(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 102065906 B
(45)授权公告日 2013.01.02

(21)申请号 200980123852.7

(22)申请日 2009.04.23

(30)优先权数据
2008902063 2008.04.24 AU

(85)PCT申请进入国家阶段日
2010.12.23

(86)PCT申请的申请数据
PCT/AU2009/000508 2009.04.23

(87)PCT申请的公布数据
WO2009/129577 EN 2009.10.29

(73)专利权人 澳大利亚国立大学
地址 澳大利亚首都直辖区

(72)发明人 罗斯·温特沃思·斯蒂芬斯
蒂莫西·约翰·森登
大卫·华莱士·金

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限责任公司 11204
代理人 王达佐 洪欣

(51)Int.Cl.
A61K 51/06(2006.01)
A61K 49/12(2006.01)
A61K 49/14(2006.01)
A61K 49/16(2006.01)
A61K 51/08(2006.01)
A61K 51/10(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件

WO 2008000045 A1,2008.01.03, 摘要，说明书第6页第14-18行，第7页第14-20行和33-36行，第8页第35-37行，第9页第1行－第11页第11行.

WO 2005018681 A1,2005.03.03, 摘要，说明书第[0007]\[0010]\[0013]-[0015]\[0024]-[0028]\[0041]-[0043]\[0046]-[0047]\[0053]\[0056]\[0059]段.

WO 2007136404 A2,2007.11.29, 摘要，说明书第4页第14-21行，第28-32行，第5页第2-4行，第15-17行，第8页第6-8行，第12页第11-17行，第15页第3-12行.

WO 9904826 A1,1999.02.04, 摘要，说明书第2页第20-24行，第3页第9-16行，第7页第22-26行，第8页第16-19行，第8页第32行，权利要求1-21.

WO 9904827 A1,1999.02.04, 摘要，说明书第2页第25-27行，第6页第29行 －第7页第2行，第7页第11-14行，第12页第7-16行，和权利要求1-22.

WO 2006063418 A2,2006.06.22, 摘要，说明书[0058]\[0059]\[0082]-[0084]\[0127]\[0133]\[0134]段.

US 20060239907 A1,2006.10.26, 摘要，说明书第[0005]\[0012]\[0014]\[0017]-[0018]\[0020]\[0021]\[0027]\[0035]\[0060]\[0068]段和权利要求15-16.

US 20060067939 A1,2006.03.30, 摘要，说明书第[0013]\[0025]-[0027]\[0039]\[0040]\表1\[0059]和[0060]段.

WO 2006116798 A1,2006.11.09, 摘要，说明书第8页第7-19行，第20页第9-10行，第21-22行，第22页第5-7行和权利要求1.

US 20040258603 A1,2004.12.23, 说明书第[0022]\[0070]\[0104]\[0234]-[0241]段，权利要求21\23\26\28和29.

审查员 豆波建

权利要求书 3 页 说明书 24 页 附图 6 页

CN 102065906 B

(54)发明名称

放射性标记大分子的方法

(57)摘要

本发明涉及制备放射性标记的大分子的方法，所述方法包括在水性介质中将大分子与具有放射性颗粒芯的碳封装纳米颗粒复合材料接触，所述水性介质包含通过减弱静电排斥力来提高所述纳米颗粒和大分子之间的短程引力而选择的pH。

1. 制备放射性标记的大分子的方法，所述方法包括在水性介质中将大分子与具有放射性颗粒芯的碳封装纳米颗粒复合材料接触，所述水性介质具有通过减弱静电排斥力来提高所述纳米颗粒和大分子之间的短程引力而选择的 pH，其中所述碳封装纳米颗粒复合材料为 FibrinLite，所述大分子选自蛋白、多肽、抗体及其片段，所述水性介质具有 pH，在该 pH 下所述大分子上的净电荷基本上为零，并且所述水性介质具有与所述大分子的 pI 基本相等的 pH。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述水性介质还具有通过减弱静电排斥力来提高所述纳米颗粒和大分子之间的短程引力而选择的电解质浓度，其中所述电解质为简单电解质，浓度为大于 1 毫摩尔至 150 毫摩尔的范围。

3. 如权利要求 2 所述的方法，其中所述简单电解质选自 Na、K 和 Ca。

4. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述放射性颗粒芯包含选自以下的放射性同位素或放射性核素：^{99m}Tc、^{198}Au、^{213}Bi、^{57}Co、^{51}Cr、^{64}Cu、^{67}Cu、^{165}Dy、^{169}Er、^{59}Fe、^{67}Ga、^{68}Ga、^{153}Gd、^{166}Ho、^{111}In、^{113m}In、^{177}Lu、^{23}Na、^{24}Na、^{103}Pd、^{81}Rb、^{82}Rb、^{186}Re、^{188}Re、^{75}Se、^{153}Sm、^{117m}Sn、^{89}Sr、^{201}Th、^{90}Y、^{169}Yb、^{192}Ir。

5. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述放射性颗粒芯包含 ^{99m}Tc。

6. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述大分子是多聚赖氨酸。

7. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述大分子被包含在导管、纤维、棒杆或细丝、膜、薄片、网状结构或纱网、多孔海绵、管或支架、珠或胶囊或已知尺寸的微珠形式的微粒、纳米颗粒、脂质体、胶或凝胶之中或之上。

8. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述方法还包括将放射性标记的大分子与未标记的大分子和 / 或自由纳米颗粒复合材料分离。

9. 放射性标记的实体，其包含与具有放射性颗粒芯的碳封装纳米颗粒复合材料复合的大分子，并且其中所述复合物在水性介质中产生，所述水性介质具有通过减弱静电排斥力来提高所述纳米颗粒和大分子之间的短程引力而选择的 pH，其中所述碳封装纳米颗粒复合材料为 FibrinLite，所述大分子选自蛋白、多肽、抗体及其片段，所述水性介质具有 pH，在该 pH 下所述大分子上的净电荷基本上为零，并且所述水性介质具有与所述大分子的 pI 基本相等的 pH。

10. 如权利要求 9 所述的放射性标记的实体，其包含多个不同的大分子。

11. 如权利要求 9 所述的放射性标记的实体，其包含多个不同的放射性标记。

12. 如权利要求 9 所述的放射性标记的实体，其包含适合于成像的放射性标记和适合于治疗应用的放射性标记。

13. 如权利要求 9 所述的放射性标记的实体，其包含导管、纤维、棒杆或细丝、膜、薄片、网状结构或纱网、多孔海绵、管或支架、珠或胶囊或已知尺寸的微珠形式的微粒、纳米颗粒、脂质体、胶或凝胶。

14. 包含放射性标记的实体的药物组合物，所述放射性标记的实体包含与具有放射性颗粒芯的碳封装纳米颗粒复合材料复合的大分子以及药学可接受的载体、佐剂或赋形剂，其中所述放射性标记的实体在水性介质中产生，所述水性介质具有通过减弱静电排斥力来提高所述纳米颗粒和大分子之间的短程引力而选择的 pH，其中所述碳封装纳米颗粒复合材料为 FibrinLite，所述大分子选自蛋白、多肽、抗体及其片段，所述水性介质具有 pH，在该

pH 下所述大分子上的净电荷基本上为零，并且所述水性介质具有与所述大分子的 pI 基本相等的 pH。

15. 如权利要求 14 所述的组合物，其中所述大分子是多聚赖氨酸。

16. 如权利要求 14 所述的组合物，其中所述大分子是组织特异性、器官特异性、细胞类型特异性、或疾病状态特异性的大分子。

17. 制备放射性标记的医疗装置的方法，所述方法包括：在适合于将放射性标记的大分子合并入医疗装置中或合并在医疗装置上的条件下，将与具有放射性颗粒芯的碳封装纳米颗粒复合材料复合的大分子与所述医疗装置接触，并且其中所述医疗装置在水性介质中产生，所述水性介质具有通过减弱静电排斥力来提高所述纳米颗粒和大分子之间的短程引力而选择的 pH，其中所述碳封装纳米颗粒复合材料为 FibrinLite，所述大分子选自蛋白、多肽、抗体及其片段，所述水性介质具有 pH，在该 pH 下所述大分子上的净电荷基本上为零，并且所述水性介质具有与所述大分子的 pI 基本相等的 pH。

18. 如权利要求 17 所述的方法，其中所述医疗装置是诊断装置或治疗装置。

19. 如权利要求 17 所述的方法，其中所述医疗装置是导管、纤维、棒杆或细丝、膜、薄片、网状结构或纱网、多孔海绵、管或支架、珠或胶囊或已知尺寸的微珠形式的微粒、纳米颗粒、脂质体、胶或凝胶。

20. 放射性标记的医疗装置，其包含合并入医疗装置中或合并在医疗装置上的与具有放射性颗粒芯的碳封装纳米颗粒复合材料复合的大分子，其中所述碳封装纳米颗粒复合材料为 FibrinLite，所述大分子选自蛋白、多肽、抗体及其片段，并且所述与具有放射性颗粒芯的碳封装纳米颗粒复合材料复合的大分子是按照权利要求 1 所述的方法制备的。

21. 放射性标记的大分子在制备用于有需要的患者的放射治疗的药物中的用途，其中所述放射性标记的大分子包含与具有放射性颗粒芯的碳封装纳米颗粒复合材料相关联的大分子，并且其中所述放射性标记的大分子在水性介质中产生，所述水性介质具有通过减弱静电排斥力来提高所述纳米颗粒和大分子之间的短程引力而选择的 pH，其中所述碳封装纳米颗粒复合材料为 FibrinLite，所述大分子选自蛋白、多肽、抗体及其片段，所述水性介质具有 pH，在该 pH 下所述大分子上的净电荷基本上为零，并且所述水性介质具有与所述大分子的 pI 基本相等的 pH。

22. 如权利要求 21 所述的用途，其中所述放射治疗是对于肺的内部放射治疗。

23. 如权利要求 21 或 22 所述的用途，其中所述放射治疗是用于原发性和 / 或转移性肺肿瘤的治疗。

24. 如权利要求 21 所述的用途，其中所述大分子对于肺是特异性的。

25. 如权利要求 21 或 24 所述的用途，其中所述大分子是多聚赖氨酸。

26. 如权利要求 25 所述的用途，其中所述多聚赖氨酸分子量为 15kd 至 30kd。

27. 如权利要求 21-26 中任一项所述的用途，其中所述放射性颗粒芯包含 ^{99m}Tc、^{198}Au、^{213}Bi、^{57}Co、^{51}Cr、^{64}Cu、^{67}Cu、^{165}Dy、^{169}Er、^{59}Fe、^{67}Ga、^{68}Ga、^{153}Gd、^{166}Ho、^{111}In、^{113m}In、^{177}Lu、^{23}Na、^{24}Na、^{103}Pd、^{81}Rb、^{82}Rb、^{186}Re、^{188}Re、^{75}Se、^{153}Sm、^{117m}Sn、^{89}Sr、^{201}Th、^{90}Y、^{169}Yb、^{192}Ir 中的至少一种。

28. 复合物在制备显像剂中的用途，所述复合物包含大分子和具有放射性颗粒芯的碳封装纳米颗粒复合材料，其中所述复合物在水性介质中产生，所述水性介质具有通过减弱静电排斥力来提高所述纳米颗粒和大分子之间的短程引力而选择的 pH，其中所述碳封装纳

米颗粒复合材料为 FibrinLite，所述大分子选自蛋白、多肽、抗体及其片段，所述水性介质具有 pH，在该 pH 下所述大分子上的净电荷基本上为零，并且所述水性介质具有与所述大分子的 pI 基本相等的 pH。

29. 如权利要求 21 或 28 所述的用途，其中所述放射性颗粒芯包含 ^{99m}Tc。

30. 显像剂，其包含与具有放射性颗粒芯的碳封装纳米颗粒复合材料复合的大分子，其中所述碳封装纳米颗粒复合材料为 FibrinLite，所述大分子选自蛋白、多肽、抗体及其片段，并且所述与具有放射性颗粒芯的碳封装纳米颗粒复合材料复合的大分子是按照权利要求 1 所述的方法制备的。

31. 如权利要求 30 所述的显像剂，其中所述大分子对于肺是特异性的。

32. 如权利要求 30 所述的显像剂，其中所述大分子是多聚 D 赖氨酸。

放射性标记大分子的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于 2008 年 4 月 24 日提交的澳大利亚临时专利申请第 2008902063 号的优先权，通过引用将其整体并入本文。

发明领域

[0003] 本发明涉及制备放射性标记的大分子的方法，所述大分子例如诸如多肽的生物大分子。本发明还涉及放射性标记的大分子及其药学制剂和兽医学制剂。在具体实施方案中，本发明涉及用于体外诊断测试和体内诊断成像、局部放射治疗和靶向放射治疗的放射性标记的大分子。

[0004] 发明背景

[0005] 本领域已知产生放射性标记的大分子的方法，所述大分子例如包括蛋白、肽和抗体在内的多肽。通常，传统方法依赖于对大分子主链的亚基的简单取代反应，例如多肽中酪氨酸的碘化，或依赖于有机化学来制造包含能够强烈地保留放射性核素（通常是金属离子）的螯合实体的衍生物，例如单克隆抗体的螯合物衍生物。

[0006] 对于医学应用，诸如抗体的多肽的放射性标记密度是相当大的问题，特别是对于成像或治疗应用，其要求在非常少量的材料中高水平的放射性。同样，如果需要研究一系列不同的金属放射性同位素的适用性，需要对于每种金属定制螯合物化学。因此，非常期望具有可使用广泛不同的金属放射性同位素而不需要对于放射性标记的化学进行重大改变的放射性标记大分子的方法。在医学中这将是特别有价值的，在医学中必须从多样性的可用的放射性同位素中选择放射性同位素以确定最适合于不同的诊断和治疗应用的那些放射性同位素。

[0007] 需要克服或避免已知方法的一个或多个缺点或局限性的制备放射性标记的大分子的改进方法。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明的目的是提供制备放射性标记的大分子，特别是放射性标记的生物大分子的改进方法，或提供现有技术的备选方法。

[0010] 根据本发明的第一方面，提供了制备放射性标记的大分子的方法，所述方法包括：在水性介质中将大分子与具有放射性颗粒芯的碳封装纳米颗粒复合材料接触，所述水性介质包含通过减弱静电排斥力来提高所述纳米颗粒和大分子之间的短程引力而选择的 pH。

[0011] 在一个实施方案中，所述碳封装纳米颗粒复合材料为 FibrinLite。

[0012] 在一个实施方案中，所述碳封装纳米颗粒复合材料包含阴离子表面活性剂。在一个实施方案中，所述阴离子表面活性剂为脱氧胆酸钠。

[0013] 在一个实施方案中，所述水性介质包含阴离子表面活性剂。在一个实施方案中，所述阴离子表面活性剂为脱氧胆酸钠。

[0014] 在一个实施方案中，所述水性介质包含 pH，在该 pH 时大分子上净电荷基本上为零。

[0015] 在一个实施方案中，所述水性介质包含基本上与大分子的 pI 相等的 pH。

[0016] 在一个实施方案中，所述水性介质还包含通过减弱静电排斥力来提高纳米颗粒和大分子之间的短程引力而选择的电解质浓度。

[0017] 在一个实施方案中，所述电解质为选自 Na、K 和 Ca 的简单电解质。

[0018] 在一个实施方案中，所述水性介质中简单电解质浓度在大于约 1 毫摩尔至约 150 毫摩尔的范围内。

[0019] 在一个实施方案中，所述水性介质包含不同于大分子的 pI 的 pH 以及大于约 1 毫摩尔至约 150 毫摩尔的范围内的简单电解质浓度。

[0020] 在一个实施方案中，所述放射性颗粒芯包含选自以下的放射性同位素或放射性核素：^{99m}Tc、^{198}Au、^{213}Bi、^{57}Co、^{51}Cr、^{64}Cu、^{67}Cu、^{165}Dy、^{169}Er、^{59}Fe、^{67}Ga、^{68}Ga、^{153}Gd、^{166}Ho、^{111}In、^{113m}In、^{177}Lu、^{23}Na、^{24}Na、^{103}Pd、^{81}Rb、^{82}Rb、^{186}Re、^{188}Re、^{75}Se、^{153}Sm、^{117m}Sn、^{89}Sr、^{201}Th、^{90}Y、^{169}Yb、^{192}Ir。

[0021] 在一个实施方案中，所述放射性颗粒芯包含 ^{99m}Tc。

[0022] 在一个实施方案中，所述大分子为生物大分子。

[0023] 在一个实施方案中，所述生物大分子选自多肽、抗体及其片段和衍生物。

[0024] 在一个实施方案中，所述大分子为多聚赖氨酸。

[0025] 在一个实施方案中，所述大分子被包含在导管、纤维、棒杆或细丝、膜、薄片、网状结构或纱网、多孔海绵、管或支架、珠或胶囊或已知尺寸的微珠形式的微粒、纳米颗粒、脂质体、胶或凝胶之中或之上。

[0026] 在一个实施方案中，所述方法还包括将放射性标记的大分子从未标记的大分子和 / 或自由纳米颗粒复合材料中分离。

[0027] 在本发明的第二方面，提供了放射性标记的实体，其包含与具有放射性颗粒芯的碳封装纳米颗粒复合材料复合的大分子。

[0028] 在一个实施方案中，所述放射性标记的实体包含多种不同的大分子。

[0029] 在一个实施方案中，所述放射性标记的实体包含多种不同的放射性标记。

[0030] 在一个实施方案中，所述放射性标记的实体包含适合于成像的放射性标记和适合于治疗应用的放射性标记。

[0031] 在一个实施方案中，所述放射性标记的实体包含导管、纤维、棒杆或细丝、膜、薄片、网状结构或纱网、多孔海绵、管或支架、珠或胶囊或已知尺寸的微珠形式的微粒、纳米颗粒、脂质体、胶或凝胶。

[0032] 在一个实施方案中，所述放射性标记的实体为医疗装置。

[0033] 在本发明的第三方面，提供包含放射性标记的实体的药物组合物，所述放射性标记的实体包含与具有放射性颗粒芯的碳封装纳米颗粒复合材料复合的大分子，以及药学上可接受的载体、佐剂或赋形剂。

[0034] 在一个实施方案中，所述生物大分子选自多肽、抗体及其片段和衍生物。

[0035] 在一个实施方案中，所述大分子为多聚赖氨酸。

[0036] 在一个实施方案中，所述大分子为组织特异性大分子、器官特异性大分子、细胞类型特异性大分子或疾病状态特异性大分子。

[0037] 在本发明的第四方面，提供制备放射性标记的医疗装置的方法，该方法包括在适合于将所述放射性标记的大分子合并入所述医疗装置中或合并在所述医疗装置上的条件

下，将与具有放射性颗粒芯的碳封装纳米颗粒复合材料复合的大分子与医疗装置接触。

[0038] 在本发明的第五方面，提供了放射性标记的医疗装置，其包含合并入医疗装置中或合并在医疗装置上的与具有放射性颗粒芯的碳封装纳米颗粒复合材料复合的大分子。

[0039] 在一个实施方案中，第二至第五方面的任一项的医疗装置选自诊断装置和治疗装置。

[0040] 在一个实施方案中，第二至第五方面的任一项的装置为可注射的医疗装置。在一个实施方案中，所述大分子被合并在微粒、纳米颗粒或脂质体中或合并在微粒、纳米颗粒或脂质体上。

[0041] 在第二至第五方面任一项的一个实施方案中，所述医疗装置包含放射性标记的大分子，所述放射性标记的大分子被包含在导管、纤维、棒杆或细丝、膜、薄片、网状结构或纱网、多孔海绵、管或支架、珠或胶囊或已知尺寸的微珠形式的微粒、纳米颗粒、脂质体之中或之上。

[0042] 在一个实施方案中，第二至第五方面任一项的装置为可植入的医疗装置。

[0043] 在一个实施方案中，第二至第五方面任一项的医疗装置为兽医装置。

[0044] 在第六方面，本发明提供了患者的放射治疗的方法，该方法包括给予所述患者治疗有效量的放射性标记的大分子，其中所述放射性标记的大分子包含与具有放射性颗粒芯的碳封装纳米颗粒复合材料相关联的大分子。

[0045] 在一个实施方案中，所述放射治疗为对于肺的内部放射治疗。例如，所述放射治疗是对于原发性和 / 或转移性的肺肿瘤的治疗。

[0046] 在一个实施方案中，所述大分子对于肺是特异性的。

[0047] 在一个实施方案中，所述大分子为多聚赖氨酸。在一个实施方案中，所述多聚赖氨酸分子量为约 15kd 至约 30kd。

[0048] 在一个实施方案中，所述放射性颗粒芯包含选自以下的至少一种：^{198}Au、^{213}Bi、^{57}Co、^{51}Cr、^{64}Cu、^{67}Cu、^{165}Dy、^{169}Er、^{59}Fe、^{67}Ga、^{68}Ga、^{153}Gd、^{166}Ho、^{111}In、^{113m}In、^{177}Lu、^{23}Na、^{24}Na、^{103}Pd、^{81}Rb、^{82}Rb、^{186}Re、^{188}Re、^{75}Se、^{153}Sm、^{117m}Sn、^{89}Sr、^{201}Th、^{90}Y、^{169}Yb、^{192}Ir。

[0049] 在本发明的第七方面中，提供了制备与放射性同位素的无活性的原始粒子复合的大分子的方法，所述方法包括：在水性介质中将大分子与具有颗粒芯的碳封装纳米颗粒复合材料接触，所述颗粒芯包含放射性同位素的无活性的原始粒子，所述水性介质包含通过减弱静电排斥力来提高所述纳米颗粒和大分子之间的短程引力而选择的 pH。

[0050] 在本发明的第八方面，提供了复合物，其包含大分子和具有颗粒芯的碳封装纳米颗粒复合材料，所述颗粒芯包含放射性同位素的无活性的原始粒子。

[0051] 在本发明的第九方面，提供了放射性标记大分子的方法，所述方法包括以下步骤：(a) 在水性介质中将大分子与具有颗粒芯的碳封装纳米颗粒复合材料接触，所述颗粒芯包含放射性同位素的无活性的原始粒子，所述水性介质包含通过减弱静电排斥力来提高所述纳米颗粒和大分子之间的短程引力而选择的 pH；以及 (b) 将所述无活性的原始粒子活化以产生放射性同位素。

[0052] 在本发明的方法的一个实施方案中，所述水性介质还包含通过减弱静电排斥力来提高所述纳米颗粒和大分子之间的短程引力而选择的电解质浓度。

[0053] 在第七至第九方面的一个实施方案中，所述放射性同位素的无活性的原始粒子是

硼的稳定同位素 (^{10}B)。

[0054] 在第七至第九方面的一个实施方案中，所述大分子被包含在导管、纤维、棒杆或细丝、膜、薄片、网状结构或纱网、多孔海绵、管或支架、珠或胶囊或已知尺寸的微珠形式的微粒、纳米颗粒、脂质体之中或之上。

[0055] 在第七至第九方面的一个实施方案中，所述方法还包括将所述大分子合并入医疗装置中或合并在医疗装置上。在一个实施方案中，在活化之前，将大分子合并入医疗装置中或合并在医疗装置上。在一个实施方案中，所述方法还包括在所述活化之前，将所述医疗装置给予个体。在一个实施方案中，所述给予包括在所述活化之前，将所述医疗装置植入个体中。

[0056] 在一个实施方案中，所述活化包括将所述原始粒子暴露于中子束。

[0057] 在第十方面，本发明提供了患者的放射治疗的方法，所述方法包括：给予所述患者一定量的复合物，所述复合物包含大分子和具有颗粒芯的碳封装纳米颗粒复合材料，所述颗粒芯包含放射性同位素的无活性的原始粒子，并且将所述无活性的原始粒子活化以产生放射性同位素，其中当所述无活性的原始粒子被活化时，所述量为治疗有效量。

[0058] 在一个实施方案中，所述放射性同位素的无活性的原始粒子为硼（硼 -10）。

[0059] 在一个实施方案中，所述活化包括将所述原始粒子暴露于中子束。

[0060] 在第十一方面，本发明提供了将患者中的医疗过程成像的方法，该方法包括将复合物给予所述患者，并且在所述个体中检测所述复合物，所述复合物包含大分子和具有放射性颗粒芯的碳封装纳米颗粒复合材料。

[0061] 在一个实施方案中，所述检测包括所述放射性的 γ 相机成像 (gamma camera imaging)。

[0062] 在一个实施方案中，所述复合物包含双重标记的大分子。在一个实施方案中，所述双重标记的大分子包含适合于治疗的放射性同位素和适合于成像的放射性同位素。

[0063] 在本发明的第十二方面，提供了显像剂，其包含与具有放射性颗粒芯的碳封装纳米颗粒复合材料复合的大分子。

[0064] 在一个实施方案中，所述大分子对于肺是特异性的。

[0065] 在一个实施方案中，所述大分子是多聚赖氨酸。

[0066] 在本发明的第十三方面，提供了诊断影响个体肺中血液循环的疾病或疾病状态的方法，所述方法包括给予所述个体与具有放射性颗粒芯的碳封装纳米颗粒复合材料复合的大分子，并且在所述个体中检测所述复合物。

[0067] 在一个实施方案中，所述大分子对于肺是特异性的。

[0068] 在一个实施方案中，所述大分子是多聚赖氨酸。在一个实施方案中，所述多聚赖氨酸分子量为约 15kd 至约 30kd。

[0069] 在一个实施方案中，所述疾病或疾病状态选自：肺栓塞、肺气肿、慢性阻塞性肺疾病 (COPD)、原发性和转移性肺肿瘤和感染。

[0070] 以上所述的发明概述是非限制性的，并且从优选实施方案的以下详细描述以及权利要求中，本发明的其它特征和优点将会清晰。

[0071] 附图简述

[0072] 现在，参考附图描述本发明的优选形式，其中：

[0073] 图 1a :pH 对 FibrinLite 与兔免疫球蛋白包被的微孔结合的影响。在图所示,在不同条件下将 Tc-99m FibrinLite 稀释液 (1 ∶ 10 ;100μL) 与兔免疫球蛋白 (Sigma I5006) 包被的聚苯乙烯微孔 (Nunc Lockwells™) 结合。500μM 柠檬酸钠 pH 3.5(“pH 3.5”) ;500μM 柠檬酸钠 pH 3.5 加 10μM 脱氧胆酸钠 (“pH 3.5DOC”) ;500μM 柠檬酸钠 pH 3.5 加 150mMNaCl(“pH 3.5+NaCl”) ;500μM 柠檬酸钠 pH 3.5 加 10μM DOC 加 150mM NaCl(“pH 3.5+N+D”) ;注释“pH 6.0”、“pH 6.0+DOC”、“pH 6.0+NaCl”以及“pH 6.0+N+D”具有相应的含义,但 pH 为 6.0 而不是 pH 3.5。条形图表示双平行孔的平均值。

[0074] 图 1b :Tc-99m FibrinLite 与未包被的微孔、用兔血清白蛋白 (Sigma A0764) 饱和包被后的微孔或用兔免疫球蛋白 (IgG ;Sigma I5006) 饱和包被后的微孔的结合。条形图表示双平行孔的平均值。

[0075] 图 2 :Tc-99m FibrinLite 与未包被的微孔、用兔免疫球蛋白的免疫制剂 (R 389 ;American Diagnostica) 饱和包被后的微孔或用 IgG 的两种不同鼠单克隆抗体 (Mab 3689 和 Mab 3471 ;American Diagnostica) 饱和包被后的微孔的结合。条形图表示双平行孔的平均值。

[0076] 图 3 :在 pH3.5(阴影条) 或 pH6.5(无阴影条) 的 500mM 柠檬酸钠中,Tc-99m FibrinLite 与未包被的微孔、用兔血清白蛋白 (Sigma A0764) 或用硫酸鱼精蛋白 (Sigma P4505) 饱和包被后的微孔的结合。条形图表示双平行孔的平均值。

[0077] 图 4 :FibrinLite 与白蛋白结合的电解质诱导

[0078] 将 Tc-99m FibrinLite(以 1 ∶ 10 稀释于所示浓度的氯化钠溶液中 ;100μL) 与预先用兔血清白蛋白 (Sigma A0764) 包被的聚苯乙烯微孔 (Nunc lockwells™) 结合。结果表示用 3 个不同的 FibrinLite 制剂进行的 3 次独立试验。

[0079] 图 5 :未包被的 Tc-99m FibrinLite 被注射入麻醉的兔的耳静脉中之后的循环系统清除和生物分布。注射之后立即开始一系列图像的获取 (Siemens Diacam γ 相机) ;每个框代表 30 秒的间隔。

[0080] 图 6 :多聚赖氨酸 (Sigma P4408) 处理的 Tc-99m FibrinLite 被注射入麻醉的兔的耳静脉中之后的循环系统清除和生物分布。注射之后立即开始一系列图像的获取 (Siemens Diacam γ 相机) ;每个框代表 30 秒的间隔。

[0081] 图 7a :多聚 D 赖氨酸 (MW 4-15kd ;Sigma P6403) 处理的 Tc-99mFibrinLite 被注射入麻醉的兔的耳静脉中之后的循环系统清除和生物分布。注射之后立即开始一系列图像的获取 (Siemens Diacam γ 相机) ;每个框代表 30 秒的间隔。

[0082] 图 7b :多聚 D 赖氨酸 (MW 30-70kd ;Sigma P7886) 处理的 Tc-99mFibrinLite 被注射入麻醉的兔的耳静脉中之后的循环系统清除和生物分布。注射之后立即开始一系列图像的获取 (Siemens Diacam γ 相机) ;每个框代表 30 秒的间隔。

[0083] 缩写

[0084] 为了方便起见,下文列出了本说明书中使用的下述缩写 :

[0085] 本文使用的术语“SPECT”是单光子发射计算机断层成像术的缩写。

[0086] 本文使用的术语“PET”是正电子发射断层成像术的缩写。

[0087] 本文使用的术语“SIRT”是选择性内部放射治疗的缩写。

[0088] 本文使用的术语“SMPS”是扫描式电移动度颗粒分径器 (scanning mobility

particle sizing) 的缩写。

[0089] 本文使用的术语“MCE”是混合纤维素酯的缩写。

[0090] 本文使用的术语“PTFE”是聚四氟乙烯的缩写。

[0091] 本文使用的术语“DOC”是脱氧胆酸钠的缩写。

[0092] 应当理解，在本文中，根据本领域技术人员所能认同的适合情况，在放射性标记的大分子的制备中，具有放射性颗粒芯的碳封装纳米颗粒复合材料（例如，FibrinLite 纳米颗粒）的制备和用途的描述能够采用必要的变换，成为具有包含放射性同位素的无活性的原始粒子的颗粒芯的碳封装纳米颗粒复合材料的用途（例如，使用无活性的原始粒子而不是有活性的放射性同位素，以及在无活性的前体实施方案的情况下的活化步骤）。

[0093] 本文使用的术语“治疗有效量”在其含义内包括本发明中使用的无毒性的但足够量的化合物或组合物以提供所需的治疗效果。根据诸如被治疗的物种、年龄、体重以及个体的一般情况、并存疾病、被治疗的疾病状态的严重程度、给予的具体试剂和给药方式等因素，所需的确切量会在个体之间不同。因此，对于任何给定的情况，本领域技术人员仅使用常规方法可以确定合适的“有效量”。

[0094] 在本说明书的上下文中，术语“包括 (comprising)”表示“主要包括，但未必唯一包括”。此外，单词“包括 (comprising)”的变形，例如“包括 (comprise)”和“包括 (comprises)”具有相应的变型的含义。因此，术语“包括 (comprising)”及其变形以包含的含义而不是排它的含义使用，使得其他的整体或特征可以任选地存在于组合物、方法等中，这被描述为包括整体 A，或包括整体 A 和 B 等。

[0095] 在本说明书的上下文中，术语“约”应被理解为指示本领域技术人员与给定值相联系的通常偏差。

[0096] 在本说明书的上下文中，在给出对于参数的范围的情况下，应当理解为该参数包括给出的范围内的所有值，包括给出的范围的端点。例如，“5 至 10”的范围应当理解为包括 5、6、7、8、9 和 10 的值，以及在给出的范围内的任何子范围，例如包括 6 至 10、7 至 10、6 至 9、7 至 9 等子范围，并且包括在整数之间的、在给出的范围的上下文中合理的任何值和范围，例如 5.5、6.5、7.5、5.5 至 8.5 和 6.5 至 9 等。

[0097] 在本说明书的上下文中，术语“多个”是指大于 1 的任何数量。

[0098] 对于允许的范围，通过引用将本文引用的所有参考文献整体并入本文。

[0099] 优选实施方案及其它实施方案的描述

[0100] 现在，包括仅通过举例说明的方式，参考以下的实例更详细地描述本发明。

[0101] 本发明人已经发现，可以选择合适的 pH 条件和任选的合适的电解质浓度条件来促进碳封装放射性核素的纳米颗粒复合材料和大分子之间的排斥电荷的减少，并因此使短程引力能够压倒远程静电排斥力，使得纳米颗粒复合材料（例如，FibrinLite 纳米颗粒）变为几乎不可逆地与大分子结合或复合。因此，本发明涉及将碳封装的放射性核素的纳米颗粒复合材料（例如，FibrinLite）用于大分子的高比活性放射性标记的方法，所述大分子能够进行吸引疏水、离子关联或与包含纳米颗粒的外部表面的石墨进行分散相互作用。通常所述大分子包括生物大分子，例如多肽、抗体等。

[0102] 在具体的实施方案中，所述方法允许大分子的高亲和力放射性标记，所述大分子例如在诊断或治疗的医学应用中使用那些大分子，和在研究应用中使用的那些大分子，例

如用于体液或组织样品中生物标志物的具体体外分析，诸如肿瘤标志物的疾病标志物的体内生物分布研究，以及由诸如单克隆抗体的特异性大分子靶向载体所鉴定的其他疾病部位的外部成像。所述方法也可以用于离体标记诸如外周血细胞群体的亚类的完整活细胞，用于随后注射入体内并且通过成像技术追踪器官分布，或在疾病部位的积累。因此，应当理解本发明的方法以及本发明的产物在放射性标记的大分子是有用的任何情况下是有用的。

[0103] 在优选的实施方案中，在标记的大分子通常遇到的条件下，大分子的高亲和力放射性标记基本上是不可逆的。通常，所述大分子的高亲和力放射性标记为，在体内的条件下，存在低于约 10％的解离。

[0104] Nair 等的日期为 2005 年 12 月 20 日标题为“Method for detection of fibrin clots（纤维蛋白凝块的检测方法）”的美国专利第 6,977,068 号中描述了在纤维蛋白凝块检测中使用碳封装的放射性核素纳米颗粒的方法。于 2006 年 4 月 28 日提交并以 WO 2006/116798 A1 公开的标题为“A method of forming an injectable radioactive composition of a carbon encapsulated radioactive particulate（形成碳封装的放射性颗粒的可注射放射性组合物的方法）”的国际专利申请第 PCT/AU2006/000554 号描述了生产碳封装的纳米颗粒的可注射制剂的方法。该文描述的方法可以被称为“FibrinLite 法”，并且由此生产的纳米颗粒可以被称为“FibrinLite”。在允许的范围内，通过引用将 US 6,977,068 和 PCT/AU2006/000554(WO 2006/116798) 的全部内容并入本文中。

[0105] 应当理解，本领域技术人员会意识到产生碳封装纳米颗粒复合材料的水性分散的方法可以包括放射性气溶胶的水捕获步骤，并且该步骤可以通过多种方式实现。例如，用于制造碳封装纳米颗粒复合材料的放射性气溶胶的水捕获步骤可以包括但不限于以下：

[0106] 1. 文丘里洗涤器中气溶胶的收集，例如根据公布于 Industrial and Engineering Chemistry(1951)volume 43,part 6,pages 1358 to 1363 的 Ekman 和 Johnstone 的方法。

[0107] 2. 液体电极上气溶胶的浓缩，例如根据公布于 Talanta(1981)volume 28，part 1，pages 43 to 47 的 Michalik 和 Stephens 的方法。

[0108] 3. 旋风装置的使用，例如 P. J. Day 在 US 6,508,864（于 2003 年 1 月 21 日公布）中公开的旋风装置。

[0109] 在一个示例性的实施方案中，可以使用 PCT/AU2006/00054 中所述的方法制备碳封装纳米颗粒复合材料，其中所述方法包括利用美国专利第 5,792,241 号中描述的 Browitt 沉淀器在水中捕获放射性气溶胶，通过引用将美国专利第 5,792,241 号的全部内容并入本文。

[0110] 如本文所述，本发明人已经发现了使用可以提供高比活性放射性和大分子的高亲和力放射性标记的碳封装纳米颗粒（例如，FibrinLite 纳米颗粒）的方法。

[0111] 通过提供使用 FibrinLite 纳米颗粒制备放射性标记的大分子的方法，本发明人利用将金属同位素包裹在碳笼中的碳封装的方法（参见 PCT/AU2006/000554），使其物理上隔离于与其外部环境的接触，这对于颗粒并从而对于大分子是特别有价值的性质，特别是当它们在体内使用时。由于只有纳米颗粒复合材料的碳外部暴露于体内的生物环境，因此放射性标记的大分子的放射性金属离子体内浸出和生物摄取的可能性几乎是不存在的。

[0112] 大分子和医学中用途

[0113] 通过本发明，提供了将碳封装的放射性核素的纳米颗粒复合材料 (FibrinLite)

用于大分子的高比活性放射性标记的方法，所述大分子优选为生物大分子，例如多肽，包括蛋白、肽，抗体和诸如多聚赖氨酸的聚阳离子。本发明涉及可以用诸如多肽、蛋白和抗体的大分子包被纳米颗粒的方法，这样得到的颗粒具有可检测的放射性标记的高比活性的芯以及牢固结合的多肽。所述多肽可以选自与组织或细胞表面标志物、抗原、受体或结合位点具有特异性相互作用的多样性的生物配体。

[0114] 基于大分子与疾病标志物所具有的特异性生物相互作用，放射性标记的大分子可用于在体内预定的疾病部位积累治疗同位素。例如，具有对于肿瘤标志物的特异性的放射性标记的单克隆抗体可用于在肿瘤内积累细胞毒性剂量的治疗同位素。在这类应用中，放射性同位素通常选自具有短程、高能量发射的能够杀死增殖细胞的那些放射性同位素，例如 ^{153}Sm、^{90}Y、^{125}I、^{131}I、^{192}Ir、^{103}Pd、^{111}In、^{166}Ho。这种肿瘤放射治疗的实例提供于 Kaminski，New England Journal of Medicine 352：441-449(2005)。

[0115] 使用放射性标记的大分子的另一方法是在医学成像中，例如用于疾病或疾病状态的诊断。当疾病或疾病状态特异于、局限于或影响特定组织、器官或细胞类型时，可以选择对该组织、器官或细胞类型具有特异性或对所述疾病或疾病状态的特征具有特异性的大分子，所述疾病或疾病状态的特征例如生物分子在受影响的状态中相对于未受影响的状态中的改变的表达。例如，如本文所示，FibrinLite 与多聚赖氨酸复合对肺组织是选择性的并且当给予至个体时优先靶向于肺。以这种方式，多聚赖氨酸包被的 FibrinLite 可被用作诊断影响肺中血液循环的疾病或疾病状态的诊断的显像剂，所述疾病或疾病状态例如肺栓塞、肺气肿、慢性阻塞性肺疾病 (COPD)、原发性和转移性肺肿瘤和感染。所述成像允许医生或技术人员形成肺循环系统的图像，例如用来鉴定疾病状态的不存在或存在，包括例如其严重程度、其进展、其治疗有效性。

[0116] 使用的另一方法为以放射性标记的纳米颗粒的形式用于术中成像，例如用于肿瘤部位引流淋巴结的鉴定和定位，例如乳腺癌患者中前哨淋巴结的成像。在该技术中，将放射性标记的纳米颗粒直接注射入肿瘤部位，从该处所述纳米颗粒在间质液中迁移并进入肿瘤部位引流淋巴，最终在最近的（前哨）淋巴结中积累。在该情况下的同位素选自最适合成像的那些同位素，例如 ^{99}Tc。[Lerman et al，Eur J Nucl Med Mol Imaging 33：329-337(2006)]。在该应用中，颗粒足够小以使它们能在组织中的间质液中分散并被收集在淋巴引流中；因此通常使用纳米颗粒而不是微粒。

[0117] 使用的另一方法是在硼中子俘获疗法 (BNCT) 中。该方法涉及在疾病部位，通常为诸如成胶质细胞瘤的肿瘤部位中积累诸如硼 -10 的稳定同位素前体（或原始粒子），并将低能量中子束应用于积累的同位素。肿瘤细胞中或与肿瘤细胞邻近的硼 -10 在俘获中子后裂变并且产生的高能量重电荷粒子仅破坏与其紧密相邻的细胞，主要破坏癌细胞，邻近的正常细胞大部分不受影响。本发明提供了诸如溶液或分散液的游离形式的大分子，或包含在医疗装置内或包含在医疗装置上的大分子，所述大分子可以与诸如硼的稳定同位素的高亲和力和 / 或高密度放射性前体进行制备，从而允许该同位素在治疗部位的改善的递送和浓度。

[0118] 应当注意，本文中关于医学中的用途应理解为同样适用于人类应用和诸如兽医的非人类应用。因此应当理解，除非另外指明，涉及患者、个体 (subject) 或个体 (individual) 是指人类或非人类，例如具有社会、经济或研究重要性的任何物种的个体，包

括但不限于兔、羊、牛、马、猪、猫、犬、灵长类和啮齿类物种。

[0119] 类似地，应当注意，本文中关于“医疗”装置应理解为同样适用于在人类应用中和在诸如兽医的非人类应用中适用的医疗装置。

[0120] 本文使用的术语“装置”应理解为包括可以用于治疗中的装置和可以用于诊断中的装置，所述治疗包括预防或实际疾病状态或症状的治疗，所述诊断包括在患者身体上或身体内进行的诊断和用获自患者身体的样品进行的诊断或对获自患者身体的样品进行的诊断。因此，本文使用的术语“装置”包括治疗装置和诊断装置。

[0121] 本文使用的“诊断”应当理解为包括在以下情况下进行的检查操作：怀疑具有疾病或疾病状态，例如初步检查、预后、无论是否存在治疗时的疾病或疾病状态的进展，以及不存在这样的怀疑，但期望检查，例如健康检查、群体筛查或研究的目的。

[0122] 放射性同位素和无活性的前体

[0123] 本领域技术人员应当理解，由于本发明的方法允许 FibrinLite 颗粒用于标记大分子，因此，可以被合并入 FibrinLite 纳米颗粒中的任何放射性同位素可以用作放射性标记大分子的放射性同位素。类似地，可以被合并入 FibrinLite 纳米颗粒中并且能够活化而产生放射性同位素的放射性同位素的任何无活性的原始粒子可以用于制备无活性的前体 - 标记的大分子并由此用于制备放射性标记的大分子。

[0124] 如 PCT/AU2006/000554 中所述，多种放射性同位素可以被合并入 FibrinLite 纳米颗粒中，所述放射性同位素包括发射 γ 射线的那些同位素，例如 Tc-99m、Ga-67；发射 β 射线的那些同位素，例如 Y-90；发射 α 射线的那些同位素，例如 Bi-213；和发射正电子射线的那些同位素，例如 Cu-64。可以利用任何合适的金属放射性同位素，包括 ^{198}Au、^{64}Cu、^{213}Bi、^{57}Co、^{51}Cr、^{165}Dy、^{169}Er、^{59}Fe、^{67}Ga、^{68}Ga、^{153}Gd、^{166}Ho、^{111}In、^{113}mIn、^{177}Lu、^{23}Na、^{24}Na、^{103}Pd、^{81}Rb、^{82}Rb、^{186}Re、^{188}Re、^{75}Se、^{153}Sm、^{117m}Sn、^{89}Sr、^{201}Th、^{90}Y、^{169}Yb、^{192}Ir。类似地，可以在相关的实施方案中利用放射性同位素的任何合适的无活性的前体，包括 ^{10}B。

[0125] 可以在 FibrinLite 纳米颗粒中使用并因此在本发明方法中使用的同位素的范围包括理想地适用于诊断成像应用的那些同位素，所述诊断成像应用为例如，使用 Tc-99m 或 Ga-67 的单光子发射计算机断层成像术 (SPECT) 和使用 Cu-64 或 Zr-89 的正电子发射断层成像术 (PET)。此外，还包括适合于如上所述的靶向放射治疗的同位素，例如已经用于某些类型肿瘤的消融那些同位素，例如用于治疗淋巴瘤的 Y-90 标记的单克隆抗体。本发明提供可选择的方法，通过该方法可以制备适合于肿瘤诊断成像或适合于肿瘤治疗的标记的实体和其它实体。

[0126] 通常，最适合成像的放射性同位素可能不是最适合治疗的。本发明还包括大分子的双重标记的可能性，其中选择一种用于最佳成像的同位素，并且选择另一种用于最佳治疗的同位素。该复合材料旨在允许在将微珠 (beads) 用于肿瘤治疗时更可靠的剂量测定，使用成像以促进治疗剂量的局部化并且还旨在能够进行已经递送至给定器官部位的治疗同位素的剂量，和递送至肿瘤的剂量与递送至正常宿主组织的剂量相比的外部评估。可以通过任何合适的方法制备双重标记的装置，例如通过将装置与两种不同标记的大分子接触或者将装置与用两种不同放射性标记进行标记的大分子组合物接触；其中对于后者的情况，双重标记的大分子组合物可以使用两种不同标记的 FibrinLite 组合物（同时地或连续地）进行制备，或通过制备自身为双重标记的单一 FibrinLite 复合材料进行制备。通常，

使用两种不同的同位素制备两种单独的 FibrinLite 制剂，并且将两种制剂的混合物用于放射性标记大分子。通过改变混合物中两种制剂的比例，能够调节治疗活性，同时保持适当水平的成像活性。

[0127] 对于某些应用，通常对于某些治疗应用，产生注射后局部位于靶器官部位的放射性同位素和携带无活性的原始粒子的大分子的局部积累是有利的。然后，将器官部位暴露于窄中子束可以活化原始粒子而形成治疗同位素。在该实施方案中，用于装载大分子的纳米颗粒可以包括封装的稳定金属同位素，例如硼 -10(^{10}B)，所述稳定金属同位素是为放射性同位素的无活性的原始粒子，其可以通过暴露于诸如中子束的合适的活化剂进行活化而在原位形成治疗同位素。通过该方法，可以更安全地并且更有效地局部产生诸如 α 发射体的非常短寿命、高能量同位素以用于肿瘤消融的目的。

[0128] 用于放射性标记大分子的纳米颗粒复合材料的制剂

[0129] 可以根据标题为“A method of forming an injectable radioactive composition of a carbon encapsulated radioactive particulate（制备碳封装的放射性颗粒的可注射放射性组合物的方法）”的 PCT/AU2006/000554（以 WO 2006/116798 公布）制备具有放射性颗粒芯的碳封装纳米颗粒复合材料 (FibrinLite)，通过引用将 PCT/AU2006/000554 的内容并入本文。因此通常可以将复合材料制备成中性或轻微酸性 pH 的、包含碳封装放射性核素的纳米颗粒的稳定水性分散液。

[0130] 纳米颗粒的分散液通常可以包含非常低（例如，约 1 微摩尔至约 20 微摩尔的范围内，通常为约 10 微摩尔）浓度的阴离子表面活性剂，所述阴离子表面活性剂例如脱氧胆酸钠，其与有生命个体的血液循环相容，并且可以注射入有生命个体的血液循环中。通常，在放射性标记的实体的治疗应用或体外诊断应用中，可以使用管理机构认可的用于在人类或视情况动物中静脉内使用（例如，注射）的任何阴离子表面活性剂。

[0131] 如 PCT/AU2006/000554 中所述，示例性的放射性核素为 Tc-99m。每个纳米颗粒在其芯中能够携带数万或更多的同位素原子，从而能够容易获得明显高于用传统标记方法可获得的比活性的非常高水平的比活性。对于 FibrinLite，以及使用 Tc-99m 作为模型封装的放射性同位素，可以制备负载为约 1mCi 至约 100mCi、约 5mCi 至约 100mCi、约 7.5mCi 至约 95mCi、约 10mCi 至约 90mCi、约 15mCi 至约 85mCi、约 20mCi 至约 80mCi、约 25mCi 至约 75mCi、约 30mCi 至约 70mCi、约 35mCi 至约 65mCi、约 40mCi 至约 60mCi、约 45mCi 至约 55mCi 或约 50mCi 至约 55mCi 的范围内的 Tc-99m。根据所需，颗粒的典型制剂可以容易地制备为在 2mL 的水悬浮液中包含约 1mCi 至约 30mCi。从使用扫描式电移动度颗粒分径器 (SMPS) 得到的颗粒的气相表征中，可以证实悬浮液能够包含约 50μg 的纳米颗粒材料，从而使比活性高达 600mCi/mg 或超过 22GBq/mg。可以根据需要，通过改变用于在气溶胶发生器中负载坩埚的同位素的活性来调整制剂的比活性。

[0132] 如 PCT/AU2006/000554 中所述，在 FibrinLite 方法中可以使用宽范围的合适的放射性同位素，因此应当认为在本发明的方法中可以使用宽范围的同位素。同位素具体的实例为锝，更具体为 ^{99m}Tc。锝的固体形式可以为高锝酸钠或 PCT/AU2006/000554 中所述的电解过程期间产生的任何不溶性形式的锝，例如不溶性氧氯化物。锝可以为锝的放射性同位素的形式。

[0133] 可以利用其它金属放射性同位素或放射性核素，例如 ^{198}Au、^{64}Cu、^{213}Bi、^{57}Co、^{51}Cr、

^{165}Dy、^{169}Er、^{59}Fe、^{66}Ga、^{67}Ga、^{68}Ga、^{153}Gd、^{166}Ho、^{111}In、^{113}mIn、^{177}Lu、^{23}Na、^{24}Na、^{103}Pd、^{81}Rb、^{82}Rb、^{186}Re、^{188}Re、^{75}Se、^{153}Sm、^{117m}Sn、^{89}Sr、^{201}Th、^{90}Y、^{169}Yb、^{192}Ir、^{94m}Tc 和 ^{89}Zr。对于涉及颗粒装载并由此用放射性同位素的无活性的原始粒子“标记”大分子或包含大分子的装置的应用，可以使用任何合适的无活性的原始粒子。通常可以使用 ^{10}B。

[0134] 如 PCT/AU2006/000554 中所述，可以将 FibrinLite 纳米颗粒制备为具有非常低电解质浓度的稳定的水性分散液，所述电解质浓度低于 1.0mM NaCl 当量。在制备用于本发明的 FibrinLite 颗粒中，可以利用 PCT/AU2006/000554 中描述的或从中推导出的用于制备 FibrinLite 颗粒的任何方法。在 PCT/AU2006/000554 所述的优选方法中，在放射性同位素在 2700℃以上烧蚀之前，可以通过将负载同位素的石墨坩埚在约 1600℃至 1650℃加热 15 秒以去除载体氯化钠来实现这点。氯化钠的沸点仅为 1413℃，并且 Tc-99m 放射性同位素在该温度下是不挥发的。当在本发明的方法中利用备选的放射性同位素时，本领域技术人员应当能够确定烧蚀的合适温度，例如参考 PCT/AU2006/000554。

[0135] 根据 PCT/AU2006/000554 制造的 FibrinLite 纳米颗粒水性分散液在静置例如 48 小时后不絮凝、沉淀或沉积。纳米颗粒的分散液可以包含非常低（例如，约 1 微摩尔至约 20 微摩尔的范围内，通常为约 10 微摩尔）浓度的阴离子表面活性剂，所述阴离子表面活性剂通常为脱氧胆酸钠，其与有生命个体的血液循环相容，并且可以注射入有生命个体的血液循环中（参见，本文的图 5 和图 6）。可以以任何合适的方式保存 FibrinLite 纳米颗粒，优选地允许分散液的稳定性，例如通过保存在低浓度的弱酸性缓冲液中，例如终浓度为 300 微摩尔的柠檬酸二氢钠、pH 4.1。纳米颗粒的分散液是稳定的，并且可以通过使用容易获得的亲水性膜过滤器进行尺寸分级，所述过滤器例如 Millipore 混合纤维素酯 (MCE) 注射过滤器，可购得 800nm、450nm 和 220nm 的孔隙率。典型的 FibrinLite 纳米颗粒制剂中大于 90％的放射性会通过 800nm 的 MCE 过滤器，并且通过薄层色谱法能够显示相同的制剂通常包含低于 5％的可溶性同位素。

[0136] 使用 FibrinLite 纳米颗粒放射性标记大分子的条件

[0137] 可以在本发明的方法中使用由此制备或获得纳米颗粒用于大分子的放射性标记。

[0138] 疏水性界面，例如空气－水界面，碳氢化合物－水界面以及推断的水性 FibrinLite 悬浮液中的石墨－水界面，通常在纯水中吸引轻微优势的羟基离子。结果为，尽管表面电位通常非常低（几十毫伏），但这些界面表现为轻微的带负电荷。对于 FibrinLite，纳米颗粒由于吸附了在其制剂中使用的阴离子表面活性剂，通常为脱氧胆酸盐，所以纳米颗粒也可以在其表面携带增加的负电荷。如果颗粒和大分子在相同水性介质中为相似的带负电荷的，则当它们的扩散双层电荷重叠时，它们可以以几十纳米的规模互相轻微排斥。然而，选择这样的水性介质的 pH，其中大分子上的净电荷基本为零，所述 pH 例如为大分子的 pI，非常迅速地屏蔽该电位，从而在这些系统中提供了对于颗粒吸附和粘连至大分子的低能屏障。德拜长度＜ 10nm 时的这样的屏蔽将产生这样的情况，其中吸引分散、离子关联或疏水力通常将主导这些表面的总相互作用能量。结果是，一旦颗粒与大分子结合，颗粒将以本质上不可逆的方式牢固地吸附于该大分子。因此，该条件促进大分子和纳米颗粒复合材料的亲和结合 (avid binding)。在优选实施方案中，其中发生接触的介质可以包含 pH 或电解质浓度，所述 pH 或电解质浓度通过在范围和级别上减小长程静电排斥力来提高纳米颗粒和大分子之间短程引力的影响以压倒长程静电排斥力。作为成功接触的结果，大分子可以

被描述为与纳米颗粒复合材料相关联或与纳米颗粒复合材料复合。所得的实体还可以被称为复合物。应当注意，在本文语境中，术语“复合 (complex)”和“与 ... 复合 (complexed with)”在除了作为成功接触的结果而发生的、在接触中大分子和纳米颗粒复合材料紧密结合之外，并非意指大分子和纳米颗粒复合材料的任何特别的结构上的排列。

[0139] 在本发明的方法中，可以通过在合适的 pH 并优选地还有合适的电解质浓度的条件下，使纳米颗粒和大分子接触，从而将 FibrinLite 纳米颗粒用于标记大分子。本发明人已经发现可以选择合适的溶液条件，所述条件促进以上所述的屏蔽过程并且因此能够使短程引力压倒静电排斥力，使得 FibrinLite 纳米颗粒几乎不可逆地与大分子结合。根据本文的公开内容应当理解，能够凭经验确定合适的结合条件以及根据需要的最佳结合条件，例如 pH 和电解质浓度，用于纳米颗粒和大分子之间所需的接触。

[0140] 在任何合适的介质中可以发生接触，尽管通常优选水性介质。在接触之前，可以在合适的保存介质中制备或保存纳米颗粒，所述合适的保存介质通常选择为允许分散液的稳定性。因此纳米颗粒的分散液可以包含非常低（例如，约 10 微摩尔）浓度的阴离子表面活性剂，例如脱氧胆酸钠。在本发明方法的接触步骤之前，可以将纳米颗粒预处理以调整分散液的条件来促进纳米颗粒与大分子的结合。例如，可以调整以下条件 :例如缓冲液类型、pH、电解质浓度和类型、表面活性剂存在或不存在以及任何组分的浓度，包括纳米颗粒。可以在大分子存在或不存在下，进行介质 pH 和离子强度的调整。通常，当纳米颗粒存在时，会在大分子也存在的情况下进行介质 pH 和离子强度的调整，从而促进纳米颗粒和大分子之间的结合，而不是仅纳米颗粒之间的结合，仅纳米颗粒之间的结合会导致聚集和成团。

[0141] 本文的实施例表明，可以通过使用与大分子的 pI 接近的 pH 和合适浓度的简单电解质氯化钠 (NaCl) 实现 FibrinLite 纳米颗粒与大分子的结合，在大于约 1mM NaCl 的浓度时，氯化钠在诱导纳米颗粒与大分子的亲和结合中是有效的。应当理解，根据本文公开的内容，可以使用多种电解质中的任意一种或多种可以达到诱导纳米颗粒与大分子亲和结合的合适条件。本发明人在本文中描述，大于约 1 毫摩尔的简单电解质浓度可以用于诱导纳米颗粒与大分子的亲和结合，并因此当纳米颗粒具有放射性颗粒芯时，可以用于提供放射性标记的大分子的制备。通常，用于接触的溶液或介质的简单电解质浓度预期为约 1 毫摩尔至约 200 毫摩尔的范围内 ;通常为约 10 毫摩尔至约 175 毫摩尔 ;约 20 毫摩尔至约 150 毫摩尔 ;约 50 毫摩尔至约 150 毫摩尔。更通常，溶液的电解质浓度预期为约 1 毫摩尔至约 200 毫摩尔 ;通常为约 10 毫摩尔至约 175 毫摩尔 ;约 20 毫摩尔至约 150 毫摩尔 ;约 40 毫摩尔至约 150 毫摩尔 ;约 50 毫摩尔至约 150 毫摩尔 ;约 75 毫摩尔至约 150 毫摩尔 ;约 90 毫摩尔至约 150 毫摩尔 ;约 100 毫摩尔至约 150 毫摩尔 ;约 150 毫摩尔。本领域技术人员应当理解，通过例如使用 NaCl，其中用约 150mM 浓度的 NaCl 可以达到合适的离子强度，或使用例如低于约 75mM 浓度的 $MgSO_4$，可以达到用于本发明接触步骤的电解质溶液或介质的离子强度。本领域技术人员还应当理解，通过使用诸如 NaCl 和 $MgSO_4$ 混合物的许多不同的离子种类，可以达到电解质溶液的合适离子强度。此外，本领域技术人员应当理解，通过使用至少一种离子种类和至少一种诸如渗透溶质或高分子量聚合物的非离子种类可以达到离子强度，所述高分子量聚合物例如聚乙二醇。例如，当水的有效浓度降低时，可需要增加电解质的浓度，例如以约 250mM。

[0142] 本发明的方法中可以使用任何合适的离子种类。例如，所述离子种类可以选自 Na、

Ni、Al、Ru、Pt、Os、Ir、Fe、Se、Sn、K、Te、Mn、Mo、V、Mg、Zn、Ca、Cu、Co 的盐。对于在有生命个体中的医疗或兽医用途，离子种类通常限于在有效浓度时无毒性的那些离子，例如 Na、K、Ca。本领域技术人员应当理解，当不存在对于给定的反应条件设定（例如在接触步骤中）的任何其它相关改变时，用于代替 Na 的 K 通常与 Na 以相同浓度使用，而用于代替 Na 的 Ca 通常以 Na 的一半浓度使用。

[0143] 接触步骤中使用的缓冲液可以是任何合适的 pH。如本文所述，水性介质的 pH 通常选择为适合于通过抑制静电排斥力促进纳米颗粒和大分子之间的短程引力。通常根据接触中将使用的大分子选择缓冲液的 pH。优选地，缓冲液在约 pH3 至约 pH10 的范围内或更高，约 pH3 至约 pH8、约 pH3.5 至约 pH8.5、约 pH4 至约 pH8、约 pH4.5 至约 pH7.5、约 pH5 至约 pH7。更优选地，接触步骤的 pH，例如水性介质的 pH，接近诸如多肽的在接触中将使用的大分子的 pI。仍然更优选地，接触步骤的 pH 基本上处于在接触中将使用的大分子的 pI。如本文所述，本领域技术人员考虑到诸如电解质类型、浓度和大分子的其他反应条件可以确定所需 pH 和最佳 pH。

[0144] 接触可以包含在接触过程期间的条件的改变，例如接触期间孵育温度的升高或降低，或接触期间介质的搅拌或混合的增加或减少。

[0145] 本发明的方法适合于任何大分子的放射性标记。为说明本文所述的方法的普遍实用性，本文的实施例证实了纳米颗粒与具有低 pI 的蛋白（白蛋白）和具有高 pI 的蛋白（鱼精蛋白）以及多克隆抗体和单克隆抗体的高亲和力结合。基于本文提供的描述，显而易见的是，本发明的方法适于在用于与 FibrinLite 接触的条件下放射性标记任何下述大分子：所述大分子表面的至少一部分存在疏水区域（优选为大部分的表面）。大分子具有这样的 pI 也是可取的，在所述 pI 时大分子保持其生物活性或返回至接近中性 pH 后可以恢复其生物活性。

[0146] 在接触步骤中，大分子可以以任何合适的形式被提供给 FibrinLite 纳米颗粒，所述合适的形式例如，诸如作为溶液的游离形式，作为例如金属、合成聚合物的表面上的包被或配体的附着形式，或者整合形式。为了说明，“附着”形式的大分子还可以包括以下情况，其中大分子与诸如导管或微粒或微球、纳米颗粒、脂质体的载体、装置或植入物结合。附着可以为任何合适的形式，包括大分子与载体、装置或植入物直接结合，或者可以为间接的，例如通过一种或多种中间分子或结合剂，所述中间分子例如在离子交换树脂上或吸附在结合表面上。“整合”形式的大分子包括，例如，大分子形成诸如导管、微粒或微球的载体、装置或植入物的组成部分的情况。包被或封装可以是部分的或者可以是完全的。大分子也可以呈现在活细胞或脂质体的表面上。

[0147] 因此，当在放射性标记的医疗装置的制备中使用本发明时，可以在大分子被合并入医疗装置中或合并在医疗装置上或者以其他方式用于医疗装置的制备之前，将大分子与碳封装的纳米颗粒（包含放射性同位素或其无活性的原始粒子）接触并因此被碳封装的纳米颗粒标记，或者可以在大分子被合并入医疗装置中或合并在医疗装置上或者以其他方式用于医疗装置的制备之后进行接触，从而在接触中使用医疗装置或其前体。

[0148] 在接触步骤中，大分子可以被提供给 FibrinLite 纳米颗粒，所述大分子被包含在导管、纤维、棒杆或细丝、膜、薄片、网状结构或纱网、多孔海绵、管或支架、珠或胶囊或已知尺寸的微珠形式的微粒、纳米颗粒、脂质体之中或之上。

[0149] 可以采用或不采用一个或多个其他过程步骤使用放射性标记的大分子（或用放射性同位素的无活性的原始粒子“标记”的大分子）。当实施一个其他步骤时，其可以是与接触同时进行或者在接触后进行，或者，当实施多个其他步骤时，它们可以是其他步骤的组合，与接触同时进行和在接触后进行。当在接触后实施其他步骤时，所述步骤可以在与实施接触相同或不同的介质的存在下实施。

[0150] 可以在接触后，将放射性标记的大分子（或用放射性同位素的无活性的原始粒子“标记”的大分子）进行一个或多个纯化步骤。这可以包括将放射性标记的大分子与未标记的大分子和/或自由纳米颗粒复合材料分离。在通常的反应中，接触可以导致纳米颗粒与大分子理想的结合以提供放射性标记的大分子，同时未反应的组分保留在接触步骤的水性介质中，通常为未与大分子连接的部分纳米颗粒复合材料。去除未反应组分是可取的，例如在自由纳米颗粒复合材料是有害的的情况下，例如血液运输至非靶器官。在以下情况时去除未反应组分是可取的，如不去除未结合的大分子，其将与标记的大分子竞争诸如细胞受体或抗原位点的特异性结合位点，并从而削弱标记的大分子的成像能力或治疗能力。未反应组分的去除可以是部分的，基本上完全的或者完全的。在该背景下，“部分”去除应理解为包括去除任何量的一种或多种未反应的或不期望的组分，更通常地，去除高达约 80％、90％或 95％的一种或多种未反应的或不期望的组分，并且“完全”去除应理解为去除大于约 95％的一种或多种未反应的或不期望的组分。通常优选去除至少 95％的未反应的或不期望的组分，更优选去除大于约 96％、97％、98％或 99％的未反应的或不期望的组分。

[0151] 因此，应当理解，在该背景下，关于“纯化”意图表示任何程度的纯化，由此，与纯化步骤前相比，“纯化”步骤后的放射性标记的大分子（或用放射性同位素的无活性的原始粒子“标记的”大分子）包含较少杂质，例如接触中的未反应的或不期望的组分。

[0152] 在纯化步骤中可以使用能够将放射性标记的大分子（或用放射性同位素的无活性的原始粒子“标记的”大分子）与诸如未结合的放射性纳米颗粒的未反应的或不期望的组分分离的任何方法。例如，所述方法可以包括从放射性标记的大分子洗去一种或多种不期望的组分，或者可以包括从一种或多种不期望的组分中提取出放射性标记的大分子，或者可以包括这些步骤的组合。

[0153] 放射性标记的大分子可以被合并或整合入实体中或合并或整合在实体上，所述实体例如生物或非生物实体，例如载体、装置或植入物，例如导管或微粒。通常，将被合并或整合入实体中或合并或整合在实体上的放射性标记的大分子是在溶液、悬浮液或分散液中自由的。可以使放射性标记的大分子附着于实体，所述实体例如生物或非生物实体，例如载体、装置或植入物，例如导管或微粒。可以通过允许放射性标记部分或完全保留的任何合适的方法进行附着，包括直接和间接结合或附着。当期望保留放射性标记的大分子的生物活性时，可以通过允许大分子生物活性部分或完全保留的任何合适方法进行附着。可以将放射性标记的大分子用于诸如载体、装置或植入物的实体的包被或封装。所述包被或封装可以是部分的或者可以是完全的。

[0154] 医疗装置，例如，诸如血管移植物和支架的可植入装置，可以包括本领域已知的另外的改进。例如，所述装置可以包含生物活性，例如生物活性包被，所述包被具有例如通过包含抗血栓形成剂、抗生素、抗细菌剂或抗病毒剂而得到的抗血栓形成和/或抗感染性质。具有生物活性包被的可植入装置的制备在本领域是已知的并且例如在 Patnaik 等的标题

为“Method for imparting a bio-active coating modified(给予改良的生物活性包被的方法)”的美国专利第6,803,069号中描述,通过引用将其全部内容并入本文。

[0155] 放射性标记多肽

[0156] 本发明提供放射性标记大分子,特别是放射性标记生物大分子的方法。所述大分子包括多肽。应当理解,本文使用的术语“多肽”意指通过肽键连接的任何氨基酸聚合物。“多肽”可以是任何长度的,包括但不限于,小于约50个氨基酸的分子和多于约50个氨基酸的分子。因此,本文使用的术语“多肽”包括也可以被可选择地称为“肽”的氨基酸聚合物,例如由约10-50个氨基酸组成的分子。氨基酸可以包括天然存在的那些氨基酸以及在实验室中合成而不是天然存在的那些氨基酸,例如天然存在的天然L构型的D立体异构体。多肽可以是线性形式、分支形式或环化形式的天然存在的肽。为清晰起见,即,应当注意术语“多肽”也包括蛋白,所述蛋白包括全长蛋白以及蛋白的免疫原片段、截短的或部分的序列,蛋白的生物学活性和无活性类似物和变体以及蛋白的前体形式。大分子可以是聚阳离子,例如多聚赖氨酸和鱼精蛋白,所述多聚赖氨酸包括多聚D赖氨酸。

[0157] 在一个实施方案中,多聚赖氨酸分子量为约1kd-约5kD或约5kd-约15kd,或约15kd-约30kd,或约30kd-约40kd,或约40kd-约50kd,或约50kd-约60kd,或约60kd-约70kd,或约70kd-约80kd,或约80kd-约90kd,或约90kd-约100kd。本发明的多肽包括天然存在的多肽,无论其是分离自或来源于天然存在来源,例如从生物物理上进行提取、纯化或分离,还是以诸如化学合成或重组产生或体外无细胞合成的任何方法产生。

[0158] 纳米颗粒与本发明的表面结合多肽的复合物可被用为探针或检测器类,所述探针或检测器类对于检测或测定具有与所述表面结合多肽的特异性相互作用的任何配体是有用的。多肽可以选自不同种类的分子,例如以下非限制性实例。

[0159] 大分子包括多肽,所述多肽包含对于以下的特异性结合位点:细胞外或细胞内蛋白、多聚体蛋白的亚基或单体链、细胞表面受体、或诸如免疫学标志物或肿瘤诊断或预后标志物的细胞表面标志物抗原。多肽与细胞表面受体的结合也会具有生物学功能,例如诱导对于受影响的细胞的抗增殖效应或诱导凋亡。在体外活细胞将标记的探针内化,在它们被引入有生命个体中后,可以实现随后体内细胞的生物分布或组织或器官局部化成像。

[0160] 大分子包括抗体或免疫球蛋白片段,所述抗体或免疫球蛋白片段与细胞外或细胞内蛋白、多聚体蛋白的亚基或单体链、细胞表面受体、或诸如免疫学标志物或肿瘤诊断或预后标志物的细胞表面标志物抗原反应。在体外活细胞将标记的探针内化,在它们被引入有生命个体中后,可以实现随后体内细胞的生物分布成像。

[0161] 根据本发明,动物或人抗血清的IgG组分可以使用本文所述的方法与诸如FibrinLite纳米颗粒的纳米颗粒的表面结合,并且使用任何已知的免疫测定的放射性测量方法,可以将所得的标记的探针用于例如检测或测定组织样品提取物或体液样品中与所述免疫IgG特异性地反应的相应抗原。反应性抗原可以具有医学重要性,例如作为癌症患者中的肿瘤标志物,在该情况下样品的免疫测定会得到对诊断、预后或治疗控制有价值的信息。

[0162] 在将标记的探针注射或局部递送(例如,通过动脉导管)至有生命个体中后,目的配体可以接近标记的探针。然后,通过诸如单光子发射计算机断层成像术(SPECT)或正电子发射断层成像术(PET)的领域内已知的方法,可以将来自标记的探针的信号用于外部成

像。因此，可以体内测定目的配体的定位和局部浓度。然后，通过领域内已知的任何手段的成像可以显示可能由于诸如肿瘤的病理损伤的配体在组织或器官部位的存在或过多。

[0163] 然后，人和动物的活体中探针定位的外部成像可以具有诊断、预后或治疗价值，例如在癌症患者的评估和治疗安排中。

[0164] 在一个实施方案中，目的配体可以作为药物、诊断或治疗物质、感染剂或外来物质存在于生物样品或有生命个体中，并且通过使用标记的探针以及本文的任何方法对其进行的检测和测定可以给出关于患者的疾病状态或对特定治疗的反应的临床重要数据。

[0165] 在另一实施方案中，体内目的配体的局部丰度可以是患者对药物的反应的标准，所述药物以诸如细胞毒性药的治疗剂或诸如射线治疗的预定剂量的放射治疗给予，在该情况下使用放射性标记的探针的目的配体的定位和丰度的成像可以提供诸如肿瘤对化学治疗或放射治疗的反应或缺乏反应的早期指征。这对于治疗医师能够在需要的情况下对癌症患者的化学治疗或放射治疗安排做出早期改变是有价值的。

[0166] 本文所述的 FibrinLite 纳米颗粒可以携带放射性同位素作为可用于离体放射性检测或体内成像的可检测的标记。在另一实施方案中，同位素可以选自适合于局部放射治疗的那些治疗放射性核素，例如 ^{153}Sm、^{90}Y、^{192}Ir、^{103}Pd、^{111}In 和 ^{166}Ho。在该情况下，可以选择用于包被 FibrinLite 的抗体（例如，单克隆抗体），从而通过抗体对已知配体的特异性的手段，能够将治疗剂量的同位素定位在预定的组织或器官部位，所述已知配体作为疾病状态结果在所述部位过多存在，例如癌症患者中肿瘤标志物。本发明人之前描述了使用可以合并入纳米颗粒中的不同种类的放射性同位素，包括 γ（例如，Tc-99m）、β（例如，Y-90）、α（例如，Bi-213）或正电子（例如，Cu-64）发射体。部分的这些同位素理想地适合于成像应用（例如，SPECT 使用 Tc-99m 或 Ga-67，PET 使用 Cu-64、Ga-68 或 Zr-89）。部分的这些同位素适合于上文所述的靶向放射治疗，并且事实上在本领域内已知用于某些类型的肿瘤的消融，例如，Y-90 用于结肠直肠癌肝转移的局部消融。在一个实施方案中，通过诸如尺寸排阻色谱（分子筛）或离心的本领域内已知的数种方法中的任意方法，可以将具有结合的蛋白的纳米颗粒复合材料与任何过量的未结合的蛋白分离。然而，应该注意到，多肽、蛋白或抗体的溶液不需要具有能饱和纳米颗粒表面的高浓度。相反，可以使用亚饱和浓度，并且可以使用非活性蛋白 (passive protein) 完成表面饱和，并从而保持标记的探针的特异性。例如，如果纳米颗粒用于标记对肿瘤标志物有特异性的单克隆抗体，并且抗体的可获得量是受限的，则可以用非免疫 γ 球蛋白或免疫测定技术领域人员已知的其他商业封闭剂来完成纳米颗粒的表面饱和。这会在免疫测定中防止 FibrinLite 颗粒与不相关的蛋白或塑料表面的结合。

[0167] 在一个实施方案中，当纳米颗粒复合材料可被用于标记将在体内成像用途中使用的探针时，应当注意，静脉注射的未包被的纳米颗粒复合材料在 20 分钟内被网状内皮系统几乎完全从循环中清除，所述网状内皮系统即诸如肝的 Kupffer 细胞的吞噬细胞。因此，对于体内成像，有时需要使用具有特定包被的纳米颗粒复合材料制剂，所述包被被设计为延长纳米颗粒复合材料标记的探针在循环中的存在，并因此允许探针与特定靶标结合更长时间。在这类情况下，可以选择这样的的包被：其适合于从循环系统中所需的清除速率，并且补充纳米颗粒表面上的探针蛋白。为此目的，包被可以选自诸如聚乙二醇 (PEG) 的已知能延长循环持久性的那些分子或被肝的网状内皮系统用作清除剂的受体拮抗剂。

[0168] 在体内使用之前，也可以用纯化的血浆蛋白包被纳米颗粒复合材料的表面，从而减少诸如补体系统的体内反应性血液组分的结合。可以使用的血浆蛋白的实例包括经典粘附蛋白，例如玻连蛋白和纤连蛋白。用这些蛋白直接包被颗粒也可以用于实现颗粒与其他特异探针蛋白通过蛋白化学领域技术人员已知的交联剂进行结合。当发现探针蛋白与 FibrinLite 颗粒直接结合可降低对于探针的特异性配体的亲和力时，这样做是可取的。该概念可以扩展到在颗粒表面上的多层复合材料，其也用于增加呈现的相互作用位点的表面密度，或增加物理颗粒大小，或促进与甚至具有不同的受体种类或特异性的细胞表面受体的多位点相互作用。

[0169] 用蛋白和抗体包被 FibrinLite 纳米颗粒复合材料的方法

[0170] 可以根据 PCT/AU2006/000554 制备碳封装的放射性核素的纳米颗粒复合材料。可以制备包含碳封装的放射性核素（例如，Tc-99m）的纳米颗粒的中性或微酸性 pH 的稳定水性分散液。纳米颗粒的分散液也可以包含非常低（例如，10 微摩尔）浓度的阴离子表面活性剂脱氧胆酸钠，其与有生命个体的血液循环相容，并且可以注射入有生命个体的血液循环中（参见，本文的图 5 和图 6）。这些颗粒中的每一个能够携带数万或更多的同位素原子作为标记源，从而能够容易地获得非常高水平的比活性，该比活性明显高于用传统标记方法可获得的那些比活性。对于具有作为模型封装的放射性同位素的 Tc-99m 的纳米颗粒复合材料，能够将纳米颗粒的典型制剂容易地制备为，按照需要在 2mL 的水性悬浮液中包含约 1mCi- 约 30mCi。从使用扫描式电移动度颗粒分径器 (SMPS) 技术得到的颗粒的气相表征中，能够证实该悬浮液包含约 50μg 的纳米颗粒材料，从而使产生的比活性高达 600mCi/mg 或超过 22GBq/mg。

[0171] 碳封装过程将金属同位素包裹在碳笼中，使其物理上隔离于与其外部环境的接触，这是对于颗粒在体内使用时的特别有价值的性质。放射性金属离子的浸出和生物摄藻的可能性几乎是不存在的。只有纳米颗粒复合材料的碳外部暴露于体内的生物环境。由于所述碳是石墨形式，所以其具有天然吸附性质，并且这可以用作对于所选择的多肽的物理吸附的基础。无论如何，需要首先确定有利于多肽附着的合适的条件，并且以下研究和实例说明如何确定这些条件。

[0172] FibrinLite 纳米颗粒复合材料能够通过涉及其石墨表面的疏水或分散相互作用而高亲和力结合。为了使石墨表面与诸如多肽的大分子形成疏水相互作用，该多肽必需能够以非常近的距离接近石墨表面，因此需要静电排斥力被抑制。本发明人证实当多肽被提供给具有最小净表面电荷的纳米颗粒制剂，或通过将 pH 调整至接近多肽的等电点，或通过用合适浓度的电解质抗衡离子屏蔽多肽的电荷时，可以满足该条件。结合经验的实验可被用于确定合适的结合条件。尽管下文研究和实例集中于 FibrinLite 纳米颗粒复合材料与免疫球蛋白相互作用，应当理解同样的方法可被用于确定 FibrinLite 纳米颗粒复合材料与几乎任何多肽的相互作用的合适条件。

[0173] 生物医学研究、医学诊断和治疗用途中大部分抗体由属于 IgG 类免疫球蛋白的血浆 γ 球蛋白组成。尽管血浆中大部分球蛋白具有 pH4.5-pH6.5 的等电点，但 IgG 包含等电点主要为 5.5-8.0 的多种不同个体蛋白。然而，可以假定，例如，在 pH3.5 下，白蛋白比大部分血浆 IgG 离它的等电点更近，而在 pH6.0 下，大部分 IgG 比白蛋白离它们的等电点更近。从而 IgG 并且因此大部分抗体在中性 pH 或接近中性 pH 下会具有最少的电荷并且应该完全

能与 FibrinLite 相互作用。

[0174] 本文中发明人描述了方法，通过该方法可以诱导大分子与碳封装的纳米颗粒复合材料的亲和结合。通过结合优选的实施方案和实例说明本文的描述。基于本文的描述，本领域技术人员应当意识到，当使用备选方案时，可以凭经验确定合适的条件，这些备选方案包括放射性同位素或其无活性的原始粒子、大分子、电解质和 pH。

[0175] 药物制剂和 / 或治疗制剂

[0176] 本发明还提供放射性标记的大分子的药物组合物和治疗组合物，所述放射性标记的大分子例如放射性标记的生物大分子，其中所述大分子与具有放射性颗粒芯的碳封装纳米颗粒复合材料 (FibrinLite) 相关联。通常地，对于医疗用途，本发明化合物的盐为药学可接受的盐，尽管其它盐用于发明的化合物或其药学可接受盐的制备。药学可接受的盐是指在正确的医学判断范围内，适于用于与人或低等动物的组织接触而没有过度的毒性、刺激、过敏反应等，并且是与合理的收益 / 风险比相匹配的那些盐。药学可接受的盐在本领域是公知的。

[0177] S.M.Berge 等在 J.Pharmaceutical Sciences，1977，66 :1-19 中详细描述了药学可接受的盐。所述盐可以在本发明化合物最终分离和纯化期间原位制备，或通过将游离碱性功能团与合适的有机酸反应来单独制备。代表性的酸加成盐包括，乙酸盐、己二酸盐、藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、二葡糖酸盐、环戊烷丙酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、氢溴酸盐、盐酸盐、氢碘酸盐、2- 羟基 - 乙磺酸盐、乳糖酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、月桂基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲基磺酸盐、2- 萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3- 苯丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、三甲基乙酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、甲苯磺酸盐、十一酸盐、戊酸盐等。代表性的碱或碱土金属盐包括钠、锂、钾、钙、镁等，以及无毒铵、季铵和胺阳离子，其包括但不限于铵、四甲基铵、四乙基铵、甲胺、二甲胺、三甲胺、三乙胺、乙胺、三乙醇胺等。

[0178] 常规给药方式包括注射（皮下、静脉内等）、口服给药、吸入、经皮施用、局部乳膏或凝胶或粉剂、或者直肠给药。在一个实施方案中，给药方式为肠胃外给药。在另一实施方案中，给药方式为口服给药。根据给药途径，可以用材料包被制剂和 / 或化合物以保护化合物免受可以使化合物治疗活性失活的酶、酸和其它自然条件的作用。化合物还可以肠胃外或腹膜内给药。

[0179] 本发明化合物的分散液还可以在甘油、液态聚乙二醇及其混合物和油中制备。在通常的保存和使用条件下，药物制剂可以包含防腐剂以防止微生物生长。

[0180] 适合于注射的药物组合物包括无菌水性溶液（可溶于水的情况下）或分散液和用于无菌注射溶液或分散液的即用型制剂的无菌粉剂。理想地，组合物在制备和保存条件下是稳定的，并且可以包含防腐剂以稳定组合物来对抗诸如细菌和真菌的微生物的污染作用。

[0181] 本发明的化合物可以口服给药，例如用惰性稀释剂或可吸收可食用的载体口服给药。化合物和其它成分还可以装入硬壳或软壳明胶胶囊中，被压缩为片剂或直接合并入个体的饮食中。对于口服治疗给药，化合物可以与赋形剂合并并且以可摄取片剂、含服片剂、

锭剂、胶囊剂、酏剂、悬浮液、糖浆剂、薄片等形式使用。适宜地，这样的组合物和制剂可以包含以重量计至少 1％的活性化合物。当然，本发明化合物，通常为药物组合物和制剂中的放射性标记的多肽的百分比可以变化，例如可以方便地为剂量单位重量的约 2％至约 90％、约 5％至约 80％、约 10％至约 75％、约 15％至约 65％、、约 20％至约 60％、约 25％至约 50％、约 30％至约 45％或约 35％至约 45％。治疗上有用的组合物中的化合物的量为可获得合适的剂量。

[0182] 术语“药学可接受的载体”旨在包括溶剂、分散介质、包被、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂及吸收延迟剂等。这些介质和试剂用于药物活性物质的用途在本领域是公知的。除非任何常规介质或试剂与化合物是不相容的，否则考虑其在治疗组合物和治疗及预防方法中的用途。补充的活性化合物也可以被合并入本发明的组合物中。以剂量单位形式配制的肠胃外组合物以用便于给药和剂量的均匀性是特别有利的。本文使用的“剂量单位形式”是指适合作为用于待治疗个体的单元式剂量的物理分离单位 (physically discrete units) ；包含预定量化合物的每一单位经过计算可与需要的药物载体联合产生所需的治疗效果。为了方便并有效的给药，化合物可以以有效量与适当的药学可接受的载体配制在可接受的剂量单位中。在组合物包含补充的活性成分的情况下，参考所述成分的通常剂量和给药方式来确定剂量。

[0183] 在一个实施方案中，载体为可口服给药的载体。

[0184] 药物组合物的另一形式是配制为适合于口服给药的肠衣颗粒、片剂或胶囊剂的剂型。

[0185] 本发明的范围内还包括延迟释放制剂。

[0186] 本发明的化合物还可以以“前药”的形式进行给药。前药是化合物的无活性的形式，其在体内转化为活性形式。合适的前药包括化合物活性形式的酯、磷酸酯等。

[0187] 在一个实施方案中，本发明的化合物可通过注射进行给药。对于可注射溶液，载体可以为包含诸如水、乙醇、多元醇（例如，丙三醇、丙二醇和液态聚乙二醇等）、其合适的混合物和植物油的溶剂或分散介质。例如，通过使用诸如卵磷脂的包被，在分散液的情况下通过保持需要的粒度以及通过使用表面活性剂，可以保持合适的流动性。通过包括各种抗细菌剂和 / 或抗真菌剂能够实现微生物作用的预防。合适的试剂为本领域技术人员所熟知的并且包括例如对羟苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、苄醇、抗坏血酸、硫汞撒 (thimerosal) 等。在许多情况下，可以优选在组合物中包括等渗剂，例如糖、诸如甘露醇、山梨糖醇的多元醇、氯化钠。通过在组合物中包含诸如单硬脂酸铝和明胶的延迟吸收的试剂可以实现可注射组合物的延长吸收。

[0188] 可以通过以下制备无菌可注射溶液 ：将适当溶剂中所需量的类似物与一种上文列举的成分或其组合合并，视需要，随后过滤灭菌。通常地，通过将类似物并入无菌媒介中来制备分散液，所述媒介包含基础分散介质和来自上文列举的所需的其它成分。

[0189] 片剂、锭剂、丸剂、胶囊剂等还能够包含以下 ：结合剂，例如黄蓍胶、阿拉伯胶、玉米淀粉或明胶 ；赋形剂，例如磷酸氢钙 ；崩解剂，例如玉米淀粉、马铃薯淀粉、藻酸等 ；润滑剂，例如硬脂酸镁 ；和甜味剂，例如蔗糖、乳糖或糖精或调味剂，例如薄荷、冬青油或樱桃调味剂。当剂量单位形式为胶囊时，除了以上类型的材料外，其能够包含液体载体。各种其它材料可以作为包被存在或者以其他方式修饰剂量单位的外形。例如，能够用虫胶、糖或两者包

被片剂、丸剂或胶囊剂。糖浆剂或酏剂能够包含类似物、作为甜味剂的蔗糖、作为防腐剂的尼泊金甲酯或尼泊金丙酯、染料和诸如樱桃或桔子调味剂的调味剂。当然，在制备任何剂量单位形式中使用的任何材料应当是药学纯的并且在使用的剂量下是基本上无毒的。此外，类似物能够被合并入缓释制剂和药剂中。

[0190] 优选地，药物组合物还可以包括合适的缓冲液以最小化酸水解。合适的缓冲剂为本领域技术人员所熟知的并且包括但不限于磷酸盐、柠檬酸盐、碳酸盐及其混合物。

[0191] 本发明的化合物和 / 或药物组合物可以进行单次或多次给药。本领域技术人员通过常规实验能够确定本发明化合物和 / 或组合物的有效、无毒剂量水平，以及确定适合于治疗所述化合物和组合物适用的疾病和 / 或感染的给药方式。

[0192] 此外，能够使用常规治疗过程测定试验确定最佳治疗过程对于本领域技术人员是显而易见的，所述最佳治疗过程例如每日给予的本发明化合物或组合物的剂量数，持续限定的天数。

[0193] 通常，每 24 小时的有效剂量可以为约 0.0001mg 每 kg 体重至约 1000mg 每 kg 体重；例如，约 0.001mg 每 kg 体重至约 750mg 每 kg 体重；约 0.01mg 每 kg 体重至约 500mg 每 kg 体重；约 0.1mg 每 kg 体重至约 500mg 每 kg 体重；约 0.1mg 每 kg 体重至约 250mg 每 kg 体重；或约 1.0mg 每 kg 体重至约 250mg 每 kg 体重。更适合地，每 24 小时的有效剂量可以为约 1.0mg 每 kg 体重至约 200mg 每 kg 体重；约 1.0mg 每 kg 体重至约 100mg 每 kg 体重；约 1.0mg 每 kg 体重至约 50mg 每 kg 体重；约 1.0mg 每 kg 体重至约 25mg 每 kg 体重；约 5.0mg 每 kg 体重至约 50mg 每 kg 体重；约 5.0mg 每 kg 体重至约 20mg 每 kg 体重；或约 5.0mg 每 kg 体重至约 15mg 每 kg 体重。

[0194] 可选地，有效剂量可以高达约 500mg/m^2。例如，通常，有效剂量预期为约 25mg/m^2 至约 500mg/m^2、约 25mg/m^2 至约 350mg/m^2、约 25mg/m^2 至约 300mg/m^2、约 25mg/m^2 至约 250mg/m^2、约 50mg/m^2 至约 250mg/m^2 和约 75mg/m^2 至约 150mg/m^2。

[0195] 在另一实施方案中，本发明的化合物的给药量可以为约 100mg 每天至约 1000mg 每天，例如，约 200mg 每天至约 750mg 每天、约 250mg 每天至约 500mg 每天、约 250mg 每天至约 300mg 每天或约 270mg 每天至约 280mg 每天。

[0196] 本发明的化合物可以作为治疗方案的一部分与其它药物一起给药。给予活性化合物的组合是可取的，例如用于治疗特殊疾病或疾病状态的目的。因此，可以将两种或更多种药物组合物组合为适于组合物共同给药的试剂盒的形式，其中至少一种包含本发明的化合物，这在本发明的范围内。

[0197] 现在，将参考以下实施例，仅通过举例说明的方式，更详细地描述本发明。该实施例旨在用作说明本发明并且不应当解释为限制贯穿本说明书的描述的公开内容的通用性。

实施例

[0198] 实施例 1.

[0199] 在该系列实验中，按照以下研究了 FibrinLite 与 γ 球蛋白在不同的 pH 条件下的结合。将 96 孔微板中的微孔用兔免疫球蛋白饱和包被之后进行结合测试，这使得在结合和多步洗涤步骤之后能够对单独的孔的放射性进行个别测定。在 pH3.5 和 pH6.0 下都使用柠檬酸盐缓冲液 (500 μ M)，以能够在非常低的电解质浓度和生理电解质浓度下直接比较 pH

对结合的影响，随后详述。

[0200] pH 对于 FibrinLite 与兔免疫球蛋白包被的微孔结合的影响

[0201] 首先用兔免疫球蛋白 (IgG，Sigma I5006) 饱和包被聚苯乙烯微孔 (Nunc-Immuno LockWell™ 模块)。用 500μg/mL(100μL/ 孔) 的 IgG 溶液在搅拌下 37℃包被孔 3 小时。在不同缓冲液条件下，将稀释的 (1 ： 10)Tc-99m FibrinLite 与包被的聚苯乙烯微孔接触，所述条件以条件 (i) 至 (viii) 列出，即 ：

[0202] (i)500μM 柠檬酸钠 pH 3.5(低电解质条件) ；

[0203] (ii)500μM 柠檬酸钠 pH 3.5 加 10μM 脱氧胆酸钠 (DOC) ；

[0204] (iii)500μM 柠檬酸钠 pH 3.5 加 150mM NaCl ；

[0205] (iv)500μM 柠檬酸钠 pH 3.5 加 10μM 脱氧胆酸钠加 150mM NaCl ；

[0206] (v)500μM 柠檬酸钠 pH 6.0(低电解质条件) ；

[0207] (vi)500μM 柠檬酸钠 pH 6.0 加 10μM 脱氧胆酸钠 (DOC) ；

[0208] (vii)500μM 柠檬酸钠 pH 3.5 加 150mM NaCl ；以及

[0209] (viii)500μM 柠檬酸钠 pH 6.0 加 10μM 脱氧胆酸钠加 150mMNaCl。

[0210] 在 37℃下搅拌孵育 20 分钟以允许结合，然后，在单独分别的孔中的放射性计数之前，用水冲洗孔五次。

[0211] 如图 1a 中所示，与 FibrinLite 与未包被的聚苯乙烯微孔的结合 (数据未显示) 相反，与 IgG 包被的孔的结合在 pH6.0 时比在 pH3.5 时更强，并且不需要添加电解质就可以获得可观的放射性标记密度。事实上，不同于 FibrinLite 与未包被的聚苯乙烯孔的结合，添加 150mM 氯化钠并未增强与 IgG 包被的结合。一旦结合，在不存在电解质情况下附着的 FibrinLite 颗粒也保持高亲和力，正如结合测定中多次冲洗后放射性标记的保留所证实的。另外，在 10μM 离子表面活性剂脱氧胆酸钠存在的存在情况下，颗粒与 IgG 包被之间的结合在 pH6.0 仍然发生，这指示不需要电解质的强的、稳定的相互作用。相比之下，在 pH3.5 时获得的较低结合显著地被脱氧胆酸降低 (图 1a)。

[0212] 在另一实验中，研究了 Tc-99m FibrinLite 稀释液 (1 ： 10 ；100μL) 与预先用白蛋白或免疫球蛋白包被的聚苯乙烯微孔 (Nunc Lockwells™) 的结合。通过与等分部分 (100μL/ 孔) 的兔血清白蛋白 (Sigma A0764 ；250μg/mL) 或兔免疫球蛋白 (IgG，Sigma I5006，250μg/mL) 在 37℃下搅拌孵育 3 小时来包被微孔。将 FibrinLite 1 ： 10 稀释到 0.5mM pH6.3 的柠檬酸钠缓冲液中，并且将等分部分 (100μL) 的稀释液分配至包被的并冲洗的微孔上，并允许在 37℃下搅拌结合 20 分钟。在用水或生理盐水 (150mM NaCl) 冲洗 5 次之后，将个体孔取下并进行计数 (图 1b)。条形图表示双平行孔的平均值。

[0213] 如图 1b 中所示，在非常低的电解质浓度 (在这种情况下为 pH6.3 的 0.5mM 柠檬酸钠缓冲液) 和接近中性 pH(6.3) 下，免疫球蛋白可以与结合 FibrinLite，而白蛋白不能。因为白蛋白由于其低等电点而在中性 pH 时具有负电荷，同时免疫球蛋白具有与中性更接近的等电点，所以这些结果符合 FibrinLite 结合取决于由可能配体上接近零电荷所促进的吸引相互作用。这种类型的相互作用也被以下观察支持 ：与用水冲洗相比，大部分结合的 FibrinLite 不会通过盐水冲洗而被释放。

[0214] 实施例 2 ：FibrinLite 与免疫球蛋白结合 ：多克隆和单克隆

[0215] 在以上实施例 6 中描述的实验中使用的兔免疫球蛋白是从正常非免疫的兔制

备。也测试了免疫作用可能显著地改变免疫球蛋白群体的平均等电点并从而改变与FibrinLite结合的可能性。因此按照以下测试了来自免疫的兔的纯化IgG。

[0216] 首先通过与等分部分(100μL/孔)的兔免疫球蛋白的免疫制剂(R389,American Diagnostica)或两种不同的IgG的鼠单克隆抗体(Mab3689和Mab 3471,American Diagnostica)中的一种在37℃搅拌孵育3小时来饱和包被聚苯乙烯微孔(Nunc-Immuno LockWell™模块)。然后,在低电解质条件下(pH 6或pH 6.5的500μM柠檬酸钠)将Tc-99mFibrinLite稀释液(1∶10)添加到未包被的和包被的微孔。在37℃下搅拌孵育30分钟以允许结合。然后,在单独分别的孔中的放射性计数之前,用水冲洗孔五次。

[0217] 如图2所示,在pH 6.0并且不添加电解质的情况下,用兔免疫球蛋白的免疫制剂仍然获得FibrinLite的强的并且可观的结合。

[0218] 上文使用的兔免疫球蛋白制剂(例如,R389)代表免疫细胞的许多不同克隆的产物,即,它们是天然多克隆的,并且因此是由许多不相关的IgG分子的群体组成,每种分子可能具有不同等电点。相比之下,单克隆抗体代表细胞的单一克隆的产物,并且仅由一种具有其自身特征的等电点的免疫球蛋白分子组成。因此,尽管不太可能一种结合条件用于获得用FibrinLite可观地或最优地标记所有单克隆抗体,但显示类型的结合实验可以确定对于指定情况的合适的条件。

[0219] 图2中使用两种不同的鼠单克隆抗体例证这点。在pH 6.0时,显而易见的是,一种单克隆(Mab 3689,American Diagnostica)以相对高水平结合FibrinLite,而FibrinLite与另一种单克隆(Mab 3471,American Diagnostica)仅相对低水平地结合。将pH增加到6.5足以使两种情况(Mab 3689和Mab 3471)中都发生相对高水平的结合。因此,对于单克隆抗体,每种情况应该单独地处理,并且通过使用例如本文描述的微孔结合测试,结合pH(并且如果需要,结合电解质浓度)优化条件。最重要原则是通过减少抗体上的净电荷来促进FibrinLite纳米颗粒和抗体之间的短程吸引相互作用。可以通过将pH调整到尽可能接近抗体的等电点来实现这点。

[0220] 实施例3

[0221] 为更好地证实通用原则,用两种具有很大不同等电点的蛋白进行结合实验,即血清白蛋白(低pI)和鱼精蛋白(pI)。用兔血清白蛋白或鱼精蛋白饱和包被聚苯乙烯微孔。用pH 7.2的磷酸盐缓冲盐溶液中500μg/mL的每种蛋白(100μL/孔)在37℃下搅拌包被孔3小时。在用水冲洗5次之后,在pH3.5和pH6.5下,将低电解质条件(500μM柠檬酸钠)中的Tc-99m FibrinLite稀释液(1∶10)添加到孔(100μL/孔)。在37℃下搅拌孵育30分钟以允许结合,并且在单独孔中的放射性计数之前,用水冲洗孔五次。

[0222] 显示对于等电点为pH4.4-5.1的血清白蛋白和等电点为pH＞10的鱼精蛋白的结合结果(图3)。在接近白蛋白的等电点的pH3.5,获得FibrinLite与白蛋白非常高的结合,而在该pH,仅获得FibrinLite与鱼精蛋白的低结合。相比之下,在更接近鱼精蛋白的等电点的pH6.5下,获得FibrinLite与鱼精蛋白可观的结合,并且在该pH下,获得与白蛋白的不显著的结合。因此,对于任何指定的蛋白,使用接近该蛋白的等电点的pH条件可以获得较强的FibrinLite结合。

[0223] 实施例4:FibrinLite与白蛋白结合的电解质诱导

[0224] 电解质诱导Tc-99m FibrinLite与预先用白蛋白包被的聚苯乙烯微孔(Nunc

lockwells™) 的结合。通过与 500μg/mL 的兔血清白蛋白 (100μL/well,Sigma A0764) 在 37℃下搅拌孵育 3 小时包被微孔,并且用水冲洗 3 次。将 FibrinLite 以 1 ∶ 10 稀释到 0、4.69、9.38、18.75、37.5、75 和 150mM 的氯化钠溶液中,并且将等分部分 (100μL) 的稀释液分配至包被的并冲洗的微孔上,并允许在 37℃下搅拌 30 分钟以允许结合。用水冲洗 4 次之后,取下个体微孔并进行计数。如图 4 所示,采用三种不同的 FibrinLite 制剂进行三次独立试验。

[0225] 如之前图 1b 和 3 中所示,FibrinLite 与白蛋白包被的微孔在 pH6.5 时仅显示非常弱的结合,而在 pH3.5 时强结合,即接近白蛋白的等电点,其吸引相互作用占优势。然而,如图 4 所示,在接近中性 pH 白蛋白带负电荷时,可以通过添加足够的电解质诱导 FibrinLite 的结合。

[0226] 实施例 5 :IV 注射的未包被的 FibrinLite 从循环中的清除

[0227] 将 Tc-99m 标记的 FibrinLite(约 1.0mL 中 1.9mCi) 注射进置于 Siemens Diacam γ 相机的检测头下的麻醉的兔的耳静脉中。注射后立即开始获取一系列图像。图 5 中显示的每个框代表之后的 30 秒间隔。兔的头部位于每个框的左边。观察到放射性同位素快速地通过心和肺并且在肝和脾中积累。仅 4 分钟之后 (框 8),绝大部分注射的放射性活性局限在肝和脾中。

[0228] 因此,静脉内注射的未包被的 FibrinLite 纳米颗粒在 20 分钟内几乎完全从循环中清除。该减少是由网状内皮系统介导,即诸如肝的 Kupffer 细胞的吞噬细胞。对于体内成像,有时需要使用具有特定包被的纳米颗粒复合材料制剂,所述特定包被被设计为延长纳米颗粒复合材料标记的探针在循环中的存在,并因此允许探针与特定靶标结合更长时间。在这类情况下,可以特别选择符合从循环系统中所需的清除速率的包被,并且补充纳米颗粒表面上的探针蛋白。为此目的,包被可以选自诸如聚乙二醇 (PEG) 的已知可延长循环持久性的那些分子,或被用作肝的网状内皮系统的清除剂的细胞受体的拮抗剂,例如聚肌苷酸。

[0229] 实施例 6 :使用多聚赖氨酸包被的 FibrinLite 的体内成像

[0230] 也可以用所选择的特异性地重新引导纳米颗粒复合材料的体内器官生物分布的试剂包被纳米颗粒复合材料的表面。对于诸如新目的器官中的肿瘤的疾病病变的成像或治疗,这样做是理想的。

[0231] 图 6 列举了实例,其显示了使用以典型聚阳离子多聚 D 赖氨酸处理的 Tc-99m FibrinLite 的特异性的兔肺的成像。用 pH6.0 的 0.5mM Tris- 乙酸缓冲液中的 3.0μg/mL 多聚 D 赖氨酸 (Sigma P4408,分子量 15-30kd) 在室温下处理 Tc-99m 标记的纳米颗粒复合材料 (约 1.0mL 中 3.5mCi)1 小时。然后,将混合物注射进置于 Siemens Diacam γ 相机的检测头下的麻醉的兔的耳静脉中。在注射之后立即开始获取一系列图像,并且图 6 中显示的每个框代表之后 30 秒的间隔。兔的头部在每个框的右边。观察到放射性同位素几乎专一地在肺中快速积累,并且稳定地保持在该位置直到获取系列的最后 (4 分钟)。

[0232] 图 6 表明用多聚 D 赖氨酸处理 Tc-99m FibrinLite 纳米颗粒是产生放射性标记在肺的血管网络中的特异性积累,从而实现该网络的成像的有效方法。使用赖氨酸的非天然存在 D 立体异构体的聚合物,从而减少体内该聚合物的蛋白酶降解的可能性,其对于赖氨酸的天然 L 立体异构体是特异性的。使用这种肺成像方法研究的兔在该操作之后顺利恢

复，并且某些兔被重复研究三次，每次持续数周的周期，同时每次获得十分相似的肺图像。接受多次该 FibrinLite 制剂注射的兔未表现任何不良反应并且所有外观和行为都是正常的。通过这种方法，提示多聚 D 赖氨酸处理的纳米颗粒复合材料可以用于检测来自流动阻塞（例如栓塞）或网络重构（例如肿瘤诱导的血管生成）的肺中正常血循环的任何病理紊乱。因此，多聚 D 赖氨酸处理的 Tc-99m FibrinLite 是用于肺诊断和预后的靶向显像剂的示例性并且非限制的实例。然而，同样地，可以制备含有诸如 Y-90 的治疗同位素而不是成像同位素的纳米颗粒复合材料，并且用合适的聚阳离子处理之后可以用于肺中存在的原发性和 / 或转移性肿瘤的区域放射治疗。

[0233] 实施例 7 ：多聚 D 赖氨酸分子量对 FibrinLite 生物分布的影响

[0234] 在 pH 6 的 0.5mM Tris- 乙酸缓冲液中的两种不同分子量范围的多聚 D 赖氨酸 ：A 分子量 4-15kd(6.0μg/mL ；Sigma P6403) 和 B 分子量 30-70kd，(1.5μg/mL ；Sigma P7886) 在 20℃下预处理 Tc-99m FibrinLite 1 小时。将每种预处理的 FibrinLite 制剂 (3.5mCi) 注射进麻醉的兔的耳静脉中并且在 Siemens Diacam γ 相机下对 Tc-99m 标记的生物分布进行成像。在注射之后立即开始获取一系列的图像，每个框代表 30 秒的间隔。兔的头部在每个框的右边。

[0235] 该实验显示获自多聚 D 赖氨酸处理的 Tc-99m FibrinLite 的肺成像取决于聚阳离子的分子大小（图 7A 和 7B）。令人意外的是，该性质不是聚阳离子分子大小的简单函数 ；尽管分子量 15kd 至 30kd 的多聚 D 赖氨酸对于特异性的肺成像有效，（参见图 6），但等摩尔浓度的分子量 4kd 至 15kd 的多聚 D 赖氨酸与分子量 30kd 至 70kd 的多聚 D 赖氨酸都不是同样有效。4-15kd 多聚 D 赖氨酸表现出部分肺特异性，但是相当部分的标记仍然出现在脾中（图 7A）。30-70kd 多聚 D 赖氨酸明显更差，相当多的标记出现在肝、脾和骨髓中（图 7B），与未处理的 Tc-99m FibrinLite 没有不同。

[0236] 因此表明，使用 Tc-99m FibrinLite 标记方法，可以容易地评估不同的大分子在体内靶向于指定器官的有用性。不需要求助于有机化学并且使用非常低浓度的靶向分子可以容易地实现这点。

[0237] 讨论

[0238] 本文的实施例证实，通过合适的 pH 和任选的电解质浓度条件能够实现诸如多肽的大分子的高亲和力标记，在该条件下，短程引力压倒静电排斥力。这些实施例表明，因为 FibrinLite 与大分子的结合涉及对增加的电解质浓度相对不敏感的吸引疏水、离子关联或分散相互作用，所以能够在生理电解质浓度下进行结合。使用本文所述的方法，FibrinLite 纳米颗粒牢固地保持与大分子相关联，并且在体内可能遇到的电解质条件下，放射性标记不会解离。

[0239] 对于多肽，带电的化学基团（例如，羧酸盐或氨基）存在于多肽表面，并且因此多肽分子的净电荷是多肽的环境 pH 的功能。在该情况下，通过调整 pH 使其接近于多肽的 pI，其中净电荷实际为零，可以诱导 FibrinLite 与多肽的结合。通过抑制静电排斥力使得短程引力可以占优势有利于结合。

[0240] 以上描述了本发明优选的形式。应当理解，本发明不应限于以上所示的具体实施方案。可以对其进行对于本领域技术人员显而易见的修饰和变化，这不脱离本发明的范围。

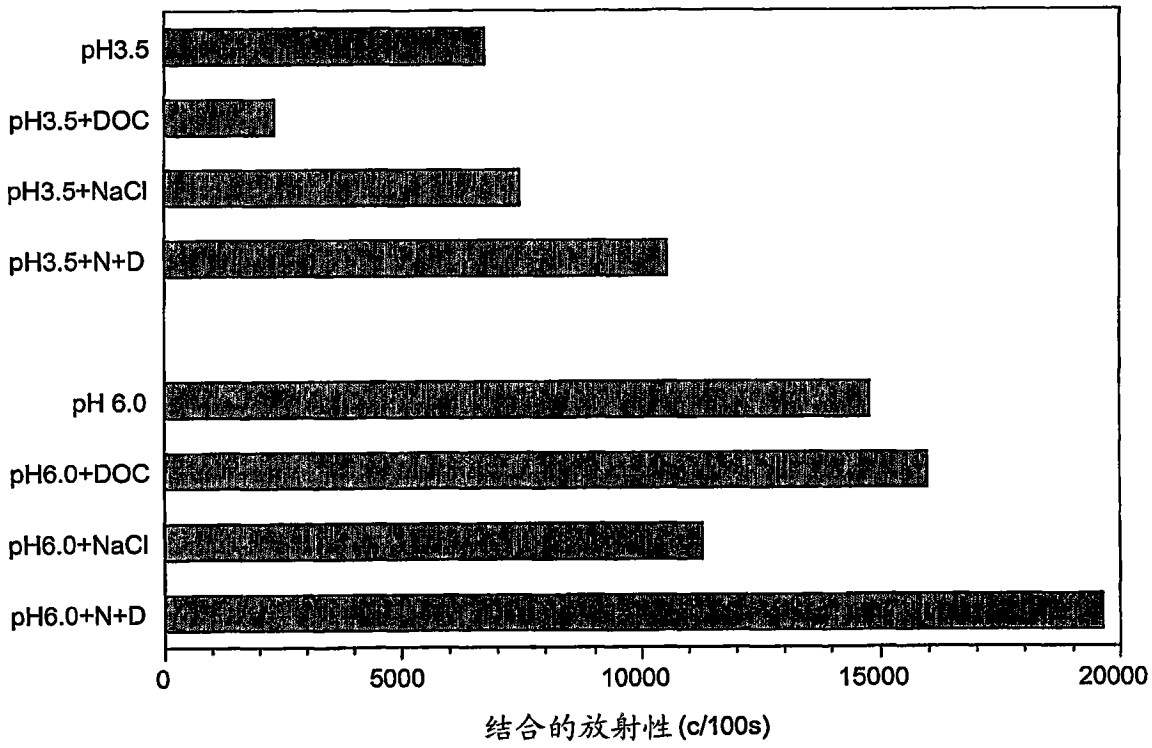

pH3.5
pH3.5+DOC
pH3.5+NaCl
pH3.5+N+D
pH 6.0
pH6.0+DOC
pH6.0+NaCl
pH6.0+N+D
0
5000
10000
15000
20000
结合的放射性(c/100s)

图 1a

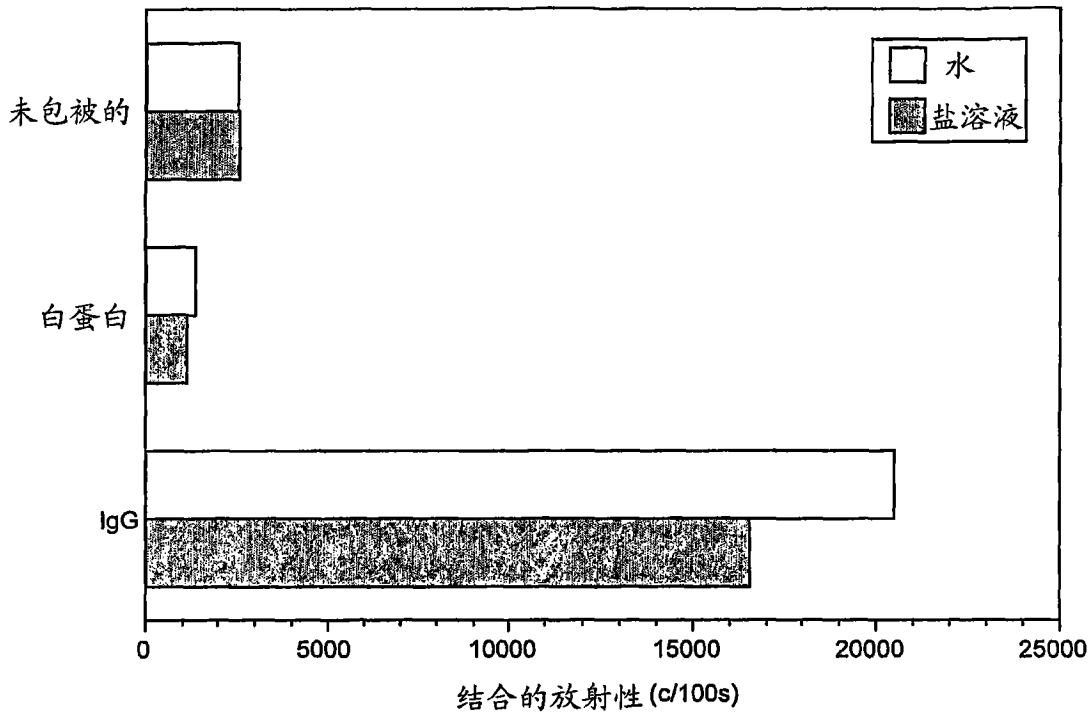

水
盐溶液
未包被的
白蛋白
IgG
0
5000
10000
15000
20000
25000
结合的放射性(c/100s)

图 1b

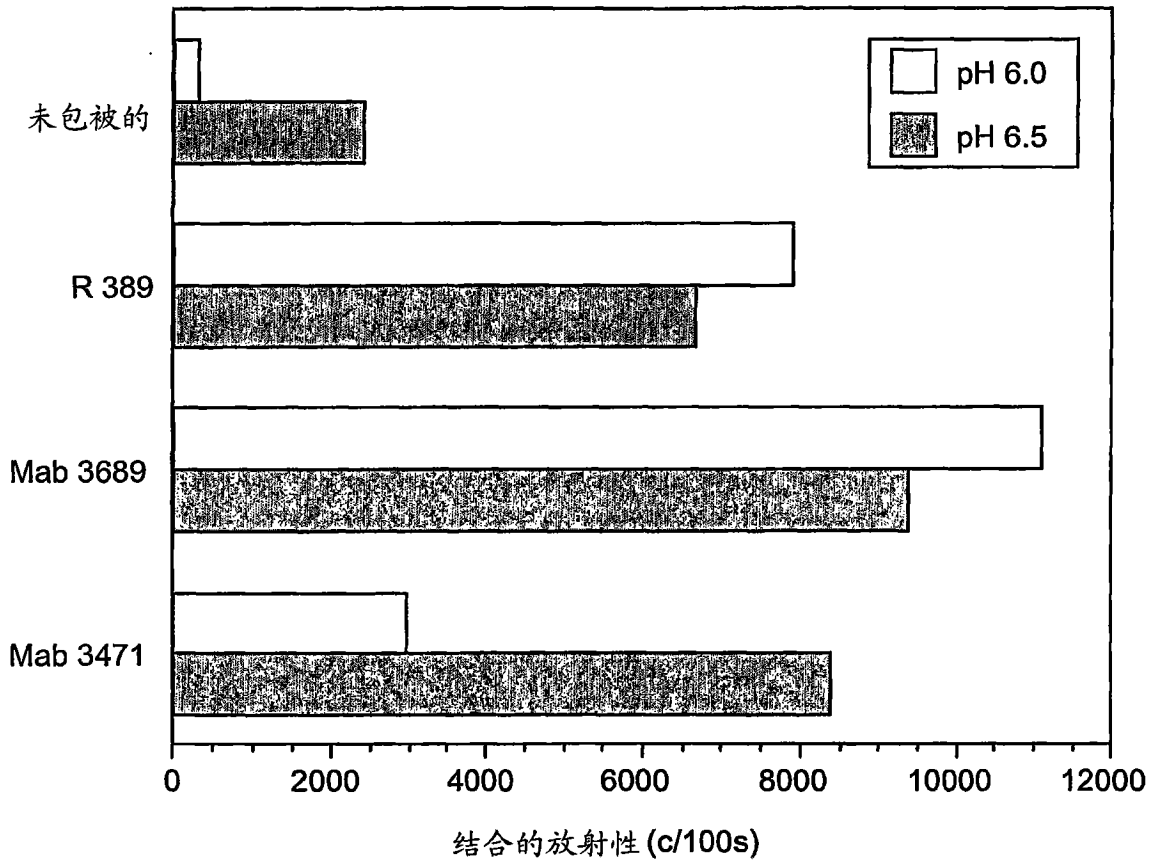

pH 6.0
pH 6.5
未包被的
R 389
Mab 3689
Mab 3471
0
2000
4000
6000
8000
10000
12000
结合的放射性 (c/100s)

图 2

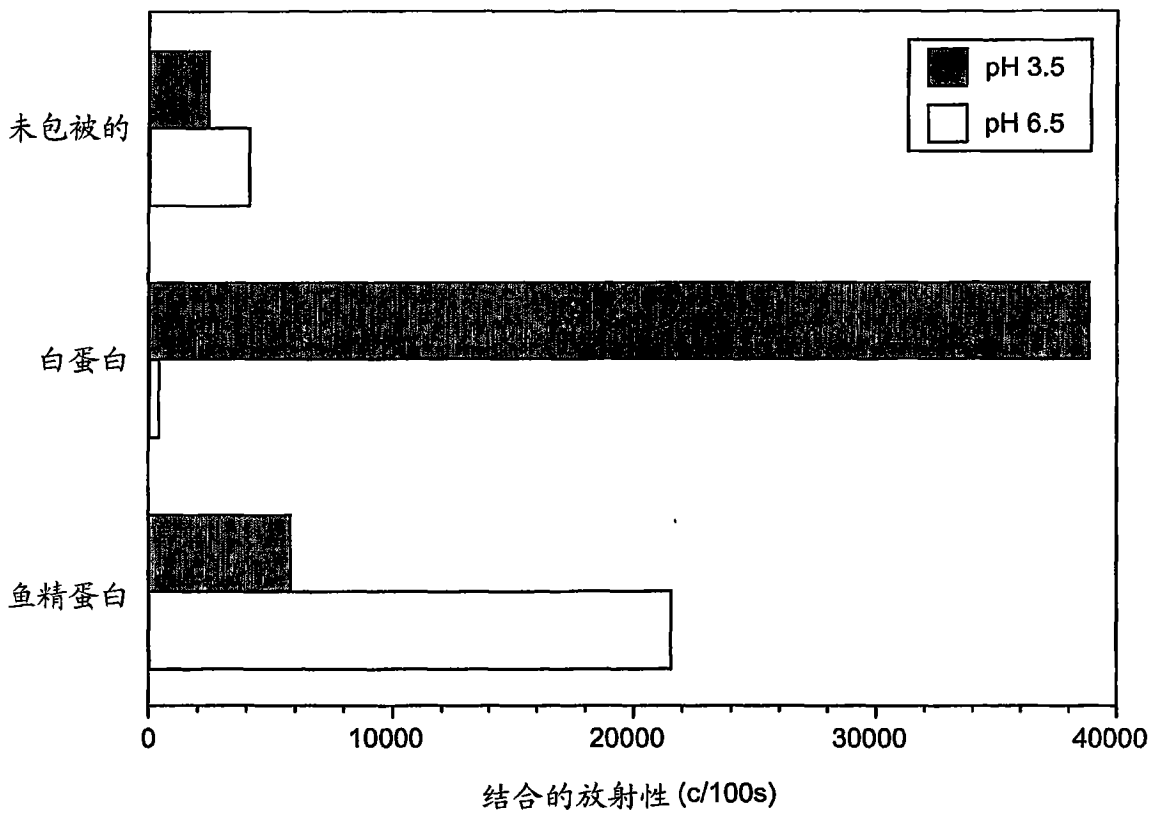

pH 3.5
pH 6.5
未包被的
白蛋白
鱼精蛋白
0
10000
20000
30000
40000
结合的放射性 (c/100s)

图 3

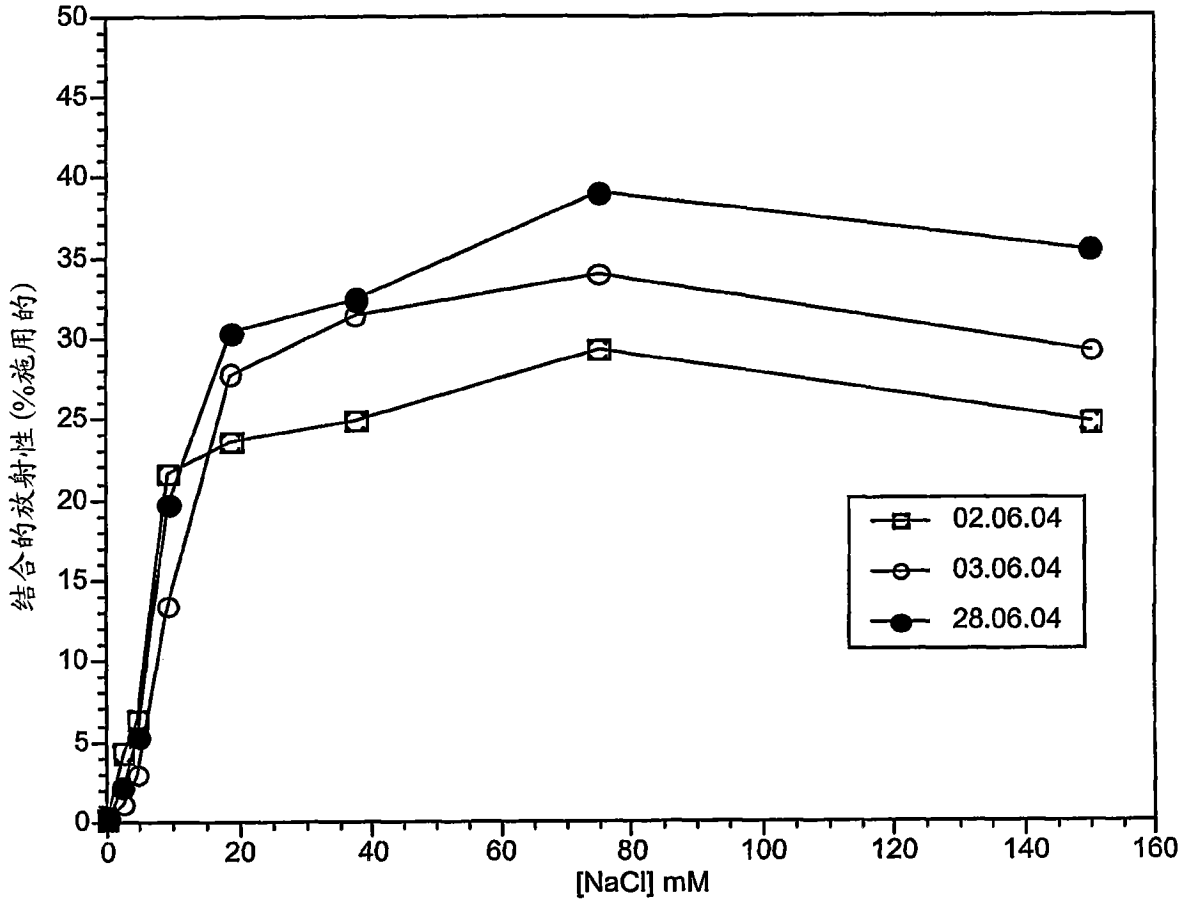

结合的放射性(%施用的)
[NaCl] mM
02.06.04
03.06.04
28.06.04
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
0
20
40
60
80
100
120
140
160

图 4

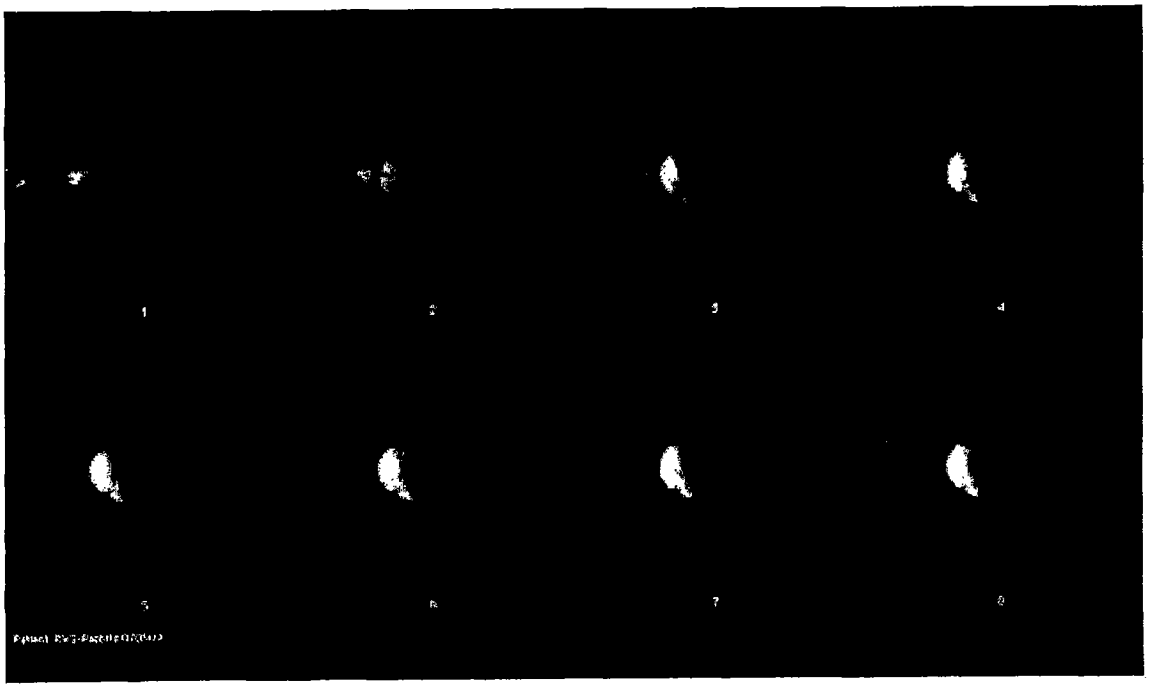


图 5

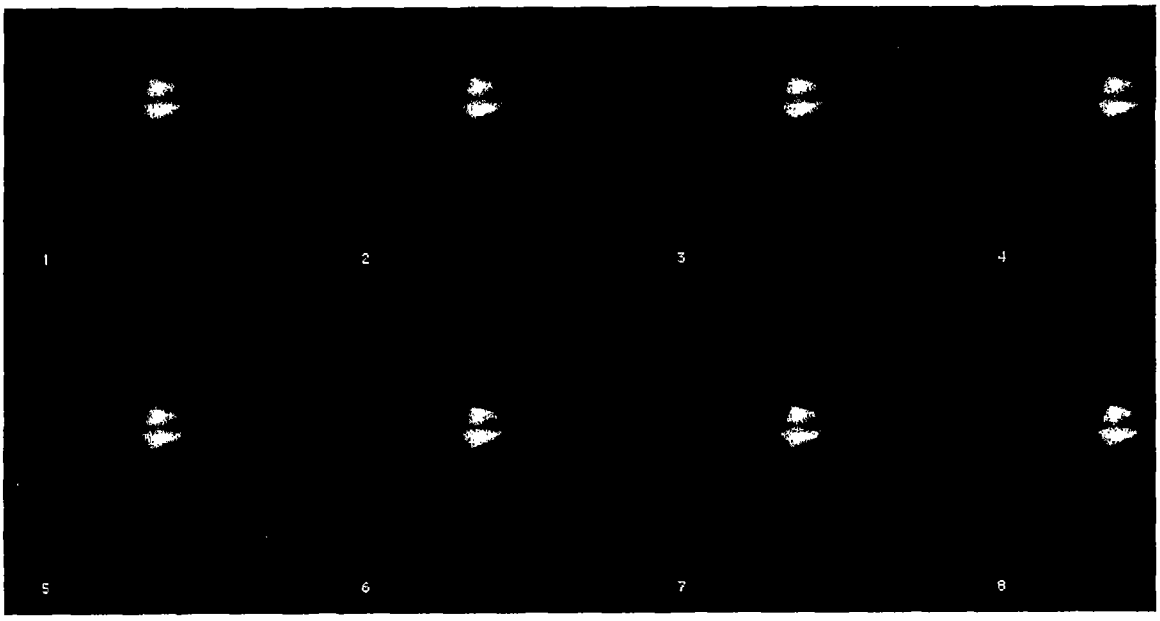


图 6

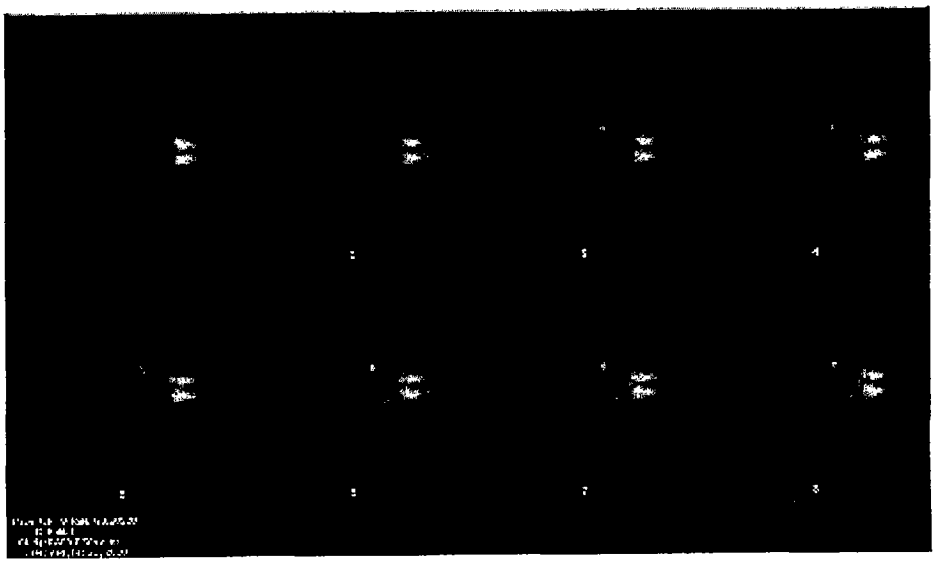


图 7a

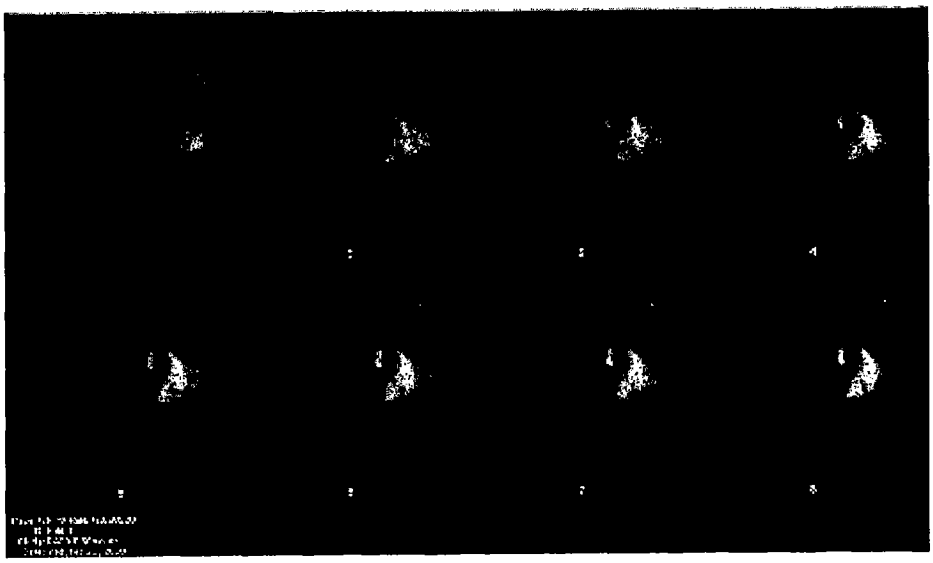


图 7b