



(12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 111388672 A

(43)申请公布日 2020.07.10

(21)申请号 202010317977.1

(22)申请日 2015.08.07

(30)优先权数据

62/034,990 2014.08.08 US

(62)分案原申请数据

201580034715.1 2015.08.07

(71)申请人 美国政府(由卫生和人类服务部的
部长所代表)

地址 美国马里兰

(72)发明人 小林久隆 P·库伊克

M·J·施纳曼

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002

代理人 王健 林晓红

(51)Int.Cl.

A61K 41/00(2020.01)

A61K 47/68(2017.01)

A61K 49/00(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

G01N 1/40(2006.01)

G01N 1/44(2006.01)

G01N 33/50(2006.01)

权利要求书1页 说明书53页 附图47页

(54)发明名称

在体内和在体外的靶标的光控移除

(57)摘要

本公开内容提供了IR700-分子缀合物及其用于在体内从样品中或在体外从受试者中移除(例如,分开或分离)靶标的方法。在本文中示出,使IR700暴露于近红外(NIR)光会移除IR700的一部分,将其从亲水性分子改变为疏水性分子,导致IR700和结合至其的任何物质的聚集。例如,所公开的IR700-分子缀合物和方法提供了光控方式来控制药物在体内的药代动力学,并且可以用于从环境或食物样品中移除不需要的试剂或在实验室中分离靶标分子。

1. IR700-分子在制备用于控制分子的药代动力学的方法中的组合物中的用途,所述方法包括:

向受试者给予治疗有效量的IR700-分子,其中所述分子为蛋白质、肽、凝集素、碳水化合物、金属、核酸分子、小的有机分子或药剂,

允许所述IR700-分子对所述受试者具有治疗作用,随后以660nm至710nm的波长和至少 4J cm^{-2} 的剂量在使IR700的一部分断裂并形成疏水性IR700-分子的条件对所述受试者进行照射;

允许所述疏水性IR700-分子在所述受试者中聚集并到达肝脏和/或脾脏;

随后从所述受试者获得包含所述疏水性IR700-分子聚集物的尿液或排粪样品;以及

在所述尿液或排粪样品中检测所述疏水性IR700-分子聚集物,从而控制所述分子的药代动力学。

2. 权利要求1的用途,其中靶包含药剂。

3. 权利要求2的用途,其中所述药剂包含化学治疗剂、生物制剂、抗生素、抗高血压药、抗抑郁药、镇痛药、生殖激素、血液稀释剂、类固醇或他汀。

4. 权利要求1的用途,其中在 $690\text{nm} \pm 20\text{nm}$ 或 $690\text{nm} \pm 4\text{nm}$ 的波长下对所述受试者进行照射。

5. 权利要求1的用途,其中检测结合至所述疏水性IR700-分子缀合物的靶包含用免疫测定、核酸杂交或核酸测序检测所述靶。

6. IR700-特异性结合剂在制备用于从受试者中移除病原体的方法中的组合物中的用途,所述方法包括:

向受试者给予治疗有效量的IR700-特异性结合剂,其中所述特异性结合剂特异性结合所述受试者中的所述病原体;

允许所述特异性结合剂结合所述病原体;

在使IR700的一部分断裂并形成结合至所述病原体的疏水性IR700-特异性结合剂的条件下,以660nm至710nm的波长和至少 4J cm^{-2} 的剂量对所述受试者进行照射;

允许所述疏水性IR700-特异性结合剂-病原体在所述受试者中聚集;以及

允许将所述疏水性IR700-特异性结合剂-病原体聚集物从所述受试者中排出。

7. 权利要求6的用途,其中所述病原体为细菌或真菌。

8. 权利要求6的用途,其中所述病原体为抗甲氧西林金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)。

9. 权利要求6的用途,其中所述特异性结合剂为抗体、抗体片段或**Affibody®**分子,其中所述抗体、抗体片段或**Affibody®**分子能够特异性结合所述病原体。

10. 权利要求6的用途,所述方法在形成所述疏水性IR700-特异性结合剂聚集物后还包括:

从所述受试者获得包含所述疏水性IR700-特异性结合剂聚集物的样品;以及

在所述样品中检测结合至所述疏水性IR700-特异性结合剂聚集物的病原体。

在体内和在体外的靶标的光控移除

[0001] 本申请是2015年8月7日提交的题为“在体内和在体外的靶标的光控移除”的中国专利申请201580034715.1的分案申请。

[0002] 相关专利申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2014年8月8日提交的第62/034,990号美国临时申请的优先权,其以引用的方式纳入本说明书。

技术领域

[0004] 本申请涉及IR700缀合物及其用于在体内或在体外移除(例如分开或分离)靶标试剂的用途。例如,所公开的IR700缀合物和方法提供了光控方式以控制药物在体内的药代动力学,并且可用于从环境或食物样品中移除不想要的试剂或在实验室中用于分离靶标分子。

背景技术

[0005] 在许多应用中,人们都期望从复杂混合物中分离生物分子,包括在体内从受试者中或在体外从其他样品中移除毒素、病原体或药物。此外,许多体外技术(包括诊断方法、环境监测或研究技术)均依赖于从复杂混合物中分开或分离分子。利用现有技术,难以在诸如溶液、细胞和整个生物体的环境中的生物分子混合物中修饰、分离和/或消除选定的生物分子。

发明内容

[0006] 利用现有技术,难以在诸如溶液、细胞和整个生物体的环境中的蛋白质混合物中分离和消除选定的蛋白质或其它靶标分子。本文所公开的方法可移除或分离IR700-标记的分子或与IR700-标记的分子相缔合的分子簇(例如IR700-抗体-抗原复合物)。当酞菁IRDye700DX (IR700) 缀合至特异性结合剂(例如抗体、抗体片段、半抗原、蛋白质、核酸分子、功能性核酸等)时,酞菁IRDye700DX (IR700) 通过特异性结合剂与靶标之间的结合而用于标记靶标试剂。类似地,当IR700缀合至分子(例如药剂(pharmacological agent)或药物)时,则允许控制对试剂的移除,例如在受试者中。一旦暴露于近红外(NIR)光下(例如690nm+/-20nm),IR700染料就会断裂(cleave),将所述分子由亲水性变成疏水性,从而导致所述分子的聚集。这使得能够从溶液、细胞或生物体中移除靶标。此外,这种变化会影响连接到IR700-特异性结合剂复合物上的靶标,其中所述靶标(例如蛋白质)会丧失其功能且在溶液中形成聚集体,损伤细胞膜并且结合有所述靶标的细胞中诱导细胞毒性,或者导致移除这些细胞,例如通过肝脏中的巨噬细胞。

[0007] 本文提供了用于从样品或受试者中移除(例如分离或分开)一种或多种靶标分子或试剂的体外、离体和体内方法。例如,所述方法可以允许移除或分开蛋白质、肽、凝集素、碳水化合物、金属(例如重金属)、核酸分子、小的有机分子、药物、病原体(例如病毒、细菌、寄生虫或真菌)和细胞。在一些实例中,所述方法还包括检测被移除的靶标。例如,该方法可

用于从制造过程(例如药物制造过程)中移除不想要的试剂(例如杂质、金属、病原性生物体、孢子等),例如以改进纯化过程。类似地,该方法可用于从环境源或样品中、或从食物样品或物品中移除病原体、毒素、孢子或金属。此外,例如通过在体内从患者中移除药物,所公开的方法可用于控制药物在体内的药代动力学,例如受控的药物传送。在另一个实例中,例如通过移除具有潜在危险的或有毒的材料(例如病原体、毒素、金属、娱乐性药物(recreational drug)、病毒、毒液等),或从肿瘤中移除特定细胞或细胞群以调节免疫应答(例如杀死肿瘤中特定肿瘤细胞或免疫细胞,例如癌症干细胞),所述方法可用于在体内移除不想要的试剂。在一些实例中,这种方法与单采术(apheresis)结合使用,例如以从血液中移除靶标(例如靶细胞),或与使用经血管分离(vascularly isolated)的器官的方法结合使用以用于灌注。此外,所述方法也可以离体使用,例如从样品(例如血液样品、骨髓样品或组织培养物)中分离或移除靶标(例如细胞)。

[0008] 本文提供了用于从样品中移除(例如分离或分开)靶标的方法。这种方法可包括使样品与IR700-分子缀合物接触,其中缀合至IR700的分子为优先结合所述靶标的特异性结合剂(例如抗体、抗体片段、半抗原、蛋白质、核酸分子、功能性核酸等)。在允许靶标与IR700-分子缀合物中的分子结合的条件下,将样品与IR700-分子缀合物一起孵育,得到IR700-分子缀合物-靶标复合物。在足以生成疏水性的IR700-分子缀合物-靶标复合物的条件下,例如在660至710nm的波长下和在至少 1 J cm^{-2} 的剂量下,使用NIR光照射样品。例如,照射IR700-分子缀合物-靶标复合物使IR700的一部分断裂或将其移除,将IR700-分子缀合物-靶标复合物从亲水性变成疏水性的IR700-分子缀合物-靶标复合物。

[0009] 然后,在允许疏水性的IR700-分子缀合物-靶标复合物聚集的条件下,孵育样品。例如,在允许形成聚集体或沉淀物的条件下,可使所述样品进行反应或将其混合,在某些实例中其积聚或沉积于容器底部。在一些实例中,离心所述样品以收集所形成的聚集体。随后将疏水性的IR700-分子缀合物-靶标复合物从样品中移除或分开,从而移除、分离或分开样品中的靶标。在一些实例中,所述方法还包括检测或测量从样品中移除的靶标。在一些实例中,所述方法还包括检测结合至靶标上的其他分子(例如其他蛋白质、核酸、凝集素碳水化合物等)。在一些实例中,所述方法包括从细胞培养物(2D或3D)中移除不想要的细胞,例如在组织再生中。

[0010] 还提供了可用于从受试者(例如哺乳动物)中移除靶标分子的体内方法。在一些实例中,所述方法包括向受试者给予治疗有效量的IR700-分子缀合物,其中缀合至IR700的分子包括靶标分子(例如药剂)或其中IR700-分子缀合物特异性地结合靶标分子(例如,包括缀合至特异性结合剂的IR700)。在足以断裂或移除IR700的一部分的条件下,用NIR光照射受试者,将IR700-分子缀合物或IR700-分子缀合物-靶标复合物由亲水性变成疏水性。这类条件的实例包括在660至710nm波长下,例如在至少 10 J cm^{-2} 剂量下照射。例如,照射可通过受试者穿戴的设备来进行,其中所述设备包括NIR发光二极管(LED)。这种设备可包括衣服、首饰或覆盖物(covering),其可进一步包括电源和/或冷却源。疏水性的IR700-分子缀合物或IR700-分子缀合物-靶标复合物被允许聚集并从受试者中移除(例如通过肝脏和/或脾脏),从而将靶标分子从受试者中移除。所述方法还包括检测受试者中靶标分子的量的减少(例如通过进行允许检测靶标的血液测试,例如免疫测定、核酸杂交、序列或PCR测定)。所述方法还可以用于从肿瘤中移除特定细胞,例如调节性免疫细胞,从而增强针对肿瘤的天然

宿主免疫应答。

[0011] 根据下述参照附图而进行的对若干实施方案的具体说明,本公开内容的前述和其他特征将会更加明显。

附图说明

[0012] 图1为示出IR700暴露于NIR光的结果的示意图。在这种暴露之后,IR700的一部分被断裂。剩余的化合物(较大部分)为“超疏水性的”,这导致其发生聚集。

[0013] 图2为示出经抗体(Ab)标记的IR700的示意图,其中在暴露于NIR光时,IR700的被圈出的部分被断裂。所形成的化合物(非圈出部分)为“超疏水性的”,这导致抗体(以及结合至抗体的任何物质)的聚集。该聚集体在SDS处理之后不会解离(参见图9)。

[0014] 图3为示出基础细胞膜的示意图,其具有结合至表面蛋白的抗体复合物。所述抗体可缀合至IR700。在暴露于NIR之后,连接到抗体的IR700发生了诱导疏水性的化学变化,其破坏细胞膜的完整性,造成了膜损伤。

[0015] 图4为SDS-PAGE电泳凝胶(上图)和考马斯亮蓝凝胶(下图)的荧光影像的数字图像。这两者示出暴露于NIR光之前(无NIR光)和之后的Pan-IR700缀合物。如上图的凝胶中所示,Pan-IR700缀合物形成聚集体并且荧光淬灭,但是并未显示除蛋白质以外的荧光(IR700未作为小分子被释放)。蓝色Pan-IR700条带显示在暴露于NIR光(LED或激光)之后存在Pan-IR700复合物的分解。

[0016] 图5提供数字荧光图像,其示出了尽管在暴露于NIR之后,IR700发生断裂,但是分子的荧光组分不受影响。

[0017] 图6为SDS-PAGE电泳凝胶(上图)和考马斯亮蓝凝胶(下图)的荧光影像的数字图像。这两者示出在暴露于NIR光之前和之后,在有氧(不处理)或无氧(NaN_3 或 O_2^-)条件下的Pan-IR700缀合物。

[0018] 图7为SDS-PAGE电泳凝胶(上图)和考马斯亮蓝凝胶(下图)的荧光影像的数字图像。所有均示出在暴露于NIR光之前和之后,在有或无过量氧条件下的Pan-IR700缀合物。水平和窗口设置(level and window setting)是不同的以更好地显示聚集量。在100% O_2 下,聚集、聚集体形成的效率较低。这证实了图1和2中所示的化学反应。

[0019] 图8为在向小鼠给予表达EGFR的肿瘤之后,Pan-IR700所发生情况的条形图。该图示出在离体暴露于NIR光(注射之前,激光)、或在体内(暴露大部分腹部(abdomen),腹部(belly))暴露于NIR光之后,在处理从身体移出的器官中放射性标记的Pan-IR700的生物分布。正常($n=5$):无激光;激光($n=5$):16J激光;腹部($n=4$):30J激光照射到腹部。与正常比较,* $p<0.05$ 且# $p<0.01$ 。

[0020] 图9为SDS-PAGE电泳凝胶(上图)和考马斯亮蓝凝胶(下图)的荧光影像的数字图像。考马斯亮蓝凝胶示出在暴露于16J/ cm^2 NIR光下,EGFR条带消失并且掺入到Pan-IR700聚集的条带中(较大分子量的条带,参见仅使用16J/ cm^2 的Pan-IR700)。

[0021] 图10A-10C示出A431细胞系的表征。(A)如通过FACS所证实的,A431细胞是采用荧光素酶和GFP(这两者在同一质粒上)稳定转染的。(B)如通过FACS所证实的,Balb/3T3细胞是用RFP稳定转染的。(C)A431-luc-GFP证明了EGFR表达。采用阻断研究证明了特异性结合。不表达EGFR的Balb/3T3-RFP也与Pan-IR700一起孵育,但是没有观察到结合。

[0022] 图11A-11C示出了观察和定量PIT对于A431-luc-GFP细胞的2D培养物的影响。(A) 将A431-luc-GFP细胞与Pan-IR700一起孵育6hr,并且在NIR光($2\text{J}/\text{cm}^2$)照射之前或之后用显微镜观察。在暴露于NIR光(PIT后1hr)之后观察到坏死细胞死亡。标尺= $10\mu\text{m}$ 。通过死细胞PI染色证实PIT诱导的膜损伤和坏死。(B) 在FACS上通过使用PI染色的死细胞计数测量PIT诱导的膜损伤和坏死。(C) 被杀死的细胞以NIR-光剂量-依赖性方式增加。

[0023] 图12A-12C示出通过荧光素酶活性来定量PIT对于A431-luc-GFP细胞的2D的影响。(A,B) 测量A431-luc-GFP细胞内的生物发光,以相对光单位(RLU)计,并且其以NIR-光剂量-依赖性方式减弱(PIT后1hr)。(C) 10cm培养皿的生物发光成像(BLI)证明了A431-luc-GFP细胞内的荧光素酶活性以NIR-光剂量-依赖性方式降低。

[0024] 图13A-13C示出在PIT后1hr时,2D细胞培养物中GFP-荧光减弱。(A) 将A431-luc-GFP细胞与Pan-IR700一起孵育6hr且用NIR-light($0.5\text{J}/\text{cm}^2$)进行照射。在PIT后1hr时,GFP-荧光强度在死细胞(*)中减弱但在活细胞中没有变化。标尺= $50\mu\text{m}$ 。(B) 在PIT后1hr时,GFP-荧光强度的减弱是以NIR-光剂量-依赖性方式进行。右上角的黑线为标记以确保所进行的观察的一致性。(C) GFP-荧光强度的定量显示以NIR-光剂量-依赖性方式减弱(在同一视野内GFP荧光的总像素, $n=12$ 个视野)。

[0025] 图14A-14B示出在PIT后1hr时,用流式细胞术评估GFP-荧光强度的减弱。(A,B) 如FACS所测量的,在PIT之后,GFP荧光强度以NIR-光剂量-依赖性方式减弱。

[0026] 图15A-15E示出体外3D球体的表征。(A) A431-luc-GFP/Balb/3T3-RFP 3D球体的代表性图像。标尺= $200\mu\text{m}$ 。(B) 3D球体生长到约 $500\mu\text{m}$ ($n=10$)。(C) 在第7天,3D球体的3D重建图像。标尺= $100\mu\text{m}$ 。(D) 3D球体的冻结切片。细胞聚集于球体的核心内。标尺= $100\mu\text{m}$ 。(E) Pan-IR700以时间依赖性方式向中心渗入(球体内的IR700荧光的平均强度)($n=10$)。

[0027] 图16示出PIT对3D球体的影响的观察。在用Pan-IR700孵育6hr之后的第7天,在NIR光照射($2\text{J}/\text{cm}^2$)之前及之后1hr的3D球体。坏死细胞死亡可在NIR光照之后1hr观察到。标尺= $100\mu\text{m}$ 。减弱的GFR荧光区域用PI染色进行共同定位。

[0028] 图17A-17E示出了PIT对体外3D球体的影响的评估。(A) 在用Pan-IR700孵育6hr之后的第7天,在NIR光照射($2\text{J}/\text{cm}^2$)之前及之后1天的3D球体。坏死细胞死亡可在NIR光照之后1天观察到(通过PI染色)。标尺= $100\mu\text{m}$ 。GFP-荧光强度的减弱及球体尺寸的减小(“剥离”)均为光剂量依赖性方式。(B) 在玻璃底培养皿中球体的生物发光成像(BLI)表明在PIT后1天,A431-luc-GFP 3D球体中的荧光素酶活性以NIR-光剂量-依赖性方式降低。标尺= 5mm 。也示出IR700荧光肉眼可见视图(Pearl Imager)。(C) GFP-荧光的定量表明强度的NIR-光剂量-依赖性减弱(在相同的球体内GFP荧光的总像素, $n=10$)。(D) 测量A431-luc-GFP 3D球体中的生物发光,以相对光单位(RLU)计,并且以NIR-光剂量-依赖性方式减弱($n=10$)。(E) A431-luc-GFP 3D球体的体积也以NIR-光剂量-依赖性方式减小($n=10$)。

[0029] 图18A-18F示出重复的PIT对于3D球体的影响。(A) 示出包括重复的NIR光暴露的PIT方案。(B) 如图所示,第7天,将A431-luc-GFP 3D球体划分为4组。标尺= $100\mu\text{m}$ 。(C) 每组的生物发光成像(BLI)表明在重复的PIT之后,荧光素酶活性降低。标尺= 5mm 。也示出IR700荧光的肉眼可见视图(Pearl Imager)。(D) GFP-荧光强度的定量示出在重复的PIT之后呈渐进式减弱,最终导致没有可检测的荧光(在相同的球体内GFP荧光的总像素)(每组中 $n=10$ 个球体)。(E) 测量生物发光,以相对光单元(RLU)计,其在重复的PIT之后呈渐进式减弱,最终

导致接近ORLU(在背景水平下) ($n=10$)。(F) 在重复的PIT之后,A431-luc-GFP 3D球体的体积也减小($n=10$)。

[0030] 图19A-19D示出了PIT对体内A431-luc-GFP侧腹(f flank)肿瘤的影响的评估。(A) 示出包括重复的NIR光暴露的PIT方案。(B) 响应于PIT, 双侧侧腹肿瘤的体内GFP/IR700荧光成像和BLI。经PIT处理的肿瘤表明GFP荧光和生物发光消失。(C) GFP-荧光的定量表明在重复的PIT之后, 强度呈渐进式减弱, 最终导致信号的完全消失(每组中 $n=10$)。(D) 测量生物发光, 以相对光单元(RLU)计, 其在PIT之后呈渐进式减弱, 最终导致RLU完全消失($n=10$)。

[0031] 图20示出PIT对于体内A431-luc-GFP侧腹肿瘤的影响。在另外两只小鼠中双侧侧腹肿瘤的体内GFP/IR700荧光成像和BLI。经PIT处理的肿瘤表明在PIT之后, GFP荧光和生物发光消失。

[0032] 图21A-21B示出PIT对于离体A431-luc-GFP侧腹肿瘤的影响。(A) 示出包括重复的NIR光暴露的PIT方案。(B) 响应于PIT, 双侧侧腹肿瘤的离体GFP/IR700荧光成像和BLI确认了GFP荧光和生物发光的消失。

[0033] 图22A-22B示出在稳定细胞中选择性/特异性荧光以及PIT的特异性杀死效应。(A) FACS表明通过它们的GFP和RFP荧光分选两类细胞系(A431和Balb/3T3)。(B) 将A431-luc-GFP细胞和Balb/3T3-RFP细胞的混合物与Pan-IR700一起孵育6hr。基线(Baseline)和PIT($2\text{J}/\text{cm}^2$)后1小时的显微镜图像表明A431-luc-GFP的特异性细胞杀死。标尺= $20\mu\text{m}$ 。通过死细胞Cyttox染色确认了PIT诱导的膜损伤和坏死。

[0034] 图23A-23E示出在2D细胞培养物中靶细胞的清除。(A) 代表性图像表明在PIT之后1hr, A431-luc-GFP细胞被清除。标尺= $200\mu\text{m}$ 。使用A431-luc-GFP和Balb/3T3-RFP的几乎汇合(confluent)的混合的细胞培养物。将细胞与Pan-IR700孵育6hr, 并且在NIR光($2\text{J}/\text{cm}^2$)照射之前或之后进行观察。(B) 示出重复的PIT($2\text{J}/\text{cm}^2$)方案($2\text{J}/\text{cm}^2$)。(D) 重复的PIT完全清除靶细胞, 而对非靶细胞无害, 直至非靶细胞汇合。培养A431-luc-GFP与Balb/3T3-RFP细胞比例为100:10的混合物。标尺= $200\mu\text{m}$ 。(D) 荧光比率的定量表明靶细胞完全清除, 且对非靶细胞没有影响(每组中 $n=10$ 个视野)。(E) 荧光素酶活性(RLU比)的定量表明靶细胞完全清除(每组中 $n=10$)。

[0035] 图24A-24C示出在2D培养物中的靶细胞杀死。(A) 示出包括重复的NIR光暴露的PIT方案。(B) 重复的PIT完全清除靶细胞, 而对非靶细胞无害, 直至非靶细胞汇合。培养比例为100:10的A431-luc-GFP与Balb/3T3-RFP混合细胞。标尺= $200\mu\text{m}$ 。显示对照组, 并且边缘的黑线是保持一致性定位的标记。标尺= $200\mu\text{m}$ 。(C) 35mm培养皿的BLI表明在重复的PIT之后, A431-luc-GFP细胞中荧光素酶活性呈渐进式降低, 最终完全消失。

[0036] 图25A-25B示出混合3D球体的表征。(A) PIT对于含有A431-luc-GFP细胞的球体的影响, 而不损害含有Balb/3T3-RFP细胞的球体。标尺= $200\mu\text{m}$ 。(B) 在第7天时, 不同比例的混合球体的表征。标尺= $200\mu\text{m}$ 。

[0037] 图26A-26D示出3D细胞球体中的靶细胞清除。(A) 示出PIT($2\text{J}/\text{cm}^2$)方案。(B) 在混合3D球体中, 重复的PIT完全清除靶细胞, 而对非靶细胞无害。标尺= $200\mu\text{m}$ 。(C) 荧光比率的定量表明靶细胞的完全清除, 并且对非靶细胞没有影响(每组中 $n=10$ 个球体)。(D) 荧光素酶活性的定量(RLU比率)表明靶细胞的完全清除(每组中 $n=10$ 个球体)。

[0038] 图27A-27C示出3D混合细胞球体中的靶细胞清除。(A) 示出处理方案。(B) 在混合3D

细胞培养物中,重复的PIT完全清除靶细胞,而未损伤非靶细胞。示出对照组(对照和仅光照)显微镜图像。标尺=200 μ m。(C)在玻璃底培养皿中球体的BLI表明在PIT之后,混合3D球体中的荧光素酶活性降低,最终完全消失。标尺=5mm。也示出IR700荧光的肉眼可见视图(Pearl Imager)。

[0039] 图28A-28B示出在3D球体中靶细胞(表达HER2靶标和PSMA的细胞)的消失。(A)在图像上方示出重复的PIT(2J/cm²)方案。重复的PIT完全清除表达HER2的细胞,而对非靶细胞无害。标尺=200 μ m。(B)在图像上方示出重复的PIT(2J/cm²)方案。重复的PIT完全清除PSMA靶细胞,而对非靶细胞无害。标尺=200 μ m。

[0040] 图29A-29B示出体内肿瘤的特征。(A)示出重复的PIT的方案。(B)PIT在靶肿瘤中有反应,对非靶肿瘤没有影响。

[0041] 图30A-30E示出体内混合肿瘤模型中的靶细胞消除。(A)示出PIT(2J/cm²)方案。(B)重复的PIT在体内从混合肿瘤中完全清除靶细胞。(C)荧光比率的定量表明完全清除混合肿瘤中的靶细胞(每组中n=10)。(D)荧光素酶活性的定量(RLU比率)表明在体内完全清除靶细胞(每组中n=10)。(E)离体肿瘤的代表性图像表明从混合肿瘤中完全清除靶细胞。

[0042] 图31表明体内靶细胞清除。重复的PIT完全清除混合肿瘤中的靶细胞。两侧侧腹肿瘤的体内GFP/IR700荧光成像和BLI(2只额外的小鼠)。经PIT处理的肿瘤表明在PIT之后,荧光和生物发光消失。

[0043] 图32A-32B示出在离体混合肿瘤(对照肿瘤)中的细胞清除。(A)示出包括重复的NIR光暴露的PIT方案。(B)响应于PIT,混合肿瘤的离体GFP/IR700荧光成像和BLI。示出对照肿瘤的离体图像。

具体实施方式

[0044] 除非另有说明,本文中所用的所有技术和科学术语具有与所公开的发明所属领域中普通技术人员通常理解的含义相同的含义。除非上下文另有明确指示相反,单数术语“一个”、“一种”和“该”(“a”“an”和“the”)包括多个指代对象。类似地,除非上下文另有明确指示相反,词语“或”旨在包括“和”。“包含”意指“包括”。因此“包含A或B”意指“包括A”或“包括B”或“包括A和B”。

[0045] 用于实施和/或测试本公开内容的实施方案的适合方法和材料描述如下。这种方法和材料仅为说明性,而不是限制性的。可使用与本文所述的那些类似或等同的其他方法和材料。例如,本公开内容所属领域中公知的常规方法记载于多篇一般性和较具体的参考文献中,包括,例如Sambrook et al.,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,3d ed.,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989;Sambrook et al.,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,3d ed.,Cold Spring Harbor Press,2001;Ausubel et al.,Current Protocols in Molecular Biology,Green Publishing Associates,1992(and Supplements to 2000);Ausubel et al.,Short Protocols in Molecular Biology:A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology,4th ed.,Wiley&Sons,1999;Harlow and Lane,Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1990;和Harlow and Lane,Using Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1999。

[0046] 所有的参考文献,包括专利和专利申请,均以引用的方式纳入本说明书。此外,本文引用的所有带有**GenBank®**登录号相关的序列均以引用的方式纳入作为2014年8月8日时可获得的序列。

[0047] 为了便于审阅本公开内容的各种实施方案,特定术语的解释提供如下:

[0048] 给药:通过任何有效途径向受试者提供或给予试剂,例如IR700-分子缀合物。示例性的给药途径包括,但不限于,局部、注射(例如皮下、肌肉内、真皮内、腹膜内、肿瘤内、动脉内和静脉内),口服、眼部、舌下、直肠、经皮、鼻内、阴道和吸入途径。在一些实例中,在灌注期间实现给药,例如器官灌注。

[0049] 抗体(Ab):包括完整免疫球蛋白(例如单克隆抗体、多克隆抗体),变体(例如嵌合抗体)和抗体部分,例如天然存在的或重组抗体的抗原结合片段。通常,Ab为包含至少一个轻链或重链免疫球蛋白可变区的多肽配体,所述可变区能够特异性识别和结合抗原(例如靶标蛋白)的表位。每条重链和轻链均具有可变区,称为可变重链(V_H)区和可变轻链(V_L)区。 V_H 区和 V_L 区一起负责结合由抗体识别的抗原。抗体可以使用常规方法与IR700分子缀合,并用于本文提供的方法中,例如以在体外或体内移除、分离或分开靶标分子。

[0050] 抗原(Ag):在动物中可以刺激产生抗体或T细胞应答的化合物、组合物或物质,包括注射到动物中或被动物吸收的组合物(例如一种包括肿瘤特异性蛋白的组合物)。抗原的实例包括,但不限于肽、脂质、多糖和含有抗原决定簇的核酸,例如由免疫细胞识别的那些。在一些实例中,抗原包括肿瘤特异性肽(例如在癌细胞表面上发现的一种肿瘤特异性肽)或其免疫原性片段。

[0051] 抗原与特异性体液或细胞免疫的产物(包括由异源抗原如所公开的抗原诱导的那些)反应。“表位”或“抗原决定簇”是指B和/或T细胞对其作出应答的抗原的区域。在一个实施方案中,当表位以与MHC分子结合的形式存在时,T细胞对表位作出应答。表位可以由连续氨基酸形成或通过蛋白质的三级折叠而并置的非连续氨基酸形成。在暴露于变性溶剂时,由连续氨基酸形成的表位通常保持不变,而在用变性溶剂处理时,通过三级折叠形成的表位通常会丢失。表位通常包括处于独特的空间构象中的至少3个、更通常地至少5个、约9个、或约8-10个氨基酸。确定表位的空间构象的方法包括,例如x射线晶体学和核磁共振。

[0052] 使用本文提供的方法,抗体与靶抗原或其表位的结合可用于移除标靶。

[0053] 适体:以高亲和力和特异性(例如高达 $10^{-14}M$)结合特定靶标试剂(例如蛋白质或小的有机分子)的单链(ss)核酸分子(例如DNA或RNA),并且一旦结合到靶标上,所述ss核酸分子发生构象变化且形成三级结构。它们的长度通常为约15至60个核苷酸(nt),但是有一些更长(例如,超过200nt)。因此,在某些实例中,适体为至少15nt、至少20nt、至少25nt、至少30nt、至少50nt、至少60nt、至少75nt、至少100nt、至少150nt、至少200nt,如15至250nt、15至200nt或20至50nt。使用常规方法,适体可以被缀合至IR700分子,并且适体可用于本文提供的方法中,例如以在体外或体内移除、分离或分开靶标分子。

[0054] 适体为已知的并且经过被称为指数富集的配体系统演化(SELEX)的组合选择方法而获得(参见Ellington et al.,Nature 1990,346,818-822;Tuerk and Gold Science 1990,249,505-510;Liu et al.,Chem.Rev.2009,109,1948-1998;Shamah et al.,Acc.Chem.Res.2008,41,130-138;Famulok,et al.,Chem.Rev.2007,107,3715-3743;Manimala et al.,RecentDev.Nucleic Acids Res.2004,1,207-231;Famulok et al.,

Acc.Chem.Res.2000,33,591-599;Hesselberth,et al.,Rev.Mol.Biotech.2000,74,15-25;Wilson et al.,Annu.Rev.Biochem.1999,68,611-647;Morris et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.1998,95,2902-2907)。在这种方法中,能够结合目的靶标分子的DNA或RNA分子是通过选择、扩增和突变的迭代步骤从由 10^{14} - 10^{15} 不同序列组成的核酸库中选择的。已经鉴定出能特异性地结合具有许多靶标(从小的有机分子例如腺苷,到蛋白质例如凝血酶,甚至病毒和细胞)的适体(Liu et al.,Chem.Rev.2009,109:1948-98;Lee et al.,Nucleic Acids Res.2004,32,D95-D100;Navani and Li,Curr.Opin.Chem.Biol.2006,10,272-281;Song et al.,TrAC,Trends Anal.Chem.2008,27:108-17)。适体对其靶标的亲和力可以比得上抗体的亲和力,其解离常数低至皮摩尔范围(Morris et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.1998,95:2902-7;Green et al.,Biochemistry 1996,35:14413-24)。

[0055] 自身免疫性疾病:其中免疫系统对作为正常宿主的一部分的抗原(即自身抗原)产生免疫应答(例如,B细胞或T细胞应答),引起组织损伤的疾病。自身抗原可衍生自宿主细胞,或可衍生自共生生物,例如通常定植于粘膜表面上的微生物(称为共生生物)。

[0056] 影响哺乳动物的示例性自身免疫性疾病包括类风湿性关节炎、幼年型少关节炎(juvenile oligoarthritis)、胶原诱发性关节炎、佐剂诱发性关节炎、干燥综合征、多发性硬化、实验性自身免疫性脑脊髓炎、炎性肠病(例如克罗恩氏病、溃疡性结肠炎)、自身免疫性胃萎缩、寻常型天疱疮、银屑病、白癜风、1型糖尿病、非肥胖性糖尿病、重症肌无力、格雷夫斯氏病、桥本氏甲状腺炎、硬化性胆管炎、硬化性唾液腺炎、系统性红斑狼疮、自身免疫性血小板减少性紫癜、古德帕斯彻氏综合征(Goodpasture's syndrome)、爱迪生氏病(Addison's disease)、系统性硬化症、多肌炎、皮肌炎、自身免疫性溶血性贫血、恶性贫血等。

[0057] 结合:两种物质或分子之间的缔合,例如一种核酸分子与另一种核酸分子(或其自身)的杂交,抗体、**Affibody®**分子、半抗原或功能性核酸与蛋白质或小的有机分子的缔合,蛋白质与另一种蛋白质或核酸分子的缔合,凝集素与碳水化合物的缔合,或半抗原和抗体之间的缔合。结合可以通过本领域技术人员已知的任何方法来检测,包括但不限于:蛋白质印迹、免疫印迹、酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、免疫沉淀、表面等离子体共振、化学发光、荧光偏振、磷光、免疫组织化学分析、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法、微细胞计数(microcytometry)、微阵列、显微术、荧光激活细胞分选(FACS)和流式细胞术。

[0058] 当特定试剂(“特异性结合剂”)可以与特定靶标(但不是无关分子)特异性反应,例如与靶标特异性免疫反应、与靶标特异性杂交或与靶标特异性结合时,一个分子被称为“特异性结合”到另一个分子。例如,铅特异性结合剂在体外或体内基本上仅结合铅,并且CD45特异性结合剂在体外或体内基本上仅结合CD45蛋白。所述结合是非随机结合反应,例如在特异性结合剂(例如抗体或其功能性片段、**Affibody®**分子、半抗原、凝集素、蛋白质,核酸分子或功能性核酸分子)和靶标(例如细胞、蛋白质、碳水化合物、病原体、小的有机分子、金属、DNA或RNA)之间。结合特异性可以从特异性结合剂差异性结合靶标和无关分子的能力的这个参考点来确定,从而区分这两种不同的分子。例如,如果有足够量的寡核苷酸分子与其

靶标核酸分子形成碱基对或与其靶标核酸分子杂交,则寡核苷酸分子与靶标核酸分子结合或稳定结合,以允许检测该结合。

[0059] 在一些实例中,分子(例如IR700-分子缀合物的分子)特异性结合靶标(例如蛋白)的结合常数要比结合样品或受试者中其他分子的结合常数至少高 10^3M^{-1} 、高 10^4M^{-1} 或高 10^5M^{-1} 。在具体实例中,当两种组分之间形成复合物的结合常数为至少 10^4L/mol ,例如至少 10^6L/mol 、至少 10^8L/mol 或至少 10^{10}L/mol 时,这两种化合物被称为特异性结合。两种组分的结合常数可使用本领域中公知的方法来测定。

[0060] 在具体实例中,当结合亲和力为至少约 $0.1 \times 10^{-8}\text{M}$ 、至少约 $0.3 \times 10^{-8}\text{M}$ 、至少约 $0.5 \times 10^{-8}\text{M}$ 、至少约 $0.75 \times 10^{-8}\text{M}$ 、至少约 $1.0 \times 10^{-8}\text{M}$ 、至少约 $1.3 \times 10^{-8}\text{M}$ 、至少约 $1.5 \times 10^{-8}\text{M}$ 、至少约 $2.0 \times 10^{-8}\text{M}$ 、至少约 2.5×10^{-8} 、至少约 3.0×10^{-8} 、至少约 3.5×10^{-8} 、至少约 4.0×10^{-8} 、至少约 4.5×10^{-8} 、或至少约 $5.0 \times 10^{-8}\text{M}$ 时,两种化合物被称为特异性结合。

[0061] 在某些实例中,结合至靶标的特异性结合剂的解离常数(K_d)为 $\leq 104\text{nM}$, $\leq 100\text{nM}$, $\leq 10\text{nM}$, $\leq 1\text{nM}$, $\leq 0.1\text{nM}$, $\leq 0.01\text{nM}$,或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如 10^{-8}M 或更小,例如 10^{-8}M 至 10^{-13}M ,例如 10^{-9}M 至 10^{-13}M)。在一个实施方案中, K_d 是通过使用Fab形式的目的抗体及其抗原进行的放射性标记抗原结合测定(RIA)来测量(参见,例如Chen et al., J.Mol.Biol.293:865-881, 1999)。在另一个实例中,在 25°C 下,使用具有固定抗原CM5芯片的BIACORES-2000或BIACORES-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.)以约10个应答单位(RU),使用表面等离子共振测定法来测量 K_d 。

[0062] 癌症:以异常或不受控制的细胞生长为特征的恶性肿瘤。通常与癌症相关的其它特征包括转移,干扰邻近细胞的正常功能,在异常水平释放细胞因子或其他分泌产物,以及抑制或加重炎症应答或免疫应答,侵入周围或远处组织或器官,例如淋巴节等。“转移性疾病”是指已经离开原始肿瘤部位并且例如通过血流或淋巴系统迁移到身体的其他部分的癌细胞。在一个实例中,被所公开的方法靶向以移除的细胞为癌细胞。

[0063] 接触:直接物理缔合的状态,包括固体或液体形式。接触可以例如通过向样品中加入试剂而在体外或离体进行,或通过向受试者给药而在体内进行。

[0064] 减少:降低某物的质量、数量或强度。在一个实例中,本文的方法使样品、源或受试者中的靶标的量减少。例如,使用IR700-分子复合物会减少靶标的量,所述靶标可以为IR700-分子所特异性结合的试剂,或者可以为IR700-分子复合物中的分子。在一些实例中,相对于在未加入IR700-分子并且没有施加NIR光时所观察到的靶标的量,靶标的减少或降低为至少20%、至少50%、至少75%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%。在其他实例中,相对于在未加入IR700-分子并且没有施加NIR光时所观察到的靶标的量,减少表示为倍数变化,例如靶标减少为至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少8倍、至少10倍、或甚至至少15或20倍。这种减少可以使用本领域中的常规方法以及本文公开的方法来测量。

[0065] 检测:用于确定特定试剂(例如靶标)是否存在,并且在一些实例中,如果检测,还包括试剂的半定量或定量。

[0066] 脱氧核酶(DNA酶):对于特定靶标显示出催化活性的功能性DNA分子。也称为催化性DNA。DNA酶通常含有包含单个RNA碱基和酶链的底物链。DNA酶对于特定的底物(例如靶标)显示出高催化水解切割活性。在存在特定靶标的情况下,靶标将结合酶链,引起DNA酶的构象变化,并在RNA碱基处底物链的断裂。DNA酶可以使用常规方法与IR700分子缀合,并且

用于本文提供的方法中,例如以在体外或体内移除、分离或分开靶标分子。

[0067] 可获得对于多种金属离子具有高特异性的DNA酶,例如 Pb^{2+} (Breaker, and Joyce, Chem.Biol.1994,1:223-9; Li and Lu, J.Am.Chem.Soc.2000,122,10466-7), Cu^{2+} (Carmi et al., Chem.Biol.1996,3:1039-46; Cuenoud et al., Nature 1995,375:611-14), Zn^{2+} (Santoro et al., J.Am.Chem.Soc.2000,122,2433-243; Li et al., Nucleic Acids Res.2000,28,481-488), Co^{2+} (Mei et al., J.Am.Chem.Soc.2003,125:412-20; Bruesehoff et al., Comb.Chem.High Throughput Screening 2002,5:327-35), Mn^{2+} (Wang et al., J.Am.Chem.Soc.2003,125,6880-1), 和 UO_2^{2+} (Liu et al., Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A.2007,104:2056-61)。

[0068] 有效量:例如在体外、体内或离体足以实现所需效果的单独的组合物或量或与额外的治疗剂(例如化学治疗剂)一起的组合物或量。试剂(例如IR700-分子缀合物或NIR光)的有效量可以取决于若干因素,包括但不限于,待治疗的样品、源、受试者或细胞,所施加的源,所治疗的病症的严重性和类型,具体的治疗剂(例如,特定IR700-分子缀合物)和给药方式。有效量也可以通过各种体外、体内或原位免疫测定来确定。根据需要,IR700分子缀合物和/或NIR光可以单一剂量或几个剂量给予,以获得所需的应答。

[0069] 在一个实例中,有效量或浓度为足以从样品、源或受试者中移除或分离靶标的有效量或浓度。在一个实例中,治疗有效量或浓度为足以延迟疾病进展、或导致疾病消退、或能够减少由疾病(例如癌症)引起的症状的量或浓度。在一个实例中,治疗有效量或浓度为足以使患有肿瘤的患者存活时间增加的治疗有效量或浓度。

[0070] 在一个实例中,有效量或浓度为这样一种有效量或浓度,即其足以从样品、源或受试者中移除或分开靶标。为使所述方法有效,一种或多种靶标不需要被完全清除。例如,与接触或给予IR700-分子缀合物之前所存在的靶标的量相比,将含有IR700-分子缀合物的组合物与样品或源或受试者接触,或含有IR700-分子缀合物的组合物给予样品或源或受试者,然后用NIR光照射,可以使存在于样品、源或受试者中的靶标的量显著减少,例如减少至少20%、至少50%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%、或甚至至少100%。

[0071] 在一个实例中,有效量或浓度为这样一种有效量或浓度,即其足以在体内或体外从混合细胞群中减少或清除(并且在某些实例中杀死)靶细胞。为使所述方法有效,一种或多种靶细胞不需要被完全清除。例如,与接触或给予IR700-分子缀合物之前所存在的靶细胞的量相比,将含有IR700-分子缀合物的组合物与样品或源或受试者接触,或将含有IR700-分子缀合物的组合物给予样品或源或受试者,然后用NIR光照射,可以使存在于样品、源或受试者的细胞混合物中的靶细胞的量显著减少,例如减少至少20%、至少50%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%、或甚至至少100%。

[0072] 在一个实例中,有效量或浓度为这样一种有效量或浓度,即其足以从样品、源或受试者中分离或纯化靶标。为使所述方法有效,一种或多种靶标不需要被完全分离或纯化。例如,与接触或给予IR700-分子缀合物之前所存在的靶标纯度的量相比,将含有IR700-分子缀合物的组合物与样品或源或受试者接触,或将含有IR700-分子缀合物的组合物给予样品或源或受试者,然后用NIR光照射,可以使靶标的纯度显著增加,例如增加至少20%、至少50%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%、或甚至至少100%的纯度。

[0073] 在一个具体实例中,有效量或浓度为这样一种有效量或浓度,即其足以治疗受试

者的疾病或病症,例如通过减少或抑制与所述疾病或病症相关的一种或多种症状。为使组合物有效,一种或多种症状不必被完全消除。例如,与接触或给予IR700-分子缀合物之前的征象或症状相比,向受试者给予含有IR700-分子缀合物的组合物,然后用NIR光照射,可以使所述疾病或病症的一种或多种征象或症状显著减少,例如减少至少20%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%、或甚至至少100%。

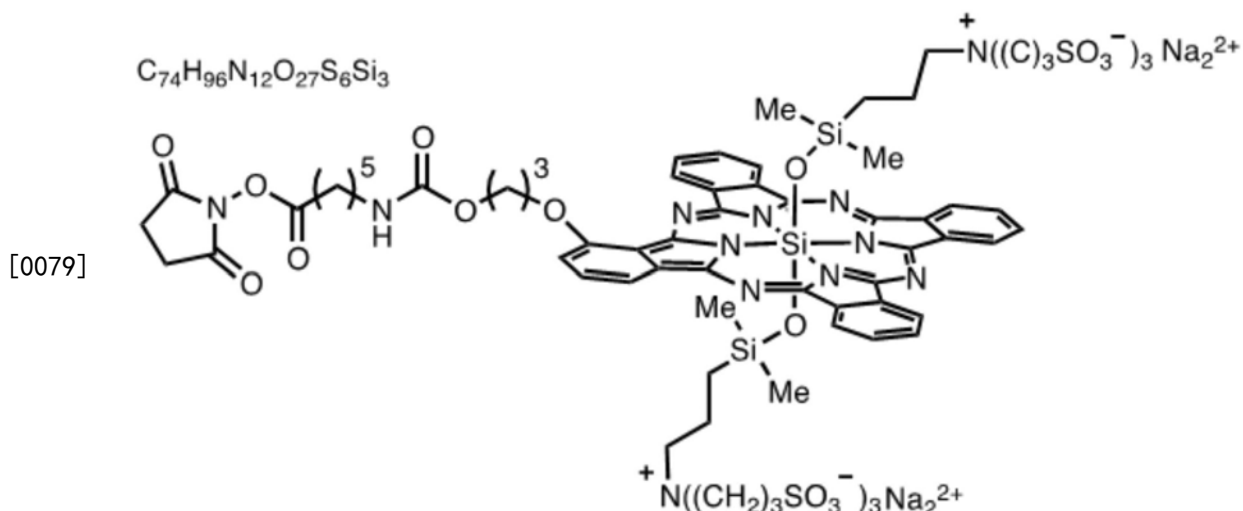
[0074] 在具体实例中,用于体外或离体目的的IR700-分子缀合物的有效量为至少 $0.5\mu\text{g}/\text{m}^2$,例如至少 $1\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、至少 $2\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、至少 $5\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、至少 $10\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、至少 $25\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、至少 $50\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、至少 $100\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、至少 $250\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、或至少 $500\mu\text{g}/\text{m}^2$,例如 $0.5\mu\text{g}/\text{m}^2$ 至 $500\mu\text{g}/\text{m}^2$, $1\mu\text{g}/\text{m}^2$ 至 $500\mu\text{g}/\text{m}^2$, $1\mu\text{g}/\text{m}^2$ 至 $50\mu\text{g}/\text{m}^2$,或 $2\mu\text{g}/\text{m}^2$ 至 $20\mu\text{g}/\text{m}^2$ 。然而,本领域技术人员将认识到,例如根据具体的IR700-分子缀合物或样品,也可使用更高或更低的量。

[0075] 在具体实例中,例如在以iv给药时,用于体内目的的IR700-分子缀合物的有效量为0.5毫克/60千克(mg/kg),至少5mg/60kg,至少10mg/60kg,至少20mg/60kg,至少30mg/60kg,至少50mg/60kg,例如0.5至50mg/60kg,如剂量为1mg/60kg、2mg/60kg、5mg/60kg、20mg/60kg或50mg/60kg。在另一个实例中,例如在以肿瘤内或ip给药时,IR700-分子缀合物的有效剂量为至少 $10\mu\text{g}/\text{kg}$,如至少 $100\mu\text{g}/\text{kg}$,至少 $500\mu\text{g}/\text{kg}$,或至少 $500\mu\text{g}/\text{kg}$,例如 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $1000\mu\text{g}/\text{kg}$,如剂量为 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $250\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约 $500\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $750\mu\text{g}/\text{kg}$ 或 $1000\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在一个实例中,例如在以局部溶液形式给药时,IR700-分子缀合物的有效剂量为至少 $1\mu\text{g}/\text{ml}$,如至少 $5000\mu\text{g}/\text{ml}$,如 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 至 $100\mu\text{g}/\text{ml}$, $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 至 $500\mu\text{g}/\text{ml}$, $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 至 $5000\mu\text{g}/\text{ml}$,如 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $30\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $40\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $60\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $70\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $80\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $90\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $500\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $1000\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $2500\mu\text{g}/\text{ml}$ 或 $5000\mu\text{g}/\text{ml}$ 。然而,本领域技术人员将认识到,例如根据具体的IR700-分子缀合物,也可使用更高或更低的剂量。在具体实例中,这种每日剂量可以一个或多个分次剂量(divided dose)(如2、3或4份剂量)给药或以单一制剂给药。在存在药学上可接受的载体的情况下,在存在其他治疗剂(如抗肿瘤剂)的情况下,所公开的IR700-分子缀合物可以单独给药。

[0076] 在将IR700-分子缀合物与样品或源接触,或将IR700-分子缀合物给予受试者之后,照射的合适剂量通常为:660-710nm的波长下至少 $1\text{J}/\text{cm}^2$,660-710nm的波长下至少 $2\text{J}/\text{cm}^2$,660-710nm的波长下至少 $4\text{J}/\text{cm}^2$,660-710nm的波长下至少 $8\text{J}/\text{cm}^2$,660-710nm的波长下至少 $10\text{J}/\text{cm}^2$,660-710nm的波长下至少 $16\text{J}/\text{cm}^2$,660-710nm的波长下至少 $50\text{J}/\text{cm}^2$,或660-710nm的波长下至少 $100\text{J}/\text{cm}^2$,例如660-710nm的波长下1至 $500\text{J}/\text{cm}^2$ 。在某些实例中,波长为680-690nm。在具体实例中,在将IR700-分子缀合物与样品或源接触,或将IR700-分子缀合物给予受试者之后,进行多次照射(如至少2次,至少3次或至少4次照射,如2、3、4、5、6、7、8、9或10次单独给药)。

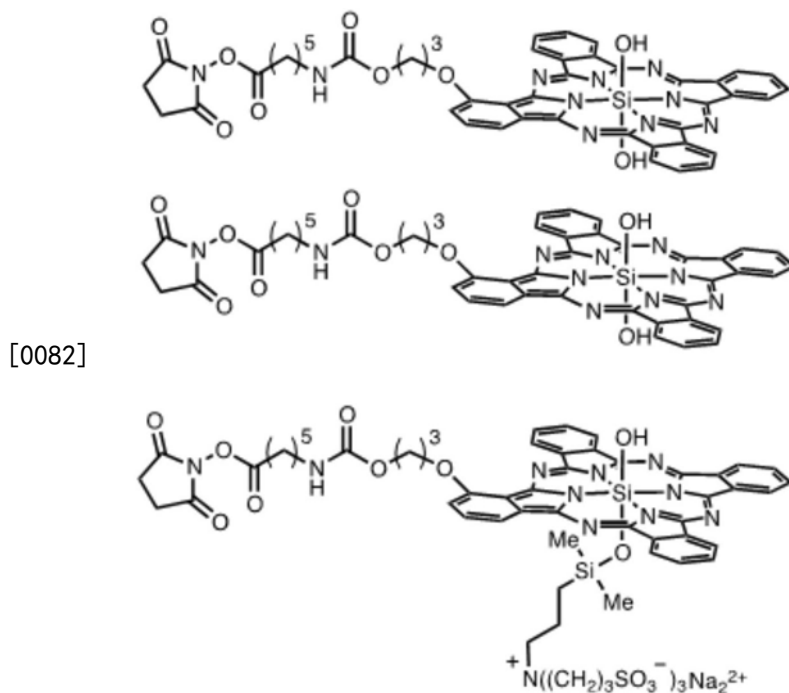
[0077] 功能性核酸(FNA):可以用作酶(用于催化)、受体(用于结合靶标)、或两者的核酸分子(例如DNA或RNA分子)。FNA包括核酶和DNA酶(例如,参见Robertson and Joyce,Nature 1990,344:467;Breaker and Joyce,Chem.Biol.1994,1,223-229),适体(例如,参见Tuerk and Gold,Science 1990,249,505),适体酶(aptazymes)(例如,参见Breaker,Curr.Opin.Biotechnol.2002,13,31)和适体。本文提供了其他实例并且是本领域中已知的。可使用常规方法将FNA缀合至IR700分子,并且用于本文提供的方法中,例如以在体外或体内移除、分离或分开靶标分子。

[0078] IR700 (**IRDye® 700DX**):具有下式的酞菁染料:

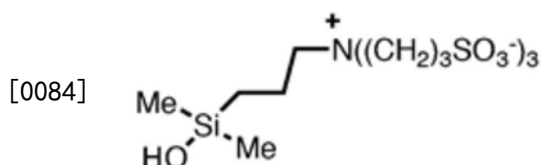


[0080] 该化合物商购自LI-COR (Lincoln, NE)。IR700为相对亲水性染料,并且可以通过使用IR700的NHS酯与抗体(或其他蛋白质)共价缀合,以及可以通过使用其他接头化学(例如补骨脂素官能化的IR700)或点击化学与核酸分子缀合。IR700还具有比常规光敏剂高5倍以上的消光系数(在689nm的最大吸收处为 $2.1 \times 10^5 M^{-1} cm^{-1}$),所述常规光敏剂例如血卟啉衍生物**Photofrin®**(630nm处为 $1.2 \times 10^3 M^{-1} cm^{-1}$);间四羟基苯基二氢卟吩,**Foscan®**(652nm处为 $2.2 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$);和单-L-天冬氨酰二氢卟吩e6,**NPe6/Laserphyrin®**(654nm处为 $4.0 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$)。

[0081] 断裂的或疏水性的IR700分子为在暴露于NIR光之后产生的一种物质(参见图1和2)。例如,示例性断裂的或疏水性的IR700分子包括下述中的一种或多种:



[0083] 其具有与它缀合的分子(如分子或特异性结合剂)。暴露于NIR之后,IR700中移除的部分为



[0085] IR700-分子缀合物：一种分子，其包括IR700染料和另一种分子（例如药物（例如药剂）或特异性结合剂（例如抗体或其片段、**Affibody®**分子、半抗原、蛋白质、凝集素、核酸分子、功能性核酸等））。例如，IR700-抗体缀合物为一种分子，其包括一种与IR700缀合的抗体或抗体片段，例如靶特异性抗体。

[0086] 分离：“分离的”试剂（例如蛋白质或核酸分子）已经基本上从其中存在该组分的其他组分中分开、得到或纯化。例如，所述试剂（如靶标）可与其中存在该组分的样品或源（如生物样品、食物样品/源或环境样品/源）中的其他组分分开。例如，所述试剂（如靶标）可与细胞或生物样品（如血样）的其他组分分开，如其他染色体和染色体外DNA和RNA以及蛋白质。在一些实例中，纯化或分离的细胞、蛋白质或核酸分子可为至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%的纯度。

[0087] 药剂或组合物：当将其以有效量适当地给予受试者时能够诱导所需的治疗或预防效果的化合物或组合物。药物组合物可包括治疗剂，例如一种或多种IR700-分子缀合物（在某些实例中，所述分子为治疗剂，如化学治疗剂）。治疗剂或药剂为可单独地或可与额外的化合物一起诱导所需应答（如在给予受试者时诱导治疗或预防效果）的治疗剂或药剂。在一个具体实例中，药物组合物包括治疗有效量的至少一种IR700-分子复合物。

[0088] 药学上可接受的载体：本公开内容中可用的药学上可接受的载体（媒介物（vehicle））为常规载体。由E.W.Martin著的Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA, 19th Edition (1995)，记载了适用于一种或多种化合物（如一种或多种IR700-分子缀合物）的药物递送的组合物和制剂。

[0089] 一般而言，载体的性质将取决于所采用的具体给药方式。例如，肠胃外制剂通常包括作为载体的可注射流体，其包括药学上和生理上可接受的流体，例如水、生理盐水、平衡盐溶液、葡萄糖水溶液、甘油等。对于固体组合物（例如粉剂、丸剂、片剂或胶囊形式），常规无毒固体载体可包括，例如药物级甘露醇、乳糖、淀粉或硬脂酸镁。除了生物中性载体外，待给予的药物组合物可含有少量无毒辅助物质，例如润湿剂或乳化剂、防腐剂和pH缓冲剂等，例如乙酸钠或脱水山梨醇单月桂酸酯。

[0090] 光免疫疗法（PIT）：一种分子靶向治疗法，其使用基于缀合至特异性结合剂的近红外（NIR）酞菁染料IR700缀合的靶标特异性光敏剂，所述特异性结合剂为例如靶向细胞表面受体的单克隆抗体（MAb）。在一个实例中，细胞表面受体为特异性存在于混合细胞群中的靶细胞（例如肿瘤中的靶细胞）上的细胞表面受体，因此PIT可用于杀死此类细胞。当抗体-IR700分子结合细胞并且用NIR照射细胞时，细胞会发生细胞死亡，而不表达IR700-分子缀合物识别的细胞表面受体的细胞，并不会被大量杀死。

[0091] 移除或分开：例如通过取走某物来分开或移开。

[0092] 样品：能够用于本文方法中的可含有（已知含有或疑似含有）靶标试剂的任何生物、食物、或环境样品（或源）。

[0093] 受试者或患者：包括人和非人哺乳动物的术语。在一个实例中，受试者为人或兽医

受试者(如小鼠),非人灵长类动物,猫,狗等。在一些实例中,受试者为患有癌症或正在接受癌症治疗的哺乳动物(例如人)。在一些实例中,受试者为具有不需要的靶标的哺乳动物,例如病原体的侵染,暴露于毒素、毒液或孢子等。在一些实例中,受试者为将要接受药剂的哺乳动物。

[0094] 靶标(或靶标试剂):在一个实例中,其为需要被移除或分开的物质,包括但不限于,化学化合物、金属(例如重金属)、病原体、毒素、毒液、核酸(例如DNA或RNA)、或蛋白质(例如细胞因子、激素或抗原),以及特定细胞(例如癌细胞、细菌细胞或血液中的特定细胞)或孢子。在一个实例中,其为具有待控制的药代动力学的物质,例如治疗药剂,例如化学治疗剂。

[0095] 肿瘤、肿瘤形成(neoplasia)、恶性肿瘤(malignancy)或癌症:新生物(neoplasm)是由过度细胞分裂引起的组织或细胞的异常生长。新生物生长可产生肿瘤。个体中肿瘤的量是“肿瘤负荷”,其可作为肿瘤的数量、体积、或重量来测量。将不转移的肿瘤称为“良性”。将侵入周围组织和/或可以转移的肿瘤称为“恶性”。“非癌性组织”为来自其中形成有恶性新生物的另一器官的组织,但不具有新生物的特征病理学。一般来说,非癌性组织在组织学上呈现正常。“正常组织”为来自器官的组织,其中该器官不受癌症或所述器官的另一种疾病或病症的影响。“无癌症”受试者未被诊断为患有该器官的癌症,并且不具有可检测的癌症。

[0096] 用所要求保护的方法可以治疗的示例性肿瘤(如癌症),包括实体瘤,如乳腺癌(例如小叶和导管癌),肉瘤,肺癌(例如非小细胞癌、大细胞癌、鳞状癌和腺癌),肺间皮瘤,结肠直肠癌,胃癌,前列腺腺癌,卵巢癌(例如浆液性囊腺癌和粘液性囊腺癌),卵巢生殖细胞肿瘤,睾丸癌和生殖细胞肿瘤,胰腺癌,胆管腺癌,肝细胞癌,膀胱癌(包括例如移行细胞癌、腺癌和鳞状细胞癌),肾细胞腺癌,子宫内膜癌(包括例如腺癌和混合副中肾管肿瘤(癌肉瘤)),宫颈内膜、外宫颈和阴道的癌(例如各自的腺癌和鳞状细胞癌),皮肤肿瘤(例如鳞状细胞癌、基底细胞癌、恶性黑色素瘤、皮肤附属(appendage)肿瘤、卡波西(Kaposi)肉瘤,皮肤淋巴瘤、皮肤附件(adnexal)肿瘤以及各种类型肉瘤和默克尔(Merkel)细胞癌),食道癌,鼻咽和口咽的癌(包括其鳞状癌和腺癌),唾液腺癌,脑和中枢神经系统肿瘤(包括例如神经胶质、神经元和脑膜源的肿瘤),外周神经的肿瘤,软组织肉瘤及骨和软骨的肉瘤,以及淋巴瘤(包括B细胞和T细胞恶性淋巴瘤)。在一个实例中,所述肿瘤为腺癌。

[0097] 所述方法还可用于治疗液体肿瘤,如淋巴、白细胞或其它类型的白血病。在具体实例中,所治疗的肿瘤为血液肿瘤,例如白血病(例如急性淋巴细胞白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)、多毛细胞白血病(HCL),T细胞幼淋巴细胞白血病(T-PLL)、大颗粒淋巴细胞白血病和成人T细胞白血病),淋巴瘤(例如霍奇金(Hodgkin's)淋巴瘤和非霍奇金(non-Hodgkin's)淋巴瘤)和骨髓瘤)。

[0098] 在足以(允许)……的条件下:用于描述允许或容许所需活性的任何环境的短语。在一个实例中,“在足以……的条件下”包括使IR700-分子缀合物与样品(如生物、环境或食物样品)接触,足以允许IR700-分子缀合物结合样品中的一种或多种靶标。在具体实例中,所需的活性为形成聚集体,从而允许在将样品暴露于NIR光之后移除靶标试剂。在一个实例中,“在足以……的条件下”包括向受试者给予IR700分子缀合物,其足以允许IR700-分子缀合物在体内结合靶标。在具体的实例中,所需的活性为在用NIR光照射受试者之后,移除与

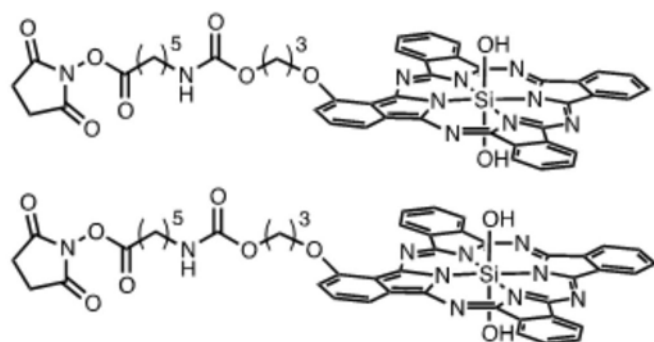
IR700-分子缀合物结合的不需要的靶标。在一个实例中,“在足以……的条件下”包括向受试者给予IR700分子缀合物,其足以允许IR700分子在体内具有治疗效果。在具体实例中,所需的活性为通过用NIR光照射受试者,在治疗后移除IR700-分子缀合物。

[0099] 未处理:未与所需试剂(例如IR700-分子缀合物)接触的细胞、样品、或受试者。在一个实例中,未处理的细胞、样品或受试者为这样一种细胞、样品或受试者,即其接受其中递送IR700-分子缀合物的媒介物或载体。

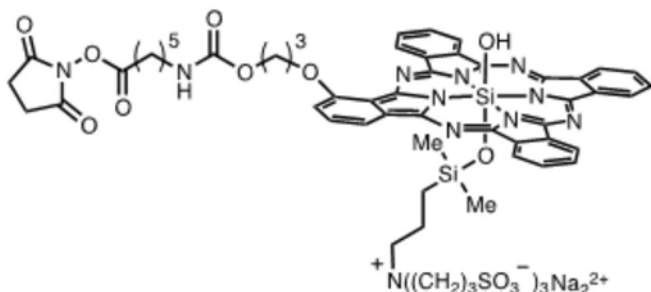
[0100] 某些具体实例的公开并不意指排出其他实施方案。此外,本文所述的任何方法或治疗并不必然排除其他方法,而是可以与其它生物活性剂或治疗方法组合。

[0101] 技术概述

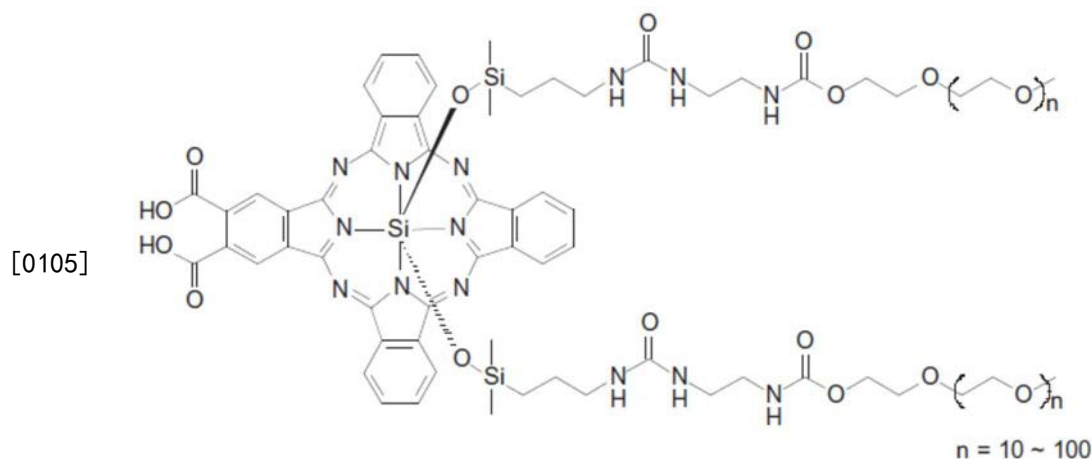
[0102] 染料IR700为一种光敏剂,在近红外(NIR)范围内激发。本发明人已经确定,将IR700染料暴露于合适波长的NIR光下,将会使IR700分子的一部分断裂(图1)。这种断裂产生了一种或多种所获得的“超疏水性”IR700化合物:



[0103]



[0104] 这种疏水性使得上述疏水性的IR700化合物及任何缔合的分子聚集。例如,如图2所示,缀合至IR700(IR700-抗体缀合物)的抗体保持与所得到的疏水性的IR700化合物结合。此外,与疏水性的IR700-抗体缀合物特异性结合的任何蛋白质也将保持结合。如图3所示,如果IR700-抗体缀合物与细胞表面上的蛋白质结合,则在暴露于NIR后,连接到抗体的IR700发生化学改变,从而诱导疏水性,这破坏了细胞膜的完整性导致膜损伤和细胞死亡。具有类似的基于硅-氧键的结构硅-酞菁的亲水性衍生物将具有与IR700相似的结果,因此可用于代替本文中的IR700。这种化合物的一个实例为La Jolla Blue(参见Peng and Braney, Fluorescence Labeling, 2004)。



La Jolla Blue

[0106] 基于这一观察,本公开内容提供了用于从溶液中移除(例如分开或分离)所得到的疏水性的IR700复合物(例如通过沉淀或离心),或从受试者的循环中移除(例如分开或分离)疏水性的IR700复合物的方法,例如通过将疏水性的IR700复合物转运到肝脏,随后通过肝脏降解所述复合物。

[0107] 从样品中移除靶标的方法

[0108] 本文提供从样品(例如食物样品(或源)、环境样品(或源)、发酵或反应器样品(或源)或从受试者获得的样品)中移除(例如分离或分开)一种或多种靶标分子或试剂的方法。例如,该方法可以用于从样品中移除或分离至少两种不同的靶标,例如至少3种、至少4种或至少5种不同的靶标,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10种不同的靶标。例如,可在同一样品上使用(例如,同时或同时期地)至少2种、至少3种、至少4种或至少5种(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10种)不同的IR700分子缀合物,其中每一种特异性针对不同的靶标。这允许从样品中移除多种靶标。可以从样品中移除或分开的示例性靶标包括,但不限于,蛋白质、肽、凝集素、碳水化合物、金属(例如重金属)、核酸分子、小的有机分子、药物、毒液、病原体(例如病毒、寄生虫、细菌或真菌)、或细胞(例如混合细胞群中的靶细胞)。在一些实例中,所述方法还包括检测所移除的靶标。

[0109] 在一个实例中,这些方法用于从样品中移除不需要的试剂(例如杂质、金属、病原性生物体、孢子、毒素、药物、细胞等)。例如,杂质可以从作为制造方法(例如药物制造方法)的一部分所产生的样品或源中移除或分开。在另一个实例中,将病原体、毒素、孢子、金属或其它不需要的试剂从环境样品或源中移除。在一个实例中,将病原体、毒素、孢子、抗生素或其它不需要的试剂从食物样品或源中移除。在一个实例中,将不需要的靶细胞从包括多种不同细胞类型的组织或器官培养物中移除(并且在某些实例中被杀死)。

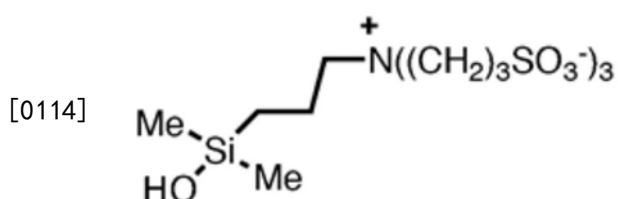
[0110] 在一个实例中,这些方法用于从样品中移除所需的试剂(例如靶细胞、病原体、金属、孢子、蛋白质、核酸分子等)。例如,这些方法可以用于从患者(例如血液样品)中移除、分开或分离所需的细胞。例如,可以使用合适的CD特异性抗体,将PBMC或干细胞(例如人干细胞)从血液样品中移除(其中可以根据需要P对BMC或干细胞进行离体操作,并重新引入受试者中,例如接受移植的人)。在一个实例中,这些方法用于从样品中移除靶标(例如,类似于免疫沉淀),其在某些实例中还可用于鉴定与靶标结合的其它试剂(例如,类似于共免疫沉淀)。因此,例如,所述方法可用于从样品(例如实验室中的样品)中移除靶标蛋白、凝集

素、碳水化合物、病原体、核酸分子、细胞或抗体。在一些实例中,鉴定了与靶标蛋白、凝集素、碳水化合物、病原体、核酸分子、细胞或抗体结合的其它试剂。在一些实例中,这些方法可用于浓缩或富集样品中存在的靶细胞或试剂,例如靶细胞、病原体、金属、孢子、蛋白质、毒液、核酸分子等(如将靶标富集或浓缩至少2倍、至少5倍、至少10倍、至少50倍、至少100倍或至少500倍)。在一些实例中,在例如组织再生应用期间,使用所公开的方法可以移除从细胞培养物中的不需要的污染物或突变细胞。

[0111] 为使所述方法有效,不要求从样品中完全移除、分离或分开靶标。例如,所述方法可包括:例如与将IR700-分子缀合物添加到样品中且用NIR光照射样品之前的靶标的量相比,将样品(或源)中靶标试剂的量减少至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.9%(并且在某些实例中为100%)。在一些实例中,例如与将IR700-分子缀合物添加到样品中且用NIR光照射样品之前的靶标纯度或浓度相比,所述方法分离或富集或浓缩靶标,以致于靶标为至少20%纯度,如至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%纯度。

[0112] 在具体实例中,所述方法包括使样品与IR700-分子缀合物接触。IR700-分子缀合物中的分子可为对于靶标具有特异性的特异性结合剂,因此与其他分子相比,其优先结合到靶标上。特异性结合剂的非限制性实例包括抗体及其片段、**Affibody®**分子、半抗原、功能性核酸分子(例如适体和DNA酶)、核酸分子(例如,具有与靶标核酸分子互补的序列以使得核酸分子彼此杂交的那些)、凝集素(碳水化合物结合蛋白)、蛋白质等。如果靶标存在于样品中,这将导致形成IR700-分子缀合物-靶标复合物。在具体实例中,在暴露于NIR光之前,IR700-分子缀合物和IR700-分子缀合物-靶标复合物为亲水性的。

[0113] 在足以断裂除去(移除)IR700-分子缀合物-靶标复合物中的IR700部分的一部分(参见图2的圈出部分)的条件下,用NIR——波长为如660nm至710nm(如680或690nm),例如剂量为至少 1J cm^{-2} ——照射样品,从而产生疏水性的IR700-分子缀合物-靶标复合物。在一些实例中,下述为在暴露于NIR光之后,从IR700-分子缀合物-靶标复合物中移除的部分:



[0115] 因此,在暴露于NIR光之后,IR700-分子缀合物由亲水性分子变为疏水性分子。因此,在暴露于NIR光之后,IR700-分子缀合物发生聚集,以便将靶标从样品中分开或移除(其在聚集体或沉淀物中)。硅酞菁的溶解度和聚集性质受轴向取代基性质的高度影响(Dyes and Pigments, 2013, 99:59-66)。没有轴向取代基的硅酞菁,例如母体化合物硅酞菁二氢氧化物(dihydroxide) (CAS#19333-15-4)在多种溶剂(包括水)中不具有可测量的溶解度(Yang et al., J. Phys. Chem. A., 2011, 115:12474)。如图5所示,在暴露于NIR光之前,IR700可以溶解于不同的水性溶剂和有机溶剂(亲水性)中。

[0116] 可将所得的疏水性的IR700-分子缀合物-靶标复合物从样品中移除(例如,分离或分开)。例如,可在允许疏水性的IR700-分子缀合物-靶标分子复合物聚集或形成沉淀物(例

如,在溶液中形成固体)的条件下,孵育样品或使样品反应。这种条件可包括混合含有疏水性的IR700-分子缀合物-靶标的溶液(例如通过涡旋、用搅拌棒混合、摇动等)。在一些实例中,简单地将含有疏水性的IR700-分子缀合物-靶标的溶液置于室温下,直至疏水性的IR700-分子缀合物-靶标形成聚集体或沉淀物(例如至少30秒,至少1分钟,至少2分钟,至少5分钟,至少10分钟,至少15分钟或至少30分钟,例如1至5分钟、1至2分钟、1至10分钟或10至20分钟)。在某些实例中,体外或离体方法是在至少4℃,至少20℃,至少30℃,至少35℃,至少37℃或至少40℃,例如约4℃至37℃、或25℃至37℃的温度下进行。

[0117] 将疏水性的IR700-分子缀合物-靶标从样品中分开或移除,从而从样品中分离靶标分子。用于从溶液中分开沉淀物或聚集体的方法是已知的,并且可包括但不限于离心法(例如旋转)、过滤法、色谱法、允许沉淀物沉降或它们的组合。例如,在允许疏水性的IR700-分子缀合物-靶标沉淀(pellet)到器皿或容器底部的条件下,可将样品离心,并且收集或移除所得的上清液(其基本上不含有靶标)。因此,所得的上清液可以不含有(或基本上不含有)不需要的靶标。在一些实例中,分析所得的沉淀物,例如以确定靶标是否存在于样品中,或鉴定与该靶标结合的其他试剂。作为离心法的替代方法(或除离心法以外),在一些实例中,在允许疏水性的IR700-分子缀合物-靶标进行结合或通过过滤器捕获的条件下,可以过滤样品,并收集所得的上清液(其不含有或基本上不含有靶标)。在一些实例中,分析过滤器,例如以确定靶标是否存在于样品中,或鉴定与该靶标结合的其他试剂。在一些实例中,在允许疏水性的IR700-分子缀合物-靶标沉淀或聚集于容器底部的条件下,简单地将样品静置或搁置,并且收集所得的上清液(其基本上不含有靶标)。在一些实例中,分析沉淀物,例如以确定靶标是否存在于样品中,或鉴定与该靶标结合的其他试剂。

[0118] 在一些实例中,所述方法包括用该方法处理样品多次,例如一次或多次(至少2次、至少3次、至少4次、至少5次、至少10次或至少20次)地重复下述步骤:与IR700-分子缀合物接触、用NIR光照射、聚集疏水性的IR700-分子缀合物以及将疏水性的IR700-分子缀合物从样品中分开。

[0119] 在一些实例中,所述方法还包括测量或检测从样品移除的靶标。这种测量方法可为定量或定性的。

[0120] 在一些实例中,所述方法还包括检测或测量与靶标结合的其他分子。例如,可以分析含有与疏水性的IR700结合的靶标的沉淀物或过滤器、或其他材料/容器。在一些实例中,可洗涤或以其它方式处理过滤器或其它材料以释放结合或附着于过滤器或其它材料上的任何疏水性的IR700-分子缀合物-靶标。在一些实例中,使用免疫学方法分析沉淀物、过滤器或从过滤器释放的材料以鉴定与靶标结合的其他蛋白质,例如免疫组织化学、蛋白质印迹、光谱法(例如质谱法、IR、拉曼或FT-IR),色谱法(例如液相色谱法)等。在一些实例中,使用杂交或测序方法分析沉淀物、过滤器或从过滤器释放的材料,以鉴定与靶标结合的核酸分子,例如原位杂交、RNA印迹、DNA印迹,PCR等。

[0121] 示例性样品

[0122] 可含有(或已知含有或疑似含有)靶标试剂的任何生物、食物或环境样品可以用于本文的方法中。样品还可包括发酵液、反应液(例如用于产生所需化合物的那些,例如药剂)和组织或器官培养液。

[0123] 生物样品通常从受试者中获得,并且可包括基因组DNA、RNA(包括mRNA)、蛋白质、

细胞或其组合。实例包括组织或肿瘤活检样品、细针抽吸物、支气管肺泡灌洗液、胸膜液、脊髓液、唾液、痰、外科手术试样、淋巴结液、腹水、外周血液(如血清或血浆)、骨髓、尿、唾液、口腔拭物(buccal swab)和尸检材料。用于采集这些样品的技术是本领域中公知的(例如参见 Schluger et al. J. Exp. Med. 176:1327-33, 1992, for the collection of serum samples)。血清或其他血液级分可以常规方式制备。因此,使用本文提供的方法,可检测和/或可移除体内的靶标分子(例如可从血液或骨髓中移除),例如细胞(例如, PBMC、HSC、淋巴细胞)、蛋白质、核酸、碳水化合物、凝集素、病原体、毒素、金属、药物或其它靶标。在一些实例中,所述方法用于从样品中移除正常细胞(例如淋巴细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突细胞和干细胞),所述细胞可通过扩增或抑制正常免疫应答而引起病症。通过移除这些细胞,可以局部恢复正常的免疫应答。或者,可以移除细胞以允许用其它、外源给予的细胞来替代它们,如基于细胞的治疗中所发生的。如果需要,可以将靶细胞耗尽(target cell-depleted)的样品返回到相同或不同的受试者中。在一些实例中,所述样品为包含至少两种不同细胞类型(例如至少3种、至少4种、至少5种或至少10种不同细胞类型)的组织培养物或器官培养物,其中一种细胞类型是待移除的靶细胞。

[0124] 环境样品包括从环境介质(例如水、空气、土壤、灰尘、木材、植物或食物)中获得的那些样品(例如这种样品的拭物)。在一个实例中,样品为从表面(例如存在于建筑物或住宅的表面)获得的拭物。因此,使用本文提供的方法,可以检测并且可以移除(例如从环境源中移除)存在于环境中的有害产物,例如病原体、毒素、金属或其他有害产物。在一些实例中,所公开的方法检测和/或移除一种或多种药物污染物(例如,在水生环境中的那些),如抗生素、高血压药物、抗抑郁药、镇痛药、生殖激素或其它处方药物。

[0125] 在一个实例中,所述样品为食物样品,例如肉、乳制品、水果或蔬菜样品。例如,使用本文提供的方法,可检测并且可移除(例如从食物产品中移除)食物产品中的掺杂物(adulterant),例如病原体或毒素或其他有害产物。例如,可用本文提供的方法处理饮料(例如乳、奶油、苏打水、瓶装水、调味水、果汁等)、和其他液体或半液体产品(例如酸奶)。在一些实例中,使用所公开的方法处理用于净化食物(例如肉、蔬菜或水果)的液体以从所用的液体中移除杂质或有害试剂。

[0126] 在一个实例中,样品为来自化学反应的样品,例如用于产生所需化合物例如药剂的样品。例如,使用本文提供的方法,可检测和可移除在化学反应期间所产生的不需要的试剂或污染物。在一些实例中,这些方法用于进一步纯化最终产物。例如,可以使用IR-700-特异性结合分子缀合物(如包含金属配位基团(例如EDTA、DTPA、DOTA)的IR700-分子缀合物)可以从这些反应中移除重金属副产物。

[0127] 在其他实例中,样品包括对照样品,例如已知含有或不含有具体量的靶标的样品。

[0128] 一旦获得样品,就可以对直接使用样品、浓缩(例如通过离心或过滤)、纯化、液化、在流体中稀释或其组合。在一些实例中,从样品提取蛋白质、细胞、核酸或病原体,并且使用本文提供的方法分析所得的制品(例如包括分离的细胞、病原体、DNA、RNA和/或蛋白质的制品)。

[0129] 照射样品或源

[0130] 在将样品与一种或多种IR700-分子缀合物接触之后,用NIR光照射。照射方法为本领域中已知的。在一些实例中,在体外照射样品,例如在组织培养皿、试管、多孔板、发酵反

应器、微量离心管 (eppendorf tube)、培养皿、医用管和袋等中。在一些实例中,照射食物样品或产品(例如一批乳、一片水果或蔬菜、或肉)。在一些实例中,照射环境样品或区域(例如陆地、水、土壤或空气的区域)。在一些实例中,照射发酵或其它反应溶液(例如产生所需产物的溶液)。

[0131] 在其他实例中,离体照射样品,例如照射从受试者获得的样品(例如血液样品或其组分)。在一些这样的实例中,预先向受试者给予IR700-分子缀合物,或者在从受试者中移出样品后,使IR700-分子缀合物与样品接触或孵育。

[0132] 在660nm至710nm,如660nm至700nm、670nm至710nm、680nm至700nm、670nm至690nm,例如680nm或690nm的波长下,用一定的放射剂量照射样品。在具体实例中,使用LED或激光器用NIR照射样品,如690nm $\pm$ 20nm的LED或690nm $\pm$ 4nm的激光系统。在具体实例中,照射样品的剂量为至少1J cm⁻²,如至少2J cm⁻²,至少4J cm⁻²,至少8J cm⁻²,至少10J cm⁻²,至少15J cm⁻²,至少30J cm⁻²,至少50J cm⁻²,至少100J cm⁻²或至少500J cm⁻²,例如,1至1000J cm⁻²、1至500J cm⁻²、1至20J cm⁻²、1至10J cm⁻²、30至50J cm⁻²、10至100J cm⁻²、4至8J cm⁻²、5至10J cm⁻²或10to 50J cm⁻²。

[0133] 可以一次或多次照射样品。因此,照射可以在单独一天内完成,或者可以以相同或不同的剂量在若干天内重复进行(例如,至少2个不同时期、3个不同时期、4个不同时期、5个不同时期或10个不同时期进行照射)。重复的照射可以在同一天内进行,连续几天内进行或者以每1-3天、每3-7天、每1-2周、每2-4周、每1-2月或甚至更长的间隔进行。

[0134] 用于从受试者移除靶标的方法

[0135] 可以在体内进行与上述体外方法类似的方法。本文提供了从受试者(例如哺乳动物,例如人、小鼠、灵长类动物、猫、狗或其他兽医受试者)中移除(例如分离或分开)一种或多种靶标分子或试剂的方法。例如,所述方法可用于移除或分离至少两种不同的靶标,如至少3种、至少4种或至少5种不同的靶标,如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10种不同的靶标。例如,在同一受试者中可以使用(例如,同时或同时期地)至少2种、至少3种、至少4种或至少5种(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10种)不同的IR700分子缀合物,其中每一种特异性针对不同的靶标。这允许从受试者中移除多种靶标。可以从受试者中移除、分离或分开的示例性靶标包括,但不限于蛋白质、肽、凝集素、碳水化合物、金属(例如重金属)、核酸分子、小的有机分子、药物(例如娱乐性药物或治疗性药物/药理学药物)、毒液、病原体(例如病毒、细菌或真菌)、或细胞(例如混合细胞群中的细胞,例如肿瘤中的靶细胞)。在一些实例中,所述方法还包括在已将待移除的靶标从受试者中移除之后检测移除的靶标,在治疗后检测受试者中靶标的减少,或者这两者。

[0136] 在一个实例中,这些方法用于从受试者中移除不需要的试剂(例如金属、病原性生物体、孢子、毒素、毒液、细胞、娱乐性药物、治疗性药物、蛋白质、核酸分子等)。例如,通过使用IR700-分子缀合物可以将不需要的试剂从受试者中移除,其中缀合物的分子为待移除的靶标的特异性结合剂。在一些实例中,从受试者中移除的不需要的试剂为对患者有毒的金属,例如重金属,其中IR700-分子缀合物中的分子为待移除的金属的特异性结合剂(例如,结合铅或汞)。在一些实例中,从受试者中移除的不需要的试剂为病原体,例如病毒、真菌、寄生虫、细菌细胞等,其中IR700-分子缀合物的分子为待移除的病原体的特异性结合剂(例如,结合特定的病原性蛋白质或核酸)。在一些实例中,从受试者中移除的不需要的试剂为

毒液,例如来自被有毒动物(例如蜘蛛、蝎子、蚂蚁、蛇、鱼、蜜蜂或黄蜂)咬伤或刺伤的受试者,其中所述IR700-分子缀合物中的分子为待移除的毒液的特异性结合剂(例如,结合蛇毒液)。在一些实例中,从受试者中移除的不需要的试剂为娱乐性药物,例如来自已经过量用药的受试者,其中IR700-分子缀合物中的分子为待移除的药物的特异性结合剂(例如,结合可卡因或海洛因)。

[0137] 在一些实例中,不需要的试剂为多种毒素,例如在肾透析期间不能移除的较小毒素。因此,该方法可以代替肾透析或与肾透析一起使用,用于从血液中移除毒素或其它不需要的试剂(因此可用于肾衰竭的受试者)。

[0138] 在一些实例中,从受试者中移除的不需要的试剂为蛋白质或核酸分子(如其存在或增加会导致或加重疾病(例如自身免疫性疾病或癌症)的蛋白质或核酸),其中IR700-分子缀合物中的分子为待移除的蛋白质或核酸分子的特异性结合剂(例如,分别与蛋白质或核酸分子结合或杂交)。

[0139] 在一些实例中,不想要的试剂为细胞,例如细菌细胞、或其存在或增加会导致或加重疾病(例如过敏症、自身免疫性疾病或癌症)的其它细胞。这些细胞的实例包括但不限于淋巴细胞、树突细胞、巨噬细胞等,如肿瘤中的那些免疫细胞。在一个实例中,从具有自身免疫性疾病或过敏症的受试者中移除活化的T细胞或其它不需要的免疫细胞。在另一个实例中,从患有癌症的受试者中移除抑制型细胞。在一个实例中,从患有癌症的受试者中移除癌症干细胞(或耗尽,例如杀死)。

[0140] 在一些实例中,将靶免疫细胞从体内肿瘤组织中移除(例如杀死)。这些细胞的实例包括但不限于阴性调节性T细胞(例如 $CD4^+CD25^+FoxP3^+$)。在一个实例中,通过其对以下物质的表达来靶向这些细胞:foxp3、CD25(例如,使用抗CD25的抗体daclitumab或巴利昔单抗(basiliximab))、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA4)(例如,使用抗CTLA4的抗体伊匹木单抗(ipilimumab)或曲美木单抗(tremelimumab))、CD52(例如,使用抗CD52的抗体阿仑珠单抗(alemtuzumab))、CD132或其组合作为靶点。因此,与缺少用一种或多种抗体-IR700分子和NIR进行的治疗的情况相比,所公开的方法在一些实例中,杀死至少10%,例如至少20%,至少40%,至少50%,至少80%,至少90%,至少95%或至少98%的经治疗的 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs(例如以治疗前受试者中 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs总数的%计或以肿瘤区域(如包括肿瘤和治疗前肿瘤周围至少1mm(如至少2mm,至少3mm,至少4mm,或至少5mm)的区域)中 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs总数的%计)。在一个实例中,所用的两种不同的抗体-IR700分子特异性针对两种不同的蛋白质或抗原,如一种特异性针对CTLA4的抗体和另一种特异性针对CD25的抗体。例如,与不存在治疗的情况相比,将抗体-IR700分子与NIR光组合使用可以将肿瘤的体积、肿瘤的大小、肿瘤的重量、转移瘤(metastases)的数目、转移瘤的体积、转移瘤的大小、转移瘤的重量或其组合减少至少20%,至少25%,至少30%,至少40%,至少50%,至少75%,至少90%或至少95%。

[0141] 所述方法还可用于从受试者中移除正常细胞,例如淋巴细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突细胞和干细胞,其可通过扩增或抑制正常免疫应答而引起病症。通过移除这些细胞,可以局部恢复正常的免疫应答。或者,可以移除细胞,从而允许用其它、外源给予的细胞来替代它们,如基于细胞的治疗中所发生的。

[0142] 在一些实例中,可以从受试者的器官中移除不想要的试剂,例如通过用一种或多

种所需的IR700-分子缀合物灌注器官。

[0143] 在一些实例中,从受试者中移除的不想要的试剂为药物,例如化学治疗剂,生物制剂(例如mAb、抗体药物缀合物,例如与毒素缀合的那些等),抗生素(例如,青霉素(penicillin)、氨苄青霉素(ampicillin)、甲硝唑(metronidazole)、四环素(tetracycline)、环丙沙星(cipro)等),抗高血压药(例如噻嗪类利尿剂(thiazide diuretics)、ACE抑制剂、钙通道阻滞剂、 β 阻滞剂和血管紧张素II受体拮抗剂),抗抑郁剂(例如,选择性5-羟色胺再摄取抑制剂(SSRI)、5-羟色胺-去甲肾上腺素再摄取抑制剂(SNRI)、三环抗抑郁药(TCA)、单胺氧化酶抑制剂(MAOI)、丁丙诺啡(buprenorphine)、色氨酸、抗精神病药、贯叶金丝桃(St John's wort)例如氟西汀(prozac)),镇痛药(例如对乙酰氨基酚(acetaminophen)、非甾体抗炎药(NSAID)、COX-2抑制剂和阿片类药物如吗啡、可待因、和羟考酮(oxycodone)),生殖激素(例如雌激素、睾酮和孕酮),血液稀释剂(例如华法林(warfarin)),类固醇(例如泼尼松(prednisone)),降低胆固醇的他汀(statin)(例如,洛伐他汀(Mevacor)、辛伐他汀(Zocor)、普伐他汀(Pravachol))和其他处方药物,其中IR700-分子缀合物中的分子为待移除的靶标(例如,为化学治疗剂)。例如,这些方法可用于控制药物的药代动力学(例如半衰期),例如使其失活并在所需的时间段后将其从受试者中移除。通过使这些药物与IR700缀合,然后用NIR光照射,与IR700染料缀合的药物将聚集并且被靶向以从身体中被移除,例如经由肝脏和/或脾脏。因此,如果药物的半衰期比所需要的更长(在一些实例中,其在体内造成了药物的不需要的累积或可能导致不需要的副作用),则可以通过在给予IR700-药物缀合物后的所需时间段之后,将患者暴露于NIR光从而使药物失活,以缩短药物的半衰期。

[0144] 在一个实例中,这些方法用于从受试者中移除所需的试剂(例如靶细胞、蛋白质、核酸分子等)。例如,这些方法可用于从患者(例如从血液样品或骨髓)中移除、分开或分离所需的细胞。在一些实例中,这种方法为单采术过程的一部分。例如,在单采术过程期间或之后,可以从血液样品中移除细胞,例如PBMC或干细胞(例如人干细胞)。在一个实例中,从受试者中移出血液,并且例如使用合适的CD特异性抗体,将所需的细胞从血液样品中移除或分离。例如,如果需要HSC,则可将血液样品与IR700-CD34抗体缀合物接触,其会结合HSC。如果需要PBMC,则可将血液样品与IR700-CD19抗体缀合物接触,其会结合PBMC。如果需要,可对从患者体内移出的细胞进行离体操作(例如扩增、通过基因治疗方法操作等),并且再导入相同或不同的受试者中,例如接受移植物的受试者。在其他实例中,可移除细胞或器官培养物中的污染细胞。在一些实例中,可移除激发疾病(例如自身免疫性疾病或过敏症)的细胞或抑制宿主应答(例如,如癌症中的免疫耐受性)的细胞。在一些实例中,这些方法可用于从受试者(例如人或实验室动物),例如从血液样品或骨髓中移除、分开或分离所需蛋白质(例如抗体)或核酸分子。

[0145] 在一些实例中,在从受试者中移除生物样品之后,将IR700-分子缀合物和/或NIR光与所述生物样品接触,并且使已移除靶标(例如,需要的靶标或不需要的靶标)的样品(或其一部分)返回到同一受试者或不同受试者中。在一些实例中,可向受试者给予IR700分子缀合物并暴露于NIR光,然后通过从受试者获得的样品中移除所得的含有靶标的聚集体来从受试者中移除它们(例如在其中从受试者中取血的单采术过程期间,移除血液中的聚集体),并且将所述无靶标(或基本上无靶标)的血液返回到所述受试者(或不同受试者)中。

[0146] 在一个实例中,这些方法用于从受试者中移除靶标,其在一些实例中也用于鉴定结合靶标的其它试剂。因此,例如,这些方法可用于从受试者中移除靶标病原体、毒素、药物、蛋白质、凝集素、碳水化合物、核酸,抗体、细胞等。在一些实例中,与靶标病原体、毒素、药物、蛋白质、凝集素、碳水化合物、核酸、抗体、细胞等结合的其它试剂在从受试者移除之后被鉴定。

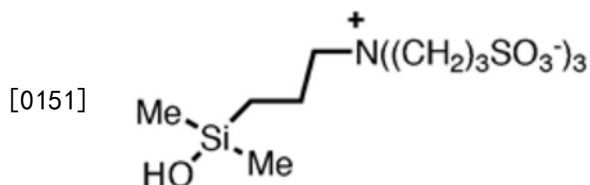
[0147] 为使所述方法有效,不需要从受试者中完全移除、分离或分开靶标。例如,所述方法可包括将受试者中的靶标的量降低至少20%,至少25%,至少30%,至少40%,至少50%,至少75%,至少80%,至少90%,至少95%,至少96%,至少97%,至少98%或至少99%,例如与在向受试者给予IR700-分子缀合物并用NIR光照射该受试者之前所存在的靶标的量相比。在一些实例中,所述方法分离靶标,使得所述靶标为至少20%纯度,例如至少25%,至少30%,至少40%,至少50%,至少75%,至少80%,至少90%,至少95%,至少96%,至少97%,至少98%或至少99%纯度,例如与不向受试者添加IR700-分子缀合物并用NIR光照射该受试者时靶标的纯度或浓度相比。

[0148] 在具体实例中,所述方法包括向受试者给予一种或多种IR700-分子缀合物,其中缀合到IR700的分子包括靶标分子或其中缀合到IR700的分子特异性结合靶标分子(例如,对靶标具有特异性,因此相对于其他分子,其优先结合靶标)。特异性结合剂的非限制性实例包括抗体及其片段、**Affibody®**分子、半抗原、功能性核酸分子(例如适体和DNA酶)、核酸分子(例如,与靶标核酸分子具有序列互补性使得核酸分子彼此杂交的那些)、凝集素(碳水化合物结合蛋白)、蛋白质等。在存在药学上可接受的载体(例如药学和生理学上可接受的流体)的情况下,例如在允许IR700-分子缀合物特异性结合靶标(例如,在其中分子为特异性结合剂的情况下),或具有治疗效果(例如,在其中分子为靶标例如药物的情况下)的条件下,可向受试者给予IR700-分子缀合物。例如,IR700-分子缀合物可存在于作为媒介物的药学上有效的载体中,例如水、生理盐水、平衡盐溶液(例如PBS/EDTA)、葡萄糖水溶液、芝麻油、甘油、乙醇、它们的组合等。载体和组合物可以是无菌的,并且所述制剂适合所述给药方式。

[0149] 在其中IR700-分子缀合物中的分子为特异性结合剂的情况下,如果所述靶标存在于受试者中,则这将导致IR700-分子缀合物-靶标复合物的形成。

[0150] 在具体实例中,在暴露于NIR光之前,IR700-分子缀合物和IR700-分子缀合物-靶标复合物为亲水性的。在允许IR700-分子缀合物中的分子结合其靶标或允许IR700-分子缀合物中的分子具有治疗效果的条件下,接触或给予一种或多种IR700-分子缀合物,然后在允许断裂IR700的条件下,例如在NIR光下(如在660nm至710nm(例如,680nm至690nm)的波长下,例如以至少 10Jcm^{-2} 的剂量),对受试者进行光照。这些条件断裂除去(移除)IR700-分子缀合物或IR700-分子缀合物-靶标复合物的IR700部分中的一部分(例如,参见图2的圈出部分),从而产生疏水性的IR700-分子缀合物或疏水性的IR700-分子缀合物-靶标复合物。在一个实例中,细胞与IR700-分子缀合物接触与照射之间的间隔为至少10分钟,至少30分钟,至少1小时,至少4小时,至少8小时,至少12小时,至少24小时,至少48小时,至少72小时,至少96小时,至少1周,至少2周,至少3周,或至少4周(例如1至4小时、30分钟至1小时、10分钟至60分钟、或30分钟至8小时)。NIR激发光波长允许透入组织至少几厘米。例如,通过使用具有漫射器尖端(diffuser tip)的光纤耦合激光二极管,NIR光可以被递送到位于身体表面

深处的几厘米区域内。此外,也可以靶向循环的靶标,由于在它们穿过浅表血管时,它们可以被激发(例如使用本文公开的NIR LED可穿戴设备)。在一些实例中,通过使用由受试者穿戴(或覆盖受试者)的设备来照射受试者,其中所述设备包括NIR发光二极管(LED)。在一些实例中,在IR700-分子缀合物或IR700-分子缀合物-靶标复合物暴露于NIR光之后,从其中移除以下物质:



[0152] 因此,在暴露于NIR光后,IR700-分子缀合物或IR700-分子缀合物-靶标复合物从亲水性分子变为疏水性分子。其结果是,在暴露于NIR光后,疏水性的IR700-分子缀合物或疏水性的IR700-分子缀合物-靶标复合物聚集,从而允许从受试者中分开或移除靶标。例如,这些聚集体可以到达肝脏和/或脾脏,在那里它们被降解和被靶向以从身体移除(例如排泄)。

[0153] 可将所得的疏水性的IR700-分子缀合物或疏水性的IR700-分子缀合物-靶标复合物从受试者中移除(例如,排泄)。所述方法也可包括检测受试者中靶标分子的量的减少(例如,测量从受试者中获得的血液样品的靶标的绝对量或相对量)或检测从受试者中排泄的靶标分子(或其降解产物)的量的增加(例如在肝脏中分解代谢后,排泄的靶标可在尿液或排粪中检测到)。这些靶标的测量可为定量或定性的。

[0154] 在一些实例中,所述方法还包括在将靶标从身体移除之后,检测或测量与所述靶标结合的其它分子。例如,可以分析所排泄的疏水性的IR700-分子缀合物或疏水性的IR700-分子缀合物-靶标复合物,例如使用免疫学方法以鉴定结合至靶标的其他蛋白质,例如免疫组织化学、蛋白质印迹、光谱法(例如质谱、IR、拉曼或FT-IR),色谱法(例如液相色谱)等。在一些实例中,使用杂交或测序方法分析沉淀物、过滤器或从过滤器释放的材料,以鉴定与靶标结合的核酸分子,例如原位杂交、RNA印迹、DNA印迹、PCR等。

[0155] 在一些实例中,所述方法包括用所述方法多次治疗受试者,例如一次或多次(至少2次、至少3次、至少4次、至少5次、至少10次或至少20次)地重复下述步骤:给予IR700-分子缀合物、用NIR光照射、疏水性的IR700-分子缀合物的聚集、以及从受试者中移除疏水性的IR700-分子缀合物。

[0156] 所公开的方法可用于移除固定在体内的靶标试剂以及循环系统中的靶标(例如白血病细胞、转移瘤、循环肿瘤细胞)。然而,循环的靶标因其性质而不能暴露于光很长时间。因此,如果靶标为在全身循环的靶标,则所述方法可以通过使用可穿戴或覆盖身体部分的设备来实现。例如,这种设备可以穿戴较长时间。可使用包括发射NIR的发光二极管(LED)和/或激光系统(例如,氩NIR激光器)及电池组的日常可穿戴物品(例如,手表,珠宝(例如项链或手镯),毯子,衣服(例如内衣,袜子和鞋内插入物)和其他日常可穿戴物品)。这些设备长时间地在设备下的皮肤上产生光线,从而使得浅表血管长时间连续地暴露于光线中。当循环的靶标穿过设备下的区域时,其暴露于光线中。作为实例,该设备的手表或手镯版本可包括多个NIR LED和/或激光器(例如,氩NIR激光器),其中电池电源组在一天的大部分时间内穿戴。

[0157] 例如,在给予一种或多种IR700-分子缀合物(例如静脉内)之后,如果合适,循环的靶标(例如细胞)结合IR700-分子缀合物。当这些细胞或其它靶标在与日常可穿戴物品(例如手镯或手表)中存在的LED和/或激光器(例如,氩NIR激光器)邻近的血管内流动时,它们将暴露于NIR光线中,使得与其结合的IR700和分子易于断裂和聚集。光线的剂量可根据诊断和靶标类型进行调整。

[0158] 在一些实例中,所述方法还包括给予一种或多种额外的治疗剂或治疗方法。这些额外的试剂的实例包括,但不限于:抗肿瘤剂,如化学治疗剂以及抗血管生成剂或疗法,例如放射疗法。

[0159] 示例性受试者

[0160] 在一些实例中,所公开的方法用于从受试者中移除靶标。在一个实例中,IR700-分子缀合物包括可与靶标结合或杂交的特异性结合剂。这些IR700-分子缀合物可用于患有因所述靶标的存在或量的增加而引起的病症的受试者,如被靶标病原体感染的受试者,被有毒动物咬伤或刺伤的受试者,患有因不需要的细胞的存在而引起的病症(例如癌症或自身免疫性病症或过敏症)的受试者,患有因靶标蛋白、细胞或核酸分子的存在或量的增加而引起的病症的受试者,药物靶标过量用药的受试者等。在一个实例中,受试者为人或实验室动物,例如兔或小鼠,其具有待分离的所需靶抗体、蛋白质、细胞或核酸分子。

[0161] 在一个实例中,IR700-分子缀合物包含治疗药物。这些IR700-药物缀合物可用于受试者,例如患有能够受益于用靶标药物(例如药理学药物)进行的治疗的病症的受试者。

[0162] 在一个实例中,受试者患有癌症,例如乳腺癌、肝癌、肾癌、子宫癌、结肠癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、脑癌、子宫颈癌、骨癌、皮肤癌或肺癌。

[0163] 所公开的方法可以用于任何哺乳动物受试者,例如人或兽医受试者。在一些实例中,受试者为已经接受其他疗法的受试者,但是这些其他疗法并没有提供所期望的治疗反应。在一些实例中,所述方法包括选择能够受益于所公开的治疗的受试者。

[0164] IR700-分子缀合物的给药

[0165] 可以在体外使IR700-分子缀合物和额外的治疗剂(如抗肿瘤剂)与样品接触,例如通过将IR700-分子缀合物加入细胞正生长于其中的生长培养基中,或者可以在体内使IR700-分子缀合物和额外的治疗剂(如抗肿瘤剂)与细胞接触,例如通过向待治疗的受试者给予IR700-分子缀合物。

[0166] 使用本领域中已知的任何方法,IR700-分子缀合物可以被局部性或全身性给药。虽然提供了具体的实例,但是本领域技术人员应理解,可以使用所公开的IR700-分子缀合物和额外治疗剂的替代性给药方法。这些方法可包括例如在需要治疗的受试者中,使用导管或可植入泵以在几小时至几天的时间段内提供连续输注。

[0167] 在一个实例中,IR700-分子缀合物通过肠胃外方式给予,包括直接注射或输注到肿瘤中(肿瘤内)。额外地或可选地,所公开的IR700分子缀合物可以向患有肿瘤(例如癌症)的受试者进行全身性给药,例如静脉内、肌内、皮下、真皮内、腹膜内、皮下或口服给药。

[0168] 向受试者给予IR700-分子缀合物的剂量没有严格的限制,但将取决于组合物及其活性成分的性质以及它的不合需要的副作用(例如针对特异性结合剂的免疫应答),治疗的受试者和治疗的病症的类型和给药方式。通常,剂量为治疗有效量,如足以实现所需生物学效果的量,例如所述量能够有效地从受试者中基本上移除靶标(例如,移除至少20%,至少

30%，至少40%，至少50%，至少60%，至少70%，至少80%，至少90%，至少95%，或至少99%，如80至100%、80至99.9%、90至95%、或90至99%）。可以与所公开的方法组合使用的其它治疗剂（例如抗生素、抗病毒剂、免疫抑制剂等）的剂量是本领域中已知的。

[0169] 对于IR700-分子缀合物的静脉内给药，用于受试者单次治疗所给予的示例性剂量的范围可为0.5至100mg/60kg体重，1至100mg/60kg体重，1至50mg/60kg体重，1至20mg/60kg体重，例如约1或2mg/60kg体重。在另一个实例中，以ip或肿瘤内给予的IR700-分子缀合物的治疗有效量其可在10 μ g至5000 μ g的IR700-分子缀合物/1kg体重的范围内改变，例如10 μ g/kg至1000 μ g/kg，10 μ g/kg至500 μ g/kg或100 μ g/kg至1000 μ g/kg。

[0170] 在一个实例中，向人患者给予的IR700-分子缀合物的剂量为至少50mg，如至少100mg，至少300mg，至少500mg，至少750mg，或甚至1g。

[0171] 使用所公开的IR700-分子缀合物（和额外的治疗剂）进行的治疗可以在单独一天内完成，或者可以用相同或不同的剂量在若干天内重复进行。重复的治疗可以在同一天内进行，连续几天内进行或以每1-3天、每3-7天、每1-2周、每2-4周、每1-2月或甚至更长的时间间隔进行。

[0172] 照射受试者或细胞

[0173] 在将受试者和/或细胞与一种或多种IR700-分子缀合物接触后，对所述受试者和/或细胞进行照射。照射方法是本领域中公知的。在一些实例中，所述细胞在被从受试者中移除后，在体外被照射，例如在组织培养皿中或在医疗管或袋中（例如，在单采术期间）。在其他实例中，将受试者进行体内照射，例如照射此前已被给予IR700-分子缀合物的受试者。在一些实例中，对受试者的一部分进行照射，例如可以照射受试者中疑似有靶标的器官或其他区域（例如，在肝脏、心脏、脑或胃中）。

[0174] 将受试者或细胞用治疗剂量的辐射进行照射，如以660-710nm，如660nm-700nm，680nm-700nm，670nm-690nm，例如680nm或690nm的波长。在具体实例中，以至少1J cm⁻²，至少4J cm⁻²，如至少10J cm⁻²，至少30J cm⁻²，至少50J cm⁻²，至少100J cm⁻²，或至少500J cm⁻²，例如1-1000J cm⁻²、1-500J cm⁻²、30至50J cm⁻²、4-8J cm⁻²、10-100J cm⁻²或10-50J cm⁻²的剂量对细胞或受试者进行照射。

[0175] 可以对细胞（或患者）进行一次或多次照射。因此，照射可以在单独一天内进行，或可以相同或不同的剂量在若干天内重复进行（例如至少2个不同时期、3个不同时期、4个不同时期、5个不同时期或10个不同时期进行照射）。重复的照射可以在同一天内进行，连续几天内进行或以每1-3天、每3-7天、每1-2周、每2-4周、每1-2月或甚至更长的时间间隔进行。

[0176] 包含NIR LED和/或激光器的示例性设备

[0177] 可以在本文所述的方法中使用任何类型的可穿戴或放置于身体上并且适于包括NIR LED和/或激光系统（例如，氩NIR激光器）的物品。在一个实例中，所述设备为患者可被容纳（inserted）于其中的腔室（chamber）。这些设备可以用于移除存在于身体中的靶标，例如血液或淋巴中的靶标或皮肤上的靶标。

[0178] 为了充分地移除足够量的体内靶标，可能需要长时间地穿戴这些设备，例如几周或几个月。因此，这些装置可以被纳入日常衣服、首饰和睡衣例如毯子中。这些设备使得可以使用便携式日常衣服和珠宝的用品而将患者暴露于NIR光，以便治疗保持私密性并且不干扰日常活动。例如，含有NIR LED和/或激光器（例如，氩NIR激光器）的项链可以根据患者

的品味来定制,并且在白天小心地穿戴以进行治疗(例如使穿过颈动脉和颈部的其他脉管系统的IR700-分子缀合物断裂)。在治疗期间,类似“日常”性质的多种设备(毯子、手镯、项链、内衣、袜子、鞋内插入物等)可由同一患者穿戴。例如在睡觉时,患者可使用NIR毯子。所述设备还可包括电源(例如电池)和用于防止诸如毯子这些设备过热的冷却元件。

[0179] 在一个实例中,所述设备为珠宝,如戒指、手表、手镯或项链。在另一个实例中,所述物品为衣服或搭配物(accessory),例如衬衫、腰带、裤子、内衣、袜子、外套、鞋内插入物、围巾、帽子、护腕、手套等。在另一个实例中,所述设备为可以覆盖身体的物品,例如毯子或毛巾。在另一个实例中,所述设备为直接暴露皮肤的全身光室(light chamber)(这种设备还可以包括电源和/或冷却源)。

[0180] 通过穿戴含有一个或多个NIR LED(如至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少10个、至少20个或至少50个NIR LED)和/或激光器的(例如,氩NIR激光器)设备,存在于身体(例如,血液、淋巴或皮肤)内的靶标暴露于由NIR LED或激光器(如在660至710nm发处射,如670至710nm或680至700nm的NIR LED或激光器)所产生的光线中。从NIR LED和/或激光器(例如,氩NIR激光器)中发射的光可以穿透皮肤和血管(例如颈动脉或皮肤中的微血管系统),从而允许光激活IR700-分子缀合物(其可以包括靶标或与靶标结合),从而使IR700断裂并使其(和与其结合的任何分子)聚集。可将NIR LED和/或激光器(例如,氩NIR激光器)布置于所述设备中,以确保靶向于皮肤或血管或淋巴系统。

[0181] 可用于本文提供的方法中的NIR LED和/或激光器(例如氩NIR激光器)设备是可商购的。来自一家制造商Marubeni America的适用产品如下所示。第一种产品,模制LED,具有低功率,但它可以使用较长的曝光时间。其他选项具有更高的功率,因此可以受益于所提供的附加冷却。除后一种产品以外(其被包装于25mm×18mm的金属外壳内),其他均适用于可穿戴设备,如手镯、项链、内衣、袜子、手套、帽子和其他可穿戴物品中。所有这些都可用于毯子、手持设备或腔室。

[0182] 例如Marubeni America Corporation(tech-led.com/index.shtml)提供了以下具有设定为照射模式的透镜选项的NIR LED:直径为5mm的模制LED(www.tech-led.com/data/L680-AU.pdf),具有总辐射功率为4mW,计算功率密度为 5mW cm^{-2} 且电力需求为1.8V 20mA;3.5mm×2.7mm的Surface Mount LED,具有总辐射功率为3mW,计算功率密度为 32mW cm^{-2} ,且电力需求为1.9V 50mA;7.6mm×7.6mm的Super Beam(tech-led.com/Superbeam_LEDs.shtml)具有总辐射功率为20–52mW,计算功率密度为 $34\text{--}90\text{mW cm}^{-2}$,且电力需求为1.65V 100mA;直径为5mmx 5mm或7mm的High Power Surface Mount(tech-led.com/SMB_BL_LEDs.shtml),具有总辐射功率为90mW,计算功率密度为 360mW cm^{-2} 且电力需求为2.4V 500mA;和25mm x 18mm的High Power Illuminators(tech-led.com/High_Power_Illuminators.shtml),具有总辐射功率为150mW,计算功率密度为 33mW cm^{-2} 且电力需求为10V 120mA。或者,可以制造这样的设备,其以类似的功率和短的强间歇脉冲发射690nm的光。

[0183] 在体外实验期间,功率密度为 2.2mW cm^{-2} (或 $2.2\text{mJ s}^{-1}\text{cm}^{-2}$)的NIR光诱导细胞死亡。假设组织的衰减系数为 4cm^{-1} ,光强度在5.8mm处降低到10%,在12mm处降低到1%。这表明对于体内应用而言,所需的功率密度需要增大10–100倍。也就是说,在一些实例中,由NIR LED设备发射的光的剂量为至少 20mW cm^{-2} ,例如至少 50mW cm^{-2} ,至少 100mW cm^{-2} ,至少 150mW cm^{-2} 。

cm^{-2} ,至少 200mW cm^{-2} 或至少 300mW cm^{-2} 。多个NIR LED可以二维阵列排列以覆盖更大的区域。在一个实例中,使用激光器作为可替代LED的NIR光源。

[0184] NIR LED和/或激光器(例如,氩NIR激光器)可以通过使用电源(其可以是所述设备的直接或间接部件)来供电。电源要求将取决于设备中LED和激光器的数量。例如,一个或多个电池可以用于给NIR LED供电。对于一些LED,4节AA电池可以为串联的3个LED提供电力。碱性AA电池的额定最大值为3000mAh,因此该配置能够以20、50和100mA提供电力最长达150、60和30hr。

[0185] 在一些实例中,所述设备还包括冷却设备(其可以是所述设备的直接或间接部件)。例如,散热器可以用于被动或主动冷却。另一种替代方案为热电效应(Peltier)。这将导致额外的电力,但它可以用在其中电源需求需要一个插入式AC适配器的应用中。

[0186] 可与所公开的方法一起使用的另一种类型的设备为具有NIR LED和/或激光器(例如,氩NIR激光器)的手电筒(flashlight)状装置。这种设备可用于手术期间的局部治疗,或者被纳入内窥镜中,以在给予IR700-分子缀合物之后将NIR光施加到体表。这些设备可以由医师或合格的卫生人员使用以将治疗导向身体上特定的靶标。

[0187] 使用可穿戴的NIR LED的治疗

[0188] 如本文所述,所公开的方法可用于在体内移除靶标。在一些实例中,为了移除在体内循环或存在于皮肤上的靶标,患者可以穿戴包含NIRLED的装置。在一些实例中,患者使用至少两个装置,例如白天的衣物或珠宝,以及晚上的毯子。在一些实例中,患者同时使用至少两个装置,例如两件衣物。这些装置使得可以使用便携的日常衣物和珠宝将患者暴露于NIR光,使得治疗保持私密并且不干扰日常活动。在一些实例中,装置可以在白天谨慎地穿戴用于PIT治疗。

[0189] 在一个实例中,使用本文所述的方法向患者施用一种或多种IR700-分子缀合物(例如一种或多种剂量)。患者然后穿戴包含NIR LED的装置,允许长期治疗并移除存在于血液或淋巴中或皮肤上的靶标。在一些实例中,剂量为至少 1J cm^{-2} 、至少 10J cm^{-2} 、至少 20J cm^{-2} 或至少 30J cm^{-2} ,例如 20J cm^{-2} 或 30J cm^{-2} 。在一些实例中,在一段时间内(例如每周两次、每隔一天、每隔一周、每月两次、每月一次或每隔一月)重复给予IR700-分子缀合物,以确保治疗/有效水平存在于体内。

[0190] 在一些实例中,患者穿戴或使用装置或装置的组合至少1周,例如至少2周、至少4周、至少8周、至少12周、至少4个月、至少6个月或甚至至少1年。在一些实例中,患者穿戴或使用装置或装置的组合至少一天4小时,例如至少一天12小时、至少一天16小时、至少一天18小时或一天24小时。在治疗期间,同一患者可能穿戴具有类似的“日常”性质的多个装置(毯子、手镯、项链、内衣、袜子、鞋内插入物)。在晚上,患者可以使用NIR LED毯子或其他覆盖物。

[0191] 示例性靶标

[0192] 所公开的方法可以设计为在体外、离体或体内移除或分离任何目的靶标试剂。因此,本文提供的方法和IR700-分子缀合物可用于移除或分离任何目的靶标试剂,例如本文提供的具体实例。下文提供了示例性的靶标试剂;然而本领域技术人员将理解,可以用所公开的方法和IR700-分子缀合物移除其它靶标试剂。如本文所述,选择与靶标试剂结合或杂交的合适的特异性结合剂,允许开发IR700特异性结合剂缀合物以移除、分离或分开特定的

靶标试剂。

[0193] 金属

[0194] 在一个实例中,靶标试剂是金属(例如,具有高导电性的元素、化合物或合金),例如重金属或营养金属。因此,所公开的方法和IR700-分子缀合物允许在体内、离体或体外移除金属。金属占据了周期表的主体,而非金属元素只能在元素周期表的右侧找到。从硼(B)到钋(Po)画出的对角线将金属与非金属分开。这条线上的大多数元素是准金属,有时称为半导体。该分割线左下方的元素称为金属,而分割线右上方的元素称为非金属。

[0195] 靶标重金属包括具有相对高密度并且在低浓度下是毒性的、高度毒性的或有毒的任何金属化学元素。靶标重金属的实例包括汞(Hg)、镉(Cd)、砷(As)、铬(Cr)、铊(Tl)、铀(U)、钚(Pu)和铅(Pb)。

[0196] 靶标营养金属离子包括在动物营养中重要并且对于特定的生物学功能可能是必需的那些,包括钙、铁、钴、镁、锰、钼、锌、镉、钠、钾、锂和铜。

[0197] 特异性针对特定金属的抗体是本领域中已知的,并且这些抗体可以与IR700缀合并用于本文提供的方法。例如,Zhu等人描述了特异性针对螯合镉离子的mAb(J.Agric.Food Chem.55:7648-53,2007),Wylie等人描述了特异性针对汞离子的mAb(PNAS 89:4104-8,1992),Love等人描述了特异性针对inidium的mAb(Biochem.32:10950-9,1993)。此外,金属离子螯合剂的双官能衍生物(EDTA、DTPA、DOTA)可以共价缀合至蛋白并且负载所需的金属离子。这些缀合物可用于制备合成金属特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞系。此外,已经开发了适体以识别金属离子,例如Zn(II)(Ciesiolka et al.,RNA 1:538-550,1995)和Ni(II)(Hofmann et al.,RNA,3:1289-1300,1997)。此外,已知特异性针对特定金属离子的DNA酶,例如铅、铜、铀、锌、汞、镉和镁。这样的分子可以用于产生IR700-分子缀合物以移除靶标金属。

[0198] 病原体/微生物

[0199] 可以使用本文提供的方法和IR700-分子缀合物移除或分离任何病原体或微生物。在一些实例中,移除特定的微生物细胞或生物体、特定的孢子或特定的病毒。示例性的靶标病原体包括但不限于病毒、细菌、真菌、线虫和原生动物。下面提供了可以使用本文提供的方法移除或分离的病原体的非限制性列表。

[0200] 例如,靶标病毒包括正链RNA病毒和负链RNA病毒。示例性的靶标正链RNA病毒包括但不限于:小核糖核酸病毒(例如口蹄疫病毒科(Aphthoviridae)[例如口蹄疫病毒(FMDV)]),心病毒科(Cardioviridae);肠道病毒科(Enteroviridae)(例如柯萨奇病毒、艾可病毒、肠道病毒和脊髓灰质炎病毒);鼻病毒科(Rhinoviridae)(鼻病毒);肝炎病毒科(Hepataviridae)(甲型肝炎病毒);披盖病毒(其实例包括风疹;甲病毒(例如西部马脑炎病毒、东部马脑炎病毒和委内瑞拉马脑炎病毒));黄病毒(其实例包括登革热病毒、西尼罗河病毒和日本脑炎病毒);嵌杯状病毒科(Calciviridae)(包括诺如病毒和札幌病毒);和冠状病毒(其实例包括SARS冠状病毒,例如Urbani株)。示例性负链RNA病毒包括但不限于:正粘病毒(例如流感病毒)、弹状病毒(例如狂犬病病毒)和副粘病毒(其实例包括麻疹病毒、呼吸道合胞病毒和副流感病毒)。

[0201] 病毒还包括DNA病毒。靶标DNA病毒包括但不限于:疱疹病毒(例如水痘带状疱疹病毒,例如Oka株;巨细胞病毒;以及1型和2型单纯疱疹病毒(HSV))、腺病毒(例如1型腺病毒和

41型腺病毒)、痘病毒(例如牛痘病毒)和细小病毒(例如细小病毒B19)。

[0202] 另一组病毒包括逆转录病毒。靶标逆转录病毒的实例包括但不限于:1型人免疫缺陷病毒(HIV-1),例如C亚型;HIV-2;马传染性贫血病毒;猫免疫缺陷病毒(FIV);猫白血病病毒(FeLV);猴免疫缺陷病毒(SIV);和禽肉瘤病毒。

[0203] 在一个实例中,用所公开的方法或传感器检测的病毒是以下中的一种或多种: HIV-1(例如HIV抗体、p24抗原或HIV基因组);甲型肝炎病毒(例如甲型肝炎抗体或甲型肝炎病毒基因组);乙型肝炎(HB)病毒(例如HB核心抗体、HB表面抗体、HB表面抗原或HB病毒基因组);丙型肝炎(HC)病毒(例如HC抗体或HC病毒基因组);丁型肝炎(HD)病毒(例如HD抗体或HD病毒基因组);戊型肝炎病毒(例如戊型肝炎抗体或HE病毒基因组);呼吸道病毒(例如A型和B型流感、呼吸道合胞病毒、人副流感病毒或人偏肺病毒(human metapneumovirus))或西尼罗河病毒。

[0204] 病原体还包括细菌。细菌可以分为革兰氏阴性或革兰氏阳性。示例性的靶标革兰氏阴性细菌包括但不限于:大肠杆菌(*Escherichia coli*) (例如,K-12和O157:H7)、痢疾杆菌(*Shigella dysenteriae*)和霍乱弧菌(*Vibrio cholera*)。示例性的靶标革兰氏阳性细菌包括但不限于:炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、李斯特菌(*Listeria*)、肺炎球菌(*pneumococcus*)、淋球菌(*gonococcus*)和链球菌性脑膜炎(*streptococcal meningitis*)。在一个实例中,用所公开的方法和IR700-分子缀合物移除的细菌是以下中的一种或多种:A组链球菌(*Streptococcus*);B组链球菌;幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*);抗甲氧西林金黄色葡萄球菌;万古霉素耐药性肠球菌(*enterococci*);艰难梭菌(*Clostridium difficile*);大肠杆菌(例如,产志贺毒素菌株);李斯特菌;沙门氏菌(*Salmonella*);弯曲杆菌(*Campylobacter*);炭疽芽孢杆菌(*B.anthraxis*) (例如孢子);沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*);埃博拉(Ebola)和淋病奈瑟氏球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)。

[0205] 原生动物、线虫和真菌也是病原体的类型。示例性的靶标原生动物包括但不限于疟原虫属(*Plasmodium*) (例如诊断疟疾的恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*))、利什曼原虫属(*Leishmania*)、棘阿米巴属(*Acanthamoeba*)、贾第虫属(*Giardia*)、内阿米巴属(*Entamoeba*)、隐孢子虫属(*Cryptosporidium*)、等孢子球虫属(*Isospora*)、小袋虫属(*Balantidium*)、毛滴虫属(*Trichomonas*)、锥虫属(*Trypanosoma*) (例如布氏锥虫(*Trypanosoma brucei*))、纳氏虫属(*Naegleria*)和弓形虫属(*Toxoplasma*)。示例性的靶标真菌包括但不限于粗球孢子菌(*Coccidioides immitis*)和皮炎芽生菌(*Blastomyces dermatitidis*)。

[0206] 在一个实例中,移除细菌孢子。例如,芽孢杆菌属(*Bacillus*)和梭菌属(*Clostridium*)细菌产生可以检测的孢子。因此,可以检测肉毒梭状芽孢杆菌(*C.botulinum*)、产气荚膜梭状芽孢杆菌(*C.perfringens*)、蜡状芽孢杆菌(*B.cereus*)和炭疽芽孢杆菌(*B.anthraxis*)孢子(例如检测炭疽孢子)。也会认识到,来自绿色植物的孢子也可以使用本文提供的方法和IR700-分子缀合物移除。

[0207] 在一些实例中,例如通过使用IR700-分子缀合物(包括例如特异性针对靶标蛋白的抗体、DNA酶或DNA适体)结合到微生物上的靶标表面蛋白(例如受体)来移除完整的微生物。例如,可以与所公开的方法和IR700-分子缀合物一起使用的抗体可从商业来源获得,例

如Novus Biologicals (Littleton, CO) 和ProSci Incorporated (Poway, CA) 提供大肠杆菌的特异性抗体;KPL (Gaithersburg, MD) 提供李斯特菌的特异性抗体;Thermo Scientific/Pierce Antibodies (Rockford, IL) 提供对几种微生物的特异性抗体,所述微生物包括细菌和病毒,例如A型流感、HIV-1、HSV 1和2、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、炭疽芽孢杆菌及其孢子,疟原虫属和隐孢子虫属。此外,特异性针对微生物蛋白的适体可以与所公开的方法和IR700-分子缀合物一起使用,例如特异性针对HIV逆转录酶 (Chaloin et al., *Nucleic Acids Research*, 30:4001-8, 2002) 和丙型肝炎病毒RNA依赖性RNA聚合酶 (Biroccio et al., *J. Virol.* 76:3688-96, 2002) 的那些;毒素例如霍乱全毒素和葡萄球菌肠毒素B (Bruno and Kiel, *BioTechniques*, 32:pp.178-180和182-183, 2002);和细菌孢子例如炭疽 (Bruno and Kiel, *Biosensors&Bioelectronics*, 14:457-464, 1999)。此外,特异性针对微生物蛋白的DNA酶可以与所公开的方法和IR700-分子缀合物一起使用,例如特异性针对大肠杆菌-K12的那些 (Ali et al., *Angewandte Chemie International Edition*. 50, 3751-4, 2011; Li, *Future Microbiol.* 6, 973-976, 2011; 和Aguirre et al., *J. Visualized Experiments*. 63, 3961, 2012)。此类分子可用于产生IR700-分子缀合物以移除靶标病原体或孢子。

[0208] 蛋白/肽

[0209] 所公开的方法和IR700-分子缀合物还允许移除或分离多种蛋白和肽,例如细胞表面受体、细胞因子、抗体、激素、凝集素、以及毒素和毒液。在一些实例中,选择与疾病或病症相关的靶标蛋白,使得靶标蛋白的移除或减少可用于治疗疾病或病症。在具体实例中,IR700-分子缀合物可以特异性结合至蛋白或肽靶标 (例如包括特异性针对蛋白的抗体、功能性抗体片段、**Affibody®**分子、核酸分子、半抗原或功能性核酸的IR700-分子缀合物)。例如,用于特定蛋白的特异性结合剂是本领域中已知的。例如,这样的抗体可从商业来源获得,例如Invitrogen, Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); ABCam (剑桥, MA) 和IBL International (汉堡, 德国)。这样的分子可以用于产生IR700-分子缀合物以移除靶标蛋白。

[0210] 在靶标分子是蛋白的一些实例中,待测试的样品可以用允许破坏细胞或病原体的试剂处理。可以提取或分离蛋白,然后暴露于本文公开的IR700-分子缀合物,例如特异性针对靶标蛋白的IR700-分子缀合物,以允许从蛋白混合物中分离或移除靶标蛋白。

[0211] 在一个实例中,所述靶标蛋白是细胞因子。细胞因子是由免疫细胞分泌的,对其他细胞有影响的小蛋白。靶标细胞因子的实例包括白细胞介素 (IL) 和干扰素 (IFN) 和趋化因子,例如IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IFN- γ 、IFN- β 、转化生长因子 (TGF- β) 和肿瘤坏死因子 (TNF)- α 。

[0212] 在一个实例中,所述靶标蛋白是激素。激素是将信号从一个细胞传送到另一个细胞的化学信使。靶标激素的实例包括植物和动物激素,例如内分泌激素或外分泌激素。具体实例包括促卵泡激素 (FSH)、人绒毛膜促性腺激素 (hCG)、促甲状腺激素 (TSH)、生长激素、孕酮等。

[0213] 在一个实例中,所述靶标蛋白是毒素。毒素是由细胞或生物体 (例如植物、动物、微生物 (包括但不限于细菌、病毒、真菌、立克次氏体或原生动物)) 产生的有毒物质。靶标毒素的具体实例包括肉毒杆菌毒素、蓖麻毒素、白喉毒素、志贺毒素、霍乱毒素、葡萄球菌肠毒素

B和炭疽毒素。在另一个实例中,毒素是环境毒素。在一个实例中,靶标毒素是真菌毒素,例如:黄曲霉毒素、桔青霉素、麦角类生物碱、展青霉素、镰孢毒素或赭曲毒素A。在一个实例中,靶标毒素是蓝藻毒素(cyanotoxin),例如:微囊藻素、节球藻素、去毒毒素-a、海螺毒素、柱细胞藻毒素(cylindrospermopsin)、鞘丝藻毒素-a和蛤蚌毒素。在一个实例中,靶标毒素是内毒素、血毒素、心脏毒素、神经毒素、坏死毒素、神经毒素或细胞毒素。

[0214] 在一个实例中,靶标蛋白是毒液(或毒液中的组分,例如毒素),例如由黄蜂、蚂蚁、蜘蛛、蝎子、鱼、蛇等产生的毒液。实例包括黄蜂毒液蛋白磷脂酶A1和B、神经毒素、蛇毒液蛋白(如金属蛋白酶、磷酸二酯酶、磷脂酶A2、氧化酶、蛋白酶和透明质酸酶)以及蝎子毒液蛋白氯毒素。

[0215] 在一个实例中,靶标蛋白是凝集素。凝集素是识别并结合至细胞表面上的特定碳水化合物的蛋白。凝集素通常含有两个或多个碳水化合物单元的结合位点。在动物中,凝集素调节对糖蛋白合成的细胞粘附、控制血液中的蛋白水平并结合可溶性细胞外和细胞内糖蛋白。此外,在免疫系统中,凝集素识别特异性存在于病原体上的碳水化合物或宿主细胞上的不可识别的碳水化合物。临床上,纯化的凝集素可用于鉴定个体红细胞上的糖脂和糖蛋白,用于血型分型。示例性的凝集素包括但不限于:伴刀豆球蛋白A、扁豆凝集素、雪花莲凝集素(均结合甘露糖);蓖麻毒素、花生凝集素、榴莲凝素(jacalin)和毛叶苕子凝集素(均结合半乳糖);小麦胚芽凝集素(其结合N-乙酰氨基葡萄糖);接骨木果凝集素、怀槐血凝素(均结合N-乙酰神经氨酸);和荆豆凝集素和橙黄网胞盘菌凝集素(均结合岩藻糖)。

[0216] 在一个实例中,靶标蛋白是肿瘤相关的或肿瘤特异性抗原,例如CA-125(卵巢癌标志物)、甲胎蛋白(AFP,肝癌标志物);癌胚抗原(CEA;肠癌)、BRCA1和2(乳腺癌)等。这种蛋白可用于移除肿瘤细胞。

[0217] 在一个实例中,靶标蛋白是生育相关的生物标志物,例如hCG、黄体生成素(LH),促卵泡激素(FSH)或胎儿纤维蛋白原。

[0218] 在一个实例中,靶标蛋白是诊断蛋白,例如前列腺特异性抗原(PSA,例如**GENBANK®**登记号NP_001025218)、C反应蛋白、环瓜氨酸肽(cyclic citrullinate peptide)(CCP,例如用于诊断类风湿性关节炎)或糖化血红蛋白(Hb A1c)。在另一个实例中,蛋白是在靶标微生物或细胞(例如细菌细胞、病毒、孢子或肿瘤细胞)的表面上存在的蛋白。这样的蛋白(例如受体)可以特异性针对微生物或细胞(例如HER2、IGF1R、EGFR或在下文“核酸”中指出的其它肿瘤特异性受体)。在一个实例中,蛋白是前列腺特异性抗原(PSA,例如**GENBANK®**登记号NP_001025218),其可以使用抗体或PSA特异性适体来靶向(例如,参见Savory et al., *Biosensors&Bioelectronics* 15:1386-91,2010和Jeong et al., *Biotechnology Letters* 32:378-85,2010)。

[0219] 核酸分子

[0220] 所公开的方法还允许移除或分离靶标核酸分子,例如DNA或RNA(例如cDNA、基因组DNA、mRNA、miRNA等),例如特异性针对特定目的病原体或细胞的DNA或RNA序列。例如,病原体可以具有特异性针对该病原体的保守的DNA或RNA序列(例如本领域中已知的用于HIV、禽流感和猪流感的保守序列),并且细胞可以对该细胞来说独特的特异性DNA或RNA序列。在一些实例中,选择与疾病或病症相关的靶标核酸分子,使得靶标核酸分子的移除或减少可用于治疗所述疾病或病症(例如下调表达)。在一个实例中,靶标核酸分子是样品占多数的靶

标核酸分子,因此可以被从样品中移除以允许分析(例如鉴定或克隆)所述样品中的稀有核酸分子(例如来自样品中的稀有生物体的核酸分子)。

[0221] 在具体的实例中,IR700-分子缀合物可以特异性结合至核酸分子靶标(例如包含特异性针对靶标核酸分子的蛋白或核酸分子的IR700-分子缀合物)。例如,用于特定核酸分子的特异性结合剂是本领域中已知的,并且可以使用常规方法设计。例如,可以产生具有足够互补性以与靶标核酸分子杂交的核酸分子(例如与靶标具有至少80%、至少90%、至少95%或至少99%的序列互补性的核酸分子)并与IR700缀合。这样的分子可以用于产生IR700-分子缀合物以移除靶标核酸分子。

[0222] 在靶标分子是核酸分子的一些实例中,待测试的样品可以用允许破坏细胞或病原体的试剂处理。可以提取或分离核酸分子,然后将其暴露于本文公开的IR700-分子缀合物,例如特异性针对靶标核酸分子的IR700-分子缀合物,以允许从核酸分子的混合物中分离或移除靶标核酸分子。

[0223] 在具体的非限制性实例中,靶标核酸序列与肿瘤(例如,癌症)相关。已经在肿瘤细胞中,特别是在新生物细胞中鉴定了许多染色体异常(包括易位和其他重排、重复(扩增)或缺失),例如B细胞和T细胞白血病、淋巴瘤、乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、神经癌等。

[0224] 示例性靶标核酸包括但不限于:位于染色体18q11.2的断裂点区的SYT基因(在滑膜肉瘤软组织肿瘤中常见);HER2,也称为c-erbB2或HER2/neu(代表性人HER2基因组序列,以 **GENBANK®** 登记号NC_000017提供,核苷酸35097919-35138441)(HER2在人乳腺癌、卵巢癌、胃癌和其他癌症中扩增);p16(包括D9S1749、D9S1747、p16(INK4A)、p14(ARF)、D9S1748、p15(INK4B)和D9S1752)(在某些膀胱癌中缺失);EGFR(7p12;例如, **GENBANK®** 登记号NC_000007,核苷酸55054219-55242525)、MET(7q31;例如, **GENBANK®** 登记号NC_000007,核苷酸116099695-116225676)、C-MYC(8q24.21;例如, **GENBANK®** 登记号NC_000008,核苷酸128817498-128822856)、IGF1R(15q26.3;例如, **GENBANK®** 登记号NC_000015,核苷酸97010284-97325282)、D5S271(5p15.2)、KRAS(12p12.1;例如 **GENBANK®** 登记号NC_000012,补充,核苷酸25249447-25295121)、TYMS(18p11.32;例如, **GENBANK™** 登记号NC_000018,核苷酸647651-663492)、CDK4(12q14;例如, **GENBANK®** 登记号NC_000012,核苷酸58142003-58146164,补充)、CCND1(11q13, **GENBANK®** 登记号NC_000011,核苷酸69455873-69469242)、MYB(6q22-q23, **GENBANK®** 登记号NC_000006,核苷酸135502453-135540311)、脂蛋白脂酶(LPL)(8p22;例如, **GENBANK®** 登记号NC_000008,核苷酸19840862-19869050)、RB1(13q14;例如, **GENBANK®** 登记号NC_000013,核苷酸47775884-47954027)、p53(17p13.1;例如, **GENBANK®** 登记号NC_000017,补充,核苷酸7512445-7531642)、N-MYC(2p24;例如, **GENBANK®** 登记号NC_000002,补充,核苷酸15998134-16004580)、CHOP(12q13;例如, **GENBANK®** 登记号NC_000012,补充,核苷酸56196638-56200567)、FUS(16p11.2;例如, **GENBANK®** 登记号NC_000016,核苷酸31098954-31110601)、FKHR(13p14;例如, **GENBANK®** 登记号NC_000013,补充,核苷酸40027817-40138734)、aALK(2p23;例如,

GENBANK®登记号NC_000002, 补充, 核苷酸29269144-29997936)、Ig重链、CCND1 (11q13; 例如, **GENBANK®**登记号NC_000011, 核苷酸69165054-69178423)、BCL2 (18q21.3; 例如, **GENBANK®**登记号NC_000018, 补充, 核苷酸58941559-59137593)、BCL6 (3q27; 例如, **GENBANK®**登记号NC_000003, 补充, 核苷酸188921859-188946169)、AP1 (1p32-p31; 例如, **GENBANK®**登记号NC_000001, 补充, 核苷酸59019051-59022373)、TOP2A (17q21-q22; 例如, **GENBANK®**登记号NC_000017, 补充, 核苷酸35798321-35827695)、TMPRSS (21q22.3; 例如, **GENBANK®**登记号NC_000021, 补充, 核苷酸41758351-41801948)、ERG (21q22.3; 例如, **GENBANK®**登记号NC_000021, 补充, 核苷酸38675671-38955488); ETV1 (7p21.3; 例如, **GENBANK®**登记号NC_000007, 补充, 核苷酸13897379-13995289)、EWS (22q12.2; 例如, **GENBANK™**登记号NC_000022, 核苷酸27994017-28026515); FLI1 (11q24.1-q24.3; 例如, **GENBANK®**登记号NC_000011, 核苷酸128069199-128187521)、PAX3 (2q35q37; 例如, **GENBANK®**登记号NC_000002, 补充, 核苷酸222772851-222871944)、PAX7 (1p36.2-p36.12; 例如, **GENBANK®**登记号NC_000001, 核苷酸18830087-18935219)、PTEN (10q23.3; 例如, **GENBANK®**登记号NC_000010, 核苷酸89613175-89718512)、AKT2 (19q13.1-q13.2; 例如, **GENBANK®**登记号NC_000019, 补充, 核苷酸45428064-45483105)、MYCL1 (1p34.2; 例如, **GENBANK™**登记号NC_000001, 补充, 核苷酸40133685-40140274)、REL (2p13-p12; 例如, **GENBANK®**登记号NC_000002, 核苷酸60962256-61003682) 和CSF1R (5q33-q35; 例如, **GENBANK®**登记号NC_000005, 补充, 核苷酸149413051-149473128)。

[0225] 碳水化合物

[0226] 所公开的方法和IR700-分子缀合物也允许移除多种碳水化合物(例如糖)。实例包括单糖和二糖。在具体的实例中, 特异性结合至碳水化合物靶标的特异性结合剂是凝集素。例如, 伴刀豆球蛋白A、扁豆凝集素、雪花莲凝集素可用于移除甘露糖; 蓖麻毒素、花生凝集素、榴莲凝素(jacalin)和毛叶苕子凝集素可用于移除半乳糖; 小麦胚芽凝集素可用于移除N-乙酰氨基葡萄糖; 接骨木果凝集素和怀槐血凝素可用于移除N-乙酰神经氨酸; 和荆豆凝集素和橙黄网胞盘菌凝集素可用于移除岩藻糖。这样的分子可以用于产生IR700-分子缀合物以移除靶标碳水化合物。

[0227] 娱乐性药物

[0228] 所公开的方法和IR700-分子缀合物还允许移除多种娱乐性药物。例如, 可以从对这些药物过量用药的受试者中移除这样的药物。特定药物的特异性抗体是本领域中已知的。例如, 针对四氢大麻酚、海洛因、可卡因、咖啡因和甲基苯丙胺的抗体可从AbCam(剑桥, MA)获得。在具体的实例中, 特异性结合至药物靶标的特异性结合剂是核酸(例如功能性核酸, 例如适体或DNA酶)。这样的分子可以用于产生IR700-分子缀合物以移除靶标娱乐性药物。

[0229] 例如, 咖啡因、可卡因、阿片制剂和阿片样物质(例如羟考酮)、大麻(例如通过检测四氢大麻酚(THC))、海洛因、甲基苯丙胺、快克(crack)、酒精、对乙酰氨基酚、苯并二氮卓

类、美沙酮、苯环利定或烟草(例如通过检测尼古丁),可以使用所公开的方法和IR700-分子缀合物移除或分离。

[0230] 细胞

[0231] 任何靶细胞均可以用所公开的方法和IR700-分子缀合物在体内、体外或离体移除或分离。要从受试者移除或分离的靶细胞可以是不合需要的或其生长不合需要的细胞(例如,肿瘤细胞、癌症干细胞、病变细胞或导致或加重受试者的疾病或病症的细胞),或者可以是所需的细胞,例如PBMC或HSC。在一些实例中,通过使用识别表面蛋白(例如细胞表面上的受体)的特异性结合剂来移除或分离细胞。例如,靶细胞可以表达在基本不存在于其它非靶细胞的表面上的细胞表面蛋白,可以选择特异性识别这种蛋白的特异性结合剂,并且针对该蛋白产生IR700-分子缀合物。例如,特异性针对特定细胞和细胞表面蛋白的抗体和功能核酸分子是本领域中已知的,并且可从商业来源获得,例如AbCam和Santa Cruz Biotechnology。

[0232] 在一个实例中,待被移除的细胞是肿瘤细胞,其可以是恶性的或良性的、固体或液体(例如,血源性)。在一个实例中,靶细胞是要从受试者中移除的不需要的细胞,例如癌症患者中的癌细胞。可以用所公开的方法移除的示例性细胞包括以下肿瘤细胞:液体肿瘤例如白血病,包括急性白血病(例如急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、急性髓性白血病、成髓细胞性、早幼粒细胞性、骨髓单核细胞性、单核细胞性和红白血病)、慢性白血病(例如慢性髓细胞(粒细胞)白血病、慢性髓性白血病和慢性淋巴细胞白血病)、真性红细胞增多症、淋巴瘤、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤(包括低度、中度和高度)、多发性骨髓瘤、Waldenström巨球蛋白血症、重链病、骨髓增生异常综合征、套细胞淋巴瘤和脊髓发育不良。在另一个实例中,移除的细胞来自实体瘤,例如肉瘤和癌、纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤和其他肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、Ewing瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、肝细胞癌、肺癌、结直肠癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌(例如胰腺、结肠、卵巢、肺、乳腺、胃、前列腺、子宫颈或食道的腺癌)、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝细胞癌、胆管癌、绒毛膜癌、肾母细胞瘤、子宫颈癌、睾丸肿瘤、膀胱癌、CNS肿瘤(例如神经胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤(meningioma)、黑素瘤、神经母细胞瘤和视网膜母细胞瘤)。

[0233] 因此,在一些实例中,细胞表面蛋白是肿瘤特异性蛋白(在本领域中也称为肿瘤特异性抗原),并且IR700-分子缀合物是IR700-肿瘤特异性蛋白结合剂缀合物。肿瘤特异性抗原的实例包括但不限于EGF受体家族(例如HER1、2、3和4)的成员和细胞因子受体(例如CD20、CD25、IL-13R、CD5、CD52等)。例如,HER2主要存在于乳腺癌中,而HER1主要存在于腺癌中,腺癌可见于许多器官,例如胰腺、乳腺、前列腺和结肠。存在于靶细胞上的示例性肿瘤特异性蛋白(并且针对该蛋白的特异性结合剂可用于配制IR700-肿瘤特异性蛋白结合剂缀合物)包括但不限于:各种MAGE(黑色素瘤相关抗原E)的任一种,包括MAGE 1(例如,GenBank登记号M77481和AAA03229)、MAGE 2(例如,GenBank登记号L18920和AAA17729)、MAGE 3(例如,GenBank登记号U03735和AAA17446)、MAGE 4(例如,GenBank登记号D32075和A06841.1)等;各种酪氨酸酶(例如,GenBank登记号U01873和AAB60319)的任一种;突变ras;突变p53(例如,GenBank登记号X54156、CAA38095和AA494311);p97黑素瘤抗原(例如,GenBank登记号

M12154和AAA59992) ;与乳腺肿瘤相关的人乳脂肪球(HMFG)(例如,GenBank登记号S56151和AAB19771) ;各种BAGE(人类B黑色素瘤相关抗原E)的任一种,包括BAGE1(例如,GenBank登记号Q13072)和BAGE2(例如,GenBank登记号NM_182482和NP_872288),各种GAGE(G抗原)的任一种,包括GAGE1(例如,GenBank登记号Q13065)或GAGE2-6的任一种;各种神经节苷脂,以及CD25(例如,GenBank登记号NP_000408.1和NM_000417.2)。其他肿瘤特异性抗原包括与宫颈癌相关的HPV 16/18和E6/E7抗原(例如,GenBank登记号NC_001526、FJ952142.1、ADB94605、ADB94606和U89349)、与乳腺癌相关的粘蛋白(MUC 1)-KLH抗原(例如,GenBank登记号J03651和AAA35756)、与结直肠癌相关的CEA(癌胚抗原)(例如,GenBank登记号X98311和CAA66955)、与例如黑素瘤相关的gp100(例如,GenBank登记号S73003和AAC60634)、与黑素瘤相关的MART1抗原(例如,GenBank登记号NP_005502)、与卵巢癌和其他癌症相关的癌抗原125(CA125,也称为粘蛋白16或MUC16)(例如,GenBank登记号NM_024690和NP_078966) ;与肝癌相关的甲胚蛋白(AFP)(例如,GenBank登记号NM_001134和NP_001125) ;与结直肠癌、胆癌、乳腺癌、小细胞肺癌和其他癌症相关的Lewis Y抗原;与腺癌相关的肿瘤相关糖蛋白(TAG72) ;以及与前列腺癌相关的PSA抗原(例如,GenBank登记号X14810和CAA32915)。其他示例性肿瘤特异性蛋白还包括,但不限于:与固体肿瘤新血管系统以及前列腺癌相关的PMSA(前列腺膜特异性抗原;例如,GenBank登记号AAA60209和AAB81971.1) ;与乳腺癌、卵巢癌、胃癌和子宫癌相关的HER-2(人表皮生长因子受体2,例如,GenBank登记号M16789.1、M16790.1、M16791.1、M16792.1和AAA58637),与肺癌、直肠癌和成胶质细胞瘤以及腺癌相关的HER-1(例如,GenBank登记号NM_005228和NP_005219) ;与黑素瘤、肉瘤、睾丸癌和其他癌症相关的NY-ESO-1(例如GenBank登记号U87459和AAB49693),hTERT(aka端粒末端转移酶)(例如,GenBank登记号NM_198253和NP_937983(变体1),NM_198255和NP_937986(变体2)) ;蛋白酶3(例如,GenBank登记号M29142、M75154、M96839、X55668、NM_00277、M96628、X56606、CAA39943和AAA36342),以及肾母细胞瘤1(Wilms tumor 1)(WT-1,例如GenBank登记号NM_000378和NP_000369(变体A),NM_024424和NP_077742(变体B),NM_024425和NP_077743(变体C),和NM_024426和NP_077744(变体D))。在一个实例中,肿瘤特异性蛋白是与慢性淋巴细胞白血病相关的CD52(例如,GenBank登记号AAH27495.1和CAI15846.1) ;与急性髓性白血病相关的CD33(例如,GenBank登记号NM_023068和CAD36509.1) ;以及与非霍奇金淋巴瘤相关的CD20(例如,GenBank登记号NP_068769NP_031667)。

[0234] 在一些实例中,移除或分离的细胞是负面影响自身免疫疾病的细胞,例如表达CD4、CD25的细胞、T细胞等。

[0235] 在一些实例中,移除或分离的细胞是所需的细胞,例如血液或骨髓中的细胞。在一个实例中,移除或分离的细胞是外周血单核细胞(PBMC)。例如,IR700-CD19特异性结合剂可用于从样品(例如血液样品)中分离或移除PBMC。将IR700-CD19特异性结合剂与样品在允许IR700-CD19特异性结合剂结合样品中的PBMC的条件下孵育,然后在允许得到的IR700-CD19特异性结合剂-PBMC复合物聚集的条件下用NIR光照射。收集所得的聚集体,从而分离PBMC。从样品中分离的PBMC在一些实例中被施用给接受移植的受试者。

[0236] 在一个实例中,移除或分离的细胞是人类干细胞(HSC)。HSC可以从脐带、血液和/或骨髓中移除或分离。例如,IR700-CD34特异性结合剂(例如来自abcam的目录号ab8158或来自Santa Cruz Biotechnolog的目录号sc 19587)和/或IR700-CD133特异性结合剂(例如

来自MyBioSource.com的目录号MBS856765)可以用于从样品(例如血液样品)中分离或移除HSC。在允许IR700-CD34特异性结合剂和/或IR700-CD133特异性结合剂结合样品中的HSC的条件下,将IR700-CD34特异性结合剂和/或IR700-CD133特异性结合剂与样品一起孵育,然后在允许所得IR700-CD34特异性结合剂-HSC和/或IR700-CD133特异性结合剂-HSC复合物聚集的条件下用NIR光照射。收集所得的聚集体,从而分离HSC。从样品中分离的HSC在一些实例中被施用给接受移植的受试者。在一些实例中,在移除或分离HSC之前,给供体受试者注射细胞因子,例如粒细胞集落刺激因子(G-CSF),以诱导细胞离开骨髓并在血管中循环。例如,可以在细胞收获前用G-CSF单独或与CXCR4抑制剂(例如,普乐沙福)结合注射供体。在一个实例中,将G-CSF(例如,10 μ g/kg)每日皮下施用于供体受试者持续四天,在第五天除了G-CSF以外,皮下施用CXCR4抑制剂(例如,普乐沙福)(例如,240 μ g/kg)。然后可以在第5天施用普乐沙福12小时后和最后一剂G-CSF 2小时后,通过白细胞除去法收集游离的外周血干细胞(PBSC)浓缩物。在另一个实例中,将G-CSF(例如,10 μ g/kg)每日皮下施用于供体受试者持续五天,然后在第5天通过白细胞分离法收集游离的PBSC浓缩物。PBSC表达CD34和/或CD133。在一个实例中,Bloan等人的方法用于获得PBM(Cr. J. Haematol. 120:801-7, 2003)。所得PBM样品可用于分离HSC。

[0237] 在一个实例中,使用从样品中消耗非HSC的方法,从而允许HSC的富集(即,阴性选择)。例如,IR700-分子缀合物(例如,包括用于CD2、CD3、CD11b、CD14、CD15、CD16、CD19、CD56、CD123和CD235a(血型糖蛋白A)的特异性结合剂的那些)可以用于显著减少B细胞、T细胞、天然杀伤细胞、树突状细胞、单核细胞、粒细胞和/或红血细胞的数目。在一个实例中,对不需要的细胞特异性的IR700-分子缀合物可以与样品一起孵育,使得IR700-分子缀合物结合不需要的细胞。然后在允许得到的IR700-分子-靶细胞复合物聚集的条件下用NIR光照射样品。收集所得的聚集体,从而移除不需要的细胞,并富集HSC。

[0238] 在一些实例中将从样品中分离的HSC施用给接受移植的受试者。在一些实例中,HSC从待治疗的相同受试者获得(自体的,供体和受体是同一人)。在其他实例中,HSC从与待治疗的受试者不同的受试者获得(同种异体,供体和受体是不同的个体,或同系基因,供体和受体是同卵双胎)。

[0239] 在一个实例中,使用从样品中消耗CD25表达细胞的方法,例如移除与移植排斥相关的细胞。因此,样品可以从接受移植的受试者中或者捐赠用于移植的器官的受试者中获得。例如,IR700-CD25特异性结合剂缀合物可用于显著减少样品中CD25表达细胞的数量,例如使用靶标IL-2R α 受体(CD25)的巴利昔单抗或达克珠单抗。在一个实例中,IR700-CD25特异性结合剂缀合物可以与样品一起孵育,允许IR700-CD25特异性结合剂缀合物与不需要的细胞结合。然后在允许所得IR700-CD25特异性结合剂-CD25细胞复合物聚集的条件下用NIR光照射样品。收集所得的聚集体,从而移除不需要的细胞。

[0240] 在一个实例中,从受试者(例如患有癌症的受试者)中移除(并在一些实例中杀死)肿瘤干细胞(CSC)。在一个实例中,CSC是膀胱CSC,并且IR700-分子的特异性结合剂识别以下的一种或多种(或使用多于一种IR700-分子缀合物):醛脱氢酶1-A1/ALDH1A1;CD47;CD44和CEACAM-6/CD66c。在一个实例中,CSC是乳腺CSC,并且IR700分子的特异性结合剂识别以下的一种或多种(或使用多于一种IR700-分子缀合物):醛脱氢酶1-A1/ALDH1A1、GLI-1、BMI-1、GLI-2、CD24、IL-1 α /IL-1F1、CD44、IL-6R α 、连接蛋白43/GJA1、CXCR1/IL-8RA、CXCR4、

整联蛋白 $\alpha 6$ /CD49f、DLL4、PON1、EpCAM/TROP1、PTEN和ErbB2/Her2。在一个实例中,CSC是结肠CSC,并且IR700分子的特异性结合剂识别以下的一种或多种(或使用多于一种IR700-分子缀合物):ALCAM/CD166、EpCAM/TROP1、醛脱氢酶1-A1/ALDH1A1、GLI-1、CD44、Lgr5/GPR49、DPPIV/CD26和Musashi-1。在一个实例中,CSC是胃CSC,并且IR700分子的特异性结合剂识别以下的一种或多种(或使用多于一种IR700-分子缀合物):CD44、Lgr5/GPR49和DLL4。在一个实例中,CSC是神经胶质瘤/髓母细胞瘤CSC,并且IR700分子的特异性结合剂识别以下的一种或多种(或使用多于一种IR700-分子缀合物):A20/TNFAIP3、IL-6R α 、ABCG2、整合蛋白 $\alpha 6$ /CD49f、醛脱氢酶1-A1/ALDH1A1、L1CAM、BMI-1、c-Maf、CD15/Lewis X、Musashi-1、CD44、c-Myc、CX3CL1/Fractalkine、巢蛋白、CX3CR1、Podoplanin、CXCR4、SOX2和HIF-2 α /EPAS1。在一个实例中,CSC是头与颈CSC,并且IR700分子的特异性结合剂识别以下的一种或多种(或使用多于一种IR700-分子缀合物):ABCG2、CD44、醛脱氢酶1-A1/ALDH1A1、HGFR/c-MET、BMI-1和Lgr5/GPR49。在一个实例中,CSC是白血病CSC,并且IR700分子的特异性结合剂识别以下的一种或多种(或使用多于一种IR700-分子缀合物):BMI-1、GLI-1、CD34、GLI-2、CD38、IL-3R α /CD123、CD44、MICL/CLEC12A、CD47、Musashi-2、CD96、TIM-3和CD117/c-kit。在一个实例中,CSC是肝CSC,并且IR700分子的特异性结合剂识别以下的一种或多种(或使用多于一种IR700-分子缀合物): α -甲胎蛋白(AFP)、CD90/Thy1、氨基肽酶N/CD13、NF2/Merlin和CD45。在一个实例中,CSC是肺CSC,并且IR700分子的特异性结合剂识别以下的一种或多种(或使用多于一种IR700-分子缀合物):ABCG2、CD117/c-kit、醛脱氢酶1-A1/ALDH1A1、EpCAM/TROP1和CD90/Thy1。在一个实例中,CSC是黑素瘤CSC,并且IR700分子的特异性结合剂识别以下的一种或多种(或使用多于一种IR700-分子缀合物):ABCB5、MS4A1/CD20、ABCG2、巢蛋白、ALCAM/CD166和NGF R/TNFRSF16。在一个实例中,CSC是骨髓瘤CSC,并且IR700分子的特异性结合剂识别以下的一种或多种(或使用多于一种IR700-分子缀合物):ABCB5、CD38、CD19、MS4A1/CD20、CD27/TNFRSF7和粘蛋白聚糖-1/CD138。在一个实例中,CSC是骨肉瘤CSC,并且IR700分子的特异性结合剂识别以下的一种或多种(或使用多于一种IR700-分子缀合物):ABCG2、巢蛋白、CD44、STRO-1和内皮糖蛋白/CD105。在一个实例中,CSC是卵巢CSC,并且IR700分子的特异性结合剂识别以下的一种或多种(或使用多于一种IR700-分子缀合物): α -甲基酰基-CoA消旋酶/AMACR、CD117/c-kit、CD44、内皮糖蛋白/CD105。在一个实例中,CSC是胰腺CSC,并且IR700分子的特异性结合剂识别以下的一种或多种(或使用多于一种IR700-分子缀合物):醛脱氢酶1-A1/ALDH1A1、CXCR4、BMI-1、EpCAM/TROP1、CD24、PON1和CD44。在一个实例中,CSC是前列腺CSC,并且IR700-分子的特异性结合剂识别以下的一种或多种(或使用多于一种IR700-分子缀合物):ABCG2、CD44、ALCAM/CD166、CD151、醛脱氢酶1-A1/ALDH1A1、c-Maf、 α -甲基酰基-CoA消旋酶/AMACR、c-Myc、BMI-1和TRA-1-60。

[0241] 药理学药物

[0242] 在一些实例中,靶标是其药代动力学被控制的药物。例如,药物可以是具有期望的治疗效果,但其在体内长期存在可能是不期望的药理学药物(例如处方药物或可从药房获得的药物)。所公开的方法和IR700-药物缀合物允许在期望的时间量之后(例如在药物已经具有其期望的治疗效果之后)从体内移除缀合的药剂。例如,IR700-药物缀合物可以以有效量施用于受试者,持续足以使药物具有其所需效果的时间。然后在允许IR700-药物复合物聚集的条件下用NIR光照射受试者。所得聚集体被身体例如通过肝脏移除或降解,从而从身

体移除药物(或使其失活)。在一些实例中,受试者接受多轮施用IR700-药物缀合物,然后暴露于NIR光,例如至少2轮、至少3轮、至少4轮、至少5轮、至少6轮、至少7轮、至少8轮、至少9轮、至少10轮或至少20轮或更多轮这样的治疗。

[0243] 可以与IR700缀合并用于所公开的方法(其以有效量施用)的示例性药物包括但不限于:抗肿瘤化学治疗剂、抗生素、烷化剂和抗氧化剂、激酶抑制剂和其它药剂。其它实例包括微管结合剂、DNA嵌入剂或交联剂、DNA合成抑制剂、DNA和/或RNA转录抑制剂、抗体、酶、酶抑制剂和基因调节剂。这样的试剂是本领域中已知的。示例性的化学治疗剂描述于Slapak和Kufe,Principles of Cancer Therapy,Harrison's Principles of Internal Medicine中的第86章,第14版;Perry et al.,Chemotherapy,Abeloff,Clinical Oncology中的第17章,第2版,2000Churchill Livingstone,Inc;Baltzer和Berkery(编者):Oncology Pocket Guide to Chemotherapy,第2版,St.Louis,Mosby-Year Book,1995;以及Fischer Knobf和Durivage(编者):The Cancer Chemotherapy Handbook,第4版,St.Louis,Mosby-Year Book,1993)。

[0244] “微管结合剂”是指与微管蛋白相互作用以稳定或去稳定微管形成,从而抑制细胞分裂的试剂。可以与本文提供的方法联合使用的微管结合剂的实例包括但不限于:紫杉醇、多西紫杉醇、长春碱、长春地辛、长春瑞滨(诺维本)、埃博霉素、秋水仙碱、多拉司他汀15、诺考达唑、鬼臼毒素和根霉素。也可以使用此类化合物的类似物和衍生物,并且是本领域普通技术人员已知的。例如,合适的埃博霉素和埃博霉素类似物描述于国际公开号WO 2004/018478中。可以使用紫杉类,例如紫杉醇和多西紫杉醇,以及紫杉醇的类似物,如美国专利号6,610,860;5,530,020;和5,912,264所教导的。

[0245] 以下类别的化合物可以与IR700缀合并与本文公开的方法一起使用:DNA和/或RNA转录调节剂,包括但不限于放线菌素D、柔红霉素、多柔比星及其衍生物和类似物。可以使用的DNA嵌入剂和交联剂包括但不限于顺铂、卡铂、奥沙利铂、丝裂霉素(例如丝裂霉素C)、博来霉素、苯丁酸氮芥、环磷酰胺及其衍生物和类似物。适合使用的DNA合成抑制剂包括但不限于甲氨蝶呤、5-氟-5'-脱氧尿苷、5-氟尿嘧啶及其类似物。合适的酶抑制剂的实例包括但不限于喜树碱、依托泊苷、福美坦、曲古抑菌素及其衍生物和类似物。影响基因调节的合适的化合物包括导致一种或多种基因的表达增加或降低的试剂,例如雷洛昔芬、5-氮杂胞苷、5-氮杂-2'-脱氧胞苷、他莫昔芬、4-羟三苯氧胺、米非司酮及其衍生物和类似物。激酶抑制剂包括防止生长因子的磷酸化和活化的格列卫、易瑞沙和塔西法。

[0246] 在一个实例中,化疗药物是表柔比星、拓扑替康、伊立替康、吉西他滨、iazofurine、伐司朴达、米托蒽醌或盐酸多柔比星脂质体(脂质体包封的多柔比星)。在一个实例中,药物是阿霉素、芹菜素、泽布拉恩、西咪替丁、茶碱或其衍生物或类似物。

[0247] 在一个实例中,药物是生物制剂(例如mAb)或小分子,例如下表中所示的那些:

[0248]

肿瘤特异性抗原	示例性肿瘤	示例性抗体/小分子
HER1	腺癌（例如，结直肠癌、头颈癌）	西妥昔单抗、帕尼单抗、扎芦木单抗、尼妥珠单抗、马妥珠单抗。也可以使用小分子抑制剂吉非替尼、厄洛替尼和拉帕替尼。
HER2	乳腺癌、卵巢癌、胃癌、子宫癌	曲妥珠单抗（Herceptin®）、帕妥珠单抗
CD20	非霍奇金淋巴瘤	托西莫单抗（Bexxar®）；利妥昔单抗（Rituxan, Mabthera）；或替伊莫单抗（Zevalin, 例如与钇-90 或铟-111 疗法结合）
CD25	T 细胞淋巴瘤	达克珠单抗（赛尼哌）
CD33	急性骨髓性白血病	吉妥珠单抗（麦罗塔，例如与加利霉素疗法结合）
CD52	慢性淋巴细胞白血病	阿仑珠单抗（Campath）

[0249]

CEA	结直肠癌、一些胃癌、胆癌	CEA 扫描 (Fab 片段, 由 FDA 批准), 结肠 101
癌抗原 125 (CA125)	卵巢癌、间皮瘤、乳腺癌	OC125 单克隆抗体
α -甲胎蛋白 (AFP)	肝细胞癌	ab75705（可从 Abcam 获得）和其它市售的 AFP 抗体
Lewis Y	结直肠癌、胆癌	B3（人源化）
TAG72	腺癌包括结直肠癌、胰腺癌、胃癌、卵巢癌、子宫内膜癌、乳腺癌和非小细胞肺癌	B72.3（FDA 批准的单克隆抗体）
血管内皮生长因子	结直肠癌	贝伐珠单抗（Avastin®）

[0250] 在一个实例中, 药物是用于治疗类风湿性关节炎的生物制剂 (例如 mAb) 或小分子,

例如托珠单抗或利妥昔单抗。

[0251] 在一个实例中,药物是以下的一种或多种:抗生素(例如青霉素、氨苄青霉素、甲硝唑、四环素、氯霉素、妥布霉素、环丙沙星等),抗高血压药物(例如噻嗪利尿剂、ACE抑制剂、钙通道阻滞剂、 β 阻断剂和血管紧张素II受体拮抗剂),抗抑郁药(例如,选择性5-羟色胺再摄取抑制剂(SSRI)、5-羟色胺-去甲肾上腺素再摄取抑制剂(SNRI)、三环抗抑郁药(TCA)、单胺氧化酶抑制剂(MAOI)、丁丙诺啡、色氨酸、抗精神病药和圣约翰草,例如百忧解),镇痛药(例如对乙酰氨基酚、非甾体抗炎药(NSAID)、COX-2抑制剂和阿片类药物(例如吗啡、可待因和羟考酮)),生殖激素(例如雌激素、睾酮和孕酮),血液稀释剂(例如华法林),类固醇(例如泼尼松),降低胆固醇的染色剂(例如美降脂、舒降之、普拉固),免疫抑制剂(例如雷帕霉素、环孢菌素和甲氨蝶呤、硫唑嘌呤、利妥昔单抗或类固醇)或细胞因子(例如GM-CSF)和其它处方药。

[0252] 示例性特异性结合剂

[0253] IR700-分子复合物中的分子可以是允许特异性结合剂和靶标试剂之间的选择性结合的特异性结合剂。特异性结合剂是本领域中已知的,并且非限制性实例提供如下。例如,IR700-分子缀合物可以是IR700-抗体缀合物、IR700-抗体片段缀合物、**IR700- Affibody®**分子缀合物、IR700-半抗原缀合物、IR700-凝集素缀合物、IR700-蛋白缀合物、IR700-核酸分子缀合物或IR700-功能性核酸缀合物,其中抗体、抗体片段、**Affibody®**分子、半抗原、凝集素、蛋白、核酸分子和功能性核酸可以特异性结合至靶标分子。市售的特异性结合剂及其产生的已知方法允许制备任何IR700特异性结合剂复合物。例如,抗体(及其功能片段)、DNA酶和适体可用于许多试剂,例如蛋白(例如细胞因子、癌抗原等)、金属、小有机化合物和核酸分子。另外,制备对特定靶标特异性的抗体、功能性核酸和核酸分子的方法是本领域熟知的。

[0254] 将特异性结合剂连接至IR700的方法是常规的。例如,通过使用IR700的NHS酯可将IR700缀合至蛋白(如抗体)。此外,通过使用连接基化学例如补骨脂素官能化的IR700或点击化学可将IR700缀合至核酸(例如功能性核酸)。

[0255] 抗体和抗体片段

[0256] 对各种分子特异性的抗体和抗体片段是本领域熟知的。因此,在一些实例中,IR700-分子复合物中的分子是抗体或其片段,允许抗体或抗体片段与靶标(例如靶标蛋白)之间的特异性结合。可用于本文提供的方法中的抗体包括完整免疫球蛋白、变体免疫球蛋白,以及抗体的部分,例如天然存在的抗体或重组抗体的抗原结合片段。

[0257] 通常,天然存在的免疫球蛋白具有通过二硫键互联的重(H)链和轻(L)链。有两种类型的轻链,兰布达(λ)和卡帕(κ)。有五种主要的重链类型(或同种型),其确定以下抗体分子的功能活性:IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。

[0258] 每条重链和轻链含有恒定区和可变区,(这些区域也称为“结构域”)。总之,重链和轻链可变区特异性结合抗原。轻链和重链可变区含有被三个高变区(也称为“互补决定区”或“CDR”)中断的“框架”区。已经定义了框架区和CDR的范围(参见,Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest,U.S.Department of Health and Human Services,1991,其通过引用并入本文中)。Kabat数据库现在保持在线。不同轻链或重链的框架区的序列在物种(例如人)内相对保守。抗体的构架区,即构成轻链和重链的组

合框架区,用于在三维空间中定位和排列CDR。

[0259] CDR主要负责结合至抗原的表位。每条链的CDR通常称为CDR1、CDR2和CDR3,从N末端开始顺序编号,并且通常还由特定CDR所在的链来鉴定。因此,VH CDR3位于发现其的抗体的重链的可变结构域中,而VL CDR1是来自发现其的抗体的轻链的可变结构域的CDR1。具有不同特异性(即不同抗原的不同结合位点)的抗体具有不同的CDR。尽管CDR是随抗体而变化的,但是CDR内仅有限数目的氨基酸位点直接参与抗原结合。CDR内的这些位点称为特异性决定残基(SDR)。

[0260] 提及“VH”或“VH”是指免疫球蛋白重链的可变区,包括Fv、scFv、dsFv或Fab的可变区。提及“VL”或“VL”是指免疫球蛋白轻链的可变区,包括Fv、scFv、dsFv或Fab的可变区。

[0261] 涵盖在术语抗体内的结合片段的特定的非限制性实例包括Fab片段、Fab'片段、F(ab)'₂片段、单链Fv蛋白(“scFv”)和二硫键稳定的Fv蛋白(“dsFv”)。scFv蛋白是其中免疫球蛋白的轻链可变区和免疫球蛋白的重链可变区通过连接基结合的融合蛋白,而在dsFv中,链已经突变以引入二硫键以稳定链的结合。

[0262] 在一个实例中,Ab是遗传工程化Ab,例如嵌合抗体(例如人源化鼠抗体)、异源缀合抗体(例如双特异性抗体)。也参见Pierce Catalog and Handbook,1994-1995(Pierce Chemical Co.,Rockford,IL);Kuby,J.,Immunology,第3版,W.H.Freeman&Co.,New York,1997。嵌合抗体具有来自一个物种(例如人类)的框架残基和来自另一个物种的CDR(其通常赋予抗原结合),例如特异性结合人EGFR的鼠抗体。

[0263] 在一个实例中,Ab是人源化Ab或人源化免疫球蛋白。人源化免疫球蛋白是包括人框架区和一个或多个来自非人(例如小鼠、大鼠或综合的)免疫球蛋白的CDR的免疫球蛋白。提供CDR的非人免疫球蛋白称为“供体”,提供框架的人免疫球蛋白称为“受体”。在一个实施方案中,所有CDR来自人源化免疫球蛋白中的供体免疫球蛋白。恒定区不需要存在,但是如果它们存在,它们必须与人免疫球蛋白恒定区基本相同,即至少约85-90%,例如约95%或更多相同。因此,除了可能的CDR外,人源化免疫球蛋白的所有部分与天然人免疫球蛋白序列的相应部分基本相同。人源化抗体是包含人源化轻链和人源化重链免疫球蛋白的抗体。人源化抗体与提供CDR的供体抗体结合相同的抗原。人源化免疫球蛋白或抗体的受体构架可以具有被取自供体构架的氨基酸的有限数目的取代。人源化或其他单克隆抗体可具有对抗原结合或其它免疫球蛋白功能基本上没有影响的另外的保守性氨基酸取代。人源化免疫球蛋白可以通过遗传工程的方法构建(参见例如,美国专利5,585,089)。

[0264] 在一个实例中,Ab是人抗体(也称为全人抗体),其包括人构架区和来自人免疫球蛋白的所有CDR。在一个实例中,框架和CDR来自相同的起始人重链和/或轻链氨基酸序列。然而,来自一种人抗体的构架可以被工程化以包括来自不同人抗体的CDR。人免疫球蛋白的所有部分与天然人免疫球蛋白序列的相应部分基本相同。

[0265] 在一个实例中,Ab是单克隆抗体(mAb)。mAb是由B淋巴细胞的单一克隆或由其中已经转染了单个抗体的轻链和重链基因的细胞产生的抗体。mAb通过本领域技术人员已知的方法产生,例如通过从骨髓瘤细胞与免疫脾细胞的融合体制备杂交抗体形成细胞。mAb包括人源化mAb。

[0266] 如本文所用,术语抗体还包括由在细胞中编码一个或多个抗体链的核酸的表达产生的重组抗体(例如参见美国专利号4,745,055;美国专利号4,444,487;WO 88/03565;EP

256,654;EP 120,694;EP 125,023;Faoulkner et al.,Nature 298:286,1982;Morrison, J.Immunol.123:793,1979;Morrison et al.,Ann Rev.Immunol.2:239,1984)。

[0267] 在具体实例中,抗体是用于治疗癌症的生物制剂,例如肿瘤蛋白特异性性的抗体。例如,可以使用以下缀合物:IR700-帕尼单抗缀合物、IR700-曲妥珠单抗缀合物、IR700-缀合物缀合物、IR700-赛尼哌缀合物、IR700-Simitect缀合物、IR700-J591缀合物或IR700-西妥昔单抗缀合物。

[0268] **Affibody®**分子

[0269] 对各种靶标特异性的 **Affibody®**分子是本领域中公知的(例如,来自Affibody、Sona、Sweden)。因此,在一些实例中,IR700-分子复合物中的分子是 **Affibody®**分子,允许 **Affibody®**分子和靶标(例如靶标蛋白)之间的特异性结合。**Affibody®**分子是约6kDa的小蛋白抗体模拟物。在一些实例中, **Affibody®**分子由具有58个氨基酸的三个 α 螺旋组成。相比之下,mAb为约150kDa,单结构域抗体为约12-15kDa。具有独特结合特性的 **Affibody®**分子通常由位于参与亲本蛋白结构域的结合活性的两个 α -螺旋中的13个氨基酸的随机化产生。在一些实例中,结合表面外部的氨基酸在支架中被取代以产生完全不同于原始蛋白A结构域的表面。使用噬菌体展示,结合靶标蛋白的特异性 **Affibody®**分子可从含有数十亿种不同变体的池(库)中被“淘汰”。

[0270] 半抗原

[0271] 半抗原是通常仅当连接到更大载体(例如蛋白)时才能引发免疫应答的小分子。半抗原在本领域中称为不完全抗原或部分抗原。但是因为它们如同抗体可以结合靶标分子,在一些实例中,IR700-分子复合物中的分子是半抗原,其允许半抗原和靶标(例如靶标蛋白)之间的特异性结合。

[0272] 凝集素

[0273] 在一个实例中,特异性结合剂是凝集素。凝集素是识别并结合特定碳水化合物(例如在细胞表面上)的蛋白。因此,在一些实例中,IR700-分子复合物中的分子是凝集素,其允许凝集素和靶标碳水化合物之间的特异性结合。凝集素可以被修饰以包括允许与IR700缀合/连接的蛋白或肽延伸。

[0274] 凝集素存在于动物、植物和微生物中,具体实例是本领域中已知的。例如,如下所示,植物凝集素麦胚凝集素、花生凝集素和植物凝集素识别不同的寡糖。



结合麦胚凝集素

结合花生凝集素

结合植物凝集素

[0276] 可用于移除特定碳水化合物的示例性凝集素包括但不限于:伴刀豆球蛋白A、扁豆凝集素、雪花莲凝集素(均结合甘露糖);蓖麻毒素、花生凝集素、榴莲凝素(jacalin)和毛叶苕子凝集素(均结合半乳糖);小麦胚芽凝集素(其结合N-乙酰氨基葡萄糖);接骨木果凝集素、怀槐血凝素(均结合N-乙酰神经氨酸);和荆豆凝集素和橙黄网胞盘菌凝集素(均结合岩藻糖)。

[0277] 蛋白

[0278] 在一个实例中,特异性结合剂是蛋白。可以使用识别并结合特定蛋白、核酸分子和其他结合配偶体的蛋白。例如,蛋白配体可以用于结合在细胞表面上的特异性受体蛋白。因此,在一些实例中,IR700-分子复合物中的分子是蛋白,其允许蛋白与靶标蛋白、核酸分子或其他结合分子之间的特异性结合,并移除与蛋白结合分子(例如与蛋白形成共价键的分子)。

[0279] 蛋白-蛋白相互作用是本领域中公知的,并且包括参与信号转导、细胞运输、肌肉功能(肌动蛋白/肌球蛋白)的那些。此外,蛋白-核酸分子相互作用是本领域中公知的,并且包括控制核酸分子(DNA或RNA)的结构和功能的那些,例如转录、翻译、DNA复制、修复和重组以及RNA处理和易位。

[0280] 核酸分子

[0281] 在一个实例中,特异性结合剂是核酸分子。可以使用识别并结合特定蛋白、核酸分子(通过杂交)和其他结合配偶体的核酸分子。例如,与靶标核酸分子具有足够互补性的核酸分子可以与互补序列杂交并移除互补序列。因此,在一些实例中,IR700-分子复合物中的分子是核酸分子,其允许核酸分子与靶标蛋白、核酸分子或其它结合分子之间的特异性结合,并移除结合核酸分子的分子。

[0282] 在一个实例中,靶标是核酸分子,并且IR700-分子缀合物包括具有足以允许两个核酸分子之间杂交的互补性(序列同一性)的序列的核酸分子。例如,核酸分子可以具有与至少部分的靶标核酸分子至少80%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性,例如这种水平的序列同一性超过靶标的至少30个连续核苷酸,至少40个、至少50个、至少75个、至少100个、至少500个、至少1000个或至少10000个标靶的连续核苷酸或更多。

[0283] 此外,蛋白-核酸分子相互作用是本领域中公知的,并且包括控制核酸分子(DNA或RNA)的结构和功能的那些,例如转录、翻译、DNA复制、修复和重组以及RNA处理和易位。

[0284] 功能性核酸(FNA)

[0285] 在一个实例中,特异性结合剂是功能性核酸分子(FNA)(Liu et al., Chem.Rev.2009,109,1948-1998)。FNA,包括DNA酶和DNA适体,是以高的亲和力和特异性识别并结合各式各样的靶标的核酸分子(例如,DNA或RNA)。因此,在一些实例中,IR700-分子复合物中的分子是FNA,其允许FNA和靶标之间的特异性结合,并且移除结合FNA的靶标。

[0286] 可以被修饰或适于在本文提供的方法和IR700-分子缀合物中使用的FNA序列是本领域中已知的(例如,参见US 8,058,415)。FNA的一个实例是催化性核酸。催化性活性核酸可以是催化性DNA/RNA,也称为DNA酶/RNA酶、脱氧核酶/核酶、DNA酶/RNA酶。催化性活性核酸也可以含有修饰的核酸。适体酶、RNA核酶和DNA核酶在通过经历化学反应(例如,断裂FNA的底物链)而结合分析物时变得反应性。在每种情况下,反应性多核苷酸变得反应性的结果是引起聚集体的解聚和至少一种寡核苷酸的释放。FNA的其它实例是适体,其在结合靶标时经历构象变化。适体在通过经历构象变化而结合分析物时变得反应性。

[0287] FNA可以通过称为体外筛选或通过指数富集配体系统进化(SELEX)的方法从具有~1015个随机序列的DNA库(通常2~25kDa)中选择。DNA核酶和适体分别对各种靶标显示出特异性催化活性和强的结合亲和力。靶标可以从金属离子和小的有机分子到生物分

子,甚至病毒或细胞而变化。

[0288] 鉴定对特定靶标试剂具有特异性的FNA的方法是本领域中常规的,并已在几个专利中描述。例如,美国专利号7,192,708;7,332,283;7,485,419;7,534,560;和7,612,185,以及美国专利公开号20070037171和20060094026,描述了鉴定能够结合特定离子(例如铅和钴)的功能性DNA分子的方法。另外,提供了具体的实例。虽然一些实例描述了具有荧光团的功能DNA分子,但是这样的标记不是本文所述的方法所需要的。

[0289] 适体是以高亲和力和特异性识别靶标的单链(ss)核酸(例如DNA或RNA),在存在其靶标的情况下其会经历构象变化。例如,可卡因适体结合作为其对应靶标的可卡因。因此,适体可以用作特异性结合剂。体外选择方法可用于获得多种靶标分子的具有特别高亲和力,具有高达皮摩尔范围内的解离常数的适体(Brody and Gold,J.Biotechnol.74:5-13,2000;Jayasena,Clin.Chem.,45:1628-1650,1999;Wilson and Szostak,Annu.Rev.Biochem.68:611-647,1999)。例如,已经开发出适体来识别金属离子,例如Zn(II)(Ciesiolka et al.,RNA 1:538-550,1995)和Ni(II)(Hofmann et al.,RNA,3:1289-1300,1997);核苷酸例如三磷酸腺苷(ATP)(Huizenga and Szostak,Biochemistry,34:656-665,1995);和鸟嘌呤(Kiga et al.,Nucleic Acids Research,26:1755-60,1998);辅因子例如NAD(Kiga et al.,Nucleic Acids Research,26:1755-60,1998)和黄素(Lauhon and Szostak,J.Am.Chem.Soc.,117:1246-57,1995);抗生素例如紫霉素(Wallis et al.,Chem.Biol.4:357-366,1997)和链霉素(Wallace and Schroeder,RNA 4:112-123,1998);蛋白例如HIV逆转录酶(Chaloin et al.,Nucleic Acids Research,30:4001-8,2002)和丙型肝炎病毒RNA依赖性RNA聚合酶(Biroccio et al.,J.Virol.76:3688-96,2002);毒素例如霍乱全毒素和葡萄球菌肠毒素B(Bruno and Kiel,BioTechniques,32:第178-180和182-183页,2002);和细菌孢子例如炭疽(Bruno and Kiel,Biosensors&Bioelectronics,14:457-464,1999)。与抗体相比,基于DNA/RNA的适体更容易获得并且生产成本更低,因为它们可以在短时间(数天对比数月)内在体外获得并且具有有限的成本。此外,DNA/RNA适体可以变性和复性多次而不丧失其生物识别能力。

[0290] DNA/RNA酶通常含有识别靶标(并且可以包括RNA碱基)的底物链,以及催化结构域或酶结构域。在一些实例中,辅因子(例如金属离子)催化底物断裂。例如,铅DNA酶结合作为其对应靶标的铅。因此,DNA/RNA酶可以用作特异性结合剂。适体酶是适体和DNA酶或核酶的组合物。当靶标结合至触发DNA酶/核酶活性或抑制DNA酶/核酶活性的适体时,适体酶起作用。因此,适体酶可用作特异性结合剂。

[0291] 实施例1

[0292] IR染料700缀合的曲妥珠单抗(抗Her2)的合成

[0293] 本实施例描述了用于将单克隆抗体曲妥珠单抗与IR染料700DXNHS酯缀合的方法。本领域技术人员将认识到,任何抗体(例如对靶细胞表面蛋白具有特异性的任何单克隆抗体)均可以使用类似的方法缀合至IR染料700DX NHS酯。

[0294] 将人源化抗HER2抗体曲妥珠单抗(Tra;Genentech,旧金山,CA)(1mg,6.8nmol)与IR染料700DX NHS酯(IR700;LI-COR Bioscience,Lincoln,NE)(66.8μg,34.2nmol,5mmol/L的DMSO溶液)在0.1mol/LNa₂HPO₄(pH 8.5)中在室温下孵育30至120min。曲妥珠单抗是针对人表皮生长因子受体(EGFR)2(HER2)酪氨酸激酶受体的细胞外结构域的重组人源化单克隆

抗体 (mAb)。将混合物用Sephadex G50柱 (PD-10; GE Healthcare, Piscataway, NJ) 纯化。通过用UV-Vis系统 (8453 Value System; Agilent Technologies, Palo Alto, CA) 测量595nm处的吸收来用Coomassie Plus蛋白测定试剂盒 (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) 测定蛋白浓度。使用UV-Vis系统通过吸收来测量IR700的浓度, 以确认与每个曲妥珠单抗分子缀合的荧光团分子的数目。每个曲妥珠单抗的IR700数量约为3。

[0295] 通过分析型分子筛HPLC (SE-HPLC) 和十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 确认了Tra-IR700缀合物的纯度。使用配备有模型126溶剂递送模块、模型168UV检测器和由32Karat软件控制的JASCO荧光检测器 (在689nm处激发和在700nm处发射) 的Beckman System Gold (Fullerton, CA) 进行SE-HPLC。在使用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 以0.5mL/min洗脱45分钟的TSKgel G2000SWx1 (Tosoh Bioscience LLC, Montgomeryville, PA) 上进行SE层析。用4%至20%梯度的聚丙烯酰胺凝胶 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 进行SDS-PAGE。刚分离蛋白后, 用Fujifilm FLA-5100荧光扫描仪 (Valhalla, NY) 分析荧光强度, 其具有用于激发的670nm内部激光器和用于发射的705nm长通滤波器。使用Multigage软件 (Fujifilm) 分析每个条带的荧光强度。然后将凝胶用Colloidal Blue Staining Kit (Invitrogen) 染色, 并数字扫描。使用ImageJ软件分析每个条带中的蛋白浓度。曲妥珠单抗-IR700 (Tra-IR700) 和帕尼单抗-IR700 (Pan-IR700; 参见实施例8) 制剂表现出强缔合并且不含可检测的MAb聚集体, 如通过高效液相色谱 (HPLC) 和十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳SDS-PAGE所测定的。

[0296] 为了确定IR700缀合物的体外结合特征, 使用Indo-Gen程序进行缀合物的¹²⁵I标记。放射性标记的抗体的特异活性 (specific activity) 是8.52mCi/mg (曲妥珠单抗), 和7.84mCi/mg (帕尼单抗) (参见下文的实施例8)。观察到分别使用每种MAb缀合物实现了73.38±0.39% (¹²⁵I-Tra-IR700) 和78.61±0.89% (¹²⁵I-Pan-IR700) 的结合, 并且通过用过量的天然未缀合的MAb (小于1.4%) 进行的阻断证实了结合的特异性。由于用相同方法测量的¹²⁵I-Tra和¹²⁵I-Pan的免疫反应性分别为78±2%和82±3%, 因此证实了与IR700缀合的MAb的最小损失。如前所述进行免疫反应性测定。简言之, 在胰蛋白酶消化后, 将2×10⁶个3T3/HER2或A431细胞重悬于含有1%牛血清白蛋白 (BSA) 的PBS中。加入¹²⁵I-Tra-IR700或¹²⁵I-Pan-IR700 (1mCi, 0.2μg), 并在冰上孵育1小时。洗涤细胞, 沉淀, 倒出上清液, 并在2470 Wizard² γ-计数器 (Perkin Elmer, Shelton, CT) 中计数。在抗体过量 (200μg未标记的曲妥珠单抗或帕尼单抗) 的条件下检查与细胞的非特异性结合。

[0297] 实施例2

[0298] IR染料700缀合的 **Vectibix®** (抗HER1) 的合成

[0299] 帕尼单抗 (**Vectibix®**)——一种针对人EGFR的完全人源化IgG2Mab, 是购自Amgen (Thousand Oaks, CA), 并使用实施例1中所述的方法与IR700缀合。该化合物称为帕尼单抗-IR700或Pan-IR700。每个帕尼单抗的IR700的数量约为3。

[0300] 实施例3

[0301] IR染料700缀合的HuJ591的合成

[0302] J591——一种针对人PSMA的完全人源化IgG2 Mab, 是从Cornell Univ的Neil Bander教授处获得并使用实施例1中所述的方法与IR700缀合。该化合物称为J591-IR700。每个J591的IR700的数量约为2。

[0303] 实施例4

[0304] IR染料700缀合的西妥昔单抗的合成

[0305] 西妥昔单抗(**Erbix[®]**)——一种针对人EGFR的嵌合(小鼠/人) Mab,是购自Bristol-Myers Squibb(Princeton,NJ),并使用实施例1中所述的方法与IR700缀合。该化合物称为西妥昔单抗-IR700或Cet-IR700。每个西妥昔单抗的IR700的数量约为3。

[0306] 实施例5

[0307] 暴露于NIR后IR700的断裂

[0308] 如实施例2中所述的生成Pan-IR700。将Pan-IR700 (2 μ g) 悬浮于PBS中,并使用LED或激光器将其暴露于2、4、8或16J/cm²的NIR光(对于LED为690nm $\pm$ 20nm;对于激光器为690nm $\pm$ 4nm)。将所得溶液在4-20%聚丙烯酰胺凝胶上电泳,用考马斯亮蓝染色并用光或荧光在700nm下显影。一些样品未暴露于NIR光。

[0309] 在图4中下图的考马斯凝胶示出了在暴露于NIR光(LED或激光)之后,Pan IR700(蓝色条带)被分解或断裂。类似地,上图的凝胶中的模糊条带表明Pan IR700断裂。上图的凝胶表明因为激光发射光的更有效的吸收,激光比具有相同光剂量的LED效果更好,这表明吸收的光以剂量依赖的方式诱导该光化学反应。

[0310] 断裂的Pan-IR700复合物的这种聚集可以从溶液中沉降,使得可以从溶液中移除Pan-IR700复合物结合的任何分子。

[0311] 实施例6

[0312] IR700在暴露于NIR后不会失去荧光

[0313] 将IR700 (0.5 μ M) 悬浮于DMF或PBS中,并用激光将其暴露于2、4、8或16J/cm²的NIR光(690nm $\pm$ 4)。将所得溶液在700nm处用荧光显影(在微量离心管中)。一些样品未暴露于NIR光。

[0314] 如图5所示,即使在暴露于强NIR光之后,IR700仍然是发荧光的。因此,即使在暴露于NIR光后释放明显的降解产物,IR700也不会发生光漂白(photobleach)。

[0315] 实施例7

[0316] IR700可以在没有氧气的情况下被NIR断裂

[0317] 如实施例2中所述的生成Pan-IR700。将Pan-IR700 (2 μ g) 悬浮于PBS中并使用LED或激光器将其暴露于0、8或16J/cm²的NIR光(对于LED为690nm $\pm$ 20nm;对于激光为690nm $\pm$ 4nm)。一些实例含有NaN₃(叠氮化钠)、活性氧清除剂或不含氧(使用氩气闪蒸20分钟)。将所得溶液在SCS-PAGE凝胶上电泳,用考马斯亮蓝染色,并用光或荧光在700nm下显影。一些样品未暴露于NIR光。

[0318] 如图6所示,在前三个泳道(无NIR)中观察到了强的Pan IR700条带。泳道4-6是8J/cm²的NIR,并且即使没有氧(O₂-)也显示了模糊的Pan-IR700条带。这也在16J/cm²的NIR的泳道7-9中观察到。因此,IR700的断裂发生在正常氧(无处理)下、使用ROS清除剂(NaN₃)时和在缺氧条件下,表明该过程是不依赖氧的。

[0319] 实施例8

[0320] 氧饱和可以减少由NIR导致的IR700的断裂

[0321] 如实施例2中所述的生成Pan-IR700。将Pan-IR700 (2 μ g) 悬浮于PBS中并使用LED或激光器将其暴露于0、4、8或16J/cm²的NIR光(对于LED为690nm $\pm$ 20nm;对于激光为690nm

+/-4nm)。一些实例含有过量的氧(使用100%氧气闪蒸20分钟)。将所得溶液在4-20% SDS-PAGE凝胶上电泳,用考马斯亮蓝染色,并用光或荧光在700nm下显影。一些样品未暴露于NIR光。

[0322] 如图6中所示,过量氧(100%)的存在导致较少的Pan1R700的降解,表明在存在NIR的情况下,氧饱和会减少或抑制IR700的断裂。凝胶上显示不同的级别和窗口设置,以更好地显示聚集的量。使用100%的O₂时,聚集形成的效率更低,证实了图1和2中所示的化学反应。

[0323] 实施例9

[0324] 断裂的IR700的体内运输

[0325] 如实施例2中所述的生成¹¹¹In-DTPA-IR700-Pan,除了将SCN-Bz-PTPA与Pan-IR700缀合。将SCN-Bz-DTPA溶解于在pH 8.5的Pan-IR700的硼酸盐缓冲液中。通过使用G25凝胶的凝胶过滤进行纯化。

[0326] 将¹¹¹In-DTPA-IR700-Pan离体暴露于NIR光(注射前,激光)或者在注射后在体内暴露于NIR光(暴露大部分腹部(abdomen)、腹部(belly))。将¹¹¹In-DTPA-IR700-Pan(100μg/小鼠)注射到携带A431的小鼠中。在NIR暴露的¹¹¹In-DTPA-IR700-Pan的给药或腹部暴露于NIR后1小时后,如下文所述收集并且分析器官。处死小鼠并解剖以分开所有主要器官。收集器官,称重并用γ计数器(Wizard 2')计数以定量器官中的放射性。

[0327] 如图8所示,在离体暴露于NIR光(注射前)或在体内暴露于NIR光(暴露大部分腹部)后,¹¹¹In-D聚集体TPA-IR700-Pan重定向至肝脏和脾脏。这表明在网状内皮系统中聚集体形成并由巨噬细胞捕获。在不存在NIR的情况下,断裂的缀合物在肝脏中积累。然而,在NIR暴露后,肝脏中断裂的缀合物的量显著增加,即使NIR被递送到小鼠的腹部(不是肿瘤的位置)。在脾脏中观察到相同的情况。这与由肝脏和脾脏摄取的Pan-IR700的聚集一致,表明光疗法后复合物的疏水性增加。

[0328] 因此,IR700与药物或特异性结合剂的缀合可用于通过将药物或特异性结合剂清除至肝脏和脾脏来控制药物的或特异性结合剂的药代动力学。这样的方法可用于从身体中“清除”或“追踪”药物或特异性结合剂,例如以避免毒性,或者实际上“将其关闭”。这样的方法也可以用于通过将药物或特异性结合剂清除到肝脏和脾脏来从身体中移除结合药物或特异性结合剂的试剂。

[0329] 实施例10

[0330] 在存在或不存在NIR(16J/cm²,690nm激光)照射的情况下,将帕尼单抗-IR700与可溶性EGFR以4:1的摩尔比混合。如图9所示,EGFR分子在NIR后与抗体聚集,因此可以被从溶液中消除(通过SDS-PAGE确认)。一旦完全形成聚集体,通过关闭IR700荧光来确定聚集形成的完成。

[0331] 实施例11

[0332] 材料和方法

[0333] 该实施例提供了用于实施例12中所述的的结果的材料和方法。

[0334] 试剂

[0335] 水溶性硅-酞菁衍生物——IR染料700DX NHS酯来自LI-CORBioscience(Lincoln, NE, USA)。针对EGFR的完全人源化IgG2mAb——帕尼单抗来自Amgen(Thousand Oaks, CA,

USA)。针对HER2的95%人源化IgG1mAb——曲妥珠单抗来自Genentech(South San Francisco,CA,USA)。所有其他化学品为试剂级。

[0336] IR700-缀合的曲妥珠单抗、帕尼单抗或抗PSMA的抗体的合成

[0337] 根据先前的报道(Mitsunaga et al.,Nat.Med.17,1685-1691,2011;Sato et al.,Mol.Oncol.8,620-632,2014),进行染料与mAb的缀合。简言之,将帕尼单抗、曲妥珠单抗或抗PSMA ab(1mg,6.8nmol)与IR700NHS酯(60.2μg,30.8nmol)在0.1mol/L Na₂HPO₄(pH 8.6)中在室温下孵育1小时。混合物用Sephadex G50柱(PD-10;GE Healthcare,Piscataway,NJ,USA)纯化。通过用光谱法(8453Value System;Agilent Technologies,Santa Clara,CA,USA)测量在595nm处的吸收,用Coomassie Plus蛋白测定试剂盒(Thermo Fisher Scientific Inc,Rockford,IL,USA)测定蛋白浓度。通过用光谱法测量在689nm处吸收来测定IR700的浓度,以确认与每个mAb缀合的IR700分子的数目。控制合成,使得单个抗体结合平均四个IR700分子。按照先前报道的(Sano et al.,ACS Nano 7,717-724,2013),使用SDS-PAGE作为每种缀合物的质量控制。缀合至曲妥珠单抗的IR700简称为Tra-IR700,缀合至帕尼单抗的简称为Pan-IR700,缀合至抗PSMA的抗体的简称为PSMA-IR700。

[0338] 细胞培养

[0339] 用RediFect Red-FLuc-GFP(PerkinElmer,Waltham,MA,USA)的转染建立了稳定表达GFP和荧光素酶的A431、3T3/HER2(稳定表达HER2的Balb/3T3细胞)或PC3-PIP(稳定表达PSMA的PC3细胞)细胞。通过10次传代证实了高的GFP和荧光素酶表达。通过由RFP(EF1a)-Puro慢病毒颗粒(AMSBIO,剑桥,MA,USA)的转染建立了稳定表达RFP的Balb/3T3细胞。在不存在选择剂的情况下通过10次传代证实了高的RFP表达。这些细胞分别简称为A431-luc-GFP、3T3/Her2-luc-GFP、PC3-PIP-luc-GFP、Balb/3T3-RFP。在37℃下和95%空气和5%二氧化碳的气氛下的加湿培养箱中,在组织培养瓶中的补充有10%胎牛血清和1%青霉素/链霉素(Life Technologies)的RPMI 1640(Life Technologies,Gaithersburg,MD,USA)中培养细胞。

[0340] 3D球体培养

[0341] 通过悬滴法产生球体,其中将五千个细胞悬浮于50μL培养基中,然后按照制造商的说明书将其分散到96孔板中(3D Biomatrix Inc,Ann Arbor,MI,USA)(Sato et al.,Mol.Oncol.8,620-632,2014)。用5000个Balb/3T3-RFP细胞和500个A431-luc-GFP细胞(100:10)制备混合球体。观察或处理后,将球体再次用含有新培养基的悬滴板孵育。用下式计算球体的体积:球体体积=4/3π×半径³

[0342] 流式细胞术

[0343] 使用流式细胞仪(FACS Calibur,BD BioSciences,San Jose,CA,USA)和CellQuest软件(BD BioSciences)测量用APC剂孵育后由细胞产生的荧光。将细胞(1×10⁵)用每种APC在37℃下孵育6小时。为了验证缀合的抗体的特异性结合,使用过量的抗体(50μg)以阻断0.5μg的染料-抗体缀合物(Sato et al.,Mol.Oncol.8,620-632,2014)。

[0344] 荧光显微镜

[0345] 为了检测IR700缀合物的抗原特异性定位,进行荧光显微镜检查(IX61或IX81;Olympus America,Melville,NY,USA)。将一万个细胞接种在有盖玻璃底培养皿上并孵育24小时。然后将APC以10μg/mL加入培养基中,并在37℃下孵育6小时。然后用PBS洗涤细胞;使

用碘化丙啶 (PI) (1:2000) (Life Technologies) 和 Cyttox Blue (1:500) (Life Technologies) 检测死亡细胞。在观察前30分钟将它们加入培养基中。然后将细胞暴露于 NIR 光并获得连续图像。设置滤波器以用 590–650nm 激发滤光片和 665–740nm 带通发射滤光片检测 IR700 荧光。

[0346] 在用 Hoechst 33342 (1:500) (Life Technologies) 孵育 30min 后, 用共聚焦激光显微镜 (LSM5meta, Carl Zeiss, Jena, 德国) 获得球体的 3D 重建。首先用 3.7% 甲醛的 PBS 溶液将球体切片在室温下固定 10min, 然后用 OCT (SAKURA, 东京, 日本) 包埋。然后, 将其在 -80°C 下冷冻, 并用低温切片机 (LEICA CM3050S, Leica microsystems, Wetzlar, 德国) 切片为 10 μ m。使用 ImageJ 软件 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) 分析图像。

[0347] 体外 PIT

[0348] 将 20 万个 A431-luc-GFP 细胞接种到 24 孔板中或将两千万个细胞接种到 10cm 培养皿上并孵育 24 小时。将培养基用含有 10 μ g/mL 的 tra-IR700 的新鲜培养基替换, 将其在 37°C 下孵育 6 小时。用 PBS 洗涤后, 加入无酚红的培养基。然后, 用发射波长为 670 至 710nm 的光的 NIR 激光器 (L690-66-60; Marubeni America Co., Santa Clara, CA, USA) 照射细胞。使用光功率计 (PM 100, Thorlabs, Newton, NJ, USA) 测量实际功率密度 (mW/cm²)。

[0349] 细胞毒性/光毒性测定

[0350] 通过荧光素酶活性和流式细胞术 PI 染色或 GFP 来测定 PIT 与 APC 的细胞毒性作用。对于荧光素酶活性, 在 PIT 后 1 小时, 将 150 μ g/mL 的含 D-荧光素的培养基 (Gold Biotechnology, St Louis, MO, USA) 给予 PBS 洗涤的细胞, 并在生物发光成像 (BLI) 系统 (Photon Imager; Biospace Lab, 巴黎, 法国) 上分析。对于流式细胞术测定, 在处理, 将细胞用胰蛋白酶消化 1 小时并用 PBS 洗涤。将 PI 加入细胞悬浮液 (最终 2 μ g/mL), 并在流式细胞术之前在室温下孵育 30min。

[0351] 体外 GFP/RFP 荧光强度的评价

[0352] 将二十万个细胞接种在有盖玻璃底培养皿上并孵育 12 小时。然后将 APC 以 10 μ g/mL 加入到培养基 (无酚红) 中, 并在 37°C 下孵育 6 小时。用 PBS 洗涤细胞, 将培养基替换为新的无酚红培养基, 并标记盖玻片的下侧 (以确定观察位置)。PIT 后 1 小时, 再次观察细胞。在每个球体 20 的相同视野中用具有相同阈值的总像素评估 GFP/RFP 强度。使用 ImageJ 软件 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) 分析图像。还使用流式细胞仪 (FACS Calibur) 测量来自经处理的细胞的荧光。

[0353] 动物和肿瘤模型

[0354] 所有体内操作均是根据美国国家研究委员会的实验动物资源的管理和使用指南 (1996) 进行, 并且由当地动物管理和使用委员会批准。6–8 周龄雌性纯合子无胸腺裸鼠购自 Charles River (NCI-Frederick)。在操作期间, 用异氟醚麻醉小鼠。

[0355] 对于单培养肿瘤模型, 在小鼠的两侧侧腹 (右侧和左侧, 对称地) 皮下注射四百万 A431-luc-GFP 细胞。对于混合肿瘤模型, 将 4 $\times$ 10⁶ A431-luc-GFP 细胞和 4 $\times$ 10⁵ Balb/3T3-RFP 细胞 (100:10) 的混合细胞在两侧侧腹 (右侧和左侧, 对称地) 皮下注射。

[0356] 体内 PIT

[0357] 将小鼠注射 100 μ g 的 pan-IR700 或如下照射: (1) 对右侧肿瘤在注射后第 1 天以 50J/cm² 将 NIR 光给予右侧肿瘤并在第 2 天以 100J/cm² 给予; (2) 无 NIR 光被给予作为对照的左侧肿

瘤并且将其屏蔽。对照包括：(1) 对右侧肿瘤，在第1天仅以 $50\text{J}/\text{cm}^2$ 的NIR光暴露和在第2天 $100\text{J}/\text{cm}^2$ 的NIR暴露；(2) 没有治疗左侧腹肿瘤。这些治疗仅在细胞植入后第7天进行一次。每天监测小鼠，并进行连续图像分析。

[0358] 体内荧光成像

[0359] 使用用于检测IR700荧光的Pearl成像器(LI-COR Bioscience)和用于GFP/RFP的Maestro成像器(CRi, Woburn, MA, USA)获得体内荧光图像。对于GFP/RFP, 分别使用用于GFP的445至490nm(激发)的带通滤波器和515nm以上(发射)的长通蓝色滤波器, 用于RFP的503至555nm(激发)的带通滤波器和580nm以上(发射)的长通绿色滤波器。在恒定曝光(800毫秒)下, 可调谐发射滤光片以10nm增量从515至580nm自动步进。光谱荧光图像由自发荧光光谱和来自GFP/RFP(肿瘤)的光谱组成, 然后使用Maestro软件(CRi)基于GFP的特征光谱模式使它们未混合。酌情在模型的侧腹肿瘤上或腹部区域上方手工绘制目的区域(ROI), 并测量荧光强度。

[0360] 体内生物发光成像

[0361] 对于BLI, 腹膜内注射D-荧光素($15\text{mg}/\text{mL}$, $200\mu\text{L}$), 并在第6天用Photon成像仪分析小鼠的荧光素酶活性。基于肿瘤大小和生物发光选择小鼠用于进一步研究。为了定量荧光素酶活性, 将相似大小的ROI置于整个肿瘤上。

[0362] 统计学分析

[0363] 数据表示为最少四个实验的平均值 $\pm$ 标准偏差, 除非另有说明。使用统计程序(GraphPad Prism; GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)进行统计学分析。

[0364] 实施例12

[0365] 细胞亚群的选择性杀死

[0366] 细胞培养物和组织通常含有潜在地干扰或污染其它目的细胞的细胞亚群。然而, 难以消除不想要的细胞而不损害正寻求保护的真正细胞群。该实施例证明所公开的方法可以通过使用近红外光免疫疗法(PIT)用于显著减少或消除混合的2D或3D细胞培养物和混合群体内肿瘤模型中的特定细胞亚群。

[0367] 出于科学和实践的原因, 通常期望从细胞培养物或从体内组织中消除特定类型的细胞, 然而, 难以在不损害邻近细胞或整个生物体的情况下实现。当细胞培养物被细菌污染时, 用抗生素消除细菌是相对直接的, 然而, 当污染物是另一种真核细胞类型时, 选择性消除更加困难。例如, 基于干细胞(例如, 胚胎干细胞:ES, 或诱导多能干细胞:iPS)的组织培养物在再生医学领域中发挥关键作用, 并且临床试验即将推出(Yamanaka, Cell Stem Cell 10:678-84, 2012; Yamanaka&Blau, Nature 465, 704-12, 2010; Birchall&Seifalian, Lancet 6736, 11-12, 2014; Kamao et al., Stem cell reports 2, 205-18, 2014; 和Klimanskaya et al., Nat. Rev. Drug Discov. 7, 131-42, 2008)。在组织再生期间, 潜在担忧的是导致新生物的转化细胞的污染(Okita et al., Nature 448, 313-7, 2007; Ohnishi et al., Cell 156, 663-77, 2014; Ben-David&Benvenisty, Nat. Rev. Cancer 11, 268-77, 2011; 和Knoepfler, Stem Cells 27, 1050-6, 2009)。非常需要选择性地移除这些转化的细胞以保持组织移植物的完整性。

[0368] 合乎需要的选择性细胞消除的另一个实例是从肿瘤或炎症中移除特定免疫细胞以有利地改变免疫细胞网络, 从而对肿瘤的总体生长速率或炎症程度产生影响。以这种方

式,可以有意识地调节宿主免疫(Pardoll, Nat. Rev. Cancer 12, 252-64, 2012)。类似地,从肿瘤中消除癌症干细胞可以预防复发(Valent et al., Nat. Rev. Cancer 12, 767-75, 2012)。虽然几个小组研究了用于从已建立的组织中或在移植后消除靶细胞的技术,但没有报道不会同时破坏相同环境中的其他细胞的明确的实用方法(Miura et al., Nat. Biotechnol. 27, 743-5, 2009; Ben-David et al., Nat. Commun. 4, 1992, 2013; Lee et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 110, E3281-90, 2013; 和 Tang et al., Nat. Biotechnol. 29, 829-34, 2011)。

[0369] 光免疫疗法(PIT)使用由缀合至基于酞菁的光敏剂(IR700)的单克隆抗体(mAb)(或其它特异性结合剂)组成的抗体-光敏剂缀合物(APC)。当暴露于近红外(NIR)光时,仅在APC结合的靶细胞中诱导细胞毒性(Mitsunaga et al., Bioconjug. Chem. 23, 604-609, 2012)。

[0370] 下面的结果示出了使用PIT选择性消除一组靶细胞的可行性。使用混合的2D和3D(球体)细胞培养物,以及混合肿瘤异种移植模型。使用光学指示物——RFP、GFP和荧光素酶,通过PIT选择性地消除不同的细胞群。因此,所公开的方法可用于在体内消除或基本上减少(例如减少至少50%、至少60%、至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或至少99.9%)细胞培养物或组织中的靶细胞。

[0371] 在这些实验中使用两个细胞群,一个表达EGFR的肿瘤细胞系(A431)和另一个对EGFR阴性的对照细胞系(Balb/3T3)。A431模型被遗传修饰以表达GFP和荧光素酶(luc),而Balb/3T3被修饰以表达RFP(图10A-10B)。证明了帕尼单抗-IR700(Pan-IR700)与表达靶标的A431-luc-GFP细胞的特异性结合,而没有示出与Balb/3T3-RFP细胞的结合(图10C)。在体外2D细胞培养中用无活力PI染色(dead PI staining)评价了PIT对新建立的具有Pan-IR700的A431-luc-GFP细胞的杀伤效力(图11A-11C)。以光剂量依赖性方式杀死A431-luc-GFP细胞。PIT也以光剂量依赖性方式诱导生物发光(BLI)和GFP荧光强度的降低(图12A-C、图13A-13C和图14A-14B),这与PI无活性染色一致。这些数据表明PIT可以用GFP荧光和BLI监测。

[0372] 接下来,评价了PIT对由A431-luc-GFP或Balb/3T3-RFP组成的3D球体的效力(图15A)。这些细胞形成直径大至约500 μ m的球体(图15B)。三维共聚焦显微法显示这些球体确实是球状的(图15C)。冷冻切片的荧光图像显示细胞均匀地分散在整个球体中(图15D)。如IR700荧光显微法所示,Pan-IR700从周边逐渐渗入球体;染色区域以时间依赖的方式逐渐向球体的中心扩展(图15E)。

[0373] 在3D球体中,PIT在A431-luc-GFP细胞的APC结合层中引起坏死细胞死亡(图16)。用GFP荧光、BLI和尺寸体积监测PIT对A431-luc-GFP球体的杀伤作用,都显示出光剂量依赖性(图17A-17E)。每日重复的PIT实现了在球体内完全根除A431-luc-GFP细胞(图18A-18F)。这些结果表明重复的PIT可以根除在3D球体中生长的表达靶标的细胞。最后,在小鼠的A431-luc-GFP侧腹肿瘤模型中评估了PIT效果(图19A-D和图20)。重复的PIT(图19A)导致A431-luc-GFP肿瘤中的GFP信号和荧光素酶活性消失(图19B和图20),表明完全根除了A431-luc-GFP肿瘤(图19C-19D)。离体A431-luc-GFP肿瘤图像验证了体内结果(图21A-21B)。

[0374] 为了证明从混合的2D和3D细胞培养物或混合肿瘤模型中表达靶标细胞的选择性

消除,本发明人使用前面描述的两种细胞系(A431-luc-GFP和Balb/3T3-RFP)(图22A)。用Cyttox无活性染色记录A431-luc-GFP的选择性细胞杀伤(图22B)。在PIT后证明了从几乎汇合的2D混合细胞培养物中消除A431-luc-GFP(图23A)。重复的PIT(图23B)导致完全的靶细胞消除,而不影响非靶细胞生长(图23C和图24A-24C)。通过荧光信号和荧光素酶活性进行的细胞生长定量证实了A431-luc-GFP的选择性杀伤(图23D和23E)。

[0375] 使用PIT,对未表达靶标的3D球体没有检测到显著的变化,而靶标3D球体的尺寸明显减小(图25A)。为了证明从3D细胞培养中的靶细胞消除,建立了混合的3D球体(图25B)。重复的PIT(图25A)导致从混合的3D细胞培养物中完全消除靶细胞,而不损伤非靶细胞(图26B和图27A-27C)。通过荧光信号和BLI监测每个细胞群(图26C-26D)。

[0376] 当将其他靶细胞加入到球体中时,适当地用NIR靶向APC导致它们从3D混合球体中的选择性消除。例如,在3T3/HER2-luc-GFP和PC3-PIP-luc-GFP细胞的混合模型中的靶向HER2和PSMA APC在每种情况下导致这些被靶向细胞的选择性消除(图28A和28B)。

[0377] 最后,证明了在植入小鼠侧腹的混合肿瘤内的完全靶细胞消除。与细胞培养物一样,未表达靶标的肿瘤细胞显示最小的损伤,而表达靶标的细胞被根除(图29A和29B)。重复的PIT(图30A)导致表达靶标的细胞从体内混合肿瘤中完全消除而对非靶细胞的损伤最小(图30B和31)。使用荧光信号和荧光素酶活性实现了对细胞群的定量(图30C、30D)。还在离体图像上证实了从混合肿瘤中的完全细胞消除(图30E和32A-32B)。

[0378] 总之,该实施例表明所公开的方法可用于从混合的2D培养物、混合的3D球体和混合的体内肿瘤中选择性地移除靶细胞。因此,所公开的方法可用于从细胞混合物、球体和体内肿瘤中选择性地消除细胞。

[0379] 考虑到可以应用本公开内容的原理的许多可能的实施方案,应当认识到,所举例说明的实施例仅仅是本公开内容的实例,并且不应被视为对本发明的范围的限制。相反,本发明的范围由所附权利要求限定。因此,本发明人要求保护落入这些权利要求的范围和精神内的所有发明。

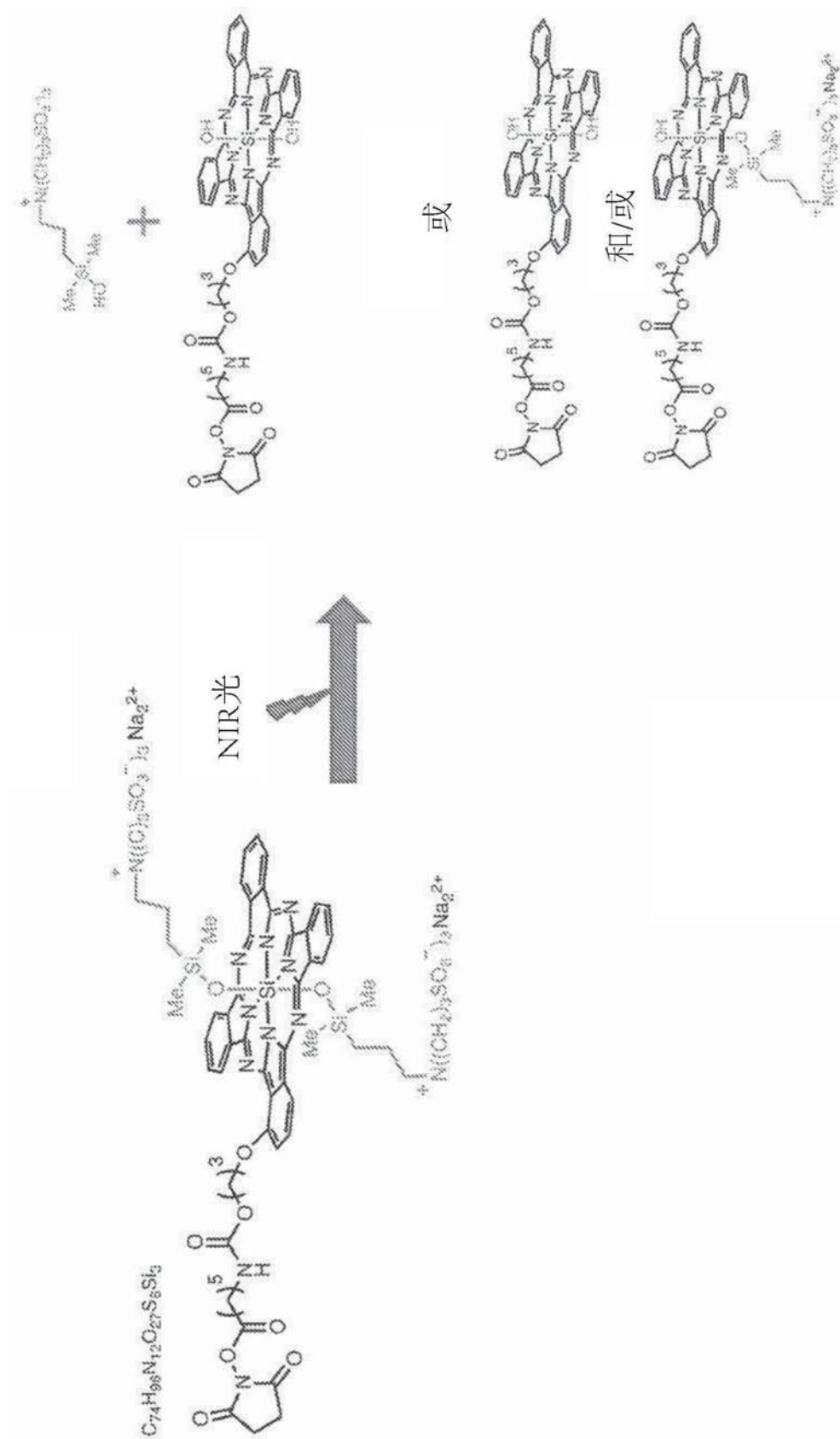


图1

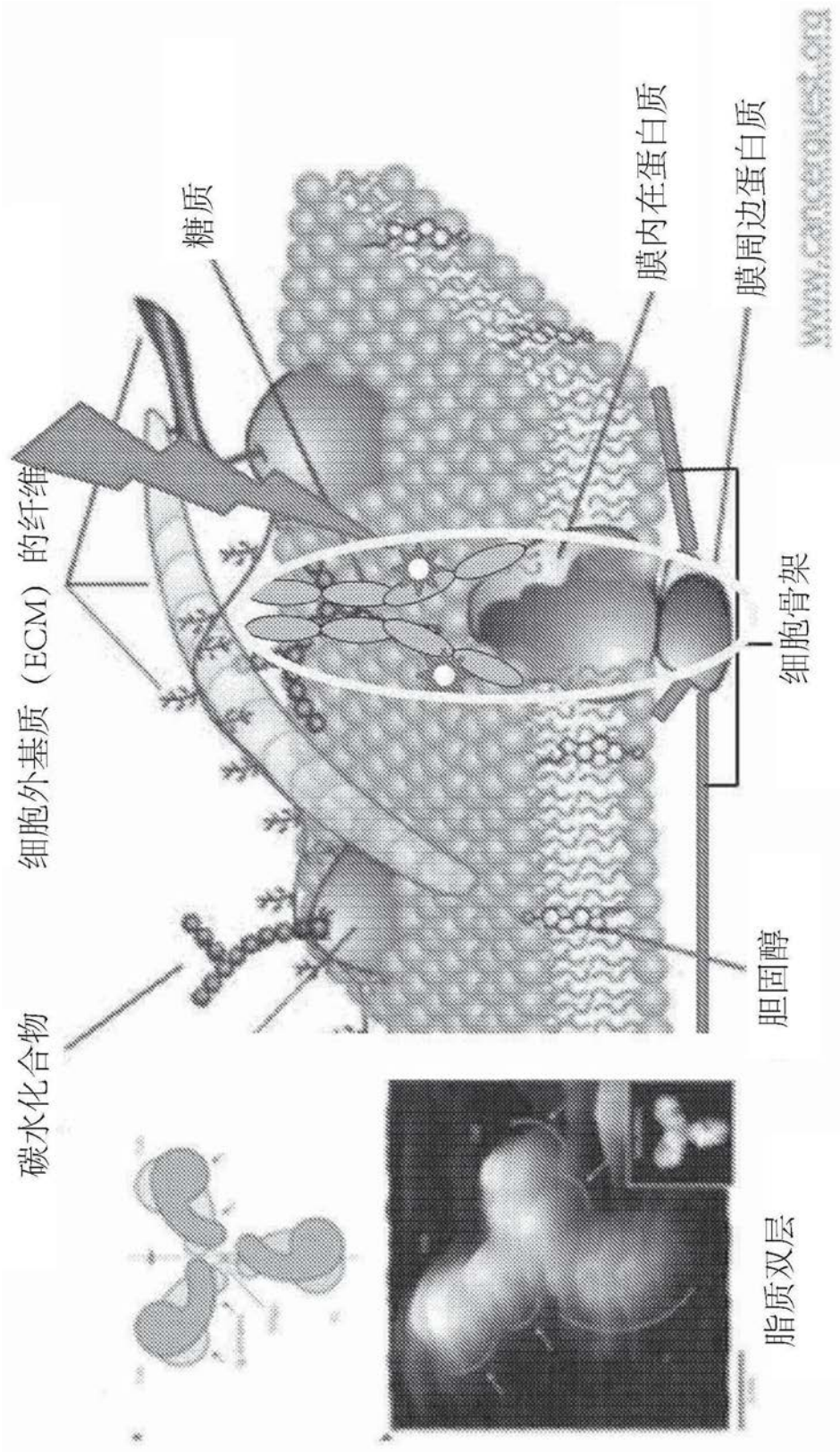


图3

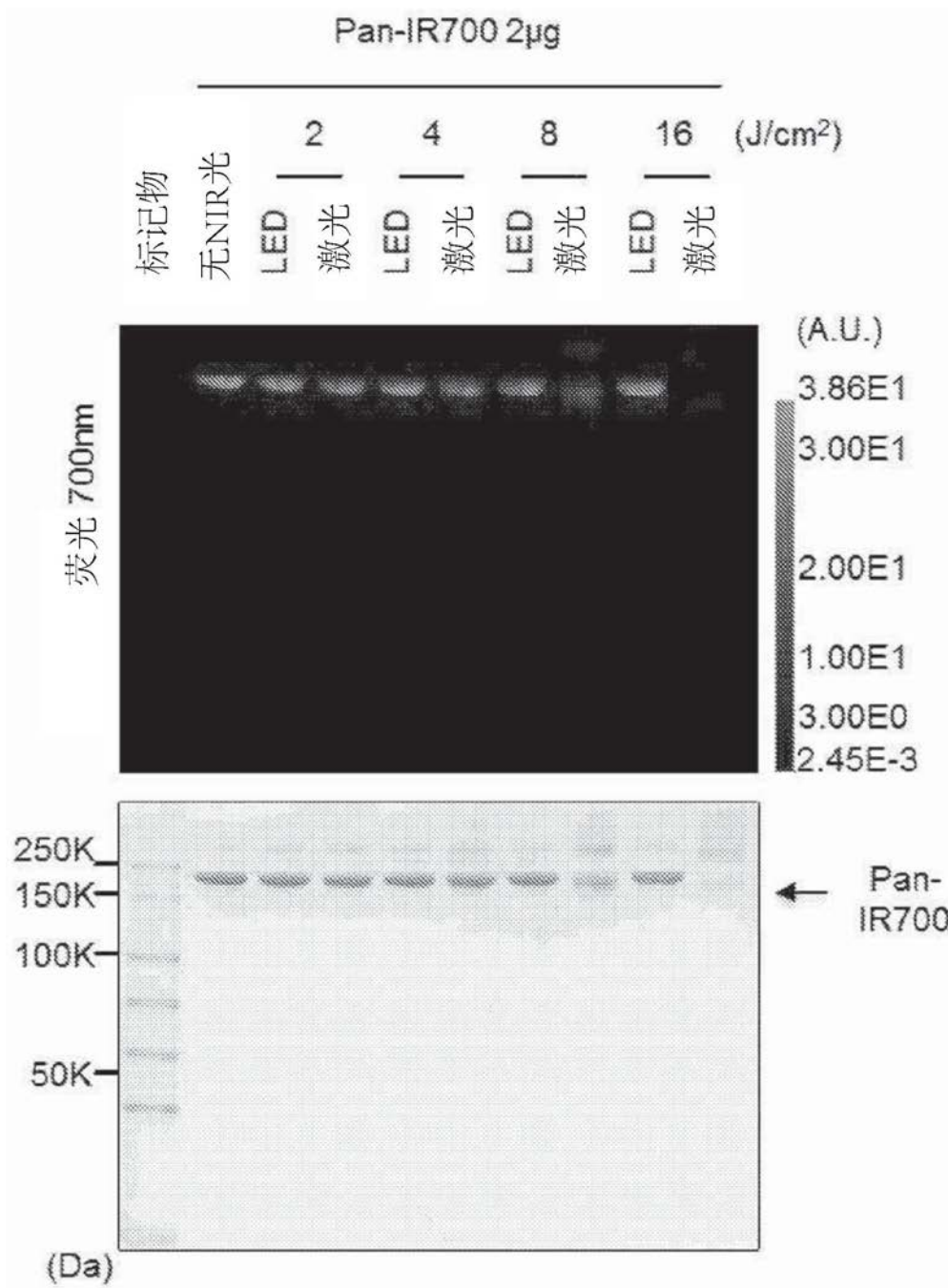


图4

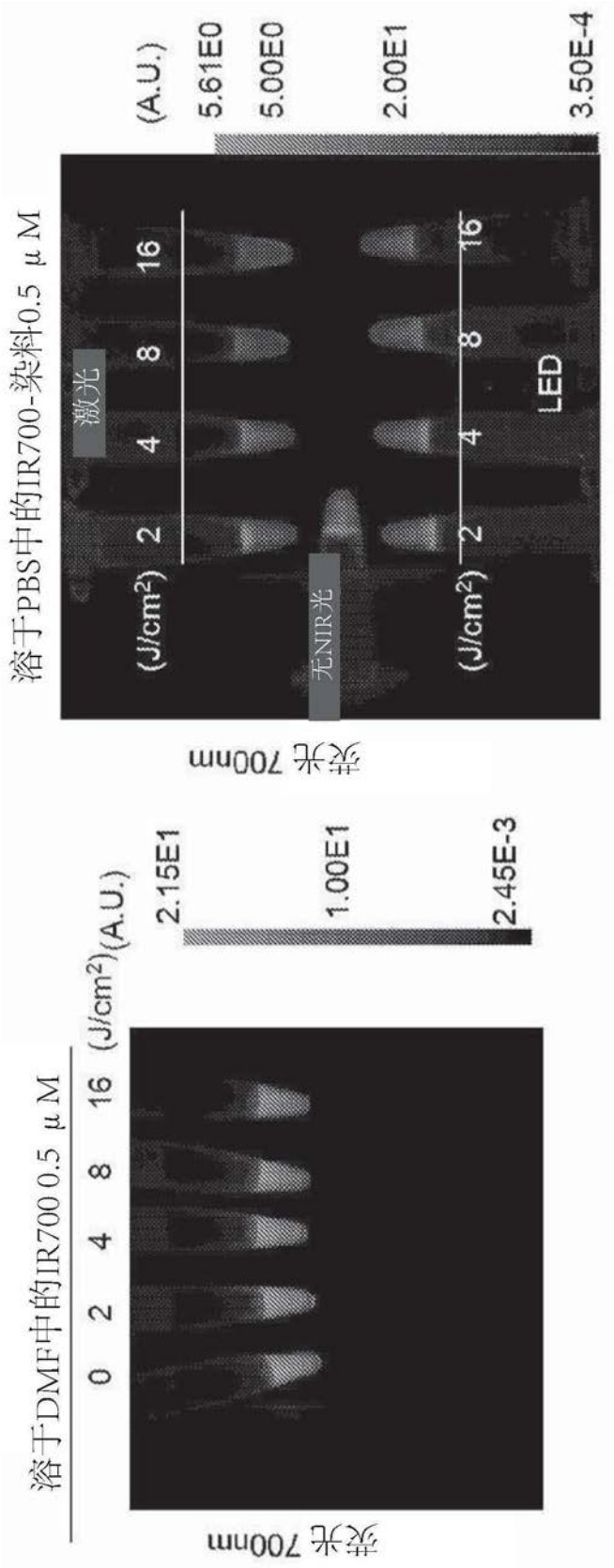


图5

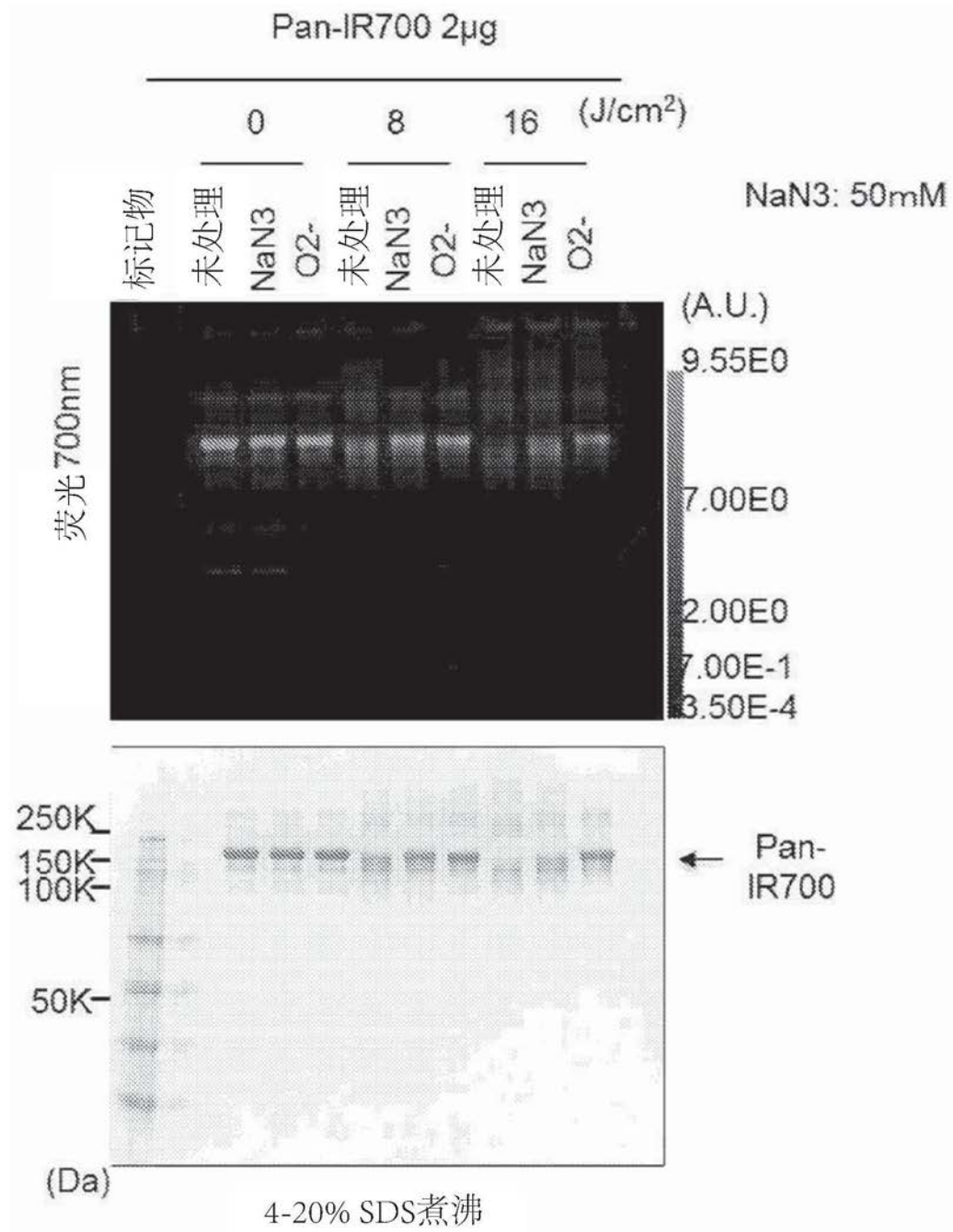


图6

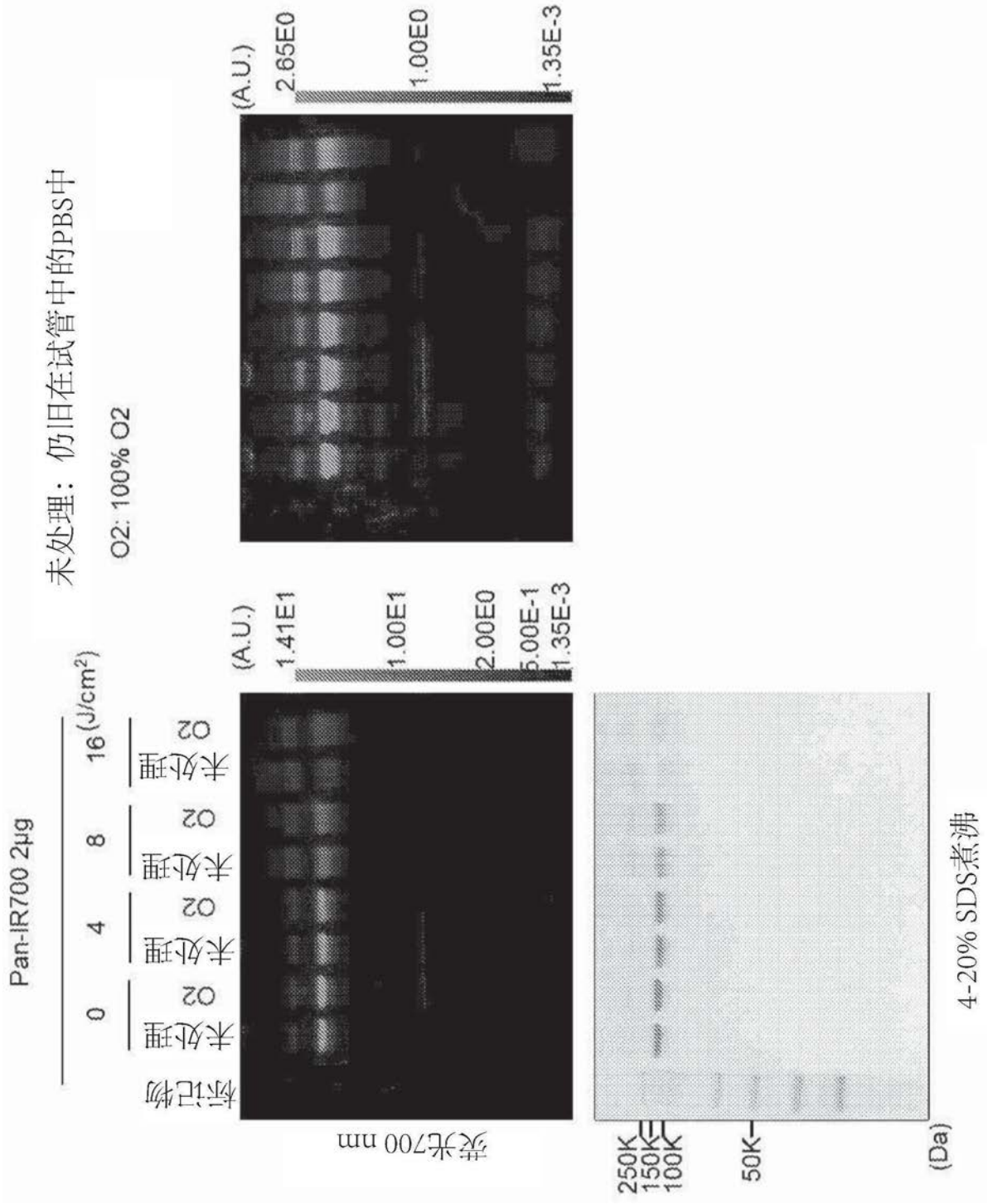


图7

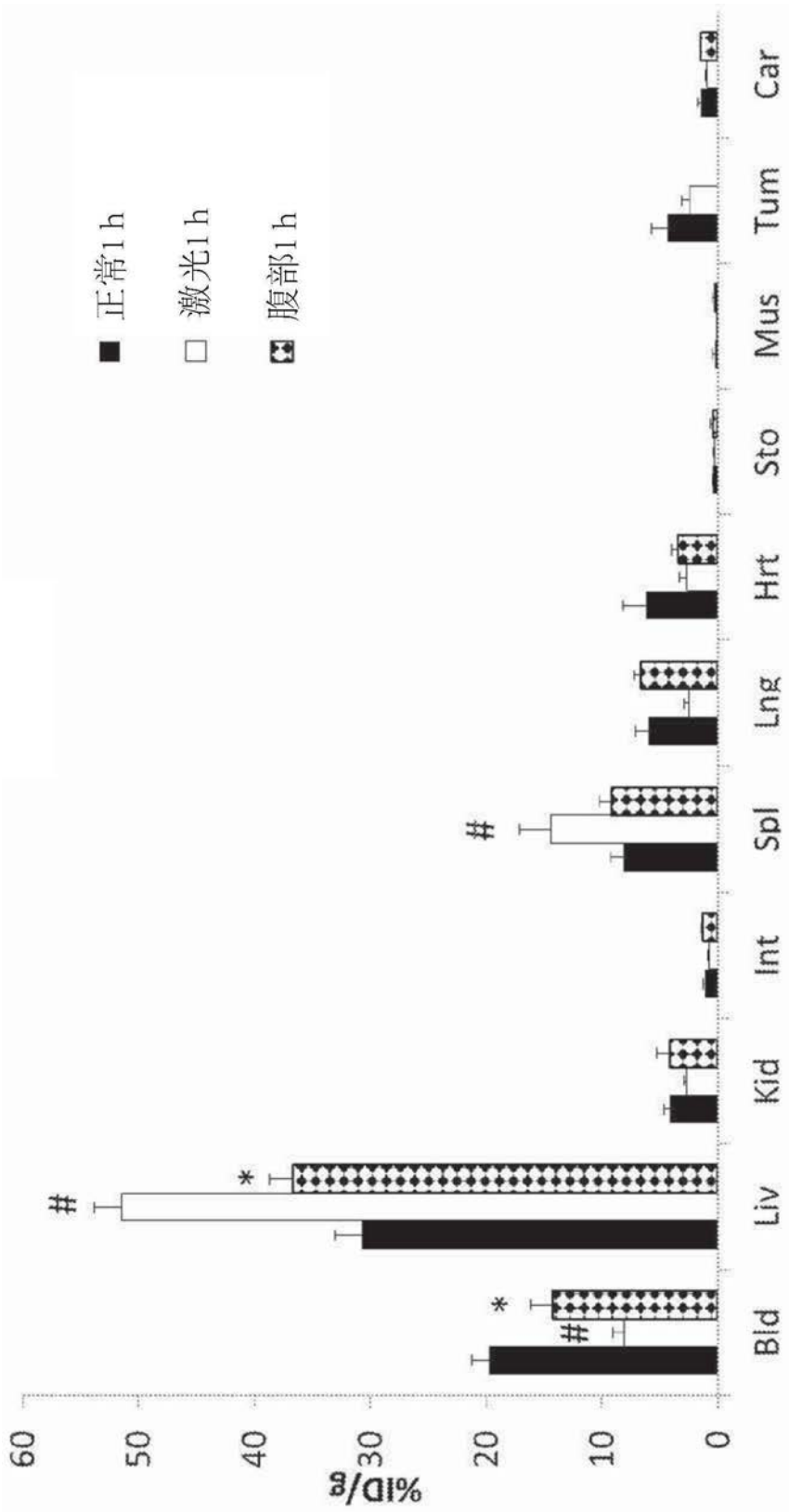


图8

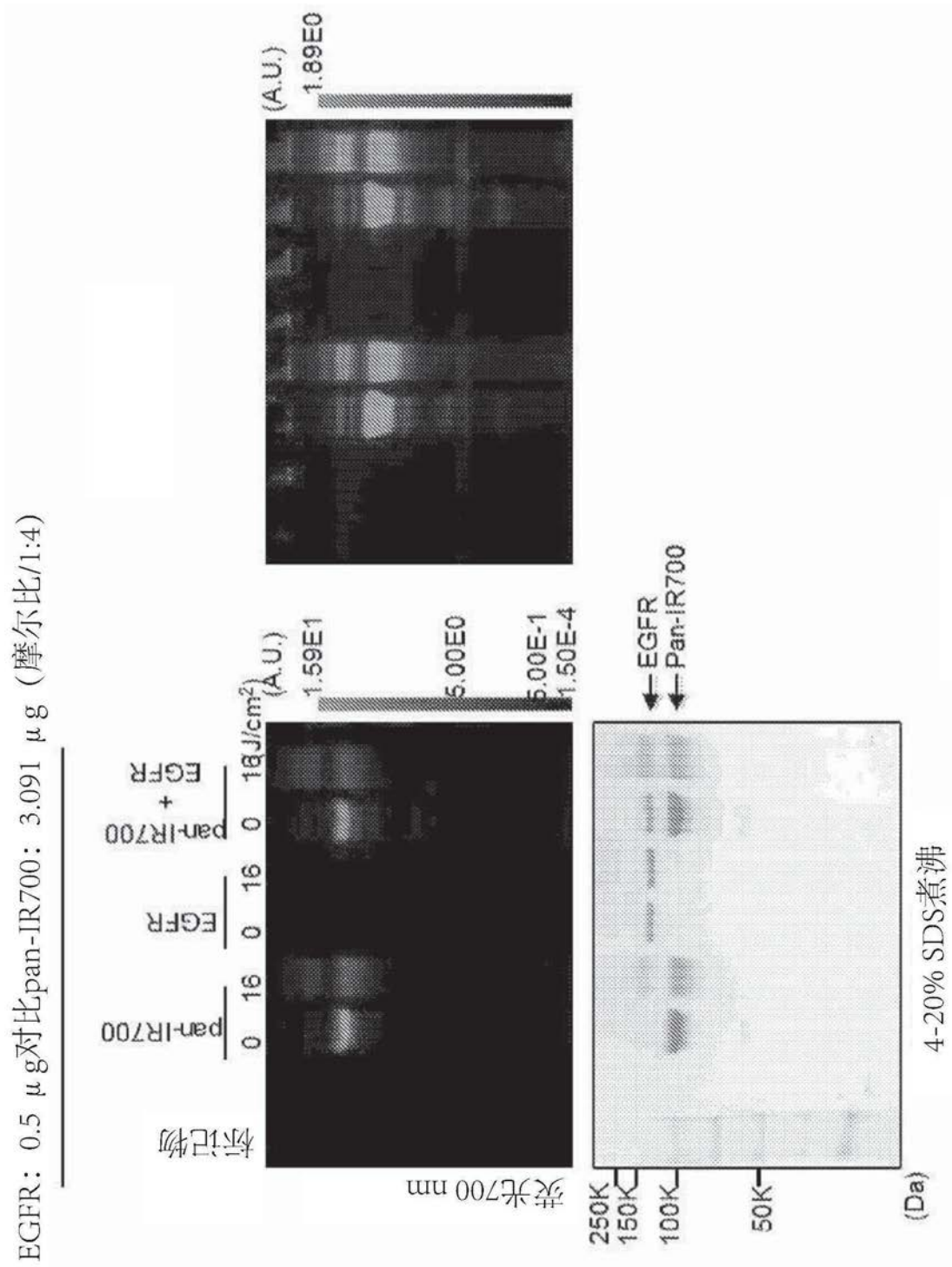


图9

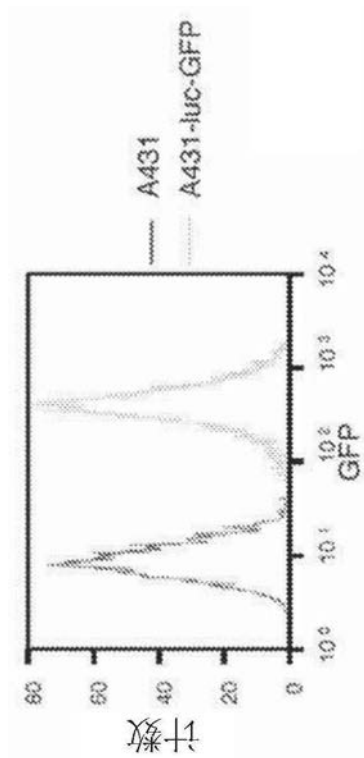


图10A

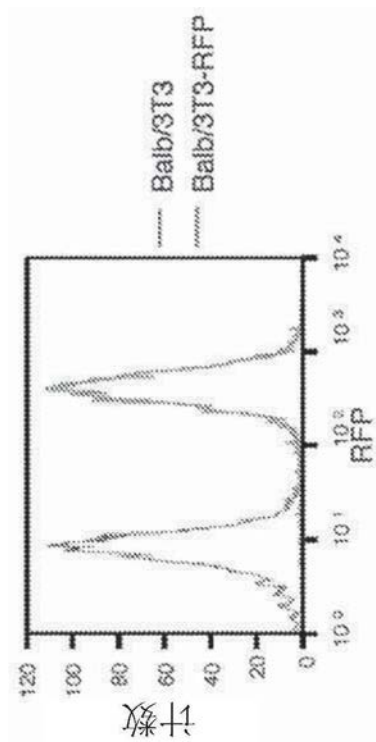


图10B

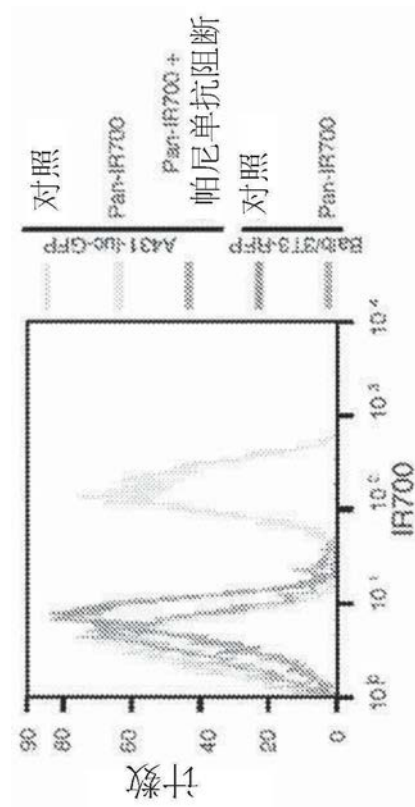


图10C

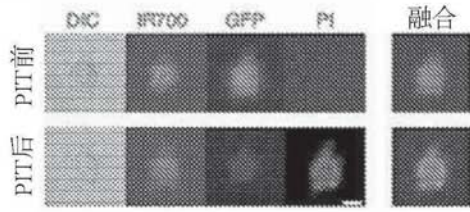


图 11A

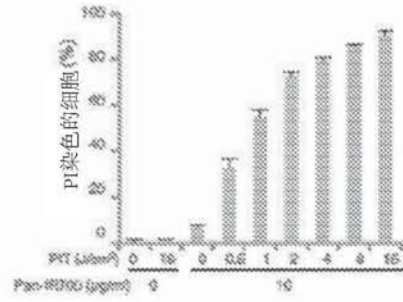


图 11C

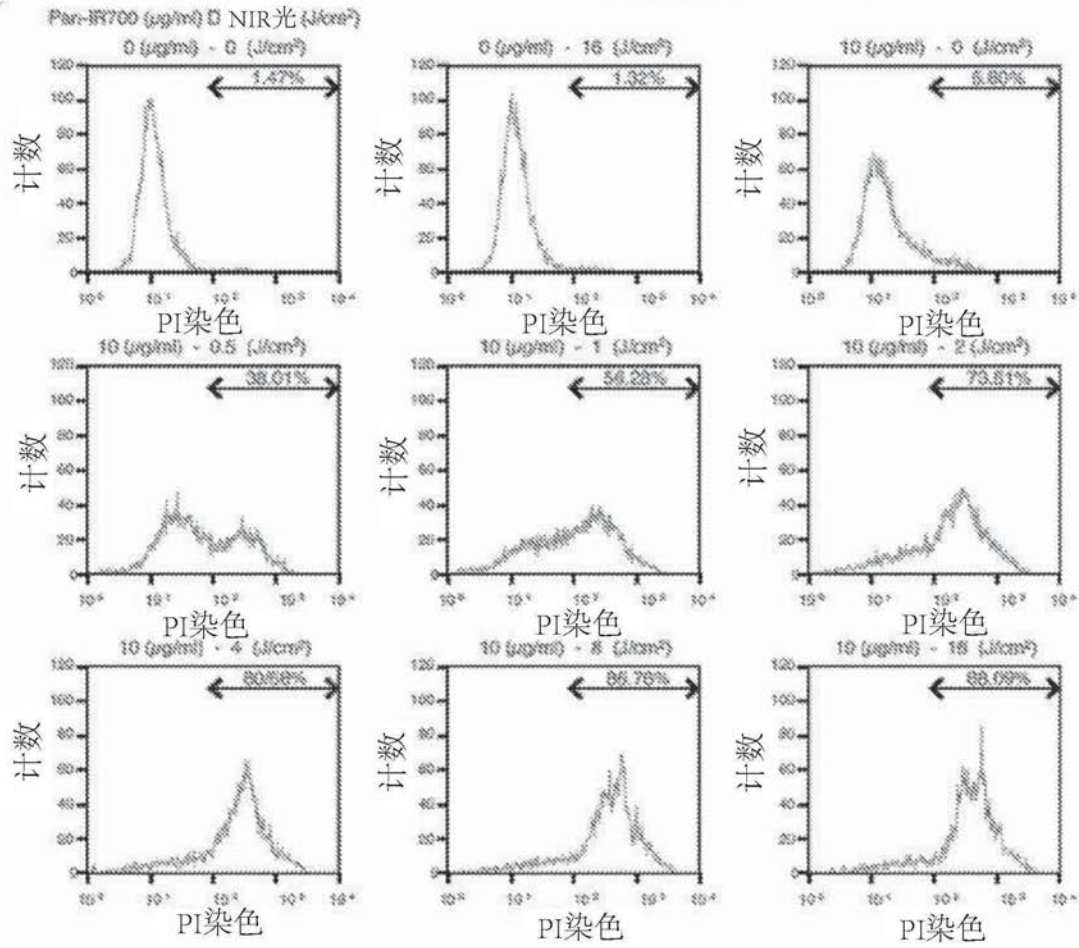
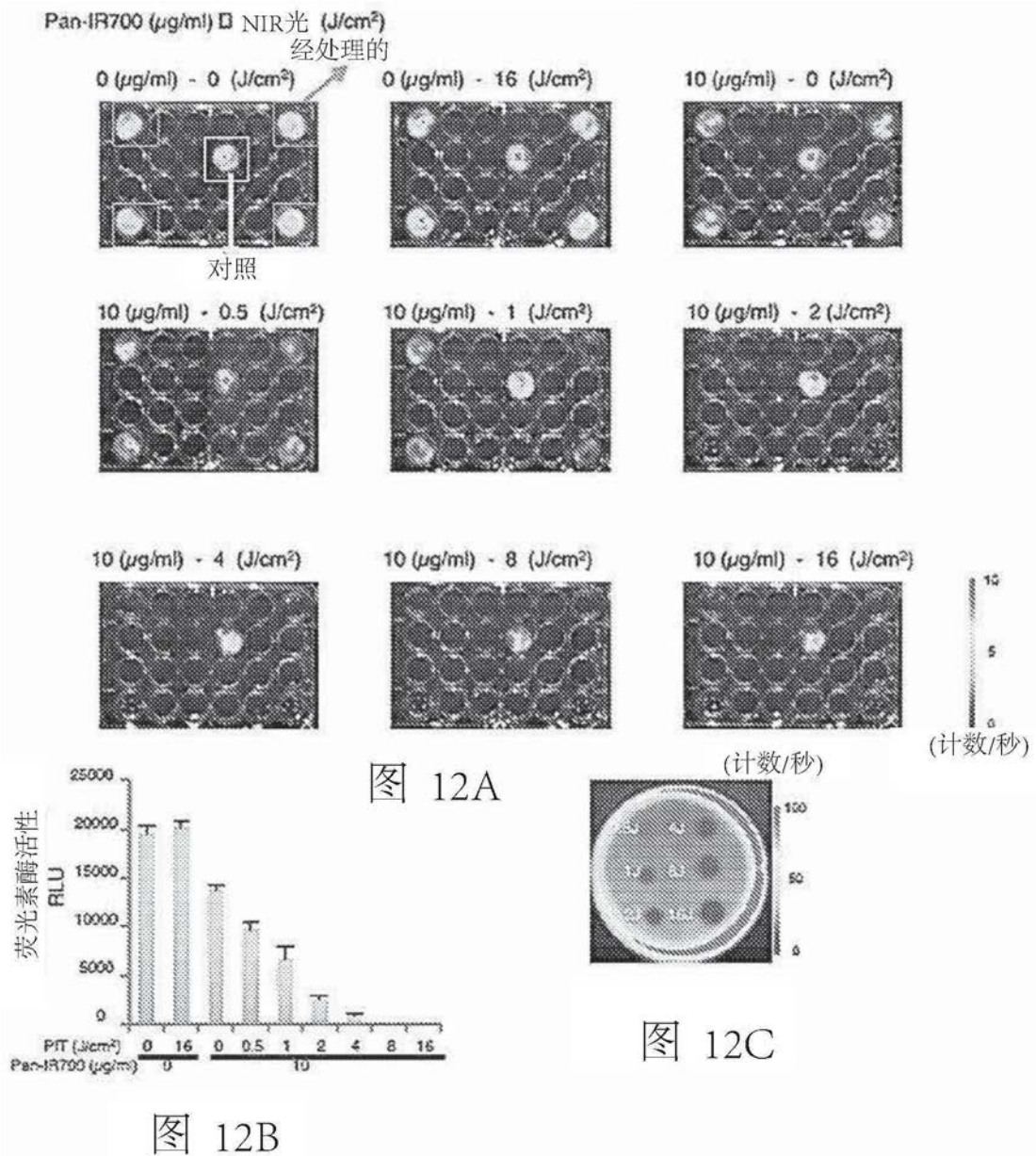


图 11B



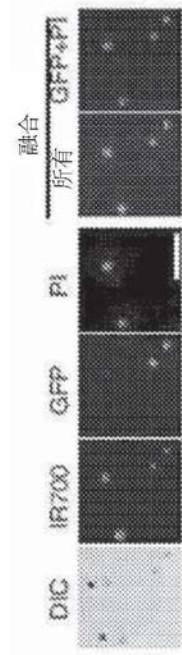


图13A

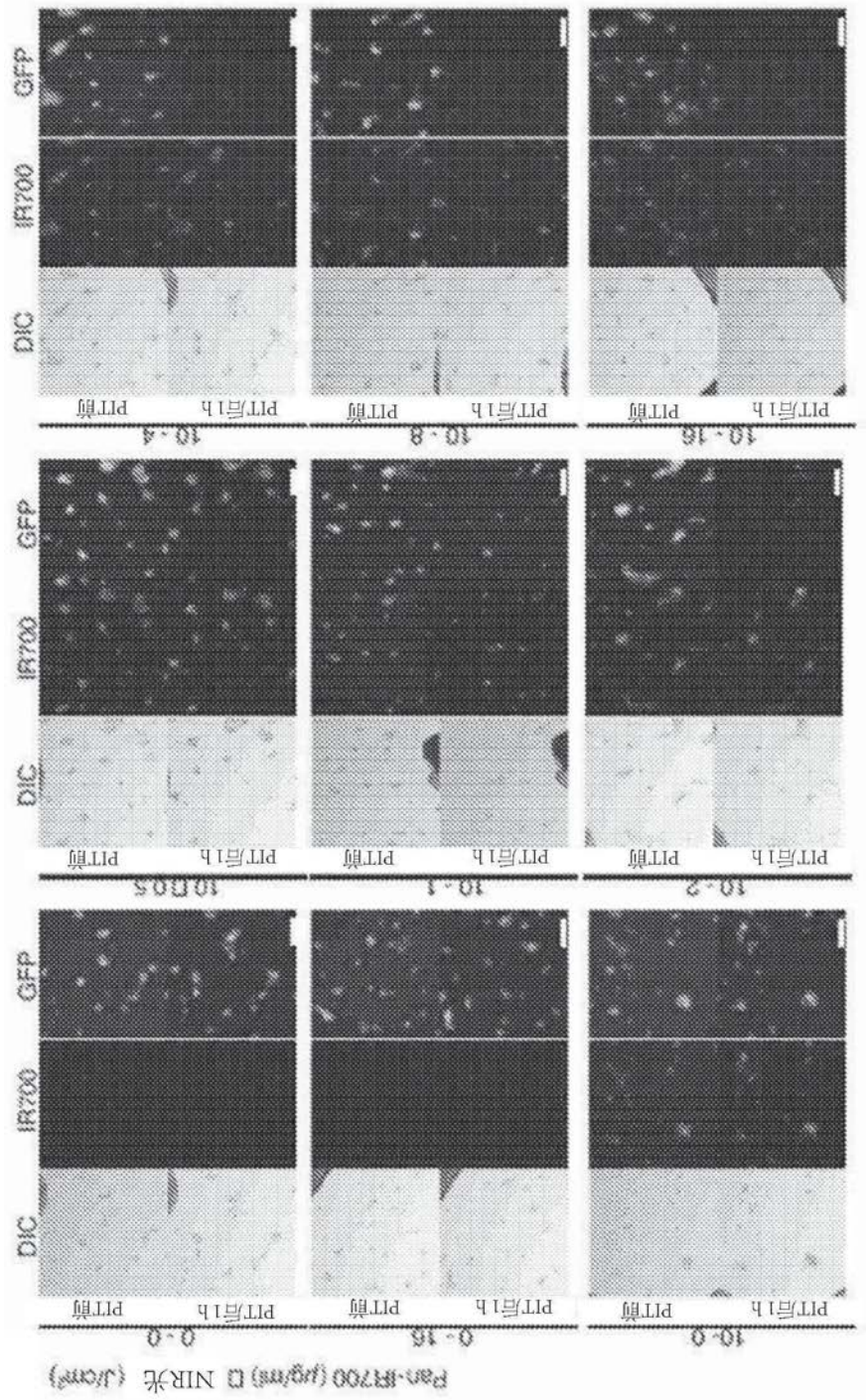


图13B

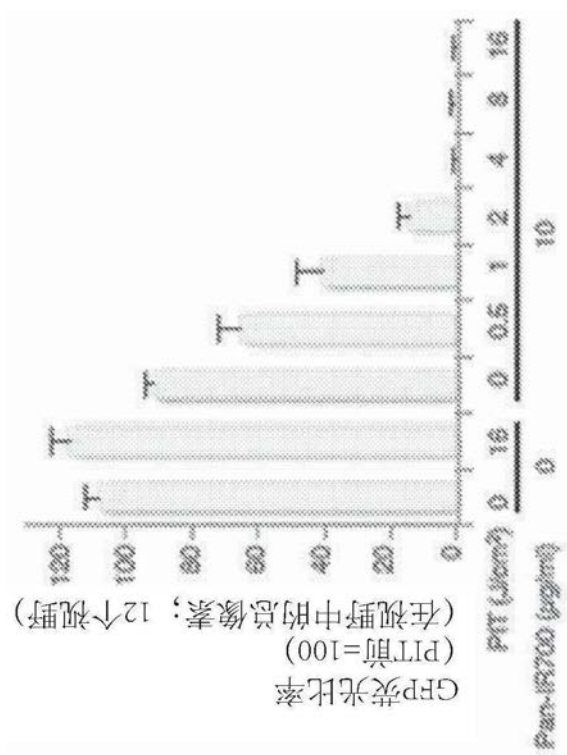


图13C

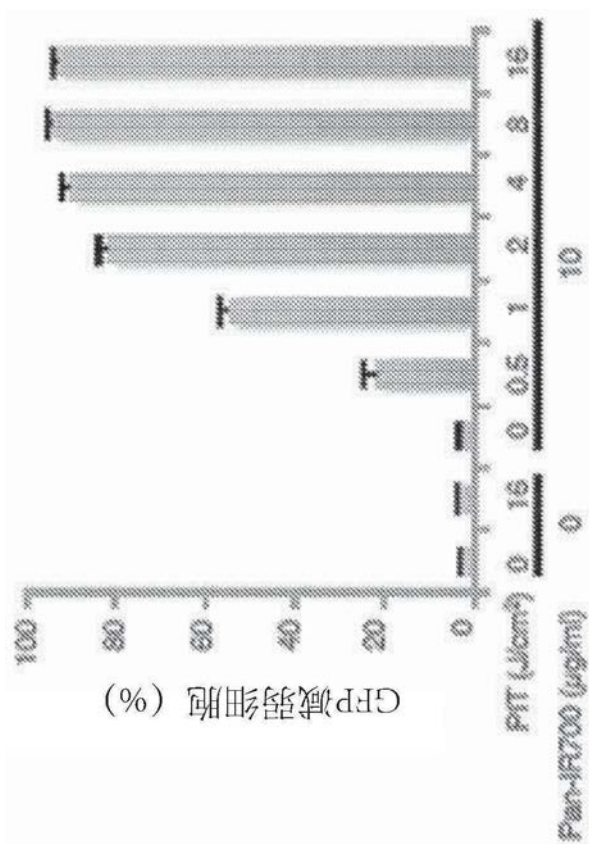


图14B

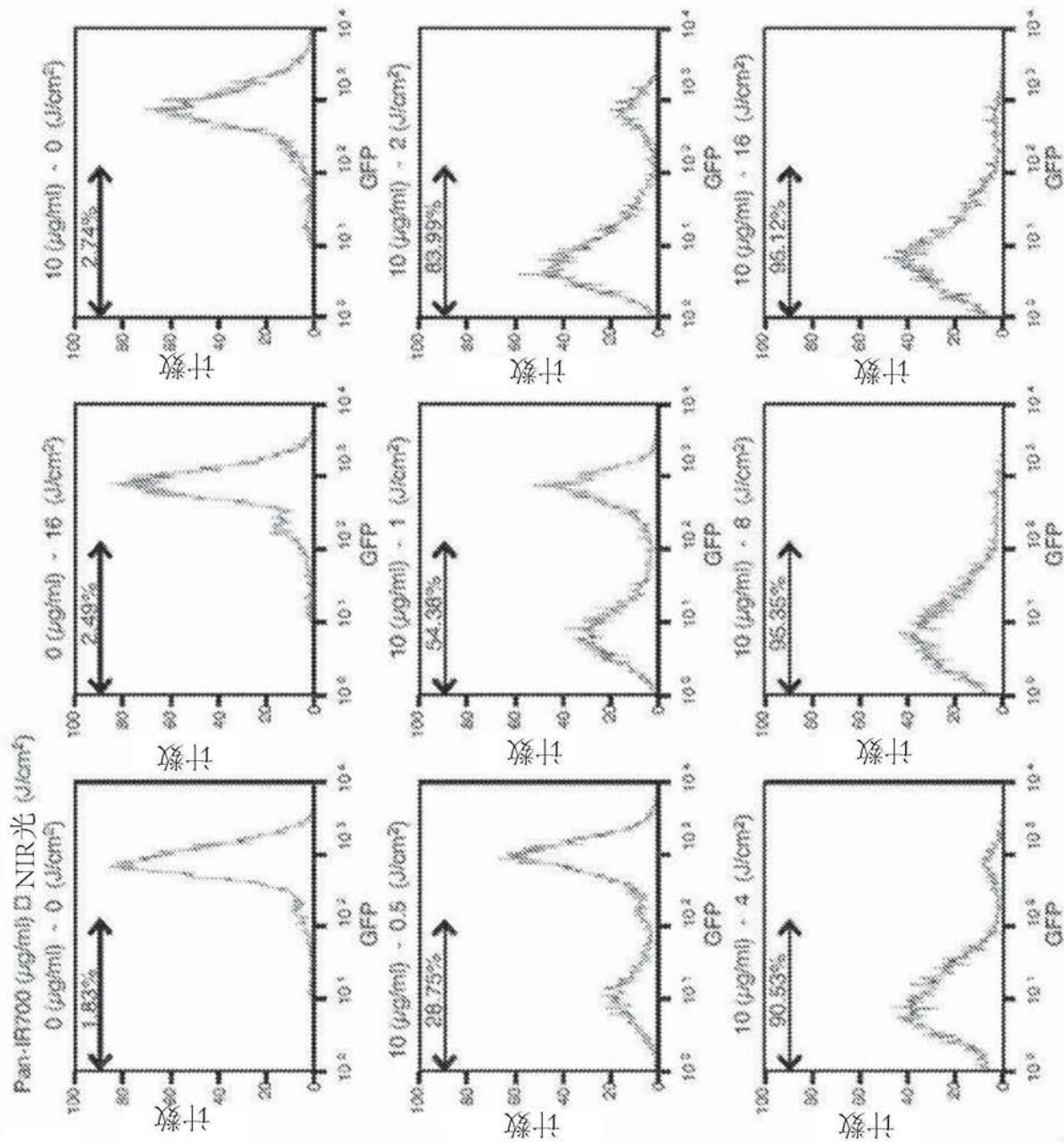


图14A

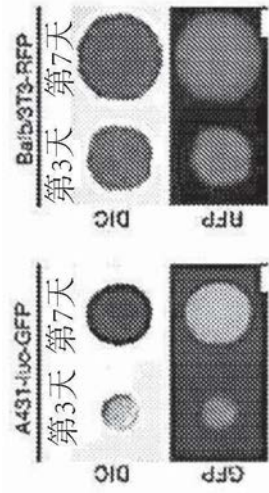


图15A

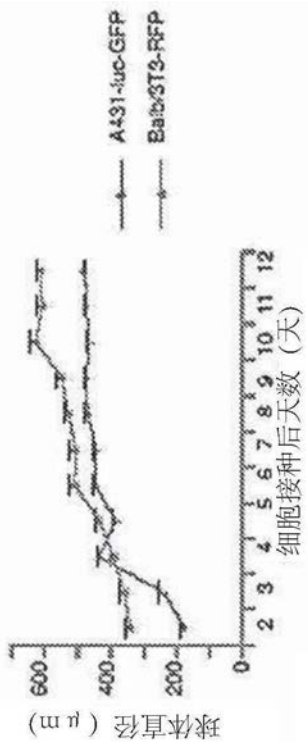


图15B

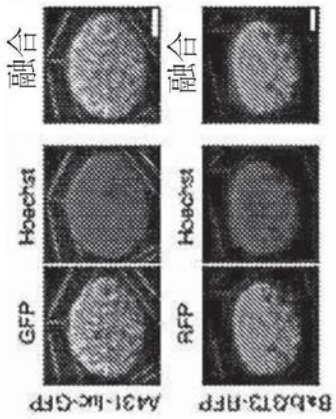


图15C

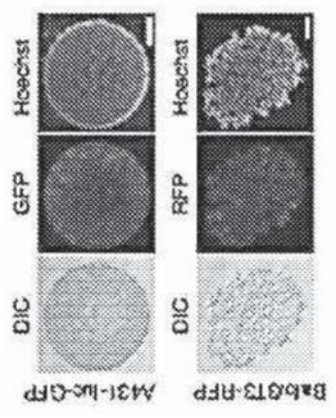


图15D

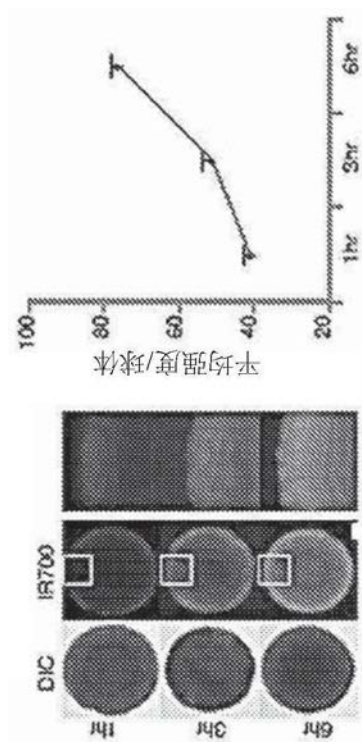


图15E

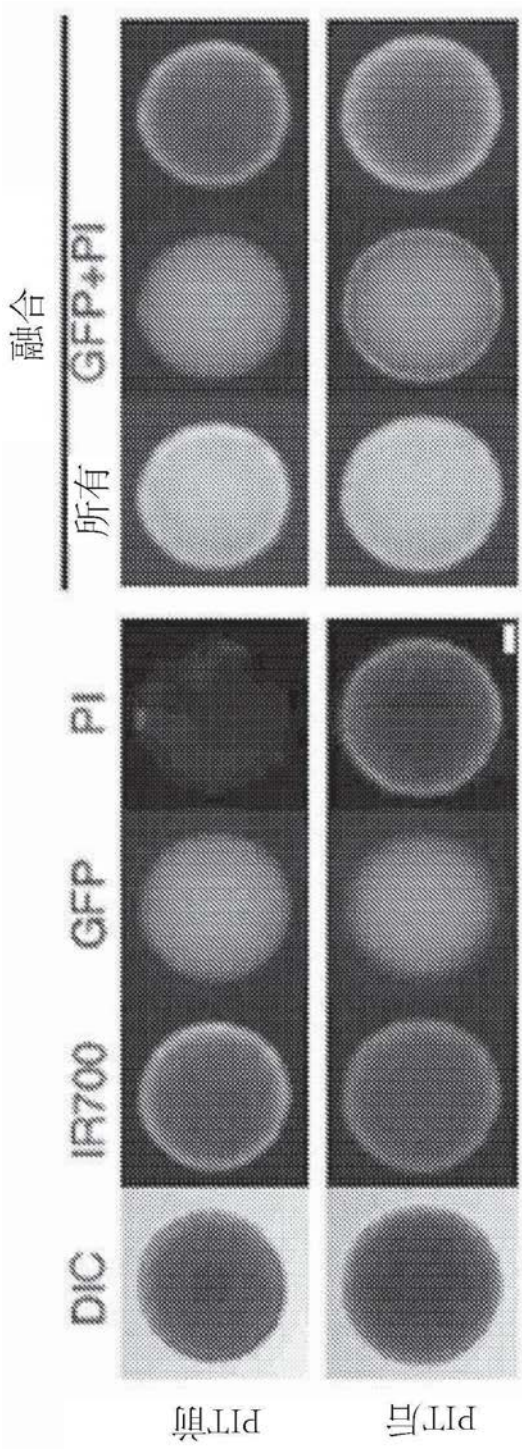


图16

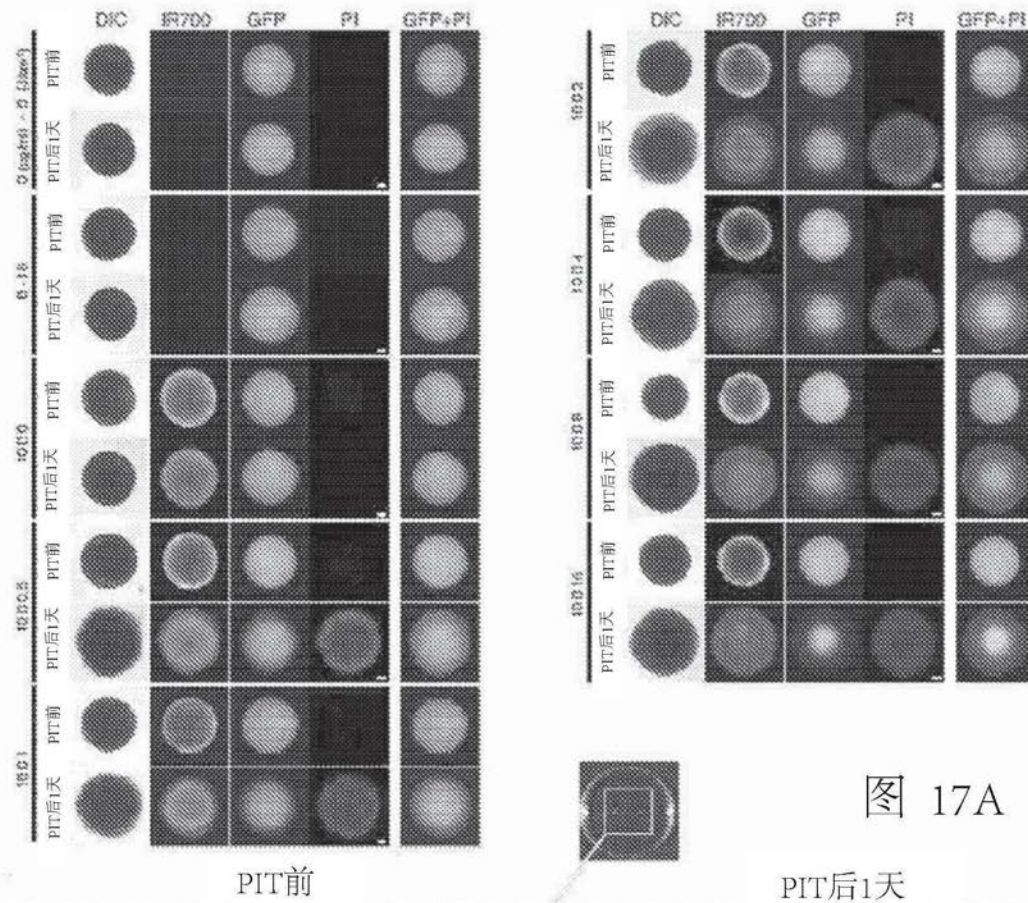


图 17A

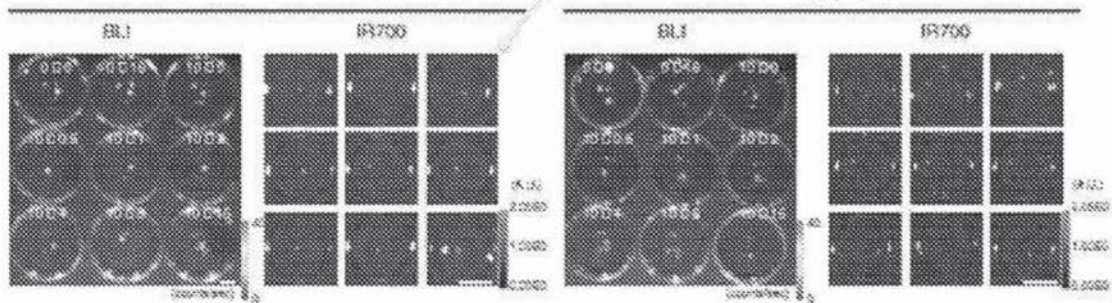


图 17B

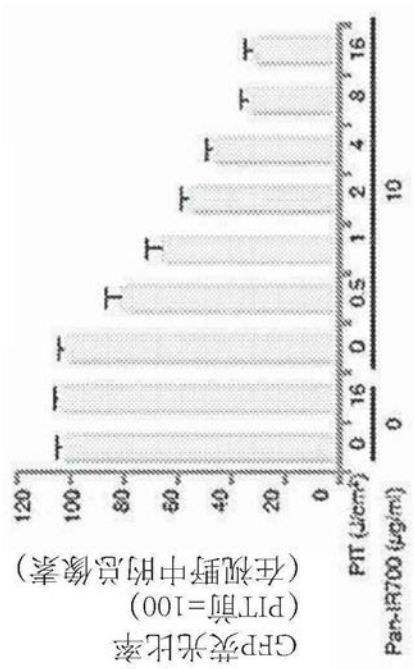


图17C

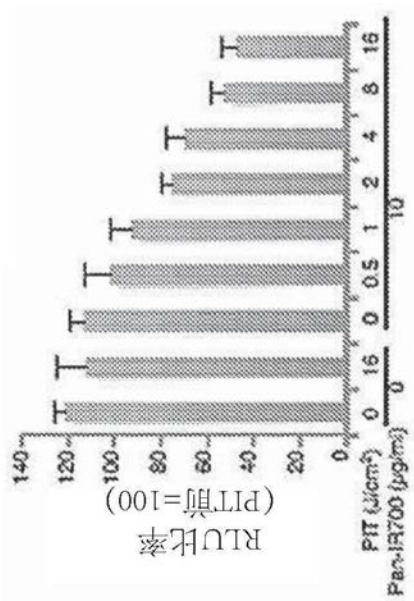


图17D

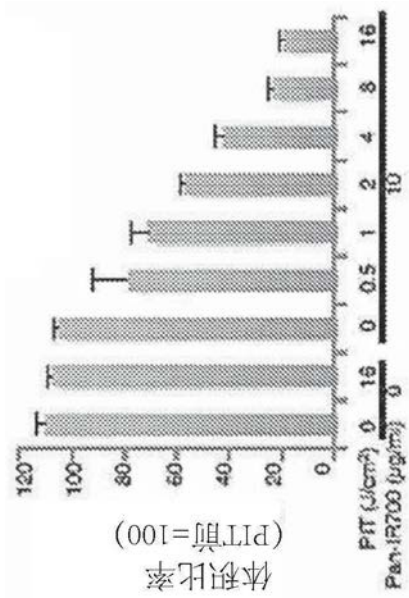


图17E

天
0 1 2 3 4
Pan-IR700
NIR光2 (10m²)
图像

图 18A

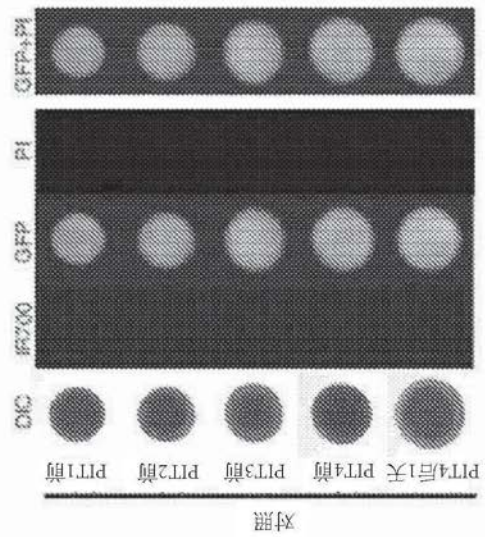
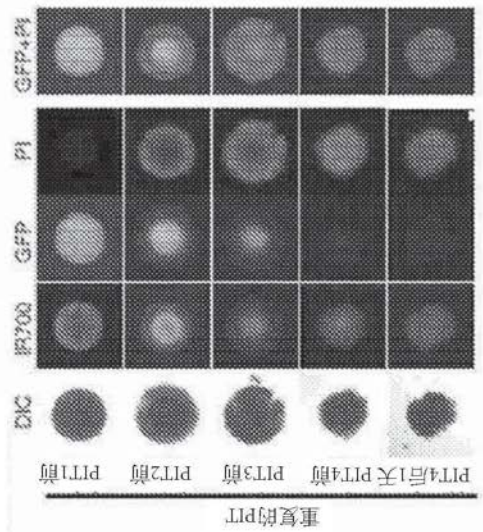


图 18B

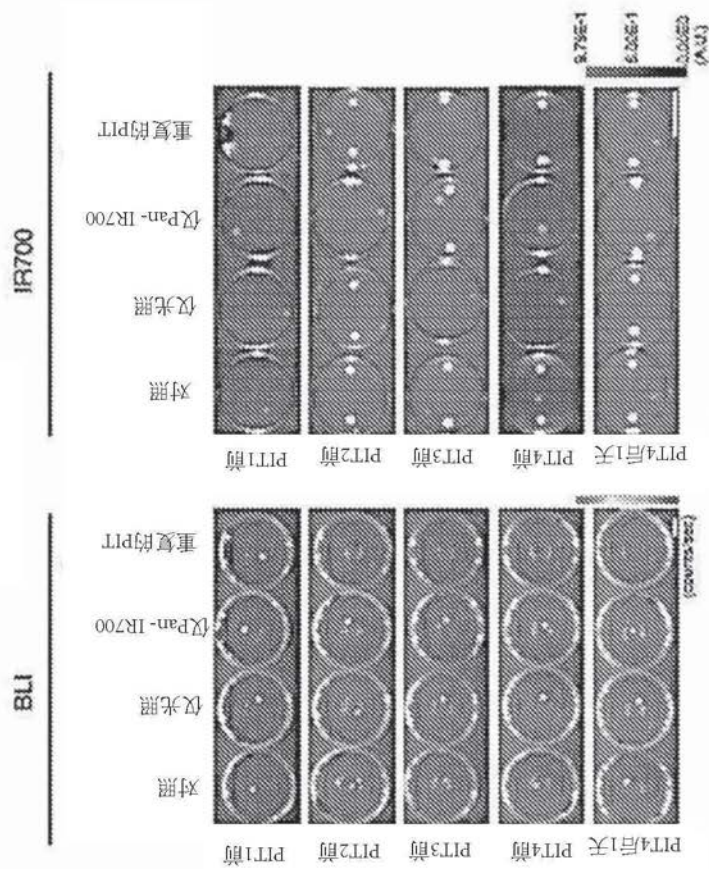


图 18C

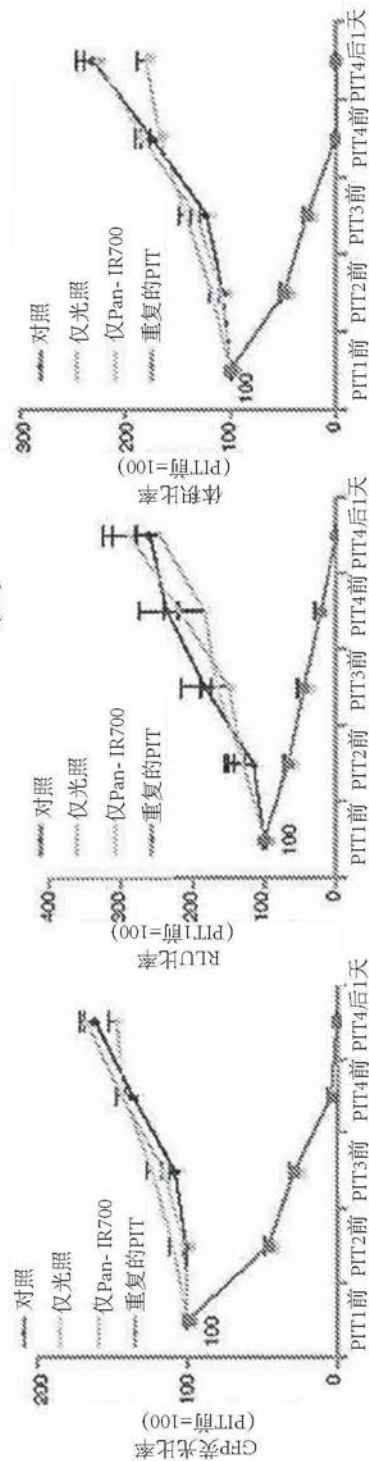


图 18D

图 18E

图 18F

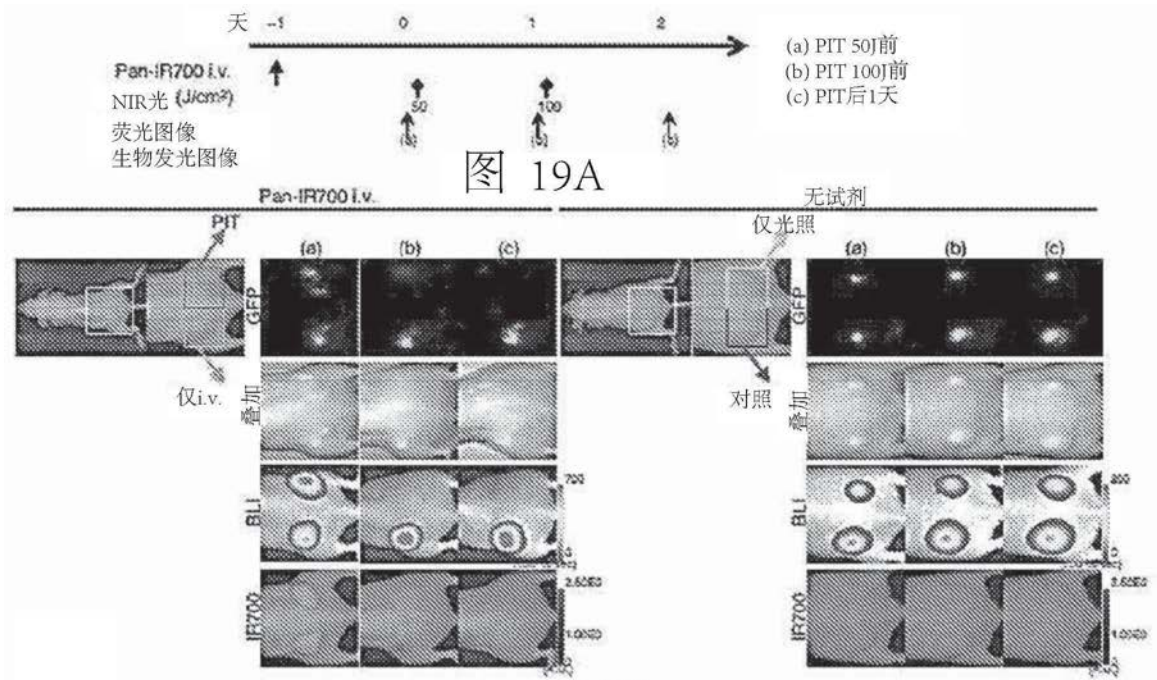


图 19B

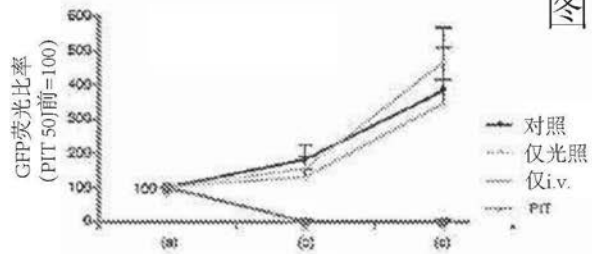


图 19C

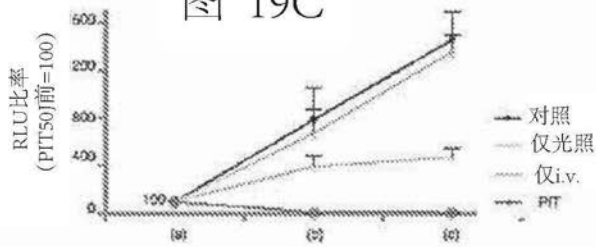


图 19D

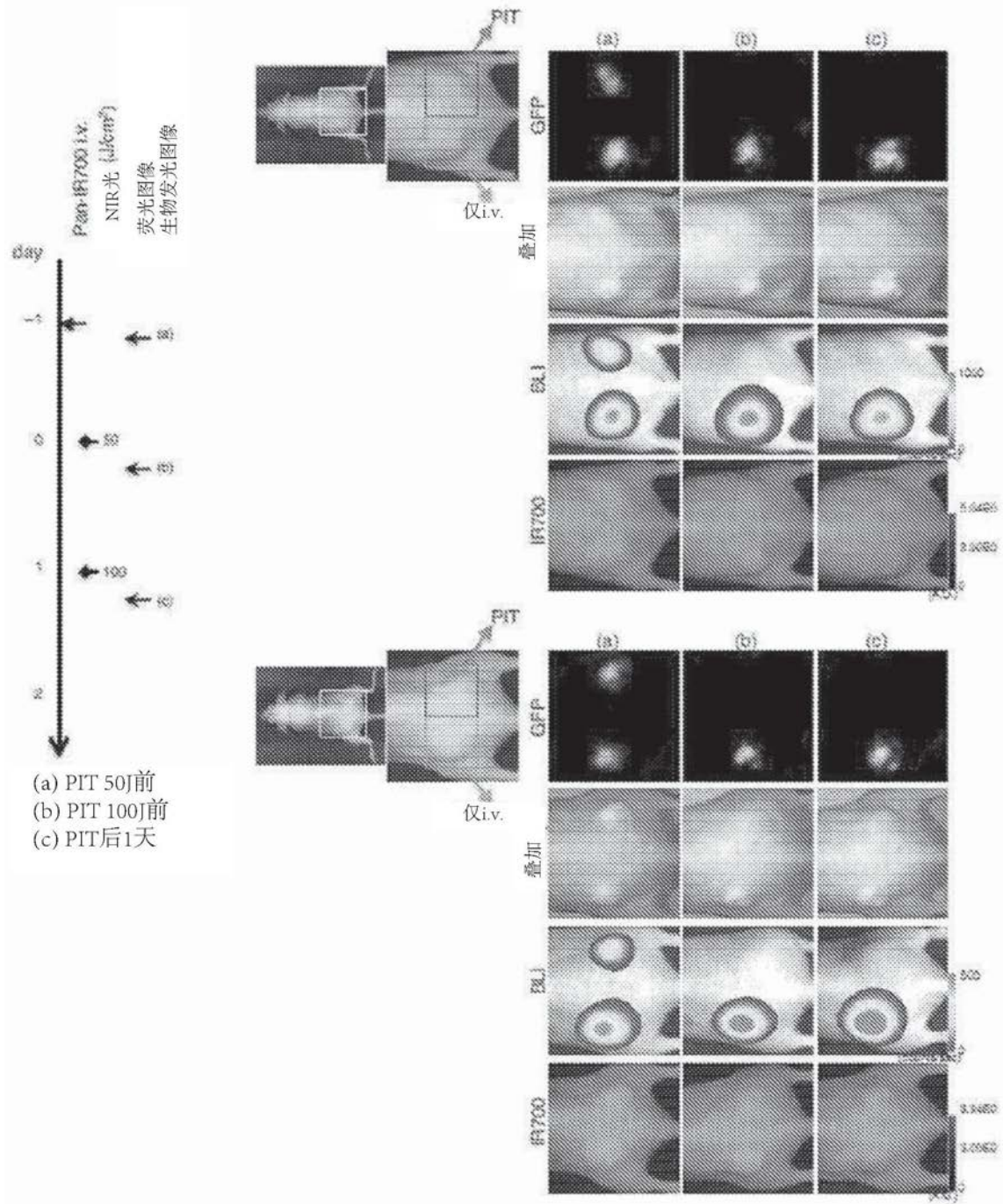


图20

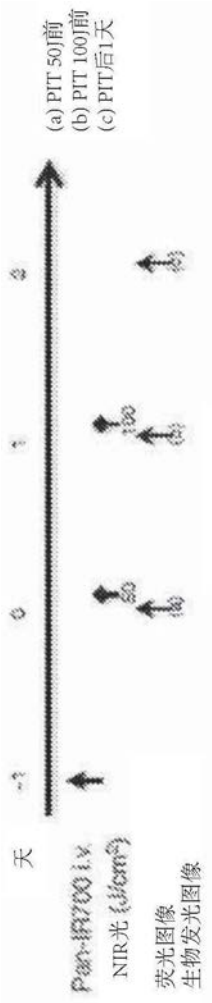


图21A

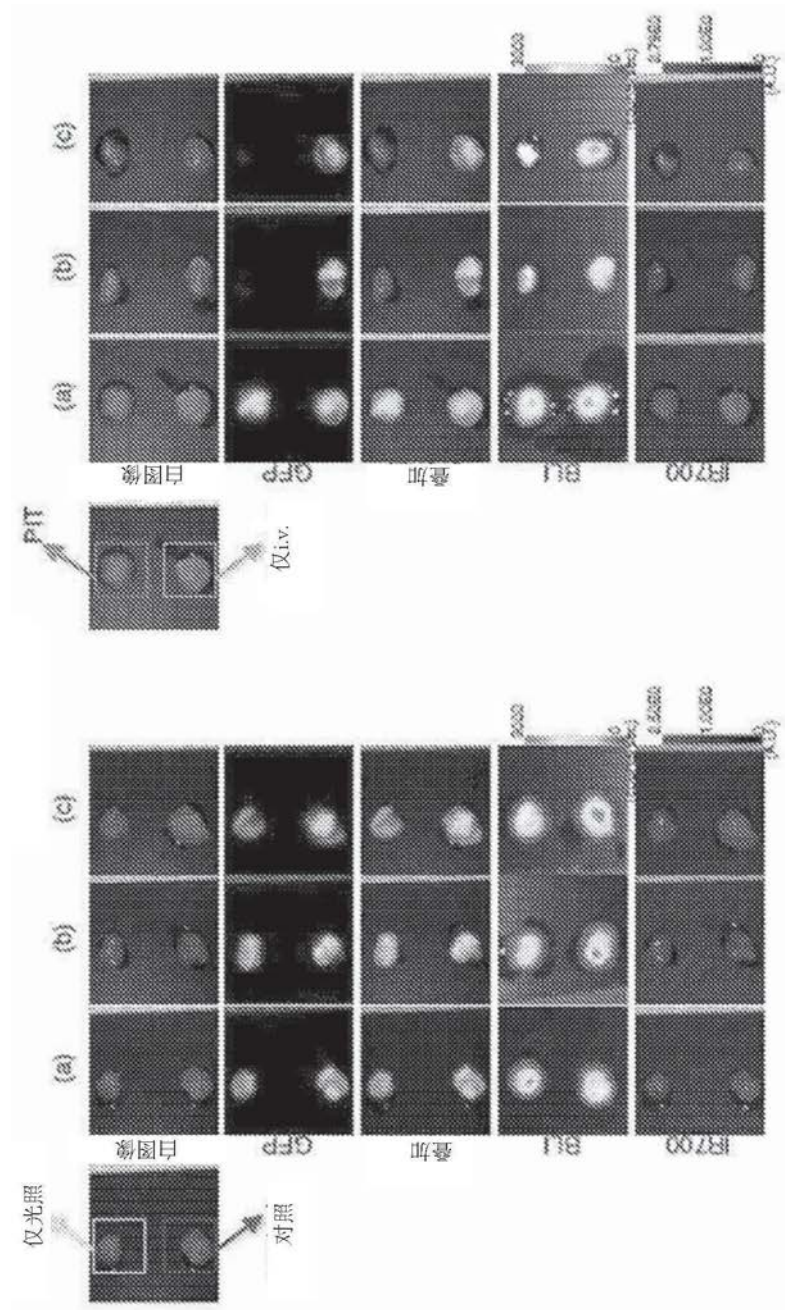


图21B

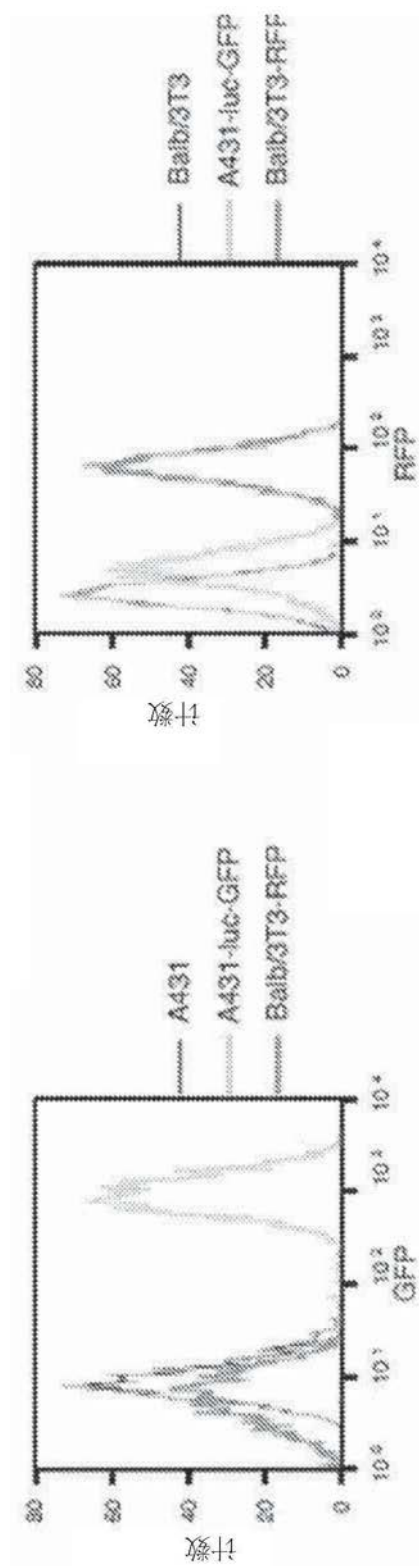


图22A

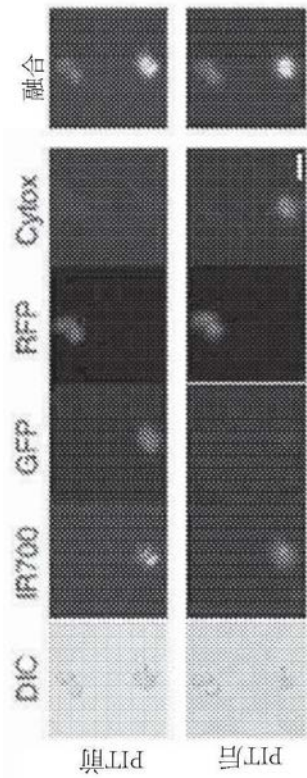


图22B

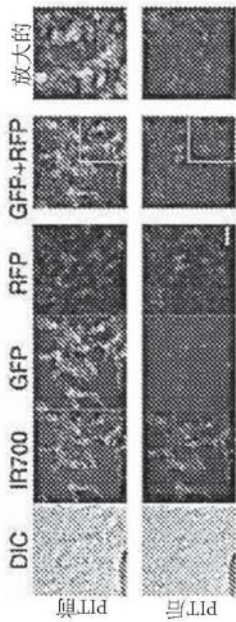


图23A

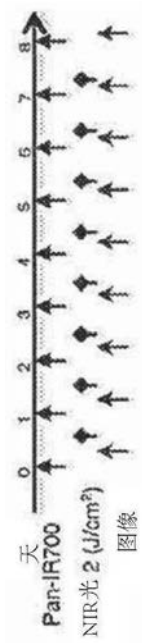


图23B

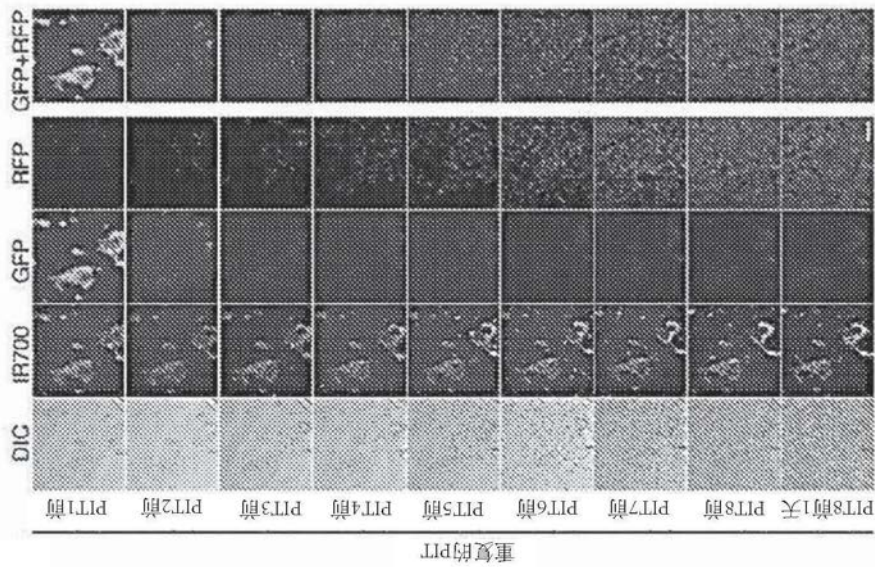


图23C

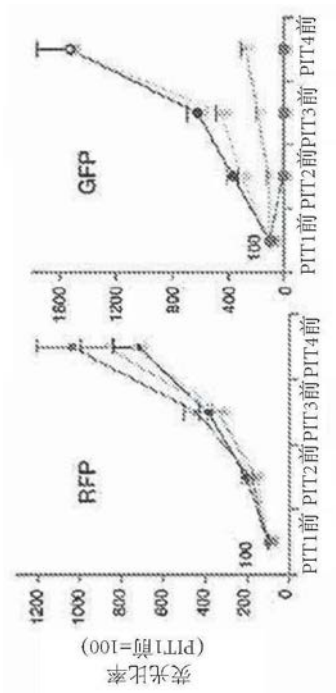


图23D

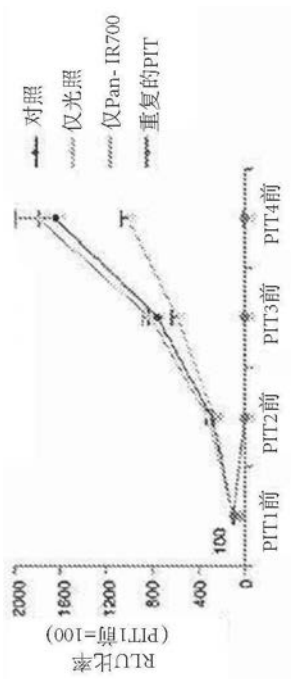


图23E

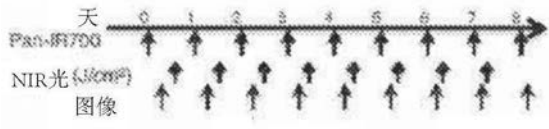


图24A

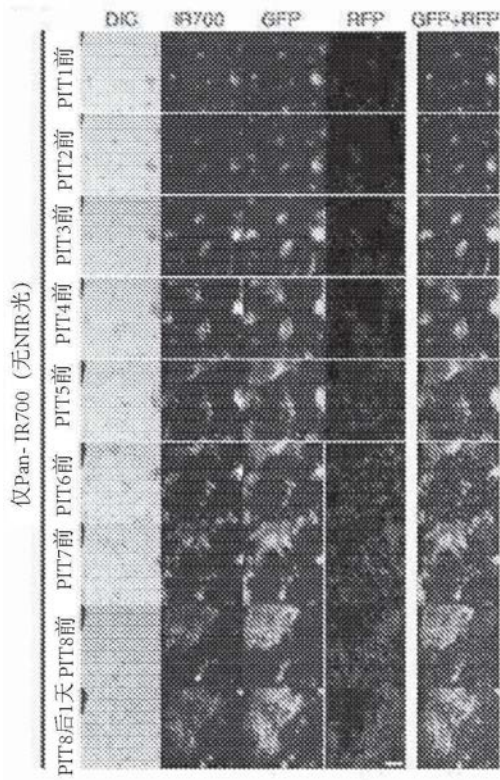


图24B

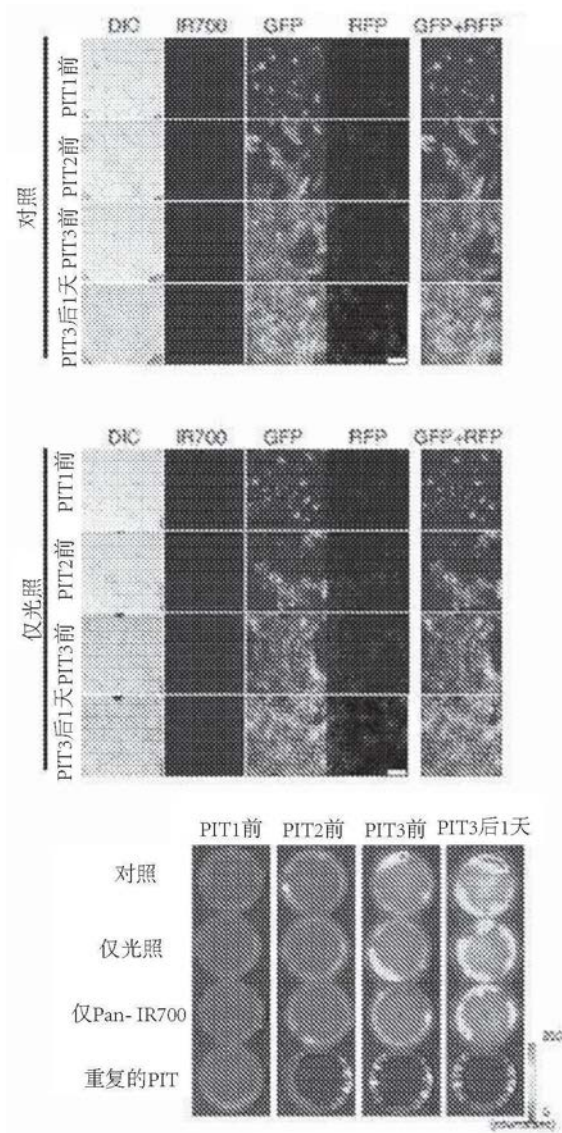


图24C

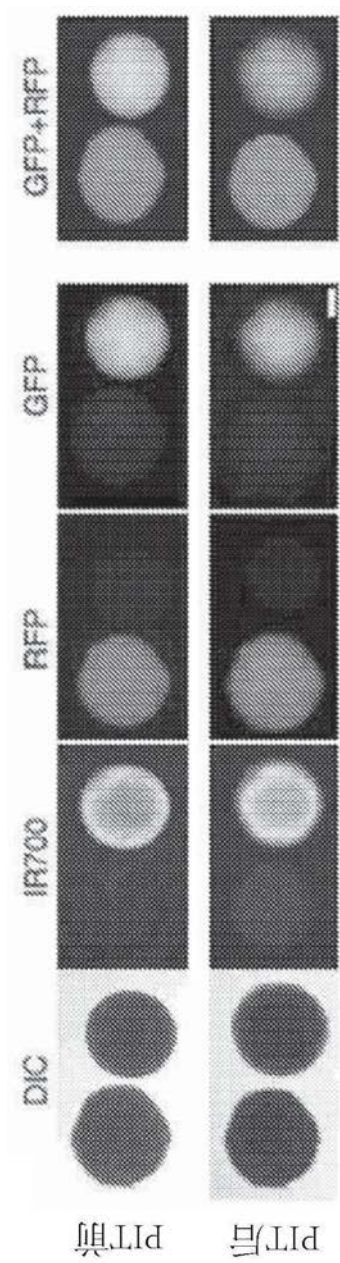


图25A

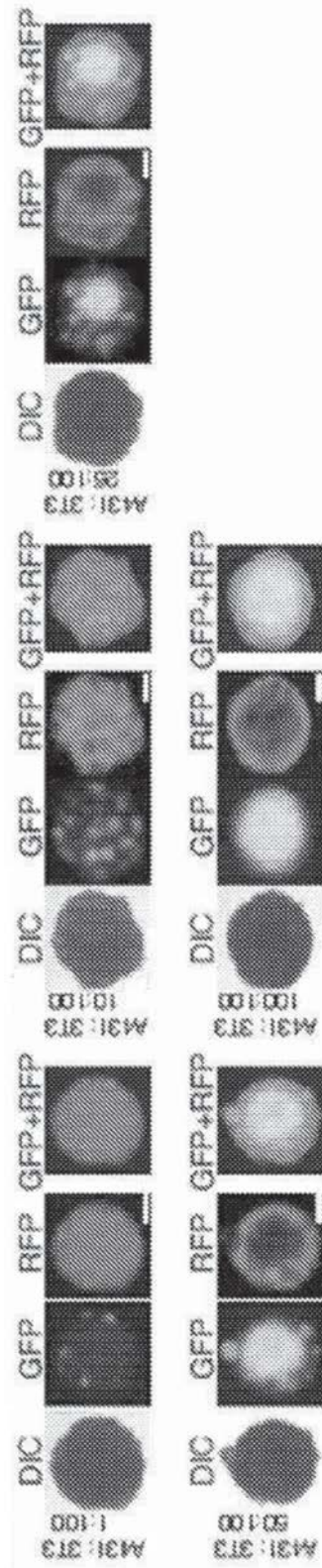


图25B



图 26A

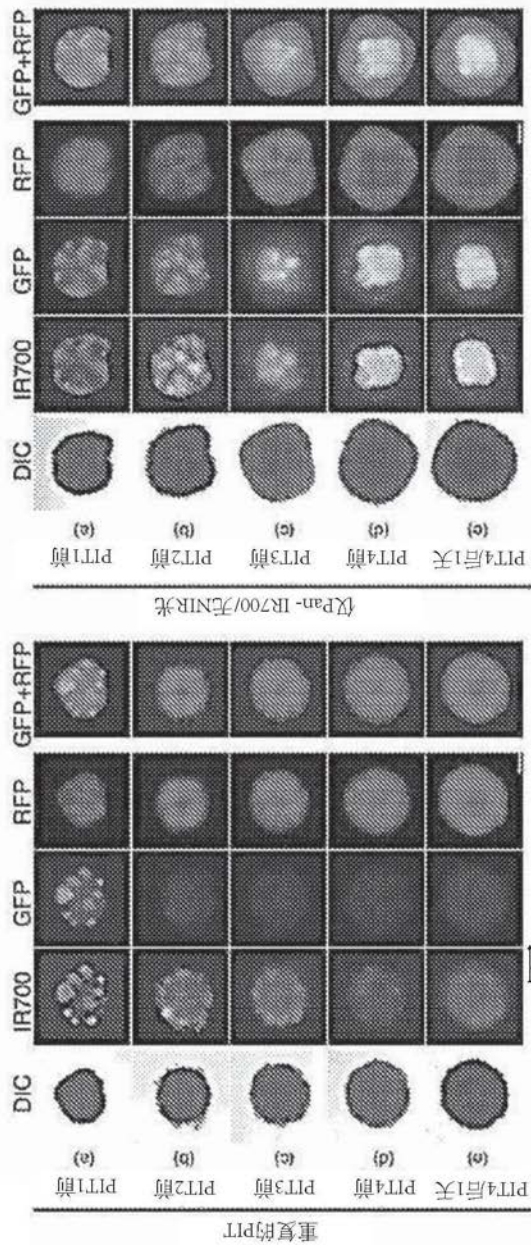


图 26B

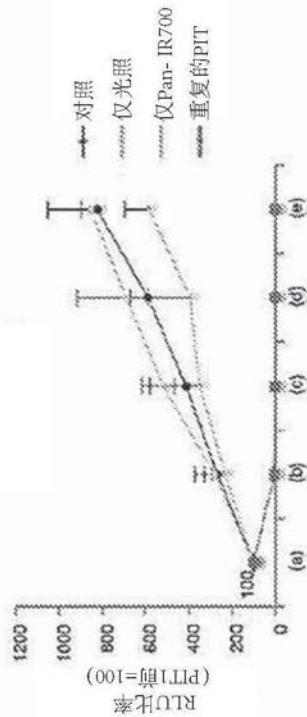
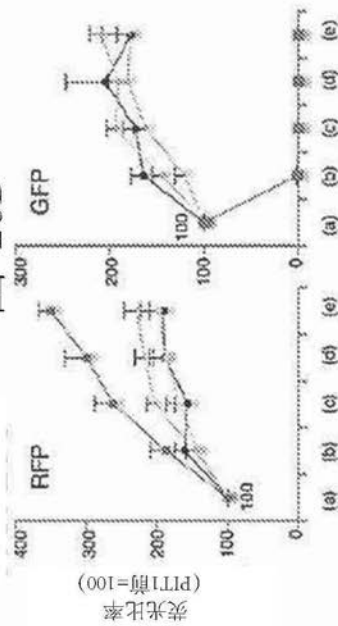
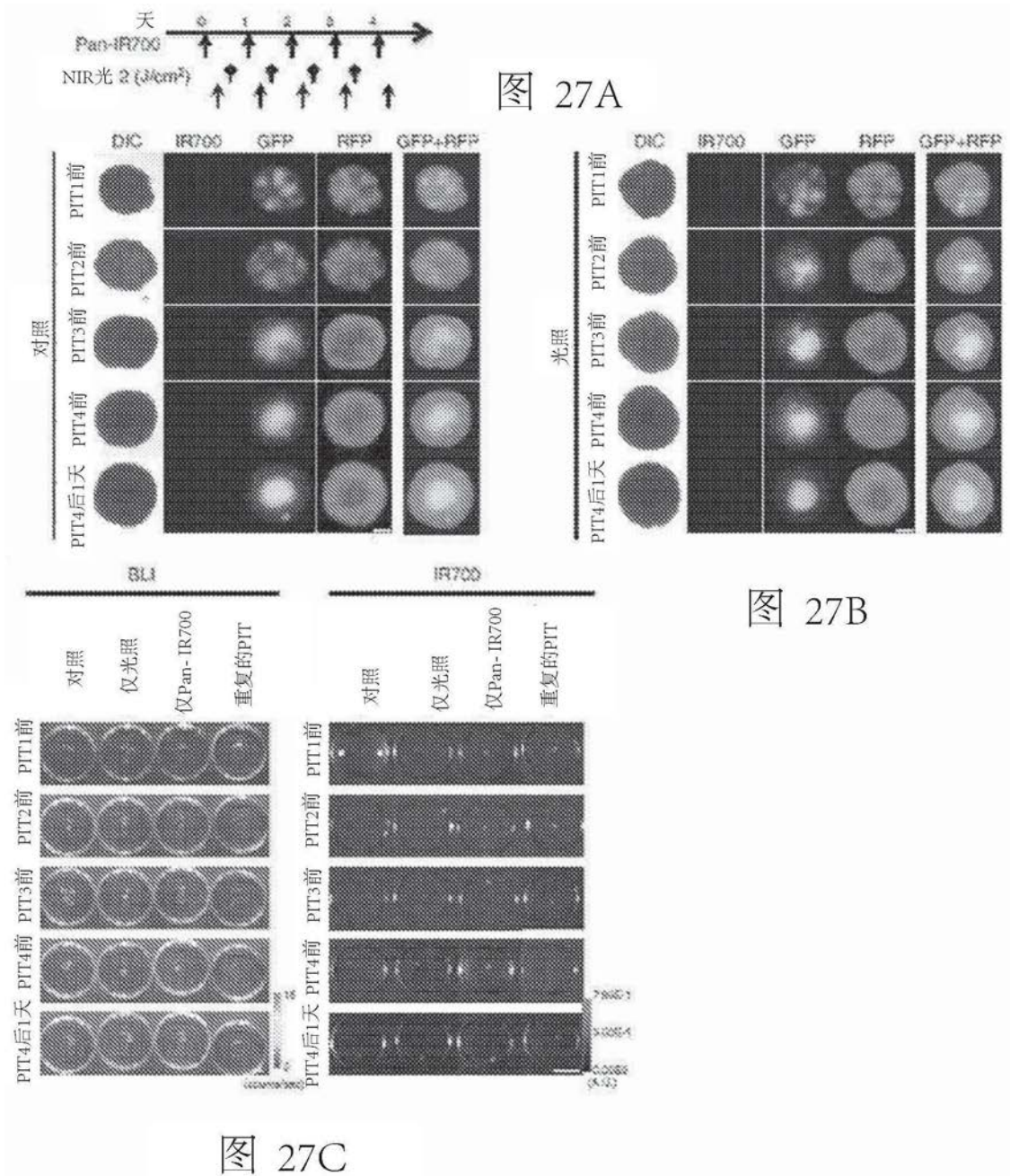


图 26C

图 26D



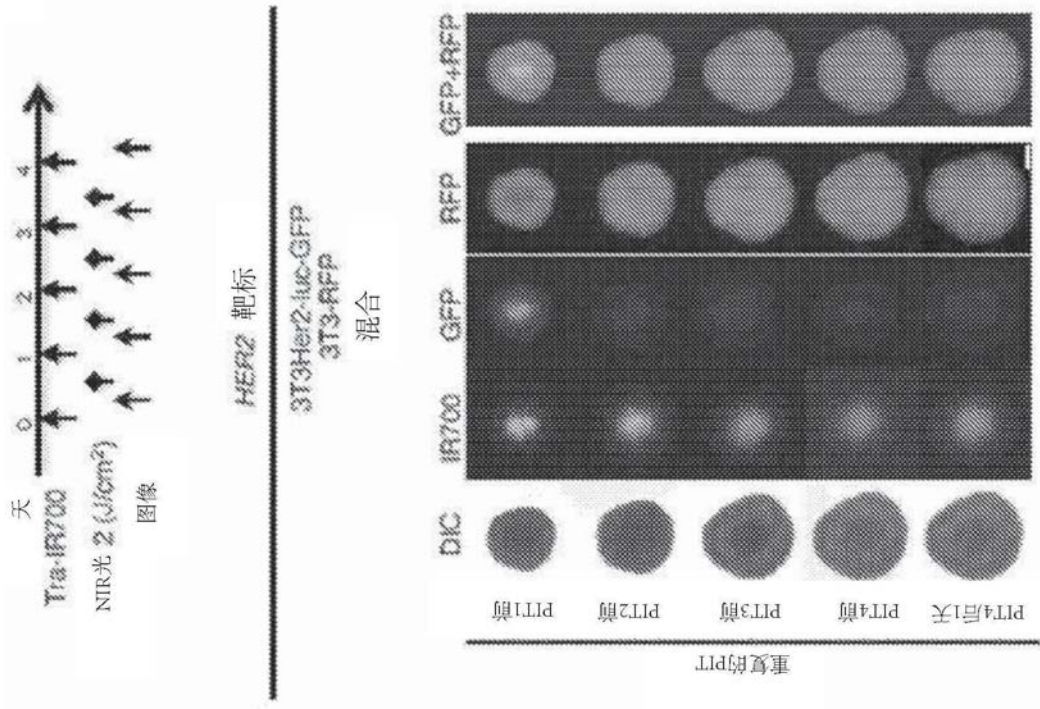


图28A

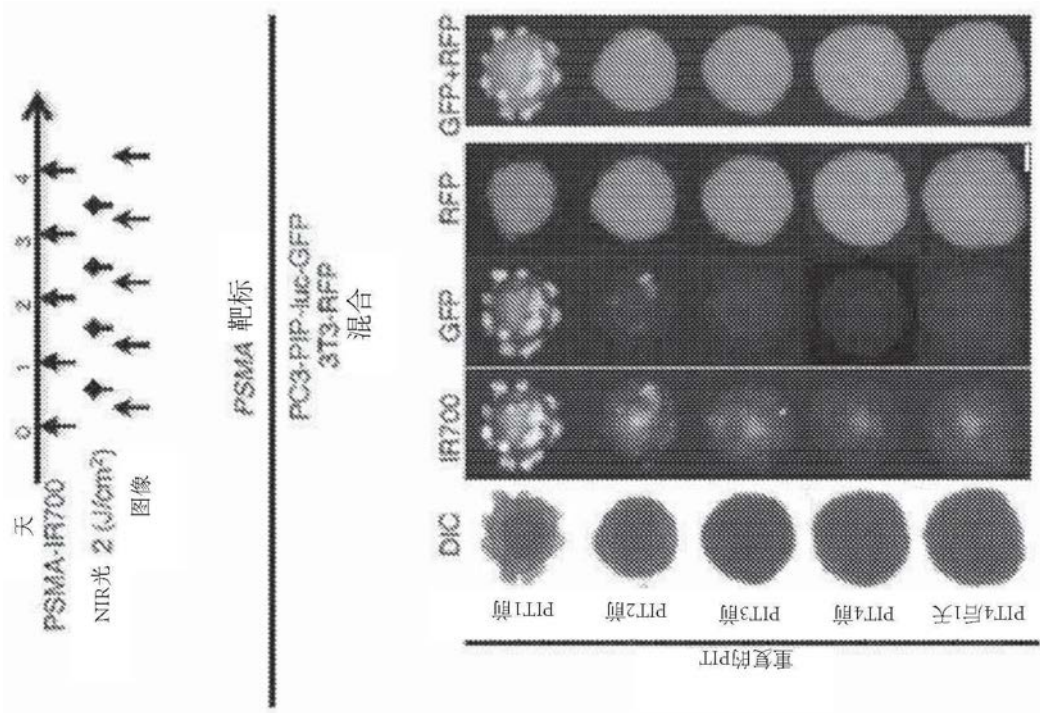


图28B

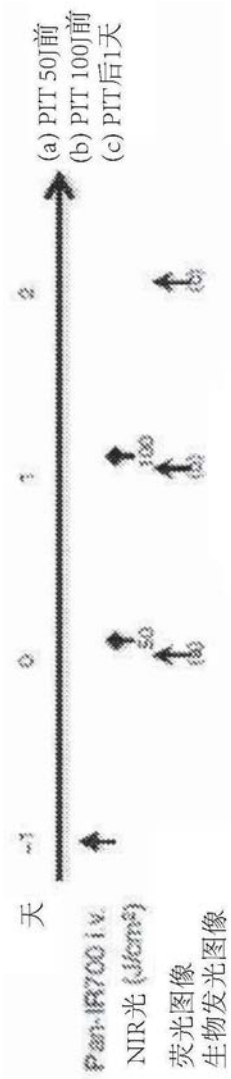


图29A

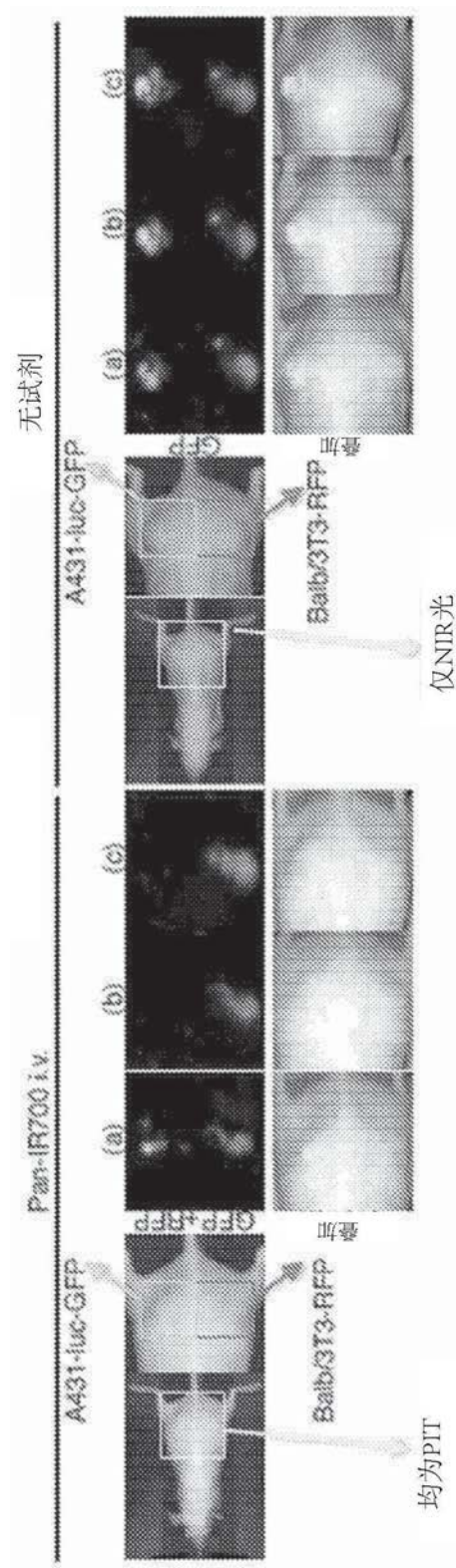
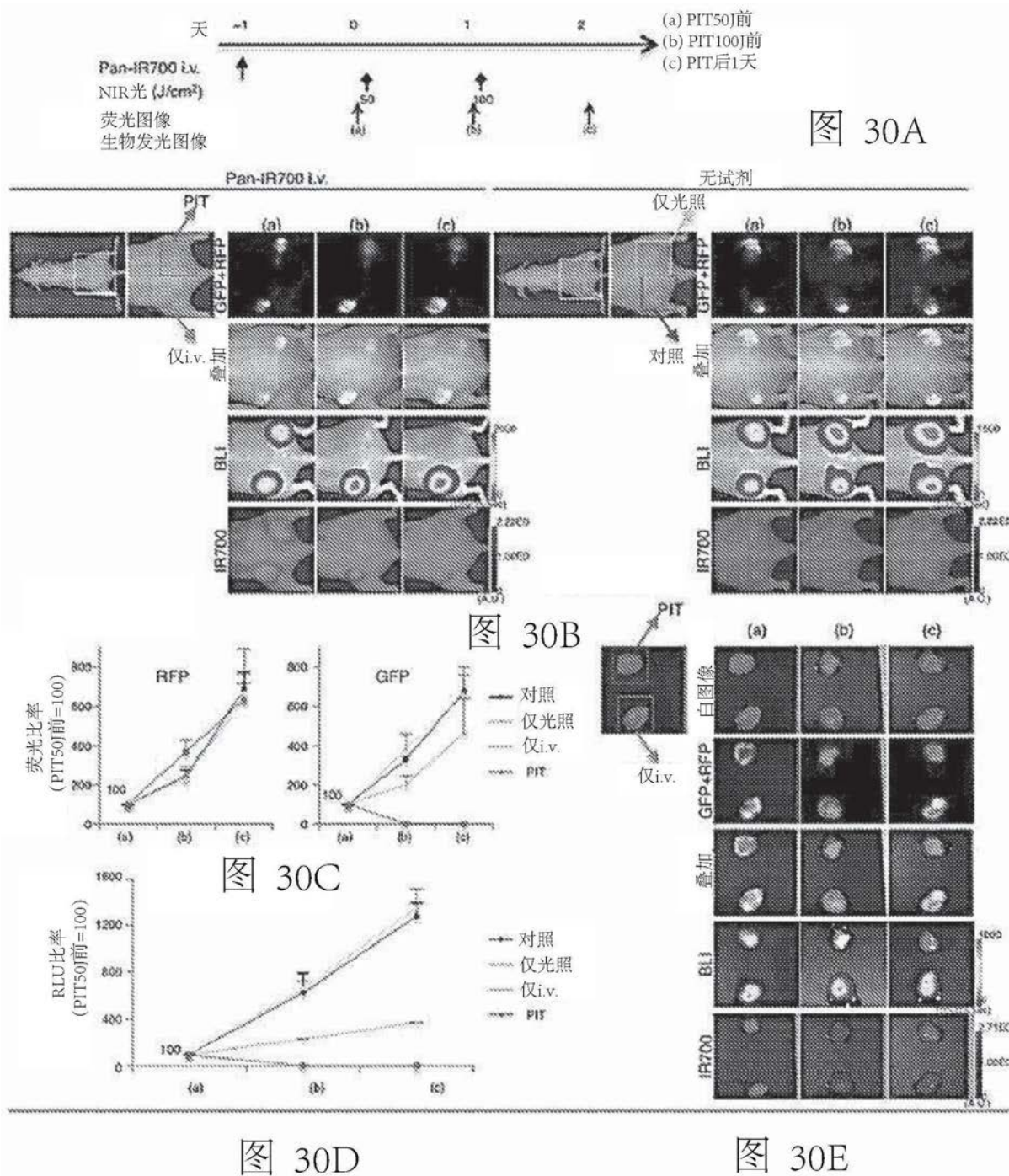


图29B



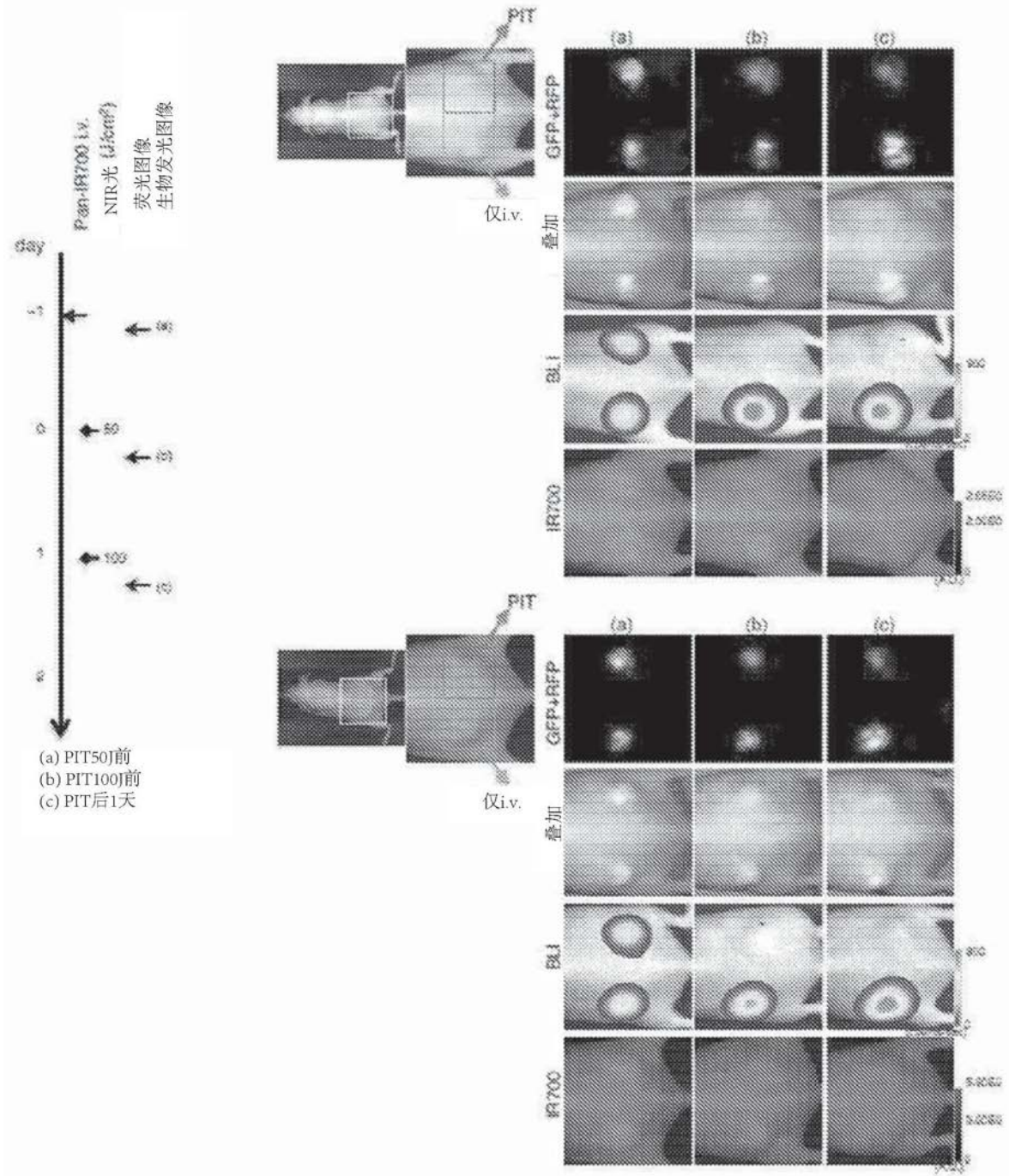


图31

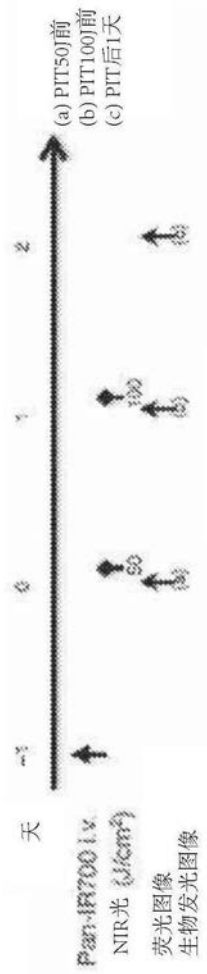


图32A

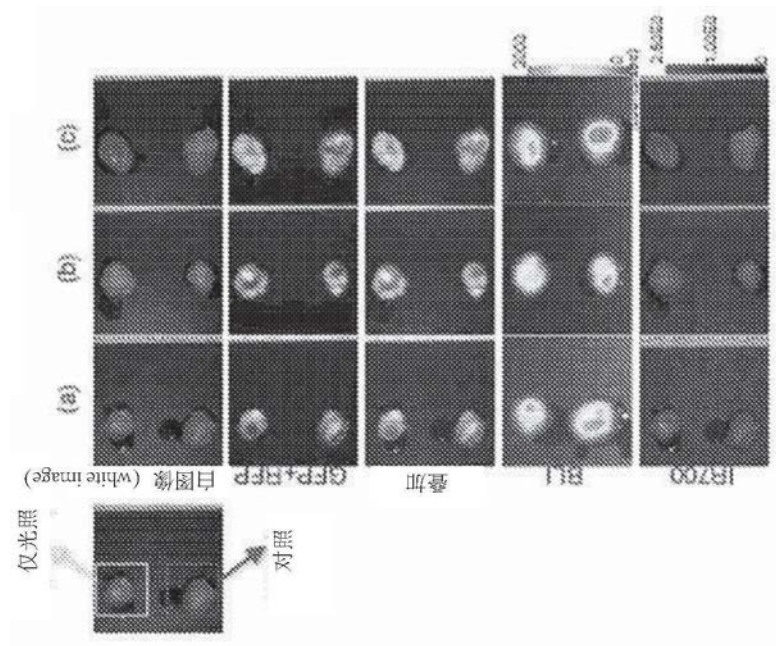


图32B