



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104080729 A

(43) 申请公布日 2014. 10. 01

(21) 申请号 201280067193. 1

(22) 申请日 2012. 11. 30

(30) 优先权数据

61/565, 461 2011. 11. 30 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 07. 16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/067236 2012. 11. 30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/082389 EN 2013. 06. 06

(71) 申请人 马林克罗特有限公司

地址 美国密苏里州

(72) 发明人 T. E. 罗杰斯 J. N. 弗雷斯科斯

(74) 专利代理机构 北京市嘉元知识产权代理事
务所(特殊普通合伙) 11484

代理人 张永新

(51) Int. Cl.

B82Y 5/00 (2006. 01)

A61K 47/48 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

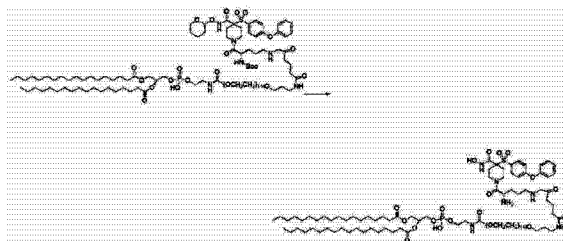
权利要求书7页 说明书29页 附图9页

(54) 发明名称

MMP- 靶向的治疗性和 / 或诊断性纳米载体

(57) 摘要

本发明提供靶向的递送组合物和使用该组合物治疗和诊断受试者的病症的方法。



1. 一种靶向的递送组合物,其包含:

(a) 包括治疗剂或诊断剂或其组合的纳米载体;和

(b) 具有下式的缀合物:

$A-(LPEG)-MMP^i$;

其中,

A 为用于将所述缀合物连接至所述纳米载体的联结组分;

(LPEG) 选自:

(i) 具有 1 至 3 个聚乙二醇组分的线性组合的连接基,

(ii) 具有式 $[(EG)(P)]_m$ 的连接基,其中各 EG 为独立地选自三乙二醇、四乙二醇、五乙二醇、六乙二醇、七乙二醇和八乙二醇的乙二醇基团,P 为磷酸基或硫代磷酸基,且 m 为 1 至 20 的整数;或

(iii) 具有式 $-Z^1-Z^2-Z^3-$ 的连接基,其中

Z^1 和 Z^3 独立地选自具有限定长度和 W_n 的 PEG 组分,其中 W 为氨基酸且下标 n 为 0 至 3 的整数;且

Z^2 选自具有限定长度和用于连接 Z^1 和 Z^3 的选自酰胺、硫代酰胺、酯、氨基甲酸酯或脲的偶联基团的 PEG 组分;且

MMP^i 为 MMP 酶抑制剂。

2. 权利要求 1 的靶向的递送组合物,其中 (LPEG) 为 $-Z^1-Z^2-Z^3-$ 。

3. 权利要求 2 的靶向的递送组合物,其中 Z^1 为 W_n ; Z^2 选自酰胺、硫代酰胺、酯、氨基甲酸酯或脲;且 Z^3 为具有限定长度的 PEG 组分。

4. 权利要求 3 的靶向的递送组合物,其中下标 n 为 3。

5. 权利要求 3 的靶向的递送组合物,其中下标 n 为 2。

6. 权利要求 3 的靶向的递送组合物,其中下标 n 为 1。

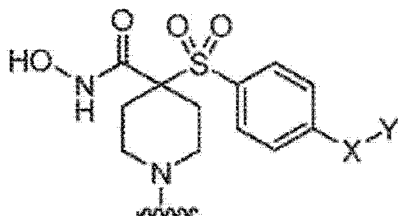
7. 权利要求 1 的靶向的递送组合物,其中下标 n 为 0。

8. 权利要求 1-7 中任一项的靶向的递送组合物,其中所述氨基酸为 α -氨基酸。

9. 权利要求 8 的靶向的递送组合物,其中所述 α -氨基酸选自门冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸和甘氨酸。

10. 权利要求 9 的靶向的递送组合物,其中所述 α -氨基酸选自谷氨酸和赖氨酸。

11. 权利要求 1 的靶向的递送组合物,其中所述 MMP 抑制剂具有下式:



其中

X 是选自 O 和 S 的成员;

Y 是选自吡啶基和苯基的成员,其中所述苯基任选经 OH、 OCH_3 、 OCF_3 和 CH_3 取代;且波浪线表示与 (LPEG) 的连接点。

12. 权利要求 1 的靶向的递送组合物,其中所述纳米载体选自脂质体、胶束、脂质涂覆

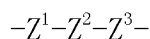
的泡囊和嵌段共聚物胶束。

13. 权利要求 1 的靶向的递送组合物,其中所述纳米载体进一步包含隐形剂。

14. 权利要求 1 的靶向的递送组合物,其中所述纳米载体包含选自多柔比星、顺铂、奥沙利铂、卡铂、5-氟尿嘧啶、吉西他滨和紫杉烷的治疗剂。

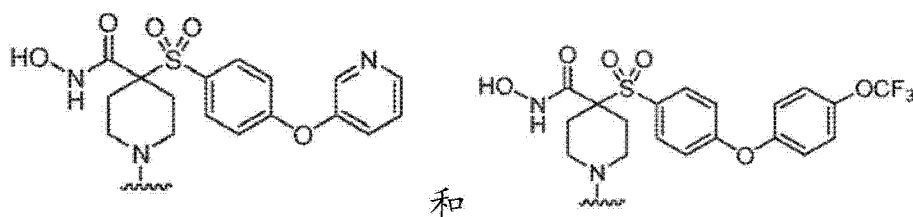
15. 权利要求 1 的靶向的递送组合物,其中所述联结组分是脂质。

16. 权利要求 1 的靶向的递送组合物,其中 (LPEG) 具有下式:

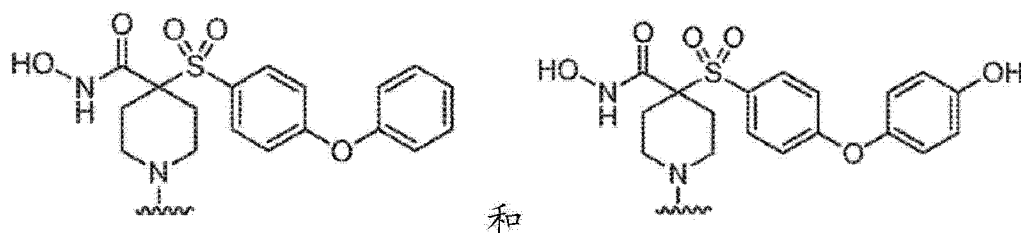


其中 Z^1 和 Z^3 各自为具有限定长度的 PEG 组分,且 Z^2 为用于连接两个 PEG 组分的选自酰胺、硫代酰胺、酯、氨基甲酸酯或脲的偶联基团。

17. 权利要求 1 的靶向的递送组合物,其中 MMP^i 选自



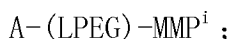
18. 权利要求 1 的靶向的递送组合物,其中 MMP^i 选自



19. 权利要求 1 的靶向的递送组合物,其包含:

(a) 包括治疗剂或诊断剂或其组合的纳米载体;和

(b) 具有下式的缀合物:



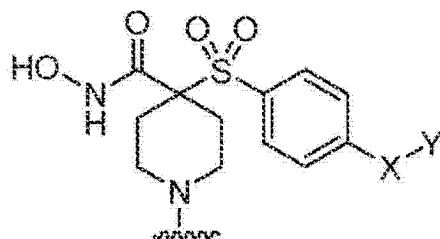
其中,

A 为用于将所述缀合物连接至所述纳米载体的联结组分;

(LPEG) 为具有 1 至 3 个聚乙二醇组分的线性组合的连接基,或具有式 $[(EG)(P)]_m$ 的连接基,其中各 EG 为独立地选自三乙二醇、四乙二醇、五乙二醇、六乙二醇、七乙二醇和八乙二醇的乙二醇基团,P 为磷酸基或硫代磷酸基,且 m 为 1 至 20 的整数;且

MMP^i 为 MMP 酶抑制剂。

20. 权利要求 19 的靶向的递送组合物,其中所述 MMP 抑制剂具有下式:



其中

X 是选自 O 和 S 的成员；

Y 是选自吡啶基和苯基的成员，其中所述苯基任选经 OH、OCH₃、OCF₃ 和 CH₃ 取代；且波浪线表示与 (LPEG) 的连接点。

21. 权利要求 1 或权利要求 19 的靶向的递送组合物，其中所述纳米载体选自脂质体、胶束、脂质涂覆的泡囊和嵌段共聚物胶束。

22. 权利要求 1 或权利要求 19 的靶向的递送组合物，其中所述纳米载体进一步包含隐形剂。

23. 权利要求 22 的靶向的递送组合物，其中所述隐形剂为聚（乙二醇）。

24. 权利要求 1 或权利要求 19 的靶向的递送组合物，其中所述治疗剂或诊断剂被嵌入、包封入所述纳米载体中或被束缚至所述纳米载体。

25. 权利要求 24 的靶向的递送组合物，其中所述纳米载体为脂质体。

26. 权利要求 1 或权利要求 19 的靶向的递送组合物，其中所述纳米载体为选自 SUV、LUV 和 MLV 的脂质体。

27. 权利要求 1 或权利要求 19 的靶向的递送组合物，其中所述纳米载体包含选自多柔比星、顺铂、奥沙利铂、卡铂、5-氟尿嘧啶、吉西他滨和紫杉烷的治疗剂。

28. 权利要求 1 或权利要求 19 的靶向的递送组合物，其中所述诊断剂为放射性试剂、荧光剂或造影剂。

29. 权利要求 1 或权利要求 19 的靶向的递送组合物，其中所述诊断剂为选自 ¹¹¹In-DTPA、^{99m}Tc(CO)₃-DTPA 和 ^{99m}Tc(CO)₃-ENPy₂ 的放射性试剂。

30. 权利要求 1 或权利要求 19 的靶向的递送组合物，其中所述诊断剂为荧光剂。

31. 权利要求 1 或权利要求 19 的靶向的递送组合物，其中所述诊断剂为 MR 试剂或 X-射线造影剂。

32. 权利要求 1 或权利要求 19 的靶向的递送组合物，其中所述联结组分包含用于共价连接至所述纳米载体的官能团。

33. 权利要求 1 或权利要求 19 的靶向的递送组合物，其中所述联结组分为脂质。

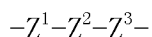
34. 权利要求 33 的靶向的递送组合物，其中所述脂质为磷脂、糖脂、鞘脂或胆固醇。

35. 权利要求 1 或权利要求 19 的靶向的递送组合物，其中所述缀合物的 A 部分存在于所述纳米载体的脂质双层部分中。

36. 权利要求 35 的靶向的递送组合物，其中所述纳米载体为脂质体。

37. 权利要求 1 或权利要求 19 的靶向的递送组合物，其中 (LPEG) 为具有 1 至 3 个聚乙二醇组分的线性组合的连接基。

38. 权利要求 1 或权利要求 19 的靶向的递送组合物，其中 (LPEG) 具有下式：

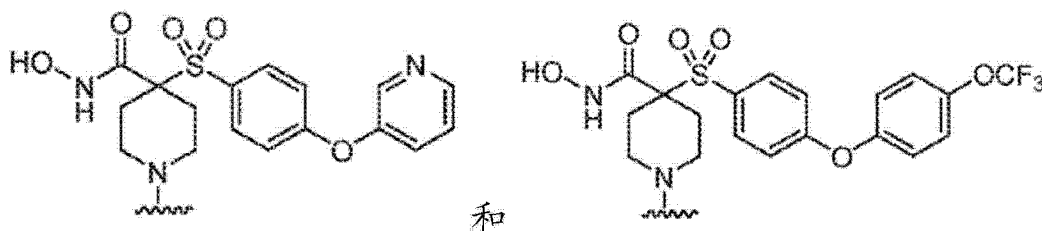


其中 Z¹ 和 Z³ 各自为具有限定长度的 PEG 组分，且 Z² 为用于连接两个 PEG 组分的选自酰胺、硫代酰胺、酯、氨基甲酸酯或脲的偶联基团。

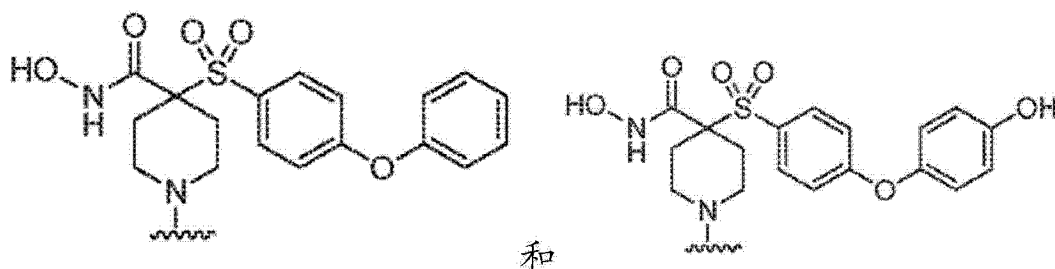
39. 权利要求 38 的靶向的递送组合物，其中 Z¹ 为连接至 A 的 PEG 组分且选自 PEG₃₄₀₀ 和 PEG₅₀₀₀。

40. 权利要求 38 的靶向的递送组合物，其中 Z³ 为具有下式的连接的 PEG 组分： $-C(O)-CH_2CH_2-(OCH_2CH_2)_{24}NH-$ 。

41. 权利要求 1 或权利要求 19 的靶向的递送组合物, 其中 MMP^i 选自



42. 权利要求 1 或权利要求 19 的靶向的递送组合物, 其中 MMP^i 选自



43. 一种缀合物, 其具有下式:

$A-(LPEG)-MMP^i$;

其中,

A 为用于将所述缀合物连接至所述纳米载体的联结组分;

(LPEG) 选自:

(i) 具有 1 至 3 个聚乙二醇组分的线性组合的连接基,

(ii) 具有式 $[(EG)(P)]_m$ 的连接基, 其中各 EG 为独立地选自三乙二醇、四乙二醇、五乙二醇、六乙二醇、七乙二醇和八乙二醇的乙二醇基团, P 为磷酰基或硫代磷酰基, 且 m 为 1 至 20 的整数; 或

(iii) 具有式 $-Z^1-Z^2-Z^3-$ 的连接基, 其中

Z^1 和 Z^3 独立地选自具有限定长度和 W_n 的 PEG 组分, 其中 W 为氨基酸且下标 n 为 0 至 3 的整数; 且

Z^2 选自具有限定长度和用于连接 Z^1 和 Z^3 的选自酰胺、硫代酰胺、酯、氨基甲酸酯或脲的偶联基团的 PEG 组分; 且

MMP^i 为 MMP 抑制剂。

44. 权利要求 43 的缀合物, 其具有下式:

$A-(LPEG)-MMP^i$;

其中,

A 为用于将所述缀合物连接至所述纳米载体的联结组分;

(LPEG) 为具有 1 至 3 个聚乙二醇组分的线性组合的连接基, 或为具有式 $[(EG)(P)]_m$ 的连接基, 其中各 EG 为独立地选自三乙二醇、四乙二醇、五乙二醇、六乙二醇、七乙二醇和八乙二醇的乙二醇基团, P 为磷酰基或硫代磷酰基, 且 m 为 1 至 20 的整数; 且

MMP^i 为 MMP 抑制剂。

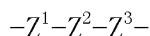
45. 权利要求 43 或权利要求 44 的缀合物, 其中所述联结组分为脂质。

46. 权利要求 45 的缀合物, 其中所述脂质选自磷脂、糖脂、鞘脂和胆固醇。

47. 权利要求 43 或权利要求 44 的缀合物, 其中 (LPEG) 为具有 1 至 3 个聚乙二醇组分

的线性组合的连接基。

48. 权利要求 43 或权利要求 44 的缀合物, 其中 (LPEG) 具有下式:

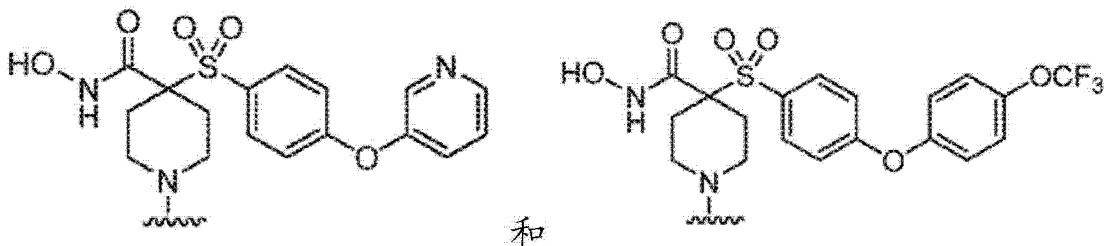


其中 Z^1 和 Z^3 各自为具有限定长度的 PEG 组分, 且 Z^2 为用于连接两个 PEG 组分的选自酰胺、硫代酰胺、酯、氨基甲酸酯或脲的偶联基团。

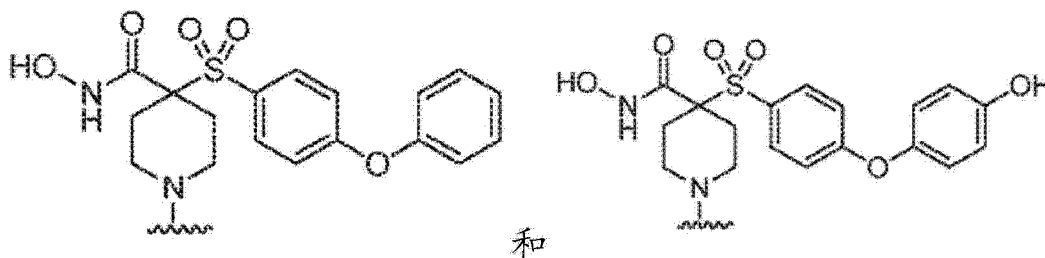
49. 权利要求 48 的缀合物, 其中 Z^1 为连接至 A 的 PEG 组分且选自 PEG₃₄₀₀ 和 PEG₅₀₀₀。

50. 权利要求 48 的缀合物, 其中 Z^3 为具有下式的连接的 PEG 组分: $-C(O)-CH_2CH_2-(OCH_2CH_2)_{24}NH-$ 。

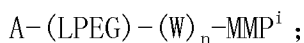
51. 权利要求 43 或权利要求 44 的缀合物, 其中 MMPⁱ 选自



52. 权利要求 43 或权利要求 44 的缀合物, 其中 MMPⁱ 选自



53. 一种制备靶向的递送组合物的方法, 其包括将包含治疗剂或诊断剂的纳米载体连接至具有下式的缀合物:



其中,

A 为用于将所述缀合物连接至所述纳米载体的联结组分;

(LPEG) 选自:

(i) 具有 1 至 3 个聚乙二醇组分的线性组合的连接基,

(ii) 具有式 $[(EG)(P)]_m$ 的连接基, 其中各 EG 为独立地选自三乙二醇、四乙二醇、五乙二醇、六乙二醇、七乙二醇和八乙二醇的乙二醇基团, P 为磷酰基或硫代磷酰基, 且 m 为 1 至 20 的整数; 或

(iii) 具有式 $-Z^1-Z^2-Z^3-$ 的连接基, 其中

Z^1 和 Z^3 独立地选自具有限定长度和 W_n 的 PEG 组分, 其中 W 为氨基酸且下标 n 为 0 至 3 的整数; 且

Z^2 选自具有限定长度和用于连接 Z^1 和 Z^3 的选自酰胺、硫代酰胺、酯、氨基甲酸酯或脲的偶联基团的 PEG 组分; 且

MMPⁱ 为 MMP 抑制剂。

54. 根据权利要求 53 的制备靶向的递送组合物的方法, 其包括将包含治疗剂或诊断剂的纳米载体连接至具有下式的缀合物:

A-(LPEG)-MMPⁱ;

其中,

A 为用于将所述缀合物连接至所述纳米载体的联结组分;

(LPEG) 为具有 1 至 3 个聚乙二醇组分的线性组合的连接基, 或为具有式 $[(EG)(P)]_m$ 的连接基, 其中各 EG 为独立地选自三乙二醇、四乙二醇、五乙二醇、六乙二醇、七乙二醇和八乙二醇的乙二醇基团, P 为磷酸基或硫代磷酸基, 且 m 为 1 至 20 的整数; 且

MMPⁱ 为 MMP 抑制剂。

55. 权利要求 53 或权利要求 54 的方法, 其中所述联结组分为脂质。

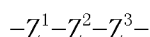
56. 权利要求 55 的方法, 其中所述脂质为磷脂、糖脂、鞘脂、胆固醇或胆固醇衍生物。

57. 权利要求 53 或权利要求 54 的方法, 其中所述缀合物的 A 部分存在于所述纳米载体的脂质双层部分中。

58. 权利要求 57 的方法, 其中所述纳米载体为脂质体。

59. 权利要求 53 或权利要求 54 的方法, 其中 (LPEG) 为具有 1 至 3 个聚乙二醇组分的线性组合的连接基。

60. 权利要求 53 或权利要求 54 的方法, 其中 (LPEG) 具有下式:

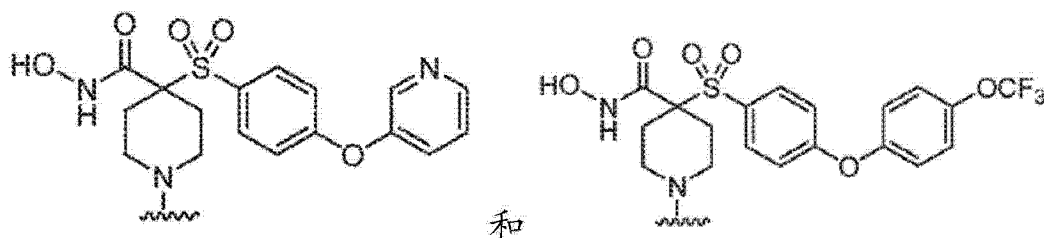


其中每个 Z¹ 和 Z³ 为具有限定长度的 PEG 组分, 且 Z² 为用于连接两个 PEG 组分的选自酰胺、硫代酰胺、酯、氨基甲酸酯或脲的偶联基团。

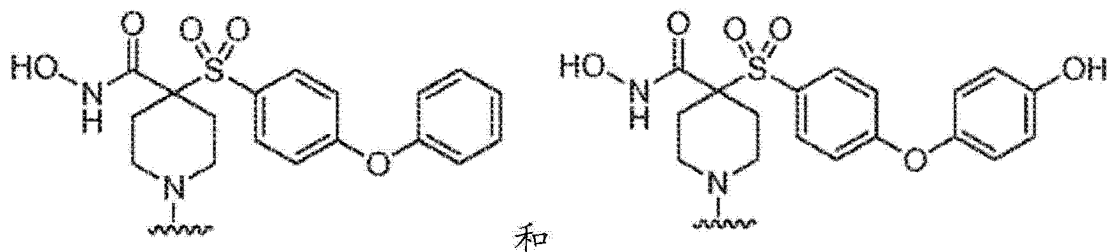
61. 权利要求 60 的方法, 其中 Z¹ 为连接至 A 的 PEG 组分且选自 PEG₃₄₀₀ 和 PEG₅₀₀₀。

62. 权利要求 60 的方法, 其中 Z³ 为具有下式的连接的 PEG 组分: $-C(O)-CH_2CH_2-(OCH_2CH_2)_{24}NH-$ 。

63. 权利要求 53 或权利要求 54 的方法, 其中 MMPⁱ 选自



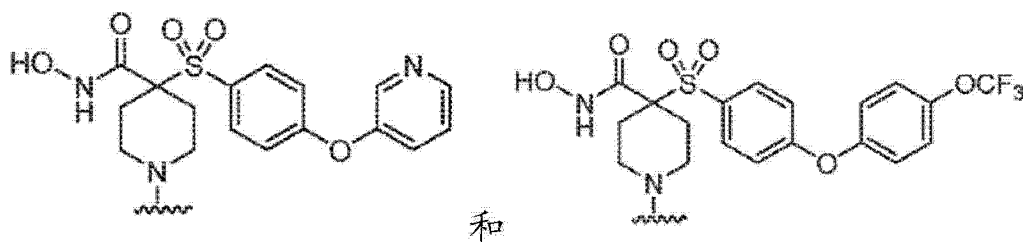
64. 权利要求 53 或权利要求 54 的方法, 其中 MMPⁱ 选自



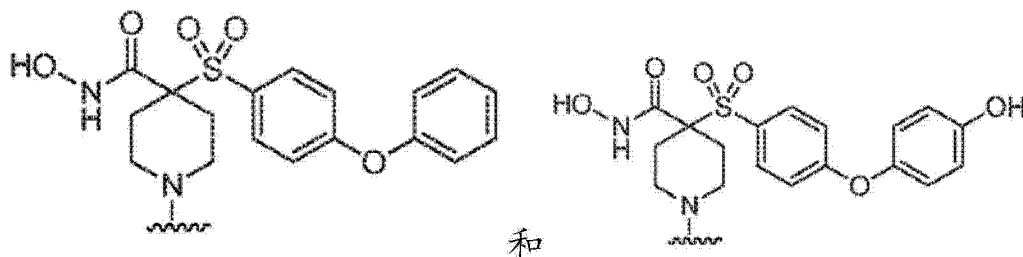
65. 一种治疗或诊断受试者的癌性病症的方法, 其包括向所述受试者给药权利要求 1 的靶向的递送组合物, 其中所述治疗剂或诊断剂足以治疗或诊断所述病症。

66. 一种治疗或诊断受试者的癌性病症的方法, 其包括向所述受试者给药权利要求 19 的靶向的递送组合物, 其中所述治疗剂或诊断剂足以治疗或诊断所述病症。

67. 权利要求 65 或权利要求 66 的方法, 其中 MMPⁱ 选自



68. 权利要求 65 或权利要求 66 的方法, 其中 MMP^i 选自



69. 权利要求 65 或权利要求 66 的方法, 其中所述纳米载体嵌入、包封入抗癌剂中或束缚至抗癌剂, 所述抗癌剂选自多柔比星、顺铂、奥沙利铂、卡铂、5-氟尿嘧啶、吉西他滨和紫杉烷。

70. 一种确定受试者对于靶向治疗性治疗的适应性的方法, 其包括向所述受试者给药权利要求 1 的靶向的递送组合物, 其中所述纳米载体包含诊断剂, 并将所述受试者成像以检测所述诊断剂。

71. 一种确定受试者对于靶向治疗性治疗的适应性的方法, 其包括向所述受试者给药权利要求 19 的靶向的递送组合物, 其中所述纳米载体包含诊断剂, 并将所述受试者成像以检测所述诊断剂。

72. 一种递送治疗剂至受试者的方法, 其包括向所述受试者给药权利要求 1 的缀合物, 其中所述组合物包含治疗剂。

73. 一种递送治疗剂至受试者的方法, 其包括向所述受试者给药权利要求 19 的缀合物, 其中所述组合物包含治疗剂。

MMP- 靶向的治疗性和 / 或诊断性纳米载体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2011 年 11 月 30 日提交的美国临时专利申请第 61/565,461 号的优先权,其全部内容通过引用并入本文。

[0003] 在联邦赞助的研究和开发下所做的关于发明权利的陈述

[0004] 不适用

[0005] 关于以光盘提交的“序列表”、表格或计算机程序列表附件

[0006] 不适用

[0007] 发明背景

[0008] 癌症为一类可影响所有年龄人群的疾病。因此,人们作出很多努力以提供可治疗或诊断患者癌症的疗法。最近讨论了纳米载体的体内靶向递送,其为药物递送和诊断成像技术中的潜在新的途径。遗憾的是,在可有效治疗或诊断癌症的基于纳米载体的产品的制备中仍然存在障碍。

[0009] 即使不是全部,但也有许多实体肿瘤在其表面表达基质金属蛋白酶 (MMP) 或将其分泌入周围的基质中或通过血管生成引起 MMP 酶产生 (参见, Y. Chau, F. E. Tan 和 R. Langer, Bioconjugate Chem, 2004, 15:931-941 和 A. Matter, ‘Tumor Angiogenesis as a Therapeutic Target’, Drug Discovery Today, 6:1005-1024 (2001))。因此,肿瘤环境中 MMP2、9 和 13 酶含量以及其他,如膜结合家族的成员 MMP14-17 特别丰富。小鼠肿瘤模型中 MMP 酶的活性已通过使用基于 FRET 的 MMP 酶测定精确揭示,其中一旦承载染料的分子 (dye-bearing molecule) 被转运到肿瘤内,荧光染料即在体内释放 (L. Zhu, J. Xie, M. Swierczewska, F. Zhang, Q. Quan, Y. Ma, X. Fang, K. Kim, S. Lee, X. Chen, Theranostics, 2011, 1:18-27)。

[0010] 纳米颗粒,如脂质体,通常经修饰在其表面掺入聚乙二醇 (PEG) 基团从而提高体内性能。将脂质体纳米颗粒靶向至肿瘤内的肿瘤细胞相关受体或酶以及通过使它靶向细胞毒性的有效负荷 (或其他负荷) 的细胞摄取 (通过由酶 / 受体识别和结合事件所驱动的内吞作用 (或其他内化机制)) 是有利的。

[0011] 仍需要可治疗或诊断癌症并提供促进患者个体化护理的方式的新的靶向递送方法。本公开内容满足了这种需求。

发明内容

[0012] 本发明提供靶向的递送组合物以及它们治疗和诊断受试者的病症如癌性病症的使用方法。

[0013] 在本发明的一个方面,所述该靶向的递送组合物可包含纳米载体和缀合物,所述纳米载体包括治疗剂、诊断剂或其组合,所述缀合物具有下式:

[0014] A-(LPEG)-MMPⁱ;

[0015] 其中,

[0016] A 为将所述缀合物连接至所述纳米载体的联结组分 (attachment component);

[0017] (LPEG) 为连接基,其选自 1 至 3 个聚乙二醇组分的线性组合;如本文定义的 [(EG)(P)]_n;和如本文定义的 -Z¹-Z²-Z³- 连接基;和

[0018] MMPⁱ 为 MMP 抑制剂。

[0019] 该靶向的递送组合物以及制备和使用该组合物的方法给药物递送和诊断成像领域提供了多种独特的优点。例如,该靶向的递送组合物连接基可被合成具有离散(discrete)数量的单体,其可被修整为例如提供特定的长度和/或化学性质。而且,该连接基完全是用户可裁剪的且可被制备成包括仅一种类型的单体或以任何顺序的多种类型的单体。该连接基也可在固相载体上合成,其实现了简单、自动的合成。除了连接基,该靶向的递送组合物可用于通过使用较低剂量的药物更有效地治疗疾病,而如果以正常剂量给药会对患者有毒性。

[0020] 对本发明的性质和优点的进一步理解可通过参考说明书和附图的其余部分实现。

附图说明

[0021] 图 1 显示缀合物 1 的质谱。

[0022] 图 2 显示 4-(4-(吡啶-3-基氧基)苯基磺酰基)哌啶-1,4-二甲酸·1-叔丁基·4-乙基酯的合成。

[0023] 图 3 显示 1-(叔丁氧基羰基)-4-(4-(吡啶-3-基氧基)苯基磺酰基)哌啶-4-甲酸的合成。

[0024] 图 4 显示 4-(苄氧基氨基甲酰基)-4-(4-(吡啶-3-基氧基)苯基磺酰基)哌啶-1-甲酸叔丁基酯的合成。

[0025] 图 5 显示 N-(苄氧基)-4-(4-(吡啶-3-基氧基)苯基磺酰基)哌啶-4-甲酰胺的合成。

[0026] 图 6 显示 N-(苄氧基)-4-(4-(吡啶-3-基氧基)苯基磺酰基)哌啶-4-甲酰胺的 PEG1000 哌啶酰胺基胺衍生物的合成。

[0027] 图 7 显示 N-(苄氧基)-4-(4-(吡啶-3-基氧基)苯基磺酰基)哌啶-4-甲酰胺的 PEG1000 哌啶酰胺基胺衍生物的脱保护。

[0028] 图 8 显示经保护的 N-(苄氧基)-4-(4-(吡啶-3-基氧基)苯基磺酰基)哌啶-4-甲酰胺-PEG1000-PEG5000 缀合物的合成。

[0029] 图 9 显示 N-羟基-4-(4-(吡啶-3-基氧基)苯基-磺酰基)哌啶-4-甲酰胺-PEG1000-PEG5000 缀合物(缀合物 1)的合成。

[0030] 图 10 显示 4-((4-苄氧基苯基)磺酰基)哌啶-1,4-二甲酸·1-苄基·4-甲基酯的合成。

[0031] 图 11 显示 1-((苄氧基)羰基)-4-((4-苄氧基苯基)磺酰基)哌啶-4-甲酸的合成。

[0032] 图 12 显示 4-((4-苄氧基苯基)磺酰基)-4-(((四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)氨基甲酰基)哌啶-1-甲酸苄基酯的合成。

[0033] 图 13 显示 4-((4-苄氧基苯基)磺酰基)-4-(((四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)氨基甲酰基)哌啶的合成。

[0034] 图 14 显示 ((5S)-6-氧代-6-(4-((4-苄氧基苯基)磺酰基)-4-(((四氢-2H-吡

喃-2-基)氧基)氨基甲酰基)哌啶-1-基)己烷-1,5-二基)二氨基甲酸·苄基·叔丁基酯的合成。

[0035] 图 15 显示((2S)-6-氨基-1-氧代-1-(4-((4-苯氧基苯基)磺酰基)-4-(((四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)氨基甲酰基)哌啶-1-基)己-2-基)氨基甲酸叔丁基酯的合成。

[0036] 图 16 显示经保护的 4-((4-苯氧基苯基)磺酰基)-4-(((四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)氨基甲酰基)哌啶-PEG5000-DSPE 缀合物的合成。

[0037] 图 17 显示 N-羟基-4-((4-苯氧基苯基)-磺酰基)哌啶-4-甲酰胺-PEG5000-DSPE 缀合物(缀合物 2)的合成。

[0038] 图 18 显示就缀合物 2 观察到的质谱。

[0039] 图 19A 显示与经非靶向的脂质体奥沙利铂和非脂质体奥沙利铂处理的小鼠相比,在经 MMP 靶向的脂质体奥沙利铂处理的具有 BxPC3 胰腺肿瘤的小鼠中观察到的平均肿瘤体积。图 19B 显示经 MMP 靶向的脂质体奥沙利铂、非靶向的脂质体奥沙利铂和非脂质体奥沙利铂处理的试验组的存活率百分数。

[0040] 图 20A 显示与经非靶向的脂质体奥沙利铂和非脂质体奥沙利铂处理的小鼠相比,在经 MMP 靶向的脂质体奥沙利铂处理的具有 BxPC3 胰腺肿瘤的小鼠中观察到的体重变化。图 20B 显示经 MMP 靶向的脂质体奥沙利铂、非靶向的脂质体奥沙利铂和非脂质体奥沙利铂处理的试验组的存活、濒死(moribundity)、体重减轻、死亡、溃疡性肿瘤以及肿瘤负荷的比率。

[0041] 图 21A 显示与经非靶向的脂质体奥沙利铂和非脂质体奥沙利铂处理的小鼠相比,在经 MMP 靶向的脂质体奥沙利铂处理的具有过度表达的 MMP14 的人纤维肉瘤 HT1080 肿瘤的裸鼠中观察到的平均肿瘤体积。图 21B 显示经 MMP 靶向的脂质体奥沙利铂、非靶向脂质体奥沙利铂和非脂质体奥沙利铂处理的试验组的存活率百分数。

[0042] 图 22A 显示在不同浓度的 MMP 靶向的脂质体奥沙利铂存在下所观察到的 MMP2 的活性。图 22B 显示在不同浓度的 MMP 靶向的脂质体奥沙利铂存在下所观察到的 MMP14 的活性。

[0043] 发明详述

[0044] I. 定义

[0045] 如本文所用,术语“靶向的递送组合物”是指连接至具有下式的缀合物的纳米载体的组合物:A-(LPEG)-MMPⁱ,如本文进一步描述。本发明的组合物可用作治疗组合物、诊断组合物,或既用作治疗组合物又用作诊断组合物。在某些实施方案中,该组合物可被靶向于受试者或测试样品中表达 MMP 的具体组织,如本文进一步描述。

[0046] 如本文所用,术语“纳米载体”是指不同尺寸、形状、类型和用途的颗粒,其在本文进一步描述。如本领域技术人员所理解,纳米载体的特征,例如,尺寸,可取决于纳米载体的类型和/或用途以及本领域通常公知的其它因素。通常,纳米载体的尺寸范围可为约 1nm 至约 1000nm。在其它实施方案中,纳米载体的尺寸范围可为约 10nm 至约 200nm。在其它实施方案中,纳米载体的尺寸范围可为约 50nm 至约 150nm。在某些实施方案中,该纳米载体的尺寸大于肾脏排泄限度,例如,直径大于约 6nm。在其它实施方案中,纳米载体足够小以避免被肝从血液中清除,例如,直径小于 1000nm。纳米载体可包括球状、锥形、椭圆体和本领域通

常已知的其它形状。纳米载体可为中空的（例如，具有中空内核的实心外核）或实心的或为多层的（具有中空且实心的层或多种实心层）。例如，纳米载体可包括实心核区域和固体外部包封区域，这两者均可作为交联的。纳米载体可由一种物质构成或由多种物质的任意组合构成，包括脂质、聚合物、二氧化硅、磁性材料或金属材料（如金、氧化铁）等。脂质可包括脂肪、蜡、固醇、胆固醇、脂溶性维生素、单甘油酯、二甘油酯、磷脂、鞘脂、糖脂、阳离子或阴离子脂质、衍生的脂质、心肌磷脂等。聚合物通常可包括嵌段共聚物，大体上为聚（乳酸）、聚乳酸-乙醇酸共聚物、聚乙二醇、丙烯酸聚合物、阳离子聚合物以及本领域已知的用于制备纳米载体的其它聚合物。在一些实施方案中，聚合物可为生物可降解的和/或生物相容的。纳米载体可包括脂质体、胶束、脂蛋白、脂质涂覆的泡囊、嵌段共聚物胶束、聚合物泡囊、囊泡(niosome)、量子点、氧化铁颗粒、金颗粒、树枝状大分子或二氧化硅颗粒。在某些实施方案中，脂质单层或双层可完全或部分涂覆由能够被脂质涂覆的材料构成的纳米载体，例如，聚合物纳米载体。在一些实施方案中，脂质体可包括多层脂质体(MLV)、大单层脂质体(LUV)和小单层脂质体(SUV)。

[0047] 如本文所用，术语“治疗剂”是指化合物或分子，当其以有效量存在时，对需要其的受试者产生所需的治疗效果。本发明涉及很多种治疗剂以及它们与靶向的递送组合物联合的用途，如本文进一步描述。

[0048] 如本文所用，术语“诊断剂”是指可在受试者或测试样品中检测到的组分，且在本文进一步描述。

[0049] 如本文所用，术语“缀合物”通常是指包含连接基的分子。在一些实施方案中，本发明的缀合物具有式： $A-(LPEG)-MMP^i$ 。A为可将缀合物连接（共价或非共价）至纳米载体的联结组分。缀合物可共价连接至纳米载体的任何部分，包括表面或内部区域。共价连接可通过使用本领域公知的连接化学经由官能团来实现，其在本文进一步描述。在其它实施方案中，非共价连接可包括本领域通常公知的相互作用，且在本文进一步描述。本发明的缀合物可进一步包括具有式(LPEG)的连接基和靶向剂 MMP^i ，它们各自在本文中进一步描述。

[0050] 如本文所用，术语“连接基”是指连接两种组分（例如，联结组分和靶向剂）的缀合物的部分。取决于所制备的缀合物和缀合物的所需性质，该连接基可从容易获得的单体组分组装以实现靶向剂和纳米载体或试剂的适当分离。

[0051] 如本文所用，术语“靶向剂”是指对靶点特异的分子，如基质金属蛋白酶(MMP)。在某些实施方案中，靶向剂可包括靶标酶的小分子模拟物或抑制剂。MMP抑制剂(MMP^i)可结合多种MMP，包括可与疾病的具体发展阶段相关的器官、组织、细胞、细胞外基质组分和/或细胞内隔室中的靶点。在一些实施方案中，靶点可包括癌细胞，特别是癌症干细胞。靶点可进一步包括细胞表面上的抗原，或肿瘤标志（其为存在于癌细胞上或与正常组织相比在癌细胞上更常见的抗原）。

[0052] 如本文所用，术语“隐形剂(stealth agent)”是指可修饰纳米载体的表面性质的分子。隐形剂可防止纳米载体彼此粘连和粘连至血液细胞或血管壁。在某些实施方案中，当纳米载体给药于受试者时，隐形纳米载体例如，隐形脂质体，可减少免疫原性和/或反应原性。隐形剂也可增加纳米载体在受试者中的血液循环时间。在一些实施方案中，纳米载体可包括隐形剂，例如，纳米载体部分或完全由隐形剂构成或纳米载体被隐形剂涂覆。本发明可用的隐形剂可包括本领域通常公知的那些。在某些实施方案中，隐形剂可包括“聚乙二醇”，

其是本领域公知的且通常是指氧化烯的低聚物或聚合物。聚乙二醇 (PEG) 可为直链或支链的, 其中支链的 PEG 分子可具有源自中心核的另外的 PEG 分子, 和 / 或多个 PEG 分子可接枝于聚合物主链。PEG 可包括低或高分子量 PEG, 例如, PEG500、PEG2000、PEG3400、PEG5000、PEG6000、PEG9000、PEG10000、PEG20000 或 PEG50000, 其中数字例如, 500, 表示平均分子量。在某些实施方案中, 聚乙二醇化的脂质存在于纳米载体 (例如, 脂质体) 的双层中, 其量足以使得纳米载体“隐形”, 其中隐形纳米载体显示减少的免疫原性。其它合适的隐形剂可包括但不限于树枝状大分子、聚氧化烯、聚乙烯醇、聚羧酸酯、多糖和 / 或羟基烷基淀粉。隐形剂可通过共价和 / 或非共价连接而连接至本发明的靶向的递送组合物, 如本文进一步描述。

[0053] 如本文所用, 术语“嵌入”是指试剂在纳米载体的表面上或邻近纳米载体的表面的位置。嵌入到纳米载体中的试剂, 例如, 位于脂质体的双层膜中或位于纳米载体的聚合物外壳内以使得被包含于该壳内。

[0054] 如本文所用, 术语“包封入”是指试剂被封入或完全包含于纳米载体内部的位置。例如, 对于脂质体, 治疗剂和 / 或诊断剂可被包封以存在于脂质体的水性内部中。该被包封的试剂可随后通过某些用于使脂质体不稳定或使包封的试剂释放的条件而引发而释放。

[0055] 如本文所用, 术语“束缚至 (tethered to)”是指一种组分连接至另一组分以使一种或多种组分可在空间中自由地到处移动。在某些示例性实施方案中, 联结组分可束缚至纳米载体以使得在纳米载体周围的溶液中自由地到处移动。在一些实施方案中, 联结组分可束缚至纳米载体的表面, 自该表面延展出去。

[0056] 如本文所用, 术语“脂质”是指脂质分子, 其可包括脂肪、蜡、固醇、胆固醇、脂溶性维生素、单甘油酯、二甘油酯、磷脂、鞘脂、糖脂、阳离子或阴离子脂质、衍生的脂质等。脂质可形成胶束、单层和双层膜。在某些实施方案中, 脂质可自组装为脂质体。在其它实施方案中, 脂质可作为单层或双层涂覆纳米载体的表面。

[0057] 如本文所用, 术语“受试者”是指在生命任何阶段的任何哺乳动物, 特别是人。

[0058] 如本文所用, 术语“给药”是指给药本发明的靶向的递送组合物的方法。本发明的靶向的递送组合物可按多种方式给药, 包括局部给药、肠胃外给药、静脉内给药、皮内给药、肌肉内给药、结肠给药、直肠给药或向腹膜内给药。肠胃外给药和静脉内给药为优选的给药方法。该靶向的递送组合物也可作为组合物或制剂的部分给药。

[0059] 如本文所用, 术语“治疗”病症、疾病、障碍或综合征包括 (i) 抑制该疾病、障碍或综合征, 即, 阻止其发展; 和 (ii) 缓解该疾病、障碍或综合征, 即, 使该疾病、障碍或综合征消退。如本领域已知的, 对于全身递送相比于局部递送的调整, 年龄、体重、一般健康、性别、饮食、给药时间、药物相互作用和病症严重性可能是需要考虑的, 且其可通过本领域技术人员使用常规实验而确定。

[0060] 如本文所用, 术语“制剂”是指给药至受试者的组分的混合物。适合肠胃外给药的制剂, 例如, 关节内 (关节中) 给药、静脉内给药、肌肉内给药、瘤内给药、皮内给药、腹腔内给药和皮下途径给药的制剂, 包括水性和非水性、等渗无菌注射溶液, 其可包含抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使得制剂与预期接受者的血液等渗的溶质, 和水性和非水性无菌悬浮液, 其可包括助悬剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂。注射溶液和悬浮液也可由无菌粉末、颗粒和片剂来制备。靶向的递送组合物的制剂可存在于单位剂量或多剂量密封容器中, 如安

甌和小瓶。靶向的递送组合物,在单独或与其它合适的组分组合时,可制备成气溶胶制剂(即,它们可被“雾化”)以通过吸入经由口或鼻给药。气溶胶制剂可置于加压可接受的推进剂中,如二氯二氟甲烷、丙烷、氮气等。用于直肠给药的合适的制剂包括,例如,栓剂,其包含有效量的靶向的递送组合物和栓剂基质。合适的栓剂基质包括天然或合成的甘油三酯或链烷烃。此外,也可使用明胶直肠胶囊,其包含靶向的递送组合物和基质的组合,所述基质包括,例如,液体甘油三酯、聚乙二醇和链烷烃。在某些实施方案中,制剂可局部给药或以滴眼剂形式给药。

[0061] 本发明的实施方案

[0062] II. 概况

[0063] 本发明提供靶向的递送组合物及其所述组合物治疗和诊断受试者病症的方法。公开的组合物和方法相比现有方法提供了多种有益特征。例如,该靶向的递送组合物包括可经合成具有离散数量的单体的连接基,其可被修整为例如提供特定长度和/或化学性质。而且,该连接基是完全用户可修剪的且可被制备成包括仅一种类型的单体或以任何顺序的多种类型的单体。该连接基也可在固相载体上合成,其允许简单、自动的合成。该靶向的递送组合物可用于通过使用较低剂量的药物更有效地治疗疾病(如果以正常剂量给药所述药物会对患者使有毒性的)。

[0064] 进入该实体肿瘤微环境可通过允许 MMP^i 靶向的脂质体进入穿过全身血液供应来实现。由于大部分肿瘤血管形成不充分且“渗漏”,现在 MMP^i 靶向的脂质体与肿瘤基质 MMP 酶接触且沿酶梯度分配。这种情况和 EPR 效应将有效地将纳米颗粒脂质体递送至肿瘤基质。一旦在基质中, MMP^i 靶向脂质体可接触膜结合 MMP 酶,并通过内吞作用被内化和将脂质体包封药物运送至细胞。因此,经合适锚定和连接的 MMP 酶抑制剂(MMP^i)分子可结合肿瘤基质,且如果设计得当,可内化到表达膜结合 MMP 酶的细胞中,从而将纳米颗粒/细胞毒性药物运送至肿瘤或肿瘤基质细胞中。

[0065] III. 靶向的递送组合物

[0066] A. 包括纳米载体的靶向的递送组合物

[0067] 在一方面,本发明的靶向的递送组合物可包括靶向的递送组合物,其包含:(a) 包括治疗剂或诊断剂或其组合的纳米载体;和(b) 具有下式的缀合物: $A-(LPEG)-MMP^i$ 。对于该缀合物,A 为用于将缀合物连接至纳米载体的联结组分,和 MMP^i 为 MMP 的抑制剂。(LPEG) 选自:i) 具有一至三个聚乙二醇组分的连接基;ii) 具有式 $[(EG)(P)]_m$ 的连接基;和 iii) 具有式 $-Z^1-Z^2-Z^3-$ 的连接基。对于具有式 $[(EG)(P)]_m$ 的连接基,EG 代表乙二醇组分(例如,乙二醇、三乙二醇、四乙二醇、六乙二醇等)且 P 代表磷酰基或硫代磷酰基,且下标 m 为 1 至 15 的整数。对于具有式 $-Z^1-Z^2-Z^3-$ 的连接基, Z^1 和 Z^3 独立地选自具有有限长度和 W_n 的 PEG 组分,其中 W 为氨基酸且下标 n 为 0 至 3 的整数;且 Z^2 选自具有有限长度和用于连接 Z^1 和 Z^3 的偶联基团的 PEG 组分,所述偶联基团选自酰胺、硫代酰胺、酯、氨基甲酸酯或脲。

[0068] 纳米载体

[0069] 多种纳米载体可用于构建靶向的递送组合物。如本领域技术人员所理解,纳米载体的特征,例如尺寸,可取决于纳米载体的类型和/或用途以及本领域通常公知的其它因素。合适的颗粒可为球体、椭圆体、扁平的、板形的、管状、立方体、长方体、卵形(oval)、椭圆形(ellipse)、圆柱体、锥体或角锥。合适的纳米载体的最大尺寸范围(例如,直径)可为约

1nm 至约 1000nm、约 10nm 至约 200nm 和约 50nm 至约 150nm。

[0070] 合适的纳米载体可由多种本领域通常已知的材料制备。在一些实施方案中,纳米载体可包括一种物质或多种物质的任意组合,这些物质包括脂质、聚合物、二氧化硅,或金属材料(如金、氧化铁)等。纳米载体的实例可包括但不限于脂质体、胶束、脂蛋白、脂质涂覆的泡囊、嵌段共聚物胶束、聚合物泡囊、囊泡(noisome)、氧化铁颗粒、金颗粒、二氧化硅颗粒、树枝状大分子或量子点。

[0071] 在一些实施方案中,该纳米载体为部分或完全由饱和或不饱和的脂质构成的脂质体。合适的脂质可包括但不限于脂肪、蜡、固醇、胆固醇、脂溶性维生素、单甘油酯、二甘油酯、磷脂、鞘脂、糖脂、衍生的脂质等。在一些实施方案中,合适的脂质可包括两亲的、中性的、非阳离子的、阴离子的、阳离子的或疏水的脂质。在某些实施方案中,脂质可包括细胞膜中通常存在的那些,如磷脂和/或鞘脂。合适的磷脂包括但不限于磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酸(PA)、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰甘油(PG)、磷脂酰丝氨酸(PS)和磷脂酰肌醇(PI)。合适的鞘脂包括但不限于鞘氨醇、神经酰胺、鞘磷脂、脑苷脂、硫脂、神经节苷脂和植物鞘氨醇。其它合适的脂质可包括脂质提取物,如卵PC、心脏提取物、脑提取物、肝提取物和大豆PC。在一些实施方案中,大豆PC可包括氢化大豆PC(HSPC)。阳离子脂质包括但不限于N,N-二油酰基-N,N-二甲基氯化铵(DODAC)、N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化铵(DDAB)、N-(1-(2,3-二油酰基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP)、N-(1-(2,3-二油基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)和N,N-二甲基-2,3-二油基氧基)丙基胺(DODMA)。非阳离子脂质包括但不限于二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱(DMPC)、二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)、二油酰基磷脂酰胆碱(DOPC)、二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)、二肉豆蔻酰基磷脂酰甘油(DMPG)、二硬脂酰基磷脂酰甘油(DSPG)、二油酰基磷脂酰甘油(DOPG)、二棕榈酰基磷脂酰甘油(DPPG)、二肉豆蔻酰基磷脂酰丝氨酸(DMPS)、二硬脂酰基磷脂酰丝氨酸(DSPS)、二油酰基磷脂酰丝氨酸(DOPS)、二棕榈酰基磷脂酰丝氨酸(DPPS)、二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)、棕榈酰基油酰基磷脂酰胆碱(POPC)、棕榈酰基油酰基-磷脂酰乙醇胺(POPE)和二油酰基-磷脂酰乙醇胺4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-羧酸酯(DOPE-mal)、二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻酰基磷酸乙醇胺(DMPE)、二硬脂酰基-磷脂酰-乙醇胺(DSPE)、16-0-单甲基PE、16-0-二甲基PE、18-1-反PE、1-硬脂酰基-2-油酰基-磷脂酰基乙醇胺(SOPE)、1,2-二反油酰基(elaidoyl)-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(反DOPE)和心肌磷脂。在某些实施方案中,脂质可包括衍生的脂质,如聚乙二醇化脂质。衍生的脂质可包括,例如,DSPE-PEG2000、胆固醇-PEG2000、DSPE-聚甘油,或本领域通常公知的其它衍生物。

[0072] 任何脂质的组合可用于构造纳米载体,如脂质体。在某些实施方案中,靶向的递送组合物的脂质组合物,如脂质体,可经修整后影响脂质体的特征,如泄漏率(leakage rate)、稳定性、粒径、 ζ 电势、蛋白质结合、体内循环和/或组织(如肿瘤、肝、脾等)中的聚集。例如,DSPC和/或胆固醇可用于减少从脂质体的泄漏。可包括带负电或带正电的脂质,如DSPG和/或DOTAP,以影响脂质体的表面电荷。在一些实施方案中,脂质体可包括约10种或更少种类的脂质,或约5种或更少种类的脂质,或约3种或更少种类的脂质。存在的具体类型的脂质的摩尔百分数(mol%)通常占纳米载体(如脂质体)中存在的总脂质的约0%至约10%、约10%至约30%、约30%至约50%、约50%至约70%、约70%至约

90%、约 90% 至 100%。本文所述的脂质可包含在脂质体中,或该脂质可用于涂覆本发明的纳米载体,如聚合物纳米载体。涂层可部分或完全围绕纳米载体且可包括单层和 / 或双层。在一个实施方案中,脂质体可由约 50.6mol% HSPC、约 44.3mol% 胆固醇和约 5.1mol% DSPE-PEG2000 构成。

[0073] 在其它实施方案中,部分或全部纳米载体可包括聚合物,如嵌段共聚物或本领域已知的用于制备纳米载体的其它聚合物。在一些实施方案中,该聚合物可为生物可降解的和 / 或生物相容的。合适的聚合物可包括但不限于聚乙烯、聚碳酸酯、聚酐、聚羧酸、聚丙烯富马酸酯、聚己内酯、聚酰胺、聚缩醛、聚醚、聚酯、聚(原酸酯)、聚氰基丙烯酸酯、聚乙烯醇、聚氨酯、聚磷腈、聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯、聚氰基丙烯酸酯、聚脲、聚苯乙烯、聚胺及其组合。在一些实施方案中,示例性颗粒可包括壳交联的 knedels,其在以下文献进一步描述:Becker 等人,美国专利第 11/250830 号;Thurmond, K. B. 等人, J. Am. Chem. Soc., 119(28)6656 - 6665 (1997); Wooley, K. L., Chem. Eur. J., 3(9):1397-1399 (1997); Wooley, K. L., J. Poly. Sci.:Part A:Polymer Chem., 38:1397-1407 (2000)。在其它实施方案中,合适的颗粒可包括乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA) (Fu, K. 等人, Pharm Res., 27:100-106 (2000))。

[0074] 用于连接至纳米载体的缀合物

[0075] 在某些实施方案中,包含纳米载体的靶向的递送组合物还可包括具有下式的缀合物: A-(LPEG)-MMPⁱ, 其中联结组分 A 可用于将缀合物连接至纳米载体。该联结组分可连接至纳米载体上的任何位置,如纳米载体的表面。该联结组分可通过多种方式连接至纳米载体,包括共价和 / 或非共价连接。如下文进一步描述,该缀合物还包括连接基 (LPEG) 和 MMPⁱ 靶向剂。

[0076] 某些实施方案中,该联结组分 A 可包括官能团,其可用于将联结组分共价连接至纳米载体上存在的反应性基团。该官能团可位于联结组分上的任何位置,如联结组分的末端位置。多种官能团是本领域通常已知的且可在多种类型的反应中反应,所述反应为例如但不限于亲核取代(例如,胺和醇与酰卤或活性酯的反应)、亲电取代(例如,烯胺反应)和向碳-碳和碳-杂原子重键的加成(例如,迈克尔反应或迪-阿加成)。这些和其它有用的反应公开于,例如, March, Advanced Organic Chemistry, 3rd Ed., John Wiley & Sons, New York, 1985; 和 Hermanson, Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego, 1996 中。合适的官能团可包括,例如: (a) 羧基及其多种衍生物,包括,但不限于, N-羟基琥珀酰亚胺酯、N-羟基苯并三唑酯、酰基卤、酰基咪唑、硫酸酯、对硝基苯基酯、烷基、烯基、炔基和芳族酯; (b) 可转化为酯、醚、醛等的羟基; (c) 卤代烷基,其中该卤根随后可被亲核基团代替,所述亲核基团为例如,胺、羧酸根阴离子、硫醇阴离子、负碳离子或烷氧离子,从而导致新的基团在卤素原子位点的共价连接; (d) 亲二烯体基团 (dienophile group), 其可参与迪-阿反应,例如,马来酰亚胺基; (e) 醛或酮基团,用于通过形成羰基衍生物,例如,亚胺、腙、缩氨基脲或肟,或通过如 Grignard 加成或烷基锂加成的反应而衍生化; (f) 磺酰基,用于随后的与胺的反应,例如,形成磺酰胺; (g) 硫醇 (thiol) 基团,其可转化为二硫化物或与酰卤或 Michael 受体反应; (h) 氨基或巯基 (sulfhydryl), 其可,例如,酰化、烷基化或氧化; (i) 烯烃,其可经历,例如,环加成、酰化、Michael 加成等; 和 (j) 环氧化物,其可例如,与胺和羟基化合物反应。在一些实施方案中,基于点击化学 (click chemistry) 的平台可用于

将联结组分连接至纳米载体 (Kolb, H. C. 等人 M. G. Finn 和 K. B. Sharpless, Angew. Chem. Int'l. Ed. 40(11):2004 - 2021(2001))。在一些实施方案中,该联结组分可包括一个官能团或多个官能团(其导致与纳米载体的多个共价键)。

[0077] 表 1 提供了可用在本发明中的官能团的另外的非限制性、代表性目录。

[0078] 表 1. 用于缀合化学的示例性官能团对

[0079]

官能团:	与基团反应:
酮和醛基团	氨基、酰肼基(hydrazido)和氨基氧基
酰亚胺	氨基、酰肼基和氨基氧基
氰基	羟基
烷化剂(如卤代烷基和马来酰亚氨基(maleimido)衍生物)	硫醇、氨基、酰肼基、氨基氧基
羧基(包括活化羧基)	氨基、羟基、酰肼基、氨基氧基
活化磺酰基(如磺酰氯)	氨基、羟基、酰肼基、氨基氧基
巯基	巯基
His-标志物(如 6-His 标志的肽或蛋白)	氮川乙酸镍(Nickel nitriloacetic acid)

[0080]

质)	
----	--

[0081] 在其它实施方案中,联结组分可通过非共价相互作用被连接至纳米载体,该非共价相互作用可包括但不限于亲和力相互作用、金属配位、物理吸附、疏水相互作用、范德华相互作用、氢键合相互作用、磁性相互作用、静电相互作用、偶极-偶极相互作用、抗体-结合相互作用、互补 DNA 之间的杂交相互作用等。在一些实施方案中,联结组分可存在于纳米载体(例如脂质体)的脂质双层部分中。例如,联结组分可为部分或完全与脂质双层的疏水性和/或亲水性区域相互作用的脂质。在一些实施方案中,该联结组分可包括允许与纳米载体非共价相互作用的一个基团,但也包括多个基团。例如,多个离子电荷可用于产生联结组分和纳米载体之间的足够的非共价相互作用。在替代性实施方案中,该联结组分可包括多种脂质,使得该多种脂质与脂质体双层膜或涂覆在纳米载体上的双层或单层相互作用。在某些实施方案中,周围的溶液条件可改变以破坏非共价相互作用,从而将联结组分从纳米载体上分离。

[0082] 连接基

[0083] 指定的连接基(LPEG)为在本文提供的组合物中使用的靶向递送缀合物的另一特征。本领域技术人员可理解多种连接基是本领域已知的且可在,例如,以下文献中找到:Hermanson, G. T., Bioconjugate Techniques, 2nd Ed., Academic Press, Inc. (2008)。本发明的连接基可用于向组合物提供另外的性质,如在缀合物的不同部分,例如, A 和 MMPⁱ 之间

提供间隔。该间隔可用于,例如,克服纳米载体引起的空间位阻问题,例如,当靶向剂结合至靶点时。在一些实施方案中,连接基可用于改变靶向的递送组合物的物理性质。

[0084] 在一组实施方案中,连接基 (LPEG) 具有下式:

[0085] $-Z^1-Z^2-Z^3-$ 。

[0086] 在一些实施方案中, Z^1 和 Z^3 独立地选自具有限定长度和 W_n 的 PEG 组分,其中 W 为氨基酸且下标 n 为 0 至 3 的整数;且 Z^2 选自具有限定长度和用于连接 Z^1 和 Z^3 的选自酰胺、硫代酰胺、酯、氨基甲酸酯或脲的偶联基团的 PEG 组分。在一些实施方案中, (LPEG) 为 $-Z^1-Z^2-Z^3-$ 。在一些实施方案中, Z^1 为 W_n ; Z^2 选自酰胺、硫代酰胺、酯、氨基甲酸酯、脲或其组合;且 Z^3 为具有限定长度的 PEG 组分。在一些实施方案中,下标 n 为 1。在一些实施方案中,下标 n 为 2。在一些实施方案中,下标 n 为 3。在一些实施方案中,下标 n 为 0。在下标 n 不为 0 的那些实施方案中,氨基酸 W 可以是 α -氨基酸。连接基可含有任何合适的 α -氨基酸。合适的 α -氨基酸的实例包括,但不限于,丙氨酸、半胱氨酸、门冬氨酸、谷氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、亮氨酸、蛋氨酸、天冬酰胺、脯氨酸、谷氨酸、精氨酸、丝氨酸、苏氨酸、缬氨酸、色氨酸和酪氨酸。在一些实施方案中, α -氨基酸选自门冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸和甘氨酸。在一些实施方案中, α -氨基酸选自谷氨酸和赖氨酸。在一些实施方案中, α -氨基酸是赖氨酸。

[0087] 在一些实施方案中, Z^1 和 Z^3 中的每一个为具有限定长度的 PEG 组分,且 Z^2 为用于连接两个 PEG 组分的偶联基团 (例如,酰胺、硫代酰胺、酯、氨基甲酸酯、脲或组合连接基 (linkage group))。本领域技术人员应理解偶联基团 (Z^2) 常常是在各端具有官能团的烯基,所述官能团可相同或不同,以方便 $-Z^1-Z^2-Z^3-$ 的组装。例如,在一组实施方案中, Z^1 为连接至联结组分的 PEG 组分 (A, 优选脂质如磷脂或 cardiolipin 分子)。类似地, Z^3 为连接至 MMPⁱ 的 PEG 组分。具有已知长度和用于连接基组装的所需官能团的许多 PEG 组分是市售的或可通过已知方法制备。例如,具有下式的 PEG 组分: $\text{HO}_2\text{C}-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{24}\text{NH}-\text{BOC}$ 容易获得且具有可选择性反应以制备合适的连接基组装的官能团。在一组实施方案中, Z^1 为 PEG3400 或 PEG5000 组分 (分别 77 或 140 个聚乙二醇单元)。在其他实施方案中, Z^3 为 PEG1000 组分 (24 个聚乙二醇单元)。在某些所选实施方案中, (LPEG) 具有下式:

[0088] $-\text{C}(\text{O})-\text{PEG}_{3400-5000}-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})_n\text{H}-\text{PEG}_{1000}-\text{C}(\text{O})-$ 。

[0089] 在一些实施方案中, (LPEG) 具有下式:

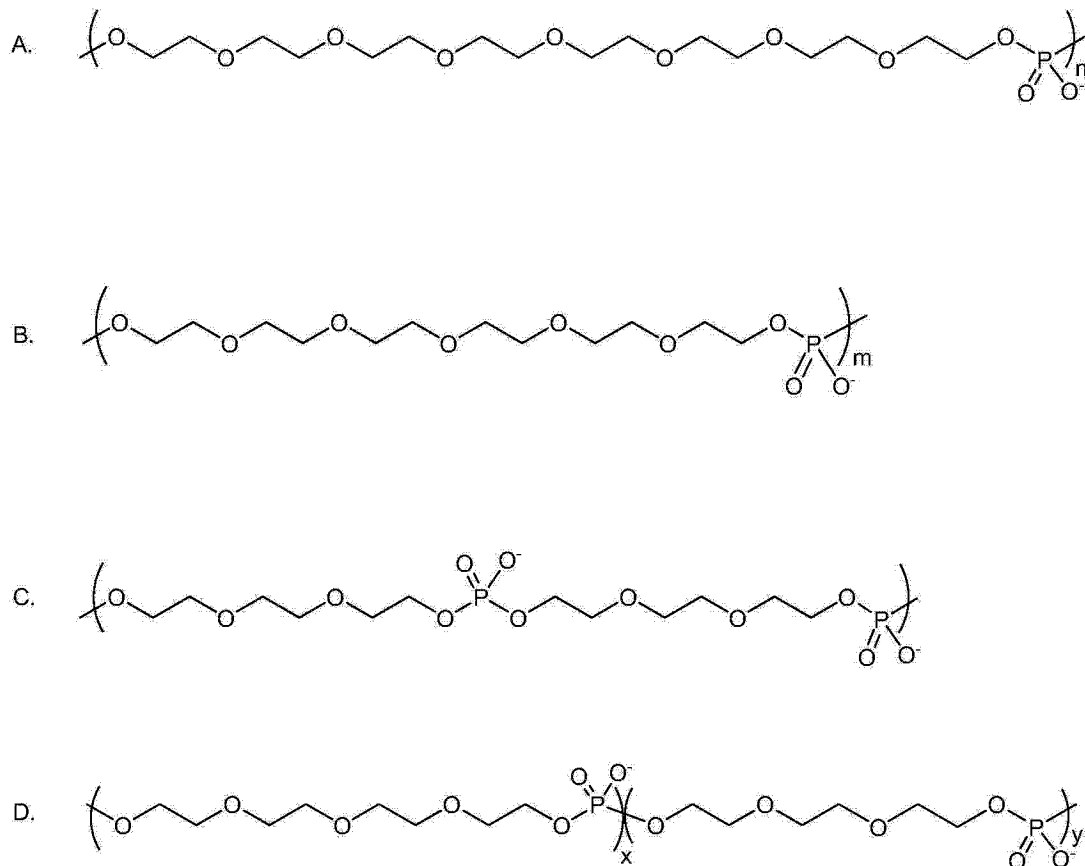
[0090] $-\text{C}(\text{O})-\text{PEG}_{3400-5000}-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{C}(\text{O})-$ 。

[0091] 在一组实施方案中,该靶向的递送组合物可包括具有下式的连接基 (LPEG): $[(\text{EG})(\text{P})]_m$, 其中各 EG 为独立地选自三乙二醇、四乙二醇、五乙二醇、六乙二醇、七乙二醇和八乙二醇的乙二醇基团;且 P 独立地选自磷酸酯和硫代磷酸酯。在一些实施方案中, m 可等于足以使连接基长于从纳米载体延伸的聚(乙二醇)部分的数字。在一些实施方案中, m 可大于 1。在其它实施方案中, m 可为 1 至 10、1 至 20、1 至 30 或 1 至 40 的整数。在其它实施方案中, m 可为 2 至 12、3 至 12、4 至 12、5 至 12、6 至 12、7 至 12、8 至 12、9 至 12、10 至 12 和 11 至 12 的整数。在其它实施方案中, m 的范围可为 4 至 20、6 至 20、8 至 20、10 至 20、12 至 20、14 至 20、16 至 20 和 18 至 20。在一个实施方案中, m 可为 8。在其它实施方案中, m 可为 4、5、6、7、8、9、10、11 或 12。关于 EG 和 P, 这两者的任意组合可用于连接基。例如,该连接基可由一种类型的乙二醇构成,如仅具有磷酸酯的六乙二醇 (HEGp)。在其它实施方案

中,可使用不同的乙二醇且并且与磷酸酯或硫代磷酸酯的任何组合进行组合。在一个示例性实施方案中,该连接基可为四乙二醇-磷酸酯-六乙二醇-硫代磷酸酯-六乙二醇-磷酸酯-三乙二醇-磷酸酯。本领域技术人员将理解本发明的连接基可用的巨大数量的组合。

[0092] 以下举例说明所述连接基的几种变体:

[0093]



[0094] 连接基 A 显示为八乙二醇磷酸酯。在 A 中, m 可为, 例如, 1 至 20。A 也可任选为另一连接基的部分, 或 A 可连接至另一连接基。类似地, 连接基 B 显示为六乙二醇磷酸酯 (本文中描述为 HEGp)。B 可包括多个重复单位, 例如, m 可为 1 至 20, 或优选约 8。如连接基 C 所示, m 可等于具体整数, 例如, $m = 2$, 如通过三乙二醇磷酸酯的示例性二聚体所描述。或者, 连接基可例如使用另外的下标 x 和 y 描述, 使得 $x + y = m$ 。连接基 D, 例如, 显示为连接至三乙二醇磷酸酯的四乙二醇磷酸酯。在某些实施方案中, x 和 y 下标的括号内的乙二醇部分 (EG) 可独立地选自三乙二醇、四乙二醇、五乙二醇、六乙二醇、七乙二醇和八乙二醇。

[0095] 治疗剂

[0096] 用于本发明的靶向的治疗性或诊断性递送组合物的纳米载体包括治疗剂、诊断剂或其组合。该治疗剂和 / 或诊断剂可存在于纳米载体之中、之上或其周围的任何地方。在一些实施方案中, 该治疗剂和 / 或诊断剂可被嵌入、包封入纳米载体中或被束缚至纳米载体。在某些实施方案中, 纳米载体为脂质体且该诊断剂和 / 或治疗剂被包封在脂质体中。

[0097] 用于本发明的治疗剂可包括任何用于治疗受试者病症的试剂。通常, 可使用本领域已知的任何治疗剂, 包括但不限于以下所列的试剂: 美国药典 (U. S. P.), Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th Ed., McGraw Hill, 2001; Katzung, Ed., Basic and Clinical Pharmacology, McGraw-Hill/Appleton & Lange, 8th

ed., 2000 年 9 月 21 日 ;Physician's Desk Reference(Thomson Publishing;和 / 或 The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 18th ed., 2006, Beers and Berkow, Eds., Merck Publishing Group;或, 在动物的情况下, The Merck Veterinary Manual, 9th ed., Kahn Ed., Merck Publishing Group, 2005;将其全部内容并入本文作为参考。

[0098] 治疗剂可根据预期治疗的疾病的类型而选择。例如, 某些类型的癌症或肿瘤, 如癌、肉瘤、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤, 和中枢神经系统癌症以及实体瘤和混合肿瘤, 可包括给药相同或可能不同的治疗剂。在某些实施方案中, 可递送治疗剂以治疗或影响受试者的癌性病征, 且其可包括化学治疗剂, 如烷化剂、抗代谢物、蒽环类抗生素、生物碱、拓扑异构酶抑制剂, 和其它抗癌剂。在一些实施方案中, 该治疗剂可包括反义治疗剂、microRNA、siRNA 和 / 或 shRNA 治疗剂。

[0099] 在一些实施方案中, 治疗剂可包括抗癌剂或细胞毒素剂, 包括但不限于阿瓦斯丁、多柔比星、顺铂、奥沙利铂、卡铂、5-氟尿嘧啶、吉西他滨或紫杉烷, 如紫杉醇和多西紫杉醇。另外的抗癌剂可包括但不限于 20-epi-1, 25-二羟基维生素 D3, 4-甘薯苦醇、5-乙炔基尿嘧啶、9-二氢紫杉醇、阿比特龙、阿西维辛、阿柔比星、盐酸阿考达唑、阿克罗宁、acylfulvene、腺环戊醇、阿多来新、阿地白介素、all-tk 拮抗剂、六甲蜜胺、氨莫司汀、安波霉素、醋酸阿美苄醌、amidox、氨磷汀、氨鲁米特、氨基乙酰丙酸、氨柔比星、安吡啶、阿那格雷、阿那曲唑、穿心莲内酯、血管发生抑制剂、拮抗剂 D、拮抗剂 G、安雷利克斯、安曲霉素、抗背侧化形态形成蛋白 -1 (anti-dorsalizing morphogenetic protein-1)、抗雌激素药、抗癌酮、反义寡核苷酸、阿非迪霉素甘氨酸盐、凋亡基因调节剂、凋亡调节剂、脱嘌呤核酸、ARA-CDP-DL-PTBA、精氨酸脱氨基酶、门冬酰胺酶、曲林菌素、asulacrine、阿他美坦、阿莫司汀、海洋环肽 1、海洋环肽 2、海洋环肽 3、阿扎胞苷、阿扎司琼、阿扎霉素、重氮酪氨酸、阿扎替派、阿佐霉素、浆果赤霉素 III 衍生物、balanol、巴马司他、苯并二氢卟吩、苯佐替派、苯甲酰基十字孢碱、 β 内酰胺衍生物、 β -alethine、 β 克林霉素 B、桦木酸、BFGF 抑制剂、比卡鲁胺、比生群、盐酸比生群、双吡丙啶基精胺、双奈法德、甲磺酸双奈法德、bistratene A、比折来新、博来霉素、硫酸博来霉素、BRC/ABL 拮抗剂、breflate、布喹那钠、溴匹立明、布多替钛、白消安、丁硫氨酸亚砷胺、放线菌素 C、卡泊三醇、卡弗他丁 C、卡普唑酮、喜树碱衍生物、金丝雀痘 IL-2 (canarypox IL-2)、卡培他滨、卡醋胺、卡贝替姆、卡铂、甲酰胺 - 氨基 - 三唑、羧基酰胺基三唑、carest M3、卡莫司汀、cam700、软骨衍生的抑制剂 (cartilage derived inhibitor)、盐酸卡柔比星、卡折来新、酪蛋白激酶抑制剂、溴粟精胺、杀菌肽 B、西地芬戈、西曲瑞克、苯丁酸氮芥、绿素类、氯喹啉磺酰胺、西卡前列素、西罗霉素、顺铂、顺 - 卟啉、克拉屈滨、氯米芬类似物、克霉唑、collismycin A、collismycin B、考布他汀 A4、考布他汀类似物、conagenin、crambescidin816、克立那托、甲磺酸克立那托、念珠藻素 8、念珠藻素 A 衍生物、curacin A、环戊苄醌、环磷酰胺、cycloplata、cypemycin、阿糖胞苷、阿糖胞苷烷磷酸酯 (cytarabine ocfosfate)、溶细胞因子、磷酸己烷雌酚、达卡巴嗪、达昔单抗、放线菌素 D、盐酸柔红霉素、地西他滨、dehydrodidemnin B、地洛瑞林、右异环磷酰胺、右奥马铂、右雷佐生、右维拉帕米、地扎呱宁、甲磺酸地扎呱宁、地吡啶、代代宁 B、didox、二乙基去甲精胺、二氢 -5- 氮胞苷、dioxamycin、二苯基螺莫司汀、多西紫杉醇、二十二烷醇、多拉司琼、去氧氟尿苷、多柔比星、盐酸多柔比星、屈洛昔芬、柠檬酸屈洛昔芬、丙酸屈他雄酮、屈大麻酚、达佐霉素、duocarmycin SA、依布硒、依考莫司汀、依达曲沙、依地福新、依

决洛单抗、依氟鸟氨酸、盐酸依氟鸟氨酸、榄香烯、依沙芦星、乙嘧替氟、恩洛铂、恩普氨酯、依匹哌啉、表柔比星、盐酸表柔比星、爱普列特、厄布洛唑、红细胞基因治疗载体体系、盐酸依索比星、雌莫司汀、雌莫司汀类似物、雌莫司汀磷酸酯钠、雌激素激动剂、雌激素拮抗剂、依他硝唑、依托泊苷、磷酸依托泊苷、氯苯乙嘧啶、依西美坦、法倔唑、盐酸法倔唑、法扎拉滨、芬维 A 胺、非格司亭、非那雄胺、夫拉平度、氟卓斯汀、氟尿苷、fluasterone、氟达拉滨、磷酸氟达拉滨、fluorodaunorubicin 盐酸盐、氟尿嘧啶、fluorocitabine、福酚美克、福美坦、磷喹酮、福司曲星、福司曲星钠、福莫司汀、钆替沙林、硝酸镓、加洛他滨、加尼瑞克、明胶酶抑制剂、吉西他滨、盐酸吉西他滨、谷胱甘肽抑制剂、hepsulfam、heregulin、六亚甲基双乙酰胺、羟基脲、金丝桃素、伊班膦酸、伊达比星、盐酸伊达比星、吡啶昔酚、伊决孟酮、异环磷酰胺、ilmofosine、伊洛马司他、咪唑并吡啶酮、咪喹莫特、免疫刺激剂肽、胰岛素样生长因子 -1 受体抑制剂、干扰素激动剂、干扰素 α -2A、干扰素 α -2B、干扰素 α -N1、干扰素 α -N3、干扰素 β -1A、干扰素 γ -1B、干扰素、白介素、碘苄胍、碘阿霉素、异丙铂、伊立替康、盐酸伊立替康、伊罗普拉、伊索拉定、isobengazole、isohomohalicondrin B、伊他司琼、jasplakinolide、kahalalide F、lamellarin-N triacetate、兰瑞肽、醋酸兰瑞肽、leinamycin、来格司亭、硫酸蘑菇多糖、leptolstatin、来曲唑、白血病抑制因子、白细胞 α 干扰素、醋酸亮丙瑞林、亮丙瑞林 / 雌激素 / 孕酮、亮丙瑞林、左旋咪唑、利阿唑、盐酸利阿唑、线性多胺类似物、亲脂二糖肽、亲脂铂化合物、lissoclinamide7、洛铂、胍乙基磷酸丝氨酸、洛美曲索、洛美曲索钠、洛莫司汀、氯尼达明、洛索萘醌、盐酸洛索萘醌、洛伐他汀、洛索立宾、勒托替康、lutetium texaphyrin、lysofylline、裂解肽、美坦新、mannostatin A、马立马司他、马索罗酚、maspin、基质溶解因子抑制剂、基质金属蛋白酶抑制剂、美登素、氮芥盐酸盐、乙酸甲地孕酮、醋酸美仑孕酮、美法仑、美诺立尔、merbarone、巯基嘌呤、美替瑞林、蛋氨酸酶、甲氨蝶呤、甲氨蝶呤钠、甲氧氯普胺、氯苯氨啉、美妥替哌、微藻蛋白激酶 C 抑制剂、MIF 抑制剂、米非司酮、米替福新、米立司亭、错配双链 RNA、米丁度胺、米托卡星、丝裂红素、米托洁林、米托胍脲、二溴卫矛醇、米托马星、丝裂霉素、丝裂霉素类似物、米托蒽胺、米托司培、米托坦、迈托毒素成纤维细胞生长因子 - 皂草素、米托萘醌、盐酸米托萘醌、莫法罗汀、莫拉司亭、单克隆抗体、人绒毛膜促性腺激素、单磷酸脂质 a / 分支杆菌细胞壁 SK、莫哌达醇、多重抗药性基因抑制剂、基于多重肿瘤抑制因子 1 的治疗、芥子抗癌剂、印度洋海绵 (mycaperoxide) B、分枝杆菌细胞壁提取物、麦考酚酸、myriaporone、正乙酰基地那林、那法瑞林、nagrestip、纳洛酮 / 喷他佐辛、napavin、萘萘二醇、那托司亭、奈达铂、奈莫柔比星、奈立膦酸、中性肽链内切酶、尼鲁米特、nisamycin、一氧化氮调节剂、硝基氧抗氧化剂 (nitroxide antioxidant)、nitrullyn、诺考达唑、诺拉霉素、n- 取代的苯甲酰胺、06- 苄基鸟嘌呤、奥曲肽、okicenone、寡核苷酸、奥那司酮、昂丹司琼、oracin、口腔细胞因子诱导剂、奥马铂、奥沙特隆、奥沙利铂、oxaunomycin、奥昔舒仑、紫杉醇、紫杉醇类似物、紫杉醇衍生物、palauamine、棕榈酰基根霉素、帕米磷酸、人参炔三醇、帕诺米芬、parabactin、帕折普汀、培门冬酶、培得星、培利霉素、戊氮芥、戊聚硫钠、喷司他丁、pentrozole、硫酸培洛霉素、全氟溴烷、培磷酰胺、紫苏醇、phenazinomycin、乙酸苯酯、磷酸酶抑制剂、溶链菌素、盐酸毛果云香碱、哌泊溴烷、哌泊舒凡、吡柔比星、吡曲克辛、盐酸吡罗萘醌、placetin A、placetin B、纤溶酶原激活物抑制剂、铂络合物、铂化合物、铂 - 三胺络合物、普卡霉素、普洛美坦、吡吩姆钠、泊非霉素、泼尼莫司汀、盐酸丙卡巴肼、丙基双吡啶酮、前列腺素 J2、前列腺癌抗雄

激素、蛋白酶体抑制剂、基于蛋白质 A 的免疫调节剂、蛋白质激酶 C 抑制剂、蛋白质酪氨酸磷酸酶抑制剂、嘌呤核苷磷酸化酶抑制剂、嘌呤霉素、嘌呤霉素盐酸盐、红紫素、吡唑呋喃菌素、吡唑并吡啶、吡哆醛化血红蛋白聚氧乙烯缀合物、RAF 拮抗剂、雷替曲塞、雷莫司琼、RAS 法呢基蛋白质转移酶抑制剂、RAS 抑制剂、RAS-GAP 抑制剂、脱甲基瑞替普汀、铈 RE186 依替膦酸盐、根霉素、利波腺苷、核酶、RII 维甲酰胺 (retinamide)、RNAi、罗谷亚胺、罗希吐碱、罗莫肽、罗喹美克、rubiginone B1、ruboxyl、沙芬戈、盐酸沙芬戈、saintopin、sarcnu、sarcophytol A、沙格司亭、SDI1 模拟物、司莫司汀、老化衍生的抑制剂 1、正义寡核苷酸、信号转导抑制剂、信号转导调节剂、辛曲秦、单链抗原结合蛋白质、sizofuran、索布佐生、硼卡钠、苯基乙酸钠、soloverol、生长调节素结合蛋白质、索纳明、磷乙酰天冬氨酸钠、膦门冬酸、司帕霉素、spicamycin D、盐酸螺旋锗、螺莫司汀、螺铂、脾脏五肽、海绵抑制素 1、角鲨胺、干细胞抑制剂、干细胞分裂抑制剂、stipiamide、链黑菌素、链佐星、基质分解素抑制剂、sulfinosine、磺氯苯脲、强效血管活性肠肽拮抗剂、suradista、苏拉明、苦马豆碱、合成糖胺聚糖、他利霉素、他莫司汀、他莫昔芬甲碘化物、牛磺莫司汀、他扎罗汀、替可加兰钠、替加氟、tellurapyrylium、端粒酶抑制剂、替洛萸醌盐酸盐、替莫泊芬、替莫唑胺、替尼泊苷、替罗昔隆、睾内酯、四氯十氧化物、tetrazomine、thaliblastine、沙利度胺、硫咪嘌呤、噻可拉林、硫鸟嘌呤、塞替派、血小板生成素、血小板生成素模拟物、胸腺法新、胸腺喷丁受体激动剂、胸腺曲南、甲状腺刺激激素、噻唑羧胺核苷、本紫红素乙酯锡、替拉扎明、二氯环戊二烯钛、盐酸拓扑替康、topsentin、托瑞米芬、柠檬酸托瑞米芬、全能干细胞因子、翻译抑制剂、醋酸曲托龙、维甲酸、三乙酰基尿苷、曲西立滨、磷酸曲西立滨、三甲曲沙、葡萄糖醛酸三甲曲沙、曲普瑞林、托烷司琼、盐酸妥布氯唑、妥罗雄脲、酪氨酸激酶抑制剂、酪氨酸磷酸化抑制剂、UBC 抑制剂、乌苯美司、尿嘧啶芥子、乌瑞替派、泌尿生殖窦衍生的生长抑制因子、尿激酶受体拮抗剂、伐普肽、variolin B、维拉雷琐、藜芦明、verdins、维替泊芬、硫酸长春碱、硫酸长春新碱、长春地辛、硫酸长春地辛、硫酸长春匹定、硫酸长春甘酯、硫酸长春罗新、长春瑞滨、酒石酸长春瑞滨、硫酸长春罗定、vinxaltine、硫酸长春利定、vitaxin、伏氯唑、扎诺特隆、折尼铂、亚苄维 C、净司他丁、净司他丁斯酯、或盐酸佐柔比星或前述药物的合适前药。

[0100] 在一些实施方案中，该治疗剂可为鸡尾酒式药物 (cocktail of agent) 的一部分，所述鸡尾酒式药物包括给药两种或更多种治疗剂。例如，可给药具有顺铂和奥沙利铂两者的脂质体。此外，该治疗剂可在免疫刺激性佐剂之前、之后或同时递送，所述佐剂为如铝凝胶或盐佐剂（例如，磷酸铝或氢氧化铝）、磷酸钙、内毒素、toll 样受体佐剂等。

[0101] 本发明的治疗剂也可包括用于治疗应用的放射性核素。例如，Auger 电子的发射体如 ^{111}In 可与螯合物如二亚乙基三胺五乙酸 (DTPA) 或 1, 4, 7, 10- 四氮杂环十二烷 -1, 4, 7, 10- 四乙酸 (DOTA) 组合，且被包括在靶向的递送组合物（如脂质体）中以用于治疗。其它合适的放射性核素和 / 或放射性核素 - 螯合物组合可包括但不限于 β 放射性核素 (^{177}Lu 、 ^{153}Sm 、 $^{88/90}\text{Y}$) 与 DOTA 的组合、 ^{64}Cu -TETA、 $^{188/186}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-IDA}$ ； $^{188/186}\text{Re}(\text{CO})_3$ 三胺（环状或线状）、 $^{188/186}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-Enpy}_2$ 和 $^{188/186}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-DTPA}$ 。

[0102] 如上所述，用于本发明的治疗剂可以多种方式与纳米载体结合，如被嵌入、包封入纳米载体中或被束缚至纳米载体。治疗剂的负载可通过本领域已知的多种方式实现，例如以下文献中公开的：de Villiers, M. M. 等人, Eds., Nanotechnology in Drug Delivery, Springer(2009)；Gregoriadis, G., Ed., Liposome Technology: Entrapment of drugs and

other materials into liposomes, CRC Press(2006)。在一组实施方案中,一种或多种治疗剂可负载至脂质体中。脂质体的负载可通过例如主动或被动方式进行。例如,治疗剂可在溶液中在脂质体的自组装过程中被包含在其中,从而使得治疗剂被包封在所述脂质体中。在某些实施方案中,该治疗剂也可被嵌入在脂质体双层或多层脂质体的多层中。在替代性实施方案中,该治疗剂可主动负载至脂质体中。例如,该脂质体可暴露于条件,如电穿孔,其中使双层膜对含有治疗剂的溶液可渗透,从而使得治疗剂进入到脂质体的内部容积中。

[0103] 诊断剂

[0104] 用于本发明的诊断剂可包括本领域已知的任何诊断剂,例如,在以下文献中提供的诊断剂:Armstrong 等人,Diagnostic Imaging,5th Ed., Blackwell Publishing(2004); Torchilin, V. P., Ed., Targeted Delivery of Imaging Agents, CRC Press(1995); Vallabhajosula, S., Molecular Imaging:Radiopharmaceuticals for PET and SPECT, Springer(2009)。诊断剂可通过多种方式检测,包括作为提供和/或增强可检测信号的试剂,该信号包括但不限于, γ -发射信号、放射性信号、回声信号、光学信号、荧光信号、吸收信号、磁性信号或断层摄影信号。用于使诊断剂成像的技术可包括但不限于,单光子发射计算机断层摄影术(SPECT)、磁共振成像(MRI)、光学成像、正电子发射断层摄影术(PET)、计算机断层摄影术(CT)、X-射线成像、 γ 射线成像等。

[0105] 在一些实施方案中,诊断剂可包括螯合剂,该螯合剂例如结合至待被用于多种诊断成像技术的金属离子。示例性螯合剂包括但不限于乙二胺四乙酸(EDTA)、[4-(1,4,8,11-四氮杂环十四烷-1-基)甲基]苯甲酸(CPTA)、环己烷二胺四乙酸(CDTA)、亚乙基双(氧亚乙基次氨基)四乙酸(EGTA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)、柠檬酸、羟基乙基乙二胺三乙酸(HEDTA)、亚氨基二乙酸(IDA)、三亚乙基四胺六乙酸(TTHA)、1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四(亚甲基膦酸)(DOTP)、1,4,8,11-四氮杂环十二烷-1,4,8,11-四乙酸(TETA)、1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)及其衍生物。

[0106] 放射性同位素可掺入本文所述的一些诊断剂中且可包括发射 γ 射线、正电子、 β 和 α 粒子和X-射线的放射性核素。合适的放射性核素包括但不限于²²⁵Ac、⁷²As、²¹¹At、¹¹B、¹²⁸Ba、²¹²Bi、⁷⁵Br、⁷⁷Br、¹⁴C、¹⁰⁹Cd、⁶²Cu、⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、¹⁸F、⁶⁷Ga、⁶⁸Ga、³H、¹²³I、¹²⁵I、¹³⁰I、¹³¹I、¹¹¹In、¹⁷⁷Lu、¹³N、¹⁵O、³²P、³³P、²¹²Pb、¹⁰³Pd、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、⁴⁷Sc、¹⁵³Sm、⁸⁹Sr、^{99m}Tc、⁸⁸Y和⁹⁰Y。在某些实施方案中,放射性试剂可包括¹¹¹In-DTPA、^{99m}Tc(CO)₃-DTPA、^{99m}Tc(CO)₃-ENPy₂、^{62/64/67}Cu-TETA、^{99m}Tc(CO)₃-IDA和^{99m}Tc(CO)₃三胺(环状或线状)。在其它实施方案中,该试剂可包括DOTA及其与¹¹¹In、¹⁷⁷Lu、¹⁵³Sm、^{88/90}Y、^{62/64/67}Cu或^{67/68}Ga的多种类似物。在一些实施方案中,该脂质体可被放射标记,例如,通过掺入连接至螯合物的脂质,如DTPA-脂质,如下文献中所提供:Phillips 等人, Wiley Interdisciplinary Reviews:Nanomedicine and Nanobiotechnology, 1(1):69-83(2008); Torchilin, V. P. & Weissig, V., Eds. Liposomes 2nd Ed.: Oxford Univ. Press(2003); Elbayoumi, T. A. & Torchilin, V. P., Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 33:1196-1205(2006); Mougin-Degraef, M. 等人, Int' l J. Pharmacology 344:110-117(2007)。

[0107] 在其它实施方案中,该诊断剂可包括光学试剂如荧光剂、磷光试剂、化学发光试剂等。多种试剂(例如染料、探针、标记或指示剂)是本领域已知的且可在本发明使用。(参

见,例如,Invitrogen, The Handbook—A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, Tenth Edition(2005))。荧光剂可包括多种有机和 / 或无机小分子或多种荧光蛋白质及其衍生物。例如,荧光剂可包括但不限于花青、酞菁、卟啉、靛青、罗丹明、吩噻嗪、苯基咕吨、吩噻嗪、吩噻嗪、荧光素、苯并卟啉、方酸菁、二吡咯并嘧啶酮、并四苯(tetracenes)、喹啉、吡嗪、咕啉、克酮酸(croconiums)、吡啶酮、菲啉、罗丹明、吡啶、蒽醌、chalcogenopyrylium 类似物、二氢卟吩、萘酞菁、甲川染料(methine dyes)、吲哚鎓染料(indolenium dyes)、偶氮化合物、甘菊蓝、氮杂甘菊蓝、三苯基甲烷染料、吲哚、苯并吲哚、吲哚碳菁、苯并吲哚碳菁,和具有 4, 4- 二氟 -4- 硼 -3a, 4a- 二氮杂 -s- 二环戊二烯并苯的通用结构的 BODIPY™ 衍生物,和 / 或任意这些的缀合物和 / 或衍生物。可使用的其它试剂包括,但不限于,例如,荧光素、荧光素 - 多天冬氨酸缀合物、荧光素 - 多谷氨酸缀合物、荧光素 - 多精氨酸缀合物、靛青绿、靛青 - 十二天冬氨酸缀合物、靛青 - 多天冬氨酸缀合物、异舒泛蓝、吲哚二磺酸盐(indole disulfonates)、苯并吲哚二磺酸盐、二(乙基羧基甲基)靛青、二(戊基羧基甲基)靛青、多羟基吲哚磺酸盐、多羟基苯并吲哚磺酸盐、刚性杂原子吲哚磺酸盐、靛青双丙酸、靛青双己酸、3, 6- 二氰基 -2, 5-[(N, N, N', N' - 四(羧基甲基)氨基]吡嗪、3, 6-[(N, N, N', N' - 四(2- 羟基乙基)氨基]吡嗪 -2, 5- 二羧酸、3, 6- 二(N- 氮杂环丁烷子基(azatedino))吡嗪 -2, 5- 二羧酸、3, 6- 二(N- 吗啉代)吡嗪 -2, 5- 二羧酸、3, 6- 二(N- 哌嗪子基)吡嗪 -2, 5- 二羧酸、3, 6- 二(N- 硫吗啉代)吡嗪 -2, 5- 二羧酸、3, 6- 二(N- 硫吗啉代)吡嗪 -2, 5- 二羧酸 S- 氧化物、2, 5- 二氰基 -3, 6- 二(N- 硫吗啉代)吡嗪 S, S- 二氧化物、吲哚碳菁四磺酸盐(indocarbocyaninetetrasulfonate)、氯吲哚碳菁和 3, 6- 二氨基吡嗪 -2, 5- 二羧酸。

[0108] 本领域技术人员将理解的是,使用的具体光学试剂可取决于用于激发的波长、皮肤下组织的深度和本领域通常公知的其它因素。例如,光学试剂的最佳的吸收或激发最大量可根据使用的试剂而改变,但通常,本发明的光学试剂将吸收以下光或被以下光激发:电磁波谱的紫外光(UV)、可见或红外(IR)范围的光。对于成像,在近红外处吸收和发射的染料(~ 700-900nm,例如,靛青)是优选的。对于使用内窥镜方法的局部可视化,在可见范围吸收的任何染料是合适的。

[0109] 在一些实施方案中,本发明的方法中使用的非电离辐射的波长范围可为约 350nm 至约 1200nm。在一个示例性实施方案中,该荧光剂可被波长在电磁波谱的可见部分的蓝色范围的光(约 430nm 至约 500nm)激发且以在电磁波谱的可见部分的绿色范围的波长(约 520nm 至约 565nm)发射。例如,荧光素染料可被波长约 488nm 的光激发且具有约 520nm 的发射波长。作为另一实例,3, 6- 二氨基吡嗪 -2, 5- 二甲酸可被波长约 470nm 的光激发且在波长约 532nm 发荧光。在另一实施方案中,光学试剂的激发和发射波长可落在电磁波谱的近红外范围。例如,靛青染料,如靛青绿,可被波长约 780nm 的光激发且具有约 830nm 的发射波长。

[0110] 在其它实施方案中,该诊断剂可包括但不限于本领域通常熟知的磁共振(MR)和 X- 射线造影剂,包括,例如,基于碘的 X- 射线造影剂、超顺磁氧化铁(SPIO)、钆或锰的复合物等。(参见,例如,Armstrong 等人,Diagnostic Imaging, 5th Ed., Blackwell Publishing(2004))。在一些实施方案中,诊断剂可包括磁共振(MR)显像剂。示例性磁共振试剂包括但不限于顺磁剂、超顺磁剂等。示例性顺磁剂可包括但不限于钆喷酸、钆特酸、

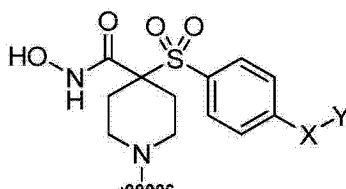
钆双胺、钆、钆特醇、锰福地吡、钆弗塞胺、柠檬酸铁铵、钆贝酸、钆布醇或钆塞酸。超顺磁剂可包括但不限于超顺磁氧化铁以及氧化铁和氧化亚铁复合物 (Ferristene)。在某些实施方案中,该诊断剂可包括 X- 射线造影剂,例如,在以下文献中提供:H. S. Thomsen, R. N. Muller 和 R. F. Mattrey, Eds., Trends in Contrast Media, (Berlin:Springer-Verlag,1999); P. Dawson, D. Cosgrove and R. Grainger, Eds., Textbook of Contrast Media (ISIS Medical Media 1999); Torchilin, V. P., Curr. Pharm. Biotech. 1:183-215 (2000); Bogdanov, A. A. 等人., Adv. Drug Del. Rev. 37:279-293 (1999); Sachse, A. 等人, Investigative Radiology 32(1):44-50 (1997)。X- 射线造影剂的实例包括,但不限于,碘帕醇、碘美普尔、碘海醇、碘喷托、碘普胺、碘西胺、碘佛醇、碘曲仑、碘酞硫、碘克沙醇、碘西醇、碘葡萄糖酰胺、碘葡苯胺、iogulamide、碘沙考、碘昔兰、碘帕醇、甲泛葡胺、碘比醇和碘美醇。在某些实施方案中,该 X- 射线造影剂可包括碘帕醇、碘美普尔、碘普胺、碘海醇、碘喷托、碘佛醇、碘比醇、碘克沙醇、碘曲仑和碘美醇。

[0111] 类似于上述治疗剂,该诊断剂可以多种方式与纳米载体结合,包括例如被嵌入、包封入纳米载体中或被束缚至纳米载体。类似地,诊断剂的负载可通过本领域已知的多种方式进行,例如以下文献中公开:de Villiers, M. M. 等人, Eds., Nanotechnology in Drug Delivery, Springer (2009); Gregoriadis, G., Ed., Liposome Technology: Entrapment of drugs and other materials into liposomes, CRC Press (2006)。

[0112] 靶向剂

[0113] 本发明的靶向的递送组合物还包括 MMPⁱ, 一种靶向剂。通常, MMPⁱ 是指任何基质金属蛋白酶抑制剂。在某些实施方案中, MMPⁱ 是具有下式的抑制剂:

[0114]



[0115] 其中

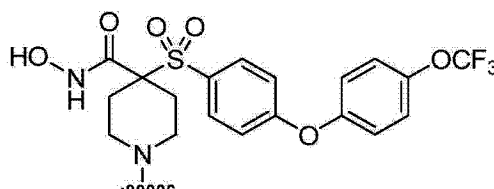
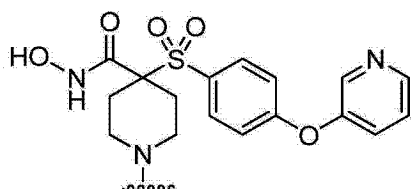
[0116] X 是选自 O 和 S 的成员;

[0117] Y 是选自吡啶基和苯基的成员,其中所述苯基任选经 OH、OCH₃、OCF₃ 和 CH₃ 取代;且

[0118] 波浪线表示与 (LPEG) 的连接点。

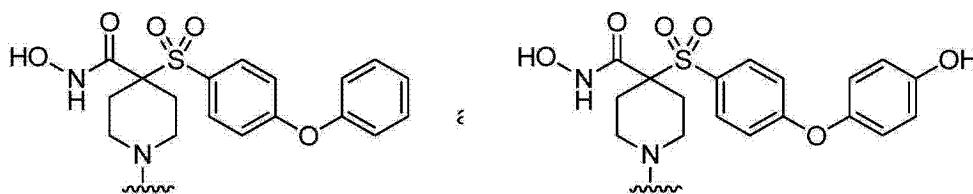
[0119] 在某些具体实施方案中, MMPⁱ 选自:

[0120]



[0121] 在某些具体实施方案中, MMPⁱ 选自:

[0122]



[0123] B. 包括纳米载体的靶向的递送组合物的各组分

[0124] 在另一方面,本发明提供本文公开的靶向的递送组合物的各组分。尤其是,本发明包括具有下式的缀合物: $A-(LPEG)-MMP^i$;其中,A为联结组分;(LPEG)为如上文所述的连接基;且, MMP^i 为MMP抑制剂。

[0125] 本领域技术人员应理解,靶向的递送组合物的组分类似地包括上述每个具体实施方案。

[0126] IV. 制备靶向的递送组合物和组分的方法

[0127] A. 包括纳米载体的靶向的递送组合物

[0128] 本发明的靶向的递送组合物可以多种方式制备。在一方面,本发明的靶向的递送组合物可通过将纳米载体连接至具有下式的缀合物而制备: $A-(LPEG)-MMP^i$;其中,A为用于将所述缀合物连接至所述纳米载体的联结组分;(LPEG)为连接基;且 MMP^i 为MMP抑制剂。纳米载体可作为负载的纳米载体(例如,具有掺入的治疗剂或诊断剂)或未负载的纳米载体与缀合物接触。

[0129] 纳米载体

[0130] 纳米载体可通过本领域通常已知的多种方式制备,且制备该纳米载体的方法可取决于所需的具体纳米载体。本领域可用的任何测量技术可用于测定靶向的递送组合物和纳米载体的性质。例如,技术如动态光散射、X-射线光子显微术、粉末X-射线衍射、扫描电子显微术(SEM)、透射电子显微术(TEM)和原子力显微镜法(AFM)可用于测定纳米载体和/或靶向的递送组合物的平均尺寸和分散度。

[0131] 用在本发明的靶向的递送组合物中的脂质体可使用本领域通常公知的多种技术制备。(参见,例如,Williams, A. P., *Liposomes: A Practical Approach*, 2nd Edition, Oxford Univ. Press(2003); Lasic, D. D., *Liposomes in Gene Delivery*, CRC Press LLC(1997))。例如,脂质体可通过但不限于以下技术制备,如挤压、搅拌、超声处理、反相蒸发(reverse phase evaporation)、水溶液中自组装(self-assembly in aqueous solution)、基于电极的形成技术(electrode-based formation techniques)、微流体导向的形成技术(microfluidic directed formation techniques)等。在某些实施方案中,该方法可用于制备多层和/或单层的脂质体,其可包括大单层囊泡(LUV)和/或小单层囊泡(SUV)。类似于溶液中脂质体的自组装,胶束可使用本领域通常公知的技术制备,使得当溶于足以形成胶束的溶液条件时两亲型分子将形成胶束。脂质涂覆的泡囊和脂蛋白也可使用本领域已知的方法来构造(参见,例如, Farook, U., *J. R. Soc. Interface*, 6(32):271-277(2009); Lacko 等人, *Lipoprotein Nanocarriers as Delivery Vehicles for Anti-Cancer Agents in Nanotechnology for Cancer Therapy*, CRC Press(2007))。

[0132] 制备可用于本发明的聚合物纳米载体的方法通常是本领域公知的(参见,例如, Sigmund, W. 等人, Eds., *Particulate Systems in Nano- and Biotechnologies*, CRC Press LLC(2009); Karnik 等人, *Nano Lett.*, 8(9):2906-2912(2008))。例如,嵌段共聚物可使用

本领域已知的合成方法制备,使得嵌段共聚物可在溶液中自组装以形成聚合物泡囊和 / 或嵌段共聚物胶束。囊泡是本领域已知的且可使用多种技术和组合物制备 (Baillie A. J. 等人, J. Pharm. Pharmacol., 38:502-505 (1988))。磁性和 / 或金属颗粒可使用本领域已知的任何方法构造,如共沉淀、热分解和微乳化。(也参见 Nagarajan, R. & Hatton, T. A., Eds., Nanocarriers Synthesis, Stabilization, Passivation, and Functionalization, Oxford Univ. Press (2008))。金颗粒及其衍生物可使用多种本领域通常已知的技术制备,如 Turkevich 方法、Brust 方法、Perraut 方法或超声波分解(也参见, Grzelczak 等人, Chem. Soc. Rev., 37:1783-1791 (2008))。在一些实施方案中,联结组分可通过硫-金的束缚化学法 (tethering chemistry) 连接。量子点或半导体纳米晶体可使用本领域已知的任何方法合成,如胶体合成技术。

[0133] 用于连接至纳米载体的缀合物

[0134] 如本文所述的具有式 $A-[(EG)(P)]_n-MMP^i$ 的缀合物可使用多种技术制备。在一些实施方案中,整个缀合物可在本领域公知的寡核苷酸合成器中合成。在某些实施方案中,掺入 $[(EG)(P)]_n$,如 $(HEGp)_n$,可使用改良的合成循环进行以更有效的掺入。特别是,增加的亚磷酰胺 (amidite) 当量和延长的洗涤循环可在本发明的缀合物中掺入作为连接基的多重 $[(EG)(P)]$ 单元。在某些实施方案中,联结组分,如胆固醇或胆固醇衍生物(例如,胆固醇-四乙二醇)可随后使用标准或改良的合成循环添加,其可包括将偶联再循环步骤加倍以保证有效的掺入。在某些实施方案中,该缀合物可使用固相方法合成,如基于二氧化硅的或基于聚苯乙烯的载体。

[0135] 在其它实施方案中,该 $[(EG)(P)]_n$ 连接基可使用本领域已知的常规化学法连接至联结组分,如胆固醇衍生物(胆固醇-四乙二醇)。该 $[(EG)(P)]_n$ 连接基可使用上述方法合成。之后,该连接基和联结组分可在足以形成缀合物的一部分即 $(A-[(EG)(P)]_n)$ 的条件下混合和反应。随后,靶向剂, MMP^i ,可连接至 $[(EG)(P)]_n$ 连接基的另一端。或者,该靶向剂可首先连接至 $[(EG)(P)]_n$ 连接基,然后再连接至联结组分。如本领域技术人员所理解,本发明的靶向剂可通过多种方式连接至 $[(EG)(P)]_n$ 连接基,其可取决于具体 MMP^i 组分的特征。

[0136] V. 给药靶向的递送组合物的方法

[0137] 如本文所述,本发明的靶向的递送组合物和方法可用于治疗和 / 或诊断与受试者相关的任何疾病、障碍和 / 或病症。在一个实施方案中,本发明的方法包括治疗或诊断受试者的癌性病症的方法,其包括向受试者给药本发明的包含纳米载体的靶向的递送组合物,其中该治疗剂或诊断剂足以治疗或诊断该病症。在某些实施方案中,癌性病症可包括充分表达(例如,在细胞表面或在脉管系统中)如下受体的癌症,所述受体被本发明的靶向的递送组合物的靶向剂靶向的。

[0138] 在另一实施方案中,本发明的方法包括确定受试者对于靶向治疗性处置的适应性的方法,其包括向受试者给药包含纳米载体的靶向的递送组合物,其中该纳米载体包含诊断剂,并将受试者成像以检测该诊断剂。

[0139] 给药

[0140] 在一些实施方案中,本发明可包括靶向的递送组合物和生理学上(即,药学上)可接受的载体。如本文所述,术语“载体”是指通常的用作药物如治疗剂的稀释剂或媒介物的惰性物质。该术语也包括使组合物具有粘聚性的常见的惰性物质。通常,生理学上可接受

的载体以液体形式存在。液体载体的实例包括生理盐水、磷酸盐缓冲液、常见的生理缓冲盐水 (135–150mM NaCl)、水、缓冲水溶液、0.4% 盐水、0.3% 甘氨酸、提供增强的稳定性的糖蛋白 (例如, 白蛋白、脂蛋白、球蛋白等) 等。因为生理学上可接受的载体部分通过是由所给予的具体组合物以及通过用于给予组合物的具体方法所确定的, 因此有很多种适于本发明的药物组合物的制剂 (参见, 例如, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., 1989)。

[0141] 本发明的组合物可通过常规、公知的灭菌技术灭菌或可在无菌条件下制备。水溶液可被包装使用或在无菌条件下过滤并冻干, 该冻干制剂在给药前与无菌水溶液合并。该组合物可按需要含有药学上可接受的辅助物质以接近生理条件, 如 pH 调节剂和缓冲剂、张度调节剂、润湿剂等, 例如, 乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、脱水山梨醇单月桂酸酯和三乙醇胺油酸盐。也可包含糖以稳定该组合物, 如用于冻干的靶向的递送组合物的稳定剂。

[0142] 所选择的靶向的递送组合物, 当单独或与其它合适的组分组合时, 可被制备成气溶胶制剂 (即, 它们可被“雾化”) 以通过吸入给药。气溶胶制剂可置于加压可接受的推进剂中, 如二氯二氟甲烷、丙烷、氮气等。

[0143] 用于直肠给药的合适的制剂包括, 例如, 栓剂, 其包含有效量的包装的靶向的递送组合物以及栓剂基质。合适的栓剂基质包括天然或合成的甘油三酯或烷属烃。此外, 也可使用明胶直肠胶囊, 其含有选择的靶向的递送组合物与基质的组合, 基质包括, 例如, 液体甘油三酯、聚乙二醇和烷属烃。

[0144] 适合肠胃外给药的制剂, 例如, 通过关节内 (关节中)、静脉内、肌肉内、瘤内、皮内、腹膜内和皮下途径, 包括水性和非水性、等渗无菌注射溶液, 其可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使得制剂与预期接受者的血液等渗的溶质, 和水性和非水性无菌悬浮液, 其可包括助悬剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂。注射溶液和悬浮液也可由无菌粉末、颗粒和片剂制备。在本发明的实践中, 组合物可通过例如静脉内输注、局部、腹膜内、膀胱内或鞘内来给药。肠胃外给药和静脉内给药是优选给药方法。靶向的递送组合物的制剂可存在于单位剂量或多剂量密封容器, 如安瓿和小瓶中。

[0145] 该药物制剂优选为单位剂型形式。当为该形式时, 制剂细分为含有合适的量的活性成分的单位剂量, 例如, 靶向的递送组合物。该单位剂型可为包装的制剂, 即含有离散量的制剂的包装。如果需要的话, 该组合物也可含有其它相容的治疗剂。

[0146] 在治疗癌症的治疗用途中, 本发明的药物组合物中使用的包含治疗剂和 / 或诊断剂的靶向的递送组合物可以初始剂量即每日约 0.001mg/kg 至约 1000mg/kg 来给药。可使用的日剂量范围约 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, 该剂量可根据患者的需求、治疗病症的严重性和使用的靶向的递送组合物而改变。例如, 剂量可考虑具体患者中诊断的癌症的类型和阶段而凭经验确定。在本发明的上下文, 给药于患者的剂量应足以随时间在患者中实现有益治疗响应。剂量大小也将通过具体患者中伴随给药具体靶向的递送组合物的任何不利副作用的存在、性质和程度而确定。针对具体情形的适当剂量的确定在医生技能范围内。通常, 治疗起始于较小剂量, 其小于靶向的递送组合物的最佳剂量。之后, 剂量通过小增量增加直到达到情况下的最佳效果。为方便起见, 总日剂量可视需要被分开且在一天过程中分批给药。

[0147] 在一些实施方案中,本发明的靶向的递送组合物可用于诊断疾病、障碍和 / 或病症。在一些实施方案中,该靶向的递送组合物可用于诊断受试者的癌性病症,如肺癌、乳腺癌、胰腺癌、前列腺癌、子宫颈癌、卵巢癌、结肠癌、肝癌、食管癌等。在一些实施方案中,诊断病症的方法可包括使用靶向的递送组合物以物理检测和 / 或定位受试者体内的肿瘤。例如,肿瘤可与充分表达(例如,在细胞表面或在脉管系统中)受体的癌症相关,所述受体被本发明的靶向的递送组合物的靶向剂靶向。在一些实施方案中,该靶向的递送组合物也可用于诊断癌症之外的疾病,如增殖性疾病、心血管疾病、胃肠疾病、泌尿生殖疾病、神经病、肌骨病、血液疾病、炎症性疾病、自身免疫性疾病、类风湿性关节炎等。

[0148] 如本文所述,本发明的靶向的递送组合物可包括具有本质上可检测性质的诊断剂。在检测受试者中的诊断剂中,该靶向的递送组合物或其中一部分为靶向的递送组合物的一群颗粒,可被给药于受试者。该受试者然后可使用用于成像诊断剂的技术成像,如单光子发射计算机断层摄影术(SPECT)、磁共振成像(MRI)、光学成像、正电子发射断层摄影术(PET)、计算机断层摄影术(CT)、X-射线成像、 γ 射线成像等。任何本文所述的成像技术可与其它成像技术结合使用。在一些实施方案中,将用于成像的放射性同位素掺入到颗粒中,这使得在受试者体内示踪该靶向的递送组合物。例如,靶向的递送组合物的生物分布和 / 或消除可被测量且任选用于改变患者的治疗。例如,可能需要或多或少的靶向的递送组合物以优化患者的治疗和 / 或诊断。

[0149] 靶向递送

[0150] 在某些实施方案中,本发明的靶向的递送组合物可被递送至受试者以通过靶向的方式释放治疗剂或诊断剂。例如,靶向的递送组合物可被递送至受试者中的靶点,然后被嵌入、包封入或束缚至靶向的递送组合物(如至纳米载体)的治疗剂可基于靶点附近的溶液条件而被递送。溶液条件,如pH、盐浓度等可引起治疗剂经较短或较长时间释放至靶点附近的区域。或者,酶可将治疗剂或诊断剂从该靶向的递送组合物上裂解下来以引发释放。在一些实施方案中,该靶向的递送组合物可通过内吞作用递送至细胞内部区域且可能随后在细胞的内部功能区隔(如溶酶体)中降解。本领域技术人员将理解治疗剂或诊断剂的靶向递送可使用本领域通常已知的多种方法进行。

[0151] 试剂盒

[0152] 本发明还提供用于将靶向的递送组合物给药至受试者以治疗和 / 或诊断病症的试剂盒。该试剂盒通常包括两种或更多种治疗和 / 或诊断病症所需的组分,如治疗癌性病症所需的组分。该组分可包括本发明的靶向的递送组合物、试剂、容器和 / 或设备。在一些实施方案中,试剂盒中的容器可含有靶向的递送组合物,该组合物包括在使用前被放射标记的放射性药物。该试剂盒可进一步包括给药靶向的递送组合物所需的任何反应组分或缓冲液。而且,该靶向的递送组合物可为冻干形式且然后在给药前重构。

[0153] 在某些实施方案中,本发明试剂盒可包括包装组件,其可包括一种或多种用于治疗和 / 或诊断患者病症的组分。例如,包装组件可包括容纳至少一种如本文所述的靶向的递送组合物的容器。单独的容器可包括可在给药至患者前与靶向的递送组合物混合的其它赋形剂或试剂。在一些实施方案中,医师可根据具体患者所需的治疗或诊断选择和匹配某些组分和 / 或包装组件。

[0154] 应理解本文所述的实施方案仅是解释性目的,基于其的各种修饰或变化都对本领域

域技术人员进行了暗示,且包含在本申请的精神和范围以及所附权利要求的范围内。本文引用的所有公开、专利和专利申请的全部内容通过引用并入本文用于所有目的。

VI. 实施例

[0155] 缩写:mL,毫升;HOBT,羟基苯并三唑;LCMS,液相色谱质谱;DMF,二甲基甲酰胺;DMSO,二甲基亚砜;EA,乙酸乙酯;H,己烷;rt,室温;h,小时;TLC,薄层色谱;TEA,三乙胺;HRMS,高分辨质谱;Boc,叔丁氧羰基。

[0156] 实施例 1

[0157] 合成用于制备靶向的递送组合物的 MMP- 靶向缀合物

[0158] 步骤 1:4-(4-(吡啶-3-基氧基)苯基磺酰基)哌啶-1,4-二甲酸·1-叔丁基·4-乙基酯的制备

[0159] 根据图 2 制备 4-(4-(吡啶-3-基氧基)苯基磺酰基)哌啶-1,4-二甲酸·1-叔丁基·4-乙基酯。向配备有磁力搅拌子(Teflon 涂覆的)和冷凝器的圆底烧瓶(100mL)中装入 1.5g 对氟-砒(p-fluoro-sulfone)、0.5g(1.5eq.)3-羟基吡啶和 1.76g(1.5eq.)碳酸铯/DMF(50mL)。将反应混合物加热至 90℃并保持 18 小时。2 小时后,LCMS 显示 4.4min 处为所需产物,和 4.8 分钟处为起始原料砒。除去挥发物并将残留物在乙酸乙酯和饱和碳酸氢钠水溶液之间分配。用 10%柠檬酸水溶液、碳酸氢钠水溶液、盐水洗涤有机层,并用无水硫酸钠干燥。TLC(硅胶)显示一个点(40%乙酸乙酯:己烷)。除去乙酸乙酯并真空干燥所得琥珀色半固体,得到 1.72g 产物,其为琥珀色泡沫。¹H-NMR(DMSO-d₆)与所需产物一致。该中间体不经进一步纯化即用于下一步骤。

[0160] 步骤 2.1-(叔丁氧基羰基)-4-(4-(吡啶-3-基氧基)苯基磺酰基)哌啶-4-甲酸的制备

[0161] 根据图 3 制备 1-(叔丁氧基羰基)-4-(4-(吡啶-3-基氧基)苯基磺酰基)哌啶-4-甲酸。向 250-mL 圆底烧瓶中装入 1.7g 乙酯(来自步骤 1)、0.78g(4eq.)氢氧化钾于 16mL 乙醇和 4mL 水中。将反应混合物加热至 90℃。1 小时后 LCMS 显示反应完全。将混合物在乙酸乙酯和 10%KHSO₄-盐水溶液之间分配。分离出黄色有机相,干燥,过滤并浓缩。真空干燥残留物过夜以得到 1.32g 灰白色泡沫,将其不经进一步纯化即使用。

[0162] 步骤 3:4-(苄氧基氨基甲酰基)-4-(4-(吡啶-3-基氧基)苯基磺酰基)哌啶-1-甲酸叔丁基酯的制备

[0163] 根据图 4 制备 4-(苄氧基氨基甲酰基)-4-(4-(吡啶-3-基氧基)苯基磺酰基)哌啶-1-甲酸叔丁基酯。向配有磁力搅拌子的 100mL 圆底烧瓶中装入 1.32g 酸、0.66g(1.2eq.)EDC、0.58(1.5eq.)HOBT 和 0.58g(2eq.)TEA/15mL CH₂Cl₂。将其搅拌 10 分钟,加入 0.55g(1.2eq.)胺 HCl 盐。将反应混合物在室温搅拌。2 小时后 LCMS 显示少量起始原料和产物与活性酯的~1:1 混合物。再将另外 1eq. 胺-HCl 盐加入到反应混合物中。LCMS 显示痕量酸和大部分产物。未观察到 HOBT 酯。将反应浓缩成固体并在乙酸乙酯和碳酸氢钠水溶液之间分配。用 10%KHSO₄水溶液、盐水洗涤有机物并干燥。TLC(硅胶,1:1 乙酸乙酯:己烷)显示一个点(R_f=~0.4 和原点处一些原料)。将所得乙酸乙酯溶液浓缩(~10mL)并通过硅胶塞过滤。用乙酸乙酯洗涤所述硅胶,浓缩合并的有机物并真空干燥以得到 1.29g(80%)灰白色泡沫。

[0164] 步骤 4. N-(苄氧基)-4-(4-(吡啶-3-基氧基)苯基磺酰基)哌啶-4-甲酰胺的制备

[0165] 根据图 5 制备 N-(苄氧基)-4-(4-(吡啶-3-基氧基)苯基磺酰基)哌啶-4-甲酰胺。向 100mL 圆底烧瓶中装入 1.3g 步骤 3 中制备的 Boc 保护的胺和 4N HCl-二氧杂环己烷 (10mL) 并将混合物搅拌 20 分钟。20 分钟后 LCMS 显示无起始原料。真空浓缩反应混合物并真空干燥过夜以得到 N-(苄氧基)-4-(4-(吡啶-3-基氧基)苯基磺酰基)哌啶-4-甲酰胺 (1.3g 二 HCl 盐), 其不经进一步纯化即使用。

[0166] 步骤 5: N-(苄氧基)-4-(4-(吡啶-3-基氧基)苯基磺酰基)哌啶-4-甲酰胺的 PEG1000 哌啶酰胺基胺衍生物的制备

[0167] 根据图 6 制备 N-(苄氧基)-4-(4-(吡啶-3-基氧基)苯基磺酰基)哌啶-4-甲酰胺的 PEG1000 哌啶酰胺基胺衍生物。向 100mL 圆底烧瓶中装入 1.16g (1.0eq.) PEG 酸单 Boc 胺、0.25g (1.2eq.) EDC、0.2g (1.5eq.) HOBt 和 0.09g (1.0eq.) TEA/5mL 二氯甲烷。将 0.5g (1.0eq.) 胺和 0.28g (3.0eq.) 额外的 TEA 加入到 7mL 二氯甲烷中并将反应在氩气下搅拌 10 分钟, 然后在室温下搅拌过夜。用 85mL CHCl_3 稀释反应混合物并用 15mL 去离子水、25mL 5% 柠檬酸水溶液洗涤, 然后用 25mL 碳酸氢钠水溶液-25mL 盐水的混合物洗涤。有机层保持淡黄色, 干燥 (硫酸钠, 无水) 并真空浓缩。TLC (20% MeOH- CHCl_3) 显示 $R_f = 0.4$, 但更重要地, 仅有一个点而在原点无 UV 可见物质。浓缩后, 将产物真空干燥以得到 1.7g。LC-HRMS_(实测) $M+H = 1695.8782\text{g/mol}$; $M+NH_4 = 1712.9046\text{g/mol}$ 。HRMS_(计算) $M+H = 1695.8775\text{g/mol}$; $M+NH_4 = 1712.9040\text{g/mol}$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) 与所需产物一致。

[0168] 步骤 6:

[0169] 根据图 7 进行 N-(苄氧基)-4-(4-(吡啶-3-基氧基)苯基磺酰基)哌啶-4-甲酰胺的 PEG1000 哌啶酰胺基胺衍生物的脱保护。向 100mL 圆底烧瓶中装入 1.66g Boc 化合物/15mL 4N HCl-二氧杂环己烷, 并使其在旋转蒸发仪上翻腾 30 分钟。将反应浓缩呈油状物, 随后将其真空干燥为澄清浓稠黄色浆状物。得到脱 BOC 的胺 (1.68g 二-HCl 盐), 不经进一步纯化即使用。测定物质的 LC-HRMS 和氯含量。测定 Cl 含量为 4%, 与 2eq. HCl 一致。

[0170] 步骤 7:

[0171] 根据图 8 进行 DSPE-PEG5000 与 N-(苄氧基)-4-(4-(吡啶-3-基氧基)苯基磺酰基)哌啶-4-甲酰胺的 PEG1000 哌啶酰胺基胺衍生物的缀合。向 50mL 圆底烧瓶中装入 60mg (1.0eq.) 步骤 6 中制备的胺和 15mg (4eq.) 三乙胺/8mL 二氯甲烷。加入 DSPE-PEG5000 的 NHS 酯 (220mg, 1.0eq) 并将反应混合物在室温搅拌 21/2 小时, 通过 LCMS 分析样品。将反应混合物浓缩成澄清油状物。将其重新溶于乙腈: 水中, 冷冻并冻干过夜得到 ~260mg 粗制白色泡沫, 其不经进一步纯化即使用。LC-HRMS: $M/2-2H_{(实测)} = 3780.2141$ LC-HRMS $M/2-2H_{(计算)} = 3780.2244$ 。

[0172] 步骤 8:

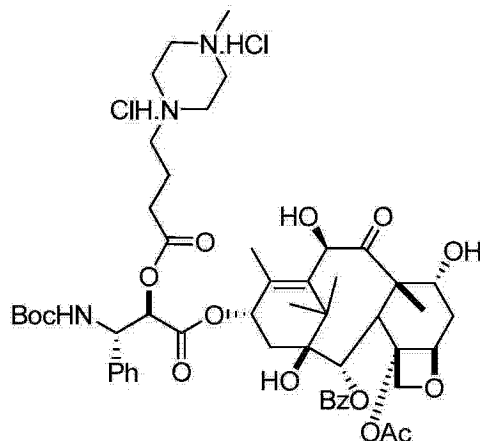
[0173] 根据图 9, 从步骤 8 中得到的 DSPE-PEG-MMPⁱ 中间体的 N-苄氧基-4-甲酰胺部分上除去苄基。向配有磁力搅拌子的含有 325mg 步骤 7 中制备的冻干的苄酯的 200mL 圆底烧瓶中装入 15mL 甲醇。加入湿的 10% Pd-C 催化剂 (75mg, Degussa) 并用氩气吹扫反应混合物 10 分钟, 然后使氢气慢慢鼓泡通过搅拌的溶液。反应进行 1 小时 20 分钟, 然后通过 MS 分析。LCMS 显示部分转化为产物。通过 Celite® 过滤反应混合物并用温甲醇 (40mL) 洗涤。

用新鲜催化剂 (75mg) 处理所得溶液并再氢化 90min。LCMS 显示无起始原料。用氩气吹洗反应混合物并通过硅藻土过滤, 然后倒入纸漏斗中过滤以除去轻微浑浊, 真空浓缩滤液以得到澄清油状物。将其溶于水 / 乙腈, 冷冻并冻干 2 天。得到所需 DSPE-PEG-MMPⁱ 产物, 其为干燥的白色粉末 (230mg)。LC-HRMS 结果参见图 1。

[0174] 实施例 2

[0175] MMPⁱ 靶向的脂质体 TD-1 的制备操作

[0176]



TD-1

[0177] 以下实施例提供了形成含有细胞毒性前药的 MMPⁱ 靶向脂质体的代表性操作。

[0178] 向含有 pH5.5 的 10mM 乙酸钠水溶液 / 300mM 蔗糖的溶液 (90mL) 的 500mL3- 颈圆底烧瓶中加入 TD-1 (189mg, 0.181mmol)。完全溶解后, 将均质溶液调节至 pH5.50。独立地, 测量预形成的脂质体 (DSPC: 胆固醇 (55:45)) 的预先制备的溶液的体积并用 pH5.5 的 10mM 乙酸钠水溶液 / 300mM 蔗糖稀释至 100mL。将非均质溶液的 pH 调节至 pH5.5。将这两种溶液缓慢加热至 65°C, 并在此时将 TD-1 溶液快速加入到脂质体溶液中。将合并的混合物在 65°C 下维持 15min., 然后冷却至 55°C。同时, 将从类脂 (138mg, 0.049mmol) 和缀合物 1 (参见前面的实施例, 5mg, 0.553umol) 获得的 DSPE-PEG (2000) 溶于 pH5.5 的 10mM 乙酸盐 / 300mM 蔗糖的溶液 (5mL) 溶液。TD-1 / 脂质体混合物达到 55°C 后, 测定 pH (pH5.98), 获得粒径 (强度和体积) (Z. Ave. = 109.4nm), 并加入类脂 / 缀合物 1 靶标的均质溶液。将所得混合物在 55°C 下加热 30min, 然后冷却至室温。测量 pH (pH5.89), 获得粒径 (强度和体积) (Z. Ave. = 117.0)。将该脂质体溶液浓缩至 60mL, 然后用 pH6.5 的 1.8L20mM 组氨酸的盐水溶液过滤 (最小 1.5x 浓缩体积)。将所得溶液浓缩至 14mL (收集最终 2mL 渗透溶液用于分析)。测量 pH (pH6.42), 获得粒径 (强度和体积) (Z. Ave. = 118.9), 并通过 rphp1c 分析确认靶向 MMPⁱ 配体的存在, 其为每个脂质体颗粒大于 100 个 MMPⁱ 配体分子。

[0179] 对样品 (1.0mL) 进行 TD-1 测定、MMPⁱ 靶向测定、多西紫杉醇面积%、DSPC、胆固醇、DSPE-PEG (2000) 和 Lyso-DSPC 测定。

[0180]

制剂	10 mM 乙酸盐于 300 mM 蔗糖中(pH 5.5)
pH	6.42
粒径	118.90
体积 (mL)	34.00
面积%, TD-1	98.03
%-BOC, RRT 0.41	0.00
%-BOC, RRT 0.43	0.00
%-ORO RRT 0.89	0.00
%-ORO RRT 0.91	0.00
%-ORO RRT 0.95	0.00

[0181]

%7-epi M3528, RRT 1.11	1.03
%多西紫杉醇, RRT 1.44	0.95
前药, mg/ml	3.34
靶标, ug/ml	262.00
Wt%Chol	26.9
Wt%DSPC	58.3
Wt%DSPE_PEG2000	9.6
Wt%Lyso-DSPC	5.2
TD1/脂质	0.157

[0182] 实施例 3

[0183] MMPⁱ- 靶向的脂质体奥沙利铂的制备

[0184] 步骤 1.

[0185] 如图 10 所示合成 4-((4- 苯氧基苯基) 磺酰基) 哌啶-1, 4- 二甲酸 • 1- 苄基 • 4- 甲基酯。向配有磁力搅拌子的 100ml RBF 中装入 1.1g (2.67mmole) 4-((4- 苯氧基苯基) 磺酰基) 哌啶-4- 甲酸 4- 甲基酯、0.73g (2.94mmole) Cbz-OSu、0.8g (8.01mmole) 三乙胺。1 小时后 LCMS 显示反应完全, 其中 M+H = 510g/mol。将反应混合物在 EA 和饱和碳酸氢钠水溶液之间分配。用 10% KHSO₄ 水溶液洗涤有机物, 干燥并浓缩成浓稠浆状物, 其经高真空干燥

后变为白色无水泡沫。将产物干燥过夜以得到 1.29g (95% 收率) Cbz 酯, 将其用于步骤 2。

[0186] 步骤 2.

[0187] 如图 11 所示合成 1-((苄氧基)羰基)-4-((4-苯氧基苯基)磺酰基)哌啶-4-甲酸。向 250ml RBF 中装入 1.75g 4-((4-苯氧基苯基)磺酰基)哌啶-1,4-二甲酸·1-苄基·4-甲基酯 (3.39mmole)、0.57g (10.16mmole) 氢氧化钾于 30ml 乙醇 / 7.5ml 水中。将反应混合物在 50℃ 下搅拌并用 LCMS 监测。LCMS 分析表明, 1hr 后有 ~ 80% 转化, 2hr 后有大约 90% 转化并出现痕量杂质。将溶液浓缩至 1/4 体积并在 EA 和 10% 柠檬酸水溶液之间分配。用盐水洗涤有机物, 干燥并真空浓缩。将产物真空干燥过夜以得到 1.6g (95% 收率) 白色固体, 将其用于步骤 3。

[0188] 步骤 3.

[0189] 如图 12 所示合成 4-((4-苯氧基苯基)磺酰基)-4-(((四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)氨基甲酰基)哌啶-1-甲酸苄基酯。向配有磁力搅拌子的 200ml RBF 中装入 1.48g (2.99mmole) 1-((苄氧基)羰基)-4-((4-苯氧基苯基)磺酰基)哌啶-4-甲酸、0.49g (4.18mmole) OTHP-羟胺、0.8g (4.18mmole) EDC、0.64g (4.18mmole) HOBt 和 1.25ml (8.96mmole) 三乙胺 / 30ml DMF。将反应混合物在室温下搅拌过夜。真空浓缩反应并在 EA 和饱和碳酸氢钠水溶液之间分配。用 10% 柠檬酸水溶液、盐水洗涤有机物, 干燥并真空浓缩。将该物质真空干燥过夜以得到 1.50g (85%) 无水白色泡沫。通过直接进样 MS 分析样品, 其显示 >90% 产物和一些痕量杂质。HRMS_(理论) M+H = 595.2108g/mol。HRMS_(实测) M+H = 595.2109g/mol。

[0190] 步骤 4.

[0191] 如图 13 所示合成 4-((4-苯氧基苯基)磺酰基)-4-(((四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)氨基甲酰基)哌啶。向配有磁力搅拌子的 200ml RBF 中装入 1.5g 4-((4-苯氧基苯基)磺酰基)-4-(((四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)氨基甲酰基)哌啶-1-甲酸苄基酯化合物和 100mg 湿的 Degussa (5% 钨 / 碳) 在 45ml 甲醇中。用氩气吹扫反应混合物 5 分钟。然后使氢气鼓泡通过溶液 1 小时。此时 MS 分析 (直接进样) 表明反应完成。通过 Celite 过滤粗制物质并再用 40ml 甲醇洗涤 Celite。将甲醇溶液真空浓缩至 1.2g 白色固体, 将其真空干燥 4 小时以得到 1.1g 产物, 其用于步骤 5。HRMS_(实测) M+H = 451.1737g/mol。

[0192] 步骤 5.

[0193] 如图 14 所示合成 ((5S)-6-氧代-6-(4-((4-苯氧基苯基)磺酰基)-4-(((四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)氨基甲酰基)哌啶-1-基)己烷-1,5-二基)二氨基甲酸·苄基·叔丁基酯。向配有磁力搅拌子的 50ml RBF 中装入 330mg (0.72mmole) 4-((4-苯氧基苯基)磺酰基)-4-(((四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)氨基甲酰基)哌啶、286mg (0.75mmole) 酸、172mg (0.9mmole) EDC、165mg (1.1mmole) HOBt 和 218mg (2.15mmole) 三乙胺在 10ml 无水 DMF 中。将反应混合物在室温下搅拌过夜。除去 DMF 并将反应残留物在 EA 和饱和碳酸氢钠水溶液之间分配。用盐水洗涤有机物, 干燥、浓缩并真空干燥以得到 585mg (97% 收率) 粗制白色泡沫, 将其用于步骤 7。HRMS_(理论) M+Na = 845.3402g/mol。HRMS_(实测) M+H = 845.3406g/mol。

[0194] 步骤 6.

[0195] 如图 15 所示合成 ((2S)-6-氨基-1-氧代-1-(4-((4-苯氧基苯基)磺酰基

基)-4-(((四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)氨基甲酰基)哌啶-1-基)己-2-基)氨基甲酸叔丁基酯。往 100ml RBF 中装入 585mg 步骤 6 的粗制物质、88mg 5% 湿钯 / 碳 (Degussa) 在 45ml 甲醇中。用氩气吹扫反应混合物 ~ 5 分钟, 然后使氢气慢慢鼓泡通过所述溶液。1 小时后 LCMS 分析显示 ~ 50-60% 转化为产物, 其中 $M+H = 689\text{g/mol}$ 。LCMS 分析表明, 3 小时后转化约 75%, 4 小时后转化约 90%。使混合物再反应 1 小时。氩气吹扫 5 分钟后, 通过 Celite 过滤反应混合物。浓缩反应并用二氯甲烷驱逐 (chased) 挥发物两次, 将白色泡沫 / 固体真空干燥过夜以得到 492mg (87%) 白色固体。

[0196] 步骤 7.

[0197] 如图 16 所示合成经保护的 4-((4-苯氧基苯基)磺酰基)-4-(((四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)氨基甲酰基)哌啶-PEG5000-DSPE 缀合物。向配有磁力搅拌子的 25ml RBF 中装入 200mg DSPE-PEG5000-GS 活性酯 (0.03mmole)、19mg (0.027mmole) 胺和 12mg (0.12mmole) 三乙胺。将反应在氩气下搅拌过夜。将产物浓缩并真空干燥过夜。在 C8 柱上使用 20-100% 的 30ml/min 梯度经 13 分钟完成 RPHPLC 纯化。起始溶剂为 20% 1:1 乙腈: 异丙醇 / 80% 25mM 乙酸铵于水中 (含有 5% 乙腈)。合并含有产物的馏分, 浓缩以除去有机物并将残留物冻干以得到 93.5mg (46% 收率) 白色粉末。

[0198] 步骤 8.

[0199] 如图 17 所示合成 N-羟基-4-((4-苯氧基苯基)磺酰基)哌啶-4-甲酰胺-PEG5000-DSPE 缀合物 (缀合物 2)。向 100ml RBF 中装入 93mg 于 1ml TFA 和 0.1ml 三乙基硅烷中。使反应混合物翻腾 60 分钟。通过 LCMS 分析样品, 显示仅形成所需产物。加入 10ml 水并用 NH_4OH 水溶液使 pH 至 7.1。将其冷冻并冻干过夜。为除去过量 NH_4TFA , 将粗制物质溶于 20ml Millipore 水中并将溶液放入到 3500MW Pierce Slide-A-Lyzer 箱中, 并在充满 Millipore 水的 1L 烧杯中搅拌过夜。在接下来的 12 小时期间, 再更换水两次以上。将所得的透析水溶液冷冻并冻干过夜以得到 ~ 83mg 干燥粉末。产物的高分辨质谱示于图 18 中。

[0200] 脂质体的制备.

[0201] 将缀合物 2 溶于 DI H_2O 中以产生 1.0mg/mL 或 2.0mg/mL 的溶液。然后将其加入到基于磷脂酰胆碱的含有奥沙利铂的脂质体制剂 (1.0mg/mL 的脂质体) 中, 并将所得混合物在 37°C 下搅拌 8h。通过 SEC-HPLC 分析粗制物质。为除去游离 MMP^i 和游离奥沙利铂, 使粗制制剂通过 Spectrum Filter Module P/N:P-DI-500E-100-01N (用 1L Millipore 水预洗涤) 并用 900mL (10 倍体积) 的缓冲液 (含有 20mM 醋酸钠的 300mM 蔗糖, 新鲜制备) 洗涤。通常经过两天完成。将缓冲液和制剂保存在冰箱中过夜。过夜储存前用 0.1N NaOH 冲洗 Spectrum Filter Module。纯化后, 将制剂浓缩至所需奥沙利铂浓度。最终样品用 SEC-HPLC 分析。(用 90uL PBS 稀释 10uL 样品 (1:9 稀释), 并注入 5uL)。粒径在 Malvern Zetasizer 上测量。脂质经 HPLC 分析, 而 Pt 用 ICP-MS 定量。“游离的”Pt 通过从 30KDa Amicon 离心过滤器 (9000rpm, 10min., 室温下) 获得的滤液的 ICP-MS 测定。嵌入的靶向配体的量通过采用校准曲线的 HPLC 方法测定的。脂质体具有 100nm 的平均粒径且每个颗粒包含 54 个配体 (缀合物 2)。

[0202] 实施例 4

[0203] MMP^i -脂质体在具有 BxPC3 异种移植肿瘤的裸鼠中的效力

[0204] 向具有 BxPC3 胰腺肿瘤的小鼠给予实施例 3 中制备的 MMPⁱ- 靶向的脂质体奥沙利铂。

[0205] 将 (2.5×10^6) 个 BxPC3 细胞皮下植入到雌性 Hsd: 无胸腺裸 -Foxn1nu/nu 小鼠 ($\approx 20\text{g}$) 的右肋中。每剂量组使用 10 只小鼠。8 个剂量组包括盐水、奥沙利铂、以 22mg/kg、44mg/kg 和 66mg/kg 含有基本 (base) 奥沙利铂的脂质体, 以及相应的 31mg/kg、62mg/kg 和 94mg/kg 的 MMPⁱ- 脂质体。

[0206] 一旦肿瘤达到 150mm^3 的中值尺寸, 将动物随机分组, 通过组间肿瘤体积标准化。无肿瘤的动物不包括在该研究中。将试验品静脉内给药一次。

[0207] 每周用测径器测量肿瘤长度和宽度 3 次并根据下式计算体积: 肿瘤体积 (mm^3) = 长度 * 宽度 2×0.5 。动物每周称重一次。肿瘤体积表示为中值并按时间的函数制图。超过 2000mm^3 尺寸而从研究中移除的任何动物有它的价值, 以 2000mm^3 继续用于随后的图中。肿瘤体积也表示为平均值并按时间的函数制图 (剩下的动物少于 50% 的组不再继续)。生长曲线之间的实测差异的统计学显著性用单因素 ANOVA 进行评估, 如果显著的话, 随后进行事后检验 (posthoc test)。

[0208] 将靶向脂质体处理的小鼠的平均肿瘤体积和存活率与对照小鼠和被给予非靶向奥沙利铂脂质体和乐沙定 (Eloxatin) (非脂质体奥沙利铂) 的小鼠的平均肿瘤体积和存活率进行比较。给予脂质体奥沙利铂导致比给予乐沙定更小的肿瘤体积, 和给予 MMPⁱ- 靶向脂质体奥沙利铂导致比类似剂量的非靶向脂质体奥沙利铂更小的肿瘤体积 (图 19A)。单次静脉注射试验品后测量平均肿瘤体积。所有剂量以奥沙利铂摩尔当量给予。5-10 只小鼠 / 组的数值为平均值 $\pm$ SEM)。图 19B 显示 Kaplan-Meier 曲线, 其显示单次静脉注射含有奥沙利铂的 MMP14 受体靶向脂质体 (靶向脂质体)、含有奥沙利铂的非靶向脂质体、乐沙定或生理盐水后, 具有 BxPC-3 人胰腺异种移植物的小鼠的存活百分数。所有剂量以奥沙利铂摩尔当量给予。各组以具有肿瘤的 10 只雌性小鼠开始。最高剂量水平下的靶向和非靶向脂质体未观察到对照组和乐沙定组的体重变化的显著差异 (图 20A ; 5-10 只小鼠 / 组的数值为平均值 $\pm$ SEM)。

[0209] 实施例 5

[0210] MMPⁱ- 脂质体在具有 MMP14 过表达的 HT-1080 异种移植肿瘤的裸鼠中的效力

[0211] 向具有过表达 MMP14 的人纤维肉瘤 HT1080 肿瘤的小鼠给予实施例 3 中制备的 MMPⁱ- 靶向脂质体奥沙利铂。

[0212] 将 (5×10^6) 个 HT1080/MMP14 肿瘤细胞皮下植入到雌性 Hsd: 无胸腺裸 -Foxn1nu/nu 小鼠 (25g) 一侧。每剂量组使用 10 只小鼠。6 个剂量组包括盐水、奥沙利铂、以 15mg/kg 和 30mg/kg 含有基本成分奥沙利铂的脂质体, 以及相应的 15mg/kg 和 30mg/kg 的 MMPⁱ- 脂质体。

[0213] 一旦肿瘤达到 150mm^3 的中值尺寸, 将动物随机分组, 通过组间肿瘤体积标准化。无肿瘤的动物不包括在该研究中。试验品静脉内给药一次。

[0214] 用测径器测定肿瘤长度和宽度, 每周 3 次, 并通过下式计算体积: 肿瘤体积 (mm^3) = 长度 * 宽度 2×0.5 。监测动物且每周称重两次。肿瘤体积表示为中值并按时间的函数制图。超过 2000mm^3 尺寸而从研究中移除的任何动物有它的价值, 以 2000mm^3 继续用于随后的图中。肿瘤体积也表示为平均值并按时间的函数制图 (剩下的动物少于 50% 的组不再继

续)。生长曲线之间的实测差异的统计学显著性用单因素 ANOVA 进行评估,如果显著的话,随后进行事后检验。

[0215] 将靶向脂质体处理的小鼠的平均肿瘤体积和存活率与对照小鼠和给予非靶向奥沙利铂脂质体和乐沙定(非脂质体奥沙利铂)的小鼠的平均肿瘤体积和存活率进行比较。给予脂质体奥沙利铂导致比给予乐沙定更小的肿瘤体积,且给予 30mg/kg 剂量的 MMP- 靶向脂质体奥沙利铂导致比同样剂量的非靶向脂质体奥沙利铂更小的肿瘤体积(图 21A)。给予 30mg/kg 剂量的 MMP- 靶向脂质体奥沙利铂导致所有测试组具有最高存活百分数(图 21B)。

[0216] 实施例 6

[0217] MMPⁱ 靶向脂质体制剂进行的 MMP 抑制

[0218] 测定实施例 3 中制备的 MMPⁱ- 靶向脂质体奥沙利铂样品抗金属蛋白酶 MMP2 和 MMP14 的活性。

[0219] 通过在 37℃ 下在测定缓冲液(50mM Tris, 10mM CaCl₂, 150mM NaCl, 0.05% (v/v) Brij-35, pH7.5) 中用 1mM APMA(对氨基苯基乙酸汞) 孵育 1hr 来活化 rhMMP-2(100 μg/mL)。在测定缓冲液中稀释经活化的 rhMMP-2 至 248ng/mL。在测定缓冲液中稀释 MMP 底物(Mca-Lys-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂) 至 25 μM。将 25 μL 含有靶向脂质体制剂的 5X 测试样品和 50 μL 248ng/mL 经活化的 rhMMP-2 加入到侧面黑色的 96 孔板中。加入 50 μL 25 μM 底物以启动酶促反应,并在动力学模式下记录荧光测量($\lambda_{ex} = 320\text{nm}$; $\lambda_{em} = 405\text{nm}$) 5 分钟。

[0220] 通过在 37℃ 下在活化缓冲液(50mM Tris, 1mM CaCl₂, 0.05% (v/v) Brij-35, pH9.0) 中用 0.86 μg/mL rhFurin 孵育 1hr 来活化 rhMMP-14(40 μg/mL)。在测定缓冲液(50mM Tris, 3mM CaCl₂, 1 μM ZnCl₂, pH8.5) 中稀释经活化的 rhMMP-14 至 1.24 μg/mL。在测定缓冲液中稀释 MMP 底物(Mca-Lys-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂) 至 20 μM。将 25 μL 含有靶向脂质体制剂的 5X 测试样品和 50 μL 浓度为 1.24 μg/mL 的经活化的 rhMMP-14 加入到侧面黑色的 96 孔板中。加入 50 μL 浓度为 20 μM 的底物以启动酶促反应,并在动力学模式下记录荧光测量($\lambda_{ex} = 320\text{nm}$; $\lambda_{em} = 405\text{nm}$) 5 分钟。

[0221] 对于 MMP2 和 MMP14,分别观察到 12.7nm 和 3.9nm 的 IC₅₀ 值(图 22A 和图 22B)。

[0222] 虽然为了清楚和理解的目的,已通过说明和实例的方式详细地描述了上述发明,但本领域技术人员应理解,可在所附的权利要求的范围内进行某些改变和修饰。此外,本文提供的各参考文献通过引用整体并入,如同各参考文献通过引用各自并入一样。

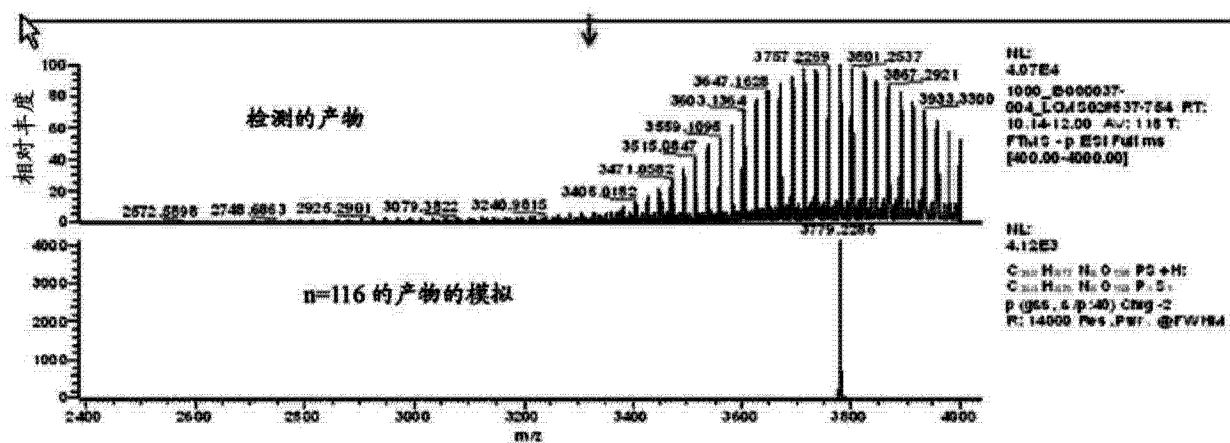


图 1



图 2

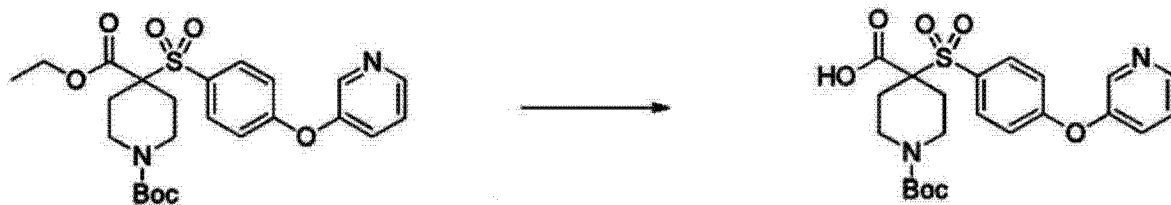


图 3

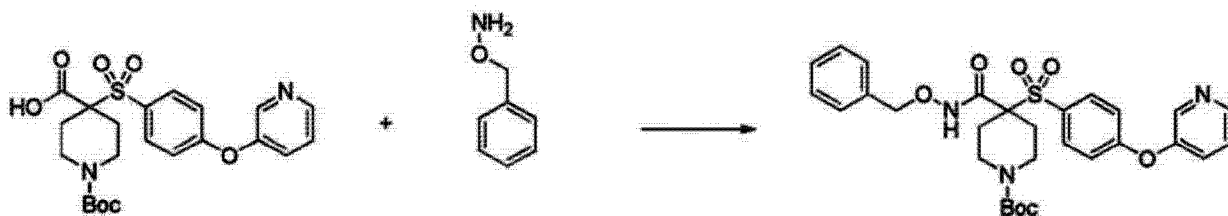


图 4

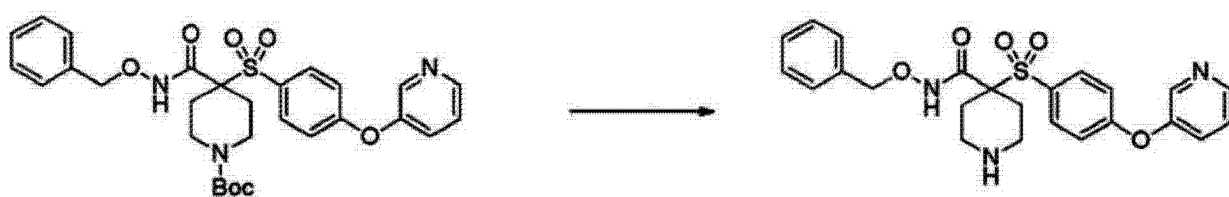


图 5

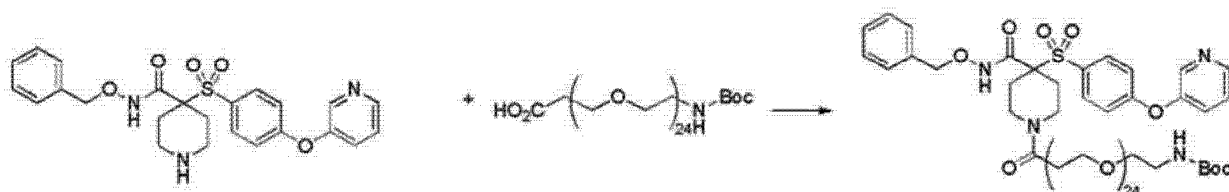


图 6



图 7

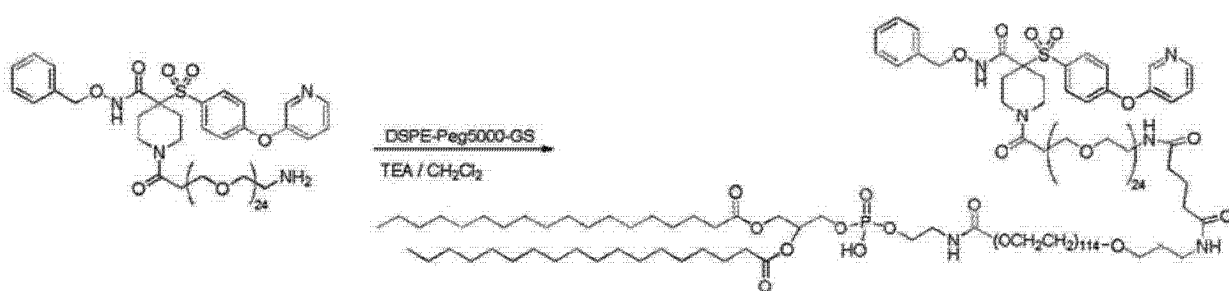


图 8

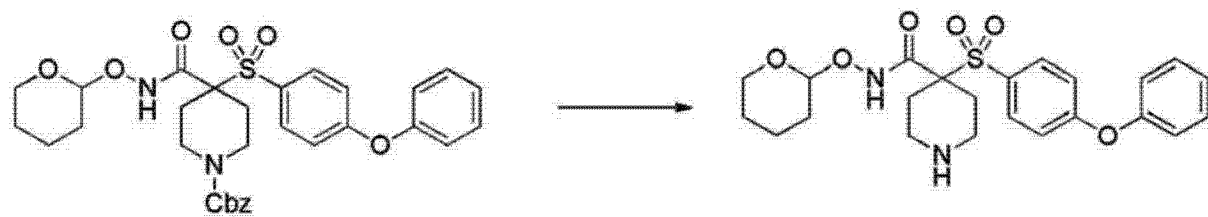


图 13

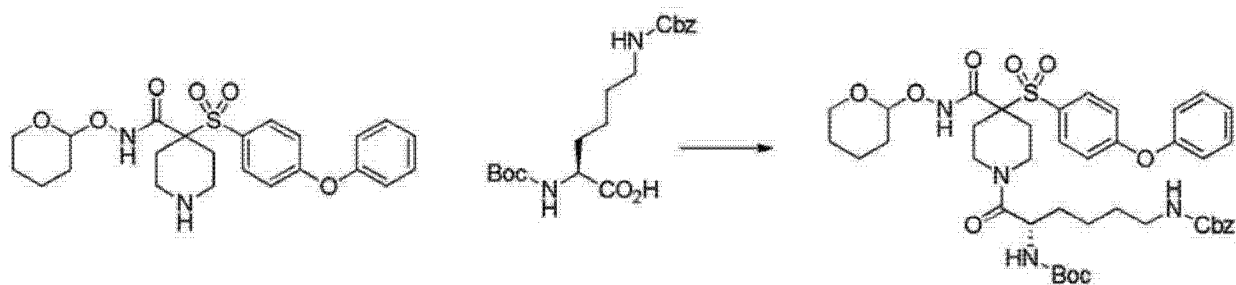


图 14

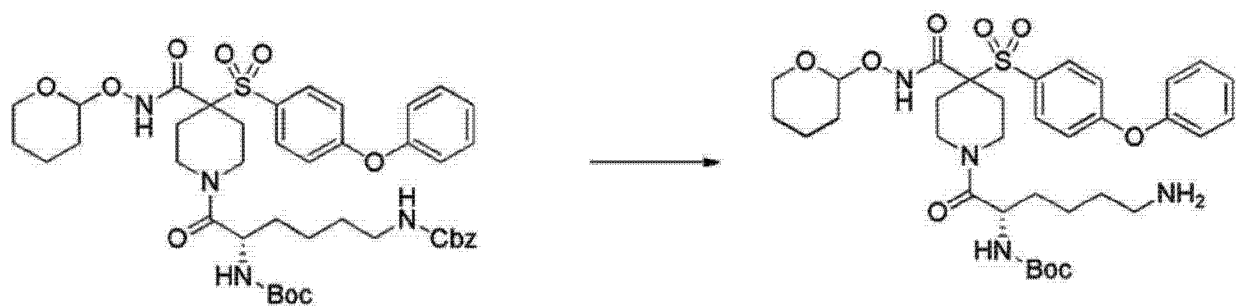


图 15

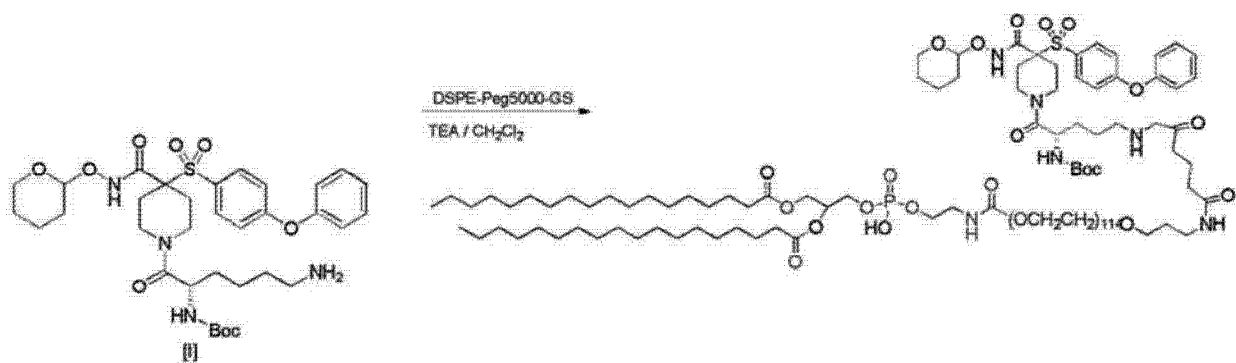


图 16

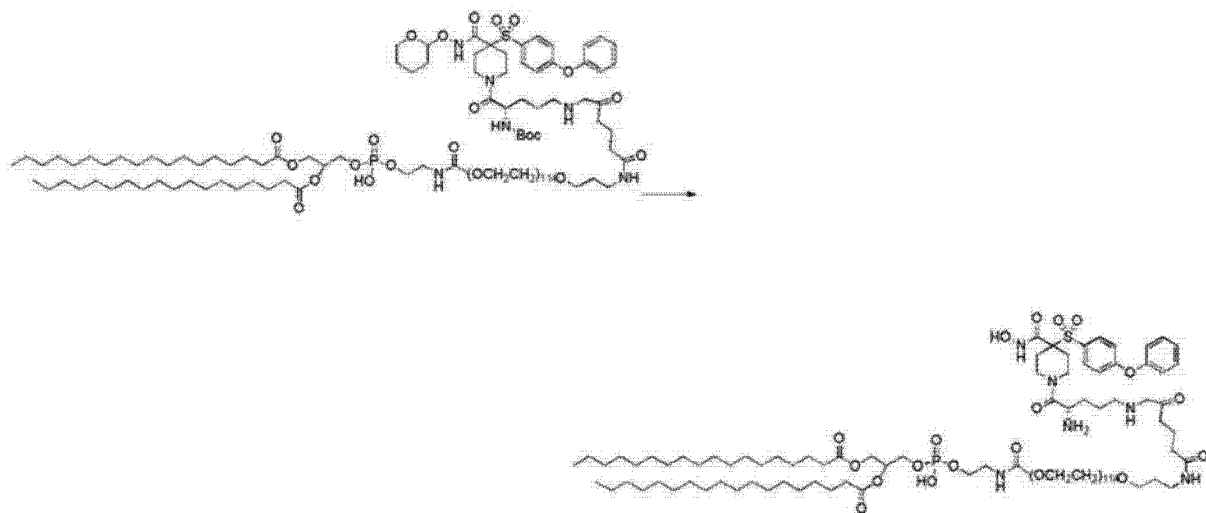
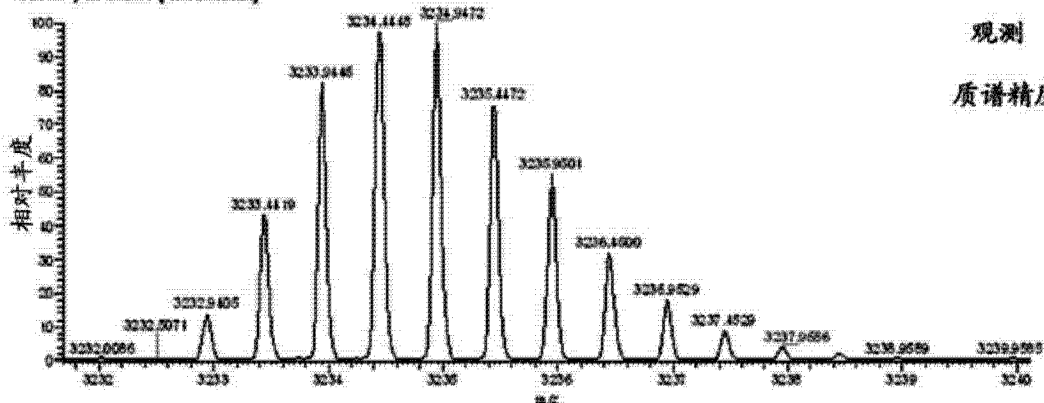


图 17



产物质谱的观测及模拟

20120430_8-000037-006_037086-1097 RT: 9.92-10.82 A/C: 112 NL: 1.11E5
T: FTMS - p ESI+8m: [500.00-4000.00]



C02H691N6O132P5 + H: C02 H679 N6 O132 P1 S1 p@ss, ...

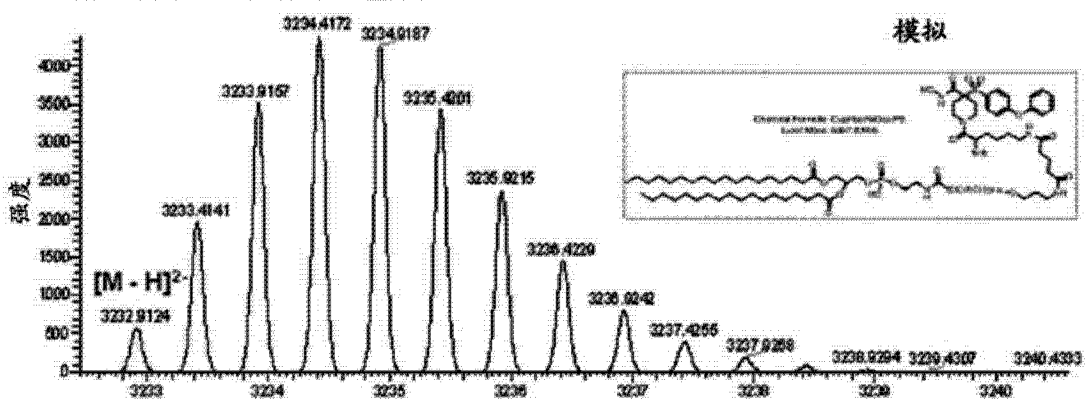


图 18

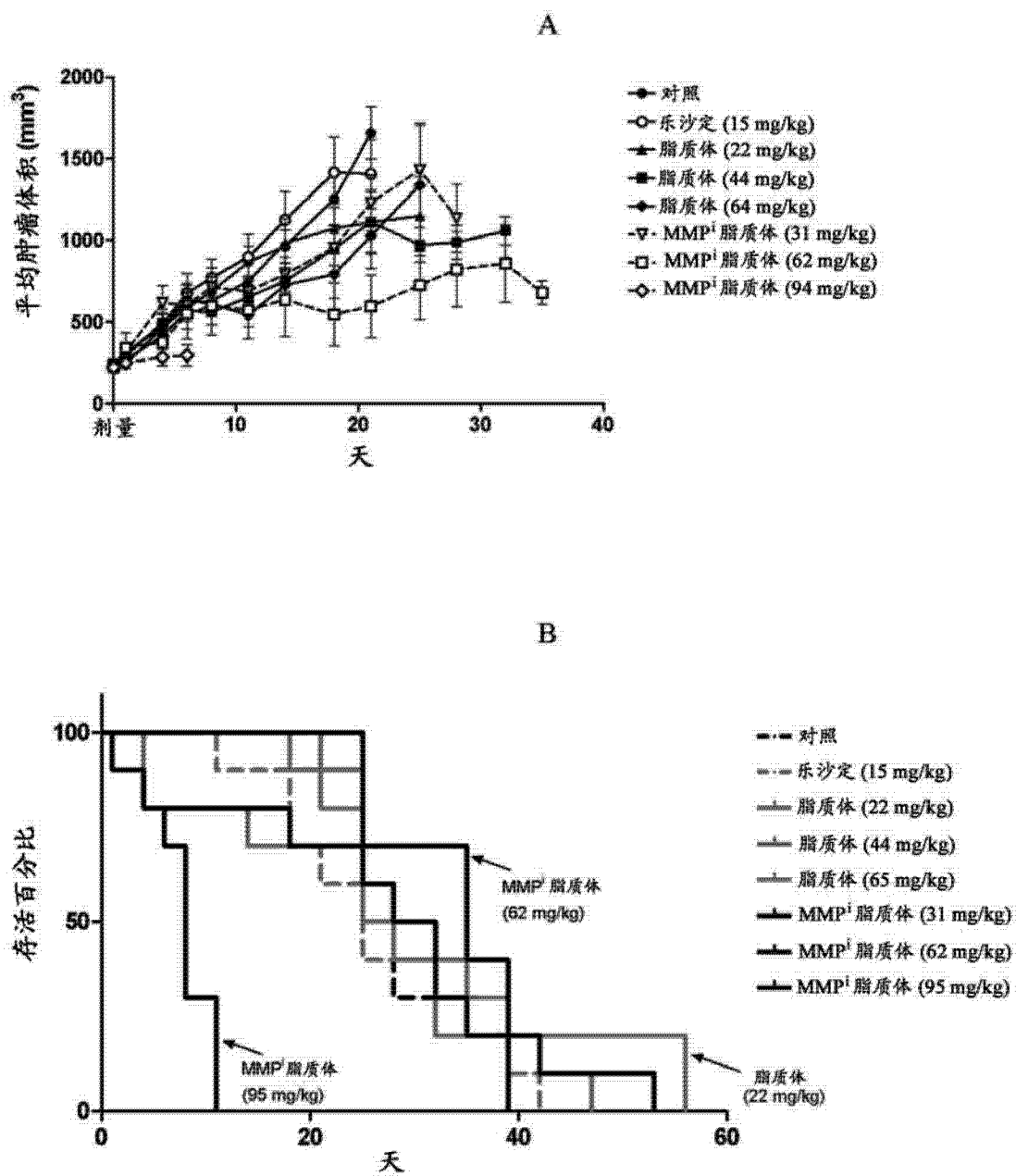


图 19

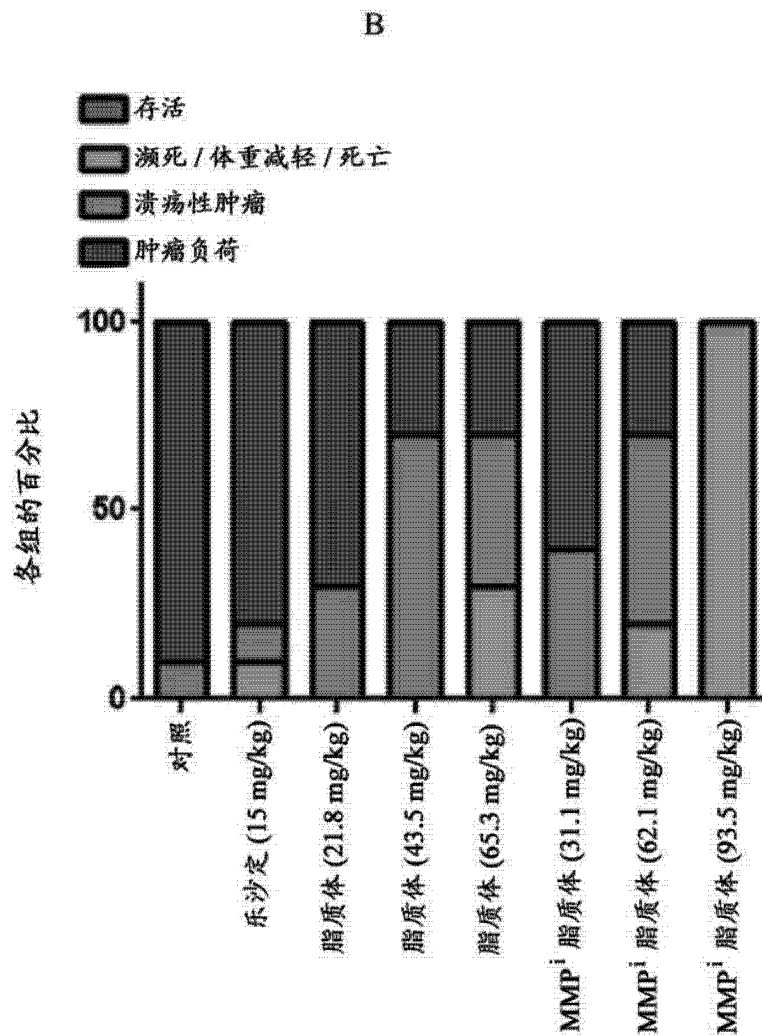
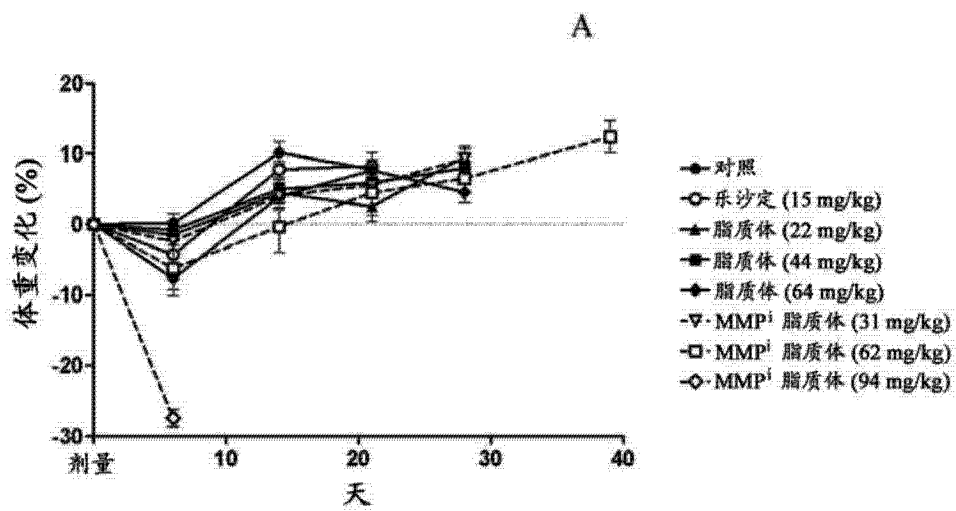


图 20

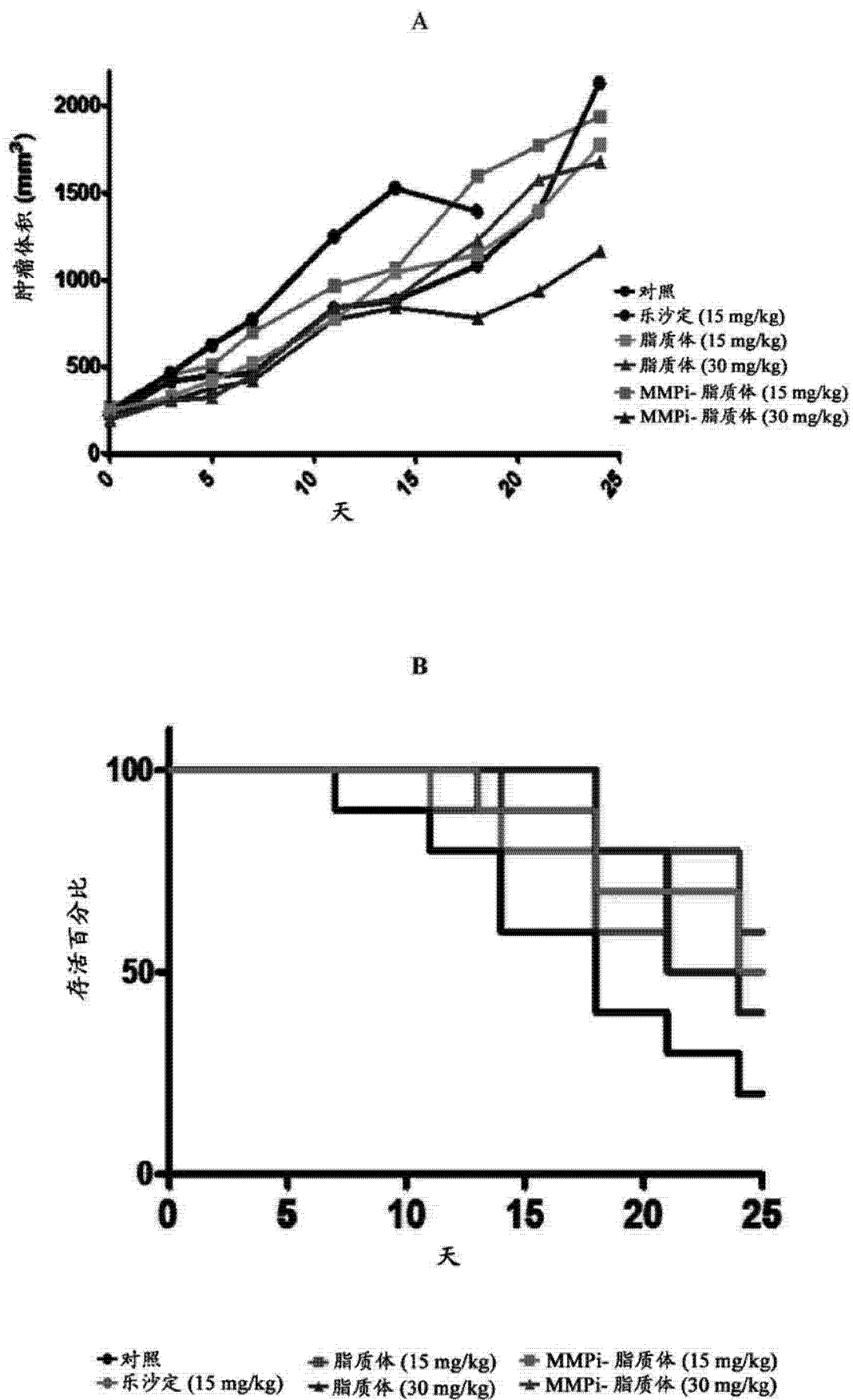


图 21

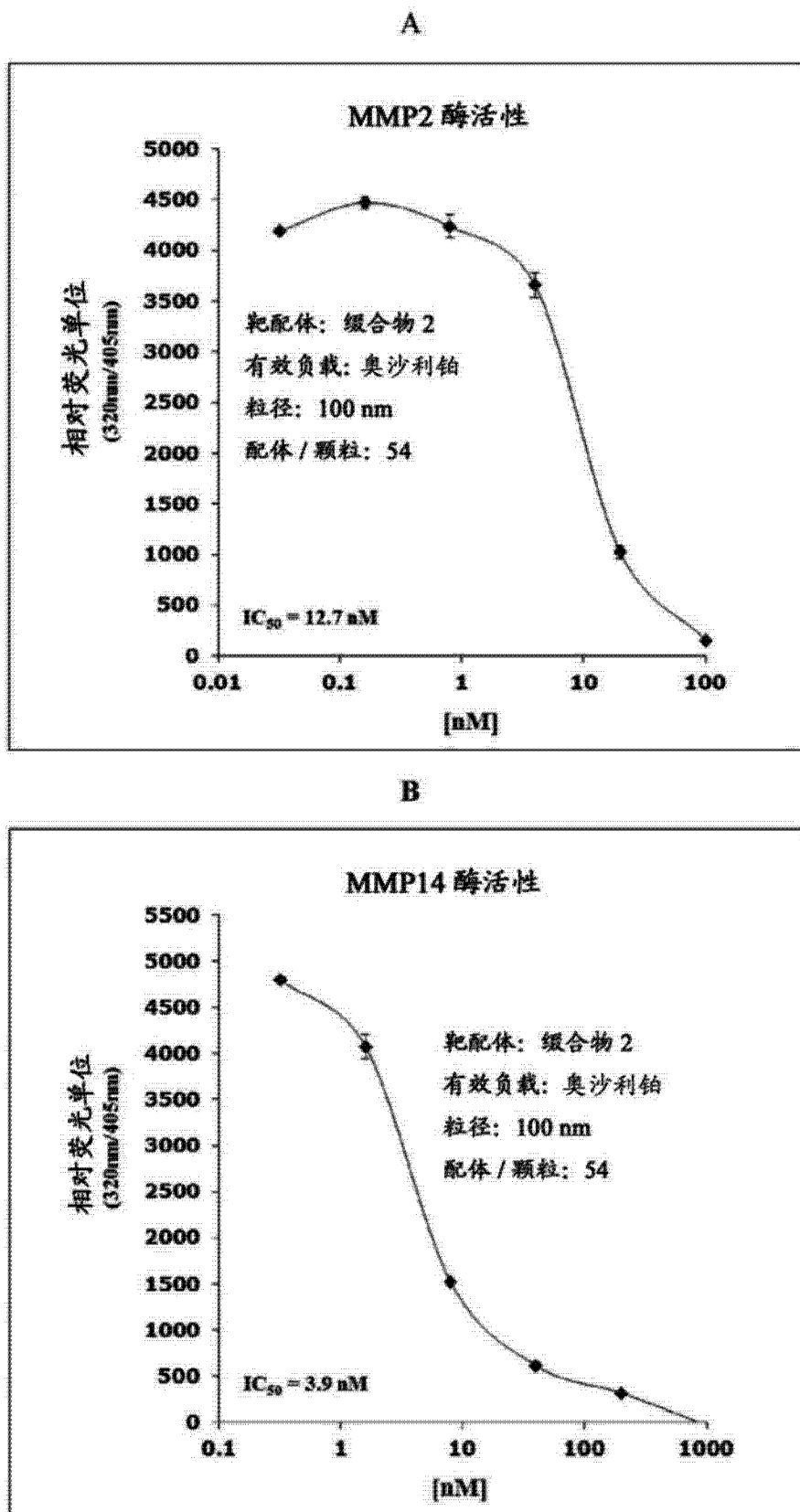


图 22