(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110178028 B
(45)授权公告日 2021.04.27

(21)申请号 201880006184.9
(22)申请日 2018.01.09
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110178028 A
(43)申请公布日 2019.08.27
(30)优先权数据
62/444,114 2017.01.09 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.07.08
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/012882 2018.01.09
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/129501 EN 2018.07.12
(73)专利权人 密苏里大学管理机构
地址 美国密苏里州
(72)发明人 R.坎南 A.扎姆布雷 A.厄彭德兰
(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
代理人 许斐斐
(51)Int.Cl.
G01N 33/48(2006.01)
A61K 47/00(2006.01)
A61K 47/64(2006.01)
(56)对比文件
CN 105451721 A,2016.03.30
US 2010021471 A1,2010.01.28
WO 2010014812 A3,2010.03.18
审查员 牛牧川

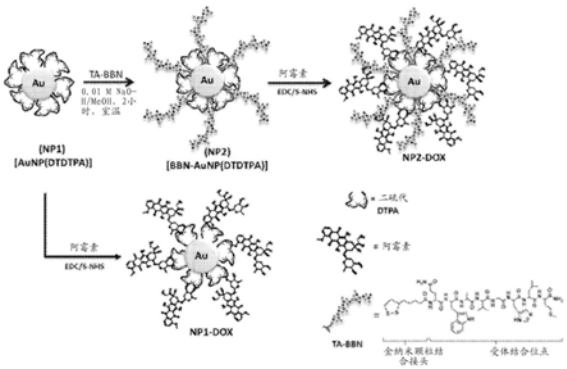
权利要求书2页 说明书14页 附图22页

(54)发明名称

用于肿瘤治疗的靶向阿霉素-金纳米缀合物

(57)摘要

本公开提供可以用于癌症治疗的阿霉素-金纳米缀合物。本公开提供了制备和使用纳米缀合物的方法。



CN 110178028 B

1.一种纳米缀合物,所述纳米缀合物包含:金纳米颗粒(AuNP)、二硫代二亚乙基三胺五乙酸(DTDTPA)、硫辛酸封端肽和阿霉素;

其中所述DTDTPA经由至少一个Au-S键直接地连接到所述金纳米颗粒表面;

所述硫辛酸封端肽经由至少一个Au-S键直接地连接到所述金纳米颗粒表面;以及

所述阿霉素连接到所述DTDTPA。

2.根据权利要求1所述的纳米缀合物,其中所述硫辛酸封端肽是硫辛酸封端的铃蟾肽。

3.根据权利要求2所述的纳米缀合物,其中所述硫辛酸封端的铃蟾肽具有以下序列:Lipoic-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH_2。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的纳米缀合物,其中所述阿霉素经由酰胺键连接到所述DTDTPA。

5.根据权利要求1至3中任一项所述的纳米缀合物,所述缀合物是使用包括使AuNP-DTDTPA纳米颗粒与所述硫辛酸封端肽缀合的方法而制备,其中在所述缀合反应中所述金纳米颗粒中的金与所述硫辛酸封端肽以1:0.5至1:4的化学计量比而存在。

6.根据权利要求5所述的纳米缀合物,其中所述金纳米颗粒中的金和所述硫辛酸封端肽以1:2的化学计量比存在于所述缀合反应中。

7.根据权利要求1至3中任一项所述的纳米缀合物,其中所述硫辛酸封端肽占所述纳米缀合物的1重量%至40重量%。

8.根据权利要求7所述的纳米缀合物,其中所述硫辛酸封端肽占所述纳米缀合物的20重量%至30重量%。

9.根据权利要求1至3中任一项所述的纳米缀合物,其中所述阿霉素占所述纳米缀合物的0.01重量%至0.05重量%。

10.根据权利要求9所述的纳米缀合物,其中所述阿霉素占所述纳米缀合物0.03重量%。

11.根据权利要求1至3中任一项所述的纳米缀合物,其中所述纳米缀合物具有使用动态光散射(DLS)所测量的110nm至140nm的流体动力学直径。

12.根据权利要求11所述的纳米缀合物,其中所述纳米缀合物具有使用动态光散射(DLS)所测量的120nm至130nm的流体动力学直径。

13.根据权利要求1至3中任一项所述的纳米缀合物,其中所述纳米缀合物具有-15mV至-30mV的ζ电位值。

14.根据权利要求13所述的纳米缀合物,其中所述纳米缀合物具有-20mV至-25mV的ζ电位值。

15.一种药物组合物,所述组合物包含根据权利要求1至14中任一项所述的纳米缀合物以及药学上可接受的载体。

16.根据权利要求1至14中任一项所述的纳米缀合物在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

17.根据权利要求16所述的用途,其中所述癌症是选自由以下项构成的组:急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性粒细胞白血病(AML)、骨肉瘤、乳腺癌、子宫内膜癌、胃癌、头颈部癌、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、肝癌、肾癌、多发性骨髓瘤、神经母细胞瘤、卵巢癌、肺癌、软组织肉瘤、胸腺瘤、甲状腺癌、膀胱癌、子宫肉瘤、前列腺癌、结肠癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、

韦尔姆斯氏瘤和瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症。

18.根据权利要求16或17所述的用途,其中通过注射将所述纳米缀合物向受试对象进行给药。

19.一种纳米缀合物,所述纳米缀合物包含:金纳米颗粒(AuNP)、二硫代二亚乙基三胺五乙酸(DTDTPA)和阿霉素,其中所述DTDTPA经由至少一个Au-S键直接地连接到所述金纳米颗粒表面;并且所述阿霉素连接到所述DTDTPA。

20.一种药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求19所述的纳米缀合物以及药学上可接受的载体。

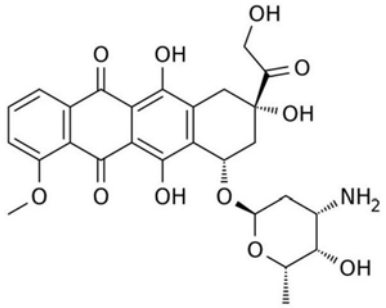
用于肿瘤治疗的靶向阿霉素-金纳米缀合物

技术领域

[0001] 本公开涉及可以用于癌症治疗的阿霉素-金纳米缀合物。本公开还涉及制备和使用该纳米缀合物的方法。

背景技术

[0002] 阿霉素(DOX)是目前用于若干肿瘤(包括乳腺癌、卵巢癌、肝癌、肾癌等)的临床应用中的化疗药物。

[0003] 

阿霉素（Doxorubicin）

[0004] 与阿霉素相关的主要副作用中的一个副作用是其心脏毒性。通过靶向给药或者通过降低该药物的浓度,可以使心脏毒性最小化。然而,减小所给药药物的量相应地降低细胞毒性和疗效。已开发出了用于靶向给药的抗体-药物缀合物,但仍然需要开发具有低心脏毒性和/或高疗效的阿霉素给药平台。

发明内容

[0005] 本公开提供用于阿霉素(doxorubicin)的靶向给药的金纳米缀合物。本公开提供一种纳米缀合物,其包含:金纳米颗粒(AuNP)、二硫代二亚乙基三胺五乙酸(DTDTPA)、硫辛酸封端肽和阿霉素,其中DTDTPA经由至少一个Au-S键直接地连接到金纳米颗粒表面,硫辛酸封端肽经由至少一个Au-S键直接地连接到金纳米颗粒表面,并且阿霉素连接到DTDTPA。

[0006] 在一些实施方案中,硫辛酸封端肽是硫辛酸铃蟾肽(thioctic bombesin)。在一些实施方案中,硫辛酸铃蟾肽具有以下序列:Lipoic-Gln- Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH_2。

[0007] 在一些实施方案中,阿霉素经由酰胺键连接到DTDTPA。

[0008] 本公开还提供一种用于制备本文中所公开的纳米缀合物的方法,其中该方法包括使AuNP-DTDTPA纳米颗粒与硫辛酸封端肽发生缀合,其中金纳米颗粒中的金和硫辛酸封端肽以约1:0.5至约1:4的化学计量比而存在。在一些实施方案中,金纳米颗粒中的金和硫辛酸封端肽以约1:2的化学计量比而存在。

[0009] 在一些实施方案中,本文中所公开的纳米缀合物包含该纳米缀合物的约20重量%至约30重量%的硫辛酸封端肽。在一些实施方案中,本文中所公开的纳米缀合物包含该纳米缀合物的约20重量%至约30重量%的硫辛酸封端肽。

[0010] 在一些实施方案中，本文中所公开的纳米缀合物包含该纳米缀合物的约0.01重量％至约0.05重量％的阿霉素。在一些实施方案中，本文中所公开的纳米缀合物包含该纳米缀合物的约0.03重量％的阿霉素。

[0011] 在一些实施方案中，该纳米缀合物具有如通过动态光散射法(DLS) 所测量的约110nm至约140nm的流体动力学直径。在一些实施方案中，该纳米缀合物具有如通过动态光散射法(DLS)所测量的约120nm至约130nm 的流体动力学直径。

[0012] 在一些实施方案中，该纳米缀合物具有约-15mV至约-30mV的ζ电位值 (动电位值)。在一些实施方案中，该纳米缀合物具有约-20mV至约-25mV 的ζ电位值。

[0013] 本公开还提供一种药物组合物，该药物组合物包含本文中所公开的纳米缀合物和药学上可接受的载体。

[0014] 本公开还提供一种用于治疗癌症的方法，该方法包括将本文中所公开的治疗有效量的纳米缀合物向需要其的受试对象进行给药。

[0015] 在一些实施方案中，癌症是选自由以下项构成的组：急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性粒细胞白血病(AML)、骨肉瘤、乳腺癌、子宫内膜癌、胃癌、头颈部癌、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、肝癌、肾癌、多发性骨髓瘤、神经母细胞瘤、卵巢癌、肺癌、软组织肉瘤、胸腺瘤 (thyomas)、甲状腺癌、膀胱癌、子宫肉瘤、前列腺癌、结肠癌、卵巢癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、韦尔姆斯氏瘤和瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症。

[0016] 在一些实施方案中，通过注射将该纳米缀合物向受试对象进行给药。

附图说明

[0017] 以下是对附图的简要描述，这些附图是为了图解说明本文中所公开示例性实施方案的目的而并非为了限制它们的目的。

[0018] 图1示出了BBN-AuNP-DTDTPA-DOX(NP2-DOX)的合成。

[0019] 图2示出了BBN-AuNP-DTDTPA-DOX(NP2-DOX)的示意性结构。

[0020] 图3示出了用[AuNP(DTDTPA)]对硫辛酸封端铃蟾肽(TA-BBN)进行滴定以测定被[AuNP(DTDTPA)]所容纳的TA-BBN的量(如利用HPLC 所测量)的图括号中给出了Au:BBN的化学计量比。

[0021] 图4A和图4B分别示出了纳米缀合物NP1和NP2的TEM(透射电子显微镜)图像。图4C示出了纳米缀合物NP1和NP2的UV可见吸收光谱。

[0022] 图5A示出了纳米缀合物NP2的XPS全扫描图谱。图5B示出了纳米缀合物NP2的C1区的XPS高分辨率图谱。

[0023] 图6A示出了纳米构建物NP2的S2p区的XPS高分辨率图谱。图6B示出了纳米构建物NP2的Au4f区的XPS高分辨率图谱。

[0024] 图7示出了在580nm处被激发和在590nm处发射时阿霉素的荧光光谱。

[0025] 图8示出通过荧光光谱法加载在纳米缀合物NP1和NP2上的阿霉素的估计。

[0026] 图9示出了纳米缀合物NP1和NP1-DOX的荧光光谱。

[0027] 图10示出了纳米缀合物NP2和NP2-DOX的荧光光谱。

[0028] 图11示出了NP1、NP2、NP1-DOX和NP2-DOX的UV可见吸收光谱。

[0029] 图12A和图12B示出了通过UV可见吸收光谱对纳米缀合物NP1和 NP2的体外稳定性

研究。图12C和图12D示出了通过流体动力学尺寸对纳米缀合物NP1和NP2的体外稳定性研究。图12E和图12F示出了当在各种生物学相关溶液中进行培养时通过ζ电位对纳米缀合物NP1和NP2的体外稳定性研究。

[0030] 图13示出了在表达GRP受体的前列腺肿瘤PC-3细胞中在Au:BBN的各种化学计量比(1:0.4、1:2、1:4)下针对^{125}I-BBN的纳米缀合物NP2的 IC_{50}值。

[0031] 图14示出了在无GRP表达的MDA-MB-231人乳腺癌细胞的中单独的阿霉素,NP1-DOX和NP2-DOX的体外细胞毒性。

[0032] 图15对在无GRP表达的人乳腺癌细胞的中将NP1-DOX、NP2-DOX的效果与单独的阿霉素的效果进行了比较。

[0033] 图16示出了在表达GRP的PC3人前列腺癌细胞中的单独的阿霉素、NP1-DOX和NP2-DOX的体外细胞毒性。

[0034] 图17对在表达GRP的人前列腺癌细胞中将NP1-DOX、NP2-DOX的效果与单独的阿霉素的效果进行了比较。

[0035] 图18对在表达GRP的人癌细胞(PC3)中将纳米缀合物(NP1-DOX 和NP2-DOX)中的阿霉素的IC_{50}值与单独的阿霉素的IC_{50}值进行了比较。

[0036] 图19对在表达GRP的人癌细胞(MDA-MB-231)中将纳米缀合物 (NP1-DOX和NP2-DOX)中阿霉素的IC_{50}值与单独的阿霉素的IC_{50}值进行了比较。

[0037] 图20对在表达GRP的人癌细胞(PC3)中和在无GRP表达的人癌细胞(MDA-MB-231)中的NP1-DOX和NP2-DOX的细胞死亡百分率的差异进行了比较。

具体实施方式

[0038] 胃泌素释放肽(GRP)受体在多种人癌细胞(如乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、和其它癌症)中被过表达。已知铃蟾肽及其类似物将GRP受体作为标靶。在某些实施方案中,本公开提供多成分纳米颗粒传递系统(纳米缀合物),该系统包含金纳米颗粒(AuNP)、靶向剂(例如铃蟾肽 (BBN))和作为癌症治疗剂的阿霉素(DOX)。用二硫代二亚乙基三胺五乙酸(DTDTPA)使金纳米颗粒稳定化,并且金纳米颗粒可以具有多层结构。因此,在某些实施方案中,纳米缀合物可以是BBN-AuNP (DTDTPA)-DOX。在乳腺癌细胞中执行的体外细胞毒性测定意外地表明 BBN-AuNP(DTDTPA)-DOX与游离阿霉素相比有效得多。

[0039] 考虑到本公开的有益效果,本文所公开的本发明的各种实施例和实施方案是可行的,并且对于本领域技术人员将是显而易见的。在本公开中对“一些实施方案”、“某些实施方案”和类似短语的引述各自表示这些实施方案是本发明的非限制性例,并且存在不被排除在外的替代实施方案。

[0040] 本文中所使用的冠词“一个”、“一种”和“所述”指代该冠词的一个或多个(即,指代至少一个)的语法对象。通过举例,“一种要素”表示一种要素或多于一种的要素。术语“或”表示“和/或”。术语“包括”、“具有”、“包含”和“含有”应被理解成开放式术语(即,表示“包括但不限于”)。

[0041] 词语“包括”是以与其开放的含义一致的方式而使用,也就是说意味着一个给定的产品或方法也可以任选地具有超出所明确描述的另外的特征或要素。应当理解的是,在用用语“包括”描述实施方案的情况下,用“由...组成”和/或“基本上由...组成”所描述的另

外类似实施方案也是可想到的并且是在本公开的范围内。

[0042] 如本文中所使用的术语，“约”表示所述值的±10％。仅通过举例，包含约30重量％的化合物的组合物可以包含从27重量％的该化合物至高达并且包含33重量％的该化合物。

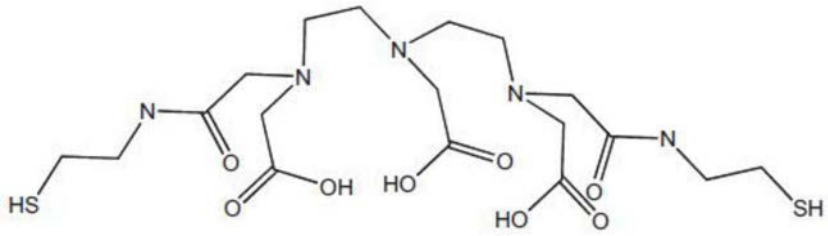
[0043] 如本文中所使用的术语，“纳米缀合物”是指包含金纳米颗粒和其它成分(如稳定剂、靶向剂、和治疗剂)的纳米材料。在某些实施方案中，稳定剂和靶向剂可以经由一个或多个共价键或非共价键直接地连接到金纳米颗粒表面。一些组分(如治疗剂)可以经由另一个组分(如稳定剂)连接到金纳米颗粒。

[0044] 如本文中所使用的术语“治疗有效量”表示当向患者给药时有效地提供预期治疗益处的量。基于个体的年龄和一般状况等，为“有效的”的量可在因受试对象而异。

[0045] 在某些实施方案中，本公开提供纳米缀合物，其包含金纳米颗粒 (AuNP)、二硫代二亚乙基三胺五乙酸(DTDTPA)、硫辛酸封端肽和阿霉素，其中DTDTPA经由至少一个Au-S键直接地连接到金纳米颗粒表面，硫辛酸封端肽经由至少一个Au-S键直接地连接到金纳米颗粒表面，并且阿霉素连接到DTDTPA。

[0046] 在某些实施方案中，本文中所公开的纳米缀合物基本上是由金纳米颗粒(AuNP)、二硫代二亚乙基三胺五乙酸(DTDTPA)、硫辛酸封端肽和阿霉素组成，其中DTDTPA经由至少一个Au-S键直接地连接到金纳米颗粒表面，硫辛酸封端肽经由至少一个Au-S键直接地连接到金纳米颗粒表面，并且阿霉素连接到DTDTPA。

[0047] 用DTDTPA稳定化的金纳米颗粒(即，AuNP-DTDTPA)在本领域中是已知的。例如，WO 2015/103028及Debouttiere等人， Advan.Funt.Mater.2006，16:2330-39中描述了AuNP-DTDTPA的制备和使用，并且这两个参考文件通过引用全文并入本文中。下面示出了DTDTPA的化学结构。DTDTPA分子可以经由一个或两个Au-S键连接到金纳米颗粒表面。

[0048] 

[0049] 不希望受到理论的约束，一般认为在AuNP表面附近的DTDTPA环可以包含一个、二个、三个、四个、五个或更多的DTDTPA分子。例如，在一些实施方案中并且不希望再次受到具体理论的约束，一般认为给定 DTDTPA分子的两个硫醇基均可以形成到AuNP表面的Au-S键，从而与一个DTDTPA分子形成环。在另一个实施方案中，给定DTDTPA分子的一个硫醇基可以形成到AuNP表面的Au-S键，同时第二硫醇基可以与第二 TDTPA分子形成分子间二硫键(S-S)。该第二DTDTPA分子可以经由二硫键连接到又一个DTDTPA分子，或者可以经由Au-S键连接到AuNP表面，从而形成由两个或更多DTDTPA分子所组成的环。基于DTDTPA分子如何自我排列，稳定化的纳米颗粒可以含有在AuNPs的表面上的五乙酸分子的多层有机外壳。参见Debouttiere等人，Advan.Funt.Mater.2006， 16:2330-39；以及图2。

[0050] 在一些实施方案中，本文中所公开的纳米缀合物包含该纳米缀合物的约10重量％至约60重量％的DTDTPA。在一些实施方案中，该纳米缀合物包含以该纳米缀合物的重量％计的DTDTPA的约10重量％、约15重量％、约20重量％、约25重量％、约30重量％、约35重量％、约40重量％、约 41重量％、约42重量％、约43重量％、约44重量％、约45重量％、约46

重量%、约47重量%、约48重量%、约49重量%、约50重量%、约51重量%、约52重量%、约53重量%、约54重量%、约55重量%或约60重量%，例如约45重量%，或者在前述值的任意两个前述值之间的范围，例如约30重量%至约60重量%、或者约40重量%至约50重量%。在一些实施方案中，该纳米缀合物包含该纳米缀合物的约45重量%的DTDTPA。

[0051] 在典型实施方案中并且如上所述，本文中所公开的纳米缀合物可以包含作为靶向剂的硫辛酸封端肽。在某些实施方案中，靶向肽可以是铃蟾肽。铃蟾肽可以用于使金纳米材料官能化用于靶向某些肿瘤细胞。参见Chanda 等人，Nano Lett.2009,9(5):1798-1805;Chanda等人PNAS 2010,107 (19):8760-8765;Suresh等人，Bioconjuate Chem.2014,25,1565-1579;以及Silva等人，Bioconjuate Chem.2016,27,1153-1164。所有这些参考文件的全部内容以参考的方式并入本文中。从两栖动物铃蟾的皮肤中分离的14-氨基酸肽铃蟾肽及相关的胃泌素释放肽(GRP)呈现在多种肿瘤组织 (例如在小细胞肺癌、前列腺癌、乳腺癌、和结肠癌中)的增强的反应。已报道具有修改结构的铃蟾肽类似物对于GRP受体呈现类似或甚至更高的亲和力。参见例如Chanda等人，Nano Lett.2009,9(5):1798-1805及其中所引用的参考文件。在本文中所描述的某些实施方案中，将图1中所示的七氨基酸截短的铃蟾肽类似物(BBN)用作靶向剂。

[0052] 在一些实施方案中，硫辛酸封端肽可以是硫辛酸封端的铃蟾肽(TA- BBN，在本文中可替代地被称为BBN)具有以下序列:Lipoic-Gln-Trp-Ala- Val-Gly-His-Leu-Met-NH_2。

[0053] 在一些实施方案中，硫辛酸封端肽(例如，TA-BBN)可以经由一个或两个Au-S键直接地连接到金纳米颗粒表面。

[0054] 在一些实施方案中，本文中所公开的纳米缀合物包含该纳米缀合物的约1重量%至约40重量%的硫辛酸封端肽。在一些实施方案中，该纳米缀合物包含以纳米缀合物重量%计的硫辛酸封端肽的约1重量%、约重量5%、约10重量%、约11重量%、约12重量%、约13重量%、约14重量%、约 15重量%、约16重量%、约17重量%、约18重量%、约19重量%、约20 重量%、约21重量%、约22重量%、约23重量%、约24重量%、约25重量%、约26重量%、约27重量%、约28重量%、约29重量%、约30重量%、约35重量%或约40重量%，例如约20重量%或约25重量%，或者在前述值的任意两个前述值之间的范围，例如约10重量%至约30重量%、约 20重量%至约30重量%或约15重量%至约25重量%。在一些实施方案中，该纳米缀合物包含该纳米缀合物的约20重量%或约25重量%的硫辛酸封端肽。

[0055] 在一些实施方案中，随后可以与阿霉素连接的AuNP-DTDTPA-BBN构建物可以通过包括使AuNP-DTDTPA纳米颗粒与硫辛酸封端肽缀合的方法而制备，其中金纳米颗粒中的金和硫辛酸封端肽能够以约1:0.5至约1:4的化学计量比存在于缀合反应中。本文中所使用的化学计量比是指摩尔比。

[0056] 在一些实施方案中，在缀合反应中所使用的金纳米颗粒中的金与硫辛酸封端肽的化学计量比可以是约1:0.75、约1:1、约1:1.5、约1:2、约1:2.5、约1:3、约1:3.5或约1:4，例如约1:2或者在任意二个前述比率之间的范围，例如约1:1至约1:4、约1:1至约1:3、约1:1至约1:2、约1:1.5至约1:4、约 1:1.5至约1:3、约1:1.5至约1:2.5或者约1:1.5至约1:2。

[0057] 在一些实施方案中，在缀合反应中所使用硫辛酸封端肽的量是采用至少约1:1.5、至少约1:2、至少约1:2.5或者至少约1:3的与金纳米颗粒中的金的比率。

[0058] 在一些实施方案中，在缀合反应中所使用金纳米颗粒中的金与硫辛酸封端肽的化

学计量比约为1:2。

[0059] 通常，纳米缀合物中的阿霉素经由形成于DTDTPA的羧基与阿霉素的氨基之间的酰胺键而连接到DTDTPA。

[0060] 在一些实施方案中，本文中所公开的纳米缀合物包含该纳米缀合物的约0.01重量％至约0.05重量％的阿霉素。在一些实施方案中，该纳米缀合物可以包含以该纳米缀合物的重量％计的阿霉素的约0.01重量％、约0.015重量％、约0.02重量％、约0.025重量％、约0.03重量％、约0.035重量％、约 0.04重量％、约0.045重量％或约0.05重量％，例如约0.03重量％或者在任意二个前述值之间的范围，例如约0.01重量％至约0.04重量％、约0.01重量％至约0.03重量％、约0.02重量％至约0.05重量％、约0.02重量％至约 0.04重量％、约0.02重量％至约0.03重量％或者约0.025重量％至0.035重量％。在一些实施方案中，该纳米缀合物包含该纳米缀合物的约0.03重量％的阿霉素。

[0061] 纳米缀合物可以用它们的流体动力学直径(即，流体动力学尺寸)来表征。在一些实施方案中，本文中所公开的纳米缀合物具有如通过动态光散射(DLS)所测量的约100nm至约150nm或者约110nm至约140nm的流体动力学直径。在一些实施方案中，该纳米缀合物具有如通过动态光散射法(DLS)所测量的约100nm、约110nm、约115nm、约120nm、约125nm、约130nm、约135nm、约140nm、约145nm或约150nm，例如约125nm，或者在前述值的任意二个前述值之间的范围，例如约120nm至约125nm、约120nm至约130nm或者约125nm至约130nm的流体动力学直径。在一些实施方案中，该纳米缀合物具有如利用动态光散射(DLS)所测量的约125nm的流体动力学直径。

[0062] 纳米缀合物也可以用它们的ζ电位来表征。在一些实施方案中，本文中所公开的纳米缀合物具有约-15mV至约-30mV的ζ电位值。在一些实施方案中，该纳米缀合物具有约-15mV、约-16mV、约-17mV、约-18mV、约- 19mV、约-20mV、约-21mV、约-22mV、约-23mV、约-24mV、约-25mV、约-26mV、约-27mV、约-28mV、约-29mV或约-30mV，例如约-23mV，或者在任意二个前述值之间的范围，例如约-15mV至约-25mV、约-20mV至约 -25mV或者约-20mV至约-30mV的ζ电位值。在一些实施方案中，该纳米缀合物具有约-20mV至约-25mV的ζ电位值。

[0063] 在一个实施方案中，本文中所公开的纳米缀合物基本上是由金纳米颗粒(AuNP)、二硫代二亚乙基三胺五乙酸(DTDTPA)、硫辛酸封端的铃蟾肽(TA-BBN)和阿霉素所组成，其中DTDTPA经由至少一个Au-S键直接地连接到金纳米颗粒表面，TA-BBN经由至少一个Au-S键直接地连接到金纳米颗粒表面，并且阿霉素连接到DTDTPA；其中AuNP-DTDTPA-BBN 纳米缀合物前体是通过包括使AuNP-DTDTPA纳米颗粒与TA-BBN缀合的方法而制备，其中金纳米颗粒中的金和硫辛酸封端的铃蟾肽以约1:2的化学计量比而存在于缀合反应中。

[0064] 在某些实施方案中，上述的纳米缀合物可以包含金纳米颗粒(AuNP)、二硫代二亚乙基三胺五乙酸(DTDTPA)、硫辛酸封端的铃蟾肽(TA-BBN) 和阿霉素，其中该纳米缀合物包含该纳米缀合物的约15重量％至约25重量％的TA-BBN、约25重量％至约35重量％的DTDTPA和约0.01重量％至约 0.05重量％的阿霉素。

[0065] 在某些实施方案中，上述的纳米缀合物可以包含金纳米颗粒(AuNP)、二硫代二亚乙基三胺五乙酸(DTDTPA)、硫辛酸封端的铃蟾肽(TA-BBN) 和阿霉素，其中该纳米缀合物包含该纳米缀合物的约15重量％至约25重量％的TA-BBN、约25重量％至约35重量％的DTDTPA和约0.01重量％至约 0.05重量％的阿霉素。

[0066] 尽管靶向肽通常是存在于本文中所描述的纳米缀合物上，但在一些实施方案中，本文中所公开的纳米缀合物不包含硫辛酸封端肽。例如，在一些实施方案中，该纳米缀合物包含金纳米颗粒(AuNP)、二硫代二亚乙基三胺五乙酸(DTDTPA)和阿霉素，其中DTDTPA经由至少一个Au-S键直接地连接到金纳米颗粒表面，并且阿霉素连接到DTDTPA，如在本文中其它地方所描述的那样。此构建物在本文中被称为AuNP(DTDTPA)-DOX。

[0067] 在某些实施方案中，本公开提供用于制备本文中所公开的纳米缀合物的方法，该方法包括使阿霉素与用DTDTPA官能化的纳米颗粒发生缀合。在一些实施方案中，该方法包括(1)使AuNP-DTDTPA与硫辛酸封端肽 (例如，TA-BBN)缀合以形成缀合物；和(2)使该缀合物与阿霉素缀合以形成纳米缀合物。

[0068] 在一些实施方案中，缀合步骤在DTDTPA的羧基与DOX的酰胺基之间形成酰胺键。在一些实施方案中，缀合步骤是在使用活化剂(如EDC (1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺)和硫代NHS(N-羟基硫代琥珀酰亚胺)的情况下进行。

[0069] 在某些实施方案中，本公开提供药物组合物，该药物组合物包含本文中所公开的纳米缀合物和药学上可接受的载体。

[0070] 在某些实施方案中，本公开还提供用于治疗癌症的方法，该方法包括将治疗有效量的本文中所公开的纳米缀合物向需要的受试对象进行给药。在一些实施方案中，受试对象是人。

[0071] 在一些实施方案中，被治疗的癌症可以是选自：急性淋巴细胞白血病 (ALL)、急性粒细胞白血病(AML)、骨肉瘤、乳腺癌、子宫内膜癌、胃癌、头颈部癌、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、肝癌、肾癌、多发性骨髓瘤、神经母细胞瘤、卵巢癌、肺癌(例如，小细胞肺癌和给小细胞肺癌)、软组织肉瘤、胸腺瘤(thyomas)、甲状腺癌、膀胱癌(例如，移行细胞膀胱癌)、子宫肉瘤、前列腺癌症、结肠癌、卵巢癌、胰腺癌、韦尔姆斯氏瘤和瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症。

[0072] 在一些实施方案中，根据本文中所描述方法而治疗的癌症与GRP过表达有关。在一些实施方案中，与GRP过表达有关的癌症可以是小细胞肺癌、前列腺癌症、乳腺癌、结肠癌、卵巢癌、非小细胞肺癌或胰腺癌。

[0073] 可以通过本领域技术人员已知的各种方法，将本文中所公开的纳米缀合物或药物组合物向受试对象进行给药。例如，本公开的纳米缀合物或药物组合物可以通过注射给药或者经由口服给药而给药。

[0074] 以下的实施例只是本文中所公开组合物和方法的例证，而并非意图限制其范围。

[0075] 实施例

[0076] 一般方法：用于金纳米颗粒(AuNPs)合成的材料是从标准供应商得到。四氯金酸三水合物($HAuCl_4.3H_2O$)、硼氢化钠($NaBH_4$)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)、乙酸酐、无水吡啶、2-氨基乙硫醇盐酸盐、三乙胺、冰乙酸(CH_3COOH)、硝酸镓($Ga(NO_3)_33$)、氢氧化钠(NaOH)、盐酸(HCl)、甲醇(MeOH)、乙醚(Et_2O)、氯化钠(NaCl)、二甲基甲酰胺(DMF)和二甲基亚砜(DMSO)是从Aldrich公司购得并且按接收时的原样使用。为了水溶液的制备并且为了金纳米颗粒的清洗而使用Milli- Q(去离子)水(ρ>18MΩ)。MTT细胞增殖检测试剂盒是从美国Promega 公司获得。

[0077] UV可见光谱学：在具有路径长度校正的一次性96孔板中，使用 Cytation 3分光光

度计(Biotek),在室温下记录UV可见吸收光谱。

[0078] 电子显微术:在JEOL1400透射电子显微镜(TEM)(JEOL有限公司,日本东京)上获得透射电子显微镜图像。通过将5μL的金纳米颗粒溶液置于碳涂覆铜格栅上而制备TEM样品。仔细地除去过量的溶液并且使格栅干燥达额外的5分钟。通过使用带Fovea插件的Adobe Photoshop软件对TEM 图像进行处理,而确定纳米颗粒的平均粒径和粒径分布。

[0079] 动态光散射(DLS)和ζ电位分析:用装备有633nm He-Ne激光器并且以173°的角度而操作的MalvernζsizerNano ZS(Malvern Instruments有限公司,美国)执行DLS测量。用于采集和分析数据的软件是来自Malvern 公司的分散技术软件(DTS)版本5.10。在具有10mm路径长度的小容积半微量一次性设定大小样品池(Fisher Scientific公司,美国)中,对600μl的各样品进行了测量。用自动衰减器在距离样品池壁4.65mm的位置进行了一式三份测量。就各样品而言,执行15次10秒的测量。就所有纳米颗粒样品而言,粒径分布、Z-平均直径和多分散指数(PDI)是从采用"通用模式"的自相关函数中获得。采用50%的默认功率因子和0.05的默认阈值下限和 0.01的阈值上限。使用水作为分散剂并采用Huckel模型,执行一式三份的ζ电位测量。就各样品而言,用自动分析模式执行20次测量。

[0080] 纳米颗粒跟踪分析:uNPs的流体动力学直径使用配置有配备有532nm (绿色)激光器(NanoSight有限公司,阿姆斯伯利,英国)的温度控制 LM14G样品观测单元的NanoSight LM10-HSGFT系统来测量。用单色 Marlin CCD摄像机(联合视觉技术公司,德国)实现基于瑞利散射的 AuNPs的视频跟踪。使用1mL注射器(Becton Dickinson,新泽西州)将样品传送到观察室并且将温度保持恒定在22℃。利用NanoSight 2.2程序来采集并分析样品数据。各尺寸测量是基于30秒视频,并且使用Stokes-Einstein 方程式来计算平均流体动力学直径。如下所述,在NTA测量之前,将各样品相对于进料AuNP浓度稀释30倍。对此稀释进行选择以便在30秒视频中对～900个颗粒进行跟踪。这些条件提供全体样品的代表性抽样,并且通过粒径分布不随着其中对明显更多的纳米颗粒进行分析的更长视频而变化的事实而得以确认。对各样品执行了三次测量,以提供平均粒径和标准偏差。

[0081] 细胞培养:使PC-3人前列腺癌和MDA-MB231人乳腺癌细胞(ATCC,美国)在用4.5g/L D-葡萄糖、25mM 4-羟乙基-1-过吖嗪乙烷磺酸、0.11g/L 丙酮酸钠、1.5g/L碳酸氢钠、2mM L-谷氨酰胺、10%热灭活胎牛血清 (Atlanta Biologicals,美国)和1%青霉素/链霉素抗生素溶液补充的 RPMI1640培养基(从位于纽约州格兰德岛的Gibco BRL公司获得)生长。将细胞在95%空气和5%CO_2的加湿气氛中在37℃(Thermo Scientific公司,美国)进行培养,并且每隔一天更换培养基。当用胰蛋白酶-EDTA (Invitrogen公司)从细胞培养瓶中收集汇合物并且对该汇合物进一步间隔地接种时,细胞粘附在单层中。

[0082] IC_{50}测量:在PC-3细胞培养物上,通过使用^{125}I-Tyr4-铃蟾肽作为GRP 特异性放射性配体的竞争性细胞结合测定,确定缀合物的受体结合亲和力。在20000cpm^{125}I-Tyr4-铃蟾肽(2200Ci/mmol)存在下并且在提高测试缀合物浓度的情况下,将大约30,000个细胞在37℃、5%CO2中保温培养达40 分钟。在保温培养后,抽出反应介质,并且将细胞用冷的RPMI1640修改缓冲液洗涤三次。通过在Packard Riastarγ计数系统中进行计数,而确定细胞相关放射性。利用Graph Fit 4.0制图软件计算IC_{50}值。随着测试缀合物浓度的提高,对结合到细胞的%^{125}I-Tyr4-铃蟾肽进行标绘以确定其IC_{50}值。

[0083] 体外细胞毒性测定:分别在表达GRP的癌症细胞和无GRP表达的癌症细胞、PC3和

MDA-MB-231上，执行了NP1-DOX和NP2-DOX与各自的对照品(如NP1、NP2)、游离阿霉素的体外细胞毒性评价。执行细胞毒性评价一式三份，并且研究方案是按照制造商所描述。简略地，将处在指数生长期的$1\times10^{5}ml^{-1}$细胞放置于平底96孔基苯乙烯包覆平板中，在CO_2培养箱中在5％CO_2并且37℃保温培养达12小时。NP1-Dox和NP2-Dox的一系列浓度范围从0到10ug/ml(0,0.31,0.625,1.25,2.5,5.0和10μg/ml)准备在培养基中。将各浓度添加发到该平板中，一式四份。在24小时的保温保养后，添加10μL每孔的MTT((按从制造商(美国Promega公司))所接收的那样)并保持4小时，将如此形成的甲臜晶体溶解于100μL洗涤剂/增溶缓冲液中。将平板在暗处在25℃保持2小时以使所有晶体溶解，并且用在570nm 波长处操作的微盘分析仪(Epoch，BioTek，美国)测量斯所形成颜色的强度。将具有完全培养基、纳米颗粒和MTT但没有细胞的孔用作空白。未处理的细胞被认为是100％存活。

[0084] 体外稳定性研究：通过培养在各种pH条件下将NP1和NP2的溶液，而执行体外稳定性研究。通过在以下各种pH条件下将NP1和NP2的溶液培养达24小时的时间段，而执行体外稳定性研究：PH2、PH5、PH7、 PH10和PH12。也通过含有0.5mL的各0.2M半胱氨酸、0.2M组氨酸、0.2M 人血清白蛋白和10％盐水溶液的NP1和NP2(0.5mL)的激发水溶液对这两者的稳定性能进行了监测。通过在0小时至96小时(0小时、1小时、24小时、48小时、72小时和96小时)监测UV可见吸收、流体动力学半径和ζ电位测量，而对稳定性进行了测量。在NP1和NP2的UV可见等离子体带中的可忽略变化确认了具有稳定性能的纳米颗粒子组合物在除半胱氨酸外的所有激发溶液中的保留。经处理的溶液不显示流体动力学半径中的任何显著变化，从而确认了这些缀合物的稳定性。

[0085] 实施例1

[0086] BBN-AuNP-DTDTPA缀合物合成和表征化

[0087] 将官能化金纳米颗粒(AuNP-DTDTPA；NP1)的二硫代二亚乙基三酰胺五乙酸(DTDTPA)用作前体，用以将靶向肽铃蟾肽(BBN)和化学治疗剂DOX缀合在纳米颗粒的表面上。参见图1。

[0088] 第一步骤是将靶向肽缀合到NP1。将三辛基封端的铃蟾肽(TA-BBN) 用于使肽经由金-巯基键缀合到NP1。采用三种不同的AuNP:BBN的化学计量比(1:0.5、1:2和1:4)。通过反复的洗涤除去过量未反应的BBN1，并且将BBN-AuNP-DTDTPA(NP2)分离为纳米颗粒小球。对在将TA-BBN缀合到NP1之后所获得上清液溶液的HPLC分析是用于对结合到NP2的TA- BBN进行定量。使用不同浓度的TA-BBN绘制标准校准曲线，并且在反应中所使用已知浓度的TA-BBN的曲线下面积(AUC)是通过HPLC而确定。使对上清液中AUC的分析与已知浓度的TA-BBN相互关联以确定到NP2的表面上的TA-BBN的量(图3缀合)。以1:2比率(Au:TA-BB)使AuDTDTPA构建物与TA-BBN缀合导致每1mg的AuDTDTPA中约0.26mg 的TA-BBN被结合入构建物中。参见图3。采用1:2比率所制备的NP2显示非常好的稳定性并因此被选择用于进一步研究。

[0089] 通过透射电子显微镜(TEM)图像分析、UV可见吸收光谱、动态光散射(DLS)和ζ电位测量，详细地对纳米缀合物进行表征。TEM图像显示纳米缀合物的均匀的粒径分布，并且具有3-5nm的粒径范围(图4A和图 4B)。当缀合到BBN.时，与NP1相比(图4C)，NP2在UV可见吸收谱中未显示变化。(图4C)。当缀合到BBN(1:2，Au:BBN)时，与NP1相比，在NP2中观察到流体动力学直径中的20nm变化。与NP1相比，在NP2 中ζ电位变化是可忽略的(3个单位)。使用纳米

颗粒跟踪分析(NTA)所测定的平均粒径与动态光散射测量值具有很好的相关性。将NP1和NP2缀合物的理化性质总结于表1中。

[0090] 表1

[0091]

	DLS 流体动力学尺寸 (*d* nm)	电荷(mV)
NP1	78	-72

[0092]

NP1-DOX	95	-23
NP2	105	-69
NP2-DOX	124	-23

[0093] 实施例2

[0094] XPS分析

[0095] 为了了解在AuNP-DTDTPA与TA-BBN之间结合的性质和化学相互作用,执行了详细的XPS分析。NP2的XPS图谱显示C、N、O、S、和Au的特征峰(图5A)。XPS高分辨率图谱的C1区显示各种C-C、C-H、C-O、 C-N、O-C=O、N-C=O区,如基于缀合的TA-BBN肽中所预测那样(图5B)。将NP2的碳物种的相对元素组成和峰归属分别示于表2和表3中。

[0096] 表2:如通过XPS[原子%]所确定的BN-[AuNP(DTDTPA)]的相对元素组成

[0097]

	C	N	O	Na†	Si*	S	Au
BBN-[AuNP(DTDTPA)]	57	14	19	3.0	1.2	3.1	3.6

[0098] †由于在NaOH溶液中的溶出所检测的钠

[0099] *由于在硅晶片上的沉积所检测到的硅

[0100] 表3:如通过XPS、C1s区[原子%]所确定的碳物种的相对组成和最有可能的峰归属

[0101]

	C-C,C-H	C-O,C-N	O-C=O,N-C=O
BBN-[AuNP(DTDTPA)]	41	35	24

[0102] 对S 2p区的XPS高分辨率谱的分析表明存在二个不同的S物种(物种1和物种1)并且各自分裂成双峰。物种1在162.3和163.5eV处呈现归因于 DTDTPA的Au-S键合的两个分开的硫峰。具有1.2ev的缀合的双峰硫峰,即S $2p_{3/2}$和S $2p_{1/2}$确认在金表面上巯基化合物的吸收。NP1的结合能和缀合值与文献中所报道的具有很好的相关性;然而,当缀合到BBN时,峰位移到略微更高的结合能(0.5eV)区。此外,具有2:1比率的在163.2和 164.4eV处的物种2的两个分开的硫峰分别对应于Au-S(配位到AuNPs的硫)和S-CH3(存在于BBN肽骨架中的甲基半胱氨酸氨基酸中的硫)。各类型的硫峰进一步分离成具有1.2eV的缀合的双峰S2p3/2和S2p1/2,确认 BBN与AuNP的缀合,如文献中所报道。具有在较高结合能处的等效面积的双峰的这种存在表明TA-BBN的两个硫原子在AuNP表面上形成了Au-S 键。当与BBN缀合时,与在文献所报道的AuNP-BBN相比,结合能值位移到较低能量区。这可能是由于用于BBN的缀合的纳米颗粒的核尺寸中的差异所致。元素S和一些有机形态的S的能量落在162-164eV的范围内(图 6A)。因为在与氧化硫相对应的图谱的较高能量区中未观察带其它的峰,因此这些测量与BBN-AuNP-DTDTPA(NP2)是在纳米缀合反应期间所形成的独有产物的观察结果是一致的。

[0103] 对应核金原子Au(0)和具有局部Au(I)特征的表面金，图谱的4f 区显示两个不同的金的信号并且分别具有用于$Au4f_{7/2}$和$Au4f_{5/2}$的83.6、84.3 和87.2、88.0eV的能量(图6B)。基于各种最近的研究，普遍认为在硫辛酸中的二硫被氧化地加入到AuNPs中，导致在纳米颗粒表面的局部Au(I) 特征。与在4f区中的Au峰的84.3和88eV结合能相对应的信号类似于在文献中所报道的肽缀合的AuNPs，表明Au结合到DTDTPA和TA-BBN的S 原子。与此事实相一致，在XPS图谱中注意到与表面原子和核金原子相对应的金的两个不同氧化态。来自对金纳米颗粒的各种XPS研究的结果确认了类似的发现。以上的观察结果明确地证实在NP2纳米缀合物中TA-BBN 的结合。

[0104] 实施例3

[0105] BBN-AuNP-DTDTPA-DOX缀合物的合成和表征化

[0106] 在AuNPs表面上的DTDTPA的羧基可用于进一步的官能化。这些羧基是用于使阿霉素缀合。将传统的EDC-硫代NHS化学方法用于使DOX的酰胺基缀合到DTDTPA的羧基，以获得非靶向AuNP-DTDTPA-阿霉素(NP1- DOX)和靶向BBN-AuNP-DTDTPA-DOX(NP2-DOX)。

[0107] 用荧光光谱法对加载在NP1和NP2上的阿霉素进行了估计。当485nm 处被激发和在590nm处被发射时，阿霉素在600nm处显示荧光标记(图7)。完成了DOX的系列稀释，并且绘制了标准校准曲线用以记录荧光强度(图 8)。对上清液的荧光强度进行了记录，并且与标准校准曲线进行了相关以便对缀合到AuNPs的阿霉素的量进行定量。通过荧光测量，发现每mg的AuNP-DTDTPA和BBN-AuNP-DTDTPA分别缀合有μ0.53g和0.3μg的阿霉素。此外，完成了NP1-DOX和NP2-DOX的系列稀释并且记录了荧光强度。荧光强度变化是成比例的且一致的，确认DOX缀合到NP1和NP2。该荧光测量也表明，当缀合到AuNPs上时，阿霉素荧光仍然未受影响(图9和图 10)。图11示出了具有它们的各自对照品的NP1-DOX、NP2-DOX的UV 可见光谱。当使用NP1和NP2两者与DOX缀合时，观察到在流体动力学直径中的10-20nm变化。当与DOX缀合时，ζ电位转变为正值。NP1和NP2 的-72和-69mV的负ζ电位值分别变化到-23mV表明了颗粒相互排除并且不存在颗粒发生聚集的倾向。将NP1-DOX和NP2-DOX缀合物的理化性质总结于表1中。

[0108] 实施例4

[0109] 体外稳定性研究

[0110] 在各种生物学相关溶液中对NP1和NP2缀合物的稳定性进行了研究。用0.9％NaCl、0.5％半胱氨酸、0.2M组氨酸、0.5％血清白蛋白(HSA)和 0.5％牛血清白蛋白(BSA)对NP1和NP2的溶液进行了激发。通过以下三种技术对在不同时间点的纳米缀合物的稳定性进行了分析：(i)使用UV 可见光谱监测等离激元共振、(ii)流体动力学直径中的变化和(iii)电泳电荷(ζ电位)测量。表面等离子体共振波长和等离子体带宽及流体动力学直径的测量中的变化与对纳米颗粒聚集行为的了解是直接相关的。ζ电位测量是存在于水溶液中的排斥力的指示并且可以用于预测纳米颗粒分散体的长期体外/体内稳定性。对用Au:BBN的1:2和1:4化学计量比所制备的纳米缀合物，执行了稳定性研究。Au:BBN的1:4比率的采用显示在24小时时间段内的聚集，同时缀合物NP1和NP2[1:2(Au:BBN)比率]两者在这些生物学相关溶液中是稳定的。UV可见吸收峰仍然保持不变，流体动力学直径和ζ电位中的变化是极小的，确认该缀合物的结构完整性和稳健性(图12)。然而，在半胱氨酸存在下，观察到NP1和NP2两者由于金巯基相互作用因而在(24小时)的时间段内显示流体动力学尺寸的增加并且该增

加不是显著的。体外稳定性数据表明NP1和NP2具有在体内内的随后的受体靶向公开中使用的最佳动力学稳定性。

[0111] 实施例5

[0112] NP2的体外受体结合亲和力研究

[0113] 人前列腺肿瘤PC-3细胞在细胞表面上表达大量的GRP受体。通过执行竞争性抑制测定并且测定IC_{50}值，而对NP2的结合亲和力进行了评价。使用利用三种不同Au:BBN的化学计量比的(1:0.5,1:2,1:4)而制备的纳米颗粒。对不同Au:BBN化学计量比(1:0.5,1:2、1:4)的IC_{50}值的比较进行了标绘(图13)。不同比率的缀合物NP2的IC_{50}值是用微克进行报告，因为不能准确地确定纳米缀合物的分子量。从数据中显而易见的是缀合物的IC_{50}值或细胞结合亲和力取决于TA-BBN肽包覆于AuNPs表面上的程度。例如，在AuNPs的表面上具有更大数量的TA-BBN肽分子的具有Au:BBN＝1:4比率的缀合物NP2当与其它缀合物比较时，呈现较低的IC_{50}值(或者更好的细胞结合亲和力)。然而，此缀合物不是高度稳定的并且不被用于细胞研究。竞争性抑制研究确认了NP2的受体靶向特性。

[0114] 实施例6

[0115] 体外细胞毒性测定：

[0116] 通过MTT测定，使用适当的对照品，检查了在表达GRP的人癌细胞上和在无GRP表达的人癌细胞上缀合AuNPs、NP1-DOX和NP2-DOX的阿霉素的体外细胞毒性。人前列腺癌症(PC3)细胞在细胞表面上具有大量的 GRP受体。具体地，文献表明有44,000个铃蟾肽受体位点存在于人前列腺癌症细胞的表面上。将人乳腺(MDA-MB231)癌细胞用作无GRP表达的癌细胞。游离阿霉素在PC3中显示9.5μg/ml的IC_{50}(图14)并且在MDA- MB231癌细胞中显示>10ug/ml的IC50(图16)。在图15、图17和图20中示出了显示具有DOX的NP1-DOX和NP2-DOX对于表达GRP的细胞和无 GRP表达的细胞两者的细胞毒性的作用的比较图表。NP1-DOX和NP2- DOX在无GRP表达的癌细胞中分别显示6μg/ml和9μg/ml的IC_{50}，同时在 PC3细胞中发现IC_{50}值分别为10δμg/ml和5μg/ml(表4)。应当指出的是，本文所给出的NP1-DOX和NP2-DOX的IC_{50}值是基于纳米缀合物的总重量，并且加载到纳米缀合物上的DOX的量分别为0.53μg/mg和0.3μg/mg。在表 4及图18和图19中列出了与阿霉素有关的纳米缀合物的IC_{50}值。

[0117] 表4

[0118]

	IC_{50}(μg/ml)	
	PC3 细胞	MDA MB231 细胞

[0119]

	纳米缀合物浓度。	阿霉素浓度。	纳米缀合物浓度。	阿霉素浓度。
NP1-DOX	9.89	0.0052	6	0.00318
NP2-DOX	5	0.0015	9	0.0027
阿霉素	9.5	9.5	>10	>10

[0120] 正如在上面可以看见的，缀合AuNPs的阿霉素呈现与游离阿霉素相比强效得多的细胞毒性。例如，与在无GRP表达的癌细胞和表达GRP的癌细胞中的游离阿霉素相比，NP2-DOX的细胞毒性分别增加3000倍和6000倍。

[0121] 实施例7

[0122] AuNP-DTDTPA的合成

[0123] 官能化AuNPs的二硫代二亚乙基三胺五乙酸(DTDTPA)是经由Brust 等人的修改方

案制备的，化学学会Commun.1995，1655-1656。简略地，在500ml圆底烧瓶中，将200mg(0.507mmol)的$HAuCl_4.3H_2O$溶解于120ml 甲醇中。在单独的烧瓶中，将482mg(0.943mmol)的DTDTPA溶解于 40ml的MeOH和2ml的冰乙酸中，在连续搅拌下，将此溶液添加到金盐的水溶液中以产生橙色溶液。在室温下，在剧烈搅拌下，向此混合物中添加溶解于14ml去离子水的190mg(5mmol)的$NaBH_4$。在$NaBH_4$的添加后该溶液立即变为深褐色，接着是黑色絮凝物的出现。允许将所形成的混合物在室温下搅拌1小时，然后添加5ml的1M HCl水溶液。然后，使该黑色溶液的金纳米颗粒经历7000RPM的离心作用达20分钟。除去上清液，用 0.01M HCl洗涤颗粒两次，保持离心参数与上述相同。将颗粒进一步彻底地洗涤并相继地用去离子水接着用乙醚洗涤。将所形成的AuNP-DTDTPA的黑色粉末在真空下干燥并且在-20℃下存放。根据需要，颗粒易于分散在 0.01M的NaOH中并且稳定超过一个月。

[0124] 实施例8

[0125] 硫辛酸BBN肽的合成

[0126] 利用采用Fmoc化学方法的固相肽合成执行BBN的合成，并且通过 HPLC将最后的肽加以纯化。将4-羟甲基苯氧基乙酰基-4'-甲基二苯甲基酰胺树脂当作用于合成的固体载体来使用。将Fmoc保护的氨基酸用一当量的 0.45M HBTU/HOBt溶液和两当量的N,N-二异丙基乙基酰胺激活。使用哌啶对氨基酸进行Fmoc保护，并且使用NMM.HBTU使其缀合。在按适当顺序使全部氨基酸的缀合之后，使用DIC.HOBt使硫辛酸(lipoic acid)缀合。使用TFA执行肽从树脂中的裂解。此裂解步骤也除去氨基酸侧链保护基。使用从0％B开始的AB梯度将肽在反相HPLC/C18柱中进行纯化，其中A是水中的0.1％TFA并且B是乙腈中的0.1％TFA。在纯化后，使用液相色谱- 质谱或基质辅助激光解吸/电离来测量肽质量，并使用HPLC反相色谱法测量纯度。

[0127] 实施例9

[0128] 用DTDTPA(BBN-AuNP-DTDTPA)稳定化的铃蟾肽受体特异性金纳米缀合物的合成

[0129] 以Au:BBN 1:0.25、1:0.5、1:1、1:2和1:4的化学计量比，使硫辛酸封端的铃蟾肽与金纳米颗粒发生反应。通常，在20ml玻璃小瓶中，使用 0.01M的NaOH的水/甲醇混合物(1:9)制备AuNP-DTDTPA ([Au]＝2.28μmol)的溶液。将硫辛酸封端的铃蟾肽(TA-BBN)0.64mg(0.57μmol)、1.28mg(1.14μmol)、2.56mg(2.27μmol)、5.12mg (4.54μmol)和10.24mg(9.08μmol)溶解于4mL的MeOH，然后添加到纳米颗粒溶液中。将该反应混合物在室温下搅拌2小时，并观察到深褐色沉淀物的形成。使该混合物受离心作用(9300g，在20℃达10分钟)并除去上清液。将沉淀的AuNPs用MeOH洗涤二次再用水洗涤三次。将BBN-AuNP- DTDTPA在低压下干燥并且在-20℃存放。

[0130] 实施例10

[0131] AuNP-DTDTPA-阿霉素和BBN-AuNP-DTDTPA-阿霉素的合成

[0132] 执行使用和不使用铃蟾肽缀合金纳米颗粒的阿霉素的合成，一式三份。通过超声处理将金纳米颗粒0.5mg悬浮于1×PBS中。向100μl的此溶液中，添加在0.1M 2-(吗啉基)乙磺酸(MES)缓冲液(pH 4.6)中的2mg 1-乙基-3-[3-二甲氨基]碳二亚胺盐酸盐(EDC)和2mg硫代NHS(N-羟基硫代琥珀酰亚胺)。使用MES缓冲液将该反应混合物的pH值保持在5.3-5.4。将该反应物在37℃以700RPM搅拌3小时。3小时后，使20000g的反应混合物在25℃受到离心作用达20分钟。将临床使用的阿霉素0.7mg用于与纳米颗粒发生缀合。向阿霉素溶液中添加

具有激活羧基的纳米颗粒，使反应混合物产生涡旋。在25℃以750rpm执行缀合过夜。使20000g的该反应混合物在25℃受到离心作用达20分钟，随后将小球用1×PBS洗涤二次并且再悬浮于1×PBS溶液中。将小球和上清液两者用于对采用荧光光谱法分析的缀合效率进行研究。

[0133] 所有的引用专利、专利公开和其它参考文献的全部内容以参考的方式并入本文中。然而，如果本公开中的术语与并入参考文件中的术语相抵触或矛盾，那么来自本公开的术语优先于来自并入参考文件的矛盾术语。

[0134] 虽然已描述了具体实施方案，但是或者目前可能未预见的替代物、修改、变更、改进和实质性等同物对于申请人或本领域技术人员会是显而易见的。因此，所提交的和可被修改的所附权利要求意图包括所有的这种替代物、修改、变更、改进和实质性等同物。

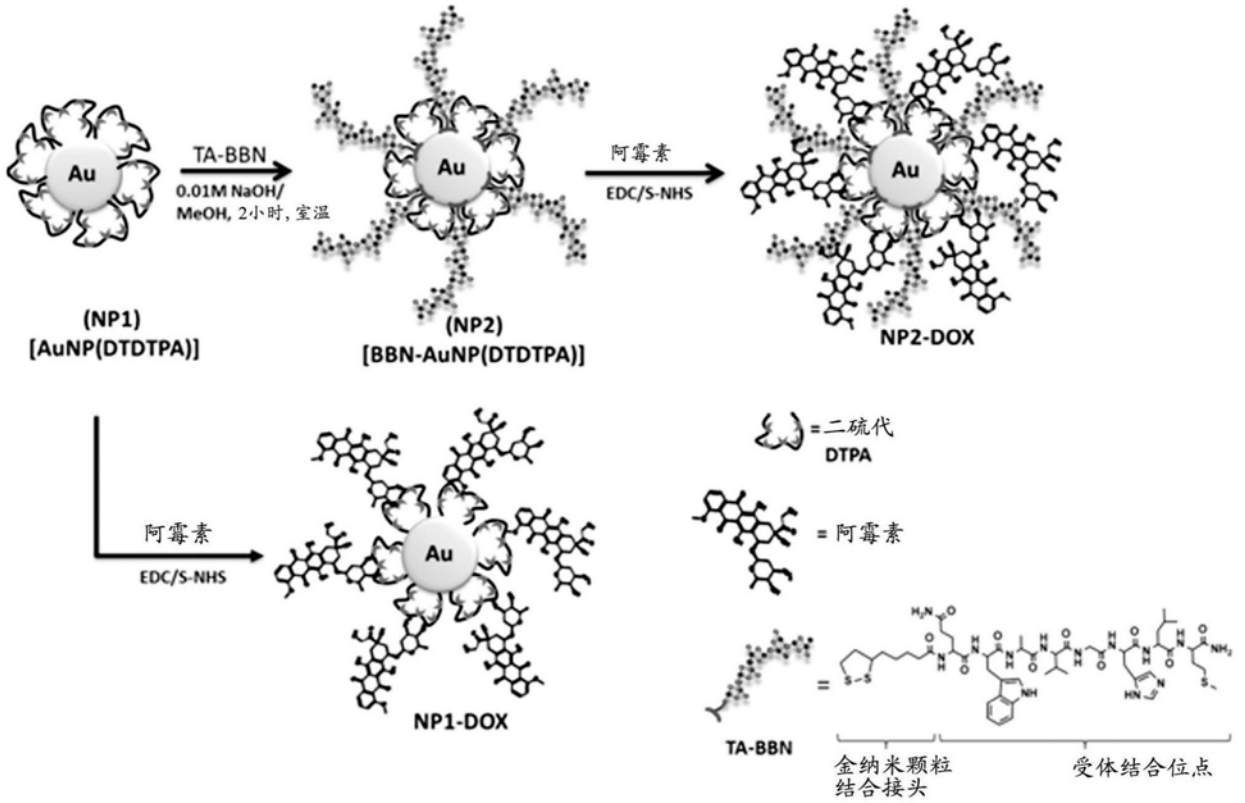

Au
TA-BBN
0.01M NaOH/
MeOH, 2小时, 室温
(NP1)
[AuNP(DTDTPA)]
(NP2)
[BBN-AuNP(DTDTPA)]
阿霉素
EDC/S-NHS
NP2-DOX
阿霉素
EDC/S-NHS
NP1-DOX
=二硫代
DTPA
= 阿霉素
TA-BBN
金纳米颗粒
结合接头
受体结合位点

图1

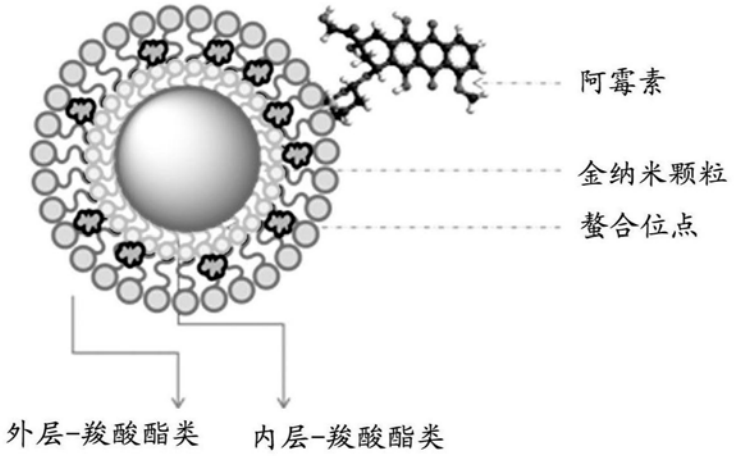

阿霉素
金纳米颗粒
螯合位点
外层-羧酸酯类
内层-羧酸酯类

图2

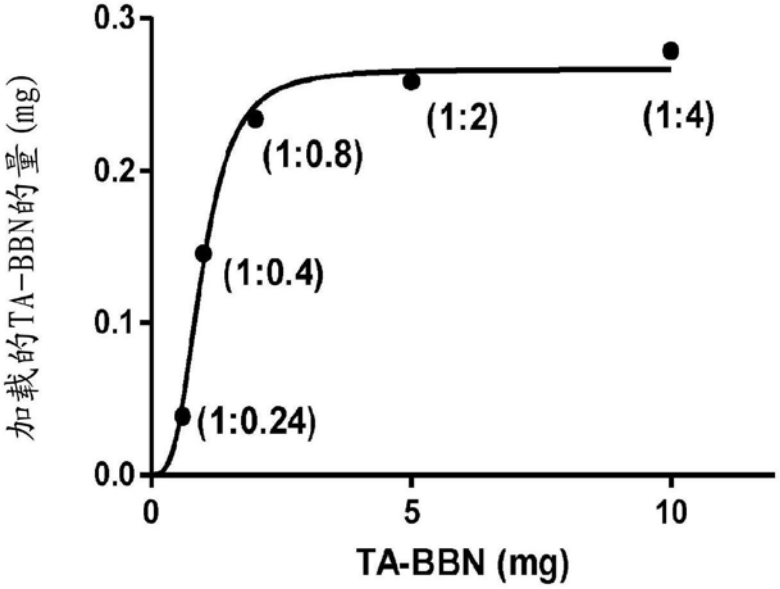


图3

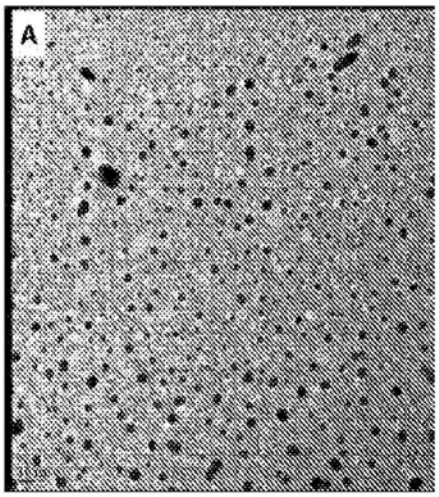


图4A

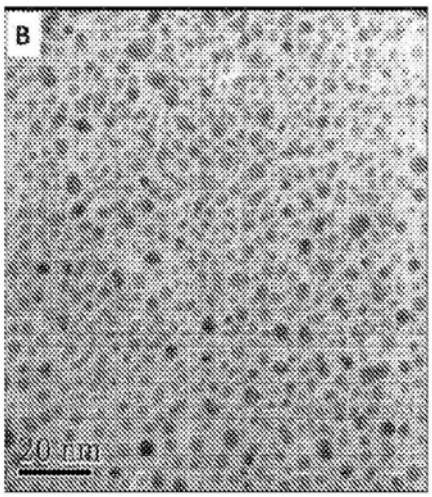


图4B

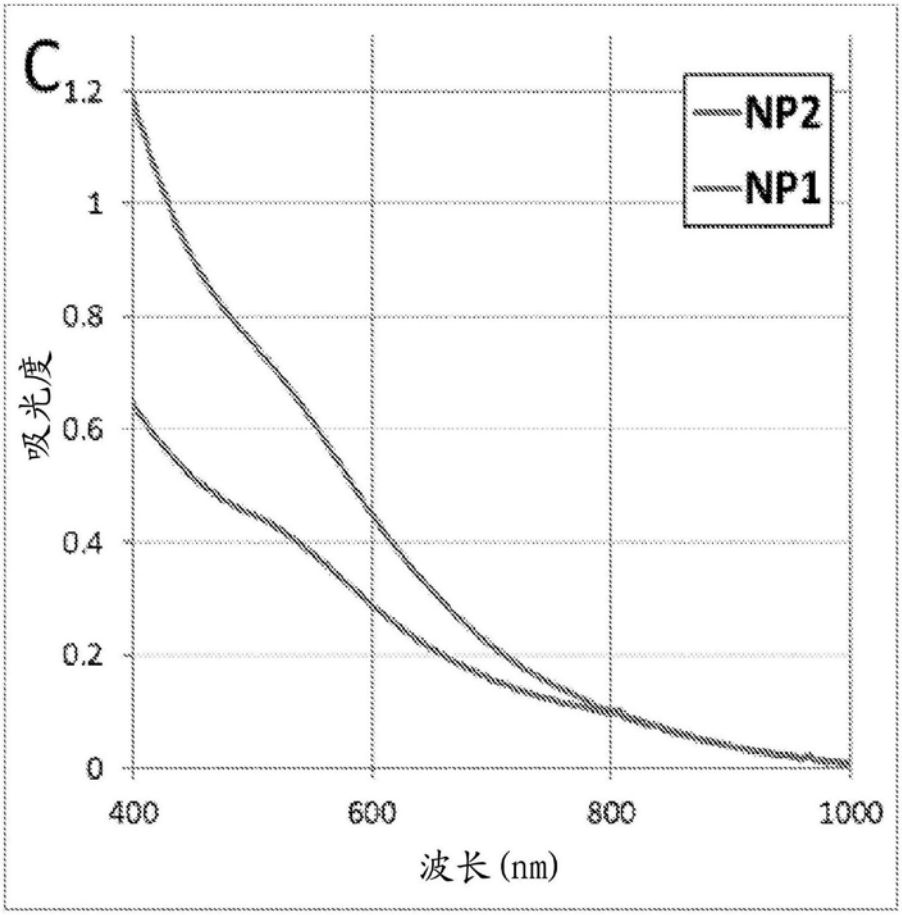


图4C

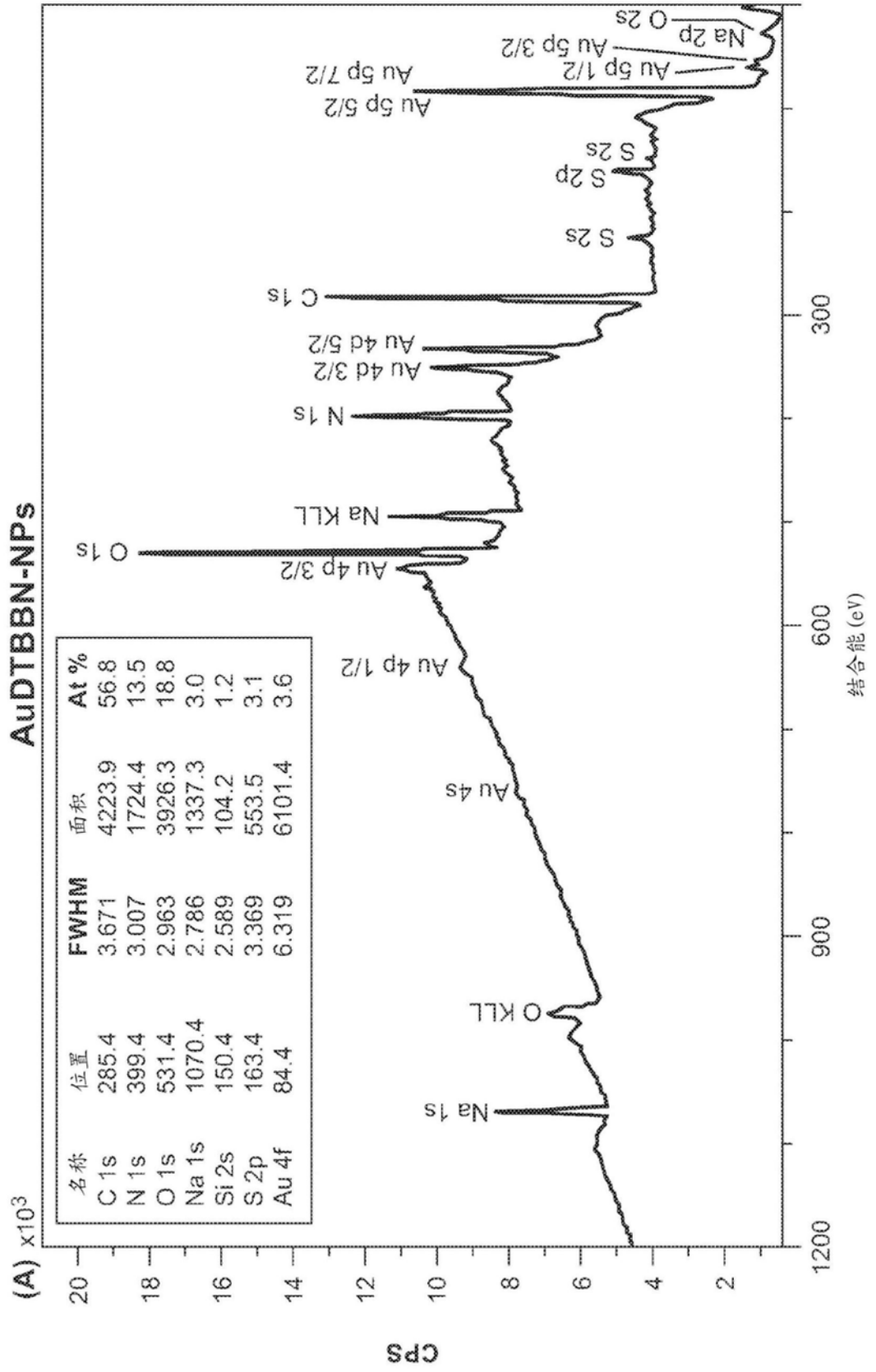

AuDTBBN-NPs
(A) x10^3
CPS
结合能 (eV)
名称 位置 FWHM 面积 At %
C 1s 285.4 3.671 4223.9 56.8
N 1s 399.4 3.007 1724.4 13.5
O 1s 531.4 2.963 3926.3 18.8
Na 1s 1070.4 2.786 1337.3 3.0
Si 2s 150.4 2.589 104.2 1.2
S 2p 163.4 3.369 553.5 3.1
Au 4f 84.4 6.319 6101.4 3.6
Na 1s
O KLL
Au 4s
Au 4p 1/2
Au 4p 3/2
O 1s
Na KLL
N 1s
Au 4d 3/2
Au 4d 5/2
C 1s
S 2s
S 2p
S 2s
Au 5p 5/2
Au 5p 7/2
Au 5p 1/2
Au 5p 3/2
Na 2p
O 2s

图5A

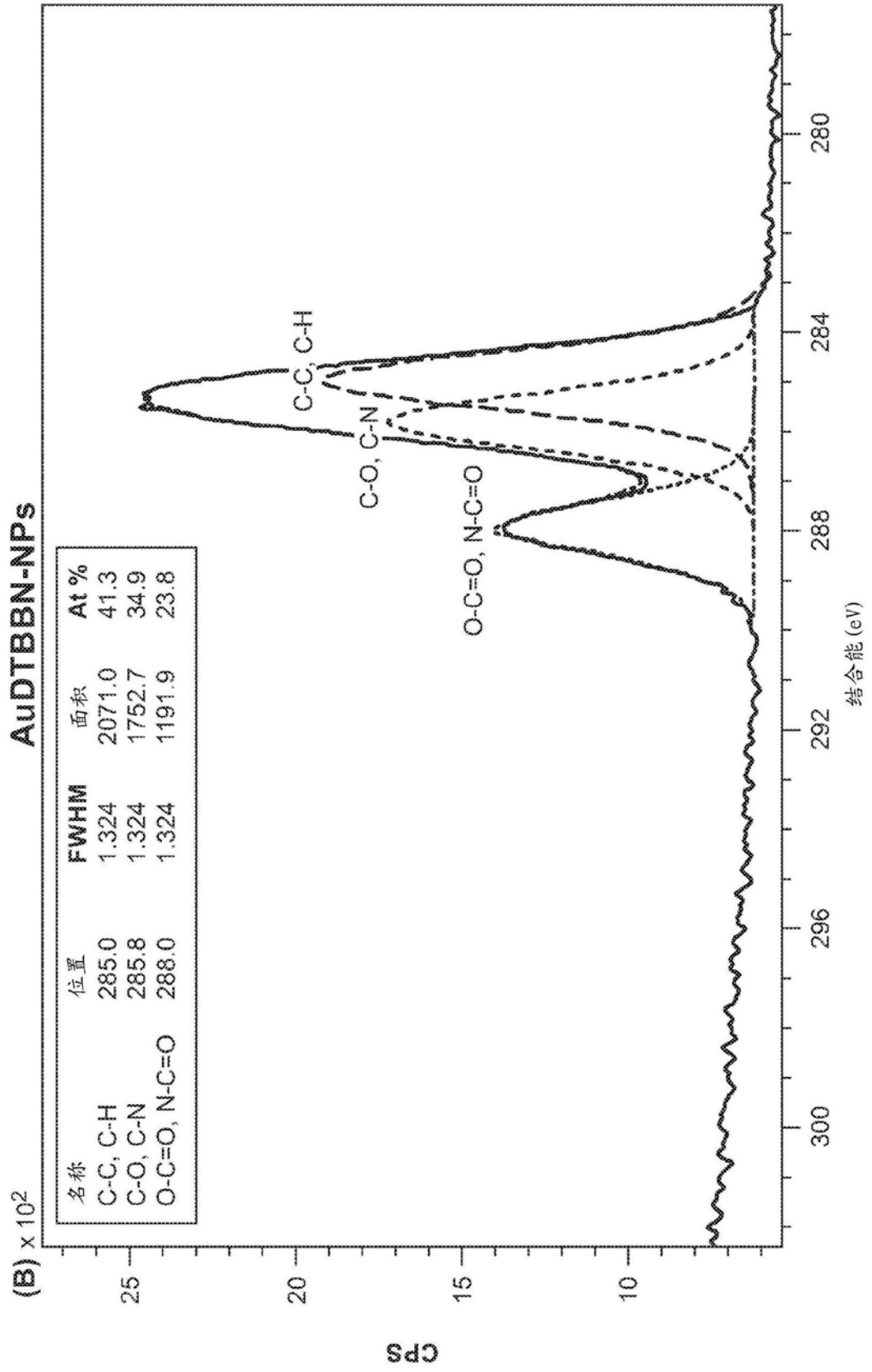

AuDTBBN-NPs
(B) x 10²
名称 位置 FWHM 面积 At %
C-C, C-H 285.0 1.324 2071.0 41.3
C-O, C-N 285.8 1.324 1752.7 34.9
O-C=O, N-C=O 288.0 1.324 1191.9 23.8
C-C, C-H
C-O, C-N
O-C=O, N-C=O
CPS
结合能 (eV)

图5B

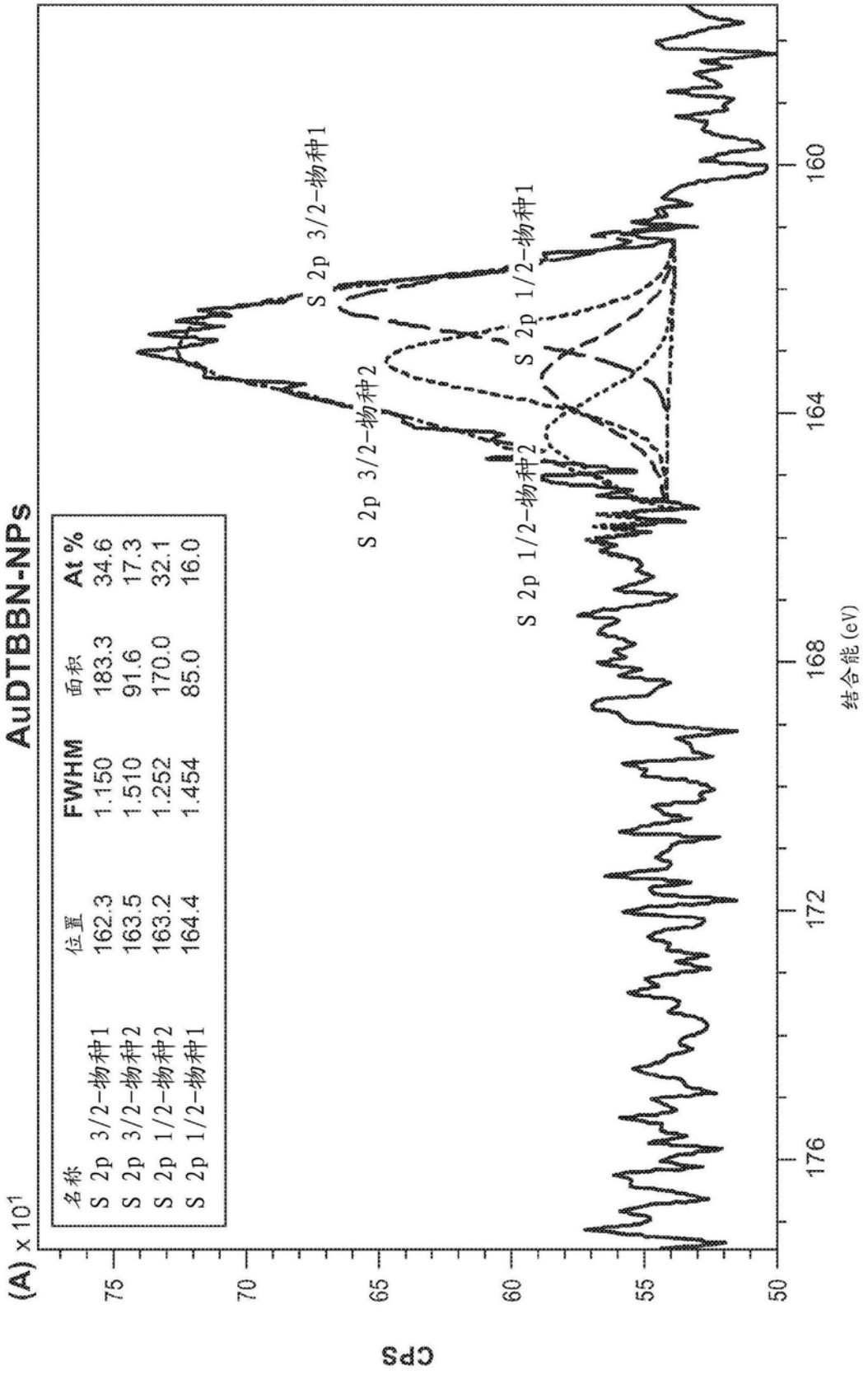

AuDTBBN-NPs
(A) x 10¹
CPS
结合能 (eV)
S 2p 3/2-物种1
S 2p 3/2-物种2
S 2p 1/2-物种2
S 2p 1/2-物种1
名称 位置 FWHM 面积 At %
S 2p 3/2-物种1 162.3 1.150 183.3 34.6
S 2p 3/2-物种2 163.5 1.510 91.6 17.3
S 2p 1/2-物种2 163.2 1.252 170.0 32.1
S 2p 1/2-物种1 164.4 1.454 85.0 16.0

图6A

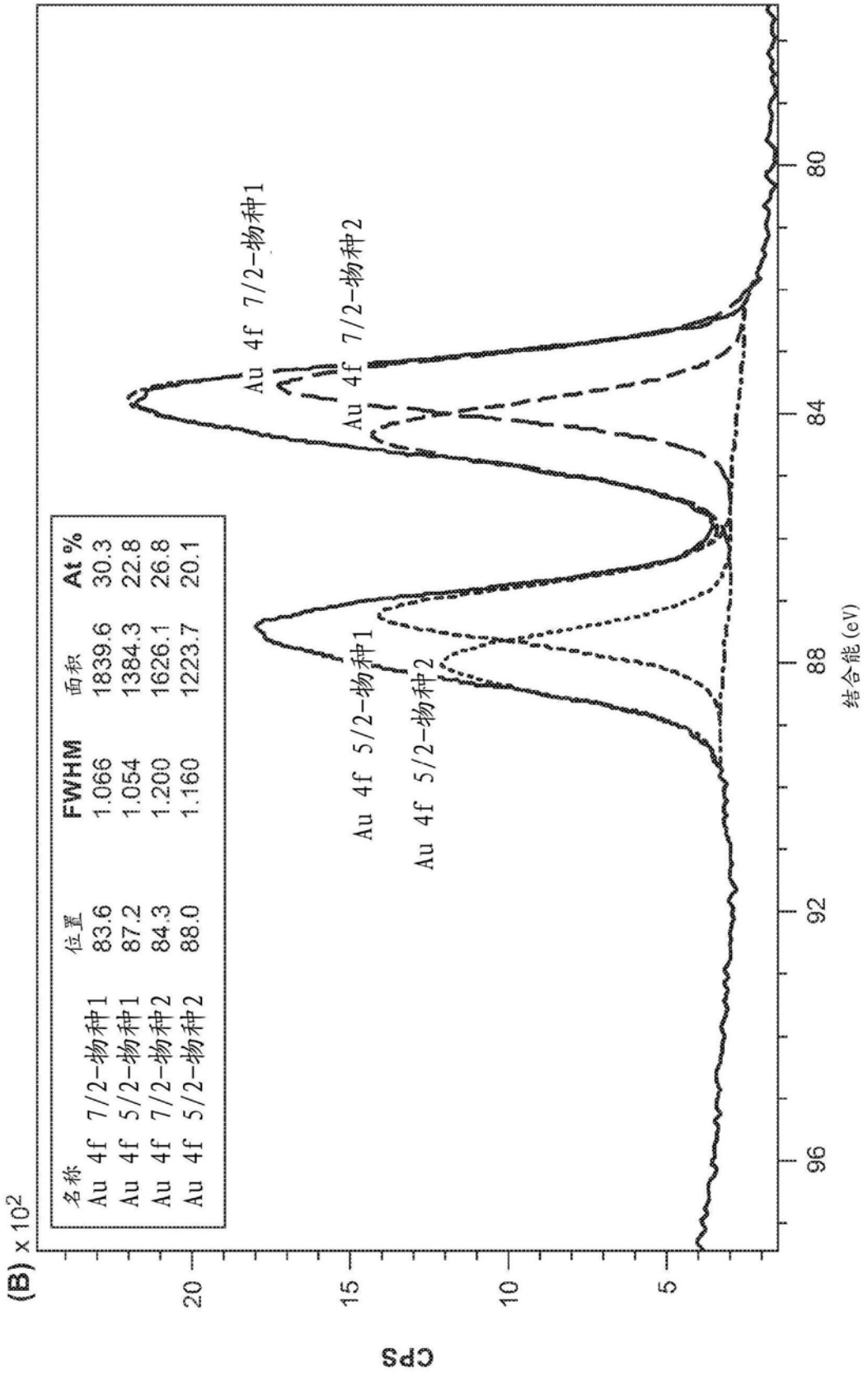

(B) x 10²
CPS
结合能 (eV)
Au 4f 7/2-物种1
Au 4f 7/2-物种2
Au 4f 5/2-物种1
Au 4f 5/2-物种2
名称 位置 FWHM 面积 At %
Au 4f 7/2-物种1 83.6 1.066 1839.6 30.3
Au 4f 5/2-物种1 87.2 1.054 1384.3 22.8
Au 4f 7/2-物种2 84.3 1.200 1626.1 26.8
Au 4f 5/2-物种2 88.0 1.160 1223.7 20.1

图6B

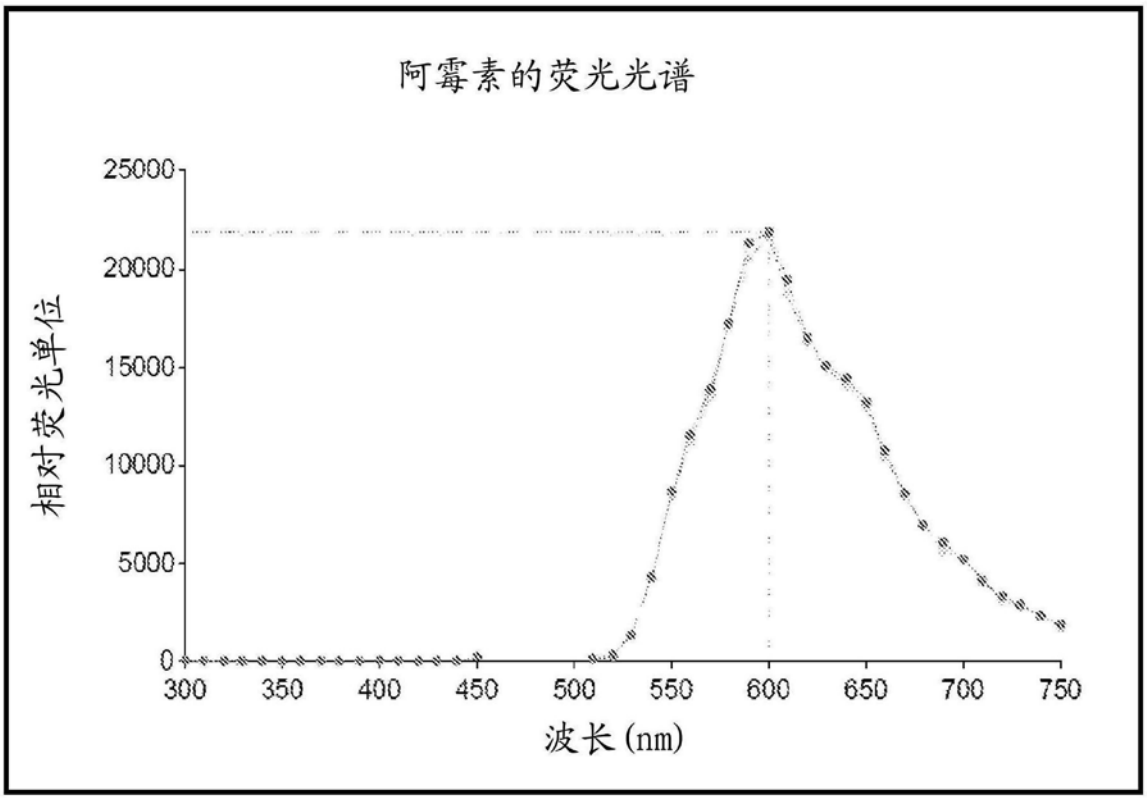

阿霉素的荧光光谱
相对荧光单位
25000
20000
15000
10000
5000
0
300
350
400
450
500
550
600
650
700
750
波长(nm)

图7

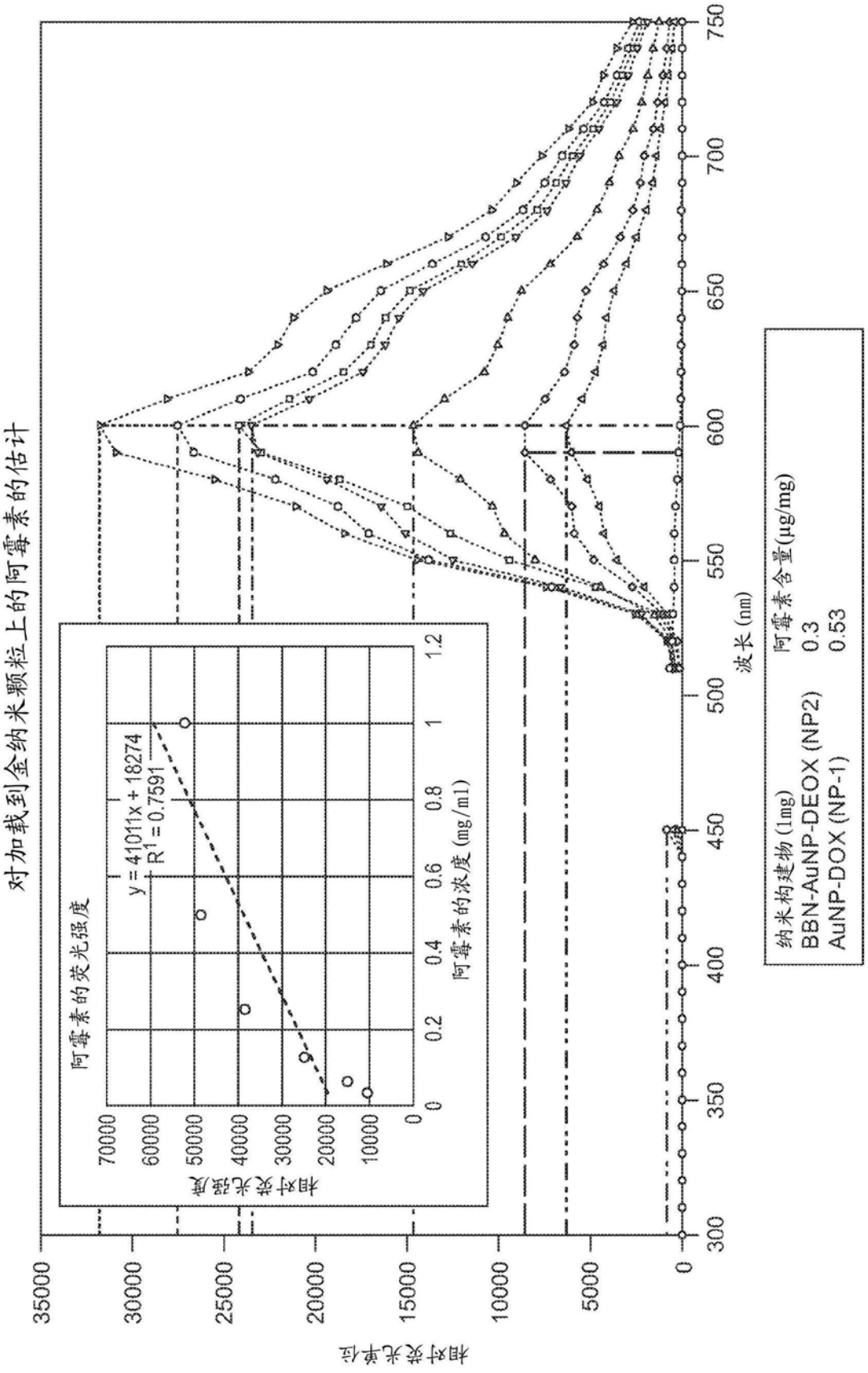

对加载到金纳米颗粒上的阿霉素的估计
相对荧光单位
波长 (nm)
纳米构建物 (1mg) 阿霉素含量(μg/mg)
BBN-AuNP-DEOX (NP2) 0.3
AuNP-DOX (NP-1) 0.53
阿霉素的荧光强度
y = 41011x + 18274
R1 = 0.7591
相对荧光强度
阿霉素的浓度 (mg/ml)

图8

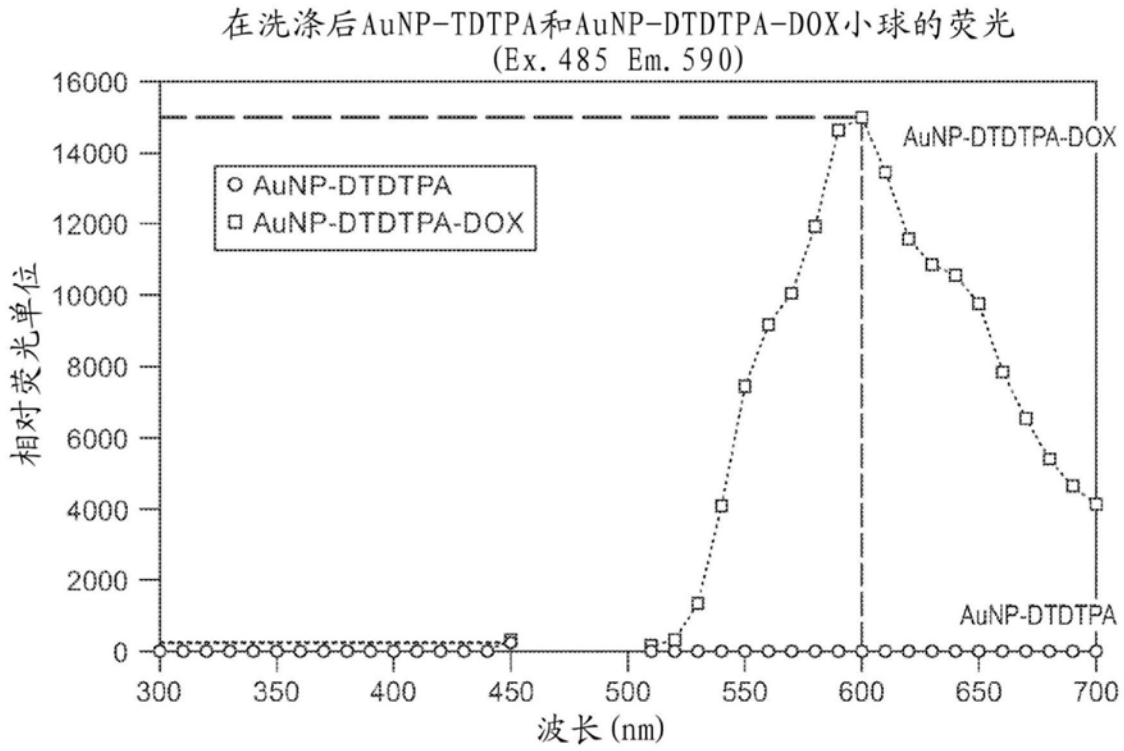

在洗涤后AuNP-TDTPA和AuNP-DTDTPA-DOX小球的荧光
(Ex. 485 Em. 590)
AuNP-DTDTPA
AuNP-DTDTPA-DOX
AuNP-DTDTPA-DOX
AuNP-DTDTPA
相对荧光单位
波长(nm)
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
300
350
400
450
500
550
600
650
700

图9

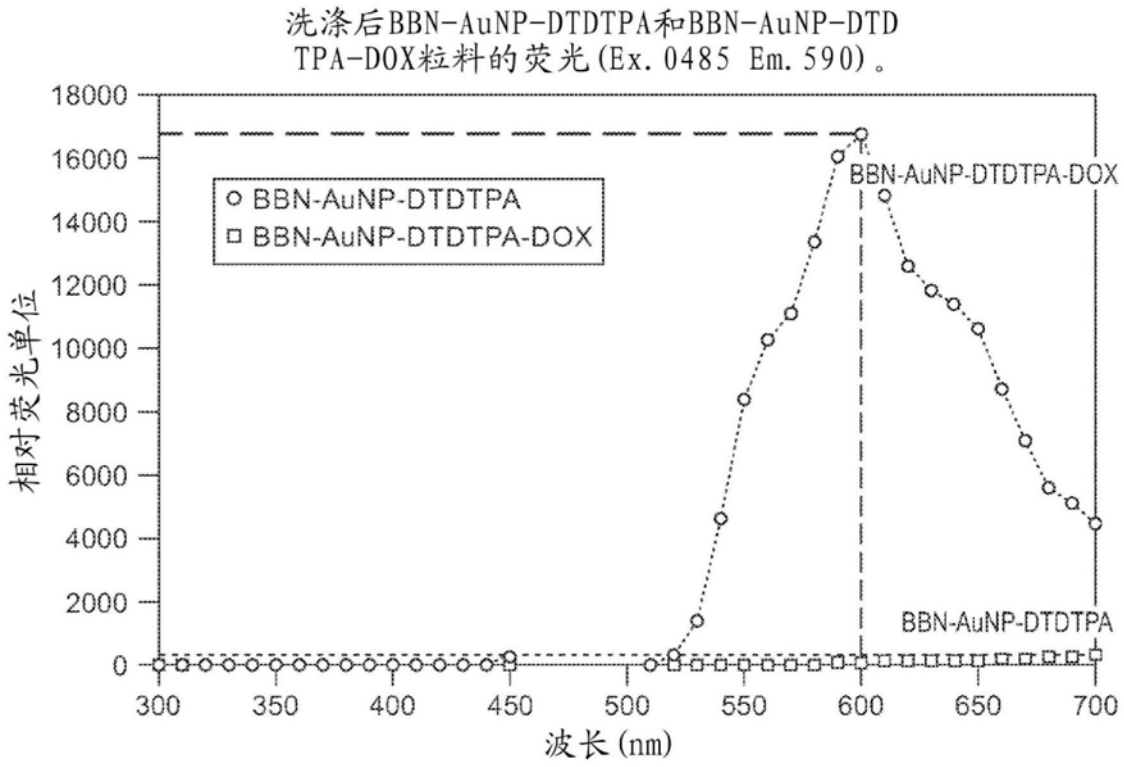

洗涤后BBN-AuNP-DTDTPA和BBN-AuNP-DTD
TPA-DOX粒料的荧光(Ex. 0485 Em. 590)。
BBN-AuNP-DTDTPA
BBN-AuNP-DTDTPA-DOX
BBN-AuNP-DTDTPA-DOX
BBN-AuNP-DTDTPA
相对荧光单位
波长(nm)
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
300
350
400
450
500
550
600
650
700

图10

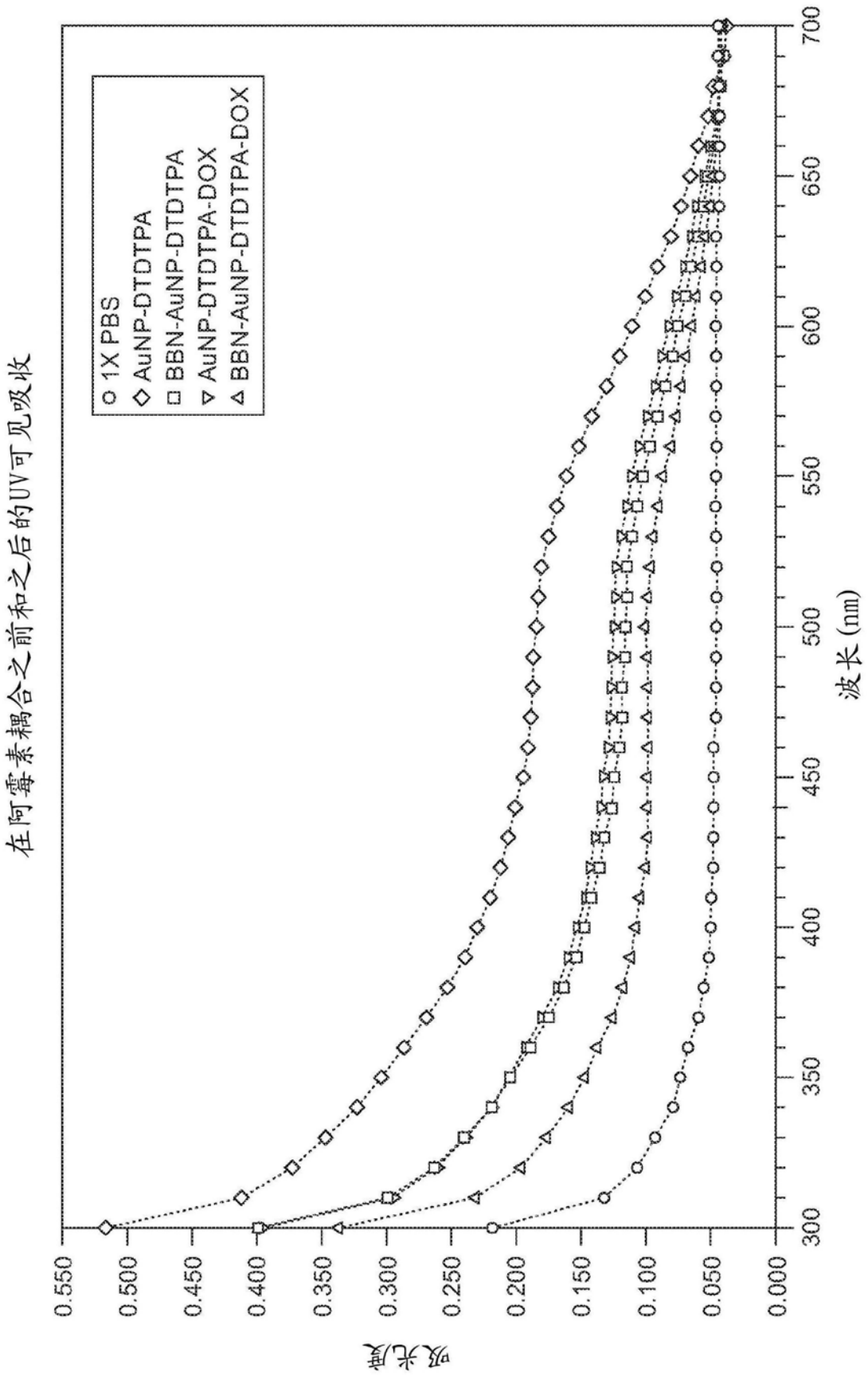

在阿霉素耦合之前和之后的UV可见吸收
1X PBS
AuNP-DTDTPA
BBN-AuNP-DTDTPA
AuNP-DTDTPA-DOX
BBN-AuNP-DTDTPA-DOX
吸光度
0.550
0.500
0.450
0.400
0.350
0.300
0.250
0.200
0.150
0.100
0.050
0.000
300
350
400
450
500
550
600
650
700
波长 (nm)

图11

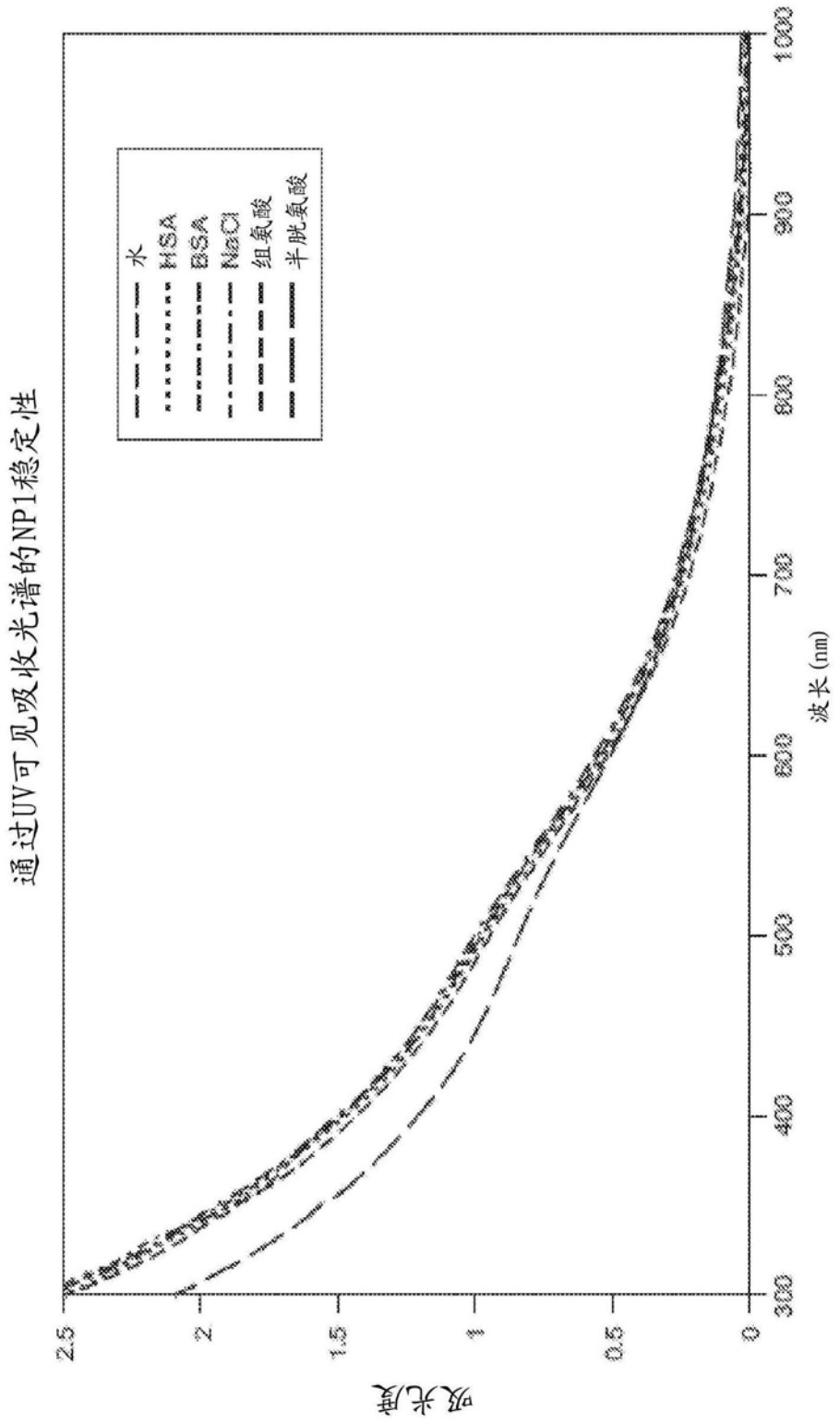

通过UV可见吸收光谱的NP1稳定性
水
HSA
BSA
NaCl
组氨酸
半胱氨酸
吸光度
2.5
2
1.5
1
0.5
0
300
400
500
600
700
800
900
1000
波长(nm)

图12A

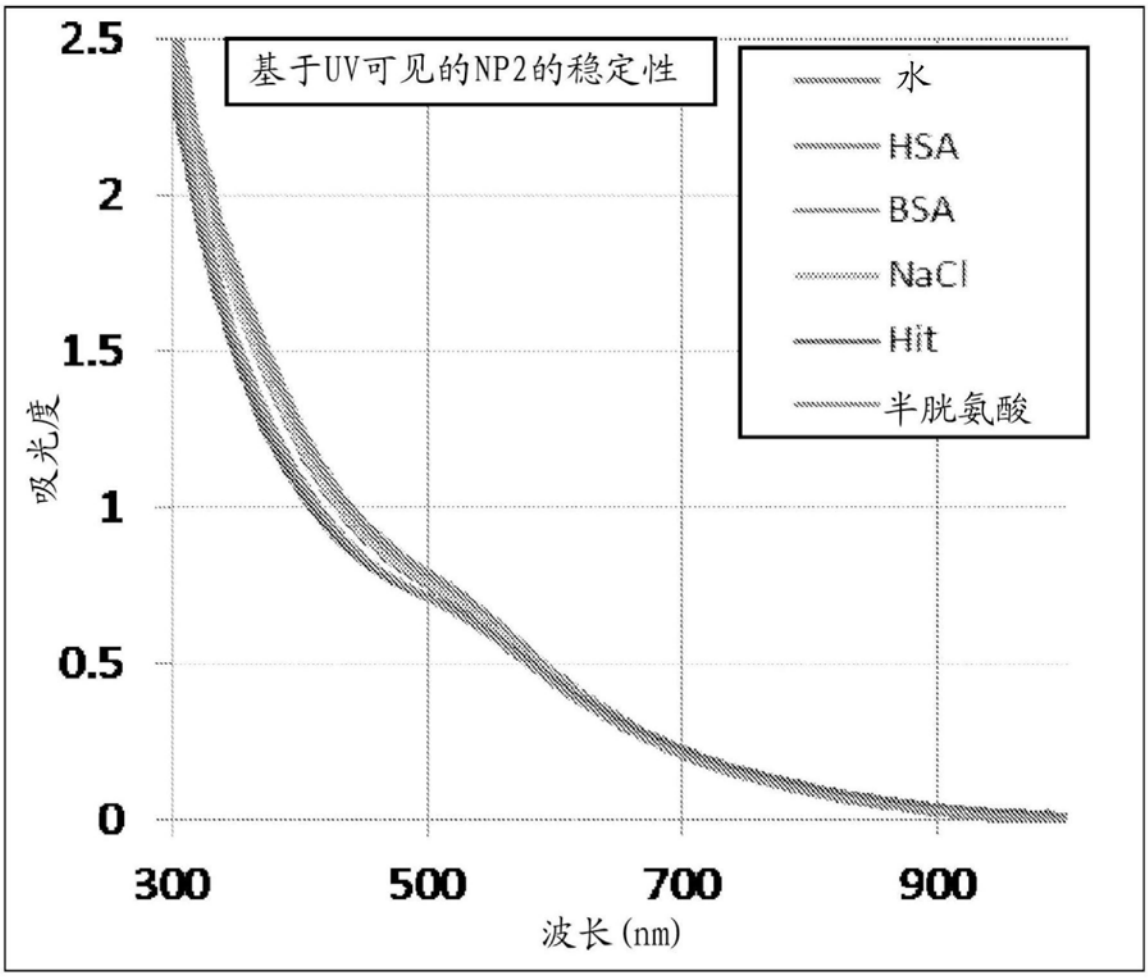

基于UV可见的NP2的稳定性
水
HSA
BSA
NaCl
Hit
半胱氨酸
2.5
2
1.5
1
0.5
0
吸光度
300
500
700
900
波长(nm)

图12B

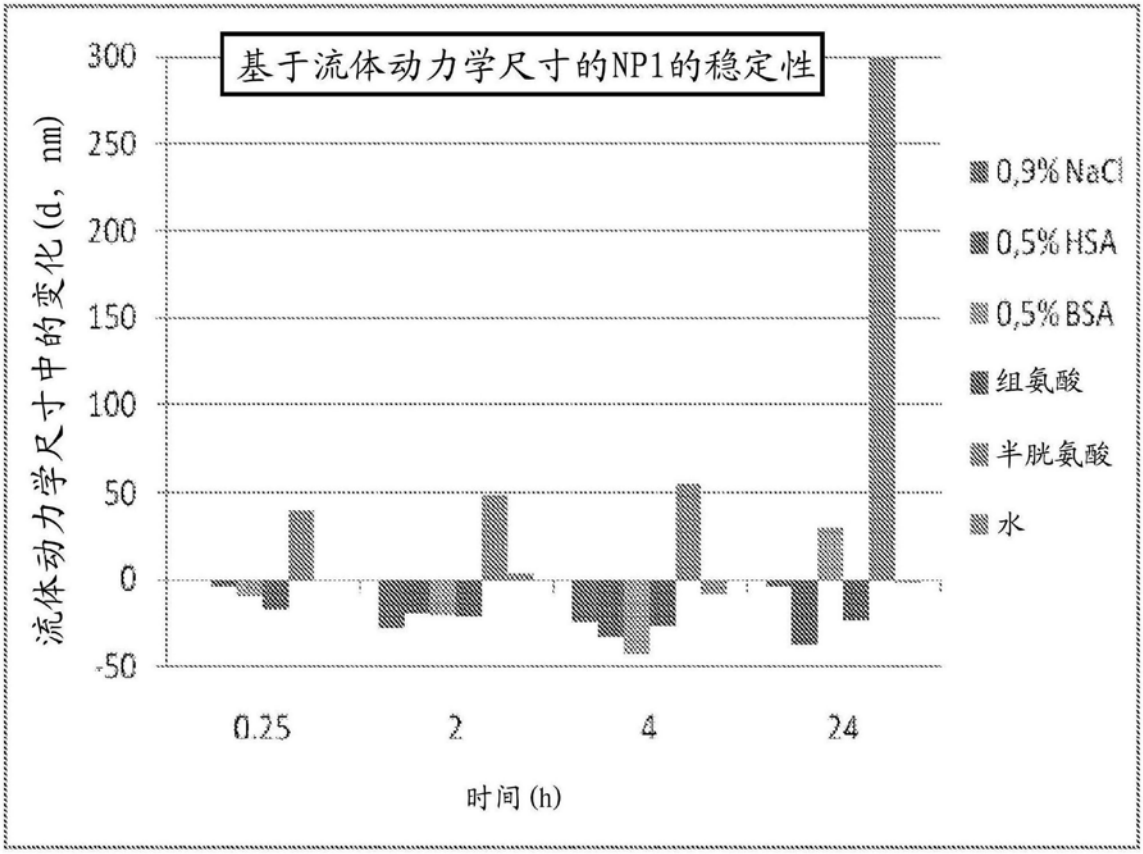

基于流体动力学尺寸的NP1的稳定性
流体动力学尺寸中的变化(d，nm)
300
250
200
150
100
50
0
-50
0.25
2
4
24
时间(h)
0,9% NaCl
0,5% HSA
0,5% BSA
组氨酸
半胱氨酸
水

图12C

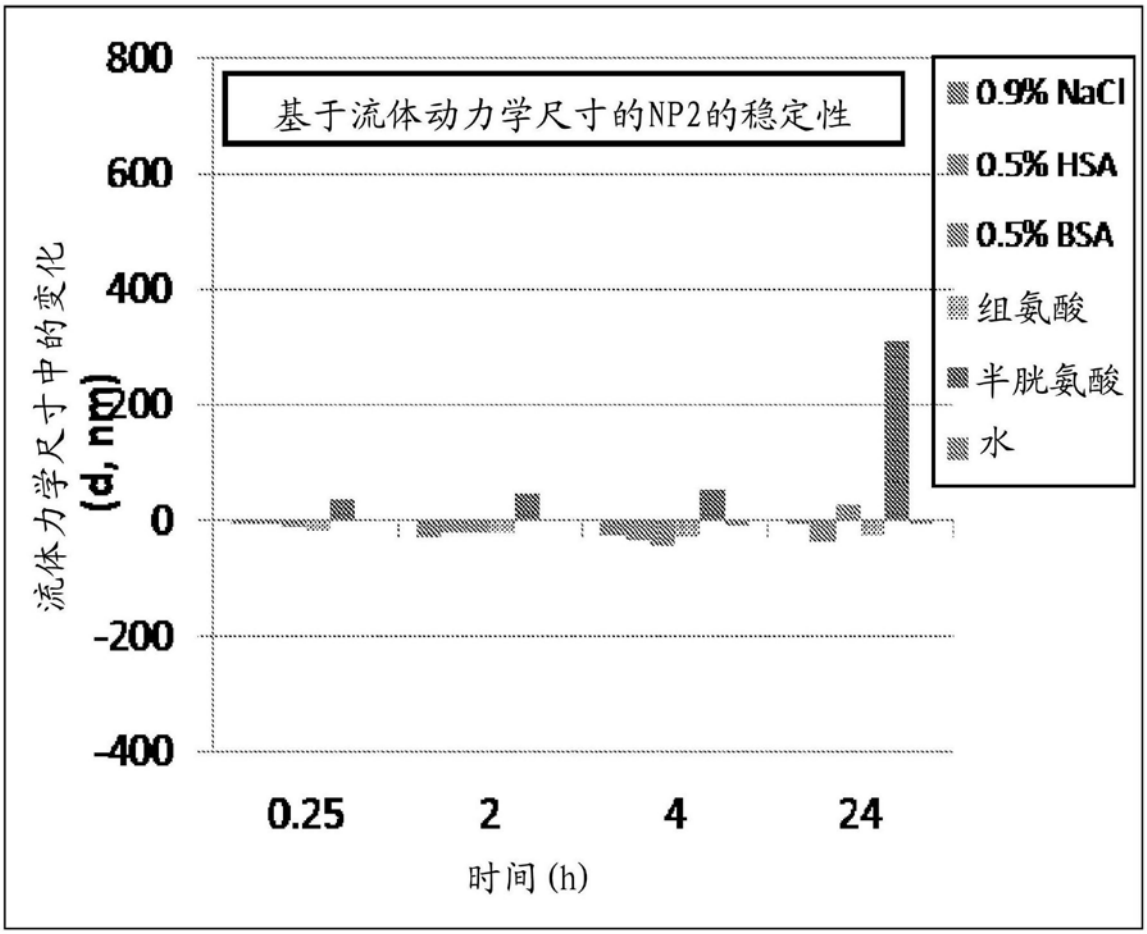

基于流体动力学尺寸的NP2的稳定性
流体力学尺寸中的变化 (d, nm)
800
600
400
200
0
-200
-400
0.25
2
4
24
时间 (h)
0.9% NaCl
0.5% HSA
0.5% BSA
组氨酸
半胱氨酸
水

图12D

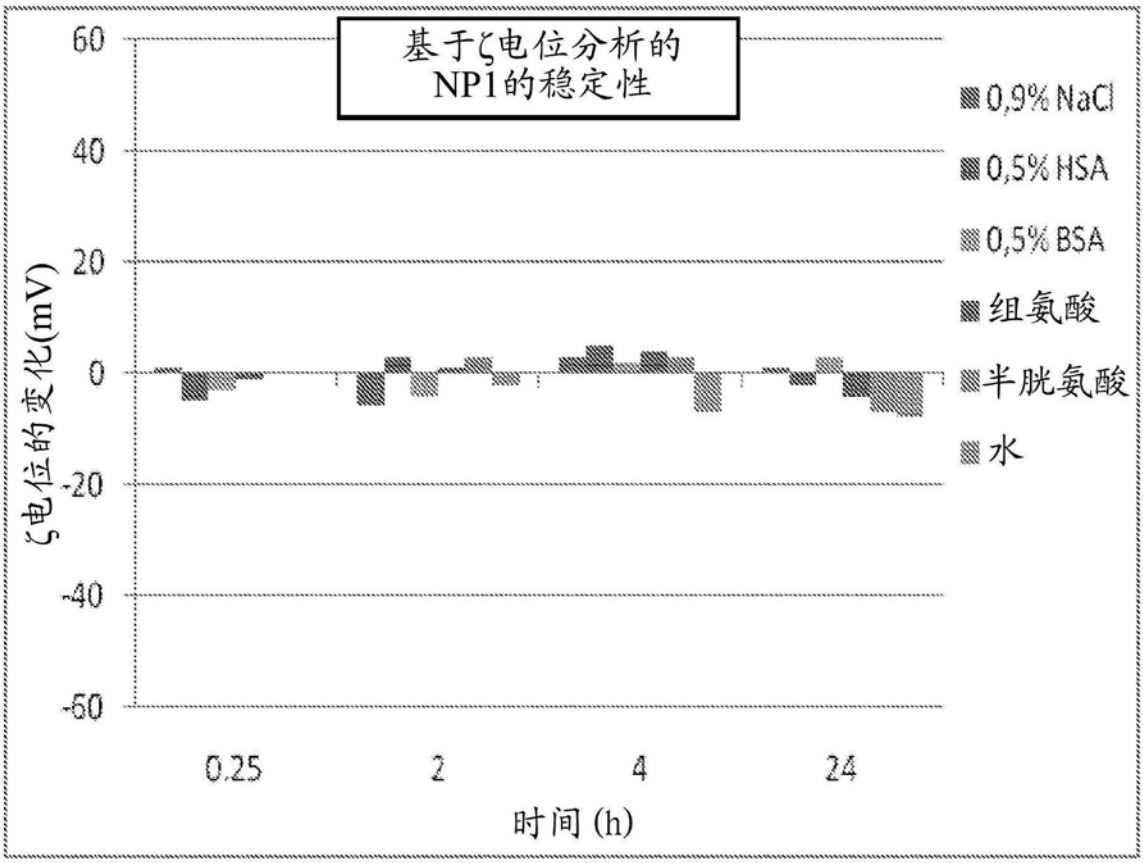

基于ζ电位分析的
NP1的稳定性
60
40
20
0
-20
-40
-60
ζ电位的变化(mV)
0.25
2
4
24
时间 (h)
0,9% NaCl
0,5% HSA
0,5% BSA
组氨酸
半胱氨酸
水

图12E

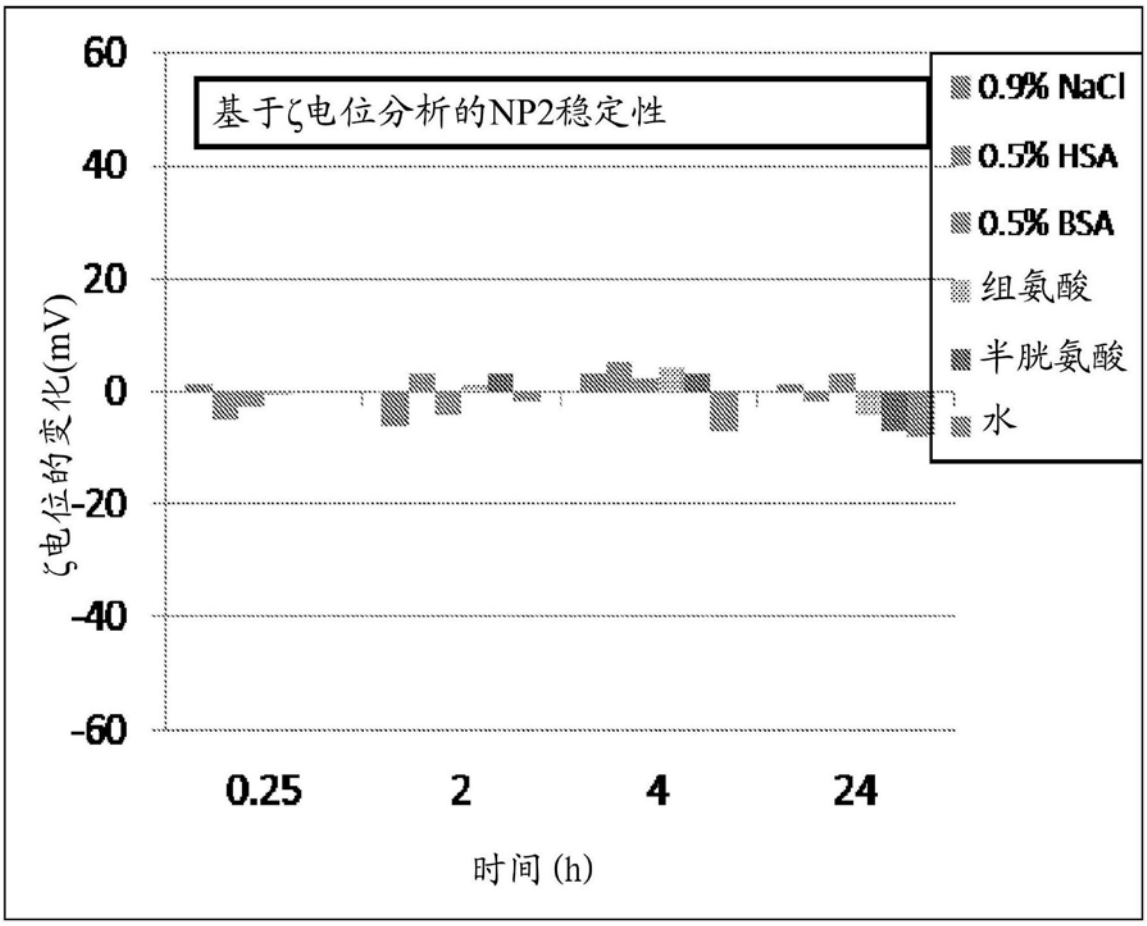

基于ζ电位分析的NP2稳定性
60
40
20
0
-20
-40
-60
ζ电位的变化(mV)
0.25
2
4
24
时间 (h)
0.9% NaCl
0.5% HSA
0.5% BSA
组氨酸
半胱氨酸
水

图12F

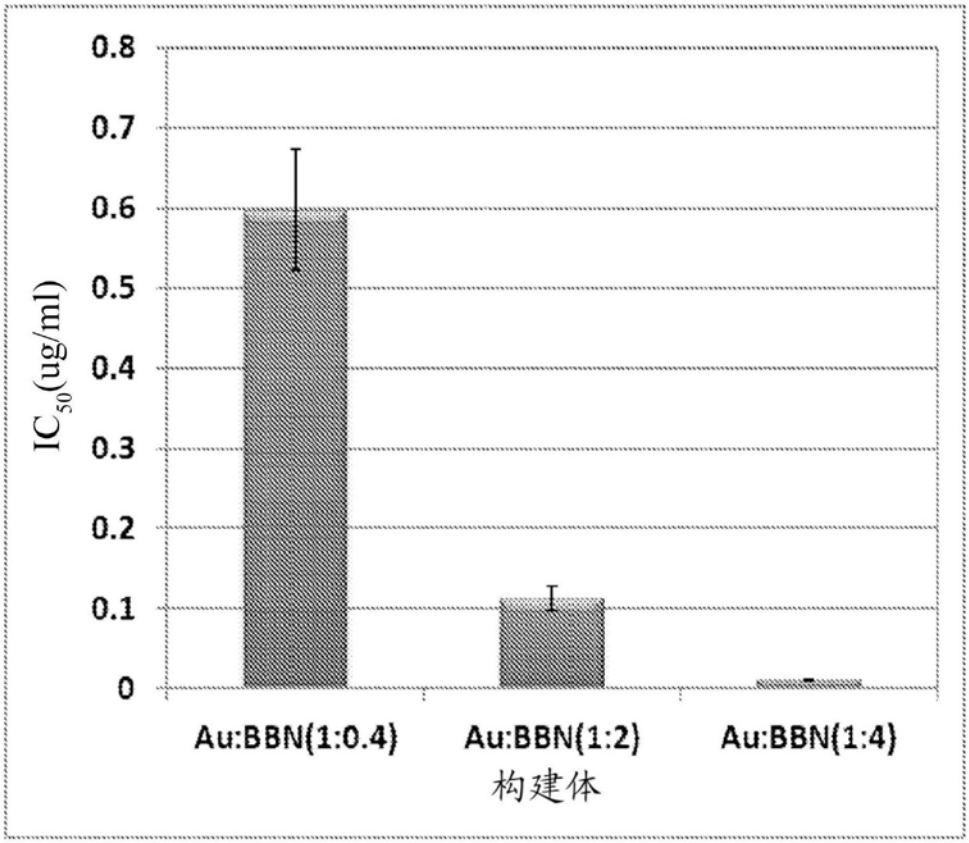

0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
IC50(ug/ml)
Au:BBN(1:0.4)
Au:BBN(1:2)
Au:BBN(1:4)
构建体

图13

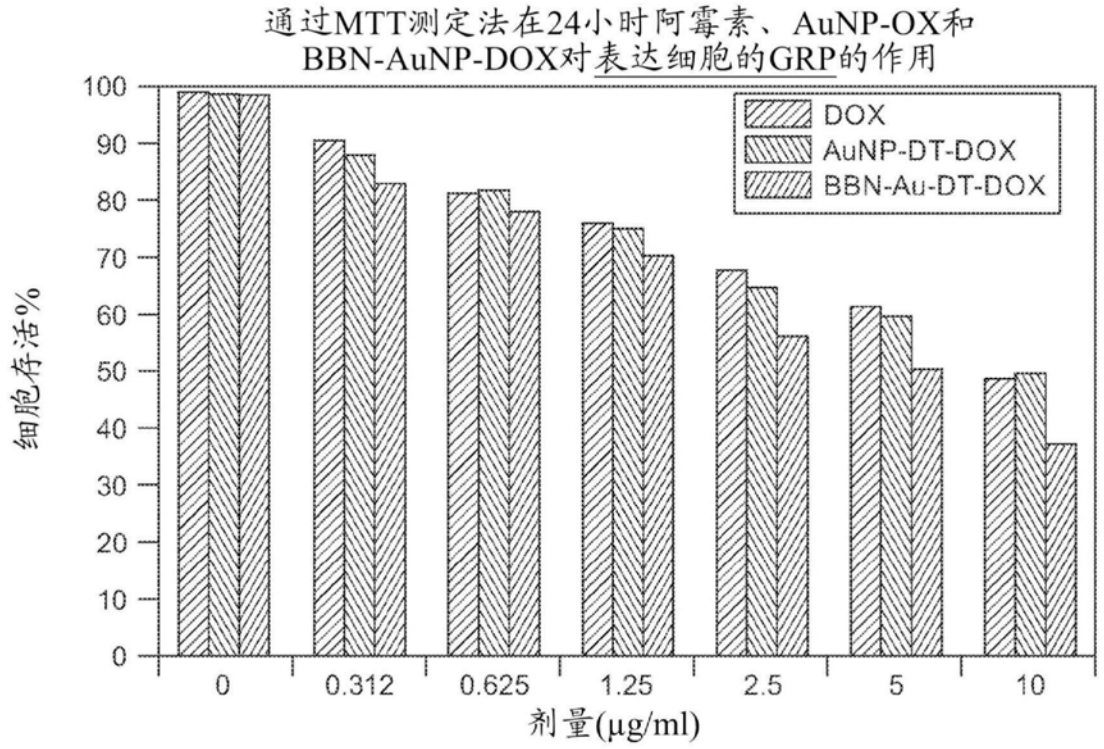

通过MTT测定法在24小时阿霉素、AuNP-OX和
BBN-AuNP-DOX对表达细胞的GRP的作用
DOX
AuNP-DT-DOX
BBN-Au-DT-DOX
细胞存活%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
0.312
0.625
1.25
2.5
5
10
剂量(μg/ml)

图14

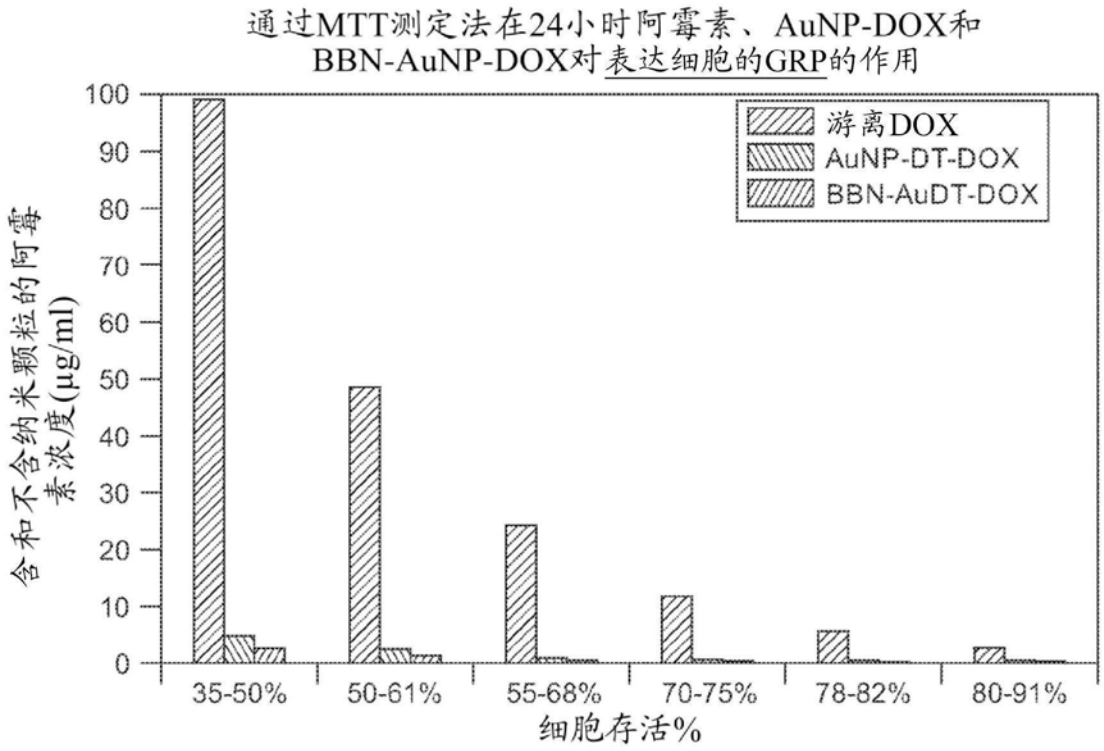

通过MTT测定法在24小时阿霉素、AuNP-DOX和
BBN-AuNP-DOX对表达细胞的GRP的作用
游离DOX
AuNP-DT-DOX
BBN-AuDT-DOX
含和不含纳米颗粒的阿霉素浓度(μg/ml)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
35-50%
50-61%
55-68%
70-75%
78-82%
80-91%
细胞存活%

图15

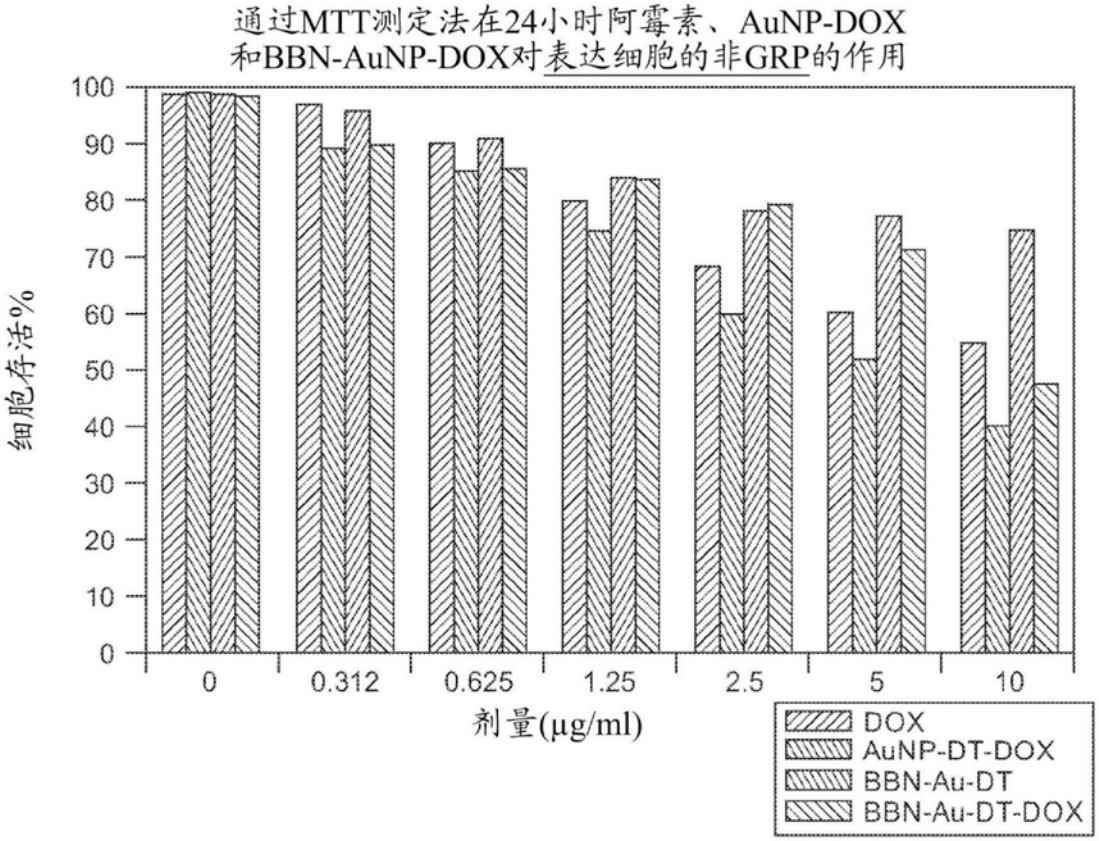

通过MTT测定法在24小时阿霉素、AuNP-DOX
和BBN-AuNP-DOX对表达细胞的非GRP的作用
细胞存活%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
0.312
0.625
1.25
2.5
5
10
剂量(μg/ml)
DOX
AuNP-DT-DOX
BBN-Au-DT
BBN-Au-DT-DOX

图16

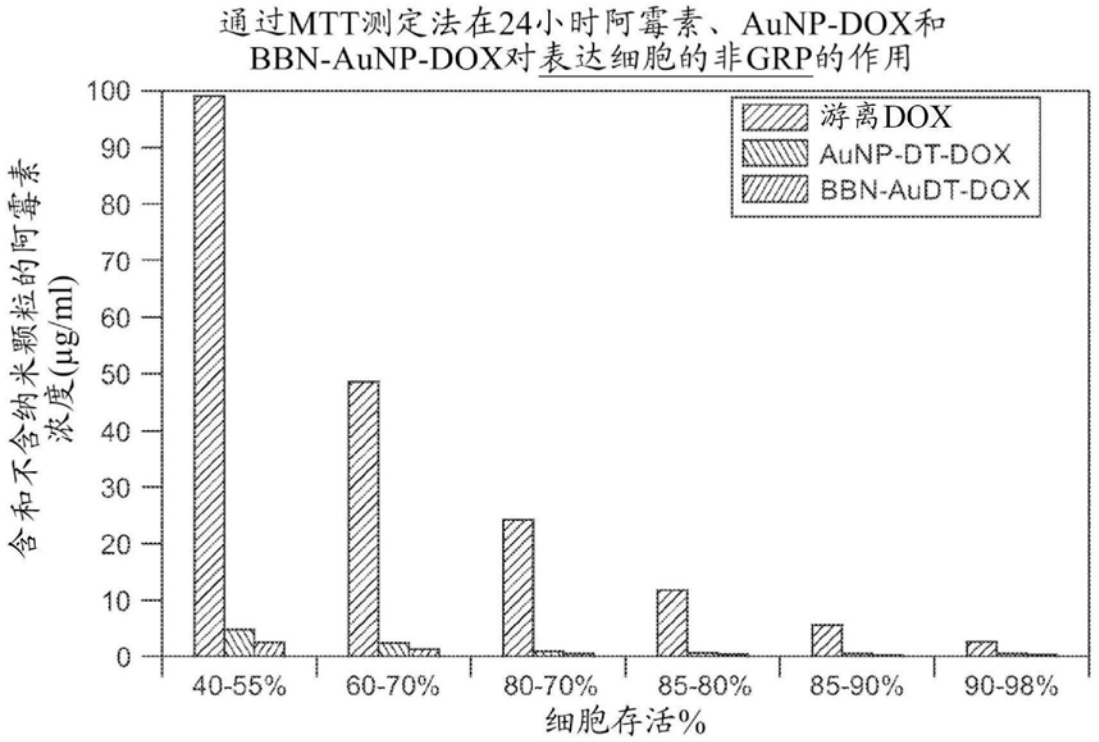

通过MTT测定法在24小时阿霉素、AuNP-DOX和
BBN-AuNP-DOX对表达细胞的非GRP的作用
含和不含纳米颗粒的阿霉素
浓度(μg/ml)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
游离DOX
AuNP-DT-DOX
BBN-AuDT-DOX
40-55%
60-70%
80-70%
85-80%
85-90%
90-98%
细胞存活%

图17

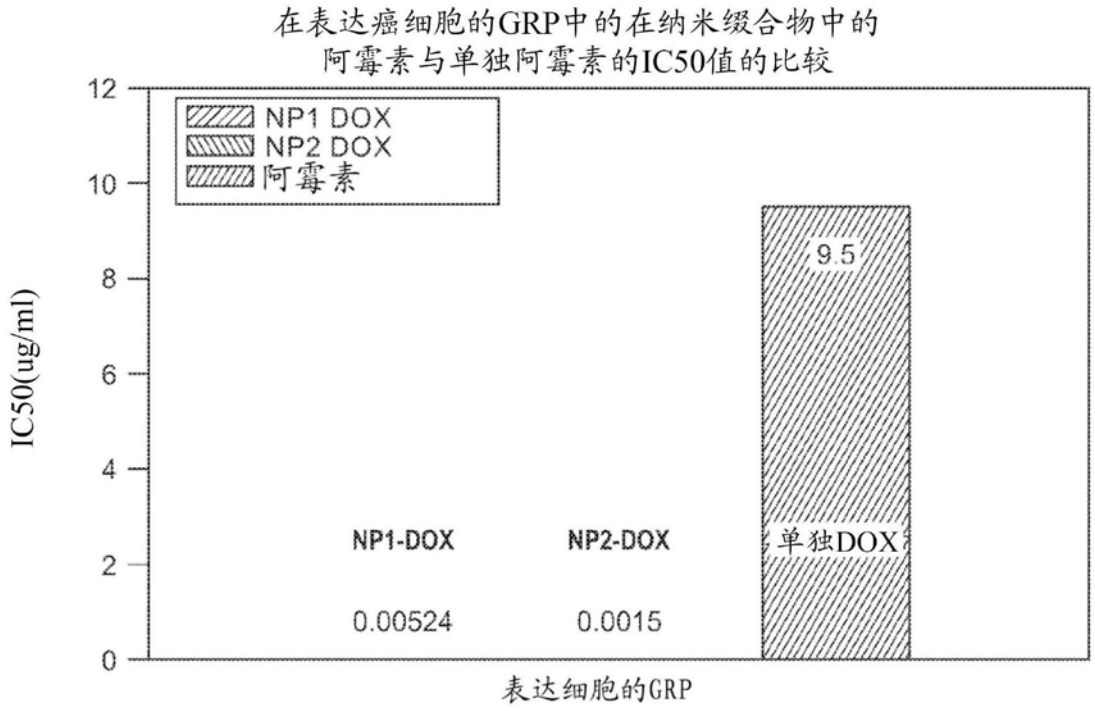

在表达癌细胞的GRP中的在纳米缀合物中的
阿霉素与单独阿霉素的IC50值的比较
NP1 DOX
NP2 DOX
阿霉素
IC50(ug/ml)
12
10
8
6
4
2
0
9.5
NP1-DOX
NP2-DOX
单独DOX
0.00524
0.0015
表达细胞的GRP

图18

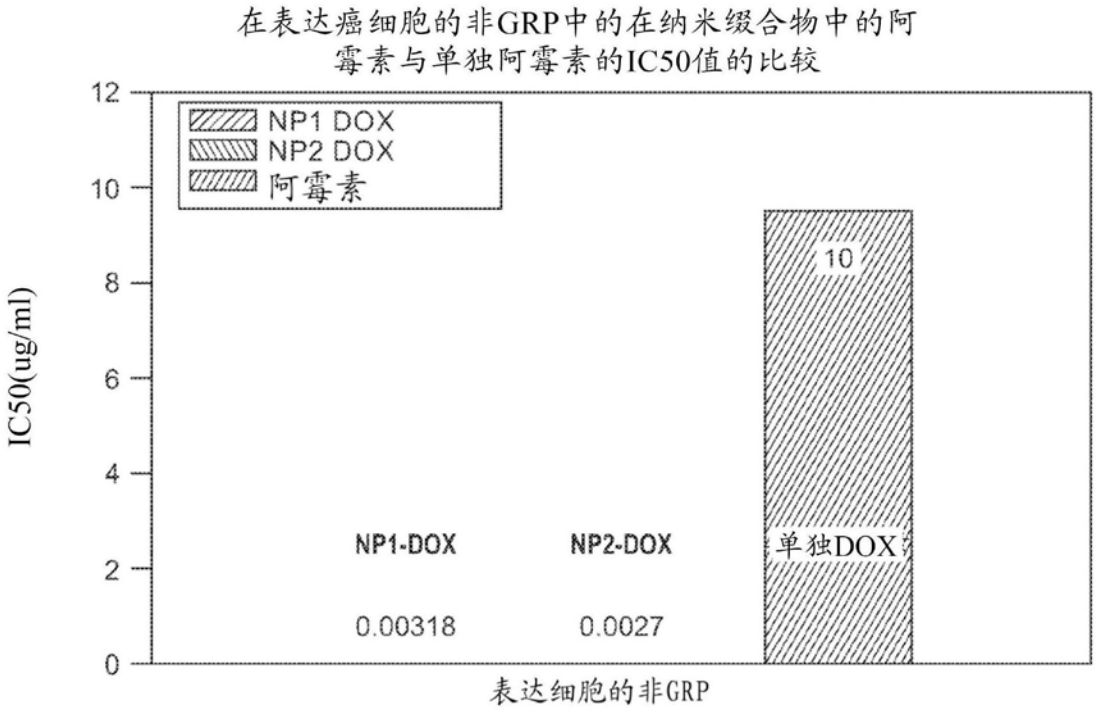

在表达癌细胞的非GRP中的在纳米缀合物中的阿
霉素与单独阿霉素的IC50值的比较
NP1 DOX
NP2 DOX
阿霉素
IC50(ug/ml)
12
10
8
6
4
2
0
10
NP1-DOX
NP2-DOX
单独DOX
0.00318
0.0027
表达细胞的非GRP

图19

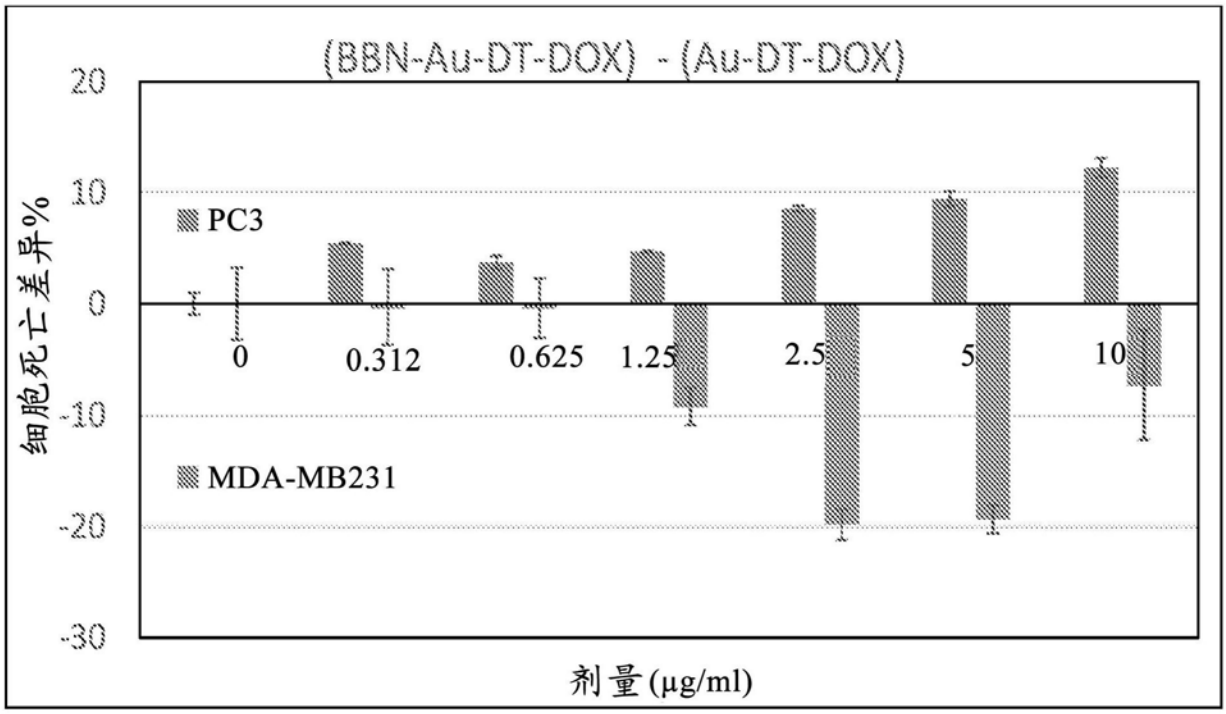

(BBN-Au-DT-DOX) - (Au-DT-DOX)
细胞死亡差异%
20
10
0
-10
-20
-30
PC3
MDA-MB231
0
0.312
0.625
1.25
2.5
5
10
剂量(μg/ml)

图20