



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104341488 A

(43) 申请公布日 2015. 02. 11

(21) 申请号 201310334417. 7

A61K 9/107(2006. 01)

(22) 申请日 2013. 08. 02

A61K 9/14(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

(71) 申请人 复旦大学

地址 200433 上海市邯郸路 220 号

(72) 发明人 陆伟跃 王飞 吴美霖 谢操

张小雨 高洁

(74) 专利代理机构 上海元一成知识产权代理事

务所(普通合伙) 31268

代理人 吴桂琴

(51) Int. Cl.

C07K 7/64(2006. 01)

A61K 47/42(2006. 01)

A61K 9/127(2006. 01)

权利要求书1页 说明书12页 附图8页

(54) 发明名称

c(LyP-1) 多肽及其构建的纳米递药系统和应用

(57) 摘要

本发明属多肽、高分子材料和药剂学领域,涉及一种酰胺键环合多肽 c(LyP-1) 及其在肿瘤主动靶向纳米递药系统中的应用;所述 c(LyP-1) 的序列为 CGNKRTRGA, 其修饰的高分子载体材料构建成纳米递药系统。实验结果表明,所述 c(LyP-1) 以酰胺键环合成环状九肽, 其比二硫键环合的环状九肽 LyP-1 具有更好的血中稳定性、受体蛋白结合活性和肿瘤细胞亲和活性; c(LyP-1) 修饰的高分子载体材料所构建的纳米递药系统脂质体等具有更好的肿瘤组织靶向性和更强的抗肿瘤生长效果, 并能更有效地抑制肿瘤淋巴管的新生, 防止肿瘤的淋巴转移; 所述 c(LyP-1) 作为可介导纳米递药系统靶向抗肿瘤并防治肿瘤淋巴转移的靶向分子, 具有良好的应用前景。

1. 一种酰胺键环合多肽 c(LyP-1), 其特征在于, 该多肽的氨基酸序列为 CGNKRTRGA; 其首尾两个氨基酸通过酰胺键连接成环状结构。
2. 一种纳米递药系统, 其特征在于, 由权利要求 1 所述酰胺键环合多肽 c(LyP-1) 修饰的高分子载体材料构建成纳米递药系统。
3. 按权利要求 2 所述的纳米递药系统, 其特征在于, 所述酰胺键环合多肽 c(LyP-1) 通过共价键连在聚乙二醇-磷脂 (PEG-PE)、聚乙二醇-聚乳酸 (PEG-PLA)、聚乙二醇-乳酸羟基乙酸共聚物 (PEG-PLGA)、聚乙二醇-聚谷氨酸 (PEG-PGA)、聚乙二醇-聚天冬氨酸 (PEG-PAA)、聚乙二醇-聚赖氨酸 (PEG-PL)、聚乙二醇-聚乙烯亚胺 (PEG-PEI) 上, 形成 c(LyP-1)-PEG-PE、c(LyP-1)-PEG-PLA、c(LyP-1)-PEG-PLGA、c(LyP-1)-PEG-PGA、c(LyP-1)-PEG-PAA、c(LyP-1)-PEG-PL 或 c(LyP-1)-PEG-PEI 高分子载体材料。
4. 按权利要求 2 所述的纳米递药系统, 其特征在于, 所述的纳米递药系统是表面含有 c(LyP-1) 的脂质体、聚合物胶束、聚合物圆盘。
5. 按权利要求 4 所述的纳米递药系统, 其特征在于, 所述的表面含有 c(LyP-1) 的脂质体, 其脂质体膜材料选自: a: 天然大豆磷脂或合成的磷脂, 和 b: 胆固醇, 和 c: 甲氧基聚乙二醇-磷脂 (MPEG-PE), 和 d: 含 c(LyP-1)-PEG-PE; 其中: 脂质体膜材料的摩尔比为 a : b = 5 : 1 ~ 1 : 2, a : c = 1000 : 1 ~ 1000 : 100, a : d = 1000 : 1 ~ 1000 : 100。
6. 按权利要求 4 所述的纳米递药系统, 其特征在于, 所述的表面含有 c(LyP-1) 的聚合物胶束, 其材料由 MPEG-PE 和 c(LyP-1)-PEG-PE 组成, 其中材料的摩尔比为 MPEG-PE : c(LyP-1)-PEG-PE = 1000 : 1 ~ 1000 : 100。
7. 按权利要求 4 所述的纳米递药系统, 其特征在于, 所述的表面含有 c(LyP-1) 的聚合物圆盘, 其材料由磷脂、MPEG-PE 和 c(LyP-1)-PEG-PE 组成, 材料的摩尔比为磷脂 : MPEG-PE 和 c(LyP-1)-PEG-PE = 100 : 15 ~ 100 : 30, 其中 MPEG-PE : c(LyP-1)-PEG-PE = 1000 : 1 ~ 1000 : 100。
8. 按权利要求 2 所述的纳米递药系统, 其特征是, 其平均粒径为 20 ~ 200nm。
9. 按权利要求 2 所述的纳米递药系统, 其特征在于, 所述的纳米递药系统包载下述药物: 阿霉素、表阿霉素、紫杉醇、多烯紫杉醇、喜树碱、羟基喜树碱、9-硝基喜树碱, 长春新碱, 硼替唑米, HNP-1, mellitin 或<sup>D</sup>PMI-theta。
10. 权利要求 2 所述的纳米递药系统在制备靶向治疗肿瘤的药物中的用途。
11. 权利要求 2 所述的纳米递药系统在制备靶向治疗肿瘤和抑制肿瘤淋巴转移的静脉注射药物中的用途。
12. 权利要求 2 所述的纳米递药系统在制备靶向治疗肿瘤淋巴转移的皮下或肌肉注射药物中的用途。

## c (LyP-1) 多肽及其构建的纳米递药系统和应用

### 技术领域

[0001] 本发明属多肽、高分子材料和药剂学领域,涉及一种新型 LyP-1 多肽及其构建的纳米递药系统和应用,具体涉及一种酰胺键环合多肽 c (LyP-1) 及其修饰的高分子材料,以及所构成的主动靶向纳米递药系统,特别涉及酰胺键环九肽 c (LyP-1) 及其对高分子材料的修饰,以及 c (LyP-1) 修饰的包载抗肿瘤药物的主动靶向纳米递药系统,和在制备抗肿瘤、抑制肿瘤淋巴转移和抗淋巴转移肿瘤靶向治疗药物中的用途。

### 背景技术

[0002] 药物化疗是临床肿瘤治疗的主要手段之一,因其对正常细胞具有杀伤性而存在毒副作用大的缺点。近年来,纳米递药系统已被广泛用于肿瘤的靶向治疗,研究表明,纳米递药系统对肿瘤组织的被动靶向主要利用肿瘤的 EPR 效应(透过性增强及滞留效应),20 世纪 90 年代起,以该策略为基础的一些纳米药物已被批准用于临床并得到了广泛应用。为使药物进一步富集于肿瘤组织,研究者多使用主动靶向策略,即在递药系统表面修饰可特异性结合肿瘤细胞或其他相关细胞的靶向分子,常用的靶向分子有抗体、核酸适体、多肽和其它小分子物质,其中,多肽类靶向分子因其高肿瘤靶向能力和化学易修饰等优势而被广泛应用,但一些多肽靶向分子存在体内稳定性差的缺点,降低了其在体内对肿瘤的寻靶能力;因此,提高多肽靶向分子的稳定性对提高主动靶向纳米递药系统的肿瘤靶向治疗效果具有重要意义。

[0003] LyP-1 多肽 (CGNKRTRGC) 是一种对多种肿瘤细胞、肿瘤淋巴管内皮细胞和肿瘤相关巨噬细胞有特异性亲和作用的环状九肽。近年来的研究表明,淋巴管新生在淋巴性肿瘤转移中发挥着重要作用,抑制肿瘤的淋巴管新生能有效地抑制淋巴转移肿瘤。鉴于 LyP-1 的特异亲和性,本发明人在前期研究工作中构建了 LyP-1 修饰的阿霉素脂质体用于抑制淋巴转移肿瘤的生长,效果良好;另外,也有多篇报道将 LyP-1 用于原位肿瘤的主动靶向治疗。虽然所述的 LyP-1 显示出了一定的主动靶向功能,但 LyP-1 在化学结构上尚存在如下缺陷;LyP-1 是以二硫键进行环合的环肽,二硫键结构稳定性较差,在血液中易被谷胱甘肽还原酶等破坏,在一定程度上影响了 LyP-1 在体内的应用。

[0004] 针对上述问题,本申请的发明人拟提供一种新型 LyP-1 多肽及其构建的纳米递药系统和应用。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种新型 LyP-1 多肽及其构建的纳米递药系统和应用,具体涉及一种酰胺键环合多肽 c (LyP-1) 及其修饰的高分子材料,以及所构成的主动靶向纳米递药系统,特别涉及酰胺键环九肽 c (LyP-1) 及其对高分子材料的修饰,以及 c (LyP-1) 修饰的包载抗肿瘤药物的主动靶向纳米递药系统,和在制备抗肿瘤、抑制肿瘤淋巴转移和抗淋巴转移肿瘤靶向治疗药物中的用途。

[0006] 本发明对 LyP-1 结构进行优化,使用酰胺键代替二硫键,制备成酰胺键环合多肽

c(LyP-1), 该 c(LyP-1) 多肽 (序列为 CGNKRTRGA) 为高稳定性的 c(LyP-1) 靶向分子, 用其修饰高分子载体材料, 构建包载药物的纳米递药系统, 能提高对肿瘤的靶向递药效果。

[0007] 具体而言, 本发明的酰胺键环合多肽 c(LyP-1) 序列为 CGNKRTRGA; 其首尾两个氨基酸通过酰胺键连接成环状结构;

[0008] 本发明中, 所述酰胺键环合多肽 c(LyP-1) 通过共价键连接所修饰的高分子载体材料; 所述高分子载体材料选自聚乙二醇-磷脂 (PEG-PE)、聚乙二醇-聚乳酸 (PEG-PLA)、聚乙二醇-乳酸羟基乙酸共聚物 (PEG-PLGA)、聚乙二醇-聚谷氨酸 (PEG-PGA)、聚乙二醇-聚天冬氨酸 (PEG-PAA)、聚乙二醇-聚赖氨酸 (PEG-PL)、聚乙二醇-聚乙烯亚胺 (PEG-PEI);

[0009] 所述酰胺键环合多肽 c(LyP-1) 通过共价键连接上述高分子载体材料, 分别制备成 c(LyP-1)-PEG-PE、c(LyP-1)-PEG-PLA、c(LyP-1)-PEG-PLGA、c(LyP-1)-PEG-PGA、c(LyP-1)-PEG-PAA、c(LyP-1)-PEG-PL、c(LyP-1)-PEG-PEI 含 c(LyP-1) 的高分子载体材料;

[0010] 本发明中, 采用含 c(LyP-1) 的高分子载体材料构建的纳米递药系统 (简称 c(LyP-1) 修饰的纳米递药系统) 包括: 脂质体、聚合物胶束、聚合物圆盘等, 其可包载的药物包括: 阿霉素、表阿霉素、紫杉醇、多烯紫杉醇、喜树碱、羟基喜树碱、9-硝基喜树碱, 长春新碱, 硼替唑米, HNP-1, mellitin, <sup>D</sup>PMI-theta 等。

[0011] 本发明的 c(LyP-1) 修饰的纳米递药系统中, 表面含有 c(LyP-1) 的脂质体中的脂质体膜材料选自天然大豆磷脂或合成的磷脂、胆固醇、甲氧基聚乙二醇-磷脂 (MPEG-PE)、含 c(LyP-1)-PEG-PE; 其中, 脂质体膜材料的摩尔比为  $a : b = 5 : 1 \sim 1 : 2$ 、 $a : c = 1000 : 1 \sim 1000 : 100$ 、 $a : d = 1000 : 1 \sim 1000 : 100$ ;

[0012] 本发明的 c(LyP-1) 修饰的纳米递药系统中, 表面含有 c(LyP-1) 的聚合物胶束中的材料由 MPEG-PE 和 c(LyP-1)-PEG-PE 组成; 其中, 材料的摩尔比为 MPEG-PE : c(LyP-1)-PEG-PE = 1000 : 1 ~ 1000 : 100;

[0013] 本发明的 c(LyP-1) 修饰的纳米递药系统中, 表面含有 c(LyP-1) 的聚合物圆盘中的材料由磷脂、MPEG-PE 和 c(LyP-1)-PEG-PE 组成, 材料的摩尔比为磷脂 : MPEG-PE 和 c(LyP-1)-PEG-PE = 100 : 15 ~ 100 : 30, 其中, MPEG-PE : c(LyP-1)-PEG-PE = 1000 : 1 ~ 1000 : 100;

[0014] 本发明中, 所述的含 c(LyP-1) 多肽修饰的高分子载体材料所构建的纳米递药系统, 其平均粒径为 20 ~ 200nm;

[0015] 本发明还提供了 c(LyP-1) 制备和性质考察以及上述所修饰的纳米递药系统用于肿瘤治疗的物质基础。本发明的试验结果表明: c(LyP-1) 比 LyP-1 在血清中具有更高的稳定性, 且具有更强的受体蛋白 p32 及其高表达 p32 蛋白的模型肿瘤细胞亲和活性; 与 LyP-1 修饰的纳米递药系统相比, c(LyP-1) 修饰的纳米递药系统显示出了更好的肿瘤组织靶向性和更强的抗肿瘤生长作用; c(LyP-1) 修饰的纳米递药系统能更有效地抑制肿瘤淋巴管的新生, 对肿瘤淋巴转移显示出了良好的抑制效果, 并具有良好的治疗淋巴转移肿瘤的效果。

[0016] 本发明同时提供了所述 c(LyP-1) 的合成方法和稳定性、亲和性评价, 及其修饰的纳米递药系统的制备方法、体内外靶向性评价、抗肿瘤生长作用, 以及体内抗淋巴管新生作用、抗肿瘤淋巴转移和抗淋巴转移肿瘤作用评价, 其包括:

[0017] (1) 合成 c(LyP-1) 及其荧光标记物 (FAM-c(LyP-1))

[0018] 采用固相合成的方法合成 c(LyP-1) 直链多肽 (CGNKRTRGA-Mpr-L) 和 LyP-1 直链多肽 (CGNKRTRGC); 通过“Native Chemical Ligation”反应合成以酰胺键环合的 c(LyP-1), 通过空气氧化的方法形成二硫键环合的 LyP-1; 通过马来酰亚胺基团与巯基的偶联反应来合成 FAM-c(LyP-1), 利用羧基与氨基在催化剂下的共轭反应来合成 LyP-1 的荧光标记物 (FAM-LyP-1), HPLC、MS 表征四者结构;

[0019] (2) c(LyP-1) 稳定性和亲和性评价

[0020] 从血清稳定性、与受体蛋白 p32 结合能力和与高表达 p32 蛋白的肿瘤细胞结合能力三方面进行 c(LyP-1) 性质的考察; 将 c(LyP-1)、LyP-1 与大鼠血清在 37℃ 进行孵育, 在不同时间点检测 c(LyP-1)、LyP-1 的浓度以进行稳定性的比较; 采用表面等离子共振方法 (SPR) 和荧光极化方法 (FP) 测量 c(LyP-1)、LyP-1 与 p32 的结合常数  $K_d$  值; 比较 FAM-c(LyP-1)、FAM-LyP-1 对 p32 蛋白高表达的模型肿瘤细胞 (如: 黑色素瘤细胞 SCI375、MDA-MB-435、B16F10; 肺癌细胞 SPC-A1、NCI-H292; 乳腺癌细胞 4T1; 胰腺癌细胞 BxPC-3 等) 的体外靶向性;

[0021] (3) 构建与表征 c(LyP-1) 修饰的纳米递药系统

[0022] ①构建与表征 c(LyP-1)-PEG-脂质体递药系统

[0023] 首先, 合成靶向分子修饰的高分子材料 c(LyP-1)-PEG-DSPE 和 LyP-1-PEG-DSPE; 将 c(LyP-1) 与 Ma1-PEG-DSPE 在 pH7.0 的 PBS 和 DMF 的混合溶液中反应得到 c(LyP-1)-PEG-DSPE; 采用固相合成的方法合成直链 Acm 保护的巯基化 LyP-1 (LyP-1(2Acm)-Cys), 将 LyP-1(2Acm)-Cys 与 Ma1-PEG-DSPE 按上述方法反应得到 LyP-1(2Acm)-PEG-DSPE, 再使用碘氧化的方法得到环合的 LyP-1-PEG-DSPE; 将上述二者透析纯化, NMR 表征结构;

[0024] 然后, 分别制备 c(LyP-1) 和 LyP-1 修饰的脂质体 (c(LyP-1)-PEG-脂质体和 LyP-1-PEG-脂质体); 以一定比例的 HSPC/Chol/PEG-DSPE/c(LyP-1)-PEG-DSPE 或 LyP-1-PEG-DSPE 为膜材料, 采用成膜水化法制备 c(LyP-1)-PEG-脂质体和 LyP-1-PEG-脂质体, 用挤压过膜的方法减小脂质体粒径, 并分别包载 DiR、FAM、阿霉素, 构建平均粒径在 100nm 的脂质体; 激光散射法测定粒径分布, 负染色电镜法观察脂质体形态;

[0025] ②构建与表征 c(LyP-1)-PEG-DSPE 胶束递药系统

[0026] 以一定比例的 mPEG2000-DSPE/c(LyP-1)-PEG-DSPE 为膜材料, 以紫杉醇 (PTX) 为模型药物, 采用成膜水化法制备 c(LyP-1)-PEG-DSPE 胶束, 构建平均粒径在 10nm 的胶束; 凝胶过滤法测定紫杉醇胶束的包封率和载药量, 激光散射法测定粒径分布;

[0027] ③构建与表征 c(LyP-1)-PEG-DSPE 圆盘递药系统

[0028] 以一定比例的 POPC/Chol/mPEG2000-DSPE/c(LyP-1)-PEG-DSPE 为膜材料, 以紫杉醇 (PTX) 为模型药物, 采用成膜水化法制备 c(LyP-1)-PEG-DSPE 圆盘, 探头超声法减小圆盘粒径, 构建平均粒径在 40nm 的圆盘; 凝胶过滤法测定紫杉醇圆盘的包封率和载药量, 激光散射法测定粒径分布;

[0029] (4) c(LyP-1)-PEG-脂质体递药系统的体内外肿瘤靶向性评价

[0030] 考察 SCI375 细胞、4T1 细胞分别对 c(LyP-1)-PEG-脂质体 /FAM、LyP-1-PEG-脂质体 /FAM 和 PEG-脂质体 /FAM 的摄取情况, 比较上述两种递药系统对肿瘤细胞的体外亲合能力;

[0031] 给 SCI375 细胞皮下移植瘤动物模型静脉注射 c(LyP-1)-PEG-脂质体 /DiR、LyP-1-PEG-脂质体 /DiR 和 PEG-脂质体 /DiR,在活体成像仪下观测并比较不同递药系统在实体瘤的影像分布;

[0032] 给 SCI375 细胞皮下移植瘤动物模型静脉注射 c(LyP-1)-PEG-脂质体 /FAM、LyP-1-PEG-脂质体 /FAM 和 PEG-脂质体 /FAM,采用免疫荧光染色法,研究 c(LyP-1)-PEG-LS/FAM 对肿瘤淋巴管和肿瘤相关巨噬细胞的亲和性;

[0033] (5) c(LyP-1)-PEG-脂质体递药系统的体内外抗肿瘤效果评价

[0034] 以 MTT 法研究 c(LyP-1)-PEG-脂质体-脂质体 /阿霉素、LyP-1-PEG-脂质体-脂质体 /阿霉素和 PEG-脂质体-脂质体 /阿霉素对 SCI375 细胞的体外生长抑制效果;

[0035] 给 SCI375 细胞皮下移植瘤动物模型静脉注射 c(LyP-1)-PEG-脂质体-脂质体 /阿霉素、LyP-1-PEG-脂质体-脂质体 /阿霉素、PEG-脂质体-脂质体 /阿霉素、游离阿霉素和生理盐水,以肿瘤体积为指标评价不同载阿霉素递药系统的体内抑制肿瘤生长效果;

[0036] 取上述给药组的肿瘤组织,用免疫荧光染色法标记淋巴管,进行淋巴管密度 (LVD) 定量检测,比较 c(LyP-1)-PEG-脂质体-脂质体 /阿霉素和 LyP-1-PEG-脂质体-脂质体 /阿霉素对肿瘤淋巴管的破坏能力;

[0037] 给 4T1 细胞腋窝皮下移植瘤动物模型静脉注射 c(LyP-1)-PEG-脂质体-脂质体 /阿霉素、PEG-脂质体-脂质体 /阿霉素、游离阿霉素和生理盐水,以腋窝淋巴结重量为指标评价不同载阿霉素递药系统的体内抑制肿瘤淋巴转移效果;

[0038] 给 SCI375 细胞足垫皮下移植瘤动物模型足垫皮下注射 c(LyP-1)-PEG-脂质体-脂质体 /阿霉素、PEG-脂质体-脂质体 /阿霉素、游离阿霉素和生理盐水,以接种侧淋巴结 (PL) 和未接种侧淋巴结 (PR) 重量比为指标评价不同载阿霉素递药系统的体内治疗淋巴转移肿瘤效果。

[0039] 实验结果表明,所述 c(LyP-1) 是一种以酰胺键环合的环状九肽,比二硫键环合的环状九肽 LyP-1 在血清中具有更高的稳定性,且具有更强的受体蛋白 p32 及其高表达 p32 蛋白的模型肿瘤细胞亲和活性;与 LyP-1 修饰的纳米递药系统相比,c(LyP-1) 修饰的纳米递药系统显示出了更好的肿瘤组织靶向性和更强的抗肿瘤生长作用;c(LyP-1) 修饰的纳米递药系统能更有效地抑制肿瘤淋巴管的新生,对肿瘤淋巴转移显示出了良好的抑制效果,并具有良好的治疗淋巴转移肿瘤的效果;所述的 c(LyP-1) 修饰的纳米递药系统,为一种更好的可介导纳米递药系统靶向抗肿瘤并防治肿瘤淋巴转移的靶向分子,具有良好的应用前景,可用于制备治疗肿瘤药物、制备静脉注射抗肿瘤和抑制肿瘤淋巴转移药物、制备皮下和肌肉注射治疗淋巴转移肿瘤药物。

[0040] 通过下述附图和实施例将有助于进一步理解本发明,但并不限制本发明的内容。

## 附图说明

[0041] 图 1 为 c(LyP-1)、LyP-1、FAM-c(LyP-1) 和 FAM-LyP-1 的 HPLC 图谱及质谱图,其中,

[0042] 色谱方法:色谱柱:Diamonsil C185  $\mu$ m200 $\times$ 4.6mm 迪马;流动相 A:0.1% TFA H<sub>2</sub>O;流动相 B:0.1% TFA 乙腈;洗脱程序:0-2min5% B,2~32min5%~65% B,32~33min65%~90% B,33~36min90% B;流速:0.7ml/min;柱温:40 $^{\circ}$ C;波长:UV214nm;所述

四种多肽其质谱结果计算所得分子量均与理论分子量相符合。

[0043] 图 2 显示了 c(LyP-1) 和 LyP-1 在血清中的降解曲线,其中,

[0044] 采用 HPLC 法测量血清中未被降解的多肽浓度;c(LyP-1) 比 LyP-1 在血清中的降解速率明显降低,拟合计算得 c(LyP-1) 和 LyP-1 在 25%血清中的半衰期分别为 324min 和 324min;结果表明,与 LyP-1 相比,c(LyP-1) 在血清中的稳定性提高了 0.82 倍。

[0045] 图 3 为 c(LyP-1) 和 LyP-1 与 p32 结合的荧光极化图谱,其中,

[0046] FAM-c(LyP-1) 或 FAM-LyP-1 与不同浓度的 p32 蛋白溶液反应;荧光极化值代表了 c(LyP-1) 或 LyP-1 与该浓度的 p32 蛋白溶液所具备的亲和能力;拟合计算得 c(LyP-1) 和 LyP-1 与 p32 结合的 Kd 值分别为 422.4nM 和 790.5nM;结果表明,与原型 LyP-1 相比,新型 c(LyP-1) 与 p32 的结合能力有所提高。

[0047] 图 4 为 c(LyP-1) 和 LyP-1 与 p32 结合的等离子共振分析图谱,其中,

[0048] 使用 Biacore 技术分析 c(LyP-1) (A) 和 LyP-1 (B) 与 p32 蛋白的结合能力;各曲线代表该浓度的多肽随时间与 p32 结合的动态曲线,选取 100s 为结合分析时间,然后使用蛋白再生剂洗脱掉芯片表明结合的多肽样品;使用 Biacore T100 软件计算多肽与蛋白结合的 Kd 值,c(LyP-1) 与 p32 结合的 Kd 值为 86.44nM, LyP-1 与 p32 结合的 Kd 值为 116.9nM;结果表明,与 LyP-1 相比,c(LyP-1) 与 p32 的结合能力更强。

[0049] 图 5 为 SCI375 细胞对不同制剂的摄取图,其中,

[0050] A、B 图:FAM-c(LyP-1) (a)、FAM-LyP-1 (b)、FAM(c)、c(LyP-1)-PEG-脂质体 /FAM(d)、LyP-1-PEG-脂质体 /FAM(e) 和 PEG-脂质体 /FAM(f) 于 37℃ 分别与 SCI375 细胞作用 2h 后的激光共聚焦显微照片;浅色代表多肽的荧光衍生物或包载 FAM 的各种脂质体,深色代表被 DAPI 染色的细胞核;C、D 图:流式细胞仪检测 SCI375 细胞对两种多肽及两种多肽分别修饰的脂质体的摄取情况;FAM-c(LyP-1)、FAM-LyP-1、FAM 组的阳性细胞比例分别为 64.00%、34.46%、5.09%,c(LyP-1)-PEG-脂质体 /FAM、LyP-1-PEG-脂质体 /FAM 和 PEG-脂质体 /FAM 组的阳性细胞比例分别为 94.75%、30.09%、7.98%;定性与定量结果均表明,与 LyP-1 相比,c(LyP-1) 与肿瘤细胞有更强的亲和能力,且能更有效的介导脂质体体外对肿瘤细胞的靶向。

[0051] 图 6 为 c(LyP-1)-PEG-DSPE 和 LyP-1-PEG-DSPE 的 <sup>1</sup>H-NMR 图谱,其中,

[0052] A 为 Mai-PEG-DSPE 的核磁图谱,B、C 分别为 c(LyP-1)-PEG-DSPE 和 LyP-1-PEG-DSPE 的核磁图谱;A 图显示出马来酰亚胺峰,而 B、C 图中该峰消失,而其余峰基本保持不变,显示 Mai-PEG-DSPE 中的马来酰亚胺基团已与 c(LyP-1) 或 LyP-1 反应。

[0053] 图 7 为 c(LyP-1)-PEG-DSPE 胶束 /PTX 和 c(LyP-1)-PEG-DSPE 圆盘 /PTX 粒径分布图,其中,

[0054] c(LyP-1)-PEG-DSPE 胶束 /PTX (A) 和 c(LyP-1)-PEG-DSPE 圆盘 /PTX (B) 粒径分布图,结果显示,二者粒径分别为 10nm 和 40nm 左右。

[0055] 图 8 为 4T1 细胞对 c(LyP-1)-PEG-脂质体 /FAM 的摄取图,其中,

[0056] A 图:c(LyP-1)-PEG-脂质体 /FAM(a) 和 PEG-脂质体 /FAM(b) 于 37℃ 分别与 4T1 细胞作用 2h 后的荧光显微照片;浅色代表包载 FAM 的各种脂质体,深色代表被 DAPI 染色的细胞核;B 图:流式细胞仪检测 4T1 细胞对两种脂质体的摄取情况;c(LyP-1)-PEG-脂质体 /FAM(c) 和 PEG-脂质体 /FAM(d) 组的阳性细胞比例分别为 71.49% 和 2.45%;定性与定量

结果均表明, c(LyP-1) 的修饰能有效地介导脂质体体外对 p32 蛋白高表达的肿瘤细胞的靶向。

[0057] 图 9 为 SCI375 肿瘤对不同制剂的摄取图, 其中,

[0058] A 图: 荷 SCI375 黑色素瘤裸小鼠经尾静脉注射 PEG-脂质体 /DiR(a)、LyP-1-PEG-脂质体 /DiR(b) 或 c(LyP-1)-PEG-脂质体 /DiR(c) 后不同时间点的活体荧光成像图; d、e、f 分别代表 48h 时 PEG-脂质体 /DiR、LyP-1-PEG-脂质体 /DiR 和 c(LyP-1)-PEG-脂质体 /DiR 组裸鼠分离出的器官和肿瘤组织的活体荧光成像图; 图片右侧色卡表示荧光强弱程度;

[0059] B 图: 各组分离出的器官和肿瘤组织的半定量荧光强度值 (数据以“平均值 ± 标准差”表示,  $n = 3$ ); c(LyP-1)-PEG-脂质体 /DiR 组肿瘤组织的荧光强度是 LyP-1-PEG-脂质体 /DiR 组的 1.82 倍 (存在显著性差异,  $*p < 0.05$ ), 表明 c(LyP-1) 修饰的脂质体比 LyP-1 修饰的脂质体有更强的体内肿瘤靶向功能。

[0060] 图 10 为不同制剂对肿瘤淋巴管靶向性的免疫荧光图, 其中,

[0061] 荷 SCI375 黑色素瘤裸小鼠经尾静脉注射 c(LyP-1)-PEG-脂质体 /FAM、LyP-1-PEG-脂质体 /FAM 和 PEG-脂质体 /FAM 后肿瘤组织的免疫荧光切片; 半深色代表被染色的淋巴管 (A、B)、巨噬细胞 (C)、血管 (D), 浅色代表各种包载 FAM 的脂质体, 深色代表被 DAPI 染色的细胞核, 箭头处显示了脂质体与染色部位的重叠共定位; 结果表明, c(LyP-1) LyP-1 有效地介导 PEG-脂质体 /FAM 对肿瘤淋巴管和巨噬细胞的靶向, 同时对肿瘤血管不会产生靶向作用。

[0062] 图 11 为 c(LyP-1)-PEG-脂质体 /阿霉素、LyP-1-PEG-脂质体 /阿霉素和 PEG-脂质体 /阿霉素对 SCI375 细胞的体外生长抑制作用图, 其中,

[0063] MTT 分析法考察 c(LyP-1)-PEG-脂质体 /阿霉素、LyP-1-PEG-脂质体 /阿霉素和 PEG-脂质体 /阿霉素在体外抑制 SCI375 细胞生长曲线图; 三者的半数抑制浓度分别为 1.05、2.57 和 6.16  $\mu\text{M}$ 。c(LyP-1)-PEG-脂质体 /阿霉素的半数抑制浓度是 LyP-1-PEG-脂质体 /阿霉素的 0.409 倍, 表明 c(LyP-1) 比 LyP-1 能更好地介导阿霉素脂质体对肿瘤细胞的生长抑制作用。

[0064] 图 12 为荷瘤裸鼠肿瘤体积随时间变化图, 其中,

[0065] 皮下接种 SCI375 肿瘤的荷瘤裸小鼠的肿瘤生长抑制试验 ( $n = 5$ ); 以阿霉素 15mg/kg 的剂量共给药 3 次, 间隔时间为 5 天; 相对肿瘤体积 = 肿瘤体积 / 首次给药前肿瘤体积; 方差分析结果表明: 与 LyP-1-PEG-脂质体 /阿霉素组相比, c(LyP-1)-PEG-脂质体 /阿霉素组自第 10 天起开始表现出极显著差异 ( $*p < 0.05$ )。在第 10、12 和 14 天, c(LyP-1)-PEG-脂质体 /阿霉素组肿瘤体积分别是 LyP-1-PEG-脂质体 /阿霉素组肿瘤体积的 0.56、0.76 和 0.63 倍, 表明 c(LyP-1) 比 LyP-1 能更好地介导阿霉素脂质体的抗肿瘤生长作用。

[0066] 图 13 为不同阿霉素脂质体对肿瘤淋巴管新生抑制作用图, 其中,

[0067] 测定各种阿霉素制剂治疗后的肿瘤组织的 LVD, 以评价其抗肿瘤淋巴管新生作用; A: 代表 c(LyP-1)-PEG-脂质体 /阿霉素组、LyP-1-PEG-脂质体 /阿霉素组、PEG-脂质体 /阿霉素组、游离阿霉素组和生理盐水组的肿瘤组织切片经淋巴管显色 (红色) 后所拍摄的荧光照片; B: 代表了通过分析 A 图中的荧光照片得到的各组 LVD 值; 结果显示,

c(LyP-1)-PEG-脂质体/阿霉素组比 LyP-1-PEG-脂质体/阿霉素组具有更强的肿瘤淋巴管新生抑制作用(极显著性差异, \* $p < 0.001$ )。

[0068] 图 14 为不同阿霉素脂质体对肿瘤淋巴转移抑制作用图, 其中,

[0069] 腋窝皮下接种 4T1 肿瘤的荷瘤裸小鼠的肿瘤淋巴转移抑制试验 ( $n = 6$ ); 以阿霉素 10mg/kg 为总剂量分 2 次给药, 间隔时间为 5 天; 取接种侧腋窝淋巴结称重以评价抑制肿瘤转移的效果; 方差分析结果表明: 三组阿霉素制剂中只有 c(LyP-1)-PEG-脂质体/阿霉素组有显著性抑制肿瘤转移的效果, c(LyP-1)-PEG-脂质体/阿霉素组腋窝淋巴结的重量为生理盐水组的 47.67%、为 PEG-脂质体/阿霉素组的 47.81%, 表明 c(LyP-1) 能有效介导阿霉素脂质体的抑制肿瘤淋巴转移作用。

[0070] 图 15 为不同阿霉素脂质体对淋巴转移肿瘤治疗作用图, 其中,

[0071] 足垫皮下接种 SCI375 肿瘤的荷瘤裸小鼠的抗淋巴转移肿瘤试验 ( $n = 6$ ); 以阿霉素 12mg/kg 为总剂量, 分 4 次给药, 间隔时间为 5 天; 取两侧腭淋巴结称重, 以 PL 与 PR 重量比评价治疗淋巴转移肿瘤的效果; 方差分析结果表明: 三个阿霉素制剂组的 PL 与 PR 的重量比均远小于生理盐水组, 表明三种阿霉素制剂对腭淋巴结 SCI375 转移肿瘤均有较强的治疗作用; 与 PEG-脂质体/阿霉素组相比, c(LyP-1)-PEG-脂质体/阿霉素对腭淋巴结转移肿瘤具有更好的治疗作用, 重量比为前者的 25.53%, 表明 c(LyP-1) 的修饰能显著增加阿霉素脂质体治疗淋巴转移肿瘤的作用。

## 具体实施方式

[0072] 实施例 1 合成、纯化和表征 c(LyP-1)、LyP-1、FAM-c(LyP-1) 和 FAM-LyP-1

[0073] 1. 合成、纯化和表征 c(LyP-1) 和 LyP-1

[0074] 合成直链肽 LyP-1-2H 和 c(LyP-1)-Mpr(Trt)-Leu; 合成 LyP-1-2H 时, 称取 Boc-Cys(Mbz1)-PAM 树脂 0.4167g (取代度 0.6mmol/g) 于接肽瓶中, 树脂用 DMF 溶胀二十分钟, 然后抽干; 加入约两倍树脂体积的 TFA 搅拌反应以脱去 Boc 保护基, 抽去 TFA, 再加入 TFA 同法操作一次; 树脂用 DMF 洗涤后加入 Boc-Gly 活化液 (用 HBTU 的 DMF 溶液和 DIEA 活化), 振摇反应; 反应结束后抽去反应液, 并用 DMF 洗涤树脂; 随后以上述方法按 LyP-1 序列顺次连接其余氨基酸; 反应结束后按前述方法洗涤树脂、TFA 脱保护基。依次用 DMF、DCM/MeOH(1/1, v/v) 洗涤树脂, 真空干燥。将树脂放入多肽切割管中, 加入适量 P-cresol, 然后通入 HF, 冰浴搅拌反应 1hr; 反应结束后减压抽去管中 HF, 残液用适量冰乙醚沉淀, 过滤得沉淀并用冰乙醚洗涤沉淀 3 次。沉淀重新用 TFA 溶解, 过滤得滤液; 滤液用 MeCN/H<sub>2</sub>O(1/1, v/v) 溶解, 制备型 HPLC 纯化, 收集主峰冻干, 得 LyP-1-2H、FAM-LyP-1-2H 直链肽纯品; 合成 c(LyP-1)-Mpr(Trt)-Leu 时, 称取 0.67mg 亮氨酸树脂 Boc-Leu(Boc)-PAM (取代度为 0.6mmol/g), 连接氨基酸时以上述方法按 c(LyP-1) 序列顺次连接, 其他方法同上。

[0075] 肽链的环化; LyP-1-2H 经空气氧化后得到 LyP-1; 将 LyP-1-2H 分别溶解于超声脱气的 0.1M 的 NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 溶液, 使其浓度为 1mg/ml, 将溶液敞口置于空气中, 轻微磁力搅拌, HPLC 监测反应; 采用制备型 HPLC 纯化, 收集主峰, 冻干得 LyP-1 纯品; c(LyP-1)-Mpr(Trt)-Leu 经“Native Chemical Ligation”反应后得到 c(LyP-1); 将 LyP-1-Mpr(Trt)-Leu 溶解于 Ligation 缓冲液 (6M 盐酸胍 (Gu·HCl) 溶液) (pH6.5) 液中, 浓度为 1mg/ml; 然后加入催化剂硫代苯酚 (0.1%, v/v), 密闭搅拌反应, HPLC 监测反应; 采用制备型 HPLC 纯化, 收集主

峰,冻干得 c(LyP-1) 纯品。

[0076] 2. 合成、纯化和表征 FAM-c(LyP-1) 和 FAM-LyP-1

[0077] FAM-c(LyP-1) 通过巯基与马来酰亚胺基团的共价反应合成;称取 7.0mg c(LyP-1) 溶于 PBS(0.1M, pH7.0) 中,称取 3mgMal-FAM 溶于 0.5mlDMF 中;在搅拌状态下将 DMF 溶液加入到 PBS 溶液中;HPLC 检测反应。用制备型 HPLC 纯化,收集主峰,冻干得 FAM-c(LyP-1) 纯品;FAM-LyP-1 通过羧基与氨基在催化剂下的共轭反应来合成;在合成 LyP-1-2H 时,氨基酸序列连接完全后,加入 FAM,得到 LyP-1-2H-FAM。LyP-1-2H-FAM 经空气氧化得 FAM-LyP-1。

[0078] c(LyP-1)、LyP-1、FAM-c(LyP-1) 和 FAM-LyP-1 的 HPLC 图谱及质谱图如图 1 所示。

[0079] 实施例 2c(LyP-1) 稳定性和亲和性评价

[0080] 1. c(LyP-1) 血清稳定性评价

[0081] 将 c(LyP-1)、LyP-1 分别与 25%的大鼠血清混合,多肽浓度为 1mg/ml。分别于 0、0.167、0.5、1、2、4、6 和 8h 吸取 100  $\mu$ l 生物样品溶液,加入 20  $\mu$ l 的 TCA 溶液以沉淀血清蛋白,涡旋震荡后以 13000rpm./min 的速度离心 10min,吸取上清液,HPLC 进样检测多肽浓度;结果如图 2 所示。

[0082] 2. c(LyP-1) 亲和性评价

[0083] 2.1c(LyP-1) 与 p32 蛋白亲和性评价

[0084] 2.1.1 荧光极化实验

[0085] 使用具有荧光偏正测定模式的酶标仪进行 FP 实验;在 386 孔酶标黑板中依次加入不同浓度的 p32 蛋白溶液(0.9nM ~ 3.0 $\times$ 10<sup>4</sup>nM)10  $\mu$ l,再加入 FAM-c(LyP-1)、FAM-LyP-1 的 PBS(pH7.4) 溶液 10  $\mu$ l,使多肽终浓度为 30nM;将黑板在 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h,再用酶标仪测量各孔的荧光偏振值,用 GraphPad Prism5.0 软件分别计算其 Kd 值;结果如图 3 所示。

[0086] 2.1.2SPR 实验

[0087] 使用 Biacore 技术进行 SPR 实验。首先是 p32 蛋白与 CM5 芯片的偶联。使用 EDC/NHS 溶液活化芯片表面的羧基后,将 p32 蛋白的 NaAc 溶液(pH4.0) 进样。结果表明,蛋白在芯片上的偶联量约为 1600RU。然后是多肽与 p32 蛋白结合 Kd 值的检测。将流动相流速设置为 30  $\mu$ l/min,样品与芯片的接触时间设置为 100s。将 c(LyP-1)、LyP-1 分别配制为浓度从 13.71nM 到 10000nM 的一系列样品溶液,从低到高浓度依次进样,用 Biacore T200Evaluation software 软件计算 c(LyP-1)、LyP-1 与 p32 蛋白的结合常数 Kd 值。结果见附图 4。

[0088] 2.2c(LyP-1) 与 SCI375 肿瘤细胞亲和性评价

[0089] 使用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液在 37 $^{\circ}$ C,5%二氧化碳及饱和湿度条件下培养 SCI375 细胞;将 SCI375 细胞以每孔 1 $\times$ 10<sup>5</sup> 个细胞接种于 24 孔培养板中,将培养板移入培养箱中培养过夜,使细胞贴壁;次日,用培养液配制一系列 FAM 浓度为 20  $\mu$ M 的 FAM-c(LyP-1)、FAM-LyP-1 和 FAM 溶液;将培养板中的培养液吸出,分别加入 c(LyP-1)-FAM、FAM-LyP-1 和 FAM 溶液,37 $^{\circ}$ C 孵育 2h,吸弃上清液;用磷酸盐缓冲液洗板两次,在荧光显微境下观察,并运用流式细胞仪计数阳性细胞比例,结果如图 5 所示。

[0090] 实施例 3 构建与表征 c(LyP-1)-PEG- 脂质体递药系统

[0091] 1. 合成、纯化和表征 c(LyP-1)-PEG-DSPE、LyP-1-PEG-DSPE

[0092] 首先是按照上述固相合成方法合成 LyP-1 (2Acm)-Cys 直链肽,即将原序列中的 Boc-Cys (Mbz1) 替换为 Boc-Cys (Acm),并最后连接 Boc-Cys (Mbz1)。脱保护、切割、纯化并冻干后,得 LyP-1 (2Acm)-Cys 纯品。

[0093] 将 c (LyP-1)、LyP-1 (2Acm)-Cys 分别溶于 PBS 溶液中 (pH7.0),取 Mal-PEG-DSPE 溶于 DMF,将 DMF 溶液滴入 PBS 溶液中,磁力搅拌反应 1h,过量的 c (LyP-1)、LyP-1 (2Acm)-Cys 和 DMF 通过透析 (截留分子量 3.5kDa) 除去;冷冻干燥,得到 c (LyP-1)-PEG-DSPE 和直链的 LyP-1 (2Acm)-PEG-DSPE;最后,取直链 LyP-1 (2Acm)-PEG-DSPE 溶于甲醇中,加入适量柠檬酸溶液和 1M 的盐酸溶液;逐滴加入碘甲醇溶液使溶液始终保持微黄色持续反应,反应结束后加入适量抗坏血酸溶液使微黄色褪去,反应液透析除去盐类,冷冻干燥得到 LyP-1-PEG-DSPE;NMR 表征二者结构,如图 6 所示。

[0094] 2. 制备与表征 c (LyP-1)-PEG- 脂质体

[0095] 2.1 制备与表征 c (LyP-1)-PEG- 脂质体 / 阿霉素

[0096] PEG- 脂质体膜材料处方组成为 HSPC/Chol/mPEG2000-DSPE (55 : 40 : 5, mol/mol), 多肽修饰的 PEG- 脂质体膜材料处方为 HSPC/Chol/mPEG2000-DSPE/c (LyP-1)-PEG-DSPE 或 LyP-1-PEG-DSPE (55 : 40 : 5 : 0.5, mol/mol);称取上述膜材料溶于氯仿,减压旋转蒸发除去有机溶媒,得均匀脂质膜,真空干燥 24h。采用硫酸铵梯度法包载模型药物阿霉素。加入一定体积的 0.155M 硫酸铵溶液,60℃ (水浴震荡 2h,得脂质体混悬液;在 60℃ 水浴中,使用微型挤出器依次将脂质体挤压过 400、200、100 和 50nm 核孔膜,使其粒径减小;然后以生理盐水为洗脱液过葡聚糖凝胶 G-50 层析柱更换外水相;按照药脂比 1 : 10 (w/w) 加入阿霉素生理盐水溶液,60℃ 水浴 20min。以生理盐水洗脱通过 Sephadex G-50 凝胶柱,除去游离药物,得阿霉素脂质体;脂质体用动态光散射法测定粒径,结果如表 1 所示,

[0097] 表 1 各种脂质体的粒径及多分散指数表

	<b>Formulation</b>	<b>Vesicle size(nm)</b>	<b>Polydispersity index</b>
	c(LyP-1)-LS/FAM	98.7±8.3	0.082±0.022
	LyP-1-LS/FAM	114.8±5.7	0.097±0.016
	LS/FAM	113.9±8.4	0.062±0.023
[0098]	c(LyP-1)-LS/DiR	117.2±7.3	0.163±0.024
	LyP-1-LS/DiR	110.8±3.1	0.129±0.018
	LS/DiR	105.1±5.5	0.128±0.014
	c(LyP-1)-LS/DOX	106.3±3.4	0.086±0.021
	LyP-1-LS/DOX	117.3±8.6	0.158±0.015
	LS/DOX	115.5±7.8	0.150±0.017

[0099] 表 1 显示,各种脂质体的粒径均在 100nm 左右,多分散系数 (PDI) 均小于 0.2,分布均匀, LyP-1 或 c (LyP-1) 的修饰对脂质体粒径无明显影响;表 1 中数据以“平均值 ± 标准

差”表示 ( $n = 3$ )。

[0100] 2.2 制备与表征 c(LyP-1)-PEG-脂质体 /FAM

[0101] 制备空白脂质体工艺基本同上,但水化时加入 FAM 的生理盐水溶液;脂质体用动态光散射法测定粒径,结果如表 1 所示。

[0102] 2.3 制备与表征 c(LyP-1)-PEG-脂质体 /DiR

[0103] 制备空白脂质体工艺基本同上,但 DiR 应同磷脂一同溶于氯仿成膜,且水化介质改为生理盐水;脂质体用动态光散射法测定粒径,结果如表 1 所示。

[0104] 实施例 4 构建与表征 c(LyP-1)-PEG-DSPE 胶束递药系统

[0105] 取 7.70mg 的 mPEG2000-DSPE 和 0.25mg 的 c(LyP-1)-PEG-DSPE 溶于 1.5ml 氯仿中,加入含 3.61mg PTX 的 MeOH 液 0.6ml, 37℃ 成膜,真空干燥过夜,0.6ml HEPES 水化;Sephadex G50 凝胶柱分离游离 PTX,制得 c(LyP-1) 修饰的紫杉醇聚合物胶束,并计算其包封率和载药量,结果如表 2 所示;胶束用动态光散射法测定粒径,结果如图 7 所示;

[0106] 表 2 是 c(LyP-1)-PEG-DSPE 胶束 /PTX 和 c(LyP-1)-PEG-DSPE 圆盘 /PTX 的包封率和载药量。

[0107] 表 2

	制剂	包封率 (%)	载药量 (%)
[0108]	c(LyP-1)-胶束/PTX	34.2±1.83	13.44±0.42
	c(LyP-1)-圆盘/PTX	78.47±0.81	4.595±0.045

[0109] 表 2 显示, c(LyP-1)-PEG-DSPE 胶束 /PTX 和 c(LyP-1)-PEG-DSPE 圆盘 /PTX 对 PTX 的包封率分别为 34.2±1.83% 和 78.47±0.81%, 载药量分别为 13.44±0.42% 和 4.595±0.045%;表 1 中数据以“平均值 ± 标准差”表示 ( $n = 3$ )。

[0110] 实施例 5 构建与表征 c(LyP-1)-PEG-DSPE 圆盘递药系统

[0111] 多肽修饰的圆盘膜材料处方为 POPC/Chol/mPEG2000-DSPE/c(LyP-1)-PEG-DSPE (35 : 40 : 25 : 2, mol/mol);将其与紫杉醇 (PTX) 共同溶于三氯甲烷中,40℃ 旋转蒸发除去有机溶剂,使膜材在瓶壁形成薄膜,真空干燥 24h。加入一定体积的 0.1M, pH7.4PBS 缓冲液,37℃ 水浴摇床振荡 1h,得圆盘混悬液;将圆盘探头超声 30min, 0.22 μm 滤膜过滤除去金属碎屑, Sephadex G50 凝胶柱分离游离 PTX,制得 c(LyP-1) 修饰的紫杉醇圆盘束,并计算其包封率和载药量,结果如表 2 所示;圆盘用动态光散射法测定粒径,结果如图 7 所示。

[0112] 实施例 6 c(LyP-1)-PEG-脂质体的体内外靶向性评价

[0113] 1. c(LyP-1)-PEG-脂质体 /FAM 对体外肿瘤细胞的靶向性评价

[0114] 实验方法基本同上述“c(LyP-1) 与 SCI375 肿瘤细胞亲和性评价”,考察 SCI375 细胞分别对 c(LyP-1)-PEG-脂质体 /FAM、LyP-1-PEG-脂质体 /FAM 和 PEG-脂质体 /FAM 的摄取情况,考察 4T1 细胞分别对 c(LyP-1)-PEG-脂质体 /FAM 和 PEG-脂质体 /FAM 的摄取情况,结果如图 5 和图 8 所示。

[0115] 2. c(LyP-1)-PEG-脂质体 /DiR 对肿瘤组织的靶向性评价

[0116] 取 SCI375 细胞皮下移植瘤模型裸小鼠 9 只,随机分成三组,每组 3 只,分别尾静脉注射等摩尔量的 c(LyP-1)-PEG-脂质体/DiR、LyP-1-PEG-脂质体/DiR 和 PEG-脂质体/DiR;在第 2,6,12,24 和 48h 时用 10%水合氯醛溶液麻醉裸鼠,使用活体动物成像系统扫描三种脂质体递药系统在裸鼠的体内分布;在第 48h 时将各组裸鼠解剖,取其肿瘤、心、肝、脾、肺和肾,在活体动物成像系统内扫描各器官,并对各器官的 DiR 荧光强度进行半定量,结果如图 9 所示。

[0117] 3. c(LyP-1)-PEG-脂质体/FAM 对肿瘤淋巴管的靶向性评价

[0118] 分别将 c(LyP-1)-PEG-脂质体/FAM、LyP-1-PEG-脂质体/FAM 和 PEG-脂质体/FAM 以等摩尔剂量通过尾静脉注入 SCI375 细胞皮下移植瘤动物模型体内,24h 后处死裸鼠,取出各肿瘤组织,在福尔马林溶液中固定,用 OCT 包埋剂(Tissue-Tek)包埋,制作 10 μm 的冰冻切片;将切片与 rabbit anti-mouse LYVE-1(2g/ml)、Hamster anti-mouse podoplanin、rat anti-mouse CD31 或 rat anti-mouse CD68(1:100)孵育 1h,然后与罗丹明标记的二级 goat anti-rabbit IgG、goat anti-Armenian hamster IgG 或 goat anti-rat IgG 孵育以显色淋巴管或血管,最后所有切片用 DAPI 复染以显示细胞核;封片后,用激光共聚焦显微镜观察,结果如图 10 所示。

[0119] 实施例 7c(LyP-1)-PEG-脂质体的体内外药效学评价

[0120] 1. c(LyP-1)-PEG-脂质体/阿霉素对肿瘤细胞体外生长抑制作用评价

[0121] 将处于对数生长期的 SCI375 细胞用 0.25%胰蛋白酶消化,细胞计数,96 孔板中每孔加入 200 μl 细胞悬液( $2 \times 10^3$  个细胞),留出三孔加入不含细胞的培养液作为空白孔,贴壁 24h。用细胞培养液将 c(LyP-1)-PEG-脂质体/阿霉素、LyP-1-PEG-脂质体/阿霉素和 PEG-脂质体/阿霉素稀释至一系列不同浓度梯度的阿霉素脂质体溶液,吸去 96 孔板内细胞培养液,分别加入 200 μl 一系列浓度的脂质体药液;每个浓度均设三副孔,留出三个仅加入培养液的孔作为对照孔,培养 72 小时。用细胞培养液配置 MTT,浓度为 0.2mg/ml,吸去 96 孔板的药液,每孔加入 MTT 溶液 200 μl,37℃培养 4h,小心吸去液体,每孔加入 150 μl 二甲亚砜,水浴振荡 10min,酶标仪检测吸光度(检测波长 570nm),根据公式:细胞存活率 =  $(A_{\text{试验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$  (A 表示吸光度),计算细胞存活率,并根据存活率计算 c(LyP-1)-PEG-脂质体/阿霉素、LyP-1-PEG-脂质体/阿霉素和 PEG-脂质体/阿霉素体外抗 SCI375 细胞的半数抑制浓度( $IC_{50}$ )值,结果如图 11 所示。

[0122] 2. c(LyP-1)-PEG-脂质体/阿霉素对肿瘤生长抑制作用评价

[0123] 将 25 只已接种 SCI375 细胞的荷瘤裸小鼠随机分成五组,每组 5 只;设置 c(LyP-1)-PEG-脂质体/阿霉素组、LyP-1-PEG-脂质体/阿霉素组、PEG-脂质体/阿霉素组、游离阿霉素组和生理盐水组;阿霉素总剂量为 15mg/kg,分三次尾静脉注射给药,两次给药间隔为 5 天,每次给药剂量为上述总剂量的三分之一,每次给药体积为 100 μl;从第一次给药开始,每隔一天测量各组肿瘤的长径( $D_{\text{max}}$ )和短径( $D_{\text{min}}$ ),按照下列公式计算瘤体积·(V),

$$[0124] \quad V = [D_{\text{max}} \times (D_{\text{min}})^2] / 2$$

[0125] 以瘤体积相对值(给药后瘤体积/首次给药前瘤体积)对给药时间作图,得药效动态变化曲线,结果如图 12 所示。

[0126] 3. c(LyP-1)-PEG-脂质体/阿霉素对肿瘤淋巴管新生抑制作用评价

[0127] 通过测量上述各给药组的肿瘤淋巴管密度 (LVD) 来评价不同阿霉素脂质体对肿瘤淋巴管新生的抑制作用;裸鼠在给药结束后处死,取出肿瘤组织,按照上述“c(LyP-1)-PEG-脂质体 / FAM 对肿瘤淋巴管的靶向性评价”中的免疫荧光方法对肿瘤组织切片进行 podoplanin 标记以显色淋巴管;将切片用激光显微镜观察拍照,拍照结束后用 Image-Pro Plus v6.0 软件定量化所有免疫荧光图片中红色区域的积分光密度值 (integrated optical density, IOD) 作为淋巴管密度,并作统计分析,结果如图 13 所示。

[0128] 4. c(LyP-1)-PEG-脂质体 / 阿霉素对肿瘤淋巴转移抑制作用评价

[0129] 将 24 只已腋窝皮下接种 4T1 细胞的荷瘤裸小鼠随机分成四组,每组 6 只;设置 c(LyP-1)-PEG-脂质体 / 阿霉素组、PEG-脂质体 / 阿霉素组、游离阿霉素组和生理盐水组;阿霉素总剂量为 10mg/kg,分两次尾静脉注射给药,两次给药间隔为 5 天,每次给药体积为 100  $\mu$  l;在接种后第 24 天,将裸鼠处死,取出接种侧的腋窝淋巴结称重,结果如图 14 所示。

[0130] 5. c(LyP-1)-PEG-脂质体 / 阿霉素对淋巴转移肿瘤治疗作用评价

[0131] 将 26 只裸小鼠足垫皮下接种 SCI375 细胞,在接种后第 15 天,随即取出两只小鼠,处死并取双侧的腭淋巴结;验证接种侧腭淋巴结内已形成转移肿瘤后,将剩余 24 只荷瘤裸小鼠随机分成四组,每组 6 只;设置 c(LyP-1)-PEG-脂质体 / 阿霉素组、PEG-脂质体 / 阿霉素组、游离阿霉素组和生理盐水组;阿霉素给药总剂量为 12mg/kg,分 4 次足垫皮下注射给药,给药间隔为 5 天,每次给药体积为 30  $\mu$  l;在接种后第 35 天,将裸鼠处死,取出两侧的腭淋巴结称重,并计算 PL 与 PR 重量比,结果如图 15 所示。

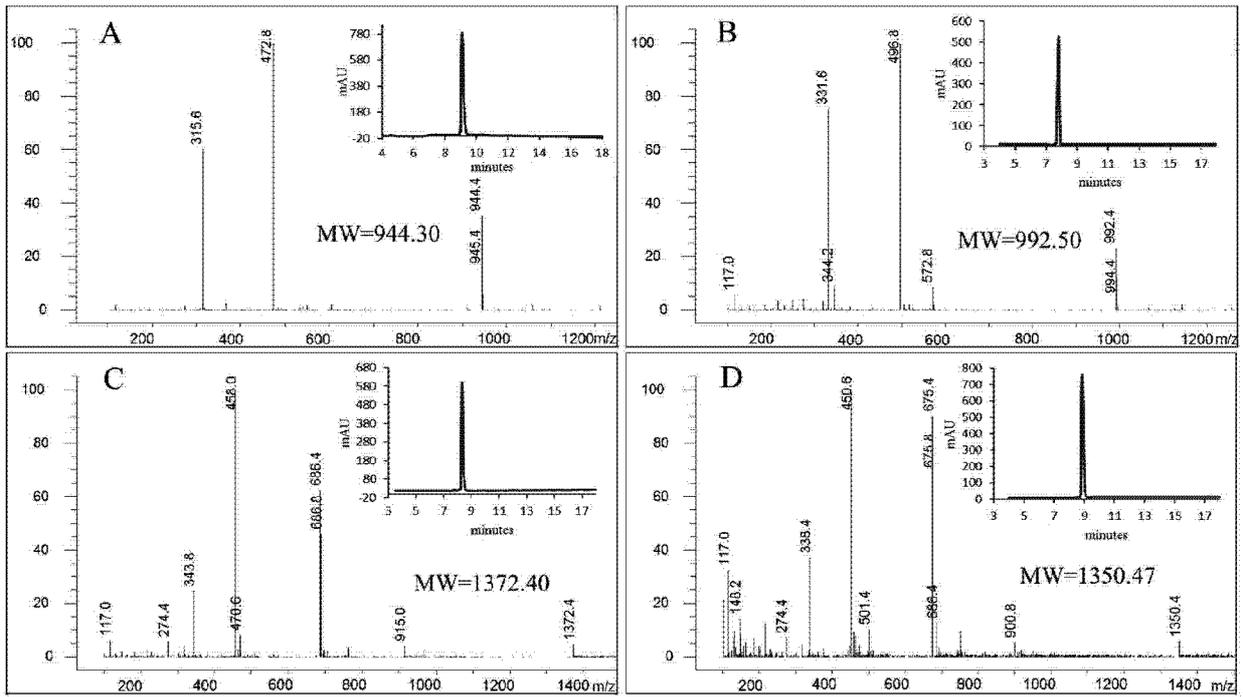


图 1

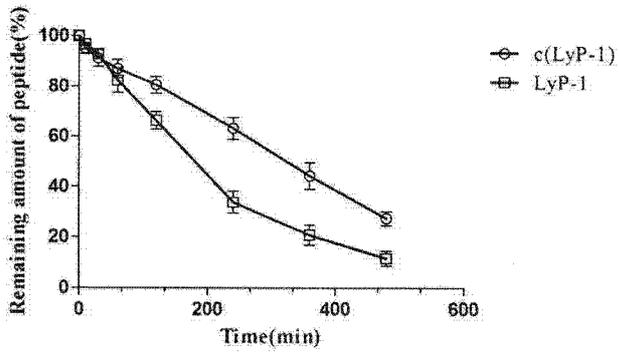


图 2

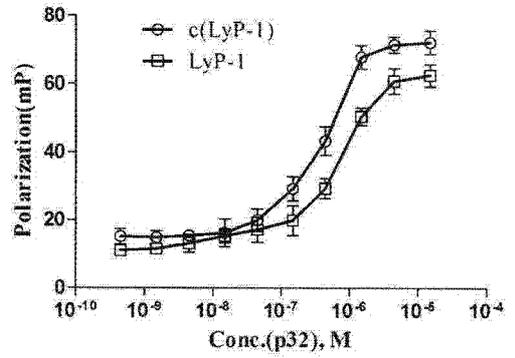


图 3

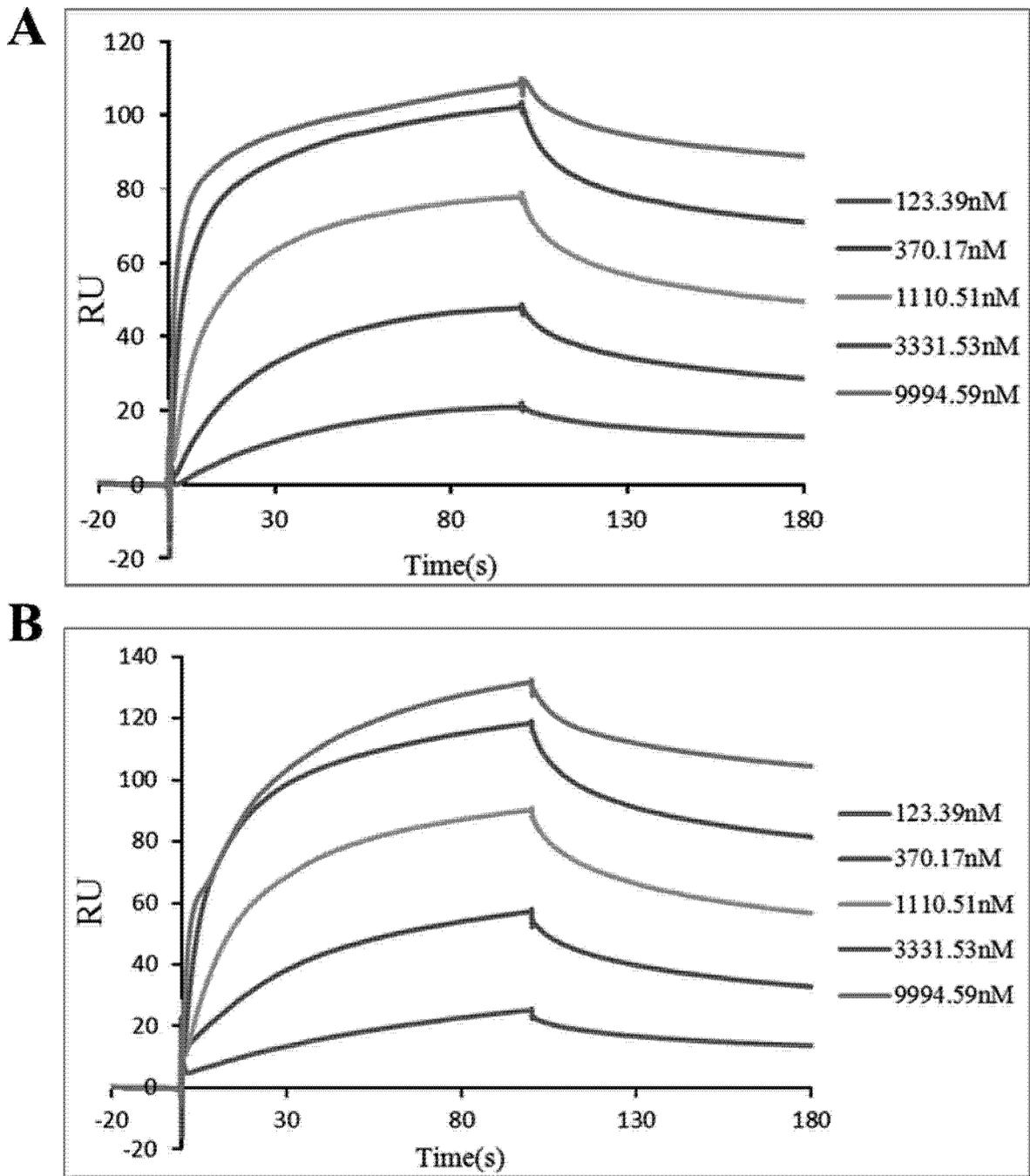


图 4

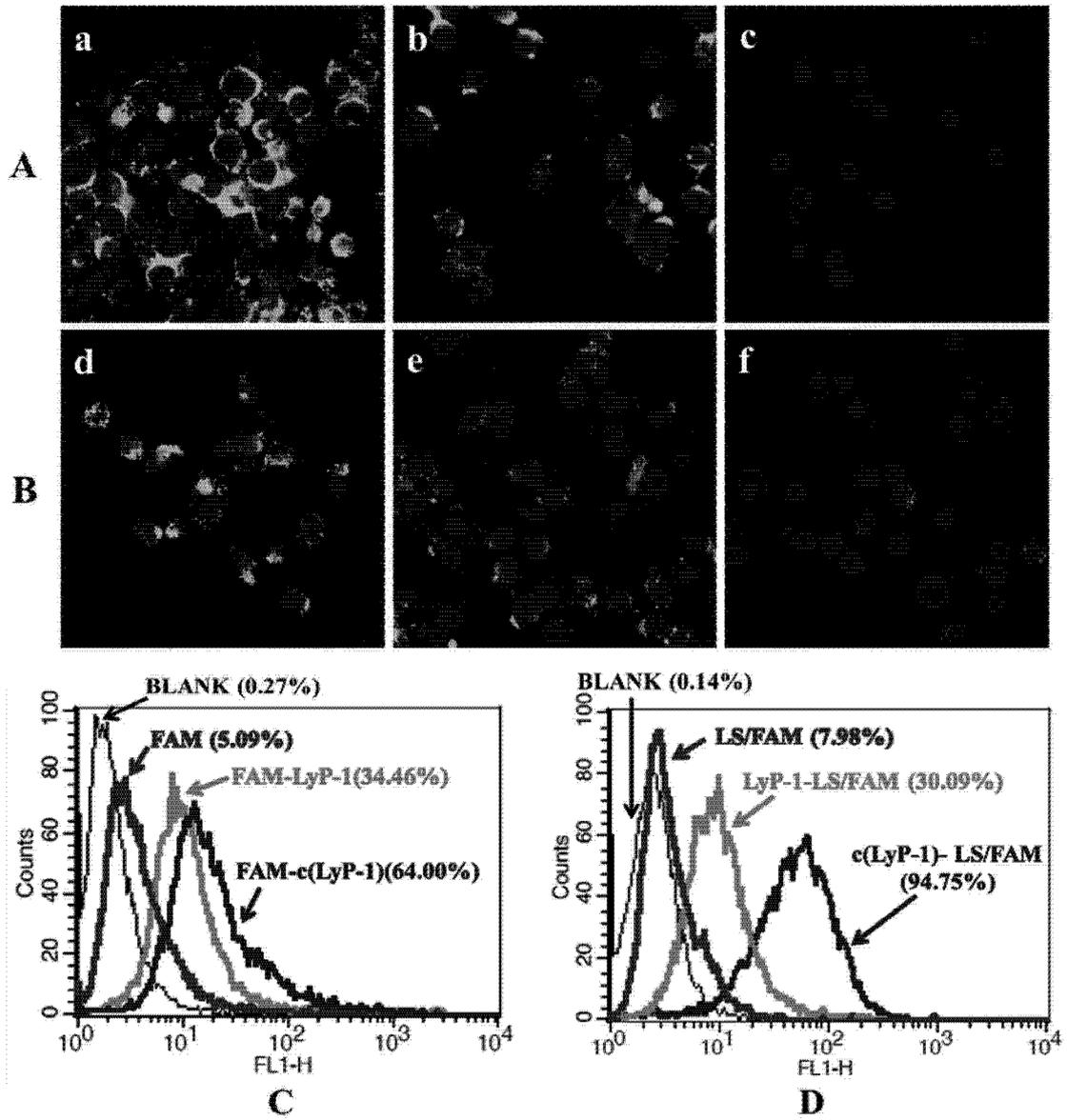


图 5

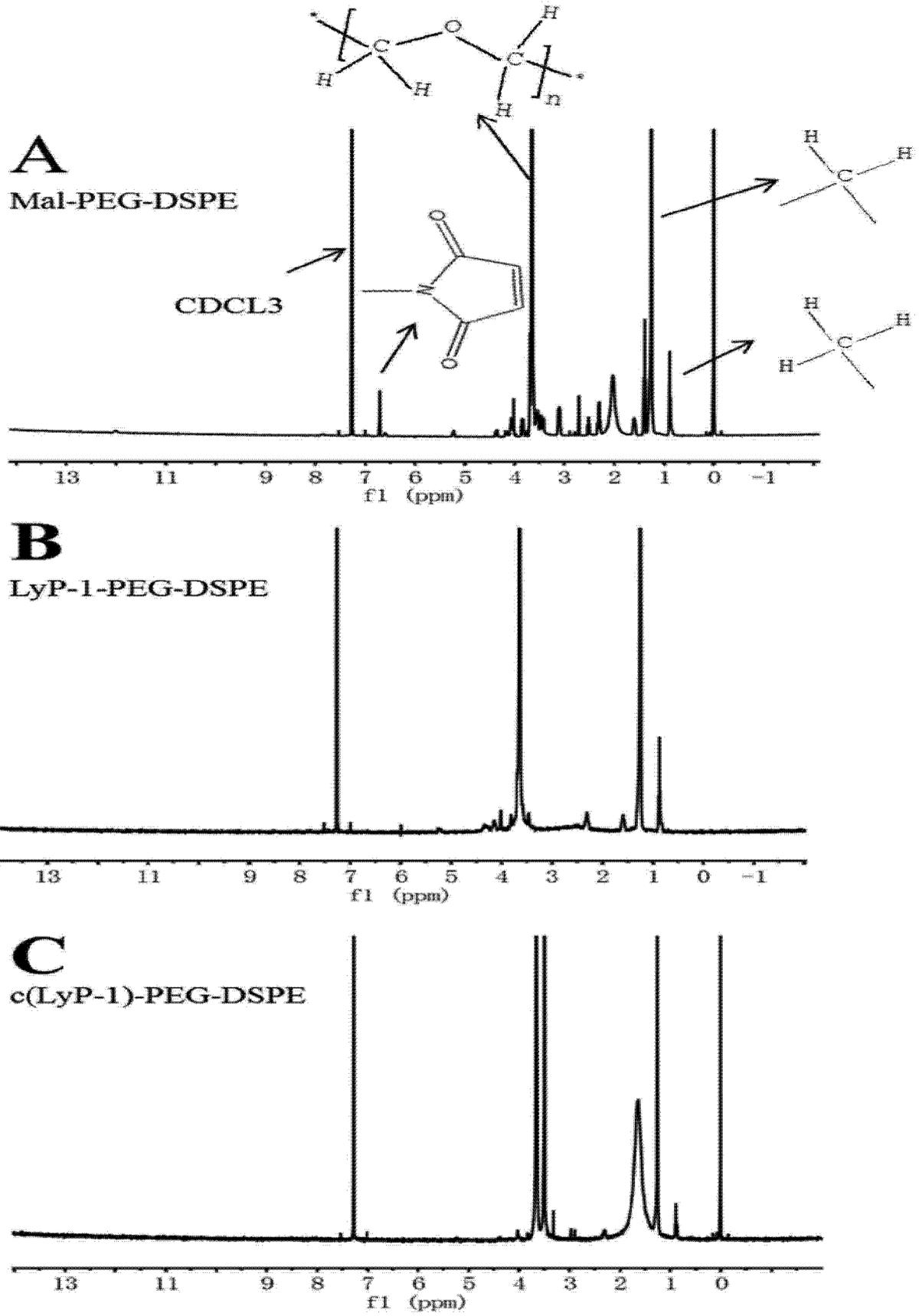


图 6

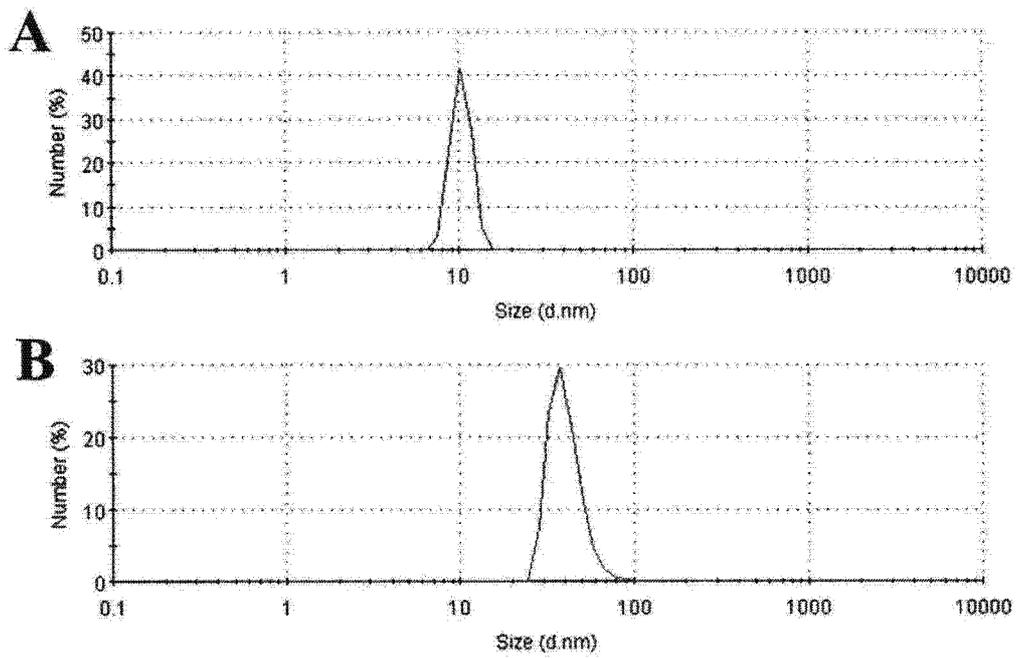


图 7

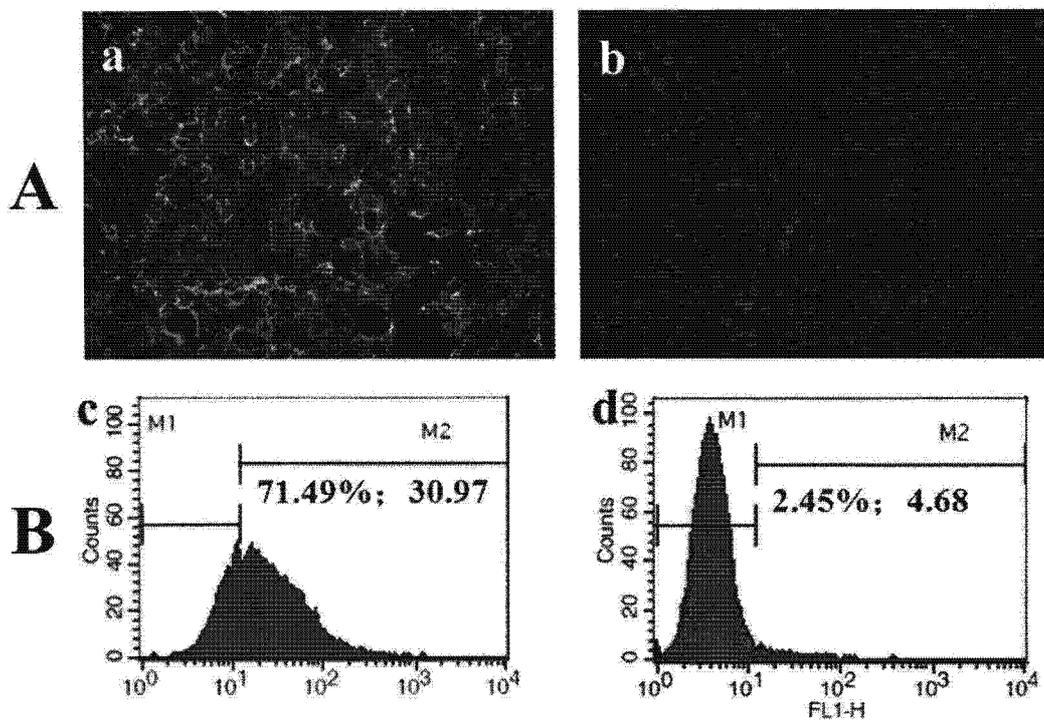


图 8

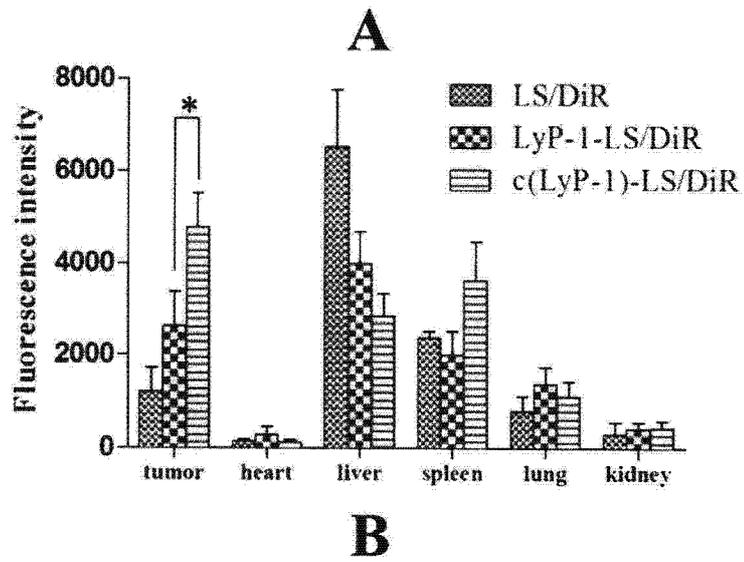
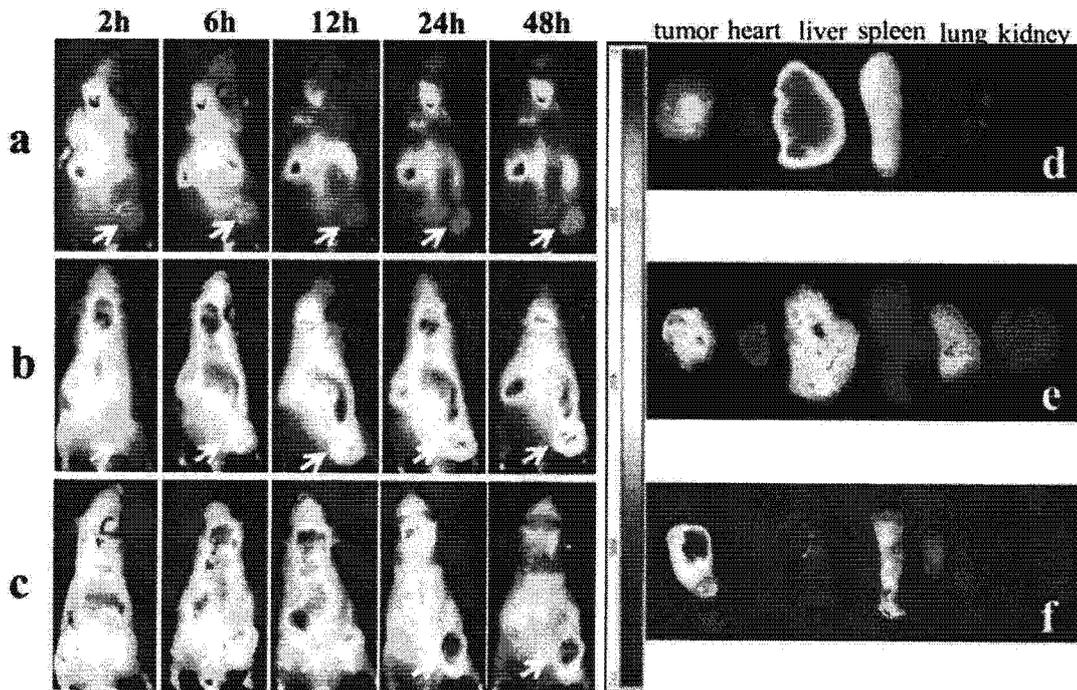


图 9

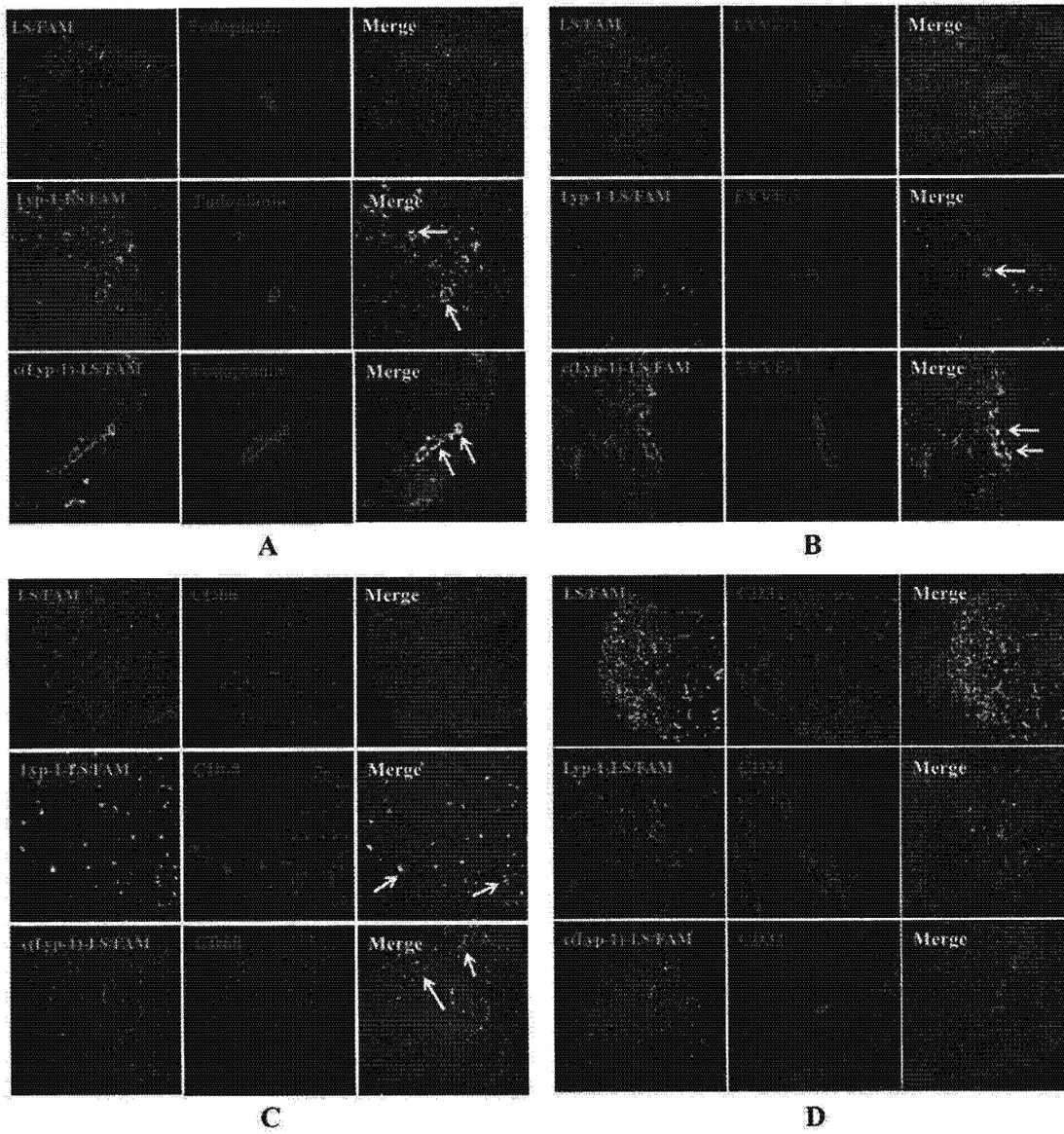


图 10

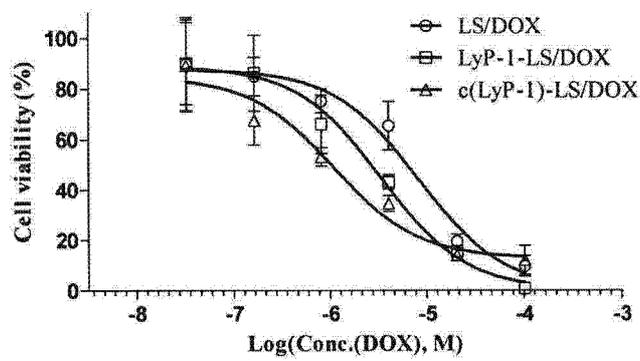


图 11

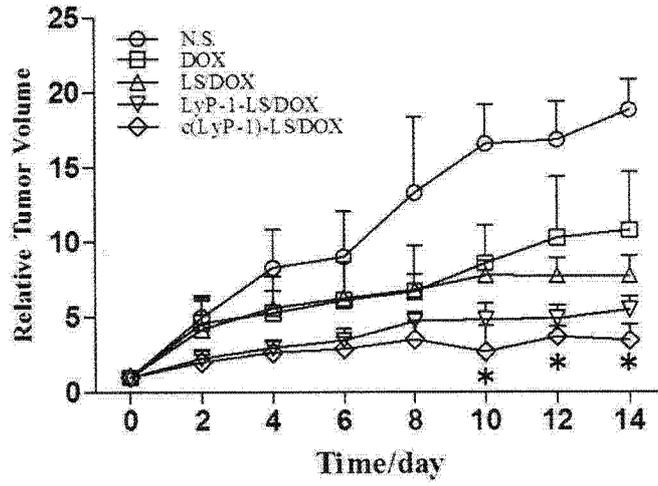


图 12

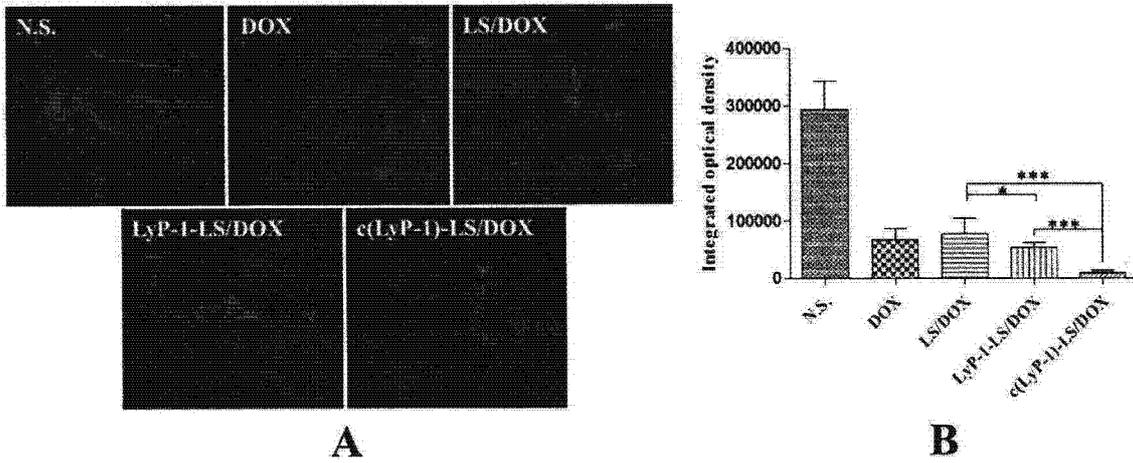


图 13

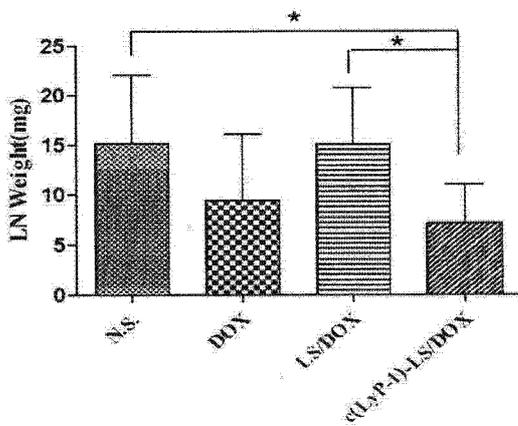


图 14

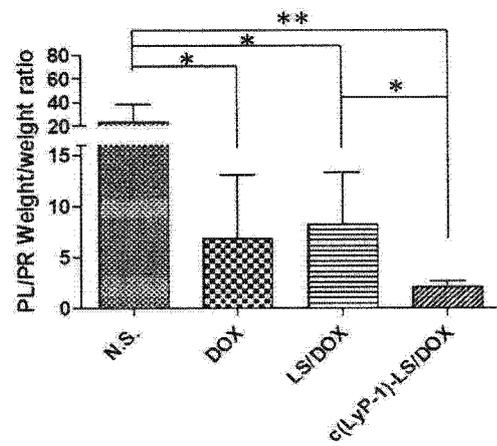


图 15