



(10) 申请公布号 CN 116723846 A

(43) 申请公布日 2023. 09. 08

(21) 申请号 202180050960.7

(22) 申请日 2021.08.20

(30) 优先权数据

63/068,904 2020.08.21 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.02.17

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/046984 2021.08.20

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/040580 EN 2022.02.24

(71) 申请人 坚毅科学股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 F·巴内特

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理师 封新琴

(51) Int.Cl.

A61K 31/724 (2006.01)

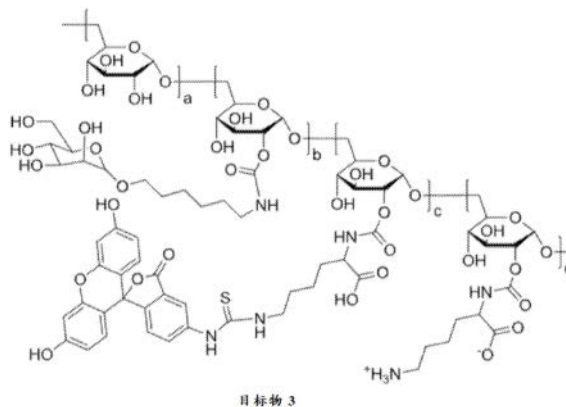
权利要求书2页 说明书20页 附图14页

(54) 发明名称

用于靶向肿瘤相关巨噬细胞的组合物和方法

(57) 摘要

本发明涉及使用与葡聚糖主链偶联的靶部分靶向单核细胞、巨噬细胞和其他表达CD-206的细胞(诸如树突细胞),特别是那些在疾病部位聚集的细胞的化合物。此处公开的化合物优选包含葡聚糖主链、靶向部分、靶向部分接头、有效载荷和任选的有效载荷接头。本发明还提供制备此类化合物和组合物的方法。本发明还提供了使用包含与葡聚糖主链偶联的靶部分的化合物的诊断方法和治疗方法。



1. 一种组合物,其包含:

CD206靶向部分,所述CD206靶向部分经由包含氨基甲酸酯基团和链部分的靶向接头偶联至包含多个主链单体的葡聚糖主链,其中所述氨基甲酸酯基团连接至主链单体并且所述链部分连接所述氨基甲酸酯基团和所述CD206靶向部分;和

偶联至所述葡聚糖主链的活性组分。

2. 如权利要求1所述的组合物,其中所述多个主链单体包含处于 α -1,6糖苷连键中的多个D-葡萄糖单体。

3. 如权利要求2所述的组合物,其中所述多个D-葡萄糖单体是n,其中n=16至111。

4. 如权利要求3所述的组合物,其中所述多个D-葡萄糖单体是n,其中n=50至65。

5. 如权利要求2所述的组合物,其中所述葡聚糖主链是直链的葡聚糖分子。

6. 如权利要求2所述的组合物,其中所述葡聚糖主链是环糊精分子并且n=6至16个D-葡萄糖单体。

7. 如权利要求1所述的组合物,其中所述CD206配体包含甘露糖、半乳糖、胶原蛋白、岩藻糖、硫酸化N-乙酰半乳糖胺、N-乙酰葡萄糖胺、促黄体激素、促甲状腺激素或硫酸软骨素的至少一部分。

8. 如权利要求7所述的组合物,其中所述靶向部分是甘露糖。

9. 如权利要求8所述的组合物,其中甘露糖与主链单体的比例为约1比5至约1比25。

10. 如权利要求7所述的组合物,其中甘露糖与主链单体的比率为约1比6至约1比19。

11. 如权利要求7所述的组合物,其中甘露糖在环糊精上的取代度在约0.1至约7的范围内。

12. 如权利要求11所述的组合物,其中甘露糖在环糊精上的取代度在约0.5至约5的范围内。

13. 如权利要求1所述的组合物,其中所述靶向接头通过氨基甲酸酯基团的氧原子连接至所述葡聚糖主链。

14. 如权利要求1所述的组合物,其中所述靶向接头的链部分包含C₃-C₇亚烷基链。

15. 如权利要求1所述的组合物,其中所述靶向接头的所述链部分包含C₆亚烷基链。

16. 如权利要求1所述的组合物,其中所述靶向接头的所述链部分是未经取代的C₆亚烷基部分。

17. 如权利要求1所述的组合物,其中当所述接头附接至甘露糖时,所述靶向接头的所述氨基甲酸酯基团的碳原子是唯一的sp²-杂化碳。

18. 如权利要求1所述的组合物,其中所述活性组分是可检测标记物或治疗剂。

19. 如权利要求18所述的化合物,其中所述可检测标志物是放射性同位素、金属螯合剂、酶、荧光化合物、生物发光化合物或化学发光化合物。

20. 如权利要求19所述的化合物,其中所述放射性同位素选自²¹²Bi、¹³¹I、¹¹¹In、⁹⁰Y、¹⁸⁶Re、²¹¹At、¹²⁵I、¹⁸⁸Re、¹⁵³Sm、²¹³Bi、³²P和¹⁷⁷Lu组成的组。

21. 如权利要求18所述的化合物,其中所述可检测标记是显像剂。

22. 如权利要求21所述的化合物,其中所述显像剂是5-羧基荧光素、5-异硫氰酸荧光素、6-异硫氰酸荧光素、6-羧基荧光素、6-异硫氰酸四甲基罗丹明、5-羧基四甲基罗丹明、5-羧基rhodol衍生物、四甲基罗丹明和四乙基罗丹明、二苯基二甲基罗丹明和二苯基二乙基

罗丹明、二萘基罗丹明、罗丹明101磺酰氯、Cy3、Cy3B、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7、DyLight650、IRDye650、IRDye680、DyLight750、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 750、IR800CW、ICG、绿色荧光蛋白、EBFP、EBFP2、Azurite、mKalamal、ECFP、Cerulean、CyPet、YFP、Citrine、Venus、YPet、钆螯合物、氧化铁颗粒、超顺磁性氧化铁颗粒、超小顺磁性颗粒、锰螯合物、含镓剂、 ^{64}Cu 二乙酰基-双(N4-甲基缩胺基硫脲)， ^{18}F -氟脱氧葡萄糖、 ^{18}F -氟化物、3'-脱氧-3'-[^{18}F]氟胸苷、 ^{18}F -氟米索硝唑、镓-99m、铊、碘、硫酸钡或它们的组合。

23. 如权利要求18所述的组合物，其中所述治疗剂是细胞毒性剂。

24. 如权利要求23所述的化合物，其中所述细胞毒性剂选自蓖麻毒素、蓖麻毒素A链、多柔比星、柔红霉素、美登木素生物碱、紫杉醇、溴化乙锭、丝裂霉素、依托泊苷、替诺泊苷、长春新碱、长春碱、秋水仙碱、二羟基炭疽菌素二酮、放线菌素、白喉毒素、假单胞菌外毒素(PE)A、PE40、相思豆毒素、相思豆毒素A链、莨菪根毒素A链、 α -八叠球菌素、白树毒素、丝裂蛋白、局限曲菌素、酚霉素、伊诺霉素、curicin、巴豆毒素、卡奇霉素、皂草抑制剂、糖皮质激素、奥瑞斯他汀、金霉素、铋、铊、考布他汀、倍癌霉素、多洛他汀、cc1065、顺铂、奥瑞斯他汀苯丙氨酸苯二胺(AFP)、单甲基奥瑞斯他汀苯丙氨酸(MMAF)和单甲基奥瑞斯他汀E(MMAE)组成的组。

25. 如权利要求24所述的组合物，其中所述细胞毒性剂是单甲基奥瑞斯他汀E(MMAE)。

26. 如权利要求1所述的组合物，其中所述活性组分经由有效载荷接头连接至葡聚糖主链。

27. 如权利要求26所述的组合物，其中所述有效载荷接头是可切割的接头或不可切割的接头。

28. 如权利要求27所述的组合物，其中所述可切割的接头能够被蛋白酶切割。

29. 如权利要求28所述的组合物，其中所述蛋白酶是溶酶体蛋白酶或内体蛋白酶。

30. 如权利要求27所述的组合物，其中所述可切割的接头能够因pH变化而被切割。

31. 如权利要求27所述的组合物，其中所述有效载荷接头是Val-Cit接头。

32. 一种将剂递送至巨噬细胞的方法，其包括使所述巨噬细胞与权利要求1所述的化合物接触。

33. 一种治疗受试者癌症的方法，其包括向所述受试者施用治疗有效量的权利要求1所述的化合物，其中所述活性组分是治疗剂。

用于靶向肿瘤相关巨噬细胞的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2020年8月21日提交的标题为“COMPOSITIONS AND METHODS FOR TARGETING TUMOR-ASSOCIATED MACROPHAGES”的美国临时申请号63/068,904的优先权,该美国临时申请出于所有目的以引用方式全文并入。

背景技术

[0003] CD206⁺细胞,尤其是巨噬细胞,已成为被各种分子靶向,希望能够向此类细胞聚集的部位提供诊断和治疗。此类分子的一个实例见于标题为“Compositions for Targeting Macrophages and Other CD206 High Expressing Cells and Methods of Treating and Diagnosis”为的US 2017/0209584。虽然本参考文献和其他文献中公开的分子可靶向感兴趣的CD206⁺细胞,但是这些分子有许多缺点。

发明内容

[0004] 在一个方面,提供了一种组合物,其包含:CD206靶向部分,该CD206靶向部分经由包含氨基甲酸酯基团和链部分的靶向接头偶联至包含多个主链单体的葡聚糖主链,其中氨基甲酸酯基团连接至主链单体并且链部分连接氨基甲酸酯基团和CD206靶向部分;和偶联至葡聚糖主链的活性组分。

[0005] 在一些方面提供了将剂递送至巨噬细胞的方法,其包括使所述巨噬细胞与本文所述的化合物接触。

[0006] 在一些方面提供了治疗受试者癌症的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的化合物,其中活性组分是治疗剂。

附图说明

[0007] 图1是用FITC标记的候选CD206⁺靶向分子的图形表示。

[0008] 图2是用MMAE标记的候选CD206⁺靶向分子的图形表示。

[0009] 图3是示出与替莫唑胺(▲)和盐水媒介物对照(●)相比较在三种不同浓度,(0.5mg/ml)(○)、5mg/ml(■)和50mg/ml(□)下目标物5的影响的曲线图。

[0010] 图4是候选CD206⁺靶向分子的图形表示,其示出了环糊精主链和潜在有效载荷。

[0011] 图5是携带金属离子螯合剂的候选CD206⁺靶向分子的图形表示。

[0012] 图6是示出三阴性乳腺癌的同基因小鼠模型中肿瘤生长的曲线图,其中小鼠用5mg/kg目标物5(○)、15mg/kg目标物5(▲),或15mg/kg紫杉醇(x)进行了治疗。

[0013] 图7是示出与施用盐水的小鼠相比,在胶质母细胞瘤的U87颅内模型中用目标物5治疗的小鼠的存活率的曲线图。

[0014] 图8A-8C是示出各种浓度的目标物5对GL261胶质瘤小鼠模型中的肿瘤体积(图8A)、肿瘤体积变化百分比(图8B)和体重(图8C)的影响的曲线图。

[0015] 图9是示出目标物5对同基因小鼠结肠癌模型中的肿瘤体积的影响的曲线图。

[0016] 图10是MRI图像,其显示了目标物-7对肿瘤具有更大的特异性,具有较低毒性的潜力。

[0017] 图11A是示出造影后肿瘤与选定组织的信号强度比的曲线图。图11B是示出按组的信噪比(SNR)比较的曲线图。

具体实施方式

[0018] 本发明涉及使用与葡聚糖主链偶联的靶部分靶向单核细胞、巨噬细胞和其他表达CD206的细胞(诸如树突细胞),特别是那些在疾病部位聚集的细胞的化合物。此处公开的化合物优选包含葡聚糖主链、靶向部分、靶向部分接头、有效载荷和任选的有效载荷接头。本发明还提供制备此类化合物和组合物的方法。本发明还提供了使用包含与葡聚糖主链偶联的靶部分的化合物的诊断方法和治疗方法。

[0019] 化学定义

[0020] 除非另有说明,否则如本文所用的“烷基”是指并包括具有指定碳原子数(即, C_1 - C_{10} 表示一至十个碳原子)的饱和的直链(即非支链)或支链的单价烃链或它们的组合。具体的烷基是具有1至20个碳原子的烷基(“ C_1 - C_{20} 烷基”)、具有1至10个碳原子的烷基(“ C_1 - C_{10} 烷基”)、具有6至10个碳原子的烷基(C_6 - C_{10} 烷基”)、具有1至6个碳原子的烷基(“ C_1 - C_6 烷基”)、具有2至6个碳原子的烷基(“ C_2 - C_6 烷基”),或具有1至4个碳原子的烷基(“ C_1 - C_4 烷基”)。烷基的实例包括但不限于诸如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、异丁基、仲丁基、正戊基、正己基、正庚基、正辛基、正壬基、正癸基等基团。

[0021] 如本文所用的“亚烷基”是指与烷基相同,但具有二价的残基。具体的亚烷基是具有1至20个碳原子的亚烷基(“ C_1 - C_{20} 亚烷基”)、具有1至10个碳原子的亚烷基(“ C_1 - C_{10} 亚烷基”)、具有6至10个碳原子的亚烷基(C_6 - C_{10} 亚烷基”)、具有1至6个碳原子的亚烷基(“ C_1 - C_6 亚烷基”)、具有1至5个碳原子的亚烷基(“ C_1 - C_5 亚烷基”)、具有1至4碳原子的亚烷基(“ C_1 - C_4 亚烷基”),或具有1至3个碳原子的亚烷基(C_1 - C_3 亚烷基”)。亚烷基的实例包括但不限于诸如亚甲基(- CH_2 -)、亚乙基(- CH_2CH_2 -)、亚丙基(- $CH_2CH_2CH_2$ -)、异亚丙基(- $CH_2CH(CH_3)$ -)、亚丁基(- $CH_2(CH_2)_2CH_2$ -)、异亚丁基(- $CH_2CH(CH_3)CH_2$ -)、亚戊基(- $CH_2(CH_2)_3CH_2$ -)、亚己基(- $CH_2(CH_2)_4CH_2$ -)、亚庚基(- $CH_2(CH_2)_5CH_2$ -)、亚辛基(- $CH_2(CH_2)_6CH_2$ -)等基团。

[0022] “卤代”或“卤素”是指原子序数为9至85的第17族系列的元素。优选的卤代基团包括氟、氯、溴和碘的基团。当一个残基被多于一个卤素取代时,它可以通过使用对应于所附接的卤素部分的数目的前缀来提及,例如,二卤代芳基、二卤代烷基、三卤代芳基等是指被两个(“二”)或三个(“三”)卤代基团取代的芳基和烷基,该卤代基团可以是但不一定是相同的卤素;因此,4-氯-3-氟苯基在二卤代芳基的范围内。其中每个氢均被卤代基团取代的烷基被称为“全卤代烷基”。优选的全卤代烷基是三氟甲基(- CF_3)。类似地,“全卤代烷氧基”是指这样的烷氧基,其中卤素替代构成该烷氧基的烷基部分的烃中的每个H。全卤代烷氧基的一个实例是三氟甲氧基(- OCF_3)。

[0023] “氨基甲酸酯”是指基团-O-C(=O)-NH-。除非另有说明,否则应理解氨基甲酸酯基团的氮原子是未经取代的(即带有氢原子)。

[0024] “氧代”是指部分=O。

[0025] 除非另有说明,否则“任选经取代的”意指基团可以是未经取代的或被一个或多个

(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个)为该基团列出的取代基取代,其中该取代基可以相同或不同。在一个实施方案中,任选经取代的基团具有一个取代基。在另一个实施方案中,任选经取代的基团具有两个取代基。在另一个实施方案中,任选经取代的基团具有三个取代基。在另一个实施方案中,任选经取代的基团具有四个取代基。在一些实施方案中,任选经取代的基团具有1至2、1至3、1至4、1至5、2至3、2至4或2至5个取代基。在一个实施方案中,任选经取代的基团是未经取代的。

[0026] 化合物

[0027] 此处公开的化合物优选包含各种组分,包括葡聚糖主链、靶向部分、靶向部分接头、有效载荷和任选的有效载荷接头。这些组分的排列提供了优先靶向CD206⁺细胞并且被内化的化合物。被CD206⁺内化的能力细胞允许所公开的化合物将有效载荷递送至此类细胞聚集的疾病部位。实体瘤癌症和肉芽肿性疾病常常包含CD206⁺细胞聚集体。本申请描述了用于对实体瘤癌症或肉芽肿性疾病进行成像和治疗的改进的组合物和方法,其通过靶向在这些疾病状态下聚集或以其他方式与这些疾病状态相关联的CD206⁺细胞来实现。在某些实施方案中,所公开的化合物还可以起到术中显像剂、MRI显像剂或放射增敏剂的作用,并且起到将放射性药物递送到脑和身体中的原发性和转移性癌症细胞的作用。

[0028] 葡聚糖主链

[0029] 此处描述的化合物包含葡聚糖主链,该葡聚糖主链是直链的、支链的或环状的寡糖或多糖,该寡糖或多糖包含主要通过C-1→C-6糖苷键连接的多个葡萄糖单体。也可能存在其他糖苷键,诸如α-1,3或α-1,4键。葡聚糖主链也可以被定义为葡萄糖的聚合物,其中糖苷键的位置是变化的。葡聚糖主链可包含葡萄糖的α或β异构体。葡聚糖主链的实例包括葡聚糖,其是一种直链或支链的化合物;以及环糊精,其是一种环状葡聚糖。

[0030] 葡聚糖主链的质量和分子量可能不同,部分取决于葡萄糖单体的数目。在一些实施方案中,葡聚糖主链的分子量可在从1-30千道尔顿(kDa)的范围内。优选的实施方案包括约1kDa、3kDa、6kDa、10kDa、20kDa或30kDa的葡聚糖主链。在一些实施方案中,葡聚糖主链的分子量可在1,000至30,000克/摩尔(g/mol)的范围内。在一些实施方案中,葡聚糖主链可含有数目在5至167范围内的葡萄糖单体。葡聚糖主链可以是直链的、支链的、环状的或它们的组合。例如,葡聚糖是直链或支链的葡聚糖主链的一个实例。环糊精是葡聚糖主链的另一个实例。此处描述的主链可以是经取代或未经取代的。例如,经取代的环糊精是疏水的环糊精衍生物、亲水的环糊精衍生物、离子化的环糊精衍生物、非离子化的环糊精衍生物,或它们的任何其他变型。

[0031] 靶向部分

[0032] 此处公开的化合物包含与葡聚糖主链偶联的靶向部分。在一些实施方案中,靶向部分是CD206靶向部分。在上述方面的一些实施方案中,靶向部分是CD206配体。靶向部分是靶向CD206⁺细胞上的一种或多种模式识别受体的分子、化合物、结构或它们的任何组合。靶向部分可以靶向也被表征为C型凝集素受体的模式识别受体。优选地,靶向部分靶向CD206,CD206是一种甘露糖受体。靶向部分可以靶向一个或多个CD206⁺细胞,特别是CD206⁺单核细胞和巨噬细胞。在一些实施方案中,靶向部分是或包含CD206配体。在一些实施方案中,CD206配体包含甘露糖、半乳糖、胶原蛋白、岩藻糖、硫酸化N-乙酰半乳糖胺、N-乙酰葡萄糖胺、促黄体激素、促甲状腺激素或硫酸软骨素的至少一部分。优选的CD206配体是甘露糖、其D-

和L-异构体,以及其呋喃糖(5元环)和吡喃糖(6元环)。

[0033] 在一些实施方案中,靶向部分附接至葡聚糖主链的约10%至约50%的葡萄糖残基,或约20%至约45%的葡萄糖残基,或约25%至约40%的葡萄糖残基。(应注意,本文中提及的MW,以及受体底物、链索以及附接至葡聚糖主链的诊断/治疗基团的数目和缀合程度是指对于给定量的载体分子的平均量,因为合成技术会导致一些变化。)

[0034] 靶向接头与主链的比率

[0035] 靶向部分的相对于主链亚基的密度是使用直链和支链的多糖主链的靶向部分与主链亚基的比率来表示的。取代度(ds)用于传达环状主链上的靶向部分的密度。靶向部分与葡聚糖主链的比率是指取代一个或多个主链亚基的靶向部分的数目。例如,比率为1:7或1到7意指葡聚糖主链中每七个葡萄糖亚基有一个靶向部分。ds描述了每单位碱基的取代基或取代位置的平均数目。例如,ds为0.9意指一个主链亚基被平均0.9个靶向部分取代。在一些实施方案中,靶向部分与主链亚基的比率为约1:5至约1:25。在一些实施方案中,靶向部分与主链亚基的比率为约1:6至约1:19。在一些实施方案中,ds为约0.1至约7。在一些实施方案中,ds为约0.5至5。

[0036] 靶向接头

[0037] 靶向接头是将葡聚糖主链连接至靶向部分的可切割的或不可切割的接头。可切割的接头能够被酶(例如,蛋白酶)、温度变化、pH变化、化学刺激或它们的任意组合切割。可切割的接头可包含蛋白酶切割位点。在一些实施方案中,可切割的接头能够被溶酶体蛋白酶或内体蛋白酶切割。

[0038] 靶向接头可包含氨基甲酸酯基团。在一些实施方案中,靶向接头包含氨基甲酸酯基和链部分,其中氨基甲酸酯基连接至主链单体并且链部分连接氨基甲酸酯基和靶向部分。在本文中,氨基甲酸酯官能团采用源自有机化学领域的简单而普通的含义。在一些实施方案中,靶向接头的链部分包含一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)单元,该单元选自由以下组成的组:任选经取代的亚烷基链、任选经取代的CO-亚烷基链、肽链、聚合物链和选自由O原子、S原子和任选经取代的N原子组成的组的杂原子。在一些实施方案中,链部分包含C₁-C₁₂亚烷基链。在一些实施方案中,链部分包含C₃-C₇亚烷基链。在一些实施方案中,链部分包含C₆亚烷基链。在一些实施方案中,链部分是C₆亚烷基链。在一些实施方案中,亚烷基链被一个或多个选自由以下组成的组的取代基取代:氧代、OH、NH₂、SH、C₁-C₁₂烷基、C₁-C₁₂卤代烷基、O(C₁-C₁₂烷基)、O(C₁-C₁₂卤代烷基)、NH(C₁-C₁₂烷基)、NH(C₁-C₁₂卤代烷基)、N(C₁-C₁₂烷基)₂、N(C₁-C₁₂卤代烷基)₂、S(C₁-C₁₂烷基)、S(C₁-C₁₂卤代烷基)、C(O)OH、C(O)O(C₁-C₁₂烷基)、C(O)O(C₁-C₁₂卤代烷基)、C(O)NH(C₁-C₁₂烷基)、C(O)NH(C₁-C₁₂卤代烷基)、C(O)N(C₁-C₁₂烷基)₂、C(O)N(C₁-C₁₂卤代烷基)₂、C(O)S(C₁-C₁₂烷基)和C(O)S(C₁-C₁₂卤代烷基)。在一些实施方案中,亚烷基链是未经取代的。

[0039] 在一些实施方案中,一个或多个CD206靶向部分通过接头附接至葡聚糖主链。所述接头可以附接在约1%至约50%的主链部分上。

[0040] 活性组分

[0041] 活性组分是可用于诊断目的、治疗目的或它们的组合的分子或化合物。活性组分也称为有效载荷。活性组分可以是或包含细胞毒性剂、显像剂或它们的组合。

[0042] 诊断有效载荷

[0043] 在一些实施方案中,活性组分是显像剂。在一些实施方案中,显像剂是5-羧基荧光素、5-异硫氰酸荧光素(fluorescein-5-isothiocyanate)、6-异硫氰酸荧光素(fluorescein-6-isothiocyanate)、6-羧基荧光素、6-异硫氰酸四甲基罗丹明(tetramethylrhodamine-6-isothiocyanate)、5-羧基四甲基罗丹明、5-羧基rhodol1衍生物、四甲基罗丹明和四乙基罗丹明、二苯基二甲基罗丹明和二苯基二乙基罗丹明、二萘基罗丹明、罗丹明101磺酰氯、Cy3、Cy3B、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7、DyLight650、IRDye6S0、IRDye680、DyLight750、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 750、IR800CW、ICG、绿色荧光蛋白、EBFP、EBFP2、Azurite、mKalamal、ECFP、Cerulean、CyPet、YFP、Citrine、Venus、YPet、钆螯合物、氧化铁颗粒、超顺磁性氧化铁颗粒、超小顺磁性颗粒、锰螯合物、含镓剂、 ^{64}Cu 二乙酰双(N4-甲基缩胺基硫脲), ^{18}F -氟脱氧葡萄糖、 ^{18}F -氟化物、3'-脱氧-3'-[^{18}F]氟胸苷、 ^{18}F -氟米索硝唑、钨-99m、铊、碘、硫酸钡或它们的组合。在一些实施方案中,显像剂与一种或多种另外的剂,诸如靶向剂、细胞毒性剂或巨噬细胞极化剂缀合。

[0044] 治疗有效载荷

[0045] 在一些实施方案中,活性组分是治疗剂。所述治疗剂可以是已知可用于治疗巨噬细胞介导的疾病的任何化合物。治疗剂包括但不限于化疗剂,诸如多柔比星;抗感染剂,诸如抗生素(例如四环素、链霉素和异烟肼)、抗病毒剂、抗真菌剂和抗寄生虫剂;免疫佐剂;类固醇;核苷酸,诸如DNA、RNA、RNAi、siRNA、CpG或Poly(I:C);多肽;蛋白质;或金属,诸如银、镓或钆。

[0046] 在某些实施方案中,治疗剂是选自由包含以下或由以下组成的组的抗微生物药物:抗生素;抗结核抗生素(诸如异烟肼、链霉素或乙胺丁醇);抗病毒或抗逆转录病毒药物,例如逆转录抑制剂(诸如齐多夫定)或蛋白酶抑制剂(诸如茚地那韦);对利什曼病有效果的药物(诸如葡甲胺锑酸盐)。在某些实施方案中,治疗剂是抗微生物活性剂,诸如阿莫西林、氨苄西林、四环素、氨基糖苷类(例如,链霉素)、大环内酯类(例如,红霉素及其相关物)、氯霉素、伊维菌素、利福霉素和多肽抗生素(例如,多粘菌素、杆菌肽)和双效菌素(zwittermicin)。在某些实施方案中,治疗剂选自异烟肼、多柔比星、链霉素和四环素。

[0047] 在一些实施方案中,治疗剂包含高能杀伤同位素,该高能杀伤同位素具有杀伤巨噬细胞和周围巨噬细胞环境中的组织的能力。合适的放射性同位素包括: $^{210/212/213/214}\text{Bi}$ 、 $^{131/140}\text{Ba}$ 、 $^{11/14}\text{C}$ 、 ^{51}Cr 、 $^{67/68}\text{Ga}$ 、 ^{153}Gd 、 ^{99}mTc 、 $^{88/90/91}\text{Y}$ 、 $^{123/124/125/131}\text{I}$ 、 $^{111/115}\text{mIn}$ 、 ^{18}F 、 ^{105}Rh 、 ^{153}Sm 、 ^{67}Cu 、 ^{166}Ho 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 和 ^{188}Re 、 $^{32/33}\text{P}$ 、 $^{46/47}\text{Sc}$ 、 $^{72/75}\text{Se}$ 、 ^{35}S 、 ^{182}Ta 、 $^{127/129/132}\text{Te}$ 、 ^{65}Zn 和 $^{89/95}\text{Zr}$ 。

[0048] 在其他实施方案中,治疗剂包含选自但不限于由以下组成的组的非放射性物质:Bi、Ba、Mg、Ni、Au、Ag、V、Co、Pt、W、Ti、Al、Si、Os、Sn、Br、Mn、Mo、Li、Sb、F、Cr、Ga、Gd、I、Rh、Cu、Fe、P、Se、S、Zn和Zr。

[0049] 在更进一步的实施方案中,治疗剂选自由细胞抑制剂、烷化剂、抗代谢物、抗增殖剂、微管蛋白结合剂、激素和激素拮抗剂、蒽环类药物、长春花药物、丝裂霉素、博来霉素、细胞毒性核苷、蝶啶药物、二炔、鬼臼毒素、有毒酶和放射增敏药物组成的组。作为更具体的实例,治疗剂选自自由以下组成的组:替莫唑胺、氮芥、三乙烯磷酰胺、环磷酰胺、异环磷酰胺、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、白消安、美法仑、三嗪酮、亚硝基脲类化合物、阿霉素、洋红霉素(carminomycin)、柔红霉素(道诺霉素)、多柔比星、异烟肼、吡哆美辛、镓(III)、 ^{68}Ga (III)、氨蝶呤(aminopterin)、甲氨蝶呤(methotrexate)、甲氧蝶呤(methopterin)、光神霉素、链

黑素、二氯甲氨蝶呤、丝裂霉素C、放线菌素-D、泊菲罗霉素、5-氟尿嘧啶、氟尿苷、氟托拉呋(ftorafur)、6-巯基嘌呤、阿糖胞苷(cytarabine)、阿拉伯糖胞嘧啶(cytosine arabinoside)、鬼臼毒素、依托泊苷、磷酸依托泊苷、马法兰、长春碱、长春新碱、异长春碱、长春地辛、环氧长春碱、紫杉醇(taxol)、紫杉烷、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、依米汀、替诺泊苷、秋水仙碱、二羟基蒽醌二酮(Dihydroxy anthracin dione)、米托蒽醌、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔、嘌呤霉素、蓖麻毒蛋白A亚基、相思豆毒素、白喉毒素、肉毒杆菌、蓝藻毒素、石房蛤毒素、志贺毒素、破伤风、河豚毒素、单端孢霉烯、致震颤真菌毒素(verrucologen)、皮质类固醇、孕激素、雌激素、抗雌激素、雄激素、芳香酶抑制剂、加利车霉素、埃斯培拉霉素(esperamicin)和达内霉素(dynemicin)。

[0050] 在其中治疗剂是激素或激素拮抗剂的实施方案中,治疗剂可以选自由泼尼松、羟孕酮、美屈孕酮(medroprogesterone)、己烯雌酚、他莫昔芬、睾酮和氨鲁米特组成的组。

[0051] 在其中治疗剂是前药的实施方案中,治疗剂可选自由可转化为更具活性的细胞毒性游离药物的含磷酸酯的前药、含硫代磷酸酯的前药、含硫酸酯的前药、含肽的前药、(-含内酰胺的前药、含任选取代的苯氧乙酰胺的前药、含任选取代的苯基乙酰胺的前药、5-氟胞嘧啶和5-氟尿苷前药组成的组。

[0052] 在一些实施方案中,活性组分是细胞毒性剂或包含细胞毒性剂。在一些实施方案中,细胞毒性剂是化疗剂、抗微管蛋白剂、DNA修饰剂或小干扰核糖核酸。在一些实施方案中,细胞毒性剂选自由奥瑞斯他汀、多拉司他汀、奥瑞斯他汀E、单甲基奥瑞斯他汀E(MMAE)、单甲基奥瑞斯他汀F(MMAF)、二甲基缬氨酸-缬氨酸-多拉异亮氨酸(dolaisoleuine)-多拉脯氨酸-苯丙氨酸-对苯二胺(AFP)、5-苯甲酰戊酸-奥瑞斯他汀E酯(AEVB)、奥瑞斯他汀EB(AEB)、安丝菌素(ansamitocin)、ivlertansine/emtansine(DMI)、拉夫坦辛(ravtansine)/索拉夫坦辛(soravtansine)(DM4)、倍癌霉素(duocarmycin)、卡利奇霉素(calicheamicin)和吡咯并苯并二氮杂萘组成的组。

[0053] 有效载荷接头

[0054] 在某些实施方案中,活性组分或有效载荷直接偶联到葡聚糖主链。在一些实施方案中,活性组分经由接头连接到葡聚糖主链。接头可以是可切割的或不可切割的。在一些实施方案中,一种或多种治疗剂经由可生物降解的接头附接。在一些实施方案中,可生物降解的接头是酸敏感的,诸如脲接头。酸敏感接头的使用使药物能够被转运到细胞中并且允许药物基本上在细胞内部释放。在一些实施方案中,有效载荷接头是Val-Cit接头。

[0055] 有效载荷接头可包含氨基甲酸酯基团。在一些实施方案中,有效载荷接头包含氨基甲酸酯基团和链部分,其中氨基甲酸酯基团连接至主链单体并且链部分连接氨基甲酸酯基团和活性组分。在本文中,氨基甲酸酯官能团采用源自有机化学领域的简单而普通的含义。在一些实施方案中,有效载荷接头的链部分包含一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)单元,该单元选自由以下组成的组:任选经取代的亚烷基链、任选经取代的C₀-亚烷基链、肽链、聚合物链和选自由O原子、S原子和任选经取代的N原子组成的组的杂原子。在一些实施方案中,链部分包含C₁-C₁₂亚烷基链。在一些实施方案中,链部分包含C₃-C₇亚烷基链。在一些实施方案中,链部分包含C₆亚烷基链。在一些实施方案中,链部分是C₆亚烷基链。在一些实施方案中,亚烷基链被一个或多个选自由以下组成的组的取代基取代:氧代、OH、NH₂、SH、C₁-C₁₂烷基、C₁-C₁₂卤代烷基、O(C₁-C₁₂烷基)、O(C₁-C₁₂卤代烷基)、NH(C₁-C₁₂烷基)、NH(C₁-

C_{12} 卤代烷基)、 $N(C_1-C_{12}烷基)_2$ 、 $N(C_1-C_{12}卤代烷基)_2$ 、 $S(C_1-C_{12}烷基)$ 、 $S(C_1-C_{12}卤代烷基)$ 、 $C(O)OH$ 、 $C(O)O(C_1-C_{12}烷基)$ 、 $C(O)O(C_1-C_{12}卤代烷基)$ 、 $C(O)NH(C_1-C_{12}烷基)$ 、 $C(O)NH(C_1-C_{12}卤代烷基)$ 、 $C(O)N(C_1-C_{12}烷基)_2$ 、 $C(O)N(C_1-C_{12}卤代烷基)_2$ 、 $C(O)S(C_1-C_{12}烷基)$ 和 $C(O)S(C_1-C_{12}卤代烷基)$ 。在一些实施方案中,亚烷基链是未经取代的。

[0056] 次级有效载荷和接头

[0057] 除了靶向、诊断和治疗有效载荷之外,本文公开的化合物还可以涵盖可与葡聚糖主链偶联以添加额外功能能力的次级剂。通常,次级有效载荷以与用于将靶向部分偶联至靶向接头的方式类似的方式被偶联至接头。

[0058] 次级有效载荷可以涵盖例如用于成像、疗法或用于其他目的的附加剂。具体而言,在一个实施方案中,可将治疗剂和显像剂的组合连接至葡聚糖主链以组合诊断功能和治疗功能。在另一个实施方案中,可以将各种氨基酸诸如半胱氨酸或赖氨酸偶联至接头以将该分子交联至靶标。

[0059] 次级有效载荷接头是将葡聚糖主链连接至次级有效载荷部分的可切割或不可切割的接头。可切割的接头能够被酶(例如,蛋白酶)、温度变化、pH变化、化学刺激或它们的任意组合切割。可切割的接头可包含蛋白酶切割位点。在一些实施方案中,可切割的接头能够被溶酶体蛋白酶或内体蛋白酶切割。

[0060] 次级有效载荷可包含氨基甲酸酯基团。在一些实施方案中,次级有效载荷接头包含氨基甲酸酯基团和链部分,其中氨基甲酸酯基团连接至主链单体并且链部分连接氨基甲酸酯基团和次级剂。在本文中,氨基甲酸酯官能团采用源自有机化学领域的简单而普通的含义。在一些实施方案中,次级有效载荷接头的链部分包含一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)单元,该单元选自由以下组成的组:任选经取代的亚烷基链、任选经取代的CO-亚烷基链、肽链、聚合物链和选自由O原子、S原子和任选经取代的N原子组成的组的杂原子。在一些实施方案中,链部分包含 C_1-C_{12} 亚烷基链。在一些实施方案中,链部分包含 C_3-C_7 亚烷基链。在一些实施方案中,链部分包含 C_6 亚烷基链。在一些实施方案中,链部分是 C_6 亚烷基链。在一些实施方案中,亚烷基链被一个或多个选自由以下组成的组的取代基取代:氧代、OH、 NH_2 、SH、 C_1-C_{12} 烷基、 C_1-C_{12} 卤代烷基、 $O(C_1-C_{12}烷基)$ 、 $O(C_1-C_{12}卤代烷基)$ 、 $NH(C_1-C_{12}烷基)$ 、 $NH(C_1-C_{12}卤代烷基)$ 、 $N(C_1-C_{12}烷基)_2$ 、 $N(C_1-C_{12}卤代烷基)_2$ 、 $S(C_1-C_{12}烷基)$ 、 $S(C_1-C_{12}卤代烷基)$ 、 $C(O)OH$ 、 $C(O)O(C_1-C_{12}烷基)$ 、 $C(O)O(C_1-C_{12}卤代烷基)$ 、 $C(O)NH(C_1-C_{12}烷基)$ 、 $C(O)NH(C_1-C_{12}卤代烷基)$ 、 $C(O)N(C_1-C_{12}烷基)_2$ 、 $C(O)N(C_1-C_{12}卤代烷基)_2$ 、 $C(O)S(C_1-C_{12}烷基)$ 和 $C(O)S(C_1-C_{12}卤代烷基)$ 。在一些实施方案中,亚烷基链是未经取代的。

[0061] 在一些实施方案中,所述一个或多个次级有效载荷部分通过接头附接至葡聚糖主链。所述接头可以附接在约1%至约50%的主链部分上。

[0062] 诊断方法

[0063] 公开了使用所公开的化合物在体内检测疾病或病症的诊断方法。在某些实施方案中,所公开的化合物包括检测。如本文所用,术语“可检测标记或部分”是指这样的原子、同位素或化学结构,其:(1)能够附接至载体分子;(2)对人类或其他哺乳动物受试者无毒;以及(3)提供可直接或间接检测的信号,特别是不仅可测量而且强度与可检测部分的量相关(例如,成比例)的信号。该信号可以通过任何合适的方式检测,该方式包括光谱、电、光、磁、听觉、无线电信号或触诊检测方式。

[0064] 检测标记包括但不限于荧光分子(又名荧光染料和荧光团)、化学发光试剂(例如鲁米诺)、生物发光试剂(例如荧光素和绿色荧光蛋白(GFP))、金属(例如金纳米颗粒)和放射性的同位素(放射性同位素)。可以基于对成像方法的挑选来选择合适的检测标记。例如,检测标记可以是用于光学成像的近红外荧光染料、用于MRI成像的钆螯合物、用于PET或SPECT成像的放射性核素或用于CT成像的金纳米颗粒。

[0065] 所公开的化合物可以包括可用于光学成像的可检测标记。许多方法可用于光学成像。各种方法依赖于作为造影来源的荧光、生物发光、吸收或反射。荧光团是吸收特定波长的能量并以不同的(但同样特定的)波长重新发射能量的化合物或部分。在某些实施方案中,可检测标记是近红外(NIR)荧光团。合适的NIR包括但不限于VivoTag-S.RTM.680和750,Kodak X-SIGHT染料和缀合物,DyLight 750和800Fluors,Cy 5.5和7Fluors,Alexa Fluor 680和750Dyes,以及IRDye 680和800CW Fluors。在某些实施方案中,具有光稳定性和明亮发射的量子点也可以与光学成像一起使用。在某些实施方案中,预先存在的手术显微镜可以通过向光源添加滤波器来调适用于“绿色”通道。

[0066] 所公开的化合物可以包括可用于核医学成像的可检测标记(例如,放射性核素)。核医学成像涉及在身体中使用和检测放射性同位素。核医学成像技术包括闪烁显像、单光子发射计算机断层扫描(SPECT)和正电子发射断层扫描(PET)。在这些技术中,来自放射性同位素的辐射可以被伽马照相机捕获以形成二维图像(闪烁显像)或3维图像(SPECT和PET)。

[0067] 可将所公开的化合物与分子成像组合使用以使用体内成像装置来检测癌细胞,诸如已经转移并因此扩散到身体的另一个器官或组织的癌细胞。因此提供了一种用于检测受试者中的癌细胞的非侵入性方法,该方法涉及向受试者施用含有所公开化合物的药物组合物,以及然后使用成像装置检测所公开化合物的生物分布。在一些实施方案中,所述药物组合物被注射到实质中。在其他实施方案中,所述药物组合物被注射到循环中。

[0068] 所公开的化合物也可用于术中癌症检测。例如,所公开的化合物可用于术中淋巴图谱分析(ILM)以追踪癌症患者的淋巴引流模式,以评价潜在的肿瘤引流和癌症在淋巴组织中的扩散。在这些实施方案中,所公开的化合物被注射到肿瘤中并且它们通过淋巴系统的运动使用分子成像装置被追踪。作为另一个实例,所公开的化合物可用于术中评估例如肿瘤边缘和肿瘤邻近组织中癌细胞的存在。这可用于例如有效切除肿瘤和检测肿瘤附近癌症的扩散。在一些实施方案中,所公开的化合物能够穿过血肿瘤屏障。在一些实施方案中,所公开的化合物能够携带有效载荷进入脑肿瘤并穿过血肿瘤屏障而不会穿过血脑屏障渗漏。

[0069] 所公开的用于检测癌细胞的成像方法在本文中称为非侵入性的。非侵入性意指可以从受试者身体外部检测所公开的化合物。这通常意味着信号检测装置位于受试者身体的外部。然而,应当理解,也可以从受试者体内部或从受试者胃肠道内部或从受试者呼吸系统内部检测所公开的化合物,并且也特别考虑了此类成像方法。例如,对于术中检测,信号检测装置可以位于受试者身体的外部或内部。由此应当理解,非侵入性成像方法可以与侵入性程序(例如外科手术)一起使用、同时使用或组合使用。

[0070] 在一些实施方案中,该方法可用于诊断受试者的癌症或检测受试者特定器官的癌症。这种方法的一个特别有用的方面是能够在次级组织或器官(诸如淋巴结)或肿瘤边缘处

或肿瘤边缘附近搜索转移性癌症细胞。因此,所公开的方法可用于评估患有或疑似患有癌症诸如乳腺癌的患者的淋巴结状态。这可以避免需要对组织或器官进行活组织检查,例如去除淋巴结。在一些实施方案中,该方法涉及向患者施用所公开的化合物以及检测该化合物是否已经结合到淋巴结中的细胞。在这些实施方案的一些中,淋巴结可以是腋窝淋巴结(ALN)。在其他实施方案中,淋巴结可以是前哨淋巴结。在进一步的实施方案中,可以在腋窝淋巴结和前哨淋巴结两者中评估所述剂与淋巴结中细胞的结合。

[0071] 所述方法还可以与其他治疗或诊断方法一起使用。例如,所述方法也可以在手术过程中被用来例如指导癌症切除,这在本文中被称作“术中指导”或“图像引导手术”。在一个特定的实施方案中,所述方法可用于治疗性治疗以去除或破坏患者淋巴结中的癌细胞。例如,可以将所公开的化合物施用于患者,并且可以使用图像引导手术来确定和移除癌组织(例如,淋巴结)的位置。在另一个优选的实施方案中,所述方法可用于治疗性治疗以防止肿瘤切除后的阳性显微镜切缘。例如,可以将所公开的化合物施用于患者,可以确定肿瘤周围癌细胞的位置,并使用图像引导手术去除整个肿瘤。在这些实施方案中,医师将所公开的化合物施用于患者并使用成像装置来检测癌细胞、指导组织切除并确保去除所有癌症。此外,成像装置可以在手术后被用来确定是否有任何癌症残留或复发。

[0072] 在一些实施方案中,所公开的化合物可连接至治疗化合物。所述治疗化合物或部分可以是直接杀死或抑制癌细胞的化合物或部分(例如,顺铂),或者它可以是可间接杀死或抑制癌细胞的化合物或部分(例如,在使用光源加热时杀死或破坏癌细胞的金纳米颗粒)。如果所述治疗化合物或部分为间接杀死或抑制癌细胞的化合物或部分,则所述方法进一步包括采取用于“活化”或以其他方式实现所述化合物或部分的抗癌活性的适当行动的步骤。在一个具体的实施方案中,附接到所述剂的所述治疗化合物或部分可以是金纳米颗粒,并且在向患者施用所述剂并且所述剂与癌细胞结合之后,金纳米颗粒被加热(例如使用激光加热)以杀死或破坏附近的癌细胞(光热消融)。例如,在一些实施方案中,所述方法涉及通过使用所公开的化合物来检测和切除来自受试者的癌症,然后使用连接至治疗化合物的相同或不同的所公开的化合物来杀死剩余的癌细胞进行的图像引导手术。

[0073] 所公开方法的癌症可以是受试者中任何正在经历不受调节的生长的细胞。所述癌症可以是任何能够转移的癌细胞。例如,所述癌症可以是肉瘤、淋巴瘤、白血病、癌、母细胞瘤或生殖细胞瘤。所公开的组合物可用于检测的代表性但非限制性癌症列表包括淋巴瘤、B细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、蕈样肉芽肿、霍奇金氏病、骨髓性白血病、多发性骨髓瘤、膀胱癌、脑癌、神经系统癌、头颈癌、头颈鳞状细胞癌、肾癌、诸如小细胞肺癌和非小细胞肺癌的肺癌、神经母细胞瘤/胶质母细胞瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、皮肤癌、肝癌、黑色素瘤、口腔鳞状细胞癌、咽喉癌、喉癌和肺癌、结肠癌、宫颈癌(cervical cancer)、宫颈癌(cervical carcinoma)、乳腺癌、三阴性乳腺癌、上皮癌、肾癌、泌尿生殖系统癌症、肺癌、食道癌、头颈癌、大肠癌、造血系统癌症;睾丸癌;结肠癌和直肠癌、前列腺癌、胶质肉瘤、卡波西肉瘤、食道癌、肝细胞癌和胰腺癌。

[0074] 所述癌症可以是乳腺癌。起源于导管的乳腺癌被称为导管癌,并且起源于为导管提供乳汁的小叶的乳腺癌被称为小叶癌。乳腺癌转移的常见部位包括骨、肝、肺和脑。

[0075] 所述癌症可以是非小细胞肺癌(NSCLC)。NSCLC是除小细胞肺癌(SCLC)之外的任何类型的上皮性肺癌。最常见的NSCLC类型是鳞状细胞癌、大细胞癌和腺癌,但还有其他几种

发生频率较低的类型,所有类型都可能以不寻常的组织学变体的形式以及作为混合细胞类型组合出现。

[0076] 治疗方法

[0077] 使用所公开的化合物提供了治疗或预防疾病或病症的方法。所公开的化合物可用于靶向CD206⁺表达细胞。所公开的化合物可用于靶向巨噬细胞以治疗细胞内病原体(结核分枝杆菌(*M.tuberculosis*)、土拉热弗朗西斯菌(*F.tularensis*)、伤寒沙门氏菌(*S.typhi*))。所公开的化合物可用于靶向例如待用于治疗癌症的肿瘤相关巨噬细胞。

[0078] 可使用本文中的组合物和方法的与巨噬细胞相关的以及其它与高表达CD206的细胞相关的疾病包括但不限于:急性播散性脑脊髓炎(ADEM)、艾迪生病、丙种球蛋白缺乏血症、过敏性疾病、斑秃、阿尔茨海默病、肌萎缩侧索硬化、强直性脊柱炎、抗磷脂综合征、抗合成酶综合征、动脉斑块病症、哮喘症、动脉粥样硬化、特应性变态反应、特应性皮炎、自身免疫性再生障碍性贫血、自身免疫性心肌病、自身免疫性肠病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、自身免疫性甲状腺功能减退、自身免疫性内耳病、自身免疫性淋巴组织增生综合征、自身免疫性周围神经病变、自身免疫性胰腺炎、自身免疫性多内分泌腺病综合征、自身免疫性孕酮皮炎、自身免疫性血小板减少性紫癜、自身免疫性荨麻疹、自身免疫性葡萄膜炎、贝罗病(Balo disease)/贝罗同心圆性硬化(Balo concentric sclerosis)、贝西氏病(disease)、Berger病、Bickerstaff氏脑炎、布劳综合征(Blau syndrome)、大疱性类天疱疮、卡斯尔曼病(Castleman's disease)、乳糜泻、查加斯病(Chagas disease)、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、慢性复发性多病灶性骨髓炎、慢性阻塞性肺疾病、慢性静脉淤积性溃疡、变应性肉芽肿性血管炎(Churg-Strauss syndrome)、瘢痕性类天疱疮、寇甘综合征、冷凝集素疾病、补体成分2缺乏、接触性皮炎、颅动脉炎、CREST综合征、克罗恩氏病(Crohn's disease)、库欣综合征、皮肤白细胞破碎性血管炎、德戈氏病(Dego's disease)、德尔肯氏病、疱疹样皮炎、皮炎、I型糖尿病、II型糖尿病、弥漫性皮肤系统性硬化症、德雷斯勒综合征、药物诱导的狼疮、盘状红斑狼疮、湿疹、肺气肿、子宫内膜异位症、与起止点炎相关的关节炎、嗜酸细胞性筋膜炎、嗜酸细胞性胃肠炎、嗜酸细胞性肺炎、获得性大疱性表皮松解症、结节性红斑、胎儿红血球母细胞增多症、特发性混合性冷球蛋白血症、埃文斯综合征、进行性骨化性纤维发育不良(fibrodysplasia ossificans progressive)、纤维化肺泡炎(或者特发性肺纤维化)、胃炎、胃肠道类天疱疮、戈谢病(Gaucher's disease)、肾小球肾炎、肺出血-肾炎综合征(Goodpasture's syndrome)、格雷夫斯病、格-巴二氏综合征(GBS)、桥本脑病、桥本甲状腺炎、心脏病、过敏性紫癜、妊娠疱疹(又称作妊娠性类天疱疮)、化脓性汗腺炎、组织细胞增多症、休-斯二氏综合征、低丙球蛋白血症、感染性疾病(包括细菌感染性疾病)、特发性炎症性脱髓鞘疾病、特发性肺纤维化、特发性血小板减少性紫癜、IgA肾病、包涵体肌炎、炎症性关节炎、炎症性肠病、炎性痴呆、间质性膀胱炎、间质性肺炎、青少年特发性关节炎(又称作幼年型类风湿关节炎)、川崎病、兰伯特肌无力综合征、白细胞碎裂性血管炎、扁平苔藓、硬化性苔藓、线状IgA病(LAD)、类狼疮性肝炎(又称作自身免疫性肝炎)、红斑狼疮、淋巴瘤样肉芽肿病、马吉德综合征(Majeed syndrome)、恶性肿瘤(包括癌症(例如肉瘤、淋巴瘤、白血病、癌和黑色素瘤)、美尼尔氏病、显微镜下多血管炎、米勒·费希尔综合征、混合性结缔组织病、硬斑病、Mucha-Habermann病(又称作急性苔藓痘疮样糠疹)、多发性硬化、重症肌无力、肌炎、发作性睡病、视神经脊髓炎(又称作德维克病)、神经性肌强直、眼瘢痕性

类天疱疮、眼阵挛-肌阵挛综合征、奥德氏甲状腺炎 (Ord's thyroiditis)、复发性风湿病、PANDAS (儿童链球菌感染相关性自身免疫性神经精神障碍)、副肿瘤性小脑变性、帕金森病症、阵发性睡眠性血红蛋白尿症 (PNH)、帕-罗二氏综合征、Parsonage-Turner 综合征、睫状体扁平部炎、寻常型天疱疮、外周动脉疾病、恶性贫血、静脉周脑脊髓炎、POEMS 综合征、结节性多动脉炎、风湿性多肌痛、多肌炎、原发性胆汁性肝硬变、原发性硬化性胆管炎、进展性炎症性神经病、银屑病、银屑病关节炎、坏疽性脓皮病、纯红细胞再生障碍、罗斯默森氏症、雷诺现象、复发性多软骨炎、莱特尔综合征、再狭窄、下肢不宁综合征、腹膜后纤维化、类风湿性关节炎、风湿热、Rosai-Dorfman disease、结节病、精神分裂症、施密特综合征、Schnitzler 综合征、巩膜炎、硬皮病、败血症、血清病、干燥综合征、脊椎关节病、斯提耳病 (成人期发病)、僵人综合征、中风、亚急性细菌性心内膜炎 (SBE)、Susac 综合征、Sweet 综合征、西德纳姆舞蹈病、交感性眼炎、系统性红斑狼疮、高安动脉炎、颞动脉炎 (又称作“巨细胞动脉炎”)、血小板减少、痛性眼肌麻痹综合征)、移植 (例如心/肺移植) 排斥反应、横贯性脊髓炎、结核病、溃疡性结肠炎、未分化结缔组织病、未分化脊柱关节病、荨麻疹性血管炎、血管炎、白癜风以及韦格纳肉芽肿病 (Wegener's granulomatosis)。

[0079] 所公开的化合物可包括治疗剂,包括但不限于细胞毒性剂、抗血管生成剂、促凋亡剂、抗生素、激素、激素拮抗剂、趋化因子、药物、前药、毒素、酶或其他剂。所公开的化合物可包括化疗剂;抗生素;免疫佐剂;可用于治疗结核病的化合物;类固醇;核苷酸;多肽;或蛋白质,诸如上述那些。

[0080] 在某些实施方案中,所公开的化合物包括用于治疗或预防癌症的化疗剂。所述癌症可以是任何能够转移的癌细胞。例如,所述癌症可以是肉瘤、淋巴瘤、白血病、癌、母细胞瘤或生殖细胞瘤。所公开的组合物可用于治疗或预防的代表性但非限制性癌症列表包括淋巴瘤、B 细胞淋巴瘤、T 细胞淋巴瘤、蕈样肉芽肿、霍奇金氏病、骨髓性白血病、膀胱癌、脑癌、神经系统癌、头颈癌、头颈鳞状细胞癌、肾癌、诸如小细胞肺癌和非小细胞肺癌的肺癌、神经母细胞瘤/胶质母细胞瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、皮肤癌、肝癌、黑色素瘤、口腔鳞状细胞癌、咽喉癌、喉癌和肺癌、结肠癌、宫颈癌 (cervical cancer)、宫颈癌 (cervical carcinoma)、乳腺癌、三阴性乳腺癌、上皮癌、肾癌、泌尿生殖系统癌症、肺癌、食道癌、头颈癌、大肠癌、造血系统癌症;睾丸癌;结肠癌和直肠癌、前列腺癌、胶质肉瘤、卡波西肉瘤、食道癌、肝细胞癌和胰腺癌。

[0081] 在某些实施方案中,所公开的化合物可有效治疗自身免疫性疾病,诸如类风湿性关节炎、狼疮 (SLE) 或血管炎。在某些实施方案中,所公开的化合物可有效治疗炎性疾病,诸如克罗恩氏病、炎症性肠病或胶原-血管疾病。

[0082] 本领域普通技术人员将理解,可以使用所公开的化合物将各种分子和化合物 (例如,治疗剂、检测标记以及它们的组合) 递送至细胞或组织。

[0083] 在一方面,本文提供了一种治疗结核病的方案,其包括向有需要的受试者施用如本文所述的化合物。

[0084] 在另一方面,本文提供了诊断和治疗巨噬细胞介导的病症的方案,其包括向有需要的受试者施用有效量的如本文所述的化合物;以及在受试者的预定位置处检测检测标签。

[0085] 在另一方面,本文提供了治疗巨噬细胞介导的病症的方案,其包括向有需要的受

试者施用有效量的如本文所述的化合物。

[0086] 在另一方面,本文提供了一种治疗疾病的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的如本文所述的化合物,其中所述疾病是自身免疫性疾病、炎性疾病或癌症。

[0087] 在另一方面,本文提供了靶向肿瘤相关巨噬细胞的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的如本文所述的化合物。

[0088] 在另一方面,本文提供了根据本文所述的方法中的任一者的方法,其中所述化合物含有至少一种治疗剂和至少一种检测标记。

[0089] 在另一方面,本文提供了根据本文所述的方法中的任一者的方法,其中接头被用于衔接一种或多种CD206靶向部分、一种或多种治疗剂和/或一种或多种检测标记

[0090] 在另一方面,本文提供了根据本文所述的方法中的任一者的方法,其中所述巨噬细胞介导的病症选自结核病和利什曼病组成的组。

[0091] 在另一方面,本文提供了根据本文所述的方法中的任一者的方法,其中所述疾病是类风湿性关节炎。

[0092] 在另一方面,本文提供了根据本文所述的方法中的任一者的方法,其中所述病症是癌症。

[0093] 在另一方面,本文提供了根据本文所述的方法中的任一者的方法,其中所述癌症是肉瘤、淋巴瘤、白血病、癌、母细胞瘤、黑素瘤或生殖细胞瘤。

[0094] 在另一方面,本文提供了根据本文所述的方法中的任一者的方法,其中至少一个A是检测标记并且检测标记是荧光团。

[0095] 在另一方面,本文提供了根据本文所述的方法中的任一者的方法,其中至少一个 L_{1-A} 包含螯合剂

[0096] 施用

[0097] 所公开的化合物可以经由任何合适的方法施用。所公开的化合物可以肠胃外施用到实质或循环中,以便所公开的化合物到达靶组织(例如,癌细胞可能位于的地方)。所公开的化合物可以直接施用到肿瘤块中或肿瘤块附近。所公开的化合物可以静脉内施用。在又其他实施方案中,所公开的化合物可以经口、腹膜内、肌内、皮下、腔内或经皮施用。

[0098] 所述化合物的肠胃外施用(如果使用的话)通常以注射为特征。注射剂可以常规形式被制备,被制备为液体溶液或悬浮液、适合于在注射前溶解或悬浮在液体中的固体形式,或者制备为乳液。经修正的肠胃外施用方法涉及使用缓慢释放或持续释放系统,以维持恒定剂量。

[0099] 一般合成方法

[0100] 现在将通过参考下文中本公开的组合物的一般制备的说明性合成方案和随后的具体实施例来对本公开的组合物进行描述。技术人员将认识到,为了获得本文中的各种组合物,可以适当地选择原料,使得最终期望的取代基将在有或没有适当保护的情况下完成反应方案以产生期望的产物。替代地,可能有必要或期望采用可以完成反应方案并且在适当的时候被期望的取代基替换的合适的基团来代替最终期望的取代基。此外,本领域技术人员将认识到,保护基可以用于保护某些官能团(氨基、羧基或侧链基团)免受反应条件的影响,并且在适当时在标准条件下将此类基团去除。

[0101] 色谱法、重结晶和其他常规分离程序也可以用于中间体或最终产物,其中期望获

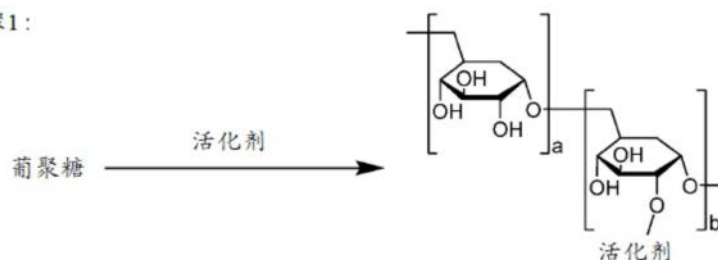
得化合物的特定异构体或期望以其他方式纯化反应产物。

[0102] 制备本文所述的组合物的一般方法描述于以下示例性方法中。

[0103] 在一些实施方案中,本文所述的组合物可根据方案A1中所示的程序合成。

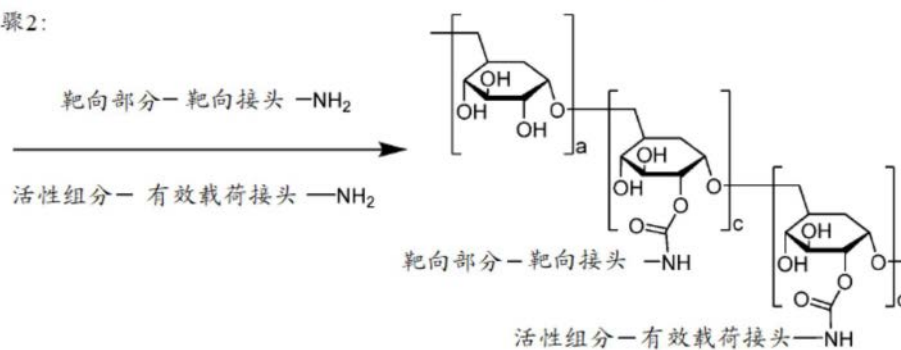
[0104] 方案A1

步骤1:



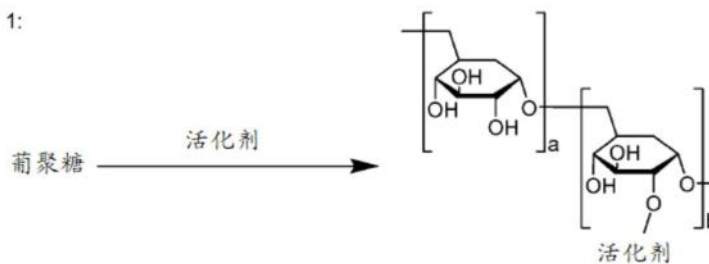
[0105]

步骤2:

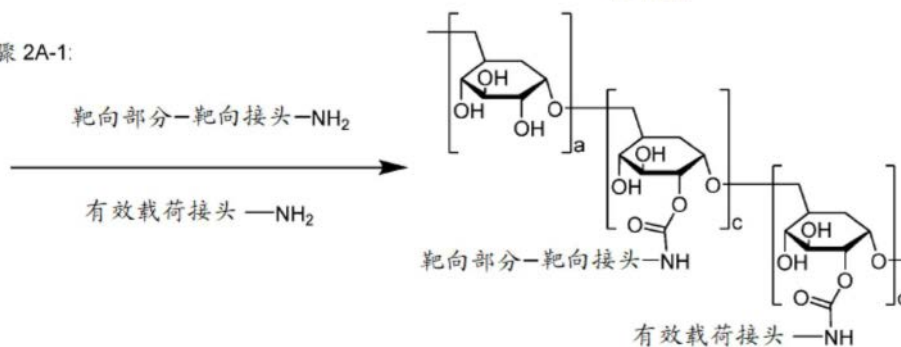


[0106] 方案A2

步骤 1:

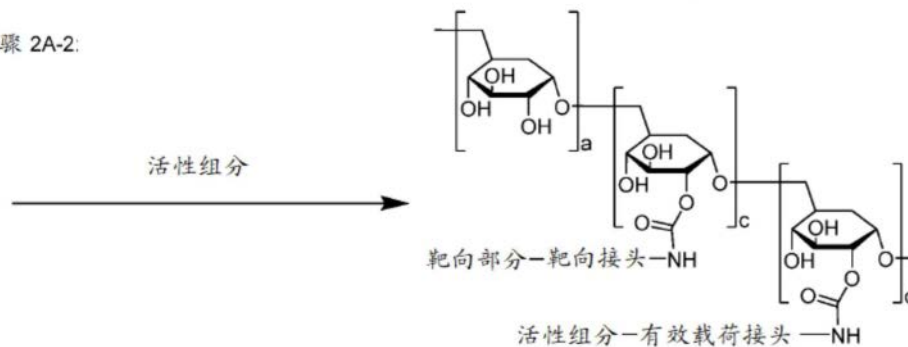


步骤 2A-1:



[0107]

步骤 2A-2:



[0108] 如从以上方案中可以看出,使葡聚糖化合物(诸如葡聚糖或环糊精)与活化剂反应。然后可以使所得活化的葡聚糖衍生物与适当的试剂反应,以引入经由靶向接头与葡聚糖主链偶联的靶向部分,以及经由有效载荷接头与葡聚糖主链连接的活性组分。熟练的技术人员将认识到以上方案是说明性的并且各种试剂和合成步骤的顺序可以根据获得预期最终产物的需要而变化。

[0109] 实施例

[0110] 下面的实施例仅仅是为了说明的目的而被包括在内,并非意在限制本发明的范围。

[0111] 实施例1:目标物3(与FITC缀合的测试化合物)的结构和合成

[0112] 目标物3,如图1所示,由与FITC有效载荷缀合的甘露糖化葡聚糖主链组成。甘露糖与葡聚糖主链的附接充当甘露糖结合位点的靶向配体,而FITC允许使用共聚焦或手术显微镜检测测试化合物。此处介绍的葡聚糖主链的分子量为约10kDa。

[0113] 实施例2:CD206⁺巨噬细胞对FITC缀合的药物目标物3的内化

[0114] 时程内吞(time course endocytosis)测定用于评估巨噬细胞对目标物3的内化,目标物3是一种由葡聚糖主链组成的构建体,该葡聚糖主链具有作为与FITC缀合的靶向部分的甘露糖。解决测试化合物是简单地结合到表面还是被巨噬细胞内化对于评价该化合物达到所需药物靶标的潜力至关重要。使用共聚焦显微术经34分钟监测CD206⁺巨噬细胞和人胚胎肾细胞(HEK293) (ATCC[®]CRL-1573TM) (一种缺乏CD206表达的细胞系)的摄取。无抗体且表达抗CD206⁺抗体的巨噬细胞和HEK293细胞被包括在测定中以确定该抗体是否会阻断目标物3的摄取。

[0115] 为内吞测定准备板,将1mg/ml纤连蛋白原液在不含Ca⁺/Mg⁺的PBS中稀释至10μg/mL。然后,将20μL经稀释的纤连蛋白溶液添加到384孔板(Perkin Elmer LLC CellCarrierTM-384Ultra Microplate)的每个孔中。在吸出过量的纤连蛋白溶液之前,将板在RT下放置的水平表面上60分钟。立即使用纤连蛋白包被的板,或将其在层流台下风干并在4℃下储存最多2周。

[0116] 将收获的巨噬细胞和HEK293细胞在各自的生长培养基中稀释至160,000个细胞/毫升的密度(4,000个细胞/孔,在25μL中)。将细胞因子和LPS添加到

[0117] 完整的M1-巨噬细胞生成培养基DXF中。将细胞(25μL)添加到所需的孔中并让该细胞粘附过夜。

[0118] 第二天早上,将测试化合物目标物3在DMSO中稀释,并利用Echo 555液体处理器使用十点三倍稀释系列以50μM的最高最终浓度将该化合物添加到所需的孔中。特定孔仅用DMSO处理。添加测试化合物后,立即以1μg/mL的最终浓度以50μL的最终体积将核染色剂Hoechst添加到所有板孔中。然后将细胞在37℃下在含5% CO₂的加湿培养箱中温育10分钟。

[0119] 使用Opera PhenixTM高内涵筛选系统使用共聚焦成像利用20X water物镜、每孔9个视野以及Hoechst和Alexa 488滤波器对板孔进行成像。在添加Hoechst后10、20和34分钟对孔进行成像。

[0120] 使用哥伦比亚图像数据存储与分析系统(Columbus Image Data Storage and Analysis System)对图像进行分析,以生成巨噬细胞和HEK293细胞的细胞核和细胞质中复

合荧光强度的定量测量值,并确定复合荧光强度高于背景水平(在这种情况下 ≥ 20 , 000RFU)的细胞数目。使用Microsoft Excel以图形格式比较巨噬细胞和HEK293细胞的定量数据。

[0121] 在与50 μ M目标物3一起温育后检测目标物3的内化百分比。10分钟后,有抗体和无抗体的巨噬细胞几乎100%内化了目标物3,这表明目标物3达到了所需的药物靶点,并且抗CD206⁺抗体不干扰化合物摄取。这个平均细胞摄取百分比在整个测定过程(即34分钟)中保持不变。相比之下,两组HEK293细胞对目标物3的摄取在34分钟时都 $<26\%$ 。

[0122] 作为参考,还在巨噬细胞和HEK293细胞中评价了10,000MW葡聚糖pHrodoTMgreen的摄取。考虑了在结合和细胞摄取之间的分辨(resolution),pHrodoTMgreen葡聚糖在酸性条件下发出强烈的荧光,但在中性pH值下相对不发出荧光。pHrodoTMgreen的内化随时间增加,在17小时时达到90%的摄取。HEK293细胞的摄取在其他时间点检测不到,但在17小时时达到14%。与10分钟后目标物3的巨噬细胞内化相比,相似百分比的经人巨噬细胞内化的pHrodoTMgreen在17小时后出现。

[0123] 实施例3:目标物-5(一种由通过缬氨酸-瓜氨酸接头连接到毒素单甲基奥瑞斯他汀E的甘露糖基化葡聚糖配体组成的靶向性化疗药物)的结构和合成

[0124] 目标物-5由四个组分(ABCD)组成。为了形成甘露糖结合位点靶向部分,将葡聚糖主链(A)甘露糖化(B)。构成靶向配体的A和B组分通过缬氨酸-瓜氨酸接头(C)连接到毒素(D)。此处,接头将毒素单甲基奥瑞斯他汀E(MMAE)联接到靶向部分。代表性的目标物5分子如图2所示。

[0125] 实施例4:在用目标物-5处理后体内U87-MG肿瘤体积的减少

[0126] 使用胶质母细胞瘤小鼠模型在体内评估目标物-5(一种由经由缬氨酸-瓜氨酸接头连接到毒素单甲基奥瑞斯他汀E(MMAE)的甘露糖基化葡聚糖主链组成的化疗构建体)的抗肿瘤活性。在荷有U87-MG肿瘤的无胸腺裸小鼠中针对替莫唑胺(temozolomide)(一种经FDA批准用于治疗胶质母细胞瘤的化疗药物)和阴性对照评价了三种不同剂量的目标物-5。

[0127] 为了提供鼠类胶质母细胞瘤模型,将U87-MG(ATCC[®]HTB-14TM)细胞注射到4-6周龄的远缘无胸腺裸鼠(Jackson Laboratories)的颅骨中。在为颅内注射作准备时,U87-MG细胞在补充有Eagle最低必需培养基(EMEM)+1X青霉素/链霉素的胎牛血清中生长10-14天,然后在达到汇合后以1:5分裂。在37 $^{\circ}$ C下持续大约3-4分钟,利用每瓶3.0ml Tryp LE Express在大约70%的汇合度时从组织培养瓶中收获细胞。通过向每个75cm²瓶中加入8ml完全培养基来停止胰蛋白酶活性,并用无菌10ml stripette收集剥离的细胞。将细胞在4 $^{\circ}$ C下以1,100RPM离心4分钟,吸出上清液,并用含阳离子的无菌1X PBS洗涤细胞两次。然后将细胞重悬于1X PBS中。使用汉密尔顿注射器来颅内注射每个脑5 μ l含有500,000个细胞的体积。

[0128] 通风的动物转运站(ventilated Animal Transfer Station,ATS)的表面区域用作手术区域。在将KOPF立体定位仪和手术器械放在ATS表面之前,先用70%乙醇对ATS表面进行消毒。将小鼠麻醉以准备手术。在腹膜内注射40 μ l含氯胺酮-甲苯噻嗪混合物的无菌盐水之前,用乙醇擦拭小鼠腹部。麻醉后,通过用无菌酒精准备片(70%异丙醇)擦拭头皮来准备头皮。将眼用软膏剂涂在双眼上,以在该程序过程中保持水分。使用无菌手术刀,在头部上方制作约1cm长的矢状切口。然后使用无菌棉签涂抹器清洁和干燥暴露的颅骨表面。一旦

颅骨干燥,前囟门就可见了。

[0129] 为了建立脑内肿瘤,使用无菌的25号锋利针刺破颅骨,以在颅骨中创建一个小孔用于随后注射肿瘤细胞。在从前囟右侧3毫米、冠状缝前1毫米和距大脑皮层表面3毫米深度开始的坐标处将细胞注射到脑中。使针从表面向下移动3.5毫米,以尽量减少注射过程中细胞的回流,并创建一个小口袋以使大部分注射的细胞保持距离脑表面3毫米。将注射器垂直于颅骨放置在先前创建的颅骨孔上方,然后放低。以大约每分钟1 μ l至1.5 μ l的速率缓慢注射细胞悬液。使针头在原位再保持一分钟,然后缓慢抽出针头以减少注射的肿瘤细胞的回流。

[0130] 使用无菌干棉签清洁颅骨并且擦干颅骨。使用无菌镊子,将头皮拉到颅骨上方,并将组织胶添加到切口中。然后清洁头皮,并在切口上涂抹三联抗生素软膏剂。手术后,对小鼠进行监测,直到它们从麻醉中醒来并恢复正常活动。

[0131] 如图3所示,与用媒介物处理的小鼠相比,用目标物-5处理导致肿瘤体积(mm^3)显著减少。从用媒介物(A)、5mg/kg目标物-5(B)和50mg/kg目标物-5(C)处理的小鼠取出的肿瘤如图3所示。数据表明目标物-5具有剂量依赖性抗肿瘤活性。目标物-5剂量增加10倍导致抗肿瘤活性增加2倍。这项研究的结果表明,目标物-5的抗肿瘤功效与用于治疗胶质母细胞瘤的标准化疗药物替莫唑胺相当。

[0132] 实施例5:目标物-6(一种促进脑肿瘤实质新生血管网络术中成像和靶向性化疗药物递送的经修饰环糊精)的结构和合成

[0133] 如图4所示的目标物-6由环糊精主链、作为靶向部分的甘露糖和用于组织固定的赖氨酸组成。与FITC或其他荧光部分缀合,目标物-6通过允许准确且特异性地可视化脑肿瘤实质新生血管网络而提供了作为术中显像剂的实用性。通过将荧光部分换成接头和毒素,该构建体可进一步用作靶向性化疗药物。重要的是,具有不同形状的主链的目标物-6仍然能够穿过血肿瘤屏障。目标物-6能够携带有效载荷进入脑肿瘤并穿过血肿瘤屏障而不会穿过血脑屏障渗漏。

[0134] 实施例6:静脉内注射的荧光目标物-6环糊精化合物靶向脑肿瘤实质新生血管网络

[0135] 在体内评价目标物-6(一种用甘露糖和赖氨酸修饰的经FITC标记的环糊精)以确定它是否靶向脑肿瘤实质新生血管网络。该网络由肿瘤相关巨噬细胞血管拟态组成,该肿瘤相关巨噬细胞血管拟态是该经修饰环糊精构建体的靶点。通过目标物-6在实质中的检测程度评估该化合物作为术中显像剂的潜力。这进一步用作用于评价构建体作为位点特异性药物递送剂的效用的替代物,提供了以细胞毒性化合物对FITC的替代。目标物-6的特异性和从注射到检测的时间对于确定构建体作为术中显像剂的效用很重要。

[0136] 为评价目标物-6的体内效用,如上所述的那样植入U87-MG肿瘤细胞,并在10-12天后,将目标物-6以50mg/ml(200-250 μ l)静脉内注射到无胸腺裸小鼠的尾静脉中并且允许该目标物-6循环。在植入和初始施用后10-12天拍摄图像。在用异氟醚对小鼠实施安乐死并随后进行颈椎脱位之前,允许该化合物全身循环2或3分钟。

[0137] 然后收获脑。将收获的脑在4 $^{\circ}$ C下在4% PFA/PBS中固定过夜。第二天早上,将该脑用4毫升1X PBS冲洗,然后在4 $^{\circ}$ C下在15%蔗糖溶液中静置过夜。第二天早上,将脑转移到35%的蔗糖溶液中,将该脑在蔗糖溶液在4 $^{\circ}$ C下储存过夜。将脑在最佳切割温度化合物中

冷冻,并在低温恒温器上以60微米厚度切片。

[0138] 将切片用PBS洗涤3次,然后在黑暗中在RT下用Hoechst 33342对细胞核染色15-20分钟。将切片用PBS洗涤3次,并安装在含有一滴slowfade试剂的聚-L-赖氨酸包被的磨砂载玻片上。在所有实验中都采用了适当的非次级对照。

[0139] 所有图像均使用共聚焦激光扫描显微镜 (LSM 700or 710, Carl Zeiss) 利用Plan-Apochromat 20X/0.8, Plan-Apochromat 63X/1.40il DIC, CApochromat 40X/1.2W Korr UV-VIS物镜 (Carl Zeiss) 采集,并且用ZEN 2010软件 (Carl Zeiss) 进行加工。扫描以顺序激光发射模式进行,以避免在其他波长下扫描。使用ZEN 2010生成三维重建。使用Zeiss 710激光扫描共聚焦显微镜使用20X物镜(1 μ m步长)或63X物镜(0.3 μ m步长)获取Z堆栈,并将其在Zen软件中组装(4次实验,每次实验中n=3-5)。

[0140] 目标物-6注射后的检测是通过使用Hoechst核染色剂处理的脑在蓝色荧光通道中成像进行的。用FITC标记的标记物-6靶向脑肿瘤实质新生血管网络,表明其具有作为术中剂的潜在效用。没有因周围组织的脱靶成像而失真的特定于肿瘤的可视化对于确定所述肿瘤的大小和位置至关重要。

[0141] 此外,几乎立即定位到肿瘤以及在肿瘤组织中的长期停留(24小时)为手术提供了广阔的窗口。荧光素是时间敏感的,有时当外科医生着手处理肿瘤时染料会被冲洗掉,或者染料不是肿瘤特异性的,因为它会因其低分子量而渗漏。

[0142] 关于目标物-6作为治疗剂的潜力,可以通过用细胞毒性化合物代替FITC来利用目标物-6在肿瘤组织中的隔离作用。使用目标物-6将细胞毒性剂靶向递送至肿瘤组织将减少向周围正常脑组织的递送,从而降低脱靶毒性。

[0143] 作为参考,将单独荧光素 (FITC) 静脉内注射到荷有U87-MG肿瘤的无胸腺小鼠中。体循环5分钟后,FITC几乎没有表现出肿瘤特异性。静脉注射后两小时,FITC已从肿瘤和周围组织中基本被冲洗掉。与本文公开的分子的特异性相比,FITC对小鼠中的肿瘤缺乏特异性,这清楚地证明了用于术中成像的FITC的递送的改进。

[0144] 实施例7:目标物-7(一种包含DOTA和钆的靶向性磁共振显像剂)的合成

[0145] 合成了由靶向元件、葡聚糖主链和DOTA螯合剂组成的钆标记的构建体,以产生对肿瘤相关巨噬细胞具有特异性的能够使用MRI进行检测的化合物。示例性分子如图5所示。

[0146] 实施例8:包含DOTA和镱-177的靶向性放射治疗药物的合成

[0147] 合成了由肿瘤相关巨噬细胞靶向元件、葡聚糖主链和DOTA螯合剂组成的类似于图5所示的镱177标记的构建体,以产生具有抗实体瘤和转移性肿瘤活性的放射治疗剂。

[0148] 在对目标物-7进行MRI检测以确定原发性肿瘤和转移癌细胞的大小和位置后,将提供利用靶向性镱标记的构建体的放射疗法。随后施用目标物-7将允许评估放射治疗对一个或多个肿瘤的大小和转移的细胞的范围的功效。

[0149] 实施例9:在用目标物-5处理后体内4T1三阴性乳腺癌肿瘤体积的减少

[0150] 使用三阴性乳腺癌小鼠模型在体内评估了目标物-5的抗肿瘤活性。在BALB/c小鼠中针对紫杉醇(一种FDA批准的化疗剂)和媒介物对照评价了两种不同剂量的目标物-5。

[0151] 具体而言,在研究第0天对六周龄的雌性BALB/c小鼠(Charles River Laboratories)在第3乳腺脂肪垫区域中接种 1×10^5 个4T1三阴性乳腺癌细胞/只动物。进行随机分组;在研究开始时,肿瘤体积平均为 162 mm^3 ,体重范围为17.6-18.4gm/小鼠(n=10/

组)。

[0152] 在0.9%盐水中配制目标物-5,并且每周两次地用通过尾静脉注射的5mg/kg或15mg/kg目标物-5处理小鼠。剂量体积根据体重进行调整。紫杉醇是以15mg/kg的剂量施用的,并且是每周两次通过静脉内给予的。

[0153] 如图6所示,与用媒介物处理的小鼠相比,用目标物-5处理导致肿瘤体积(mm^3)显著减少。与用紫杉醇治疗的小鼠相比,用任一剂量的目标物-5处理的小鼠也经历了肿瘤体积的减少,其中接受15mg/kg目标物-5的小鼠经历最低的肿瘤负荷。这些数据表明目标物-5具有剂量依赖性抗肿瘤活性。此外,这些数据表明,在这个4T1三阴性乳腺癌模型中,目标物-5的抗肿瘤功效在减少肿瘤体积方面比紫杉醇更有效。

[0154] 实施例10:目标物-5延长U87胶质母细胞瘤颅内模型的存活期

[0155] 为了确定用目标物-5处理的小鼠的存活率,给小鼠植入颅内肿瘤。具体来说,在研究第0天,给所有小鼠在颅内接种U-87MG细胞(0.5×10^6 细胞/动物)。U87MG细胞已在DMEM/10% FBS中进行培养。

[0156] 手术是在通风的动物转运站的经消毒表面区域进行的。将小鼠用1.5-2%异氟醚麻醉。麻醉后,用无菌酒精准备片擦拭头皮。将Puralube Vet眼用软膏剂涂抹在双眼上。使用无菌手术刀,沿头部中心向下切开约1cm长的矢状切口以暴露颅骨。使用无菌棉签涂抹器清洁和干燥颅骨,使前囟可视化。使用无菌25号针头在立体定向坐标下制作穿过颅骨的钻孔,使用以下坐标(前囟右侧3毫米、冠状缝前侧1毫米和3毫米深度)将 0.5×10^6 个U87MG肿瘤细胞注射到5微升体积中。将针头引入3.5毫米深度,然后缩回0.5毫米以形成一个口袋,以最大限度地减少注射过程中细胞的回流。在每次细胞植入之前将细胞悬液重悬,并且以大约每分钟 $1\mu\text{l}$ 至 $1.5\mu\text{l}$ 的速率缓慢注射该细胞。使针头在原位再保持一分钟,然后缓慢抽出针头以减少注射的肿瘤细胞的回流。在肿瘤细胞植入之后,使用无菌干棉签清洁颅骨并且擦干颅骨。使用无菌镊子,用组织胶闭合切口。清洁头皮,并在切口上涂抹三联抗生素软膏剂。术后丁丙诺啡-SR以1mg/kg (1mL/kg) 用作止痛药。术后在温暖的笼子(使用循环水加热垫)中监测小鼠,直到它们恢复正常活动。

[0157] 在研究第9天,测量体重以进行随机分组,并将小鼠按体重分成3个10只动物的组,以获得相似的组间平均体重。随机分组后,开始施用测试制品(盐水或目标物t-5)。

[0158] 基于个体体重将测试制品施用给每只动物。在研究第0天,每组小鼠的平均体重为24.7克。测试制品每周两次地被静脉内施用到侧尾静脉中或被经口施用,持续45天。用于每次处理的药物都是新鲜配制的。

[0159] 每周给动物称重三次。体重减轻(与第0天相比超过20%)将导致安乐死。如果观察到体重减轻约10%,则动物将被供应每天皮下给予的0.1mL盐水、置于培养皿上的粉状和湿润食物以及置于笼子中的水凝胶。如有必要,小鼠将被给予0.1mL P0。

[0160] 每天检查小鼠是否有不适迹象,并且如果符合根据IACUC指南的标准,则处以安乐死。在研究第45天,通过异氟醚过量对所有剩余的小鼠实施安乐死。存活数据由Prism软件分析。

[0161] 如图所示7,施用目标物-5 (5mg/kg) 的小鼠比接受盐水的小鼠具有更高的存活百分比。这些数据表明,在胶质母细胞瘤颅内模型中,目标物-5不仅可以抑制肿瘤体积,而且目标物-5还提高存活率。

[0162] 实施例11:在用目标物-5处理后体内胶质瘤肿瘤体积的减少

[0163] 使用免疫活性胶质瘤小鼠模型在体内评估了目标物-5的抗肿瘤活性。在C57BL/6小鼠中针对替莫唑胺(一种FDA批准的化疗剂)和媒介物对照评价了三种不同剂量的目标物-5。

[0164] 具体而言,给雌性C57BL/6小鼠(Jackson Laboratories)接种 5×10^6 个GL261细胞(支原体检测为阴性),其存活率为96%,肿瘤转换率为100%(平板接种前的细胞传代(#7))。让肿瘤生长,直到它们达到95.1mm³的平均肿瘤体积,并且小鼠具有21.0克的平均体重。

[0165] 在0.9%盐水中配制目标物-5,并且每周两次地用通过尾静脉注射的5mg/kg、7.5mg/kg或10mg/kg目标物-5处理小鼠。剂量体积根据体重进行调整。在含10% DMSO的0.9%氯化钠中配制替莫唑胺,并且每周两次地以12.5mg/kg剂量通过灌胃处理小鼠。对于每个组,n=10。

[0166] 如图8A和8B所示,与用媒介物处理的小鼠相比,目标物-5处理以剂量依赖性方式抑制肿瘤体积(mm³)。第21天,媒介物处理的平均肿瘤体积=1687mm³,SD=928.9mm³;5mg/kg目标物-5处理的平均肿瘤体积=440.5mm³,SD=159.2mm³;7.5mg/kg目标物-5处理的平均肿瘤体积=275.1mm³,SD=120.7mm³;10mg/kg目标物-5处理的平均肿瘤体积=117.2mm³,SD=89.6mm³;替莫唑胺处理的平均肿瘤体积=302.6mm³;SD=99.7。这些数据表明,在这种具有免疫活性的小鼠胶质瘤模型中,目标物-5提供的保护大于替莫唑胺提供的保护。虽然目标物-5和替莫唑胺抑制了肿瘤体积进展,但在任何处理组中小鼠的体重都没有显著变化(图8C)。

[0167] 实施例12:在用目标物-5处理后体内MC38结肠癌肿瘤体积的减少

[0168] 使用结肠癌小鼠模型在体内评估了目标物-5的抗肿瘤活性。在C57BL/6小鼠中针对吉西他滨(一种FDA批准的化疗剂)和媒介物对照评价了两种不同剂量的目标物-5。

[0169] 具体而言,在研究第0天,给8至12周龄的C57BL/6雌性小鼠(Charles River Laboratories)在侧腹中皮下接种0.1mL/只的体积的在0%Matrigel中的 5×10^5 个MC38肿瘤细胞。当肿瘤的平均大小达到80-120mm³时进行配对,此时开始治疗。

[0170] 在0.9%盐水中配制目标物-5,并且每周两次地用静脉内给予的5mg/kg或10mg/kg目标物-5处理小鼠,并然后在第15天的给药假期后通过腹膜内递送。剂量体积根据体重进行调整。吉西他滨以40mg/kg剂量施用并且在q3X 4天后通过腹膜内递送。每周两次通过卡尺测量肿瘤。每天测量体重,持续5天,然后每两周测量一次体重,直至研究结束。(n=10/组)。研究的终点是肿瘤体积达到1500mm³时。

[0171] 如图9所示,与用媒介物处理的小鼠相比,用目标物5处理导致肿瘤体积(mm³)减少。吉西他滨似乎比用任一剂量的目标物-5处理的小鼠更能减少肿瘤体积,但是由于小鼠尾巴肿胀导致施途径从静脉内切换到腹膜内,因此错过了多次剂量的目标物-5。数据显示,接受10mg/kg目标物-5的小鼠经历了比接受5mg/kg目标物-5的小鼠更低的肿瘤体积,这表明在这种模型中,目标物-5具有剂量依赖性的抗肿瘤活性。

[0172] 实施例13:目标物-7显示出颅内和皮下U87MG肿瘤的可靠增强

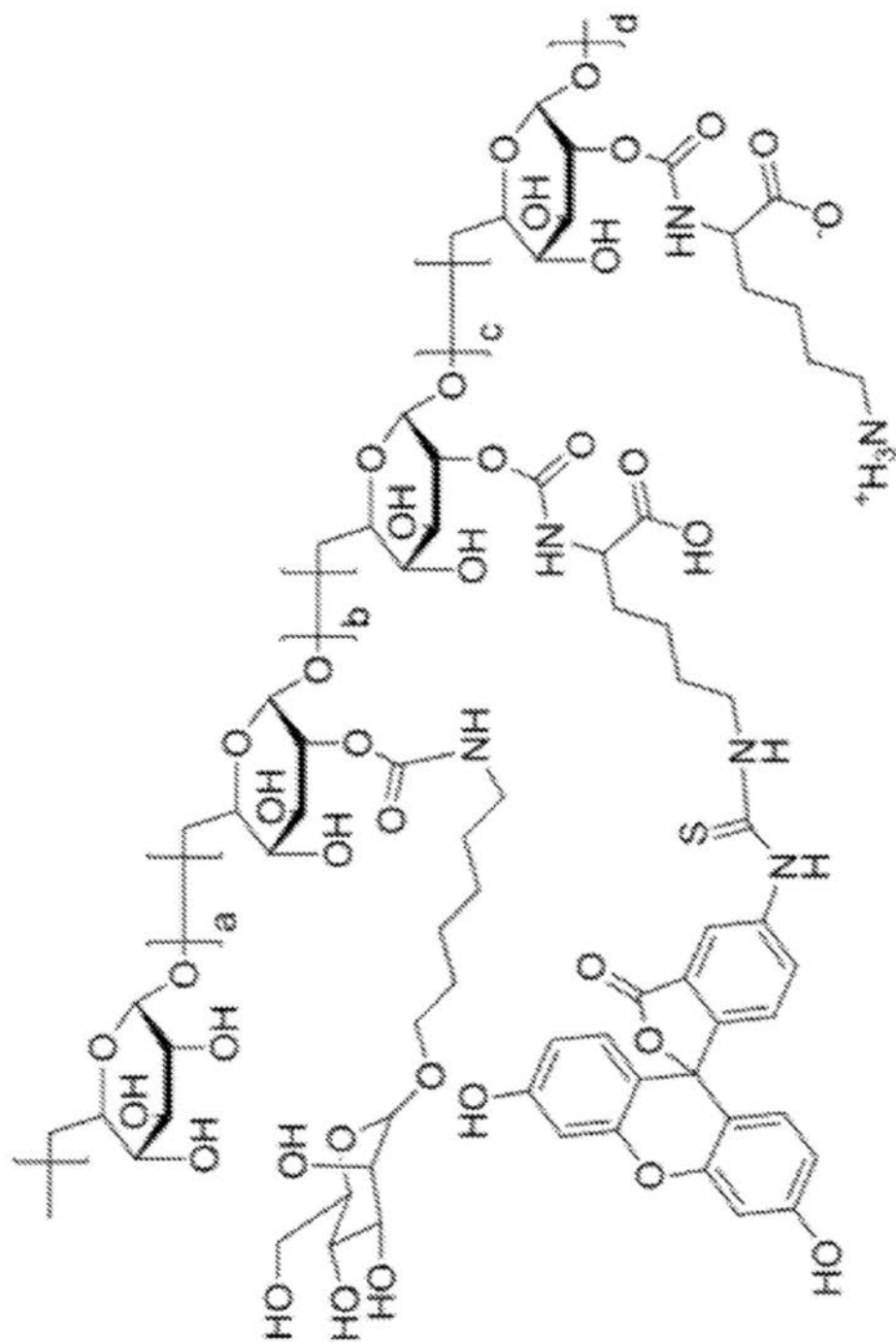
[0173] 生成的数据在nu/nu小鼠中的颅内和皮下植入的U87MG肿瘤中比较了目标物-7与马根维显(Magnevist)(一种标准护理钆MRI造影剂)。颅内模型方案如上所描述。具体来说,

将50,000个U87细胞植入在与先前描述的相同坐标处 ($n=6$)。对于皮下肿瘤模型,将 4×10^6 个细胞以50 μ l的体积注射到右侧腹中 ($n=6$)。

[0174] 在肿瘤细胞植入后第14天和第18天之间通过交错采集进行MRI成像(图10)。图像表明目标物-7穿过血肿瘤屏障,但不穿过血脑屏障。与马根维显相比,目标物-7向正常组织中的渗漏也较少。对于颅内肿瘤,使用T2加权(造影施用前)和T1加权(造影施用前和施用后)对小鼠进行成像。在皮下模型中,在造影施用前和施用后均使用T1加权序列对小鼠进行成像。图11A示出造影后肿瘤与选定组织的信号强度比。

[0175] 确定皮下肿瘤的造影前感兴趣区域(ROI),并将其与造影后ROI进行比较。对于颅内研究,将肿瘤轮廓绘制为ROI,并将对侧半球用作比较器。使用VivoQuant软件进行ROI分析。在以下扫描中为每个横向切片手动分割肿瘤ROI:T1 RARE造影前(所有受试者)、T1 RARE造影后(所有受试者)、T2。

[0176] 对于被皮下注射的小鼠,通过将固定体积的圆柱体放置在动物外部但在上面列出的所有扫描的视野(FOV)内产生噪声ROI。对于被颅内注射的小鼠,噪声ROI被表示为具有相似体积的手绘制的棱柱体(prism)。对于被颅内注射的小鼠,正常组织ROI是使用不含肿瘤组织的脑区域中肿瘤ROI的反射生成的。图11B示出T1肿瘤造影后与T1肿瘤造影前的信噪比(SNR)。左图示出被定义为FOV中不含组织的背景区域的强度的“噪声”。右图示出被定义为不含肿瘤的脑组织强度的“噪声”。通过将每个分割的切片的面积乘以切片厚度来计算基于MRI的肿瘤体积。



目标物 3

图1

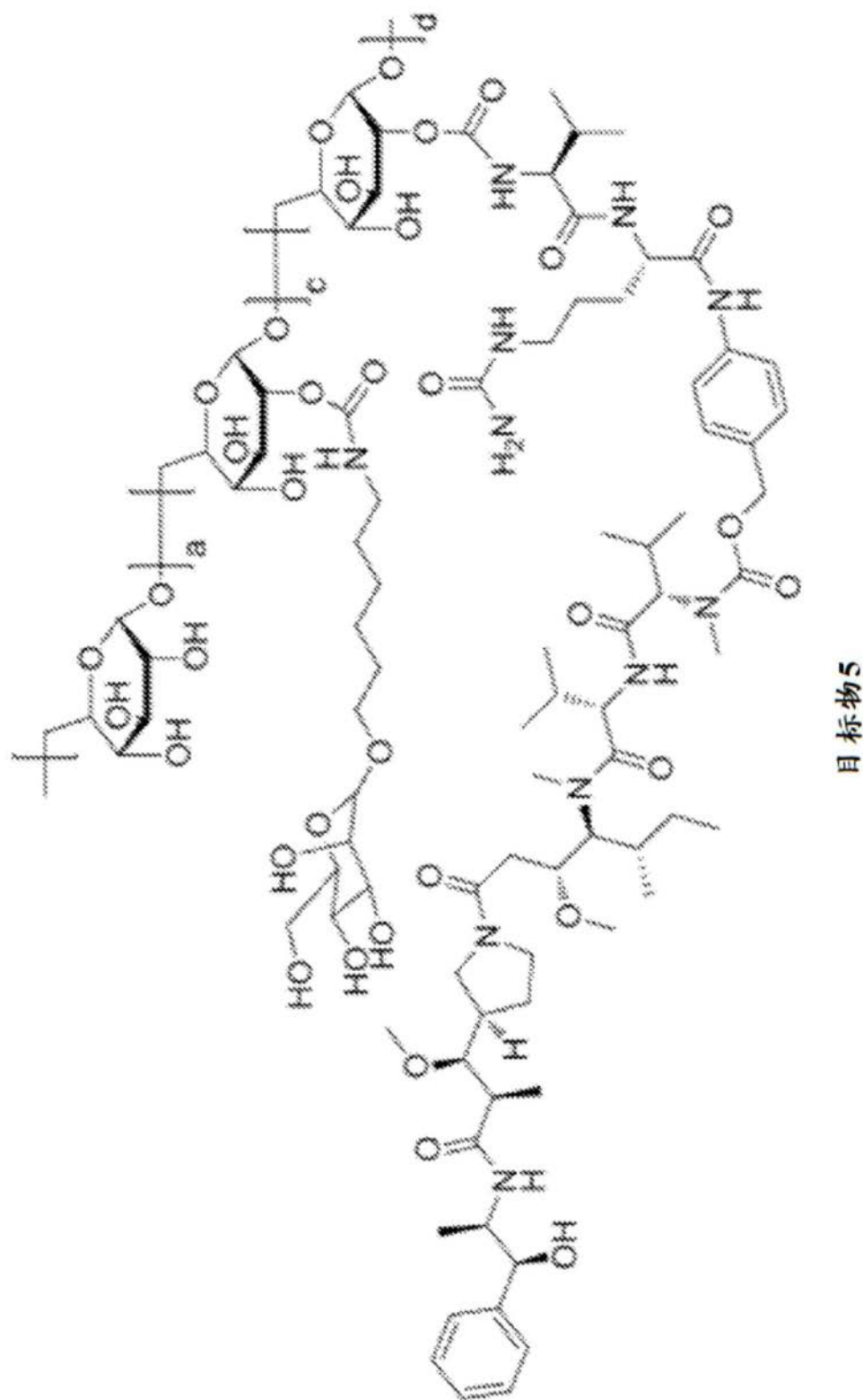


图2

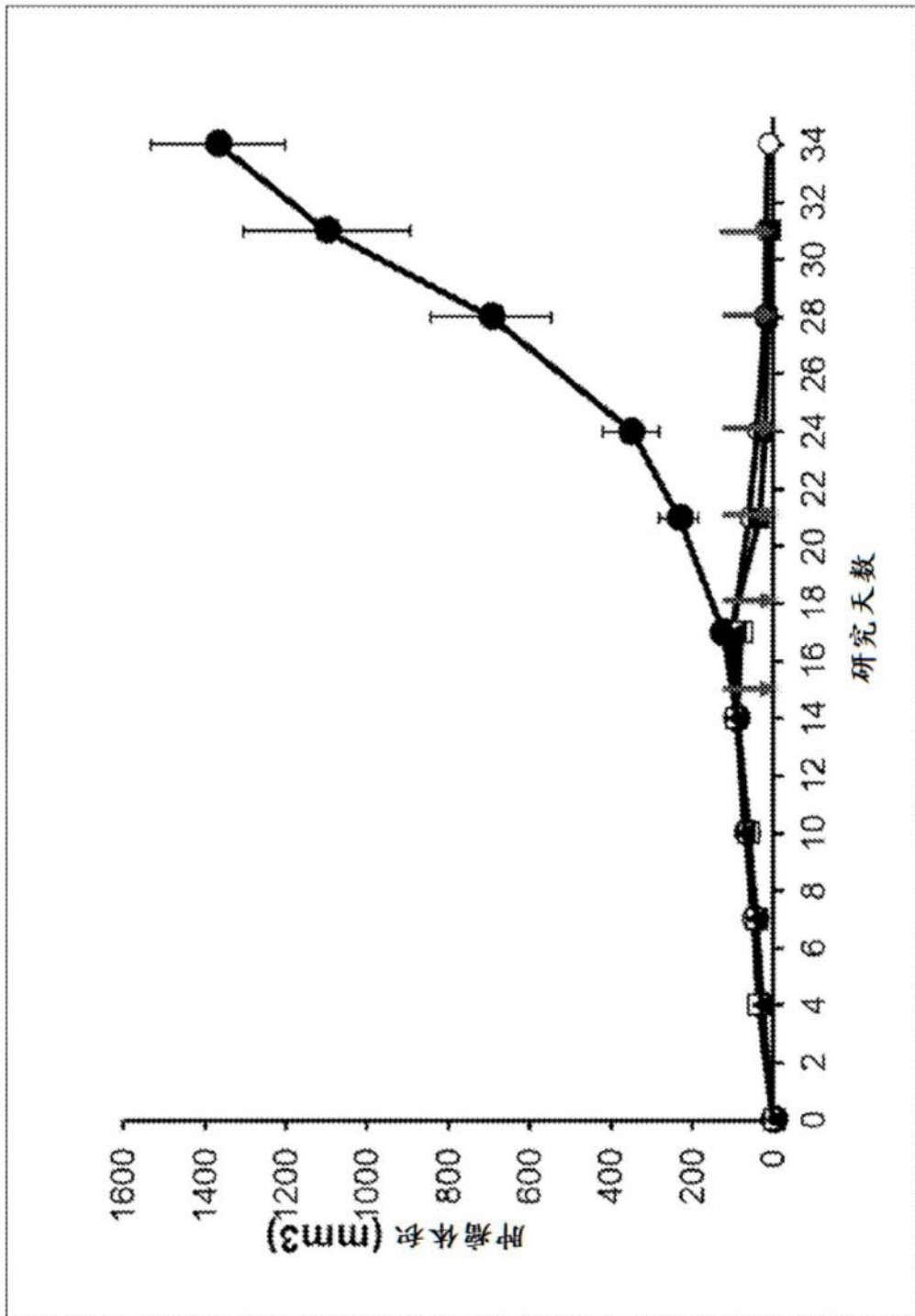


图3

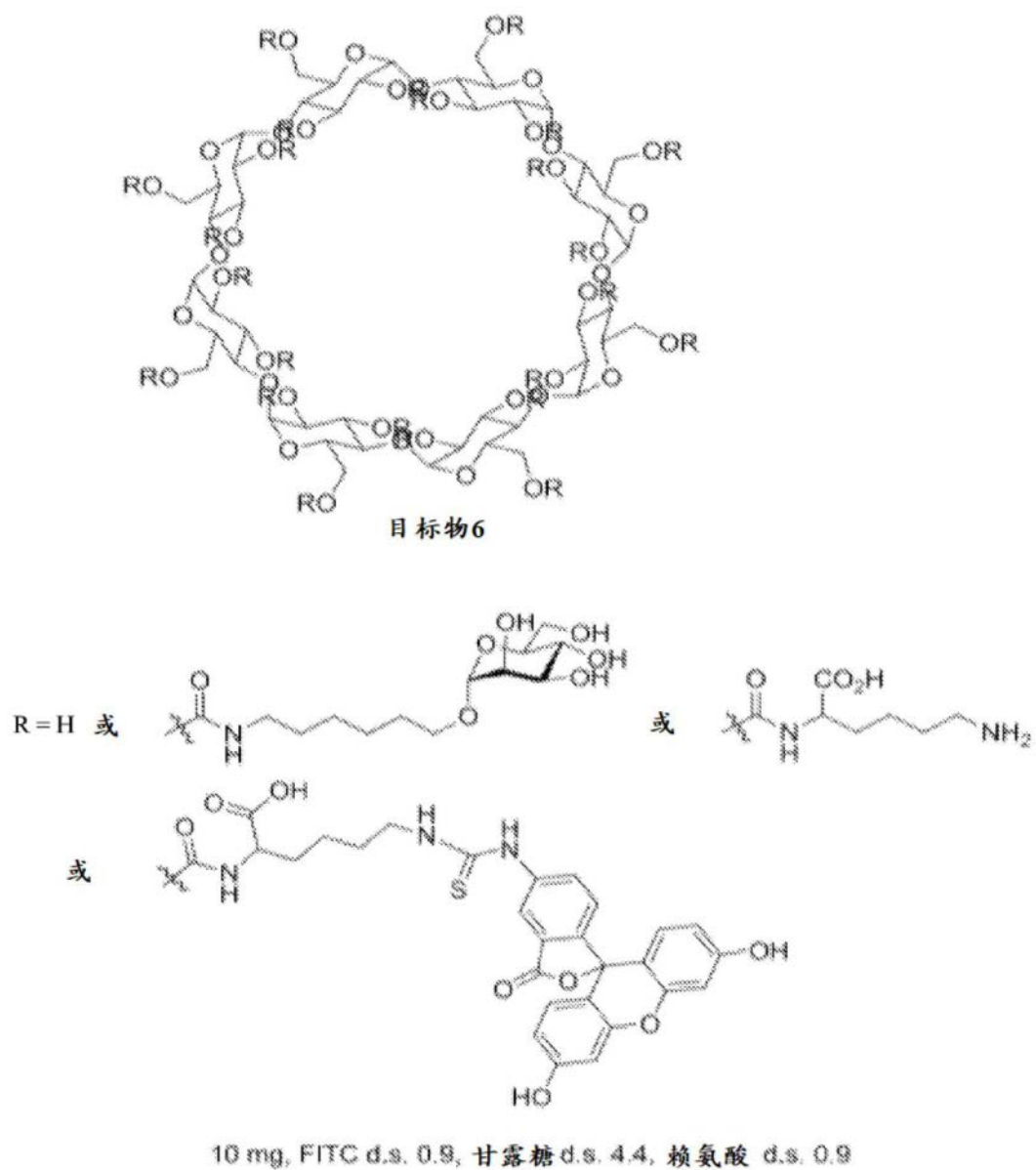
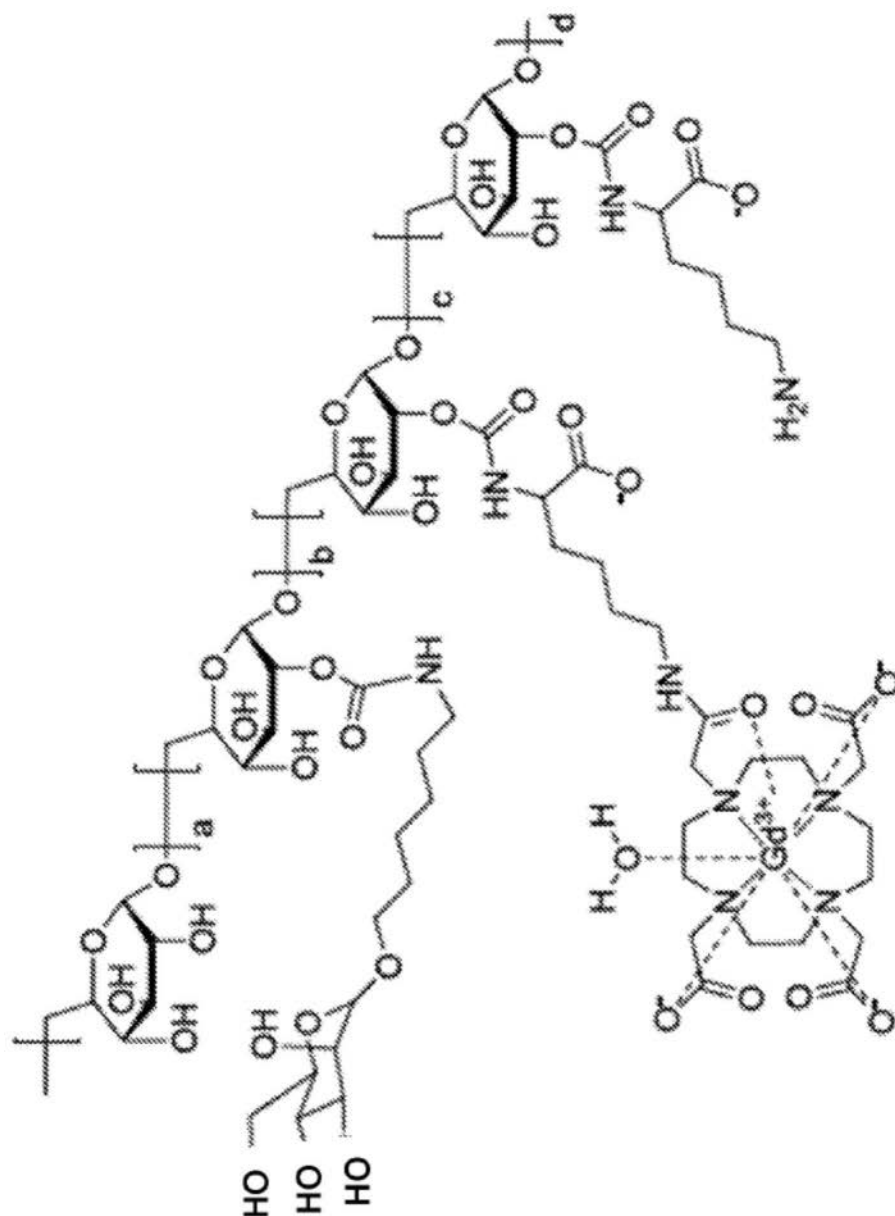


图4



目标物 7^*Gd (反离子未示出)

图5

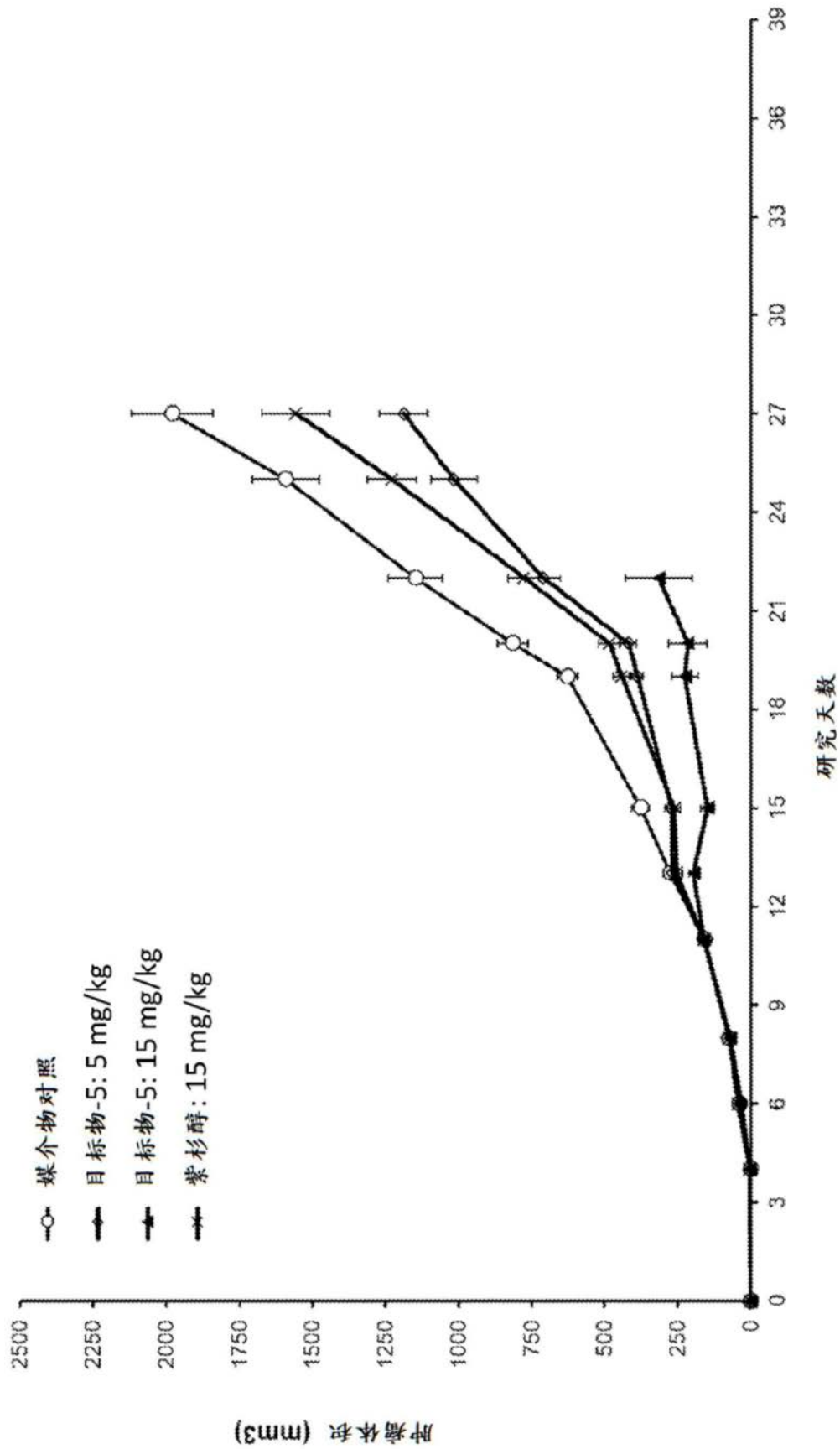


图6

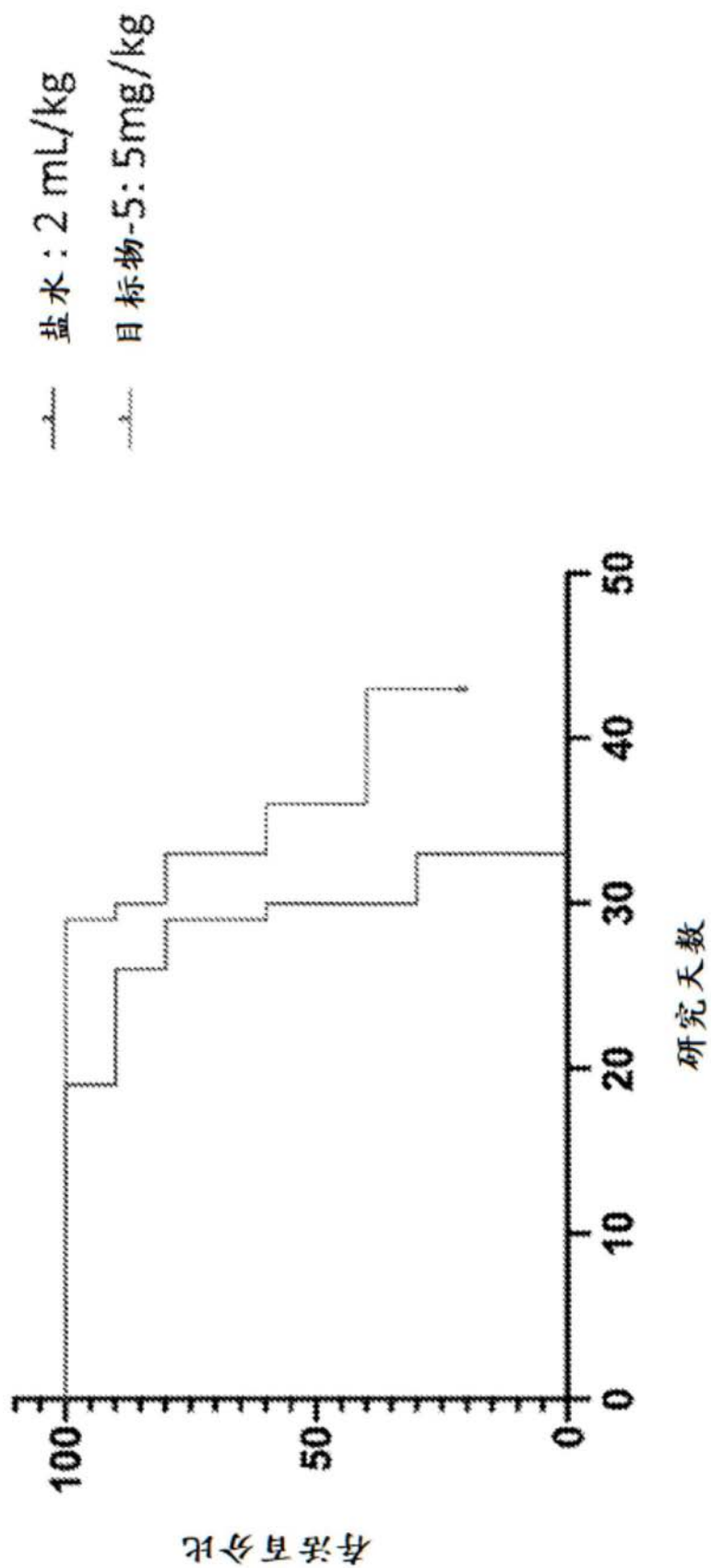


图7

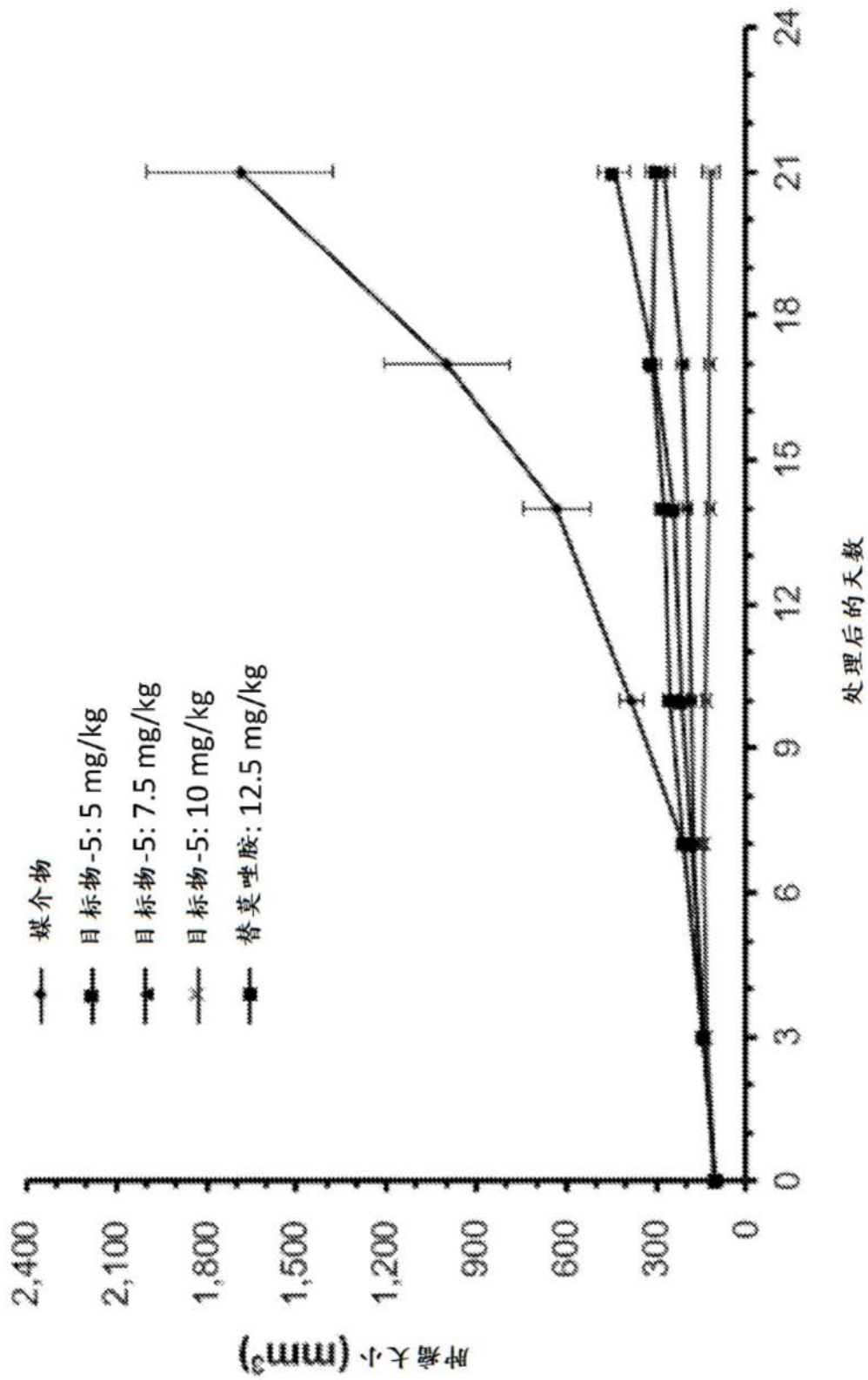


图8A

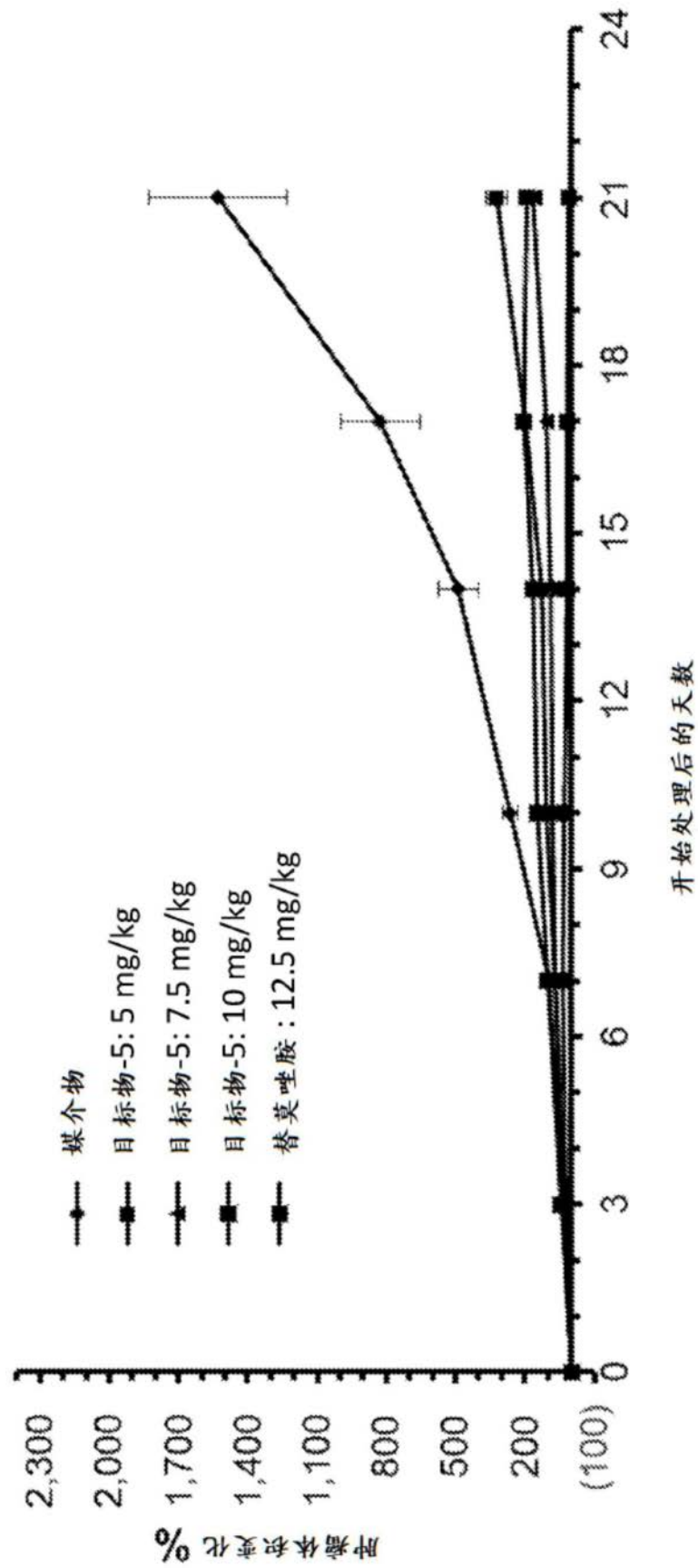


图8B

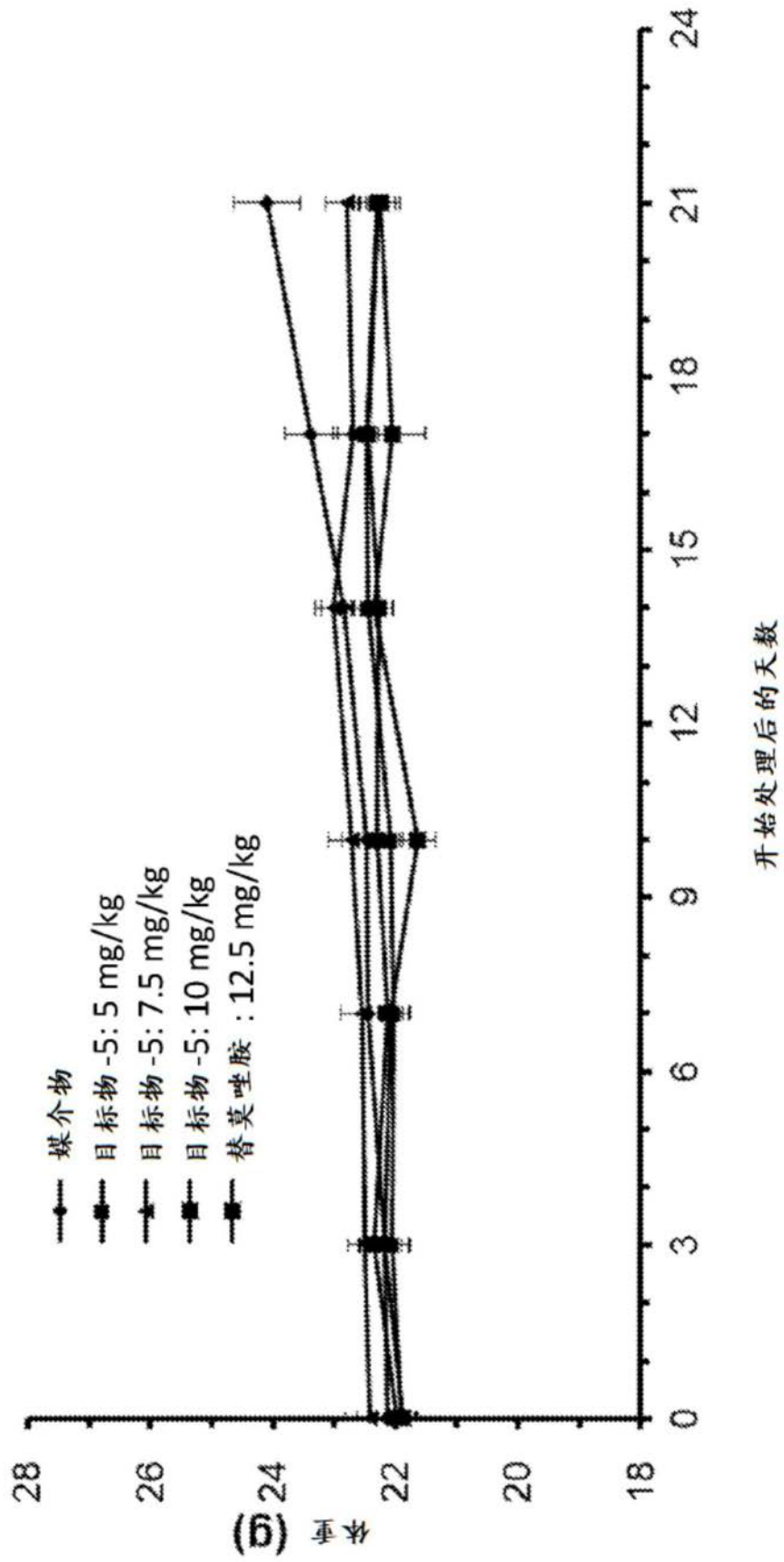


图8C

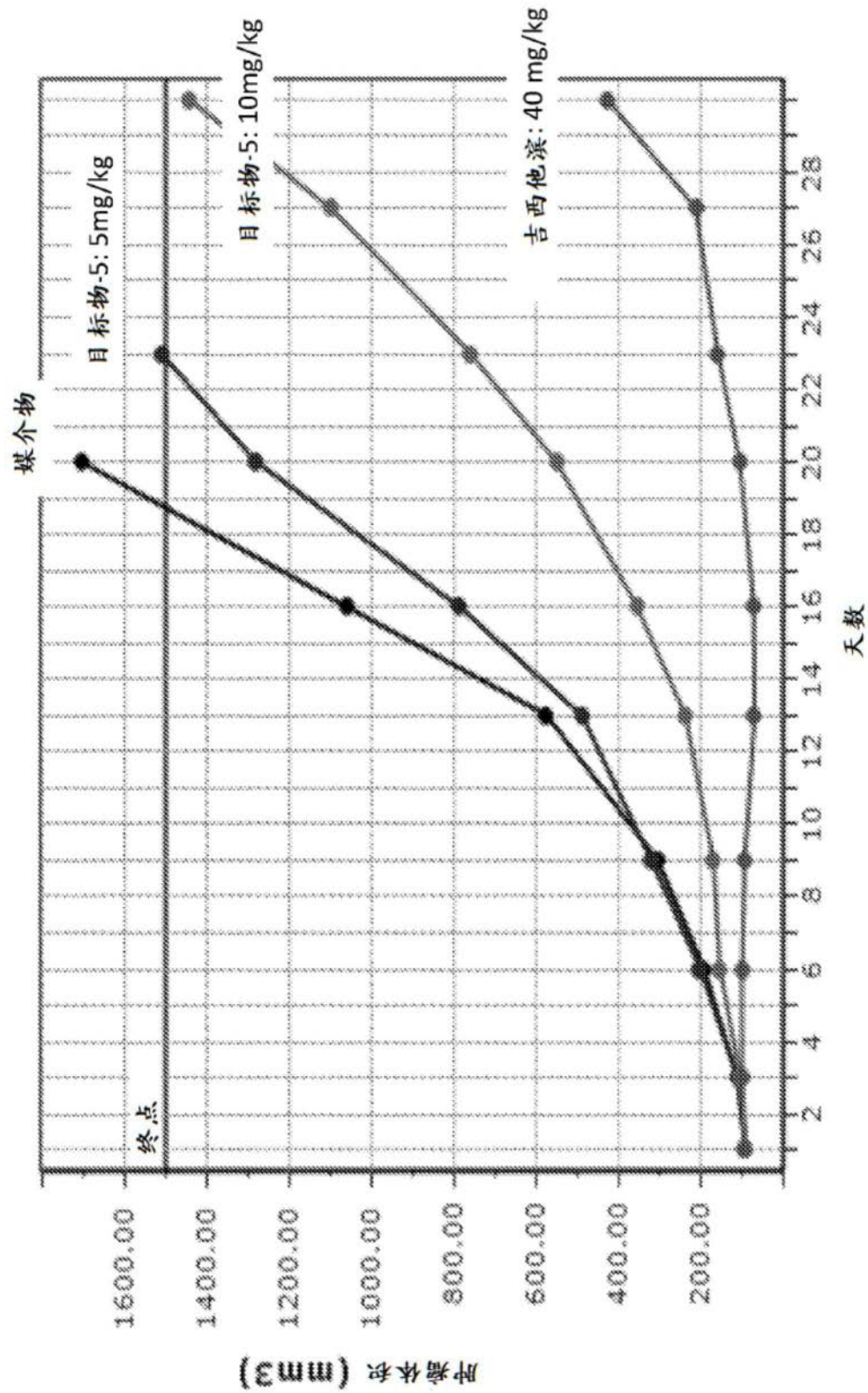
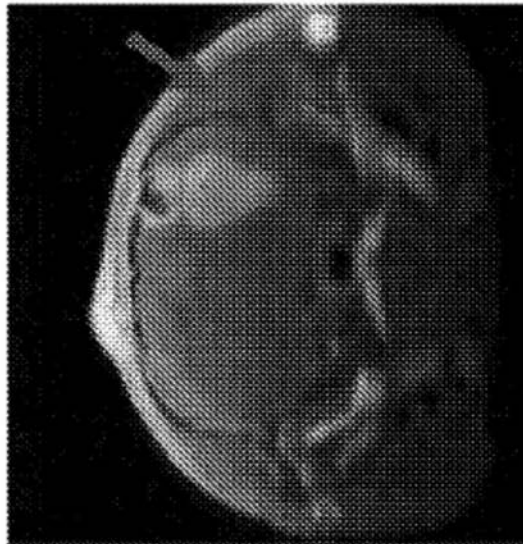
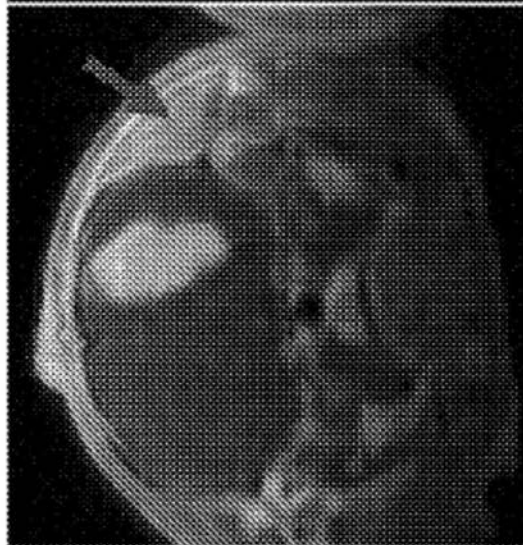


图9

目标物~7



马根维显



造影前

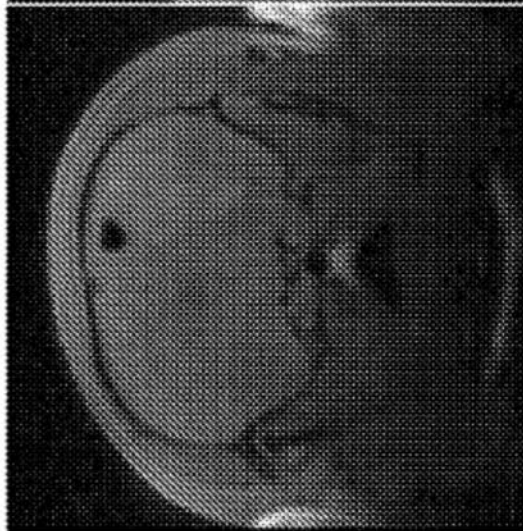


图10

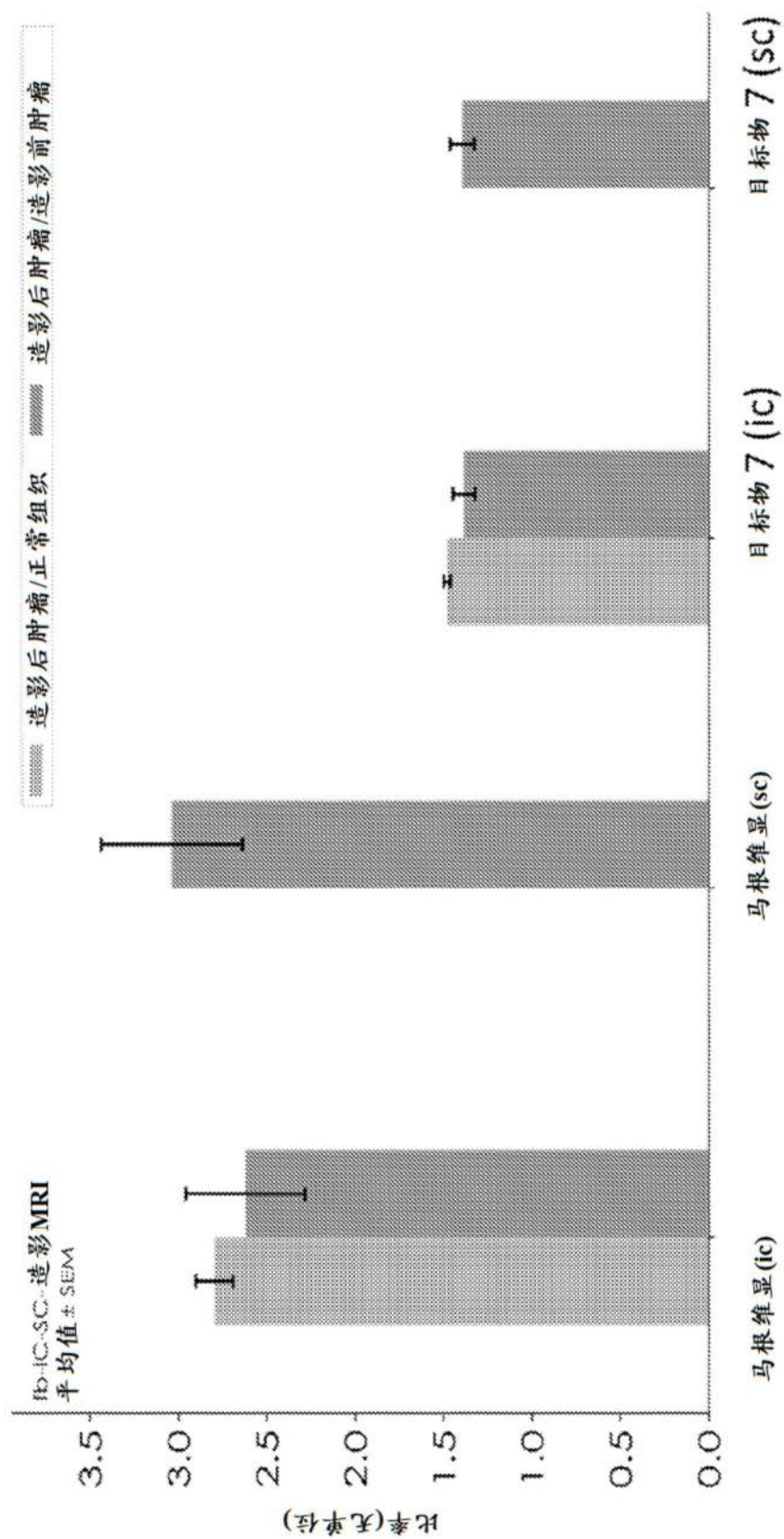


图11A

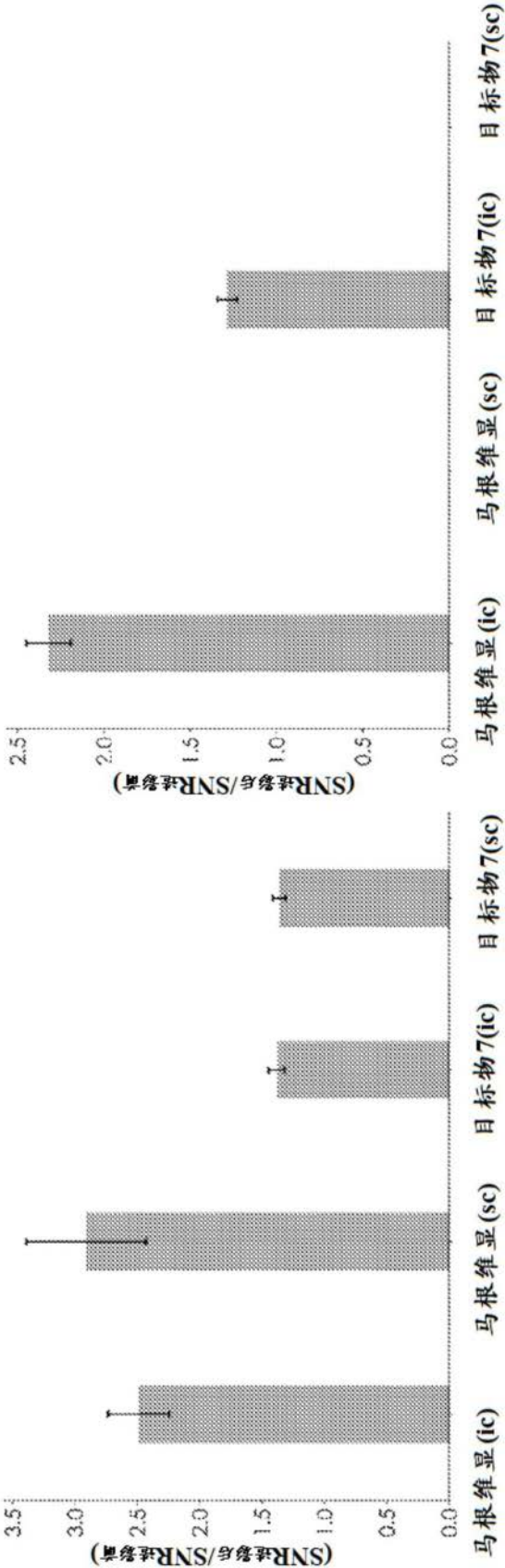


图11B