(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115297842 A
(43)申请公布日 2022.11.04

(21)申请号 202180021424.4

(22)申请日 2021.03.12

(30)优先权数据
10-2020-0032035 2020.03.16 KR
10-2020-0172631 2020.12.10 KR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.09.15

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2021/003095 2021.03.12

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/187813 KO 2021.09.23

(71)申请人 斯科拉福克斯特有限公司
地址 韩国首尔
申请人 高丽大学校产学协力团

(72)发明人 金宗城 蔡允珍

(74)专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038
专利代理师 郑天松

(51)Int.Cl.
A61K 9/06(2006.01)
A61K 47/69(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

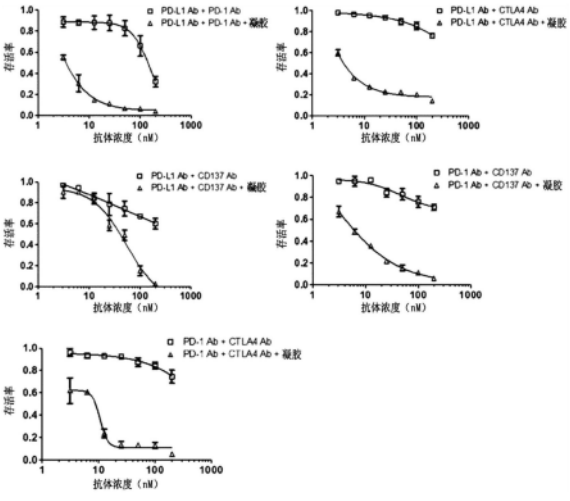
权利要求书2页 说明书19页 附图12页

(54)发明名称

可变形水凝胶粒子及包括其的用于治疗癌症的药物组合物

(57)摘要

本发明的目的在于提供一种可变形(deformable)的水凝胶(hydrogel)粒子,其表面结合有可结合到癌细胞或T细胞的细胞表面成分的蛋白,并且提供包括该水凝胶粒子的用于治疗癌症的药物组合物。



CN 115297842 A

1.一种水凝胶粒子,其特征在于,所述水凝胶粒子可变形,并且其表面结合有可结合到癌细胞或T细胞的细胞表面成分的蛋白。

2.根据权利要求1所述的水凝胶粒子,其特征在于,所述细胞表面成分是从CD2、CD3、CD19、CD24、CD27、CD28、CD31、CD34、CD45、CD46、CD80、CD86、CD133、CD134、CD135、CD137、CD160、CD335、CD337、CD40L、ICOS、GITR、HVEM、半乳糖凝集素9、TIM-1、LFA-1、PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、ILT3、ILT4、PD-1、CTLA-4、BTLA、MHC-I、MHC-II、TGF-β受体、潜在TGF-β结合蛋白(LTBP);包括DLL-Fc、DLL-1或DLL-4的δ样配体、WNT3、干细胞因子以及血小板生成素中选择的一种以上。

3.根据权利要求1所述的水凝胶粒子,其特征在于,所述癌细胞的细胞表面成分是PD-L1蛋白,所述T细胞的细胞表面成分是从由PD-1蛋白、CTLA-4蛋白以及CD137蛋白组成的群组中选择。

4.根据权利要求1所述的水凝胶粒子,其特征在于,结合到所述水凝胶表面的蛋白是抗体、重组蛋白或它们的组合。

5.根据权利要求4所述的水凝胶粒子,其特征在于,所述抗体是抗-PD-1抗体、抗-PD-L1抗体、抗-CD137抗体、抗-CTLA-4抗体或它们的组合。

6.根据权利要求4所述的水凝胶粒子,其特征在于,所述重组蛋白是可靶向结合至从由PD-L1蛋白、PD-1蛋白、CTLA-4蛋白以及CD137蛋白组成的群组中选择的至少一种的从由蛋白、适体或它们的组合组成的群组中选择的至少一种。

7.根据权利要求1所述的水凝胶粒子,其特征在于,在去离子水中所述水凝胶的直径是440nm以上。

8.根据权利要求7所述的水凝胶粒子,其特征在于,在去离子水中所述水凝胶的直径是540nm以上或700nm以上。

9.根据权利要求1所述的水凝胶粒子,其特征在于,所述水凝胶包括由主要单体与共聚单体构成的共聚体。

10.根据权利要求9所述的水凝胶粒子,其特征在于,

所述主要单体是从由N-异丙基丙烯酰胺、N-丙烯酰甘氨酰胺、羟丙基纤维素、乙烯基己内酰胺、N-乙烯基吡咯烷酮、甲基丙烯酸2-羟乙酯、乙二醇;天冬氨酸、谷氨酸、L-赖氨酸等氨基酸;己内酯以及乙烯基甲醚组成的群组中选择,

所述共聚单体是从由烯丙胺(AA)、甲基丙烯酸二甲氨基乙酯(DMAEMA)、丙烯酸二甲氨基乙酯(DMAEA)、丙烯酸(AAc)、聚乙二醇(PEG)以及甲基丙烯酸(MAAc)组成的群组中选择。

11.根据权利要求9所述的水凝胶粒子,其特征在于,所述水凝胶还包括交联剂。

12.根据权利要求11所述的水凝胶粒子,其特征在于,所述交联剂是从由N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(MBA)、聚乙二醇(PEG)二羟基、聚乙二醇二胺、聚乙二醇二氧胺、聚乙二醇二氯化物、聚乙二醇二溴化物、聚乙二醇二叠氮化物、聚乙二醇二硫醇、聚乙二醇二醛、聚乙二醇二环氧化物、聚乙二醇二丙烯酸酯、聚乙二醇二甲基丙烯酸酯、聚乙二醇二乙酰乙酸、聚乙二醇二琥珀酸、聚乙二醇二琥珀酰亚胺羧甲基酯、聚(ε-己内酯)二丙烯酸酯、聚(ε-己内酯)二甲基丙烯酸酯、聚丙交酯二丙烯酸酯、聚丙交酯二甲基丙烯酸酯、聚(丙交酯-co-乙交酯)二丙烯酸酯、聚(丙交酯-co-乙交酯)二甲基丙烯酸酯、聚(ε-己内酯-b-乙二醇-b-ε-己内酯)二丙烯酸酯、聚(ε-己内酯-b-乙二醇-b-ε-己内酯)二甲基丙烯酸酯、聚(丙交酯-b-乙二

醇-b-丙交酯)二丙烯酸酯、聚(丙交酯-b-乙二醇-b-丙交酯)二甲基丙烯酸酯、聚[(丙交酯-co-乙交酯)-b-乙二醇-b-(丙交酯-co-乙交酯)]二丙烯酸酯、聚[(丙交酯-co-乙交酯)-b-乙二醇-b-(丙交酯-co-乙交酯)]二甲基丙烯酸酯、聚(ε-己内酯-co-丙交酯)-二丙烯酸酯、聚(ε-己内酯-co-丙交酯)-二甲基丙烯酸酯、聚(ε-己内酯-co-乙交酯)-二丙烯酸酯、聚(ε-己内酯-co-乙交酯)-二甲基丙烯酸酯、聚[(己内酯-co-丙交酯)-b-乙二醇-b-(己内酯-co-丙交酯)]二丙烯酸酯、聚[(己内酯-co-丙交酯)-b-乙二醇-b-(己内酯-co-丙交酯)]二甲基丙烯酸酯、聚[(己内酯-co-乙交酯)-b-乙二醇-b-(己内酯-co-乙交酯)]二丙烯酸酯、聚[(己内酯-co-乙交酯)-b-乙二醇-b-(己内酯-co-乙交酯)]二甲基丙烯酸酯以及它们的组合组成的群组中选择。

13.根据权利要求11所述的水凝胶粒子,其特征在于,所述水凝胶包括由50重量%至97.9重量%的所述主要单体、2重量%至40重量%的共聚单体以及0.1重量%至10重量%的交联剂组成的共聚体。

14.根据权利要求1所述的水凝胶粒子,其特征在于,所述水凝胶包括从由聚(N-异丙基丙烯酰胺-co-烯丙胺)、聚(N-异丙基丙烯酰胺-co-甲基丙烯酸二甲氨基乙酯)、聚(N-异丙基丙烯酰胺-co-丙烯酸二甲氨基乙酯)、聚(N-异丙基丙烯酰胺-co-丙烯酸、聚(N-异丙基丙烯酰胺-co-聚乙二醇-丙烯酸)以及聚(N-异丙基丙烯酰胺-co-甲基丙烯酸)组成的群组中选择的至少一种。

15.根据权利要求13所述的水凝胶粒子,其特征在于,所述水凝胶包括使用N-异丙基丙烯酰胺作为主要单体、丙烯酸作为共聚单体以及N,N'-亚甲基双丙烯酰胺作为交联剂制备的共聚体。

16.一种权利要求1所述的可变形水凝胶粒子的制备方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

(i)制备水凝胶粒子;

(ii)对水凝胶粒子表面进行改性,使得蛋白可以结合到水凝胶粒子的表面;

(iii)向表面改性的水凝胶粒子添加蛋白,从而将蛋白结合到水凝胶粒子表面。

17.根据权利要求16所述的方法,其特征在于,制备所述水凝胶粒子的步骤(i),包括以下步骤:

混合50重量%至97.9重量%的主要单、2重量%至40重量%的共聚单体以及0.1重量%至10重量%的交联剂,使得三者成分之和达到100重量%;

将所得混合液加热至55℃至80℃;

在添加或不添加引发剂的条件下开始聚合反应;

获得通过所述聚合反应产生的水凝胶水溶液;以及

利用纯净水对所述水凝胶水溶液进行2周透析。

18.根据权利要求16所述的方法,其特征在于,所述蛋白是抗体或重组蛋白。

19.包括治疗有效剂量的权利要求1至15之任一项所述的水凝胶粒子的用于治疗癌症的药物组合物。

20.包括权利要求1至15之任一项所述的水凝胶粒子的免疫抗癌剂。

可变形水凝胶粒子及包括其的用于治疗癌症的药物组合物

【技术领域】

[0001] 【政府资助研发声明】

[0002] 本发明是卫生和福利部授予编号HI14C3477的政府支持研究项目。

[0003] 本发明涉及可以防止癌细胞的免疫系统逃逸机制的可变形水凝胶粒子(hydrogel particles)及包括其的用于治疗癌症的药物组合物。

【背景技术】

[0004] 人体免疫系统是由各种器官和具有免疫作用的特殊细胞和物质组成。免疫细胞和免疫物质可以抑制来源于人体外的外部物质或者细菌等刺激免疫反应的抗原所引起的炎症,还可以抑制癌细胞。T细胞和B细胞是代表性的免疫细胞。不同类型的T细胞会直接攻击抗原或辅助B细胞发挥功能。B细胞通过分泌可以攻击抗原的抗体来清除抗原。

[0005] 癌细胞可以通过免疫检查点(immune checkpoint)来逃避免疫系统的监视。免疫检查点蛋白是一种激活或失活体内免疫细胞的蛋白,是免疫系统区分癌细胞和正常细胞的介质。代表性的检查点蛋白有T细胞表面的PD-1(Programmed Death 1)和CTLA-4(Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Antigen 4)。当它们遇到正常细胞表面的蛋白(例如PD-L1、B7)时,会使T细胞失活来防止攻击正常细胞。癌细胞通过表达PD-L1和B7等检查点蛋白来逃避免疫系统的攻击。

[0006] 免疫抗癌剂可以抑制癌细胞逃避免疫系统的监视,或者增强免疫细胞的作用使得免疫细胞更有效地攻击癌细胞。抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗CTLA-4抗体等已获得FDA批准,并已经应用到临床中。然而,基于抗体的免疫抗癌剂需要大量给药以调节免疫检查点分子功能,这不仅会产生毒副作用,而且还伴随着高昂的治疗费用。

[0007] 作为另一种基于免疫疗法的癌症治疗方法,该方法向从患者血液中分离的T细胞中转入可以识别癌细胞并传递T细胞免疫激活信号的基因(CAR,嵌合抗原受体),应用该方法的治疗剂已经获得FDA批准。但将完成的CAR-T细胞扩增至数百万个后再回输给患者,这个过程不仅耗时长,而且感染风险和成本也相当高。

[0008] 目前正在开发双抗体或三抗体技术,该技术能够结合CAR-T免疫抗癌疗法的优点以及相比CAR-T更加低廉的单抗体免疫抗癌治疗剂的优点。双抗体和三抗体通过两种以上抗体的作用,相比单抗体具有更好的癌细胞杀伤活性。然而,为了实现这一点,需要使用重组蛋白技术,该过程需要大量的时间和金钱。

[0009] 另一方面,将水凝胶作为药物递送手段的研究十分活跃。水凝胶是由亲水性聚合物网络组成的三维结构,90%以上的成分是水。水凝胶具有与活体组织相似的特性,例如含水量高、多孔结构、相对柔和的物理特性以及生物相容性等,因此作为一种药物递送手段在制药领域受到关注。

[0010] 水凝胶根据用作主链的聚合物的类型和交联方法表现出不同性质。例如,通过使用刺激响应聚合物(stimuli-responsive polymer),可以形成响应特定刺激的水凝胶。通过使用具有大量离子化官能团的聚合物,可以形成物理性质随着pH值改变的水凝胶;利用

会因温度或光等特定刺激产生结构变形的聚合物,可以形成响应刺激而改变物理化学行为的水凝胶。交联方法和聚合物种类一样,对水凝胶特性产生巨大影响。即使使用相同的聚合物作为主链,如果交联方法不同也可以获得完全不同特性的水凝胶。水凝胶的交联方法主要分为物理交联法和化学交联法。物理交联法包括离子相互作用(ionic interaction)、疏水相互作用(hydrophobic interaction)、氢键和(hydrogen bond)以及通过结构上的分子缠结实现的可逆交联方法等。通过这些交联方法,无需单独的化学添加剂或复杂的交联过程就可以容易地诱导形成三维网络内部结构。另一方面,化学交联法一般是通过共价键结合的不可逆方法,与物理交联法相比可以形成稳定的网络。与刺激响应聚合物一样,掺入因pH变化、温度、光或超声波等刺激而发生结构变形或分解的交联剂(crosslinker)的水凝胶可以通过外部刺激控制凝胶的物理性质。(Jisoo Shin等人,"用于药物递送和组织工程应用的功能性水凝胶",KIC新闻,第18卷,第6期,(2015):第2-3页)(Jisoo Shin et al.,"Functional Hydrogel for the Application of Drug Delivery and Tissue Engineering",KIC News,Vol.18,No.6,(2015):pages 2-3)。

[0011] 韩国授权专利第10-1754774号公开了一种使用水凝胶的生物芯片,该水凝胶的物理性质会因特定刺激而发生改变。在该水凝胶表面形成有结合介导底物,当该结合介导底物与靶蛋白结合时,水凝胶会发生消溶胀(de-swelling),改变水凝胶的物理性质(如折射率、体积等)。所改变的物理性质作为相应的位移(displacement)信号被传输到分析设备,通过分析位移信号可以测量靶蛋白与结合介导底物之间的多重键的数量,从而起到生物芯片的作用。然而,该文献没有公开将所述水凝胶作为药物递送剂或使用该水凝胶的抗癌治疗剂的内容。

[0012] 【在先技术文献】

[0013] 【专利文献】

[0014] (专利文献1)韩国授权专利第10-1754774号

[0015] 【非专利文献】

[0016] (非专利文献1)Jisoo Shin et al.,"Functional Hydrogel for the Application of Drug Delivery and Tissue Engineering",KIC News,Vol.18,No.6,(2015):pages 2-3.

【发明内容】

[0017] 【要解决的技术问题】

[0018] 基于上述背景技术,本申请的发明人开发出了一种基于水凝胶的起到人工T细胞作用的可变形(deformable)免疫抗癌剂粒子,其通过与癌细胞和/或T细胞结合来阻断两者之间的相互作用,从而防止癌细胞的免疫系统逃逸机制。

[0019] 因此,本发明的目的在于提供一种可变形的(deformable)水凝胶(hydrogel)粒子,其表面结合有可与癌细胞和/或T细胞的细胞表面成分结合的蛋白,以及提供包括该水凝胶粒子的免疫抗癌剂或用于治疗癌症的药物组合物。

[0020] 然而,本发明要解决的技术问题并不受限于上述言及课题,未言及的其他课题将通过下面的记载由本领域普通技术人员明确理解。

[0021] 【解决问题的技术方案】

[0022] 本发明的一实施方式涉及一种水凝胶(hydrogel)粒子,所述水凝胶粒子可变形(deformable),并且其表面结合有可结合到癌细胞或T细胞的细胞表面成分的蛋白。

[0023] 在一些实施例中,所述细胞表面成分是从CD2、CD3、CD19、CD24、CD27、CD28、CD31、CD34、CD45、CD46、CD80、CD86、CD133、CD134、CD135、CD137、CD160、CD335、CD337、CD40L、ICOS、GITR、HVEM、半乳糖凝集素9、TIM-1、LFA-1、PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、ILT3、ILT4、PD-1、CTLA-4、BTLA、MHC-I、MHC-II、TGF-β受体、潜在TGF-β结合蛋白(LTBP);包括DLL-Fc、DLL-1或DLL-4的δ样配体、WNT3、干细胞因子以及血小板生成素中选择的一种以上。

[0024] 根据一方面,所述癌细胞的细胞表面成分可以是PD-L1蛋白,所述T细胞的细胞表面成分可以是从由PD-1蛋白、CTLA-4蛋白以及CD137蛋白组成的群组中选择。

[0025] 根据一方面,结合到所述水凝胶表面的蛋白可以是抗体、重组蛋白或它们的组合。

[0026] 根据一方面,所述抗体可以是抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗CD137抗体、抗CTLA-4抗体或它们的组合。

[0027] 根据一方面,所述重组蛋白可以是可靶向结合至从由PD-L1蛋白、PD-1蛋白、CTLA-4蛋白以及CD137蛋白组成的群组中选择的至少一种的从由蛋白、适体或它们的组合组成的群组中选择的至少一种。

[0028] 根据一方面,所述水凝胶是纳米粒子。具体地,在去离子水(deionized water)中所述水凝胶的直径范围是约50nm至约3000nm,例如约100nm至约2500nm,或约300nm至约2000nm,优选约440nm以上,更优选约540nm以上,最优选约700nm以上,例如约700nm至约1300nm。

[0029] 根据一方面,所述水凝胶可以包括由主要单体与共聚单体构成的共聚体。例如,所述主要单体可以是从由N-异丙基丙烯酰胺、N-丙烯酰甘氨酰胺(N-acryloylglycinamide)、羟丙基纤维素(hydroxypropylcellulose)、乙烯基己内酰胺(vinylcaprolactame)、N-乙烯基吡咯烷酮(N-vinyl pyrrolidone)、甲基丙烯酸2-羟乙酯(2-hydrocyethyl methacrylate)、乙二醇(ethylene glycol);天冬氨酸、谷氨酸、L-赖氨酸等氨基酸;己内酯(caprolactone)以及乙烯基甲醚(vinyl methyl ether)组成的群组中选择,所述共聚单体可以是从由烯丙胺(AA)、甲基丙烯酸二甲氨基乙酯(DMAEMA)、丙烯酸二甲氨基乙酯(DMAEA)、丙烯酸(AAc)、聚乙二醇(PEG)以及甲基丙烯酸(MAAc)组成的群组中选择。

[0030] 根据一方面,所述水凝胶可以包括由单一单体组成的合成均聚物。作为示例,均聚物可以是聚(乙二醇)(PEG)、聚(2-甲基-2-恶唑啉)(PMOXA)、聚(环氧乙烷)(PEO)、聚(乙烯醇)(PVA)以及聚(丙烯酰胺)(PAAm)、聚(n-丙烯酸丁酯)、聚-(α-酯)、聚(乙醇酸)(PGA)、聚天冬氨酸、聚谷氨酸、聚丙交酯、聚(N-异丙基丙烯酰胺)(pNIPAAM)、聚(己内酯)以及聚乙烯基甲醚。

[0031] 根据一方面,所述水凝胶还可以包括交联剂。所述交联剂可以是从由N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(MBA)、聚乙二醇(PEG)二羟基(PEG dihydroxyl)、聚乙二醇二胺(PEG diamine)、聚乙二醇二氧胺(PEG dioxyamine)、聚乙二醇二氯化物(PEG dichloride)、聚乙二醇二溴化物(PEG dibromide)、聚乙二醇二叠氮化物(PEG diazide)、聚乙二醇二硫醇(PEG dithiol)、聚乙二醇二醛(PEG dialdehyde)、聚乙二醇二环氧化物(PEG diepoxide)、聚乙二醇二丙烯酸酯(PEG diacrylate)、聚乙二醇二甲基丙烯酸酯(PEG dimethacrylate)、聚乙二醇二乙酰乙酸(PEG diacetic acid)、聚乙二醇二琥珀酸(PEG

disuccinic acid)、聚乙二醇二琥珀酰亚胺羧甲基酯(PEG discuccinimidyl carboxy methyl ester)、聚(ε-己内酯)二丙烯酸酯[poly(ε-caprolactone)diacrylate]、聚(ε-己内酯)二甲基丙烯酸酯[poly(ε-caprolactone)dimethacrylate]、聚丙交酯二丙烯酸酯(polylactide diacrylate)、聚丙交酯二甲基丙烯酸酯(polylactide dimethacrylate)、聚(丙交酯-co-乙交酯)二丙烯酸酯[poly(lactide-co-glycolide)diacrylate]、聚(丙交酯-co-乙交酯)二甲基丙烯酸酯[poly(lactide-co-glycolide)dimethacrylate]、聚(ε-己内酯-b-乙二醇-b-ε-己内酯)二丙烯酸酯[poly(ε-caprolactone-b-ethylene glycol-b-ε-caprolactone)diacrylate]、聚(ε-己内酯-b-乙二醇-b-ε-己内酯)二甲基丙烯酸酯[poly(ε-caprolactone-b-ethylene glycol-b-ε-caprolactone)dimethacrylate]、聚(丙交酯-b-乙二醇-b-丙交酯)二丙烯酸酯[poly(lactide-b-ethylene glycol-b-lactide)diacrylate]、聚(丙交酯-b-乙二醇-b-丙交酯)二甲基丙烯酸酯[poly(lactide-b-ethylene glycol-b-lactide)dimethacrylate]、聚[(丙交酯-co-乙交酯)-b-乙二醇-b-(丙交酯-co-乙交酯)]二丙烯酸酯{poly[(lactide-co-glycolide)-b-ethylene glycol-b-(lactide-co-glycolide)]diacrylate}、聚[(丙交酯-co-乙交酯)-b-乙二醇-b-(丙交酯-co-乙交酯)]二甲基丙烯酸酯{poly[(lactide-co-glycolide)-b-ethyleneglycol-b-(lactide-co-glycolide)]dimethacrylate}、聚(ε-己内酯-co-丙交酯)-二丙烯酸酯[poly(ε-caprolactone-co-lactide)-diacrylate]、聚(ε-己内酯-co-丙交酯)-二甲基丙烯酸酯[poly(ε-caprolactone-co-lactide)-dimethacrylate]、聚(ε-己内酯-co-乙交酯)-二丙烯酸酯[poly(ε-caprolactone-co-glycolide)-diacrylate]、聚(ε-己内酯-co-乙交酯)-二甲基丙烯酸酯[poly(ε-caprolactone-co-glycolide)-dimethacrylate]、聚[(己内酯-co-丙交酯)-b-乙二醇-b-(己内酯-co-丙交酯)]二丙烯酸酯{poly[(caprolactone-co-lactide)-b-ethyleneglycol-b-(caprolactone-co-lactide)]diacrylate}、聚[(己内酯-co-丙交酯)-b-乙二醇-b-(己内酯-co-丙交酯)]二甲基丙烯酸酯{poly[(caprolactone-co-lactide)-b-ethyleneglycol-b-(caprolactone-co-lactide)]dimethacrylate}、聚[(己内酯-co-乙交酯)-b-乙二醇-b-(己内酯-co-乙交酯)]二丙烯酸酯{poly[(caprolactone-co-glycolide)-b-ethyleneglycol-b-(caprolactone-co-glycolide)]diacrylate}、聚[(己内酯-co-乙交酯)-b-乙二醇-b-(己内酯-co-乙交酯)]二甲基丙烯酸酯{poly[(caprolactone-co-glycolide)-b-ethyleneglycol-b-(caprolactone-co-glycolide)]dimethacrylate}以及它们的组合组成的群组中选择。

[0032] 根据一方面,所述水凝胶可以包括通过主要单体、共聚单体以及交联剂聚合所得到的合成共聚物,例如,主要单体是50重量%至97.9重量%,共聚单体是2重量%至40重量%以及交联剂是0.1重量%至10重量%。

[0033] 根据一方面,所述水凝胶包括从由聚(N-异丙基丙烯酰胺-co-烯丙胺)[poly(N-isoprophylacrylamide-co-allylamine):poly(NIPAM-co-AA)]、聚(N-异丙基丙烯酰胺-co-甲基丙烯酸二甲氨基乙酯)[poly(N-isopropyl acrylamide-co-2-(dimethylamino)ethyl methacrylate):poly(NIPAM-co-DMAEMA)]、聚(N-异丙基丙烯酰胺-co-丙烯酸二甲氨基乙酯)[poly(N-isopropyl acrylamide-co-2-(dimethylamino)ethyl acrylate):poly(NIPAM-co-DMAEA)]、聚(N-异丙基丙烯酰胺-co-丙烯酸)[poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid):poly(NIPAM-co-AAc)]、聚(N-异丙基丙烯酰胺-

co-聚乙二醇-丙烯酸)[poly(N-isopropylacrylamide-co-polyethylene glycol-acrylic acid):poly(NIPAM-co-PEG-AAc)]、以及聚(N-异丙基丙烯酰胺-co-甲基丙烯酸)[poly(N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid):poly(NIPAM-co-MAAc)]组成的群组中选择的至少一种。

[0034] 根据一方面,所述水凝胶可以包括天然聚合物。例如,天然聚合物可以是海藻酸盐,琼脂糖,角叉菜胶,壳聚糖,葡聚糖,羧甲基纤维素,肝素,透明质酸,聚氨基酸,胶原,明胶,纤维蛋白,纤维蛋白基生物聚合物(例如,蚕丝,角蛋白,弹性蛋白以及节肢弹性蛋白)以及它们的组合。

[0035] 根据一方面,结合到所述水凝胶表面的蛋白是通过从由碳二亚胺(Carbodiimide)交联、席夫碱(Schiff base)交联、吖内酯(Azlactone)交联、羰基二咪唑(Carbonyl diimidazole:CDI)交联、碘乙酰(Iodoacetyl)交联、酰肼(Hydrazide)交联、曼尼希(Mannich)交联以及马来酰亚胺组成的群组中选择的一种以上结合方法来结合到水凝胶表面。

[0036] 根据一方面,结合到所述水凝胶表面的蛋白可以通过蛋白A:Fc相互作用(protein A:Fc interaction)、蛋白G:Fc相互作用(protein G:Fc interaction)、蛋白A/G:Fc相互作用(protein A/G:Fc interaction)或马来酰亚胺/硫醇以及EDC/NHS结合等标准结合方法来结合到可靶向结合至一种以上的细胞表面成分的另一种由蛋白、适体或它们的组合组成的群组中选择的至少一个中。

[0037] 本发明的另一实施方式涉及可变形水凝胶粒子的制备方法,所述水凝胶粒子的表面结合有可结合到癌细胞和/或T细胞的细胞表面成分的蛋白,所述方法包括以下步骤:

[0038] (i)制备水凝胶粒子;

[0039] (ii)对水凝胶粒子表面进行改性,使得蛋白可以结合到水凝胶粒子的表面;

[0040] (iii)向表面改性的水凝胶粒子添加蛋白,从而将蛋白结合到水凝胶粒子表面。

[0041] 本发明的又一实施方式涉及包括治疗有效剂量的所述可变形水凝胶粒子的免疫抗癌剂或用于治疗癌症的药物组合物,以及将所述药物组合物施用于患者来治疗癌症的方法。

[0042] 【发明效果】

[0043] 本公开的可变形粒子基于软水凝胶,在水凝胶的表面结合有可以与癌细胞和/或T细胞的细胞表面成分,特别是免疫检查点蛋白结合的蛋白。结合到所述水凝胶表面的蛋白与癌细胞和/或T细胞的细胞表面成分结合时,根据本公开的可变形粒子附着在癌细胞和/或T细胞来防止两种细胞之间产生相互作用,由此防止癌细胞的免疫体系监视逃逸机制,促进癌细胞的死亡。

[0044] 特别地,由于软水凝胶中水凝胶成分的机械延展性(mechanical softness),当水凝胶接触细胞时,水凝胶会发生物理变形(deformation)从而覆盖细胞表面来增大接触面积,由此,通过区域抑制(area inhibition)作用,相比现有免疫抗癌剂可以使用更少量的抗体来大幅降低癌细胞和T细胞的免疫检查点蛋白发生结合的可能性。

[0045] 并且,本发明的可变形粒子不仅可以结合单一抗体,还可以结合两种以上的抗体,可以通过相比重组蛋白技术更简单的制备过程来实现多抗体的效果。

[0046] 应当理解,本发明的效果并不受限于上述效果,还包括可通过本发明的具体说明

或权利要求书中记载的发明推导出的全部效果。

【附图说明】

[0047] 图1是显示现有免疫抗癌剂的机制的模拟图。

[0048] 图2是模拟图，用来显示根据本公开的可变形粒子结合到癌细胞表面起到覆盖癌细胞表面蛋白的区域抑制作用，由此阻断癌细胞表面蛋白与T细胞表面蛋白之间的相互作用，从而防止癌细胞的免疫逃逸。

[0049] 图3是比较现有免疫抗癌剂和利用本公开的可变形粒子的抗癌机制的附图。

[0050] 图4是比较现有的利用单抗体或双抗体的抗癌机制(左图)与利用本公开的可变形粒子的抗癌机制(右图)的附图。

[0051] 图5是单独利用抗体处理癌细胞的情况，或者将抗体结合到本公开的可变形粒子进行处理的情况下与免疫细胞一起培养时，根据所处理的抗体浓度的癌细胞的存活率：图5A至图5D有关乳腺癌细胞的存活率，图5A比较了分别单独处理抗PD-L1抗体、抗PD-1抗体、抗CD137抗体以及抗CTLA-4抗体的情况，和结合到700nm粒子大小的本公开的可变形粒子进行处理时的情况；图5B比较了组合所述抗体中两种后单独处理的情况，和结合到所述可变形粒子进行处理时的情况；图5C是比较组合所述4种抗体中3种(左图：抗PD-L1抗体、CD137抗体以及抗CTLA-4抗体；右图：抗PD-1抗体、抗CD137抗体以及抗CTLA-4抗体)后单独处理的情况，和结合到所述可变形粒子进行处理时的情况；图5D比较了组合全部4种抗体后单独处理的情况，和全部结合到所述可变形粒子进行处理时的情况。图5E至图5G有关肝癌细胞的存活率；图5E以及图5F比较了分别单独处理抗PD-L1抗体以及抗CTLA-4抗体的情况，和将各个抗体结合到所述可变形粒子进行处理时的情况；图5G比较了组合抗PD-L1抗体以及抗CTLA-4抗体后单独处理的情况，和结合到700nm粒子大小的可变形粒子进行处理的情况。

[0052] 图6是确认根据本公开的可变形粒子大小的癌细胞杀伤效果的附图；图6A是在直径分别是440、540、700或1300nm的水凝胶中结合抗CTLA-4抗体后的癌细胞杀伤效果。图6B是在直径是440、540、700或1300nm的水凝胶中结合抗PD-L1抗体以及抗CTLA-4抗体后的癌细胞杀伤效果。

[0053] 图7是在组合抗PD-L1抗体以及抗CTLA-4抗体后单独处理的情况下，以及将抗PD-L1抗体以及抗CTLA-4抗体分别结合到本公开的可变形粒子(直径为700或1300nm的水凝胶粒子)与无法变形的聚苯乙烯微球(polystyrene beads)(直径为810以及1230nm的粒子)的情况下，根据抗体浓度的癌细胞杀伤效果。

[0054] 图8是根据本公开的可变形水凝胶粒子不结合抗体与免疫细胞一起培养时，根据水凝胶粒子的浓度的癌细胞的存活率。

[0055] 图9是在小鼠模型中评价本发明的可变形水凝胶粒子的抗癌效果的附图，分别对不注入抗体或水凝胶仅处理PBS的小鼠组(对照组)；组合抗PD-L1抗体以及抗CTLA-4抗体后单独处理的小鼠组；以及将抗PD-L1抗体以及抗CTLA-4抗体结合到本公开的可变形粒子(直径为700nm)进行处理的小鼠组，示出了注入抗体后第0天、第4天、第8天、第12天以及第16天的癌细胞荧光表达量。

【具体实施方式】

[0056] 下面，将参照附图对实施例进行详细说明。应当理解，可以对实施例进行多种改变，本申请的权利范围并不受限于下面的实施例。对实施例进行的所有改变、及其等同物乃至其替代物均属于本发明的权利范围。

[0057] 实施利中使用的术语仅用于说明特定实施例，并非用于限定范围。在内容中没有特别说明的情况下，单数表达包括复数含义。在本说明书中，“包括”或者“具有”等术语用于表达存在说明书中所记载的特征、数字、步骤、操作、构成要素、配件或其组合，并不排除存在或者额外附加一个或一个以上其他特征、数字、步骤、操作、构成要素、配件或其组合的可能性。

[0058] 在没有其他定义的情况下，包括技术或者科学术语在内的本文使用的全部术语，都具有本领域普通技术人员所理解的通常含义。通常使用的如词典定义的术语，应理解为相关技术内容中的含义，在本说明书中没有明确定义的情况下，不能解释为理想化或过于形式化的含义。

[0059] 并且，在参照附图进行说明的过程中，与附图标记无关，相同的构成要素使用相同的附图标记，并省略重复说明。在说明实施例的过程中，当判断对于相关公知技术的具体说明会不必要地混淆实施例时，省略其详细说明。

[0060] 当一个构成要素与某一实施例的构成要素具有共同功能时，在其他实施例中也使用相同名称对该构成要素进行说明。在没有言及反例的情况下，某一实施例的说明能够适用于其他实施例，对重复内容省略具体说明。

[0061] 在全文中阐述的所有数值范围包括它们的上限值和下限值，以及落入该范围内的每一个数值和更小范围的数值，每一个数值和更小的数值范围在本文中均被认为是明确和具体的。

[0062] 根据本发明的一实施方式，提供一种可变形(deformable)的水凝胶(hydrogel)粒子，其表面结合有可与癌细胞和/或T细胞的细胞表面成分结合的蛋白。

[0063] 根据本公开的术语“细胞表面成分”是指作为位于细胞膜(cell membrane)的蛋白，可与细胞外成分结合或相互作用的蛋白。细胞表面成分的示例有从CD2、CD3、CD19、CD24、CD27、CD28、CD31、CD34、CD45、CD46、CD80、CD86、CD133、CD134、CD135、CD137、CD160、CD335、CD337、CD40L、ICOS、GITR、HVEM、半乳糖凝集素9、TIM-1、LFA-1、PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、ILT3、ILT4、PD-1、CTLA-4、BTLA、MHC-I、MHC-II、TGF-β受体(receptor)、潜在TGF-β结合蛋白(latent TGF-β-binding protein，LTBP)、δ样配体(例如，DLL-Fc、DLL-1或DLL-4)、WNT3、干细胞因子以及血小板生成素中选择的一种以上。更具体地，例如T细胞表面的PD-1以及CTLA-4蛋白，癌细胞表面的PD-L1以及B7等免疫检查点蛋白。

[0064] 根据本公开的术语“可变形(deformable)”是指粒子的物理形状可以改变，是指根据本公开的水凝胶由于其延展性，在与细胞接触时会自行改变粒子形状的性质。特别是在体液(body fluid)中保持球形的水凝胶在接触其他细胞时不会发生粉碎或破损而是会薄薄地延展，向毯子(blanket)或罩子(cover)一样把细胞盖住。

[0065] 根据本公开的水凝胶的可变形程度可以通过测量水凝胶粒子接触细胞前后的直径变化来确定。与接触细胞前的球形状态(横向X轴、纵向Y轴、高度Z轴)的水凝胶的高度轴直径(D)相比，水凝胶在接触细胞后像被子一样盖住细胞时的高度轴直径缩小约30％至约

99％(即,接触后高度轴直径是0.01D至0.7D)则判断为可发生变形。优选地,水凝胶的接触后高度轴直径相比接触前减小约30％至约90％(即,接触后直径是约0.1D至约0.7D)。

[0066] 为了可在细胞表面发生变形,根据本公开的水凝胶具有适当的延展性(softness)和/或(点)弹性模量。根据本公开的水凝胶偏柔软(soft),即延展性偏高,为此在一实施方式中,在25℃中水凝胶粒子的弹性模量范围可以是0.01Pa至100Pa(对于水凝胶延展性的进一步讨论可参考下面的文献,本说明书引入其全文作为参考:Mattias Karg et al., Langmuir 2019,35,6231-6255).

[0067] 根据本公开的水凝胶的直径范围是约50nm至约3000nm例如,约100nm至约2500nm,或约300nm至约2000nm,优选约440nm以上,更优选约540nm以上,最优选约700nm以上,例如约700nm至约1300nm。

[0068] 水凝胶的直径可以通过本领域技术人员已知的常规方法测量,例如可以使用动态光散射(光相关光谱法、激光衍射、小角激光散射(LALLS)和多角激光散射(MALLS))、光阻法(light obscuration methods)(例如库尔特分析法(Coulter analysis method))或其他方法(例如流变学和光学或电子显微镜等)。

[0069] 本公开中的“蛋白(protein)”是指由多个氨基酸的肽键合形成的聚合物,非限制性示例包括抗体(antibody)、重组蛋白(recombinant protein)、肽(peptide)、多肽(polypeptide)、糖蛋白(glycoprotein)、脂蛋白(lipoprotein)、合成蛋白质(synthetic protein)等。

[0070] 本公开中的“抗体(antibody)”是指与特定抗原具有免疫反应性的免疫球蛋白(immunoglobulin)分子,是指起到特异性地识别抗原的受体作用的蛋白分子,是涵盖全部抗体(whole antibody)和抗原结合片段等的全部抗体片段(antibody fragment)的概念。

[0071] 在本说明书中,“单独处理”抗体是指在用抗体处理癌细胞等时,不结合到水凝胶等的表面,而是将单离(isolated)的抗体稀释到PBS等中进行处理。

[0072] 本公开中的“重组蛋白(recombinant protein)”是指通过重组DNA技术工程改造的DNA所表达的蛋白,特别是将重组DNA克隆(cloning)到载体(vector)等表达系统中进行表达的蛋白。

[0073] 本公开的“水凝胶(hydrogel)”是指本领域本身已知的通过亲水性聚合物链(polymer chain)交联(crosslinked)形成的三维网络,例如韩国授权专利第10-1754774号中公开的水凝胶。

[0074] 根据本公开的水凝胶粒子的表面可以被改性,使得蛋白可以结合到其表面。在一示例中,可以使用马来酰亚胺/硫醇和EDC/NHS结合等标准结合方法来对粒子表面进行改性。更具体地,该结合是通过碳二亚胺(carbodiimide)交联、席夫碱(Schiff base)交联、叠氮内酯(azlactone)交联、羰基二咪唑(carbonyl diimidazole,CDI)交联、碘乙酰(iodoacetyl)交联、酰肼(hydrazide)交联、曼尼希(Mannich)交联以及马来酰亚胺(maleimide)交联中选择的一种以上的反应来实现。Hermanson等人,(2013)生物共轭技术:学术出版社(Hermanson et al.,(2013)Bioconjugate Techniques:Academic Press)中描述了与水凝胶粒子结合的其他有用方法,其整体引入本文作为参考。

[0075] 根据本发明的另一实施方式,提供一种包括所述可变形粒子的用于治疗癌症的药物组合物,以及将所述药物组合物施用于患者来治疗癌症的方法。

[0076] 这里的“癌症(cancer)”包括所有癌症,非限制性示例包括肺癌、食道癌、胸腺癌、乳腺癌、肝癌、胃癌、结肠直肠癌、胰腺癌、宫颈癌、皮肤癌、前列腺癌、卵巢癌、甲状腺癌、膀胱癌、宫颈癌、骨髓癌和胆道癌等。

[0077] 本公开的术语“治疗”可以被解释为包括通过将本发明的药物组合物施用于患者来改善或有益于癌症症状的任何行为,但并不受限于此。

[0078] 本发明的药物组合物还可以包括制备药物组合物常用的合适的载体、赋形剂以及稀释剂,所述载体还可以是非天然载体。

[0079] 所述载体、赋形剂和稀释剂包括乳糖,葡萄糖,蔗糖,山梨糖醇,甘露醇,木糖醇,赤藓糖醇,麦芽糖醇,淀粉,阿拉伯树胶,海藻酸盐,明胶,磷酸钙,硅酸钙,纤维素,甲基纤维素,微晶纤维素,聚乙烯吡咯烷酮、水、水杨酸甲酯、尼泊金丙酯、滑石、硬脂酸镁和矿物油。

[0080] 一方面,本发明的药物组合物可以通过常规方法配制成散剂、粒子剂、片剂、胶囊剂、混悬剂、乳剂、糖浆剂等口服剂型、气雾剂型、外用剂型、栓剂型或无菌注射液等。配制药物组合物时,使用通常的填充剂、增量剂、粘合剂、润湿剂、崩解剂、表面活性剂等稀释剂、赋形剂或载体。

[0081] 本发明的药物组合物可以作为单独的治疗剂给药或者可以与其他治疗剂一同使用来进行给药,并且可以与常规治疗剂顺序或同时给药。并且可以单次或多次给药。重要的是应考虑所有上述因素,以可获得最大效果且没有副作用的最小剂量给药。

[0082] 同时,如本文中的术语“给药”是指通过任何合适的方法将本发明的药物组合物施用于受试者,给药途径可以是能够到达靶组织的多种途径。

[0083] 给药途径的示例包括口服、肠胃外、皮下(subcutaneously)、腹膜内(intraperitoneally)、肺内或鼻内给药,并且肠胃外注射包括常规的肠胃外给药方法,例如肌肉内(intramuscularly)、关节内、鞘内、椎管硬膜外空间内、静脉内、皮内(intradermally)、腹膜内、瘤内(intratumorally)或皮下给药。对于该组合物的肠胃外给药,优选地,可以在优选纯度下混合药学上可接受的载体,即所用浓度和剂量对受体无毒,并且可与其他制剂成分混合,制成单位剂量的剂型。

[0084] 本发明的药物组合物以“免疫有效剂量(an immunologically effective amount)”、“抗肿瘤有效剂量(an anti-tumor effective amount)”、“抑肿瘤有效剂量(an tumor-inhibiting effective amount)”或者“治疗有效剂量(therapeutically effective amount)”给药,本发明的组合物的准确给药量是由医师基于年龄、体重、肿瘤大小、感染或转移程度以及患者(对象)状况等个体差异来确定。在一实施方式中,本发明的药物组合物可以以每次约0.01至约20mg/kg(患者体重)的剂量、约0.01至约3mg/kg的剂量、约0.05至2mg/kg,约0.1至约2mg/kg的剂量,约0.1至约1mg/kg的剂量,约1至约2mg/kg的剂量,或约2至约20mg/kg的剂量给药2至3周。根据本发明,与现有的免疫抗癌剂的不与水凝胶结合而单独给药的情况相比,可以施用最小有效剂量的免疫抗癌剂。药学领域的普通技术人员可以通过监测患者的疾病迹象并相应地调整治疗来容易地确定特定患者的最佳剂量方案。

[0085] 在下文中,将参照附图更详细描述根据本公开的可变形粒子的机制。

[0086] 图1是说明现有免疫抗癌剂的机制的附图。癌细胞表面具有作为免疫检查点蛋白的多数PD-L1以及B7蛋白。当癌细胞表面的PD-L1或B7与T细胞表面的PD-1或CTLA-4蛋白结

合时，会抑制T细胞的免疫机能，导致癌细胞逃避免疫体系。免疫抗癌剂防止T细胞失活，使得T细胞可以攻击癌细胞来防止癌细胞的免疫机能逃逸机制。为此，免疫抗癌剂包括抗-PD-L1和/或抗CTLA-4抗体(antibody)。抗PD-L1抗体通过与癌细胞表面的PD-L1蛋白结合来阻断PD-L1以及PD-1的结合，抗CTLA-4抗体与T细胞的CTLA-4蛋白结合来阻断CTLA-4以及B7的结合，由此防止因免疫检查点蛋白导致的T细胞失活，相反可以激活免疫机制使得T细胞攻击癌细胞。然而，现有的免疫抗癌剂为有效防止癌细胞的免疫机能逃逸，需要包括比癌细胞表面的PD-L1蛋白或T细胞的CTLA-4蛋白数量更多或相同个数的抗体。

[0087] 相反，本公开的可变形粒子利用水凝胶延展性，可以利用少量的抗体更有效地防止癌细胞的免疫逃逸。本公开的可变形粒子相比现有免疫抗癌剂(图1)具有相对较少数量的抗PD-L1抗体(图2的左侧)。所述可变形粒子表面的抗PD-L1抗体与癌细胞表面的PD-L1蛋白结合，结合的同时水凝胶如同被子一样盖住癌细胞表面，使得T细胞的PD-1蛋白无法与癌细胞表面的PD-L1蛋白结合(区域抑制)(图2的右图)。即，软水凝胶在附着至癌细胞时会发生变形(deformation)，从而扩大与癌细胞的接触面积，即使使用少量的抗体也能大幅降低癌细胞的检查点蛋白与T细胞的检查点蛋白结合，有效抑制癌细胞的免疫逃逸。

[0088] 图3是比较利用本公开的可变形粒子的癌细胞治疗剂与现有技术的附图。癌细胞表面具有多数PD-L1以及B7蛋白，它们与T细胞表面的PD-1或CTLA-4蛋白结合会抑制T细胞的免疫机能，使得癌细胞出现免疫监视体系逃逸(图3的左侧)。现有的免疫抗癌剂是利用抗体来抑制癌细胞的免疫逃逸，为实现有效阻断，现有的免疫抗癌剂需要具有比癌细胞表面的PD-L1蛋白更多或相似数量的抗PD-L1抗体(图3的中间图)。相反，本公开的可变形粒子包括对于PD-1、PD-L1、CTLA-4和/或CD137等免疫检查点蛋白的抗体，因此不仅可以通过这些抗体附着至癌细胞和/或T细胞，还可以通过软水凝胶的特性，在附着至细胞时会发生形状变化从而大面积附着到细胞上(图3的右侧)。大范围附着到癌细胞和/或T细胞表面的软水凝胶其本身就可以防止T细胞的检查点蛋白的失活。

[0089] 进一步地，根据本公开的可变形粒子不仅可以在水凝胶单独结合免疫检查点蛋白PD-1、PD-L1以及CTLA-4靶向(targeting)抗体与T细胞活化受体、CD137(4-1BB)靶向抗体等，还可以将这些抗体中的两种以上进行组合后结合到水凝胶，因此可以实现如同双抗体或三抗体的多抗体的效果(图4的右侧)。即，本公开的可变形粒子可以利用现有抗体轻松制备具有多重特异性的水凝胶，可以显著降低合成多抗体的开发时间与费用。

[0090] 下面对比较癌细胞存活率的实验过程与结果进行说明，该实验比较了在癌细胞单独处理抗体的情况下，以及结合到根据本公开的可变形粒子进行处理的情况下，与作为免疫细胞的外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell，PBMC)一起培养时的癌细胞存活率。下面的实施例仅用于示例本发明，并非用于限定本发明的范围。

[0091] 【实施例】

[0092] 【实施例1：制备水凝胶】

[0093] 水凝胶的制备方法参考韩国授权专利第10-1754774号。所述文献的内容通过引用整体并入本文。

[0094] 构成根本公开的可变形粒子的水凝胶由以下步骤制备：混合50重量％至97.9重量％的主要单体，2重量％至40重量％的共聚单体，以及0.1重量％至10重量％的交联剂，使得三者成分之和达到100重量％；将包括所述单体的水溶液加热至55℃至80℃；在添加或不

添加引发剂的情况下开始(initiate)聚合反应;获得通过所述反应产生的水凝胶水溶液;以及利用纯净水对所述水凝胶水溶液进行约2周的透析(dialysis)。

[0095] 所述主要单体、共聚单体和交联剂可以分别以50重量%～97.9重量%、2重量%～40重量%、0.1重量%～10重量%的含量范围混合,当主要单体的含量低于50重量%时,会降低聚合反应性导致不能很好地进行聚合;当超过97.9重量%时,由于缺乏共聚单体提供的活性基团,可能难以结合所需的蛋白(例如,通过丙烯酸的EDC/NHS偶联)。当共聚单体的含量低于2重量%或超过40重量%时,则分别会在使用共聚单体的活性基团结合蛋白时存在技术困难,或者难以均匀聚合水凝胶粒子。另外,当交联剂的含量低于0.1重量%时,难以形成水凝胶,当超过10重量%时,会降低水凝胶的延展性。

[0096] 在一制备例中,所述主要单体可以使用从由N-异丙基丙烯酰胺,N-丙烯酰甘氨酰胺(N-acryloylglycinamide)、羟丙基纤维素(hydroxypropylcellulose)、乙烯基己内酰胺(vinylcaprolactame)、N-乙烯基吡咯烷酮(N-vinyl pyrrolidone)、甲基丙烯酸2-羟乙酯(2-hydrocyethyl methacrylate)、乙二醇(ethylene glycol);天冬氨酸、谷氨酸、L-赖氨酸等氨基酸;己内酯(caprolactone)以及乙烯基甲醚(vinyl methyl ether)组成的群组中选择的一种,所述共聚单体可以使用从由烯丙胺(AA)、甲基丙烯酸二甲氨基乙酯(DMAEMA)、丙烯酸二甲氨基乙酯(DMAEA)、丙烯酸(AAc)、乙二醇(EG)以及甲基丙烯酸(MAAc)组成的群组中选择的一种。

[0097] 在另一制备例中,所述主要单体可以使用N-异丙基丙烯酰胺,所述共聚单体可以使用丙烯酸。此时,交联剂可以是N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(N,N'-methylene-bis-acrylamide,MBA)。

[0098] 在又一制备例中,水凝胶可以包括从由聚(N-异丙基丙烯酰胺-co-烯丙胺)[poly(N-isoprophylacrylamide-co-allylamine):poly(NIPAM-co-AA)]、聚(N-异丙基丙烯酰胺-co-甲基丙烯酸二甲氨基乙酯)[poly(N-isopropyl acrylamide-co-2-(dimethylamino)ethyl methacrylate):poly(NIPAM-co-DMAEMA)]、聚(N-异丙基丙烯酰胺-co-丙烯酸二甲氨基乙酯)[poly(N-isopropylacrylamide-co-2-(dimethylamino)ethyl acrylate):poly(NIPAM-co-DMAEA)]、聚(N-异丙基丙烯酰胺-co-丙烯酸)[poly(N-isopropyl acrylamide-co-acrylic acid):poly(NIPAM-co-Aac)]、聚(N-异丙基丙烯酰胺-co-聚乙二醇-丙烯酸)[poly(N-isopropyl acrylamide-co-polyethylene glycol-acrylic acid):poly(NIPAM-co-PEG-Aac)]以及聚(N-异丙基丙烯酰胺-co-甲基丙烯酸)[poly(N-isopropyl acrylamide-co-methacrylic acid):poly(NIPAM-co-MAAc)]组成的群组中选择的至少一种。

[0099] 所述引发剂可以使用过硫酸铵(ammonium persulfate,APS),可以根据所使用的单体基于公知技术进行适当选择。

[0100] 本公开的水凝胶是根据本领域的常识,通过控制单体、交联剂和/或表面活性剂的种类和含量或控制聚合引发和聚合过程中的温度来调节所制备的水凝胶粒子的延展性等物理性质与大小。例如,随着聚合物中丙烯酸的含量提高而BIS的含量降低,所制备的水凝胶粒子的消溶胀(de-swelling)会逐渐增加。此外,如果BIS的含量过高,则无法形成大粒子的水凝胶。特别地,根据本发明的水凝胶的粒子大小优选为约440nm以上,在制备过程中,通过调节表面活性剂和交联剂的量和种类,或者通过调节聚合引发和聚合过程中的温度,可

以将所制备的粒子大小控制在所述范围内。

[0101] 【具体制备例1】

[0102] 【制备粒子大小为700nm的聚(N-异丙基丙烯酰胺-co-丙烯酸)水凝胶】

[0103] 将996mg N-异丙基丙烯酰胺、30.8mg BIS、65.5mg Tween80在室温下溶于100ml蒸馏水中,然后放入250ml大小三颈玻璃反应器中,通入氩气1小时来去除溶液中的氧气,同时利用加热器加热至70℃的反应温度。然后,将72mg的丙烯酸加入反应器内的溶液中,通入氩气10分钟并加热至70℃后,加入22.8mg的过硫酸铵来引发聚合反应。使用磁棒充分混合溶液6小时的同时注入氩气,并通过加热将反应温度保持在70℃来完成聚合反应。通过每天更换两次纯净水的方式对所得的水凝胶水溶液进行2周透析(dialysis)来去除未反应的单体和表面活性剂等,然后通过冷冻干燥机制备粉末状水凝胶粒子。在每个实验中,在测量冷冻干燥的水凝胶粒子的质量后溶解至溶液(缓冲液或纯净水)中来使用。

[0104] 【测量所制备的水凝胶粒子大小】

[0105] 在去离子水中稀释水凝胶,然后使用动态光散射(dynamic light scattering,DLS)设备在25℃下重复测量5次,将由此获得的值的平均值作为所制备的水凝胶的尺寸。

[0106] 【具体制备例2】

[0107] 【制备粒子大小为440nm的聚(N-异丙基丙烯酰胺-co-丙烯酸)水凝胶】

[0108] 将996mg的N-异丙基丙烯酰胺、30.8mg的BIS、28.8mg的SDS在室温下溶于100ml蒸馏水中,然后放入250ml大小的三颈玻璃反应器中,通入氩气1小时来去除溶液中的氧气,同时利用加热器加热至70℃的反应温度。然后,将72mg的丙烯酸加入反应器内的溶液中,通入氩气10分钟并加热至70℃后,加入22.8mg的过硫酸铵来引发聚合反应。使用磁棒充分混合溶液6小时的同时注入氩气,并通过加热将反应温度保持在70℃来完成聚合反应。通过每天更换两次纯净水的方式对所得的水凝胶水溶液进行2周透析(dialysis)来去除未反应的单体和表面活性剂等,然后通过冷冻干燥机制备粉末状水凝胶粒子。在每个实验中,在测量冷冻干燥的水凝胶粒子的质量后溶解至溶液(缓冲液或纯净水)中来使用。

[0109] 【测量所制备的水凝胶粒子大小】

[0110] 按照与具体制备例1相同的方式,在去离子水中稀释水凝胶,然后使用动态光散射(dynamic light scattering,DLS)设备在25℃下重复测量5次,将由此获得的值的平均值作为所制备的水凝胶的尺寸。

[0111] 【实施例2:水凝胶粒子表面改性:EDC/NHS偶联(EDC/NHS coupling)】

[0112] 进行EDC/NHS偶联,以使抗体与上述实施例1中获得的水凝胶粒子结合。交联剂是使用1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride,EDC)(SIGMA-ALDRICH;Cat.E7750-25G)和N-羟基琥珀酰亚胺(N-Hydroxysuccinimide,NHS)(SIGMA-ALDRICH;Cat.130672-25G);交联剂溶剂是使用0.1M的MES缓冲液(2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid buffer,2-吗啉乙磺酸)(Biosolution;Cat.BM020-5.5)。

[0113] 将5mg的聚(N-异丙基丙烯酰胺-co-丙烯酸)水凝胶粒子(丙烯酸含量10%)与500μl的0.1M MES缓冲液混合来制备水凝胶混合液,将4mg的EDC和8mg的NHS分别溶解至200μl的0.1M MES缓冲液中。然后,将400μl的水凝胶混合液、200μl的EDC溶液和200μl NHS溶液全部混合,并在室温下培养5分钟。培养后,加入16μl的500μM蛋白A(Sino Biological Inc.;

LC12N00802)并混合,将装有样品的试管反复倒置(inverting)并在室温下继续培养1小时。

[0114] 完成培养后,将样品在室温下在8000rpm下离心2分钟,在洁净工作台(Clean bench)弃上清液后,加入500μM的PBS(WEL GENE;LB001-02)洗涤样品。将离心分离和PBS洗涤步骤重复5次以上来去除样品中的所有MES缓冲液和未反应的物质(EDC、NHS、蛋白A)。最后一次离心后,弃上清液,将样品悬浮在800μM的PBS中后在4℃下保管样品。

[0115] 【实施例3:结合水凝胶粒子与抗体】

[0116] 下面说明将抗体与实施例2中获得的表面改性的水凝胶粒子结合来完成本发明的可变形粒子的过程。抗体使用抗PD-L1抗体(Sino Biological;Cat.10084-R639);抗PD-1抗体(Sino Biological;Cat.10377-HN94);抗CD137抗体(Sino Biological;Cat.10041-RP01);抗CTLA-4抗体(Bioxcell;Cat.BE0190,Lot.744719s1),以上均为人类抗体。

[0117] 将抗体加入到利用蛋白A改性的水凝胶粒子中直到浓度达到8μM,并在4℃下培养1小时来诱导水凝胶粒子与抗体结合。添加DMEM(WEL GENE;Cat.LM001-11;含有10%FBS以及1%抗菌-抗真菌剂(antibiotic-antimycotic,A·A)),从而在用抗体-结合水凝胶(即本公开的可变形粒子)处理细胞时,抗体的最高浓度(top concentration)达到400nM。为了制备抗体浓度不同的多个样品,以制备最高浓度溶液所用抗体和水凝胶体积为基准,加入1XPBS来代替抗体进行稀释,将抗体浓度依次稀释至400nM、200nM、100nM、50nM、25nM、12.5nM和6.25nM。在后面的过程中,每次向细胞处理100μl的可变形粒子,加入可变形粒子的48孔板(48well plate)的每孔有100μl的培养基,因此所加入的抗体浓度最终会被稀释到一半。因此,添加到细胞中的抗体的最终浓度是200nM、100nM、50nM、25nM、12.5nM、6.25nM和3.125nM。当组合两种以上抗体来结合到水凝胶粒子时,按照上述方法制备抗体的总浓度,但每种抗体都以相同的比例(即1:1的比例)结合。

[0118] 为进行比较实验,另外制备了三个组:(i)PBS组是不包含抗体和水凝胶的对照组,浓度为10%v/v(DMEM 360μl+PBS 40μM);(ii)抗体-未结合水凝胶组,是在上述制备可变形粒子的过程(即,将抗体与水凝胶结合的过程)中,将不含抗体的PBS加入水凝胶中来制备,该水凝胶的体积与用于实现最高抗体浓度(200nM)所使用的水凝胶的体积相同;(iii)未与水凝胶结合的抗体组,在DMEM中稀释抗体来制备400nM、200nM、100nM、50nM、25nM、12.5nM或6.25nM的浓度后,每次用100μl处理细胞,如前所述,由于各孔中所含的培养基,抗体浓度最终会被稀释到一半。因此,最终添加到细胞中的抗体浓度是200nM、100nM、50nM、25nM、12.5nM、6.25nM、3.125nM。

[0119] 【实施例4:癌细胞存活率的体外分析】

[0120] 为了验证根据本发明的可变形水凝胶粒子是否抑制癌细胞的免疫监视逃逸,并促进免疫细胞对癌细胞的杀伤效果,通过体外实验(in-vitro)来确认癌细胞的存活率。

[0121] 【制备用于癌细胞存活率分析实验的癌细胞】

[0122] 在实验的第0天,制备了MCF-7(韩国首尔大学韩国细胞株银行)乳腺癌细胞株。从培养MCF-7的T75烧瓶中去除现有培养基,用10ml的PBS洗涤剩余的培养基,然后抽吸(suction)去除PBS。用2ml的0.25%胰蛋白酶-EDTA(Trypsin-EDTA)(Gibco;REF.25200-056)处理后,在37℃下培养2分钟。加入含有10%胎牛血清(Fetal bovine serum,FBS)(Gibco;Lot.1985900)和1%的抗生素-抗真菌剂(Antibiotic-antimycotic,A·A)(Gibco;REF.15240-062)的8ml DMEM,由此来中和胰蛋白酶-EDTA,然后收集从烧瓶底部掉落的癌细

胞并转移到15ml试管中。接下来，在24℃，1300rpm下离心3分钟。从离心后的样品中弃上清液，加入5ml的DMEM来悬浮细胞团(cell pellet)，以1×10^4个细胞/100μl/孔的浓度接种到48孔板中。在37℃下整夜培养细胞。

[0123] 【结合有抗体的可变形粒子和PBMC的处理】

[0124] 从完成培养的癌细胞中去除100μl的培养基后，在每孔中处理100μl的实施例3中制备的结合不同浓度的抗体的可变形粒子，并在37℃下培养2小时。作为对照组，将实施例3中制备的(i)PBS组、(ii)抗体-非结合水凝胶组和(iii)未与水凝胶结合的抗体组也以每孔100μl进行处理，并在相同条件下进行培养。

[0125] 在用所述可变形水凝胶粒子处理癌细胞期间，制备由T细胞、B细胞、NK细胞等组成的外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell，PBMC)(Zenbio;Cat.SER-PBMC-200P-F)。将保管在-70℃的PBMC在37℃水浴(water bath)中解冻，并将解冻的细胞转移到50ml试管，然后加入RPMI培养基(Gibco;Lot.2145483)(添加有10％FBS和1％的A·A)使总体积为25ml。在19℃，400g下离心10分钟后弃上清液，加入5ml的RPMI来悬浮细胞团。

[0126] 在经过所述可变形水凝胶粒子处理的癌细胞中以1×10^4个细胞/100μl/孔的浓度处理制备的PBMC。每个孔用10μl的FBS处理，并在37℃，5％CO_2条件的培养器中培养4天。在培养期间，每隔一天向每个孔中加入20μl的DMEM和10μl的FBS。

[0127] 【通过荧光染色确认癌细胞存活率】

[0128] 培养4天后，在实验的第5天进行荧光染色以确认细胞存活率。每10ml PBS混合5μl钙黄绿素AM(Calcein AM)(Invitrogen;Lot.2049068)来制备荧光染色试剂。

[0129] 从与所述可变形粒子和PBMC完成培养的癌细胞中去除培养基，用PBS洗涤后抽吸去除PBS。每孔加入200μl的所制备的荧光染色试剂。然后，用箔纸包裹48孔板以遮光，并在37℃下培养15分钟。培养后，去除荧光染色试剂，用PBS洗涤后，每孔加入200μl的DMEM培养基，并用荧光显微镜(Nikon;Ti2-E)进行荧光拍摄。

[0130] 使用Image J程序(由美国国立卫生研究院提供)分析拍摄的荧光照片。计算与总面积相比用Calcein AM荧光染色的面积，用其表示癌细胞存活率。

[0131] 【实验结果】

[0132] 在下文中，比较了本公开的可变形粒子与现有的基于抗体的免疫抗癌剂(即通过单独处理抗体)的癌细胞杀伤效果，确认所述可变形粒子的水凝胶大小和延展性对癌细胞的杀伤效果是否产生影响。

[0133] 【比较现有免疫抗癌剂与本公开的可变形粒子的癌细胞杀伤效果】

[0134] 在MCF7乳腺癌细胞中单独用抗体处理(即，抗体是游离状态，不与可变形粒子结合)(下面称为抗体组)时，以及将抗体结合到本公开的可变形粒子后进行处理(下面称为抗体+凝胶组)时，与PBMC免疫细胞一起培养后的MCF7的存活率(图5A至5D)。抗体是使用靶向免疫检查点蛋白的抗PD-L1抗体、抗PD-1抗体和抗CTLA-4抗体和靶向T细胞活化受体的抗CTLA-4抗体。

[0135] 图5A显示了分别单独处理上述四种抗体，或者将各个抗体与本公开的可变形粒子结合处理时，基于抗体浓度的癌细胞存活率。

[0136] 对于抗PD-1抗体，当抗体浓度为3.125nM时，抗体组和抗体+凝胶组的癌细胞存活率分别为0.93和0.95。然而，当抗体浓度为12.5nM以上时，两组的癌细胞存活率差异增大。

在最高浓度200nM时，抗体组的癌细胞存活率为0.5，而抗体+凝胶组的存活率显著降低至0.05。

[0137] 对于抗PD-L1抗体，当抗体浓度为3.125nM时，抗体组和抗体+凝胶组均显示出相似的癌细胞存活率，均为0.7。然而，当抗体浓度为6.25nM以上时，细胞存活率开始出现差异。在最高浓度200nM时，抗体组的癌细胞存活率为0.5，而抗体+凝胶组的癌细胞存活率为0.02。

[0138] 对于抗CD137抗体，当浓度是12.5nM以下时，两组的癌细胞存活率没有显著差异。然而，在抗体浓度为12.5nM以上时，癌细胞存活率开始出现差异，在100nM时，癌细胞存活率的差异最大，相差8倍。在最高浓度200nM时，抗体组的癌细胞存活率为0.37，而抗体+凝胶组显著降低至0.04。

[0139] 对于CTLA-4抗体，当浓度是12.5nM以下时，两组的癌细胞存活率没有显著差异。但是，当抗体浓度为12.5nM以上时，癌细胞存活率开始出现差异，在100nM时差异最大，相差8倍。在最高浓度200nM时，抗体组的癌细胞存活率为0.9，而抗体+凝胶组的癌细胞存活率显著降低至0.15。

[0140] 图5B显示了组合上述四种抗体中的两种后单独处理，或一起结合到可变形粒子处理时，基于抗体浓度的癌细胞存活率。

[0141] 当组合抗PD-L1抗体+抗PD-1抗体时，抗体组直到25nM的浓度保持0.9的癌细胞存活率，从50nM开始急剧下降。在3.125nM时，抗体+凝胶组的癌细胞存活率为0.55，癌细胞存活率低于抗体组，且存活率依赖浓度大幅降低。浓度为25nM和50nM时抗体组和抗体+凝胶组的存活率差异最大，在200nM时，抗体组的存活率为0.3，而抗体+凝胶组的存活率为0.04。

[0142] 当组合抗PD-L1抗体+抗CTLA-4抗体时，抗体组在3.125nM的浓度下显示出0.98的存活率，即使在200nM时也保持在0.7的存活率。相反，抗体+凝胶组在3.125nM时的癌细胞存活率为0.6，在200nM时降至0.05。抗体+凝胶组在3.125nM时的癌细胞存活率低于抗体组在200nM时的癌细胞存活率。

[0143] 当组合抗PD-L1抗体+抗CD137抗体时，抗体组在3.125nM的浓度下的存活率为0.97，在200nM时维持在0.6。相反，抗体+凝胶组在3.125nM时癌细胞存活率为0.9，在200nM时存活率显著降低至0.02。

[0144] 当组合抗PD-1抗体+抗CD137抗体时，抗体组在3.125nM时显示出0.9的存活率，即使在200nM时仍保持0.7的存活率。相反，抗体+凝胶组在3.125nM的癌细胞存活率为0.7，与抗体组在200nM时的癌细胞存活率相似，而在200nM时存活率显著降低至0.06。

[0145] 当组合抗PD-1抗体+抗CTLA-4抗体时，抗体组在3.125nM的浓度下显示出0.9的存活率，即使在200nM时也保持0.7的存活率。抗体+凝胶组在3.125nM的癌细胞存活率为0.6，低于抗体组在200nM的癌细胞存活率，在200nM时癌细胞存活率显著降低至0.05。浓度为25nM时两组的存活率差异最大，差异达到9倍。

[0146] 图5C显示了组合四种抗体中的三种单独处理，或一起结合到可变形粒子处理时，基于抗体浓度的癌细胞存活率。

[0147] 当组合抗PD-L1抗体+抗CD137抗体+抗CTLA-4抗体时(图5C左侧图表)，抗体组在3.125nM的浓度下显示出0.9的存活率，即使在200nM也保持0.6的存活率。相反，抗体+凝胶组在3.125nM时已经显示出0.7的存活率，在200nM时存活率显著降低至0.1。

[0148] 当组合抗PD-1抗体+抗CD137抗体+抗CTLA-4抗体时(图5C右侧图表),抗体组在3.125nM时显示出0.9的存活率,直到100nM也保持几乎相同的存活率,而在200nM存活率急剧下降至0.4。相反,抗体+凝胶组在3.125nM时已经显示出0.24的存活率,在200nM时存活率显著下降至0.02。

[0149] 图5D显示了组合所有上述四种抗体单独处理,或一起结合到可变形粒子处理时,基于抗体浓度的癌细胞存活率。抗体组在3.125nM时的存活率为0.99,在200nM时癌细胞存活率为0.5。相反,抗体+凝胶组在3.125nM时已经显示出0.6的存活率,特别是当抗体浓度为12.5nM以上时,存活率急剧下降,在200nM时存活率为0.06。

[0150] 综上说明,不论时分别单独处理上述抗体,或者组合两种以上进行处理,相比单独处理抗体,在与可变形粒子结合时癌细胞存活率显著降低。特别是与单一抗体结合时相比,将两种以上的抗体结合在一起时,可变形粒子的癌细胞杀伤效果更加优异。这证明了本发明的可变形粒子与现有免疫抗癌剂相比,可以通过使用少量抗体来促进癌细胞死亡,并且还可以通过相对简单的制备过程实现多抗体的效果。

[0151] 特别地,确认到抗体和可变形粒子均没有处理的组(PBS组),或使用不与抗体结合的可变形粒子处理的组(抗体-非结合水凝胶组),它们的癌细胞存活率几乎没有变化。这意味着水凝胶本身不会显著影响癌细胞或免疫细胞,但当与抗体结合时,通过抗体与细胞表面蛋白的结合可以阻断癌细胞与免疫细胞之间的相互作用,从而防止癌细胞的免疫逃逸,说明本发明的水凝胶粒子不仅仅充当药物递送手段,而是像人工T细胞一样起到免疫细胞的作用。

[0152] 单独处理抗体的组(抗体组)和通过与可变形粒子结合处理的组(抗体+凝胶组)的癌细胞存活率的IC_{50}如表1所示。

[0153] 【表1】

[0154] 单独处理抗体的情况(抗体组)和通过与本公开的可变形粒子(粒径700nm)结合处理的情况(抗体+凝胶组),癌细胞存活率的IC_{50}比较

[0155]

单抗体	IC_{50}	单抗体:凝胶	IC_{50}	单抗体 IC_{50}/单抗体:凝胶 IC_{50}
PD-1 抗体	520	PD-1 抗体:凝胶	26	50
PD-L1 抗体	180	PD-L1 抗体:凝胶	12	15
CD137 抗体	170	CD137 抗体:凝胶	36	4.7
CTLA4 抗体	660	CTLA4 抗体:凝胶	30	22

双抗体	IC_{50}	双抗体:凝胶	IC_{50}	双抗体 IC_{50}/双抗体:凝胶 IC_{50}
PD-1 Ab + PD-L1 Ab	146	(PD-1 Ab + PD-L1 Ab):凝胶	2.6	56
PD-1 Ab + CD137 Ab	7200	(PD-1 Ab + CD137 Ab):凝胶	6	1200
PD-1 Ab + CTLA4 Ab	440	(PD-1 Ab + CTLA4 Ab):凝胶	4.8	92
PD-L1 Ab + CD137 Ab	670	(PD-L1 Ab + CD137 Ab):凝胶	33	20
PD-L1 Ab + CTLA4 Ab	4700	(PD-L1 Ab + CTLA4 Ab):凝胶	2.8	1700

三抗体	IC_{50}	三抗体:凝胶	IC_{50}	三抗体 IC_{50}/三抗体:凝胶 IC_{50}
PD-1 Ab + CD137 Ab + CTLA4 Ab	190	(PD-1 Ab + CD137 Ab + CTLA4 Ab):凝胶	0.6	320
PD-L1 Ab + CD137 Ab + CTLA4 Ab	4400	(PD-L1 Ab + CD137 Ab + CTLA4 Ab):凝胶	8.2	540

四抗体	IC_{50}	四抗体:凝胶	IC_{50}	四抗体 IC_{50}/四抗体:凝胶 IC_{50}
PD-1 Ab + PD-L1 Ab + CD137 Ab + CTLA4 Ab	180	(PD-1 Ab + PD-L1 Ab + CD137 Ab + CTLA4 Ab):凝胶	3.6	50

[0156] 【确认本公开的水凝胶对肝癌细胞的杀伤效果】

[0157] 对肝癌细胞(HepG2)也进行了与上述相同的实验,证实了根据本发明的水凝胶粒子具有与乳腺癌细胞相似的癌细胞杀伤效果。结果如图5E至5G所示。

[0158] 【实施例5:比较不同水凝胶大小的癌细胞杀伤效果】

[0159] 确认本公开的可变形粒子的水凝胶大小是否影响癌细胞杀伤效果(图6)。下面描述的水凝胶直径是在去离子水中测量,是不与细胞结合的球状的水凝胶的直径。

[0160] 首先,确认结合单一抗体的可变形粒子中,水凝胶的大小是否影响癌细胞存活率(图6A)。将抗CTLA-4抗体与直径为440nm、540nm、700nm或1300nm的水凝胶结合后对癌细胞进行处理,并与单独处理抗CTLA的情况比较癌细胞存活率。如图6A所示,水凝胶直径为440nm时,与单独处理抗CTLA-4抗体相比,癌细胞存活率略有降低,但癌细胞存活率没有显著下降。然而,当直径为540nm以上时,在相同抗体浓度下,抗体+凝胶组中癌细胞的存活率相比抗体组显著下降20%以上。

[0161] 进一步确认组合两种抗体后结合到水凝胶粒子时,水凝胶粒子大小是否会影响癌细胞存活率(图6B)。抗PD-L1抗体和抗CTLA-4抗体与直径为440nm、540nm、700nm或1300nm的水凝胶粒子结合来处理癌细胞,并与将组合上述两种抗体单独处理的情况比较了癌细胞存

活率。如图6B所示，当组合两种抗体时，水凝胶粒子直径为440nm时与抗体组相比癌细胞杀伤效果得到提高，水凝胶粒子直径是700nm以上时，癌细胞存活率显著降低。

[0162] 这些结果表明，水凝胶粒子的直径影响本发明的可变形粒子的癌细胞杀伤效果。即，与现有的免疫抗癌剂相比，为使得本发明的可变形粒子具有优异的癌细胞杀伤能力，水凝胶粒子的直径应为440nm以上，优选为540nm以上，更优选700nm为以上。

[0163] 【实施例6：比较水凝胶具备或不具备延展性时的癌细胞杀伤效果】

[0164] 确认水凝胶的延展性是否影响本发明的可变形粒子的癌细胞杀伤效果(图7)。

[0165] 在粒子大小为1230nm的聚苯乙烯微球[polystyrene beads，产品名：CP-10-10(Spherotech，Lake Forest，IL，USA)]中结合抗PD-L1抗体以及抗CTLA-4抗体，并且与结合有相同抗体的本发明的可变形粒子(1300nm)比较癌细胞杀伤能力。聚苯乙烯微球由芳烃聚合物制成，与本公开的可变形粒子不同，是完全不具备延展性的球形的不可变形(non-deformable)的坚硬微球。

[0166] 如图7所示，当将抗体与本公开的可变形粒子结合进行处理时，与单独处理抗体的情况相比，癌细胞存活率急剧下降，但当通过与聚苯乙烯微球结合进行处理时，在低浓度时与抗体组无明显差异，即使在最高浓度(200nm)下，癌细胞存活率也高达0.6。

[0167] 使用相同的抗体，将聚苯乙烯微球[产品名：CP-08-10(Spherotech，Lake Forest，IL，USA)]和水凝胶粒子的粒径分别更改为810nm和700nm后进行相同实验，得到了类似的结果(图7底部)。

[0168] 这些结果表明，本发明的可变形粒子通过水凝胶的延展性大面积覆盖细胞区域，可以有效阻断癌细胞与T细胞的相互作用，促进癌细胞死亡。

[0169] 【比较例1：确认可变形水凝胶粒子本身的癌细胞杀伤效果】

[0170] 确认当本发明的可变形水凝胶粒子不结合抗体的情况下与免疫细胞一起培养时，基于水凝胶粒子浓度的癌细胞存活率(图8)。如图8中所示，当抗体未结合至本发明的可变形水凝胶粒子时，癌细胞杀伤能力并不显著。这说明为了具备癌细胞杀伤效果，本公开的水凝胶粒子的水凝胶表面必须具备可以结合到癌细胞或T细胞的细胞表面成分(理想情况下，免疫检查点调节蛋白、免疫细胞激活蛋白或参与癌细胞调节的蛋白)的蛋白，表明根据本发明的水凝胶粒子起到模拟T细胞功能的人造T细胞的作用，可以维持人体内免疫细胞的活性，并有效抑制癌细胞的免疫逃逸机制。

[0171] 【实施例7：评价可变形水凝胶粒子在小鼠模型中的抗癌效果】

[0172] 在小鼠模型中评价了本公开的可变形水凝胶粒子的抗癌效果。该实验是在获得高丽大学IACUC(KOREA-2020-0203)批准后进行。小鼠购自Orient Bio(位于京畿道城南市中原区)，使用6周雌性C57BL/6。带入动物实验室并经过一周的稳定期后开始实验。为移植癌细胞，在细胞接种前2天通过肌肉注射(Intramuscular injection，IM)环孢菌素(Cyclosporine，Chong Kun Dang，Cat.EG001，450μg/15G)，并在饮用水中混合酮康唑(Ketoconazole，Eaglevet，Cat.170432001，2.5μg/μl)给药。将人类乳腺癌细胞株MCF-7-luc2(ATCC，HTB-22-LUC2)2.5×10^{6}细胞与100μl无血清RPMI 1640(Gibco，Cat.11875093)+100μl基质胶(Corning，Lot.0062015)混合后皮下注射(subcutaneous injection，SC)至乳头4次。接种后2天继续肌内注射环孢菌素。为确认MCF-7/Luc2的表达量，使用Indigo分析设备(NightOWL II LB 983)进行荧光拍摄，并在拍摄前15分钟，皮下注射1.5mg/100μl的D-荧

光素(Goldbio,GOLD-1G),然后每4天拍摄一次发光(luminescence)。

[0173] 实验时间为16天,共进行5次荧光拍摄。以接种癌细胞的当天为第0天,分别在第0天、第4天、第8天、第12天、第16天进行荧光拍摄。共有三个实验组,分别为对照组(control)(只注射癌细胞的组:PBS组,不注射水凝胶);双抗体组(用未与水凝胶结合的PD-L1抗体和CTLA4抗体处理癌细胞的组);和用与双抗体结合的水凝胶处理的组(用与PD-L1抗体和CTLA4抗体结合的水凝胶处理的组-实施例3中制备的具有PD-L1 ab+CTLA-4ab的hAC)。每个实验组分别使用3到4只小鼠。注射癌细胞后,对照组每4天注射一次PBS,治疗组每4天用双抗体或与双抗体结合的水凝胶处理,最后第16天未注射PBS或药物,而是在荧光拍摄后通过CO_2安乐死后摘取组织。

[0174] 所拍摄的荧光照片是利用Indigo分析设备的程序将荧光数据提取为生物发光表达量(ph/s),并根据药物治疗开始后第4天的生物发光表达量对每个个体和组进行校正。

[0175] 样品处理组的样品浓度如下。

[0176] -双抗体组浓度:以每只小鼠60μg(PD-L1抗体30μg+CTLA4抗体30μg)/20g进行计算,注射100μl。

[0177] -与双抗体结合的水凝胶组:以每只小鼠60μg(PD-L1抗体60μg+CTLA4抗体60μg+水凝胶(添加量与抗体量相同))/20g进行计算,注射100μl。这时由于水凝胶的存在,抗体的浓度与水凝胶以1:1的比例稀释,因此与不存在水凝胶的情况相比,所添加的每种抗体的浓度提高两倍。

[0178] 【实验结果】

[0179] 图9示出了荧光照片中分析的癌细胞荧光表达量。在仅注射癌细胞且未注射抗体或水凝胶样品的对照组(Control)中(图9中的左图),平均在接种癌细胞后的第四天荧光表达量增加,但在癌细胞接种后的第8天,癌细胞荧光表达量减少,然后在第12天再次增加,即癌细胞荧光表达量不是以既定方向发生变动。对于双抗体组(图9的中间图),在癌细胞接种后第4天,癌细胞的荧光表达量大幅下降至0.1,接种第8天的癌细胞荧光表达量下降至0.02,但接种第12天癌细胞的荧光表达与接种后第8天相似,并且荧光表达量没有进一步下降。对于本发明的结合有的双抗体的水凝胶组(图9的最右侧),接种癌细胞后的第4天,癌细胞的荧光表达量急剧下降至0.04,在接种第8天,癌细胞的荧光表达量下降至0.004,在接种第12天荧光表达量下降至0.001,在部分个体中完全没有观察到癌细胞,确认到癌细胞显著减少。

[0180] 综上,通过有限的附图对实施例进行了说明,本领域普通技术人员能够基于所述记载进行多种更改与变形。因此,其他体现、其他实施例及与权利要求的等同物均属于所附权利要求书的范围。

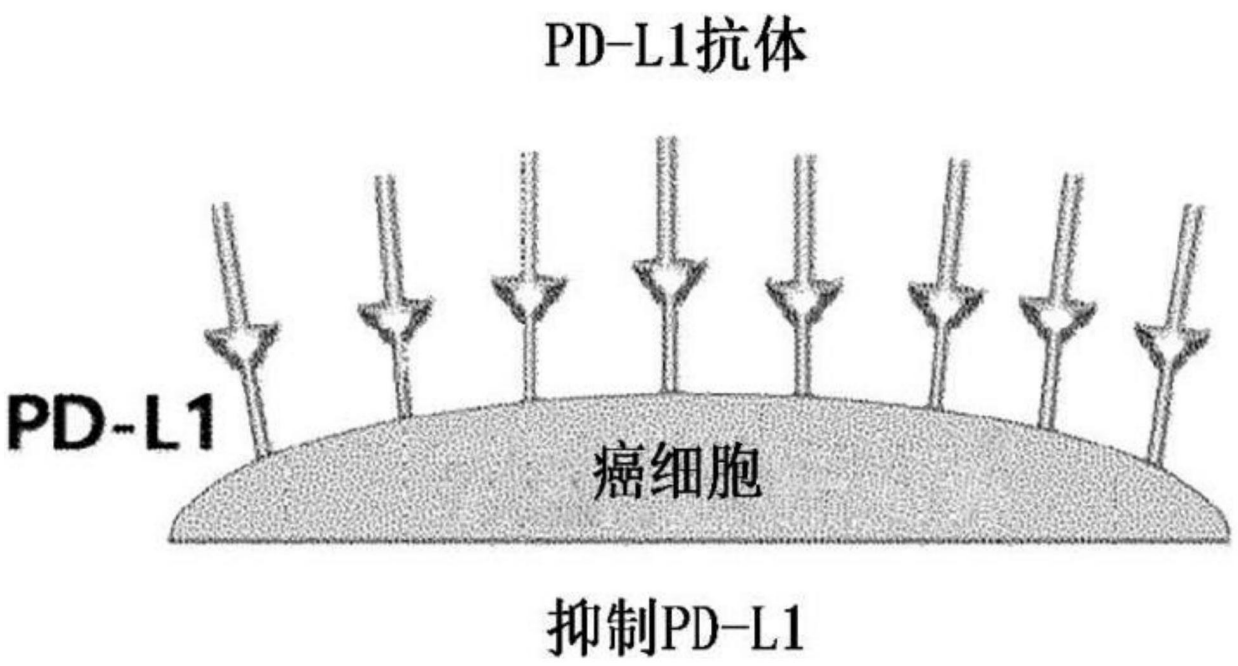

PD-L1抗体
PD-L1
癌细胞
抑制PD-L1

图1

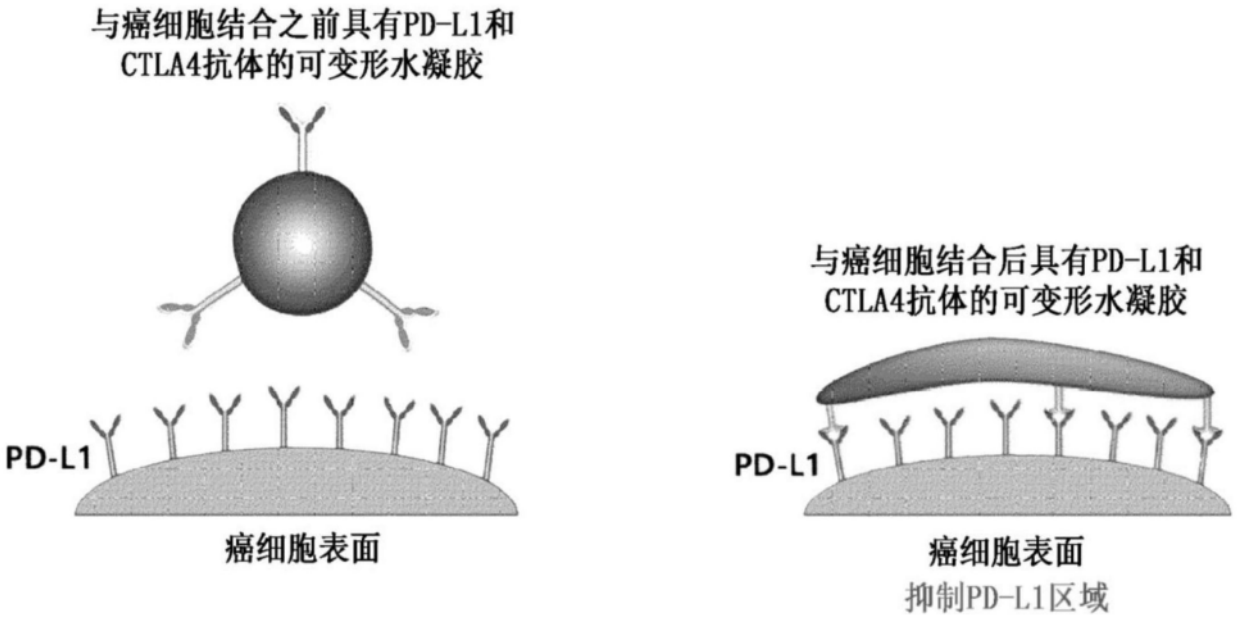

与癌细胞结合之前具有PD-L1和
CTLA4抗体的可变形水凝胶
PD-L1
癌细胞表面
与癌细胞结合后具有PD-L1和
CTLA4抗体的可变形水凝胶
PD-L1
癌细胞表面
抑制PD-L1区域

图2

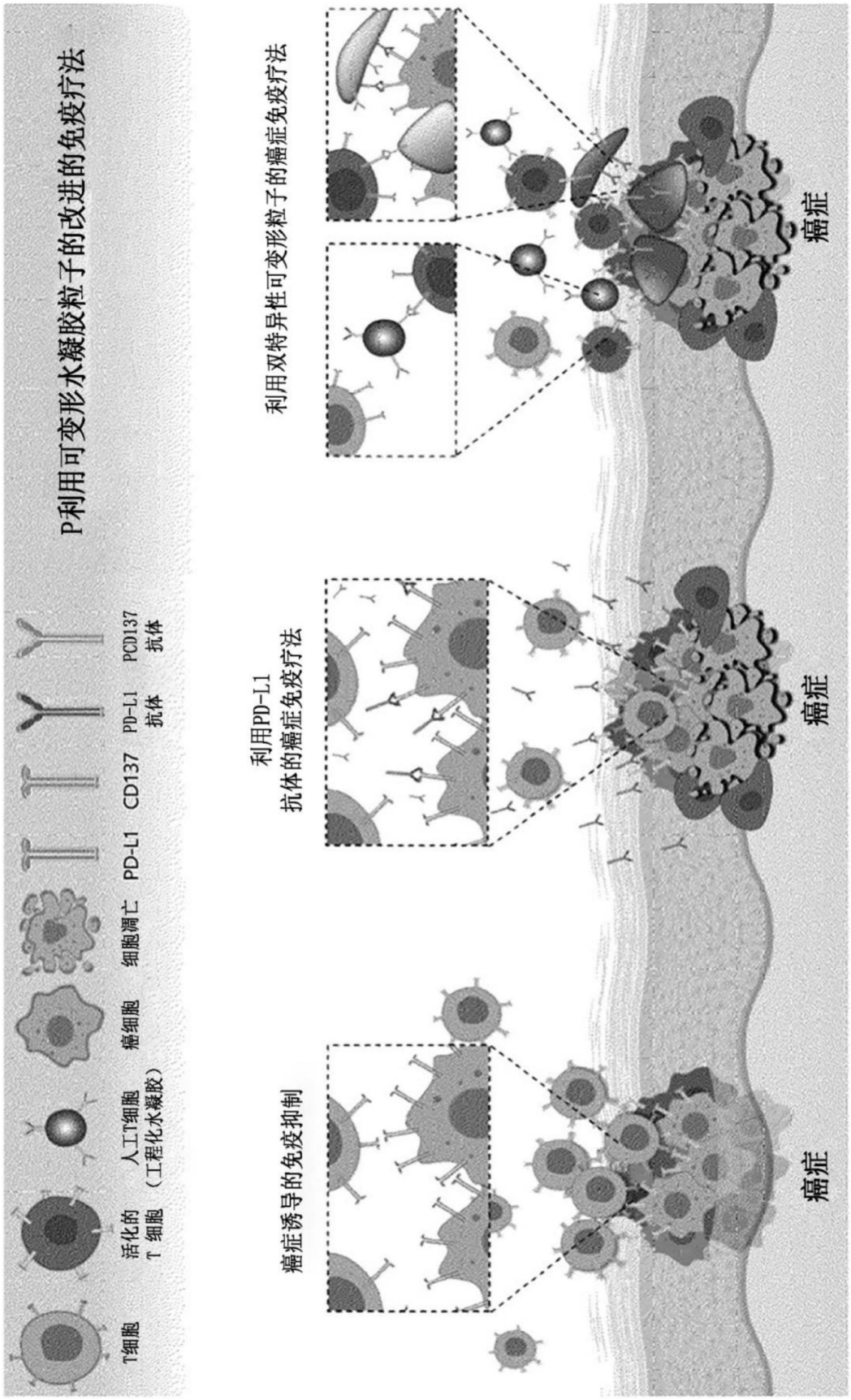

P利用可变形水凝胶粒子的改进的免疫疗法
T细胞
活化的T细胞
人工T细胞（工程化水凝胶）
癌细胞
细胞凋亡
PD-L1
CD137
PD-L1抗体
PCD137抗体
癌症诱导的免疫抑制
利用PD-L1抗体的癌症免疫疗法
利用双特异性可变形粒子的癌症免疫疗法
癌症
癌症
癌症

图3

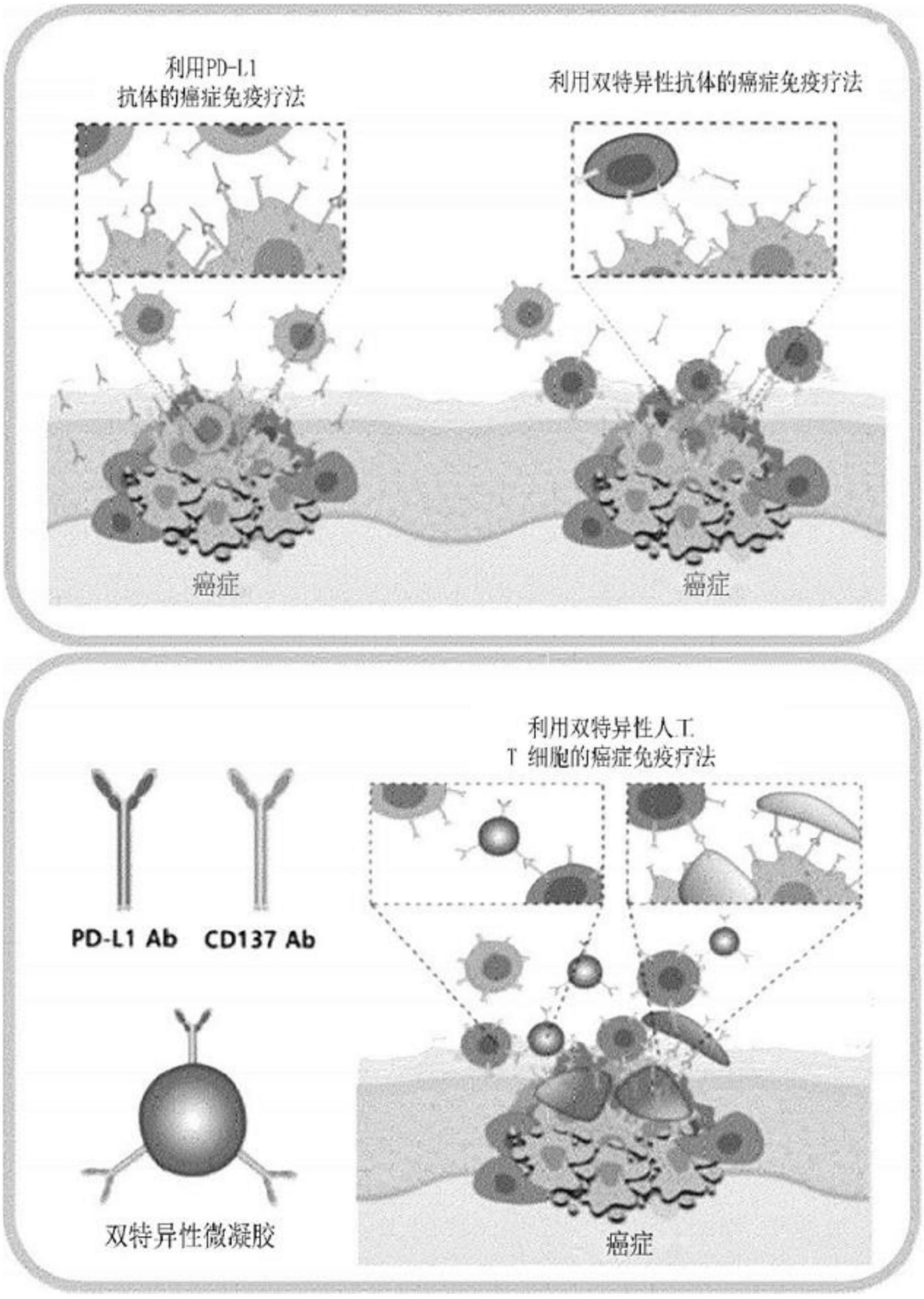

利用PD-L1
抗体的癌症免疫疗法
癌症
利用双特异性抗体的癌症免疫疗法
癌症
PD-L1 Ab
CD137 Ab
双特异性微凝胶
利用双特异性人工
T 细胞的癌症免疫疗法
癌症

图4

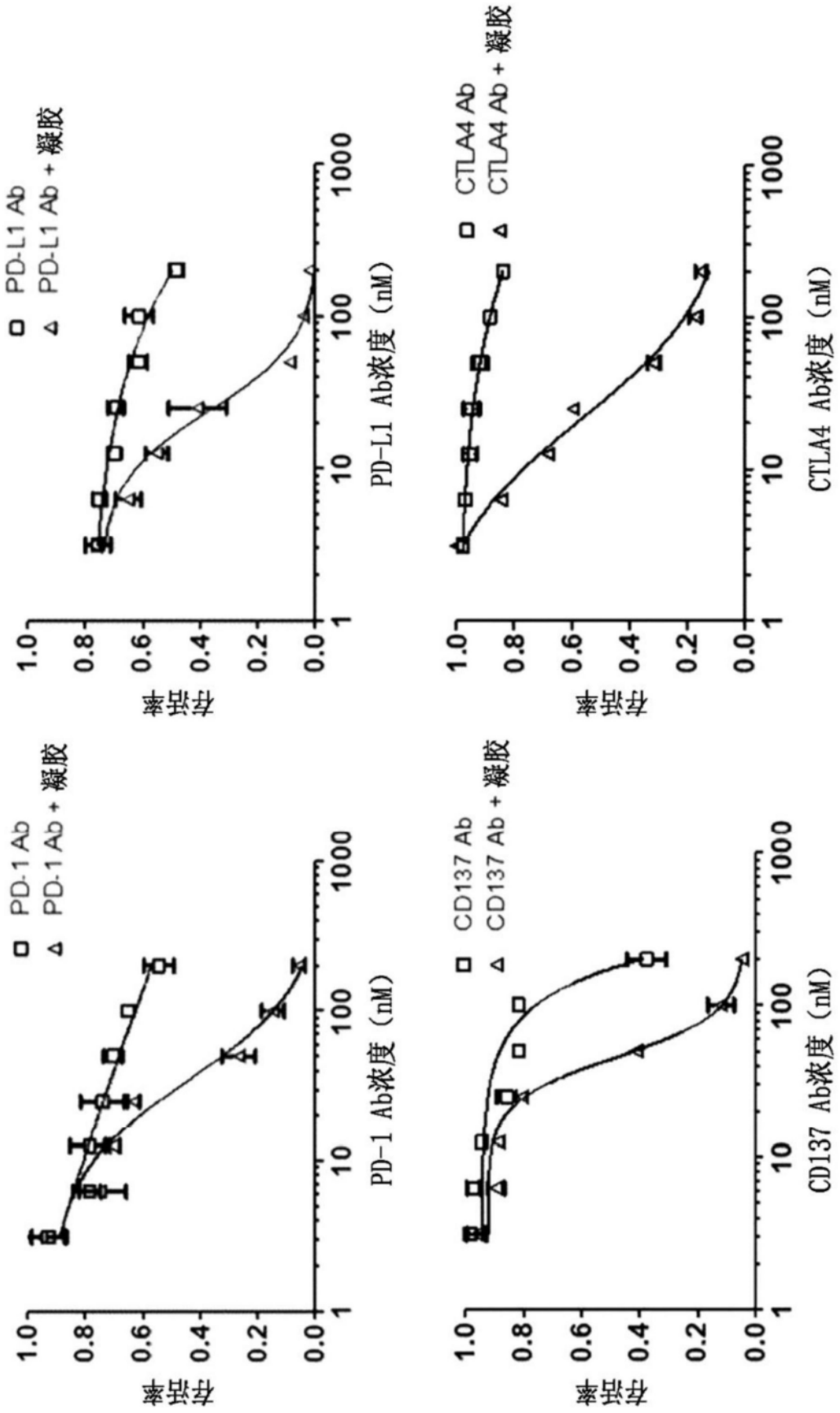

PD-L1 Ab
PD-L1 Ab + 凝胶
存活率
PD-L1 Ab浓度（nM）
CTLA4 Ab
CTLA4 Ab + 凝胶
CTLA4 Ab浓度（nM）
PD-1 Ab
PD-1 Ab + 凝胶
PD-1 Ab浓度（nM）
CD137 Ab
CD137 Ab + 凝胶
CD137 Ab浓度（nM）

图5a

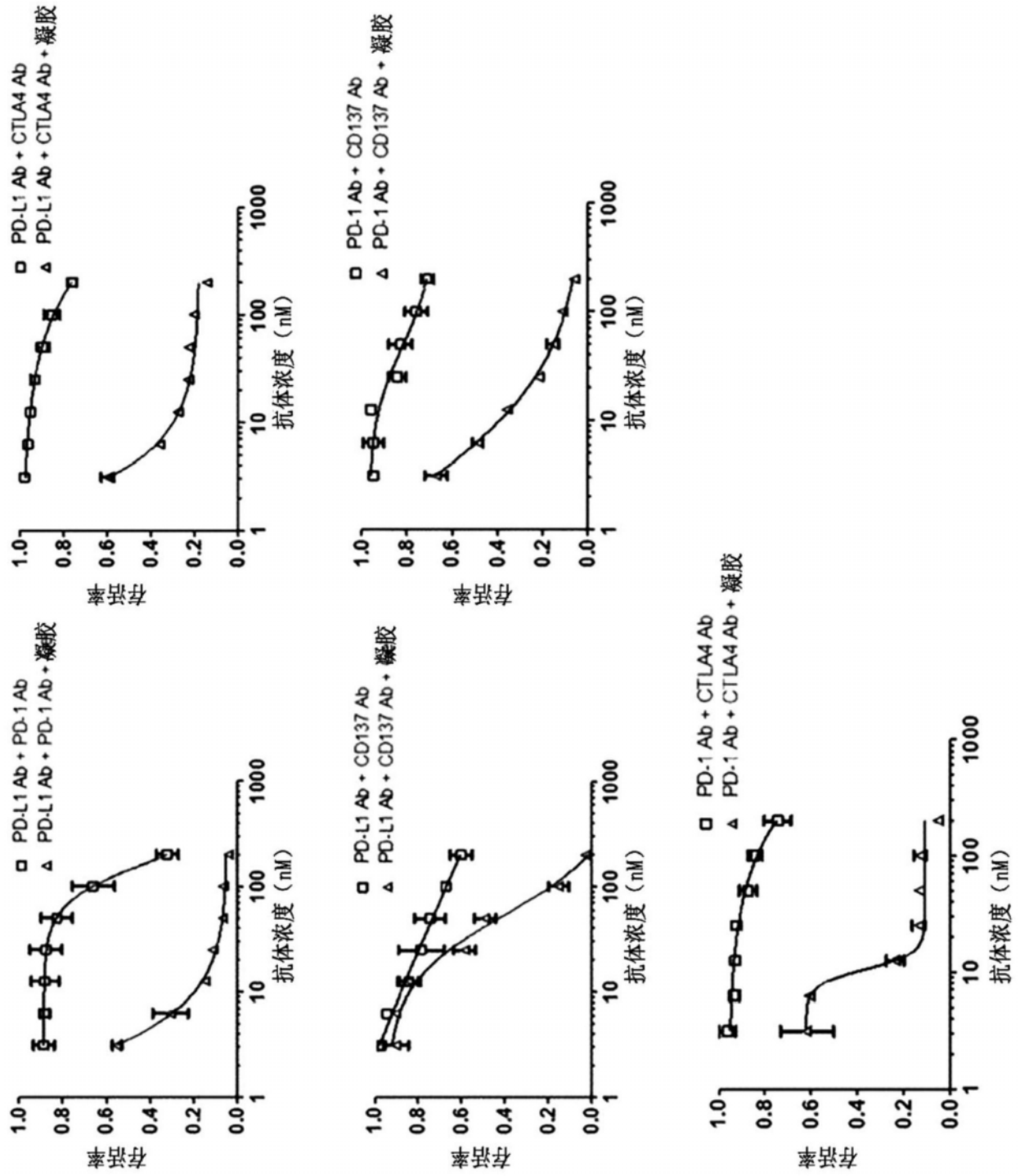

PD-L1 Ab + CTLA4 Ab
PD-L1 Ab + CTLA4 Ab + 凝胶
PD-L1 Ab + CD137 Ab
PD-L1 Ab + CD137 Ab + 凝胶
PD-L1 Ab + PD-1 Ab
PD-L1 Ab + PD-1 Ab + 凝胶
PD-1 Ab + CTLA4 Ab
PD-1 Ab + CTLA4 Ab + 凝胶
存活率
抗体浓度（nM）

图5b

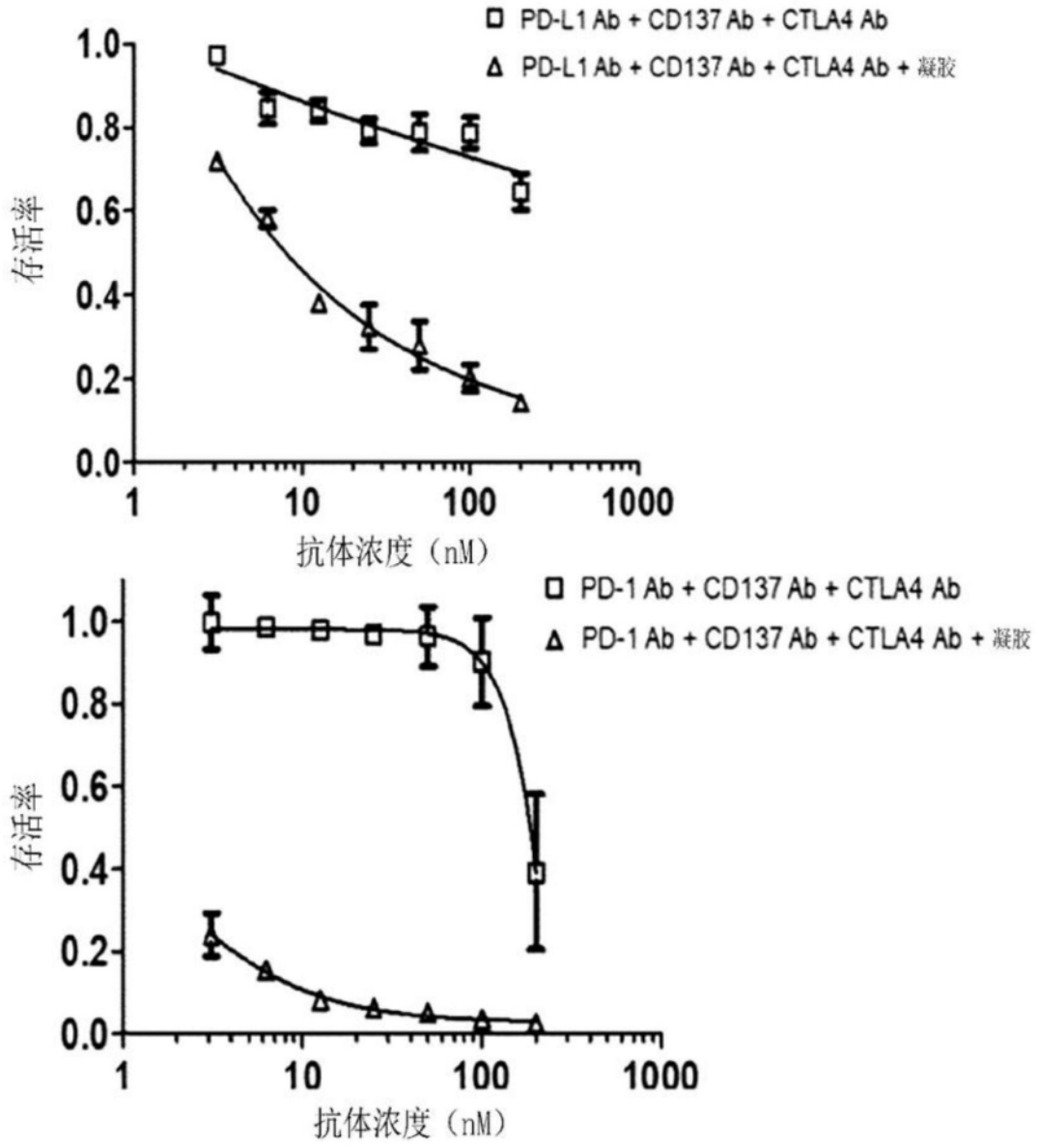

PD-L1 Ab + CD137 Ab + CTLA4 Ab
PD-L1 Ab + CD137 Ab + CTLA4 Ab + 凝胶
存活率
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
1
10
100
1000
抗体浓度（nM）
PD-1 Ab + CD137 Ab + CTLA4 Ab
PD-1 Ab + CD137 Ab + CTLA4 Ab + 凝胶
存活率
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
1
10
100
1000
抗体浓度（nM）

图5c

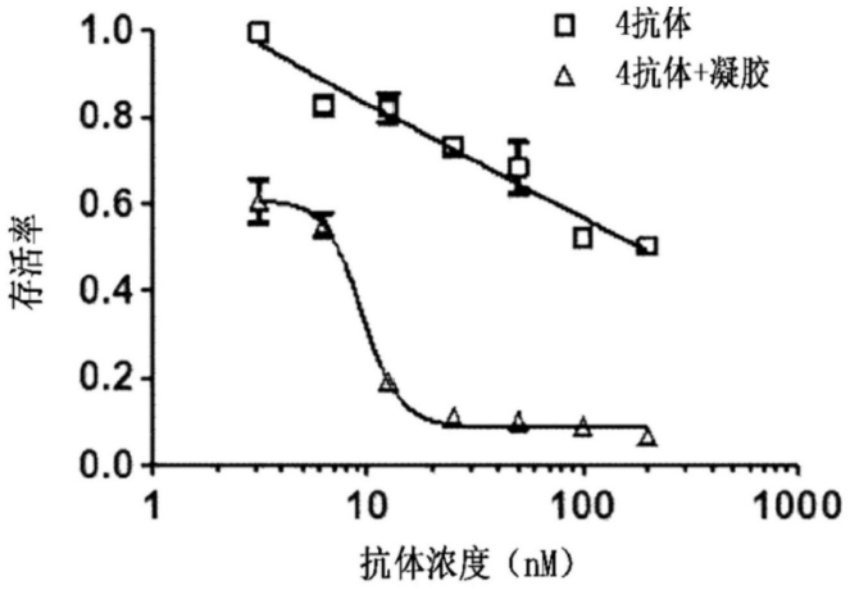

4抗体
4抗体+凝胶
存活率
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
1
10
100
1000
抗体浓度（nM）

图5d

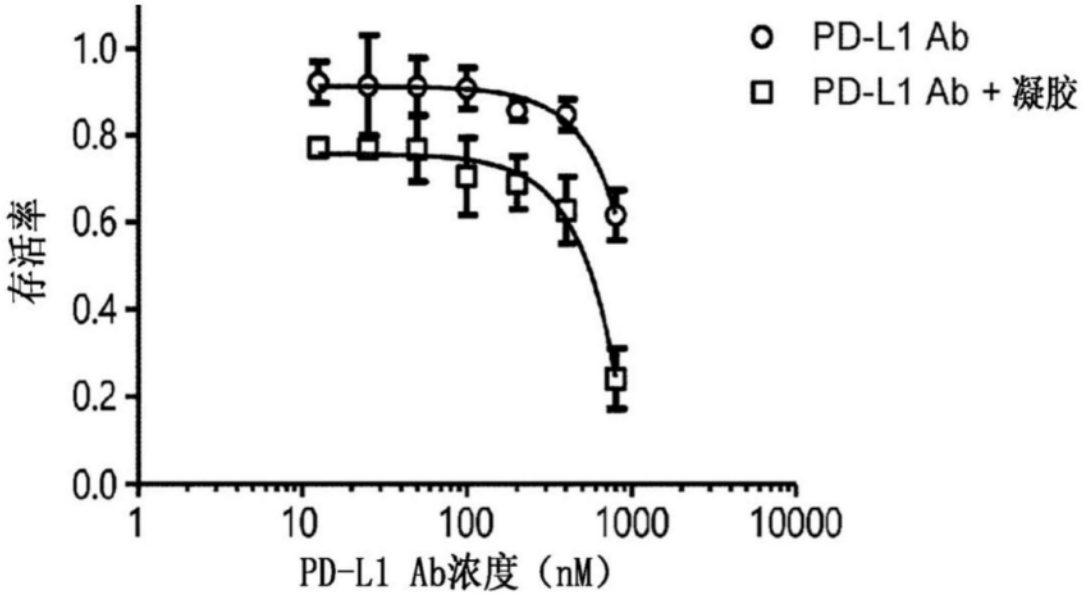

PD-L1 Ab
PD-L1 Ab + 凝胶
存活率
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
1
10
100
1000
10000
PD-L1 Ab浓度（nM）

图5e

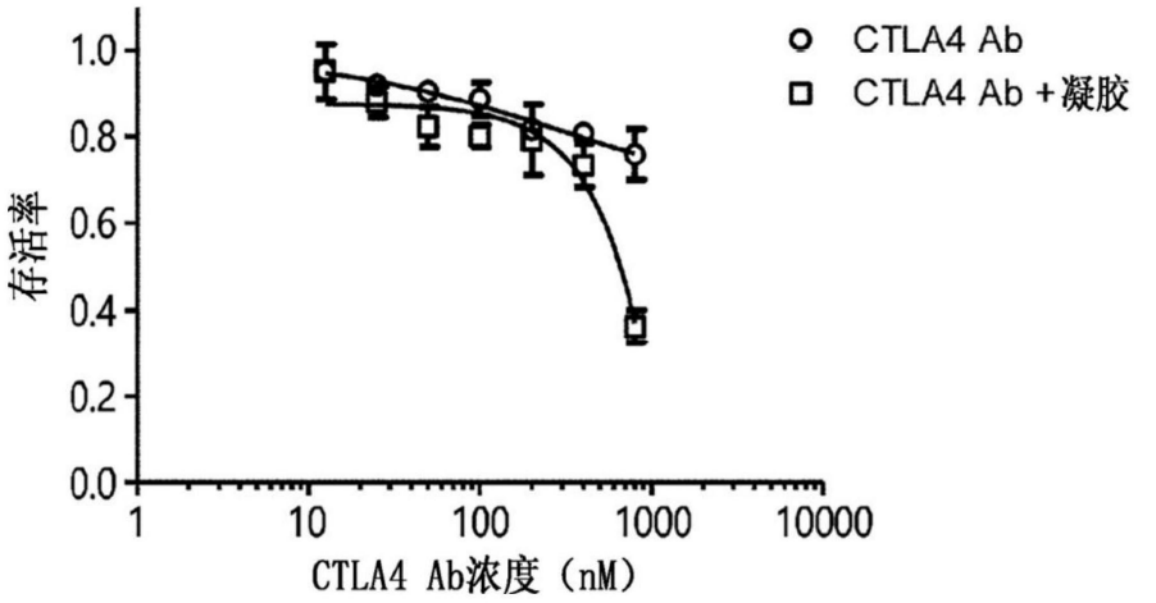

CTLA4 Ab
CTLA4 Ab +凝胶
存活率
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
1
10
100
1000
10000
CTLA4 Ab浓度（nM）

图5f

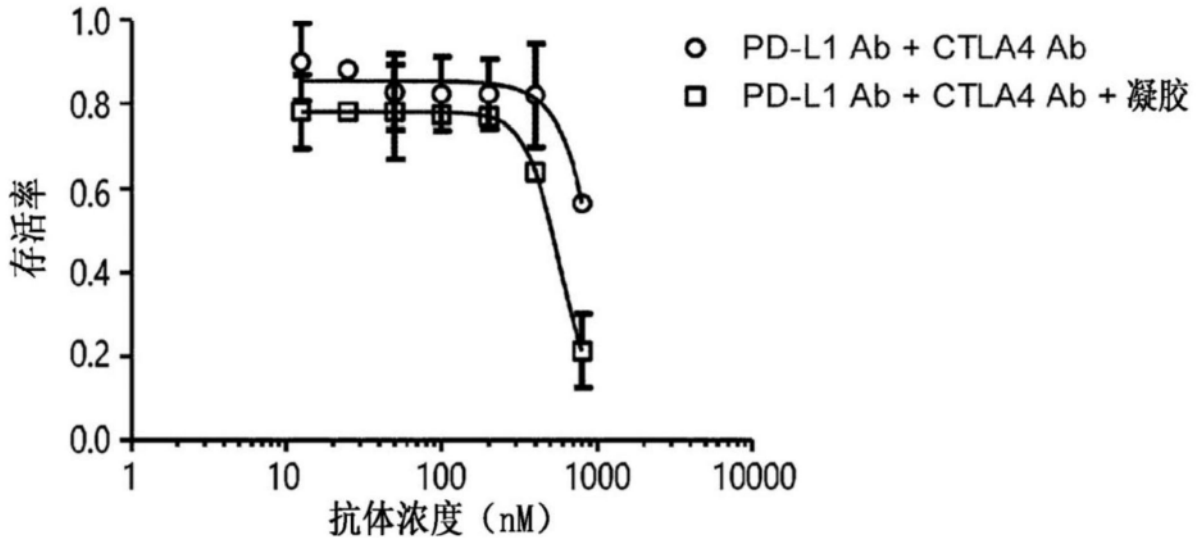

PD-L1 Ab + CTLA4 Ab
PD-L1 Ab + CTLA4 Ab + 凝胶
存活率
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
1
10
100
1000
10000
抗体浓度（nM）

图5g

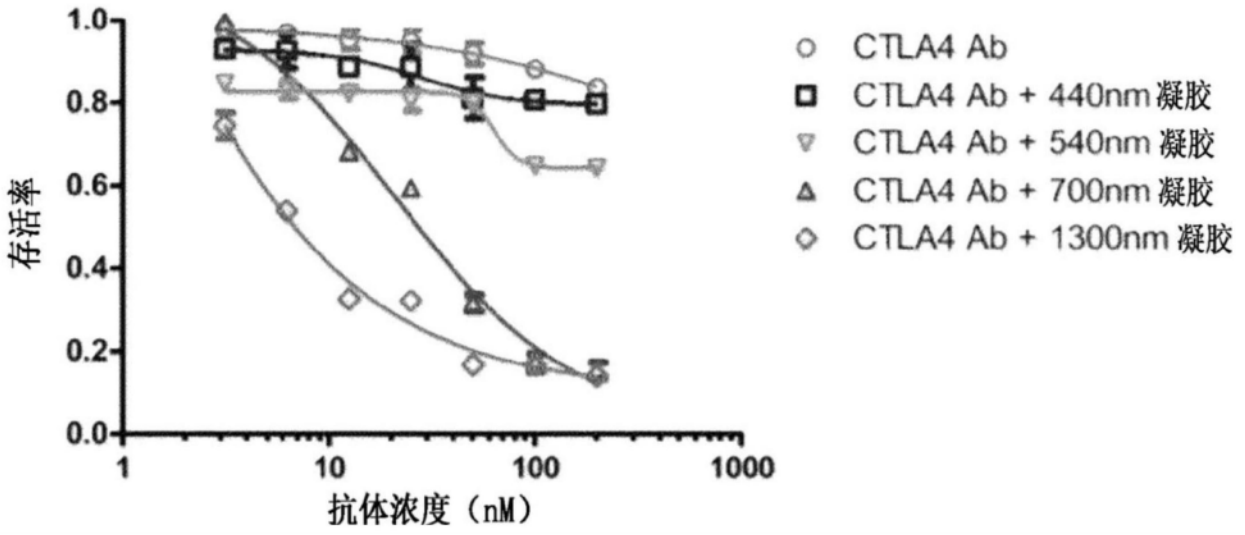

1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
存活率
1
10
100
1000
抗体浓度（nM）
CTLA4 Ab
CTLA4 Ab + 440nm凝胶
CTLA4 Ab + 540nm 凝胶
CTLA4 Ab + 700nm 凝胶
CTLA4 Ab + 1300nm 凝胶

图6a

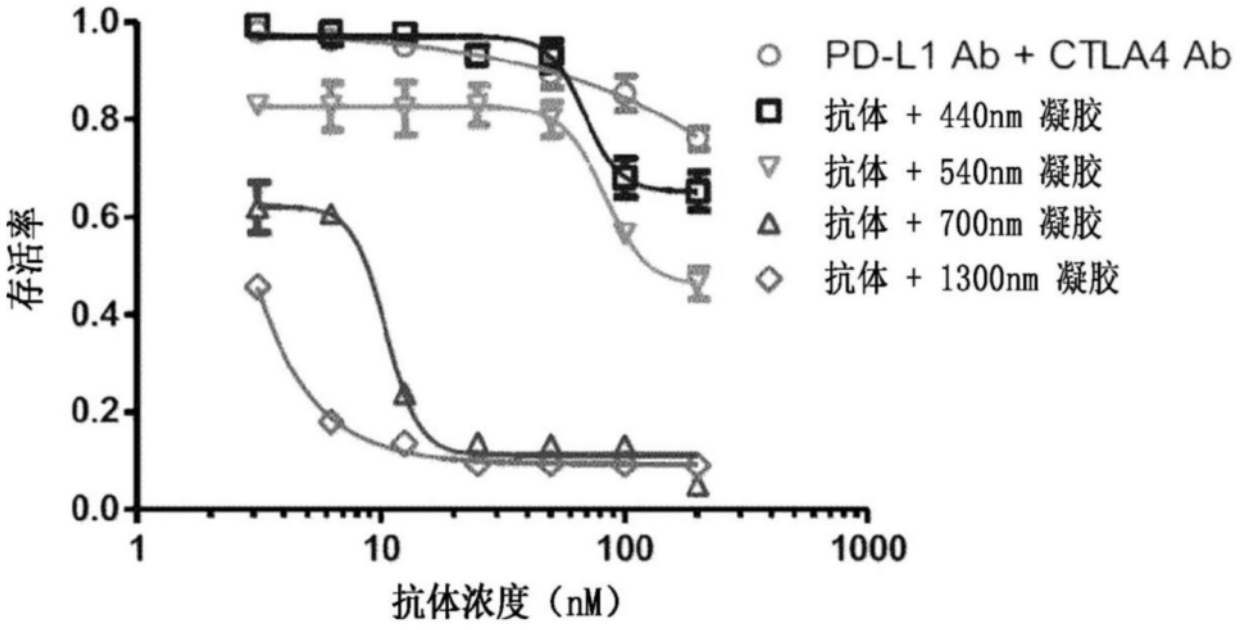

1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
存活率
1
10
100
1000
抗体浓度（nM）
PD-L1 Ab + CTLA4 Ab
抗体 + 440nm 凝胶
抗体 + 540nm 凝胶
抗体 + 700nm 凝胶
抗体 + 1300nm 凝胶

图6b

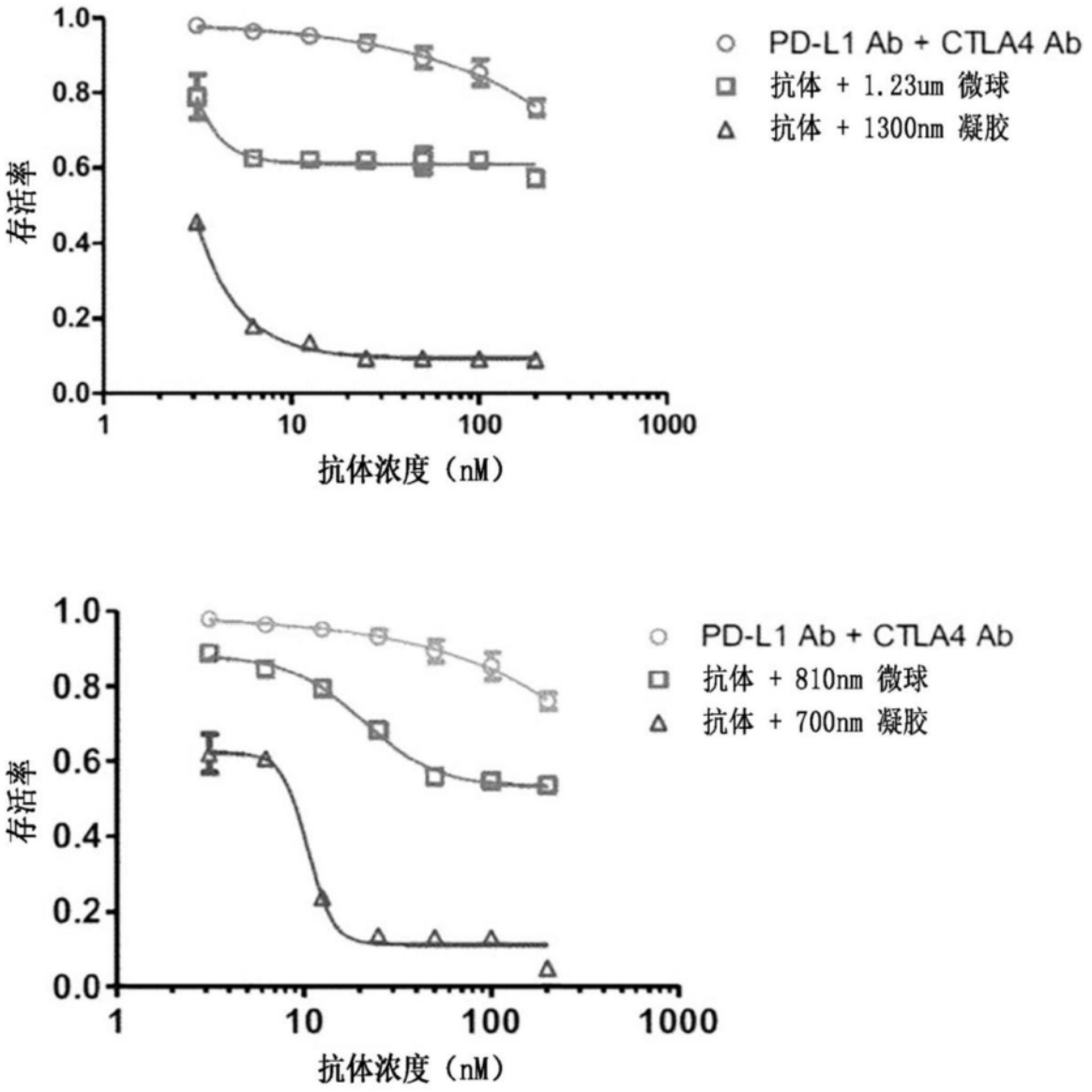

1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
存活率
1
10
100
1000
抗体浓度（nM）
PD-L1 Ab + CTLA4 Ab
抗体 + 1.23um 微球
抗体 + 1300nm 凝胶
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
存活率
1
10
100
1000
抗体浓度（nM）
PD-L1 Ab + CTLA4 Ab
抗体 + 810nm 微球
抗体 + 700nm 凝胶

图7

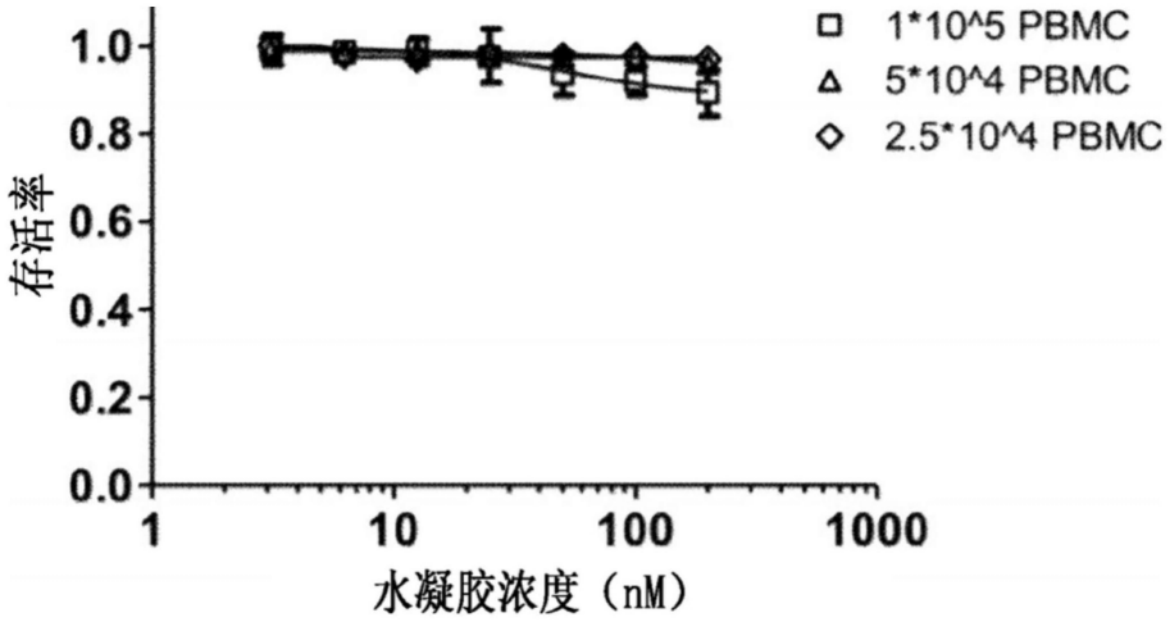

1*10^5 PBMC
5*10^4 PBMC
2.5*10^4 PBMC
存活率
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
1
10
100
1000
水凝胶浓度（nM）

图8

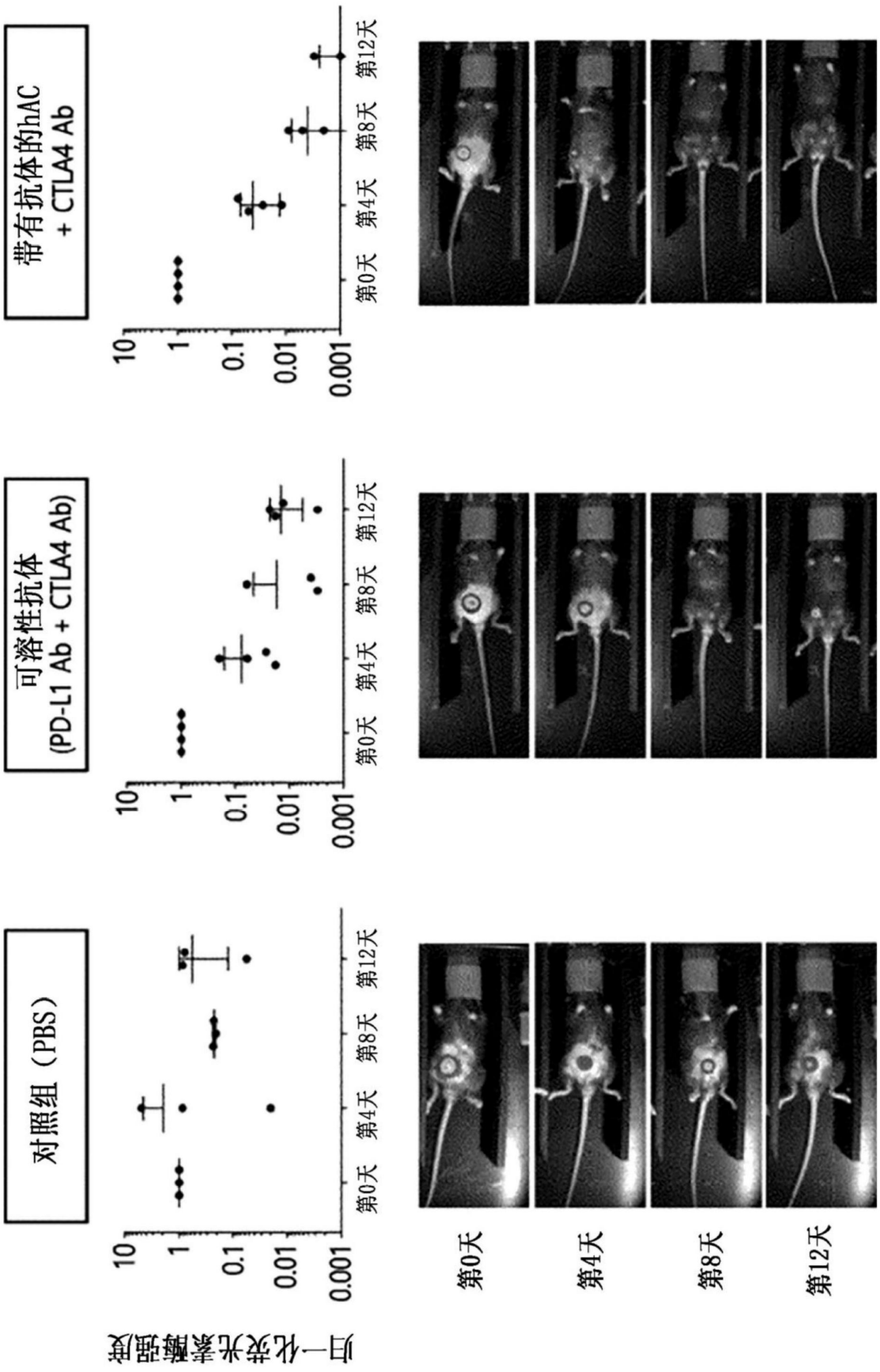

对照组（PBS）
可溶性抗体
(PD-L1 Ab + CTLA4 Ab)
带有抗体的hAC
+ CTLA4 Ab
10
1
0.1
0.01
0.001
第0天
第4天
第8天
第12天
第0天
第4天
第8天
第12天
荧光素酶强度

图9