



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118742316 A

(43) 申请公布日 2024. 10. 01

(21) 申请号 202280092332.X

(22) 申请日 2022.12.26

(30) 优先权数据

2022-027791 2022.02.25 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.08.22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2022/047969 2022.12.26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/162456 JA 2023.08.31

(71) 申请人 一丸自然美健有限公司

地址 日本国岐阜县

申请人 国立大学法人广岛大学

(72) 发明人 吾乡由希夫 浅野智志

坂元孝太郎

(74) 专利代理机构 北京汇思诚业知识产权代理有限公司 11444

专利代理师 李宏轩 王刚

(51) Int. Cl.

A61K 38/10 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

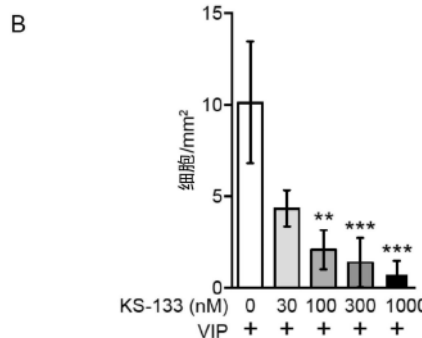
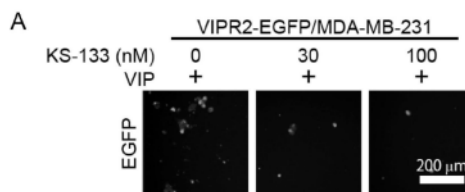
权利要求书1页 说明书12页
序列表(电子公布) 附图5页

(54) 发明名称

用于抑制癌转移的VIPR2拮抗肽

(57) 摘要

通过研究对癌细胞的迁移产生影响的VIPR2信号的作用及其机制,公开了抑制癌转移的方法。提供一种用于抑制癌转移的组合物,所述组合物包含环状肽、其衍生物或修饰体或药理学上可接受的它们的盐,所述环状肽包含式(1):
 $c [X^1 - \text{Pro}^2 - X^3 - \text{Tyr}^4 - \text{Leu}^5 - \text{Pro}^6 - c (X^7 - X^8 - \text{Leu}^9 - \text{Cys}^{10}) - X^{11}) - X^{12} - X^{13} (1) (X^1, X^3, X^7, X^8, X^{11}, X^{12} \text{和} X^{13} \text{如说明书中所述。})$ 所示的氨基酸序列。



1. 一种用于抑制癌转移的组合物,其包含环状肽、其衍生物或修饰体或药理学上可接受的它们的盐,所述环状肽包含式(1)所示的氨基酸序列,

式(1):

$c[X^1-Pro^2-X^3-Tyr^4-Leu^5-Pro^6-c(X^7-X^8-Leu^9-Cys^{10})-X^{11})-X^{12}-X^{13}$ (1) 式中, X^1 表示半胱氨酸、Mpa即3-巯基丙酸、或D型半胱氨酸,

X^3 表示N-甲基化甘氨酸、N-甲基化丙氨酸、2-氮杂环丁烷-2-羧酸、脯氨酸、羟脯氨酸、3,4-脱氢脯氨酸、哌可酸、丝氨酸或赖氨酸,

X^8 表示酪氨酸、脯氨酸或精氨酸,

X^7 和 X^{11} 表示赖氨酸和天冬氨酸、鸟氨酸和谷氨酸、天冬氨酸和赖氨酸、谷氨酸和鸟氨酸、赖氨酸和谷氨酸、或谷氨酸和赖氨酸中的任一组合,

X^{12} 和 X^{13} 各自独立地表示亮氨酸、异亮氨酸或正亮氨酸,

X^1 和 Cys^{10} 在各自的侧链之间形成二硫键, X^7 和 X^{11} 在各自的侧链之间形成酰胺键,由此,式(1)的肽在分子内具有2个环状结构,

N末端氨基和C末端羧基被修饰或未被修饰、或者、N末端氨基和C末端羧基缺失或未缺失。

2. 根据权利要求1所述的用于抑制癌转移的组合物,其中,在所述环肽中,

X^1 表示半胱氨酸,

X^3 表示脯氨酸或丝氨酸,

X^7 表示赖氨酸,

X^8 表示酪氨酸,

X^{11} 表示天冬氨酸,

X^{12} 和 X^{13} 各自独立地表示亮氨酸、异亮氨酸或正亮氨酸,N-末端氨基被乙酰化,C-末端羧基被酰胺化。

3. 根据权利要求1或2所述的组合物,其中,所述组合物用于治疗包含PI3K/AKT信号传导通路被活化的癌细胞的对象。

4. 根据权利要求3所述的组合物,其中,所述组合物抑制所述癌细胞内的AKT的磷酸化。

用于抑制癌转移的VIPR2拮抗肽

交叉参考

[0001] 本申请主张2022年2月25日在日本申请的日本专利申请第2022-027791号的优先权,其整体通过参照而明确地援引加入于此。

技术领域

[0002] 本发明涉及用于抑制癌转移的组合物,更详细而言,涉及包含用于抑制癌转移的VIPR2拮抗肽的组合物。

背景技术

[0003] 细胞的迁移是进化保守机制,不仅在胚胎发育、免疫、血管新生、创伤愈合等正常过程中,而且在癌转移等致病性过程中也起作用。细胞的迁移通过细胞内的肌动蛋白纤维的局部存在来控制,在细胞的前缘部形成被称为片状伪足(lamellipodia)的突出的结构(突起)。由生长因子、细胞因子、趋化因子等引起的细胞外刺激诱导片状伪足的形成。例如,在经由趋化因子和作为其受体的G蛋白偶联受体(GPCR)的信号传导的情况下,键合于GTP的G α i直接活化SRK样激酶,上调磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)信号。被活化的PI3K将磷脂酰肌醇4,5-二磷酸[PI(4,5)P₂]转换为磷脂酰肌醇3,4,5-三磷酸[PI(3,4,5)P₃]。PI(3,4,5)P₃促进AKT的磷酸化,并且促进向WASP家族的verprolin homologous protein2(WAVE2)的细胞膜的移动,控制经由GEF-Rac的肌动蛋白丝的重塑,从而促进片状伪足的形成。实际上,PI3K的功能获得突变(即PI3K的p110催化亚基突变)增强了PI(3,4,5)P₃信号传导通路,在乳腺癌等中显得较为频繁。被活化的PI(3,4,5)P₃通路诱导癌细胞的生长和运动性,其结果,促进了癌细胞的移动和浸润。

[0004] 垂体腺苷酸环化酶激活多肽(PACAP)和作为近缘神经肽的血管活性肠肽(VIP)在中枢和末梢神经系统中广泛表达。作为其受体的G蛋白偶联受体(GPCR):VIPR1和VIPR2(也称为VPAC1和VPAC2)在大脑中广泛表达,也在心血管系统、肾系统、消化系统、免疫系统、内分泌系统、生殖系统等多个末梢靶脏器中表达。关于VIP与肿瘤生长的关系有很多报道。值得注意的是,在卵巢上皮肿瘤、多形性胶质母细胞瘤、浸润性乳腺癌等几种癌症中,报道了VIPR2 mRNA表达和/或VIPR2基因拷贝数的增加。但是,关于癌中的VIPR2的病态生理学的作用等,还几乎未知。

[0005] 另一方面,本发明人等发现了新型的VIPR2拮抗肽组,并对其进行了公开(参照非专利文献1和专利文献1)。关于其中的代表性的二环性肽KS-133(非专利文献2中公开。在后述的实施例中称为Seq-10(序列号2。)),还报告了抑制精神疾病模型小鼠的认知功能的降低(参照非专利文献2)。

现有技术文献

非专利文献

[0006] 非专利文献1:Sakamoto K et al.,Biochem Biophys Res Commun(2018),503:1973-1979.

非专利文献2:Sakamoto K et al.,Frontiers in Pharmacology (2021),12:751587

非专利文献3:Biochemical and Biophysical Research Communications552 (2021)106-113

专利文献

[0007] 专利文献1:国际公开W02021/200259号小册子

发明内容

发明要解决的技术问题

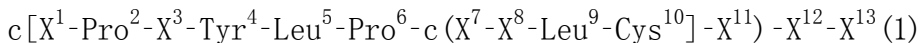
[0008] 本发明要解决的技术问题在于,例如通过研究对癌细胞的迁移产生影响的VIPR2信号的作用及其机理,来提供抑制癌转移的方法。

用于解决技术问题的技术方案

[0009] 本发明是为了解决上述技术问题而完成、基于如下发现而创作的:VIP-VIPR2信号经由PI(3,4,5)P₃的合成来控制基于WAVE2的、用于形成片状伪足的肌动蛋白的局部存在和延伸,由此控制体外和体内的癌细胞的迁移。即,本发明提供通过阻碍VIPR2的功能来抑制癌转移的方法,具体而言,包括以下的实施方式。

[0010] 一种用于抑制癌转移的组合物,其包含环状肽、其衍生物或修饰体或药理学上可接受的它们的盐,所述环状肽包含式(1)所示的氨基酸序列,

式(1):



(式中,X¹表示半胱氨酸、Mpa(3-巯基丙酸)或D型半胱氨酸,X³表示N-甲基化甘氨酸、N-甲基化丙氨酸、2-氮杂环丁烷-2-羧酸、脯氨酸、羟脯氨酸、3,4-脱氢脯氨酸、哌可酸(pipecolic acid)、丝氨酸或赖氨酸,X⁸表示酪氨酸、脯氨酸或精氨酸,X⁷和X¹¹表示赖氨酸和天冬氨酸、鸟氨酸和谷氨酸、天冬氨酸和赖氨酸、谷氨酸和鸟氨酸、赖氨酸和谷氨酸、或谷氨酸和赖氨酸的任一组合,X¹²和X¹³各自独立地表示亮氨酸、异亮氨酸或正亮氨酸,X¹和Cys¹⁰在各自的侧链之间形成二硫键,X⁷和X¹¹在各自的侧链之间形成酰胺键,由此式(1)的肽在分子内具有2个环状结构,N末端氨基和C末端羧基可以被修饰也可以缺失。)

[0011] 上述式(I)的环状肽中,优选X¹表示半胱氨酸,X³表示脯氨酸或丝氨酸,X⁷表示赖氨酸,X⁸表示酪氨酸,X¹¹表示天冬氨酸,X¹²和X¹³各自独立地表示亮氨酸、异亮氨酸或正亮氨酸,N末端氨基被乙酰化,C末端羧基被酰胺化。

[0012] 该组合物例如能够用于治疗包含AKT、WAVE2这样PI3K下游的信号传导通路经由VIPR2而被活化的癌细胞的对象,也能够用于抑制经由VIPR2的癌细胞内的AKT的磷酸化。

发明效果

[0013] 包含本发明涉及的环状肽的组合物例如能够通过阻碍VIPR2的功能来抑制癌转移。

附图说明

[0014] 图1为研究VIP对MCF-7和MDA-MB-231乳腺癌细胞中AKT磷酸化的影响的结果。

图2为评价过表达MCF-7和VIPR2-EGFP的MCF-7乳腺癌细胞的细胞运动性的结果。

图3为使用Transwell迁移实验(Transwell migration assay)测定过表达EGFP或VIPR2-EGFP的MDA-MB-231乳腺癌细胞的迁移运动的结果。

图4为将片状伪足的面积定量化的结果。

图5为体内评价过表达VIPR2-EGFP的MDA-MB-231乳腺癌细胞迁移活性的结果。

图6为对过表达VIPR2-EGFP的MDA-MB-231乳腺癌细胞添加VIPR2选择性拮抗肽,评价AKT磷酸化的结果。

图7为示出过表达VIPR2-EGFP的MDA-MB-231乳腺癌细胞中的细胞运动性评价中使用的transwell的结构示意图。

图8为评价VIPR2选择性拮抗肽对过表达VIPR2-EGFP的MDA-MB-231乳腺癌细胞迁移的抑制效果的结果。

图9为在过表达VIPR2的MCF-7细胞中,确认在添加作为VIPR2拮抗剂的KS-133时(KS-133组)或在未添加KS-133时(对照组)的细胞增殖效果的结果。该确认在每组(对照组、KS-133)N=4下进行。将图表的数值(各组的平均值)示于表3。数据用平均值±SD表示。与Day0相比,示出*: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.01$ 、***: $p < 0.001$ (Mann-Whitney U检验)。在过表达VIPR2的MCF-7细胞中,通过添加KS-133,从培养第二天以后细胞增殖被显著抑制。另一方面,在对照组中,确认了经日性的细胞增殖。

具体实施方式

[0015] 接下来,参照附图对本发明的各实施方式进行说明。应予说明,以下说明的各实施方式并不限定权利要求书涉及的发明,另外,在各实施方式中说明的各要素及其组合的全部并不一定是本发明的解决方法所必需的。

[0016] (定义)

在本说明书中,肽是指2个以上的氨基酸通过酰胺键(肽键)键合而得到的物质,例如能够是2~20个氨基酸进行酰胺键合而得到的物质。另外,根据肽标记的惯例,左端为N末端(氨基末端),右端为C末端(羧基末端)。将与形成肽键的羰基邻接的第一个碳原子称为C α 碳。

[0017] 本说明书中,“任意的氨基酸或其衍生物”以其最广义的含义使用,除了天然氨基酸以外,还包含具有非天然结构的人工氨基酸、具有作为氨基酸特征的本领域公知的特性的化学合成的化合物、进而具有官能团的羧酸。作为非天然氨基酸的例子,可举出:D型氨基酸、主链的结构与天然型不同的 α/α -二取代氨基酸(2-氨基异丁酸之类的 α -甲基化氨基酸等)、N-烷基-氨基酸(N-甲基化氨基酸等)、N-取代甘氨酸(肽)、主链延长的氨基酸(β 高氨基酸、 γ 高氨基酸)、侧链的结构与天然型不同的氨基酸(环己基丙氨酸、烯丙基甘氨酸、2-(2-吡啶基)甘氨酸、3-(1H-苯并咪唑-2-基)丙氨酸等)、侧链的一部分被取代的氨基酸(正亮氨酸、二氨基丙氨酸、3-(2-吡啶基)丙氨酸等)、侧链具有多余的官能团的氨基酸;侧链具有多余的C、烷基、甲基的氨基酸(高正亮氨酸(homonorleucine)、 γ -甲基亮氨酸等)、侧链具有卤素原子(F、Cl、Br、I)的氨基酸(3-氯丙氨酸等)、侧链具有卤素原子(F、Cl、Br、I)的羧酸(3-氯丙氨酸等)、侧链具有官能团的羧酸(3-丁烯酸等)、侧链具有多余的N或氨基的氨基酸(β -叠氮丙氨酸、鸟氨酸等)、侧链具有多余的O或甲氧基的氨基酸(O-甲基丝氨酸、O-甲基苏氨酸等)、侧链具有多余的羟基的氨基酸(3-羟基苯丙氨酸等)、侧链具有多余的羧基(-COOH)的

氨基酸(3-羧基苯丙氨酸等)、侧链具有多余的S的氨基酸(乙硫氨酸等)、侧链中的羧酸官能团被酯保护的氨基酸(天冬氨酸-4-甲酯等)、侧链的巯基(-S-)被氧化而变换为亚磺酰基(-S(=O)-)或磺酰基(-S(=O)₂-)的氨基酸(蛋氨酸亚砷)等,并不限于这些。

[0018] 在本说明书中,“VIPR2”是指小鼠、大鼠、狗、猴、人等哺乳类的蛋白质、“血管活性肠肽受体2”。

[0019] 本说明书中,“抑制癌转移”是指例如抑制在原发性的肿瘤尚未转移的情况下的肿瘤转移、或抑制在肿瘤已经转移的情况下的进一步的肿瘤转移中的任一者或两者。癌细胞的转移是指从癌细胞发生的场所(原发病灶)移动,在远距离部位再次形成肿瘤。其机理有各种研究报告,例如由癌细胞的1)原发病灶中的增殖、2)癌细胞从原发病灶的脱离和向脉管(血管、淋巴管)的浸润、3)在脉管内的移动、4)向转移脏器的血管内皮的粘附、5)向转移脏器的浸润、6)转移脏器内的增殖等过程构成。认为细胞的迁移对于这些过程中的癌细胞的移动发挥重要的作用,通过阻碍该作用,能够抑制癌转移。

[0020] (环状肽)

作为本发明的1个有效成分的环状肽在专利文献1中被公开,其内容全部通过参照被引入本申请。专利文献1中公开的肽在维持或增强非专利文献1中公开的VIpep-3的VIPR2键合活性所涉及的特征(药效团(pharmacophore))的同时,通过二环状化而稳定化。这些文献中公开的肽均能够用于本发明的新用途。

[0021] 这些环状肽中,特别适合用于抑制癌转移的实施方式的环状肽包含下述式(1):

$c[X^1\text{-Pro}^2\text{-X}^3\text{-Tyr}^4\text{-Leu}^5\text{-Pro}^6\text{-c}(X^7\text{-X}^8\text{-Leu}^9\text{-Cys}^{10})\text{-X}^{11})\text{-X}^{12}\text{-X}^{13}$ (1) 所示的氨基酸序列。式(1)中, X^1 表示半胱氨酸、Mpa(3-巯基丙酸)或D型半胱氨酸, X^3 表示N-甲基化甘氨酸、N-甲基化丙氨酸、2-氮杂环丁烷-2-羧酸、脯氨酸、羟脯氨酸、3,4-脱氢脯氨酸、哌可酸(pipecolic acid)、丝氨酸或赖氨酸, X^8 表示酪氨酸、脯氨酸或精氨酸, X^7 和 X^{11} 表示赖氨酸和天冬氨酸、鸟氨酸和谷氨酸、天冬氨酸和赖氨酸、谷氨酸和鸟氨酸、赖氨酸和谷氨酸、或谷氨酸和赖氨酸的任一组合, X^{12} 和 X^{13} 各自独立地表示亮氨酸、异亮氨酸或正亮氨酸, X^1 和 Cys^{10} 在各自的侧链之间形成二硫键, X^7 和 X^{11} 在各自的侧链之间形成酰胺键,由此式(1)的肽在分子内具有2个环状结构,N末端氨基和C末端羧基可以被修饰也可以缺失。

[0022] 进一步优选的实施方式的环状肽为:在上述式(1)中, X^1 表示半胱氨酸, X^3 表示脯氨酸或丝氨酸, X^7 表示赖氨酸, X^8 表示酪氨酸, X^{11} 表示天冬氨酸,并且, X^{12} 和 X^{13} 各自独立地表示亮氨酸、异亮氨酸或正亮氨酸。N末端氨基被乙酰化,C末端羧基被酰胺化。

[0023] 作为上述式(1)中包含的各个环状肽,例如可举出以下的例子。

$c(\text{Mpa-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-c}[\text{Lys-Tyr-Leu-Cys}]\text{-Asp})\text{-Leu-Ile-NH}_2$ (序列号1)

$\text{Ac-c}[\text{Cys}^1\text{-Pro}^2\text{-Pro}^3\text{-Tyr}^4\text{-Leu}^5\text{-Pro}^6\text{-c}(\text{Lys}^7\text{-Tyr}^8\text{-Leu}^9\text{-Cys}^{10})\text{-Asp}^{11}\text{-Leu}^{12}\text{-Ile}^{13}\text{-NH}_2$ (序列号2)和专利文献1的段落0056至段落0059中记载的肽。

[0024] 本发明中涉及的肽包括:即使是具有在上述式(1)所示的氨基酸序列中缺失、添加和/或取代1~数个氨基酸的同源性的肽,也具有对VIPR2的键合活性的肽。在本说明书中,在称为“缺失、添加和/或取代1~数个氨基酸的肽”的情况下,关于这些氨基酸的个数,只要该肽具有VIPR2键合活性就没有特别限定,优选为1~5个,进一步优选为1个或2个。缺失、添加和/或取代的部位可以是肽的末端,也可以是中间,可以是1处,也可以是2处以上。

[0025] 作为在这样的上述氨基酸序列中缺失、添加和/或取代1~数个氨基酸的氨基酸序列,可举出使用BLAST(Basic Local Alignment Search Tool at the National Center for Biological Information(美国国立生物学信息中心的基本局部比对检索工具))等(例如,使用默认即初始设定的参数)计算时,具有与所述氨基酸序列至少50%以上、优选70%以上、进一步优选80%以上、特别优选90%以上的同源性的氨基酸序列。

[0026] 本发明中涉及的肽只要解决本发明的技术问题,也包含其各种衍生物和/或修饰体。作为所述衍生物,可举出:肽的饱和脂肪链被替换为不饱和脂肪链的衍生物,肽的原子的一部分被替换为包含放射性或非放射性的同位素原子的其他原子的衍生物,肽的酰胺键被替换为硫代酰胺键(-NH-C(=S)-)的衍生物,肽的酰胺键被替换为烯炔(-C=C-)的衍生物,肽的酰胺键被替换为烷基(-C-C-)的衍生物,肽的酰胺键被替换为羟基亚乙基(-C(OH)-C-)的衍生物,肽的酰胺键被替换为酯(-O-C(=O)-)的衍生物,肽的酰胺键被替换为烯炔(-C=C-)的衍生物,肽的酰胺键被替换为(-C-NH-)的衍生物,或肽的酰胺键被替换为(-C(=O)-C-)的衍生物等;作为所述修饰体,可举出:肽的 α 位碳被二取代的修饰体,肽的酰胺键被N-烷基化的修饰体,肽的官能团的一部分受到卤化、氰化、硝化、氧化、羟基化、氨基化、脱氨基化、脱氢化、酰胺化、乙酰化、甲氧基化、异戊二烯基化、烷基化等修饰的修饰体(例如,肽的氨基的一部分被乙酰化、甲酰化、肉豆蔻酰化、棕榈酰化、焦谷氨酸化、烷基化或脱氨基化的修饰体,肽的羧基的一部分被N-吡咯烷基化或N-哌啶基化,或变成酰胺(酰胺、甲酰胺、乙酰胺、对硝基酰基苯胺、 β -萘基酰胺等)、酯(甲酯、乙酯、硫酯等)的修饰体等),肽的S变成亚砷S(=O)或砷S(=O)₂的修饰体,肽经由化学连接子(chemical linker)多聚化的修饰体,肽被生物素标记化的修饰体,肽被荧光标记化的修饰体,肽被发光标记化的修饰体,以及使烷基链、聚乙二醇、抗体、凝集素类、糖链、酶、膜透过性肽、低分子化合物或诱导蛋白质的泛素化的分子等与肽融合而成的修饰体等,但并不限于这些。

[0027] 本发明涉及的肽也包含肽的盐。作为肽的盐,可使用与生理学上可接受的碱、酸的盐,例如可举出:无机酸(盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸、磷酸等)的加成盐,有机酸(对甲苯磺酸、甲磺酸、草酸、对溴苯磺酸、羧酸、琥珀酸、柠檬酸、苯甲酸、乙酸等)的加成盐,无机碱(氢氧化铵、或碱、或碱土金属氢氧化物、碳酸盐、碳酸氢盐等)、氨基酸的加成盐等。

[0028] 本发明涉及的肽可以是前药。前药是指在生物体内的生理条件下通过基于酶、胃酸等的反应而转化为本发明涉及的肽的化合物,即,发生酶氧化、还原、水解等而转化为本发明涉及的肽的化合物,通过胃酸等发生水解等而转化为本发明涉及的肽的化合物。

[0029] 作为本发明涉及的肽的前药,可举出:本发明涉及的肽的氨基被酰基化、烷基化或磷酸化而成的化合物(例如,本发明涉及的肽的氨基被二十烷酰基化、丙氨酰基化、戊基氨基羰基化、(5-甲基-2-氧代-1,3-二氧戊环-4-基)甲氧基羰基化、四氢呋喃基化、吡咯烷基甲基化、新戊酰氧基甲基化或叔丁基化的化合物),本发明涉及的肽的羟基被酰基化、烷基化、磷酸化或硼酸化的化合物(例如,本发明涉及的肽的羟基被乙酰化、棕榈酰化、丙酰基化、新戊酰基化、琥珀酰化、富马酰基化、丙氨酰基化或二甲基氨基甲基羰基化的化合物),本发明涉及的肽的羟基、羧基被酯化或酰胺化的化合物(例如,本发明涉及的肽的羟基、羧基被C₁₋₆烷基酯化、苯基酯化、羧基甲基酯化、二甲基氨基甲基酯化、新戊酰氧基甲基化、乙氧基羰基氧基乙基酯化、酞基(phthalidyl)酯化、(5-甲基-2-氧代-1,3-二氧戊环-4-基)甲基酯化、环己基氧基羰基乙基酯化或甲基酰胺化的化合物)等,但并不限于这些。这些化

合物能够通过本身公知的方法由本发明涉及的肽制造。

[0030] 本发明涉及的肽的前药可以在广川书店1990年刊《医药品的开发》第七卷分子设计163~198页中记载的生理条件下变化为本发明涉及的肽。

[0031] 本说明书中,前药可以形成盐,作为所述盐,可举出作为本发明涉及的肽的盐而例示的盐。

[0032] 本发明涉及的肽可以是晶体,晶型可以是单一的,也可以是晶型混合物,都包含在本发明涉及的肽中。晶体能够通过应用自身公知的结晶化法进行结晶化来制造。

[0033] 本发明涉及的肽可以是药学上可接受的共结晶或共结晶盐。在此,共结晶或共结晶盐是指各自具有不同的物理特性(例如结构、熔点、溶解热、吸湿性、溶解性和稳定性等)的、在室温下由两种或两种以上的独特的固体构成的结晶性物质。共结晶或共结晶盐能够按照自身公知的共结晶化法来制造。

[0034] (包含环状肽的组合物)

作为本发明的1种有效成分的环状肽、其衍生物或修饰体能够作为药物、诊断药、研究用试剂以组合物的形态使用。组合物(例如,药物组合物)的给药方式没有特别限定,可以是经口给药,也可以是非经口给药。作为非经口给药,例如可举出:经粘膜给药(经鼻、经口腔、经眼、经肺、经阴道或经直肠给药)、注射给药(静脉注射、皮下注射、肌肉注射等)、经皮给药等。关于组合物中的肽,考虑到容易代谢和排泄的性质,能够进行各种修饰。例如,通过对肽附加烷基链、聚乙二醇或糖链等,能够延长血中滞留时间,降低抗原性。另外,也可以使用聚乳酸·羟基乙酸(PLGA)等生物体内分解性的高分子化合物、多孔性羟基磷灰石、脂质体、表面修饰脂质体、由不饱和脂肪酸制备的乳液、纳米颗粒、纳米微球等作为缓释化基剂,使其内含肽。在经皮给药的情况下,也能够使弱电流流过皮肤表面而使其透过角质层(离子电渗法)。

[0035] 上述组合物可以直接使用有效成分,也可以加入药学上可接受的载体、赋形剂、添加剂等进行制剂化。作为剂型,例如可举出:液体制剂(注射剂等)、分散剂、混悬剂、片剂、丸剂、粉末剂、栓剂、散剂、细粒剂、颗粒剂、胶囊剂、糖浆剂、锭剂、吸入剂、软膏剂、滴眼剂、滴鼻剂、滴耳剂、糊剂等。这些制剂可以是速释制剂或缓释制剂等控释制剂(缓释微胶囊等)。制剂化例如能够适当使用赋形剂、粘合剂、崩解剂、润滑剂、溶解剂、助溶剂、着色剂、矫味矫臭剂、稳定剂、乳化剂、吸收促进剂、表面活性剂、pH调节剂、防腐剂、抗氧化剂等,通过常规方法进行。作为制剂化中使用的成分的例子,可举出:纯化水、食盐水、磷酸缓冲液、葡萄糖(dextrose)、甘油、乙醇等药学上可接受的有机溶剂、动植物油、乳糖、甘露醇、葡萄糖(glucose)、山梨糖醇、结晶纤维素、羟丙基纤维素、淀粉、玉米淀粉、硅酸酐、硅酸铝镁、胶原蛋白、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、羧基乙烯基聚合物、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸钠、海藻酸钠、水溶性葡聚糖、羧甲基淀粉钠、果胶、甲基纤维素、乙基纤维素、黄原胶、阿拉伯胶、黄蓍胶、酪蛋白、琼脂、聚乙二醇、二甘油、甘油、丙二醇、凡士林、石蜡、肉豆蔻酸辛基十二烷基酯、肉豆蔻酸异丙酯、高级醇、硬脂醇、硬脂酸、人血清白蛋白等,但不限于这些。在肽难以被经粘膜吸收的情况下,作为改善难吸收性药物的吸收的吸收促进剂,可以使用:聚氧乙烯月桂基醚类、月桂基硫酸钠、皂苷等表面活性剂;甘氨酸(glycocholic acid)、脱氧胆酸、牛磺胆酸等胆汁酸盐;EDTA、水杨酸类等螯合剂;己酸、癸酸、月桂酸、油酸、亚油酸、混合胶束等脂肪酸类;烯胺衍生物、N-酰基胶原肽、N-酰基氨基酸、环糊精类、壳聚糖类、一氧化氮

供体等。

[0036] 丸剂或片剂也能够用糖衣、胃溶性、肠溶性物质包覆。注射剂能够包含注射用蒸馏水、生理盐水、丙二醇、聚乙二醇、植物油、醇类等。进而,能够加入湿润剂、乳化剂、分散剂、稳定剂、溶解剂、助溶剂、防腐剂等。根据需要,也能够适当适量使用通常的防腐剂、抗氧化剂、着色剂、甜味剂、吸附剂、湿润剂等添加物。

[0037] 本发明的组合物具有抑制癌转移的作用,因此能够对肿瘤转移后的患者和肿瘤转移风险高的患者给药。因此,该组合物可以在肿瘤转移发生前给药受试者,也可以在肿瘤转移发生后给药受试者。所述受试者中的适用对象只要是细胞就没有特别限定,优选肿瘤细胞。癌的种类没有限制,作为例子,可举出:头颈部癌、胃癌、结肠癌、直肠癌、大肠癌、肝癌、胆·胆管癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、膀胱癌、前列腺癌、子宫癌、口腔癌、咽癌、咽喉癌、舌癌、食道癌、肾癌、卵巢癌等。

[0038] 本发明的组合物可以与对上述疾病有用的各种化学疗法、外科治疗、放射线疗法之类的其他药物、治疗法组合使用。

[0039] 将本发明的组合物给药哺乳类(例如人、小鼠、大鼠、豚鼠、兔、狗、马、猴、猪等)、特别是人的情况下的给药量根据症状、患者的年龄、性别、体重、敏感性差、给药方法、给药间隔、有效成分的种类、制剂的种类而不同,没有特别限定,例如能够将 $30\mu\text{g} \sim 1000\text{mg}$ 、 $100\mu\text{g} \sim 500\text{mg}$ 、 $100\mu\text{g} \sim 100\text{mg}$ 分1次或数次给药。

[0040] 以下所示的实施例仅是例示,仅意图与上述的实施方式一起详细地说明本发明,并不限定本发明。本领域技术人员能够在不脱离本发明的意义的情况下将本发明变更为各种方式,所述变更也包含在本发明的范围内。

实施例

[0041] (肽合成)

本实施例中使用的全部肽的化学合成委托给株式会社SCRUM(东京、日本),利用自动合成机SyroII(Biotage公司制造)实施将9-苄基甲氧基羰基(Fmoc基)用作 α 氨基的保护基的标准的固相合成法。将位于C末端的侧链保护氨基酸-树脂放入合成柱,设置装置。接着,在利用Fmoc基保护的次氨基酸中加入1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧代六氟磷酸盐(HATU)/二异丙基乙胺(DIEA)进行活化,放入柱中进行反应。反应结束后清洗,使用20%哌啶脱保护Fmoc基。通过重复本工序,使肽链延长,将最终氨基酸的Fmoc基脱保护后,从装置中取出肽树脂。

[0042] 关于肽的环状化,参考Biopolymers.2016,106(6):843-852;Chem Soc Rev.2015,44(1)91-102;Nat Chem.2014,6(11)1009-1016等中记载的方法。作为例子,将Seq-1和Seq-10的环状化示于以下。利用二甲基甲酰胺(DMF)使直链的侧链保护肽树脂溶胀,在2%胍溶液中反应5~10分钟,从而将赖氨酸的侧链的保护基(Dde)和天冬氨酸的侧链的保护基(ODmab)脱保护后,加入作为偶联试剂的Oxima Pure和二异丙基碳二亚胺(DIC),在 50°C 下反应3小时。清洗树脂后,加入TFA,将硫醇基的保护基脱保护,同时从树脂中切出单环肽。通过使用了SunFire C18柱($10 \times 150\text{mm}$)(Waters公司制造)的RT-HPLC,将单环肽精制后,进行冷冻干燥。将单环肽溶解于Tris-HCl缓冲液(pH8.5)和乙腈的混合液后,添加DMSO,在室温下搅拌36小时,由此通过二硫键将肽环状化。通过使用了SunFire C18柱($10 \times 150\text{mm}$)(Waters公司制造)的RT-HPLC,将作为二环肽的Seq-1和Seq-10精制后,进行冷冻干燥。最终

得到的肽的分子量使用microflex (Bruker公司) 进行测定, 鉴定目标物。

[0043] 将本实施例中合成的肽的理论分子量、实测分子量、纯度、环状化类型、序列示于表1。另外, 将它们中Seq-1和Seq-10的氨基酸序列示于以下。应予说明, 在表1和以下的氨基酸序列中, 没有标注D型的氨基酸表L型。

[0044] [表1]

名称	理论分子量 MW	实测分子量 MW	电压 极性	纯度 (%)	环化
Seq-1 (序列号 1)	1508.8	1508.8	NEG	95.9	S-S(1-10)/酰胺 (7-11)
Seq-10 (序列号 2)	1558.8	1558.7	NEG	100.0	S-S(1-10)/酰胺 (7-11)

[0045] Seq-1: c (Mpa-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-c [Lys-Tyr-Leu-Cys) -Asp] -Leu-Ile-NH₂ (序列号1)

Seq-10: Ac-c [Cys¹-Pro²-Pro³-Tyr⁴-Leu⁵-Pro⁶-c (Lys⁷-Tyr⁸-Leu⁹-Cys¹⁰]-Asp¹¹)-Leu¹²-Ile¹³-NH₂ (序列号2)

[0046] Seq-1和Seq-10是除去VIpep-3 (参照非专利文献1) 的C末端3残基 (Leu-Arg-Ser), 通过1位-10位之间的S-S键和7位-11位之间的酰胺键进行二环化而成的肽。

[0047] (参考例) 基于VIPR2信号分析癌细胞的迁移机制

材料和方法

<质粒和siRNA>

pCMV6-AN-Myc-DDK载体 (PS100016) 和阴性对照siRNA (S10C-0600) 购自Cosmo Bio株式会社。pEGFP-N2载体购自Takara Clontech公司。pCMV6-VIPR2-Myc-DDK质粒由pCMV6-AN-Myc-DDK载体和VIPR2cDNA构建。将VIPR2-Myc区从得到的质粒克隆到pEGFP-N2载体中。人VIPR2-siRNA (si1, 3024813653-000080和-000090; si2, 3024813653-000020和-000030; si3, 3024813653-000050和-000060) 购自Sigma-Aldrich公司。

[0048] <抗体>

抗GAPDH抗体 (#2118)、抗WAVE2抗体 (#3659)、抗pan AKT抗体 (#4691)、抗磷酸化AKT抗体 (Ser473; #4060)、抗磷酸化AKT抗体 (Thr308; #2965) 购自Cell Signaling Technology公司。

[0049] <VIPR2-EGFP过表达细胞的制备>

MCF-7和MDA-MB-231细胞株购自JCRB Cell Bank (国立研究开发法人医药基盘・健康・营养研究所)。使用Lipofectamine 3000 (Invitrogen公司), 按照制造商的推荐, 转染对照siRNA和VIPR2siRNA。在MCF-7和MDA-MB-231细胞中转染编码VIPR2-EGFP的表达载体或对照的EGFP表达载体, 在1mg/mL的G418 (Nacalai Tesque公司) 存在下培养14天, 由此建立稳定表达VIPR2-EGFP或EGFP的细胞株。

[0050] <免疫印记>

免疫印记按照以前记载的方法 (Asano et al. 2014, Biol. Open 3, 463-474; Asano et al. 2019, Sci. Rep. 9, 12729) 实施。

[0051] <随机迁移试验和Transwell迁移试验>

将MCF-7细胞 (1.5×10^4 个) 在无血清培养基中接种于35mm培养皿中, 培养至粘附后, 利用100nM的VIP (Cayman Chemical Company) 刺激。在移动测定中, 使用恒温板 (TOKAI

HIT株式会社制造),在37℃下每1小时通过实时细胞成像(BZ-X800;KEYENCE株式会社)监测细胞,共监测12小时。细胞的追踪分析使用Image-Pro premier ver.9.4(Media Cybernetics,Inc.)进行。

[0052] 另外,使用Boyden小室(Boyden Chamber),按照以前记载的方法(Asano et al.2012,Mol.Cell Biol.32,3242-3252)实施。向孔中加入包含200nM的VIP的600 μ L无血清培养液。将细胞(1×10^4 个)悬浮于100 μ L的无血清培养液中,加入到插入物中。在37℃下使细胞迁移30小时或48小时。除去附着于膜的上表面的非移动性的细胞,用4%多聚甲醛将附着于下表面的移动性的细胞固定,利用荧光显微镜计数。

[0053] <小鼠腹腔内转移试验>

MDA-MB-231乳腺癌细胞的腹腔内转移通过改变Cabral等使用HeLa细胞进行的方法进行评价(Cabral等,2007年,J.Control Release.121,146-155)。简单来说,将稳定表达VIPR2-EGFP的MDA-MB-231细胞或稳定表达EGFP的MDA-MB-231细胞(6×10^6 个/200 μ L)接种于一致5周龄年龄的雌性裸鼠(BALB/c-nu;日本Charles river株式会社)腹腔内(n=3/组)。肿瘤的生长和转移通过使用NightOWL(Berthold Technologies公司制造)的实时动物成像进行可视化,每周监测,监测6周。

[0054] <统计分析>

统计分析使用GraphPad Prism。除了非参数Mann-Whitney U检验(2组的情况)和Kruskal-Wallis检验(2组以上的情况)以外,还使用Dunn的多重比较检验。在p值小于0.05的情况下,判断为统计上有显著差异。

[0055] 结果

<VIP-VIPR2信号促进MCF-7和MDA-MB-231乳腺癌细胞的PI3K/PI(3,4,5)P₃通路>

为了研究VIP是否参与经由PI3K/PI(3,4,5)P₃通路的细胞移动,利用免疫印迹评价癌细胞中的PI3K/PI(3,4,5)P₃通路的下游信号即AKT的磷酸化。如图1的A所示,使MCF-7细胞处于饥饿状态3小时后,利用0~1000nM的VIP刺激10分钟时,AKT依赖于VIP的添加浓度而磷酸化。如图1的B所示,该AKT的磷酸化被相对于VIPR2的siRNA强力地抑制。如图1的C所示,该AKT磷酸化在稳定表达VIPR2-EGFP的MDA-MB-231细胞中显著增加。全部实验独立地实施至少3次,得到同样的数据。将代表性的图像示于图1的A-C。这些结果显示出,在乳腺癌细胞如MCF-7、MDA-MB-231中,由VIP诱导的PI3K/PI(3,4,5)P₃通路的活化经由VIPR2进行。

[0056] <VIP-VIPR2信号促进MCF-7乳腺癌细胞的细胞迁移>

为了研究VIPR2的表达是否影响癌细胞的运动性,研究了MCF-7细胞的细胞迁移。如图2的A所示,在100nM的VIP存在下,MCF-7细胞随着培养时间的经过而移动,但该移动被相对于VIPR2的siRNA强力地抑制。另一方面,在稳定表达VIPR2-EGFP的MCF-7细胞中,除了细胞的移动以外,细胞的形态也发生变化,明显观察到伪足。图2的B是对转染了对照siRNA和VIPR2siRNA的MCF-7细胞的轨迹图进行分析并图表化的结果。将各个细胞的起始点置于图的中央时,显示出MCF-7细胞的移动被相对于VIPR2的siRNA强力地抑制。图2的C利用柱状图显示移动速度的比较。MCF-7细胞的移动速度被相对于VIPR2的siRNA强力地抑制,相反,在稳定表达VIPR2-EGFP的MCF-7细胞中显著加速。数据用平均值 \pm SD表示。在标明的组间,***:p<0.001(Kruskal-Wallis检验后,Dunn的多重比较检验)。

[0057] 使用图7所示的Transwell小室实验,评价MDA-MB-231细胞的移动能力。将细胞悬浮在无血清培养基中(1×10^4 cells/100mL)。将包含200nM的VIP的无血清培养基6在各孔中各加入600 μ L,将具有3 μ m的细孔5的插入物3沉入孔中后,将悬浮的细胞1加入插入物3中,在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂条件下培养。30小时后,固定细胞,除去插入物3表面的细胞后,通过荧光显微镜检测被VIP诱导而移动到背面的细胞2的EGFP的荧光。基于荧光图像将移动到插入物的背面的细胞数图表化。图3为使用Transwell小室实验测定稳定表达EGFP或VIPR2-EGFP的MDA-MB-231细胞移动的结果。将VIP(200nM)加入孔中,将细胞加入插入物中,在37 $^{\circ}$ C下孵育30小时,将移动到插入物背面侧的细胞进行定量化并显示在图表中。在VIP存在下,移动到插入物的背面侧的细胞的数量增加,在表达VIPR2-EGFP的细胞中,其移动进一步显著地亢进。数据用平均值 \pm SD表示。在标明的组间示出*: $p < 0.05$ 、***: $p < 0.001$ (Kruskal-Wallis检验后,Dunn的多重比较检验)。这些结果显示,由VIP诱导的细胞移动依赖于VIPR2的表达量而被促进。

[0058] <如果使VIPR2过表达,则形成WAVE2丰富的片状伪足>

将稳定表达EGFP或VIPR2-EGFP的MDA-MB-231细胞(2×10^5 cells)接种于胶原蛋白涂覆盖玻片,在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂条件下孵育。24小时后,利用无血清培养基清洗,加入新的无血清培养基孵育细胞(37 $^{\circ}$ C、5%CO₂条件下)。3小时后,替换成包含100nM的VIP的无血清培养基,孵育30分钟。利用4%多聚甲醛固定,使用抗WAVE2抗体进行免疫染色。根据该荧光染色图像测定细胞膜正下方的WAVE2富集区域的表面积并图表化。

[0059] 将其结果示于图4。柱状图表示片状伪足的面积。数据用平均值 \pm SD表示。**: $p < 0.01$ 、***: $p < 0.001$,指示的组间(Kruskal-Wallis检验和Dunn的多重比较检验)。n.s.表示统计上没有显著差异。通过VIP刺激,MDA-MB-231的WAVE2富集的片状伪足的面积扩大。稳定表达VIPR2-EGFP的MDA-MB-231细胞与EGFP表达的对照MDA-MB-231细胞相比,片状伪足面积的扩大更为显著。

[0060] <VIPR2的过表达促进体内肿瘤转移>

为了研究VIPR2是否对生物体内肿瘤转移扩散起作用,在裸鼠腹腔内接种稳定表达EGFP或VIPR2-EGFP的MDA-MB-231细胞。每隔一周使用NightOWL进行体内荧光成像,观察癌细胞的全身性迁移。将其结果示于图5的A。图示板为第一周、第四周、第六周体内表达EGFP或VIPR2-EGFP的MDA-MB-231细胞的荧光图像。图5的B的图表以标明的周末示出第一周移植的部分与接下来密集的部分(箭头)的距离(从给药部位到最远的细胞群的距离)。

[0061] 这些结果显示,稳定表达VIPR2-EGFP的MDA-MB-231细胞与稳定表达EGFP的MDA-MB-231细胞相比,在腹腔内向远处移动。由以上的结果可以明确:VIPR2的过表达促进体内的肿瘤细胞的移动。

[0062] <VIPR2选择性拮抗剂KS-133阻碍稳定表达VIPR2-EGFP的MDA-MB-231细胞中基于VIP的PI3K/PI(3,4,5)P₃通路的活化>

对基于稳定表达VIPR2-EGFP的MDA-MB-231细胞的VIP对AKT的磷酸化,在KS-133不存在和存在下进行评价。KS-133强力抑制了对添加浓度依赖性地由VIP诱导的AKT的磷酸化。KS-133对AKT的表达没有影响。

[0063] <VIPR2选择性拮抗剂KS-133抑制稳定表达VIPR2-EGFP的MDA-MB-231乳腺癌细胞的迁移>

使用图7所示的Transwell,研究KS-133对稳定表达VIPR2-EGFP的MDA-MB-231乳腺癌细胞迁移的效果。将稳定表达VIPR2-EGFP的MDA-MB-231细胞悬浮于包含0~1000nM的各浓度的KS-133的无血清培养基中(1×10^4 cells/100 μ L)。将包含200nM的VIP和上述各浓度的KS-133的无血清培养基6在各孔中各加入600 μ L,将具有3 μ m的细孔5的插入物3沉入孔中后,将悬浮的细胞1加入插入物3中,在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂条件下孵育。48小时后,固定细胞,除去插入物3表面的细胞后,通过荧光显微镜检测被VIP诱导而移动到背面的细胞2的EGFP的荧光。基于荧光图像将移动到插入物的背面的细胞数图表化。将其结果示于图8。

[0064] 图8的A为示出迁移的细胞的荧光显微镜照片。图8的B和表2示出添加各浓度的KS-133时的迁移的细胞数。稳定表达VIPR2-EGFP的MDA-MB-231的VIP诱导性的细胞迁移通过KS-133的添加而被抑制(Kruskal-Wallis检验和Dunn的多重比较检验的结果是,相对于未添加KS-133,只有在添加100nM以上的KS-133时确认到显著差异)。

[0065] [表2]

KS-133添加浓度 (nM)	0	30	100	300	1000
细胞数平均值 (Cells/mm ²)	10.13	4.35	2.08	1.39	0.78
标准偏差	3.34	0.99	1.07	1.34	0.70

[0066] <在过表达VIPR2的MCF-7细胞中,添加作为选择性的VIPR2拮抗剂的KS-133时的细胞增殖抑制效果>

确认了该效果。细胞的增殖试验按照非专利文献3实施。将过表达VIPR2-EGFP的MCF-7细胞以 1×10^5 cells/dish的密度接种于35mm培养皿中6小时,将培养液更换成包含2%FBS、100nM的VIP、0或100nM的KS-133的新鲜培养基(第0天)。利用BZ-X800(Keyence, Kyoto, Japan)荧光显微镜观察细胞,使用血细胞计数仪通过台盼蓝(trypan blue)色素染色法每24小时计数细胞数,最多计数4天(时程试验,timecourse experiment)。

[0067] 对于过表达VIPR2-EGFP的MCF-7细胞,添加作为VIPR2拮抗剂的KS-133(非专利文献2),确认了该细胞的增殖效果。将确认的结果示于图9和表3。在过表达VIPR2的MCF-7细胞中,通过添加KS-133,从培养第二天以后,细胞增殖被显著抑制。另一方面,在对照组中,确认到经日性的细胞增殖。由该确认的结果可以明确:VIP-VIPR2信号引起乳腺癌细胞的增殖。

[0068] [表3]

天	对照组		KS-133组	
	细胞数(平均值)	标准偏差	细胞数(平均值)	标准偏差
0	1.0×10^5	0	1.0×10^5	0
1	1.5×10^5	0.9309	0.85×10^5	0.2517
2	1.45×10^5	0.3416	0.65×10^5	0.2517
3	1.95×10^5	0.9849	0.45×10^5	0.3786
4	3.2×10^5	0.6325	0.2×10^5	0.1633

工业实用性

[0069] 包含本发明涉及的环状肽的组合物能够作为癌转移抑制剂等医药品使用。

符号说明

1 细胞

- 2 VIP诱导而移动的细胞
- 3 插入物
- 4 KS-133 (有或无) /无血清培养
- 5 细孔 (3 μ m)
- 6 200nM的VIP+KS-133 (有或无) /无血清培养。

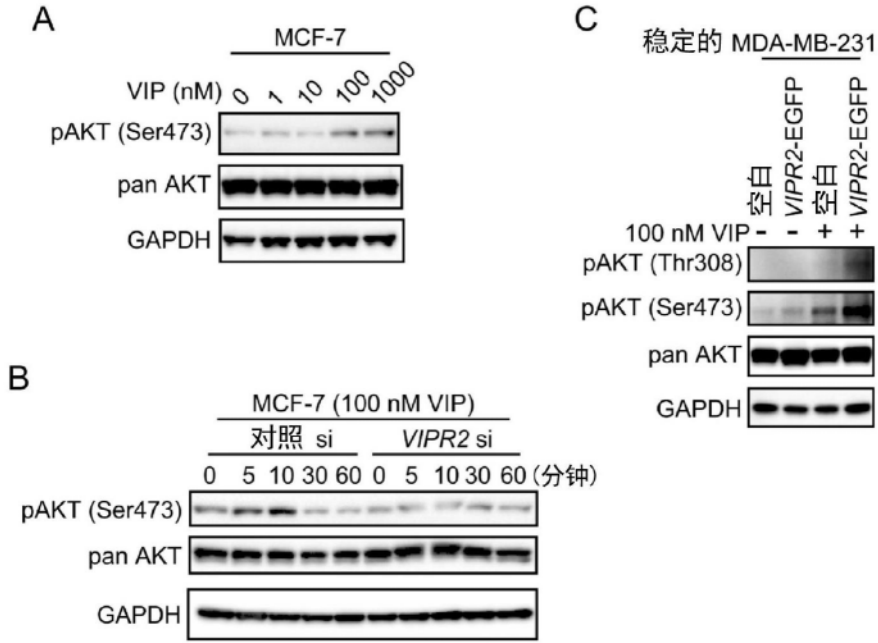


图1

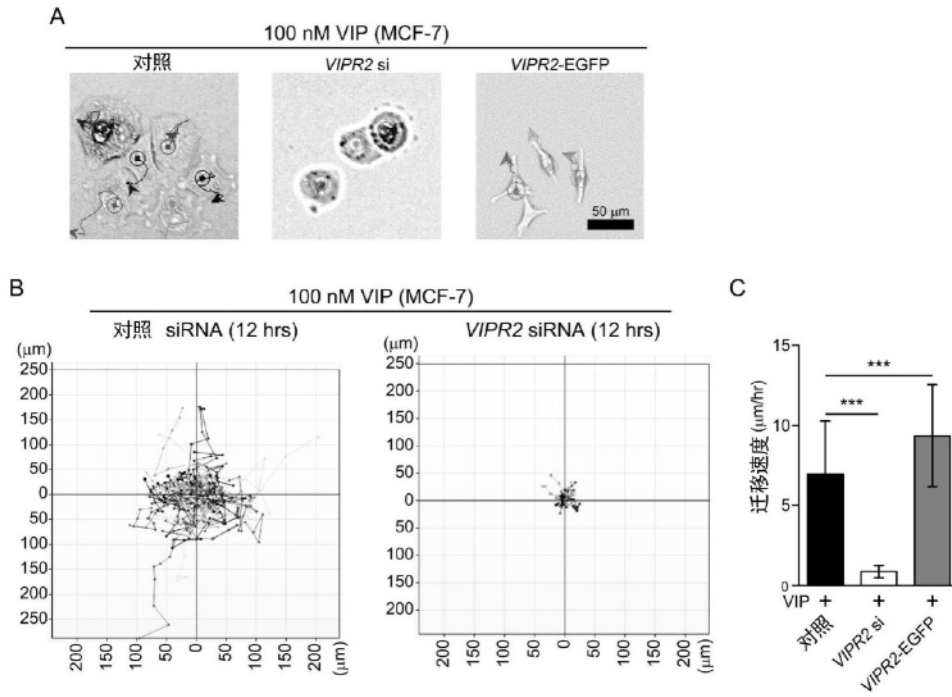


图2

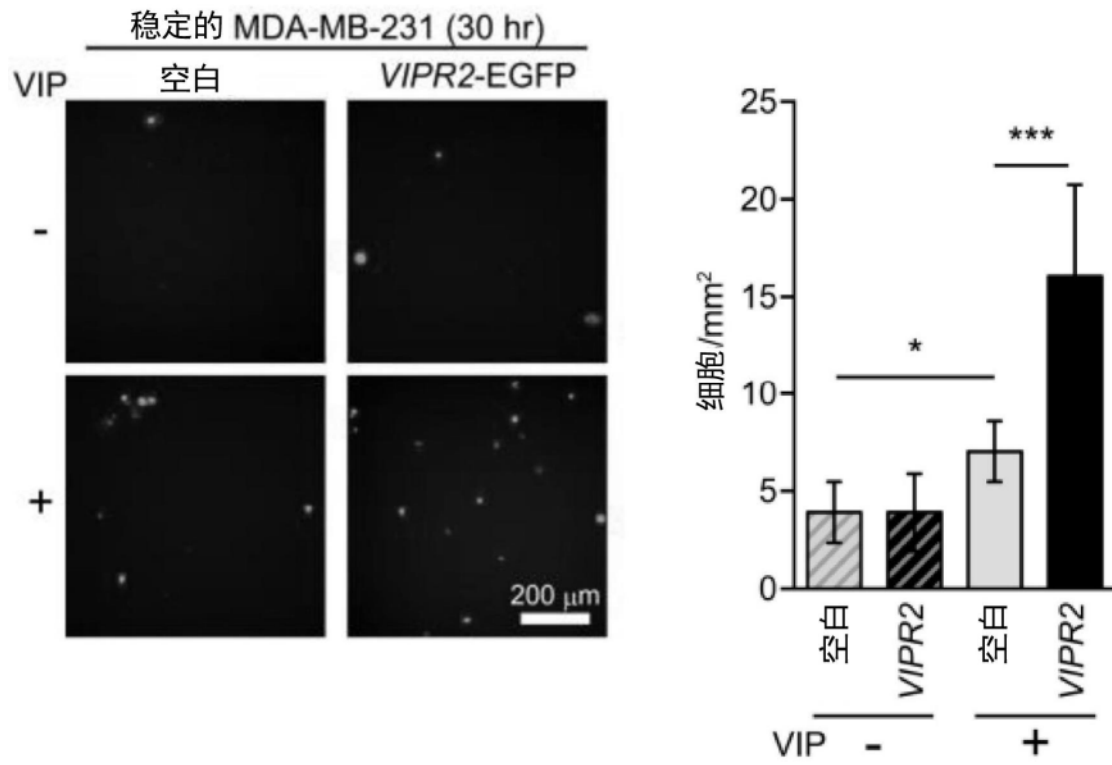


图3

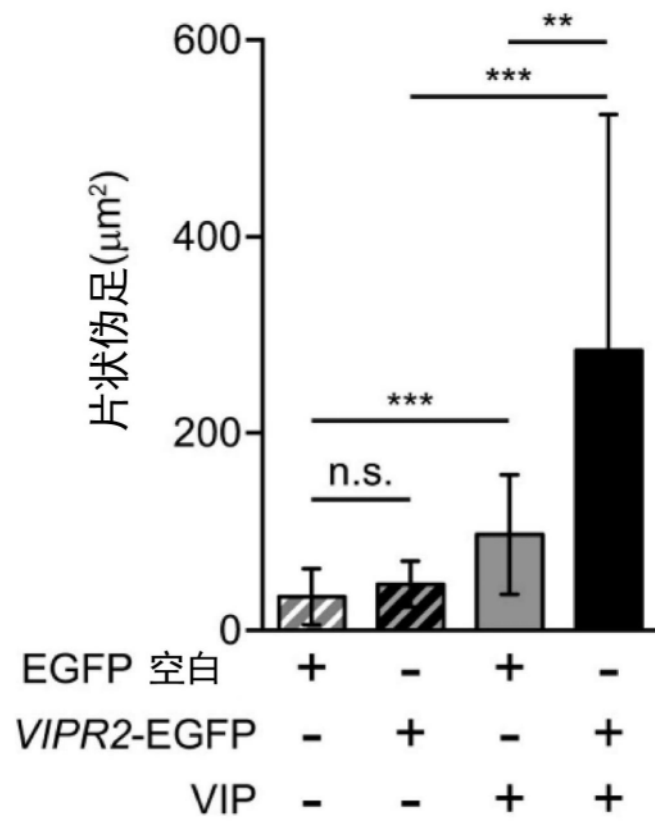


图4

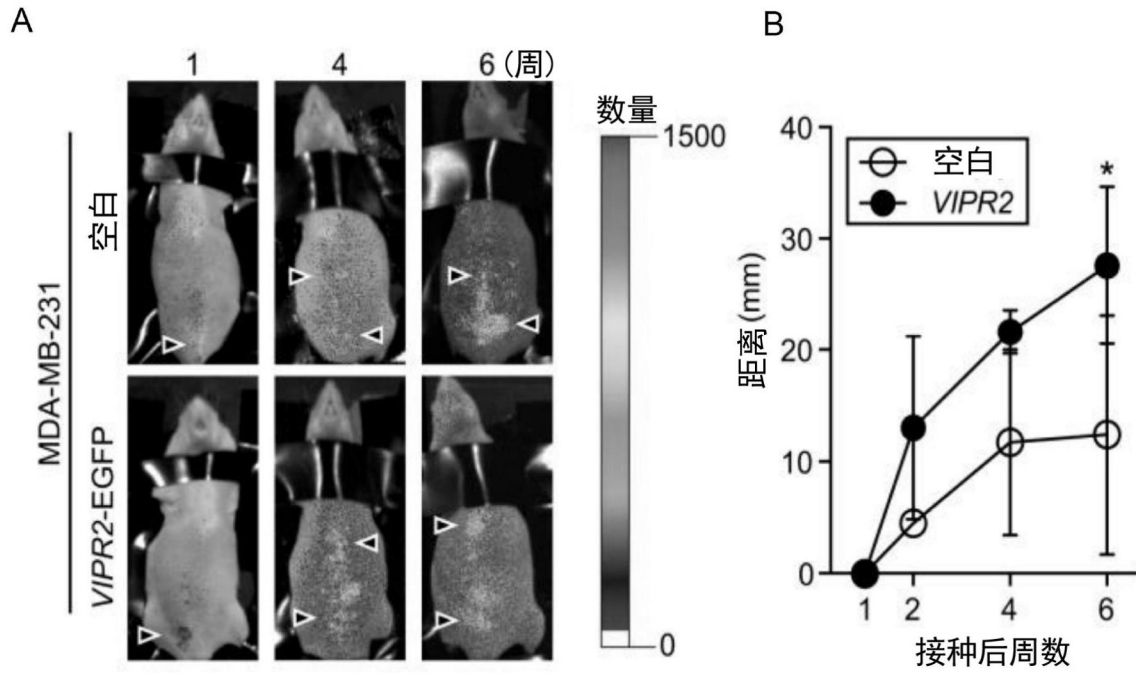


图5

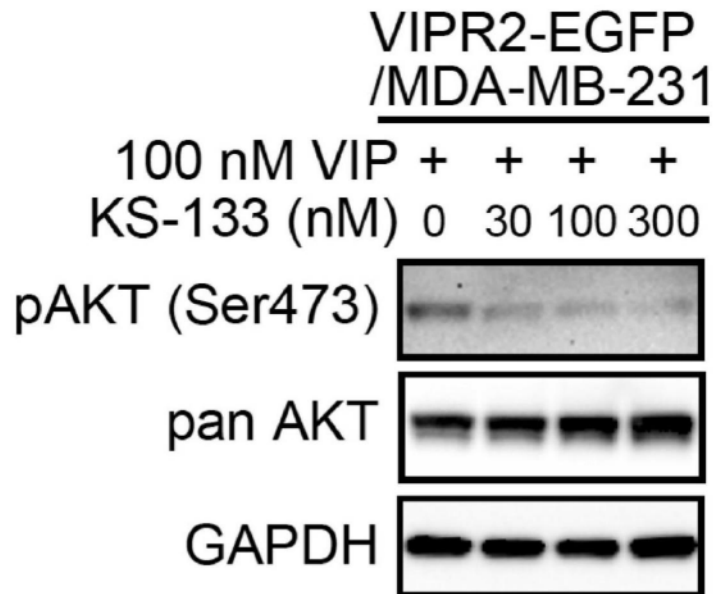


图6

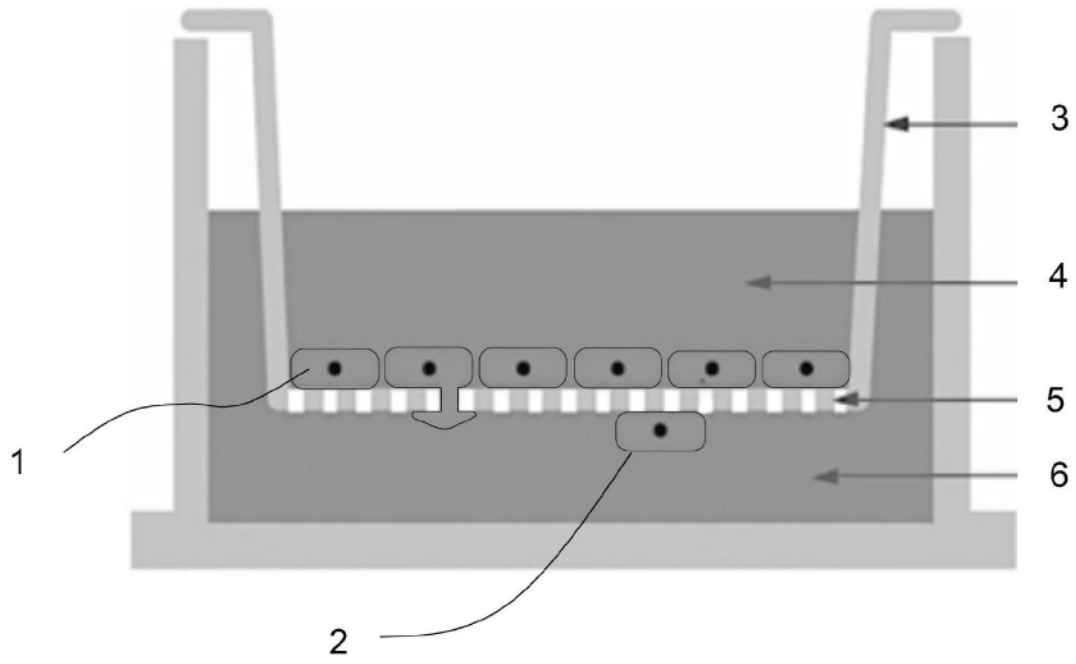


图7

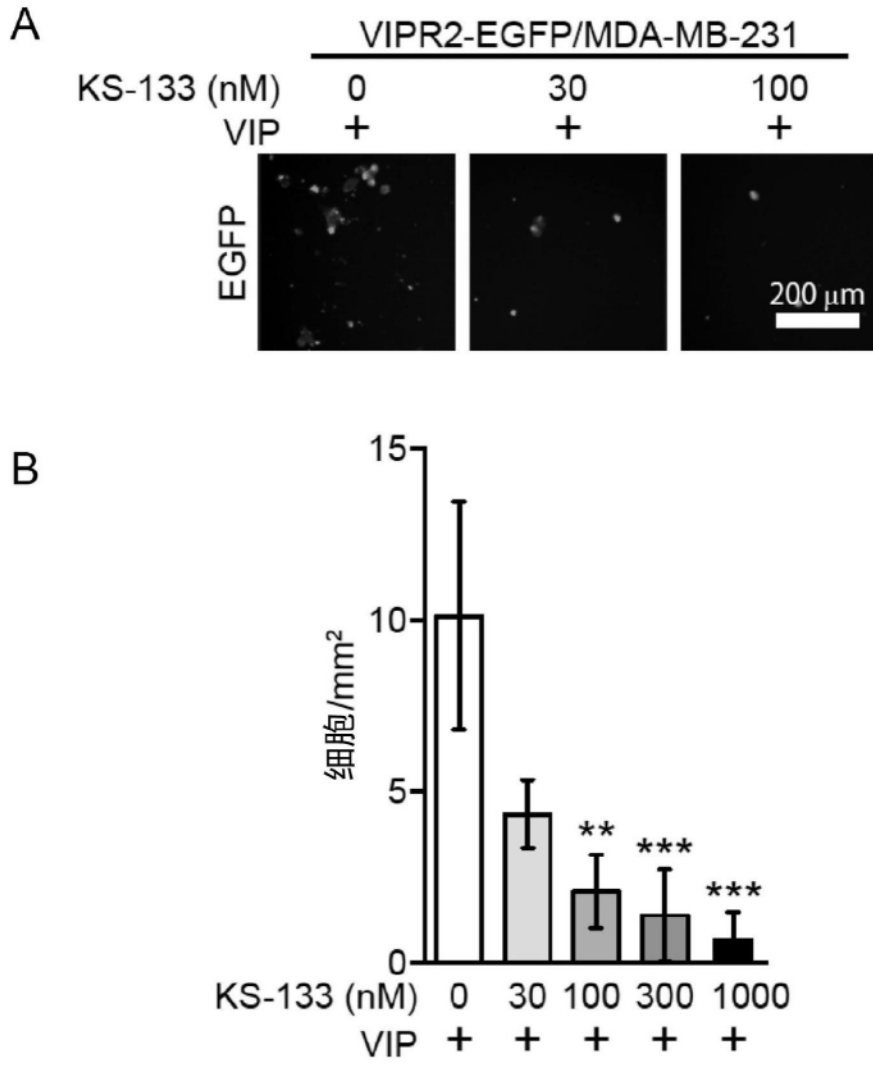


图8

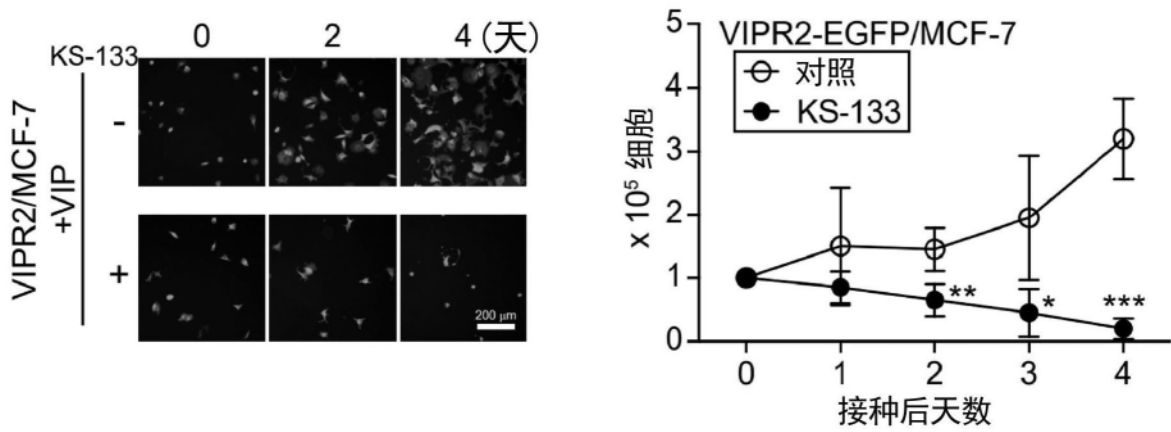


图9