



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108697693 B

(45) 授权公告日 2022.07.29

(21) 申请号 201780005663.4
 (22) 申请日 2017.01.11
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 108697693 A
 (43) 申请公布日 2018.10.23
 (30) 优先权数据
 62/278,295 2016.01.13 US
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2018.07.04
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/US2017/012962 2017.01.11
 (87) PCT国际申请的公布数据
 WO2017/123600 EN 2017.07.20
 (73) 专利权人 台湾地区“中央研究院”
 地址 中国台湾台北市南港区研究院路2段
 128号
 (72) 发明人 吴汉忠 葉承昀
 (74) 专利代理机构 北京金信知识产权代理有限公司 11225
 专利代理师 张皓 徐琳

A61K 31/704 (2006.01)
 A61K 38/10 (2006.01)
 A61K 45/00 (2006.01)
 A61K 47/50 (2006.01)
 (56) 对比文件
 US 2015202315 A1, 2015.07.23
 US 2009169478 A1, 2009.07.02
 ZHU et al..In Vivo Molecular MRI
 Imaging of Prostate Cancer by Targeting
 PSMA with Polypeptide-Labeled
 Superparamagnetic Iron Oxide
 Nanoparticles.《International Journal of
 Molecular Sciences》.2015,第16卷第9573-
 9587页.
 WADAJKAR A.S..magnetic-based
 theranostic nanoparticles for prostate
 cancer management.《http://uta-ir.tdl.org/
 uta-ir/bitstream/handle/10106/11671/
 Wadajkar_uta_2502D_11824.pdf?sequence=1》
 .2013, (续)

审查员 曹寅秋

(51) Int.Cl.
 A61K 31/437 (2006.01)

权利要求书2页 说明书13页
 序列表3页 附图8页

(54) 发明名称
 用于靶向、成像和治疗前列腺癌的肽共轭的
 纳米粒子

前列腺癌、抑制前列腺癌细胞生长、诱发前列腺
 癌细胞的细胞毒性和/或增加前列腺癌患者存活
 率的组合物。

(57) 摘要

本发明公开了一种分离或合成的靶向肽,其
 包含与SEQ ID NO:8具有至少90%同一性的氨基
 酸序列。所述靶向肽可共轭至选自于由聚合物胶
 束、基于脂蛋白的药物载体、纳米粒子药物载体、
 化学治疗剂、胶束、脂质体、树状聚合物、聚合物、
 脂质、寡核苷酸、肽、多肽、蛋白质、前列腺癌细
 胞、干细胞和显像剂组成的群组的一种组分。本
 发明亦公开了一种用于成像和检测体内或体外
 前列腺癌细胞存在的试剂盒,以及一种用于治疗

组别	中位数存活 时间 (天数)
PBS	80
LD	76
sLV	81
SP204-LD	115
SP204-sLV	101
LD+ sLV	103
SP204-LD+ SP204-sLV	184

CN 108697693 B

[接上页]

(56) 对比文件

Chen-Yun Yeh et al..Peptide-conjugated nanoparticles for targeted imaging and therapy of prostate cancer.

《Biomaterials》.2016,第99卷第1-15页.

Chen-Yun Yeh et al..Peptide-conjugated nanoparticles for targeted imaging and therapy of prostate cancer.
《Biomaterials》.2016,第99卷第1-15页.

1. 一种共轭体,其包含:
 - (a) 一种分离或合成的靶向肽,其包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列;以及
 - (b) 一种组分,该组分共轭至该靶向肽,该组分为脂质体或显像剂,其中该显像剂为量子点或超顺磁氧化铁纳米粒子。
2. 如权利要求1所述的共轭体,其中该靶向肽共轭至所述脂质体。
3. 如权利要求1所述的共轭体,其中该组分是该脂质体,且该共轭体进一步包含封装于该脂质体内的一种或多种抗癌药剂。
4. 一种共轭体,其包含:
 - (a) 一种分离或合成的靶向肽,其长度小于20个氨基酸残基,该靶向肽包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列;以及
 - (b) 一种组分,该组分共轭至该靶向肽;其中,该组分为脂质体或显像剂,该显像剂为量子点或超顺磁氧化铁纳米粒子。
5. 如权利要求1至4中任一项所述的共轭体,其中该脂质体是聚乙二醇化的(PEGylated)。
6. 如权利要求1或4所述的共轭体,其中该显像剂为超顺磁氧化铁纳米粒子。
7. 一种共轭体在制造用于成像和检测体内或体外前列腺癌细胞存在的试剂盒中的用途,其中所述共轭体包含:
 - (a) 一种分离或合成的靶向肽,其包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列;以及
 - (b) 一种组分,该靶向肽共轭至该组分,该组分为选自由量子点和超顺磁氧化铁纳米粒子组成的群组的显像剂。
8. 一种用于成像和检测体内或体外前列腺癌细胞存在的试剂盒,其包含:
 - (a) 共轭体,其包含:
一种分离或合成的靶向肽,其包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列;以及
一种组分,该靶向肽共轭至该组分,该组分为选自由量子点和超顺磁氧化铁纳米粒子组成的群组的显像剂;以及
 - (b) 以该试剂盒用于成像和检测前列腺癌细胞存在的书面指示。
9. 一种分离或合成的靶向肽,其包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。
10. 一种分离或合成的靶向肽,其长度小于20个氨基酸残基,该靶向肽包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。
11. 如权利要求9或10所述的靶向肽,其共轭至包含抗癌药剂的聚乙二醇化(PEGylated)脂质体。
12. 如权利要求9或10所述的靶向肽,其共轭至脂质体或显像剂,其中该显像剂选自由量子点和超顺磁氧化铁纳米粒子组成的群组。
13. 一种组合物,其包含:
 - (a) 脂质体;
 - (b) 治疗上有效量的一种或多种化学治疗剂,其被封装于该脂质体内;以及
 - (c) 一种分离或合成的靶向肽,其包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,其共轭至该脂质体表面。
14. 如权利要求13所述的组合物,其包含两种或更多种不同化学治疗剂,其中各化学治

疗剂被分别封装于该脂质体内。

15. 一种如权利要求13或14所述的组合物在制造用于治疗前列腺癌和/或增加前列腺癌病患存活率的药剂中的用途。

用于靶向、成像和治疗前列腺癌的肽共轭的纳米粒子

技术领域

[0001] 本发明主要涉及药物递送系统,且更特定而言,涉及前列腺癌靶向药物递送系统。

背景技术

[0002] 前列腺癌为最常见的男性恶性肿瘤,且为发达国家中男性中癌症死亡的第二大原因。早期阶段的前列腺癌病患治疗采用前列腺切除术(prostatectomy)、放射治疗及/或近程放射治疗(brachytherapy)。晚期阶段前列腺癌病患则进行雄性激素剥夺治疗(androgen deprivation therapy),其特定靶向局部前列腺癌的雄性激素受体(androgen receptor)。

[0003] 抗阉割(castration-resistant)前列腺癌病患通常以化学治疗剂治疗,包括多西紫杉醇(docetaxel)。此外,阿比特龙醋酸酯(abiraterone acetate)与恩扎拉平(enzalutamide),两者均减少雄性激素受体传讯,亦有利于存活。封装于配体靶向(ligand-targeted)纳米粒子内的化学治疗剂可提高抗肿瘤疗效。靶向活性肿瘤的药物递送(active tumor-targeting drug delivery)可通过各靶向分子达成,如抗体、肽或适配体(aptamer)。

[0004] 肽噬菌体展示技术(phage display technology)为鉴定能辨识肿瘤靶点的疾病特异性抗原(disease-specific antigen)的有力工具。因此,筛选针对特异性靶组织的噬菌体展示库为鉴定适合供作药物标靶的肽序列的快速与直接方法。

发明内容

[0005] 于一个方面中,本发明涉及一种共轭体,其包含:

[0006] (a)一种分离或合成的靶向肽,其包含与SEQ ID NO:8具有至少90%同一性的氨基酸序列;以及

[0007] (b)一种组分,该靶向肽共轭至该组分,该组分选自于由聚合物胶束、基于脂蛋白的药物载体、纳米粒子药物载体、化学治疗剂、胶束、脂质体、树状聚合物、聚合物、脂质、寡核苷酸、肽、多肽、蛋白质、前列腺癌细胞、干细胞和显像剂组成的群组。

[0008] 于一个实施方式中,所述靶向肽共轭至:(a)化学治疗剂;(b)寡核苷酸;(c)显像剂;或(d)脂质体。于另一个实施方式中,所述组分是脂质体且所述共轭体进一步包含封装于脂质体内的一种或多种抗癌药剂。于另一个实施方式中,所述靶向肽由长度小于20个氨基酸的残基组成。于另一个实施方式中,所述脂质体是聚乙二醇化的(PEGylated)。于另一个实施方式中,所述显像剂选自于由量子点、超顺磁氧化铁纳米粒子及封装于该脂质体内的荧光染料组成的群组。

[0009] 于另一个方面中,本发明涉及本发明共轭体在制造用于成像和检测体内或体外前列腺癌细胞存在的药剂或试剂盒中的用途。

[0010] 本发明亦涉及本发明共轭体的用途,以成像和检测体内或体外前列腺癌细胞的存在。或者,本发明涉及检测体内或体外前列腺癌细胞存在的方法,其包含:(a)提供本发明的共轭体;(b)致使前列腺癌细胞于体外或体内曝露至所述共轭体;(c)容许所述共轭体的靶

向肽于体外或体内结合至前列腺癌细胞;以及(d)进行成像以检测体外或体内前列腺癌细胞的存在。

[0011] 进一步于另一个方面中,本发明涉及一种用于成像和检测体内或体外前列腺癌细胞存在的试剂盒,其包含:(a)本发明的共轭体;以及(b)以试剂盒用于成像和检测前列腺癌细胞存在的书面指示。

[0012] 于另一个方面中,本发明涉及一种分离或合成的靶向肽,其包含与SEQ ID NO:8具有至少90%同一性的氨基酸序列。于一个实施方式中,所述靶向肽包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列。于另一个实施方式中,所述靶向肽由长度小于20个氨基酸的残基组成。于另一个实施方式中,所述靶向肽共轭至脂质体、聚乙二醇化脂质体、纳米粒子或显像剂。

[0013] 进一步于另一个方面中,本发明涉及一种组合物,其包含:(a)脂质体;(b)治疗上有效量的一种或多种化学治疗剂,其被封装于脂质体内;以及(c)一种分离或合成的靶向肽,其包含与SEQ ID NO:8具有至少90%同一性的氨基酸序列,其共轭至脂质体表面。于一个实施方式中,所述组合物包含二种或更多种不同化学治疗剂,其中各化学治疗剂被分别封装于脂质体内。

[0014] 又于另一个方面中,本发明涉及本发明组合物在制造用于治疗前列腺癌、抑制前列腺癌细胞生长、诱发前列腺癌细胞细胞毒性和/或增加前列腺癌病患存活率的药剂中的用途。或者,本发明涉及本发明组合物,其用于治疗前列腺癌、抑制前列腺癌细胞生长、诱发前列腺癌细胞细胞毒性和/或增加前列腺癌病患存活率的用途。

附图说明

[0015] 图1显示以经由体外噬菌体展示试验的前列腺癌细胞亲和性鉴定肽。(A)以噬菌体展示用于筛选结合至PC3前列腺癌细胞株的肽。相较于第一回合筛选,于五回合的生物淘选(biopanning)后,由PC3洗出的噬菌体效价增加475倍。Pfu,噬斑形成单位。(B)利用细胞ELISA测试个别噬菌体克隆与PC3细胞间的结合活性及特异性。 A_{549} ,于549nm时的光学密度。(C)利用流式细胞术分析PC204噬菌体对PC3、DU145及LNCaP前列腺癌细胞株的结合活性。PC204以剂量依赖方式增加癌症细胞株而非293T细胞的相对荧光密度。(D)以共焦影像显示4°C与37°C下PC204的结合与内化能力。以小鼠抗M13抗体辨识噬菌体,之后以FITC共轭的山羊抗小鼠IgG抗体探测。对照组噬菌体(con-phage)未检测出FITC讯号。以DAPI进行细胞核染色。利用对照组噬菌体(E)或PC204噬菌体(F)进行人类前列腺癌组织微点阵的免疫组织化学染色。依据染色密度测定PC204的结合活性。(G)PC204与源自前列腺癌病患的肿瘤微点阵的结合程度。藻红蛋白(PE),红色蛋白质-颜料复合物,共轭至抗体以进行流式细胞术分析。以机器计算PE的总面积讯号,称作PE-A。

[0016] 图2显示确认PC204的体内肿瘤归巢能力。PC204或对照组噬菌体(con-phage)经由尾静脉注射至含有PC3(A)或DU145(B)前列腺癌异种移植物的老鼠。PC204对肿瘤组织的靶向活性可由其合成肽(SP204)而非对照组肽(con-peptide)进行竞争抑制。(C)于静脉注射含有PC3前列腺癌异种移植物的SCID小鼠后,利用免疫组织化学检测定位PC204。观察到,噬菌体免疫反应性位于肿瘤组织而非正常器官,如大脑、肺脏、心脏及前列腺。既非肿瘤细胞亦非正常器官呈现对照组噬菌体免疫反应性。(D)以HILYTE FLUOR™750标记的PC204或对照组噬菌体注射含有PC3前列腺肿瘤的SCID小鼠24小时。以红圈表示肿瘤的体内荧光成像。利

用IVIS[®] 200软件量化肿瘤荧光讯号。 $n=3$,***, $p<0.001$ 。

[0017] 图3显示SP204增强脂质体SRB、脂质体多柔比星(liposomal doxorubicin;LD)及稳定型脂质体长春瑞滨(stable liposomal vinorelbine;sLV)对人类前列腺癌细胞株的结合及内化。SP204-LS与LS于PC3(A)与DU145(B)前列腺癌细胞株的内化研究。细胞过夜培养于24孔培养盘(2×10^4 个细胞/孔)。内化的SRB依据用SP204-LS或LS(10 μ M)处理后0.167、1、4、8及24小时的OD_{EX520/EM570}量化。(C) PC3与DU145细胞于37 $^{\circ}$ C下以10 μ M SP204-LS或非靶向的LS培养30min。DAPI用于细胞核染色。以鉴别干涉对比(differential interference contrast;DIC)模型观察细胞形状。针对体外细胞毒性试验,PC3(D与F)与DU145(E与G)用不同浓度的LD、SP204-LD、sLV或SP204-sLV处理。利用MTT试验分析细胞存活率,并计算成活细胞百分比。黑色虚线显示平均50%存活率。***, $p<0.001$ 。

[0018] 图4显示SP204共轭量子点与SPIONs的体内肿瘤靶向及成像。(A)于静脉注射QD或SP204-QD六小时后,进行含有PC3衍生肿瘤的SCID小鼠的体内荧光成像。红圈代表肿瘤位点(loci)。以IVIS软件量化肿瘤区域的荧光强度($n=3$)。(B)PC3细胞以10 μ g/ml SPIONs或SP204-SPIONs培养4小时后经普鲁士蓝染色的铁的显微镜影像。以SP204-SPION处理的细胞含有蓝色斑点,表示存在氧化铁颗粒。以40 μ g/ml SPIONs或SP204-SPIONs处理PC3异种移植石蜡切片(C)与前列腺癌病患手术组织切片(D)十二小时,之后以普鲁士蓝试剂染色。SP204-SPIONs组观察到蓝色颗粒反应产物,但SPION组则否。(E)注射SPIONs或SP204-SPIONs小鼠的PC3异种移植普鲁士蓝染色。两组含有PC3异种移植物的SCID小鼠于尾静脉注射SPIONs(F)或SP204-SPIONs(G)四小时后,进行7Tesla MRI分析。于注射前与后拍摄MRI影像($n=3$)。(H)SP204-SPION处理组的MR讯号强度直方图分析,显示讯号强度比异种移植物的低20.1%。*, $p<0.05$

[0019] 图5显示共轭靶向肽SP204增强药物治疗效率及延长前列腺癌异种移植模型存活率。含有PC3(A-E)或DU145(F-J)前列腺癌异种移植物的鼠以1mg/kg SP204-LD、1mg/kg LD、或PBS处理。此外,亦以1mg/kg SP204-sLV、1mg/kg sLV、或PBS注射含有PC3(K与L)或DU145(M与N)异种移植物的鼠。所有化合物每周经由尾静脉注射两次,并持续2至4周。于处理期结束时,将肿瘤组织切片及称重(B、C、G、H、L及N)。观察多柔比星处理下的小鼠存活率。于PC3异种移植模型中,PBS组、LD组及SP204-LD组的中位数存活率为33、47及74天(D与E)。于DU145异种移植模型中,PBS组、LD组及SP204-LD组的中位数存活率为139、140及174天(I与J)。存活分析以对数秩(log-rank)运算,显示所有小鼠的存活机率。 $n=6$ 。条带(bar),平均值 \pm SEM。*, $p<0.05$;**, $p<0.01$ 。

[0020] 图6显示在前列腺癌异种移植(xenograft)模型与原位模型(orthotopic model)中靶向肽SP204的共轭增强组合治疗效率及延长存活率。(A)含有DU145前列腺癌异种移植物的鼠静脉注射LD、sLV、SP204-LD、SP204-sLV、LD+sLV、SP204-LD+SP204-sLV(1mg/kg的多柔比星及长春瑞滨,每周二次,持续四周)、或PBS($n=6$)。SP204-LD+SP204-sLV处理对肿瘤生长的推迟比其他药物更有效。(B)各组体重。(C与D)PBS组、LD组、sLV组、SP204-LD组、SP204-sLV组、LD+sLV组及SP204-LD+SP204-sLV组的中位数存活时间各为80、76、81、115、101、103及184天。于原位模型,小鼠植入PC3-Luc细胞,之后用FD+FDV、LD+sLV、SP204-LD+SP204-sLV、多西紫杉醇、或PBS($n=8$)处理。每周静脉注射两次剂量为1mg/kg的多柔比星及2mg/kg的长春瑞滨。每周腹腔注射一次剂量为5mg/kg的多西紫杉醇。小鼠共处

理4周。(E)于植入后七天,以IVIS®200Image System检查生物发光(bioluminescence),以监测肿瘤进展。(F)利用生物发光定量法监测肿瘤进展。插图显示Y轴放大视图。(G)各组合体重。(H与I)PBS组、FD+FV组、LD+sLV组、SP204-LD+SP204-sLV组及多西紫杉醇组的中位数存活率各为36、39、65、72及58天。存活分析以对数秩运算,显示所有小鼠的存活机率。*, $p < 0.05$;***, $p < 0.001$ 。

[0021] 图7为肽靶向纳米粒子的合成示意图。

[0022] 图8显示靶向肽增强结合至癌症干细胞样细胞。(A)PC204对CD133⁻与CD133⁺PC3细胞的表面结合活性。(B)亮视野下(左)及AP染色后的PC3肿瘤球形成。(C)SP204-LS与LS内化至PC3肿瘤球。将组分过夜培养于24孔培养盘。于SP204-LS或LS处理后1、4、8及24小时,以 $OD_{EX520/EM570}$ 定量内化的SRB。(D)利用流式细胞术分析PC204噬菌体与EpCAM⁺PC3的结合活性。于PC3细胞株,EpCAM/PC204亲和性亚族群出现的比例大于对照组噬菌体。*, $p < 0.05$;**, $p < 0.01$ 。

具体实施方式

[0023] 定义

[0024] 除非另有定义,本文中使用的技术与科学术语,具有与本发明所属领域普通技术人员通常理解相同含义。于冲突情况下,将以本文件(包括定义)为依归。

[0025] 术语“治疗”或“处理”意指授予有效量的化合物至有此需求的个体,其患有癌症,或有演变成此疾病的症状或倾向,其旨在治愈、减轻、缓解、补救或改善该疾病或其症状。此个体可由医疗保健专业人员基于任何合适诊断方法的结果而确定。

[0026] “有效量”意指赋予治疗个体疗效所需的活性化合物的量。有效剂量将可变,如本领域技术人员所认知的,其取决于授予途径、赋形剂使用、及与其他治疗性治疗共同使用的可能性。

[0027] 术语“抗癌药物”与术语“化学治疗剂”可互换。

[0028] 异硫氰酸荧光素(Fluorescein isothiocyanate;FITC)为橘黄色,其最大吸收波长为495nm。

[0029] “成人健康志愿者治疗的临床试验安全起始剂量的产业与评估人指导方针(Guidance for Industry and Reviewers Estimating the Safe Starting Dose in Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers)”由美国卫生与人类服务部食品药品监督管理局发表,其公开的“治疗有效量”可利用下列公式计算取得:

[0030] $HED = \text{以mg/kg计的动物剂量} \times (\text{以kg计的动物重量} / \text{以kg计的人体重量})^{0.33}$

[0031] 缩写:抗阉割前列腺癌(CRPC);噬菌体克隆204(PC204);磺酸玫瑰红B磺基罗丹明B(sulforhodamine B;SRB);脂质体封装的SRB(LS);超顺磁氧化铁纳米粒子(SPIONs);循环肿瘤细胞(CTC);癌症干细胞(CSCs);碱性磷酸酶染色(AP染色);藻红蛋白(phycoerythrin;PE)。

[0032] 于此,发明人使用噬菌体展示随机肽库鉴定新颖的肽SP204,其可结合至前列腺癌细胞。将在肿瘤与正常器官中的肽共轭的超顺磁氧化铁纳米粒子(SPIONs)与脂质体药物的诊断潜力和生物分布情况相较于彼等非靶向药物。在异种移植与原位模型中均观察到靶向纳米医药具有抗肿瘤活性,且增加携带人类前列腺癌小鼠的存活率。发明人的结果显示,

SP204具有相当大的潜力开发成针对前列腺癌的诊断工具及靶向药物递送系统。

[0033] 实施例

[0034] 材料与amp;方法

[0035] 细胞株

[0036] PC3、DU145与LNCaP人类前列腺癌细胞株及293T人类肾脏细胞于37℃ 5%CO₂下培养于补充有10%FBS的RPMI (PC3与LNCaP)、MEM (DU145) 及DMEM (293T) 培养基中。

[0037] 噬菌体展示生物淘选程序

[0038] 生物淘选程序的进行如前述。简言之,PC3细胞生长至接近80%汇合度,并于4℃的无血清培养基中,以Ph.D.-12 (New England Biolabs) 的 2×10^{11} 噬菌体处理1小时。于PBS清洗后,以RIPA缓冲液收取噬菌体,之后放大且使用ER2738大肠杆菌 (*E. coli.*) 菌株进行效价检测 (titer-detection)。将上述生物淘选步骤重复五次,接着随机选择噬菌体克隆进行培养,供细胞ELISA筛选。

[0039] 细胞ELISA分析

[0040] 将细胞接种于96孔ELISA培养盘上过夜,接着于室温下以2%多聚甲醛固定30min。于清洗后,细胞于4℃下以5%脱脂奶粉培养过夜。在移除剩余奶粉后,将所选噬菌体克隆加入且培养1小时。以PBS清洗三次后,细胞以辣根过氧化物酶 (HRP) 共轭的小鼠抗M13抗体 (1:2000稀释) 培养1小时。在重复清洗步骤后,培养盘以过氧化物酶底物邻苯二胺二盐酸盐 (o-phenylenediamine dihydrochloride) 加上H₂O₂孵育。反应通过加入3N HCl而终止,并以ELISA读盘仪 (Model 680, BioRad) 测定490nm的吸光度。

[0041] 流式细胞术分析

[0042] 以含10mM EDTA的PBS收集前列腺癌与对照组细胞株。将总数 4×10^8 至 5×10^9 pfu的噬菌体加至 2×10^5 个细胞中,并于4℃下孵育1小时。于4℃下以PE-或FITC-共轭的抗小鼠 Fab Abs培养30min之前,样本于4℃下以抗M13mAbs孵育1小时。利用流式细胞术分析讯号。

[0043] 体内归巢实验及检查噬菌体的组织分布

[0044] SCID小鼠皮下注射 5×10^6 个前列腺癌细胞。一旦前列腺癌异种移植物达到适当尺寸时 (约200~300mm³),小鼠静脉注射存在或不存在100μg合成肽的 2×10^9 pfu噬菌体。于10分钟后,将小鼠处死,并灌注50ml PBS,以移除未结合的噬菌体。将选取的器官与异种移植物肿瘤移除,且喷洒IPTG/X-Gal以测定由大肠杆菌菌株ER2738恢复的噬菌体效价。以理想切割温度化合物 (O.C.T.) 包埋部分器官与肿瘤,以制备免疫组织化学染色切片。

[0045] 噬菌体于异种移植物肿瘤切片的免疫组织化学定位

[0046] 将体内噬菌体归巢实验的组织样本包埋于冻结块中。各组织噬菌体分布的评估是首先以冷的PBS移除O.C.T.,之后冷冻切片以4%多聚甲醛固定10min。切片以1%BSA培养30min,以阻断非特异性结合。在清洗后,切片以稀释倍率1:250的小鼠抗M13抗体培养1小时,之后以基于聚合物的SUPER SENSITIVE™ IHC检测系统处理。简言之,切片以SUPER ENHANCER™试剂孵育20min及以聚HRP试剂孵育30min。以DAB作为色素原 (chromogen),以视觉化过氧化物酶活性,且通过添加PBS停止反应。制备物以苏木精 (hematoxylin) 轻度复染、以PERMOUNT™包埋、及利用光学显微镜检查。

[0047] 利用免疫组织化学分析噬菌体克隆对临床肿瘤手术标本的结合

[0048] 人类前列腺癌组织微点阵购自SuperBioChips及US Biomax Laboratories。依据

制造商的说明,将载玻片脱蜡,同时于TRILOGY™缓冲液系统中进行抗原修复(antigen retrieval)。切片以3% H_2O_2 与1%BSA阻断30min,之后添加 2×10^8 pfu/ μ l的噬菌体,并将切片孵育1小时。在清洗后,切片以稀释倍率1:250的小鼠抗M13抗体孵育1小时,之后以基于聚合物的SUPER SENSITIVE™IHC检测系统处理。

[0049] 噬菌体标记及成像

[0050] 噬菌体以荧光染料HILYTE™氟酸NHS酯(HILYTE™750,AnaSpec)标记。噬菌体(4×10^{11} pfu)随即用含20nmole HILYTE™750的PBS溶液孵育。噬菌体/荧光染料(fluorochrome)反应于室温避光下持续1小时。之后,标记的噬菌体溶液体积以PBS调整成1ml,且噬菌体以聚乙二醇沉淀法纯化。最后,将荧光染料标记的噬菌体再次悬浮于PBS。

[0051] SP204共轭量子点的合成

[0052] 量子点(QDs,Invitrogen)用于体内成像研究。肽共轭QDs的合成程序描述于Lu等人(2013)(PloS One 8,e66128)。简言之,QDs是以磺酸基SMCC(4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸磺酸基琥珀酰亚胺基酯;Thermo)进行共轭反应,以于QDs上产生马来酰亚胺基活化表面,并以NAP-5脱盐管柱移除游离的磺酸基SMCC。SP204-GGGC合成涉及硫醇化(thiolation)。马来酰亚胺官能化的QDs于4℃下以SP204-GGGC孵育过夜。SP204共轭QDs以NAP-5脱盐管柱纯化,以移除游离的QDs。

[0053] SP204-PEG-DSPE共轭体的合成

[0054] 将溶于0.25ml二氯甲烷的总共8.5mg的NHS-PEG-DSPE[N-羟基琥珀酰亚胺羧基聚乙二醇(MW,3400)衍生的二硬脂酰基磷脂酰基乙醇胺]加入含3.1mg SP204肽的0.25ml DMSO中。将11 μ l体积的三乙基胺加入混合物中催化反应。SP204与NHS-PEG-DSPE的化学计量摩尔比为1.1:1。反应于室温下缓慢旋转72小时。以3.5kDa截止膜(cut-off membrane)透析纯化SP204-PEG-DSPE共轭体,并经冻干干燥。产物以MALDI-TOF检测,并与原料进行比较。

[0055] 肽共轭脂质体药物的制备

[0056] 依据下列程序制备脂质体。简言之,将DSPC、胆固醇及MPEG₂₀₀₀-DSPE(针对磺基罗丹明B(SRB)及多柔比星,摩尔比为3:2:0.3;针对长春瑞滨,摩尔比为3:2:0.15)的混合物溶于氯仿,并利用旋转式真空蒸发器干燥,形成薄脂质膜。干燥的脂质膜于60℃下以250mM硫酸铵(针对SRB及多柔比星)或300mM 5-磺酸基水杨酸的铵盐(针对长春瑞滨)水合,接着摇晃直至溶液溶解。利用液态氮与60℃水浴,将溶液冷冻与解冻5次。藉由LIPOSOFAST®-100夹套挤出机(jacketed extruder),并通过100nm聚碳酸酯滤膜,将分散体挤出8次。以巴特利特法(Bartlett's method)测定磷脂浓度。多柔比星及长春瑞滨以远程填载法(remote loading method)封装,其浓度为每10 μ mol磷脂含1mg的多柔比星或3.5mg的长春瑞滨。SP204-PEG-DSPE随后并入预先形成的脂质体,其于60℃水浴中摇晃混合物30min,之后迅速置于冰上10min。将额外的脂质体缓冲液换成HEPES缓冲液,并以SEPHADEX®G-50管柱移除释出的游离药物、未共轭肽及未并入的共轭体。利用ELISA读盘仪,测定 $\lambda_{EX/EM}$ =485/590nm的荧光值,以测定多柔比星浓度。以HPLC测定长春瑞滨浓度。利用Malvern Zetasizer Nano ZS,分析囊泡的 ζ 平均粒径(zeta average size)。

[0057] MTT细胞增殖试验

[0058] 将细胞种植于96孔盘(4000个细胞/孔)。于过夜孵育后,脂质体药物于不存在或存在SP204下加至细胞中24小时,随后将细胞孵育于无药物的培养基中48小时。最后,于额外3

至4小时孵育后,加入MTT试剂与DMSO,并以ELISA读盘仪(SPECTRAMAX®M5)测定540nm的吸光度。

[0059] 前列腺癌细胞的SP204-LS与SP204-SPIONs摄入

[0060] 将细胞种植于24孔盘(2×10^5 个细胞/孔)过夜;接着,于0.17、0.5、1、4、8、及24小时之后加入脂质体SRB。细胞于PBS清洗后,以1%TRITON™X-100溶解,接着测定细胞内SRB。细胞溶解产物以12,000rpm离心5min,并利用ELISA读盘仪,测定 $\lambda_{EX/EM} = 520/570\text{nm}$ 的荧光强度。

[0061] 将PC3细胞移至含10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 超顺磁氧化铁纳米粒子(SPIONs)或SP204-SPIONs的培养基,并于37°C下培养细胞4小时,以测定铁摄入(iron uptake)。细胞以PBS清洗,移除游离纳米粒子,并以普鲁士蓝试剂(Prussian blue reagent)培养、核快速红色溶液染色、及光学显微镜观察。

[0062] 前列腺癌组织中的SP204定位

[0063] 以SP204共轭Dex- Fe_3O_4 纳米粒子,制成SP204-SPIONs。各Dex- Fe_3O_4 纳米粒子可连接超过10个SP204分子。在石蜡包埋的异种移植物切片以TRILOGY™缓冲液系统脱蜡及回收后,切片于4°C下以SPIONs或SP204-SPIONs(40 $\mu\text{g}/\text{ml}$)孵育12小时、清洗,之后以常规普鲁士蓝试剂孵育30min,该试剂内含5%铁氰化钾+5%HCL(1:1)。接着,以核快速红色溶液复染(counter staining)5min。制备物以PERMOUNT™固定,并以光学显微镜观察。大规模进行SPION与SP204-SPION归巢试验,如前面“体内归巢实验”一节所述,并省略4°C孵育12小时的步骤。

[0064] 使用SP204-QDs与SP204-SPIONs的人类前列腺癌异种移植物体内成像

[0065] 六至八周龄SCID小鼠皮下注射PC3或DU145前列腺癌细胞。一旦肿瘤大小达到约200 mm^3 ,则经由尾静脉注射HILYTE™750共轭噬菌体或QD-共轭肽。以IVIS®200成像系统撷取HILYTE™-750与QDs的荧光影像。以量化方式比较肿瘤的HILYTE™750与QDs累积情形,其以LIVING IMAGE®软件(Xenogen)减去荧光强度的背景值。

[0066] 针对动物MRI实验,使用7Tesla MRI系统(Bruker,USA),以取得较佳分辨率。发明人选择TurboRARE-T2脉冲程序(TR/TE 3000/32.862ms,回转角度180,及矩阵大小256 \times 256)以得较佳T2加权成像。切片厚度为1mm并具1mm间隙,视域(field of view;FOV)为8.5 \times 4cm,以冠状扫描测试管,且于NEX定为4时,矢状扫描(sagittal scanning)6min与24s的扫描时间。之后影像以Bruker healthcare提供的工作站分析。

[0067] 用于肽靶向治疗研究的动物模型

[0068] 将总数 5×10^6 个前列腺癌细胞皮下注射至六周龄SCID小鼠背侧。当肿瘤大小达到150 mm^3 时,经由尾静脉注射含或不含SP204的脂质体药物。每周测量两次小鼠体重及肿瘤大小。于实验结束时,将一些器官及肿瘤包埋于O.C.T.化合物中。

[0069] 末端脱氧核糖核苷酸转移酶介导的dUTP缺口末端标记(Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling,TUNEL)染色

[0070] 于37°C下,将固定的切片孵育于TUNEL反应混合物(Roach Diagnostics)中1小时,并以DAPI试剂复染。于荧光显微镜下观察载玻片,并以METAMORPH®软件定量。

[0071] CD31染色

[0072] 以大鼠抗小鼠CD31抗体培养孵育固定的切片。于二次抗体孵育后,以DAPI试剂复染

载玻片。之后于荧光显微镜下观察载玻片,并以METAMORPH[®]软件定量。

[0073] 原位移植及治疗研究

[0074] 以Lenti-Luc病毒(含有荧光素酶基因的慢病毒)转染PC3细胞,并以嘌呤霉素筛选法(puromycin screening)筛选PC3-Luc稳定细胞株。以250mg/kg剂量的阿佛丁(Avertin)麻醉后,将PC3-Luc细胞(每只小鼠20 μ l PBS,内含 5×10^5 个细胞)原位移植至SCID小鼠前列腺背瓣。于七天后,依据XenogenIVIS[®]200Luminal Image测得的光子通量指数(photon flux indices),将所有含肿瘤小鼠随机分成五组(每组n=8)。以不同抗癌药物或PBS配方处理含肿瘤小鼠。每隔7天记录肿瘤发展。测量体重及存活率。

[0075] 统计分析

[0076] 以Student氏t检定计算小鼠体重变化的P值。以卡本-麦尔(Kaplan-Meier)存活曲线测定存活率。以对数秩检定(log rank test)测定显著差异性。

[0077] 结果

[0078] 辨别结合至前列腺癌细胞的新颖肽

[0079] 发明人使用噬菌体展示随机肽库,分离能结合PC3前列腺癌细胞的噬菌体。于五回合的亲合性筛选后,第五回合的回收率为第一回合的475倍以上(图1A)。随机分离噬菌体克隆,并以细胞ELISA试验检查其与前列腺癌细胞与正常细胞反应的能力。选取及测序九个噬菌体克隆(表1),其证实对前列腺癌细胞有相当高的反应性但对293T无反应性(图1B)。进行流式细胞术分析,以辨别特异性结合至PC3前列腺癌细胞而非细胞内分子的噬菌体克隆;噬菌体克隆204(PC204)发现对前列腺癌细胞具高度反应性,而其他八个噬菌体克隆呈现弱结合活性。表1显示比对的PC3细胞筛选出的噬菌体展示肽序列。

[0080] 表1

肽名称	氨基酸序列	SEQ ID NO:
SP103	FPWTEPSYKQGD	1
SP108	FPWTEPLYKYGE	2
SP135	FPWTEPSYKYGD	3
SP149	MPWKESAWLEKI	4
[0081] SP150	MPWTEPNYLLTQ	5
SP195	IPWKESACLAKI	6
SP196	APWLEGSYKTVY	7
SP204	KQFSALPFNFYT	8
SP215	SEFPRSWDMETN	9

[0082] 发明人以不同浓度的噬菌体孵育三个前列腺癌细胞株 (PC3、DU145及LNCaP)。利用荧光活化细胞分选分析,显示PC204与PC3与DU145强力反应,但对LNCaP仅显示中度反应性(图1C)。所有受测噬菌体克隆对293T细胞株的辨识皆差。PC3或DU145皆于4℃或37℃下以PC204或对照组噬菌体孵育30min。孵育于4℃时,观察到PC204分布于细胞膜上。当细胞孵育于37℃时,发现荧光讯号内化且通过细胞质全面扩散(图1D)。

[0083] 发明人以人类前列腺癌组织阵列进行PC204的免疫组织化学染色。对照组噬菌体无法辨识前列腺癌(图1E),但PC204可结合(图1F)。在不同病患的86个前列腺癌标本中,74%(64/86)呈现阳性PC204染色(图1G)。数据显示,PC204可辨识表达于前列腺癌细胞株及前列腺癌手术标本细胞上的不明分子。

[0084] PC204肿瘤靶向研究的动物模型

[0085] 为了探讨PC204的体内肿瘤靶向能力,发明人利用静脉注射噬菌体至含有PC3(图2A)或DU145衍生的(图2B)肿瘤异种移植小鼠的尾静脉。以肿瘤与正常器官的噬菌体效价比率测定肿瘤归巢能力,并相较于对照组噬菌体(图2A与2B)。PC204呈现强的肿瘤归巢能力,其中肿瘤块的噬菌体浓度比正常器官的(包括大脑、肺脏、心脏及前列腺)高6至20倍。然而,对照组噬菌体(Con-phage)显示无此归巢能力(图2A与2B)。利用肽竞争抑制实验进一步确认PC204噬菌体的肿瘤归巢能力。以PC204及其同源合成肽SP204共同注射至含有PC3或DU145异种移植小鼠。共同注射合成肽SP204与PC204可抑制PC204自肿瘤组织恢复(recovery)。SP204抑制PC204结合至PC3与DU145肿瘤组织的能力分别为5.2与2.87倍,而相

同浓度的对照组肽显示无此抑制功效(图2A与2B)。

[0086] 为了确认PC204的分布,发明人以噬菌体抗体进行源自归巢及竞争实验的肿瘤与正常器官的组织切片的免疫染色(图2C)。PC204噬菌体靶向肿瘤组织而非正常器官。然而,共同注射PC204与同源合成肽SP204的肿瘤组织观察到无免疫反应活性。发现到,既非肿瘤细胞亦非正常器官对于对照组噬菌体产生免疫反应性(图2C)。发明人将HILYTE™750标记的噬菌体注射至小鼠肿瘤模型,并利用肿瘤成像测定噬菌体归巢能力。以PC204-HILYTE™750或对照组噬菌体-HILYTE™750静脉注射含有PC3或DU145衍生的异种移植物SCID小鼠,并于注射后利用IVIS®200监测荧光影像24h。相较于对照组噬菌体-HILYTE™750注射的PC3或DU145衍生的异种移植物小鼠,PC204-HILYTE™750注射小鼠的肿瘤区域荧光强度分别增加7.6与6.5倍(图2D)。综上,这些结果指出,PC204噬菌体对前列腺癌异种移植物具有体内肿瘤靶向能力。

[0087] SP204共轭脂质体呈现增强的细胞内药物递送及细胞毒性

[0088] 发明人合成针对PC204的肽配体(SP204),并将此配体偶联至NHS-PEG₃₄₀₀-DSPE以形成SP204-PEG₃₄₀₀-DSPE。在插入磷脂DSPE后,将SP204-PEG₃₄₀₀-DSPE共轭体偶联至含有磺基罗丹明B(SRB)、多柔比星或长春瑞滨的脂质体纳米粒子外表面(图7)。

[0089] 以SP204-LS处理的前列腺癌细胞观察到比以非靶向的LS孵育的细胞有更大量的SRB(图3A与3B)。以SP204-LS处理的细胞周围细胞质含有内化的SRB,而单独以LS处理的细胞则无(图3C)。这些结果指出,SP204可结合至前列腺癌细胞表面,并诱发受体介导的LS胞饮作用。

[0090] 为了评估是否SP204可增强脂质体多柔比星(LD)的治疗潜力,发明人以PC3与DU145细胞进行SP204-LD的体外细胞毒性试验。SP204-LD的半最大抑制浓度(IC₅₀)分别比PC3与DU145细胞LD的低2.0与3.4倍(图3D与3E)。此外,发明人亦开发稳定的长春瑞滨填充型靶向脂质体(sLV),其中插入SP204-PEG₃₄₀₀-DSPE。SP204共轭脂质体长春瑞滨(SP204-sLV)的IC₅₀发现到分别比PC3与DU145细胞sLV的低4.5与10.1倍(图3F与3G)。

[0091] SP204-QD与SP204-SPIONs的体内肿瘤成像

[0092] 发明人将SP204共轭量子点(SP204-QD)或非共轭量子点(QD)注射至含有PC3或DU145衍生的异种移植物的的小鼠。于注射后4小时,相较于以QD处理的PC3或DU145衍生的异种移植物小鼠,SP204-QD处理小鼠肿瘤区域的近红外线荧光讯号强度分别增加16.6与5.2倍(图4A)。发明人进一步检查细胞的超顺磁氧化铁纳米粒子(SPIONs)摄入,以测定是否SP204共轭SPIONs(SP204-SPIONs)可稳定增强肿瘤成像。PC3细胞以SP204-SPIONs或SPIONs孵育4小时,之后细胞以普鲁士蓝染色。发明人于SP204-SPIONs处理的PC3细胞内观察到比非靶向性SPIONs孵育的细胞更高的氧化铁浓度(图4B),确认了SP204共轭至SPIONs可增进细胞摄入。相较于以SPIONs处理的切片,以SP204-SPIONs孵育的PC3异种移植物石蜡切片(图4C)与前列腺癌病患手术标本(图4D)观察到实质的普鲁士蓝颗粒反应染色。

[0093] 探讨含有肿瘤小鼠于外部磁场下体内SP204-SPIONs的肿瘤特异性累积及MRI适应性。以SP204-SPIONs或SPIONs注射含有PC3肿瘤小鼠四小时后,发明人以普鲁士蓝进行这些异种移植物的石蜡切片染色。SP204-SPIONs组的异种移植物切片含有零星分布的蓝色颗粒反应产物(图4E)。于T2加权MRI期间,这些肿瘤显示明显讯号强度下降(图4G)。于以SPIONs处理后,观察到未有普鲁士蓝染色或MRI讯号(图4E与4F)。虽然以SP204-SPIONs注射的小鼠

肿瘤之后与之前对比影像间讯号强度比 (signal intensity ratio) 减少20.1%，但以SPIONs注射的小鼠肿瘤观察到无变化(图4H)。

[0094] SP204-LD的药物动力学及生物分布

[0095] 经由尾静脉注射，投予相符于2mg多柔比星/kg剂量的游离型多柔比星、LD及SP204-LD至NOD/SCID小鼠，测定这些药物的药物动力学性质及生物分布。于选取的时间点采集血液样本，并分析多柔比星的量。游离型多柔比星的药物动力学情况较差，可能是因其分子量小(Mr. 543.54)，使其能有效经由肾脏清除。LD组与SP204-LD组的多柔比星浓度呈现类似的随时间下降情况，显示与SP204共轭不会影响血浆蛋白交互作用或影响LD的体内血浆药物动力学。

[0096] 于注射后24小时，SP204-LD组的平均肿瘤内多柔比星浓度分别比FD组与LD组的高6.1与2.6倍。FD组、LD组及SP204-LD组的肿瘤多柔比星AUC₀₋₄₈分别为4.27、9.82及26.02 μ g.h/g。于各检查时间点，所有正常器官的SP204-LD分布皆高度类似于LD。

[0097] 小鼠模型SP204介导的靶向脂质体的治疗效用

[0098] 发明人以LD、SP204-LD或等体积PBS经由尾静脉注射含有PC3衍生的异种移植体SCID小鼠(每3.5天1mg/kg，六次注射，总累积剂量为6mg/kg)。于处理期结束时，LD组的肿瘤大小逐渐增为SP204-LD组的3.0倍(图5A)。处理SP204-LD小鼠的最终平均肿瘤重量为0.23g，相较之下，处理LD的小鼠为0.69g且处理PBS缓冲液的小鼠为1.30g(图5B与5C)。肿瘤重量的明显减少证实，相较于LD，SP204-LD具有优越的抑制效用。于处理期间，SP204-LD组与LD组的体重无明显变化。SP204-LD可增加小鼠异种移植体模型的中位数总生存率(median overall survival rate)(图5D与5E)：SP204-LD组的中位数生存率为74d，明显比LD组的47d及PBS组的33d更长(图5D与5E)。

[0099] 标记的弥漫性坏死/凋亡区域显示，SP204-LD组比LD组与PBS组有更大的散布。以抗CD31抗体检测肿瘤血管，并以末端脱氧核糖核苷酸转移酶介导的dUTP缺口末端标记(TUNEL)鉴定凋亡细胞。肿瘤的代表性荧光显微镜视野显示，SP204-LD处理组比LD处理组或PBS组有更低密度的血管及更多的凋亡肿瘤细胞。相较于LD组与PBS组，SP204-LD处理组明显较少区域含有CD31⁺内皮细胞。SP204-LD处理组比LD组与PBS处理组有更多凋亡细胞。使用DU145异种移植体的研究观察到类似结果：相较于LD处理，SP204-LD处理抑制肿瘤生长(图5F、5G及5H)，而处理期间体重不受任何药物影响。SP204-LD可增加含有DU145衍生的异种移植体小鼠的中位数总存活率(图5I与5J)。SP204-LD组的中位数存活率为174d，其明显比LD组的140d与PBS组的139d更长(图5I与5J)。SP204-LD组比LD组的坏死/凋亡区域更多且血管更少。

[0100] 发明人检测SP204-sLV在抑制含有PC3衍生的异种移植体SCID小鼠肿瘤的功效。治疗经由尾静脉注射投予(每3.5天1mg/kg，持续四次注射，总累积剂量为4mg/kg)。于治疗期结束时，sLV组的肿瘤大小逐渐增至SP204-sLV组的5.3倍(图5K)。以SP204-sLV处理的小鼠的最终平均肿瘤重量为0.13g，对比于以sLV处理的小鼠的0.53g及以PBS缓冲液处理的小鼠的1.03g(图5L)。于处理期间，SP204-sLV组或sLV组未观察到体重明显改变，而SP204-sLV组比sLV组检测到更多坏死/凋亡区域及更少血管。使用DU145衍生的异种移植体的不同动物模型研究观察到类似结果(图5M、5N)。于处理期间，没有组别呈现明显体重改变。

[0101] 异种移植体及原位前列腺癌模型的综合治疗的治疗潜力

[0102] 于异种移植物前列腺癌模型中,分析单独或组合的非靶向脂质体药物与靶向脂质体药物的影响。以LD、sLV、SP204-LD、SP204-sLV、LD+sLV、SP204-LD+SP204-sLV或等体积PBS静脉注射含有DU145衍生的异种移植物NOD-SCID小鼠。多柔比星及长春瑞滨由尾静脉注射授予,其中每3.5天1mg/kg,总共八剂。以LD或sLV处理适度抑制肿瘤生长,但组合以LD与sLV处理造成统计学上显著抑制肿瘤生长(图6A)。相较于未处理的对照组,以LD与sLV两者处理抑制70%生长。然而,以LD或sLV处理则分别抑制64%或45%肿瘤生长(图6A)。相较于所有接受非靶向脂质体药物组别,接受SP204靶向脂质体药物组别呈现增强的肿瘤生长抑制。授予SP204-LD与SP204-sLV两者抑制85%肿瘤生长,而以SP204-LD或SP204-sLV处理则分别抑制76%或64%肿瘤生长(图6A)。体重不受任何处理影响(图6B)。相较于其他处理组,以SP204-LD与SP204-sLV共同处理的小鼠显示明显改进存活率(图6C与6D)。这些结果指出,于前列腺癌异种移植物模型,组合的SP204-LD与SP204-sLV处理的治疗效用优于其他受测配方。

[0103] 在宿主肿瘤交互作用及对治疗的反应方面,原位肿瘤模型比异种移植物模型更相关。发明人探讨以SP204-LD与SP204-sLV组合处理的抗肿瘤潜力,其将这些药物静脉注射于人类前列腺癌的原位模型,之后利用生物发光成像检查PC3-Luc肿瘤,其稳定表达萤火虫荧光素酶(firefly luciferase)。于首次治疗注射前,发明人观察到生长的原位肿瘤主要位于骨盆腔(pelvic cavity)。

[0104] 小鼠注射载剂(PBS)、多西紫杉醇(5mg/kg)、脂质体药物、或靶向脂质体药物(多柔比星1mg/kg;长春瑞滨2mg/kg)。SP204-LD与SP204-sLV处理小鼠的肿瘤生物发光程度比其他治疗组的更低(图6E与6F)。不同处理组间的体重无明显不同(图6G)。相较于其他组别,以SP204-LD与SP204-sLV组合处理增强抗肿瘤效果且延长原位模型小鼠存活率(图6H与6I)。于研究结束时,PBS、FD与FV、LD与sLV、SP204-LD与SP204-sLV、及多西紫杉醇的中位数存活时间分别为36、39、65、72、及58天。对数秩检定的存活分析显示,相较于其他受测处理组,SP204-LD与SP204-sLV处理明显延长动物存活率。

[0105] 于小鼠前列腺癌异种移植物及原位模型中,经由增强药物递送至肿瘤组织,前列腺癌细胞靶向肽SP204介导的靶向脂质体明显增加多柔比星及长春瑞滨的治疗效用。SP204对前列腺癌细胞具有高亲和性,且可诱发胞饮作用。SP204共轭脂质体药物在抑制肿瘤生长方面明显更有效。SP204辨识表达于许多前列腺癌标本上的肿瘤抗原。此说明,SP204具有成为靶向配体的潜力,以增强抗癌药物的治疗效用。

[0106] SP204肽可辨识前列腺癌手术标本,且增强PC3与DU145异种移植物模型的肿瘤治疗。PC3与DU145两者均为CRPC细胞株。长春瑞滨靶向细胞微管体(microtubule apparatus),且多西紫杉醇为CRPC病患的标准化学治疗剂。SP204-LD与SP204-sLV可抑制CRPC肿瘤生长。结合SP204介导的靶向脂质体与两种不同作用机制药物,如多柔比星(拓扑异构酶抑制剂)及长春瑞滨(有丝分裂纺锤体抑制剂),明显抑制CRPC的肿瘤生长。这些结果说明,SP204-LD与SP204-sLV可用于治疗CRPC。

[0107] 偶联靶向肽SP204与基于脂质的脂质体药物不会影响药物粒径或药物动力学。SP204肽共轭靶向脂质体的药物动力学性质与这些非靶向脂质体一致。SP204介导的靶向脂质体增强抗癌药物于肿瘤组织中的累积,而不会增加药物递送至非癌性宿主组织或增强宿主毒性。

[0108] SP204-SPIO强烈且选择性累积于肿瘤组织中,说明其具有用于前列腺癌靶向成像的极大潜力。癌症干细胞(CSCs)对于前列腺癌发展出抗药性扮演重要角色。CD133,跨膜糖蛋白家族的成员,为CSCs的重要标记。PC204对于CD133⁺与CD133⁻PC3细胞具有强的亲和性,而对照组噬菌体证实对于受测细胞无结合活性(图8A)。发明人培养癌细胞,其附着成肿瘤球,且利用AP染色观察到强烈反应(图8B)。发明人观察到,以SP204-LS处理的PC3肿瘤球逐渐增加大量SRB,而以非靶向LS孵育的细胞则检测到极低剂量的SRB(图8C)。此说明,脂质体共轭SP204可藉由PC3肿瘤球有效内化SRB。

[0109] 上皮细胞黏附分子(Epithelial cell adhesion molecule;EpCAM)于许多癌症(包括前列腺癌)中过度表达。其在细胞与细胞间的黏附、侵袭、迁移及增殖中扮演重要角色。过度表达EpCAM导致发展成晚期肿瘤阶段及较短的无复发存活率。双重染色显示,几乎90%的EpCAM⁺PC3细胞位于PC204(图8D)。SP204以高度特异性靶向前列腺癌细胞及前列腺癌干细胞。因此,SP204具有用于前列腺癌的治疗及分子成像的高度临床潜力。

[0110] 总结,本发明涉及新颖肽SP204,其能于体外与体内特异性结合至前列腺癌细胞的细胞表面。以SP204连接含多柔比星及长春瑞滨的脂质体,可增加这些药物对于含有人类前列腺癌异种移植物小鼠的治疗效用,其经由增强肿瘤凋亡且减少肿瘤血管生成(angiogenesis)。本发明的靶向肽可增加抗癌药物如多柔比星经由脂质体靶向后于肿瘤组织中的浓度,突显出增强多柔比星递送及渗透肿瘤的能力。此结果说明,SP204肽适于肿瘤细胞的特异性靶向,以治疗前列腺癌,并促进此恶性肿瘤的分子成像。

SEQUENCE LISTING

<110> 台湾地区“中央研究院”

<120> 用于靶向、成像和治疗前列腺癌的肽共轭的纳米粒子

<130> 10011-061PCT

<150> 62278295

<151> 2016-01-13

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> SP103

<400> 1

Phe Pro Trp Thr Glu Pro Ser Tyr Lys Gln Gly Asp

1 5 10

[0001]

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> SP108

<400> 2

Phe Pro Trp Thr Glu Pro Leu Tyr Lys Tyr Gly Glu

1 5 10

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> SP135

<400> 3

Phe Pro Trp Thr Glu Pro Ser Tyr Lys Tyr Gly Asp

1 5 10

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> SP149

<400> 4

Met Pro Trp Lys Glu Ser Ala Trp Leu Glu Lys Ile

1 5 10

<210> 5

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> SP150

<400> 5

[0002]

Met Pro Trp Thr Glu Pro Asn Tyr Leu Leu Thr Gln

1 5 10

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> SP195

<400> 6

Ile Pro Trp Lys Glu Ser Ala Cys Leu Ala Lys Ile

1 5 10

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> SP196

<400> 7

Ala Pro Trp Leu Glu Gly Ser Tyr Lys Thr Val Tyr

1 5 10

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> SP204

<400> 8

[0003] Lys Gln Phe Ser Ala Leu Pro Phe Asn Phe Tyr Thr

1 5 10

<210> 9

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> SP215

<400> 9

Ser Glu Phe Pro Arg Ser Trp Asp Met Glu Thr Asn

1 5 10

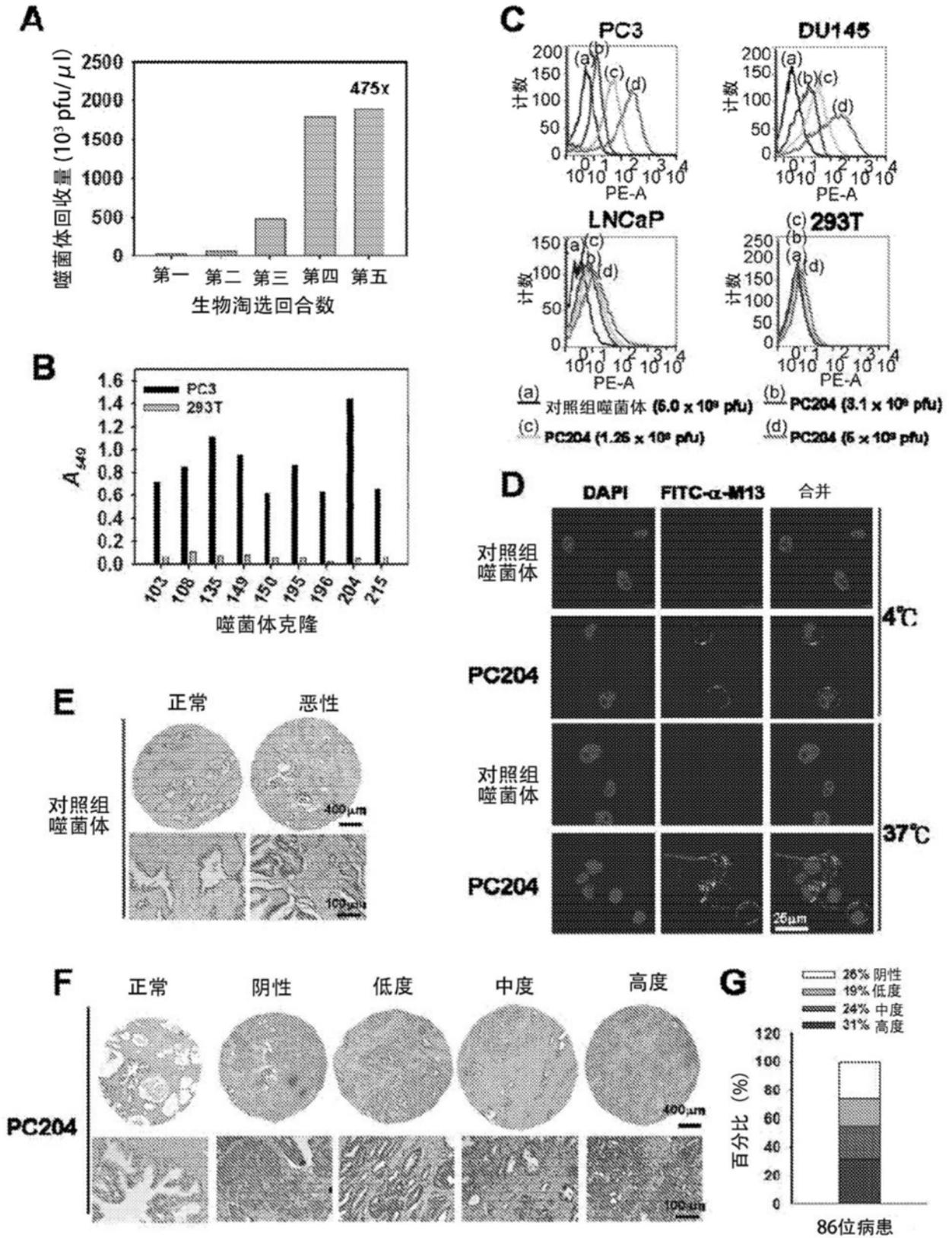


图1

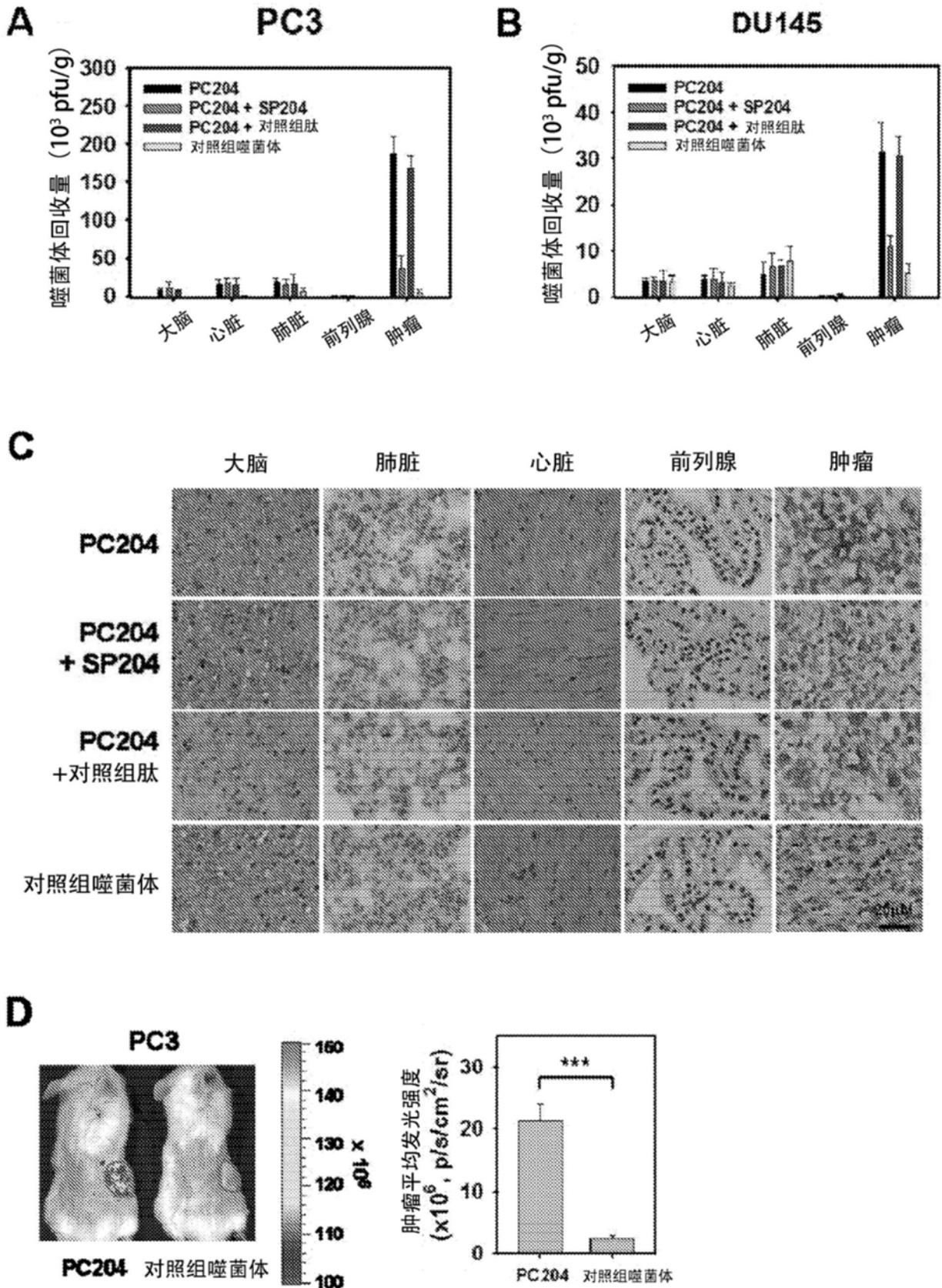


图2

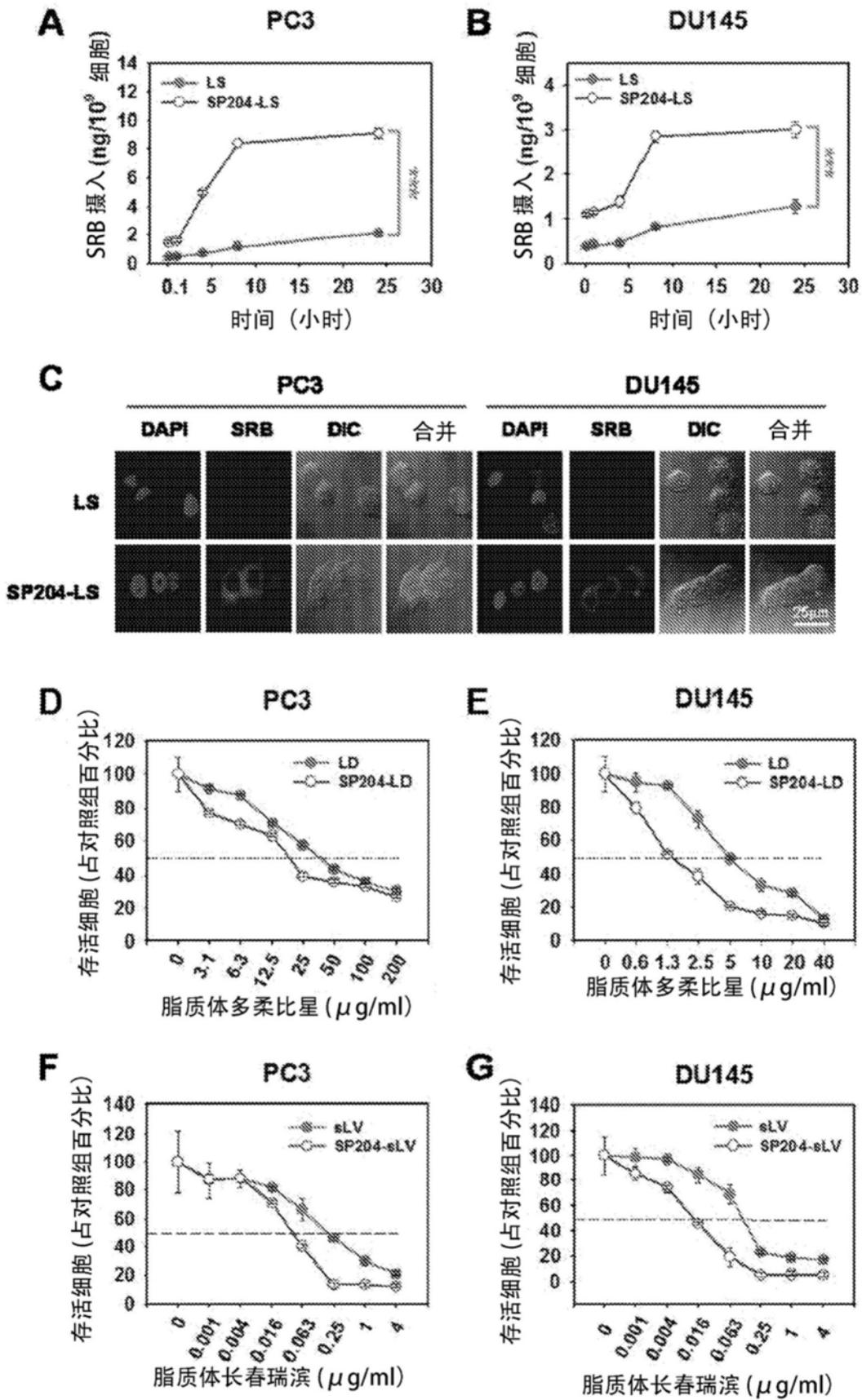


图3

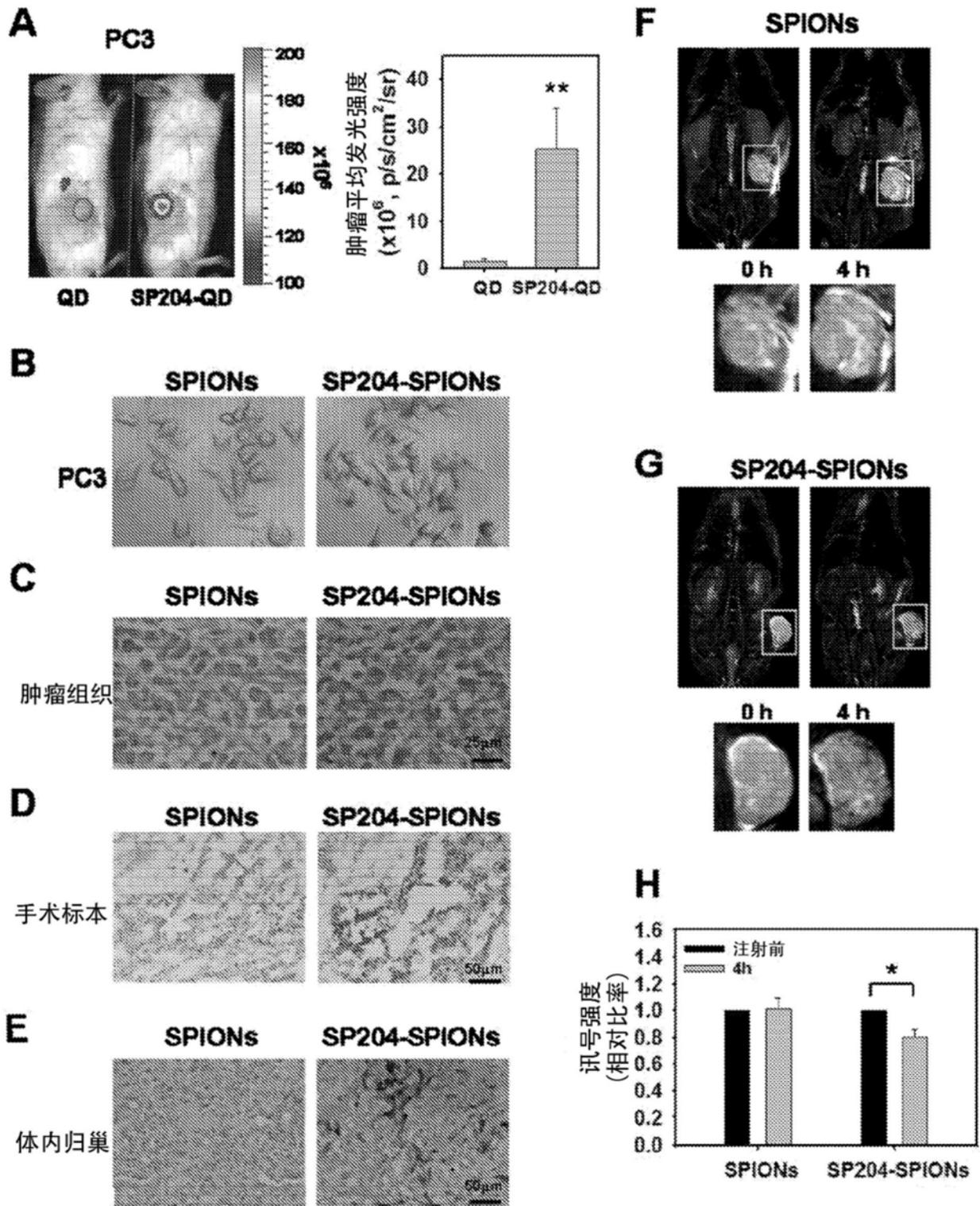


图4

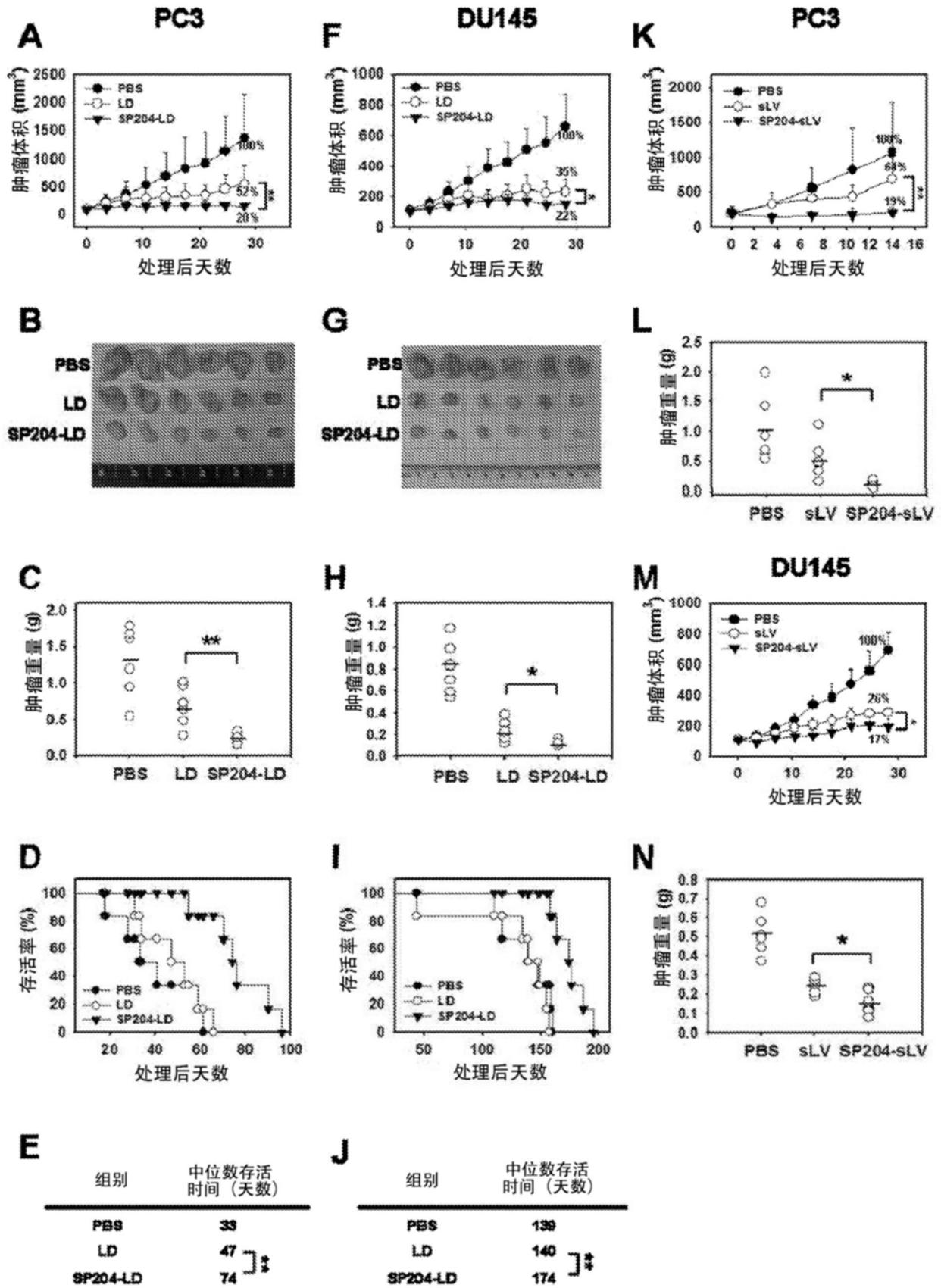


图5

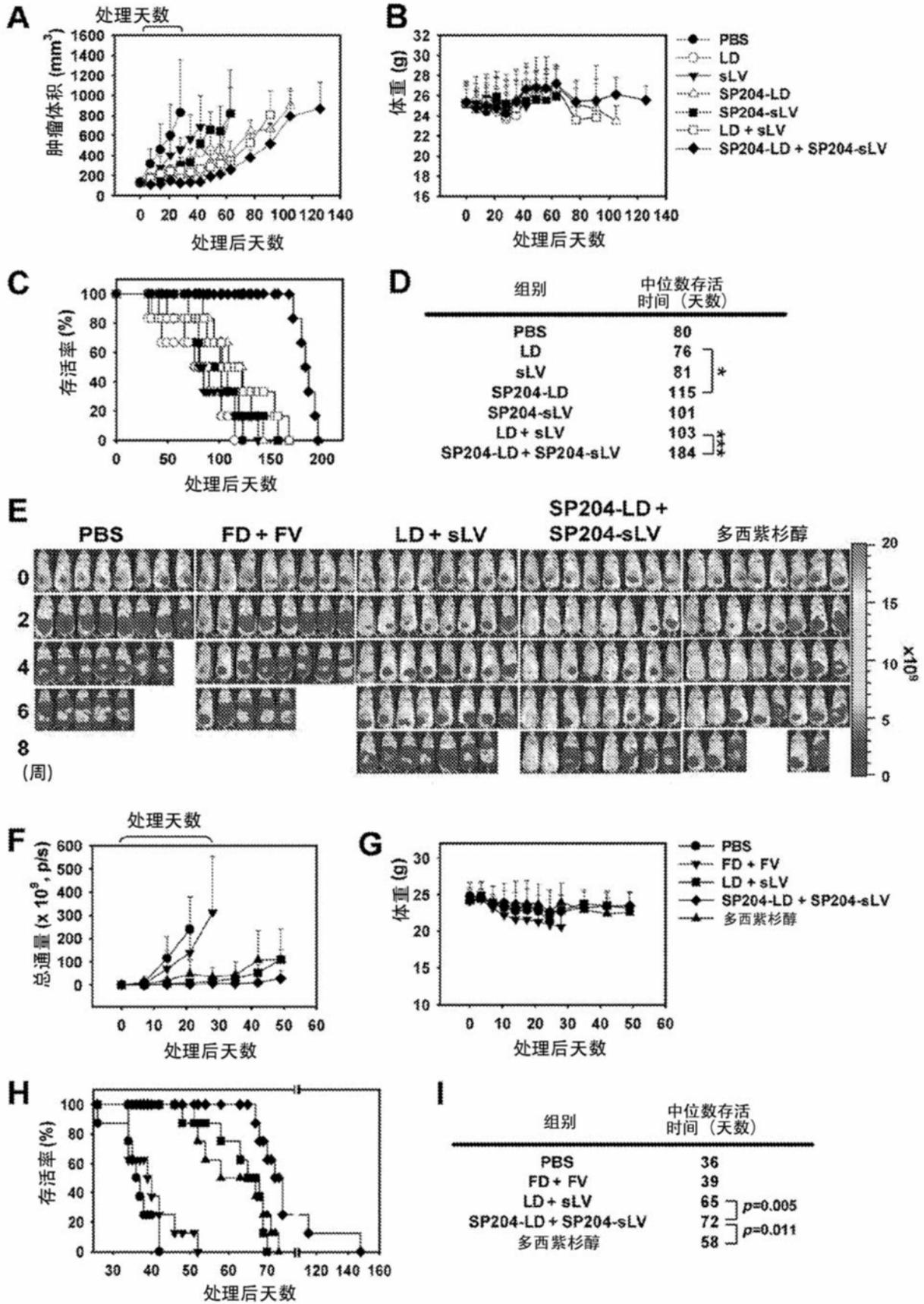


图6

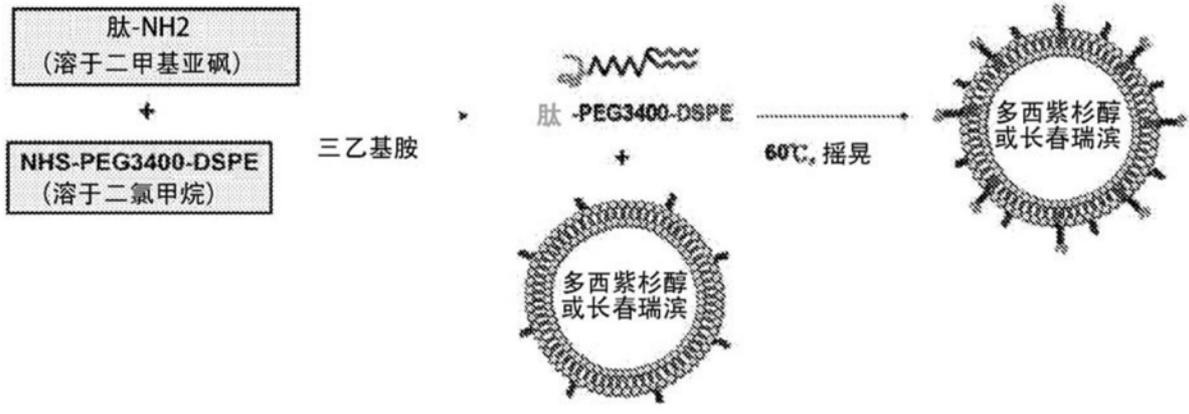


图7

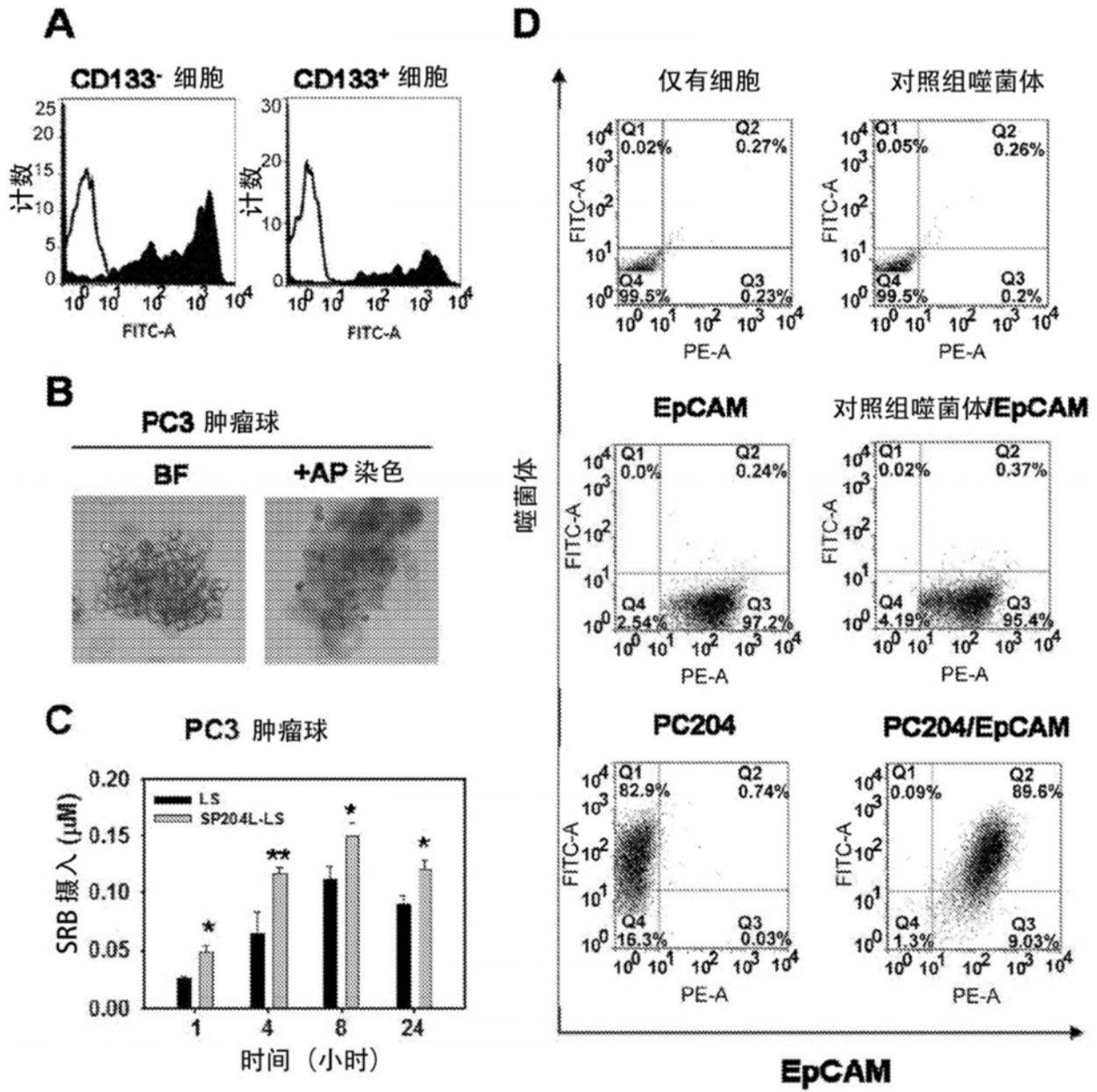


图8