

抗肿瘤多肽 M1-21 的剂型优化

谭拥军[†], 裴超柱, 程浩杰, 卜会铜, 谭桂湘, 邓磊
(湖南大学生物学院, 湖南长沙 410082)

摘要:通过去溶剂化方法,将单体抗肿瘤多肽 M1-21 纳米化,形成 50 nm 左右大小的多肽纳米颗粒(Nano-M1-21).运用动态光散射技术(DLS)和低压透射电镜(TEM)对 Nano-M1-21 进行表征,并进行体外 37 °C 条件下颗粒稳定性测试.运用乳腺癌 MDA-MB-231、MCF-7 和 4T1 细胞验证 Nano-M1-21 的抗肿瘤效果,结果表明 Nano-M1-21 更容易被细胞摄取;相比单体多肽,达到抑制肿瘤细胞的浓度更低.运用小鼠乳腺癌 4T1 细胞活体肿瘤移植模型,发现 Nano-M1-21 展示出良好的抑瘤效果.总之,单体肽 M1-21 经纳米剂型优化后,有利于改善细胞的摄取,显示出更好的抑瘤效果.

关键词: M1-21; Nano-M1-21; 纳米化; 抑瘤效果; 多肽

中图分类号: Q784

文献标志码: A

Desolution Optimization of Anti-tumor Peptide M1-21

TAN Yongjun[†], PEI Chaozhu, CHENG Haojie, BU Huitong, TAN Guixiang, DENG Lei
(College of Biology, Hunan University, Changsha 410082, China)

Abstract: The anti-tumor peptide M1-21 monomer was used to create nanoparticles (Nano-M1-21, about 50 nm) by the desolution method. The characteristics of Nano-M1-21 were determined by the dynamic optical dispersion (DLS) and the low pressure transmission electron microscopy (TEM). The stability of Nano-M1-21 particles was measured in vitro at 37 degrees centigrade. To verify the anti-tumor effects of Nano-M1-21, we used breast cancer MDA-MB-231, MCF-7 and 4T1 cells to show that Nano-M1-21 was easily absorbed by the cells and its tumor inhibitory concentration was lower than that of monomer peptide. With a mouse breast cancer 4T1 cell-grafting tumor model, we found that Nano-M1-21 showed a good suppressive effect on the tumors. In conclusion, compared to the monomer peptide M1-21, the optimized Nano-M1-21 nanoparticles provide benefits to improve the cellular uptake and anti-tumor effects.

Key words: M1-21; Nano-M1-21; nanoization; antitumor effect; peptides

自 1920 年胰岛素疗法问世以来,多肽药物以持续稳定的速度进入临床开发^[1].天然多肽由于较差

的化学和物理稳定性以及较短的血浆半衰期,通常不适合直接用于治疗,已经利用许多化学的修饰的

* 收稿日期:2021-01-06

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81472718), National Natural Science Foundation of China(81472718)

作者简介:谭拥军(1967—),男,湖南长沙人,湖南大学教授,博士生导师

[†] 通信联系人, E-mail: yjtan@hnu.edu.cn

方法,或增强肽的二级结构(即折叠)来防止被蛋白水解酶降解,从而改善多肽药物的体内半衰期^[2-5]。

多肽可自组装成不同的结构,包括纳米管、纳米球、纳米线和纳米纤维^[6]。这些有序纳米结构的形成与各种分子间非共价相互作用的协同效应有关,包括氢键、 π - π 堆积、静电、疏水和范德华相互作用^[7]。自组装球形肽(NPs)直径小于100 nm,由于易被细胞吸收特别适合生物医学应用。NPs还可以在自组装过程中将疏水性药物加载到其内核中,从而使其成为药物递送系统的理想候选药物^[8-9]。较小的颗粒(<100 nm)避免被网状内皮系统(RES)立即清除,而较大的颗粒(>250 nm)通过吞噬作用和肾脏的天然过滤系统迅速清除^[10]。肿瘤血管系统的高渗透性允许大分子和纳米颗粒进入肿瘤间质空间,这种自发性积累或“被动”靶向作用被称为增强的通透性和保留(EPR)效应,EPR效应介导的药物递送目前被认为是将药物引入肿瘤的有效方法,特别是大分子药物和载有药物的药物纳米载体^[11-12]。

本课题组筛选出了一种来源于FOX M1的抗肿瘤多肽 M1-21(专利号:CN108440671B),已经展现出抗肿瘤效果^[13],具体的药理机制已经完成正在投稿中。我们过去溶剂化的方式,使抗肿瘤多肽 M1-21 自组装形成一定大小的纳米颗粒,增强了多肽的二级结构,不易被水解酶快速降解,并且 Nano-M1-21 可通过 EPR 效应在肿瘤组织部位富集,更好地发挥抗肿瘤的效果。

1 材料与方法

1.1 材料

二氯树脂、氨基酸购于希施生物科技有限公司,DMF、PIP、DIEA、HBTU、DCM、TFA、EDT、TIS、无水乙醚、乙腈(色谱级)、无水乙醇、甲醇、异丙醇、吡啶等购于国药集团化学试剂有限公司,DMEM 培养基购于 GIBCO 公司,胎牛血清(FBS)为 Hyclone 公司产品,乳腺癌 MDA-MB-231、MCF-7、4T1 细胞购自 TACC,台盼蓝、FITC、BCA 试剂盒购自生工生物工程有限公司,balb/c 小鼠购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 设置程序进行多肽 M1-21 的合成以及纯化、鉴定、标记

利用全自动多肽合成仪合成多肽 M1-21[图 2(a)],合成的多肽粗品在蛋白纯化仪上使用 C18 柱

反向层析进行纯化,流动相分别是水(0.05%TFA)和乙腈(0.05%TFA),乙腈上升洗脱。先对纯化出的多肽进行质谱定性分析,再用高效液相色谱仪对纯化的多肽 M1-21 进行纯度检测,采用 C18 柱反向层析进行,流动相分别是水(0.05%TFA)和乙腈(0.05%TFA),乙腈上升洗脱,最后软件积分求出峰面积百分比。用过摩尔比的 FITC 对多肽进行标记,FITC 粉末溶于 Py:DMF:DCM=12:7:5 的混合溶液中,再与连有多肽的二氯树脂混合反应 6 h,反应结束后用 DMF、异丙醇、DCM,先后各洗两遍,再用切割液将标记好的多肽切割下来,用 9 倍体积乙醚进行沉淀,冻干。

1.2.2 单体 M1-21 去溶剂化形成 Nano-M1-21 及表征

10 mg 的多肽 M1-21 溶于 1 mL 的 1*PBS 中,取 100 μ L 于反应瓶中,置于磁力加热搅拌器上(600 r/min,25 $^{\circ}$ C)搅拌,以 1 mL/min 的流速加入 4 倍体积的无水乙醇,持续搅拌 20 min,18 000 g 离心收集沉淀,用 PBS 清洗沉淀,去上清,再用 PBS 超声重悬 Nano-M1-21。最后用 BCA 试剂盒测量 Nano-M1-21 的浓度(图 1)。动态光色散(DLS)仪测量纳米颗粒流体动力学直径及其分布。取 10 μ L 乙酸铀染色的 Nano-M1-21 悬浮液滴吸附在碳涂层的 300 目铜网上 5 min,然后用滤纸除去残留的液体,干燥,再进行 TEM 观察。

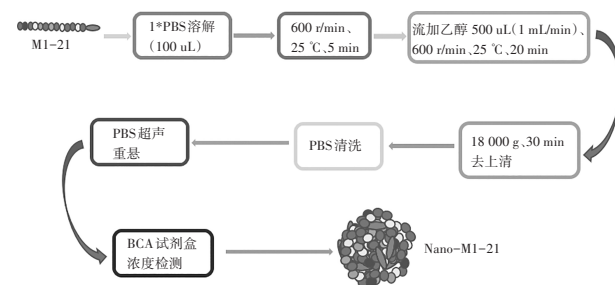


图 1 Nano-M1-21 的制备

Fig.1 Preparation of Nano-M1-21

1.2.3 Nano-M1-21 细胞水平效果验证

将 MCF-7、MDA-MB-231、4T1 乳腺癌细胞铺到 24 孔板中,待细胞贴壁后,按 10 μ M、20 μ M、30 μ M、40 μ M、50 μ M 的浓度分别加入 M1-21、Nano-M1-21,36 h 后去上清加入 0.04% 的台盼蓝溶液处理 3~5 min,去除台盼蓝溶液并用 PBS 清洗两遍,显微镜下拍照,再进行活细胞计数。按照上述方法,将 FITC 标记的 M1-21 与未标记的多肽按 1:9 的比例混合制备带荧光的 Nano-M1-21,按照前面相同的方法测量浓

度以及表征. 再按 $30 \mu\text{M}$ 的浓度加入到 MCF-7, MDA-MB-231 乳腺癌细胞中处理 2 h, 然后观察荧光判断 M1-21、Nano-M1-21 进入细胞的情况.

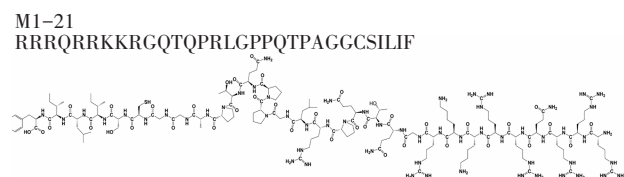
1.2.4 Nano-M1-21 动物水平效果验证

状态较好的 balb/c 小鼠, 年龄达到 6 周后, 皮下接种 5×10^5 个 4T1 乳腺癌细胞建立皮下实体瘤模型. 3 d 后, M1-21、Nano-M1-21 分别以 25 mg/kg 的剂量尾静脉给药, 隔天给药一次, 并对小鼠体重和肿瘤大小进行测量.

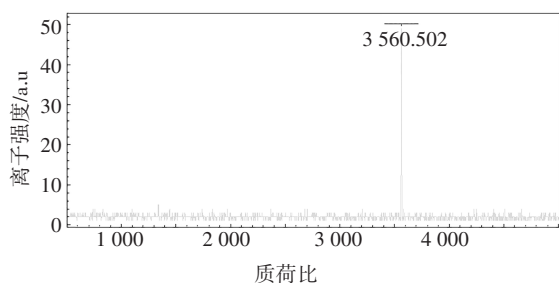
2 结果

2.1 多肽 M1-21 的合成与鉴定

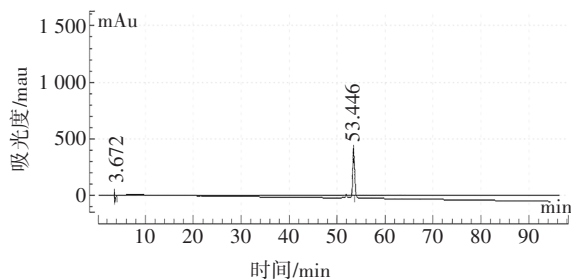
为了检测多肽合成的质量, 我们通过质谱分析多肽 M1-21 [图 2(a)], 质谱结果显示 [图 2(b)] 在 3560 处有明显峰图, 与 M1-21 相对分子质量一致, 说明多肽 M1-21 合成成功, 并且高效液相色谱检测纯化后的 M1-21 浓度高达 96.161% [图 2(c)].



(a) 多肽 M1-21 的序列信息



(b) 多肽 M1-21 的质谱鉴定



(c) 多肽 M1-21 的纯度检测

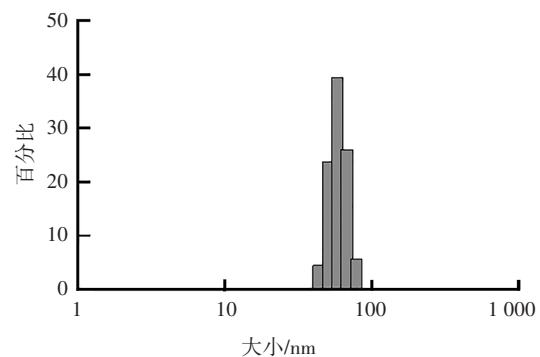
图 2 多肽 M1-21 的鉴定及纯度检测

Fig.2 Identification and purity detection of peptide M1-21

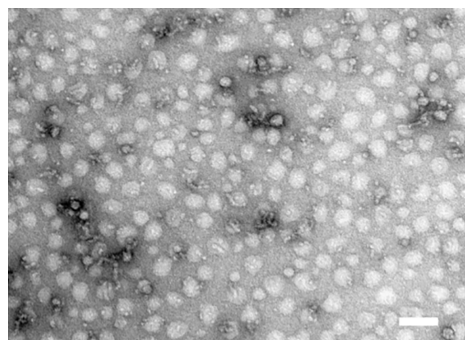
2.2 Nano-M1-21 的制备与表征

单体多肽 M1-21 通过去溶剂化自组装形成纳米颗粒 (图 1), TEM 和 DLS 的结果显示纳米颗粒大小均

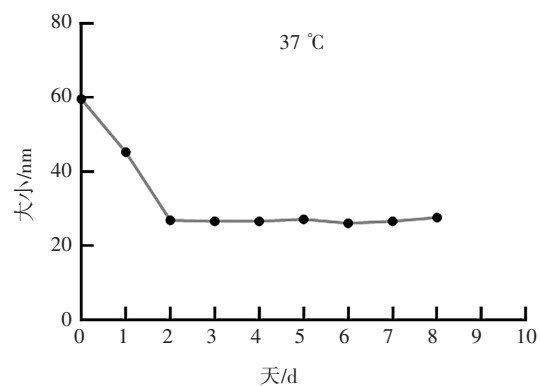
匀地分布在 50 nm 左右 [图 3(a)(b)]. 体外 37°C 稳定性测试 (DLS 检测) 可知, 24 h 后纳米颗粒的大小主要分布在 45 nm 左右, 48 h 后大小主要分布在 27 nm 左右, 8 d 后纳米颗粒大小一直维持在 27 nm 左右 [图 3(c)], 说明纳米颗粒在 37°C 下具有比较好的稳定性, 不会完全解聚为单体.



(a) Nano-M1-21 通过 DLS 测得粒径大小分布



(b) Nano-M1-21 的 TEM 图 (标尺: 100 nm)



(c) Nano-M1-21 在 37°C 条件下的大小 (以占比最多的粒径为标准) 随时间的变化

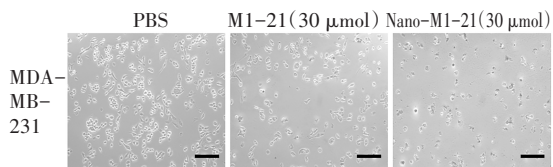
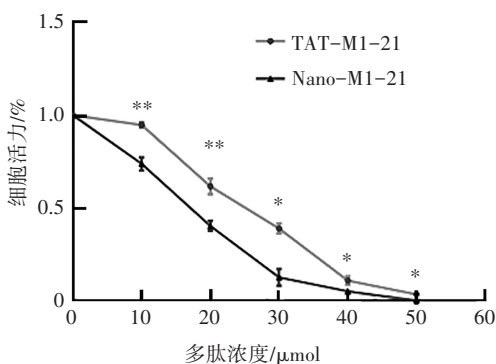
图 3 Nano-M1-21 的表征

Fig.3 characterization of Nano-M1-21

2.3 细胞水平上 Nano-M1-21 能更好地抑制肿瘤细胞的活力

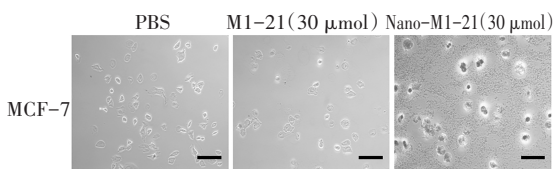
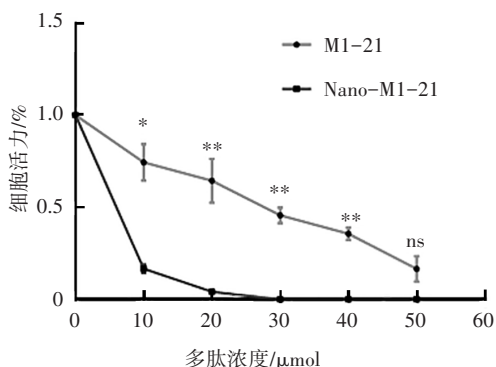
为了验证 Nano-M1-21 的效果, 在 MDA-MB-231、MCF-7、4T1 乳腺癌细胞中, 将 M1-21 和 Nano-M1-21 按浓度梯度分别加入这三种肿瘤细胞中, 36 h

后,用台盼蓝染色后活细胞计数发现,Nano-M1-21 达到和 M1-21 单体多肽相同的效果所需的量更少. 在 MDA-MB-231、MCF-7 和 4T1 细胞中,相对于 M1-21,Nano-M1-21 的 IC50 分别减少 1.53 倍、3.37 倍以及 1.5 倍(见图 4).



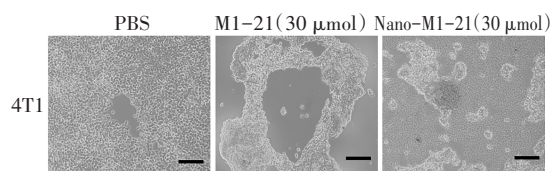
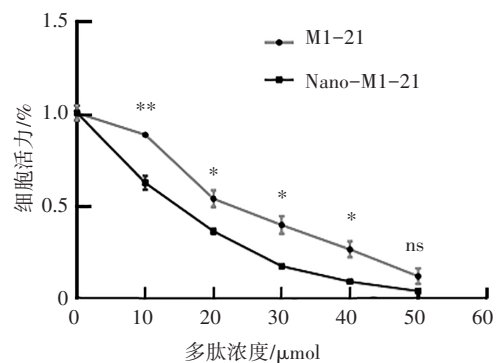
台盼蓝染色进行活细胞计数(标尺:100 μm)

(a)在 MDA-MB-231 乳腺癌细胞中抑制肿瘤细胞活力的效果



台盼蓝染色进行活细胞计数(标尺:100 μm)

(b)在 MCF-7 乳腺癌细胞中抑制肿瘤细胞活力的效果



台盼蓝染色进行活细胞计数(标尺:100 μm)

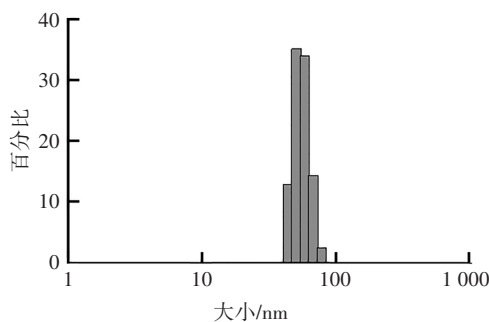
(c)在 4T1 乳腺癌细胞中抑制肿瘤细胞活力的效果

图 4 Nano-M1-21 能更好地抑制肿瘤细胞的活力

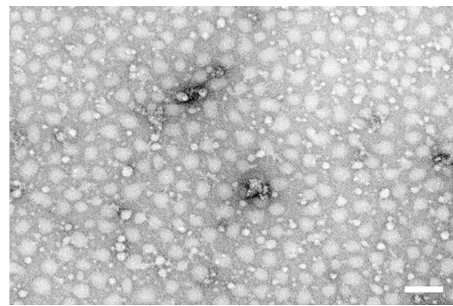
Fig4 Nano-M1-21 can better inhibit the activity of tumor cells

2.4 Nano-M1-21 更易于被细胞吸收

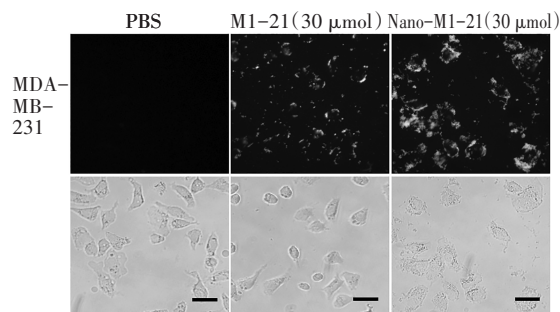
按照前面去溶剂的方法,将 FITC 标记的 M1-21 和未标记的 M1-21 按 1:9 混合制备了带荧光的 Nano-M1-21,DLS 和 TEM 表征发现,颗粒大小均匀分布在 50 nm 左右[图 5(a)(b)]. 在 MDA-MB-231、MCF-7 乳腺癌细胞中,荧光图[图 5(c)(d)]可知 Nano-M1-21 更易于被细胞吸收,可能由于纳米化后改变了细胞对 M1-21 的摄取方式,明场细胞图发现 Nano-M1-21 组的细胞形态发生了明显改变.



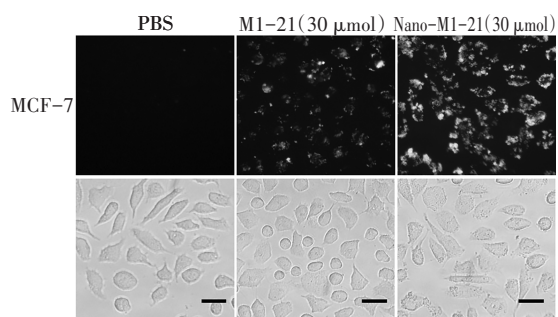
(a)按照相同方法将 FITC 标记的 M1-21 和未标记的混合制备 Nano-M1-21,通过 DLS 测得粒径大小分布



(b)带 FITC 标记的 Nano-M1-21TEM 图(标尺:100 nm)



(c)在 MDA-MB-231 细胞中,Nano-M1-21 与 M1-21 细胞吸收情况(标尺:20 μm)



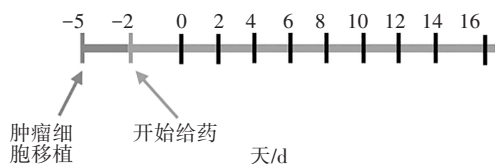
(d)在MCF-7细胞中,Nano-M1-21与M1-21细胞吸收情况(标尺:20 μm)

图5 Nano-M1-21 更易于被肿瘤细胞吸收

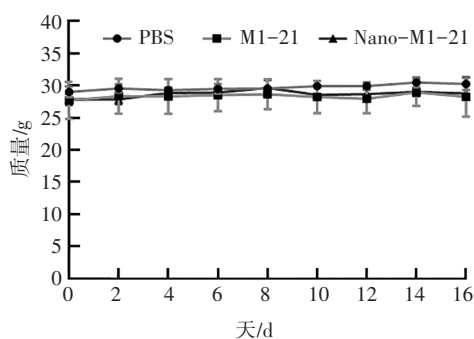
Fig5 Nano-M1-21 is more easily absorbed by tumor cells

2.5 Nano-M1-21 明显抑制 balb/c 荷瘤小鼠肿瘤的生长

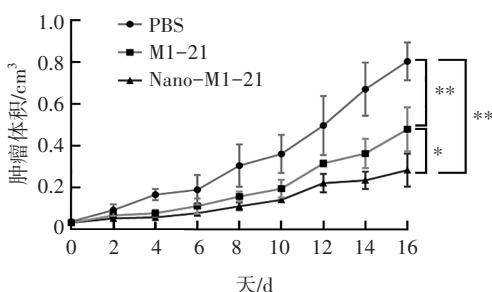
在 balb/c 小鼠皮下实体瘤模型中,通过隔天尾静脉给药进行治疗,给药过程中[图 6(a)],小鼠体重没有发生明显变化[图 6(b)],Nano-M1-21 比起 M1-21 单体肽展现出更好的抑瘤效果[图 6(c)],治疗结束后,将小鼠处死,取出每组皮下瘤观察大小[图 6(d)]并称量瘤子的质量[图 6(e)],这些结果都表明,在小鼠肿瘤模型中 Nano-M1-21 有更好的抑瘤效果。



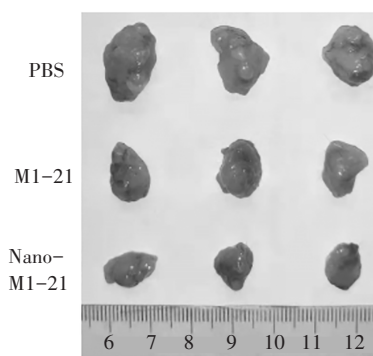
(a)Balb/c 荷瘤小鼠的给药治疗过程



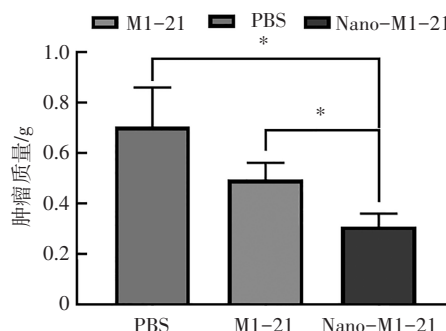
(b)Balb/c 荷瘤小鼠治疗过程中小鼠体重的变化



(c)Balb/c 荷瘤小鼠治疗过程中肿瘤体积大小的变化



(d)每组小鼠肿瘤的最终大小



(e)每组小鼠肿瘤的最终质量

图6 Nano-M1-21 在小鼠肿瘤模型中有比较好的抑瘤效果

Fig6 Nano-M1-21 has a better anti-tumor effect in mouse tumor models

3 讨论

肽类药物给药后可能受到蛋白水解酶降解或诱导免疫反应而受到限制,所以将多肽充分递送至肿瘤部位是具有挑战性的^[14].因此,部分肽类药物需要改进其递送方式以成功开发出抗癌肽.药物递送研究的基本目标是通过改善治疗分子的递送来提高治疗分子的功效.制剂、控释、递送途径和保存期限的改进大大提高了治疗效果^[15-19].纳米颗粒已被用于改善小分子抗癌药(例如阿霉素和紫杉醇)的药代动力学特性和治疗效果^[20].通过这种方式,纳米颗粒具有通过增强渗透和保留(EPR)效应在肿瘤微环境中维持药物暴露的能力^[21].另外,可以用与肿瘤细胞表面特异性的靶标结合的配体来修饰纳米颗粒^[22],从而达到抗癌药物靶向肿瘤治疗的效果。

因此,我们在具有抗肿瘤效果的多肽 M1-21 的基础上,通过去溶剂化的方式,使单体多肽分子间在疏水力的相互作用下自组装形成 50 nm 左右的多肽纳米颗粒.纳米化后,细胞对颗粒物质进行胞吞,纳米颗粒的大小会影响它与细胞膜的相互作用,并最终影响细胞内吸收,直径约 50 nm 的纳米颗粒通常更容易被细胞吸收^[23],因此 M1-21 单体多肽通过纳

米化后易于被细胞吸收,改善了多肽对于肿瘤的抑制效果.而自组装方法可用于治疗性肽药物的剂型改造,以改善其稳定性和治疗活性,从而开发无载体的药物递送系统.在本次研究中,Nano-M1-21在小鼠肿瘤模型中取得了比较好的抗肿瘤活性,但Nano-M1-21通过EPR效应在肿瘤部位的富集以及延长其代谢周期还需进一步验证.除了通过M1-21本身自组装形成纳米颗粒完成递送外,还可尝试其他可自组装的两亲性材料(脂质体等)来完成多肽M1-21的递送,这两种方法往往只是EPR效应的被动靶向.想要取得更好的靶向效果,可以考虑采用主动靶向的策略,在纳米粒子表面直接修饰与肿瘤细胞表达的受体定向结合的配体(iRGD)来靶向肿瘤细胞.因此,多肽M1-21可尝试结合被动靶向和主动靶向的优化策略,达到更好的抑瘤效果.

最后,多肽在自组装过程中可将疏水性药物(紫杉醇,阿霉素)载入其疏水内核^[9],那么我们的多肽M1-21成为药物递送系统的理想候选药物的同时也可联合其他药物共同治疗肿瘤.一种重组蛋白(四聚体M2e)可通过去溶剂化先形成纳米粒子核心,然后在其表面交联抗原肽(HA),这种纳米颗粒疫苗可诱导持久且强大的免疫力^[24],所以Nano-M1-21可成为有效抗原的载体,进入体内关键区域诱导免疫反应.

参考文献

- [1] LAU J L, DUNN M K. Therapeutic peptides: historical perspectives, current development trends, and future directions[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2018, 26(10): 2700-2707.
- [2] LEE A C L, HARRIS J L, KHANNA K K, *et al.* A comprehensive review on current advances in peptide drug development and design[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(10): 2383.
- [3] TIMMERMAN P, PUIJK W C, MELOEN R H. Functional reconstruction and synthetic mimicry of a conformational epitope using CLIPS™ technology[J]. *Journal of Molecular Recognition*, 2007, 20(5): 283-299.
- [4] HOUSTON M E Jr, CAMPBELL A P, LIX B, *et al.* Lactam bridge stabilization of alpha-helices: the role of hydrophobicity in controlling dimeric versus monomeric alpha-helices[J]. *Biochemistry*, 1996, 35(31): 10041-10050.
- [5] SIM S, KIM Y, KIM T, *et al.* Directional assembly of α -helical peptides induced by cyclization[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(50): 20270-20272.
- [6] WANG J, LIU K, XING R R, *et al.* Peptide self-assembly: thermodynamics and kinetics[J]. *Chemical Society Reviews*, 2016, 45(20): 5589-5604.
- [7] WHITESIDES G M, GRZYBOWSKI B. Self-assembly at all scales[J]. *Science*, 2002, 295(5564): 2418-2421.
- [8] CHAN K H, LEE W H, ZHUO S M, *et al.* Harnessing supramolecular peptide nanotechnology in biomedical applications[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2017, 12: 1171-1182.
- [9] DE BRUYN OUBOTER D, SCHUSTER T, SHANKER V, *et al.* Multicompartment micelle-structured peptide nanoparticles: a new biocompatible gene- and drug-delivery tool[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2014, 102(4): 1155-1163.
- [10] UN K, SAKAI-KATO K, OSHIMA Y, *et al.* Intracellular trafficking mechanism, from intracellular uptake to extracellular efflux, for phospholipid/cholesterol liposomes[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(32): 8131-8141.
- [11] MAEDA H, WU J, SAWA T, *et al.* Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review[J]. *Journal of Controlled Release*, 2000, 65(1/2): 271-284.
- [12] MAEDA H, SAWA T, KONNO T. Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS[J]. *Journal of Controlled Release*, 2001, 74(1/2/3): 47-61.
- [13] 谭拥军, 张振旺, 余景卫. 一种来源于FoxM1蛋白的抗肿瘤多肽: 中国专利. CN108440671B[P]. 2020-03-06.
TAN Y J, ZHANG Z W, YU J W. An anti-tumor peptide derived from FOXM1 protein: CN108440671B, 2020-03-06 [P]. 2020-03-06. (In Chinese)
- [14] TALMADGE J E. Pharmacodynamic aspects of peptide administration biological response modifiers[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1998, 33(3): 241-252.
- [15] SAHA R N, VASANTHAKUMAR S, BENDE G, *et al.* Nanoparticulate drug delivery systems for cancer chemotherapy[J]. *Molecular Membrane Biology*, 2010, 27(7): 215-231.
- [16] LIM S B, BANERJEE A, ÖNYÜKSEL H. Improvement of drug safety by the use of lipid-based nanocarriers[J]. *Journal of Controlled Release*, 2012, 163(1): 34-45.
- [17] SANNA V, ROGGIO A M, SILJANI S, *et al.* Development of novel cationic chitosan-and anionic alginate-coated poly(D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles for controlled release and light protection of resveratrol[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2012, 7: 5501-5516.
- [18] IBRAHIM B M, PARK S, HAN B, *et al.* A strategy to deliver genes to cystic fibrosis lungs: a battle with environment[J]. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 2011, 155(2): 289-295.
- [19] KOVACEVIC A, SAVIC S, VULETA G, *et al.* Polyhydroxy surfactants for the formulation of lipid nanoparticles (SLN and NLC): effects on size, physical stability and particle matrix structure[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2011, 406(1/2): 163-172.
- [20] KRATZ F, WARNECKE A. Finding the optimal balance: challenges of improving conventional cancer chemotherapy using suitable combinations with nano-sized drug delivery systems[J]. *Journal of Controlled Release*, 2012, 164(2): 221-235.
- [21] MANZOOR A A, LINDNER L H, LANDON C D, *et al.* Overcoming limitations in nanoparticle drug delivery: triggered, intravascular release to improve drug penetration into tumors[J]. *Cancer Research*, 2012, 72(21): 5566-5575.
- [22] KAMALY N, XIAO Z Y, VALENCIA P M, *et al.* Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation[J]. *Chemical Society Reviews*, 2012, 41(7): 2971-3010.
- [23] KUMARI A, YADAV S K. Cellular interactions of therapeutically delivered nanoparticles[J]. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2011, 8(2): 141-151.
- [24] DENG L, MOHAN T, CHANG T Z, *et al.* Double-layered protein nanoparticles induce broad protection against divergent influenza A viruses[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 359.