

说明书

发明名称: 一种新型多肽、多肽衍生物及其应用

技术领域

[0001] 本申请属于生物医药技术领域,具体涉及一种新型多肽、多肽衍生物及其应用,更具体地涉及一种新型多肽、多肽衍生物及其在肿瘤预防或治疗中的应用。

背景技术

[0002] 编码蛋白质的开放阅读框(open reading frames, ORFs)是由一串有义密码子组成,由起始密码子开始,至终止密码子结束。由于传统计算机算法和检测手段的限制,大多数预测ORF的算法都以100个氨基酸为最低下限。随着核糖体图谱测序技术、计算生物学和高通量组学技术的发展,越来越多的研究表明,很多非编码RNA(non-coding RNA)其实包含长度小于300nt的小开放阅读框(small open reading frames, sORFs),能编码长度小于100个氨基酸的功能性多肽,称之为微肽(Micropeptide)。微肽的转录本来源主要包括非编码RNAs(lncRNAs、circRNAs、pri-miRNAs)、核糖体RNAs(rRNA)、反义转录本(antisense)、5' UTR、3' UTR、基因间ORF等。

[0003] 微肽最早的研究工作开始于1996年,德国科学家在豆科植物中发现由ENOD40(early nodulin 40,早期结瘤素40)基因转录出来的发挥非编码功能的679nt的RNA,基于它的长度大于200nt,当时被归类于lncRNA,实际上是可以编码蛋白,并能调控植物的生长,具体成果发表在science期刊;2002年,德国研究人员更加详细地研究这种RNA时,他们发现它含有两个sORF,而且确实编码微肽(一个编码12肽,另一个编码24肽),并且证实能与一种蔗糖合成酶相互作用。随后20年的时间里,随着计算生物学和多组学深度测序技术(如核糖体印迹测序、多肽组测序)的发展,科学家在线虫、果蝇、斑马鱼、植物、小鼠和人类等多物种中发现大量之前未被注释、隐藏在非编码RNA中的sORF,能翻译出参与肌肉发育、mRNA修饰、免疫调节和肿瘤发展等生物学功能的全新多肽,这为蛋白组学研究打开新的视角。

- [0004] 近年来一些研究报道由ncRNA编码的微肽(如SMIM22、HOXB-AS3、SMIM30、MP31、PINT87aa)能够调控不同肿瘤(包括乳腺癌、结直肠癌、脑胶质瘤、肝癌、黑色素瘤、食管鳞癌等)的发生发展,具体可以在促进或抑制肿瘤增殖、转移、能量代谢、耐药等方面发挥作用,提示微肽可以作为潜在的肿瘤诊断标志物或治疗靶点进行深入开发。
- [0005] 公开号为CN112442116A的中国发明专利记载了由lncRNA编码的微肽HMMW以及其在头颈癌、甲状腺癌、肾癌等恶性肿瘤检测和治疗中的应用,HMMW是全新的内源多肽序列,具体包括51个氨基酸残基,直接结合受体是AQP2蛋白。
- [0006] 发明内容
- [0007] 1.发明目的
- [0008] 针对申请人首次发现的全新微肽HMMW(详见申请人前期授权公告号为CN112442116B的专利),
- [0009] 本申请的目的之一在于对与微肽HMMW具有同源性的多肽的功能进行了验证;
- [0010] 本申请的目的之二在于对微肽HMMW的关键活性氨基酸进行研究,提供长度小于微肽HMMW,但具有相同或基本相同功能的微肽HMMW的同源性功能片段,即本申请中的新型多肽;
- [0011] 本申请的目的之三在于提供本申请中的新型多肽的衍生物,如新型多肽经过长效化修饰的衍生物,更好地保留了新型多肽的体内活性、提高新型多肽稳定性、延长新型多肽半衰期;
- [0012] 本申请的目的之四在于进一步提供了本申请中的新型多肽或其衍生物在制备肿瘤预防或治疗药物中的应用,具体包括在人的脑胶质瘤、神经母细胞瘤、头颈癌、食管癌、甲状腺癌、肺癌、肝癌、肾癌、乳腺癌、宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、结肠癌、小肠癌、回盲肠癌、胃癌、膀胱癌、胰腺癌、前列腺癌、胆管癌、黑色素瘤、肉瘤、骨髓瘤、淋巴瘤、白血病等中的预防或治疗作用。
- [0013] 2.技术方案
- [0014] 为了达到上述发明目的,本申请所采用的技术方案如下:

- [0015] 本申请提供了一种新型多肽，该新型多肽是以发明人首次发现的全新微肽HMMW(SEQ ID NO.1)为基础，经过序列改造、结构分析和氨基酸突变等方式确定的具有与微肽HMMW相同或基本相同功能的多肽，具体选自以下任意一种：
- [0016] (1)：SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的多肽缺失连续3个氨基酸而形成的具有相同或基本相同功能的多肽；
- [0017] (2)：SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的多肽N端缺失1~34个任意数量的氨基酸而形成的具有相同或基本相同功能的多肽；
- [0018] (3)：SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列多肽或(1)或(2)经过取代一个或多个氨基酸而形成的具有相同或基本相同功能的多肽。
- [0019] 进一步地，上述一种新型多肽，该新型多肽是SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的多肽缺失连续3个氨基酸而形成的具有相同或基本相同功能的多肽。
- [0020] 进一步地，上述一种新型多肽，该新型多肽是SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的多肽缺失3N-2、3N-1和3N位的连续3个氨基酸而形成的具有相同或基本相同功能的多肽，其中N=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16或17。
- [0021] 进一步地，上述一种新型多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.2~SEQ ID NO.18任一所示。
- [0022] 进一步地，上述一种新型多肽，该新型多肽是SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的多肽缺失3N-2、3N-1和3N位的连续3个氨基酸而形成的具有相同或基本相同功能的多肽，其中N=1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 14, 15或16。
- [0023] 进一步地，上述一种新型多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.2~SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.6~SEQ ID NO.10、SEQ ID NO.13或SEQ ID NO.15~SEQ ID NO.17任一所示。
- [0024] 进一步地，上述一种新型多肽，该新型多肽是SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的多肽缺失3N-2、3N-1和3N位的连续3个氨基酸而形成的具有相同或基本相同功能的多肽，其中N=1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 12或16。

- [0025] 进一步地, 上述一种新型多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.2 ~ SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.6 ~ SEQ ID NO.10、SEQ ID NO.13或SEQ ID NO.17任一所示。
- [0026] 进一步地, 上述一种新型多肽, 该新型多肽是SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的多肽N端缺失1 ~ 34个任意数量的氨基酸而形成的具有相同或基本相同功能的多肽。
- [0027] 进一步地, 上述一种新型多肽, 该新型多肽是SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的多肽N端缺失1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33或34个氨基酸而形成的具有相同或基本相同功能的多肽。
- [0028] 进一步地, 上述一种新型多肽, 该新型多肽是SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的多肽N端缺失4、9、14、19、24、29或34个氨基酸而形成的具有相同或基本相同功能的多肽。
- [0029] 进一步地, 上述一种新型多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.19 ~ SEQ ID NO.25任一所示。
- [0030] 进一步地, 上述一种新型多肽, 该新型多肽是SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的多肽N端缺失1 ~ 19个任意数量的氨基酸而形成的具有相同或基本相同功能的多肽。
- [0031] 进一步地, 上述一种新型多肽, 该新型多肽是SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的多肽N端缺失1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18或19个氨基酸而形成的具有相同或基本相同功能的多肽。
- [0032] 进一步地, 上述一种新型多肽, 该新型多肽是SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的多肽N端缺失4、9、14或19个氨基酸而形成的具有相同或基本相同功能的多肽。
- [0033] 进一步地, 上述一种新型多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.19 ~ SEQ ID NO.22任一所示。

- [0034] 进一步地，上述一种新型多肽，该新型多肽是SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的多肽N端缺失1~14个任意数量的氨基酸而形成的具有相同或基本相同功能的多肽。
- [0035] 进一步地，上述一种新型多肽，该新型多肽是SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的多肽N端缺失1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14个氨基酸而形成的具有相同或基本相同功能的多肽。
- [0036] 进一步地，上述一种新型多肽，该新型多肽是SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的多肽N端缺失4、9或14个氨基酸而形成的具有相同或基本相同功能的多肽。
- [0037] 进一步地，上述一种新型多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.19~SEQ ID NO.21任一所示。
- [0038] 进一步地，上述一种新型多肽，该新型多肽是SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列多肽经过取代一个或多个氨基酸而形成的具有相同或基本相同功能的多肽。
- [0039] 进一步地，上述一种新型多肽，该新型多肽是SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列多肽经过取代一个氨基酸而形成的具有相同或基本相同功能的多肽。
- [0040] 进一步地，上述取代一个氨基酸是SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的第2、3、8、9、10、11、12、13、17、19、20、21、22、25、27、28、30、31、32、40、41、42、43、44、45、48、49或50位氨基酸发生取代而形成的具有相同或基本相同功能的多肽。
- [0041] 进一步地，上述一种新型多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.26~SEQ ID NO.53任一所示。
- [0042] 进一步地，上述取代一个氨基酸是SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的第2、3、8、9、10、11、12、13、17、19、20、21、22、25、27、28、30、31、32、40、41、42、43、44、45、48或50位氨基酸发生取代而形成的具有相同或基本相同功能的多肽。
- [0043] 进一步地，上述一种新型多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.26~SEQ ID NO.51、SEQ ID NO.53任一所示。
- [0044] 进一步地，上述取代一个氨基酸是SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的第2、3、8、9、10、11、12、13、17、19、20、21、22、25、27、28、30、31

、32、40、41、42、44、45或50位氨基酸发生取代而形成的具有相同或基本相同功能的多肽。

- [0045] 进一步地，上述一种新型多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.26～SEQ ID NO.47、SEQ ID NO.49～SEQ ID NO.50、SEQ ID NO.53任一所示。
- [0046] 本申请还提供了一种核苷酸，该核苷酸编码上述一种新型多肽。
- [0047] 本申请还提供了一种重组载体，该重组载体包括上述编码新型多肽的核苷酸序列，该重组载体可以是质粒、病毒载体等本领域技术人员知晓的载体。
- [0048] 本申请还提供了上述新型多肽的衍生物，该衍生物是上述新型多肽经过修饰的具有相同或基本相同功能的衍生物。
- [0049] 进一步地，上述修饰包括N端修饰、C端修饰、侧链修饰、氨基酸修饰或骨架修饰中一种或几种。
- [0050] 进一步地，上述修饰包括聚乙二醇修饰，脂肪酸链接，融合Fc(igg1，igg4)多肽，与人血清白蛋白结合，非天然氨基酸替换，多肽环化，或高端制剂等长效化修饰中一种或几种。
- [0051] 进一步地，上述聚乙二醇修饰方式主要修饰位点在多肽的N端、C端，Lys侧链和Cys的巯基。
- [0052] 进一步地，上述聚乙二醇修饰所用聚乙二醇单分子分子量区间在PEG5～PEG40之间。
- [0053] 进一步地，上述聚乙二醇修饰可以使用单个聚乙二醇，或者多个聚乙二醇分子。
- [0054] 进一步地，上述脂肪酸链接发挥在体内与血清白蛋白的结合作用，链接方式包括直接在N端链接，也可以包括使用linker链接18碳脂肪酸和多肽，使用小的肽段Ala-Ala-Asn作为linker。
- [0055] 进一步地，上述脂肪酸链接包括N端链接。
- [0056] 进一步地，上述N端链接包括12～20碳脂肪酸N端链接。更进一步地，上述N端链接包括18碳脂肪酸N端链接。
- [0057] 进一步地，上述脂肪酸链接包括使用linker链接脂肪酸。

- [0058] 进一步地，上述使用linker链接包括使用linker链接12~20碳脂肪酸。更进一步地，上述使用linker链接包括使用linker链接18碳脂肪酸。
- [0059] 进一步地，上述linker为长度小于5个氨基酸的肽段。
- [0060] 进一步地，上述linker为长度小于3个氨基酸的肽段。更进一步地，上述linker为肽段Ala-Ala-Asn。
- [0061] 本申请还提供了上述新型多肽或其衍生物、编码新型多肽的核苷酸或重组载体在制备预防或治疗肿瘤药物中的应用。
- [0062] 本申请还提供了上述多肽及其在药学上可接受的盐、酯或多肽衍生物及其在药学上可接受的盐、酯在制备预防或治疗肿瘤药物中的应用。
- [0063] 进一步地，上述肿瘤包括脑胶质瘤、神经母细胞瘤、头颈癌、食管癌、甲状腺癌、肺癌、肝癌、肾癌、乳腺癌、宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、结肠癌、小肠癌、回盲肠癌、胃癌、膀胱癌、胰腺癌、前列腺癌、胆管癌、黑色素瘤、肉瘤、骨髓瘤、淋巴瘤、白血病中一种或多种。
- [0064] 进一步地，上述预防或治疗肿瘤包括抑制肿瘤细胞的增殖和/或转移。
- [0065] 进一步地，上述预防或治疗肿瘤包括抑制肿瘤细胞的增殖。
- [0066] 进一步地，上述预防或治疗肿瘤包括抑制肿瘤细胞转移。
- [0067] 进一步地，上述抑制肿瘤细胞的增殖中的肿瘤细胞包括：
- [0068] 所述胶质母细胞瘤的癌细胞包括：U87-MG；
- [0069] 所述神经母细胞瘤的癌细胞包括：SH-SY5Y；
- [0070] 所述头颈癌的癌细胞包括：口腔表皮样癌细胞KB、喉表皮样癌细胞HEp2、舌鳞癌细胞CAL27、鼻咽癌细胞CNE-2Z中的任意一种；
- [0071] 所述食管癌的癌细胞包括：Eca-109和/或TE-13；
- [0072] 所述甲状腺癌的癌细胞包括：NPPA87-1；
- [0073] 所述肺癌的癌细胞包括：95-D、SK-MES-1、SPC-A1、A549中的任意一种或组合；
- [0074] 所述肝癌的癌细胞包括：HCCLM3和/或HepG2；
- [0075] 所述肾癌的癌细胞包括：Ketr-3和/或786-O；
- [0076] 所述乳腺癌的癌细胞包括：SK-BR-3和/或MDA-MB-231；

- [0077] 所述宫颈癌的癌细胞包括：CaSki和/或Hela；
- [0078] 所述子宫癌的癌细胞包括：RL-952和/或MS751；
- [0079] 所述卵巢癌的癌细胞包括：ES-2和/或SKOV3
- [0080] 所述结肠癌的癌细胞包括：HT29和/或SW480；
- [0081] 所述小肠癌的癌细胞包括：HIC；
- [0082] 所述回盲肠癌的癌细胞包括：HCT-8；
- [0083] 所述胃癌的癌细胞包括：MGC-803和/或BGC-823；
- [0084] 所述膀胱癌的癌细胞包括：T24和/或EJ；
- [0085] 所述胰腺癌的癌细胞包括：ASPC-1和/或PANC-1；
- [0086] 所述前列腺癌的癌细胞包括：22RV1和/或PC-3；
- [0087] 所述胆管癌的癌细胞包括：QBC939；
- [0088] 所述黑色素瘤的癌细胞包括：SK-mel-2和/或A375；
- [0089] 所述肉瘤的癌细胞包括：MG63和/或HT-1080；
- [0090] 所述骨髓瘤的癌细胞包括：LP-1；
- [0091] 所述淋巴瘤的癌细胞包括：Raji、RPMI 8226、U937、WSU-DLCL2中的任意一种或组合；
- [0092] 所述白血病的癌细胞包括：CEM/C1、NB4、KG-1、K562、HL60、Jurkat, Clone E6-1中的任意一种或组合。
- [0093] 进一步地，上述抑制肿瘤细胞转移中的肿瘤细胞包括：
- [0094] 所述黑色素瘤的癌细胞包括：A375；
- [0095] 所述宫颈癌的癌细胞包括：Hela；
- [0096] 所述卵巢癌的癌细胞包括：Skvo3；
- [0097] 所述肝癌的癌细胞包括：Hep3B；
- [0098] 所述肺癌的癌细胞包括：A549。
- [0099] 本申请还提供了一种预防或治疗肿瘤的药物组合物，该药物组合物至少含有上述新型多肽或其衍生物，及药学上可接受的载体，所述肿瘤包括脑胶质瘤、神经母细胞瘤、头颈癌、食管癌、甲状腺癌、肺癌、肝癌、肾癌、乳腺癌、宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、结肠癌、小肠癌、回盲肠癌、胃癌、膀胱癌、胰腺癌、

前列腺癌、胆管癌、黑色素瘤、肉瘤、骨髓瘤、淋巴瘤、白血病中的一种或多种。

[0100] 3.有益效果

[0101] 本申请与现有技术相比，其有益效果在于：

[0102] (1)本申请提供的一种新型多肽，是微肽HMMW的缺失或截短多肽，由17~50，尤其是37~50个氨基酸组成，比微肽HMMW的长度更短，一方面较短的多肽，其分子量较少，更有利于吸收，如实施例1中，相同剂量下新型多肽HMMW15-51对人脑胶质瘤、神经母细胞瘤、头颈癌、食管癌、甲状腺癌、肺癌、肝癌、肾癌、乳腺癌、宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、结肠癌、小肠癌、回盲肠癌、胃癌、膀胱癌、胰腺癌、前列腺癌、胆管癌、黑色素瘤、肉瘤、骨髓瘤、淋巴瘤、白血病细胞的增殖抑制作用均显著优于微肽HMMW，对人黑色素瘤细胞的转移抑制作用显著优于微肽HMMW，对人卵巢癌、肝癌、肺癌细胞的转移抑制作用与微肽HMMW相当；另一方面能够简化合成工艺、节约合成成本。

[0103] (2)本申请提供的一种新型多肽，是微肽HMMW或微肽HMMW的缺失或截短多肽，经过氨基酸取代而形成，本申请通过尝试结合不同筛选方法和活性评价系统，确认了微肽HMMW序列中的L43、R48、R49是关键活性位点，为微肽HMMW的二次开发提供依据。

[0104] (3)本申请提供的一种新型多肽的衍生物，包括聚乙二醇修饰、脂肪酸修饰等长效化修饰方式，能更好地保留了新型多肽的体内活性，提高新型多肽稳定性和延长半衰期，本申请通过尝试，并结合体内活性实验评价，确定长效化修饰方案，新型多肽的半衰期及体内抗肿瘤时间显著延长，在肿瘤药物开发方面具有应用潜力。在相同作用剂量下，长效化修饰的新型多肽在体内的抗肿瘤效果显著优于新型多肽，且给药频率显著缩短。

附图说明

[0105] 图1是微肽HMMW的不同缺失体对舌鳞癌CAL27细胞增殖的影响；

[0106] 图2是微肽HMMW的不同截断片段对舌鳞癌CAL27细胞增殖的影响；

[0107] 图3是微肽HMMW的丙氨酸扫描突变的序列信息；

- [0108] 图4是微肽HMMW的单个氨基酸突变序列对舌鳞癌CAL27细胞增殖的影响；
- [0109] 图5是新型多肽和微肽HMMW对黑色素瘤A375细胞转移活性的统计结果；
- [0110] 图6是新型多肽和微肽HMMW对宫颈癌Hela细胞转移活性的统计结果；
- [0111] 图7是新型多肽和微肽HMMW对卵巢癌Skvo3细胞转移活性的统计结果；
- [0112] 图8是新型多肽和微肽HMMW对肝癌Hep3B细胞转移活性的统计结果；
- [0113] 图9是新型多肽和微肽HMMW对肺癌A549细胞转移活性的统计结果；
- [0114] 图10是新型多肽和微肽HMMW对人舌鳞癌CAL27细胞体内成瘤能力的抑制结果；
- [0115] 图11是新型多肽和长效化修饰肽对人舌鳞癌CAL27细胞增殖的影响；
- [0116] 图12是新型多肽和长效化修饰肽对人卵巢癌SKOV3细胞增殖的影响；
- [0117] 图13是新型多肽和长效化修饰肽对人肝癌Hep3B细胞增殖的影响；
- [0118] 图14是新型多肽和长效化修饰肽对人舌鳞癌CAL27细胞体内成瘤能力的抑制结果。

具体实施方式

- [0119] 下面结合具体实施例对本申请进一步进行描述。
- [0120] 实施例1
- [0121] 本实施例提供微肽HMMW不同缺失突变体对人舌鳞癌CAL27细胞增殖的影响。
- [0122] 由于微肽HMMW(SEQ ID NO.1)是全新序列，进一步开发其较小功能片段，可以降低后期开发成本，首先从多肽N端(1-51aa)以三个氨基酸为一组依次进行缺失改造，共得到17条不同的缺失体多肽，分别命名为HMMW-1(缺失1-3aa, SEQ ID NO.2)、HMMW-2(缺失4-6aa, SEQ ID NO.3)、HMMW-3(缺失7-9aa, SEQ ID NO.4)、HMMW-4(缺失10-12aa, SEQ ID NO.5)、HMMW-5(缺失13-15aa, SEQ ID NO.6)、HMMW-6(缺失16-18aa, SEQ ID NO.7)、HMMW-7(缺失19-21aa, SEQ ID NO.8)、HMMW-8(缺失22-24aa, SEQ ID NO.9)、HMMW-9(缺失25-27aa, SEQ ID NO.10)、HMMW-10(缺失28-30aa, SEQ ID NO.11)、HMMW-11(缺失31-33aa, SEQ ID NO.12)、HMMW-12(缺失34-36aa, SEQ ID NO.13)、HMMW-13(缺失37-

39aa, SEQ ID NO.14)、HMMW-14(缺失40-42aa, SEQ ID NO.15)、HMMW-15(缺失43-45aa, SEQ ID NO.16)、HMMW-16(缺失46-48aa, SEQ ID NO.17)、HMMW-17(缺失49-51aa, SEQ ID NO.18), 通过化学固相合成上述缺失体多肽, 其中 HMMW-4、HMMW-10、HMMW-11、HMMW-13、HMMW-17五条多肽可能由于氨基酸组成发生变化, 溶解性差, 无法进行后续的活性实验评价, 因此选择溶解性好的其他12条缺失体多肽比较对人舌鳞癌CAL27细胞增殖的影响。

[0123] 在37℃、5%CO₂的培养箱中将人舌鳞癌CAL27细胞培养至密度90%时, 用胰蛋白酶消化收集, 用培养液重悬细胞并在显微镜下计数, 将细胞浓度调整至约为 5×10^4 个/mL, 将细胞悬液接种到96孔板中, 每孔100 μL, 并于37℃, 5%CO₂培养箱中培养过夜。待细胞完全贴壁后, 分别加入100 μL, 浓度为80 μM的上述12条缺失体多肽和HMMW, 以不加任何药物的培养液作为阴性对照组。继续孵育48h后, 向96孔板中每孔加入100 μL CCK8溶解。用酶标仪在检测波长为450nm处测定吸光值OD, 并计算生长抑制率(proliferation inhibition, PI), 公式为: $PI(\%) = 1 - \frac{\text{给药组}}{\text{阴性对照组}}$ 。试验独立重复3次, 结果以Mean ± SD表示, 并进行统计T检验, 结果见表1和图1。

[0124] 表1微肽HMMW不同缺失突变体对人舌鳞癌CAL27细胞增殖的影响

组别	48 h		溶解性
	OD	生长抑制率 (%)	PBS/0.1%DMSO
阴性对照组	2.048±0.241	—	
HMMW	0.260±0.098	87.302±4.785	可溶
HMMW-1	0.390±0.087	80.965±4.248	可溶
HMMW-2	0.404±0.076	80.251±3.711	可溶
HMMW-3	0.415±0.091	79.742±4.443	可溶
HMMW-5	0.410±0.079	79.992±3.857	可溶
HMMW-6	0.352±0.068	82.830±3.320	可溶
HMMW-7	0.392±0.059	80.840±2.881	可溶
HMMW-8	0.365±0.047	82.201±2.295	可溶
HMMW-9	0.405±0.061	80.234±2.979	可溶
HMMW-12	0.307±0.073	85.016±3.564	可溶
HMMW-14	1.007±0.052	50.816±2.539***	可溶
HMMW-15	1.208±0.038	41.022±1.855***	可溶
HMMW-16	0.403±0.075	80.314±3.662	可溶

注：与HMMW给药组相比，★代表P<0.05，★★代表P<0.01，***代表P<0.001。

[0125] 由表1和图1可知，在溶解性正常的情况下，与HMMW给药组相比，在相同剂量下，HMMW-1、HMMW-2、HMMW-3、HMMW-5、HMMW-6、HMMW-7、HMMW-8、HMMW-9、HMMW-12、HMMW-16 10条缺失肽与HMMW对人舌鳞癌CAL27细胞增殖作用的抑制作用相当，活性没有显著下降；HMMW-14、HMMW-15对人舌鳞癌CAL27细胞增殖的抑制作用与HMMW相比，虽然显著下降，但仍具有活性。

[0126] 实施例2

[0127] 本实施例提供微肽HMMW不同截短片段对人舌鳞癌CAL27细胞增殖的影响。

[0128] 基于实施例1的结果，从微肽HMMW的N端进行截短，由于实施例1中的HMMW-1是缺失第1-3aa氨基酸，发现不会影响多肽的抗肿瘤作用，因此从N端开始截短，分别保留第5-51位氨基酸、第10-51位氨基酸、第15-51位氨基酸、第20-51位氨基酸、第25-51位氨基酸、第30-51位氨基酸和第35-51位氨基酸，并分别命名为HMMW5-51(SEQ ID NO.19)、HMMW10-51(SEQ ID NO.20)、HMMW15-51(SEQ ID NO.21)、HMMW20-51(SEQ ID NO.22)、

HMMW25-51(SEQ ID NO.23)、HMMW30-51(SEQ ID NO.24)、HMMW35-51(SEQ ID NO.25), 通过化学固相合成上述六条截短多肽, 其中HMMW25-51、HMMW30-51、HMMW35-51三条多肽可能由于氨基酸组成发生很大变化, 溶解性差, 无法进行后续的活性实验评价, 因此选择溶解性好的HMMW5-51、HMMW10-51、HMMW15-51、HMMW20-51四条截短多肽继续比较对人舌鳞癌CAL27细胞增殖的影响。

[0129] 同样在37℃、5%CO₂的培养箱中将人舌鳞癌CAL27细胞培养至密度90%时, 用胰蛋白酶消化收集, 用培养液重悬细胞并在显微镜下计数, 将细胞浓度调整至约为5×10⁴个/mL, 将细胞悬液接种到96孔板中, 每孔100μL, 并于37℃, 5%CO₂培养箱中培养过夜。待细胞完全贴壁后, 分别加入100μL, 浓度为80μM的HMMW微肽和上述HMMW5-51、HMMW10-51、HMMW15-51、HMMW20-51四条截短多肽, 以不加任何药物的培养液作为阴性对照组。继续孵育48h后, 向96孔板中每孔加入100μL CCK8溶解。用酶标仪在检测波长为450nm处测定吸光值OD, 并计算生长抑制率(proliferation inhibition, PI), 公式为: PI(%)=1给药组/阴性对照组。试验独立重复3次, 结果以Mean±SD表示, 并进行统计T检验, 结果见表2和图2。

[0130] 表2微肽HMMW不同截短片段对人舌鳞癌CAL27细胞增殖的影响

组别	48 h	
	OD	生长抑制率 (%)
阴性对照组	1.832±0.158	—
HMMW	0.351±0.078	80.841±4.258
HMMW5-51	0.384±0.085	79.000±3.891
HMMW10-51	0.426±0.093	76.747±5.076
HMMW15-51	0.521±0.087	71.561±4.749
HMMW20-51	0.798±0.076	56.441±4.148**

注: 与HMMW给药组相比, ★代表P<0.05, **代表P<0.01。

[0131] 由表2和图2可知, 与HMMW给药组相比, 在相同剂量下, HMMW5-51、HMMW10-51和HMMW15-51三条截短多肽对人舌鳞癌CAL27细胞增殖作用的抑制作用与HMMW相当, 虽然HMMW20-51截短肽对人舌鳞癌CAL27细胞增殖作用的抑制作用显著降低, 但仍具有活性, 结合实施例1的结果, 推测HMMW15-51是HMMW最小功能片段。

[0132] 实施例3

- [0133] 本实施例提供微肽HMMW进行单个氨基酸的丙氨酸扫描突变及亲和力检测分析。
- [0134] 利用MOE软件对微肽HMMW与其结合蛋白AQP2进行分子对接模拟，找到预测的潜在互作位点，对接模拟分为以下二组：(1)AQP2同源四聚体与HMMW随机对接，不限制结合区域；(2)AQP2单体与HMMW随机对接，不限制结合区域。将以上二种对接方式所得的互作位点进行整合分析，选出所有可能结合的氨基酸作为潜在关键位点用于丙氨酸(Ala)突变，由于丙氨酸是最小的手性氨基酸，通过将Ala系统性地、依次地替换序列中每一个氨基酸，来分辨出某一特定氨基酸对整个蛋白生物活性的影响。将上述预测到的多肽通过固相合成，通过微量热泳动实验(MST)检测不同突变多肽与AQP2蛋白的亲和力，微肽HMMW丙氨酸扫描突变的序列信息见图3，具体预测到的关键位点以及与AQP2的结合情况表3。
- [0135] 表3微肽HMMW与AQP2蛋白结合的关键位点预测

多肽名称	SEQ ID NO	亲和力 (μM)
HMMW	SEQ ID NO.1	3.07
HMMW-2A	SEQ ID NO.26	2.5
HMMW-3A	SEQ ID NO.27	2.8
HMMW-8A	SEQ ID NO.28	14.76
HMMW-9A	SEQ ID NO.29	3.95
HMMW-10A	SEQ ID NO.30	4.03
HMMW-11A	SEQ ID NO.31	2.33
HMMW-12A	SEQ ID NO.32	1.12
HMMW-13A	SEQ ID NO.33	6.61
HMMW-17A	SEQ ID NO.34	3.93
HMMW-19A	SEQ ID NO.35	5.11
HMMW-20A	SEQ ID NO.36	2.59
HMMW-21A	SEQ ID NO.37	7.64
HMMW-22A	SEQ ID NO.38	3.21
HMMW-25A	SEQ ID NO.39	1.97
HMMW-27A	SEQ ID NO.40	2.39
HMMW-28A	SEQ ID NO.41	2.27
HMMW-30A	SEQ ID NO.42	2.23
HMMW-31A	SEQ ID NO.43	3.06
HMMW-32A	SEQ ID NO.44	2.01
HMMW-40A	SEQ ID NO.45	1.19
HMMW-41A	SEQ ID NO.46	4.32
HMMW-42A	SEQ ID NO.47	0.25
HMMW-43A	SEQ ID NO.48	0.36
HMMW-44A	SEQ ID NO.49	5.23
HMMW-45A	SEQ ID NO.50	3.24
HMMW-48A	SEQ ID NO.51	11.64
HMMW-49A	SEQ ID NO.52	20.76
HMMW-50A	SEQ ID NO.53	0.55

- [0136] 由表3可知，与HMMW相比，突变第8位、48位和49位氨基酸后，多肽与蛋白AQP2的亲和力显著下降，初步说明HMMW的关键位点是第8位、48位和49位氨基酸。
- [0137] 实施例4
- [0138] 本实施例提供微肽HMMW的单个氨基酸突变序列对人舌鳞癌CAL27细胞增殖的影响。
- [0139] 在37℃、5%CO₂的培养箱中将人舌鳞癌CAL27细胞培养至密度90%时，用胰蛋白酶消化收集，用培养液重悬细胞并在显微镜下计数，将细胞浓度调整至约为5 × 10⁴个/mL，将细胞悬液接种到96孔板中，每孔100 μ L，并于37℃，5%CO₂培养箱中培养过夜。待细胞完全贴壁后，分别加入100 μ L，浓度为80 μ M的

HMMW微肽和实施例3中合成的单个氨基酸突变多肽，以不加任何药物的培养液作为阴性对照组。继续孵育48h后，向96孔板中每孔加入100 μ L CCK8溶解。用酶标仪在检测波长为450nm处测定吸光值OD，并计算生长抑制率 (proliferation inhibition, PI)，公式为：PI(%)=1给药组/阴性对照组。试验独立重复3次，结果以Mean $\pm$ SD表示，并进行统计T检验，结果见图4，★代表P<0.05，★★代表P<0.01，★★★代表P<0.001，在作用剂量为80 μ M的浓度下，除了HMMW-3A和HMMW-11A两条肽由于溶解性很差无法进行活性比较，与HMMW给药组相比，在分别突变第43位、48位和49位氨基酸后的多肽对人舌鳞癌CAL27细胞增殖作用的抑制作用显著降低，其中突变第8位氨基酸的多肽在抗肿瘤活性方面与HMMW没有差异，由此确定第43位、48位和49位氨基酸是微肽HMMW的关键活性位点。

[0140] 实施例5

[0141] 本实施例提供新型多肽HMMW15-51(SEQ ID NO.21)和微肽HMMW对不同肿瘤细胞增殖抑制作用的检测。

[0142] 将人的神经母细胞瘤细胞SH-SY5Y、脑星形胶质母细胞瘤细胞U87MG、口腔表皮样癌细胞KB、喉表皮样癌细胞HEp2、舌鳞癌细胞CAL27、鼻咽癌细胞细胞CNE-2Z、食管癌细胞Eca-109和TE-13、甲状腺乳头状癌细胞NPPA87-1、肺巨细胞癌细胞95-D、肺鳞癌细胞SK-MES-1、肺腺癌细胞SPC-A1、非小细胞肺癌细胞A549、肝癌细胞HCCLM3和HepG2、肾癌细胞Ketr-3和786-O、乳腺癌细胞SK-BR-3和MDA-MB-231、宫颈癌细胞CaSki和Hela、子宫癌细胞RL-952和MS751、卵巢癌细胞ES-2和SKOV3、结肠癌细胞HT29和SW480、小肠癌细胞HIC、回盲肠癌细胞HCT-8、胃癌细胞MGC-803和BGC-823、膀胱癌细胞T24和EJ、胰腺癌细胞ASPC-1和PANC-1、前列腺癌细胞22RV1和PC-3、胆管癌细胞QBC939、恶性黑色素瘤细胞SK-mel-2和A375、成骨肉瘤细胞MG63、纤维肉瘤细胞HT-1080、多发性骨髓瘤细胞LP-1、淋巴瘤细胞Raji、多发性骨髓瘤外周血B淋巴细胞RPMI 8226、组织细胞淋巴瘤细胞U937、弥漫大B淋巴瘤细胞WSU-DLCL2、急性淋巴细胞白血病细胞CEM/C1、急性早幼粒细胞白血病细胞NB4、急性骨髓性白血病细胞KG-1、慢性髓原白血病细胞K562、原髓细胞

白血病细胞HL60、T淋巴细胞白血病细胞(Jurkat, Clone E6-1)在37℃、5% CO₂的培养箱中培养至密度90%时,用胰蛋白酶消化收集,用培养液重悬细胞并在显微镜下计数,将细胞浓度调整至约为1.0×10⁵个/mL,将细胞悬液接种到96孔板中,每孔100 μL,并于37℃,5% CO₂培养箱中培养过夜。待细胞完全贴壁后,加入100 μL浓度分别为50 μM微肽HMMW, 50 μM/75 μM/100 μM的新型多肽HMMW15-51作为给药组;以不加任何药物的培养液作为阴性对照组。继续孵育48h后,向96孔板中每孔加入10 μL CCK8溶解,在细胞培养箱内继续孵育4小时,450nm下测定吸光值,并计算增殖抑制率。数据以mean±SD表示,应用GraphPad Prism 5.0统计软件,两组组间比较采用t-test检验,多组间比较采用One-way Anova(Dunnett)。结果见表4-56,★代表P<0.05,★★代表P<0.01,★★★代表P<0.001。

[0143] 表4.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人脑星形胶质母细胞瘤细胞U87MG增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		0.965±0.026	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.112±0.024**	88.359±2.440**
	75 μM	0.169±0.023**	82.487±2.383**
	50 μM	0.197±0.042**	79.585±4.324**
HMMW	50 μM	0.365±0.019**	62.176±2.001**

[0144] 表5.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人神经母细胞瘤细胞SH-SY5Y增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		0.983±0.015	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.162±0.019	83.525±1.948**
	75 μM	0.191±0.037	80.576±3.787**
	50 μM	0.263±0.034	73.220±3.443**
HMMW	50 μM	0.486±0.049	50.542±4.982**

[0145] 表6.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人口腔表皮样癌细胞KB增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		1.010±0.021	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.122±0.026**	87.888±2.575**
	75 μM	0.167±0.005**	83.432±0.508**
	50 μM	0.218±0.012**	78.383±1.148**
HMMW	50 μM	0.471±0.040**	53.399±3.971**

[0146] 表7.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人喉表皮样癌细胞HEp2增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		0.875±0.011	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.127±0.007**	85.518±0.744**
	75 μM	0.169±0.027**	80.716±3.030**
	50 μM	0.210±0.024**	76.029±2.728**
HMMW	50 μM	0.504±0.020**	42.416±2.236**

[0147] 表8.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人舌鳞癌细胞CAL27增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		1.165±0.012	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.151±0.010**	87.035±0.828**
	75 μM	0.211±0.039**	81.912±3.381**
	50 μM	0.261±0.021**	77.619±1.804**
HMMW	50 μM	0.383±0.064**	67.115±5.457**

[0148] 表9.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人鼻咽癌细胞CNE-2Z增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		0.963±0.023	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.112±0.012**	88.404±1.252**
	75 μM	0.154±0.017**	84.043±1.806**
	50 μM	0.244±0.044**	74.697±4.553**
HMMW	50 μM	0.472±0.042**	50.952±4.312**

[0149] 表10.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人食管癌细胞Eca-109增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		0.949±0.041	
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.076±0.017**	92.024±1.793**
	75 μM	0.109±0.025**	88.510±2.588**
	50 μM	0.168±0.034**	82.256±3.531**

HMMW	50 μM	0.350±0.028**	63.071±2.982**
------	-------	---------------	----------------

[0150] 表11.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人食管癌细胞TE-13增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		0.828±0.017	
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.132±0.012**	84.018±1.451**
	75 μM	0.205±0.013**	75.242±1.579**
	50 μM	0.302±0.029**	63.486±3.547**
HMMW	50 μM	0.389±0.016**	53.060±1.911**

[0151] 表12.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人甲状腺乳头状癌细胞NPPA87-1增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		0.922±0.032	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.221±0.019**	76.030±2.061**
	75 μM	0.271±0.044**	70.607±4.793**
	50 μM	0.381±0.026**	58.677±2.767**
HMMW	50 μM	0.478±0.028**	48.192±2.999**

[0152] 表13.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人肺巨细胞癌细胞95-D增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		1.098±0.012	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.150±0.018**	86.343±1.600**
	75 μM	0.211±0.020**	80.789±1.791**
	50 μM	0.259±0.032**	76.449±2.914**
HMMW	50 μM	0.442±0.059**	59.757±5.365**

[0153] 表14.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人肺鳞癌细胞SK-MES-1增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		0.964±0.024	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.119±0.024**	87.621±2.501**
	75 μM	0.203±0.030**	78.942±3.061**
	50 μM	0.279±0.018**	71.058±1.844**
HMMW	50 μM	0.435±0.043**	54.910±4.426**

[0154] 表15.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人肺腺癌细胞SPC-A1增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		1.032±0.038	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.151±0.028**	85.368±2.729**
	75 μM	0.259±0.018**	74.935±1.734**
	50 μM	0.358±0.044**	65.278±4.300**
HMMW	50 μM	0.525±0.032**	49.128±3.053**

[0155] 表16.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人非小细胞肺癌细胞A549增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		1.079±0.022	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.229±0.041**	78.808±3.770**
	75 μM	0.354±0.041**	67.161±3.844**
	50 μM	0.469±0.003**	56.534±0.278**
HMMW	50 μM	0.508±0.022**	52.950±2.023**

[0156] 表17.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人肝癌细胞HCCLM3增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		0.998±0.032	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.117±0.025**	88.239±2.474**
	75 μM	0.201±0.037**	79.820±3.700**
	50 μM	0.301±0.039**	69.863±3.920**
HMMW	50 μM	0.460±0.076**	53.926±7.634**

[0157] 表18.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人肝癌细胞HepG2增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		1.073±0.036	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.154±0.022**	85.674±2.069**
	75 μM	0.241±0.019**	77.564±1.730**
	50 μM	0.311±0.052**	70.976±4.848**
HMMW	50 μM	0.509±0.027**	52.579±2.504**

[0158] 表19.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人肾癌细胞Ketr-3增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		0.929±0.049	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.178±0.016**	80.797±1.717**
	75 μM	0.248±0.026**	73.295±2.760**
	50 μM	0.351±0.020**	62.240±2.197**
HMMW	50 μM	0.476±0.045**	48.708±4.852**

[0159] 表20.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人肾透明细胞腺癌细胞786-O增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		1.105±0.019	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.205±0.035**	81.478±3.122**
	75 μM	0.312±0.029**	71.765±2.634**
	50 μM	0.341±0.054**	69.140±4.893**
HMMW	50 μM	0.413±0.078**	62.624±7.014**

[0160] 表21.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人乳腺癌细胞SK-BR-3增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		1.096±0.039	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.122±0.019**	88.899±1.746**
	75 μM	0.224±0.049**	79.592±4.474**
	50 μM	0.291±0.022**	73.418±1.970**
HMMW	50 μM	0.507±0.054**	53.710±4.902**

[0161] 表22.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人乳腺癌细胞MDA-MB-231增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		1.233±0.007	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.211±0.027**	82.865±2.194**
	75 μM	0.237±0.032**	80.757±2.620**
	50 μM	0.341±0.042**	72.378±3.406**
HMMW	50 μM	0.429±0.056**	65.216±4.512**

[0162] 表23.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人宫颈癌上皮细胞CaSki增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		0.981±0.035	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.228±0.035**	76.800±3.597**
	75 μM	0.302±0.030**	69.226±3.007**
	50 μM	0.402±0.024**	59.001±2.408**
HMMW	50 μM	0.458±0.038**	53.329±3.884**

[0163] 表24.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人宫颈癌细胞Hela增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		0.964±0.023	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.198±0.026**	83.661±1.557**
	75 μM	0.328±0.011**	74.508±2.703**
	50 μM	0.377±0.044**	66.508±2.412**
HMMW	50 μM	0.493±0.049**	52.644±4.018**

[0164] 表25.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人子宫内膜癌细胞RL-952增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		0.860±0.027	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.190±0.038**	77.916±4.415**
	75 μM	0.324±0.022**	62.379±2.505**
	50 μM	0.355±0.044**	58.776±5.167**
HMMW	50 μM	0.422±0.034**	50.988±3.897**

[0165] 表26.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人子宫表皮癌细胞MS751增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		0.934±0.013	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.259±0.026**	72.296±2.763**
	75 μM	0.355±0.024**	61.942±2.517**
	50 μM	0.430±0.031**	53.945±3.268**
HMMW	50 μM	0.474±0.024**	49.268±2.531**

[0166] 表27.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人卵巢透明细胞癌细胞ES-2增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		0.966±0.032	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.183±0.013**	81.049±1.298**
	75 μM	0.270±0.028**	72.006±2.904**
	50 μM	0.410±0.042**	57.508±4.384**
HMMW	50 μM	0.464±0.007**	51.916±0.690**

[0167] 表28.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人卵巢癌细胞SKOV3增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		0.983±0.042	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.161±0.015**	83.661±1.557**
	75 μM	0.251±0.027**	74.508±2.703**
	50 μM	0.329±0.024**	66.508±2.412**
HMMW	50 μM	0.466±0.040**	52.644±4.018**

[0168] 表29.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人结肠癌细胞HT29增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		0.974±0.016	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.103±0.019**	89.456±1.928**
	75 μM	0.129±0.014**	86.717±1.402**
	50 μM	0.192±0.006**	80.246±0.584**
HMMW	50 μM	0.479±0.024**	50.805±2.422**

[0169] 表30.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人结肠癌细胞SW480增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		0.941±0.028	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.160±0.035**	82.991±3.678**
	75 μM	0.269±0.029**	71.439±3.113**
	50 μM	0.358±0.016**	61.906±1.695**
HMMW	50 μM	0.479±0.025**	49.114±2.626**

[0170] 表31.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人小肠癌细胞HIC增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		1.018±0.018	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.221±0.040**	78.251±3.911**
	75 μM	0.293±0.022**	71.209±2.133**
	50 μM	0.383±0.031**	62.332±3.021**
HMMW	50 μM	0.507±0.022**	50.213±2.165**

[0171] 表32.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人回盲肠癌细胞HCT-8增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		0.939±0.029	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.205±0.047**	78.211±4.966**
	75 μM	0.297±0.066**	68.346±7.028**
	50 μM	0.445±0.064**	52.590±6.777**
HMMW	50 μM	0.482±0.036**	48.687±3.785**

[0172] 表33.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人胃癌细胞MGC-803增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		1.145±0.029	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.134±0.010**	88.329±0.861**
	75 μM	0.190±0.020**	83.382±1.747**
	50 μM	0.254±0.010**	77.852±0.861**
HMMW	50 μM	0.675±0.035**	41.094±3.077**

[0173] 表34.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人胃癌细胞BGC-823增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		0.976±0.038	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.169±0.021**	82.690±2.158**
	75 μM	0.229±0.027**	76.511±2.776**
	50 μM	0.299±0.037**	69.409±3.800**
HMMW	50 μM	0.510±0.046**	47.730±4.739**

[0174] 表35.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人膀胱移行细胞癌细胞T24增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		0.950±0.013	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.090±0.013**	90.523±1.319**
	75 μM	0.158±0.033**	83.363±3.522**
	50 μM	0.205±0.011**	78.378±1.184**
HMMW	50 μM	0.460±0.045**	51.562±4.780**

[0175] 表36.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人膀胱癌细胞EJ增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		1.223±0.018	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.169±0.052**	86.185±4.258**
	75 μM	0.345±0.017**	71.798±1.375**
	50 μM	0.439±0.016**	64.142±1.270**
HMMW	50 μM	0.638±0.018**	47.820±1.486**

[0176] 表37.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人胰腺癌细胞ASPC-1增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		1.024±0.020	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.131±0.027**	87.179±2.645**
	75 μM	0.234±0.035**	77.188±3.413**
	50 μM	0.363±0.063**	64.562±6.146**
HMMW	50 μM	0.497±0.045**	51.448±4.377**

[0177] 表38.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人胰腺癌细胞PANC-1增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		0.853±0.034	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.095±0.013**	88.906±1.493**
	75 μM	0.184±0.023**	78.398±2.704**
	50 μM	0.310±0.047**	63.672±5.525**
HMMW	50 μM	0.424±0.052**	50.273±6.135**

[0178] 表39.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人前列腺癌细胞22RV1增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		1.115±0.030	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.193±0.042**	82.720±3.730**
	75 μM	0.305±0.044**	72.646±3.906**
	50 μM	0.426±0.036**	61.794±3.210**
HMMW	50 μM	0.552±0.019**	50.463±1.693**

[0179] 表40.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人前列腺癌细胞PC-3增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		1.025±0.014	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.193±0.049**	81.203±4.742**
	75 μM	0.244±0.017**	76.163±1.651**
	50 μM	0.291±0.038**	71.642±3.715**
HMMW	50 μM	0.509±0.040**	50.341±3.864**

[0180] 表41.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人胆管癌细胞QBC939增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		0.850±0.032	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.156±0.037**	81.608±4.366**
	75 μM	0.253±0.041**	70.196±4.847**
	50 μM	0.344±0.037**	59.529±4.305**
HMMW	50 μM	0.429±0.018**	49.490±2.138**

[0181] 表42.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人恶性黑色素瘤细胞SK-mel-2增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		0.867±0.029	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.133±0.025**	84.704±2.846**
	75 μM	0.174±0.019**	79.977±2.225**
	50 μM	0.233±0.014**	73.136±1.614**
HMMW	50 μM	0.466±0.042**	46.311±4.884**

[0182] 表43.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人恶性黑色素瘤细胞A375增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		0.974±0.035	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.150±0.045**	84.571±4.579**
	75 μM	0.269±0.058**	72.357±5.914**
	50 μM	0.360±0.015**	63.052±1.491**
HMMW	50 μM	0.491±0.040**	49.572±4.128**

[0183] 表44.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人成骨肉瘤细胞MG63增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		0.917±0.032	
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.126±0.025**	86.228±2.728**
HMMW	75 μM	0.200±0.023**	78.161±2.520**
	50 μM	0.270±0.026**	70.603±2.845**
	50 μM	0.435±0.024**	52.544±2.562**

[0184] 表45.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人纤维肉瘤细胞HT-1080增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		0.922±0.030	
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.166±0.022**	81.953±2.407**
	75 μM	0.256±0.036**	72.260±3.852**
	50 μM	0.365±0.032**	60.434±3.432**
HMMW	50 μM	0.432±0.038**	53.092±4.138**

[0185] 表46.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人多发性骨髓瘤细胞LP-1增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		0.882±0.037	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.146±0.027**	83.440±3.052**
	75 μM	0.200±0.009**	77.278±1.054**
	50 μM	0.299±0.023**	66.125±2.629**
HMMW	50 μM	0.462±0.038**	47.561±4.259**

[0186] 表47.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人淋巴瘤细胞Raji增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		1.268±0.042	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.189±0.017**	85.099±1.317**
	75 μM	0.237±0.020**	81.340±1.546**
	50 μM	0.380±0.036**	70.013±2.862**
HMMW	50 μM	0.576±0.047**	54.560±3.675**

[0187] 表48.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人多发性骨髓瘤外周血B淋巴细胞RPMI 8226增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		1.229±0.022	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.148±0.025**	87.954±2.000**
	75 μM	0.235±0.011**	80.846±0.908**
	50 μM	0.360±0.034**	70.700±2.799**
HMMW	50 μM	0.578±0.056**	52.930±4.562**

[0188] 表49.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人组织细胞淋巴瘤细胞U937增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		1.337±0.034	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.331±0.031**	75.274±2.328**
	75 μM	0.498±0.050**	62.787±3.714**
	50 μM	0.599±0.044**	55.234±3.264**
HMMW	50 μM	0.855±0.029**	36.042±2.134**

[0189] 表50.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人弥漫大B淋巴瘤细胞WSU-DLCL2增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		1.313±0.040	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.277±0.028**	78.934±2.143**
	75 μM	0.478±0.032**	63.629±2.463**
	50 μM	0.626±0.048**	52.360±3.672**
HMMW	50 μM	0.731±0.032**	44.365±2.462**

[0190] 表51.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人急性淋巴细胞白血病细胞CEM/C1增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		1.177±0.035	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.251±0.043**	78.709±3.692**
	75 μM	0.443±0.050**	62.344±4.216**
	50 μM	0.579±0.059**	50.849±5.040**
HMMW	50 μM	0.630±0.017**	46.518±1.484**

[0191] 表52.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人急性早幼粒细胞白血病细胞NB4增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		1.415±0.037	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.354±0.047**	74.988±3.332**
	75 μM	0.504±0.040**	64.390±2.797**
	50 μM	0.685±0.019**	51.578±1.363**
HMMW	50 μM	0.740±0.070**	47.692±4.919**

[0192] 表53.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人急性骨髓性白血病细胞KG-1增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		1.161±0.046	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.319±0.033**	72.532±2.815**
	75 μM	0.420±0.016**	63.863±1.416**
	50 μM	0.561±0.017**	51.665±1.467**
HMMW	50 μM	0.725±0.070**	37.600±5.989**

[0193] 表54.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人慢性髓原白血病细胞K562增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		1.285±0.026	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.409±0.052**	68.197±4.053**
	75 μM	0.524±0.038**	59.222±2.991**
	50 μM	0.597±0.046**	53.567±3.588**
HMMW	50 μM	0.618±0.036**	51.933±2.838**

[0194] 表55.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人原髓细胞白血病细胞HL60增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		1.097±0.035	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.310±0.041**	71.733±3.732**
	75 μM	0.427±0.025**	61.064±2.269**
	50 μM	0.501±0.008**	54.286±0.696**
HMMW	50 μM	0.578±0.062**	47.264±5.692**

[0195] 表56.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人T淋巴细胞白血病细胞Jurkat,Clone E6-1增殖的抑制作用

组别		48 h	
		OD	抑制率 (%)
阴性对照组		1.080±0.029	—
新型多肽 HMMW15-51	100 μM	0.275±0.053**	74.545±4.881**
	75 μM	0.406±0.051**	62.388±4.707**
	50 μM	0.486±0.059**	55.014±5.442**
HMMW	50 μM	0.602±0.037**	44.307±3.404**

[0196] 由表4-56可知，在相同作用剂量下，新型多肽HMMW15-51对神经母细胞瘤、人脑胶质瘤、头颈癌、食管癌、甲状腺癌、肺癌、肝癌、肾癌、乳腺癌、宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、肠癌、胃癌、膀胱癌、胰腺癌、前列腺癌、胆管癌、黑色素瘤、骨肉瘤、纤维肉瘤、骨髓瘤、淋巴瘤、血液瘤细胞的增殖抑制作用均显著优于微肽HMMW；且新型多肽HMMW15-51对上述肿瘤细胞的增殖抑制作用呈现剂量依赖关系，说明新型多肽HMMW15-51可以通过抑制上述恶性肿瘤细胞的增殖开发成抗肿瘤药物。

[0197] 实施例6

[0198] 本实施例提供新型多肽HMMW15-51(SEQ ID NO.21)和微肽HMMW对人不同肿瘤细胞转移的抑制作用。

[0199] 将黑色素瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、肺癌细胞接种到transwell小室中，每孔100 μ L，每个小室分别加入不同剂量HMMW微肽和新型多肽HMMW15-51作为给药组，空白组不加药物。然后在transwell下室加入0.6mL含10 % FBS的完全培养基刺激细胞转移，于5 % CO₂，37℃培养48h。弃去孔中培液，甲醇常温固定30min，0.1 % 结晶紫常温染色10min，清水漂净，用棉签擦掉上层未转移细胞，显微镜下观察并选择四个视野拍照计数。按照公式计算转移抑制率(Invasion inhibition rate, MI)：

$$MI(\%) = \left(1 - \frac{N_{test}}{N_{control}}\right) \times 100\%,$$

[0200] 其中，N_{test}为给药组细胞转移数，N_{control}为空白对照组细胞转移数。

[0201] 数据以mean ± SD表示，应用GraphPad Prism 5.0统计软件，两组组间比较采用t-test检验，★代表P<0.05，★★代表P<0.01，★★★代表P<0.001，结果见表57-61及图5-9。

[0202] 表57.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人黑色素瘤A375细胞转移的抑制作用

组别	剂量(μmol/L)	细胞转移数目	抑制率(%)
无	0	590±44.73	—
新型多肽	50	61±30.07	89.63***
	25	316±4.57	46.40***
HMMW	50	371±13.00	37.13***

[0203] 表58.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人宫颈癌Hela细胞转移的抑制作用

组别	剂量(μmol/L)	细胞转移数目	抑制率(%)
无	0	1028±121.65	
新型多肽	50	441±22.66	57.13***
	25	448±7.96	56.40***
HMMW	50	115±20.32	88.80***

[0204] 表59.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人卵巢癌Skvo3细胞转移的抑制作用

组别	剂量($\mu\text{mol/L}$)	细胞转移数目	抑制率(%)
无	0	1138 $\pm$ 202.60	—
新型多肽	50	115 $\pm$ 21.48	89.87***
	25	468 $\pm$ 65.96	58.90***
HMMW	50	118 $\pm$ 26.16	89.60***

[0205] 表60.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人肝癌Hep3B细胞转移的抑制作用

组别	剂量($\mu\text{mol/L}$)	细胞转移数目	抑制率(%)
无	0	1238 $\pm$ 83.12	—
新型多肽	50	50 $\pm$ 28.14	89.65***
	25	583 $\pm$ 75.82	48.90***
HMMW	50	70 $\pm$ 75.82	88.13***

[0206] 表61.新型多肽HMMW15-51和微肽HMMW对人肺癌A549细胞转移的抑制作用

药物	剂量($\mu\text{mol/L}$)	细胞转移数目	抑制率(%)
无	0	623 $\pm$ 29.92	—
新型多肽	50	64 $\pm$ 32.44	89.62***
	25	43 $\pm$ 19.22	92.97***
HMMW	50	33 $\pm$ 20.50	94.57***

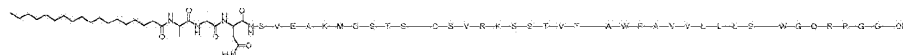
[0207] 由表57-61和附图5-9可知，与空白对照相比，新型多肽HMMW15-51对人黑色素瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、肺癌细胞的转移有显著的抑制作用，说明新型多肽HMMW15-51可以通过抑制上述恶性肿瘤细胞的转移转移开发成抗肿瘤药物。

[0208] 实施例7

[0209] 本实施例提供新型多肽HMMW15-51(SEQ ID NO.21)和微肽HMMW(SEQ ID NO.1)对舌鳞癌细胞CAL27皮下移植瘤模型体内作用的检测。

[0210] (1)大量培养人舌鳞癌CAL27细胞，采用0.25%胰酶溶液消化，终止消化后细胞悬液1000rpm，离心5min，用无血清的DMEM培养基重悬细胞后计数，调整细胞浓度至 5×10^7 个/mL；

- [0211] (2)每只BALB/c裸鼠(订购4~6周龄、体重在14~16g的雌性,在SPF级动物饲养室适应性饲养1周)左侧腋下接种100 μ L对应组别的细胞悬液,注射细胞量为 5×10^6 个;
- [0212] (3)接种后密切观察裸鼠接种部位的肿瘤生长情况,接种后第7天,接种部位出现白色结节,触摸后可于皮下活动,随着肿瘤组织生长,接种部位逐渐形成坚硬瘤块,约14天肿瘤组织平均体积达到80mm³,将BALB/c裸鼠随机分至3组(生理盐水组为空白对照,微肽HMMW及新型多肽HMMW15-51使用量为2.7 μ M/kg),空白组10只,其余每组6只,开始给药时动物体重为20g左右;
- [0213] (4)每隔两日测量并记录移植瘤体积,肿瘤体积(tumor volume, TV)计算公式如下:
- [0214] 肿瘤体积 $=0.5 \times a \times b^2$,其中,a为移植瘤长度(mm),b为移植瘤宽度(mm);
- [0215] (5)给药结束安乐死裸鼠,剥取瘤块称重,计算肿瘤生长抑制率,计算公式为:
- [0216] 肿瘤生长抑制率 $=(1-T/C) \times 100\%$,其中:T为治疗组平均瘤重;C为对照组平均瘤重;
- [0217] 数据以mean $\pm$ SD表示,应用GraphPad Prism 5.0统计软件,两组组间比较采用t-test检验,多组间比较采用One-way Anova, ****代表 $P < 0.0001$ 。
- [0218] 结果如图10所示,与生理盐水对照组相比,微肽HMMW和新型多肽HMMW15-51能够在不同程度显著抑制人舌鳞癌CAL27细胞的体内成瘤能力,而与HMMW相比,HMMW15-51活性没有显著差异。
- [0219] 实施例8
- [0220] 本实施例提供长效化修饰的新型多肽HMMW15-51(SEQ ID NO.21)对不同肿瘤细胞增殖抑制作用的检测。
- [0221] 在本实施例中,长效化修饰包括N端链接18碳脂肪酸,即修饰肽C18-HMMW15-51;和使用小的肽段Ala-Ala-Asn作为linker链接18碳脂肪酸,即C18-L-HMMW15-51。
- [0222] C18-HMMW15-51的结构为:
- $$\text{CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)NSVEARMGSTSCSVRKSSSTVTAFVAVVLLISVGGRRGG-OH}$$
- [0223] C18-L-HMMW15-51的结构为:



- [0224] C18-HMMW15-51和C18-L-HMMW15-51可以通过固相合成法偶联氨基酸，若须偶联脂肪酸，将脂肪酸按照氨基酸的合成方案(固相合成法)偶联到肽树脂上拿到粗品。将粗品裂解后通过制备型高效液相法并冻干拿到目的的化合物。
- [0225] 将人的舌鳞癌细胞CAL27、卵巢癌细胞SKOV3和肝癌细胞Hep3B在37℃、5%CO₂的培养箱中培养至密度90%时，用胰蛋白酶消化收集，用培养液重悬细胞并在显微镜下计数，将细胞浓度调整至约为 1.0×10^5 个/mL，将细胞悬液接种到96孔板中，每孔100 μL，并于37℃，5%CO₂培养箱中培养过夜。待细胞完全贴壁后，加入100 μL浓度分别为100 μM HMMW15-51、C18-HMMW15-51及C18-L-HMMW15-51作为给药组；以不加任何药物的培养液作为阴性对照组。继续孵育48h后，向96孔板中每孔加入10 μL CCK8溶解，在细胞培养箱内继续孵育4小时，450nm下测定吸光值，并计算增殖抑制率。数据以mean ± SD表示，应用GraphPad Prism5.0统计软件，两组组间比较采用t-test检验，多组间比较采用One-way Anova。
- [0226] 结果如图11-13所示，****代表P<0.0001，新型多肽HMMW15-51(SEQ ID NO.21)、修饰肽C18-HMMW15-51和C18-L-HMMW15-51对不同肿瘤细胞增殖抑制作用没有显著差别。
- [0227] 实施例9
- [0228] 本实施例提供新型多肽HMMW15-51(SEQ ID NO.21)、C18-HMMW15-51和C18-L-HMMW15-51对舌鳞癌细胞CAL27皮下移植瘤模型体内作用的检测。
- [0229] (1)大量培养人舌鳞癌细胞CAL27，采用0.25%胰酶溶液消化，终止消化后细胞悬液1000rpm，离心5min，用无血清的DMEM培养基重悬细胞后计数，调整细胞浓度至 5×10^7 个/mL；
- [0230] (2)每只BALB/c裸鼠(订购4~6周龄、体重在14~16g的雌性，在SPF级动物饲养室适应性饲养1周)左侧腋下接种100 μL对应组别的细胞悬液，注射细胞量为 5×10^6 个；

- [0231] (3)接种后密切观察裸鼠接种部位的肿瘤生长情况，接种后第7天，接种部位出现白色结节，触摸后可于皮下活动，随着肿瘤组织生长，接种部位逐渐形成坚硬瘤块，约14天肿瘤组织平均体积达到 80mm^3 ，将BALB/c裸鼠随机分至4组：生理盐水组为空白对照，微肽HMMW15-51(每天静脉注射)、C18-HMMW15-51(隔天皮下注射)及C18-L-HMMW15-51(隔天皮下注射)，使用量为 $2.7\mu\text{M}/\text{kg}$ ，空白组10只，其余每组6只，开始给药时动物体重为20g左右；
- [0232] (4)每隔两日测量并记录移植瘤体积，肿瘤体积(tumor volume, TV)计算公式如下：
- [0233] 肿瘤体积 $=0.5 \times a \times b^2$ ，其中，a为移植瘤长度(mm)，b为移植瘤宽度(mm)；
- [0234] (5)给药21天后安乐死裸鼠，并剥取瘤块称重，计算肿瘤生长抑制率，计算公式为：
- [0235] 肿瘤生长抑制率 $= (1 - T/C) \times 100\%$ ，其中：T为治疗组平均瘤重；C为对照组平均瘤重；
- [0236] 数据以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示，应用GraphPad Prism 5.0统计软件，两组组间比较采用t-test检验，多组间比较采用One-way Anova。
- [0237] 结果见图14所示，★代表 $P < 0.05$ ，★★代表 $P < 0.01$ ，★★★代表 $P < 0.001$ ，与生理盐水对照组相比，微肽HMMW15-51(每天静脉注射)、C18-HMMW15-51(隔天皮下注射)及C18-L-HMMW15-51(隔天皮下注射)能够在不同程度显著抑制人舌鳞癌细胞CAL27的体内成瘤能力，而与HMMW15-51相比，C18-L-HMMW15-51在降低给药次数和优化给药途径后，抑制效果更好。

权利要求书

- [权利要求 1]

一种新型多肽或其衍生物在制备预防或治疗肿瘤药物中的应用，其特征在于，所述新型多肽选自以下任意一种：

(1)：SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的多肽缺失连续3个氨基酸而形成的具有相同或基本相同功能的多肽；

(2)：SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的多肽N端缺失1~34个任意数量的氨基酸而形成的具有相同或基本相同功能的多肽；

(3)：SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列多肽或(1)或(2)经过取代一个或多个氨基酸而形成的具有相同或基本相同功能的多肽。
- [权利要求 2]

根据权利要求1所述的一种新型多肽或其衍生物在制备预防或治疗肿瘤药物中的应用，其特征在于，

所述(1)中，是SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的多肽缺失3N-2、3N-1和3N位的连续3个氨基酸而形成的具有相同或基本相同功能的多肽，其中N=1，2，3，4，5，6，7，8，9，10，11，12，13，14，15，16或17；或

所述(2)中，是SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的多肽N端缺失4、9、14、19、24、29或34个氨基酸而形成的具有相同或基本相同功能的多肽；或

所述(3)中，是SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的第2、3、8、9、10、11、12、13、17、19、20、21、22、25、27、28、30、31、32、40、41、42、43、44、45、48、49或50位氨基酸发生取代。
- [权利要求 3]

根据权利要求2所述的一种新型多肽或其衍生物在制备预防或治疗肿瘤药物中的应用，其特征在于，所述新型多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.2~SEQ ID NO.53任一所示。
- [权利要求 4]

根据权利要求3所述的一种新型多肽或其衍生物在制备预防或治疗肿瘤药物中的应用，其特征在于，所述新型多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.2~SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.6~SEQ ID NO

.10、SEQ ID NO.13、SEQ ID NO.15~SEQ ID NO.17、SEQ ID NO.19~SEQ ID NO.21、SEQ ID NO.26~SEQ ID NO.51、SEQ ID NO.53任一所示。

- [权利要求 5] 根据权利要求1-4任一所述的一种新型多肽或其衍生物在制备预防或治疗肿瘤药物中的应用，其特征在于，所述衍生物包括新型多肽经过修饰的具有相同或基本相同功能的衍生物。
- [权利要求 6] 根据权利要求5所述的一种新型多肽或其衍生物在制备预防或治疗肿瘤药物中的应用，其特征在于，所述修饰包括N端修饰、C端修饰、侧链修饰、氨基酸修饰或骨架修饰中一种或几种。
- [权利要求 7] 根据权利要求6所述的一种新型多肽或其衍生物在制备预防或治疗肿瘤药物中的应用，其特征在于，所述修饰包括聚乙二醇修饰、脂肪酸链接、融合Fc多肽、与人血清白蛋白结合、非天然氨基酸替换、多肽环化、或高端制剂的长效化修饰中一种或多种。
- [权利要求 8] 根据权利要求7所述的一种新型多肽或其衍生物在制备预防或治疗肿瘤药物中的应用，其特征在于，所述修饰包括脂肪酸链接，所述脂肪酸链接包括12~20碳脂肪酸N端链接；或使用linker链接12~20碳脂肪酸。
- [权利要求 9] 根据权利要求8所述的一种新型多肽或其衍生物在制备预防或治疗肿瘤药物中的应用，其特征在于，所述脂肪酸链接包括18碳脂肪酸N端链接；或使用linker链接18碳脂肪酸，所述linker为长度小于5个氨基酸的肽段。
- [权利要求 10] 根据权利要求1-9任一所述的一种新型多肽或其衍生物在制备预防或治疗肿瘤药物中的应用，其特征在于，所述肿瘤包括脑胶质瘤、神经母细胞瘤、头颈癌、食管癌、甲状腺癌、肺癌、肝癌、肾癌、乳腺癌、宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、结肠癌、小肠癌、回盲肠癌、胃癌、膀胱癌、胰腺癌、前列腺癌、胆管癌、黑色素瘤、肉瘤、骨髓瘤、淋巴瘤、白血病中一种或多种。

- [权利要求 11] 根据权利要求10所述的一种新型多肽或其衍生物在制备预防或治疗肿瘤药物中的应用，其特征在于，所述预防或治疗肿瘤包括抑制肿瘤细胞的增殖和/或转移。
- [权利要求 12] 根据权利要求11所述的一种新型多肽或其衍生物在制备预防或治疗肿瘤药物中的应用，其特征在于，所述预防或治疗肿瘤包括抑制肿瘤细胞的增殖，所述肿瘤及细胞包括：
- 所述胶质母细胞瘤的癌细胞包括：U87-MG；
- 所述神经母细胞瘤的癌细胞包括：SH-SY5Y；
- 所述头颈癌的癌细胞包括：口腔表皮样癌细胞KB、喉表皮样癌细胞HEp2、舌鳞癌细胞CAL27、鼻咽癌细胞细胞CNE-2Z中的任意一种；
- 所述食管癌的癌细胞包括：Eca-109和/或TE-13；
- 所述甲状腺癌的癌细胞包括：NPPA87-1；
- 所述肺癌的癌细胞包括：95-D、SK-MES-1、SPC-A1、A549中的任意一种或组合；
- 所述肝癌的癌细胞包括：HCCLM3和/或HepG2；
- 所述肾癌的癌细胞包括：Ketr-3和/或786-O；
- 所述乳腺癌的癌细胞包括：SK-BR-3和/或MDA-MB-231；
- 所述宫颈癌的癌细胞包括：CaSki和/或Hela；
- 所述子宫癌的癌细胞包括：RL-952和/或MS751；
- 所述卵巢癌的癌细胞包括：ES-2和/或SKOV3
- 所述结肠癌的癌细胞包括：HT29和/或SW480；
- 所述小肠癌的癌细胞包括：HIC；
- 所述回盲肠癌的癌细胞包括：HCT-8；
- 所述胃癌的癌细胞包括：MGC-803和/或BGC-823；
- 所述膀胱癌的癌细胞包括：T24和/或EJ；
- 所述胰腺癌的癌细胞包括：ASPC-1和/或PANC-1；
- 所述前列腺癌的癌细胞包括：22RV1和/或PC-3；

所述胆管癌的癌细胞包括：QBC939；

所述黑色素瘤的癌细胞包括：SK-mel-2和/或A375；

所述肉瘤的癌细胞包括：MG63和/或HT-1080；

所述骨髓瘤的癌细胞包括：LP-1；

所述淋巴瘤的癌细胞包括：Raji、RPMI 8226、U937、WSU-DLCL2中的任意一种或组合；

所述白血病的癌细胞包括：CEM/C1、NB4、KG-

1、K562、HL60、Jurkat, Clone E6-1中的任意一种或组合。

[权利要求 13]

根据权利要求11所述的一种新型多肽或其衍生物在制备预防或治疗肿瘤药物中的应用，其特征在于，所述预防或治疗肿瘤包括抑制肿瘤细胞的转移，所述肿瘤及细胞包括：

所述黑色素瘤的癌细胞包括：A375；

所述宫颈癌的癌细胞包括：Hela；

所述卵巢癌的癌细胞包括：Skvo3；

所述肝癌的癌细胞包括：Hep3B；

所述肺癌的癌细胞包括：A549。

[权利要求 14]

一种预防或治疗肿瘤的药物组合物，其特征在于，所述药物组合物至少含有权利要求1-9中任一所述的新型多肽或其衍生物，及药学上可接受的载体，所述肿瘤包括脑胶质瘤、神经母细胞瘤、头颈癌、食管癌、甲状腺癌、肺癌、肝癌、肾癌、乳腺癌、宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、结肠癌、小肠癌、回盲肠癌、胃癌、膀胱癌、胰腺癌、前列腺癌、胆管癌、黑色素瘤、肉瘤、骨髓瘤、淋巴瘤、白血病中一种或多种。