



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105188717 B

(45)授权公告日 2018.11.30

(21)申请号 201380072874.1

(22)申请日 2013.12.12

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105188717 A

(43)申请公布日 2015.12.23

(30)优先权数据

61/736,067 2012.12.12 US

13/803,878 2013.03.14 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.08.12

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/074762 2013.12.12

(87)PCT国际申请的公布数据

W02014/093675 EN 2014.06.19

(73)专利权人 加利福尼亚大学董事会

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 K·S·拉姆 李源培 潘崇贤

(74)专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266

代理人 陈详 马莉华

(51)Int.Cl.

A61K 31/74(2006.01)

C07D 487/22(2006.01)

A61B 5/00(2006.01)

审查员 郑茹

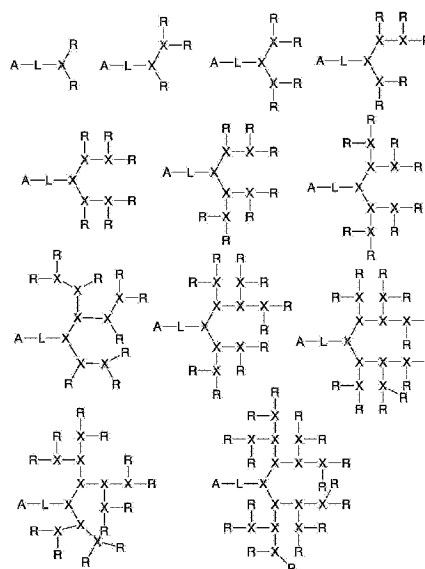
权利要求书3页 说明书34页 附图27页

(54)发明名称

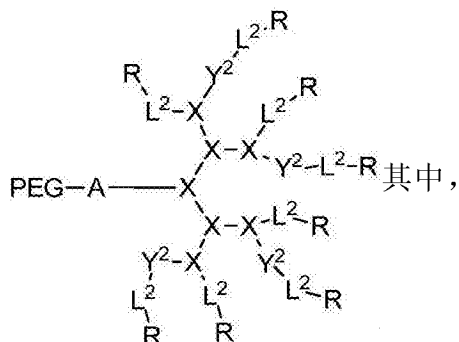
卟啉修饰末端树枝状聚合物

(57)摘要

本发明提供两亲性的末端树枝状聚合物,其能够聚合以形成纳米载体,所述纳米载体的特征是以具有一疏水的核心和一亲水的外部。纳米载体的核心可以包括两亲性的功能体,例如胆酸或胆酸衍生物,并且外部可以包括支化的或线性聚(乙二醇)片段。纳米载体负载物,例如疏水药物和其它材料,可以非共价的方式被掩蔽在核心或可以共价的方式键合至末端树枝状聚合物构建模块。可以定制末端树枝状聚合物结构以改变负载性能、和材料(例如生物膜)的相互作用、以及其它特性。



1. 具有下式结构的化合物:



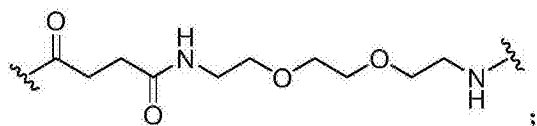
PEG是聚乙二醇 (PEG) 聚合物, 具有1-100kDa的分子量;

A包括至少一个支化的单体单元X并且连接至至少一个PEG基团;

各支化的单体单元X是赖氨酸;

各Y²为无或半胱氨酸;

各L²独立地为键或下式所示的连接物:



各R独立地选自下组: 卟啉、胆酸、(3 α , 5 β , 7 α , 12 α)-7, 12-二羟基-3-(2, 3-二羟基-1-丙氧基)-胆酸 (CA-40H)、(3 α , 5 β , 7 α , 12 α)-7-羟基-3, 12-二(2, 3-二羟基-1-丙氧基)-胆酸 (CA-50H)、或(3 α , 5 β , 7 α , 12 α)-7, 12-二羟基-3-(3-氨基-2-羟基-1-丙氧基)-胆酸 (CA-30H-NH₂), 其中至少一个R基团为卟啉。

2. 如权利要求1所述的化合物, 其中, 各余下的R是胆酸。

3. 如权利要求1所述的化合物, 其中,

PEG是PEG5k;

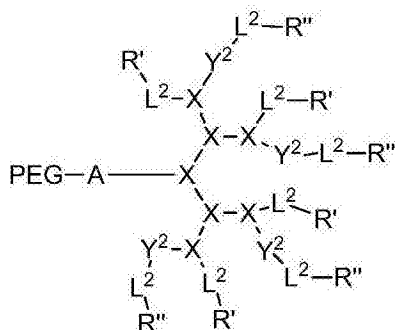
A是赖氨酸;

各L²是键或Ebes连接物;

各Y²是无或半胱氨酸; 并且

各R是胆酸或卟啉。

4. 如权利要求3所述的化合物, 其中所述化合物选自下组:



其中, 各R' 选自下组: 胆酸 (CA)、(3 α , 5 β , 7 α , 12 α)-7, 12-二羟基-3-(2, 3-二羟基-1-丙氧基)-胆酸 (CA-40H)、(3 α , 5 β , 7 α , 12 α)-7-羟基-3, 12-二(2, 3-二羟基-1-丙氧基)-胆酸 (CA-50H)、和(3 α , 5 β , 7 α , 12 α)-7, 12-二羟基-3-(3-氨基-2-羟基-1-丙氧基)-胆酸 (CA-30H-

NH₂) ;并且

各R”是选自下组的卟啉:焦脱镁叶绿酸-a、脱镁叶绿酸、二氢卟吩e 6、紫红素和紫红素酰亚胺。

5. 如权利要求4所述的化合物,其中,所述卟啉是焦脱镁叶绿酸-a。

6. 如权利要求4所述的化合物,其中,所述化合物选自下组:

- (1) 各L²是键,各Y²是无,各R’是胆酸,并且各R”是焦脱镁叶绿酸-a;
- (2) 各L²是连接物Ebes,各Y²是无,各R’是胆酸,并且各R”是焦脱镁叶绿酸-a;
- (3) 各L²是键,各Y²是半胱氨酸,各R’是胆酸,并且各R”是焦脱镁叶绿酸-a;
- (4) 各L²是连接物Ebes,各Y²是半胱氨酸,并且各R’是胆酸,各R”是焦脱镁叶绿酸-a;
- (5) 各L²是键,各Y²是无,并且各R’是胆酸,各R”是焦脱镁叶绿酸-a;
- (6) 各L²是连接物Ebes,并且各Y²是无,各R’是胆酸,各R”是焦脱镁叶绿酸-a;
- (7) 各L²是键,各Y²是半胱氨酸,并且各R’是胆酸,各R”是焦脱镁叶绿酸-a;和
- (8) 各L²是连接物Ebes,各Y²是半胱氨酸,并且各R’是胆酸,各R”是焦脱镁叶绿酸-a。

7. 一种具有内部和外部的纳米载体,所述纳米载体包括多个第一缀合物,其中各缀合物为如权利要求1所述的缀合物;

其中,各缀合物在水性溶剂中自组装以形成纳米载体,通过各两亲性化合物的疏水面向彼此的定向在所述纳米载体的内部形成疏水口袋,其中各缀合物的PEG在所述纳米载体外部自组装。

8. 如权利要求7所述的纳米载体,其中,所述纳米载体进一步包括一疏水药物或一成像剂,使得所述疏水性药物或成像剂被掩蔽在纳米载体的疏水性口袋中。

9. 如权利要求7所述的纳米载体,其中,至少一种单体单元可选地连接至选自下组的组分:光学探针、放射性核素、顺磁剂、金属螯合物和药物。

10. 如权利要求8所述的纳米载体,其中,所述疏水药物选自下组:硼替佐米、紫杉醇、SN38、喜树碱、依托泊苷和多柔比星、多西他赛、道诺霉素、VP16、强的松、地塞米松、长春新碱、长春花碱、替西罗莫司(temsirolimus)、卡莫西尼(carmusine)、索拉非尼、和拉帕替尼。

11. 如权利要求7所述的纳米载体,其中,所述纳米载体进一步包括选自下组的放射金属阳离子:⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、¹⁷⁷Lu、⁶⁷Ga、¹¹¹In、和⁹⁰Yt,其中所述放射金属阳离子螯合于卟啉。

12. 如权利要求7所述的纳米载体,其中,所述缀合物是通过可交联基团交联的。

13. 如权利要求7所述的纳米载体,其中,各缀合物包括:

至少两个胆酸;

至少两个焦脱镁叶绿酸-a基团;

和至少两个可交联基团,其中所述纳米载体的所述缀合物通过所述可交联基团交联。

14. 如权利要求13所述的纳米载体,进一步包括螯合至至少一个所述焦脱镁叶绿酸-a基团的金属。

15. 如权利要求7所述的纳米载体,进一步包括至少一结合缀合物,所述结合缀合物为如权利要求1中所述的缀合物,且所述的缀合物还包括:

连接于所述PEG聚合物的结合配体;

其中在水性溶剂中,各结合缀合物和所述第一缀合物自组装以形成纳米载体,通过各两亲性化合物的疏水面向彼此的定向在所述纳米载体的内部形成疏水口袋,其中各缀合

物的PEG在所述纳米载体的外表面自组装。

16. 根据权利要求11所述的纳米载体在制备组合物中的用途,所述组合物用于通过光动力或光热疗法治疗疾病。

17. 如权利要求16所述的用途,其中,所述疾病为癌症。

18. 如权利要求16所述的用途,其中,所述疾病选自下组:膀胱癌和卵巢癌。

19. 如权利要求16所述的用途,其中,所述纳米载体是权利要求14所述的纳米载体。

20. 一种非诊断性目的的成像方法,包括向待成像的个体给予有效量的权利要求7的纳米载体,其中所述纳米载体进一步包含成像剂。

21. 根据权利要求11所述的纳米载体在制备组合物中的用途,所述组合物用于通过声动力疗法治疗疾病。

卟啉修饰末端树枝状聚合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请是2013年3月14日提交的美国申请号13/803,878的部分继续申请,美国申请号13/803,878要求2012年12月12日提交的美国临时申请号61/736,067的优先权,各申请以全部内容并入本文用于所有目的。

[0003] 关于对在联邦政府资助的研发下作出的发明的权利的声明

[0004] 本发明是在由美国国立卫生研究院和国家癌症研究所授予的拨款号为2R01CA115483-06的政府支持以及VA职业发展奖-2下作出。政府对本发明具有一定的权利。

[0005] 发明背景

[0006] 用于治疗多种癌症类型的多种有效化疗剂非常不溶于水,需要使用会诱发不利副作用的制剂。最近,纳米治疗制剂如 Abraxane® (载紫杉醇的白蛋白纳米粒), Doxil® (载阿霉素的脂质体) 和其他制剂已经被证明可以改善药物的临床毒性特征,但它们的抗肿瘤作用仅比原来的药物制剂略好。这已部分归因于纳米治疗制剂相对大的尺寸(通常>100纳米),这限制了药物渗透到肿瘤块的程度。在某些情况下,这种大尺寸还会导致纳米治疗剂被截留在肝脏和网状内皮系统(RES)内。因此,为在体内有效递送抗癌药,有必要开发更小(20-80nm)的隐形和生物相容性纳米载体。

[0007] 最近我们已经开发了紫杉醇(PTX)或其他疏水性药物的一些新纳米载体。这些新纳米载体,其包括聚(乙二醇)(PEG)和寡聚胆酸,可以在水性下自组装从而形成核-壳(胆烷-PEG)结构,该结构可以在疏水性内部携带PTX。这些两亲载药纳米粒本身是有治疗效果的,具有改善的临床毒性特征。更重要的是,当被靶向癌细胞表面的配体和/或肿瘤血管配体修饰时,这些纳米载体将能够递送毒性治疗剂到肿瘤部位。通过使用各种不同胆烷-PEG制剂或其组合,可调节纳米载体的最终尺寸(10至100nm)。纳米载体组分,PEG和胆酸,均是生物相容和基本上无毒的。事实上,在小鼠模型和陪伴犬体内施用用于抗癌治疗中,紫杉醇纳米疗法的表现是安全的。但是纳米载体对某些药物已经表现出体外和体内某种溶血活性以及下降的负载能力。因此有需要开发具有改善的生物相容性和多功能性的纳米载体。

[0008] 本发明是基于令人惊讶的发现,即构成嵌段的亲水和疏水片段的某些变化,能改善治疗性能而不破坏纳米载体装配,解决了上述需要。

发明概要

[0009] 在一些实施方式中,本发明提供式I所示的化合物:

[0010] $(B)_k-(PEG)_m-A(Y^1)_p-L^1-D-[Y^2-L^2-R]_n$ (I)

[0011] 其中B可以是结合配体;各PEG可以是分子量为1-100kDa的聚乙二醇(PEG)聚合物;A包括至少一支化的单体单元X,且可以连接到至少一个PEG基团;D可以是树枝状聚合物,该树枝状聚合物具有单一中心基团(focal point group),多个分支单体单元X和多个端基;各Y¹和Y²可以为无或可交联的基团,该可交联的基团可以是硼酸、苯二酚或硫醇;各L¹和L²可以独立地为键或连接物(接头),其中L¹可以连接到树枝状聚合物的中心基团;各R可以独立地为树枝状聚合物的端基、卟啉、疏水基团、亲水基团,两亲化合物或药物,其中至少一R

基团可以是卟啉；下标k可以是0或1；下标m可以是0-20的整数；下标n可以是2-20的整数，其中下标n可以与树枝状聚合物上的端基数相等；和下标p可以是0-8。

[0012] 在一些实施方式中，本发明提供具有内部和外部的纳米载体，所述纳米载体包括多个本发明的树枝状聚合物缀合物，其中各化合物在水性溶剂中自组装从而形成纳米载体，以致在纳米载体的内部形成疏水囊，且其中各化合物的PEG自组装在纳米载体的外部。

[0013] 在一些实施方式中，本发明提供通过光动力或光热疗法治疗疾病的方法，包括将治疗有效量的本发明的纳米载体给予有需要的对象，并将所述对象暴露于辐照 (radiation)，从而通过光动力或光热疗法治疗疾病。

附图说明

[0014] 图1示出本发明的末端树枝状聚合物的支化性质的几个实施方式。

[0015] 图2示出4小时孵育后，非靶向NP相对PLZ4-NP被5637人膀胱癌细胞的细胞摄取情况。(b) 用游离PLZ4肽预孵育K9TCC-Pu-In细胞一小时，随后用2.2 μ M的PLZ4-NP再孵育一小时。未经游离PLZ4肽处理的细胞用作100%对照。细胞用福尔马林固定并用流式细胞术分析。

[0016] 图3示出K9TCC-Pu-In膀胱癌细胞的对PLZ4-NP的细胞摄取与 (a) PLZ4-NP浓度 (4hr 孵育) 和 (b) 时间 (2.2 μ M的PLZ4-NP) 的关系。(c) 在玻璃底平皿中用2.2 μ M的PLZ4-NP孵育人膀胱癌细胞系5637二十分钟。加入包含用于核染的介质的DAPI后，采用高分辨形貌成像系统 (Delta vision公司) 获取活细胞影像。箭头表示膜分布。(d) 采用2.2 μ M的PLZ4-NP处理5637两小时。洗涤后，在新鲜的完全培养基中再培养细胞0、24、48和72小时。然后胰酶消化细胞并用10%福尔马林固定，之后用于测试，且通过流式细胞术分析细胞。

[0017] 图4示出膀胱癌细胞特异性摄取PLZ4-NP，但正常尿路上皮细胞不摄取。(a) 采用PLZ4-NP处理共培养的正常犬尿路上皮细胞 (Uro) 和已用DiO预标记的人膀胱癌细胞系5637 (BC) 两小时 (卟啉: 红; DiO: 绿; Hoechst: 蓝) (100X)。

[0018] 图5示出5637膀胱癌细胞在 (a) 暴露于2.2 μ M的PLZ4-NP两小时，之后用各种水平的光 (红光, 650nm波长) 照射后，以及 (b) 用PLZ4-NP或5-ALA孵育两小时之后暴露于4.2J/cm²红光后的细胞毒性。

[0019] 图6示出PZL4-NP和PDT处理5637人膀胱癌细胞后ROS介导的细胞死亡。(a) 用或不用2.2 μ M的PZL4-NP处理细胞两小时，并用氨基苯基荧光素 (APF; ROS指示剂) 负载处理三十分。之后在4.2J/cm²用PDT处理细胞并用流式细胞术分析；(b) 采用不同浓度的PZL4-NP处理细胞2小时，之后用PDT处理。24小时后，通过 **SensoLyte®** 试剂盒 (Anaspec, Fremont, CA) 检测含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 (caspase) 3/7活性 (PTX紫杉醇处理作为细胞凋亡的阳性对照)。

[0020] 图7示出在96孔黑壁板中用2.2 μ M PZL4-NP孵育5637细胞2小时，在孵育结束后用40nM的DiOC₆ (3) (绿, $\Delta \Psi_m^{\text{高}}$) 染色20min从而评价线粒体膜电势 ($\Delta \Psi_m$)，随后通过照射各孔的部分从而引起PDT效应。24小时后，用碘化丙啶对细胞进行染色鉴别细胞死亡。

[0021] 图8示出PDT处理后细胞形态。5637细胞培养于8孔腔室玻片，无处理、仅光 (4.2J/cm²) 处理、仅PLZ4-NP处理或PLZ4-NP和光结合处理 (PDT) 2小时，或T-PN处理2小时后用PDT处理。然后固定细胞并用 **Hema3®** 染色。

[0022] 图9示出PLZ4-NP的选择性摄入膀胱内给药入裸鼠后,原位人膀胱癌异种移植模型对PLZ4-NP的选择性摄入。(a)在NSG鼠内建立人类患者源异体移植(PDX)BL269f。通过将悬浮BL269f细胞直接注入膀胱壁生成BL269f的鼠原位模型。4周后,注意到实体肿瘤生长,膀胱内腔容量降低。在全麻下,我们注射30微升PLZ4-NP进入膀胱2小时。采用PBS清洗膀胱并与体外隔离用于体内成像。之后,立即处死鼠,解剖大部分器官以体外成像。用正常NSG鼠做相似的实验,不进行膀胱肿瘤移植。(b)有或无BL269f异种移植的膀胱固定于O.C.T,获得10微米厚的冰冻切片。采用DAPI(蓝)逆染细胞核,细胞内PLZ4-NP红色荧光。荧光成像研究后,用Hema3®再染组织(黄色箭头:暴露的膀胱癌组织;红色箭头:完整正常上皮细胞)(40x)。

[0023] 图10示出静脉注射非交联PLZ4-NP24小时后肿瘤/膀胱和器官的体外近红外成像。

[0024] 图11示出阿霉素和PLZ4-NP结合介导PDT的细胞毒性作用。(a)以1 μ g/ml阿霉素和/或2.2 μ M卟啉的浓度采用PLZ4-NP、PLZ4-NP-DOX或PLZ4-NM-DOX处理5637细胞2小时。洗涤后,细胞不暴露或暴露于2.1和4.2J/cm²的光下。48小时后检测细胞生存能力(活力)。* $p < 0.05$ (b)采用PLZ4-NP、PLZ4-NP-DOX、无DOX、DOXil、PLZ4-NM-DOX以及PLZ4-NP和PLZ4-NM-DOX的组合处理5637细胞5分钟和两小时。采用流式细胞术评价胞内阿霉素浓度。该结果以三个独立实验的均值 $\pm$ SD呈现。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (c)采用PLZ4-NP(PNP)、PLZ4-NM-DOX(PN-DOX)、PNP和PN-DOX的组合、以及PLZ4-NP-DOX(PNP-DOX)处理5637细胞两小时。通过荧光显微镜(100X)检测卟啉(红)和阿霉素(绿)。(d)通过共聚焦显微镜(600X油镜)在5分钟、1小时和3小时检测PLZ4-NP-DOX(PNP-DOX)的亚细胞分布。洗涤细胞但不固定。PNP(卟啉:红),阿霉素(绿)。

[0025] 图12示出了本发明的各不同方面,包括:(a)多功能、自组装卟啉-末端树枝状聚合物,PEG^{5k}-Por₄-CA₄,具有4焦脱镁叶绿酸-a分子和4胆酸连接于线性PEG链末端的示意图;(b)纳米卟啉作为用于癌症治疗的巧妙的“8合1(eight-in-one)”纳米医学平台的示意图;(c)纳米卟啉的TEM影响(磷钨酸染色,PTA);(d)空纳米卟啉和螯合不同金属离子的纳米卟啉的吸收光谱;负载Cu(II)的纳米卟啉(e)和Gd(III)(f)通过TEM观察(PTA染色);(g)在PBS和SDS中的纳米卟啉的荧光发射光谱,405nm激发;(h)存在或不存在SDS的情况下纳米卟啉溶液(10 μ L)的近红外荧光影像,使用625/20nm激发带通滤波器和700/35nm滤波器;(i)通过使用2',7'-二氯荧光素乙酰乙酸盐(DCF)作为ROS指示剂检测PBS和SDS中纳米卟啉(0.125mg/mL)单线态氧的产生;纳米卟啉的浓度依赖的光-热传导,包括(j)热成像和(k)定量温度变化曲线(n=2),其中,在用1.25w/cm²NIR激光(690nm)照射20秒后使用热感摄像机监测在有或没有SDS时纳米卟啉溶液(10 μ L)的温度;和(l)使用1.25w/cm²NIR激光照射溶液(4.0mg/mL)120秒后的具有高温度的纳米卟啉的代表性图像。

[0026] 图13示出PEG^{5k}-Por₄-CA₄末端树枝状聚合物的化学结构。

[0027] 图14示出了PEG^{5k}-Por₄-CA₄末端树枝状聚合物的MALDI-TOF质谱。

[0028] 图15示出了PEG^{5k}-Por₄-CA₄末端树枝状聚合物的¹H NMR谱,分别记录于DMSO-d₆(a)和D₂O中(b)。PEG链(3.5-3.7ppm),胆酸(0.5-2.4ppm)和焦脱镁叶绿酸-a(0.9-2.2ppm)的化学位移能够在末端树枝状聚合物于DMSO-d₆中的¹H NMR谱(a)中观察到。胆酸中甲基质子18、19、和21的特征峰能够分别在0.58,0.80和0.95ppm看到。焦脱镁叶绿酸-a中甲基质子8和18的特征峰能够分别在1.8和1.9ppm看到。当在D₂O中记NMR谱,PEG^{5k}-Por₄-CA₄中胆酸质子和焦脱镁叶绿酸-a质子被高度抑制(b),显示水相环境中形成的核-壳胶束结构高度限制了

胆烷和焦脱镁叶绿酸-a中质子的运动。

[0029] 图16示出：(a) 典型的交联卟啉-末端树枝状聚合物($\text{PEG}^{5k}\text{-Cys}_4\text{-Por}_4\text{-CA}_4$)示意图，具有连接于线性PEG末端的4个半胱氨酸、4个焦脱镁叶绿酸-a分子和4个胆酸，把Ebes用作间隔物(spacer)；(b) 二硫键交联纳米卟啉的TEM影像(PTA染色)；(c) 在PBS和SDS存在下的交联纳米卟啉的荧光发射光谱，与未交联纳米卟啉的对比，其中使用谷胱甘肽(GSH)作为还原剂来打破二硫键的交联(激发于405nm)；(d) 相对于在初始负载时添加的药物水平，二硫键交联NPs的阿霉素负载和体积变化，其中最终NP溶液的体积保持在1mL并且最终末端树枝状聚合物的浓度为20mg/mL；(e) 在人血浆中纳米卟啉实时释放阿霉素的研究，基于FRET方法的示意图；在人血浆中照射($1.25\text{w}/\text{cm}^2$ 5min) 24h和28h负载阿霉素交联纳米卟啉(CNP-DOX)的FRET信号(f)和FRET比率变化(g)；和(h)使用GSH(10mM)处理24h的人血浆中NP-DOX的FRET比率变化。

[0030] 图17示出了有或没有SDS时NPs(10 μL)的热成像，用NIR激光(690nm) $0.1\text{w}/\text{cm}^2$ 照射120秒后，使用热成像摄影机拍摄。对于NM-POR，焦脱镁叶绿酸-a的浓度保持在0.2mg/mL，与NPs的1.0mg/mL的焦脱镁叶绿酸-a的浓度相当。

[0031] 图18示出了 $\text{PEG}^{5k}\text{-Cys}_4\text{-Por}_4\text{-CA}_4$ 末端树枝状聚合物的化学结构。

[0032] 图19示出了没有染色的负载于纳米卟啉的Cu(II)的TEM影像。

[0033] 图20示出了有(a)和没有(b) 2.5g/L SDS时NPs的粒径。使用动态光散射(DLS)检测粒径。加入SDS后NPs被完全降解。

[0034] 图21示出了有和没有SDS时纳米卟啉溶液液滴的明场像。

[0035] 图22示出了有(a)和没有(b) 2.5g/L SDS时游离焦脱镁叶绿酸-a负载于标准的 $\text{PEG}^{5k}\text{-CA}_8$ 胶束(NM-POR)的粒径。使用动态光散射(DLS)检测粒径。加入SDS后NM-POR被完全降解。

[0036] 图23示出了有和没有SDS时游离焦脱镁叶绿酸-a负载于标准的 $\text{PEG}^{5k}\text{-CA}_8$ 胶束(NM-POR) 7溶液(10 μL) (上图)的近红外荧光影像，都使用625/20nm的激发带通滤波器(excitation bandpass filter)和700/35nm的滤波器(emission filter)，并与纳米卟啉溶液(下图)对比。对于NM-POR，焦脱镁叶绿酸-a的浓度保持在0.2mg/mL，与NPs的1.0mg/mL的焦脱镁叶绿酸-a的浓度相当。通过计算在SDS中和在PBS中平均荧光强度的比值，发现NPs具有比在相同的Por浓度下的NM-POR多10倍的自淬灭(self-quenching)。

[0037] 图24示出了有和没有SDS时NM-POR溶液(10 μL)的热成像，用NIR激光(690nm) $1.25\text{w}/\text{cm}^2$ 照射20秒后，使用热成像摄影机拍摄。对于NM-POR，焦脱镁叶绿酸-a的浓度保持在0.2mg/mL，与NPs的1.0mg/mL的焦脱镁叶绿酸-a的浓度相当。

[0038] 图25示出了非交联纳米卟啉(20mg/mL)的粒径分别负载(a)阿霉素(2.5mg/mL)，(b)紫杉醇(1.0mg/mL)，(c)长春新碱(1.5mg/mL)，(d)硼替佐米(2.0mg/mL)，(e)索拉非尼(2.0mg/mL)，和(f)17-烯丙基氨基-17-去甲氧基格尔德霉素(17AAG)(1.0mg/mL)。使用动态光散射(DLS)检测粒径。

[0039] 图26示出了在50%(v/v)的人血浆存在下负载DOX的交联NPs(NP-DOX)的连续粒径检测。

[0040] 图27示出了 $\text{PEG}^{5k}\text{-Cys}_4\text{-L}_8\text{-CA}_8$ 末端树枝状聚合物的MALDI-TOF质谱。

[0041] 图28示出了二硫键交联的NPs在没有(a)和有2.5g/L SDS(b)，2.5g/L SDS+20mM

NAC (c), 2.5g/L SDS+20mM GSH (d) 时的粒径。使用动态光散射 (DLS) 检测粒径。加入 SDS 后, 非交联的 NPs 完全降解。作为对比, 在相同条件下, 交联的 NPs 的大小维持 20–30nm。形成交联 NPs 的二硫键在存在 SDS 时, 在加入内源性还原剂谷胱甘肽 (GSH, 20mM) 和外源性的还原剂 N-乙酰半胱氨酸 (NAC, 20mM) 约 40min 后, 解开了。

[0042] 图 29 示出了在 SKOV-3 卵巢癌细胞中的细胞毒性, 在细胞暴露于 NPs、负载 Por 的 PEG^{5k}-CA₈ 胶束 (NM-POR) 和游离焦脱镁叶绿酸-a (Por) 2h 后, 然后在黑暗条件下孵育 22h。

[0043] 图 30 示出了在 SKOV-3 卵巢癌细胞中的细胞毒性, (a) 在细胞暴露于 4.4μM NPs 2h 后, 然后使用不同水平的 NIR 光照射, 和 (b) 使用 NPs 或 5-ALA 孵育 24h, 然后暴露于 0.07W cm⁻² NIR 光下 60s;

[0044] 图 30 (c) 示出了在 NPs 和光处理 SKOV-3 卵巢癌细胞后, ROS 介导的细胞死亡。不用或用 2.2μM NPs 处理细胞 24h 并加载 DCF 30min。在使用 0.07W cm⁻² NIR 光照 60s 后, 使用荧光显微镜检测 ROS 的产生图片。

[0045] 图 30 (d) 示出了在 96 孔黑壁板中使用 2.2μM NPs 处理 24h 的 SKOV-3 卵巢癌细胞, 在孵育末期使用 40nM 的 DiOC₆ (3) (绿, ΔΨ_m^高) 染色 20min, 来评价线粒体膜电位 (ΔΨ_m), 随后照射各孔的一部分来引起 PDT 效应。照射区域标记为 “L.” 24h 后, 用碘化丙啶 (PI) 对细胞进行染色鉴别细胞死亡。

[0046] 图 30 (e) 示出了使用不同浓度的 NPs 处理 24h 后随 PDT 的细胞中半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (caspase) 3/7 的活性。24h 后, 使用 SensoLyte® 试剂盒 (Anaspec, Fremont, CA) 检测 caspase 3/7 活性。

[0047] 图 30 (f) 示出了 PDT 后细胞形态。SKOV-3 卵巢癌细胞培养于 8 孔腔室玻片, 仅 PBS、仅 NPs 和联合 NPs 和光照 (0.07W cm⁻², 60 秒) 处理 24h。然后固定细胞 2h 后, 用 Hema3® 染色。用 NPs+光照处理的细胞表现出了明显的细胞核膨胀、细胞变圆、细胞膜破坏、和细胞质聚集。

[0048] 图 30 (g) 示出了阿霉素联合 NP 介导的光疗法的细胞毒性。使用不同浓度的 DOX 和/或 NPs, 仅使用 NPs、负载阿霉素纳米卟啉 (NP-DOX)、负载阿霉素标准胶束 (NM-DOX) 处理 SKOV-3 卵巢癌细胞 24h。洗涤后, 将细胞暴露于光照 24h 后检测细胞活力 *p<0.05。

[0049] 图 30 (h) 示出了 NP-AAG 对 PC3 前列腺癌细胞系的生长抑制效果, 相比于仅使用 NP 和游离药物 17AAG。在 NP-AAG 和 NP 组中保持 NP 浓度一致。移除并使用新鲜的培养基替换药物, 然后将细胞暴露于 NIR 光照射 2min。72h 后使用 MTT 测试检测生长抑制。左栏, 未光照; 框内右栏, 光照。n=3。

[0050] 图 30 (i) 示出了 24h 后使用膜联蛋白 V 和 PI 染色 (n=3) 分析细胞凋亡。

[0051] 图 30 (j) 示出了 12h 后使用相关抗体的 Western blotting 分析 HIF1α、生存素 (survivin)、AKT、STAT3 和 Src 水平。

[0052] 图 31 示出了 NP-AAG 对 LNCAP 前列腺癌细胞系和 RPWE1 正常前列腺细胞系的生长抑制效果, 相比于仅使用 NP 和游离药物 17AAG。NP-AAG 和 NP 组中的 NP 浓度保持一致。移除并使用新鲜的培养基替换药物, 然后将细胞暴露于 NIR 光照射 2min。72h 后使用 MTT 测试检测生长抑制。左栏, 未光照; 右栏框内, 光照。n=3。

[0053] 图 32 (a) 示出了交联的 NPs 和 NM-POR (均包含 0.5mg/mL 的 Por) 在 10x DMSO 中的吸光度。图 32 (b) 示出了 NIR 的荧光信号和图 32 (c) 示出了注射交联 NPs 和 NM-POR (Por 剂量: 5mg/kg) 5min 后的从异种移植肿瘤的小鼠中获取的血液的定量荧光。图像作为感兴趣区域 (ROI)

的平均信号进行分析。 $***p<0.001$ 。

[0054] 图33显示了注射NPs和NM-POR (Por剂量:5mg/kg) 5min之后暴露于光照后从异种移植肿瘤的裸鼠中获取的血液的ROS产生量。光剂量:0.1W, 60s和300s。使用2', 7'-二氯代荧光素乙酰乙酸盐 (2', 7'-dichlorofluorescein diacetate, DCF) 作为ROS指示剂进行检测。 $**p<0.002$, $***p<0.001$ 。

[0055] 图34显示了异种移植肿瘤的裸鼠体外的溶血活性。使用交联NP (a, b) 和NM-POR (c, d) 注射1min后收集2 μ L小鼠血液, 使用PBS稀释至100 μ L, 随后暴露于光照0、60、和300秒。光照后 (Por剂量:5mg/kg)。光剂量:0.1W cm^{-2} , 4小时后, 离心沉降血细胞, 在NM-POR处理的小鼠的样本中观察到了溶血 (a, c)。进一步制备了经过300秒细胞离心的样本, 用来评估细胞形态 (b, d) (Hema3[®]染色, 100X油镜)。相对于在交联的NP样本中发现的正常的血细胞形态 (b), 在NM-POR样本 (d) 中RBCs和WBCs经过光照后, 被大量的破坏, 这极有可能是因为ROS引起的对血细胞的氧化性损伤。

[0056] 图35示出了异种移植肿瘤的裸鼠的血液温度, 注射二硫键交联的NPs和NM-POR (Por剂量:5mg/kg) 光照后5min。光剂量:0.1W, 300秒。使用热成像摄影机监测温度。

[0057] 图36示出了异种移植肿瘤的裸鼠的肿瘤中的ROS产生量, 其中注射PBS和二硫键交联的NPs或NM-POR (Por剂量:5mg/kg) 24h后并经光照后 ($n=5$)。光剂量:1.25W/ cm^2 , 120秒。使用2', 7'-二氯代荧光素乙酰乙酸盐 (DCF) 作为ROS指示剂进行检测。 $***p<0.001$ 。

[0058] 图37示出了异种移植肿瘤的裸鼠的肿瘤的温度变化 (ΔT), 其中注射PBS和二硫键交联的NPs或NM-POR (Por剂量:5mg/kg) 24h后并经光照后 ($n=5$)。光剂量:1.25W/ cm^2 , 120秒。使用热成像摄影机监测温度。 $***p<0.001$ 。

[0059] 图38 (a) 示出了SKOV-3卵巢癌移植瘤的典型的体内NIRF图像, 静脉注射非交联和二硫键交联的NPs (NP剂量:25mg/kg)。白色箭头指向肿瘤位置。

[0060] 图38 (b) 示出了SKOV-3卵巢癌移植瘤的典型的体外NIRF图像, 注射非交联 (左) 和二硫键交联的 (右) NPs 24h后。

[0061] 图38 (c) 示出了注射非交联和二硫键交联的NPs ($n=4$; NP剂量:25mg/kg) 24h后的SKOV-3肿瘤的定量NIRF荧光反应, 其中, 在肿瘤和正常肌肉中图像作为感兴趣区域 (ROI) 的平均信号进行分析 ($***p<0.001$)。

[0062] 图38 (d) 示出了注射1、24、48h后通过大规模成像 (LSI) 激光扫描共聚焦显微镜观察到的在SKOV-3肿瘤中的二硫键交联的NPs分布投影图像, NPs成像为红色, 葡萄糖聚糖-FITC (dextran-FITC) 标记的肿瘤血管成像为绿色 (标尺=100 μ m)。

[0063] 图38 (e) 示出了具有乳腺癌的转基因小鼠 (FVB/n Tg (MMTV-PyVmT) 的典型性的体内和体外NIRF光图像, 在注射二硫键交联的NPs 24h后 (NP剂量:25mg/kg)。

[0064] 图38 (f) 示出了具有乳腺癌的转基因小鼠的转移的肺中NPs的积累, 注射24h后使用LSI激光扫描共聚焦显微镜观察。

[0065] 图39示出了从异种移植肿瘤模型中获取的血液的典型的NIR荧光信号, 注射二硫键交联的NPs (Por剂量:5mg/kg) 后5min, 在没有或有SDS和GSH (10mM) 的情况下。

[0066] 图40示出了组织病理学图像确认了转基因小鼠的乳腺癌 (FVB/n Tg (MMTV-PyVmT) 在肺部的转移病灶 (箭头)。(H&E染色, 4X和插图40X)

[0067] 图41 (a) 示出了没有或有SDS时体外Gd-NPs的MRI信号, 获自在Bruker Biospec 7T

MRI扫描仪上使用FLASH序列的T1-加权MR (T1-weighted MR) 成像。

[0068] 图41 (b) 示出了在注射之前和注射0.15mL Gd-NPs (Gd剂量:0.015mmole/kg) 后的使用FLASH序列的乳腺癌转基因小鼠 (FVB/n Tg (MMTV-PyVmt)) 的典型对照轴向MR图像。白色箭头指向肿瘤位置。

[0069] 图41 (c) 示出了具有SKOV-3卵巢癌异种移植裸鼠的PET图像,在注射⁶⁴Cu-标记NPs (150-200μL, ⁶⁴Cu剂量:0.6-0.8mCi) 后4、8、16、24、48h,其中白色箭头指向肿瘤位置。

[0070] 图41 (d) 示出了具有A549肺癌异种移植的裸鼠的3D冠状MR图像,使用FLASH序列,在注射0.15mL ⁶⁴Cu和Gd双重-标记NPs (150-200μL, ⁶⁴Cu剂量:0.6-0.8mCi, Gd剂量:0.015mmol/kg) 4或24h后,其中白色箭头指向肿瘤位置。

[0071] 图41 (e) 示出了具有A549肺癌异种移植的裸鼠的肿瘤切片的PET-MR图像,在注射双重-标记NPs 4或24h后,其中白色箭头指示了肿瘤中心的坏死区域。

[0072] 图42示出了离心后滤液⁶⁴Cu-纳米卟啉 (左图) 和Gd-⁶⁴Cu-纳米卟啉 (右图) 的快速薄层层析 (ITLC) 痕迹。放射化学产率 (RYC) 高于96.5%,同时放射化学纯度大于97%。ITLC方法:Biodex检测条展开于90mM EDTA/0.9%NaCl (aq),在Bioscan读板仪上成像。

[0073] 图43 (a) 示出了乳腺癌转基因小鼠 (FVB/n Tg (MMTV-PyVmt)) 肿瘤的典型的热成像,在注射交联的NPs 24h后光照之后。图43 (b) 示出了注射PBS的小鼠图像。

[0074] 图43 (c) 示出了转基因小鼠肿瘤的温度变化,在注射交联的NPs和PBS并光照后。

[0075] 图43 (d) 示出了使用交联的NPs和PBS (对照) 处理24h随后激光照射的转基因小鼠的ROS产生量。 $p < 0.025$ 。

[0076] 图43 (e) 示出了照射PBS或NPs 24h后照射的小鼠的肿瘤组织病理学。光照剂量为 1.55 W cm^{-2} 2min, NPs剂量为25mg/kg (相当于5mg/kg的卟啉) 图43a-e。

[0077] 图43 (f) 示出了使用交联的NPs、CNP-DOX和NM-DOX (标准胶束无卟啉) 处理的乳腺癌转基因小鼠 (n=8) 肿瘤体积的变化,在第0、7、和14天 (黑色箭头),随后在注射24h后将所有组的小鼠肿瘤暴露在光照下 (红色箭头)。DOX剂量:2.5mg/kg、NP剂量:25mg/kg (相当于5mg/kg的卟啉),光剂量: 1.25 W cm^{-2} 2mm。图43 (g) 示出了在处理第34天的转基因小鼠的图片。(*:乳腺肿瘤)

[0078] 图43 (h) 示出了SKOV-3卵巢癌异种移植的小鼠 (n=8) 的肿瘤体积的变化,在第0、4、和8天使用交联的NPs和CNP-DOX处理 (黑色箭头),随后在第1、和9 (红色箭头) 天照射。注射PBS和NM-DOX作为对照。DOX剂量:2.5mg/kg, NP剂量:25mg/kg (相对于5mg/kg卟啉),光剂量: 0.25 W cm^{-2} 2mm。 $p < 0.01$ 。

[0079] 图43 (i) 示出了MRI-指导的PTT/PDT。注射Gd-NPs (Gd剂量:0.015mmole/kg) 的鼠的典型MR图像,其中之前或之后进行激光照射。白色箭头指示肿瘤位置。在注射后第0 (注射前)、4、24、48、72、96和168h采集图像。在剂量为 1.25 W cm^{-2} 3mm照射24h后 (注射48h后) MR图像显示了肿瘤位置的大的信号缺失 (绿色箭头),并且在注射168h (7天) 后肿瘤完全消失。

[0080] 图44显示了在NP-介导的PDT后的乳腺肿瘤组织中的caspase3的反应性和DNA破坏。转基因小鼠用PBS (对照) 或NPs处理,随后在注射24h后进行光处理。DOX剂量:2.5mg/kg, NP剂量:25mg/kg (相当于5mg/kgPor),光剂量: 1.25 W cm^{-2} 2mm。在24小时后收获肿瘤并在福尔马林中固定。用组织切片 (4μm厚) 进行IHC检测裂解的caspase3。使用TUNEL (TdT-介导dUTP缺口末端标记) 检测试剂盒 (GenScript, Piscataway, NJ) 依据制造商的说明检测破坏

的DNA。通过免疫化学检测裂解的caspase3的抗体反应性(细胞信号)。

[0081] 图45显示了SKOV-3卵巢癌异种移植小鼠(n=8)的体重变化,第0、4、和8使用纳米卟啉(NPs)和负载阿霉素纳米卟啉(NP-DOX)处理(箭头轴线标记),随后在第1和9天激光(690nm)照射(三角轴向标记)。注射PBS和负载阿霉素标准胶束(NM-DOX)作为对照。DOX剂量:2.5mg/kg,NP剂量:25mg/kg(相当于5mg/kg的Por),光剂量:0.25W cm⁻² 2min。

[0082] 发明详述

[0083] I. 定义

[0084] 如本文所用,术语“树枝状聚合物(树枝状聚合物)”和“树枝状聚合物(树枝状polymer)”是指包含中心(focal point)、多个支化单体单元和多个端基的支化聚合物。单体彼此连接以形成从中心延伸并在端基结束的臂(或“树突(dendrons)”)。树枝状聚合物的中心可以与本发明化合物的其他片段连接,并且端基可以被其他化学部分进一步官能化。

[0085] 如本文所用,术语“末端树枝状聚合物”是指一种树枝状聚合物,其包含亲水性PEG片段以及与该树枝状聚合物的一个或多个端基共价结合的一个或多个化学部分。这些部分可以包括但不限于疏水性基团、亲水性基团、两亲性化合物以及药物。使用正交保护基团策略,可以将不同的部分选择性地安装于期望的端基。

[0086] 如本文所用,术语“纳米载体”是指由本发明的树枝状聚合物缀合物的聚集而产生的胶束。纳米载体具有疏水性核心和亲水性外部。

[0087] 如本文所用,术语“单体”和“单体单元”是指二氨基羧酸、二羟基羧酸和羟基氨基羧酸。本发明的二氨基羧酸基团的实例包括但不限于2,3-二氨基丙酸、2,4-二氨基丁酸、2,5-二氨基戊酸(鸟氨酸)、2,6-二氨基己酸(赖氨酸)、(2-氨基乙基)-半胱氨酸、3-氨基-2-氨基甲基丙酸、3-氨基-2-氨基甲基-2-甲基丙酸、4-氨基-2-(2-氨基乙基)丁酸和5-氨基-2-(3-氨基丙基)戊酸。本发明的二羟基羧酸基团的实例包括但不限于甘油酸、2,4-二羟基丁酸、甘油酸、2,4-二羟基丁酸、2,2-双(羟基甲基)丙酸和2,2-双(羟基甲基)丁酸。羟基氨基羧酸的实例包括但不限于丝氨酸和高丝氨酸。本领域技术人员会认识到其他单体单元可用于本发明。

[0088] 如本文所用,术语“氨基酸”是指携带胺官能团的羧酸。氨基酸包括上述二氨基羧酸。氨基酸包括天然存在的 α -氨基酸,其中胺结合于与羧酸的羰基碳相邻的碳。天然存在的 α -氨基酸的实例包括但不限于L-天冬氨酸、L-谷氨酸、L-组氨酸、L-赖氨酸和L-精氨酸。氨基酸还包括天然存在的 α -氨基酸的D-对映异构体以及 β -氨基酸和其他非天然存在的氨基酸。

[0089] 如本文所用,术语“连接物(接头)”是指使树枝状聚合物缀合物的一个片段与另一个片段相连接的化学部分。用于将连接物连接于树枝状聚合物的片段的键的类型包括但不限于酰胺、胺、酯、氨基甲酸酯、脲、硫醚、硫代氨基甲酸酯、硫代碳酸酯和硫脲。本领域技术人员会认识到其他类型的键可用于本发明。

[0090] 如本文所用,术语“低聚物”是指五个或更少的共价连接在一起的如上所述的单体。单体可以以线性或支化方式连接在一起。低聚物可以用作末端树枝状聚合物的支化片段的中心。

[0091] 如本文所用,术语“疏水性基团”是指不可溶于水的或被水排斥的化学部分。疏水性基团的实例包括但不限于长链烷烃和脂肪酸、碳氟化物、硅酮、诸如胆固醇的某些类固

醇,以及许多聚合物,包括例如聚苯乙烯和聚异戊二烯。

[0092] 如本文所用,术语“亲水性基团”是指可溶于水的或被水吸引的化学部分。亲水性基团的实例包括但不限于醇、短链羧酸、季胺、磺酸盐、磷酸盐、糖和某些聚合物,例如PEG。

[0093] 如本文所用,术语“两亲性化合物”是指具有疏水性部分和亲水性部分二者的化合物。例如,本发明的两亲性化合物能具有化合物的一个亲水面和化合物的一个疏水面。可用于本发明的两亲性化合物包括但不限于胆酸以及胆酸类似物及衍生物。

[0094] 如本文所用,术语“胆酸”是指(R)-4-((3R,5S,7R,8R,9S,10S,12S,13R,14S,17R)-3,7,12-三羟基-10,13-二甲基十六氢-1H-环戊[a]菲-17-基)戊酸。胆酸还被称为3 α ,7 α ,12 α -三羟基-5 β -胆烷酸;3- α ,7- α ,12- α -三羟基-5- β -胆烷-24-酸;17- β -(1-甲基-3-羧基丙基)本胆烷-3 α ,7 α ,12 α -三醇;胆酸(cholalic acid);以及胆酸(cholalin)。胆酸衍生物及类似物,例如别胆酸、蟾胆酸、禽胆酸(avicholic acid)、脱氧胆酸、鹅脱氧胆酸,也可用于本发明。胆酸衍生物可以设计为调节由末端树枝状聚合物组装而产生的纳米载体的性质,例如胶束稳定性和膜活性。例如,胆酸衍生物能具有被一个或多个甘油基团、氨基丙二醇基团或其他基团修饰的亲水面。

[0095] 如本文所用,术语“药物”或“治疗剂”是指能治疗和/或减轻病况或疾病的作用剂。药物可以为疏水性药物,即任何排斥水的药物。可用于本发明的疏水性药物包括但不限于紫杉醇、阿霉素(多柔比星)、依托泊苷、伊立替康、SN-38、环孢菌素A、鬼臼毒素、卡氮芥、两性霉素、伊沙匹隆、帕土匹龙(埃博霉素类)、雷帕霉素和铂类药物。本发明的药物还包括前药形式。本领域技术人员会认识到其他药物可用于本发明。

[0096] 如本文所用,术语“可交联的基团”或“交联基团”是指能与另一分子上的类似或互补的基团结合的官能团,例如与第二树枝状聚合物上的第二可交联基团连接的第一树枝状聚合物上的第一可交联基团。适于作为本发明中可交联基团和交联基团的基团包括诸如半胱氨酸的硫醇、硼酸和1,2-二醇,包括1,2-二羟基苯,例如邻苯二酚。当可交联基团和交联基团结合时,它们形成交联键,例如二硫化物和硼酸酯。其他可交联基团和交联基团适于本发明。

[0097] 如本文所用,术语“键裂解组分”是指能裂解使用本发明的可交联基团和交联基团而形成的交联键的作用剂。键裂解组分可以为还原剂,例如谷胱甘肽(当交联键为二硫化物时),或甘露醇(当由硼酸和1,2-二醇形成交联键时)。

[0098] 如本文所用,术语“成像剂”是指使身体器官、组织或系统成像的化学品。示例性成像剂包括顺磁剂、光学探针和放射性核素。

[0099] 如本文所用,术语“治疗(treat)”、“治疗(treating)”和“治疗(treatment)”是指在治疗或减轻损伤、病理、病状或症状(例如疼痛)方面的任何成功标志,包括任何客观或主观参数,例如症状的减轻、消退、消失,或者使症状、损伤、病理或病况对于患者而言更耐受,减少症状或病况的频率或持续时间,或者在某些情况中,防止症状或病况的发作。症状的治疗或减轻能基于任何客观或主观的参数,包括例如体检结果。

[0100] 如本文所用,术语“个体”是指动物,例如哺乳动物,包括但不限于灵长类动物(例如人)、牛、绵羊、山羊、马、狗、猫、兔、大鼠、小鼠等。在某些实施方式中,所述个体为人。

[0101] 如本文所用,术语“治疗有效量或剂量”或“治疗足够量或剂量”或“有效或足够量或剂量”是指产生给药所预期的治疗作用的剂量。准确的剂量将取决于治疗目的,并且将由

本领域技术人员使用已知技术(参见,例如Lieberman,药物剂型(第1-3卷,1992);Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding(1999);Pickar, Dosage Calculations(1999);以及Remington:和药科学和实践,第20版,2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins)来确定。在敏化细胞中,治疗有效剂量通常可低于非敏化细胞的常规治疗有效剂量。

[0102] 如本文所用,术语“光动力疗法”是指使用无毒、光敏感化合物,所述化合物暴露于光照下能够变成对恶性或疾病细胞有毒。光动力疗法包括包括光敏剂、光源和氧。暴露于光照下,光敏剂产生与恶性组织反应并破坏恶性组织的活性氧类(单线态氧,氧自由基)。多种光敏剂可以使用,包括卟啉、叶绿素和色素。

[0103] 如本文所用,术语“光热疗法”是指使用在暴露于光照下能够产生热量的无毒、光敏感化合物。像光动力疗法一样,光热疗法包括光敏剂、和光源(典型为红外线)。但是光热疗法不需要氧。多种光敏剂可以使用,包括卟啉、叶绿素和色素。

[0104] II. 末端树枝状聚合物

[0105] 本发明提供了具有亲水性聚(乙二醇)(PEG)片段和疏水性片段,和至少一卟啉的两亲性末端树枝状聚合物缀合物。PEG片段可以具有包括一个或多个PEG链的支化或线性构造。可由具有疏水面和亲水面的胆酸来提供末端树枝状聚合物的疏水片段。卟啉、胆酸和PEG通过可包含多种酸重复单元的低聚物和/或聚合物来连接。典型地,低聚物和聚合物包括二氨基羧酸、赖氨酸。末端树枝状聚合物可在溶液中聚集以形成具有疏水性内部和亲水性外部的胶束。该胶束可用作纳米载体以递送具有低水溶解度的药物或其他作用剂。

[0106] 在一些实施方式中,本发明提供一缀合物,具有聚乙二醇(PEG)聚合物、至少两个具有疏水面和亲水面的两亲性化合物、至少一卟啉、可选地至少两个交联基团,和一树枝状聚合物,所述树枝状聚合物共价地连接于所述PEG、所述两亲性化合物、所述卟啉和所述交联基团,其中在水性溶剂中各缀合物自组装以形成纳米载体,以便通过各两亲性化合物的疏水面面向彼此的定向在所述纳米载体的内部形成疏水口袋,其中在所述纳米载体的外表面各缀合物的PEG自组装。

[0107] 在一些实施方式中,本发明提供式I所示的化合物:

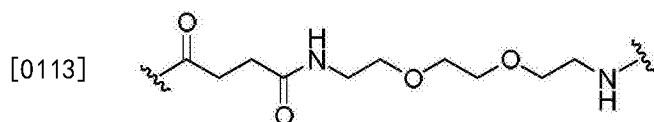
[0108] $(B)_k - (PEG)_m - A(Y^1)_p - L^1 - D - [Y^2 - L^2 - R]_n$ (I)

[0109] 其中B可以是结合配体;各PEG可以是具有1-100kDa分子量的聚乙二醇(PEG)聚合物;A包括至少一支化的单体单元X并且可以是连接至至少一PEG基团;D可以是具有单中心(focal point)基团、多个支化单体单元X和多个端基的树枝状聚合物;各 Y^1 和 Y^2 可以是缺失的或可交联基团,其可为硼酸、二羟基苯或硫醇;各 L^1 和 L^2 可以独立地为键或连接物,其中 L^1 可以联结于树枝状聚合物的中心基团;各R可以独立地为树枝状聚合物的端基,卟啉、疏水性基团、亲水性基团、两亲性化合物或药物,其中至少一个R基可以是卟啉;下标k可以是0或1;下标m可以是0-20的整数;下标n可以是2-20的整数,其中下标n可等于树枝状聚合物上端基的数目;并且下标p可以是0-8。

[0110] 任何合适的结合配体都可以用在本发明的化合物中。例如,能够靶向一个特定的器官、健康组织或疾病组织的结合配体。典型的结合配体包括具有氨基酸序列QDGRMGF的PLZ4配体。参见U.S.申请号:13/497,041,提交日期2010年9月23,现在的U.S.公开号为2012/0230994。

[0111] 连接物 L^1 和 L^2 能包括任何合适的连接物。通常,连接物为双官能连接物,其具有用于与两个末端树枝状聚合物片段中的各个进行反应的两个官能团。在一些实施方式中,连接物 L^1 和 L^2 可为杂双官能连接物。在一些实施方案中,连接物 L^1 和 L^2 可为同双官能连接物。在一些实施方式中,连接物 L^1 和 L^2 可独立地为聚乙二醇、聚丝氨酸、聚甘氨酸、聚(丝氨酸-甘氨酸)、脂肪族氨基酸、6-氨基己酸、5-氨基戊酸、4-氨基丁酸或 β -丙氨酸。本领域技术人员会认识到,连接物的尺寸和化学性质可根据要连接的末端树枝状聚合物片段的结构而变化。

[0112] 在一些实施方式中,连接物 L^1 和 L^2 可以具有通式:



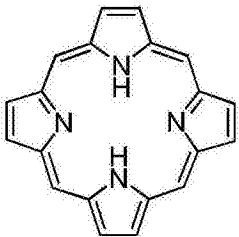
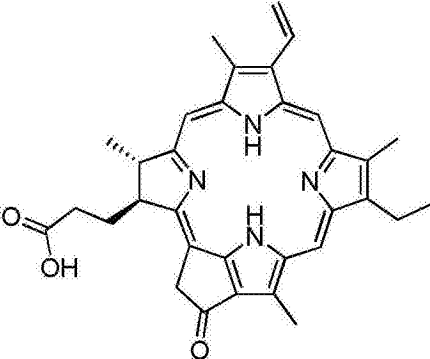
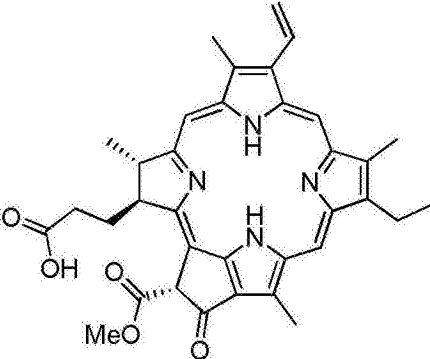
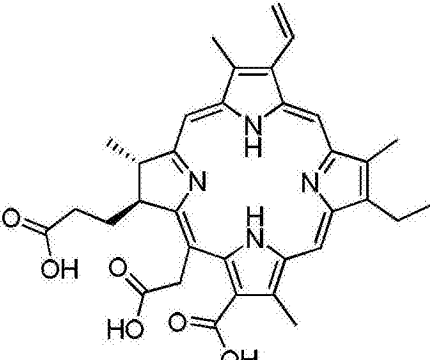
[0114] 任何尺寸和构造的聚乙二醇(PEG)聚合物可用于本发明的纳米载体。在一些实施方式中,PEG为1kDa至100kDa。在其他实施方式中,PEG为1kDa至10kDa。在一些其他实施方式中,PEG为约3kDa。在又一些其他实施方式中,额外的PEG聚合物连接至两亲性化合物。例如,当两亲性化合物为胆酸时,3个以内的PEG聚合物连接至各个胆酸。与两亲性化合物连接的PEG聚合物在尺寸上为200Da至10,000Da。在另一些其他实施方式中,与两亲性化合物连接的PEG聚合物在尺寸上为1kDa至5kDa。本领域技术人员会认识到其他PEG聚合物和其他亲水性聚合物可用于本发明。PEG能为任何合适的长度。

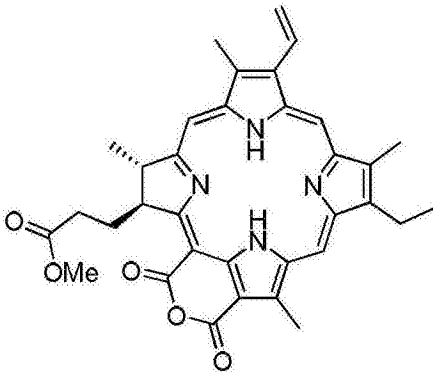
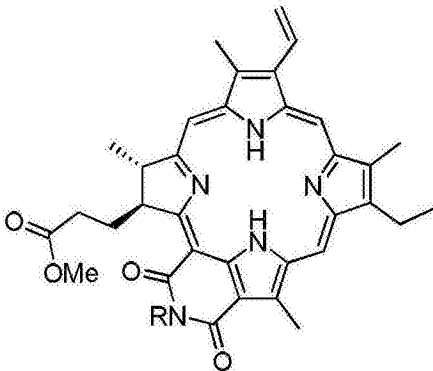
[0115] 所述树枝状聚合物可为任何合适的树枝状聚合物。树枝状聚合物可由包括氨基酸或其他双官能AB₂-型单体的支化单体单元形成,其中A和B为两种不同的能在一起反应以使所得聚合物链具有形成A-B键的支化点的官能团。在一些实施方式中,各支化单体单元X可以为二氨基羧酸、二羟基羧酸和羟基氨基羧酸。在一些实施方式中,各二氨基羧酸可为2,3-二氨基丙酸、2,4-二氨基丁酸、2,5-二氨基戊酸(鸟氨酸)、2,6-二氨基己酸(赖氨酸)、(2-氨基乙基)-半胱氨酸、3-氨基-2-氨基甲基丙酸、3-氨基-2-氨基甲基-2-甲基丙酸、4-氨基-2-(2-氨基乙基)丁酸或5-氨基-2-(3-氨基丙基)戊酸。在一些实施方式中,各二羟基羧酸可为甘油酸、2,4-二羟基丁酸、2,2-双(羟基甲基)丙酸、2,2-双(羟基甲基)丁酸、丝氨酸或苏氨酸。在一些实施方式中,各羟基氨基羧酸可为丝氨酸或高丝氨酸。在一些实施方式中,二氨基羧酸为氨基酸。在一些实施方式中,各支化单体单元X为赖氨酸。

[0116] 末端树枝状聚合物的树枝状聚合物可为树枝状聚合物的任何合适的代,包括1、2、3、4、5代或更多代,其中树枝状聚合物的各“代”是指在树枝状聚合物的一个分支之后,在中心与端基之间交汇的支化点的数量。末端树枝状聚合物的树枝状聚合物还可以包括局部代(partial-generation),例如1.5、2.5、3.5、4.5、5.5等,其中树枝状聚合物的支化点仅具有单一的分支。参见,例如图1中的结构。树枝状聚合物的各种构造可以提供任何合适数量的端基,包括但不限于2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31或32个端基。

[0117] 末端树枝状聚合物或末端树枝状聚合物片段的中心可以为任何合适的官能团。在一些实施方式中,中心包括使末端树枝状聚合物或末端树枝状聚合物片段与另一片段连接的官能团。中心官能团可为亲核基团,包括但不限于醇、胺、硫醇或肼。中心官能团还可以为亲电子体,例如醛、羧酸或羧酸衍生物,包括酰基氯或N-羟基琥珀酰亚胺基酯。

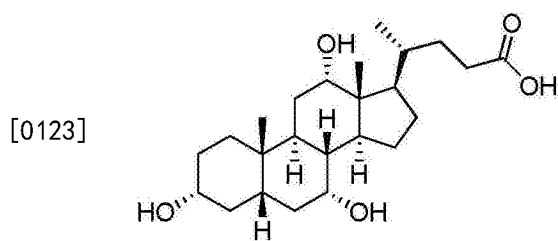
[0118] 安装在末端树枝状聚合物周围的R基团可以为任何合适的化学部分,包括卟啉、亲水性基团、疏水性基团或两亲性化合物,其中至少一个R基团可以是卟啉。任何适宜的卟啉均可以用于本发明的末端树枝状聚合物。代表性的适合本发明的卟啉包括,但不限于,焦脱镁叶绿酸-a、脱镁叶绿酸、二氢卟吩e6、紫红素或紫红素酰亚胺(Purpurinimide)。在一些实施方式中,卟啉可以是焦脱镁叶绿酸-a。代表性的结构如下:

卟啉	结构
卟啉	
焦脱镁叶绿酸-a	
脱镁叶绿酸	
二氢卟吩 e6 (Chlorin e6)	

卟啉	结构
紫红素	
紫红素酰亚胺	

[0121] 疏水性基团的实例包括但不限于长链烷烃和脂肪酸、碳氟化物、硅酮、诸如胆固醇的某些类固醇,以及许多聚合物,包括例如聚苯乙烯和聚异戊二烯。亲水性基团的实例包括但不限于醇、短链羧酸、胺、磺酸盐、磷酸盐、糖和某些聚合物,例如PEG。两亲性化合物的实例包括但不限于具有一个亲水面和一个疏水面的分子。

[0122] 可用于本发明的两亲性化合物包括但不限于胆酸以及胆酸类似物及衍生物。“胆酸”是指(R)-4-((3R,5S,7R,8R,9S,10S,12S,13R,14S,17R)-3,7,12-三羟基-10,13-二甲基十六氢-1H-环戊[a]菲-17-基)戊酸,其具有结构:



[0124] 胆酸衍生物和类似物包括但不限于别胆酸、螯胆酸、禽胆酸、脱氧胆酸和鹅脱氧胆酸。胆酸衍生物可以设计为调节由末端树枝状聚合物组装而产生的纳米载体的性质,例如胶束稳定性和膜活性。例如,胆酸衍生物能具有被一个或多个甘油基团、氨基丙二醇基团或其他基团修饰的亲水面。

[0125] 末端树枝状聚合物端基还可以包括药物,例如紫杉醇、多柔比星、依托泊苷、伊立替康、SN-38、环孢菌素A、鬼臼毒素、卡氮芥、两性霉素、伊沙匹隆、帕土匹龙(埃博霉素类)、雷帕霉素和铂类药物。本领域技术人员会认识到其他药物可用于本发明。

[0126] 在一些实施方式中,各R可为胆酸、(3 α ,5 β ,7 α ,12 α)-7,12-二羟基-3-(2,3-二羟

基-1-丙氧基)-胆酸、(3 α ,5 β ,7 α ,12 α)-7-羟基-3,12-二(2,3-二羟基-1-丙氧基)-胆酸、(3 α ,5 β ,7 α ,12 α)-7,12-二羟基-3-(3-氨基-2-羟基-1-丙氧基)-胆酸、胆固醇甲酸酯、多柔比星或大黄酸。在一些实施方式中,各R可以为胆酸。

[0127] 末端树枝状聚合物骨架可根据分支数量以及端基和R基团的数量和化学性质而变化,其会调节溶液构象、流变学性质和其他特性。末端树枝状聚合物能具有任何合适数量n的端基和任何合适数量的R基团。在一些实施方式中,n可为2至70,或2至50,或2至30,或2至10。在一些实施方式中,n为2至20。

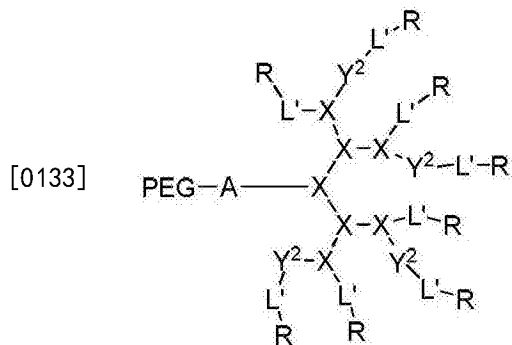
[0128] 末端树枝状聚合物可具有在周围的单一类型的R基团,或R基团以任何合适比例的任何组合。通常,数量n个R基团的至少一半是不同于端基的。例如,数量n个R基团的至少一半可为疏水性基团、亲水性基团、两亲性化合物、药物或其任何组合。在一些实施方案中,数量n个R基团的一半为两亲性化合物。

[0129] 在一些实施方式中,所述化合物具有结构:

[0130] $\text{PEG-A-D-[Y}^2\text{-L}^2\text{-R]}_n$ (Ia)

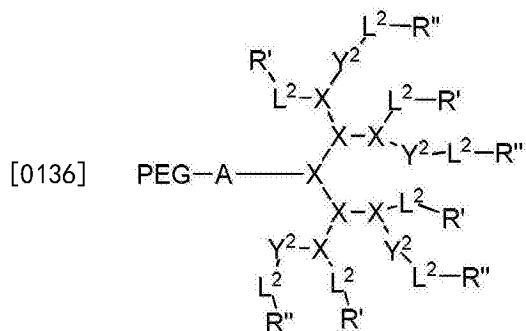
[0131] 其中,各R可以独立地为卟啉、两亲性化合物或药物,其中至少一个R基为卟啉。

[0132] 在一些实施方式中,所述化合物具有结构:



[0134] 其中PEG可以是PEG5k,各支化单体单元X可以是赖氨酸,A可以是赖氨酸,各L²可以是键或连接物Ebes,各Y²可以是无或可以是半胱氨酸;并且各R可以是胆酸或卟啉。

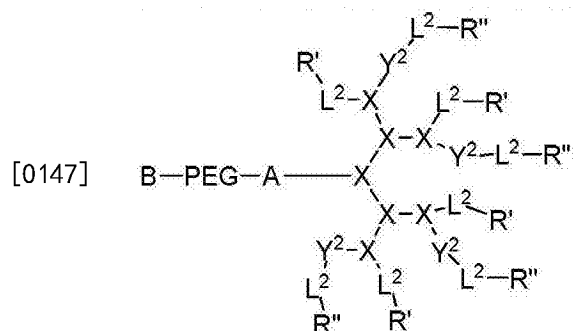
[0135] 在一些实施方式中,所述化合物具有结构:



[0137] 其中各R'可以是胆酸(CA)、(3 α ,5 β ,7 α ,12 α)-7,12-二羟基-3-(2,3-二羟基-1-丙氧基)-胆酸(CA-40H)、(3 α ,5 β ,7 α ,12 α)-7-羟基-3,12-二(2,3-二羟基-1-丙氧基)-胆酸(CA-50H)、或(3 α ,5 β ,7 α ,12 α)-7,12-二羟基-3-(3-氨基-2-羟基-1-丙氧基)-胆酸(CA-30H-NH₂);并且各R''可以是选自下组的卟啉:焦脱镁叶绿酸-a、脱镁叶绿酸、二氢卟吩e6、紫红素或紫红素酰亚胺。在一些实施方式中,卟啉可以是焦脱镁叶绿酸-a。在其它一些实施方式中,下标k是1。在其它一些实施方式中,所述化合物可以是:

- [0138] (1) 各 L^2 是键, 各 Y^2 是无, 各 R' 是胆酸, 各 R'' 是焦脱镁叶绿酸-a, 并且下标k是0;
- [0139] (2) 各 L^2 是连接物Ebes, 各 Y^2 是无, 各 R' 是胆酸, 各 R'' 是焦脱镁叶绿酸-a, 并且下标k是0;
- [0140] (3) 各 L^2 是键, 各 Y^2 是半胱氨酸, 各 R' 是胆酸, 各 R'' 是焦脱镁叶绿酸-a, 并且下标k是0;
- [0141] (4) 各 L^2 是连接物Ebes, 各 Y^2 是半胱氨酸, 各 R' 是胆酸, 各 R'' 是焦脱镁叶绿酸-a, 并且下标k是0;
- [0142] (5) 各 L^2 是键, 各 Y^2 是无, 各 R' 是胆酸, 各 R'' 是焦脱镁叶绿酸-a, 并且下标k是1;
- [0143] (6) 各 L^2 是连接物Ebes, 各 Y^2 是无, 各 R' 是胆酸, 各 R'' 是焦脱镁叶绿酸-a, 并且下标k是1;
- [0144] (7) 各 L^2 是键, 各 Y^2 是半胱氨酸, 各 R' 是胆酸, 各 R'' 是焦脱镁叶绿酸-a, 并且下标k是1;或
- [0145] (8) 各 L^2 是连接物Ebes, 各 Y^2 是半胱氨酸, 各 R' 是胆酸, 各 R'' 是焦脱镁叶绿酸-a, 并且下标k是1。

[0146] 在一些实施方式中, 所述化合物具有结构:



[0148] 其中, 各 R' 可为胆酸(CA)、(3 α , 5 β , 7 α , 12 α)-7, 12-二羟基-3-(2, 3-二羟基-1-丙氧基)-胆酸(CA-40H)、(3 α , 5 β , 7 α , 12 α)-7-羟基-3, 12-二(2, 3-二羟基-1-丙氧基)-胆酸(CA-50H)、(3 α , 5 β , 7 α , 12 α)-7, 12-二羟基-3-(3-氨基-2-羟基-1-丙氧基)-胆酸(CA-30H-NH₂); 并且各 R'' 可以是选自下组的卟啉: 焦脱镁叶绿酸-a、脱镁叶绿酸、二氢卟吩e 6、紫红素或紫红素酰亚胺。在一些实施方式中, 卟啉可以是焦脱镁叶绿酸-a。在其它一些实施方式中, 下标k是1。在其它一些实施方式中, 所述化合物可以是:

[0149]

化合物	B	PEG (mw)	A	X	L ²	Y ²	R'	R''
1	无	5k	赖氨酸	赖氨酸	键	无	胆酸	焦脱镁叶绿酸-a
2	无	5k	赖氨酸	赖氨酸	Ebes	无	胆酸	焦脱镁叶绿酸-a
3	无	5k	赖氨酸	赖氨酸	键	半胱氨酸	胆酸	焦脱镁叶绿酸-a
4	无	5k	赖氨酸	赖氨酸	Ebes	半胱氨酸	胆酸	焦脱镁叶绿酸-a
5	PLZ4	5k	赖氨酸	赖氨酸	键	无	胆酸	焦脱镁叶绿酸-a
6	PLZ4	5k	赖氨酸	赖氨酸	Ebes	无	胆酸	焦脱镁叶绿酸-a
7	PLZ4	5k	赖氨酸	赖氨酸	键	半胱氨酸	胆酸	焦脱镁叶绿酸-a
8	PLZ4	5k	赖氨酸	赖氨酸	Ebes	半胱氨酸	胆酸	焦脱镁叶绿酸-a

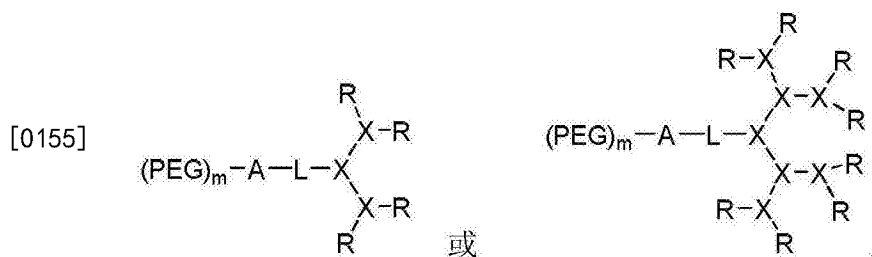
[0150] 本发明的化合物也可以包括螯合于卟啉的金属阳离子。任何适合的金属都可以螯合于卟啉。在本发明中可以用的金属包括碱金属、碱土金属、过渡金属和后过渡金属。碱金属包括Li, Na, K, Rb和Cs。碱土金属包括Be, Mg, Ca, Sr和Ba。过渡金属包括Sc, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Y, Zr, Nb, Mo, Tc, Ru, Rh, Pd, Ag, Cd, La, Hf, Ta, W, Re, Os, Ir, Pt, Au, Hg和Ac。后过渡金属包括Al, Ga, In, Tl, Ge, Sn, Pb, Sb, Bi, 和Po。任何这些金属的放射性同位素也可通过卟啉螯合。在一些实施方式中, 金属阳离子可以是螯合于卟啉的。在其他实施方式中, 金属阳离子可以是放射金属阳离子。在一些其它实施例中, 螯合到卟啉的放射金属阳离子可以是⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ¹⁷⁷Lu, ⁶⁷Ga, ¹¹¹In, 和⁹⁰Yt。

[0151] III. 具有分支的PEG部分的末端树枝状聚合物

[0152] 本发明的末端树枝状聚合物包括两个支化的片段, 通过它们的中心连接在一起。通常, 所述末端树枝状聚合物包括任何上述的或之前描述的 (WO 2010/039496) 末端树枝状聚合物, 以及包括两个或更多的键合到低聚中心的PEG链的支化PEG片段。

[0153] 末端树枝状聚合物的树枝状聚合物可为树枝状聚合物的任何合适的代, 包括1、2、3、4、5代或更多代, 其中树枝状聚合物的各“代”是指在树枝状聚合物的一个分支之后, 在中心与端基之间交汇的支化点的数量。末端树枝状聚合物的树枝状聚合物还可以包括局部代 (partial-generation), 例如1.5、2.5、3.5、4.5、5.5等, 其中树枝状聚合物的支化点仅具有单一的分支。参见, 例如图1中的结构。树枝状聚合物的各种构造可以提供任何合适数量的端基, 包括但不限于2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31或32个端基。

[0154] 在一些实施方式中, 所述化合物可以是:



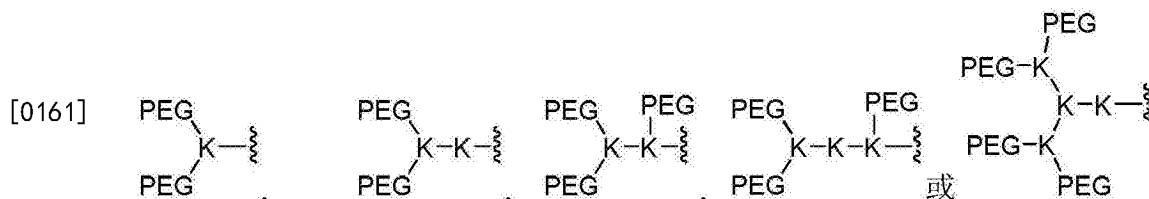
[0156] 其中各支化的单体单元X是赖氨酸。

[0157] 在一些实施方式中,所述化合物可以是:



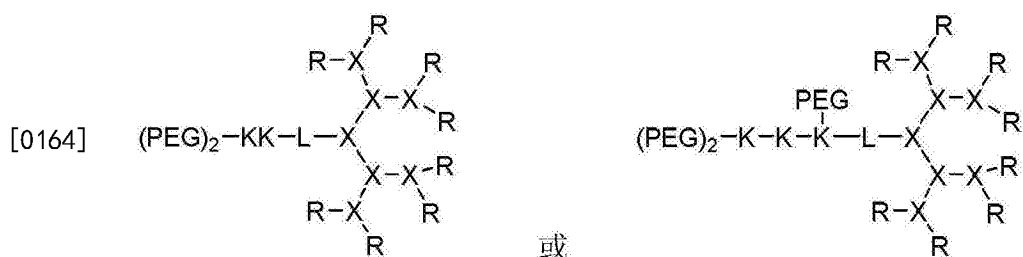
[0159] 其中各支化的单体单元X是赖氨酸。

[0160] 末端树枝状聚合物中的PEG-低聚单元可以包含任何合适数量的PEG部分。通过使用正交保护基团,PEG部分可以位点选择性的安装于在低聚物的不同位置。在一些实施方式中,所述化合物的(PEG)_m-A部分可以为:

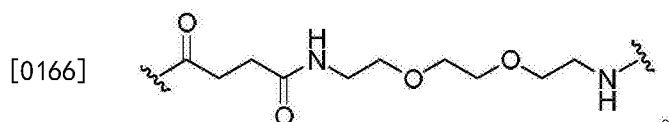


[0162] 其中各K是赖氨酸。

[0163] 在一些实施方式中,末端树枝状聚合物可以是:



[0165] 其中各K是赖氨酸;各PEG是PEG2k;各支化单体单元X是赖氨酸;各R是胆酸;并且连接物L具有通式:



[0167] IV. 纳米载体

[0168] 本发明的末端树枝状聚合物聚集以形成具有疏水性核心和亲水性外部的纳米载体。在一些实施方式中,本发明提供了具有内部和外部的纳米载体,所述纳米载体包括多个本发明的树枝状聚合物缀合物,各化合物在水性溶剂中自组装以形成纳米载体,使得在纳

米载体的内部中形成疏水口袋,其中各化合物的PEG自组装在纳米载体的外部。

[0169] 在一些实施方式中,纳米载体的各缀合物,具有一聚乙二醇(PEG)聚合物、至少两个具有疏水面和亲水面的两亲性化合物、至少一卟啉、可选地至少两个可交联基团,和一树枝状聚合物,所述树枝状聚合物共价地连接于所述PEG、所述两亲性化合物、所述卟啉和所述可交联基团,其中在水性溶剂中各缀合物自组装以形成纳米载体,以便通过各两亲性化合物的疏水面面向彼此的定向在所述纳米载体的内部形成疏水口袋,其中在所述纳米载体的外表面各缀合物的PEG自组装。在一些实施方式中,各缀合物是式I所示的化合物。

[0170] 在一些实施方式中,所述纳米载体包括疏水性药物或成像剂,使得所述疏水性药物或成像剂被掩蔽在纳米载体的疏水性口袋中。可用于本发明的纳米载体的疏水性药物包括任何具有低水溶解度的药物。在一些实施方式中,在纳米载体中的疏水性药物可以为硼替佐米、紫杉醇、SN38、喜树碱、依托泊苷和多柔比星、多西他赛、道诺霉素、VP16、强的松、地塞米松、长春新碱、长春花碱、替西罗莫司(temsirolimus)和卡莫西尼(carmustine)。

[0171] 在一些实施方式中,纳米载体包括至少一个单体单元,所述单体单元任选地与光学探针、放射性核素、顺磁剂、金属螯合物或药物连接。药物可以为各种不同的亲水性或疏水性药物,并且不限于在本发明的纳米载体的内部中被掩蔽的疏水性药物。

[0172] 能在纳米载体中被掩蔽或连接于本发明的缀合物的药物包括但不限于:细胞抑制剂、细胞毒素剂(例如但不限于DNA相互作用剂(例如顺铂或多柔比星));紫杉烷(例如泰素帝、紫杉酚(taxol));拓扑异构酶II抑制剂(例如依托泊苷);拓扑异构酶I抑制剂(例如伊立替康(或CPT-11)、肯托斯塔(camptostar)或拓扑替康);微管蛋白相互作用剂(例如紫杉醇(paclitaxel)、多西他赛或埃博霉素);激素类药剂(例如它莫西芬);胸苷酸(thymidilate)合酶抑制剂(例如5-氟尿嘧啶);抗代谢药物(例如氨甲喋呤);烷化剂(例如替莫唑胺(来自先灵葆雅公司, Kenilworth, N.J. 的TEMODAR™)、环磷酰胺);芳香化酶组合;阿糖胞苷、阿霉素、环磷酰胺(cytosan)以及吉西他滨。可用于本发明的纳米载体的其他药物包括但不限于:尿嘧啶氮芥、异环磷酰胺、美法仑、苯丁酸氮芥、哌泊溴烷、三亚乙基密胺、三亚乙基硫代磷酰胺、白消安、卡莫司汀、洛莫司汀、链脲霉素、达卡巴嗪、氟尿苷、阿糖胞苷、6-巯基嘌呤、6-硫代鸟嘌呤、磷酸氟达拉滨、奥沙利铂、亚叶酸(leucovorin)、奥沙利铂(来自法国的Sanofi-Synthelabo Pharmaceuticals的ELOXATIN™)、喷司他丁(Pentostatin)、长春花碱、长春新碱、长春地辛、博来霉素、更生霉素、道诺霉素、多柔比星、表柔比星、伊达比星、光神霉素、脱氧助间型霉素、丝裂霉素-C、L-天冬酰胺酶、替尼泊苷、17 α -炔雌醇、己烯雌酚、睾酮、强的松、氟羟甲睾酮、丙酸屈他雄酮、睾内酯、醋酸甲地孕酮、甲基强的松龙、甲基睾酮、氢化波尼松、曲安西龙、氯烯雌醚、羟孕酮、氨鲁米特、雌氮芥、醋酸甲羟孕酮、亮丙瑞林、氟他胺、托瑞米芬、戈舍瑞林、顺铂、卡铂、羟基脲、安吡啶、丙卡巴肼、米托坦、米托蒽醌、左旋咪唑、诺维本(Navelbine)、阿那曲唑、来曲唑、卡培他滨、雷洛塞芬(Reloxafine)、屈洛塞芬(Droloxafine)或六甲密胺。前药形式也可用于本发明。

[0173] 可用于本发明的其他药物还包括放射性核素,例如⁶⁷Cu、⁹⁰Y、¹²³I、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁷⁷Lu、¹⁸⁸Re、¹⁸⁶Re和²¹¹At。在一些实施方式中,放射性核素能在治疗上用作药物或成像剂。

[0174] 成像剂包括顺磁剂、光学探针和放射性核素。顺磁剂包括铁颗粒,例如被掩蔽在纳米载体的疏水性口袋中的铁纳米颗粒。

[0175] 在一些实施方式中,所述缀合物可以是通过可交联基团交联的。所述可交联基团

可以是如上所述的任何适合的可交联基团。在一些实施方式中,可交联基团可以是硫醇、硼酸或苯二酚(dihydroxybenzene)。在一些实施方式中,可交联基团可以是硫醇。在一些实施方式中第一缀合物组包括硼酸可交联基团,和第二缀合物组包括苯二酚可交联基团。在一些实施方式中,纳米载体的各缀合物包括至少两个胆酸,至少两个焦脱镁叶绿酸-a基团,和至少两个可交联基团,其中所述纳米载体的所述缀合物通过所述可交联基团交联。

[0176] 所述纳米载体可以包括任何如上所述的适合的卟啉。在一些实施方式中,所述卟啉可以是焦脱镁叶绿酸-a。在一些实施方式中,所述卟啉可以螯合于一金属,如上所述。任何适合的金属可以螯合于卟啉的,包括放射性和非放射性的金属,如上所述。在一些实施方式中,所述纳米载体包括螯合至至少一个焦脱镁叶绿酸-a基团的金属。

[0177] 本发明的一些实施方式提供了纳米载体,其中各两亲性化合物R独立地为胆酸、别胆酸、蟾胆酸、禽胆酸、脱氧胆酸或鹅脱氧胆酸。

[0178] 本发明的纳米载体还可以包括用来结合至靶实体的结合配体。所述结合配体可以是连接于所述纳米载体的缀合物之一,或者可以是分离的。能够用于本发明化合物的任何合适的结合配体,如上所述。例如,所述结合配体能够靶向一个特定的器官、健康组织或疾病组织的结合配体。典型地结合配体包括具有氨基酸序列cQDGRMGFc的PLZ4配体。在一些实施方式中,所述纳米载体包括至少一个结合缀合物,该缀合物包含聚乙二醇(PEG)聚合物、连接于所述PEG聚合物的结合配体、至少两个具有疏水面和亲水面的两亲性化合物、共价地连接于所述PEG和两亲性化合物的树枝状聚合物,其中在水性溶剂中各结合缀合物和第一缀合物自组装以形成纳米载体,以便通过各两亲性化合物的疏水面面向彼此的定向在所述纳米载体的内部形成疏水口袋,其中各缀合物的PEG在所述纳米载体的外表面进行自组装。

[0179] V. 治疗方法

[0180] 例如通过在纳米载体的内部掩蔽疏水性药物,或通过药物与纳米载体的缀合物的共价连接,本发明的纳米载体可用于治疗任何需要药物给药的疾病。通过在纳米载体的内部掩蔽成像剂,或通过成像剂与纳米载体的缀合物的连接,所述纳米载体也可用于成像。

[0181] 在一些实施方式中,本发明提供了治疗疾病的方法,其包括向需要这样的治疗的个体给予治疗有效量的本发明的纳米载体,其中所述纳米载体包括药物。药物能与纳米载体的缀合物共价连接。在一些实施方式中,药物为掩蔽在纳米载体的内部的疏水性药物。在一些实施方式中,所述纳米载体也包含成像剂。所述成像剂可以是共价地与纳米载体的缀合物连接,或掩蔽于纳米载体的内部。在一些实施方式中,疏水性药物和成像剂均被掩蔽于纳米载体内部。在其它一些实施方式中,疏水性药物和成像剂均共价地与纳米载体的缀合物(conjugate)或缀合物(conjugates)连接。在其它一些实施方式中,所述纳米载体也可以包括放射性同位素。

[0182] 使用本发明的纳米载体的治疗方法也包括使用光动力疗法或光热疗法治疗疾病。所述方法通常包括向一个体施用本发明的纳米载体,然后将所述个体暴露于特定波长的辐射下以引发根据光的波长的光动力或光热治疗。在经过暴露于光或辐射之后,本发明的纳米载体使用的复合金属或没有复合金属的卟啉,产生适用于光动力疗法的反应单线态氧,或者产生光热疗法需要的足够的热量。在一些实施方式中,本发明提供一种通过光动力或光热疗法治疗疾病的方法,包括给需要的对象施用治疗有效量的本发明的纳米载体,并将该对象暴露于辐射,从而通过光动力或光热疗法治疗疾病。在一些实施方式中,所述方法是

通过光动力疗法治疗疾病的方法。在另一些实施方式中,所述方法是通过光热疗法治疗疾病的方法。

[0183] 在其它的实施方式中,本发明提供一种通过声动力疗法治疗疾病的方法,包括给需要的对象施用治疗有效量的本发明的纳米载体,并将该对象暴露于声波,从而通过声动力疗法治疗疾病。

[0184] 本发明的纳米载体可以被给予个体用于治疗,例如过度增殖病症,包括癌症,例如但不限于癌、神经胶质瘤、间皮瘤、黑色素瘤、淋巴瘤、白血病、腺癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、成胶质细胞瘤、白血病、淋巴瘤、前列腺癌和Burkitt淋巴瘤、头颈癌、结肠癌、结肠直肠癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、食道癌、胃癌、胰腺癌、肝胆癌、胆囊癌、小肠癌、直肠癌、肾癌、膀胱癌、前列腺癌、阴茎癌、尿道癌、睾丸癌、宫颈癌、阴道癌、子宫癌、卵巢癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、肾上腺癌、内分泌腺癌、类癌、骨癌、皮肤癌、成视网膜细胞瘤、多发性骨髓瘤、霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤(其他癌症参见CANCER:PRINCIPLESANDPRACTICE (DeVita,V.T.等人编辑,2008))。

[0185] 可通过本发明的纳米载体治疗的其他疾病包括:(1) 炎性或过敏性疾病,例如全身性过敏或超敏应答、药物过敏、昆虫螫刺过敏;炎性肠疾病,例如克罗恩病、溃疡性结肠炎、回肠炎和肠炎;阴道炎;银屑病和炎性皮肤病,例如皮炎、湿疹、特应性皮炎、过敏性接触性皮炎、荨麻疹;血管炎;脊椎关节病;硬皮病;呼吸系统过敏疾病,例如哮喘、过敏性鼻炎、超敏性肺病等,(2) 自身免疫疾病,例如关节炎(类风湿性关节炎和银屑病性关节炎)、骨关节炎、多发性硬化、全身性红斑狼疮、糖尿病、肾小球肾炎等,(3) 移植排斥(包括同种异体移植排斥和移植物抗宿主病),以及(4) 将抑制其中不期望的炎性应答的其他疾病(例如,动脉粥样硬化、肌炎、神经病症如中风和封闭式头损伤、神经退行性疾病、阿尔茨海默病、脑炎、脑膜炎、骨质疏松症、痛风、肝炎、肾炎、败血症、类肉状瘤病、结膜炎、耳炎、慢性阻塞性肺病、鼻窦炎和白塞氏综合征)。在一些实施方式中,所述疾病为癌。在其它实施方式中,所述疾病可以是膀胱癌或卵巢癌。

[0186] 此外,本发明的纳米载体可用于治疗诸如病毒、细菌、真菌和寄生虫的病原体的感染。可使用本发明的纳米载体治疗其他疾病。

[0187] 在本发明的方法中可以使用任何合适的缀合物或纳米载体。在一些实施方式中,所述纳米载体的各缀合物包括至少两个胆酸,至少两个焦脱镁叶绿酸-a基团,至少两个可交联基团,和螯合至至少一个焦脱镁叶绿酸-a基团的金属,其中所述纳米载体的所述缀合物通过可交联基团交联。

[0188] A. 制剂

[0189] 本发明的纳米载体可以本领域技术人员已知的多种不同的方式来配制。药物可接受的载体部分地由所给予的具体组合物以及由施用该组合物的具体方法来确定。因此,本发明的药物组合物有广泛的多种合适的制剂(参见,例如Remington's Pharmaceutical Sciences,第20版,2003,见上文)。有效的制剂包括口服和鼻用制剂、用于胃肠外给药的制剂以及为延长释放而配制的组合物。

[0190] 适于口服给药的制剂可由以下组成:(a) 液体溶液,例如有效量的悬浮于稀释剂(例如水、盐水或PEG400)中的本发明的化合物;(b) 胶囊、药囊、储库或片剂,各种均包含预定量的为液体、固体、颗粒或明胶形式的活性成分;(c) 在合适的液体中的悬浮剂;(d) 合适

的乳剂;以及(e)贴剂。上述液体溶液可为无菌溶液。药物形式可包含以下的一种或多种:乳糖、蔗糖、甘露醇、山梨醇、磷酸钙、玉米淀粉、马铃薯淀粉、微晶纤维素、明胶、胶体二氧化硅、滑石、硬脂酸镁、硬脂酸以及其他赋形剂、着色剂、填充剂、粘合剂、稀释剂、缓冲剂、湿润剂、防腐剂、调味剂、染料、崩解剂以及药学上相容的载体。锭剂形式可包含在例如蔗糖的调味剂中的活性成分,以及包含在惰性基质(例如明胶和甘油)中的活性成分或蔗糖和阿拉伯树胶乳液、凝胶等的锭剂(pastille),其除了活性成分之外还包含本领域已知的载体。

[0191] 药物制剂优选为单位剂型。在这样的形式中,制剂被细分为包含适量的活性组分的单位剂量。单位剂型可为包装的制剂,该包装包含预定量的制剂,例如在小瓶或安瓿中的包装的片剂、胶囊以及粉末。此外,单位剂型的形式可为胶囊、片剂、扁囊剂(cachet)或锭剂,或者其可为合适数量的包装形式的这些单位剂型中的任一种。若需要,组合物还可包含其他相容的治疗剂。优选的药物制剂可递送持续释放的制剂中的本发明化合物。

[0192] 可用于本发明的药物制剂还包含延长释放的制剂。在一些实施方式中,可用于本发明的延长释放的制剂描述于第6,699,508号美国专利中,其可以根据第7,125,567号美国专利制备,两个专利均通过引用并入本文。

[0193] 药物制剂通常被递送至哺乳动物,包括人和非人哺乳动物。使用本方法治疗的非人哺乳动物包括驯养动物(即,犬、猫、鼠、啮齿类和兔)和农业动物(牛、马、绵羊、猪)。

[0194] 在本发明方法的实施中,药物组合物可以单独使用,或与其他治疗剂或诊断剂组合地使用。

[0195] B. 给药

[0196] 本发明的纳米载体可根据所需频率来给药,包括每小时一次,每天一次、每周一次或每月一次。用于本发明的药物方法的化合物以每天约0.0001mg/kg至约1000mg/kg的初始剂量来给药。可使用的日剂量范围为约0.01mg/kg至约500mg/kg、或约0.1mg/kg至约200mg/kg、或约1mg/kg至约100mg/kg、或约10mg/kg至约50mg/kg。然而,剂量可以根据患者需求、治疗的病况的严重性和所采用的化合物而变化。例如,考虑到特定患者中诊断的疾病类型和阶段,可根据经验确定剂量。在本发明的上下文中,向患者给予的剂量应足以随时间在患者中实现有益的治疗反应。还将通过在特定患者中给予特定化合物所伴随的任何副作用的存在、性质和程度来确定剂量的大小。针对特定情况来确定适当剂量在从业者的技能范围之内。通常,以低于化合物最佳剂量的较小剂量开始治疗。此后,通过小幅增加来提高剂量,直至达到所处情况下的最佳效果。为简便起见,若需要,每日总剂量可被分开并在一天中分批给药。根据进行治疗的医师的决定,可以每天或隔天给药。还可在较长时段(数周、数月或数年)内定期或连续的给药,例如通过使用皮下胶囊、药囊或储库,或者通过贴剂或泵。

[0197] 可以多种方式向患者给予药物组合物,包括局部、胃肠外、静脉内、皮内、皮下、肌内、结肠、直肠或腹膜内。优选地,胃肠外地、局部地、静脉内地、肌内地、皮下地、口服地或经鼻地(例如通过吸入)给予药物组合物。

[0198] 在本发明方法的实施中,药物组合物可以单独使用,或与其他治疗剂或诊断剂组合地使用。用于本发明的组合方案的其他药物可分别给予,或用于该组合方案的药物中的一种或多种可一起给予,例如在混合物中。当一种或多种药物分别给予时,各药物给药的时间和方案可以变化。其他治疗剂或诊断剂能与本发明的化合物同时给予、分别给予或在不同时间给予。

[0199] VI. 成像方法

[0200] 在一些实施方式中,本发明提供了成像的方法,其包括向待成像的个体给予有效量的本发明的纳米载体,其中所述纳米载体包含成像剂。在其他实施方式中,使用具有药物和成像剂二者的纳米载体来同时完成治疗方法和成像方法。

[0201] 示例性成像剂包括顺磁剂、光学探针和放射性核素。顺磁剂为在外加场下为磁性的成像剂。顺磁剂的实例包括但不限于铁颗粒,包括纳米颗粒。光学探针为可通过在一个辐射波长处激发并在第二个不同的辐射波长处检测而被检测到的荧光化合物。可用于本发明的优选地光学探针包括但不限于Cy5.5、Alexa680、Cy5、DiD (1,1'-双十八烷基-3,3,3',3'-四甲基吡啶二碳菁高氯酸盐)以及DiR (1,1'-双十八烷基-3,3,3',3'-四甲基吡啶三碳菁碘化物)。其他光学探针包括量子点。放射性核素为进行放射性衰变的元素。可用于本发明的放射性核素包括但不限于 ^3H 、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{18}F 、 ^{19}F 、 ^{60}Co 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{68}Ga 、 ^{82}Rb 、 ^{90}Sr 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{129}I 、 ^{131}I 、 ^{137}Cs 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{211}At 、Rn、Ra、Th、U、Pu和 ^{241}Am 。

[0202] 本发明的纳米载体也能够用于检测肿瘤。例如,纳米载体的卟啉基团在经过第一波长的光照射后能够发出第二波长的光。可以使用本领域已知的方法检测该第二波长的发射光。用于检测肿瘤的纳米载体可以包括螯合至卟啉的金属,或可以不包括金属。在一些实施方式中,本发明提供一种在个体中检测肿瘤的方法,包括向该个体施用有效量的本发明的纳米载体,将该个体暴露于第一波长辐射下,其中所述辐射激发存在于所述纳米载体中的卟啉,以便所述卟啉发射出第二波长的辐射,并检测由卟啉发射的辐射,从而检测肿瘤。

[0203] VII. 实施例

[0204] 材料

[0205] 单甲基封端的聚(乙二醇)单胺(MeO-PEG-NH₂, Mw:5000Da)和 α -氨基- ω -Boc-氨基聚(乙二醇)(Boc-NH-PEG-NH₂, Mw:5000Da)购自Rapp Polymere (德国)。焦脱镁叶绿酸-a获自圣克鲁兹生物技术有限公司(圣克鲁兹)。多柔比星盐酸盐(DOX • HCl) (Novaplus) 获自UC Davis癌症中心药房。(Fmoc)lys (Boc)-OH、(Fmoc) Lys (Dde)-OH、(Fmoc) Lys (Fmoc)-OH、(Fmoc) Cys (Trt)-OH以及(Fmoc) Ebs-OH得自AnaSpec Inc. (San Jose, CA)。 $3,3'$ -双(二十六烷基)氧杂甲花青苷高氯酸酯(DiO)和4,6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI, 蓝色)购自Invitrogen。胆酸、MTT[3-(4,5-二甲基二唑-2-基)-2,5-二苯基溴化四唑鎓]、Ellman试剂[DTNB, 5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)]以及所有其他化学品购自Sigma-Aldrich (St. Louis)。

[0206] 在Rink树脂上,通过固相肽合成制备PLZ4(氨基酸序列:cQDGRMGFc,其中大写字母代表L氨基酸,小写字母代表非天然D半胱氨酸用来环化和稳定PLZ4),如之前描述的那样(Bioconjug Chem 21,1216-1224 (2010); Biomaterials 30,6006-6016 (2009); Urol Oncol 印刷前电子公开(2012))。

[0207] 通过对两组进行Student t-检验以及对多组进行单因素ANOVA来进行统计分析。除非另外指出,所有结果均表达为平均值 $\pm$ 标准误差(SEM)。P<0.05的值被认为是统计学显著的。

[0208] 实施例1. 末端树枝状聚合物合成

[0209] 使用MeO-PEG-NH₂、Boc-NH-PEG-NH₂、赖氨酸、胆酸和焦脱镁叶绿酸-a作为构建模块,通过液相缩合反应合成末端树枝状聚合物,如之前的报道(Bioconjug Chem 21,1216-

1224 (2010); Biomaterials 30, 6006–6016 (2009))。

[0210] 为了合成PLZ4-末端树枝状聚合物,使用通过亚铜离子催化的水相“点击化学”,来将PLZ4肽上的炔基连接于我们之前报道的末端树枝状聚合物(PEG^{5k}-CA₈)的PEG末端的叠氮基团,摩尔比为1:2(PLZ4:PEG)。偶联后,未检测出PLZ4,这表明已经成功地将PLZ4连接到末端树枝状聚合物。

[0211] 合成末端树枝状聚合物。利用逐步肽化学法(stepwise peptide chemistry),通过液相合成卟啉/胆酸杂合末端树枝状聚合物。通过溶剂蒸发方法¹¹,那些末端树枝状聚合物自组装形成NPs。通过结合和分子量来表征末端树枝状聚合物。通过粒径、负载药物、稳定性、ROS产生、吸光度、荧光性和热力学性能来表征NPs。

[0212] 利用逐步肽化学法,用MeO-PEG-NH₂通过液相缩合反应合成典型的卟啉/胆酸杂合末端树枝状聚合物(PEG^{5k}-Por₄-CA₄,图12a,图13)。简略地,使用DIC和HOBt作为偶联剂将(Fmoc)Lys(Fmoc)-OH(3eq.)偶联到PEG的N末端,直到获得阴性的茚三酮检测结果(这表示偶联反应的完成)。通过添加冷乙醚使PEG化的分子沉淀,然后用冷乙醚洗涤两次。通过使用20%(v/v)4-甲基哌啶的二甲基甲酰胺(DMF)溶液处理移除Fmoc基团,PEG化的分子经沉淀并用冷乙醚洗涤三次。真空干燥白色沉淀粉末,分别偶联(Fmoc)Lys(Fmoc)-OH一次和(Fmoc)lys(Boc)-OH一次,以产生以四个Boc和Fmoc基团在PEG末端进行封端的第三代的树枝状聚赖氨酸。分别使用20%(v/v)4-甲基哌啶移除Fmoc和使用50%(v/v)三氟乙酸(TFA)移除Boc基团(在二氯甲烷(DCM)中)之后,将胆酸NHS酯¹和焦脱镁叶绿酸-a偶联到树枝状聚赖氨酸的末端。过滤末端树枝状聚合物溶液,然后使用MWC0值3.5Kda的透析袋中对应4L水进行透析。在24h中完全更换4次水。最后,冻干末端树枝状聚合物。使用ABI 4700MALDI TOF/TOF质谱仪(线性模型)检测PEG^{5k}-Por₄-CA₄分子量,使用R-氰基-4-羟基肉桂酸作为基质。检测了末端树枝状聚合物的单分散质量痕迹,来自MALDI-TOF MS的末端树枝状聚合物的分子量(图14)与理论值几乎一致。使用Avance 500核磁共振波谱仪(Bruker)检测末端树枝状聚合物¹H NMR的波谱,其中使用DMSO-d₆和D₂O作为溶剂。对于NMR检测,末端树枝状聚合物的浓度保持在5×10⁻⁴M(图15)。

[0213] 使用相同的策略^{1,2},通过替换我们之前报道的硫醇化的末端树枝状聚合物(PEG^{5k}-Cys₄-L₈-CA₈)中8个胆酸中的4个,合成硫醇化的焦脱镁叶绿酸-a末端树枝状聚合物(命名为PEG^{5k}-Cys₄-Por₄-CA₄,图16a,图17)。合成PEG^{5k}-Cys₄-Por₄-CA₄的典型步骤包括:使用DIC和HOBt作为偶联剂将(Fmoc)Lys(Fmoc)-OH(3eq.)偶联到PEG的N末端,直到获得阴性的茚三酮检测结果(这指示偶联反应的完成)。通过添加冷乙醚使PEG化的分子沉淀,然后用冷乙醚洗涤两次。通过使用20%(v/v)4-甲基哌啶的二甲基甲酰胺(DMF)溶液处理移除Fmoc基团,PEG化的分子经沉淀并用冷乙醚洗涤三次。真空干燥白色沉淀粉末,分别偶联(Fmoc)Lys(Fmoc)-OH一次和(Fmoc)lys(Boc)-OH一次,以产生以四个Boc和Fmoc基团在PEG末端进行封端的第三代的树枝状聚赖氨酸。然后移除Fmoc基团。在树枝状聚赖氨酸的末端逐步偶联(Fmoc)Cys(Trt)-OH、(Fmoc)Ebes-OH和胆酸NHS酯(12eq.)。用2%(v/v)联氨的DMF溶液移除Dde保护基团后,依次将(Fmoc)Ebes-OH和焦脱镁叶绿酸-a(12eq.)偶联到树枝状聚赖氨酸末端的残余氨基上。用TFA/H₂O/乙二硫醇(EDT)/三乙基硅烷(TIS)(94:2.5:2.5:1,v/v)移除半胱氨酸上的Trt基团,产生PEG^{5k}-Cys₄-Por₄-CA₄硫醇化末端树枝状聚合物(图16a,图17)。分别使用DMF和酯的三个溶解/沉淀循环,从混合物中回收硫醇化末端树枝状聚合物。

最终,将硫醇化末端树枝状聚合物溶于乙腈/水中并冻干。使用ABI4700MALDI TOF/TOF质谱仪(线性模型)检测PEG^{5k}-Cys₄-Por₄-CA₄分子量,使用R-氨基-4-羟基肉桂酸作为基质。检测了初始PEG和末端树枝状聚合物的单分散质量痕迹,来自MALDI-TOF MS的末端树枝状聚合物分子量(图18)与理论值几乎一致。

[0214] 实施例2.含金属的末端树枝状聚合物的产生

[0215] 制备含金属的纳米卟啉。为了生产整合金属的末端树枝状聚合物,在氮气下,根据以前报道的方法^{6,49},将过量的游离金属离子(如,过量10倍)和末端树枝状聚合物在甲醇/氯仿中孵育1-5h。使用截留分子量为3,500的过滤柱回收游离金属。分装、干燥并在-20℃的氩气中存储金属卟啉-脂。

[0216] 实施例3.制备纳米-卟啉胶束

[0217] 超声溶解金属-末端树枝状聚合物于PBS中,产生含金属的NPs。20mg硫醇游离卟啉-末端树枝状聚合物溶解于1mL磷酸盐缓冲盐(PBS)中,随后超声10min以形成非交联纳米卟啉。为了制备靶向胶束,将PLZ4-偶联的末端树枝状聚合物(PLZ4-PEG^{5k}-CA₈)与PEG^{5k}-Por₄-CA₄混合。自组装后,更亲水的靶向PLZ4的配体展示在胶束的表面。

[0218] 为了制备二硫键交联的胶束,总计20mg的PEG^{5k}-Cys₄-Por₄-CA₄和PEG^{5k}-Cys₄-L₈-CA₈溶解于1mL磷酸缓冲盐(PBS)中以形成胶束,然后超声10min。末端树枝状聚合物的硫醇基被过氧化氢氧化形成二硫键。随时使用Ellman检测,监测游离硫醇基的水平。在游离硫醇基维持在一恒定的低值后,不经透析对胶束溶液进行进一步的表征。

[0219] 金属纳米卟啉的表征。通过动态光散射(DLS)仪(Microtrac)检测纳米卟啉的大小和大小分布。用于DLS检测的浓度保持在1.0mg/mL。所有检测均在25℃下进行,使用Microtrac FLEX软件10.5.3分析数据。使用飞利浦的透射式电子显微镜(TEM)CM-120观察纳米卟啉的形态。简略地,将纳米颗粒水溶液(1.0mg/mL)沉积在铜网上,不用或用磷钨酸染色(PTA)2秒,并且在室温下测量。使用荧光光谱仪(SpectraMax M2,Molecular Devices, USA)检测纳米卟啉的吸光度和荧光信号。使用Kodak多功能成像系统IS2000MM扫描纳米卟啉溶液(10μL)的近红外荧光。使用Flir热感摄像机研究纳米卟啉溶液(10μL)的热性能。使用2',7'-二氯荧光素乙酰乙酸盐(DCF)作为指示剂研究纳米卟啉的ROS产生量并和PBS比较。

[0220] 放射性标记。用乙酸铵将0.1M HCl中的⁶⁴CuCl₂(Washington University,MO,USA)缓冲至pH7。将PEG^{5k}-Por₄-CA₄末端树枝状聚合物溶解在甲醇中,然后添加小体积的经缓冲的⁶⁴CuCl₂。在室温下孵育放射性溶液30min。蒸干甲醇,用PBS再水化末端树枝状聚合物的薄膜以产生⁶⁴Cu标记NPs。使用3500kDa的超滤离心过滤器(Millipore,Billerica,MA,USA)离心过滤,,或者,使用Micro Bio-Spin 6柱(Bio-Rad,Hercules,CA,USA),从而移除游离的⁶⁴Cu。使用快速薄层层析(ITLC)评估放射化学纯度和产量。为了制备双-标记Gd/⁶⁴Cu NPs,将预先制备的Gd-末端树枝状聚合物添加到⁶⁴Cu-PEG^{5k}-Por₄-CA₄末端树枝状聚合物放射性标记的甲醇溶液中,然后干燥,在PBS中重构,并纯化。

[0221] 结果

[0222] NPs的合成和表征。通过一类新型的包含线性聚乙二醇(PEG)和焦脱镁叶绿酸-a(Por,卟啉类似物)的树枝状低聚物和胆酸(CA)的杂合两亲性聚合物(称为末端树枝状聚合物)自组装形成NPs(图12-图15)。一个典型的末端树枝状聚合物PEG^{5k}-Por₄-CA₄如图12a所

示。透射电子显微镜 (TEM) 显示该 NPs 是具有 20nm 大小的球形 (图 12c)。NPs 具有两个光吸收峰, 一个在 405nm, 另一个在 680nm 的近红外 (NIR) 区 (图 12d)。PEG^{5k}-Por₄-CA₄ 能够螯合一系列的金属离子, 例如铜 (Cu (II)), 钯 (Pd (II)), 钆 (Gd (III)) 和镓 (Ga (III))。负载金属离子的 NPs 的, 通过在 PBS 中这些金属-末端树枝状聚合物的自组装产生, 展现了独特的吸收峰的转变 (650-690nm) (图 12d)。当金属离子负载于 NPs 的卟啉内, 重原子将电子分散至一个大的角度导致更多的相移动并增加了 TEM 中的对比度。因此, 即使不染色也能够通过 TEM 观察到该金属离子层 (图 19)。使用磷钨酸染色并用 TEM 观察, 在 NPs 疏水核心和亲水冠之间的界面发现了金属层 (图 12e, f)。

[0223] 当在 405nm 下激发, 在 PBS 中形成的 NPs 表现出了非常弱的在 660nm 峰值的红色荧光发射 (图 12g, 红色曲线)。由于 π - π 相互作用和疏水特征, 这是出乎意料的, 在 NPs 核心, Por 分子能够容易形成高度有序的结构, 在水性介质中表现出激发状态的强烈的自淬灭效应¹⁰。相反, 当使用十二烷基磺酸钠 (SDS) 破坏 NPs (图 20) 后¹¹, 当在 405nm 激发时在 660nm 观察到了强烈的荧光 (图 12g, 蓝色曲线)。图 12h 比较了基于 NP 浓度的 NPs 的 NIR 荧光, 其中不添加或添加 SDS (图 21)。通过胶束的分解, NPs 的 NIR 荧光信号被极大地放大, 其被认为发生在肿瘤位置和/或肿瘤细胞内部。我们曾使用我们之前报道的 PEG^{5k}-CA₈ 胶束¹¹⁻¹⁷ 作为常规的基于胶束的纳米载体对 Por 进行物理包容作为对比。在相同的 Por 浓度下, NPs 显示出了比负载 Por 的 PEG^{5k}-CA₈ 胶束 (NM-POR) 大 10 倍多的自淬灭 (图 22, 图 23), 这显示淬灭是在纳米卟啉构建物核心中独特组装的 Por 分子的一个显著的特征。与荧光特性类似, NPs 也具有构造依赖性的“开/关”光动力转换。经过光辐射在 PBS 中 NPs 产生的单线态氧是很低的, 但是能够在添加 SDS 之后恢复 (图 12i)。

[0224] 由于在 PBS 中 NPs 是高度自淬灭的, 激光辐射后能量以产生热量而不是荧光和/或单线态氧的形式释放 (图 12j, k)。随着 NP 浓度从 0 提高至 1.0mg/mL, NP 溶液的温度从 24℃ 升高到了 62℃。当 NPs 在 SDS 存在下解离并且用相同剂量的光辐射时, 观察到了强烈的荧光但是溶液的温度没有显著的升高 (图 12j, k)。相反地, 在相同的辐射水平下相比于在 SDS 中, 在 PBS 中 NM-POR 仅显示了中等的温度升高 (图 24), 这表明光热转换仅在当 Por 被限制于 NPs 的独特结构中时是高效的。通过改变光剂量和 NP 浓度, 我们能够进一步的调整 NPs 的光热传导。我们验证了, 4.0mg/mL 的 NPs 用 1.25W cm⁻² 辐射 120 秒能够达到超高的温度 (120℃), 导致塑料膜基底的融化。而低剂量 (0.1W cm⁻²) 光辐射 120 秒, NP 溶液的温度仅升高几度 (图 17)。

[0225] 实施例 4. 制备负载药物的纳米卟啉

[0226] 制备负载药物的胶束

[0227] 通过如之前描述的溶剂蒸发的方法, 把多柔比星负载入所述胶束。在将 DOX 封装入聚合胶束之前, 将 DOX · HCl 与相当于 3 摩尔的三乙胺氯仿 (CHCl₃) / 甲醇 (MeOH) (1:1, v/v) 溶液一起搅拌过夜以移除 DOX · HCl 中的 HCl。20mg 末端树枝状聚合物与不同数量的中性 DOX 首先溶于 CHCl₃/MeOH, 混合, 并在旋转蒸发仪上蒸发以获得均匀的干燥聚合物膜。将该薄膜在 1mL 磷酸盐缓冲液 (PBS) 重构, 随后超声处理 30min, 将薄膜样品消散为胶束溶液。为了追踪它们在体内的变化, 使用相似的方法将疏水的 NIRF 染料 DiD 封装至一部分胶束中。最终, 使用 0.22μm 滤器过滤制成的胶束以对样品除菌。为了检测 DOX 的数量, 将负载 DOX 胶束用 DMSO (胶束溶液/DMSO: 1:9, v/v) 稀释以解离胶束纳米载体, 并用 NanoDrop 2000 分光光度计 (Thermo Scientific) 检测荧光, 其中使用一系列不同浓度的 DOX/DMSO 标准溶液制作校准

曲线。通过同样的方法制备负载DOX的二硫键交联的胶束,随后用过氧化氢将二硫键氧化以形成胶束内二硫键。

[0228] 使用类似的方法,将疏水性药物,例如多柔比星、紫杉醇、长春新碱、硼替佐米、索拉非尼和17-烯丙基氨基-17-去甲氧基格尔德霉素,负载入纳米卟啉中。为了检测封装的药物数量,将负载药物的纳米卟啉用DMSO(纳米卟啉溶液/DMSO:1:9,v/v)稀释以解离纳米颗粒。用HPLC系统(Waters)分析负载的药物,其中使用一系列不同浓度的药物/DMSO标准溶液制作校准曲线。通过同样的方法制备负载药物的二硫键交联的纳米卟啉,随后用过氧化氢将硫醇氧化以形成胶束内二硫键²。

[0229] DOX在人血浆中的释放。制备NP-DOX溶液来检测血浆中体外的药物释放谱。初始的DOX浓度是1.0mg/mL,NP浓度是10mg/mL。同样制备了仅NP和我们之前报道的标准胶束(具卟啉)11(具有相同药物含量)的DOX作为对比。当将封装DOX至NPs的核心,DOX和Por之间的距离在FRET范围内,这允许当用480nm激发DOX后从DOX至Por的高效的能量传递(图16e,f)。480nm激发后,与相应的FRET信号相比,仅NPs的信号非常小。因此通过监测FRET比率的动态变化,我们能够实时监测的DOX从NPs中的释放。使用人血浆对这些纳米颗粒的等分溶液进行9倍稀释,在37℃孵育器中孵育,搅拌速度100rpm。在预设的时间点,使用NanoDrop分光光度计(Thermo Scientific)检测纳米颗粒溶液的荧光光谱。在一些实验中,纳米颗粒溶液用光辐射5min或在固定温度的水浴中孵育,以便研究光或温度对负载DOX的NPs的影响。

[0230] 在十二烷基磺酸钠(SDS)存在下通过监测纳米卟啉和二硫键交联的纳米卟啉的荧光和粒径的变化来研究稳定性,有报道SDS能够有效地分解聚合的胶束⁴。在纳米卟啉水溶液(1.5mg/mL)中加入SDS溶液(7.5mg/mL)。SDS的终浓度是2.5mg/mL,胶束浓度保持在1.0mg/mL。使用荧光光谱仪(SpectraMax M2,Molecular Devices,USA)检测溶液的荧光信号。用DLS监测预定时间间隔纳米卟啉溶液的大小和大小分布。在谷胱甘肽(GSH,20mM)和SDS存在下评估胶束的稳定性。在来自健康人志愿者的50%(v/v)血浆中进一步研究负载DOX的NPs的稳定性。在生理体温(37℃)下孵育混合物,然后在预定时间间隔进行大小检测,直至48h。

[0231] 结果

[0232] 我们进一步表明了由PEG^{5k}-Por₄-CA₄形成的NPs能够有效负载多种难溶于水的化学治疗药物和分子靶向药物。例如,化学治疗剂(多柔比星、紫杉醇和长春新碱)和分子靶向药物例如蛋白酶抑制剂(硼替佐米),酪氨酸激酶抑制剂(索拉非尼)和热休克蛋白90(Hsp90)抑制剂(17-烯丙基氨基-17-去甲氧基格尔德霉素,17AAG)能够被容易地整合入NPs,产生显著增加的水溶性。负载药物的NPs的最终粒径均在12-20nm,与空的NPs相似(图25)。

[0233] 我们证实了能够将DOX封装入交联的NPs,负载容量为3.7mg/mL(图16d)。DOX负载的和交联的NPs(CNP-DOX)的最终粒径为约20nm,DOX负载可高达2.5mg/mL。我们然后研究了CNP-DOX和人血浆的相互作用,以模拟体内应用中的不稳定的条件。在人血浆中CNP-DOX的粒径是高度稳定的(图26)。我们利用在多柔比星和NPs之间的荧光共振能量转移(FRET)来实时监测人血浆中的药物释放(图16e)。如图16f-g所示,当在37℃将CNP-DOX在人血浆中孵育24h,FRET信号非常稳定,这表明从交联的NPs中仅有极少的多柔比星释放。然而,分别地用光照射24h和28h,产生显著的FRET信号降低(图16f-g)。上述结果示出,能够通过光照触

发二硫键交联的NPs释放药物。或者,DOX的释放可通过细胞内水平的GSH($\sim 10\text{mM}$)触发,并可通过FRET监测(图16h)。

[0234] 通过静脉内给药,对于基于纳米颗粒的药物递送系统,血液是首选的生物载体。与血液蛋白和脂蛋白的相互作用可能会导致纳米颗粒的离解并导致药物的提前释放。为了进一步增加NPs在血液循环中的结构稳定性,我们在NP平台中应用了可逆的二硫键交联的策略。在末端树枝状聚合物的聚赖氨酸骨架中引入4个半胱氨酸形成 $\text{PEG}^{5k}\text{-Cys}_4\text{-P}(\text{Or}_4\text{-CA}_4$ (图16a,图18,图27)。对半胱氨酸硫醇基的氧化产生了通过二硫键交联的NPs。TEM显示,这些二硫键交联的NPs是20–30nm直径的球体(图16b),与非交联的对应物相似。与非交联的NPs相似,在PBS中交联的NPs的荧光性也高度地淬灭。

[0235] 相应地,在SDS和内源性还原剂如细胞内水平的谷胱甘肽(GSH)¹¹存在下,荧光性能够恢复(图16c)。如图16c所示,当用405nm(绿色曲线)激发,二硫键交联的NPs同样显示了非常弱的红色荧光发射,其峰值在660nm。当在SDS存在时记录交联的NPs的荧光发射谱,在660nm的发射峰有所增加(黑色曲线)。然而,峰值显著低于相同卟啉浓度下在SDS存在下的非交联的NPs的峰值。加入GSH后,二硫键交联的NPs被完全降解,荧光发射谱中的660nm峰进一步增加至与非交联NPs相似的值(在SDS存在下)(粉色曲线)。在SDS中交联的NPs能够保持它们的粒径,但是能够被添加的还原剂降解(图28)。

[0236] 实施例5. 体外细胞毒性

[0237] 方法

[0238] 体外细胞毒性和机制。使用SKOV-3卵巢癌细胞系和PC3前列腺癌细胞系评估NPs的光敏感性功能。使用NPs处理细胞24h或72h,然后在处理后24h用光照射。使用WST-8试剂盒监测细胞活力。在照射时研究热和ROS的产生量。

[0239] 使用SKOV-3卵巢癌细胞系评估NPs的光敏感性功能。我们首先用不同浓度的NPs或5-氨基乙酰丙酸(5-ALA)(传统的光动力诊断/治疗剂)处理癌细胞24h。充分洗涤后,按指示将细胞暴露于NIR光下。照射24h后使用WST-8增殖试剂盒检测细胞活力。在另一实施方式中,使用交联的NPs或负载DOX的交联的NPs、游离的DOX、和负载DOX的交联的胶束(无卟啉)⁵处理癌细胞24h。洗涤三次后,用光照射细胞1分钟。孵育24h后用WST-8检测细胞活力。在另一研究中,比较了NP-AAG、仅NP和游离药物17AAG对LNCAP、PC3和RPWE1细胞的生长抑制效果。按5000细胞/50 μl /孔接种细胞,使用所述药物处理24h。将药物移除并用新鲜培养基替换,然后将细胞暴露于NIR光下2min。72h后使用MTT试验检测生长抑制。24h后使用膜联蛋白V和PI染色分析细胞凋亡。12h后,使用western印迹法和相关抗体分析HIF1 α 、生存素、AKT、STAT3和Src。

[0240] 我们首先用或不用2.2 μM 的NPs处理SKOV-3细胞24h,随后在96孔板中加载2',7'-二氯荧光素乙酰乙酸盐(DCF)30min,以监测POS的产生。使用PBS洗涤细胞三次并用新鲜培养基替换。用NIR光照射一部分孔(例如0.07W cm^{-2} 60秒),在用Metamorph程序的荧光显微镜上获得细胞图像。接着,为了评价经过NPs预处理的SKOV-3细胞的线粒体膜电势($\Delta\Psi_m$)受损,我们用40nM的DiOC6(3)负载细胞,用NIR光照射一部分孔。24小时后,用碘化丙啶(标记细胞)和Hoechst 33342(细胞核)标记细胞,并用荧光显微镜获取图像。最后,为了评估对NPs和光疗法的细胞反应,我们评估了含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(caspase)3/7活性,其能作为部分细胞凋亡途径活化的标志物。用或不用2.2 μM NPs处理SKOV-3细胞24h。洗

涤后,将细胞不暴露于光或光照0.5、1和2分钟。孵育24h后,通过添加另外50 μ L的工作溶液45min后检测含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3/7活性。用酶标仪(SpectraMax M2, Molecular Devices, USA)读板。最后,为了研究形态,将SKOV-3细胞培养在8-孔载玻片,并不用或用NPs处理24h。光照处理两小时后,用Hema3®对载玻片染色。

[0241] 结果

[0242] 我们发现,NPs独特的基于构造的ROS产生(图12i)能够用来降低光敏剂自身的光毒性。不经光照射,没有观察到高至1.0mg/mL的完整的NPs对SKOV-3卵巢癌细胞细胞的毒性,而游离的Por显示出了显著地剂量依赖的细胞毒性(图29)。光照后NPs的体外抗肿瘤效果是光剂量和NP剂量依赖的(图30a,b),并且在细胞毒性方面在相同照射剂量下比5-氨基乙酰丙酸(图30-ALA, FDA批准的PDT治疗剂)更强。细胞活力的损失与细胞内ROS产生有关(图30c),它导致线粒体膜电位的损伤、细胞破坏、和经含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3/7激活证明的细胞凋亡(图30d-f)。而且,我们发现,经过相同的光照,NP-DOX介导的化学和光疗法的结合与仅NPs介导的光疗法、游离的DOX、或NM-DOX(负载DOX标准胶束,无卟啉)¹¹相比,显著地更有效(图30g)。我们进一步证明了NP-介导的光疗法能够协同地与分子靶向药物(如,Hsp90抑制剂17AAG)联合。在雄激素依赖的PC3前列腺癌细胞系(图30h,下)和雄激素依赖的LNCAP前列腺癌细胞系(图31,左,下)中,均观察到了负载17AAG的NPs(NP-AAG)强烈的协同效果。永生的正常前列腺细胞系RWPE1对该疗法具有一定的抵抗(图31,右)。在PC3细胞中,通过膜联蛋白V和PI染色检测,NP-AAG具有更大的诱导细胞凋亡的效果(图30i)。有趣的是,在PDT上HIF1 α 、Akt、生存素和MMP2均被NPs提高,该效应和Src一样被NP-AAG耗尽(图30j),暗示了NP-AAG强烈的协同效果的机制。

[0243] 在本文中,我们在体内第一次证明了,据我们所知,“柔性”有机NPs能够用作智能纳米转换器,其能够在血液循环中保持未激活的状态,但是能够通过使用便携的、单一波长NIR激光在肿瘤位点被激活以释放热和ROS,从而用于PTT/PDT。静脉注射到异种移植肿瘤的小鼠体内后,在血液中介联的NPs的荧光保持淬灭。相似的,用低剂量的光照射(与日常生活中受到的690nm的日光类似,0.1W/cm²)血液中介联的NPs时,的ROS产量也是最低的(图33)。经过光照后,对于血液中介联的NPs没有观察到明显的溶血(图34)。相同剂量光照后,介联的NPs产生的热量也是微不足道的(图35)。相反,与介联的NPs相比,在小鼠血液中NM-POR、传统的PEG^{5k}-CA₈胶束封装的Por展现了5倍高的荧光,并产生了显著地更高数量的ROS导致严重的溶血(图32-图34)。这可能是由于当物理封装入胶束时缺乏Por分子的淬灭效应(图23)。注射PBS、介联的NPs和NM-POR 24h后,用治疗剂量的光(1.25W/cm²120s)辐射肿瘤。与NM-POR相比,在肿瘤位置NPs产生了显著更高数量的ROS并导致了2.5倍的温度变化(图36,图37)。在肿瘤位置的同步ROS和热量的产生,归因于在注射24h后NPs在肿瘤位置的显著的积累和部分的降解(图38d)。基于图12i,j中的结果,经过光辐射,完整的NPs能够被激活并产生热量,而降解的NPs能够被激活并产生ROS。上述结果表明,与对比纳米载体相比,NPs的构造依赖的光动力学特性,能够用于在血液中减小光敏剂的不利的毒性,并向肿瘤递送显著更高数量的ROS和热量。

[0244] 实施例6.人卵巢癌和膀胱癌细胞的治疗

[0245] SKOV-3人卵巢癌细胞系和5637人膀胱癌细胞系购自ATCC并在推荐的培养基中培养。狗膀胱癌细胞系K9TCC-Pu-In,由普渡大学的Deborah Knapp博士在2009年7月开发并直

接提供。在Knapp博士实验室中于2009年对这些细胞系进行了测试和验证,其中使用形态学、免疫组化、基因表达和致瘤性测试。由于这些细胞直接获自Knapp博士(其鉴定了细胞系特性),并在使用者的实验室中复苏后6个月内的传代,因此不需要重新授权。

[0246] 纳米卟啉的细胞摄取

[0247] 将肿瘤细胞接种于八孔组织培养的培养板(BD Biosciences, Bedford, MA, USA)中,随后在含10%FBS的细胞培养基中孵育24h。移除培养基,并向各孔中添加纳米卟啉胶束。在预设的时间点,使用PBS洗涤细胞三次,用4%多聚甲醛固定并用DAPI对细胞核染色。用盖片盖住培养板,并用DeltaVision成像系统(Applied Precision, CA)依据制造商的说明观察,。

[0248] 在其它实验组中,在完全培养基(在RPMI1640中含10%FBS, 抗生素)中培养犬的泌尿道上皮细胞3天,至铺满60%。人膀胱细胞系5637使用DiO (400nm) 预染色20min,并在相同的板上与泌尿道上皮细胞共培养过夜。添加2.2μM的PLZ4-NP,并用DeltaVision成像系统获得细胞成像。

[0249] 实施例7. 体外光动力疗法(PDT)

[0250] 使用K9TCC-Pu-In和5637膀胱癌细胞系和SKOV-3卵巢癌细胞系评估纳米卟啉的光敏性功能。我们首先用2.2μM纳米卟啉处理癌细胞2h。彻底洗涤后,用红光(650nm)照射细胞。光照24h后使用WST-8增殖试剂盒(Caymen)检测细胞活力。5-氨基乙酰丙酸(5-ALA)(传统的光动力诊断/治疗剂),被用作对照。在另一实验中,使用负载DOX的纳米卟啉处理癌细胞,随后光照射。同样用不同稀释的末端树枝状聚合物和空的交联的胶束处理细胞,并孵育总计72h,不经过光照,以评估黑暗毒性和末端树枝状聚合物相关的毒性。

[0251] 动物和肿瘤异种移植模型

[0252] 6至8周龄雌性无胸腺裸鼠(Nu/Nu株)购自Harlan (Livermore, CA)。所有动物根据AAALAC指导方针而保持在无病原体条件下,并且在任何实验前允许适应环境至少4天。所有动物实验依照制度指导方针并根据由在加利福尼亚大学戴维斯分校动物使用和饲养委员会批准的第07-13119号和第09-15584号方案来进行。通过皮下注射100μL PBS和Matrigel (1:1v/v)混合物中的 7×10^6 SKOV-3卵巢癌细胞至雌性裸鼠的右前肢肩胛背侧(right flank),建立了卵巢癌的皮下异种移植模型。

[0253] 建立患者衍生的异种移植:在实验进行前,动物方案获得了加州大学戴维斯分校机构动物护理和使用委员会(IACUC)的批准。为了建立皮下患者衍生的异种移植(PDX),使用了NOD SCID γ (NSG; Jackson实验室, West Sacramento, CA) 4-5周龄的小鼠。用无菌钳子将新鲜、未处理的临床肿瘤片段(3-5mm³)放入套管针。然后将负载的套管针轻轻地推入侧面皮肤,并压套管针活塞喷出肿瘤片段。轻轻地移除套管针并将注射区域消毒。

[0254] 为了在NSG小鼠中产生原位异种移植模型,收获传代的#1PDX标本,并切成小片。37℃下使用1ml的Accutase (Innovative Cell Technology, San Diego, CA)处理30分钟,通过细胞滤器(BD Falcon, Canaan, CT)过滤去除大的组织后获得单细胞悬液。将在5-10μl PBS中的细胞注射入鼠膀胱壁,同时在常规麻醉下可视化定位膀胱。手术后每天监视鼠。

[0255] 实施例8. 纳米卟啉的生物分布

[0256] 对具有直径约8mm至10mm的皮下K9TCC-Pu-In和5637膀胱癌和SKOV-3卵巢癌的异种移植鼠模型,进行体内NIRF光学成像。在注射纳米卟啉胶束之后的不同时间点,使用具有

625nm的激发带通滤波器和700nm的发射的Kodak多峰成像系统IS2000MM来扫描小鼠。在每次成像之前,通过腹膜内注射戊巴比妥(60mg/kg)来麻醉小鼠。在体内成像之后,于注射后24h、48h和72h通过过量CO₂来使动物安乐死。肿瘤和主要器官被切除并用Kodak成像工作站来成像。

[0257] 在NSG鼠的原位异种移植模型中研究NIRF成像。简略地,通过尿道,在全身麻醉下,具有原位人膀胱癌的雌性NSG鼠或正常NSG鼠膀胱灌注30 μ l的PLZ4-NP。孵育2h后,从完整身体分离膀胱,使用Kodak成像系统成像。

[0258] 实施例9.NPs介导的多模型成像

[0259] 方法

[0260] 动物模型.6至8周龄雌性无胸腺裸鼠(Nu/Nu株)购自Harlan(Livermore,CA)。这些鼠能够在4周-40周自发地患乳腺癌。所有动物根据AAALAC指导方针而保持在无病原体条件下,并且在任何实验前允许适应环境至少4天。所有动物实验依照制度指导方针并根据由加利福尼亚大学戴维斯分校动物使用和护理管理委员会批准的第07-13119号和第09-15584号方案来进行。通过皮下注射100 μ L的PBS和Matrigel(1:1v/v)混合物中的 2×10^6 SKOV-3卵巢细胞或A549肺癌细胞至雌性裸鼠的右前肢肩胛背侧(right flank),建立了卵巢癌的皮下异种移植模型。具有乳腺癌的转基因小鼠(FVB/n Tg(MMTV-PyVmT))订自Jackson实验室。

[0261] NIRF光学成像。转基因小鼠(10-12周)和裸鼠发展建立肿瘤(6-10mm直径)后,通过尾部血管注射100 μ L的NPs进行体内NIRF光学成像。在注射NPs后的不同时间点,在麻醉状态下使用具有625/20nm的激发带通滤波器和700/35nm的发射的Kodak多峰成像系统IS2000MM来扫描小鼠。体内成像后,将动物安乐死。分离肿瘤和主要的器官,并用Kodak成像工作站成像。为了监测在组织水平的生物分布动力学,通过尾部血管给予携带SKOV-3肿瘤鼠100 μ L交联的NPs,并在第1h、24h、或48h处死。刚好在安乐死之前,注射葡萄糖聚糖-FITC溶液来定位血管。收获并在冰上的冷福尔马林中固定肿瘤。制作一新鲜的横截面供大规模(LSI)激光扫描共焦显微镜成像。此外,从老的转基因小鼠(20-24周)收集具有转移病灶的肺部并在冷福尔马林固定1小时。使用LSI激光扫描共焦显微镜对肺表面成像。成像后,对肺部进行组织病理学评估。在某些情况下,在预定时间点抽取鼠的血液并在检测。

[0262] MRI和PET成像。在Bruker Biospec 7T MRI扫描仪上使用T1-加权快速小角度激发(FLASH)序列(回波时间(TE)/重复时间(TR)=4/200ms)的MR成像,使用128 $\times$ 128矩阵大小,获取没有或有SDS时的Gd-NPs的体外的MRI信号增强。用Bruker Biospec 7T MRI扫描仪对携带SKOV-3卵巢癌异种移植的裸鼠、携带A549肺癌异种移植的裸鼠和携带乳腺癌的转基因小鼠(FVB/n Tg(MMTV-PyVmT))成像。用获得的自旋回波图像确定固体肿瘤的位置和体积。为了评价Gd-NPs在身体和肿瘤中的动力学,以及增强的纳米颗粒MRI信号密度,在注射Gd-NPs(Gd剂量:Gd剂量:0.015-0.02mmole/kg)前和注射后的特定时间点,使用动态的T1-加权FLASH序列来获得图像(TE/TR=4/200ms),其中使用128 $\times$ 128矩阵大小。用相同的参数,在PTT/PDT之前或之后,使用MRI监测携带SKOV-3卵巢癌异种移植裸鼠中肿瘤的生长。在小动物微PET系统(Siemens Inveon D-PET)上,在注射⁶⁴Cu-标记NPs(150-200 μ L,⁶⁴Cu剂量:0.6-0.8mCi)后,在携带SKOV-3卵巢癌异种移植裸鼠上进行PET。在小动物微PET系统(Siemens Inveon D-PET)和Bruker Biospec 7T MRI扫描仪上进行PET-MRI。将携带A549肺癌异种移植裸鼠放置在适合两种扫描仪的可移动的床上,以便帮助PET和MR图像配准。尾部血管注

射 ^{64}Cu 和Gd双-标记NPs (150–200 μL , ^{64}Cu 剂量:0.6–0.8mCi, Gd剂量:0.015–0.02mM/kg) 后, 注射后4或24h在麻醉(氧气中含2%异氟烷, 2L/min) 下对鼠进行成像。使用Amide软件对PET和MR图像进行配准(co-register)。

[0263] 结果

[0264] NPs和二硫键交联的NPs的粒径为约20–30nm (图12c, 图16b), 这是肿瘤靶向和渗透的最佳范围^{11,14,20}。在它们可逆交联性质和独特的基于构造的荧光特性基础上, 交联的NPs特别适用于作为可激活的纳米探针来增加NIRFI的敏感性, 以便通过血液中的背景抑制、在肿瘤位点的优先积累和信号放大来改善肿瘤监测。在血液循环中交联的NPs能够保持沉默(或者处于关闭状态), 具有最小的背景荧光信号(图38a, 下图)。通过添加SDS和GSH来恢复荧光进一步证明了血液中交联的NPs的淬灭状态(图39)。如预期一致, 在静脉注射入SKOV-3卵巢癌鼠模型后, 交联的NPs在全身内的总的荧光信号大幅度低于非交联的NPs(图38a)。通过大小介导的增强的渗透和滞留(EPR)效应积累在肿瘤位点, 这些交联的纳米探针能够转变为开, 这是通过在肿瘤位点或肿瘤细胞中的内源性还原剂GSH对二硫键的裂解, 随后胶束分解并放大荧光信号。注射24h后, 交联的NPs比非交联的NPs展现了显著更高的富集于肿瘤。注射24h后, 相比于正常器官, 非交联的和交联的NPs在体外(Ex vivo)成像中均表现出在肿瘤中具有更突出的信号(图38b)。在肿瘤位点交联的NPs平均荧光高于相同组鼠肌肉的15倍, 并高于非交联NPs的在肿瘤位点的3倍(图38c)。交联的NPs和非交联的NPs之间的不同荧光信号, 可以解释为通过前者构造在循环系统中的稳定性, 以及更多地被肿瘤摄入。

[0265] 图38d显示了交联的NPs(红)肿瘤内的分布投影图像。用Dextran-FITC(绿)标记肿瘤血管(BV)。注射1h后, 肿瘤组织内部的来自NPs的总的NIRF信号非常低(图38d, 左)。在24h在血管(绿)周围观察到了显著的NIRF信号(图38d, 中间), 这表明NPs的积累和部分解离入围绕BV的肿瘤组织。在48h, NPs信号分散式分布在整个肿瘤暗示了它们优异的组织渗透和解离能力(图38d, 右)。这些结果经证明对于指导以后在动物模型中的光疗法研究中的设计是很有价值的。

[0266] 通过静脉注射, 我们然后研究了交联的NPs, 在具有天然发生的乳腺癌转基因鼠(FVB/n Tg(MMTV-PyVmT)) (10–12周) 中的NIRFI能力。在这些转基因小鼠自发地产生出不同大小的多重乳腺癌后, 肿瘤细胞和内皮细胞均衍生自相同的鼠, 这里没有考虑可能发生在同基因或异种肿瘤移植模型中的肿瘤血管伪影(artifact)。24h后, 在所有的自发乳腺癌中均观察到了高荧光(图38e), 由于NPs在肿瘤和肿瘤细胞内部积累, 解离并变为未淬灭型。在图38e中, 白色箭头指向肿瘤位点。通过 $(L \times W^2)/2$ 计算肿瘤体积, 其中L是长度, W是最短的肿瘤直径(mm)。体外(Ex vivo)成像进一步证实了, 在24h后相对于正常器官所有的9个离体的乳腺肿瘤优先摄取NPs。应该提到, 甚至在乳腺脂肪垫的小肿瘤(约18mm³体积)中也具有很强的来自NPs的NIRF信号(图38e), 指示NPs能够用于检测乳腺癌的早期阶段。我们然后研究了NPs在老的转基因鼠(20–24周)中的分布, 使用大规模(LSI)激光扫描共焦显微镜并成功定位了肺部的转移病灶(约0.006mm³和0.5mm³体积)的微小病灶积累(图38f, 图40)。在图38f中, 白色的箭头指向转移性位点。红: 纳米卟啉; 绿: 葡萄糖聚糖-FITC标记的肿瘤血管(标尺=250 μm)。这些结果指示NPs能够提供极大的机会来检测初期肿瘤以及转移病灶。

[0267] NPs具有螯合Gd(III)的固有的能力(图12d, f)并具有构造依赖的磁共振特性, 使它们能够被用作可激活的对照剂, 从而用于敏感的和肿瘤特异的MRI。与图12g, h中的荧光

检测相似,当Gd-NPs在PBS中保留完整性时,出现了最小的MRI信号增强(图41a)。这可能是由于Gd/Por在疏水核和亲水冠之间的界面堆叠(图12f),因而屏蔽了Gd(III)与水中的质子接触。在SDS中解离后,Por螯合的Gd离子有机会缩短附近质子的自旋-晶格弛豫时间,导致MRI信号的提高(图41a)。这一独特的Gd-NPs的构造特征,提供了对肿瘤敏感MRI检测的机会,由于循环NPs的背景值较低。我们证实了应用Gd-NPs对携带“自发的”乳腺癌的转基因小鼠进行MRI。图41b显示了在注射后不同时间点的一组典型的切片。我们证明了在注射后1.5h Gd-NPs能够显著的提高肿瘤的对比度,而在正常组织中仅有非常低的信号提高。肿瘤对比维持了多于26h。这些研究中使用的Gd的剂量相当于临床推荐的人用Gd剂量²¹的1/7。这些结果证实了当Gd-NPs在血液相中循环时在整个身体的MRI信号的提高较低。抵达肿瘤位点或肿瘤细胞后,Gd-NPs解离并允许Gd离子和周围的质子相互作用,仅在肿瘤位点产生显著的MRI对比(图12b)。

[0268] 此外,NPs具有包含用作PET纳米探针的放射性示踪物的固有能力。例如,通过简单、快速、一锅法、高产量的放射性标记策略我们已经将放射性示踪物(⁶⁴Cu(II))整合入NPs用于PET成像(放射化学产率(RYC) > 96.5%) (图12d,图42)。直接螯合⁶⁴Cu(II)是NPs的固有能力,通过PET,能够非侵袭性地在体内追踪它们的生物分布和药代动力学(图41c)。PET成像显示,注射4h后⁶⁴Cu-纳米卟啉开始在肿瘤位点积累,在16h达到最大水平。24h后,主要在移植肿瘤上发现了放射性标记,在身体的其它部位具有非常低的背景(图41c)。虽然本文中没有做,⁶⁷Cu的螯合作用和癌特异性递送能够潜在用于全身的原位放射疗法6

[0269] PET和MRI的协同组合很有可能导致产生下一代的可提供准确诊断的双形态扫描仪器^{22,23}。因此,开发双形态试剂具有极大的需求,所述试剂能够利用PET(高敏感性和可定量)和MR(高的软组织分辨率)成像的互补优势²⁴⁻²⁶。作为具有同时螯合Gd(III)和放射性示踪物的固有的能力的无外源螯合剂的纳米平台,NPs展现了开发用于PET-MRI的双模式纳米探针的极大的希望。我们展示了⁶⁴Cu(II)和Gd(III)均能够被有效整合入NPs(图12d,图42)。在注射24h后,在肿瘤位点双标记NPs能够显著提高MRI对比和PET信号(图41d,e)。感兴趣的是,肿瘤的异质性和NPs在肿瘤中分布的不均匀性,都可非侵袭性地的通过PET-MRI揭示出(图41e)。

[0270] 实施例10.NPs介导的多模式治疗

[0271] 方法

[0272] 体内治疗研究。用携带乳腺癌转基因鼠(FVB/n Tg(MMTV-PyVmT)和携带SKOV-3卵巢癌的异种移植裸鼠研究体内治疗。当在转基因小鼠中肿瘤体积达到4-5mm时,通过尾部血管每周一次注射(3剂)有或没有2.5mg/kg DOX交联的NPs。24h后,使用二极管激光系统(Applied Optonics,Newport,CT)在690nm下照射肿瘤,在全身麻醉下。光剂量为1.25W cm⁻²,2min,通过光纤产生0.8cm²的覆盖整个肿瘤的光斑。用红外摄像机(F1ir)记录肿瘤温度。使用2',7'-二氯荧光素乙酰乙酸盐(DCF)混合100μL的衍生自肿瘤(用NPs和PBS处理)的组织溶解物,检测照射后肿瘤内ROS产生量。在某些情况下,抽取鼠的血液并在特定时间点检测照射后血液中ROS和热量的产生。随后是溶血。一周两次检测肿瘤体积,当肿瘤体积达到1000mm³后处死鼠。照射24h后收获肿瘤用于组织病理学评价。通过皮下注射一百万个细胞至低侧腹区域建立SKOV-3卵巢癌异种移植模型。当肿瘤达到150-200mm³后,鼠接受PBS、2.5mg/kg DOX、和有或没有2.5mg/kg DOX的交联的NPs,每3天3剂量。1和3剂量后,给予0.2W

cm^{-2} 的激光2min。每周测量两次肿瘤体积和体重,同时日常监控潜在的毒性标志。最后剂量两天后,进行CBC和血清化学分析。处死来自各组的一只鼠并收获主要器官进行组织病理学评估。

[0273] 统计分析。通过对两组进行Student t-检验以及对多组进行单因素ANOVA来进行统计分析。除非另外指出,所有结果均表达为平均值±标准误差(SEM)。P<0.05的值被认为是统计学显著的。

[0274] 结果

[0275] 基于光的技术,例如PDT和PTT给癌症治疗带来了希望²⁷⁻³⁶。光疗法的临床应用被阻碍于:1) 光敏剂具有很差的肿瘤和正常组织的选择性,导致了有限的效果和对正常组织的光毒性³⁷⁻⁴¹;2) 光疗法介导的氧化压力诱导肿瘤微环境中的促活和血管生成信号分子如生存素、Akt、低氧诱导因子1 α (HIF-1 α)、基质金属蛋白酶-2 (MMP-2) 和血管内皮生长因子(VEGF),其治疗效果具有消极影响并导致治疗的复发^{27,42,43}。已使用纳米载体(如胶束和脂质体)靶向递送光敏剂至肿瘤以进行光疗法^{6,44}。然而,体内结果表明,由于体内的不稳定性而非特异性靶向正常组织⁴⁴这些纳米载体的肿瘤靶向特异性达不到预期。因此最近,报道了一种新型的有机卟啉体(porphysome)纳米囊泡⁶用作多功能生物光作用剂从而能够有效地将光转导为热量用于PTT。不幸的是,部分由于它们的相对较大的大小($\sim 100\text{nm}$),卟啉体具有较高的肝和脾积累,导致网状内皮系统的非特异性清除^{11,14,20}。相反,交联的NPs表现出了极低的肝和脾吸收和高度的肿瘤靶向特异性(图38b,c)。预计交联的NPs能够被用来降低光敏剂的光毒性并极大提高光疗法的效率。

[0276] 已有研究表明,PTT具有同PDT的协同效用,并通过提高敏化剂和药物的局部渗透性来提高PDT和化疗的效果^{33,45,46}。几种无机的纳米颗粒复合物,例如已开发了用于PTT/PDT双疗法的偶联金纳米棒³³、氧化石墨烯⁴⁵纳米颗粒和硅包覆钯/银纳米颗粒⁴⁶的光敏剂。然而,合成这些化合物较为复杂并且激活这些纳米颗粒需要使用多重-波长激光器进行两种分开的辐照(e.g. 808nm和675nm)^{33,45,46}。同时也担心这些有机纳米颗粒的长期安全性。

[0277] 我们也已经证实了注射NPs 24h后转基因小鼠的肿瘤位点的温度经过光辐射后增加到了 57°C (1.25W cm^{-2} , 2min) (图43a,c)。该温度足够引起对肿瘤细胞的不可逆的损坏⁶。相对地,在PBS对照组中使用相同光照射肿瘤位点的温度仅提高到了 41°C (图43b,c)。经过辐射后,NPs产生的ROS也显著高于PBS对照组中的组织背景(图43d)。辐照24h后,组织病理学显示出了大区域严重组织破坏,例如细胞降解和凋亡(图43e),这由阳性的TUNEL结果和裂解的caspase3免疫-反应性(图44)为证。可以认为这些变化是产生热和ROS所导致的效果(图43a,c,d)。

[0278] 我们在图16中显示了交联的纳米卟啉能够被用作可程序化释放的纳米载体,它可减少在人血浆中的药物释放,但是通过光照和细胞内还原剂能够触发所含药物的释放。经近红外光的辐照,负载药物的交联的NPs能够被活化并在肿瘤位点同时释放单线态氧、热量和药物,用于同时发生的PTT/PDT和化疗。在转基因和异种移植鼠模型中,我们进行了体内治疗研究来评估交联的NPs的抗肿瘤疗效。在转基因鼠研究中,相比于PBS对照组和NM-DOX组以每周一次的 1.25W cm^{-2} , 2min的光剂量,NP-介导的PTT/PDT能够显著地抑制肿瘤生长,。在第12天,治疗的肿瘤完全消除,形成溃疡(图43f)。在第32天也没有检测到明显的肿瘤(图43g)。CNP-DOX介导的联合PTT/PDT和DOX的疗法显示了类似的效果(图43f,g)。为了有效地

比较NP介导的联合疗法的效力,我们将需要使用更低剂量的NPs和/或更低剂量的光。这将是未来工作的主题。有趣的是,在SKOV-3卵巢癌异种移植模型中,NP介导的光疗法,游离的DOX和NM-DOX介导的化疗,相比于PBS对照组在SKOV-3中导致更慢的肿瘤生长(图43h)。而施加相同剂量的DOX、光敏剂(卟啉)和光(0.25W cm^{-2} , 2min),在各组之间CNP-DOX介导的联合疗法显示了最好的抗肿瘤活性,并且在研究过程中完全地抑制了肿瘤生长。经过3剂量的治疗后,在体重、完全血计数、和血清化学方面没有观察到显著的变化(图45表1)。处理鼠不用避免在实验室中环境光,没有表现出皮肤光毒性。

[0279] 基于NPs独特的成像能力,可以采用利用MRI的深层组织渗透的非侵入性实时成像策略,从而便利地监测同时发生的NPs的输送和检测以及治疗后的治疗效果,包括PTT/PDT后的肿瘤大小和肿瘤内部的坏死。作为概念验证,我们因而使用MRI来观察施加Gd-NPs后在有或没有光辐照下SKOV-3卵巢癌鼠模型中肿瘤生长(图43i)。MR图像显示在注射后4h Gd-NPs在肿瘤位点开始具有显著的积累。对于治疗组,注射后24h对肿瘤进行辐照。在注射后48h(辐照后24h)MR图像显示在肿瘤位点的肿瘤的收缩和坏死体积的变大。在注射后7天MRI显示完全的肿瘤消除。作为对比,MR图像显示没有辐射的对照小鼠的肿瘤生长没有受到影响(数据未显示)。

[0280] 虽然前述发明已经过通过实例说明和实施例的方式进行了相当详细的描述,以便能够清楚的理解,本领域技术人员将意识到在所附的权利要求的范围内能够进行某些变化和修改。此外,本文提供的各参考文献将其全部以相同的程度引入作为参考,如同每个参考文献以引用方式单独并入。其中,本申请和本文提供的参考文献之间存在的冲突,以本申请为准。

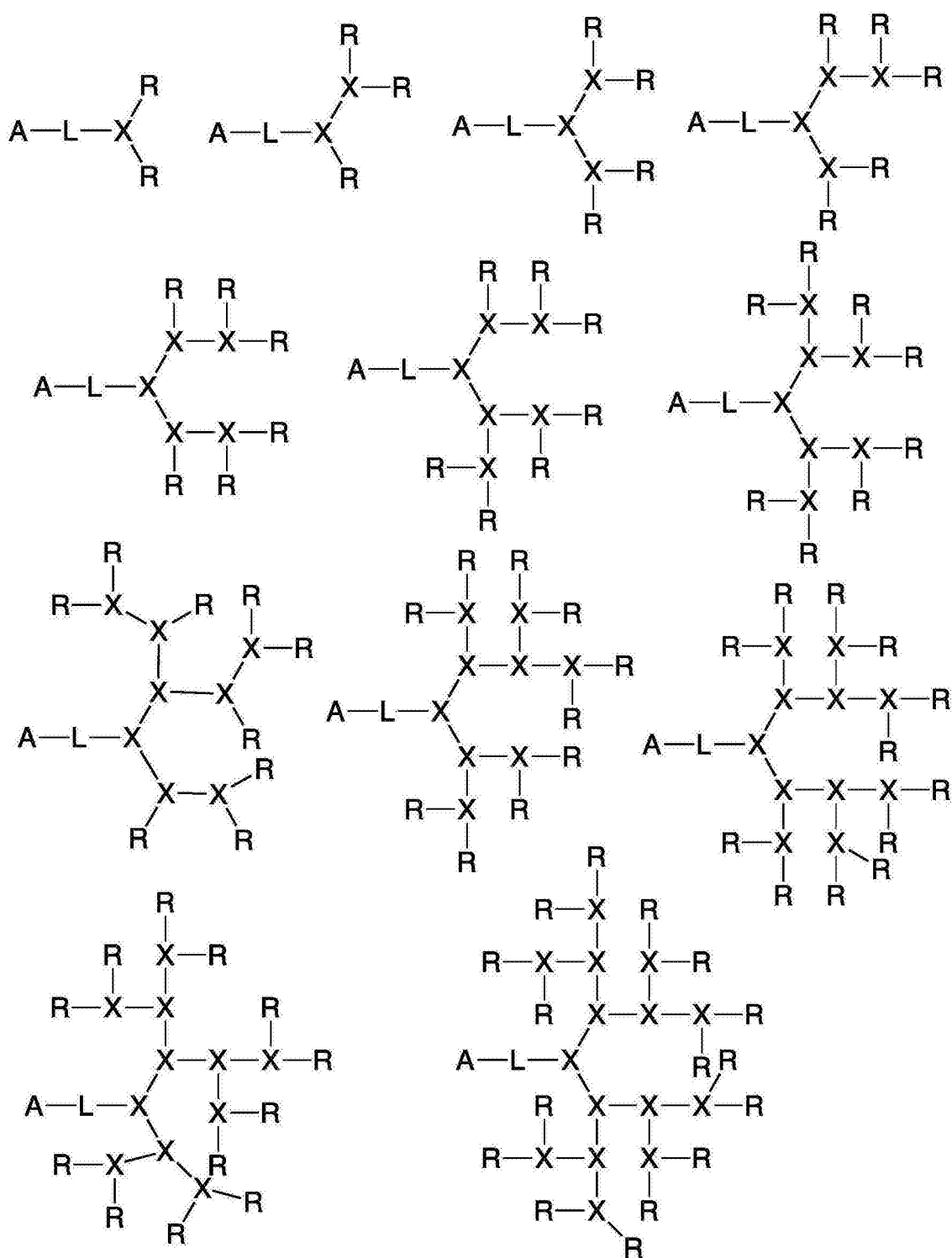


图1

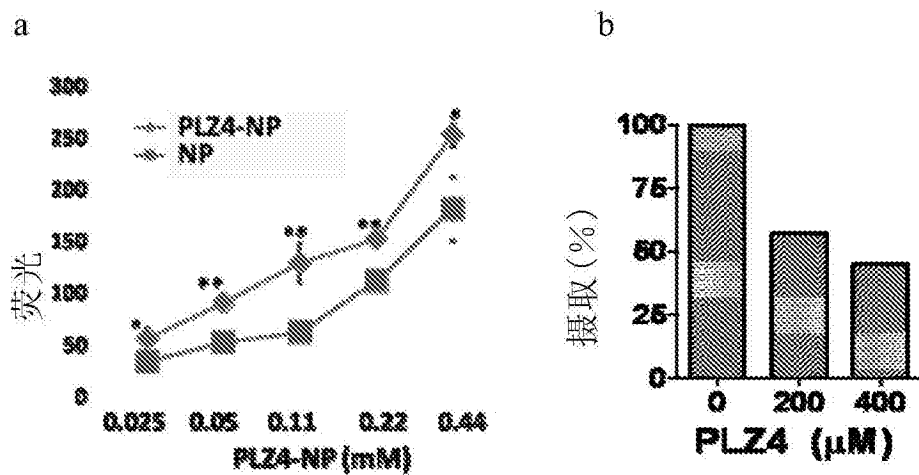


图2

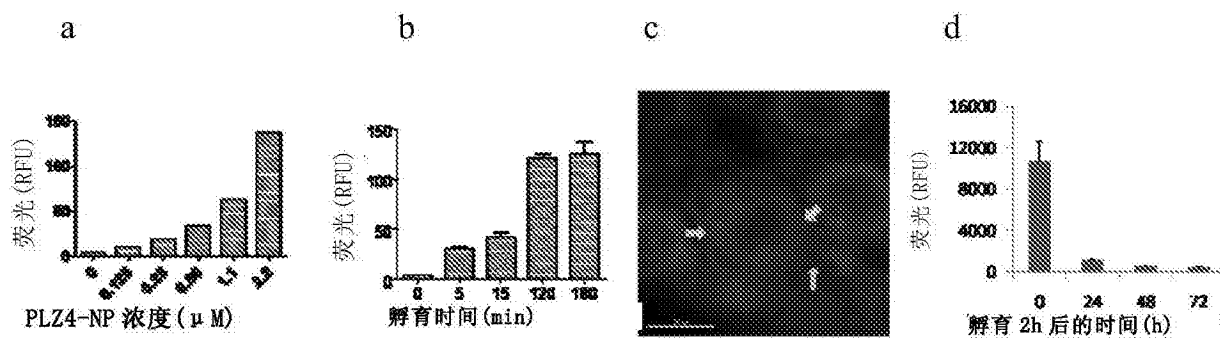


图3

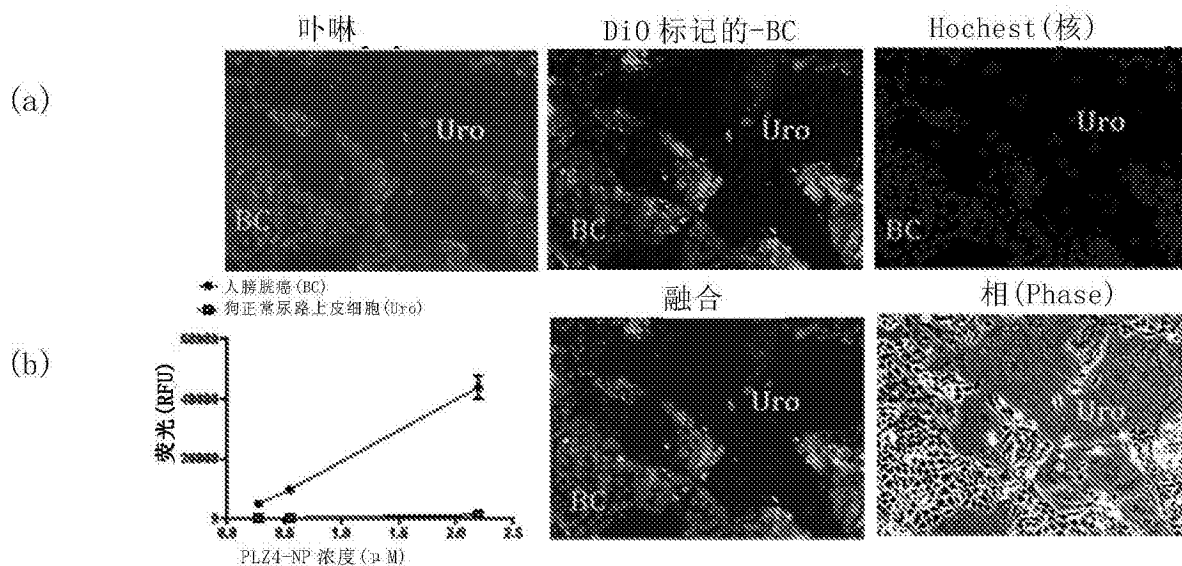


图4

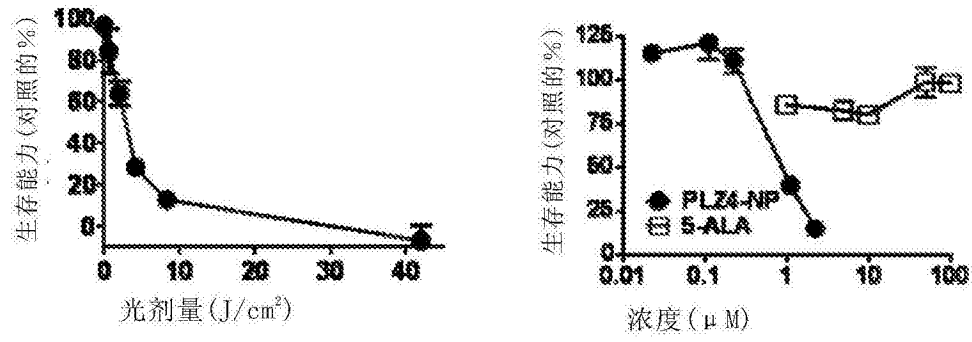


图5

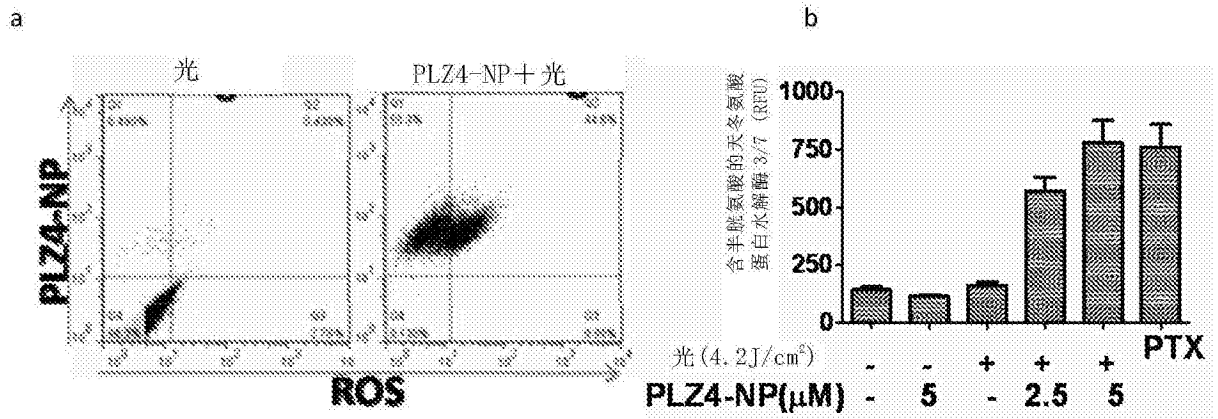


图6

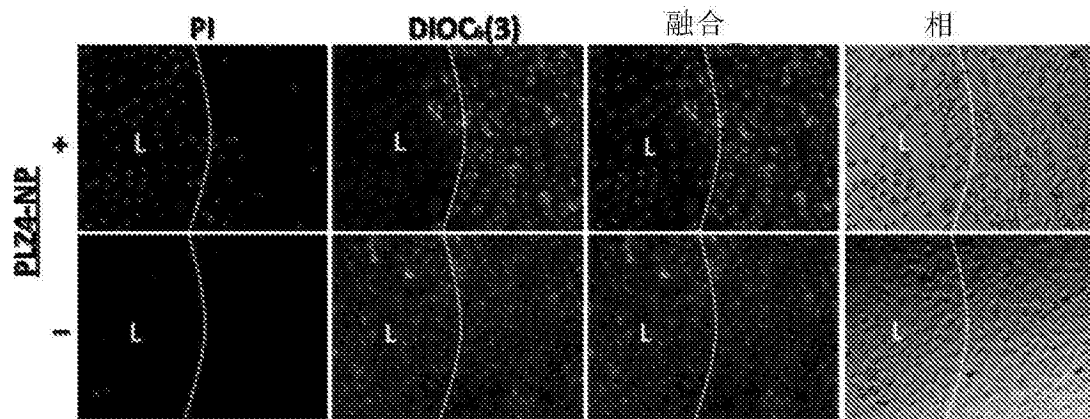


图7

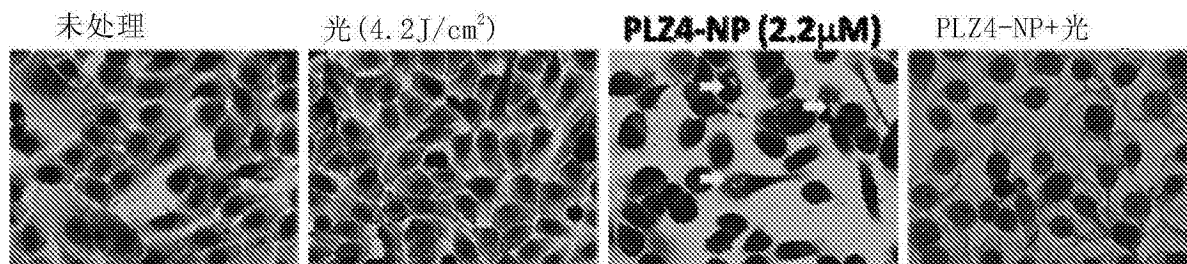


图8

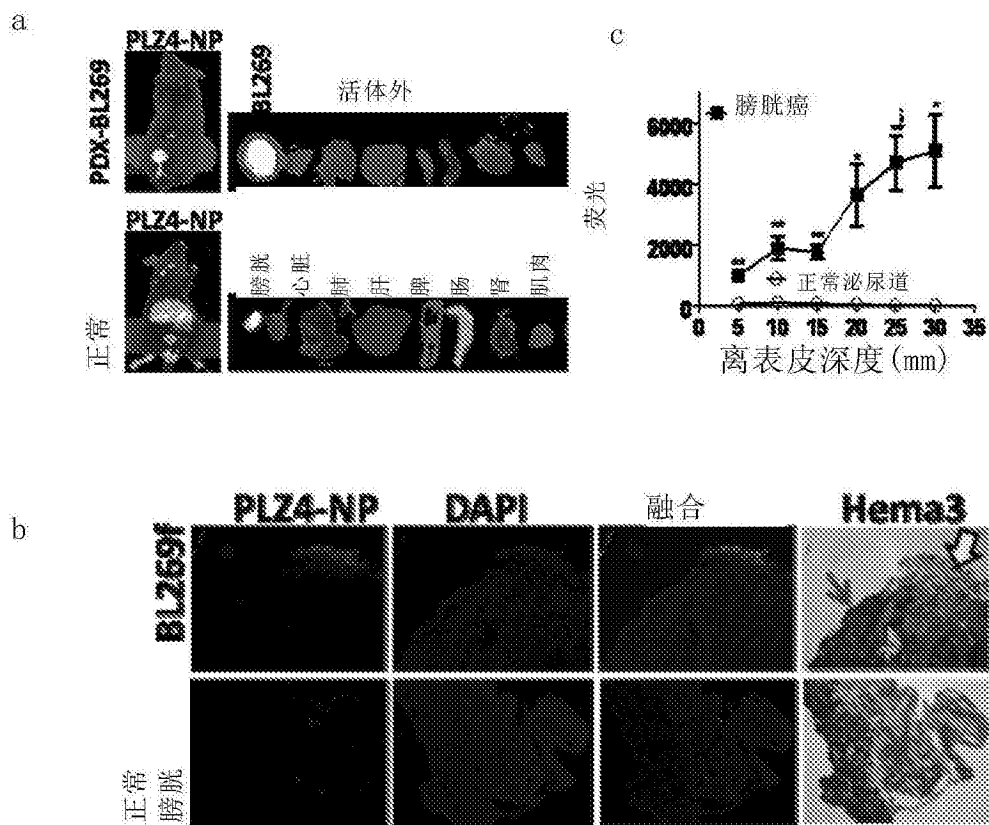


图9

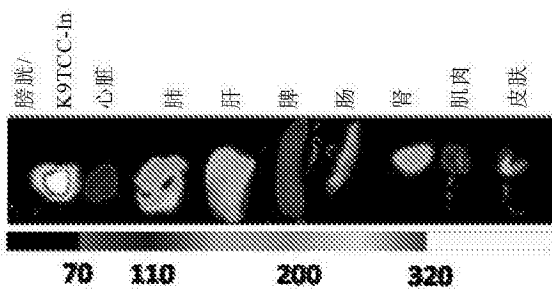


图10

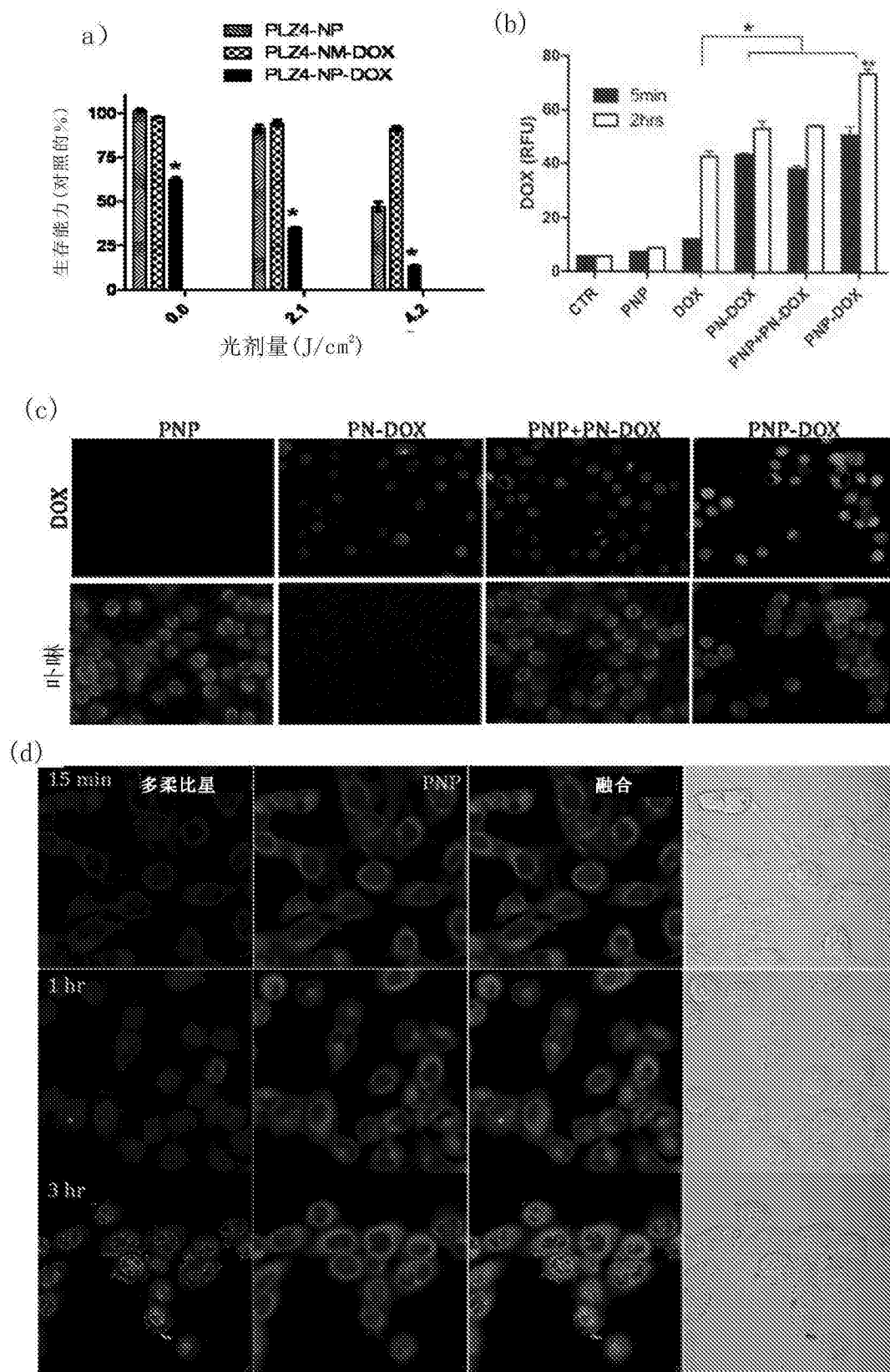


图11

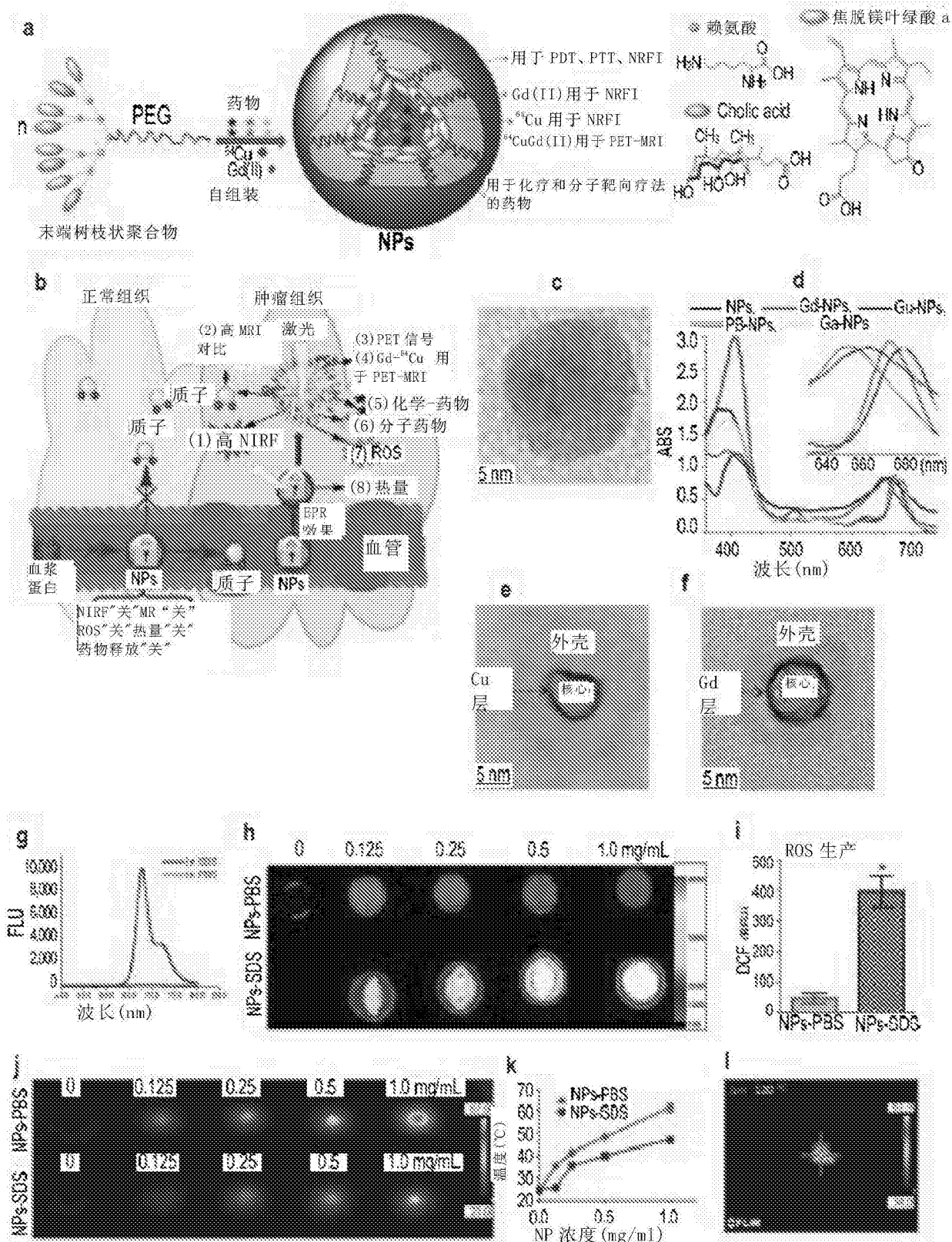


图12

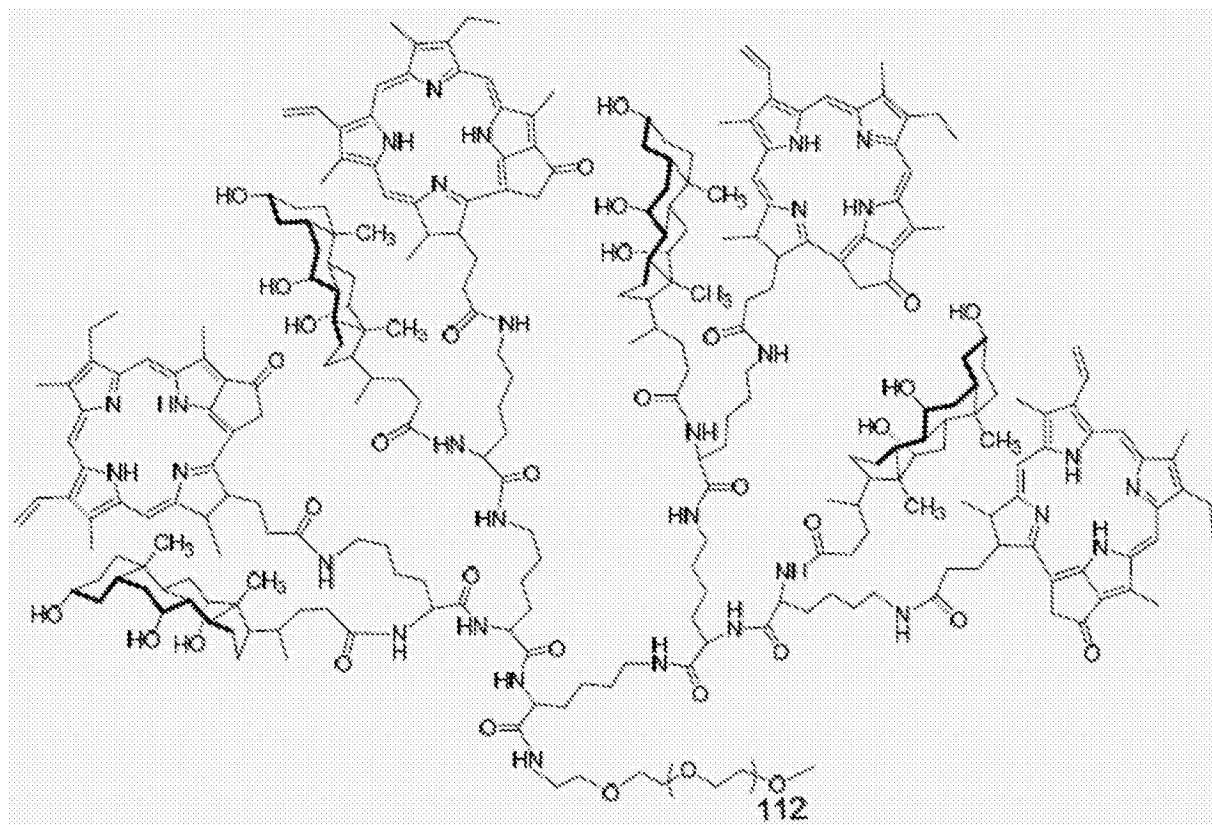


图13

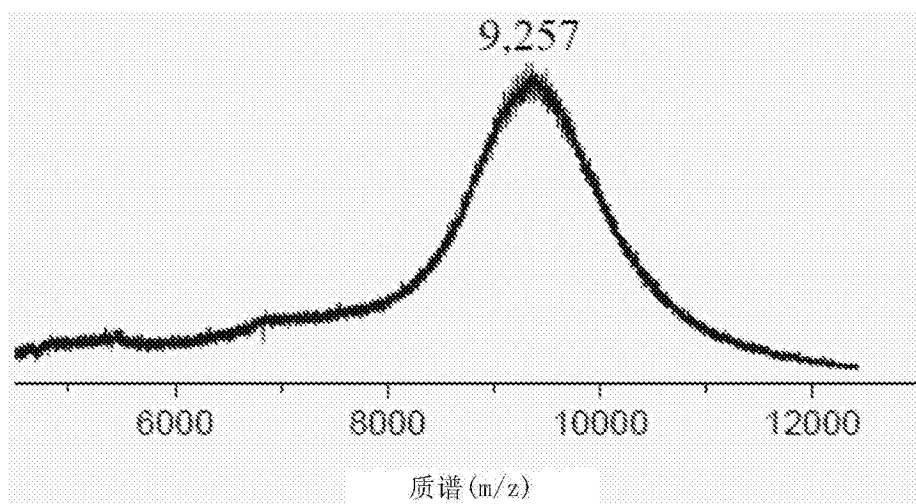


图14

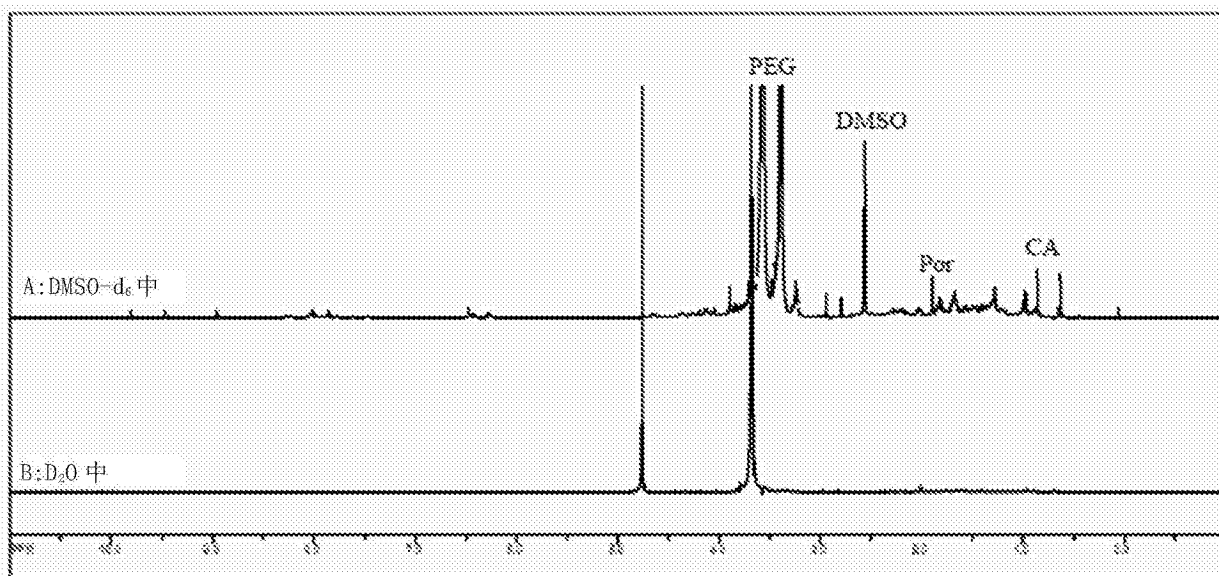


图15

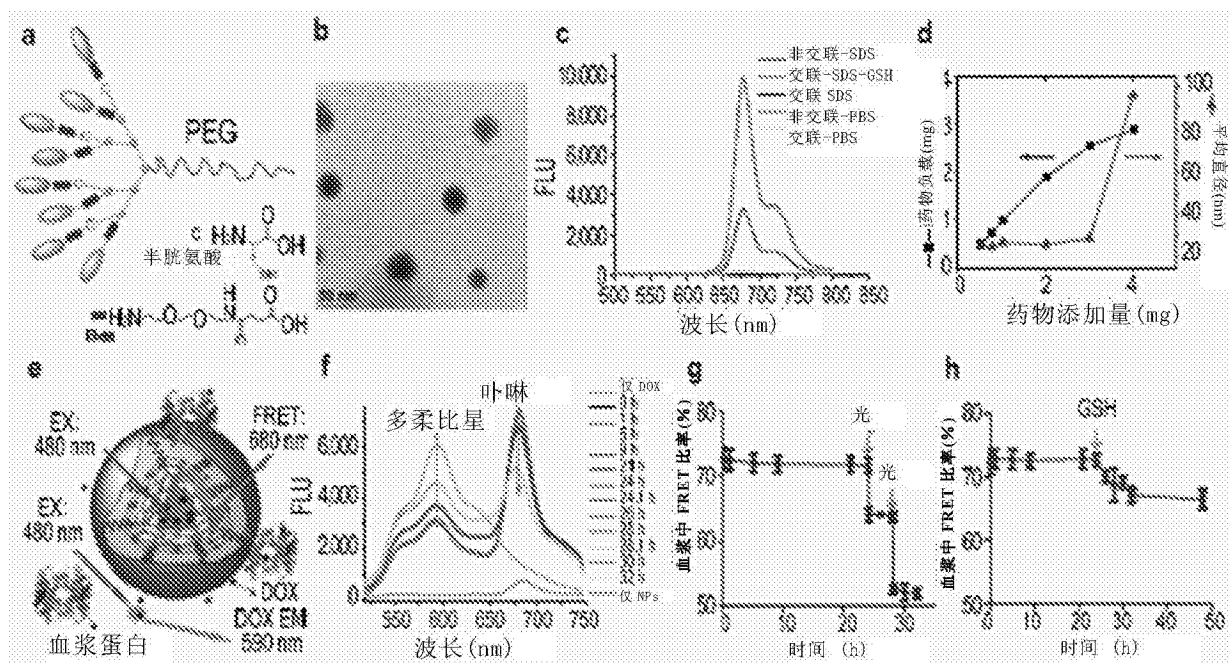


图16

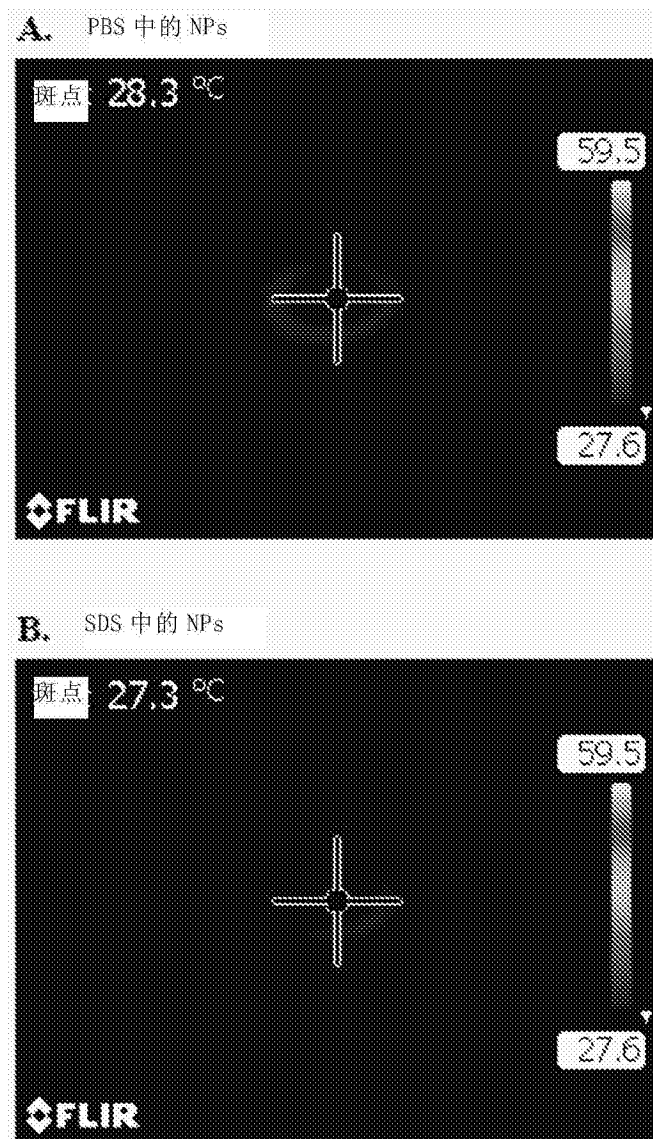


图17

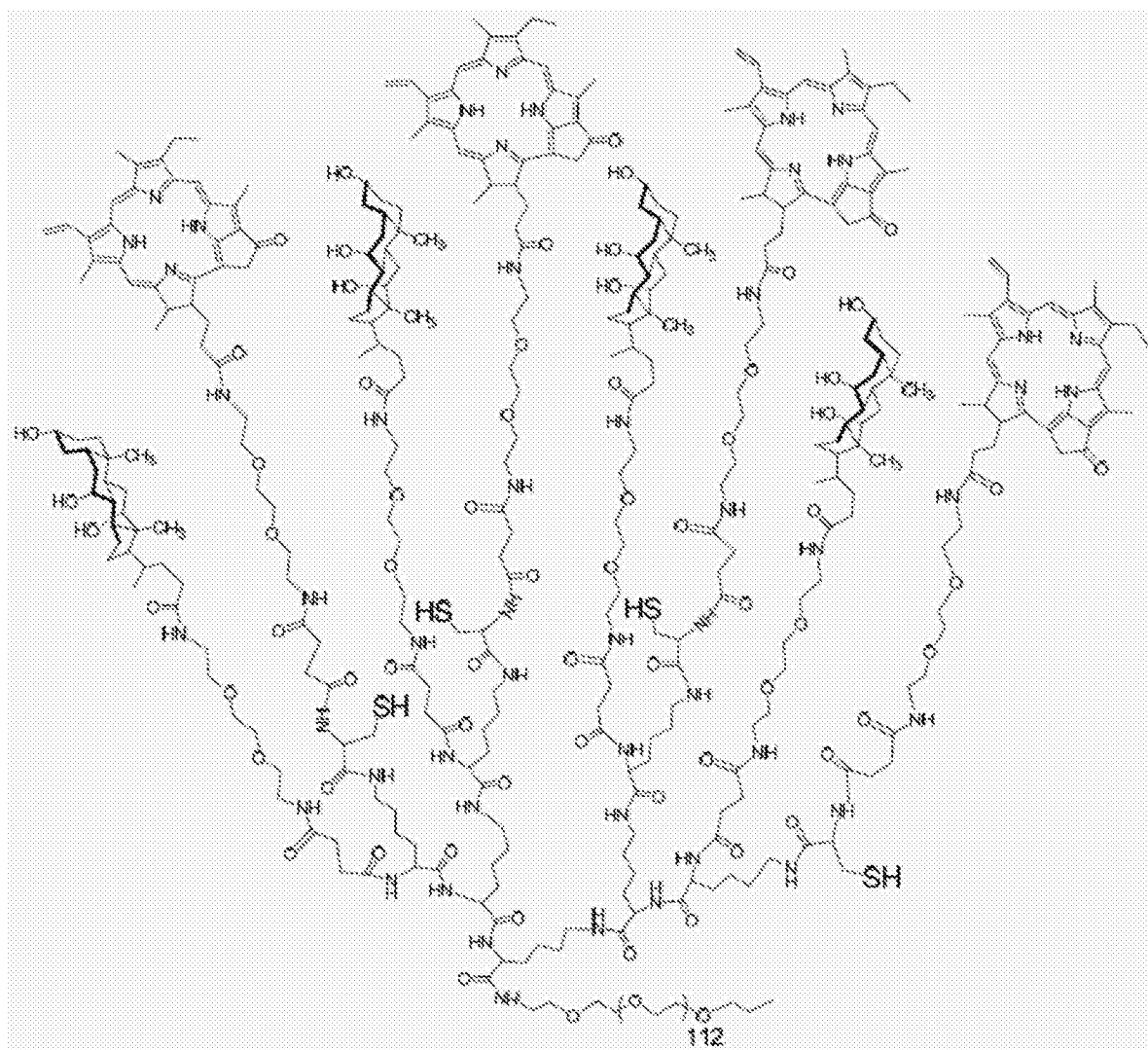


图18

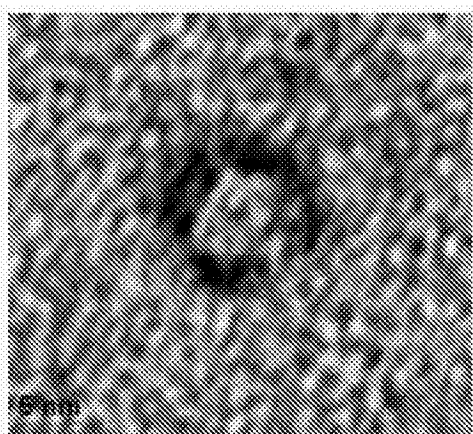


图19

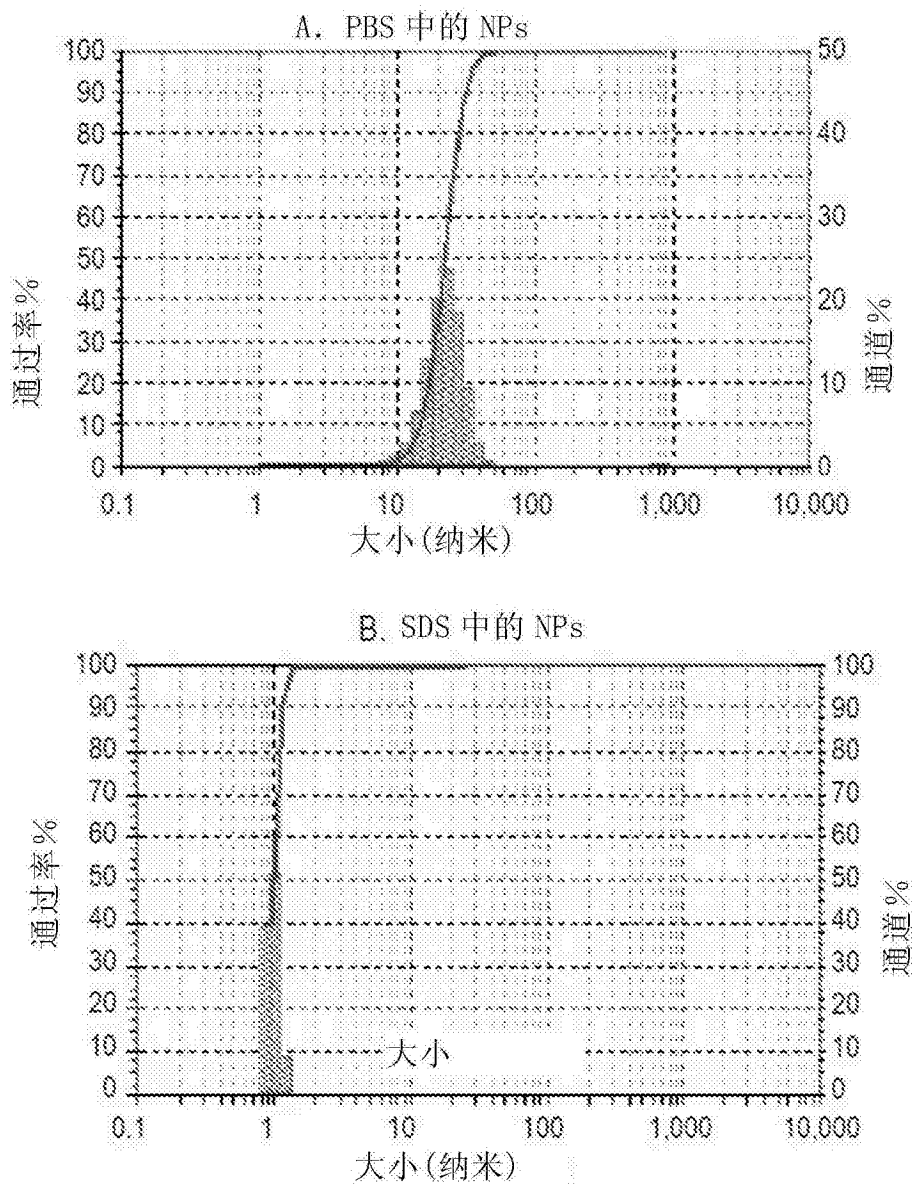


图20

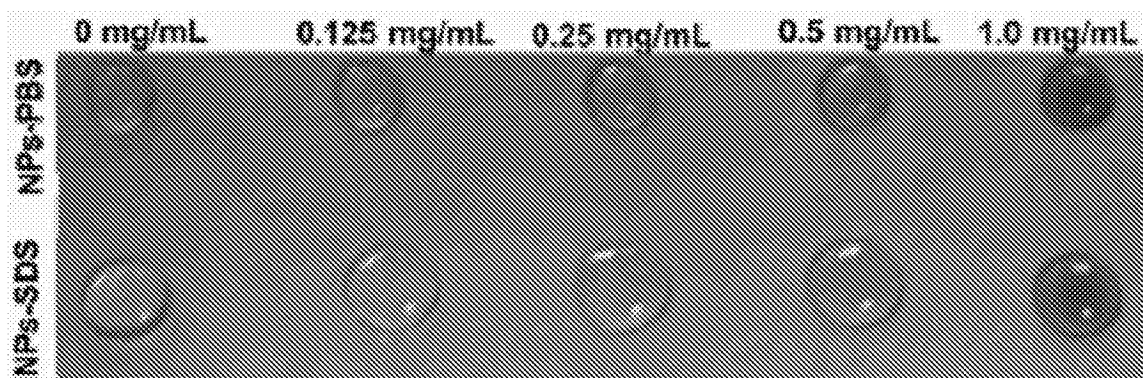


图21

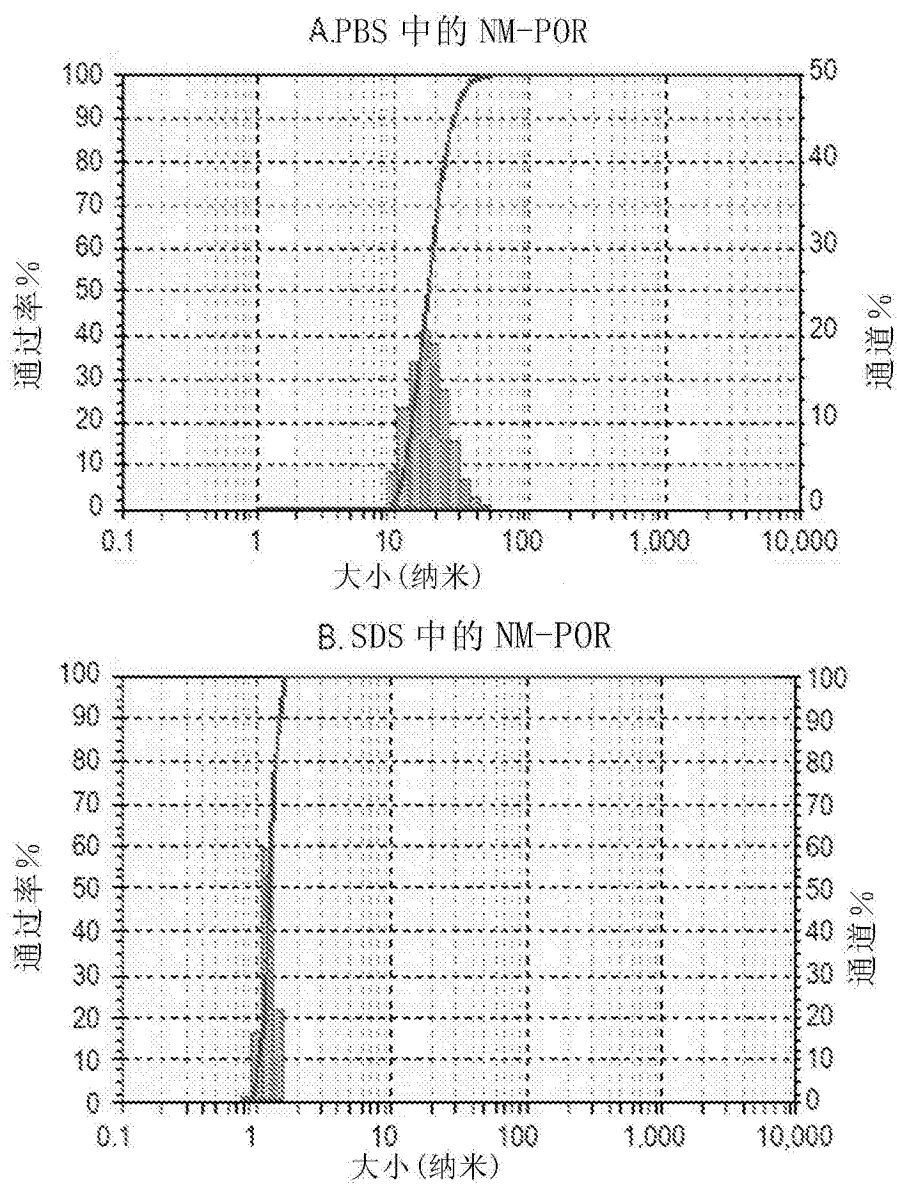


图22

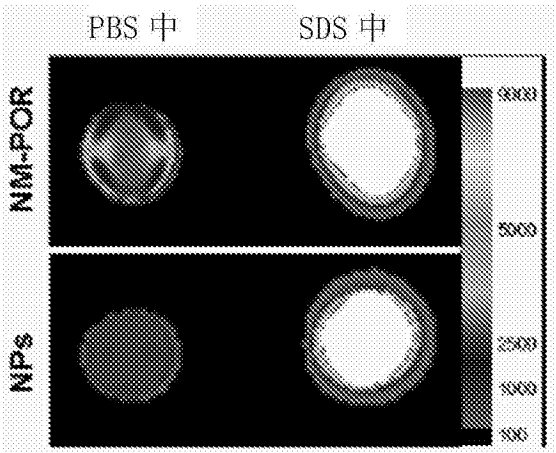


图23

A. PBS 中的 NM-POR



B. SDS 中的 NM-POR



图24

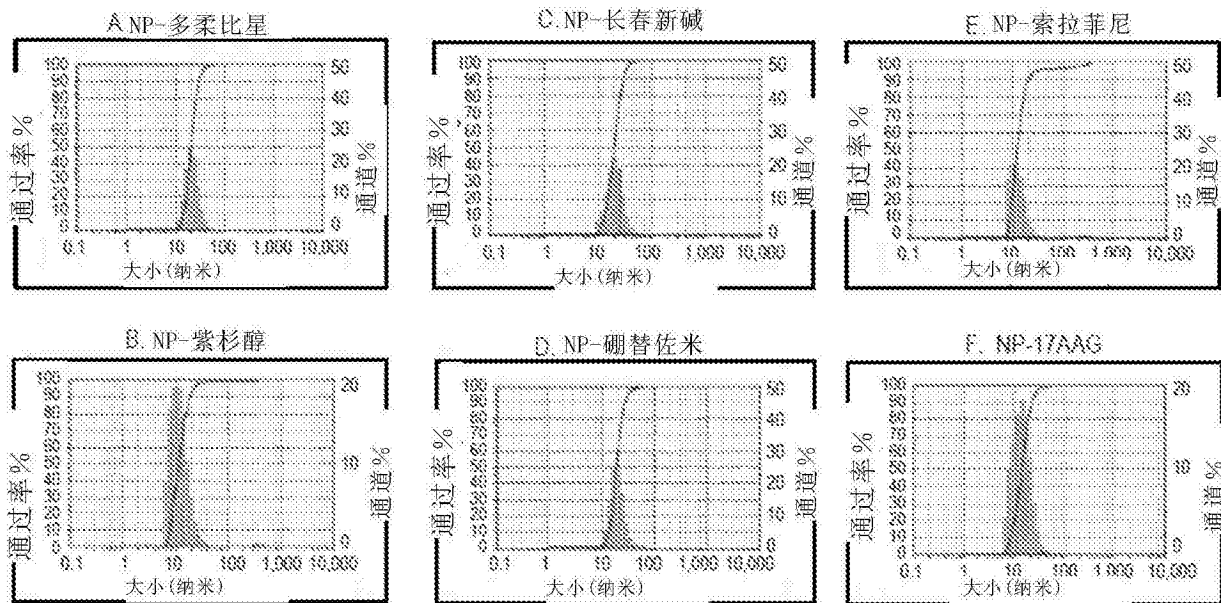


图25

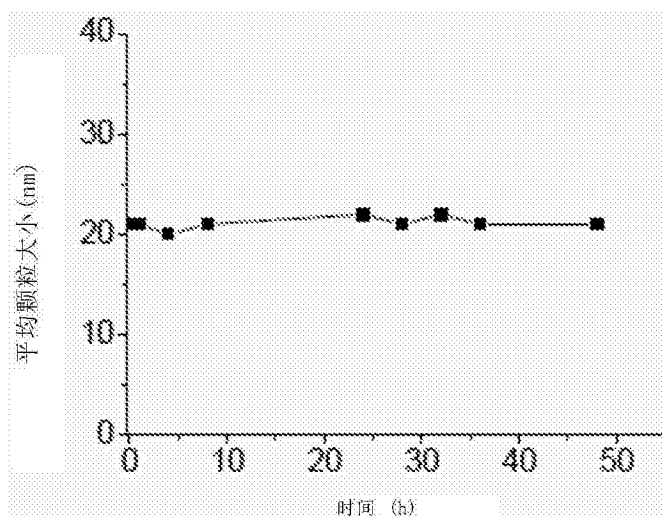


图26

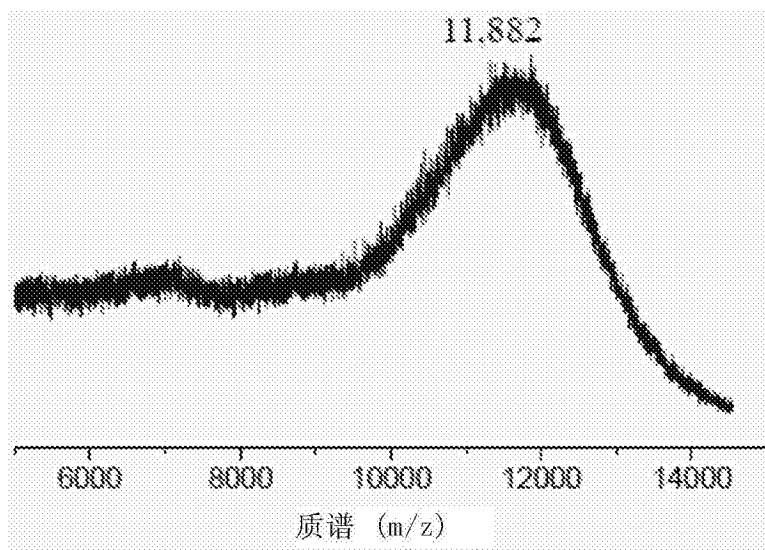


图27

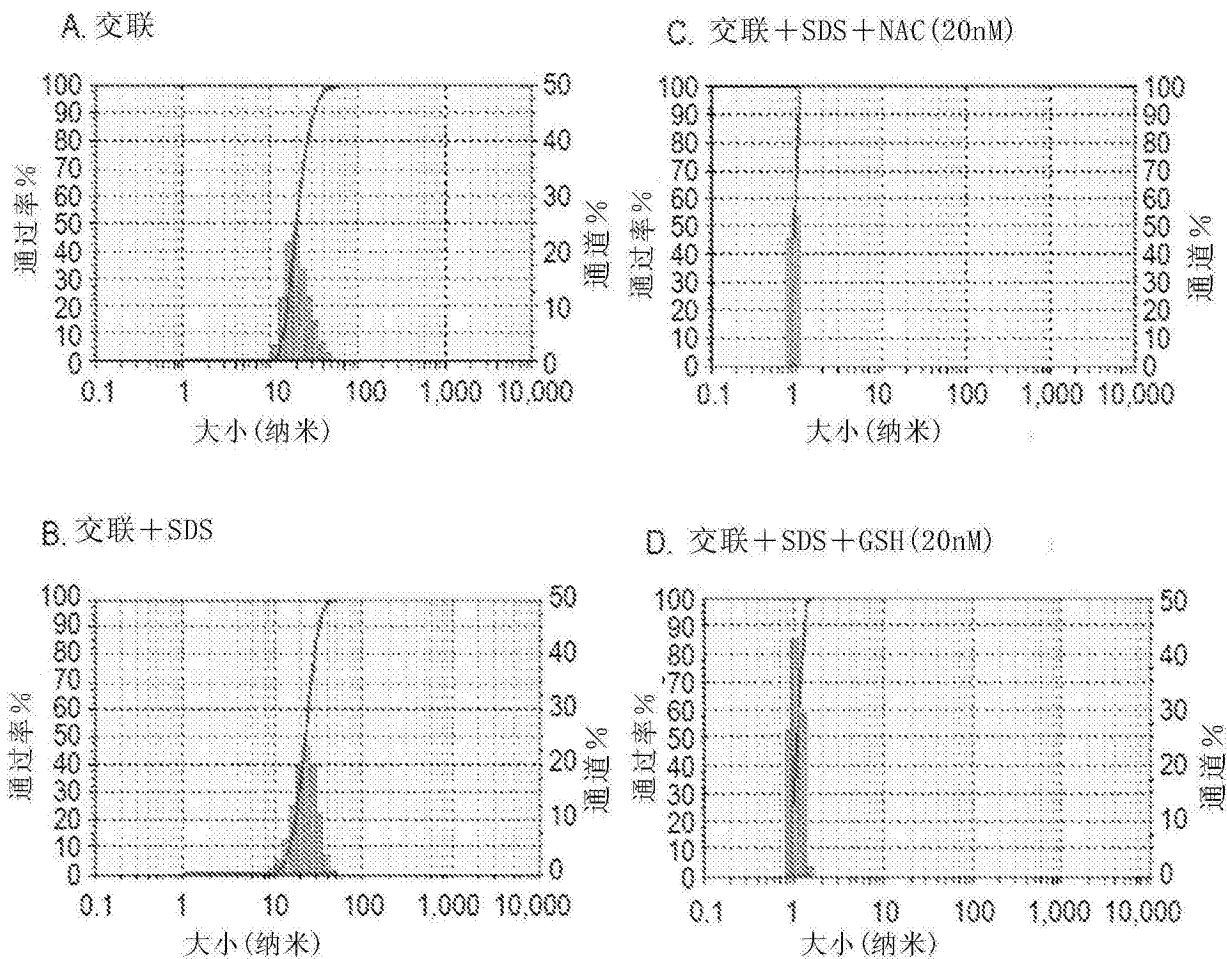


图28

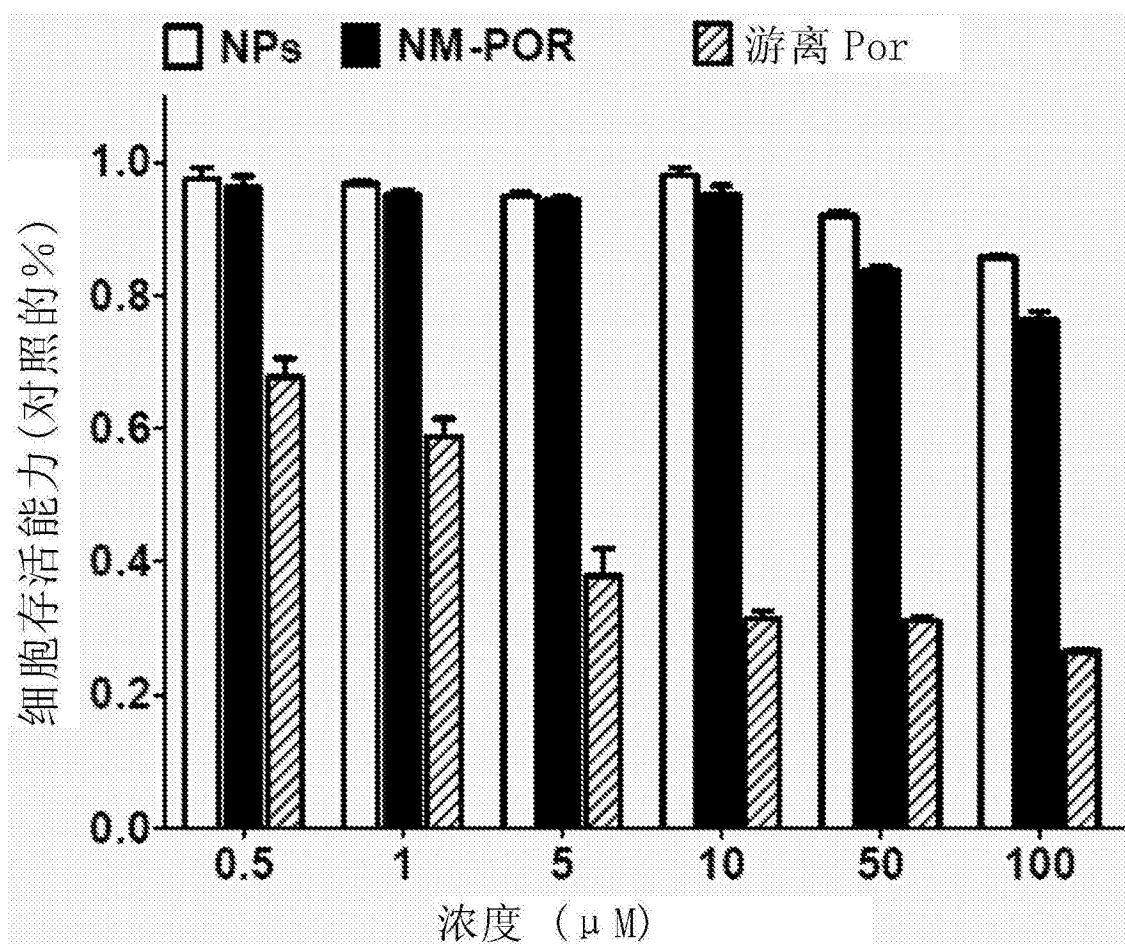


图29

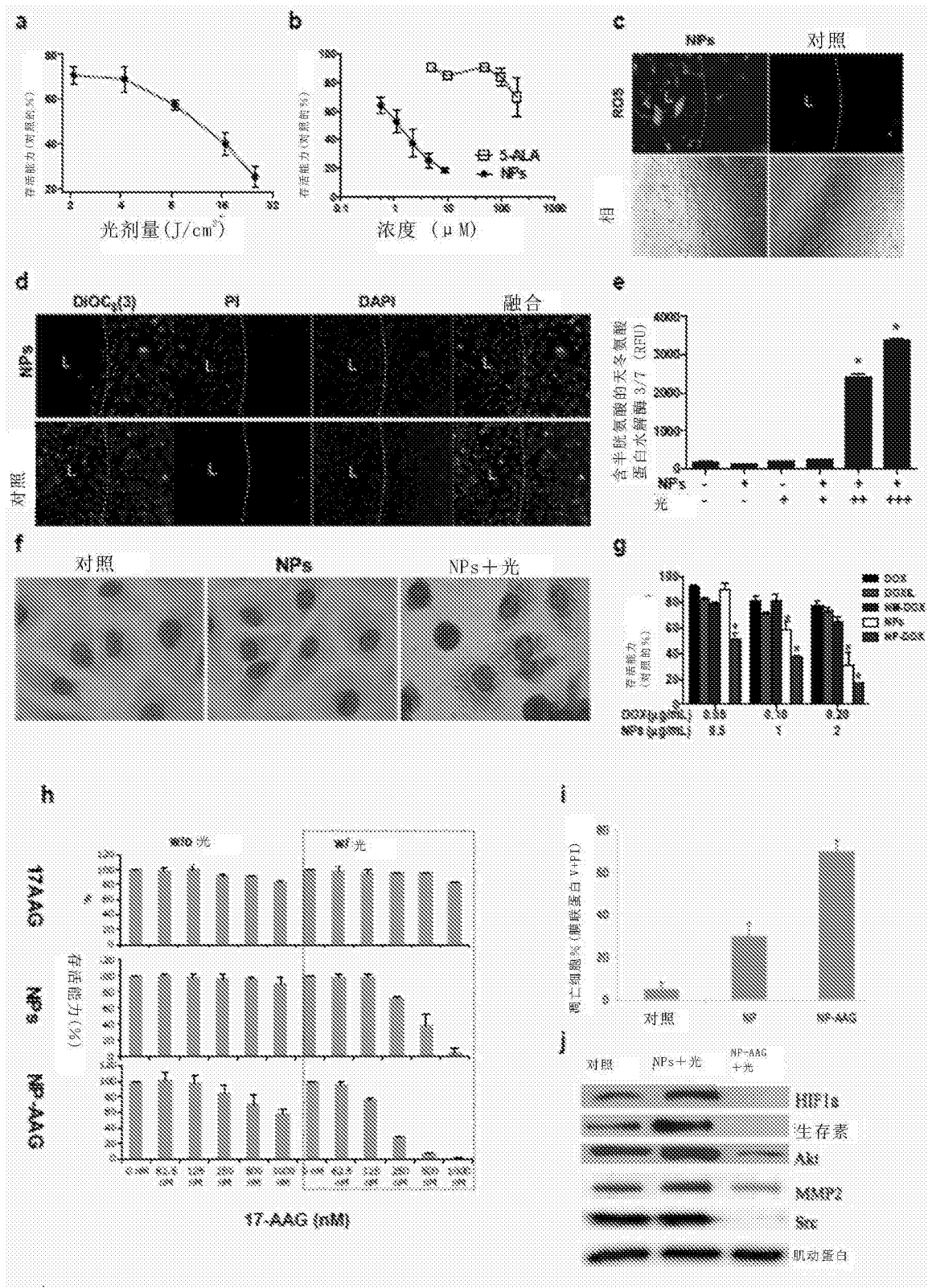


图30

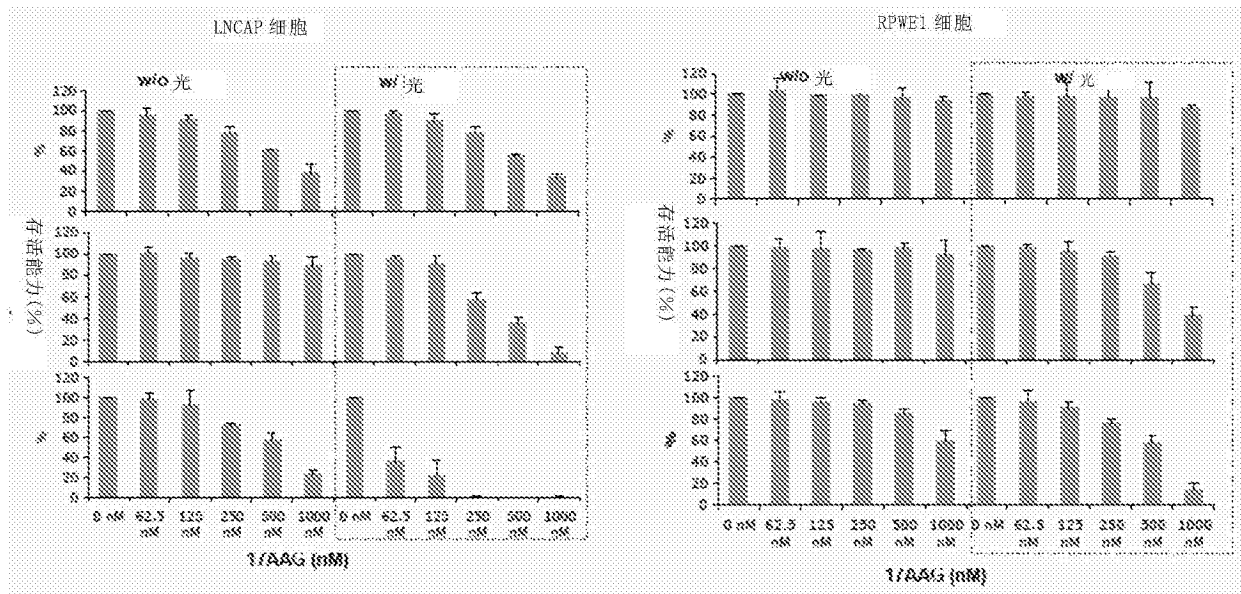


图31

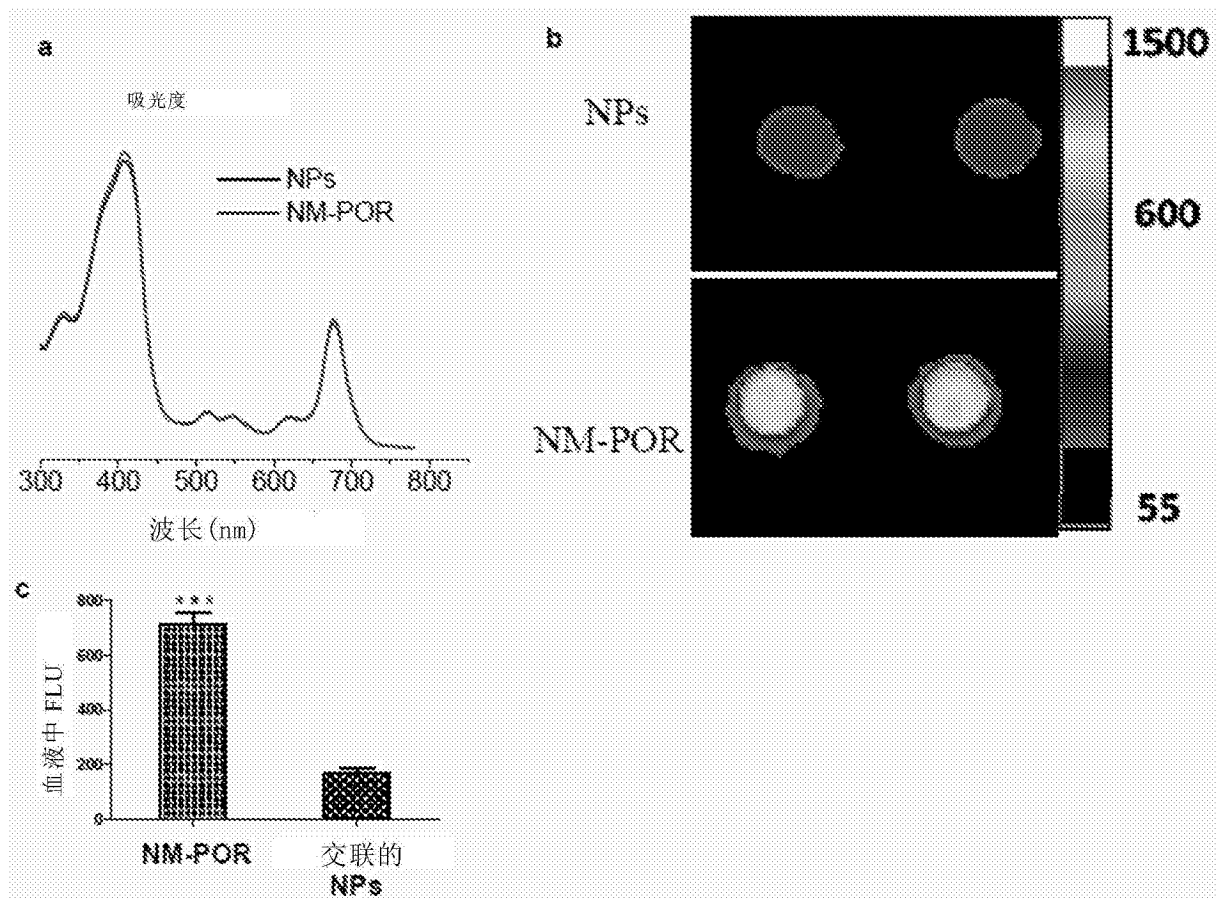


图32

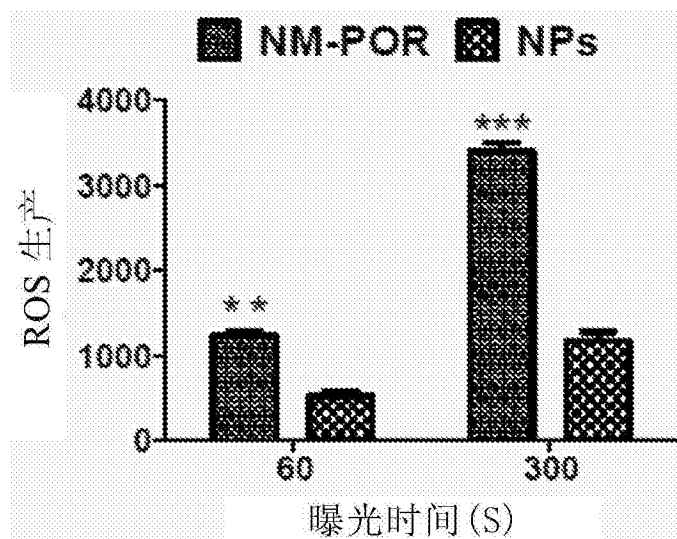


图33

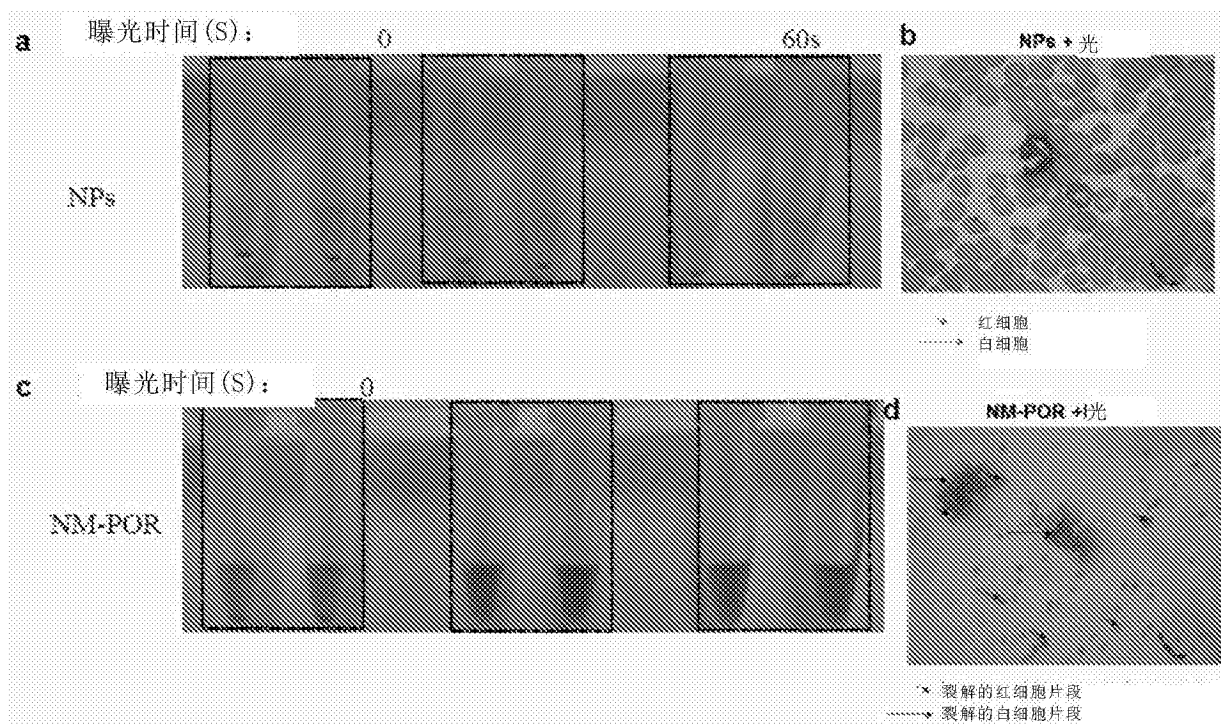


图34

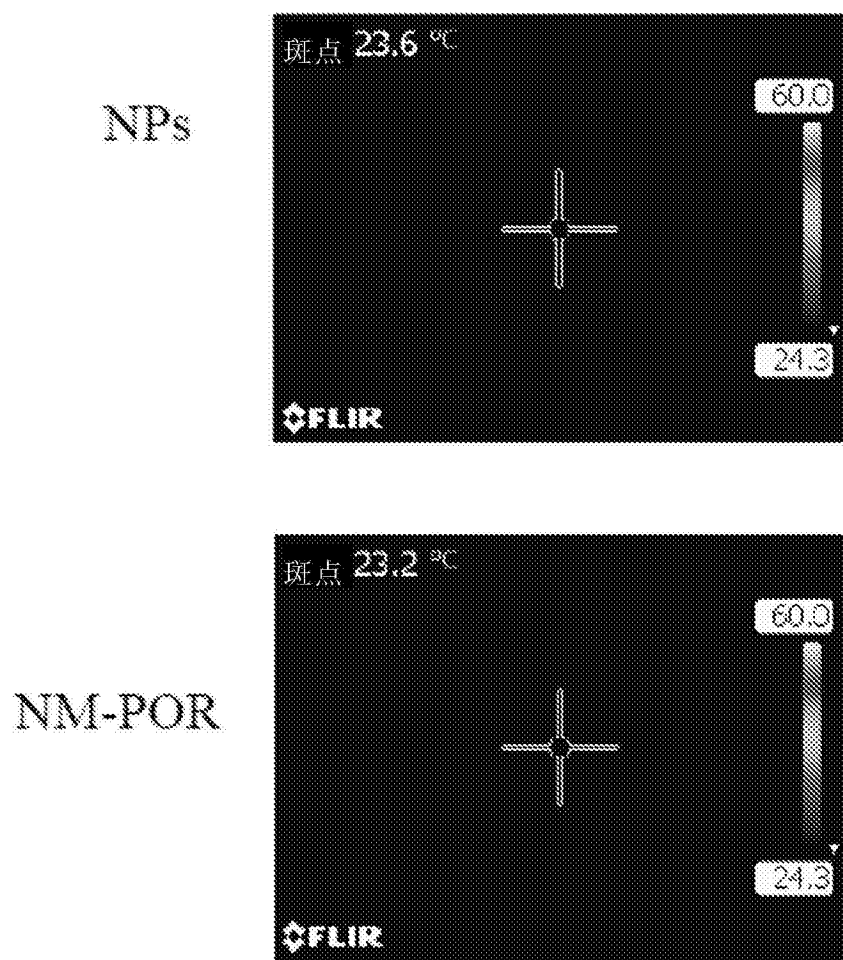


图35

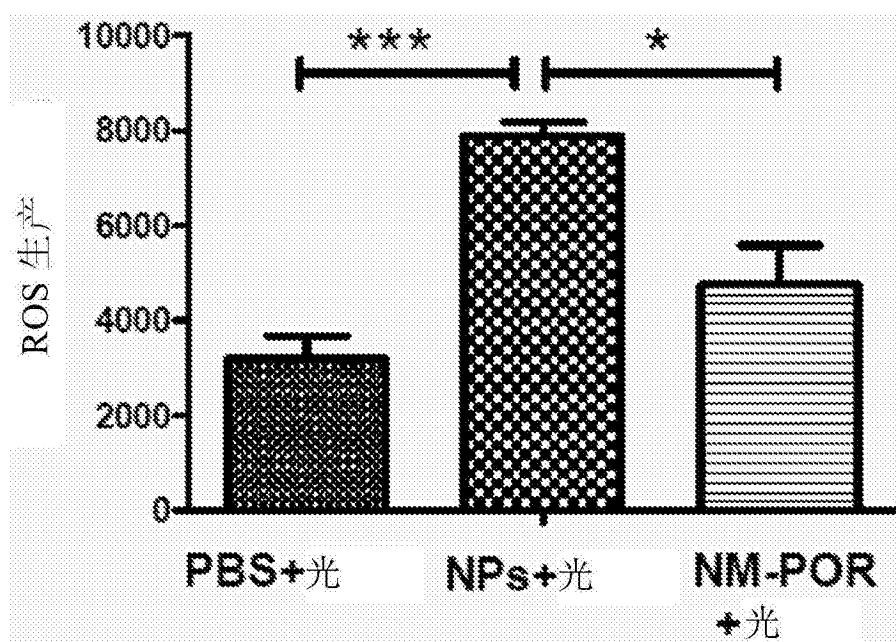


图36

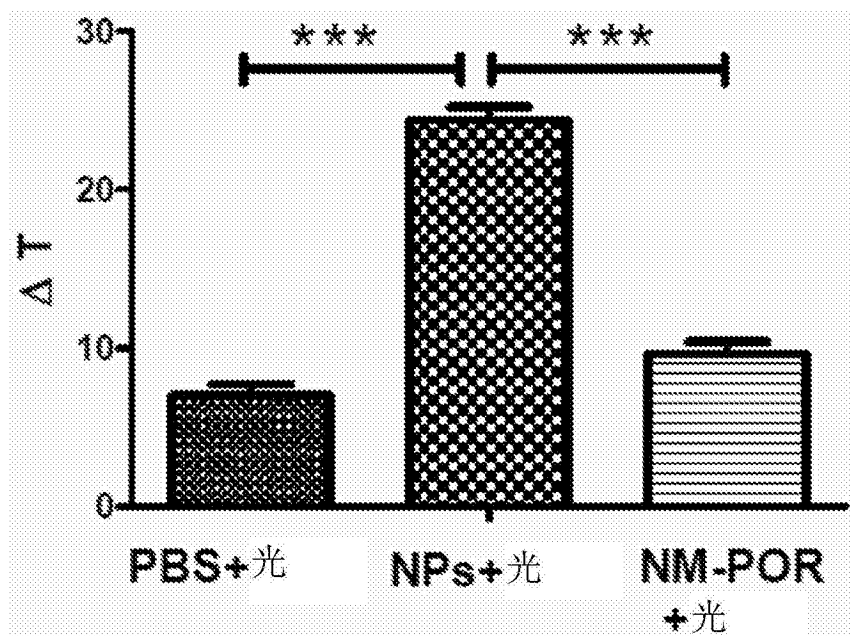


图37

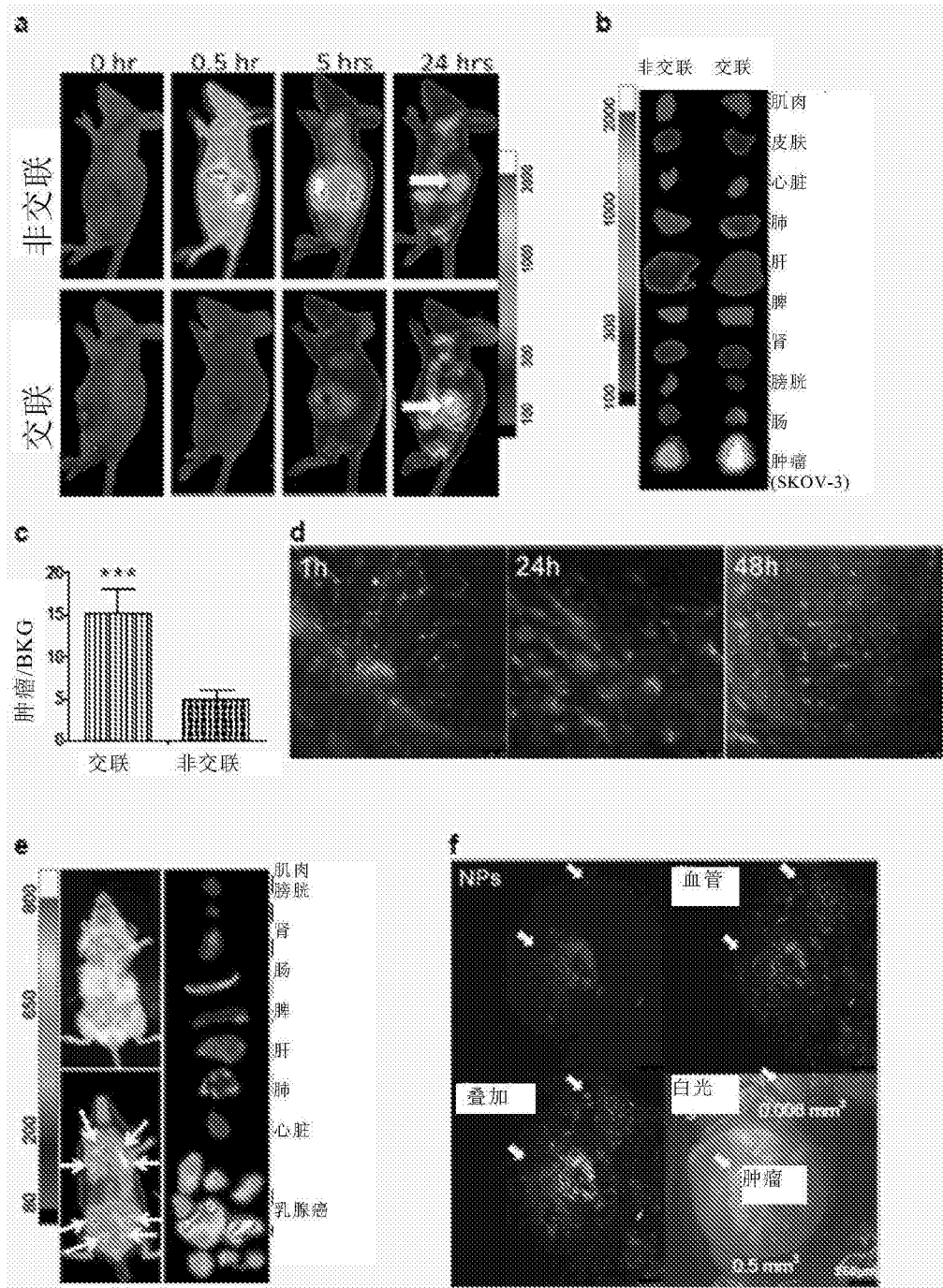


图38

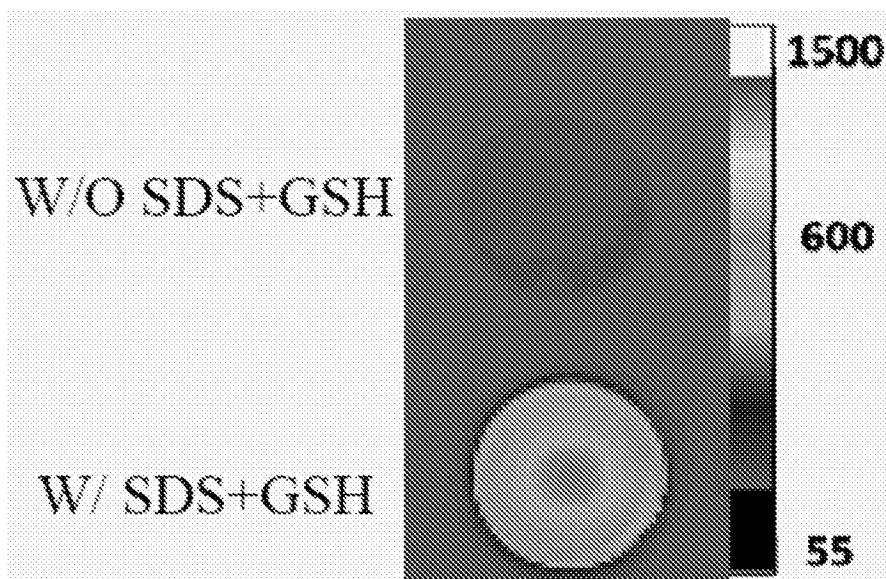


图39

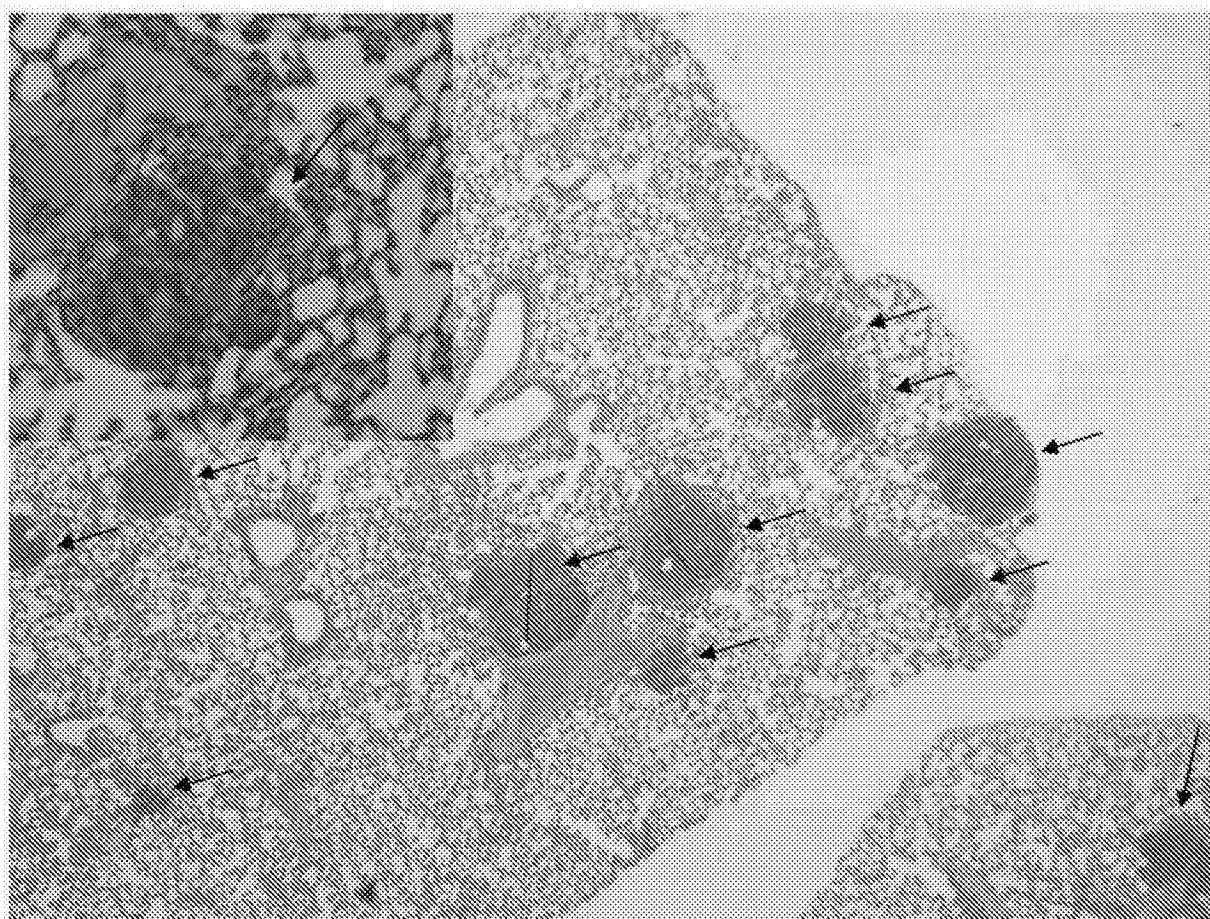


图40

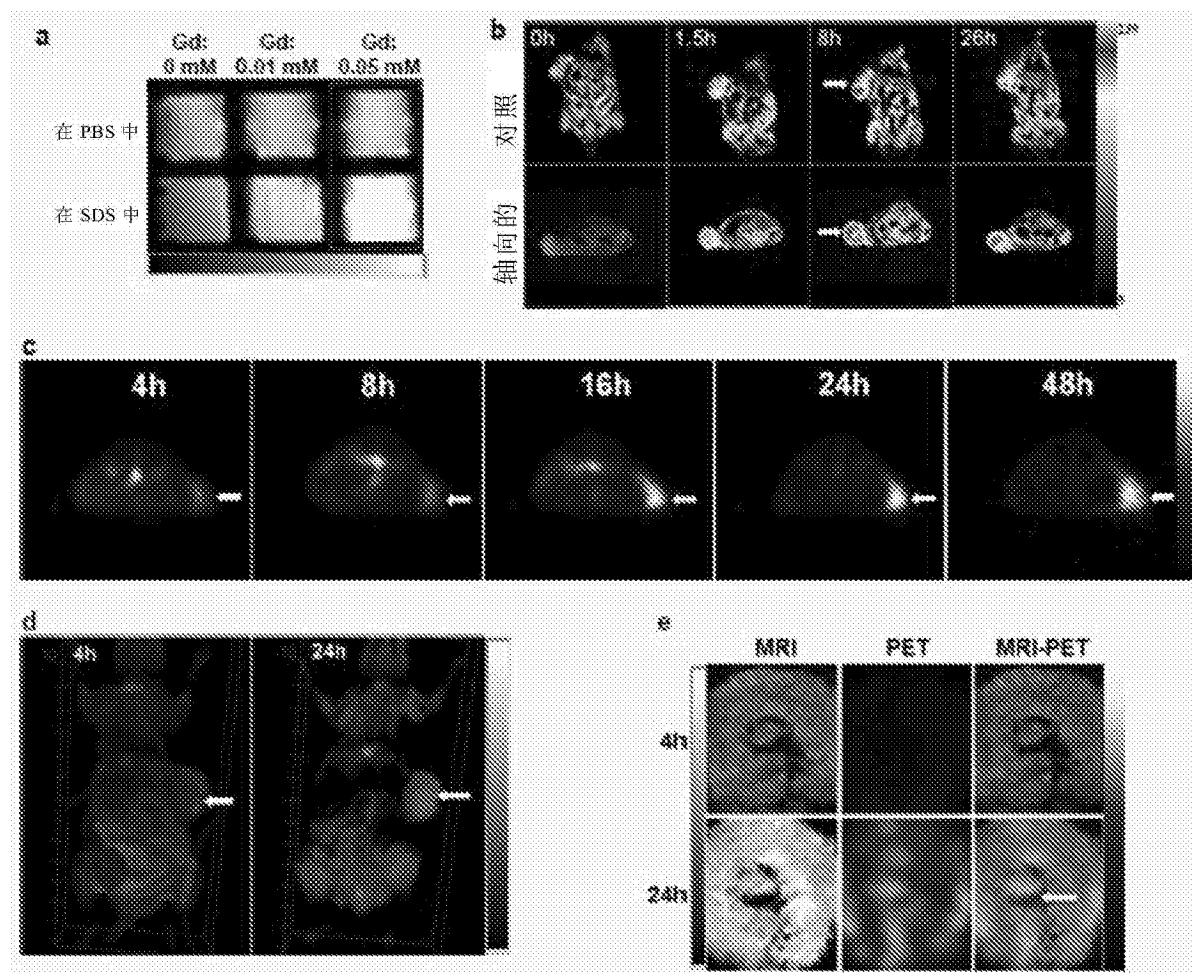


图41

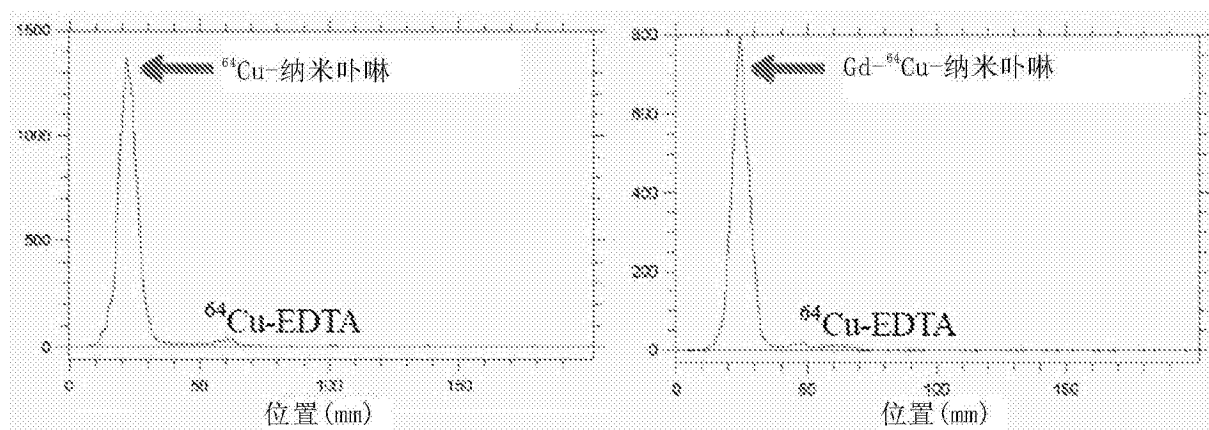


图42

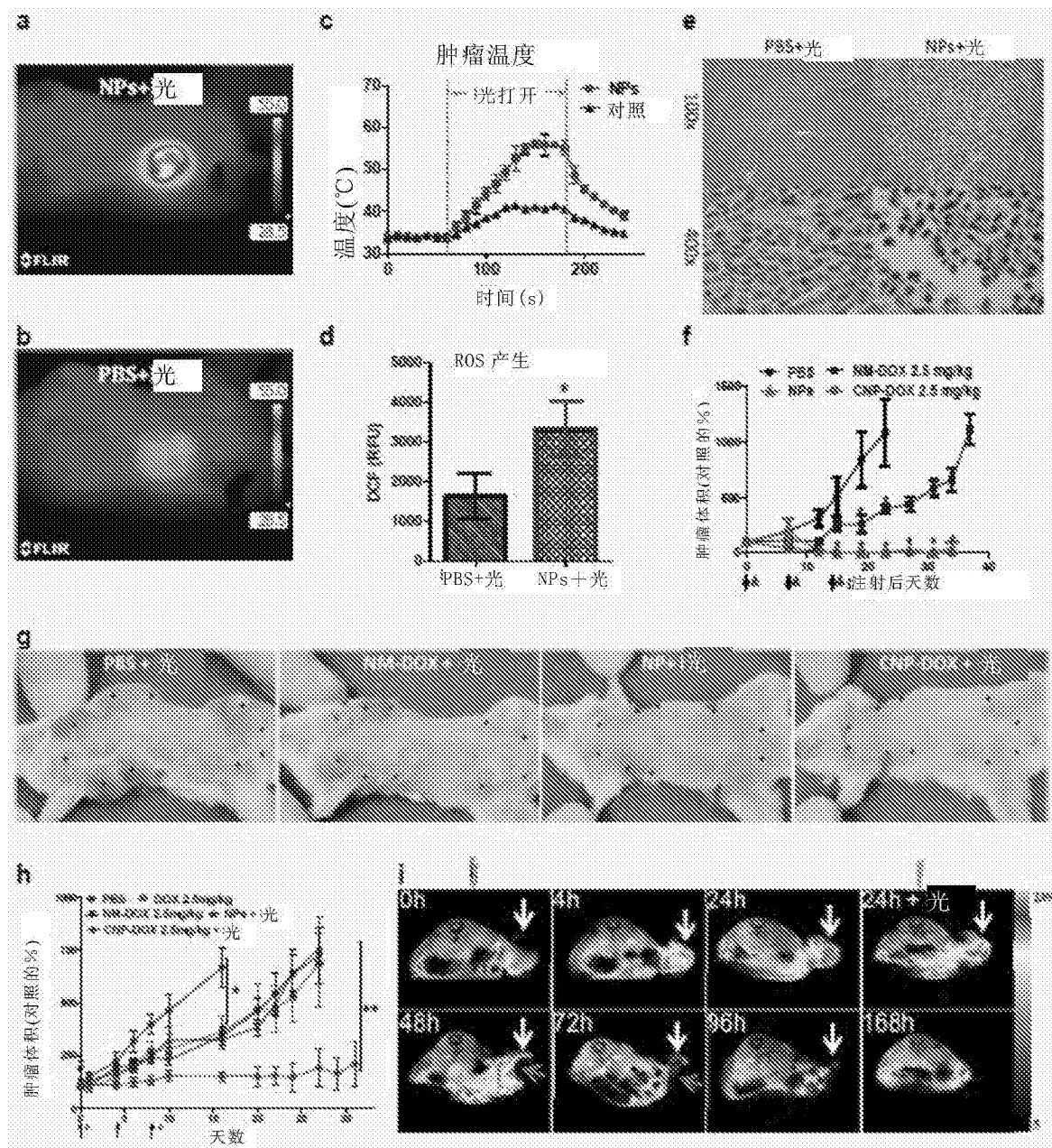


图43

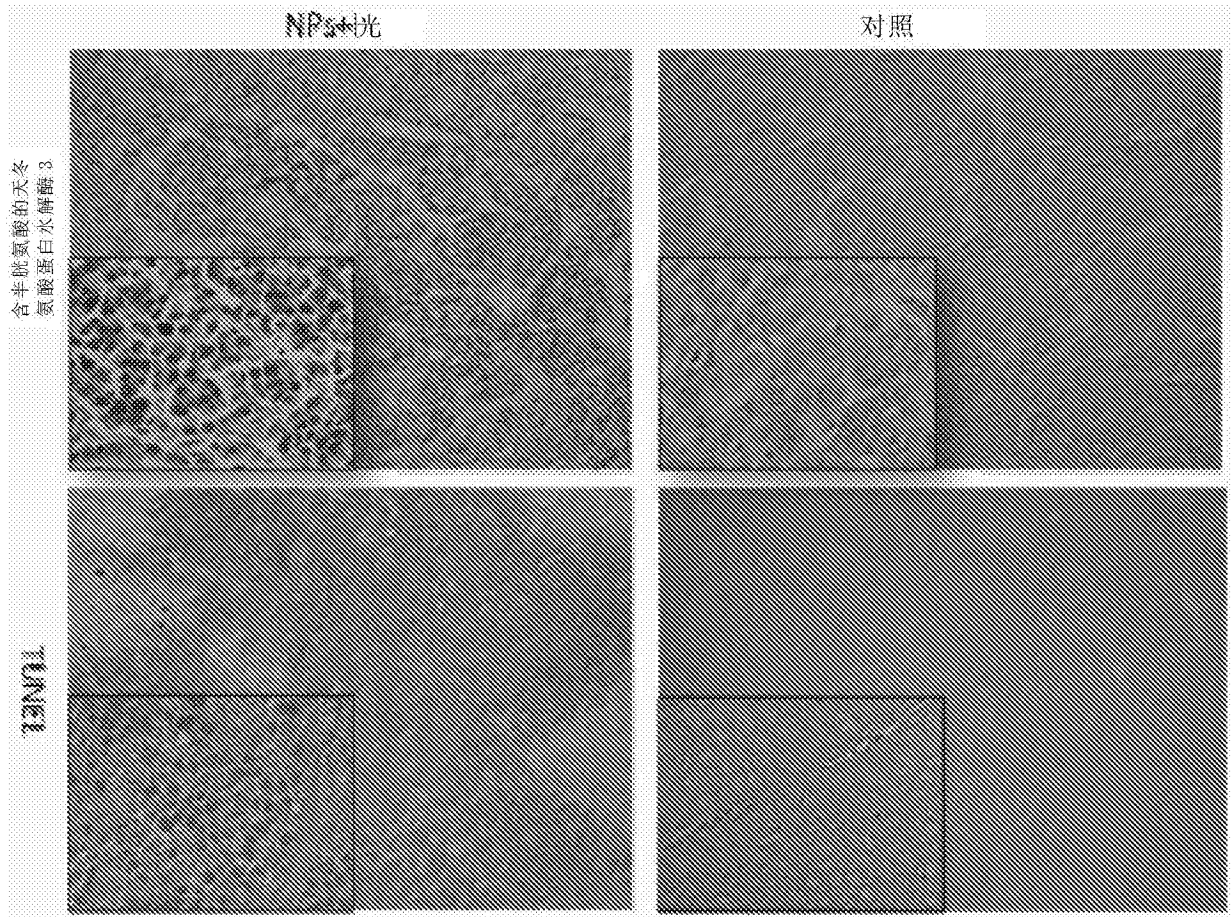


图44

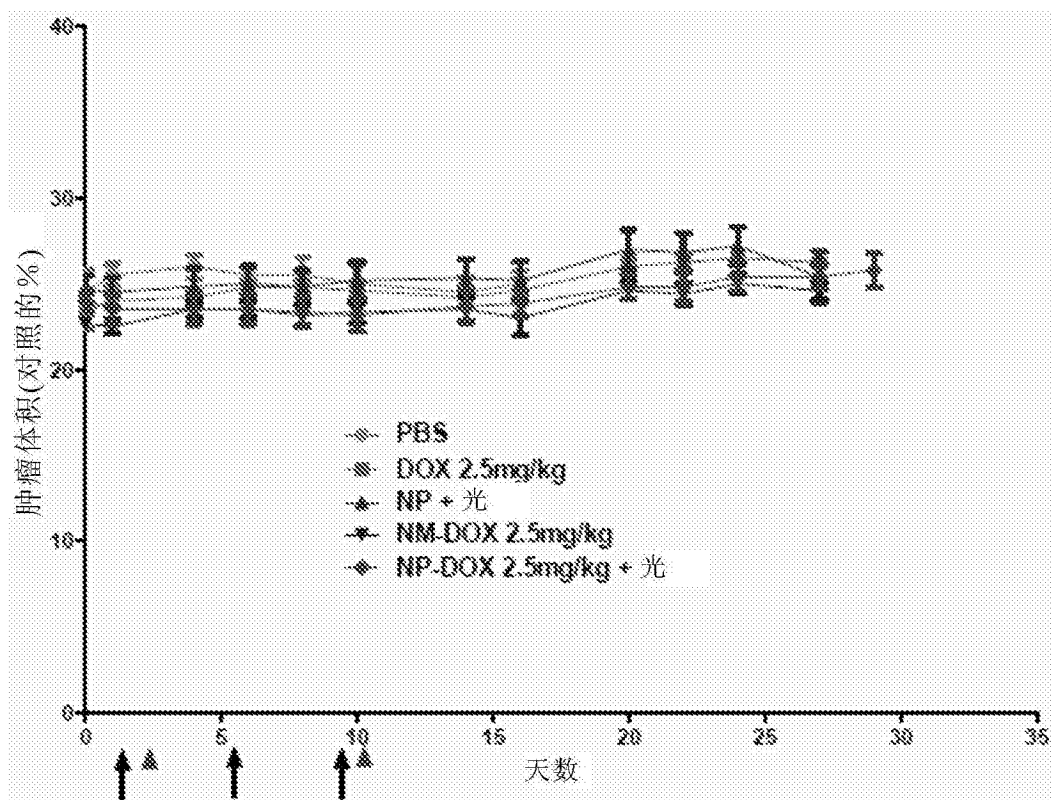


图45