



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108697815 A

(43)申请公布日 2018.10.23

(21)申请号 201680081577.7

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002

(22)申请日 2016.08.19

代理人 左路 林晓红

(30)优先权数据

62/293,609 2016.02.10 US

62/369,590 2016.08.01 US

(51)Int.Cl.

A61K 49/08(2006.01)

A61K 51/08(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.08.10

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/047807 2016.08.19

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/138983 EN 2017.08.17

(71)申请人 辉瑞公司

地址 美国纽约

(72)发明人 S·E·扎尔 K·麦克唐奈

A·霍尔霍塔

权利要求书2页 说明书38页 附图19页

(54)发明名称

具有EGFR配体的治疗性纳米颗粒及其制备
和使用方法

(57)摘要

本文部分提供治疗性纳米颗粒,其包括生物
相容性聚合物;聚合物-EGFR配体缀合物,其中
EGFR配体直接或经化学接头共价结合聚合物,以
及治疗剂。

1. 一种治疗性纳米颗粒, 包含:
治疗剂; 和
二嵌段聚乳酸-聚乙二醇共聚物或二嵌段聚乳酸-共-聚乙醇酸-聚乙二醇共聚物; 和
由PLA-PEG-EGFR配体表示的聚合缀合物, 其中EGFR配体与PEG直接或间接或经化学接头结合或相关联, 且其中PLA是聚乳酸且PEG是聚乙二醇。
2. 一种治疗性纳米颗粒, 包含:
约0.2-约35重量百分比的治疗剂; 和
约50-约98重量百分比的二嵌段聚乳酸-聚乙二醇共聚物或二嵌段聚乳酸-共-聚乙醇酸-聚乙二醇共聚物; 和
约2%-约12%PLA-PEG-EGFR配体密度, 其中EGFR配体与叠氮化物功能化的PEG-PLA结合或相关联, 且其中PLA是聚乳酸且PEG是聚乙二醇。
3. 如权利要求1-2中任一项所述的治疗性纳米颗粒, 其中所述治疗性纳米颗粒的流体动力学直径是约60-约150nm。
4. 如权利要求1-3中任一项所述的治疗性纳米颗粒, 其中流体动力学直径是约90-约140nm。
5. 如权利要求1-4中任一项所述的治疗性纳米颗粒, 包含约1-约10重量百分比的治疗剂。
6. 如权利要求1-5中任一项所述的治疗性纳米颗粒, 其中所述EGFR配体是肽。
7. 如权利要求6所述的治疗性纳米颗粒, 其中所述肽通过点击化学共价缀合所述纳米颗粒。
8. 一种纳米颗粒, 包含缀合肽基配体的PLA-PEG, 所述肽基配体包含选自下组的序列:
Ac-DPCTWEVWGRECLQGGK (PEG4-DBCO) -CONH₂, Ac-DACTWEVWGRECLQGGK (PEG4-DBCO) -CONH₂,
Ac-DPCT (2Ind) GEV (5MeO) WGRECLQGGK (PEG4-DBCO) -CONH₂, Ac-DPPenTWEVWGREPenLQGGK
(PEG4-DBCO) -CONH₂, AcDAPenTWEVWGREPenLQGGK (DBCO) -CONH₂, Ac-DACT (2Ind) GEV (5MeO)
WGRECLQGGK (DBCO) -CONH₂, Ac-DPPenT (2Ind) GEV (5MeO) WGREPenLQGGK (DBCO) -CONH₂, Ac-
DAPenT (2Ind) GEV (5MeO) WGREPenLQGGK (DBCO) -CONH₂, Ac-DAPenTWEVWGREPenLQGGK (DBCO) -
CONH₂, Ac-DPCTWEVWGRECLQGGK (PEG5-DBCO) -CONH₂, Ac-DACT (2Ind) GEV (5MeO) WGRECLQGGK
(DBCO) -CONH₂, AcDPPenT (2Ind) GEV (5MeO) WGREPenLQGGK (DBCO) -CONH₂和AcDAPenT (2Ind)
GEV (5MeO) WGREPenLQGGK (DBCO) -CONH₂, Ac-DPCTWEVWGRECLQGGK (PEG5-DBCO) -CONH₂或其修
饰。
9. 如权利要求8所述的纳米颗粒, 其包含约200-约500个缀合所述肽基配体分子的PLA-
PEG。
10. 如权利要求8或9所述的纳米颗粒, 其中通过使叠氮化物功能化的PLA-PEG反应和使用促进应变的炔烃-叠氮化物环加成, 将所述PLA-PEG缀合所述肽基配体分子。
11. 如权利要求1-10中任一项所述的纳米颗粒, 其中PLA-PEG的PLA具有约15-约17kDa的数均分子量。
12. 如权利要求1-10中任一项所述的纳米颗粒, 其中所述PLA-PEG的PEG具有约4-约6kDa的数均分子量。
13. 一种药学上可接受的组合物, 包含多种如权利要求1-12中任一项所述的治疗性纳

米颗粒和药学上可接受的赋形剂。

14. 一种治疗有需要的患者的实体瘤癌症的方法, 包括给患者施用治疗有效量的包含权利要求1-13中任一项所述的治疗性纳米颗粒的组合物。

15. 一种鉴定靶向性配体-纳米颗粒缀合物的方法, 包括

- 1) 提供叠氮化物功能化的PLA-PEG纳米颗粒;
- 2) 使可能的EGFR配体接触所述叠氮化物PLA-PEG纳米颗粒以形成靶向的纳米颗粒;
- 3) 就配体亲和性和/或纳米颗粒结合筛选靶向的纳米颗粒; 和
- 4) 调节所述可能的EGFR配体; 和
- 5) 重复步骤2-4以获得具有所需的配体亲和性和/或结合的靶向性纳米颗粒。

16. 如权利要求15所述的方法, 其中所述筛选包括使用表面等离子体共振。

17. 如权利要求14或15所述的方法, 其中所述调节包括取代、插入或修饰所述配体的一个或多个氨基酸。

具有EGFR配体的治疗性纳米颗粒及其制备和使用方法

[0001] 参考相关申请

[0002] 本申请要求2016年2月10日提交的美国临时申请号62/293,609以及2016年8月1日提交的美国临时申请号62/369,590的优先权和权益,各申请通过引用全文纳入本文。

背景技术

[0003] 向患者递送某些药物(如靶向具体组织或细胞类型或者靶向特定疾病组织但非正常组织)或控制药物释放的系统长期以来被认为是有益的。

[0004] 例如,包括活性药物和靶向具体组织或细胞类型或者靶向特定疾病组织但非正常组织的疗法可减少非靶向身体组织中的药物量。当治疗诸如癌症等病症时,这尤其重要,所述病症中需要向癌细胞递送细胞毒性剂量的药物,而不杀死周围非癌组织。有效药物靶向可减少抗癌疗法中常见的不需要且有时是威胁生命的副作用。另外,这类疗法可允许药物到达某些除此疗法之外其无法到达的组织。提供受控释放和/或靶向治疗的疗法也必须能递送有效量的药物,这在其它纳米颗粒递送系统中是已知的限制。

[0005] 例如,传统癌症治疗的主要限制是缺乏对癌细胞相比健康细胞的选择性。近期,大量研究致力于使用纳米药物以有效递送抗癌药剂给肿瘤。实体瘤依赖于大量营养物和氧气,引起血管生成过多,这进而导致内皮细胞间形成大缝隙。由此产生的渗漏血管系统导致肿瘤中尺寸依赖性如200-800nm的大分子和纳米颗粒积聚。尽管此被动靶向形式提供纳米药物相比游离药物的优势,但这不确保药物直接递送到或进入肿瘤细胞。

[0006] 表皮生长因子受体(EGFR)是一个得到充分理解的靶标,其在多种癌中上调,与肿瘤增殖相关,一般被认为是用于纳米治疗靶向的有潜力受体。因此,需要靶向纳米颗粒疗法,如能靶向EGFR的纳米颗粒。

发明内容

[0007] 本文描述聚合纳米颗粒,其包括治疗剂和靶向表皮生长因子受体的配体,以及制备和使用这类治疗性纳米颗粒的方法。在一些实施方案中,所设想的纳米颗粒可用于治疗癌症。

[0008] 例如,本文提供包括以下的治疗性纳米颗粒:治疗剂;二嵌段聚乳酸-聚乙二醇共聚物或二嵌段聚乳酸-共-聚乙醇酸-聚乙二醇共聚物;和由以下表示的聚合缀合物:PLA-PEG-EGFR配体,其中EGFR配体与PEG直接或间接或经化学接头结合或关联,且其中PLA是聚乳酸和PEG是聚乙二醇。

[0009] 本文还提供包含多种所设想的治疗性纳米颗粒的药学上可接受的组合物和在有需要的患者中治疗实体瘤癌症的方法,所述方法包括给患者施用治疗有效量的含预期治疗性纳米颗粒的组合物。

[0010] 在另一方面,提供鉴定靶向配体-纳米颗粒缀合物的方法,包括1)提供叠氮化物功能化PLA-PEG纳米颗粒;2)使潜在的EGFR配体接触叠氮化物PLA-PEG纳米颗粒以形成靶向纳米颗粒;3)筛选靶向纳米颗粒的配体亲和性和/或纳米颗粒结合;4)调节潜在的EGFR配体;

和5) 重复步骤2-4以获得具有所需配体亲和性和/或结合的靶向纳米颗粒。

[0011] 附图简要说明

[0012] 图1是用于形成所公开的纳米颗粒的乳化过程的流程图。

[0013] 图2A是所公开的乳化过程的流程图。

[0014] 图2B是所公开的乳化过程的流程图。

[0015] 图3A描述从市售可得的可得H0-PEG-叠氮化物合成聚合物组分PLA-PEG-叠氮化物,图3B描述合成聚合物PLA-Cy5荧光有效负载(payload)。

[0016] 图4A-4B描述DBCO-胺与PLA-PEG-叠氮化物的缀合(图4A),点击反应的液相色谱质谱(LCMS)分析证明与PLA-PEG-叠氮化物反应时消耗99%的DBCO胺(图4B),点击反应的LCMS分析证明应用于叠氮化物纳米颗粒时消耗98%的DBCO胺(图4C)。

[0017] 图5描述DBCO醛接头(顶部)和制备DBCO-醛用于还原胺化EGF的N末端及随后缀合叠氮化物功能化纳米颗粒(底部)。

[0018] 图6是EGF-DBCO经点击到叠氮化物功能化纳米颗粒(中部)后和通过Zeba Spin纯化纳米颗粒(底部)后,Zeba Spin纯化之后EGF-DBCO的LCMS分析(顶部)。

[0019] 图7A通过EGF竞争ELISA描述EGF纳米颗粒和DBCO配体结合EGFR ($EGF\ IC_{50}=1.2\text{ nM}$, $EGF\text{-}DBCO\ IC_{50}=2.3\text{ nM}$, $2.5\%EGF\ IC_{50}=9\text{ nM}$)。图7B描述EGF, EGF-DBCO, EGF纳米颗粒和基础(base)叠氮化物纳米颗粒结合EGFR-Fc表面的SPR分析。插图放大来自未修饰EGF和最小非特异性结合碱基叠氮化物纳米颗粒的较低信号。PTNP指示未功能化的纳米颗粒。

[0020] 图8A描述所报告EGFR结合肽的SPR结合数据的图,图8B描述以5%和10%缀合纳米颗粒(1 mg/mL)的选定文献肽的SPR分析。显示2.5%EGF纳米颗粒以作比较。

[0021] 图9A通过EGF竞争ELISA描述游离配体和纳米颗粒缀合物结合的相对 IC_{50} 。P1中的各氨基酸被丙氨酸取代,其对结合的影响与亲代肽或肽-NP作比较。图9B通过EGF竞争ELISA描述P1丙氨酸扫描纳米颗粒结合($P_{1-3}IC_{50}=10.3\text{ }\mu\text{g/mL}$, $P_1IC_{50}=211\text{ }\mu\text{g/mL}$)。图9C通过在 1 mg/mL 的SPR描述P1和P1-3NP结合。

[0022] 图10描述P2-NP缀合物(1 mg/mL)的SPR分析,配体密度为5和10%,有或没有EGF。

[0023] 图11描述P2-NP缀合物(0.25 mg/mL)的SPR分析,有或没有EGF。

[0024] 图12描述EGF/P2双重靶向NP的协同影响。PTNP指示未功能化的纳米颗粒。

[0025] 图13显示P2肽的丙氨酸扫描结果,指示用于结合EGFR的关键残基。相对于亲代肽P2的 K_D ,就各肽显示由SPR测量的相对结合亲和性。*值高于图中所示。

[0026] 图14描述二氨基丁酸(Dab)与天冬氨酸残基之间的内部酰胺键形成示例。

[0027] 图15显示青霉胺(pen)和高半胱氨酸(homocys)的结构。

[0028] 图16描述P2的替代二硫化物变体。就2个位置(Cys3或Cys12)各自指示Cys取代,由SPR测量的相对结合亲和性与亲代肽(P2)的 K_D 作比较。*值高于图中所示。

[0029] 图17描述P2-生物素二聚体(顶部)并显示生物素化P2衍生物对EGF浓度的依赖性(底部)。

[0030] 图18描述P2竞争试验结果,比较游离P2与1和5%P2-缀合纳米颗粒。

[0031] 图19描述来自具有不同动力学谱(profile)的配体的协同NP结合。

[0032] 图20通过 $3.2\text{ }\mu\text{M}$ 的SPR显示优化的P2类似物的结合。

[0033] 图21A和21B描述5%P2-2纳米颗粒在多个浓度的SPR传感图。各剂量的结合应答就

传感器表面上的蛋白密度进行标准化,在注射终点时间点提取并对剂量作图。图21C描述携带P₂类似物的纳米颗粒在5%配体密度、有和没有EGF情况下的相对结合,由SPR测量,所述类似物具有单一氨基酸置换。

[0034] 图22显示与携带P₂类似物的纳米颗粒缀合的纳米颗粒在5%配体密度、有和没有EGF情况下的相对结合,由SPR测量,所述类似物具有2或3个氨基酸置换。

[0035] 图23A-23C描述在没有EGF(图23A)和有50-nM EGF(图23B)情况下,EGFR靶向纳米颗粒结合A₄₃₁细胞。图23C描述EGF、P₁₋₃和P_{2/55/102}纳米颗粒结合的比较。

[0036] 图24显示所指示的纳米颗粒的相对结合,通过流式细胞术测定。

[0037] 图25A-25B描述EGF、P₁₋₃和P_{2/55/102}纳米颗粒在37℃与A₄₃₁细胞的总结合及内化(图25A),以及靶向纳米颗粒的内化速率(图25B)。

[0038] 图26描述Cy5PLA在37℃随着时间从纳米颗粒中的释放,通过HPLC和体外释放测量。

[0039] 发明详述

[0040] 本文描述含治疗剂的聚合纳米颗粒以及制备和使用这类有效地穿过血脑屏障的治疗性EGFR配体及治疗剂的方法。

[0041] 本文提供治疗性纳米颗粒,其包括生物相容性聚合物;和由PLA-PEG-EGFR配体表示的聚合缀合物;其中EGFR配体直接或间接或经化学接头与PEG共价结合,且其中PLA是聚乳酸和PEG是聚乙二醇;和治疗剂。例如,公开的纳米颗粒可包括约0.2-约10重量百分比的PLA-PEG-EGFR配体。

[0042] 本文也提供治疗性纳米颗粒,其具有包含治疗剂和约50-约700PLA-PEG-EGFR配体分子及生物相容性聚合物的治疗性纳米颗粒的流体动力学直径。

[0043] 本文描述合适的生物相容性聚合物,且在一些实施方案中,可选自二嵌段聚乳酸-聚乙二醇共聚物、聚乳酸、二嵌段聚(乳酸-共-乙醇酸)-聚乙二醇共聚物、聚(乳酸-共-乙醇酸)和其混合物。例如,所设想的纳米颗粒可包括二嵌段聚乳酸-聚乙二醇共聚物,其含有数均分子量为约15-约20kDa的聚乳酸和数均分子量为约4-约6kDa的聚乙二醇。所公开的治疗性纳米颗粒可包括约10-约97重量百分比的二嵌段聚乳酸-聚乙二醇共聚物,或在某些实施方案中,约40-约90重量百分比的二嵌段聚乳酸-聚乙二醇共聚物。

[0044] 在一些实施方案中,所公开的PLA-PEG-EGFR配体包括数均分子量为约15-约20kDa的聚乳酸(PLA)和数均分子量为约4-约6kDa的聚乙二醇(PEG)。应理解PLA-PEG-EGFR配体缀合物可包括PEG与EGFR配体本身之间的可接受的化学和/或聚合接头。例如,本文提供具有生物素的纳米颗粒和靶向构建体(EGFR配体包括偶联EGFR抗体的抗生物素抗体),生物素用叠氮化物官能团缀合PEG。

[0045] 例如,所公开的纳米颗粒包括诸如本文所述的肽或抗体配体,有效用于靶向或结合转铁蛋白受体(Ter1)。在某些实施方案中,所述纳米颗粒包括一定比例的配体-缀合的聚合物(如PLA-PEG-EGFR配体)与未功能化的聚合物(如PLA-PEG或PLGA-PEG)。纳米颗粒能具有优化比例的这两种聚合物,从而有效量的配体与纳米颗粒相关联以治疗疾病或紊乱,如癌症。例如,增加配体密度可提高靶结合(细胞结合/靶摄取),使纳米颗粒成为“靶特异性”。或者,纳米颗粒中一定浓度的未功能化的聚合物(如未功能化的PLGA-PEG聚合物)可控制炎症和/或免疫原性(如激发免疫应答的能力),并允许纳米颗粒具有适于治疗疾病或紊乱的

循环半衰期。此外,在一些实施方案中,所述未功能化的聚合物可降低经网状内皮系统(RES)从循环系统清除的速度。因此,未功能化的聚合物可以给纳米颗粒提供允许颗粒经施用经过(travel through)身体的特性。在一些实施方案中,未功能化的聚合物可平衡本来高浓度的配体,否则高浓度的配体会加速对象的清除,导致对靶细胞的递送更少。

[0046] 在一些实施方案中,本文公开的纳米颗粒可包括缀合EGFR配体的功能性聚合物,其构成纳米颗粒整个聚合物组成(例如功能化的+未功能化的聚合物)的约0.1-50,如0.1-30,如0.1-20,如0.1-10,如0.1-2.5摩尔百分比。

[0047] 例如,本文提供纳米颗粒,包括约50-约1000的与聚合物(如PLA-PEG)分子相关联(例如直接或间接经接头结合,或通过抗体/抗-抗体相连)配体,例如约50-约800,约100-约1000,约200-约900,约500-约900,约600-约900的配体相关联的聚合物分子。例如,本文考虑约500-约800个PLA-PEG-接头-EGFR配体分子。

[0048] 一般,“纳米颗粒”指直径(如流体动力学直径)小于1000nm的任何颗粒,例如约10nm-约200nm。所公开的治疗性纳米颗粒可包括直径为约60-约120nm、或约70-约120nm、或约80-约120nm、或约90-约120nm、或约100-约120nm、或约60-约130nm、或约70-约130nm、或约80-约130nm、或约90-约130nm、或约100-约130nm、或约110-约130nm、或约60-约140nm、或约70-约140nm、或约80-约140nm、或约90-约140nm、或约100-约140nm、或约110-约140nm、或约60-约150nm、或约70-约150nm、或约80-约150nm、或约90-约150nm、或约100-约150nm、或约110-约150nm、或约120-约150nm的纳米颗粒。例如,公开的纳米颗粒可具有约50-约140nm、约60-130nm、约70-约140nm的直径。

[0049] 聚合物

[0050] 在一些实施方案中,所述纳米颗粒可包括聚合物基质与治疗剂。在一些实施方案中,治疗剂和/或靶向部分(如EGFR抗体或肽)能与至少部分聚合基质相关联。例如,在一些实施方案中,靶向部分(如EGFR配体)能与聚合基质表面共价关联。在一些实施方案中,共价关联由接头介导。治疗剂能与聚合基质表面相关联,在聚合基质内包封,由其包围和/或分散于其中。

[0051] 在药物递送领域已知多种聚合物和从其形成颗粒的方法。在一些实施方案中,本公开针对具有至少2种大分子的纳米颗粒,其中第一大分子包括结合低分子量配体(如靶向部分)的第一聚合物;第二大分子包括不结合靶向部分的第二聚合物。纳米颗粒可选包括一种或多种额外、非功能化的聚合物。

[0052] 任何适当聚合物能用于所公开的纳米颗粒。聚合物可以是天然或非天然(合成)聚合物。聚合物可以是均聚物或共聚物,包括2个或更多单体。在序列方面,共聚物可以是随机、嵌段或包括随机与嵌段序列的组合。通常,聚合物是有机聚合物。

[0053] 本文所用的术语“聚合物”以其用于本领域的通常意义给出,即分子结构包括一或多种由共价键连接的重复单元(单体)。重复单元可都相同,或在一些情况中,可有一种以上类型的重复单元存在于聚合物内。一些情况中,聚合物能是生物衍生的,如生物聚合物。一些情况中,额外部分也可存在于聚合物内,例如生物部分,如下文所述的那些。如果一种以上类型的重复单元存在于聚合物内,则聚合物被称为“共聚物”。应理解,在采用聚合物的任何实施方案中,所用聚合物在一些情况中可以是共聚物。形成共聚物的重复单元能以任何方式排列。例如,重复单元可以随机顺序、交替顺序排列,或作为嵌段共聚物,即包括一个或

多个各自含第一重复单元(如第一嵌段)的区域,和一个或多个各自含第二重复单元(如第二嵌段)的区域等。嵌段共聚物可具有2个(二嵌段共聚物)、3个(三嵌段共聚物)或更多数目的不同嵌段。

[0054] 所公开的颗粒能包括共聚物,在一些实施方案中,其描述2种或更多彼此相关联的聚合物(如本文所述的那些),通常通过2种或更多聚合物共价结合在一起而相关联。因此,共聚物能包括第一聚合物和第二聚合物,其缀合在一起形成嵌段共聚物,其中第一聚合物可以是嵌段共聚物的第一嵌段且第二聚合物可以是嵌段共聚物的第二嵌段。当然,本领域普通技术人员应理解,在一些情况中,嵌段共聚物可包含多嵌段的聚合物,本文所用的“嵌段共聚物”不仅限于具有单个第一嵌段和单个第二嵌段的嵌段共聚物。例如,嵌段共聚物可包括含第一聚合物的第一嵌段,含第二聚合物的第二嵌段,和含第三聚合物或第一聚合物的第三嵌段等。在一些情况中,嵌段共聚物能包含任何数目的第一聚合物的第一嵌段和第二聚合物的第二嵌段(和在一些情况中,第三嵌段、第四嵌段等)。另外,应注意在一些情况中,嵌段共聚物也能形成自其它嵌段共聚物。例如,第一嵌段共聚物可缀合另一聚合物(其可以是均聚物、生物聚合物、另一嵌段共聚物等),以形成含多种类型嵌段和/或其它部分(如非聚合部分)的新的嵌段共聚物。

[0055] 在一组实施方案中,本文所设想的聚合物(如共聚物,例如嵌段共聚物)包括生物相容性聚合物,即聚合物在插入或注入活体时通常不诱导不良应答,例如没有显著炎症和/或免疫系统对聚合物的急性排斥反应(如通过T细胞应答)。因此,本文所设想的治疗性颗粒可以是非免疫原性的。本文所用的术语非免疫原性指处于其天然状态的内源性生长因子,其通常不引起或仅引起最小水平的循环抗体、T细胞或反应性免疫细胞,且其通常不在个体中引起针对本身的免疫应答。

[0056] 生物相容性一般涉及至少部分免疫系统对物质的急性排斥反应,即植入对象的非生物相容性物质在对象中诱发免疫应答,所述免疫应答可能严重到足以使免疫系统对物质的排斥反应无法得到适当控制,且通常具有的程度使物质必须从对象中移出。一个测定生物相容性的简化试验可以是使聚合物体外暴露于细胞;生物相容性聚合物是一般在中等浓度不导致显著细胞死亡的聚合物,如50微克/ 10^6 细胞的浓度。例如,生物相容性聚合物在暴露于细胞如成纤维细胞或上皮细胞时,可导致小于约20%的细胞死亡,即使被这类细胞吞噬或以另外方式摄取。可用于多个实施方案的生物相容性聚合物的非限制性示例包括聚二恶烷酮(PDO)、聚羟基脂肪酸酯、聚羟基丁酸酯、聚癸二酸丙三醇酯、聚乙交酯(即聚乙醇酸)(PGA)、聚丙交酯(聚乳酸)(PLA)、聚乳酸-共-聚乙醇酸(PLGA)、聚己酸内酯,或包括这些和/或其它聚合物的共聚物或衍生物。

[0057] 在某些实施方案中,所设想的生物相容性聚合物可生物降解,即聚合物能在生理环境内如体内化学和/或生物降解。本文所用的“生物可降解”聚合物是引入细胞时,被细胞机器(生物可降解)和/或化学过程如水解(化学可降解)分解成组分的那些聚合物,细胞能再使用或处理所述组分而对细胞没有显著毒性作用。在一个实施方案中,所述生物可降解聚合物和其降解副产物可以是生物相容性的。

[0058] 本文公开的颗粒可包含或不含PEG。另外,某些实施方案可以指向含聚酯醚的共聚物,如聚合物具有通过酯键(例如R-C(O)-O-R'键)和醚键(例如R-O-R'键)连接的重复单元。在一些实施方案中,含羧酸基团的生物可降解聚合物,如可水解聚合物,可缀合聚乙二醇重

复单元形成聚酯醚。含聚乙二醇重复单元的聚合物(如共聚物,例如嵌段共聚物)也能称为“PEG化”聚合物。

[0059] 在一些实施方案中,聚合物可以是聚酯,包括含乳酸和乙醇酸单元的共聚物,如聚乳酸乙醇酸共聚物和聚丙交酯乙交酯共聚物,本文统称为“PLGA”;均聚物,包括乙醇酸单元(本文称为“PGA”)和乳酸单元,如聚L-乳酸、聚D-乳酸、聚-D,L-乳酸、聚L-丙交酯、聚D-丙交酯、和聚-D,L-丙交酯,本文统称为“PLA”。在一些实施方案中,示范性聚酯包括例如聚羟基酸;PEG化的聚合物以及丙交酯和乙交酯的共聚物(如PEG化的PLA、PEG化的PGA、PEG化的PLGA和其衍生物)。在一些实施方案中,聚酯包括例如聚酸酐、聚原酸酯、PEG化的聚原酸酯、聚己酸内酯、PEG化的聚己酸内酯、聚赖氨酸、PEG化的聚赖氨酸、聚乙烯亚胺、PEG化的聚乙烯亚胺、聚L-丙交酯-共-L-赖氨酸、聚丝氨酸酯、聚(4-羟基-L-脯氨酸酯)、聚[α -(4-氨基丁基)-L-乙醇酸],和其衍生物。

[0060] 在一些实施方案中,聚合物可以是PLGA。PLGA是乳酸和乙醇酸的生物相容性及生物可降解共聚物,多种形式的PLGA能通过乳酸:乙醇酸之比鉴定。乳酸可以是L-乳酸、D-乳酸或D,L-乳酸。PLGA的降解速率能通过改变乳酸-乙醇酸之比来调整。在一些实施方案中,PLGA能通过约85:15、约75:25、约60:40、约50:50、约40:60、约25:75或约15:85的乳酸:乙醇酸之比鉴定。在一些实施方案中,可选择颗粒聚合物(如PLGA嵌段共聚物或PLGA-PEG嵌段共聚物)中的乳酸与乙醇酸单体之比以优化多种参数,如可以优化吸水、治疗剂释放和/或聚合物降解动力学。

[0061] 预期PEG,例如作为PLA-PEG共聚物的部分,可被终止并包括末端基团,如在PEG未缀合配体时。例如,PEG可终止于羟基、甲氧基或其它烷氧基、甲基或其它烷基、芳基、羧酸、胺、酰胺、乙酰基、胍基或咪唑。其它预期的末端基团包括叠氮化物、炔烃、马来酰亚胺、醛、酰肼、羟胺、烷氧基胺或巯基部分。

[0062] 本领域普通技术人员了解用于PEG化聚合物的方法和技术,例如,通过开环聚合技术(ROMP)使用EDC(1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐)和NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)以使聚合物与终止于胺的PEG基团反应等。

[0063] 例如,所公开的颗粒能包括PEG和PL(G)A的二嵌段共聚物,其中例如,PEG部分可具有约1,000-20,000的数均分子量,如约2,000-20,000,如约2-约10,000(例如约5kDa),PL(G)A部分可具有约5,000-约20,000或约5,000-100,000的数均分子量,如约20,000-70,000,如约15,000-50,000(例如约16kDa)。

[0064] 例如,本文公开示范性治疗性纳米颗粒,包括约10-约99重量百分比的聚乳酸-聚乙二醇共聚物或聚乳酸-共-聚乙醇酸-聚乙二醇共聚物,或者约20-约80重量百分比,约40-约80重量百分比,或约30-约50重量百分比,或约70-约90重量百分比的聚乳酸-聚乙二醇共聚物或聚乳酸-共-聚乙醇酸-聚乙二醇共聚物。示范性聚乳酸-聚乙二醇共聚物能包括约15-约20kDa或约10-约25kDa数均分子量的聚乳酸和约4-约6或约2kDa-约10kDa数均分子量的聚乙二醇。

[0065] 在一些实施方案中,所述的聚乳酸-聚乙二醇共聚物可具有约0.6-约0.95数均分子量分数的聚乳酸,在一些实施方案中,为约0.7-约0.9,在一些实施方案中,为约0.6-约0.8,在一些实施方案中,为约0.7-约0.8,在一些实施方案中,为约0.75-约0.85,在一些实施方案中,为约0.8-约0.9,在一些实施方案中,为约0.85-约0.95。应理解聚乳酸数均分子

量分数可如下计算：共聚物聚乳酸组分的数均分子量除以聚乳酸组分数均分子量与聚乙二醇组分数均分子量之和。

[0066] 所公开的纳米颗粒可选包括约1-约50重量百分比的聚乳酸或聚乳酸-共-聚乙醇酸(不包括PEG),或可任选地包括约1-约50重量百分比或约10-约50重量百分比或约30-约50重量百分比的聚乳酸或聚乳酸-共-聚乙醇酸。例如,聚乳酸或聚乳酸-共-聚乙醇酸可具有约5-约15kDa或约5-约12kDa的数均分子量。示范性PLA可具有约5-约10kDa的数均分子量。示范性PLGA可具有约8-约12kDa的数均分子量。

[0067] 在一些实施方案中,治疗性纳米颗粒可包含约10-约30重量百分比的聚乙二醇,在一些实施方案中,约10-约25重量百分比,在一些实施方案中,约10-约20重量百分比,在一些实施方案中,约10-约15重量百分比,在一些实施方案中,约15-约20重量百分比,在一些实施方案中,约15-约25重量百分比,在一些实施方案中,约20-约25重量百分比,在一些实施方案中,约20-约30重量百分比,或在一些实施方案中,约25-约30重量百分比,其中聚乙二醇可以以聚乳酸-聚乙二醇共聚物、聚乳酸-共-聚乙醇酸-聚乙二醇共聚物或聚乙二醇均聚物存在。

[0068] EGFR配体

[0069] 本文提供的纳米颗粒可包括EGFR配体。所设想的EGFR部分可包括小分子、肽或蛋白。靶向部分可以是抗体,该术语意在包括抗体片段、抗体的特征性部分。抗体片段可包括scFv, Fv, scFab, Fab, VHH或F(ab')₂。能鉴定单链靶向部分,如用诸如噬菌体展示等过程鉴定。靶向部分可以是靶向肽或靶向拟肽,长度多至约50个残基或更多。所公开的聚合缀合物可用任何合适的缀合技术形成。

[0070] 在一些实施方案中,本文公开的EGFR靶向部分能缀合所公开的聚合物或共聚物(如PLA-PEG),且这种聚合缀合物可形成部分所公开的纳米颗粒。例如,铜介导的炔烃-叠氮化物环加成化学(CuAAC)可用于缀合EGFR靶向部分与PLA-PEG,如纳米颗粒表面上的PEG。在另一个实施方案中,可使用促进的应变(strain-promoted)叠氮化物-炔烃环加成(SPAAC)化学。例如,可合成单一大批PLA-PEG-叠氮化物聚合物,其在PEG末端(可大体稳定)和纳米颗粒表面上呈现叠氮化物基团,而不是靶向配体本身。用此聚合物形成的纳米颗粒在纳米颗粒表面上携带一些叠氮化物基团,且可以多种密度偶联具有对应应变的炔烃官能团的配体。这样,许多靶向配体可以个位数毫克的量合成,并就作为纳米颗粒缀合物结合进行筛选。例如,聚合物赋形剂和靶向配体上更稳定的叠氮化物(N₃)基团能用反应性二苯并环辛炔部分(DBCO)功能化。

[0071] 在其它实施方案中,EGFR配体和生物相容性聚合物(如生物相容性聚合物和聚乙二醇)可缀合在一起,使用诸如以下的技术:EDC-NHS化学(1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺)或者涉及马来酰亚胺或羧酸的反应,其能缀合巯基、胺或类似功能化聚醚的一个末端。靶向部分或药物与聚合物缀合形成聚合物-靶向部分缀合物或聚合物-药物缀合物,能在有机溶剂中进行,例如但不限于二氯甲烷、乙腈、氯仿、二甲基甲酰胺、四氢呋喃、丙酮等。特异性反应条件能由本领域普通技术人员仅使用常规实验确定。

[0072] 在另一组实施方案中,缀合反应可如下进行:使含羧酸官能团的聚合物(如聚酯醚化合物)与含胺的聚合物或其它部分(如EGFR部分)反应。例如,靶向部分可与胺反应形成含

胺部分,其随后能缀合聚合物(如PEG)的羧酸。这种反应可作为单步反应发生,即缀合不用中间物如N-羟基琥珀酰亚胺或马来酰亚胺进行。在一些实施方案中,所述EGFR部分可与接头如含胺接头反应形成含胺部分,其随后能缀合上述聚合物的羧酸。在一组实施方案中,可实现含胺部分与羧酸末端聚合物(如聚酯醚化合物)之间的缀合反应,这是通过向含羧酸末端聚合物的溶液加入含胺部分,溶于有机溶剂,例如(但不限于)二氯甲烷、乙腈、氯仿、四氢呋喃、丙酮、甲酰胺、二甲基甲酰胺、吡啶、二恶烷或二甲亚砜。羧酸末端聚合物可包含于有机溶剂,例如但不限于二氯甲烷、乙腈、氯仿、二甲基甲酰胺、四氢呋喃、丙酮。在一些情况中,含胺部分与羧酸末端聚合物之间的反应可自发发生。未缀合反应剂可在这类反应后洗去,聚合物可在溶剂中沉淀,例如乙醚、己烷、甲醇或乙醇。在某些实施方案中,缀合物可在含醇部分与聚合物羧酸官能团之间形成,其能与上面就胺和羧酸缀合物所述类似完成。

[0073] 本文所设想的EGFR配体作为,例如,所公开的纳米颗粒的部分,包括含以下序列(或其部分)的肽:YHWYGYTPQNV I, LARLLT, CEHGAME I C, AKFNDYWRW, TDCVIFGLETYCLR, SGCLDALWQCVY, LPDDSLPELICKVR, GPCVLIRDYLLCLE, VLCHRYHPICYT, MFCFRWYAGWSCVS, HFYPTKTPGY, AASRALWAFNSD, SYWGYTVDIRRGK, DPCTWEVWGRECLQ和SECFPLAPDWLSCIL。应理解EGFR肽可修饰成包括非天然氨基酸、氘化氨基酸等。例如,所公开的序列的色氨酸能被苯丙氨酸、丙氨酸和/或其它天然或非天然氨基酸取代。在额外的实施方案中,EGFR配体可用反应性二苯并环辛炔部分(DBCO)修饰。

[0074] 例如,所设想的EGFR配体包括具有约1200-约1900MW的肽。示范性改良EGFR肽包括选自下组的序列:

[0075] Ac-DPCTWEVWGRECLQGGK (PEG4-DBCO) -CONH₂,

[0076] Ac-DACTWEVWGRECLQGGK (PEG4-DBCO) -CONH₂,

[0077] Ac-DPCT (2Ind) GEV (5MeO) WGRECLQGGK (PEG4-DBCO) -CONH₂,

[0078] Ac-DPPenTWEVWGREPenLQGGK (PEG4-DBCO) -CONH₂,

[0079] AcDAPenTWEVWGREPenLQGGK (DBCO) -CONH₂,

[0080] Ac-DACT (2Ind) GEV (5MeO) WGRECLQ,GGK (DBCO) -CONH₂,

[0081] Ac-DPPenT (2Ind) GEV (5MeO) WGREPen LQGGK (DBCO) -CONH₂,

[0082] Ac-DAPenT (2Ind) GEV (5MeO) WGREPen, LQGGK (DBCO) -CONH₂,

[0083] Ac-DAPenTWEVWGREPenLQGGK (DBCO) -CONH₂,

[0084] Ac-DPCTWEVWGRECLQGGK (PEG5-DBCO) -CONH₂,

[0085] Ac-DACT (2Ind) GEV (5MeO) WGRECLQGGK (DBCO) -CONH₂,

[0086] AcDPPenT (2Ind) GEV (5MeO) WGREPenLQGGK (DBCO) -CONH₂和

[0087] AcDAPenT (2Ind) GEV (5MeO) WGREPenLQGGK (DBCO) -CONH₂,或其片段。

[0088] 在实施方案中,本文提供的纳米颗粒具有功能化的PLA-PEG(如用可功能化/偶联(例如直接或间接共价结合EGFR配体)的叠氮化物基团)。公开的纳米颗粒可包括PLA-PEG-功能化,在纳米颗粒表面上有约10%,约20%,约30%的总PEG末端基(如约10%-约40%功能化的PLA-PEG-叠氮化物(例如随后缀合有配体的叠氮化物功能化纳米颗粒)。例如,所公开的纳米颗粒可具有约4-约12%配体密度(如约5%或约10%配体密度,例如到C末端的赖氨酸侧链(包括Gly-Gly间隔区)),然后缀合叠氮化物纳米颗粒。例如,公开的纳米颗粒可具有约200-约500EGFR配体或约225或约450配体(如约200-约230配体或约400-约5000配体)

每纳米颗粒。

[0089] 治疗剂

[0090] 根据本公开,包括例如治疗剂(如抗癌剂)、诊断剂(如造影剂;放射性核素;和荧光、发光及磁性部分)、预防剂(如疫苗)和/或营养剂(如维生素、矿物质等)的任何物质可通过所公开的纳米颗粒递送。待递送和/或形成部分所公开纳米颗粒的示范性药剂包括但不限于小分子(如细胞毒性剂)、核酸(如siRNA、RNAi和微RNA剂)、蛋白(如抗体)、肽、脂质、碳水化合物、激素、金属、放射性元素和化合物、药物、疫苗、免疫药剂等,和/或其组合。

[0091] 活性剂或药物可以是治疗剂例如抗肿瘤剂如mTor抑制剂(如西罗莫司、替西罗莫司或依维莫司),长春花生物碱如长春新碱,双萜衍生物或紫杉烷如紫杉醇(或其衍生物如DHA-紫杉醇或PG-紫杉醇)或多西他赛。

[0092] 如上所讨论,所公开的纳米颗粒可包含治疗剂。所设想的物质包括化疗剂如紫杉烷剂、激酶抑制剂等。例如,所公开的纳米颗粒可包括(如治疗剂)一种或多种EGFR激酶抑制剂,如吉非替尼、厄洛替尼(erlotinib)和/或拉帕替尼的一种或多种。也考虑含酪氨酸激酶抑制剂的纳米颗粒,如伊马替尼、尼罗替尼、达沙替尼、博舒替尼、帕纳替尼和巴氟替尼。任何纳米颗粒实施方案能用达沙替尼取代伊马替尼、尼罗替尼、达沙替尼、博舒替尼、帕纳替尼和巴氟替尼,或例如任何其它Bcr-Abl酪氨酸激酶抑制剂。

[0093] 在一组实施方案中,所述治疗剂是药物或一种以上药物的组合。示范性组合或单独治疗剂包括化疗剂如多柔比星(阿霉素)、吉西他滨(健择)、道诺霉素、甲基苄肼、丝裂霉素、阿糖胞苷、依托泊苷、氮甲蝶呤、异长春花碱、5-氟尿嘧啶(5-FU)、长春花生物碱如长春花碱或长春新碱;博来霉素、紫杉醇(紫杉醇)、多西他赛(泰素帝)、卡巴他赛、阿地白介素、天冬酰胺酶、白消安、卡铂、克拉屈滨、喜树碱、CPT-11、10-羟基-7-乙基喜树碱(SN38)、达卡巴嗪、S-I卡培他滨、替加氟、5'脱氧氟尿苷、UFT、恩尿嘧啶、脱氧胞苷、5-氮杂胞嘧啶、5-氮杂脱氧胞嘧啶、别嘌呤醇、2-氯腺苷、三甲曲沙、氨基蝶呤、亚甲基-10-去氮杂氨基蝶呤(MDAM)、oxaplatin、吡铂、tetraplatin、赛特铂、铂-DACH、奥马铂、CI-973、JM-216和其类似物、表柔比星、磷酸依托泊苷、9-氨基喜树碱、10,11-亚甲二氧基喜树碱、karenitecin、9-硝基喜树碱、TAS 103、长春地辛、L-苯丙氨酸氮芥、ifosfamideme fosphamide、培磷酰胺、曲磷胺(trophosphamide)卡莫司汀、司莫司汀、埃博霉素A-E、雷替曲塞、6-巯嘌呤、6-巯鸟嘌呤、安吡啶、磷酸依托泊苷、karenitecin、阿昔洛韦、伐昔洛韦、更昔洛韦、金刚烷胺、金刚乙胺、拉米夫定、齐多夫定、贝伐单抗、曲妥珠单抗、利妥昔单抗、5-氟尿嘧啶,和其组合。

[0094] 可形成所公开的纳米颗粒的部分的潜在的合适的单独或组合药物的非限制性示例包括抗癌剂,包括例如卡巴他赛、米托蒽醌和盐酸米托蒽醌。在另一个实施方案中,有效负载可以是抗癌药物如20-表-1,25二羟基维生素D3、4-甘薯苦醇、5-乙炔基尿嘧啶、9-二氢紫杉醇、阿比特龙、阿西维辛、阿柔比星、盐酸阿考达唑、阿克罗宁、acylfiilvene、腺环戊醇(adeacypenol)、阿多来新、阿地白介素、all-tk拮抗剂、六甲蜜胺、氨莫司汀、安波霉素、醋酸阿美蒽醌、amidox、氨磷汀、氨鲁米特、氨基乙酰丙酸、氨柔比星、安吡啶、阿那格雷、阿那曲唑、穿心莲内酯、血管生成抑制剂、拮抗剂D、拮抗剂G、安雷利克斯、安曲霉素、抗背部化形态形成蛋白-1(anti-dorsalizing morphogenetic protein-1)、抗雌激素药、抗瘤酮、反义寡核苷酸、甘氨酸阿非迪霉素、细胞凋亡基因调节剂、细胞凋亡调节剂、脱嘌呤酸、ARA-CDP-DL-PTBA、精氨酸脱氨酶、天冬酰胺酶、曲林菌素、asulacriner、阿他美坦、阿莫司汀、

axinastatin 1、axinastatin 2、axinastatin 3、阿扎胞苷、阿扎司琼、阿扎毒素、重氮酪氨酸、阿扎替派、阿佐霉素、巴卡丁III衍生物、balanol、巴马司他、benzochlorins、苯佐替派、苯甲酰星孢菌素、 β 内酰胺衍生物、 β -alethine、betaclamycin B、桦木酸、BFGF抑制剂、比卡鲁胺、比生群、盐酸比生群、bisazuidinylspermine、双奈法德、双甲磺酸双奈法德、bistratene A、比折来新、博来霉素、硫酸博来霉素、BRC/ABL拮抗剂、breflate、布喹那钠、溴匹立明、布度钛、白消安、丁硫氨酸亚砷亚胺、放线菌素、卡泊三醇、卡弗他丁C、卡普唑酮、喜树碱衍生物、金丝雀痘IL-2、卡培他滨、caraceraide、卡巴他赛、卡贝替姆、卡铂、甲酰胺-氨基-三唑、羧胺三唑、carest M3、卡莫司汀、earn 700、软骨源性抑制剂、盐酸卡柔比星、卡泽来新、酪蛋白激酶抑制剂、栗精胺、抗菌肽B、西地芬戈、西曲瑞克、苯丁酸氮芥、二氢吡吩类、氯喹啉磺胺、西卡前列素、西罗霉素、顺铂、顺式吡啶、克拉屈滨、氯米芬类似物、克霉唑、collismycin A、collismycin B、考布他汀A4、考布他汀类似物、conagenin、crambescidin 816、克立那托、甲磺酸克立那托、念珠藻素8、念珠藻素A衍生物、curacin A、环戊蒽醌类(cyclopentantraquinones)、环磷酰胺、环普拉坦(cycloplatam)、塞培霉素(cypemycin)、阿糖胞苷、阿糖胞苷ocfosfate、溶细胞因子、cytostatin、达卡巴嗪、达昔单抗、更生霉素、盐酸柔红霉素、地西他滨、脱氢膜海鞘素B、地洛瑞林、dexifosfamide、右奥马铂、右雷佐生、右维拉帕米、地扎胍宁、甲磺酸地扎胍宁、地吡酮、膜海鞘素B、didox、二乙基去甲精胺(diethyhiorspermine)、二氢-5-氮杂胞苷、二氧阿霉素(dioxamycin)、联苯基螺莫司汀、多西紫杉醇、二十二烷醇、多拉司琼、去氧氟尿苷、多柔比星、盐酸多柔比星、屈洛昔芬、柠檬酸屈洛昔芬、丙酸屈他雄酮、屈大麻酚、达佐霉素、duocannycin SA、依布硒、依考莫司汀、依达曲沙、依地福新、依决洛单抗、eflomithine、盐酸eflomithine、榄香烯、elsarnitruicin、乙嘧替氟、恩洛铂、恩普氨酯、依匹哌啉、表柔比星、盐酸表柔比星、爱普列特、厄布洛唑、红细胞基因治疗载体系统、盐酸依索比星、雌莫司汀、雌莫司汀类似物、雌莫司汀磷酸钠、雌激素激动剂、雌激素拮抗剂、依他硝唑、依托泊苷、磷酸依托泊苷、氯苯乙嘧胺、依西美坦、法倔唑、盐酸法倔唑、法扎拉滨、芬维A胺、非格司亭、非那雄胺、夫拉平度(flavopiridol)、氟卓斯汀、氟尿苷、氟海星酮(fluasterone)、氟达拉滨、磷酸氟达拉滨、盐酸氟道儒尼星(fluorodaunorunicin hydrochloride)、氟尿嘧啶、氟西他滨、福酚美克、福美坦、磷喹酮、福司曲星、福司曲星钠、福莫司汀、钆texaphyrin、硝酸镓、加洛他滨、加尼瑞克、明胶酶抑制剂、吉西他滨、盐酸吉西他滨、谷胱甘肽抑制剂、hepsulfam、调蛋白(heregulin)、环己烷双乙酰胺、羟基脲、金丝桃素、伊班膦酸、伊达比星、盐酸伊达比星、艾多昔芬、依决孟酮、异环磷酰胺、ihnofosine、伊洛马司他、咪唑并吡啶酮类、咪喹莫特、免疫刺激剂肽、胰岛素样生长因子-1受体抑制剂、干扰素激动剂、干扰素 α -2A、干扰素 α -2B、干扰素 α -N1、干扰素 α -N3、干扰素 β -1A、干扰素 γ -1B、干扰素、白介素、碘苄胍、碘阿霉素、异丙铂(iproplatm)、伊立替康、盐酸伊立替康、伊罗普拉、伊索拉定、异本格唑(isobengazole)、isohomohalicondrin B、伊他司琼、jasplakinolide、kahalalide F、三醋酸片螺素-N、兰瑞肽、醋酸兰瑞肽、leinamycin、来格司亭、硫酸香菇多糖、来普他汀(leptolstatin)、来曲唑、白血病抑制因子、白细胞 α 干扰素、醋酸亮丙瑞林、亮丙瑞林/雌激素/孕酮、亮丙瑞林、左旋咪唑、利阿唑、盐酸利阿唑、线性多胺类似物、亲脂二糖肽、亲脂铂化合物、lissoclinamide、洛铂、蚯蚓磷脂、洛美曲索、洛美曲索钠、洛莫司汀、氯尼达明、洛索蒽醌、盐酸洛索蒽醌、洛伐他汀、洛索立滨、勒托替康、镧texaphyrin、利索茶碱(lysofylline)、裂解肽、美坦新、

mannostatin A、马立马司他、马索罗酚、乳腺丝抑蛋白、基质裂解素抑制剂、基质金属蛋白酶抑制剂、美登素、盐酸氮芥、醋酸甲地孕酮、醋酸美仑孕酮、美法仑、美诺立尔、美巴龙 (merbarone)、巯嘌呤、阿伏瑞林、甲硫氨酸酶、氨甲蝶呤、氨甲蝶呤钠、甲氧氯普胺、氯苯氨啉、美妥替哌、微藻蛋白激酶C抑制剂、MIF抑制剂、米非司酮、米替福新、米立司亭、错配双链RNA、米丁度胺、米托霉素 (mitocarcin)、丝裂红素 (mitocromin)、米托洁林、米托胍脲、二溴卫矛醇、米托马星、丝裂霉素、丝裂霉素类似物、米托蒽胺、米托司培、米托坦、米托毒素成纤维细胞生长因子-皂草素、米托蒽醌、盐酸米托蒽醌、莫法罗汀、莫拉司亭、单克隆抗体、人绒毛膜促性腺激素、单磷酸脂质a/分支杆菌 (myobacterium) 细胞壁SK、莫哌达醇、多药抗性基因抑制剂、基于多肿瘤抑制蛋白 (suppressor) -1的治疗、芥类抗癌剂、mycaperoxide B、分枝杆菌细胞壁提取物、麦考酚酸、myriaporone、n-乙酰地那林、那法瑞林、那瑞替喷 (nagrestip)、纳洛酮/喷他佐辛、napavin、萘萘二醇 (naphterpin)、那托司亭、奈达铂、奈莫柔比星、奈立膦酸、中性肽链内切酶、尼鲁米特、二左霉素 (nisamycin)、一氧化氮调节剂、氮氧化物抗氧化剂、尼多林 (nitruillyn)、诺考达唑、诺加霉素、n-取代的苯甲酰胺、06-苜基鸟嘌呤、奥曲肽、okicenone、寡核苷酸、奥那司酮、昂丹司琼、oracin、口服细胞因子诱导剂、奥马铂、奥沙特隆、奥沙利铂、奥诺霉素 (oxaunomycin)、奥昔舒仑、紫杉醇、紫杉醇类似物、紫杉醇衍生物、帕劳胺 (palauamine)、棕榈酰根霉素、帕米膦酸、人参炔三醇、帕诺米芬、parabactin、帕折普汀、培门冬酶、peldesine、培利霉素、戊氮芥、戊聚糖聚硫酸酯钠、喷司他丁、pentrozole、硫酸培洛霉素、全氟溴烷、培磷酰胺、紫苏子醇、phenazinomycin、苯乙酸盐、磷酸酶抑制剂、溶链菌制剂、盐酸毛果芸香碱、哌泊溴烷、哌泊舒凡、吡柔比星、吡曲克辛、盐酸吡罗蒽醌、placetin A、placetin B、纤溶酶原激活物抑制剂、铂络合物、铂化合物、铂-三胺络合物、普卡霉素、普洛美坦、吡吩姆钠、泊非霉素、泼尼莫司汀、盐酸丙卡巴肼、丙基双-吡啶酮、前列腺素J2、前列腺癌抗雄激素、蛋白酶体抑制剂、基于蛋白A的免疫调节物、蛋白激酶C抑制剂、蛋白酪氨酸磷酸酶抑制剂、嘌呤核苷磷酸化酶抑制剂、嘌呤霉素、嘌呤霉素盐酸盐、红紫素、pyrazorurin、吡唑啉吡啶、吡哆醛化血红蛋白聚氧乙烯缀合物、RAF拮抗剂、雷替曲塞、雷莫司琼、RAS法呢基蛋白转移酶抑制剂、RAS抑制剂、RAS-GAP抑制剂、去甲基化瑞替普汀、依替膦酸铈RE 186、根霉素、利波腺苷、核酶、RH retinarnide、RNAi、罗谷亚胺、罗希吐碱、罗莫肽、罗喹美克、卢比酮B1 (rubiginone B1)、ruboxyl、沙芬戈、盐酸沙芬戈、saintopin、亚硝脲、肉松醇A、沙格司亭、SDI1模拟物、司莫司汀、衰老源性抑制剂1、有义寡核苷酸、信号传导抑制剂、信号转导调节剂、辛曲素、单链抗原结合蛋白、西佐喃、索布佐生、硼卡钠、苯乙酸钠、solverol、生长调节素结合蛋白、索纳明、sparfosafe钠、斯帕磷酸、司帕霉素、斯匹卡霉素D (spicamycin D)、盐酸螺旋锗、螺莫司汀、螺铂、斯耐潘定、海绵抑制素1、角鲨胺、干细胞抑制剂、干细胞分裂抑制剂、地巴胺 (stipiamide)、链黑菌素、链佐星、基质溶素抑制剂、磺胺嘧啶 (sulfinosine)、磺氯苯脲、强效血管活性肠肽拮抗剂、suradista、舒拉明、苦马豆素、合成的葡糖氨基聚糖、他利霉素、他莫司汀、甲碘化他莫昔芬、牛碘莫司汀、他扎罗汀、替可加兰钠、替加氟、tellurapyrylium、端粒酶抑制剂、盐酸替洛蒽醌、替莫泊芬、替莫唑胺、替尼泊昔、替罗昔隆、鞣内酯、四氯十氧化物 (tetrachlorodecaoxide)、四唑胺 (tetrazomine)、thaliblastine、沙利度胺、硫咪嘌呤、噻可拉林、硫鸟嘌呤、塞替派、血小板生成素、血小板生成素模拟物、胸腺法新、胸腺生成素受体激动剂、胸腺曲南、促甲状腺激素、噻唑羧胺核苷、乙基伊托普林锡 (tin ethyl

etiopurpurin)、替拉扎明、二氯环戊二烯钛、盐酸拓泊替康、拓扑生素 (topsentin)、托瑞米芬、柠檬酸托瑞米芬、全能干细胞因子、翻译抑制剂、醋酸曲托龙、维甲酸、三乙酰基尿苷、曲西瑞宾、磷酸曲西瑞宾、三甲曲沙、三甲曲沙葡萄糖醛酸酯、曲普瑞林、托烷司琼、盐酸妥布氯唑、妥罗雄脲、酪氨酸激酶抑制剂、酪氨酸磷酸化抑制剂、UBC抑制剂、乌苯美司、乌拉莫司汀、乌瑞替哌、泌尿生殖窦源性生长抑制因子、尿激酶受体拮抗剂、伐普肽、variolin B、维拉雷琐、藜芦胺、弗丁 (verdins)、维替泊芬、硫酸长春碱、硫酸长春新碱、长春地辛、硫酸长春地辛、硫酸长春匹定、硫酸长春甘酯、硫酸长春罗辛、长春瑞滨或酒石酸长春瑞滨、硫酸长春罗定、vinxaltine、硫酸长春利定、vitaxin、伏氯唑、扎诺特隆、折尼铂、zilascorb、净司他丁、净司他丁斯酯或盐酸佐柔比星。

[0095] 在实施方案中,例如,除了活性剂外所公开的纳米颗粒可包括疏水性酸。例如,所公开的纳米颗粒还可包括疏水性酸(如脂肪酸和/或胆汁酸)和/或通过含疏水性酸的过程制备。在此实施方案中,考虑任何合适的疏水性酸,例如饱和脂肪酸如己酸、庚酸、辛酸、壬酸、癸酸、十一酸、月桂酸、十三酸、肉豆蔻酸、十五酸、棕榈酸、十七酸、硬脂酸、十九酸、花生酸、二十一烷酸、山嵛酸、二十三烷酸、二十四烷酸、二十五烷酸、蜡酸、二十七烷酸、褐煤酸、二十九烷酸、蜂花酸、三十一烷酸、虫漆醋酸、叶虱酸、格地酸、蜡塑酸、三十六烷酸,和其组合。

[0096] 不饱和脂肪酸的非限制性示例包括十六碳三烯酸、 α -亚麻酸、亚麻油酸、二十碳三烯酸、二十碳四烯酸、二十碳五烯酸、二十一碳五烯酸、二十二碳五烯酸、二十二碳六烯酸、二十四碳五烯酸、二十四碳六烯酸、亚油酸、 γ -亚麻酸、二十碳二烯酸、二高 γ 亚麻酸、花生四烯酸、二十二碳二烯酸、二十二碳四烯酸、二十二碳五烯酸、二十四碳四烯酸(tetracosatetraenoic acid)、二十四碳五烯酸、油酸、二十烯酸、二十碳三烯酸、芥酸、神经酸、瘤胃酸、 α -十八碳三烯酸、 β -十八碳三烯酸、兰花酸(jacaric acid)、 α -桐酸、 β -桐酸、梓树酸、石榴酸、rumelenic acid、 α -十八碳四烯酸、 β -十八碳四烯酸、bosseopentaenoic acid、皮诺敛酸、罗汉松酸、棕榈油酸、十八碳烯酸、鳕油酸、芥酸,和其组合。在一些实施方案中,所述疏水性酸可以是胆汁酸。胆汁酸的非限制性示例包括鹅去氧胆酸、熊去氧胆酸、去氧胆酸、猪胆酸(hychoic acid)、 β -鼠胆酸(muricholic acid)、胆酸、氨基酸缀合的胆汁酸,和其组合。氨基酸缀合的胆汁酸可缀合任何合适的氨基酸。在一些实施方案中,所述氨基酸结合胆汁酸是甘氨酸缀合的胆汁酸或牛磺酸缀合的胆汁酸。

[0097] 所公开的治疗性纳米颗粒可包括约0.2-约25重量百分比的治疗剂,或例如,纳米颗粒的约1-约10重量百分比,约0.5-约6重量百分比,约0.1-约3重量百分比或约2-约12重量百分比。

[0098] 在一些实施方案中,治疗性纳米颗粒可包括聚合物-药物缀合物。例如,药物可缀合公开的聚合物或共聚物(如PLA-PEG),这类聚合物-药物缀合物可形成所公开纳米颗粒的一部分。例如,公开的治疗性纳米颗粒可选包括约0.2-约30重量百分比的PLA-PEG或PLGA-PEG,其中PEG用药物功能化(如PLA-PEG-药物)。

[0099] 药物配制物

[0100] 根据另一方面,本文公开的纳米颗粒能与药学上可接受载体组合以形成药物组合物。本领域技术人员应理解,载体可基于下述给药途径、靶组织位置、所递送药物、药物递送时程等来选择。

[0101] 药物组合物能通过本领域已知的任何方式给患者施用,包括口服和胃肠外途径。本文所用的术语“患者”指人以及非人,包括例如哺乳动物、鸟、爬行动物、两栖动物和鱼。例如,非人可以是哺乳动物(如啮齿动物、小鼠、大鼠、兔、猴、狗、猫、灵长类动物或猪)。在某些实施方案中,需要胃肠外途径,因为其避免接触消化道中发现的消化酶。根据这类实施方案,组合物可通过注射(如静脉内、皮下或肌肉内、腹膜内注射)、直肠、阴道、局部(作为粉末、乳膏、油膏或滴剂)或吸入(作为喷雾)施用。

[0102] 在特定实施方案中,给需要的对象全身施用所述纳米颗粒,如通过IV输注或注射施用。

[0103] 可根据本领域已知方式配制可注射制剂例如无菌可注射水性或油质悬液,使用合适的分散或润湿剂和悬浮剂。无菌可注射制剂也可以是溶于无毒胃肠外可接受稀释剂或溶剂的无菌可注射溶液、悬液或乳液,例如溶于1,3-丁二醇的溶液。可采用的可接受载剂和溶剂是水、林格溶液、U.S.P. 和等渗氯化钠溶液。另外,无菌的固定油常规用作溶剂或悬浮介质。出于此目的,能采用任何平衡的固定油,包括合成的单甘酯或双甘酯。另外,脂肪酸如油酸用于制备注射剂。在一个实施方案中,所述缀合物悬于含1% (w/v) 羧甲基纤维素钠和0.1% (v/v) TWEEN™ 80的载体流体。可注射制剂能灭菌,例如通过细菌过滤器过滤,或通过以无菌固体组合物形式纳入杀菌剂灭菌,所述组合物能在使用前溶解或分散于无菌水或其它无菌可注射介质。

[0104] 用于口服给药的固体剂型包括胶囊、片剂、药丸、粉末和颗粒。采用这些固体剂型,包封或未包封的缀合物混合至少一种惰性的、药学上可接受的赋形剂或载体如柠檬酸钠或磷酸二钙和/或(a) 填充剂或增充剂如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和硅酸,(b) 粘合剂例如羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯胶,(c) 湿润剂如甘油,(d) 崩解剂如琼脂-琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠,(e) 溶液阻滞剂如石蜡,(f) 吸收加速剂如季铵化合物,(g) 润湿剂例如鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯,(h) 吸收剂如高岭土和膨润土和(i) 润滑剂如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠,和其混合物。在胶囊、片剂和药丸的情况中,剂型也可包括缓冲剂。

[0105] 应理解含治疗剂的纳米颗粒准确剂量由医生个人根据待治疗患者来选择,一般,调整剂量和给药以向所治疗患者提供有效量的治疗剂纳米颗粒。如本文所用,“有效量”的含治疗剂的纳米颗粒指引起所需生物反应必要的量。本领域普通技术人员应理解,有效量的含治疗剂的纳米颗粒可根据因素如所需生物学终点、待递送药物、靶组织、给药途径等而变化。例如,有效量的含治疗剂的纳米颗粒可以是引起肿瘤尺寸减少的量,这是通过所需量持续所需时间段。可纳入考虑的额外因素包括疾病状态的严重度;所治疗患者的年龄、体重和性别;给药的饮食、时间和频率;药物组合;反应敏感性;和对治疗的耐受性/反应。

[0106] 纳米颗粒可以剂量单位形式配制以用于方便给药和剂量均匀性。本文所用的表示“剂量单位形式”指适合待治疗患者的纳米颗粒物理分开单元。然而,应理解组合物的总日用量由主治医生在合理医学判断范围内决定。对于任何纳米颗粒,治疗有效剂量能最初在细胞培养试验或动物模型中估计,所述动物模型通常是小鼠、兔、狗或猪。动物模型也用于实现所需的浓度范围和给药途径。这类信息随后可以用于确定就人施用而言有用的剂量和途径。纳米颗粒的疗效和毒性能通过细胞培养或实验动物中的标准药物程序确定,如ED₅₀ (该剂量在50%群体中治疗有效) 和LD₅₀ (该剂量对50%群体致死)。毒性与治疗效果的剂量

比是治疗指数,其能表示为LD₅₀/ED₅₀之比。显示大治疗指数的药物组合物可用于一些实施方案。获自细胞培养试验和动物研究的数据能用于配制一定范围的人使用剂量。

[0107] 在一些实施方案中,考虑适合冷冻的组合物,包括本文公开的纳米颗粒和适合冷冻的溶液,如糖例如单、二或多糖,如蔗糖和/或海藻糖、和/或盐和/或环糊精溶液被加入纳米颗粒悬液。糖(如蔗糖或海藻糖)可作为例如冷冻保护剂以防止颗粒在冷冻后聚集。例如,本文提供纳米颗粒制剂,包括多种公开的纳米颗粒、蔗糖、离子卤化物和/或水;其中纳米颗粒/蔗糖/水/离子卤化物是约3-40%/10-40%/20-95%/0.1-10% (w/w/w/w) 或约5-10%/10-15%/80-90%/1-10% (w/w/w/w)。例如,这种溶液可包括本文公开的纳米颗粒,约5%-约20%重量的蔗糖和离子卤化物如氯化钠,浓度为约10-100mM。另一示例中,本文提供纳米颗粒制剂,包括多种公开的纳米颗粒、海藻糖、环糊精和/或水;其中纳米颗粒/海藻糖/水/环糊精是约3-40%/1-25%/20-95%/1-25% (w/w/w/w) 或约5-10%/1-25%/80-90%/10-15% (w/w/w/w)。

[0108] 例如,所设想的溶液可包括本文公开的纳米颗粒,约1%-约25%重量的二糖如海藻糖或蔗糖(例如约5%-约25%海藻糖或蔗糖,如约10%海藻糖或蔗糖,或约15%海藻糖或蔗糖,如约5%蔗糖)重量)和环糊精如β-环糊精,浓度为约1%-约25%重量(例如约5%-约20%,如10%或约20%重量,或约15%-约20%重量的环糊精)。所设想的制剂可包括多种公开的纳米颗粒(如具有PLA-PEG和活性剂的纳米颗粒)和约2%-约15wt% (或约4%-约6wt%,如约5wt%)蔗糖及约5wt%-约20% (例如约7wt%-约12wt%,如约10wt%)环糊精,例如HPβCD。

[0109] 动态光散射(DLS)可用于测量粒径,但其依赖于布朗运动,因而该技术可能检测不到一些更大的颗粒。激光衍射依赖于颗粒与悬浮介质之间的折射率差异。所述技术能检测亚微米到毫米范围的颗粒。相对小的(如约1-5重量%)量的较大颗粒能在纳米颗粒悬液中测定。单颗粒光学传感技术(SPOS)使用稀释悬液的不透光性以计数约0.5μm的个体颗粒。通过了解所测样品的颗粒浓度,能计算聚集物的重量百分比或聚集物浓度(颗粒/mL)。

[0110] 在一些实施方案中,一种或多种离子卤化物盐可用作糖之外的冻干保护剂,所述糖如蔗糖、海藻糖或其混合物。糖可包括二糖、单糖、三糖和/或多糖,且可包括其它赋形剂,如甘油和/或表面活性剂。任选地,环糊精可单独或除了其它赋形剂以外,纳入作为冻干保护剂,例如,环糊精可加入取代离子卤化物盐或糖。或者,除了离子卤化物盐和/或糖外,可加入环糊精。

[0111] 合适的离子卤化物盐可包括氯化钠、氯化钙、氯化锌或其混合物。额外的合适离子卤化物盐包括氯化钾、氯化镁、氯化铵、溴化钠、溴化钙、溴化锌、溴化钾、溴化镁、溴化铵、碘化钠、碘化钙、碘化锌、碘化钾、碘化镁或碘化铵,和/或其混合物。在一个实施方案中,约1-约15重量百分比的蔗糖可与离子卤化物盐一起使用。合适的环糊精可包括α-环糊精、β-环糊精、γ-环糊精,或其混合物。用于本文所公开组合物的示范性环糊精包括羟丙基-β-环糊精(HPβCD)、羟乙基-β-环糊精、磺丁基醚-β-环糊精、甲基-β-环糊精、二甲基-β-环糊精、羧甲基-β-环糊精、羧甲基乙基-β-环糊精、二乙基-β-环糊精、三-O-烷基-β-环糊精、糖基-β-环糊精和麦芽糖基-β-环糊精。在一个实施方案中,约1-约25重量百分比的海藻糖(例如约10%-约15%,如5-约20%重量)可与环糊精一起使用。在一个实施方案中,冻干的药物组合物可包括约1-约25重量百分比的β-环糊精。示范性组合物可包括纳米颗粒(包含PLA-PEG-

EGFR配体,活性/治疗剂),约4%-约6%(如约5%wt百分比)蔗糖和约8-约12重量百分比(如约10wt.%)HPbCD。

[0112] 治疗方法

[0113] 在一些实施方案中,靶向性纳米颗粒可用于治疗、缓解、改善、减轻疾病、紊乱和/或病症的一种或多种症状或特征,延迟其发生,抑制其发展,降低其严重度和/或减少其发生率。在一些实施方案中,靶向性纳米颗粒可用于治疗癌症,如实体瘤癌症和/或例如肺癌(如非小细胞肺癌)、肛门癌和/或多形性成胶质细胞瘤,其中例如,所述治疗包括施用有效量的某些所公开的纳米颗粒。在其它实施方案中,本文提供治疗和/或改善有需要的患者的炎性疾病(如牛皮癣、湿疹和/或动脉粥样硬化)的方法,包括施用有效量的所公开纳米颗粒。

[0114] 一方面,提供给患有癌症或其它所公开的适应症的对象施用组合物的方法。术语“癌症”包括癌前病变以及恶性肿瘤。癌症包括但不限于血癌(如慢性髓细胞性白血病、慢性粒细胞白血病、费城染色体阳性急性淋巴细胞白血病、套细胞淋巴瘤)、前列腺癌、胃癌、口咽癌、宫颈癌、肛门癌、胆囊癌、胆管癌、肠癌、结直肠癌、皮肤癌如黑素瘤或基底细胞癌、肺癌(如小细胞肺癌或非小细胞肺癌(例如腺癌、鳞状细胞癌))、乳腺癌、头颈癌、支气管癌、胰腺癌、尿膀胱癌、脑或中枢神经系统癌、扁桃腺癌、周围神经系统癌、食管癌、口腔或咽部癌、肝癌(如肝细胞癌)、肾癌(如肾细胞癌)、睾丸癌、胆道癌、小肠或阑尾癌、胃肠道间质瘤、唾液腺癌、甲状腺癌(如滤泡性甲状腺癌和未分化甲状腺癌)、肾上腺癌、骨肉瘤、软骨肉瘤、血液组织癌症,治疗有KRas突变的癌症,治疗难治性癌等。“癌细胞”能采用肿瘤形式(即实体瘤),在对象内单独存在(如白血病细胞),或是衍生自癌变的细胞系。所公开的纳米颗粒可用于治疗肾细胞癌。在另一个实施方案中,是公开的纳米颗粒可用于治疗肾癌、多形性成胶质细胞瘤、套细胞淋巴瘤或皮肤卡波济氏肉瘤。

[0115] 癌症可能与多种身体症状相关。癌症症状一般取决于肿瘤的类型和位置。例如,肺癌能导致咳嗽、气促和胸痛,而结肠癌通常导致腹泻、便秘和便血。然而,给出一些示例,以下症状通常一般与许多癌症相关:发烧、发冷、盗汗、咳嗽、呼吸困难、体重减轻、食欲不振、厌食、恶心、呕吐、腹泻、贫血、黄疸、肝肿大、咯血、疲劳、不适、认知紊乱、抑郁、内分泌障碍、嗜中性白血球减少症、疼痛、不愈合性疮疡、肿大的淋巴结、周围神经病和性功能障碍。所公开的纳米颗粒可用于治疗癌症的身体症状。

[0116] 一方面,提供治疗癌症(如白血病)的方法。应理解诸如感染、炎症、遗传病等的其它治疗方法能如本文所公开完成。在一些实施方案中,所述癌症治疗包括给需要的对象施用治疗有效量的所公开纳米颗粒,以这样的量施用这样的时间是达到所需结果必需的。在某些实施方案中,所公开纳米颗粒的“治疗有效量”是有效治疗、缓解、改善、减轻癌症一种或多种症状或特征,延迟其发生,抑制其发展,降低其严重度和/或减少其发生率的量。

[0117] 一方面,提供给患有癌症(如白血病)的对象施用组合物的方法。在一些实施方案中,可以以达到所需结果(即治疗癌症)所必需的量和时间给对象施用颗粒。在一些实施方案中,可以以达到所需结果(即癌症缓解)所必需的量和时间给对象施用颗粒。在某些实施方案中,所公开纳米颗粒的“治疗有效量”是有效治疗、缓解、改善、减轻所公开疾病一种或多种症状或特征,延迟其发生,抑制其发展,降低其严重度和/或减少其发生率的量。

[0118] 这里还考虑通过施用所公开的纳米颗粒来治疗接受器官移植的患者的方法。本文

考虑的其它方法包括通过施用有效量所公开纳米颗粒来治疗患有结节性硬化症和/或孤独症患者的方法。

[0119] 本文考虑的方法包括例如预防或阻止患者血管中的新生内膜增生,例如在血管病变中接受裸金属支架的患者,包括施用含所公开非纳米颗粒的组合物。本文还考虑治疗或预防再狭窄(如在接受支架的患者中)的方法,包括施用所公开的纳米颗粒。

[0120] 考虑的方法包括治疗炎症性疾病,其可以是炎症性肠病,如克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、胶原性结肠炎、淋巴细胞性结肠炎、缺血性结肠炎、改道性结肠炎、白塞氏病或未定型结肠炎。在其它实施方案中,提供在需要的患者中治疗肠道易激综合征的方法。所述方法包括给患者施用治疗有效量的纳米颗粒。在一些实施方案中,所述纳米颗粒可包含治疗剂。例如,在某些实施方案中,所述治疗剂可以是抗炎剂,如上所述。

[0121] 治疗操作涉及给健康个体(即不展示任何癌症症状和/或未诊断有癌症的对象)施用治疗有效量的所公开的纳米颗粒。例如,健康个体可在癌症发展和/或癌症症状开始前,用所公开的纳米颗粒“免疫”;有风险的个体(如患者有癌症家族史;患者携带一个或多个与癌症发展相关的基因突变;患者有与癌症发展相关的遗传多态性;患者感染有与癌症发展相关的病毒;患者有与癌症发展相关的习惯和/或生活方式;等等)能与癌症症状开始基本同时(如48小时内、24小时内或12小时内)治疗。当然,已知有癌症的个体可在任何时间接受治疗。

[0122] 在其它实施方案中,所公开的纳米颗粒能用于抑制癌细胞生长,如骨髓性白血病癌细胞。本文所用的术语“抑制癌细胞生长”或“遏制癌细胞生长”指任何减缓癌细胞增殖和/或迁移速度,阻滞癌细胞增殖和/或迁移,或杀死癌细胞,从而相较未治疗对照癌细胞的观察或预测生长速度,癌细胞生长速度降低。术语“抑制生长”也能指癌细胞或肿瘤尺寸减小或消失,以及其转移潜能降低。优选地,这种细胞水平抑制可在患者中减少癌尺寸、阻止生长、降低侵袭性或者预防或抑制转移。本领域技术人员能通过任意多种合适标记来容易地确定癌细胞生长是否受抑制。

[0123] 通过例如癌细胞在特定细胞周期时相阻滞,如在细胞G2/M期阻滞,可证实癌细胞生长抑制。癌细胞生长抑制也能通过直接或间接测量癌细胞或肿瘤尺寸来证实。在人类癌症患者中,这种测量一般用熟知的成像方法完成,如磁共振成像、计算机化X射线轴向分层造影和X射线。癌细胞生长也能间接确定,如通过测定循环癌胚抗原、前列腺特异抗原或其它癌特异抗原的水平,所述抗原与癌细胞生长相关。癌生长抑制一般也与对象生存延长和/或增加的健康及康乐相关。本文也提供向患者施用本文所公开纳米颗粒的方法,所述纳米颗粒包括活性剂和EGFR靶向部分,其中,施用患者后,这种纳米颗粒相较单独施用药剂(即不作为公开的纳米颗粒)大幅降低分布体积和/或大幅降低游离 C_{max} 。

[0124] 2012年6月26日授权、题为“载药聚合纳米颗粒以及制备和使用其的方法 (Drug Loaded Polymeric Nanoparticles and Methods of Making and Using Same)”的美国专利号8,206,747通过引用全文纳入本文。

实施例

[0125] 通过参考以下实施例会更易理解现在大体描述的所公开的纳米颗粒,所述实施例纳入仅用于阐明某些方面和实施方案的目的,且不意在以任何方式限制所公开的纳米颗

粒。

[0126] 实施例1:纳米颗粒乳化过程

[0127] 下述过程使用固体含量增加的油相。该过程的总流程图示于图1,工艺流程图示于图2。通过降低乳化油相的溶剂含量,当纳米颗粒(NP)硬化时,损失到淬火液(quench fluid)的药物更少。选择固体和溶剂体系以避免过度粘稠,其可能限制乳化成~100nm液滴的能力。使用相对较低分子量的聚合物(~16kDa-5kDa的PLA-PEG)允许配制物在高固体含量保持足够低的粘性。选择的溶剂体系具有合适的溶剂化力以在高浓度保持药物在溶液中。使用共溶剂体系(通常79:21乙酸乙酯:苯醇)允许多至50%固体的连续溶液,聚合物:活性剂混合物为80:20。

[0128] 形成有机相,由活性剂与聚合物(共聚物和带配体的共聚物)的混合物构成。有机相与水性相以约1:5比例(油相:水性相)混合,其中水性相由表面活性剂和一些溶解的溶剂构成。为实现高载药量,使用含约30%固体的有机相。

[0129] 形成有机相,由活性剂与聚合物(均聚物、共聚物和带配体的共聚物)的混合物构成。组成和有机溶剂列于表1。有机相与水性相以约1:5比例(油相:水性相)混合,其中水性相由表面活性剂和一些溶解的溶剂构成。主乳液如下形成:在简单混合下或通过使用转子定子均质机来组合2个相。主乳液随后用高压均质机形成细乳液。细乳液随之通过在混合下加入去离子水来淬火。淬火液:乳液比是约8.5:1。然后,向淬火液加入25%(wt%)吐温(Tween) 80溶液以达到总体约2%吐温80。这用于溶液游离、未包封的药物,并使纳米颗粒分离过程可行。纳米颗粒随后通过离心或超滤/透析过滤分离。

[0130] 一套标准的纳米乳液条件如下所提供:

[0131] 表1. 靶向纳米颗粒批-30%固体

[0132]

属性	示例值
共聚物(类型/量)	16/5PLA-PEG, 40%, 有1wt%作为配体-PEG-PLA
药物(量)	20%
有机溶剂(类型/量)	乙酸乙酯(EA), 79%
有机共溶剂(类型/量)	苯醇(BA), 21%
水相	1%胆酸钠, 2%BA, 4%EA, 溶于水
油相中的[固体]	30wt%
属性	示例值
粒径	114.1nm
载药量	11.85%

[0133] 实施例2:材料与方法

[0134] 除非另有说明,下列材料与方法用于本文实施例部分所述的全部实验。

[0135] 肽合成

[0136] 肽合成用标准Fmoc/tBu固相肽合成(SPPS)在CEM Liberty Blue微波辅助自动肽合成仪上进行。所有氨基酸获自商业来源(Novabiochem, Anaspec, Bachem, Chem-Impex)。Rink酰胺树脂(加利福尼亚州圣地亚哥的Novabiochem)与激活剂N,N'-二异丙基碳二亚胺(西格玛奥德里奇(Sigma-Aldrich))、Oxyma Pure(Novabiochem)和N,N-二异丙基乙胺

(DIEA)一起用作基质。移除N末端Fmoc基团用含20vol%哌啶的二甲基甲酰胺(DMF)完成。除非另有说明,否则所有肽在N末端乙酰化和在C末端酰胺化。乙酰化用15vol%乙酸酐(西格玛奥德里奇)的DMF溶液完成。肽合成后,树脂用20mL二氯甲烷(DCM)洗3次并真空干燥。肽用含2.5vol%三异丙基硅烷(TIS,西格玛奥德里奇)、2.5vol%水、2.5wt%二硫苏糖醇(DTT)和92.5vol%三氟乙酸(TFA,Alfa Aesar)的溶液裂解1-2小时。滤去树脂且TFA溶液用氮气流浓缩。肽用~20体积的冷二乙醚从TFA溶液中沉淀,离心收集并用冷乙醚研磨(各3x, 20mL)。

[0137] 肽二硫化物形成

[0138] 含半胱氨酸的粗肽如下氧化成对应二硫化物:肽以1mg/mL溶于20%DMSO/水并室温搅拌。通过LC/MS监测反应。完成后,粗肽用固相萃取分离(2g Sep-Pak tC18筒,沃特世(Waters)),并冻干。肽溶于水/乙腈,通过反相HPLC用250x 21.2mm C18柱(菲罗门(Phenomenex))纯化,采用含0.1%TFA的乙腈/水梯度。收集纯的部分,冻干并通过LCMS测定为>90%纯。正确的肽结构用电喷雾质谱确认。本文报告的所有肽具有预期的m/z值。

[0139] 内酰胺的形成

[0140] 为确保定点内酰胺形成,使用甲基三苯甲游基(Mtt)和2-苯基异丙氧基(O-2PhiPr)保护基,所述基团能用弱酸裂解,留下其它受保护侧链和附于固体支撑物的肽。94%DCM、5%TIS与1%TFA的混合物缓慢穿过树脂。能观察到保护基释放,因为游离Mtt具有强的黄/橙色。裂解溶液穿过树脂,直至观察到黄色,随后再次减弱。树脂用DCM(20mL, 3x)和DMF(20mL, 3x)洗涤。然后,树脂浸泡于20mL DMF,接着加入PyBOP(3当量)和DIEA(9当量)。允许溶液摇动6小时,然后用DCM(20mL, 3x)洗涤并裂解,如上所述。

[0141] P₂-生物素二聚体的合成

[0142] P₂-生物素二聚体用Fmoc-PEG生物素NovaTag树脂(Novabiochem)合成。肽如上所报道进行裂解和氧化,并经赖氨酸残基的游离胺二聚化,使用BS(PEG)5(PEG化的双(磺基琥珀酰亚胺)辛二酸酯)(赛默飞世尔科技公司(ThermoFisher Scientific))。二聚化反应在DMF中进行,DIEA作为基质(6当量),随后稀释到水中并通过RP-HPLC纯化产生的P₂-生物素二聚体。此试剂用于P₂竞争ELISA。预期的MW是5167.9,去卷积质量:5167.6,观察到的离子是1292.9和1723.5。

[0143] DBCO缀合肽的典型过程

[0144] 粗肽缀合DBCO以用于二硫化物氧化后的无铜催化的点击化学(若适用)。P₁(22.96mg, 11.88μmol)溶于1.2mL干DMF。DBCO-PEG5-NHS酯(12.4mg, 17.8μmol, 1.5当量)溶于0.3mL干DMF并加入肽溶液,接着加入N,N-二异丙基乙胺(12.4μL, 71.3μmol, 6当量)。允许反应搅拌1小时,同时由LCMS监测。1小时后,原材料耗尽且产物经RP-HPLC用乙腈(0.1%TFA)和水(0.1%TFA)纯化。

[0145] 通过LC-MS的肽完整质量测量

[0146] 样品注入带安捷伦(Agilent)1200HPLC的C18Jupiter®柱(250x 2mm, 5μm, 300 Å, 菲罗门)上,使用乙腈(0.02%TFA, 0.08%甲酸)和水(0.02%TFA, 0.08%甲酸)作为流动相, 0.5mL/min。所述方法是在10分钟内从5%到75%乙腈的线性梯度,肽在3-10分钟范围内洗脱并导向安捷伦6220TOF。电喷射条件由350℃气体温度、3500V毛细管电压和120V裂解电压组成。m/z质量范围是100-3000Da。采集软件是MassHunter(安捷伦)。

[0147] DBCO-醛接头的合成

[0148] DBCO-PEG4-胺 (19.24mg, 0.037mmol) 溶于DMF (700uL), 接着加入对甲酰苯甲酸N-羟基琥珀酰亚胺酯 (9.1mg, 0.037mmol) 和DIEA (38.4uL, 0.22mmol)。允许反应室温搅拌3小时, 之后通过LCMS显示完成。粗产物通过RP-HPLC纯化, 纯产物冻干产生11.3mg的纯产物 (47% 收率)。预期的MW是655.75, 观察到的MW+1=656.296。

[0149] EGF的还原烷基化

[0150] 重组人EGF (安迪生物 (R&D systems)) 缀合DBCO-醛, 使用与之前报道类似的方法。EGF溶液 (6.4mg, 7.95mL, PBS中0.806mg/ml) 联合1mL乙酸钠缓冲液 (500mM, pH 5.5)。DBCO-醛 (9.92mg, 15当量) 溶于950uL DMF并加入EGF溶液。允许反应搅拌30分钟, 接着加入氰基硼氢化钠 (100uL, THF中1M), 以产生10mM终浓度。允许室温搅拌过夜。通过LCMS监测反应并在约70% 转变成所需产物由UV检出时确定反应完全 (预期MW6986.92, 观察到的MW 6986.9)。反应混合物用Amicon Ultra 5K离心式过滤器 (默克密理博 (EMD Millipore)) 浓缩, 所需产物经Zeba Spin柱, 7K MWC0 (赛默飞世尔 (ThermoFisher)) 纯化。终产物的浓度通过UV分析确定。DBCO部分的完整性通过与10当量的4-叠氮苯胺盐酸盐反应来检测。通过LCMS观察EGF-DBCO与叠氮苯胺的完全反应 (预期MW 7121.06, 观察到的MW 7120.85)。

[0151] PLA-PEG-叠氮化物的合成

[0152] 市售可得的 α -羟基- ω -叠氮基-聚乙二醇 (HO-PEG-叠氮化物, Rapp Polymere) 用作D,L-丙交酯开环聚合中的大分子引发剂, 使用2-乙基己酸亚锡作为催化剂, 处于130℃的单体熔融条件下。所得PLA-PEG-叠氮化物溶于二氯甲烷, 随后通过沉淀到甲基叔丁醚 (MTBE) 和庚烷 (70/30v/v) 中来回收。

[0153] PLA-Cy5的合成

[0154] 就100mg/mL终浓度而言, 10kDa PLA-COOH (1克, 0.1mmol) 溶于10mL DMSO。向此中加入Cy5-胺 (0.058g, 0.1mmol), PyBOP (0.052g, 0.1mmol) 和DIEA (0.087mL, 0.5mmol)。偶联反应由LCMS监测且在完成后, 聚合物产物通过在含20% 庚烷的MBTE中沉淀来纯化。滤出所得蓝色固体并用含20% 庚烷的MBTE洗涤。

[0155] 纳米颗粒制备

[0156] 用于制备溶于水性悬液的PLA-Cy5加载纳米颗粒的一般乳化过程如下: 形成由20% (wt%) 构成的固体有机相, 包括19.8% 聚合物和0.2% PLA-Cy5。有机溶剂是乙酸乙酯 (EA) 和苯醇 (BA), 其中BA包括20% (wt%) 的有机相。有机相与水相以约1:5比例 (有机相: 水相) 混合物, 其中水相由溶于水的0.25% 胆酸钠、2% BA和4% EA (wt%) 构成。主乳液如下形成: 在简单混合下或通过使用转子定子均质机来组合2个相。主乳液随后用高压均质机形成细乳液。细乳液随之通过在混合下加入冷冻 (0-5℃) 去离子水来淬灭。淬灭液: 乳液比是约10:1。然后, 向淬灭液加入35% (wt%) 吐温80溶液以获得总体约4% 吐温80。纳米颗粒通过超滤/透析过滤来分离并浓缩。

[0157] 聚合物表征

[0158] 聚合物的数均分子量、重均分子量和多分散指数通过Tosoh Biosciences EcoSEC (模型HLC-8320GPC) 上的体积排阻色谱确定。样品注入 (10uL, 1mg/mL) TSKgel柱 (4.6mmx15cm, 3um, Tosoh Biosciences #W00013) 上, 以0.25mL/min在35℃运行。

[0159] 纳米颗粒尺寸分析

[0160] 粒径分布通过稀释水性悬液的动态光散射 (DLS) 在Wyatt DynaPro酶标仪上于25℃测定,830nm激光在158°散射。粒径分析一式三份进行,报告平均颗粒直径的均值。对于所有样品,一式三份测量的标准偏差 $\leq 3\text{nm}$ 。

[0161] ζ 电位分析

[0162] 在Brookhaven仪器PALS电动电位分析仪上测定电动电位。样品在1mM NaCl溶液中稀释到 $\sim 1\text{mg/mL}$ 纳米颗粒的终浓度。向各比色皿加入1.7mL的各样品;各比色皿放置在Brookhaven ZetaPlus中,随后能平衡到25℃,持续5分钟,然后测量。

[0163] ELISA

[0164] 重组人EGFR ($5\mu\text{g/mL}$, 安迪生物) 在96孔板的0.1M碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液 (西格玛奥德里奇) 中4℃捕获过夜。板用含2%BSA的PBS室温封闭2小时。对于已知与EGF竞争EGFR结合的EGFR靶向肽和纳米颗粒,连续稀释的肽和纳米颗粒 (靶向及非靶向) 用0.7nM生物素化重组人EGF (分子探针公司 (Molecular Probes)) 在试验缓冲液 (含2%BSA, 0.05%吐温-20的PBS) 中室温孵育90分钟。对于源自P₂配体的肽和纳米颗粒,连续稀释的肽和纳米颗粒 (靶向及非靶向) 用1nM P₂-生物素二聚体和50nM重组人EGF (安迪生物) 在试验缓冲液中室温孵育90分钟。板用含0.05%吐温-20的PBS (PBS-T) 洗3次,随后用1:10,000稀释、稀释于试验缓冲液的链霉亲和素-HRP (赛默飞世尔科技公司) 室温孵育90分钟。板再用PBS-T洗3次,然后用TMB底物 (BioF_x) 室温孵育15分钟。反应用终止溶液 (BioF_x) 停止,在酶标仪 (SpectraMax M5e, 分子探针公司) 中于450nm读取吸光度。

[0165] 筛选ELISA

[0166] 开发不同模式的EGFR结合ELISA以筛选所报道与EGF竞争的肽。采用前述ELISA方法,重组人EGFR ($5\mu\text{g/mL}$, 安迪生物) 在96孔板的0.1M碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液 (西格玛奥德里奇) 中4℃捕获过夜。板用含2%BSA的PBS室温封闭2小时。肽在一个浓度即100 μM 用0.7nM生物素化重组人EGF (分子探针公司) 在试验缓冲液 (含2%BSA, 0.05%吐温-20的PBS) 中室温孵育90分钟。肽重建为100%DMSO储液,就所有样品而言产生试验中2%的DMSO终浓度。板用含0.05%吐温-20的PBS (PBS-T) 洗3次,随后用1:10,000稀释、稀释于试验缓冲液的链霉亲和素-HRP (Pierce) 室温孵育90分钟。板再用PBS-T洗3次,然后用TMB底物 (BioF_x) 室温孵育15分钟。反应用终止溶液 (BioF_x) 停止,在酶标仪 (SpectraMax M5e, 分子探针公司) 中于450nm读取吸光度。

[0167] 细胞培养

[0168] 过表达EGFR的人表皮样癌细胞系A431 (ATCC) 在RPMI培养基中于5%CO₂气氛下37℃培养,所述培养基补充有10%胎牛血清 (FBS) 和100单位/mL青霉素-链霉素 (所有组织培养试剂来自赛默飞世尔科技公司)。

[0169] 表面结合

[0170] 所培养的A431细胞以 2×10^6 细胞/mL重悬于含5%BSA的PBS。连续稀释的靶向和非靶向Cy5缀合纳米颗粒用A431细胞在V型底96孔板中4℃孵育1小时。样品用冰冷PBS洗3次以移除未结合纳米颗粒,并重悬于冰冷PBS。样品在Accuri C6流式细胞分析仪 (BD 生物科学 (BD Biosciences)) 上分析。

[0171] 内化试验

[0172] 所培养的A431细胞以 2×10^6 细胞/mL重悬于含5%BSA的PBS,如同表面结合试验。

连续稀释的靶向和非靶向Cy5缀合纳米颗粒用A431细胞在V型底96孔板中37℃孵育不同时间。样品用冰冷PBS洗3次以移除未结合纳米颗粒。各样品中的一半重悬于冰冷PBS,在Accuri C6上分析以产生表面结合的纳米颗粒荧光。剩余的一半样品用0.2M乙酸和0.5M NaCl酸洗涤缓冲液处理5分钟。样品随后离心并重悬于冰冷PBS,分析Accuri C6上保留的荧光。

[0173] SPR

[0174] 表面等离子体共振 (SPR) 结合研究在Biacore T200仪器 (通用电气医疗集团 (GE Healthcare)) 上完成。约10,000RU的抗Fc抗体 (通用电气医疗集团, Cat#BR100839) 经胺偶联固定于CM5葡聚糖包被金传感器芯片 (通用电气医疗集团, Cat#BR100530) 的各流动池1和2。带Fc标签的重组人EGFR (rhEGFR-Fc, 安迪生物, Cat#344-ER-050) 以10μg/mL在PBS中重建并在流动池2上捕获。rhEGFR-Fc捕获的接触时间和所得量根据分析物性质而变化, 即其是肽或是纳米颗粒。在EGF存在下检测分析物结合时, 溶于PBS的rhEGF (安迪生物, Cat#236-EG) 溶液在rhEGFR-Fc上预注射, 然后引入分析物。

[0175] 肽结合试验在10mM PBS缓冲液中于25℃完成, 所述缓冲液补充有0.05%体积的表面活性剂P20和5%体积的DMSO。肽在rhEGFR-Fc表面之上注射60秒, 接着分离 (缓冲液注射) 60秒并用10s脉冲的3M MgCl₂再生。就各测试肽的各个浓度产生新rhEGFR-Fc表面。肽结合数据如下分析: 拟合1:1Langmuir动力学模型以获得相互作用的结合速率 (k_a)、解离速率 (k_d) 和/或平衡结合常数 (K_D)。

[0176] 纳米颗粒结合试验在10mM HBS-EP+缓冲液 (通用电气医疗集团, Cat#BR100669) 中于25℃完成。纳米颗粒在rhEGFR-Fc表面之上注射60秒, 接着分离60秒并用10s脉冲的3M MgCl₂再生。就各测试纳米颗粒的各个浓度产生新rhEGFR-Fc表面。由于纳米颗粒与靶标之间结合相互作用的多价性质, 纳米颗粒传感图无法准确拟合1:1Langmuir动力学模型。相反, 纳米颗粒结合数据表示为在注射终点后的单一时间点, 结合反应相比浓度的图。

[0177] Cy5的体外释放动力学

[0178] PLA-Cy5释放动力学在生理漏槽条件下体外测定。纳米颗粒悬于含10%聚山梨醇酯20的磷酸盐缓冲盐水 (PBS), 在37℃水浴中轻微搅动下孵育。定期移出悬液等分样品, 在264,000g超离心30分钟。超离心前的上清和悬液样品通过荧光 (ex 650nm, em 670nm) 分析, 释放百分比如下计算: 比较上清中释放的PLA-Cy5浓度与超离心样品中的总浓度。

[0179] 实施例3: 点击化学激活的纳米颗粒

[0180] 在临床开发和大规模制造中, 受体靶向性纳米颗粒如下生产: 纳入含PLA-PEG的靶向聚合物, PLA-PEG在PEG末端共价缀合低分子量靶向配体。在纳米乳液制造过程中, 靶向配体被导向沿着亲水PEG链的纳米颗粒表面。尽管需要合成靶向聚合物宜用于大规模纳米颗粒生成, 其可能需要数百毫克到克的靶向配体量, 以及可去除评估大量分子的重要化学工作。因此, 我们开发了表面缀合策略, 使更迅速和配体有效筛选缀合纳米颗粒的不同靶向分子成为可能。

[0181] 为使纳米颗粒表面缀合成为可能, 我们研究了多种化学方式, 其与大部分靶向配体中发现的官能团正交, 与纳米颗粒水性悬液相容, 并在纳米颗粒储液长期存储中稳定。尽管铜催化叠氮化物-炔烃环加成化学反应 (CuAAC) 最初看上去像有前途的策略, 发现此方法与多种通常筛选的配体 (小分子、肽、蛋白) 不一致相容, 尽管评估了数种反应条件。在一些

情况中,反应未有效推进,而其它情况中,在反应期间形成大量基于配体的杂质。由于缀合后鉴定分子结构是个重大挑战,配体降解的可能性加剧,因此,该化学方式被认为不适合评估受体靶向的纳米颗粒。

[0182] 最可靠和有效的化学方式是促进应变的叠氮化物-炔烃环加成 (SPAAC)。此方法中,合成单一大批PLA-PEG-叠氮化物聚合物,该聚合物在PEG末端呈现叠氮化物基团,其随后在纳米颗粒表面上呈现。纳入此聚合物的纳米颗粒携带一些叠氮化物基团且偶联具有对应应变的炔烃官能团的配体。选择二苯并环辛炔 (DBCO),这是出于其对反应性和稳定性的平衡、其水溶性和商业可用性。这样,许多靶向配体可以个位数毫克的量合成,并就作为纳米颗粒缀合物结合进行筛选。

[0183] PLA-PEG-叠氮化物通过辛酸亚锡开环聚合反应从HO-PEG-叠氮化物中合成(图3A和3B)。产生的聚合物匹配含大部分纳米颗粒(16kDa PLA,5kDa PEG)的聚合物性质。此聚合物上叠氮化物官能团的完整性通过与市售可得DBCO胺反应来确认(图4A)。通过紫外线(UV) A280和质谱检测未反应DBCO,通过监测色谱图PLGA-PEG洗脱区域的A280来检测产物PLA-PEG-叠氮化物-DBCO。由于PLA-PEG-叠氮化物步具有280-nm吸收性,吸光度增加指示反应推进且DBCO部分的UV特性已转移到聚合物(图4B)。应指出,当形成三唑环时,DBCO部分的UV吸收性减少,因此聚合物的UV吸光度未达到与起始游离DBCO相同的强度。此分析证明叠氮化物官能团在聚合条件中未改变,观察到99%的DBCO胺消耗。

[0184] 为使纳米检测在流式细胞术和其它试验中可行,我们努力将荧光标记纳入纳米颗粒结构。尽管点击化学能对有配体和荧光团的纳米颗粒进行有效表面修饰,优选纳米颗粒表面仅用靶向配体修饰以防止非特异性结合。因此,合成能稳定包封于纳米颗粒的Cy5荧光有效负载。10-kDa PLA-羧酸聚合物缀合Cy5-胺荧光团衍生物。此聚合物是疏水性的,且具有的分子量足以使其在试验条件下保持大部分包封于纳米颗粒内。这用体外释放方法确认,证明在T=0下的4% Cy5释放,然后在48小时内<10% Cy5,如图26所示。

[0185] 纳米颗粒通过纳米乳化过程产生,如实施例1和2所述。简言之,所有纳米颗粒组分(PLA-PEG, PLA-PEG-叠氮化物和PLA-Cy5)溶于由苯醇和乙酸乙酯组成的有机相。有机相用含表面活性剂的水相乳化,乳液穿过高压均质机以获得所需液滴尺寸。终乳液如下产生:稀释到大量过剩的水以用于来自乳滴和颗粒的额外溶剂。终步骤是正切流动过滤,其移出未包封组分和溶剂。以30% (PLA-PEG聚合物的摩尔%) 纳入叠氮化物聚合物和PLA-Cy5聚合物(总聚合物的重量%)显示相较缺乏这些成分的纳米颗粒,对粒径或多分散性的影响很小,如表2所示。

[0186] 表2. PLA-PEG-叠氮化物聚合物、非叠氮化物聚合物、叠氮化物功能化纳米颗粒和非叠氮化物功能化纳米颗粒的特性

[0187]

	聚合物性质				纳米颗粒性质	
	Mn (NMR)	Mn (SEC)	Mw (SEC)	PDI (SEC)	尺寸	电动电位
16-5-叠氮化物	20246	24663	27674	1.12	106.6	-11.74
16-5-OMe	19855	24213	27380	1.13	105.1	-9.21

[0188] 通过使用DBCO-胺作为替代配体,在表面呈递和叠氮化物官能团反应性方面鉴定

纳米颗粒的终水性悬液。预期叠氮化物基团代表纳米颗粒表面上30%的总PEG末端基团。如果所有PEG链在纳米颗粒表面上呈现,则化学计算量的DBCO-胺应充分消耗。确实,反应非常有效并消耗约100% DBCO-胺,表明叠氮化物官能团在纳米颗粒表面上几乎定量呈现(图4C)。在相同30%纳米颗粒上,能使用更低化学计算量的DBCO配体,产生有不同表面缀合配体水平的纳米颗粒。在所测试0.25%-30%范围中观察到大致定量的DBCO配体缀合。反应在4℃孵育过夜以尽可能减少纳米颗粒降解和Cy5有效负载释放。

[0189] 因此,确定使用叠氮化物纳米颗粒和DBCO试剂是有效的方法,用于在纳米颗粒表面以多种水平引入靶向配体。缀合的高效率可省却过量配体,简化了缀合后纯化并尽可能减小游离配体干扰结合试验的风险。另外,通过改变输入配体化学计算量,能精确和容易控制所需配体水平。

[0190] 实施例4:EGF靶向性纳米颗粒

[0191] 为建立这些研究的阳性对照,EGFR的天然存在的配体即表皮生长因子(EGF)共价结合DBCO以允许缀合纳米颗粒表面(图5)。EGF是53氨基酸的约6-kDa蛋白。不加区分地用形成酰胺键的试剂(如NHS酯)修饰EGF氨基(赖氨酸和N末端胺)能导致EGF对EGFR的亲性和性削弱。选择性N末端修饰EGF通过用双功能DBCO-醛接头还原烷基化来实现。醛接头在多种条件下与EGF反应,产物通过LCMS分析。在pH 5.5下用10-15当量的醛和10-mM氰基硼氢化钠还原烷基化主要引起单烷基化EGF,各有10%-20%的双烷基化或未修饰EGF(表3)。所有反应在含10%DMF(v/v)的50-mM醋酸钠缓冲液,pH 5.5中运行。产物分布通过LC/MS(280nm处的UV吸收)测量。

[0192] 表3.筛选EGF还原胺化的反应条件

[0193]

反应条件	产物分布
------	------

[0194]

mM NaCNBH3	醛当量	% EGF	% EGF-DBCO ₂	% EGF-DBCO
10	5	35	6	59
10	10	26	8	66
10	15	12	16	72
10	20	11	18	71
15	20	7	23	70
20	20	6	26	68

[0195] 尽管增加还原剂浓度导致EGF消耗更高,这也产生更大比例的双烷基化产物。这不需要,因为其可能活性较低或能导致纳米颗粒交联。另外,未修饰EGF不缀合纳米颗粒且随后能用尺寸排除色谱(SEC)移出。所得DBCO-EGF用脱盐柱从剩余试剂纯化,然后用离心浓缩机浓缩。通过使DBCO-EGF产物与叠氮苯胺盐酸盐(AAHC)反应,DBCO部分的完整性得到确认。单一和双修饰的DBCO有效缀合AAHC,而未修饰EGF保持完整(图6和表4)。

[0196] 表4. EGF-DBCO缀合预期和观察到的分子量

[0197]

化合物	计算的MW	观察到的MW
-----	-------	--------

EGF	6347.1	6347.6
EGF-DBCO	6986.9	6986.9
EGF-DBCO2	7626.7	7627.2
EGF-DBCO-叠氮苯胺	7121.1	7120.9

[0198] DBCO-EGF配体接着以约2.5%配体密度缀合到叠氮化物纳米颗粒上(例如,每12个叠氮化物中的1个会缀合EGF配体),所得缀合物通过尺寸排除色谱纯化。单和双标记DBCO-EGF组分有效偶联纳米颗粒,而未修饰EGF保留并通过SEC移出。

[0199] 实施例5:EGF-NP结合重组EGFR

[0200] EGF-纳米颗粒(EGF-NP)的结合特性通过表面等离子体共振(SPR或Biacore)和用竞争ELISA试验评估。ELISA试验中,纳米颗粒或游离EGF配体与市售可得的生物素-EGF缀合物竞争结合96孔板上包被的重组人EGFR-Fc。重组人EGFR(5 μ g/mL,安迪生物)在96孔板的0.1-M碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液(西格玛奥德里奇)中4 $^{\circ}$ C捕获过夜。板用含2%BSA的PBS室温(RT)封闭2小时。100 μ M的肽用0.7nM生物素化的重组人EGF(分子探针公司)在试验缓冲液(含2%BSA,0.05%吐温-20的PBS)中室温孵育90分钟。肽复水为100%DMSO储液,就所有样品而言产生试验中2%的DMSO终浓度。板用含0.05%吐温-20的PBS(PBS-T)洗3次,随后用1:10,000稀释、稀释于试验缓冲液的链霉亲和素-HRP(Pierce)室温孵育90分钟。板再用PBS-T洗3次,然后用TMB底物(BioRx)室温孵育15分钟。反应应用终止溶液(BioRx)停止,在酶标仪(SpectraMax M5e,分子探针公司)中于450nm读取吸光度。图7显示此分析的结果。如ELISA所示,纳米颗粒和游离EGF-DBCO配体与市售可得的生物素-EGF竞争结合96孔板上包被的重组人EGFR-Fc融合蛋白。DBCO-EGF配体结合EGFR比未修饰EGF低约2倍(如IC₅₀高2倍),表明DBCO修饰化学对结合亲和性的影响很小(图7A)。纳米颗粒-EGF缀合物的IC₅₀比未修饰EGF高约10倍且比DBCO-EGF高4倍。然而,这并非完全出乎意料,因为未预期缀合纳米颗粒表面的EGF都会接触EGFR,这归因于纳米颗粒的三维结构和尺寸。因此,EGF缀合纳米颗粒适度改变了其结合亲和性。未修饰叠氮化物纳米颗粒不与EGF-生物素竞争结合EGFR,证明没有非特异性纳米颗粒结合。

[0201] SPR用作正交法以鉴定未修饰EGF和EGF-纳米颗粒缀合物结合重组EGFR-Fc融合蛋白。如图7B所见,DBCO修饰的EGF有轻微改变的传感图,与ELISA数据一致。EGF-纳米颗粒相较于未修饰EGF产生明显更大的反应,这归因于分析物的更大摩尔质量。非功能化叠氮化物-纳米颗粒显示与EGFR-Fc包被表面的结合最小,表明EGF纳米颗粒的反应产生自特异性受体结合。由于纳米颗粒与EGFR受体表面相互作用的多价性质和准确鉴定纳米颗粒分子量的困难,无法就此相互作用确定平衡结合常数(K_D)。然而,SPR曲线的结合动力学提示有慢解离率的紧密相互作用,这是多价结合相互作用所预期的。

[0202] 实施例6:低分子量EGFR配体筛选

[0203] 尽管EGF用作纳米颗粒靶向EGFR的可靠概念验证配体,我们寻找与纳米颗粒制造过程相容的更低分子量配体。作为第一种方法,合成天然产生配体EGF和TGF α (转化生长因子 α)的重叠10氨基酸长度肽片段,并用EGFR竞争ELISA和SPR来筛选EGFR结合。不幸地,且与指示一些合成片段保留EGFR结合能力的报道相反,产生的肽中没有一种通过任一方法显示结合EGFR(表5和6)。

[0204] 表5. EGFR片段

[0205]

名称	序列 ^a	K _D	% EGF 抑制
EGFf-1	H2N-NSDSECPLSH-CONH2	无结合	< 20
EGFf-2	H2N-CPLSHDGYCL-CONH2	未观察到	未测试
EGFf-3	H2N-DGYCLHDGVCL-CONH2 ^b	无结合	62.5
EGFf-4	H2N-HDGVCMYIEA-CONH2	未观察到	未测试
EGFf-5	H2N-MYIEALDKYA-CONH2	无结合	< 20
EGFf-6	H2N-LDKYACNC(Acm)VV-CONH2	无结合	< 20
EGFf-7	H2N-C(Acm)NCVVG YIGE-CONH2	无结合	< 20
EGFf-8	H2N-GYIGERCQYR-CONH2	无结合	< 20
EGFf-9	H2N-RCQYRDLKWW-CONH2 ^b	> 100 mM	63.8
EGFf-10	H2N-YRDLKWWELR-CONH2	无结合	< 20
EGFf-11	H2N-CLHDGVC(Acm)MYIEALDKYACN-CONH2	未观察到	未测试
EGFf-12	H2N-CMYIEALDKYACN-CONH2	未观察到	未测试
EGFf-13	H2N-CVVG YIGERC-CONH2	未观察到	未测试

[0206] ^a二硫键连接带下划线的半胱氨酸。Acm保护基留在未配对半胱氨酸上。[0207] ^b由于经游离半胱氨酸的氧化二聚反应,结合随着时间减少。

[0208] 表6.TGF片段

[0209]

名称	序列 ^a	K _D	% EGF 抑制 @100 μM
TGFf-1	H2N-G-Par-GG-CHSGYVGARC-CONH2	无结合	未测试
TGFf-2	H2N-G-Par-GG-CFHGTC(Acm)RFLVQEDKPAC-CONH2	无结合	未测试
TGFf-3	H2N-G-Par-GG-CPDSHTQFC(Acm)FHGTC-CO NH2	不溶	未测试
TGFf-4	H2N-G-Par-GG-ADLLAVVAA-CONH2	无结合	< 20
TGFf-5	H2N-G-Par-GG-ARCEHADADL-CONH2	无结合	< 20
TGFf-6	H2N-G-Par-GG-SGYVGARCEH-CONH2	无结合	< 20
TGFf-7	H2N-G-Par-GG-AC(Acm)VCHSGYVG-CONH2	无结合	< 20
TGFf-8	H2N-G-Par-GG-QEDKPAC(Acm)VCH-CONH2	无结合	< 20
TGFf-9	H2N-G-Par-GG-CRFLVQEDKP-CONH2	无结合	< 20
TGFf-10	H2N-G-Par-GG-C(Acm)FHGTCRFV-CONH2	无结合	< 20
TGFf-11	H2N-G-Par-GG-SHTQFCFHGT-CONH2	无结合	< 20
TGFf-12	H2N-G-Par-GG-NDPCDSHTQF-CONH2	无结合	< 20
TGFf-13	H2N-G-Par-GG-WSHFNDPCD-CONH2	无结合	< 20

[0210]

TGFf-14	H2N-G-Par-GG-ARCEHADLLA-CONH2	无结合	< 20
---------	-------------------------------	-----	------

[0211] ^a二硫键连接带下划线的半胱氨酸。Acm保护基留在未配对半胱氨酸上。

[0212] 文献综述揭示数种报道结合EGFR的肽(MW范围1200-1900)。合成所有的肽并用SPR评估EGFR结合(表7)。竞争ELISA未用于筛选这些肽,因为并非所有的肽被报道与EGF竞争结合EGFR。意外地,仅少量报道的肽显示可重现EGFR结合。图8A和8B显示用于肽的SPR结合数据汇总。17种合成肽中仅5种产生高于基线的结合信号,这些肽中仅3种显示在小于50 μ M浓度处的饱和结合。所有5种结合肽和选择的其它非结合肽用在C末端附于赖氨酸侧链的DBC0部分(包括Gly-Gly间隔区)再合成,然后以5%和10%配体密度($\sim$ 225和450配体/纳米颗粒)缀合叠氮化物纳米颗粒。

[0213] 表7. 据报道结合EGF的肽序列。

[0214]

序列	报道的 EGF 竞争物	肽 ID	分子量
SECFPLAPDWLSCIL	+	1	1689.79
DPCTWEVWGREGCLQ	-	2	1717.73
TDCVIFGLETYCLR	-	3	1628.77
SGCLDALWQCVY	-	4	1353.58
LPDDSLPELICKVR	-	5	1652.89
GPCVLIRDYLLCLE	-	6	1765.89
VLCHRYYHPICYT	+	7	1663.78
MFCFRWYAGWSCVS	+	8	1738.72
HFYPTKTPGY	-	9	1451.72
AASRALWAFNSD	-	10	1307.62
SYWGYTVDIRRGK	-	11	1577.76
KTCVSTTFDLWFVCF	+	12	1863.87
YHWYGYTPQNVI	+	13	1538.73
LARLLT	-	14	684.46
CEHGAMEIC	+	15	988.36
AKFNDYWRW	+	16	1283.62
CPAKFSPSVC	+	17	1628.77
YCPWKFPEECY	-	18	1688.7

[0215] 用SPR评估纳米颗粒与EGFR-Fc的结合。图8B显示纳米颗粒缀合物的结合传感图。就P₁证明与EGF-NP相当的纳米颗粒结合信号,就P₂观察到略低的结合。然而,在这些条件下没有观察到结合其它肽-纳米颗粒缀合物。10mol%的纳米颗粒缀合P₁的结合反应高于5和10%的P₂纳米颗粒且动力学看来更快(结合和解离速率),尽管P₂确实在2种配体密度下结合EGFR。P₁显示的更快动力学可解释为什么P₁仅能在较高(10%)配体密度下介导纳米颗粒结合EGFR。我们相信,通过颗粒上加载更多来增加P₁局部浓度会进而产生更多结合机会,尽管配体显示的动力学如此。进一步研究P₁以鉴定关键结合元件。

[0216] 实施例7:P₁的结构活性关系

[0217] 在肽结构环部分内的氨基酸上进行丙氨酸扫描以确定哪些氨基酸对结合关键。肽内的各氨基酸独立用丙氨酸取代。P₁显示与EGF竞争,因而EGF竞争ELISA用于评估EGFR结合(图9A和表8)。数据表明,需要此肽序列中的大部分氨基酸用于最优肽结合EGFR,因为丙氨酸突变肽中的结合减少。然而,一个氨基酸(Leu6)变成丙氨酸时,所产生肽的亲性和略高于

P₁ (P₁₋₃)。随后,进行P₁₋₃上侧翼氨基酸的丙氨酸扫描。4个侧翼残基中的3个也在结合EGFR中起重要作用,如丙氨酸突变肽中的EGFR结合减少所证明。然而,1位的丙氨酸显示亲和性相对于P₁₋₃提高最小。

[0218] 表8. 丙氨酸扫描

[0219]

Ac-S ₁ E ₂ C ₃ F ₄ P ₅ L ₆ A ₇ P ₈ D ₉ W ₁₀ L ₁₁ S ₁₂ C ₁₃ I ₁₄ L ₁₅ GGK(DBCO)-CONH ₂			
AA 位置	肽 ID	肽相对 IC ₅₀ (根据 P ₁ 标准化)	10% NP 相对 IC ₅₀ (根据 P ₁ 标准化)
3	X	-	-
4	P ₁₋₁	1.9	~ 0.3
5	P ₁₋₂	11.5	> 2.5
6	P ₁₋₃	0.8	0.05
7	X	-	-
8	P ₁₋₄	2.7	> 3
9	P ₁₋₅	4.4	> 3
10	P ₁₋₆	7.1	> 3
11	P ₁₋₇	3.5	> 3
12	P ₁₋₈	1	> 3
13	X	-	-
1	P ₁₋₃₋₁	0.7	1
2	P ₁₋₃₋₂	> 5	> 10
14	P ₁₋₃₋₃	> 5	> 10
15	P ₁₋₃₋₄	3.2	> 10

[0220] 所有丙氨酸扫描肽以10mol%缀合纳米颗粒,并用EGF竞争ELISA评估结合。P₁₋₃ (Leu6-Ala) 缀合物显示EGFR结合相较P₁缀合物提高。如图9B所示,P₁₋₃纳米颗粒的亲和性相对于P₁纳米颗粒增加约20倍,表明此单一氨基酸突变尽管对游离配体亲和性影响有限,在缀合纳米颗粒时引起EGFR结合有意料不到的改善。

[0221] 进行SPR分析以比较P₁与P₁₋₃纳米颗粒结合EGFR。P₁与P₁₋₃纳米颗粒在1mg/mL纳米颗粒浓度的传感图显示在5%密度的结合最小且在10%配体密度的结合更稳健(图9C)。另外,相较10%P₁纳米颗粒,10%P₁₋₃纳米颗粒表现出显著更低的解离速率。因此,游离肽亲和性的小幅改善引起纳米颗粒结合特性的显著变化。

[0222] 尽管用P₁₋₃纳米颗粒获得了令人鼓舞的EGFR结合,此配体与EGF共有表位,这可能导致靶向纳米颗粒遭受体内与天然配体竞争。另外,我们需要能在较低密度实现稳健纳米颗粒结合的配体,从而纳米颗粒表面修饰最少,这可能对维持颗粒隐身和长循环重要。产生额外的P₁₋₃类似物,包括用N-甲基氨基酸取代以及其它天然和非天然氨基酸点突变,但所得肽中没有一种显示超过P₁₋₃的任何额外EGFR结合(表9)。

[0223] 表9. P₁₋₃截断和N-甲基类似物的K_D及相对IC₅₀。

[0224]

肽	序列 ^a	K _D (μM)
P ₁₋₃ 截短		
P ₁₋₃₋₅	Ac-SEC <u>F</u> PAAPDWLSCGGK(DBCO)-CONH ₂	
P ₁₋₃₋₆	Ac-C <u>F</u> PAAPDWLSCGGK(DBCO)-CONH ₂	NB
P ₁₋₃₋₇	Ac-C <u>F</u> PAAPDWLSCGGK(DBCO)--CONH ₂	NB
P ₁₋₃ N-甲基扫描		
P ₁₋₃₋₈	Ac-SEC <u>F</u> PA(Me)APDWLSCILGGK(DBCO)-CONH ₂	NB
P ₁₋₃₋₉	Ac-SEC <u>F</u> PAAPDWL(Me)SCILGGK-CONH ₂	NB
P ₁₋₃₋₁₀	Ac-SEC <u>F</u> PAAPDWLSCI(Me)LGGK-CONH ₂	NB
P ₁₋₃₋₁₁	Ac-SEC <u>F</u> PAAPDWL(Me)SCILGGK-CONH ₂	NB
P ₁₋₃₋₁₂	Ac-SE(ME) <u>C</u> FPAAPDWLSCILGGK(DBCO)-CONH ₂	4.4
P ₁₋₃₋₁₃	Ac-SEC <u>F</u> (ME)PAAPDWLSCILGGK(DBCO)-CONH ₂	1.4
P ₁₋₃₋₈	Ac-SEC <u>F</u> PA(Me)APDWLSCILGGK(DBCO)-CONH ₂	NB
交替 DBCO 位置		
P ₁₋₃₋₁₄	(DBCO)SEC <u>F</u> PAAPDWLSCIL-CONH ₂	NB

[0225] ^a二硫键连接带下划线的半胱氨酸。[0226] 实施例8:P₂的结构活性关系

[0227] 另一显示介导纳米颗粒结合的文献EGFR结合肽即P₂,被报道在EGF也结合EGFR时具有提高的亲性和。然而,在我们的手中,有或没有EGF情况下此肽亲和性的SPR分析显示K_D相当(表10)。

[0228] 表10.P₂对apo-EGFR的亲性和与对EGF结合EGFR的亲性和相当

[0229]

	没有EGF	有EGF
k _a (M ⁻¹ s ⁻¹)	3.7 ± 0.2 × 10 ⁴	3.8 ± 0.4 × 10 ⁴
k _d (s ⁻¹)	9 ± 2 × 10 ⁻³	7 ± 2 × 10 ⁻³
K _D (M)	2.4 ± 0.3 × 10 ⁻⁷	1.7 ± 0.6 × 10 ⁻⁷

[0230] 有趣的是,5和10%配体密度的P₂纳米颗粒缀合物都显示在结合EGF存在情况下EGFR结合提高(图10和图11)。此外,就含EGF和P₂的双靶向纳米颗粒观察到协同效应(图12)。已知EGFR经历构象改变,其在EGF结合后稳定,转变成使EGFR二聚化可行的更“开放”构型。通过噬菌体展示在EGF存在情况下发现原始肽,并作为脂质体缀合物研究。因此,结合表位可存在于结合或未结合状态的EGFR,但当EGFR处于EGF结合状态时,该表位可能更易接触,允许空间位阻更少的纳米颗粒、脂质体或噬菌体颗粒方法。

[0231] 由于靶向纳米颗粒递送需要不与EGF竞争的配体,进一步评估P₂以理解其特性和优化结合亲性和。成功调节3种特征以改善纳米颗粒结合。

[0232] 肽P₂的类似物最初用C末端炔丙基甘氨酸部分产生,其旨在用于缀合叠氮化物纳米颗粒,使用CuAAC。然而,在以后的工作中,炔烃用DBCO部分取代,因为确定SPAAC化学方式更有效且在缀合其间不太可能产生配体杂质。然而,评估含此C末端部分的游离配体以评价肽的结构活性关系。

[0233] P₂的丙氨酸扫描突出肽结构的关键组分(图13和表11)。具体地,环结构和一个芳

香残基 (Trp8) 对结合最关键。其它重要残基包括其它芳香残基 (Trp5) 和残基9-11 (Gly-Arg-Glu)。残基4、6和7以及侧翼氨基酸1、2、13和14 (环部分外) 在变成丙氨酸时对结合的影响小或没有影响。尤其是用丙氨酸取代Pro2 (P₂₋₂) 似乎产生适度更高的亲和性肽。截断分析表明在半胱氨酸之间的残基内获得核心结合元件, 这得到丙氨酸扫描分析确认 (表12)。

[0234] 表11. P₂Ala扫描

AA 位置	P ₂ Ala 扫描		
	肽 ID	K _D (μM)	相对亲和性
亲代	P ₂	0.8	1
1	P ₂₋₁	1.3	1.6
2	P ₂₋₂	0.6	0.8
3	P ₂₋₃	nb	nb
4	P ₂₋₄	4.4	5.7
5	P ₂₋₅	75	96
6	P ₂₋₆	2.3	2.9
7	P ₂₋₇	4.0	5.1
8	P ₂₋₈	nb	nb
9	P ₂₋₉	78	100
10	P ₂₋₂₀	50	63
11	P ₂₋₁₁	~300	>100
12	P ₂₋₁₂	nb	nb
13	P ₂₋₁₃	1.4	1.8
14	P ₂₋₁₄	1.7	2.1

[0236] 表12. 截短, 包括有替代炔烃位置的那些

[0237]

名称	序列 ^a	K _D /P ₂ K _D
P ₂₋₁₅	H2N-DPCTWEVWGREC-GG-Par-G-CONH2	0.9
P ₂₋₁₆	H2N-CTWEVWGREC-LQ-GG-Par-G-CONH2	2.0
P ₂₋₁₇	H2N-CTWEVWGREC-GG-Par-G-CONH2	0.4
P ₂₋₁₈	H2N-DACTWEVWGREC-GG-Par-G-CONH2	1.6
P ₂₋₁₉	H2N-ACTWEVWGREC-GG-Par-G-CONH2	2.4
P ₂₋₂₀	Ac-ACTWEVWGREC-GG-Par-G-CONH2	3.0
P ₂₋₂₁	H2N-Par-ACTWEVWGREC-CONH2	6.7
P ₂₋₂₂	H2N-DPCTWEVWGREC-Par-CONH2	1.8
P ₂₋₂₃	H2N-Par-CTWEVWGREC-CONH2	4.5

[0238] ^a二硫键连接带下划线的半胱氨酸。

[0239] 某些位置另外突变成其它氨基酸以确定能在各位置适应的类似氨基酸范围 (表13)。

[0240] 表13. P₂中关键氨基酸上的点突变

[0241]

名称	序列 ^a	K _D / P ₂ K _D
在 Thr-4 取代		
P ₂₋₂₄	H2N-DPC <u>A</u> WEVWG <u>R</u> ECLQ-GG-Par-G-CONH2	5.45
P ₂₋₂₅	H2N-DPC <u>V</u> WEVWG <u>R</u> ECLQ-GG-Par-G-CONH2	1.10

[0242]

P ₂₋₂₆	H2N-DPC <u>S</u> WEVWG <u>R</u> ECLQ-GG-Par-G-CONH2	1.68
P ₂₋₂₇	H2N-DPC-Par-WEVWG <u>R</u> ECLQ-CONH2	5.40
在 Trp-5 取代		
P ₂₋₂₈	H2N-DPCTA <u>E</u> VWG <u>R</u> ECLQ-GG-Par-G-CONH2	62.49
P ₂₋₂₉	H2N-DPCTF <u>E</u> VWG <u>R</u> ECLQ-GG-Par-G-CONH2	9.24
在 Glu-6 取代		
P ₂₋₃₀	H2N-DPCTW <u>A</u> VWG <u>R</u> ECLQ-GG-Par-G-CONH2	2.89
P ₂₋₃₁	H2N-DPCTW-Par-VWG <u>R</u> ECLQ-CONH2	0.86
P ₂₋₃₂	H2N-DPCTW <u>R</u> VWG <u>R</u> ECLQ-GG-Par-G-CONH2	1.21
P ₂₋₃₃	H2N-DPCTW <u>G</u> VWG <u>R</u> ECLQ-GG-Par-G-CONH2	42.69
在 Val-7 取代		
P ₂₋₃₄	H2N-DPCTWE <u>A</u> WG <u>R</u> ECLQ-GG-Par-G-CONH2	5.79
P ₂₋₃₅	H2N-DPCTWE-Par-WG <u>R</u> ECLQ-CONH2	5.69
P ₂₋₃₆	H2N-DPCTWEI <u>I</u> WG <u>R</u> ECLQ-GG-Par-G-CONH2	3.48
P ₂₋₃₇	H2N-DPCTWE <u>L</u> WG <u>R</u> ECLQ-GG-Par-G-CONH2	10.1
P ₂₋₃₈	H2N-DPCTWE <u>T</u> WG <u>R</u> ECLQ-GG-Par-G-CONH2	12.3
在 Trp-8 取代		
P ₂₋₃₉	H2N-DPCTWEV <u>A</u> G <u>R</u> ECLQ-GG-Par-G-CONH2	NB
P ₂₋₄₀	H2N-DPCTWEV <u>F</u> G <u>R</u> ECLQ-GG-Par-G-CONH2	100 μm 处 NS
在 Gly-9 取代		
P ₂₋₄₁	H2N-DPCTWEVW <u>A</u> R <u>E</u> CLQ-GG-Par-G-CONH2	100 μm 处 NS
P ₂₋₄₂	H2N-DPCTWEVW <u>a</u> R <u>E</u> CLQ-GG-Par-G-CONH2	NB
P ₂₋₄₃	H2N-DPCTWEVW-Sar- <u>R</u> ECLQ-GG-Par-G-CONH2	NB
P ₂₋₄₄	H2N-DPCTWEVW-βA- <u>R</u> ECLQ-GG-Par-G-CONH2	NB
在 Arg-10 取代		
P ₂₋₄₅	H2N-DPCTWEVWGA <u>E</u> CLQ-GG-Par-G-CONH2	100 μm 处 NS
P ₂₋₄₆	H2N-DPCTWEVWGK <u>E</u> CLQ-GG-Par-G-CONH2	13.94
P ₂₋₄₇	H2N-DPCTWEVWG-F(pg)- <u>E</u> CLQ-GG-Par-G-CONH2	37.08
在 Glu-11 取代		
P ₂₋₄₈	H2N-DPCTWEVWGA <u>E</u> CLQ-GG-Par-G-CONH2	100 μm 处 NS
P ₂₋₄₉	H2N-DPCTWEVWGRD <u>C</u> LQ-GG-Par-G-CONH2	3.39

[0243] ^a二硫键连接带下划线的半胱氨酸。

[0244] 如所预期的,耐受丙氨酸取代的残基能同样变成其它氨基酸,对结合的影响小。为确定二硫键是否能突变或取代,产生一系列内酰胺和二硫环化肽类似物。二氨基丁酸(Dab)与天冬氨酸残基之间的内部酰胺键形成示例如图14所示。所有内酰胺环化肽丧失大量活

性,表明更多极化酰胺键环化在肽结构内无法良好耐受(表14)。

[0245] 表14.采用多种含胺和羧酸的氨基酸用内酰胺环化取代二硫键

[0246]

名称	序列	结果
在 Cys-3 和 Cys-12 的二硫键取代		
P ₂₋₅₀	H2N-DP <u>C</u> TWEVWGRE- <u>homoC</u> -LQ-GG-Par-G-CONH2	4.56
P ₂₋₅₁	H2N-DP- <u>homoC</u> -TWEVWGRE <u>C</u> LQ-GG-Par-G-CONH2	8.88
P ₂₋₅₂	H2N-DP- <u>homoC</u> -TWEVWGRE- <u>homoC</u> -LQ-GG-Par-G-CONH2	14.04
P ₂₋₅₃	H2N-DP <u>C</u> TWEVWGRE- <u>Pen</u> -LQ-GG-Par-G-CONH2	2.64
P ₂₋₅₄	H2N-DP- <u>Pen</u> -TWEVWGRE <u>C</u> LQ-GG-Par-G-CONH2	4.78
P ₂₋₅₅	H2N-DP- <u>Pen</u> -TWEVWGRE- <u>Pen</u> -LQ-GG-Par-G-CONH2	1.18
P ₂₋₅₆	H2N-DP- <u>homoC</u> -TWEVWGRE- <u>Pen</u> -LQ-GG-Par-G-CONH2	> 100 mM
内酰胺取代 ^b		
P ₂₋₅₈	H2N-GDP- <u>Orn</u> -TWEVWGRE <u>D</u> LQ-GG-Par-G-CONH2	无结合
P ₂₋₅₉	H2N-GDP- <u>Dap</u> -TWEVWGRE <u>D</u> LQ-GG-Par-G-CONH2	无结合
P ₂₋₆₀	H2N-GDP <u>K</u> TWEVWGRE <u>E</u> LQ-GG-Par-G-CONH2	无结合
P ₂₋₆₁	H2N-GDP- <u>Orn</u> -TWEVWGRE <u>E</u> LQ-GG-Par-G-CONH2	无结合
P ₂₋₆₂	H2N-GDP- <u>Dab</u> -TWEVWGRE <u>E</u> LQ-GG-Par-G-CONH2	17 μm 不饱和
P ₂₋₆₃	H2N-GDP- <u>Dap</u> -TWEVWGRE <u>E</u> LQ-GG-Par-G-CONH2	无结合
P ₂₋₆₄	H2N-GDP <u>D</u> TWEVWGRE <u>K</u> LQ-GG-Par-G-CONH2	无结合
P ₂₋₆₅	H2N-GDP <u>D</u> TWEVWGRE- <u>Orn</u> -LQ-GG-Par-G-CONH2	无结合
P ₂₋₆₆	H2N-GDP <u>D</u> TWEVWGRE- <u>Dap</u> -LQ-GG-Par-G-CONH2	无结合
P ₂₋₆₇	H2N-GGDP <u>E</u> TWEVWGRE <u>K</u> LQ-GG-Par-G-CONH2	100 μm 不饱和
P ₂₋₆₈	H2N-GDP <u>E</u> TWEVWGRE- <u>Orn</u> -LQ-GG-Par-G-CONH2	无结合
P ₂₋₆₉	H2N-GDP <u>E</u> TWEVWGRE- <u>Dap</u> -LQ-GG-Par-G-CONH2	无结合

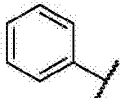
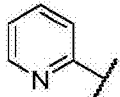
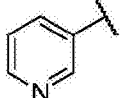
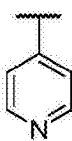
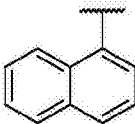
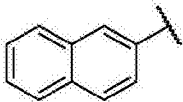
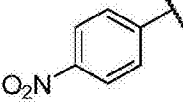
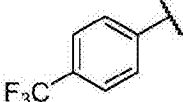
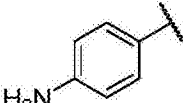
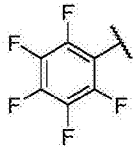
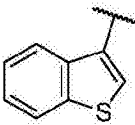
[0247] ^b内酰胺键连接带下划线的氨基酸。

[0248] 用其它二硫键取代Cys-Cys二硫键可产生具有不同结合程度的类似物。选定半胱氨酸类似物示于图15,半胱氨酸类似物对结合的影响示于图16和表14。纳入在主干与二硫化物之间有额外亚甲基的高半胱氨酸(homocys)似乎对结合有害,表明不倾向较大的大环化合物。纳入青霉胺(pen)仅在与Cys的组合中耐受,然而,PenPen类似物在亲和性方面与亲代Cys-Cys肽相当。

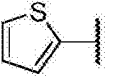
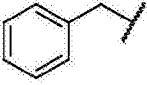
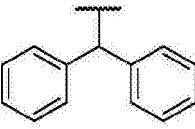
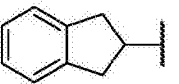
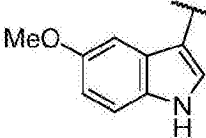
[0249] 尝试改善结合亲和性,对肽结合而言关键的芳香残基单独用不同芳香氨基酸取代(表15)。由于芳香残基介导与EGFR的关键接触,其可能通过引入替代官能团来提高结合,所述官能团与受体有改善或额外的接触。在不太关键的色氨酸残基上的苯丙氨酸取代保留一些结合,然而,在更关键的Trp8位置,苯丙氨酸不耐受。各苯丙氨酸也单独用15个非天然氨基酸取代。当然,各位置的氨基酸显示亲和性略有改善。处于5位的2-茚满酰-甘氨酸残基能实现相对于色氨酸稍有提高的结合,然而,结合用处于8位的此残基完全消除。在8位,5-甲氧基色氨酸比色氨酸好约2倍,然而,在5位合成此氨基酸不成功。

[0250] 表15.非天然芳香氨基酸取代色氨酸5和8

[0251]

R 名称	R 结构	位置		肽 ID	相对于 P ₂ 的 K _D
		W5	W8		
苯丙氨酸		R	Trp	P ₂₋₇₀	9.24
		Trp	R	P ₂₋₇₁	> 100
2-吡啶丙氨酸-1		R	Trp	P ₂₋₇₂	**
		Trp	R	P ₂₋₇₃	> 100
3-吡啶丙氨酸-1		R	Trp	P ₂₋₇₄	11.8
		Trp	R	P ₂₋₇₅	> 100
4-吡啶丙氨酸-1		R	Trp	P ₂₋₇₆	> 100
		Trp	R	P ₂₋₇₇	> 100
1-萘基丙氨酸-1		R	Trp	P ₂₋₇₈	> 100
		Trp	R	P ₂₋₇₉	42.9
2-萘基丙氨酸-1		R	Trp	P ₂₋₈₀	> 100
		Trp	R	P ₂₋₈₁	> 100
4-硝基苯丙氨酸-1		R	Trp	P ₂₋₈₂	> 100
		Trp	R	P ₂₋₈₃	> 100
4-三氟甲基苯丙氨酸-1		R	Trp	P ₂₋₈₄	> 100
		Trp	R	P ₂₋₈₅	> 100
4-氨基苯丙氨酸-1		R	Trp	P ₂₋₈₆	9
		Trp	R	P ₂₋₈₇	**
五氟苯丙氨酸-1		R	Trp	P ₂₋₈₈	8.5
		Trp	R	P ₂₋₈₉	> 100
3-苯并噻吩基丙氨酸-1		R	Trp	P ₂₋₉₀	1.6
		Trp	R	P ₂₋₉₁	123.5

[0252]

2-噻吩基丙氨酸-1		R	Trp	P ₂₋₉₂	15.9
		Trp	R	P ₂₋₉₃	> 100
高苯丙氨酸-1		R	Trp	P ₂₋₉₄	9.1
		Trp	R	P ₂₋₉₅	> 100
二苯丙氨酸-1		R	Trp	P ₂₋₉₆	8.9
		Trp	R	P ₂₋₉₇	> 100
2-茚满基甘氨酸-1		R	Trp	P ₂₋₉₈	0.3
		Trp	R	P ₂₋₉₉	> 100
5-甲氧基色氨酸-1		R	Trp	P ₂₋₁₀₀	**
		Trp	R	P ₂₋₁₀₁	0.5

[0253] 开发额外试验以在P₂肽类似物和纳米颗粒缀合物评估期间提供SPR的正交试验。由于这些肽不与EGF竞争,合成P₂的新型生物素化、二聚形式。此肽在EGF存在下是用于竞争ELISA模式的良好追踪物。图18显示来自无竞争肽P₂或NP缀合物在1或5%配体浓度的结果。显然,当缀合纳米颗粒时,P₂显示在摩尔基础上改善的EGFR结合,这与亲和性略下降的天然配体EGF相反。缀合纳米颗粒和多价结合引起的所得解离速率减小,可能对肽配体的影响大于EGF配体,肽配体有快速结合和解离速率,EGF配体有快结合和慢解离速率引起的高亲和性结合。有不同动力学分布的配体组合能产生协同纳米颗粒结合(图19)。

[0254] 在结构活性关系研究中产生的许多类似物中,进一步评估3种。这3种肽(P₂₋₂、P₂₋₁₀₂和P₂₋₅₅)作为DBC0缀合物合成,并与亲代肽(P₂)作比较。2种芳香突变P₂₋₉₈和P₂₋₁₀₁合并到一种肽(P₂₋₁₀₂)上。P₂₋₂产生自丙氨酸扫描系列和P₂₋₅₅纳入Pen-Pen环化。图20所示的这3种类似物的SPR分析显示,所有3种都表现出亲和性相对亲代肽提高(P₂₋₂、P₂₋₁₀₂、P₂₋₅₅相较P₂)。再次,有或没有EGF情况下的K_D没有显著差异(表16)。

[0255] 表16.P₂和纳入丙氨酸、pen及芳香取代的类似物的结合亲和性SPR分析,以及杂合肽配体的SPR分析。

[0256]

配体	序列	K _D -EGF (nM)	K _D +EGF (nM)
P ₂	Ac-DPCTWEVWGRECLQGGK(PEG4-DBCO)-CONH2	240 ± 30	170 ± 60
P _{2-2'}	Ac-DACTWEVWGRECLQGGK(PEG4-DBCO)-CONH2	29 ± 10	54 ± 21
P ₂₋₁₀₂	Ac-DPCT(2Ind)GEV(5MeO)WGRECLQGGK(PEG4-DBCO)-CONH2	38 ± 14	32 ± 13
P ₂₋₅₅	Ac-DPPenTWEVWGREPenLQGGK(PEG4-DBCO)-CONH2	74 ± 14	69 ± 24
P _{2-2/55}	Ac-DAPenTWEVWGREPenLQGGK(DBCO)-CONH2	137 ± 56	97 ± 7
P _{2-2/102}	Ac-DACT(2Ind)GEV(5MeO)WGRECLQGGK(DBCO)-CONH2	23.8 ± 4.5	23.3 ± 0.3
P _{2-55/102}	Ac-DPPenT(2Ind)GEV(5MeO)WGREPenLQGGK(DBCO)-CONH2	72.0 ± 4.8	75.4 ± 1.4
P _{2-2/55/102}	Ac-DAPenT(2Ind)GEV(5MeO)WGREPenLQGGK(DBCO)-CONH2	53 ± 26	33.4 ± 2.9

[0257] 这3种类似物的纳米颗粒缀合物在1%和5%配体密度制备,并通过SPR和/或P₂竞争ELISA评估。将SPR数据转变成“快照”图,代表2分钟注射后观察到的浓度依赖性结合反应,而不是尝试拟合传感图数据以获得K_D(图21A,21B)。这些图的传感图反应数据进行标准化以将捕获水平的实验差异纳入考虑。比较亲代P₂缀合纳米颗粒(5%)的捕获标准化反应与都处于5%配体密度的新类似物显示,所有3种类似物结合在没有EGF情况下改善有限,丙氨酸和芳香类似物的改善有限,Pen类似物结合在EGF存在情况下显著增加(图21C)。青霉胺在氨基酸β碳上包含gem-二甲基,这降低构象灵活性。鉴于此肽相对于其它类似物不展示作为游离配体的优良结合亲和性,可能该更刚性肽结构改变了结合动力学,这可对纳米颗粒结合产生影响。

[0258] 表17. P₂和纳入丙氨酸、pen及芳香取代的类似物的结合亲和性ELISA分析。

[0259]

配体	序列	5% 配体密度 NP		1% 配体密度 NP	
		IC ₅₀ (μg/mL)	Rel IC ₅₀	IC ₅₀ (μg/mL)	Rel IC ₅₀
P ₂	Ac-DPCTWEVWGRECLQGGK(PEG4-DBCO)-CONH2	4.3	Ref	81	Ref
P ₂₋₂	Ac-DACTWEVWGRECLQGGK(PEG4-DBCO)-CONH2	3	0.7	17	0.2

[0260]

P ₂₋₁₀₂	Ac-DPCT(2Ind)GEV(5MeO)WGRECLQGGK(PEG4-DBCO)-CONH2	2.6	0.6	7.6	0.09
P ₂₋₅₅	Ac-DPPenTWEVWGREPenLQGGK(PEG4-DBCO)-CONH2	3.4	0.79	135	1.67

[0261] ELISA数据示于表17. P₂竞争ELISA结果与SPR数据一致。用于高亲和性结合追踪物的P₂ELISA需要EGF,因此,纳米颗粒结合不能评价+/-EGF。结果表明,所有3种类似物-缀合

物在5%配体密度的亲和性改善有限。

[0262] 鉴于所有3种类似物作为纳米颗粒缀合物的改善有限,合成将2种或所有3种类似物特征纳入单一肽序列的杂合序列,并作为游离配体和作为纳米颗粒缀合物评估。游离配体的K_D分析显示对亲和性影响适度。一般,纳入芳香残基似乎改善亲和性,所有游离配体亲和性对EGF的存在不敏感(表16)。

[0263] 相比之下,杂合肽的纳米颗粒缀合物显示在结合时的一些显著差异。图22显示3种双突变体和1种三突变体的SPR快照图。最引人注目的趋势是纳入芳香残基可在没有EGF结合情况下显著提高纳米颗粒缀合物结合EGFR。Ala2和Pen的组合似乎对结合产生负面影响。这通过以下突出:比较仅含Pen和Ala2取代(P_{2-2/55})的双突变体与含芳香取代的那些。此纳米颗粒在EGF存在下显示适度EGFR结合,然而与单独受体结合极低。包含芳香取代的所有纳米颗粒在EGF结合后显示结合改变最小,有芳香取代的双突变和三突变配体显示改善总体纳米颗粒结合。

[0264] 表18所示P₂竞争ELISA显示类似结果,相较5%的亲代肽-纳米颗粒缀合物,Ala2-Pen相对未变,而含芳香取代的杂合类似物有较低的IC₅₀值。尽管含芳香残基的配体相对于原始亲代肽的亲和性提高,其与单一取代的肽没有显著差异(表16)。因此,仅通过配体亲和性无法解释纳米颗粒结合的明显改善。

[0265] 表18.5%杂合肽配体缀合纳米颗粒的ELISA结合分析

[0266]

配体	序列	IC ₅₀ (μg/mL)	相对 差异
P ₂	Ac-DPCTWEVWGRECLQGKG(PEG5-DBCO)-CONH ₂	6	Ref

[0267]

P _{2-2/55} [DA PenPen]	Ac-DAPenTWEVWGREPenLQGKG(DBCO)-CONH ₂	6.3	1.05
P _{2-2/102} [DA Aro]	Ac-DACT(2Ind)GEV(5MeO)WGRECLQGKG(DBCO)-CONH ₂	3.7	0.62
P _{2-55/102} [Aro PenPen]	AcDPPenT(2Ind)GEV(5MeO)WGREPenLQGKG(DBCO)-CONH ₂	2.2	0.37
P _{2-2/55/102} [DA Aro PenPen]	AcDAPenT(2Ind)GEV(5MeO)WGREPenLQGKG(DBCO)-CONH ₂	1.6	0.27

[0268] 实施例9:流式细胞术分析

[0269] 就结合人上皮癌A₄₃₁细胞表面上所表达EGFR,通过流式细胞术进一步评估纳入PLA-Cy5的肽纳米颗粒缀合物。纳米颗粒用A₄₃₁细胞在有或没有EGF情况下4℃孵育,随后洗涤以移出任何未结合纳米颗粒。在流式细胞仪上分析纳米颗粒结合。EGFR受体内化在4℃最小,观察到的信号主要是缘于细胞表面结合。

[0270] 图23A-23C显示来自流式细胞术实验的代表性数据,完整数据示于图24。在图23A和23B中,比较有Pen取代的纳米颗粒-缀合物的结合曲线。尽管所有缀合物在EGF存在下结合良好,仅Pen/芳香和三突变体在没有EGF情况下结合良好。在细胞结合数据概括图与来自图22的SPR数据的概括图之间有高度一致性。含青霉胺和芳族化合物的双突变体以及三突变体是最强结合的纳米颗粒,尤其在有或没有EGF情况下显示接近平衡的结合。

[0271] 直接比较EGF、P₁₋₃和三重杂交纳米颗粒缀合物(图23C)。尽管未在等效配体负荷测

试,结果证明配体选择和优化方法引起产生2种纳米颗粒缀合物,其能结合EGFR表达细胞,程度类似缀合相对高亲和性、天然产生EGFR配体的纳米颗粒。

[0272] 筛选这些配体和纳米颗粒缀合物,并用SPR在室温和流式细胞术在4℃优化。尽管SPR和流式细胞术数据有相对较强的关联性,由于我们想要体内评估这些纳米颗粒,因而评价其在生理温度的结合。评估纳米颗粒在37℃对A₄₃₁细胞的结合和内化。在孵育后30分钟评价总结合纳米颗粒,包括表面结合和内化颗粒(图25A)。各样品的一部分随后用酸处理以移出表面结合的纳米颗粒。与纳米颗粒相连的剩余荧光信号代表内化部分(图25B)。有趣的是,发现所有3种纳米颗粒有效结合和内化,在30分钟内有30-60%内化。

[0273] 实施例10:肽和纳米颗粒表征

[0274] 所选功能化和非功能化纳米颗粒的粒径和电动电位示于表19,所选肽和肽-DBC0缀合物的预期及观察到的分子量示于表20。

[0275] 表19. 纳米颗粒尺寸和ζ电位

[0276]

配体	基础30%叠氮化物颗粒尺寸	尺寸	尺寸变化	电动电位
2.5% EGF	106.6	108.1	+1.5	-10.3
10% P ₁	106.6	100.3	-6.3	-10.4
5% P ₁	73.2	78.7	+5.5	-17.1
10% P ₁₋₃	106.6	105.9	-0.7	-17.1
5% P ₁₋₃	73.2	78.2	+5.0	NT
10% P ₂	106.6	101.5	-5.1	-22.3
5% P ₂	106.6	96.3	-10.3	-11.4
5% P ₂₋₅₅	106.6	104.7	-1.9	NT
5% P ₂₋₂	106.6	122.6	+16.0	NT
5% P ₂₋₁₀₂	106.6	88.7	-17.9	NT
5% P _{2-2/55}	106.6	87.2	-19.4	NT
5% P _{2-2/102}	106.6	89.0	-17.6	NT
5% P _{2-55/102}	106.6	84.8	-21.8	NT
5% P _{2-2/55/102}	106.6	104.0	-2.6	-8.1
30% N ₃ -NP	-	106.6	-	-11.7
30% N ₃ -NP	-	73.2	-	NT
100% PEG-NP	-	105.1	-	-9.2

[0277] 表20. 所选肽和缀合物的预期及观察到的分子量

[0278]

肽 ID	序列	计算的 MW (Da)	MW 观察到的去卷积 (Da)	观察到的 m/z 离子
1	SECFPLAPDWLSCIL	1691	1691.2	846.6
2	DPCTWEVWGRECLQ	1718.9	1718	860
3	TDCVIFGLETYCLR	1629.9	1629	815.5
4	SGCLDALWQCVY	1354.6	1354.8	678.4
5	LPDDSLPELICKVR	1653.9	1653.2	827.6
6	GPCVLIRDYLLCLE	1767.1	1767	884.49
7	VLCHRYYPICYT	1664.9	1664.2	833.1
8	MFCFRWYAGWSCVS	1740.1	1740	871
9	HFYPTKTPGY	1209.4	1208.8	605.4
10	AASRALWAFNSD	1307.5	1307	654.5
11	SYYWGYTVDIRR	1577.8	1577	789.5

[0279]

12	KTCVSTTFDLWFVCFA	1867.22	NS	NS
13	YHWYGYTPQNVI	1539.7	1539.2	770.6
14	LARLLT	684.9	684.6	343.3
15	CEHGAMEIC	989.2	990.6	496.3
16	AKFNDYWRW	1284.5	1283.8	642.9
17	CPAKFSPSVC	1035.3	1036.8	519.4
18	YCPWKFPEECY	1688.7	1689	845.5
P ₁	Ac-SECFPLAPDWLSCILGGK(DBCO)-CONH ₂	2554	2553.6	1277.8, 852.2
P ₁₋₃	Ac-SECFPAAPDWLSCILGGK(DBCO)-CONH ₂	2511.9	2511.6	1256.8, 838.2
P ₂	Ac-DPCTWEVWGRECLQGGK(DBCO)-CONH ₂	2581.9	2581.6	1291.8, 861.5
P ₂₋₂	Ac-DACTWEVWGRECLQGGK(DBCO)-CONH ₂	2555.9	2555.6	1278.8, 852.9
P ₂₋₅₅	Ac-DP-Pen-TWEVWGRE-Pen-LQGGK(DBCO)-CONH ₂	2638	2637.6	1319.8, 880.2
P ₂₋₁₀₂	Ac-DPCT-(2Ind)G-EV-(5MeO)W-GREC LQGGK(DBCO)-CONH ₂	2598.9	2598.6	1300.3, 867.2
P _{2-2/55}	Ac-DA-Pen-TWEVWGRE-Pen-LQGGK(DBCO)-CONH ₂	2567.9	2567.2	1284.6, 856.7
P _{2-2/102}	Ac-DACT-(2Ind)G-EV-(5MeO)W-GREC LQGGK(DBCO)-CONH ₂	2528.4	2528.2	1265.1, 843.7
P _{2-55/102}	Ac-DP-Pen-T-(2Ind)G-EV-(5MeO)W-GRE-Pen-LQGGK(DBCO)-CONH ₂	2655	2654.4	1328.2, 885.8
P _{2-2/55/102}	Ac-DA-Pen-T-(2Ind)G-EV-(5MeO)W-GRE-Pen-LQGGK(DBCO)-CONH ₂	2629	2628.6	1315.3, 877.2

[0280] 等价物

[0281] 本领域技术人员会意识到或能确认本文所述公开纳米颗粒的特定实施方案的许多等同物,仅使用常规实验。这类等同物意在被下列权利要求涵盖。

[0282] 通过引用纳入

[0283] 本文引用的所有专利、发表的专利申请、网页和其它参考文献的完整公开内容通过引用全文纳入本文。

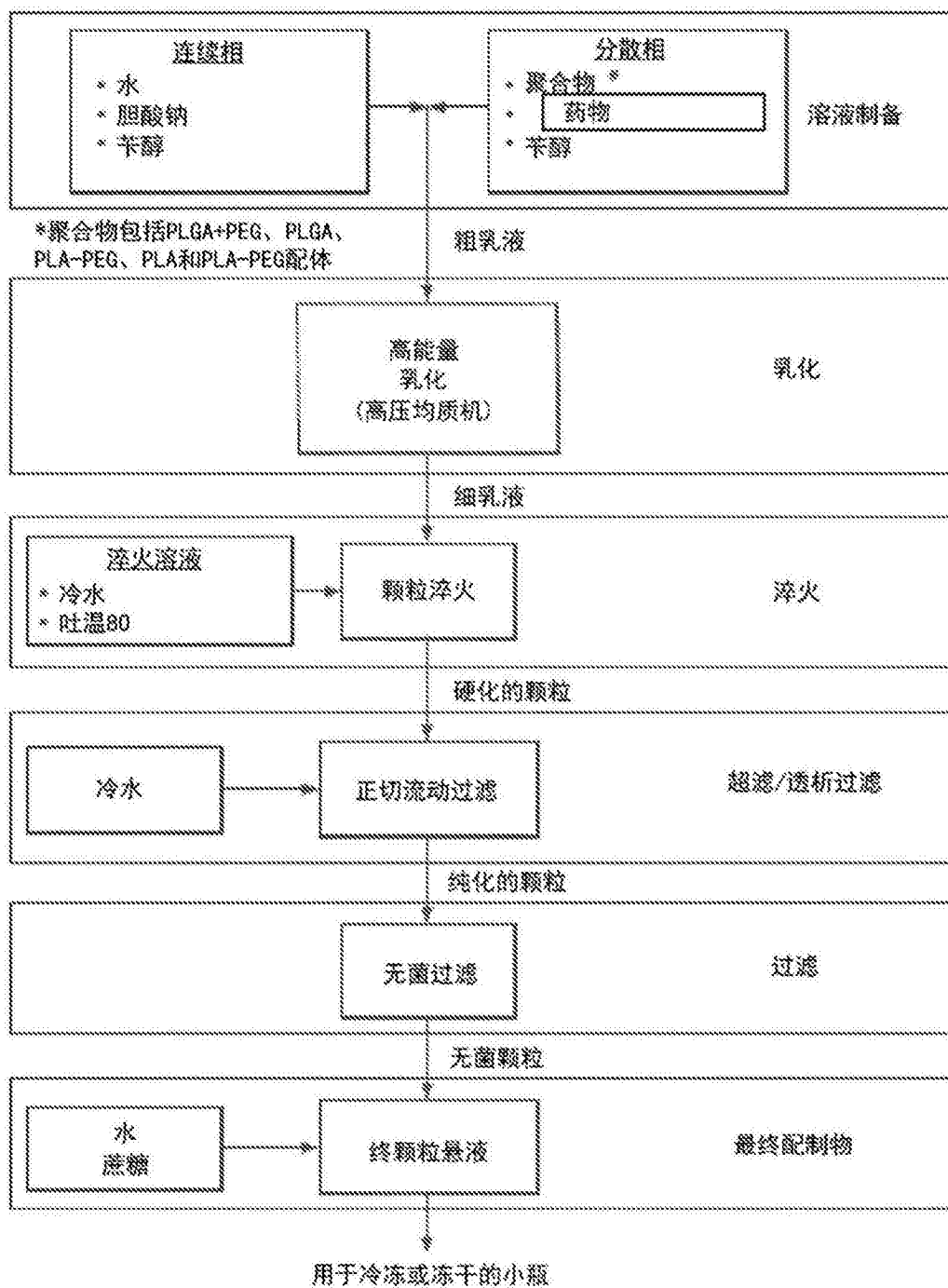


图1

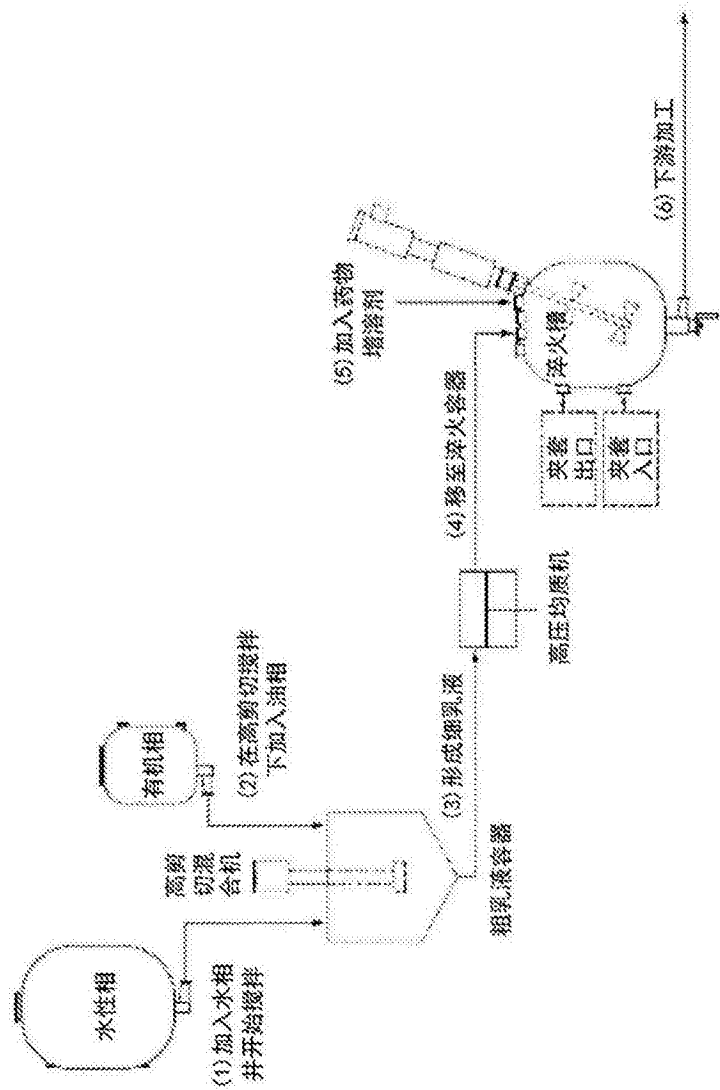


图2A

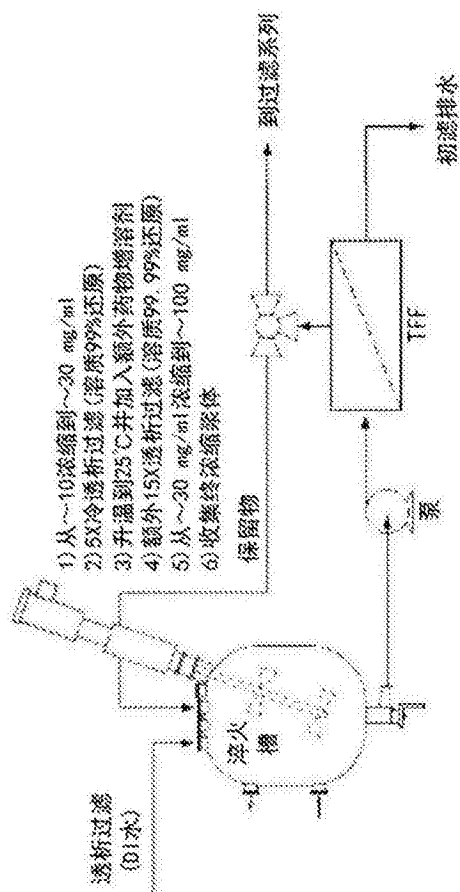


图2B



图3A

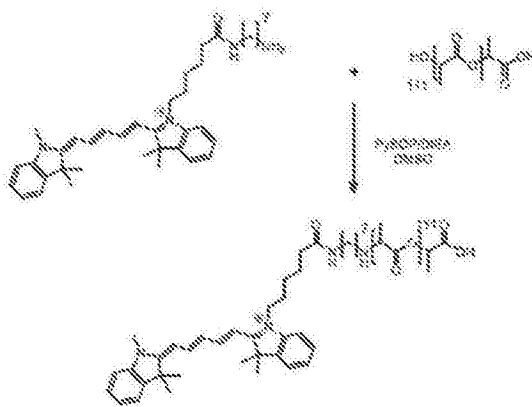


图3B

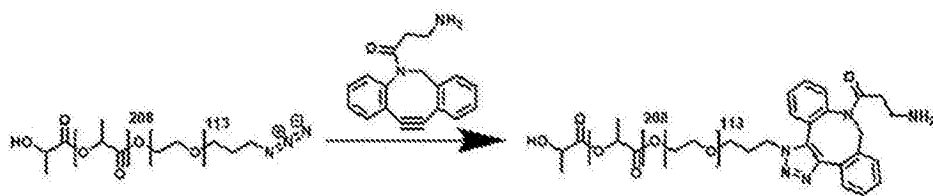


图4A

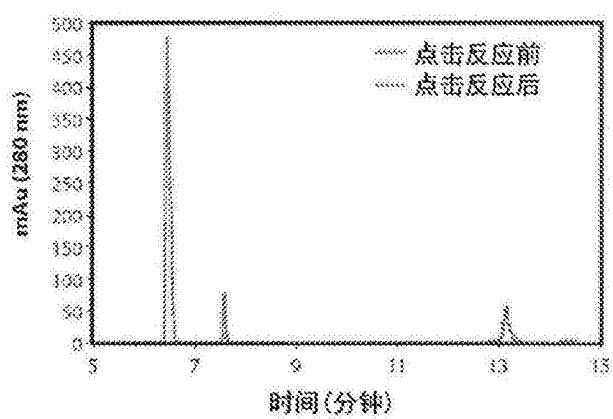


图4B

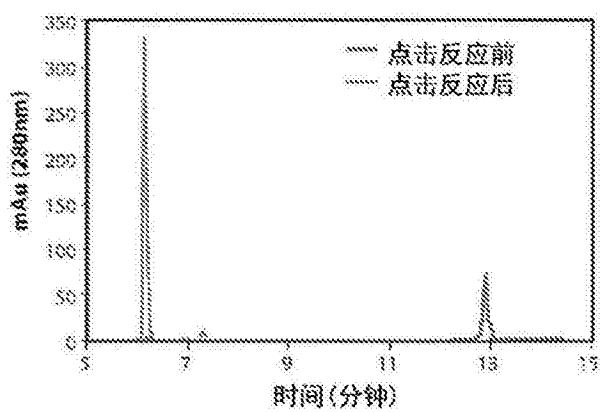


图4C

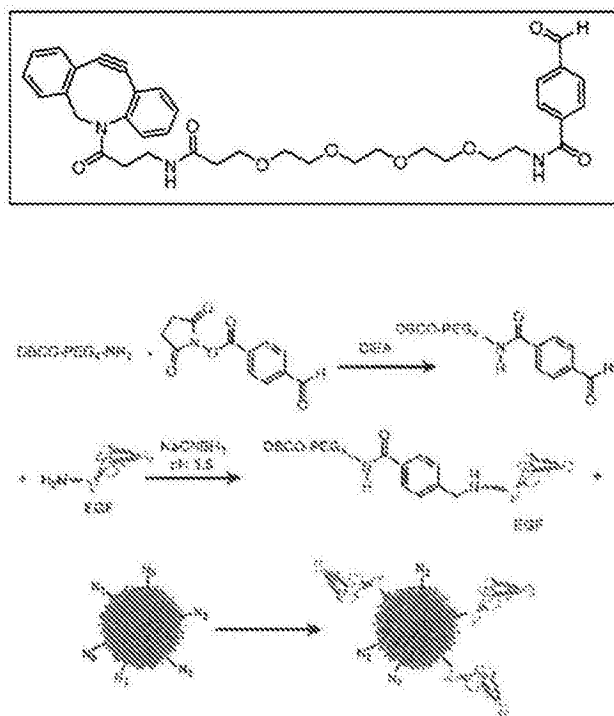


图5

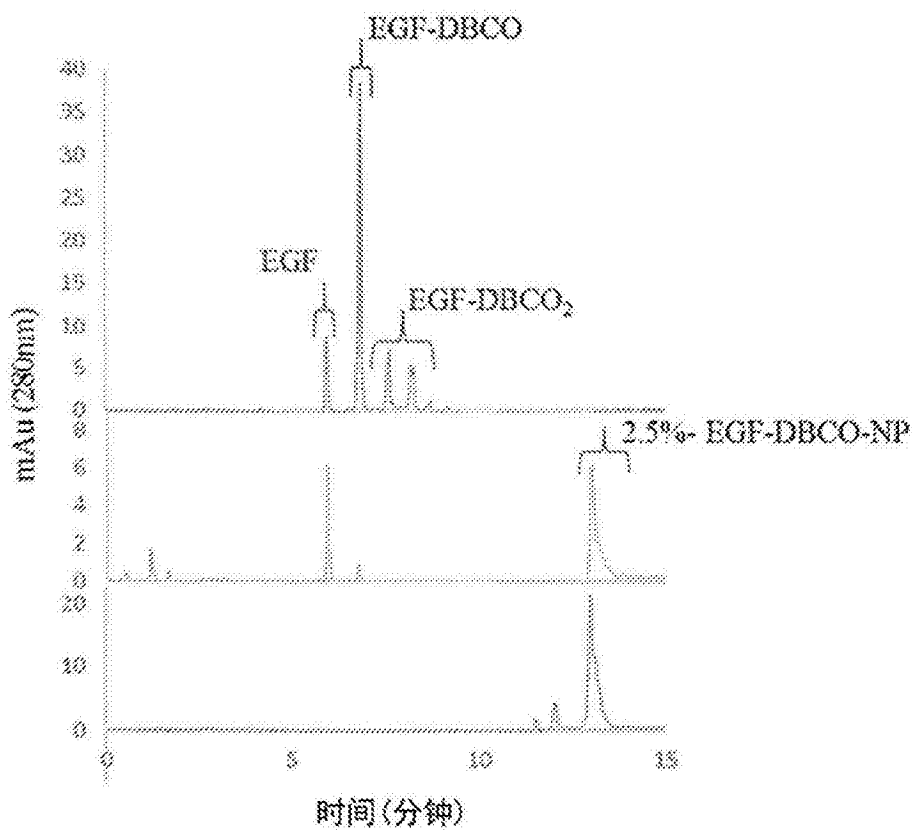


图6

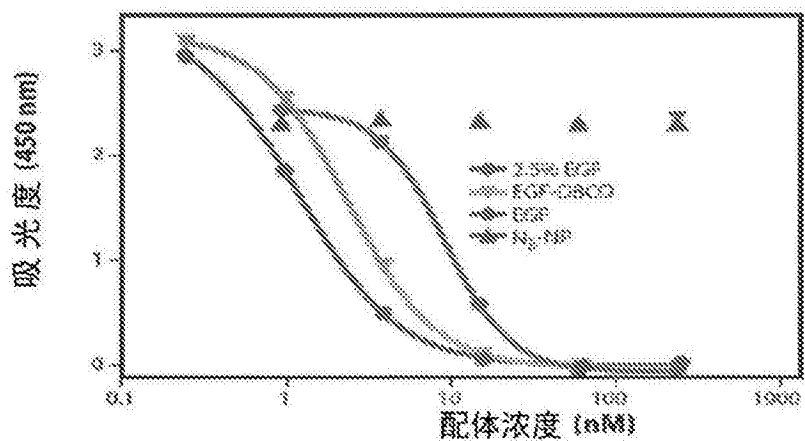


图7A

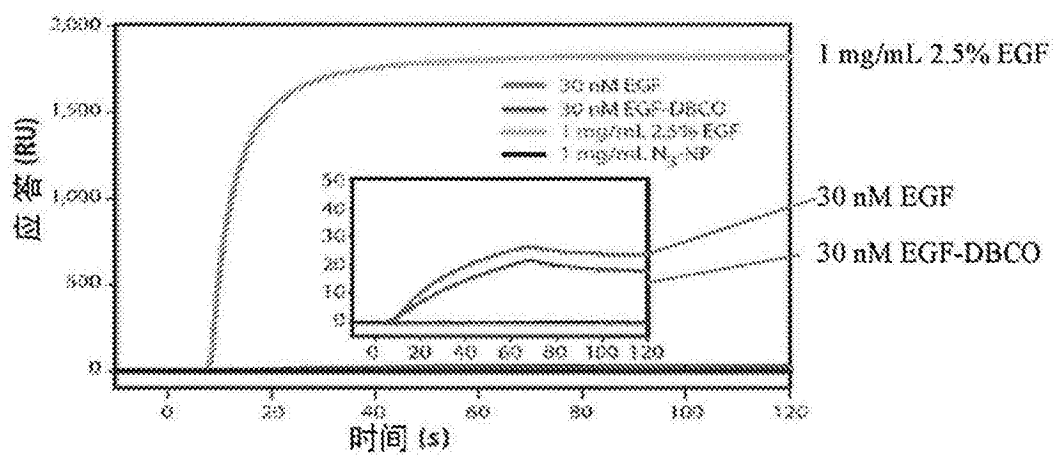


图7B

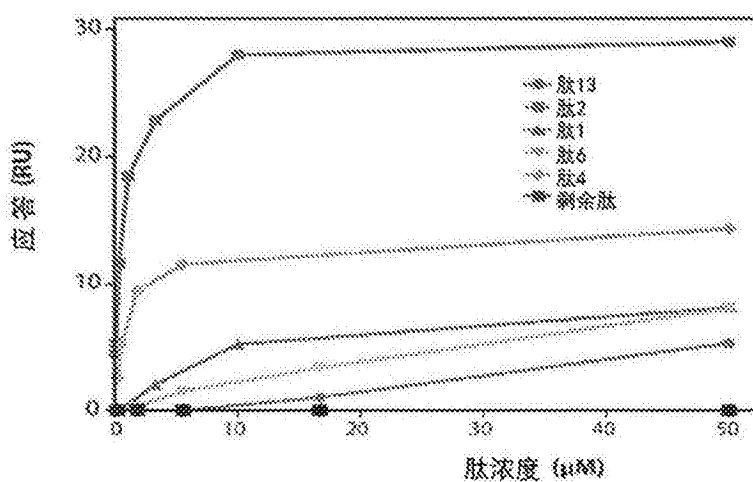


图8A

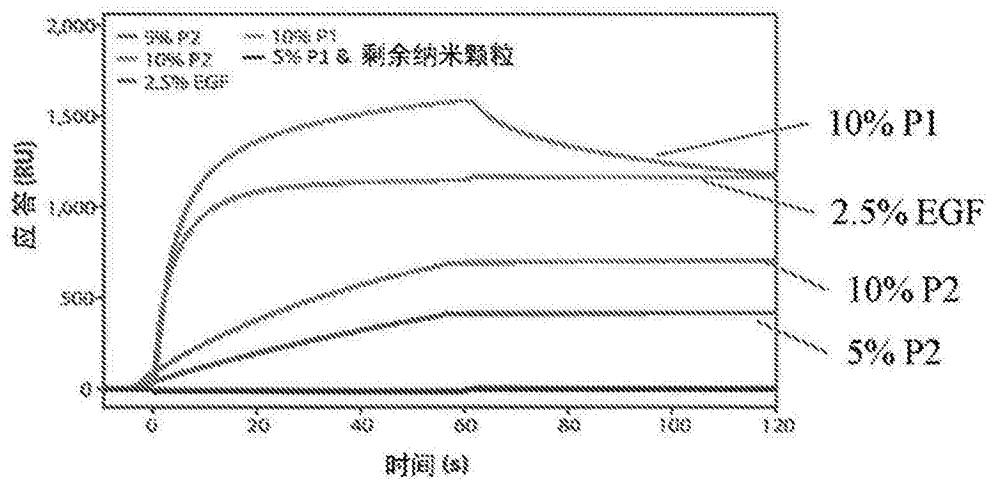


图8B

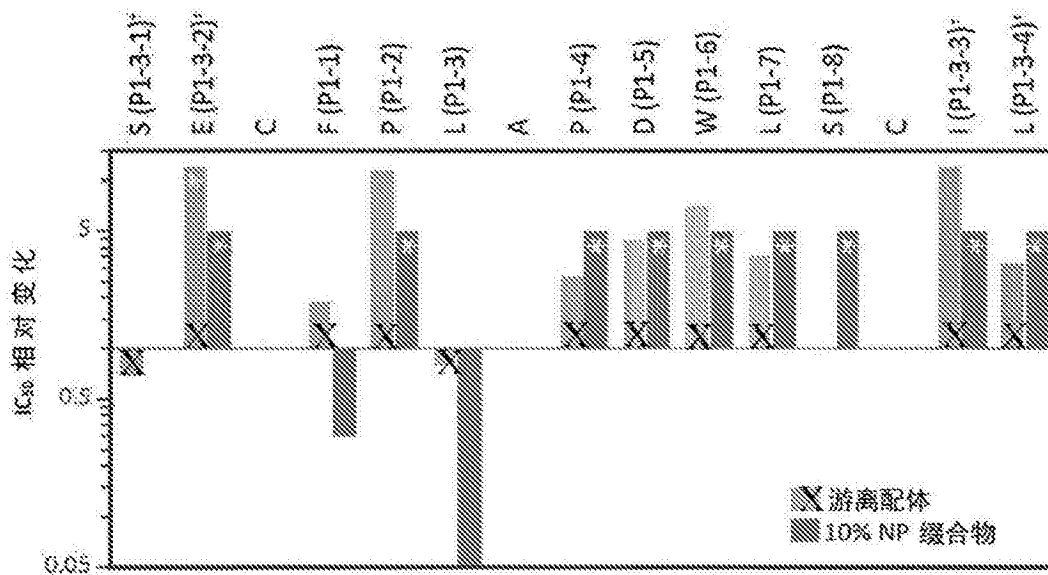


图9A

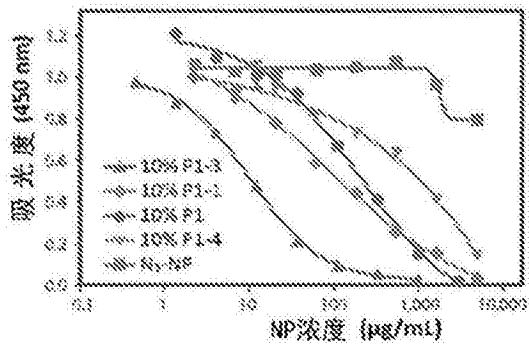


图9B

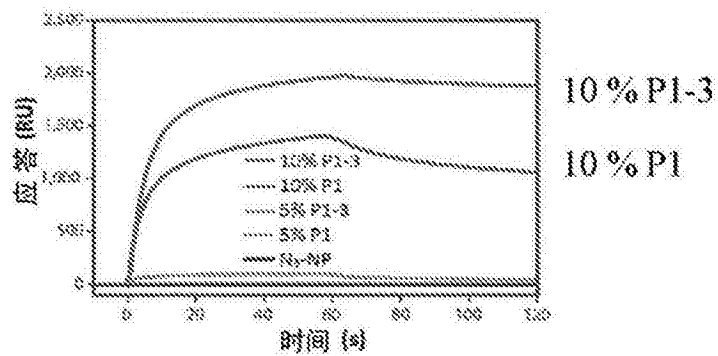


图9C

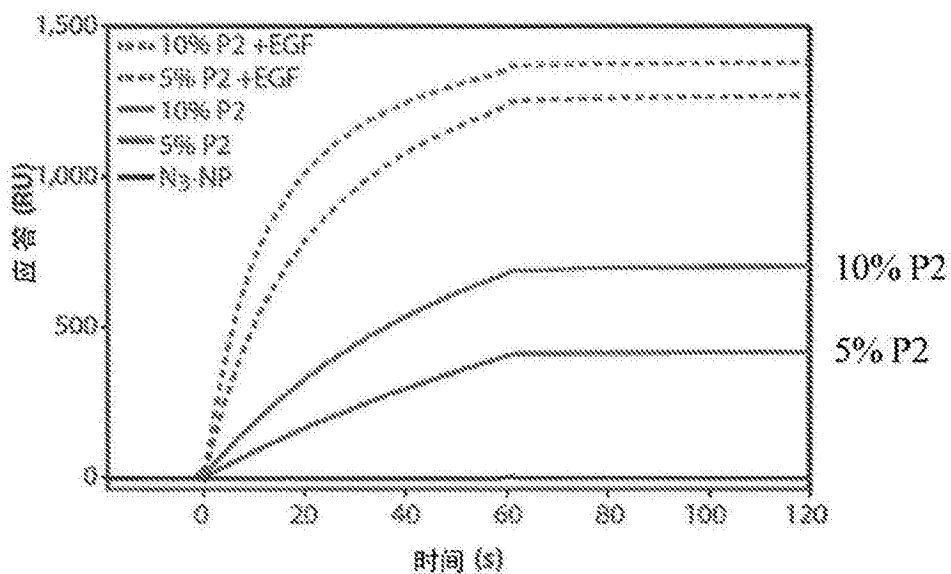


图10

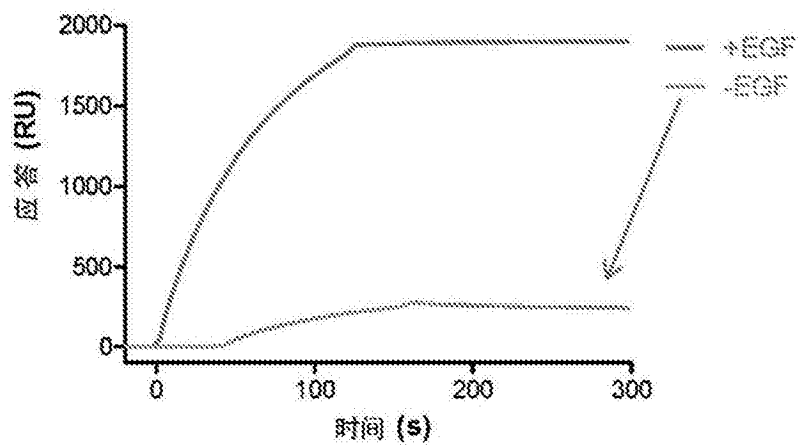


图11

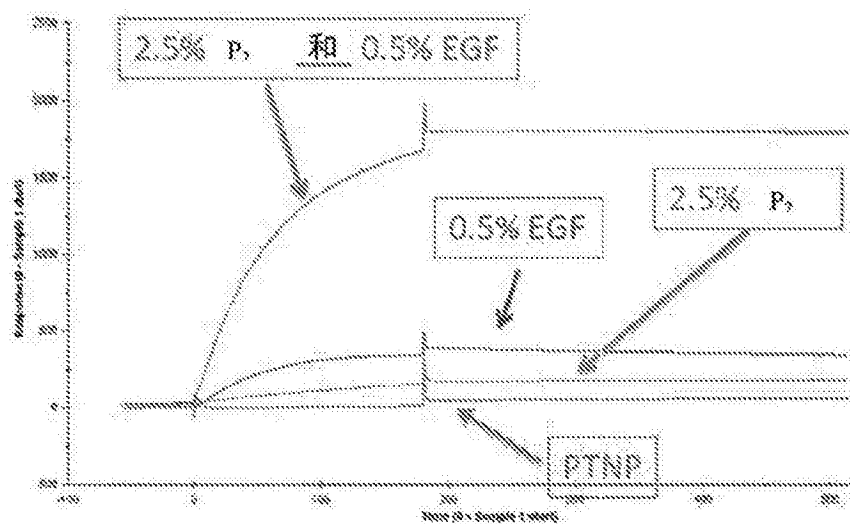


图12

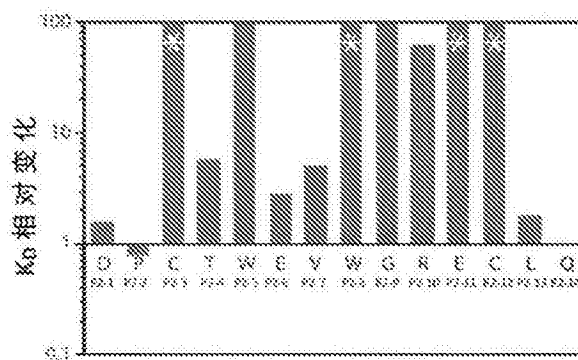


图13

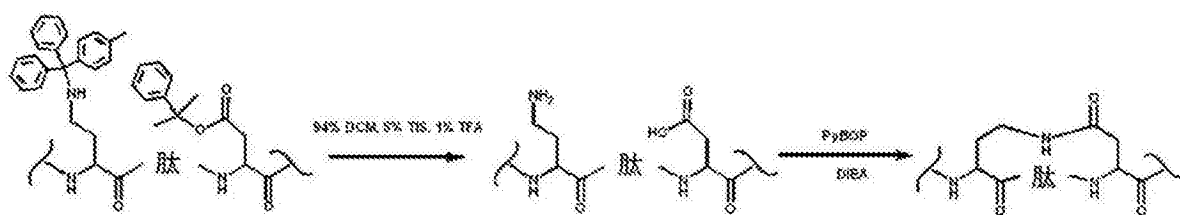
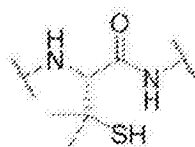
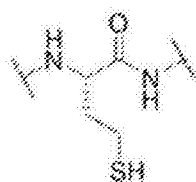


图14



Pen= 青霉胺



Homo cys= 高半胱氨酸

图15

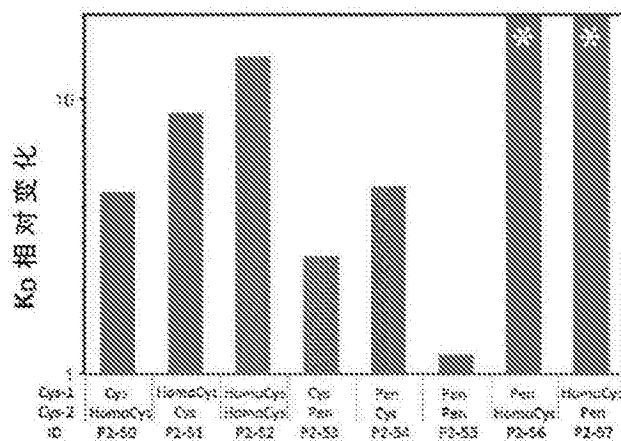


图16

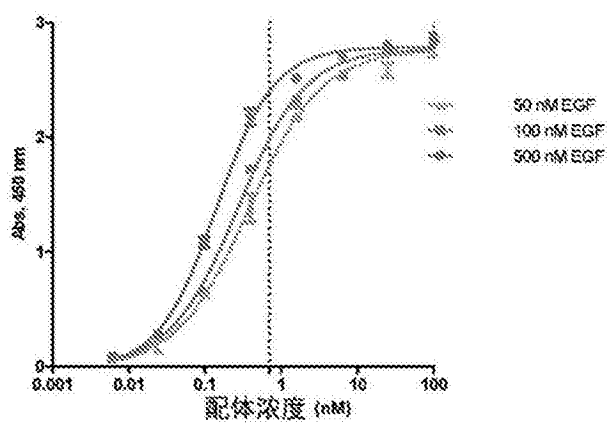
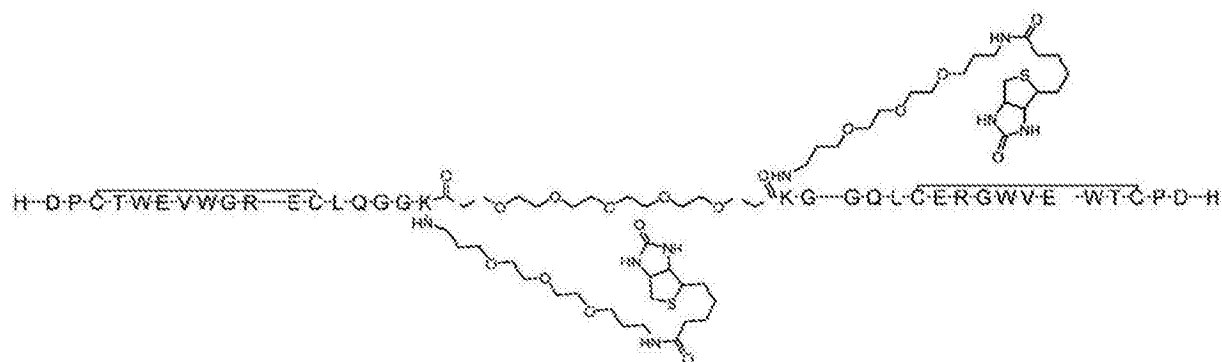


图17

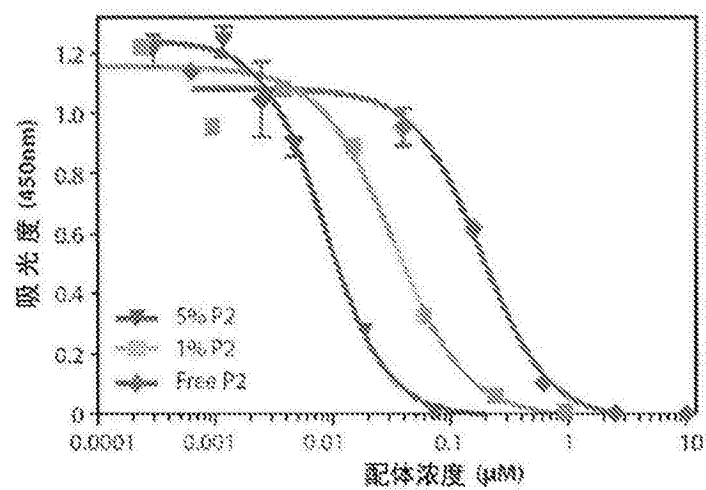


图18

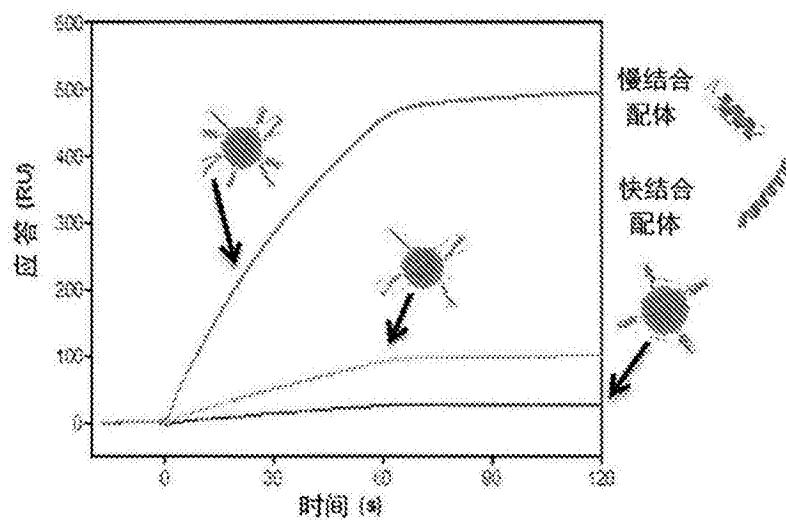


图19

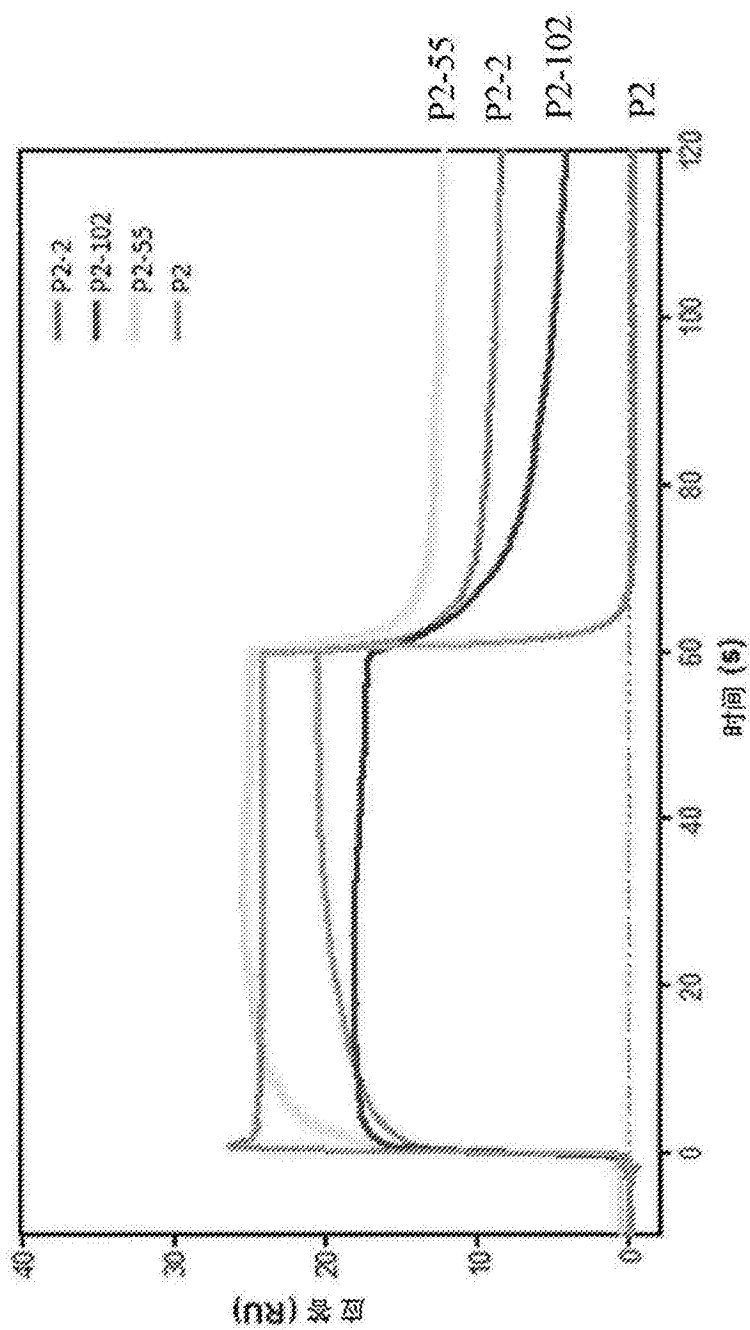


图20

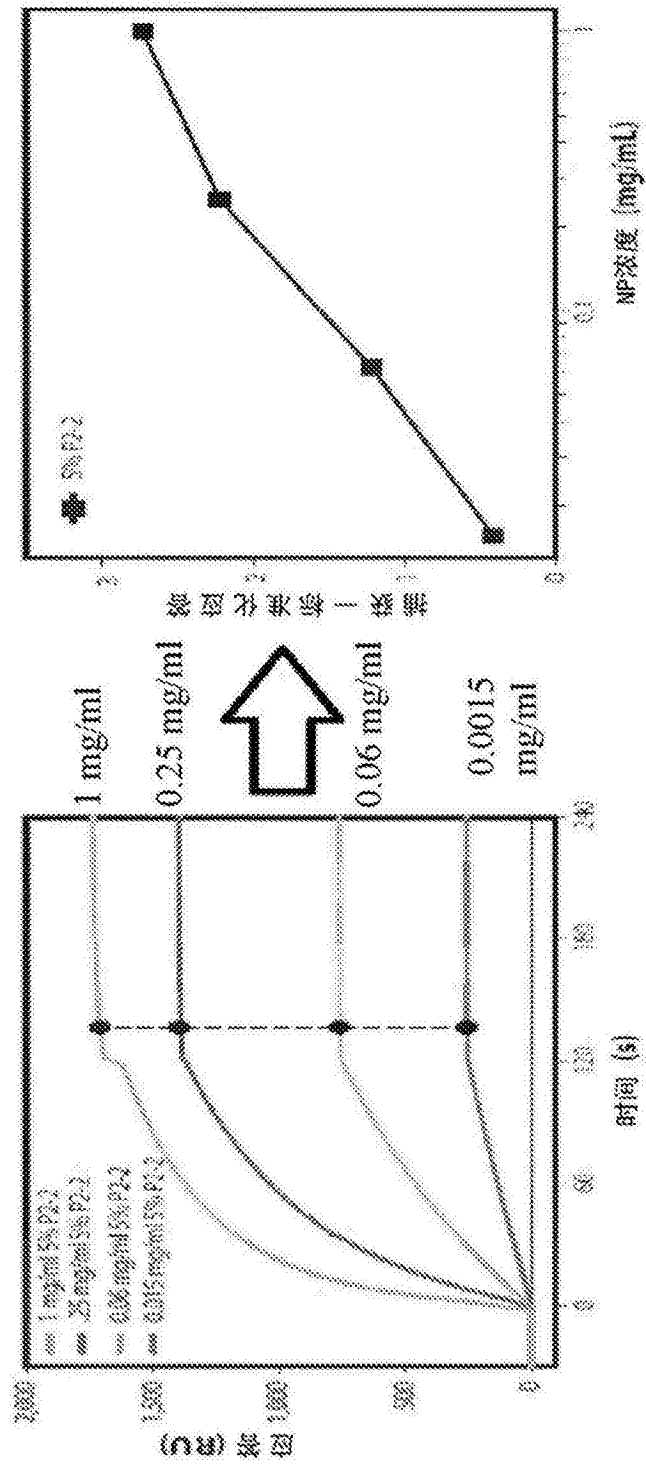


图21A

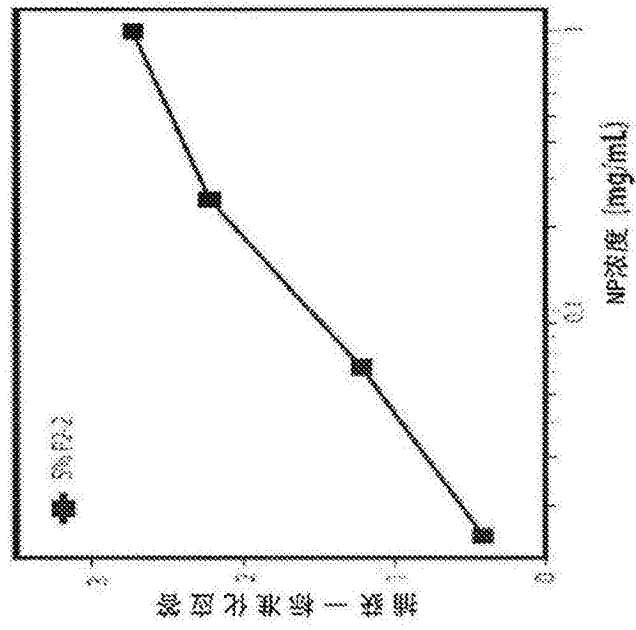


图21B

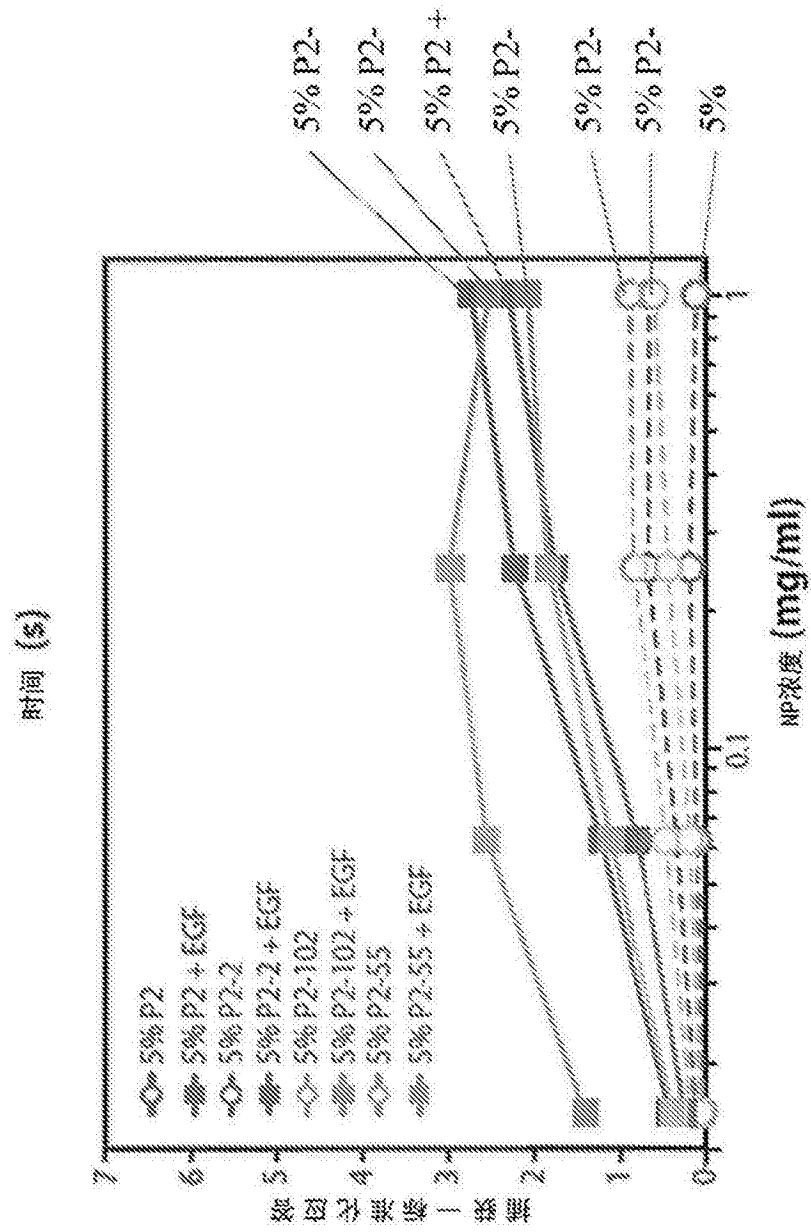


图21C

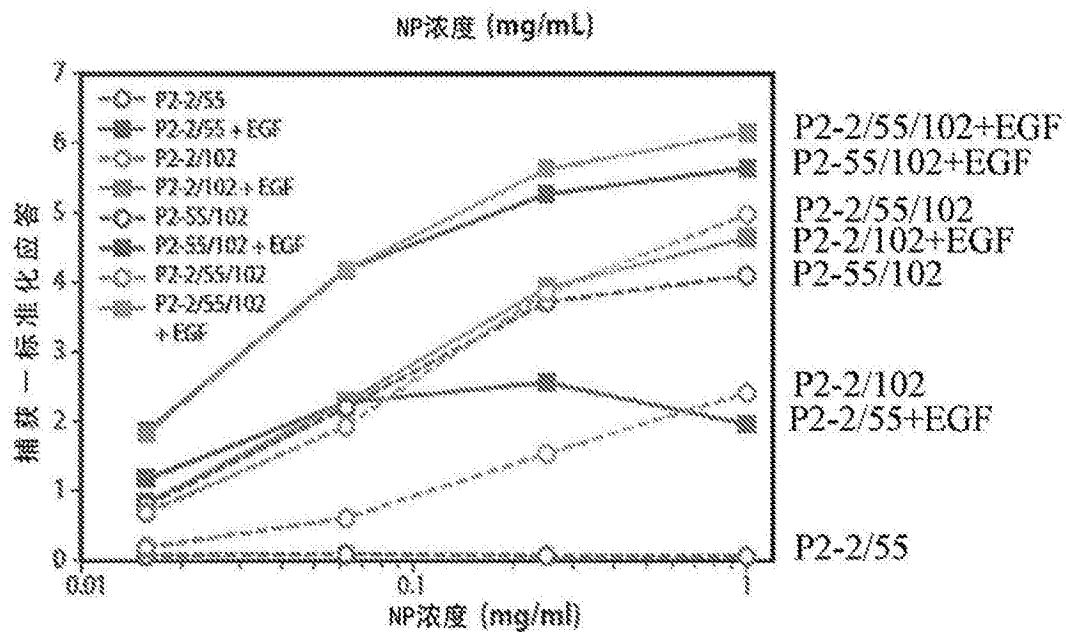


图22

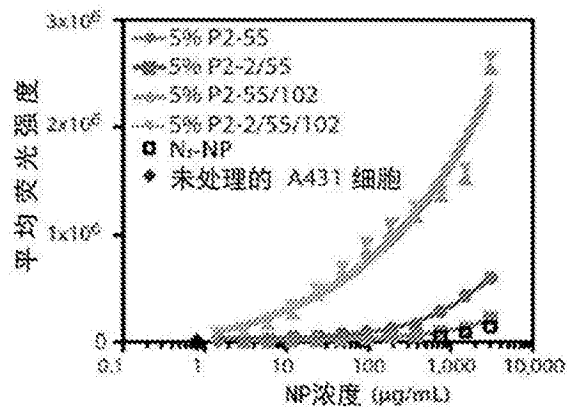


图23A

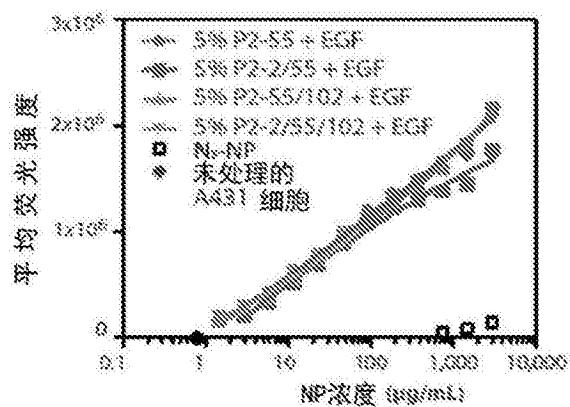


图23B

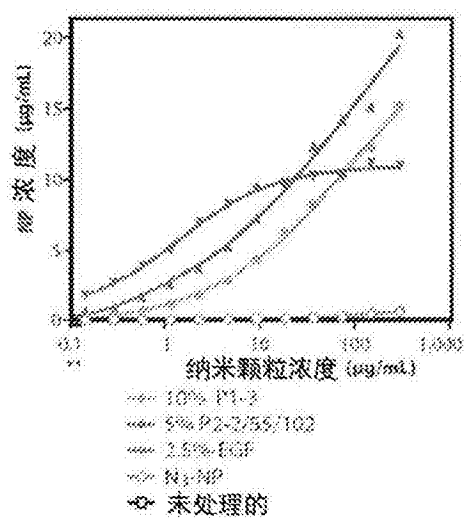


图23C

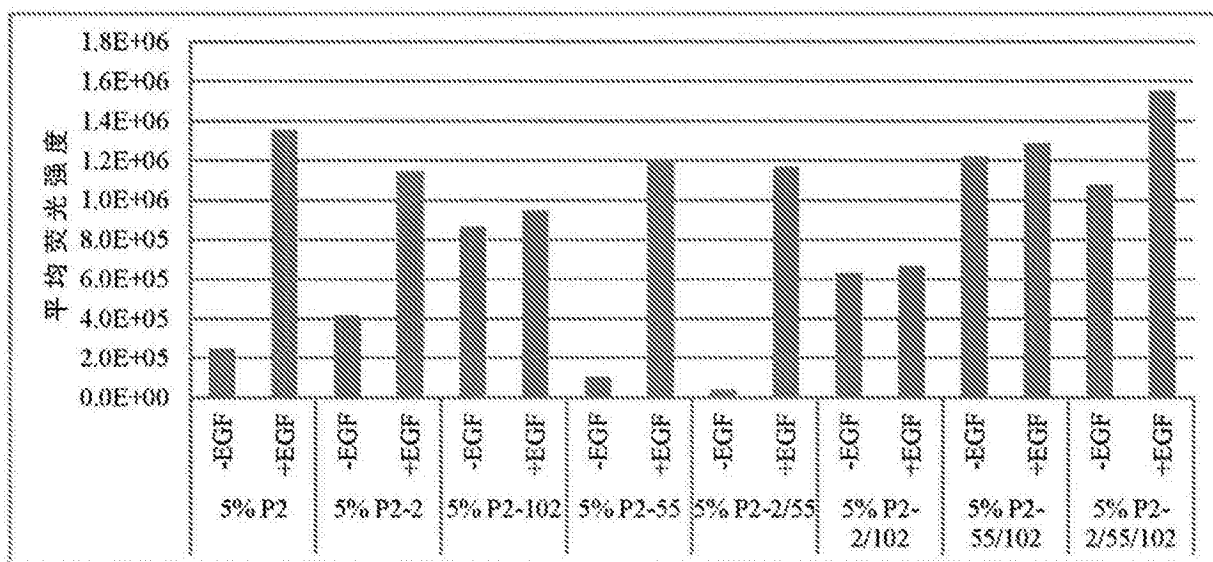


图24

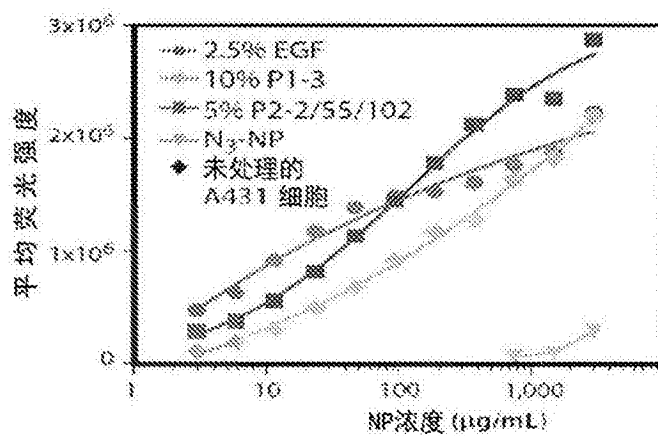


图25A

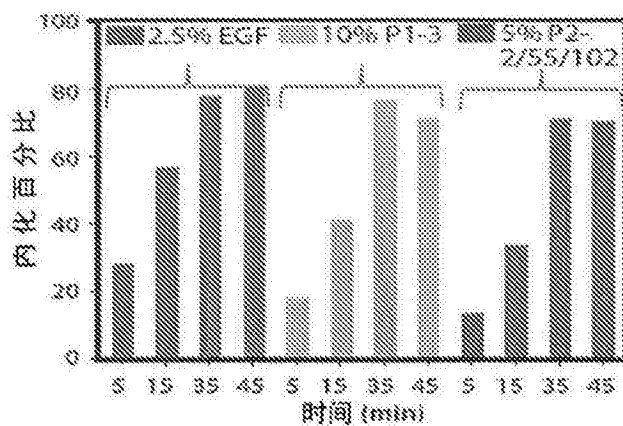


图25B

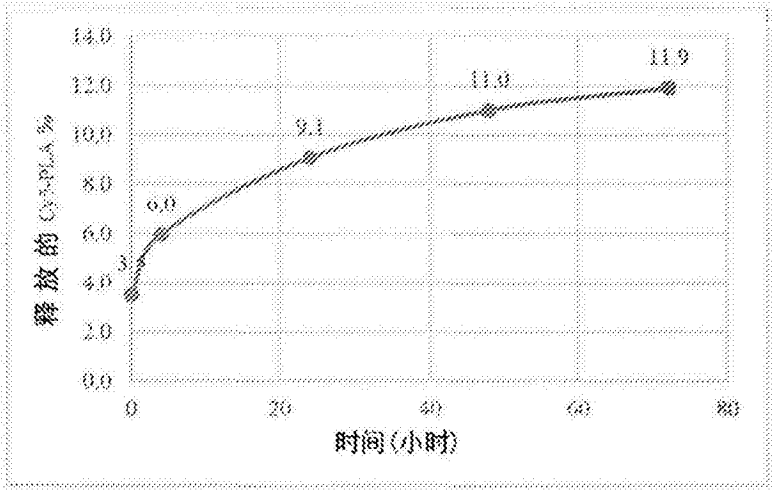


图26