 聂广军 程科满

(74)专利代理机构 北京品源专利代理有限公司 11332

代理人 巩克栋

(51)Int.Cl.

A61K 9/51(2006.01)

A61K 47/54(2017.01)

A61K 38/16(2006.01)

A61K 45/06(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

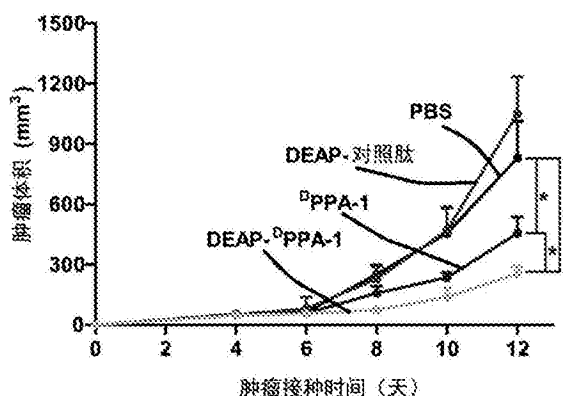
权利要求书2页 说明书10页 附图7页

(54)发明名称

一种抗肿瘤多肽纳米药物及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明提供了一种抗肿瘤多肽纳米药物及其制备方法和应用,所述抗肿瘤多肽纳米药物包括两亲性抗肿瘤多肽以及与两亲性抗肿瘤多肽偶联的酸响应性功能分子;所述两亲性抗肿瘤多肽包括亲水性抗肿瘤多肽、酶响应多肽和疏水性多肽,通过本发明制备方法制备得到的抗肿瘤多肽纳米药物克服了普通多肽药物半衰期短的瓶颈,是一种具有肿瘤部位弱酸环境和蛋白酶双重响应性、生物相容性好、稳定性强、安全性高、生物利用度高和良好抗肿瘤功能的肿瘤免疫治疗多肽纳米药物。



1. 一种抗肿瘤多肽纳米药物,其特征在于,所述抗肿瘤多肽纳米药物包括两亲性抗肿瘤多肽以及与两亲性抗肿瘤多肽偶联的酸响应性功能分子;所述两亲性抗肿瘤多肽包括亲水性抗肿瘤多肽、酶响应多肽和疏水性多肽。

2. 根据权利要求1所述的抗肿瘤多肽纳米药物,其特征在于,所述两亲性抗肿瘤多肽包括通过酰胺键偶联在一起的亲水性抗肿瘤多肽、酶响应多肽和疏水性多肽;所述酸响应性功能分子包括异氰酸酯类分子。

3. 根据权利要求2所述的抗肿瘤多肽纳米药物,其特征在于,所述酸响应性功能分子通过疏水性多肽末端氨基偶联至疏水性多肽上;

优选地,所述抗肿瘤多肽纳米药物还包括与疏水性多肽连接的赖氨酸;

优选地,所述酸响应性功能分子通过赖氨酸连接至疏水性多肽上;

优选地,所述与疏水性多肽连接的赖氨酸包括1-5个赖氨酸形成的肽链;

优选地,所述赖氨酸的末端氨基和侧链氨基均与所述酸响应性功能分子连接。

4. 根据权利要求2或3所述的抗肿瘤多肽纳米药物,其特征在于,所述亲水性抗肿瘤多肽为具有阻断免疫检查点功能的多肽分子中的任意一种或至少两种的组合;

优选地,所述亲水性抗肿瘤多肽为包括8-30个氨基酸的可溶性多肽;

优选地,所述酶响应多肽为MMP-2的底物肽,包括脯氨酸-亮氨酸-甘氨酸-亮氨酸-丙氨酸-甘氨酸、脯氨酸-亮氨酸-甘氨酸-丝氨酸-酪氨酸-亮氨酸、甘氨酸-脯氨酸-亮氨酸-甘氨酸-异亮氨酸-丙氨酸-甘氨酸-谷氨酰胺或脯氨酸-亮氨酸-甘氨酸-甲硫氨酸-色氨酸-丝氨酸-精氨酸中的任意一种氨基酸序列所组成的多肽分子;

优选地,所述疏水性多肽为含有5-40个疏水性氨基酸的多肽;

优选地,所述疏水性多肽包括亮氨酸、丙氨酸、甘氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸、脯氨酸、缬氨酸或酪氨酸中的任意一种或至少两种的组合;

优选地,所述酸响应性功能分子进行酸响应的pH值为6.7-7.2;

优选地,所述异氰酸酯类分子为3-(二乙基氨基)丙基硫代异氰酸酯。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的抗肿瘤多肽纳米药物,其特征在于,所述抗肿瘤多肽纳米药物的结构如下:亲水性抗肿瘤多肽-(MMP-2的底物肽)-(甘氨酸形成的二肽)-(亮氨酸形成的二肽)-(赖氨酸形成的三肽)-(DEAP)₄;

其中,亲水性抗肿瘤多肽为^DPPA-1多肽,MMP-2的底物肽氨基酸序列为脯氨酸-亮氨酸-甘氨酸-亮氨酸-丙氨酸-甘氨酸,甘氨酸形成的二肽和亮氨酸形成的二肽组成疏水性多肽,DEAP为3-(二乙基氨基)丙基硫代异氰酸酯;

优选地,所述抗肿瘤多肽纳米药物的粒径为10-200nm。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的抗肿瘤多肽纳米药物的制备方法,其特征在于,所述方法包括:以氨基酸为原料,合成亲水性抗肿瘤多肽、酶响应多肽和疏水性多肽,组成两亲性抗肿瘤多肽分子,而后在两亲性抗肿瘤多肽分子上引入酸响应性功能分子,然后进行自组装得到所述抗肿瘤多肽纳米药物。

7. 根据权利要求6所述的抗肿瘤多肽纳米药物的制备方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

(1) 以氨基酸为原料,利用固相合成法合成亲水性抗肿瘤多肽、酶响应多肽和疏水性多肽,疏水性多肽末端连接有赖氨酸的两亲性抗肿瘤酶响应多肽分子;

(2) 使步骤(1)合成的两亲性抗肿瘤酶响应多肽分子的疏水性多肽末端的赖氨酸与酸响应性功能分子偶联；

(3) 将步骤(2)的产物在中性水环境中自组装得到所述抗肿瘤多肽纳米药物；

优选地,步骤(3)中所述中性水环境为pH为7.4的磷酸盐缓冲溶液。

8. 根据权利要求6或7所述的抗肿瘤多肽纳米药物的制备方法,其特征在于,所述方法具体包括以下步骤:

(1) 氨基酸的末端氨基均由Fmoc保护,用于合成亲水性抗肿瘤多肽的赖氨酸侧链氨基由Boc保护,用于偶联功能分子的赖氨酸侧链的氨基由Cbz保护;

(2) 将所要合成的两亲性多肽分子由Fmoc保护的第一个氨基酸的末端羧基与CLEAR-酰胺树脂的氨基末端连接,通过哌啶和N,N-二甲基甲酰胺的混合溶液脱去Fmoc保护基,然后以此结合在树脂上的氨基酸作为氨基组分,同过量的含活化羧基的下一个氨基酸反应接长肽链,重复上述操作直至所有的氨基酸缩合完毕,形成肽链上氨基被保护的两亲性抗肿瘤酶响应多肽分子;

(3) 将两亲性抗肿瘤酶响应多肽分子用哌啶和N,N-二甲基甲酰胺的混合溶液脱去Fmoc保护基,用催化氢解法脱去Cbz保护基,使酸响应性功能分子与脱去保护的氨基反应,从而将酸响应性功能分子连接至两亲性抗肿瘤酶响应多肽上;

(4) 用三氟乙酸的二氯甲烷溶液将肽链从树脂上裂解下来,两亲性抗肿瘤酶响应多肽上Boc保护基团也将同时脱去,经过纯化处理,即得到连接有酸响应性功能分子的两亲性抗肿瘤酶响应多肽分子;

(5) 将所得到的连接有酸响应性功能分子的两亲性抗肿瘤酶响应多肽分子在中性水环境中进行自组装形成纳米颗粒体系,即得到所述抗肿瘤多肽纳米药物。

9. 一种肿瘤免疫治疗纳米药物组合体系,其特征在于,所述肿瘤免疫治疗纳米药物组合体系是以如权利要求1-5中所述的抗肿瘤多肽纳米药物作为载体,包载有吡啶胺-2,3-双加氧酶抑制剂。

10. 根据权利要求1-5中任一项所述的抗肿瘤多肽纳米药物在制备抗肿瘤药物中的应用。

一种抗肿瘤多肽纳米药物及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于纳米材料领域,涉及一种抗肿瘤多肽纳米药物及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 近年来基于阻断免疫检查点实现肿瘤免疫治疗的策略被广泛研究,与传统放化疗相比,该策略疗效显著且持久,不良反应小,为真正治愈肿瘤提供了希望。目前临床应用的免疫检查点药物主要为程序性死亡受体1(programmed death1,PD-1)、程序性死亡配体1(programmed death-ligand 1,PD-L1)和细胞毒T淋巴细胞相关抗原4(cytotoxic T-lymphocyte antigen 4,CTLA-4)的抗体。在临床使用过程中,人们发现仅有不足30%的患者能积极响应免疫检查点治疗,大部分患者对这些药物天然无应答,如何提高患者免疫检查点治疗的响应率是该领域亟需研究的一个重要问题。此外,这些药物被发现仍然存在一定的毒副作用,尤其是多种免疫检查点药物联合应用导致的不良反应率更高,其中一个重要原因是抗体类药物的免疫原性很高。抗体药物还存在研发周期长、制备成本高和组织渗透率低等问题。解决这些问题需要寻找新的有效且毒副作用低的免疫检查点抑制剂或利用新技术改进已有的药物,并与肿瘤部位的其它免疫抑制分子阻断剂联合应用,以提高抗肿瘤免疫应答效率。

[0003] 吡嗪胺-2,3-双加氧酶是色氨酸代谢过程中的关键限速酶,可催化色氨酸分解为犬尿氨酸,从而抑制T细胞增殖。研究发现,很多肿瘤细胞过度表达吡嗪胺-2,3-双加氧酶,导致肿瘤局部色氨酸耗竭和犬尿氨酸累积,进而构建免疫抑制微环境,使肿瘤细胞逃避T细胞的杀伤。近期研究表明,免疫检查点PD-1抗体Keytruda与吡嗪胺-2,3-双加氧酶抑制剂Epacadostat联合应用于晚期黑色素瘤患者,客观响应率能达到56%,疾病控制率达到74%,比Keytruda单独使用响应率更高。因此,免疫检查点阻断与色氨酸代谢阻断的有机结合,是肿瘤免疫治疗的一种重要策略。

[0004] 一直以来,多肽类药物的研发备受关注。与抗体和小分子药物相比,多肽药物免疫原性低、受体结合率高、制备成本低且易于改造以便于与其他药物联用。将阻断免疫检查点抗体药物中的抗原结合区分析筛选并进行表达,制备成免疫检查点阻断的多肽药物将能够很好解决抗体药物的不足。但多肽类药物最大的缺点是体内半衰期短,易被蛋白酶降解和肝肾等脏器代谢。因此,改善多肽的药代动力学而不降低其疗效是多肽药物研发的重要方向。

[0005] 纳米药物是新兴的药物剂型,通过设计和调控有机或无机材料的纳米特性,制备结构稳定、功能多样和生物相容性好的纳米载体,可显著延长药物半衰期、提高靶向性、降低用药剂量并实现联合用药。通过合理调控多肽的分子结构和改变外界环境,某些多肽分子间或多肽分子中某一片段和另一片段之间可利用非共价的弱相互作用力,如氢键、范德华力、静电力、疏水作用和 π - π 堆积作用等,自发或触发地自组装成具有特定排列顺序的分子聚集体。多肽自身具有良好的生物相容性和可控的降解性能,但是其在体内的稳定性不够,分子结构易于被破坏。如果将抗肿瘤多肽通过改造使其能直接组装成纳米结构,可开发

出分散性好、纯度高、毒副作用低和稳定性高的抗肿瘤纳米药物。

[0006] 研究表明,恶性肿瘤组织的pH环境为微酸性,肿瘤部位pH值在6.7-7.2之间,并且肿瘤细胞外基质中特异性高表达多种特征蛋白,例如基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2,MMP-2)。因此,为了减少药物对于正常组织细胞的毒副作用,期望能够得到一种pH和MMP-2酶双响应性纳米药物,其在体内运输过程中可以稳定存在,而当到达肿瘤部位时可以释放药物以达到治疗肿瘤目的。

发明内容

[0007] 针对现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种抗肿瘤多肽纳米药物及其制备方法和应用。

[0008] 为达到此发明目的,本发明采用以下技术方案:

[0009] 第一方面,本发明提供了一种抗肿瘤多肽纳米药物,所述抗肿瘤多肽纳米药物包括两亲性抗肿瘤多肽以及与两亲性抗肿瘤多肽偶联的酸响应性功能分子;所述两亲性抗肿瘤多肽包括亲水性抗肿瘤多肽、酶响应多肽和疏水性多肽。

[0010] 本发明提供的抗肿瘤多肽纳米药物克服了普通多肽药物半衰期短的瓶颈,是一种具有肿瘤部位弱酸环境和蛋白酶双重响应性、生物相容性好、稳定性强、安全性高、生物利用度高和良好抗肿瘤功能的肿瘤免疫治疗多肽纳米药物。

[0011] 与裸肽相比,在中性环境下,抗肿瘤多肽纳米药物形成高度有序的纳米结构,隐藏了多肽上的受体结合位点,从而延长了在体内循环的半衰期。

[0012] 目前存在的具有抗肿瘤性的多肽分子大多数是亲水性的,但是其体内半衰期短,易被蛋白酶降解和肝肾等脏器代谢,并且一些少数的两亲性多肽分子由于疏水与亲水片段之间的比例不协调造成很难形成纳米颗粒,因此,本发明对亲水性抗肿瘤多肽进行改造,将亲水性抗肿瘤多肽片段和疏水性多肽片段(包含酶响应底物片段)相结合,改造成两亲性肿瘤免疫治疗酶响应多肽,而后与酸响应性功能分子偶联得到的肿瘤免疫治疗多肽纳米药物,相容性好,稳定,使得其在体内的半衰期延长,也提高了对肿瘤部位的靶向性以及肿瘤免疫治疗多肽分子的生物利用度,另外,由于该药物中含有酶响应多肽片段和酸响应性功能分子使得纳米药物具有酶响应性和酸响应性,以在肿瘤细胞外基质高表达MMP-2酶和pH值为酸性的环境下,实现较好的药物释放和富集并达到良好的治疗效果。

[0013] 此外,本发明将所述肿瘤免疫治疗多肽药物制备成纳米颗粒,是因为纳米颗粒体系稳定,肿瘤富集作用强,具有靶向性,此外,将其制备成纳米颗粒还可以使得亲水性抗肿瘤多肽上的受体结合位点不暴露在外,提高了亲水性抗肿瘤多肽分子在体内的稳定性。

[0014] 优选地,所述两亲性抗肿瘤多肽包括通过酰胺键偶联在一起的亲水性抗肿瘤多肽、酶响应多肽和疏水性多肽;所述酸响应性功能分子包括异氰酸酯类分子。

[0015] 优选地,所述酸响应性功能分子通过疏水性多肽末端氨基偶联至疏水性多肽上。

[0016] 优选地,所述抗肿瘤多肽纳米药物还包括与疏水性多肽连接的赖氨酸。

[0017] 优选地,所述酸响应性功能分子通过赖氨酸连接至疏水性多肽上。

[0018] 优选地,所述与疏水性多肽连接的赖氨酸包括1-5个赖氨酸形成的肽链,例如可以是1个、2个、3个、4个或5个。

[0019] 优选地,所述赖氨酸的末端氨基和侧链氨基均与所述酸响应性功能分子连接。

[0020] 在本发明中,所述与疏水性多肽连接的赖氨酸为1个赖氨酸或2-5个赖氨酸形成的肽链,例如疏水性多肽可以连接1个赖氨酸,或者疏水性多肽可以连接有2、3、4或5个赖氨酸形成的肽链。在疏水性多肽上引入赖氨酸,而后再通过赖氨酸引入酸响应性功能分子,这样可以在肿瘤免疫治疗多肽上引入多个酸响应性功能分子,例如,当疏水性多肽不连接赖氨酸时,通过疏水性氨基酸末端氨基连接一个酸响应性功能分子,而当疏水性多肽连接一个赖氨酸时,可以通过赖氨酸的末端氨基和侧链氨基共连接2个酸响应性功能分子,如果疏水性多肽连接的是3个赖氨酸形成的肽链,其中赖氨酸的连接方式可以为直链型和分枝型,可以通过赖氨酸肽链的末端氨基和侧链氨基共连接4个酸响应性功能分子。连接奇数个赖氨酸并且以分枝型排布可以更好的连接酸响应功能分子。连接多个酸响应性功能分子能够保证两亲性多肽疏水端的疏水性,并使得药物在肿瘤部位发生酸响应的动力更强。

[0021] 优选地,所述亲水性抗肿瘤多肽为具有阻断免疫检查点功能的多肽分子中的任意一种或至少两种的组合。

[0022] 优选地,所述亲水性抗肿瘤多肽为包括8-30个氨基酸的可溶性多肽,例如可以是8个、10个、13个、15个、20个、24个、26个、28个或30个。

[0023] 优选地,所述酶响应多肽为MMP-2的底物肽,包括脯氨酸-亮氨酸-甘氨酸-亮氨酸-丙氨酸-甘氨酸、脯氨酸-亮氨酸-甘氨酸-丝氨酸-酪氨酸-亮氨酸、甘氨酸-脯氨酸-亮氨酸-甘氨酸-异亮氨酸-丙氨酸-甘氨酸-谷氨酰胺或脯氨酸-亮氨酸-甘氨酸-甲硫氨酸-色氨酸-丝氨酸-精氨酸中的任意一种氨基酸序列所组成的多肽分子。

[0024] 在本发明中酶响应底物是指在每种酶高表达的环境刺激下具有发生酶解能力的多肽片段,例如,脯氨酸-亮氨酸-甘氨酸-亮氨酸-丙氨酸-甘氨酸所组成的多肽分子可以在MMP-2作用下被酶解。

[0025] 优选地,所述疏水性多肽为含有5-40个疏水性氨基酸的多肽,例如可以是5个、7个、10个、15个、20个、25个、30个、35个或40个。

[0026] 优选地,所述疏水性多肽包括亮氨酸、丙氨酸、甘氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸、脯氨酸、缬氨酸或酪氨酸中的任意一种或至少两种的组合。

[0027] 优选地,所述酸响应性功能分子进行酸响应的pH值为6.7-7.2,例如可以是6.7、6.8、6.9、7.0、7.1或7.2。

[0028] 在本发明中,酸响应的弱酸性pH值是相对于人体内正常组织内的pH值而言的,人体正常组织的pH值为7.4,而肿瘤部位的pH值为6.7-7.2,因此相对于人体正常组织来说,肿瘤组织部位的pH环境为弱酸性。

[0029] 酸响应性功能分子在pH值为6.7-7.2时,可以被质子化,导致多肽疏水端之间产生正电荷排斥力,使自组装纳米颗粒形态膨胀甚至解聚。

[0030] 由于肿瘤部位的pH值为弱酸性环境即(6.7-7.2),该药物在pH值为6.7-7.2时,会使得药物纳米颗粒在短期内发生膨胀,纳米颗粒结构变松散,使得肿瘤组织中的MMP-2酶能够结合并水解两亲性抗肿瘤多肽上的酶响应底物肽,多肽自组装纳米药物解聚,并彻底释放出免疫治疗多肽,从而发挥出药效。

[0031] 优选地,所述异氰酸酯类分子为3-(二乙基氨基)丙基硫代异氰酸酯。

[0032] 在本发明中,酸响应性功能分子是指在一定酸性环境下的刺激下具有发生某种反应的能力的分子,3-(二乙基氨基)丙基硫代异氰酸酯分子在酸性环境下可以被质子化。

[0033] 优选地,所述抗肿瘤多肽纳米药物的结构如下:亲水性抗肿瘤多肽-(MMP-2的底物肽)-(甘氨酸形成的二肽)-(亮氨酸形成的二肽)-(赖氨酸形成的三肽)-(DEAP)₄。

[0034] 其中,亲水性抗肿瘤多肽为^DPPA-1多肽,MMP-2的底物肽氨基酸序列为脯氨酸-亮氨酸-甘氨酸-亮氨酸-丙氨酸-甘氨酸,甘氨酸形成的二肽和亮氨酸形成的二肽组成疏水性多肽,DEAP为3-(二乙基氨基)丙基硫代异氰酸酯。

[0035] ^DPPA-1多肽为,拮抗免疫检查点PD-L1并且能够抑制肿瘤生长的D-peptide antagonist多肽。

[0036] 优选地,所述抗肿瘤多肽纳米药物的粒径为10-200nm,例如可以是10nm、20nm、40nm、60nm、80nm、100nm、140nm、160nm、180nm或200nm。

[0037] 本发明制备的抗肿瘤多肽纳米药物的粒径在10-200nm,粒径较均一,有利于在肿瘤部位的富集,提高了药物的靶向性,减少了对正常细胞的毒副作用。

[0038] 第二方面,本发明提供了一种如第一方面所述的抗肿瘤多肽纳米药物的制备方法,所述方法包括:以氨基酸为原料,合成亲水性抗肿瘤多肽、酶响应多肽和疏水性多肽,组成两亲性抗肿瘤多肽分子,而后在两亲性抗肿瘤多肽分子上引入酸响应性功能分子,然后进行自组装得到所述抗肿瘤多肽纳米药物。

[0039] 在本发明中,由于多肽分子侧链可带不同电荷,通过设计和修饰使多肽分子具有微酸性pH响应性,其中最简易的方法就是通过两亲性多肽自组装方式构建。两亲性多肽在水溶液中倾向于将其亲水部分暴露在外层与水分子形成交界面,疏水部分则聚集于内。在中性环境中,多肽分子主要通过疏水作用和氢键的物理相互作用力,自组装形成纳米颗粒;在微酸性环境中,多肽分子疏水端被质子化,疏水端之间的正电荷排斥力使自组装体膨胀甚至解聚,使得自组装体变得松散并初步释放出多肽分子,进一步的在肿瘤部位MMP-2酶的作用下,酶解出肿瘤免疫治疗多肽。该方法可使肿瘤免疫治疗多肽药物在生理环境中形成纳米结构,延长其在生物体内的半衰期,纳米结构在微酸性和MMP-2酶高表达的肿瘤微环境中特异响应性解聚,释放出多肽分子,发挥抗肿瘤作用。

[0040] 优选地,所述方法包括以下步骤:

[0041] (1) 以氨基酸为原料,利用固相合成法合成亲水性抗肿瘤多肽、酶响应多肽和疏水性多肽,疏水性多肽末端连接有赖氨酸的两亲性抗肿瘤酶响应多肽分子;

[0042] (2) 使步骤(1)合成的两亲性抗肿瘤酶响应多肽分子的疏水性多肽末端的赖氨酸与酸响应性功能分子偶联;

[0043] (3) 将步骤(2)的产物在中性水环境中自组装得到所述抗肿瘤多肽纳米药物;

[0044] 优选地,步骤(3)中所述中性水环境为pH为7.4的磷酸盐缓冲溶液。

[0045] 优选地,所述方法具体包括以下步骤:

[0046] (1) 氨基酸的末端氨基均由Fmoc保护,用于合成亲水性抗肿瘤多肽的赖氨酸侧链氨基由Boc保护,用于偶联功能分子的赖氨酸侧链的氨基由Cbz保护;

[0047] (2) 将所要合成的两亲性多肽分子由Fmoc保护的第一个氨基酸的末端羧基与CLEAR-酰胺树脂的氨基末端连接,通过20%哌啶和N,N-二甲基甲酰胺的混合溶液脱去Fmoc保护基,然后以此结合在树脂上的氨基酸作为氨基组分,同过量的含活化羧基的下一个氨基酸反应接长肽链,重复上述操作直至所有的氨基酸缩合完毕,形成肽链上氨基被保护的两亲性抗肿瘤酶响应多肽分子;

[0048] (3) 将两亲性抗肿瘤酶响应多肽分子用20%哌啶和N,N-二甲基甲酰胺的混合溶液脱去Fmoc保护基,用催化氢解法脱去Cbz保护基,使酸响应性功能分子与脱去保护的氨基反应,从而将酸响应性功能分子连接至两亲性抗肿瘤酶响应多肽上;

[0049] (4) 用三氟乙酸的二氯甲烷溶液将肽链从树脂上裂解下来,两亲性抗肿瘤酶响应多肽上Boc保护基团也将同时除去,经过纯化处理,即得到连接有酸响应性功能分子的两亲性抗肿瘤酶响应多肽分子;

[0050] (5) 将所得到的连接有酸响应性功能分子的两亲性抗肿瘤酶响应多肽分子在中性水环境中进行自组装形成纳米颗粒体系,即得到所述抗肿瘤多肽纳米药物。

[0051] 本发明提供的制备方法简单,自组装过程中不生成共价键,没有逆反应。

[0052] 第三方面,本发明提供了一种肿瘤免疫治疗纳米药物组合体系,所述肿瘤免疫治疗纳米药物组合体系是以如第一方面所述的抗肿瘤多肽纳米药物作为载体,包载有吲哚胺-2,3-双加氧酶抑制剂。

[0053] 在肿瘤免疫治疗纳米药物组合体系中,抗肿瘤多肽纳米药物与疏水性的吲哚胺-2,3-双加氧酶抑制剂,在pH 7.4的磷酸盐缓冲液或水中共组装成纳米结构,肿瘤免疫治疗多肽纳米药物作为载体将抑制剂包载于内。纳米药物组合体系具有与上述肿瘤免疫治疗多肽纳米药物相同的微酸性和酶响应性,能在肿瘤部位响应微酸性pH短期内发生膨胀,纳米颗粒结构变松散,使得肿瘤组织中的MMP-2酶能够结合并水解两亲性肿瘤免疫治疗多肽上的酶响应底物肽,多肽自组装纳米结构解聚,并彻底释放出免疫治疗多肽和吲哚胺-2,3-双加氧酶抑制剂(NLG919),提高抗肿瘤免疫应答效率,达到联合抑制肿瘤的目的。

[0054] 第四方面,本发明提供了一种如第一方面所述的抗肿瘤多肽纳米药物在制备抗肿瘤药物中的应用。

[0055] 本发明还提供了一种如第三方面所述的肿瘤免疫治疗纳米药物组合体系在制备抗肿瘤药物中的应用。

[0056] 相对于现有技术,本发明具有以下有益效果:

[0057] 本发明提供的抗肿瘤多肽纳米药物克服了普通多肽药物半衰期短的瓶颈,是一种具有肿瘤部位弱酸环境和蛋白酶双重响应性、生物相容性好、稳定性强、安全性高、生物利用度高和良好抗肿瘤功能的肿瘤免疫治疗多肽纳米药物。

[0058] 本发明提供的抗肿瘤多肽纳米药物制备成纳米颗粒,体系稳定,肿瘤富集作用强,具有靶向性,此外,将其制备纳米颗粒还可以使得亲水性肿瘤免疫治疗多肽上的受体结合位点不暴露在外,提高了亲水性肿瘤免疫治疗多肽分子在体内的稳定性。

[0059] 本发明提供的抗肿瘤多肽纳米药物具有酶响应性和酸响应性,在肿瘤细胞外基质高表达MMP-2酶和pH值为酸性的环境下,实现较好的药物释放和富集并达到良好的效果。

[0060] 本发明提供的肿瘤免疫治疗纳米药物组合体系能在肿瘤部位响应微酸性pH短期内发生膨胀,纳米颗粒结构变松散,使得肿瘤组织中的MMP-2酶能够结合并水解两亲性肿瘤免疫治疗多肽上的酶响应底物肽,多肽自组装纳米结构解聚,并彻底释放出免疫治疗多肽和吲哚胺-2,3-双加氧酶抑制剂,提高抗肿瘤免疫应答效率,达到联合抑制肿瘤的目的。

[0061] 本发明提供的制备方法简单,自组装过程中不生成共价键,没有逆反应。

附图说明

- [0062] 图1为实施例1中两亲性抗肿瘤多肽分子的高效液相色谱图。
- [0063] 图2为实施例1中两亲性抗肿瘤多肽分子的质谱图。
- [0064] 图3A为实施例1中抗肿瘤多肽纳米药物在中性磷酸盐缓冲液中的电镜形貌图(标尺100nm)。
- [0065] 图3B为实施例1中抗肿瘤多肽纳米药物在中性磷酸盐缓冲液中的粒径分布图。
- [0066] 图4A为实施例1中制备的抗肿瘤多肽纳米药物在pH值为6.8的磷酸盐缓冲液中作用2h的电镜形貌图(标尺100nm)。
- [0067] 图4B为实施例1中制备的抗肿瘤多肽纳米药物在pH值为6.8的磷酸盐缓冲液中作用2h的粒径分布图。
- [0068] 图5A为实施例1中制备的抗肿瘤多肽纳米药物在pH值为6.8和MMP-2酶存在的磷酸盐缓冲液中作用2h的电镜形貌图(标尺100nm)。
- [0069] 图5B为实施例1中制备的抗肿瘤多肽纳米药物在pH值为6.8和MMP-2酶存在的磷酸盐缓冲液中作用2h的粒径分布图。
- [0070] 图6为实施例3中对实施例1制备的抗肿瘤多肽纳米药物进行肿瘤部位响应性测定的结果图。
- [0071] 图7为实施例4中测定的实施例1制备的抗肿瘤多肽纳米药物在小鼠体内血液循环中的稳定性结果图。
- [0072] 图8为实施例5中对实施例1制备的抗肿瘤多肽纳米药物测定的抑制肿瘤生长的效果图。
- [0073] 图9A为实施例6中两亲性抗肿瘤多肽和NLG919在中性磷酸盐缓冲液中的电镜图(标尺100nm)。
- [0074] 图9B为实施例6中制备的纳米药物组合体系的粒径分布图。
- [0075] 图10为实施例7对实施例6制备的纳米药物组合体系测定的NLG919的药物释放曲线。
- [0076] 图11为实施例8对实施例6制备的纳米药物组合体系测定的抑制肿瘤生长的效果图。

具体实施方式

[0077] 下面通过具体实施方式来进一步说明本发明的技术方案。本领域技术人员应该明了,所述实施例仅仅是帮助理解本发明,不应视为对本发明的具体限制。

[0078] 实施例1

[0079] 在本实施例中,通过以下方法制备抗肿瘤多肽纳米药物:

[0080] 选用HaoNan Chang等,Angewandte Chemie International Edition,2015,127(40):11760-11764提供的拮抗免疫检查点PD-L1并且能够抑制肿瘤生长的D-peptide antagonist^D(PPA-1)多肽(从氨基末端开始的序列为:天冬酰胺-酪氨酸-丝氨酸-赖氨酸-脯氨酸-苏氨酸-天冬氨酸-精氨酸-谷氨酰胺-酪氨酸-组氨酸-苯丙氨酸)作为亲水性肿瘤免疫治疗多肽,按照固相合成法以及多肽纯化方法,将MMP-2响应的底物、2个甘氨酸和2个亮氨酸组成的疏水性多肽连接至肿瘤免疫治疗多肽^DPPA-1上,并在疏水性多肽的氨基末端连接由3个赖氨酸形成的三肽,而后通过赖氨酸上的氨基(包括末端氨基和侧链氨基)连接4

个3-(二乙基氨基)丙基硫代异氰酸酯功能分子(DEAP),获得偶联有酸响应性功能分子的两亲性肿瘤免疫治疗多肽。具体合成过程如下:

[0081] (1)用于合成^DPPA-1和MMP-2酶底物的氨基酸以及亮氨酸、甘氨酸和赖氨酸的末端氨基均由Fmoc(芴甲氧羰基)保护,用于合成^DPPA-1的赖氨酸侧链氨基由Boc(叔丁氧羰基)保护,用于偶联功能分子的赖氨酸侧链的氨基由Cbz(苄氧羰基)保护,以上氨基酸均购自吉尔生化(上海)有限公司。

[0082] (2)使^DPPA-1羧基末端氨基酸的羧基与CLEAR-酰胺树脂(引入CLEAR-酰胺树脂的目的是将氨基酸的羧基末端固定,以便使其氨基端发生反应)的氨基末端连接,通过20%哌啶/N,N-二甲基甲酰胺脱去该氨基酸上的Fmoc保护基以暴露出氨基,然后以此结合在树脂上的氨基酸作为氨基组分,同过量的含活化羧基的下一个氨基酸反应接长肽链,重复上述操作直至所有的氨基酸缩合完毕,形成肽链上氨基被保护的两亲性肿瘤免疫治疗多肽。

[0083] (3)将两亲性抗肿瘤多肽用20%哌啶/N,N-二甲基甲酰胺脱去Fmoc保护基,用催化氢解法脱去Cbz保护基,使酸响应性功能分子DEAP与脱去保护的氨基反应,从而将酸响应性功能分子DEAP连接至两亲性抗肿瘤多肽上。

[0084] (4)用高浓度三氟乙酸的二氯甲烷溶液将肽链从树脂上裂解下来,^DPPA-1片段中的Boc保护基团也将同时除去,经过纯化等处理,即得到偶联有DEAP的两亲性抗肿瘤多肽。

[0085] (5)取1mg两亲性抗肿瘤多肽溶解于10 μ L二甲基亚砷中,接着加入到1mL的pH值为7.4的磷酸盐缓冲液中,将混合液于功率为100W的超声波清洗机中超声处理2min。超声完毕后,样品于室温静置2h后即得到肿瘤免疫治疗多肽纳米药物体系。体系中的二甲基亚砷通过在pH 7.4的磷酸盐缓冲液中透析除去。

[0086] 通过高效液相色谱和电喷雾离子化质谱手段证实了本实施例得到的偶联有DEAP的两亲性肿瘤免疫治疗多肽的结构为:^DPPA-1-(脯氨酸-亮氨酸-甘氨酸-亮氨酸-丙氨酸-甘氨酸)-(甘氨酸形成的二肽)-(亮氨酸形成的二肽)-(赖氨酸形成的三肽)-(DEAP)₄,图1为肿瘤免疫治疗多肽的高效液相色谱图,图2为合成的肿瘤免疫治疗多肽的质谱图,表1中总结了图1的高效液相色谱图中各峰的出峰时间、峰面积、高度以及含量数据。

[0087] 表1

峰	出峰时间	峰面积	峰高度	含量
1	9.509	333338	20932	1.3
2	10.380	702220	71022	2.738
[0088] 3	10.749	434984	31058	1.696
4	11.065	23980486	1440175	93.51
5	11.596	167582	9080	0.6535
6	12.880	27613	3743	0.1077

[0089] 由图1和图2的结果分析得出,主峰4(633.75的峰)为合成的肿瘤免疫治疗多肽的峰,由表1的结果可以看出,合成的肿瘤免疫治疗多肽纯度在90%以上。

[0090] 利用透射电镜(美国FEI,Tecnai G2 20S-TWIN,200kV)和激光粒度仪(英国Malvern,Zetasizer Nano ZS90)对得到的肿瘤免疫治疗多肽纳米药物体系进行形态以及粒径表征,结果如图3A与图3B所示。图3A为肿瘤免疫治疗多肽纳米药物体系的透射电镜图,从图中可以看出,制备得到的肿瘤免疫治疗多肽纳米药物呈球形,颗粒大小较均一;图3B为

粒径分布图,所得肿瘤免疫治疗多肽纳米药物的粒径分布为25-35nm,平均粒径约为29nm,分散指数(PDI)为0.25,与电镜图所测得的结果相符合。

[0091] 实施例2

[0092] 本实施例目的在于测定抗肿瘤多肽纳米药物自组装纳米颗粒在微酸性溶液中的形貌和粒径。

[0093] 将实施例1中得到的抗肿瘤多肽纳米药物体系样品的pH值调整至6.8,室温静置2h后,通过透射电镜观察形貌并用激光粒度仪测定粒径分布。如图4A与图4B所示。图4A为透射电镜图,在酸性溶液中,多肽呈纳米球形结构,图4A的粒径分布图可以得出,粒径分布为40-200nm,平均粒径为100nm。

[0094] 另外将抗肿瘤多肽纳米药物体系样品的pH值分别调整至6.7、7.0、7.1和7.2时均得到了与将pH值调整至6.8相似的结果,这说明在酸性溶液中,抗肿瘤多肽纳米药物有初步的膨胀现象,是由于酸响应性分子带有正电荷之后,使得纳米球结构产生排斥力,使得纳米球结构有所膨胀,结构松散。

[0095] 而当抗肿瘤多肽纳米药物体系样品的pH值调整至6.8且加入重组MMP-2蛋白孵育2h后,通过透射电镜观察形貌并用激光粒度仪测定粒径分布,结果如图5A和图5B所示。从图5A电镜图可以看出,多肽纳米药物已无明显的纳米球形结构,图5B得出粒径分布为7-20nm,平均粒径为10nm。

[0096] 实施例3

[0097] 本实施例目的在于测定抗肿瘤多肽纳米药物在体内对肿瘤酸性环境的响应性。

[0098] 取1mg实施例1步骤(4)得到的偶联有DEAP的两亲性抗肿瘤多肽(DEAP-两亲性抗肿瘤多肽),与0.1mg四甲基罗丹明-5-异硫氰酸酯荧光分子和0.1mg淬灭分子共同溶解于10 μ L二甲基亚砷中,接着加入到1mL的pH值为7.4的磷酸盐缓冲液中,将混合液于功率为100W的超声波清洗仪中超声处理2min。超声完毕后,样品于室温静置2h后,于10000g离心5min,取上清即得到同时包载有荧光分子和淬灭分子的DEAP-抗肿瘤多肽纳米药物自组装纳米颗粒,经测定该纳米颗粒为大小较均一、稳定的球形结构。

[0099] 取100 μ L制备的纳米颗粒,从尾静脉处注射至荷瘤小鼠体内,于1h、2h、4h、8h、12h和24h用小动物活体成像仪(美国的Cambridge Research&Instrumentation, MaestroTM)检测体内荧光分布,如图6所示,可以看出荧光信号主要分布于肿瘤部位,这说明本发明制备的抗肿瘤多肽纳米药物能响应弱酸性的肿瘤环境而解聚释放出荧光分子。

[0100] 实施例4

[0101] 本实施例目的在于测定抗肿瘤多肽纳米药物自组装纳米颗粒在血液循环中的稳定性。

[0102] 利用实施例1中制备的抗肿瘤多肽纳米药物(简记为DEAP-^DPPA-1)进行测定,以^DPPA-1多肽为对照样品,各取400 μ mol的^DPPA-1和DEAP-^DPPA-1,将100 μ mol的荧光分子Cy5.5分别偶联至^DPPA-1和DEAP-^DPPA-1多肽分子的氨基上,获得偶联荧光分子的多肽。将偶联Cy5.5的^DPPA-1多肽直接溶解在100 μ L的pH值为7.4的磷酸盐缓冲液中;将偶联Cy5.5的DEAP-^DPPA-1溶解于10 μ L二甲基亚砷中,接着加入到100 μ L的pH值为7.4的磷酸盐缓冲液中,将混合液于功率为100W的超声波清洗仪中超声处理2min,室温静置2h后获得偶联荧光分子的DEAP-^DPPA-1多肽自组装纳米颗粒。体系中的二甲基亚砷以及多余的荧光分子通过在pH

7.4的磷酸盐缓冲液中透析除去。

[0103] 将偶联荧光分子的^DPPA-1和^DPPA-1自组装纳米颗粒,于尾静脉处注射入BALB/c小鼠体内,于1h、2h、4h、6h和12h等时间点分别从尾静脉处取小鼠血液10 μ L,利用小动物活体成像仪检测血浆中的荧光信号,与注射荧光标记的^DPPA-1组比较,如图7所示,注射荧光标记的DEAP-^DPPA-1自组装纳米颗粒组的血浆中的荧光信号存在的时间显著延长,这说明本发明制备的抗肿瘤多肽纳米药物(DEAP-^DPPA-1)比^DPPA-1在体内血液循环中更稳定。

[0104] 实施例5

[0105] 本实施例的目的在于测试抗肿瘤多肽纳米药物自组装纳米颗粒抑制肿瘤生长的效果。

[0106] 利用实施例1中制备的抗肿瘤多肽纳米药物(简记为DEAP-^DPPA-1)进行测定,以^DPPA-1多肽为对照样品,同时将DEAP-^DPPA-1两亲性多肽中^DPPA-1序列打乱作为对照样品(DEAP-对照肽)。将C57BL/6小鼠于背部皮下处接种B16/F10黑色素瘤细胞,待肿瘤生长至体积为100mm³时,尾静脉注射中性磷酸盐(PBS)缓冲液、^DPPA-1或DEAP-^DPPA-1,其中^DPPA-1为每天注射一次,DEAP-^DPPA-1每两天注射一次和每三天注射一次各设一组,其中^DPPA-1多肽剂量均为17.5 μ mol/kg,PBS为每三天注射一次,每组10只小鼠。处理8天,每隔一天记录小鼠的肿瘤体积。如图8所示,DEAP-^DPPA-1每两或三天注射一次时抑制肿瘤生长的效果最显著,DEAP-^DPPA-1每三天注射一次明显优于^DPPA-1每天注射一次的抑瘤率,这说明应用DEAP-^DPPA-1和^DPPA-1对肿瘤进行治疗时,侧面反映了注射单独的^DPPA-1时,由于^DPPA-1在体内循环时不稳定而造成药物利用率低,本发明的抗肿瘤多肽纳米药物很好地克服了此缺陷,具有很好的应用前景。

[0107] 实施例6

[0108] 在本实施例中,通过以下方法制备肿瘤免疫治疗纳米药物组合体系,具体方法如下:

[0109] 取1mg偶联有DEAP的两亲性抗肿瘤多肽和0.33mg吡啶胺-2,3-双加氧酶的抑制剂NLG919溶解于10 μ L二甲基亚砜中,接着加入到1mL的pH值为7.4的磷酸盐缓冲液中,将混合液于功率为100W的超声波清洗机中超声处理2min。超声完毕后,样品于室温静置2h后即得到纳米药物组合体系。体系中的二甲基亚砜通过在pH 7.4的磷酸盐缓冲液中透析除去。

[0110] 利用透射电镜观察纳米药物组合体系的形貌,并用激光粒度仪测定其粒径分布。如图9A所示,透射电镜显示,纳米药物组合体系在pH 7.4的磷酸盐缓冲液中呈现球形纳米结构;图9B所示,粒径分布范围为30-500nm,平均粒径约74nm。

[0111] 实施例7

[0112] 本实施例的目的在于测定纳米药物组合体系的释药特征。

[0113] 将实施例6中制备的纳米药物组合体系分别置于pH 7.4磷酸盐缓冲液、pH6.8磷酸盐缓冲液、含有重组MMP-2蛋白的pH 7.4磷酸盐缓冲液、含有重组MMP-2蛋白的pH 6.8磷酸盐缓冲液中,每种取1mL分别置于截留分子量为2000Da的透析袋中,并分别放入100mL同种溶液环境中透析,在1h、2h、3h、4h、8h、12h、18h、24h、36h、48h分别取2mL透析液,用高效液相色谱测定透析液中NLG919的含量,并换算出整个透析液中NLG919的含量,即纳米药物组合体系释放出的NLG919的量,计算出释放的NLG919量占纳米药物体系装载的NLG919量的百分比,即为每个时间点纳米药物组合体系的释药率,具体结果如图10所示。

[0114] 从图10可以看出,在含有重组MMP-2蛋白的pH 6.8磷酸盐缓冲液中,释放率最高。

[0115] 实施例8

[0116] 本实施例的目的在于测定纳米药物组合体系抑制肿瘤生长的效果。

[0117] 利用实施例6中制备的纳米药物组合体系(简记为NLG919@DEAP-^DPPA-1)进行测定,以DEAP-对照肽自组装纳米颗粒、NLG919、DEAP-^DPPA-1多肽自组装纳米药物和DEAP-对照肽包载NLG919形成的纳米颗粒(简记为NLG919@DEAP-对照肽)作为对照样品。将C57BL/6小鼠于背部皮下处接种B16/F10黑色素瘤细胞,待肿瘤生长至体积为100mm³时,尾静脉注射DEAP-对照肽自组装纳米颗粒、NLG919、DEAP-^DPPA-1多肽自组装纳米药物或NLG919@DEAP-^DPPA-1,每三天注射一次,其中DEAP-^DPPA-1多肽剂量均为17.5μmol/kg,NLG919剂量为2mg/kg,每组10只小鼠。处理8天,每隔一天记录小鼠的肿瘤体积。

[0118] 结果如图11所示,NLG919@DEAP-^DPPA-1明显优于其它处理,这说明应用纳米药物组合体系对肿瘤进行治疗时,能比每种药物单独使用达到更好的肿瘤抑制效果,侧面反映了同时抑制吡啶胺-2,3-双加氧酶和免疫检查点能引起更强的抗肿瘤免疫应答效果。

[0119] 本发明提供的纳米药物组合体系免疫治疗效果显著,具有很好的应用前景。

[0120] 申请人声明,本发明通过上述实施例来说明本发明的抗肿瘤多肽纳米药物及其制备方法和应用,但本发明并不局限于上述工艺步骤,即不意味着本发明必须依赖上述工艺步骤才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了,对本发明的任何改进,对本发明所选用原料的等效替换及辅助成分的添加、具体方式的选择等,均落在本发明的保护范围和公开范围之内。

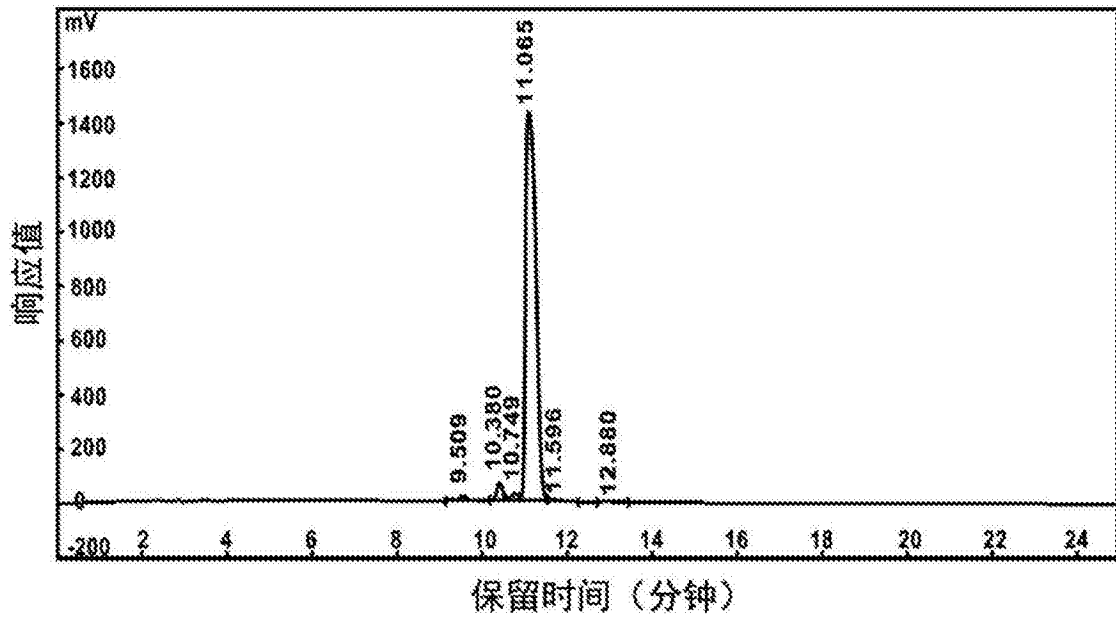


图1

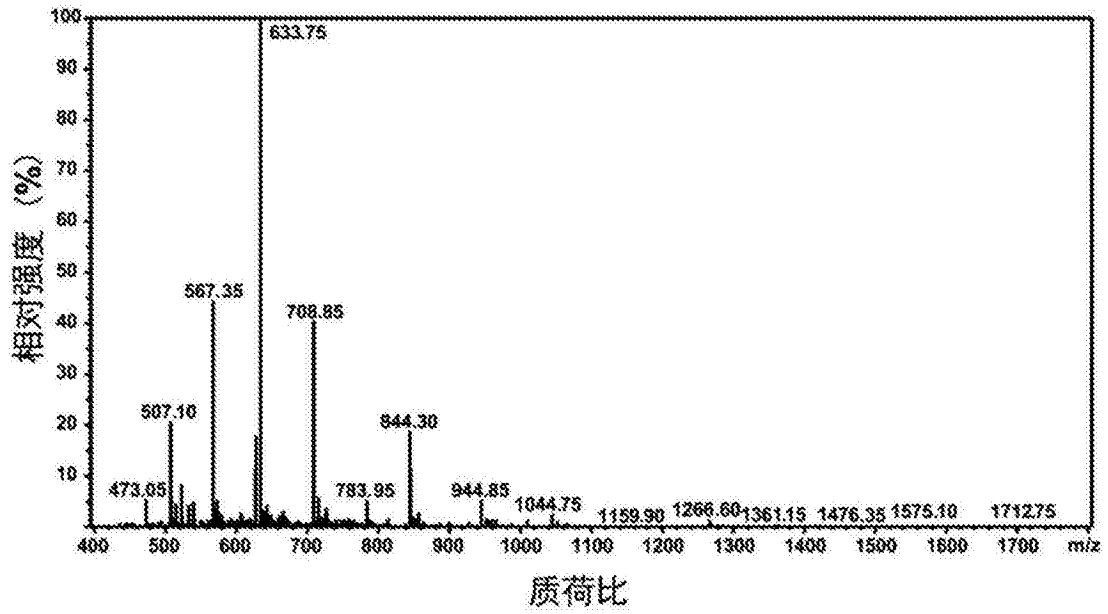


图2

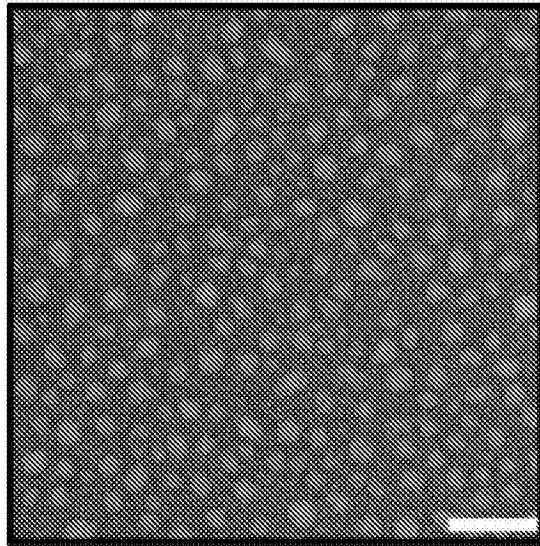


图3A

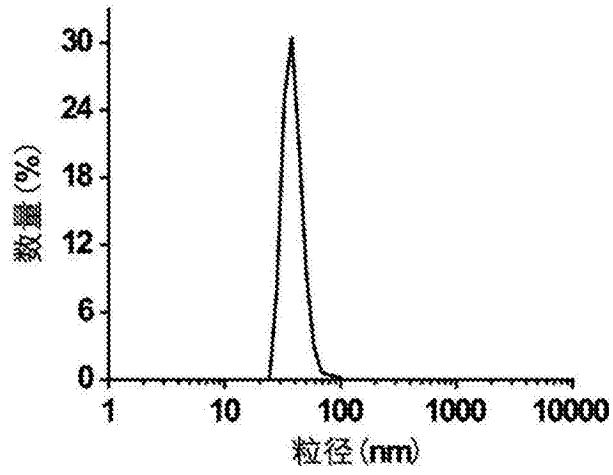


图3B

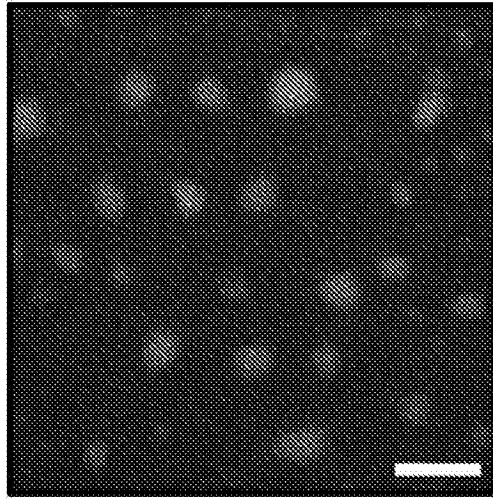


图4A

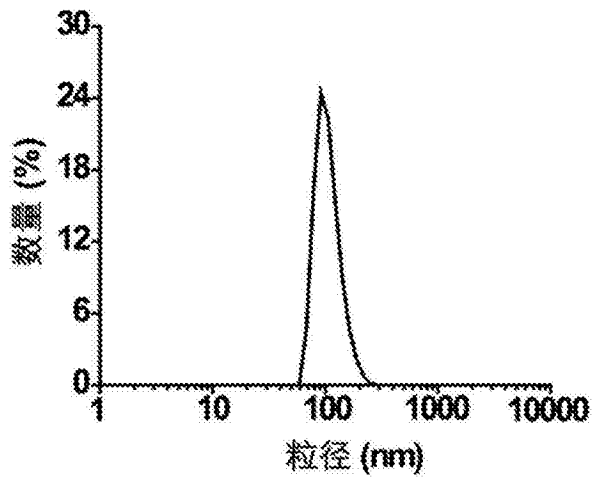


图4B

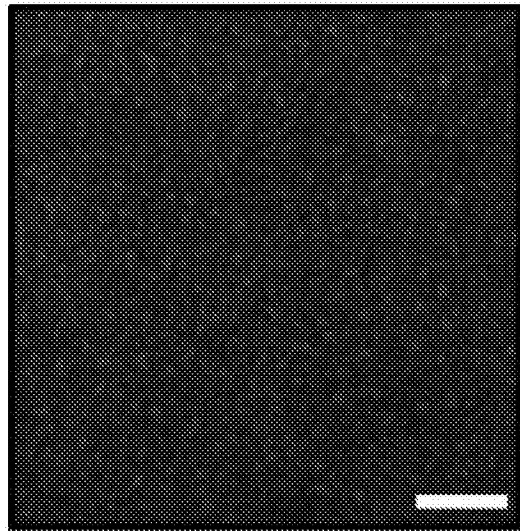


图5A

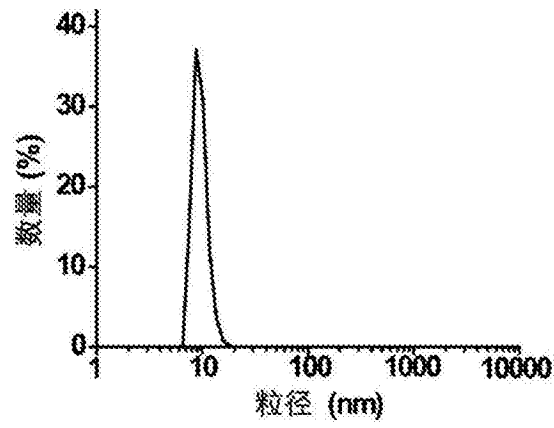


图5B

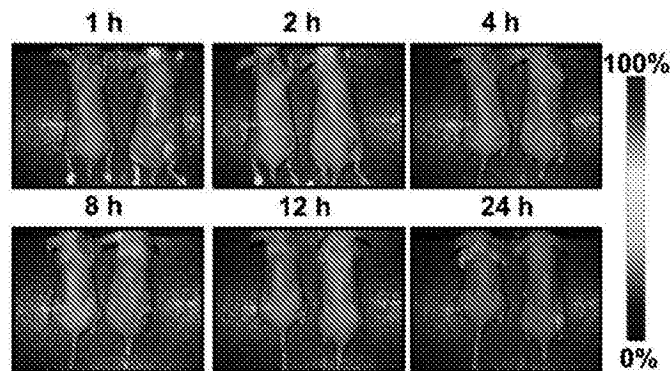


图6

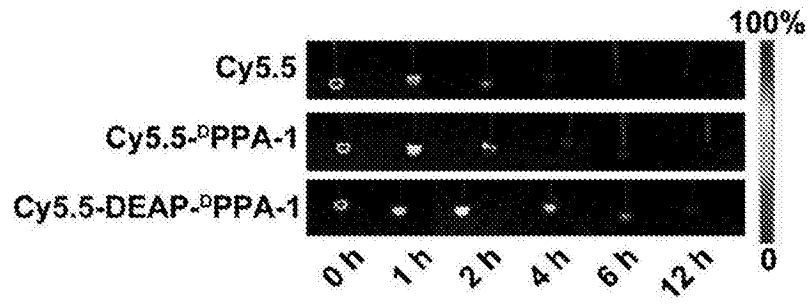


图7

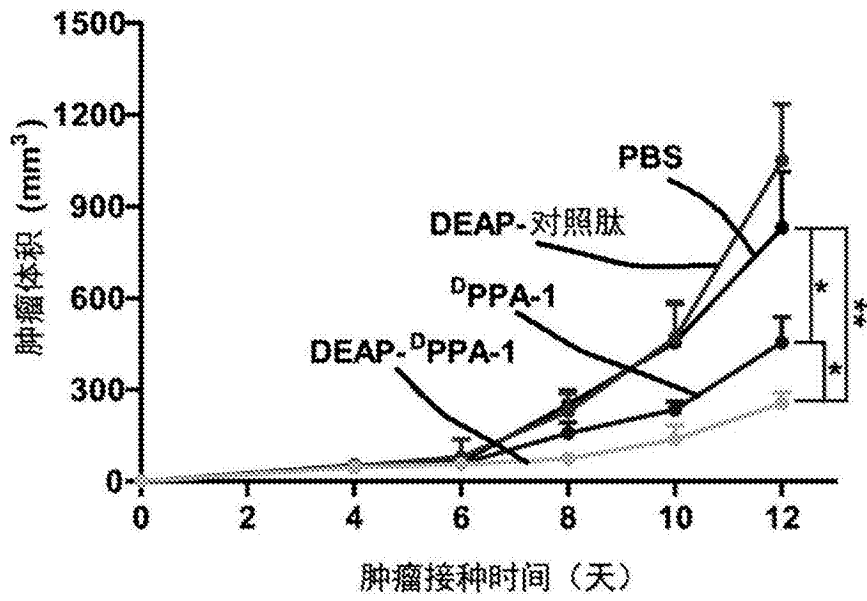


图8

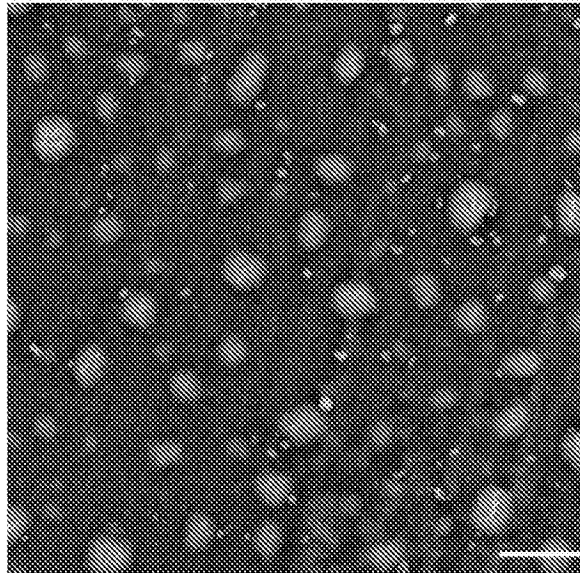


图9A

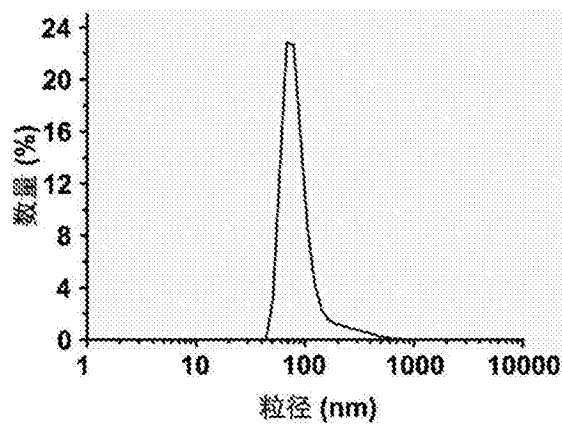


图9B

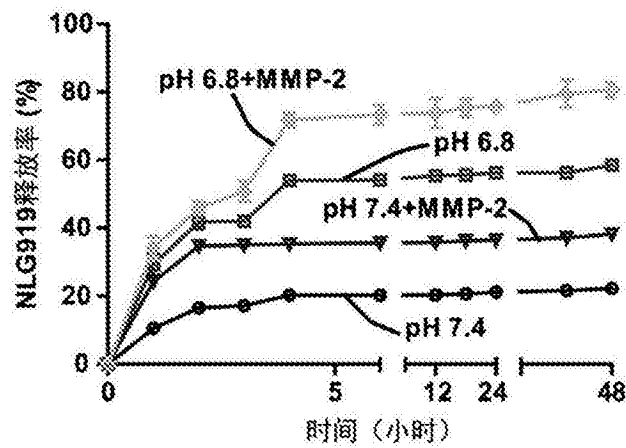


图10

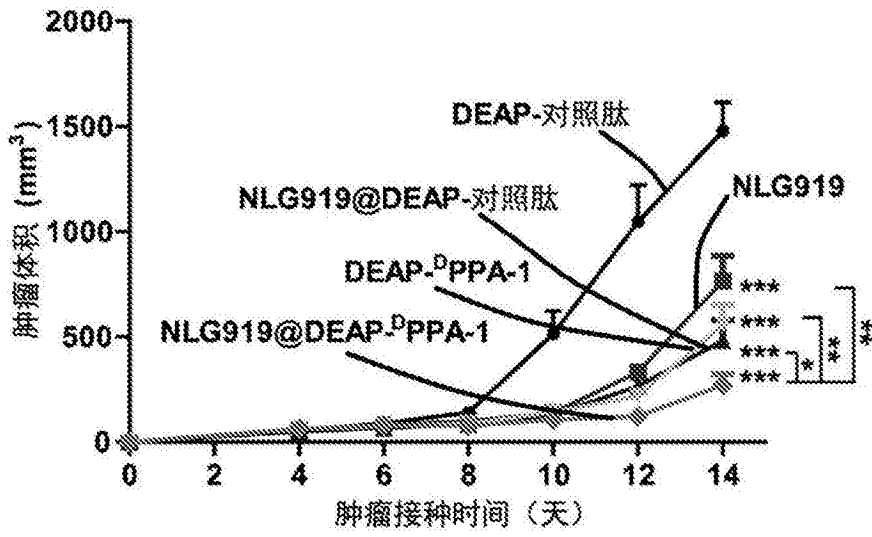


图11