



# (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113288871 B

(45) 授权公告日 2022. 09. 16

(21) 申请号 202110589914.6

A61K 31/44 (2006.01)

(22) 申请日 2021.05.28

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 113288871 A

(43) 申请公布日 2021.08.24

(73) 专利权人 华中科技大学

地址 430074 湖北省武汉市洪山区珞喻路  
1037号

(72) 发明人 张志平 涂坤 余育林

(74) 专利代理机构 华中科技大学专利中心

42201

专利代理师 许恒恒

(51) Int. Cl.

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 47/10 (2006.01)

A61K 47/24 (2006.01)

A61K 47/28 (2006.01)

A61K 31/4406 (2006.01)

(56) 对比文件

US 2019185511 A1, 2019.06.20

WO 2018009466 A1, 2018.01.11

WO 2019222272 A1, 2019.11.21

Kun Tu, 等. Combination of Chidamide-Mediated Epigenetic Modulation with Immunotherapy: Boosting Tumor Immunogenicity and Response to PD-1/PD-L1 Blockade. 《ACS Appl. Mater. Interfaces》. 2021, 第13卷 (第33期), 第39003-39017页.

只向成等. 西达本胺治疗乳腺肿瘤的研究进展. 《天津医药》. 2020, (第06期), 第108-112页.

熊戴群等. 西达本胺联合紫杉醇脂质体治疗HER-2阴性晚期乳腺癌的临床研究. 《临床肿瘤学杂志》. 2018, (第08期), 第54-57页.

审查员 马冰

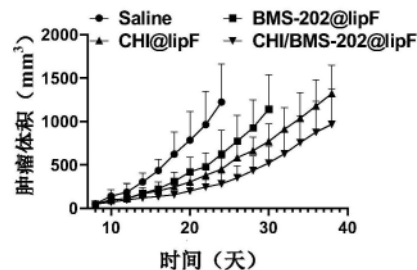
权利要求书2页 说明书8页 附图5页

(54) 发明名称

用于调控表观遗传与免疫检查点的药物组合物脂质体制剂

(57) 摘要

本发明属于抗肿瘤制药技术领域,公开了一种用于调控表观遗传与免疫检查点的药物组合物脂质体制剂,包括药物组合物和负载该药物组合物的脂质体,所述药物组合物包括表观遗传调节剂和免疫检查点抑制剂,该药物组合物脂质体制剂能够调控肿瘤免疫原性和/或抑制肿瘤生长和/或抑制肿瘤转移。本发明利用脂质体负载表观遗传调节剂和免疫检查点抑制剂,相应得到的脂质体制剂能高效包封表观遗传调节剂和免疫检查点抑制剂,靶向肿瘤,缓控释释放,尤其可用于肿瘤免疫联合治疗。



1. 一种用于调控表观遗传与免疫检查点的药物组合物脂质体制剂,其特征在于,包括药物组合物和负载该药物组合物的脂质体,所述药物组合物包括表观遗传调节剂和免疫检查点抑制剂,该药物组合物脂质体制剂能够调控肿瘤免疫原性和/或抑制肿瘤生长和/或抑制肿瘤转移;

其中,所述表观遗传调节剂为西达本胺,所述免疫检查点抑制剂为BMS-202、BMS-1166或BMS-1001。

2. 如权利要求1所述药物组合物脂质体制剂,其特征在于,所述脂质体的制备材料选自普朗尼克、磷脂、聚乙二醇化磷脂和胆固醇。

3. 如权利要求2所述药物组合物脂质体制剂,其特征在于,所述普朗尼克为普朗尼克L61、普朗尼克F68、普朗尼克F127、普朗尼克P123中的至少一种;

所述磷脂为1,2-二油酰基磷脂酰胆碱(DOPC)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)、二棕榈酰基磷脂酰丝氨酸(DPPS)中的至少一种;

所述聚乙二醇化磷脂为二硬脂酰基磷乙醇胺-聚乙二醇1000(DSPE-mPEG1000)、二硬脂酰基磷乙醇胺-聚乙二醇2000(DSPE-mPEG2000)、二硬脂酰基磷乙醇胺-聚乙二醇5000(DSPE-mPEG5000)中的至少一种。

4. 如权利要求1-3任意一项所述用于调控表观遗传与免疫检查点的药物组合物脂质体制剂的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 将含有普朗尼克的水相与含有表观遗传调节剂的有机相混合,超声搅拌得均匀乳液,经减压旋蒸、冷冻干燥处理后,得普朗尼克载药复合物;其中,所述表观遗传调节剂为西达本胺;

(2) 将步骤(1)所述的普朗尼克载药复合物溶于水中,形成水相,加入到含磷脂、聚乙二醇化磷脂、胆固醇和免疫检查点抑制剂的有机相中;然后经超声、减压旋蒸、加水水化、再超声处理,得到载药的脂质体制剂;其中,所述免疫检查点抑制剂为BMS-202、BMS-1166或BMS-1001。

5. 如权利要求4所述制备方法,其特征在于,所述步骤(1)中:

普朗尼克与表观遗传调节剂的质量比为10:1~1:1;

所述水相与有机相的体积比为5:1~1:1;

所述有机相选自二氯甲烷、三氯甲烷、二甲基亚砷和丙酮。

6. 如权利要求5所述制备方法,其特征在于,所述步骤(1)中:

普朗尼克与表观遗传调节剂的质量比为5:1;

所述水相与有机相的体积比为3:1;

所述有机相为二氯甲烷。

7. 如权利要求4所述制备方法,其特征在于,所述步骤(2)中:

各组分按重量份计算,以普朗尼克载药复合物中的表观遗传调节剂药物计1份,则磷脂为2~15份,聚乙二醇化磷脂为1~15份,胆固醇为0.4~4份,免疫检查点抑制剂为0.5~2份;

所述水相与有机相的体积比为0.1:1~1:1。

8. 如权利要求7所述制备方法,其特征在于,所述步骤(2)中:

各组分按重量份计算,以普朗尼克载药复合物中的表观遗传调节剂药物计1份,则磷脂为8份;聚乙二醇化磷脂为6份;胆固醇为2份;免疫检查点抑制剂为1份;  
所述水相与有机相的体积比为0.2:1。

## 用于调控表观遗传与免疫检查点的药物组合物脂质体制剂

### 技术领域

[0001] 本发明属于抗肿瘤制药技术领域,更具体地,涉及一种用于调控表观遗传与免疫检查点的药物组合物脂质体制剂,该药物组合物脂质体制剂尤其能够应用于肿瘤免疫联合治疗。

### 背景技术

[0002] 虽然目前医学已取得高速发展,但癌症仍是威胁人类健康的重大疾病之一,其发病率和死亡率居所有疾病前列。最新统计数据显示,仅2020年中国新发癌症病例数为457万例,癌症死亡病例300万例,每年因癌症对我国造成的经济损失达数千亿元。常见的癌症治疗手段包括放疗、化疗、手术切除及免疫治疗,其中免疫治疗被认为是最有可能治愈癌症的方式。免疫检查点阻断治疗作为免疫治疗的杰出代表,在一部分肿瘤病人中显示出优良且持久的临床疗效。尽管如此,由于肿瘤贫瘠的抗原表达和免疫抑制微环境也常常导致单一免疫治疗临床应答效率不佳,因此探索有效的组合药物治疗策略用于改善肿瘤免疫原性是免疫治疗新的发展方向。

[0003] 近年研究表明,表观遗传改变对肿瘤发生发展起着关键作用,其中很重要的机制在于肿瘤通过改变自身表观遗传水平诱导免疫耐受和免疫逃逸,从而躲避免疫系统攻击,进而也能降低免疫治疗的疗效。而通过药物对表观遗传进行调控,能增加肿瘤相关抗原的表达,促进效应性免疫细胞的浸润,并增强肿瘤细胞对免疫细胞的杀伤敏感性。因此,使肿瘤表观遗传正常化,有望恢复免疫系统对肿瘤的监视,提高免疫治疗的响应性。

[0004] 目前,表观遗传调节剂与免疫检查点抑制剂的组合疗法在临床已取了一定进展,但二者通常采取独立给予游离药物的方式,即增加了患者的给药次数,导致患者依从性降低;游离药物也会非特异地分布到正常组织,引起较大毒副作用。此外,大多表观遗传调节剂为口服给药,因生物利用度低,需要给予较大剂量,即存在较大的潜在毒性,也易导致药物滥用。因此,亟需开发有效的递送技术去提高药物的靶向性和稳定性,以实现表观遗传调节剂与免疫检查点抑制剂高效协同效应。

### 发明内容

[0005] 针对现有技术的缺陷或改进需求,本发明的目的在于提供一种用于调控表观遗传与免疫检查点的药物组合物脂质体制剂,利用脂质体负载表观遗传调节剂和免疫检查点抑制剂,相应得到的脂质体制剂能高效包封表观遗传调节剂和免疫检查点抑制剂,靶向肿瘤,缓控释释放,尤其可用于肿瘤免疫联合治疗。本发明中的脂质体制剂还解决了药物溶解性差难以制成制剂,现有脂质体包封率低、稳定性差、药物易突释和快速泄露等问题,生物相容性好,具有一定靶向性,提高药物在肿瘤的聚集,实现了表观遗传调节剂与免疫检查点抑制剂的协同作用,对原发和转移肿瘤展现出更显著的抑制疗效。本发明药物组合新颖有效,制备方法简单方便,具有良好的临床转化和应用前景。

[0006] 为实现上述目的,按照本发明的一个方面,提供了一种用于调控表观遗传与免疫

检查点的药物组合物脂质体制剂,其特征在于,包括药物组合物和负载该药物组合物的脂质体,所述药物组合物包括表观遗传调节剂和免疫检查点抑制剂,该药物组合物脂质体制剂能够调控肿瘤免疫原性和/或抑制肿瘤生长和/或抑制肿瘤转移。

[0007] 作为本发明的进一步优选,所述表观遗传调节剂为组蛋白去乙酰化酶抑制剂(HDACi)或DNA甲基转移酶抑制(DNMTi);

[0008] 所述免疫检查点抑制剂为PD-1阻断剂或PD-L1阻断剂,包括多肽、单克隆抗体、或化学合成小分子抑制剂。

[0009] 作为本发明的进一步优选,所述脂质体的制备材料选自普朗尼克、磷脂、聚乙二醇化磷脂和胆固醇。

[0010] 作为本发明的进一步优选,所述普朗尼克为普朗尼克L61、普朗尼克F68、普朗尼克F127、普朗尼克P123中的至少一种;

[0011] 所述磷脂为1,2-二油酰基磷脂酰胆碱(DOPC)、二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)、二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)、二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)、二棕榈酰基磷脂酰丝氨酸(DPPS)中的至少一种;

[0012] 所述聚乙二醇化磷脂为二硬脂酰基磷乙醇胺-聚乙二醇1000(DSPE-mPEG1000)、二硬脂酰基磷乙醇胺-聚乙二醇2000(DSPE-mPEG2000)、二硬脂酰基磷乙醇胺-聚乙二醇5000(DSPE-mPEG5000)中的至少一种。

[0013] 按照本发明的另一方面,本发明提供了一种上述用于调控表观遗传与免疫检查点的药物组合物脂质体制剂的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

[0014] (1)将含有普朗尼克的水相与含有表观遗传调节剂的有机相混合,超声搅拌得均匀乳液,经减压旋蒸、冷冻干燥处理后,得普朗尼克载药复合物;

[0015] (2)将步骤(1)所述的普朗尼克载药复合物溶于水中,形成水相,加入到含磷脂、聚乙二醇化磷脂、胆固醇和免疫检查点抑制剂的有机相中;然后经超声、减压旋蒸、加水水化、再超声处理,得到载药的脂质体制剂。

[0016] 作为本发明的进一步优选,所述步骤(1)中:

[0017] 普朗尼克与表观遗传调节剂的质量比为10:1~1:1,优选为5:1;

[0018] 所述表观遗传调节剂选自西达本胺、伏立诺他、罗米地辛、地西他滨和阿扎胞苷,优选为西达本胺;

[0019] 所述水相与有机相的体积比为5:1~1:1,优选为3:1;

[0020] 所述有机相选自二氯甲烷、三氯甲烷、二甲基亚砷和丙酮,优选为二氯甲烷。

[0021] 作为本发明的进一步优选,所述步骤(2)中:

[0022] 各组分按重量份计算,以普朗尼克载药复合物中的表观遗传调节剂药物计1份,则磷脂为2~15份,优选为8份;聚乙二醇化磷脂为1~15份,优选为6份;胆固醇为0.4~4份,优选为2份;免疫检查点抑制剂为0.5~2份,优选为1份;

[0023] 所述免疫检查点抑制剂为PD-1抗体、PD-1多肽、PD-L1抗体、PD-L1多肽、BMS-202、BMS-1166、BMS-1001,优选为BMS-202;

[0024] 所述水相与有机相的体积比为0.1:1~1:1,优选为0.2:1。

[0025] 总体而言,通过本发明所构思的以上技术方案与现有技术相比,主要具备以下的技术优点:

[0026] (1) 本发明提供的表观遗传调节剂与免疫检查点的药物组合策略是一种新颖有效的免疫联合治疗形式,通过脂质体技术对药物进行共封装能实现协同有效的抗肿瘤效应。

[0027] (2) 本发明中的脂质体制剂具有良好的稳定性;解决了药物溶解性差难以制成制剂的问题;对不同理化性质的药物具有高效的载药能力;药物释放可控,可避免传统脂质体制剂药物易突释和快速泄露等问题;制备工艺简便,易于临床转化和扩大生产。本发明中的脂质体制剂可高效负载理化性质不同的药物,例如尤其可负载LogP值在 $-0.3 < \text{LogP} < 4.5$ 范围内的药物。

[0028] (3) 本发明的脂质体制剂具有良好的肿瘤靶向特性,能长时间滞留在肿瘤部位释放药物。

[0029] (4) 本发明的脂质体制剂即可缓慢释放药物,也能降低给药剂量,从而避免高浓度游离药物引起的全身性毒副反应。

[0030] (5) 本发明的脂质体制剂经静脉给药后,富集到肿瘤,释放的表观遗传调节剂可诱导肿瘤免疫原性死亡、促进抗原释放和免疫细胞浸润;而免疫检查点抑制剂能阻断PD-1/PD-L1相互作用,放大T细胞介导的抗肿瘤免疫反应。二者协同增强肿瘤免疫原性和改善免疫抑制微环境,进而显著抑制肿瘤的生长和转移。

[0031] 综上,本发明中的脂质体制剂,尤其可用于肿瘤免疫联合治疗,例如,既可以直接增强肿瘤免疫原性、诱导抗肿瘤免疫反应,同时阻断免疫检查点进一步放大抗肿瘤免疫力,实现协同抑制肿瘤生长和转移。

## 附图说明

[0032] 图1为不同存在形式的西达本胺在水中的溶解度对比图。

[0033] 图2为本发明所述脂质体制剂的粒径、电位、多分散性及形貌表征;其中,图2中的(a)为DLS结果,图2中的(b)为TEM结果,图2中的(b)左下角所示标尺代表 $0.5\mu\text{m}$ 。

[0034] 图3为本发明脂质体制剂在不同介质(去离子水( $\text{ddH}_2\text{O}$ )、磷酸盐缓冲液(PBS)和胎牛血清(FBS))中的稳定性。

[0035] 图4为本发明脂质体制剂的体外药物释放曲线;其中,图4中的(a)对应西达本胺,图4中的(b)对应BMS-202。图4中各个图例所示的数字,代表对应的pH值。

[0036] 图5为本发明脂质体制剂在整体荷瘤动物水平的分布研究图;其中,图5中的(a)为代表性的荧光成像图,图5中的(b)为肿瘤部位荧光强度定量结果。

[0037] 图6为本发明脂质体制剂在离体组织器官水平的分布研究图;其中,图6中的(a)为代表性的荧光成像图,图6中的(b)为荧光强度定量结果。对于图6中的(b),每个时刻下的柱状标记,自左向右均依次对应:心(Heart)、肝(Liver)、脾(Spleen)、肺(Lung)、肾(Kidney)、肿瘤(Tumor)。

[0038] 图7为本发明所述的表观遗传调节剂西达本胺诱导4T1细胞免疫原性死亡效应的研究结果,其中以顺铂(CDDP)作为阴性对照,奥沙利铂(OXA)作为阳性对照。其中,图7中的(a)为钙网蛋白(CRT)阳性的细胞比例,图7中的(b)为药物处理的细胞培养上清中三磷酸腺苷(ATP)的含量,图7中的(c)为药物处理的细胞培养上清中高迁移率族蛋白-1(HMGB-1)的含量。对于图7中的(b)和图7中的(c),CDDP、CHI、OXA对应的柱状标记,自左向右均依次对应: $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $20\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0039] 图8为本发明所述的表观遗传调节剂西达本胺诱导肿瘤细胞表面免疫相关分子的表达情况。其中,图8中的(a)为PD-L1表达,图8中的(b)为MHC I的表达,图8中的(c)为MHC II的表达。

[0040] 图9为本发明所述的表观遗传调节剂西达本胺对BMDC细胞的熟化作用;其中,图9中的(a)为代表性的流式统计图,图9中的(b)为定量结果。

[0041] 图10为本发明所述的检查点抑制剂BMS-202对PD-1/PD-L1相互作用的体外阻断研究图;其中,图10中的(a)为CD3<sup>+</sup> T细胞的增殖情况,图10中的(b)为细胞上清中IFN- $\gamma$ 的含量。

[0042] 图11、图12均对应本发明载药脂质体制剂对4T1原位乳腺癌的抑制情况,其中图11为肿瘤生长曲线,图12为小鼠生存期。

[0043] 图13为本发明所述脂质体制剂对4T1肺转移的抑制情况图。

### 具体实施方式

[0044] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合附图及实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。此外,下面所描述的本发明各个实施方式中所涉及到的技术特征只要彼此之间未构成冲突就可以相互组合。

[0045] 以下实施例所采用的西达本胺(CHI)购自湖南华腾制药有限公司,所采用的普朗尼克F127(F127)购自Sigma-Aldrich公司,所采用的PD-L1小分子抑制剂(BMS-202)购自上海瀚香生物科技有限公司,所采用的DOPC、DSPE-mPEG2000、胆固醇购自西安瑞禧生物科技有限公司。

[0046] 实施例1

[0047] CHI-F127复合物的制备:通过分析CHI的药物性质发现其LogP值在2.5左右,属于不适合脂质体包载的药物类型( $-0.3 < \text{LogP} < 4.5$ )。为了改善CHI的水溶性,我们首先用F127对CHI进行增溶。制备过程如下:用DMSO将CHI配制成浓度20mg/mL的溶液,取50 $\mu$ L加入到1mL氯仿中混匀。将上述有机相加入到3mL F127水溶液(2mg/mL)中,用细胞破碎仪超声3min,功率为250w,超声2s,停歇2s。随后,减压旋蒸除去氯仿,0.22 $\mu$ m过滤除去不溶物,将滤液进行冷冻干燥处理。精准称取适量干燥产物,加水溶解,用超滤管进行超滤处理,取超滤液通过HPLC-UV检测方法测定CHI的含量,以此确定CHI-F127的溶解度和包封情况。CHI原料药按同种处理方法确定药物溶解度。结果如图1,CHI-F127复合物中CHI的溶解度为3.75mg/mL,相比于原型药物的0.00236mg/mL,其水溶性提升了近1600倍。其机理可能是由于F127的表面活性剂作用,形成了“类胶束”结构,使药物的溶解度显著增大。此外,表1结果显示CHI-F127复合物中CHI的包封率达到75%,包载量超过12%,满足后续的脂质体制剂制备。

[0048] 表1. CHI在CHI-F127中的包封率和载药量

	CHI 的包封率(%)	CHI 的载药量(%)
[0049] CHI-F127 复合物	75.8 $\pm$ 3.8	12.6 $\pm$ 2.8

[0050] CHI/BMS-202@LipF的制备:采取逆向蒸发法制备载药脂质体。称取8mg DOPC、7mg

DSPE-mPEG2000、2mg胆固醇和1mg BMS-202,用3mL氯仿溶解。向上述氯仿溶液中加入0.5mL含1.2mg CHI的CHI-F127水溶液,随后用细胞破碎仪超声2min,功率为250w,超声2s,停歇2s,使形成油包水(w/o)初乳。将初乳转入25mL茄形瓶中进行,当初乳由液态转为凝胶态覆于瓶壁时,取下烧瓶,加入1mL PBS在减压旋蒸下开始水化,当瓶壁上固体都脱落至水相中时,取下,水浴超声使团块均匀分散,继续减压旋蒸至有机溶剂完全除去,0.22 $\mu$ m过滤除去大颗粒,得到淡蓝色载药脂质体,命名为CHI/BMS-202@LipF(即负载CHI与BMS-202的脂质体制剂),其他载药脂质体CHI@LipF(即只负载CHI的脂质体制剂)和BMS-202@LipF(即只负载BMS-202的脂质体制剂)制备过程与上述类似,只添加对应的药物制备即可。随后通过HPLC-UV检测方法确定脂质体对CHI和BMS-202的包载效率。结果如表2,增溶后的CHI-F127包载于脂质体亲水内腔,其包封率在85%以上,而BMS-202通过疏水作用嵌入疏水脂质层中,包封率在95%以上。二者在脂质体中的载药量均达到3%,可满足后续的应用需求。

[0051] 表2. CHI和BMS-202在脂质体中的包封率和载药量

	%	CHI 的 包封率	CHI 的 载药量	BMS-202 的包封率	BMS-202 的载药量
[0052] CHI@lipF		90.3 $\pm$ 1.2	3.5 $\pm$ 0.4		
BMS-202@lipF				97.5 $\pm$ 2.5	3.7 $\pm$ 0.2
CHI/BMS-202@lipF		85.3 $\pm$ 2.8	3.0 $\pm$ 0.3	98.3 $\pm$ 3.1	3.4 $\pm$ 0.1

[0053] 进一步对载药脂质体进行理化性质评价。采用透射电子显微镜(TEM)观察脂质体制剂的形貌特征;采用动态光散射粒径仪(DLS)测定脂质体制剂的粒径分布和表面电位,测定温度为25 $^{\circ}$ C,每个样品重复测定5次,连续7天测定脂质体制剂在ddH<sub>2</sub>O、PBS和FBS中的粒径变化以考察其稳定性。结果如图2,脂质体的水合粒径为144.7nm,多分散指数PDI为0.184,表明脂质体粒径均匀分布;表面电位为-31.04mV,有利于提高血液循环中的稳定性和半衰期;TEM结果显示,脂质体近球形,分布均一,在球形边界隐约能看到层状结构,属于脂质体特征,电镜下脂质体的平均粒径在100nm左右,小于DLS的测定值,可能是由于脂质体表面的水化层,导致DLS测定结果偏高;脂质体制剂外观显示出均匀的淡蓝色乳光,表现出良好的纳米胶体外观特征。图3稳定性考察结果显示,在各孵育介质中,脂质体粒径在7天内无显著性改变。这表明载药脂质体制剂无论是体外储存,还是体内应用,都具有较高的稳定性。

#### [0054] 实施例2

[0055] 本发明进一步对实施例1中的载药脂质体制剂进行体外释放研究。将1.5mL含200 $\mu$ g CHI和200 $\mu$ g BMS-202的CHI/BMS-202@LipF脂质体加到透析袋(MWC0,3.5kDa)中,以30mL不同pH(7.4、6.5和5.5)的0.01M磷酸盐缓冲液为外相,置于37 $^{\circ}$ C摇床中进行透析,振荡速度为80rpm。在预设定的时间点,用30mL相同的释放介质更换透析外相,保证透析介质始终处于漏槽状态。实验重复三次。取5mL透析样品进行冷冻干燥,冻干产物加甲醇涡旋超声溶解,12000rpm离心10min后取上清,进行HPLC-UV检测。结果如图4,CHI的释放没有明显的pH依赖性,在24h,其累积释放率在55%左右,而较多报道的载药脂质体一般都具有“突释”和较快



的药物释放。因此推测F127的引入,使CHI包载至脂质体亲水内腔,能延缓药物的释放效率,有利于延长药物在体内的循环半衰期。BMS-202展现出一定的pH依赖性药物释放,这可能是在较低pH条件下,BMS-202中的-NH能质子化,增加了药物的溶解度,促进药物释放。此外,BMS-202相比于CHI表现出更缓慢的释放行为,可能是BMS-202的两亲性结构能嵌入到脂质层中,与疏水脂质结合能力较强,不易从脂质层中释放出来,但这一现象能减少循环递送过程中BMS-202的泄露,有利于减轻对正常组织的毒性和增强抗肿瘤效果。

#### [0056] 实施例3

[0057] 为考察所述脂质体制剂的体内生物分布,首先制备了荧光染料DiR标记的脂质体(DiR@lipF)。随后建立4T1原位肿瘤模型:消化对数生长期的4T1细胞,PBS洗涤两遍,去除残余的血清和胰蛋白酶,用空白1640培养基将4T1细胞稀释至 $2 \times 10^6$ /mL。选取6-8周的Balb/c雌性小鼠,植瘤前一天剔除右腋下的毛发。次日,按 $2 \times 10^5$ /只的密度将100 $\mu$ L 4T1肿瘤细胞注射至右腋下第二对乳房脂肪垫处。当肿瘤体积约300-500mm<sup>3</sup>时,将DiR@LipF以10 $\mu$ g DiR/只的剂量通过尾静脉注射到4T1荷瘤小鼠体内,在预设时间点,通过小动物活体成像仪检测整体动物和主要离体器官的荧光强度。结果如图5,游离DiR注射后,体内荧光信号低,仅在肝脏有微弱的荧光信号,肿瘤部位基本没有,可能是DiR的疏水特性,在血液循环中容易被清除。而DiR@lipF随着时间的推移,在肿瘤部位的荧光信号逐渐增强,48h达到峰值,在72h也能观察到明显的荧光信号。上述结果表明脂质体制剂具有较长的血液循环特性,能长时间不断的向肿瘤部位富集。此外,离体组织器官结果显示(图6),DiR@lipF在肝脏和脾脏仍有较高的荧光信号,这是纳米载体共有的特性。此外,DiR@lipF在肿瘤组织也有较高的富集,趋势与整体动物结果一致。上述结果表明,本发明所述脂质体制剂具有良好的长循环特性和肿瘤靶向能力,有助于发挥增效减毒的作用。

#### [0058] 实施例4

[0059] 将对数生长期的4T1细胞以 $1 \times 10^5$ /孔接种于24孔板,过夜培养后,弃去培养基,更换为含药的空白培养基继续处理细胞24h。随后,分别收集上清和细胞进行相关指标分析,其中细胞与anti-CRT抗体以及荧光标记的二抗孵育,进行流式分析;上清通过试剂盒检测ATP和HMGB-1的含量。结果如图7所示,CHI组和阳性对照组OXA相比于空白组PBS和阴性对照组CDDP将CRT阳性细胞比例上调了近3-5倍;CHI处理后ATP和HMGB-1的释放量也呈浓度依赖的方式增加。上述结果表明,西达本胺能诱导肿瘤细胞免疫原性死亡,有助于引出强大的抗肿瘤免疫原性。

#### [0060] 实施例5

[0061] 将对数生长期的4T1细胞按 $5 \times 10^4$ /孔接种于24孔板中,过夜培养,当细胞融合度达75%左右,用含不同CHI浓度的空白培养基处理细胞24h,随后收集细胞与相关流式抗体孵育并进行流式检测。结果如图8,CHI处理24h后,细胞表面的PD-L1表达显著上调,相比未处理组,提高近1倍。此外,MHCI和MHC II也明显升高,尤其是MHCI,这有利于抗原提呈,以及T细胞对肿瘤细胞的识别、杀伤。综合实施例4和5,表明西达本胺能有效增强肿瘤的免疫原性和对免疫系统杀伤的敏感性,将其与免疫治疗联合是一种有前景的药物组合策略。

#### [0062] 实施例6

[0063] 提取小鼠骨髓来源的树突状细胞(BMDC),培养至第七天后,用含不同浓度的CHI处理BMDC(CHI的浓度分别为0、0.5、1、2 $\mu$ g/mL)。24h后,收集细胞,加入anti-CD11c-APC、anti-

CD86-PE和anti-CD80-FITC流式抗体4℃染色30min,随后通过流式细胞仪进行检测分析。结果如图9,CHI处理未成熟的BMDC后,细胞表面共刺激分子CD80、CD86显著上调,熟化DC (CD80<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>in CD11c<sup>+</sup>cells)的比例呈现浓度依赖性的上调,从未处理组的22%升高至68%,表面CHI具有促DC熟化能力,有助于抗肿瘤免疫反应中的抗原提呈过程。

#### [0064] 实施例7

[0065] 从小鼠脾脏中分离得到小鼠脾淋巴细胞,用含2μg/mL anti-CD28的1640完全培养基将细胞密度稀释至 $1 \times 10^6$ /mL。将细胞培养板提前用10μg/mL的anti-CD3在4℃包被过夜。取0.5mL上述稀释好的细胞悬液加到包被后的24孔细胞培养板中,同时分别加入相应的药物处理。作用72h后,通过流式细胞仪对细胞数进行统计,观察细胞增殖情况。此外,收集细胞培养上清,用ELISA试剂盒检测上清中IFN-γ的含量。如图10所示,未用anti-CD3和anti-CD28活化的脾淋巴细胞,CD3<sup>+</sup>细胞数和IFN-γ分泌水平都较低,基本处于静止的状态,而经过anti-CD3和anti-CD28活化后,CD3<sup>+</sup>细胞数和IFN-γ分泌水平分别有1.2倍和7倍左右的提升,表明T细胞有增殖和活化。随后,我们在抗体活化过程中加入100ng/mL可溶性PD-L1重组蛋白模拟PD-1/PD-L1的相互作用。结果表明,加入PD-L1重组蛋白后,能显著抑制CD3<sup>+</sup>T细胞的增殖和IFN-γ的分泌。而随着BMS-202的加入,能减弱这种抑制效果,这可能是由于BMS-202诱导PD-L1蛋白的二聚化,减轻了PD-1/PD-L1相互作用,从而恢复了T细胞的增殖和活化。综合上述结果和相关文献报道,本发明所述的免疫检查点抑制剂BMS-202能通过诱导PD-L1蛋白的二聚化,阻断PD-1/PD-L1的相互作用,恢复T细胞的增殖和功能,进而促进抗肿瘤免疫。

#### [0066] 实施例8

[0067] 按照实施例1制备得到CHI/BMS-202@lipF脂质体。随后,按照实施例3建立4T1原位乳腺癌模型,当肿瘤体积约为30-50mm<sup>3</sup>时,将荷瘤小鼠随机分为4组,每组7只,分别尾静脉注射PBS、CHI@LipF、BMS-202@LipF和CHI/BMS-202@lipF,CHI和BMS-202的给药剂量分别为5mg/kg和5mg/kg,给药间隔2天,共给药4次。治疗过程中,用游标卡尺监测肿瘤生长情况,并计算肿瘤体积大小,公式为:肿瘤体积(mm<sup>3</sup>)=长(mm)×宽(mm)×宽(mm)/2。长期监测小鼠肿瘤生长和体重变化,当出现小鼠出现体重下降20%、肿瘤体积超过2000mm<sup>3</sup>、单边肿瘤长度超过20mm或小鼠状态明显不佳时,结束对该组小鼠的观察,实验结束后,绘制肿瘤生长和小鼠生存期曲线。结果如图11,saline组展现出快速的肿瘤生长,在第24天,某些小鼠的肿瘤体积接近2000mm<sup>3</sup>,平均肿瘤体积为1240mm<sup>3</sup>。而BMS-202@lipF、CHI@lipF和CHI/BMS-202@lipF在第24天时平均肿瘤体积分别为710mm<sup>3</sup>、514mm<sup>3</sup>和321mm<sup>3</sup>。生存期结果显示(图12),联合组能显著延长荷瘤小鼠的存活率。因此,本发明所述载药脂质体制剂体现了较明显的协同抗肿瘤作用。

#### [0068] 实施例9

[0069] 按照实施例1制备得到CHI/BMS-202@lipF脂质体。随后建立4T1肺转移模型,操作如下:消化对数生长期的4T1细胞,PBS洗涤两遍,去除残余的血清和胰蛋白酶,用PBS将4T1细胞稀释至 $5 \times 10^6$ /mL。选取6-8周的Balb/c雌性健康小鼠,随机分成4组,每组6只。按 $5 \times 10^5$ /只的密度将100μL稀释好的4T1细胞尾静脉注射到小鼠体内,此时记为第0天。次日,按实施例8下的给药方式进行处理,在第16天,处死所有小鼠,取出肺组织,用Bouin's固定液对肺组织进行固定,48h后计数肿瘤结节。结果如图13,saline组有很明显的转移结节,平均

结节数在180个左右,表明肺转移模型成功建立。药物处理后,能不同程度抑制肺转移结节的形成。BMS-202@lipF、CHI@lipF和CHI/BMS-202@lipF的平均肺结节数分别为23、12和8个,分别是saline组的12.7%、6.7%和4.4%。以上结果表明本发明所述脂质体制剂对肿瘤转移也有良好的抑制作用。

[0070] 本领域的技术人员容易理解,以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

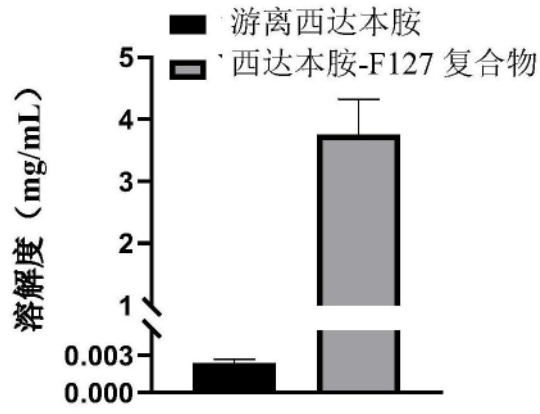


图1

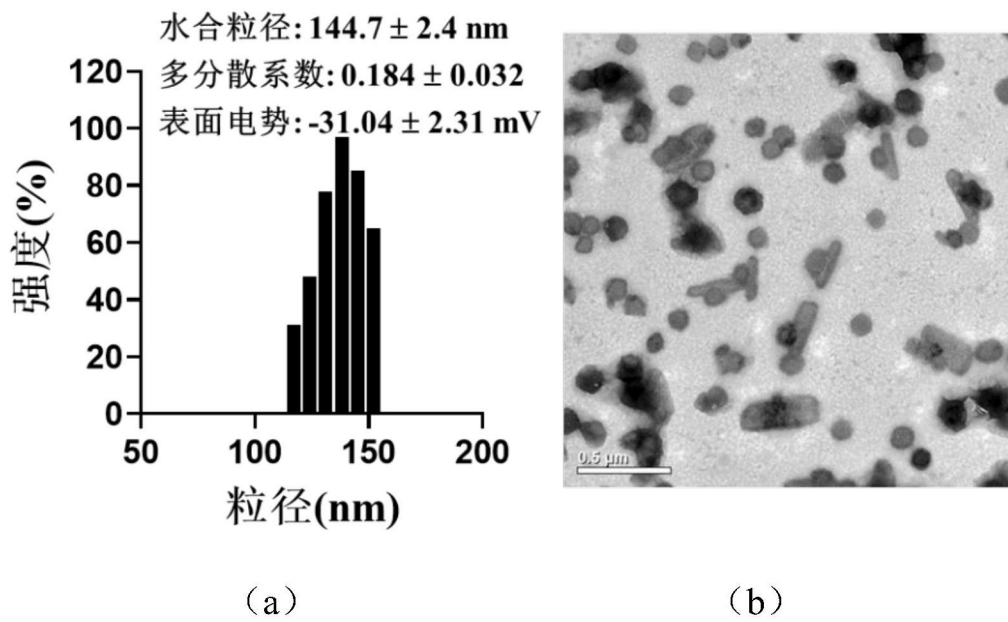


图2

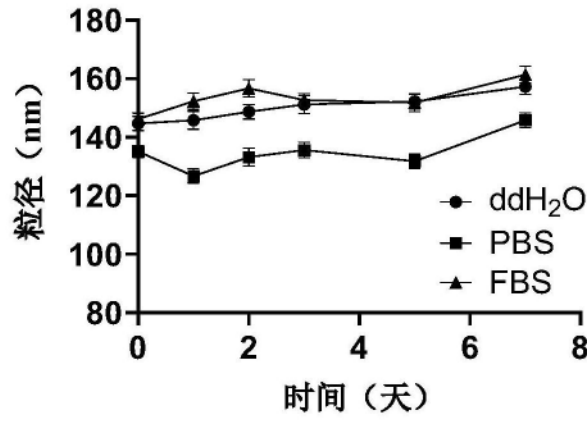


图3

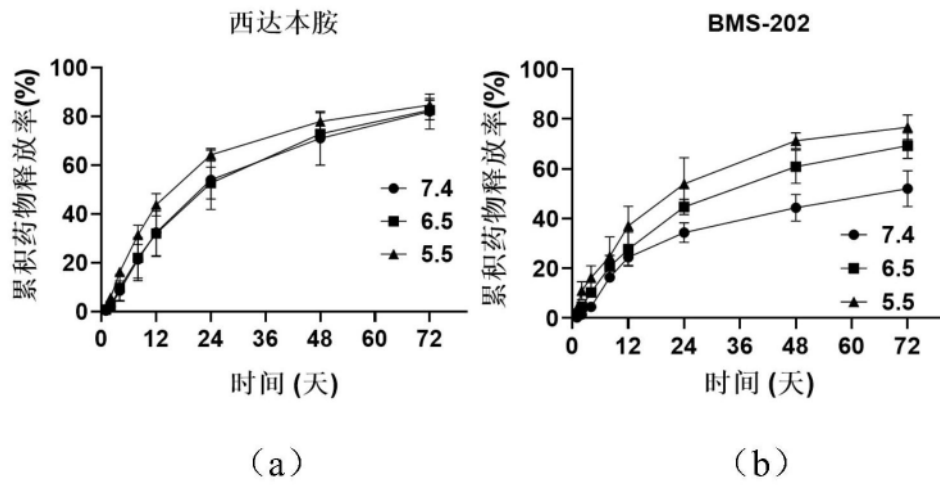


图4

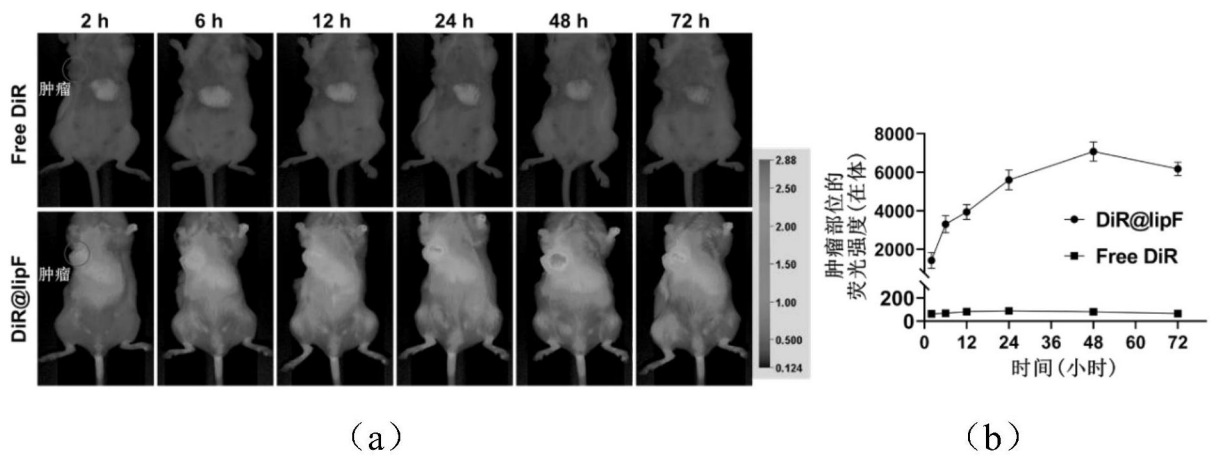


图5

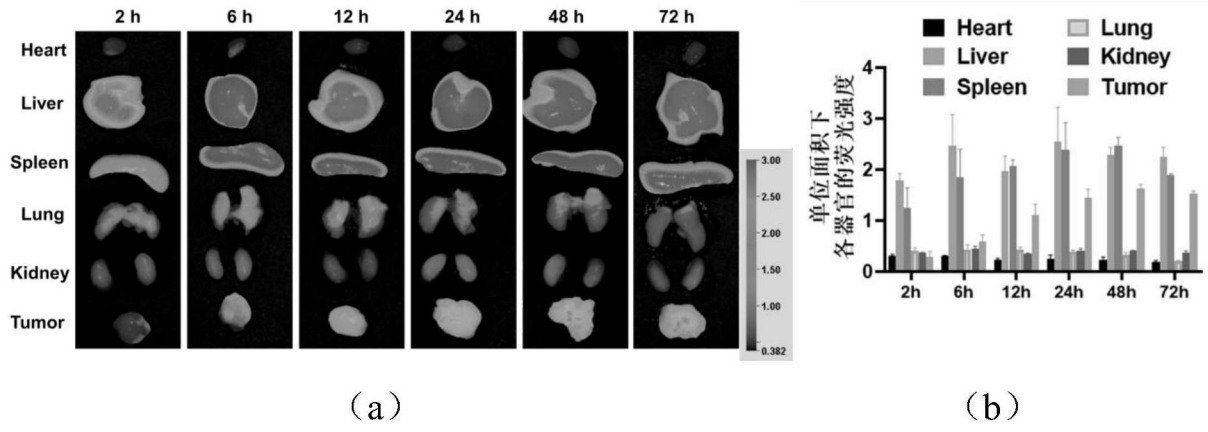


图6

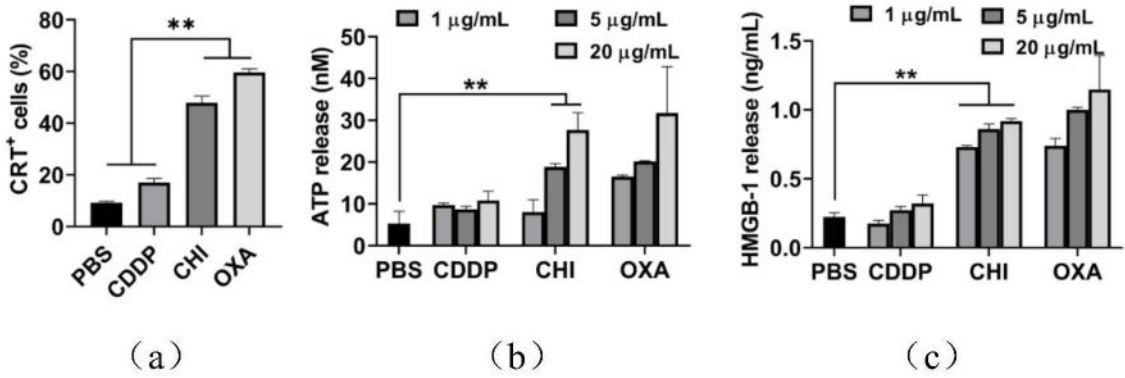


图7

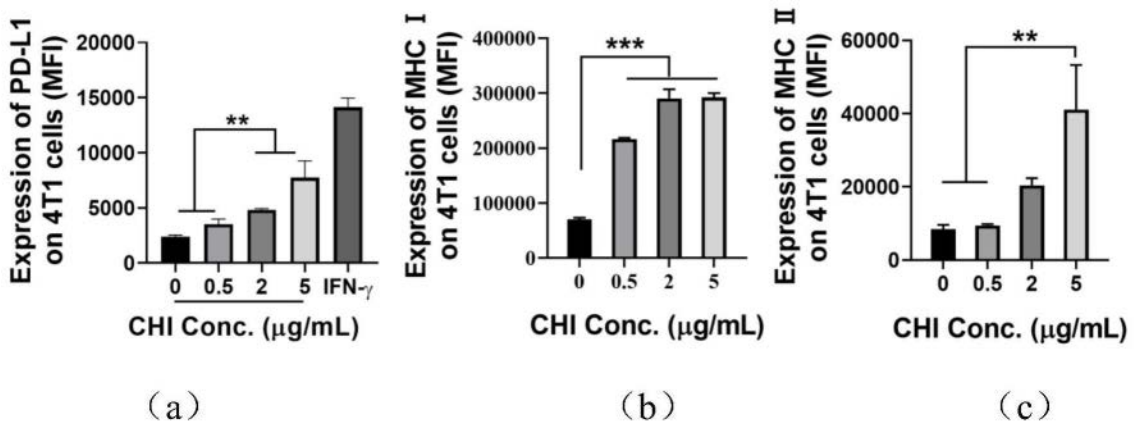


图8

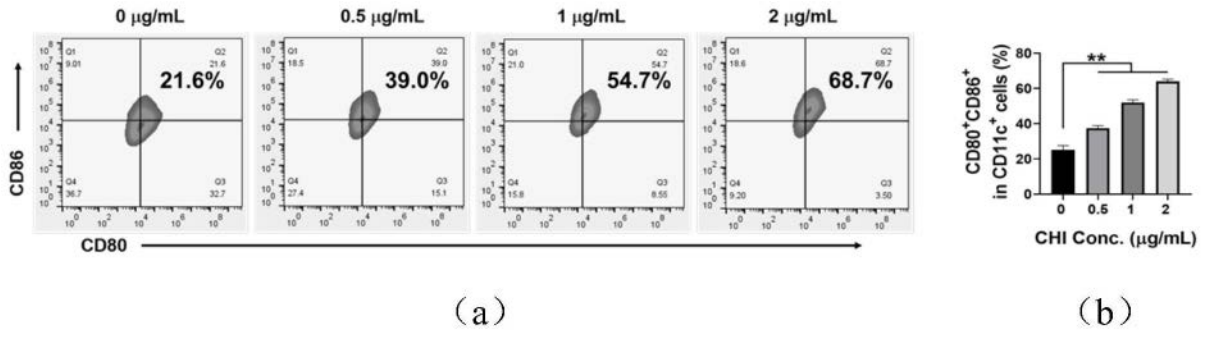


图9

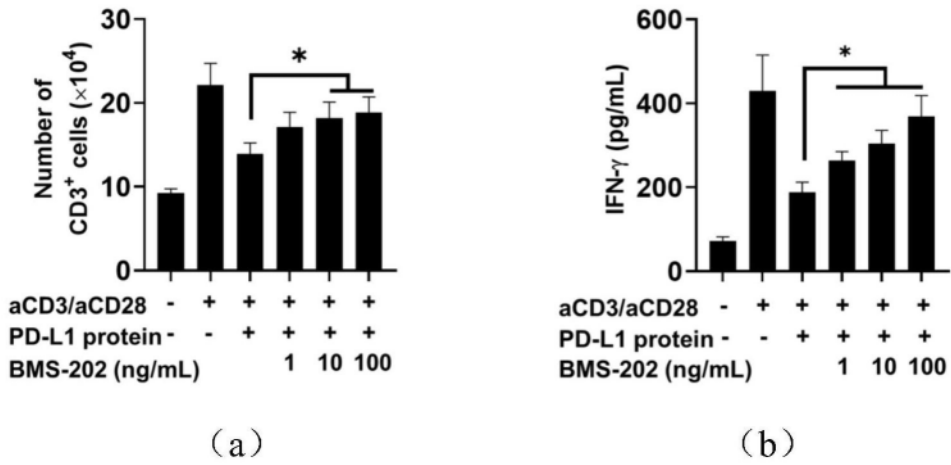


图10

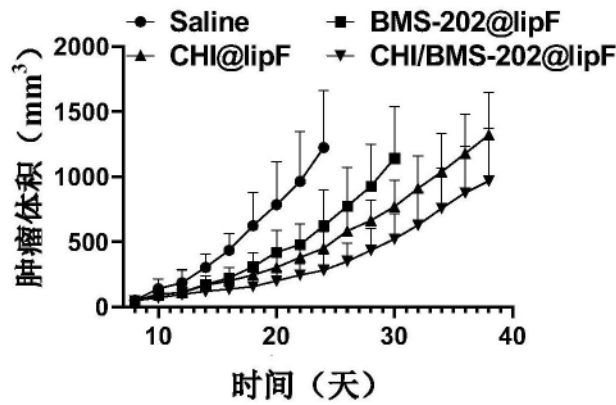


图11

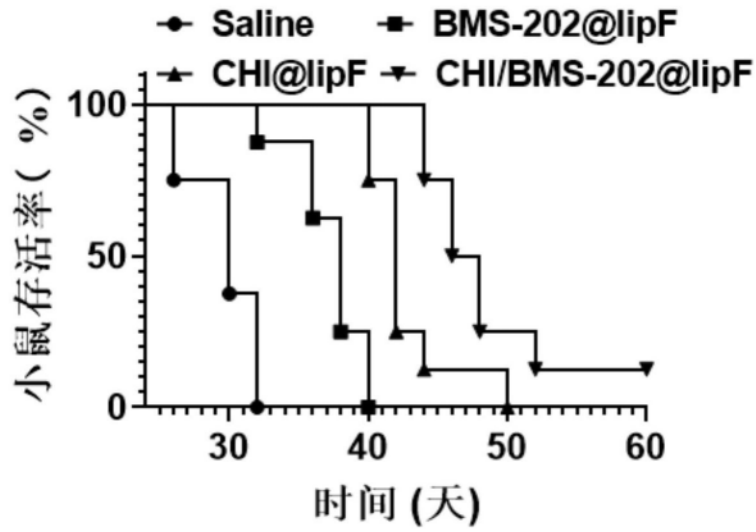


图12

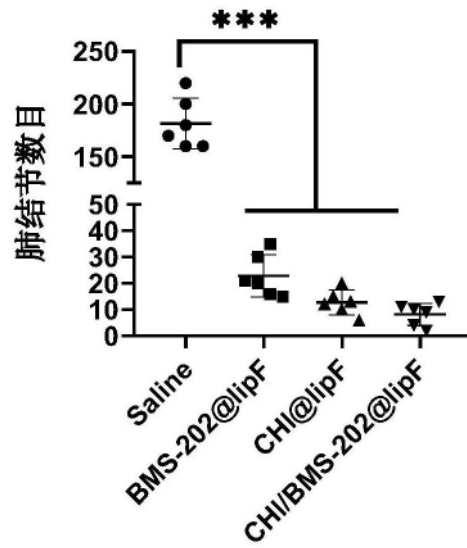


图13