



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112778403 B

(45) 授权公告日 2022. 08. 19

(21) 申请号 202110003547.7

A61P 35/00 (2006.01)

(22) 申请日 2021.01.04

审查员 周洁

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 112778403 A

(43) 申请公布日 2021.05.11

(73) 专利权人 上海大学

地址 200444 上海市宝山区上大路99号

(72) 发明人 胡宏岗 丛薇 刘婧 何世鹏

高飞 汤华 李英华

(74) 专利代理机构 东莞市汇橙知识产权代理事

务所(普通合伙) 44571

专利代理师 黎敏强

(51) Int. Cl.

C07K 7/64 (2006.01)

A61K 38/12 (2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

环肽类抗肿瘤活性化合物及其制备方法与
应用

(57) 摘要

本发明涉及医药技术领域,且公开了多肽类抗肿瘤活性化合物,具体指具有式(I)-(IV)结构的多肽及其药学上可接受的盐或酯:
GFKS₅LLKS₅AAKALVKT VLF(I)
GFKDLLKS₅AAKS₅LVKT VLF(II)
GFKDLLKGA AKS₅LVKS₅VLF(III)
GFKDLLKGR₈AKALVKS₅VLF(IV)其中,S₅表示(2R)-2-氨基-2-甲基-6-庚烯酸;R₈表示(2R)-2-氨基-2-甲基-9-癸烯酸;片段中成对的(2R)-2-氨基-2-甲基-6-庚烯酸或(2R)-2-氨基-2-甲基-9-癸烯酸通过烯炔复分解反应进行环合。该多肽类抗肿瘤活性化合物及其制备方法与应用,旨在增强其细胞渗透性,提高酶稳定性和抗肿瘤活性。



1. 多肽类抗肿瘤活性化合物,其特征在于,具体指式(I) - (IV)所示结构的多肽;
式(I) - (IV)结构的多肽及其药学上可接受的盐或酯:

GFKS₅LLKS₅AAKALVKT₅VLF (I)

GFKDLLKS₅AAKS₅LVKT₅VLF (II)

GFKDLLKGA₅AKS₅LVKS₅VLF (III)

GFKDLLKGR₈AKALVKS₅VLF (IV)

其中,S₅表示(2R)-2-氨基-2-甲基-6-庚烯酸;R₈表示(2R)-2-氨基-2-甲基-9-癸烯酸;
片段中成对的(2R)-2-氨基-2-甲基-6-庚烯酸或(2R)-2-氨基-2-甲基-9-癸烯酸通过烯炔
复分解反应进行环合。

2. 含有上述式(I) - (IV)结构的多肽的药物组合物,其特征在于,该药物组合物可以含
有权利要求1中任一项所述的多肽。

3. 根据权利要求2所述的多肽的药物组合物,其特征在于,其还含有药学上可接受的稀
释剂、赋形剂或载体。

4. 根据权利要求3所述的多肽的药物组合物,其特征在于,其中所述的载体是乙醇、甘
油或水中的一种或多种。

环肽类抗肿瘤活性化合物及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及医药技术领域,具体为环肽类抗肿瘤活性化合物及其制备方法与应用,其具有抑制前列腺癌骨转移细胞系C4-2B的活性,可用于制备相关抗癌药物。

背景技术

[0002] 前列腺癌是发生在男性身体上最为普遍的一种癌症,对于前列腺癌的治疗,通常是手术、化疗和雄性激素阻断治疗。然而,这些有效的治疗受到耐药性和细胞毒性的限制。近年来,小分子药物在治疗肿瘤等重大疾病方面使用较为广泛,但小分子药物也因为其副作用大、容易出现耐药性等受到限制。而多肽药物的毒性小,并且具有较高的抗肿瘤活性,因此,受到了广泛的关注。

[0003] Ascaphin-8 (GFKDLLKGAALKVKTVLF.NH₂) 是从北美尾蛙真皮分泌物中分离得到的一种具有19个氨基酸残基的 α -螺旋抗菌肽。之前的研究表明,Ascaphin-8具有抗菌以及抗肿瘤的活性。然而,作为直链肽,Ascaphin-8具有半衰期短、构象不稳定、易被酶水解、透膜性差等的缺点。研究表明,通过一定的化学修饰能够增强多肽螺旋结构。因此,我们提出改善Ascaphin-8的化学结构来提高其抗肿瘤活性,酶水解稳定性以及构象稳定性。

发明内容

[0004] (一)解决的技术问题

[0005] 针对现有技术的不足,本发明提供了环肽类抗肿瘤活性化合物及其制备方法与应用,具备增强其细胞渗透性、提高酶稳定性和抗肿瘤活性等优点,解决了现有的抗癌药物构象不稳定、透膜能力差及抗水解酶能力弱的问题。

[0006] (二)技术方案

[0007] 为实现上述增强其细胞渗透性、提高酶稳定性和抗肿瘤活性的目的,本发明提供如下技术方案:环肽类抗肿瘤活性化合物,具体指具有式(I)所示结构的环肽类活性分子和多肽;

[0008] 具有式(I)结构的环肽类活性分子及其药学上可接受的盐或酯:

[0009] GFKX1LLKX2X3AKX4LVKX5VLF.NH₂

[0010] 其中,X1表示天冬氨酸或(2R)-2-氨基-2-甲基-6-庚烯酸;X2表示甘氨酸或(2R)-2-氨基-2-甲基-6-庚烯酸;X3表示丙氨酸或(2R)-2-氨基-2-甲基-9-癸烯酸;X4表示丙氨酸或(2R)-2-氨基-2-甲基-6-庚烯酸;X5表示苏氨酸或(2R)-2-氨基-2-甲基-6-庚烯酸;片段中成对的(2R)-2-氨基-2-甲基-6-庚烯酸或(2R)-2-氨基-2-甲基-9-癸烯酸通过烯烃复分解反应进行环合。

[0011] 在本文中,“本发明的环肽类活性分子”指的是本发明中具有式(I)所示结构多肽,在本文中,这种多肽可以称为“环肽类活性分子”,“多肽片段”或“本发明多肽”。

[0012] 式(I)多肽的N末端的氨基和C末端的羧基以及氨基酸侧链基团可以不进行修饰,也可以在基本不影响本发明多肽活性的前提下进行修饰,如形成“药学上可接受的酯”,N末

端氨基基团的修饰包括但不限于脱-氨基、N-低级烷基、N-二低级烷基和N-酰基修饰，C末端羧基基团的修饰包括但不限于酰胺、低级烷基酰胺、二烷基酰胺和低级烷基酯修饰，本发明多肽C末端的羧基进行酰胺化修饰，即是-NH₂。

[0013] 本文所使用的多肽及氨基酸和化学基团的表示方法均为所属领域公认表示方法，其中氨基酸的缩写可参照表1中的定义。特殊氨基酸结构可参照表2中的定义，在本文中，若不特别指出，氨基酸一般指L-型的氨基酸。

[0014] 表1氨基酸缩写表

氨基酸	三字母缩写	一字母缩写	氨基酸	三字母缩写	一字母缩写
丙氨酸	Ala	A	亮氨酸	Leu	L
精氨酸	Arg	R	赖氨酸	Lys	K
天冬酰胺	Asn	N	蛋氨酸	Met	M
天冬氨酸	Asp	D	苯丙氨酸	Phe	F
半胱酰胺	Cys	C	脯氨酸	Pro	P
谷氨酰胺	Gln	Q	丝氨酸	Ser	S
谷氨酸	Glu	E	苏氨酸	Thr	T
甘氨酸	Gly	G	色氨酸	Trp	W
组氨酸	His	H	酪氨酸	Tyr	Y
异亮氨酸	Ile	I	缬氨酸	Val	V

[0017] 表2特殊氨基酸缩写表

氨基酸	缩写
(2R)-2-氨基-2-甲基-6-庚烯酸	S ₅
(2R)-2-氨基-2-甲基-9-癸烯酸	R ₈

[0019] “药物上可接受的盐”指一些小分子酸性或碱性化合物与多肽形成的盐，一般能够增加多肽的溶解性，所形成的盐基本上不改变多肽的活性。

[0020] 例如，通常能与本发明多肽形成盐的酸有盐酸、磷酸、硫酸、乙酸、琥珀酸、马来酸和柠檬酸等；能与本发明多肽形成盐的碱有碱金属或碱土金属的氢氧化物、铵和碳酸盐等。

[0021] 本发明多肽的抗肿瘤作用可以通过所属领域常规的实验方法来验证，如细胞学实验等，在本发明的具体实施方式中，优选通过细胞学实验如CCK-8法，通过该试验，发现本发明所涉及的式(I)环肽类活性分子都具有体外抗肿瘤作用。

[0022] 此外，本发明要解决的另一技术问题是提供了含有式(I)结构的多肽片段的药物组合物，其可以用于抗肿瘤治疗。

[0023] 该组合物可以含有本发明的环肽类活性分子中的一种或多种，优选仅含一种。

[0024] 该组合物可以含有一种或多种药学上可接受的稀释剂、赋形剂或载体，优选该组

合物为单位剂量形式,如片剂、膜剂、丸剂、胶囊(包括持续释放或延迟释放形式)、粉剂、颗粒剂、糖浆剂或乳液剂、消毒的注射用溶液、悬浮液或冻干粉末针剂、气雾剂或液体喷剂、滴剂自动注射装置或栓剂。

[0025] 上述活性药物组分可以与一种无毒的药物学可接受的惰性载体组合在一起,如乙醇、甘油、水或其组合,本发明式(I)的环肽类活性分子优选使用消毒的注射用水溶液。

[0026] 本发明的药物组合物可通过所属领域技术人员所熟知的给药方式来进行给药,例如口服、直肠、舌下、肺部、透皮、离子透入、阴道及鼻内给药。本发明的药物组合物优选胃肠道外给药,如皮下、肌内或静脉内注射。

[0027] 本发明合成的部分优选化合物的名称、结构式和质谱数据如表3所示

[0028] 表3优选环肽类活性分子的名称、结构式和质谱数据

名称	结构式	分子量
Ascaphin-8-1	如图 1 所示	[M+2H] ²⁺ =1049.197 [M+3H] ³⁺ =699.803
Ascaphin-8-2	如图 2 所示	[M+2H] ²⁺ =1071.184 [M+3H] ³⁺ =579.718
Ascaphin-8-3	如图 3 所示	[M+2H] ²⁺ =1049.177 [M+3H] ³⁺ =699.7878
Ascaphin-8-4	如图 4 所示	[M+2H] ²⁺ =1070.196 [M+3H] ³⁺ =713.8007

[0030] 为了便于理解,以下将通过具体的实施例和附图对本发明进行描述,需要特别指出的是,这些描述仅仅是示例性的描述,并不构成对本发明范围的限制。

[0031] (三)有益效果

[0032] 与现有技术相比,本发明提供了环肽类抗肿瘤活性化合物及其制备方法与应用,具备以下有益效果:

[0033] 该环肽类抗肿瘤活性化合物及其制备方法与应用,研究报道,通过化学手段增强多肽的 α 螺旋构型,从而增加其透膜能力和酶稳定性是解决线性多肽成药性差的有效策略,在众多的修饰方法中,订书肽策略是常用来稳定 α -螺旋肽的一种方法。这是由Verdine发明的一种具有全碳氢支架的 α -螺旋肽,能够增强多肽的 α -螺旋结构、透膜性、抗蛋白酶水解能力、抗蛋白蛋白相互作用的能力等。在合成中,特定氨基酸的侧链戊烯通过烯炔复分解反应而进行环合,从而稳定 α -螺旋结构。提高抗肿瘤活性。因此,我们采用订书化环合修饰策略设计并合成了一系列新型Ascaphin-8环肽类活性分子,旨在增强其细胞渗透性,提高酶稳定性和抗肿瘤活性,以便研发更加适用于癌症病人的安全用药。

附图说明

- [0034] 图1为本发明表3中Ascaphin-8-1结构式示意图；
[0035] 图2为本发明表3中Ascaphin-8-2结构式示意图；
[0036] 图3为本发明表3中Ascaphin-8-3结构式示意图；
[0037] 图4为本发明表3中Ascaphin-8-4结构式示意图；

具体实施方式

[0038] 下面将结合本发明的实施例,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0039] 实施例一:环肽类抗肿瘤活性化合物的制备方法,固相合成Ascaphin-8-1,具体步骤如下:

[0040] 将用9-芴基甲氧羰基(Fmoc)保护的氨基树脂溶胀,耦合前须脱去Fmoc。用Fmoc-S5-OH替换第四位和第八位的氨基酸,以6-氯苯并三氮唑-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸酯(HCTU)、N,N-二异丙基乙胺(DIPEA)为活化试剂,使上述保护氨基酸依次偶联,偶联每次40分钟。每偶联一个氨基酸后需以20%哌啶/DMF为脱Fmoc试剂脱去Fmoc,每次10分钟。多肽连接完毕后,苯基亚甲基双(三苯己基磷)二氯化钨(第一代Grubbs催化剂)作为环合试剂,反应过夜。使用TFA/EDT/TIPs/Water(95:2:2:1,v/v/v/v)室温反应2小时,从而将其从树脂上切割下来,同时脱除侧链保护基。然后用无水乙醚沉淀得到粗肽。粗肽在30分钟内以反相HPLC纯化,冻干得到纯度 $\geq 95.0\%$ 的白色冻干粉末。

[0041] 实施例二:环肽类抗肿瘤活性化合物的制备方法,固相合成Ascaphin-8-4,具体步骤如下:

[0042] 将用9-芴基甲氧羰基(Fmoc)保护的氨基树脂溶胀,耦合前须脱去Fmoc。用Fmoc-R8-OH替换第九位的氨基酸,用Fmoc-S5-OH替换第十七位的氨基酸。以6-氯苯并三氮唑-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸酯(HCTU)、N,N-二异丙基乙胺(DIPEA)为活化试剂,使上述保护氨基酸依次偶联,偶联每次40分钟。每偶联一个氨基酸后需以20%哌啶/DMF为脱Fmoc试剂脱去Fmoc,每次10分钟。多肽连接完毕后,苯基亚甲基双(三苯己基磷)二氯化钨(第一代Grubbs催化剂)作为环合试剂,反应过夜。使用TFA/EDT/TIPs/Water(95:2:2:1,v/v/v/v)室温反应2小时,从而将其从树脂上切割下来,同时脱除侧链保护基。然后用无水乙醚沉淀得到粗肽。粗肽在30分钟内以反相HPLC纯化,冻干得到纯度 $\geq 95\%$ 的白色冻干粉末。

[0043] 实验例:

[0044] 1) 细胞生物学实验

[0045] 将前列腺癌骨转移细胞系C4-2B用含10%胎牛血清(fetal bovine serum)、100U/ml青霉素及100mg·L⁻¹链霉素的高糖D-MEM培养基于37℃,5%CO₂培养箱中常规培养传代。前列腺癌骨转移细胞系C4-2B以每孔1000个细胞铺96孔板,第二天分别加入不同浓度(0,3.125,25,12.5,25,50,100um)的多肽Ascaphin-8,Ascaphin-8-1,Ascaphin-8-2,Ascaphin-8-3,Ascaphin-8-4。96h后每孔加入10μL CCK8试剂,并在37℃下孵育1h。用酶标仪(BioTek,Vermont,USA)在波长450nm处检测各孔吸光度值(OD),根据OD值计算细胞存活

率(vital rate,VR): $VR = (\text{用药组OD值} - \text{空白组OD值}) / (\text{对照组OD值} - \text{空白组OD值})$ 。计算3个平行孔的平均值VR,根据药物VR,由药物浓度的对数值与VR线性回归求出药物的半数抑制浓度(50% inhibitory concentration,IC₅₀)。

[0046] 实验结果:CCK-8体外肿瘤抑制实验结果显示,多肽片段均显示出良好的体外肿瘤细胞抑制作用,较阴性对照Ascaphin-8均有提高,结果如表4所示。

[0047] 2) 酶稳定性实验

[0048] 糜蛋白酶稳定性试验:分别称取1mg的多肽溶解于二甲基亚砜,配制成肽储存液。称取一定量的糜蛋白酶溶于含有2mM氯化钙的磷酸盐缓冲溶液(50mM,pH7.4)至糜蛋白的浓度为1.5ng/ μ l,取50 μ L的肽储存溶液和1950 μ L的糜蛋白酶溶液放入2mL的离心管中进行酶降解反应。在0,10,20,30和60分钟取50 μ L的反应液并加入50 μ L盐酸(1M)进行淬灭,用HPLC分析不同时间点肽的残余量。

[0049] 实验结果:糜蛋白酶稳定性实验结果显示,Ascaphin-8-3显示出更强的抗糜蛋白酶能力,结果如表4所示。

[0050] 表4环肽类活性分子糜蛋白酶降解半衰期以及抗前列腺癌骨转移细胞系C4-2B的半数抑制浓度

[0051]

名称	t _{1/2} (h)	IC ₅₀ / μ M
Ascaphin-8	24.41	42.91
Ascaphin-8-1	17.74	11.09
Ascaphin-8-2	24.50	7.88
Ascaphin-8-3	41.10	7.17
Ascaphin-8-4	21.33	17.26

[0052] 本发明的有益效果是:该环肽类抗肿瘤活性化合物及其制备方法与应用,研究报告,通过化学手段增强多肽的 α 螺旋构型,从而增加其透膜能力和酶稳定性是解决线性多肽成药性差的有效策略,在众多的修饰方法中,订书肽策略是常用来稳定 α -螺旋肽的一种方法。这是由Verdine发明的一种具有全碳氢支架的 α -螺旋肽,能够增强多肽的 α -螺旋结构、透膜性、抗蛋白酶水解能力、抗蛋白蛋白相互作用的能力等。在合成中,特定氨基酸的侧链戊烯通过烯炔复分解反应而进行环合,从而稳定 α -螺旋结构。提高抗肿瘤活性。因此,我们采用订书化环合修饰策略设计并合成了一系列新型Ascaphin-8环肽类活性分子,旨在增强其细胞渗透性,提高酶稳定性和抗肿瘤活性,为现有的抗癌药物具有构象不稳定、透膜能力差以及抗水解酶能力弱的问题提供了解决的方法。

[0053] 尽管已经示出和描述了本发明的实施例,对于本领域的普通技术人员而言,可以理解在不脱离本发明的原理和精神的情况下可以对这些实施例进行多种变化、修改、替换和变型,本发明的范围由所附权利要求及其等同物限定。



图1

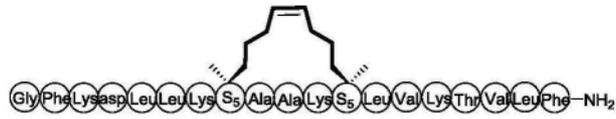


图2

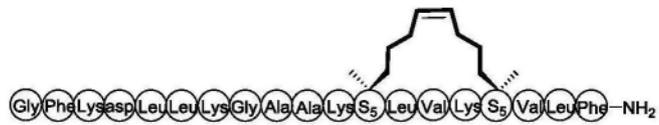


图3

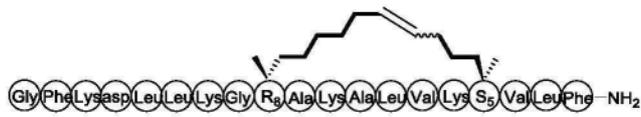


图4