



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103845290 A

(43) 申请公布日 2014. 06. 11

(21) 申请号 201310631940. 6

(22) 申请日 2013. 12. 02

(30) 优先权数据

61/732, 629 2012. 12. 03 US

(71) 申请人 曼丽国际有限公司

地址 新加坡新加坡

(72) 发明人 游廷彬 苏矢宏

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 吴小明

(51) Int. Cl.

A61K 9/127(2006. 01)

A61K 9/107(2006. 01)

A61K 31/436(2006. 01)

A61K 47/34(2006. 01)

A61K 47/42(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

A61P 35/02(2006. 01)

权利要求书2页 说明书10页 附图2页

(54) 发明名称

UMIROLIMUS 及其衍生物用于治疗癌症的用途

(57) 摘要

本发明提供了具有增强的渗透性和在肿瘤部位滞留的新型包封的 umirolimus 和 umirolimus 聚合物缀合物制剂。还提供了通过施用所述 umirolimus 制剂用于治疗癌症的方法。

1. 一种药物制剂,所述药物制剂包含:被包封在脂质体或聚合物胶束中的 umirolimus;以及药用赋形剂、载体或稀释剂,其中所述脂质体或所述聚合物胶束的粒度为 10-200nm。

2. 根据权利要求 1 所述的制剂,其中所述 umirolimus 被包封在包括聚乙二醇 (PEG) 缀合的磷脂 (PEG 化磷脂) 和磷脂酰胆碱 (PC) 的脂质体中,基于所述 PEG 化磷脂和所述 PC 的量,所述 umirolimus 以 0.1-10% 的摩尔比存在,并且所述 PEG 的长度为 10-3000 个单体单元。

3. 根据权利要求 2 所述的制剂,其中所述磷脂选自以下组成的组:二硬脂酰磷脂酰胆碱 (DSPC),二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 (DSPE),二硬脂酰磷脂酰甘油 (DSPG),二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱 (DMPC),二油酰磷脂酰胆碱 (DOPC),二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE) 和二棕榈酰磷脂酰甘油 (DPPG)。

4. 根据权利要求 3 所述的制剂,其中所述 PC 是氢化大豆 PC (HSPC),卵 PC 或大豆 PC。

5. 根据权利要求 4 所述的制剂,其中所述磷脂是 DSPE,所述 PC 是 HSPC,并且所述 umirolimus、所述 PEG 化磷脂和所述 PC 之间的摩尔比为 10:60:30。

6. 根据权利要求 4 所述的制剂,其还包含胆固醇,其中所述磷脂是 DSPE,所述 PC 是 HSPC,所述 umirolimus 以 0.1-2% 的摩尔比存在,并且所述 PEG 化磷脂、所述 PC 和所述胆固醇之间的摩尔比为 55-65:2-10:20-40。

7. 根据权利要求 1 所述的制剂,其中所述 umirolimus 被包封在包括二嵌段共聚物的聚合物胶束中并且所述 umirolimus 以所述聚合物胶束的 5-40 重量 % 存在。

8. 根据权利要求 7 所述的制剂,其中所述二嵌段共聚物是聚乙二醇-聚交酯 (PEG-PLA) 或聚乙二醇-聚己酸内酯 (PEG-PCL)。

9. 根据权利要求 1 所述的制剂,其中所述 umirolimus 被包封在包括三臂嵌段共聚物的聚合物胶束中,并且所述 umirolimus 以所述聚合物胶束的 5-40 重量 % 存在。

10. 根据权利要求 9 所述的制剂,其中所述三臂嵌段共聚物是聚乙二醇 (聚交酯)₂[PEG(PLA)₂]。

11. 根据权利要求 1 所述的制剂,其中所述 umirolimus 被包封在包括嵌段复合肽的聚合物胶束中,所述嵌段复合肽含有亲水肽和疏水肽,所述亲水肽的长度为 40-300 个氨基酸,所述疏水肽的长度为 10-40 个氨基酸,并且所述 umirolimus 以所述聚合物胶束的 5-40 重量 % 存在。

12. 根据权利要求 11 所述的制剂,其中所述亲水肽是聚 -Asp,聚 -Gln,聚 -Asn 或聚 -Glu。

13. 根据权利要求 12 所述的制剂,其中所述疏水肽是聚 -Ala,聚 -Leu,聚 -Ile,聚 -Val,聚 -Phe,聚 -Tyr 或聚 -Trp。

14. 根据权利要求 13 所述的制剂,其中所述亲水肽是聚 -rac-Asp 并且所述疏水肽是聚 -rac-Phe。

15. 根据权利要求 1 所述的制剂,其中所述 umirolimus 被包封在包括缀合至亲水聚合物的疏水肽的聚合物胶束中,所述疏水肽的长度为 5-40 个氨基酸,并且所述亲水聚合物的分子量为 2000-100000 道尔顿。

16. 根据权利要求 15 所述的制剂,其中所述疏水肽是聚 -Tyr,聚 -Leu,聚 -Phe,

聚 -Ala, 聚 -Ile, 聚 -Val 或聚 -Phe。

17. 根据权利要求 16 所述的制剂, 其中所述亲水聚合物是 PEG。

18. 一种用于治疗癌症的方法, 所述方法包括向需要其的受试者施用有效量的权利要求 1 所述的药物制剂。

19. 根据权利要求 18 所述的方法, 其中所述癌症选自由以下组成的组: 胃癌, 胰腺癌, 骨髓瘤, 肺癌, 卵巢癌, 肝癌, 慢性髓细胞源性白血病, 结肠直肠癌和乳腺癌。

20. 一种用于治疗癌症的方法, 所述方法包括向需要其的受试者施用有效量的权利要求 8 所述的药物制剂。

21. 根据权利要求 20 所述的方法, 其中所述癌症选自由以下组成的组: 胃癌, 胰腺癌, 骨髓瘤, 肺癌, 卵巢癌, 肝癌, 慢性髓细胞源性白血病, 结肠直肠癌和乳腺癌。

UMIROLIMUS 及其衍生物用于治疗癌症的用途

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求于 2012 年 12 月 3 日提交的美国临时专利申请序列号 61/732,629 的权益。该临时专利申请的内容以其整体通过引用结合于此。

背景技术

[0003] 肿瘤随时间过去趋于发展对化疗药物的抗性。为了克服这样的药物抗性,医生常规地在不同治疗阶段开具不同化疗药物处方。因此,随着新型抗癌药物增多,癌症患者对于他们的具体癌症将会具有更高的存活可能性。

[0004] 西罗莫司 (Sirolimus),也称为雷帕霉素 (rapamycin),是一种最初开发作用于移植患者的免疫抑制剂的亲脂大环内酯抗生素。其随后被用在用于冠状动脉支架的药物涂层中,在那里它通过抑制平滑肌细胞增殖发挥作用而减少血管成形术后的再狭窄。西罗莫司还具有抗肿瘤活性。参见美国专利 4,885,171。

[0005] 也已经发现西罗莫司的衍生物有效用于治疗某些癌症。例如,依维莫司 (everolimus),一种西罗莫司衍生物,是一种被批准的药物,其用于治疗晚期肾癌和不能手术的进展性或转移性胰腺神经内分泌肿瘤。

[0006] Umirolimus(40-烷氧基烷基雷帕霉素或 biolimus A9),一种西罗莫司的高度亲脂衍生物,相比于其他“莫司 (limus)”家族化合物如西罗莫司和依维莫司,其亲脂性是 10 倍高。参见 J. Med. Chem. 2000, 43:2922-2928。这种性质为 umirolimus 提供更高的对于富脂质细胞膜的亲和性。然而,这样的高亲脂性使 umirolimus 在典型药物制剂中溶解度更小。因此,需要 umirolimus 的特殊制剂以将其有效地递送至肿瘤部位。

[0007] 存在对于开发含有 umirolimus 制剂的新化疗药的需要,所述 umirolimus 制剂在水溶液中可溶并且稳定,在施用后具有延长的循环,并且具有靶向肿瘤的能力。

发明内容

[0008] 本发明的主要目的是提供用于治疗癌症的 umirolimus 制剂。因此,本发明的主要方面涉及媒介物 (vehicle)-包封的 umirolimus 或 umirolimus 缀合物。

[0009] 提供了一种药物制剂,所述药物制剂包含:被包封在脂质体或聚合物胶束中的 umirolimus,以及药用赋形剂、载体或稀释剂。

[0010] 还提供了一种用于治疗癌症的方法,其中向受试者施用有效量的药物制剂,所述药物制剂包含被包封在脂质体或聚合物胶束中的 umirolimus。

[0011] 在另一个实施方案中,提供了一种药物制剂,所述药物制剂包含:缀合至聚合物的 umirolimus,以及药用赋形剂、载体或稀释剂。

[0012] 在又一个实施方案中,提供一种治疗癌症的方法,其中向受试者施用有效量的药物制剂,所述药物制剂包含缀合至聚合物的 umirolimus。

[0013] 本发明的一个或多个实施方案的细节在附图和以下描述中提出。本发明的其他特征、目的和优点从说明书和权利要求书中将能明显得出。本文中引述的所有文献以其整体

通过引用结合于此。

附图说明

[0014] 图 1 是在各种示例性人类癌细胞系上测试的三种“莫司”药物的 50% 抑制浓度 (IC_{50}) 值的图示；

[0015] 图 2A 是相对于时间,剩余的 umirolimus 或包封的 umirolimus 的百分比的图示；

[0016] 图 2B 是相对于时间,从聚合物胶束释放的 umirolimus 的百分比的图示；和

[0017] 图 3 是显示在实验动物中在注射包封的 umirolimus 后肿瘤生长的减少的条形图。

具体实施方式

[0018] 本发明的主要方面涉及用于治疗癌症的媒介物 - 包封的 umirolimus 制剂和 umirolimus 缀合物制剂。

[0019] 在一个实施方案中,提供了一种药物制剂,其包含被包封在脂质体中的 umirolimus。所述脂质体包括聚乙二醇 (PEG) 缀合的磷脂 (PEG 化磷脂) 和磷脂酰胆碱 (PC)。所述 PEG 的长度为 10-3000 个单体单元 (monomeric unit)。在一个优选实施方案中,所述 PEG 的长度为 40-150 个单体单元。基于 PEG 化磷脂和 PC 的量,所述 umirolimus 以 0.1-10% 的摩尔比存在。

[0020] 所述磷脂可以是,但不限于,二硬脂酰磷脂酰胆碱 (DSPC), 二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 (DSPE), 二硬脂酰磷脂酰甘油 (DSPG), 二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱 (DMPC), 二油酰磷脂酰胆碱 (DOPC), 二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE) 或二棕榈酰磷脂酰甘油 (DPPG)。所述 PC 可以是,但不限于,氢化大豆 PC (HSPC), 卵 (egg) PC 或大豆 PC。

[0021] 在一个优选实施方案中,所述磷脂是 DSPE, 所述 PC 是 HSPC, 并且所述 umirolimus、所述 PEG 化磷脂和所述 PC 之间的摩尔比为 10:60:30。

[0022] 在一个另外的实施方案中,上述制剂还包含胆固醇。例如,所述制剂可以包含胆固醇, PEG 化 DSPE, HSPC, 以及摩尔比为 0.1-2% 的 umirolimus, 其中所述 PEG 化 DSPE、HSPC 和胆固醇之间的摩尔比为 55-65:2-10:20-40。

[0023] 还提供了一种药物制剂,其包含被包封在聚合物胶束中的 umirolimus。所述 umirolimus 可以以所述聚合物胶束的 5-40 重量 % 存在。所述聚合物可以是三臂嵌段共聚物或嵌段共聚物。

[0024] 所述三臂嵌段共聚物可以含有缀合至两个疏水聚合物的亲水聚合物。例如,所述亲水聚合物可以是 PEG 并且所述两个疏水聚合物可以两者都是聚交酯 (PLA), 即 PEG (PLA)₂。在另一个实施方案中,所述亲水聚合物是 PEG 并且所述疏水聚合物两者都是聚己酸内酯 (PCL), 即 PEG (PCL)₂。

[0025] 所述三臂嵌段共聚物还可以含有缀合至两个疏水聚合物的亲水肽。例如,所述亲水肽可以是聚 -Asp, 聚 -Gln, 聚 -Asn 或聚 -Glu。所述两个疏水聚合物可以两者都是 PLA 或 PCL。所述疏水聚合物的分子量可以为 1000-5000Da。在一个优选实施方案中,所述疏水聚合物是 PCL。所述亲水肽的长度可以为 20-50 个氨基酸。

[0026] 在另一个实施方案中,所述三臂嵌段共聚物含有缀合至两个疏水肽的亲水肽。所述亲水肽可以是聚 -Asp, 聚 -Gln, 聚 -Asn 或聚 -Glu。所述疏水肽可以是聚 -Tyr, 聚 -Leu,

聚 -Phe, 聚 -Ala 或聚 -Ile。所述亲水肽的长度可以为 20-50 个氨基酸, 并且所述疏水肽的长度可以为 5-40 个氨基酸。在一个优选实施方案中, 所述疏水肽是聚 -Ile 或聚 -Leu。

[0027] 如上提及的, 所述 umirolimus 可以被包封在聚合物胶束中, 其中所述聚合物是嵌段共聚物。所述 umirolimus 可以以所述聚合物胶束的 5-40 重量 % 存在。

[0028] 所述嵌段共聚物可以含有缀合至疏水聚合物的亲水聚合物。例如, 所述亲水聚合物可以是 PEG 并且所述疏水聚合物可以是 PLA, 即 PEG-PLA。在另一个实施方案中, 所述亲水聚合物是 PEG 并且所述疏水聚合物是 PCL, 即 PEG-PCL。所述 PEG 的长度可以为 10-3000 个单体单元。所述疏水聚合物 PLA 和 PCL 的分子量可以为 1000-10000Da。

[0029] 备选地, 所述嵌段共聚物可以含有缀合至疏水肽的亲水肽或缀合至亲水聚合物的疏水肽。

[0030] 例如, 所述嵌段共聚物可以含有亲水肽聚 -Asp, 聚 -Gln, 聚 -Asn 或聚 -Glu。所述疏水肽可以是聚 -Ala, 聚 -Leu, 聚 -Ile, 聚 -Val, 聚 -Phe, 聚 -Tyr 或聚 -Trp。所述疏水肽的长度可以为 10-40 个氨基酸, 而所述亲水肽的长度可以为 40-300 个氨基酸。

[0031] 构成所述疏水和亲水肽的以上氨基酸残基中的任一个可以是 L 氨基酸或 D 氨基酸。在其他实施方案中, 可以使用以上提及的氨基酸的外消旋混合物 (rac)。在一个实施方案中, 所述嵌段共聚物含有亲水肽聚 -rac-Asp 和疏水肽聚 -rac-Phe。在另一个实施方案中, 所述疏水肽的长度为 10-40 个氨基酸并且所述亲水肽的长度为 40-300 个氨基酸。

[0032] 在又一个实施方案中, 所述 umirolimus 被包封在包括嵌段共聚物的聚合物胶束中, 所述嵌段共聚物含有缀合至亲水聚合物的疏水肽。所述疏水肽的长度可以为 5-40 个氨基酸, 并且所述亲水聚合物的分子量可以为 2,000-100,000 道尔顿。

[0033] 所述疏水肽可以是, 例如, 聚 -Tyr, 聚 -Leu, 聚 -Phe, 聚 -Ala, 聚 -Ile, 聚 -Val 或聚 -Phe。在优选的实施方案中, 所述疏水肽是聚 -Leu 或聚 -Ile。所述亲水聚合物可以是 PEG。

[0034] 还提供了一种药物制剂, 其包含缀合至聚合物的 umirolimus。所述 umirolimus 可以以所述聚合物缀合物的 10 重量 % 至 50 重量 % 存在。所述聚合物的分子量在 20,000 道尔顿至 100,000 道尔顿的范围内。所述聚合物可以是, 但不限于, 聚 -Glu, 聚 -Asp, 聚 -Lys, 聚 -Tyr 和 PEG。在另外的实施方案中, 所述 PEG 是 4-臂或 8-臂支化聚合物。在一个优选实施方案中, 所述 PEG 是 4-臂支化聚合物。

[0035] 在另一个实施方案中, umirolimus 可以缀合至包括疏水聚合物和亲水聚合物的嵌段共聚物, 其中所述 umirolimus 结合至所述疏水聚合物。所述疏水聚合物可以是 PLA, PCL 或疏水肽。所述亲水聚合物可以是 PEG。

[0036] 在其中所述疏水聚合物是疏水肽的实施方案中, 所述疏水肽可以是聚 -Ala, 聚 -Leu, 聚 -Ile, 聚 -Val, 聚 -Phe, 聚 -Tyr 或聚 -Trp。

[0037] 以上提及的含 umirolimus 制剂中的任一种可以用来制备用于治疗癌症的药物。

[0038] 本发明提供一种用于治疗癌症的方法, 其中向受试者施用有效量的上述包含包封的 umirolimus 或 umirolimus 缀合物的药物制剂。

[0039] 例如, 包含被包封在脂质体中的 umirolimus 的药物制剂可以经由任何常规方法施用至癌症患者, 所述常规方法包括但不限于腹膜内注射、静脉内注射、直接注射到肿瘤中、注射到肿瘤上游的动脉循环中以及鼻吸入。上述药物制剂也可以以丸剂形式或胶囊形

式口服施用。

[0040] 不受理论限制,据信,(i) umirolimus,一种脂溶性药物,在脂质体的脂质双层中被稳定化,(ii) 加载到脂质体中的 umirolimus 在施用后缓慢且持续地被释放,和 (iii) 相比于纯的 umirolimus,包封为 umirolimus 提供更高的水溶性和稳定性。

[0041] 在另一个实施方案中,包含被包封在聚合物胶束中的 umirolimus 的药物制剂可以经由上述方法施用至癌症患者,所述方法包括但不限于腹膜内注射、静脉内注射、直接注射到肿瘤中、注射到肿瘤上游的动脉循环中以及鼻吸入。

[0042] 脂质体和胶束二者包封的药物递送有利地展现出被动疾病部位靶向。以包封形式递送的 umirolimus 趋于在肿瘤、感染或炎症部位处积累,其中这些部位具有比正常更大的多孔微血管结构。

[0043] 在又一个实施方案中,提供了一种用于治疗癌症的方法,其中向受试者施用有效量的上述包含缀合至聚合物的 umirolimus 的药物制剂。

[0044] 类似于上述包封的 umirolimus 制剂,包含缀合的 umirolimus 的制剂可以通过常规手段施用至受试者,所述常规手段包括但不限于腹膜内注射、静脉内注射、直接注射到肿瘤中、注射到肿瘤上游的动脉循环中以及鼻吸入。

[0045] 缀合的 umirolimus 将充当前药。更具体地,在施用所述缀合物后,umirolimus 将会在身体组织中通过水解从 umirolimus/ 聚合物缀合物释放。

[0046] 相比于纯的 umirolimus,预期 umirolimus- 聚合物缀合物显示增大的水溶性、增强的药物稳定性、延长的血液中药物循环时间、用于肿瘤靶向的增加的肿瘤血管渗透性(EPR 效应)以及改善的药动学。

[0047] 可以通过施用上述制剂治疗的癌症的类型包括但不限于:急性淋巴细胞白血病、急性髓样白血病、肾上腺癌、成人软组织肉瘤、肛癌、再生障碍性贫血、基细胞和鳞状细胞皮肤癌、胆道癌、膀胱癌、骨癌、脑/CNS 肿瘤、乳腺癌、男性乳腺癌、儿童癌症、不明来源的癌、卡斯尔曼病(Castleman's disease)、宫颈癌、慢性淋巴细胞白血病、慢性髓样白血病、慢性髓单核细胞白血病、结肠直肠癌、子宫内膜癌、食道癌、尤因家族肿瘤(Ewing Family of tumors)、眼癌、胆囊癌、胃癌、胃肠道类癌(gastrointestinal carcinoid)、胃肠道基质瘤(gastrointestinal stromal tumor)、妊娠滋养层病(gestational trophoblastic disease)、霍奇金病(Hodgkin's disease)、卡波西肉瘤(Kaposi's sarcoma)、肾癌、喉头和下咽癌、儿童白血病、肝癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肺类癌瘤、恶性间皮瘤、黑素瘤皮肤癌、多发性骨髓瘤、骨髓发育不良综合征(myelodysplastic syndrome)、鼻腔和鼻旁窦癌、鼻咽癌、成神经细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、口腔和口咽癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、阴茎癌、垂体瘤、前列腺癌、肾细胞瘤、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、皮肤淋巴瘤、小肠癌、胃癌、睾丸癌、胸腺癌、甲状腺癌、子宫肉瘤、阴道癌、外阴癌、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia)和维尔姆斯瘤(Wilms' tumor)。

[0048] 在没有进一步的细节下,据信,基于以上描述,本领域技术人员可以在最充分程度上利用本发明。以下的具体实施例将被解释为仅仅是举例说明性的,而不以任何方式解释为是对本公开内容其余部分的限制性的。

[0049] **实施例 1**: umirolimus 抑制癌细胞生长

[0050] 将 umirolimus 添加到来源于 9 种人类癌症的培养细胞系中。在体外培养 72 小时

后,使用 CellTiter-Glo 发光细胞生存测定测量 umirolimus 对细胞生长的 50% 抑制浓度 (IC_{50})。

[0051] 表 1. umirolimus 抑制癌细胞生长

细胞系/人类癌症种类	IC_{50} (μM)	最大抑制(%)
SNU-16/胃癌	1.14	99.75
BxPC-3/胰腺癌	3.07	77.24
AZ-521/胃癌	4.23	99.88
RPMI-8226/多发性骨髓瘤	6.8	99.26
NCI-H460/肺癌	7.07	88.99
A2780/卵巢癌	7.31	100.19
SK-HEP-1/肝癌	7.81	99.97
K562/慢性髓细胞源性白血病	7.97	98.49
SK-MES-1/肺癌	8.24	96.57
SW620/结肠直肠癌	8.33	55.69
MDA-MB-231/乳腺癌	9.52	99.23

[0053] 结果表明,来自 9 种人癌症的 11 个细胞系对 umirolimus 敏感,其中 IC_{50} 小于 $10 \mu M$ 。

[0054] 实施例 2:相比于西罗莫司和依维莫司,umirolimus 对癌细胞生长的抑制

[0055] 如实施例 1 中所述的,使用 CellTiter-Glo 发光细胞生存测定来测量 3 种“莫司”药物对于 10 种人类癌细胞系的生长的抑制的 IC_{50} 。所测试的十种示例性人类癌细胞系是 SK-MES-1(肺癌),BxPC-3(胰腺癌),AZ-521(胃癌),SNU-16(胃癌),SK-HEP-1(肝癌),A2780(卵巢癌),MDA-MB-231(乳腺癌),DLD-1(结肠直肠癌),DU-145(前列腺癌)和 786-0(肾癌)。结果显示在图 1 中。

[0056] umirolimus 的 IC_{50} 出乎意料地对于所测试的 10 种癌细胞系中的 8 种都优于西罗莫司和依维莫司的 IC_{50} 。更具体地,在抑制以下细胞系的生长方面 umirolimus 优异:A2780,SK-HEP-1,DLD-1,SNU-16,BxPC-3,786-0,SK-MES-1 和 AZ-521。

[0057] 实施例 3:含 umirolimus 的脂质体

[0058] 将 umirolimus(0.1-2mM 的 umirolimus/100mM 总脂质)、PEG 化二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(mPEG-DSPE;聚乙二醇单体链长度为 2,000)、氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)和胆固醇(DSPE/HSPC/胆固醇比率:55-65/2-10/20-40)溶解在乙醇(脂质体的总体积的 10-30%)

中。然后在持续搅拌下将所述混合物注入到 10mL 蒸馏水中。由此形成的脂质体溶液通过 0.5 μm 聚碳酸酯滤器挤出 10 次,然后通过 0.22 μm 聚碳酸酯滤器挤出 10 次以将粒度减小至 100-200nm。

[0059] **实施例 4**:没有胆固醇的含 umirolimus 的脂质体

[0060] 将 umirolimus、mPEG-DSPE (聚乙二醇单体链长度为 2,000) 和 HSPC(umirolimus/DSPE/HSPC 比率:10-30/60-80/10-20) 溶解在乙醇(脂质体的总体积的 10-30%)中。然后在持续搅拌下将所述混合物注入到 10mL 蒸馏水中。由此形成的脂质体溶液通过 0.5 μm 聚碳酸酯滤器挤出 10 次,然后通过 0.22 μm 聚碳酸酯滤器挤出 10 次以将粒度减小至 100-200nm。

[0061] **实施例 5**:含 umirolimus 的三臂嵌段共聚物胶束

[0062] 首先使甲基 PEG-OH(methyl PEG-OH) 与 4-(氯甲基)-2,2-二甲基-1,3-二氧戊环反应以形成缩酮衍生物。在除去酸性溶液中的缩酮基团后,所得二醇用于交酯聚合以获得 PEG(PLA)₂ 三臂嵌段共聚物。

[0063] 将五十毫克的所述 PEG(PLA)₂ 三臂嵌段共聚物和 5-20mg 的 umirolimus 溶解在 2.0mL 的乙腈中。然后使用旋转蒸发器除去乙腈。所得聚合物膜用 2.0mL 的水进行水合以形成胶束。通过 0.22 μm 滤器过滤含 umirolimus 的 PEG(PLA)₂ 胶束的溶液以在使用前对其消毒。

[0064] **实施例 6**:含 umirolimus 的肽基三臂嵌段共聚物胶束

[0065] 首先,利用标准的 Fmoc/叔丁基保护的氨基酸和 0-7 氮杂苯并三唑四甲基六氟磷酸脲(HATU) 活性酯基偶联,在 Rink 酰胺甲基二苯甲基胺(MBHA) 树脂上,使用自动化肽合成仪,通过固相肽合成(SPPS) 合成长度为 5-40 个氨基酸的疏水肽。所合成的肽可以是聚-Tyr, 聚-Leu, 聚-Phe, 聚-Ala, 聚-Ile, 聚-Val 或聚-Phe。

[0066] 其次,也通过如上所述的固相肽合成来合成赖氨酸残基封端的长度为 20-50 个氨基酸的亲水肽。所合成的肽可以是聚-Asp, 聚-Gln, 聚-Asn 或聚-Glu。利用 HATU 作为偶联剂,将末端赖氨酸中的两个活性胺基团各自用于缀合至上述疏水多肽。肽侧链上的保护基通过用 95% 三氟乙酸(TFA) 处理除去并且所述肽基三臂嵌段共聚物通过甲醇沉淀获得。

[0067] 将 50mg 的所述肽基三臂嵌段共聚物和 5-20mg 的 umirolimus 溶解在 2.0mL 乙腈中。然后使用旋转蒸发器除去乙腈。所得膜用 2.0mL 的水进行水合以形成胶束。通过 0.22 μm 滤器过滤含 umirolimus 的胶束的溶液以在使用前对其消毒。

[0068] **实施例 7**:含 umirolimus 的肽/聚合物基三臂嵌段共聚物胶束

[0069] 通过以上实施例 5 所述的固相肽合成来合成赖氨酸残基封端的长度为 20-50 个氨基酸的亲水肽。所合成的肽可以是聚-Asp, 聚-Gln, 聚-Asn 或聚-Glu。如以上实施例 4 中所述,将末端赖氨酸中的两个活性胺基团各自用于聚交酯(PLA) 合成。代替所述聚交酯,也可以合成聚己酸内酯(PCL)。

[0070] 肽侧链上的保护基通过用 95%TFA 处理除去并且所述肽-(PLA)₂ 或肽-(PCL)₂ 三臂嵌段共聚物通过甲醇沉淀获得。

[0071] 将 50mg 的肽/聚合物三臂嵌段共聚物和 5-20mg 的 umirolimus 溶解在 2.0mL 乙腈中。然后使用旋转蒸发器除去乙腈。所得膜用 2.0mL 的水进行水合以形成胶束。含 umirolimus 的肽/聚合物胶束的溶液通过 0.22 μm 滤器过滤以在使用前对其消毒。

[0072] **实施例 8:** 含 umirolimus 的肽 / 聚合物嵌段共聚物胶束

[0073] 利用标准的 Fmoc/叔丁基保护的氨基酸和 HATU 活性酯基偶联, 在 Rink 酰胺 MBHA 树脂上, 使用自动化肽合成仪, 通过 SPPS 合成含有疏水氨基酸的长度为 5-40 个残基的肽。所述疏水肽可以是聚 Ala, 聚 Ile, 聚 Val 或聚 Trp。可以使用左旋 (levo) 和外消旋 (racemic) 氨基酸二者。

[0074] 为了形成肽 / 聚合物嵌段共聚物, 通过溶液相缩合将所述疏水肽连接至 α -甲基- ω -丙酸-聚(氧化乙烯)(PEO-OCH₂CH₂-COOH)。所述 PEO 的分子量在 2,000-100,000 道尔顿的范围内。

[0075] 将 50mg 的肽 / 聚合物嵌段共聚物和 5-20mg 的 umirolimus 溶解在 2.0mL 乙腈中。然后使用旋转蒸发器除去乙腈。所得膜用 2.0mL 的水进行水合以形成胶束。含 umirolimus 的肽 / 聚合物胶束的溶液通过 0.22 μ m 滤器过滤以在使用前对其消毒。

[0076] **实施例 9:** 包含亲水和疏水肽结构域的含 umirolimus 的肽胶束

[0077] 疏水肽是购买的或通过 N-羧酸酐 (NCA) 聚合合成以用作大分子引发剂 (macroinitiator)。然后通过将所述大分子引发剂添加到含有所需氨基酸-NCA 缀合物的二氯甲烷的溶液中来组装亲水肽。所述反应在 Ar 气氛下在 40°C 进行 24h。将反应混合物倒入冷甲醇中, 导致白色固体产物的沉淀。所述产物通过 NMR 和凝胶渗透色谱表征。氨基酸侧链保护基的除去通过用在水中的 95%TFA 处理所述产物来进行。将所述脱保护反应混合物倒入冷二乙醚中以沉淀白色固体聚合物。所得亲水-疏水肽嵌段聚合物在真空下干燥并通过 NMR 表征。

[0078] 将 50mg 的亲水-疏水肽嵌段共聚物和 5-20mg 的 umirolimus 溶解在 2.0mL 乙腈中。然后使用旋转蒸发器除去乙腈。所得的肽聚合物膜用 2.0mL 的水进行水合以形成胶束。含 umirolimus 的肽胶束的溶液通过 0.22 μ m 滤器过滤以在使用前对其消毒。

[0079] **实施例 10:** umirolimus- 聚合物胶束前药缀合物

[0080] 通过开环聚合合成 mPEG-PLA-COOH 共聚物。简言之, 将交酯和 2mol% α -甲基- ω -丙酸-PEO(PEO-OCH₂CH₂-COOH) 在氮气下在 160°C 溶解。加入 0.2% 2-乙基己酸亚锡并且反应在 140°C 温度在真空下进行 90min。然后将由此形成的共聚物溶解在二氯甲烷中并在冷乙醚中沉淀。

[0081] 将所述 mPEG-PLA 共聚物 (1000g) 和 umirolimus (50mg) 溶解在无水 DCM 中。然后添加 20mg 4-二甲基氨基吡啶、70mg 溴三吡咯烷基六氟磷酸磷和 50 μ L 二异丙基乙胺 (DIPEA)。反应在室温搅拌 24h, 接着通过旋转蒸发完全除去溶剂。所得的共聚物 / 药物缀合物用过量乙醇洗涤以除去未反应的 umirolimus 和催化剂。前药结构和缀合度通过将所述缀合聚合物溶解在氘化二甲亚砷中并通过 ¹H 和 ¹³CNMR 对其进行分析而确定。

[0082] **实施例 11:** 缀合至亲水多肽的 umirolimus

[0083] 将 100mg 的聚谷氨酸 (MW>50,000)、50mg 的 umirolimus 和 20 μ L 的 DIPEA 在 3.5mL 的无水二甲基甲酰胺中的混合物冷却至 0°C。加入 30mg 的二环己基碳二亚胺并且所述反应物在室温温育过夜。将所述混合物倒入氯仿中以终止所述反应并且沉淀所述 umirolimus/肽缀合物。所得沉淀进一步用氯仿洗涤几次从而获得白色粉末。

[0084] **实施例 12:** 包封在 PEG-PLA 嵌段共聚物中的 umirolimus

[0085] 将 23.42mg 的 PEG-PLA 嵌段共聚物连同 2.23mg 的 umirolimus 的混合物溶解在

0.5mL 二氯甲烷中。在室温下在层流净化罩中蒸发所述二氯甲烷。由此形成的聚合物膜在 2.2mL 的 HPLC 级 H₂O 中再水化。所得溶液通过孔径为 0.22 μm 的聚四氟乙烯 (PTFE) 膜过滤。

[0086] 实施例 13:包封在 PEG-PCL 嵌段共聚物中的 umirolimus

[0087] 将 33.24mg 的 PEG-PCL 嵌段共聚物连同 3.17mg 的 umirolimus 的混合物溶解在 0.5mL 的二氯甲烷中。在室温下在层流净化罩中蒸发所述二氯甲烷。由此形成的聚合物膜在 4.0mL 的 HPLC 级 H₂O 中再水化。所得溶液通过孔径为 0.22 μm 的 PTFE 膜过滤。

[0088] 实施例 14:嵌段共聚物聚合物 - 包封的 umirolimus 的物理性质。

[0089] 溶解度

[0090] 确定 umirolimus 在 H₂O 中的溶解度并分别与以上实施例 12 和实施例 13 中所述的包封在 PEG-PLA 和 PEG-PCL 中的 umirolimus 在 H₂O 中的溶解度进行比较。在溶解所述药物或包封药物之后,使用 HPLC 来测量 umirolimus 浓度。结果显示在下表 2 中。纯的 umirolimus 在水中的溶解度为 0.11 μg/mL。umirolimus 的溶解度小于在文献中报道的西罗莫司的溶解度 (2.6 μg/mL)。包封在 PEG-PCL 和 PEG-PLA 中的 umirolimus 的溶解度分别为 55.6g/mL 和 739.1g/mL。

[0091] 表 2:umirolimus 制剂的水溶性

	溶解度(μg/mL)	增加倍数
umirolimus	0.11	1
umirolimus + PEG-PCL	55.6	505
umirolimus + PEG-PLA	739.1	6719

[0093] 稳定性

[0094] 将 umirolimus 的稳定性与如以上在实施例 12 中所述的包封在 PEG-PLA 嵌段共聚物胶束中的 umirolimus 的稳定性进行比较。将 umirolimus (50 μg/mL) 和包封的 umirolimus (157.4 μg/mL) 在 90%PBS、10%MeOH 中的溶液置于 37°C 的水浴中。通过在不同温育时间测量药物含量来确定 umirolimus 的稳定性。结果显示在图 2A 中。包封在 PEG-PLA 嵌段共聚物胶束中的 umirolimus 比未包封的药物显著更稳定。

[0095] umirolimus 的半衰期基于以下公式计算:

[0096] 半衰期 = $(t * \ln(2)) / (\ln(C_t / C_{t_0}))$,

[0097] 其中 t 是结束时间点, C_t 是结束时间点的浓度, 并且 C_{t₀} 是初始浓度。结果表明, umirolimus 的半衰期为 21h, 而包封在 PEG-PLA 嵌段共聚物胶束中的 umirolimus 的半衰期为 148h, 表示 7- 倍增加。

[0098] 释放曲线

[0099] 确定包封在 PEG-PLA 嵌段共聚物胶束中的 umirolimus 的累积药物释放曲线。将所述聚合物胶束 (380 μg) 悬浮在 5mL 的 90%PBS/10% 甲醇溶液中。所述混悬液在 37°C 水浴中温育。在每个时间点, 将 0.2mL 的所述混悬液转移到微量离心管。在所述管中的聚合物胶束在 5°C 通过以 15,000xg 离心 15min 收集。在除去上清后, 所得沉淀通过超声处理再悬浮在 0.2mL 新鲜甲醇中。所得溶液通过 HPLC 分析以确定在所述聚合物胶束中剩余的 umirolimus

的量。结果显示在图 2B 中。大约 80% 的 umirolimus 在温育的 8 天内释放。

[0100] 实施例 15 : 体内抑制效力研究

[0101] 采用 BALB/c 裸鼠中的 SNU-16 人类胃癌异种移植模型来评价包封的 umirolimus 的抑制效力。

[0102] 在 5%CO₂ 中在 37 °C, 将 SNU-16 肿瘤细胞在补充有 10% 热失活胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中进行悬浮培养。细胞常规地每周传代培养两次。收获指数生长期的细胞并在将它们接种到 Nu/nu 小鼠中以建立肿瘤之前进行计数。

[0103] 每只小鼠在右上背部皮下地用在 0.1mL 的 PBS 中的 1x10⁷ 个 SNU-16 细胞连同基质胶 (matrigel) (1:1) 接种以支持肿瘤发展。在注射后第 8 天, 平均肿瘤尺寸达到大约 150mm³ 时开始药物或媒介物治疗。在第 8 天开始, 每只动物腹膜内注射, 连续 5 天。每个研究组中施用的制剂和动物数量显示在下表 3 中。

[0104] 表 3 : 研究设计和试验制剂制备

[0105]

化合物	N	制备	剂 量 (mg/kg)	给 药 路径	时间安 排
媒介物 (第 1 组)	10	将 2.0mL 的无菌 8%乙醇和 2.0ml 的无菌 10% 聚山梨醇酯 80 添加到 5ml 玻璃瓶中, 涡旋以形成清澈溶液。	0	i.p.	QD x 5
PEG-PLA 包 封 的 umirolimus (第 2 组)	10	测量在 10mL 玻璃瓶中的 70mg 试验化合物(过滤后, 4.5mg 药物当量), 添加 6mL 注射用水, 并且涡旋/超声处理直至所述试验化合物完全悬浮在溶液中并且没有观察到沉淀。然后通过 0.45 微米滤器(23mm 或 40 mm, PDVF 或 PTFE)过滤所得溶液以制备 0.75mg/mL 纳米混悬液。	15	i.p.	QD x 5

[0106] 在肿瘤细胞接种后, 每天检查动物的发病率和死亡率。在常规监测时间, 检查动物的肿瘤负担和治疗对正常行为例如活动性的任何作用, 肉眼评估食物和水消耗, 体重增加 / 减少, 眼光暗淡 (eye matting) 以及其他任何异常作用。对每只动物记录死亡和所观察到的临床体征。

[0107] 使用卡尺在二维上每周测量肿瘤体积, 并且使用以下公式计算所述体积 : $V=0.5a \times b^2$, 其中 a 和 b 分别是所述肿瘤的长径和短径。

[0108] 结果显示在图 3 中。包封在 PEG-PLA 嵌段共聚物胶束中的 umirolimus 有效减慢实验肿瘤的生长。

[0109] 其他实施方案

[0110] 本说明书中公开的所有特征可以以任意组合进行组合。本说明书中公开的每个特征可以被用于相同、等价或类似目的的备选特征替代。因此,除非另有明确说明,所公开的每个特征仅仅是等价或类似特征的一般系列的实例。

[0111] 根据以上描述,本领域技术人员可以容易地确定本发明的基本特性,并且在不背离其实质和范围的情况下,可以做出本发明的各种改变和更改以使其适合不同用途和情形。因此,其他实施方案也在所附权利要求的范围内。

莫司药物对于不同癌细胞系的 IC₅₀

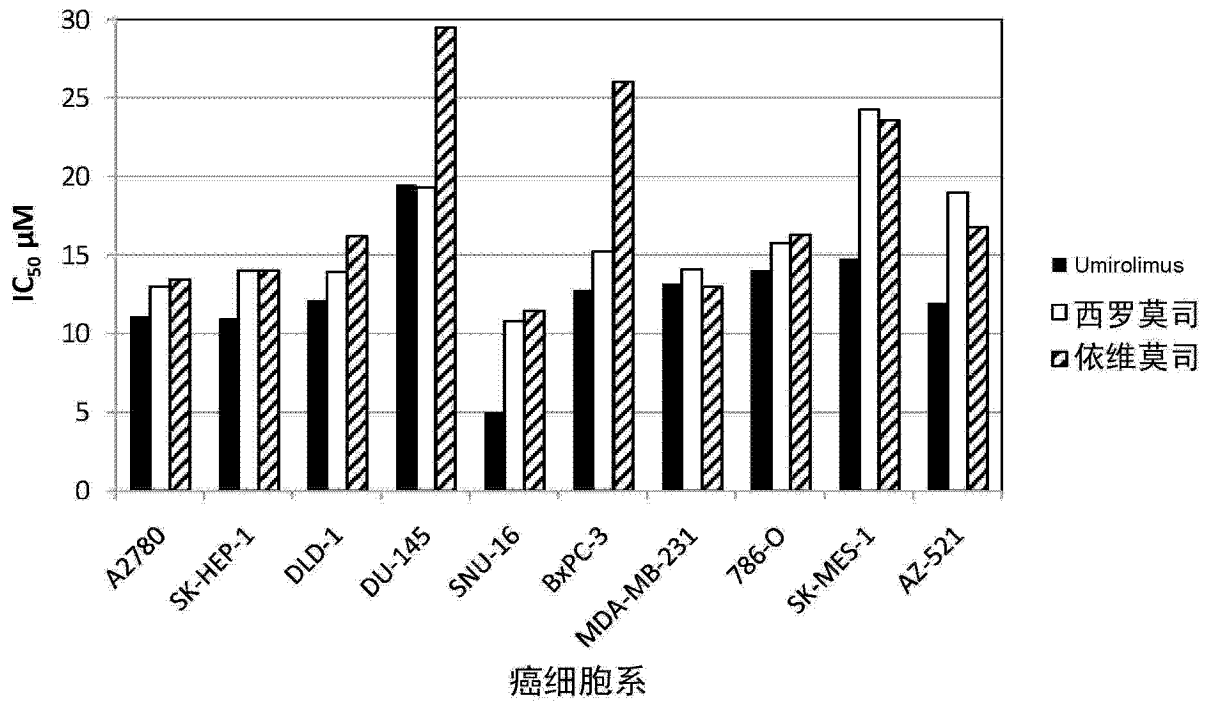


图 1

umirolimus 降解曲线

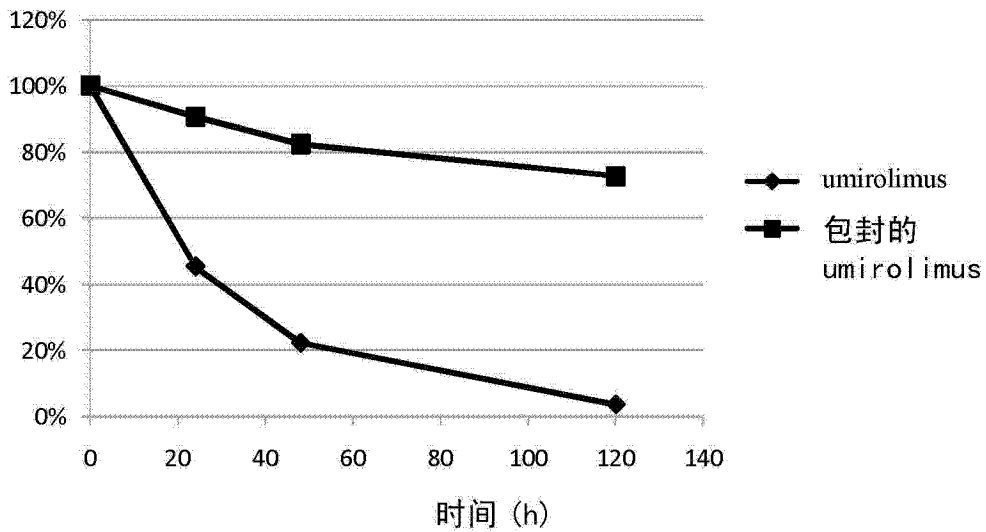


图 2A

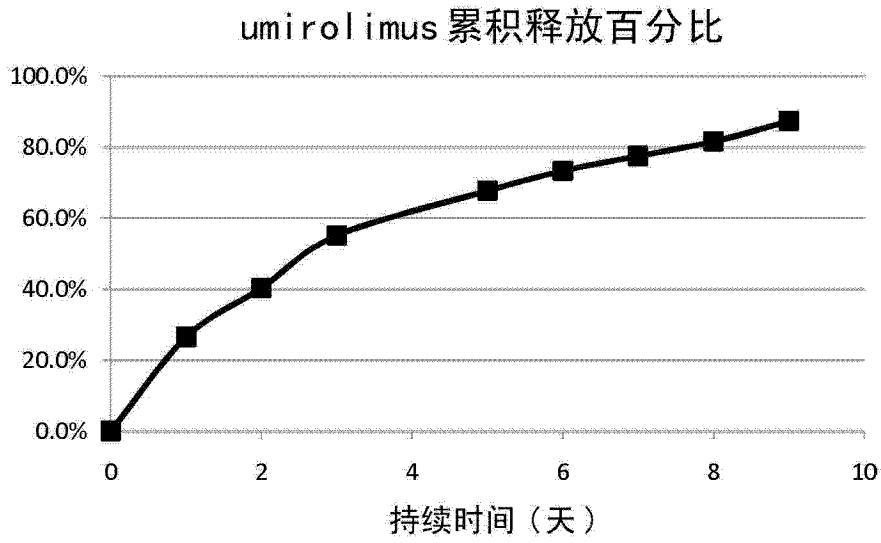


图 2B

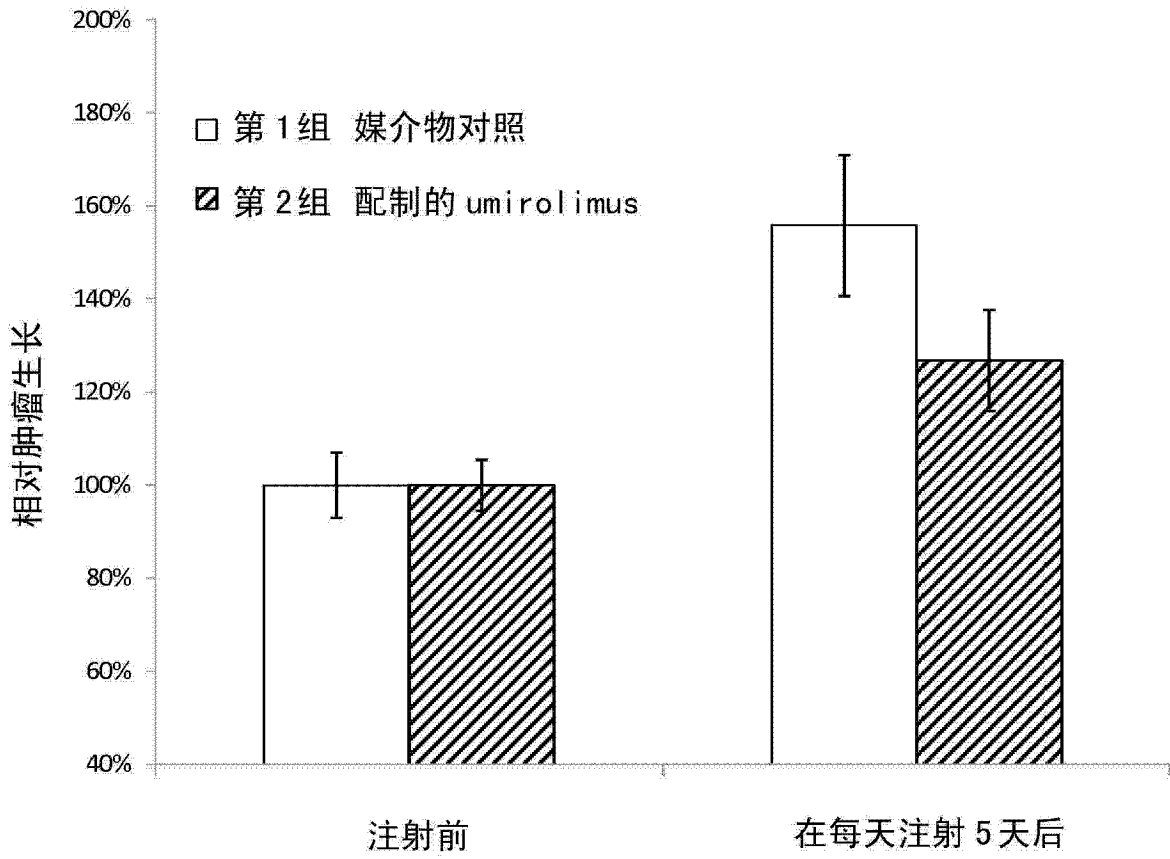


图 3