



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113876962 A

(43) 申请公布日 2022. 01. 04

(21) 申请号 202111317319.3

(74) 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限公司 11287

(22) 申请日 2016.04.07

代理人 沈锦华

(30) 优先权数据

62/144,278 2015.04.07 US

62/151,943 2015.04.23 US

(62) 分案原申请数据

201680024624.4 2016.04.07

(71) 申请人 纪念斯隆-凯特琳癌症中心

地址 美国纽约州

申请人 康奈尔大学 密苏里大学董事会

(72) 发明人 巴内·游 汤姆·奎因

米歇尔·布拉德伯里

乌尔里希·维斯纳 贾森·刘易斯

马凯 陈风

(51) Int.Cl.

A61K 47/52 (2017.01)

A61K 47/65 (2017.01)

A61K 47/68 (2017.01)

A61K 47/69 (2017.01)

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 47/10 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 51/10 (2006.01)

A61K 51/12 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

A61K 49/18 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

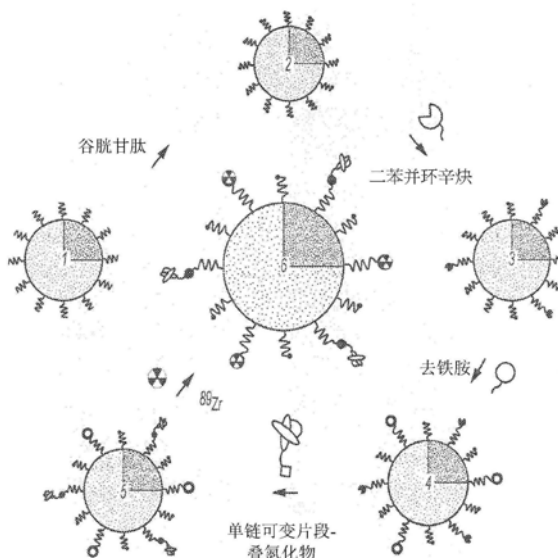
权利要求书1页 说明书18页 附图12页

(54) 发明名称

纳米粒子免疫偶联物

(57) 摘要

本申请涉及纳米粒子免疫偶联物。本文揭示适用于治疗和/或诊断的纳米粒子免疫偶联物。所述免疫偶联物具有不大于20纳米的直径(例如,平均直径)(例如,如通过水溶液、例如盐水溶液中的动态光散射DLS所测量)。在某些实施例中,所述偶联物是附接有单链抗体片段的基于二氧化硅的纳米粒子。



1. 一种免疫偶联物,其包含:  
经有机聚合物涂布的纳米粒子;  
偶联到所述有机聚合物涂布的纳米粒子的抗体片段;和  
通过连接体偶联到所述有机聚合物涂布的纳米粒子的治疗剂;  
其中所述纳米粒子具有不大于20纳米的直径,  
其中所述纳米粒子包含基于二氧化硅的核心和包围所述核心的至少一部分的二氧化硅壳;  
其中所述抗体片段是单链可变片段(scFv);并且  
其中所述有机聚合物是聚乙二醇(PEG)。
2. 根据权利要求1所述的免疫偶联物,其中所述连接体是可裂解连接体。
3. 根据权利要求2所述的免疫偶联物,其中所述可裂解连接体选自由以下组成的群组:  
肽、胍和二硫化物连接体。
4. 根据权利要求1所述的免疫偶联物,其中所述连接体是肽连接体。
5. 根据权利要求1所述的免疫偶联物,其中所述连接体是被溶酶体蛋白酶裂解的肽连接体。
6. 根据权利要求5所述的免疫偶联物,其中所述溶酶体蛋白酶是组织蛋白酶-B。
7. 根据权利要求1所述的免疫偶联物,其中所述连接体是二肽连接体。
8. 根据权利要求7所述的免疫偶联物,其中所述二肽连接体是缬氨酸-瓜氨酸连接体。
9. 根据权利要求1所述的免疫偶联物,其中所述抗体片段为25kDa到30kDa。
10. 根据权利要求1所述的免疫偶联物,其中所述纳米粒子包含在所述核心内的荧光化合物。
11. 根据权利要求1所述的免疫偶联物,其中所述纳米粒子附接有1到10个抗体片段。
12. 根据权利要求1所述的免疫偶联物,其中所述纳米粒子具有不大于15纳米的直径。
13. 根据权利要求1所述的免疫偶联物,其中所述纳米粒子具有介于1nm到20nm范围内的直径。
14. 根据权利要求1所述的免疫偶联物,其中所述抗体片段包含抗VEGF-A。
15. 根据权利要求1所述的免疫偶联物,其中所述免疫偶联物包含一或多种成像剂。
16. 根据权利要求15所述的免疫偶联物,其中所述一或多种成像剂包含PET示踪剂。
17. 根据权利要求15所述的免疫偶联物,其中所述一或多种成像剂包含荧光团。
18. 根据权利要求1所述的免疫偶联物,其中所述治疗剂包含化学治疗药物。
19. 根据权利要求1所述的免疫偶联物,其中所述治疗剂包含放射性同位素。
20. 根据权利要求19所述的免疫偶联物,其中所述放射性同位素是选自由以下组成的群组的成员:<sup>99m</sup>Tc、<sup>111</sup>In、<sup>64</sup>Cu、<sup>67</sup>Ga、<sup>186</sup>Re、<sup>188</sup>Re、<sup>153</sup>Sm、<sup>177</sup>Lu、<sup>67</sup>Cu、<sup>123</sup>I、<sup>124</sup>I、<sup>125</sup>I、<sup>11</sup>C、<sup>13</sup>N、<sup>15</sup>O、<sup>18</sup>F、<sup>186</sup>Re、<sup>188</sup>Re、<sup>153</sup>Sm、<sup>166</sup>Ho、<sup>177</sup>Lu、<sup>149</sup>Pm、<sup>90</sup>Y、<sup>213</sup>Bi、<sup>103</sup>Pd、<sup>109</sup>Pd、<sup>159</sup>Gd、<sup>140</sup>La、<sup>198</sup>Au、<sup>199</sup>Au、<sup>169</sup>Yb、<sup>175</sup>Yb、<sup>165</sup>Dy、<sup>166</sup>Dy、<sup>67</sup>Cu、<sup>105</sup>Rh、<sup>111</sup>Ag、<sup>89</sup>Zr、<sup>225</sup>Ac和<sup>192</sup>Ir。

## 纳米粒子免疫偶联物

[0001] 本申请是申请日为2016年4月7日,申请号为201680024624.4,发明名称为“纳米粒子免疫偶联物”的申请的分案申请。

[0002] 相关申请案的交叉参考

[0003] 本申请案主张于2015年4月7日提出申请的美国申请案第62/144,278号和于2015年4月23日提出申请的美国申请案第62/151,943号的权益,所述申请案的揭示内容的全文以引用方式并入本文中。

### 技术领域

[0004] 本发明通常涉及纳米粒子免疫偶联物(例如,直径小于20纳米),其可用于例如检测、预防和/或治疗癌症和其它疾病。

[0005] 政府资助

[0006] 本发明是在由NIH授予的批准号U54 CA199081-01的政府支持下完成。政府具有本发明中的某些权利。

### 背景技术

[0007] 纳米治疗剂和/或诊断剂递送媒剂通常为大小介于1-1,000nm范围内的大分子或超分子多组分系统,其固有地为治疗剂(例如,不含活性医药成分)或用作治疗剂或诊断剂递送系统。迄今为止,脂质体纳米粒子和生物剂包含较大比例的FDA批准产品数量或临床试验中用于治疗 and/或检测多种癌症类型的产品数量,而多种基于聚合物的粒子调配物目前处于早期试验中。

[0008] 所需候选纳米治疗剂递送系统共享以受控方式纳入和释放药物化合物的共同特征,此可有利地改变药物生物利用度和药代动力学,同时最小化脱靶毒性。理想地,将成像标记纳入其中以评价其精确定位和疾病位点处的滞留。

[0009] 然而,这些系统利用不同机制发挥功能。例如,抗体药物偶联物(ADC)主要通过活性靶向肿瘤细胞和条件性释放药物分子来实现较低药物毒性。在结合细胞表面抗原时,在细胞内化和胞内体摄取后发生活性药物释放。另一方面,基于脂质体和聚合物的药物递送系统通常为被动地负载有较大有效负载(对于Doxil为约10,000个药物分子)或成像剂的显著较大的组装复合体(约20-150nm直径),其通常已缺乏靶向能力(BIND-014除外)。因此,这些复合体主要依赖于熟知的高渗透滞留(EPR)效应来成功地递送纳米调配药物。尽管脂质体的间隙渗透可因其大小而较差,但游离药物通过未完全理解的多种机制释放。例如,阿巴生(Abraxane,约140nm)依赖于不同方式来增强疏水化合物的生物利用度。在此情形下,白蛋白和药物(紫杉酚)的特定调配物形成初始复合体,估计其在注射时进而分散成较小的蛋白质-药物聚集体。

[0010] 转移性疾病可有效地用免疫疗法来治疗;然而,较大亚群将因缺乏抗原突变或癌症的免疫逃避性质而无反应。另外,尽管辐射疗法(RT)是癌症的标准治疗,但会发生局部失效。临床前数据指示,RT可加强免疫疗法的全身效能,同时活化先天和适应性免疫系统可增

强RT的局部效能。

[0011] 业内仍需要可用于检测、预防和/或治疗癌症和其它疾病的平台。

### 发明内容

[0012] 本文描述靶向诊断和/或治疗平台的靶特异性纳米粒子免疫偶联物(例如,结合到粒子表面的单链抗体片段)。在某些实施例中,纳米粒子免疫偶联物的直径小于20nm(例如,6到10nm)。发现此小大小在治疗和/或成像应用中提供优点。例如,所揭示免疫偶联物可提供经改良的患病组织靶向和减少的器官(例如,肝)非特异性摄取。较小免疫偶联物还可展示降低的免疫反应性,由此进一步改良效能。

[0013] 本文还描述包含免疫偶联物和治疗性放射性同位素的多治疗剂平台。在某些实施例中,免疫偶联物和治疗性放射性同位素协作递送用于组合辐射疗法和免疫疗法的协同作用。在某些实施例中,将抗体片段和治疗性放射性同位素附接到纳米粒子,由此产生靶特异性纳米粒子免疫偶联物。给定纳米粒子可附接有放射性核素(放射性同位素)和抗体(和/或抗体片段)二者(在所述情形下,免疫偶联物是放射性免疫偶联物)。另外,在一些实施例中,一部分所投与纳米粒子附接有放射性核素(共价或非共价键结,或以其它方式与纳米粒子缔合),而其它所投与纳米粒子附接有抗体片段。多个实施例还包括组合疗法,其中现有(例如,传统)放射性疗法与投与本文所述的纳米粒子免疫偶联物组合,或现有(例如,传统)免疫疗法与投与纳米粒子放射性偶联物(纳米粒子与放射性同位素结合)组合。

[0014] 在某些实施例中,靶特异性纳米粒子免疫偶联物包含靶向肽。在某些实施例中,治疗性放射性同位素与靶特异性纳米粒子免疫偶联物分开递送(例如,通过辐射疗法或通过附接到单独靶特异性纳米粒子)。在某些实施例中,免疫疗法与靶特异性免疫偶联物分开递送。在某些实施例中,将抗体片段附接到一个聚乙二醇(PEG)部分(通过特定螯合剂)且将放射性同位素附接到另一PEG部分(通过另一螯合剂)。然后将PEG部分附接到纳米粒子。

[0015] 在一个方面中,本发明涉及免疫偶联物,其包含:纳米粒子;和偶联到纳米粒子的抗体片段,其中纳米粒子具有不大于20纳米的直径(例如,平均直径)(例如,如通过水溶液、例如盐水溶液中的动态光散射(DLS)所测量)(例如,其中平均纳米粒子直径为1到20nm,例如1到15nm,例如1到10nm,例如1到8nm,例如4到10nm,例如4到8nm)(例如,其中免疫偶联物具有不大于50nm、例如不大于40nm、例如不大于30nm、例如不大于20nm、例如不大于15nm、例如不大于10nm的平均直径)。

[0016] 在某些实施例中,抗体片段通过连接体共价或非共价键结到纳米粒子或直接共价或非共价键结到纳米粒子,或例如通过范德华力(van der Waals force)与纳米粒子或包围纳米粒子的组合物缔合。

[0017] 在某些实施例中,纳米粒子经有机聚合物(例如,聚乙二醇(PEG))涂布(例如,其中免疫偶联物包含螯合剂)。

[0018] 在某些实施例中,靶向肽(例如, $\alpha$ MSH、已知具有免疫调节和抗炎性质的任一肽)。

[0019] 在某些实施例中,抗体片段在约5kDa到约25kDa范围内(例如约10kDa到约20kDa,例如约15kDa)(例如,其中抗体片段包含功能性单结构域抗体片段)。

[0020] 在某些实施例中,抗体片段为约20kDa到约45kDa(例如约25kDa到约30kDa)(例如,

其中抗体片段包含功能性单链抗体片段)。

[0021] 在某些实施例中,抗体片段为约40kDa到约80kDa(例如约50kDa到约70kDa,例如约60kDa)(例如,其中抗体片段包含功能性fab片段)。

[0022] 在某些实施例中,纳米粒子包含二氧化硅。

[0023] 在某些实施例中,纳米粒子包含基于二氧化硅的核心和包围核心的至少一部分的二氧化硅壳。

[0024] 在某些实施例中,纳米粒子包含核心内的荧光化合物。

[0025] 在某些实施例中,抗体片段是选自由重组抗体片段(fAb)、单链可变片段(scFv)和单结构域抗体(sdAb)片段组成的集合的成员。

[0026] 在某些实施例中,抗体片段是单链可变片段(scFv)。

[0027] 在某些实施例中,抗体片段是单结构域(sdAb)片段。

[0028] 在某些实施例中,纳米粒子(单一纳米粒子)附接有1到10个抗体片段(例如1到7个,例如1到5个,例如2到7个,例如2到5个,例如1到4个,例如2到4个)。

[0029] 在某些实施例中,抗体片段通过PEG部分和螯合剂偶联到纳米粒子。

[0030] 在某些实施例中,纳米粒子具有不大于15纳米(例如不大于13纳米,例如不大于10纳米)的直径(例如,平均直径)。

[0031] 在某些实施例中,纳米粒子具有介于1nm到20nm范围内的直径(例如,平均直径)(例如2nm到15nm,例如5nm到15nm,例如1nm到10nm,例如2nm到10nm,例如5nm到10nm)。

[0032] 在某些实施例中,抗体片段包含选自由抗CEA scFv、抗GPIIb/IIIa、抗VEGF-A和抗TNF- $\alpha$ (例如,聚乙二醇化)组成的集合的成员。

[0033] 在某些实施例中,免疫偶联物包含一或多种成像剂(例如,在纳米粒子内、附接到纳米粒子和/或附接到抗体片段)。

[0034] 在某些实施例中,一或多种成像剂包含PET示踪剂(例如, $^{89}\text{Zr}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 和/或 $^{18}\text{F}$ 氟脱氧葡萄糖)。

[0035] 在某些实施例中,一或多种成像剂包含荧光团(例如酞菁)。

[0036] 在某些实施例中,免疫偶联物进一步包含治疗剂(例如,其中治疗剂附接到纳米粒子,或附接到抗体片段,或附接到纳米粒子和抗体片段二者,例如其中附接为共价或非共价)。

[0037] 在某些实施例中,治疗剂包含化学治疗药物(例如,索拉菲尼(sorafenib)、紫杉酚(paclitaxel)、多西他赛(docetaxel)、MEK162、依托泊苷(etoposide)、拉帕替尼(lapatinib)、尼罗替尼(nilotinib)、克唑替尼(crizotinib)、氟维司群(fulvestrant)、维罗非尼(vemurafenib)、贝沙罗汀(bexorotene)和/或喜树碱(camptotecin))。

[0038] 在某些实施例中,治疗剂包含放射性同位素(例如,其中放射性同位素通过第二螯合剂附接到纳米粒子)(例如,其中放射性同位素是治疗性放射性同位素)。

[0039] 在某些实施例中,放射性同位素是选自由以下组成的群组的成员: $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{124}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{11}\text{C}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{15}\text{O}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{149}\text{Pm}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{213}\text{Bi}$ 、 $^{103}\text{Pd}$ 、 $^{109}\text{Pd}$ 、 $^{159}\text{Gd}$ 、 $^{140}\text{La}$ 、 $^{198}\text{Au}$ 、 $^{199}\text{Au}$ 、 $^{169}\text{Yb}$ 、 $^{175}\text{Yb}$ 、 $^{165}\text{Dy}$ 、 $^{166}\text{Dy}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{105}\text{Rh}$ 、 $^{111}\text{Ag}$ 、 $^{89}\text{Zr}$ 、 $^{225}\text{Ac}$ 和 $^{192}\text{Ir}$ 。

[0040] 在另一方面中,本发明涉及治疗疾病或病况的方法,所述方法包含向个体投与包

含免疫偶联物的医药组合物(例如,以靶向特定类型的组织,例如癌症)。

[0041] 在某些实施例中,所述方法包含投与治疗性放射性同位素(例如,其中治疗性放射性同位素附接到具有不大于20纳米直径(例如,平均直径)的第二纳米粒子(例如,如通过水溶液、例如盐水溶液中的动态光散射(DLS)所测量)(例如,其中放射性同位素通过第二螯合剂附接到第二纳米粒子))(例如,其中第二纳米粒子具有1到20nm、例如1到15nm、例如1到10nm、例如1到8nm、例如4到10nm、例如4到8nm的直径)。

[0042] 在另一方面中,本发明涉及治疗疾病或病况的方法,所述方法包含向个体投与包含免疫偶联物的医药组合物(例如,以靶向特定类型的组织,例如癌症)(例如,用于组合辐射疗法和免疫疗法)。

[0043] 在某些实施例中,医药组合物进一步包含载剂。

[0044] 在另一方面中,本发明涉及体内成像(例如,手术中成像)的方法,所述方法包含:向个体投与包含免疫偶联物的组合物(例如,使得免疫偶联物优先在特定区域中、例如在特定组织类型、例如癌症附近或其内聚集),其中免疫偶联物包含成像剂;和检测(例如,通过PET、X射线、MRI、CT等)成像剂。

[0045] 在另一方面中,本发明涉及制备免疫偶联物的方法,所述方法包含:使纳米粒子-PEG-硫醇与蛋白质-马来酰亚胺接触,由此产生免疫偶联物。

[0046] 在某些实施例中,所述方法进一步包含使纳米粒子与一或多种化合物反应,一或多种化合物包含硫醇部分和胺部分(例如,半胱氨酸甲酯或半胱胺-HCl),由此产生纳米粒子-PEG-胺;使纳米粒子-PEG-胺与SPDP反应,然后自产物移除吡啶2-硫酮(例如,使用TCEP),由此产生纳米粒子-PEG-硫醇。

[0047] 在另一方面中,本发明涉及制备免疫偶联物的方法,所述方法包含:用第一点击(click)反应性基团(例如,甲基四嗪-PEG4-NHS酯)修饰抗体片段(蛋白质);用第一点击反应性基团的点击搭配物(例如,TCO-PEG4-NHS酯)修饰纳米粒子-PEG-胺;和使经修饰抗体片段与经修饰纳米粒子-PEG反应,由此产生免疫偶联物。

[0048] 在某些实施例中,所述方法进一步包含使纳米粒子与一或多种化合物反应,一或多种化合物包含硫醇部分和胺部分(例如,半胱氨酸甲酯或半胱胺-HCl),由此产生纳米粒子-PEG-胺。

[0049] 在另一方面中,本发明涉及治疗疾病或病况的方法,所述方法包含向个体投与组合物(例如医药组合物),其包含:纳米粒子;和偶联到纳米粒子的治疗性放射性同位素(例如,通过连接体共价或非共价键结到纳米粒子或直接共价或非共价键结到纳米粒子,或例如通过范德华力与纳米粒子或包围纳米粒子的组合物缔合),其中纳米粒子具有不大于20纳米的直径(例如,平均直径)(例如,如通过水溶液、例如盐水溶液中的动态光散射(DLS)所测量)(例如,其中平均纳米粒子直径为1到20nm,例如1到15nm,例如1到10nm,例如1到8nm,例如4到10nm,例如4到8nm)(例如,以靶向特定类型的组织,例如癌症)。

[0050] 在某些实施例中,所述方法包含投与免疫疗法(例如,其中免疫疗法包含向个体投与包含免疫偶联物的医药组合物)。

[0051] 在另一方面中,本发明涉及免疫偶联物,其包含:纳米粒子;和偶联到纳米粒子的抗体片段(例如,通过连接体共价或非共价键结到纳米粒子或直接共价或非共价键结到纳米粒子,或例如通过范德华力与纳米粒子或包围纳米粒子的组合物缔合),其中纳米粒子具

有不大于20纳米的直径(例如,平均直径)(例如,如通过水溶液、例如盐水溶液中的动态光散射(DLS)所测量)(例如,其中平均纳米粒子直径为1到20nm,例如1到15nm,例如1到10nm,例如1到8nm,例如4到10nm,例如4到8nm)(例如,其中免疫偶联物具有不大于50nm、例如不大于40nm、例如不大于30nm、例如不大于20nm、例如不大于15nm、例如不大于10nm的平均直径)(例如,其中纳米粒子经有机聚合物(例如,聚乙二醇(PEG))涂布(例如,其中免疫偶联物包含螯合剂)),其用于治疗个体的疾病或病况的方法中,其中治疗包含:将免疫偶联物递送到个体;和递送治疗性放射性同位素(例如,其中治疗性放射性同位素附接到具有不大于20纳米直径(例如,平均直径)的第二纳米粒子(例如,如通过水溶液、例如盐水溶液中的动态光散射(DLS)所测量)(例如,其中放射性同位素通过第二螯合剂附接到第二纳米粒子))。

[0052] 在另一方面中,本发明涉及免疫偶联物,其包含:纳米粒子;治疗性放射性同位素(例如,其中放射性同位素通过第二螯合剂附接到纳米粒子)(例如,其中放射性同位素是治疗性放射性同位素);和偶联到纳米粒子的抗体片段(例如,通过连接体共价或非共价键结到纳米粒子或直接共价或非共价键结到纳米粒子,或例如通过范德华力与纳米粒子或包围纳米粒子的组合物缔合),其中纳米粒子具有不大于20纳米的直径(例如,平均直径)(例如,如通过水溶液、例如盐水溶液中的动态光散射(DLS)所测量)(例如,其中平均纳米粒子直径为1到20nm,例如1到15nm,例如1到10nm,例如1到8nm,例如4到10nm,例如4到8nm)(例如,其中免疫偶联物具有不大于50nm、例如不大于40nm、例如不大于30nm、例如不大于20nm、例如不大于15nm、例如不大于10nm的平均直径)(例如,其中纳米粒子经有机聚合物(例如,聚乙二醇(PEG))涂布(例如,其中免疫偶联物包含螯合剂)),其用于治疗个体的疾病或病况的方法中,其中治疗包含:将免疫偶联物递送到个体。

[0053] 在另一方面中,本发明涉及免疫偶联物,其包含纳米粒子;和偶联到纳米粒子的抗体片段(例如,通过连接体共价或非共价键结到纳米粒子或直接共价或非共价键结到纳米粒子,或例如通过范德华力与纳米粒子或包围纳米粒子的组合物缔合),其中纳米粒子具有不大于20纳米的直径(例如,平均直径)(例如,如通过水溶液、例如盐水溶液中的动态光散射(DLS)所测量)(例如,其中平均纳米粒子直径为1到20nm,例如1到15nm,例如1到10nm,例如1到8nm,例如4到10nm,例如4到8nm)(例如,其中免疫偶联物具有不大于50nm、例如不大于40nm、例如不大于30nm、例如不大于20nm、例如不大于15nm、例如不大于10nm的平均直径)(例如,其中纳米粒子经有机聚合物(例如,聚乙二醇(PEG))涂布(例如,其中免疫偶联物包含螯合剂)),且其中免疫偶联物包含成像剂,其用于体内诊断个体的疾病或病况的方法中,其中体内诊断包含:将免疫偶联物递送到个体;和检测(例如,通过PET、X射线、MRI、CT等)成像剂。

[0054] 在另一方面中,本发明涉及免疫偶联物,其包含:纳米粒子;和偶联到纳米粒子的抗体片段(例如,通过连接体共价或非共价键结到纳米粒子或直接共价或非共价键结到纳米粒子,或例如通过范德华力与纳米粒子或包围纳米粒子的组合物缔合),其中纳米粒子具有不大于20纳米的直径(例如,平均直径)(例如,如通过水溶液、例如盐水溶液中的动态光散射(DLS)所测量)(例如,其中平均纳米粒子直径为1到20nm,例如1到15nm,例如1到10nm,例如1到8nm,例如4到10nm,例如4到8nm)(例如,其中免疫偶联物具有不大于50nm、例如不大于40nm、例如不大于30nm、例如不大于20nm、例如不大于15nm、例如不大于10nm的平均直径)(例如,其中纳米粒子经有机聚合物(例如,聚乙二醇(PEG))涂布(例如,其中免疫偶联物包

含螯合剂)),且其中免疫偶联物包含成像剂,其用于(a)治疗个体的疾病或病况的方法或(b)体内诊断个体的疾病或病况的方法中,其中所述方法包含:向个体投与包含免疫偶联物的医药组合物(例如,以靶向特定类型的组织,例如癌症);和任选地检测(例如,通过PET、X射线、MRI、CT等)成像剂。

[0055] 在另一方面中,本发明涉及免疫偶联物,其包含纳米粒子;和偶联到纳米粒子的抗体片段(例如,通过连接体共价或非共价键结到纳米粒子或直接共价或非共价键结到纳米粒子,或例如通过范德华力与纳米粒子或包围纳米粒子的组合物缔合),其中纳米粒子具有不大于20纳米的直径(例如,平均直径)(例如,如通过水溶液、例如盐水溶液中的动态光散射(DLS)所测量)(例如,其中平均纳米粒子直径为1到20nm,例如1到15nm,例如1到10nm,例如1到8nm,例如4到10nm,例如4到8nm)(例如,其中免疫偶联物具有不大于50nm、例如不大于40nm、例如不大于30nm、例如不大于20nm、例如不大于15nm、例如不大于10nm的平均直径)(例如,其中纳米粒子经有机聚合物(例如,聚乙二醇(PEG))涂布(例如,其中免疫偶联物包含螯合剂)),其用于疗法中。

[0056] 在另一方面中,本发明涉及免疫偶联物,其包含:纳米粒子;治疗性放射性同位素(例如,其中放射性同位素通过第二螯合剂附接到纳米粒子)(例如,其中放射性同位素是治疗性放射性同位素);和偶联到纳米粒子的抗体片段(例如,通过连接体共价或非共价键结到纳米粒子或直接共价或非共价键结到纳米粒子,或例如通过范德华力与纳米粒子或包围纳米粒子的组合物缔合),其中纳米粒子具有不大于20纳米的直径(例如,平均直径)(例如,如通过水溶液、例如盐水溶液中的动态光散射(DLS)所测量)(例如,其中平均纳米粒子直径为1到20nm,例如1到15nm,例如1到10nm,例如1到8nm,例如4到10nm,例如4到8nm)(例如,其中免疫偶联物具有不大于50nm、例如不大于40nm、例如不大于30nm、例如不大于20nm、例如不大于15nm、例如不大于10nm的平均直径)(例如,其中纳米粒子经有机聚合物(例如,聚乙二醇(PEG))涂布(例如,其中免疫偶联物包含螯合剂)),其用于疗法中。

[0057] 在另一方面中,本发明涉及免疫偶联物,其包含:纳米粒子;和偶联到纳米粒子的抗体片段(例如,通过连接体共价或非共价键结到纳米粒子或直接共价或非共价键结到纳米粒子,或例如通过范德华力与纳米粒子或包围纳米粒子的组合物缔合),其中纳米粒子具有不大于20纳米的直径(例如,平均直径)(例如,如通过水溶液、例如盐水溶液中的动态光散射(DLS)所测量)(例如,其中平均纳米粒子直径为1到20nm,例如1到15nm,例如1到10nm,例如1到8nm,例如4到10nm,例如4到8nm)(例如,其中免疫偶联物具有不大于50nm、例如不大于40nm、例如不大于30nm、例如不大于20nm、例如不大于15nm、例如不大于10nm的平均直径)(例如,其中纳米粒子经有机聚合物(例如,聚乙二醇(PEG))涂布(例如,其中免疫偶联物包含螯合剂)),且其中免疫偶联物包含成像剂,其用于体内诊断中。

[0058] 在另一方面中,本发明涉及组合物(例如,医药组合物),其包含:纳米粒子;和偶联到纳米粒子的治疗性放射性同位素(例如,通过连接体共价或非共价键结到纳米粒子或直接共价或非共价键结到纳米粒子,或例如通过范德华力与纳米粒子或包围纳米粒子的组合物缔合),其中纳米粒子具有不大于20纳米的直径(例如,平均直径)(例如,如通过水溶液、例如盐水溶液中的动态光散射(DLS)所测量)(例如,其中平均纳米粒子直径为1到20nm,例如1到15nm,例如1到10nm,例如1到8nm,例如4到10nm,例如4到8nm)(例如,其中纳米粒子经有机聚合物(例如,聚乙二醇(PEG))涂布(例如,其中免疫偶联物包含螯合剂)),其用于治疗

个体的疾病或病况的方法中,其中治疗包含:将组合物递送到个体;和递送免疫疗法(例如,其中免疫疗法包含向个体投与包含免疫偶联物的医药组合物)。

[0059] 涉及本发明一个方面(例如,方法)的实施例的要素可应用于涉及本发明其它方面(例如,系统)的实施例中,且反之亦然。

#### [0060] 定义

[0061] 为更容易地理解本发明,首先在下文定义某些术语。在本说明书通篇中陈述以下术语和其它术语的额外定义。

[0062] 在本申请案中,除非另有说明,否则使用“或”意指“和/或”。如本申请案中所用的术语“包含(comprise)”和所述术语的变化形式(例如“包含(comprising)”和“包含(comprises)”)不打算排除其它添加剂、组分、整数或步骤。如本申请案中所用的术语“约”和“大约”以等效形式使用。本申请案中与约/大约一起使用或未一起使用的任何数字打算涵盖相关领域技术人员所了解的任何正常波动。在某些实施例中,除非另有说明或上下文其它含义较明显,否则术语“大约”或“约”是指在所述参考值的任一方向(大于或小于)上的25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更小内的值范围(所述数值将超过可能值的100%的情形除外)。

[0063] “投与”:术语“投与”是指将物质引入个体中。一般来说,可利用任一投与途径,包括例如非经肠(例如,静脉内)、经口、局部、皮下、腹膜、动脉内、吸入、阴道、直肠、鼻、引入脑脊液或滴入身体隔室中。在某些实施例中,投与为经口。另外或或者,在某些实施例中,投与为非经肠。在某些实施例中,投与为静脉内。

[0064] “抗体”:如本文所用术语“抗体”是指包括足以赋予特定靶抗原特异性结合的规范免疫球蛋白序列元件的多肽。在自然界中产生原样的完整抗体是大约150kD四聚剂,其包含彼此缔合成通常称为“Y形”结构的两条相同的重链多肽(各自约50kD)和两条相同的轻链多肽(各自约25kD)。每一重链包含至少四个结构域(各自长约110个氨基酸)-胺基末端可变(VH)结构域(位于Y结构的尖端),其后为三个恒定结构域:CH<sub>1</sub>、CH<sub>2</sub>和羧基末端CH<sub>3</sub>(其位于Y主干的基底处)。称为“开关”的短区域连接重链可变区和恒定区。“铰链”将CH<sub>2</sub>和CH<sub>3</sub>结构域连接到抗体的其余部分。在完整抗体中,此铰链区中的两个二硫键使两条重链多肽彼此连接。每一轻链包含两个结构域-胺基末端可变(VL)结构域,其后为羧基末端恒定(CL)结构域,通过另一“开关”彼此分开。完整抗体四聚体包含两个重链-轻链二聚体,其中重链和轻链通过单一二硫键彼此连接;两个其它二硫键使重链铰链区彼此连接,以使得二聚体彼此连接且形成四聚体。天然产生的抗体还通常在CH<sub>2</sub>结构域上糖基化。天然抗体中的每一结构域具有特征在于自彼此相对封装于压缩的反平行β桶中的两个β片(例如,3股、4股或5股片)形成的“免疫球蛋白折叠”的结构。每一可变结构域含有三个超变环(称为“互补决定区”(CDR1、CDR2和CDR3))和四个在某种程度上不变的“框架”区(FR1、FR2、FR3和FR4)。当天然抗体折叠时,FR区形成为结构域提供结构框架的β片,且重链和轻链二者的CDR环区一起带入三维空间中,以使得其产生位于Y结构尖端的单一超变抗原结合位点。天然抗体的Fc区结合到补体系统的元件,且还结合到效应细胞(包括例如调介细胞毒性的效应细胞)上的受体。Fc区对Fc受体的亲和力和/或其它结合属性可通过糖基化或其它修饰来调节。在某些实施例中,根据本发明产生和/或使用的抗体包括糖基化Fc结构域,包括具有经修饰或改造的所述糖基化的Fc结构域。出于本发明的目的,在某些实施例中,包括如在天然抗体中发现的足

够免疫球蛋白结构域序列的任一多肽或多肽复合体可称为和/或用作“抗体”，无论所述多肽是天然产生（例如，通过生物体对抗原反应）还是通过重组改造，化学合成或其它人工系统或方法产生。在某些实施例中，抗体是多克隆抗体；在某些实施例中，抗体是单克隆抗体。在某些实施例中，抗体具有小鼠、兔、灵长类动物或人类抗体所特有的恒定区序列。在某些实施例中，抗体序列元件为人类化、灵长化、嵌合等，如业内已知。另外，如本文所用术语“抗体”在适当实施例中（除非另有说明或上下文明确指出）可指业内已知或研发出的将抗体结构和功能特征用于替代性呈现中的构筑体或格式中的任一者。例如，在某些实施例中，根据本发明使用的抗体呈选自（但不限于）以下各项的格式：完整IgG、IgE和IgM、双特异性或多特异性抗体（例如，Zybodyes®等）、单链Fv、多肽-Fc融合物、Fab、骆驼抗体、经遮蔽抗体（例如，Probodyes®）、小模块免疫医药（Small Modular ImmunoPharmaceuticals）（“SMIPs<sup>TM</sup>”）、单链或串联双价抗体（TandAb®）、VHH、Anticalins®、Nanobodies®、微小抗体、BiTE®、锚蛋白重复蛋白或DARPINs®、Avimers®、DART、TCR样抗体、Adnectins®、Affilins®、Trans-bodies®、Affibodies®、TrimerX®、微蛋白、Fynomers®、Centyrins®和KALBITOR®。在某些实施例中，抗体可缺乏其在天然产生时将具有的共价修饰（例如，附接聚糖）。在某些实施例中，抗体可含有共价修饰（例如，附接聚糖、有效负载[例如可检测部分、治疗部分、催化部分等]或其它侧基[例如，聚乙二醇等]）。

[0065] “抗体片段”：如本文所用“抗体片段”包括完整抗体的一部分，例如抗体的抗原结合区或可变区。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>和Fv片段；三价抗体；四价抗体；线性抗体；单链抗体分子；和自抗体片段形成的多特异性抗体。例如，抗体片段包括经分离片段、由重链和轻链的可变区组成的“Fv”片段、其中轻链和重链可变区通过肽连接体连接的重组单链多肽分子（“ScFv蛋白”）和由模拟超变区的氨基酸残基组成的最小识别单元。在许多实施例中，抗体片段含有足够的亲代抗体序列，其中其是结合到与亲代抗体相同的抗原的片段；在某些实施例中，片段以与亲代抗体相当的亲和力结合到抗原和/或与亲代抗体竞争结合到抗原。抗体的抗原结合片段的实例包括（但不限于）Fab片段、Fab'片段、F(ab')<sub>2</sub>片段、scFv片段、Fv片段、dsFv双价抗体、dAb片段、Fd'片段、Fd片段和经分离互补决定区（CDR）。抗体的抗原结合片段可通过任何方式产生。例如，抗体的抗原结合片段可通过完整抗体的片段化以酶或化学方式产生和/或其可自编码部分抗体序列的基因重组产生。或者或另外，抗体的抗原结合片段可以全部或部分合成的方式产生。抗体的抗原结合片段可任选地包含单链抗体片段。或者或另外，抗体的抗原结合片段可包含例如通过二硫键联接连接在一起的多条链。抗体的抗原结合片段可任选地包含多分子复合体。功能性单结构域抗体片段在约5kDa到约25kDa范围内，例如约10kDa到约20kDa，例如约15kDa；功能性单链片段为约10kDa到约50kDa，例如约20kDa到约45kDa，例如约25kDa到约30kDa；且功能性fab片段为约40kDa到约80kDa，例如约50kDa到约70kDa，例如约60kDa。

[0066] “缔合”：如本文所用术语“缔合”通常是指两个或更多个实体彼此直接或间接（例如，通过一或多个用作连接剂的其它实体）物理邻近以形成足够稳定的结构，以使得各实体在相关条件（例如生理条件）下保持物理邻近。在某些实施例中，缔合部分彼此共价连接。在某些实施例中，缔合实体为非共价连接。在某些实施例中，缔合实体通过特异性非共价相互作用（例如，例如通过区分其相互作用搭配物与使用背景下存在的其它实体的相互作用配体之间的相互作用、抗生素链菌素/抗生物素蛋白相互作用、抗体/抗原相互作用等）彼此连接。或者或另外，足够数量的较弱非共价相互作用可为部分提供足够稳定性以保持缔合。

实例性非共价相互作用包括(但不限于)静电相互作用、氢键结、亲和力、金属配位、物理吸附、主体-客体相互作用、疏水相互作用、 $\pi$ 堆叠相互作用、范德华相互作用、磁相互作用、静电相互作用、偶极-偶极相互作用等。

[0067] “生物相容性”:如本文所用术语“生物相容性”打算描述不会在体内引发显著有害反应的材料。在某些实施例中,如果材料对细胞无毒性,那么其具有“生物相容性”。在某些实施例中,如果材料在体内添加到细胞引起小于或等于20%细胞死亡和/或其体内投与不会诱导炎症或其它所述不利作用,则其具有“生物相容性”。在某些实施例中,材料是生物可降解的。

[0068] “生物可降解”:如本文所用“生物可降解”材料是在引入细胞中时,通过细胞机构(例如,酶降解)或通过水解成细胞可再利用或处置且对细胞无显著毒性作用的组分分解的那些。在某些实施例中,通过分解生物可降解材料产生的组分不会诱导体内炎症和/或其它不利作用。在某些实施例中,生物可降解材料被酶分解。或者或另外,在某些实施例中,生物可降解材料通过水解分解。在某些实施例中,生物可降解聚合物分解成其组分聚合物。在某些实施例中,生物可降解材料(包括例如生物可降解聚合物)的分解包括水解酯键。在某些实施例中,材料(包括例如生物可降解聚合物)的分解包括裂解氨基甲酸酯键联。

[0069] “载剂”:如本文所用“载剂”是指与化合物一起投与的稀释剂、佐剂、赋形剂或媒剂。所述医药载剂可为无菌液体,例如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的那些,例如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油和诸如此类。优选地使用水或水溶液盐水溶液和水性右旋糖和甘油溶液作为载剂,尤其用于可注射溶液。适宜医药载剂描述于E.W.马丁(E.W.Martin)的“雷明顿医药科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)”中。

[0070] “成像剂”:如本文所用“成像剂”是指帮助检测其所连接的药剂(例如多糖纳米粒子)的任何元素、分子、功能性基团、化合物、其片段或部分。成像剂的实例包括(但不限于):各种配体、放射性核素(例如, $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{19}\text{F}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{135}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{187}\text{Re}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{89}\text{Zr}$ 等)、荧光染料(关于具体实例性荧光染料参见下文)、化学发光剂(例如吡啶酯、稳定的双氧烷等)、生物发光剂、可光谱拆分的无机荧光半导体纳米晶体(即量子点)、金属纳米粒子(例如,金、银、铜、铂等)纳米簇、顺磁金属离子、酶(关于酶的具体实例参见下文)、比色标记(例如染料、胶体金等)、生物素、地高辛(dioxigenin)、半抗原和抗血清或单克隆抗体可用的蛋白质。放射性核素可通过例如点击化学法衔接。

[0071] “蛋白质”:如本文所用术语“蛋白质”是指多肽(即通过肽键彼此连接的至少3-5个氨基酸串)。蛋白质可包括除氨基酸外的部分(例如,可为糖蛋白、蛋白聚糖等)和/或可以其它方式处理或修饰。在某些实施例中,“蛋白质”可为细胞产生原样和/或在细胞中有活性的完整多肽(含或不合信号序列);在某些实施例中,“蛋白质”是或包含特征性部分,例如细胞产生原样和/或在细胞中有活性的多肽。在某些实施例中,蛋白质包括一条以上的多肽链。例如,多肽链可通过一或多个二硫键连接或通过其它方式缔合。在某些实施例中,如本文所述的蛋白质或多肽可含有L-氨基酸、D-氨基酸或二者和/或可含有业内已知的多个氨基酸修饰或类似物中的任一者。有用修饰包括例如末端乙酰化、胺酰化、甲基化等。在某些实施例中,蛋白质或多肽可包含天然氨基酸、非天然氨基酸、合成氨基酸和/或其组合。在某些实施例中,蛋白质是或包含抗体、抗体多肽、抗体片段、其生物活性部分和/或其特征性部分。

[0072] “医药组合物”:如本文所用术语“医药组合物”是指与一或多种医药上可接受的载

剂调配在一起的活性剂。在某些实施例中,活性剂是以适于投与治疗方案的单位剂量量存在,所述治疗方案在投与相关群体时显示实现预定治疗作用的统计学上显著的机率。在某些实施例中,医药组合物可经特殊调配以固体或液体形式投与,包括适于以下各项的那些:经口投与,例如施用到舌的灌药(水性或非水性溶液或悬浮液)、片剂(例如靶向颊、舌下和全身性吸收的那些)、浓注、粉剂、颗粒、糊剂;非经肠投与,以例如无菌溶液或悬浮液或持续释放调配物形式例如通过皮下、肌内、静脉内或硬膜外注射;局部施用,例如以施用到皮肤、肺或口腔的乳霜、软膏或受控释放贴片或喷雾剂;阴道内或直肠内,例如以子宫套、乳霜或泡沫形式;舌下;经眼;经皮;或经鼻、肺和施用到其它粘膜表面。

[0073] “基本上”:如本文所用术语“基本上”和语法等效形式是指展现所关注特征或性质的全或近全范围或程度的定性条件。所属领域技术人员将理解,生物和化学现象(如果有)很少进行到完成和/或进展到完成或实现或避免绝对结果。

[0074] “个体”:如本文所用术语“个体”包括人类和哺乳动物(例如,小鼠、大鼠、猪、猫、狗和马)。在许多实施例中,个体是哺乳动物,具体来说灵长类动物,尤其人类。在某些实施例中,个体是家畜类,例如牛、绵羊、山羊、母牛、猪等;家禽,例如鸡、鸭、鹅、火鸡等;和家养动物,具体来说宠物,例如狗和猫。在某些实施例中(例如,具体来说在研究背景下),个体哺乳动物将为例如啮齿类动物(例如,小鼠、大鼠、仓鼠)、兔、灵长类动物或猪(例如小型猪等)。

[0075] “治疗剂”:如本文所用片语“治疗剂”是指在投与个体时具有治疗作用和/或引发所需生物和/或药理学作用的任一药剂。

[0076] “治疗有效量”:如本文所用,意指其投与产生所需作用的量。在某些实施例中,所述术语是指在根据治疗投药方案投与患有或易患疾病、病症和/或病况的群体时足以治疗所述疾病、病症和/或病况的量。在某些实施例中,治疗有效量是降低所述疾病、病症和/或病况的一或多种症状的发生率和/或严重程度和/或延迟其发作的量。所属领域技术人员将了解,术语“治疗有效量”实际上无需在特定个体中实现成功治疗。相反,治疗有效量可为在投与需要所述治疗的患者时提供大量个体中的特定所需药理学反应的量。在某些实施例中,提到治疗有效量可提到如在一或多种特定组织(例如受疾病、病症或病况侵袭的组织)或液体(例如,血液、唾液、血清、汗液、眼泪、尿液等)中测量的量。所属领域技术人员将了解,在某些实施例中,特定药剂或疗法的治疗有效量可以单一剂量调配和/或投与。在某些实施例中,治疗有效药剂可以多个剂量(例如作为投药方案的一部分)调配和/或投与。

[0077] “治疗”:如本文所用术语“治疗(treatment)”(还为“治疗(treat)”或“治疗(treating)”)是指部分或完全减轻、改善、缓解、抑制特定疾病、病症和/或病况的一或多种症状、特征和/或病因、延迟其发作、降低其严重程度和/或降低其发生率的物质的任一投与。所述治疗可用于不展现相关疾病、病症和/或病况的体征的个体和/或仅展现所述疾病、病症和/或病况的早期体征的个体。或者或另外,所述治疗可用于展现相关疾病、病症和/或病况的一或多种已确立体征的个体。在某些实施例中,治疗可用于已经诊断患有相关疾病、病症和/或病况的个体。在某些实施例中,治疗可用于已知具有一或多种在统计学上与增加的罹患相关疾病、病症和/或病况风险相关联的敏感因素的个体。

[0078] 本文呈现图式用于说明目的而非用来限制。

## 附图说明

[0079] 通过结合附图一起参考以下描述将更明显并且更好地理解本发明的前述和其它目标、方面、特征和优点,其中:

[0080] 图1显示示意图,其显示利用基于螯合剂的放射性标记技术合成<sup>89</sup>Zr标记的C'点放射性免疫偶联物。首先使聚乙二醇化和马来酰亚胺官能化C'点(C'点-PEG-Mal,1)与还原的谷胱甘肽(GSH)反应以为后续生物偶联物引入-NH<sub>2</sub>基团,形成C'点-PEG-GSH(2)。然后使纳米粒子与DBCO-PEG4-NHS酯和DF0-NCS偶联,分别形成C'点-PEG-DBCO(3)和DF0-C'点-PEG-DBCO(4)。基于应变促进的叠氮化物-炔环加成使叠氮化物官能化小靶向配体(例如单链可变片段(scFv-叠氮化物))(或单结构域抗体sdAb-叠氮化物)偶联到纳米粒子,形成DF0-C'点-PEG-scFv(5)。通过用草酸<sup>89</sup>Zr标记最终C'点放射性免疫偶联物(<sup>89</sup>Zr-DF0-C'点-PEG-scFv,6)。图1中所图解说明的实施例并不限于scFv并且可包括不同类型的抗体片段,例如sdAb。

[0081] 图2A和2B显示在健康裸小鼠中在不同注射后时间点(10min、1h、第1天、第3天和第6天)<sup>89</sup>Zr-DF0-C'点-PEG的体内(图2A)冠状和(图2B)矢状PET图像。C'点-PEG-Mal与GSH之间的反应比保持在1:20。PET图像是通过使用Focus 120MicroPET扫描仪获取。

[0082] 图3显示在第6天时健康裸小鼠中<sup>89</sup>Zr-DF0-C'点-PEG的生物分布数据。观察到小于2% ID/g的骨(和关节)摄取。

[0083] 图4A和4B显示不含螯合剂的<sup>89</sup>Zr放射性标记实验实例。

[0084] 图4A显示在75°C下在不同pH条件下C'点-PEG-Mal的<sup>89</sup>Zr标记产率。

[0085] 图4B显示使用C'点对草酸<sup>89</sup>Zr比率的不同组合的C'点-PEG-Mal的<sup>89</sup>Zr标记产率。

[0086] 图5A和5B显示在健康裸小鼠中在不同注射后时间点(10min、第1天、第3天和第6天)[<sup>89</sup>Zr]C'点-PEG的体内冠状PET图像。 [<sup>89</sup>Zr]C'点-PEG是通过使用不含螯合剂的放射性标记技术合成。PET图像是通过使用Focus 120MicroPET扫描仪获取。

[0087] 图5A显示在不具EDTA(乙二胺四乙酸)下获取的PET图像。

[0088] 图5B显示利用EDTA获取的PET图像

[0089] 图6显示在第7天时健康裸小鼠(n=3)中 [<sup>89</sup>Zr]C'点-PEG的生物分布数据。在此情形下观察到超过10% ID/g的骨(和关节)摄取,此指示使用不含螯合剂的方法获得较不稳定的放射性标记(与基于螯合剂的方法相比)。

[0090] 图7显示在注射后48h时在健康裸小鼠中<sup>89</sup>Zr-DF0-C'点、<sup>89</sup>Zr-DF0-C'点-DBCO和<sup>89</sup>Zr-DF0-C'点-PEG-sdAb的生物分布数据。通过最佳化来自每一C'点的DF0、DBCO和sdAb的数量可实现经改良的药代动力学特征(具有延长的血液循环半衰期和较低肝摄取)。

[0091] 图8显示硫醇-马来酰亚胺化学法的实例性示意图。

[0092] 图9显示烯烃-四嗪化学法的实例性示意图。

## 具体实施方式

[0093] 在本说明书通篇中,在将组合物描述为具有、包括或包含特定组分时,或在将方法描述为具有、包括或包含特定步骤时,预期另外存在基本上由所列举的组分组成或由所列举的组分组成的本发明组合物,且存在基本上由所列举的处理步骤组成或由所列举的处理步骤组成的本发明方法。

[0094] 应理解,只要本发明保持可操作,各步骤的顺序或执行某一动作的顺序并不重要。此外,可同时实施两个或更多个步骤或动作。

[0095] 本文中提到的例如[背景技术]章节中的任何公开案并非承认所述公开案充当关于本文中所呈现的技术方案中的任一者的现有技术。[背景技术]章节是出于清楚目的而呈现且并非意指为对关于任一技术方案的现有技术的描述。

[0096] 分子治疗剂(例如,抗体)可通过操纵免疫检查点(例如,单克隆抗体伊匹单抗(ipilimumab)抑制CTLA4,其是抑制免疫系统功能的负调控分子)调节针对抗肿瘤活性的免疫系统。原理是触发预先存在但静止的抗肿瘤免疫反应。其它分子和路径已用作免疫开关。还靶向在T细胞上表达的另一负调控受体PD-1。开关单一免疫检查点可不足以诱导抗肿瘤反应,此解释靶向如PD-1或CTLA4等单一免疫调控检查点的一些失败。然而,不希望受限于任何理论,可通过添加在一些情形下认为具有免疫调节性质的RT来支持治疗。在这些情形下,已发现在RT治疗领域外的肿瘤因推定的由RT引起的全身性炎症或免疫反应而皱缩,此突出显示辐射激发全身性抗肿瘤免疫反应的潜能。强化免疫活性还可加强RT的局部作用。

[0097] 可通过仅升高这些免疫偶联物的浓度治疗疾病。还可添加治疗性放射性标记以进一步治疗疾病。在某些实施例中,免疫偶联物在高浓度和无治疗性放射性标记下用作治疗剂。在某些实施例中,在一体化多治疗剂平台中放射性标记附接到相同的纳米粒子。或者,可独立地投与治疗性放射性同位素。

[0098] 本文描述靶向诊断和/或治疗平台的靶特异性纳米粒子免疫偶联物(例如,结合到粒子表面的单链抗体片段)。在某些实施例中,纳米粒子免疫偶联物的直径小于20nm(例如,6到10nm)。发现此小大小在治疗和/或成像应用中提供优点。例如,所揭示免疫偶联物可提供经改良的患病组织靶向和减少的器官(例如,肝)非特异性摄取。较小免疫偶联物还可展示降低的免疫反应性,由此进一步改良效能。

[0099] 在某些实施例中,纳米粒子包含二氧化硅、聚合物(例如,聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA))和/或金属(例如,金、铁)。

[0100] 在某些实施例中,基于二氧化硅的纳米粒子平台包含超小纳米粒子或“C点”,其是具有可控低至次10nm范围的直径和一系列模块功能的有机二氧化硅核心壳荧光粒子。C点描述于美国专利第8298677B2号“基于二氧化硅的荧光纳米粒子(Fluorescent silica-based nanoparticles)”、美国公开案第2013/0039848 A1号“基于二氧化硅的荧光纳米粒子(Fluorescent silica-based nanoparticles)”和美国公开案第US 2014/0248210 A1号“基于二氧化硅的多模态纳米粒子(Multimodal silica-based nanoparticles)”中,所述专利的内容的全文以引用方式并入本文中。将近红外染料分子(例如Cy5.5)纳入核心的二氧化硅基质中,此向其提供独特的光学性质。二氧化硅层或壳包围核心。二氧化硅表面经甲硅烷基-聚乙二醇(PEG)基团共价修饰以增强在水性和生物相关条件中的稳定性。这些粒子已在体内进行评估且展现优异的清除性质,此极大地归因于其大小和惰性表面。化学感测、非光学(PET)图像对比和体外/体内靶向能力是纳入C点中的其它功能,此使其能够用于使淋巴结可视化以供手术应用和癌症中的黑色素瘤检测。

[0101] C点是通过基于醇的经修改施托贝尔方法(Stöber process)来合成。C'点是在水中合成。

[0102] C点或C'点因其物理性质且展示人类体内特征而提供独特的药物递送平台。这些

粒子超小且受益于肿瘤微环境中的EPR作用,同时保留所需清除率和药代动力学性质。为此,本文描述纳米粒子药物递送系统,其中在某些实施例中,药物构筑体共价附接到C点或C'点(或其它纳米粒子)。

[0103] C点或C'点可用作高度特异性且强效的多治疗剂靶向粒子探针以在单一平台上组合抗体片段与治疗性放射性标记(例如, $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{225}\text{Ac}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{89}\text{Zr}$ )。或者,已知具有免疫调节和抗炎性质的靶向肽(例如 $\alpha\text{MSH}$ )的C点或C'点偶合还可与C点或C'点放射性治疗剂(和/或基于其它粒子)平台组合以实现增强的效能。在某些实施例中,放射性同位素和/或抗体片段的浓度与诊断应用相比在治疗应用中较高。

[0104] 与其它多模态平台不同,免疫偶联物可包含附接到纳米粒子自身的不同部分。例如,在某些实施例中,放射性同位素附接到纳米粒子且抗体片段附接到纳米粒子,也就是说,在这些实施例中,放射性标记并不附接到抗体片段自身。作为另一实例,免疫偶联物可包含附接到纳米粒子的靶向配体、附接到纳米粒子的放射性同位素和附接到纳米粒子的抗体片段。附接到C点的不同部分的化学计量比将影响纳米粒子免疫偶联物的生物分布。

[0105] 免疫偶联物(例如C点-抗体(mAb)和C点-抗体片段(vFab)偶联物)可使用两种方法中的任一者来制备。方案1包含硫醇-马来酰亚胺化学法,如图8中所显示。方案1是围绕经修饰以含有马来酰亚胺基团的蛋白质来设计。方案2包含烯烃-四嗪化学法,如图9中所显示。

[0106] 在如图8中所显示的方案1中,含有Cy5染料、经PEG和马来酰亚胺基团表面官能化的C点(C点-(Cy5)-PEG-mal)是如布莱柏利(Bradbury)等人,2014中先前所述制备。制备经Cy5荧光团修饰的甲硅烷且用四甲基原甲硅烷(TMOS)滴定到稀 $\text{NH}_4\text{OH}$ 溶液(摩尔比TMOS: Cy5:  $\text{NH}_3$ :  $\text{H}_2\text{O}$ 为1:0.001:0.44:1215)中并混合24小时(乌拉塔C(Urata C)、青山Y(Aoyama Y)、利根川进A(Tonegawa A)、山内Y(Yamauchi Y)、黑田东彦K(Kuroda K)。移除表面活性剂以形成胶体中孔二氧化硅纳米粒子的透析方法(Dialysis process for the removal of surfactants to form colloidal mesoporous silica nanoparticles).化学通讯(Chem Commun)(剑桥(Camb)).2009;(34):5094-6)(山田H(Yamada H)、乌拉塔C、青山Y、长田S(Osada S)、山内Y、黑田东彦K.具有不同直径的胶体中孔二氧化硅纳米粒子的制备和其在静态水性系统中的独特降解行为(Preparation of Colloidal Mesoporous Silica Nanoparticles with Different Diameters and Their Unique Degradation Behavior in Static Aqueous Systems),材料化学(Chem.Mater.)2012;24(8):1462-71。)(王J(Wang J)、菅原-鸣泷A(Sugawara-Narutaki A)、赴考M(Fukao M)、横井T(Yokoi T)、下岛A(Shimajima A)、大久保T(Okubo T)。利用胺或氨催化剂的单分散二氧化硅纳米球体的两相合成和其受控自组装(Two-phase synthesis of monodisperse silica nanospheres with amines or ammonia catalyst and their controlled self-assembly).美国化学会应用材料与界面(ACS Appl Mater Interfaces).2011;3(5):1538-44。)此产生Cy5囊封的二氧化硅粒子,其表面进一步经聚乙二醇化且通过用PEG-甲硅烷(500g/摩尔)(铃木K(Suzuki K)、怒K(Ikari K)、今井H(Imai H)。使用双表面活性剂系统合成具有有序细观结构的二氧化硅纳米粒子(Synthesis of silica nanoparticles having a well-ordered mesostructured using a double surfactant system).美国化学学会杂志(J Am Chem Soc).2004;126(2):462-3)和马来酰亚胺-PEG-甲硅烷(摩尔比PEG-甲硅烷:TMOS:mal-PEG-甲硅烷为1:2.3:0.006)处理用马来酰亚胺基团官能化。随后可通过使粒子与含有硫醇和胺

的化合物(例如,半胱氨酸甲酯或半胱胺-HCl)反应将马来酰亚胺基团有效地转变成胺基。随后可用3-(2-吡啶基二硫代)丙酸琥珀酰亚胺酯(SPDP)修饰所得C点-(Cy5)-PEG-胺。吡啶基二硫醇用于至少两个目的:一,其可用于量化偶联效率;二,其可用作“保护基团”以最小化硫醇基团的氧化等。然后可使用TCEP移除释放吡啶2-硫酮的基团,其可通过HPLC或UV吸收测量用于定量。然后可使所得C点-(Cy5)-PEG-硫醇与蛋白质-马来酰亚胺反应,产生所需C点-(Cy5)-PEG-mAb或C点-(Cy5)-PEG-vFab。

[0107] 在如图9中所显示的方案2中,使用烯炔-四嗪化学法进行蛋白质附接。在此处,用点击反应性基团(例如甲基四嗪-PEG<sub>4</sub>-NHS酯)修饰mAb或vFab。如图8(方案1)中所述,然后用适当点击搭配物(例如,TCO-PEG4-NHS酯)修饰C点-(Cy5)-PEG-胺。在最终步骤中,然后可使甲基四嗪-mAb或甲基四嗪-vFab与C点-(Cy5)-PEG-TCO反应,产生C点-(Cy5)-PEG-mAb或C点-(Cy5)-PEG-vFab产物。

[0108] 抗体片段(fAb)与标准单克隆抗体(mAb)相比提供优点(例如,大小、无Fc区以降低免疫原性、可扩缩性和适应性)。fAb是抗体的分拆(stripped-down)结合区域,通常在表达宿主(例如,大肠杆菌(E.Coli))中表达为单一连续序列。在某些实施例中,fAb或mAb可小至15kDa(+/-5kDa)(例如约3nm)。在其它实施例中,fAb或mAb可高达150kDa(例如,高达20nm)。在一个实施例中,fAb为大约60kDa(例如,+/-15kDa)。fAb包含连接到免疫球蛋白轻链的相应结构域的免疫球蛋白重链可变和恒定结构域。在另一实施例中,抗体格式可为大约30kDa(例如,+/-10kDa)的单链可变片段(scFv)片段。scFv片段包含连接到轻链可变结构域的重链可变结构域。在其它实施例中,抗体格式可为大约15kDa(例如,+/-5kDa)的单结构域抗体(sdAb)片段。sdAb片段包含单一重链可变结构域。在某些实施例中,抗体片段是靶向不同肿瘤的抗CEA scFv。

[0109] 在某些实施例中,使用多个连接体。在某些实施例中,使用可裂解连接体(例如,肽、胍或二硫化物)。在某些实施例中,使用不可裂解连接体(例如,硫醚)。在某些实施例中,肽连接体通过溶酶体蛋白酶(例如,组织蛋白酶-B)选择性裂解。在某些实施例中,使用缬氨酸-瓜氨酸二肽连接体。

[0110] 在某些实施例中,使用如以下文献中所述的不同连接体:美国专利第4,680,338号、第5,122,368号、第5,141,648号、第5,208,020号、第5,416,064号、第5,475,092号、第5,543,390号、第5,563,250号、第5,585,499号、第5,880,270号、第6,214,345号、第6,436,931号、第6,372,738号、第6,340,701号、第6,989,452号、第7,129,261号、第7,375,078号、第7,498,302号、第7,507,420号、第7,691,962号、第7,910,594号、第7,968,586号、第7,989,434号、第7,994,135号、第7,999,083号、第8,153,768号、第8,236,319号;Zhao,R.等人(2011)欧洲医药化学杂志(J.Med.Chem.)36,5404;多罗宁,S.(Doronina,S.)等人(2006)生物偶联化学(Bioconjug Chem),17,114;哈曼,P.(Hamann,P.)等人(2005)生物偶联化学.16,346,所述参考文献的内容以引用方式并入本文中。

[0111] 在某些实施例中,mAb和/或fAb经美国批准用于某些用途。mAb和fAb的非限制性实例包括抗GPIIb/IIIa、抗VEGF-A和抗TNF- $\alpha$ 。ReoPro(阿昔单抗(abciximab))是由森德(Centocor)/礼来(Eli Lilly)研发的抗GPIIb/IIIa嵌合fAb IgG1- $\kappa$ ,如纳尔逊(Nelson)和赖克特(Reichert),“治疗性抗体片段的发展趋势(Development trends for therapeutic antibody fragments)”,自然生物技术(Nature Biotechnology),27(4),2009所述。乐舒晴

(Lucentis) (兰尼单抗 (ranibizumab)) 是由基因泰克 (Genentech) 研发的抗 VEGF-A 人类化 Fab IgG1- $\kappa$  (纳尔逊和赖克特, 2009), 其用于预防湿性年龄相关性黄斑变性。欣膝亚 (Cimzia) (聚乙二醇化赛妥珠单抗 (certolizumab pegol)) 是由 UCB 研发的抗 TNF- $\alpha$  聚乙二醇化人类化 fAb (纳尔逊和赖克特, 2009), 其用于预防中度到重度克隆氏病 (Crohn's disease)。

[0112] 在某些实施例中, 使用 PET (正电子发射断层摄影术) 示踪剂作为成像剂。在某些实施例中, PET 示踪剂包含  $^{89}\text{Zr}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{18}\text{F}$  氟脱氧葡萄糖。

[0113] 在某些实施例中, 荧光团包含荧光染料、荧光染料猝灭剂分子、任何有机或无机染料、金属螯合物或任何荧光酶底物, 包括蛋白酶可活化酶底物。在某些实施例中, 荧光团包含长链嗜碳酸气酞菁。在其它实施例中, 荧光团包含 DiI、DiR、DiD 等。荧光染料包含远红和近红外荧光染料 (NIRF)。荧光染料包括 (但不限于) 碳菁和靛菁荧光染料。在某些实施例中, 成像剂包含市售荧光染料包括 (但不限于) Cy5.5、Cy5 和 Cy7 (GE 医疗 (GE Healthcare)); AlexaFluor660、AlexaFluor680、AlexaFluor750 和 AlexaFluor790 (英杰 (Invitrogen)); VivoTag680、VivoTag-S680 和 VivoTag-S750 (维森医药 (VisEn Medical)); Dy677、Dy682、Dy752 和 Dy780 (戴欧米克斯 (Dyomics)); DyLight547、DyLight647 (皮尔斯 (Pierce)); HiLyte Fluor 647、HiLyte Fluor 680 和 HiLyte Fluor 750 (阿纳拜客 (AnaSpec)); IRDye 800CW、IRDye 800RS 和 IRDye 700DX (拉哥 (Li-Cor)); 和 ADS780WS、ADS830WS 和 ADS832WS (美国染料来源 (American Dye Source)) 和 Kodak X-SIGHT 650、Kodak X-SIGHT 691、Kodak X-SIGHT 751 (锐珂医疗 (Carestream Health))。

[0114] 在某些实施例中, 使用点击反应性基团 (用于 '点击化学法')。点击反应性基团的实例包括以下各项: 炔、叠氮化物、硫醇 (巯基)、烯烃、丙烯酸酯、肟、马来酰胺、NHS (N-羧基琥珀酰亚胺)、胺 (伯胺、仲胺、叔胺和/或季铵)、苯基、苄基、羟基、羰基、醛、碳酸酯、羧酸酯、羧基、酯、甲氧基、氢过氧基、过氧基、醚、半缩醛、半缩酮、缩醛、缩酮、原酸酯、原碳酸酯、酰胺、甲酰胺、亚胺 (伯酮亚胺、仲氯胺酮、伯醛亚胺、仲醛亚胺)、酰亚胺、偶氮 (二酰亚胺)、氰酸酯 (氰酸酯或异氰酸酯)、硝酸酯、腈、异腈、亚硝酸酯 (亚硝酸基)、硝基、亚硝基、吡啶基、硫化物、二硫化物、亚硫酰基、磺酰基、亚磺酰基、磺基、硫代氰酸酯、异硫代氰酸酯、硫代羰基、硫酮、硫醛、磷化氢、膦酰基、磷酸酯、磷酸二酯、硼基、硼酸酯、亚硼基、亚硼酸酯、卤基、氟、氯、溴和/或碘部分。

[0115] 可治疗的癌症包括例如前列腺癌、乳腺癌、睾丸癌、子宫颈癌、肺癌、结肠癌、骨癌、神经胶质瘤、神经胶质母细胞瘤、多发性骨髓瘤、肉瘤、小细胞癌、黑色素瘤、直肠癌、肝癌、头颈癌、食管癌、甲状腺癌、淋巴瘤和/或白血病。

[0116] 在某些实施例中, 附接到 C 点的靶向肽配体 (例如  $\alpha$ -MSH) 可用作免疫调节剂与其它疗法一起增强治疗反应。

[0117] 在某些实施例中, 除投与本文所述的免疫偶联物外, 治疗方法可包括投与抗体、小分子药物、辐射、药物治疗、化学疗法、冷冻疗法、温热疗法、电疗法、光疗法、超声疗法和/或手术。

[0118] 在某些实施例中, 免疫偶联物包含治疗剂, 例如药物 (例如化学治疗药物) 和/或治疗性放射性同位素。如本文所用 "治疗剂" 是指当投与个体时具有治疗作用和/或引发所需生物和/或药理学作用的任何药剂。

[0119] 在某些实施例中,放射性同位素是可监测/成像(例如,通过PET或单光子发射计算机断层摄影术(SPECT))的放射性标记。可用实例放射性同位素包括 $\beta$ 发射体(例如 $^{177}\text{Lu}$ )和 $\alpha$ 发射体(例如, $^{225}\text{Ac}$ )。在某些实施例中,使用以下放射性同位素中的一或多个: $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{124}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{11}\text{C}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{15}\text{O}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{149}\text{Pm}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{213}\text{Bi}$ 、 $^{103}\text{Pd}$ 、 $^{109}\text{Pd}$ 、 $^{159}\text{Gd}$ 、 $^{140}\text{La}$ 、 $^{198}\text{Au}$ 、 $^{199}\text{Au}$ 、 $^{169}\text{Yb}$ 、 $^{175}\text{Yb}$ 、 $^{165}\text{Dy}$ 、 $^{166}\text{Dy}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{105}\text{Rh}$ 、 $^{111}\text{Ag}$ 、 $^{89}\text{Zr}$ 、 $^{225}\text{Ac}$ 和 $^{192}\text{Ir}$ 。

[0120] 在某些实施例中,免疫偶联物包含一或多种药物,例如一或多种化学治疗药物,例如索拉菲尼、紫杉酚、多西他赛、MEK162、依托泊苷、拉帕替尼、尼罗替尼、克唑替尼、氟维司群、维罗非尼、贝沙罗汀和/或喜树碱。

[0121] 在某些实施例中,免疫偶联物包含螯合剂,例如1,4,8,11-四氮杂二环[6.6.2]十六烷-4,11-二基)二乙酸(CB-TE2A);去铁胺(DFO);二乙三胺五乙酸(DTPA);1,4,7,10-四氮杂环十四烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA);乙二胺四乙酸(EDTA);乙二醇双(2-氨基乙基)-N,N,N',N'-四乙酸(EGTA);1,4,8,11-四氮杂环十四烷-1,4,8,11-四乙酸(TETA);亚乙基双-(2-4羟基-苯基甘氨酸)(EHPG);5-Cl-EHPG;5Br-EHPG;5-Me-EHPG;5t-Bu-EHPG;5-仲-Bu-EHPG;苯并二乙三胺五乙酸(苯并-DTPA);二苯并-DTPA;苯基-DTPA、二苯基-DTPA;苄基-DTPA;二苄基DTPA;双-2(羟基苄基)-乙二胺二乙酸(HBED)和其衍生物;Ac-DOTA;苯并-DOTA;二苯并-DOTA;1,4,7-三氮杂环壬烷N,N',N''-三乙酸(NOTA);苯并-NOTA;苯并-TETA、苯并-DOTMA(其中DOTMA是1,4,7,10-四氮杂环十四烷-1,4,7,10-四(甲基四乙酸))、苯并-TETMA(其中TETMA是1,4,8,11-四氮杂环十四烷-1,4,8,11-(甲基四乙酸));1,3-丙二胺四乙酸(PDTA)的衍生物;三乙四胺六乙酸(TTHA);1,5,10-N,N',N''-三(2,3-二羟基苯甲酰基)-儿茶酚酸酯(LICAM)的衍生物;和1,3,5-N,N',N''-三(2,3-二羟基苯甲酰基)氨基甲基苯(MECAM)或其它金属螯合剂。

[0122] 在某些实施例中,免疫偶联物包含一种以上的螯合剂。

[0123] 在某些实施例中,放射性同位素-螯合剂对是 $^{89}\text{Zr}$ -DFO。在某些实施例中,放射性同位素-螯合剂对是 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA。在某些实施例中,放射性同位素-螯合剂对是 $^{225}\text{Ac}$ -DOTA。

[0124] 在某些实施例中,使用生物正交偶联方法(例如,胺/NHS-酯、硫醇/马来酰亚胺、叠氮化物/炔点击或四嗪/TCO点击)将治疗剂(例如,药物和/或放射性同位素)附接到纳米粒子或抗体片段(蛋白质)或二者。对于使用放射性金属的放射性标记,可首先使放射性金属螯合剂附接到粒子或蛋白质或二者,然后附接到放射性金属。或者,可进行放射性金属/螯合剂错合,然后附接到粒子或蛋白质或二者上。还可使用其中通过亲电加成化学法修饰粒子或蛋白质或二者上的酪氨酸或酚基的标准方法实现放射性碘化。

[0125] 在某些实施例中,将免疫偶联物投与患有特定疾病或病况(例如,癌症)的个体来治疗所述疾病或病况。

#### [0126] 实验实例

[0127] C点-(Cy5)-PEG-马来酰亚胺的制备:

[0128] 将马来酰亚胺和NHS酯官能化聚乙二醇(mal-dPEG<sub>12</sub>-NHS)与氨基甲硅烷(APTES)于DMSO中偶联(摩尔比mal-PEG-NHS:APTES:DMSO 1:0.9:60)。将反应混合物在室温下在氮下静置48小时以产生甲硅烷官能化mal-dPEG(mal-dPEG-APTES)。使马来酰亚胺官能化Cy5(mal-Cy5)与硫醇-甲硅烷(MPTMS)于DMSO中反应(摩尔比Cy5:MPTMS:DMOS 1:25:1150)。将

反应物在室温下在氮下静置24小时以产生甲硅烷官能化Cy5 (Cy5-MPTMS)。然后将TMOS和Cy5-MPTMS滴定到氢氧化铵溶液(约pH 8)中(摩尔比TMOS: Cy5: NH<sub>3</sub>: H<sub>2</sub>O 1: 0.001: 0.44: 1215)。将溶液在室温下在600rpm下搅拌24小时以形成均质的Cy5囊封的二氧化硅纳米粒子。然后将mal-dPEG-APTES和甲硅烷官能化聚乙二醇(PEG-甲硅烷, MW约500, 盖勒斯特(Gelst))添加至合成溶液中以聚乙二醇化且表面官能化粒子(PEG-甲硅烷: TMOS: mal-PEG-APTES 1: 2.3: 0.006)。将溶液在室温下在600rpm下搅拌24小时, 然后在80°C下在不搅拌下再培育24小时。将溶液在2000mL去离子水中透析两天(10k MWCO), 用200nm针筒过滤器过滤, 且最后色谱纯化(Superdex 200), 产生所需mal-C点。

[0129] C点免疫偶联物的制备

[0130] 进行研究以将单链抗体片段(scFv)偶联到C点核心二氧化硅纳米粒子。在大肠杆菌中表达结合基质金属蛋白酶12(MMP-12)的scFv。构筑体含有C末端His和FLAG标签用于镍亲和色谱和免疫检测。构筑其中多肽链的最后一个氨基酸转化成半胱氨酸(Cys)的突变体scFv。通过对突变体基因测序来确认所述改变。通过十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)确认野生型scFv和含C末端Cys突变体的表达和镍亲和纯化, 通过在与scFv一致的分子量下用考马斯蓝(Coomassie blue)染色可视化。用抗FLAG标签HRP偶联物进行scFv SDS PAGE凝胶的西方墨点(western blot)分析。西方墨点分析确认凝胶条带的属性为scFv。

[0131] scFv是经含有双功能性连接体的叠氮化物修饰的克隆。野生型scFv经N-羟基-琥珀酰亚胺(NHS)酯-聚乙二醇(PEG)<sub>4</sub>-叠氮化物修饰。不希望受限于任何理论, 用NHS酯-PEG<sub>4</sub>-叠氮化物修饰野生型scFv可将PEG<sub>4</sub>-叠氮化物随机纳入表面赖氨酸刺激上的游离胺上。将C末端scFv Cys构筑体与马来酰亚胺-PEG<sub>3</sub>-叠氮化物偶联以将位点特异性PEG<sub>3</sub>-叠氮化物引入Cys巯基上。通过与二苯并环辛炔(DBCO)-PEG-Cy5荧光探针反应分析scFv构筑体的叠氮化物纳入。通过不含金属的点击化学反应使叠氮化物与DBCO反应以形成共价键联。通过40kDa截止大小排阻旋转柱自反应混合物移除未反应的DBCO-Cy5染料。通过使用伯乐(BioRad) Versa-Doc成像仪使野生型和C末端Cys scFv-PEG-Cy5荧光染料构筑体可视化来确认将叠氮基成功引入scFv的表面上。

[0132] 然后使叠氮化物偶联的scFv与含有1-3个DBCO的C点在其表面上反应。使反应在室温下持续12h。使用多种技术自偶联的scFv-C点纯化未偶联的scFv, 所述技术包括50,000分子量截止旋转柱中的磷酸盐缓冲盐水洗涤、G-200大小排阻柱色谱或大小排阻旋转柱和通过蔗糖垫的速率沉降。速率沉降和大小排阻色谱似乎是最可缩放的纯化方法。通过点墨点scFv免疫检测/粒子荧光分析、凝胶电泳和使用固定化MMP-12的荧光ELISA分析经纯化的scFv C点偶联物。

[0133] 这些方法可适用于其它类型的抗体片段, 例如sdAb。

[0134] 图1显示示意性图解说明, 其显示使用基于螯合剂的放射性标记技术合成<sup>89</sup>Zr标记的C'点放射性免疫偶联物。首先使聚乙二醇化和马来酰亚胺官能化C'点(C'点-PEG-Mal, 1)与还原谷胱甘肽(GSH)反应以为后续生物偶联物引入-NH<sub>2</sub>基团, 形成C'点-PEG-GSH(2)。然后使纳米粒子与DBCO-PEG<sub>4</sub>-NHS酯和DFO-NCS偶联, 分别形成C'点-PEG-DBCO(3)和DFO-C'点-PEG-DBCO(4)。基于应变促进的叠氮化物-炔环加成使叠氮化物官能化小靶向配体(例如单链可变片段(scFv-叠氮化物))(或单结构域抗体sdAb-叠氮化物)偶联到纳米粒子, 形成

DF0-C' 点-PEG-scFv (5)。通过用草酸<sup>89</sup>Zr标记最终C'点放射性免疫偶联物(<sup>89</sup>Zr-DF0-C'点-PEG-scFv, 6)。图1中所图解说明的示意图并不限于scFv且可包括不同类型的抗体片段, 例如sdAb。

[0135] 图2A和2B显示在健康裸小鼠中在不同注射后时间点(10min、1h、第1天、第3天和第6天)<sup>89</sup>Zr-DF0-C'点-PEG的体内(图2A)冠状和(图2B)矢状PET图像。C'点-PEG-Mal与GSH之间的反应比保持在1:20。PET图像是通过使用Focus 120MicroPET扫描仪获取。

[0136] 图3显示在第6天时健康裸小鼠中<sup>89</sup>Zr-DF0-C'点-PEG的生物分布数据。观察到小于2% ID/g的骨(和关节)摄取。

[0137] 图4A和4B显示不含螯合剂的<sup>89</sup>Zr放射性标记实验实例。

[0138] 图4A显示在75°C下在不同pH条件下C'点-PEG-Mal的<sup>89</sup>Zr标记产率。

[0139] 图4B显示使用C'点对草酸<sup>89</sup>Zr比率的不同组合的C'点-PEG-Mal的<sup>89</sup>Zr标记产率。

[0140] 图5A和5B显示在健康裸小鼠中在不同注射后时间点(10min、第1天、第3天和第6天)[<sup>89</sup>Zr]C'点-PEG的体内冠状PET图像。 [<sup>89</sup>Zr]C'点-PEG是通过使用不含螯合剂的放射性标记技术合成。PET图像是通过使用Focus 120MicroPET扫描仪获取。

[0141] 图5A显示在不具EDTA(乙二胺四乙酸)下获取的PET图像。

[0142] 图5B显示利用EDTA获取的PET图像

[0143] 图6显示在第7天时健康裸小鼠(n=3)中[<sup>89</sup>Zr]C'点-PEG的生物分布数据。在此情形下观察到超过10% ID/g的骨(和关节)摄取(用红框突出显示), 此指示使用不含螯合剂的方法获得较不稳定的放射性标记(与基于螯合剂的方法相比)。

[0144] 图7显示在注射后48h时在健康裸小鼠中<sup>89</sup>Zr-DF0-C'点、<sup>89</sup>Zr-DF0-C'点-DBCO和<sup>89</sup>Zr-DF0-C'点-PEG-sdAb的生物分布数据。通过最佳化来自每一C'点的DF0、DBCO和sdAb的数量可实现经改良的药代动力学特征(具有延长的血液循环半衰期和较低肝摄取)。

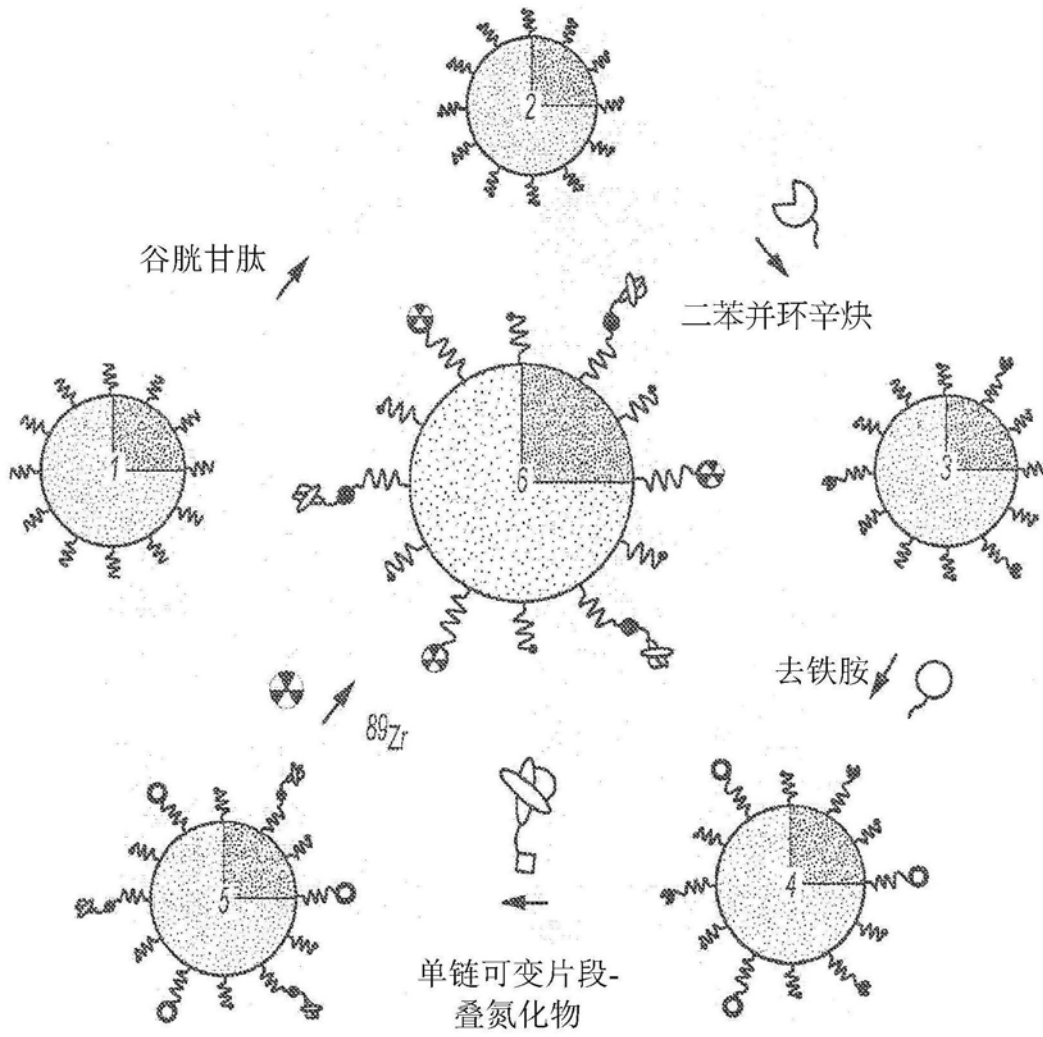


图1

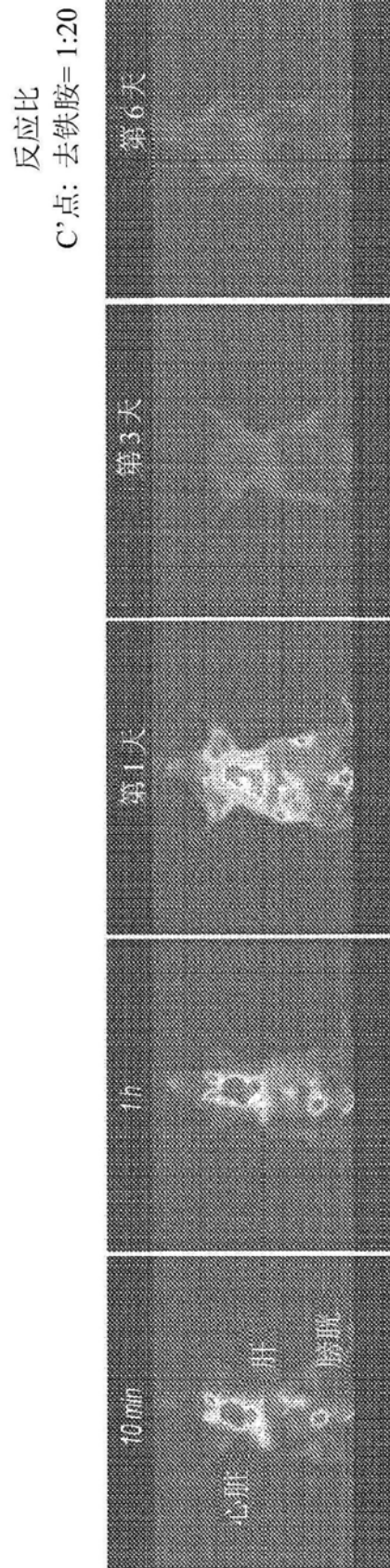


图2A

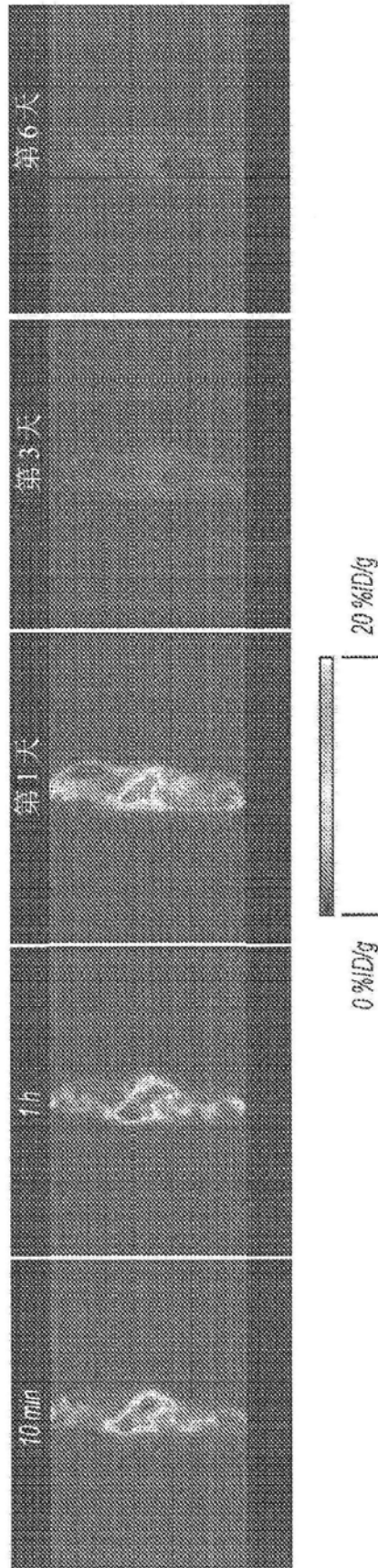


图2B

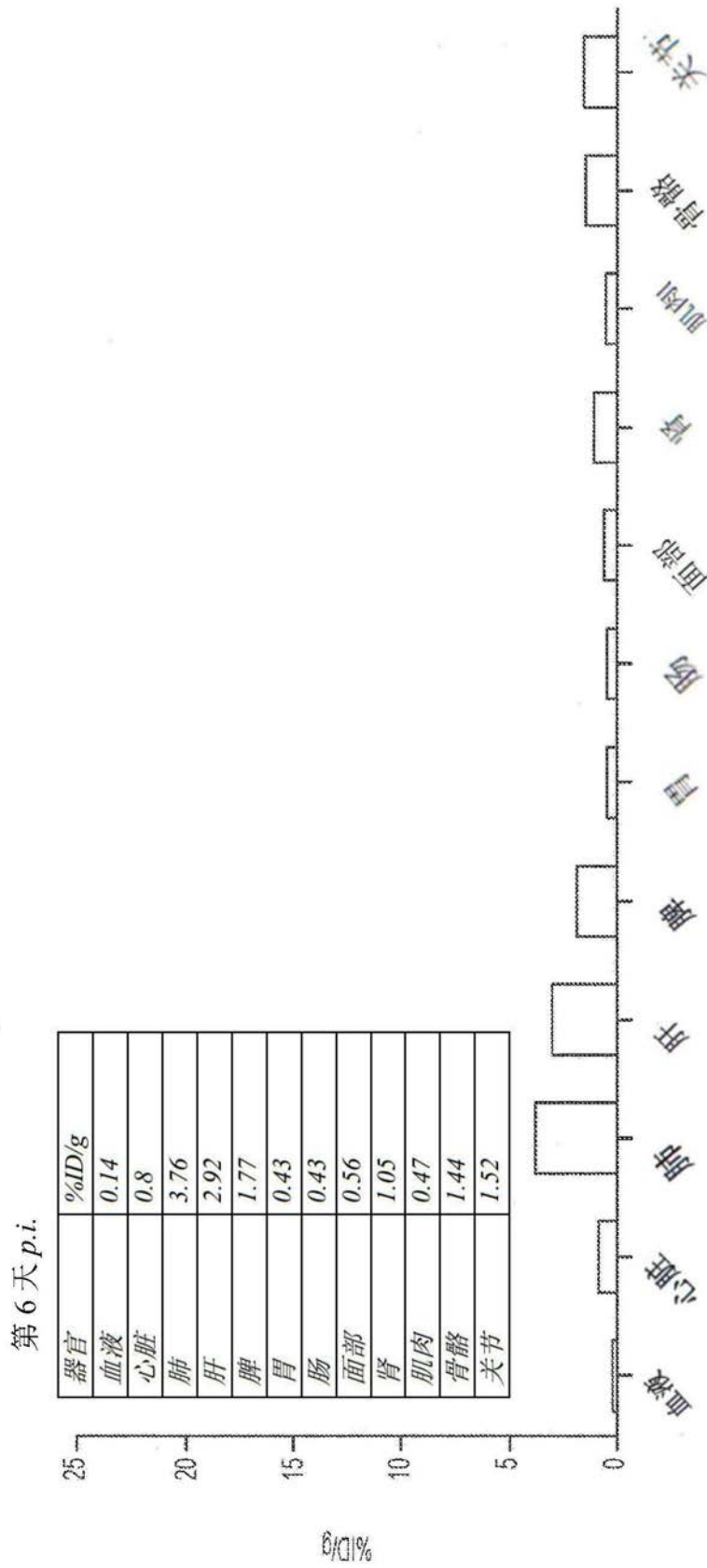


图3

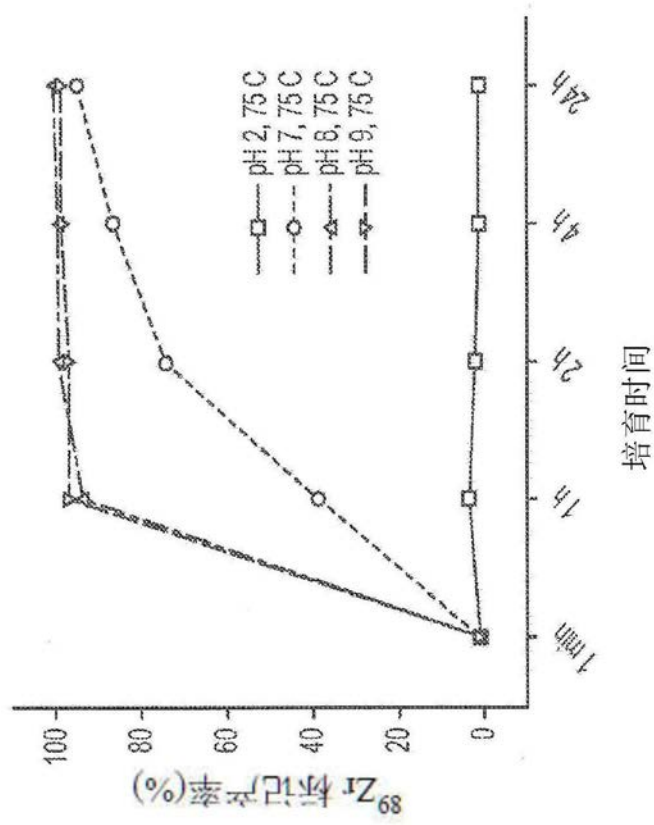


图4A

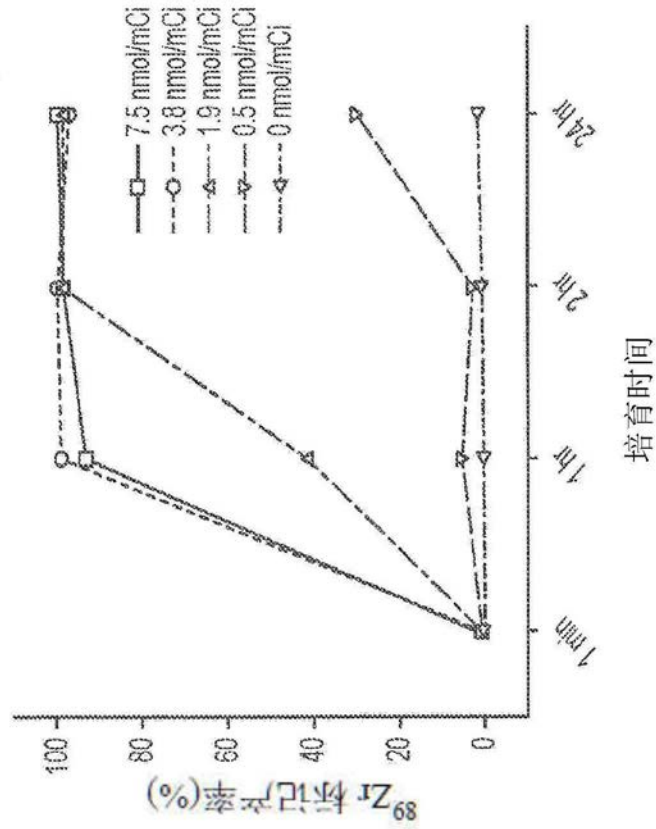


图4B

没有 EDTA 激发

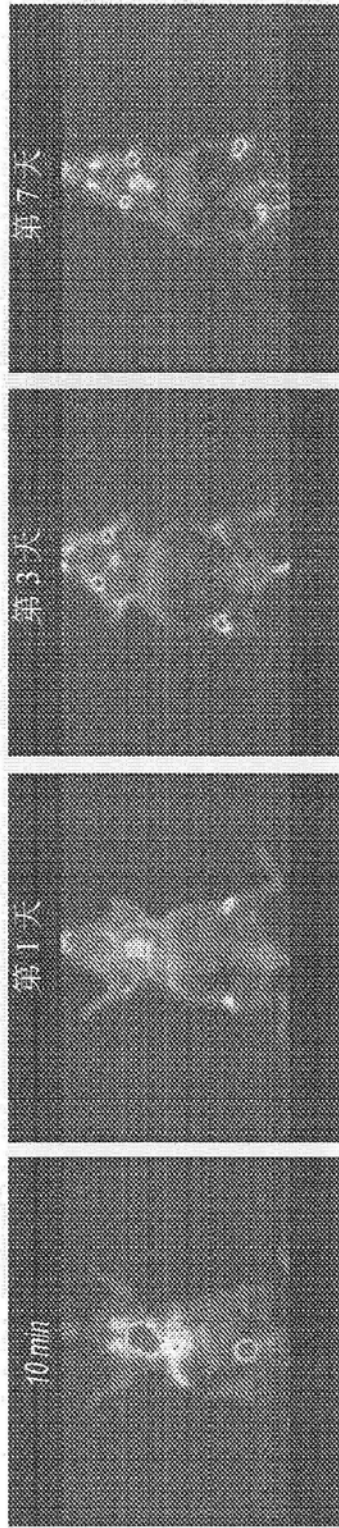


图5A

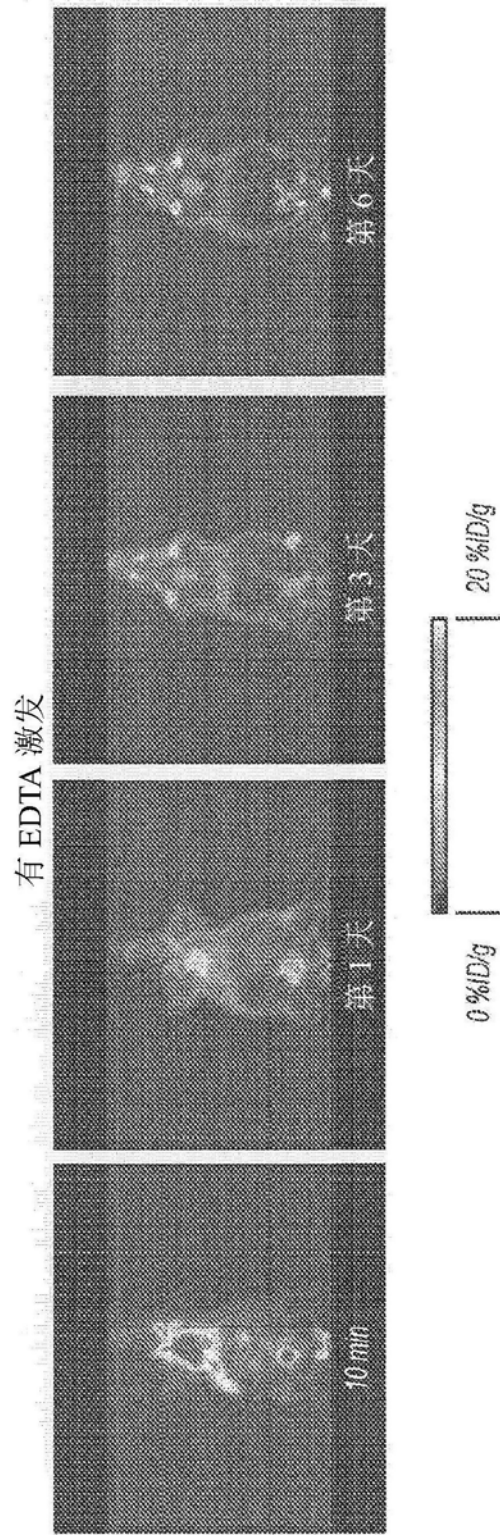


图5B

第 7 天 p.i.

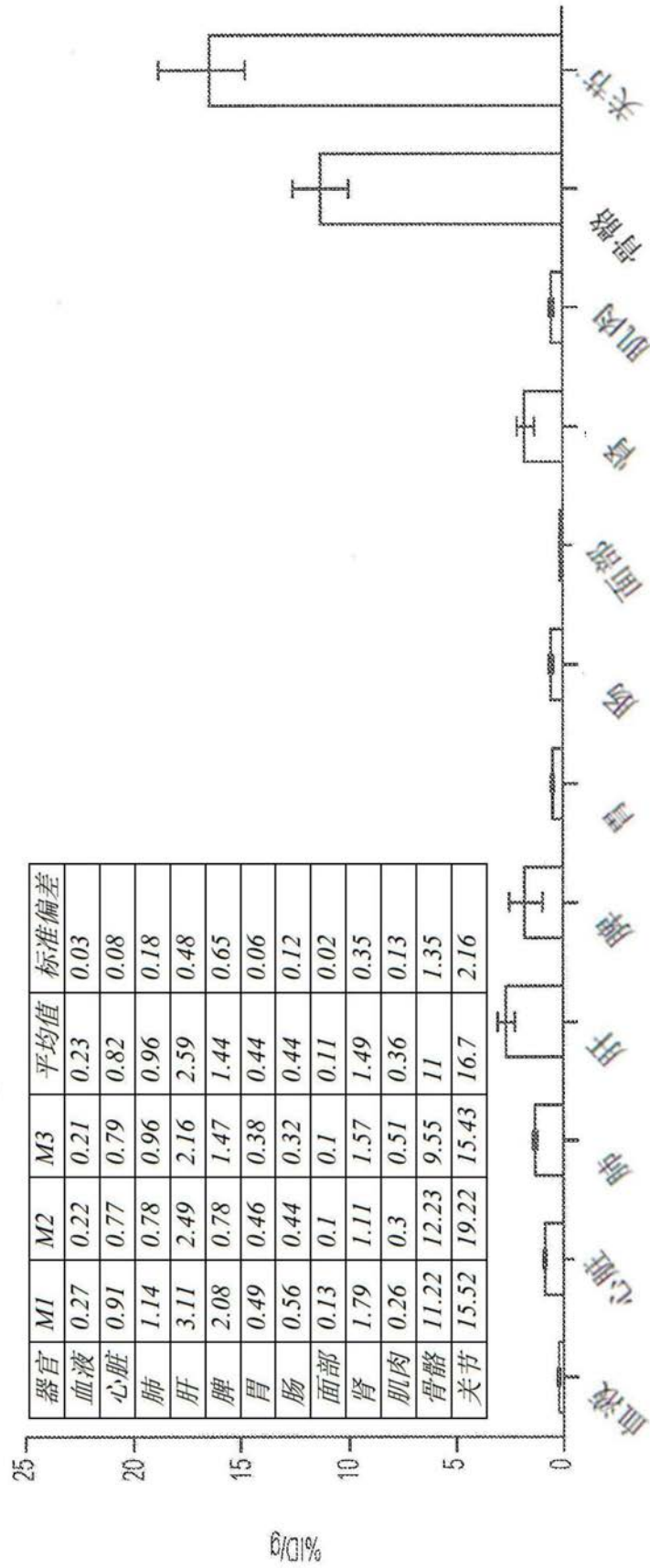


图6

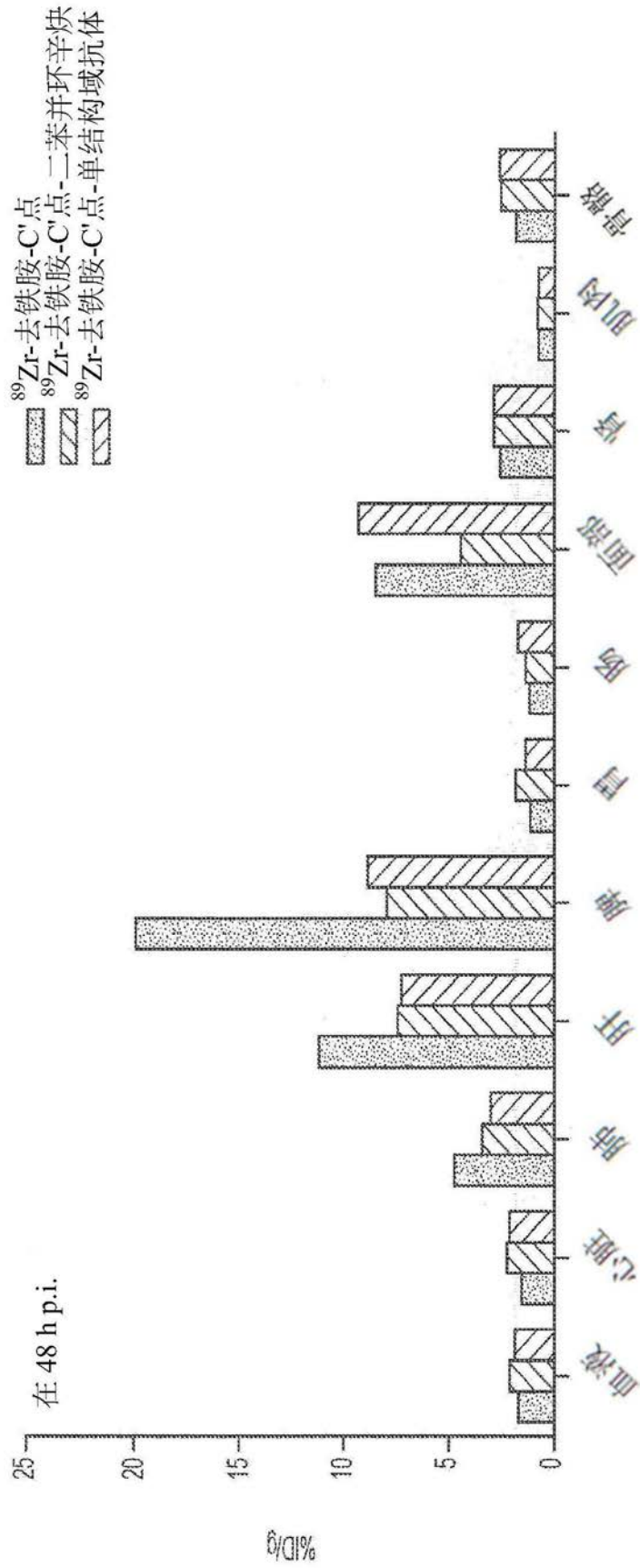
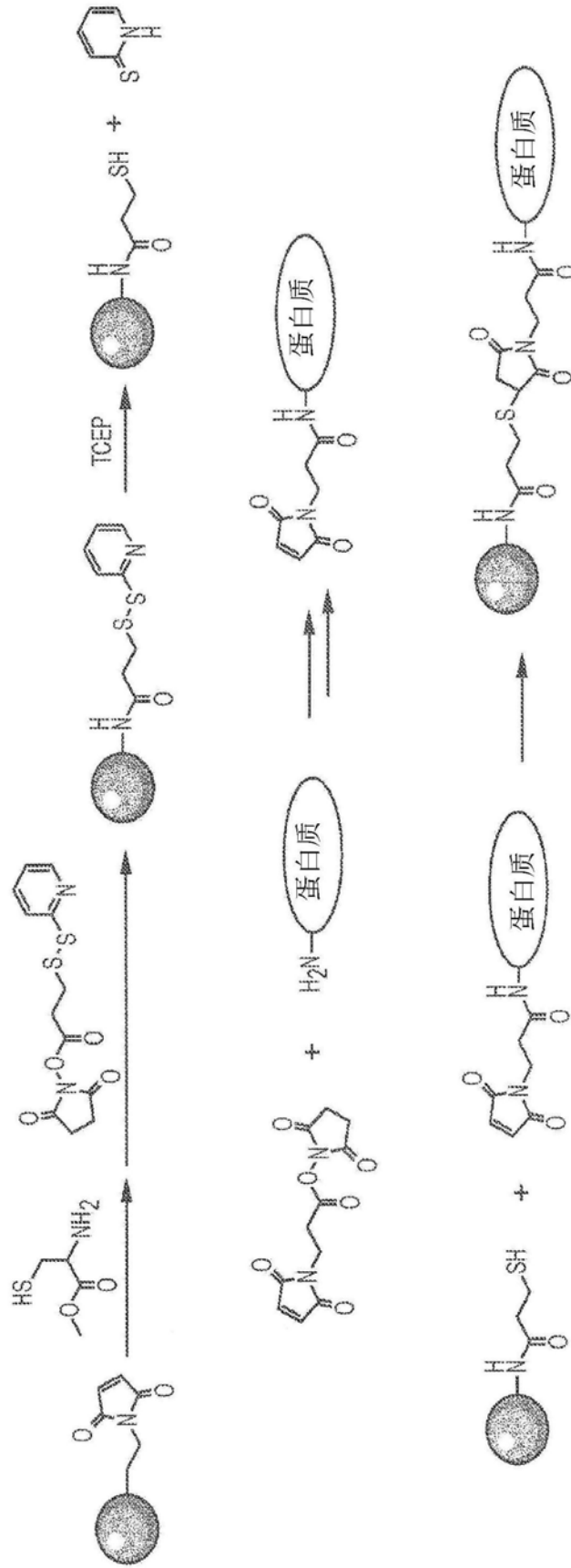
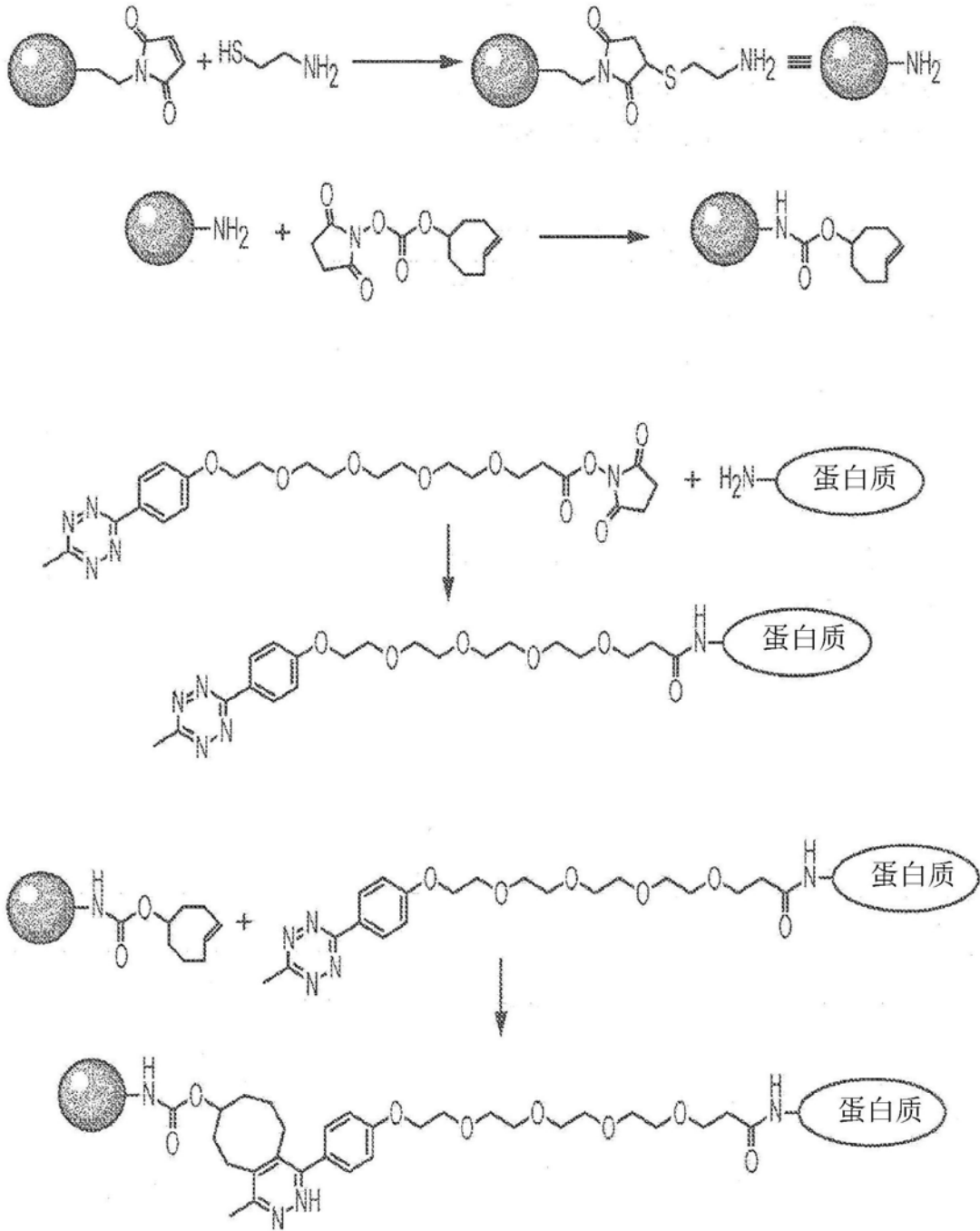


图7



方案1. 硫醇-马来酰亚胺化学法

图8



方案2. 烯炔-四嗪化学法

图9