



(10) 申请公布号 CN 116019768 A

(43) 申请公布日 2023.04.28

(21) 申请号 202310169465.9

(22) 申请日 2017.06.07

(30) 优先权数据

62/346,755 2016.06.07 US

(62) 分案原申请数据

201780047015.5 2017.06.07

(71) 申请人 塔佳吉尼克斯公司

地址 美国纽约州

申请人 纽约州立大学研究基金会  
东北大学

(72) 发明人 詹姆斯·E·伊根

伊瓦奥·奥吉马

曼苏尔·M·阿米吉

加林娜·伊凡诺夫娜·伯奇基娜

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理  
有限公司 11262

专利代理师 王玮玮 郑霞

(51) Int. Cl.

A61K 9/107 (2006.01)

A61K 47/54 (2017.01)

A61K 47/44 (2017.01)

A61K 47/69 (2017.01)

A61K 31/337 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

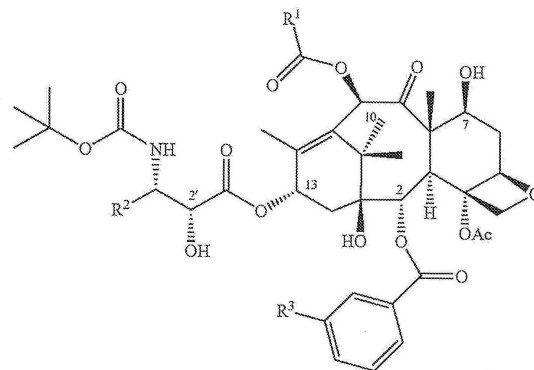
权利要求书1页 说明书31页 附图58页

## (54) 发明名称

靶向癌细胞和癌干细胞的紫杉烷类药物的  
纳米乳剂组合物及其使用方法

## (57) 摘要

本申请涉及靶向癌细胞和癌干细胞的紫杉烷类药物的纳米乳剂组合物及其使用方法。一种包封在水包油纳米乳剂 (NE) 药物递送系统中的  $\omega$ -3 多不饱和脂肪酸 (PUFA) - 紫杉烷偶联物的组合物。一种通过向需要治疗的受试者施用有效量的药物组合物并治疗癌症而治疗癌症的方法, 所述药物组合物包含包封在水包油 NE 药物递送系统中的 PUFA - 紫杉烷偶联物。一种通过将多药耐药性细胞暴露于有效量的药物组合物并诱导所述多药耐药性细胞的死亡来克服多药耐药性的方法, 所述药物组合物包含包封在水包油 NE 药物递送系统中的  $\omega$ -3 多不饱和脂肪酸 (PUFA) - 紫杉烷偶联物。一种消除癌干细胞的方法。降低癌干细胞的干细胞性、在体内保留药物并提供较慢释放曲线的方法。

其中 R<sup>1</sup> 是环丙基, R<sup>2</sup> 是 2-甲基-1-丙烯基, 并且 R<sup>3</sup> 是 H。

1. 一种组合物,该组合物包含包封在水包油纳米乳剂(NE)药物递送系统中的 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸(PUFA)-紫杉烷偶联物,其中所述油包含一种或更多种 $\omega$ 脂肪酸。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述PUFA选自下组,该组由以下组成:二十二碳六烯酸(DHA)、二十碳五烯酸(EPA)和 $\alpha$ -亚麻酸(LNA)。

3. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述PUFA-紫杉烷偶联物是DHA-SBT-1214。

4. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述PUFA-紫杉烷偶联物中的紫杉烷选自下组,该组由以下组成:紫杉醇、多西他赛、SBT-1213、SBT-12854、SBT-121303、SBT-1216、SBT-11033、SBT-121313、SBT-121602、卡巴他赛、SBT-1212、SBT-1217、SBT-1102、SBT-1103、SBT-1104、SBT-1106、SBT-1107、SBT-121301、SBT-121302、SBT-121304、SBT-121403、SBT-11031、SBT-11032、SBT-11034、SBT-12851、SBT-12852、SBT-12853、SBT-12855、SBT-12851-1、SBT-12851-3、SBT-12852-1、SBT-12852-3、SBT-12853-1、SBT-12853-3、SBT-12854-1、SBT-12854-3、SBT-12855-1和SBT-12855-3。

5. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述PUFA-紫杉烷偶联物选自下组,该组由以下组成:DHA-紫杉醇、DHA-多西他赛、DHA-SBT-1213、DHA-SBT-1103、DHA-SBT-1104、DHA-SBT-1216、LNA-SBT-1213、LNA-紫杉醇、LNA-多西他赛、DHA-卡巴他赛和LNA-卡巴他赛。

6. 根据权利要求4所述的组合物,其中所述PUFA-紫杉烷偶联物是权利要求4中定义的所述紫杉烷的DHA或LNA酯。

7. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述水包油NE包括从50nm至1000nm范围内的平均液滴直径。

8. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述水包油NE包括小于200nm的平均液滴直径。

9. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述水包油NE中的油是富含 $\omega$ -3脂肪酸的食用油,所述食用油选自下组,该组由以下组成:鱼油、松子油、亚麻籽油、红花油、月见草油、黑醋栗油、琉璃苣油、小麦胚芽油、奇亚籽油、大麻油、紫苏油、葡萄油、角鲨烯油以及真菌油。

10. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述油被选自下组的物质修饰,该组由以下组成:表面活性剂、靶向剂、图像造影剂及其组合。

## 靶向癌细胞和癌干细胞的紫杉烷类药物的纳米乳剂组合物及其使用方法

[0001] 本申请是申请日为2017年06月07日,申请号为201780047015.5,发明名称为“靶向癌细胞和癌干细胞的紫杉烷类药物的纳米乳剂组合物及其使用方法”的申请的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及用于治疗癌症(并且特别是用于克服多药耐药性,包括癌干细胞中的多药耐药性)的治疗剂和方法。特别地,本发明涉及紫杉烷类药物(例如第三代紫杉烷)的纳米乳剂配制品和递送系统。

### 背景技术

[0003] 在美国,癌症是第二大致死原因。近十年来,与其他人癌症相比,前列腺癌(PrC)的发病率和死亡率显著增加。超过70%的PrC患者将面临治疗后复发和疾病转变为无法治愈的状态。人们普遍认为人肿瘤是分等级而被组织的,并且这种等级的顶层被恶性干细胞占据,恶性干细胞具有无限的自我更新和肿瘤起始能力。根据最近的致癌概念,只有癌干细胞(CSC)的一个或多个特定表型亚群负责肿瘤的发展,并且负责产生构成肿瘤块的分化后代(包括转移性细胞和耐药性细胞)的整个谱系。已从所有主要的人癌症类型(包括结肠直肠癌、胰腺癌和前列腺癌)中分离出CSC。对许多癌症类型的大量研究已经证明,表达常见CSC标志物(特别是CD133和CD44)的致瘤细胞对常规抗癌药物(例如5-FU、奥沙利铂、伊立替康、多西他赛等)具有特别的抗性。

[0004] 对常规和新型化学治疗剂的多药耐药性(MDR)代表了临床癌症治疗的巨大挑战。虽然MDR并非仅仅是CSC的特性,但大量证据表明MDR与CSC的存在密切相关。由于多种机制,CSC对化学疗法具有天然抗性,这些机制包括它们的相对静止、它们强大的DNA修复能力、它们的ATP结合盒(ABC)转运蛋白的激活外排许多标准抗癌剂以及它们对细胞凋亡的抗性。CSC的静止也促进了它们对化学疗法和放射疗法的抗性。此外,大多数标准抗癌药物实际上刺激静止的CSC使其自我更新并用抗药性细胞重新填充肿瘤。CSC还显示出许多对肿瘤表型至关重要的表型特性,例如不受限制的细胞复制、自给自足和长期存活。这些特性有助于解释为什么许多癌症疗法虽然杀死大量成熟肿瘤细胞但常常失败,因为它们不能根除CSC。目前的前列腺癌治疗主要针对大量肿瘤性快速生长的癌细胞,但不针对CSC亚群,这可能是大多数前列腺癌疗法所见的有限生存益处的原因。在通过手术切除和/或放射和化学疗法明显成功减瘤(de-bulking)后,存活的CSC部分使肿瘤复发几乎不可避免。

[0005] 大多数癌症药物没有解决CSC亚群的事实解释了这样一个事实,即与其他疾病相比,正在开发的抗癌药物的损耗率最高:在临床前开发中只有5%具有抗癌活性的药剂通过了监管批准,然后甚至可能只有很小的益处。特别地,目前与其他癌症相比用于前列腺癌的正在开发的抗癌药物具有显著更低的成功率。另一方面,候选抗癌剂的临床前评估传统上基于作为单层培养物生长的未经选择的高度传代商业癌细胞系的使用。然而,长期的体外维持不可避免地导致另外的基因组变化和表观基因组变化的积累、以及优势细胞亚群的选

择。实际上,最近证明最常用的已建立的癌细胞系与原始临床样本没有相关性或有很低相关性。这表明使用已建立的细胞系来研究基因组改变、临床相关分子靶标的发现和抗癌药物开发是有问题的,因为这些细胞系的使用不能解释体内肿瘤的复杂性和病理生理学。所有以上考虑突出了CSC在临床相关分子靶标的发现中的关键作用,并为CSC靶向药物的研发、生理和临床更相关的癌细胞源、以及更相关的体外和体内模型产生迫切需要。

[0006] 最近,申请人已经建立了患者来源的超低传代前列腺癌细胞系(PPT2细胞系),其稳定保留了未成熟的干细胞样细胞的特征。先前的研究已经证明前列腺癌细胞的CD133<sup>hi</sup>/CD44<sup>hi</sup>表型显示出明显的干细胞相关特征,包括较高的肿瘤起始能力和球状体起始能力、可塑性(产生多种细胞表型的能力)和较高的对标准药物的抗性。这些细胞表达过度激活的发育途径并表达高水平的决定胚胎干细胞多能性的若干种关键转录因子。此外,PPT2细胞表达许多与抗凋亡信号传导和抗药性相关的基因,这使它们成为CSC靶向药物开发研究的良好模型。

[0007] Weinberg、Lander和其他小组的最近研究表明癌细胞在分化的肿瘤和癌干细胞(CSC)表型之间的相互转化方面具有巨大的可塑性。临床研究工作表明,具有表型-CSC标志物的细胞在用传统化学治疗剂治疗后更普遍,并且比其分化的对应物更具致瘤性。CSC以显著可塑性的“元状态”存在,因此这些细胞可以分化为具有致癌性且具有化学敏感性或抗MDR的细胞。

[0008] 该信息表明需要解决多种“元-表型”状态的治疗,并且是多模式的,以减轻由分化的肿瘤细胞和CSC群体引起的MDR机制。第一代紫杉烷类药物(如紫杉醇(PX)和多西他赛)不能满足这一需求。紫杉烷类药物可稳定微管并抑制细胞周期的晚期G2或M期,从而导致细胞死亡。尽管临床上非常具有活性,但PX和多西他赛具有若干个临床问题,包括药物溶解性差、严重的剂量限制性毒性(例如骨髓抑制、外周感觉神经病变、过敏反应和最终抗药性的发展)。这些副作用中的许多与用于稀释这些抗肿瘤剂的溶剂有关:用于紫杉醇的Cremophor EL以及用于多西他赛的聚山梨醇酯80。此外,有报道称这些溶剂与PX和多西他赛药代动力学特征的不期望的改变有关。第一代紫杉烷的主要缺点是对MDR细胞无效。这些药物是P-糖蛋白(Pgp)的底物,P-糖蛋白是一种有效的ATP结合盒(ABC)转运蛋白,它主动将药物泵出细胞并诱导抗药性。这有助于解释为什么PX和多西他赛最初对乳腺癌、卵巢癌和肺癌有效,但对结肠癌、胰腺癌、黑色素瘤和肾癌没有功效。例如,由于Pgp的过表达,人结肠癌具有固有的多药耐药性。因此,在小鼠中PX未显示出对人结肠癌异种移植物的任何明显功效。

[0009] 第二代紫杉烷为MDR和CSC问题提供了改进的解决方案。与PX形成鲜明对比,许多第二代紫杉烷(如SBT-1214)对表达MDR表型的抗药性癌细胞表现出优异的活性(比PX强2-3个数量级)。在使用结肠直肠癌和前列腺癌模型的若干项研究中,显示SBT-1214有效杀死体外CSC和异种移植模型中的CSC。还发现SBT-1214具有固有的Pgp调节能力。在SCID小鼠中SBT-1214对若干种抗药性(Pgp+)结肠肿瘤异种移植植物表现出显著的功效,在所有存活小鼠中诱导完全消退,肿瘤生长延迟>187天。观察到的SBT-1214对肿瘤复发的完全抑制可以表明该紫杉烷可以杀死或调节CSC。因此,我们在3D培养中使用癌症球状体检查了SBT-1214对来自HCT116、HT-29和DLD-1细胞系的结肠CSC的活性。向HCT116、HT-29和DLD-1球状体施用100nM SBT-1214持续48小时导致所有细胞中二级球状体的生长的显著抑制。最重要的是,



在该治疗方案中存活的活细胞显著丧失了形成二级球状体的能力,这表明结肠CSC群体受到严重影响。还发现用SBT-1214治疗HCT116、DLD-1和HT-29CSC导致许多干细胞相关基因的下调和对参与保留多能性的基因的显著抑制。SBT-1214抑制了检查的所有结肠CSC中的大多数干细胞相关基因。值得注意的是,这些基因中的许多与自我更新、对称/不对称分裂和多能性的调节有关。这些结果为使用这种新一代紫杉烷SBT-1214作为本研究中针对PPT2细胞和肿瘤的高效细胞毒性抗肿瘤剂组分提供了强有力的支持。

[0010] 紫杉烷类药物递送的进一步改进是紫杉烷与天然脂肪酸(多不饱和脂肪酸(PUFA))的偶联。这是一个有吸引力的策略,主要是因为,(a)一些PUFA通过在多种癌症中过表达的信号传导途径而具有癌症特异性毒性,(b)多种细胞毒性药物和PUFA通常对多种癌细胞系表现出协同作用,(c)PUFA似乎通过预防药物诱导的细胞凋亡对健康细胞具有保护作用,(d)偶联可以通过改变细胞毒性药物的药代动力学特征来降低全身毒性,和(e)PUFA是FDA批准的食品添加剂。已经表明,n-3PUFA通过多种机制抑制由n-6PUFA衍生的致癌性类二十烷酸的产生。衍生自n-3PUFA的类二十烷酸通常表现出对炎症和肿瘤生长的抑制作用。最后,已显示n-3PUFA抑制与抗药性有关的ERK1/2途径。所有这些因素可能有助于观察到n-3PUFA与多种细胞毒性剂之间的协同作用。

[0011] 在天然存在的n-3PUFA中,二十二碳六烯酸(DHA)表现出最高的效力,因此已被广泛研究。已经显示DHA易于并且优先被肿瘤细胞吸收以用作生物化学前体和能量来源。这种效应不仅产生优先的肿瘤靶向作用,而且DHA偶联物也显示出减少的被Pgp外排。开发了第一代紫杉烷PX的DHA偶联物(TAXOPREXIN®:Protarga/Luitpold)。发现DHA偶联物被肿瘤细胞贪婪地摄取、内化(可能通过DHA部分与癌细胞膜的强脂质-脂质相互作用),并且被癌细胞中的酯酶缓慢水解。DHA似乎不是Pgp的良好底物,并且被发现可以减少PX的外排。

[0012] 然而,DHA与第一代紫杉烷的偶联不是克服CSC和其他癌细胞中MDR的最佳策略。如果癌细胞过度表达Pgp和/或其他ABC转运蛋白,则PX分子即使缓慢释放也会被外排泵捕获并从癌细胞中消除。

[0013] 因为像SBT-1214这样的第二代紫杉烷已经对Pgp介导的外排具有固有抗性,所以开发了以下策略,该策略通过利用HAS-脂肪酸-紫杉烷复合物的EPR效应使偶联物可能地靶向肿瘤,并经由Gp 60通过将DHA与这些紫杉烷偶联而使肿瘤选择性转胞吞HSA复合物。结果是下一代紫杉烷,其包括紫杉烷-脂肪酸偶联物,例如DHA-SBT-1214和LNA-SBT-1214。

[0014] 与SBT-1214偶联的DHA还提供了前药性质,使得偶联药物比游离SBT-1214毒性低10倍。DHA部分屏蔽紫杉烷骨架并防止微管蛋白结合。直到偶联物被细胞吸收并且DHA部分被细胞内酯酶裂解,该化合物才具有活性。

[0015] 成功合成DHA-SBT-1214并评估其对SCID小鼠中PX敏感性和PX抗性人肿瘤异种移植物的抗肿瘤活性。发现DHA-SBT-1214引起PX抗性和非抗性肿瘤的完全消退。

[0016] 在小鼠模型中评估DHA-SBT-1214对结肠、卵巢、胰腺和NSCL肿瘤异种移植物的功效,其显示出令人印象深刻的功效。然而,在这些研究中,在soluto1 HS-15(或聚山梨醇酯80)/乙醇/盐水中配制DHA-SBT-1214,并且发现使用赋形剂会产生归因于赋形剂和乙醇的充分证明的不良反应,以及在较低浓度的赋形剂下的一些稳定性问题。因此,申请人已经研究了在配制研究实验室中开发的纳米乳剂制剂的功效。尽管用DHA-SBT-1214看到了稳健的临床前效果,但使用现有配制品存在缺点,申请人正在寻求可能改善临床中安全性、PK、分

布、滞留和易用性的方法。

[0017] 虽然临床上具有活性,但紫杉烷也有若干个问题。这些包括药物溶解性差、严重的剂量限制性毒性(例如骨髓抑制、外周感觉神经病变、过敏反应和最终抗药性的发展)。这些副作用中的许多与用于稀释这些抗肿瘤剂的溶剂有关:用于紫杉醇的CrEL以及用于多西他赛的聚山梨醇酯80。特别地,聚氧乙烯蓖麻油具有生物学和药理学活性,并从标准静脉内(i.v.)管中浸出增塑剂,释放二(2-乙基己基)邻苯二甲酸酯(DEHP)。其输注产生组胺释放,随后产生充分描述的超敏反应,包括过敏反应。在早期I期试验中,20%至40%的未预先用药的患者受到这些反应的影响。此外,它还与高脂血症、异常脂蛋白模式、红细胞聚集、以及延长的(有时不可逆的)感觉神经病变(可能与脱髓鞘和轴突变性相关)有关。CrEL也可引起中性粒细胞减少症。此外,有报道称这些溶剂与紫杉醇和多西他赛药代动力学特征的改变有关。聚山梨醇酯80也可发生过敏反应,但程度低于CrEL。聚山梨醇酯80还与有时严重且不可逆的感觉和运动神经病变有关。此外,聚山梨醇酯80可改变膜流动性,导致累积的体液滞留。预防性皮质类固醇可以降低这种独特的多西他赛毒性。另一个重点是CrEL和聚山梨醇酯80可能限制肿瘤渗透,伴随对疗效的负面影响。特别地,在等离子体隔室中CrEL-紫杉醇的大的极性胶束的形成诱捕药物并且由于药物清除率降低和分布体积减小而导致非线性药代动力学。这促使缺乏剂量依赖性抗肿瘤活性。

[0018] 由于DHA-SBT-1214极其疏水,因此需要将其配制在聚山梨醇酯80/乙醇/盐水或Solutol H-15/乙醇/盐水中,以便静脉内输注。如前所述,诸如Cremophor和聚山梨醇酯80等运载体产生严重的副作用,并且先前提到了对药代动力学的不良影响。

[0019] 由于“增强的渗透性和滞留(EPR)”效应,纳米级分子在用作抗癌药物的运载体方面具有独特的性质。由于纳米级分子的积累不需要特定的受体,因此EPR效应本质上是被动的,但已被证明是有效的。由于纳米乳剂配制方案包括磷脂和鱼油,所以DHA-SBT-1214的使用明显优于SBT-1214本身从而对鱼油组分具有高亲和力,因此封装效率高,实现了胶束内部药物的高浓度。

[0020] 去势抗性前列腺癌(CRPC)的一线疗法是多西他赛与泼尼松,而卡巴他赛已于2010年获得FDA批准,代替多西他赛治疗或除多西他赛治疗以外另行使用。然而,涉及CSC的CRPC不表现出雄激素信号传导,因此这种类型的CRPC对多西他赛或卡巴他赛与泼尼松的组合无响应。

[0021] 非常需要能够增强PUFA-紫杉烷偶联物(如DHA-SBT-1214)的溶解性、抗MDR性和CSC靶向性的递送系统,以及治疗前列腺癌的方法。

## 发明内容

[0022] 本发明提供一种组合物,其包含包封在水包油纳米乳剂(NE)药物递送系统中的 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸(PUFA)-紫杉烷偶联物。

[0023] 本发明还提供了一种药物组合物,其包含包封在水包油NE药物递送系统中的PUFA-紫杉烷偶联物。

[0024] 本发明进一步提供了一种通过向需要治疗的受试者施用有效量的药物组合物并治疗癌症而治疗癌症的方法,所述药物组合物包含包封在水包油NE药物递送系统中的PUFA-紫杉烷偶联物。

[0025] 本发明还进一步提供了一种通过将多药耐药性细胞暴露于有效量的药物组合物并诱导多药耐药性细胞的死亡来克服多药耐药性的方法,所述药物组合物包含包封在水包油NE药物递送系统中的PUFA-紫杉烷偶联物。

[0026] 本发明还提供了一种通过将癌干细胞暴露于有效量的药物组合物并诱导癌干细胞死亡来消除癌干细胞的方法,所述药物组合物包含包封在水包油NE药物递送系统中的PUFA-紫杉烷偶联物。

[0027] 本发明进一步提供了一种通过将癌干细胞暴露于有效量的药物组合物并减少癌干细胞中促干细胞性基因的表达来降低癌干细胞的干细胞性的方法,所述药物组合物包含包封在水包油NE药物递送系统中的PUFA-紫杉烷偶联物。

[0028] 本发明提供了一种通过施用有效量的药物组合物并且将该药物组合物保留在体内比该药物组合物的溶液形式更长的时间来增加受试者体内PUFA-紫杉烷偶联物的保留时间的方法,所述药物组合物包含包封在NE药物递送系统中的PUFA-紫杉烷偶联物。

[0029] 本发明还提供了一种在受试者体内提供PUFA-紫杉烷偶联物的较慢释放曲线的方法,所述方法包括以下步骤:施用有效量的药物组合物,并且在体内比该药物组合物的溶液形式慢至少三倍来释放该药物组合物,所述药物组合物包含包封在NE药物递送系统中的PUFA-紫杉烷偶联物。

[0030] 本发明还提供了以下项目:

[0031] 1.一种组合物,该组合物包含包封在水包油纳米乳剂(NE)药物递送系统中的 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸(PUFA)-紫杉烷偶联物。

[0032] 2.如项目1所述的组合物,其中所述PUFA选自下组,该组由以下组成:二十二碳六烯酸(DHA)、二十碳五烯酸(EPA)和 $\alpha$ -亚麻酸(LNA)。

[0033] 3.如项目1所述的组合物,其中所述PUFA-紫杉烷偶联物是DHA-SBT-1214。

[0034] 4.如项目1所述的组合物,其中所述PUFA-紫杉烷偶联物中的紫杉烷选自下组,该组由以下组成:紫杉醇、多西他赛、SBT-1213、SBT-12854、SBT-121303、SBT-1216、SBT-11033、SBT-121313、SBT-121602、卡巴他赛、SBT-1212、SBT-1217、SBT-1102、SBT-1103、SBT-1104、SBT-1106、SBT-1107、SBT-121301、SBT-121302、SBT-121304、SBT-121403、SBT-11031、SBT-11032、SBT-11034、SBT-12851、SBT-12852、SBT-12853、SBT-12855、SBT-12851-1、SBT-12851-3、SBT-12852-1、SBT-12852-3、SBT-12853-1、SBT-12853-3、SBT-12854-1、SBT-12854-3、SBT-12855-1和SBT-12855-3。

[0035] 5.如项目1所述的组合物,其中所述PUFA-紫杉烷偶联物选自下组,该组由以下组成:DHA-紫杉醇、DHA-多西他赛、DHA-SBT-1213、DHA-SBT-1103、DHA-SBT-1104、DHA-SBT-1216、LNA-SBT-1213、LNA-紫杉醇、LNA-多西他赛、DHA-卡巴他赛和LNA-卡巴他赛。

[0036] 6.如项目4所述的组合物,其中所述PUFA-紫杉烷偶联物是项目4中定义的所述紫杉烷的DHA或LNA酯。

[0037] 7.如项目1所述的组合物,其中所述水包油NE包括50nm至1000nm范围内的平均液滴直径。

[0038] 8.如项目1所述的组合物,其中所述水包油NE包括小于200nm的平均液滴直径。

[0039] 9.如项目1所述的组合物,其中所述水包油NE中的油是富含 $\omega$ -3脂肪酸的食用油,所述食用油选自下组,该组由以下组成:鱼油、松子油、亚麻籽油、红花油、月见草油、黑醋栗

油、琉璃苣油、小麦胚芽油、奇亚籽油、大麻油、紫苏油、葡萄油、角鲨烯油以及真菌油。

[0040] 10. 如项目1所述的组合物,其中所述油被选自下组的物质修饰,该组由以下组成:表面活性剂、靶向剂、图像造影剂及其组合。

[0041] 11. 如项目1所述的组合物,其中所述PUFA-紫杉烷偶联物被包封在纳米颗粒中。

[0042] 12. 如项目1所述的组合物,其中所述组合物是包含药学上可接受的载体的药物组合物。

[0043] 13. 如项目1所述的组合物,其中所述组合物在4℃下物理稳定长达6个月。

[0044] 14. 如项目13所述的组合物,其中所述组合物具有稳定的粒度持续长达6个月。

[0045] 15. 如项目1所述的组合物,其中所述组合物在体内具有比所述PUFA-紫杉烷偶联物的溶液形式增加的保留时间。

[0046] 16. 如项目1所述的组合物,其中所述组合物在体内具有比所述PUFA-紫杉烷偶联物的溶液形式慢至少三倍的释放曲线。

[0047] 17. 一种治疗癌症的方法,该方法包括以下步骤:

[0048] 向需要治疗的受试者施用有效量的药物组合物,所述药物组合物包含包封在水包油NE药物递送系统中的 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸(PUFA)-紫杉烷偶联物;以及

[0049] 治疗癌症。

[0050] 18. 如项目17所述的方法,其中所述PUFA选自下组,该组由以下组成:二十二碳六烯酸(DHA)、二十碳五烯酸(EPA)和 $\alpha$ -亚麻酸(LNA)。

[0051] 19. 如项目18所述的方法,其中所述PUFA-紫杉烷偶联物是DHA-SBT-1214。

[0052] 20. 如项目18所述的方法,其中所述PUFA-紫杉烷偶联物中的紫杉烷选自下组,该组由以下组成:紫杉醇、多西他赛、SBT-1213、SBT-12854、SBT-121303、SBT-1216、SBT-11033、SBT-121313、SBT-121602、卡巴他赛、SBT-1212、SBT-1217、SBT-1102、SBT-1103、SBT-1104、SBT-1106、SBT-1107、SBT-121301、SBT-121302、SBT-121304、SBT-121403、SBT-11031、SBT-11032、SBT-11034、SBT-12851、SBT-12852、SBT-12853、SBT-12855、SBT-12851-1、SBT-12851-3、SBT-12852-1、SBT-12852-3、SBT-12853-1、SBT-12853-3、SBT-12854-1、SBT-12854-3、SBT-12855-1和SBT-12855-3。

[0053] 21. 如项目18所述的方法,其中所述PUFA-紫杉烷偶联物选自下组,该组由以下组成:DHA-紫杉醇、DHA-多西他赛、DHA-SBT-1213、DHA-SBT-1103、DHA-SBT-1104、DHA-SBT-1216、LNA-SBT-1213、LNA-紫杉醇、LNA-多西他赛、DHA-卡巴他赛和LNA-卡巴他赛。

[0054] 22. 如项目20所述的方法,其中所述PUFA-紫杉烷偶联物是项目20中定义的紫杉烷的DHA或LNA酯。

[0055] 23. 如项目19所述的方法,其中所述癌症选自下组,该组由以下组成:乳腺癌、卵巢癌、肺癌、头颈癌、结肠癌、直肠癌、胰腺癌、黑色素瘤、脑癌、前列腺癌、白血病、肉瘤、甲状腺癌、非霍奇金淋巴瘤、膀胱癌、胶质瘤、子宫内膜癌和肾癌。

[0056] 24. 如项目19所述的方法,该方法进一步包括以下步骤:降低癌干细胞中促干细胞性基因和转录因子的表达。

[0057] 25. 如项目24所述的方法,其中所述促干细胞性基因选自下组,该组由以下组成:ABCG2、ACAN、ACTB、AIN1、ALDH1A1、ALPI、ASCL2、BMP1、BMP3、CCND1、CD3D、CD4、CD8A、CD8B、CD8B1、CDH2、COL1A1、COL2A1、COL9A1、CTNNA1、DHH、DLL1、DLL3、DTX1、DVL1、FGF1、FGF3、

FGFR1、FZD1、GDF2、GDF3、GJA1、GJB1、IGF1、ISL1、JAG1、KRT15、MME、MSX1、MYOD、NEUROG2、NCAM1、NOTCH1、NUMB、PARD6A、PPARD、RB1、RPL13A、S100B、SOX1、SOX2、TERT及其组合。

[0058] 26. 如项目24所述的方法,其中所述转录因子选自下组,该组由以下组成:Sox-2、Oct3/4、c-Myc、Klf4及其组合。

[0059] 27. 如项目19所述的方法,该方法进一步包括以下步骤:减少或消除肿瘤的癌干细胞组分以及使肿瘤更易于治疗。

[0060] 28. 如项目19所述的方法,该方法进一步包括以下步骤:快速聚合微管蛋白以及诱导细胞死亡。

[0061] 29. 如项目19所述的方法,该方法进一步包括以下步骤:向受试者施用非偶联形式的PUFA-紫杉烷。

[0062] 30. 如项目19所述的方法,其中所述受试者具有紫杉醇敏感性或紫杉醇抗性肿瘤。

[0063] 31. 如项目19所述的方法,该方法进一步包括以下步骤:下调CDX2、DLX2、DNMT3B、EGR、FOXP3、GLI2、HOX家族TF、IRX4、JUN、KLF2、NFATC1、NR2F2、PCNA、PITX3、POU4F1、SIX2、SOX9、WT1及其组合的表达。

[0064] 32. 如项目19所述的方法,该方法进一步包括以下步骤:抑制肿瘤生长,诱导肿瘤缩小,防止粘附的全克隆的产生,以及防止肿瘤血管化。

[0065] 33. 如项目19所述的方法,其中所述施用步骤进一步包括以下步骤:由于组合物对人血清白蛋白的亲合力,通过gp60介导的转胞吞作用使所述组合物肿瘤特异性积聚到肿瘤间质中。

[0066] 34. 如项目19所述的方法,该方法进一步包括以下步骤:将所述药物组合物在所述受试者中保留比所述药物组合物的溶液形式更长的时间。

[0067] 35. 如项目34所述的方法,其中所述药物组合物在所述受试者的肿瘤中保留比所述药物组合物的溶液形式更长的时间。

[0068] 36. 如项目19所述的方法,该方法进一步包括以下步骤:提供所述药物组合物的释放曲线,所述释放曲线比所述药物组合物的溶液形式的释放曲线慢至少三倍。

[0069] 37. 一种克服多药耐药性的方法,该方法包括以下步骤:

[0070] 将多药耐药性细胞暴露于有效量的药物组合物,所述药物组合物包含包封在水包油NE药物递送系统中的 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸(PUFA)-紫杉烷偶联物;以及

[0071] 诱导所述多药耐药性细胞的死亡。

[0072] 38. 如项目37所述的方法,其中所述PUFA-紫杉烷偶联物是DHA-SBT-1214。

[0073] 39. 如项目37所述的方法,该方法进一步包括以下步骤:降低癌干细胞中促干细胞性基因和转录因子的表达。

[0074] 40. 如项目39所述的方法,其中所述促干细胞性基因选自下组,该组由以下组成:ABCG2、ACAN、ACTB、AIN1、ALDH1A1、ALPI、ASCL2、BMP1、BMP3、CCND1、CD3D、CD4、CD8A、CD8B、CD8B1、CDH2、COL1A1、COL2A1、COL9A1、CTNNA1、DHH、DLL1、DLL3、DTX1、DVL1、FGF1、FGF3、FGFR1、FZD1、GDF2、GDF3、GJA1、GJB1、IGF1、ISL1、JAG1、KRT15、MME、MSX1、MYOD、NEUROG2、NCAM1、NOTCH1、NUMB、PARD6A、PPARD、RB1、RPL13A、S100B、SOX1、SOX2、TERT及其组合。

[0075] 41. 如项目39所述的方法,其中所述转录因子选自下组,该组由以下组成:Sox-2、Oct3/4、c-Myc、Klf4及其组合。

[0076] 42.如项目37所述的方法,该方法进一步包括以下步骤:减少或消除肿瘤的癌干细胞组分以及使肿瘤更易于治疗。

[0077] 43.如项目37所述的方法,该方法进一步包括以下步骤:快速聚合微管蛋白以及诱导细胞死亡。

[0078] 44.如项目37所述的方法,其中所述受试者具有紫杉醇敏感性或紫杉醇抗性肿瘤。

[0079] 45.如项目37所述的方法,该方法进一步包括以下步骤:下调CDX2、DLX2、DNMT3B、EGR、FOXP3、GLI2、HOX家族TF、IRX4、JUN、KLF2、NFATC1、NR2F2、PCNA、PITX3、POU4F1、SIX2、SOX9、WT1及其组合的表达。

[0080] 46.如项目37所述的方法,该方法进一步包括以下步骤:抑制肿瘤生长,诱导肿瘤缩小,防止粘附的全克隆的产生,以及防止肿瘤血管化。

[0081] 47.如项目37所述的方法,其中所述施用步骤进一步包括以下步骤:由于组合物对人血清白蛋白的亲合力,通过gp60介导的转胞吞作用使所述组合物肿瘤特异性积聚到肿瘤间质中。

[0082] 48.一种消除癌干细胞的方法,该方法包括以下步骤:

[0083] 将癌干细胞暴露于有效量的药物组合物,所述药物组合物包含包封在水包油NE药物递送系统中的 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸(PUFA)-紫杉烷偶联物;以及

[0084] 诱导癌干细胞的死亡。

[0085] 49.如项目48所述的方法,其中所述PUFA-紫杉烷偶联物是DHA-SBT-1214。

[0086] 50.一种降低癌干细胞的干细胞性的方法,该方法包括以下步骤:

[0087] 将癌干细胞暴露于有效量的药物组合物,所述药物组合物包含包封在水包油NE药物递送系统中的 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸(PUFA)-紫杉烷偶联物;以及

[0088] 减少所述癌干细胞中促干细胞性基因的表达。

[0089] 51.如项目50所述的方法,其中所述PUFA-紫杉烷偶联物是DHA-SBT-1214。

[0090] 52.一种增加 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸(PUFA)-紫杉烷偶联物在受试者体内的保留时间的方法,该方法包括以下步骤:

[0091] 施用有效量的药物组合物,所述药物组合物包含包封在NE药物递送系统中的 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸(PUFA)-紫杉烷偶联物;以及

[0092] 使所述药物组合物在体内保留比所述药物组合物的溶液形式更长的时间。

[0093] 53.如项目52所述的方法,其中所述保留步骤被进一步定义为使所述药物组合物在选自自由血浆和肿瘤组成的组的身体区域中保留比所述药物组合物的溶液形式更长的时间。

[0094] 54.一种提供 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸(PUFA)-紫杉烷偶联物在受试者体内的较慢释放曲线的方法,该方法包括以下步骤:

[0095] 施用有效量的药物组合物,所述药物组合物包含包封在NE药物递送系统中的 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸(PUFA)-紫杉烷偶联物;以及

[0096] 使所述药物组合物在体内的释放比所述药物组合物的溶液形式慢至少三倍。

## 附图说明

[0097] 在与以下附图结合考虑时,参照以下详细描述,会容易认识到也将更好地理解本

发明的其他优点：

[0098] 图1显示PUFA-紫杉烷偶联物DHA-SBT-1214的化学结构；

[0099] 图2A显示根据本发明的典型NE的结构，以及NE的典型纳米颗粒(右侧)的结构；

[0100] 图2B显示包含靶向EGFR<sup>+</sup>细胞的表面肽的NE纳米颗粒的结构；

[0101] 图3A显示在用DHA-SBT-1214和其他紫杉烷治疗的SCID小鼠中Pgp<sup>+</sup>、PX-抗性DLD1结肠癌异种移植物的生长图；

[0102] 图3B显示在用DHA-SBT-1214和其他紫杉烷治疗的SCID小鼠中PANC-1胰腺癌异种移植物的生长图；

[0103] 图3C显示在用DHA-SBT-1214和其他紫杉烷治疗的SCID小鼠中CFPAC-1胰腺癌异种移植物的生长图；

[0104] 图3D显示在用DHA-SBT-1214和其他紫杉烷治疗的SCID小鼠中H460非小细胞肺癌异种移植物的生长图；

[0105] 图4A显示SBT-1213的化学结构；

[0106] 图4B显示SBT-12854的化学结构；

[0107] 图4C显示SBT-121303的化学结构；

[0108] 图4D显示DHA-紫杉醇的化学结构；

[0109] 图5显示了实验结果，所述实验结果证明了SBT-1214对富含癌干细胞的肿瘤球状体的细胞毒性作用；

[0110] 图6A-6C是安慰剂(NE-安慰剂)(图6A)、DHA-SBT-1214纳米乳剂配制品(NE-DHA-SBT-1214)(图6B)和ABRAXANE®(图6C)的透射电子显微照片(TEM)；

[0111] 图7A是以nm为单位测定的粒度图，图7B是以mV为单位测定的ζ电位图；

[0112] 图8A是在单层PPT2细胞培养物中摄取包封罗丹明的纳米乳剂配制品的荧光显微图像，图8B是在球状体PPT2细胞培养物中摄取包封罗丹明的纳米乳剂配制品的荧光显微图像；

[0113] 图9A是当向PPT2细胞施用呈水溶液或呈纳米乳剂配制品的DHA-SBT-1214时作为DHA-SBT-1214的函数的最大响应百分比的图，图9B-9G是用不同浓度的DHA-SBT-1214纳米乳剂治疗并在显微镜下观察毒性的PPT2球状体的照片(对照(图9B)、10nM(图9C)、100nM(图9D)、1μM(图9E)、5μM(图9F)和10μM(图9G))；

[0114] 图10A-10D是在亲本PPT2细胞系(CD133+(图10A)和CD44+(图10B))以及来自PPT2诱导的小鼠肿瘤异种移植植物(CD133+(图10C)和CD44+(图10D))的原代细胞悬浮液中细胞表面标志物表达的流式细胞术分析；

[0115] 图11A-11F是小鼠肿瘤的照片(图11A显示来自用运载体治疗的小鼠的对照肿瘤，图11B和11C显示来自Abraxane(分别为25mg/kg和40mg/kg)治疗的小鼠的肿瘤，图11D、11E和11F显示来自NE-DHA-SBT(分别为25mg/kg、30mg/kg和40mg/kg)治疗的小鼠的肿瘤，图11G是通过用不同浓度的NE-DHA-SBT治疗而诱导的体重改变的图，图11H是总结所有治疗方式的图)；

[0116] 图12A是使用NE-DHA-SBT对PPT2诱导的小鼠肿瘤异种移植物的体内功效随时间的肿瘤体积变化的图，图12B是通过用不同浓度的NE-DHA-SBT治疗而诱导的体重改变的图；

[0117] 图13A-13L是显示PPT2诱导的肿瘤以及从对照和NE-DHA-SBT治疗的小鼠收集的不

同器官组织的组织病理学评估的照片(苏木精和伊红染色),图13A-未治疗的对照肿瘤显示出低分化的腺癌;图13B-13D-30mg/kg NE-DHA-SBT-1214治疗的肿瘤显示出大量的透明化、空泡化和广泛坏死。来自未治疗的对照小鼠的组织:图13E-肝脏;图13G-肠;图13I-肾脏;图13K-胰腺;来自40mg/kg NE-DHA-SBT治疗的小鼠的组织:图13F-肝脏(插入图是x40);图13H-肠;图13J-肾脏;和图13L-胰腺;

[0118] 图14A是漂浮的球状体和分离的球状体下的致密全克隆的照片,图14B是由对照(未治疗的)肿瘤的原代细胞悬浮液产生的漂浮的球状体的照片;

[0119] 图15A是不存在粘附集落或活细胞的单个球状体的照片,图15B是由用NE-DHA-SBT-1214治疗的肿瘤细胞诱导的培养物中单个球状体的照片;

[0120] 图16是在球状体中培养后在未经治疗对照球状体中的残余肿瘤中的治疗后细胞活力分析图;

[0121] 图17是在NE-DHA-SBT-1214治疗的球状体中的治疗后细胞活力分析图;

[0122] 图18A-18K是DHA-SBT-1214溶液和纳米乳剂在脑(图18A)、胰腺(图18B)、肾脏(图18C)、前列腺(图18D)、结肠(图18E)、心脏(图18F)、肺(图18G)、肝脏(图18H)、脾脏(图18I)、血浆(图18J)和肿瘤(图18K)中的生物分布图;

[0123] 图19A-19D是DHA-SBT-1214药物溶液和纳米乳剂随时间和温度的稳定性的图:图19A是稳定性图,图19B是粒度图,图19C是多分散性指数图,图19D是 $\zeta$ 电位图;

[0124] 图20A-20E是不同治疗组的肿瘤的照片:对照(图20A)、NE-DHA-SBT30mg/kg(图20B)、NE-DHA-SBT 40mg/kg(图20C)、NE-DHA-SBT 50mg/kg(图20D)和NE-DHA-SBT 70mg/kg(图20E);以及

[0125] 图21是来自溶液和纳米乳剂(NE)的DHA-SBT-1214的体外透析释放研究图,将来自溶液和NE的累积DHA-SBT-1214释放(%)相对于时间(小时)作图。

## 具体实施方式

[0126] 本发明包括在水包油纳米乳剂(NE)药物递送系统中配制的 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸(PUFA)-紫杉烷偶联物。优选的实施例是NE-DHA-SBT-1214,其中PUFA-紫杉烷偶联物是DHA-SBT-1214,其结构示于图1中。

[0127] 术语“第二代紫杉烷”将用于指如下第一代紫杉烷,例如紫杉醇(紫杉酚)和多西他赛(紫杉烷),其中(i)C-3'-苯基基团被烯基或烷基基团替代,和(ii)用某些酰基基团修饰C-10位,并且C-3' N位是t-Boc基团。术语“PUFA-紫杉烷偶联物”将用于指在其间位具有经修饰的C2-苯甲酰基基团的第二代紫杉烷。PUFA-紫杉烷偶联物的特征在于它们能够实质上规避Pgp介导的MDR(Ojima I.和Das M.,Recent advances in the chemistry and biology of new generation taxoids.[新一代紫杉烷的化学和生物学最新进展]J Nat Prod.[天然产物杂志](2009)72(3):554-565)。

[0128] 术语“纳米乳剂”(NE)将用于指水包油乳剂,其平均液滴直径为50nm-1000nm,优选直径>200nm。使用富含 $\omega$ -3脂肪酸的食用油(如鱼油或亚麻籽油),如Amiji等人的美国专利申请公开US20070148194中那样制备优选的NE油相。可以使用其他油,例如但不限于松子油、红花油、月见草油、黑醋栗油、琉璃苣油、小麦胚芽油、奇亚籽油(chia oil)、大麻油、紫苏油、葡萄油、角鲨烯油、和真菌油。用表面活性剂修饰油滴,所述表面活性剂包括磷脂(例



如 LIPOID®) 和含聚(环氧乙烷)的非离子表面活性剂(例如Pluronic或Tween)。还可以修饰油滴的表面以用靶向剂(包括使用叶酸、EGFR肽和其他已知的靶向配体)选择性靶向肿瘤细胞。该组合物还可含有图像造影剂,包括荧光团、MRI造影剂或放射性化合物。

[0129] 偶联物中的PUFA优选为DHA(C-22),但也可以是二十碳五烯酸(EPA,C-20)或 $\alpha$ -亚麻酸(LNA,C-18)。

[0130] 本发明包括被包封在NE中的纳米颗粒(如Amiji等人的美国专利申请公开US20070148194(2007)中所公开,将该文献以其全文并入本文)中的PUFA-紫杉烷偶联物的制剂。典型NE的结构显示在图2A的左侧,并且NE的典型纳米颗粒的结构显示在图2A的右侧。优选的PUFA-紫杉烷偶联物是DHA-SBT-1214,其结构示于图1中。可替代地,任何紫杉烷或紫杉烷的组合(包括但不限于Ojima等人的美国专利号7,820,839以及Ojima I和Das M,(2009)中描述的任何PUFA-紫杉烷偶联物,将这两个文献都以其全文并入本文)都可以包封在NE中。在本文实例3中提供了配制的细节。

[0131] 可以作为NE配制品包括在本发明中的其他紫杉烷包括但不限于紫杉醇、多西他赛、SBT-1213(图4A)、SBT-12854(图4B)和SBT-121303(图4C)(Matesanz等人,2014);SBT-1216、SBT-11033、SBT-121313、SBT-121602(Ojima等人,2009)、卡巴他赛、SBT-1212、SBT-1217、SBT-1102、SBT-1103、SBT-1104、SBT-1106、SBT-1107、SBT-121301、SBT-121302、SBT-121304、SBT-121403、SBT-11031、SBT-11032、SBT-11034、SBT-12851、SBT-12852、SBT-12853、SBT-12855、SBT-12851-1、SBT-12851-3、SBT-12852-1、SBT-12852-3、SBT-12853-1、SBT-12853-3、SBT-12854-1、SBT-12854-3、SBT-12855-1和SBT-12855-3。还包括PUFA偶联的第二代紫杉烷,包括但不限于DHA-紫杉醇(图4D)(Bradley等人,2001);DHA-多西他赛、DHA-SBT-1213、DHA-SBT-1103、DHA-SBT-1104、DHA-SBT-1216、LNA-SBT-1213、LNA-紫杉醇、LNA-多西他赛、DHA-卡巴他赛和LNA-卡巴他赛,其中LNA= $\alpha$ -亚麻酸。而且,可以使用任何上述第二代紫杉烷的DHA酯或LNA酯。本领域的技术人员可以容易地制备这类酯。它们的配制和有效性的工作实例在所示的参考文献中找到,将这些参考文献以其全文并入本文。

[0132] 示例性的PUFA-紫杉烷偶联物是DHA-SBT-1214。如先前所讨论的,DHA-SBT-1214的优点包括在靶向癌细胞(包括CSC)和克服MDR方面的有效性。在本文实例1中给出了DHA-SBT-1214在克服抗药性方面的有效性的更详细证据。在这些实验中,DHA-SBT-1214对紫杉醇(PX)抗性人细胞系DLD1(结肠癌)、PANC-1和CFPAC-1(胰腺癌)、以及H460(非小细胞肺癌)的SCID小鼠异种移植有效。此外,有证据表明DHA-SBT-1214对CSC有特异性作用。首先,母体药物SBT-1214降低了CSC的“干细胞性”,即降低了促干细胞性基因和转录因子(包括对多能性有关键作用的那些,如Sox-2、Oct3/4、c-Myc、Klf4等等)的表达(Botchkina等人,2010和2013,以及实例2)。这减少或消除了肿瘤的CSC组分,使肿瘤更容易受到治疗。在本文实例2中提供了实验的细节。此外,已显示SBT-1214在几分钟内聚合微管蛋白,与PX需要的数小时截然不同。即使在静止的CSC中,这种微管生物学的快速破坏也可以诱导细胞死亡。

[0133] 通过包封在根据本发明的NE配制品中,克服了DHA-SBT-1214在体液中溶解性差的主要缺点。DHA-SBT-1214和其他PUFA-紫杉烷偶联物可以通过与根据本发明的NE一起配制而被溶解和递送。这些NE是通过将富含 $\omega$ -3、 $\omega$ -6和 $\omega$ -9多不饱和脂肪酸(PUFA)的油分散在水中并且用两亲磷脂单层稳定而形成的简单胶体载体。NE具有<200nm的流体动力学直径,可以在高体积分数的油相中掺入相当大量的疏水性药物,并且适合于递送水溶性差的

药物。NE完全由通常认为是安全等级 (GRAS) 的材料 (其具有非常有利的安全性) 构成。这是临床应用的重要优势。

[0134] 在先前使用PX的研究中,NE的PX包封效率为100%。这种高药物包封效率归因于PX的高亲脂性,其中药物被保留在NE纳米颗粒的油核中。PX的NE配制品在3个月的储存期内是稳定的,没有观察到相分离或液滴大小的变化。

[0135] 已发现本发明的NE组合物在4℃在长达6个月内是物理上稳定的,如实例6中所述。在此期间发现粒度是一致的,并且还分析了PDI和 $\zeta$ 电位。如实例5中详述的,与PUFA-紫杉烷偶联物的溶液形式相比,NE组合物在体内具有增加的保留时间。如实例8中详述的,NE组合物还在体内提供比PUFA-紫杉烷偶联物的溶液形式慢至少三倍的释放曲线。

[0136] 另外,发现由富含 $\omega$ -3PUFA的油构成的NE增强了PX在SKOV3细胞中的积累。含有松子油或亚麻籽油的NE分别具有40%或47%的 $\omega$ -3PUFA,并且如在小鼠中评估的,已经显示出增强PX配制品的生物利用度和功效。

[0137] NE的另一个优点是它们的表面可以用靶向分子进行修饰,以增加包封药物的肿瘤特异性递送。例如,携带EGFR结合肽的NE纳米颗粒比非靶向性NE纳米颗粒更快地被EGFR<sup>+</sup> SKOV细胞吸收。它们在60分钟时也显示出比非靶向性NE纳米颗粒更多的积累。示例性靶向性NE纳米颗粒的结构显示在图2B中。本发明包括任何合适的NE紫杉烷配制品,其中NE纳米颗粒携带靶向性分子,例如生长因子受体结合肽、单克隆抗体及其片段。

[0138] NE-DHA-SBT-1214配制品的一个特别的优点是DHA部分有助于掺入到富含油的纳米乳剂中。疏水性脂肪酸尾部允许将这些前药包封到长循环靶向性NE的脂质核中。

[0139] NE-DHA-SBT-1214配制品的另一个优点是在水溶液 (例如可注射盐水) 中的溶解度。因此,根据本发明的配制品消除了对有毒溶剂 (例如CREMOPHOR®) 的需求。因此,本发明提供了包封在水包油纳米乳剂药物递送系统中的PUFA-紫杉烷偶联物。

[0140] NE-DHA-SBT-1214比未配制的母体化合物更有效和毒性更低的形式提供DHA-SBT-1214的所有优点。如先前所讨论的,DHA-SBT-1214的这些优点包括杀死抗MDR的癌细胞 (包括CSC) 的能力,以及通过减少促干细胞性基因的表达和通过微管的快速聚合而杀死静止细胞来靶向CSC的能力。根据临床先例,通过化学疗法对肿瘤进行减瘤导致正常静止的CSC群体“醒来”并重新填充肿瘤细胞群。因此预测NE-DHA-SBT-1214的初始治疗将通过标准微管稳定机制开启肿瘤减瘤,并且还改变CSC群体中的基因表达谱。一旦CSC开始重新填充肿瘤,它们将更容易受到微管稳定作用的影响。另外,已显示DHA-SBT-1214下调CSC基因表达并引起CSC的分化,因此它们更容易受到DHA-SBT-1214诱导的凋亡的影响。

[0141] 因此,本发明提供了一种通过向需要治疗的受试者施用有效量的药物组合物并治疗癌症而治疗癌症的方法,所述药物组合物包含包封在NE药物递送系统中的PUFA-紫杉烷偶联物。在本文的方法中治疗的癌症或CSC可以是任何类型的癌症,例如但不限于乳腺癌、卵巢癌、肺癌、头颈癌、结肠癌、直肠癌、胰腺癌、黑色素瘤、脑癌、前列腺癌、白血病、肉瘤、甲状腺癌、非霍奇金淋巴瘤、膀胱癌、胶质瘤、子宫内膜癌和肾癌。PUFA-紫杉烷偶联物可以是本文所述那些中的任何一种,尤其是DHA-SBT-1214。因为PUFA-紫杉烷偶联物被包封在NE中,所以它被身体主动摄取并且DHA比普通递送方法中的DHA更有效地裂解。该方法可以进一步包括以下步骤:降低CSC中促干细胞性基因和转录因子 (包括对多能性有关键作用的那些,例如Sox-2、Oct3/4、c-Myc和Klf4) 的表达。被下调的促干细胞性基因可以是但不限于

ABCG2、ACAN、ACTB、AIN1、ALDH1A1、ALPI、ASCL2、BMP1、BMP3、CCND1、CD3D、CD4、CD8A、CD8B、CD8B1、CDH2、COL1A1、COL2A1、COL9A1、CTNNA1、DHH、DLL1、DLL3、DTX1、DVL1、FGF1、FGF3、FGFR1、FZD1、GDF2、GDF3、GJA1、GJB1、IGF1、ISL1、JAG1、KRT15、MME、MSX1、MYOD、NEUROG2、NCAM1、NOTCH1、NUMB、PARD6A、PPARD、RB1、RPL13A、S100B、SOX1、SOX2、TERT及其组合。CDX2、DLX2、DNMT3B、EGR、FOXP3、GLI2、HOX家族TF、IRX4、JUN、KLF2、NFATC1、NR2F2、PCNA、PITX3、POU4F1、SIX2、SOX9和WT1的表达也可以被下调。该方法可以进一步包括以下步骤：减少或消除肿瘤的CSC组分以及使肿瘤更易于治疗。该方法可以进一步包括以下步骤：快速聚合微管蛋白以及诱导细胞死亡。如实例4中所示，DHA-SBT-1214偶联物的纳米乳剂在前列腺癌模型中诱导优异的肿瘤消退和肿瘤生长抑制。该组合物和方法对紫杉醇敏感性肿瘤和紫杉醇抗性肿瘤特别有效。该组合物可抑制肿瘤生长并诱导肿瘤缩小，防止粘附的全克隆的产生，并防止肿瘤的血管化。由于DHA偶联的药物对人血清白蛋白 (HAS) 的较高亲和力，存在以下现象：通过gp60介导的转胞吞作用该组合物特异性积聚到肿瘤间质中，所述人血清白蛋白是血流中PUFA的主要载体 (如实例4中所述)。此外，如实例5所证明的，该方法可以进一步包括以下步骤：将该药物组合物保持在体内比该药物组合物的溶液形式更长时间，并且尤其是将该药物组合物保留在肿瘤中更长时间。

[0142] 而且，PUFA-紫杉烷的非偶联形式可以与本文任何方法中的偶联物一起施用。由于DHA需要在体内活化之前被裂解，因此非偶联形式可以提供即时效应，而偶联形式可以在体内提供持续效应。对于特别具有侵袭性的肿瘤，期望快速治疗它们，但也期望对癌干细胞具有持续的、更长的作用。该组合治疗可以作为单剂量或注射中的负荷剂量和维持剂量施用。

[0143] 本发明还提供了一种通过将多药耐药性细胞暴露于有效量的药物组合物并诱导多药耐药性细胞的死亡来克服多药耐药性的方法，所述药物组合物包含包封在NE药物递送系统中的PUFA-紫杉烷偶联物。PUFA-紫杉烷偶联物可以是本文所述那些中的任何一种，尤其是DHA-SBT-1214。例如，在实例1中，DHA-SBT-1214引起小鼠中多药耐药性肿瘤的完全消退。该方法可以进一步包括以下步骤：降低CSC中促干细胞性基因和转录因子 (包括对多能性有关作用的那些，例如Sox-2、Oct3/4、c-Myc和Klf4) 的表达。该方法可以进一步包括以下步骤：减少或消除肿瘤的CSC组分、使肿瘤更易于治疗。该方法可以进一步包括以下步骤：快速聚合微管蛋白以及诱导细胞死亡。

[0144] 本发明还提供了一种通过将癌干细胞暴露于有效量的药物组合物并诱导癌干细胞死亡来消除癌干细胞的方法，所述药物组合物包含包封在NE药物递送系统中的PUFA-紫杉烷偶联物。PUFA-紫杉烷偶联物可以是本文所述那些中的任何一种，尤其是DHA-SBT-1214。该方法可以进一步包括以下步骤：降低CSC中促干细胞性基因和转录因子 (包括对多能性有关作用的那些，例如Sox-2、Oct3/4、c-Myc和Klf4) 的表达。该方法可以进一步包括以下步骤：减少或消除肿瘤的CSC组分、以及使肿瘤更易于治疗。该方法可以进一步包括以下步骤：快速聚合微管蛋白以及诱导细胞死亡。

[0145] 本发明还提供了一种通过将癌干细胞暴露于有效量的药物组合物并减少癌干细胞中促干细胞性基因的表达来降低癌干细胞的干细胞性的方法，所述药物组合物包含包封在NE药物递送系统中的PUFA-紫杉烷偶联物。PUFA-紫杉烷偶联物可以是本文所述那些中的任何一种，尤其是DHA-SBT-1214。该方法可以进一步包括以下步骤：降低CSC中促干细胞性基因和转录因子 (包括对多能性有关作用的那些，例如Sox-2、Oct3/4、c-Myc和Klf4) 的表

达。该方法可以进一步包括以下步骤：减少或消除肿瘤的CSC组分、使肿瘤更易于治疗。该方法可以进一步包括以下步骤：快速聚合微管蛋白以及诱导细胞死亡。

[0146] 本发明进一步提供了一种通过施用有效量的药物组合物并且将该药物组合物保留在体内比该药物组合物的溶液形式更长的时间来增加受试者体内PUFA-紫杉烷偶联物的保留时间的方法，所述药物组合物包含包封在NE药物递送系统中的PUFA-紫杉烷偶联物。如实例5所证明的，与溶液形式相比，PUFA-紫杉烷偶联物的NE药物递送系统能够在体内尤其是在血浆和肿瘤中提供更长的保留时间。PUFA-紫杉烷偶联物可以是本文所述那些中的任何一种，尤其是DHA-SBT-1214。由于保留时间增加，还可以给予较低剂量的PUFA-紫杉烷偶联物，从而减少副作用。

[0147] 本发明还提供了一种在受试者体内提供PUFA-紫杉烷偶联物的较慢释放曲线的方法，所述方法包括以下步骤：施用有效量的药物组合物，并且在体内比该药物组合物的溶液形式慢至少三倍来释放该药物组合物，所述药物组合物包含包封在NE药物递送系统中的PUFA-紫杉烷偶联物。如实例8所证明的，NE组合物的释放曲线比溶液形式慢三倍。PUFA-紫杉烷偶联物可以是本文所述那些中的任何一种，尤其是DHA-SBT-1214。由于较慢的释放曲线，还可以给予较低剂量的PUFA-紫杉烷偶联物，从而减少副作用。

[0148] 根据本发明的药物组合物优选地是水溶液，例如无菌、无热原的普通(0.9%)盐水。不太优选地，可以使用替代溶剂或可以使用载体。本发明还可以包括相容的药学上可接受的赋形剂、缓冲剂或稳定剂。

[0149] 药物组合物的“有效量”由负责的制造商和/或从业者确定，并且通常考虑待治疗的障碍、受试患者的病症、递送部位、施用方法和其他因素。确定有效量的技术和方案的实例可以在Remington's Pharmaceutical Sciences[雷明顿药物科学]，第17版，Gennaro, A.R. (编辑)，麦克出版公司(Mack Publishing Co.)，伊斯顿(Easton)，宾夕法尼亚州(PA)1985中找到。通常，组合物的“有效量”被定义为足以显著诱导疾病状态的阳性改变的量。该术语还意味着该量足够小以避免严重的副作用。这些量的确定通常位于合理的医学判断范围。“有效量”将根据以下各项而变化：待治疗的具体病症以及待治疗患者的年龄和身体状况、病症的严重程度、治疗的持续时间、伴随疗法的性质、所使用的具体药学上可接受的载体以及类似因素。根据本发明的药物组合物可用于人医学和兽医医学目的。

[0150] 本发明的药物组合物优选肠胃外施用，最优选通过静脉内途径，但也可以替代地通过肌肉内、皮下、皮内、鞘内和硬膜外途径施用。对于特定目的，例如肿瘤局部治疗，也可以通过非肠胃外途径，例如口服、舌下、局部、透皮、眼部、耳部、鼻、直肠和阴道途径来施用。

[0151] 如先前所描绘的，本发明的各个实施例和方面在以下实例中得到实验支持。

[0152] 实例1：母体PUFA-紫杉烷偶联物DHA-SBT-1214对体内PX敏感性和PX抗性肿瘤是有效的。

[0153] 在SCID小鼠中DHA-SBT-1214对PX抗性人结肠癌异种移植物的生长的影响。

[0154] 在使用皮下植入SCID小鼠中的紫杉醇抗性、Pgp<sup>(+)</sup>DLD1人结肠肿瘤异种移植物的实验中，紫杉醇和TAXOPREXIN®是完全无效的。与此形成鲜明对比的是，DHA-SBT-1214在第5天、第8天和第11天以80mg/kg剂量施用的5只小鼠中的5只中导致DLD-1肿瘤完全消退(肿瘤生长延迟>187天)(图3A)。

[0155] 在SCID小鼠中DHA-SBT-1214对人胰腺癌异种移植物的生长的影响。

[0156] 该实验使用在RPCI SCID小鼠中的人PANC-1胰腺肿瘤异种移植物,比较了针对PX和DHA-SBT-1214的q7dx3和q3dx3方案。结果(图3B)表明这两种方案在人胰腺肿瘤异种移植物中非常有效(肿瘤生长延迟>90天)。DHA-SBT-1214的最大耐受量(MTD)似乎是240mg/kg总剂量(80mg/kg x 3次注射=240mg/kg),在300mg/kg总剂量下发生一次毒性死亡。所有接受DHA-SBT-1214的小鼠均获得完全缓解,并且基本上治愈了。相比之下,PX只是微弱有效,显示q7dx3方案下的肿瘤生长延迟18天和q3dx3方案下的肿瘤生长延迟13天以及没有完全缓解。

[0157] 在SCID小鼠中DHA-SBT-1214对人胰腺腺癌异种移植物的生长的影响。

[0158] 该实验使用人CFPAC-1导管胰腺腺癌异种移植物,比较了PX、DHA-紫杉醇和DHA-SBT-1214的功效。总剂量为240mg/kg或300mg/kg的DHA-SBT-1214是非常有效的,分别导致完全消退和治愈5只中的5只或4只中的4只(图3C)。与运载体相比,PX和DHA-紫杉醇的效果要差得多,只有很小的肿瘤生长延迟。SBT-1214(120mg/kg总剂量)显示出优于PX的结果,6只小鼠中有6只肿瘤消退,尽管6只中只有1只治愈,并且该药物似乎比DHA-SBT-1214更具毒性。到第20天,SBT-1214治疗的小鼠仅显示轻微的体重减轻(<4%),而240mg/kg或300mg/kg总剂量的DHA-SBT-1214治疗的小鼠体重减轻可忽略不计。

[0159] 在SCID小鼠中DHA-SBT-1214对人非小细胞肺癌异种移植物的生长的影响。

[0160] 该实验针对高度侵袭性H460人非小细胞肺癌异种移植物比较了DHA-SBT-1214、PX、DHA-紫杉醇和SBT-1214。在第8天和第3天,用在MTD(75mg/kg总剂量)下的PX和在MTD(240mg/kg总剂量)下的DHA-紫杉醇分别仅观察到轻微肿瘤生长延迟。相比之下,DHA-SBT-1214和SBT-1214在约MTD(分别为240mg/kg和120mg/kg总剂量)下引起55天和34天的肿瘤生长延迟。DHA-SBT-1214明显比SBT-1214耐受性更好。

[0161] 该实例的结果表明,NE-DHA-SBT-1215的母体DHA-SBT-1214在克服多种靶细胞中的MDR方面是有效的。这些结果表明,根据本发明的NE-DHA-SBT-1214制剂将产生与DHA-SBT-1214至少相当的抗肿瘤作用,在于该制剂比未配制的母体化合物更可溶和毒性更低。

[0162] 实例2:母体紫杉烷SBT-1214降低癌干细胞的干细胞特性。

[0163] 用患者来源的前列腺癌的癌干细胞系PPT2(Botchkina 2013,Rowehl2014)进行实验。细胞系PPT2由患者来源的前列腺癌肿瘤产生。对这些含有小细胞的全克隆进行亚克隆导致表达高水平的CD133、CD44、CD44v6、EpCAM、CD49f和CD166的细胞的显著富集。PPT2细胞系作为NOD/SCID小鼠肿瘤异种移植物、漂浮的3D球状体和I型胶原贴壁培养物连续增殖。根据ATCC报告(ID号002872),PPT2细胞是未被任何已知的已建立细胞系污染的唯一人细胞。尽管由于CSC的双重性质(即,自我更新和产生定向祖细胞的能力),富含CSC的培养物的表型是动态的,但PPT2细胞保持相对稳定的表型,甚至一直到在无血清培养基中的I型胶原包被表面上分选并培养MACS-CD133<sup>+</sup>细胞之后的8周。事实上,整个PPT2细胞群保持未分化(仅3%-5%表达分化细胞的标志物,即泛角蛋白),对EpCAM、CD49f、和CD44的标准同种型呈阳性(98%-99%)。高达72%表达变体同种型CD44v6。在>27次传代后,约90%的PPT2细胞仍然表达中等至高水平的CD133,并且在3D培养中具有非常高的球状体形成能力。绝大多数CD133<sup>+</sup>PPT2细胞表达高细胞质水平的波形蛋白和巢蛋白,这是神经干细胞和胚胎干细胞的特征。PPT2细胞的细胞核和细胞质部分均表达c-Myc,而其他多能性标志物(Oct-4和Sox-2)仅在细胞核部分中检测到。重要的是,PPT2细胞对促凋亡/肿瘤抑制蛋白p53和p21呈阴性,

并对标准抗癌药物具有极强的抗药性。

[0164] 为了表征药物诱导的在干细胞性基因表达方面的可能改变,在用SBT-1214和CMC 2.24(化学修饰的姜黄素)的组合治疗之前和之后分析CD133<sup>+</sup>PPT2细胞。使用PCR阵列分析(PAHS 501;SABiosciences公司;过滤标准为1.5倍或更大的表达变化),发现大约50%的分析的84种干细胞相关转录因子(TF)在CD133<sup>+</sup>中比在分化的PrC细胞中被上调。其中有CDX2、DLX2、DNMT3B、EGR、FOXP3、GLI2、HOX家族TF、IRX4、JUN、KLF2、NFATC1、NR2F2、PCNA、PITX3、POU4F1、SIX2、SOX2、SOX9、TERT、WT1等。用SB-1214(1 $\mu$ M)和CMC 2.24进行单次治疗24小时诱导这些过表达基因的显著下调。蛋白质印迹分析显示SBT-1214诱导c-Myc和Sox2在CD133<sup>+</sup>和大部分PPT2细胞的核提取物中的中度下调。重要的是,CD133<sup>+</sup>和大部分PPT2细胞的核部分都不表达这两种肿瘤抑制因子/凋亡调节因子p53和p21,这可以部分地解释它们对抗癌药物的极端抗性。SBT-1214诱导p21和p53的表达。通过用该药物预处理而诱导的这种“基因唤醒”显著增加这些高度抗药性细胞对第二次治疗的进一步敏感性,导致富含CSC的细胞几乎完全死亡。

[0165] 在另一个实例中,富含干细胞的结肠癌细胞群选自三种侵袭性结肠癌细胞系HCT116、HT29和DLD-1。群体以3D多细胞球状体生长。发现SBT-1214在所有三种类型的球状体中有效地诱导细胞毒性(图5)。此外,SBT-1214治疗下调所有这三种肿瘤细胞类型的球状体中的以下干细胞性相关基因:

[0166] HCT116:SOX1、RPL13A、BMP1、BMP3、NEUROG2、GJB1、GJA1、ASCL2、CTNNA1、GDF2、ALPI、S100B、CD8B1、ACTB、CCND1、FGF1、PARD6A、DVL1、GDF3、ISL1、CD3D、MME、FGFR1、RB1、AIN1、ALDH1A1、CD8A、PPARD、FZD1、NUMB和ABCG2;

[0167] HT29:ACAN、ALPI、BMP3、CD3D、CD4、CD8A、CD8B、CDH2、COL2A1、COL9A1、DHH、DLL1、DLL3、DTX1、FGF1、FGF3、FZD1、GDF2、IGF1、MME、MYOD、NCAM1、NEUROG2、S100B、SOX2和TERT;

[0168] DLD-1:CD4、CDH2、COL1A1、DLL1、DTX1、IGF1、FGF3、FZD1、JAG1、KRT15、MSX1、NCAM1和NOTCH1(Botchkina等人,2010)。

[0169] 这些示例性研究的结果表明SBT-1214降低CSC中的干细胞特性并有效地消除它们。可以预测,当配制为NE-DHA-SBT-1214时,SBT-1214将产生与未配制的母体化合物相似的干细胞性基因表达抑制,但具有更高的溶解度和更低的毒性作用。

[0170] 实例3:NE-DHA-SBT-1214配制品的制备。

[0171] 本发明的NE是通过将富含 $\omega$ -3、 $\omega$ -6和 $\omega$ -9多不饱和脂肪酸(PUFA)的油分散在水中并且用两亲磷脂单层稳定而形成的简单胶体载体。可以在Amiji等人的美国专利申请公开US20070148194(2007)中找到这些NE的组成的详细描述及制备它们的方法,已发现由富含 $\omega$ -3PUFA的油构成的NE增强PX在SKOV3细胞中的积累。

[0172] 简言之,为配制NE-DHA-SBT-1214,通过高能微流化方法制备水包油NE配制品。首先,通过将卵磷脂酰胆碱和聚乙二醇化试剂(PEG2000DSPE)溶解于去离子水中来制备水相。然后将DHA-SBT-1214添加到富含PUFA的油中以获得油/脂质相。将混合物在低压下用MICROFLUIDIZER®处理器M-110EH进行预均质化5个循环以形成粗乳剂,并且进行另外5个循环的高压均质化以形成液滴大小<200nm的NE。DHA与SBT-1214的先前连接有助于将DHA-SBT-1214掺入到纳米乳剂中。

[0173] 优选的是油含有至少2%(w/w)的至少一种PUFA。含有松子油或亚麻籽油的NE分别

具有40%或47%的 $\omega$ -3PUFA,并且是优选的形式,已经如在小鼠(41只)中评估的显示增强紫杉烷制剂的功效。用于NE配制品的其他优选的油包括但不限于红花油、月见草油、黑醋栗油、琉璃苣油、小麦胚芽油、墨西哥油、大麻油、紫苏油、葡萄油、角鲨烯油和真菌油、以及富含 $\omega$ -3的鱼油。

[0174] 已经发现有效包封紫杉烷化合物的示例性配制品(Ganta等人,2010)可以如下适用于SBT-1214:在玻璃小瓶中,将在氯仿中的SBT-1214(例如10mg)添加到1.0g超纯的富含 $\omega$ -3脂肪酸的亚麻籽油(杰德沃德兹国际公司(Jedwards International),昆西(Quincy),马萨诸塞州(MA))中。通过吹入氮气流蒸发氯仿。通过以下来制备水相:将120mg蛋黄卵磷脂(Lipoid E80®,类脂股份有限公司(Lipoid GmbH),路德维希港(Ludwigshafen),德国)和40mg脱氧胆酸(阿克罗斯有机物公司(Acros Organics),帕西帕尼(Parsippany),新泽西州(NJ))添加到4mL去离子蒸馏水中并使用SILVERSON®均质器以5000rpm搅拌30分钟来实现完全溶解。将油相和水相分别加热至70°C-75°C,持续2分钟。将水相逐渐添加到油相中,然后使用VIBRA-CELL®VC 505超声仪器(声能和材料有限公司(Sonics and Materials),纽敦(Newtown),康涅狄格州(CT))以21%振幅和50%占空比将混合物超声处理10分钟以获得稳定的纳米乳剂。使用Brookhaven仪器的90Plus粒度分析仪(Holtsville, NY),在90°固定角和25°C温度下,使用动态光散射法测量纳米乳剂中油滴的粒度。在分析之前,将所有样品在去离子蒸馏水中稀释,并测定平均油滴流体动力学直径。还测定了多分散性指数(PDI),即样品中粒度分布的量度。另外,使用Brookhaven仪器的ZetaPALS方法,基于油滴的电泳迁移率确定油滴表面电荷( $\zeta$ 电位)值。

[0175] 接下来对NE-DHA-SBT-1214的具体配制品的大小、电荷和形态进行表征,以确定其稳定性、功能性和容量。通过使用众所周知的离心过滤装置的超滤方法来测定NE-DHA-SBT-1214配制品中的包封效率(保留在油相中的药物的百分比作为添加量的函数)。通过ICP-MS或LC-MS测定药物有效负载的浓度。如果发现任何这些测量显著偏离所期望的参数,则可通过简单的实验优化油/脂质混合物。

[0176] 实例4

[0177] 材料与方法

[0178] 新一代紫杉烷DHA-SBT-1214由石溪大学(石溪(Stony Brook),纽约州(NY))的Ojima博士实验室或ChemMaster国际公司(ChemMaster International, Inc.) (石溪(Stony Brook),纽约州)合成。富含 $\omega$ -3的超纯鱼油购自杰德沃德兹国际公司(昆西,马萨诸塞州), Lipoid E80购自类脂股份有限公司(路德维希港,德国),DSPE PEG2000购自Avanti极性脂质有限公司(Avanti Polar Lipids, Inc.) (阿拉巴斯特(Alabaster),阿拉巴马州(AL)), Tween 80购自西格玛化学品有限公司(Sigma Chemicals, Inc.) (圣路易斯(St Louis),密苏里州(MO)), CellTiter 96水溶液细胞增殖检测试剂盒(G3580)购自普洛麦格公司(Promega) (麦迪逊(Madison),威斯康辛州(WI)),间充质干细胞生长培养基(MSCGM)购自龙沙公司(Lonza) (朴茨茅斯(Portsmouth),新罕布什尔州(NH)), LAL显色内毒素定量试剂盒购自赛默科技公司(Thermo Scientific) (罗克福德(Rockford),伊利诺伊州(IL)),显微镜载片单凹陷凹面购自Amscope公司(尔湾(Irvine),加利福尼亚州(CA)), II型和IV型胶原酶购自西格玛-奥德里奇公司(Sigma-Aldrich),罗丹明123购自西格玛奥德里奇公司(圣路易



斯,密苏里州),抗人CD133/2-APC抗体(克隆293C3)购自美国加利福尼亚州的美天旎生物技术公司(Miltenyi Biotec);CD166-PE抗体(克隆105902)购自美国明尼苏达州(MN)R&D系统公司(R&D systems);CD44-FITC抗体(克隆F10-44-2)购自或CD44-PE抗体(克隆F10-44-2)购自美国英杰/生物来源公司(Invitrogen/Biosources);CD44v6-FITC抗体(克隆2F10)购自美国R&D系统公司,EpCAM-FITC购自美国加利福尼亚州生物来源公司,泛角蛋白(C11)抗体-ALEXAFLUOR® 488购自细胞信号传导公司(Cell Signaling),并且所有同种型对照抗体购自日本贵弥功株式会社(Chemicon)。青霉素、链霉素和TrypLE获自英杰公司I(格兰德岛(Grand Island),纽约州(NY),美国)。所有其他试剂均通过飞世尔科技公司(Fisher Scientific)购买。

#### [0179] 纳米乳剂配制品的制备和表征

[0180] 如最近报道的那样进行纳米乳剂配制品的制备并进行一些修改。通过如下的微流体方法代替超声处理方法来制备水包油纳米乳剂。简言之,将由单独的鱼油(用于安慰剂)组成的或与DHA-SBT-1214一起组成的预热油相(10ml)逐渐添加到含有卵磷脂酰胆碱(Lipoid E80®)(1200mg)、聚山梨醇酯80(Tween80®)(0.5ml)、DSPE-PEG2000(1,2-二硬脂酰基-Sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[氨基(聚乙二醇)-2000])(75mg)的预热水相(40ml)中。将所得混合物均质化,并使油-水悬浮液以10,000psi通过M-110EH-30高剪切流体处理器的氧化锆柱塞持续4个循环,以获得均匀的纳米乳剂配制品。

[0181] 在实验室中通过已确立的方案表征水包油纳米乳剂配制品。总之,通过使用Brookhaven仪器的90Plus ZetaPALS粒度分析仪(豪斯维尔公司(Holtsville),纽约州)测量水稀释的纳米乳剂的粒度和表面电荷,并且用透射电子显微镜(TEM)观察纳米乳剂配制品中的油滴形态。如前所述,使用HPLC评估载药量、包封效率和稳定性。简言之,对于载药量,用有机物(乙腈)充分稀释纳米乳剂,并将20μL等分试样注射到HPLC中。对于包封效率,使用利用离心过滤装置(截留分子量3,000道尔顿;密理博公司(Millipore),贝德福德(Bedford),马萨诸塞州)的超滤方法。在申请体内和体外研究之前,根据制造商的说明,通过鲎属(Limulus)变形细胞裂解物(LAL)测定法测试所有批次的纳米乳剂的内毒素水平。

#### [0182] 肿瘤起始细胞的细胞培养、分离、纯化和表征

[0183] 最近从阶段pT2c pNX pMX前列腺癌患者建立了人前列腺癌干细胞(PPT2)(富集前列腺腺癌CSC的)细胞系。简言之,将PPT2细胞在大鼠1型胶原包被的组织培养皿上以单层培养并用于诱导漂浮的3D球状体培养,将这些细胞在5% CO<sub>2</sub>气氛下于37℃接种于超低粘附(ULA)平板或烧瓶(康宁公司(Corning))中。为了确保并控制CSC的可靠富集,用若干种与不同荧光染料偶联的标志物标记细胞。将这些染色的细胞进行分选并用多参数流式细胞仪BD FACS Aria(BD公司(Becton Dickinson),加利福尼亚州)进行分析,或将解离的细胞进行离心并用如制造商所推荐的直接或间接偶联铁磁珠的CD133 Ab(美天旎生物技术公司,加利福尼亚州)进行标记。在功能上测试分离的细胞在非贴壁培养条件下诱导圆形菌落(全克隆)和3D球状体的能力。对于来自原代小鼠肿瘤的组织培养,在无菌条件下将肿瘤组织机械地解聚成单细胞悬浮液,用汉克氏(Hank's)平衡盐溶液冲洗并在37℃在无血清RPMI培养基1640中孵育1.5小时,该培养基含有200单位/ml的II型和IV型胶原酶、120μg/ml青霉素和100μg/ml链霉素。通过移液和经由细胞解离筛(大小40目和80目;西格玛-奥德里奇公司)的连续过滤进一步解聚细胞。原代细胞悬浮液以单层和球状体生长。



[0184] 细胞摄取研究

[0185] 进行这些研究是为了评估和比较包封罗丹明的纳米乳剂配制品在单层和球状体培养的PPT2细胞中的摄取。进行荧光共聚焦显微镜研究以评估如前所述的纳米颗粒的定性细胞内化。简言之,将细胞以单层和球状体培养。在获得单层细胞的获得性汇合和球状体的最佳直径后,将这些与不同浓度的包封染料的纳米乳剂一起孵育8小时。用冷的磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤细胞和球状体,用4%多聚甲醛固定20分钟,用冷PBS洗涤,并在单层细胞培养物的情况下用DAPI固定在常规清洁载玻片上以及固定在具有用单凹陷凹面的显微镜载片上以保持球状体的完整形状。数字图像由LSM 700®共聚焦显微镜(卡尔·蔡司公司(Carl Zeiss),哥廷根(Göttingen),德国)以63倍放大率捕获并使用NIH Image-J软件进行分析。用于荧光检测和图像分析的所有设定参数保持恒定,以允许用于比较的样品的成像的一致性。

[0186] 细胞活力分析

[0187] 用含有不同浓度的DHA-SBT-1214的水性药物溶液和纳米乳剂配制品进行细胞活力研究。为此目的,将PPT2细胞以每孔10000个细胞的密度接种到胶原包被的96孔板中。24小时后,将在水溶液或纳米乳剂配制品中的不同浓度的DHA-SBT-1214与各自的对照一起添加到单层细胞中。将用培养基和DMSO(不含任何药物)单独处理的细胞用作阴性对照。每种测试条件进行八次重复。48小时的孵育期之后,根据制造商的说明用CellTiter测定法测定细胞活力。使用BioTek-HT UV-Vis/荧光酶标仪在570nm波长下读取板的吸光度。根据药物治疗的细胞的吸光度除以对照(仅培养基)细胞的吸光度并乘以100来计算细胞活力百分比。使用Graph Pad Prism计算由溶液或纳米乳剂配制品中的DHA-SBT-1214产生的50%细胞活力抑制(IC50)。

[0188] 小鼠肿瘤异种移植物

[0189] 如前所述,所有涉及动物使用的实验都严格按照美国国立卫生研究院(the National Institutes of Health)的实验动物护理和使用指南(the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals)中的建议,通过石溪大学研究机构动物护理和使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)批准的研究方案进行。简言之,在充分繁殖后,将表达高水平的CD133、CD44、CD44v6、CD166和EpCAM的克隆源性细胞重悬于1:1MSCGM/基质胶中,并注射到6周龄NOD/SCID小鼠的侧腹中(每只小鼠高达1百万个细胞;皮下)。每周监测肿瘤发展。用卡尺每周测量原发性肿瘤的大小,并使用公式 $0.5ab^2$ 确定近似肿瘤重量,其中b是两个垂直直径中较小的一个。

[0190] NE-DHA-SBT-1214和**ABRAXANE®**的体内功效和原发性肿瘤细胞的离体表征

[0191] 向携带可触知的肿瘤异种移植物的NOD/SCID小鼠每周一次静脉内施用NE-DHA-SBT-1214(1、3、10、25、30、40、50和70mg/kg)和**ABRAXANE®**(蛋白质结合的紫杉醇,新基公司(Celgene)) (30和40mg/kg),持续3周。移植PPT2细胞一周后,当肿瘤异种移植物达到大约50-150mm<sup>3</sup>时,开始治疗。通过规范标准(肌动活动、发病率、食欲、姿势和外观)密切监测并评估NOD/SCID小鼠的全身毒性,并且在它们看起来垂死或具有过大或溃烂的肿瘤后进行人道安乐死。在最后一次治疗后,再监测肿瘤发展4周。随访四周后终结所有小鼠。收获一些对照或治疗后残余肿瘤并对其进行组织病理学分析用于离体克隆源性和球状体形成能力以及其他测定。对于处理后的表征,收获小鼠肿瘤异种移植物并机械地和酶促地解聚成

单细胞悬浮液。对于对照(未治疗的)和药物处理的小鼠,确定这些原代细胞诱导圆形集落(全克隆)和球状体形成的能力。对于全克隆,计数细胞并在48孔板上以每孔300个细胞的最终计数进行铺板;对于球状体形成,将细胞重悬于1:4基质胶/MSGM中,并将已知细胞数量在ULA平板上进行铺板。开始一周后,分别检查平板的菌落生长和漂浮球状物生长。通过相差显微镜观察每个孔内的菌落和漂浮球状物。将来自未治疗的和治疗的肿瘤异种移植物的一些细胞用于用FACS和阵列来分析药物诱导的干细胞标志物表达的改变。

#### [0192] 统计分析

[0193] 将对药物治疗的体内响应评估为对药物治疗的异种移植物与未治疗的对照异种移植物的肿瘤体积的变化。数据表示为对照和药物治疗的肿瘤的平均值 $\pm$ SD。使用利用Graph Pad **Prism**®软件(GraphPad软件公司(GraphPad Software),拉荷亚(La Jolla),加利福尼亚州,美国)的学生t检验来测定差异的统计学显著性。使用的参数是双尾分布和配对检验。 $P<0.05$ 被认为是统计学上显著的。

#### [0194] 结果

##### [0195] DHA-SBT-1214纳米乳剂配制品的表征

[0196] 纳米乳剂是液体的异质分散体,其可以按水包油或油包水顺序制备,并且粒度为100nm-150nm范围。纳米乳剂配制品是最常用于疏水性药物递送的载体,因为它们在体外和体内都具有有效的治疗能力。许多包封抗癌药物的纳米乳剂由于其靶标特异性全身递送至肿瘤部位而显示出增强的功效。这种递送方法在我们之前的研究中也显示出增强的治疗潜力。

[0197] 在目前的这项研究中,申请人开发了使用鱼油的水包油纳米乳剂,所述鱼油富含PUFA(如 $\omega$ -3和 $\omega$ -6脂肪酸)并具有溶解大量亲脂性抗癌药物的能力。纳米乳剂配制品用于包封DHA-SBT-1214(第二代紫杉烷,作为针对前列腺癌的独立疗法)。申请人使用微流体技术产生均匀的乳白色乳剂配制品。如透射电子显微镜(TEM)所观察到的,所有纳米乳剂在结构上接近球形,大小范围为100nm-220nm(图6A-6C)。在TEM图像中,NE-安慰剂和NE-DHA-SBT-1214均以60000倍放大率拍摄,但Abraxane以40000倍放大率拍摄。纳米乳剂样品的油滴是球形的,其大小在100nm-220nm的范围内。比例尺表示100nm的距离。测定安慰剂、负载DHA-SBT-1214的纳米乳剂配制品和**ABRAXANE**®的粒度、多分散性指数(PDI)和 $\zeta$ 电位(表面电荷)。通过微流体技术制备并通过0.2微米过滤器过滤的所有配制品具有小尺寸( $<230$ nm)和窄PDI( $<0.3$ ),除了**ABRAXANE**®,其PDI为0.361并且带负电荷。表1显示了本研究中使用的所有配制品的平均粒度、PDI和 $\zeta$ 电位。

#### [0198] 表1:空白和含有DHA-SBT-1214的水包油纳米乳剂配制品的粒度和表面电荷特征

[0199]	配制品	流体动力学直径 (nm)	多分散性指数	表面电荷 (Mv)
	Abraxane®	134.1 $\pm$ 6*	0.361	-20.2 $\pm$ 2.3
	空白纳米乳剂	225 $\pm$ 7	0.11	-27.0 $\pm$ 3.7
	DHA-SBT-1214 纳米乳剂	228 $\pm$ 7	0.12	-24.9 $\pm$ 4.3

#### [0200] \*平均值 $\pm$ S.D.

[0201] DHA-SBT-1214纳米乳剂配制品的大小和 $\zeta$ 电位的代表性图分别显示在图7A和7B中。空白纳米乳剂(不含任何药物)的平均粒度为 $225 \pm 7\text{nm}$ 。在纳米乳剂中掺入DHA-SBT-1214没有显著改变流体动力学粒度和尺寸,并且它保持在大约 $228\text{nm} \pm 7\text{nm}$ 。与这两种纳米乳剂配制品相比,ABRAXANE®显示出更小的粒度。纳米乳剂中油滴的平均表面电荷在-20.2至-27.0mV的范围内。使用药物在油滴内的最大包封,所有配制品的表面电荷没有显著差异。HPLC测定法用于测定纳米乳剂配制品中的药物浓度。20mg/ml的DHA-SBT-1214纳米乳剂的载药量为97%。纳米乳剂的这种高药物包封效率归因于药物的相对亲脂性,因为这些药物保留在纳米乳剂的油核中。另外,所有配制品在储存期间保持其粒度和表面电荷,并且包封药物的纳米乳剂配制品在4℃储存下化学稳定至少长达6个月。所有配制品在储存期间具有最低水平的内毒素,如通过鲎属变形细胞裂解物(LAL)测定所确认的。

[0202] 在PPT2 CSC中体外评估NE DHA-SBT-1214

[0203] 为了检查纳米乳剂是否在PPT2细胞的单层和球状体中内化,将罗丹明包封在纳米乳剂中并进行共聚焦显微镜研究。在用不同浓度的染料配制品孵育8小时后,观察到包封罗丹明的纳米乳剂配制品的最佳细胞和球状体摄取,如图8A和8B所示。荧光显微镜图像显示蓝色(细胞核)、红色(包封罗丹明的纳米乳剂)和紫色的叠加图像。这些图像都是63倍放大率下拍摄的。比例尺为 $100\mu\text{m}$ 。来自图8A和8B的图像清楚地表明,纳米乳剂确实有效地将包封的染料递送到细胞中,并且在较高浓度的罗丹明纳米乳剂治疗的细胞和球状体中增加的荧光信号表明PPT2细胞和球状体进行较高的细胞内摄取。由于通过细胞摄取实验证实了纳米乳剂配制品的内化,所以罗丹明在纳米乳剂配制品中被DHA-SBT-1214替代,并将其对细胞活力的影响与药物溶液进行比较。使用CellTiter测定法在PPT2细胞单层中检查DHA-SBT-1214在水溶液和纳米乳剂配制品中的细胞杀灭效率。基于SBT-1214的研究,经选择的用于这些研究的DHA-SBT-1214的最终浓度为1nM、10nM、100nM和1000nM。将PPT2细胞中的作为单一试剂的DHA-SBT-1214的剂量-响应研究总结在表2中并显示在图9A中。

[0204] 表2:在PPT2前列腺肿瘤细胞中DHA-SBT-1214纳米乳剂配制品与其溶液形式相比更有效

[0205]	配制品	IC <sub>50</sub> (nM)	P值
	DHA-SBT-1214溶液	$47.9 \pm 1.15^*$	
	DHA-SBT-1214纳米乳剂	$3.73 \pm 0.63$	0.0023

[0206] \*平均值 $\pm$ S.D

[0207] 结果显示为在37℃药物暴露48小时之后作为治疗的函数的剩余活细胞百分比。当以10nM和100nM浓度施用DHA-SBT-1214时,与水溶液配制品相比,用纳米乳剂观察到更高的细胞毒性。PPT2细胞的DHA-SBT-1214溶液IC<sub>50</sub>为48nM,而使用DHA-SBT-1214纳米乳剂配制品的相同细胞的IC<sub>50</sub>为4nM。这揭示了与其对应的药物纳米乳剂配制品相比,PPT2细胞需要至少约12倍浓度的DHA-SBT-1214溶液来达到类似的IC<sub>50</sub>,这证明纳米乳剂配制品的功效优于药物溶液。

[0208] 为了证实DHA-SBT-1214纳米乳剂是否也能杀死PPT2细胞球状体,用范围为0.01 $\mu\text{M}$ 至10 $\mu\text{M}$ 的不同浓度的DHA-SBT-1214纳米乳剂治疗相同数量的球状体,并在特定时间后用明视野显微镜观察其表型。图9B-9G显示未治疗样品中明亮、健康的球状体,其在通过增加包封药物的纳米乳剂显示增强的细胞死亡的浓度增加下变成深棕色。

[0209] PPT2细胞系和基于CSC的体内异种移植模型

[0210] 绝大多数最近建立的PPT2细胞仍未分化(只有3%-5%表达泛角蛋白,即分化细胞的标志物),具有许多干细胞特征,包括许多常见细胞表面标志物(如CD133、CD44、CD44v6、CD166、CD49f和EpCAM)的高水平表达。此外,PPT2细胞表达若干种多能性标志物,包括c-Myc、Oct-4和Sox-2等。绝大多数CD133<sup>+</sup>PPT2细胞表达高细胞质水平的波形蛋白和巢蛋白,这是神经干细胞和胚胎干细胞的特征。具有最高的CD133和CD44表达的PPT2细胞的总数的约10%共同表达最高水平的CXCR4,CXCR4是若干种癌症类型中与转移活性相关的趋化因子受体。重要的是,PPT2细胞对促凋亡/肿瘤抑制蛋白p53和p21呈阴性,并对标准抗癌药物具有极强的抗药性。PPT2细胞稳定地具有非常高的克隆源性(全克隆)、球状体形成和致瘤能力。此外,这些细胞对药物治疗具有极强的抗性。所有上述内容代表了利用PPT2细胞系评估抗癌候选药物的CSC靶向功效的坚实论据。尽管甚至数千个PPT2细胞在NOD/SCID小鼠中均匀地诱导肿瘤,但申请人已经确定皮下移植相对高数量的细胞(每只小鼠多达1百万个细胞)诱导具有异常高百分比的干细胞样细胞的肿瘤异种移植。因此,如果移植的细胞含有高达98%的CD133<sup>+</sup>细胞和84%的CD44<sup>+</sup>细胞(图10A和10B),则由小鼠肿瘤异种移植制备的原代细胞悬浮液含有高达91%的CD133<sup>+</sup>细胞和78%的CD44<sup>+</sup>细胞(图10C和10D)。所有这些特征表明PPT2体内和体外模型适用于测试NE-DHA-SBT-1214的CSC靶向活性。

[0211] NOD/SCID小鼠中PPT2肿瘤的生长抑制

[0212] 所有动物程序均在研究机构动物护理和使用委员会(IACUC)的指南和批准下进行。移植PPT2细胞后,将NOD/SCID小鼠分成特定数量的组,每周通过静脉内注射NE-DHA-SBT-1214(25、30、40、50和70mg/kg)、**ABRAXANE®**[25和40mg/kg;**ABRAXANE®**是**Cremophor®**无EL纳米颗粒白蛋白结合紫杉醇)和运载体(未治疗的对照)进行治疗。每个剂量组包含四只小鼠(n=4;用25mg/kg NE-DHA-SBT-1214治疗的组具有n=6)。移植肿瘤细胞后一周,当肿瘤异种移植变得可触知(肿瘤通常达到50mm<sup>3</sup>-150 mm<sup>3</sup>)时,开始治疗。每周监测肿瘤发展。在每周3次注射后,再监测肿瘤生长4周,并且所有测量和形态显示在图11A-11F中。发现相比于**ABRAXANE®**(图11B、11C),甚至相对低浓度的NE-DHA-SBT-1214与未治疗的肿瘤异种移植(图11A)相比诱导肿瘤生长的显著抑制(图11D、11E、11F),并且与初始肿瘤大小相比,肿瘤体积的剂量依赖性降低(图11H)。因此,所有测试浓度的NE-DHA-SBT-1214诱导肿瘤缩小(用25mg/kg最低剂量的NE-DHA-SBT-1214治疗的6只小鼠中的1只例外)。所有残余的治疗后肿瘤几乎是透明的,没有可见的血管化。随访第4周观察到最大肿瘤消退。特别地,25mg/kg诱导平均45%的缩小,30mg/kg-62%,40mg/kg-74%和50mg/kg-88%(图12A)肿瘤体积减小。值得注意的是,较高剂量的NE-DHA-SBT-1214(70mg/kg)(图12A)未增加肿瘤减小。与NE-DHA-SBT-1214相比,**ABRAXANE®**的最佳剂量(25mg/kg)以及甚至40mg/kg仅引起对PPT2诱导的肿瘤生长的显著抑制约4周,随后以与未治疗的小鼠异种移植相似的速率继续生长(图11H)。尽管用不同浓度的NE-DHA-SBT-1214治疗的所有小鼠的肿瘤生长抑制和肿瘤缩小是显著的,但是所有小鼠在治疗的第三周时损失了高达17%的体重(图11G和图12B)。然而,从随访的第二周起,所有小鼠都开始体重增加。通过用Abraxane治疗没有引起显著的体重变化。最后一次治疗后四周,收集来自不同实验组的残余肿瘤并进行组织病理学、基因组学和功能分析。根据IRB要求,在达到最大直径约2cm后,去除未治疗

的对照肿瘤。

[0213] 组织的组织病理学分析

[0214] 分析苏木精和伊红染色的肿瘤异种移植组织切片,以及来自未治疗和NE-DHA-SBT-1214治疗的NOD/SCID小鼠的若干种主要器官(包括肝脏、肾脏、肠和胰腺)的组织切片。未治疗的对照肿瘤组织切片显示出人低分化腺癌的典型组织学特征,即很大程度的核异型性(图13A)。NE-DHA-SBT-1214(30mg/kg)治疗的肿瘤组织显示出显著的细胞异常、深度透明化、空泡化和广泛坏死(图13B-13D)。在组织学评估的主要器官(例如肝脏(图13E)、肾脏(图13I)、肠(图13G)、胰腺(图13K))中,仅来自NE-DHA-SBT-1214(40mg/kg)治疗的小鼠的肝脏组织显示肝细胞的反应性核变化,这暗示一些损伤(图13F)。其他器官未显示任何诊断性异常(图13H、13J和13L)。

[0215] 肿瘤细胞的克隆源性和球状体形成能力的治疗后改变

[0216] 为了测试NE-DHA-SBT-1214的治疗是否影响富含CSC的小鼠肿瘤异种移植细胞的克隆源性潜力(即它们诱导漂浮的球状体或粘附的圆形菌落(全克隆)的能力),将来自对照和NE-DHA-SBT-1214治疗的残余肿瘤(离体细胞培养物)的总细胞悬浮液接种在I型胶原包被的培养皿和ULA平板上。未治疗的(运载体治疗的)PPT2诱导的肿瘤异种移植被密集血管化(图14A和14B),而NE-DHA-SBT-1214治疗的残余肿瘤非常小、透明、缺乏可见的毛细血管(图15A和15B)并且没有产生粘附的全克隆,在3D培养中仅有零星的单个球状体出现。这些原发性肿瘤细胞在接下来的几天内在培养中经历了严重的细胞死亡,如未治疗的球状体(图16)和NE-DHA-SBT-1214治疗的球状体(图17)的活细胞百分比数据所示,所述球状体生长自原发性肿瘤细胞悬浮液。存活细胞的百分比显示在左下象限,死细胞显示在右下象限。

[0217] 讨论

[0218] 大量文献记载,肿瘤起始细胞或CSC不仅对常规治疗策略具有高度抗性,而且由于自我更新的药物诱导的补偿性增加,实际上可能促进癌症进展。这突出了针对CSC的有效治疗干预的必要性。这些研究是在患者来源的富含CSC的PPT2细胞系中进行的,其干细胞性特征先前已经被描述并在实验室中不断地维持。在PPT2细胞中观察到的若干种发展性级联(例如Hedgehog、EGFR、Wnt/ $\beta$ -连环蛋白和Notch)的过度激活与前列腺干细胞调节以及前列腺癌向雄激素非依赖性和转移的进展相关。SOX2和OCT3/4参与前列腺转移通过这些基因的靶向敲除证实,这些基因显著抑制体外前列腺癌细胞的侵袭。波形蛋白和巢蛋白均与雄激素依赖性前列腺癌转变为去势抗性转移性前列腺癌相关。因此,开发靶向来自最具侵袭性的肿瘤类型或细胞系的CSC的药物将是有益的,因为这类药物可能具有更大范围的作用机制,因此具有更广泛的抗癌影响。越来越多的证据表明,有效的抗癌药物应靶向癌症特异性肿瘤起始细胞,所述细胞在功能和形态上与其大多数肿瘤对应细胞不同。所有上述内容均表明,PPT2细胞代表了CSC靶向药物开发和前列腺癌发展的基本功能研究的独特临床前模型。

[0219] 最近表明,靶向主要干细胞信号传导途径(如Hedgehog和Notch)的药物会对正常干细胞引起严重的副作用。对试图调节CSC的抗药性的药物外排泵的抑制没有提供任何显著的临床益处。累积的临床和临床前证据表明,抗血管生成剂对癌症患者长期存活的益处可以忽略不计。微管稳定剂如紫杉醇(紫杉酚)和多西他赛最初可有效治疗患有雄激素非依赖性前列腺癌的患者,但该癌症几乎总是以更具侵袭性的形式复发。紫杉醇仍然是许多实

体瘤适应症的一线疗法,包括乳腺癌、卵巢癌和非小细胞肺癌(NSCLC)以及卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)。紫杉醇通过与 $\beta$ -微管蛋白结合、过度稳定微管并损害微管框架的动态不稳定性而发挥其有效的细胞毒性。这导致细胞周期停滞并在G2/M期开始细胞凋亡。为了管理其较差的水溶性,已经开发了许多紫杉醇的配制品以及前药,包括脂质体、环糊精和HSA结合的纳米颗粒(“ABRAXANE®”)配制品。由于P-糖蛋白(Pgp)的过度表达,紫杉醇对前列腺癌和结肠癌无效,P-糖蛋白是一种有效的ATP结合盒(ABC)转运蛋白,其外排紫杉醇。因此,在小鼠中紫杉醇甚至未显示出对人结肠癌异种移植物的任何明显功效。

[0220] 为了克服外排问题,将紫杉醇与多不饱和脂肪酸(PUFA)二十二碳六烯酸(DHA)偶联,这是由于二十二碳六烯酸的癌特异性活性、对健康细胞的保护作用以及药物偶联物通过gp60介导的转胞吞作用在肿瘤间质中增强的肿瘤特异性积累。这是由于DHA偶联的药物对人血清白蛋白(HAS)具有更高亲和力,人血清白蛋白是血流中PUFA的主要载体。DHA-紫杉醇(TXP)被肿瘤细胞贪婪地摄取、内化,并被癌细胞中的酯酶缓慢水解。如上所述,与紫杉醇相比,发现DHA紫杉醇是Pgp的相对较弱的底物。然而,如果癌细胞过度表达Pgp和/或其他ABC转运蛋白,则游离的紫杉醇分子即使缓慢释放也会被外排泵捕获并从癌细胞中消除。与紫杉醇相比,新一代紫杉烷SBT-1214对表达多药耐药性(MDR)表型的抗药性癌细胞表现出优异的活性(比紫杉醇强2-3个数量级)。先前申请人已经表明,这种新一代紫杉烷SBT-1214诱导抗药性结肠肿瘤异种移植物的长期(167天)消退和肿瘤生长延迟。后来,发现该药物分子诱导多种干细胞性相关基因(包括涉及干细胞调节、癌症发展和进展的若干种关键转录因子)的显著下调。值得注意的是,多西他赛(转移性去势抗性前列腺癌的标准一线治疗)可以通过TGF- $\beta$ 机制促进前列腺癌细胞的抗药性和去分化(上皮细胞向间充质细胞转变)。为了进一步改善血液循环和最终的治疗,在本研究中将DHA与SBT-1214偶联。

[0221] 为了进一步改善这种疏水性药物的递送,将DHA-SBT-1214包封在纳米乳剂中,所述纳米乳剂是油在水中的热力学稳定的分散体,其中通过使用高能超声波或微流化仪器施加高剪切应力来将油滴大小减小至纳米长度尺度(约200)。当亲脂性药物掺入纳米乳剂中时,在全身性施用后化合物的药代动力学和生物分布模式将取决于纳米乳剂配制品的性质而非药物分子的物理化学特征。例如,PEG修饰可以增强血液循环中纳米乳剂的寿命。这反过来增加了药物分子在血液中的保留时间,并且还允许通过EPR效应而增强的在肿瘤部位的积聚。在该研究中,申请人已经开发出使用鱼油的优化的水包油纳米乳剂配制品,鱼油具有高浓度的PUFA。通常,所有纳米乳剂显示出小于250nm的油滴大小和较窄的尺寸分布。TEM图像还证实油滴是球形的并且均匀分布。使用DSPE-PEG2000对纳米乳剂进行的PEG表面修饰不影响粒度和尺寸分布。观察到纳米乳剂的表面电荷值在-23.37mV至-34.53mV的范围内。纳米乳剂油滴上的表面电荷代表形成界面层的组分的离子化。在PEG修饰的纳米乳剂的情况下,由卵磷脂和PEG修饰的磷脂(DSPE-PEG2000)形成界面层。这些配制品用于递送针对PPT2细胞和球状体的DHA-SBT-1214。定性细胞摄取分析证明了纳米乳剂配制品在PPT2细胞和球状体中被有效内化。这表明纳米乳剂确实有效地将有效负载递送到细胞中的亚细胞位点。可以确定的是,相对低浓度的DHA-SBT-1214(0.1-1 $\mu$ M)的纳米乳剂诱导在促干细胞性培养条件下维持的高达90%的高度致瘤性和高度抗药性前列腺CD133+细胞的死亡,并且比其药物溶液更有效。在该研究中,发现DHA-SBT-1214在纳米乳剂配制品中递送时抑制PPT2肿瘤。除了这些观察结果,流式细胞术分析还揭示了植入的肿瘤细胞在皮下肿瘤内保留其

干细胞性。在纳米乳剂中递送的DHA-SBT-1214的治疗确实在PPT2细胞和肿瘤中显示出更高的治疗功效。在所分析的任何治疗组中均未观察到显著的体重减轻。组织组织学在任何治疗组中的肝脏、心脏或肾脏中未显示任何异常发现。这些试验表明,当作为纳米乳剂施用, DHA-SBT-1214在小鼠中具有良好的耐受性。总之,我们的数据证明DHA-SBT-1214偶联物的纳米乳剂诱导优异的消退和肿瘤生长抑制,并且作为新的CSC靶向性抗癌候选药物具有较高的潜力。

#### [0222] 结论

[0223] 在目前的研究中,基于多不饱和脂肪酸的纳米乳剂系统有效地包封疏水性药物DHA-SBT-1214,并且在体内和体外模型中均显示出治疗功效。如在小鼠中测试的,该配制品也具有良好的耐受性。粒度和 $\zeta$ 电位数据证明了物理稳定的纳米乳剂的形成。当在纳米乳剂配制品中施用时,DHA-SBT-1214在PPT2细胞内递送并导致体外细胞毒性的显著增强。总之,数据表明,DHA-SBT-1214的纳米乳剂配制品与其溶液相比增强抗癌功效。因此,疏水性药物(其对具有CD133+/高/CD44+/高表型的原发性的、患者来源的、自发永生化的、低传代、高致瘤性和克隆源性前列腺癌细胞发挥多效CSC靶向活性)具有临床相关性,并且具有作为抗癌药物组合的高潜力。

[0224] 期望如下递送系统,该递送系统可以容易地制备、且有效地掺入疏水性分子、具有临床安全性并改善DHA-SBT-1214的药理学。结果表明,新型紫杉烷DHA-SBT-1214的纳米乳剂配制品可以为难以治疗的癌症提供新的治疗。纳米乳剂是有希望的新型配制品,其可以增强疏水性药物如DHA-SBT-1214的治疗功效。此外,可以使用这些纳米乳剂作为用于筛选和评价水溶性差的实验候选药物的选择配制品。在这类情况下,纳米乳剂可以容易地配制,从而避免了其他耗时且昂贵的配制品研究。纳米递送系统是药物递送中有前景的运载体,因为它们改善疏水性药物如PX的溶解性,并且通常也具有低毒性。**ABRAXANE®**是PX白蛋白结合的纳米颗粒配制品,粒度约为130nm,于2005年被FDA批准用于治疗转移性乳腺癌。与紫杉酚相比,该配制品在降低毒性方面表现出一些优势。此外,可在30分钟内施用总剂量而无需预处理。因此,有各种迹象表明,NE-DHA-SBT-1214是一种强大的肿瘤靶向性化学治疗剂(其克服了紫杉醇、多西他赛和**TAXOPREXIN®**的弱点),并显著改善了癌症患者的生活质量。还有越来越多的证据表明,紫杉烷具有免疫学效应,从而可与免疫肿瘤学药剂如检查点抑制剂组合使用。紫杉烷治疗已显示刺激肿瘤相关的巨噬细胞毒性,诱导树突细胞、自然杀伤细胞、肿瘤特异性细胞毒性T细胞的活化,以及下调调节性T细胞( $T_{regs}$ )。因此,新型第二代紫杉烷的纳米乳剂配制品代表明确未满足的医疗需求的可能解决方案,所述第二代紫杉烷不是Pgp转运蛋白的底物、对MDR肿瘤和癌干细胞("CSC")有效、具有改善的安全性和药物递送特征、并且被动地靶向肿瘤。

#### [0225] 实例5

[0226] DHA-SBT-1214溶液及其纳米乳剂在PPT2皮下荷瘤小鼠中的药代动力学分析和生物分布。

#### [0227] 材料

[0228] 雄性 **CD-1®** 小鼠(4-6周龄)购自查尔斯河实验室(Charles River Laboratories)(坎布里奇(Cambridge),马萨诸塞州)。将人原发性前列腺癌细胞(PPT2)皮下移植到这些小鼠的右侧腹以形成肿瘤。所以的动物程序均由东北大学(Northeastern



University)的研究机构动物护理和使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee)批准。溶剂购自飞世尔科技公司(费尔劳恩(Fair Lawn),新泽西州(NJ))。

[0229] 高效液相色谱(HPLC)分析

[0230] 将包括两个泵、自动进样器和UV检测器的Waters LC(型号2487,沃特斯公司(Waters Corporation),米尔福德(Milford))用于进行分析。将LC系统与Empower软件连接用于仪器控制、数据采集和处理。将由(A)在水中的0.1% TFA和(B)在乙腈中的0.1% TFA组成的流动相以1mL/min的流速泵送通过Grace Vydac 218TP54柱(C18,粒度5 $\mu$ m,4.6mm $\times$ 250mm)。在15分钟内梯度为60% B至95% B,并在230nm波长下监测药物洗脱。将80 $\mu$ L等分试样注射到HPLC中。

[0231] DHA-SBT-1214溶液和纳米乳剂配制品的血浆药代动力学分析

[0232] 通过尾静脉注射,将120mg/kg的DHA-SBT-1214作为溶液或纳米乳剂配制品静脉内给药给小鼠。以不同的时间间隔:给药后0.5、4、10、24和48小时在EDTA处理的管中收集血液并保持在冰上。将样品在4 $^{\circ}$ C以10,000rpm离心20分钟以分离血浆。将血浆储存在-20 $^{\circ}$ C或立即用于分析。用300 $\mu$ L的乙腈构成100 $\mu$ L的血浆,并在涡旋后,以10,000rpm离心10分钟以提取并分离DHA-SBT-1214。对上清液进行HPLC,并通过HPLC分析洗脱液。

[0233] DHA-SBT-1214溶液和纳米乳剂配制品在不同组织中的生物分布

[0234] 通过尾静脉注射,将120mg/kg的DHA-SBT-1214作为溶液或纳米乳剂配制品静脉内给药给小鼠。在静脉内给药DHA-SBT-1214后,将小鼠麻醉,并在0.5、4、10、24和48小时的预定时间点,通过心脏穿刺完全取出血液。用PBS灌注动物,然后通过颈脱位法处死动物,并收获包括心脏、前列腺、胰腺、脑、结肠、肺、脾脏、肾脏、肝脏和肿瘤组织在内的各种组织,称重,在液氮中速冻并储存在-80 $^{\circ}$ C。将冷冻组织悬浮在等重量的生理盐水溶液中,并使用组织匀浆器以5000rpm进行均质化2分钟。将4倍过量的乙酸乙酯:甲醇:乙腈(50:25:25)的混合物添加到均质化的组织中,并在涡旋后,将样品在4 $^{\circ}$ C以10,000rpm离心10分钟,以提取并分离DHA-SBT-1214。将上清液用氮气蒸发,并将样品重构于400 $\mu$ L的乙腈中。对重构的样品进行HPLC,并通过HPLC分析洗脱液。

[0235] 药代动力学数据分析

[0236] 使用利用Phoenix<sup>®</sup> WinNonlin<sup>®</sup> v.1.3软件的非隔室分析来测定DHA-SBT-1214药代动力学参数。使用对数线性梯形法计算从零到无穷大(AUC<sub>0- $\infty$</sub> )的血浆浓度-时间曲线下面积。评估PK参数,这些PK参数包括稳态分布容积(V<sub>ss</sub>)、清除率(C<sub>l</sub>)、 $\lambda_z$ ( $\lambda_z$ ,它是与终端消除阶段相关的速率常数)、相应的半衰期( $t_{1/2}$ )和平均停留时间(MRT)。

[0237] 结果

[0238] 将PPT2细胞植入5周龄的雄性NOD.SCID/NCr小鼠中。当肿瘤体积达到平均100mm<sup>3</sup>时,将小鼠随机分成两组。在不同时间点(0.5、4、10、24和48小时),一组用DHA-SBT-1214溶液进行治疗,另一组小鼠用同一药物的纳米乳剂以120mg/kg小鼠通过静脉给药进行治疗。每次治疗每个时间点有两只小鼠。将每个器官分成两份,以对于每个时间点有四次重复。肿瘤体积为100mm<sup>3</sup>至150mm<sup>3</sup>。在每个时间点结束后,将动物处死,并收集所有主要器官和肿瘤,并收集血液。用乙腈从所有器官和血浆中提取DHA-SBT-1214药物,并通过HPLC方法进行定量。图18A-18K显示了不同器官中来自溶液和纳米乳剂的药物的生物分布。在几乎所有器官中,与其溶液形式相比,来自纳米乳剂的药物保留更长时间。即使在48小时后,药物在不同



器官中的较高保留率表明纳米乳剂使药物在血液循环中保持较长时间,因此与目前使用的药物溶液相比,它可以使血管瘤更多地暴露于药物以获得更好的治疗效率。

[0239] 实例6

[0240] DHA-SBT-1214纳米乳剂配制品的稳定性

[0241] 研究了纳米乳剂在不同温度下储存长达6个月后关于均匀性(外观)、粒度和表面电荷的稳定性。将来自三个不同批次的DHA-SBT-1214溶液和纳米乳剂在不同储存条件(即室温、4℃和-20℃)下孵育长达6个月并通过HPLC定期计算储存期间该药物的浓度,以找出哪种温度最适合储存DHA-SBT-1214药物的溶液和纳米乳剂。如图19A所示,DHA-SBT-1214的纳米乳剂在4℃和-20℃条件下都是稳定的,但在室温下不稳定。然而,DHA-SBT-1214的药物溶液仅在-20℃储存条件下是稳定的,但在室温和4℃不稳定。在该储存期间,还定期测定了纳米乳剂的物理特征。图19B显示4℃是纳米乳剂的粒度几乎保持不变的理想储存条件,但在-20℃粒度逐渐增加,并且在室温下显示出非常大的聚集体。在此期间,也测定PDI(多分散性指数),显示于图19C中;并且测定 $\zeta$ 电位(表面电荷),显示于图19D中;并且得出的结论是4℃是用于长期储存纳米乳剂配制品的最佳储存条件。

[0242] 实例7

[0243] 进一步的体内细胞毒性研究

[0244] 这些体内研究集中于对不同剂量的NE-DHA-SBT-1214的细胞毒性的分析。将动物分成以下各组(表3)。每周一次静脉内施用不同剂量的NE-DHA-SBT-1214(30、40、50和70mg/kg)持续3周,随访观察4周。

[0245] 表3:实验组

组号	条件	小鼠数量/组
1	对照(未治疗)	3
2	NE-DHA-SBT 30mg/kg	4
3	NE-DHA-SBT 40mg/kg	4
4	NE-DHA-SBT 50mg/kg	3
5	NE-DHA-SBT 70mg/kg	3

[0247] 观察到由所有测试浓度的NE-DHA-SBT引起的肿瘤生长的显著抑制(图20A-20E),这促使进一步评估其低得多的剂量。如前所述,通过规范标准(肌动活动、发病率、食欲、姿势和外观)密切监测并评估全身性毒性,并且每周测量肿瘤生长。将每个小鼠肿瘤异种移植的一部分用RNA-Later预处理并保持在-80℃,然后对CSC相关基因的表达进行PCR阵列分析(这将在完成体内研究后进行)。如前所述,将每个收获的肿瘤的一部分机械地和酶促地解聚成单细胞悬浮液,并测试诱导圆形菌落(全克隆)和3D球状体的能力(作为CSC存活的测试)。

[0248] 针对PPT2细胞(其时常用于体内和体外研究)的高克隆源性和致瘤性群体的维持、纯化和繁殖做出持续的努力。将另一组NOD/SCID小鼠移植有PPT2细胞,用于研究低剂量NE-DHA-SBT-1214的细胞毒性。

[0249] 实例8

[0250] DHA-SBT-1214从药物溶液和纳米乳剂配制品的体外释放

[0251] 为了研究药物溶液和从其纳米乳剂配制品的体外释放曲线,在用透析缓冲液调理

后,在3500MWC0 Slide-Lyzer透析盒中注射5 $\mu$ g的DHA-SBT-1214纳米乳剂或药物溶液,并悬浮于PBS+十二烷基硫酸钠(SLS)缓冲液中的不同的点处,以100rpm旋转12小时。每小时后从烧杯中取出1ml样品,并将药物用乙腈提取并运行HPLC以定量从溶液和纳米乳剂中释放药物的量。如图21所示,DHA-SBT-1214自药物溶液的释放比其纳米乳剂配制品快3倍以上。

[0252] 已经以示例性的方式描述了本发明,并且应理解,已经使用的术语意在具有说明性词语的性质,而非限制性的。显而易见地,能够根据以上教导进行本发明的很多修改和变化。因此,应当理解,在所附权利要求的范围内可以用不同于具体描述的方式来实践本发明。

#### [0253] 参考文献

[0254] Botchkina GI,Zuniga ES,Das M,Wang Y,Wang H,Zhu S,Savitt AG,Rowehl RA,Leyfman Y,Ju J,Shroyer K,Ojima I.New-generation taxoid SB-T-1214inhibits stem cell-related gene expression in 3D cancer spheroids induced by purified colon tumor-initiating cells.Mol Cancer. (2010) Jul 14;9:192.doi:10.1186/1476-4598-9-192.

[0255] Botchkina GI,Zuniga ES,Rowehl RH,Park R,Bhalla R,Bialkowska AB,Johnson F,Golub LM,Zhang Y,Ojima I,Shroyer KR.Prostate cancer stem cell-targeted efficacy of a new-generation taxoid,SBT-1214and novel polyenolic zinc-binding curcuminoid,CMC2.24.PLoS One. (2013) Sep24;8(9):e69884.doi:10.1371/journal.pone.0069884.

[0256] Bradley MO,Webb NL,Anthony FH,Devanesan P,Witman PA,Hemamalini S,Chander MC,Baker SD,He L,Horwitz SB,Swindell CS.Tumor targeting by covalent conjugation of a natural fatty acid to paclitaxel.Clin Cancer Res. (2001)Oct;7(10):3229-38.

[0257] Ferlini C,Distefano M,Pignatelli F,Lin S,Riva A,Bombardelli E,Mancuso S,Ojima I,Scambia G.Antitumour activity of novel taxanes that act at the same time as cytotoxic agents and P-glycoprotein inhibitors.Br J Cancer. (2000)Dec;83(12):1762-8.

[0258] Ganta S,Devalapally H,Amiji M.Curcumin enhances oral bioavailability and anti-tumor therapeutic efficacy of paclitaxel upon administration in nanoemulsion formulation.J Pharm Sci. (2010) Nov;99(11):4630-41.doi:10.1002/jps.22157.

[0259] Ganta S,Singh A,Patel NR,Cacaccio J,Rawal YH,Davis BJ,Amiji MM,Coleman TP.Development of EGFR-targeted nanoemulsion for imaging and novel platinum therapy of ovarian cancer.Pharm Res. (2014) Sep;31(9):2490-502.doi:10.1007/s11095-014-1345-z.Epub 2014 Mar 19.

[0260] Matesanz R,Trigili C,Rodríguez-Salarichs J,Zanardi I,Pera B,Nogales A,Fang WS,Jimenez-Barbero J,Canales A,Barasoain I,Ojima I,Díaz JF.Taxanes with high potency inducing tubulin assembly overcome tumoural cell resistances.Bioorg Med Chem. (2014) Sep 15;22(18):5078-90.doi:10.1016/

j.bmc.2014.05.048.Epub 2014 Jun 19.

[0261] Ojima I,Zuniga ES,Berger WT,Seitz JD.Tumor-targeting drug delivery of new-generation taxoids.Future Med Chem. (2012) Jan;4(1):33-50.doi:10.4155/fmc.11.167.

[0262] “Drug Conjugates with Polyunsaturated Fatty Acids”,J.Seitz and I.Ojima,In Drug Delivery in Oncology-From Research Concepts to Cancer Therapy (F.Kratz,P.Senter and H.Steinhausen Ed.)Wiley-VCH:Weinheim.Vol.3. (2011)Chapter 5.9:pp 1323-1360.

[0263] Tiwari SB,Amiji MM.Improved oral delivery of paclitaxel following administration in nanoemulsion formulations.J Nanosci Nanotechnol. (2006) Sep-Oct;6(9-10):3215-21.

[0264] Gupta PB,Chaffer CL,Weinberg RA.Cancer stem cells:mirage or reality? Nature medicine.2009;15(9):1010-2.doi:10.1038/nm0909-1010.PubMed PMID:19734877.

[0265] Gupta PB,Fillmore CM,Jiang G,Shapira SD,Tao K,Kuperwasser C,Lander ES.Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells.Cell.2011;146(4):633-44.doi:10.1016/j.cell.2011.07.026.PubMed PMID:21854987.

[0266] Hanahan D,Weinberg RA.Hallmarks of cancer:the next generation.Cell.2011;144(5):646-74.doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.PubMed PMID:21376230.

[0267] Fanali C,Lucchetti D,Farina M,Corbi M,Cufino V,Cittadini A,Sgambato A.Cancer stem cells in colorectal cancer from pathogenesis to therapy: controversies and perspectives.World journal of gastroenterology:WJG.2014;20(4):923-42.doi:10.3748/wjg.v20.i4.923.PubMed PMID:24574766;PMCID:3921545.

[0268] Hermann PC,Huber SL,Herrler T,Aicher A,Ellwart JW,Guba M,Bruns CJ,Heeschen C.Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer.Cell stem cell.2007;1(3):313-23.doi:10.1016/j.stem.2007.06.002.PubMed PMID:18371365.

[0269] Goldstein AS,Huang J,Guo C,Garraway IP,Witte ON.Identification of a cell of origin for human prostate cancer.Science.2010;329(5991):568-71.doi:10.1126/science.1189992.PubMed PMID:20671189;PMCID:2917982.Miki J,Furusato B,Li H,Gu Y,Takahashi H,Egawa S,Sesterhenn IA,McLeod DG,Srivastava S,Rhim JS.Identification of putative stem cell markers,CD133 and CXCR4,in hTERT-immortalized primary nonmalignant and malignant tumor-derived human prostate epithelial cell lines and in prostate cancer specimens.Cancer research.2007;67(7):3153-61.doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4429.PubMed PMID:17409422.

[0270] Di C,Zhao Y.Multiple drug resistance due to resistance to stem cells and stem cell treatment progress in cancer(Review).Experimental and

Therapeutic Medicine.2015;9(2):289-93.doi:10.3892/etm.2014.2141.PubMed PMID: PMC4280950.

[0271] Lathia JD.Awakening the Beast:Chemotherapeutic Activation of Cancer Stem Cells.Science translational medicine.2015;7(269):269ec3-ec3.doi:10.1126/scitranslmed.aaa3470.

[0272] Gelderblom H,Verweij J,Nooter K,Sparreboom A.Cremophor EL:the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation.European journal of cancer.2001;37(13):1590-8.PubMed PMID:11527683.

[0273] Gianni L,Kearns CM,Giani A,Capri G,Vigano L,Lacatelli A,Bonadonna G,Egorin MJ.Nonlinear pharmacokinetics and metabolism of paclitaxel and its pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships in humans.Journal of clinical oncology:official journal of the American Society of Clinical Oncology.1995; 13(1):180-90.PubMed PMID:7799018.

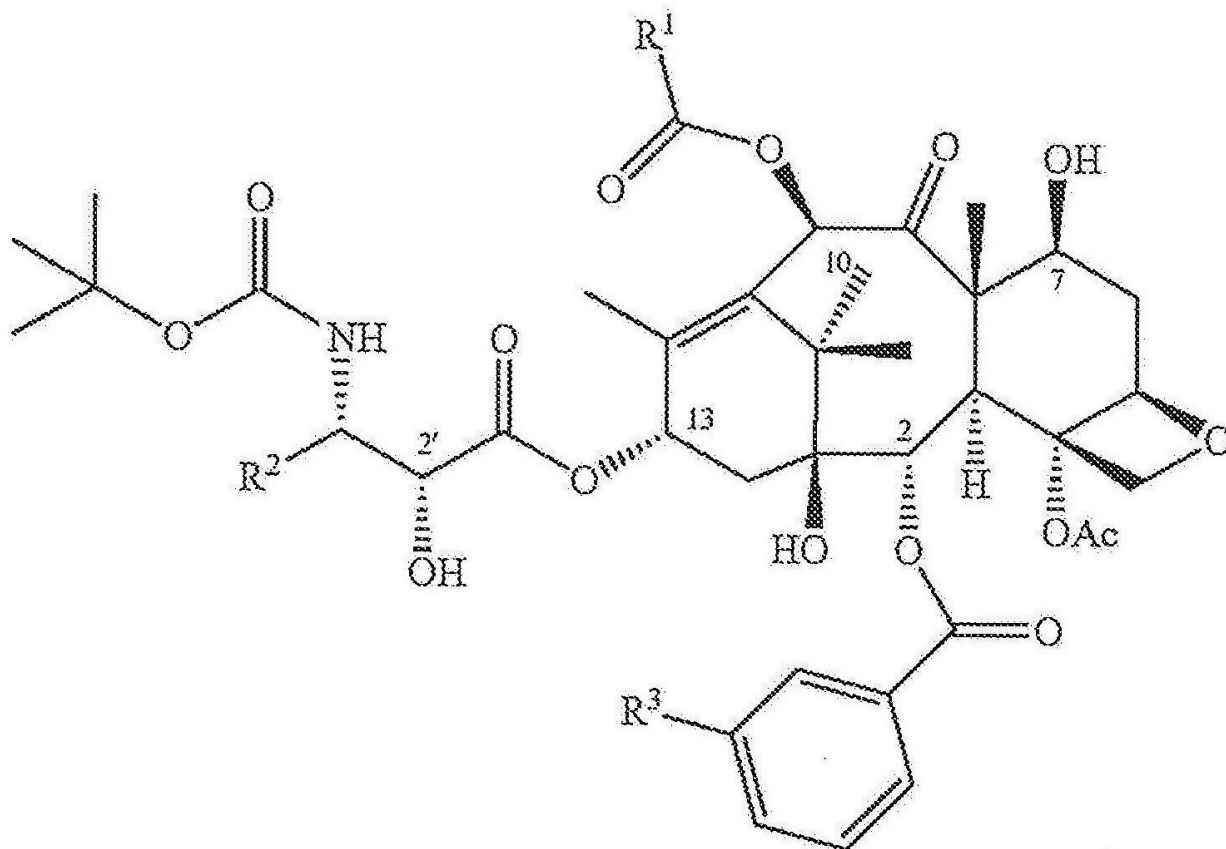
[0274] Nooter K,Stoter G.Molecular Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy.Pathology-Research and Practice.1996;192(7):768-80.Vredenburg MR,Ojima I,Veith J,Pera P,Kee K,Cabral F,Sharma A,Kanter P,Bernacki RJ.Effects of orally active taxanes on P-glycoprotein modulation and colon and breast carcinoma drug resistance.J Nat'l Cancer Inst.2001;93:1234-45.

[0275] Ojima I,Slater JC,Michaud E,Kuduk SD,Bounaud P-Y,Vrignaud P,Bissery M-C,Veith J,Pera P,Bernacki RJ.Syntheses and Structure-Activity Relationships of the Second Generation Antitumor Taxoids.Exceptional Activity against Drug Resistant Cancer Cells.J Med Chem.1996;39:3889-96.Ojima I,Slater JS,Kuduk SD,Takeuchi CS,Gimi RH,Sun C-M,Park YH,Pera P,Veith JM,Bernacki RJ.Syntheses and Structure-Activity Relationships of Taxoids Derived from 14 $\beta$ -Hydroxy-10-deacetylbaccatin III.J Med Chem.1997;40:267-78.

[0276] Ojima I,Wang T,Miller ML,Lin S,Borella C,Geng X,Pera P,Bernacki RJ.Syntheses and Structure-Activity Relationships of New Second-Generation Taxoids.Bioorg Med Chem Lett.1999;9:3423-8.

[0277] Botchkina GI,Zuniga ES,Das M,Wang Y,Wang H,Zhu S,Savitt AG,Rowehl RA,Leyfman Y,Ju J,Shroyer K,Ojima I.New-generation taxoid SB-T-1214inhibits stem cell-related gene expression in 3D cancer spheroids induced by purified colon tumor-initiating cells.Molecular cancer.2010;9:192.doi:10.1186/1476-4598-9-192.PubMed PMID:20630067;PMCID:2911448.Botchkina GI,Zuniga ES,Rowehl RH,Park R,Bhalla R,Bialkowska AB,Johnson F,Golub LM,Zhang Y,Ojima I,Shroyer KR.Prostate cancer stem cell-targeted efficacy of a new-generation taxoid, SBT-1214 and novel polyenolic zinc-binding curcuminoid,CMC2.24.PloS one.2013; 8(9):e69884.doi:10.1371/journal.pone.0069884.PubMed PMID:24086245;PMCID: 3782470.

- [0278] Botchkina IL,Rowehl RA,Rivadeneira DE,Karpeh MS,Jr.,Crawford H,Dufour A,Ju J,Wang Y,Leyfman Y,Botchkina GI.Phenotypic subpopulations of metastatic colon cancer stem cells:genomic analysis.Cancer genomics&proteomics.2009;6(1):19-29.PubMed PMID:19451087.
- [0279] Ferlini C,Distefano M,Pignatelli F,Lin S,Riva A,Bombardelli E,Mancuso S,Ojima I,Scambia G.Antitumor Activity of Novel Taxanes That Act as Cytotoxic Agents and P-Glycoprotein Inhibitors at the Same Time.Brit J Cancer.2000;83:1762-8.
- [0280] Ganta S,Amiji M.Coadministration of Paclitaxel and curcumin in nanoemulsion formulations to overcome multidrug resistance in tumor cells.Molecular pharmaceutics.2009;6(3):928-39.doi:10.1021/mp800240j.PubMed PMID:19278222.
- [0281] Ganta S,Devalapally H,Amiji M.Curcumin enhances oral bioavailability and anti-tumor therapeutic efficacy of paclitaxel upon administration in nanoemulsion formulation.Journal of pharmaceutical sciences.2010;99(11):4630-41.doi:10.1002/jps.22157.PubMed PMID:20845461.
- [0282] van Vlerken LE,Duan Z,Little SR,Seiden MV,Amiji MM.Biodistribution and pharmacokinetic analysis of Paclitaxel and ceramide administered in multifunctional polymer-blend nanoparticles in drug resistant breast cancer model.Molecular pharmaceutics.2008;5(4):516-26.doi:10.1021/mp800030k.PubMed PMID:18616278;PMCID:2646668.
- [0283] Tiwari SB,Amiji MM.Improved oral delivery of paclitaxel following administration in nanoemulsion formulations.Journal of nanoscience and nanotechnology.2006;6(9-10):3215-21.PubMed PMID:17048539.
- [0284] Ganta S,Singh A,Patel NR,Cacaccio J,Rawal YH,Davis BJ,Amiji MM,Coleman TP.Development of EGFR-targeted nanoemulsion for imaging and novel platinum therapy of ovarian cancer.Pharmaceutical research.2014;31(9):2490-502.doi:10.1007/s11095-014-1345-z.PubMed PMID:24643932;PMCID:PMC4169355.
- [0285] Chen J,Li Y,Yu TS,McKay RM,Burns DK,Kernie SG,Parada LF.A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy.Nature.2012;488(7412):522-6.doi:10.1038/nature11287.PubMed PMID:22854781;PMCID:3427400.



其中 $R^1$ 是环丙基， $R^2$ 是2-甲基-1-丙烯基，并且 $R^3$ 是H。

图1

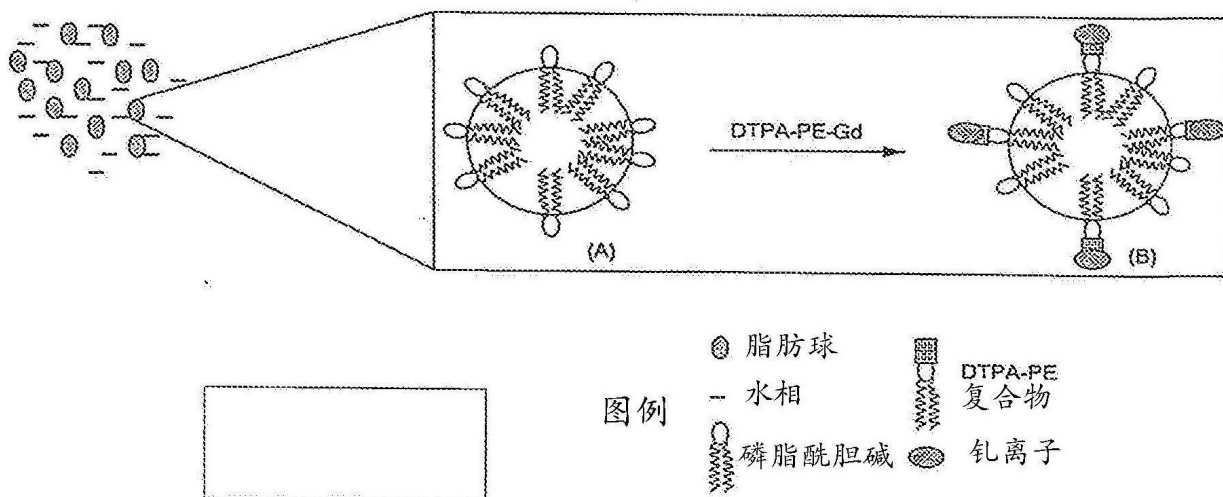


图2A

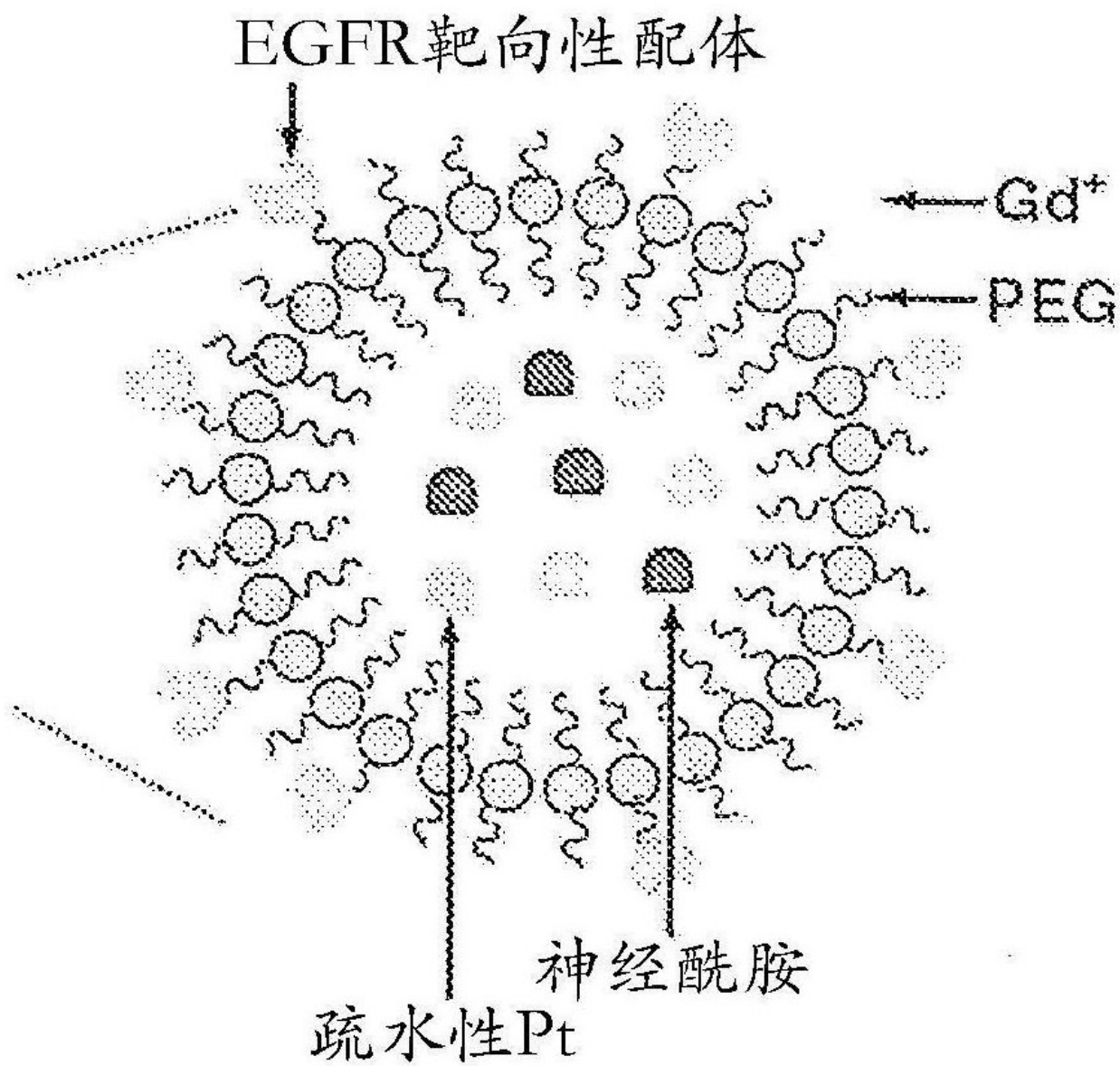


图2B

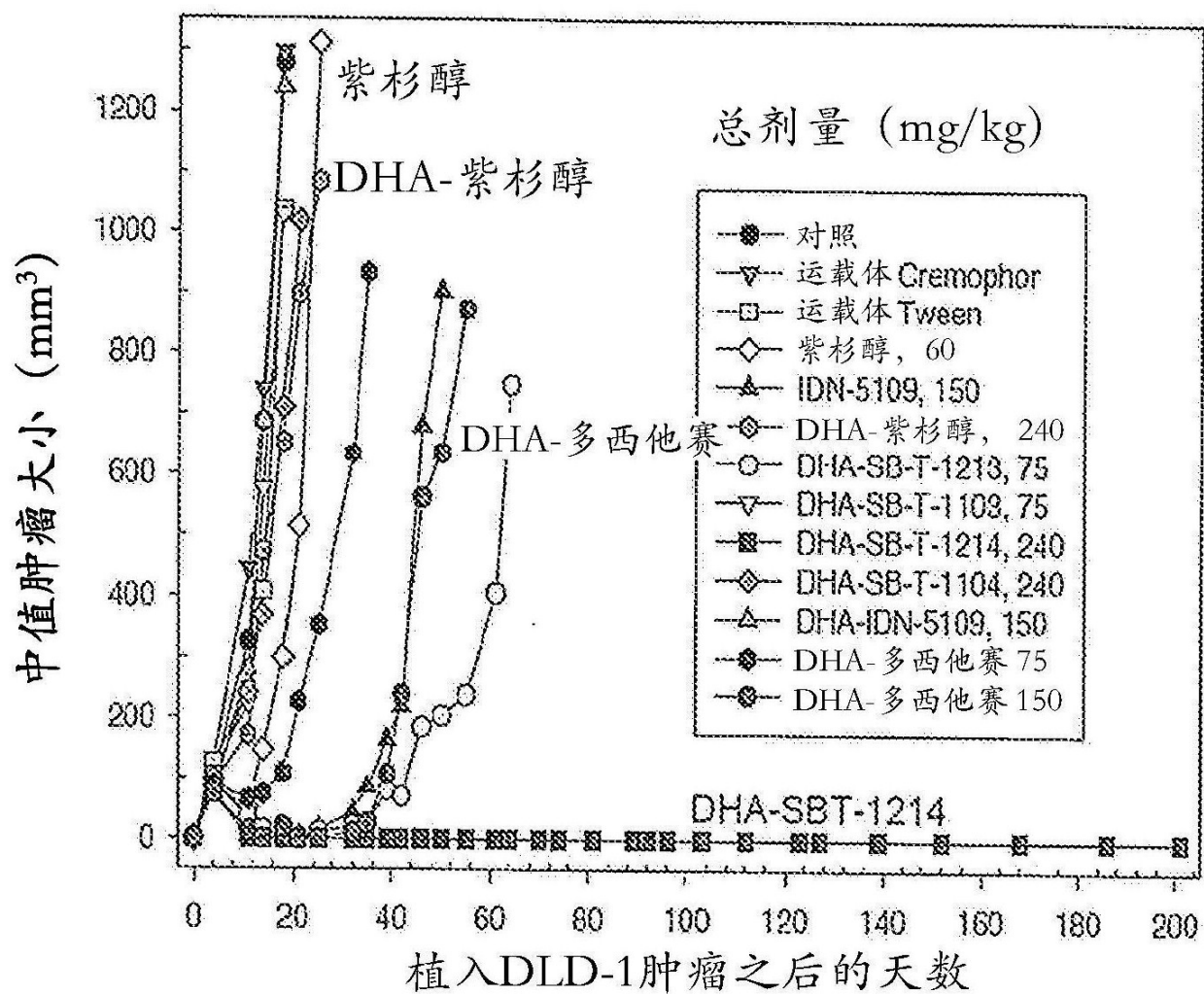


图3A



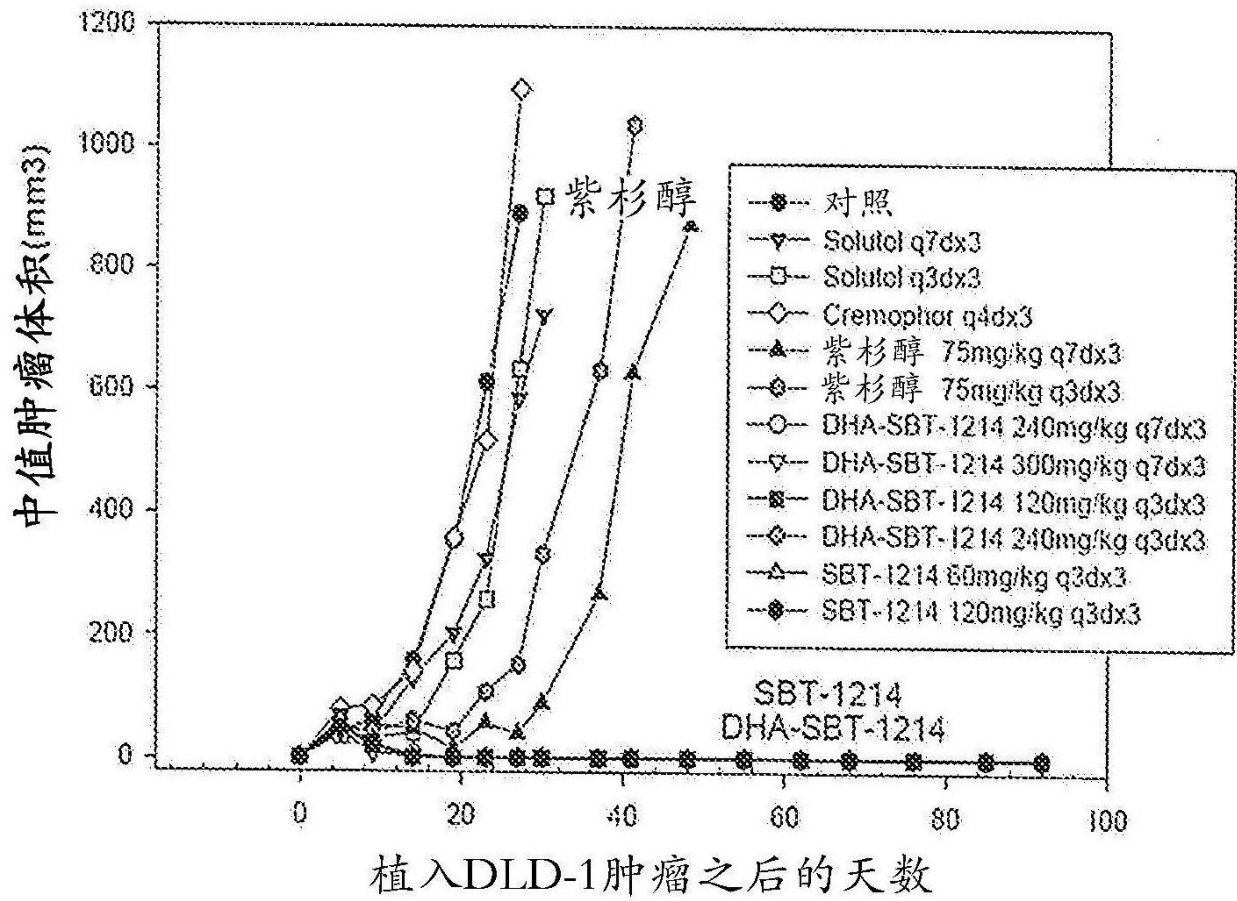
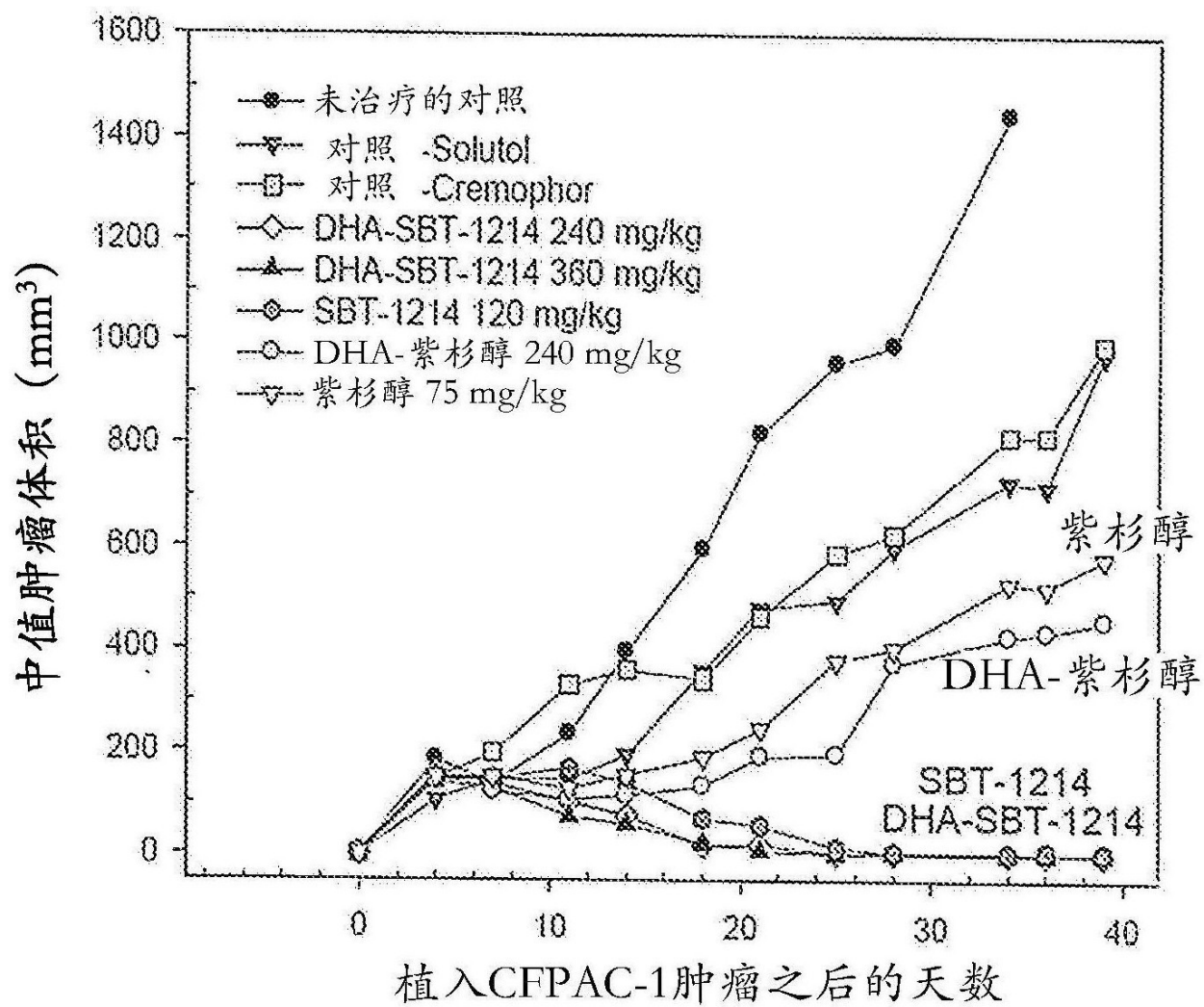


图3B



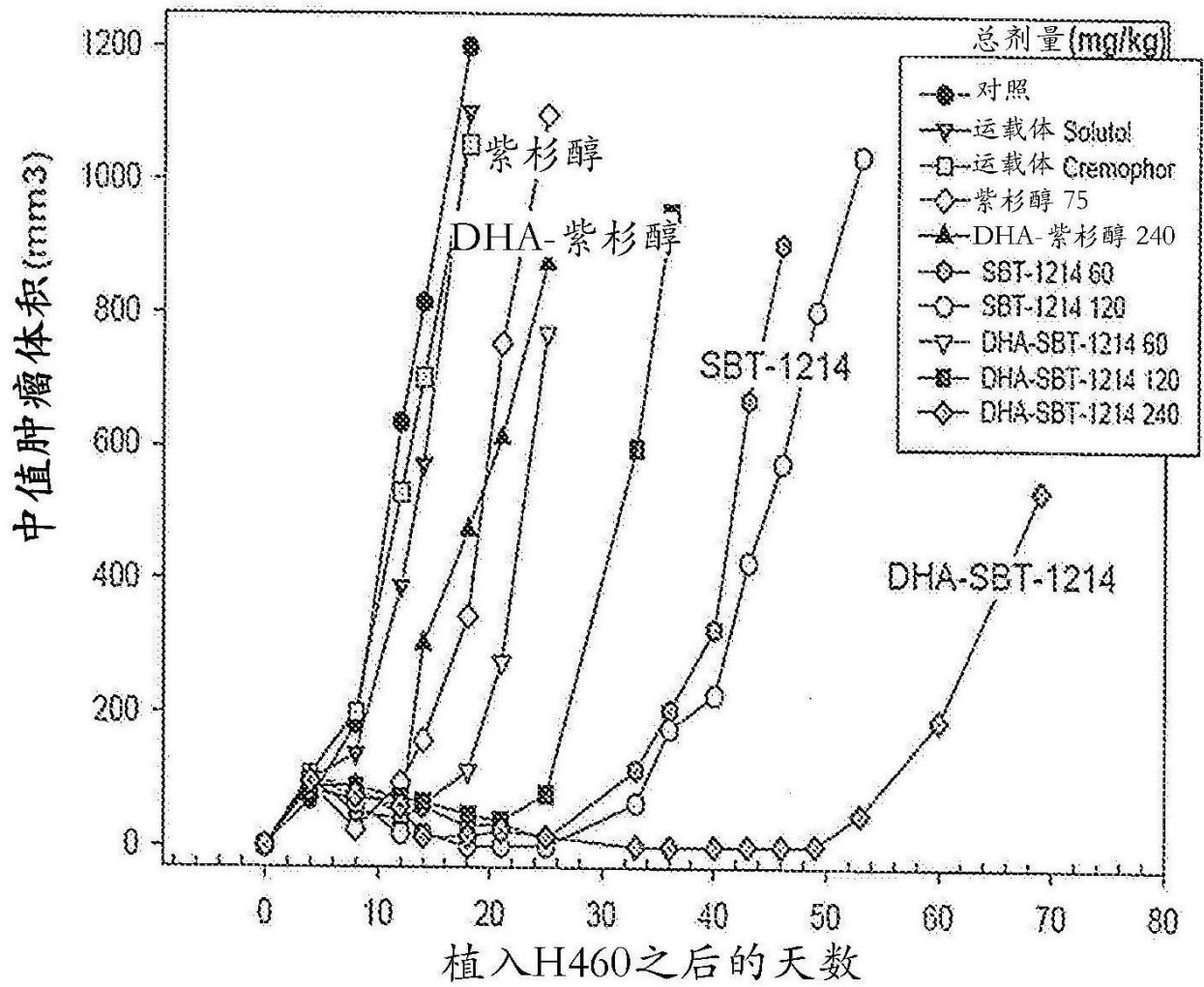


图3D

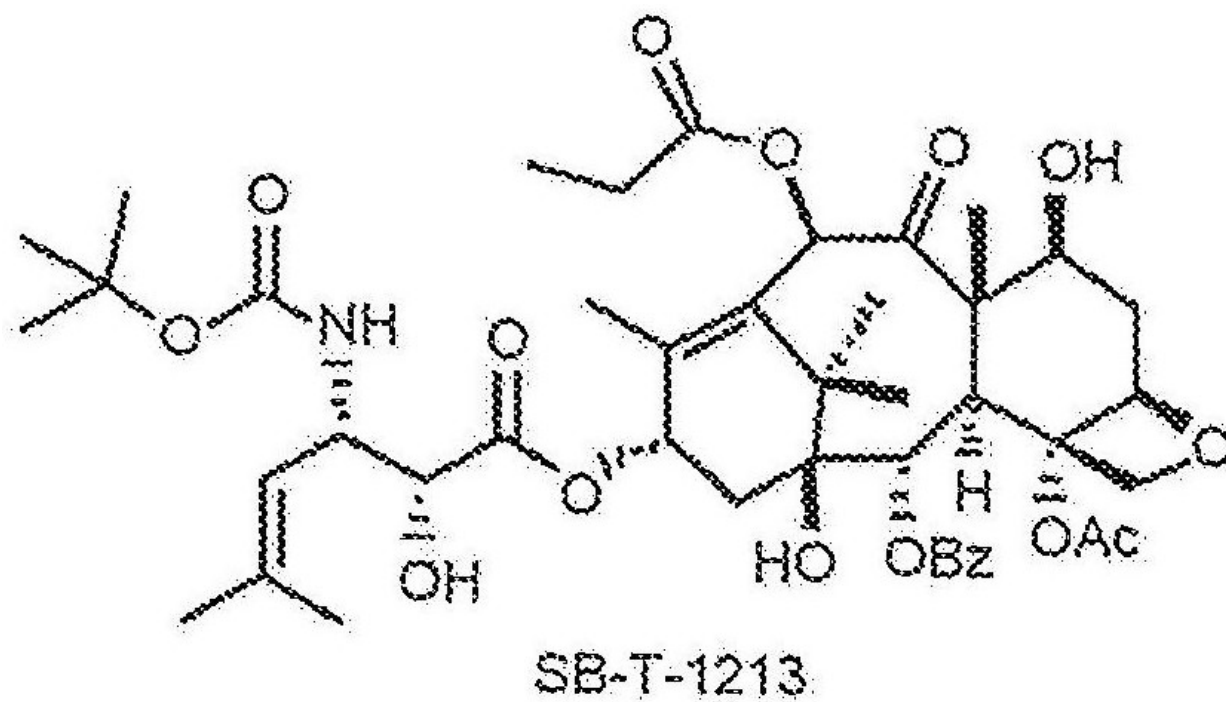
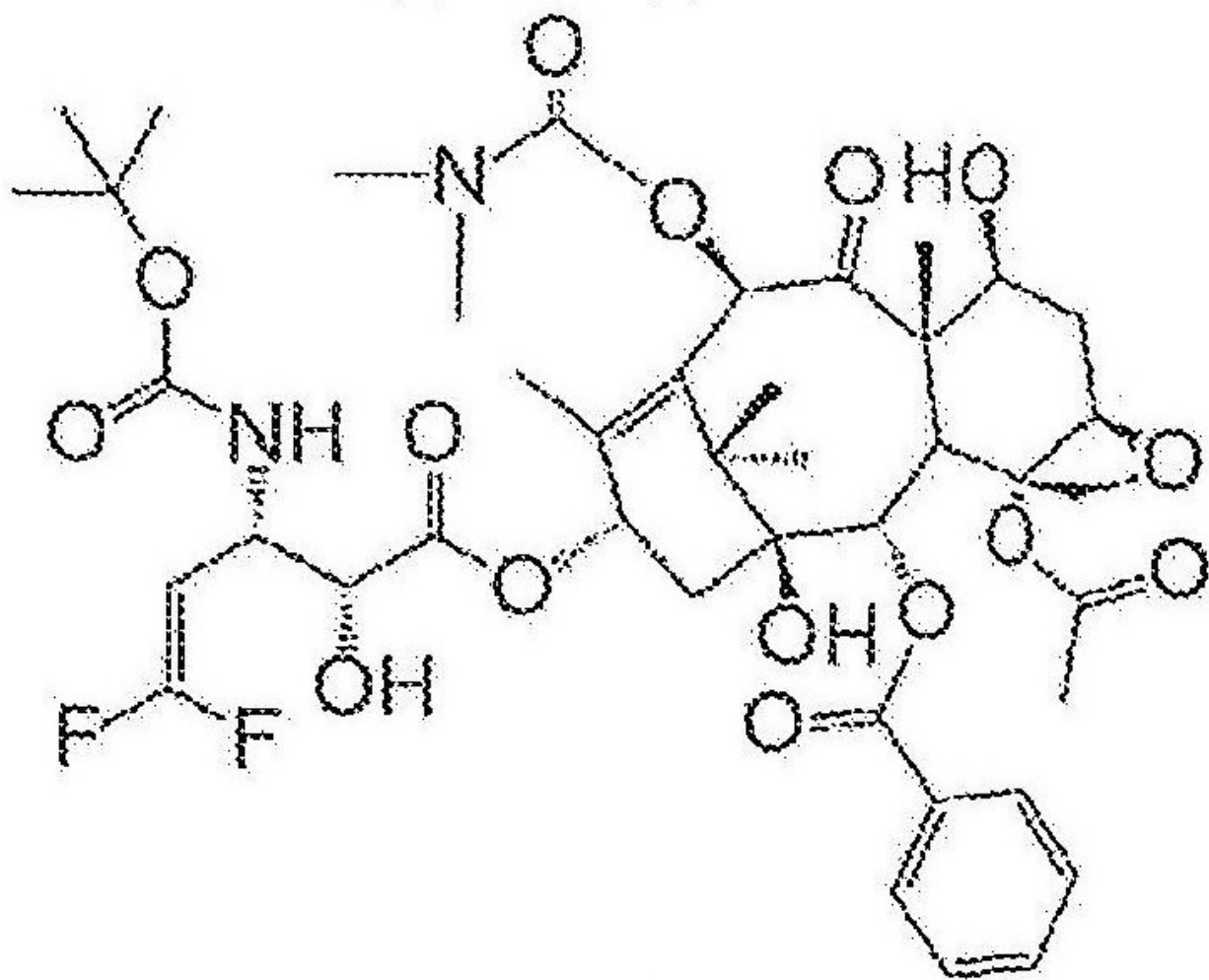


图4A



SB-T-12854

图4B

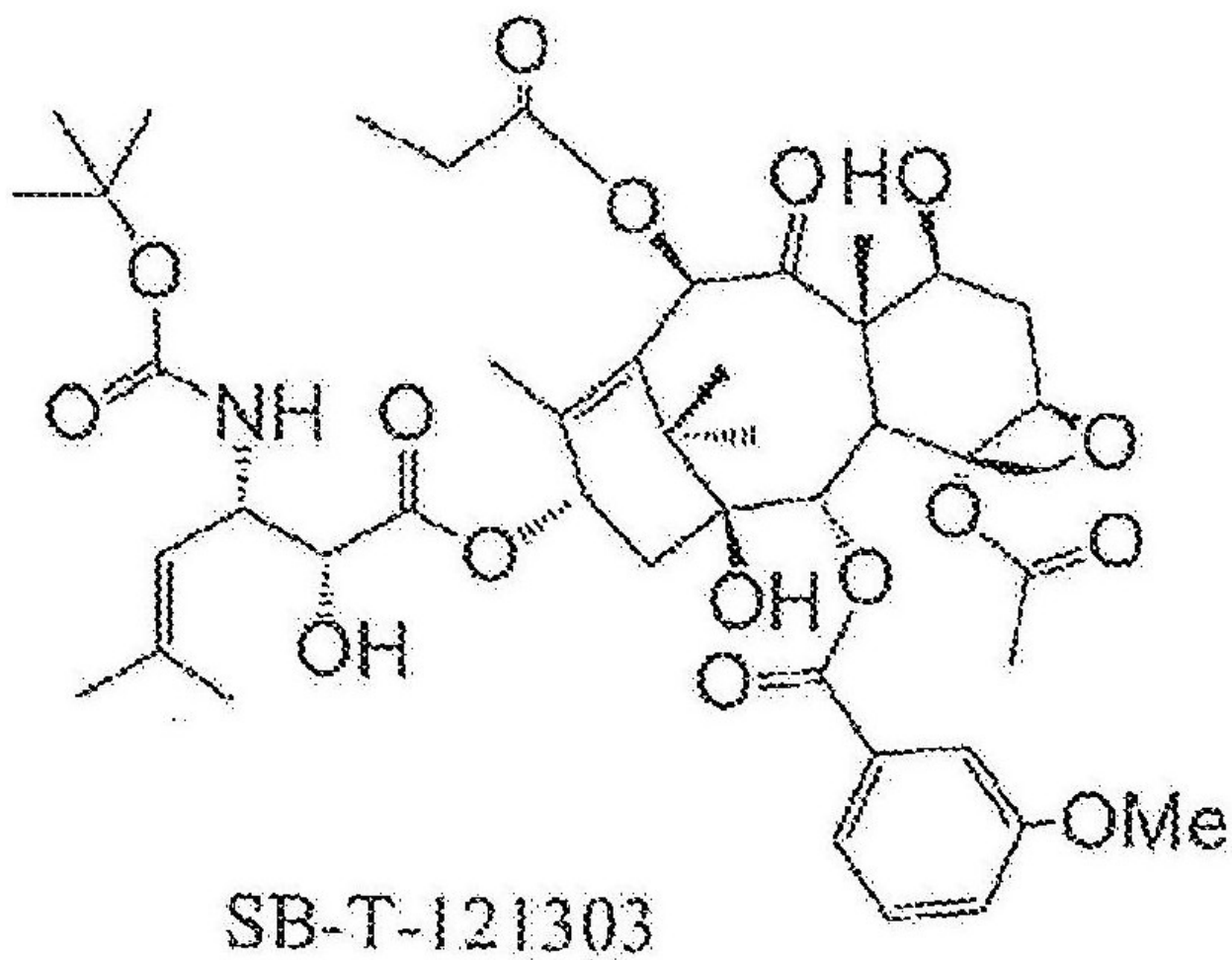


图4C

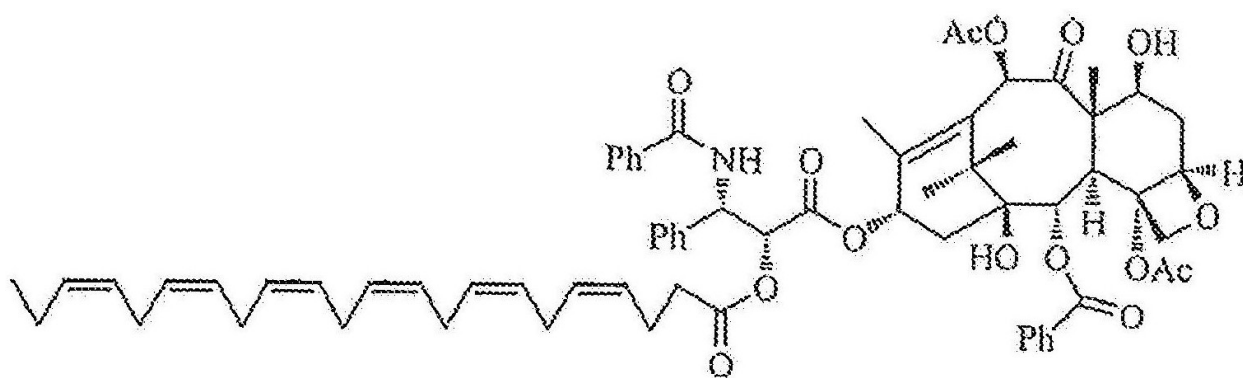


图4D

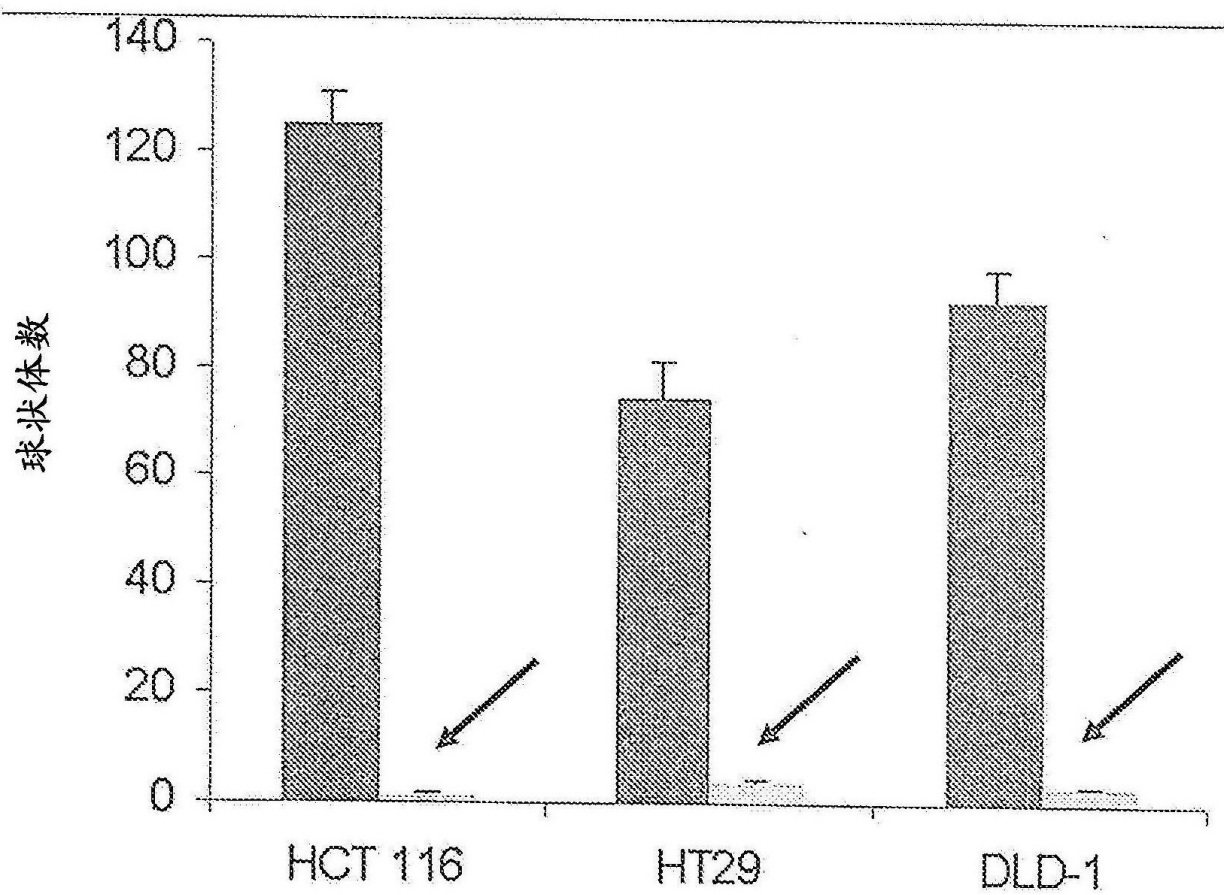


图5

# NE-安慰剂

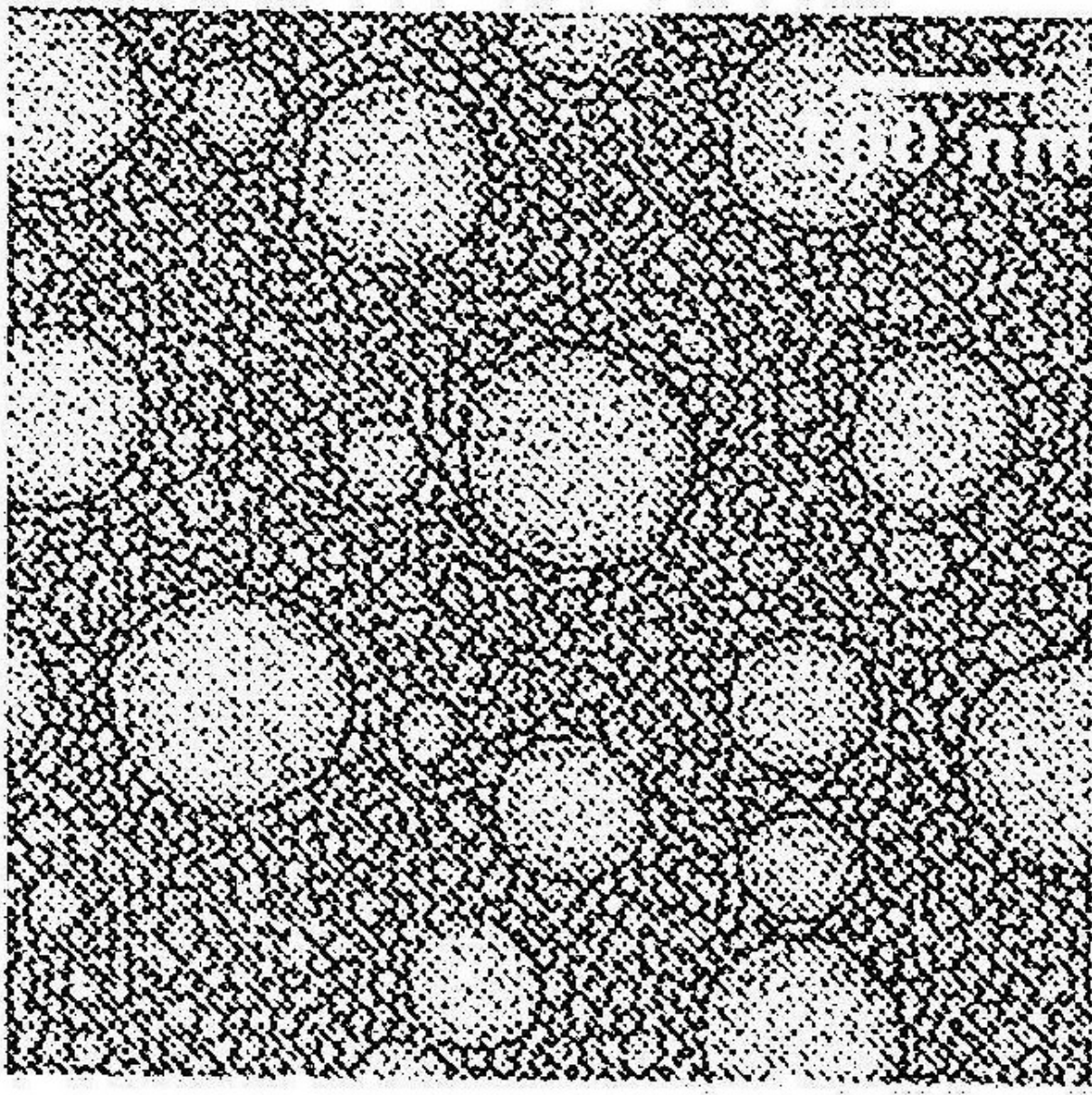


图6A



NE-DHA-ABT-1214

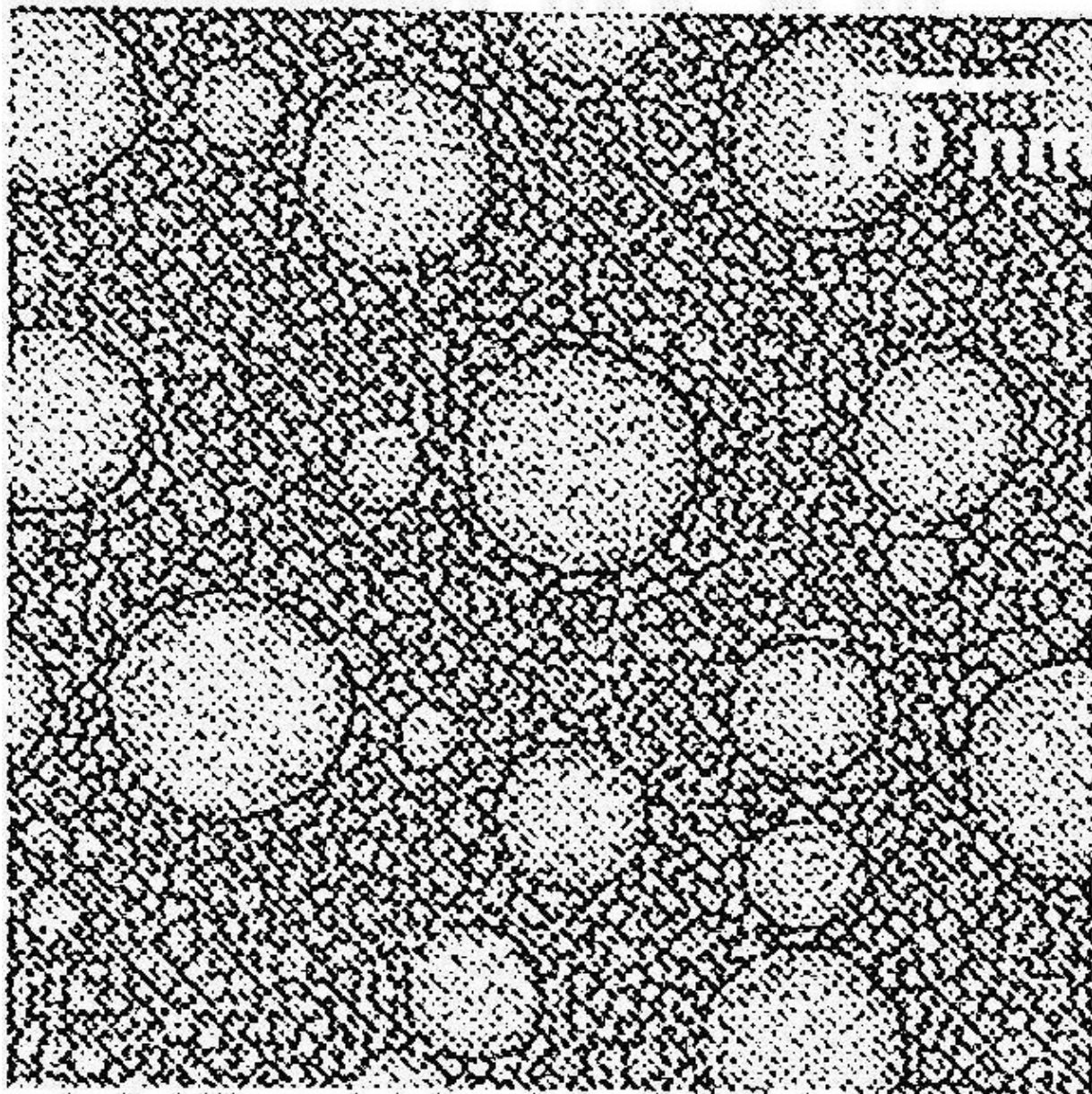


图6B

Abraxane

100 nm

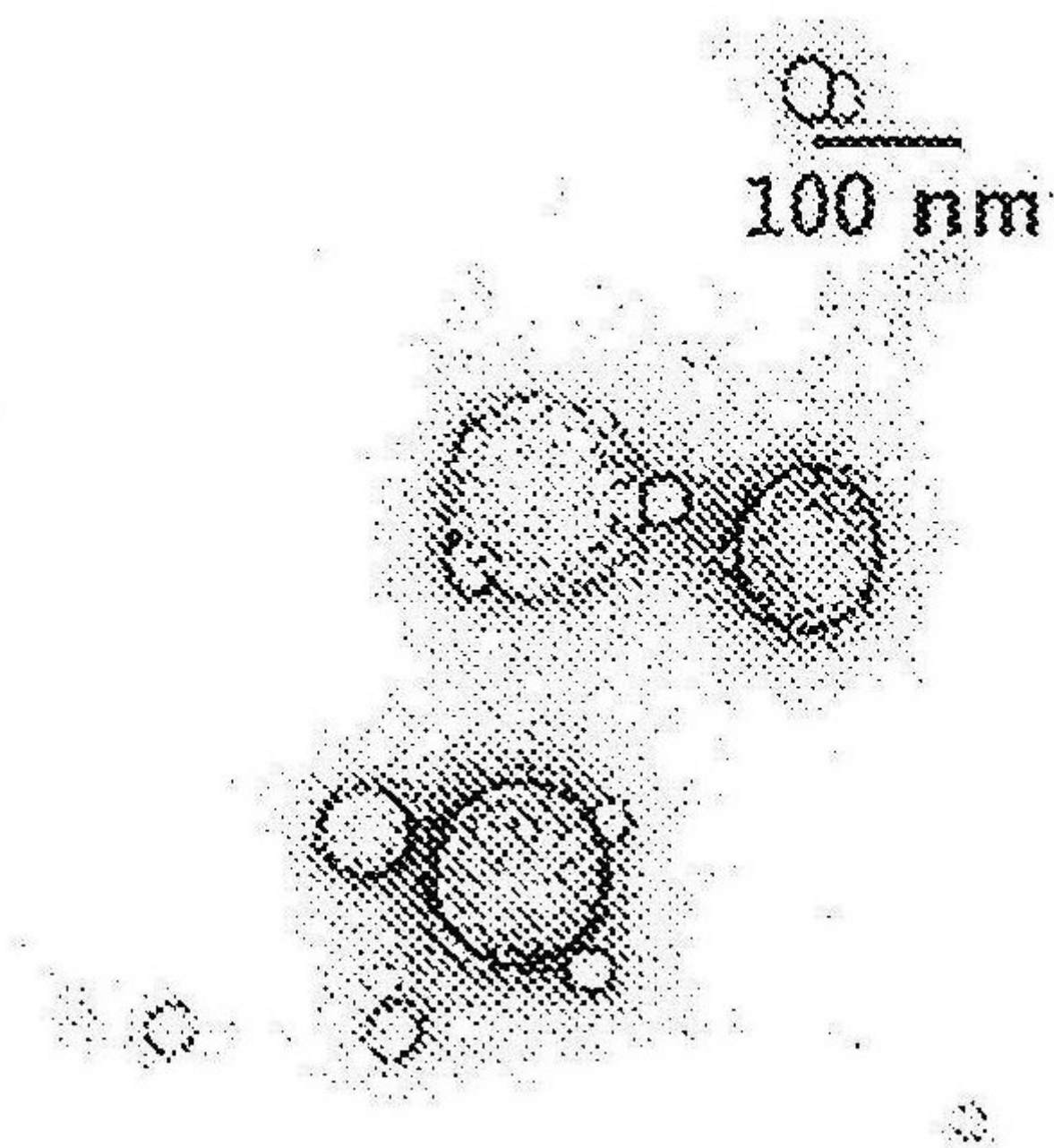


图6C

由强度表示的尺寸分布

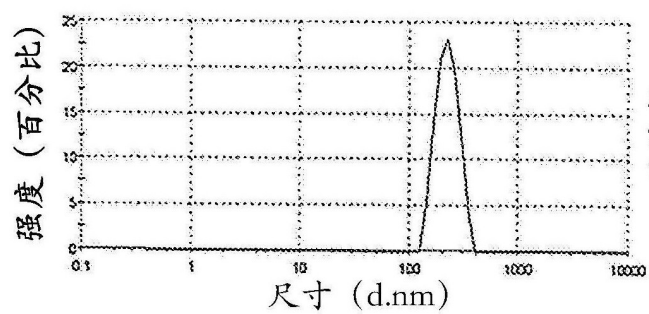


图 7A

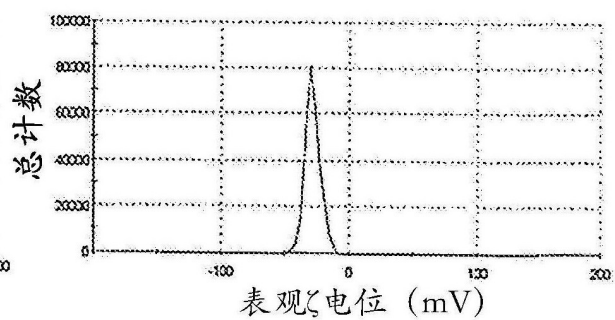
 $\zeta$  电位分布

图 7B

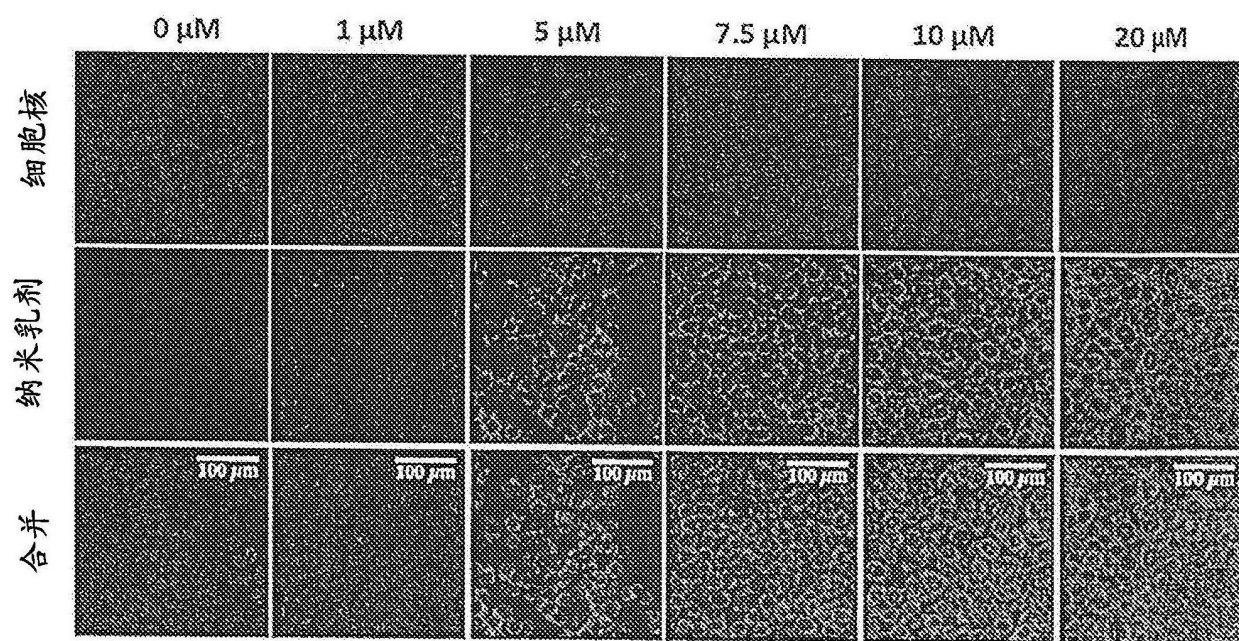


图8A

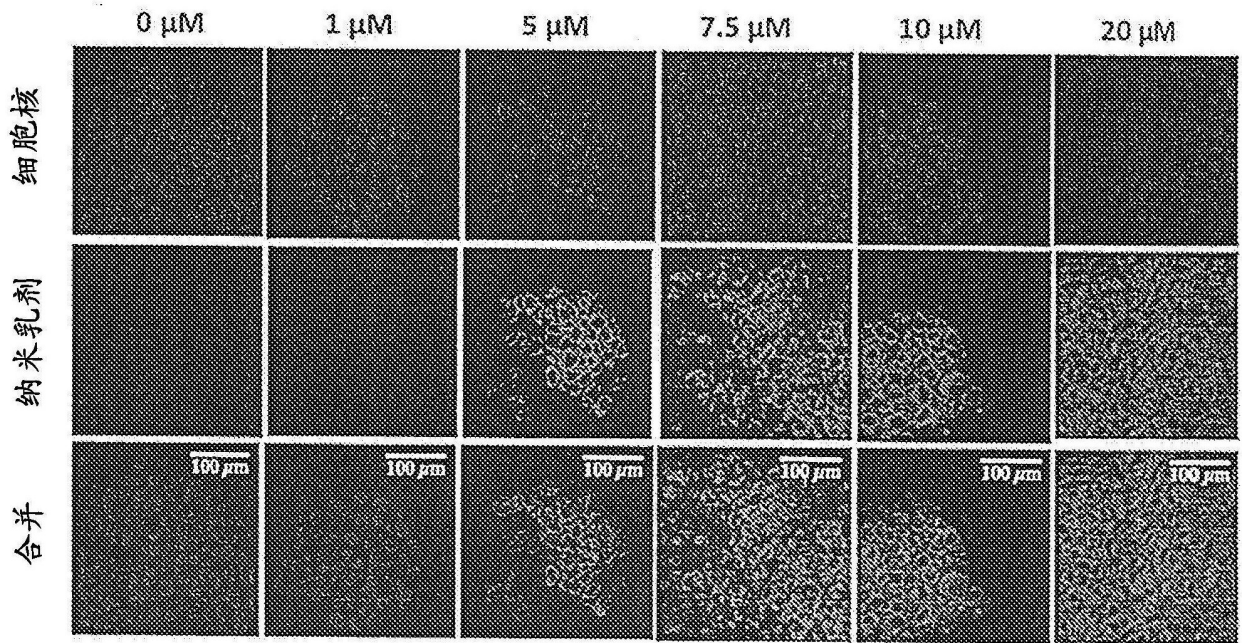


图8B

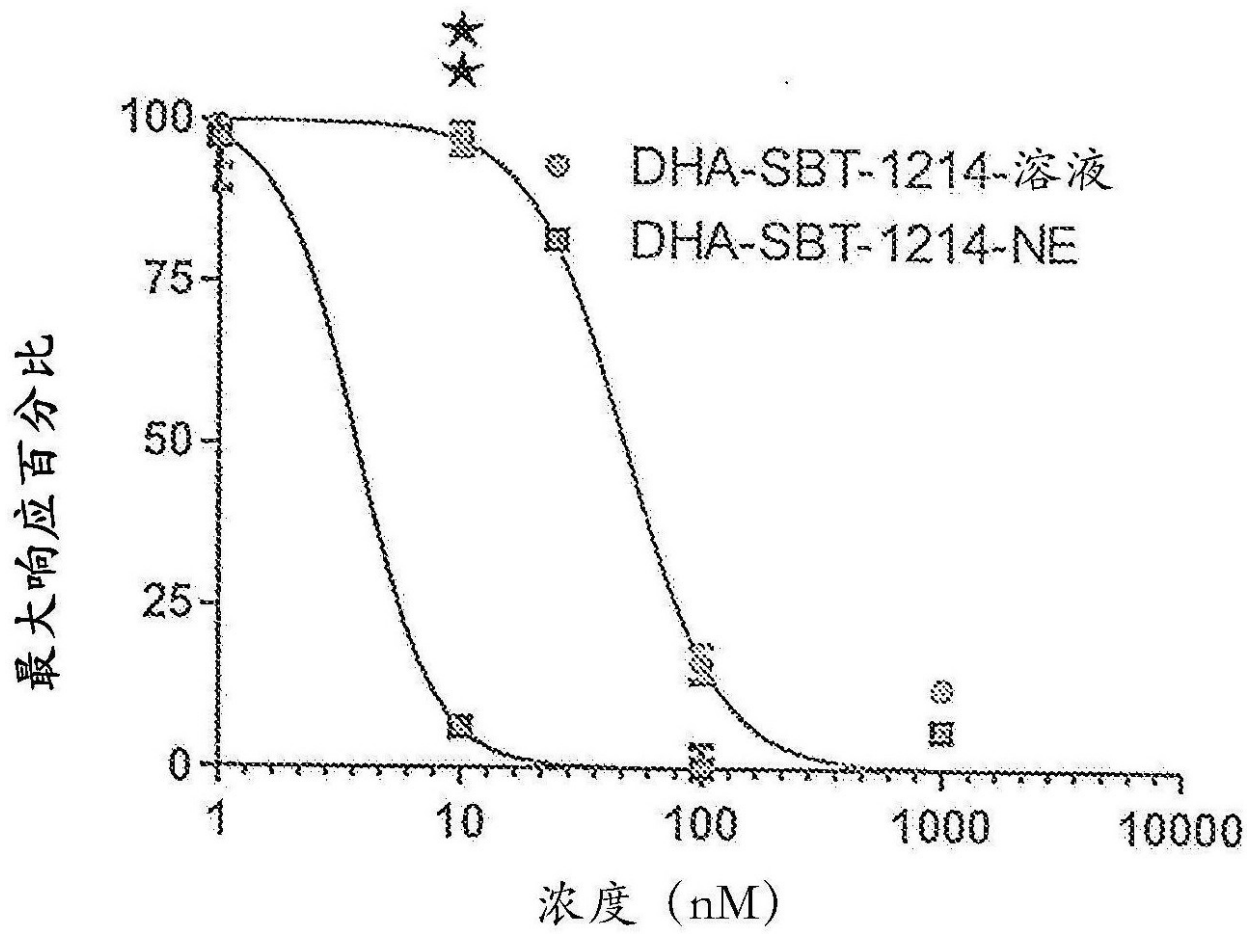


图9A

对照

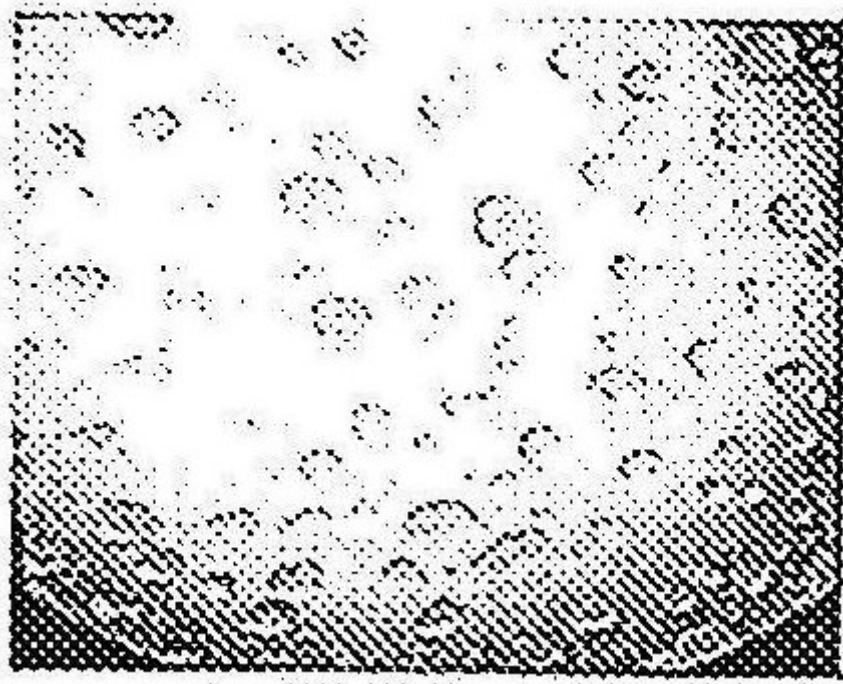


图9B



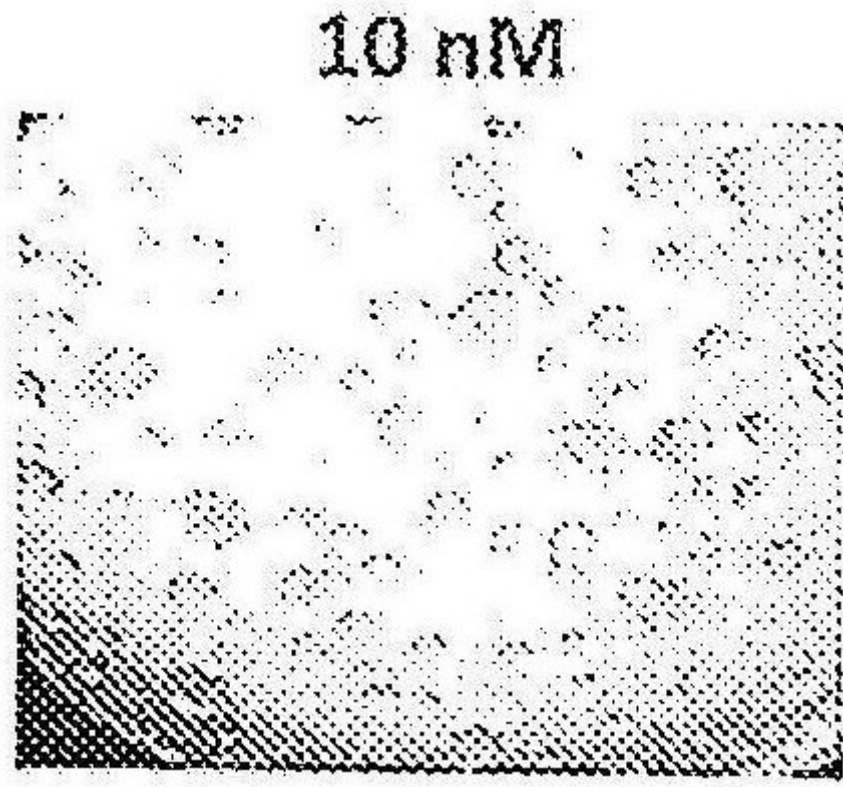


图9C

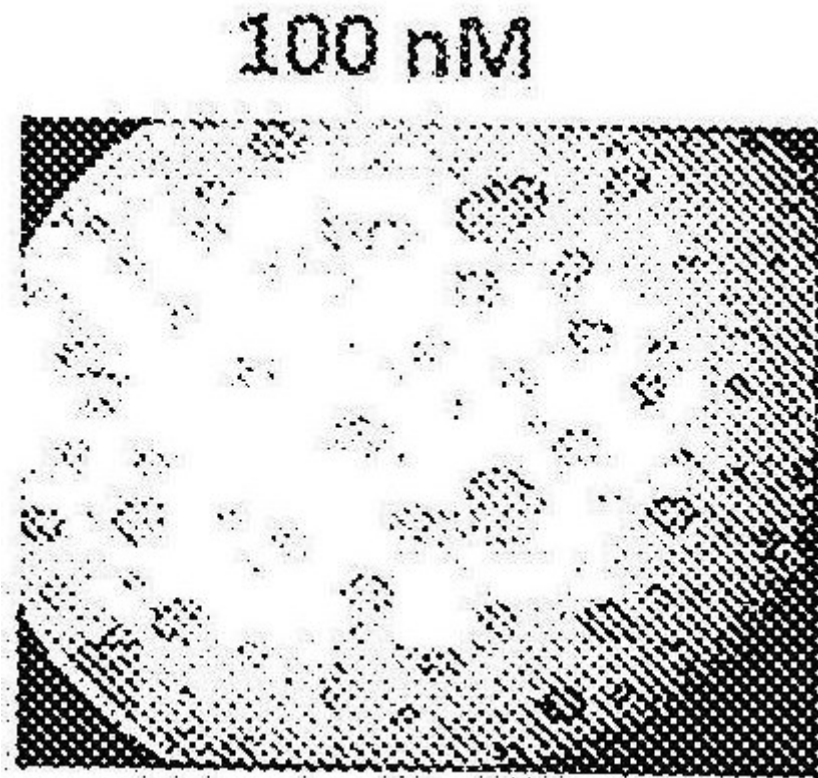


图9D

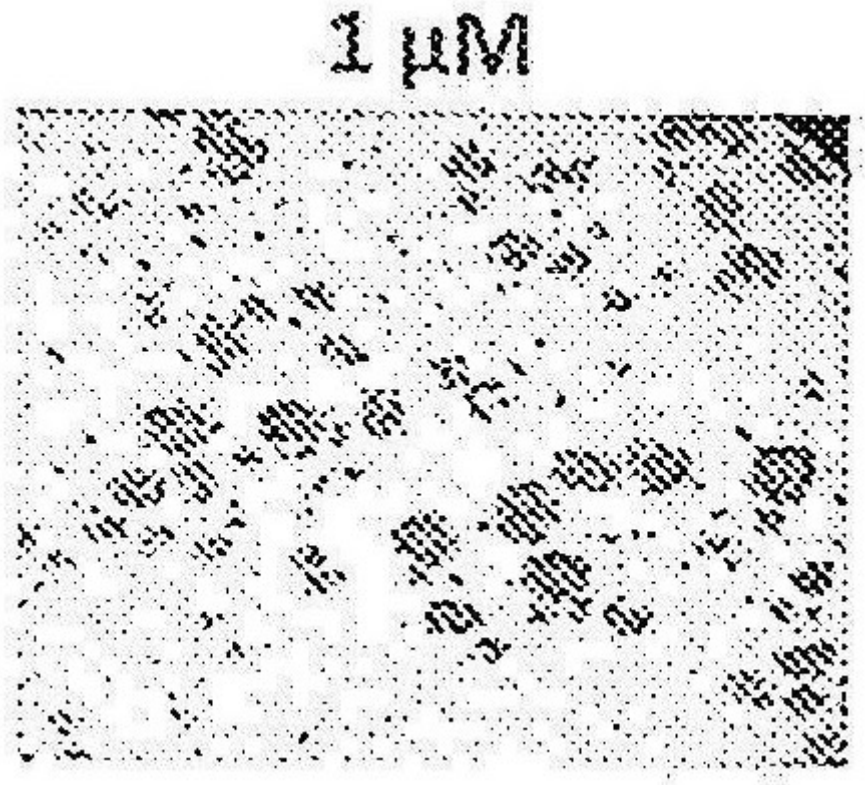


图9E

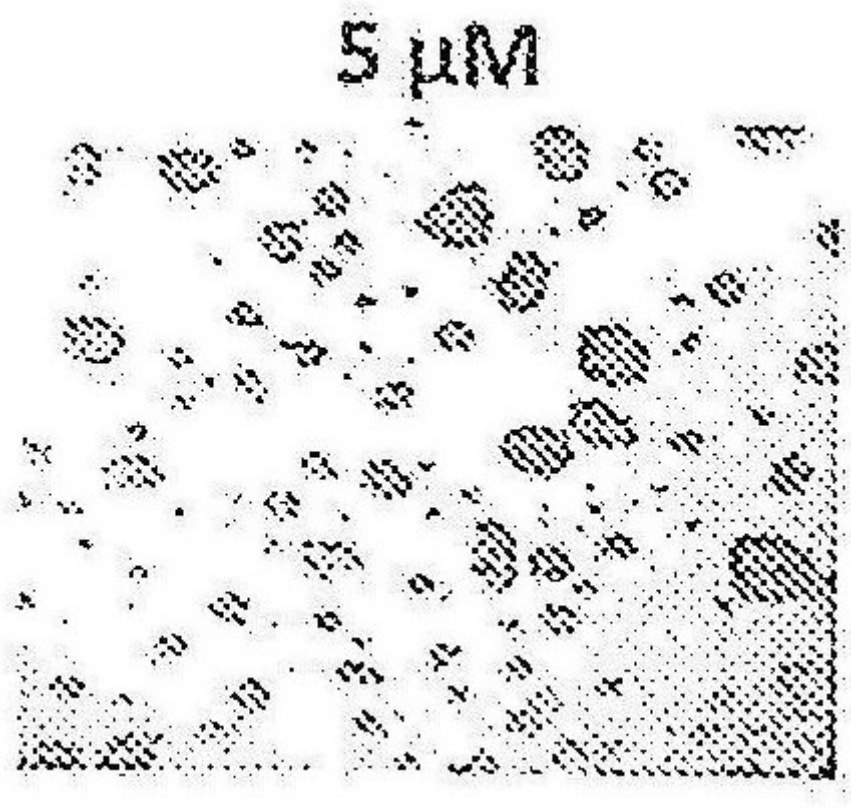


图9F



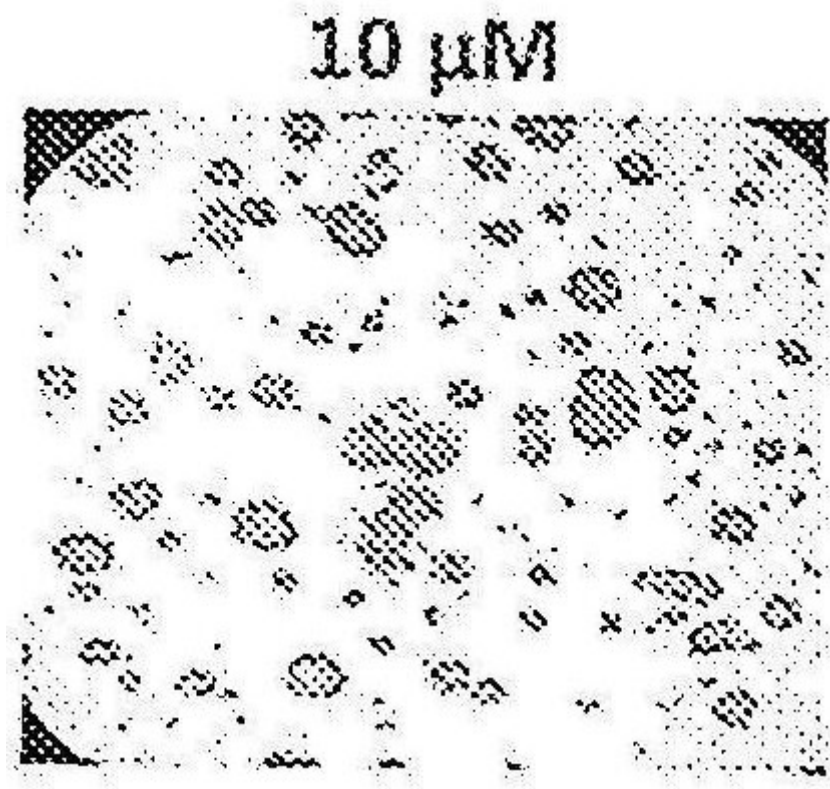


图9G

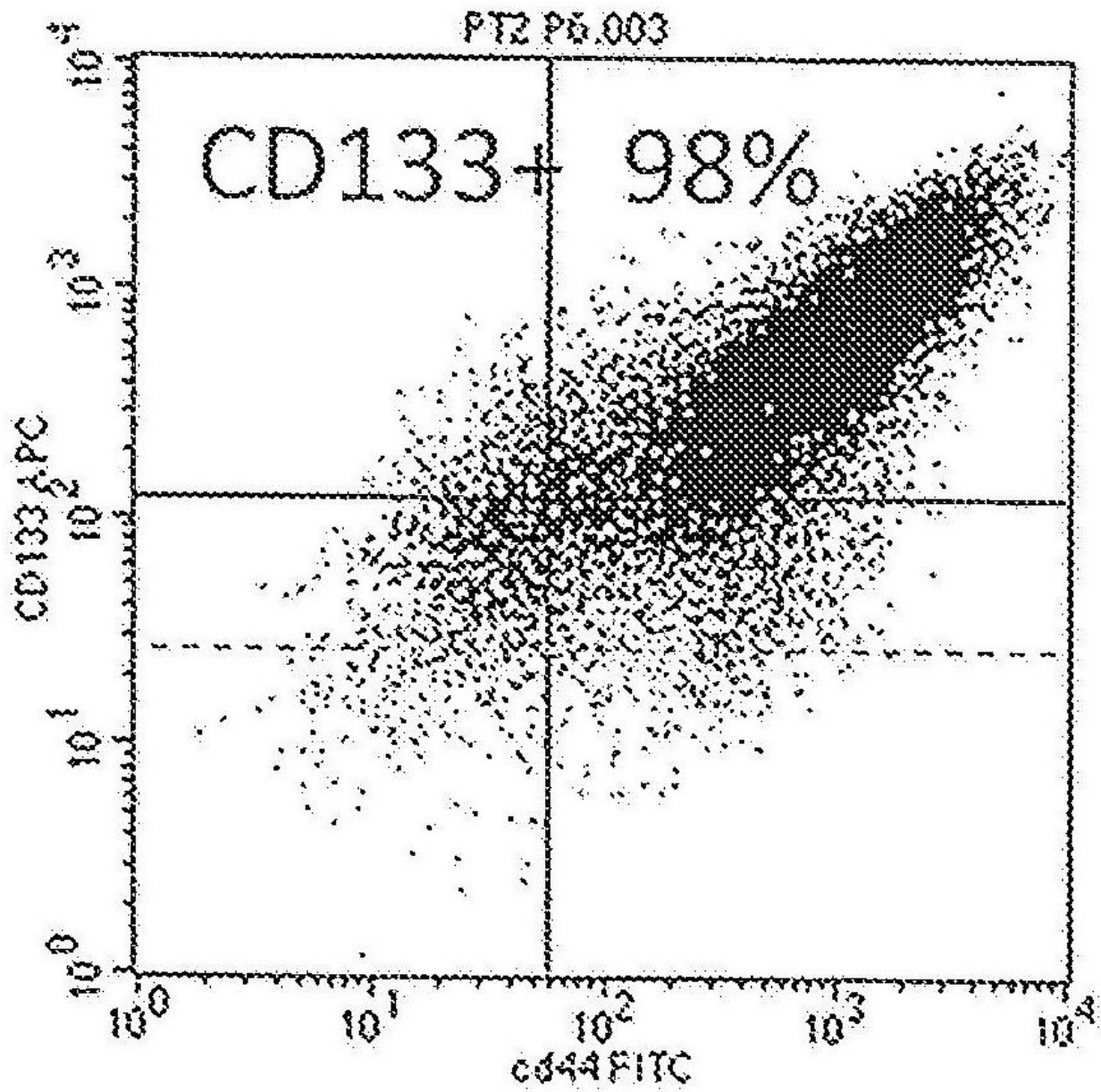


图10A

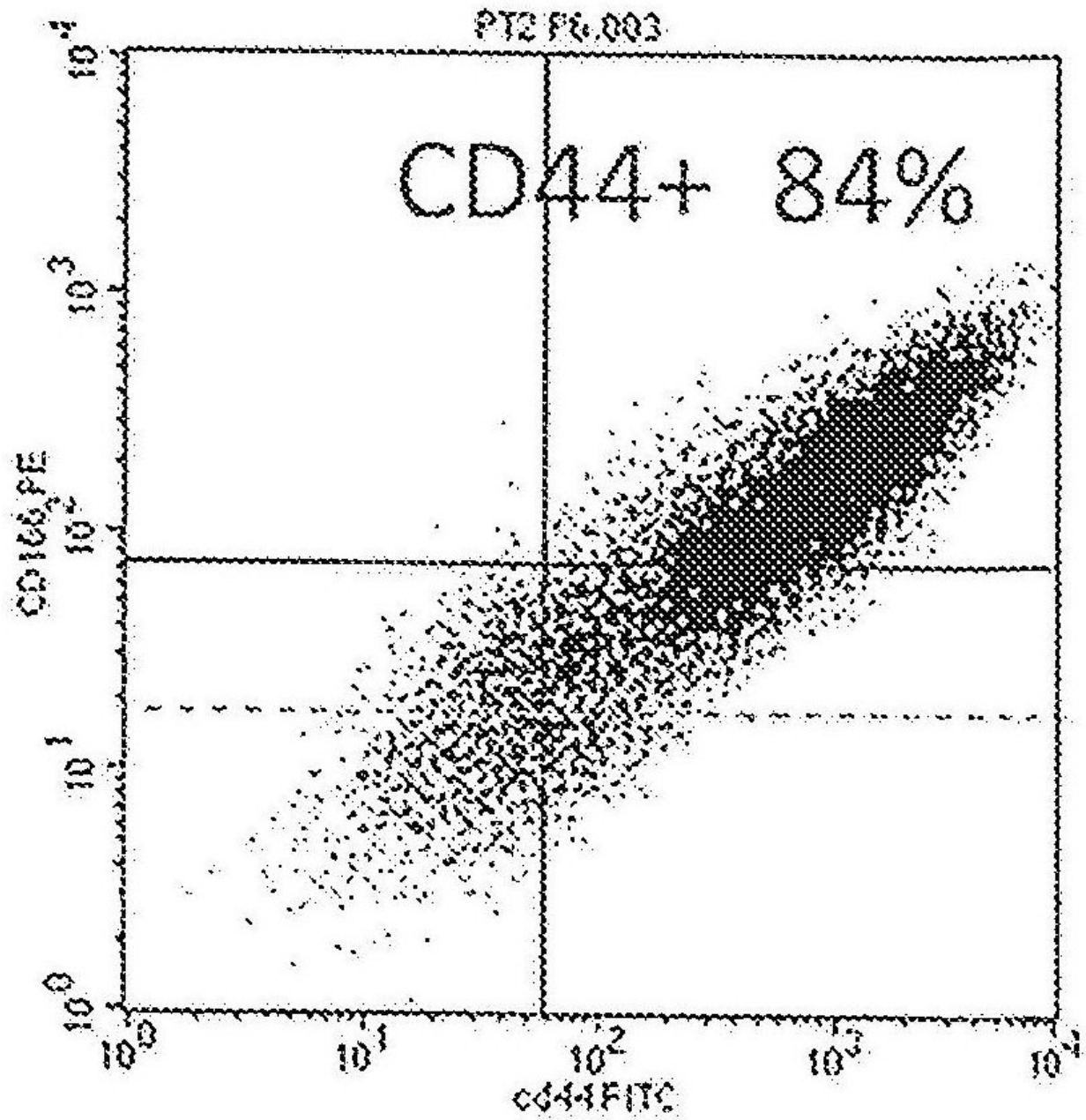


图10B

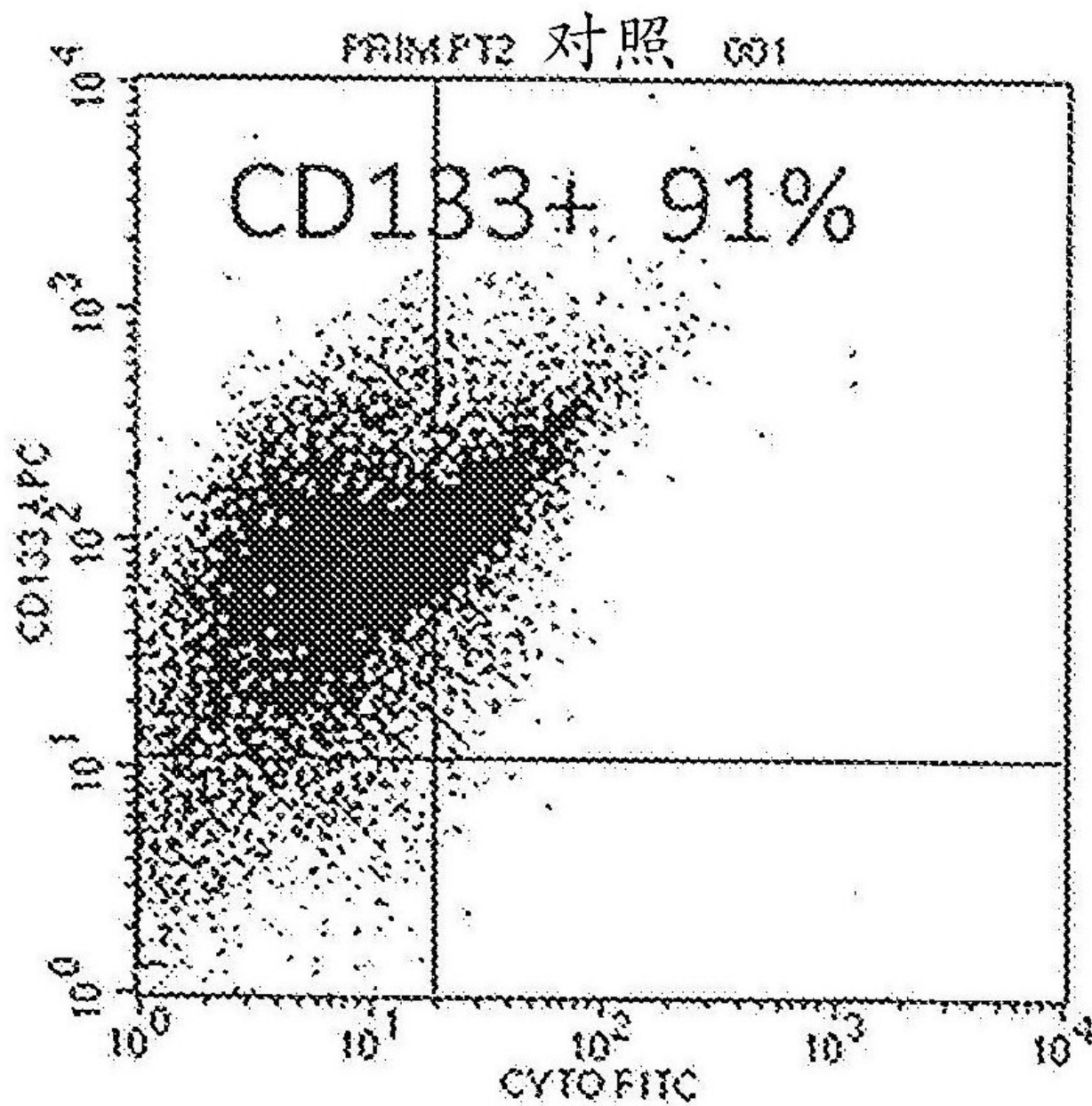


图10C

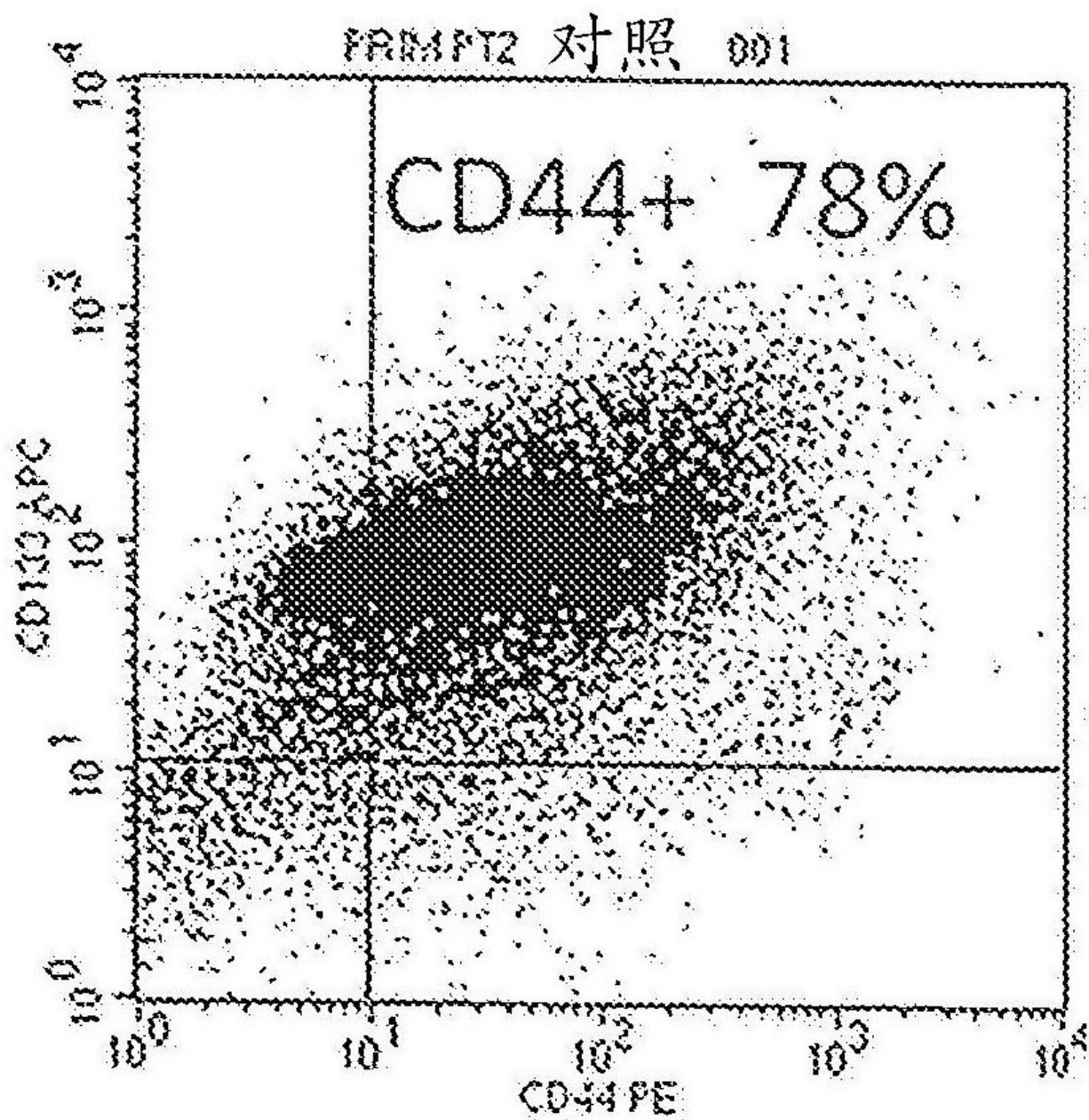


图10D

图 11A

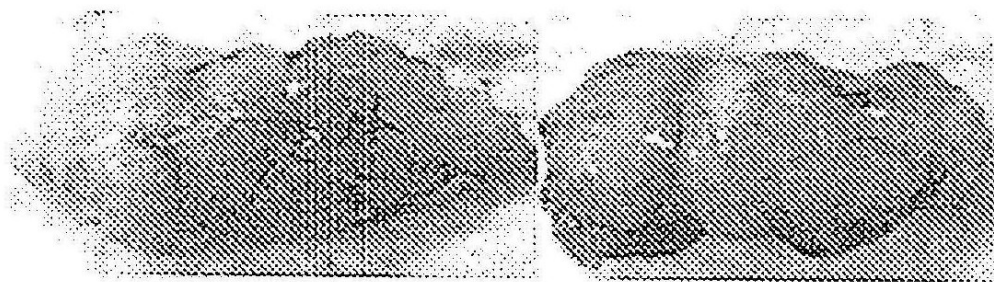


图 11B

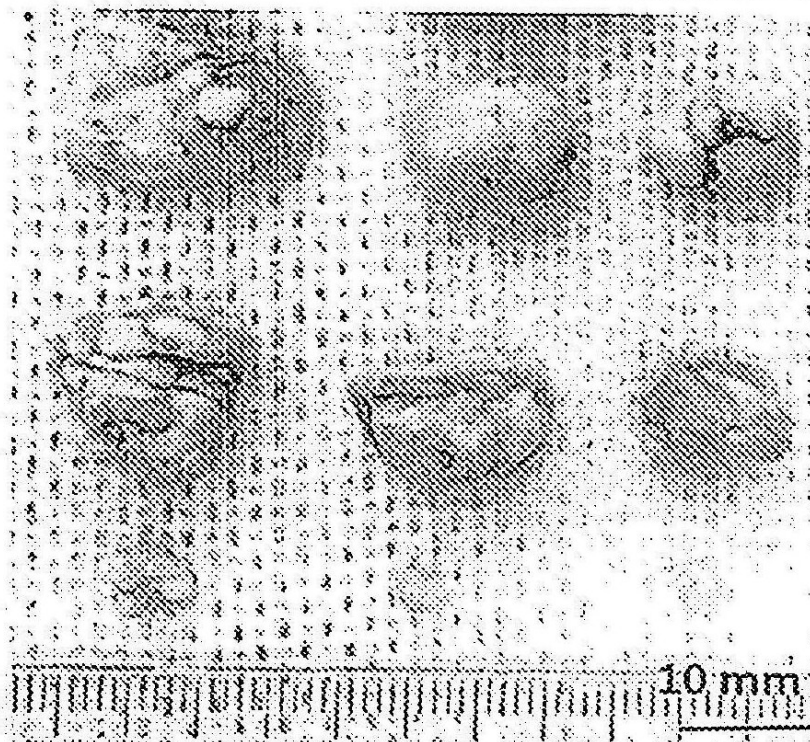
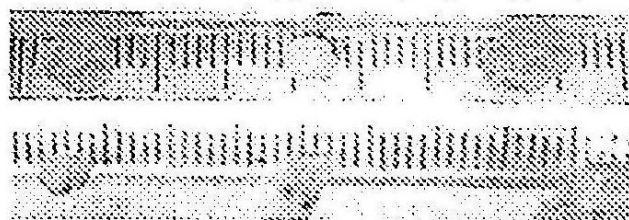


图 11C

图 11D

图 11E

图 11F



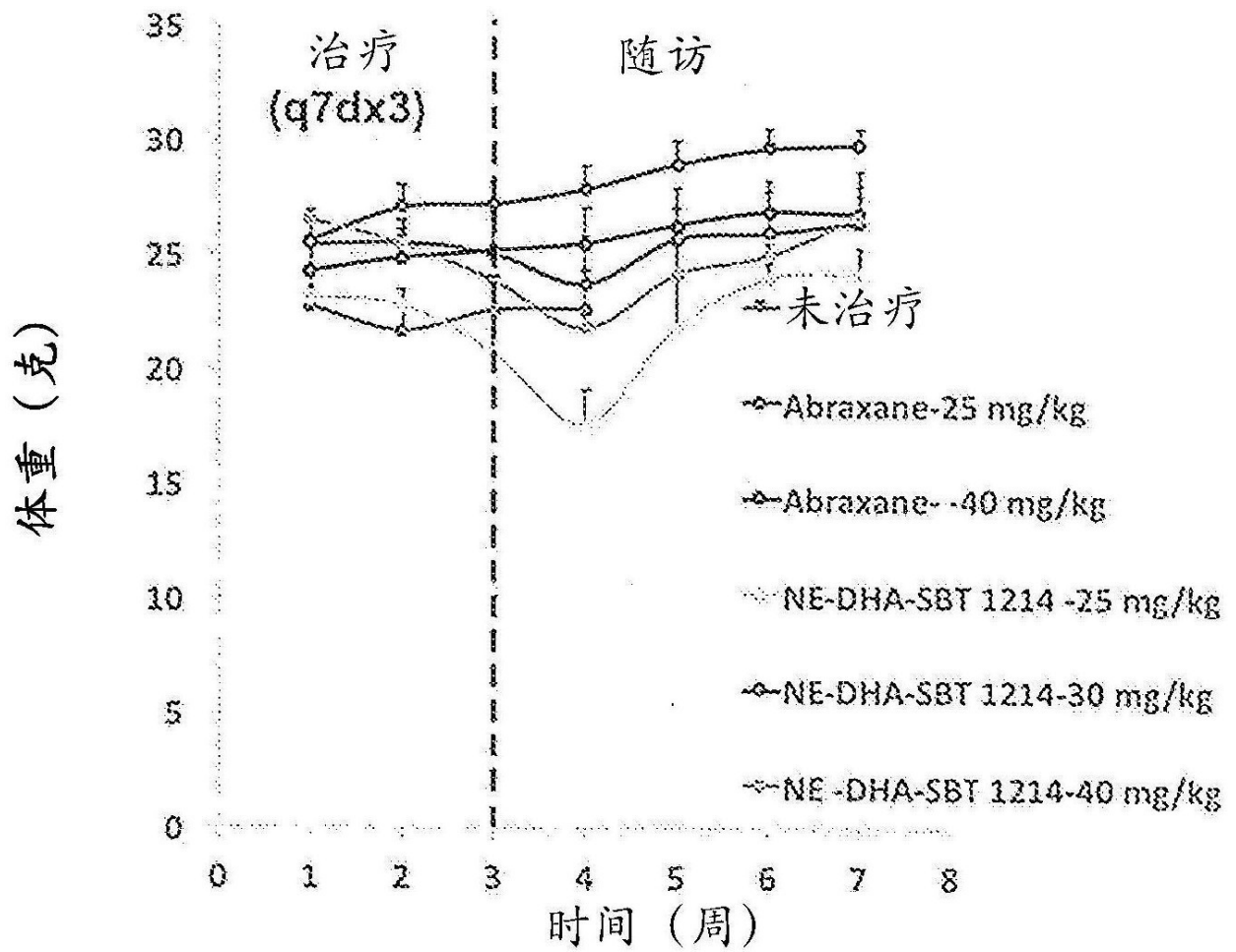


图11G

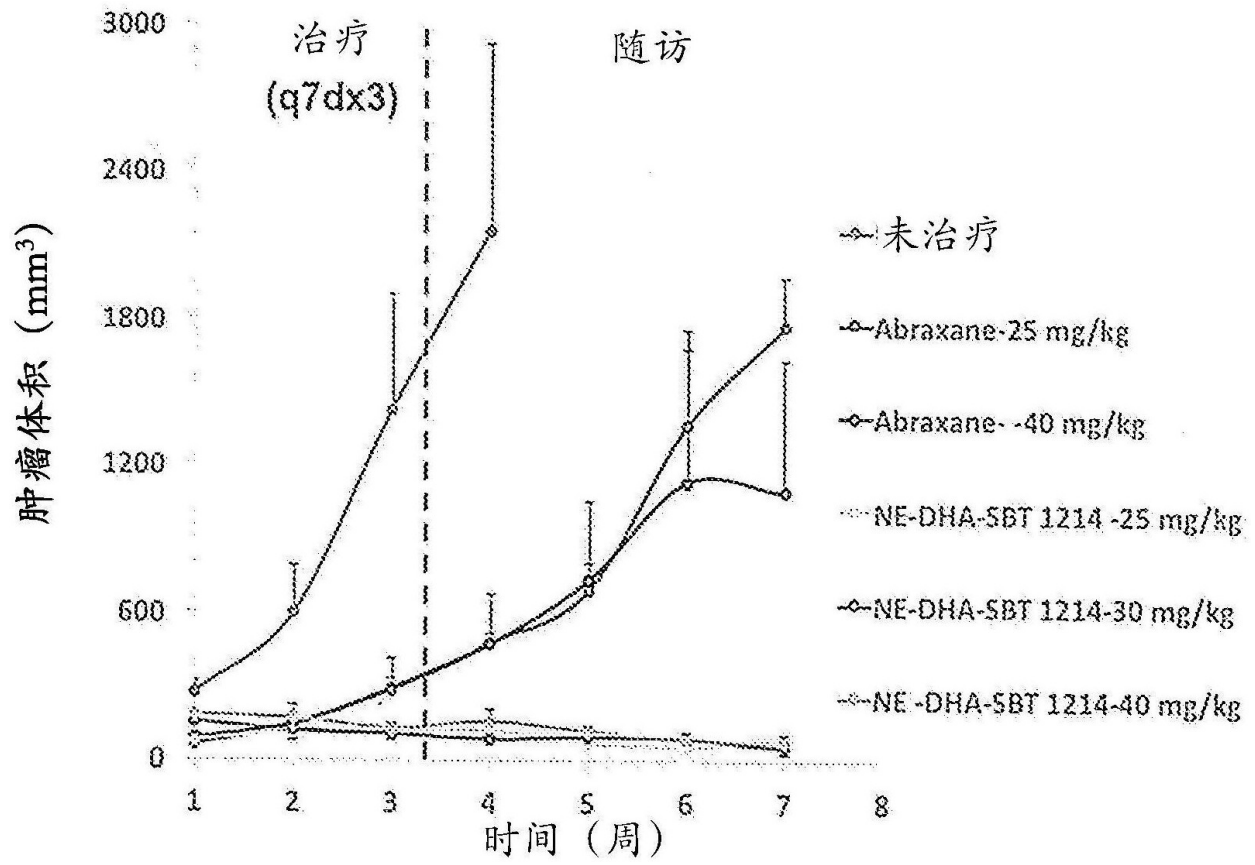


图11H



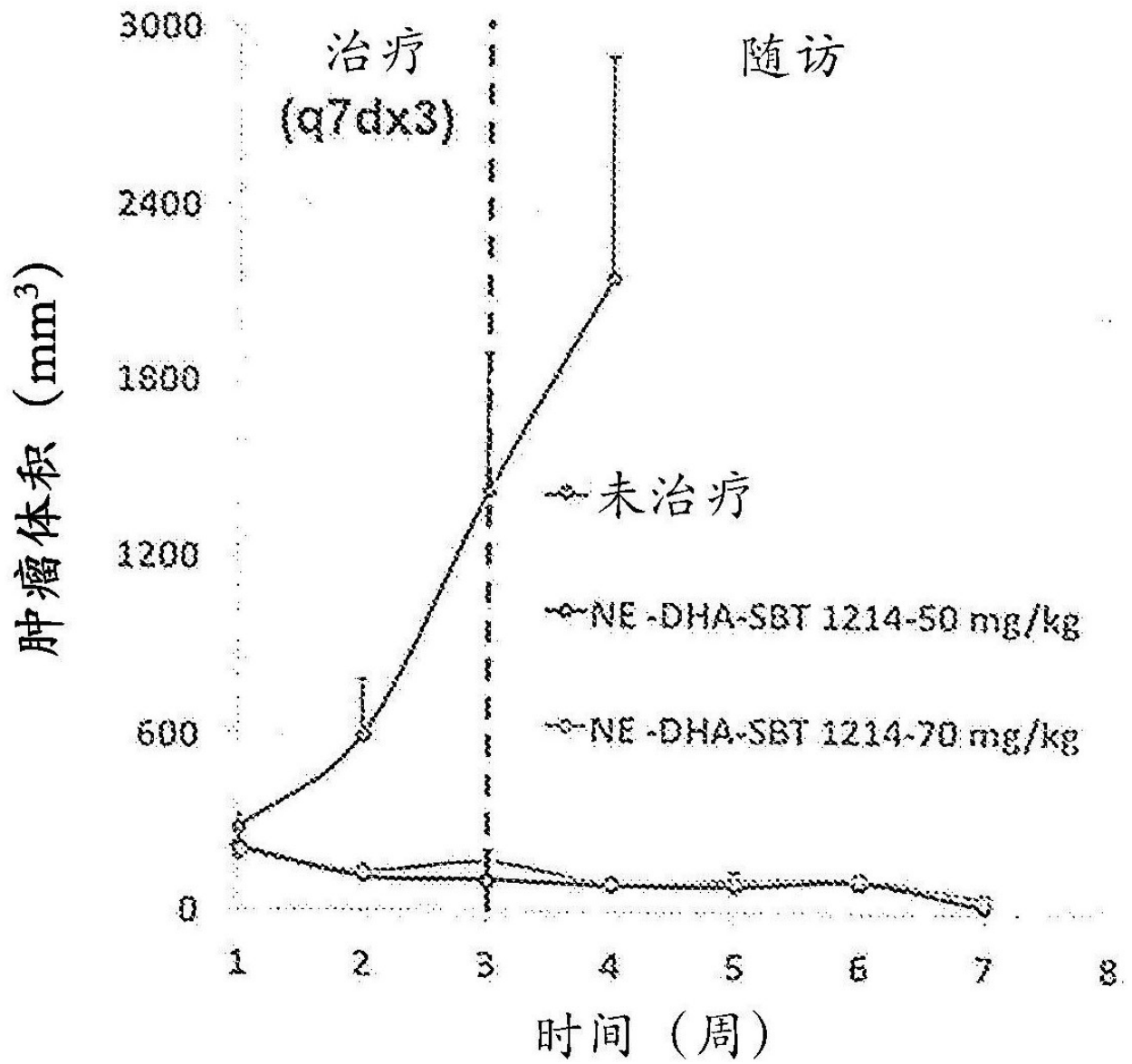


图12A

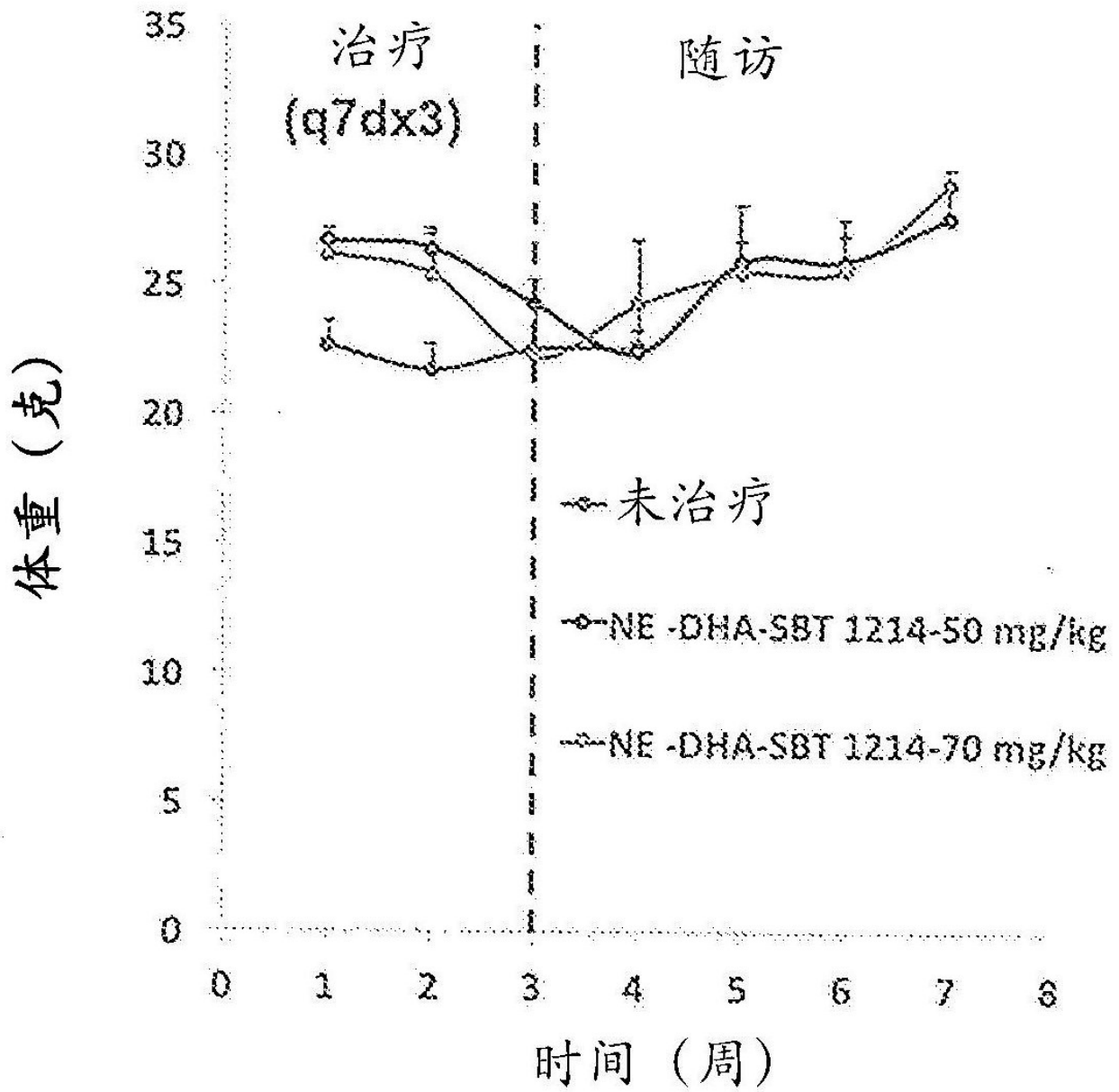


图12B

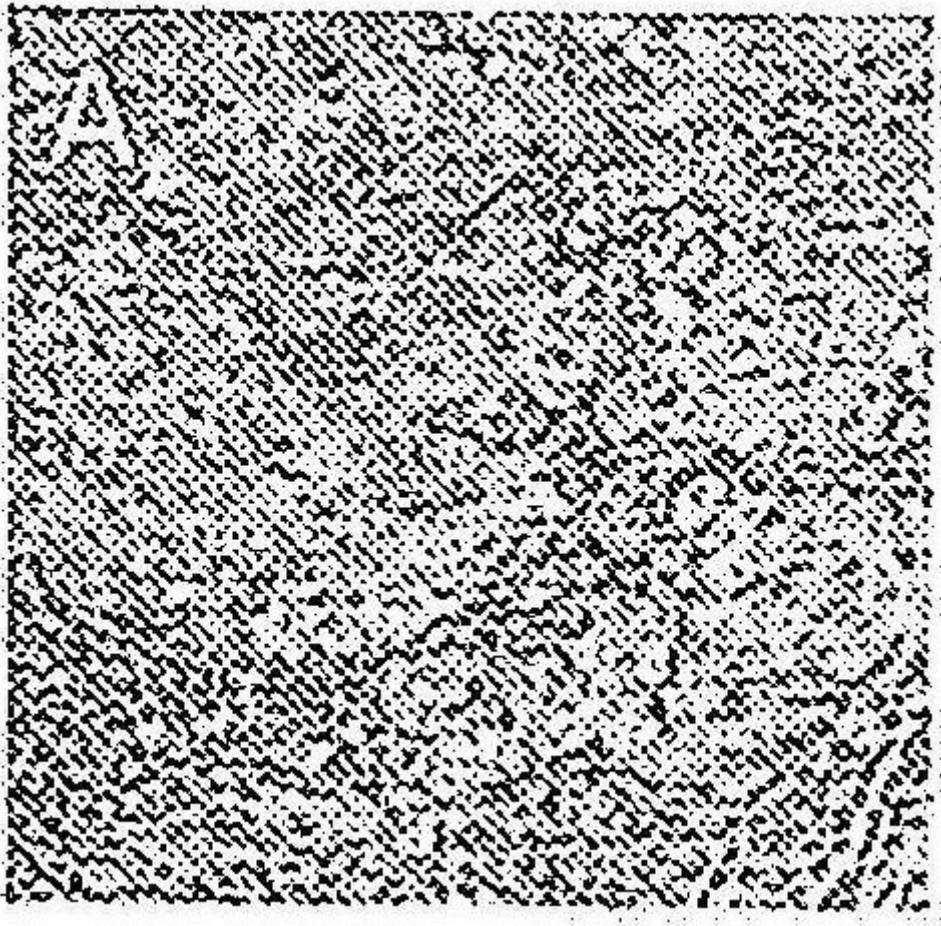


图13A

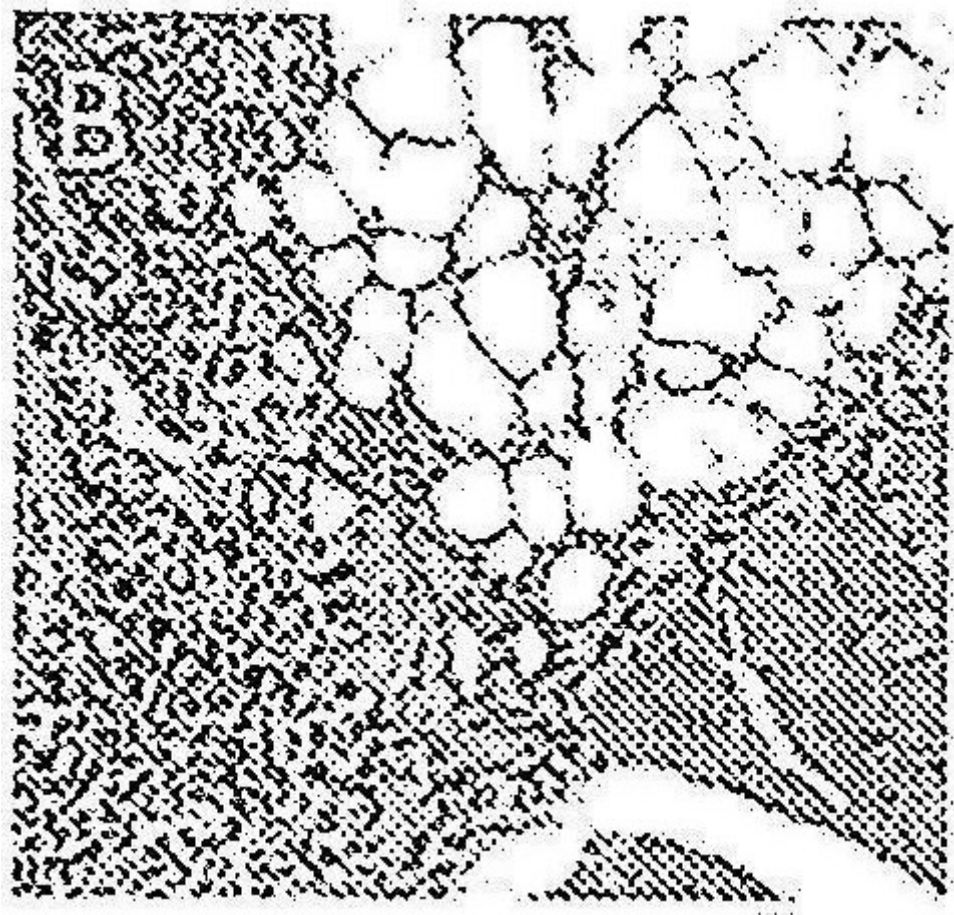


图13B

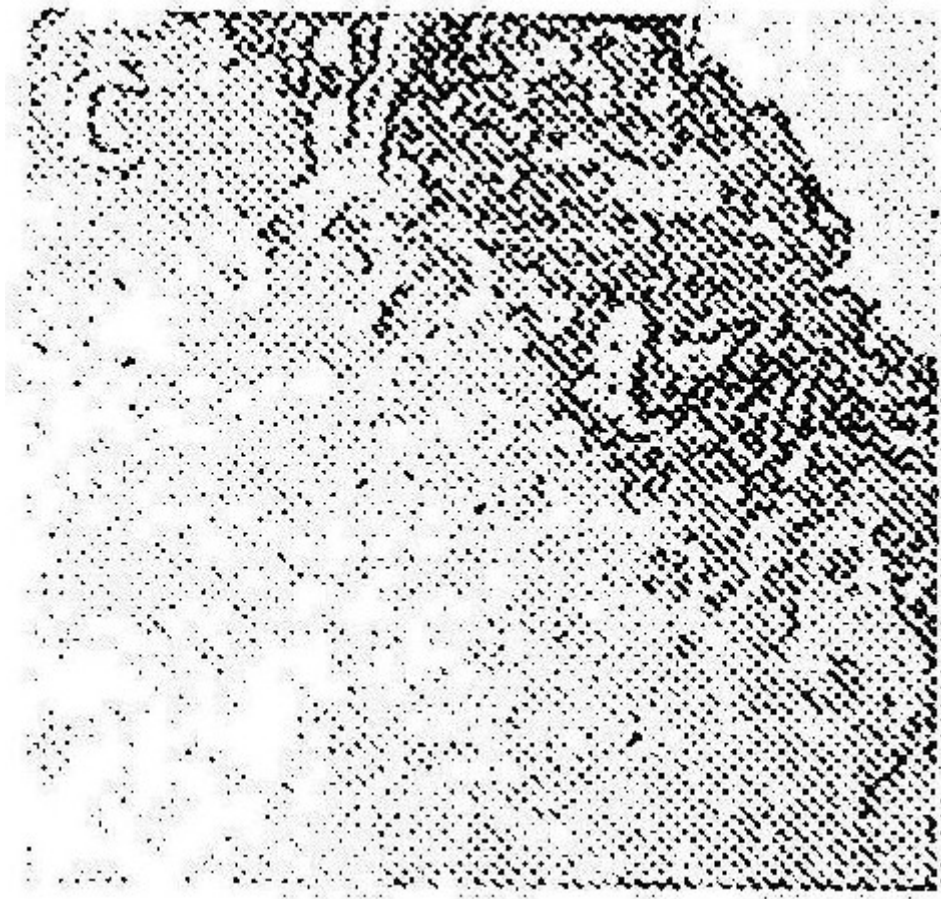


图13C

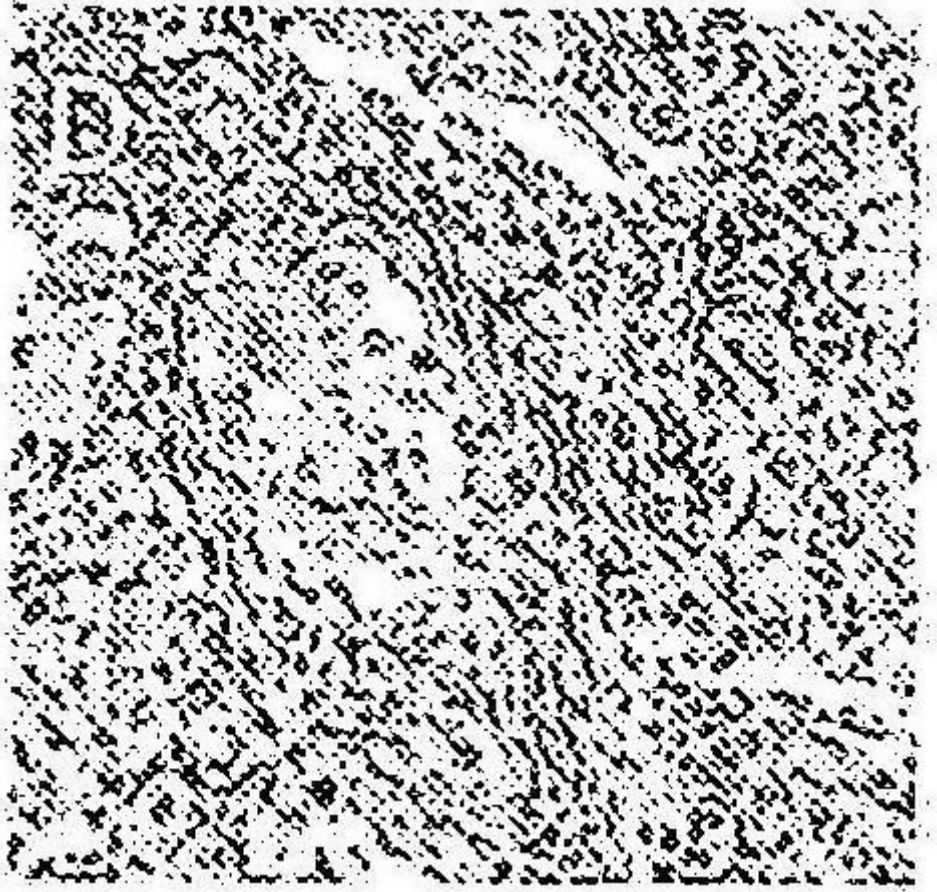


图13D

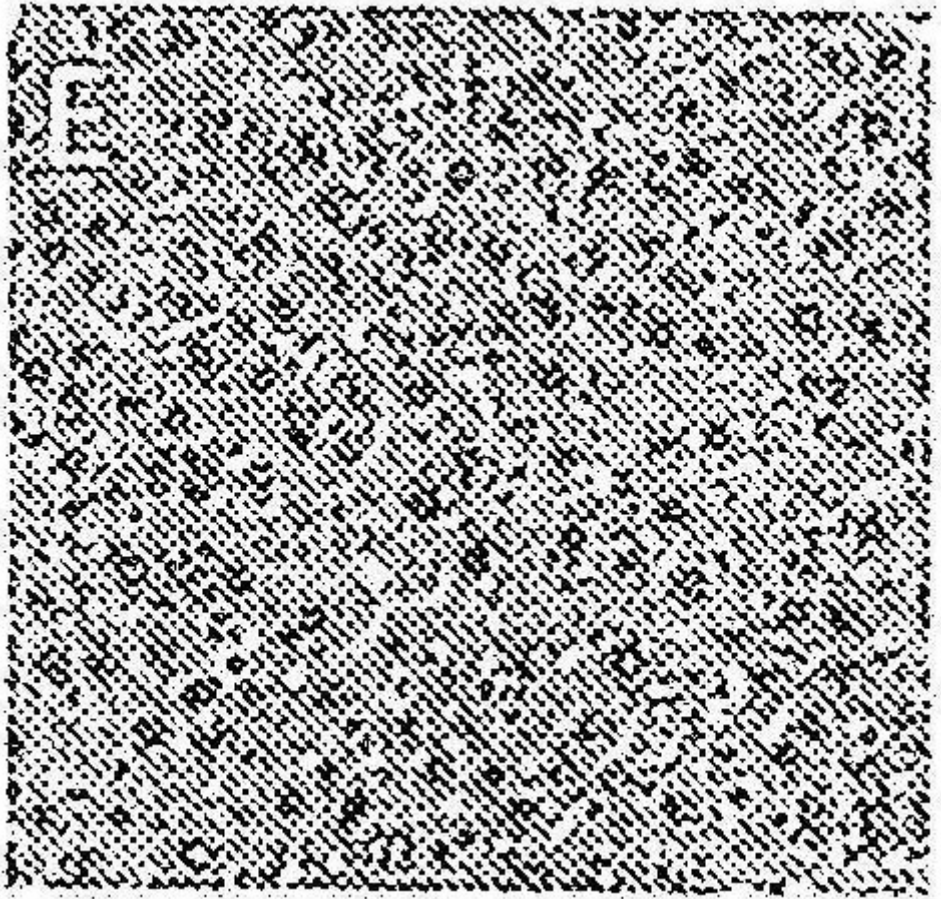


图13E



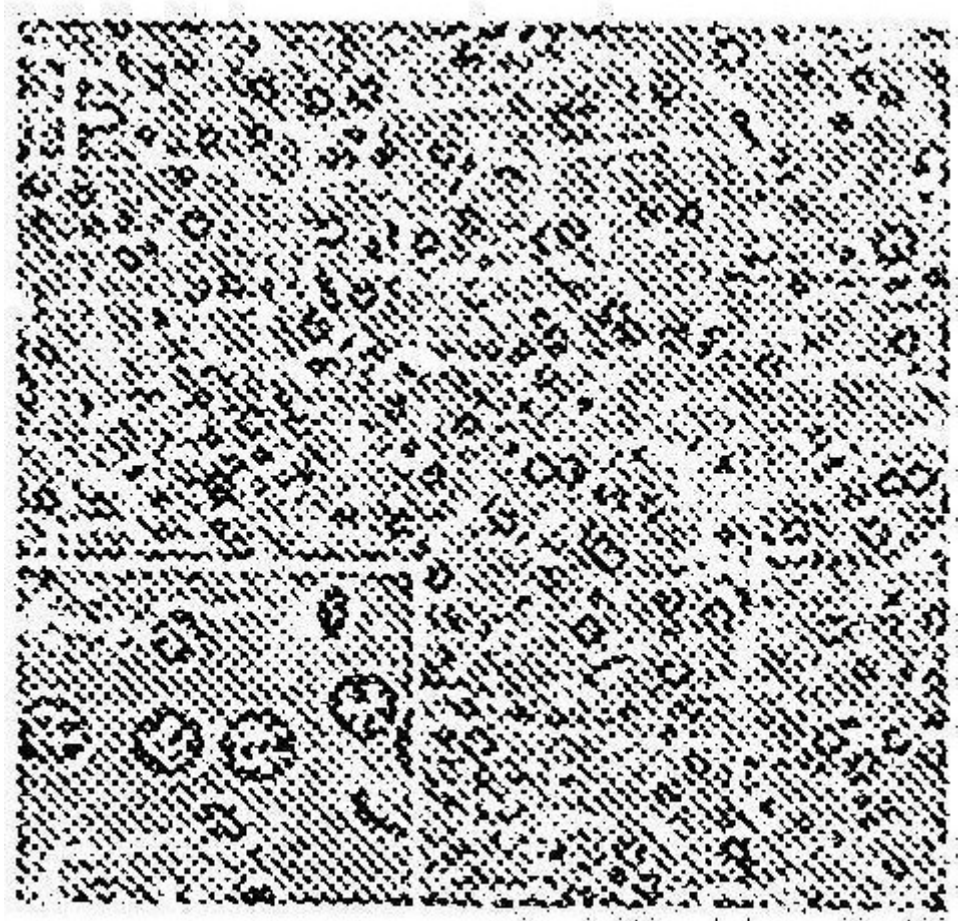


图13F





图13G

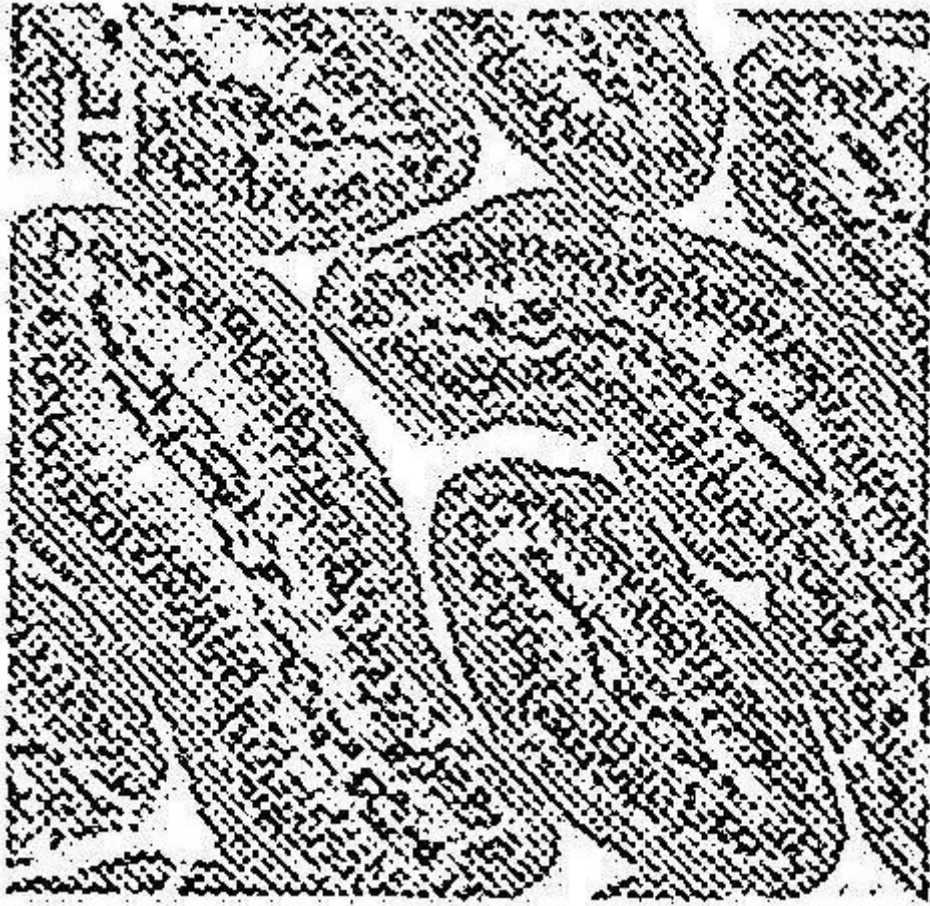


图13H

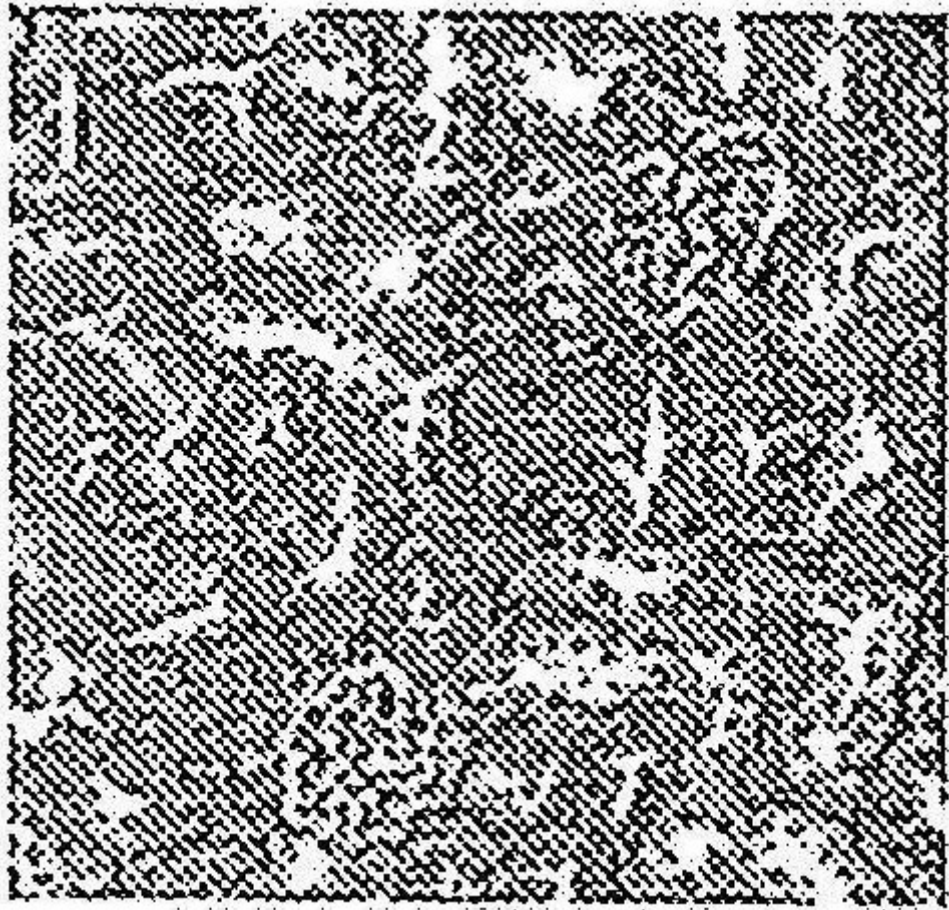


图13I

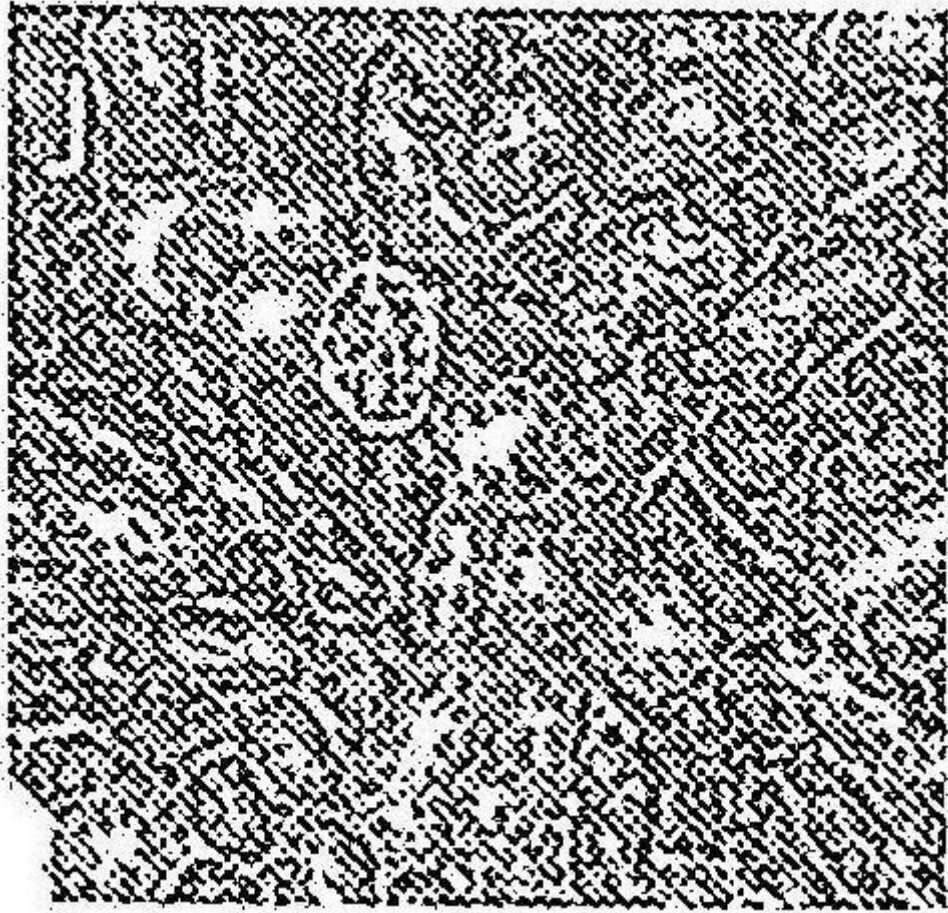


图13J

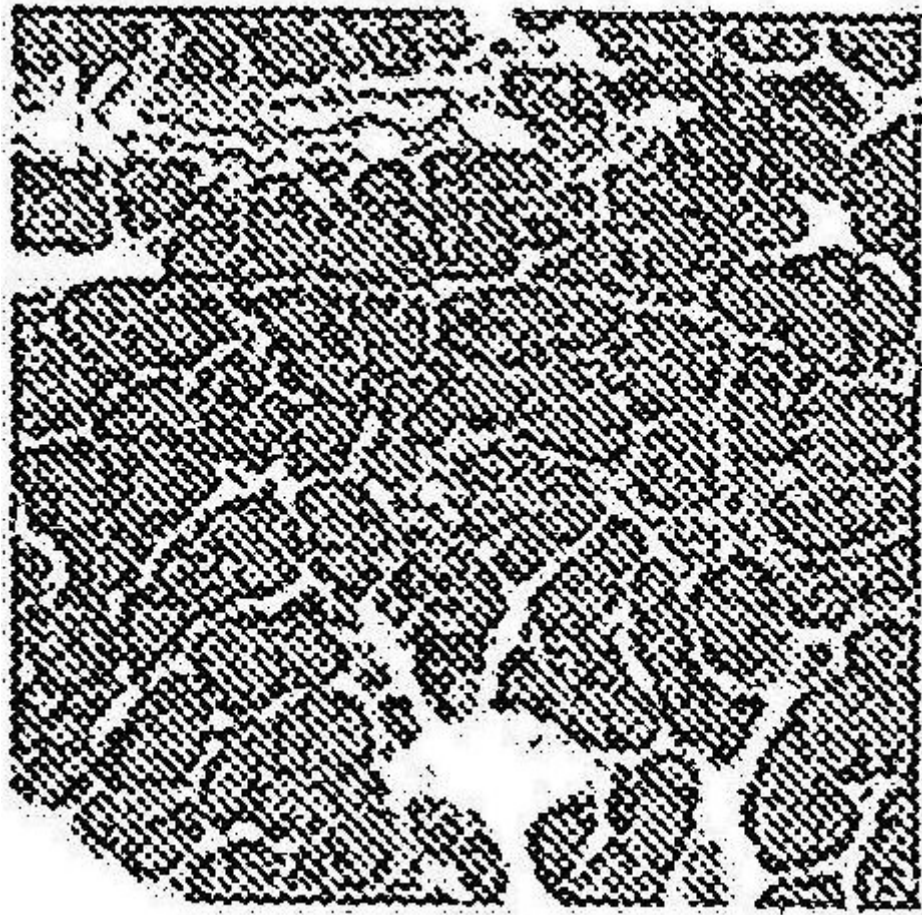


图13K

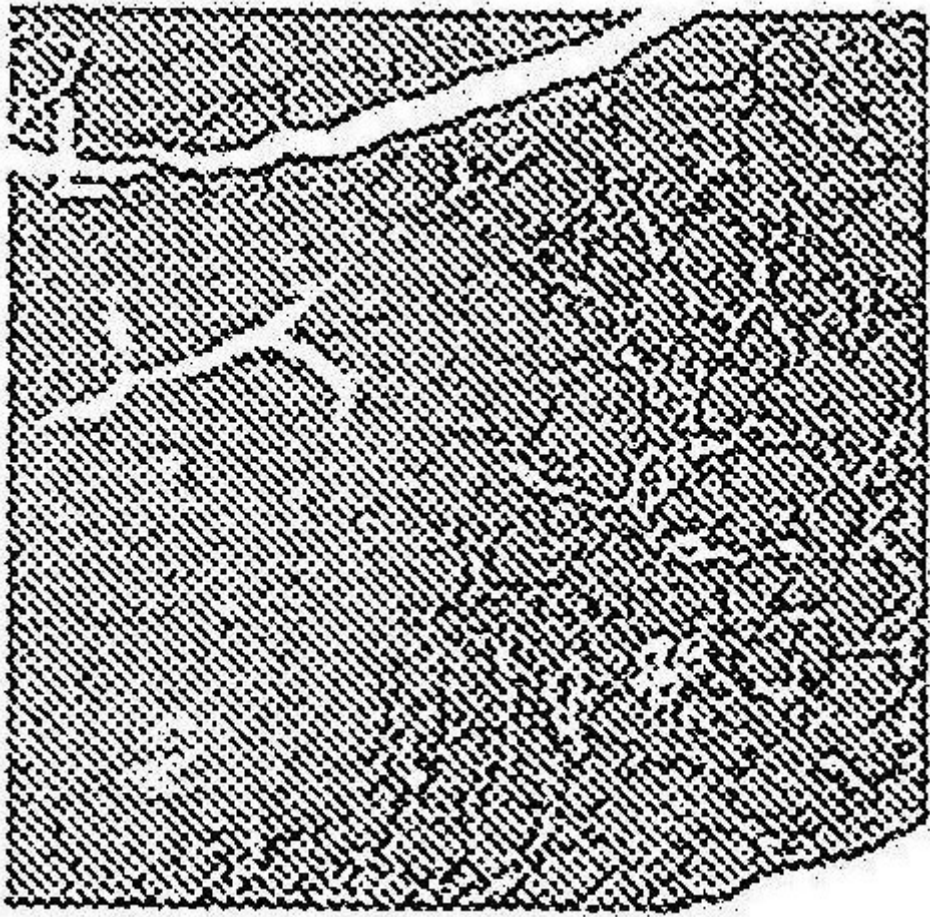


图13L



图 14A

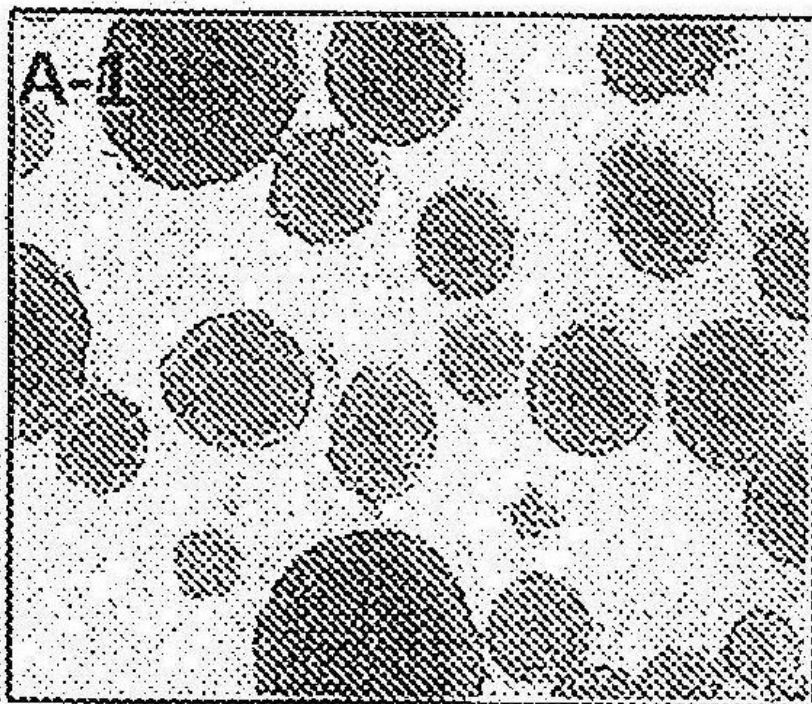


图 14B



图 15A

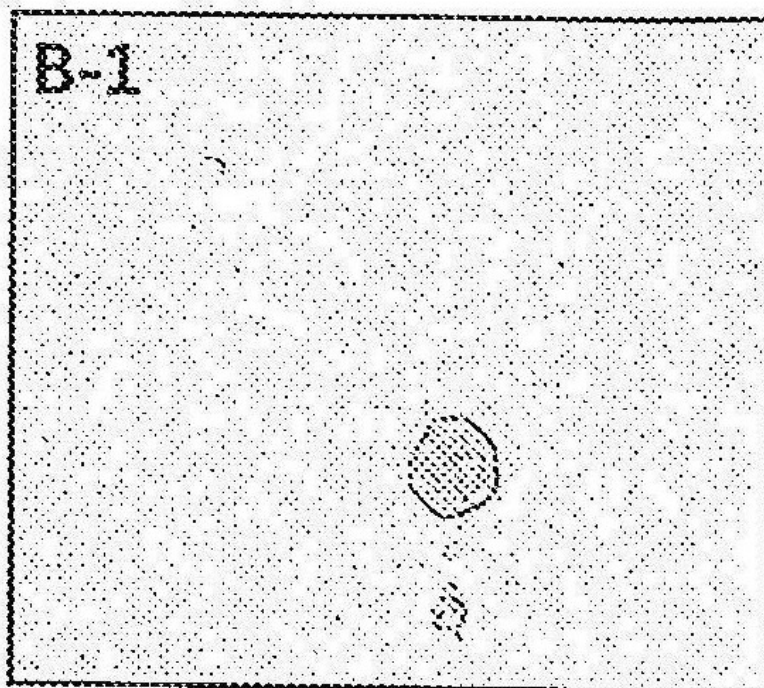


图 15B





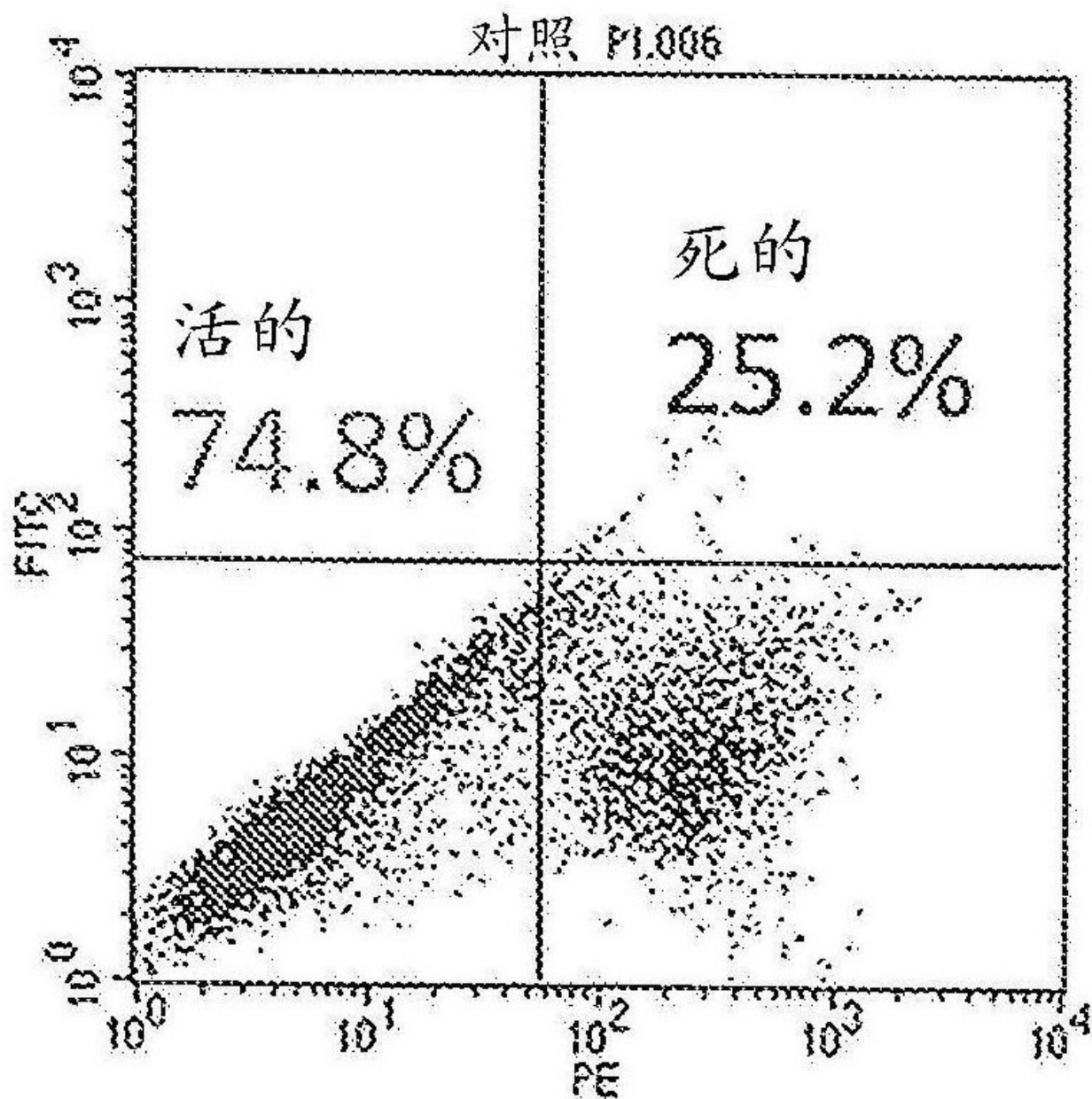


图16

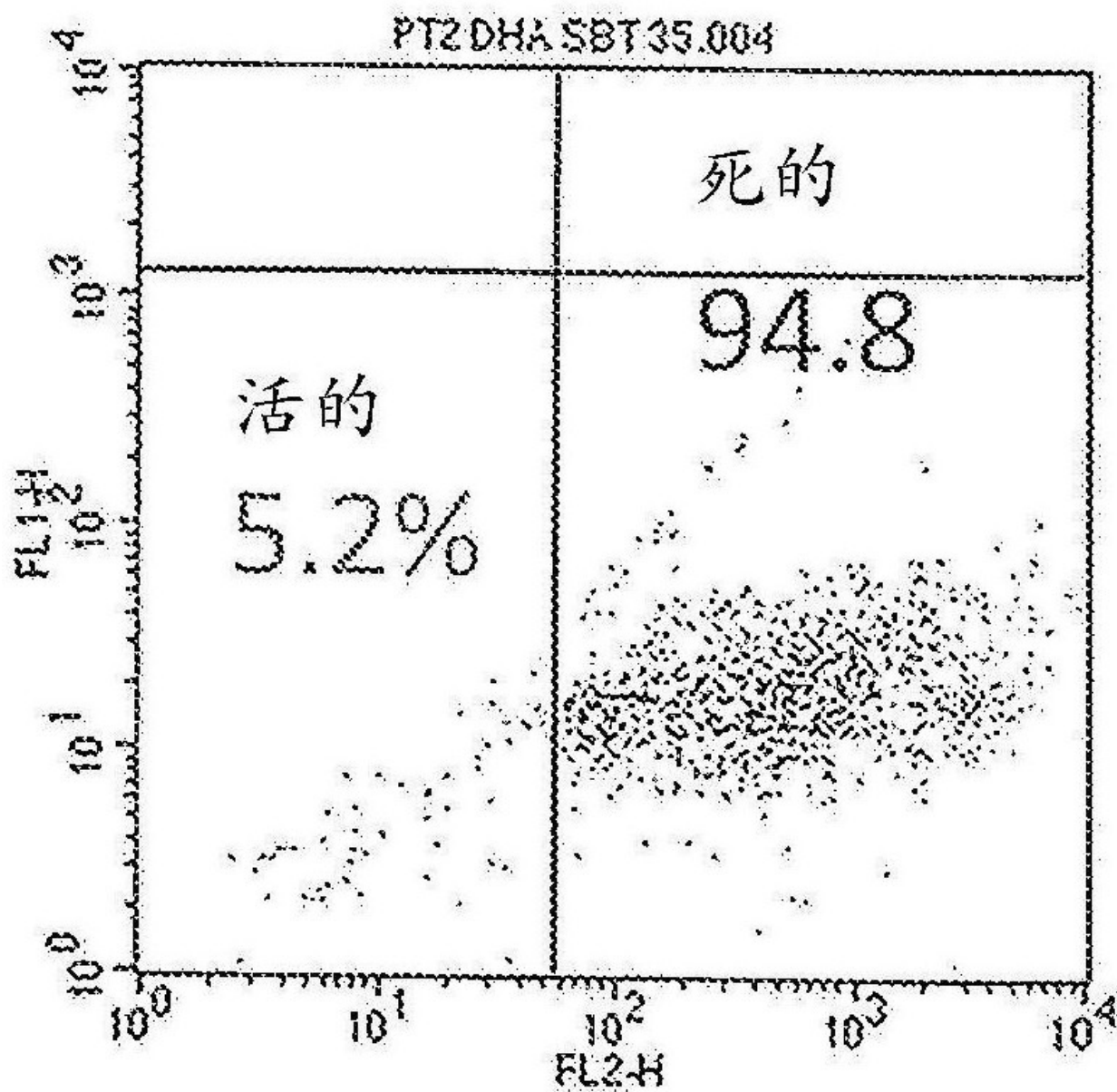
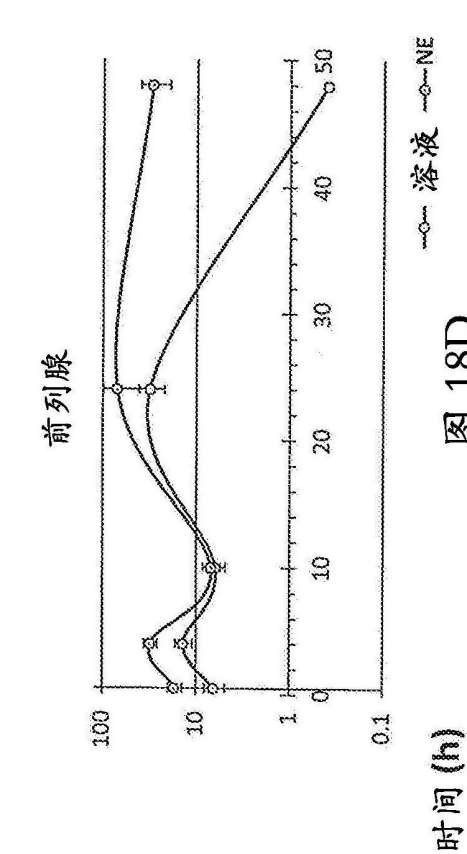
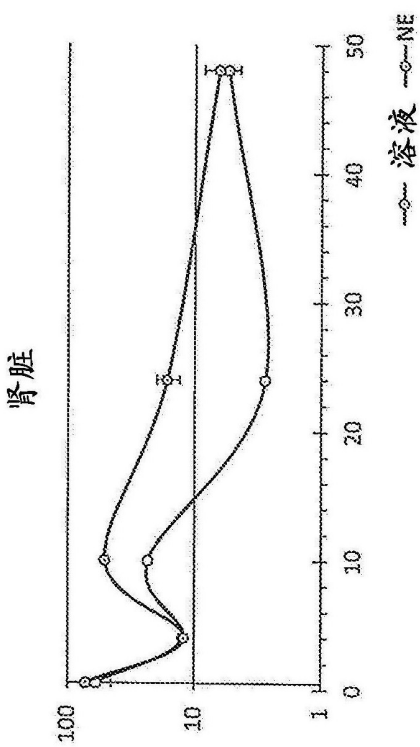
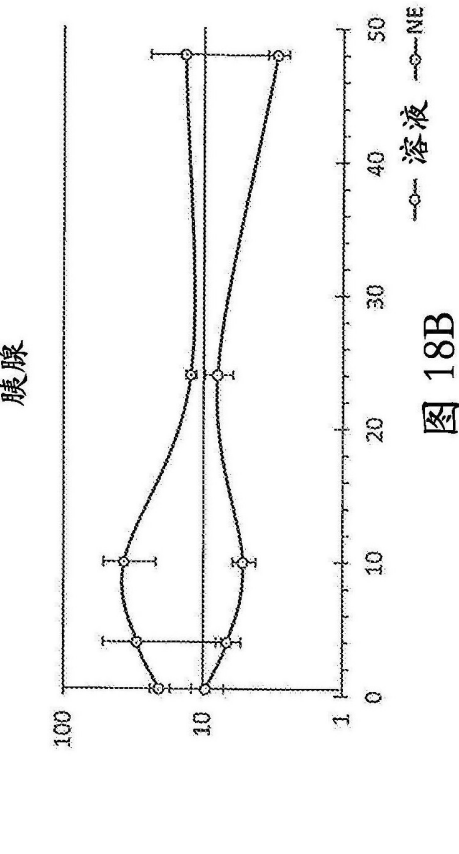
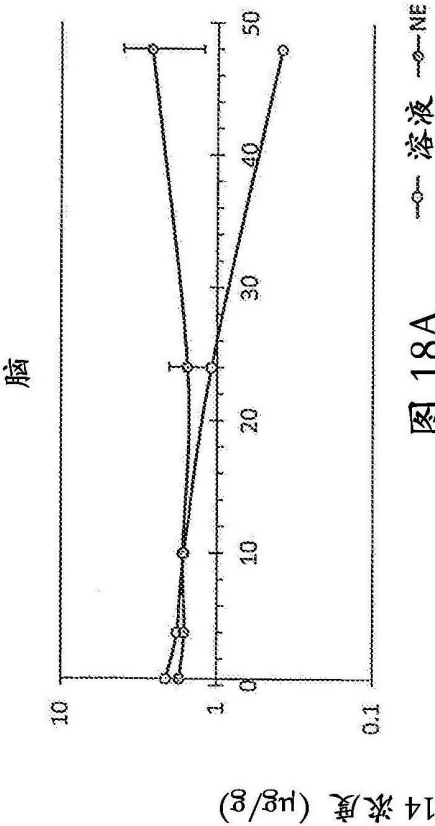


图17

DHA-SBT-1214溶液或纳米乳剂的生物分布



DHA-SBT-1214溶液或纳米乳剂的生物分布

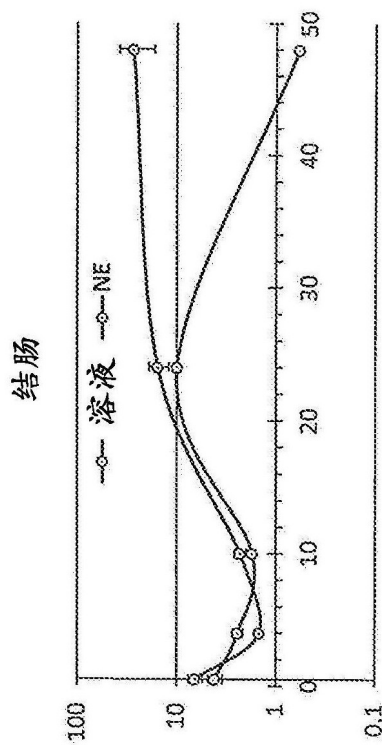


图 18E

肺

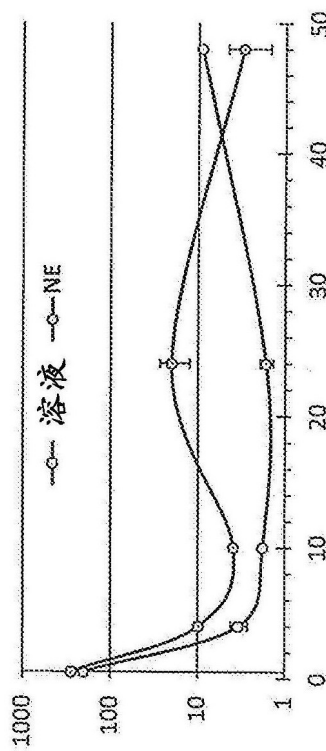


图 18G

时间 (小时)

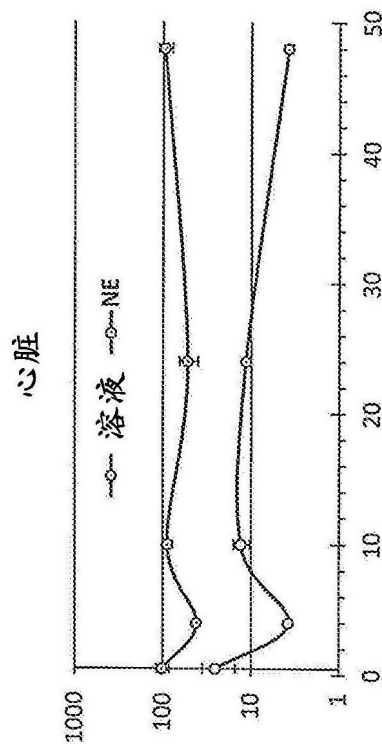


图 18F

肝脏

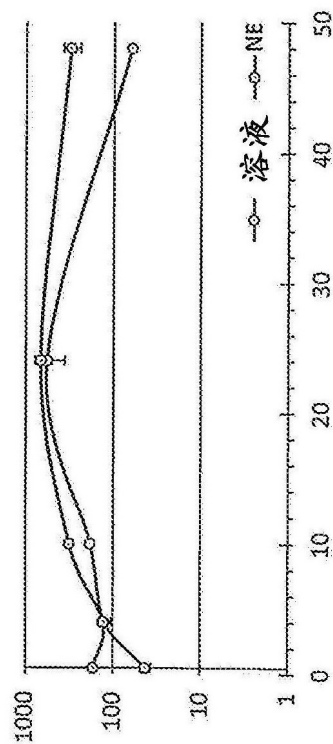
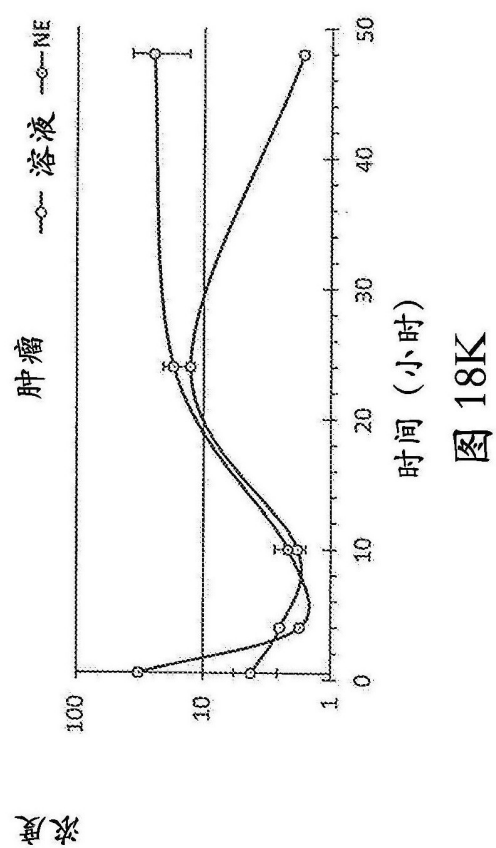
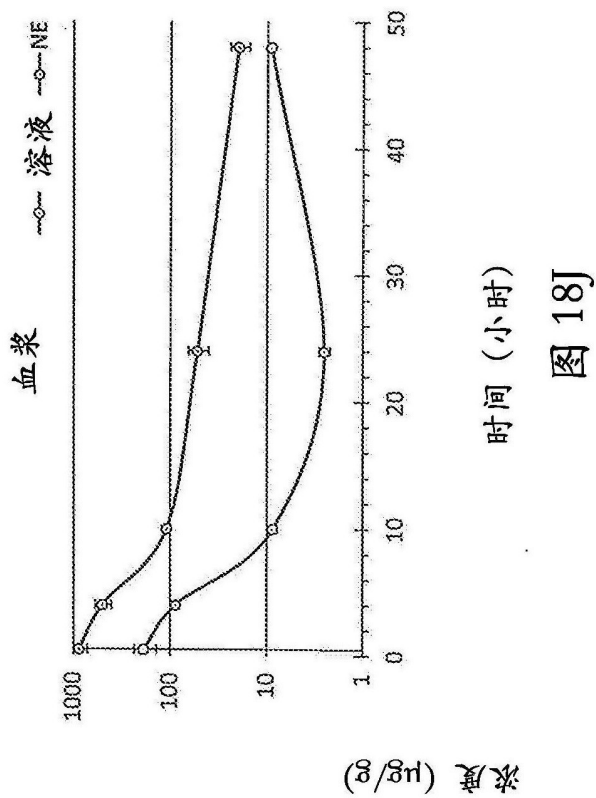
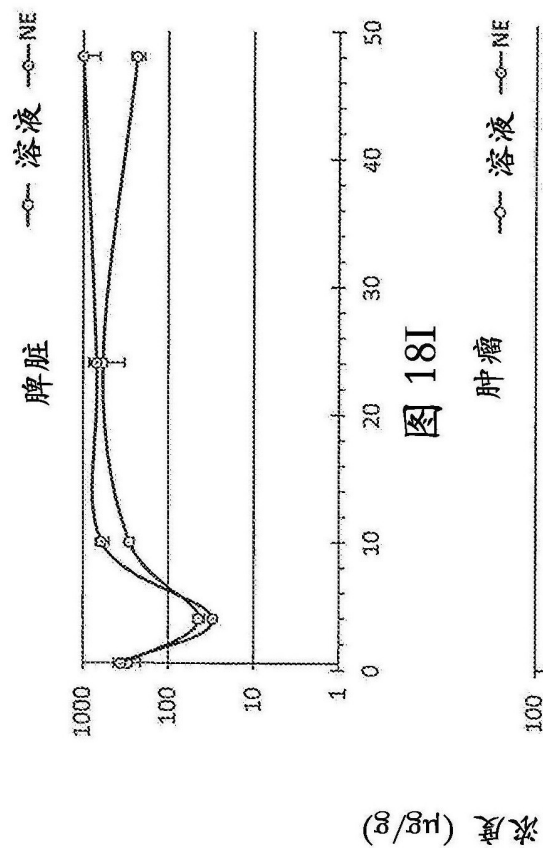


图 18H

## DHA-SBT-1214溶液或纳米乳剂的生物分布



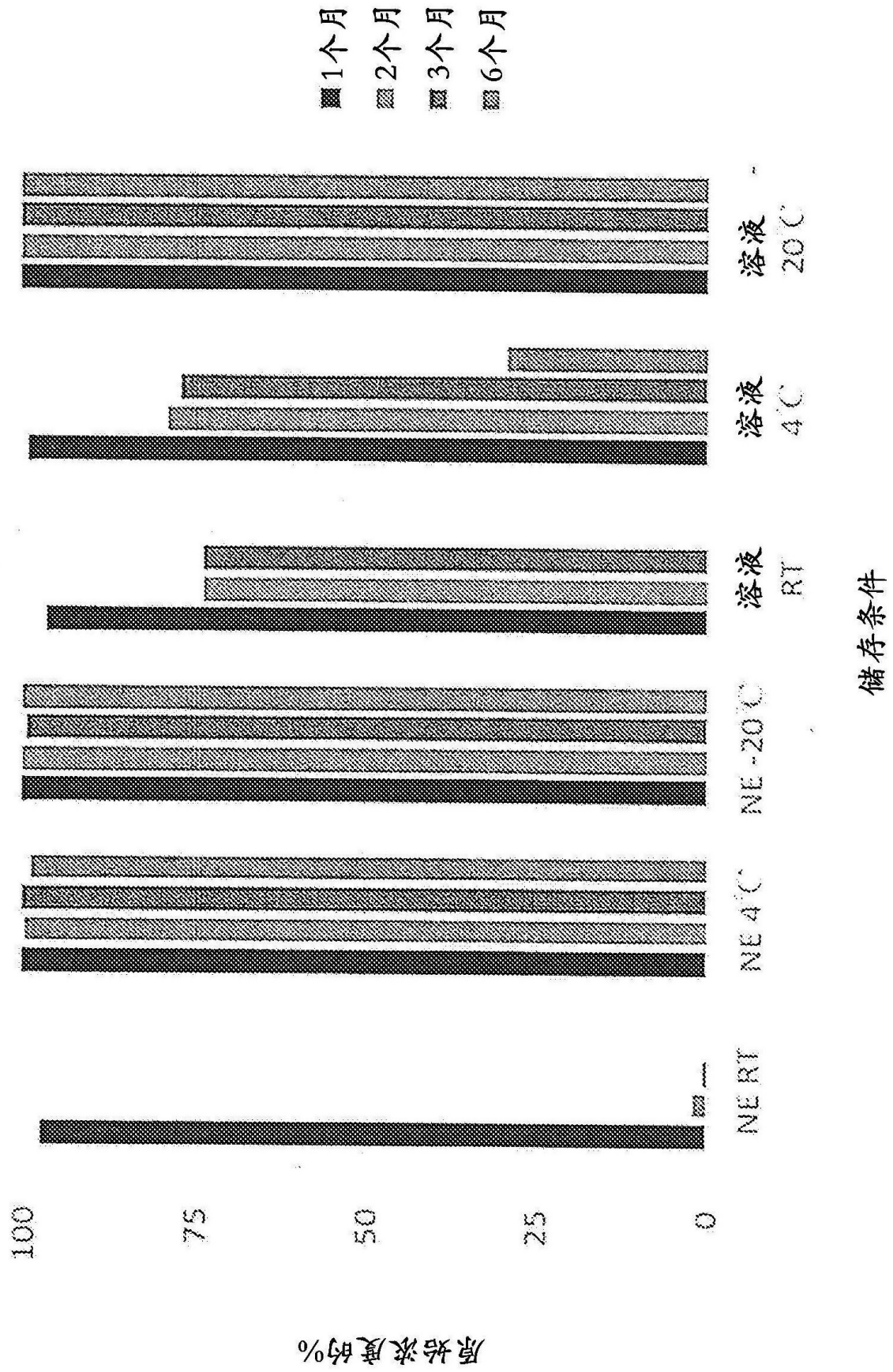


图19A

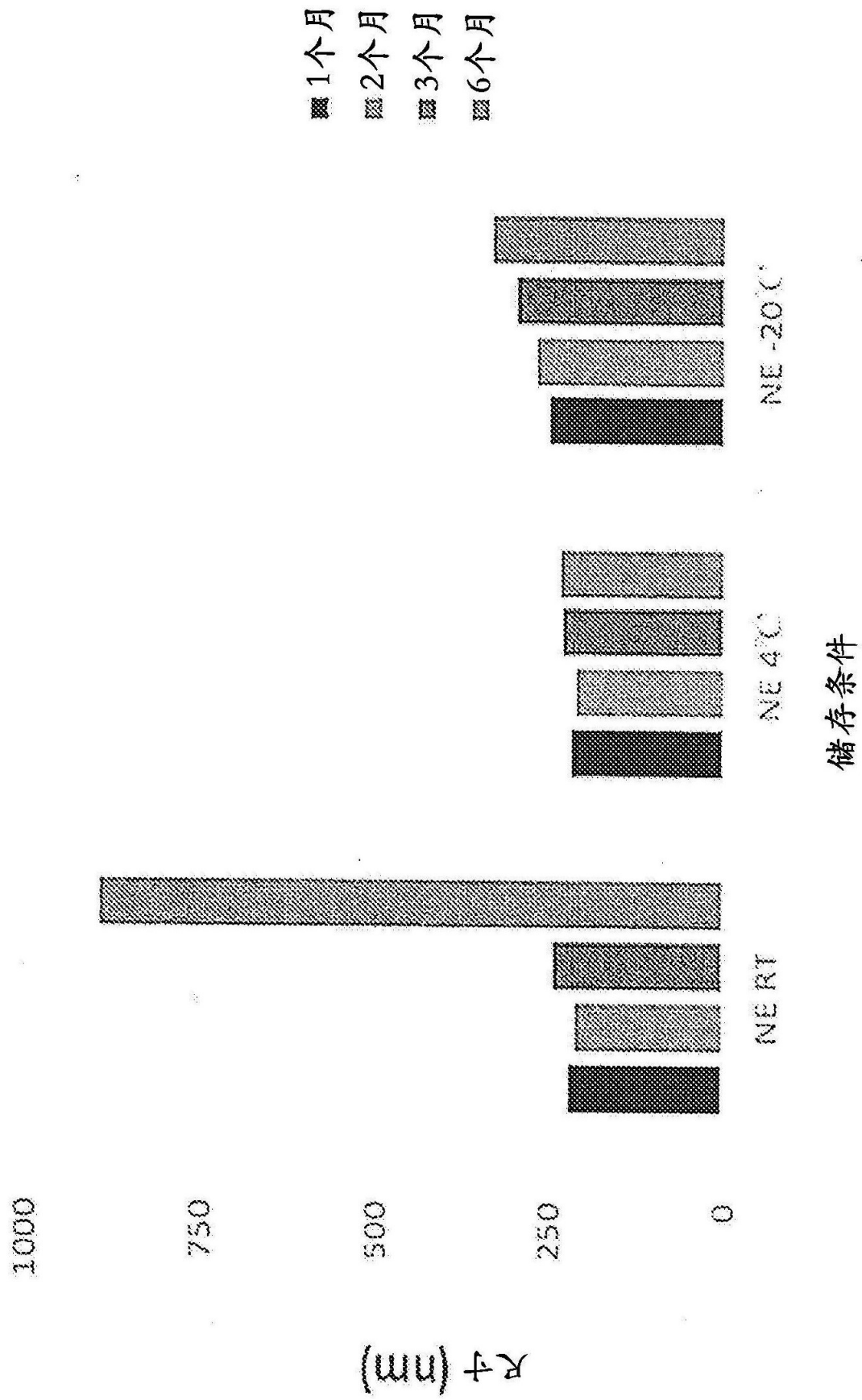


图19B

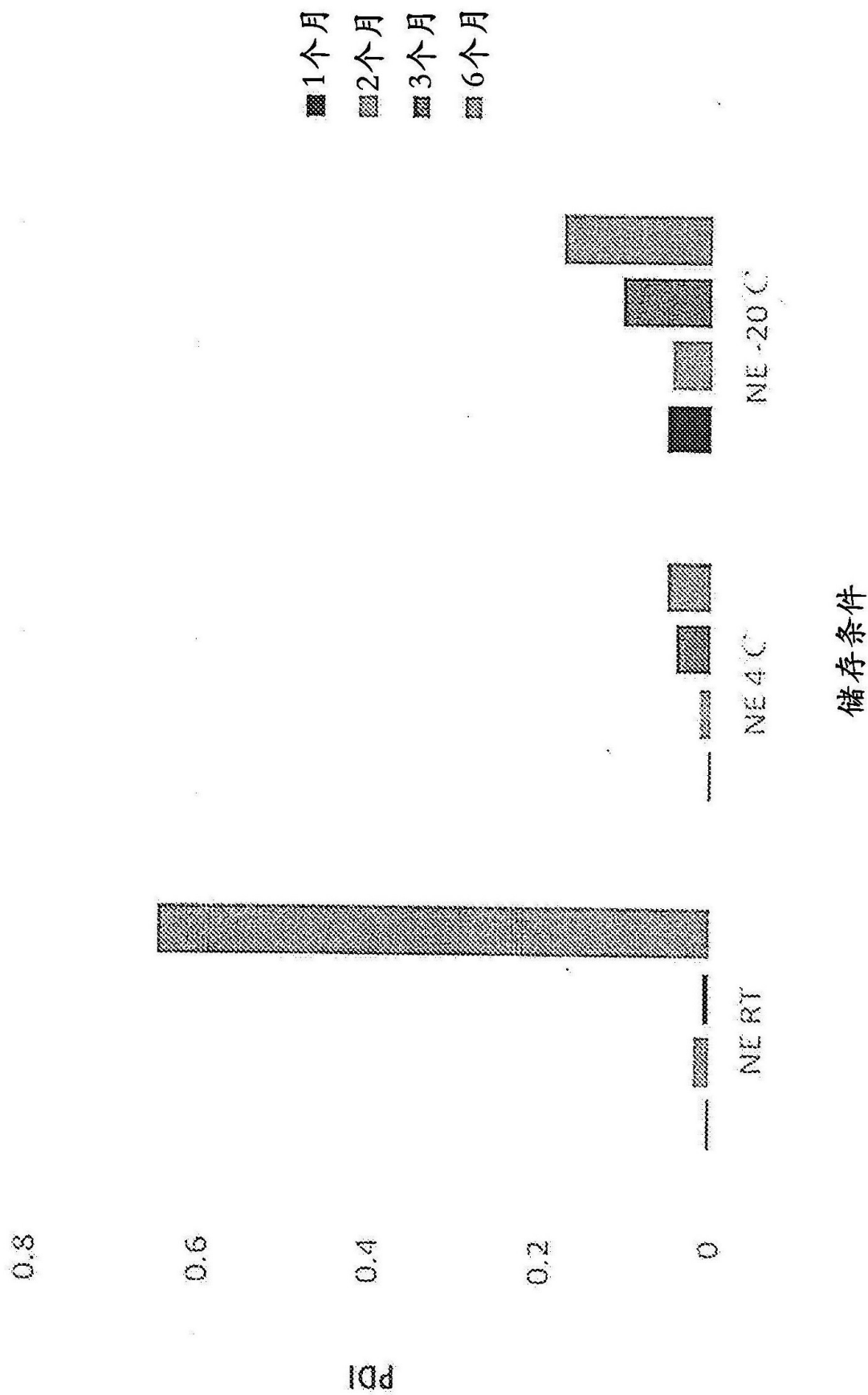


图19C



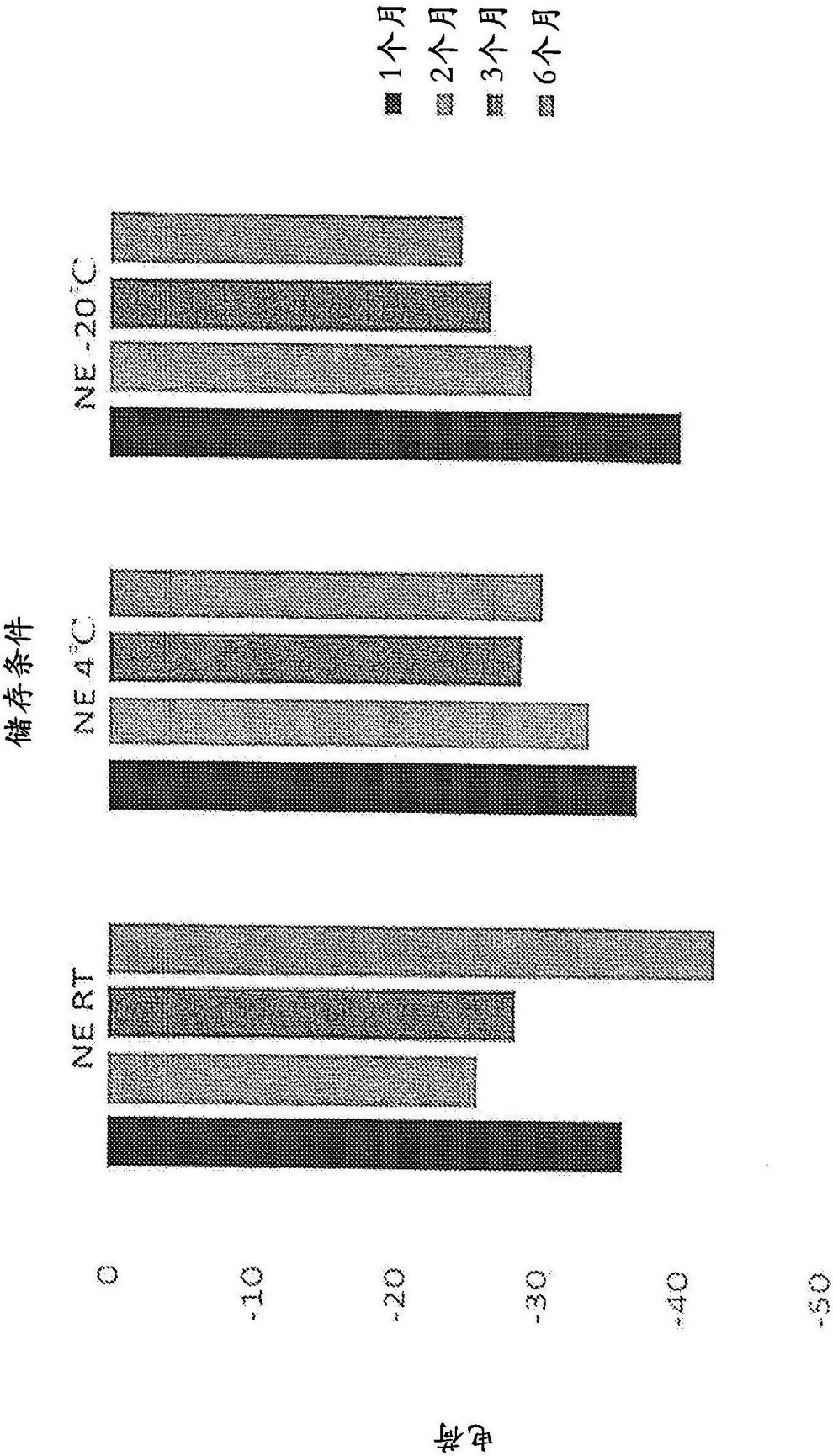


图19D

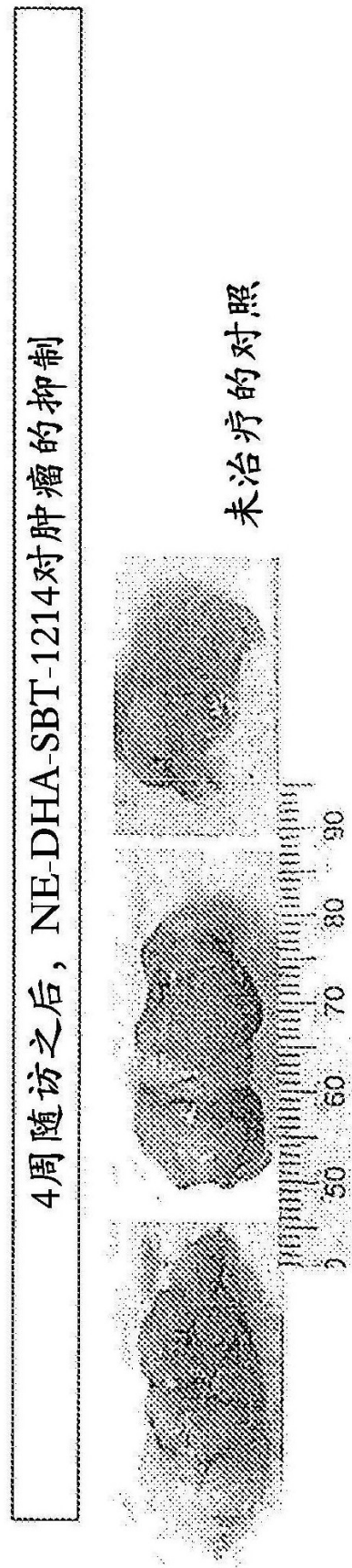


图20A



图20B

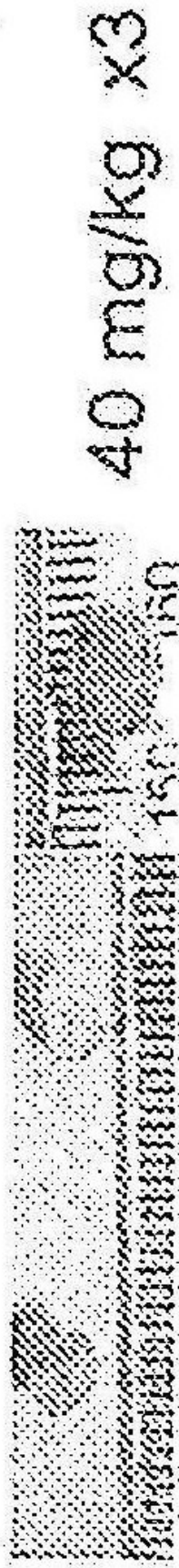


图20C



图20D



图20E

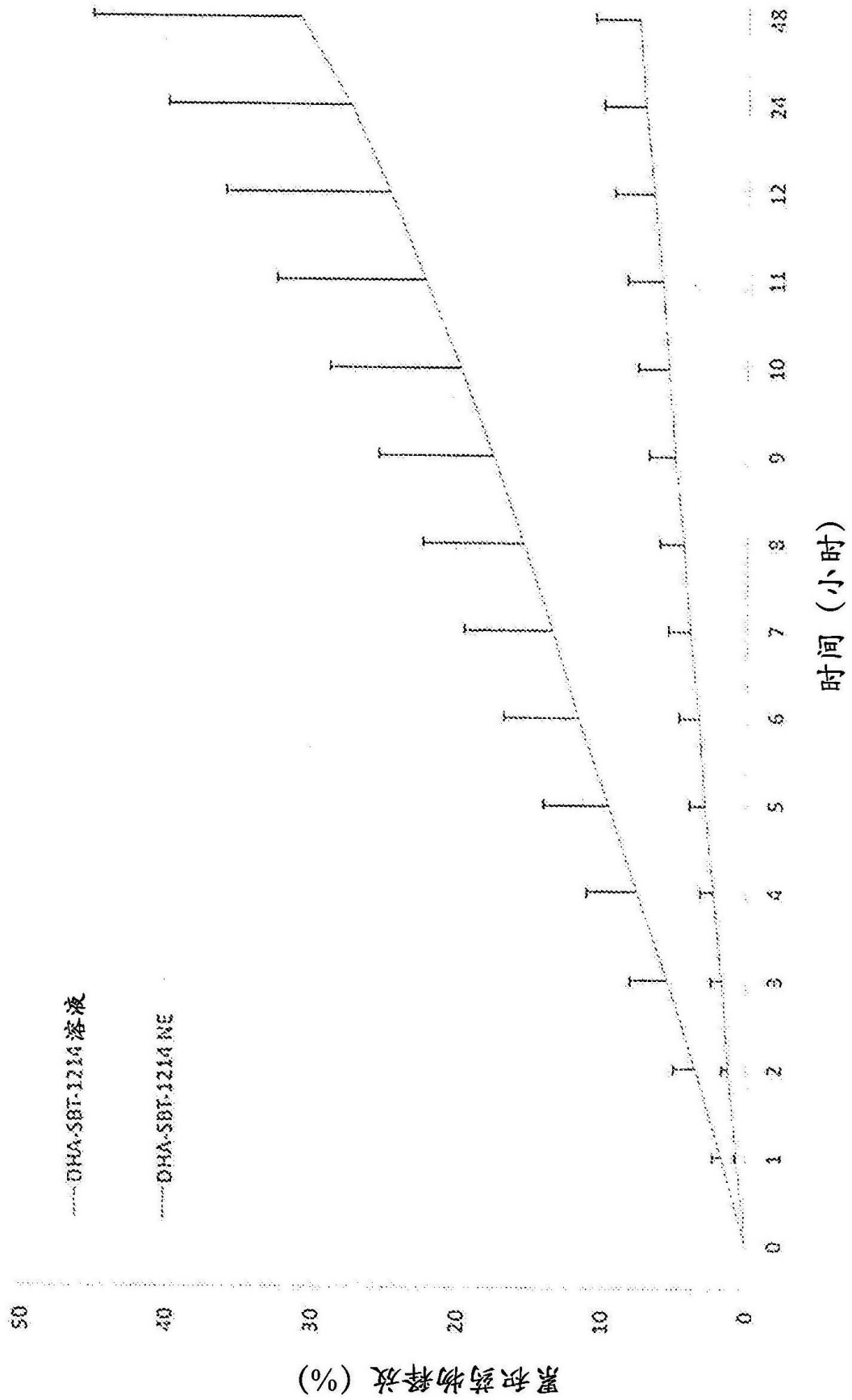


图21