



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101351225 B

(45) 授权公告日 2013.09.25

(21) 申请号 200680046573.1

(22) 申请日 2006.10.20

(30) 优先权数据

60/728,303 2005.10.20 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008.06.11

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2006/041139 2006.10.20

(87) PCT申请的公布数据

W02007/047981 EN 2007.04.26

(73) 专利权人 乔治敦大学

地址 美国华盛顿特区

(72) 发明人 E·H·常 K·F·皮洛罗

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 焦丽雅

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

(56) 对比文件

US 2003/0044407 A1, 2003.03.06, 权利要求 1-21, 说明书第 0038、0046-0053、0075-0077 段.

US 2003/0044407 A1, 2003.03.06, 权利要求 1-21, 说明书第 0038、0046-0053、0075-0077 段.

Wei Yu 等. <Enhanced transfection efficiency of a systemically delivered tumor-targeting immunolipoplex by inclusion of a pH-sensitive histidylated oligolysine peptide>. <Nucleic Acids Research>. 2004, 第 32 卷 (第 5 期), 标题和摘要.

审查员 罗德明

权利要求书3页 说明书26页 附图19页

(54) 发明名称

提高癌症早期 MRI 检测的肿瘤靶向纳米传送系统

(57) 摘要

本发明是药物传送, 癌症治疗和诊断以及药物领域。本发明提供了制备抗体或抗体片段靶向免疫脂质体的方法, 该脂质体用于全身传送分子来治疗和成像疾病, 包括癌肿瘤。本发明还提供了免疫脂质体和组合物, 以及使各种组织成像的方法。脂质体复合物用于成像剂的包裹, 例如, 用于磁共振成像。传送系统的特异性源自靶向抗体或抗体片段。

1. 制备抗体或抗体片段靶向阳离子免疫脂质体复合物的方法,包括:
 - (a) 制备抗体或抗体片段;
 - (b) 将所述抗体或抗体片段与阳离子脂质体混合来形成阳离子免疫脂质体,其中所述抗体或抗体片段没有在化学上与所述阳离子脂质体缀合;和
 - (c) 将成像剂与所述阳离子免疫脂质体以 mg 成像剂: μ g 脂质体为 1 : 10 至 1 : 35 的比例混合来形成所述抗体或抗体片段靶向阳离子免疫脂质体复合物。
2. 权利要求 1 的方法,其中将抗体与所述阳离子脂质体混合。
3. 权利要求 1 的方法,其中将抗体片段与所述阳离子脂质体混合。
4. 权利要求 3 的方法,其中所述抗体片段是单链 Fv 片段。
5. 权利要求 4 的方法,其中所述抗体片段是抗转铁蛋白受体单链 Fv 片段。
6. 权利要求 1 的方法,其中所述抗体或抗体片段是抗-HER-2 抗体或抗体片段。
7. 权利要求 1 的方法,其中所述抗体片段在与所述阳离子脂质体混合之前在羧基端包括半胱氨酸部分。
8. 权利要求 1 的方法,进一步包括将所述阳离子免疫脂质体与包括 K[K(H)KKK]₅-K(H)KKC(HoKC) (SEQ ID NO :1) 肽的肽混合。
9. 权利要求 1 的方法,其中所述阳离子脂质体包括一种或多种阳离子脂质和一种或多种中性或辅助脂质的混合物。
10. 权利要求 1 的方法,其中将所述抗体或抗体片段与所述阳离子脂质体以 1 : 20 至 1 : 40 的 w : w 比例混合。
11. 权利要求 1 的方法,其中所述阳离子脂质体包括二油酰三甲磷酸铵与二油酰磷脂酰乙醇胺和 / 或胆固醇的混合物;或二甲基二(十八烷基)溴化铵与二油酰磷脂酰乙醇胺和 / 或胆固醇的混合物。
12. 权利要求 1 的方法,其中将所述成像剂与所述阳离子免疫脂质体以 mg 成像剂: μ g 脂质体为 1 : 14 至 1 : 28 的比例混合。
13. 权利要求 1 的方法,其中将所述成像剂与所述阳离子免疫脂质体以 mg 成像剂: μ g 脂质体为 1 : 21 的比例混合。
14. 权利要求 1 的方法,其中所述成像剂是磁共振成像即 MRI 剂,计算机断层扫描即 CT 成像剂或正电子发射断层扫描即 PET 成像剂。
15. 权利要求 14 的方法,其中所述 MRI 剂是钆喷葡胺,氧化铁或碘帕醇,所述 CT 成像剂是钡,碘或盐水,或所述 PET 成像剂是 ¹⁸F-2- 脱氧 -2- 氟代 -D- 葡萄糖即 FDG。
16. 抗体或抗体片段靶向阳离子免疫脂质体复合物,其包括阳离子脂质体,抗体或抗体片段和成像剂,其中所述抗体或抗体片段没有在化学上与所述阳离子脂质体缀合,所述成像剂与所述阳离子免疫脂质体以 mg 成像剂: μ g 脂质体为 1 : 10 至 1 : 35 的比例存在。
17. 权利要求 16 的阳离子免疫脂质体复合物,其中所述成像剂包裹于所述阳离子脂质体内。
18. 权利要求 16 的阳离子免疫脂质体复合物,其中所述成像剂与所述阳离子脂质体的内侧或外侧单层相连。
19. 权利要求 16 的阳离子免疫脂质体复合物,其中所述抗体片段是单链 Fv 片段。
20. 权利要求 16 的阳离子免疫脂质体复合物,其中所述抗体片段是抗转铁蛋白受体单

链 Fv。

21. 权利要求 16 的阳离子免疫脂质体复合物,其中所述抗体或抗体片段是抗 HER-2 抗体或抗体片段。

22. 权利要求 16 的阳离子免疫脂质体复合物,其中所述阳离子脂质体包括一种或多种阳离子脂质和一种或多种中性或辅助脂质的混合物。

23. 权利要求 16 的阳离子免疫脂质体复合物,其中所述抗体或抗体片段与所述阳离子脂质体以 1 : 20 至 1 : 40 的 w : w 比例存在。

24. 权利要求 16 的阳离子免疫脂质体复合物,其中所述阳离子脂质体包括二油酰三甲磷酸铵与二油酰磷脂酰乙醇胺和 / 或胆固醇的混合物 ;或二甲基二 (十八烷基) 溴化铵与二油酰磷脂酰乙醇胺和 / 或胆固醇的混合物。

25. 权利要求 16 的阳离子免疫脂质体复合物,其中所述成像剂与所述阳离子免疫脂质体以 mg 成像剂 : μ g 脂质体为 1 : 14 至 1 : 28 的比例存在。

26. 权利要求 16 的阳离子免疫脂质体复合物,其中所述成像剂与所述阳离子免疫脂质体以 mg 成像剂 : μ g 脂质体为 1 : 21 的比例存在。

27. 权利要求 16 的阳离子免疫脂质体复合物,其中所述成像剂是磁共振成像即 MRI 剂,计算机断层扫描即 CT 成像剂或正电子发射断层扫描即 PET 成像剂。

28. 权利要求 27 的阳离子免疫脂质体复合物,其中所述 MRI 剂是钆喷葡胺,氧化铁或碘帕醇,所述 CT 成像剂是钡,碘或盐水,或所述 PET 成像剂是 ^{18}F -2- 脱氧 -2- 氟代 -D- 葡萄糖即 FDG。

29. 权利要求 16 的阳离子免疫脂质体复合物,进一步包括与所述复合物相连的 K[K(H)KKK]₅-K(H)K(KC)(HoKC)(SEQ ID NO :1) 肽。

30. 抗体或抗体片段靶向阳离子免疫脂质体复合物制备用于使患者器官或组织成像的试剂的用途,所述复合物包括阳离子脂质体,抗体或抗体片段和成像剂,其中所述抗体或抗体片段没有在化学上与所述阳离子脂质体缀合,所述成像剂与所述阳离子免疫脂质体以 mg 成像剂 : μ g 脂质体为 1 : 10 至 1 : 35 的比例存在。

31. 抗体或抗体片段靶向阳离子免疫脂质体复合物制备用于使患者癌组织成像的试剂的用途,所述复合物包括阳离子脂质体,抗体或抗体片段和成像剂,其中所述抗体或抗体片段没有在化学上与所述阳离子脂质体缀合,所述成像剂与所述阳离子免疫脂质体以 mg 成像剂 : μ g 脂质体为 1 : 10 至 1 : 35 的比例存在。

32. 抗体或抗体片段靶向阳离子免疫脂质体复合物制备用于使患者癌转移瘤成像的试剂的用途,所述复合物包括阳离子脂质体,抗体或抗体片段和成像剂,其中所述抗体或抗体片段没有在化学上与所述阳离子脂质体缀合,所述成像剂与所述阳离子免疫脂质体以 mg 成像剂 : μ g 脂质体为 1 : 10 至 1 : 35 的比例存在。

33. 抗体或抗体片段靶向阳离子免疫脂质体复合物制备用于患有癌症的患者的肿瘤组织的成像和使用抗癌剂来制备用于治疗肿瘤组织的试剂的用途,所述复合物包括阳离子脂质体,抗体或抗体片段和成像剂,其中所述抗体或抗体片段没有在化学上与所述阳离子脂质体缀合,所述成像剂与所述阳离子免疫脂质体以 mg 成像剂 : μ g 脂质体为 1 : 10 至 1 : 35 的比例存在。

34. 权利要求 33 的用途,其中所述抗癌剂是化疗剂,基因或小分子。

35. 权利要求 34 的用途,其中所述化疗剂选自阿霉素,米托蒽醌和吉西他滨。
36. 权利要求 34 的用途,其中所述抗癌剂与所述阳离子免疫脂质体相连。
37. 权利要求 33 的用途,其中所述抗癌剂是反义寡核苷酸或 siRNA。
38. 权利要求 37 的用途,其中所述反义寡核苷酸或所述 siRNA 与所述阳离子免疫脂质体相连。
39. 权利要求 33 的用途,其中在阳离子免疫脂质体复合物之前或之后传送所述抗癌剂。
40. 权利要求 39 的用途,其中在阳离子免疫脂质体复合物之前或之后至少 12 小时传送所述抗癌剂。
41. 权利要求 33 的用途,进一步包括使用放疗治疗肿瘤组织。

提高癌症早期 MRI 检测的肿瘤靶向纳米传送系统

[0001] 发明背景

发明领域

[0002] 本发明属于药物传送,癌症治疗和诊断以及药物领域。本发明提供了制备抗体或抗体片段靶向免疫脂质体的方法,该免疫脂质体用于全身传送治疗疾病和使疾病成像的分子,疾病包括癌性肿瘤。本发明还提供了免疫脂质体和组合物,以及使各种组织成像的方法。脂质体复合物用于成像剂的包裹,例如,用于磁共振成像。传送系统的特异性源自靶向抗体或抗体片段。

[0003] 发明背景

[0004] 对于结束由疾病引起的疼痛和苦难的目标而言,在早期检测原发性和转移性癌症的能力将是主要的步骤。用于基因治疗的肿瘤靶向传送系统的研发已经展现了比目前可用的方法更有效地传送成像剂的可能。磁共振成像 (MRI) 可以获取器官的 3- 维解剖图像。将这些结合顺磁性图像导致肿瘤的精确定位以及肿瘤生长和血管生成的纵向和定量的监控 (Gillies, R. J. 等, *Neoplasia* 2:139-451(2000); Degani, H. 等, *Thrombosis & Haemostasis* 89:25-33)。

[0005] 癌症诊断中最常用的顺磁性成像剂之一是 Magnevist[®] (钆喷葡胺) (Mag) (Berlex Imaging, Montville, NJ)。钆是稀有土族元素。由于其离子 (Gd^{3+}) 具有七个未配对的电子,其显示出顺磁性的特征。MRI 扫描中观察到的造影增强主要是由于 Gd^{3+} 对氢质子自旋点阵弛豫时间的强烈影响而引起的。尽管游离的钆是高度毒性的,并因此不适于临床使用,但与二乙撑三胺五乙酸 (DTPA) 的螯合产生了良好耐受性的,稳定的,强烈顺磁性的复合物。这种金属螯合物在代谢上是惰性的。然而,静脉注射钆喷葡胺后,葡甲胺离子与疏水性钆喷酸盐 (gadopentetate) 分离,其只分布在胞外水中。它不能够穿过完整的血脑屏障,并因此不在正常的脑组织,包囊,术后伤疤等中累积,并在尿液中快速排出。它具有约 1.6 小时的平均半衰期。大约 80% 的剂量在 6 小时内从尿液中排出。

[0006] 然而,使用现有的造影剂存在显著的局限性,包括它们主要是基于灌注和扩散标记以及葡萄糖摄取。使用这些游离的 (非复合的) 试剂,在肿瘤,炎症疾病中看到变化,甚至具有激素影响 (在乳腺中) (例如,最常见的基于钆和基于碘的造影剂证明了灌注并扩散至胞间隙中,PDG-PET 证明了葡萄糖摄取)。因此,这些造影剂没有特异性地靶向肿瘤。此外,活动的良性过程通常不能与恶性的区分开来,例如,乳腺 MRI 上的良性增强区域,慢性胰腺炎对胰腺癌。还存在小肿瘤不能充分摄取这些试剂,并因此灵敏度差和缺乏早期检测,这在如肺癌这样的疾病中是特别关键的。它还可能检测出孤立性肺结节或胸膜结节。因此,需要用于将这样的试剂传送至体内的特定组织,例如,传送至肿瘤组织和转移瘤的机制。

[0007] 发明简述

[0008] 在一个实施方案中,本发明提供了制备抗体或抗体片段靶向阳离子免疫脂质体复合物的方法,其包括制备抗体或抗体片段,将抗体或抗体片段与阳离子脂质体混合来形成阳离子免疫脂质体,其中抗体或抗体片段没有在化学上缀合阳离子脂质体,并将阳离子免

疫脂质体与成像剂混合来形成抗体或抗体片段靶向阳离子免疫脂质体复合物。用于本发明实践中的示例抗体片段包括单链 Fv 片段,如抗转铁蛋白受体单链 Fv (TfRscFv) 和抗 HER-2 抗体或抗体片段。在其他的实施方案中,该方法进一步包括将阳离子免疫脂质体与包括 K[K(H)KKK]5-K(H)KCC(HoKC) (SEQ ID NO :1) 肽的肽混合。

[0009] 合适地,以约 1 : 20 至约 1 : 40 (w : w) 的比例将抗体或抗体片段与所述阳离子脂质体混合。合适地,阳离子脂质体包括二油酰三甲磷酸铵与二油酰磷脂酰乙醇胺和 / 或胆固醇的混合物 ;或二甲基二 (十八烷基) 溴化铵与二油酰磷脂酰乙醇胺和 / 或胆固醇的混合物。

[0010] 在其他的实施方案中,以约 1 : 10 至约 1 : 35 的比例 (mg 成像剂 : μ g 脂质体),合适地约 1 : 14 至约 1 : 28 (mg 成像剂 : μ g 脂质体),或约 1 : 21 (mg 成像剂 : μ g 脂质体) 将阳离子免疫脂质体与成像剂混合。用于本发明实践中的示例成像剂包括,但不限于,磁共振成像 (MRI) 剂,如钆,钆喷葡胺,碘帕醇和氧化铁。此外,还可以使用用于 CT 的钆,碘和盐水成像剂,用于 PET 的 ^{18}F -2-脱氧-2-氟代-D-葡萄糖 (FDG) 和其他成像剂。

[0011] 本发明还提供了通过本发明的方法制得的阳离子免疫脂质体复合物以及包括阳离子脂质体,抗体或抗体片段和成像剂的抗体或抗体片段靶向阳离子免疫脂质体复合物,其中抗体或抗体片段没有在化学上与所述阳离子脂质体缀合。

[0012] 在进一步的实施方案中,本发明提供了使器官或组织成像的方法,并且还用于区分患者的良性组织 / 疾病和癌性组织 / 疾病,包括在进行成像之前将本发明的阳离子免疫脂质体复合物给药于患者。可以通过任何途径来进行给药,例如,静脉内给药,肌内给药,皮内给药,眼内给药,腹膜内给药,肿瘤内给药,鼻内给药,脑内给药或皮下给药。合适地,使用本发明的方法和复合物成像的组织是癌性组织,包括癌性转移瘤。

[0013] 本发明还提供了使患有癌症的患者的肿瘤组织成像和治疗患有癌症的患者的肿瘤组织的方法,包括将本发明的阳离子免疫脂质体复合物给药于患者来使肿瘤组织成像并将抗癌剂给药于患者来治疗肿瘤组织。示例抗癌剂包括核酸,基因,蛋白质,肽,小分子,化疗剂,如多西紫杉醇,米托蒽醌和吉西他滨,以及反义寡核苷酸或 siRNA。

[0014] 本发明的其他实施方案是本领域普通技术人员熟知的。

[0015] 附图简述

[0016] 图 1A 和 1B 显示了 TfRscFv-脂质体-DNA 纳米复合物的 CaPan-1 原位转移模型的肿瘤特异性靶向。1A 中箭头所示的肝脏中相同的肿瘤结节呈现出 1B 中强烈的 β -半乳糖苷酶表达。1A = 尸检 ;1A = β -半乳糖苷酶染色后的组织。

[0017] 图 2A-2C 显示了用 TfRscFv-Lip-Mag 纳米复合物转染后, K564 细胞的体外 MRI 成像。1A = 时间依赖性转染。给出的值是相对强度。1B = 显示出相对强度随复合物中包括的 Magnevist $\text{\textcircled{R}}$ 含量 (以 μ l 计) 的变化。1C = TfRscFv-Lip-Mag 纳米复合物对游离 Magnevist $\text{\textcircled{R}}$ 的相对强度的比较。所有图像中的小圆是样本定位的标记。

[0018] 图 3A-I 显示了两个不同癌症模型中使用配体-脂质体-Mag 纳米复合物提高的 MR 成像。3A, D 和 G 显示了大的胰腺原位肿瘤 (箭头) (外科植入肿瘤后 4 个月) 中静脉注射给药游离的造影剂和 TfRscFv-Lip-Mag 复合物之间的 MRI 信号差异。3B, E 和 H 显示了带有皮下胰腺肿瘤和更小的腹部胰腺肿瘤 (箭头) 的第二只小鼠中的相似效果。3C, F 和 I 是带有皮下前列腺肿瘤 (箭头) 的第三只动物的图像,其中相同的效果是明显的。

[0019] 图 4A-C 显示了不含 Magnevist [®] 的脂质体的 SPM 相位图像。各自在 1.68V, 1.45V 和 1.35V 的给定值获得了 4A, 4B 和 4C 中显示的图像。不顺从底物和机械上顺从脂质体之间的相应相差为 -3.5° , $+8^{\circ}$ 和 $+40^{\circ}$ 。随着设定值的降低, SPM 尖端和脂质体的相互作用从吸引改变至排斥。图 5A-C 显示了脂质体包裹的 Magnevist [®] (Lip+Mag) 的 SPM 和 SEM 图像。5A 是脂质体包裹的 Magnevist [®] 颗粒的原子力显微镜地形图。SPM 相位图像 (设定值 = 1.6) (5B) 和 15keV SEM(TE) [传输模式电子检测仪] 图像 (5C) 具有相似的反差, 尽管是通过完全不同的互补物理原理产生的。

[0020] 图 6A 和 6B 显示了 TfRscFv+Lip+Mag 纳米复合物的 SPM 地形和相位成像。6A 是整个纳米复合物的 15keV SEM(TE) [传输模式电子检测仪] 图像。6B 是场的低功耗图像。框起来的区域是 6A 中的图像。

[0021] 图 7A 和 7B 显示了使用 25-nm 高度位移的升高模式中 SPM 地形和磁性相位图像的截面比较。7A 是整个 TfRscFv-Lip-Mag 纳米复合物的 SPM 地形 / 磁性相位图像。7B 中由吸引和排斥面内磁性相互作用构成的双偶极子样信号的出现表明了这种相互作用的诱因是 NDS 内的 Magnevist 的不均匀环形分布, 与 SEM 和非磁性 SPM 相位图像相一致。

[0022] 图 8A-8H 显示了两种不同癌症模型中使用配体-HK-脂质体-Mag 纳米复合物提高的 MR 成像。人乳腺癌 MDA-MB-435 (图 8E-8H) 和人前列腺癌细胞系 (DU145) (图 8A-8D)。

[0023] 图 9A-C 显示了 TfRscFV-HK-脂质体-Mag 纳米复合物的 CaPan-1 皮下肿瘤和原位转移模型的肿瘤特异性靶向。

[0024] 图 10 显示了动态 MRI, 该 MRI 显示了胰腺癌模型中使用由本发明的复合物传送的 Mag 提高的强度, 与游离 Mag 相比较。

[0025] 图 11A-11C 显示了通过本发明的含 Mag 复合物的胰腺癌转移的 MR 成像。

[0026] 图 12A-12E 显示了肺转移 MR 成像中通过本发明的含 Mag 复合物的更大的增强。

[0027] 图 13A-13D 显示了肾细胞癌肺转移的 MR 成像中通过本发明的含 Mag 复合物的更大的增强。

[0028] 图 14A-14D 显示了通过小肾细胞癌肺转移的 MR 成像更高的检测灵敏度, 利用本发明的含 Mag 复合物。

[0029] 图 15A-15B 显示了通过本发明的含 Mag 复合物的非常小转移瘤的 MR 成像, 证明了本发明的复合物的灵敏度。

[0030] 图 16 显示了转移组织的切片, 证实了使用本发明的含 Mag 复合物通过 MRI 看到的检测 / 成像。

[0031] 图 17 显示了图 16 更高倍数的放大。

[0032] 图 18A-18F 显示了通过本发明的含 Mag 复合物的肺胸膜下转移的 MR 成像。

[0033] 图 19A-19B 显示了通过本发明的含 Mag 复合物的 B₁₆/F₁₀ 黑素瘤肺转移的检测。

[0034] 发明详述

[0035] 本发明通过提供用于将成像剂全身传送至靶向组织如肿瘤的纳米复合物满足了一个重要的需求, 即, 用于肿瘤对良性组织的早期检测和鉴别诊断的更高的灵敏度和肿瘤细胞特异性, 成像剂如磁共振成像 (MRI) 剂, 如钆, 钆喷葡胺 (Magnevist [®]), 和碘帕醇, 氧化铁; 用于 CT 的钡, 碘和盐水成像剂; 和用于 PET 的 ¹⁸F-2-脱氧-2-氟代-D-葡萄糖 (FDG) 和其他成像剂。扫描电子显微术 (SEM) 和扫描探针显微术 (SPM) (Wolfert, M. A. 等,

Human Gene Therapy 7 :2123-2133(1996) ;Dunlap, D. D. 等, Nucleic Acids Research 25 : 3095-3101(1997) ;Kawaura, C. 等, FEBS Letters 421 :69-72(1998) ;Choi, Y. H. 等, Human Gene Therapy 10 :2657-2665(1999) ;Diebel, C. E. 等, Nature 406 :299-302(2000) ;Rasa, M. 等, J. Coll. Interface Sci 250 :303-315(2002)) 已经用于观察这些带有成像剂的纳米复合物的物理结构和尺寸。在钆的情况中,钆是一种具有大磁矩的高原子数元素,可以以各种途径开发这些特征来提高 SEM 和 SPM 中的反差。在此呈现的发现证明了本发明的脂质体纳米复合物真正地包裹了成像剂,如 Magnevist[®],并且这些复合物的静脉内给药形成提高的肿瘤成像。本发明提供了出乎意料且令人惊讶的非常小的转移瘤的检测结果,包括肺中的胸膜转移,以及鉴别良性和癌性组织的能力。

[0036] 在一个实施方案中,本发明提供了肿瘤靶向传送系统,包括造影剂,例如磁共振成像 (MRI) 造影剂。U. S. 公开专利申请 No. 2003/0044407 (在此将其公开内容全部引入作为参考) 公开了那些包裹不同试剂的纳米尺寸的阳离子脂质体。修饰这些脂质体表面的是靶向分子,其可以是配体,如叶酸盐或转铁蛋白,或针对细胞表面受体的抗体或抗体片段。脂质体上的配体 / 抗体的存在有助于复合物进入细胞中,通过受体结合靶向分子,接着结合的复合物通过受体介导的胞吞作用内在化,胞吞作用是一种高效的内在化途径 (Cristiano, R. J. 和 Curiel, D. T., Cancer Gene Therapy 3 :49-57(1996) ;Cheng, P. W., Human Gene Therapy 7 :275-282(1996))。脂质体的这种修饰导致它们不仅能够选择性地将它们的有效负荷传送到肿瘤细胞,而且提高了脂质体的转染效率。转铁蛋白受体 (TfR) 水平在各种癌组织中得到升高,包括口腔,前列腺,乳腺和胰腺 (Keer, H. N. 等, Journal of Urology 143 :381-385(1990) ;Rossi, M. C. 和 Zetter, B. R., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 89 :6197-6201(1992) ;Elliott, R. L. 等, Ann. N. Y. Acad. Sci. 698 :159-166(1993) ;Thorstensen, K. 和 Romslo, I., Scand. J. Clin. Lab. Investig. (增补) 215 :113-120(1993) ;Miyamoto, T. 等, Intl. J. Oral Maxillofacial Surg. 23 :430-433(1994) ;Ponka, P. 和 Lok, C. N., Int' l. J. Biochem. Cell Biol. 37 :1111-1137(1999))。此外, TfR 在快速发展细胞如癌细胞中的内在化过程中再循环 (Ponka, P. 和 Lok, C. N., Int' l. J. Biochem. Cell Biol. 31 :1111-1137(1999)), 因此有助于这些转铁蛋白靶向的纳米复合物的摄入,甚至在其中 TfR 水平没有升高的癌细胞中。在合适的实施方案中,在此所述的纳米复合物使用抗转铁蛋白受体单链抗体片段 (TfRscFv) 作为靶向部分 (Hanynes, B. F. 等, J. Immunol. 127 :347-351(1981) ;Batra, J. K. 等, Molecular & Cellular Biology 11 :2200-2205(1991))。TfRscFv 含有完整的抗体结合位点,用于单克隆抗体 5E9 识别 TfR 的抗原决定部位 (Batra, J. K. 等, Molecular & Cellular Biology 11 :2200-2205(1991))。在将脂质体靶向具有升高 TfR 水平的癌细胞中, TfRscFv 具有优于 Tf 分子自身或完整 Mab 的优势 :1) scFv (28kDa) 的尺寸比 Tf 分子 (80kDa) 或亲本 Mab (155kDa) 小的多。scFv-脂质体-DNA 复合物因此呈现出更好地渗入实体肿瘤特征性的小毛细血管中。2) 较小的 scFv 对于临床试验需要的大规模生产具有实践优势。3) scFv 是重组分子并且不是和 Tf 一样的血液制品,并因此不具有由血液带有的病原体引起的潜在污染的危险。4) 没有 Mab 的 Fc 片段,消除了通过 Fc 受体的非抗原特异性结合的结果 (Jain, R. K. 和 Baxter, L. T., Cancer Res. 48 :7022-7032(1988))。这样的抗-TfR 单链抗体分子可以优先将静脉内给药的阳离子脂质体-DNA 纳米复合物靶向肿瘤 (参见, U. S. 公开专利申请 No. 2003/0044407 ;Xu, L. 等, Molecular Medicine

7:723-734(2001); Xu L 等, *Molecular Cancer Therapeutics* 1:337-346(2002))。将 Magnevist[®] (Mag) 包裹于这样的肿瘤靶向纳米复合物内给予了提高的灵敏度以及检测肿瘤转移和诊断癌症的优势。钆, 钆喷葡胺 (Magnevist[®]), 碘帕醇, 氧化铁; 用于 CT 的钆, 碘和盐水成像剂; 用于 PET 的 ¹⁸F-2-脱氧-2-氟代-D-葡萄糖 (FDG) 和其他成像剂, 以及本领域普通技术人员已知的任何其他常用造影剂, 以及将来有待研发的任何造影剂或成像剂 (例如, 用于 MRI, CT, PET, SPECT 等) 也可以包裹于本发明的免疫脂质体内。

[0037] 通过简单而有效的非化学缀合方法制得根据本发明的抗体或抗体片段靶向的阳离子脂质体复合物, 在该方法中将所需的复合物成分以限定的比例和限定的次序混在一起 (参见, U. S. 公开专利申请 No. 2003/0044407)。所得到的复合物与其中抗体或抗体片段与脂质体或聚合物化学缀合的相似复合物一样有效, 或更有效。术语“免疫复合物”, “免疫脂质体”, “复合物”, “纳米复合物”, “免疫纳米复合物”, “脂质体复合物”可互换使用, 全部用来表示本发明的阳离子脂质体。

[0038] 完整的抗体或抗体片段都可以用来制备本发明的复合物。在合适的实施方案中, 使用抗体片段。优选, 抗体片段是抗体的单链 Fv 片段。一种优选的抗体是抗 TfR 单克隆抗体, 而优选的抗体片段是基于抗 TfR 单克隆抗体的 scFv。合适的抗 TfR 单克隆抗体是 5E9 (参见, 例如, Hayes, B. F. 等, “Characterization of a Monoclonal Antibody (5E9) that Defines a Human Cell Surface Antigen of Cell Activation” (限定细胞激活的人细胞表面抗原的单克隆抗体 (5E9) 的表征), *J. Immunol.* 127: 341-352(1981); Batra, J. K. 等, “Single-chain Immunotoxins Directed at the Human Transferring Receptor Containing Pseudomonas Exotoxin A or Diphtheria Toxin: Anti-TfR(Fv)-PE40 and DT388-Anti-TfR(Fv)” (针对含有假单胞菌外毒素 A 或白喉毒素的人转移受体的单链免疫毒素: 抗-TfR(Fv)-PE40 和 DT388-抗-TfR(Fv)), *Mol. Cell. Biol.* 11:2200-2205(1991); 将其公开内容引入作为参考)。基于 5E9 抗体的 scFv 含有完整的抗体结合位点, 用于该 Mab 识别的 TfR 的抗原决定部位, 作为大约分子量 26,000 的单多肽链。通过连接各自来自重链和轻链的成分 VH 和 VL 可变结构域形成 scFv, 使用适当设计的连接肽, 其桥接了第一个可变区的 C-端和第二个可变区的 N-端, 次序为 VH-连接物-VL 和 VL-连接物-VH。另一个优选的抗体是抗-HER-2 单克隆抗体, 而另一个优选的抗体片段是基于抗-HER-2 单克隆抗体的 scFv。

[0039] 在合适的实施方案中, 将半胱氨酸部分添加至 scFv 的 C-端。尽管不希望受到理论的束缚, 但认为提供了游离巯基的半胱氨酸可以提高抗体和脂质体之间的复合物的形成, 例如, 通过电荷-电荷相互作用。使用或不用半胱氨酸, 可以在大肠杆菌包含体中表达蛋白质, 然后重折叠来产生活性形式的抗体片段。

[0040] 如果不希望在复合物的形成中使用空间上稳定的免疫脂质体, 制备复合物的第一个步骤包括将阳离子脂质体或脂质体或小聚合物的组合物与选择的抗体或抗体片段混合 (参见本文中的实施例和 U. S. 公开专利申请 No. 2003/0044407)。多种阳离子脂质体可用于本发明复合物的制备中。公开的 PCT 申请 W099/25320 描述了几种阳离子脂质体的制备。理想的脂质体的实例包括含有二油酰三甲磷酸铵 (DOTAP) 与二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE) 和 / 或胆固醇 (chol) 的混合物; 或二甲基二(十八烷基) 溴化铵 (DDAB) 与 DOPE 和 / 或 chol 的混合物的那些。对于特定的目标细胞类型, 可以改变脂质的比例来最佳化治疗分子的摄

入效率。脂质体可以包括一种或多种阳离子脂质和一种或多种中性或辅助脂质的混合物。阳离子脂质与中性或辅助脂质的理想比例为约 1 : (0.5-3), 优选 1 : (1-2) (摩尔比)。

[0041] 本发明还提供了用于传送成像剂的靶向阳离子聚合物。合适的聚合物是能够介导 DNA 收缩并且还可以介导核内体释放的 DNA 结合阳离子聚合物。优选的聚合物是聚乙烯亚胺。其他有用的聚合物包括聚赖氨酸, 鱼精蛋白和聚酰胺胺树状聚合物。

[0042] 抗体或抗体片段是结合靶细胞表面的抗体或抗体片段, 并优选结合在靶细胞上差异表达的受体。将抗体或抗体片段在室温与阳离子脂质体或聚合物混合, 并且蛋白质:脂质的比例为约 1 : 20 至约 1 : 40 (w : w), 或蛋白质聚合物的比例为约 0.1 : 1 至 10 : 1 (摩尔比)。

[0043] 使抗体或抗体片段和脂质体或聚合物在室温孵育一小段时间, 通常约 10-15 分钟, 然后将混合物与选择的治疗剂或诊断剂混合。可以与抗体和脂质体复合的治疗分子或治疗剂的实例包括基因, 高分子量 DNA (基因组 DNA), 质粒 DNA, 反义寡核苷酸, 肽, 核酶, 核酸 (包括 siRNA 和反义), 病毒颗粒, 免疫调节剂, 蛋白质, 小分子和化学试剂。优选的治疗分子包括编码 p53, Rb94 和 Apoptin 的基因。RB94 是视网膜母细胞瘤抑制基因的变体。Apoptin 是只诱导肿瘤细胞凋亡的基因。在另一个优选的实施方案中, 试剂是反义寡核苷酸或 siRNA 分子, 如 HER-2 反义或 siRNA 分子。第三种优选的试剂是诊断成像剂, 如 MRI 成像剂, 如 Gd-DTPA 剂。其他成像剂包括, 但不限于, 钆, 钆喷葡胺 (Magnevist®), 碘帕醇, 氧化铁; 用于 CT 的钡, 碘和盐水成像剂; 和用于 PET 的 18F-2-脱氧-2-氟代-D-葡萄糖 (FDG) 和其他成像剂。如果试剂是 DNA, 如 p53 的编码片段, 可以将其置于强组成型启动子, 如 RSV 或 CMV 启动子的控制下。

[0044] 将抗体或抗体片段和脂质体组合物以约 1 : 10 至 1 : 20 (μg 试剂 : nmol 总脂质) 或 1 : 10 至 1 : 40 (μg 试剂 : nmol 总聚合物) 的比例与治疗剂或诊断剂混合, 然后在室温孵育一小段时间, 通常约 10 至 15 分钟。脂质体复合物的尺寸通常在约 50-400nm 的范围内, 如使用 Malvern Zetasizer 3000 通过动态光散射所测量的。

[0045] 在本发明的一个实施方案中, 用于形成复合物的脂质体是空间上稳定的脂质体。空间上稳定的脂质体是其中已经结合了亲水性聚合物如 PEG, 聚(2-乙基丙烯酸) 或聚(n-异丙基丙烯酰胺) (PNIPAM) 的脂质体。当与治疗剂或诊断剂复合时, 这样修饰过的脂质体特别有用, 因为它们通常没有象未经这样修饰过的相当脂质体那样快地通过网状内皮组织系统从血流中清除出来。为了制备本发明的空间上稳定的脂质体复合物, 混合抗体或抗体片段, 脂质体和治疗剂或诊断剂的次序与上述的次序相反。在第一个步骤中, 首先将阳离子脂质体以约 1 : 10 至 1 : 20 (μg 试剂 : nmol 脂质) 的比例与上述的治疗剂或诊断剂混合。将生理学上可接受缓冲液中的 PEG 聚合物溶液加入该 lipoplex 中, 并将所得到的溶液在室温孵育足以使聚合物结合脂质体复合物的时间。然后将抗体或抗体片段与稳定的脂质体聚合物在室温混合, 并且蛋白质:脂质的比例为约 1 : 5 至约 1 : 30 (w : w)。

[0046] 根据本发明制得的脂质体或聚合物复合物可以配制成用于体内给药的药物学上可接受的制剂。可以将复合物结合药物学上相容的介质或载体。可以配制组合物, 例如, 用于静脉内给药于人患者, 该患者得益于复合物的治疗或诊断分子的给药。复合物的尺寸是合适的, 使得在静脉注射给药后可以全身分布。或者, 可以通过其他给药途径来传送复合物, 如肿瘤内 (IT), 病损内 (IL), 气溶胶, 经皮, 内窥镜, 局部, 肌肉 (IM), 皮内 (ID), 眼内

(IO), 腹膜内 (IP), 鼻内 (IN), 脑内 (IC) 或皮下给药。用于通过这样的方法传送的制剂的制备和使用这样的方法的传送是本领域公知的。

[0047] 在一个实施方案中, 给药包括抗体或抗体片段靶向的脂质体 (或聚合物) 和治疗剂复合物的组合物, 以实现人的基因治疗。复合物的治疗剂成分包括合适调控序列控制下的治疗基因。通过全身传送含有编码 wt p53 或 RB94 的核酸的抗体或抗体片段靶向脂质体或聚合物复合物来实现用于各种形式的人癌症的基因治疗。复合物可以特异性地靶向并敏化原发性和转移性肿瘤的肿瘤细胞, 以在体外和体内照射和 / 或化疗。

[0048] 可以针对靶细胞类型通过脂质的选择和比例, 抗体或抗体片段与脂质体的比例, 抗体或抗体片段和脂质体与治疗剂或诊断剂的比例, 以及抗体或抗体片段和治疗剂或诊断剂的选择来最佳化复合物。

[0049] 在一个实施方案中, 靶细胞是癌细胞。尽管任何具有恶性细胞生长的组织可以是目标, 但头颈, 乳腺, 前列腺, 胰腺, 大脑, 包括成胶质细胞瘤, 子宫颈, 肺, 肝, 脂肪肉瘤, 横纹肌肉瘤, 绒毛膜癌, 黑素瘤, 视网膜母细胞瘤, 子宫, 泌尿生殖器, 胃和结直肠的癌是合适的目标。

[0050] 通过本发明的方法制得的复合物还可以用于靶向非肿瘤细胞, 用于传送治疗分子或任何核酸。尽管任何正常细胞可以是目标物, 但优选的细胞是树突细胞, 血管的内皮细胞, 肺细胞, 乳腺细胞, 骨髓细胞, 胸腺细胞和肝细胞。可以靶向不利的但是良性的细胞, 如良性前列腺增生细胞, 过于活跃的甲状腺细胞, 脂肪瘤细胞和自体免疫疾病相关的细胞, 如产生涉及关节炎, 狼疮, 重症肌无力, 鳞状上皮化生, 黄斑变性, 心血管疾病, 神经病, 如阿尔茨海默病, 发育异常等的抗体的 B 细胞。

[0051] 可以结合另一种治疗性处理来给药复合物, 如放疗或化疗剂。可以在复合物的给药之前或之后来给予治疗性处理, 或治疗性处理的组合, 例如在约 12 小时至约 7 天内。化疗剂包括, 例如, 阿霉素, 5-氟尿嘧啶 (5FU), 顺铂 (CDDP), 多西紫杉醇 (TAXOTERE®), 吉西他滨 (GEMZAR®), 紫杉醇, 长春花碱, 足叶乙甙 (VP-16), 喜树碱, 放线菌素-D, 米托蒽醌和丝裂霉素 C。放射治疗 / 处理包括 γ 放射 (^{137}Cs), X-射线, UV 照射, 微波, 电子发射等。其他的治疗剂包括小分子, 肽, 蛋白质等。

[0052] 还可以通过脂质体或聚合物复合物将诊断剂或成像剂传送至靶向细胞。术语“诊断剂”和“成像剂”可互换使用, 全部用来表示在给药后可以在体内得到检测, 目测, 成像或观察的试剂。用于检测, 目测, 成像或观察诊断剂和成像剂的实例方法是本领域公知的, 并包括, 例如, 光学成像, 如荧光成像 (荧光计) 或生物发光成像, 正电子发射断层 (PET) 扫描, 单光子发射计算机化断层 (SPECT) 扫描, 磁共振成像 (MRI), x-射线, 放射性核苷酸成像 (例如, γ 照相机, 计算机断层扫描 (CT), 定量自动射线照相术等) 等。示例诊断剂包括电子密度材料, 铁, 磁共振成像剂和放射性药物。成像有用的放射性核素包括铜, 镓, 铟, 铈和钨的放射性同位素, 包括同位素 ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{67}Ga 或 ^{68}Ga 。MRI 剂如 Gd-DTPA 剂, 钆或 Magnevist® (钆喷葡胺) (Mag) (Berlex Imaging, Montville, NJ)。Low 等在 U. S. 专利 5, 688, 488 中公开的成像剂可用于本发明中, 在此将其引入作为参考。其他成像剂包括, 但不限于, 碘帕醇 (例如, ISOVUE®, RegionalHealih Limited, Auckland, AU), 氧化铁; 用于 CT 的钡, 碘和盐水成像剂; 和用于 PET 的 ^{18}F -2-脱氧-2-氟代-D-葡萄糖 (FDG) 和其他成像剂。

[0053] 可以以试剂盒的形式来提供根据本发明的方法制得的复合物,该试剂盒用于通过复合物全身传送治疗分子或诊断分子。合适的试剂盒可以分开地包括合适的容器(或在单个的容器中),脂质体,抗体或抗体片段和治疗剂或诊断剂。可以在无菌条件下以合适的次序混合组分并在制备后的合理时间段内给药于患者,通常约30分钟至约24小时。优选作为溶液或作为干粉来提供试剂盒组分。优选将溶液形式提供的组分配制于无菌注射用水中,和合适的缓冲液,摩尔渗透压浓度控制剂等一起。

[0054] 成像剂的包裹和传送

[0055] 在特定的实施方案中,本发明提供了阳离子脂质体复合物,其中将一种或多种成像剂包裹在脂质体内部中,包含在双层的烃链片段内,与内侧和/或外侧单层复合/相连(例如,通过静电相互作用或化学/共价相互作用),或这些可能性中的任一种或全部的组合。合适地,将成像剂包裹在脂质体的内部中和/或与内侧和/或外侧单层相连。

[0056] 如在此所用的,术语“诊断剂”和“成像剂”指的是给药后可以在体内得到检测,目测,成像或观察的试剂。示例成像剂包括电子密度材料,铁,磁共振成像剂和放射性药物。成像有用的放射性核素包括铜,镓,铟,铯和铊的放射性同位素,包括同位素 ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{67}Ga 或 ^{68}Ga 。MRI剂如钆,Gd-DTPA剂或Magnevist®(钆喷葡胺)(Mag)(Berlex Imaging, Montville, NJ)。Low等在U.S.专利5,688,488中公开的成像剂也可用于本发明中,在此将其引入作为参考。其他成像剂包括,但不限于,碘帕醇(例如,ISOVUE®, Regional Health Limited, Auckland, AU),氧化铁;用于CT的钡,碘和盐水成像剂;和用于PET的 ^{18}F -2-脱氧-2-氟代-D-葡萄糖(FDG)和其他成像剂。

[0057] 如在此所述的,可以在加工过程中通过简单地混合一种或多种成像剂和脂质体将成像剂合适地与本发明的脂质体复合物包裹,包含或复合/相连。通过本领域技术人员可容易地测定成像剂:脂质体复合物的合适比例。例如,成像剂与脂质体复合物的比例合适地为约1:10至约1:35(mg成像剂: μg 脂质体),更合适地约1:14至约1:28(mg成像剂: μg 脂质体),或约1:21(mg成像剂: μg 脂质体)。

[0058] 如全文中所述的,用于传送/包括成像剂的理想阳离子脂质体的实例包括含有二油酰三甲磷酸铵(DOTAP)与二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)和/或胆固醇(cho1)的混合物;或二甲基二(十八烷基)溴化铵(DDAB)与DOPE和/或cho1的混合物的那些。可以改变脂质的比例来最佳化成像剂的摄入效率。脂质体可以包括一种或多种阳离子脂质和一种或多种中性或辅助脂质的混合物。阳离子脂质与中性或辅助脂质的理想比例为约1:(0.5-3),优选约1:(1-2)(摩尔比)。本发明实践中有用的各种脂质比例的实例包括,但不限于:

[0059]

LipA	DOTAP/DOPE	1:1 摩尔比
LipB	DDAB/DOPE	1:1 摩尔比
LipC	DDAB/DOPE	1:2 摩尔比
LipD	DOTAP/Chol	1:1 摩尔比
LipE	DDAB/ Chol	1:1 摩尔比
LipG	DOTAP/DOPE/Chol	2:1:1 摩尔比
LipH	DDAB/DOPE/Chol	2:1:1 摩尔比

[0060] (DOTAP = 二油酰三甲磷酸铵, DDAB = 二甲基二(十八烷基)溴化铵; DOPE = 二油酰磷脂酰乙醇胺; chol = 胆固醇)。

[0061] 在一个实施方案中, 本发明提供了制备含成像剂的抗体或抗体片段靶向阳离子免疫脂质体复合物的方法, 包括制备抗体或抗体片段; 将抗体或抗体片段与阳离子脂质体混合来形成阳离子免疫脂质体, 其中抗体或抗体片段没有在化学上与阳离子脂质体缀合; 并将阳离子免疫脂质体与一种或多种成像剂混合来形成抗体或抗体片段靶向阳离子免疫脂质体复合物。

[0062] 在合适的实施方案中, 抗体片段是单链 Fv 片段, 例如, 抗转铁蛋白受体单链 Fv (TfRscFv) 和抗 HER-2 抗体或抗体片段。在此描述了用于制备含成像剂的阳离子免疫脂质体的合适脂质的实例, 并包括, 二油酰三甲磷酸铵与二油酰磷脂酰乙醇胺和 / 或胆固醇的混合物; 或二甲基二(十八烷基)溴化铵与二油酰磷脂酰乙醇胺和 / 或胆固醇的混合物。合适地, 以约 1 : 20 至约 1 : 40 (w : w) 的比例将抗体或抗体片段与阳离子脂质体混合来形成阳离子免疫脂质体。合适地, 以约 1 : 10 至约 1 : 35 的比例 (mg 成像剂 : μ g 脂质体), 更合适地约 1 : 14 至约 1 : 28 (mg 成像剂 : μ g 脂质体), 或约 1 : 21 (mg 成像剂 : μ g 脂质体) 将阳离子免疫脂质体与成像剂混合。

[0063] 实例成像剂包括在此所述的以及本领域已知的那些。合适地, 成像剂是 MRI 成像剂, 如钆, 钆喷葡胺, 碘帕醇 (例如, **ISOVUE**[®], Regional Health Limited, Auckland, AU), 或氧化铁; 用于 CT 的钡, 碘和盐成像剂; 和用于 PET 的 ¹⁸F-2-脱氧-2-氟代-D-葡萄糖 (FDG) 和其他成像剂。

[0064] 在其他实施方案中, 本发明的方法和免疫脂质体复合物进一步包括将阳离子脂质体与包括 K[K(H)KKK]5-K(H)KHC(HoKC 或 HK) (SEQ IDNO :1) 肽的肽混合。HoKC 肽携带末端半胱氨酸以允许缀合马来酰亚胺基团。因此, 使用 HoKC 肽时, 脂质体制剂还合适地包括总脂质的 0.1 至 50 摩尔百分比的 N-马来酰亚胺-苯基丁酸盐-DOPE (MPB-DOPE), 更优选总脂质的 1-10 摩尔百分比, 最优选总脂质的 5 摩尔百分比。按照之前所述的制备 HoKC 脂质体 (Yu, W 等, Enhanced transfection efficiency of a systemically delivered tumor-targeting immunolipoplex by inclusion of a pH-sensitive histidylated oligolysine peptide (通过包括 pH-敏感性组氨酰盐化寡赖氨酸肽提高全身传送的肿瘤靶向免疫 lipoplex 的转染效率), Nucleic Acids Research 32, e48 (2004))。

[0065] 在进一步的实施方案中, 本发明提供了抗体或抗体片段靶向阳离子免疫脂质体复合物, 其包括阳离子脂质体, 抗体或抗体片段, 和一种或多种成像剂, 其中抗体或抗体片段

没有在化学上与阳离子脂质体缀合。将抗体或抗体片段通过抗体或抗体片段与脂质体之间的相互作用（例如，静电，范德华氏力或其他非化学上缀合的相互作用）与脂质体合适地相连，合适地通过抗体或抗体片段上的半胱氨酸残基和脂质体表面之间的相互作用。通常，连接物或间隔物分子（例如，聚合物或其他分子）不是用来连接抗体和脂质体。可以将成像剂包裹在阳离子脂质体内，包含在阳离子脂质体的烃链片段内，与阳离子脂质体，或其任何组合的内侧或外侧单层相连。合适地，本发明的阳离子免疫脂质体是单层脂质体（即，单个双层），尽管也可以使用包括几个同心双层的多层脂质体。本发明的单个双层阳离子免疫脂质体包括内部含水容积，其中可以包裹试剂（例如，成像剂）。它们还可以包括单个双层，其具有烃链片段（即，脂质的脂链片段），其中可以含有试剂（例如，成像剂）。此外，试剂（例如，成像剂）可以与脂质体膜（即，脂质的头部基团部分）的内侧单层和 / 或外侧单层的任一或两者复合或相连，例如，通过负电荷成像剂和正电荷阳离子脂质体之间的电荷 - 电荷相互作用完成。在进一步的实施方案中，可以将试剂（例如，成像剂）包裹 / 相连 / 复合于本发明的阳离子免疫脂质体复合物的这些区域中的任一或全部中。

[0066] 在进一步的实施方案中，本发明提供了使患者的器官或组织成像的方法，包括在进行成像之前将本发明的含成像剂的阳离子免疫脂质体复合物给药于患者。可以通过任何所需的途径来给药免疫脂质体复合物，包括，但不限于，静脉内（IV），口服，局部，通过吸入，肌肉（IM）注射，肿瘤内（IT）注射，皮内（ID）注射，腹膜内（IP）注射，鼻内（IN）注射，眼内（IO）注射，颅内（IC）注射或其他途径。如在此所用的，术语患者包括动物患者（例如，非人哺乳动物，如狗，猫，猪，绵羊等）以及人。用于患者组织成像的方法是本领域公知的并包括，但不限于，PET 扫描，SPECT 扫描，MRI 成像等。可以使用本发明的方法和复合物使患者的任何组织或器官成像。通过简单地修饰脂质体上的靶向配体，可以靶向任何超表达的蛋白或分子。

[0067] 合适地，本发明的方法用来使患有或易于患有癌症的患者的癌性组织成像。可以使用本发明的方法成像的癌性组织包括实体瘤，以及转移灶。本发明的方法还可以区别癌性组织和非癌性（良性）组织。

[0068] 在进一步的实施方案中，本发明提供了使患有或易患癌症的患者的肿瘤组织成像并进行治疗的方法，包括给药本发明的含成像剂的免疫脂质体复合物使肿瘤组织成像，并将抗癌剂给药于患者来治疗肿瘤组织。

[0069] 可以给药的抗癌剂实例包括，但不限于，小分子，蛋白质，肽和化疗剂，如在此所述的那些，基因，反义寡核苷酸和 siRNA。实例化疗剂包括，但不限于，阿霉素，5-氟尿嘧啶（5FU），顺铂（CDDP），多西紫杉醇（TAXOTERE®），吉西他滨（GEMZAR®），紫杉醇，长春花碱，足叶乙甙（VP-16），喜树碱，放线菌素 -D，米托蒽醌和丝裂霉素 C，和抗体治疗，如单克隆抗体，例如，HERCEPTIN®（Genentech, San Francisco CA）。用于本发明实践中的反义寡核苷酸和 siRNA 分子的实例包括，但不限于，U. S. 公开专利申请 No. 2003/0044407 和 2006 年 9 月 14 日申请的 U. S. 专利申请 No. 11/520, 796 中公开的那些，在此将每篇的公开内容以其整体引入作为参考。其他抗癌剂包括肽，蛋白质和小分子（参见，例如，2006 年 5 月 15 日申请的 U. S. 临时专利申请 No. 60/800, 163 和 2006 年 9 月 14 日申请的 60/844, 352，在此将每篇的公开内容以其整体引入作为参考）。可以将抗癌剂（例如，化疗剂，小分子，基因或反义或 siRNA 等）与还包括成像剂的阳离子免疫脂质体相连，或将其在根据本发明的不同免疫脂

质体中,或通过另一个载体或传送系统(例如,按照正常临床标准的化疗剂 IV 注射)来分开传送。

[0070] 在合适的实施方案中,本发明的方法包括在不同的时间给药包括成像剂(例如, MRI 成像剂,如钆喷葡胺)的免疫脂质体复合物和抗癌剂(即,可以同时或在不同的时间给予复合物和试剂)。合适地,在包括成像剂的免疫脂质体复合物之前或之后给药抗癌剂,(例如,给药阳离子免疫脂质体复合物至少 1 小时之前或之后,至少 6 小时之前或之后,至少 12 小时之前或之后,至少 24 小时之前或之后,至少 48 小时之前或之后等)。在进一步的实施方案中,使癌症患者的肿瘤组织成像并治疗癌症组织的方法进一步包括给患者给予放疗。

[0071] 根据本发明中所含的以及本领域容易获得的信息,本领域技术人员可以容易地确定人体中合适的抗癌剂(例如,化疗剂,基因,小分子,蛋白质,肽,反义寡核苷酸或 siRNA 等)剂量和给药时间。此外,通过对动物例如小鼠,大鼠,狗进行的实验或其他研究的推断来估算这样的含量。

[0072] 使用本发明的纳米免疫脂质体复合物(scL 和 scL-HoKC)来包裹和传送成像剂的示例益处包括由于复合物的肿瘤靶向性质在癌组织中引起的较高浓度。由于复合物在癌细胞中累积,因此从癌特异性成像存在血管流动并扩散至胞间隙的差异(如使用目前临床中使用的非复合游离成像剂所看到的)。还存在癌对良性过程的差异增强。较长的血管和组织半衰期允许使用本发明复合物的延迟成像。复合物和方法可以用来使不同深度的目标组织成像。

[0073] 因此,本发明的方法和复合物不仅导致肿瘤中提高的信号,而且导致肿瘤内部结构更高的清晰度。更具体地,可以检测较小的肿瘤,使得能更早得到检测并因此提高应答/存活。这些复合物还可以用来区分良性和恶性结节。这帮助促进决定什么时候开始治疗。目前,由于不确定是恶性的或不是恶性的,通常延迟确定结节是否增大。然而,由于本发明的复合物优选并特异性地转染肿瘤细胞,这还可以作为恶性肿瘤的证实,例如,在肺 CT 上看到的小结节是否是小的恶性肿瘤。这最后两点在肺癌和胰腺癌中是特别重要的。

[0074] 通过使用本发明的含成像剂的复合物可以解决成像问题的癌症类型实例包括,胰腺癌,早期检测并与慢性胰腺炎区分开来;早期检测肺部的转移性疾病;孤立性肺部结节区分为良性或恶性;乳腺中提高的 MR 增强的小焦点区域区分为良性或恶性。

[0075] 本发明的复合物还可以用来证实:使用该传送系统,治疗剂将更可能进入患者特定的癌细胞。即,含成像剂的复合物能够进入细胞的事实,提供了与本发明的复合物相连的治疗剂或其他试剂的传送也将进入这些特定癌细胞的迹象。

[0076] 本领域技术人员将容易地得知可以形成在此所述的方法和应用的其他合适的修饰和改进,而没有脱离本发明的范围或其任何的实施方案。已经详细地描述了本发明,通过参照以下的实施例将更清楚地理解,在此包括这些实施例只是用于说明的目的,并不是用来限制本发明。

[0077] 具体实施方案

[0078] 实施例 1

[0079] 包括 Magnevist®的免疫脂质体复合物

[0080] 材料和方法

[0081] 细胞系

[0082] 从 Lombardi Comprehensive Cancer Tissue Culture 核心机构获得人淋巴细胞性白血病细胞系 K562。将这些悬浮细胞维持于补充 10% 热灭活 FBS 加 2mM L- 谷氨酰胺, 青霉素, 链霉素和新霉素各 50 μ g/ml 的 RPMI1640 中。从胰腺的转移性腺癌产生人胰腺癌细胞系 CaPan-1 (从 ATCC Manassas, VA 获得)。将其维持于含有 4mM L- 谷氨酰胺和碳酸氢钠, 补充 20% 非热灭活的 FBS, 2mM L- 谷氨酰胺和青霉素, 链霉素和新霉素各 50 μ g/ml 的 Iscov's Modified Dulbecco's Medium 中。最初从广泛转移性前列腺癌患者的脑损伤中产生人前列腺癌细胞系 DU145 (ATCC, Manassas, VA)。将其维持于补充 10% 热灭活的 FBS 加 L- 谷氨酰胺和如上所述的抗体的含有 Earle's 盐的最小必需培养基 (EMEM)。

[0083] 纳米复合物形成

[0084] 按照之前所述的乙醇注射方法制备阳离子脂质体 (DOTAP:DOPE) (参见 U. S. 公开专利申请系列 No. 2003/0044407; Xu L 等, *Molecular Cancer Therapeutics* 1: 337-346 (2002), 将每篇的公开内容引入作为参考)。传送质粒 DNA 时, 以之前所述的相同方式形成完整的复合物 (参见 U. S. 公开专利申请系列 No. 2003/0044407)。为了包裹用于体外使用的成像剂, 将 TfRscFv 以特定的比例与脂质体混合, 并在室温孵育 10 分钟。将 Magnevist® 加入该溶液中, 混合并再次在室温孵育 10 分钟。存储在 2-8°C 时, 复合物至少稳定 8 天, 如使用 Malvern Zetasizer 3000H 通过尺寸测量所确定的。随着该时间框架测量的累积量 (Z 平均) 平均是 112.3 ± 4.67 (S. E.), 而多分散性 (表示重复扫描过程中的值的再现性) 是 0.445 ± 0.03 。纳米复合物的可接受尺寸范围是约 20 至 1000nm, 合适地为约 50 至 700nm, 更合适地约 100 至 500nm。对于体外转染, 在转染之前, 将 2ml 无血清培养基加入复合物中。对于体内使用, 使用上述方法以 1mg 成像剂比 0.33-1.17 μ g TfRscFv 比 10-35 μ g 脂质体的比例形成复合物 (合适地 1mg 成像剂比 0.5 至 1.0 μ g TfRscFv 比 14-28 μ g 脂质体, 最合适地 1mg 成像剂比 0.71 μ g TfRscFv 比 21 μ g 脂质体)。用于体内使用而制备时, 加入葡萄糖至 5% 的终浓度。

[0085] 体外转染

[0086] 为了转染悬浮细胞 K562, 将使用除了血清的所有补充物的 4.0ml 总体积培养基中的 15×10^6 细胞置于 100mm² 组织培养皿中。将 2ml 含有不同含量的 Magnevist® 的上述转染溶液加入细胞悬浮液中。将平板在 37°C 孵育, 轻柔摇晃, 持续结果部分中给出的时间长度 (高达 90 分钟), 此后将细胞在 4°C 在 0.5ml 微量离心管中温和沉淀 (600 \times g 7 分钟), 并用 10ml 无血清培养基洗涤三次来除去任何过量的转染溶液并置于湿冰上直至成像。

[0087] 体内肿瘤靶向

[0088] 为了测定 TfRscFv-Lip 纳米复合物对原发性和转移性肿瘤的肿瘤选择性靶向, 使用了原位转移模型, 该模型使用了人胰腺癌细胞系 CaPan-1。通过注射悬浮于 Matrigel™ 胶原基底膜基质 (BD Biosciences) 中的 1×10^7 CaPan-1 细胞诱导雌性无胸腺小鼠中的 CaPan-1 的皮下异种移植肿瘤。大约八周后, 收集肿瘤并制备肿瘤的单细胞悬浮液。将同样悬浮于 Matrigel™ 中的 $1.2-1.5 \times 10^7$ 细胞注射至雌性无胸腺小鼠外科手术暴露的胰腺中。手术后五周, 将携带 LacZ 基因的复合物在 24hr 内静脉注射 3X (40 μ g DNA/注射)。60 小时后, 将动物处死并使用之前所述的方法检查转移的存在和对于 β -半乳糖苷酶表达染色的器官 (Xu, L 等, *Human Gene Therapy* 10:2941-2952 (1999))。

[0089] MRI 成像

[0090] 对于体外 MRI 成像,将微量离心管中的细胞沉淀置于磁铁的中心。在霍华德大学使用 4.7T 水平孔 NMR 机器 (Varian Inc, Palo Alto, CA) 进行 MR 成像。成像实验方案包括多薄片 T1- 加权自旋回声成像序列和饱和回收序列。对于 T1- 加权成像技术,重复时间 (TR) 为 1000ms,回声时间 (TE) 为 13ms。应用 T1- 加权自旋回声成像技术来证实正向成像增强。将使用不同回声时间的饱和 - 回收 MR 次序用于 T1 测量。图像的切片厚度为 0.5mm。所用的 RF 卷是 30mm 单环卷。RF 卷用作 RF 发射器和接受器。RF 脉冲是选择性的 5ms sinc 脉冲。相编码步骤的数量是 256。视场是 15mm×15mm。研究中选择的影像区位于 RF 卷的中心,用于 RF 均匀性。在微量离心管的截面方向获取 MR 图像。细胞沉淀的高度是 12mm。多切片图像的范围覆盖整个沉淀物。将中心切片的图像用于研究,该图像没有受到由于从空气 - 沉淀边界的灵敏度影响引起的图像变形的影响。使用 Varian 图像预览软件测量图像强度。从目标区域获取信号,其足够大来覆盖取自每个微量离心管的三分之二图像。将来自这些管的沉淀的相对图像强度用于反差增强评价和 T1 测量。

[0091] 对于体内研究,使用带有 CaPan-1 原位肿瘤或 DU145 皮下异种移植肿瘤的小鼠。如上所述诱导 CaPan-1 肿瘤。通过皮下接种 Matrigel 中的 7×10^6 细胞来诱导 DU145 肿瘤。在乔治敦大学进行这些研究。麻醉待成像的动物并置于专有的室内设计的动物管理系统。该系统引入温水加热系统,将温度维持于 37°C,以及四通道热光学监控系统,用来监控动物的皮肤温度,环境温度和装置的壁温。为了成像,使用 4% 异氟烷诱导麻醉,剩余的气体由 66% 氧和 30% 一氧化二氮混合构成。使用 1.5% 异氟烷在所述的相似氧和一氧化二氮的气体条件下获得麻醉的维持。将麻醉的动物置于圆柱状可变放射频率共振天线内部 (鸟笼共振器体积型线圈) 并调谐至大约 300MHz 的中心频率 (水分子接受 7 特斯拉场强时的共振频率)。所用的成像实验方案是在 7T BrukerBioSpin (Germany/USA) 成像控制台上进行的 T1 加权 Turbo RARE (快速获取快速增强) 三维成像序列。所用的成像参数是: T1 加权 Turbo-RARE 3D (3-维), TE 13.3ms, TR 229.5, Flipback on, 具有 8.0/3.5/3.5cm 的视场和 $256 \times 256 \times 256$ 矩阵的 4 个回声波。获取基线图像后,将动物保持固定于动物支架中并使用 27G 针通过静脉内注射至动物的尾静脉中来全身给药 Magnevist [®] (用 1x 磷酸盐缓冲的盐水 pH = 7.4 稀释至 400 μ l) 或含有 Magnevist [®] 的免疫脂质体复合物 (TfRscFv-Lip-Mag) (总体积 400 μ l) 并立即开始 3-D 成像序列。在连续天数进行使用两种溶液的成像。

[0092] 扫描电子显微镜术 (SEM)

[0093] 在 GUMC 制备脂质体包裹的 Magnevist [®] 造影剂的样本溶液,和由覆盖脂质体包裹的复合物的肿瘤靶向单链转铁蛋白受体蛋白构成的完整纳米复合物, TfRscFv-Lip-Mag, 传送至 NIST 并在黑暗冷藏下存储。对于每个成像部分,用去离子水制备 1 : 3 体积的新鲜稀释液并将 5 μ l 小滴微量注射至由 30-60nm 聚醋酸甲基乙烯酯和 15-20nm 碳构成的标准 200- 目 TEM 网络上。在装载于显微镜的真空室之前使小滴在网络上空气干燥 5 分钟。在 NIST 使用 Hitachi S-4800 场发射显微镜进行成像。特别有有趣的是 SEM 应用于 NDA 成像是上侧和下侧二次电子检测仪 [SE (U) 和 SE (L)] -- 使用常规模式的 SEM -- 与添加发射电子 (TE) 检测仪的比较,将设备转化成低电压 STEM。

[0094] 扫描探针显微镜术 (SPM)

[0095] 在 GUMC 制备脂质体包裹的 Magnevist [®] 造影剂的样本溶液,和完整纳米复合物,

传送至 NIST 并在黑暗冷藏下存储。对于每个成像部分,用去离子水制备 1 : 3 体积的新鲜稀释液并将 5 μ l 小滴微量注射至超声波清洗的硅基质上,使用天然氧化物或聚 L 赖氨酸涂布该基质。使用具有 Nanoscope IV 控制仪的 Veeco MultiMode 显微镜获得 SPM 成像。以生活模式进行通过带有 Z 控制的敲击模式 (Veeco RTESP 悬臂, ~ 320 – 360 kHz 和 $k \sim 20$ – 60 N/m) 的地形学、相成像和使用磁覆盖的尖端的磁力显微镜 (Veeco MESP 68kHz)。随着溶液蒸发来暴露分离的纳米颗粒和聚集物的去湿和表面能量“相分离”的动态成像用来理解溶剂干燥对颗粒稳定性的结果及其对使用 SPM 系统可获得的各种 SPM 造影机理的影响。

[0096] 结果

[0097] 通过携带报告基因的配体 - 脂质体纳米复合物的肿瘤特异性靶向

[0098] 为了评估 TfRscFv-LipA 纳米复合物对原发性肿瘤和转移瘤的选择性靶向,使用原位转移模型,临床情况的接近近似法,使用人 PanCa 细胞系 CaPan-1。将 CaPan-1 异种移植肿瘤部分外科原位植入裸鼠中已经显示出在 56 天内肝脏和脾脏中产生了转移 (Alisauskus, R. 等, *Cancer Research* 55 :5743a-5748s(1995))。按照方法中所述的在雌性无胸腺裸鼠中诱导 CaPan-1 的原位肿瘤。大约 5 周后,使动物安乐死并尸检来寻找胰腺和其他器官中的肿瘤。如图 1A 中所示的,在整个胰腺中广泛的肿瘤生长是明显的。1A 中剪头所示的肝脏中的相同肿瘤结节呈现出 1B 中强烈的 β -半乳糖苷酶表达。1A = 尸检; 1A = β -半乳糖苷酶染色后的组织。五只小鼠中的四只的各种器官中存在转移瘤,包括脾脏,肝脏,肺,肾上腺,甚至在隔膜内。重复该实验,获得相似的结果。

[0099] 为了建立选择性靶向肿瘤和转移瘤,在处死小鼠之前,将携带用于 β -半乳糖苷酶表达的 ρ SVb(LacZ) 质粒 DNA 的 TfRscFv-LipA 复合物静脉注射至小鼠中,在 24 小时内三次 (每次注射 40 μ g 质粒 DNA)。注射后 60 小时将全部五只小鼠处死并收集各种器官,包括肝脏,肺,脾脏和隔膜,检测转移瘤和肿瘤特异性染色质的存在。用 X-gal 将切成 1mm 厚度的新鲜样本染色以在表达基因的地方产生蓝色。通过该动物各种器官中的报告基因的存在证明了复合物的肿瘤靶向能力和高转染效率 (图 1B)。在肝脏,肺,肾上腺和隔膜中,清楚地显示了报告基因只在转移瘤中高度表达,尽管在邻近正常组织中没有明显的蓝色。图 1A 肝脏中可见的转移瘤 (箭头) 是图 1B 中强烈表达 β -半乳糖苷酶的同肿瘤结节 (箭头),证实了该纳米复合物的肿瘤特异性性质。在一些小鼠中,胰腺中肿瘤的生长还导致了用于植入的整个最初切口部分的肿瘤突出。在图 1B 中,还显示了由正常非染色皮肤围绕的该强烈蓝色染色的皮下肿瘤,再次显示了肿瘤细胞特异性。在剩余的小鼠和重复的实验中观察到相似的结果,因此,这全身给药的纳米复合物将靶向原发性和转移性的肿瘤细胞,不管它们是在体内何处产生,都能有效地传送质粒 DNA。我们希望扩展该传送系统的潜能来包括造影剂。这种能力将导致提高的成像和癌症检测。

[0100] 使用 TfRscFv-Lip 复合物传送 Magnevist $\text{\textcircled{R}}$ 的体外研究

[0101] 因为 Magnevist $\text{\textcircled{R}}$ 是临床中最常用的造影剂之一,因此选择用于这些研究中。在这些最初的实验中,检测复合物是否能用 Magnevist $\text{\textcircled{R}}$ 制备以及这样做是否可以提高 MRI 信号。因为胰蛋白酶处理将导致膜损坏和造影剂从细胞中漏出,因此在这些研究中没有使用附着细胞。替代的是,使用了人淋巴细胞性白血病细胞系, K562, 其作为悬浮培养物生长。此外,在成像之前细胞的柔和沉淀和洗涤将除去任何过量的 Magnevist $\text{\textcircled{R}}$ 或复合物,使得只检测与细胞相关的信号。

[0102] 1. 通过 TfRscFv-Lip-Mag 纳米复合物的时间依赖性成像提高

[0103] 检测了 TfRscFv-Lip-Magnevist [®] 纳米复合物转染的最佳时间。建议的 Magnevist [®] 临床剂量为 0.1mMole/kg。在这些最初的研究中,使用了每 250 μ l 转染溶液 0.3mMole/kg 的复合物剂量(对小鼠对人的较小体重和血液体积校正)。将 K562 细胞转染 20 至 90 分钟的时间。基于成像强度,二十分钟显示了非常低的转染活性。然而,如图 2A 中所示的,六十分钟时,用复合物转染的细胞显示出强度的大量提高,与未处理的细胞相比较。未处理细胞的强度 (202 ± 48) 与空标记管 (194 ± 43) 的没有显著差异,表明细胞自身没有引起检测到的信号。更重要地,在大约 60 分钟时转染效率出现了平稳状态,因为细胞转染 60 和 90 分钟的相对强度是相同的(各自为 317 ± 46 和 317 ± 47)。

[0104] 2. Magnevist [®] 剂量依赖性成像提高

[0105] 使用 60 分钟作为转染时间,然后测定了递增含量的 Magnevist [®] 对 TfRscFv-Lip-Mag 复合物成像提高的影响。测试的剂量为 0.05,0.3 和 0.9mMole/kg。对小鼠的大小和血液体积进行校正,每 250 μ l 转染溶液的复合物中使用的 Magnevist [®] 体积为 0.25 μ l,1.5 μ l 和 4.5 μ l。如图 2B 和表 1 中所示的,作为复合物中包括的造影剂含量的函数,图像强度提高且 T1 张弛时间缩短。

[0106] 表 1:作为免疫脂质体复合物中 Magnevist [®] 函数的相对强度和 T1 张弛时间

[0107]

造影剂的剂量 (mM/kg)	相对强度	T1 (秒)
0.05(0.25 μ l)	293 ± 50	1.43 ± 0.007
0.3(1.5 μ l)	379 ± 43	1.16 ± 0.004
0.9(4.5 μ l)	454 ± 51	1.01 ± 0.004

[0108] 3. 与游离 Magnevist [®] 相比较 TfRscFv-Lip-Mag 的成像提高

[0109] 基于上述实验,显示了 TfRscFv-脂质体可以与 Magnevist [®] 复合并将其传送至细胞用于图像增强。为了测定复合的造影剂与单独试剂相比较的增强水平和证明所获得的信号不是由于未引入的 Magnevist [®] 的存在所引起的,用游离 Magnevist [®] 或 TfRscFv-Lip-Mag 纳米复合物处理 K562 细胞。对于两种溶液,使用相同含量的造影剂(0.3 μ M/kg 或 1.5 μ l/250 μ l 转染体积)和转染时间(60 分钟)。尽管如所预期的,游离的 Magnevist [®] 相对于未处理的细胞显示出提高的反差,用 TfRscFv-Lip-Mag 复合物处理的细胞证明了与未处理的和游离 Magnevist [®] 处理的细胞相比较图像强度更大的提高并缩短了 Ti 张弛时间(图 2C,表 2)。这些结果不仅证明了通过靶向纳米复合物提高的造影剂摄入效率,而且表明所观察到的信号很可能不是由未复合的 Magnevist [®] 引起的。

[0110] 表 2:游离和免疫脂质体复合的 Magnevist [®] 之间的相对强度和 T1 张弛时间的比较

[0111]

处理	相对强度	T1 (秒)
未处理	455 ± 47	1.80 ± 0.009
游离 Magnevist [®]	538 ± 50	1.51 ± 0.007
免疫脂质体复合的 Magnevist [®]	662 ± 52	1.40 ± 0.004

[0112] 使用 TfRscFv-Lip-Mag 的体内图像增强

[0113] 以上的研究确定了纳米复合物体外成像肿瘤细胞比 Magnevist[®] 单独更有效。然而,为了具有临床使用的可能,复合物必须在体内呈现出相似的效果。将相同的人胰腺癌原位小鼠模型 (CaPan-1) 用于这些研究,和以上的一样来证明携带报告基因的复合物的肿瘤特异性靶向。此外,还使用了第二种肿瘤模型,皮下前列腺异种移植小鼠模型 (DU145)。按照“方法”部分所述在 7T Bruker NMR 上使带有 CaPan-1 或 DU145 肿瘤的小鼠成像。一旦置于线圈中,使用 T1 加权 Turbo RARE (快速获取快速增强) 三维成像序列获得基线图像。为了促进图像对比,基线获取后,将动物维持于动物支架中,同时通过静脉内注射给药成像溶液。在注射三分钟内开始信号获取。给药于小鼠的游离 (和临床中进行的一样) 或包括于复合物中的 Magnevist[®] 含量为 10 μ L。该含量等于 0.2mM/kg 或人体中所用的两倍。选择该含量是因为标准的 0.1mM/Kg Magnevist[®] 单独人剂量在小鼠中获得了非常差的信号。在连续两天进行游离 Magnevist[®] 和 TfRscFv-Lip-Mag 复合物的成像。还在给药纳米复合物之前进行了基线扫描来证实前一天的所有 Magnevist[®] 已经排出。两组图像之间的 MR 技术和窗口是一致的,调节窗口以对于扫描仪的自动化窗口特征来校正。

[0114] 图 3A-I 中显示了三个独立小鼠中 Magnevist[®] 和纳米复合物 -Mag 的图像。图 3A, 3D 和 3G 中,外科植入 CaPan-1 肿瘤细胞后四个月,动物携带大的原位肿瘤。与单独造影剂相比较,提高的分辨率和信号强度非常明显。在带有 CaPan-1 肿瘤的第二种小鼠中观察到相似的结果,显示于图 3B, 3E 和 3H 中。手术后只有两个月的该动物在整个切口部位具有明显的皮下肿瘤生长。通过触诊还检查到小的异常肿块。不仅是给药复合的 Magnevist[®] 后皮下肿瘤的信号更强,而且在该扫描中,显示出小的原位肿瘤 (箭头) 是明显的,而接受 Magnevist[®] 的动物中却不是这样。相似地,与游离 Magnevist[®] 相比较,注射 TfRscFv-Lip-Mag 复合物后,皮下 DU145 肿瘤中提高的清晰度和反差是明显的 (图 3C, 3F 和 3I)。在表示两个不同肿瘤模型胰腺癌 (CaPan-1) 和前列腺癌 (DU145) 的图 3B, 3E 和 3H 以及 3C, 3F 和 3I 中的图像上进行重建和定量。在两种情况中,如所预期的,游离 Magnevist[®] 存在超过基线增加的强度 (像素)。然而,成像剂通过肿瘤靶向纳米复合物的传送导致这两个肿瘤模型中信号强度几乎再三倍的增强。因此这些研究证明了将 Magnevist[®] 掺入 TfRscFv- 脂质体复合物中时,在体内情况中存在提高的肿瘤可视性,它们表明进一步研发这种肿瘤检测方法用于临床使用的潜在用处。

[0115] 物理表征研究

[0116] 尽管体外研究给予了将复合 Magnevist[®] 包裹于脂质体内的证据,而复杂的显微镜技术 (SEM 和 SPM) 已经证实了 TfRscFv-Lip-Mag 的这一和更多的特征 (例如,复合物尺寸)。

[0117] 1. 没有 Magnevist[®] 的脂质体的成像

[0118] 高分辨率成像意味着窄的景深,并因此需要相对薄而平的样本。薄的程度根据技术而改变,但是表面和基底效应 -- 表面能量和对称降低 -- 通常主导了生物材料典型的结构力。这在脂质体的情况下尤其如此,给予了它们的纤细特性 (Foo, J. J 等, *Annals of Biomedical Engineering* 31:1279-1286 (2003))。因此理解用于制备和表征分离脂质体的二维和机械稳定性的可靠方法是一个必需的步骤。该表征的目的是进行纳米颗粒的机械硬度和磁性特征的直接检测,以确定造影剂是否真正地包含于纳米颗粒内而并不是与脂质体

简单地在外部相连。

[0119] 通过以敲击模式振动尖端和与其连接的悬臂的 SPM 图像表面地形与悬臂共振频率接近。反馈回路以恒定的振幅维持悬臂的振动。以设定值给出该恒定的振幅,其稍小于自由摆动的悬臂。因为 SPM 尖端通过各种小力与表面相互作用,在悬臂激发和表面上给定点的应答之间存在相移。对于不均匀的表面,尖端-表面相互作用将根据例如表面电荷,陡峭地形变化和机械硬度变化而改变。通过改变设定值和观察特定的特征怎样应答更柔软或更坚硬的敲击,我们可以将这与对特定结构如脂质体预期的应答相关联。(自由的振幅信号大约为 1.78V)。图 4A-C 中示出了的一对没有有效载荷的分离脂质体的 SPM 相图的序列。图 4A 是在 1.68V 的设定值成像的并且基质和脂质体之间的相应负相差异表示尖端-样本相互作用对于脂质体吸引,以 -3.5 度的相值给出。在吸引相互作用和负相的情况中,脂质体的相图显示出暗色的,除了在脂质体边缘的地形上关键的环。图 4B 证明了将设定值降至 1.45V 的效果:脂质体现在显示出是亮色的,因为尖端-样本相互作用变成排斥了,并且在该情况中,脂质体和基质之间的相差是 +8 度。最后,图 4C 显示出在 1.35V 的设定值记录的相差进一步提高,变成 +35 度。

[0120] 2. 脂质体包裹的 Magnevist[®] 的成像

[0121] 图 5A-C 表示分离的脂质体包裹的 Magnevist (Lip+Mag) 纳米颗粒的 SPM 和 SEM 图像。单个 Lip+Mag 颗粒的尺寸分布是 100-200nm 直径并且根据光学测定的分级表明包裹有效载荷的脂质体大约比球状的单独脂质体大 50%。

[0122] 图 5A 中显示的 SPM 地形表明含有 Magnevist[®] 的脂质体在干燥后具有双峰表面形状,比不含有有效载荷的脂质体的简单椭圆表面的(未显示)更复杂。SPM 相行为与无有效载荷的脂质体显著不同,外环相对于中心是排斥的,图 5B 中显示了相应的 SPM 相图。吸引和排斥的尖端-样本相互作用的部分在中等设定值出现。1.6 设定值处获得的 SPM 相图和 TE 模式中的 SEM 图之间的相关性在图 5B 和 5C 中是明显的。SEM 图中脂质体在整个颗粒显示出均匀的亮度(未显示),与我们通过 SPM 获得的均匀相图相似。尖端和悬臂随时间和用途改变。此外,重要的是证实产生的图像没有受到由于尖端上的外源材料引起的尖端不稳定性的影响。因此,将它们频繁改变。由于每个悬臂对于其共振特性稍有不同,因此图 4 和 5 中所用的设定值不同。

[0123] 3. TfRscFv-Lip-Mag 纳米复合物的成像

[0124] 按照方法中所述的制备完整的 TfRscFv-Lip-Mag 纳米复合物并通过 SEM 和 SPM 成像。图 6A 和 6B 中所示的结果表明溶剂膜经受了相分离;然而,可以在干燥的膜上容易地观察到分离 NDS 的实例。注意到 SEM 束清楚地引起膜的一些损坏,但是可以在束损坏变得明显之前将颗粒重复扫描几次。完整复合物的外观不同于只有 (Lip+Mag) 的情况。形状不太规则,并且干燥后脂质体表面显著的组织化与蛋白质变性相一致。此外,SEM TE 图像表明脂质体的外环与中心之间清晰的界限,而 (Lip+Mag) 颗粒看到的不太明显,并且形状变化更大。这与脂质体内蛋白质的存在改变了膜干燥过程中穿过脂质体的渗透外流物的观点相一致。

[0125] 使用 SPM(MFM) 的磁力显微成像能力可以获得关于这些 NDS 颗粒的其他信息。因为含钆 Magnevist[®] 的磁矩非常大,应当可以使用磁化的 SPM 尖端来与脂质体内浓缩的定向 Magnevist[®] 相互作用。对于几个大约 10-200nm 直径纳米颗粒的 MFM,显示于图 7A 和

7B 中。使用 SPM 的上升模式能力,确定了产生的图像在本质上确实是磁性的。在该模式中,获得了正常敲击模式条件下的地形图。然后使用参照表面信息将尖端偏移远离表面的特定高度,然后在该提高的高度扫描表面。这除去了地形对信号的影响。通过磁相图像给出了离开表面 15nm 或更高高度处以升高模式获得的 MFM 图像。信号的出现证实了复合物内包裹的钆的存在。图 7A 是完整的 TfRscFv-Lip-Mag 纳米复合物的 SPM 地形 / 磁相图像。图 7B 中由吸引和排斥平面磁相互作用构成的双偶极子样信号的出现表明该相互作用的诱因是 NDS 内 Magnevist [®] 的不均匀环形分布,与 SEM 和非磁 SPM 相图相一致。

[0126] 讨论

[0127] 在此所述的结果证明了我们可以包裹常用的 MR 成像剂 Magnevist [®] 并将其在体外或在原位动物模型中传送到肿瘤细胞,并且这样做产生了比用未复合的 Magnevist [®] 看到的更清晰而强烈的图像。

[0128] 如图 1 中所示,本发明的纳米复合物可以靶向转移性疾病,因此提高转移瘤的检测灵敏度。使用 SEM 和 SPM,证明了 TfRscFv- 脂质体复合物在包裹 Magnevist [®] 时维持了纳米尺寸(图 6 和 7 中显示了大约 100-200nm 的颗粒)。已经证明了含有有效载荷的脂质体的结构和机械特征显著不同于不含的那些,因此证实了脂质体确实包裹了 Magnevist [®]。通过复合物的 MFM 成像进一步证实了这一点。

[0129] 不希望受到以下理论的束缚,(Lip+Mag) 内部结构的尝试性解释是 SPM 地形图中的微小突出部分表示脂质体限定的相位分离,即,围绕颗粒外周密集的 Magnevist [®] - 脂质体环形分布的形成,在颗粒中心的水相优先。这种应答可能是由于几个重要的因素引起的:首先,根据 制造商, Magnevist [®] 溶液的特征是 pH ~ 6.5-8, 1,960 的摩尔渗透压浓度和 20°C 时 4.9 的粘度。Magnevist [®] 数据单中标注的该溶液分离的似是而非的化学基础:葡甲胺盐完全从复合物中分离出来,因此改变了局部渗透条件。外加与钆复合物和阳离子脂质体的电荷相互作用,这些相互作用可以提供强烈的驱动力,使脂质体内的高渗相分离。在稳定脂质体和提供溶液中的结构支持时,阳离子脂质体和 Magnevist [®] 溶液之间的电荷分布是有效的,并且在血流中是明显的。这种提高的结构支持对于这些研究有重要的益处,因为这允许大部分颗粒在膜干燥过程中保持完整,与使用只有脂质体的溶液观察到的大范围的分解相反。

[0130] 之前的实施例证明了本发明的免疫脂质体复合物中 MR 造影剂的成功包裹。通过复合物证明的超过常规传送的 Magnevist [®] 的图像增强表明该系统提高了通过 MRI 的癌症早期检测的能力。

[0131] 实施例 2

[0132] 不同细胞系中的成像比较

[0133] 图 8A-8H 显示了两个不同癌症模型中使用配体 -HK- 脂质体 -Mag 纳米复合物的提高 MR 成像。使用实施例 1 中所示的相同比例和方法制备该实施例中所用的纳米颗粒。在雌性无胸腺小鼠的下背部皮下注射人乳腺癌 MDA-MB-435(图 8E-8H) 或人前列腺癌细胞系(DU145)(图 8A-8D)。将游离的 Magnevist [®], 或 TfRscFv- 脂质体纳米复合物(scLip-Mag), 或包含 HoKc 肽和相同剂量 Magnevist [®] 的 TfRscFv-HK- 脂质体纳米复合物(scLip-HK-Mag) 连续分别三天静脉注射(通过尾静脉)注射至三只小鼠中。Magnevist [®] 的该含量是等于给药于人患者剂量的两倍。所有情况中给药的溶液总体积是 400 μ l。就

在给药两种纳米复合物之前进行基线扫描来证实来自前一天的所有 Magnevist® 已经排出。四组图像之间的 MR 技术和窗口是不变的, 调节窗口以对扫描仪的自动化窗口特征进行校正。图显示出带有皮下肿瘤的小鼠中 MRI 信号的差异, 其中在前列腺肿瘤 (DU145) (图 8A-8D) 和乳腺肿瘤 (435) (图 8E-8H) 中注射 scLip-Mag 后提高的清晰度和反差是明显的, 注射 scLip-HK-Mag 后甚至更明显。

[0134] 图 9A-9C 显示了 CaPan-1 皮下肿瘤和原位转移瘤模型通过 TfRscFv-HK- 脂质体-Mag 纳米复合物的肿瘤特异性靶向。按照实施例 1 的方法中所述的在雌性无胸腺小鼠中诱导皮下 CaPan-1 异种移植肿瘤。收集肿瘤并将 MATRIGEL® 中的单个细胞悬浮液注射至外科手术暴露的胰腺中。注射后八周, 将携带 Magnevist® 的含有或不含 HoKC(HK) 肽的 TfRscFv- 脂质体复合物连续两天注射至小鼠中。在所有情况中给药溶液的总体积为 400 μ l。就在给药纳米复合物之前进行基线扫描来证实来自前一天的所有 Magnevist® 已经排出。三组图像之间的 MR 技术和窗口是不变的, 调节窗口以对扫描仪的自动化窗口特征进行校正。与图 8A-8H 相似, 观察到皮下肿瘤 (白色箭头) 和转移性损害提高的成像分辨率, 如表 3 中所示的。

[0135] 表 3: 游离和复合的 Magnevist® 超出基线的强度增加

[0136]

样本	CaPan-1	DU145
	超过基线的%提高	
复合的 Magnevist®	99	215
游离的 Magnevist®	34.5	70

[0137] 实施例 3

[0138] 全身注射游离 (未复合的) 或 TfRscFv-Lip-Magnevist 后皮下 PANC-1 肿瘤的动态 MRI 扫描的比较

[0139] 进行以下实验来比较全身传送后肿瘤中游离 (未复合的) 和 TfRscFv-Lip-Mag 之间的摄入和排出的速率和水平。通过注射悬浮于 Matrigel™ 胶原基底膜基质 (BD Biosciences) 中的 2×10^7 PANC-1 细胞在雌性无胸腺小鼠中诱导 PANC-1 的皮下异种移植肿瘤。大约 2.5-3 周后, 将动物用于成像。按照之前所述的通过乙醇注射方法制备阳离子脂质体 (DOTAP:DOPE) (参见 U. S. 公开专利申请 No. 2003/0044407; Xu L 等, Molecular Cancer Therapeutics 1:337-346 (2002), 将其公开内容在此引入作为参考)。这些研究中所用的靶向部分是抗转铁蛋白受体单链抗体片段 (TfRscFv)。

[0140] 为了包裹成像剂, 将 TfRscFv 与脂质体以一定的比例混合并在室温孵育 1-30 分钟, 合适地 5-20 分钟, 最合适 10-12 分钟。将 Magnevist® 加入该溶液中, 混合并再次在室温孵育 1-30 分钟, 合适地 5-20 分钟, 最合适地 10-12 分钟。当制备用于体内使用时, 加入蔗糖或葡萄糖至 0.5-50% 的终浓度, 合适地 1-20%, 最合适地对于蔗糖为 10%, 对于葡萄糖为 5%, 并在室温孵育 1-30 分钟, 合适地 5-25 分钟, 最合适 15-20 分钟。使用上述的方法 1mg 成像剂比 0.33-1.17 μ g TfRscFv 比 10-35 μ g 脂质体的比例 (合适地 1mg 成像剂比 0.5-1.0 μ g TfRscFv 比 14-28 μ g 脂质体, 最合适 1mg 成像剂比 0.71 μ g TfRscFv 比 21 μ g

脂质体)形成复合物。可接受的复合物尺寸范围为约 20 至 1000nm,合适地约 50 至 700nm,最合适约 100 至 500nm。在此使用 4.7mgMagnevist,99 μ g 脂质体和 3.3 μ g TfRscFv,使用终浓度为 5%的葡萄糖形成复合物。

[0141] 将如上所诱导的带有 PANC-1 皮下肿瘤的小鼠麻醉并置于动物支架系统中。使用 4%异氟烷诱导麻醉,剩余气体包括 66%氧和 30%一氧化二氮混合物。在所述相似的氧和一氧化二氮的气体条件下使用 1.0 至 2.0% (优选 1.5%) 异氟烷获得麻醉的维持。将麻醉的动物置于圆柱状可变放射频率共振天线内部(鸟笼共振器体积型线圈)并调谐至大约 300MHz 的中心频率(水分子接受 7 特斯拉场强时的共振频率)。所用的成像实验方案是在 7T Bruker BioSpin(Germany/USA) 成像控制台上进行的 T1 加权 Turbo RARE(快速获取快速增强)二维成像序列。所用的成像参数是:T1 加权 2D(2-维),TE 10.21ms,TR 420.3,Flipbackoff,具有 5.12/5.12cm 视场的 8 个回声波。获取基线图像后,将动物保持固定于动物支架中并使用 27G 针通过静脉内注射至动物的尾静脉中来全身给药游离(未复合的) Magnevist $\text{\textcircled{R}}$ (Mag,或在此的 gad-d) 或含有相同含量 Mag 的 TfRscFv-Lip-Mag(总体积 50-1000 μ l,合适地 100-500 μ l,最合适 200-400 μ l) 并立即开始成像序列。在两小时内周期性地重复扫描(平均值 2,1.3 分钟),并测量和绘制像素强度。相同的小鼠用于游离和复合物的成像。在连续的天数里进行成像,首先使用游离的 Mag。

[0142] 如图 10 中所示的,与游离的成像剂相比较,静脉内注射复合物后,肿瘤中存在显著较高水平的信号。更重要地,在实验的时间过程中保持了该较高的水平。

[0143] 实施例 4

[0144] 通过 TfRscFv-Lip-HoKC-Magnevist 检测 CaPan-1 的肝转移

[0145] 进行以下实验来评估本发明的 TfRscFv-Lip-HoKC-Mag 复合物检测和提高转移性肿瘤的成像的能力。例如,检测了来自胰腺癌的转移瘤,然而,使用本发明的复合物和方法可以获得来自任何类型的癌症的转移瘤的成像(例如,前列腺,黑素瘤,肾,乳腺,胃,肝,卵巢,膀胱,头颈,脑,骨头和任何其他类型的实体肿瘤)。通过注射悬浮于 MatrigelTM 胶原基底膜基质(BD Biosciences)中的 0.5 至 1×10^7 CaPan-1 细胞在雌性无胸腺小鼠中诱导 CaPan-1 的皮下异种移植肿瘤。大约八周后,收集肿瘤并制备肿瘤的单细胞悬浮液。按照之前所述的将同样悬浮于 MatrigelTM 中的 $1.2-1.5 \times 10^7$ 细胞注射至雌性无胸腺小鼠外科手术暴露的胰腺中(Alisauskus, R., G. Y., 和 Gold, D. V., Initial studies of monoclonal antibody PAM4 targeting toxngrafted orthotopic pancreatic cancer(靶向异种移植的原位胰腺癌的单克隆抗体 PAM4 的初步研究), Cancer Research 55, 5743s-5748s(1995))。

[0146] 通过之前所述的乙醇注射方法制备阳离子脂质体(DOTAP:DOPE)(参见 U. S. 公开专利申请 No. 2003/0044407;Xu L 等, MolecularCancer Therapeutics 1:337-346(2002), 将其公开内容引入作为参考)。HoKC 肽 {K[K(H)KKK]5-K(H)KKC} (SEQ ID NO:1) 带有末端半胱氨酸以允许缀合马来酰亚胺基团。因此,使用 HoKC 肽时,脂质体制剂还包括总脂质的 0.1 至 50 摩尔百分比,更优选总脂质的 1-10 摩尔百分比,最优选总脂质的 5 摩尔百分比的 N-马来酰亚胺-苯基丁酸盐-DOPE(MPB-DOPE)。如前所述地制备 HoKC 脂质体(Yu, W 等, Enhancedtransfection efficiency of a systemically deliveredtumor-targeting immunolipoplex by inclusion of a pH-sensitivehistidylated oligolysine

peptide(通过包括 pH 敏感性组酰氨盐寡赖氨酸肽提高的全身传送的肿瘤靶向免疫 lipoplex 的转染率), Nucleic Acids Research 32, e48(2004))。这些研究中所用的靶向部分是抗转铁蛋白受体单链抗体片段 (TfRscFv)。

[0147] 为了包裹成像剂,将 TfRscFv 与脂质体以特定的比例混合并在室温孵育 1-30 分钟,合适地 5-20 分钟,最合适地 10-12 分钟。将 Magnevist[®] 加入该溶液中,混合并再次在室温孵育 1-30 分钟,合适地 5-20 分钟,最合适 10-12 分钟。当制备用于体内使用时,加入蔗糖或葡萄糖至 0.5-50% 的终浓度,合适地 1-20%,最合适地对于蔗糖为 10%,对于葡萄糖为 5%,并在室温孵育 1-30 分钟,合适地 5-25 分钟,最合适地 15-20 分钟。使用上述的方法 1mg 成像剂比 0.33-1.17 μ g TfRscFv 比 10-35 μ g 脂质体-HoKC 的比例(合适地 1mg 成像剂比 0.5-1.0 μ g TfRscFv 比 14-28 μ g 脂质体-HoKC,最合适 1mg 成像剂比 0.71 μ g TfRscFv 比 21 μ g 脂质体-HoKC) 形成复合物。可接受的复合物尺寸范围为约 20 至 1000nm,合适地约 50 至 700nm,最合适约 100 至 500nm。在此使用 4.7mg Magnevist,99 μ g 脂质体和 3.3 μ g TfRscFv,使用终浓度为 5% 的葡萄糖形成复合物。

[0148] 将带有以上诱导的 CaPan-1 原位肿瘤的小鼠(大约外科手术植入肿瘤细胞后 12 周)麻醉并置于动物支架系统中。使用 4% 异氟烷诱导麻醉,剩余气体包括 66% 氧和 30% 一氧化二氮混合物。在所述相似的氧和一氧化二氮的气体条件下使用 1.0 至 2.0% (优选 1.5%) 异氟烷获得麻醉的维持。将麻醉的动物置于圆柱状可变放射频率共振天线内部(鸟笼共振器体积型线圈)并调谐至大约 300MHz 的中心频率(水分子接受 7 特斯拉场强时的共振频率)。所用的成像实验方案是在 7T Bruker BioSpin(Germany/USA) 成像控制台上进行的 T1 加权 Turbo RARE(快速获取快速增强)三维成像序列。所用的成像参数是:T1 加权 Turbo-RARE 3D(三维),TE 13.3ms,TR229.5ms,Flipback on,具有 8.0/3.5/3.5cm 视场和 256 \times 256 \times 256 矩阵的 4 个回声波。获取基线图像后,将动物保持固定于动物支架中并使用 27G 针通过静脉内注射至动物的尾静脉中来全身给药 TfRscFv-Lip-HoKC-Mag(总体积 50-1000 μ l,合适地 100-500 μ l,最合适 200-400 μ l) 并立即开始 3D 成像序列。

[0149] 成像后,将动物安乐死并目测转移瘤的存在。使用本领域普通技术人员公知的方法取出肝脏,固定于福尔马林中,石蜡包埋,切片并使用 H&E 染色。通过显微镜检查切片并拍摄观察到的转移瘤。

[0150] 图 11A-11A :图 11A :造影前。图 11B :TfRcFv-Lip-HoKC-Mag 注射,图 11C :组织学。原位胰腺癌显示了使用 TfRcFv-Lip-HoKC-Mag 的提高(短的白色箭头)。连接在较后面切片上的用短的白色箭头表示的两个区域并表示最初原位的肿瘤。与原发性肿瘤中看到的相同的模式观察到小的转移瘤(粗的白色箭头)提高。肝脏的薄扩展(长的细箭头)位于转移瘤的附近。尸检(未显示)和组织学(右侧图像)证实了转移瘤的存在(黑色箭头),转移瘤直接邻接肝脏的长薄扩展。注意到转移性肿瘤薄片之一的形状与 MRI 上的外观的相似性。

[0151] 实施例 5

[0152] 通过 TfRscFv-Lip-Magnevist 的提高了的肺转移瘤检测

[0153] 进行以下实验来证明与没有使用复合物给药成像剂时相比较,静脉内给药(或通过任何其他合适的途径,例如,但不限于,IT, ID, IM, IP) 本发明携带成像剂的复合物时可以增强转移瘤的检测。通过静脉内注射 1 至 10 \times 10⁴RenCa 细胞在雌性 Balb/C 小鼠中诱导肺

肿瘤。该方法导致几乎专门停留于动物肺部中的转移瘤,并因此作为任何将导致作为原发性疾病或作为转移瘤的肺肿瘤的癌症的动物模型系统。大约 2-4 周后,将动物用于成像。

[0154] 按照之前所述的通过乙醇注射方法制备阳离子脂质体 (DOTAP:DOPE) (参见 U. S. 公开专利申请 No. 2003/0044407; XuL 等, *Molecular Cancer Therapeutics* 1: 337-346 (2002), 将其公开内容在此引入作为参考)。这些研究中所用的靶向部分是抗转铁蛋白受体单链抗体片段 (TfRscFv)。

[0155] 为了包裹成像剂,将 TfRscFv 与脂质体以特定的比例混合并在室温孵育 1-30 分钟,合适地 5-20 分钟,最合适地 10-12 分钟。将 Magnevist[®] 加入该溶液中,混合并再次在室温孵育 1-30 分钟,合适地 5-20 分钟,最合适 10-12 分钟。当制备用于体内使用时,加入蔗糖或葡萄糖至 0.5-50% 的终浓度,合适地 1-20%,最合适地对于蔗糖为 10%,对于葡萄糖为 5%,并在室温孵育 1-30 分钟,合适地 5-25 分钟,最合适地 15-20 分钟。使用上述的方法以 1mg 成像剂比 0.33-1.17 μ g TfRscFv 比 10-35 μ g 脂质体的比例 (合适地 1mg 成像剂比 0.5 至 1.0 μ g TfRscFv 比 14-28 μ g 脂质体,最合适 1mg 成像剂比 0.71 μ g TfRscFv 比 21 μ g 脂质体) 形成复合物。可接受的复合物尺寸范围为约 20 至 1000nm,合适地约 50 至 700nm,最合适约 100 至 500nm。在此使用 4.7mg Magnevist, 99 μ g 脂质体和 3.3 μ g TfRscFv, 使用终浓度为 5% 的葡萄糖形成复合物。

[0156] 将带有以上诱导的肿瘤的小鼠麻醉并置于动物支架系统中。使用 4% 异氟烷诱导麻醉,剩余气体包括 66% 氧和 30% 一氧化二氮混合物。在所述相似的氧和一氧化二氮的气体条件下使用 1.0 至 2.0% (优选 1.5%) 异氟烷获得麻醉的维持。将麻醉的动物置于圆柱状可变放射频率共振天线内部 (鸟笼共振器体积型线圈) 并调谐至大约 300MHz 的中心频率 (水分子接受 7 特斯拉场强时的共振频率)。所用的成像实验方案是在 7T Bruker BioSpin (Germany/USA) 成像控制台上进行的 T1 加权二维 Turbo Multislice-Multiecho 成像序列。所用的成像参数是: T1 加权 2D (2-维), TE 10.21ms, TR400ms, Flipback off, 具有 3.84 \times 3.84cm 视场和 256 \times 256 矩阵的 8 个平均值。获取基线图像后,将动物保持固定于动物支架中并使用 27G 针通过静脉内注射至动物的尾静脉中来全身给药游离 (未复合的) Magnevist[®] (gad-d) 或含有相同含量 Mag 的 TfRscFv-Lip-Mag (总体积 50-1000 μ l, 合适地 100-500 μ l, 最合适 200-400 μ l) 并立即开始成像序列。测量和绘制图像的像素强度。相同的小鼠用于游离和复合物的成像。在连续的天数里进行成像。

[0157] 如图 12A-12E 中所示的,与游离成像剂相比较,静脉内注射复合物后,肿瘤中存在显著较高水平的信号。因此,与常用的给药游离成像剂的方法相比较,本发明的复合物还提高了肺部中相对大的转移瘤的检测。

[0158] 实施例 6

[0159] 通过 TfRscFv-Lip-Magnevist 提高的小的肺部转移瘤的检测

[0160] 进行以下的实验来证明静脉内给药 (或通过任何其他合适的途径,例如,但不限于,IT, ID, IM, IP) 本发明带有成像剂的复合物时可以检测给药没有使用复合物的成像剂时不能检测到的非常小的转移瘤。通过静脉内注射 1 至 10×10^4 RenCa 细胞在雌性 Balb/C 小鼠中诱导肺肿瘤。该方法导致几乎专门停留于动物肺部中的转移瘤,并因此作为任何将导致作为原发性疾病或作为转移瘤的肺肿瘤的癌症的动物模型系统。大约 7-9 天后,将动物用于成像。

[0161] 按照之前所述的通过乙醇注射方法制备阳离子脂质体 (DOTAP:DOPE) (参见 U. S. 公开专利申请 No. 2003/0044407; XuL 等, *Molecular Cancer Therapeutics* 1: 337-346 (2002), 将其公开内容在此引入作为参考)。这些研究中所用的靶向部分是抗转铁蛋白受体单链抗体片段 (TfRscFv)。

[0162] 为了包裹成像剂, 将 TfRscFv 与脂质体以特定的比例混合并在室温孵育 1-30 分钟, 合适地 5-20 分钟, 最合适地 10-12 分钟。将 Magnevist[®] 加入该溶液中, 混合并再次在室温孵育 1-30 分钟, 合适地 5-20 分钟, 最合适 10-12 分钟。当制备用于体内使用时, 加入蔗糖或葡萄糖至 0.5-50% 的终浓度, 合适地 1-20%, 最合适地对于蔗糖为 10%, 对于葡萄糖为 5%, 并在室温孵育 1-30 分钟, 合适地 5-25 分钟, 最合适地 15-20 分钟。使用上述的方法以 1mg 成像剂比 0.33-1.17 μ g TfRscFv 比 10-35 μ g 脂质体的比例 (合适地 1mg 成像剂比 0.5 至 1.0 μ g TfRscFv 比 14-28 μ g 脂质体, 最合适 1mg 成像剂比 0.71 μ g TfRscFv 比 21 μ g 脂质体) 形成复合物。可接受的复合物尺寸范围为约 20 至 1000nm, 合适地约 50 至 700nm, 最合适约 100 至 500nm。在此使用 4.7mg Magnevist, 99 μ g 脂质体和 3.3 μ g TfRscFv, 使用终浓度为 5% 的葡萄糖形成复合物。

[0163] 将带有以上诱导的肿瘤的小鼠麻醉并置于动物支架系统中。使用 4% 异氟烷诱导麻醉, 剩余气体包括 66% 氧和 30% 一氧化二氮混合物。在所述相似的氧和一氧化二氮的气体条件下使用 1.0 至 2.0% (优选 1.5%) 异氟烷获得麻醉的维持。将麻醉的动物置于圆柱状可变放射频率共振天线内部 (鸟笼共振器体积型线圈) 并调谐至大约 300MHz 的中心频率 (水分子接受 7 特斯拉场强时的共振频率)。所用的成像实验方案是在 7T Bruker BioSpin (Germany/USA) 成像控制台上进行的 T1 加权二维 Turbo Multislice-Multiecho 成像序列。所用的成像参数是: T1 加权 2D (2-维) 成像序列, TE 10.21ms, TR 572.99ms, Flipback off, 具有 2.56 \times 2.56cm 视场和 256 \times 256 矩阵的 8 个平均值。获取基线图像后, 将动物保持固定于动物支架中并使用 27G 针通过静脉内注射至动物的尾静脉中来全身给药游离 (未复合的) Magnevist[®] (gad-d) 或含有相同含量 Mag 的 TfRscFv-Lip-Mag 复合物 (总体积 50-1000 μ l, 合适地 100-500 μ l, 最合适 200-400 μ l) 并立即开始成像序列。测量和绘制图像的像素强度。相同的小鼠用于游离和复合物的成像。在连续的天数里进行成像。在该视场下, 5 个像素等于通过 CT 检测的大约 3mm 的人肿瘤。

[0164] 如图 13A-13D 中所示的, 注射复合物后但不是游离 gad-d 后可以检测 4 个像素的转移瘤 (下面的箭头) (对应于大约直径 0.4mm 的转移瘤)。此外, 与游离 gad-d 相比较, 在第二个略微大点的转移瘤 (上面的箭头) 中信号显著提高。因此, 与常用的给药游离成像剂的方法相比较, 本发明的复合物还提高了肺部中小转移瘤的检测。使用本发明的复合物还检测到大约 3 个像素的更小的转移瘤 (等于大约直径 0.3mm 的肿瘤), 但是使用游离 gad-d 没有检测到 (图 14A-14D)。

[0165] 使用和上面相同的肿瘤模型系统, 静脉内注射本发明的复合物后, 可以检测甚至更小尺寸的肿瘤。在此使用的成像参数也是 T1- 加权 2D (2-维) Multislice-Multiecho 成像序列, TE 10.21ms, TR = 630.8ms, Flipback off, 2.56 \times 2.56cm 视场和 256 \times 256 矩阵的 8 个平均值。如图 15A-15B 中所示的, 通过复合物可以检测 1-2 个像素的结节。在 MRI 扫描时观察到结节 N1 和 N2。因为它们非常小 (1-2 个像素) 以致不能确定它们是否实际上给出超过背景的信号, 使用 Image J 软件测量强度, 并测定两个结节的最小, 最大, 平均值和

标准偏差 (SD)。在统计学上,如果结节的最大值大于基础的最大值 + 基础的 2SD, 存在 95% 置信度结节不是噪音而是真实的。结节 2 明显在该 95% 置信度内, 而结节 1 就在极限, 因此通过复合物的增强很可能也是真实的肿瘤块。成像后, 使用本领域普通技术人员公知的标准程序取出该动物的肺, 固定于福尔马林, 石蜡包埋, 切片并使用 H&E 染色。通过显微镜检查切片, 并拍摄观察到的转移瘤。如图 16 (小功率, 2X) 和图 17 (大功率, 10X) 所示的, 如基于 MRI 所预期的, 在相同的肺叶和大概的位置发现大约 0.1mm 尺寸的两个转移瘤。在 MRI 图像上测量两个结节之间的距离并发现等于 ($\sim 600\text{nm}$) 基于组织学所测量的。因此, 这些非常小的组织学测定的肿瘤块实际上表示使用本发明的复合物根据 MRI 检测到的结节。在此发现对于肺转移瘤检测的灵敏度水平高于通常用 CT 看到的, CT 是检测肺原发性肿瘤和源自其他癌症类型的肺转移瘤的常用方法。显然这表示了出乎意料和令人惊讶的结果。

[0166] 实施例 7

[0167] 通过 TfRscFv-Lip-Magnevist 检测胸膜下的肺转移瘤

[0168] 使用以上实施例 6 中对图 13 和 14 所述的相同肿瘤模型系统和成像参数, 还可以检测图 18A-18F 中所示的肺胸膜下的转移瘤。这是出乎意料的和令人惊讶的, 因为使用目前实际上不能进入细胞的非复合试剂的 MRI 成像试剂不能检测该位置的转移瘤。这给早期检测和治疗肺癌和其他类型的癌症提供了重要的优势。

[0169] 实施例 8

[0170] 通过 TfRscFv-Lip-Magnevist 提高的黑素瘤肺转移的检测

[0171] 关于胸膜转移瘤的检测 / 治疗, 临床控制非常难以实现, 而且有益性的测量也是困难的。在此实施例中呈现的结果表明本发明的复合物可以到达并转染胸膜转移瘤并因此也可以用来治疗它们。此外, 本发明的复合物可以是用来测量这种或任何其他治疗的有效性的成像工具。

[0172] 进行以下的实验来证明静脉内 (或通过任何其他合适的途径, 例如但不限于 IT, ID, IM, IP) 给药本发明带有成像剂的复合物时可以检测不限于来自肾细胞癌的那些转移瘤。通过静脉内注射 0.1 至 5×10^5 B16/F10 小鼠黑素瘤细胞在雌性 C57/B16 小鼠中诱导肺肿瘤。该方法导致几乎专门停留于动物肺部中的转移瘤, 并因此作为任何将导致作为原发性疾病或作为转移瘤的肺肿瘤的癌症的动物模型系统。大约 2-4 周后, 将动物用于成像。

[0173] 按照之前所述的通过乙醇注射方法制备阳离子脂质体 (DOTAP:DOPE) (参见 U. S. 公开专利申请 No. 2003/0044407; XuL 等, Molecular Cancer Therapeutics 1: 337-346 (2002), 将其公开内容在此引入作为参考)。这些研究中所用的靶向部分是抗转铁蛋白受体单链抗体部分 (TfRscFv)。

[0174] 为了包裹成像剂, 将 TfRscFv 与脂质体以特定的比例混合并在室温孵育 1-30 分钟, 合适地 5-20 分钟, 最合适地 10-12 分钟。将 Magnevist [®] 加入该溶液中, 混合并再次在室温孵育 1-30 分钟, 合适地 5-20 分钟, 最合适地 10-12 分钟。当制备用于体内使用时, 加入蔗糖或葡萄糖至 0.5-50% 的终浓度, 合适地 1-20%, 最合适地对于蔗糖为 10%, 对于葡萄糖为 5%, 并在室温孵育 1-30 分钟, 合适地 5-25 分钟, 最合适地 15-20 分钟。使用上述方法以 1mg 成像剂比 0.33-1.17 μg TfRscFv 比 10-35 μg 脂质体的比例 (合适地 1mg 成像剂比 0.5 至 1.0 μg TfRscFv 比 14-28 μg 脂质体, 最合适 1mg 成像剂比 0.71 μg TfRscFv 比 21 μg 脂质体) 形成复合物。可接受的复合物尺寸范围为约 20 至 1000nm, 合适地约 50 至 700nm,

最合适约 100 至 500nm。在此使用 4.7mg Magnevist, 99 μ g 脂质体和 3.3 μ g TfRscFv, 使用终浓度为 5% 的葡萄糖形成复合物。

[0175] 将带有以上诱导的肿瘤的小鼠麻醉并置于动物支架系统中。使用 4% 异氟烷诱导麻醉, 剩余气体包括 66% 氧和 30% 一氧化二氮混合物。在所述相似的氧和一氧化二氮的气体条件下使用 1.0 至 2.0% (优选 1.5%) 异氟烷获得麻醉的维持。将麻醉的动物置于圆柱状可变放射频率共振天线内部 (鸟笼共振器体积型线圈) 并调谐至大约 300MHz 的中心频率 (水分子接受 7 特斯拉场强时的共振频率)。所用的成像实验方案是在 7T Bruker BioSpin (Germany/USA) 成像控制台上进行的 T1 加权二维 Turbo Multislice-Multiecho 成像序列。所用的成像参数是: T1 加权 Turbo-RARE 2D (2-维) 成像序列, TE 10.21ms, TR1418.13ms, Flipback off, 具有 3.84 \times 3.84cm 视场和 256 \times 256 矩阵的 8 个平均值。获取基线图像后, 将动物保持固定于动物支架中并使用 27G 针通过静脉内注射至动物的尾静脉中来全身给药游离 (未复合的) Magnevist $\text{\textcircled{R}}$ (gad-d) 或含有相同含量 Mag 的 TfRscFv-Lip-Mag 复合物 (总体积 50-1000 μ l, 合适地 100-500 μ l, 最合适 200-400 μ l) 并立即开始成像序列。测量图像的像素强度。将相同的小鼠用于游离和复合物的成像。在连续的天数里进行成像。

[0176] 如图 19A-19B 所示的, 注射复合的 Magnevist $\text{\textcircled{R}}$ 后在肺中检测到两个小的转移瘤 (箭头)。图像表示通过肺的两个不同切片。

[0177] 使用和以上一样的肿瘤模型系统 (B16/F10 黑素瘤) 和成像参数, 使用 Image J 软件中的动力曲线测量另一个动物中基线后, 游离 Magnevist $\text{\textcircled{R}}$ 后和 TfRscFv-Lip-Mag 后的转移瘤像素强度, 并将数值进行比较。如以下的表 4 所示的, 复合物显示出超过基线值的最大增强。标准偏差显示出复合物与基线值之间的差异是显著的, 而游离 Magnevist $\text{\textcircled{R}}$ 和基线之间的则不是。

[0178] 表 4 : B16/F10 肺转移瘤中的信号强度的比较

[0179]

处理	最大像素值	平均像素值	标准偏差
Baseline $\text{\textcircled{R}}$	12888	7765.1	1757.2
游离 Magnevist $\text{\textcircled{R}}$	17959	12979.3	2976.8
复合 Magnevist $\text{\textcircled{R}}$	22351	14341.3	2384.6

[0180] 参考文献

[0181] 1. Gillies, R.J., 等, Neoplasia (New York) 2 :139-451 (2000)

[0182] 2. Degani, H., 等, Thrombosis & Haemostasis 9 :25-33 (2003)

[0183] 3. Xu, L., 等, Human Gene Therapy 10 :2941-2952 (1999)

[0184] 4. Xu, L., 等, Tumor Targeting 4 :92-104 (1999)

[0185] 5. Xu, L., 等, Molecular Medicine 7 :723-734 (2001)

[0186] 6. Xu L, 等, Molecular Cancer Therapeutics 7 :337-346 (2002)

[0187] 7. Rait, A., 等, Molecular Medicine 5 :476-487 (2002)

[0188] 8. Rait, A., 等, Ann. NY. Acad. Sci. 1002 :1-12 (2003)

[0189] 9. Cristiano, R.J., 和 Curiel, D. T., Cancer Gene Therapy 5 :49-57 (1996)

- [0190] 10. Cheng, P. W. , Human Gene Therapy 7 :275-282(1996)
- [0191] 11. Keer, H. N. ,等, Journal of Urology 743 :381-385(1990)
- [0192] 12. Rossi, M. C. , 和 Zetter, B. R. , Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 89 : 6197-6201(1992)
- [0193] 13. Elliott, R. L. ,等, Ann. NY. Acad. Sc. 698 :159-166(1993)
- [0194] 14. Thorstensen, K. , 和 Romslo, I. , Scand. J. Clin. Lab. Investig. (Supp.) 275 : 113-120(1993)
- [0195] 15. Miyamoto, T. ,等, Intl. J. Oral Maxillofacial Surg. 23 :430-433(1994)
- [0196] 16. Ponka, P. 和 Lok, C. N. , Int' l J. Biochem. Cell Biol. 37 :1111-1137(1999)
- [0197] 17. Haynes, B. F. ,等, J. Immunol 727 :347-351(1981)
- [0198] 18. Batra, J. K. ,等, Molecular & Cellular Biology 77 :2200-2205(1991)
- [0199] 19. Jain, R. K. 和 Baxter, L. T. , Cancer Res. 48 :7022-1032(1988)
- [0200] 20. Wolfert, M. A. ,等, Human Gene Therapy 7 :2123-2133(1996)
- [0201] 21. Dunlap, D. D. ,等, Nucleic Acids Research 25 :3095-3101(1997)
- [0202] 22. Kawaura, C,等, FEBS Letters 421 :69-72(1998)
- [0203] 23. Choi, Y. H. ,等, Human Gene Therapy 10 :2657-2665(1999)
- [0204] 24. Diebel, C. E. ,等, Nature 406 :299-302(2000)
- [0205] 25. Rasa, M. ,等, J. Coll. Interface Sci 250 :303-315(2002)
- [0206] 26. Yu, W. ,等, Nucleic Acids Research, 32(5) :e48(2004)
- [0207] 27. Alisauskus, R. ,等, Cancer Research 55 :5743s-5748s(1995)
- [0208] 28. Foo, J. J. ,等, Annals of Biomedical Engineering 31 :1279-1286(2003)
- [0209] 29. Xu, L,等, Human Gene Therapy 73 :469-481(2002)
- [0210] 30. Freedman, M. , 等, SPIE Medical Imaging :Physiology andFunction from Multidimensional Images 4321 :163-167(2001)
- [0211] 31. Wisner, E. R. ,等, Inyestigative Radiology 37 :232-239(2002)
- [0212] 32. Winter, P. M. ,等, Circulation 108 :2270-2274(2003)
- [0213] 33. Morawski, A. M. ,等, Magnetic Resonance in Medicine 51 :480 ~ 486(2004)
- [0214] 本说明书中提及的所有出版物,专利和专利申请在此引入作为参考,至如同每个单独的出版物,专利或专利申请特意并单独表示引入参考的程度。

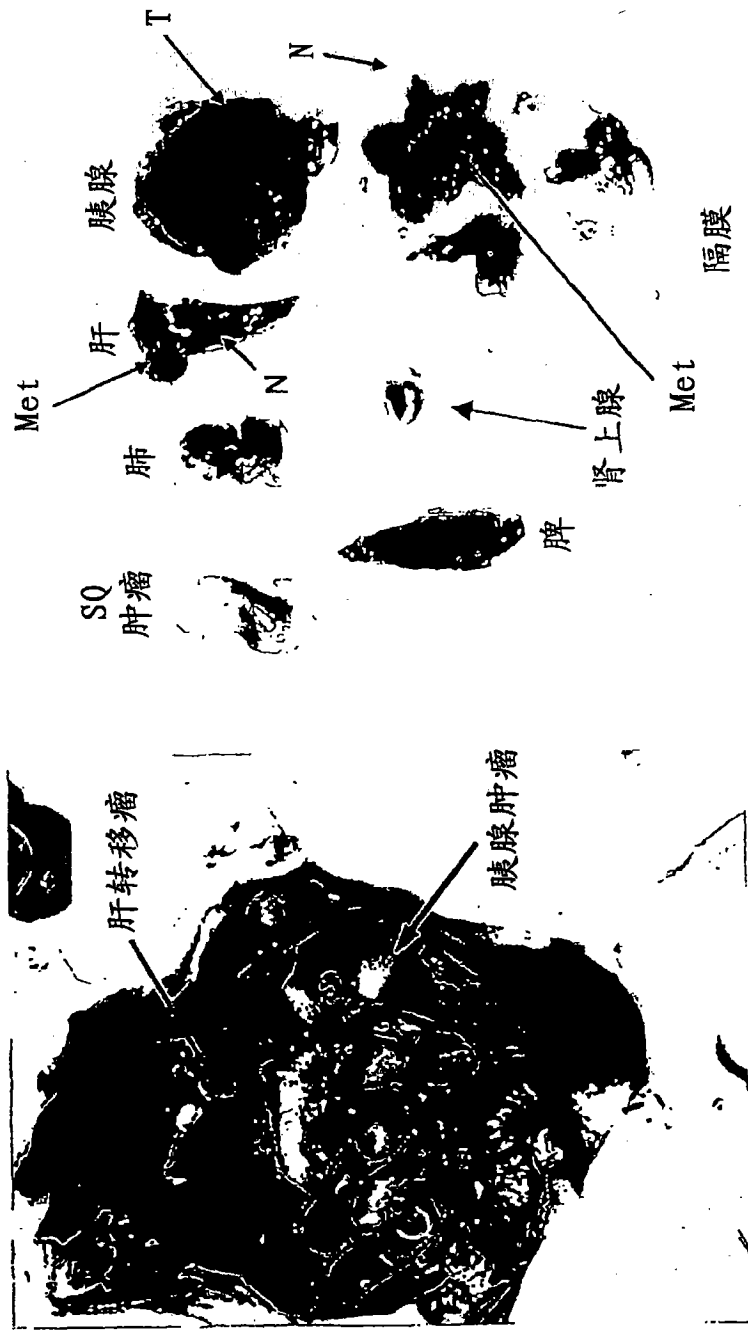


图1A

图1B

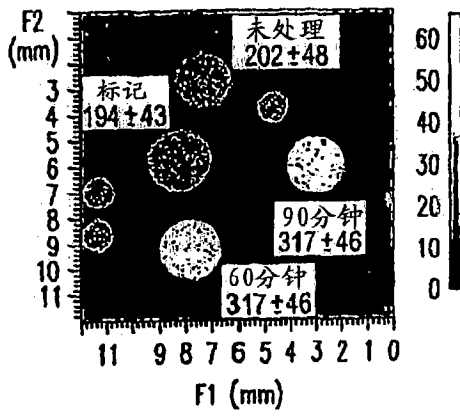


图 2A

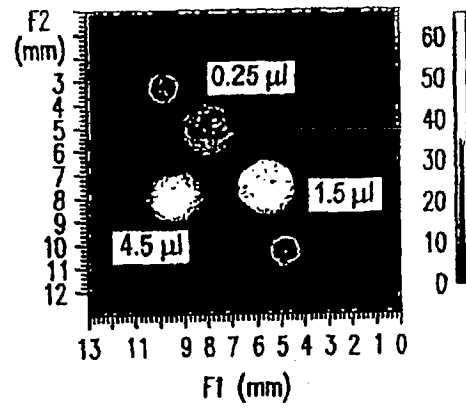


图 2B

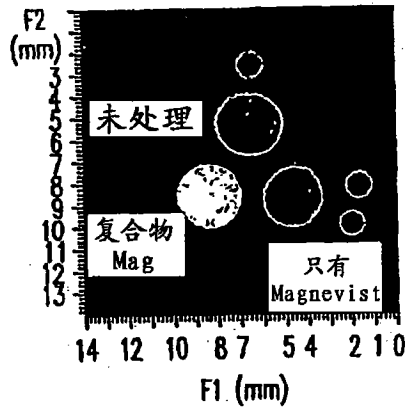


图 2C

基线

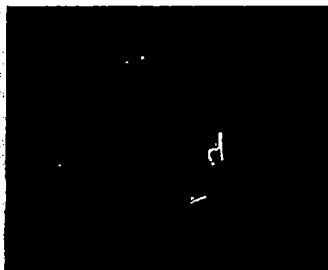


图 3A

游离Magnevist

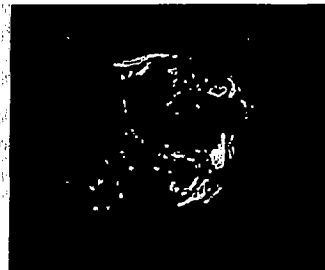


图 3D

纳米复合物-Mag



图 3G



图 3B

图 3E

图 3H



图 3C

图 3F

图 3I

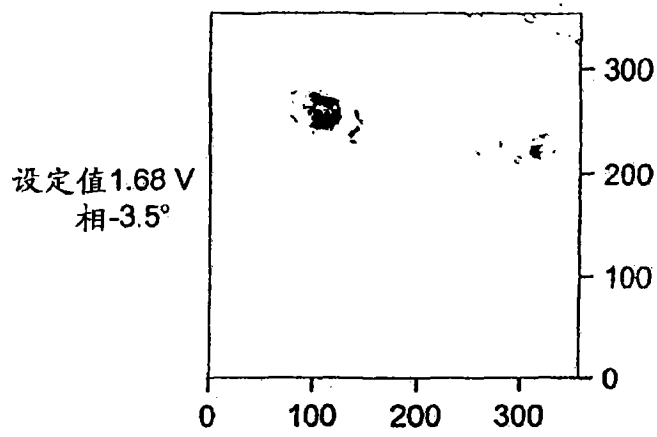


图 4A

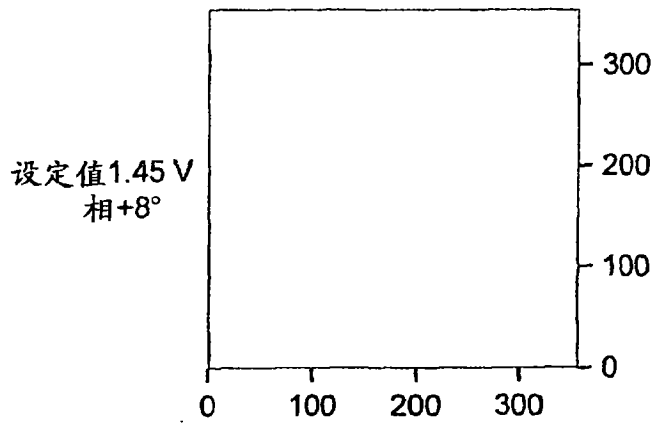


图 4B

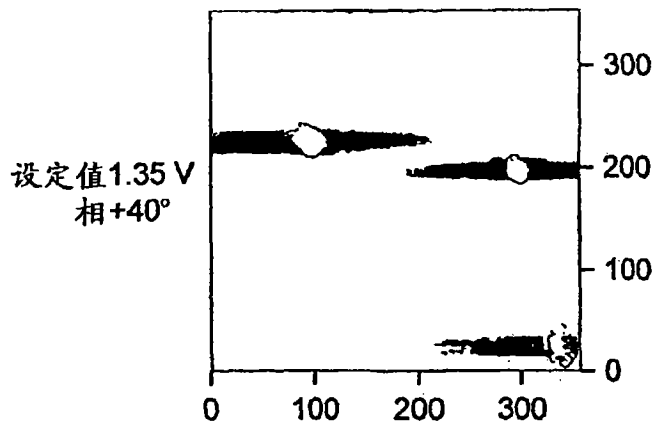


图 4C

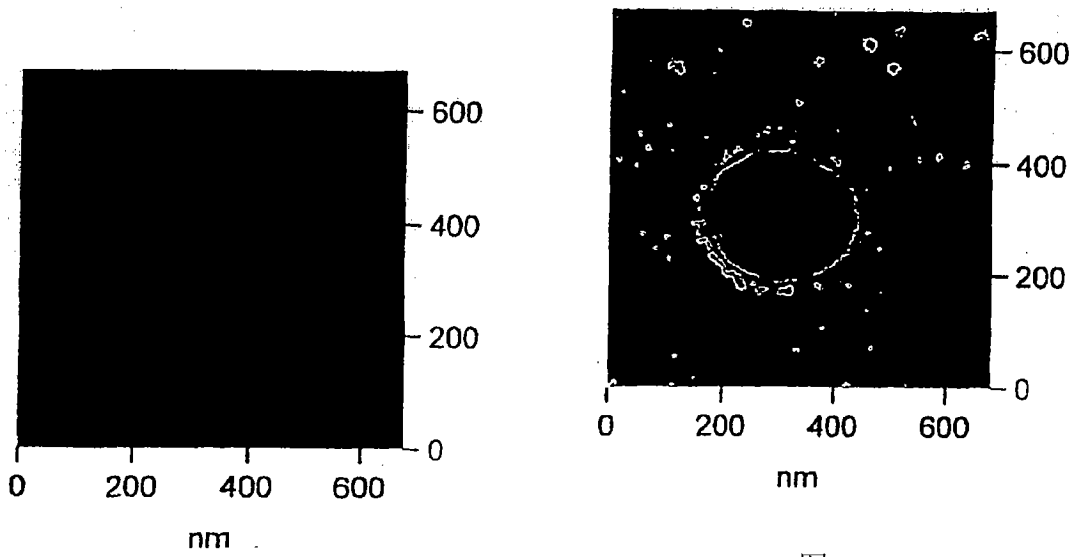


图 5A

图 5B

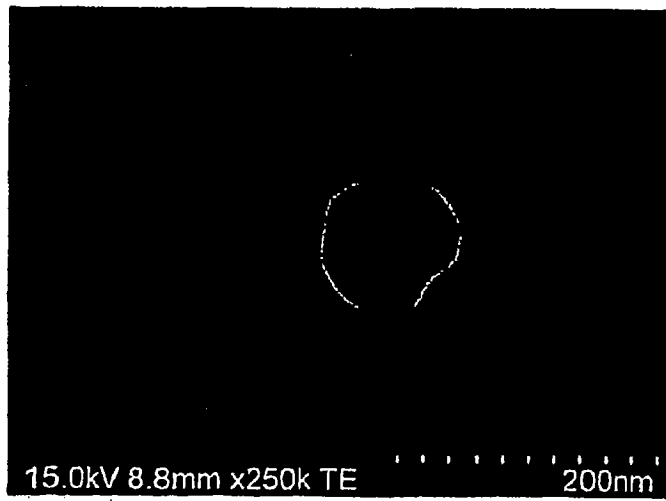


图 5C

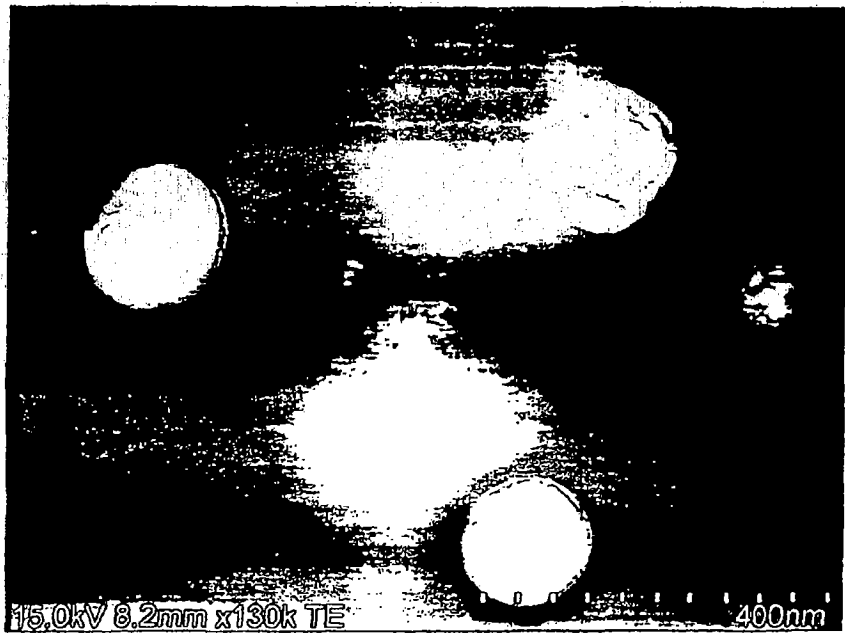


图 6A

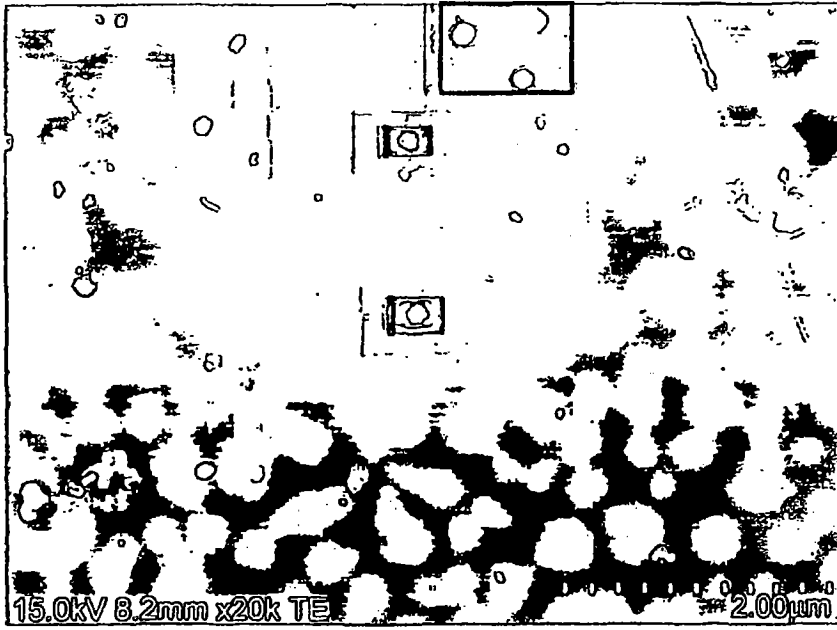


图 6B

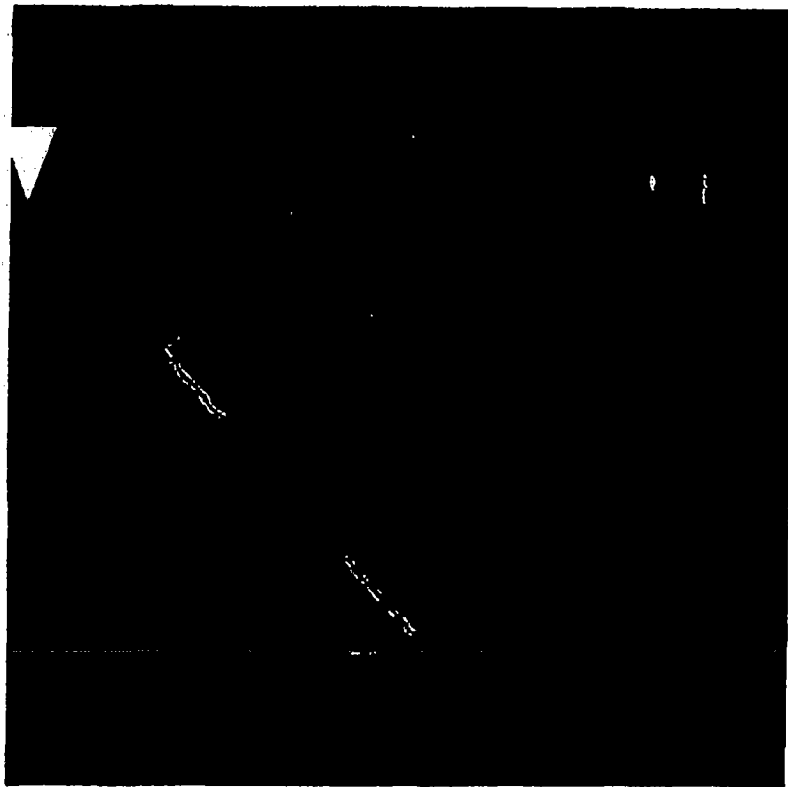


图 7A

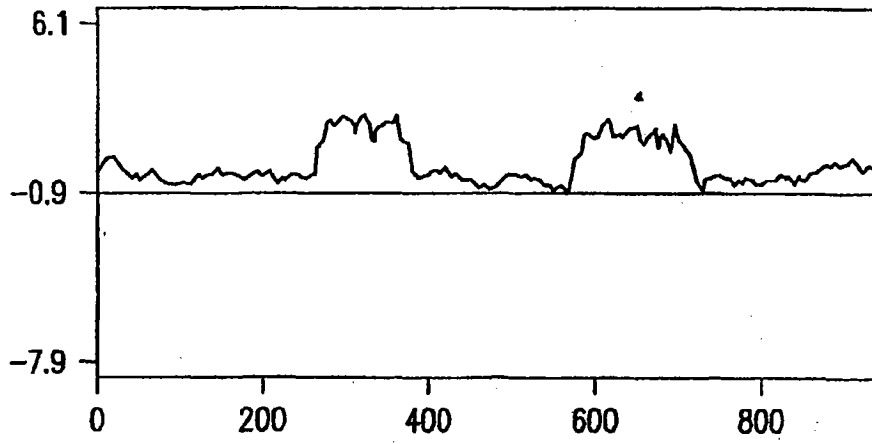


图 7B

用配体-脂质体复合物处理的
DU145 肿瘤的 MR 成像

基线



图 8A

游离 Mag



图 8B

scLip-Mag



图 8C

scLip-HK-Mag



图 8D

通过第三代配体-脂质体复合物
改善的 MDA-MB-435 肿瘤的 MR 成像

基线



图 8E

游离 Mag



图 8F

scLip-Mag



图 8G

scLip-HK-Mag



图 8H

使用包含HK肽的第三代纳米复合物改善的
胰腺肿瘤和转移病的MRI成像

基线

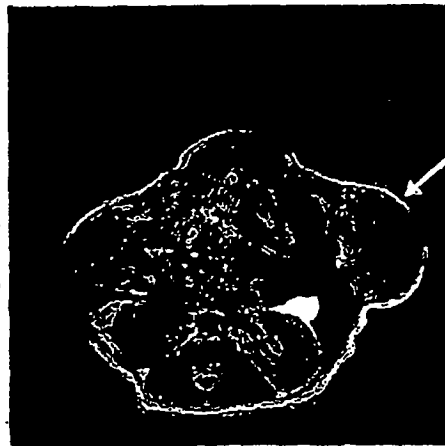


图9A

scLip-Mag

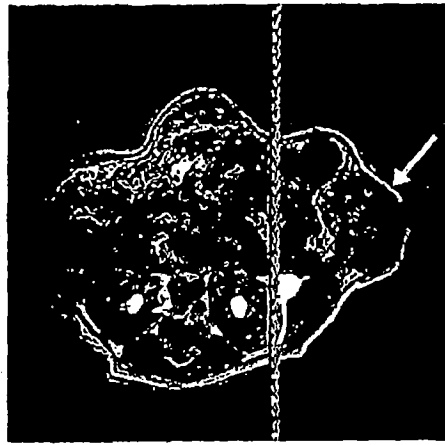


图9B

scL-HK-Mag

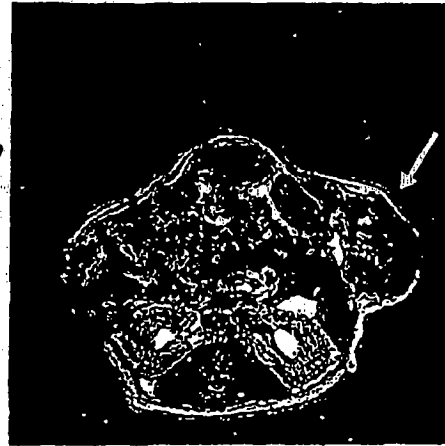


图9C

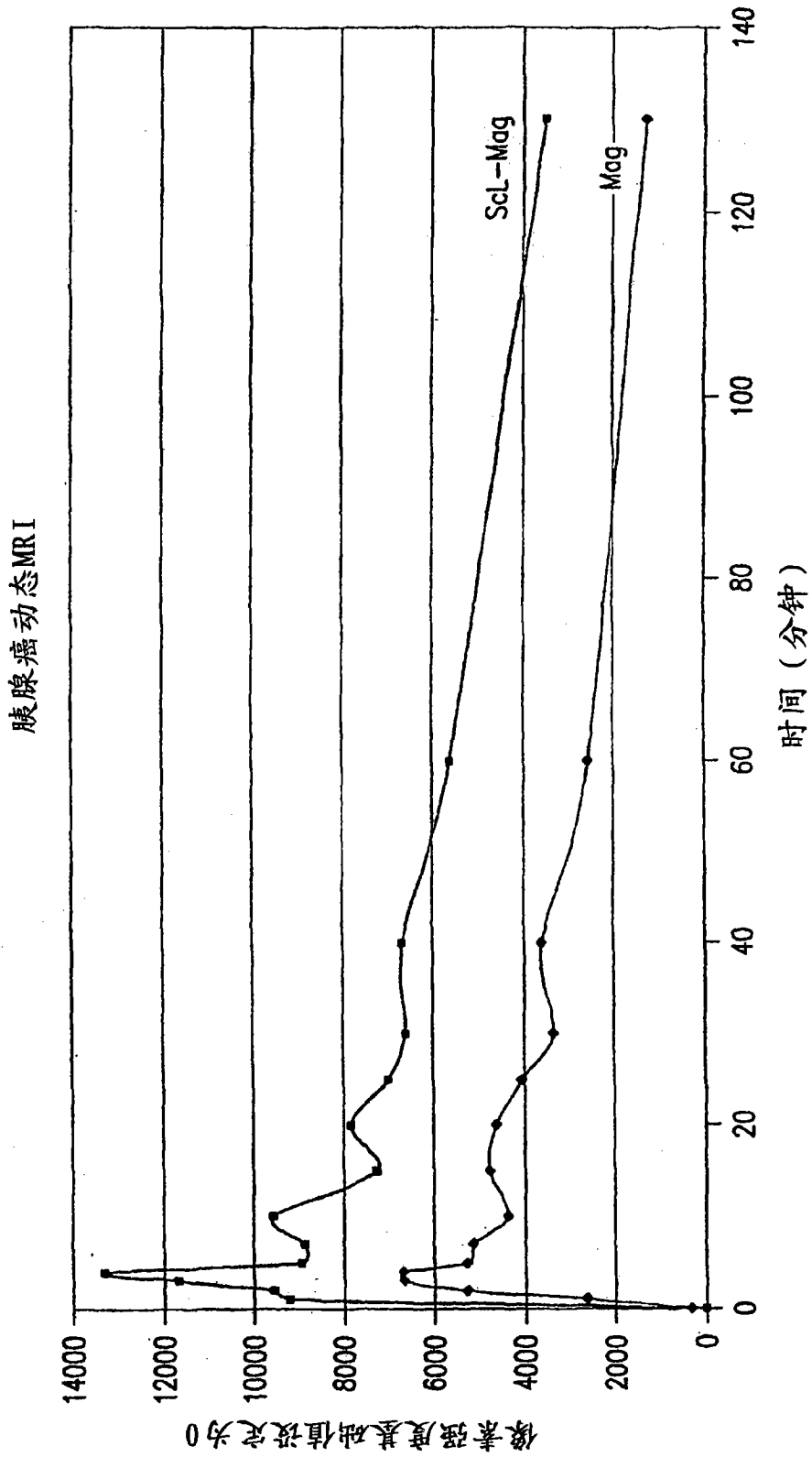


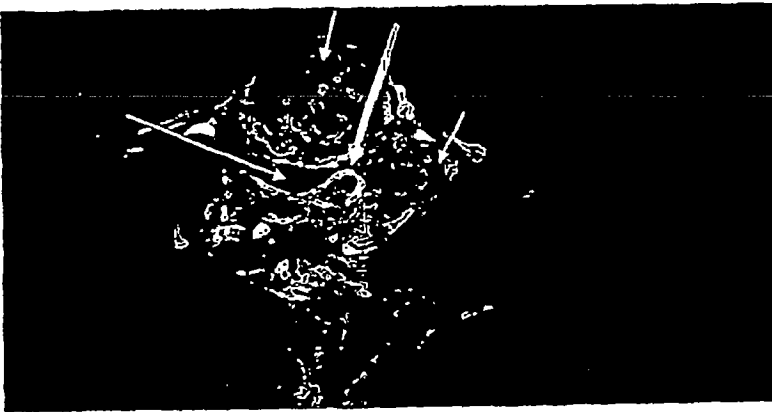
图10

通过系统性递送纳米复合物gad-d的胰腺癌转移的MR成像



基线

图11A



复合物

图11B



图11C

对6个匹配的结节用复合物VS Gad-d在MRI图像上转移瘤的较大增强, $p < 0.04$
(接种后25天)



基线(PI 5413)

图12A



复合物(PI 10137)

图12B

PI=像素强度



基线(PI 6313)

图12C



Gad-d (PI)

图12D

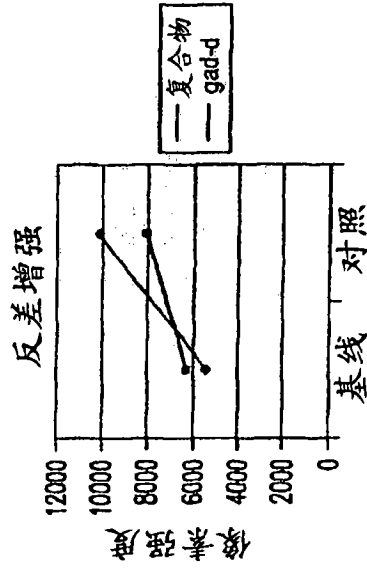


图12E

用复合物增强的肾细胞癌肺转移检测



图13A



图13B

4像素=约
0.4mm



图13C

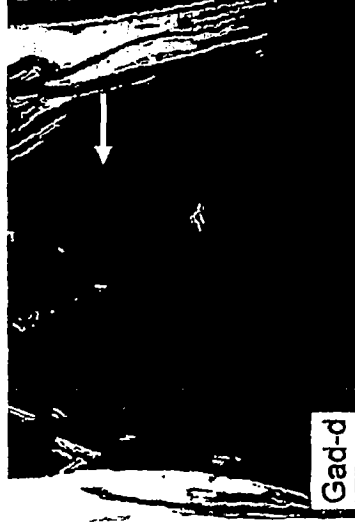


图13D

5像素等于人肺CT中约3mm

用复合物增强小肾细胞癌转移的检测



图14A

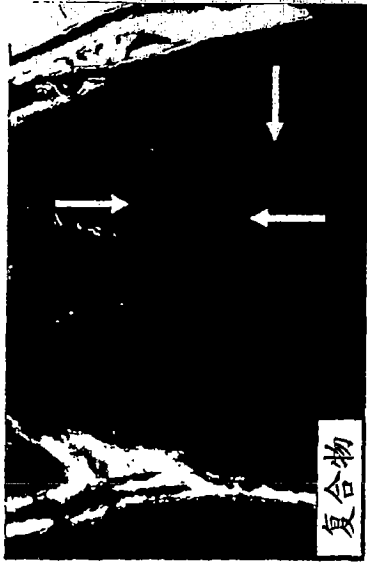


图14B



图14C

3像素=约0.3mm

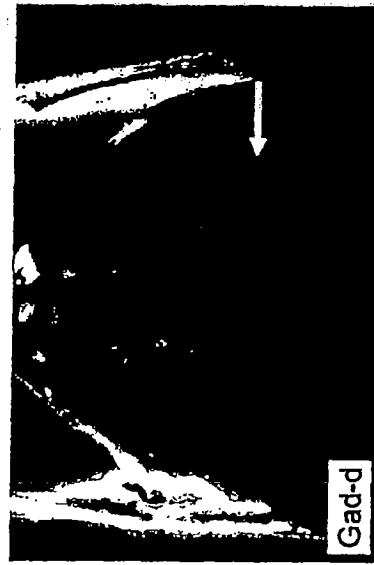


图14D

非常小的结节VS噪声 (接种后7天)



图15A

图15B

	均值	标准误	最大值
基线	566	278	1588
复合物	981	515	2542
结节1	591	299	1589
结节2	665	339	2274

用复合物的结节2的最大值 ≥ 2 SD最大基线值以上

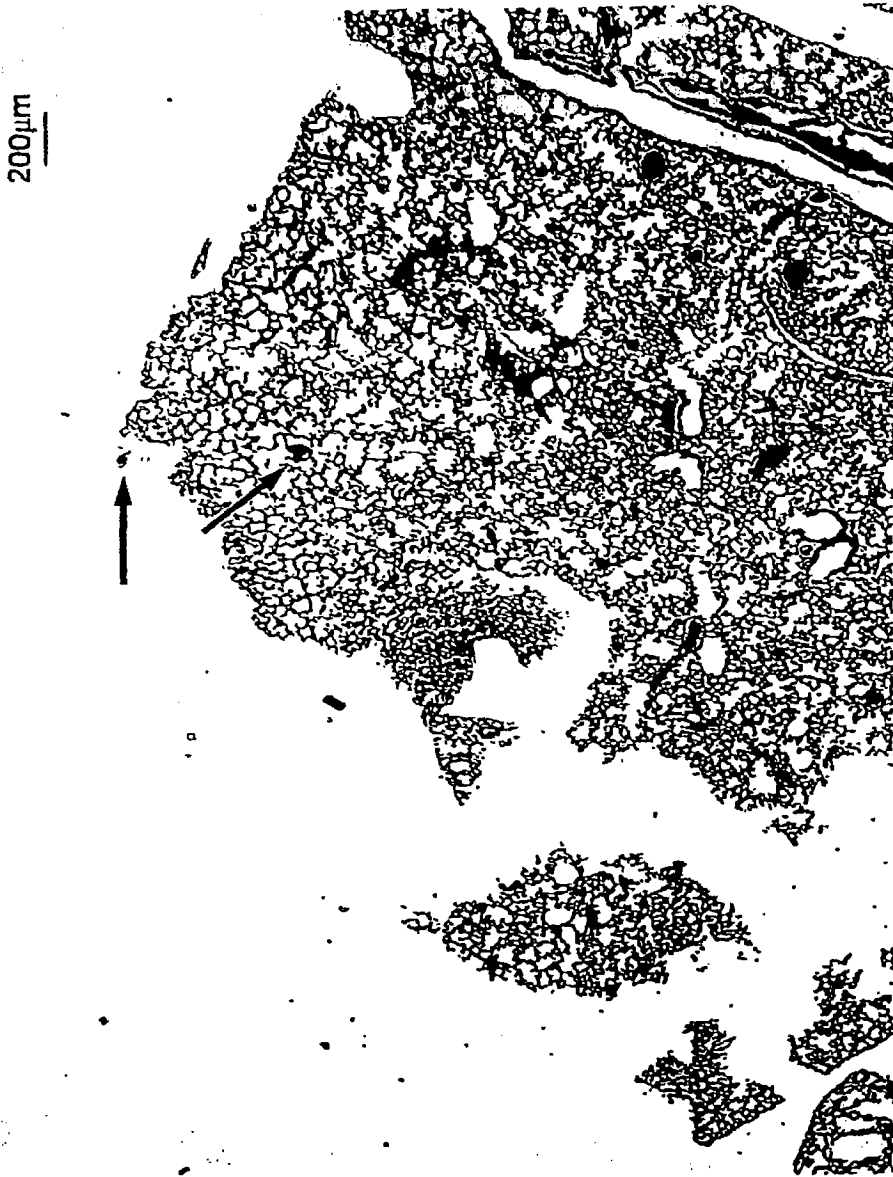


图16

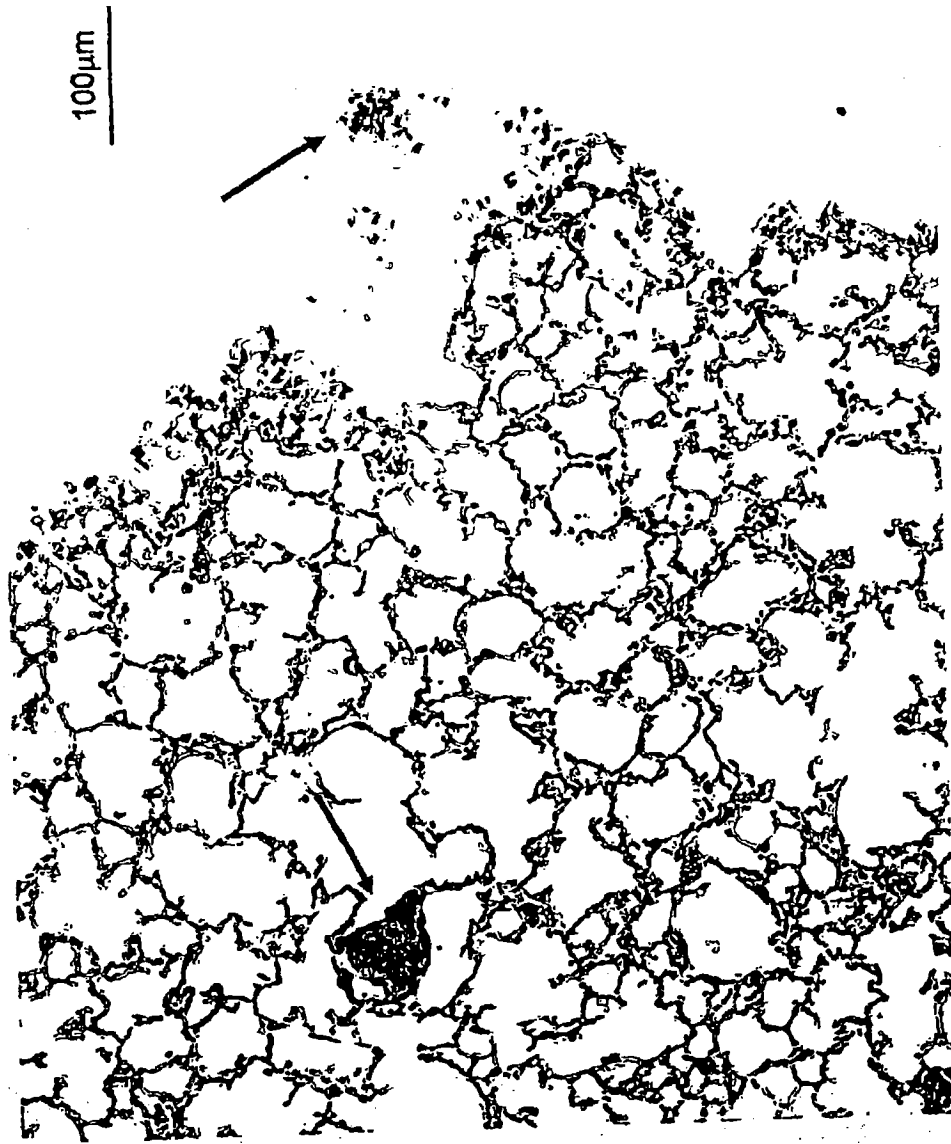


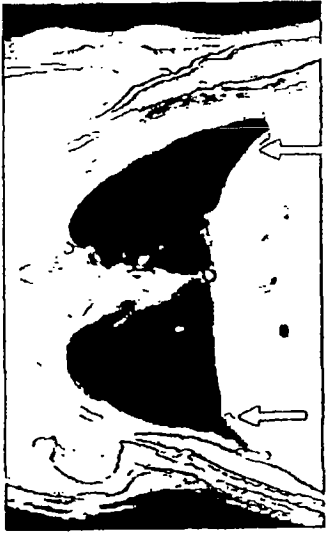
图17

肾细胞癌胸膜下转移
两片 (接种后8天)



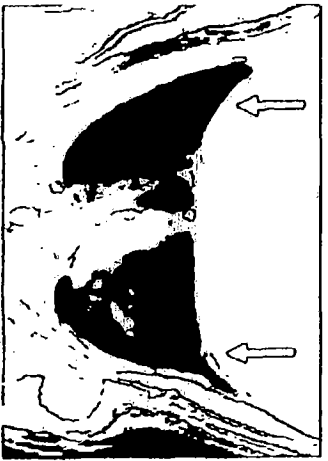
基线

图18A



复合物于1小时

图8B



复合物于2小时

图18C



基线

图18D



复合物于1小时

图18E



复合物于2小时

图18F

通过TfRscFv-Lip-Mag检测B₁₆/F₁₀ 肺转移

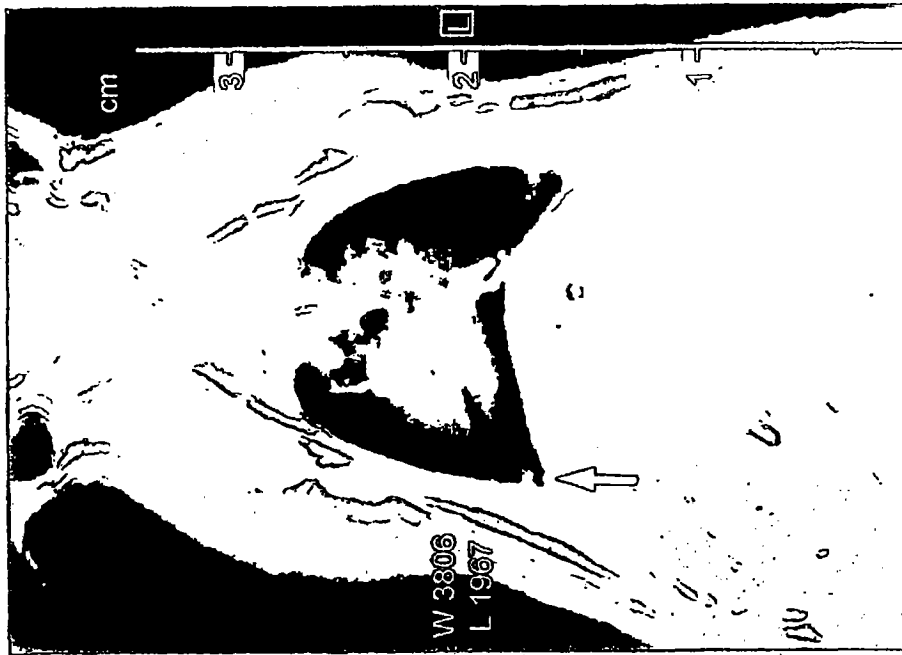


图19A

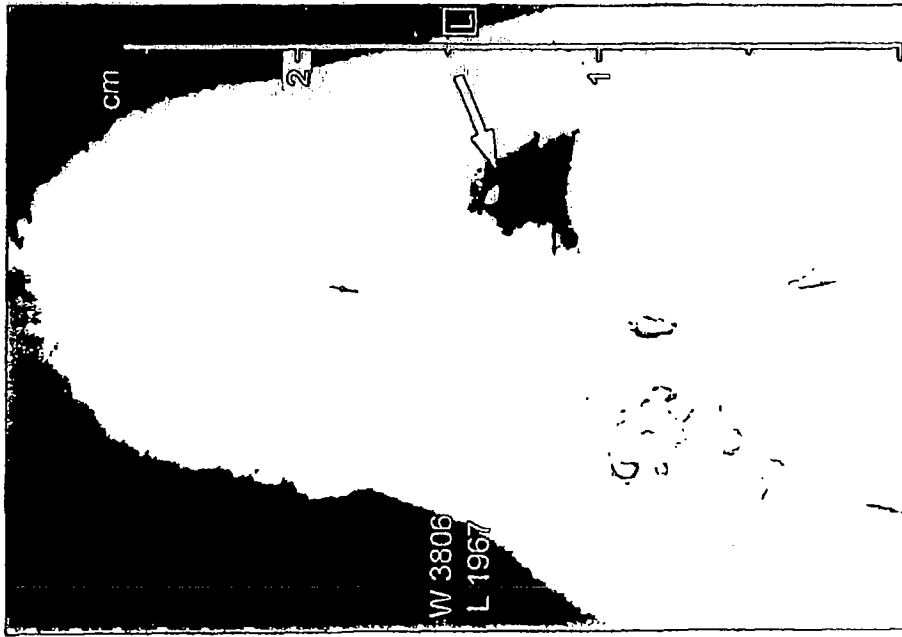


图19B