抗肿瘤多肽 GE11 及其应用研究进展

谭祖稳, 吴梦雪, 黄鑫, 段东

(重庆医科大学附属第一医院, 重庆 400016)

摘要:自肿瘤靶向治疗成为手术、化疗和放疗等方法外的又一新的抗癌策略,国内外出现了多种靶向药物。较 EGFR-TKI、单克隆抗体,多肽具有对靶蛋白亲和性高、分子量小、免疫原性低、易于合成和修饰等优点,其中,小分子多肽 GE11 的应用最为广泛。GE11 可以特异性结合并作用于高表达 EGFR 的肿瘤组织,与肿瘤生长转移相关的信号转导分子相互作用,从而达到显像或者治疗目的。全文就抗肿瘤多肽 GE11 的作用机制、合成方法、临床科研中的应用进展等进行概述。

关键词:靶向治疗;小分子多肽;GE11;EGFR

中图分类号:R73 文献标识码:A 文章编号:1671-170X(2019)10-0900-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2019.10.B010

Research Advances on Antineoplastic Peptide GE11 and Its Application

TAN Zu-wen, WU Meng-xue, HUANG Xin, DUAN Dong

(First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Since tumor targeting therapy became a new anticancer strategy, a variety of targeted drugs have developed at home and abroad. Compared with EGFR-TKI and monoclonal antibodies, peptides have the advantages of high affinity to target protein, low molecular weight, low immunogenicity, and they are also easy to be synthesized and modified. Among them, the small molecular peptide GE11 is most widely used. GE11 can specifically bind on tumor tissues with high expression of EGFR, and interact with signal transduction molecules related to tumor growth and metastasis, which can be used for cancer imaging or therapy. The progress on the mechanism, synthetic method, clinical application of antineoplastic peptide GE11 is summarized in this article.

Subject words: targeting therapy; small molecular peptide; GE11; EGFR

近年,医学研究者开始将靶向药物引入肿瘤的诊治中,利用靶向药物中的小分子多肽对肿瘤实现无创条件下监视其生长状况及实施靶向治疗,为肿瘤的诊治问题研究提供了新的方向和思路。鉴于亲和性高、分子量小、免疫原性低、易合成、副作用低等优点,小分子多肽在研究中被广泛应用并取得了一定的成效。目前,基于抗体和配体的肿瘤靶向肽药物层出不穷。本文就抗高表达 EGFR 肿瘤细胞的小分子多肽 GE11 进行综述。

1 高表达 EGFR 肿瘤及小分子多肽 GE11

绝大多数肿瘤细胞均高表达表皮生长因子受体(EGFR)。EGFR 是原癌基因 c-erbB1 的表达产物,来自表皮生长因子受体(HER)家族。HER 家族在细胞生理过程中发挥重要调节作用。EGFR 广泛分布于人体各种细胞表面,其信号通路可以调节细胞的生长、增殖和分化。EGFR 功能缺失或其相关信号通路中关键因子的活性异常,均会引起肿瘤的发生。EGFR 分为三区:胞外配体结合区,跨膜区和胞内激酶区。目前,EGFR 已经成为肿瘤的重要诊治靶点,针对 EGFR 的靶向药物主要包括 EGFR-TKI、单克隆抗体、多肽,如第三代 EGFR-TKI 奥希替尼^[1]等。较 EGFR-TKI、单克隆抗体而言,多肽有其固有的优

基金项目:重庆市自然科学基金计划项目(cstc2014jcyj10012)

通信作者:段东,副主任,主任医师,博士;重庆医科大学附属第一医院核医学科,重庆市渝中区友谊路1号(400016);E-mail: duandong26@163.com

收稿日期:2018-07-12;修回日期:2018-10-13

势,越来越受到研究者的青睐。

小分子多肽 GE11 是一种氨基酸序列为酪氨酸-组氨酸-色氨酸-酪氨酸-甘氨酸-酪氨酸-苏氨酸-脯氨酸-谷氨酰胺-天冬酰胺-缬氨酸-异亮氨酸 (YHWYGYTPQNVI) 的十二肽,由李宗海团队^[2]于 2005 年通过噬菌体肽库技术获得,并发现其对高表达 EGFR 肿瘤细胞具有高度的亲和力。将 GE11 作为靶向药物来针对肿瘤的诊治的研究越来越多。

2 小分子多肽 GE11 的作用机制

增殖、转移等细胞事件的发生是通过细胞内各信号分子的相互作用实现的,可利用肿瘤细胞与正常细胞信号转导途径的差异作为肿瘤靶向治疗的靶点^[3]。细胞无限增殖并转移是肿瘤细胞与正常细胞最大的差异,而肿瘤细胞可以无限增殖和转移的原因之一是 EGFR 过度表达。因此,具有靶向 EGFR 的多肽 GE11 可以靶向 EGFR,进而抑制肿瘤细胞的增殖、转移、促进细胞的凋亡,从而提高肿瘤细胞对化疗的敏感性,达到治疗的目的。

2.1 抑制肿瘤生长和转移

肿瘤细胞无限增殖的主要原因之一是 EGFR 受体的过度表达,人工化学合成技术合成的多肽 GE11 可作用于 EGFR 受体结构域而抑制其活性,有利于控制肿瘤的生长和转移^[2]。其主要作用机制是通过抑制肿瘤细胞内蛋白质和核酸的合成,干扰细胞周期的进行,抑制肿瘤细胞的分裂,从而阻止肿瘤细胞的无限增殖。研究表明,1 μ g/ml 的 GE11 多肽对 SMMC-7721 细胞的促有丝分裂作用约为 10%,而且增加溶度对这种作用没有明显影响^[2]。

2.2 促进肿瘤细胞凋亡

研究表明,非小细胞肺癌中 80%~90% 的肿瘤细胞过表达 EGFR^[4],抗肿瘤多肽 GE11 作用于 EGFR 受体,可以直接诱导肿瘤细胞凋亡,但其促进细胞凋亡的机制尚不明确。

2.3 提高肿瘤细胞对放疗敏感性

近年来有研究发现,多肽 GE11 耦联放射性核素后,以脏器内外或正常组织与病变组织之间对放射性药物摄取的差别为基础,利用显像仪器可以获得脏器或者病变的影像^[5]。也有研究发现,放射性核素可以直接作用于肿瘤细胞,对肿瘤造成杀伤作用。

3 肿瘤多肽 GE11 的来源及合成

3.1 利用噬菌体展示技术获得 GE11

多肽的获取方法主要包括天然活性肽分离提取、食物蛋白质水解制取、化学合成、基因重组法制取,随着 DNA 重组技术制取多肽多肽方法的日益成熟,于 2005 年,顺键人、李宗海团队通过以 EGFR 为靶点,利用噬菌体展示随机 12 肽库进行筛选。通过多轮筛选后,对随机挑选的 12 肽进行克隆测序,获得展示 GE11 (YHWYGYTPQNVIA) 多肽的噬菌体 Phage-GE11。

3.2 GE11 靶向性的研究

筛选得到多肽 GE11 后,该团队通过噬菌体回收实验证实 Phage-GE11 不仅可以和 EGFR 有效结合,而且可以被 EGF 和 GE11 多肽所竞争抑制。免疫组化结合显示 Phage-GE11 可以和高表达 EGFR 的细胞 SMMC-7721、NCI-H460 结合,但是和 K-562 细胞系(EGFR 表达阴性)没有结合^[6]。用双功能交联剂分别将 GE11 [接头序列为 (GGGGS)₃] 和聚乙烯亚胺 (PEI) 结合得到共价复合物 gPEI,随后将编码荧光素酶报告基因的质粒 pGL3 包裹在其内,得到复合物 gPEI/pGL3,粒径测序显示 gPEI/pGL3 的粒径基本上在 120nm 左右,gPEI/pGL3 与 PEI/pGL3 在 SMMC-7721 细胞中的体外基因转导效率基本一致。但在它们均加入过量的游离 GE11 多肽后,gPEI/pGL3 较 PEI/pGL3 的转导效率明显下降。体内实验显示 gPEI 导入系统能有效的将报告基因导入到高表达 EGFR 的 SMMC-7721 细胞及其裸鼠种植瘤^[7]。在此基础上,该团队于 2008 年应用亲和毛细管电泳 (ACE) 分析方法,对表皮生长因子受体 (EGFR) 和多肽配体 GE11 之间的结合能力进行分析,结果显示两者之间存在特异性相互作用,表明 GE11 与 EGFR 可以特异性结合^[8]。

3.3 GE11 多肽的理化性质及特性

目前,国内外学者对 GE11 多肽的理化性质及特性的研究取得了较多进展。李宗海等^[6]、王海等^[8]于 2012 年先将 GE11 和 LyP1 两种靶向蛋白分别与荧光靶向蛋白在不同位置融合表达,然后将纯化后的蛋白加入 SMMC-7721 肝癌细胞株培养液中,接着用荧光显微镜对其进行观察。该研究结果显示多肽与荧光蛋白的羧基端结合后,融合蛋白与细胞有很

强的结合能力;相反,多肽与荧光蛋白的氨基端结合后,它们的结合能力明显降低。这一研究表明不同的融合策略会影响靶向蛋白与细胞之间的结合能力。Song等^[9]则将GE11与脂质体连接,研究结果显示其产物对EGFR具有较高的靶向性。Master等^[10]将GE11与胶束耦联,结果显示产物加速了细胞对药物的摄取。

4 小分子多肽GE11的科研及临床应用

目前,小分子多肽抗肿瘤药物的研发还处于初步阶段,小分子多肽主要有三种形式应用在肿瘤的治疗中:单独使用多肽、多肽疫苗、制成多肽与纳米载体共轭物。国内外针对小分子多肽GE11抗高表达EGFR肿瘤细胞的研究主要包括:单独使用小分子多肽GE11、小分子多肽耦联显像的纳米颗粒、小分子多肽GE11耦联放射性核素、小分子多肽GE11耦联抗肿瘤药物。

4.1 单独使用多肽GE11

目前,单独使用多肽GE11主要应用于EGFR竞争性结合试验相关方面的研究,如李宗海等研究其生物学特征时,足量GE11可以竞争性抑制¹²⁵I-GE11和EGFR的结合。

4.2 耦联放射性核素

放射性核素具有不稳定的原子核,能自发的放出射线,如 α 射线、 β 射线等,利用放射性核素及其标记化合物可以对疾病进行诊治和研究,此种方法在现代医学诊治技术中具有重要的地位。研究者们将GE11耦联到¹²⁵I、^{99m}Tc,其化合物得到的显像效果良好。

4.2.1 用^{99m}Tc进行标记

目前,采用此方法进行标记的研究最具代表性的是蔡佳丽等^[5]研究者。研究者们将GE11与^{99m}Tc、USPIO、RGD结合,并评价其产物在非小细胞肺癌H1299动物模型早期诊断方面的能力。该实验首先制备出具有超磁性的氧化铁纳米材料,然后耦联小分子多肽GE11和RGD,用双功能螯合剂DTPA进行^{99m}Tc标记后,并通过尾静脉注入到荷H1299肿瘤细胞裸鼠的体内,然后进行MRI和SPECT显像。其体内MRI成像结果显示探针在肿瘤部位聚集,T2加权图像效果良好,SPECT成像时,肿瘤部位放射

性摄取明显增高。MRI和SPECT结果表明该探针可以用于裸鼠肿瘤皮下移植瘤的靶向诊断,为其走向临床奠定了基础。

4.2.2 用¹²⁵I进行标记

李宗海团队通过氯氨T法用¹²⁵I标记GE11,荷瘤裸鼠体内实验显示¹²⁵I-GE11可以富集到SMMC-7211肝癌裸鼠(EGFR高表达)的肿瘤组织,肿瘤组织内的放射性活性在其通过尾静脉注射4h后最高。此研究进一步证实了GE11可以特异性靶向EGFR,为我们用¹³¹I标记GE11,以达到治疗的目的提供了思路。

4.3 耦联纳米颗粒

目前纳米颗粒主要包括:超小粒径超顺磁性氧化铁纳米颗粒、阿霉素、Abraxane[®]、Genexol-PM、NK911、NK105、基于脂肪族聚酯、聚碳酸酯和聚氨基酸的聚合物载体等。研究者将GE11与纳米颗粒耦联,以期达到显像和治疗的目的。如Chen等^[11]将GE11小分子多肽耦联在超小粒径超顺磁性氧化铁纳米颗粒表面,用于荷肺腺癌A549细胞裸鼠模型的MRI成像,其T2加权图像对比效果良好。

4.4 耦联抗肿瘤药物

目前已上市的具有肿瘤靶向性药物输送系统中,有单克隆抗体、聚合物、胶束、纳米粒和脂质体。小分子多肽GE11耦联抗肿瘤药物能特异性靶向肿瘤组织,其副作用小。如黄发珍等^[12]将GE11与抗肿瘤药物阿霉素脂质体耦联,为高表达EGFR的非小细胞肺癌的治疗提供了新的思路。该研究首先通过加成反应合成DSPE-PEG2000-GE11,然后包被抗肿瘤药物阿霉素,采用荧光显微镜对产物的摄取进行定性和定量观察,通过近红外活体成像仪动态观察合成产物在肿瘤组织的聚集过程,结果显示阿霉素脂质体表面连接的GE11聚集在裸鼠的肿瘤部位,这表明合成物能有效的靶向肿瘤组织。唐海玲等进一步研究了DSPE-PEG2000-GE11靶向肿瘤的输送过程,为了解影响靶向脂质体药物在肿瘤部位的分布及其杀伤效应的生理屏障因素提供了依据。体内稳定性欠缺、难以在肿瘤部位渗透、肿瘤细胞内吞少、细胞内释放缓慢是传统药物提高治疗效率并走向临床需解决的四大难题。除此之外,探究特异性强、高效率、无毒的基因治疗及诊断治疗一体化多功能纳米平台也是聚合物纳米药物发展的两大趋势。

除了上述的几种耦联药物外,也有研究者尝试耦联生物毒素来进行肿瘤的诊治。

4.5 临床应用

目前,GE11的诊疗效果在肿瘤细胞和动物模型中已得到肯定,这为其走向临床奠定了基础。通过耦联放射性核素、纳米颗粒、抗肿瘤药物及其它生物因子,我们不仅可以提前发现肿瘤细胞,而且可以抑制肿瘤细胞的无限增殖和转移,以达到诊疗的目的。

5 小 结

抗体、多肽、小分子核酸以及小分子化合物等生物分子均可干扰肿瘤细胞的生长、转移,促进肿瘤细胞的凋亡^[13-14]。其中抗体、核酸类药物有成本较高、生物结构复杂、肝毒性较大、细胞吸收困难、易产生免疫刺激等缺点^[15-16]。小分子多肽GE11作为靶向药物的递送系统,在科研中得到了广泛的应用,为EGFR高表达肿瘤患者带来了福音,但是由于其易于降解、细胞膜穿透性低等缺点而限制了其在临床中的应用,期待未来的研究解决这些问题。

参考文献:

- [1] Goss G, Tsai CM, Shepherd FA, et al. Osimertinib for pre-treated EGFR Thr790Met-positive advanced non-small-cell lung cancer (AURA2): a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 study[J]. *Lancet Oncol*, 2016, 14(12): 1643-1652.
- [2] Li Z, Zhao R, Wu X, et al. Identification and characterization of a novel peptide ligand of epidermal growth factor receptor for selective therapeutic delivery[J]. *FASEB J*, 2005, 19(14): 1978-1985.
- [3] Li WL, Wang WZ, Ding MJ, et al. Research progress on the peptide antagonist of cancer and its application[J]. *Chinese Journal of Clinical Pharmacology*, 2014, 30(1): 52-54. [李伟莉, 王闻哲, 丁明建, 等. 抗肿瘤活性肽及其应用研究进展[J]. *中国临床药理学杂志*, 2014, 30(1): 52-54.]
- [4] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016[J]. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67(1): 7-30.
- [5] Cai JL. The synthesis of $\alpha\beta 3$ and EGFR targeted SPECT/MRI probe and its application in the diagnosis of H1299 xenograft tumor[D]. Shanghai: Second Military Medical University, 2016. [蔡佳丽. 基于 $\alpha\beta 3$ 和 EGFR 双靶点 SPECT/MRI 双模态靶向探针的制备及其在肺癌动物模型早期诊断中的应用研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2016.]
- [6] Li ZH. Epidermal growth factor receptor-targeted gene delivery system [D]. Shanghai: Fudan University, 2006. [李宗海. 表皮生长因子受体介导的靶向性基因治疗导入系统[D]. 上海: 复旦大学, 2006.]
- [7] Guo Y, Li ZH, Gu JR, et al. Study on the binding ability of new peptide ligand GE11 and EGFR[J]. *Journal of Instrument Analysis*, 2008, 27(12): 1318-1321. [郭妍, 李宗海, 顾健人, 等. 新多肽配体 GE11 与表皮生长因子受体的结合能力分析[J]. *分析测试学报*, 2008, 27(12): 1318-1321.]
- [8] Wang H, Shi BZ, Yang SL, et al. Location of EGFP tag affects the binding activity of peptide fusions[J]. *China Biotechnology*, 2012, 32(6): 74-78. [王海, 石必枝, 杨胜利, 等. 靶向肽位置影响融合蛋白与细胞结合活性[J]. *中国生物工程杂志*, 2012, 32(6): 74-78.]
- [9] Song S, Liu D, Peng J, et al. Peptide ligand-mediated liposome distribution and targeting to EGFR expressing tumor in vivo[J]. *Int Pharm*, 2008, 363(1-2): 155-161.
- [10] Master AM, Qi Y, Oleinik NL, et al. EGFR-mediated intracellular delivery of Pc 4 nanoformulation for targeted photodynamic therapy of cancer: in vitro studies[J]. *Nanomed-nanotechnol*, 2012, 8(5): 655-664.
- [11] Chen CL, Hu GY, Mei Q, et al. Epidermal growth factor receptor-targeted ultra-small superparamagnetic iron oxide particles for magnetic resonance molecular imaging of lung cancer cells in vitro [J]. *Chin Med J*, 2012, 125(13): 2322-2328.
- [12] Huang FZ, Jiang XC, Hu Q, et al. Preparation and characterization of the ligand peptide-GE11 modified doxorubicin-loaded liposome[J]. *Chinese Journal of New Drugs*, 2013, 22(17): 2086-2089. [黄发珍, 姜晓淳, 胡青, 等. 配体多肽 GE11 修饰的阿霉素靶向脂质体的制备及表征[J]. *中国新药杂志*, 2013, 22(17): 2086-2089.]
- [13] Loud JT, Peters JA, Fraser M, et al. Applications of advances in molecular biology and genomics to clinical cancer care[J]. *Cancer Nurs*, 2002, 25(2): 110-122.
- [14] Hopkins AL, Groom CR. The drug gable genome [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, 1(9): 727-730.
- [15] Goldenberg DM. Advancing role of radiolabeled antibodies in the therapy of cancer[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2003, 52(5): 281-296.
- [16] Tarhini AA, Kirwood JM. Clinical and immunologic basis of interferon therapy in melanoma[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, 1182: 47-57.