



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109862883 A

(43)申请公布日 2019.06.07

(21)申请号 201780063609.5

(22)申请日 2017.08.18

(30)优先权数据

2016904292 2016.10.21 AU

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.04.15

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/AU2017/050885 2017.08.18

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/071959 EN 2018.04.26

(71)申请人 生物权威(英国)有限公司

地址 英国剑桥郡

(72)发明人 朱利安·亚历山大·巴登 贡晓娟

米诺·J·穆加达姆

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 郑斌 刘振佳

(51)Int.Cl.

A61K 9/127(2006.01)

A61K 47/69(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61K 31/7068(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书17页

序列表5页 附图14页

(54)发明名称

细胞毒性颗粒

(57)摘要

本发明涉及用于癌症治疗的细胞毒性颗粒，其包含芯和排列在所述芯上用于与癌细胞上的P2X7受体结合的多个可变结构域。

1. 细胞毒性颗粒,其包含:
 - 芯;
 - 包含在所述芯中或者陷入其中或其上的细胞毒性化合物;
 - 排列在所述芯上的多个可变结构域,其用于与癌细胞上的P2X₇R结合,从而在所述颗粒与癌细胞接触时使所述颗粒能够与其上表达有P2X₇R的癌细胞结合。
2. 权利要求1所述的颗粒,其中所述芯是脂质体。
3. 权利要求1或2所述的颗粒,其中所述细胞毒性化合物是吉西他滨。
4. 权利要求3所述的颗粒,其中所述脂质体包含形成所述脂质体之脂质层的烃链,并且其中吉西他滨的伯胺通过氨基甲酸酯基团与所述脂质层的烃链键合。
5. 权利要求3或4所述的颗粒,其中所述脂质体包含排列在其上使抗体能够与所述脂质体缀合的马来酰亚胺基团。
6. 权利要求1至5中任一项所述的颗粒,其中所述可变结构域与由序列GHNYTTNILPGLNITC (SEQ ID NO:2)组成的肽结合。
7. 权利要求1至5中任一项所述的颗粒,其中所述可变结构域与由序列KYYKENNVEKRTLK (SEQ ID NO:3)组成的肽结合。
8. 权利要求1至7中任一项所述的颗粒,其中排列在所述芯上用于与癌细胞上的P2X₇受体结合的所述可变结构域可以以完整抗体或包含可变结构域之抗体片段的形式提供。
9. 权利要求1至8中任一项所述的颗粒,其中所述可变结构域用于与癌症相关P2X₇受体结合。
10. 权利要求9所述的颗粒,其中所述可变结构域用于与非功能性P2X₇受体结合。
11. 权利要求8所述的颗粒,其中包含可变结构域的抗体片段包含单链抗体、单链Fv片段、以及F(ab')₂、Fab、Fd和Fv片段。
12. 前述权利要求中任一项所述的颗粒,其中所述可变结构域由式1限定:
CDR1-CDR2-CDR3
其中CDR1是RNHDMG (SEQ ID NO:4)
其中CDR2是AISGSGGSTYYANSVKG (SEQ ID NO:5)
其中CDR3是EPKPMDETFDY (SEQ ID NO:6)。
13. 前述权利要求中任一项所述的颗粒,其中所述可变结构域包含如SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列。
14. 前述权利要求中任一项所述的颗粒,其中所述可变结构域由如SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列组成。
15. 药物组合物,其包含前述权利要求中任一项所述的多个细胞毒性颗粒,以及药学上有效的稀释剂、赋形剂或载体。
16. 治疗患有癌症的个体的方法,其包括向所述个体施用权利要求1至14中任一项所述的颗粒或组合物,从而治疗所述个体的癌症。
17. 权利要求16所述的方法,其中所述癌症是实体瘤。
18. 权利要求17所述的方法,其中所述癌症是乳腺癌。
19. 权利要求1至15中任一项所述的颗粒或组合物,其用于治疗患有癌症的个体。
20. 权利要求1至15中任一项所述的颗粒或组合物在制备用于治疗癌症的药物中的用

途。

21. 用于杀伤癌细胞的方法,其包括使癌细胞与权利要求1至15中任一项所述的颗粒或组合物接触。

细胞毒性颗粒

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求澳大利亚申请AU 2016904292的优先权,其全部内容通过引用整体并入本文。

发明领域

[0003] 本发明涉及癌症的化学治疗、纳米颗粒(尤其是脂质体)的形成、以及细胞毒性药物和抗体与其缀合。

背景技术

[0004] 在说明书中对任何现有技术的引用并不是承认或表明该现有技术构成任何管辖权内的一般常识的一部分或者该现有技术可被合理地预期被本领域中技术人员理解、认为与其他现有技术相关和/或与其组合。

[0005] 大多数癌症经常通过多种方法的组合来进行治疗,包括手术摘除肿瘤、化学治疗和/或放射治疗。手术操作通常不足以完全摘除肿瘤,因此手术经常伴有化学治疗和/或放射治疗。化学治疗涉及使用药物来杀伤肿瘤细胞,且放射治疗涉及用高能射线(例如,X射线)进行治疗来杀伤肿瘤细胞或使其缩小。

[0006] 遗憾的是,化学治疗和辐射引起严重的且有时甚至危及生命的副作用,包括疲劳;恶心;呕吐;疼痛;脱发;贫血;中枢神经系统问题;感染;凝血问题;口、牙龈和咽喉问题;腹泻;便秘;神经和肌肉影响;肾和膀胱影响;流感样症状;体液潴留(fluid retention);以及对性器官的影响。

[0007] 化学治疗引起如此严重的副作用的原因是治疗涉及向患者全身性施用细胞毒性剂。这些药剂不可区分肿瘤细胞和正常细胞,并因此杀伤健康细胞以及肿瘤细胞。副作用恶化的原因是必须向患者施用非常大的剂量以将治疗有效剂量递送至肿瘤部位。与化学治疗相比,虽然放射治疗稍微更局部地施用,但放射治疗仍然导致肿瘤附近正常组织的破坏。

[0008] 因此,在治疗组织特异性疾病例如癌症(例如前列腺癌)中,治疗剂的靶向性(例如,靶向特定的组织或细胞类型;靶向特定的患病组织而不是正常组织;等)是期望的。例如,与细胞毒性抗癌剂的全身性递送形成对比,靶向递送可防止药剂杀伤健康细胞。另外,靶向递送将允许施用较低剂量的药剂或以较低的施用频率施用,这可降低通常与传统化学治疗相关的不期望的副作用。

[0009] 尽管癌症治疗取得了进展,但是仍然需要向癌细胞靶向递送高度毒性的药剂。

发明内容

[0010] 本发明寻求解决上述需求,并且在一个实施方案中提供了细胞毒性颗粒,其包含:

[0011] -芯(core);

[0012] -包含在所述芯中或者陷入(entrapped)其中或其上的细胞毒性化合物;

[0013] -排列在所述芯上的多个可变结构域,其用于与癌细胞上的P2X7R结合,从而在所

述颗粒与所述癌细胞接触时使所述颗粒能够与其上表达有P2X₇R的癌细胞结合。

[0014] 在另一个实施方案中,提供了细胞毒性颗粒,其包含:

[0015] -脂质体;

[0016] -包含在所述脂质体中或者陷入其中或其上的细胞毒性化合物;

[0017] -排列在所述脂质体上的多个可变结构域,其用于与癌细胞上的P2X₇R结合,从而在所述颗粒与所述癌细胞接触时使所述颗粒能够与其上表达有P2X₇R的癌细胞结合。

[0018] 在另一个实施方案中,提供了细胞毒性颗粒,其包含:

[0019] -脂质体;

[0020] -包含在所述脂质体中或者陷入其中或其上的吉西他滨形式的细胞毒性化合物;

[0021] -排列在所述脂质体上的多个可变结构域,其用于与癌细胞上的P2X₇R结合,从而在所述颗粒与所述癌细胞接触时使所述颗粒能够与其上表达有P2X₇R的癌细胞结合。

[0022] 在另一个实施方案中,提供了细胞毒性颗粒,其包含:

[0023] -脂质体,其包含形成脂质体之脂质层的烃链;

[0024] -吉西他滨形式的细胞毒性化合物,其中吉西他滨的伯胺通过氨基甲酸酯基团与所述脂质层的烃链键合;

[0025] -排列在所述脂质体上的多个可变结构域,其用于与癌细胞上的P2X₇R结合,从而在所述颗粒与所述癌细胞接触时使所述颗粒能够与其上表达有P2X₇R的癌细胞结合。

[0026] 在另一个实施方案中,提供了细胞毒性颗粒,其包含:

[0027] -脂质体,所述脂质体包含:

[0028] -形成所述脂质体之脂质层的烃链;

[0029] -排列在所述脂质体上使得抗体能够与其缀合的马来酰亚胺基团;

[0030] -吉西他滨形式的细胞毒性化合物,其中吉西他滨的伯胺通过氨基甲酸酯基团与所述脂质层的烃链键合;

[0031] -与排列在所述脂质体上的马来酰亚胺基团结合的多个可变结构域,其用于与癌细胞上的P2X₇R结合,从而在所述颗粒与所述癌细胞接触时使所述颗粒能够与其上表达有P2X₇R的癌细胞结合。

[0032] 在另一个实施方案中,提供了细胞毒性颗粒,其包含:

[0033] -脂质体,所述脂质体包含:

[0034] -形成所述脂质体之脂质层的烃链;

[0035] -排列在所述脂质体上使得抗体能够与其缀合的马来酰亚胺基团;

[0036] -吉西他滨形式的细胞毒性化合物,其中吉西他滨的伯胺通过氨基甲酸酯基团与所述脂质层的烃链键合;

[0037] -与排列在所述脂质体上的马来酰亚胺基团结合的多个可变结构域,其用于与癌细胞上的P2X₇R结合,从而在所述颗粒与所述癌细胞接触时使所述颗粒能够与其上表达有P2X₇R的癌细胞结合,

[0038] 其中所述可变结构域由式1限定:

[0039] CDR1-CDR2-CDR3;

[0040] 其中CDR1是^{RNHDMG}(SEQ ID NO:4);

[0041] 其中CDR2是^{ATSGSGGSTYYANSVKG}(SEQ ID NO:5);

- [0042] 其中CDR3是^{EPKPMDEFDY} (SEQ ID NO:6)。
- [0043] 优选地,可变结构域含有式FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4中的框架区。
- [0044] 在另一个实施方案中,提供了细胞毒性颗粒,其包含:
- [0045] -脂质体,所述脂质体包含:
- [0046] -形成所述脂质体之脂质层的烃链;
- [0047] -排列在所述脂质体上使得抗体能够与其缀合的马来酰亚胺基团;
- [0048] -吉西他滨形式的细胞毒性化合物,其中吉西他滨的伯胺通过氨基甲酸酯基团与所述脂质层的烃链键合;
- [0049] -与排列在所述脂质体上的马来酰亚胺基团结合的多个可变结构域,其用于与癌细胞上的P2X₇R结合,从而在所述颗粒与所述癌细胞接触时使所述颗粒能够与其上表达有P2X₇R的癌细胞结合,
- [0050] 其中所述可变结构域具有以下氨基酸序列 (SEQ ID NO:7):
- [0051]

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRNHDMGWWRQAPGKGLEWWSAIS
GSGGSTYYANSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAEPKPMDEFDYR
SPGTLTVSS

- [0052] 在任一实施方案中,吉西他滨的伯胺与脂质层的烃链共价键合。优选地,伯胺是吉西他滨的胞嘧啶C4胺。
- [0053] 在本发明的任一实施方案中,脂质体是球形脂质体。
- [0054] 在另一个实施方案中,提供了药物组合物,其包含多种上述细胞毒性颗粒和药学上有效的稀释剂、赋形剂或载体。通常来说,药物组合物适于静脉内施用。
- [0055] 在另一个实施方案中,提供了治疗患有癌症的个体的方法,其包括向个体施用上述颗粒或组合物,从而治疗所述个体的癌症。
- [0056] 在另一个实施方案中,提供了降低患有癌症的个体中的肿瘤体积的方法,其包括向所述个体施用上述颗粒或组合物,从而降低所述个体中的肿瘤体积。
- [0057] 在另一个实施方案中,提供了上述颗粒或组合物,其用于治疗患有癌症的个体。
- [0058] 在另一个实施方案中,提供了上述颗粒或组合物在制备用于治疗癌症的药物中的用途。
- [0059] 在另一个实施方案中,提供了用于杀伤癌细胞的方法,其包括使癌细胞与上述颗粒或组合物接触。
- [0060] 在另一个实施方案中,提供了包含上述颗粒或组合物的药盒(kit)。
- [0061] 在本发明的任一方面,细胞毒性化合物可包含吉西他滨。优选地,吉西他滨是缀合物的形式,其允许吉西他滨连接至或并入芯或脂质体中。
- [0062] 在本发明的任一方面,细胞毒性颗粒的芯或脂质体由二油酰磷脂酰胆碱(dioleoylphosphatidylcholine, DOPC)构成。
- [0063] 在本发明的任一方面,可变结构域可以是单结构域抗体或者可以是如本文中所述的任何其他抗体结构的一部分。此外,可变结构域可以是人源化的或人的。
- [0064] 在本发明的任一方面,多个可变结构域排列在芯上,用于与癌细胞上的P2X₇R选择性结合。此外,选择性结合可以是针对P2X₇R的,其不能形成凋亡孔。

[0065] 从通过示例并参照附图所给出的以下描述中,本发明的另一些方面以及在前面段落中描述的另一些实施方案将变得明显。

附图说明

[0066] 图1示出了油烯基-吉西他滨缀合物和形成成为脂质体的细胞毒性纳米颗粒形成。

[0067] 图2抗体可变结构域通过马来酰亚胺基团与脂质体的缀合。

[0068] 图3脂质体的尺寸分布。

[0069] 图4通过ELISA的脂质体血清学结合。切向流过滤(tangential flow filtration, TFF)洗涤之后的蛋白质浓度为400至500 $\mu\text{g/mL}$ 。

[0070] 图5通过SDS PAGE凝胶示出的抗体与脂质体的缀合。Nupage 4-12%Bis tris凝胶, MOPS缓冲液(1 $\times$)。凝胶在180V下运行55分钟。

[0071] 图6细胞毒性颗粒对4T1肿瘤的选择性定位。

[0072] 图7整体动物NIR成像,其揭示了与(A)非抗体缀合的颗粒相比,(B)抗体缀合的细胞毒性颗粒在肿瘤中保留的时间长得多。

[0073] 图8纳米颗粒选择性地定位:在96小时的时间点时,切除的肿瘤的平均总辐射效率 $\pm\text{-SEM (p/s) / [A}\mu\text{W/cm}^2\text{]})$ 。在研究的第0天,通过静脉内尾静脉注射以一次50 μL 的体积施用载剂对照(PBS;第1组),未包被的纳米颗粒(第2组);Ab包被的纳米颗粒(第3组)和HEL4包被的纳米颗粒(第4组)。

[0074] 图9在96小时时的NIR信号强度。离体生物发光成像显示与裸纳米颗粒相比,抗体包被的NP在切除的肿瘤中具有更高的积累。A:PBS组;B:未包被的纳米颗粒;C:抗体包被的纳米颗粒;D:HEL4包被的纳米颗粒。

[0075] 图10抗体缀合的纳米颗粒对荷有4T1鼠乳腺肿瘤小鼠的效力:每个处理组的平均肿瘤体积相对于接种后的天数。每周三次静脉内给予治疗。

[0076] 图11抗体包被的纳米颗粒的给药频率的影响:每个处理组的平均肿瘤体积相对于接种后的天数。每周两次静脉内给予治疗。

具体实施方式

[0077] 现在将详细参照本发明的某些实施方案。虽然将结合实施方案描述本发明,但应理解的是,目的不是将本发明限制于那些实施方案。相反,本发明旨在涵盖可包括在由权利要求所限定的本发明的范围内的所有替代物、修改和等同物。

[0078] 本领域技术人员将认识到许多与本文中所述的那些类似的或等同的方法和材料,其可用于本发明的实践中。本发明决不限于所述的方法和材料。

[0079] 应当理解的是,在本说明书中公开和限定的本发明延伸至正文或附图中提及的或明显的两个或更多个单独特征的所有替代组合。所有这些不同的组合构成了本发明的多个替代方面。

[0080] 本文中提及的所有专利和出版物均通过引用整体并入。

[0081] 本发明提供了细胞毒性颗粒,其由细胞毒性剂构成并且具有排列在颗粒上的多个可变结构域,其中所述可变结构域允许与癌细胞上的P2X₇R结合。当颗粒与癌细胞接触时,颗粒能够与其上表达有P2X₇R的癌细胞结合。

[0082] 在某些方面,本发明的细胞毒性颗粒提供了细胞毒性剂的持续释放,还提供了降低的由细胞毒性剂引起的毒性。这是因为用于与P2X₇R结合的可变结构域确保了颗粒与癌组织结合的特异性,并因此降低了对健康的非癌组织的毒性。本发明因此提供了优于向癌细胞提供细胞毒性剂的其他方式的优点。

[0083] A定义

[0084] 出于解释本说明书的目的,通常将应用以下定义,并且在适当时,没有数量词修饰的名词表示一个/种或更多个/种。

[0085] “嘌呤能受体”通常是指使用嘌呤(例如ATP)作为配体的受体。

[0086] “P2X₇受体”通常是指由三个蛋白质亚基或单体形成的嘌呤能受体,其中至少一个单体具有基本上如以下SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列:

[0087] SEQ ID NO:1

```
1      MPACCSKSDV FQYETNKVTR IQSMNYGTIK WFFHVLIIFY VCFALVSDKL YQRKEPVISS
61     VHTKVKGIAE VKEEIVENG V KKLVSFVDT ADYTFPLQGN SFFVMTNFLK TEGQEQRLLCP
121    EYPTRTILCS SDRGCKKGWM DPQSKGIQTG RCVVHEGNQK TCEVSAWCPI EAVEEAPRPA
181    LLNSAENFTV LIKNNIDFPG HNYTTRNLP GLNITCTFHK TQNQCPIFR LGDIFRETGD
241    NFSDVAIQGG IMGIEIYWDC NLDWFHHC PKYSFRRLDD KTTNVSILYPG YNFRYAKYYK
[0088] 301    ENNVEKRTLI KVFGEFEDIL VFGTGKFDI IQLVVIYIGT LSYFGLAAVF IDFLIDTYSS
361    NCCRSIYPW CKCCQPCVVN EYYYRKKCES IVEPKPTLKY VSFVDESHIR MVNQQLLGRS
421    LQDVKGQEV RPAMDFTDLS RLPLALHDT PIPGQPEEIQ LLRKEATPRS RDSPVWCQCG
481    SCLPSQLPES HRCLEELCCR KKPACITTS ELFRKLVLRS HVLQFLLLYQ EPLALDVDS
541    TNSRLRHCA YRCYATWRFSG QDMADFAILP SCCRWIRKE FPKSEGQYSG FKSPY
```

[0089] 就P2X₇受体由三个单体形成的方面而言,其是“三聚体”或“三聚体的”。“P2X₇受体”涵盖天然存在的P2X₇受体的变体,例如,其中P2X₇单体是剪接变体、等位基因变体和同种型,包括形成P2X₇受体的单体的天然存在的截短或分泌形式(例如,由其胞外结构域序列或截短形式组成的形式)、天然存在的变体形式(例如,选择性剪接形式)和天然存在的等位基因变体。在本发明的某些实施方案中,本文中公开的天然序列P2X₇单体多肽是成熟或全长天然序列多肽,其包含SEQ ID NO:1中所示的全长氨基酸序列。在某些实施方案中,P2X₇受体可具有经修饰的氨基酸序列,例如SEQ ID NO:1中所示序列中的多种氨基酸可被替换、缺失,或者可插入残基。

[0090] “功能性P2X₇受体”通常是指具有用于与ATP结合的三个完整结合位点或裂隙(cleft)的P2X₇受体的形式。当与ATP结合时,功能性受体形成非选择性钠/钙通道,其转化为孔状结构,使钙离子和高至900Da的分子能够进入到胞质溶胶中,其一个结果可以是诱导程序性细胞死亡。在正常的稳态中,功能性P2X₇受体的表达通常限于经历程序性细胞死亡的细胞,例如胸腺细胞、树突细胞、淋巴细胞、巨噬细胞和单核细胞。在红细胞和其他细胞类

型上也可能存在一些功能性P2X₇受体的表达。

[0091] “非功能性P2X₇受体”通常是指这样的P2X₇受体形式,其具有与功能性P2X₇不同的构象,由此受体不能形成凋亡孔,但其仍然能够作为非选择性通道通过维持位于相邻单体之间的单个功能性ATP结合位点而发挥作用。一个实例是其中一个或多个单体在Pro210处具有顺式异构化(根据SEQ ID NO:1)。异构化可来自导致单体错误折叠的任何分子事件,包括例如单体一级序列的突变或异常的翻译后加工。异构化的一个结果是受体在三聚体上的一个或两个ATP结合位点处不能与ATP结合,并因此不能使通道的开口延伸。在这种情况下,受体不能形成孔,并且这限制了钙离子可进入胞质溶胶的程度。非功能性P2X₇受体在广泛范围的上皮癌症和造血系统癌症上表达。

[0092] “癌症相关P2X₇受体”通常是在癌细胞(包括肿瘤前(pre-neoplastic)细胞、肿瘤细胞、恶性细胞、良性细胞或转移细胞)上存在但不在非癌或正常细胞上存在的P2X₇受体。

[0093] “E200表位”通常是指具有序列^{GHNYTTNLPGLNITC}(SEQ ID NO:2)的表位。

[0094] “E300表位”通常是指具有序列^{KYYKENNVEKRTLK}(SEQ ID NO:3)的表位。

[0095] “复合表位”通常是指由E200和E300表位或这些表位的一部分并置(juxtaposition)形成的表位。

[0096] “抗体”或“免疫球蛋白”或“Ig”是在脊椎动物的血液或其他体液中存在的γ球蛋白,其在免疫系统中发挥作用以结合抗原,因此识别和/或中和外来物。

[0097] 抗体通常是由两条相同的轻(L)链和两条相同的重(H)链构成的异四聚体糖蛋白。每条L链通过一个共价二硫键与H链连接。根据H链同种型,两条H链通过一个或多个二硫键彼此连接。每条H和L链还具有规则间隔的链内二硫键。

[0098] H链和L链限定特异性Ig结构域。更具体地,每条H链在N端具有可变结构域(variable domain,VH),其后是三个恒定结构域(constant domain,CH)(对于α和γ链中的每一个)和四个CH结构域(对于μ和ε同种型)。每条L链在N端具有可变结构域(VL),随后在其另一端具有恒定结构域(CL)。VL与VH对齐,且CL与重链的第一恒定结构域(CHL)对齐。

[0099] 抗体可分配成不同的类别或同种型。存在五类免疫球蛋白:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,分别具有定名为α、δ、ε、γ和μ的重链。基于3/4序列和功能中的相对小的差异,将γ和α类进一步分为亚类,例如,人表达以下亚类:IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。来自任何脊椎动物物种的L链可基于其恒定结构域的氨基酸序列分配成两种明显不同的类型(称为κ和λ)之一。

[0100] 恒定结构域包含Fc部分,其包含通过二硫化物保持在一起的两条H链的羧基端部分。抗体的效应功能(例如ADCC)由Fc区中的序列决定,该区域也是由在某些类型的细胞上存在的Fc受体(FcR)识别的部分。

[0101] VH和VL的配对一起形成“可变区”或“可变结构域”,包括抗体重链或轻链的氨基端结构域。重链的可变结构域可称为“VH”。轻链的可变结构域可称为“VL”。V结构域包含“抗原结合位点”,其影响抗原结合并限定特定抗体对其特定抗原的特异性。V区跨越约110个氨基酸残基,并且由相对不变的段(stretch)组成,所述段被称为框架区(framework region,FR)(通常约4个),具有15至30个氨基酸,其通过被称为“高变区”的极端变异的较短区域(通常有约3个,每个通常9至12个氨基酸长)隔开。FR主要采用β-片层构型,并且高变区形成连接β-片层结构的环,并且在一些情况下形成β-片层结构的一部分。

[0102] “高变区”是指抗体可变结构域的区域,其在序列中是高变的和/或形成结构上限定的环。通常来说,抗体包含六个高变区;三个在VH中(H1、H2、H3),且三个在VL中(L1、L2、L3)。

[0103] “框架”或“FR”残基是除本文中限定的高变区残基之外的那些可变结构域残基。

[0104] “抗原结合位点”通常是指至少包括赋予V结构域以抗原结合功能所需的高变区和构架区的分子。在本文中所述的方法中,抗原结合位点可以是抗体或抗体片段(例如dAb、Fab、Fd、Fv、F(ab')₂或scFv)的形式。

[0105] “完好(intact)”或“完整(whole)”抗体是包含抗原结合位点以及CL和至少重链恒定结构域CH1、CH2和CH3的抗体。恒定结构域可以是天然序列恒定结构域(例如人天然序列恒定结构域)或其氨基酸序列变体。

[0106] “包括可变结构域的完整抗体片段”包括Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段;双抗体(diabody);线性抗体、单链抗体分子;以及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0107] “Fab片段”由整条L链以及H链的可变区结构域(VH)和一条重链的第一恒定结构域(CH1)组成。每个Fab片段就抗原结合而言是单价的,即它具有单个抗原结合位点。

[0108] “Fab'片段”与Fab片段的不同之处在于,其在CH1结构域的羧基端具有另外的数个残基,包括来自抗体铰链区的一个或更多个半胱氨酸。Fab'-SH是本文中对Fab'的命名,其中恒定结构域的半胱氨酸残基带有游离的巯基。

[0109] “F(ab')₂片段”大致对应于两个二硫化物连接的Fab片段,其具有二价抗原结合活性并且仍然能够交联抗原。

[0110] “Fv”是包含完全抗原识别和结合位点的最小抗体片段。该片段由紧密的非共价缔合的一个重链可变区结构域和一个轻链可变区结构域的二聚体组成。

[0111] 在单链Fv(scFv)种类中,一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域可通过柔性肽接头共价连接,使得轻链和重链可以以类似于双链Fv种类中结构的“二聚体”结构缔合。从这两个结构域的折叠中发出六个高变环(来自H链和L链各3个环),其为抗原结合贡献氨基酸残基并赋予抗体以抗原结合特异性。

[0112] “单链Fv”也缩写为“sFv”或“scFv”,其是包含连接以形成单个多肽链的VH和VL抗体结构域的抗体片段。优选地,scFv多肽还包含VH与VL结构域之间的多肽接头,其使得scFv能够形成抗原结合所期望的结构。

[0113] “单个可变结构域”是Fv的一半(仅包含对抗原具有特异性的三个CDR),其具有识别和结合抗原的能力,尽管其亲和力低于整个结合位点。

[0114] “双抗体”是指具有两个抗原结合位点的抗体片段,该片段包含与同一多肽链中的轻链可变结构域(VL)连接的重链可变结构域(VH)(VH-VL)。通过构建在VH与VL结构域之间具有短接头(约5至10个残基)的sFv片段(参见前段)使得实现V结构域的链间而不是链内配对,来制备小抗体片段,产生二价片段,即具有两个抗原结合位点的片段。

[0115] 双抗体可以是二价的或双特异性的。双特异性双抗体是两个“交叉”sFv片段的异二聚体,其中两个抗体的VH和VL结构域存在于不同的多肽链上。三抗体(triobody)和四抗体(tetrabody)也是本领域中公知的。

[0116] “分离的抗体”是已经鉴定并与其预先存在的环境的组分分离和/或从其中回收的抗体。污染组分是会干扰抗体的治疗用途的物质,并且可包括酶、激素和其他蛋白质或非蛋

白质溶质。

[0117] “人抗体”是指具有与由人产生的抗体的氨基酸序列相对应的氨基酸序列的抗体。可使用本领域中已知的多种技术制备人抗体,包括噬菌体展示文库。可通过向转基因动物施用抗原来制备人抗体,所述转基因动物已被修饰以响应于抗原攻击而产生此类抗体,但其内源基因座已失效(disabled)。

[0118] 非人(例如,啮齿动物)抗体的“人源化”形式是嵌合抗体,其包含源自非人抗体的最小序列。大多数情况下,人源化抗体是人免疫球蛋白(接纳体抗体),其中来自接纳体的高变区的残基被来自非人物种(供体抗体)的高变区的残基替代,所述非人物种例如具有所期望抗体特异性、亲和力和能力的小鼠、大鼠、兔或非人灵长类。在某些情况下,人免疫球蛋白的框架区(FR)残基被相应的非人残基替代。此外,人源化抗体可包含在接纳体抗体或供体抗体中不存在的残基。进行这些修饰以进一步改善抗体性能。通常来说,人源化抗体将包含至少一个(通常是两个)可变结构域的基本上全部,其中高变环的全部或基本上全部对应于非人免疫球蛋白的高变环,并且FR的全部或基本上全部是人免疫球蛋白序列的FR。人源化抗体任选还包含免疫球蛋白恒定区(Fc)(通常为人免疫球蛋白恒定区)的至少一部分。

[0119] “单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体群体获得的抗体,即除了可少量存在的可能天然发生的突变外,构成群体的单个抗体是相同的。单克隆抗体是高度特异性的,针对抗原上的单个抗原位点或决定簇。除了它们的特异性之外,单克隆抗体的优点还在于它们可在不被其他抗体污染地情况下合成。可通过杂交瘤方法制备单克隆抗体。“单克隆抗体”还可使用分子工程技术从噬菌体抗体文库中分离。

[0120] 术语“抗P2X₇受体抗体”或“与P2X₇受体结合的抗体”是指能够以足够的亲和力结合P2X₇受体的抗体,使得该抗体可在靶向P2X₇受体(通常是非功能性P2X₇受体或癌症相关P2X₇受体)中用作诊断剂和/或治疗剂。优选地,P2X₇受体抗体与不相关蛋白的结合程度小于抗体与P2X₇受体之结合的约10%,如通过例如放射免疫测定(radioimmunoassay,RIA)、酶联免疫吸附测定(Enzyme-linked Immunosorbent Assay,ELISA)、Biacore或流式细胞术所测定的。在某些实施方案中,与P2X₇受体结合的抗体的解离常数(K_d)为<1μM、<100nM、<10nM、<1nM或<0.1nM。抗非功能性P2X₇受体抗体是通常具有一些或全部这些血清学特征并且与非功能性P2X₇受体结合但不与功能性P2X₇受体结合的抗体。

[0121] “亲和力成熟的”抗体是这样的抗体:在其一个或更多个高变区中具有一个或更多个改变,与不具有这些改变的亲本抗体相比,其引起抗体对抗原之亲和力的改善。优选的亲和力成熟的抗体将对靶抗原具有纳摩或甚至皮摩的亲和力。亲和力成熟的抗体通过本领域中已知的方法产生。

[0122] “阻断”抗体或“拮抗剂”抗体是抑制或降低其结合的抗原的生物活性的抗体。优选的阻断抗体或拮抗剂抗体基本上或完全抑制抗原的生物活性。

[0123] 本文中使用的“激动剂抗体”是模拟目的多肽的至少一种功能活性的抗体。

[0124] “结合亲和力”通常是指分子(例如抗体)的单个结合位点与其结合配偶体(例如抗原)之间非共价相互作用的总和的强度。除非另有说明,否则本文中使用的“结合亲和力”是指内在结合亲和力,其反映结合对的成员(例如,抗体和抗原)之间的1:1相互作用。分子X对其配偶体Y的亲和力通常可由解离常数(K_d)表示。亲和力可通过本领域中已知的常用方法(包括本文中所述的那些)测量。低亲和力抗体通常缓慢地结合抗原并且易于解离,而高亲

和力抗体通常更快地结合抗原并且倾向于保持结合更长时间。测量结合亲和力的多种方法是本领域中已知的,其中任何方法都可用于本发明的目的。

[0125] “表位”通常是指通过抗体的抗原结合位点来结合的抗原部分。就形成抗原结合位点的抗体CDR的高变环与氨基酸序列结合而言,表位可以是“线性的”,如在一级蛋白质结构中那样。在某些实施方案中,表位是“构象表位”,即其中CDR的高变环与残基结合的表位,如同它们在三级或四级蛋白质结构中呈现的那样。

[0126] “治疗”通常是指治疗性治疗和预防或防范措施二者。

[0127] 需要治疗的对象包括已经患有良性肿瘤、癌前肿瘤或非转移性肿瘤的对象以及其中要预防癌症发生或复发的对象。

[0128] 治疗的目的或结局可以是降低癌细胞的数目;降低原发肿瘤尺寸;抑制(即,在一定程度上减缓并且优选地中止)癌细胞浸润到外周器官中;抑制(即,在一定程度上减缓并且优选地中止)肿瘤转移;在一定程度上抑制肿瘤生长;和/或在一定程度上缓解与病症相关的一种或更多种症状。

[0129] 治疗的效力可通过评估存活持续时间、疾病进展时间、响应率(response rate, RR)、响应持续时间和/或生活质量来测量。

[0130] “癌前”或“肿瘤前”通常是指通常在癌症之前或发展成癌症之前的病症或生长。“癌前”生长可具有以异常细胞周期调节、增殖或分化为特征的细胞,其可通过细胞周期的标志物来确定。

[0131] 癌症的另一些实例包括母细胞瘤(包括髓母细胞瘤和视网膜母细胞瘤)、肉瘤(包括脂肪肉瘤和滑膜细胞肉瘤)、神经内分泌肿瘤(包括类癌肿瘤、胃泌素瘤和胰岛细胞癌)、间皮瘤、神经鞘瘤(schwannoma)(包括听神经瘤)、脑膜瘤、腺癌、黑素瘤、白血病或淋巴恶性肿瘤(lymphoid malignancy)、肺癌(包括小细胞肺癌(small-cell lung cancer, SCLG)、非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLG)、肺腺癌和肺鳞状细胞癌)、腹膜癌、肝细胞癌、胃癌(gastric or stomach cancer)(包括胃肠癌)、胰腺癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝肿瘤(hepatoma)、乳腺癌(包括转移性乳腺癌)、结肠癌、直肠癌、结直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌(kidney or renal cancer)、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌、肛门癌、阴茎癌、睾丸癌、食管癌、胆道肿瘤、以及头颈癌。

[0132] “[与癌症]相关的病症或症状”可以是由于癌症而出现的、在癌症之前出现的或在癌症之后出现的任何病理状况。例如,在癌症是皮肤癌的情况下,病症或相关症状可以是微生物感染。在癌症是继发性肿瘤的情况下,病症或症状可涉及具有肿瘤转移的相关器官的器官功能障碍。在一个实施方案中,本文中所述的治疗方法是用于在个体中使个体中的与癌症相关的病症或症状最小化或治疗所述病症或症状。

[0133] 除非上下文另有要求的情况,否则本文中使用的术语“包含”及该术语的变化形式(例如“包含(comprise)”“包含(comprising)”“包含(comprised)”)并不旨在排除其他附加物、组分、整数或步骤。术语“包括”和“包含”可互换使用。

[0134] B. 细胞毒性颗粒

[0135] 在一个实施方案中,提供了细胞毒性颗粒,其包含:

[0136] -芯;

[0137] -包含在所述芯中或者陷入其中或其上的细胞毒性化合物;

[0138] 一排列在所述芯上的多个可变结构域,其用于与癌细胞上的P2X₇受体结合,当所述颗粒与癌细胞接触时,该排列使得所述颗粒能够交联癌细胞上的P2X₇受体。

[0139] B.1芯

[0140] 芯通常可限定颗粒的整体尺寸和物理特征。

[0141] 芯可由脂质、蛋白质、糖或其他生物分子形成。或者,芯可由聚合物、树脂、塑料或陶瓷或玻璃形成。

[0142] 在一个特别优选的实施方案中,芯以脂质体、胶束、微乳液或粗乳液的形式提供。

[0143] 胶束是两亲性(表面活性剂)分子的胶体聚集体,其在明确限定的浓度(称为临界胶束浓度)下形成。胶束的取向为位于内部的非极性部分和位于外表面暴露于水的极性部分。胶束中聚集分子的典型数目(聚集数)为50至100。

[0144] 微乳液基本上是溶胀的胶束,但是不是所有的胶束溶液都可溶胀形成微乳液。微乳液是热力学稳定的,自发形成,并含有极小的颗粒。微乳液中的液滴直径通常为10至100nm。

[0145] 粗乳液是直径大于100nm的微滴。

[0146] 脂质体是封闭的脂质囊泡,其包含环绕水性内部的脂质双层。脂质体通常具有25nm至1 μ m的直径(参见,例如,D.O.Shah(ed),1998,Micelles,Microemulsions,and Monolayers:Science and Technology,Marcel Dekker;A.S.Janoff(ed),1998,Liposomes:Rational Design,Marcel Dekker)。

[0147] 优选地,芯以脂质体的形式提供。在该实施方案中,颗粒可描述为抗体-脂质体缀合物。

[0148] 脂质体可由脂质(包括磷酸甘油酯和鞘脂)组成,其代表性实例包括磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酸、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰乙醇胺、二棕榈酰磷脂酰胆碱、二油酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰胆碱或二亚油酰磷脂酰胆碱。还考虑了其他不含磷的化合物,例如鞘脂和鞘糖脂家族。另外,上述两亲性脂质可与其他脂质(包括三酰甘油和甾醇)混合。

[0149] 脂质体的直径可以是约50nm至200 μ m。因此,脂质体可以是小的经超声处理的单层囊泡(sonicated unilamellar vesicle,SUV)、大的单层囊泡(large unilamellar vesicle,LUV),或通过反相蒸发(REV)、弗氏压碎器(FPV)或醚注射(EIV)制备的脂质体。制备这样尺寸的脂质体的方法(包括对所期望尺寸的脂质体进行分级和纯化的方法)是本领域中技术人员已知的。通常来说,脂质体的直径范围为约10至600nm。在一个实施方案中,脂质体的直径为约50至200nm。在一个实施方案中,脂质体是LUV。

[0150] 通常来说,相对于脂质体脂双层,本发明的脂质体是单层的。然而,应理解的是,本发明的脂质体可包含多于一个脂双层。因此,在一个实施方案中,脂质体可以是多层囊泡,例如大的涡旋多层囊泡(multilamellar vesicle,MLV)。

[0151] 如本文中所述,用于为脂质体提供电荷以使脂质体与癌细胞结合的化合物有利于改善癌细胞脂质双层与脂质体双层之间的融合。例如,DOTAP特别可用作用于使脂质体脂双层与靶细胞结合的结合方式。

[0152] 脂质体可适于在早期内体的pH下使脂质体脂双层去稳定化。早期内体是在胞吞途径的早期形成的液泡或囊泡。该细胞器的pH通常为5.5至6.0。

[0153] 脂质体可通过公知的技术构建(参见,例如,G Gregoriadis(ed.),1993,Liposome Technology第1-3卷,CRC Press,Boca Raton,FL)。脂质通常溶解在氯仿中,并通过旋转蒸发在管或烧瓶的表面上以薄膜形式铺展。如果期望由脂质的混合物构成的脂质体,则将各组分在原始氯仿溶液中混合。在除去有机溶剂后,添加由任选地含有缓冲液和/或电解质的水组成的相,并搅动容器以使脂质混悬。然后可通过使用均化器使该混合物乳化,冻干并融化以获得多层脂质体。或者,单层脂质体可通过反相蒸发法制备(Szoka和Papahadjopoulos,1978,Proc.Natl.Acad.Sci.USA75:4194-4198)。单层囊泡也可通过超声处理或挤出来制备。超声处理通常用浴式超声仪(sonifier)(例如Branson尖端超声波仪(G.Heinemann Ultrashall und Labortechnik,Schwabisch Gmund,Germany))在如通过脂质的熔点确定的受控温度下进行。挤出可通过生物膜挤出机(例如Lipex生物膜挤出机(Northern Lipids Inc,Vancouver,British Columbia,Canada))进行。挤出过滤器中限定的孔径可产生特定尺寸的单层脂质体囊泡。脂质体还可通过不对称陶瓷过滤器(例如Ceraflow微过滤器(可从Norton Company,Worcester,MA商购获得))挤出形成。

[0154] 在脂质体制备之后,在形成期间设定尺寸的脂质体可通过挤出来设定尺寸,以达到所期望的尺寸范围和相对窄的脂质体尺寸分布。约0.1至0.5微米的尺寸范围将允许通过常规过滤器(例如,0.22微米过滤器或其他过滤器)过滤来对脂质体混悬液进行灭菌。过滤器灭菌方法可在高通量的基础上进行。

[0155] 数种技术可用于将脂质体的尺寸设定成所期望的尺寸,包括超声波处理、高速均化和加压过滤(M.J.Hope等.,1985,Biochimica et Biophysica Acta 812:55;U.S.专利No.4,529,561和4,737,323)。通过浴或探针超声处理对脂质体混悬液进行超声处理产生渐进的尺寸降低,直至尺寸小于约0.05微米的小的单层小泡。多层囊泡可通过标准乳液均化器进行再循环,直至所选的脂质体尺寸,该尺寸通常为约0.1至0.5微米,且优选约0.1至0.2微米。脂质体囊泡的尺寸可通过准弹性光散射(quasi-elastic light scattering,QELS)来确定(参见Bloomfield,1981,Ann.Rev.Biophys.Bioeng.10:421-450)。可通过对所形成的脂质体进行超声处理来降低平均脂质体直径。间歇的超声处理循环可与QELS评估交替以指导高效的脂质体合成。

[0156] 脂质体可通过小孔聚碳酸酯膜或不对称陶瓷膜挤出,以产生明确限定的尺寸分布。通常来说,将混悬液通过膜循环一次或更多次,直至达到所期望的脂质体尺寸分布。脂质体可通过连续的小孔膜挤出,以实现脂质体尺寸的逐渐降低。

[0157] 在一个特别优选的实施方案中,细胞毒性颗粒包含脂质体形式的芯,其中脂质体包含脂质体的脂质层中的油酸脂肪酸链。芯优选为球形双层膜的形式以形成脂质体。可将油酸官能化以形成氨基甲酸酯基团以与吉西他滨结合,或用马来酰亚胺基团官能化以与免疫球蛋白结构域结合。优选地,脂质体的尺寸为约60至150nm。

[0158] B.2可变结构域

[0159] 排列在芯上用于与癌细胞上的P2X₇受体结合的可变结构域可以以完整抗体或包含可变结构域的抗体片段的形式提供。

[0160] 在一个实施方案中,可变结构域用于与癌症相关P2X₇受体结合。

[0161] 在另一个实施方案中,可变结构域用于与非功能性P2X₇受体结合。

[0162] 在一个实施方案中,可变结构域是这样的结构域,其区分功能性和非功能性P2X₇

受体,以便与非功能性受体结合,而不与功能性受体结合。可变结构域的实例是与E200表位、E300表位或复合表位结合的那些,如例如在PCT/AU2002/000061、PCT/AU2002/001204、PCT/AU2007/001540、PCT/AU2007/001541、PCT/AU2008/001364、PCT/AU2008/001365、PCT/AU2009/000869和PCT/AU2010/001070中的那些,所有这些都通过引用并入。

[0163] 可变结构域的片段包括单链抗体、单链Fv片段、以及F(ab')₂、Fab、Fd和Fv片段。

[0164] 可变结构域可来自单克隆或多克隆抗血清。

[0165] 可变结构域可以是人的、人源化的、嵌合的、小鼠的、大鼠的、兔的或其他哺乳动物物种的。

[0166] 可变结构域可以是亲和力成熟的。

[0167] 其中排列有可变结构域的抗体可具有多重特异性或价。

[0168] 可调整可变结构域以便适合于通过所选方法进行施用。

[0169] 可变结构域可以以任何同种型的抗体提供。抗体可通过杂交瘤或通过重组表达产生,或者可从血清中获得,例如可从哺乳动物(特别是人或小鼠)中获得。抗体也可从禽类中获得。

[0170] 在一个特别优选的实施方案中,可变结构域由式1限定:

[0171] CDR1-CDR2-CDR3

[0172] 其中CDR1是^{RNHDMG}(SEQ ID NO:4)

[0173] 其中CDR2是^{ATSGSGGSTYYANSVKG}(SEQ ID NO:5)

[0174] 其中CDR3是^{EPKPMDEFDY}(SEQ ID NO:6)。

[0175] 在一个特别优选的实施方案中,可变结构域具有以下氨基酸序列(SEQ ID NO:7):

[0176]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRNHDMGWWRQAPGKGLEWWSAIS
GSGGSTYYANSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAEPKPMDEFDYR
SPGTLTVSS

[0177] 或者

[0178]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRNHDMGWWRQAPGKGLEWWSAIS
GSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAEPKPMDEFDYR
SPGTLTVSS

[0179] (SEQ ID NO:8)。

[0180] B.3可变结构域与脂质体的缀合

[0181] 可使用常规技术使可变结构域或抗体与脂质体缀合(参见,例如,M.J.Ostro(ed.) 1987,Liposomes:from Biophysics to Therapeutics,Marcel Dekker,New York,NY)。制备脂质体并使免疫球蛋白与其表面缀合的一种优选方法由Y.Ishimoto等,1984,J.Immunol.Met.75:351-360描述。根据该方法,制备由二棕榈酰磷脂酰胆碱、胆固醇和磷脂酰乙醇胺构成的多层脂质体。然后通过交联剂3-(2-吡啶基二硫代)丙酸N-羧基琥珀酰亚胺酯使经纯化的片段与磷脂酰乙醇胺偶联。通过从脂质体中释放预捕获的标志物(例如,羧基荧光素)来证明抗体或片段与脂质体的偶联。该释放在与针对缀合抗体、片段或补体的二抗孵育时发生。

[0182] 可变结构域和抗体也可通过碳水化合物部分与本发明的脂质体或其他载体偶联。可使用这样的偶联,前提是碳水化合物部分不在高变区中或不位于抗体结合位点处。以这种方式,通过与碳水化合物的交联的缀合不会影响结合,并且结合位点将仍然可用于与细胞表面抗原结合。用于使本发明的抗体或抗体片段(除Fv外)与聚合物骨架或脂质体偶联的一种优选方法涉及通过恒定区中的碳水化合物部分进行缀合。这使可用的抗原结合位点的数目最大化。已经建立了用于使糖环部分衍生化以产生用于与抗体片段(和抗体)偶联的酰肼基团的方法(参见J.D.Rodwell等,1986,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83:2632-36)。以这种方式制备的数种免疫缀合物正处于临床研究中或待批准用于常规临床用途。

[0183] 单克隆抗体与脂质体表面的结合也可通过使用戊二醛在磷脂酰乙醇胺与抗体之间形成交联来实现。类似地,靶向抗体可通过锚定在脂质体表面上并用作隐形涂层(stealth coating)的反应性PEG基团与脂质体交联。

[0184] 或者,可使硫醇化抗体与其中已并入马来酰亚胺基团的包含脂质的脂质体反应。脂质体表面上的剩余马来酰亚胺基团可进一步与含有硫醇化聚亚烷基二醇部分的化合物反应。抗体或抗体片段的硫醇化可通过使用3-(2-吡啶基二硫代)丙酸N-琥珀酰亚胺基酯(N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate, SPDP)(其通常用于蛋白质、亚氨基硫杂环戊烷(iminothiolane)或巯基烷基亚胺酸酯(mercaptoalkylimidate)的硫醇化)来实现。或者,可将抗体内源的二巯基基团(dithiol group)还原以形成巯基。后一种方法优选用于维持抗体功能。根据另一种方法,用酶(例如胃蛋白酶)处理完整抗体以形成F(ab)2片段,然后用二巯苏糖醇(dithiothreitol, DTT)还原以形成Fab片段,其结果是产生一至三个巯基。硫醇化抗体与含马来酰亚胺基团的脂质体的缀合可通过使组分在pH 6.5至7.5的中性缓冲溶液中反应2至16小时来完成。

[0185] B.3细胞毒性药物

[0186] 优选地,细胞毒性药物是核苷类似物,当其在复制期间并入到核酸链中时引起凋亡。

[0187] 优选地,核苷类似物是嘧啶。

[0188] 嘧啶可选自吉西他滨(4-氨基-1-(2-脱氧-2,2-二氟-β-D-赤式-呋喃戊糖基)嘧啶-2(1H)-酮)(Gemzar)或阿糖胞苷(4-氨基-1-[(2R,3S,4S,5R)-3,4-二羟基-5-(羟甲基)氧杂环戊烷-2-基]-1,2-二氢嘧啶-2-酮或ara-C)。

[0189] 优选地,嘧啶是吉西他滨。

[0190] B.4细胞毒性药物与脂质体的缀合

[0191] 通常来说,细胞毒性药物可通过以下步骤与脂质体缀合:使脂质组分官能化以形成脂质体的脂质层,并随后使官能团与细胞毒性剂反应以形成脂质-药物缀合物。然后在适用于形成如上所述的脂质体的条件下将药物缀合物与其他脂质组分混合。在一个实施方案中,油酸烃脂肪酸链被官能化,使得能够在细胞毒性剂与油酸之间形成氨基甲酸酯基团。

[0192] C. 药物组合物和癌症治疗

[0193] 在一个实施方案中,提供了药物组合物,其包含多种根据本发明的细胞毒性颗粒和药学上有效的稀释剂、赋形剂或载体。在一个实施方案中,用于组合物的颗粒具有脂质体形式的芯。

[0194] 组合物的颗粒可具有相同的可变结构域密度。

[0195] 组合物中每个颗粒的芯可具有相同的表面积。

[0196] 在一个实施方案中,提供了治疗个体的癌症(尤其是包含具有低拷贝数的细胞表面P2X₇R或低表达或产生细胞表面P2X₇R的癌细胞的癌症)的方法,其包括向个体提供治疗有效量的上述颗粒或组合物,从而治疗个体的癌症。在该实施方案中,提供了上述用于治疗患有癌症的个体的颗粒或组合物,其中癌症包含具有低拷贝数的细胞表面P2X₇R或低表达或产生细胞表面P2X₇R的癌细胞。

[0197] 本发明的颗粒或组合物可通过经口、肠胃外(例如静脉内、动脉内、腹膜内、肌内、皮下、皮内、经直肠或经阴道)途径,通过吸入或表面施用(topical application)向有此需要的对象施用。一种施用形式是用于注射(特别是用于静脉内或动脉内注射或滴注)的溶液,其包含缓冲液(例如乙酸盐、磷酸盐或柠檬酸盐缓冲液)、表面活性剂(例如聚山梨酯)、任选的稳定剂(例如人白蛋白)。在另一些方法中,颗粒可被直接递送至疾病部位,从而提高患病细胞或组织对抗体的暴露。

[0198] 肠胃外施用的制剂包括无菌水性(水性载体包括水、醇/水溶液、乳剂或混悬剂,包括盐水和缓冲介质)或非水性(非水溶剂是丙二醇、聚乙二醇、植物油(例如橄榄油)、以及可注射的有机酯(例如油酸乙酯))溶液剂、混悬剂和乳剂。可药用载体包括0.01至0.1M、优选0.05M磷酸盐缓冲液或0.9%盐水。其他常见的肠胃外载剂包括磷酸钠溶液、林格右旋糖(Ringer's dextrose)、右旋糖和氯化钠、乳酸林格液(lactated Ringer's)或固定油(fixed oil)。静脉内载剂包括流体和营养补充剂、电解质补充剂,例如基于林格右旋糖的那些,等。还可存在防腐剂和其他添加剂,例如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等。

[0199] 更具体地,适于注射使用的药物组合物包括无菌水溶液(在水溶的情况下)或分散体和用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末,在这样的情况下,该组合物必须是无菌的并且其流动性达到易于注射的程度。其应在制造和储存条件下稳定,并且将优选在防止微生物(例如细菌和真菌)的污染作用的条件下保存。载体可以是溶剂或分散介质,其包含例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适的混合物。例如,可通过使用涂层(例如卵磷脂)、通过在分散体的情况下保持所需要的粒径和通过使用表面活性剂来保持适当的流动性。用于本文中公开的治疗方法的合适制剂描述于Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., 第16版.(1980)中。

[0200] 通过多种抗菌剂和抗真菌剂(例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等),可实现防止微生物的作用。在许多情况下,将优选在组合物中包含等张剂,例如糖、多元醇(例如甘露醇、山梨醇)或氯化钠。可通过在组合物中包含延迟吸收的物质(例如单硬脂酸铝和明胶)来实现可注射组合物的延长吸收。

[0201] 在任何情况下,无菌可注射溶液可通过根据需要在适当的溶剂中与本文中列举的成分中的一种或组合一起以所需量并入本发明的颗粒,然后过滤灭菌来制备。通常来说,通过将活性化合物并入到无菌载剂中来制备分散体,所述分散体含有基础分散介质和来自上面列举的那些的所需其他成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥、冷冻干燥和喷雾干燥,其产生活性成分加上来自其先前无菌过滤溶液的任何其他期望成分的粉末。对用于注射的制剂进行处理,将其填充到容器(例如安瓿、袋、瓶、注射器或小瓶)中,并根据本领域中已知的方法在无菌条件下密封。此外,制剂可以

以药盒的形式包装和销售。这样的制品将优选具有标签或包装插页 (package insert), 表明相关组合物可用于治疗患有或易患病症的对象。

[0202] 如本文中所述, 用于治疗病症的本发明组合物的有效剂量根据许多不同因素而变化, 所述因素包括施用方式、靶位点、患者的生理状态、患者是人还是动物、施用的其他药物、以及治疗是预防性还是治疗性的。可使用本领域技术人员已知的常规方法对治疗剂量进行调整 (titrate) 以优化安全性和效力。

[0203] 本发明的颗粒可在用于切除或摘除肿瘤或组织的手术干预之前、期间或之后施用。

[0204] 在一个实施方案中, 该方法特别地可用于延迟疾病进展。

[0205] 在一个实施方案中, 该方法特别地可用于延长人的存活, 包括总体存活以及无进展存活。

[0206] 在一个实施方案中, 该方法特别地可用于提供对治疗的完全响应, 由此响应于治疗的所有癌症体征已消失。这并不总是意味着癌症已被治愈。

[0207] 在一个实施方案中, 该方法特别地可用于提供对治疗的部分响应, 由此一个或多个肿瘤或病变的尺寸或体内癌症的程度已响应于治疗而降低。

[0208] 在一个实施方案中, 癌症是癌前或肿瘤前的。

[0209] 在一个实施方案中, 癌症是继发性癌症或转移瘤。继发性癌症可位于任何器官或组织中, 并且特别是具有相对较高血液动力学压力的那些器官或组织, 例如肺、肝、肾、胰腺、肠和脑。

[0210] D. 活性的测定

[0211] 本发明颗粒的活性可参照多种细胞功能参数在体外测量, 所述参数包括细胞毒性、白细胞郁积 (cytostasis)、凋亡诱导、细胞形态、细胞因子产生、信号转导、细胞增殖和活化状态以及蛋白质表达和活化。还可考虑其他生物学上合适的终点。

[0212] 在本发明的一些具体实施方案中, 可通过以下方式来评估活性: MTT测定或XTT测定 (细胞增殖); 台盼蓝排除测定 (细胞生存力); 膜磷酸丝氨酸不对称性、膜联蛋白5结合和胱天蛋白酶测定 (凋亡); 以及细胞因子产生 (细胞功能)。

[0213] 该测定可使用表达P2X₇R的细胞系。优选使用具有高拷贝数的P2X₇R或高产生或表达P2X₇R的细胞系 (例如下文讨论的PC3) 和具有低拷贝数的P2X₇R或低产生或表达P2X₇R的细胞 (例如下文讨论的COL025)。

[0214] 在一个实施方案中, 这些测定可特别地可用于确定排列在颗粒的芯上的可变结构域的量。

[0215] 实施例

[0216] 实施例1: 脂质体形成

[0217] 免疫脂质体的制造由两个主要部分组成: 纳米颗粒构建和抗体缀合。

[0218] 纳米颗粒构建: 纳米颗粒接纳体是DOPC (来自Avanti Polar Lipids)、Gem-01e (通过氨基甲酸酯化学键 (chemical linkage) 通过使氯甲酸油醇酯 (oleyl chloroformate) 与经羟基保护的吉西他滨碱反应合成, SOP-Syn001-002) 和马来酰亚胺基-琥珀酰基-PEG4000-油酸酯 (通过将琥珀酰基PEG4000-油酸酯转化为马来酰亚胺基-琥珀酰基-PEG4000-油酸酯合成, SOP-Syn 003-005)。将43%DOPC、30%Gem 01e和27%马来酰亚胺基-

琥珀酰基-PEG4000-油酸酯溶解在EtOH中,并通过旋转蒸发产生薄膜。用1×PBS将薄膜进一步水合至10mg/mL的浓度。将水合的纳米颗粒溶液超声处理2分钟,然后通过200nm膜三次并通过100nm膜六次,以产生平均尺寸为50至100nm平均直径的半透明纳米颗粒溶液。

[0219] 抗体缀合:在与纳米颗粒溶液混合之前,通过Traut试剂活化抗体。缀合的纳米颗粒用L-半胱氨酸淬灭并通过切向流过滤纯化。然后将免疫脂质体进一步通过100nm膜挤出三次,并随后通过200nm膜无菌过滤。本文中使用的抗体是单结构域抗体。所述单结构域抗体包含如SEQ ID NO:4、5和6中所示的CDR序列。此外,可变结构域包含SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列。

[0220] 图1是细胞毒性纳米颗粒形成的示意图,其示出了油烯基-吉西他滨缀合物和形成脂质体。图2示出了抗体可变结构域通过马来酰亚胺基团与脂质体的缀合。图3示出了脂质体的尺寸分布。

[0221] 实施例2:细胞毒性纳米颗粒的结合特异性

[0222] 通过SDS PAGE凝胶Nupage 4-12%Bis tris凝胶,MOPS缓冲液(1×)示出抗体与脂质体的缀合(参见图5)。

[0223] 还评估了本发明的脂质体与P2X₇R的E200表位结合的能力。结果(通过ELISA,并在图4中示出)表明纳米颗粒对E200表位具有颗粒亲和力。因此,本发明的脂质体提供了与表达非功能性P2X₇R的癌细胞的选择性结合。

[0224] 实施例3:在荷有4T1-luc2肿瘤的小鼠中荧光标记的纳米颗粒的生物分布成像

[0225] 将近红外(near-infrared,NIR)亲脂性荧光染料DiR(ThermoFisher)并入到以下颗粒的脂双层中:裸纳米颗粒、包被有HEL4(同种型)的纳米颗粒和包被有用于与抗P2X₇R结合的可变结构域的纳米颗粒(P2X₇结合结构域包被的纳米颗粒,或“BIL03s包被的”)。用4T1-luc2鼠乳腺癌细胞原位接种(第4乳腺脂肪垫)雌性Balb/c小鼠。在研究的第0天静脉内注射50μL剂量的纳米颗粒,并且在治疗之后6、12、24、48和96小时进行近红外(NIR)成像。在结束时,进行切除的肝、脾和肿瘤NIR成像,并对肿瘤组织进行生物发光成像。

[0226] 整体动物NIR成像和离体生物发光示出,与对照纳米颗粒(裸颗粒或HEL4包被的)相比,在包被有P2X₇R结合结构域(BIL03s)的纳米颗粒在肿瘤中的积累更高(参见图6和7)。特别地,图6示出了细胞毒性颗粒对4T1肿瘤的选择性定位。与非抗体缀合的颗粒相比,抗体缀合的细胞毒性颗粒在肿瘤中的积累高得多(图7和9)。具体地,图9通过离体生物发光成像示出了与裸纳米颗粒相比,抗体包被的纳米颗粒在切除的肿瘤中具有更高的积累。

[0227] 图8示出了纳米颗粒选择性地定位:在96小时时间点,切除的肿瘤的平均总辐射效率 $\pm$ SEM(p/s)/[AμW/cmA²])。在研究的第0天,通过静脉内尾静脉注射,以50μL体积施用载剂对照(PBS;第1组)、未包被的纳米颗粒(第2组);Ab包被的纳米颗粒(第3组)和HEL4包被的纳米颗粒(第4组)。

[0228] 实施例4:与用于与P2X₇R结合的结构域缀合的吉西他滨脂质体纳米颗粒的效力

[0229] 该研究旨在确定在4T1鼠乳腺肿瘤模型中P2X₇结合结构域包被的纳米颗粒(即,“BIL03s包被的”)和HEL4包被的纳米颗粒将细胞毒性剂吉西他滨递送至肿瘤的效力。

[0230] 静脉内施用纳米颗粒,每周3次。纳米颗粒含有0.2mg吉西他滨或PBS缓冲液(对照)。

[0231] 在研究期间测量肿瘤体积(参见图10)。当评估的肿瘤体积超过1000mm³时处死小

鼠。

[0232] 图10示出了抗体缀合的纳米颗粒对荷有4T1鼠乳腺肿瘤的小鼠的效力。图11示出了抗体包被的纳米颗粒的给药频率的影响。

[0233] 结果示出,与含有吉西他滨的HEL4包被的纳米颗粒相比,含有吉西他滨的P2X₇结合结构域包被的纳米颗粒提供了更大的肿瘤抑制和延长的存活 ($P=0.0456$)。

[0234] 实施例5:给药方案研究

[0235] 图11示出了比较含有吉西他滨的P2X₇结合结构域包被的纳米颗粒与单独的吉西他滨对于抑制肿瘤生长之效力的研究结果。该研究比较了施用0.3mg吉西他滨(“游离吉西他滨”)或含有吉西他滨的P2X₇结合结构域包被的纳米颗粒(相当于0.3mg吉西他滨的剂量)之后的结果。

[0236] 这两种治疗的效力相当,表明如果使用P2X₇结合结构域包被的纳米颗粒,则P2X₇结合结构域包被的纳米颗粒的一个益处是能够降低给药频率。

[0237] 包被的纳米颗粒提供了持续的释放和较低的毒性,从而提供优于现有癌症治疗的优势。

[0238] 体内研究的发现还表明,通过提高施用的吉西他滨的量同时降低给药频率,可获得含有吉西他滨的P2X₇结合结构域包被的纳米颗粒优于市售的吉西他滨的更大效力。换言之,较低的治疗频率引起与当前吉西他滨给药方案相当的效力。

序列表

<110> 生物权威(英国)有限公司

<120> 细胞毒性颗粒

<130> 50176243AZD

<150> AU2016904292

<151> 2016-10-21

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 595

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 1

```

Met Pro Ala Cys Cys Ser Cys Ser Asp Val Phe Gln Tyr Glu Thr Asn
1           5           10           15
Lys Val Thr Arg Ile Gln Ser Met Asn Tyr Gly Thr Ile Lys Trp Phe
           20           25           30
Phe His Val Ile Ile Phe Ser Tyr Val Cys Phe Ala Leu Val Ser Asp
           35           40           45
Lys Leu Tyr Gln Arg Lys Glu Pro Val Ile Ser Ser Val His Thr Lys
           50           55           60
Val Lys Gly Ile Ala Glu Val Lys Glu Glu Ile Val Glu Asn Gly Val
65           70           75           80
Lys Lys Leu Val His Ser Val Phe Asp Thr Ala Asp Tyr Thr Phe Pro
           85           90           95
Leu Gln Gly Asn Ser Phe Phe Val Met Thr Asn Phe Leu Lys Thr Glu
           100          105          110
Gly Gln Glu Gln Arg Leu Cys Pro Glu Tyr Pro Thr Arg Arg Thr Leu
           115          120          125
Cys Ser Ser Asp Arg Gly Cys Lys Lys Gly Trp Met Asp Pro Gln Ser
           130          135          140
Lys Gly Ile Gln Thr Gly Arg Cys Val Val His Glu Gly Asn Gln Lys
145          150          155          160
Thr Cys Glu Val Ser Ala Trp Cys Pro Ile Glu Ala Val Glu Glu Ala
           165          170          175
Pro Arg Pro Ala Leu Leu Asn Ser Ala Glu Asn Phe Thr Val Leu Ile
           180          185          190
Lys Asn Asn Ile Asp Phe Pro Gly His Asn Tyr Thr Thr Arg Asn Ile

```

195	200	205
Leu Pro Gly Leu Asn Ile Thr Cys Thr Phe His Lys Thr Gln Asn Pro		
210	215	220
Gln Cys Pro Ile Phe Arg Leu Gly Asp Ile Phe Arg Glu Thr Gly Asp		
225	230	235
Asn Phe Ser Asp Val Ala Ile Gln Gly Gly Ile Met Gly Ile Glu Ile		240
245	250	255
Tyr Trp Asp Cys Asn Leu Asp Arg Trp Phe His His Cys Arg Pro Lys		
260	265	270
Tyr Ser Phe Arg Arg Leu Asp Asp Lys Thr Thr Asn Val Ser Leu Tyr		
275	280	285
Pro Gly Tyr Asn Phe Arg Tyr Ala Lys Tyr Tyr Lys Glu Asn Asn Val		
290	295	300
Glu Lys Arg Thr Leu Ile Lys Val Phe Gly Ile Arg Phe Asp Ile Leu		
305	310	315
Val Phe Gly Thr Gly Gly Lys Phe Asp Ile Ile Gln Leu Val Val Tyr		
325	330	335
Ile Gly Ser Thr Leu Ser Tyr Phe Gly Leu Ala Ala Val Phe Ile Asp		
340	345	350
Phe Leu Ile Asp Thr Tyr Ser Ser Asn Cys Cys Arg Ser His Ile Tyr		
355	360	365
Pro Trp Cys Lys Cys Cys Gln Pro Cys Val Val Asn Glu Tyr Tyr Tyr		
370	375	380
Arg Lys Lys Cys Glu Ser Ile Val Glu Pro Lys Pro Thr Leu Lys Tyr		
385	390	395
Val Ser Phe Val Asp Glu Ser His Ile Arg Met Val Asn Gln Gln Leu		
405	410	415
Leu Gly Arg Ser Leu Gln Asp Val Lys Gly Gln Glu Val Pro Arg Pro		
420	425	430
Ala Met Asp Phe Thr Asp Leu Ser Arg Leu Pro Leu Ala Leu His Asp		
435	440	445
Thr Pro Pro Ile Pro Gly Gln Pro Glu Glu Ile Gln Leu Leu Arg Lys		
450	455	460
Glu Ala Thr Pro Arg Ser Arg Asp Ser Pro Val Trp Cys Gln Cys Gly		
465	470	475
Ser Cys Leu Pro Ser Gln Leu Pro Glu Ser His Arg Cys Leu Glu Glu		480
485	490	495
Leu Cys Cys Arg Lys Lys Pro Gly Ala Cys Ile Thr Thr Ser Glu Leu		
500	505	510

Phe Arg Lys Leu Val Leu Ser Arg His Val Leu Gln Phe Leu Leu Leu
 515 520 525
 Tyr Gln Glu Pro Leu Leu Ala Leu Asp Val Asp Ser Thr Asn Ser Arg
 530 535 540
 Leu Arg His Cys Ala Tyr Arg Cys Tyr Ala Thr Trp Arg Phe Gly Ser
 545 550 555 560
 Gln Asp Met Ala Asp Phe Ala Ile Leu Pro Ser Cys Cys Arg Trp Arg
 565 570 575
 Ile Arg Lys Glu Phe Pro Lys Ser Glu Gly Gln Tyr Ser Gly Phe Lys
 580 585 590
 Ser Pro Tyr
 595
 <210> 2
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 2
 Gly His Asn Tyr Thr Thr Asn Ile Leu Pro Gly Leu Asn Ile Thr Cys
 1 5 10 15
 <210> 3
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 3
 Lys Tyr Tyr Lys Glu Asn Asn Val Glu Lys Arg Thr Leu Ile Lys
 1 5 10 15
 <210> 4
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 4
 Arg Asn His Asp Met Gly
 1 5
 <210> 5
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 5
 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Ser Val Lys

1	5	10	15
Gly			
<210> 6			
<211> 11			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 6			
Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr			
1	5	10	
<210> 7			
<211> 119			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 7			
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asn His			
	20	25	30
Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
	35	40	45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Ser Val			
	50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr Arg Ser Pro Gly			
	100	105	110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
	115		
<210> 8			
<211> 119			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 8			
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asn His			
	20	25	30

Asp	Met	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
35				40				45							
Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
50				55				60							
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65				70				75				80			
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
85				90				95							
Ala	Glu	Pro	Lys	Pro	Met	Asp	Thr	Glu	Phe	Asp	Tyr	Arg	Ser	Pro	Gly
100				105				110							
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
115															

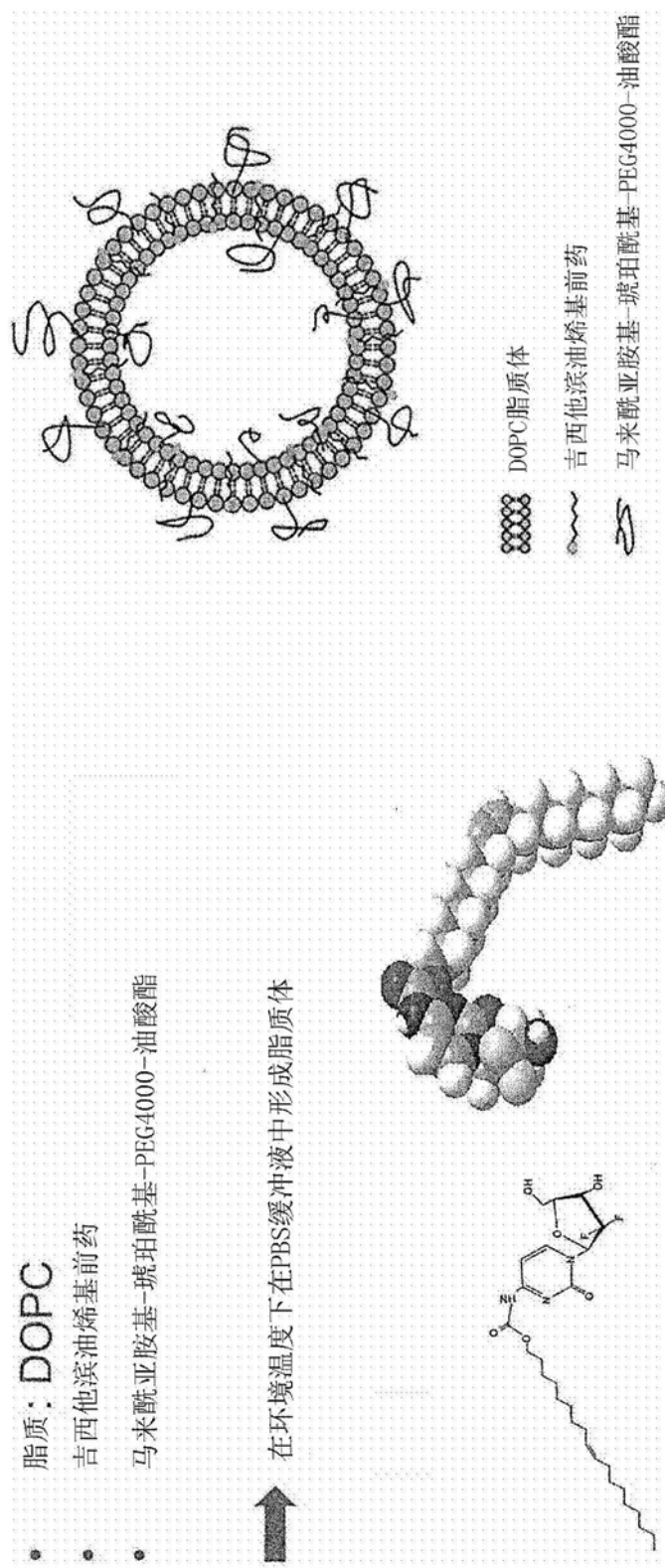


图1

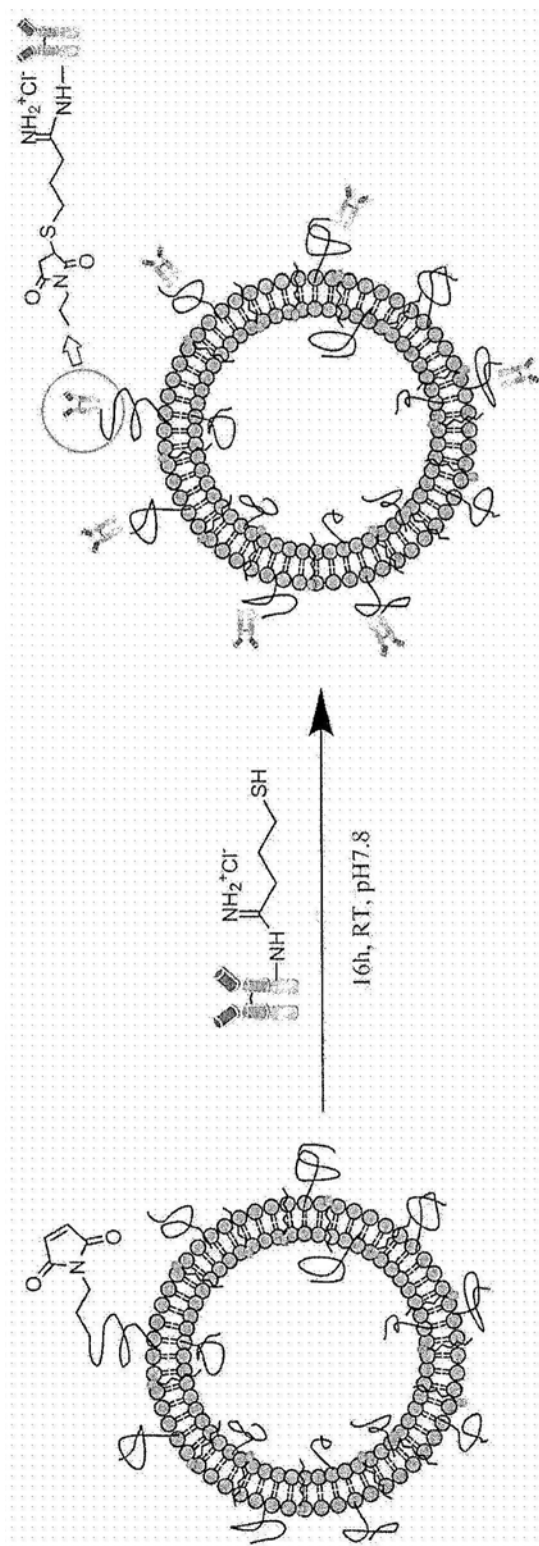


图2

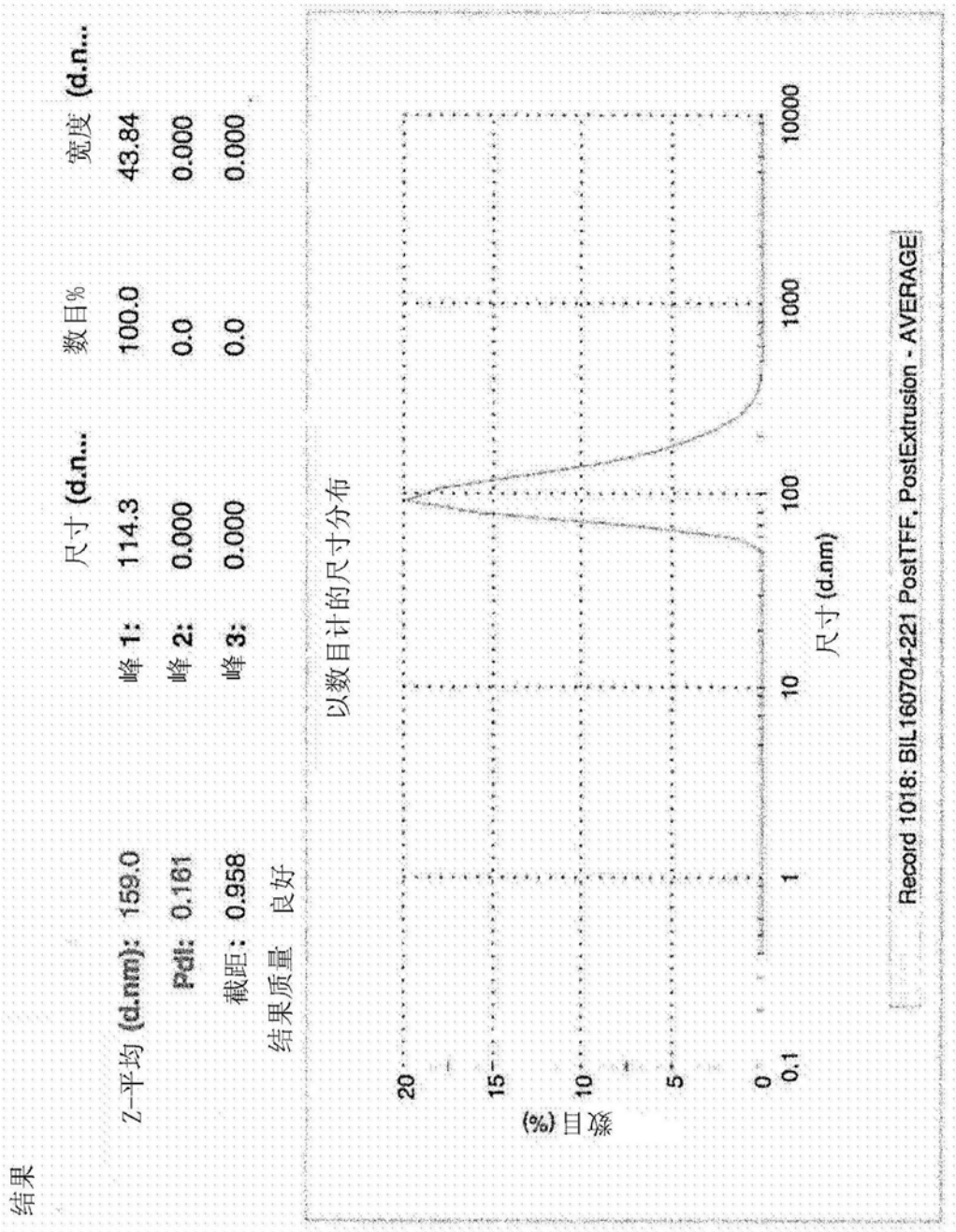


图3

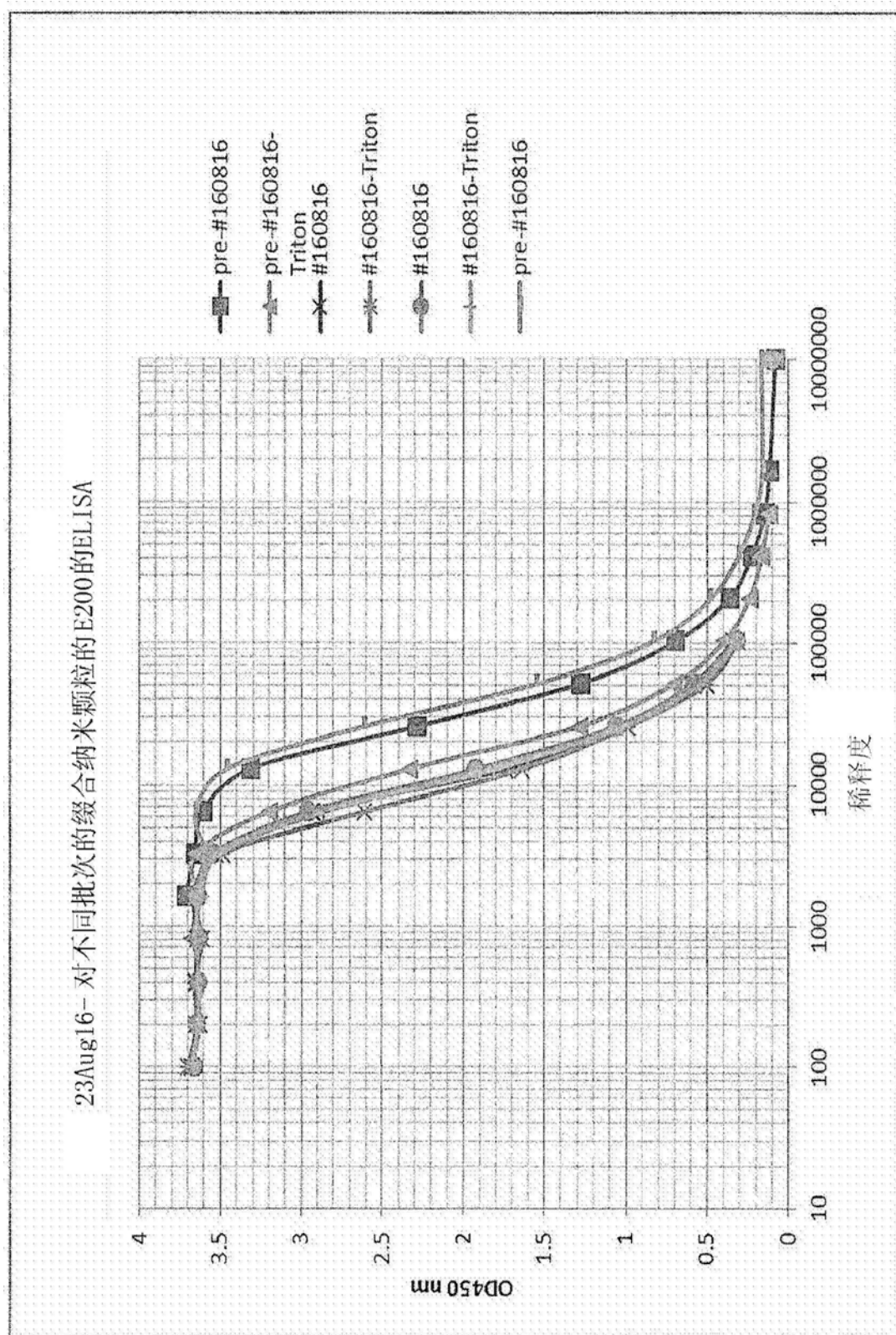


图4

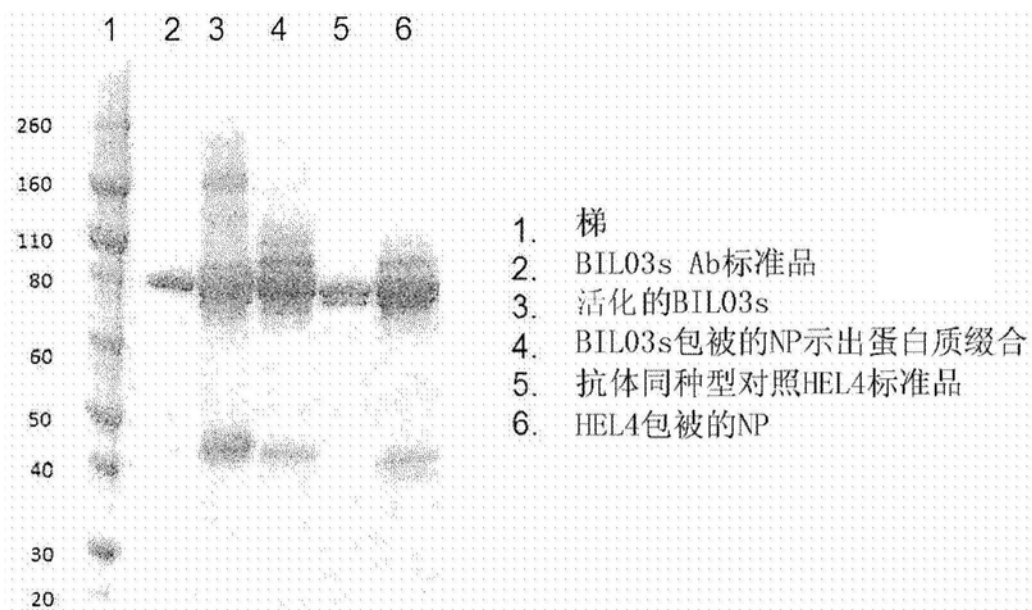


图5

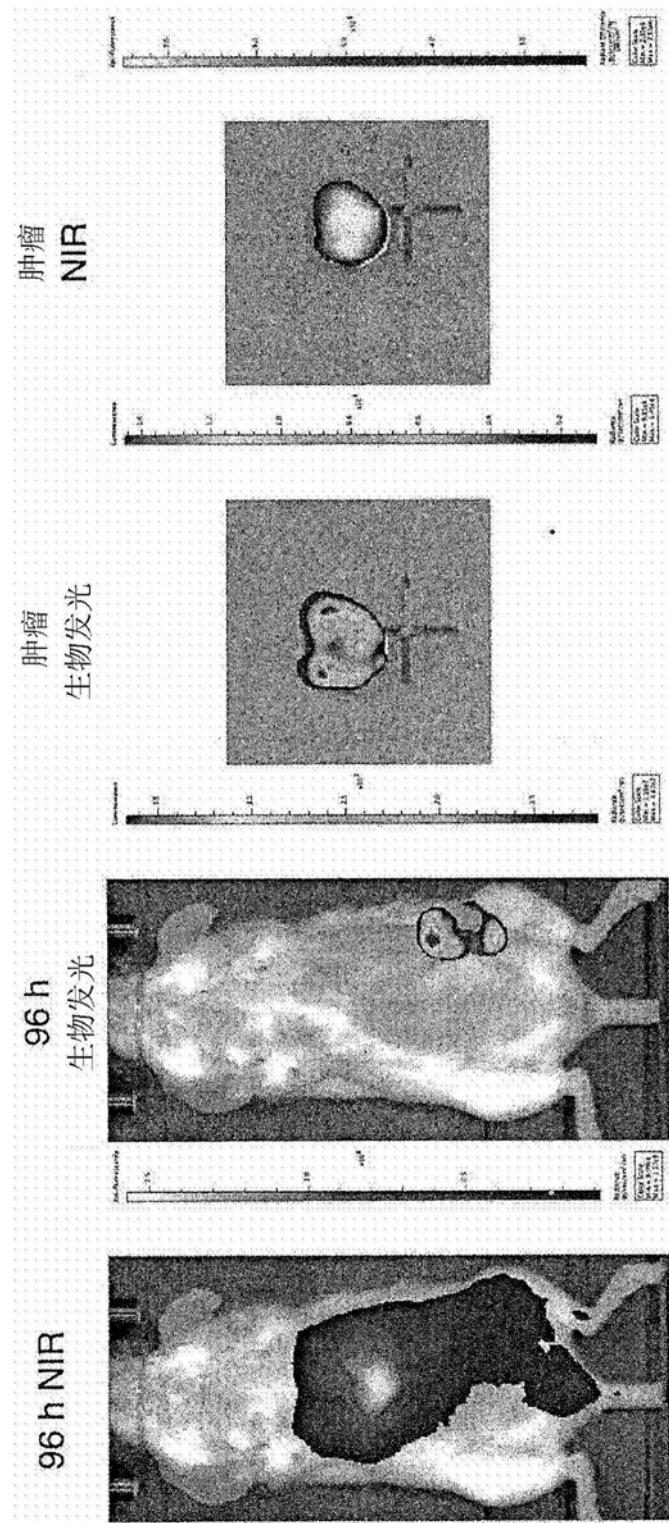


图6

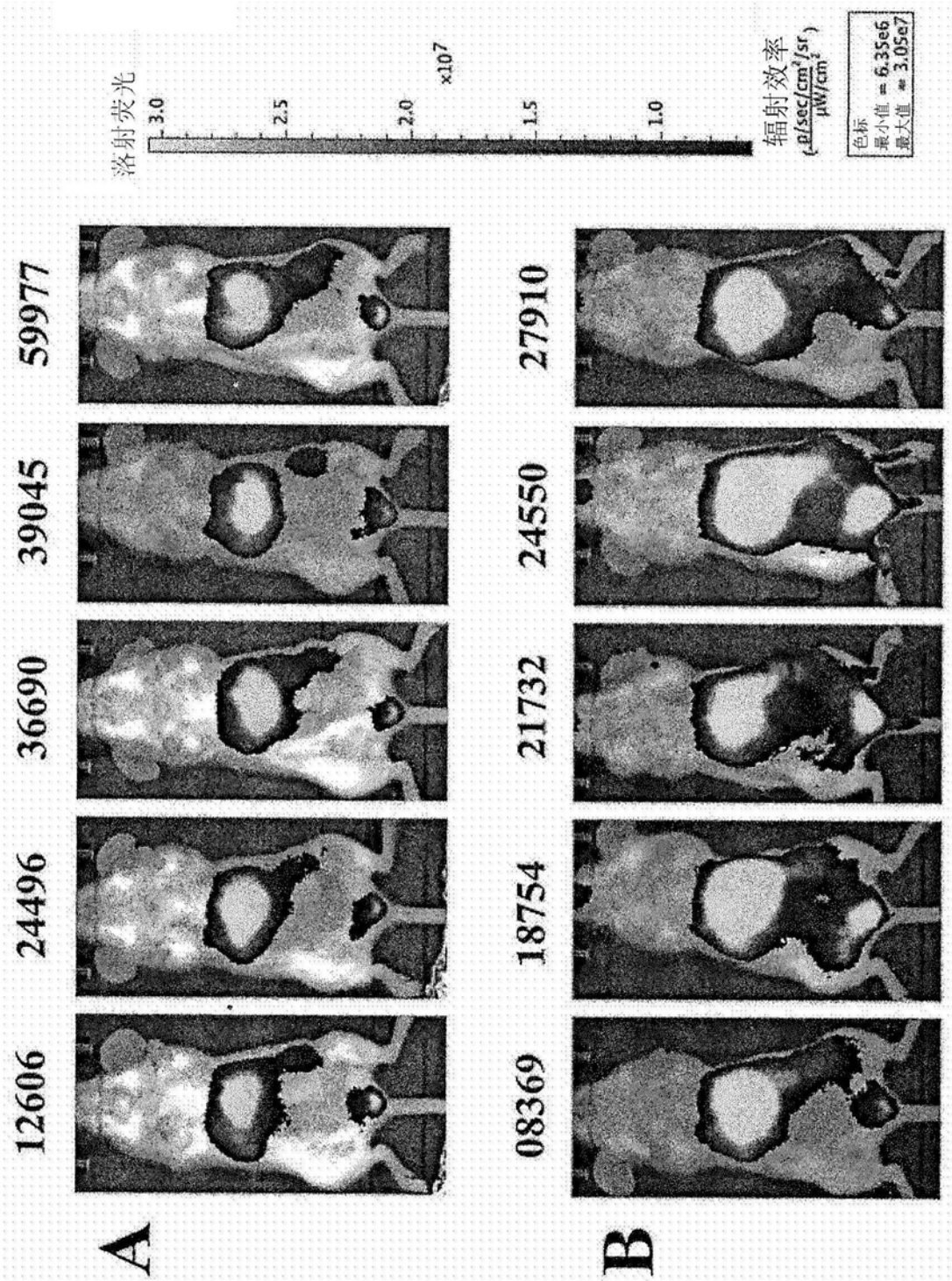


图7

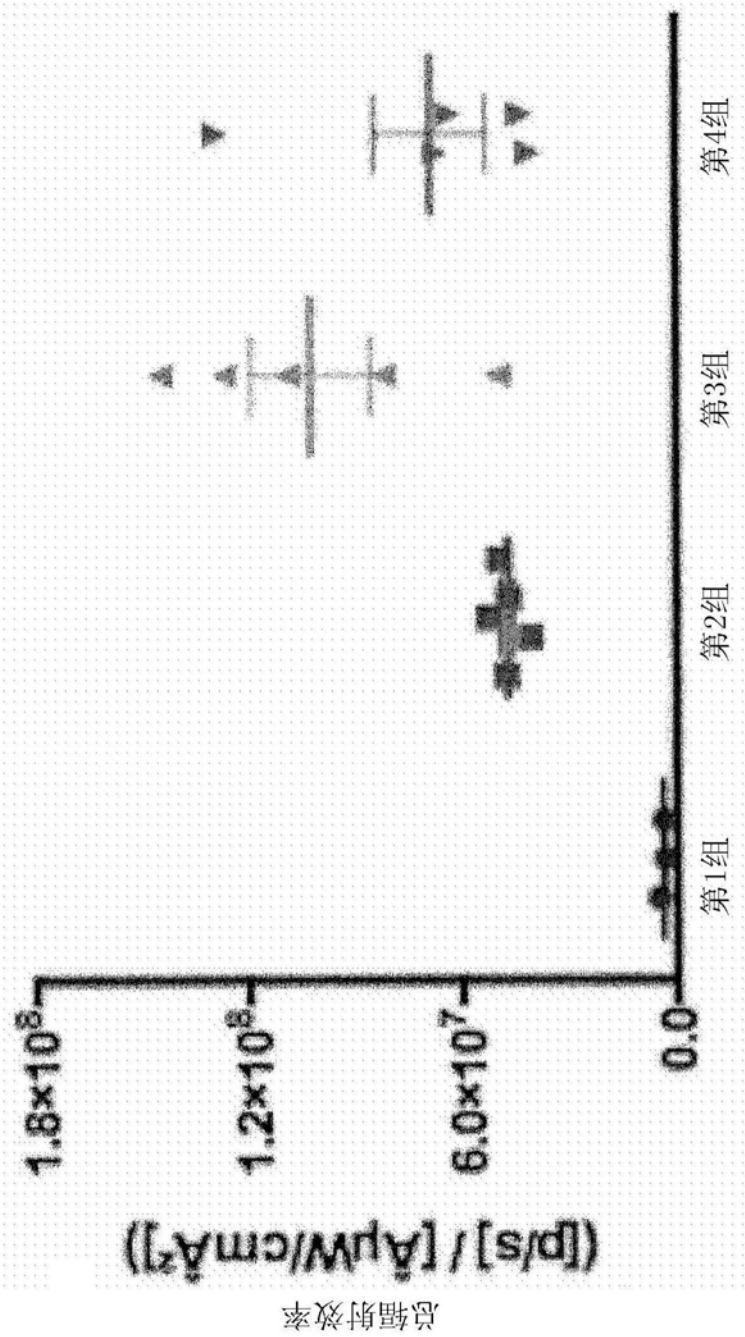


图8

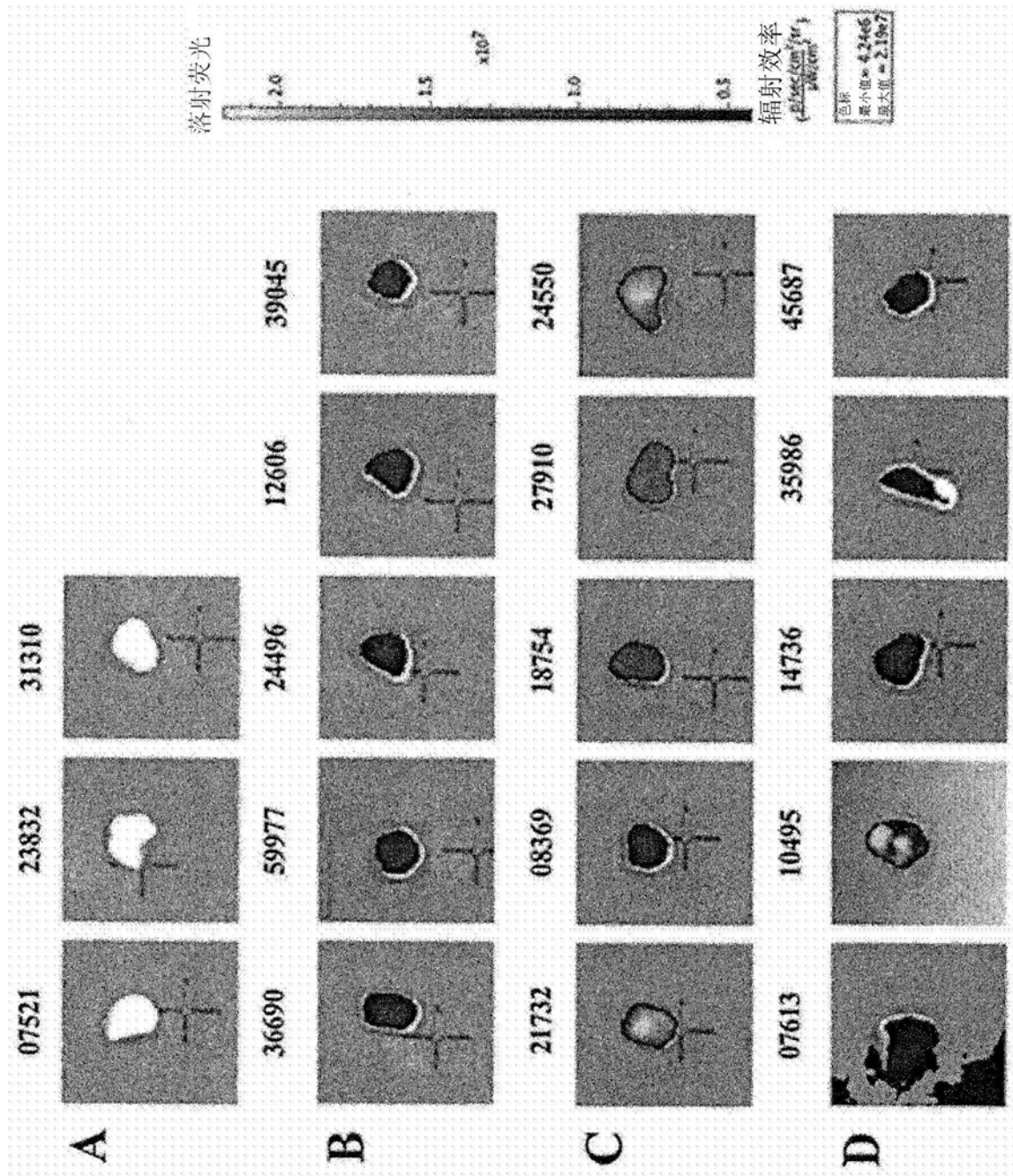


图9

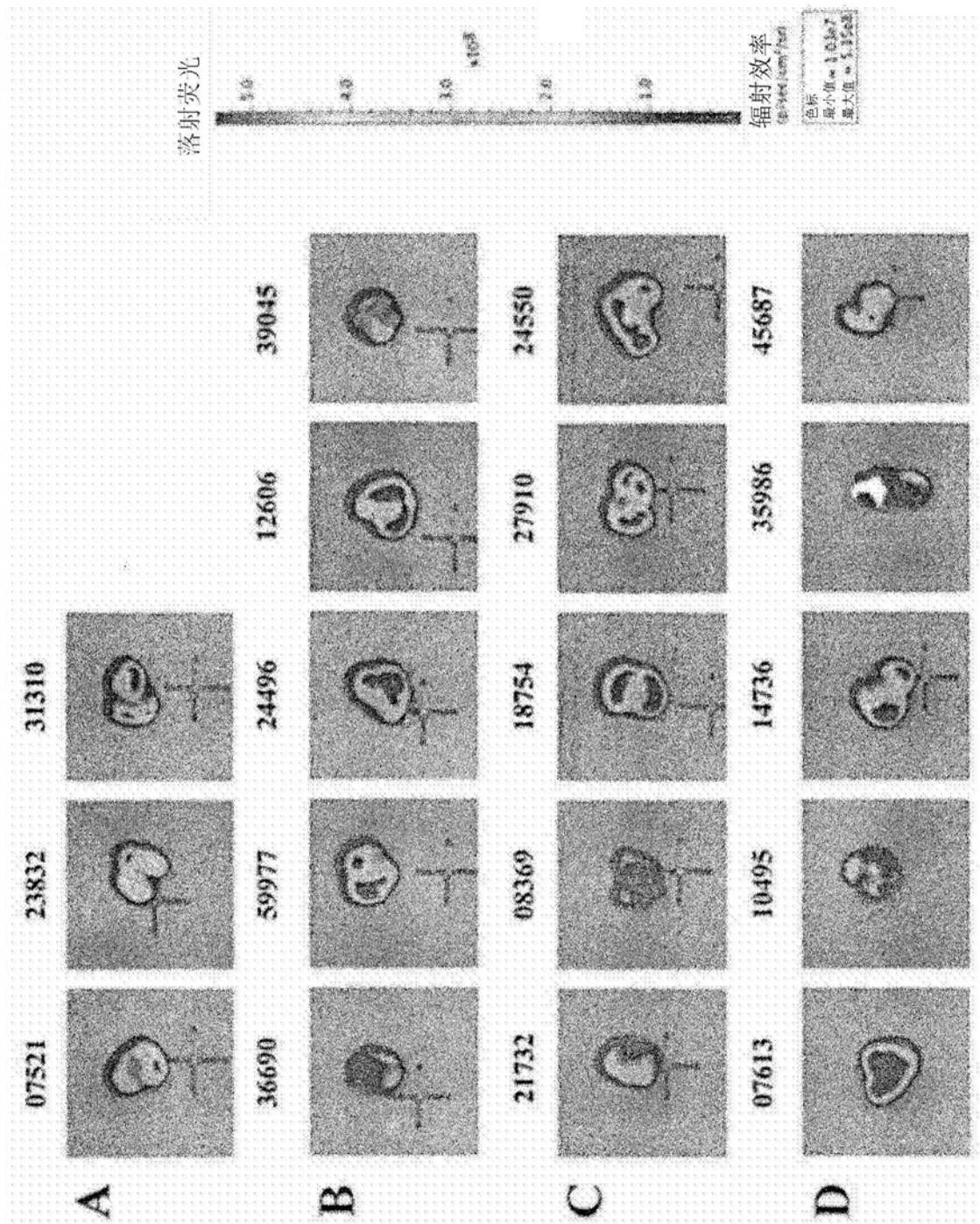


图9(续)

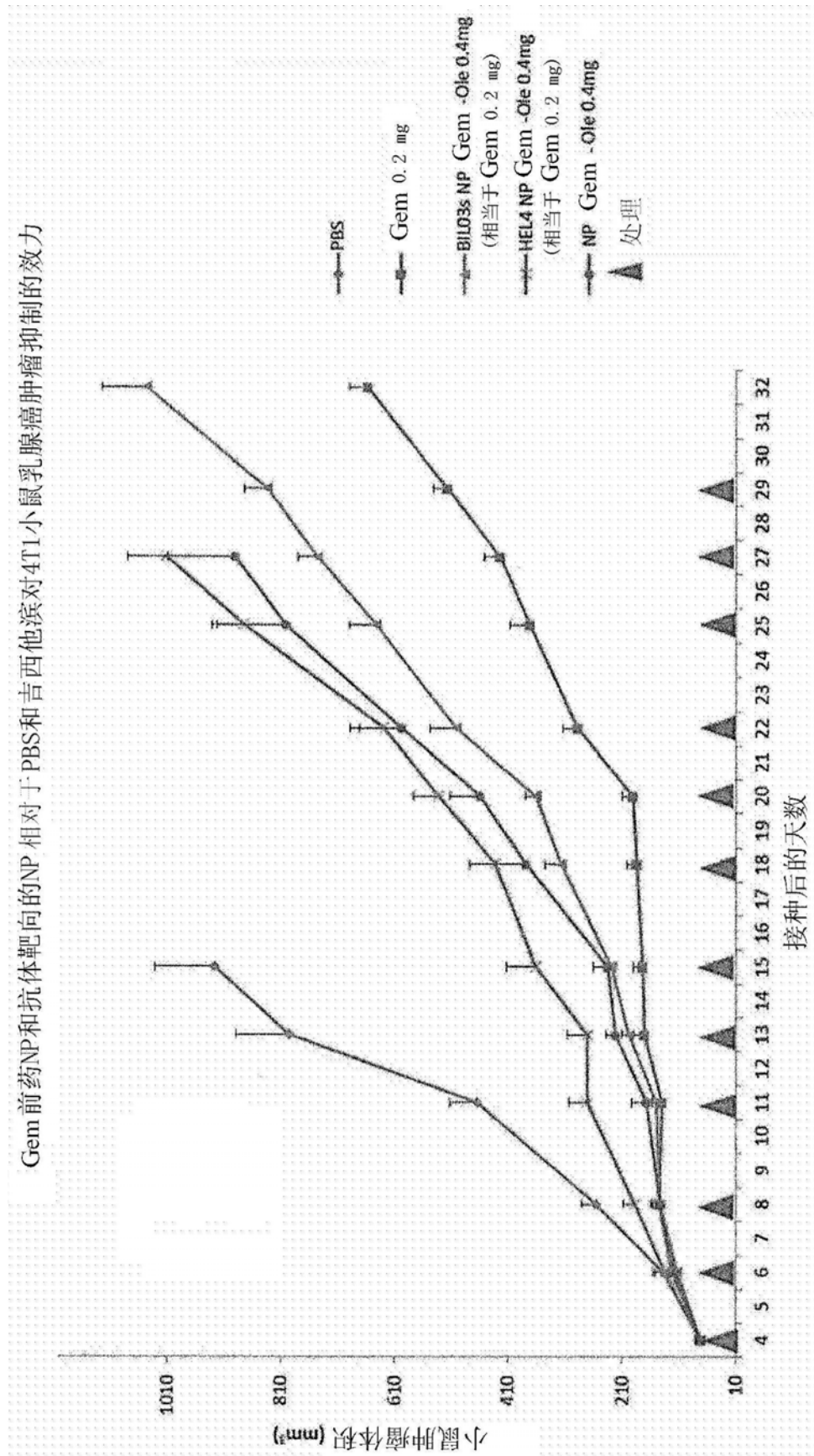


图10

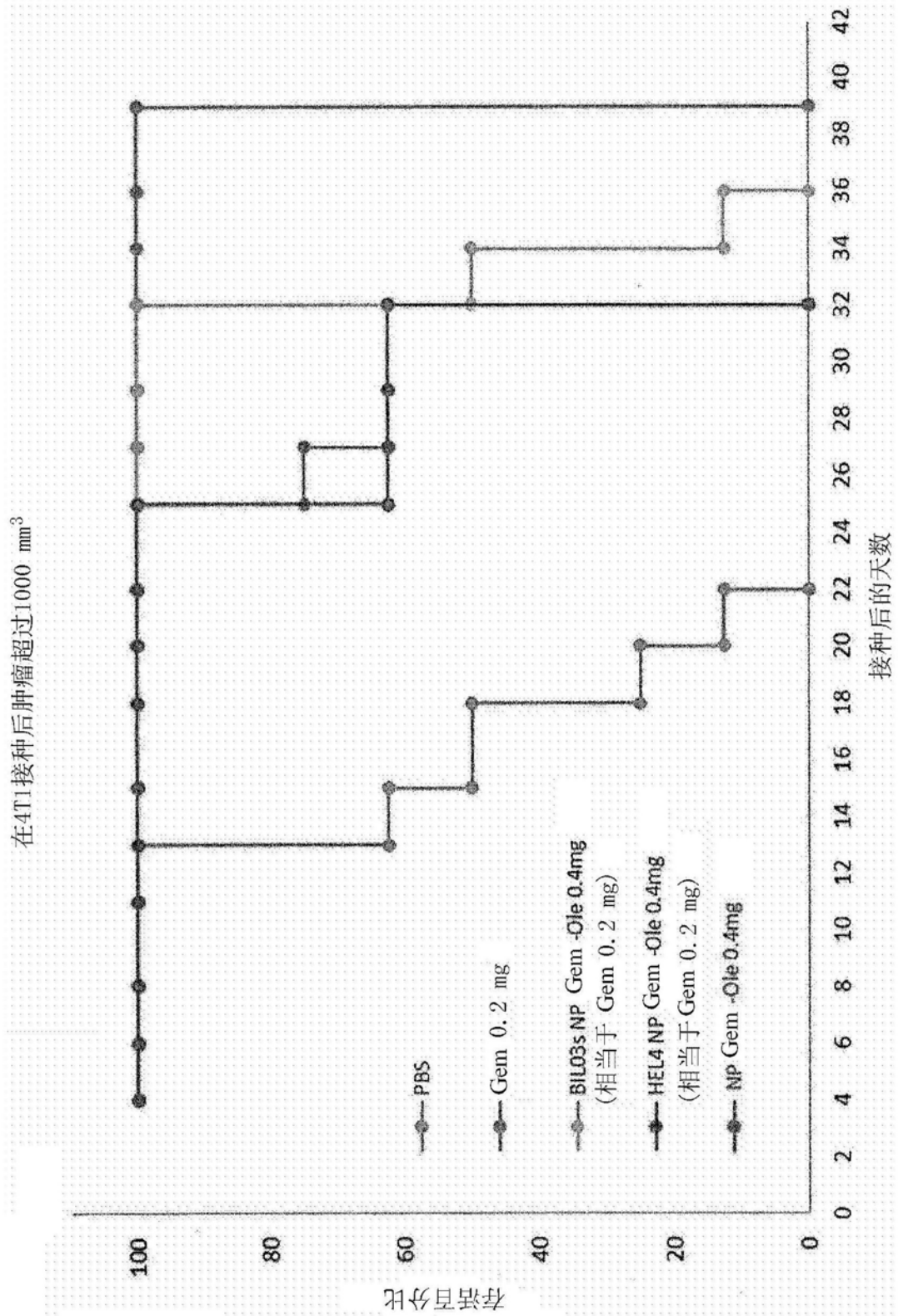


图10(续)

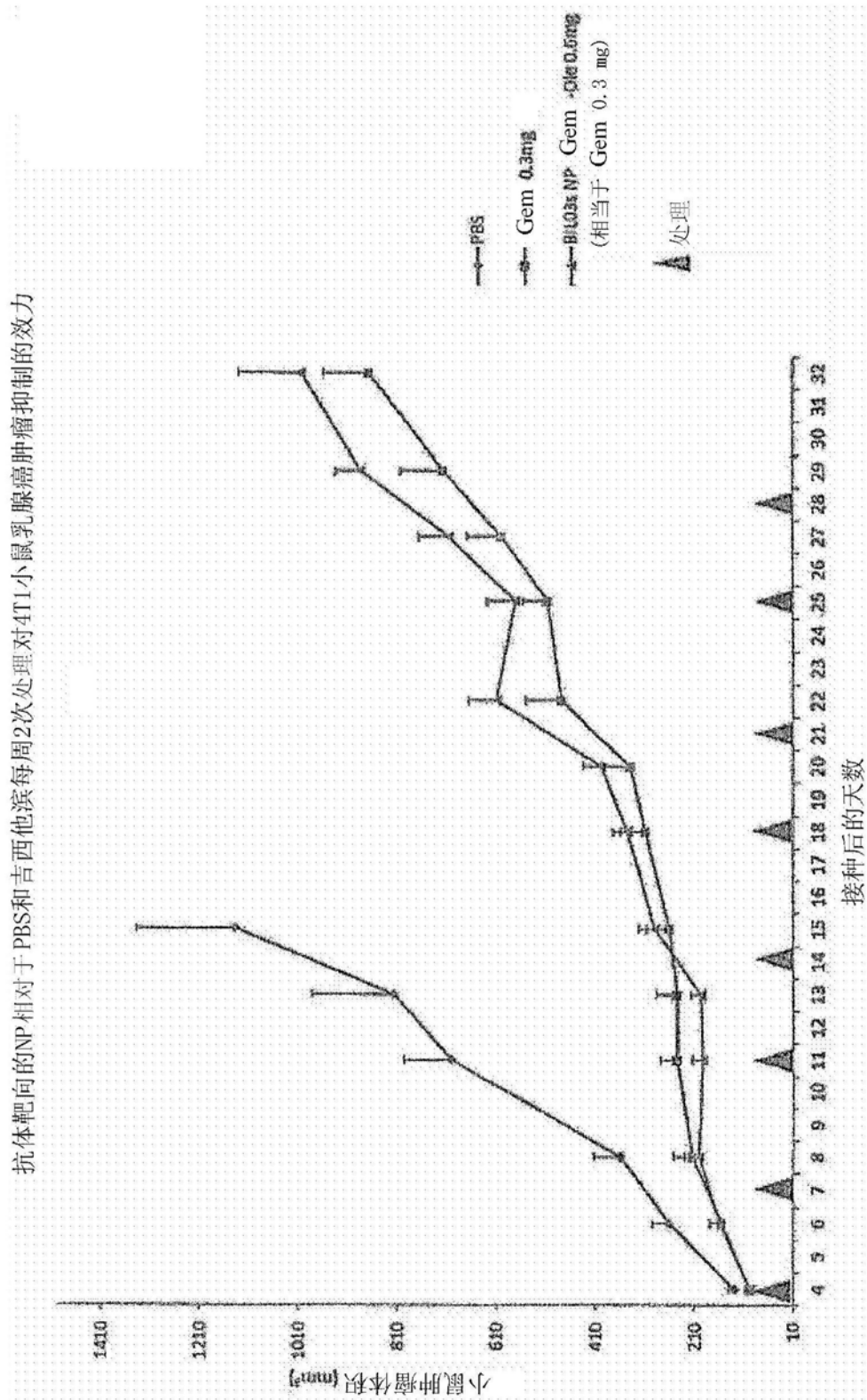


图11

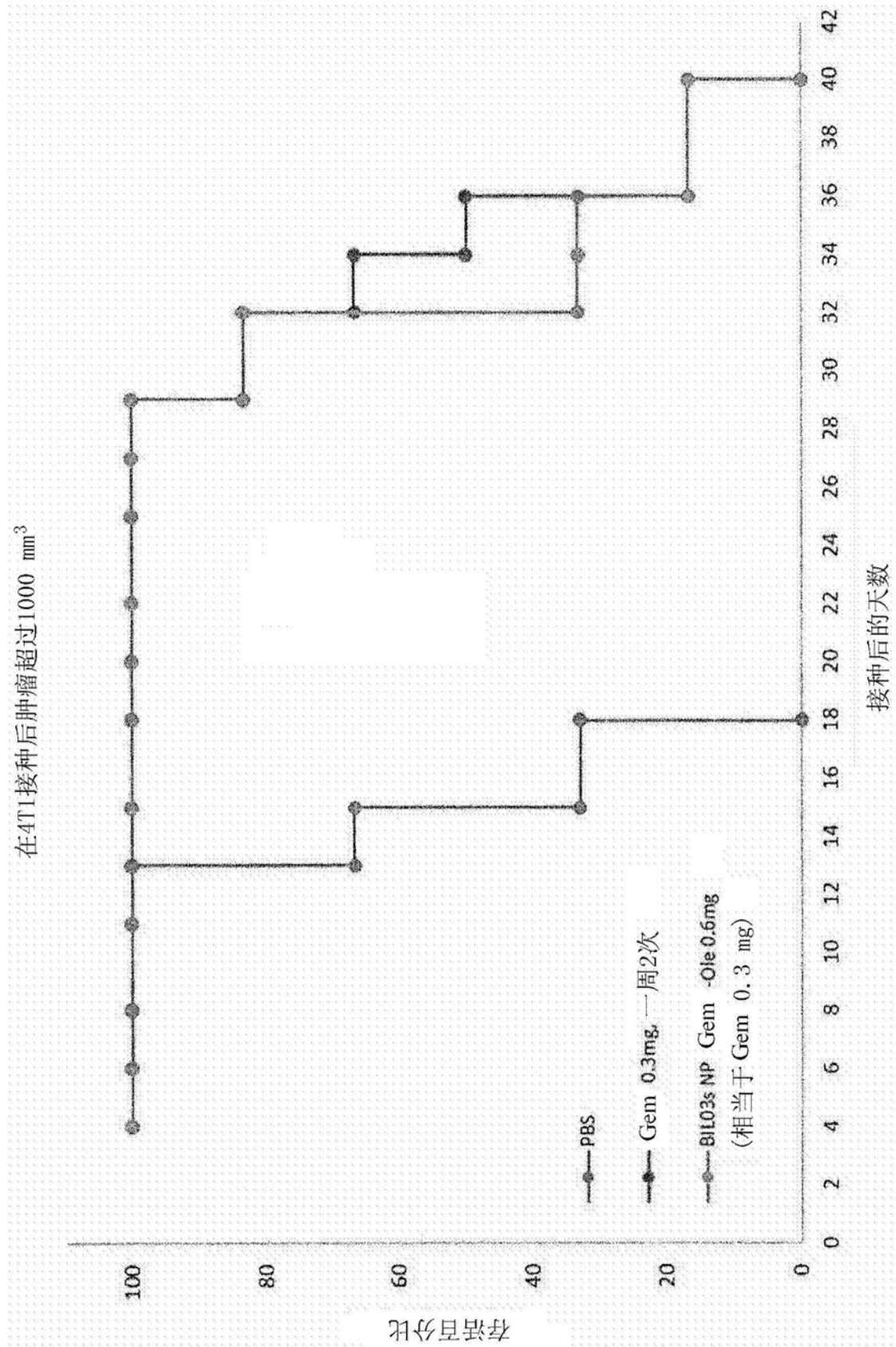


图11 (续)