



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117795064 A

(43) 申请公布日 2024. 03. 29

(21) 申请号 202280055326.7

(22) 申请日 2022.07.07

(30) 优先权数据

2021-0058 2021.07.09 CU

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.02.07

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CU2022/050007 2022.07.07

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/280330 ES 2023.01.12

(71) 申请人 遗传工程与生物技术中心

地址 古巴哈瓦那

(72) 发明人 Y • 马斯福罗尔冈萨雷斯

H • E • 加雷派雷兹

O • 乐耶斯阿克斯塔

Y • 佩雷拉尼格林

E • 卡瓦列罗门嫩德斯

L • J • 冈萨雷斯洛佩斯

V • A • 贝萨达佩雷斯

S • E • 派雷罗德里圭兹

G • E • 吉伦涅托

S • 冈萨雷斯布兰科

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所

有限公司 11038

专利代理师 殷骏

(51) Int.Cl.

C12N 9/12 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

权利要求书1页 说明书15页

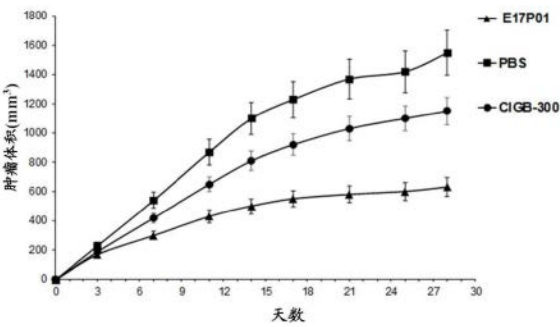
序列表 (电子公布) 附图4页

(54) 发明名称

抑制由CK2介导的磷酸化的线性肽和包含其的组合物

(57) 摘要

一种抑制由酶酪蛋白激酶2 (CK2) 介导的磷酸化的线性肽,其具有选自标识为SEQ ID NO: 45、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50和SEQ ID NO: 57-SEQ ID NO:62的序列组成的组的氨基酸序列,以及包含所述肽和胞内穿透肽的多肽。一种药物组合物,其包含这些线性肽或多肽中的至少一种和药学上可接受的载体。本发明还公开了所述肽或多肽用于制造药物的用途,以及治疗其中施用了所述药物的实体瘤或液体瘤的方法。



1. 一种抑制由酪蛋白激酶2 (CK2) 介导的磷酸化的线性肽, 其特征在于具有选自标识为SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:57-SEQ ID NO:62的序列组成的组的氨基酸序列。
2. 一种多肽, 其包含权利要求1的抑制由酶酪蛋白激酶2 (CK2) 介导的磷酸化的线性肽和胞内穿透肽。
3. 权利要求2的多肽, 其中所述胞内穿透肽是来自人免疫缺陷病毒的Tat1蛋白的肽。
4. 权利要求2的多肽, 其中所述胞内穿透肽具有被标识为SEQ ID NO:65或SEQ ID NO:66的氨基酸序列。
5. 权利要求4的多肽, 其具有选自标识为SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48和SEQ ID NO:51-SEQ ID NO:56的序列组成的组的氨基酸序列。
6. 一种药物组合物, 其包含至少一种权利要求1的抑制由酪蛋白激酶2 (CK2) 介导的磷酸化的线性肽或权利要求2-5中任一项的多肽以及药学上可接受的赋形剂。
7. 权利要求6的药物组合物, 其经配制用于通过全身、瘤内、口服或粘膜途径施用。
8. 权利要求6的药物组合物, 其对于治疗实体瘤或液体瘤是有用的。
9. 权利要求1的抑制由酪蛋白激酶2 (CK2) 介导的磷酸化的线性肽或权利要求2-5中任一项的多肽用于制备药物的用途。
10. 根据权利要求9的用途, 其中所述药物用于治疗实体瘤或液体瘤。
11. 一种治疗有需要的个体的实体瘤或液体瘤的方法, 其包括施用治疗有效量的权利要求6的药物组合物。
12. 权利要求11的治疗方法, 其中所述实体瘤为肺、子宫颈、喉、胰腺或膀胱的实体瘤。
13. 权利要求11的治疗方法, 其中所述液体瘤为慢性淋巴细胞白血病、T型急性淋巴细胞性白血病或急性髓细胞样白血病。

抑制由CK2介导的磷酸化的线性肽和包含其的组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及分子药理学和人类医学领域。具体而言,本发明涉及获得线性肽,所述线性肽通过与底物上的磷酸受体位点直接相互作用来抑制由酶酪蛋白激酶2(CK2)介导的磷酸化事件。由于其生物活性,本发明的肽和多肽可用于治疗不同类型的实体瘤和其它来源的实体瘤。

[0002] 先前的技术

[0003] CK2是参与增加细胞增殖的丝氨酸/苏氨酸酶,在恶性转化过程中其细胞内定位基本上是细胞核内的(Tawfic S.等人,2001,Histol.Histopathol.16:573-582)。因此,这种酶构成了有吸引力的治疗靶点。(Duncan J.S.等人,2008,Biochim.Biophys.Acta,1784:33-47)。

[0004] 通过使用衍生自4,5,6,7-四溴苯并三唑(TBB)的化合物(Pagano M.A.等人,2004,J.Med.Chem.,47:6239-6247)、反义寡核苷酸(Slaton J.W.等人,2004,Mol.Cancer Res.2:712-720)和阻断该酶的催化亚基与调节亚基之间相互作用的肽(Laudet B.等人,2007,Biochem.J.,408:363-373),已经在实验肿瘤学中操纵了由CK2酶介导的磷酸化事件。化合物CX-4945抑制CK2酶的两个催化亚基(Siddiqui-Jain A.等人,2010,Cancer Res.70:10288-10298),并且是体外细胞增殖的强效抑制剂,平均最大抑制浓度(IC₅₀)为5.5μM。然而,需要高剂量的该化合物(25和75mg/kg)和积极的给药方案来抑制体内肿瘤生长。只有这种CK2酶抑制剂在人中得到令人满意的评估,其中在I期临床研究中记录了有利的药代动力学和安全性参数(Lim J.K.C.等人,2010,Cancer Res.70:2763-2766)。首次用名为CIGB-300的肽(专利申请W003/054002;Perea S.E.,等人,2004,Cancer Res.,64:7127-7129)描述了通过分子与底物中CK2酶的磷酸受体位点直接相互作用抑制这种磷酸化事件。

[0005] CIGB-300肽是嵌合分子,其含有与底物上的CK2磷酸受体位点相互作用的环肽和来自人免疫缺陷病毒(HIV)的Tat1蛋白的“胞内穿透”肽,以保证其在细胞中的内化。CIGB-300已在体外和体内在各种实体瘤(诸如肺、子宫颈、喉)的细胞株(Perera Y.等人,2014,MolClinOncol,2(6):935-944)和液体瘤诸如慢性淋巴细胞白血病(Martins L.等人,2013,Oncotarget,5(1):258-263)和T型急性淋巴母细胞性白血病(Perera Y.等人,Cancers,12,1377)中表示出抗增殖和促凋亡特性。另外,这种肽显示出在I/II期临床研究中得到证实的临床获益的迹象(Perea S.等人,2011,Mol Cell Biochem.,356(1-2):45-50)(Sarduy M.等人,2015,Br.J.Cancer,112:1636-1643)。

[0006] 然而,CIGB-300是在其序列中含有甲硫氨酸和分子内二硫键的25个氨基酸的肽。这些是分子中化学不稳定性的来源,并且可能是产品开发的更高阶段中不一致的原因,无论是在液体中还是在冻干制剂中以及在稳定性研究中。(Frokjaer S.等人,2000,Pharmaceutical formulation development of peptides and proteins.Taylor&Francis)。这种肽中存在的主要杂质归因于甲硫氨酸的氧化和聚集体(二聚体和三聚体)的形成(由于分子间二硫键的形成而导致的)。(Garay H.等人,2018,J Pept Sci.24(6):e3081)。另一方面,含半胱氨酸肽的合成过程更加繁琐。(Albericio F.等人,2000,Fmoc

solid phase peptide synthesis. A Practical Approach. Oxford University Press Inc, New York. 第4章, 77-114), 并且分子内二硫键的形成在生产过程中引入了额外的步骤, 这增加了生产成本。因此, 对于开发针对不同类型肿瘤的疗法, 获得由CK2酶介导的磷酸化的抑制剂仍然是令人感兴趣的, 所述抑制剂是线性肽类型的, 具有更小的大小和结构复杂性, 其合成更简单和更便宜。

[0007] 发明描述

[0008] 本发明通过提供线性肽解决了上述问题, 所述线性肽抑制由CK2介导的磷酸化, 并且具有选自标识为SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:57-SEQ ID NO:62的序列组成的组的氨基酸序列。这些序列如下所示:

	a)	SEQ ID NO: 45	RKRSRYWP
	b)	SEQ ID NO: 49	RKRWRYWP
	c)	SEQ ID NO: 50	RKRSWYWP
	d)	SEQ ID NO: 57	R (D-Lys) RWRYP
[0009]	e)	SEQ ID NO: 58	RK (D-Arg) WRYWP
	f)	SEQ ID NO: 59	RKRWR (NMe-Tyr) WP
	g)	SEQ ID NO: 60	R (D-Lys) RSWYWP
	h)	SEQ ID NO: 61	RK (D-Arg) SWYWP
	i)	SEQ ID NO: 62	RKRSW (NMe-Tyr) WP

[0010] 这些肽不同于CIGB-300, 因为它们是线性的, 大小更小, 化学性质更稳定。它们在其序列中没有甲硫氨酸或半胱氨酸, 这是有利方面。另外, 从生产的角度来看, 这种获得更可行。

[0011] 就它们与人乳头瘤病毒 (HPV) - 16的E7底物上CK2酶的磷酸受体位点 (LNDSSSEEEDEI) 相互作用的能力以及其抑制由CK2介导的这种癌蛋白的磷酸化的能力选择被标识为SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:57-SEQ ID NO:62的线性肽。如在本发明的实施例中所见, 这些线性肽能够以与肽CIGB-300相似的方式抑制由CK2介导的E7蛋白的磷酸化。

[0012] 为了实现对内源性CK2底物的细胞内作用, 可将本发明的肽与“胞内穿透”肽化学缀合, 所述胞内穿透肽属于诸如HIV的Tat1蛋白 (Schwarze S.R. 等人, 2000, Trends Pharmacol, 21:45-48)、单纯疱疹病毒VP22蛋白 (Lindgreen M. 等人, 2000, Trends PharmacolSci, 21:99-103)、Penetratin和转运素 (Transportan) (Gariepy J. 等人, 2001, Trends Biotech 19:21-28) 等的蛋白质。

[0013] 因此, 本发明还提供了包含线性肽的多肽和一种细胞穿透肽, 所述线性肽具有选自标识为SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:57-SEQ ID NO:62的序列的氨基酸序列。

[0014] 在本发明的一个实施方案中, 这些多肽中的胞内穿透肽是来自HIV的Tat1蛋白的肽。在其一个实施方案中, 胞内穿透肽具有标识为SEQ ID NO:65或SEQ ID NO:66的氨基酸

序列。

[0015] 在特定的实施方案中,本发明的多肽具有选自由标识为SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48和SEQ ID NO:51-SEQ ID NO:56的序列组成的组的氨基酸序列。这些序列如下所示:

[0016] a) SEQ ID NO:35 GRKKRRQRRRPPQ- β A-RKRSRYWP

[0017] b) SEQ ID NO:47 GRKKRRQRRRPPQ- β A-RKRWRYWP

[0018] c) SEQ ID NO:48 GRKKRRQRRRPPQ- β A-RKRSWYWP

[0019] d) SEQ ID NO:51 Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ- β A-R(D-Lys)RWRYWP

[0020] e) SEQ ID NO:52 Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ- β A-RK(D-Arg)WRYWP

[0021] f) SEQ ID NO:53 Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ- β A-RKRWR(NMe-Tyr)WP

[0022] g) SEQ ID NO:54 Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ- β A-R(D-Lys)RSWYWP

[0023] h) SEQ ID NO:55 Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ- β A-RK(D-Arg)SWYWP

[0024] i) SEQ ID NO:56 Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ- β A-RKRSW(NMe-Tyr)WP

[0025] 这些多肽中的大多数比肽CIGB-300更具活性,因为它们在各种癌细胞系(肺、膀胱、喉、胰腺和白血病)中具有较低的IC₅₀。这些多肽能够对癌细胞的增殖产生剂量依赖性的作用。此外,标识为SEQ ID NO:35的多肽显示出与CIGB-300在这些细胞系中的IC₅₀值相似的IC₅₀值。然而,其被认为是更优的,因为其具有线性氨基酸序列,大小更小,化学性质更稳定,具有加速治疗产品开发的生产有利方面。

[0026] 为了鉴定本发明中描述的肽,合成了“一珠一化合物”类型的线性肽的组合文库其包含超过1600万个不同的肽序列,并且使用包含用生物素修饰的E7癌蛋白的28-38区的合成肽进行筛选。通过使用质谱法,对筛选呈阳性的九粒珠粒中包含的肽序列进行了分配。标识为SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:9的肽是化学合成的,并且证实它们能够抑制HPV-16的E7癌蛋白中由CK2介导的磷酸化。为了实现对内源性CK2底物的细胞内作用,设计并合成了含有九种肽的多肽,其中在N-末端添加了对应于HIV Tat1蛋白的胞内穿透肽(GRKKRRQRRRPPQ,鉴定的SEQ ID NO:65)。接下来,评估了这九种多肽对NCI-H125细胞系(非小细胞肺癌)的细胞生长的作用。在所评估的浓度范围内,所述多肽都没有达到类似于CIGB-300的抑制值。其中只有三种(标识为SEQ ID NO:18-SEQ ID NO:20)在所研究的最高浓度下抑制了介于20%与30%之间的细胞增殖,因此对其序列进行了修饰以提高其生物活性。

[0027] 设计并获得了Trp位置扫描文库,以评估Trp掺入对标识为SEQ ID NO:18-SEQ ID NO:20的多肽的生物活性的影响。接下来,评估在Trp文库中产生的24种多肽(标识为SEQ ID NO:21-SEQ ID NO:44)在NCI-H125细胞系中的抗增殖作用。24种多肽中的6种(被标识为SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:43)在所评估的最高浓度下显示出与肽CIGB-300相似的细胞增殖的抑制百分比。在NCI-H125和AsPC-1(胰腺腺癌)细胞系中获得的标识为SEQ ID NO:35的多肽和CIGB-300的IC₅₀值相当。具体说,被标识为SEQ ID NO:35的多肽被认为优于CIGB-300,因为其是大小较小、化学性质更稳定并且具有生产有利方面的线性序列。

[0028] 比CIGB-300肽活性更高的另外两种线性多肽(在本发明中被标识为SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:48)是一项研究的结果,其中在标识为SEQ ID NO:35的多肽中的3个位置处引入了第二Trp残基。结果表明,被标识为SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:48的多肽在其抑制胰腺

癌 (AsPC-1, PanC-1) 和急性髓细胞样白血病 (OCI-AML3) 细胞系中细胞增殖的能力方面比肽 CIGB-300 更强效, 并且在所用的肺癌细胞系 (NCI-H125) 中与 CIGB-300 相似。

[0029] 由于在标识为 SEQ ID NO:47 和 SEQ ID NO:48 的序列中引入非天然氨基酸, 因此在易于酶促降解的位点中, 获得了比 CIGB-300 更具活性的六种新的线性多肽, 它们被标识为 SEQ ID NO:51-SEQ ID NO:56。对 NCI-H125、Hep2C (喉癌) 细胞系和两种膀胱癌细胞系 (MGH-U3 和 MGH-U4) 进行了抗增殖测定。在 NCI-H125、Hep2C、MGH-U3 和 MGH-U4 细胞系中获得的标识为 SEQ ID NO:51-SEQ ID NO:56 的肽的 IC_{50} 值低于对于 CIGB-300 获得的 IC_{50} 值, 这表明它们更强效。在膀胱癌细胞系 (MGH-U3 和 MGH-U4) 的情况下, 与 CIGB-300 相比, IC_{50} 值低一个数量级, 这是非常有吸引力的, 因为它是一个探索较少、没有得到解决并且对健康具有很大影响的小生境 (niche)。非天然氨基酸的引入是为了提高针对蛋白酶的稳定性。令人惊讶的是, 也有可能增强这些多肽抑制由 CK2 介导的磷酸化的能力。

[0030] 本发明还提供了药物组合物, 其包含至少一种线性肽 (所述线性肽具有选自标识为 SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50 和 SEQ ID NO:57-SEQ ID NO:62 的序列组成的组的氨基酸序列) 或至少一种多肽 (其具有选自标识为 SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48 和 SEQ ID NO:51-SEQ ID NO:56 的序列组成的组的氨基酸序列) 和药学上可接受的赋形剂。

[0031] 可形成本发明的药物组合物的一部分的赋形剂为本领域技术人员所知。在本发明的一个实施方案中, 药物组合物被配制用于通过全身、瘤内、口服或粘膜途径施用。在本发明的一个实施方案中, 药物组合物可用于治疗有需要的个体的实体瘤或液体瘤。

[0032] 本发明的目的是线性肽 (其具有选自标识为 SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50 和 SEQ ID NO:57-SEQ ID NO:62 的序列组成的组的序列) 或多肽 (其具有选自标识为 SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48 和 SEQ ID NO:51-SEQ ID NO:56 的序列组成的组的氨基酸序列) 用于制造药物的用途。

[0033] 在本发明的一个实施方案中, 所述药物用于治疗实体瘤或液体瘤。

[0034] 另一方面, 本发明公开了治疗有需要的个体的实体瘤或液体瘤的方法, 其包括施用治疗有效量的药物组合物, 所述药物组合物包含至少一种线性肽 (其具有选自标识为 SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50 和 SEQ ID NO:57-SEQ ID NO:62 的序列组成的组的氨基酸序列) 或至少一种多肽 (其具有选自标识为 SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48 和 SEQ ID NO:51-SEQ ID NO:56 的序列组成的组的氨基酸序列)。在本发明的一个实施方案中, 被治疗的实体瘤是肺、子宫颈、喉、胰腺或膀胱的肿瘤。在本发明的另一个实施方案中, 所治疗的液体瘤是慢性淋巴细胞白血病、T 型急性淋巴细胞性白血病或急性髓细胞样白血病。

[0035] 附图简述

[0036] 图 1. SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:9 的合成肽对由 CK2 介导的 HPV-16E7 癌蛋白的磷酸化的作用。不与 CK2 酶的磷酸受体位点相互作用的两种肽 (标识为 SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:11)。将每分钟计数 (cpm) 绘制在 Y 轴上。

[0037] 图 2. 标识为 SEQ ID NO:12-SEQ ID NO:20 的九种多肽在 NCI-H125 细胞系中对细胞增殖的抑制百分比 (I%)。肽 CIGB-300 和 Tat 分别用作测定的阳性和阴性对照。选择显示 $\geq 20\%$ 的细胞增殖的抑制百分比的多肽。

[0038] 图3.多肽F11P19、F11P20和F11P21 (SEQ ID NO:18-SEQ ID NO:20) 在NCI-H125细胞系中的剂量-效应曲线。包括了用作测定的阳性对照的CIGB-300肽的剂量-效应曲线。I%:细胞增殖的抑制百分比。C:浓度。

[0039] 图4.通过对加载序列 (SEQ ID NO:21-SEQ ID NO:44) 中Trp残基的位置扫描,从标识为SEQ ID NO:18-SEQ ID NO:20的序列产生的多肽在NCI-H125细胞系中的细胞增殖的抑制百分比 (I%)。A.由标识为SEQ ID NO:21-SEQ ID NO:44的多肽在两种浓度下实现的抑制百分比。标识为SEQ ID NO:18-SEQ ID NO:20的前体肽和CIGB-300作为阳性对照。虚线框概述了在200 μ M和CIGB-300下显示出大于60%的细胞增殖抑制的六种多肽。B.在介于12.5 μ M与200 μ M之间的各种浓度下由六种最具活性的多肽实现的抑制百分比。

[0040] 图5.多肽A14P27 (SEQ ID NO:21)、A14P31 (SEQ ID NO:25)、A14P33 (SEQ ID NO:27)、A14P43 (SEQ ID NO:32)、A14P46 (SEQ ID NO:35)、A14P59 (SEQ ID NO:43) 在NCI-H125细胞系中的剂量-效应曲线。包括用作对照肽的CIGB-300肽的剂量-效应曲线。I%:细胞增殖的抑制百分比。C:浓度。

[0041] 图6.多肽A14P46 (SEQ ID NO:35) 和CIGB-300肽在AsPC-1细胞系中的剂量-效应曲线。I%:细胞增殖的抑制百分比。C:浓度。

[0042] 图7.多肽A15P35、A15P36和A15P37 (SEQ ID NO:46-SEQ ID NO:48) 在NCI-H125细胞系中的剂量-效应曲线。包括前体多肽A14P46 (SEQ ID NO:35) 和用作对照的CIGB-300肽的剂量-效应曲线。I%:细胞增殖的抑制百分比。C:浓度。

[0043] 图8.多肽E17P01、E17P02和E17P03 (SEQ ID NO:51-SEQ ID NO:53) 在NCI-H125细胞系中的剂量-效应曲线。包括前体多肽A15P36 (SEQ ID NO:47) 和用作对照的CIGB-300的剂量-效应曲线。I%:细胞增殖的抑制百分比。C:浓度。

[0044] 图9.多肽D17P78、D17P79和D17P80 (SEQ ID NO:54-SEQ ID NO:56) 在NCI-H125细胞系中的剂量-效应曲线。包括前体多肽A15P37 (SEQ ID NO:48) 和用作对照的CIGB-300的剂量-效应曲线。I%:细胞增殖的抑制百分比。C:浓度。

[0045] 图10.CK2磷酸化E17P01的多肽抑制剂 (SEQ ID NO:51) 在植入无胸腺小鼠的人膀胱肿瘤模型中的抗肿瘤作用。

[0046] 实施方案/实施方案的实例的详细说明

[0047] 实施例1.与HPV-16的E7蛋白中CK2酶的磷酸受体位点相互作用的线性肽的选择。

[0048] 为了鉴定与CK2酶的磷酸受体位点相互作用的生物活性线性肽,通过“一珠一化合物”类型筛选了名为BCP-1的合成线性肽的组合文库,其包含超过1600万种不同的肽序列。该文库被设计成与电喷雾电离质谱 (ESI-MS) 序列分析 (Masforrol Y. 等人,2012,ACS Combinatorial Science,14 (3):145-9) 兼容。用被称为BIOT的生物素化的合成肽进行筛选,所述合成肽含有HPV-16的E7底物中CK2酶的磷酸受体位点 (LNDSSSEEEDEI,标识为SEQ ID NO:63)。链霉抗生物素蛋白-碱性磷酸酶缀合物用作识别分子,5-溴-4-氯-3-吡啶基-磷酸 (BCIP) 的对甲苯胺盐用作显影的底物。与BCP-1文库中TentaGel树脂的明亮浅黄色相比,蓝色有助于视觉区分含有被BIOT肽识别的生物活性序列的珠粒。使用Fmoc/tBu化学 (Field GB and Noble RL.Int.J.Peptide Protein Res.1990;35 (3):161-214) 在4-甲基二苯甲基胺 (4-methylbenzhydrylamine) (MBHA) 树脂上合成BIOT肽。通过反相色谱 (RP-HPLC) 对其进行纯化,并通过ESI-MS对其进行鉴定。获得的纯度超过95%,ESI-MS分析确认其分子量 (MM)

为1574.6Da。

[0049] 将BCP-1文库置于具有真空过滤系统和机械搅拌的聚丙烯反应器中。其用纯化水和pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液(PBS)洗涤;并用1%的于pH 7.4的PBS中的牛血清白蛋白(BSA)封闭1小时。通过真空过滤除去溶剂和试剂。在4℃下,将该文库与80mL的150μg/mL(于1%的pH 7.4的PBS中的BSA中)的BIOT肽溶液一起孵育16小时。其用Tween-PBS(T-PBS) pH 7.4洗涤;并与链霉抗生物素蛋白-碱性磷酸酶缀合物(0.4μg/mL)一起在1%的pH 7.4的PBS中的BSA溶液中孵育。两小时后,其用pH 7.4的T-PBS洗涤,并在底物溶液中与BCIP(0.5mg/mL)一起孵育30min。当出现蓝色时,通过过滤和用pH 7.4的PBS充分洗涤来停止反应。

[0050] 借助于目镜,通过视觉检查将阳性珠粒从其余珠粒中分离出来,转移到具有玻璃料的反应器中,并再生。随后,进行测试以排除链霉抗生物素蛋白-碱性磷酸酶缀合物和BCIP的非特异性识别。在更收敛的条件下进行筛选,以选择亲和力更大的序列并减少阳性珠粒的数量,从而将BIOT肽的浓度降低至120μg/mL。根据上述程序(Masforrol Y.等人,2012,ACS Combinatorial Science,14(3):145-9),再生阳性珠粒并通过nanoESI-MS/MS进行序列鉴定。

[0051] 作为使用150μg/mL的肽BIOT进行初步筛选的结果,选择了56个阳性珠粒。在用较低浓度的BIOT(120μg/mL)进行第二次筛选后,选择了9个阳性珠粒,所述阳性珠粒在初始筛选时显示出比其余阳性珠粒更强烈的蓝色显色,这证明了这些肽对CK2磷酸受体位点的更大亲和力。通过手动从头测序和自动测序,使用Mascot程序搜索BCP-1数据库并行分析了从9个阳性珠粒获得的nanoESI-MS/MS光谱。表1显示了已鉴定的九种肽的序列(SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:9)。根据分配给每个肽的序列的分析,获得了人工鉴定与自动测序之间m/z信号分配的完全对应,这允许在每种情况下精确鉴定肽序列。

[0052] 在表1所示的九种肽的氨基酸组成中观察到相似性。其特征在于碱性氨基酸(K、R)占优势,并且存在疏水性氨基酸(L、A、V、F、Y)。

[0053] 表1. 在用BIOT肽筛选BCP-1文库时分离的9个阳性珠粒中鉴定的肽的氨基酸序列。

[0054]

珠粒	珠粒中的肽序列	SEQ ID.No
1	RLRRKADP	1
2	LRRRKADP	2
3	TYRYRRDP	3
4	VARRRYDP	4
5	AVRRRYDP	5
6	TFYRRYDP	6
7	RKRSRYDP	7
8	GYRYKRDP	8
9	VKKRRLDP	9

[0055] 为了证实通过nanoESI-MS/MS鉴定的九个序列与E7蛋白中CK2酶的磷酸受体位点相互作用,使用Fmoc/tBu化学(Field G.B.等人,1990,Int.J.Peptide Protein Res.,35(3):161-214)在Tentagel树脂上直接合成肽。对与树脂偶联的肽进行酶促反应,其中BIOT肽的浓度为120μg/mL。链霉抗生物素蛋白-碱性磷酸酶缀合物用作识别分子,BCIP用作显影的底物。将含有15mg与树脂偶联的编码的肽(P1-P9)的九个反应器置于真空过滤系统中,并

进行机械搅拌。使用了两种与树脂偶联的对照肽(标识为SEQ ID NO:10的P10和标识为SEQ ID NO:11的P11),所述两种对照肽不与E7蛋白上的CK2磷酸受体位点相互作用。调整程序以在每个反应器的500 μ L工作体积中重现BCP-1文库筛选测定。结果表明,与树脂(P1-P9)偶联的九种肽在酶促测定后呈现出强烈的蓝色,这证明了所述九种已鉴定的线性肽与底物中CK2酶的磷酸受体位点相互作用的能力。E7模型。相反地,树脂偶联的对照肽(P10和P11)不显蓝色。

[0056] 实施例2.标识为SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:9的肽对由CK2介导的HPV-16E7癌蛋白的磷酸化的作用。

[0057] 使用Fmoc/tBu化学(Field GB and Noble RL.Int.J.Peptide Protein Res.1990;35(3):161-214)在MBHA树脂上合成肽。通过RP-HPLC纯化肽,并通过ESI-MS确认其身份。为了合成,它们被命名为F11P04-F11P12,并且它们的氨基酸序列对应于标识为SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:9的序列。如表2中所见,所有肽以超过95%的纯度获得,并且ESI-MS分析证实了它们的身份。

[0058] 表2.含有用BIOT筛选BCP-1文库后鉴定的序列的合成肽的表征。

[0059]

SEQ ID NO:	合成代码	序列	纯度(%)	MW(Da)
1	F11P04	RLRRKADP	99.1	1009.6
2	F11P05	LRRRKADP	99.1	1009.6
3	F11P06	TYRYRRDP	98.1	1124.6
4	F11P07	VARRRYDP	99.3	1030.6
5	F11P08	AVRRRYDP	98.6	1030.6
6	F11P09	TFYRRYDP	98.9	1115.5
7	F11P10	RKRSRYDP	98.8	1075.7
8	F11P11	GYRYKRDP	97.9	1052.5
9	F11P12	VKKRRLDLP	99.6	1009.7
10	D10P94	EQPAFHDP	98.5	938.6
11	D10P95	VAGFFLDP	98.7	863.4

[0060] 测量这些肽对由CK2介导的HPV-16E7癌蛋白磷酸化的作用的测定基于体外磷酸化反应,其中在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中表达的HPV-16的E7癌蛋白用作底物。这种癌蛋白作为与谷胱甘肽S-转移酶的融合蛋白获得。根据前述程序进行测定(Perea S.E.等人,2004,Cancer Res.,64:7127-7129)。结果如图1所示,表明标识为SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:9的肽能够抑制由CK2介导的HPV-16的E7蛋白的磷酸化。

[0061] 实施例3.标识为SEQ ID NO:12-SEQ ID NO:20的合成多肽对非小细胞肺癌细胞系NCI-H125的细胞生长的作用。

[0062] 为了实现对内源性CK2底物的细胞内作用,标识为SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:9的序列在N末端添加了对应于HIV的Tat1蛋白的胞内穿透肽Tat(GRKKRRQRRRPPQ)。 β -丙氨酸(β A)残基被引入作为目标肽与Tat肽之间的间隔区。用于合成的多肽编码为F11P13-F11P21,对应于标识为SEQ ID NO:12-SEQ ID NO:20的序列,如表3所示。肽CIGB-300被标识为SEQ ID NO:64,Tat肽被标识为SEQ ID NO:65。如实施例2所示进行肽的合成、纯化和身份分析。如表3所示,其全部均以超过95%的纯度获得,并且ESI-MS分析证实了它们的身份。

[0063] 表3.标识为SEQ ID NO:12-SEQ ID NO:20的合成多肽的表征。

SEQ ID NO:	合成代码	序列	纯度 (%)	MW (Da)	
[0064]	12	F11P13	GRKKRRQRRRPPQ-βA-RLRRKADP	98.7	2780.8
	13	F11P14	GRKKRRQRRRPPQ-βA-LRRRKADP	98.7	2780.7
	14	F11P15	GRKKRRQRRRPPQ-βA-TYRYRRDP	96.6	2895.8
	15	F11P16	GRKKRRQRRRPPQ-βA-VARRRYDP	97.2	2801.7
	16	F11P17	GRKKRRQRRRPPQ-βA-AVRRRYDP	98.2	2801.7
	17	F11P18	GRKKRRQRRRPPQ-βA-TFYRRYDP	96.9	2886.8
[0065]	18	F11P19	GRKKRRQRRRPPQ-βA-RKRSRYDP	96.6	2846.7
	19	F11P20	GRKKRRQRRRPPQ-βA-GYRYKRDP	97.4	2823.7
	20	F11P21	GRKKRRQRRRPPQ-βA-VKKRRLDP	97.4	2780.7
	64	CIGB-300	环 (Cys ₁₅ -Cys ₂₅) GRKKRRQRRRPPQ-βA-CWMSPRHLGTC	99.2	3057.6
	65	Tat	GRKKRRQRRRPPQ	98.3	1717.1

[0066] 对多肽F11P13-F11P21 (SEQ ID NO:12-SEQ ID NO:20) 的抗增殖活性的评估在NCI-H125细胞系上进行。该细胞系对低浓度的待评估的药物表现出高度敏感性 (Hu L.-Y. 等人, 2018, European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 22:4551-4556)。CIGB-300肽的抗增殖作用已在该细胞系中得到广泛表征 (Cirigliano S.M. 等人, 2017, Cancer Cell International, 17, 42), 因此, 其被选为阳性对照。Tat肽用作阴性对照。在25 μ M、50 μ M、100 μ M和200 μ M的浓度下评估多肽。细胞增殖测定通过先前描述的程序 (Perera Y. 等人, 2012, J. Pept. Sci., 18(4):215-23) 进行。

[0067] 图2显示了来自NCI-H125细胞中抗增殖测定的数据。每个条对应于所评估的多肽的浓度 (25 μ M、50 μ M、100 μ M和200 μ M) 达到的细胞增殖抑制百分比 (I%) 的值。选择显示细胞增殖抑制值大于或等于20%的多肽, 因为该百分比值在测定的变异系数范围内。只有多肽F11P19、F11P20和F11P21在200 μ M的浓度下抑制了20%至30%的细胞增殖。仅以肽CIGB-300作为对照, 就达到了50%的增殖抑制。

[0068] 图3显示了与肽CIGB-300相比的多肽F11P19、F11P20和F11P21的剂量-效应曲线。多肽F11P19、F11P20、F11P21和CIGB-300的IC₅₀值分别为336 μ M、305 μ M、668 μ M和64 μ M。多肽F11P19、F11P20、F11P21的IC₅₀值仍远未达到对于CIGB-300获得的IC₅₀值, 因此有必要优化所述一级结构以提高其生物活性。

[0069] 实施例4. 通过加载序列中色氨酸扫描优化标识为SEQ ID NO:18-SEQ ID NO:20的序列。

[0070] 通过设计将Trp氨基酸排除在BCP-1文库合成之外(Masforrol Y.等人,2012,ACS Combinatorial Science,14(3):145-9)。出于这个原因,Trp位置扫描文库被设计用于标识为SEQ ID NO:18-SEQ ID NO:20的序列,其中在加载序列中对Trp进行每个氨基酸残基的精确取代(表4)。这使我们能够研究Trp在经加载的序列的每个位置的贡献。

[0071] 使用Fmoc/tBu化学(Field GB y Noble RL.Int.J.Peptide Protein Res.1990; 35(3):161-214)在MBHA树脂上合成Trp位置扫描文库多肽,用RP-HPLC进行纯化,并通过ESI-MS确认身份如可在表4中看到的,其显示了氨基酸序列,其全部均以超过95%的纯度获得,并且ESI-MS分析证实了与设计的分子的一致性。

[0072] 表4.通过Trp位置扫描产生的标识为SEQ ID NO:21-SEQ ID NO:44的多肽的表征。

[0073]

SEQ ID NO:	来源	代码	序列	纯度 (%)	MW (Da)
21	SEQ ID NO: 19 的多肽衍生物	A14P27	GRKKRRQRRRPPQ-βA-WYRYKRDP	96.5	2952.6
22		A14P28	GRKKRRQRRRPPQ-βA-GWRYKRDP	97.8	2846.6
23		A14P29	GRKKRRQRRRPPQ-βA-GYWYKRDP	96.4	2853.5
24		A14P30	GRKKRRQRRRPPQ-βA-GYRWKRDP	97.8	2846.6
25		A14P31	GRKKRRQRRRPPQ-βA-GYRYWRDP	97.8	2881.6
26		A14P32	GRKKRRQRRRPPQ-βA-GYRYKWDP	97.7	2853.6
27		A14P33	GRKKRRQRRRPPQ-βA-GYRYKRWP	95.7	2894.6
28		A14P34	GRKKRRQRRRPPQ-βA-GYRYKRDW	95.1	2912.6
29	SEQ ID NO: 18	A14P40	GRKKRRQRRRPPQ-βA-WKRSRYDP	96.7	2876.6
30		A14P41	GRKKRRQRRRPPQ-βA-RWRSRYDP	95.9	2904.6
31		A14P42	GRKKRRQRRRPPQ-βA-RKWSRYDP	97.6	2876.6
32		A14P43	GRKKRRQRRRPPQ-βA-RKRWRYDP	98.7	2945.6

[0074]	33	SEQ ID NO: 20	A14P44	GRKKRRQRRRPPQ- β A-RKRSWYDP	95.7	2876.6
	34		A14P45	GRKKRRQRRRPPQ- β A-RKRSRWDP	99.1	2869.6
	35		A14P46	GRKKRRQRRRPPQ- β A-RKRSRYWP	99.7	2917.6
	36		A14P47	GRKKRRQRRRPPQ- β A-RKRSRYDW	99.3	2935.7
	37	SEQ ID NO: 20	A14P53	GRKKRRQRRRPPQ- β A-WKKRRLDP	98.1	2867.8
	38		A14P54	GRKKRRQRRRPPQ- β A-VWKRRLDP	98.8	2838.7
	39		A14P55	GRKKRRQRRRPPQ- β A-VKWRRLLDP	99.7	2838.7
	40		A14P56	GRKKRRQRRRPPQ- β A-VKKWRLLDP	99.0	2810.7
	41		A14P57	GRKKRRQRRRPPQ- β A-VKKRWLLDP	99.3	2810.7
	42		A14P58	GRKKRRQRRRPPQ- β A-VKKRRWDP	96.3	2853.8
	43		A14P59	GRKKRRQRRRPPQ- β A-VKKRRLWP	99.6	2851.8
	44		A14P60	GRKKRRQRRRPPQ- β A-VKKRRLDW	99.3	2869.8

[0075] 对经加载的氨基酸序列(the cargo amino acid sequences)进行的改变以粗体突出显示。

[0076] 为了证实利用Trp的修饰不影响多肽与E7蛋白中CK2酶的磷酸受体位点相互作用的能力,进行了实施例1中描述的程序。酶测定后,与树脂偶联的24种多肽显现出强烈的蓝色,证明了与模型E7底物中CK2酶的磷酸受体位点的相互作用。另一方面,为了证明利用Trp的修饰不影响多肽对CK2磷酸化E7蛋白的作用,进行了实施例2中所述的程序。标识为SEQ ID NO:21-SEQ ID NO:44的24种多肽保持了抑制由CK2介导的HPV-16的E7蛋白的磷酸化的能力,因为获得了介于60%与85%之间的磷酸化抑制值。CIGB-300显示了87%的磷酸化抑制。

[0077] 通过Trp的位置扫描产生的合成多肽(SEQ ID NO:21-SEQ ID NO:44)的抗增殖活性的评估在NCI-H125细胞系上进行。该测试按照之前描述的程序(Perera Y.,等人,2012, J.Pept.Sci,18(4):215-23)进行。将前体多肽(F11P19、F11P20、F11P21)和肽CIGB-300包括作为阳性对照。在12.5 μ M、25 μ M、50 μ M、100 μ M和200 μ M的浓度下评估多肽。图4A显示了多肽浓度为100 μ M和200 μ M时细胞增殖抑制百分比的结果。结果显示评估的24种多肽中的6种(A14P27(SEQ ID NO:21)、A14P31(SEQ ID NO:25)、A14P33(SEQ ID NO:27)、A14P43(SEQ ID NO:32)、A14P46(SEQ ID NO:35)、A14P59(SEQ ID NO:43))在200 μ M处显示出超过60%的细胞增殖抑制作用,类似于用肽CIGB-300发现的效果。图4B显示了在评估的浓度下对于六种选定的多肽获得的细胞增殖抑制百分比值。如可看到的,A14P46多肽在高于100 μ M和200 μ M的浓度下抑制超过50%的细胞增殖,与CIGB-300的行为类似。在较低浓度下,与CIGB-300肽的性能相比,A14P46多肽表现出更好的剂量-效应相关性。

[0078] 图5显示了多肽A14P27、A14P31、A14P33、A14P43、A14P46、A14P59和CIGB-300的剂量-效应曲线。就其本身而言,表5显示这六种多肽的IC₅₀值低于针对它们的前体多肽F11P19(336 μ M)、F11P20(305 μ M)和F11P21(668 μ M)获得的IC₅₀值。A14P46多肽的IC₅₀(72 μ M)与CIGB-300参照肽的IC₅₀(64 μ M)相当。

[0079] 表5.标识为SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:43的多肽在用NCI-H125系进行的细胞增殖测定中的IC₅₀值。

SEQ ID NO:	代码	序列	IC ₅₀ (μM)
21	A14P27	GRKKRRQRRRPPQ-βA-WYRYKRDP	165
25	A14P31	GRKKRRQRRRPPQ-βA-GYRYWRDP	135
27	A14P33	GRKKRRQRRRPPQ-βA-GYRYKRWP	124
32	A14P43	GRKKRRQRRRPPQ-βA-RKRWRYP	107
35	A14P46	GRKKRRQRRRPPQ-βA-RKRSRYWP	72
43	A14P59	GRKKRRQRRRPPQ-βA-VKKRRLWP	140
64	CIGB-300	环(Cys15-Cys 25) GRKKRRQRRRPPQ-βA-CWMSPRHLGTC	64

[0081] 对肽序列X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈进行的结构研究允许得出结论:位置X₇中D被W改变对增强生物活性至关重要(A14P46>>A14P33>A14P59),其中对多肽A14P46的反应最好。另外,得出位置X₄>X₅>X₁也显示出关于生物活性的显著结果,这表明引入第二个氨基酸W替代所述位置。

[0082] 为了证实多肽A14P46(SEQ ID NO:35)的生物活性仅归因于加载位置(RKRSRYWP),使用本实施例中描述的合成程序合成了无Tat和βA序列的类似肽。肽D14P165(标识为SEQ ID NO:45)以95%的纯度获得,并且通过ESI-MS的分析证实其MW为1146.7Da。如实施例2所述进行磷酸化抑制测定,获得了85%的抑制,证实了该肽抑制由CK2介导的HPV-16E7蛋白的磷酸化的能力。

[0083] 考虑到多肽A14P46在NCI-H125细胞系中显示出与CIGB-300相似的生物活性结果,研究了这种多肽在胰腺腺癌肿瘤细胞系(AsPC-1)中的行为,并将其与CIGB-300进行了比较。细胞增殖测定按照之前描述的程序(Perera Y, et al., 2012, J. Pept. Sci, 18(4):215-23)进行。如图6所示,这两种分子都能对AsPC-1细胞的增殖产生剂量依赖性的作用。获得了针对A14P46的125μM和针对CIGB-300的102μM的IC₅₀值,这表明两种肽在该细胞系中都具有相似的效力。

[0084] 表明多肽A14P46(SEQ ID NO:35)在其抑制NCI-H125和AsPC-1细胞系的细胞增殖的能力方面与CIGB-300相当(图5和图6),然而其更优越,因为其是大小较小,化学性质更稳定,在其序列中不包含甲硫氨酸或半胱氨酸的线性多肽,这使其从生产角度来看更有吸引力。

[0085] 实施例5.通过在其序列中引入第二个Trp残基优化标识为SEQ ID NO:35的多肽

[0086] 基于实施例4中获得的结果,在A14P46多肽的位置X₁、X₄和X₅处引入另一个Trp残基,并评估其对生物活性的影响。使用Fmoc/tBu化学(Field GB y Noble RL. Int. J. Peptide Protein Res. 1990; 35(3):161-214)在MBHA树脂上合成多肽,通过RP-HPLC纯化,并通过ESI-MS确认身份。如表6所示,所述三种肽均以超过95%的纯度获得,并且ESI-MS分析证实了所述分子的身份。

[0087] 表6.表征为优化标识为SEQ ID NO:35的肽而产生的肽。

SEQ ID NO:	代码	序列	纯度 (%)	MW (Da)
[0088] 46	A15P35	GRKKRRQRRRPPQ-βA- WKRSRYWP	99.7	2947.7
47	A15P36	GRKKRRQRRRPPQ-βA- RKRWRYWP	95.1	3016.8
48	A15P37	GRKKRRQRRRPPQ-βA- RKRSWYWP	95.1	2947.7

[0089] 粗体字突出显示了标识为SEQ ID NO:35的肽序列中第二个Trp残基的引入。

[0090] 合成多肽A15P35、A15P36和A15P37 (SEQ ID NO:46-SEQ ID NO:48) 的抗增殖活性的评估在NCI-H125、AsPC-1、PanC-1 (胰腺癌) 和OCI-AML3 (急性髓细胞样白血病-3) 细胞系上进行。测试根据先前描述的程序 (Perera Y等人, 2012, J. Pept. Sci, 18(4):215-23) 进行。图7显示了三种多肽在NCI-H125细胞系中与其前体A14P46和对照肽CIGB-300相比的剂量-效应曲线。多肽A15P35、A15P36和A15P37能够对NCI-H125细胞的增殖产生剂量依赖性作用。在AsPC-1、PanC-1和OCI-AML3细胞系中, 所述三种多肽也显示出剂量反应模式。

[0091] 表7概括了在NCI-H125、AsPC-1、PanC-1和OCI-AML3细胞系中获得的A15P35、A15P36和A15P37多肽与其前体A14P46和对照肽CIGB-300相比的IC₅₀值。在所研究的四个细胞系中, 多肽A15P35的IC₅₀值与针对其前体A14P46和针对CIGB-300获得的IC₅₀值相似, 这表明在序列的X1位置引入Trp是不相关的。相反, 尤其是在胰腺癌细胞系 (AsPC-1, PanC-1) 和急性髓细胞样白血病 (OCI-AML3) 中, 针对多肽A15P36和A15P37获得的IC₅₀值低于针对多肽A14P46和肽CIGB-300获得的IC₅₀值。

[0092] 表7. 标识为SEQ ID NO:46-SEQ ID NO:48的多肽在利用NCI-H125、AsPC-1、PanC-1和OCI-AML3细胞系进行的细胞增殖试验中的IC₅₀值。

SEQ ID NO:	代码	IC ₅₀ (μM)			
		NCI-H125	AsPC-1	PanC-1	OCI-AML3
[0093] 46	A15P35	106	127	145	130
47	A15P36	42	26	54	9
48	A15P37	46	23	65	21
35	A14P46	72	125	166	70
64	CIGB-300	64	102	156	63

[0094] 包括针对对照肽A14P46和CIGB-300获得的值。

[0095] 为了证实A15P36多肽 (SEQ ID NO:47) 和A15P37 (SEQ ID NO:48) 的生物活性仅归因于加载RKRWRYWP和RKRSWYWP, 这两种肽都是在Tat或βA序列不存在的情况下使用本实施例中描述的合成程序合成的。肽D15P105 (SEQ ID NO:49) 和D15P106 (SEQ ID NO:50), 它们以超过95%的纯度获得, 并且ESI-MS分析证实了它们的分子量分别为1245.7Da和1176.6Da。如实施例2所述进行磷酸化测定, 分别获得87%和82%的磷酸化抑制值, 证实了两种肽抑制由CK2介导的蛋白HPV-16E7的磷酸化的能力。

[0096] 该实施例的结果表明在多肽序列A14P46(SEQ ID NO:35)的位置X₄和X₅中引入第二个Trp有利于肽与磷酸受体位点的相互作用,因此有利于其抑制通过CK2产生的磷酸化的能力。A15P36和A15P37多肽经显示在其抑制胰腺癌(AsPC-1, PanC-1)和急性髓细胞样白血病(OCI-AML3)细胞系的细胞增殖的能力方面比CIGB-300更高效。两种多肽都具有额外的有利方面,即它们是大小较小、化学性质更稳定的线性序列,因为它们没有敏感性残基,诸如甲硫氨酸和半胱氨酸。另外,从生产角度来看,它们更具吸引力。

[0097] 实施例6.通过引入非天然氨基酸(D-和L-N-甲基氨基酸)进行的标识为SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:48的多肽的优化。

[0098] 为了保护多肽A15P36(SEQ ID NO:47)和A15P37(SEQ ID NO:48)免受生物液体中内肽酶的作用,将非天然氨基酸引入更易于被胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶降解的序列的那些位点中。在Expasy位点(<http://www.expasy.org>)的帮助下预测了对蛋白水解最敏感的位点(Gasteiger E.等人,2003,Nucleic Acids Research.31(13):3784-3788)。将D-Arg掺入Tat的R₈中,并分别通过引入D-Lys、D-Arg和NMe-Tyr来评估K₁₆、R₁₇和Y₂₀的保护作用。将每个多肽的N-末端乙酰化以保护其免受N-肽酶的降解。多肽E17P01、E17P02和E17P03(SEQ ID NO:51-SEQ ID NO:53)是A15P36的衍生物,多肽D17P78、D17P79和D17P80(SEQ ID NO:54-SEQ ID NO:56)是A15P37的衍生物。使用Fmoc/tBu化学在MBHA树脂上合成多肽,将所述多肽通过RP-HPLC纯化,并通过ESI-MS确认其身份。如表8所示,所有多肽均以超过95%的纯度获得,并且ESI-MS分析证实了所述分子的身份。

[0099] 表8.标识为SEQ ID NO:51-SEQ ID NO:56的多肽的表征。

[0100]	SEQ ID NO:	代码	序列	纯度(%)	MW (Da)
	51	E17P01	Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ-βA-R(D-Lys) RWRYP	98.4	3058.8
	52	E17P02	Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ-βA-RK(D-Arg)WRYWP	96.3	3058.8
	53	E17P03	Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ-βA-RKRWR(NMe-Tyr)WP	96.6	3072.8
	54	D17P78	Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ-βA-R(D-Lys)RSWYP	97.3	2989.7
	55	D17P79	Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ-βA-RK(D-Arg)SWYWP	98.2	2989.7
	56	D17P80	Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ-βA-RKRSW(NMe-Tyr)WP	95.7	3003.7

[0101] 为了证实非天然氨基酸的引入不影响多肽与E7蛋白中CK2酶的磷酸受体位点相互作用的能力,进行了实施例1中描述的程序。酶测定后,六种树脂偶联的多肽显现深蓝色,证明了与模型E7底物上CK2酶的磷酸受体位点的相互作用。另一方面,为了证明该修饰不影响肽对E7蛋白中CK2酶磷酸化的作用,进行了实施例2中描述的程序。多肽E17P01-E17P03和D17P78-D17P80(标识为SEQ ID NO:51-SEQ ID NO:56)保持抑制由CK2介导的HPV-16的E7蛋白的磷酸化的能力,获得了介于83%与90%之间的磷酸化抑制值。

[0102] 对NCI-H125、Hep2C(喉癌)细胞系和两种膀胱癌细胞系(MGH-U3和MGH-U4)进行了抗增殖测定。测试根据先前描述的程序(Perera Y.等人,2012,Pept.Sci,18(4):215-23)进行。

[0103] 图8和图9分别显示了多肽E17P01、E17P02和E17P03 (SEQ ID NO:51-SEQ ID NO:53) 以及D17P78、D17P79和D17P80 (SEQ ID NO:54-SEQ ID NO:56) 在NCI-H125细胞系中的剂量-效应曲线。分别包括对照CIGB-300肽以及前体多肽A15P36和A15P37。所述六种多肽能够对NCI-H125细胞系的细胞增殖产生剂量依赖性作用。在Hep2C、MGH-U3和MGH-U4细胞系中, 所有六种多肽也显示出剂量反应模式。

[0104] 表9概括了多肽E17P01、E17P02、E17P03、D17P78、D17P79和D17P80 (SEQ ID NO:51-SEQ ID NO:56) 与其前体和对照肽CIGB-300相比在细胞系NCI-H125、Hep2C、MGH-U3和MGH-U4中获得的IC₅₀值。

[0105] 表9. 标识为SEQ ID NO:51-SEQ ID NO:56的多肽在NCI-H125、Hep2C、MGH-U3和MGH-U4细胞系中的IC₅₀值。

SEQ ID NO:	代码	IC ₅₀ (μM)			
		NCI-H125	Hep2C	MGH-U3	MGH-U4
51	E17P01	20	11	65	53
52	E17P02	27	26	55	38
53	E17P03	47	11	29	33
[0106] 54	D17P78	14	20	86	89
55	D17P79	21	18	77	69
56	D17P80	13	24	65	70
47	A15P36	42	44	—	—
48	A15P37	46	48	—	—
64	CIGB-300	64	61	327	335

[0107] 包括针对对照多肽A15P36、A15P37和CIGB-300获得的值。

[0108] 表9显示了标识为SEQ ID NO:51-SEQ ID NO:56的多肽在NCI-H125、Hep2C、MGH-U3和MGH-U4细胞系中的IC₅₀值低于针对肽CIGB-300中获得的IC₅₀值, 这表明它们在其抗增殖作用方面更强。令人惊讶的是, 在膀胱癌细胞系 (MGH-U3和MGH-U4) 的情况下, IC₅₀值比CIGB-300低一个数量级, 这是非常有吸引力的, 因为它是一个探索较少、没有得到解决并且对健康具有很大影响的小生境。对A15P36和A15P37多肽的修饰被引入来增强对蛋白酶的稳定性。然而, 令人惊讶的是, 抑制CK2磷酸化的能力也得到增强。

[0109] 为了证实标识为SEQ ID NO:51-SEQ ID NO:56的肽的生物活性仅归因于它们的加载, 使用该同一实施例中描述的合成程序合成了无Tat和βA序列的肽。肽D17P81-D17P86 (SEQ ID NO:57-SEQ ID NO:62) 以超过95%的纯度获得, 并且ESI-MS分析证实了所获得的分子与设计的分子一致 (表10)。

[0110] 表10. 标识为SEQ ID NO:57-SEQ ID NO:62的肽的表征。

SEQ ID NO:	代码	序列	纯度 (%)	MW (Da)
57	D17P81	R (D-Lys) RWRYWP	98.5	1245.7

58	D17P82	RK (D-Arg) WRYWP	97.6	1245.7
59	D17P83	RKRWR (NMe-Tyr) WP	95.8	1259.7
60	D17P84	R (D-Lys) RSWYWP	96.3	1176.7
61	D17P85	RK (D-Arg) SWYWP	97.8	1176.7
62	D17P86	RKRSW (NMe-Tyr) WP	95.5	1190.6

[0112] 如实施例2所述进行磷酸化测定,获得了介于83%与90%之间的磷酸化抑制值,证实了这些肽抑制由CK2介导的HPV-16E7蛋白的磷酸化的能力。

[0113] 总之,标识为SEQ ID NO:51-SEQ ID NO:56的多肽在其抑制细胞增殖的能力(特别是其在膀胱癌细胞系(MGH-U3和MGH-U4)中的抑制活性)方面比肽CIGB-300更加高效。另外,这些肽是线性的,大小更小,化学性质更稳定,从生产角度来看,这无疑带来有利方面。

[0114] 实施例7.CK2磷酸化多肽的抑制剂在移植在无胸腺小鼠中的人膀胱肿瘤模型中的抗肿瘤作用。

[0115] 在这些测试中,使用了介于6周龄与8周龄之间的无胸腺雌性BalbC小鼠。使用来自膀胱细胞癌的MGH-U3细胞。对于该模型中的肿瘤植入,将细胞以每毫升1 000 000个细胞的浓度悬浮在PBS中。将细胞悬浮液皮下接种于动物的腹腔内。E17P01多肽(标识为SEQ ID NO:51)或CIGB-300的施用在接种肿瘤细胞后5天开始,并继续连续5天腹膜内施用。将多肽和肽溶解在PBS中。施用剂量为20 μ g,该剂量对应于1mg/kg体重。在不同时间,测量肿瘤体积(以mm³为单位),作为评估多肽抗肿瘤作用的参数。如在图10中看到的,E17P01多肽显示出其抑制肿瘤进展的能力,所述能力强于对于CIGB-300所观察到的所述能力。这些结果证明了标识为SEQ ID NO:51的多肽在植入实验动物的人肿瘤模型中的抗肿瘤功效。

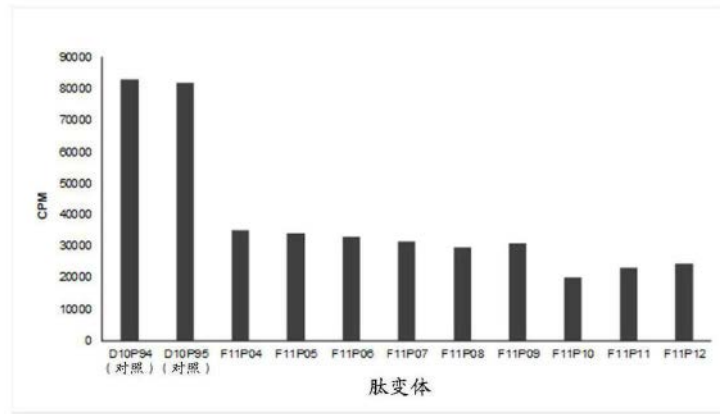


图1

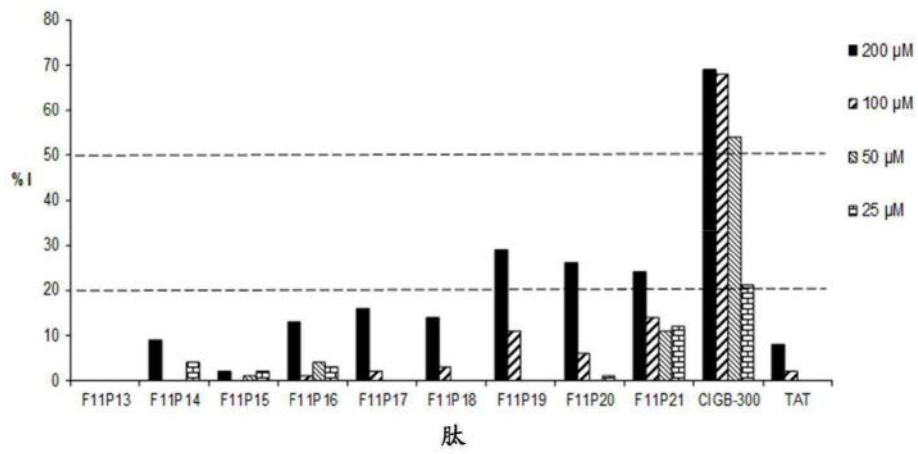


图2

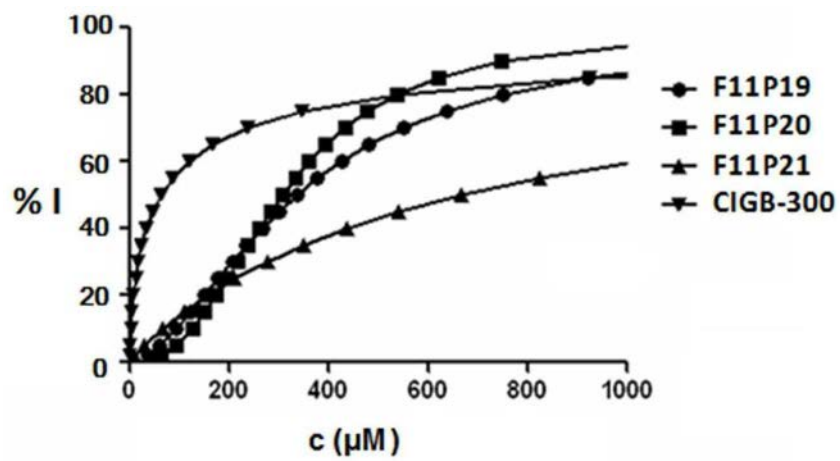


图3

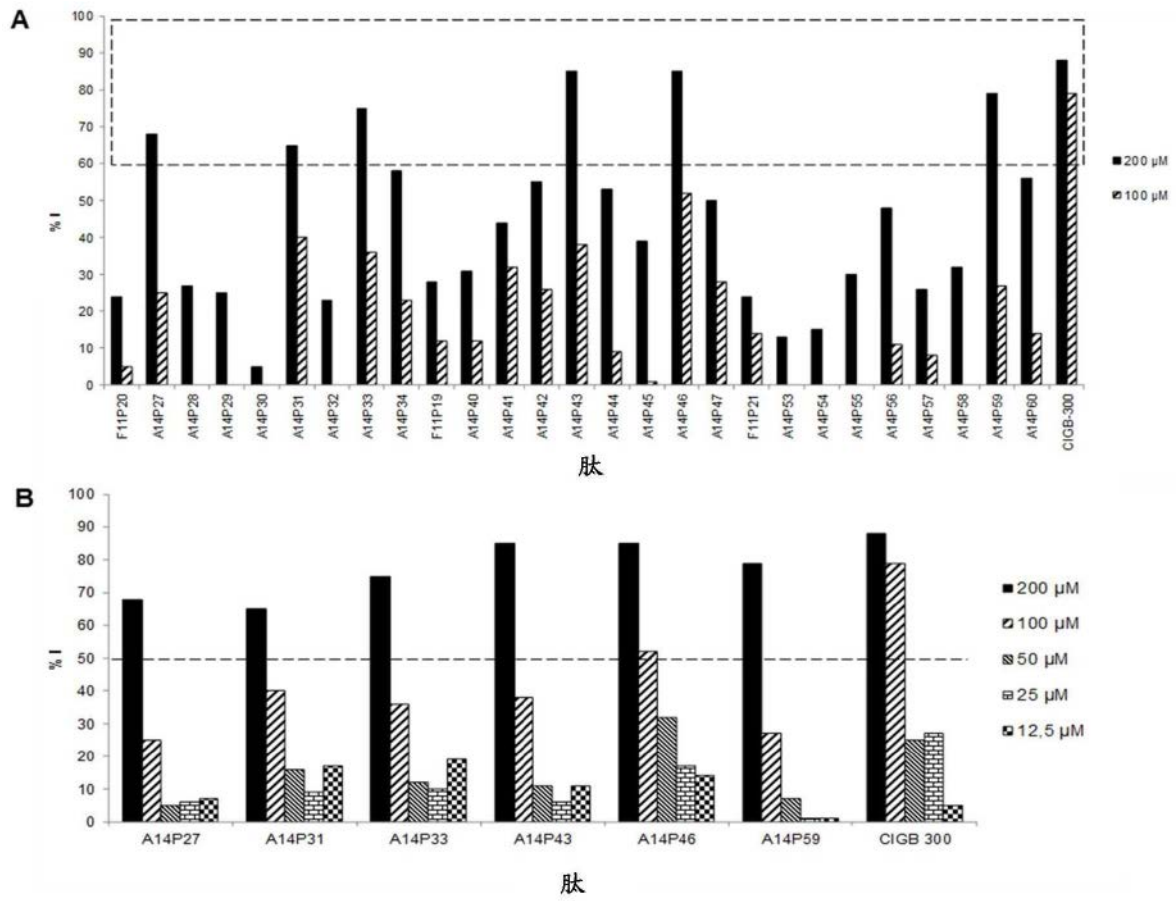


图4

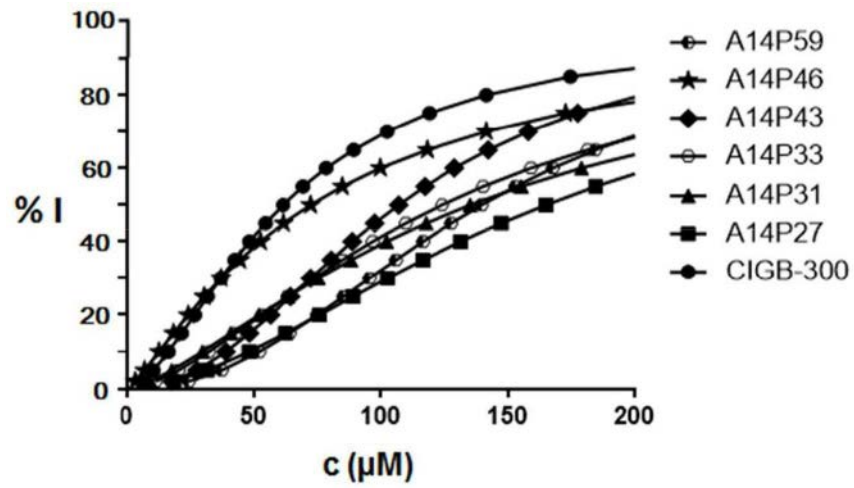


图5

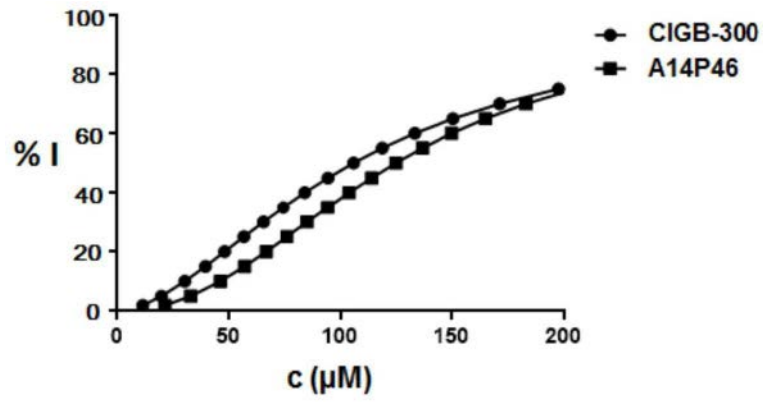


图6

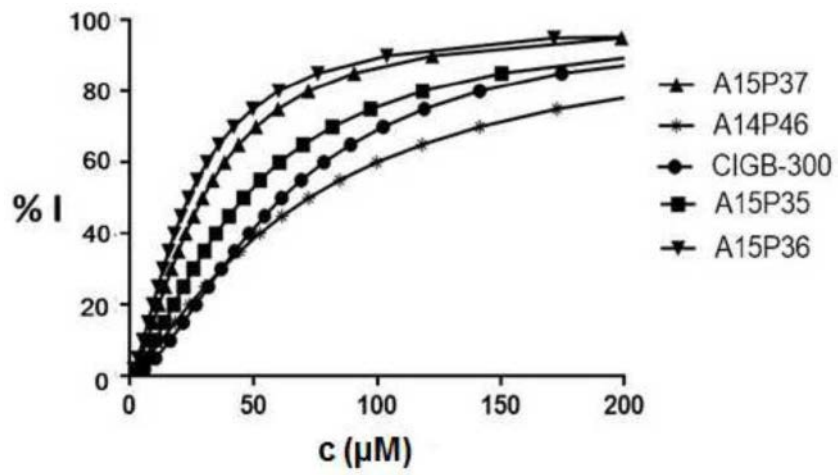


图7

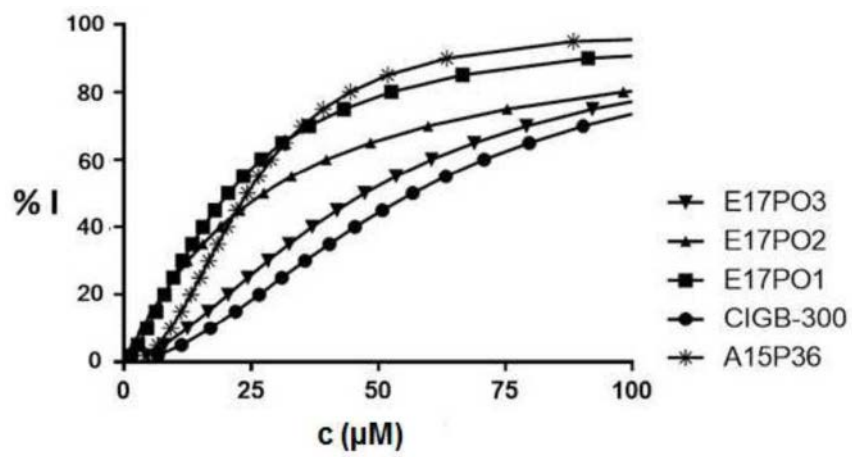


图8

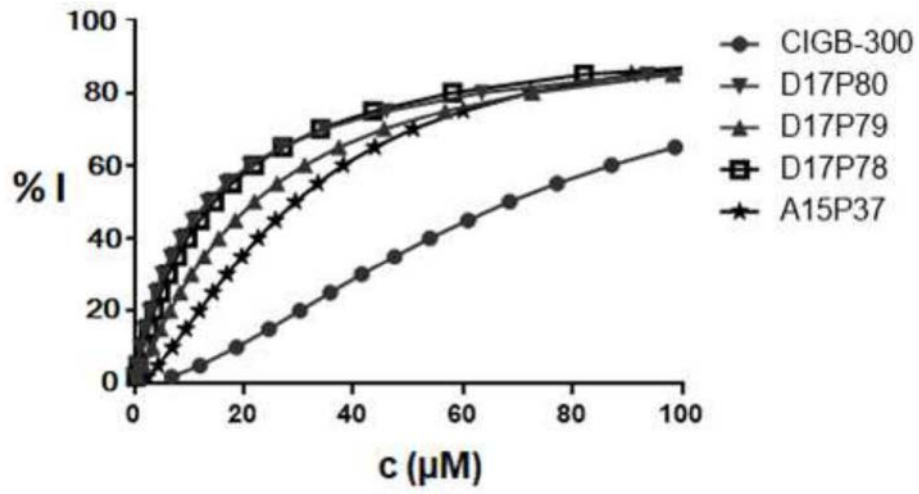


图9

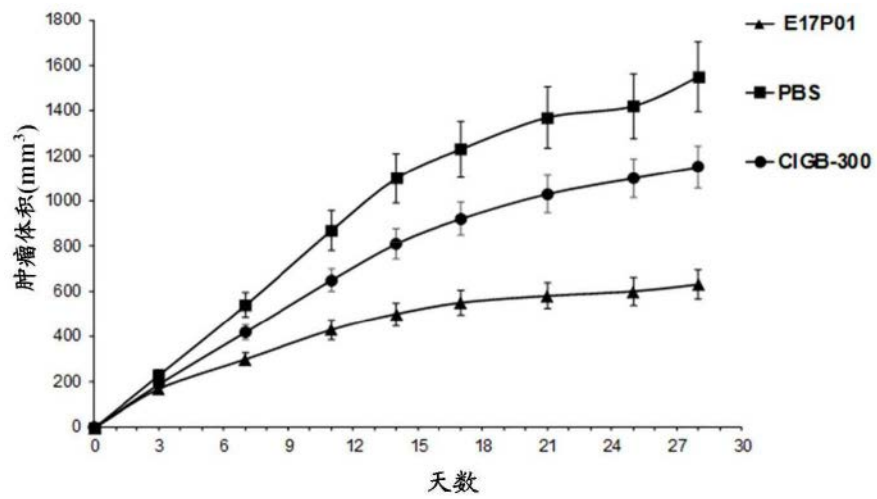


图10