



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108601746 B

(45) 授权公告日 2024.09.13

(21) 申请号 201780010248.8

(51) Int.CI.

(22) 申请日 2017.01.06

A61K 9/51 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61K 47/50 (2006.01)

申请公布号 CN 108601746 A

A61K 31/337 (2006.01)

(43) 申请公布日 2018.09.28

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

62/276,634 2016.01.08 US

Xinxin Zhang et al..Biofunctionalized polymer-lipid supported mesoporous silica nanoparticles for release of chemotherapeutics in multidrug resistant cancer cells.《Biomaterials》.2014,

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2018.08.07

Daryl C. Drummond et al..Development of a Highly Active Nanoliposomal Irinotecan Using a Novel Intraliposomal Stabilization Strategy.《Cancer Research》.2006,

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/012625 2017.01.06

Huan Meng et al..Use of a Lipid-Coated Mesoporous Silica Nanoparticle Platform for Synergistic Gemcitabine and Paclitaxel Delivery to Human Pancreatic Cancer in Mice.《ACS NANO》.2015,

(87) PCT国际申请的公布数据

W02017/120537 EN 2017.07.13

审查员 孙妍妍

(73) 专利权人 加利福尼亚大学董事会

权利要求书6页 说明书85页 附图48页

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 A·E·内尔 孟幻 刘湘圣

(74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127

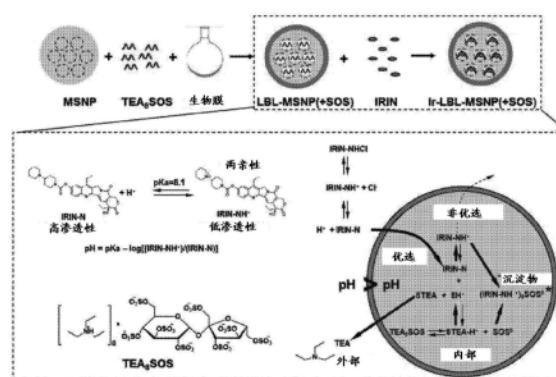
专利代理人 庞东成 宋珂

(54) 发明名称

用于运载物递送的具有脂质双层包衣的中孔二氧化硅纳米颗粒

(57) 摘要

本发明描述了一种纳米载体，所述纳米载体包含二氧化硅主体，所述二氧化硅主体具有表面并且限定适于将分子容纳其中的多个孔隙。所述纳米载体还包括包被所述表面的脂质双层以及所述磷脂双层内的运载物捕集剂。所述磷脂双层稳定地密封所述多个孔隙。所述运载物捕集试剂可以被选择为与所期望的运载物，如药物相互作用。



1.一种纳米颗粒药物载体,其包含:

二氧化硅纳米颗粒,所述二氧化硅纳米颗粒具有表面并且限定适于将分子容纳其中的多个孔隙;

包被所述表面的脂质双层,其中所述脂质双层包含磷脂和胆固醇(CHOL);

包括所述多个孔隙的孔隙内的质子化剂,其中所述质子化剂是蔗糖八硫酸酯三乙铵(TEA₈SOS);以及

包含伊立替康的运载物,其中所述运载物与所述孔隙中的所述质子化剂缔合;

其中所述二氧化硅纳米颗粒具有小于1微米的最大尺寸,并且其中所述脂质双层稳定地密封所述多个孔隙。

2.根据权利要求1所述的纳米颗粒药物载体,其中所述脂质双层包含磷脂、胆固醇(CHOL)以及mPEG磷脂。

3.根据权利要求1至2中任一项所述的纳米颗粒药物载体,其中所述磷脂包含具有C14-C20碳链的饱和脂肪酸,和/或具有C14-C20碳链的不饱和脂肪酸,和/或包含具有C12-C20碳链的脂肪酸的混合物的天然脂质。

4.根据权利要求3所述的纳米颗粒药物载体,其中所述磷脂包含选自以下的饱和脂肪酸:磷脂酰胆碱(DPPC)、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)以及二酰基磷脂酰胆碱(DAPC)。

5.根据权利要求3所述的纳米颗粒药物载体,其中所述磷脂包含选自以下的天然脂质:卵磷脂酰胆碱(卵PC)和大豆磷脂酰胆碱(大豆PC)。

6.根据权利要求3所述的纳米颗粒药物载体,其中所述磷脂包含选自以下的不饱和脂肪酸:1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二棕榈油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)以及1,2-二二十碳烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱。

7.根据权利要求1所述的纳米颗粒药物载体,其中所述脂质双层包含具有磷脂C14-C18碳链和350 Da至5000 Da范围内的PEG分子量的mPEG磷脂。

8.根据权利要求7所述的纳米颗粒药物载体,其中所述脂质双层包含1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-PEG(DSPE-PEG)。

9.根据权利要求2所述的纳米颗粒药物载体,其中所述脂质双层包含DPPC/Chol/DSPE-PEG或DSPC/Chol/DSPE-PEG。

10.根据权利要求9所述的纳米颗粒药物载体,其中所述脂质双层包含DSPC/Chol/DSPE-PEG。

11.根据权利要求10所述的纳米颗粒药物载体,其中所述脂质双层包含DSPC/Chol/DSPE-PEG2000。

12.根据权利要求2所述的纳米颗粒药物载体,其中所述脂质双层包含磷脂、胆固醇以及mPEG磷脂,它们的比率是50-90 mol% 磷脂:10-50 mol% CHOL:1-10 mol% mPEG磷脂。

13.根据权利要求10所述的纳米颗粒药物载体,其中所述脂质双层包含3:2:0.15的摩尔比的DSPC/Chol/DSPE-PEG。

14.根据权利要求1所述的纳米颗粒药物载体,其中所述脂质双层形成包围整个所述纳米颗粒的连续的双层。

15. 根据权利要求1所述的纳米颗粒药物载体,其中所述脂质双层形成包围整个所述纳米颗粒的均匀且完整的双层。

16. 根据权利要求1所述的纳米颗粒药物载体,其中所述二氧化硅纳米颗粒是中孔二氧化硅纳米颗粒。

17. 根据权利要求16所述的纳米颗粒药物载体,其中所述中孔二氧化硅纳米颗粒是胶体稳定的。

18. 根据权利要求16所述的纳米颗粒药物载体,其中所述中孔二氧化硅具有:

1 nm至20 nm的范围内的平均孔径;以及

50 nm至300 nm的范围内的平均尺寸。

19. 根据权利要求18所述的纳米颗粒药物载体,其中所述平均孔径为1 nm至10 nm。

20. 根据权利要求18所述的纳米颗粒药物载体,其中所述平均孔径为2 nm至8 nm。

21. 根据权利要求18所述的纳米颗粒药物载体,其中所述平均尺寸为50 nm至200 nm。

22. 根据权利要求18所述的纳米颗粒药物载体,其中所述平均尺寸为50 nm至150 nm。

23. 根据权利要求18所述的纳米颗粒药物载体,其中所述平均尺寸为50 nm至100 nm。

24. 根据权利要求18所述的纳米颗粒药物载体,其中所述平均尺寸为50 nm至80 nm。

25. 根据权利要求18所述的纳米颗粒药物载体,其中所述平均尺寸为50 nm至70 nm。

26. 根据权利要求18所述的纳米颗粒药物载体,其中所述平均尺寸为60 nm至70 nm。

27. 根据权利要求1所述的纳米颗粒药物载体,其中在与所述药物反应之前,所述质子化剂为铵盐。

28. 根据权利要求1所述的纳米颗粒药物载体,其中所述药物被质子化并且在与SOS⁸⁻结合时作为凝胶状沉淀物被捕集在所述孔隙中。

29. 根据权利要求1所述的纳米颗粒药物载体,其中所述药物载体与选自以下的部分缀合:靶向部分、融合肽以及转运肽。

30. 根据权利要求29所述的纳米颗粒药物载体,其中所述药物载体与结合癌细胞或肿瘤血管上的受体的肽缀合。

31. 根据权利要求30所述的纳米颗粒药物载体,其中所述药物载体与iRGD肽缀合。

32. 根据权利要求30所述的纳米颗粒药物载体,其中所述药物载体与靶向肽缀合,所述靶向肽选自c(RGDFK)、c(RGDfC)、c(RGDyC)、RGD、GE11、GSG-KCCYSL、奥曲肽、QWAVGHML、DYMGMDF、RRPYIL、RRPYILQLYENKPRRPYIL和戈那瑞林。

33. 根据权利要求29至32中任一项所述的纳米颗粒药物载体,其中所述药物载体与转铁蛋白,和/或ApoE,和/或叶酸缀合。

34. 根据权利要求29所述的纳米颗粒药物载体,其中所述药物载体与包含结合癌症标志物的抗体的靶向部分缀合。

35. 根据权利要求34所述的纳米颗粒药物载体,其中所述药物载体与包含结合癌症标志物的抗体的靶向部分缀合,所述癌症标志物选自5α还原酶、α-甲胎蛋白、AM-1、APC、APRIL、BAGE、β-连环蛋白、Bc12、bcr-abl、CA-125、CASP-8/FLICE、CD19、CD20、CD21、CD23、CD22、CD38、CD33、CD35、CD44、CD45、CD46、CD5、CD52、CD55、CD59、CDC27、CDK4、CEA、c-myc、Cox-2、DCC、DcR3、E6/E7、EGFR、EMBP、Ena78、FGF8b、FGF8a、FLK-1/KDR、叶酸受体、G250、胃泌素17、胃泌素释放激素、GD2/GD3/GM2、GnRH、GnTV、gp100/Pme117、gp-100-in4、gp15、gp75/

TRP-1、hCG、肝素酶、Her2/neu、Her3、HMTV、Hsp70、hTERT、IGFR1、IL-13R、iNOS、Ki 67、KIAA0205、K-ras、H-ras、N-ras、KSA、LDLR-FUT、MAGE1、MAGE3、乳腺珠蛋白、MAP17、黑色素-A、MART-1、间皮素、MIC A/B、MMP2、MMP3、MMP7、MMP9、Mox1、MUC-1、MUC-2、MUC-3、MUC-4、MUM-1、NY-ESO-1、骨粘连蛋白、p15、P170/MDR1、p53、p97/黑素转铁蛋白、PAI-1、PDGF、前列腺碱性蛋白、祖细胞生成素、PSA、PSM、RAGE-1、Rb、RCAS1、SART-1、STAT3、STn、TAG-72、TGF-a、TGF-β、胸腺素β 15、IFN-α、TPA、TPI、TRP-2、酪氨酸酶、VEGF、ZAG和p16INK4。

36. 根据权利要求1所述的纳米颗粒药物载体，其中所述药物载体在37℃下在具有7.4的pH值的生物缓冲液中在24小时内具有少于20%的所述运载物的泄漏。

37. 根据权利要求1所述的纳米颗粒药物载体，其中所述药物载体在37℃下在具有7.4的pH值的生物缓冲液中在24小时内具有少于15%的所述运载物的泄漏。

38. 根据权利要求1所述的纳米颗粒药物载体，其中所述药物载体在37℃下在具有7.4的pH值的生物缓冲液中在24小时内具有少于10%的所述运载物的泄漏。

39. 根据权利要求1所述的纳米颗粒药物载体，其中所述药物载体在37℃下在具有7.4的pH值的生物缓冲液中在24小时内具有少于5%的所述运载物的泄漏。

40. 根据权利要求1所述的纳米颗粒药物载体，其中所述药物载体具有至少8% w/w的药物负载容量。

41. 根据权利要求1所述的纳米颗粒药物载体，其中所述药物载体具有至少10% w/w的药物负载容量。

42. 根据权利要求1所述的纳米颗粒药物载体，其中所述药物载体具有至少20% w/w的药物负载容量。

43. 根据权利要求1所述的纳米颗粒药物载体，其中所述药物载体具有至少30% w/w的药物负载容量。

44. 根据权利要求1所述的纳米颗粒药物载体，其中所述药物载体具有大于40% w/w的药物负载容量。

45. 根据权利要求1所述的纳米颗粒药物载体，其中所述药物载体具有大于50% w/w的药物负载容量。

46. 根据权利要求1所述的纳米颗粒药物载体，其中所述药物载体具有大于60% w/w的药物负载容量。

47. 根据权利要求1所述的纳米颗粒药物载体，其中所述药物载体具有大于70% w/w的药物负载容量。

48. 根据权利要求1所述的纳米颗粒药物载体，其中所述药物载体具有大于80% w/w的药物负载容量。

49. 根据权利要求1所述的纳米颗粒药物载体，其中所述药物载体具有至少80% w/w的药物负载容量。

50. 根据权利要求1所述的纳米颗粒药物载体，其中所述脂质双层包含疏水性药物。

51. 根据权利要求50所述的纳米颗粒药物载体，其中所述脂质双层包含选自以下的疏水性药物：紫杉醇、玫瑰树碱、喜树碱、SN-38、阿昔洛韦二磷酸酯二肉豆蔻酰甘油、以及磷脂连接的苯丁酸氮芥。

52. 根据权利要求51所述的纳米颗粒药物载体，其中所述脂质双层包含紫杉醇。

53. 根据权利要求1所述的纳米颗粒药物载体,其中当在4℃下储存时,在悬浮液中所述药物载体在至少1个月内是稳定的。

54. 根据权利要求1所述的纳米颗粒药物载体,其中当在4℃下储存时,在悬浮液中所述药物载体在至少2个月内是稳定的。

55. 根据权利要求1所述的纳米颗粒药物载体,其中当在4℃下储存时,在悬浮液中所述药物载体在至少3个月内是稳定的。

56. 根据权利要求1所述的纳米颗粒药物载体,其中当在4℃下储存时,在悬浮液中所述药物载体在至少4个月内是稳定的。

57. 根据权利要求1所述的纳米颗粒药物载体,其中当在4℃下储存时,在悬浮液中所述药物载体在至少5个月内是稳定的。

58. 根据权利要求1所述的纳米颗粒药物载体,其中当在4℃下储存时,在悬浮液中所述药物载体在至少6个月内是稳定的。

59. 根据权利要求1所述的纳米颗粒药物载体,其中在悬浮液中所述药物载体的群体:

显示出半峰全宽小于30 nm的尺寸分布;和/或

显示出单峰的尺寸分布;和/或

显示出小于0.2的PDI;和/或

显示出小于0.1的尺寸变异系数。

60. 根据权利要求59所述的纳米颗粒药物载体,其中所述半峰全宽小于20 nm。

61. 根据权利要求59所述的纳米颗粒药物载体,其中所述半峰全宽小于10 nm。

62. 根据权利要求59所述的纳米颗粒药物载体,其中所述半峰全宽小于5 nm。

63. 根据权利要求59所述的纳米颗粒药物载体,其中所述半峰全宽小于3 nm。

64. 根据权利要求59所述的纳米颗粒药物载体,其中所述半峰全宽小于2 nm。

65. 根据权利要求59所述的纳米颗粒药物载体,其中所述PDI小于0.1。

66. 根据权利要求59所述的纳米颗粒药物载体,其中所述尺寸变异系数小于0.05。

67. 根据权利要求59所述的纳米颗粒药物载体,其中所述尺寸变异系数小于1.7/120。

68. 根据权利要求1所述的纳米颗粒药物载体,其中3%或更多的所述纳米颗粒药物载体在静脉内注射时分布到发展中的肿瘤部位。

69. 根据权利要求1所述的纳米颗粒药物载体,其中所述纳米颗粒药物载体在冻干之后再水化时形成稳定的悬浮液。

70. 根据权利要求1所述的纳米颗粒药物载体,其中所述纳米颗粒药物载体在原位PDAC模型中提供比游离药物或含有所述药物的脂质体更有效的癌细胞杀伤。

71. 根据权利要求1所述的纳米颗粒药物载体,其中所述纳米颗粒药物载体与游离药物和/或脂质体中的药物相比显示出降低的药物毒性。

72. 根据权利要求1所述的纳米颗粒药物载体,其中所述纳米颗粒药物载体在具有pH 7.4的生理流体中具有胶体稳定性并且保持单分散以允许全身性生物分布并且能够通过血管渗漏或转胞吞进入疾病部位。

73. 一种药物制剂,所述制剂包含:

多个根据权利要求1至72中任一项所述的纳米颗粒药物载体;以及
药学上可接受的载体。

74. 根据权利要求73所述的制剂,其中所述制剂是乳液、分散体,或悬浮液。

75. 根据权利要求74所述的制剂,其中当在4℃下储存时,所述悬浮液、乳液或分散体在至少1个月内是稳定的。

76. 根据权利要求74所述的制剂,其中当在4℃下储存时,所述悬浮液、乳液或分散体在至少2个月内是稳定的。

77. 根据权利要求74所述的制剂,其中当在4℃下储存时,所述悬浮液、乳液或分散体在至少3个月内是稳定的。

78. 根据权利要求74所述的制剂,其中当在4℃下储存时,所述悬浮液、乳液或分散体在至少4个月内是稳定的。

79. 根据权利要求74所述的制剂,其中当在4℃下储存时,所述悬浮液、乳液或分散体在至少5个月内是稳定的。

80. 根据权利要求74所述的制剂,其中当在4℃下储存时,所述悬浮液、乳液或分散体在至少6个月内是稳定的。

81. 根据权利要求74所述的制剂,其中:

所述制剂中的所述纳米颗粒药物载体显示出单峰的尺寸分布;和/或

所述悬浮液、乳液,或分散体中的所述纳米颗粒药物载体显示出小于0.2的PDI。

82. 根据权利要求81所述的制剂,其中所述PDI小于0.1。

83. 根据权利要求73所述的制剂,其中所述制剂被配制用于经由选自以下的途径施用:静脉内施用、动脉内施用、脑内施用、鞘内施用、口服施用、气溶胶施用、经由吸入施用、经由套管进行颅内施用以及皮下或肌内贮库沉积,所述经由吸入施用包括鼻内和气管内递送。

84. 根据权利要求73所述的制剂,其中所述制剂是无菌注射剂。

85. 根据权利要求73所述的制剂,其中所述制剂是单位剂量制剂。

86. 根据权利要求1至72中任一项所述的纳米颗粒药物载体在制造用于治疗癌症的药品中的用途,其中所述纳米颗粒药物载体中的所述药物包含抗癌药物。

87. 根据权利要求86所述的用途,其中所述癌症是胰腺导管腺癌(PDAC)。

88. 根据权利要求86所述的用途,其中所述癌症是选自以下的癌症:白血病、肾癌、肉瘤、头颈癌、嗜铬细胞瘤、皮肤癌、宫颈癌、淋巴瘤、胆管癌、心脏肿瘤、乳腺癌、巨球蛋白血症、生殖细胞肿瘤、结肠/结肠直肠癌和肺癌。

89. 根据权利要求86所述的用途,其中所述纳米颗粒药物载体不与iRGD肽缀合并且所述纳米颗粒药物载体联合iRGD肽施用。

90. 根据权利要求86所述的用途,其中所述药品配制用于经由选自以下的途径施用:静脉内施用、动脉内施用、脑内施用、鞘内施用、口服施用、气溶胶施用、经由吸入施用、经由套管进行颅内施用以及皮下或肌内贮库沉积,所述经由吸入施用包括鼻内和气管内递送。

91. 根据权利要求86所述的用途,其中所述药品配制用于对人类施用。

92. 一种制备伊立替康纳米载体的方法,所述方法包括:

提供纳米载体,所述纳米载体包含二氧化硅主体,所述二氧化硅主体具有包括适于将伊立替康容纳其中的多个孔隙的表面;

将质子化剂设置在所述多个孔隙内,其中所述质子化剂是蔗糖八硫酸酯三乙铵(TEA₈SOS);

用包含胆固醇的磷脂双层包被所述纳米载体的孔隙；以及
将伊立替康引入所述磷脂双层包被的孔隙中，
以制成磷脂双层包被的伊立替康纳米载体。

93. 根据权利要求92所述的方法，其中用包含胆固醇的磷脂双层包被所述纳米载体的孔隙使用超声处理方法。

94. 根据权利要求92所述的方法，其中所述二氧化硅主体包含溶胶-凝胶合成的、尺寸控制的和胶体稳定的二氧化硅主体。

95. 根据权利要求94所述的方法，其中所述纳米载体：

(a) 具有至少20%w/w的伊立替康负载容量；和/或

(b) 在37℃下在具有7.4的pH值的生物缓冲液中在24小时内显示出<10%的伊立替康泄漏。

96. 根据权利要求95所述的方法，其中所述伊立替康负载容量为至少30% w/w。

97. 根据权利要求95所述的方法，其中所述伊立替康负载容量为至少40% w/w。

98. 根据权利要求95所述的方法，其中所述伊立替康泄漏为<5%。

99. 根据权利要求95所述的方法，其中所述纳米载体在具有pH 7.4的生理流体中具有胶体稳定性并且保持单分散以允许全身性生物分布并且能够通过血管渗漏或转胞吞进入疾病部位。

用于运载物递送的具有脂质双层包衣的中孔二氧化硅纳米颗粒

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2016年1月8日提交的USSN 62/276,634的权益和优先权,该USSN 62/276,634以引用的方式整体并入本文用于所有目的。

[0003] 政府支持声明

[0004] 本发明是在政府支持下根据美国国家卫生研究院(National Institutes of Health)/美国国家癌症研究所(National Cancer Institute)授予的基金号R01 CA133697和U01 CA198846作出的。政府享有本发明的某些权利。

背景技术

[0005] 胰腺导管腺癌(PDAC)是一种致命性疾病,5年存活率低于6% (Siegel等人(2014)CA Cancer J.Clin. 64 (1) :9-29)。目前,用于化疗的主要治疗方案包括单一试剂吉西他滨(GEM)或四药方案。虽然FOLFIRINOX比GEM具有更好的响应率(31.6%相比于9.4%),具有改善的存活期(11个月相比于6.8个月),但是前者组合显著更具毒性并且局限于具有良好表现状态的少数PDAC患者(Conroy等人(2011)N Engl J Med. 364 (19) :1817-1825)。伊立替康(irinotecan)显著导致这种毒性,包括对骨髓(例如中性粒细胞减少)、肝脏(例如坏死和脂肪变性)以及胃肠(GI)道(例如呕吐、腹泻)的严重影响(Conroy等人(2011)N Engl J Med. 364 (19) :1817-1825; Ueno等人(2007)Cancer Chemother. Pharmacol. 59 (4) :447-454; Loupakis等人(2013)Br. J. Cancer, 108 (12) :2549-2556)。因此,非常需要改善伊立替康毒性的治疗方案,目的在于改进用于PDAC的一线治疗的可用药物。

[0006] 降低伊立替康毒性而维持功效的一种方法是将高剂量药物封装在纳米载体中,所述纳米载体具有受保护的向癌症部位的递送,同时减少全身药物释放。不同的载体类型,包括聚合物颗粒和脂质体,已经被用于伊立替康递送而获得一定的成功(Chou等人(2003)J. Biosci. Bioeng., 95 (4) :405-408; Onishi等人(2003)Biol. Pharmaceut. Bull. 26 (1) :116-119; Messerer等人(2004)Clin. Cancer Res, 10 (19) :6638-6649; Drummond等人(2006)Cancer Res., 66 (6) :3271-3277; Valencia等人(2013)Nanomed. 8 (5) :687-698; Sadzuka等人(1998)Cancer Lett., 127 (1) :99-106; Ramsay等人(2008)Eur. J. Pharm. Biopharm. 68 (3) :607-617; Li等人(2015)Adv. Func. Mat. 25 (5) :788-798)。然而,虽然聚合物纳米颗粒显示出有前途的体外结果,但是负载伊立替康(<1%, w/w)的容量有限加上过早的药物释放(例如在5小时内40%),纳米颗粒没有在提高肿瘤内药物递送的同时实现所需的毒性降低(Valencia等人(2013)Nanomed. 8 (5) :687-698)。虽然脂质体可以经由使用硫酸铵或质子包封剂实现高的伊立替康负载容量(Chou等人(2003)J. Biosci. Bioeng., 95 (4) :405-408; Messerer等人(2004)Clin. Cancer Res, 10 (19) :6638-6649; Drummond等人(2006)Cancer Res., 66 (6) :3271-3277; Sadzuka等人(1998)Cancer Lett., 127 (1) :99-106; Ramsay等人(2008)Eur. J. Pharm. Biopharm. 68 (3) :607-617),但是载体在剪切和渗透应力下的不稳定性以及血清蛋白所引起的双层破坏会导致过早的药物释放和毒性(Liu等人(2000),

Colloids and Surfaces A:Physicochemical and Engineering Aspects, 172(1-3) :57-67; Heurtault等人 (2003) Biomaterials, 24 (23) :4283-4300; Sabin 等人 (2006) Eur.Phys.J.E.20(4) :401-408)。

[0007] 如上所述,在临床试验中或在治疗环境中递送癌症药物的许多尝试已经基于脂质体系统 (Messerer等人 (2004) Clin.Cancer Res, 10(19) :6638-6649; Cancer Res. 2006, 66, 3271) 或基于聚合物的系统 (Onishi等人 (2003) Biol.Pharm.Bull. 26 (1) :116-119)。这些载体中的大多数是80nm-200nm的尺寸范围内的球形颗粒或超分子组装体,它们常常在表面上含有PEG包衣以延长循环半衰期,并且通常表现出约5w/w% (例如基于聚合物的纳米颗粒) 至约50w/w% (例如脂质体载体) 的负载容量。在临床前水平,在包括鼠类PDAC模型的动物研究中这些纳米载体的潜在益处已经被证实为包括体内毒性降低、抗肿瘤功效增强以及存活率提高。

[0008] 然而,只有少数的纳米载体已经进展到PDAC患者的临床试验。包括离子载体 (A23187, 也被称为calimycin (钙镁盐混合物)) 的纳米载体使得伊立替康递送脂质体制剂 (Irinophore C) 和质子化剂伊立替康递送脂质体制剂 (MM-398) 成为可能 (Baker等人 (2008) Clin.Cancer Res. 14: 7260-7271; Drummond等人 (2006) Cancer Res. 15 (66) :3271-3277)。Irinophore C制剂 (Champions Biotechnology公司) 是一种脂质体载体,它经由使用离子载体A23187或硫酸铵产生跨膜质子梯度来利用活性伊立替康负载 (Ramsay等人 (2008) Eur.J.Pharm.Biopharm. 68:607-617)。Irinophore C制剂被用于在2011年开始的临床研究中,但是一直没有关于所述研究的成果或结果的更新信息。

[0009] 虽然在最近的3期临床试验中, Merrimack公司对用于伊立替康的脂质体载体 (MM-398) 的开发在PDAC中作为二线治疗选择方案显示出提高的存活益处,但是相对高的GI道和骨髓毒性率已经导致严重和危及生命的腹泻和中性粒细胞减少的黑框警告 (Von Hoff等人 (2013) Br . J . Cancer , 109 (4) : 920 - 925 ; www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm468654.htm)。参与MM-398临床试验的人类受试者还显示出肝酶显著升高,包括丙氨酸转氨酶 (ALT) (参见例如www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2015/207793LB.pdf)。尽管如此, MM-398获得FDA批准用于PDAC,用于不能对GEM治疗作出响应的患者,并且作为 Onivyde® 被销售 (参见例如www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm468654.htm)。

[0010] MM-398脂质体制剂 (Merrimack Pharmaceuticals公司) 在多阴离子捕集剂 (ESMO G1 2014, www.merrimackpharma.com) 的帮助下包含盐酸伊立替康。更确切地说,伊立替康负载到MM-398脂质体中是通过多价阴离子捕集剂蔗糖八硫酸酯三乙铵 (TE₈SOS) 的脂质体内药物封装来实现的。这种化学品以可以经由被动药物封装实现的负载的超过10倍引起伊立替康质子化和包封 (Drummond等人 (2006) Cancer Res. 66 (6) :3271-3277)。MM-398脂质体的静脉内施用已经被证实在小鼠的各种PDAC肿瘤模型中诱导完全肿瘤消退,包括抑制转移性肿瘤病灶 (Paz等人 (2102) Cancer Res. 72 (12增刊) :摘要A63)。MM-398目前处于3期临床试验中并且声称在动物和人类研究中与游离伊立替康相比提供改善的肿瘤抑制、药物代谢动力学以及功效 (Kalra (2012) AACR meeting, 摘要号5622)。这包括在鼠类异种移植研究中使用20mg/kg MM-398的剂量 (人类等效剂量:60mg/m²-120 mg/m²) 声称完全PDAC消退的实验数据 (Paz等人 (2102) Cancer Res. 72 (12增刊) :摘要A63)。在小鼠中MM-398还使游离伊立

替康的最大耐受剂量 (MTD) 从 80mg/kg 增加到 324mg/kg (Drummond 等人 (2006) Cancer Res. 66 (6) : 3271-3277)。此外, 在 Merrimack Pharmaceuticals 公司的涉及 417 名 PDAC 患者的 3 期临床试验 (Hoff 等人 ESMO GI 2014, www.merrimackpharma.com) 中, MM-398、5-FU 以及 甲酰四氢叶酸 (leucovorin) 的组合引起 6.1 个月的总存活期 (OS), 这比接受 5-FU 和 甲酰四氢叶酸的对照组长了 1.9 个月。然而, 虽然将伊立替康主动负载到 MM-398 脂质体制剂中相对于被动封装程序增强了药物负载容量, 但是合成技术需要多个步骤并且与本文提供的 LB-MSNP 平台相比, 脂质体载体不能提供相同的胶体稳定性或相同量的细胞内释放。尽管如此, MM-398 获得 FDA 批准用于 PDAC, 用于不能对 GEM 治疗作出响应的患者, 并且作为 ONIVYDE® 销售。使用多阴离子聚合物增加脂质体中的药物包封引起约 80nm 药物沉淀 (Zhu 等人 (1996) 39 (1) : 138-142; Colbern 等人 (1998) Clin. Cancer Res. 4 (12) : 3077-3082), 这构成了与 LB-MSNP 孔相比伊立替康从脂质体载体中缓慢释放的原因之一。

[0011] 因此, 仍然存在对纳米载体和递送方法的未满足的需求, 所述纳米载体和递送方法使得能够实现有效药物递送, 包括化疗, 如伊立替康化疗, 具有提高的安全限度和降低的毒性。

发明内容

[0012] 需要紧急干预来提高胰腺导管腺癌 (PDAC) 的 5 年存活率。虽然 4 药方案 FOLFIRINOX (包含伊立替康 (IRIN)、5-氟尿嘧啶 (5-FU)、奥沙利铂 (oxaliplatin, OX) 以及 甲酰四氢叶酸 (LV)) 比更常用的吉西他滨 (GEM) 具有更好的存活结果, 但是前者治疗方案具有高毒性并且限制用于具有良好表现状态的患者。由于伊立替康显著导致 FOLFIRINOX 毒性 (骨髓和胃肠道), 因此本发明的一个具体目标是用定制设计的中孔二氧化硅纳米颗粒 (MSNP) 平台降低前者药物的毒性, 所述平台使用质子梯度以穿过包被的脂质双层 (LB) 进行高剂量伊立替康负载。在免疫活性小鼠的 Kras 衍生的原位 PDAC 模型中, 当例如与脂质体等同物相比时, LB 包被的 MSNP (LB-MSNP) 载体的提高的稳定性允许更好的受保护的伊立替康递送和增加的肿瘤药物浓度。LB-MSNP 纳米载体对于治疗肿瘤转移也是更有效的。同样重要的是, 与脂质体载体相比, LB-MSNP 载体的泄漏减少和更慢的药物释放速率显著降低骨髓、胃肠道以及肝脏毒性率。LB-MSNP 载体的高功效和毒性降低的组合有助于使用伊立替康作为一线治疗剂来提高 PDAC 存活率。

[0013] 一般来说, 在本发明的一个方面, 提供了一种纳米载体, 所述纳米载体包含二氧化硅主体, 所述二氧化硅主体具有表面并且限定适于将分子容纳其中的多个孔隙; 包被所述表面的脂质双层 (例如磷脂双层); 以及由所述包被的脂质双层容纳在所述孔隙中的运载物捕集剂, 其中亚微米结构具有小于 1 微米的最大尺寸, 并且其中所述磷脂双层稳定地密封所述多个孔隙并且可以用作基础以用于另外的包装、靶向、成像以及官能化。

[0014] 本发明的一个重要方面包括用于制备改进的运载物/药剂 (例如伊立替康或具有本文所述的化学结构的一种或多种其他分子) 纳米载体的新方法。这些方法一般包括提供未负载的纳米载体, 其包含具有表面的二氧化硅主体, 所述表面具有适于将分子容纳其中的多个孔隙; 以及通过脂质双层 (例如磷脂双层) 将运载物捕集剂、靶向剂, 或成像剂封装在所述孔隙内。如下文详细论述的那样, 工作实施例包括但不限于制备浓缩伊立替康纳米载体的新方法。在某些实施方案中, 这些方法包括选择纳米载体, 所述纳米载体包含二氧化硅

主体，所述二氧化硅主体具有包括适于将伊立替康容纳其中的多个孔隙的表面。在这些方法中，还选择具有特异性影响伊立替康分子的扩散和/或捕集伊立替康分子的能力的试剂（例如蔗糖八硫酸酯三乙铵）并且将其设置在所述多个孔隙内。将所述纳米载体和孔隙用脂质双层完全包被（例如使用超声处理方法）。通常，在即将进行该包被步骤之前不干燥和/或洗涤所述二氧化硅主体纳米载体。任选地，在某些实施方案中，该脂质双层可以包含被选择以促进纳米载体功能的一种或多种生物活性分子（如聚乙二醇，和/或靶向配体，和/或紫杉醇和/或活化的伊立替康SN38）。在该包被步骤之后，然后使伊立替康迁移穿过脂质双层进入其中它被包封的孔隙中。这也被称为“远程药物负载”。以这种方式，可以形成具有惊人高的负载容量（例如40重量%或大于40%的药物/MSNP）的伊立替康纳米载体。除了这些高药物负载容量之外，使用这些方法形成的伊立替康纳米载体还具有一系列其他所期望的特性，例如在37°C下在具有7.4的pH值的生物缓冲液中在24小时内表现出<5%的伊立替康泄漏。

- [0015] 本文所考虑的各种实施方案可以包括但不必限于以下一个或多个：
 - [0016] 实施方案1：一种纳米颗粒药物载体，所述纳米颗粒药物载体包含：
 - [0017] 二氧化硅纳米颗粒，所述二氧化硅纳米颗粒具有表面并且限定适于将分子容纳其中的多个孔隙；
 - [0018] 包被所述表面的脂质双层；
 - [0019] 包括所述多个孔隙的孔隙内的运载物捕集剂；以及
 - [0020] 包含药物的运载物，其中所述运载物与所述孔隙中的所述运载物捕集剂缔合；
 - [0021] 其中亚微米结构具有小于1微米的最大尺寸，并且其中所述脂质双层稳定地密封所述多个孔隙。
- [0022] 实施方案2：实施方案1的纳米颗粒药物载体，其中所述脂质双层包含磷脂、胆固醇(CHOL)以及mPEG磷脂。
- [0023] 实施方案3：根据实施方案1至2中的任一个的纳米颗粒药物载体，其中所述磷脂包含具有C14-C20碳链的饱和脂肪酸，和/或具有C14-C20碳链的不饱和脂肪酸，和/或包含具有C12-C20碳链的脂肪酸的混合物的天然脂质。
- [0024] 实施方案4：实施方案3的纳米颗粒药物载体，其中所述磷脂包含选自以下的饱和脂肪酸：磷脂酰胆碱(DPPC)、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)以及二酰基磷脂酰胆碱(diacylphosphatidylcholine) (DAPC)。
- [0025] 实施方案5：实施方案3的纳米颗粒药物载体，其中所述磷脂包含选自以下的天然脂质：卵磷脂酰胆碱(卵PC)和大豆磷脂酰胆碱(大豆PC)。
- [0026] 实施方案6：实施方案3的纳米颗粒药物载体，其中所述磷脂包含选自以下的不饱和脂肪酸：1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二棕榈油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)以及1,2-二二十碳烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱。
- [0027] 实施方案7：根据实施方案1至6中的任一个的纳米颗粒药物载体，其中所述脂质双层包含具有磷脂C14-C18碳链和约350Da至5000Da范围内的PEG分子量的mPEG磷脂。
- [0028] 实施方案8：实施方案7的纳米颗粒药物载体，其中所述脂质双层包含1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-PEG(DSPE-PEG)。

[0029] 实施方案9:实施方案2的纳米颗粒药物载体,其中所述脂质双层包含DPPC/Chol/DSPE-PEG或DSPC/Chol/DSPE-PEG。

[0030] 实施方案10:实施方案9的纳米颗粒药物载体,其中所述脂质双层包含DSPC/Chol/DSPE-PEG。

[0031] 实施方案11:实施方案10的纳米颗粒药物载体,其中所述脂质双层包含DSPC/Chol/DSPE-PEG2000。

[0032] 实施方案12:根据实施方案1至11中的任一个的纳米颗粒药物载体,其中所述脂质双层包含磷脂、胆固醇以及mPEG磷脂,它们的比率是50-90mol %的磷脂:10-50mol %的CHOL:1-10mol %的mPEG磷脂。

[0033] 实施方案13:实施方案10的纳米颗粒药物载体,其中所述脂质双层包含约3:2:0.15的摩尔比的DSPC/Chol/DSPE-PEG。

[0034] 实施方案14:根据实施方案1至13中的任一个的纳米颗粒药物载体,其中所述脂质双层形成包围整个纳米颗粒的基本上连续的双层。

[0035] 实施方案15:根据实施方案1至14中的任一个的纳米颗粒药物载体,其中所述脂质双层形成包围整个纳米颗粒的基本上均匀且完整的双层。

[0036] 实施方案16:根据实施方案1至15中的任一个的纳米颗粒药物载体,其中所述二氧化硅纳米颗粒是中孔二氧化硅纳米颗粒。

[0037] 实施方案17:实施方案16的纳米颗粒药物载体,其中所述二氧化硅纳米颗粒包含溶胶-凝胶合成的中孔二氧化硅纳米颗粒。

[0038] 实施方案18:根据实施方案16至17中的任一个的纳米颗粒药物载体,其中所述中孔二氧化硅纳米颗粒是尺寸控制的。

[0039] 实施方案19:根据实施方案16至18中的任一个的纳米颗粒药物载体,其中所述中孔二氧化硅纳米颗粒是胶体稳定的。

[0040] 实施方案20:根据实施方案16至19中的任一个的纳米颗粒药物载体,其中所述中孔二氧化硅具有约1nm至约20nm,或约1nm至约10nm,或约2nm至约8nm的范围内的平均孔径。

[0041] 实施方案21:根据实施方案1至20中的任一个的纳米颗粒药物载体,其中所述中孔二氧化硅纳米颗粒具有以下范围内的平均尺寸:约50nm至约300nm,或约50nm至约200nm,或约50nm至约150nm,或约50nm至约100nm,或约50nm至约80nm,或约50nm至约70nm,或约60nm至约70nm。

[0042] 实施方案22:根据实施方案1至21中的任一个的纳米颗粒药物载体,其中在与所述药物反应之前,运载物捕集剂选自蔗糖八硫酸酯三乙铵(TEA₈SOS)、(NH₄)₂SO₄、铵盐、三甲基铵盐以及三乙铵盐。

[0043] 实施方案23:实施方案22的纳米颗粒药物载体,其中所述运载物捕集剂包含(NH₄)₂SO₄。

[0044] 实施方案24:实施方案22的纳米颗粒药物载体,其中所述运载物捕集剂包含选自以下的铵盐:硫酸铵;蔗糖八硫酸酯铵; α -环糊精硫酸酯铵; β -环糊精硫酸酯铵; γ -环糊精硫酸酯铵;磷酸铵; α -环糊精磷酸酯铵; β -环糊精磷酸酯铵; γ -环糊精磷酸酯铵;枸橼酸铵;以及乙酸铵。

[0045] 实施方案25:实施方案22的纳米颗粒药物载体,其中所述运载物捕集剂包含选自

以下的三甲基铵盐:三甲基硫酸铵、蔗糖八硫酸酯三甲基铵、 α -环糊精硫酸酯三甲基铵、 β -环糊精硫酸酯三甲基铵、 γ -环糊精硫酸酯三甲基铵、三甲基磷酸铵、 α -环糊精磷酸酯三甲基铵、 β -环糊精磷酸酯三甲基铵、 γ -环糊精磷酸酯三甲基铵、三甲基枸橼酸铵以及三甲基乙酸铵。

[0046] 实施方案26:实施方案22的纳米颗粒药物载体,其中所述运载物捕集剂包含选自以下的三乙铵盐:三乙基硫酸铵、蔗糖八硫酸酯三乙铵、 α -环糊精硫酸酯三乙铵、 β -环糊精硫酸酯三乙铵、 γ -环糊精硫酸酯三乙铵、三乙基磷酸铵、 α -环糊精磷酸酯三乙铵、 β -环糊精磷酸酯三乙铵、 γ -环糊精磷酸酯三乙铵、三乙基枸橼酸铵以及三乙基乙酸铵。

[0047] 实施方案27:实施方案22的纳米颗粒药物载体,其中在与所述药物反应之前,运载物捕集剂是蔗糖八硫酸酯三乙铵(TEA₈SOS)。

[0048] 实施方案28:实施方案27的纳米颗粒药物载体,其中所述药物被质子化并且在与SOS⁸⁻结合时作为凝胶状沉淀物被捕集在所述孔隙中。

[0049] 实施方案29:根据实施方案1至28中的任一个的纳米颗粒药物载体,其中所述药物包含能够被质子化的至少一个弱碱性基团,并且所述运载物捕集剂包含至少一个阴离子基团。

[0050] 实施方案30:根据实施方案1至29中的任一个的纳米颗粒药物载体,其中所述药物被选择为具有大于7并且小于11的pKa。

[0051] 实施方案31:根据实施方案1至30中的任一个的纳米颗粒药物载体,所述药物包含伯胺、仲胺以及叔胺。

[0052] 实施方案32:根据实施方案1至31中的任一个的纳米颗粒药物载体,其中所述药物被选择为具有约5mg/mL至约25mg/mL的水溶性指数。

[0053] 实施方案33:根据实施方案1至32中的任一个的纳米颗粒药物载体,其中所述运载物被选择为具有约-3.0至约3.0的辛醇/水分配系数或logP值。

[0054] 实施方案34:根据实施方案1至33中的任一个的纳米颗粒药物载体,其中所述运载物被选择为2nm-8nm并且小于所述二氧化硅纳米颗粒的孔隙的平均尺寸或中值尺寸。

[0055] 实施方案35:根据实施方案29至34中的任一个的纳米颗粒药物载体,其中所述运载物包含抗癌药物。

[0056] 实施方案36:实施方案35的纳米颗粒药物载体,其中所述运载物包含伊立替康。

[0057] 实施方案37:实施方案35的纳米颗粒药物载体,其中所述运载物包含独立地选自以下的一种或多种药物:拓扑异构酶抑制剂、抗肿瘤蒽环类抗生素、有丝分裂抑制剂、生物碱、碱性烷化剂、嘌呤或嘧啶衍生物以及蛋白激酶抑制剂。

[0058] 实施方案38:实施方案37的纳米颗粒药物载体,其中所述载体包含拓扑异构酶抑制剂,包括托泊替康。

[0059] 实施方案39:实施方案37的纳米颗粒药物载体,其中所述载体包含选自以下的生物碱:托泊替康、10-羟基喜树碱(10-hydroxycamptothecin)、贝洛替康(belotecan)、卢比替康(rubitecan)、长春瑞滨以及LAQ824。

[0060] 实施方案40:实施方案37的纳米颗粒药物载体,其中所述载体包含选自多柔比星和米托蒽醌的抗肿瘤蒽环类抗生素。

[0061] 实施方案41:实施方案37的纳米颗粒药物载体,其中所述载体包含选自长春碱和

长春瑞滨的有丝分裂抑制剂。

[0062] 实施方案42:实施方案37的纳米颗粒药物载体,其中所述载体包含选自环磷酰胺、氮芥以及替莫唑胺的碱性烷化剂。

[0063] 实施方案43:实施方案37的纳米颗粒药物载体,其中所述载体包含选自以下的嘌呤或嘧啶衍生物:5-氟尿嘧啶、5'-脱氧-5-氟尿苷以及吉西他滨。

[0064] 实施方案44:实施方案37的纳米颗粒药物载体,其中所述载体包含选自以下的蛋白激酶抑制剂:伊马替尼、奥希替尼(osimertinib)和舒尼替尼(sunitinib)、帕唑帕尼(pazopanib)、恩扎妥林(enzastaurin)、凡德他尼(vandetanib)、厄洛替尼(erlotinib)、达沙替尼(dasatinib)以及尼洛替尼(nilotinib)。

[0065] 实施方案45:根据实施方案1至44中的任一个的纳米颗粒药物载体,其中所述药物载体与选自以下的部分缀合:靶向部分、融合肽以及转运肽。

[0066] 实施方案46:实施方案45的纳米颗粒药物载体,其中所述药物载体与结合癌细胞或肿瘤血管上的受体的肽缀合。

[0067] 实施方案47:实施方案46的纳米颗粒药物载体,其中所述药物载体与iRGD肽缀合。

[0068] 实施方案48:实施方案46的纳米颗粒药物载体,其中所述药物载体与表2中所示的靶向肽缀合。

[0069] 实施方案49:根据实施方案45至48中的任一个的纳米颗粒药物载体,其中所述药物载体与转铁蛋白,和/或ApoE,和/或叶酸缀合。

[0070] 实施方案50:根据实施方案45至49中的任一个的纳米颗粒药物载体,其中所述药物载体与包含结合癌症标志物的抗体的靶向部分缀合。

[0071] 实施方案51:实施方案50的纳米颗粒药物载体,其中所述药物载体与包含结合表1中所示的癌症标志物的抗体的靶向部分缀合。

[0072] 实施方案52:根据实施方案29至34中的任一个的纳米颗粒药物载体,其中所述运载物包含抗生素、抗病毒剂,或抗真菌剂。

[0073] 实施方案53:实施方案52的纳米颗粒药物载体,其中所述运载物包含选自环丙沙星和左氧氟沙星的抗生素。

[0074] 实施方案54:实施方案52的纳米颗粒药物载体,其中所述运载物包含HIV抗病毒剂。

[0075] 实施方案55:实施方案54的纳米颗粒药物载体,其中所述运载物包含选自以下的抗病毒剂:替诺福韦(tenofovir)、二吡呋酯(disoproxil)以及富马酸盐。

[0076] 实施方案56:实施方案52的纳米颗粒药物载体,其中所述运载物包含选自以下的抗真菌剂:两性霉素B、阿尼芬净、卡泊芬净、氟康唑、氟胞嘧啶、艾沙康唑(Isavuconazole)、伊曲康唑、米卡芬净、泊沙康唑以及伏立康唑。

[0077] 实施方案57:根据实施方案1至56中的任一个的纳米颗粒药物载体,其中所述药物载体在37°C下在具有7.4的pH值的生物缓冲液中在24小时内具有少于约20%,或少于约15%,或少于约10%,或少于约5%的所述运载物的泄漏。

[0078] 实施方案58:根据实施方案1至57中的任一个的纳米颗粒药物载体,其中所述药物载体具有以下药物负载容量:至少约8%w/w,或至少约10%w/w,或至少约20%w/w,或至少约30%w/w,或大于约40%w/w,或大于约50%w/w,或大于约60%w/w,或大于约70%w/w,或

大于约80% w/w。

[0079] 实施方案59:根据实施方案1至57中的任一个的纳米颗粒药物载体,其中所述药物载体具有至少80% w/w的药物负载容量。

[0080] 实施方案60:根据实施方案1至59中的任一个的纳米颗粒药物载体,其中所述脂质双层包含疏水性药物。

[0081] 实施方案61:实施方案60的纳米颗粒药物载体,其中所述脂质双层包含选自以下的疏水性药物:紫杉醇、玫瑰树碱(ellipticine)、喜树碱、SN-38以及脂质前药(例如阿昔洛韦二磷酸酯二肉豆蔻酰甘油(acyclovir diphosphate dimyristoylglycerol)、多柔比星缀合的磷脂前药、核苷类似物的磷脂衍生物、磷脂连接的苯丁酸氮芥等)。

[0082] 实施方案62:实施方案60的纳米颗粒药物载体,其中所述脂质双层包含紫杉醇。

[0083] 实施方案63:根据实施方案1至61中的任一个的纳米颗粒药物载体,其中当在4°C下储存时,在悬浮液中所述药物载体在至少1个月,或至少2个月,或至少3个月,或至少4个月,或至少5个月,或至少6个月内是稳定的。

[0084] 实施方案64:根据实施方案1至63中的任一个的纳米颗粒药物载体,其中在悬浮液中所述药物载体的群体显示出宽度(半峰全宽)在以下范围内的尺寸分布:小于约30nm,或小于约20nm,或小于约10nm,或小于约5nm,或小于约3nm,或小于约2nm。

[0085] 实施方案65:根据实施方案1至64中的任一个的纳米颗粒药物载体,其中在悬浮液中所述药物载体的群体显示出基本上单峰的尺寸分布。

[0086] 实施方案66:根据实施方案1至65中的任一个的纳米颗粒药物载体,其中在悬浮液中所述药物载体的群体显示出小于约0.2,或小于约0.1的PDI。

[0087] 实施方案67:根据实施方案1至66中的任一个的纳米颗粒药物载体,其中在悬浮液中所述药物载体的群体显示出小于约0.1或小于约0.05,或小于约1.7/120的尺寸变异系数。

[0088] 实施方案68:根据实施方案1至67中的任一个的纳米颗粒药物载体,其中约3%或更多的所述纳米颗粒药物载体在静脉内注射时分布到发展中的肿瘤部位。

[0089] 实施方案69:根据实施方案1至68中的任一个的纳米颗粒药物载体,其中所述纳米颗粒药物载体在冻干之后再水化时形成稳定的悬浮液。

[0090] 实施方案70:根据实施方案1至69中的任一个的纳米颗粒药物载体,其中在负载抗癌药物时,所述纳米颗粒药物载体在原位PDAC模型中提供比游离药物或含有所述药物的脂质体更有效的癌细胞杀伤。

[0091] 实施方案71:根据实施方案1至70中的任一个的纳米颗粒药物载体,其中在负载抗癌药物时,所述纳米颗粒药物载体与游离药物和/或脂质体中的药物相比显示出降低的药物毒性。

[0092] 实施方案72:根据实施方案1至71中的任一个的纳米颗粒药物载体,其中所述纳米颗粒药物载体在具有pH 7.4的生理流体中具有胶体稳定性并且保持单分散以允许全身性生物分布并且能够通过血管渗漏(EPR效应)或转胞吞进入疾病部位。

[0093] 实施方案73:一种药物制剂,所述制剂包含:

[0094] 根据实施方案1至72中的任一个的多个纳米颗粒药物载体;以及

[0095] 药学上可接受的载体。

- [0096] 实施方案74:实施方案73的制剂,其中所述制剂是乳液、分散体,或悬浮液。
- [0097] 实施方案75:实施方案74的制剂,其中当在4°C下储存时,所述悬浮液、乳液或分散体在至少1个月,或至少2个月,或至少3个月,或至少4个月,或至少5个月,或至少6个月内是稳定的。
- [0098] 实施方案76:根据实施方案73至75中的任一个的制剂,其中所述制剂中的所述纳米级药物载体显示出基本上单峰的尺寸分布。
- [0099] 实施方案77:根据实施方案73至76中的任一个的制剂,其中所述悬浮液、乳液,或分散体中的所述药物载体显示出小于约0.2,或小于约0.1的PDI。
- [0100] 实施方案78:根据实施方案73至77中的任一个的制剂,其中所述制剂被配制用于经由选自以下的途径施用:静脉内施用、动脉内施用、脑内施用、鞘内施用、口服施用、气溶胶施用、经由吸入施用(包括鼻内和气管内递送)、经由套管进行颅内施用以及皮下或肌内贮库沉积。
- [0101] 实施方案79:根据实施方案73至77中的任一个的制剂,其中所述制剂是无菌注射剂。
- [0102] 实施方案80:根据实施方案73至79中的任一个的制剂,其中所述制剂是单位剂量制剂。
- [0103] 实施方案81:一种治疗癌症的方法,所述方法包括:
- [0104] 向有需要的受试者施用有效量的根据实施方案1至51或57至72中的任一个的纳米颗粒药物载体或根据实施方案73至80中的任一个的药物制剂,其中所述纳米颗粒药物载体和/或所述药物制剂中的药物包含抗癌药物。
- [0105] 实施方案82:实施方案81的方法,其中所述纳米颗粒药物载体和/或所述药物制剂是化疗方案中的主要治疗。
- [0106] 实施方案83:实施方案81的方法,其中所述纳米颗粒药物载体和/或所述药物制剂是多药化疔方案中的组分。
- [0107] 实施方案84:实施方案83的方法,其中所述多药化疔方案包含选自以下的至少两种药物:伊立替康(IRIN)、奥沙利铂(OX)、5-氟尿嘧啶(5-FU)以及甲酰四氢叶酸(LV)。
- [0108] 实施方案85:实施方案83的方法,其中所述多药化疔方案包含选自以下的至少三种药物:伊立替康(IRIN)、奥沙利铂(OX)、5-氟尿嘧啶(5-FU)以及甲酰四氢叶酸(LV)。
- [0109] 实施方案86:实施方案83的方法,其中所述多药化疔方案至少包含伊立替康(IRIN)、奥沙利铂(OX)、5-氟尿嘧啶(5-FU)以及甲酰四氢叶酸(LV)。
- [0110] 实施方案87:根据实施方案81至86中的任一个的方法,其中所述癌症是胰腺导管腺癌(PDAC)。
- [0111] 实施方案88:根据实施方案81至86中的任一个的方法,其中所述癌症是选自以下的癌症:急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、急性髓性白血病(AML)、肾上腺皮质癌、AIDS相关癌症(例如卡波西氏肉瘤(Kaposi sarcoma)、淋巴瘤)、肛门癌、阑尾癌、星形细胞瘤、非典型畸胎样瘤/横纹肌样瘤、胆管癌、肝外癌、膀胱癌、骨癌(例如尤文肉瘤(Ewing sarcoma)、骨肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤)、脑干神经胶质瘤、脑肿瘤(例如星形细胞瘤、脑和脊髓肿瘤、脑干神经胶质瘤、中枢神经系统非典型畸胎样瘤/横纹肌样瘤、中枢神经系统胚胎性瘤、中枢神经系统生殖细胞肿瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、乳腺癌、支气管肿瘤、伯基特淋巴瘤(burkitt

lymphoma)、类癌肿瘤(例如儿童期、胃肠道)、心脏肿瘤、宫颈癌、脊索瘤、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、慢性骨髓增殖性病症、结肠癌、结肠直肠癌、颅咽管瘤、皮肤t细胞淋巴瘤、导管癌(例如胆管癌、肝外癌)、原位导管癌(DCIS)、胚胎性瘤、子宫内膜癌、室管膜瘤、食道癌、嗅神经母细胞瘤、颅外生殖细胞肿瘤、性腺外生殖细胞肿瘤、肝外胆管癌、眼癌(例如眼内黑素瘤、成视网膜细胞瘤)、恶性骨纤维组织细胞瘤,和骨肉瘤、胆囊癌、胃(胃部)癌、胃肠道类癌肿瘤、胃肠道间质瘤(GIST)、生殖细胞肿瘤(例如卵巢癌、睾丸癌、颅外癌、性腺外癌、中枢神经系统生殖细胞肿瘤)、妊娠滋养细胞肿瘤、脑干癌、毛细胞白血病、头颈癌、心脏病、肝细胞(肝)癌、组织细胞增多症、朗格汉斯细胞癌(langerhans cell cancer)、霍奇金淋巴瘤(Hodgkin lymphoma)、下咽癌、眼内黑素瘤、胰岛细胞瘤、胰腺神经内分泌肿瘤、卡波西氏肉瘤、肾癌(例如肾细胞癌、肾母细胞瘤(Wilm's tumor)以及其他肾肿瘤)、朗格汉斯细胞组织细胞增多症、喉癌、急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、急性髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、毛细胞白血病、唇和口腔癌、肝癌(原发性)、小叶原位癌(LCIS)、肺癌(例如儿童期肺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌)、淋巴瘤(例如AIDS相关淋巴瘤、伯基特淋巴瘤(例如非霍奇金淋巴瘤)、皮肤T细胞淋巴瘤(例如蕈样真菌病、塞扎里综合征(Sézary syndrome))、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、原发性中枢神经系统(CNS)淋巴瘤)、巨球蛋白血症、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(Waldenström macroglobulinemia)、男性乳腺癌、骨恶性纤维组织细胞瘤和骨肉瘤、黑素瘤(例如儿童期黑素瘤、眼内(眼睛)黑素瘤)、梅克尔细胞癌(merkel cell carcinoma)、间皮瘤、转移性鳞状颈癌、中线道癌、口腔癌、多发性内分泌肿瘤综合征、多发性骨髓瘤/浆细胞肿瘤、蕈样真菌病、骨髓增生异常综合征、慢性骨髓性白血病(CML)、多发性骨髓瘤、鼻腔和鼻旁窦癌、鼻咽癌、成神经细胞瘤、口腔癌、唇和口咽癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、胰腺神经内分泌肿瘤(胰岛细胞瘤)、乳头状瘤病、副神经节瘤、鼻旁窦和鼻腔癌、甲状腺旁腺癌、阴茎癌、咽癌、嗜铬细胞瘤、垂体瘤、浆细胞肿瘤、胸膜肺母细胞瘤、原发性中枢神经系统(CNS)淋巴瘤、前列腺癌、直肠癌、肾细胞(肾)癌、肾盂和输尿管癌、移行细胞癌、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、肉瘤(例如尤文肉瘤、卡波西氏肉瘤、骨肉瘤、横纹肌肉瘤、软组织肉瘤、子宫肉瘤)、塞扎里综合征、皮肤癌(例如黑素瘤、梅克尔细胞癌、基底细胞癌、非黑素瘤)、小肠癌、鳞状细胞癌、隐匿性原发性鳞状颈癌、胃部(胃)癌、睾丸癌、咽喉癌、胸腺瘤和胸腺癌、甲状腺癌、滋养细胞肿瘤、输尿管和肾盂癌、尿道癌、子宫癌、子宫内膜癌、子宫肉瘤、阴道癌、外阴癌、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症以及肾母细胞瘤。

[0112] 实施方案89:根据实施方案81至88中的任一个的方法,其中所述纳米颗粒药物载体不与iRGD肽缀合并且所述纳米颗粒药物载体联合iRGD肽施用。

[0113] 实施方案90:一种治疗感染的方法,所述方法包括:

[0114] 向有需要的受试者施用有效量的根据实施方案1至34或52至56中的任一个的纳米颗粒药物载体或根据实施方案73至80中的任一个的药物制剂,其中所述纳米颗粒药物载体和/或所述药物制剂中的药物包含抗微生物药物。

[0115] 实施方案91:实施方案81的方法,其中所述感染包括耐药性细菌、病毒,或真菌的感染。

[0116] 实施方案92:根据实施方案81至91中的任一个的方法,其中经由选自以下的途径施用所述纳米颗粒药物载体和/或药物制剂:静脉内施用、动脉内施用、脑内施用、鞘内施

用、口服施用、气溶胶施用、经由吸入施用(包括鼻内和气管内递送)、经由套管进行颅内施用以及皮下或肌内贮库沉积。

[0117] 实施方案93:根据实施方案81至91中的任一个的方法,其中所述纳米颗粒药物载体和/或药物制剂作为注射剂、从IV滴注袋,或经由药物递送套管施用。

[0118] 实施方案94:根据实施方案81至93中的任一个的方法,其中所述受试者是人类。

[0119] 实施方案95:根据实施方案81至93中的任一个的方法,其中所述受试者是非人类哺乳动物。

[0120] 实施方案96:一种制备纳米颗粒药物载体的方法,所述方法包括:提供包含二氧化硅的纳米颗粒,所述二氧化硅具有表面并且限定适于将药物分子容纳其中的多个孔隙;将捕集剂设置在包括所述多个孔隙的孔隙中,其中所述捕集剂是针对它将所述药物捕集在所述孔隙内的能力来选择的;用脂质双层包被所述纳米颗粒的孔隙;以及将所述包被有脂质双层的纳米颗粒与可以穿过所述双层的药物接触或浸泡,其中所述药物进入所述孔隙,与所述捕集剂反应并且保留在所述双层内。

[0121] 实施方案97:实施方案96的方法,其中所述脂质双层包含磷脂、胆固醇(CHOL)以及mPEG磷脂。

[0122] 实施方案98:根据实施方案96至97中的任一个的方法,其中所述磷脂包含具有C14-C20碳链的饱和脂肪酸,和/或具有C14-C20碳链的不饱和脂肪酸,和/或包含具有C12-C20碳链的脂肪酸的混合物的天然脂质。

[0123] 实施方案99:实施方案98的方法,其中所述磷脂包含选自以下的饱和脂肪酸:磷脂酰胆碱(DPPC)、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)以及二酰基磷脂酰胆碱(DAPC)。

[0124] 实施方案100:实施方案98的方法,其中所述磷脂包含选自以下的天然脂质:卵磷脂酰胆碱(卵PC)和大豆磷脂酰胆碱(大豆PC)。

[0125] 实施方案101:实施方案98的方法,其中所述磷脂包含选自以下的不饱和脂肪酸:1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二棕榈油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)以及1,2-二二十碳烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱。

[0126] 实施方案102:根据实施方案96至101中的任一个的方法,其中所述脂质双层包含具有磷脂C14-C18碳链和约350Da至5000Da范围内的PEG分子量的mPEG磷脂。

[0127] 实施方案103:实施方案102的纳米颗粒药物载体,其中所述脂质双层包含1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-PEG(DSPE-PEG)。

[0128] 实施方案104:实施方案97的方法,其中所述脂质双层包含DPPC/Chol/DSPE-PEG或DSPC/Chol/DSPE-PEG。

[0129] 实施方案105:实施方案104的方法,其中所述脂质双层包含DSPC/Chol/DSPE-PEG。

[0130] 实施方案106:实施方案105的方法,其中所述脂质双层包含DSPC/Chol/DSPE-PEG2000。

[0131] 实施方案107:根据实施方案96至106中的任一个的方法,其中所述脂质双层包含磷脂、胆固醇以及mPEG磷脂,它们的比率是50mol% - 90mol% 的磷脂:10mol% - 50mol% 的CHOL:1mol% - 10mol% 的mPEG磷脂。

[0132] 实施方案108:实施方案105的方法,其中所述脂质双层包含约3:2:0.15的摩尔比

的DSPC/Chol/DSPE-PEG。

[0133] 实施方案109:根据实施方案96至108中的任一个的方法,其中包含所述脂质双层的所述脂质与所述纳米颗粒以足以在整个纳米颗粒上形成连续双层的比率组合。

[0134] 实施方案110:根据实施方案96至109中的任一个的方法,其中包含所述脂质双层的所述脂质与所述纳米颗粒以从约1.0:3.0开始的范围内的颗粒:脂质比组合。

[0135] 实施方案111:根据实施方案96至109中的任一个的方法,其中包含所述脂质双层的所述脂质与所述纳米颗粒以约1.0:1.1的颗粒:脂质比组合。

[0136] 实施方案112:根据实施方案96至111中的任一个的方法,其中所述脂质双层形成包围整个纳米颗粒的基本上连续的双层。

[0137] 实施方案113:根据实施方案96至112中的任一个的方法,其中所述脂质双层形成包围整个纳米颗粒的基本上均匀且完整的双层。

[0138] 实施方案114:根据实施方案96至113中的任一个的方法,其中所述二氧化硅纳米颗粒是中孔二氧化硅纳米颗粒。

[0139] 实施方案115:实施方案114的方法,其中所述二氧化硅纳米颗粒包含溶胶-凝胶合成的中孔二氧化硅纳米颗粒。

[0140] 实施方案116:根据实施方案96至115中的任一个的方法,其中所述中孔二氧化硅纳米颗粒是尺寸控制的。

[0141] 实施方案117:根据实施方案96至116中的任一个的方法,其中所述中孔二氧化硅纳米颗粒是胶体稳定的。

[0142] 实施方案118:根据实施方案96至117中的任一个的方法,其中所述中孔二氧化硅具有约1nm至约20nm,或约1nm至约10nm,或约2nm至约8nm的范围内的平均孔径。

[0143] 实施方案119:根据实施方案96至118中的任一个的方法,其中所述中孔二氧化硅纳米颗粒具有以下范围内的平均尺寸:约50nm至约300nm,或约50nm至约200nm,或约50nm至约150nm,或约50nm至约100nm,或约50nm至约80nm,或约50nm至约70nm,或约60nm至约70nm。

[0144] 实施方案120:根据实施方案96至119中的任一个的方法,其中在与所述药物反应之前,运载物捕集剂选自蔗糖八硫酸酯三乙铵(TEA₈SOS)、(NH₄)₂SO₄、铵盐、三甲基铵盐以及三乙铵盐。

[0145] 实施方案121:实施方案120的方法,其中所述运载物捕集剂包含(NH₄)₂SO₄。

[0146] 实施方案122:实施方案120的方法,其中所述运载物捕集剂包含选自以下的铵盐:硫酸铵;蔗糖八硫酸酯铵; α -环糊精硫酸酯铵; β -环糊精硫酸酯铵; γ -环糊精硫酸酯铵;磷酸铵; α -环糊精磷酸酯铵; β -环糊精磷酸酯铵; γ -环糊精磷酸酯铵;枸橼酸铵;以及乙酸铵。

[0147] 实施方案123:实施方案120的方法,其中所述运载物捕集剂包含选自以下的三甲基铵盐:三甲基硫酸铵、蔗糖八硫酸酯三甲基铵、 α -环糊精硫酸酯三甲基铵、 β -环糊精硫酸酯三甲基铵、 γ -环糊精硫酸酯三甲基铵、三甲基磷酸铵、 α -环糊精磷酸酯三甲基铵、 β -环糊精磷酸酯三甲基铵、 γ -环糊精磷酸酯三甲基铵、三甲基枸橼酸铵以及三甲基乙酸铵。

[0148] 实施方案124:实施方案120的方法,其中所述运载物捕集剂包含选自以下的三乙铵盐:三乙基硫酸铵、蔗糖八硫酸酯三乙铵、 α -环糊精硫酸酯三乙铵、 β -环糊精硫酸酯三乙铵、 γ -环糊精硫酸酯三乙铵、三乙基磷酸铵、 α -环糊精磷酸酯三乙铵、 β -环糊精磷酸酯三乙铵、 γ -环糊精磷酸酯三乙铵、三乙基枸橼酸铵以及三乙基乙酸铵。

[0149] 实施方案125:实施方案120的方法,其中在与所述药物反应之前,运载物捕集剂是蔗糖八硫酸酯三乙铵(TEA₈SOS)。

[0150] 实施方案126:实施方案125的方法,其中所述药物被质子化并且在与SOS⁸⁻结合时作为凝胶状沉淀物被捕集在所述孔隙中。

[0151] 实施方案127:根据实施方案96至126中的任一个的方法,其中所述药物包含能够被质子化的至少一个弱碱性基团,并且所述运载物捕集剂包含至少一个阴离子基团。

[0152] 实施方案128:根据实施方案96至127中的任一个的方法,其中所述药物被选择为具有大于7并且小于11的pKa。

[0153] 实施方案129:根据实施方案96至128中的任一个的方法,所述药物包含伯胺、仲胺、叔胺或季胺。

[0154] 实施方案130:根据实施方案96至129中的任一个的方法,其中所述药物被选择为具有约5mg/mL至约25mg/mL的水溶性指数。

[0155] 实施方案131:根据实施方案96至130中的任一个的方法,其中所述运载物被选择为具有约-3.0至约3.0的辛醇/水分配系数或logP值。

[0156] 实施方案132:根据实施方案96至131中的任一个的方法,其中所述运载物被选择为2nm-8nm并且小于所述二氧化硅纳米颗粒的孔隙的平均尺寸或中值尺寸。

[0157] 实施方案133:根据实施方案127至132中的任一个的方法,其中所述运载物包含抗癌药物。

[0158] 实施方案134:实施方案133的方法,其中所述运载物包含伊立替康。

[0159] 实施方案135:实施方案133的方法,其中所述运载物包含独立地选自以下的一种或多种药物:拓扑异构酶抑制剂、抗肿瘤蒽环类抗生素、有丝分裂抑制剂、生物碱、碱性烷化剂、嘌呤或嘧啶衍生物、蛋白激酶抑制剂。

[0160] 实施方案136:实施方案135的方法,其中所述载体包含拓扑异构酶抑制剂,包括托泊替康。

[0161] 实施方案137:实施方案135的方法,其中所述载体包含选自以下的生物碱:托泊替康、10-羟基喜树碱、贝洛替康、卢比替康、长春瑞滨以及LAQ824。

[0162] 实施方案138:实施方案135的方法,其中所述载体包含选自多柔比星和米托蒽醌的抗肿瘤蒽环类抗生素。

[0163] 实施方案139:实施方案135的方法,其中所述载体包含选自长春碱和长春瑞滨的有丝分裂抑制剂。

[0164] 实施方案140:实施方案135的方法,其中所述载体包含选自环磷酰胺、氮芥以及替莫唑胺的碱性烷化剂。

[0165] 实施方案141:实施方案135的方法,其中所述载体包含选自以下的嘌呤或嘧啶衍生物:5-氟尿嘧啶、5'-脱氧-5-氟尿苷以及吉西他滨。

[0166] 实施方案142:实施方案135的方法,其中所述载体包含选自以下的蛋白激酶抑制剂:伊马替尼、奥希替尼和舒尼替尼、帕唑帕尼、恩扎妥林、凡德他尼、厄洛替尼、达沙替尼以及尼洛替尼。

[0167] 实施方案143:根据实施方案96至142中的任一个的方法,其中所述药物载体与选自以下的部分缀合:靶向部分、融合肽以及转运肽。

- [0168] 实施方案144:根据实施方案96至143中的任一个的方法,其中所述方法产生根据实施方案1至72中的任一个的纳米颗粒药物载体。
- [0169] 实施方案145:实施方案143的方法,其中所述药物载体与结合癌细胞上的受体的肽缀合。
- [0170] 实施方案146:实施方案145的方法,其中所述药物载体与iRGD肽缀合。
- [0171] 实施方案147:实施方案145的方法,其中所述药物载体与表2中所示的靶向肽缀合。
- [0172] 实施方案148:根据实施方案143至147中的任一个的方法,其中所述药物载体与转铁蛋白,和/或ApoE,和/或叶酸缀合。
- [0173] 实施方案149:根据实施方案143至148中的任一个的方法,其中所述药物载体与包含结合癌症标志物的抗体的靶向部分缀合。
- [0174] 实施方案150:实施方案149的方法,其中所述药物载体与包含结合表1中所示的癌症标志物的抗体的靶向部分缀合。
- [0175] 实施方案151:根据实施方案127至132中的任一个的方法,其中所述运载物包含抗生素。
- [0176] 实施方案152:实施方案151的方法,其中所述运载物包含选自以下的抗生素:环丙沙星、左氧氟沙星以及HIV抗逆转录病毒药(例如替诺福韦二吡呋酯富马酸盐等)。
- [0177] 实施方案153:根据实施方案96至152中的任一个的方法,其中所述药物载体被负载到以下容量:至少30%w/w,或大于约40%w/w,或大于约50%w/w,或大于约60%w/w,或大于约70%w/w,或大于约80%w/w。
- [0178] 实施方案154:根据实施方案96至152中的任一个的方法,其中所述药物载体被负载到至少80%w/w的容量。
- [0179] 实施方案155:根据实施方案96至154中的任一个的方法,其中所述脂质双层包含疏水性药物。
- [0180] 实施方案156:实施方案155的方法,其中所述脂质双层包含选自以下的疏水性药物:紫杉醇、玫瑰树碱、喜树碱、SN-38以及脂质前药(例如阿昔洛韦二磷酸酯二肉豆蔻酰甘油、多柔比星缀合的磷脂前药、核苷类似物的磷脂衍生物、磷脂连接的苯丁酸氮芥等)。
- [0181] 实施方案157:实施方案155的方法,其中所述脂质双层包含紫杉醇。
- [0182] 实施方案158:一种制备伊立替康纳米载体的方法,所述方法包括:提供纳米载体,所述纳米载体包含二氧化硅主体,所述二氧化硅主体具有表面,所述表面包括适于将伊立替康容纳其中的多个孔隙;设置针对将伊立替康捕集到所述多个孔隙内的能力选择的试剂;用磷脂双层包被所述纳米载体的孔隙(任选地使用超声处理方法);以及将伊立替康引入到所述磷脂双层包被的孔隙中,以制备磷脂双层包被的伊立替康纳米载体。
- [0183] 实施方案159:实施方案158的方法,其中所述二氧化硅主体包含溶胶-凝胶合成的、尺寸控制的以及胶体稳定的二氧化硅主体。
- [0184] 实施方案160:实施方案158的方法,其中所述伊立替康捕集剂是蔗糖八硫酸酯三乙铵(TEA_8SOS)。
- [0185] 实施方案161:实施方案160的方法,其中所述纳米载体:(a)具有至少20%(或30%或40%)w/w的伊立替康负载容量;和/或(b)在37°C下在具有7.4的pH值的生物缓冲液中在

24小时内显示出<5% (或<10%) 的伊立替康泄漏。

[0186] 实施方案162:实施方案161的方法,其中所述纳米载体在具有pH 7.4的生理流体中具有胶体稳定性并且保持单分散以允许全身性生物分布并且能够通过血管渗漏(EPR效应)或转胞吞进入疾病部位。

[0187] 实施方案163:实施方案161的方法,其中所述磷脂双层包含胆固醇和/或紫杉醇。

[0188] 实施方案164:一种制备纳米载体的方法,所述方法包括:提供未负载的纳米载体,所述未负载的纳米载体包含:二氧化硅主体,所述二氧化硅主体具有表面并且限定适于将分子容纳其中的多个孔隙;以及包被所述表面的磷脂双层;将运载物捕集剂封装在所述磷脂双层内。

[0189] 实施方案165:实施方案164的方法,所述方法还包括使所述纳米载体暴露于被选择为与所述运载物捕集剂相互作用的运载物。

[0190] 实施方案166:实施方案165的方法,其中所述运载物被选择为具有大于7并且小于11的pKa并且能够被质子化,并且所述运载物捕集剂包括至少一个阴离子基团。

[0191] 实施方案167:实施方案165的方法,其中所述运载物是伊立替康并且所述运载物捕集剂是蔗糖八硫酸酯三乙铵(TEA₈SOS)。

[0192] 实施方案168:实施方案165的方法,其中所述运载物是拓扑异构酶I抑制剂:托泊替康;一种或多种抗肿瘤蒽环类抗生素:多柔比星和米托蒽醌;一种或多种有丝分裂抑制剂:长春碱和长春瑞滨;或一种或多种酪氨酸激酶抑制剂:伊马替尼、奥希替尼以及舒尼替尼。

[0193] 实施方案169:实施方案165的方法,其中所述纳米载体具有至少30%w/w的药物负载容量。

[0194] 实施方案170:一种纳米载体,其包含:二氧化硅主体,所述二氧化硅主体具有表面并且限定适于将分子容纳其中的多个孔隙;包被所述表面的磷脂双层;以及所述磷脂双层内的运载物捕集剂;其中亚微米结构具有小于1微米的最大尺寸,并且其中所述磷脂双层稳定地密封所述多个孔隙。

[0195] 实施方案171:实施方案170的纳米载体,所述纳米载体在所述磷脂双层内还包含运载物。

[0196] 实施方案172:实施方案171的纳米载体,其中所述运载物与所述运载物捕集剂缔合。

[0197] 实施方案173:实施方案172的纳米载体,其中所述运载物包括能够被质子化的至少一个弱碱性基团,并且所述运载物捕集剂包括至少一个阴离子基团。

[0198] 实施方案174:实施方案171的纳米载体,其中所述运载物被选择为具有大于7并且小于11的pKa。

[0199] 实施方案175:实施方案171的纳米载体,其中所述运载物包含伯胺、仲胺、叔胺或季胺。

[0200] 实施方案176:实施方案171的纳米载体,其中所述运载物被选择为具有5mg/mL-25mg/mL的水溶性指数。

[0201] 实施方案177:实施方案171的纳米载体,其中所述运载物被选择为具有-3.0至3.0的辛醇/水分配系数或logP值。

[0202] 实施方案178:实施方案171的纳米载体,其中所述运载物被选择为2nm-8nm并且小于所述纳米载体的孔隙的尺寸。

[0203] 实施方案179:实施方案171的纳米载体,其中所述运载物是伊立替康并且所述运载物捕集剂是蔗糖八硫酸酯三乙铵(TEA₈SOS)。

[0204] 实施方案180:实施方案171的纳米载体,其中所述运载物是拓扑异构酶I抑制剂:托泊替康;一种或多种抗肿瘤蒽环类抗生素:多柔比星和米托蒽醌;一种或多种有丝分裂抑制剂:长春碱和长春瑞滨;或一种或多种酪氨酸激酶抑制剂:伊马替尼、奥希替尼以及舒尼替尼。

[0205] 实施方案181:实施方案171的纳米载体,其中所述纳米载体在37℃下在具有7.4的pH值的生物缓冲液中在24小时内具有少于5%的所述运载物的泄漏。

[0206] 实施方案182:实施方案171的纳米载体,其中所述纳米载体具有至少30%w/w的药物负载容量。

[0207] 实施方案183:实施方案171的纳米载体,其中所述纳米载体具有至少80%w/w的药物负载容量。

[0208] 实施方案184:实施方案170的纳米载体,其中所述磷脂双层包含紫杉醇。

[0209] 根据以下详细说明,本发明的其他目的、特征以及优势对本领域技术人员来说将变得显而易见。然而,应当了解的是,所述详细说明和具体实施例虽然表明了本发明的一些实施方案,但是以说明而非限制的方式给出的。可以进行落入本发明的范围内的许多变化和修改而不脱离其精神,并且本发明包括所有这样的修改。

[0210] 定义

[0211] 术语“受试者”、“个体”以及“患者”可以可互换地使用并且指的是人类以及非人类哺乳动物(例如非人类灵长类动物、犬科动物、马科动物、猫科动物、猪科动物、牛科动物、有蹄类动物、兔类动物等)。在各种实施方案中,所述受试者可以是在医院中作为门诊患者或其他临床背景下在医师或其他卫生工作者的护理下的人类(例如成年男性、成年女性、青少年男性、青少年女性、男性儿童、女性儿童)。在某些实施方案中,所述受试者可以不在医师或其他卫生工作者的护理或处方下。

[0212] 如本文所用的短语“有需要的受试者”指的是如下文所述的患有本文所述的纳米颗粒药物载体(二氧化硅体(silicasome))所针对的病变或有患所述病变的风险的受试者。因此,例如,在某些实施方案中,所述受试者是患有癌症(例如胰腺导管腺癌(PDAC)、乳腺癌(例如耐药性乳腺癌)、结肠癌、脑癌等)的受试者。在某些实施方案中,所述受试者是患有微生物感染的受试者,所述微生物感染包括但不限于耐药性微生物感染。

[0213] 术语“治疗”在关于治疗例如病变或疾病使用时指的是减轻和/或消除该病变或疾病的一种或多种症状,和/或延迟该病变或疾病的一种或多种症状的进展和/或降低该病变或疾病的一种或多种症状的发病率或严重程度,和/或预防该病变或疾病。术语治疗可以指的是预防性治疗,其包括延迟病变或疾病的发作或预防病变或疾病的发作。

[0214] 术语“共同施用”或“联合……施用”或“共同治疗”在关于第一化合物(例如含有伊立替康的二氧化硅体)和第二化合物(例如iRGD肽)的共同施用使用时表示施用第一化合物和第二化合物以使在接受它们的施用的生物体中第一化合物和第二化合物的生物活性存在至少一定的时间上的重叠。共同施用可以包括同时施用或顺序施用。在顺序施用中,在第

一化合物与第二化合物的施用之间甚至可以存在一定的实质性的延迟(例如数分钟或甚至数小时),只要它们的生物活性重叠即可。在某些实施方案中,共同施用在容许第一化合物和第二化合物对生物体产生增强的治疗作用或预防作用的时间范围内。在某些实施方案中,增强的作用是协同作用。

[0215] 术语“纳米载体”和“纳米颗粒药物载体”以及“二氧化硅体”是可互换使用的并且指的是纳米结构,所述纳米结构具有多孔颗粒核心,其与如本文所用的术语“多孔纳米颗粒”是可互换的;以及包裹(或围绕或包围)所述多孔颗粒核心的脂质双层。在某些实施方案中,所述二氧化硅纳米颗粒是多孔二氧化硅纳米颗粒(例如中孔二氧化硅纳米颗粒(MSNP))。

[0216] 如本文所用的术语“脂质”指的是常规的脂质、磷脂、胆固醇、用于连接PEG和配体的化学官能化的脂质等。

[0217] 如本文所用的术语“脂质双层”或“LB”指的是任何双层的定向两亲性脂质分子,其中烃尾面向内以形成连续的非极性相。

[0218] 如本文所用的术语“脂质体”指的是由脂质双层包围的水性隔室,如常规所定义的那样(参见例如Stryer(1981)Biochemistry,第2版,W.H.Freeman&Co.,第213页)。

[0219] 与二氧化硅体中所限定的脂质双层相比,脂质体中的脂质双层可以被称为“无支撑的脂质双层”并且脂质体本身(在未负载时)可以被称为“空脂质体”。二氧化硅体中的脂质双层可以被称为“被支撑的脂质双层”,这是因为二氧化硅体中的脂质双层位于表面上并且由多孔颗粒核心支撑。在某些实施方案中,所述脂质双层可以具有约6nm至约7nm的范围内的厚度,这包括疏水核心的3nm-4nm的厚度,加上水合亲水性头部基团层(各约0.9nm)加上各约0.3nm的两个部分水合区域。

[0220] 如本文所用的术语“选择性靶向”或“特异性结合”指的是在二氧化硅体(空的或负载的)的表面上,特别是在二氧化硅体的脂质双层的表面上使用靶向配体,其中所述配体与靶标,例如所关注的细胞表面上表达的受体或其他生物分子组分特异性/选择性地相互作用。靶向配体可以包括诸如肽、抗体、适体、靶向肽、多糖等分子和/或材料。

[0221] 具有靶向配体的二氧化硅体可以被称为“靶向二氧化硅体”。

[0222] 术语“二氧化硅体”指的是含有药物的(药物递送)二氧化硅纳米颗粒,其中所述二氧化硅纳米颗粒被脂质双层(例如磷脂双层)完全覆盖。在某些实施方案中,所述二氧化硅纳米颗粒是多孔二氧化硅纳米颗粒(例如中孔二氧化硅纳米颗粒)。

[0223] 如本文所用的术语“约”或“近似”指的是在如由本领域的普通技术人员所确定的具体值的可接受的误差范围内,这将部分地取决于所述值是如何测量或确定的,即测量系统的限制,即特定目的,如药物制剂所需的精确度。举例来说,根据本领域中的惯例,“约”可以意指在1倍标准偏差或多于1倍标准偏差内。或者,“约”可以意指给定值的最多20%,优选地最多10%,更优选地最多5%,并且还更优选地最多1%的范围。或者,特别是对于生物系统或方法,所述术语可以意指在值的一个数量级内,优选地在5倍内,并且更优选地在2倍内。除非另有说明,否则在本申请和权利要求书中描述具体值的情况下,应当假定术语“约”意指在具体值的可接受的误差范围内。

[0224] 如本文所用的术语“药物”指的是在动物和人类中表现出治疗作用的不同分子尺寸(小的和大的)、天然存在或合成的化学实体。药物可以包括但不限于有机分子(例如小有

机分子)、治疗性蛋白质、肽、抗原,或其他生物分子、寡核苷酸、siRNA、编码CRISPR cas9组分和任选的一个或多个向导RNA的构建体等。

[0225] 如本文所用的“药学上可接受的载体”被定义为标准药学上可接受的载体中的任一种。本发明的药物组合物可以根据用于制备药学上有用的组合物的已知方法来配制。药学上可接受的载体可以包括稀释剂、佐剂,和媒介物以及载体,和惰性无毒固体或液体填充剂、稀释剂,或不与本发明的活性成分反应的封装材料。实例包括但不限于磷酸盐缓冲盐水、生理盐水、水以及乳液,如油/水乳液。载体可以是溶剂或分散介质,其含有例如乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等)、其合适的混合物以及植物油。制剂描述于本领域技术人员公知的和容易获得的许多来源中。举例来说,Remington's Pharmaceutical Sciences (Martin E W[1995]宾夕法尼亚州的伊斯顿(Easton Pa.),麦克出版公司(Mack Publishing Company),第19版)描述了可以联合本文所述的二氧化硅体使用的制剂。

[0226] 如本文所用的“抗体”指的是由基本上由免疫球蛋白基因或免疫球蛋白基因的片段编码或由其衍生的一个或多个多肽组成能够结合(例如特异性结合)靶标(例如靶多肽)的蛋白质。公认的免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 以及 μ 恒定区基因以及无数免疫球蛋白可变区基因。轻链被分类为 κ 或 λ 。重链被分类为 γ 、 μ 、 α 、 δ ,或 ϵ ,其进而分别限定了免疫球蛋白类别IgG、IgM、IgA、IgD以及IgE。

[0227] 已知典型的免疫球蛋白(抗体)结构单元包含四聚体。每一个四聚体由两对相同的多肽链构成,每一对具有一条“轻”链(约25kD)和一条“重”链(约50kDa-70kDa)。每一条链的N末端限定了主要负责抗原识别的具有约100个至110个或更多个氨基酸的可变区。术语可变轻链(V_L)和可变重链(V_H)分别指的是这些轻链和重链。

[0228] 抗体作为完整免疫球蛋白或作为通过用各种肽酶消化所产生的许多充分表征的片段存在。因此,例如,胃蛋白酶在铰链区中的二硫键下消化抗体以产生 $F(ab')_2$,即Fab的二聚体,其本身是通过二硫键与 V_H -C $_H1$ 连接的轻链。 $F(ab')_2$ 可以在温和条件下被还原以破坏铰链区中的二硫键,从而将 $(Fab')_2$ 二聚体转化成Fab'单体。Fab'单体基本上是具有一部分铰链区的Fab(关于其他抗体片段的更详细的说明,参见Fundamental Immunology, W.E.Paul编著,Raven Press,N.Y. (1993))。虽然各种抗体片段是用完整抗体的消化来定义的,但是本领域技术人员将了解的是,这样的Fab'片段可以通过化学方法或通过利用重组DNA方法来从头合成。因此,如本文所用的术语抗体还包括通过修饰全抗体所产生的或使用重组DNA方法从头合成的抗体片段。某些优选的抗体包括单链抗体(作为单一多肽链存在的抗体),更优选地是单链Fv抗体(sFv或scFv),其中可变重链和可变轻链连接在一起(直接或经由肽接头)以形成连续的多肽。单链Fv抗体是共价连接的 V_H - V_L 异二聚体,其可以由包括直接连接或通过肽编码接头连接的 V_H 编码序列和 V_L 编码序列的核酸表达。Huston等人,(1988) Proc.Nat.Acad.Sci.USA,85:5879-5883。虽然 V_H 和 V_L 相互连接成单一多肽链,但是 V_H 结构域和 V_L 结构域非共价缔合。待在丝状噬菌体的表面上表达的第一功能性抗体分子是单链Fv(scFv),然而,替表达策略也是成功的。举例来说,如果所述链(重链或轻链)之一与g3衣壳蛋白融合并且互补链作为可溶性分子输出到外周胞质中,那么可以将Fab分子展示在噬菌体上。这两条链可以在相同的或不同的复制子上编码;重要的是,每一个Fab分子中的两条抗体链在翻译后组装并且经由使所述链之一与例如g3p连接而将所述二聚体并入噬菌体颗粒中(参见例如美国专利号:5733743)。scFv抗体和将天然聚集的,但是化学分离的轻链

多肽和重链多肽从抗体V区转化成折叠成基本上类似于抗原结合位点的结构的三维结构的分子的许多其他结构是本领域技术人员已知的(参见例如美国专利号5,091,513、5,132,405以及4,956,778)。在某些实施方案中,抗体应当包括已经在噬菌体上展示的所有抗体(例如scFv、Fv、Fab以及二硫键连接的Fv(参见例如Reiter等人(1995)Protein Eng. 8:1323-1331)以及亲和体、单抗体等)。

[0229] 在提到生物分子(例如蛋白质、核酸、抗体等)时,如本文所用的术语“特异性结合”指的是确定分子(例如蛋白质和其他生物制剂)的异质群体中生物分子的存在的结合反应。因此,在指定的条件(例如在抗体的情况下,是免疫测定条件或在核酸的情况下,是严格杂交条件)下,指定的配体或抗体与它的特定的“靶”分子结合并且不以显著量与样品中存在的其他分子结合。

附图说明

[0230] 现在参考附图,其中相同的附图标记始终表示相应的部件:

[0231] 图1A-1E图示了根据本文所述的一个或多个实施方案,使用质子化剂进行药物负载的LB-MSNP和脂质体伊立替康载体的制备。图1A示出了描绘LB-MSNP和脂质体的合成方法和对伊立替康的负载的示意图(图1A,图A1)。在将TEA₈SOS浸入MSNP颗粒中之后,将孔隙由LB密封,这源自于对脂质生物膜进行超声处理(Lu等人(2007)Small, 3:1341-1346)。图1A的图A2:将TEA₈SOS浸泡的颗粒在伊立替康溶液中温育,从而允许所述两亲性药物扩散穿过脂质双层以由TEA₈SOS质子化($\text{TEA}_8\text{SOS} \leftrightarrow 8\text{TEA} + 20\text{H}^+ + \text{SOS}^{8-}$)。脂溶性TEA离开颗粒,而H⁺将伊立替康转化成不能穿过LB的亲水性衍生物。质子化的药物与SOS⁸⁻相互作用以形成凝胶状沉淀物,其保留在孔隙中。图1A的图A3:使用相同的技术产生用于伊立替康包封的脂质体等同物(Drummond等人(2006)Cancer Res., 66(6):3271-3277)。图1B:对Ir-MSNP载体和Ir-脂质体载体的药物负载容量(DLC)的评估。DLC[伊立替康的总量(m₀)-未封装的伊立替康(m₁)]/[颗粒的总量(m_{MSNP}或m_{脂质})]×100%。将TEA₈SOS包括在内对颗粒的流体动力学尺寸和ζ电位的影响可忽略不计。流体动力学尺寸和ζ电位数据示于表3(实施例2)中。图1C:空的、未包被的MSNP、Ir-MSNP以及Ir-脂质体载体的CryoEM图像。所述技术灵敏到足以将脂质体中的伊立替康沉淀可视化。图1D:通过在37°C下在100%血清中温育24小时,并且通过HPLC确定药物泄漏来评估载体稳定性。图1E)如通过在冻干和水重悬之后流体动力学直径的变化和药物泄漏%所确定的载体稳定性。

[0232] 图2A-2D图示了根据本文所述的一个或多个实施方案,Ir-LB-MSNP和Ir-脂质体的生物分布。图2A:在48小时内的间隔IVIS成像,以比较静脉内注射的NIR标记的载体向KPC衍生的原位肿瘤部位的生物分布(n=3)。示出了在静脉内注射100mg/kg的NIR标记的LB-MSNP或脂质体之后代表性动物中的NIR荧光图像。图2B:在相同实验中外植器官的离体成像;在24小时之后将动物处死。共聚焦显微镜术确认了在肿瘤部位处,与脂质体相比,NIR标记的LB-MSNP的丰度更高。图2C:在原位KPC衍生的异种移植模型(n=3)中确定伊立替康肿瘤含量。对于不同药物制剂,动物接受60mg/kg的伊立替康剂量当量的静脉内注射。在24小时之后处死动物,随后收集肿瘤组织以通过HPLC测量伊立替康含量。伊立替康含量被表示为每克肿瘤组织的总注射剂量%(ID%/g)。数据表示平均值±SD,*p<0.05。图2D:在相同的实验中对血浆伊立替康浓度的HPLC测量。数据表示平均值±SD,*p<0.05。

[0233] 图3A-3E示出了根据本文所述的一个或多个实施方案,在KPC衍生的原位肿瘤模型中,游离药物和封装的伊立替康载体的差异肿瘤抑制作用。图3A:使用NCI方案,在急性剂量探索研究中对MTD的评估。图3B:在每4天一次静脉内施用40mg/kg的游离药物或封装的伊立替康,进行最多8次施用之后,对B6/129小鼠的KPC衍生的原位肿瘤的生长抑制。使用间隔IVIS成像来监测肿瘤生长,其根据操作人员限定的ROI处的图像强度来定量表示。图3C:在处理之后动物(在第40天-第47天处死)的原发肿瘤部位处的细胞凋亡的定量分析(使用针对切割的胱天蛋白酶-3的IHC染色)。图3D:在垂死动物(在第40天-第47天处死)中的代表性尸检结果和生物发光强度的离体成像,以显示处理对周围转移的影响。可以在胃、肠、肝脏、脾脏、肾脏、横隔膜以及腹壁中看到可见的转移性扩散。心或肺没有浸润。图3E:热图显示以汇总通过(图3D)中的定量离体成像所确定的肿瘤扩散的比较分析。数据表示平均值±SEM,*p<0.05。

[0234] 图4A-4E图示了根据本文所述的一个或多个实施方案,Ir-LB-MSNP和Ir-脂质体的毒性降低的比较分析。图4A:使用来自图3B中所示的实验的组织,从代表性的垂死动物(在第40天-第47天处死)获得的肝脏组织学。H&E染色的切片中的箭头指向坏死的肝脏组织,而标有星号的部位表示脂肪变性。比例尺是200 μm 。图4B:在接受60mg/kg的剂量当量的不同伊立替康制剂,继而在24小时之时被处死的动物的肝脏中切割的胱天蛋白酶-3(细胞凋亡标志物,红色)和F4/80(KC标志物,绿色)的双重IHC染色。将核用Hoechst 33342(蓝色)染色。比例尺=100 μm 。图4C:针对切割的胱天蛋白酶-3的IHC染色,用H&E复染揭示在图3B中所研究的相同的处理动物组中细胞凋亡的扩散和肠绒毛的变钝。比例尺代表100 μm 。图4D:单独的实验,其中使用每隔一天静脉内注射(3次)的40mg/kg剂量当量的伊立替康来研究对胸骨骨髓的影响。在第7天收集胸骨以用于包埋、脱钙以及H&E染色。比例尺代表200 μm 。图4E:解释Ir-LB-MSNP制剂和Ir-脂质体制剂在肝脏中的差异肝毒性的示意图。不受具体理论所束缚,据考虑,注射的纳米载体最初由KC摄取,其中载体崩解引起伊立替康释放到旁观者肝细胞。后续的载体崩解和药物向肝细胞释放的速率可以决定伊立替康是否被代谢并且变得无活性的程度。进一步假设的是,与更稳定的Ir-LB-MSNP相比,脂质体载体的不稳定性更高会导致更快的药物释放,这解释了在细胞凋亡和坏死方面的差异。

[0235] 图5图示了根据本发明的一个或多个实施方案,描绘脂质双层包被的中孔二氧化硅纳米颗粒(LB-MSNP)的合成程序和TEA₈SOS介导的伊立替康(IRIN)负载的机制的示意图。使用溶胶/凝胶化学方法合成MSNP。首先将TEA₈SOS(内部合成)与MSNP一起温育。在这之后,使用我们的生物膜技术(Meng等人(2015)ACS Nano, 9 (4):3540-3557)沉积LB包衣。将TEA₈SOS浸泡的MSNP添加到干脂质生物膜(例如3:2:0.15摩尔比的DSPC/胆固醇/DSPE-PEG)中,继而在超声处理时进行孔隙密封。在去除游离的捕集剂之后,将负载TEA₈SOS的LB-MSNP与伊立替康一起温育。这允许游离的亲脂性的伊立替康扩散到颗粒中以被质子化并且捕集在孔隙中。该反应如下进行:由于LB-MSNP内部捕集剂的存在,因此“TEA₈SOS \leftrightarrow 8TEA-H⁺+SOS⁸⁻”的平衡引起脂质可渗透的三乙胺(TEA)流出到颗粒温育介质中。颗粒内部H⁺的释放产生pH值梯度,该pH值梯度引起扩散穿过LB的亲脂性伊立替康的质子化。脂质不可渗透的质子化的IRIN与SOS⁸⁻相互作用以形成沉淀物,从而引起LB-MSNP中有效的IRIN包封。

[0236] 图6A和6B示出了根据本文所述的一个或多个实施方案,含有捕集试剂的负载伊立替康的LB-MSNP(Ir-LB-MSNP(+SOS))和使用捕集试剂的负载伊立替康的脂质体(Ir-Lipo(+

SOS))的形态和药物释放曲线。图6A: Ir-LB-MSNP (+SOS) (上图) 和Ir-Lipo (+SOS) (下图) 的 CryoEM图像 (TF20, FET) 。可以明显地看到MSNP表面上包被的脂质双层。上部放大图像示出了在颗粒表面上具有完整脂质包衣的MSNP, 而多孔内部示出了TEO₈SOS与伊立替康之间高密度复合物的存在。类似地, 在脂质体图像(下图)中, 可以看到作为内部的高密度沉淀物(标有红色箭头)的伊立替康-捕集剂复合物。图6B: 在PBS (pH值=7.4) 和吞噬溶酶体模拟流体 (PSF, pH 4.5) 中Ir-LB-MSNP (+SOS) 和Ir-Lipo (+SOS) 的药物释放曲线。对于药物释放测量, 在PBS或PSF (1mL, 伊立替康0.1mg/mL) 中制备NP, 继而在37℃下振荡。在所示的时间点, 通过具有30kD的尺寸截止值的离心过滤器单元将释放的伊立替康与NP分离。通过酶标仪, 在360nm的OD处确定滤液中的伊立替康浓度。将所述实验重复至少两次。

[0237] 图7图示了根据本文所述的一个或多个实施方案, 如通过共聚焦显微镜所确定的 Ir-LB-MSNP (+SOS) 和Ir-Lipo (+SOS) 的细胞摄取和细胞内分布。将LB-MSNP和脂质体通过脂质双层中0.1%w/w的德克萨斯红 (Texas red)-DHPE进行荧光标记。将这两种颗粒与PANC-1细胞一起温育24小时, 然后在PBS中洗涤三次。在细胞固定并且用PBS洗涤之后, 将细胞膜用 WGA 488染色并且将核用Hoechst染料染色。使用共聚焦显微镜将载玻片可视化。

[0238] 图8的图A-F图示了根据本发明的一个或多个实施方案, Ir-LB-MSNP (+SOS) 和Ir-Lipo (+SOS) 或游离药物的比较细胞毒性分析。图8的图A-C: 在用所示浓度的游离IRIN、Ir-LB-MSNP (+SOS) 以及Ir-Lipo (+SOS) 处理后, 通过MTS测定确定PANC-1细胞的细胞活力。还以不同的时间间隔 (24小时、48小时以及72小时) 进行实验。图8的图D-F: 在如对于PANC-1细胞所述的不同药物浓度和时间点用游离IRIN、Ir-LB-MSNP (+SOS) 以及Ir-LB-MSNP (+SOS) 处理之后BxPC-3细胞的细胞活力。

[0239] 图9示出了根据本文所述的一个或多个实施方案, 对骨髓的组织学分析。在用游离 IRIN、Ir-Lipo (+SOS) 以及Ir-LB-MSNP (+SOS) 处理之后的骨髓组织学。以60mg/kg的药物剂量向BALB/c雄性小鼠静脉内注射IRIN、Ir-Lipo (+SOS) 或Ir-LB-MSNP (+SOS) 。在24小时之后, 将小鼠处死并且收集胸骨并且将其在10%福尔马林中固定。将切片用苏木精-伊红 (H&E) 染色, 并且通过光学显微镜术检查。数据表明LB-MSNP制剂和脂质体制剂这两者都降低了由伊立替康诱导的骨髓去除。在游离药物组中可以看到严重的骨髓损伤和细胞凋亡。

[0240] 图10示出了根据本文所述的一个或多个实施方案, 对肾的组织学分析。在用游离 IRIN、Ir-Lipo (+SOS) 以及Ir-LB-MSNP (+SOS) 处理之后对肾的组织学分析。以60mg/kg的药物剂量向BALB/c雄性小鼠静脉内注射IRIN、Ir-Lipo (+SOS) 或Ir-LB-MSNP (+SOS) 。在24小时之后, 将小鼠处死并且收集肾并且将其在10%福尔马林中固定, 继而进行石蜡包埋。将4μm 厚度的组织切片封固在载玻片上。将切片用苏木精-伊红 (H&E) 染色, 并且通过光学显微镜术检查。在游离IRIN或Ir-Lipo (+SOS) 处理的动物中观测到显示出肾小囊腔 (Bowman's space) (标有箭头) 的肿胀和水肿的代表性组织学图像。这些病变指示了急性肾小球炎症。在Ir-LB-MSNP (+SOS) 组中没有发现显著的肾脏异常。

[0241] 图11示出了根据本发明的一个或多个实施方案, 代表性的负载伊立替康的LB-MSNP的低分辨率cyroEM图像。比例尺代表100nm。目视检查约500个颗粒确认了LB的结构完整性,>99%的颗粒被成功包被。

[0242] 图12的图A-F示出了根据本发明的一个或多个实施方案, 进行H&E染色以显示在植入B6/129小鼠体内之后5周, KPC衍生的肿瘤浸润到周围器官中。拍摄代表性的图像以显示

对胰腺(图A)、肝脏(图B)、脾脏(图C)、肾脏(图D)、肠(图E)以及胃(图F)的浸润。比例尺尺寸是 $200\mu\text{m}$ 。

[0243] 图13示出了根据本文所述的一个或多个实施方案,在图2A中的KPC衍生模型中静脉内注射NIR标记的颗粒后48小时拍摄的离体IVIS图像。这表明了对于等同的颗粒剂量,与标记的脂质体相比,在肿瘤部位处LB-MSNP的丰度增加。

[0244] 图14示出了根据本发明的一个或多个实施方案,在静脉内注射LB-MSNP (100mg/kg) 并且在24小时之时处死动物之后,B6/129小鼠(n=3)的KPC衍生的原位肿瘤模型中LB-MSNP的生物分布。收集肿瘤组织和主要器官以使用电感耦合等离子体光发射光谱法测量Si含量。颗粒生物分布被表示为每一个位置的总注射Si剂量% (ID%)。数据表示平均值±SD。

[0245] 图15A示出了在裸小鼠(n=3)的皮下PANC-1异种移植模型中确定的伊立替康肿瘤含量。对于不同药物制剂,动物接受60mg/kg的伊立替康剂量当量的静脉内注射。在24小时之后处死动物之后,收集肿瘤组织以通过HPLC测量伊立替康含量。伊立替康含量被表示为每克肿瘤组织的总注射剂量% (ID%/g)。数据表示平均值±SD, MSNP与其他组相比,*p<0.05。图15B示出了在静脉内注射100mg/kg NIR标记的LB-MSNP之后24小时,代表性动物中的NIR荧光图像。

[0246] 图16示出了B6/129小鼠的周围器官中伊立替康含量的HPLC定量。对于不同药物制剂,动物接受60mg/kg的伊立替康剂量当量的静脉内注射(n=3)。在24小时之后处死动物之后,收集组织以通过HPLC测量伊立替康含量。伊立替康含量被表示为每克组织的总注射剂量% (ID%/g)。数据表示平均值±SD,*p<0.05。

[0247] 图17示出了代表性图像以显示在图3B中所述的实验中从每一个动物组(在第40天-第47天处死)中的原发肿瘤部位获得的原发肿瘤部位处针对切割的胱天蛋白酶-3(细胞凋亡标志物)的IHC染色。凋亡细胞(棕色)以红色箭头指示。比例尺=50 μm 。

[0248] 图18示出了根据本发明的一个或多个实施方案,图3B中所述的功效研究的每一个处理组中动物的死亡率。x轴上的箭头表示注射日。经常监测小鼠并且基于“垂死标准”(Zucker等人(2009) J.Control.Release, 139(1):73-80) 处死小鼠而不是自发死亡。与盐水和游离伊立替康相比,负载伊立替康的LB-MSNP引起显著(p<0.01,通过使用SPSS19.0 (IBM SPSS Statistics,美国) 进行对数秩检验来比较) 存活改善。与Ir-脂质体相比,对于Ir-LB-MSNP观测到更好的存活结果。

[0249] 图19示出了根据本发明的一个或多个实施方案,对从图4D中所述的实验中获得的样品进行全血计数分析。白细胞分类计数显示对游离药物或Ir-脂质体处理组进行的绝对中性粒细胞计数的显著降低。相反,用Ir-LB-MSNP进行的处理显示出中性粒细胞计数的小幅而非显著的下降。数据表示平均值±SEM,与对照组相比,*p<0.05,与LB-MSNP组相比,#p<0.05。

[0250] 图20示出了根据本文所述的一个或多个实施方案,不同药物载体的肝脏中伊立替康含量的HPLC定量。对于不同药物制剂,动物接受60mg/kg的伊立替康剂量当量的静脉内注射(n=3)。分别在0.5小时、4小时、24小时之后处死动物之后,收集肝脏组织以通过HPLC测量伊立替康含量。伊立替康含量被表示为每克肝脏组织的总注射剂量% (ID%/g)。数据表示平均值±SD,*p<0.05。

[0251] 图21A和21B图示了用于药物负载和可视化的二氧化硅体的合成和表征。图21A:上

图提供了示出了用于构建二氧化硅体和远程药物负载的合成步骤的示意图(参见实施例1和Liu等人(2016)ACS Nano.10 (2) :2702-2715)。简单地说,通过溶胶-凝胶化学方法合成MSNP核心并且将其浸泡在含有质子化剂TEA₈SOS的溶液中。使用超声处理程序,在脂质生物膜存在下,将这些颗粒用LB包被(同上)。在这之后,穿过由TEA₈SOS提供的质子梯度进行远程伊立替康负载。方框1:不同二氧化硅体组分的示意图。方框2:iRGD肽与LB的缀合,使用硫醇-顺丁烯二酰亚胺反应以使半胱氨酸修饰的iRGD肽与DSPE-PEG₂₀₀₀-顺丁烯二酰亚胺连接。方框3:Cryo-EM图像,示出了在有和没有约10nm的Au核心的嵌入(用于TEM可视化)的情况下裸颗粒和二氧化硅体。合成程序描述于实施例3补充材料和方法中。比例尺=50nm。图21B:免疫活性B6/129小鼠的KPC衍生的原位PDAC模型的尸检和IVIS图像。原位植入涉及在胰腺尾中注射 2×10^6 个KPC-1uc细胞的小手术(左图)。尸检和生物发光成像揭示在1周-2周之后发生原发肿瘤生长,继而到3周-5周时发生肿瘤转移。宏观转移由箭头标出。

[0252] 图22A和22B示出了在KPC衍生的原位模型中共同施用iRGD增强了静脉内注射的二氧化硅体的肿瘤生物分布。图22A:荷瘤小鼠接受(i)静脉内50mg/kg的NIR标记的二氧化硅体IV与8μmol/kg游离iRGD的共同施用(n=3,被称为“二氧化硅体+iRGD”);(ii)50mg/kg的NIR标记的与iRGD缀合的二氧化硅体(n=3,被称为“二氧化硅体-iRGD”);或(iii)不含iRGD的50mg/kg NIR标记的二氧化硅体。在注射后24小时将动物处死,继而使用IVIS进行离体NIR成像。图22B:使用NIR荧光强度和Si含量来定量原位肿瘤中的纳米颗粒含量。数据表示平均值±SD,*p<0.05。

[0253] 图23A-23E示出了在KPC衍生的原位模型中,iRGD共同施用增强了Ir-二氧化硅体的摄取和功效。图23A:表达荧光素酶的KPC衍生的原位肿瘤模型(n=6)中功效研究的时间表。所选择的Ir-二氧化硅体剂量(40mg/kg伊立替康;80mg/kg MSNP)是基于先前的功效研究(Liu等人(2016)ACS Nano.10 (2) :2702-2715)。在共同施用或不共同施用8μmol/kg iRGD的情况下,静脉内注射该剂量的Ir-二氧化硅体。将注射每3天重复一次,总共4次施用。对照组包括仅接受相同剂量的游离iRGD或Ir-二氧化硅体的动物组。图23B:在处死之前小鼠中生物发光强度的代表性离体成像,以显示原发肿瘤负荷和转移。所述图像显示iRGD共同施用可以增强二氧化硅体功效。图23C:汇总图23B中对肿瘤和肿瘤转移抑制的影响的热图。图23D:iRGD共同施用提高了Ir-二氧化硅体的存活率影响,如通过卡普兰-迈耶分析(Kaplan-Meier analysis)所示。与PBS和游离iRGD相比,单独的二氧化硅体的作用是非常显著的(p=0.001)。iRGD共同施用进一步提高存活率(p=0.027)。图23E:在共同施用或不共同施用8μmol/kg iRGD的情况下,注射一次剂量的Ir-二氧化硅体(40mg/kg药物)之后24小时,肿瘤中伊立替康含量的HPLC分析。数据表示平均值±SD(n=3),*p<0.05。

[0254] 图24A和24C示出了iRGD介导的二氧化硅体摄取需要肿瘤血管系统上的NRP-1表达。图24A:说明iRGD引发纳米颗粒转胞吞的机制的示意图。图24B:KPC衍生的肿瘤切片中NRP-1(绿色)和CD31(红色)的多色IHC染色,加上核染色(蓝色)。IHC染色方法描述于方法部分中。NRP-1在肿瘤组织以及血管上均表达。合并图像显示NRP-1与CD31的高度共定位(94.2%);通过Image J软件确定共定位比(CR)。比例尺=100μm。图24C:抗NRP-1抗体对iRGD介导的二氧化硅体生物分布的干扰。在静脉内注射50mg/kg的NIR-二氧化硅体+8μmol/kg游离iRGD之前15分钟静脉内注射50μg的阻断抗体或对照IgG(n=3)。示出了24小时之后的纳米颗粒生物分布的离体NIR图像。使用NIR强度以及Si含量来定量原位肿瘤部位处的纳

米颗粒摄取。数据表示平均值±SD,*p<0.05。

[0255] 图25A-25C提供了通过iRGD共同施用所引发的二氧化硅体转运系统的超微结构观察。图25A:在共同施用或不共同施用8 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ iRGD的情况下,向携带原位肿瘤的小鼠注射50mg/kg的Au-二氧化硅体。在24小时收获肿瘤并且立即固定以进行TEM分析。观察每一组中至少10个所关注的区域以定量地表示血管内皮细胞中分组的互连的囊泡(黄色箭头)的丰度。我们计算了每1 μm^2 细胞内表面积的囊泡数量(左图)。数据表示平均值±SD,*p<0.05。示出了具有高放大倍数和低放大倍数的代表性TEM照片。L=管腔;R=血红细胞。图25B:接受50mg/kg的Au-二氧化硅体,然后在24小时后被处死的荷瘤小鼠中的二氧化硅体转胞吞的TEM可视化。电子显微镜照片显示二氧化硅体:(i)在肿瘤血管的管腔中(红色箭头);(ii)在内皮囊泡中转运(粉红色箭头)以及在肿瘤间质中沉积(蓝色箭头)。区域“1”-“3”的高放大倍数图像提供于右图中。E=内皮细胞;L=管腔;P=周细胞;R=血红细胞。图25C:示出了癌细胞内部核周分布中二氧化硅体的存在的TEM图像。N=核;M=线粒体。

[0256] 图26A-26B图示了NSG小鼠中源自于患者的异种移植物中iRGD诱导的二氧化硅体生物分布。图26A:选择具有匹配的基质丰度,但是具有不同的NRP-1表达水平的一对肿瘤(XWR#8和XWR#187)以在不存在和存在iRGD共同施用的情况下进行生物分布研究。马松三色染色(Masson's trichrome staining)显示在这两个肿瘤中胶原表达的水平等同。使用多色IHC染色(NRP-1的绿色荧光抗体、CD31的红色荧光抗体)以使用image J软件确定NRP-1表达的相对丰度和与内皮细胞重叠的程度。数据表示平均值±SD,*p<0.05。图26B:在共同施用或不共同施用8 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ iRGD的情况下,荷瘤动物接受50mg/kg NIR标记的二氧化硅体的静脉内注射。在24小时之后将动物处死(n=3)。如通过NIR荧光强度和Si含量所确定的二氧化硅体的摄取的离体评估。数据表示平均值±SD,*p<0.05。

[0257] 图27的图A-C图示了使用硫醇-顺丁烯二酰亚胺反应使iRGD与二氧化硅体上的脂质双层成功共价缀合。为了验证共价缀合的成功,使用由Ruosahti博士提供的反应性荧光素(FAM)标记的iRGD肽(Sugahara等人(2009)Cancer Cell,16:510-520)与DSPE-PEG-顺丁烯二酰亚胺结合。详细的方法描述于实施例3方法部分中。图A:在酶标仪(Molecular Device M5e)中在488nm的激发波长处获得以100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 悬浮的原始二氧化硅体和FAM-iRGD-二氧化硅体的荧光光谱,洗涤和纯化的FAM-iRGD-二氧化硅体上荧光信号的显著保留确认了成功的缀合反应(Cancer Cell 2009,16:510)。图B和C:测试iRGD缀合对二氧化硅体在它对细胞摄取的影响方面的影响。合成一批二氧化硅体-iRGD,对MSNP框架进行NIR标记(DyLight 680),如方法部分中所述。在37°C下以100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的颗粒浓度将KPC细胞处理2小时并且通过流式细胞术(图B)和共聚焦显微镜术(图C)测定摄取。使用具有类似标记效率的无iRGD的NIR-二氧化硅体作为对照。数据表示平均值±SD,*p<0.05。共聚焦显微镜术确认了所述结果(细胞膜被小麦胚芽凝集素染成绿色并且核被Hoechst 33342染成蓝色)。比例尺=20 μm 。

[0258] 图28的图A-B图示了对非功能性肽(缺少CendR基序)对静脉内二氧化硅体生物分布的影响的评估。图A:我们使用非CendR肽环状(RGDfK)来重复在图22中所示的在原位模型中进行的生物分布实验。简单地说,荷瘤动物接受与PBS或8 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 游离环状(RGDfK)共同施用的50mg/kg的NIR标记的二氧化硅体的静脉内注射,继而在24小时之时将动物处死(n=3)。获得代表性离体器官NIR荧光图像以显示纳米颗粒生物分布。图B:NIR荧光强度分析(通

过IVIS软件)和Si含量的确定(通过ICP-OES)显示非CendR肽不能提高肿瘤部位处二氧化硅体的摄取。数据表示平均值±SD。

[0259] 图29的图A-B图示了通过共聚焦显微镜术评估肿瘤中的二氧化硅体转运。图A:从图22中的实验中获得肿瘤切片。在SP2-1P-FCS Leica显微镜下,使用633nm激光获得代表性共聚焦图像以评估NIR标记的二氧化硅体丰度的肿瘤内丰度。对相同切片进行IHC染色以检查血管的存在(绿色的CD31)和核的存在(蓝色的DAPI染色)允许我们使用Sugahara等人(2010) Science, 328:1031-1035所述的方法确定肿瘤组织中纳米颗粒的存在和迁移。比例尺=20μm。图B:使用Image J软件针对约15根血管估计二氧化硅体距离最接近的肿瘤血管的穿透距离的计算。开发箱须图(Origin软件)以显示中值(水平线)、第25个-第75个百分位数(箱)、平均值(空心正方形)以及SD(须)。与单独的二氧化硅体或二氧化硅体-iRGD相比,*p<0.05。

[0260] 图30示出了使用从图22中所用的动物获得的器官,通过ICP-OES分析确定肝脏(左侧)和脾脏(右侧)中的Si含量。数据表示平均值±SD,与二氧化硅体组或“二氧化硅体+iRGD”组相比,*p<0.05。

[0261] 图31示出了来自之前(24小时)接受50mg/kg Au嵌入式二氧化硅体的注射而没有接受iRGD共同施用的动物的KPC衍生的肿瘤的代表性TEM图像。所述图像显示不存在转胞吞囊泡,颗粒沉积在近腔侧上。E=内皮细胞,L=管腔。

[0262] 图32图示了原生细胞(protoce11)技术与二氧化硅体技术之间的比较的结果。

具体实施方式

[0263] 为了解决高毒性率,同时维持或提高治疗功效,提供药物递送纳米载体以增强靶部位(例如肿瘤部位、感染部位等)处的药物递送(例如化疗药物、抗微生物药物等),同时限制可以引起全身毒性的游离药物的量。期望的是,载体本身维持稳定的药物负载以防止毒性并且提高功效。在由各种癌细胞建立的动物肿瘤模型中使用纳米载体递送化疗剂已经证实了这样的纳米载体与游离药物等同物相比延长药物循环半衰期、向肿瘤部位递送高药物浓度而具有提高的细胞毒性杀伤以及降低全身毒性的能力(参见例如Messerer等人(2004) Clin.Cancer Res.10 (19) :6638-6649; Drummond等人(2006) Cancer Res.66 (6) :3271-3277; Ramsay等人(2008) Clin.Cancer Res.14 (4) :1208-1217)。

[0264] 鉴于许多脂质体载体未能提高高毒性药物,如伊立替康的安全性,因此本文提供了新型纳米颗粒药物载体,所述载体使用施加于二氧化硅纳米颗粒(例如中孔二氧化硅纳米颗粒(MSNP))的脂质双层(LB),从而提供被支撑的脂质双层。这些脂质双层包被的多孔二氧化硅纳米颗粒(也被称为二氧化硅体)提供了与脂质体相比显著更少泄漏的药物载体(Meng等人(2013) ACS Nano, 7 (2) :994-1005; Meng等人(2011) ACS Nano, 5 (5) :4131-4144; Meng等人(2013) ACS Nano, 7 (11) :10048-10065; Meng等人(2015) ACS Nano, 9 (4) :3540-3557)。由于可以用于药物包装的大内表面积、可调的孔径、载体稳定性以及受控的药物释放能力,因此MSNP已经被证实为构成用于癌症治疗的通用和多功能纳米载体平台(Meng等人(2013) ACS Nano, 7 (2) :994-1005; Meng等人(2011) ACS Nano, 5 (5) :4131-4144; Meng等人(2013) ACS Nano, 7 (11) :10048-10065; Meng等人(2015) ACS Nano, 9 (4) :3540-3557; Meng等人(2010) J.Am.Chem.Soc.132 (36) :12690-12697; Li等人(2012) Chem.Soc.Rev.41 (7) :

2590-2605; Tang等人(2012)Adv. Mat. 24 (12): 1504-1534; Tarn等人(2013)Acc. Chem. Res. 46 (3): 792-801)。然而,有效负载脂质双层包被的二氧化硅颗粒的方法受到限制,通常提供约10重量%至40重量%的范围内的负载。

[0265] 在各种实施方案中,本文提供了新的负载方法,所述方法实现了脂质双层包被的纳米颗粒药物载体的显著更大的负载。一般来说,所述新的负载方法利用运载物捕集试剂以将运载物(例如所关注的一种或多种药物)保留在脂质双层内部纳米颗粒的孔隙内。更确切地说,在某些实施方案中,所述方法可以包括:

[0266] 提供纳米载体,所述纳米载体包含多孔二氧化硅主体,所述多孔二氧化硅主体包含能够容纳运载物(例如所关注的药物)的多个孔隙;

[0267] 将捕集剂(运载物捕集剂)设置在所述多个孔隙内,其中所述捕集剂是针对它将所述运载物捕集在所述孔隙内的能力来选择的;

[0268] 用脂质双层包被所述纳米载体的表面孔隙;以及将所述运载物引入到所述由所述脂质双层包被的孔隙中,其中所述运载物与所述捕集剂反应并且保留在所述孔隙内。

[0269] 在某些实施方案中,所述捕集剂包含质子化剂并且所述方法包括提供可以穿过脂质双层进入所述双层包被的多孔纳米颗粒中的一种或多种药物。多孔纳米颗粒中的质子化剂将所述药物转化成亲水性衍生物,所述亲水性衍生物不能反向扩散穿过所述脂质双层。

[0270] 在实施例1中所示的说明性的而非限制性的实施方案中,通过溶胶-凝胶化学方法合成MSNP核心并且将其浸泡在含有质子化剂TEA₈SOS的溶液中。在具有对于双层稳定性来说最佳组成的脂质生物膜存在下,使用超声处理程序,将这些颗粒用LB包被。在这之后,通过由TEA₈SOS提供的质子梯度进行远程伊立替康负载。伊立替康是可以扩散穿过LB进入MSNP内部包装空间中的弱碱性和两亲性分子,其中先前包封的蔗糖八硫酸酯三乙铵(TEA₈SOS)的质子释放将所述药物转化成亲水性衍生物,所述亲水性衍生物不能反向扩散穿过LB。使用这种方法,实现高负载容量(例如大于40重量%,或大于45重量%,或大于50重量%,或大于60重量%,或大于70重量%,或大于80重量%等)。

[0271] 使用本文所述的方法产生的脂质双层纳米颗粒药物载体(LB-MSNP或“二氧化硅体”)提供了许多优势。将合成LB-MSNP的现有生物膜包被方法与诸如TEA₈SOS的质子化剂组合提供了颗粒状载体中诸如伊立替康的药物的主动和高剂量负载,所述载体与脂质体相比显示出许多优势。这些优势包括但不限于易于合成、改进的药物负载和释放特征、提高的稳定性以及改进的生物分布。在某些说明性而非限制性实施方案中,与在MSNP中LB后面被动的药物封装相比,这种远程负载方法使得伊立替康的负载容量增加到4倍或更大。使用本文所述的方法,未封装的伊立替康通过扩散穿过LB而进入MSNP孔隙中,于是质子化使得伊立替康变成亲水性的并且不能逃逸。

[0272] 此外,纳米载体的负载容量增加使得癌症部位处的药物递送增加,在其中伊立替康会引起毒性的诸如骨髓和胃肠道(GIT)的部位处可获得的游离药物更少。在一个实例中,与MM-398的内部脂质体等同物(42.5重量%的负载容量)相比,LB-MSNP具有提高的负载容量(83.5重量%的伊立替康负载)。在优化负载时间、捕集剂浓度以及提供用于负载的伊立替康的量之后,LB-MSNP制剂的实施方案在酸性pH值(4.5)下已经显示出是脂质体制剂的3倍-5倍的释放容量。伴随的剂量调整允许施用更小的药物剂量来获得相同的功能,从而引起全身药物毒性的进一步降低。在一个实例中,在计算最大耐受剂量(MTD)时,LB-MSNP的实

施方案显示出耐受剂量提高到游离药物的5倍。增加的MTD类似于脂质体制剂。对骨髓组织学的分析显示伊立替康毒性由LB-MSNP大幅降低。

[0273] 此外,与制备常规的脂质体或由Zhang等人(2104) *Biomaterials*, 35 (11) :3560-3665使用的聚合物-脂质技术相比,本文所述的合成/负载方法更容易进行。这对于按比例扩大到GMP制造是有利的,包括通过减少未封装的药物的量来节约成本。

[0274] 虽然所述方法和由此产生的纳米颗粒药物载体(二氧化硅体)在本文是关于伊立替康描述的,但是应当了解的是,如下文所解释的那样,所述方法可以应用于许多其他运载物(例如包含一种或多种药物的运载物)。此外,鉴于本文提供的教导,认为在许多其他药物的情况下,药物递送(在靶标上)的提高,和/或毒性降低,和/或生物分布改进,和/或释放特征改进将使用本文所述的方法和组合物来实现。

[0275] 因此,在某些实施方案中,描述了基于LB-MSNP的纳米载体递送系统,其允许在运载物捕集剂的帮助下以高负载水平实现稳定的和受保护的运载物负载。在一些实施方案中,所述运载物可以是药物。通过改进的LB-MSNP封装和捕集进行药物递送允许更频繁地使用药物封装,例如化疗药物,这是因为功效增强、药物负载容量高以及全身毒性降低。从纳米载体设计的角度来看,这种系统的各种实施方案,例如LB-MSNP内的多阴离子运载物捕集剂被用作有效的设计原理以用于递送多种另外的弱碱性分子和药物以治疗几种不同类型的癌症和其他疾病过程。

[0276] 在一个实例中,对于伊立替康,通过改进的LB-MSNP封装和捕集程序进行的递送允许在人类PDAC患者中更频繁地使用伊立替康和FOLFIRINOX,这是因为功效增强、药物负载容量高以及伊立替康的全身毒性降低。这还允许更多的PDAC患者接受比吉西他滨更高效的治疗方案的治疗,有望提高存活率。最终,提供了一种用于PDAC治疗的静脉内可注射的、有效的、生物相容的以及转化上有竞争力的伊立替康制剂(相比于MM398脂质体)。特别是鉴于本文所述的方法和所得的纳米颗粒药物载体,伊立替康和FOLFIRINOX治疗还可能可用于治疗其他癌症,包括但不限于结肠癌、直肠癌、肺癌以及卵巢癌。

[0277] 本文公开的二氧化硅体递送系统是一种多功能的平台。中孔二氧化硅药物载体已经被证实能够向癌细胞以及动物中的多种人类癌症模型递送广泛的运载物。这些包括向小鼠的异种移植物和原位PDAC肿瘤共同递送吉西他滨和紫杉醇。此外,MSNP是可生物降解的并且在广泛的动物测试中被证明是安全的(Meng等人(2013) *ACS Nano*, 7 (2) :994-1005; Meng等人(2011) *ACS Nano*, 5 (5) :4131-4144; Meng等人(2013) *ACS Nano*, 7 (11) :10048-10065; Meng等人(2015) *ACS Nano*, 9 (4) :3540-3557; Tang等人(2012) *Adv. Mat.* 24 (12) :1504-1534; Tarn等人(2013) *Acc. Chem. Res.* 46 (3) :792-801; Zhang等人(2012) *J. Am. Chem. Soc.* 134 (38) :15790-15804; Lu等人(2010) *Small*, 6 (16) :1794-1805)。

[0278] 鉴于本文所述的提高的负载、所得的药物代谢动力学特征等,认为本文所述的负载方法、脂质双层组成以及所得纳米颗粒药物载体的稳定性与先前的纳米颗粒药物载体相比提供了显著的改进和优势。

[0279] 负载脂质双层包被的多孔纳米颗粒的方法

[0280] 在各种实施方案中,提供了改进的负载脂质双层包被的多孔纳米颗粒(例如中孔二氧化硅颗粒)的方法以及通过这样的方法产生的药物递送纳米颗粒。在某些实施方案中,本文所述的方法实现了非常高水平的药物负载,例如大于40重量%,或大于45重量%,或大

于50重量%，或大于60重量%，或大于70重量%，或大于80重量%等。

[0281] 如上所述，在某些实施方案中，所述方法可以包括：

[0282] 提供纳米载体，所述纳米载体包含多孔二氧化硅主体，所述多孔二氧化硅主体包含能够容纳运载物(例如所关注的药物)的多个孔隙；

[0283] 将捕集剂(运载物捕集剂)设置在所述多个孔隙内，其中所述捕集剂是针对它将所述运载物捕集在所述孔隙内的能力来选择的；

[0284] 用脂质双层包被所述纳米载体的表面孔隙；以及

[0285] 将所述运载物引入到所述由所述脂质双层包被的孔隙中，其中所述运载物与所述捕集剂反应并且保留在所述孔隙内。

[0286] 虽然多阴离子化合物TEA₈SOS先前从未被用于MSNP平台中，但是它被用于MM-398中以包封伊立替康(Drummond等人(2006)Cancer Res., 66 (6) :3271-3277)。然而，在本文所述的研究之前，尚不清楚TEA₈SOS是否可以用于以比其他负载或浸入方法显著更高的水平有效进行多孔纳米颗粒的远程负载。

[0287] 如实施例中所述，TEA₈SOS是质子产生剂，其在水解时释放八个H⁺离子和八价SOS⁸⁻(图1A, 图A2)。使用离子交换色谱法产生TEA₈SOS，将其浸入MSNP中，如下文在方法部分中所述的那样(同上)。将浸泡的颗粒引入包被有脂质生物膜的圆底烧瓶中，所述脂质生物膜由3:2:0.15的摩尔比的DSPC/胆固醇/DSPE-PEG2000构成。对悬浮液进行超声处理产生LB包被的颗粒，这些颗粒含有包封剂(图1A, 图A1)。立即将这些颗粒在伊立替康溶液中温育，从而允许所述药物被导入，质子化，并且在与SOS⁸⁻结合时作为凝胶状沉淀物被包封在所述孔隙中(图1A的图A1和A2、图1B)。这允许我们实现高达80重量%或更大的伊立替康负载容量(图1B)，这近似于具有850m²/g的组合表面积和约0.7cm³/g的孔体积的多孔载体的理论最大负载容量(约100重量%)，如先前所证实(Meng等人(2015)ACS Nano, 9 (4) :3540-3557)。

[0288] 虽然所述方法是关于使用药物伊立替康以及作为捕集剂的TEA₈SOS来说明的，但是将认识到的是，在已经证实原理论证的情况下，可以使用相同的方法将许多其他药物(特别是弱碱性药物)并入二氧化硅体中并且可以类似地利用许多其他捕集剂，例如如本文所述。

[0289] 由于药物负载容量是重要的制造考虑因素，其对治疗有效性和药物毒性的限制也是至关重要的，因此许多研究已经致力于优化MSNP的药物封装的功效，从而使得负载容量提高以及能够共同递送协同药物组合。虽然有可能通过传统的浸泡方法将诸如伊立替康的药物引入到MSNP中，但是这种负载方法已经被证明是相对低效的，实现约10重量%的负载水平(参见例如He等人(2010)Biomaterials, 31 (12) :3335-3346)，并且难以将药物保留在孔隙中(参见例如Meng等人(2010)J. Am. Chem. Soc. 132 (36) :12690-12697)。不同于依赖于物理吸附、静电附着、超分子组装或使用包封方法(例如塞、纳米阀门或阻挡实体)的传统药物负载方法，使用设置在多孔纳米颗粒上的完整脂质双层包衣为药物包封提供了快速和瞬时的孔隙密封。这简化了合成并且提供了稳定和高的药物负载容量。本文所述的方法有效地将多孔颗粒负载以高水平的运载物并且与这种用脂质双层进行的快速和瞬时的孔隙密封是相容的。

[0290] 生物膜技术已经被开发用于LB包被的MSNP平台，所述平台可以用于通过被支撑的LB快速封装吉西他滨(GEM)(例如水溶性核昔)(Meng等人(2015)ACS Nano, 9 (4) :3540-

3557)。这不仅允许LB-MSNP实现高达40重量%GEM的负载容量,而且还使得能够共同递送可以被并入脂质双层(LB)中的疏水性紫杉醇(PTX)(Meng等人(2015)ACS Nano,9(4):3540-3557)。这已经在小鼠的原位人类PDAC模型中为PDAC治疗提供了协同和比率计量设计的载体(同上)。

[0291] 这种被支撑的LB包被方法还已经被证实远远优于用于MSNP的类似的脂质体包被技术,所述技术包括几个步骤,包括脂质体粘附到MSNP表面,破裂,通过不完整的包衣部分覆盖MSNP表面,所述不完整的包衣其次通过添加额外的脂质体组合物来密封(Liu等人(2009)J.Am.Chem.Soc.131:7567-7569)。

[0292] 然而,虽然脂质双层(LB)的存在提供了对先前的药物递送纳米颗粒的改进,但是在利用本文所述的远程负载方法之前,所述双层仍然对实现甚至更高的药物负载水平造成了阻碍。

[0293] 如上所述,在各种实施方案中,LB-MSNP平台的药物负载已经得到进一步提高,这是通过使用LB封装质子化剂作为第一步骤,继而进行伊立替康负载来实现的,这取决于药物的弱碱性特性($pK_a=8.1$)。如本文的实施例中所示,在MSNP载体与脂质体等同物之间进行比较,在所述脂质体等同物中,在封装蔗糖八硫酸酯三乙铵(TEA₈SOS)之后,使用无支撑的LB进行伊立替康负载(Drummond等人(2006)Cancer Res.,66(6):3271-3277;Von Hoff等人(2013)Br.J.Cancer,109(4):920-925)。MSNP载体不仅在稳健的原位PDAC模型中实现了比脂质体制剂更高的伊立替康负载容量和肿瘤杀伤,而且它还由于与脂质体相比增加的载体稳定性和减少的泄漏而防止了药物毒性。因此,LB-MSNP平台表现出用于PDAC(或其他癌症)治疗的一线伊立替康载体所期望的特性。

[0294] 最近,聚合物-脂质支撑式包被方法已经由Zhang等人描述用于MSNP的伊立替康药物负载以治疗Balb/c裸小鼠中的耐药性乳腺癌肿瘤(Zhang等人(2014)Biomaterials,35(11):3650-3665)。然而,与本文所述的方法和组合物相比,该参考文献中所述的方法是不同的,并且没有实现相同的药物负载容量。首先,Zhang等人没有使用典型的LB或捕集剂,从而产生仅具有本文提供的载体(约83.5%,w/w)的1/5的负载容量(约15%,w/w)的载体。

[0295] 第二个主要的差异在于药物负载程序。作者陈述,将“CPT-11@MSN”离心并且在PBS(pH 7.4)中洗涤,然后在真空下在室温下干燥。相反,本文所述的方法不需要干燥未受保护的MSNP。干燥MSNP可能是有问题的,这是因为难以在水性介质中重悬时获得分散体,这对于全身药物递送是一个关键的要求。除此之外,本发明的方法不需要在孔隙密封之前洗涤负载药物(例如伊立替康)的MSNP,这使得药物损失减到最低限度,并且有助于高负载容量(例如约83.5%(w/w))。

[0296] 第三个主要的差异是LB配方的组成。在一个或多个实施方案中,使用可商购获得的脂质加上胆固醇的混合物(例如DSPC/胆固醇/DSPE-PEG),而Zhang等人使用内部合成的pH值敏感性Pluronic P123接枝的DOPE。Pluronic的使用显然是基于它用作药物流出抑制剂的能力(参见例如Batrakova等人(2004)Pharm.Res.21(12):2226-2233),因此是基于治疗耐药性乳腺癌的考虑。包被的双层中不存在胆固醇会降低平台的流动性和稳定性。相反,二氧化硅体中胆固醇的存在有助于本文公开的LB-MSNP的优良的稳定性(参见实施例)。此外,在所提供的载体中伊立替康的封装在37°C下在具有7.4的pH值的生物缓冲液中在24小时内显示出<5%的泄漏。这比由Zhang等人(2014)Biomaterials,35:3650-3665所述的过早

泄漏(在pH7.4和37°C下在24小时内约16%的泄漏)低2.5×。

[0297] 与由Zhang等人所述的药物递送平台的另一个差异是本发明的各种实施方案使用探针超声处理来进行生物膜再水化和孔隙密封,继而进行离心纯化或尺寸排阻色谱法。另一方面,Zhang等人利用了膜挤出法,就如同对于脂质体那样。此外,使用CTAC作为MSNP合成的模板剂,而Zhang等人利用CTAB。最终,本发明解决了用于PDAC和其他癌症的治疗的开发,并且不是主要被设计成克服耐药性,就如同Zhang等人所述的用于乳腺癌研究的药物递送颗粒那样。综上所述而不受具体理论所束缚,认为本文所述的脂质双层包被的纳米颗粒药物载体(例如递送伊立替康的LB-MSNP)基于药物负载容量、胶体稳定性、易于生产性以及血液和体液中稳定的药物保留提供了优于Zhang等人的载体的独特的设计。

[0298] 纳米颗粒

[0299] 在各种实施方案中,本文所述的纳米颗粒药物载体包含包被有脂质双层的多孔二氧化硅纳米颗粒(例如具有表面并且限定适于将分子容纳其中的多个孔隙的二氧化硅主体)。举例来说,在某些实施方案中,所述二氧化硅纳米颗粒可以是中孔二氧化硅纳米颗粒。所述纳米颗粒被称为二氧化硅纳米颗粒的事实并不排除除二氧化硅以外的材料也被并入二氧化硅纳米颗粒内。在一些实施方案中,二氧化硅纳米颗粒可以是基本上球形的,具有穿过表面的多个孔隙开口,从而提供进入孔隙的通路。然而,在各种实施方案中,二氧化硅纳米颗粒可以具有除基本上球形以外的形状。因此,例如,在某些实施方案中,二氧化硅纳米颗粒可以是基本上卵形的、棒形的、基本上正多边形、不规则多边形等。

[0300] 一般来说,所述二氧化硅纳米颗粒包含二氧化硅主体,所述二氧化硅主体限定孔隙开口之间的外表面上以及孔隙内的侧壁。所述孔隙可以延伸穿过二氧化硅主体到达另一个孔隙开口,或孔隙可以仅部分延伸穿过二氧化硅主体以使得它具有由二氧化硅主体限定的底表面。

[0301] 在一些实施方案中,所述二氧化硅主体是中孔的。在其他实施方案中,所述二氧化硅主体是微孔的。如本文所用的“中孔”意指具有具约2nm至约50nm的直径的孔隙,而“微孔”意指具有具小于约2nm的直径的孔隙。一般来说,所述孔隙可以具有任何尺寸,但是在典型的实施方案中,大到足以将一种或多种治疗化合物容纳其中。在这样的实施方案中,所述孔隙允许小分子,例如治疗化合物,如抗癌化合物粘附或结合到所述孔隙的内表面,并且在用于治疗目的时,从二氧化硅主体释放。在一些实施方案中,所述孔隙是基本上圆柱形的。

[0302] 在某些实施方案中,所述纳米颗粒包含在直径上具有约1nm至约10nm或约2nm至约8nm的孔径的孔隙。在某些实施方案中,所述纳米颗粒包含具有约1nm至约6nm,或约2nm至约5nm的孔径的孔隙。其他实施方案包括具有小于2.5nm的孔径的颗粒。在其他实施方案中,孔径是1.5nm至2.5nm。具有其他孔径的二氧化硅纳米颗粒可以制备,例如通过在制备二氧化硅纳米颗粒期间使用不同的表面活性剂或溶胀剂来制备。

[0303] 在各种实施方案中,所述纳米颗粒可以包括大到约1000nm(例如平均直径或中值直径或其他特征尺寸)的颗粒。然而,在各种实施方案中,所述纳米颗粒通常小于500nm或小于约300nm,这是因为一般来说,大于300nm的颗粒在进入活细胞或血管窗孔方面可能不太有效。在某些实施方案中,纳米颗粒的尺寸在从约40nm,或从约50nm,或从约60nm到约100nm,或到约90nm,或到约80nm,或到约70nm的范围内。在某些实施方案中,所述纳米颗粒的尺寸在约60nm至约70nm的范围内。一些实施方案包括具有约50nm至约1000nm的平均最大

尺寸的纳米颗粒。其他实施方案包括具有约50nm至约500nm的平均最大尺寸的纳米颗粒。其他实施方案包括具有约50nm至约200nm的平均最大尺寸的纳米颗粒。在一些实施方案中，平均最大尺寸大于约20nm、大于约30nm、大于40nm，或大于约50nm。其他实施方案包括具有小于约500nm、小于约300nm、小于约200nm、小于约100nm或小于约75nm的平均最大尺寸的纳米颗粒。如本文所用的纳米颗粒的尺寸指的是主要颗粒的平均尺寸或中值尺寸，如通过透射电子显微镜术(TEM)或类似的可视化技术所测量。

[0304] 说明性中孔二氧化硅纳米颗粒包括但不限于MCM-41、MCM-48以及SBA-15(参见例如Katiyar等人(2006)J.Chromatog.1122(1-2):13-20)。

[0305] 制备多孔二氧化硅纳米颗粒的方法是本领域技术人员公知的。在某些实施方案中，通过使原硅酸四乙酯(TEOS)与由胶束棒制成的模板反应来合成中孔二氧化硅纳米颗粒。结果是纳米尺寸的球体或棒的集合，其填充有孔隙的规则排列。然后可以通过用被调节到适当pH值的溶剂洗涤来去除模板(参见例如Trewyn等人(2007)Chem.Eng.J.137(1):23-29)。在某些实施方案中，中孔颗粒也可以使用简单的溶胶-凝胶法合成(参见例如Nandiyanto等人，(2009)Microporous and Mesoporous Mat.120(3):447-453等)。在某些实施方案中，原硅酸四乙酯也可以与另外的聚合物单体(作为模板)一起使用。在某些实施方案中，使用(3-巯基丙基)三甲氧基硅烷(MPTMS)代替TEOS。

[0306] 在某些实施方案中，所述中孔二氧化硅纳米颗粒是通过Meng等人(2015)ACS Nano, 9(4):3540-3557所述的溶胶/凝胶程序的修改方案来合成的核心。为了合成一批约500mg的MSNP，将50mL的CTAC与150mL的H₂O在烧瓶(例如500mL锥形烧瓶)中混合，继而搅拌(例如以350rpm在85℃搅拌15分钟)。在这之后，在相同的温度下添加8mL的10%三乙醇胺，持续30分钟。然后，使用蠕动泵以1mL/min的速度逐滴添加7.5mL的二氧化硅前体TEOS。将溶液在85℃以350rpm搅拌20分钟，从而引起具有约65nm的主要尺寸的颗粒形成。可以通过在室温下将颗粒用甲醇/HCl(500:19v/v)的混合物洗涤24小时来去除表面活性剂。可以将颗粒以10 000rpm离心60分钟并且在甲醇中洗涤三次。

[0307] 虽然已经关于多孔二氧化硅纳米颗粒(例如中孔二氧化硅)的负载说明了本文所述的负载方法，但是将认识到的是，类似的负载方法可以与其他多孔纳米颗粒一起使用。可以用于药物递送纳米颗粒中的许多其他中孔材料是本领域技术人员已知的。举例来说，在某些实施方案中，可以利用中孔碳纳米颗粒。中孔碳纳米颗粒是本领域技术人员公知的(参见例如Huang等人(2016)Carbon, 101:135-142; Zhu等人(2014)Asian J.Pharm.Sci., 9(2):82-91;等)。

[0308] 类似地，在某些实施方案中，可以利用中孔聚合物颗粒。通过蒸发诱导的自组装策略从三嵌段共聚物与可溶性低分子量酚醛树脂前体(甲阶酚醛树脂)的有机-有机组装合成高度有序的中孔聚合物和碳框架已经由Meng等人(2006)Chem.Mat.6(18):4447-4464和其中引用的参考文献报道。

[0309] 本文所述的纳米颗粒是说明性的而非限制性的。使用本文提供的教导，许多其他脂质双层药物递送纳米颗粒将是本领域技术人员可获得的。

[0310] 脂质双层。

[0311] 本文所述的药物载体纳米颗粒包含包被有脂质双层的多孔纳米颗粒(例如中孔二氧化硅纳米颗粒(MSNP))。在某些实施方案中，优化双层组成以提供快速和均匀的颗粒包

被、以提供胶体稳定性和循环稳定性以及以提供有效的运载物保留,同时还容许所期望的运载物释放特征。

[0312] 在某些实施方案中,所述脂质双层包含以下各项的组合:磷脂、胆固醇以及在某些实施方案中,聚乙二醇化的脂质(例如DSPE-PEG₂₀₀₀),或官能化的聚乙二醇化脂质(例如DSPE-PEG₂₀₀₀-顺丁烯二酰亚胺)以有助于与靶向部分或其他部分缀合。

[0313] 为了附着表面LB包衣,开发了包被的脂质膜程序,其中将药物或TEA₈SOS浸泡的MSNP悬浮液添加到包被在例如圆底烧瓶上的大脂质膜表面。使用不同的脂质双层组成,可以进行一系列实验以找到在超声处理时提供快速和均匀的颗粒包裹、包被以及有效的运载物保留和/或释放的组成和最佳的脂质/颗粒比。认为该脂质组成和包裹不能通过在低能量涡旋条件下脂质体融合到颗粒表面来实现。

[0314] 如实施例1中所述,在某些实施方案中,将500mg MSNP浸泡在20mL TEA₈SOS(80mM溶液)中,将其添加在脂质生物膜的顶部上,所述脂质生物膜包含DSPC/Chol/DSPE-PEG₂₀₀₀(摩尔比3:2:0.15)的550mg混合物,包被在圆底烧瓶的底部(参见实施例1以及Liu等人(2016)ACS Nano.10(2):2702-2715)。如果使用mol%来表示比率,那么“3:2:0.15”的比率等于“58.3mol%:38.8mol%:3.9mol%”。这提供了约1.1:1的脂质:颗粒比。在进行超声处理以完成LB对颗粒的包裹和包被之后,通过在琼脂糖凝胶CL-4B柱上进行尺寸排阻色谱法去除游离TEA₈SOS。在水浴中在65°C将负载TEA₈SOS的二氧化硅体在10mg/mL的伊立替康溶液中温育以进行药物负载。在30分钟之后通过在冰水浴中淬灭来停止负载,之后,通过离心将负载药物的二氧化硅体洗涤3次并且重悬在PBS中。

[0315] 上文和实施例1中所述的脂质双层配方是说明性的而非限制性的。在各种实施方案中,根据被负载到二氧化硅体中的一种或多种药物和提供的所期望的释放,可以使用不同的脂质双层配方并且可以确定最佳的配方。

[0316] 因此,在某些实施方案中,所述脂质双层可以包含:1)具有C14-C20碳链的一种或多种饱和脂肪酸,如二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)、二棕榈油酰基磷脂酰胆碱(DPPC)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)以及二酰基磷脂酰胆碱(DAPC);和/或2)具有C14-C20碳链的一种或多种不饱和脂肪酸,如1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二棕榈油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)、1,2-二二十碳烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱;和/或3)包含具有C12-C20碳链的脂肪酸的混合物的天然脂质,如卵PC以及大豆PC、鞘磷脂等。这些脂质是说明性的而非限制性的并且许多其他脂质是已知的并且可以被并入脂质双层中以形成二氧化硅体。

[0317] 在某些实施方案中,所述二氧化硅体含有脂质(例如磷脂)、胆固醇以及PEG官能化的脂质(例如mPEG磷脂)。在某些实施方案中,mPEG磷脂包含C14-C18磷脂碳链和350-5000的PEG分子量(例如MP EG 5000、MPEG 3000、MPEG 2000、MPEG 1000、MPEG 750、MPEG 550、MPEG 350等)。在某些实施方案中,mPEG磷脂包含DSPE-PEG5000、DSPE-PEG3000、DSPE-PEG2000、DSPE-PEG1000、DSPE-PEG750、DSPE-PEG550,或DSPE-PEG350。MPEG是可商购获得的(参见例如//avantilipids.com/product-category/products/polymers-polymerizable-lipids/mpeg-phospholipids/)。

[0318] 在某些实施方案中,磷脂:CHOL:PEG的比率是约磷脂(50mol%-90mol%):CHOL(10mol%-50mol%):PEG(1mol%-10mol%)。

[0319] 上文和实施例中提供的这种方案是说明性的。在某些实施方案中,可以改变捕集剂,可以改变脂质组成和摩尔比,并且可以改变一种或多种药物以鉴定针对一种或多种特定的运载物优化的其他二氧化硅体。

[0320] 应当指出的是,例如,用于含有吉西他滨的二氧化硅体的有效脂质配方包含77.5:20:2.5的摩尔比的DPPC/胆固醇/DSPE-PEG,而用于含有伊立替康的二氧化硅体的有效脂质配方包含DSPC/Chol/DSPE-PEG₂₀₀₀(摩尔比:3:2:0.15,其等于58.3mol%:38.8mol%:3.9mol%)。

[0321] 在某些实施方案中,可以改变这些方法以提高药物负载容量(药物的重量/载体的总重量)。在某些实施方案中,药物负载容量是至少约30%w/w,或至少约40%w/w、至少约50%w/w、至少约60%w/w、至少约70%w/w,或至少80%w/w。在某些实施方案中,药物负载量大于40%w/w,或大于45%w/w,或大于50%w/w,或大于60%w/w,或大于70%w/w,或大于80%w/w。

[0322] 本文所述的方案提供了优于通过与MSNP表面融合的脂质体包被方法所制备的纳米载体的纳米颗粒药物载体(纳米载体),如通过本文提供的易于合成性以及改进的负载容量和释放特征的说明所说明。在典型的实施方案中,使用LB包被程序快速封装质子化剂,例如TEA₈SOS,其随后通过将扩散穿过LB的进入的药物质子化来提供伊立替康负载和包封。这引起颗粒孔隙中的高药物负载。快速的和有效的孔隙密封以保留捕集剂(例如TEA₈SOS)而没有泄漏促进了载体的有效性和稳定性。

[0323] 运载物捕集试剂。

[0324] 可以选择运载物捕集试剂以与所期望的运载物相互作用。在一些实施方案中,该相互作用可以是离子反应或质子化反应,尽管考虑了其他相互作用方式。运载物捕集剂可以具有一个或多个离子位点,即可以是单离子的或多离子的。所述离子部分可以是阳离子的、阴离子的,或在一些情况下,运载物捕集剂可以包括阳离子部分和阴离子部分。离子位点可以与相应的不带电荷的形式平衡;例如,阴离子羧酸根(-COO⁻)可以与它的相应的羧酸(-COOH)平衡;或在另一个实例中,胺(-NH₂)可以与它的相应的质子化铵形式(-NH₃⁺)平衡。这些平衡受局部环境的pH值的影响。

[0325] 同样,在某些实施方案中,所述运载物可以包括一个或多个离子位点。可以选择运载物捕集剂和运载物以在纳米颗粒(例如中孔二氧化硅纳米颗粒)内部相互作用。该相互作用可以有助于将运载物保留在纳米颗粒内直到期望释放所述运载物为止。在一些实施方案中,所述运载物可以非离子形式与离子形式之间的pH值依赖性平衡存在。非离子形式可以扩散穿过脂质双层并且进入MSNP的孔隙中。在那里,运载物捕集剂(例如多离子运载物捕集剂)可以与所述运载物的离子形式相互作用并且从而将所述运载物保留在所述纳米载体内,例如MSNP的孔隙内(前提条件是所述运载物的离子形式和运载物捕集剂具有相反的电荷)。所述相互作用可以是离子相互作用,并且可以包括沉淀物的形成。与类似的系统,例如省去运载物捕集剂的纳米载体,或包括捕集剂的脂质体相比,将运载物捕集在纳米载体内可以提供更高水平的运载物负载。运载物的释放可以通过pH值的适当变化以破坏运载物与运载物捕集剂之间的相互作用来实现,例如通过使运载物回到它的非离子状态,所述非离子状态更容易地扩散穿过脂质双层。在一个实施方案中,所述运载物是伊立替康并且所述运载物捕集剂是TEA₈SOS。

[0326] 所述运载物捕集剂不必限于TEA₈SOS。在某些实施方案中,所述运载物捕集剂包含小分子,如(NH₄)₂SO₄等。其他捕集剂包括但不限于铵盐(例如硫酸铵、蔗糖八硫酸酯铵、 α -环糊精硫酸酯铵、 β -环糊精硫酸酯铵、 γ -环糊精硫酸酯铵、磷酸铵、 α -环糊精磷酸酯铵、 β -环糊精磷酸酯铵、 γ -环糊精磷酸酯铵、枸橼酸铵、乙酸铵等);三甲基铵盐(例如三甲基硫酸铵、蔗糖八硫酸酯三甲基铵、 α -环糊精硫酸酯三甲基铵、 β -环糊精硫酸酯三甲基铵、 γ -环糊精硫酸酯三甲基铵、三甲基磷酸铵、 α -环糊精磷酸酯三甲基铵、 β -环糊精磷酸酯三甲基铵、 γ -环糊精磷酸酯三甲基铵、三甲基枸橼酸铵、三甲基乙酸铵等);三乙铵盐(例如三乙基硫酸铵、蔗糖八硫酸酯三乙铵、 α -环糊精硫酸酯三乙铵、 β -环糊精硫酸酯三乙铵、 γ -环糊精硫酸酯三乙铵、三乙基磷酸铵、 α -环糊精磷酸酯三乙铵、 β -环糊精磷酸酯三乙铵、 γ -环糊精磷酸酯三乙铵、三乙基枸橼酸铵、三乙基乙酸铵等)。

[0327] 除了TEA₈SOS之外,还值得指出的是,跨膜pH值梯度也可以通过以下各项产生:酸性缓冲液(例如枸橼酸盐)(Chou等人(2003)J.Biosci.Bioengineer.,95(4):405-408;Nichols等人(1976)Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes,455(1):269-271);产生质子的可解离的盐(例如(NH₄)₂SO₄)(Haran等人(1993)Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes,1151(2):201-215;Maurer-Spurej等人(1999)Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes,1416(1):1-10;Fritze等人(2006)Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes,1758(10):1633-1640);或来自金属盐(例如A23187和MnSO₄)的由离子载体介导的离子梯度(Messerer等人(2004)Clinical Cancer Res.10(19):6638-6649;Ramsay等人(2008)Eur.J.Pharmaceut.Biopharmaceut.68(3):607-617;Fenske等人(1998)Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes,1414(1):L188-204)。此外,有可能产生反向pH值梯度以进行药物负载,如使用乙酸钙梯度来提高LB-MSNP中的两亲性弱酸负载,该策略已经被用于脂质体(Avnir等人(2008)Arthritis&Rheumatism,58(1):119-129)。

[0328] 运载物/药物。

[0329] 在一个或多个实施方案中,所述运载物包含能够被质子化的包括至少一个伯胺基团,或至少一个仲胺基团,或至少一个叔胺基团,或至少一个季胺基团,或其任何组合的有机化合物。我们还已经鉴定出可以经由质子梯度负载到LB-MSNP中的弱碱性药物的综合清单。这些运载物分子的一般特征包括以下化学特性:

[0330] (i) 包括一个或多个伯胺、仲胺、叔胺或季胺的有机分子化合物;

[0331] (ii) pKa < 11以允许在LB后面质子化和包封(Zucker等人(2009)J.Control.Release,139(1):73-80;Cern等人(2012)J.Control.Release,160(2):147-157;Xu等人(2014)Pharmaceut.Res.31(10):2583-2592);

[0332] (iii) 5mg/mL-25mg/mL的水溶性指数和允许扩散穿过LB的两亲性特征;

[0333] (iv) -3.0至3.0的辛醇/水分配系数或log P值(Zucker等人(2009)J.Control.Release,139(1):73-80;Cern等人(2012)J.Control.Release,160(2):147-157);

[0334] (v) 合适的分子量和小于MSNP孔径(2nm-8nm)的几何尺寸,以允许进入MSNP孔隙中(Li等人(2012)Chem.Soc.Rev.41(7):2590-2605;Tang等人(2012)Adv.Mat.24(12):1504-1534;Tarn等人(2013)Acc.Chem.Res.46(3):792-801)。

[0335] 并非囊括所有,在各种实施方案中,潜在的化疗剂的清单可以包括伊立替康衍生物和代谢物,如SN38以及其他生物碱(例如托泊替康、10-羟基喜树碱、贝洛替康、卢比替康、长春瑞滨、LAQ824、长春碱、长春新碱、高三尖杉酯碱、曲贝替定)、蒽环类药物(例如多柔比星、表柔比星、吡柔比星、柔红霉素、红比霉素(rubidomycin)、戊柔比星、氨柔比星)、碱性蒽二酮(例如米托蒽醌)、碱性烷化剂(例如环磷酰胺、氮芥、替莫唑胺)、嘌呤或嘧啶衍生物(例如5-氟尿嘧啶、5'-脱氧-5-氟尿苷、吉西他滨、卡培他滨)以及蛋白激酶抑制剂(例如帕唑帕尼、恩扎妥林、凡德他尼、厄洛替尼、达沙替尼、尼洛替尼、舒尼替尼)。

[0336] 包装和递送上述药剂中的一种或组合的能力将增强多功能LB-MSNP平台的更广泛的效用,包括另外的癌症类型,如结肠癌、乳腺癌、肺癌、肝癌、神经胶质瘤、黑素瘤等的治疗考虑。

[0337] 还有可能将上述清单中的药物组合共同包装到单个载体中。举例来说,基于我们用我们的GEM/PTX共同递送平台实现的成功(参见例如Meng等人(2015) ACS Nano, 9 (4) : 3540-3557),有可能考虑使用本文所述的二氧化硅体组合FOLFIRINOX方案中的药物(例如奥沙利铂和伊立替康)以用于协同和比率计量递送。此外,通过我们的LB-MSNP进行的药物负载可以用于非癌应用,如封装抗生素以用于感染性疾病应用,例如环丙沙星、左氧氟沙星或HIV抗逆转录病毒药(例如替诺福韦二吡呋酯富马酸盐)。

[0338] 除了上述癌症药物之外,只要药物分子如上文所述是碱性的,捕集试剂促成的LB-MSNP平台就可用于有效的药物负载和递送。对于非碱性药物分子,虽然捕集试剂将提供有限的帮助,但是所提供的用于MSNP孔隙闭合的单步生物膜技术对于甚至更大范围的药物分子,如抗癌药、抗病毒药、抗真菌药以及抗生素仍然是有效的。

[0339] 举例来说,在某些实施方案中,在使用LB生物膜进行MSNP密封的情况下,有效的药物封装包括但不限于依维莫司、曲贝替定、紫杉醇、TLK 286、AV-299、DN-101、帕唑帕尼、GSK690693、RTA 744、ON 0910.Na、AZD 6244(ARRY-142886)、AMN-107、TKI-258、GSK461364、AZD 1152、恩扎妥林、凡德他尼、ARQ-197、MK-0457、MLN8054、PHA-739358、R-763、AT-9263、FLT-3抑制剂、VEGFR抑制剂、EGFR TK抑制剂、极光激酶抑制剂、PIK-1调节剂、Bcl-2抑制剂、HDAC抑制剂、c-MET抑制剂、PARP抑制剂、Cdk抑制剂、EGFR TK抑制剂、IGFR-TK抑制剂、抗HGF抗体、PI3激酶抑制剂、AKT抑制剂、JAK/STAT抑制剂、检查点-1或检查点-2抑制剂、局部粘着斑激酶抑制剂、Map激酶激酶(mek)抑制剂、VEGF捕捉抗体、培美曲塞、厄洛替尼、达沙替尼、尼洛替尼、德卡坦尼(decatanib)、帕尼单抗(panitumumab)、氨柔比星、奥戈伏单抗(oregovomab)、Lep-etu、诺拉曲沙(nolatrexed)、azd2171、巴他布林(bataulin)、奥法木单抗(ofatumumab)、扎木单抗(zanolimumab)、艾特味林(edotecarin)、粉防己碱、卢比替康、替米利芬(tesmilifene)、奥利默森(oblimersen)、替西木单抗(ticilimumab)、伊匹单抗(ipilimumab)、棉子酚、Bio 111、131-I-TM-601、ALT-110、BI0 140、CC 8490、西仑吉肽(cilengitide)、吉马替康(gimatecan)、IL13-PE38QQR、INO 1001、IPdR1 KRX-0402、硫蒽酮、LY 317615、纽迪(neuradiab)、维特斯潘(vitespan)、Rta 744、Sdx 102、他仑帕奈(talampanel)、阿曲生坦、Xr 311、罗米地辛(romidepsin)、ADS-100380、舒尼替尼、5-氟尿嘧啶、伏立诺他(vorinostat)、依托泊苷、吉西他滨、多柔比星、5'-脱氧-5-氟尿苷、长春新碱、替莫唑胺、ZK-304709、塞利西利(seliciclib);PD0325901、AZD-6244、卡培他滨、N-[4-[2-(2-氨基-4,7-二氢-4-氧代-1H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)乙基]苯甲酰基]-L-谷氨酸

二钠盐七水合物、喜树碱、PEG标记的伊立替康、他莫昔芬、枸橼酸托瑞米芬、阿那曲唑(anastrazole)、依西美坦、来曲唑、DES(二乙基己烯雌酚)、雌二醇、雌激素、结合雌激素、贝伐珠单抗、IMC-1C11、CHIR-258;3-[5-(甲基磺酰基哌啶甲基)-吲哚基]-喹诺酮、瓦他拉尼(vatalanib)、AG-013736、AVE-0005、[D-Ser(Bu^t)₆,Azgly¹⁰]的乙酸盐(pyro-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(Bu^t)-Leu-Arg-Pro-Azgly-NH₂乙酸盐)[C59H84N18O₁₄-(C₂H₄O₂)X,其中x=1至2.4]、醋酸戈舍瑞林、醋酸亮丙瑞林(leeprolide acetate)、双羟萘酸曲普瑞林、醋酸甲羟孕酮、己酸羟孕酮、醋酸甲地孕酮、雷洛昔芬、比卡鲁胺、氟他胺、尼鲁米特、醋酸甲地孕酮、CP-724714;TAK-165、HKI-272、厄洛替尼、拉帕替尼(lapatanib)、卡奈替尼(canertinib)、ABX-EGF抗体、爱必妥(erbitux)、EKB-569、PKI-166、GW-572016、艾那法尼(Ionafarnib)、BMS-214662、替吡法尼(tipifarnib);氨磷汀、NVP-LAQ824、辛二酰苯胺异羟肟酸、丙戊酸、曲古抑菌素A(trichostatin A)、FK-228、SU11248、索拉非尼、KRN951、氨鲁米特、安吖啶、阿那格雷、L-门冬酰胺酶、卡介苗(*Bacillus Calmette-Guerin*) (BCG) 疫苗、博莱霉素、布舍瑞林、白消安、卡铂、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、克拉屈滨、氯膦酸盐(clodronate)、环丙孕酮(cyproterone)、阿糖胞苷、达卡巴嗪、更生霉素(dactinomycin)、柔红霉素、二乙基己烯雌酚、表柔比星、氟达拉滨、氟氢可的松、氟甲睾酮、氟他胺、吉西他滨、格列卫(gleevac)、羟基脲、伊达比星、异环磷酰胺、伊马替尼、亮丙瑞林、左旋咪唑、洛莫司汀、氮芥、美法仑、6-巯基嘌呤、美司钠(mesna)、甲氨蝶呤、丝裂霉素、米托坦、米托蒽醌、尼鲁米特、奥曲肽(octreotide)、奥沙利铂、帕米膦酸盐(pamidronate)、喷司他丁、普卡霉素、卟吩姆(porfimer)、丙卡巴肼、雷替曲塞、利妥昔单抗、链脲霉素(streptozocin)、替尼泊苷、睾酮、沙利度胺、硫鸟嘌呤、塞替派、维甲酸(tretinoin)、长春地辛、13-顺式视黄酸、苯丙氨酸氮芥、尿嘧啶氮芥、雌莫司汀、六甲蜜胺、氟尿苷、5-脱氧尿苷、胞嘧啶阿拉伯糖苷、6-巯基嘌呤、脱氧柯福霉素(deoxycosformycin)、骨化三醇、戊柔比星、光神霉素(mithramycin)、长春碱、长春瑞滨、托泊替康、雷佐生、马立司他(marimastat)、COL-3、新伐司他(neovastat)、BMS-275291、角鲨胺(squalamine)、内皮抑素(endostatin)、SU5416、SU6668、EMD121974、白细胞介素-12、IM862、血管抑素、维他辛(vitaxin)、屈洛昔芬、艾多昔芬(idoxyfene)、螺内酯、非那雄胺、西咪替丁(cimetidine)、曲妥珠单抗、地尼白介素2(denileukin diftitox)、吉非替尼、波替单抗(bortezomib)、紫杉醇、不含聚氧乙烯蓖麻油(cremophor)的紫杉醇、多西他赛、埃博霉素B(epithilone B)、BMS-247550、BMS-310705、屈洛昔芬、4-羟基他莫昔芬、哌嗪昔芬(pipendoxifene)、ERA-923、阿佐昔芬(arzoxifene)、氟维司群(fulvestrant)、阿考比芬(acolbifene)、拉索昔芬(lasofoxifene)、艾多昔芬、TSE-424、HMR-3339、ZK186619、托泊替康、PTK787/ZK 222584、VX-745、PD 184352、雷帕霉素(rapamycin)、40-O-(2-羟乙基)-雷帕霉素、替西罗莫司(temsirolimus)、AP-23573、RAD001、ABT-578、BC-210、LY294002、LY292223、LY292696、LY293684、LY293646、渥曼青霉素(wortmannin)、ZM336372、L-779,450、PEG-非格司亭、达依泊汀(darbepoetin)、促红细胞生成素、粒细胞集落刺激因子、唑来膦酸盐(zolendronate)、泼尼松、西妥昔单抗、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、组氨瑞林、聚乙二醇化干扰素 α -2a、干扰素 α -2a、聚乙二醇化干扰素 α -2b、干扰素 α -2b、阿扎胞苷、PEG-L-门冬酰胺酶、来那度胺、吉妥珠单抗、氢化可的松、白细胞介素-11、右雷佐生、阿仑珠单抗、全反式视黄酸、酮康唑、白细胞介素-2、甲地孕酮、免疫球蛋白、氮芥、甲泼尼龙、替坦异贝莫单抗(ibritgumomab tiuxetan)、雄激素、地西他滨、六甲

蜜胺、贝沙罗汀、托西莫单抗 (tositumomab)、三氧化二砷、可的松、依替膦酸盐 (editronate)、米托坦、环孢素 (cyclosporine)、脂质体柔红霉素、Edwina-门冬酰胺酶、锶 89、卡索匹坦 (casopitant)、奈妥匹坦 (netupitant)、NK-1受体拮抗剂、帕洛诺司琼、阿瑞匹坦、苯海拉明、羟嗪、甲氧氯普胺、劳拉西泮、阿普唑仑、氟哌啶醇、氟哌利多、屈大麻酚、地塞米松、甲泼尼龙、丙氯拉嗪、格拉司琼、昂丹司琼、多拉司琼、托烷司琼、培非司亭、促红细胞生成素、阿法依泊汀 (epoetin alfa) 和阿法达贝泊汀 (darbepoetin alfa)、波西普韦 (boceprevir)、达卡他韦 (daclatasvir)、阿舒瑞韦 (asunapavir)、INX-189、FV-100、NM 283、VX-950 (特拉匹韦 (telaprevir))、SCH 50304、TMC435、VX-500、BX-813、SCH503034、R1626、ITMN-191 (R7227)、R7128、PF-868554、TT033、CGH-759、GI 5005、MK-7009、SIRNA-034、MK-0608、A-837093、GS 9190、GS 9256、GS 9451、GS 5885、GS 6620、GS9620、GS9669、ACH-1095、ACH-2928、GSK625433、TG4040 (MVA-HCV)、A-831、F351、NS5A、NS4B、ANA598、A-689、GNI-104、IDX102、ADX184、ALS-2200、ALS-2158、BI 201335、BI 207127、BIT-225、BIT-8020、GL59728、GL60667、PSI-938、PSI-7977、PSI-7851、SCY-635、利巴韦林、聚乙二醇化干扰素、PHX1766、SP-30，或其混合物。

[0340] 在某些实施方案中，所述运载物包含抗真菌剂。说明性抗真菌剂包括但不限于两性霉素 B (例如用于除假阿利什菌属菌种 (*Pseudallescheria* sp.) 之外的大部分真菌感染等)、阿尼芬净 (例如用于念珠菌病，包括念珠菌血症等)、卡泊芬净 (例如用于曲霉病、念珠菌病，包括念珠菌血症等)、氟康唑 (例如用于粘膜和全身性念珠菌病、隐球菌性脑膜炎、球孢子菌性脑膜炎等)、氟胞嘧啶 (例如用于念珠菌病 (全身性)、隐球菌病等)、艾沙康唑 (例如用于曲霉病、毛霉菌病等)、伊曲康唑 (例如用于皮肤真菌病、组织胞浆菌病、芽生菌病、球孢子菌病、孢子丝菌病等)、米卡芬净 (例如用于念珠菌病，包括念珠菌血症)、泊沙康唑 (例如用于预防侵袭性曲霉病和念珠菌病、口腔念珠菌病、伊曲康唑难治性口腔念珠菌病等)、伏立康唑 (例如用于侵袭性曲霉病、镰刀菌病、赛多孢子菌病 (*Scedosporiosis*) 等) 等等。

[0341] 双重治疗性二氧化硅体。

[0342] 将认识到的是，在某些实施方案中，本文所述的纳米颗粒药物载体 (二氧化硅体) 可以包含两种或更多种治疗剂。因此，例如，在某些实施方案中，二氧化硅体中的孔隙可以负载两种，或三种，或四种，或更多种不同的治疗剂。在某些实施方案中，这可以容许这些治疗剂的比率计量递送。作为非限制性说明，已知许多药剂治疗方案用于治疗癌症。这些包括但不限于COMP (甲氨蝶呤、泼尼松)、LSA₂-L₂ (环磷酰胺、长春新碱、泼尼松、道诺霉素 (daunomycin)、甲氨蝶呤、阿糖胞苷、硫鸟嘌呤、门冬酰胺酶以及卡莫司汀)、FOLFIRINOX (伊立替康、奥沙利铂、5-氟尿嘧啶、甲酰四氢叶酸) 等。在某些实施方案中，满足本文对于待使用本文所述的方法负载到二氧化硅体中的药物所述的要求的两种或更多种药剂可以在二氧化硅体中提供。在多药方案包括与本文所述的负载方法不相容的药剂的情况下，一些药剂 (例如伊立替康) 可以在二氧化硅体中提供以提供提高的耐受性并且所述治疗方案的其他组分可以通过传统的模式来施用。

[0343] 在某些实施方案中，疏水性 (例如亲脂性) 药物和其他药剂可以在二氧化硅体的脂质双层组分中提供。这些疏水性药物包括但不限于紫杉醇、玫瑰树碱、喜树碱、L-门冬酰胺酶、多柔比星、SN-38 等。在某些实施方案中，二氧化硅体的脂质双层组分可以含有一种或多种磷脂前药 (例如与脂质缀合的药物)。说明性脂质前药包括但不限于阿昔洛韦二磷酸酯二

肉豆蔻酰甘油(参见例如Hostetler等人, (1993) Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 90(24) :11835-11839)、多柔比星缀合的磷脂前药(参见例如Wang等人(2015) J.Mater.Chem.B., 3:3297-3305)、核苷类似物的磷脂衍生物(例如1- β -D-阿拉伯呋喃糖基胞嘧啶(ara-C)、9- β -D-阿拉伯呋喃糖基腺嘌呤(ara-A)、杀结核菌素等的5'-二磷酸酯-L-1,2-二棕榈精衍生物(参见例如Matsushita等人(1981) Cancer Res., 41:2707-2713))、磷脂连接的苯丁酸氮芥(参见例如Pederson等人(2010) J.Med.Chem., 53:3782-3792)等。

[0344] 上述多药剂二氧化硅体是说明性的而非限制性的。使用本文提供的教导,用于并入本文所述的二氧化硅体中(或上)的治疗剂的许多组合将是本领域技术人员可用的。

[0345] 靶向配体和免疫缀合物。

[0346] 在某些实施方案中,LB包被的纳米颗粒(二氧化硅体)可以与以下各项缀合:一种或多种靶向配体,例如以有助于在内皮细胞中、向癌细胞进行特异性递送;融合配体,例如以有助于内体逃逸;配体,以促进跨血脑屏障的转运;等。

[0347] 在一个说明性而非限制性实施方案中,二氧化硅体与融合肽缀合,如富含组氨酸的H5WYG(H₂N-GLFHIAHFIHGGWHGLIHGW YG-COOH, (SEQ ID NO:1)) (参见例如Midoux等人, (1998) Bioconjug.Chem. 9:260-267)。

[0348] 在某些实施方案中,二氧化硅体与靶向配体缀合,所述靶向配体包括抗体以及靶向肽。靶向抗体包括但不限于完整免疫球蛋白、免疫球蛋白片段(例如F(ab)[’]₂、Fab等)、单链抗体、双体抗体、亲和体、单抗体、纳米抗体等。在某些实施方案中,将使用特异性结合癌症标志物(例如肿瘤相关抗原)的抗体。多种多样的癌症标志物是本领域技术人员已知的。所述标志物不一定是癌细胞独有的,但是在所述标志物的表达在癌细胞中升高(与正常健康细胞相比)的情况下或在所述标志物不以相当的水平存在于周围组织中的情况下(特别是在局部递送嵌合部分的情况下)也可以是有效的。

[0349] 说明性癌症标志物包括例如由ND4单克隆抗体识别的肿瘤标志物。这种标志物存在于低分化的结肠直肠癌以及胃肠道神经内分泌肿瘤上(参见例如Tobi等人(1998) Cancer Detection and Prevention, 22(2) :147-152)。用于癌症免疫治疗的其他重要的靶标是膜结合补体调节糖蛋白CD46、CD55以及CD59,已经发现它们在体内和体外在大部分的肿瘤细胞上表达。人类粘蛋白(例如MUC1)是已知的肿瘤标志物, gp100、酪氨酸酶以及MAGE也是已知的肿瘤标志物,它们存在于黑素瘤中。野生型肾母细胞瘤基因WT1不仅以高水平在大部分的急性髓细胞性白血病、急性淋巴细胞性白血病以及慢性髓细胞性白血病中表达,而且还在包括肺癌的各种类型的实体肿瘤中表达。

[0350] 急性淋巴细胞性白血病的特征在于TAA HLA-Dr、CD1、CD2、CD5、CD7、CD19以及CD20。急性髓细胞性白血病的特征在于TAA HLA-Dr、CD7、CD13、CD14、CD15、CD33以及CD34。乳腺癌的特征在于标志物EGFR、HER2、MUC1、Tag-72。各种癌瘤的特征在于标志物MUC1、TAG-72以及CEA。慢性淋巴细胞性白血病的特征在于标志物CD3、CD19、CD20、CD21、CD25以及HLA-DR。毛细胞白血病的特征在于标志物CD19、CD20、CD21、CD25。霍奇金氏病的特征在于Ley-M1标志物。各种黑素瘤的特征在于HMB 45标志物。非霍奇金淋巴瘤的特征在于CD20、CD19以及Ia标志物。并且各种前列腺癌的特征在于PSMA和SE10标志物。

[0351] 此外,许多种类的肿瘤细胞显示出对于细胞类型和/或它的环境来说不适当的或通常仅在生物体发育期间存在(例如胚胎性抗原)的异常抗原。这些抗原的实例包括糖鞘脂

GD2,它是通常仅以显著水平表达在神经元细胞的外表面膜上的二唾液酸神经节苷脂,其中它对免疫系统的暴露受到血脑屏障的限制。GD2在包括成神经细胞瘤、成神经管细胞瘤、星形细胞瘤、黑素瘤、小细胞肺癌、骨肉瘤以及其他软组织肉瘤的广泛肿瘤细胞的表面上表达。GD2因此是用于免疫治疗的适宜肿瘤特异性靶标。

[0352] 其他种类的肿瘤细胞显示出在健康细胞的表面上罕见的或不存在的并且负责激活引起肿瘤细胞的不受调节的生长和分裂的细胞信号转导途径的细胞表面受体。实例包括(ErbB2) HER2/neu,它是以异常高的水平在乳腺癌肿瘤细胞的表面上产生的组成型活性细胞表面受体。

[0353] 其他有用的靶标包括但不限于CD20、CD52、CD33、表皮生长因子受体等。

[0354] 合适的肿瘤标志物的说明性而非限制性列表提供于表1中。这些和其他癌症标志物的抗体是本领域技术人员已知的并且可以商购获得或容易地产生,例如使用噬菌体展示技术。这些抗体可以容易地与本文所述的二氧化硅体缀合,例如以与实施例3中缀合iRGD肽的方式相同的方式。

[0355] 表1:说明性癌症标志物和相关的参考文献,它们全部以引用的方式并入本文用于鉴定所参考的肿瘤标志物的目的。

标志物	参考文献
5α 还原酶	Délos 等人 (1998) <i>Int J Cancer</i> , 75(6): 840-846。
α-甲胎蛋白	Esteban 等人 (1996) <i>Tumour Biol.</i> , 17(5): 299-305。
AM-1	Harada 等人 (1996) <i>Tohoku J Exp Med.</i> , 180(3): 273-288。
APC	Dihlmann 等人 (1997) <i>Oncol Res.</i> , 9(3): 119-127。
APRIL	Sordat 等人 (1998) <i>J Exp Med.</i> , 188(6): 1185-1190。
BAGE	Böel 等人 (1995) <i>Immunity</i> , 2: 167-175。
β-连环蛋白	Hugh 等人 (1999) <i>Int J Cancer</i> , 82(4): 504-11。
Bc12	Koty 等人 (1999) <i>Lung Cancer</i> , 23(2): 115-127。
bcr-abl(b3a2)	Verfaillie 等人 (1996) <i>Blood</i> , 87(11): 4770-4779。
CA-125	Bast 等人 (1998) <i>Int J Biol Markers</i> , 13(4): 179-187。
CASP-8/FLI CE	Mandruzzato 等人 (1997) <i>J Exp Med.</i> , 186(5): 785-793。
组织蛋白酶	Thomssen 等人 (1995) <i>Clin Cancer Res.</i> , 1(7): 741-746。
CD19	Scheuermann 等人 (1995) <i>Leuk Lymphoma</i> , 18(5-6): 385-397。
CD20	Knox 等人 (1996) <i>Clin Cancer Res.</i> , 2(3): 457-470。
CD21 、 CD23	Shubinsky 等人 (1997) <i>Leuk Lymphoma</i> , 25(5-6): 521-530。
CD22 、 CD38	French 等人 (1995) <i>Br J Cancer</i> , 71(5): 986-994。
CD33	Nakase 等人 (1996) <i>Am J Clin Pathol.</i> , 105(6): 761-768。
CD35	Yamakawa 等人 <i>Cancer</i> , 73(11): 2808-2817。
CD44	Naot 等人 (1997) <i>Adv Cancer Res.</i> , 71: 241-319。
CD45	Buzzi 等人 (1992) <i>Cancer Res.</i> , 52(14): 4027-4035。
CD46	Yamakawa 等人 (1994) <i>Cancer</i> , 73(11): 2808-2817。
CD5	Stein 等人 (1991) <i>Clin Exp Immunol.</i> , 85(3): 418-423。
CD52	Ginaldi 等人 (1998) <i>Leuk Res.</i> , 22(2): 185-191。
CD55	Spendlove 等人 (1999) <i>Cancer Res.</i> , 59: 2282-2286。
CD59(791T gp72)	Jarvis 等人 (1997) <i>Int J Cancer</i> , 71(6): 1049-1055。
CDC27	Wang 等人 (1999) <i>Science</i> , 284(5418): 1351-1354。

[0356]

[0357]	CDK4	Wölfel 等人 (1995) <i>Science</i> , 269(5228): 1281-1284。
	CEA	Kass 等人 (1999) <i>Cancer Res.</i> , 59(3): 676-683。
	c-myc	Watson 等人 (1991) <i>Cancer Res.</i> , 51(15): 3996-4000。
	Cox-2	Tsujii 等人 (1998) <i>Cell</i> , 93: 705-716。
	DCC	Gotley 等人 (1996) <i>Oncogene</i> , 13(4): 787-795。
	DcR3	Pitti 等人 (1998) <i>Nature</i> , 396: 699-703。
	E6/E7	Steller 等人 (1996) <i>Cancer Res.</i> , 56(21): 5087-5091。
	EGFR	Yang 等人 (1999) <i>Cancer Res.</i> , 59(6): 1236-1243。
	EMBP	Shiina 等人 (1996) <i>Prostate</i> , 29(3): 169-176。
	Ena78	Arenberg 等人 (1998) <i>J. Clin. Invest.</i> , 102: 465-472。
	FGF8b 和 FGF8a	Dorkin 等人 (1999) <i>Oncogene</i> , 18(17): 2755-2761。
	FLK-1/KDR	Annie 和 Fong (1999) <i>Cancer Res.</i> , 59: 99-106。
	叶酸受体	Dixon 等人 (1992) <i>J Biol Chem.</i> , 267(33): 24140-24141。
	G250	Divgi 等人 (1998) <i>Clin Cancer Res.</i> , 4(11): 2729-2739。
	GAGE 家族	De Backer 等人 (1999) <i>Cancer Res.</i> , 59(13): 3157-3165。
	胃泌素 17	Watson 等人 (1995) <i>Int J Cancer</i> , 61(2): 233-240。
	胃泌素释放激素 (蛙皮素)	Wang 等人 (1996) <i>Int J Cancer</i> , 68(4): 528-534。
	GD2/GD3/GM2	Wiesner 和 Sweeley (1995) <i>Int J Cancer</i> , 60(3): 294-299。
	GnRH	Bahk 等人 (1998) <i>Urol Res.</i> , 26(4): 259-264。
	GnTV	Hengstler 等人 (1998) <i>Recent Results Cancer Res.</i> , 154: 47-85。
	gp100/Pmel 17	Wagner 等人 (1997) <i>Cancer Immunol Immunother.</i> , 44(4): 239-247。
	gp-100-in4	Kirkin 等人 (1998) <i>APMIS</i> , 106(7): 665-679。
	gp15	Maeurer 等人 (1996) <i>Melanoma Res.</i> , 6(1): 11-24。
	gp75/TRP-1	Lewis 等人 (1995) <i>Semin Cancer Biol.</i> , 6(6): 321-327。
	hCG	Hoermann 等人 (1992) <i>Cancer Res.</i> , 52(6): 1520-1524。

[0358]	肝素酶	Vlodavsky 等人 (1999) <i>Nat Med.</i> , 5(7): 793-802。
	Her2/neu	Lewis 等人 (1995) <i>Semin Cancer Biol.</i> , 6(6): 321-327。
	Her3	
	HMTV	Kahl 等人(1991) <i>Br J Cancer</i> , 63(4): 534-540。
	Hsp70	Jaattela 等人 (1998) <i>EMBO J.</i> , 17(21): 6124-6134。
	hTERT(端粒酶)	Vonderheide 等人 (1999) <i>Immunity</i> , 10: 673-679. 1999。
	IGFR1	Ellis 等人 (1998) <i>Breast Cancer Res. Treat.</i> , 52: 175-184。
	IL-13R	Murata 等人 (1997) <i>Biochem Biophys Res Commun.</i> , 238(1): 90-94。
	iNOS	Klotz 等人 (1998) <i>Cancer</i> , 82(10): 1897-1903。
	Ki 67	Gerdes 等人 (1983) <i>Int J Cancer</i> , 31: 13-20。
	KIAA0205	Guéguen 等人 (1998) <i>J Immunol.</i> , 160(12): 6188-6194。
	K-ras 、 H-ras、 N-ras	Abrams 等人 (1996) <i>Semin Oncol.</i> , 23(1): 118-134。
	KSA (CO17-1A)	Zhang 等人 (1998) <i>Clin Cancer Res.</i> , 4(2): 295-302。
	LDLR-FUT	Caruso 等人 (1998) <i>Oncol Rep.</i> , 5(4): 927-930。
	MAGE 家族 (MAGE1、 MAGE3 等)	Marchand 等人 (1999) <i>Int J Cancer</i> , 80(2): 219-230。
	乳腺珠蛋白	Watson 等人 (1999) <i>Cancer Res.</i> , 59: 13 3028-3031。
	MAP17	Kocher 等人 (1996) <i>Am J Pathol.</i> , 149(2): 493-500。
	黑色素-A/ MART-1	Lewis 和 Houghton (1995) <i>Semin Cancer Biol.</i> , 6(6): 321-327。
	间皮素	Chang 等人 (1996) <i>Proc. Natl. Acad. Sci., USA</i> , 93(1): 136-140。
	MIC A/B	Groh 等人(1998) <i>Science</i> , 279: 1737-1740。
	MT-MMP , 如 MMP2、 MMP3 、 MMP7 、 MMP9	Sato 和 Seiki (1996) <i>J Biochem (Tokyo)</i> , 119(2): 209-215。

Mox1	Candia 等人 (1992) <i>Development</i> , 116(4): 1123-1136。
粘蛋白，如 MUC-1 、 MUC-2 、 MUC-3 以 及 MUC-4	Lewis 和 Houghton (1995) <i>Semin Cancer Biol.</i> , 6(6): 321-327。
MUM-1	Kirkin 等人 (1998) <i>APMIS</i> , 106(7): 665-679。
NY-ESO-1	Jager 等人 (1998) <i>J. Exp. Med.</i> , 187: 265-270。
骨粘连蛋白	Graham 等人 (1997) <i>Eur J Cancer</i> , 33(10): 1654-1660。
p15	Yoshida 等人 (1995) <i>Cancer Res.</i> , 55(13): 2756-2760。
P170/MDR1	Trock 等人 (1997) <i>J Natl Cancer Inst.</i> , 89(13): 917-931。
p53	Roth 等人 (1996) <i>Proc. Natl. Acad. Sci., USA</i> , 93(10): 4781-4786。
p97/黑素转铁蛋白	Furukawa 等人 (1989) <i>J Exp Med.</i> , 169(2): 585-590。
PAI-1	Grøndahl-Hansen 等人 (1993) <i>Cancer Res.</i> , 53(11): 2513-2521。
PDGF	Vassbotn 等人 (1993) <i>Mol Cell Biol.</i> , 13(7): 4066-4076。
纤溶酶原 (uPA)	Naitoh 等人 (1995) <i>Jpn J Cancer Res.</i> , 86(1): 48-56。
PRAME	Kirkin 等人 (1998) <i>APMIS</i> , 106(7): 665-679。
前列腺碱性蛋白 (Probasin)	Matuo 等人 (1985) <i>Biochem Biophys Res Commun.</i> , 130(1): 293-300。
祖细胞生成素	-----
PSA	Sanda 等人 (1999) <i>Urology</i> , 53(2): 260-266。
PSM	Kawakami 等人 (1997) <i>Cancer Res.</i> , 57(12): 2321-2324。
RAGE-1	Gaugler 等人 (1996) <i>Immunogenetics</i> , 44(5): 323-330。
Rb	Dosaka-Akita 等人 (1997) <i>Cancer</i> , 79(7): 1329-1337。

[0359]

[0360]	RCAS1	Sonoda 等人(1996) <i>Cancer</i> , 77(8): 1501-1509。
	SART-1	Kikuchi 等人(1999) <i>Int J Cancer</i> , 81(3): 459-466。
	SSX 基因家族	Gure 等人 (1997) <i>Int J Cancer</i> , 72(6): 965-971。
	STAT3	Bromberg 等人 (1999) <i>Cell</i> , 98(3): 295-303。
	STn(粘蛋白相关)	Sandmaier 等人 (1999) <i>J Immunother.</i> , 22(1): 54-66。
	TAG-72	Kuroki 等人 (1990) <i>Cancer Res.</i> , 50(16): 4872-4879。
	TGF- α	Imanishi 等人 (1989) <i>Br J Cancer</i> , 59(5): 761-765。
	TGF- β	Picon 等人 (1998) <i>Cancer Epidemiol Biomarkers Prey</i> , 7(6): 497-504。
	胸腺素 β 15	Bao 等人 (1996) <i>Nature Medicine</i> , 2(12), 1322-1328。
	IFN- α	Moradi 等人 (1993) <i>Cancer</i> , 72(8): 2433-2440。
	TPA	Maulard 等人 (1994) <i>Cancer</i> , 73(2): 394-398。
	TPI	Nishida 等人(1984) <i>Cancer Res</i> 44(8): 3324-9。
	TRP-2	Parkhurst 等人 (1998) <i>Cancer Res.</i> , 58(21) 4895-4901。
	酪氨酸酶	Kirkin 等人 (1998) <i>APMIS</i> , 106(7): 665-679。
	VEGF	Hyodo 等人 (1998) <i>Eur J Cancer</i> , 34(13): 2041-2045。
	ZAG	Sanchez 等人 (1999) <i>Science</i> , 283(5409): 1914-1919。
	p16INK4	Quelle 等人 (1995) <i>Oncogene</i> , 1995 年 8 月 17 日; 11(4): 635-645。
	谷胱甘肽 S-转移酶	Hengstler (1998) 等人 <i>Recent Results Cancer Res.</i> , 154: 47-85。

[0361] 上述标志物中的任一种可以用作构成本文所述的二氧化硅体构建体的靶向部分的靶标。在某些实施方案中，靶标志物包括但不限于表皮生长因子家族的成员(例如HER2、HER3、EGF、HER4)、CD1、CD2、CD3、CD5、CD7、CD13、CD14、CD15、CD19、CD20、CD21、CD23、CD25、CD33、CD34、CD38、5E10、CEA、HLA-DR、HM 1.24、HMB 45、1a、Leu-M1、MUC1、PMSA、TAG-72、磷脂酰丝氨酸抗原等。

[0362] 上述标志物意在是说明性的而非限制性的。其他肿瘤相关抗原将是本领域技术人员已知的。

[0363] 在肿瘤标志物是细胞表面受体的情况下,该受体的配体可以充当靶向部分。类似地,这样的配体的模拟物也可以用作靶向部分。因此,在某些实施方案中,除了各种抗体之外或代替各种抗体,可以使用肽配体。合适的靶向肽的说明性而非限制性列表示于表2中。在某些实施方案中,这些肽中的任何一种或多种可以与本文所述的二氧化硅体缀合。

[0364] 表2:靶向由各种癌细胞表达或过表达的膜受体的说明性而非限制性肽。

靶膜受体	靶向肽	SEQ ID NO
整合素受体 A _v β ₃	c(RGDfK) c(RGDfC) c(RGDyC) RGD	2 3 4
GFR	GE11(YHWYGYTPQNV)	5
GFR	GSG-KCCYSL	6
SSTR2	奥曲肽	
GRP	QWAVGHML	7
CCK	DYMGWMDF	8
NT	RRPYIL RRPYILQLYENKPRRPYIL	9 10
LHRH	戈那瑞林	
GPRC 家族成员	拮抗剂 G	
c()表示环肽。小写字母表示“D”氨基酸。		

[0365]

[0366] 在某些实施方案中,二氧化硅体可以与促进循环中的稳定性和/或掩藏二氧化硅体以躲避网状内皮系统(REC)和/或促进跨屏障(例如基质屏障、血脑屏障等)转运和/或转到组织中的部分缀合。在某些实施方案中,二氧化硅体与转铁蛋白或ApoE缀合以促进跨血脑屏障转运。在某些实施方案中,二氧化硅体与叶酸缀合。

[0367] 使二氧化硅体与靶向剂(或其他试剂)偶联的方法是本领域技术人员公知的。实例包括但不限于使用生物素和亲和素或链霉亲和素(参见例如美国专利号:US 4,885,172 A);通过传统的化学反应,使用例如双官能偶联剂,如戊二醛、二酰亚胺酯、芳族和脂族二异氰酸酯、二羧酸的双-对硝基苯基酯、芳族二碘酰氯化物和双官能芳基卤化物,如1,5-二氟-2,4-二硝基苯;p,p'-二氟m,m'-二硝基二苯基砜、巯基反应性顺丁烯二酰亚胺等。可以应用于这样的偶联的适当的反应描述于Williams等人Methods in Immunology and Immunochemistry第1卷,纽约的学术出版社(Academic Press, New York)1967中。在实施例3中所述的一种说明性而非限制性方法中,通过用DSPE-PEG₂₀₀₀-顺丁烯二酰亚胺代替DSPE-PEG₂₀₀₀来使肽(在该实施例中是iRGD)与二氧化硅体偶联(参见实施例3中的方法部分),从而允许硫醇-顺丁烯二酰亚胺与半胱氨酸修饰的肽偶联。还将认识到的是,在某些实施方案中,靶向部分(和其他部分)可以与构成脂质双层的脂质缀合。

[0368] 前者缀合物和偶联方法是说明性的而非限制性的。使用本文提供的教导,可以通过多种方法中的任一种使许多其他部分与本文所述的二氧化硅体缀合。

[0369] 药物制剂、施用以及治疗

[0370] 药物制剂

[0371] 在一些实施方案中,本文所述的纳米颗粒药物载体是单独施用的或在与根据施用途径和标准制药操作所选择的生理学上可接受的载体(如生理盐水或磷酸盐缓冲液)的混合物中施用。举例来说,当用作注射剂时,二氧化硅体可以用药学上可接受的载体配制成无菌悬浮液、分散体,或乳液。在某些实施方案中,生理盐水可以用作药学上可接受的载体。其他合适的载体包括例如水、缓冲水、0.4%盐水、0.3%甘氨酸等,包括用于增强稳定性的糖蛋白,如白蛋白、脂蛋白、球蛋白等。在包含盐水或其他含盐载体的组合物中,优选地在二氧化硅体形成后添加所述载体。因此,在形成二氧化硅体并且负载一种或多种合适的药物之后,可以将所述二氧化硅体在药学上可接受的载体,如生理盐水中稀释。可以通过常规的公知的灭菌技术将这些组合物灭菌。可以将所得的水溶液、悬浮液、分散体、乳液等在无菌条件下包装以供使用或过滤。在某些实施方案中,将所述二氧化硅体冻干,在施用之前将冻干制剂与无菌水溶液组合。所述组合物还可以含有如接近生理条件所需的药学上可接受的辅剂物质,如pH值调节剂和缓冲剂、张力调节剂等,例如乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙等。

[0372] 此外,在某些实施方案中,药物制剂可以包括保护脂质防止在储存时的自由基和脂质过氧化损伤的脂质保护剂。亲脂性自由基猝灭剂,如 α -生育酚和水溶性铁特异性螯合剂,如铁草胺(ferrioxamine)是合适的。

[0373] 药物制剂中二氧化硅体的浓度可以广泛变化,例如从小于约0.05重量%,通常至少约2重量%至5重量%到多达10重量%至50重量%,或到40重量%,或到30重量%变动并且主要通过流体体积、粘度等,根据所选择的具体施用方式来选择。举例来说,可以增加浓度以降低与治疗相关的流体负载。这在患有动脉粥样硬化相关的充血性心力衰竭或严重高血压的患者中可能是特别理想的。或者,可以将由刺激性脂质构成的二氧化硅体稀释到低浓度以减轻施用部位处的炎症。施用的二氧化硅体的量将取决于所使用的具体药物、所治疗的疾病状态以及临床医师的判断,但是一般将是每公斤体重约0.01mg至约50mg,优选地每公斤体重约0.1mg至约5mg。

[0374] 在一些实施方案中,例如,期望在二氧化硅体中包括聚乙二醇(PEG)修饰的磷脂。作为另外一种选择或除此之外,在某些实施方案中,可以将PEG-神经酰胺,或神经节苷脂G_{MI}修饰的脂质并入二氧化硅体中。添加这样的组分有助于防止二氧化硅体聚集并且提供延长的循环寿命并且增加负载的二氧化硅体向靶组织的递送。在某些实施方案中,二氧化硅体中PEG修饰的磷脂、PEG-神经酰胺,或G_{MI}修饰的脂质的浓度将是约1%至15%。

[0375] 在一些实施方案中,总二氧化硅体电荷是二氧化硅体从血液中清除的重要决定因素。认为,带电荷的二氧化硅体通常将更快速地由网状内皮系统摄取(参见例如Juliano (1975), Biochem. Biophys. Res. Commun. 63:651-658,其论述了RES对脂质体的清除)并且因此在血流中具有更短的半衰期。具有延长的循环半衰期的二氧化硅体对于治疗用途来说通常是理想的。举例来说,在某些实施方案中,维持8小时,或12小时,或24小时或更长时间的二氧化硅体是所期望的。

[0376] 在它们的使用的另一个实例中,负载药物的二氧化硅体可以被并入广泛的局部剂型中,包括但不限于凝胶剂、油、乳液等,例如以用于治疗局部癌症。举例来说,在一些实施

方案中,含有负载药物的二氧化硅体的悬浮液是作为局部乳膏剂、糊剂、软膏剂、凝胶剂、洗剂等配制和施用的。

[0377] 在一些实施方案中,包含本文所述的二氧化硅体的药物制剂另外包含缓冲剂。所述缓冲剂可以是任何药学上可接受的缓冲剂。缓冲系统包括但不限于枸橼酸盐缓冲液、乙酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液以及磷酸盐缓冲液。缓冲剂的实例包括但不限于枸橼酸、枸橼酸钠、乙酸钠、乙酸、磷酸钠和磷酸、抗坏血酸钠、酒石酸、马来酸、甘氨酸、乳酸钠、乳酸、抗坏血酸、咪唑、碳酸氢钠和碳酸、琥珀酸钠和琥珀酸、组氨酸以及苯甲酸钠、苯甲酸等。

[0378] 在一些实施方案中,包含本文所述的二氧化硅体的药物制剂另外包含螯合剂。所述螯合剂可以是任何药学上可接受的螯合剂。螯合剂包括但不限于乙二胺四乙酸(也与EDTA、依地酸、维尔烯酸(versene acid)以及西奎斯特林(sequestrene)同义),和EDTA衍生物,如依地酸二钾、依地酸二钠、依地酸钙二钠、依地酸钠、依地酸三钠以及依地酸钾。其他螯合剂包括枸橼酸(例如枸橼酸一水合物)及其衍生物。枸橼酸的衍生物包括无水枸橼酸、枸橼酸三钠二水合物等。另外的其他螯合剂包括但不限于烟酰胺及其衍生物以及脱氧胆酸钠及其衍生物。

[0379] 在一些实施方案中,包含本文所述的二氧化硅体的药物制剂另外包含含有抗氧化剂的生物活性剂。所述抗氧化剂可以是任何药学上可接受的抗氧化剂。抗氧化剂是本领域的普通技术人员公知的并且包括但不限于诸如以下各项的材料:抗坏血酸、抗坏血酸衍生物(例如抗坏血酸棕榈酸酯、抗坏血酸硬脂酸酯、抗坏血酸钠、抗坏血酸钙等)、丁基化羟基苯甲醚、丁基化羟基甲苯、没食子酸烷基酯、偏硫酸氢钠、硫酸氢钠、连二亚硫酸钠、巯基乙酸钠、甲醛次硫酸氢钠、生育酚及其衍生物(d- α 生育酚、d- α 生育酚乙酸酯、d1- α 生育酚乙酸酯、d- α 生育酚琥珀酸酯、 β 生育酚、 δ 生育酚、 γ 生育酚以及d- α 生育酚聚氧乙二醇1000琥珀酸酯)、单硫代甘油、亚硫酸钠以及N-乙酰半胱氨酸。在某些实施方案中,这样的材料在存在时通常是以0.01%至2.0%的范围添加的。

[0380] 在一些实施方案中,包含本文所述的二氧化硅体的药物制剂是用冷冻保护剂配制的。所述冷冻保护剂可以是任何药学上可接受的冷冻保护剂。常见的冷冻保护剂包括但不限于组氨酸、聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷、乳糖、蔗糖、甘露糖醇、多元醇等。

[0381] 在一些实施方案中,包含本文所述的二氧化硅体的药物制剂是用等张剂配制的。所述等张剂可以是任何药学上可接受的等张剂。该术语在本领域中是与等渗剂可互换使用的,并且已知为被添加到药物制剂中以增加渗透压,例如在一些实施方案中,使渗透压增加到0.9%氯化钠溶液的渗透压(其与人类细胞外液,如血浆是等渗的)的化合物。说明性等张剂包括但不限于氯化钠、甘露糖醇、山梨糖醇、乳糖、右旋糖以及甘油。

[0382] 在某些实施方案中,二氧化硅体的药物制剂可以任选地包含防腐剂。常见的防腐剂包括但不限于选自以下的那些:氯丁醇、对羟基苯甲酸酯、硫柳汞、苯甲醇以及苯酚。合适的防腐剂包括但不限于:氯丁醇(例如0.3% - 0.9% w/v)、对羟基苯甲酸酯(例如0.01% - 5.0%)、硫柳汞(例如0.004% - 0.2%)、苯甲醇(例如0.5% - 5%)、苯酚(例如0.1% - 1.0%)等。

[0383] 在一些实施方案中,包含二氧化硅体的药物制剂是用湿润剂配制的以例如在口服施用时提供令人愉快的口感。本领域已知的湿润剂包括但不限于胆固醇、脂肪酸、甘油、月桂酸、硬脂酸镁、季戊四醇以及丙二醇。

[0384] 在一些实施方案中,在所述制剂中包括乳化剂,例如以确保所有赋形剂完全溶解,特别是疏水性组分,如苯甲醇。许多乳化剂是本领域已知的,例如聚山梨酯60。

[0385] 对于与口服施用相关的一些实施方案,可能期望添加药学上可接受的调味剂和/或甜味剂。诸如糖精、甘油、单糖浆以及山梨糖醇的化合物可用作甜味剂。

[0386] 施用和治疗

[0387] 负载运载物(例如药物)的二氧化硅体可以通过多种技术中的任一种向受试者(例如患者)施用。

[0388] 在某些实施方案中,肠胃外施用所述药物制剂,例如关节内、静脉内、腹膜内、皮下,或肌内。在一些实施方案中,通过推注静脉内、动脉内或腹膜内施用所述药物组合物(参见例如美国专利号3,993,754;4,145,410;4,235,871;4,224,179;4,522,803;以及4,588,578,它们描述了脂质体的施用)。适用于这种施用的特定药物制剂见于Remington's Pharmaceutical Sciences,宾夕法尼亚州费城的麦克出版公司(Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa.),第17版(1985)中。通常,所述制剂包含悬浮在可接受的载体,优选地水性载体中的二氧化硅体的溶液。如上所述,合适的水溶液包括但不限于生理学上相容的缓冲液,如汉克斯溶液(Hanks solution)、林格氏溶液(Ringer's solution),或生理(例如0.9%等张)盐水缓冲液和/或某些乳液制剂。所述一种或多种溶液可以含有配制剂,如助悬剂、稳定剂和/或分散剂。在某些实施方案中,所述一种或多种活性剂可以粉末形式提供以用于在使用之前用合适的媒介物,例如无菌无热原水复原。对于经粘膜施用和/或对于血/脑屏障通过,可以在制剂中使用适用于待渗透的屏障的渗透剂。这些组合物可以通过常规的公知的灭菌技术灭菌或可以无菌过滤。可以将所得的水溶液包装以按原样使用或冻干,在施用之前将冻干制剂与无菌水溶液组合。所述组合物可以含有如接近生理条件所需的药学上可接受的辅剂物质,如pH值调节剂和缓冲剂、张力调节剂、润湿剂等,例如乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、单月桂酸脱水山梨糖醇酯、油酸三乙醇胺酯等,例如如上文所述。

[0389] 在其他方法中,含有本文所述的二氧化硅体的药物制剂可以通过向组织直接施用制剂来与靶组织接触。所述施用可以通过局部、“开放”或“封闭”程序进行。“局部”意指向暴露于环境的组织,如皮肤、口咽、外耳道等直接施用药物制剂。开放程序是包括切开患者的皮肤并且直接可视化接受药物制剂的施用的下层组织的那些程序。这一般是通过手术程序来完成的,如胸廓切开术以进入肺、腹部剖腹术以进入腹部内脏,或进入靶组织的其他直接手术方法。封闭程序是侵入性程序,其中内部靶组织没有被直接可视化,但是经由插入仪器通过皮肤中的小创口进入。举例来说,可以通过针灌洗向腹膜施用所述制剂。同样,所述药物制剂可以通过在腰椎穿刺期间输注来向脑膜或脊髓施用,继而将患者适当定位,如通常对于脊髓麻醉或脊髓的甲泛葡胺成像所实施的那样。或者,所述制剂可以经由内窥镜装置施用。在某些实施方案中,经由套管引入所述药物制剂。

[0390] 在某些实施方案中,经由吸入(例如作为气溶胶)施用包含本文所述的二氧化硅体的药物制剂。吸入可以是用于向肺和/或脑施用的一种特别有效的递送途径。对于通过吸入施用,所述二氧化硅体方便地借助于合适的推进剂以来自加压包装或雾化器的气溶胶喷雾的形式来递送,所述合适的推进剂例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其他合适的气体。在加压气溶胶的情况下,可以通过提供阀门以递送经过计量的量来

确定剂量单位。用于吸入器或吹入器中的由例如明胶制成的胶囊和药筒可以被配制成含有化合物和合适的粉末基质(如乳糖或淀粉)的粉末混合物。

[0391] 在某些实施方案中,本文所述的二氧化硅体被配制用于口服施用。对于口服施用,合适的制剂可以容易地通过将一种或多种二氧化硅体与本领域公知的适用于口服递送的药学上可接受的载体组合来配制。这样的载体使得本文所述的一种或多种活性剂能够被配制成片剂、丸剂、糖衣丸、囊片、糖锭、胶囊锭、胶囊、液体、凝胶剂、糖浆、浆液、悬浮液等以用于由待治疗的患者口服摄入。对于口服固体制剂,例如像粉剂、胶囊以及片剂,合适的赋形剂可以包括填充剂,如糖(例如乳糖、蔗糖、甘露糖醇以及山梨糖醇)、纤维素制剂(例如玉米淀粉、小麦淀粉、米淀粉、马铃薯淀粉、明胶、黄蓍胶、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠)、合成聚合物(例如聚乙烯吡咯烷酮(PVP))、造粒剂;以及粘合剂。如果需要的话,可以添加崩解剂,如交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂,或藻酸或其盐,如藻酸钠。如果需要的话,固体剂型可以使用标准技术包被糖衣或包被肠溶衣。肠溶包衣颗粒的制备公开于例如美国专利号4,786,505和4,853,230中。

[0392] 在各种实施方案中,所述一种或多种二氧化硅体可以被配制成经直肠或经阴道组合物,如栓剂或保留灌肠剂,例如含有常规的栓剂基质,如可可脂或其他甘油酯。配制活性剂以用于经直肠或经阴道递送的方法是本领域技术人员公知的(参见例如Allén (2007) Suppositories, Pharmaceutical Press)并且通常包括将活性剂与合适的基质(例如亲水性材料(PEG);亲脂性材料,如可可脂或Witepsol W45;两亲性材料,如Suppocire AP和聚乙二醇化甘油酯等)组合。针对所期望的熔融/递送特征来选择和配混所述基质。

[0393] 二氧化硅体的递送途径也可能影响它们在体内的分布。二氧化硅体的被动递送涉及使用各种施用途径,例如肠胃外,尽管还设想了其他有效的施用形式,如关节内注射剂、吸入喷雾剂、口服活性制剂、透皮离子电渗疗法,或栓剂。每一种途径产生二氧化硅体定位的差异。

[0394] 由于用于药剂的给药方案是执业医师公知的,因此对于治疗哺乳动物,特别是人类的疾病或病况具有有效性或治疗性的脂质体药剂制剂的量对于本领域技术人员将是显而易见的。本文的制剂的单个剂量的最佳量和间隔将由所治疗的病况的性质和程度、施用的形式、途径以及部位以及所治疗的具体患者决定,并且这样的最佳情况可以通过常规技术来确定。本领域技术人员还将了解的是,最佳治疗过程,例如在限定的天数内每天给予的剂量数可以由本领域技术人员使用常规的治疗过程确定测试来确定。

[0395] 在某些实施方案中,二氧化硅体和/或其药物形成物可以治疗性用于动物(包括人类)以治疗各种癌症或各种感染等,包括需要以下各项的病况:(1)重复施用;(2)药物以它的生物活性形式的持续递送;或(3)与所考虑的游离药物相比,毒性降低而具有合适的功效。在各种实施方案中,二氧化硅体和/或其药物形成物是以治疗有效剂量施用的。术语“治疗有效”在它涉及本文所述的二氧化硅体及其制剂时意指存在的和/或二氧化硅体中的生物活性物质以足以实现所述生物活性物质(治疗剂)预期用于实现的特定医疗效果的方式提供/释放。可以获得的所期望的医疗效果的实例是但不限于化疗、抗生素治疗以及代谢调节。因此,例如,用于癌症化疗的治疗有效剂量可以是有效减慢癌细胞生长和/或增殖,和/或减慢、停止实体肿瘤的生长或缩小或消除实体肿瘤,和/或减慢、停止转移细胞的增殖等的剂量(和/或给药方案)。用于治疗感染的治疗有效剂量可以是足以抑制病原体生长和/或

增殖,和/或杀灭病原体,和/或缓和由病原体产生的一种或多种症状的剂量(和/或给药方案)。

[0396] 确切的剂量将根据诸如具体治疗剂和所期望的医疗效果以及患者因素,如年龄、性别、一般情况等因素而变化。本领域技术人员可以容易地将这些因素考虑在内并且使用它们确定有效的治疗浓度而无需过多的实验。

[0397] 为了向人类(或非人类哺乳动物)施用以治愈性、减轻性、延缓性,或预防性治疗疾病,处方医师将最终确定用于给定人类(或非人类)受试者的药物的适当剂量,并且这预期可以根据个体的年龄、体重,和响应以及患者的疾病的性质和严重程度而变化。在某些实施方案中,由一种或多种二氧化硅体提供的药物的剂量可以约等于游离药物所用的剂量。然而,如上所述,本文所述的二氧化硅体可以显著降低由其所施用的一种或多种药物的毒性并且显著增加治疗窗口。因此,在一些情况下,将利用超过对于游离药物所开出剂量的剂量。

[0398] 在某些实施方案中,在特定时间点施用的封装药物的剂量将在以下范围内:约 $1\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $1,000\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$,或至约 $800\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$,或至约 $600\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$,或至约 $400\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 。举例来说,在某些实施方案中,利用提供以下范围的剂量(剂量方案):约 $1\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $350\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、 $1\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $300\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、 $1\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $250\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、 $1\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $200\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、 $1\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $150\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、 $1\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $100\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $5\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $80\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $5\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $70\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $5\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $60\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $5\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $50\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $5\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $40\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $5\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $20\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $10\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $80\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $10\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $70\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $10\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $60\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $10\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $50\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $10\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $40\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $10\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $20\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $20\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $40\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $20\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $50\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $20\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $90\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $30\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $80\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $40\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $90\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $40\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $100\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $80\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $150\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $80\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $140\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $80\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $135\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $80\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $130\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $80\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $120\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $85\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $140\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $85\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $135\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $85\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $135\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $85\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $130\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$,或约 $85\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $120\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 。在某些实施方案中,在特定时间点施用的剂量还可以是约 $130\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $120\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $100\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $90\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $85\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $80\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $70\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $60\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $50\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $40\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $30\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $20\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $15\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$,或约 $10\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 。

[0399] 还可以使用体内动物模型估计剂量,如将由本领域技术人员所了解的那样。在这方面,对于本文所述的负载伊立替康的二氧化硅体,应当指出的是,在KPC衍生的原位动物模型中Ir-二氧化硅体的有效治疗剂量是约 $40\text{mg}/\text{kg}$,这相当于在70公斤的人类受试者中的 $120\text{mg}/\text{m}^2$ (Liu等人,(2016) ACS Nano, 10:2702-2715)。斐波那契分析(Fibonacci analysis)表明该剂量可以通过 $40\text{mg}/\text{m}^2$ 和 $80\text{mg}/\text{m}^2$ 的起始剂量和中间剂量来实现。

[0400] 所施用的剂量可以高于或低于本文所述的剂量范围,除了其他因素以外,这还取决于组合物的生物利用度、个体对不良副作用的耐受性、施用方式以及上述各种因素。剂量和时间间隔可以根据处方医师的判断单独地调整以提供足以维持治疗作用的组合物的血浆水平。鉴于本文提供的教导,本领域技术人员将能够优化有效局部剂量而无需过多的实

验。

[0401] 还可以在数小时、数天、数周，或数个月的过程中向有需要的个体施用如本文所述的组合物的多次剂量（例如连续或推注）。举例来说但不限于，每天1次、2次、3次、4次、5次，或6次、每隔一天一次、每10天一次、每周一次、每月一次、每周两次、每周三次、每月两次、每月三次、每月四次、每月五次、每隔一个月一次、每隔两个月一次、每隔三个月一次等。

[0402] 治疗方法。

[0403] 在各种实施方案中，提供了使用本文所述的一种或多种纳米颗粒药物载体和/或包含纳米颗粒药物载体的一种或多种药物制剂的治疗方法。在某些实施方案中，所述一种或多种方法包括治疗癌症的方法。在某些实施方案中，所述方法可以包括向有需要的受试者施用有效量的如本文所述的纳米颗粒药物载体和/或包含纳米颗粒药物载体的药物制剂，其中所述纳米颗粒药物载体和/或所述药物制剂中的药物包含抗癌药物。在某些实施方案中，所述纳米颗粒药物载体和/或药物制剂是化疗方案中的主要治疗。在某些实施方案中，所述纳米颗粒药物载体和/或药物制剂是多药化疗方案中的组分。在某些实施方案中，所述多药化疗方案包含选自以下的至少两种药物：伊立替康（IRIN）、奥沙利铂（OX）、5-氟尿嘧啶（5-FU）以及甲酰四氢叶酸（LV）。在某些实施方案中，所述多药化疗方案包含选自以下的至少三种药物：伊立替康（IRIN）、奥沙利铂（OX）、5-氟尿嘧啶（5-FU）以及甲酰四氢叶酸（LV）。在某些实施方案中，所述多药化疗方案至少包含伊立替康（IRIN）、奥沙利铂（OX）、5-氟尿嘧啶（5-FU）以及甲酰四氢叶酸（LV）。

[0404] 在各种实施方案中，本文所述的一种或多种纳米颗粒药物载体和/或包含纳米颗粒药物载体的一种或多种药物制剂有效治疗多种癌症中的任一种。在某些实施方案中，所述癌症是胰腺导管腺癌（PDAC）。在某些实施方案中，所述癌症是选自以下的癌症：急性成淋巴细胞性白血病（ALL）、急性髓性白血病（AML）、肾上腺皮质癌、AIDS相关癌症（例如卡波西氏肉瘤、淋巴瘤）、肛门癌、阑尾癌、星形细胞瘤、非典型畸胎样瘤/横纹肌样瘤、胆管癌、肝外癌、膀胱癌、骨癌（例如尤文肉瘤、骨肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤）、脑干神经胶质瘤、脑肿瘤（例如星形细胞瘤、成胶质细胞瘤、脑和脊髓肿瘤、脑干神经胶质瘤、中枢神经系统非典型畸胎样瘤/横纹肌样瘤、中枢神经系统胚胎性瘤、中枢神经系统生殖细胞肿瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、乳腺癌、支气管肿瘤、伯基特淋巴瘤、类癌肿瘤（例如儿童期、胃肠道）、心脏肿瘤、宫颈癌、脊索瘤、慢性淋巴细胞性白血病（CLL）、慢性骨髓性白血病（CML）、慢性骨髓增殖性病症、结肠癌、结肠直肠癌、颅咽管瘤、皮肤t细胞淋巴瘤、导管癌（例如胆管癌、肝外癌）、原位导管癌（DCIS）、胚胎性瘤、子宫内膜癌、室管膜瘤、食道癌、嗅神经母细胞瘤、颅外生殖细胞肿瘤、性腺外生殖细胞肿瘤、肝外胆管癌、眼癌（例如眼内黑素瘤、成视网膜细胞瘤）、恶性骨纤维组织细胞瘤，和骨肉瘤、胆囊癌、胃（胃部）癌、胃肠道类癌肿瘤、胃肠道间质瘤（GIST）、生殖细胞肿瘤（例如卵巢癌、睾丸癌、颅外癌、性腺外癌、中枢神经系统生殖细胞肿瘤）、妊娠滋养细胞肿瘤、脑干癌、毛细胞白血病、头颈癌、心脏病、肝细胞（肝）癌、组织细胞增多症、朗格汉斯细胞癌、霍奇金淋巴瘤、下咽癌、眼内黑素瘤、胰岛细胞瘤、胰腺神经内分泌肿瘤、卡波西氏肉瘤、肾癌（例如肾细胞癌、肾母细胞瘤以及其他肾肿瘤）、朗格汉斯细胞组织细胞增多症、喉癌、急性成淋巴细胞性白血病（ALL）、急性髓性白血病（AML）、慢性淋巴细胞性白血病（CLL）、慢性骨髓性白血病（CML）、毛细胞白血病、唇和口腔癌、肝癌（原发性）、小叶原位癌（LCIS）、肺癌（例如儿童期肺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌）、淋巴瘤（例如AIDS相关淋巴

瘤、伯基特淋巴瘤(例如非霍奇金淋巴瘤)、皮肤T细胞淋巴瘤(例如蕈样真菌病、塞扎里综合征)、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、原发性中枢神经系统(CNS)淋巴瘤)、巨球蛋白血症、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、男性乳腺癌、骨恶性纤维组织细胞瘤和骨肉瘤、黑素瘤(例如儿童期黑素瘤、眼内(眼睛)黑素瘤)、梅克尔细胞癌、间皮瘤、转移性鳞状颈癌、中线道癌、口腔癌、多发性内分泌肿瘤综合征、多发性骨髓瘤/浆细胞肿瘤、蕈样真菌病、骨髓增生异常综合征、慢性骨髓性白血病(CML)、多发性骨髓瘤、鼻腔和鼻旁窦癌、鼻咽癌、成神经细胞瘤、口腔癌、唇和口咽癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、胰腺神经内分泌肿瘤(胰岛细胞瘤)、乳头状瘤病、副神经节瘤、鼻旁窦和鼻腔癌、甲状腺旁腺癌、阴茎癌、咽癌、嗜铬细胞瘤、垂体瘤、浆细胞肿瘤、胸膜肺母细胞瘤、原发性中枢神经系统(CNS)淋巴瘤、前列腺癌、直肠癌、肾细胞(肾)癌、肾盂和输尿管癌、移行细胞癌、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、肉瘤(例如尤文肉瘤、卡波西氏肉瘤、骨肉瘤、横纹肌肉瘤、软组织肉瘤、子宫肉瘤)、塞扎里综合征、皮肤癌(例如黑素瘤、梅克尔细胞癌、基底细胞癌、非黑素瘤)、小肠癌、鳞状细胞癌、隐匿性原发性鳞状颈癌、胃部(胃)癌、睾丸癌、咽喉癌、胸腺癌和胸腺癌、甲状腺癌、滋养细胞肿瘤、输尿管和肾盂癌、尿道癌、子宫癌、子宫内膜癌、子宫肉瘤、阴道癌、外阴癌、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症以及肾母细胞瘤。

[0405] 在某些实施方案中,所述纳米颗粒药物载体不与iRGD肽缀合并且所述纳米颗粒药物载体联合iRGD肽施用(例如所述纳米颗粒药物载体和iRGD肽作为单独的制剂共同施用)。

[0406] 在某些实施方案中,所述一种或多种方法包括治疗感染的方法。在某些实施方案中,所述方法可以包括向有需要的受试者施用有效量的如本文所述的纳米颗粒药物载体和/或包含纳米颗粒药物载体的药物制剂,其中所述纳米颗粒药物载体和/或所述药物制剂中的药物包含抗微生物剂或抗病毒剂。在某些实施方案中,所述感染包括医院感染。在某些实施方案中,所述感染是由病毒病原体、细菌病原体或真菌病原体所引起的。在某些实施方案中,所述感染包括血流感染(BSI)、肺炎(例如呼吸机相关肺炎(VAP))、胃肠道感染、泌尿道感染(UTI)、手术部位感染(SSI),或皮肤感染。在某些实施方案中,所述感染是由诸如以下的病原体所引起:金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) (例如血液感染)、大肠杆菌(例如UTI)、肠球菌(*Enterococci*) (例如血液、UTI、伤口)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) (例如肾脏或呼吸道感染)、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*) (例如肺)等。在某些实施方案中,所述感染是病毒感染(例如HIV、乙型肝炎、丙型肝炎等)。

[0407] 在某些实施方案中,所述感染是由耐药性病原体所引起的。说明性耐药性病原体包括但不限于甲氧西林抗性金黄色葡萄球菌(MRSA)、万古霉素抗性肠球菌(VRE)和多药抗性结核分枝杆菌(MDR-TB)以及肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)碳青霉烯酶产生细菌(KPC)。

[0408] 在这些治疗方法的各种实施方案中,所述纳米颗粒药物载体和/或药物制剂是经由选自以下的途径施用的:静脉内施用、动脉内施用、脑内施用、鞘内施用、口服施用、气溶胶施用、经由吸入施用(包括鼻内和气管内递送)、经由套管进行颅内施用以及皮下或肌内贮库沉积。在某些实施方案中,所述纳米颗粒药物载体和/或药物制剂作为注射剂、从IV滴注袋,或经由药物递送套管施用。在各种实施方案中,所述受试者是人类并且在其他实施方案中,所述受试者是非人类哺乳动物。

[0409] 试剂盒。

[0410] 在某些实施方案中，试剂盒含有本文所述的脂质双层包被的纳米颗粒药物载体以用于治疗病变(例如癌症、微生物感染、病毒感染等)。所述试剂盒通常包括如本文所述的负载药物的二氧化硅体和/或包含本文所述的负载药物的二氧化硅体的免疫缀合物。在某些实施方案中，所述二氧化硅体含有伊立替康。在某些实施方案中，所述二氧化硅体连接有iRGD肽，而在其他实施方案中，所述试剂盒含有单独的iRGD肽，其被配制用于与负载药物(例如伊立替康)的二氧化硅体或二氧化硅体免疫缀合物共同施用。

[0411] 此外，在某些实施方案中，所述试剂盒可以包括说明材料，所述说明材料公开了负载药物的二氧化硅体或二氧化硅体免疫缀合物的使用方式(例如作为用于胰腺癌、胃癌、宫颈癌、卵巢癌等的治疗剂)。

[0412] 此外，所述试剂盒任选地包括标签材料和/或说明材料，其提供了关于本文所述的纳米颗粒药物载体的使用，例如单独或组合用于治疗各种癌症的指导(例如方案)。说明材料还可以包括推荐剂量、禁忌症的说明等。

[0413] 虽然各种试剂盒中的说明材料通常包括书面或印刷材料，但是它们不限于此。能够存储这样的说明并且将它们传达给最终使用者的任何介质由本发明所考虑。这样的介质包括但不限于电子存储介质(例如磁盘、磁带、盒式磁带、芯片)、光学介质(例如CD ROM)等。这样的介质可以包括提供这样的说明材料的互联网网站的地址。

[0414] 实施例

[0415] 提供以下实施例以说明，而非限制要求保护的发明。

[0416] 实施例1

[0417] 脂质包被的中孔二氧化硅纳米颗粒的伊立替康递送与脂质体相比对于胰腺癌显示出提高的功效和安全性

[0418] 由于脂质体载体可能不能提高高毒性药物，如伊立替康的安全性的担忧，因此我们关注的是，使用施加到中孔二氧化硅纳米颗粒(MSNP)的被支撑的脂质双层(LB)以观察这是否将产生更稳定的载体(与脂质体相比)。由于可以用于药物包装的大内表面积、可调的孔径、载体稳定性以及受控的药物释放能力，因此MSNP已经被证实为构成了用于癌症治疗的通用的和多功能的纳米载体平台(Lu等人(2007)Small, 3:1341-1346; Slowing等人(2008)Adv. Drug Deliv. Rev. 60:1278-1288; Meng等人(2010)J. Am. Chem. Soc. 132 (36) : 12690-12697; Lee等人(2010)Angew. Chem. 122:8390-8395; Meng等人(2011)ACS Nano, 5 (5) : 4131-4144; He和Shi(2011)J. Mater. Chem 21:5845-5855; Gao等人(2011)ACS Nano, 5: 9788-9798; Li等人(2012)Chem. Soc. Rev. 41:2590-2605; Tang等人(2012)Adv. Mat. 24 (12) : 1504-1534; Meng等人(2013)ACS Nano, 7 (2) : 994-1005; Tarn等人(2013)Acc. Chem. Res. 46 (3) : 792-801; Meng等人(2013)ACS Nano, 7 (11) : 10048-10065; Argyo等人(2014)Chem. Mater. 26:435-451; Meng等人(2015)ACS Nano, 9 (4) : 3540-3557)。此外，MSNP是可生物降解的并且在广泛的动物测试中被证明是安全的(Meng等人(2011)ACS Nano, 5 (5) : 4131-4144; Tang等人(2012)Adv. Mat. 24 (12) : 1504-1534; Meng等人(2013)ACS Nano, 7 (2) : 994-1005; Tarn等人(2013)Acc. Chem. Res. 46 (3) : 792-801; Meng等人(2013)ACS Nano, 7 (11) : 10048-10065; Meng等人(2015)ACS Nano, 9 (4) : 3540-3557; Lu等人(2010)Small, 6 (16) : 1794-18050)。虽然有可能通过浸入将伊立替康或喜树碱引入到MSNP中，但是这种方法是相对低效的(负载容量<10重量%) (Lu等人(2007)Small, 3:1341-1346; He等人(2010)

Biomaterials 31:3335-3346) 并且可能导致不佳的药物保留 (Meng等人 (2010) J.Am.Chem.Soc.132(36):12690-12697)。然而,我们已经开发了可以用于通过被支撑的LB 进行快速GEM封装的生物膜技术 (Meng等人 (2015) ACS Nano, 9 (4):3540-3557)。虽然已经公开了许多LB包被程序,包括脂质体相互作用和与颗粒表面融合 (Liu等人, (2009) J.Am.Chem.Soc., 131 (22):7567-7569; Liu等人, (2009) J.Am.Chem.Soc., 131 (4):1354-1355) 或利用EtOH分散脂质溶液的溶剂交换 (Cauda等人 (2010) Nano Lett.10:2484-2492),但是使用生物膜技术提供了更可再现的和完全的包被、快速封装以及提高的载体稳定性 (Meng等人 (2015) ACS Nano, 9 (4):3540-3557)。这不仅允许LB-MSNP实现高达40重量%GEM 的负载容量,而且它还使得能够共同递送紫杉醇 (PTX),所述紫杉醇可以被并入LB中(同上)。这允许我们开发协同和比率计量设计的载体以用于在小鼠的原位人类PDAC模型中进行PDAC治疗(同上)。最近,Zhang等人报道了用于递送伊立替康的聚合物-脂质支撑MSNP,但是药物负载量较低(即约16重量%) (Zhang等人 (2014) Biomaterials, 35:3650-3665)。

[0419] 在该实施例中,我们为LB-MSNP平台特别引入了一种新颖设计特征,其中使用LB封装质子化剂;这允许高伊立替康药物负载的远程负载,这利用了药物的弱碱性特性 ($pK_a=8.1$)。此外,被支撑的LB的增加的能力还允许我们与脂质体等同物进行比较分析,其中使用无支撑的LB囊泡通过捕集剂蔗糖八硫酸酯三乙铵 (TEA₈SOS) 远程负载伊立替康 (Drummond等人 (2006) Cancer Res., 66 (6):3271-3277; Von Hoff等人 (2013) Br.J.Cancer, 109 (4):920-925)。MSNP载体不仅在稳健的原位PDAC模型中实现了比脂质体制剂更高的负载容量和肿瘤杀伤,而且它还由于提高的载体稳定性和减少的泄漏而防止了伊立替康毒性。这提供了通过LB包被的载体降低高毒性化疗剂的毒性的创新方法,这允许使用伊立替康作为用于PDAC的一线治疗选择方案而不是被保留用于GEM治疗失败(当前FDA改进的关于使用脂质体载体的适应症)。

[0420] 结果

[0421] 经由使用包被的LB和质子梯度实现MSNP中的高伊立替康负载。

[0422] 我们第一次尝试是产生通过LB包衣封装伊立替康的MSNP载体,所述LB包衣提供了快速的和均匀的孔隙密封 (Meng等人 (2015) ACS Nano, 9 (4):3540-3557)。这允许被动包封22重量%的伊立替康(相对于MSNP重量)。为了进一步提高负载容量,我们还确定了质子化剂的包封是否将能够扩散穿过LB的两亲性伊立替康转化成保留在孔隙中的亲水性衍生物(图1A,图A1)。我们和其他人已经在脂质体中使用这种包封程序有效地导入和封装弱碱性药物,如GEM和伊立替康 (Chou等人 (2003) J.Biosci.Bioeng., 95 (4):405-408; Meng等人 (2013) ACS Nano, 7 (11):10048-10065; Haran等人 (1993) Biochim.Biophys.Acta, Biomembr.1151:201-215)。虽然多阴离子化合物TEA₈SOS先前从未被用于MSNP平台中,但是它被用于MM-398中以包封伊立替康 (Drummond等人 (2006) Cancer Res., 66 (6):3271-3277)。TEA₈SOS是质子产生剂,其在水解时释放八个H⁺离子和八价SOS⁸⁻(图1A,图A2)。使用离子交换色谱法产生TEA₈SOS,将其浸入MSNP中,如下文在方法部分中所述的那样(同上)。将浸泡的颗粒引入包被有脂质生物膜的圆底烧瓶中,所述脂质生物膜由3:2:0.15的摩尔比的DSPC/胆固醇/DSPE-PEG2000构成。最佳的脂质:颗粒比被确定为1.1:1.0。对悬浮液进行超声处理产生LB包被的颗粒,这些颗粒含有包封剂(图1A,图A1)。立即将这些颗粒在伊立替康溶液中温育,从而允许所述药物被导入,质子化,并且在与SOS⁸⁻结合时作为凝胶状沉淀物

被包封在所述孔隙中(图1A的图A1和A2、图1B)。这允许我们实现高达80重量%的伊立替康负载容量(图1B),这近似于具有 $850\text{m}^2/\text{g}$ 的组合表面积和约 $0.7\text{cm}^3/\text{g}$ 的孔体积的多孔载体的理论最大负载容量(约100重量%),如先前所证实(Meng等人(2015)ACS Nano,9(4):3540-3557)。使用含有50重量%伊立替康的颗粒进行后续的研究。

[0423] 为了比较负载伊立替康的LB-MSNP(Ir-LB-MSNP)与使用TEA₈SOS的脂质体载体的功效和安全性,通过类似于MM-398的程序构建脂质体(图1A,图A3)(Drummond等人(2006)Cancer Res.,66(6):3271-3277)。这产生了具有约40重量%伊立替康的负载容量的脂质体(命名为“Ir-脂质体”);这显著高于在不存在包封剂的情况下产生脂质体(约5重量%)(图1B)。冷冻电子显微镜术(cryoEM)揭示脂质体和LB-MSNP的粒度分别是约75nm和约80nm(图1C)。高放大倍数的cryoEM图像确认了Ir-LB-MSNP被完整约7nm厚的双层均匀包被。低放大倍数cryoEM图像显示在>99%的颗粒中LB是完整的(图11)。这确认了单步封装方案的再现性,其相对于MSNP双层包被的其他方法具有显著的进步(Meng等人(2015)ACS Nano,9(4):3540-3557)。

[0424] 由于我们的主要假设是LB-MSNP与脂质体相比可以提高载体稳定性,因此将这两种载体在血清中温育并且冻干以确定它们的药物保留能力和伊立替康泄漏。在连续和平缓的振荡下,将这两种载体在37°C下在100%血清中温育24小时。由于血清蛋白的吸附干扰cryoEM可视化,因此改为使用高效液相色谱法(HPLC)分析,以确定载体悬浮液中的药物释放;这显示LB-MSNP有<6%的过早伊立替康释放,相比之下,脂质体有约22%的过早伊立替康释放(图1D)。然而,在4°C将颗粒在无血清悬浮液中储存90天显示这两种载体均具有高胶体稳定性,有较少(<5%)的过早药物释放或流体动力学粒度变化(<5%)。相反,在冷冻保护性5%右旋糖溶液40中进行颗粒冻干显示在水中重悬时载体稳定性的显著性差异(图1E)。因此,虽然Ir-LB-MSNP没有改变流体动力学尺寸并且仅引起2.7%的药物释放,但是脂质体明显聚集并且释放它们的伊立替康含量的20.8%。这确认了尽管LB包被的载体在形态上看起来相似,但是LB-MSNP比脂质体显著更稳定。

[0425] 在Kras衍生的原位PDAC模型中与脂质体相比LB-MSNP具有改进的生物分布、药物代谢动力学(PK)以及伊立替康递送

[0426] 在免疫活性B6/129小鼠中进行生物分布和PK研究,所述小鼠被原位植入了源自于转基因KrasLSL-G12D+/Trp53LSL-R172H+/Pdx-1-Cre(KPC)动物中的自发性PDAC肿瘤的表达荧光素酶的细胞系(Hingorani等人(2005)Cancer Cell,7:469-483)。KPC衍生的原位模型在Kras突变、相对大量的基质的表达、局部组织侵袭以及转移发展方面模拟了人类PDAC(Tseng等人(2010)Clin.Cancer Res.16:3684-3695;Provenzano等人(2013)Br.J.Cancer,108:1-8;Torres等人(2013)PLoS One,8:e80580)。原发肿瘤在原位植入部位处在2周-3周内产生,在约5周时出现转移,这与文献相一致(图12)(同上)。为了跟踪伊立替康载体向肿瘤部位的生物分布,在原位植入之后3周向动物静脉内注射近红外(NIR)标记(Dylight 680)的脂质体或LB-MSNP(图2A)。在静脉内注射100mg/kg标记的LB-MSNP或脂质体之前(第2列)和之后在所示的时间点(第3-6列,图2A)获得IVIS成像。这与生物发光IVIS成像结合以检测接受D-荧光素的腹膜内(IP)注射的动物中发展中的肿瘤中的荧光素酶表达(图2A,第一列)。在LB-MSNP注射的2小时内肿瘤部位处观测到稳健的荧光强度,之后该信号持续至少48小时。相反,在接受脂质体(具有类似的标记效率)注射的小鼠中,NIR信号

强度更暗并且更快地消失。这还通过在注射后24小时之后处死之后从动物收集的肿瘤和主要器官的离体成像来确认(图2B)。还在48小时之后进行离体成像,这确认了与脂质体处理的动物相比,在LB-MSNP中在操作人员限定的所关注的区域(ROI)中NIR信号强度更强(图13)。除了在肿瘤部位处大量的颗粒摄取之外,肝脏和脾脏也是颗粒分布的主要部位。在肺、心脏以及肾脏中获得很少的信号传导。定量肿瘤组织和主要器官中的硅(Si)丰度的电感耦合等离子体光发射光谱法(ICP-OES)显示总施用的元素Si剂量的约3%可以分布到发展中的肿瘤部位(图14)。这代表了与脂质体、聚合物胶束、明胶,或MoS₂/Fe₃O₄纳米颗粒相比非常好的生物分布,其中分布到PDAC部位的颗粒的百分比达到0.2%-2.4%(Yoshida等人(2012)PLoS One,7:e39545;Yu等人(2015)Theranostics,5:931-945;Cabral等人(2011)Nat.Nanotechnol.6:815-823;Guo等人(2013)Biomaterials 34:8323-8332;Xu等人(2013)Mol.Pharmaceutics,10:2031-2044)。我们还获得了肿瘤切片以用于通过共聚焦显微镜术可视化NIR标记的颗粒的肿瘤内分布;这显示与脂质体相比LB-MSNP在24小时之后在肿瘤部位处的颗粒丰度更高(图2B)。为了评估肿瘤部位处的伊立替康含量,以游离药物、Ir-LB-MSNP(60mg/kg药物;120mg/kg颗粒剂量)或Ir-脂质体(60mg/kg药物;150mg/kg颗粒剂量)的形式作为单次剂量注射60mg/kg当量的药物。在0.5小时、4小时、24小时以及48小时之后将动物处死以用于血液收集和肿瘤收获。将这些组织用于HPLC分析以定量伊立替康组织含量,在24小时之时,Ir-LB-MSNP和Ir-脂质体是游离药物的5倍和2倍(图2C)。通过使用血浆药物浓度的HPLC定量来计算伊立替康的循环半衰期,并且LB-MSNP、脂质体以及游离药物分别被计算为11小时、8.7小时以及1.0小时(图2D)。可从小鼠获得的血液体积的逻辑限制使我们无法确定载体的血液停留时间。我们还在皮下PANC-1异种移植模型中进行生物分布和PK研究,其中我们观测到Ir-LB-MSNP和Ir-脂质体的肿瘤药物含量分别增加到游离药物的30倍和4倍(图15)。我们还比较了单个器官的药物含量(图16)。这显示在注射后24小时之时,Ir-脂质体在肝脏、脾脏以及肠组织中的药物含量分别是Ir-LB-MSNP的0.8倍、0.2倍以及0.2倍。对于肾脏没有看到显著性差异。

- [0427] 在原位PDAC模型中Ir-LB-MSNP提供了比游离药物或Ir-脂质体更有效的杀伤。
- [0428] 为了开发用于功效评估的剂量探索方案,我们使用来自美国国家癌症研究所的方案以在健康小鼠中确定最大耐受剂量(MTD)(Drummond等人(2006)Cancer Res.,66(6):3271-3277)。该评估显示游离伊立替康、Ir-脂质体以及Ir-LB-MSNP的MTD分别是60mg/kg、295mg/kg以及295mg/kg(图3A)。选择40mg/kg(相当于游离药物或封装药物量的MTD的66.7%或13.3%)的药物剂量进行后续的实验。对于Ir-LB-MSNP或Ir-脂质体,这些剂量分别相当于80mg/kg或100mg/kg的纳米颗粒剂量。在 2×10^6 个KPC细胞的原位肿瘤植入之后第14天开始静脉内注射;此时,平均原发肿瘤尺寸是约5mm而没有宏观转移。每4天重复静脉内注射一次,进行最多8次重复(图3B)。对照组包括仅接受静脉内盐水的动物。在设定的时间点,通过IVIS生物发光成像来监测原位肿瘤生长(图3B)。通过确定ROI中的成像强度的IVIS软件定量表示肿瘤生长显示与盐水、游离药物,或Ir-脂质体相比,Ir-LB-MSNP处理使肿瘤生长显著更慢(图3B)。还根据从在第40天-第47天处死的动物中收集的肿瘤外植体中细胞凋亡的速率来测量抗肿瘤功效。利用免疫组织化学(IHC)染色方案来检测激活(切割)的胱天蛋白酶-3,我们在Ir-LB-MSNP处理的小鼠中观测到约25%的细胞凋亡性细胞死亡,相比之下,对于游离伊立替康或Ir-脂质体分别观测到约6%和约11%的细胞凋亡性细胞死亡

(图3C)。

[0429] 代表性IHC图像示于图17中。尽管我们没有着手进行正式的存活率研究,但是有可能在47天之后使用卡普兰-迈耶数据显示来比较在研究的不同阶段存活动物的数量(图18)。这显示相对于游离药物,这两种载体的存活率提高,包括Ir-LB-MSNP的存活率比脂质体制剂更好(图18)。

[0430] 进行动物尸检以评估局部肿瘤扩散和转移的出现(图3D)。除了胃、肠、肝脏、脾脏、肾脏、横隔膜以及腹壁的直接肿瘤侵袭之外,在盐水处理的动物中还可以看到许多宏观转移灶,这些动物还产生血性腹水。虽然游离伊立替康不能影响转移,但是Ir-脂质体在转移部位处提供了适度的生物发光强度降低(图3D)。与之形成鲜明对比的是,Ir-LB-MSNP处理发挥了强效的抑制作用,证据是在IVIS成像期间原发肿瘤区域外的生物发光暗淡(图3D)。这在肾脏区域中是特别显著的,所述肾脏区域在HPLC分析期间显示出伊立替康的更高而非显著的含量(图16)。图3E中的热图提供了处理对肿瘤转移的影响的定量显示。

[0431] 在小鼠原位模型中LB-MSNP提高了伊立替康递送的安全性,但是脂质体不是这样。

[0432] 由于伊立替康以主要方式导致FOLFIRINOX毒性,因此通过封装递送降低药物毒性的可能性是主要的研究目标。MTD评估显示这两种载体均能够使急性致死剂量增加到游离药物的约5倍(图3A)。为了经由封装药物递送解决伊立替康毒性(图3B),从功效研究中处死的动物中收集肝脏、胸骨骨髓以及肠组织。这些是PDAC患者中伊立替康毒性的主要靶器官(Conroy等人(2011)N Engl J Med. 364 (19) :1817-1825; Ueno等人(2007)Cancer Chemother Pharmacol. 59 (4) :447-454; Loupakis等人(2013)Br J Cancer, 108 (12) :2549-2556)。对肝脏的组织学检查显示在接受游离药物处理的动物中严重和广泛的肝细胞坏死(图4A)。这反映在肝细胞中致密和碎裂的核的存在(Ziegler等人(2004)News Physiol Sci. 19:124-128)。虽然Ir-脂质体在一定程度上降低了肝损伤的严重程度,但是观测到广泛的肝坏死(图4A)。相反,Ir-LB-MSNP处理的动物仅表现出轻微的脂肪变性,这是可逆的药物诱导的应激反应,而没有坏死(图4A)(King和Perry(2001)Oncologist, 6:162-176; Maor和Malnick(2013)Int J Hepatol Art:815105)。组织学数据也由IHC分析确认,其中使用肝组织来对库普弗细胞(Kuppfer cell) (KC)进行染色(用FITC标记的抗F4/80抗体),用RITC标记的抗体(识别切割的胱天蛋白酶-3)检测凋亡细胞并且用Hoechst 33342(蓝色染料)对细胞核进行染色(图4B)。在荧光显微镜下检查染色的切片显示在接受游离药物处理的动物的整个肝脏中广泛的细胞凋亡。接受Ir-脂质体处理的动物显示出更少的细胞凋亡,其经常累及KC或相邻的肝组织。相反,在接受Ir-LB-MSNP处理的动物的肝脏中没有看到细胞凋亡。

[0433] 虽然GI道的H&E染色没有揭示出处理组中的任一个中毒性的显微镜证据,但是针对切割的胱天蛋白酶-3的IHC染色显示出由游离药物所引起的凋亡细胞的存在和肠绒毛的变钝(图4C)。虽然用Ir-脂质体进行的处理防止了绒毛的变钝,但是IHC染色揭示了顶端肠上皮细胞中细胞凋亡的存在。这与用Ir-LB-MSNP进行的处理形成鲜明对比,所述处理没有引起任何细胞凋亡或对绒毛的损伤(图4C)。

[0434] 在单独的实验中研究骨髓毒性,其中动物接受40mg/kg伊立替康剂量当量的三次注射,如上文所述。在处死之后,收集胸骨骨髓以通过H&E染色评价骨髓毒性(图4D)(Iusuf等人(2014)Mol Cancer Ther. 13:492-503)。虽然接受游离药物或Ir-脂质体处理的动物显

示出广泛的骨髓损伤,由<30%的骨髓腔由造血细胞填充(Travlos (2006) Toxicol.Pathol.34:566-598)所证实,但是在Ir-LB-MSNP处理的动物中骨髓细胞构成没有变化(图4D)。此外,游离药物或Ir-脂质体对骨髓的损伤伴有外周血液中性粒细胞减少,而Ir-LB-MSNP处理显示出中性粒细胞计数的非显著性下降(图19)。综上所述,这些数据显示在用Ir-LB-MSNP处理期间全身毒性和靶器官毒性显著降低,而脂质体载体仍表现出相当大的器官毒性。

[0435] 讨论

[0436] 我们使用被支撑的LB和产生质子的包封剂开发了一种定制设计的中孔二氧化硅纳米颗粒平台,以用于高剂量伊立替康负载和递送,并且在免疫活性小鼠的KPC衍生的胰腺癌模型中对它进行测试。使用相同的负载程序和捕集剂(TEA_8SOS),与内部合成的MM-398脂质体等同物相比,所述载体的稳定性和负载容量提高改进了伊立替康的生物分布、循环半衰期以及药物肿瘤含量。Ir-LB-MSNP不仅在原发肿瘤部位处更有效地诱导肿瘤杀伤,而且它在治疗转移方面也是更具活性的。同样重要的是,LB-MSNP载体没有诱导明显的全身毒性,与之形成鲜明对比的是,脂质体对骨髓、胃肠道以及肝脏具有不良影响。我们将在维持治疗功效的情况下毒性降低归因于与脂质体相比LB-MSNP的载体能力增加。因此,LB-MSNP载体提供了用于引入伊立替康以治疗PDAC的创新的方法,有可能促进这种药物用作一线考虑而不是被保留用于GEM治疗失败的患者,正如最近FDA改进的脂质体载体目前的情况那样。

[0437] 我们已经开发了一种用于伊立替康的稳健的MSNP载体,其与脂质体等同物具有形态相似性。然而,除了由完整的被支撑的LB提供的优越的药物封装之外,LB-MSNP还允许由于键合和/或静电相互作用而倚靠多孔二氧化硅侧壁进行致密药物包装(Tarn等人(2013)Acc.Chem.Res.46(3):792-801;Meng等人(2010)ACS Nano,4:4539-4550;Ashley等人(2011)Nat.Mater.,10:389-397)。与脂质体相比,这允许我们实现提高的伊立替康负载容量,其在原位肿瘤部位处提供优越的杀伤效率。提高的负载容量进一步由被支撑的LB稳定性辅助,这与脂质体双层相比在血液循环和生物分布到肿瘤部位期间提高运载物保护。我们提出,被支撑的LB的波动减少(这大概是由与颗粒表面稳固的静电相互作用和范德华(van der Waals)相互作用)减少了由于血清蛋白与无支撑的脂质双层(脂质体)相互作用所造成的脂质损失。被支撑的LB还可以保护载体防止补体介导的裂解和在血液流动期间产生的剪切力(Liu等人(2000)In:Colloids and Surfaces A:Physicochemical and Engineering Aspects,172(1-3):57-67;Heurtault等人(2003)Biomaterials,24(23):4283-4300;Ashley等人(2011)Nat.Mater.,10:389-397;Liang等人(2004)J.Colloid Interface Sci.278:53-62;Anderson等人(2009)Langmuir,25:6997-7005;Michel等人(2012)Int.J.Mol.Sci.13:11610-11642;Wang等人(2014)Small 10:3927-3931)。举例来说,在37°C下在模拟的含有血清的生物流体环境中在24小时内,负载多柔比星的DOPC脂质体表现出约40%的药物泄漏(Ashley等人(2011)Nat.Mater.,10:389-397)。这与我们的发现相一致,即,虽然Ir-脂质体作为纳米载体是有效的,但是其在全血清中或在颗粒冻干和重悬之后与Ir-LB-MSNP相比显著不太稳定(图1D和1E)。在动物研究中高毒性拓扑异构酶抑制剂从Ir-脂质体中的过早释放还伴有骨髓、肝脏以及肠中的高毒性率,这与Ir-LB-MSNP的保护作用完全不同。因此,尽管与脂质体具有形态相似性,但是从功效和药物毒性这两个角

度来看,LB-MSNP载体与脂质体伊立替康递送相比提供了明显的优势。

[0438] 从最近FDA批准的MM-398脂质体制剂Onivyde以在治疗PDAC患者期间可能的严重中性粒细胞减少症和腹泻的黑框警告销售的角度来看,Ir-LB-MSNP的骨髓和肠毒性降低是值得注意的(参见例如www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm468654.htm; www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2015/207793LB.pdf)。该警告声明,在0.8%的患者中观测到致命的中性粒细胞减少性败血病,而在3%中发生严重的或危及生命的中性粒细胞减少性发热(www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2015/207793LB.pdf)。在接受Onivyde与5-氟尿嘧啶和甲酰四氢叶酸的组合的20%患者中观测到危及生命的中性粒细胞减少症(同上)。相同的药物组合在13%治疗的受试者中还引起严重的腹泻(同上)。尽管我们没有使用Onivyde进行比较,但是使用TEA₈SOS进行伊立替康负载的内部脂质体制剂与显著的骨髓和肠毒性有关,这类似于游离药物。在用Ir-LB-MSNP平台治疗期间没有看到类似的影响。

[0439] 有趣的是,MSNP载体和脂质体载体这两者均由肝脏中的KC隔离,如通过使用NIR标记的颗粒和FITC标记的抗F4/80抗体进行共聚焦显微镜术所证实(未示)。虽然难以提供直接的体内验证,但是我们提出,LB的崩解和伊立替康释放在KC中的酸性内体/溶酶体隔室中开始(Hwang等人(1980) Proc.Natl.Acad.Sci.USA,77:4030-4034;Derksen等人(1988) *Biochim.Biophys.Acta,Bioenerg.* 971:127-136;Kolter和Sandhoff(2010) *FEBS Lett.* 584:1700-1712)。脂质体的更快的崩解可以解释为何与大量Ir-LB-MSNP的存在相比,在接受Ir-脂质体注射的动物中仅看到稀少的NIR标记的颗粒(图2B)。载体崩解的速率进而可以决定药物向旁观者肝细胞释放的速率。这提高了伊立替康从脂质体载体中的突释可能超过所述药物的肝脏代谢的可能性,所述肝脏代谢是由CYP 3A和尿苷二磷酸葡萄糖醛酸基转移酶(UGT1A1)进行的(Mathijssen等人(2001) *Clin.Cancer Res.* 7:2182-2194)。代谢减少可能导致非代谢药物的更高保留,这会造成肝细胞损伤和坏死,如图4A中所示。这可以解释在静脉内注射后24小时,接受Ir-脂质体处理的动物的肝脏组织中非缀合的伊立替康的含量与Ir-LB-MSNP相比显著更高,即26% ID/g相比于15% ID/g(图16)。这些发现也与KC和激活的胱天蛋白酶-3的IHC染色相容,所述IHC染色显示在用Ir-脂质体处理期间KC和相邻肝细胞中细胞死亡率高,相比之下,在Ir-LB-MSNP处理的动物中不存在细胞凋亡(图4B)。图4E中的示意图概述了我们关于载体稳定性和伊立替康从KC释放的速率在决定肝细胞凋亡和坏死的程度中的作用的假设(Zhao等人(2015) *In vivo.Sci.Bull.*,60:3-20)。不可能测量肝酶,这是因为在垂死状态下可以从动物获得的血液的量有限。

[0440] GEM经常用作PDAC的一线治疗,具有6.8个月的存活期结果(Burris等人(1997) *J.Clin.Oncol.*,15:2403-2413;Teague等人(2014) *Ther.Adv.Med.Oncol.* 7:68-84)。虽然FOLFIRINOX可以将存活期延长到约11个月,但是严重药物毒性的频繁发生(主要是由于伊立替康和奥沙利铂)妨碍了它用作一线治疗。因此,FOLFIRINOX常常被保留用于具有良好表现状态的患者。令人遗憾的是,该地位并没有随着Onivyde的引入而发生改变,Onivyde没有被批准作为一线治疗并且包括严重腹泻和中性粒细胞减少症的黑框警告。由于约80%的PDAC患者处于疾病的晚期阶段,因此使用FOLFIRINOX方案中的药物作为一线治疗将是有利的。尽管我们没有使用Onivyde进行比较分析,但是Ir-LB-MSNP平台与我们的等同内部Ir-脂质体制剂相比是更有效的和生物相容的而具有更低的全身毒性。我们因此提出,Ir-LB-

MSNP平台可以被开发用于PDAC的一线治疗。我们最近已经在PDAC模型中证实了用于GEM和PTX的双重递送MSNP载体的可行性(Meng等人(2015)ACS Nano,9(4):3540-3557)。每一种治疗方法应当在实施之前仔细考虑设计复杂性、成本以及对优良制造规范的影响(Sugahara等人(2010)Science,328:1031-1035)。

[0441] 尽管脂质包被的MSNP已经被证实为对于体外和/或体内运载物递送是有效的(Meng等人(2015)ACS Nano,9(4):3540-3557;Zhang等人(2014)Biomaterials,35:3650-36651;Ashley等人(2011)Nat.Mater.,10:389-397;Ashley等人(2012)ACS Nano,6:2174-2188;Dengler等人(2013)J.Controlled Release,168:209-224),但是这是首次验证了质子化剂如何可以用于增加该载体平台的负载效率。我们还已经鉴定出可以经由质子梯度负载到LB-MSNP中的弱碱性药物的综合清单。这些运载物分子的一般特征包括以下化学特性:

[0442] (i) 包括一个或多个伯胺、仲胺、叔胺或季胺的有机分子化合物;

[0443] (ii) $pK_a < 11$ 以允许在LB后面质子化和包封(Zucker等人(2009)J.Control.Release,139(1):73-80;Cern Cern等人(2012)J.Control.Release,160(2):147-157;Xu等人(2014)Pharmaceut.Res.31(10):2583-2592);

[0444] (iii) 在约5mg/mL至25mg/mL的范围内的水中溶解度和允许扩散穿过LB的两亲性特征;

[0445] (iv) -3.0至3.0的辛醇/水分配系数或 $\log P$ 值;71,72(v)合适的分子量和小于MSNP孔径(2nm-8nm)的几何尺寸以允许进入MSNP孔隙中(Li等人(2012)Chem.Soc.Rev.41:2590-2605;Tang等人(2012)Adv.Mat.24(12):1504-1534;Tarn等人(2013)Acc.Chem.Res.46(3):792-801)。

[0446] 并非囊括所有,潜在化疗剂的清单包括拓扑异构酶I抑制剂:托泊替康;抗肿瘤蒽环类抗生素:多柔比星和米托蒽醌;有丝分裂抑制剂:长春碱和长春瑞滨;酪氨酸激酶抑制剂:伊马替尼、奥希替尼以及舒尼替尼等。包装和递送上述药剂中的一种或组合的能力将增强我们的多功能LB-MSNP平台的更广泛的效果,包括另外的癌症类型,如结肠癌、乳腺癌、肺癌、肝癌、神经胶质瘤、黑素瘤等的治疗考虑。还有可能将上述清单中的药物组合共同包装到单个载体中。举例来说,基于我们已经用我们的GEM/PTX共同递送平台实现的成功(Meng等人(2015)ACS Nano,9(4):3540-3557),有可能考虑组合FOLFIRINOX方案中的药物(例如奥沙利铂和伊立替康)以用于协同和比率计量递送。此外,通过我们的LB-MSNP进行的药物负载可以用于非癌应用,如封装用于感染性疾病的抗生素,例如环丙沙星、左氧氟沙星,或HIV抗逆转录病毒药(例如替诺福韦二吡呋酯富马酸盐)。除了TEA_aSOS之外,还值得指出的是,跨膜pH值梯度也可以通过以下各项产生:酸性缓冲液(例如枸橼酸盐)(Chou等人(2003)J.Biosci.Bioeng.,95(4):405-408;Nichols等人(1976)Biochim.Biophys.Acta,Biomembr.455:269-271);产生质子的可解离的盐(例如(NH₄)₂SO₄)(Haran等人(1993)Biochim.Biophys.Acta,Biomembr.1151:201-215;Maurer-Spurej等人(1999)Biochim.Biophys.Acta,Biomembr.1416:1-10;Fritze等人(2006)Biochim.Biophys.Acta,Biomembr.1758:1633-1640);或来自金属盐(例如A23187和MnSO₄)的由离子载体介导的离子梯度(Messerer等人(2004)Clin.Cancer Res,10(19):6638-6649;Ramsay等人(2008)Eur.J.Pharm.Biopharm.68(3):607-617;Fenske等人(1998)Biochim.Biophys.Acta,Biomembr.1414:188-204)。此外,有可能产生反向pH值梯度以进行药物负载,如使用乙酸钙

梯度来提高LB-MSNP中的两亲性弱酸负载,该策略已经被用于脂质体(Avnir等人(2008)Arthritis Rheum.58:119-129)。

[0447] 结论

[0448] 综上所述,我们已经开发了一种用于伊立替康的MSNP递送平台,尽管它与脂质体具有形态相似性,但是它提供了优于等同脂质体制剂或游离药物的生物相容性和治疗功效。所述新载体可以用于将伊立替康递送和FOLFIRINOX方案中的药物组合提升到用于PDAC的一线治疗地位。

[0449] 方法

[0450] 材料。

[0451] 原硅酸四乙酯(TEOS)、三乙醇胺、十六烷基三甲基氯化铵溶液(CTAC,25重量%于水中)、三乙胺(TEA)、Dowex 50WX8树脂、琼脂糖凝胶CL-4B以及交联葡聚糖凝胶G-25购自美国的Sigma-Aldrich公司。1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000](铵盐)(DSPE-PEG2000)以及胆固醇(Chol)购自美国的Avanti Polar Lipids公司。蔗糖八硫酸酯(SOS)钠盐购自加拿大的Toronto Research Chemicals公司。盐酸伊立替康三水合物购自美国的LC Laboratories公司。青霉素(penicillin)、链霉素(streptomycin)以及杜氏改良伊格氏培养基(Dulbecco's modified Eagle medium,DMEM)是从Invitrogen公司获得的。胎牛血清(FBS)购自Gemini Bio Products公司。检测激活(切割)的胱天蛋白酶-3的兔mAb抗体(目录号9664)购自Cell Signaling公司。基质胶基质基底膜购自BD Bioscience公司。离心过滤器单元(截止尺寸:10K和30K)购自EMD Millipore公司。所有化学品不经进一步纯化而被直接使用。

[0452] 使用捕集试剂制备负载伊立替康的LB-MSNP。

[0453] 合成MSNP。

[0454] 通过略微修改我们先前的溶胶/凝胶程序来合成MSNP核心(Meng等人(2015)ACS Nano,9(4):3540-3557)。为了合成一批约500mg的MSNP,将50mL的CTAC与150mL的H₂O在500mL锥形烧瓶中混合,继而以350rpm在85℃搅拌15分钟。在这之后,在相同的温度下添加8mL的10%三乙醇胺,持续30分钟。然后,使用蠕动泵以1mL/min的速率逐滴添加7.5mL的二氧化硅前体TEOS。将溶液在85℃以350rpm搅拌20分钟,从而引起具有约65nm的主要尺寸的颗粒形成。可以通过在室温下将颗粒用甲醇/HCl(500:19v/v)的混合物洗涤24小时来去除表面活性剂。可以将颗粒以10 000rpm离心60分钟并且在甲醇中洗涤三次。

[0455] 合成捕集剂TEA8SOS。

[0456] 通过离子交换色谱法从可商购获得的SOS钠盐合成TEA₈SOS(Drummond等人(2006)Cancer Res.,66(6):3271-3277)。简单地说,将500mg的盐溶解在1mL去离子(DI)水中,从而得到500mg/mL的水溶液。使溶液通过在去离子水中制备的8cm×1.5cm的阳离子离子交换树脂(Dowex 50WX8)柱。将SOS盐添加到柱中并且用水洗脱以转化成蔗糖八磺酸(SOS)。立即用纯三乙胺滴定酸性SOS洗脱液以达到5.8的最终pH值。这引起TEA8SOS的形成。将盐浓度调节到约80mM并且在使用之前在4℃储存在冰箱中。

[0457] 在MSNP中通过LB负载和包封TEA8SOS。

[0458] 我们使用一种新方法以经由使用LB包衣来将TEA8SOS包封在MSNP中(Meng等人

(2015) ACS Nano, 9 (4) : 3540-3557)。通过探针超声处理将100mg的空MSNP在4mL 80mM TEA₈SOS水溶液中浸泡5分钟来开始合成,使用15秒/15秒的开/关工作循环和32.5W的功率输出。立即将颗粒悬浮液添加到包被的脂质生物膜中,所述脂质生物膜是通过将以10mg/mL悬浮在氯仿中的110mg的DSPC/Chol/DSPE-PEG2000(摩尔比:3:2:0.15)的混合物添加到6cm圆底烧瓶的底部来获得的。这相当于1.0:1.1的颗粒:脂质比。在室温下在旋转蒸发仪中溶剂蒸发之后,我们获得了具有约30cm²的表面积的生物膜。在将颗粒悬浮液添加到生物膜之后,用15秒/15秒的开/关工作循环以32.5W的功率输出使用探针超声处理30分钟。通过在琼脂糖凝胶CL-4B柱(1.5cm×15cm)上,使用HEPES缓冲右旋糖溶液(5mM HEPES、5%右旋糖,pH 6.5)进行洗脱来进行尺寸排阻色谱法以去除未包封的TEA₈SOS。

[0459] 使用负载TEA₈SOS的LB-MSNP进行伊立替康负载。

[0460] 将伊立替康以10mg/mL溶解在HEPES缓冲右旋糖(5mM HEPES、5%右旋糖,pH 6.5)中,将其与负载TEA₈SOS的颗粒混合以实现1:1(w/w)的伊立替康/MSNP比。将混合物在水浴中在65℃温育30分钟,然后在冰水中淬灭10分钟。通过以15 000rpm离心10分钟将负载药物的颗粒洗涤和纯化三次。将洗涤过的颗粒如所示重悬在水、盐水,或PBS中。

[0461] 制备用于伊立替康递送的比较脂质体制剂。

[0462] 在不存在捕集剂的情况下通过LB-MSNP进行的伊立替康封装。

[0463] 在超声处理下将空MSNP(40mg)添加到4mL 10mg/mL的伊立替康溶液(于水中)中,继而在室温下搅拌4小时。然后如上文所述,使用对具有类似组成的脂质生物膜的超声处理,通过LB封装药物。在探针超声处理之后,如上文所述,将颗粒通过离心和洗涤来纯化并且重悬。

[0464] 使用TEA₈SOS对伊立替康进行脂质体封装。

[0465] 为了开发MM-398制剂的内部类似物(Drummond等人(2006)Cancer Res., 66 (6) : 3271-3277; Ko等人(2013) Br. J. Cancer, 109:920-925),在65℃将212mg含有DSPC/Chol/DSPE-PEG2000(以3:2:0.015的摩尔比)的脂质混合物溶解在0.4mL乙醇中。在相同的温度下,将4毫升的TEA₈SOS溶液(80mM)与脂质乙醇溶液混合,继而在水浴中超声处理2分钟。在65℃将脂质悬浮液通过具有0.1μm孔径的聚碳酸酯膜挤出15次。通过尺寸排阻色谱柱(琼脂糖凝胶CL-4B)去除未包封的TEA₈SOS,用HEPES缓冲右旋糖溶液(5mM HEPES、5%右旋糖,pH 6.5)洗脱。将以10mg/mL在HEPES缓冲右旋糖(5mM HEPES、5%右旋糖,pH 6.5)中制备的伊立替康溶液与负载TEA₈SOS的脂质体悬浮液(伊立替康/脂质=1:2.1w/w)混合并且在水浴中在65℃温育30分钟。将样品立即在冰水中淬灭10分钟。使用交联葡聚糖凝胶G-25柱去除游离药物,用HEPES缓冲盐水(5mM HEPES、145mM NaCl,pH 6.5)洗脱。

[0466] 在不存在捕集剂的情况下合成伊立替康脂质体载体。

[0467] 我们还合成了使用被动封装方法而非包封剂的伊立替康递送脂质体。简单地说,在65℃将脂质混合物(53mg脂质,3:2:0.015的摩尔比的DSPC/Chol/DSPE-PEG2000)溶解在0.1mL乙醇中。在65℃将1毫升的伊立替康溶液(10mg/mL于水中)与脂质乙醇溶液混合,继而超声处理2分钟。在65℃将脂质悬浮液通过具有0.1μm孔径的聚碳酸酯膜挤出15次。使用与上述相同的方法纯化负载药物的脂质体。

[0468] 物理化学表征。

[0469] 对该实施例中所用的所有颗粒的形态、尺寸、尺寸分布、形状以及表面电荷进行广

泛表征。通过TEM(JEOL 1200-EX)和cryoEM(TF20FEI Tecnai-G2)来表征LB包衣的均匀性和它的完整性。通过ZETAPALS仪器(Brookhaven Instruments公司)测量粒度和 ζ 电位。使用以100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的颗粒浓度悬浮在水、PBS以及细胞培养基加上10%FBS中的纳米颗粒进行这些测量。

[0470] 通过减法方法确定每一种载体的药物负载容量,如先前所述(Meng等人(2015)ACS Nano,9(4):3540-3557)。简单地说,通过酶标仪(M5e,美国的Molecular Device公司)中的OD(360nm)或经由使用HPLC(德国的Raytest公司)确定纯化期间检测到的未封装的伊立替康的量(m_1)。药物负载容量被定义为DLC=[伊立替康的总量(m_0)-未封装的伊立替康(m_1)]/[颗粒的总量(m_{MSNP} 或 $m_{脂质}$)] $\times 100\%$ 。在37°C下在100% FBS中在24小时内测试药物保留稳定性。简单地说,在37°C下,在连续振荡下,将40 μL 的负载药物的NP(伊立替康:10mg/mL)添加到1mL血清中。以设定的时间间隔,使用离心过滤器分离装置(分子量截止值:10K)将混合物离心。在酶标仪中或通过HPLC定量释放的伊立替康。使用不含NP的血清滤液作为对照。还经由冻干程序测试这两种载体的稳定性。简单地说,将Ir-MSNP悬浮在5%右旋糖中。将样品在-60°C冻干过夜并且储存在-80°C冰箱中。通过平缓涡旋将储存的样品在水中重悬,之后如先前所述,针对尺寸、 ζ 电位以及药物释放对悬浮溶液进行表征。

[0471] 细胞培养。

[0472] 源自于转基因KrasLSL-G12D/+;Trp53LSL-R172H/+;Pdx1-Cre小鼠中的自发产生的肿瘤的永生化细胞系由加州大学圣地亚哥分校(UC San Diego)的Andrew Lowy博士友情提供。PANC-1细胞购自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)。将这两种细胞类型培养在含有10% FBS、100U/mL青霉素、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素以及2mM L-谷氨酰胺的DMEM中。为了允许在IVIS系统中进行生物发光肿瘤成像,在UCLA载体核心设施中将这两种细胞用基于荧光素酶的慢病毒载体永久转染,如先前所述(Meng等人(2015)ACS Nano,9(4):3540-3557)。在进行有限稀释方案以选择单细胞克隆之后,使用KPC-1uc和PANC-1-1uc细胞群体开发PDAC模型。

[0473] 对最大耐受剂量的评估。

[0474] 使用来自美国国家癌症研究所的毒理学和药理学分部(Toxicology and Pharmacology Branch)(dtp.nci.nih.gov/branches/tpb/default.htm)的方案来确定游离伊立替康制剂和封装的伊立替康制剂的MTD(Drummond等人(2006)Cancer Res.,66(6):3271-3277)。向两只健康雄性BALB/c小鼠静脉内注射50mg/kg(C1剂量)当量的游离伊立替康或封装的伊立替康。在这之后,利用1.8的剂量递增因子以获得Cn剂量,其在最后一次施用之后24小时内导致动物死亡。第二轮剂量探索从Cn-1剂量开始并且利用1.15的递增因子(n=2)以找到MTD,该MTD被定义为不存在死亡或发病。通过对六只小鼠进行注射来验证MTD,跟踪这些小鼠15天以确定不存在发病、死亡,或>15%体重减轻。

[0475] 在免疫活性小鼠中建立KPC衍生的原位肿瘤模型。

[0476] 雌性B6/129小鼠(约8周)购自The Jackson Laboratory公司并且被维持在无病原体条件下。使用由UCLA动物研究委员会(UCLA Animal Research Committee)批准的方案进行所有的动物实验。为了使原位异种移植物生长,用异氟烷使小鼠麻醉,继而腹膜内注射50mg/kg的氯胺酮(ketamine)和10mg/kg的甲苯噻嗪(xylazine)。将手术部位剃毛以在切口部位周围留下1cm的边缘并且通过用聚维酮碘(betadine)和70%乙醇擦洗来灭菌。将小鼠

定位在加热垫上以进行手术，并且用无菌纱布覆盖左侧腹部的切口部位。制作0.5cm-0.7cm的手术切口以暴露胰腺注射部位，继而通过27号针将含有 2×10^6 个KPC-luc细胞的50 μ L的DMEM/基质胶(1:1v/v)注射到胰腺尾中。将筋膜层用可吸收缝合线(PDS II, Ethicon公司)封闭并且将皮肤用不可吸收缝合线(PROLENE, Ethicon公司)封闭。将小鼠保持在升温垫上直到从麻醉中完全恢复为止，然后转移到清洁的笼舍中。在植入之后约2周在荷瘤小鼠中进行功效研究，此时原发肿瘤已经生长到约0.5cm，而没有宏观肿瘤转移的证据。对于生物分布实验，在肿瘤植入之后3周使用荷瘤小鼠，此时，原发肿瘤已经生长到约0.8cm的尺寸。

[0477] 静脉内注射的NIR标记的纳米颗粒的全身和肿瘤内生物分布。

[0478] 使用IVIS(Xenogen公司)体内成像系统来研究NIR标记的MSNP和脂质体在KPC衍生的原位模型中的生物分布(n=3只小鼠)。通过在不含药物的脂质体载体和MSNP载体这两者的LB中并入0.1%w/w的Dy light 680-DMPE来进行NIR标记(Meng等人(2015)ACS Nano, 9 (4):3540-3557)。对于肿瘤部位的生物发光成像，向小鼠腹膜内注射75mg/kg的D-荧光素。在颗粒注射之前拍摄荷瘤小鼠的参照荧光图像。在接受100mg/kg的NIR标记的颗粒的静脉内注射的动物中在48小时内获得NIR图像。在处死动物之后，获得切除的肿瘤和主要器官的离体图像以定量评估颗粒生物分布。使用OCT试剂将一小部分的肿瘤组织冷冻包埋，并且用于制备肿瘤切片。通过共聚焦显微镜术(SP2-1P-FCS, Leica公司)，使用NIR激光研究NIR标记的颗粒的肿瘤内分布。通过使用Hoechst 33342染料(蓝色)对相同的切片进行核染色。在接受LB-MSNP处理的动物中，还使用肿瘤组织和主要器官来通过ICP-OES评估Si含量。颗粒生物分布被表示为总注射剂量%(ID%)，其可以显示分布到单个器官。为了测量肿瘤或其他正常组织中的伊立替康含量，向动物注射60mg/kg的游离伊立替康或封装的伊立替康(颗粒剂量：120mg/kg的MSNP和150mg/kg的脂质体)，继而在24小时之后处死。对所收获的肿瘤组织、肝脏、脾脏、肾脏、肠以及血液进行HPLC分析以确定伊立替康含量。

[0479] HPLC分析。

[0480] 将所收获的肿瘤和器官样品称重并且在冰上匀浆。在用0.4mL的酸性溶液(0.1mol/L磷酸/甲醇，1:4v/v)提取0.1mL的血浆或组织匀浆之后，将提取物涡旋两次，持续10秒，并且以13 000rpm离心10分钟。经由0.22 μ m过滤器过滤含有伊立替康的上清液以用于在含有Knauer Smartline气动泵、C18柱、K-2600分光光度计以及Gina数据采集软件的系统中进行HPLC分析。以1.00毫升/分钟的流速递送的流动相包含3%三乙基乙酸铵水性缓冲液(pH 5.5)和乙腈(73:27v/v)(Noble等人(2006)Cancer Res., 66(5):2801-2806)。注入20微升的含有伊立替康的样品以测量254nm处的药物吸收，通常在4.4分钟内洗脱。在0.05 μ g/mL-100 μ g/mL的浓度范围内产生伊立替康标准曲线。伊立替康含量被表示为每克组织的注射剂量%(ID%/g)。

[0481] 使用KPC衍生的原位模型的功效评估。

[0482] 将荷瘤B6/129小鼠随机分配到四组，每组包括八只动物。向小鼠静脉内注射游离伊立替康或封装的伊立替康以每4天一次接受40mg/kg的剂量(即100mg/kg的脂质体剂量或80mg/kg的MSNP)。在28天观测期内施用最多八次注射。盐水注射用作阴性对照。每8天一次通过IVIS成像来监测肿瘤负荷并且定量表示为操作人员限定的ROI中的生物发光成像强度。使用t检验进行组之间的差异的统计分析(Excel软件, Microsoft公司)。在第47天将所有存活小鼠处死，此时，盐水组和无药物组中的所有动物都已经死亡。收获肿瘤组织和主要

器官(胃肠道、肝脏、脾脏、心脏、肺以及肾脏)以用于定量离体生物发光图像强度。

[0483] 比较不同伊立替康制剂的毒性潜力。

[0484] 将在功效测试实验期间收集的主要组织(肝脏、肾脏、脾脏、胃以及肠)在10%福尔马林中固定,继而石蜡包埋。将组织切片通过H&E染色以用于组织学分析并且还用于激活(切割)的胱天蛋白酶-3的表达的IHC分析。由有经验的兽医病理学家以盲法方式解读载玻片。用于评估骨髓毒性的第二种方法使用在健康小鼠中40mg/kg的游离药物和载体制剂的三次静脉内施用(相隔2天)。在第7天将动物处死,并且将胸骨用于在10%福尔马林中固定,脱钙,石蜡包埋,并且H&E染色。我们还收集了血液以用于通过UCLA实验动物医学系(Division of Laboratory Animal Medicine, DLAM)诊断实验室服务进行白细胞分类计数。为了了解游离药物和载体的差异肝脏毒性的机制,在24小时之后将接受60mg/kg伊立替康的剂量当量的单次注射的小鼠处死。将肝脏组织冷冻包埋以用于分别使用FITC标记的抗F4/80抗体或RITC缀合的二抗鉴定KC和切割的胱天蛋白酶-3来对KC和激活的胱天蛋白酶-3的表达进行免疫荧光染色。使用Hoechst 33342染料来定位相同切片中的细胞核。在共聚焦显微镜(Observer D1, Zeiss公司)下检查染色的载玻片。

[0485] 统计分析。

[0486] 使用双侧学生t检验(Student's t-test)(Excel软件, Microsoft公司)进行组之间的差异的比较分析。在p<0.05时确定统计显著性差异。值被表示为多次测定的平均值±SD或SEM,如附图图例说明中所述的那样。

[0487] 实施例2

[0488] 胰腺导管腺癌(PDAC)是一种无法治愈的疾病,具有小于5%的5年存活率。目前,用于PDAC的一线化疗包括通过吉西他滨(GEM)进行的治疗(单药治疗)或使用四药方案,其包括甲酰四氢叶酸、5-FU、奥沙利铂以及伊立替康,也被称为FOLFIRINOX。虽然FOLFIRINOX与GEM相比具有增加的PDAC响应率,即31.6%相比于9.4%,但是这种方案具有大得多的毒性,并且因此局限于少数具有良好功能状态的晚期PDAC患者(Conroy等人(2011)N Engl J Med. 364:1817-1825)。伊立替康以主要方式导致FOLFIRINOX毒性,这是因为它对骨髓(例如约60%的中性粒细胞减少症发病率)以及胃肠道(例如约50%的患者出现呕吐、腹泻、恶心、厌食)有不良影响(Ueno等人(2007)Cancer Chemother. Pharmacol. 59(4):447-454)。对开发具有更低毒性的FOLFIRINOX方案存在未满足的需求,包括降低伊立替康的毒性。

[0489] 使用纳米颗粒载体递送伊立替康提供了降低这种药物的毒性的一种潜在的解决方案,如通过用以下各项递送伊立替康所说明:脂质体纳米载体(Messerer等人(2004)Clin. Cancer Res, 10 (19): 6638-6649; Drummond等人(2006)Cancer Res., 66 (6): 3271-3277)或基于聚合物的纳米载体(Onishi等人(2003)Biol. Pharmaceut. Bull. 26 (1): 116-119)。在临床前水平,使用这些纳米载体的益处包括毒性降低、抗肿瘤功效增加以及各种鼠类PDAC模型的存活率提高。迄今为止,只有少数伊立替康载体已经在临床试验中测试,包括通过离子载体A23187(Irinophore C)或质子化包封剂蔗糖八硫酸酯三乙铵(TEA₈SOS)促进药物负载的脂质体制剂。MM-398的治疗功效取决于经由使用多价阴离子捕集剂TEA₈SOS在脂质体中对伊立替康的封装和捕集。TEA₈SOS引起扩散穿过脂质双层的伊立替康的质子化,从而将它转化成不能离开脂质双层的亲水性组分。药物因此以超过脂质体双层的被动

封装的10倍的浓度被捕集(Drummond等人(2006)Cancer Res.,66(6):3271-3277)。MM-398目前正处在由Merrimack Pharmaceuticals公司(www.merrimackpharma.com)进行的3期试验中(Hoff等人,Society for Medical Oncology,2014的海报介绍)。该海报可以在//merrimackpharma.com/sites/default/files/documents/ESMOGI2014MM398.pdf查看。在AACR 2012年会中,Merrimack公司发表了含有以下陈述的摘要:“MM-398在多种小鼠胰腺癌模型中诱导肿瘤消退,包括原位转移模型”。皮下模型包括BxPC3、AsPC-1、Panc-1以及MiaPaCa。使用BxPC3进行胰腺中的原位植入。没有提供详细数据。MM-398的静脉内施用已经被证实在小鼠的各种PDAC肿瘤模型中诱导完全肿瘤消退,包括抑制转移性肿瘤病灶形成(Drummond等人(2006)Cancer Res.15(66):3271-3277)。在3期PDAC试验中用MM-398、5-FU以及甲酰四氢叶酸的组合治疗417名患者显示,与接受5-FU和甲酰四氢叶酸的人类对照中的1.9个月相比,总存活期延长(6.1个月)(Hoff等人,ESMO海报,www.merrimackpharma.com)。

[0490] 在本实施例中,我们描述了一种新型的中孔二氧化硅纳米颗粒(MSNP)平台,其能够通过与脂质体等同物相比具有优越的能力的纳米载体来实现伊立替康的主动负载、包封以及封装。这些颗粒的合成是通过由被支撑的脂质双层LB将TEA₈SOS快速封装在颗粒的多孔内部中来实现的。随后将这些颗粒在伊立替康溶液中温育允许伊立替康的主动包封,所述伊立替康扩散穿过双层,然后被TEA₈SOS质子化。在负载伊立替康的LB-MSNP与MM-398的内部合成的脂质体等同物之间进行比较分析。该分析证实了MSNP载体的优越的负载容量、负载效率以及释放特征。我们还证实了与内部MM-398脂质体相比相似的体外有效性和体内毒性降低。我们目前正进行动物功效研究以在皮下和原位人类PDAC肿瘤模型中比较这些载体。

[0491] 我们认为LB-MSNP介导的伊立替康的纳米封装和靶向递送将通过降低毒性,包括降低伊立替康在骨髓和胃肠道中的毒性来提高FOLFIRINOX的临床使用。该发现使得能够由于负载容量和足够的癌症部位药物释放而优于脂质体载体的可静脉内注射的、有效的、生物相容的、并且在商业上有竞争力的伊立替康制剂成为可能。在某些实施方案中,本发明也可以用作用于递送可以用于癌症治疗以及治疗其他疾病的其他弱碱性分子($pK_a > 7.0$)的有效设计原理。

[0492] 以下描述说明了用于伊立替康负载的载体设计的某些实施方案以及LB-MSNP载体与类似于MM-398的内部合成的脂质体制剂的比较分析。

[0493] 通过还包括捕集剂以实现另外的主动负载的LB-MSNP进行伊立替康封装

[0494] 为了提供LB-MSNP对伊立替康的有效负载,我们通过首先封装捕集剂TEA₈SOS来调整我们最近发现的生物膜程序以进行药物负载,所述TEA₈SOS然后通过将扩散穿过被支撑的LB进入孔隙中的药物质子化来负责伊立替康导入和保留。这引起伊立替康在密封的MSNP孔隙中的稳定包封,从而产生用于进一步扩散穿过LB的梯度直到达到平衡为止。这实际上允许药物在多孔内部的大表面积和捕集剂介导的药物保留的帮助下以高浓度积聚。在某些实施方案中,合成程序包括四个部分,即MSNP核心合成;合成功载TEA₈SOS的LB-MSNP;经由TEA₈SOS的作用将伊立替康主动负载到颗粒中;以及最终纯化载体。

[0495] 化学品:

[0496] 原硅酸四乙酯(TEOS,≥99.0%,批号:BCBK9540V)、三乙醇胺(≥99.0%,批号:

BCBH9036V)、十六烷基三甲基氯化铵溶液(CTAC, 25重量%于水中, 批号: STBC7888V)、三乙胺(TEA, ≥99.0%, 批号: SHBD9006V)购自美国的Sigma-Aldrich公司。二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC, >99.0%, 批号: 180PC-147)、甲氧基聚乙二醇(PEG2000)衍生化的二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE-PEG2000, >99.0%, 批号: 180PEG2PE-122)以及胆固醇(Chol, >98.0%, 批号: CH-94)购自美国的Avanti Polar Lipids公司。蔗糖八硫酸酯钠盐(批号: 1-TMH-175-4)购自加拿大的Toronto Research Chemicals公司。盐酸伊立替康三水合物(IRIN, ≥99.0%, 批号: RCN-104)购自美国的LC Laboratories公司。所有化学品不经进一步纯化而被直接使用。

[0497] MSNP的溶胶-凝胶合成和模板去除

[0498] 通过略微修改我们的溶胶/凝胶程序来合成MSNP核心。在500mL锥形烧瓶中进行反应。将50mL CTAC (25%)与150mL H₂O混合, 同时在85°C以350rpm搅拌15分钟。在这之后, 在85°C添加8mL 10%的三乙醇胺, 持续30分钟。以通过蠕动泵控制的1毫升/分钟的速率将二氧化硅前体TEOS (7.5mL)逐滴添加到混合物中。为了实现具有约60nm的主要尺寸的颗粒的合成, 在85°C将溶液以350rpm搅拌20分钟。为了去除表面活性剂, 在室温下通过薄荷醇和HCl (500:19, v/v)将颗粒洗涤24小时。将颗粒以10,000rpm离心60分钟并且在薄荷醇中洗涤3次。为了获得高质量的MSNP核心, 进行频繁的质量检查, 包括DLS测量以监测颗粒聚集和污染; TEM以用于可视化颗粒形态; 以及红外光谱学和细胞毒性测定以检查洗涤剂是否被彻底去除。

[0499] 使用TEA₈SOS作为捕集剂制备负载伊立替康的LB-MSNP

[0500] 为了建立用于通过LB-MSNP负载伊立替康的最佳程序, 我们开发了一种新的方法, 其中我们使用生物膜程序(先前所公开)将质子化剂捕集在颗粒中, 之后将所述颗粒在伊立替康溶液中温育。这允许亲脂性伊立替康扩散穿过LB膜, 随后在孔隙中质子化, 从而逆浓度梯度进行药物包封(参见图5)。考虑到负载容量和药物释放行为, 我们通过系统地改变负载时间、捕集剂浓度、LB-MSNP浓度、伊立替康浓度以及伊立替康/LB-MSNP比来优化伊立替康负载程序。这允许我们实现85% (伊立替康/MSNP, w/w)的伊立替康负载容量, 这超过了在不存在捕集试剂的情况下药物负载容量的约4倍。这达到了平行合成的脂质体型式的MM-398的负载容量的两倍。为了进一步讨论, 我们将负载伊立替康的LB-MSNP命名为“Ir-LB-MSNP (+SOS)”。

[0501] 合成负载TEA₈SOS的LB-MSNP

[0502] 从可商购获得的蔗糖八硫酸酯钠盐制备捕集剂蔗糖八硫酸酯三乙铵(TEA₈SOS)。

[0503] 我们使用离子交换反应以前体蔗糖八硫酸酯钠盐合成TEA₈SOS。简单地说, 将500mg的前体盐溶解在1mL去离子水中, 从而得到500mg/mL的水溶液。使该溶液通过阳离子Dowex 50WX8树脂离子交换柱(15mm的直径和8cm的长度, 购自Sigma公司, 批号: MKBH8810V)。在用去离子水洗脱柱之后, 蔗糖钠在该过程中被转化成质子化的八硫酸盐。立即用三甲胺(TEA)将收集的蔗糖八磺酸滴定到5.5至6.0的最终pH值, 从而引起TEA₈SOS的形成。基于TEA量的滴定, 将TEA₈SOS浓度调节到约80mM。在使用之前将多价阴离子TEA₈SOS储存于4°C冰箱中。

[0504] 制备负载TEA₈SOS的LB-MSNP。

[0505] 我们调整了我们先前公开的用于LB包被的生物膜技术(PCT/US2014/020857(UCLA公开2013-534-2), 其以引用的方式整体并入本文)以在进行伊立替康负载之前封装

TEA₈SOS。简单地说,以15秒/15秒开/关工作循环,以32.5W的功率输出使用探针超声处理30分钟将100mg空的MSNP浸泡在4mL TEA₈SOS水溶液(40mM)中。立即将悬浮液添加到在圆底烧瓶(6cm直径)的底部占据约30cm²的表面积的包被的脂质生物膜的顶部上。在进行实验以实现脂质组分的最佳混合(目的在于稳定的包被而不泄漏)之后,我们决定用含有228mg DSPC/Chol/DSPE-PEG(摩尔比:3:2:0.15)的混合物。将该混合物以10mg/mL溶解在氯仿中。通过在室温下使用与真空系统连接的旋转蒸发仪经过约1小时溶剂蒸发来实现生物膜形成。在将4mL颗粒悬浮液添加到生物膜之后,以15秒/15秒开/关工作循环,以32.5W的功率输出使用探针超声处理30分钟。由于经过超声处理的悬浮液含有包被的颗粒、脂质体以及游离的TEA₈SOS,因此使用色谱程序纯化TEA₈SOS LB-MSNP,其中用HEPES缓冲液(5mM HEPES、5%右旋糖,pH 6.5)洗脱琼脂糖凝胶CL-4B柱(15mm直径和15cm长度,购自Sigma公司,批号:MKBPO885V)。

[0506] 使用负载TEA₈SOS的LB-MSNP进行主动伊立替康负载。

[0507] 将伊立替康以10mg/mL的浓度溶解在HEPES缓冲溶液(5mM HEPES、5%右旋糖,pH 6.5)中。将药物溶液与负载TEA₈SOS的LB-MSNP悬浮液以1:1(w/w)的伊立替康/颗粒比混合,并且在水浴中在60℃温育0.5小时。通过将容器在冰水中放置10分钟来终止反应。

[0508] 颗粒纯化

[0509] 通过将颗粒以15,000rpm离心10分钟,继而在盐水或5%右旋糖中重悬来纯化Ir-LB-MSNP(+SOS)而清除游离脂质体和游离伊立替康。将洗涤程序重复3次。

[0510] 使用Ir-LB-MSNP(+SOS)颗粒制备对照制剂以用于比较研究

[0511] 为了进行反映Ir-LB-MSNP(+SOS)颗粒的独特特性的比较分析,我们合成了不含捕集剂的LB-MSNP,从而允许浸泡的伊立替康被LB密封。我们还制备了用捕集剂制备的MM-398的脂质体等同物以及在没有捕集剂的情况下封装伊立替康的对照脂质体。

[0512] 不含捕集剂的伊立替康LB-MSNP的合成:

[0513] 在超声处理下将空的MSNP(40mg)在4mL伊立替康溶液(于水中,10mg/mL)中放置5分钟,然后在室温下再搅拌4小时。将伊立替康浸泡的MSNP悬浮液添加到干脂质膜(91mg含有3:2:0.15的摩尔比的DSPC/胆固醇/PE-PEG2000的脂质混合物)中,继而使用15秒/15秒开/关工作循环,以32.5W的功率输出,进行探针超声处理30分钟。如上文所述,使用以15,000rpm离心10分钟,继而进行颗粒洗涤和重悬来纯化颗粒而清除游离脂质体和游离药物。我们将不含捕集剂的颗粒称为“Ir-LB-MSNP(-SOS)”。

[0514] 商业开发的脂质体制剂MM-398的脂质体等同物的内部合成。

[0515] 根据Drummond等人(Cancer Res. 2006, 66, 3271-3277)公开的用于MM-398的程序来进行合成。简单地说,在60℃-65℃,将脂质混合物(212mg脂质,3:2:0.015的摩尔比的DSPC/Chol/DSPE-PEG)溶解在0.4mL乙醇中。在相同的温度下,将4mL的TEA₈SOS溶液(80mM)与脂质乙醇溶液混合,继而在水浴中超声处理2分钟。在60℃-65℃将脂质悬浮液通过具有0.1μm孔径的聚碳酸酯膜挤出15次。通过在琼脂糖凝胶CL-4B柱上进行色谱法来去除未包封的TEA₈SOS,使用HEPES缓冲液(5mM HEPES、5%右旋糖,pH 6.5)洗脱。将伊立替康溶液(含有HEPES缓冲液(5mM HEPES和5%右旋糖,pH 6.5)的10mg/mL水溶液)与预先负载TEA₈SOS的脂质体悬浮液(伊立替康:脂质=1:2.1w/w)混合,然后在水浴中在65℃温育0.5小时。通过将混合物在冰水中放置10分钟来终止反应。然后通过在交联葡聚糖凝胶G-25柱(15mm直径和

15cm长度,Sigma公司,批号:019K1077)上去除游离伊立替康来纯化负载伊立替康的脂质体,通过HEPES缓冲盐水(5mmol/L HEPES、145mmol/L NaCl,pH 6.5)洗脱。我们将内部合成的脂质体制剂称为“Ir-Lipo(+SOS)”。

[0516] 在不使用捕集剂的情况下合成封装伊立替康的脂质体。

[0517] 我们还合成了使用被动封装方法的脂质体。简单地说,在60℃至65℃将脂质混合物(53mg脂质,3:2:0.015的摩尔比的DSPC/Chol/DSPE-PEG)溶解在0.1mL乙醇中。在60℃至65℃将1mL伊立替康溶液(于水中,10mg/mL)与脂质乙醇溶液混合,继而进行水浴超声处理2分钟。在60℃至65℃将脂质悬浮液通过具有0.1μm孔径的聚碳酸酯膜挤出15次。通过使用交联葡聚糖凝胶G-25柱去除游离伊立替康来纯化负载药物的脂质体,用HEPES缓冲盐水(5mmol/L HEPES、145mmol/L NaCl,pH 6.5)洗脱。我们将该脂质体制剂称为“Ir-Lipo(-SOS)”。

[0518] Ir-LB-MSNP(+SOS)与对照伊立替康制剂的比较分析。

[0519] Ir-LB-MSNP(+SOS)和对照制剂的物理化学表征。

[0520] 表3显示与对照制剂相比Ir-LB-MSNP(+SOS)的流体动力学尺寸、尺寸分布以及表面电荷。Ir-LB-MSNP(+SOS)具有110nm-130nm的流体动力学尺寸,多分散指数(PDI)是约0.1。这种颗粒在纯水中显示出负的 ζ 电位值,即-24.7mV。 ζ 电位在PBS中变成-2.95mV,并且在完全DMEM培养基中变成-3.27mV。在不同的溶液中,这些物理化学参数类似于对照制剂,如Ir-Lipo(-SOS)、Ir-Lipo(+SOS)以及Ir-LB-MSNP(-SOS)。

[0521] 表3:在不同的温育介质中负载Ir的颗粒的尺寸和 ζ 电位。

NP	DLS 流体动力学尺寸(nm) (PDI)			ζ 电位		
	水	PBS	DMEM+10% FBS	水	PBS	DMEM+10% FBS
Ir-Lipo(-SOS)	101.7 (0.113)	95.5 (0.01 4)	76.5 (0.275)	-11. 7	-4.9 5	-4.63
Ir-Lipo(+SOS)	102.0 (0.112)	104.7 (0.06 7)	98.6 (0.172)	-13. 4	-2.2 6	-4.38
IF-LBL-MSNP(-SOS)	129.4 (0.140)	116.1 (0.087)	110.2 (0.17)	-22. 4	-5.8 7	-3.57
Ir-LBL-MSNP(+SOS)	128.0 (0.107)	125.7 (0.112)	121.1 (0.200)	-24. 7	-2.9 5	-3.27

不同的负载伊立替康的颗粒的流体动力学尺寸、尺寸分布以及表面电荷。将所述颗粒以约0.1 mg/mL的MSNP或脂质浓度分散在水、PBS以及补充有10% FBS的DMEM培养基中。通过ZETAPALS粒度分析仪和 ζ 电位分析仪(Brookhaven instruments公司)测量尺寸和 ζ 电位。结果代表三次测量的平均值。

[0523] 表4显示在使用和不使用捕集剂的情况下LB-MSNP的负载容量和负载效率。负载容量=(总伊立替康-上清液中的伊立替康)/(MSNP或脂质体的质量)×100%。负载效率被定

义为[(总伊立替康-上清液中的伊立替康)/总伊立替康]×100%。对于脂质体,在不存在或存在80mM捕集试剂的情况下,负载容量是4.12%w/w和45.2%w/w。在脂质体平台中伊立替康的负载效率由于捕集剂的作用从8.71%增加到95.5%。这与对于合成的MM-398脂质体公开的数据(Cancer Res. 2006, 66, 3271)相一致。在进行实验以获得最稳定的颗粒制剂之后,我们使用40mM捕集剂来合成LB-MSNP。在与伊立替康一起温育之后,我们实现了具有83.5%w/w的负载容量的Ir-LB-MSNP(+SOS),相比之下,不含捕集试剂的LB-MSNP的负载容量是22.5%w/w。当与含有80mM捕集剂的内部MM-398脂质体相比时,虽然Ir-LB-MSNP使用更少的捕集剂(40mM),但是它实际上产生2×负载容量。

[0524] 表4:在不存在和存在TEA₈SOS捕集剂的情况下LB-MSNP和脂质体的负载容量和负载效率

	NP	进料中的 IRIN(g/mo 1磷脂)	负载容量 IRIN/MSNP, w/w	负载 容量 IRIN/ 脂 质, w/w	封装 效率
[0525]	Ir-Lipo(-SOS)	500	N/A	4.12 %	8.71 %
	Ir-Lipo(+SOS)	500	N/A	45.2 %	95.5 %
	IF-LBL-MSNP(-SO ₃ S)	500	22.5%	N/A	22.5 %
	Ir-LBL-MSNP(+SO ₃ S)	500	83.5%	N/A	83.5 %

[0526] 我们还进行cryoEM分析以可视化Ir-LB-MSNP(+SOS)的形态。这确认了MSNP表面被脂质双层均匀包被(图6A,上图)。高放大倍数cryoEM图像显示主要粒度是约80nm,由约7.1nm厚的双层完全表面包被。放大图像确认完整脂质包衣的存在,同时还显示孔隙中高密度材料的存在;该材料代表伊立替康-TEA₈SOS复合物。我们观测到偶见的由没有紧密粘附到颗粒表面的略微更大的脂质体封装的颗粒,然而LB层保持完整。Ir-Lipo(+SOS)的图像显示具有约6.5nm厚的单层双层的约75nm的脂质体结构(图6A,下图)。高放大倍数cryoEM提供了足够的分辨率以看见脂质体内部的高密度IRIN-TEA₈SOS沉淀物(红色箭头)。

[0527] 为了评估每一种制剂的稳定性,我们比较了在37℃下在PBS(pH值=7.4)中的药物稳定性(图6B),意图是估计伊立替康在血流中的稳定性。这显示Ir-LB-MSNP(+SOS)在PBS中是非常稳定的,在24小时内引起<5%的释放。在内部MM-398脂质体中发现相当的在PBS中的稳定性。

[0528] 由于葡萄糖摄取升高、糖酵解、乳酸产生(瓦伯格氏效应(Warburg effect))、异常血液灌流以及致密基质的存在,因此PDAC的pH值是酸性的(Wojtkowiak等人,(2012)Cancer Res. 72 (16):3938-3947;Estrella等人(2013)Cancer Res. 73 (5):1524-1535)。因此,我们还研究了在酸性pH值条件下的药物释放特征。肿瘤pH值通常下降到约6.5,但是可以低到约

5.5 (**Jähde**等人 (1992) *Cancer Res.* 52:6209-6215)。当颗粒由PDAC细胞摄取时,在溶酶体隔室中pH值可以进一步下降到<5 (**Mindell**等人 (2012) *Annu Rev Physiol.* 74:69-86)。因此,我们在吞噬溶酶体模拟流体 (PSF, pH值=4.5) 中进行药物释放实验。在PSF中,在LB-MSNP中可以看到快速的伊立替康释放(即在4小时内释放20%)。然而,在内部MM-398制剂中,我们发现在PSF中显著更慢的药物释放特征,即在24小时内仅有约4%药物释放。

[0529] 在培养的PDAC细胞中Ir-LB-MSNP (+SOS) 的细胞摄取和杀伤效率

[0530] 利用德克萨斯红标记的LB-MSNP或脂质体进行的共聚焦显微镜术显示在PANC-1细胞中的核周分布中大量的细胞摄取(图7)。我们还使用MTS细胞毒性测定以确定在用递增伊立替康浓度处理期间Ir-LB-MSNP (+SOS) 对PANC-1细胞和BxPC3细胞的影响。我们比较了这些颗粒与游离药物和Ir-Lipo (+SOS) 对照的影响。虽然游离药物在24小时内杀伤方面是更有效的,但是Ir-LB-MSNP (+SOS) 和脂质体这两者在这两种细胞类型中在72小时均显示出相当的杀伤(图8)。空的纳米颗粒在48小时内高达500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度下没有诱导毒性。

[0531] 在小鼠中Ir-LB-MSNP (+SOS) 与Ir-Lipo (+SOS) 的体内毒理作用的比较分析。

[0532] 最大耐受剂量 (MTD)。

[0533] 我们通过确定各种伊立替康制剂的MTD来开始体内毒性研究。这是使用来自毒理学和药理学分部的NCI方案 (dtp.nci.nih.gov/branches/tpb/default.htm) 完成的。向两只健康雄性BALB/c小鼠静脉内注射50mg/kg (C_1 剂量) 游离药物或封装药物。我们然后使用1.8的剂量递增因子以确定 C_n 剂量,其中这两只动物($n=2$)在用游离伊立替康或封装伊立替康处理之后24小时内死亡。第二轮剂量探索从 C_{n-1} 剂量开始,并且利用1.15的递增因子($n=2$)以找到MTD,其中没有死亡或严重的发病。通过对5只小鼠进行注射,并且跟踪它们15天以确定没有发病、死亡或>20%体重减轻来进一步验证MTD。我们的结果显示Ir-LB-MSNP (+SOS)、Ir-Lipo (+SOS) 以及游离伊立替康的MTD剂量值分别是295mg/kg、350mg/kg以及60mg/kg。与游离药物相比,纳米制剂显示出约5倍的MTD剂量,明确表明在使用LB-MSNP和脂质体制剂这两者时毒性降低的能力。

[0534] 组织学分析。

[0535] 在单独的实验中,健康小鼠接受60mg/kg IV的药物剂量的Ir-LB-MSNP (+SOS)、Ir-Lipo (+SOS) 以及游离伊立替康的单次静脉内施用。在处理后24小时,将小鼠处死以用于器官收获。将胸骨、胃肠道(GI, 胃和肠)、胸腺、肝脏、肾脏、脾脏以及肺的适当尺寸的切片在10%福尔马林中固定,然后包埋到石蜡中。将4 μm 厚度的组织切片封固在载玻片上。将切片用苏木精-伊红(H&E)染色并且通过光学显微镜术检查。由有经验的兽医病理学家解读载玻片。结果显示Ir-LB-MSNP (+SOS) 和Ir-Lipo (+SOS) 的骨髓毒性与游离IRIN相比大幅降低(图9)。我们正使用免疫组织化学对胸骨骨髓进行更详细的研究以评估对红系细胞、巨核细胞或血白细胞前体是否存在差异毒性。游离伊立替康和脂质体制剂引起肾毒性,这表现为肾小球肿胀。在用Ir-LB-MSNP (+SOS) 颗粒处理的小鼠中没有发现显著的肾脏异常(图10)。

[0536] 结论。

[0537] 该项目的目标是开发用于有效PDAC杀伤和毒性降低的可静脉内注射的伊立替康纳米递送平台。经由使用高药物负载容量、纳米载体生物相容性以及有效的药物封装,LB-MSNP平台已经在PDAC细胞和急性动物毒性研究中显示出有希望的结果。

[0538] 实施例3

[0539] 在鼠类和人类胰腺癌中iRGD介导的转胞吞增强了二氧化硅体纳米载体的伊立替康递送和功效

[0540] 尽管胰腺导管腺癌(PDAC)几乎一律是致命的,但是已经通过引入递送伊立替康或紫杉醇的纳米载体实现了一定程度提高的总体存活率。我们已经在动物原位模型中使用包含包被有脂质双层的中孔二氧化硅纳米颗粒(MSNP)的伊立替康二氧化硅体载体进一步改善了这些结果。与用于伊立替康的脂质体载体相比,所述二氧化硅体载体还提供了大幅的毒性降低。尽管一般假定纳米载体主要依赖于异常渗漏血管系统(也被称为增强的通透性和保留效应)以进入肿瘤,但是最近已经报道了通过神经纤毛蛋白-1(NRP-1)受体调节的转胞吞转运途径。该独特的转运途径可以由环状iRGD肽触发,该环状iRGD肽与肿瘤相关整合素结合,其中所述肽被加工用于后续与NRP-1结合。在稳健的Kras原位PDAC模型中iRGD的共同施用将伊立替康-二氧化硅体的摄取提高到3倍-4倍,从而产生存活益处和转移的显著减少。将嵌入有金纳米颗粒核心的二氧化硅体用于体内转胞吞途径的超微结构观察,显示iRGD共同施用诱导囊泡转运途径,所述途径将电子致密载体从血管腔转运到癌细胞中的核周位点。在源自于患者的异种移植物中也观测到iRGD介导的二氧化硅体摄取的增强,这与肿瘤血管上NRP-1的表达水平相称。这些结果显示iRGD用于使用伊立替康-二氧化硅体载体进行PDAC治疗的潜在个性化方法的效用。

[0541] 在本实施例中,我们描述了用于伊立替康递送的脂质双层包被的中孔二氧化硅纳米载体(二氧化硅体)的开发,所述纳米载体在稳健的胰腺导管腺癌(PDAC)动物模型中优于脂质体。我们证实了,二氧化硅体在原位肿瘤部位处的摄取可以通过iRGD肽的共同施用提高到3倍-4倍,所述iRGD肽经由连接神经纤毛蛋白-1受体而触发新的转胞吞途径。iRGD在表达同一血管受体的源自于患者的异种移植物中也提高二氧化硅体摄取。我们提供了基于囊泡的转胞吞途径的超微结构证据,所述途径可以补充通常用于解释纳米载体在肿瘤部位处的摄取的增强的通透性和保留效应。转胞吞途径提供了增强伊立替康-二氧化硅体载体在PDAC患者中的益处的可能性。

[0542] 引言

[0543] 我们已经开发了一种多功能的中孔二氧化硅纳米颗粒(MSNP)平台,它已经被适配成使用被支撑的脂质双层(LB)进行药物封装以提供高剂量PDAC化疗(参见例如实施例1)。该载体也已经被命名为“二氧化硅体”以将它与形态上相似的脂质体载体相区分,所述脂质体载体含有无支撑的LB。与包括用于伊立替康的内部脂质体载体的脂质体相比,本文所述的二氧化硅体已经被证实为表现出对这种药物显著更高的负载容量、提高的循环稳定性(由于被支撑的LB)以及药物泄漏减少。这些特征允许二氧化硅体在严格的原位Kras PDAC模型中的药物代谢动力学和治疗功效与脂质体相比得到改进(参见例如实施例1)。此外,与脂质体等同物相比,二氧化硅体还在胃肠道、肝脏以及骨髓中提供大幅的毒性降低(同上)。除了伊立替康的成功之外,所述二氧化硅体平台还已经适用于协同递送紫杉醇和吉西他滨,从而允许它在原位PDAC模型中显著(>10倍)优于游离吉西他滨与Abraxane[®]的组合。值得注意的是,二氧化硅体载体的上述结果可以通过“被动”递送来实现,而无需采用靶向配体。

[0544] 鉴于该背景,我们关注的是,负载伊立替康的二氧化硅体(Ir-二氧化硅体)的PDAC治疗功效是否可以通过转胞吞来提高,以及这是可通过iRGD与载体的缀合还是它的共同施

用来最好地实现。在本实施例中,我们证实了在Kras原位模型中使用游离iRGD肽的共同施用来增强载体摄取和治疗功效的可行性。此外,我们提供了分组囊泡系统的超微结构证据,所述系统允许Au标记的二氧化硅体从血管腔转运到癌细胞中的核周位点。我们还在源自于患者的PDAC异种移植物中证实了经由使用iRGD共同施用,肿瘤血管系统上NRP-1表达的相对丰度决定了对二氧化硅体的响应幅度。

[0545] 结果

[0546] 用于药物负载和在PDAC肿瘤中可视化的二氧化硅体的合成和表征

[0547] 我们已经证实了使用依赖于质子化剂的远程负载技术由LB包被的MSNP(也被称为二氧化硅体)实现的高伊立替康负载(参见例如图21A的上图和Liu等人(2016)ACS Nano. 10 (2):2702-2715)。伊立替康是可以扩散穿过LB进入MSNP内部包装空间中的弱碱性和两亲性分子,其中先前包封的蔗糖八硫酸酯三乙铵(TEA₈SOS)的质子释放将所述药物转化成亲水性衍生物,所述亲水性衍生物不能反向扩散穿过LB(图21A,上图)。所述远程负载程序用于合成实现50重量% (w/w,伊立替康/MSNP) 的药物负载容量的Ir-二氧化硅体批料(同上)。为了确定iRGD肽缀合到二氧化硅体表面上是否可以影响载体向PDAC肿瘤部位的生物分布,我们还合成了其中使用LB的DSPE-PEG₂₀₀₀组分与所述肽中的半胱氨酸残基缀合的颗粒批料。这是通过用DSPE-PEG₂₀₀₀-顺丁烯二酰亚胺代替DSPE-PEG₂₀₀₀来完成的(参见方法部分),从而允许硫醇-顺丁烯二酰亚胺与半胱氨酸修饰的肽Cys-c(CRGDKGPDC)(SEQ ID NO:11)偶联(图21A,方框2)。为了确认缀合反应的成功,我们还使用由Ruoslahti等人开发的所述肽的荧光素标记的型式(FAM-iRGD)以在充分洗涤后对缀合的二氧化硅体进行荧光光谱分析(图27,图A)(Sugahara等人(2009)Cancer Cell, 16 (6): 510-520)。这确认了荧光肽与LB的稳定缔合。iRGD缀合的密度限于约3mol% (占所有LB组分)以防止胶体不稳定性和对载体摄取的干扰。在KPC细胞中通过流式细胞术和共聚焦显微镜术确认完整二氧化硅体-iRGD载体的摄取(图27,图B和C)。

[0548] 为了对PDAC肿瘤中的转胞吞过程进行TEM可视化,我们还合成了包括约10nm电子致密Au-纳米颗粒的一批核壳型MSNP(图1A,方框3)。类似于裸颗粒,核/壳型颗粒可以有效地被LB包被,如由CryoEM所示(图21A,方框3)。该信息中所用的所有载体的详细的合成和表征程序论述于支持信息的方法部分中。二氧化硅体的主要物理化学特征汇总于下表5中。

[0549] 表5:说明性二氧化硅体物理化学特性。

[0550]

特性	值
MSNP 表面积(BET)	约 850 m ² /g
MSNP 孔体积(BET)	约 0.75 cm ³ /g
MSNP 孔径(BET、 TEM)	约 3 nm
MSNP 核心尺寸(TEM)	约 65 nm
LB 厚度(cryo-EM)	约 7 nm
二氧化硅体尺寸(cryl-EM)	约 80 nm
流体动力学尺寸(DLS)	约 130 nm
ζ 电位	约-10 mV
药物负载容量 (伊立替康)	约 50% (w/w, 药物/MSNP)

[0551] 缀合的iRGD肽和非缀合的iRGD肽对二氧化硅体在原位PDAC模型中的生物分布的影响的比较

[0552] 将源自于来自转基因Kras^{LSL-G12D/+}; Trp53^{LSL-R172H/+}; Pdx-1-Cre动物的自发性PDAC肿瘤的表达荧光素酶的KPC细胞原位植入免疫活性B6/129小鼠的胰腺尾中(参见例如图21B的左图和Liu等人(2016)ACS Nano. 10 (2) : 2702-2715; Tseng等人(2010)Clin.Cancer Res. 16 (14) : 3684-3695)。这种严格的PDAC肿瘤模型在癌基因表达、生长特征、转移、组织学特征以及发育不良基质的发展方面模拟人类PDAC。图21B汇总了如在动物尸检和IVIS成像期间所看到的肿瘤生长特征和转移的细节(图21B)(Tseng等人(2010)Clin.Cancer Res. 16 (14) : 3684-3695; Torres等人(2013)PloS One 8:e80580)。通过50mg/kg非缀合(即“无iRGD”状态)或与肽缀合(“二氧化硅体-iRGD”)的近红外(NIR)标记(DyLight 680)的颗粒的一次静脉内(IV)注射来评估二氧化硅体向原位肿瘤部位的生物分布(图22A)。第三组动物接受8μmol/kg的游离肽加上非缀合颗粒(“二氧化硅体+iRGD”)的共同施用。在初始注射和动物处死之后24小时进行的外植器官的IVIS成像显示,与二氧化硅体-iRGD组或仅二氧化硅体组中的信号传导强度相比,“二氧化硅体+iRGD”组在肿瘤部位处的NIR信号传导强度显著增加(图22A)。通过IVIS Lumina Living Image软件定量成像强度。与它们缺乏体内作用相反,可以看到与肽缀合的二氧化硅体增强了KPC细胞中的载体摄取(图27,图B和C)。我们将其解释为足够的NRP-1受体密度以引发跨膜摄取,而肿瘤血管部位处的受体丰度在被允许通过的缀合颗粒的数量上可能是有限的,如Ruoslahti等人先前关于体外/体内比较所报道(Sugahara等人(2009)Cancer Cell, 16 (6) : 510-520; Teesalu等人(2009)Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 106 (38) : 16157-16162; Hussain等人(2014)Sci Rep 4:5232)。为了证实NIR强度(图22B,左图)反映了实际的MSNP摄取,使用电感耦合等离子体光发射光谱法(ICP-OES)来定量肿瘤硅(Si)含量(图22B,右图)。这显示与二氧化硅体-iRGD组或仅二氧化硅体组相比,“二氧化硅体+iRGD”组中的Si含量显著(约3倍)增加。我们还通过进行单独的实验以证实二氧化硅体与对照非CendR肽环状(RGDfK)(Sugahara等人(2010)Science, 328 (5981) : 1031-1035)共同施用不能增强二氧化硅体摄取来证实C末端(CendR)基序对PDAC生物分布的重要性(图28)。该结果也由ICP-OES确认(图28)。

[0553] 使用肿瘤组织切片来评估NIR标记的二氧化硅体的肿瘤内生物分布的相对丰度和

从肿瘤血管的行进距离,这是通过抗CD31 Alexa Fluor[®] 488染色来阐明的(图29)。该分析显示iRGD共同施用是增强二氧化硅体在原位肿瘤部位处的摄取的最有效的策略。相反,在我们的KPC原位模型中,与iRGD缀合的载体没能对颗粒数量以及行进距离产生显著的影响(图29)。上述发现使得使用游离iRGD进行后续的功效研究。

[0554] 由于所有纳米载体也在网状内皮系统(RES)中被摄取,因此重要的是,对肝脏和脾脏中可观测的二氧化硅体摄取进行评价(对肺、心脏以及肾脏几乎没有明显的影响)。有趣的是,IVIS成像显示缀合的载体向RES器官的生物分布可能增加(图22A)。这由在进行ICP-OES期间肝脏和脾脏中的Si含量增加所确认(图30)。虽然我们缺乏对该观测结果的确切的解释,但是有可能,肽缀合直接或间接引起颗粒调理作用以及清道夫受体的摄取增加,而与NRP-1无关(Li和Huang(2008) Mol.Pharm. 5 (4) :496-504)。

[0555] iRGD共同施用增强了二氧化硅体的伊立替康递送的功效

[0556] 为了证实iRGD的共同施用在用Ir-二氧化硅体进行的PDAC治疗中的可能治疗益处,在相同的原位肿瘤模型中进行功效实验。在共同施用或不共同施用8 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ iRGD的情况下,动物接受40mg/kg(相当于80mg/kg的载体剂量)的药物剂量的Ir-二氧化硅体的静脉内注射。在原位植入 2×10^6 个KPC-1uc细胞之后13天开始处理(图23A),此时,原发肿瘤尺寸是约3mm-5mm而不存在宏观转移(参见上文和Liu等人(2016) ACS Nano. 10 (2) :2702-2715)。每3天重复注射一次,进行总共4次施用(图23A)。对照组由接受静脉内PBS、单独的Ir-二氧化硅体(相同剂量)或单独的游离iRGD(相同剂量)的动物组成。使用卡普兰-迈耶图来表示动物存活率(同上)并且使用动物尸检来评估局部肿瘤扩散和转移的存在。在接受盐水或游离iRGD肽处理的动物的脾脏、肠、胃、肝脏以及肾脏中可以看到许多转移灶(图23B)。虽然Ir-二氧化硅体显著降低肿瘤负荷和转移数量,但是iRGD共同施用进一步增强了原发肿瘤的缩小以及抑制向肝脏、胃以及肠的扩散(图23B)。图23C中的热图提供了共同施用的肽对转移性疾病的影响的定量显示。对数秩检验(SPSS19.0软件,美国的IBM SPSS Statistics)还显示,与PBS组相比,单独的Ir-二氧化硅体的处理将存活率提高了28.6%,相比之下,在共同施用iRGD肽期间,提高了57.1%(图23D);该差异具有统计显著性($p=0.027$)。我们还确认了在接受iRGD(8 $\mu\text{mol}/\text{kg}$,静脉内)与Ir-二氧化硅体(40mg/kg药物)的一次施用的动物中,在24小时之时,伊立替康的肿瘤内含量显著(约2倍)增加,如通过高效液相色谱法(HPLC)所确定(图23E)。

[0557] iRGD介导的二氧化硅体摄取需要肿瘤血管系统上NRP-1的表达

[0558] iRGD在介导药物摄取中的作用机制依赖于归巢到 $\alpha_v\beta_3$ 整合素或 $\alpha_v\beta_5$ 整合素,所述整合素优先地表达在癌症血管上(Ruoslahti和Pierschbacher(1987) Science, 238 (4826) :491-497;Hanahan和Weinberg(2000) Cell, 100 (1) :57-70)。在环肽与整合素结合之后是所述肽的C末端的切割和释放,这介导了与NRP-1的相互作用(这也被称为C末端规则)。NRP-1结合引起可以辅助药物和纳米颗粒转运的囊泡系统的触发(Sugahara等人(2009) Cancer Cell, 16 (6) :510-520;Pang等人(2014) Nat.Commun. 5:4904)。为了确定KPC肿瘤部位处NRP-1的表达,通过Alexa Fluor[®] 488标记的抗NRP-1进行IHC染色,而分别通过用Alexa Fluor[®] 594标记的抗CD31和DAPI染色来定位内皮细胞和核。进行荧光显微镜术和Image J分析来确定NRP-1与CD31的重叠%;这显示94.2%的共定位(图24B)。为了验证NRP-1在原位肿瘤部位处二氧化硅体摄取中的作用,向荷瘤小鼠预先注射NRP-1的b1b2结构域的拮抗剂抗体

(Sugahara等人(2009)Cancer Cell,16 (6) :510-520; Sugahara等人(2010)Science,328 (5981) :1031-1035)。随后施用iRGD加上NIR标记的二氧化硅体显示,与没有接受阻断抗体处理的动物相比,载体摄取明显减少(图24C)。在对照IgG的情况下没有看到相同的干扰(图24C)。这些数据确认了NRP-1在iRGD介导的二氧化硅体摄取中的作用。

[0559] 在KPC癌症部位处转胞吞囊泡对二氧化硅体的转运的超微结构验证

[0560] 已经证实了,iRGD的C末端与NRP-1的结合可以引发整体转胞吞途径,该途径涉及对于向癌症递送营养素具有重要性的新囊泡转运机制(Sugahara等人(2009)Cancer Cell,16 (6) :510-520; Sugahara等人(2010)Science,328 (5981) :1031-1035; Pang等人(2014)Nat. Commun. 5:4904)。据我们所知,该转胞吞途径从未在向肿瘤部位转运治疗性纳米载体期间被直接可视化。使用可以提供视觉增强验证的电子显微镜术(EM)来尝试对KPC模型中iRGD介导的转运途径进行超微结构分析。最初,我们比较了在存在或不存在iRGD共同施用的情况下静脉内注射二氧化硅体之后以不同的时间间隔对所收获的肿瘤部位拍摄的TEM图像(图25A)。在24小时之时,可以清楚地看到iRGD共同施用诱导具有110nm至370nm的直径的葡萄状囊泡的形成,所述囊泡扩散穿过内皮细胞,从血管的腔侧到近腔侧(图25A,区域“3”和“4”)。这些特征类似于由Dvorak等人(Feng等人(1996)J. Exp. Med. 183 (5) :1981-1986)所述的囊泡-液泡细胞器或VVO。对囊泡密度进行半定量分析显示,iRGD可以使囊泡密度增加到没有接受肽共同施用的动物的约3倍(图25A,左图),该囊泡密度是通过对至少10个所关注的区域(ROI)中囊泡的数量进行计数并且表示每平方微米细胞中的内表面积的囊泡数量来确定的。

[0561] 当尝试可视化囊泡系统对二氧化硅体的转运时,MSNP的低电子密度使得难以分辨异质和复杂的PDAC微环境中载体的存在。为了解决这一挑战,合成二氧化硅体以包括可以容易地通过TEM可视化的约10nm Au-纳米颗粒(图21A)(Liu等人92013)ACS Nano. 7 (7) :6244-6257)。在不存在或存在8 μ mol/kg iRGD的情况下,向表达原位KPC肿瘤的小鼠静脉内注射50mg/kg的Au-二氧化硅体。在注射后24小时收获肿瘤组织并且固定以进行TEM分析。代表性电子显微镜照片示于图25B中,所述代表性电子显微镜照片在一个图像中显示接受iRGD共同施用的动物的(i)血管腔中的电子致密二氧化硅体;(ii)内皮细胞中的囊泡转运;以及(iii)肿瘤基质中颗粒的沉积。图像的区域1-3的更高放大倍数确认了含有Au的颗粒的存在。在iRGD共同施用期间也可能显示在经历细胞凋亡的肿瘤细胞中的核周分布中出现二氧化硅体(图25C)。该部位与最近的肿瘤血管相距几百微米(图25C)。虽然有可能在没有接受iRGD处理的动物的肿瘤基质中观测到较低的颗粒密度,但是我们找不到正由囊泡转运系统运送的任何二氧化硅体,我们也无法在静态图像中鉴定替代进入机制(图31)。

[0562] 在针对NRP-1表达进行表型分析的源自于患者的PDAC肿瘤中iRGD共同施用对二氧化硅体摄取的差异影响

[0563] 虽然很明显在KPC肿瘤模型中NRP-1途径可以通过iRGD功能性地参与,但是我们关注的是,观察所述肽是否可以影响在NOD SCID IL2 α 敲除(NSG)小鼠中生长的源自于患者的异种移植物中的二氧化硅体摄取(Rückert等人(2012). J. Surg. Res. 172 (1) :29-39)。我们其中一人(TD)已经在NSG小鼠中建立了23个人类PDAC肿瘤的库;这些肿瘤样品是在惠普尔手术(Whipple's surgery)期间从患者获得的。对转移的肿瘤组织的癌症特征进行表型表征,所述癌症特征是相应人类PDAC肿瘤的独特特征,包括作为PDAC的特征的癌基因和信号

途径组分的基质丰度和表达(同上)。我们使用表型分析信息来选择具有等同的基质丰度,但是在NRP-1表达的密度和分布方面不同的一对肿瘤,如通过IHC染色所确定。使用image J软件对在第3次或第4次肿瘤传代时从NSG小鼠收获的肿瘤组织进行染色,以比较NRP-1表达的密度以及它与CD31和细胞核(DAPI)的共定位(图26A)。我们能够鉴定出两个患者肿瘤样品,它们被命名为XWR#8和XWR#187,显示出相似的胶原密度(三色染色),但是在NRP-1表达方面不同(图26A)。因此,虽然XWR#8的特征在于低NRP-1丰度,但是XWR#187具有高NRP-1表达水平(图26A)。XWR#187与XWR#8(约35%)相比还表现出更多的NRP-1阳性肿瘤血管(约80%)。在NSG小鼠的侧腹上建立皮下异种移植植物(n=3),之后在存在或不存在iRGD肽(8 μ mol/kg)的共同施用的情况下向动物静脉内注射NIR标记的二氧化硅体(50mg/kg)。在24小时之后处死动物之后,外植组织的IVIS成像显示在接受iRGD的XWR#187小鼠的肿瘤部位处NIR强度增加了50%;在XWR#8中没有看到类似的增强(图26B)。这些数据通过使用ICP-OES评估肿瘤组织的元素Si含量来确认(图26B)。综上所述,我们的数据表明NRP-1表达的密度和分布决定了二氧化硅体在体内向人类肿瘤的生物分布的程度。

[0564] 讨论

[0565] 在本实施例中,我们证实了伊立替康-二氧化硅体载体的功效可以通过共同施用不需要与载体连接以增强肿瘤摄取的未缀合的iRGD肽来显著提高。游离iRGD肽的共同施用使原位KPC肿瘤部位处的二氧化硅体摄取增加到3倍-4倍,从而引起对原发肿瘤的杀伤增强以及转移抑制。总体来说,这使得动物存活率与单独的Ir-二氧化硅体相比有显著的提高。iRGD作用是通过最初与肿瘤相关整合素相互作用,继而发生肽切割和与NRP-1接合的C末端的释放来介导的。尽管NRP-1的生理作用是控制转胞吞用于营养目的,但是所述囊泡系统也可以用于转运纳米颗粒,如通过在注射受体阻断抗体之后颗粒转运减少所证实。此外,EM成像提供了超微结构证据,即iRGD可以诱导内皮细胞中分组囊泡的出现,所述囊泡具有将Au标记的二氧化硅体从血管腔运送到肿瘤基质的能力。我们还获得了证据表明NRP-1调节已经被植入NSG小鼠体内的人类胰腺肿瘤中的转胞吞途径。选择在肿瘤血管系统上具有差异NRP-1表达的一对肿瘤显示在iRGD处理期间载体摄取和伊立替康递送的差异。综上所述,这些数据表明有可能使用个性化的PDAC化疗方法以通过iRGD共同施用来提高伊立替康二氧化硅体载体的功效。

[0566] 转胞吞途径在PDAC中增强伊立替康递送的效用出于许多原因是显著的。第一个是显示发育不良的基质,除了增加肿瘤生长和转移之外,这还导致肿瘤部位处的耐药性(Feig等人(2012)Clin.Cancer Res.18(16):4266-4276;Dimou等人(2012)Ther.Adv.Med.Oncol.1758834012446008)。虽然常常了解的是,异常的血管通透性是纳米颗粒外渗的原因,这个概念被称为EPR效应,但是我们已知胰腺癌基质活跃地干扰血管通透性(Meng等人(2013)ACS Nano.7(11):10048-10065;Kano等人(2007)Proc.Natl.Acad.Sci.USA,104(9):3460-3465;Cabral等人(2011)Nat.Nanotechnol.6(12):815-823;Liu等人(2012)Proc.Natl.Acad.Sci.USA,109(41):16618-16623)。这包括与血管内皮细胞紧密粘附的周细胞的存在(同上)。因此,虽然EPR效应可能有助于PDAC中的纳米载体摄取,但是重要的是考虑其他血管机制可能有助于肿瘤部位处的纳米颗粒摄取的可能性,包括营养转运途径和调节该转运的血管生长因子以及血管渗漏的可能贡献(Jain和Stylianopoulos(2010)Nat.Rev.Clin.Oncol.7(11):653-664;Ruosahti等人(2010)J.Cell.Biol.188(6):759-

768; Maeda等人(2000) *J. Control. Release* 65(1):271-284; Li和Huang(2008) *Mol. Pharm.* 5(4):496-504; Feng等人(1996) *J. Exp. Med.* 183(5):1981-1986; Kobayashi等人(2014) *Theranostics*, 4(1):81-89。Ruoslahti等人描述了一种内吞途径,它在肿瘤营养中起作用,并且还可以通过肿瘤穿透性iRGD肽而治疗性地参与(Pang等人(2014) *Nat. Commun.* 5:4904)。此外,血管生长因子,如VEGF、VEGF-A、VEGF-A165、TGF- β 以及信号素3A显示允许与肿瘤血管系统上的 $\alpha_v\beta_3$ 整合素和 $\alpha_v\beta_5$ 整合素结合的RGD基序(Sugahara等人(2009) *Cancer Cell*, 16(6):510-520; Sugahara等人(2010) *Science*, 328(5981):1031-1035; Pang等人(2014) *Nat. Commun.* 5:4904)。因此,除了与生长因子受体相关的信号转导途径和血管通透性的作用(Kolodkin等人(1997) *Cell*, 90(4):753-762; Ellis(2006) *Mol. Cancer Ther.* 5(5):1099-1107; Glinka和Prud'homme(2008) *J. Leukoc. Biol.* 84(1):302-310)之外,CendR基序的蛋白水解切割和释放也可以触发NRP-1介导的转胞吞(Pang等人(2014) *Nat. Commun.* 5:4904)。因此,有可能的是,NRP-1途径可以与血管渗漏共存,包括EPR效应,但是显示出不同的时间动力学。虽然对CendR基序的响应可以在数分钟内开始,但是EPR效应通常需要6小时-8小时以达到峰值(Sugahara等人(2009) *Cancer Cell*, 16(6):510-520; Maeda等人(2003) *Int. Immunopharmacol.* 3(3):319-328)。

[0567] 我们关于在iRGD共同施用期间二氧化硅体转胞吞的数据补充了先前在PDAC治疗期间克服基质-血管屏障的尝试(Feig等人(2012) *Clin. Cancer Res.* 18(16):4266-4276; Dimou等人(2012) *Ther. Adv. Med. Oncol.* 1758834012446008; Meng等人(2013) *ACS Nano.* 7(11):10048-10065; Meng等人(2015) *ACS Nano.* 9(4):3540-3557)。几种血管生成药物已经被引入以提高纳米载体的肿瘤进入(Dimou等人(2012) *Ther. Adv. Med. Oncol.* 1758834012446008; Kobayashi等人(2014) *Theranostics*, 4(1):81-89)。在这些当中,VEGF可以提供PDAC部位处灌流和血管渗漏的暂时增加以增加纳米颗粒摄取(Olive等人(2009) *Science*, 324(5933):1457-1461; Jacobetz等人(2013) *Gut*, 62(1):112-120)。促进肿瘤部位处的血管通透性的其他药剂包括缓激肽、一氧化氮、血管紧张素转化酶抑制剂、肿瘤坏死因子 α 、血红素加氧酶-1、胶原酶以及透明质酸酶(Kobayashi等人(2014) *Theranostics*, 4(1):81-89; Eikenes等人(2004) *Cancer Res.* 64(14):4768-4773; Seynhaeve等人(2007) *Cancer Res.* 67(19):9455-9462; Fang等人(2011) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63(3):136-151; Fang等人(2012) *Cancer Sci.* 103(3):535-541; Maeda(2013) *Cancer Sci.* 104(7):779-789; Eikenes等人(2005) *Br. J. Cancer.* 93(1):81-88)。我们还已经证实了使用递送转化生长因子 β (TGF- β)途径的小分子抑制剂LY364947的纳米载体可以快速地(<2小时)逆转体内周细胞对内皮细胞的粘附(Meng等人(2013) *ACS Nano.* 7(11):10048-10065)。伴随的血管通透性的多倍增加被证实在肿瘤部位处提供了递送吉西他滨的脂质体的流出的显著增加(19)。还已经报道了通过靶向TGF- β 途径增强血管通透性的其他方法(Cabral等人(2011) *Nat. Nanotechnol.* 6(12):815-823; Liu等人(2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109(41):16618-16623)。最终,值得提到的是,二氧化硅体载体可以通过将紫杉醇与吉西他滨共同递送来实现基质减少(Meng等人(2015) *ACS Nano.* 9(4):3540-3557),达到这样的程度以使得我们的载体在处理小鼠的原位PDAC肿瘤期间可以优于Abraxane加上游离吉西他滨的施用(Frese等人(2012) *Cancer Discov.* 2(3):260-269)。

[0568] 基于iRGD的共同递送增强了PDAC肿瘤部位处二氧化硅体的摄取的验证(图22),重

要的是强调所述共同施用方法克服了其中所述肽与纳米载体缀合的替代递送机制的主要限制。对这种差异的解释在于基于可用的NRP-1受体数量，载体系统的转运能力 (Sugahara 等人 (2010) *Science*, 328 (5981) :1031-1035; Ruoslahti (2012) *Adv. Mater.* 24 (28) :3747-3756; Ruoslahti (2016) *Adv. Drug Deliv. Rev.* pii:S0169-409X(16)30094-1.doi:10.1016/j.addr.2016.03.008)。因此，虽然缀合的二氧化硅体的转运受到血管系统上相对少的和有限数量的靶受体的限制，但是单独注射未缀合的肽触发肿瘤部位处旁观者二氧化硅体的大量转移(更大的数量)。此外，游离iRGD还经由调节整合素功能而具有抗转移活性，如由干扰纤连蛋白基质上培养的肿瘤细胞的附着和迁移所证实 (Sugahara 等人 (2015) *Mol. Cancer Ther.* 14 (1) :120-128)。这可以部分地解释在我们的研究中肽对肿瘤转移的干扰(图23B和23C)。与依靠增加载体合成的成本和复杂性的缀合机制相比，使用游离肽对于临床使用来说也是更实用的和可承受的。

[0569] 材料和方法

[0570] 对材料和实验程序的更详细说明见于以下补充材料和方法中。

[0571] 二氧化硅体制备

[0572] 合成负载伊立替康的二氧化硅体：

[0573] 使用如上所示的溶胶-凝胶程序合成65nm MSNP核心(还参见Liu等人 (2016) *ACS Nano.* 10 (2) :2702-2715)。如先前所报道，使用脂质生物膜产生二氧化硅体 (Meng等人 (2015) *ACS Nano.* 9 (4) :3540-3557；参见实施例1和Liu等人 (2016) *ACS Nano.* 10 (2) :2702-2715)。简单地说，将500mg MSNP浸泡在20mL TEA₈SOS (80mM溶液) 中，将其添加在脂质生物膜的顶部上，所述脂质生物膜包含DSPC/Chol/DSPE-PEG₂₀₀₀(摩尔比3:2:0.15)的550mg混合物，包被在圆底烧瓶的底部(参见实施例1以及Liu等人 (2016) *ACS Nano.* 10 (2) :2702-2715)。在进行超声处理以完成LB对颗粒的包被之后，通过在琼脂糖凝胶CL-4B柱上进行尺寸排阻色谱法去除游离TEA₈SOS。在水浴中在65°C将负载TEA₈SOS的二氧化硅体在10mg/mL的伊立替康溶液中温育以进行药物负载。在30分钟之后通过在冰水浴中淬灭来停止负载，之后，通过离心将负载药物的二氧化硅体洗涤3次并且重悬在PBS中。

[0574] 合成与iRGD缀合的二氧化硅体：

[0575] 通过使肽与LB中所包括的PEG链连接来合成与iRGD缀合的二氧化硅体。这是通过使用可商购获得的DSPE-PEG₂₀₀₀-顺丁烯二酰亚胺代替DSPE-PEG₂₀₀₀来完成的，同时维持如上文所述的脂质的摩尔比。使用在室温下进行4小时的硫醇-顺丁烯二酰亚胺反应，使过量(0.15mL, 5mg/mL)的半胱氨酸修饰的iRGD肽与DSPE-PEG₂₀₀₀-顺丁烯二酰亚胺缀合 (Sugahara 等人 (2009) *Cancer Cell*, 16 (6) :510-520)。洗涤所述颗粒以去除未反应的iRGD。缀合反应的成功是通过还制备一批与荧光素(FAM)标记的iRGD肽缀合的颗粒，继而充分洗涤来确认(同上)(图27, 图A)。

[0576] 合成具有金核心标记的二氧化硅体：

[0577] 在含有枸橼酸盐的溶液中合成10nm Au纳米颗粒(参见以下补充材料和材料)。为了使MSNP壳在Au纳米颗粒核心上生长，将36mL枸橼酸盐包覆的颗粒快速注入12mL CTAC溶液(25重量%于H₂O中)中。将颗粒洗涤并且重悬在CTAC溶液(6.25重量%于H₂O中)中，同时在85°C以350rpm搅拌5分钟。向该混合物中，我们添加0.256mL的10% (w/v) 三乙醇胺，持续10分钟，继而逐滴添加0.32mL二氧化硅前体TEOS。将溶液以350rpm搅拌20分钟，从而引起具有

约65nm的平均尺寸的Au核心/MSNP壳颗粒的产生。通过在含1% NaCl的甲醇(w/v)和纯甲醇中依次洗涤来纯化颗粒。然后如之前所述,将Au标记的MSNP用LB包被。

[0578] 在存在或不存在iRGD共同施用的情况下静脉内注射的二氧化硅体的生物分布研究

[0579] 使用IVIS(Xenogen公司)成像来研究NIR标记的二氧化硅体在KPC衍生的原位模型(n=3只小鼠/组)中的生物分布(参见实施例1和Liu等人(2016)ACS Nano.10 (2) :2702-2715)。在共同施用或不共同施用8 μ mol/kg iRGD的情况下,向动物静脉内注射50mg/kg的缀合的二氧化硅体和非缀合的二氧化硅体。在24小时之后将动物处死,继而对切除的肿瘤和主要器官进行离体成像。还通过使用ICP-OES方案评估Si含量来确认肿瘤生物分布(同上)。

[0580] 在KPC衍生的原位肿瘤模型中评估在iRGD共同施用的情况下Ir-二氧化硅体的功效

[0581] 将荷瘤B6/129小鼠随机分配到4组中,每组有6只动物。每3天一次向第一组静脉内注射含有40mg/kg的伊立替康剂量的二氧化硅体(80mg/kg的MSNP),进行总共4次施用。第二组接受相同剂量的Ir-二氧化硅体加上8 μ mol/kg iRGD的共同施用。用PBS或单独的iRGD处理第三组和第四组。每天监测小鼠直到自发动物死亡或接近垂死状态之时(参见实施例1和Liu等人(2016)ACS Nano.10 (2) :2702-2715; olive等人(2009)Science,324 (5933) :1457-1461)。通过在处死之前10分钟向动物腹膜内注射75mg/kg的D-荧光素来对原发肿瘤和转移部位进行生物发光成像。收获肿瘤组织和主要器官(胃肠道、肝脏、脾脏、心脏、肺以及肾脏)以定量评估生物发光图像强度。

[0582] 经由TEM观察对转胞吞途径进行超微结构分析

[0583] 在共同施用或不共同施用8 μ mol/kg iRGD的情况下,通过静脉内注射50mg/kg的封装Au的二氧化硅体来处理KPC原位肿瘤小鼠。在24小时之后收集肿瘤活检,在PBS中洗涤,并且立即在4℃用2.5%戊二醛固定。通过UCLA的电子显微镜服务中心(Electron Microscopy Services Center)进行进一步的样品制备和切片。在1% OsO₄中固定之后,将样品在环氧丙烷中脱水并且包埋在树脂中。将60nm-80nm厚的组织切片放置在铜网上并且在JEOL 1200-EX电子显微镜下观察。

[0584] 二氧化硅体在源自于患者的PDAC肿瘤中的生物分布

[0585] 在机构人类受试者批准下,从接受惠普尔手术的患者收集23个PDAC样品的库,并且将其用于在Timothy Donahue博士的实验室中在NSG小鼠中建立异种移植植物。利用表型分析数据和对NRP-1表达进行IHC染色,收集两个患者样品(XWR#8和XWR#187)以用于在6周大的雌性NSG小鼠的侧腹中使新鲜的皮下异种移植生长(Rückert等人(2012).J.Surg.Res.172 (1) :29-39)。当肿瘤尺寸长到约0.8cm的直径时,使用在存在或不存在iRGD共同施用的情况下接受二氧化硅体的每一组中的3只动物来评估向肿瘤部位的生物分布,类似于上述程序。在24小时之后将动物处死以进行离体成像以确定NIR标记的二氧化硅体的摄取。还通过ICP-OES评估肿瘤部位处的Si含量来确认成像数据。

[0586] 统计分析

[0587] 使用双侧学生t检验(Excel软件,Microsoft公司)对组之间的差异进行比较分析。在p<0.05时确定统计显著性差异。值被表示为多次测定的平均值±SD,如附图图例说明中所述的那样。使用SPSS软件通过对数秩检验(曼特尔-考克斯(Mantel-Cox))来处理存活率

数据。

[0588] 补充材料和方法

[0589] 材料

[0590] 原硅酸四乙酯(TEOS)、三乙醇胺、十六烷基三甲基氯化铵溶液(CTAC, 25重量%于水中)、(3-氨基丙基)三乙氧基硅烷(APTES)、三乙胺(TEA)、氯化金(III)水合物、枸橼酸三钠脱水物、Dowex 50WX8树脂以及琼脂糖凝胶CL-4B购自美国的Sigma-Aldrich公司。1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氨基(聚乙二醇)-2000](铵盐)(DSPE-PEG₂₀₀₀)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[顺丁烯二酰亚胺(聚乙二醇)-2000](铵盐)(DSPE-PEG₂₀₀₀-顺丁烯二酰亚胺)以及胆固醇(Chol)购自美国的Avanti Polar Lipids公司。蔗糖八硫酸酯(SOS)钠盐购自加拿大的Toronto Research Chemicals公司。盐酸伊立替康三水合物购自美国的LC Laboratories公司。青霉素、链霉素以及杜氏改良伊格氏培养基(DMEM)是从Invitrogen公司获得的。胎牛血清(FBS)购自美国的Gemini Bio Products公司。iRGD(CRGDKGPDC, SEQ ID NO:11)购自美国的Biomatik公司。被半胱氨酸残基修饰的反应性iRGD和阻断抗NPR-1抗体(针对NRP-1的重组b1b2结构域)是由Ruoslahti博士友情提供的。环状(-RGDfK)(SEQ ID NO:12)购自美国的ApexBio Technology公司。抗CD31抗体(目录号553708)购自美国的BD PharmingenTM。抗NPR-1抗体(ab81321)购自美国的Abcam公司。对照正常山羊IgG(sc-2028)购自美国的Santa Cruz Biotechnology公司。Alexa Fluor[®]488缀合的山羊抗兔IgG(H+L)二抗(A11008)、Alexa Fluor[®]594缀合的山羊抗大鼠IgG(H+L)二抗(A11007)以及DyLight680NHS酯购自美国的Thermo Fisher Scientific公司。MatrigelTM基质基底膜购自美国的BD Bioscience公司。所有化学品不经进一步纯化而被直接使用。

[0591] 使用DyLight680对MSNP进行NIR标记

[0592] 使用NIR荧光染料DyLight 680NHS酯进行MSNP标记。首先,将MSNP表面用NH₂基团官能化以缀合NHS酯。简单地说,将10mg MSNP悬浮在1mL乙醇中并且与1μL的APTES混合。在惰性N₂气氛下进行反应,同时在80℃搅拌过夜。随后,将混合物离心并且用乙醇洗涤3次。将NH₂缀合的MSNP悬浮在1mL DMF中,与0.01mg的DyLight 680NHS酯混合并且在室温下搅拌2小时。将标记的MSNP用乙醇和去离子水洗涤。使用NIR标记的MSNP制备二氧化硅体。

[0593] 合成约10nm金纳米颗粒

[0594] 通过将5mL HAuCl₄(10mM)和45mL Milli-Q水添加到配备有冷凝器的100mL圆底烧瓶中来制备约10nm的金纳米颗粒。在达到沸点温度之后,在剧烈搅拌同时,将5.8mL枸橼酸钠(38.8mM)添加到煮沸的溶液中。这伴随有颜色从浅黄色变成暗红色。将煮沸的溶液在160℃搅拌10分钟,然后在没有加热的情况下再搅拌15分钟。使用金颗粒作为核心来合成二氧化硅体,如文稿的方法部分中所述。

[0595] 细胞系

[0596] 永生化细胞系源自于转基因Kras^{LSL-G12D/+};Trp53^{LSL-R172H/+};Pdx-1-Cre小鼠的自发性肿瘤。为了允许在原位植入之后对生长的肿瘤进行生物发光肿瘤成像,在UCLA载体核心设施中将细胞用基于荧光素酶的慢病毒载体永久转染。在使用有限稀释方案之后获得代表性细胞克隆。

[0597] 使用KPC衍生的细胞系在免疫活性小鼠中制备原位肿瘤

[0598] 使用由UCLA动物研究委员会批准的方案进行所有的动物实验。雌性B6/129小鼠(约8周)购自The Jackson Laboratory公司。为了使原位异种移植物生长,用异氟烷使小鼠麻醉,继而腹膜内注射50mg/kg的氯胺酮和10mg/kg甲苯噻嗪。将手术部位剃毛以在切口部位周围留下1cm的边缘并且通过用聚维酮碘和70%乙醇擦洗来灭菌。将小鼠定位在加热垫上以进行手术,并且用无菌纱布覆盖左侧腹部的切口部位。制作约0.7cm的手术切口以暴露注射部位,继而经由27号针将含有 2×10^6 个KPC-luc细胞的50μL的DMEM/基质胶(1:1v/v)注射到胰腺尾中。将筋膜层用可吸收缝合线(PDS II, Ethicon公司)封闭并且将皮肤用不可吸收缝合线(PROLENE, Ethicon公司)封闭。将小鼠保持在升温垫上直到从麻醉中完全恢复为止,然后转移到清洁的笼舍中。在手术期间使用人工泪液软膏剂保护小鼠眼睛。

[0599] 使用抗NRP-1阻断抗体干扰iRGD作用

[0600] 在携带KPC衍生的原位肿瘤的小鼠接受50mg/kg NIR标记的二氧化硅体加上8μmol/kg游离iRGD的静脉内注射之前15分钟注射50μg的阻断抗NRP-1抗体或对照IgG。使用仅接受二氧化硅体的动物作为对照。在注射后24小时将动物处死并且使用离体NIR成像来研究NIR标记的二氧化硅体的生物分布。通过使用IVIS软件进行NIR强度分析,继而使用ICP-OES进行Si含量分析来定量离体成像数据。

[0601] HPLC分析

[0602] 对于组织中伊立替康的HPLC分析,将所收获的肿瘤和器官样品称重并且在冰上匀浆。在用0.4mL的酸性溶液(0.1mol/L磷酸/甲醇,1:4v/v)提取0.1mL的组织匀浆之后,将提取物涡旋两次,持续10秒,并且以13,000rpm离心10分钟。经由0.22μm过滤器过滤含有伊立替康的上清液以用于在含有Knauer Smartline气动泵、C18柱、K-2600分光光度计以及Gina数据采集软件的系统中进行HPLC分析。以1.0毫升/分钟的流速递送的流动相包含3%三乙基乙酸铵水性缓冲液(pH值=5.5)和乙腈(73:27v/v)。注入20微升的含有伊立替康的样品以测量254nm处的药物吸收,通常在约4.4分钟洗脱。在0.05μg/mL-100μg/mL的浓度范围内产生伊立替康标准曲线。

[0603] 免疫荧光染色

[0604] 使用双色免疫荧光染色来确定KPC肿瘤组织中的NPR-1阳性血管。使用OCT试剂将肿瘤组织冷冻包埋,并且用于制备肿瘤切片。首先在4°C将切片用抗NRP1单克隆抗体(1:250)处理过夜。在去除一抗并且在PBS中洗涤3次之后,添加Alexa Fluor® 488二抗(1:500)并且在室温下温育1小时。还将相同的切片用抗CD31抗体染色,继而进行Alexa Fluor® 594缀合的二抗处理以鉴定CD31表达。使用DAPI定位细胞核。在荧光显微镜(Observer D1, Zeiss公司)下检查染色的载玻片。通过Imaging J软件确定NRP-1⁺/CD31⁺血管的共定位比。

[0605] 实施例4

[0606] 原生细胞与二氧化硅体的比较分析

[0607] 制备脂质双层包被的纳米颗粒的一种方法涉及使用通过气溶胶辅助的自组装方法合成的MSNP。通过使用带静电荷的脂质体来包被MSNP,所述脂质体依次粘附,破裂,然后与带负电荷的MSNP表面融合(参见例如Liu等人(2009)J.Am.chem.Soc.131:7567-7569)。由桑迪亚(Sandia)和新墨西哥大学(University of New Mexico)的Brinker博士小组开发的这种产品被称作“原生细胞”,并且以名称Protocells and their use for targeted delivery of multicomponent cargos to cancer cells获得了美国专利(US 8,992,984

B1)。所述专利特别教导“原生细胞可以通过将运载物组分和多孔颗粒与脂质体或脂质混合,继而使脂质双层在多孔颗粒上融合并且将运载物组分协同负载到多孔颗粒的一个或多个孔隙中以形成原生细胞配混物来形成”。8,992,984专利的图1C中所示的示例性原生细胞描绘了“带正电荷的多孔颗粒可以与带负电荷的脂质双层,如DOPS脂质双层融合,其中所述带正电荷的多孔颗粒可以吸收带负电荷的运载物组分(例如钙黄绿素或DNA或siRNA)”。

[0608] 在开发本文所述的方法和二氧化硅体时,我们主动避免了原生细胞中所用的程序和成分,这是因为我们认为这种方法出于许多原因是不可预测的和不可行的。我们不仅没能使用8,992,984专利中所述的脂质体融合方法实现均匀的MSNP包被,而且我们也没能在大量的尝试中实现显著的药物负载。这促使我们开发本文所述的生物膜技术、超声处理程序以及负载方法以获得用于使用与原生细胞具有不同脂质组成的LB进行均匀颗粒包被的可再现的程序。

[0609] 图32描绘了在我们尝试产生“原生细胞”期间产生的数据,该“原生细胞”等同于由Ashley等人(2011)Nat. Mat., 10: 389-397所述的原生细胞。简单地说,将100 μ L 25mg/mL的MSNP以2.5mg/mL添加到100 μ L的脂质体中,继而进行Ashley等人的出版物(同上)中所述的步骤的序列。最终产物示于上图中。对该产物的流体动力学尺寸、尺寸分布以及胶体稳定性进行评估。左侧的照片插图示出了“包被”产物的相分离并且中间的DLS图示出了无包衣的颗粒的小峰加上团聚颗粒物质的大峰。右侧的TEM图像确认了proce11的颗粒聚集和二氧化硅体的胶体稳定性。原生细胞缺乏胶体稳定性使得所述产物没有资格用于通过静脉内施用来使用。综上所述,不同于原生细胞,二氧化硅体表现出优良的胶体稳定性、低PDI以及窄的尺寸分布。

[0610] 表6说明了二氧化硅体技术与原生细胞技术之间的各种差异。

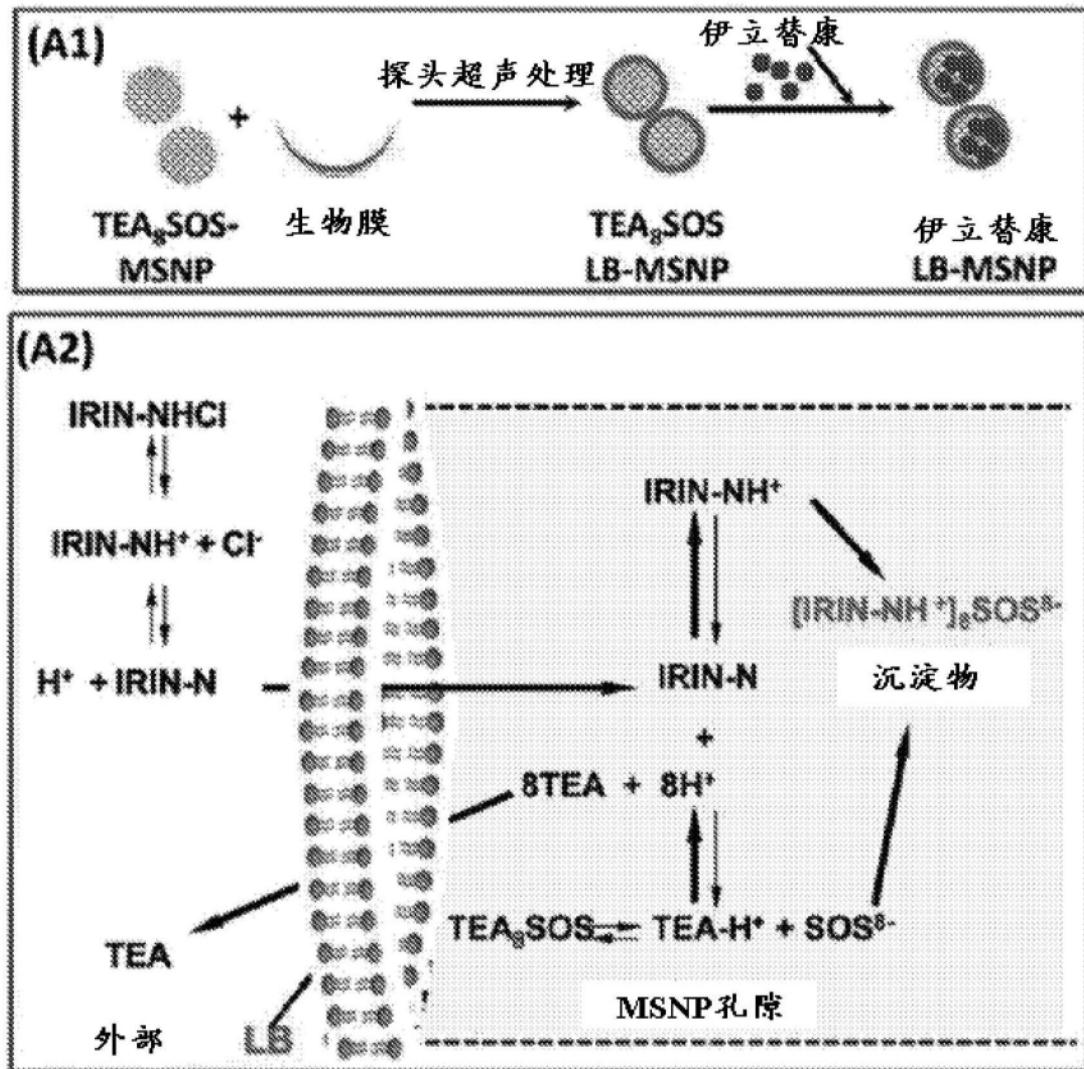
[0611] 表6:二氧化硅体技术与原生细胞技术的某些特征的比较。

	组成、方法,或结果	二氧化硅体	原生细胞
[0612]	MSNP 合 成 方法	溶胶-凝胶法, 产生均匀粒度分布和实施例 1-3 中所示的特征	气溶胶辅助自组装, 产生具有不均匀尺寸分布和上文所示的特征

		的颗粒
LB 组成	说明性而非限制性二氧化硅体的生物膜的脂质组成是： DPPC/Chol/DSPE-PEG(PTX/GEM 共同递送二氧化硅体) DSPC/Chol/DSPE-PEG(伊立替康二氧化硅体)	包被的颗粒的实际脂质组成是未知的，但是由具有以下组成的脂质体制成： DOPC/Chol/DOTAP DOPC/Chol/DOPS DOPC/Chol/DSPE-PEG DPPC/Chol/DSPE-PEG DOPC/Chol/DOPE-PEG DSPC/Chol/DSPE-PEG
[0613]	MSNP : 脂质比 (wt/wt)	10:1 (Ashley 等人(同上)中变成 1:2)
包被技术效率	单步方法，使用具有高能量输入的超声处理并且瞬时封装颗粒群体中约 100% 的颗粒，有 CryoEM 证据	多步方法，使用以低能量输入对颗粒/脂质体混合物进行涡旋，并且缺乏证据表明包被了群体中的大部分颗粒
粒度、尺寸分布	在说明性而非限制性实施方案中，MSNP 核心尺寸在 60 nm-70 nm 的范围内。 它们是高度均匀的，具有 PDI<0.1。 在 LB 包被之后，二氧化硅体表现出 110 nm-130 nm 的流体动力学尺寸，PDI<0.1。 CryoEM 显示约 80 nm 的主要二氧化硅体尺寸。 我们的 LB 包被程序还有效包被具有均匀的和更小或更大的 MSNP 核心尺寸，如 50 nm-300 nm 的 MSNP。	MSNP 核心 <u>不是</u> 在溶胶-凝胶程序中制成的，因此，核心颗粒 <u>不是</u> 均匀的，而是大颗粒和小颗粒的混合物。在原生细胞中，MSNP 核心尺寸在 50 nm 至 300 nm 的范围内。因此，样品的 PDI 太不均匀而无法计算。

孔隙分布尺寸	蠕虫状分布，尺寸约 3 nm	蠕虫状；1.95 nm-2.25 nm
胶体稳定性	高胶体稳定性。持续稳定性测试显示从产生时刻到在 4°C 下在 PBS 中储存超过 6 个月，稳定性良好并且没有变化。	瞬间团聚，从而使得不可能进行进一步的稳定性测试
合成再现性	高度可再现的，甚至是由第一次执行所述技术的大学本科生也能实现	在我们的手中以及与 Brinker 人员并行工作时不可再现的
药物负载方法	通过质子梯度远程负载	主要是在封装之前浸入和使用与孔隙的静电附着
[0614]	亲水性药物；疏水性药物；亲水性和疏水性的组合；具有根据以下范例所述的弱碱特征的药物的远程负载： 这些运载物分子的一般特征包括以下化学特性：(i)包括一个或多个伯胺、仲胺、叔胺或季胺的有机分子化合物；(ii) $pK_a < 11$ 以允许在 LB 后面质子化和包封；(iii)在约 5 mg/mL 至 25 mg/mL 的范围内的水中溶解度和允许扩散穿过 LB 的两亲性特征；(iv)-3.0 至 3.0 的辛醇/水分配系数或 $\log P$ 值；(v)合适的分子量和小于 MSNP 孔径(2 nm-8 nm)的几何尺寸，以允许进入 MSNP 孔隙中。	8,992,984 专利叙述了大量有效负载而关于这些 API 的结构没有明确的定义。最少，这包括约 360 种有效负载结构，如化疗剂、激酶抑制剂、抗体以及蛋白质。还声称各种 DNA 和 siRNA 的封装。虽然静电相互作用在某些情况下可能起作用，但是这些 API 中的大部分是经由被动封装过程封装的。

[0615] 应当了解的是，本文所述的实施例和实施方案仅是用于说明目的并且鉴于其的各种改动方案或变化方案将由本领域技术人员想到并且被包括在本申请的精神和范围以及所附权利要求书的范围内。本文引用的所有出版物、专利以及专利申请在此以引用的方式整体并入本文用于所有目的。



冬1A

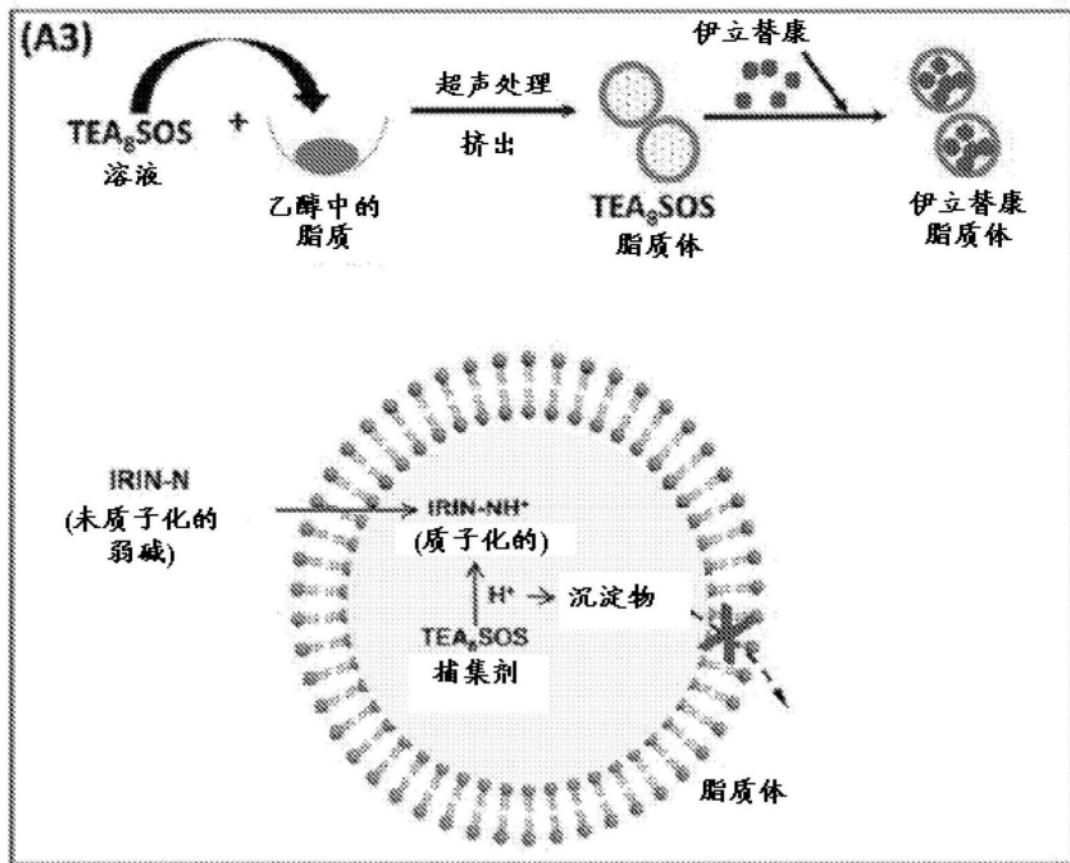


图1A续

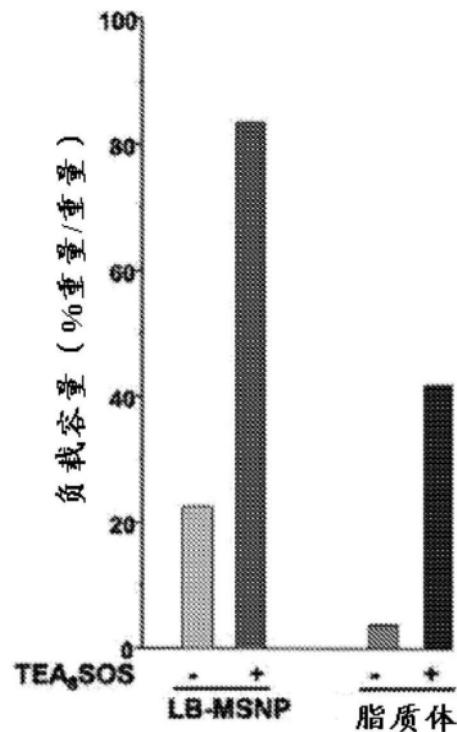


图1B

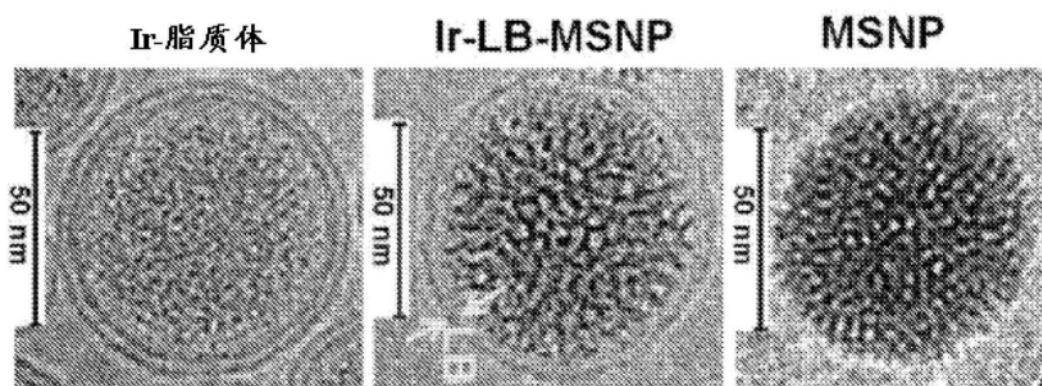


图1C

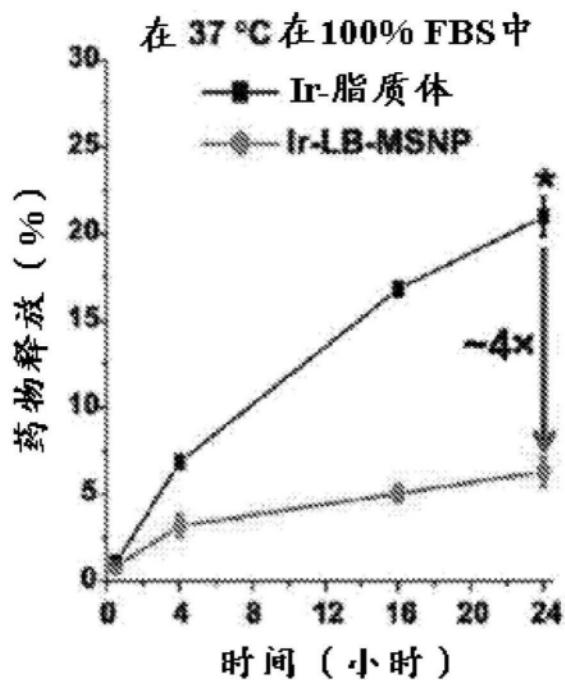


图1D

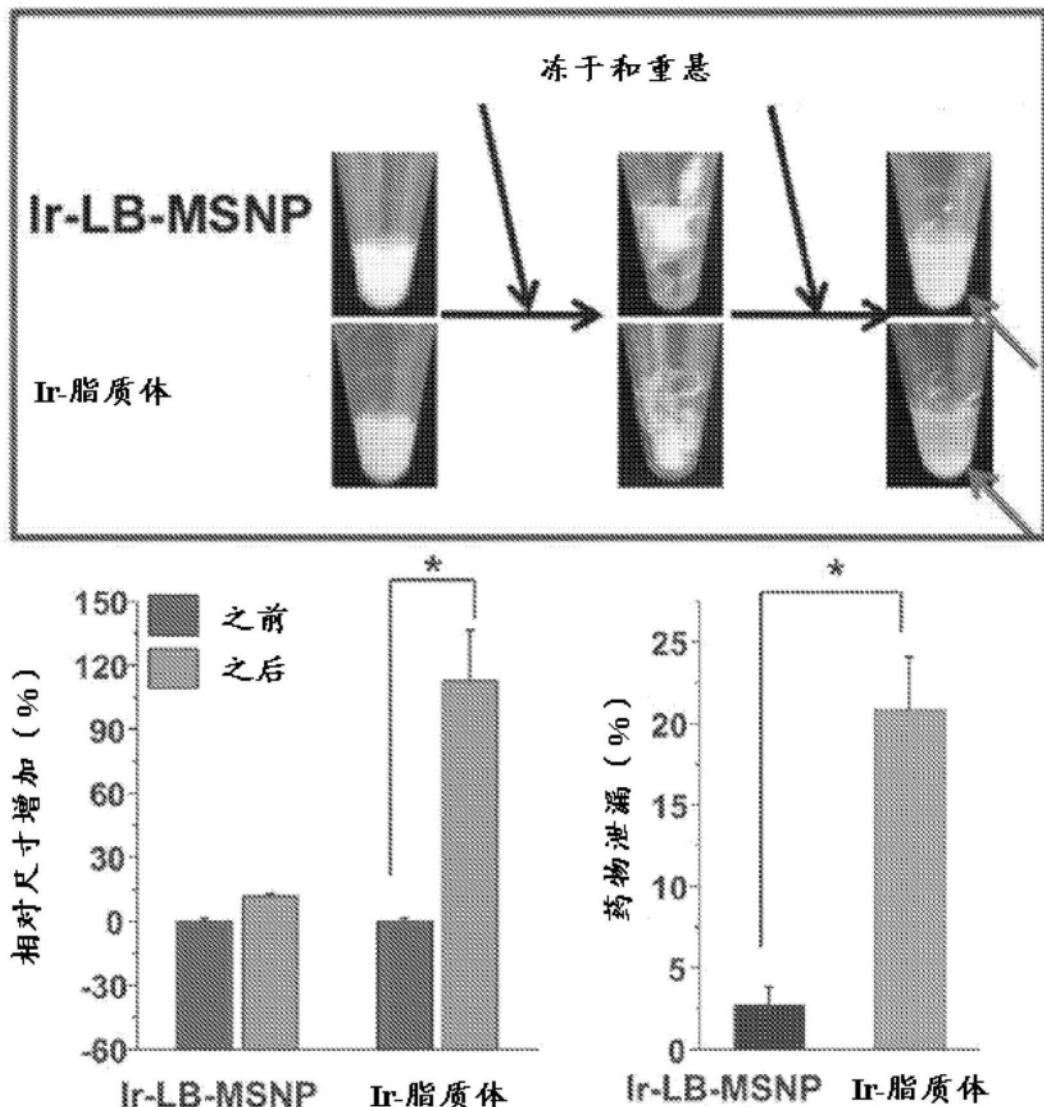


图1E

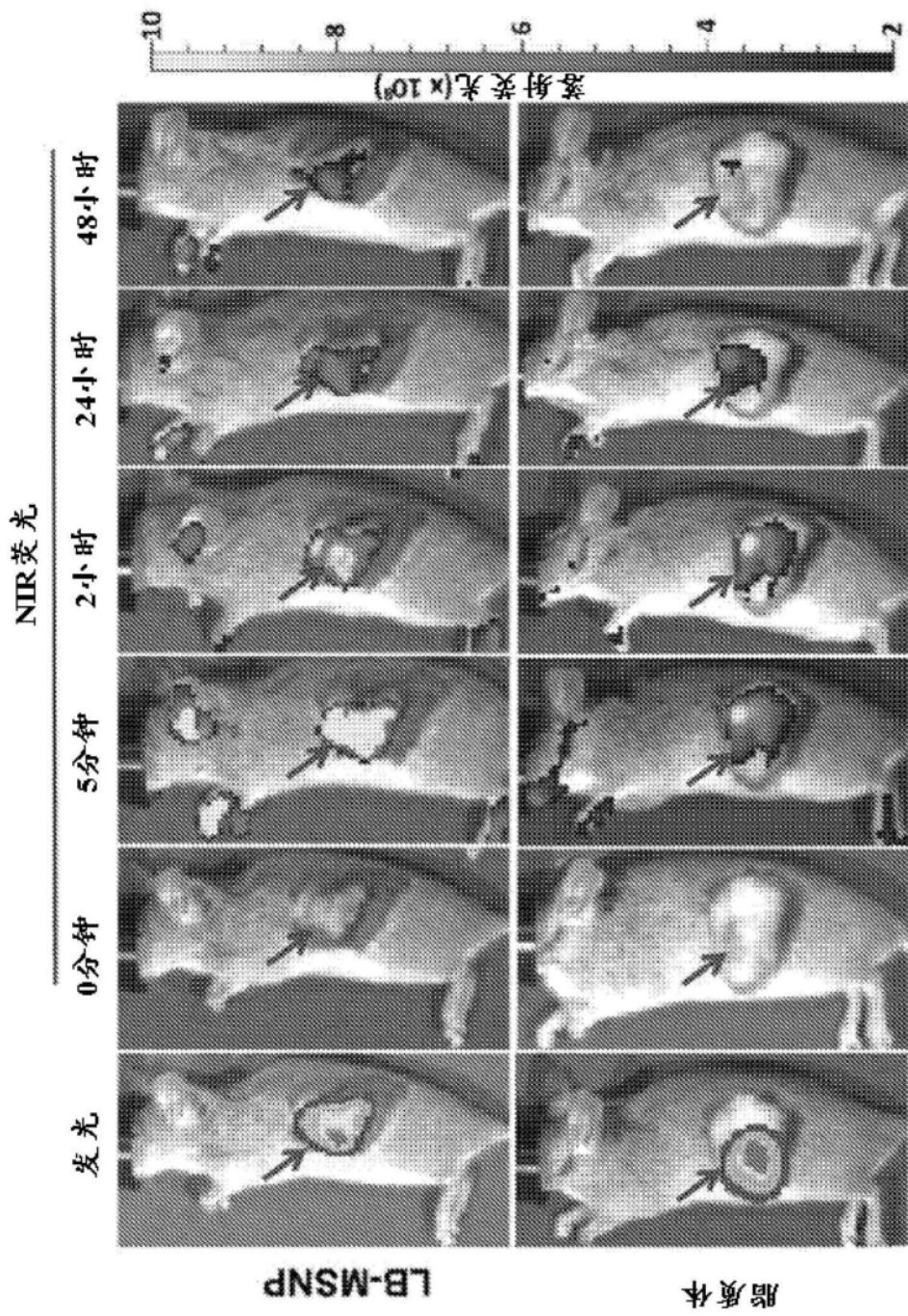


图2A

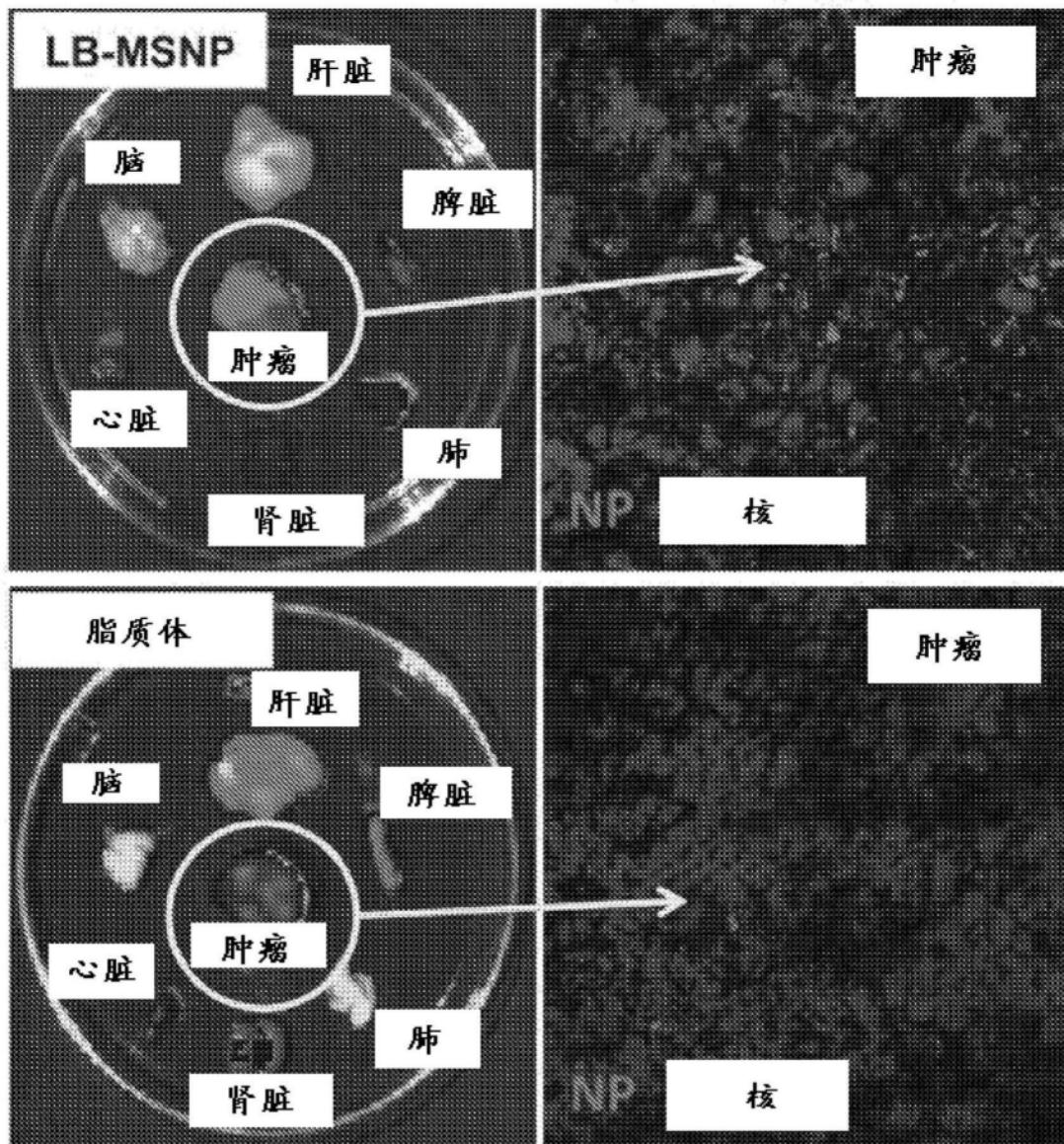


图2B

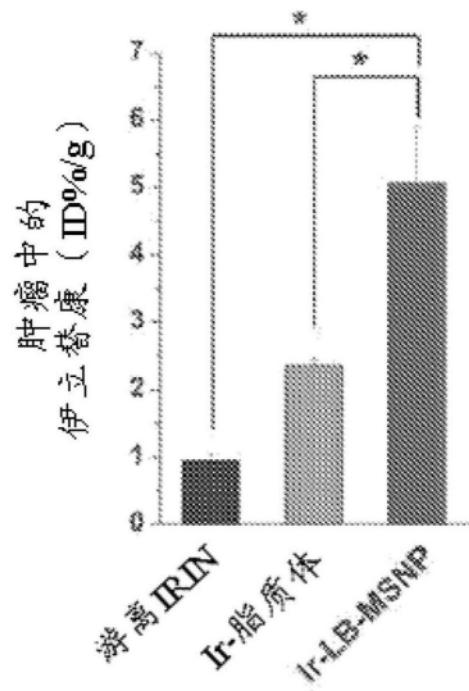


图2C

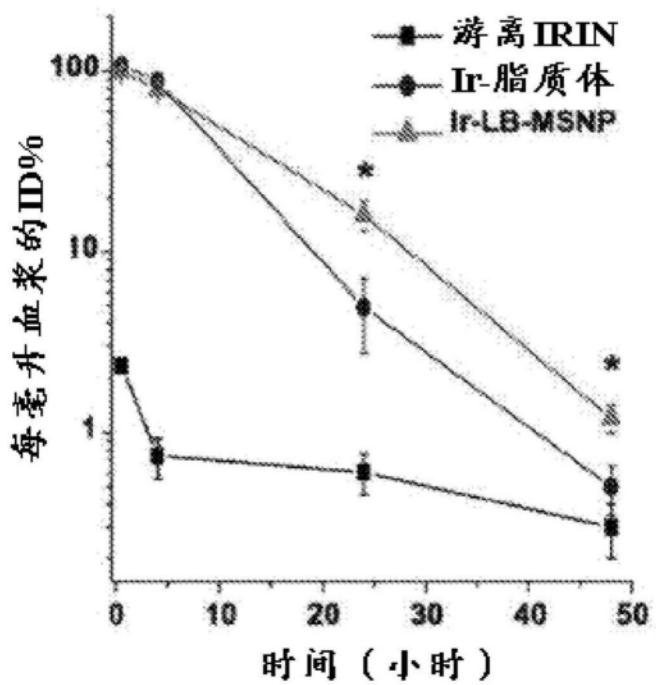


图2D

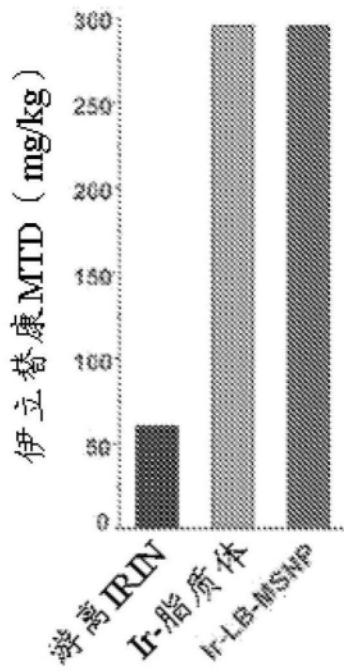


图3A

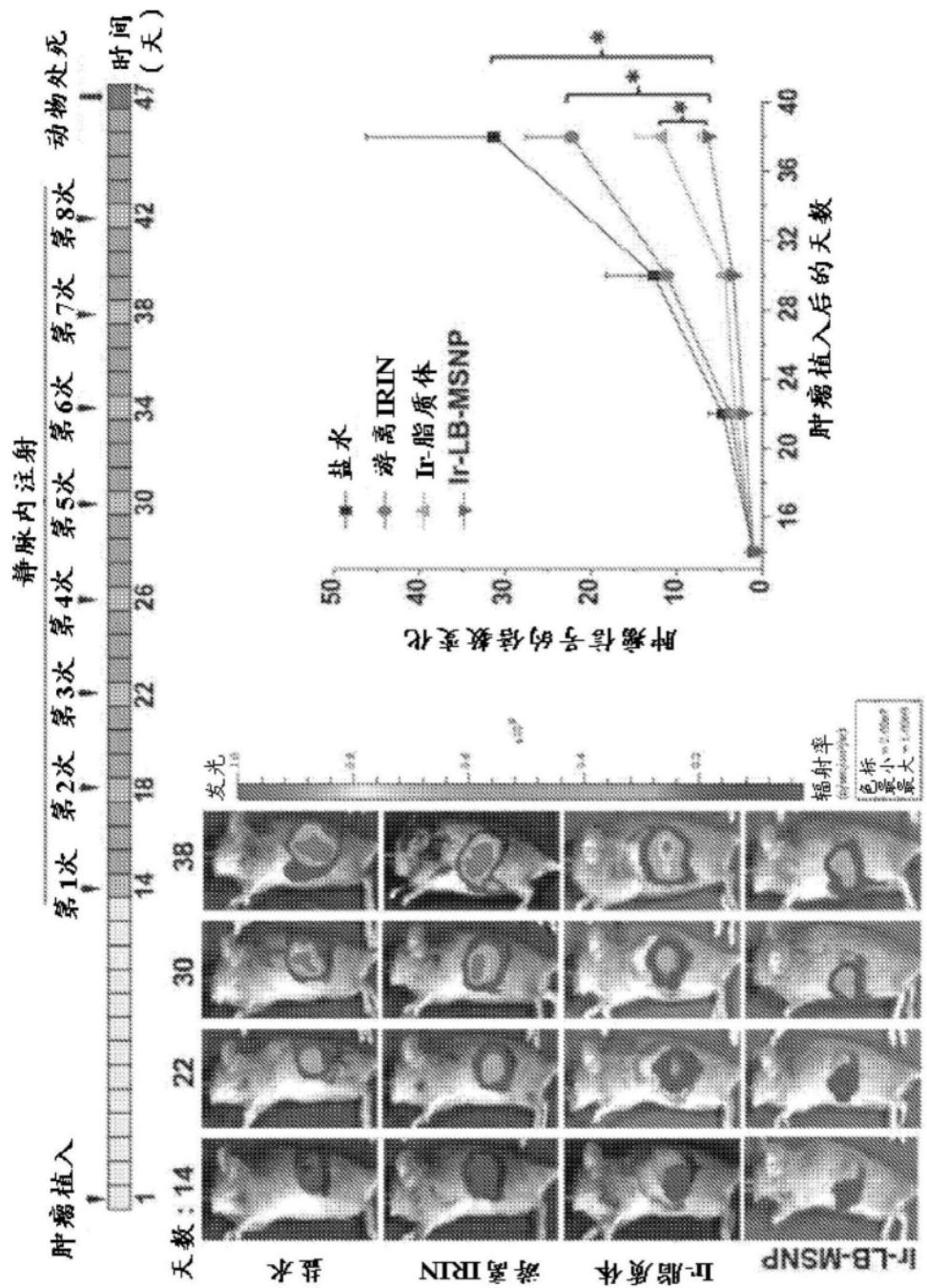


图3B

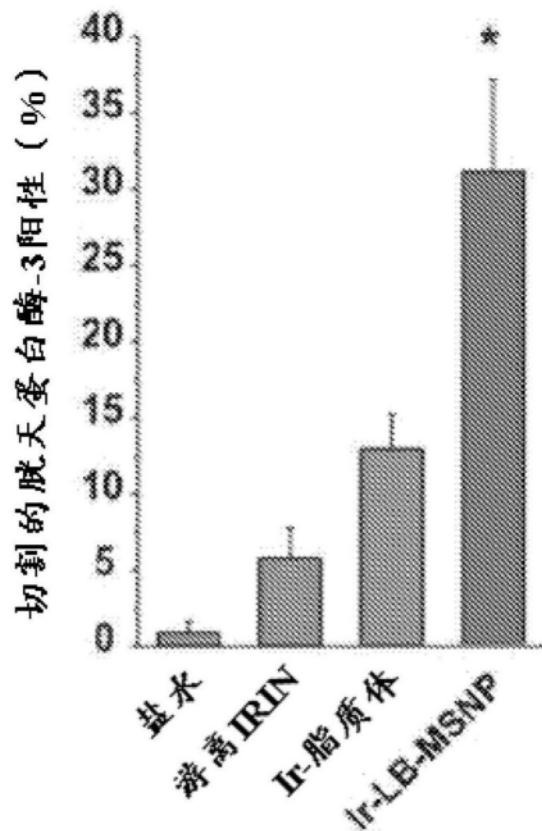


图3C

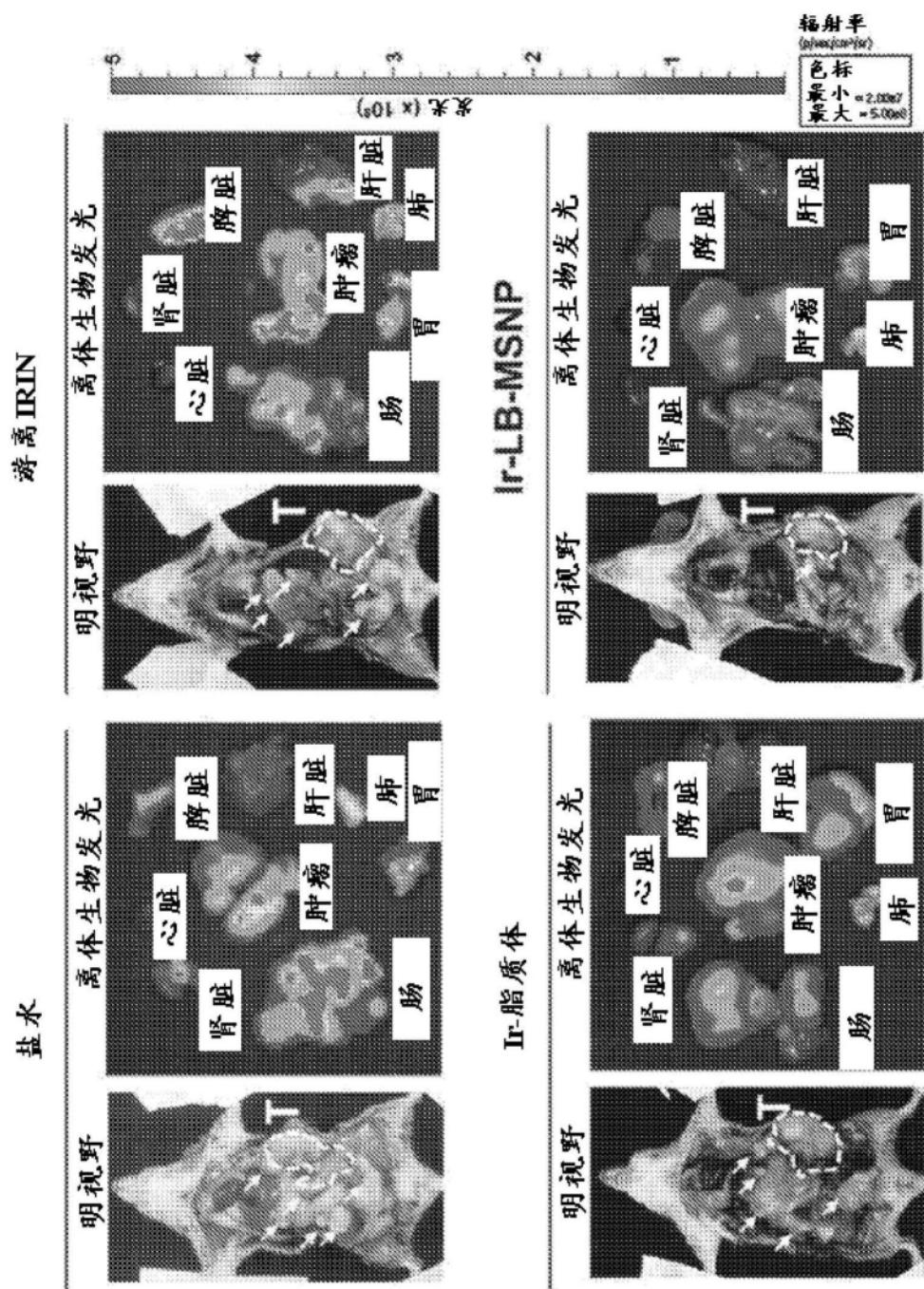
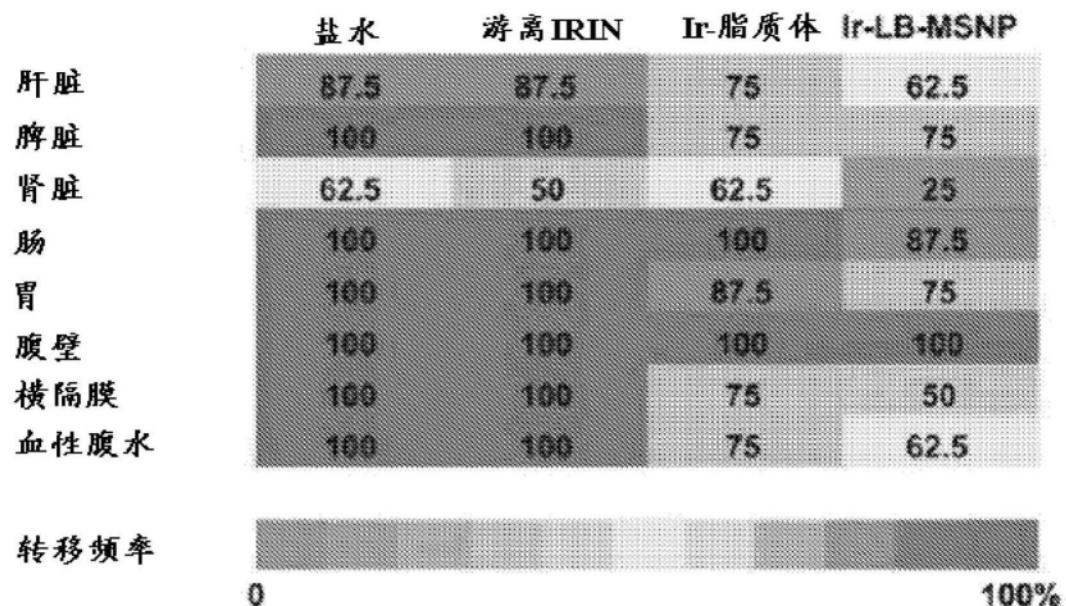


图3D



冬 3E

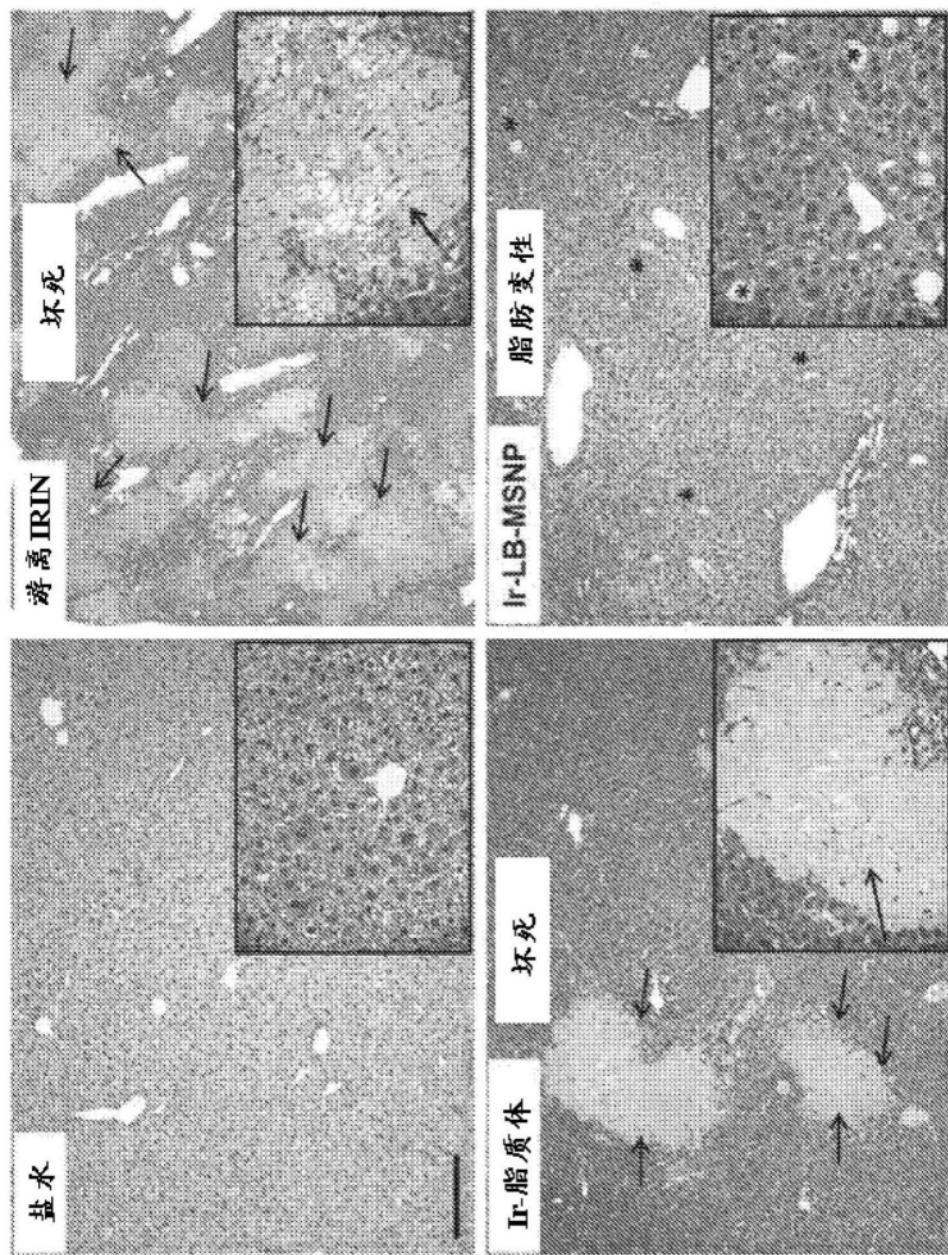


图4A

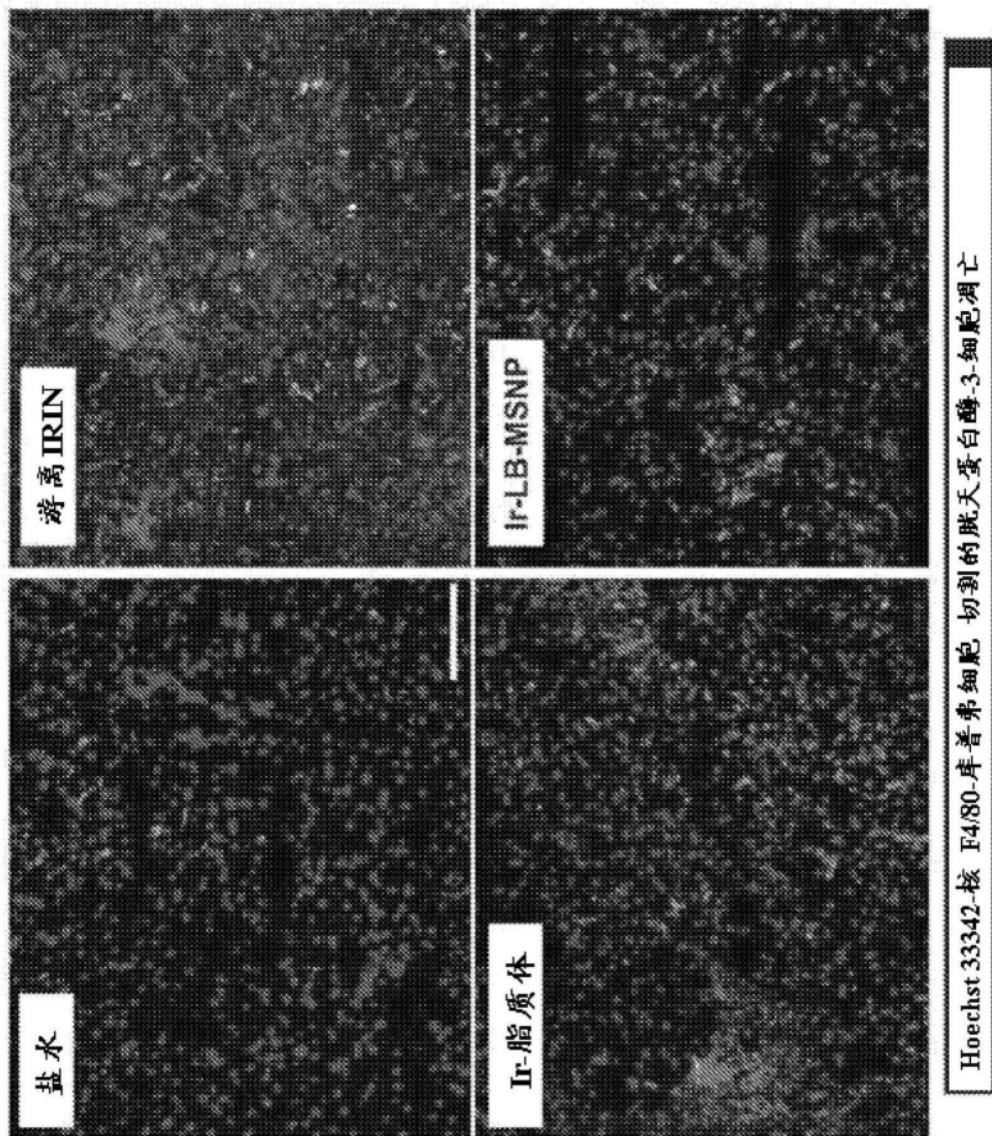


图4B

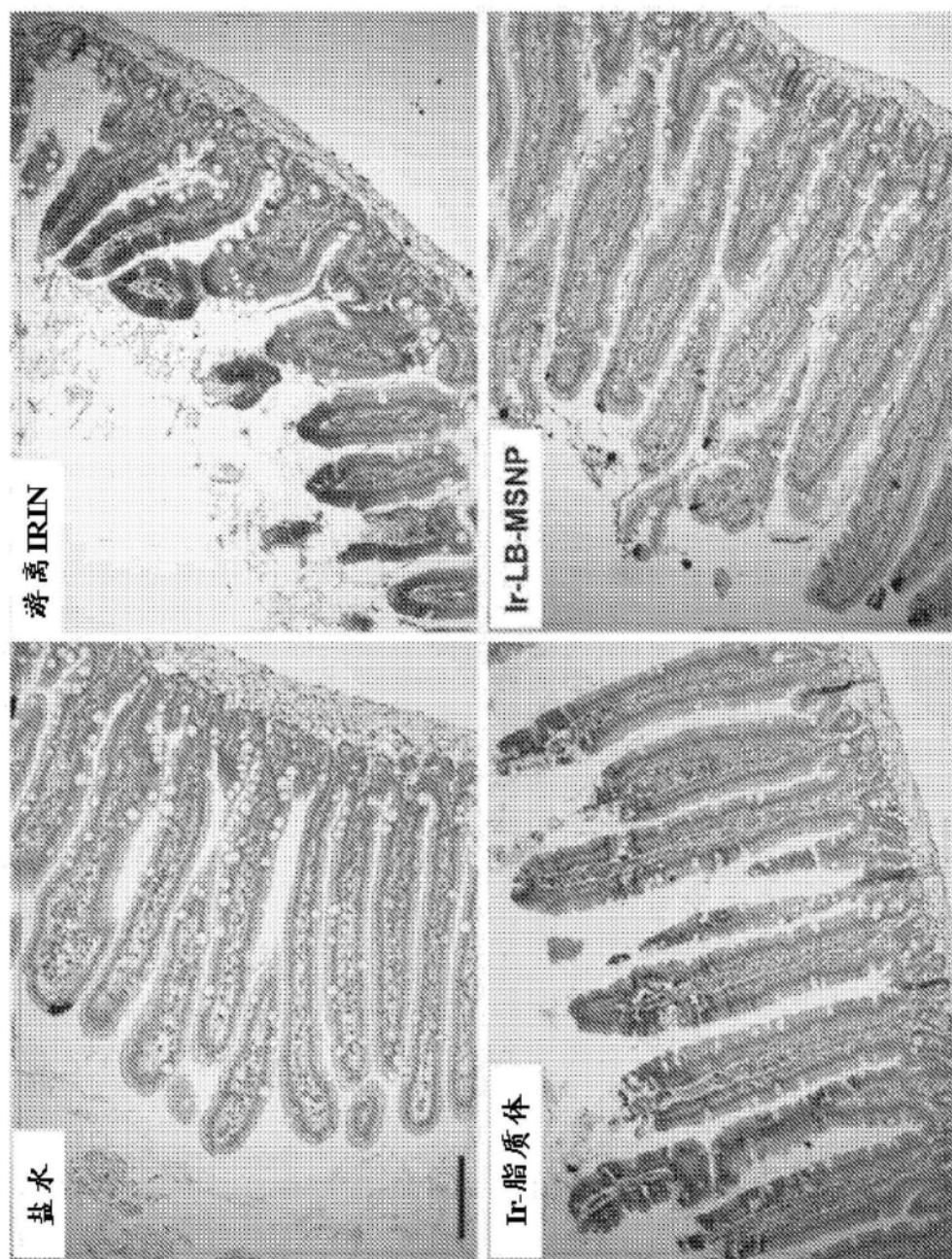


图4C

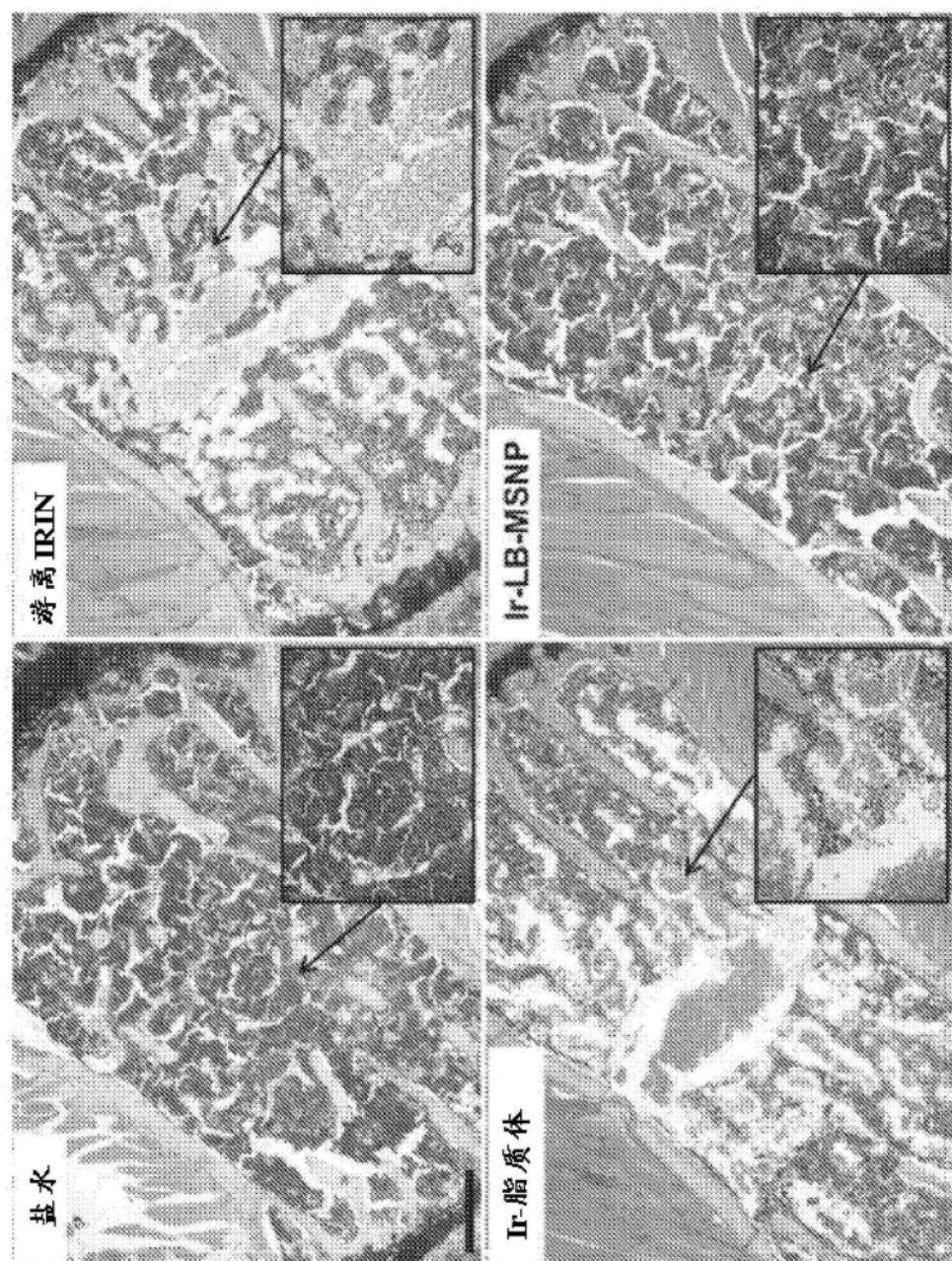


图4D

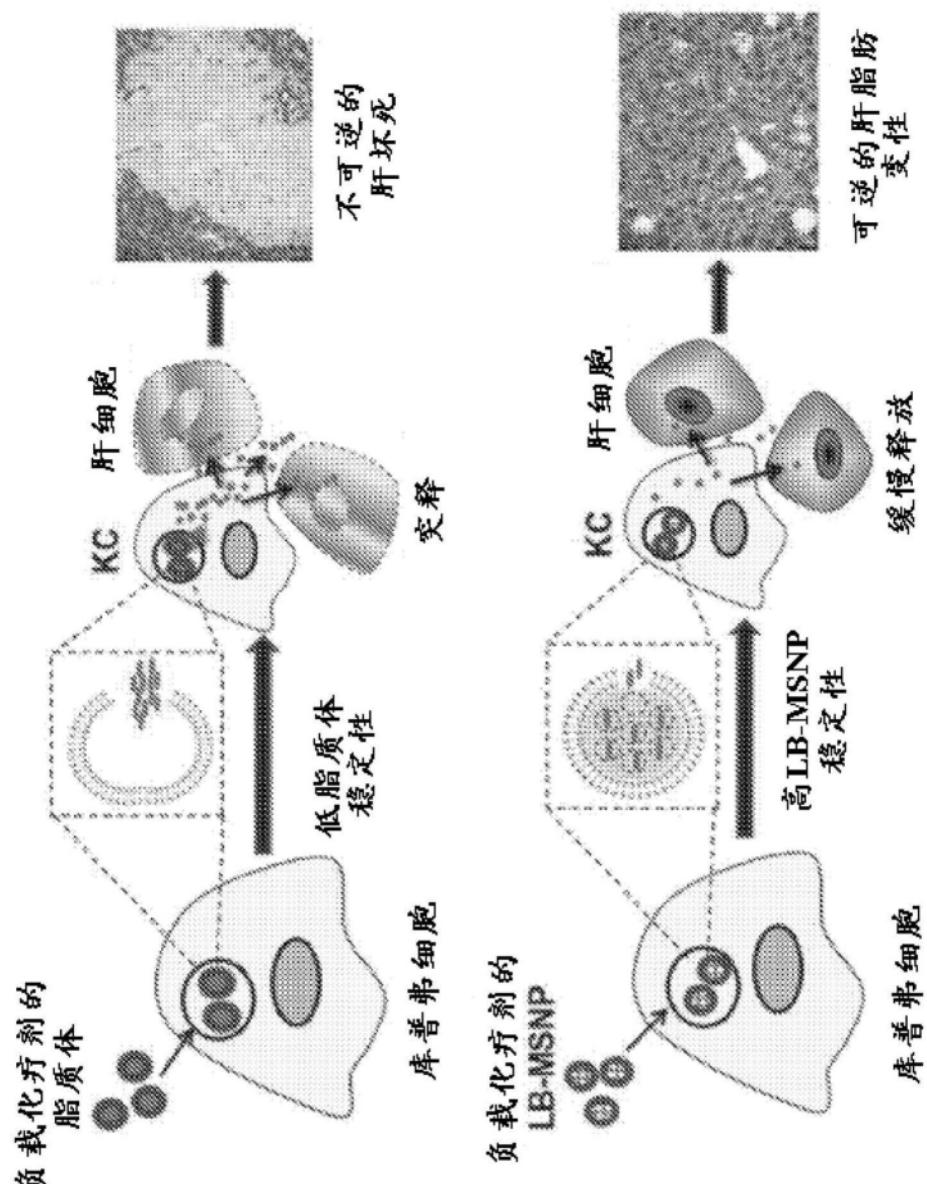


图4E

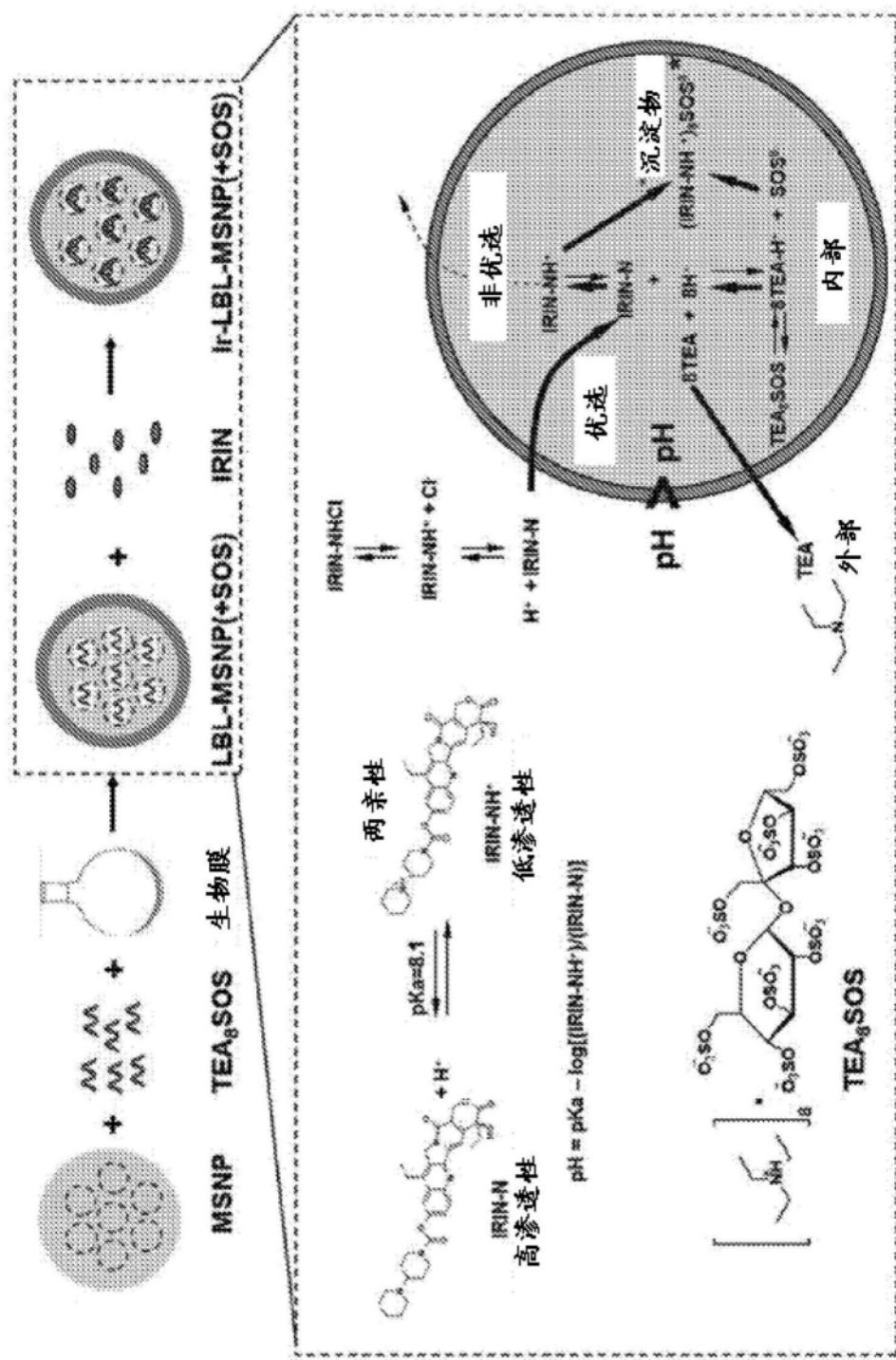


图5

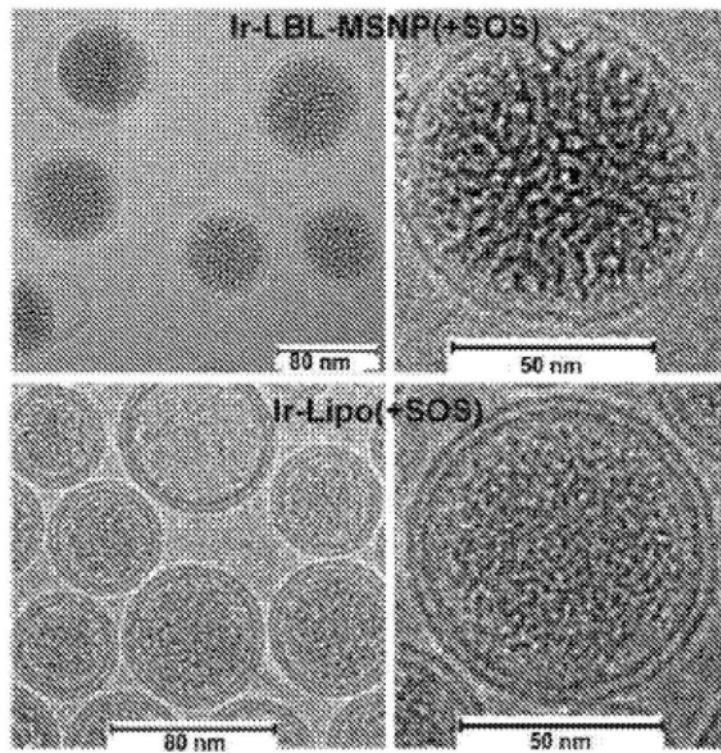


图6A

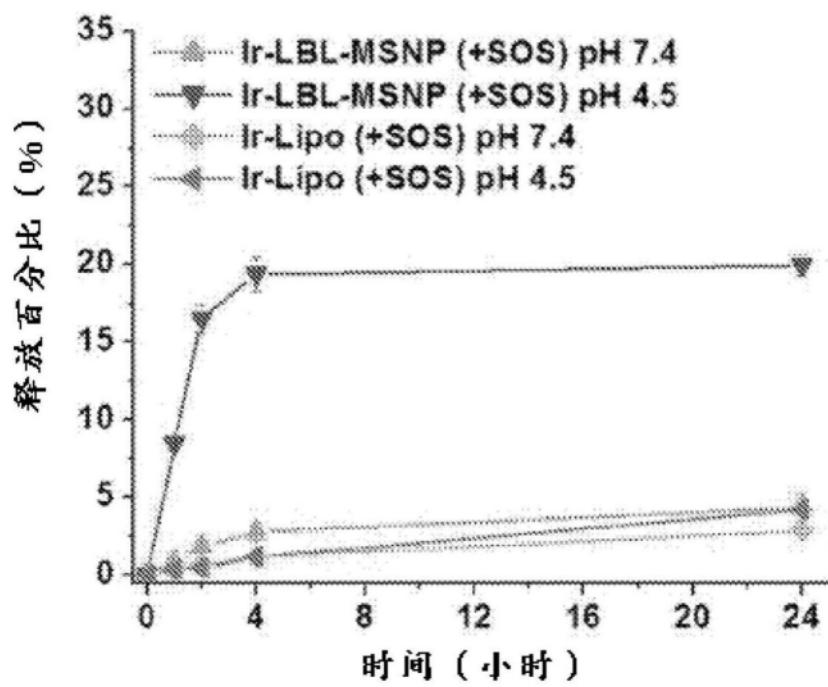


图6B

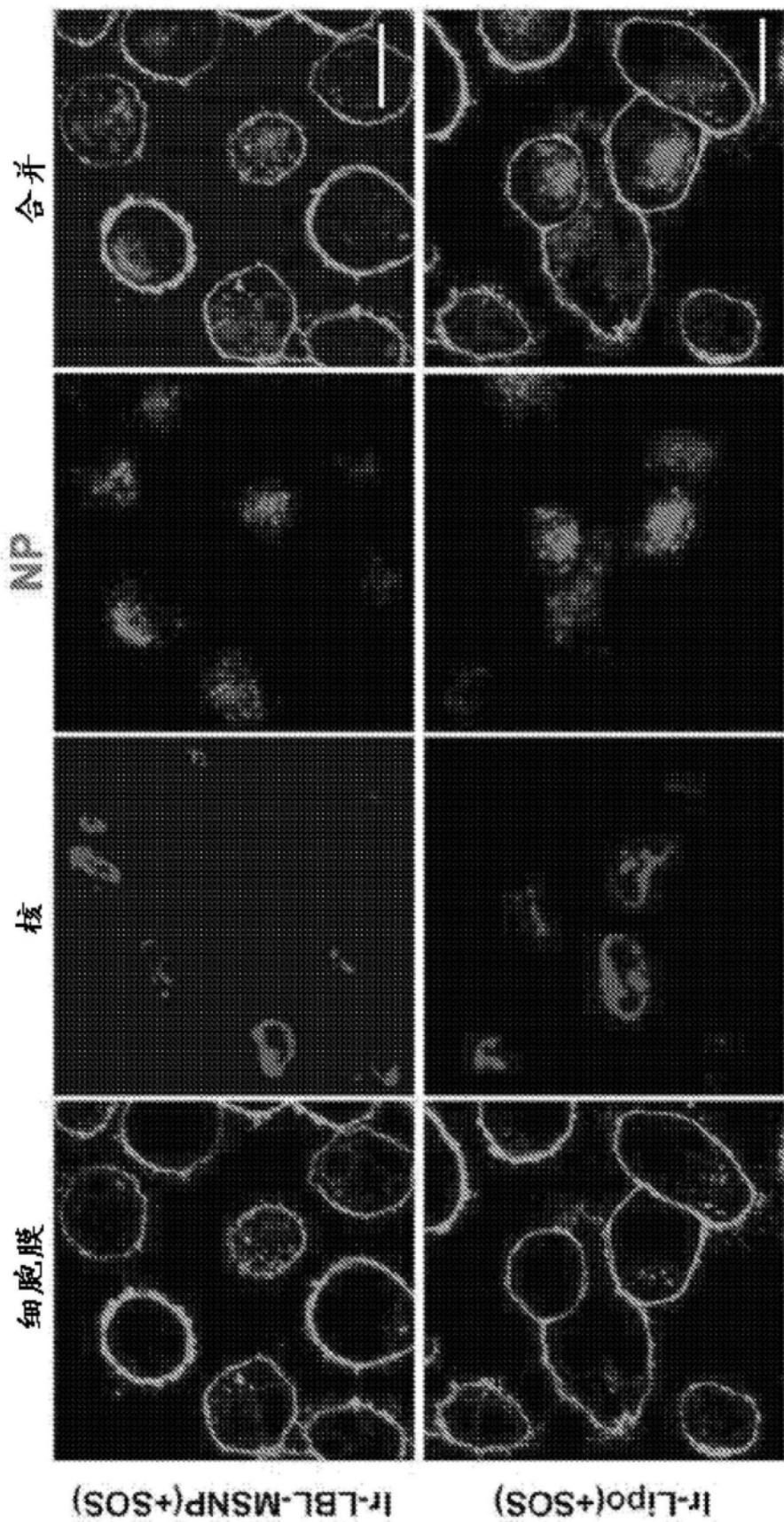


图7

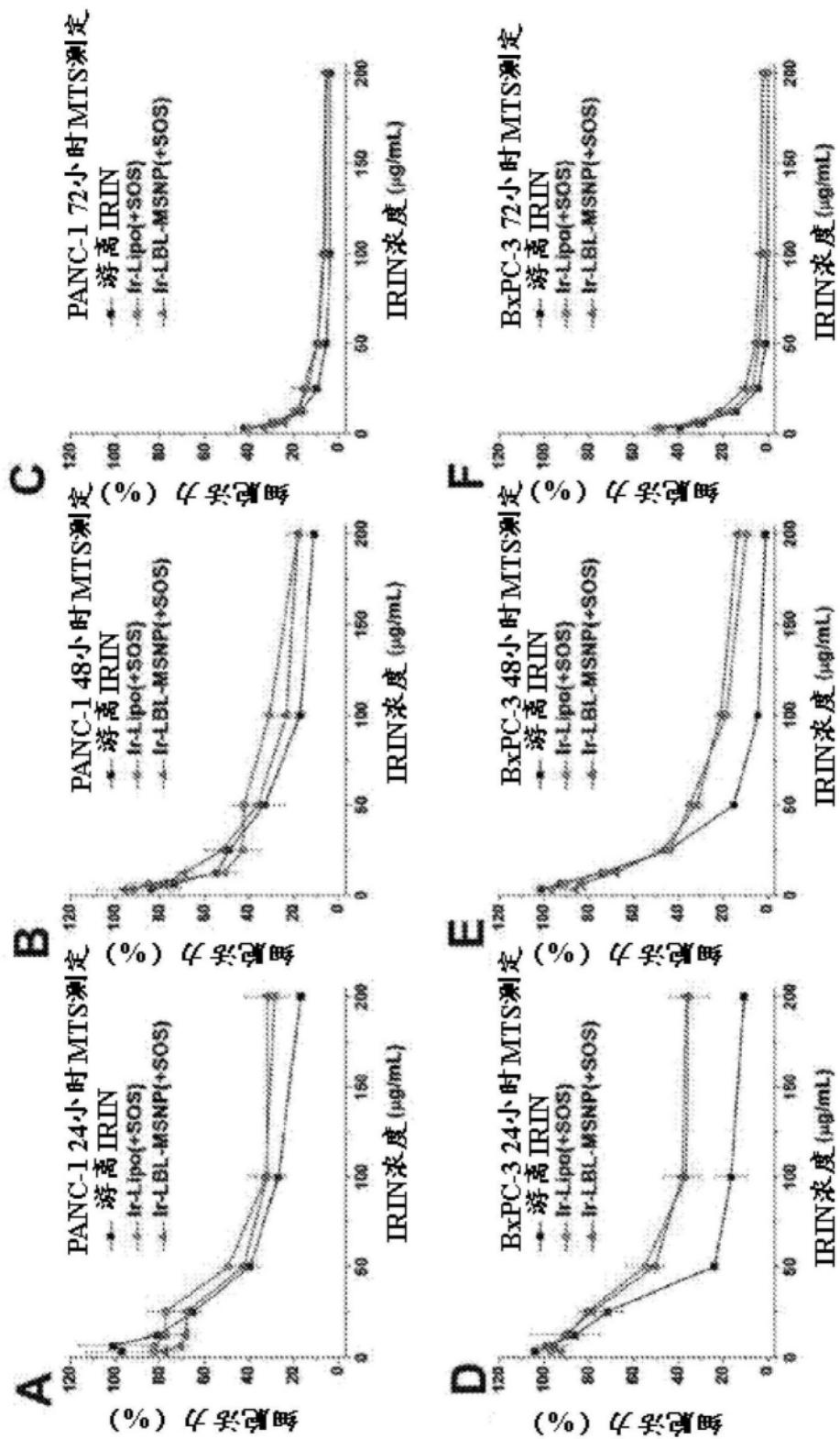


图8

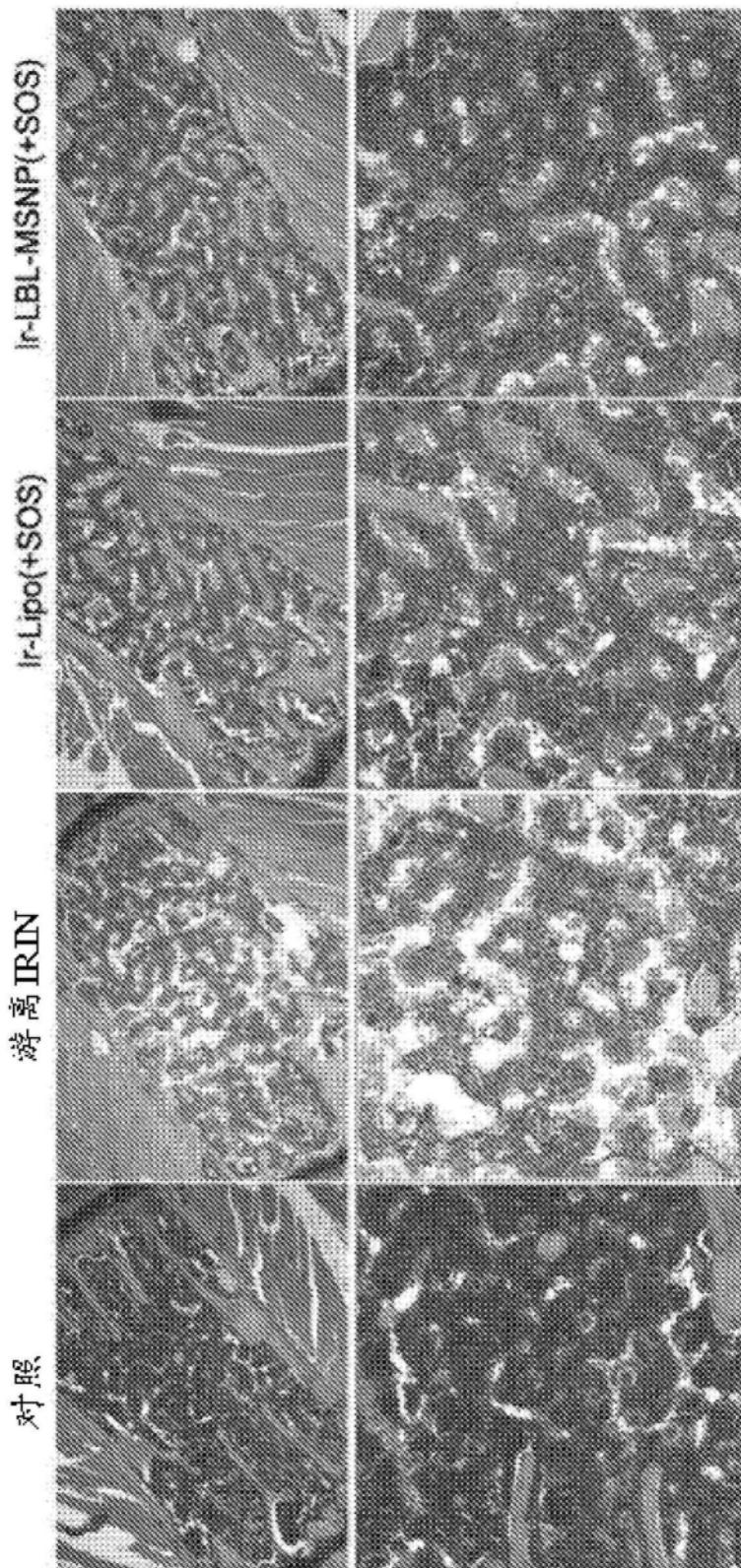


图9

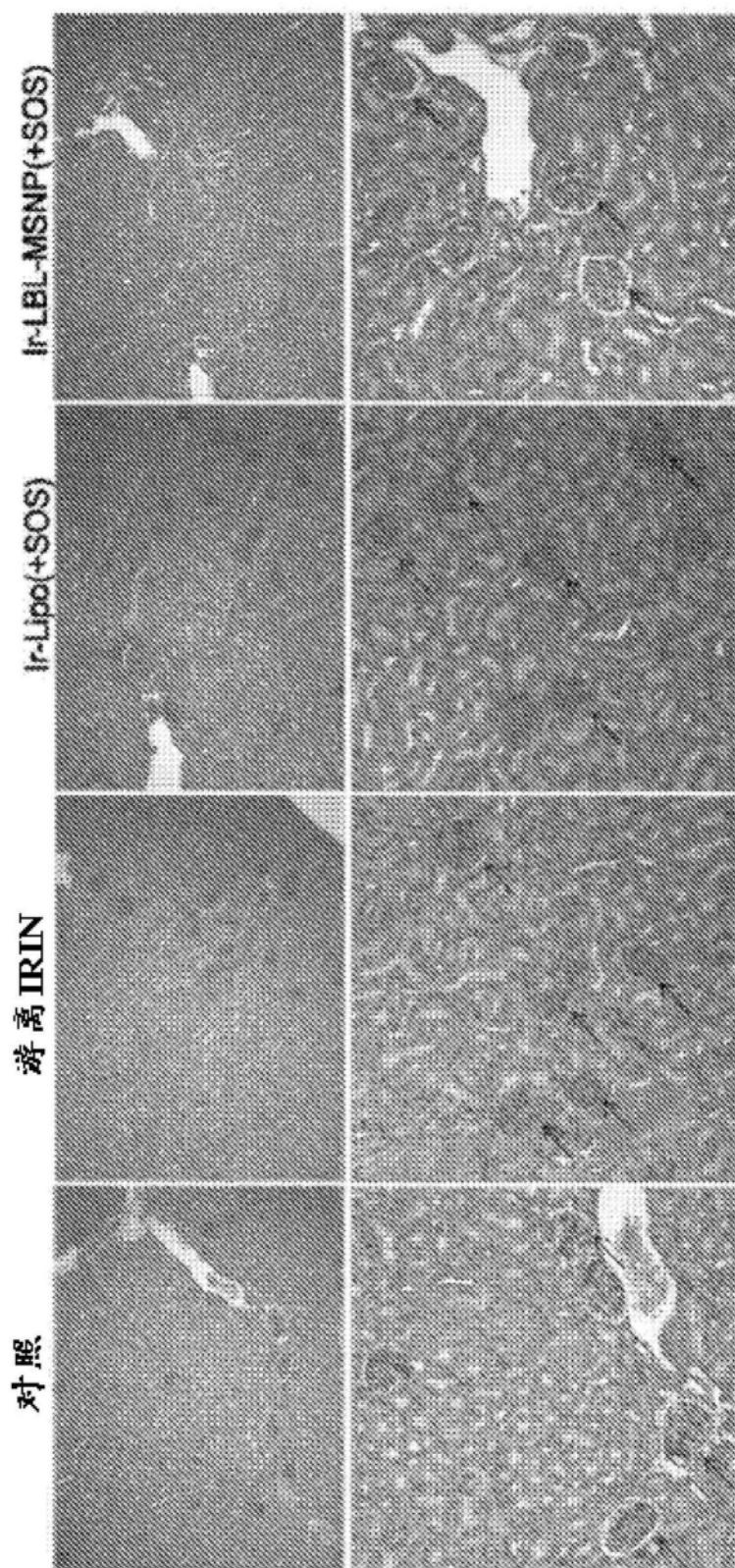


图10

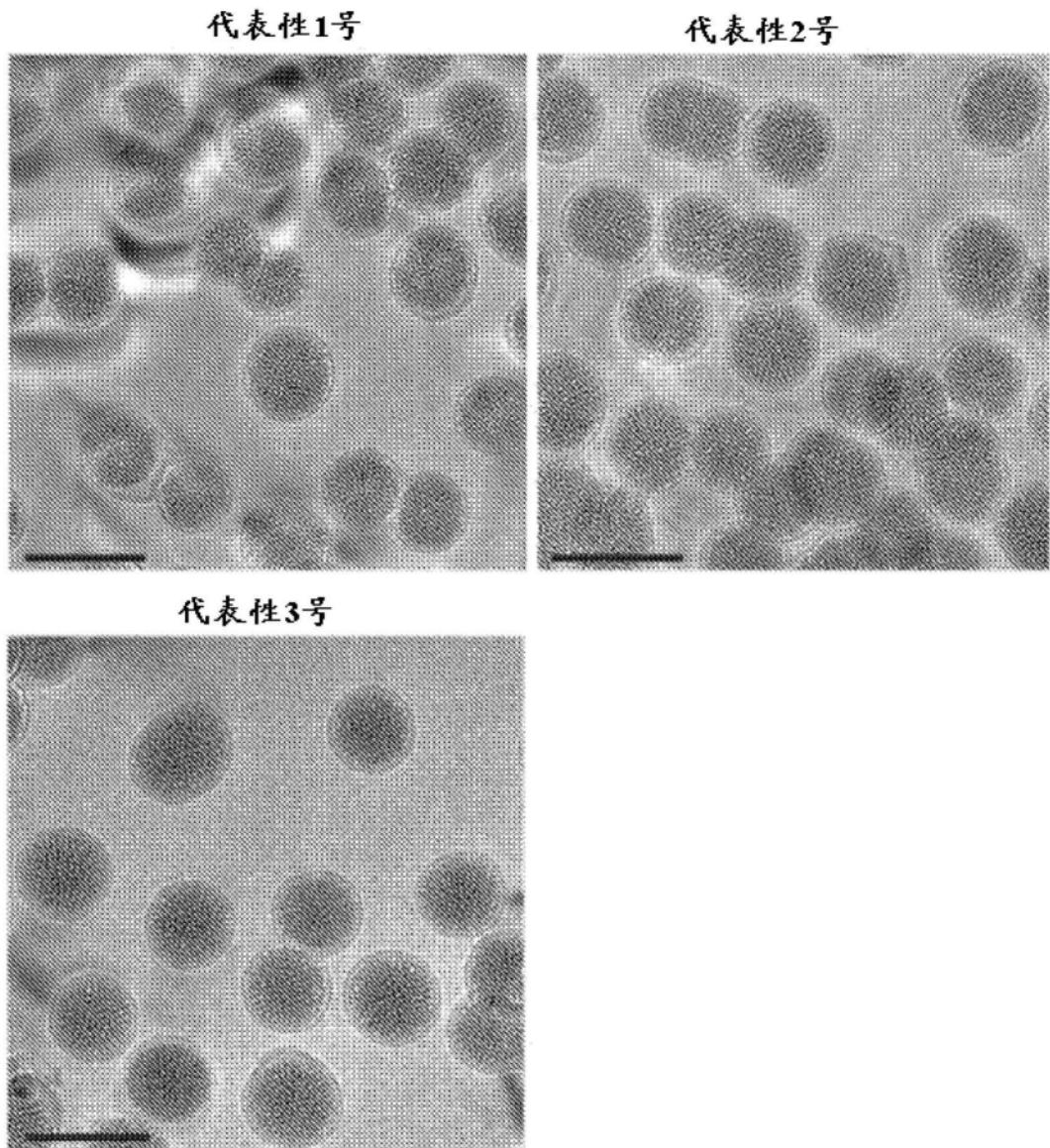


图11

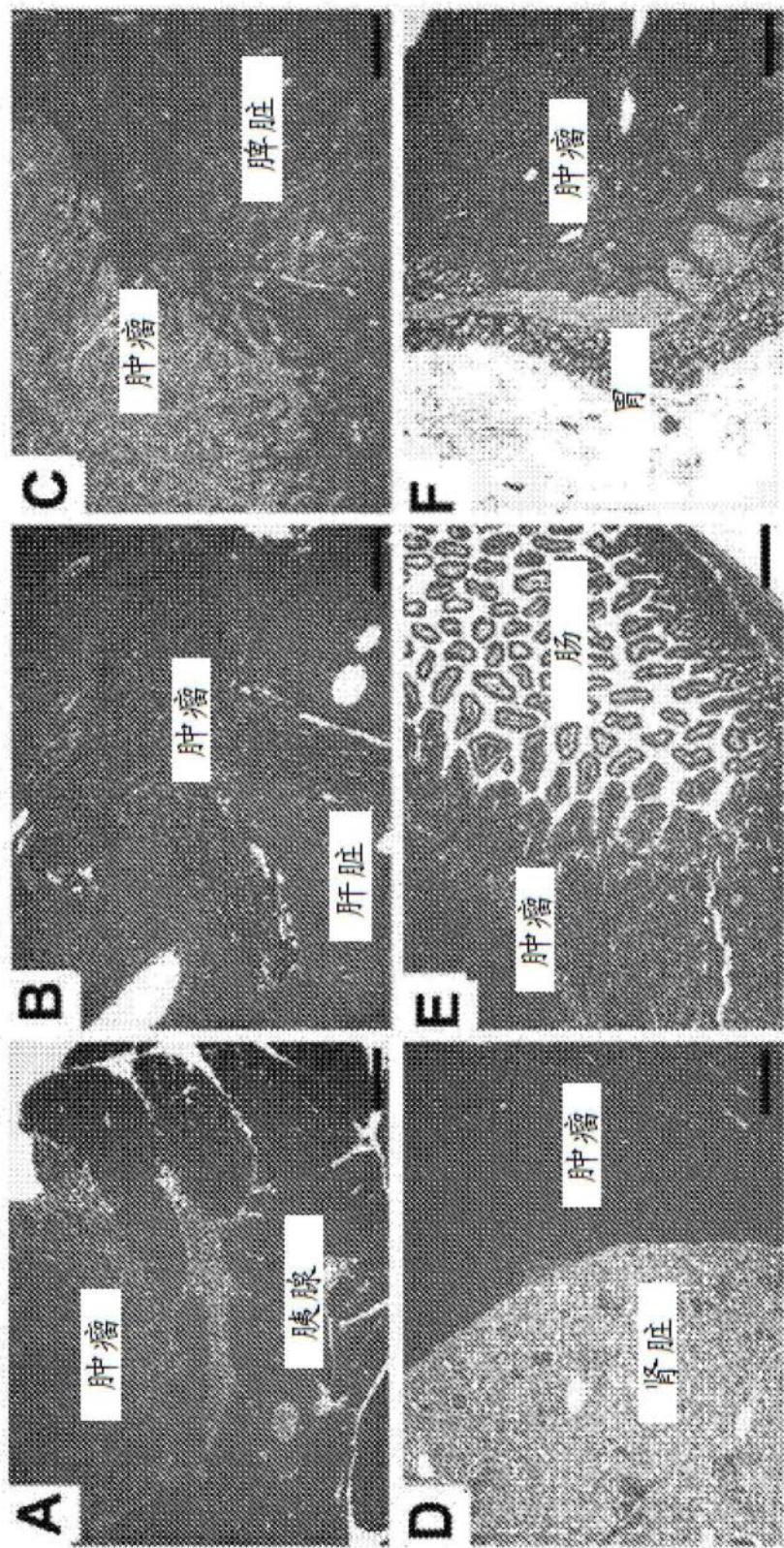


图12

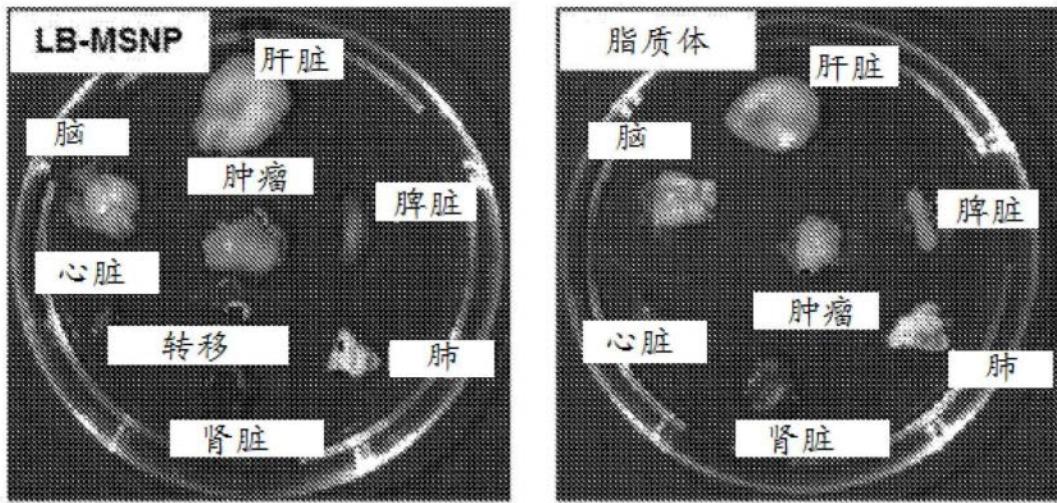


图13

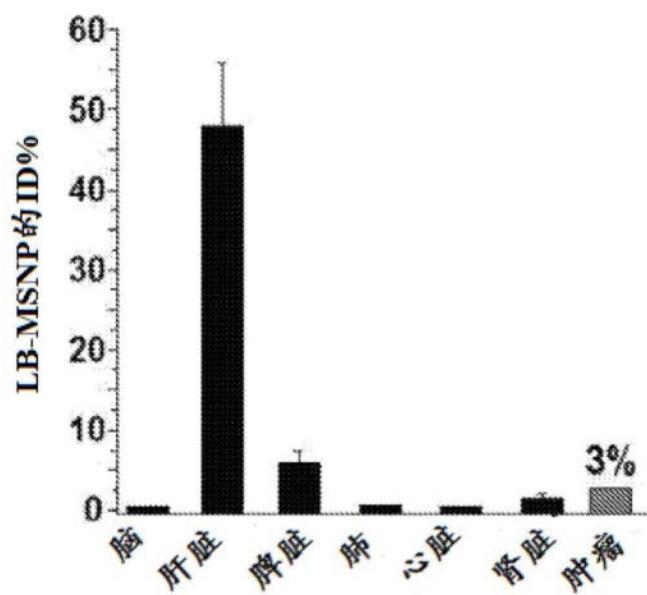


图14

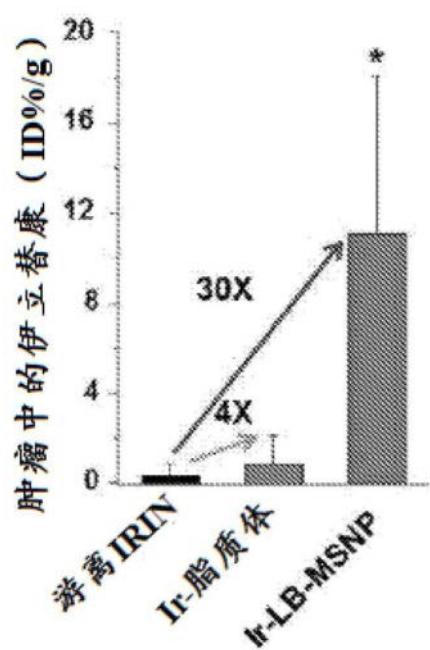


图15A

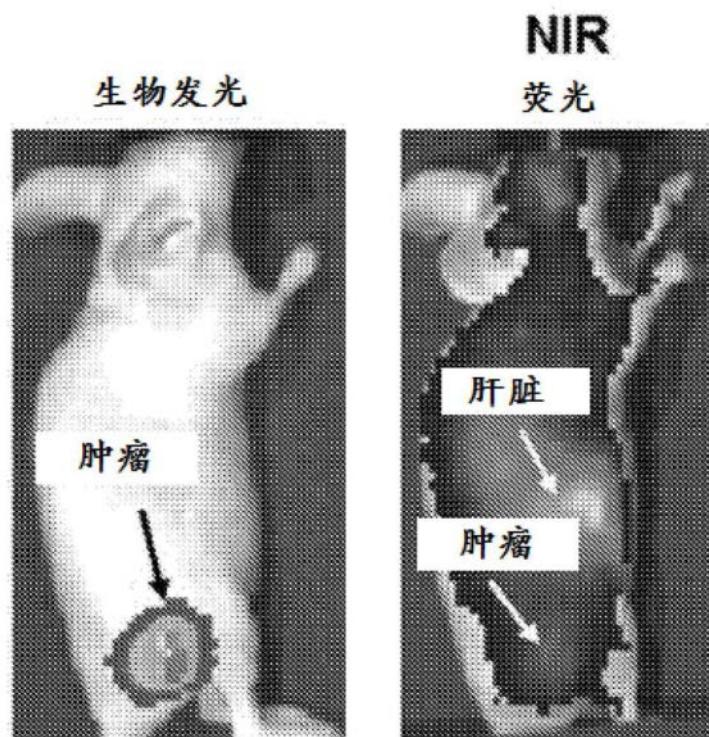


图15B

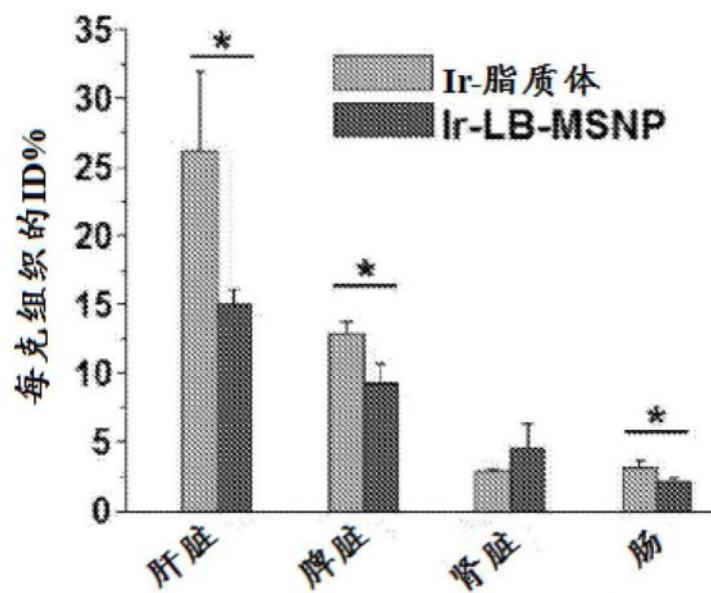


图16

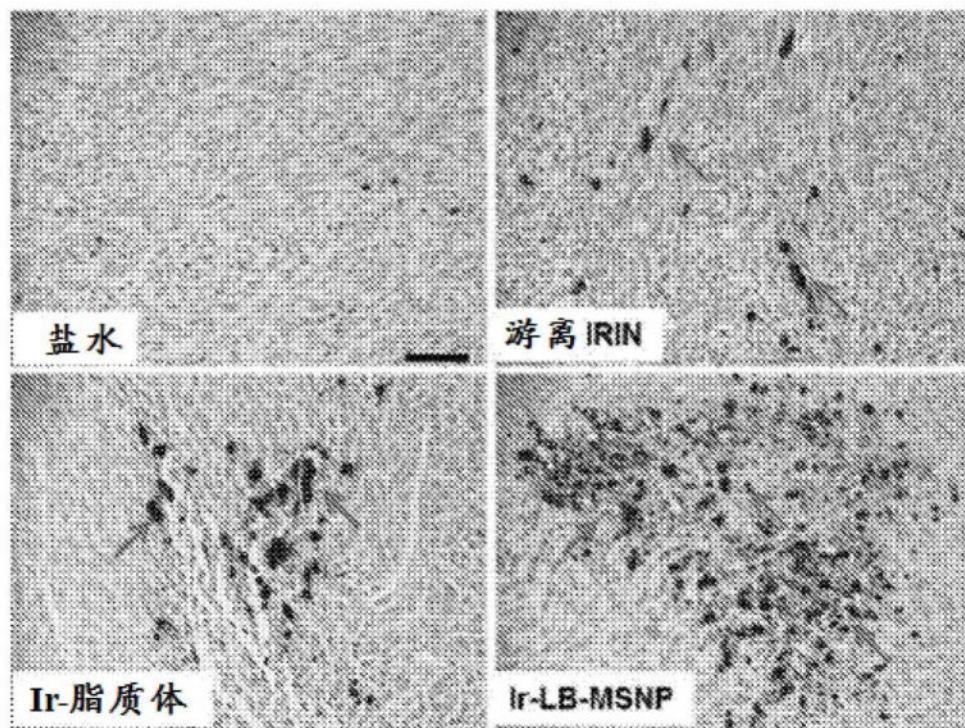


图17

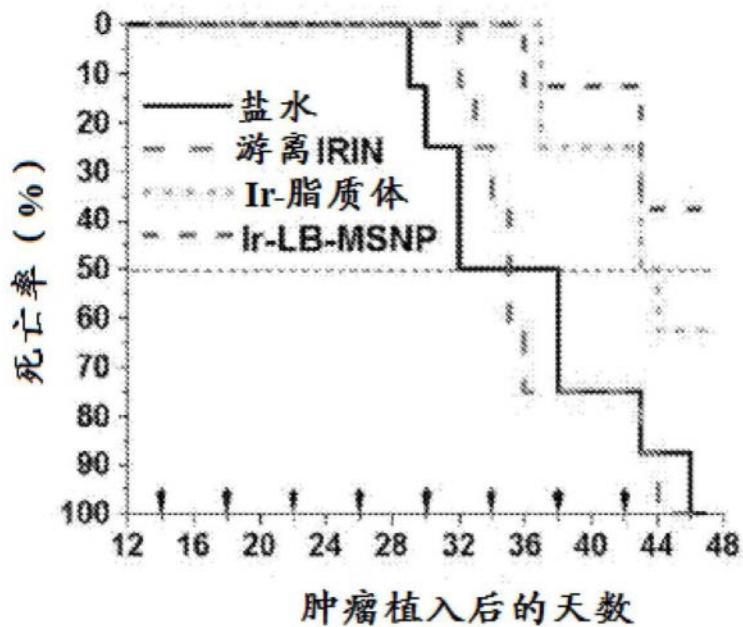


图18

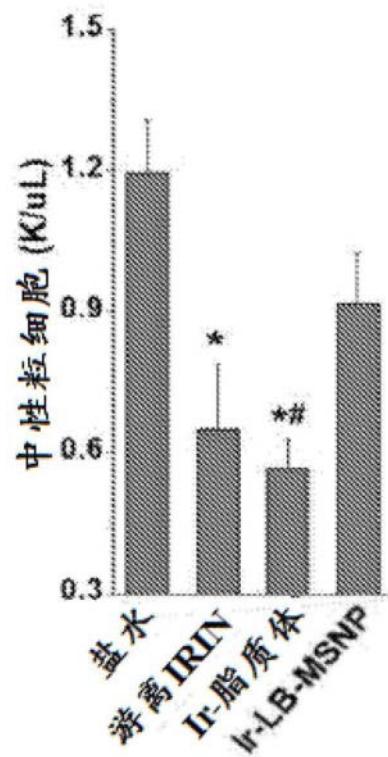


图19

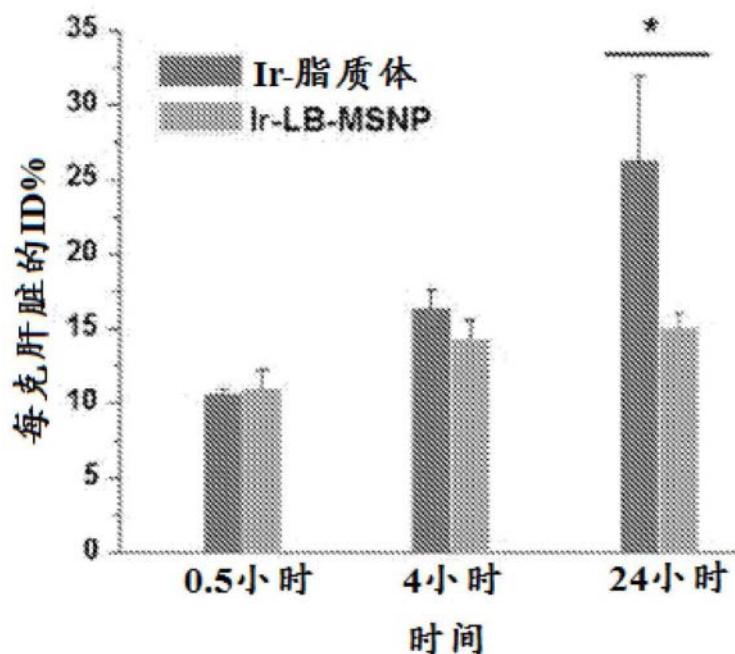
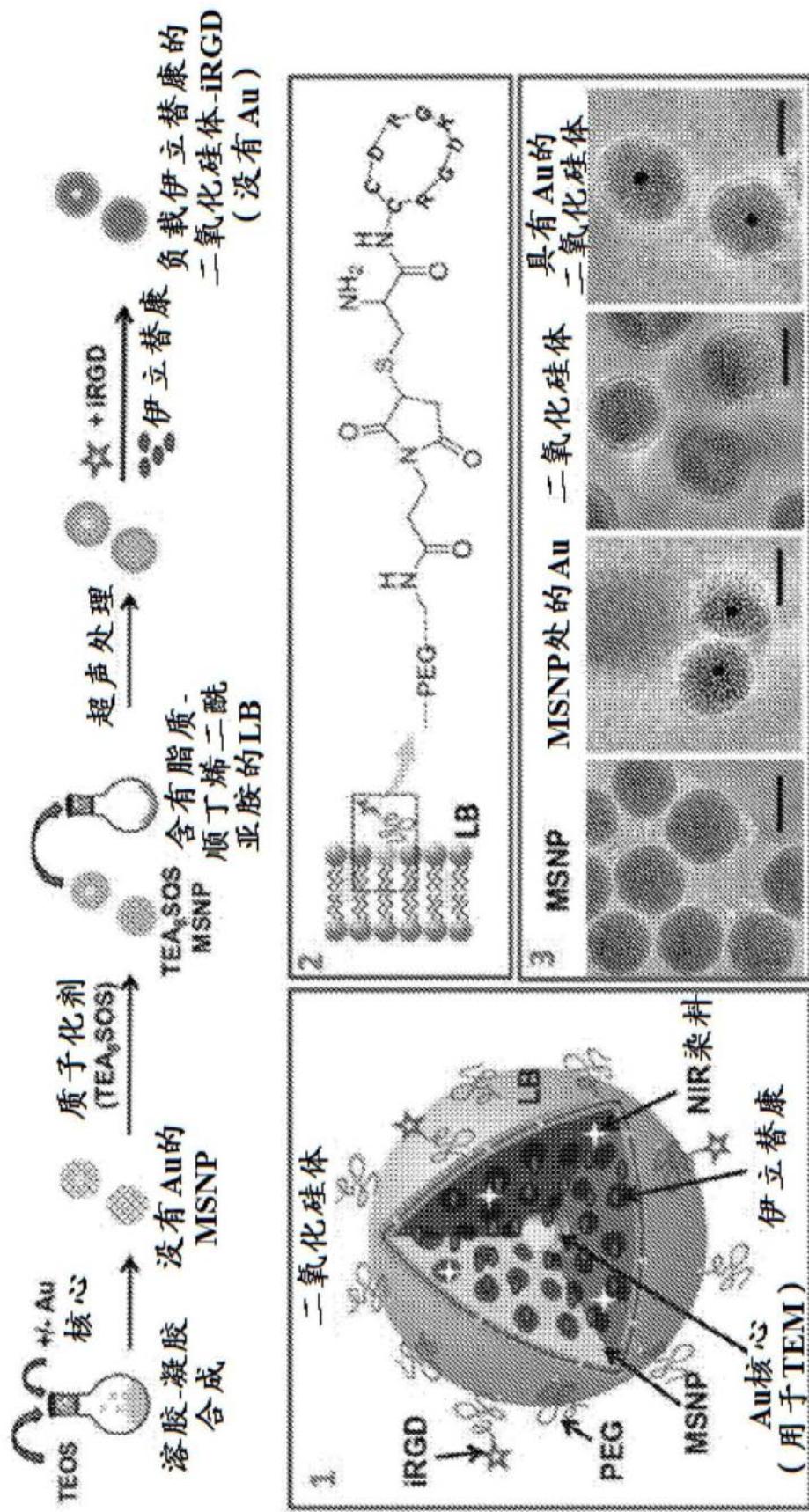


图20



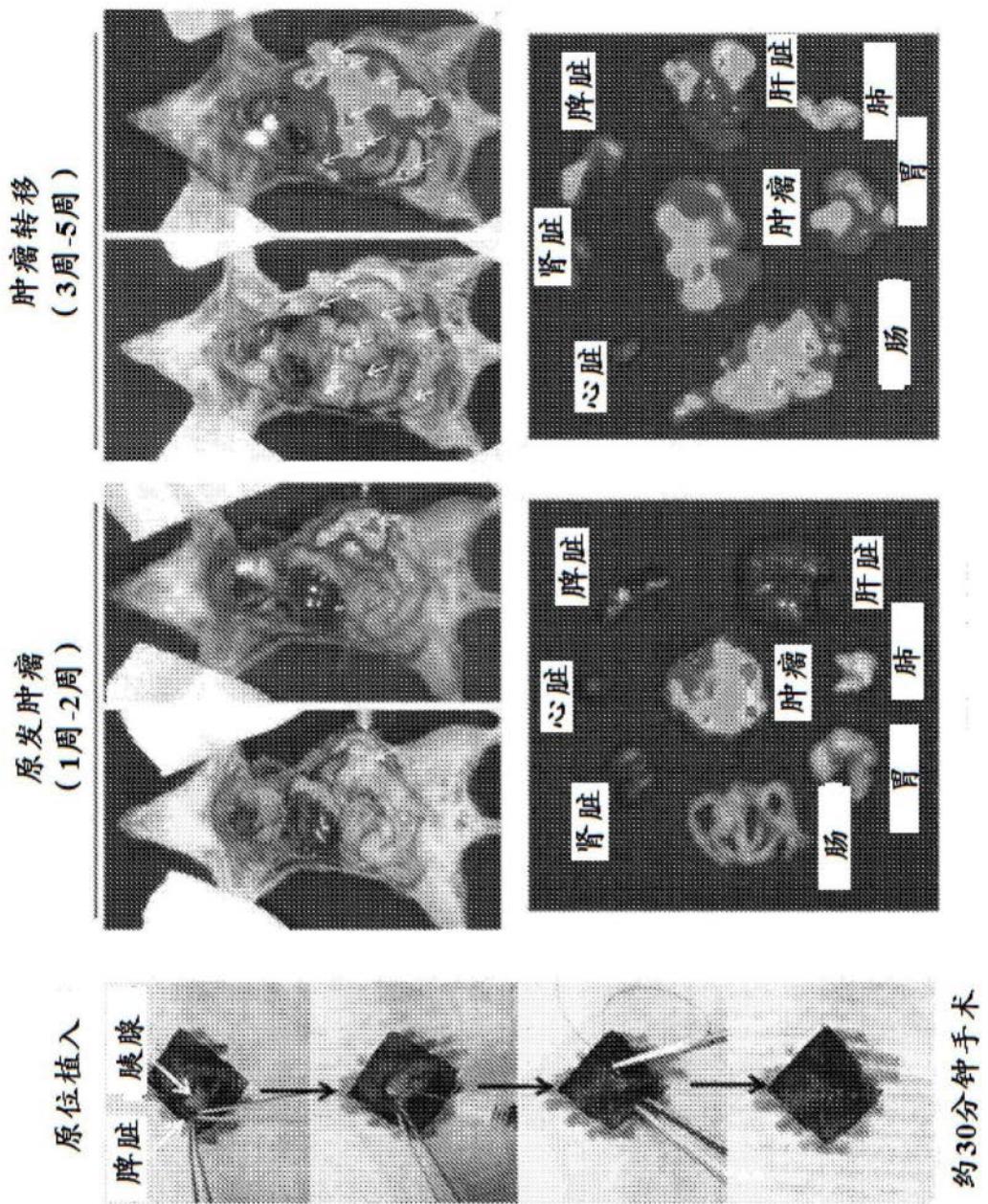


图21B

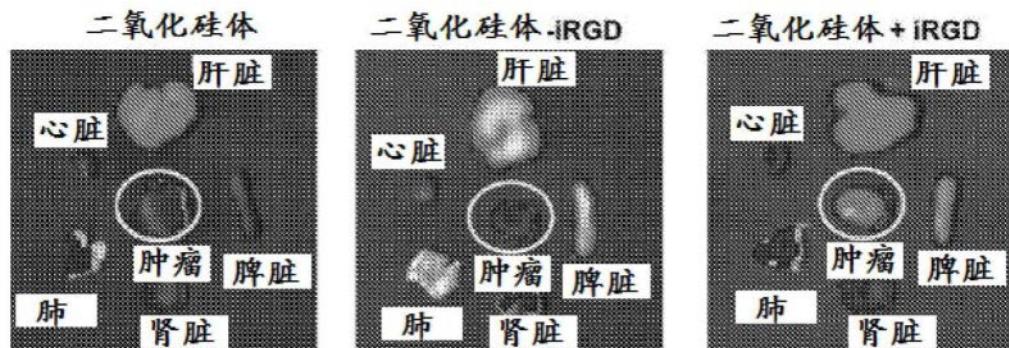


图22A

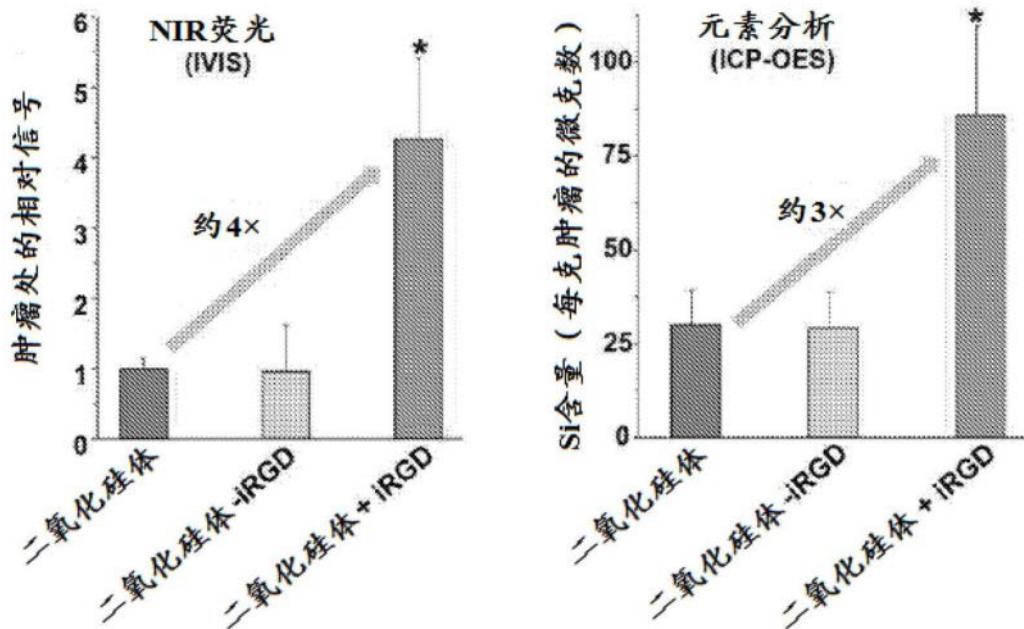


图22B

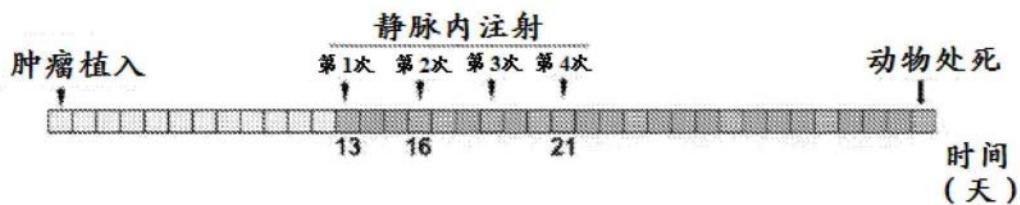


图23A

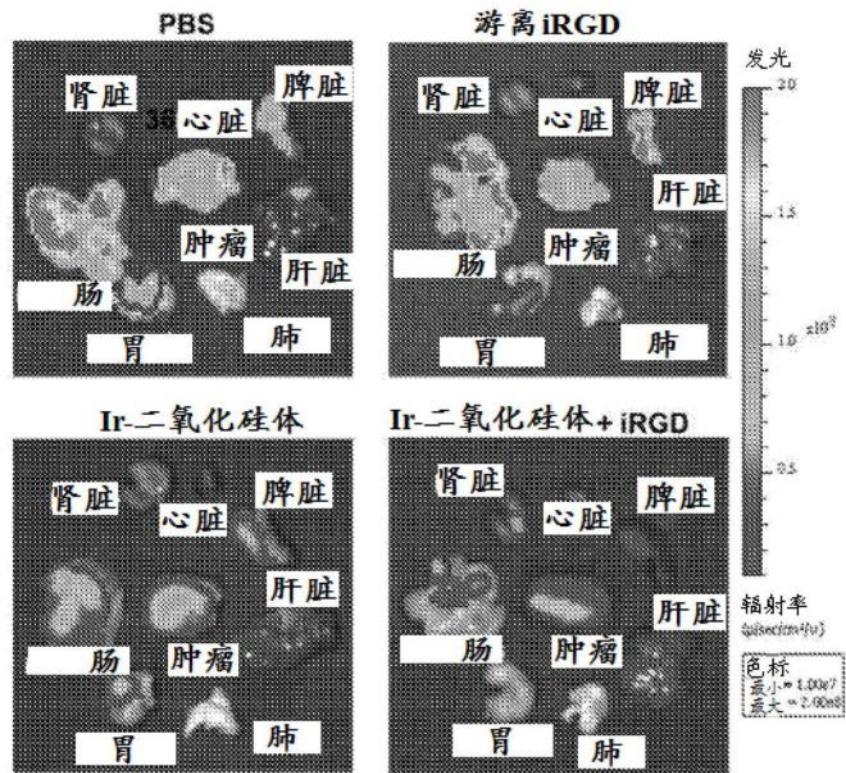


图23B

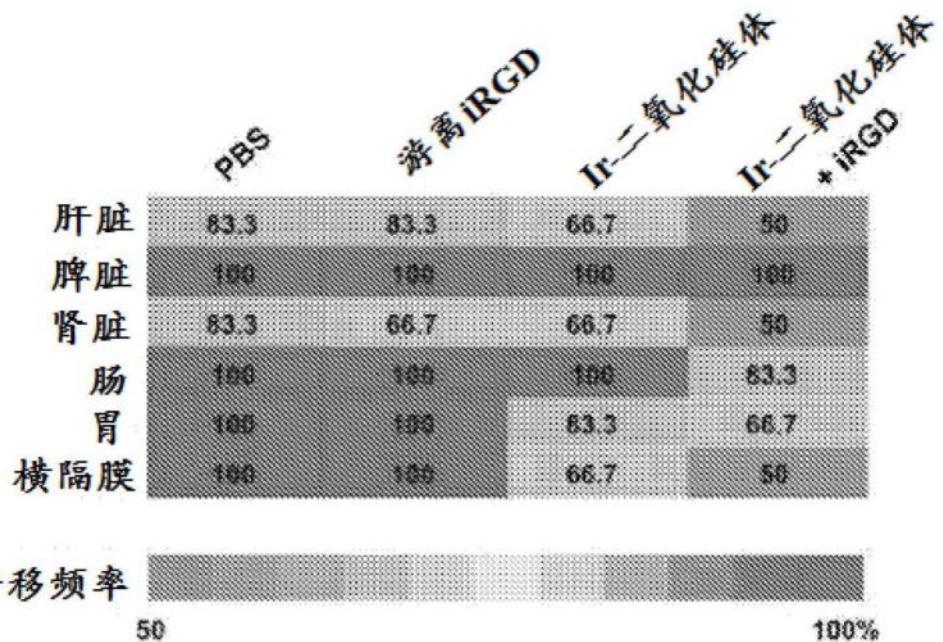


图23C

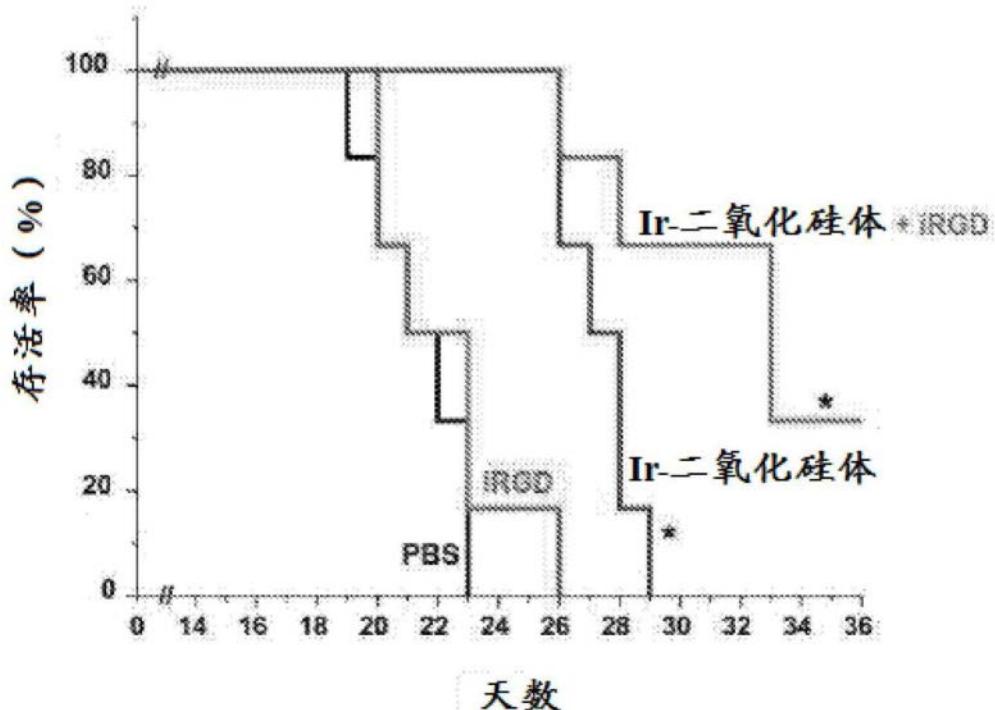


图23D

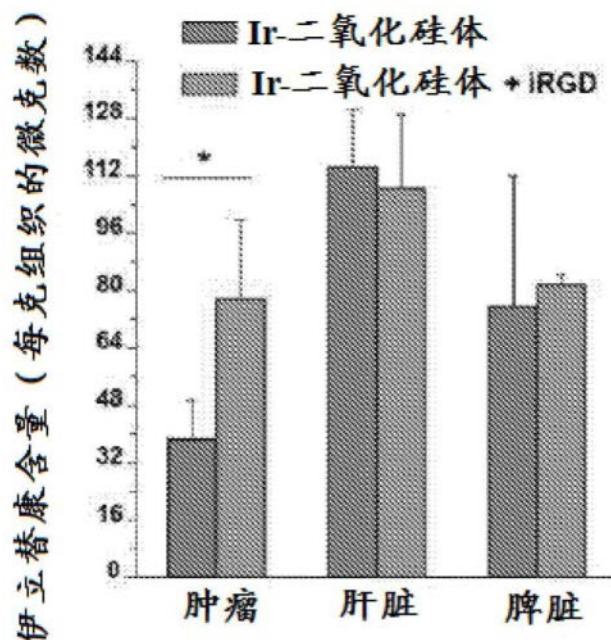


图23E

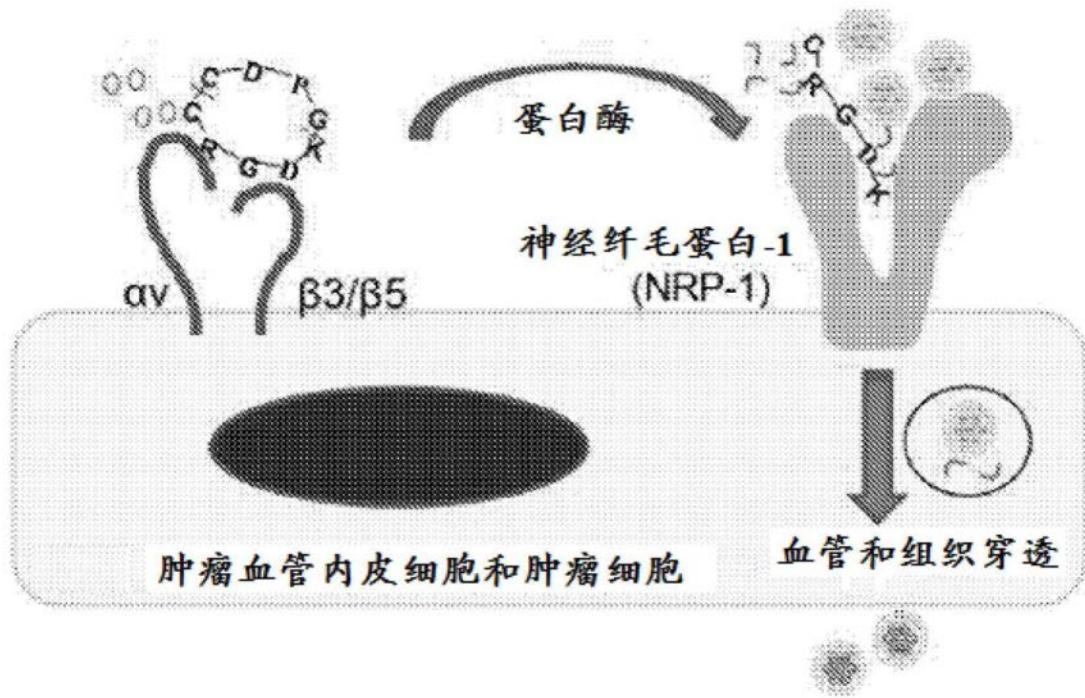


图24A

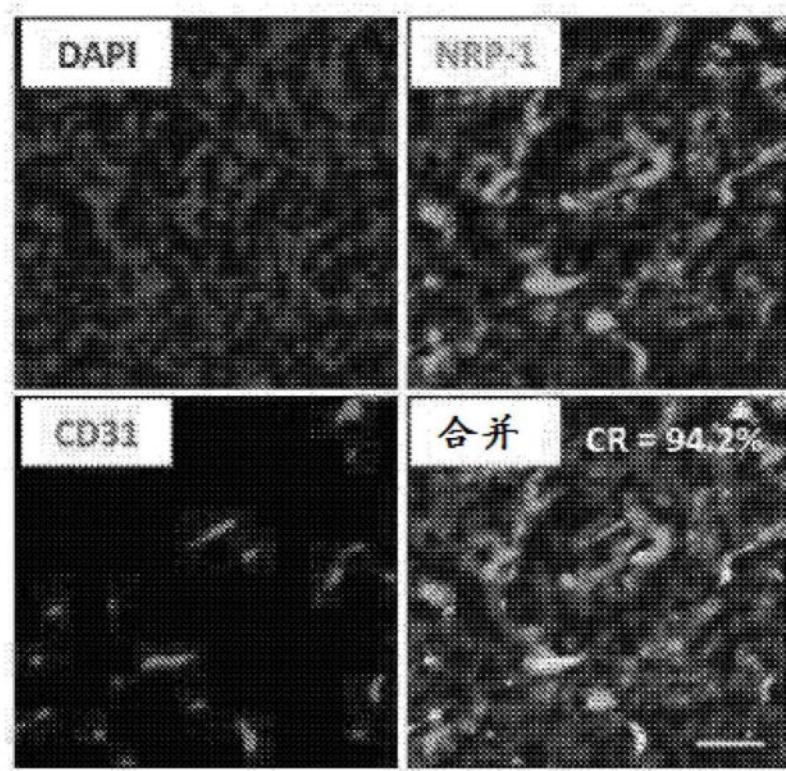


图24B

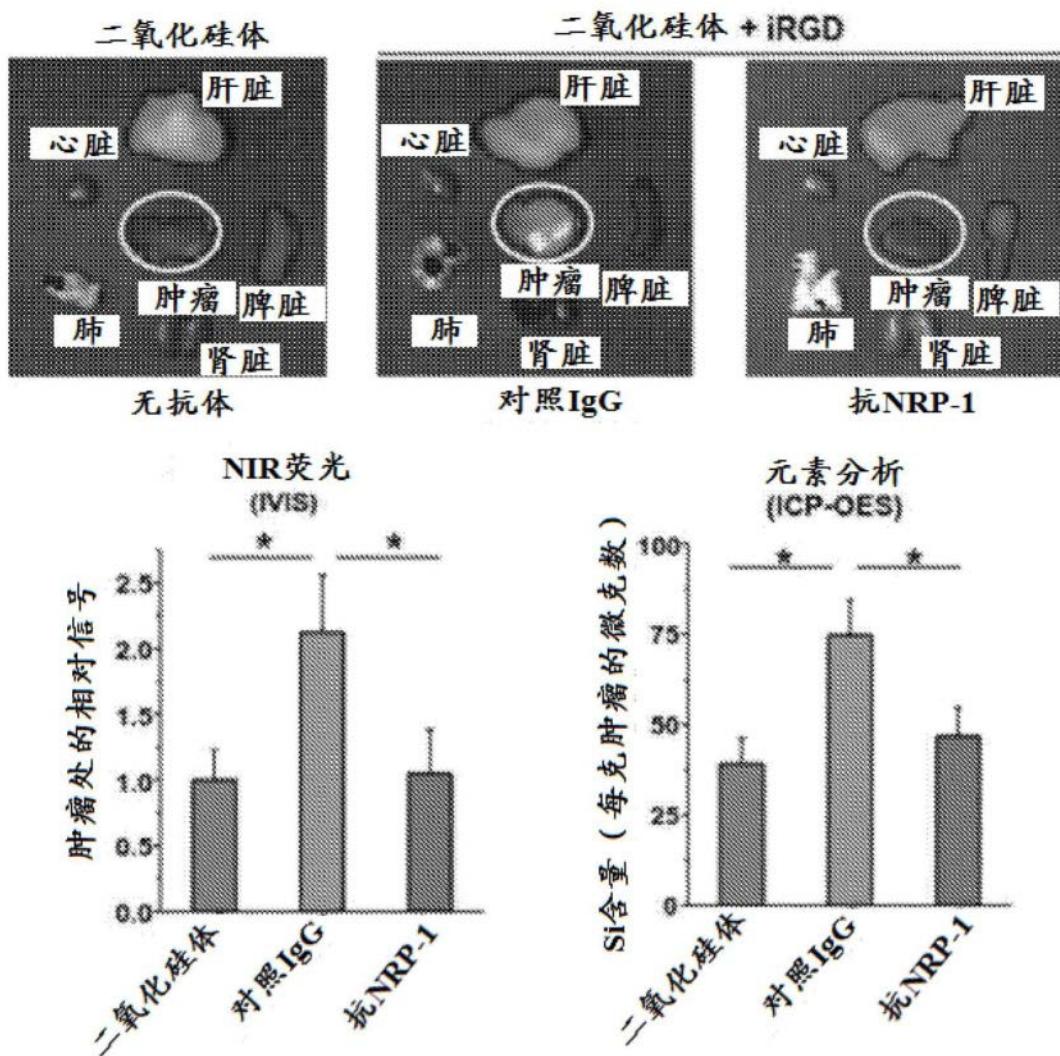


图24C

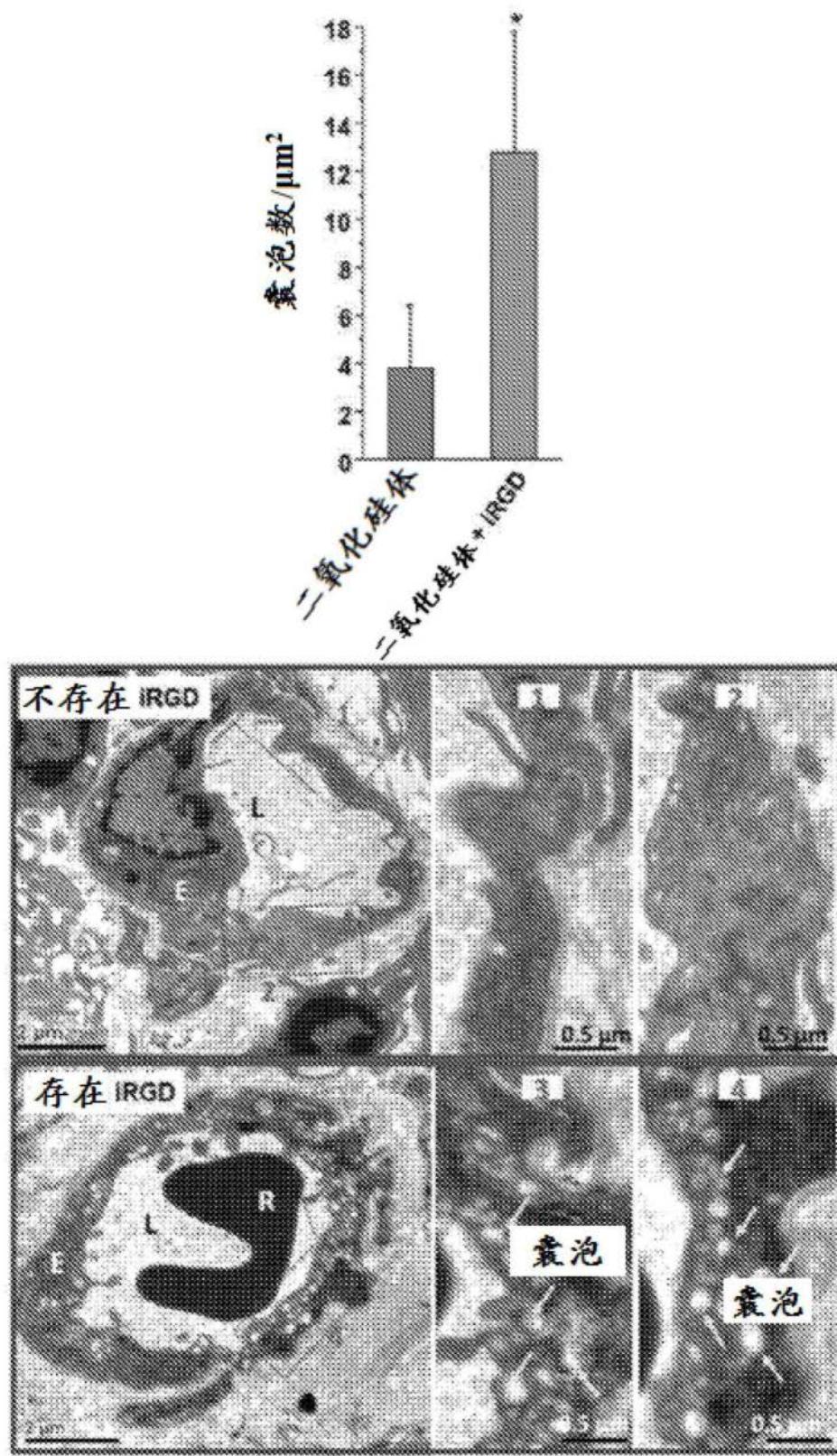


图25A

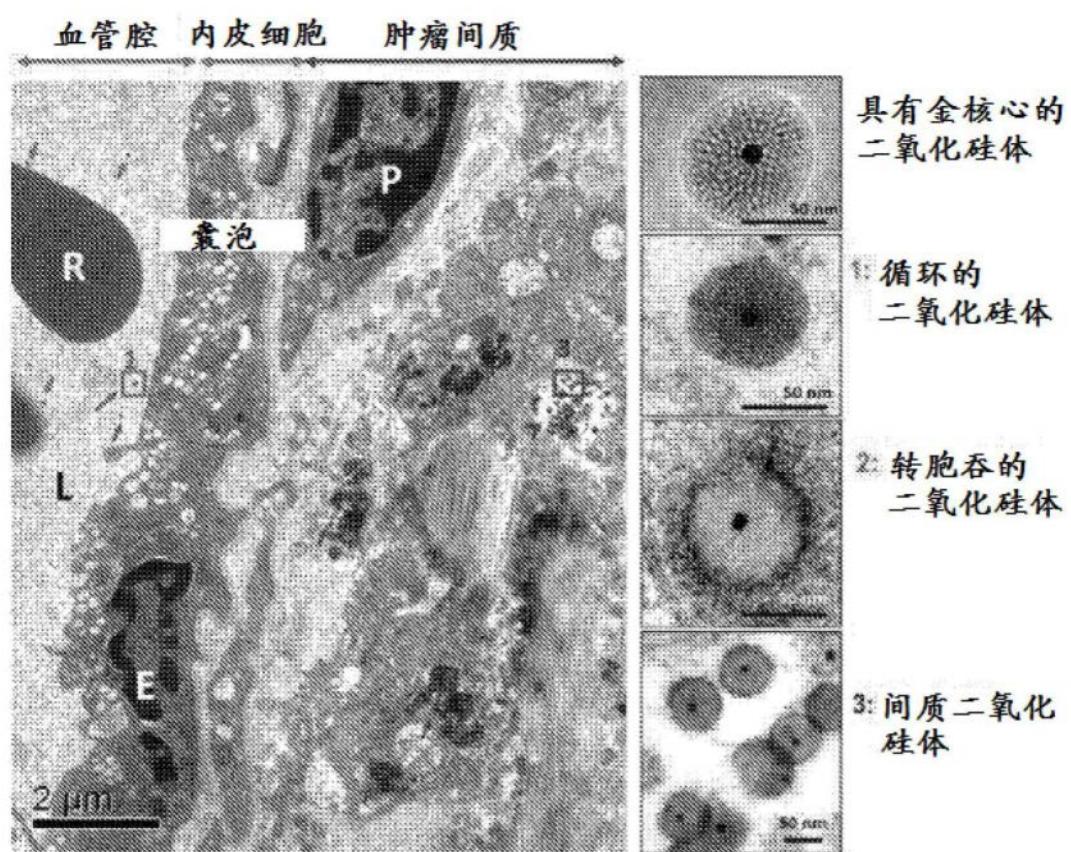


图25B

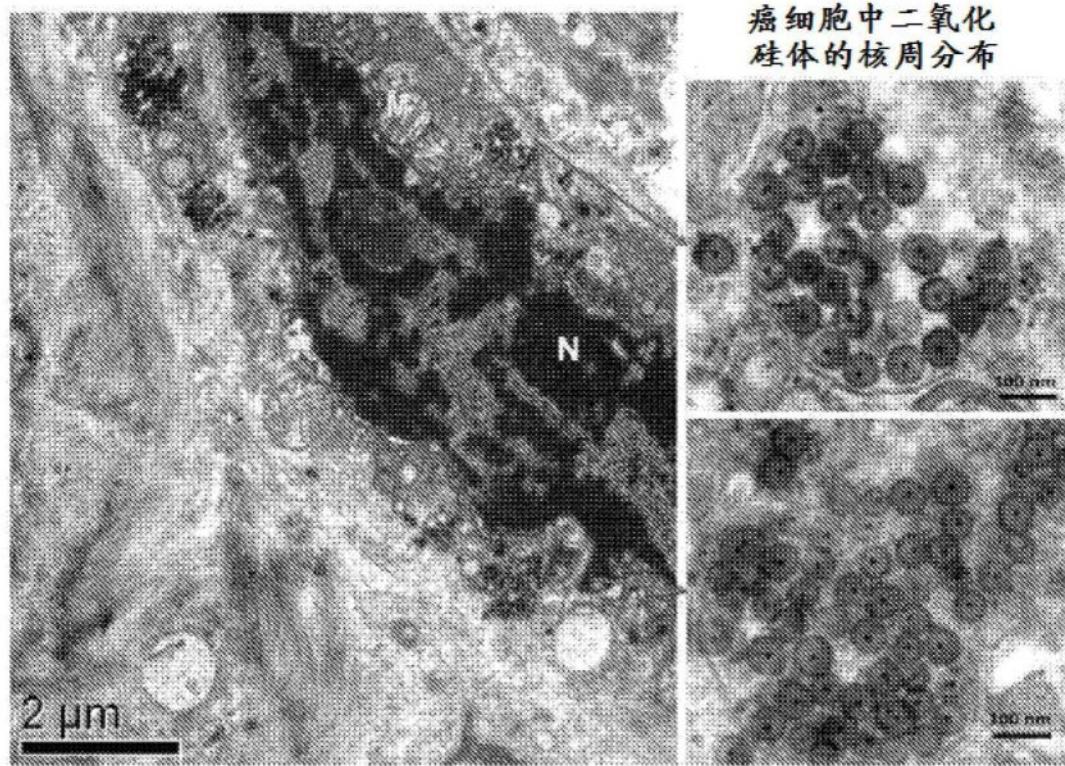


图25C

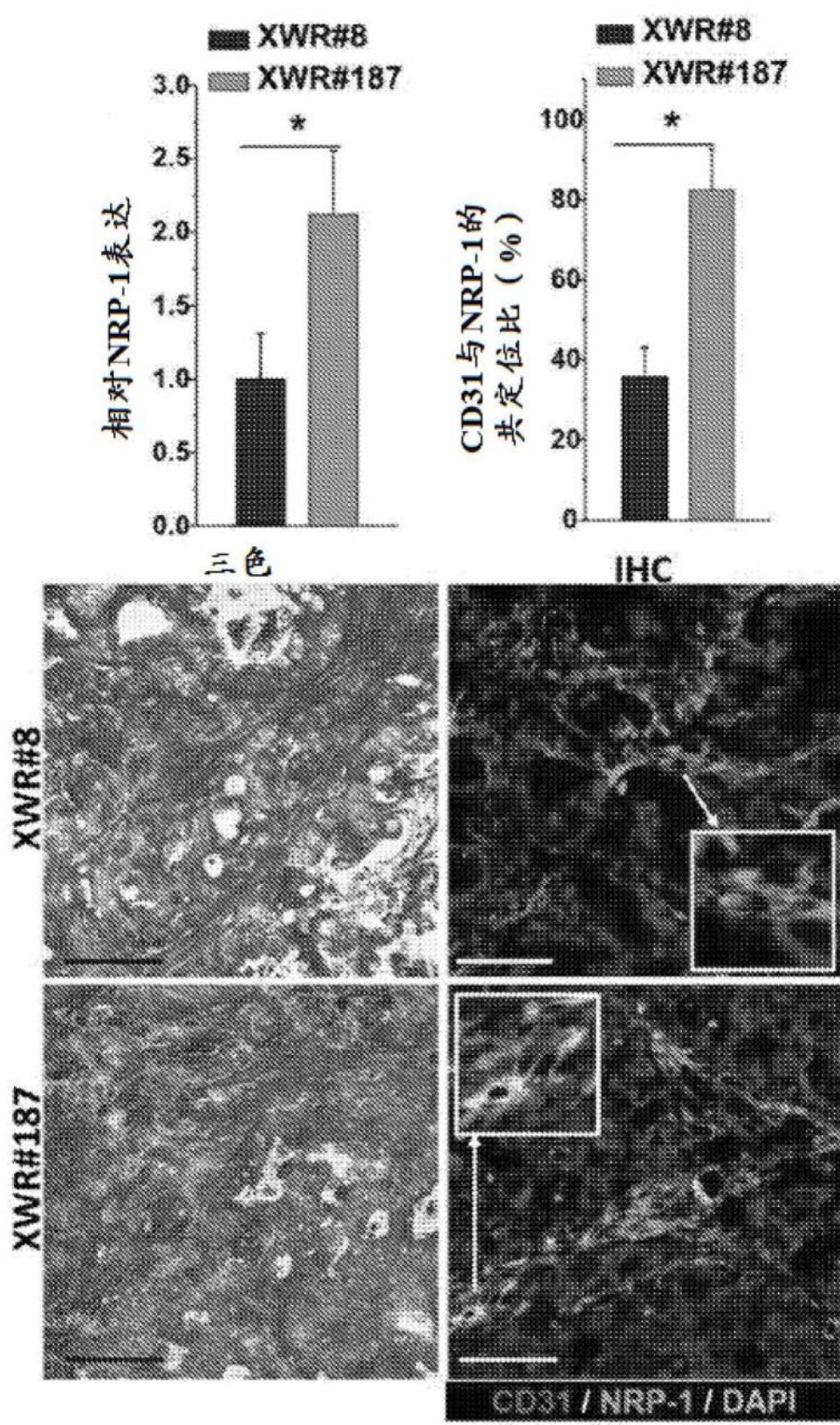


图26A

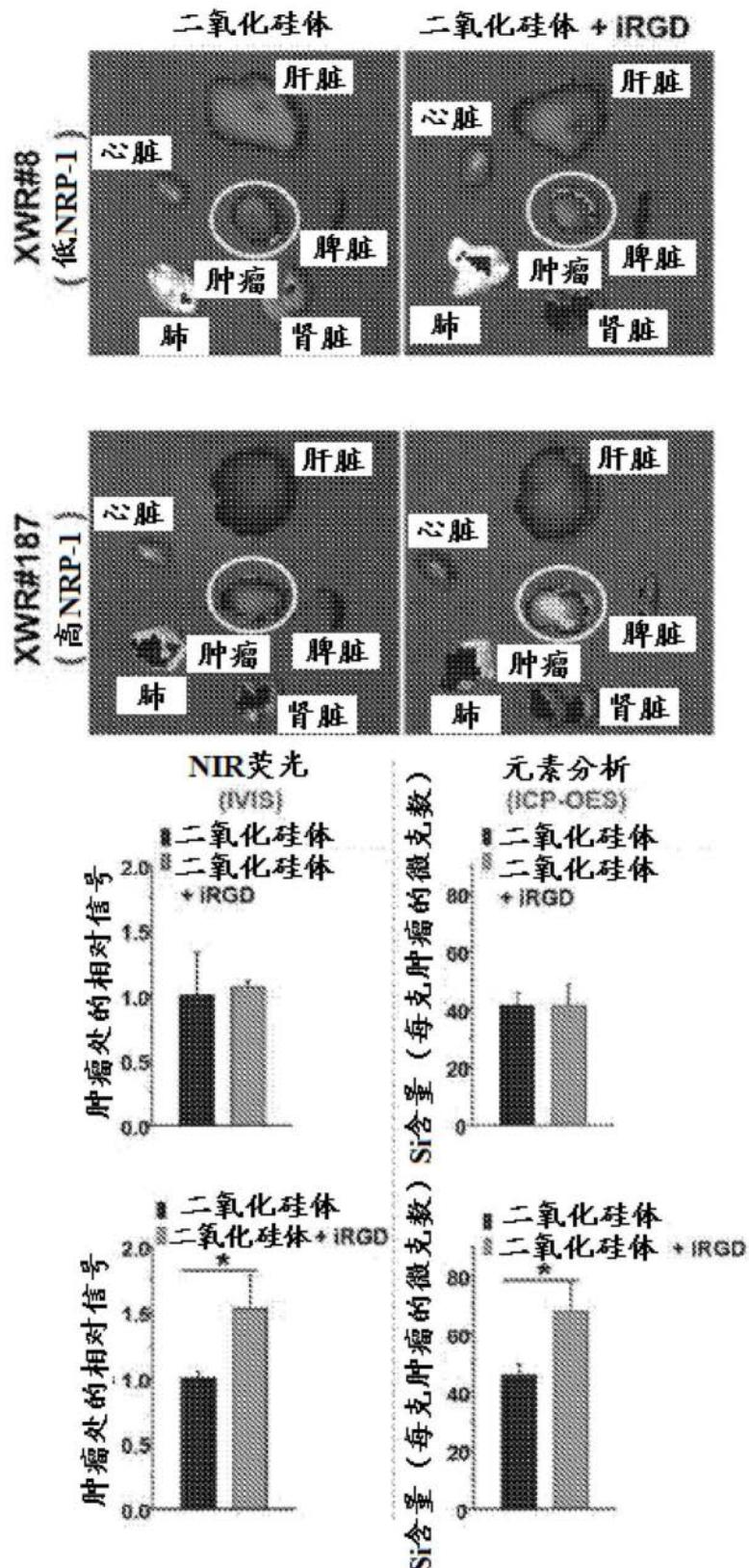


图26B

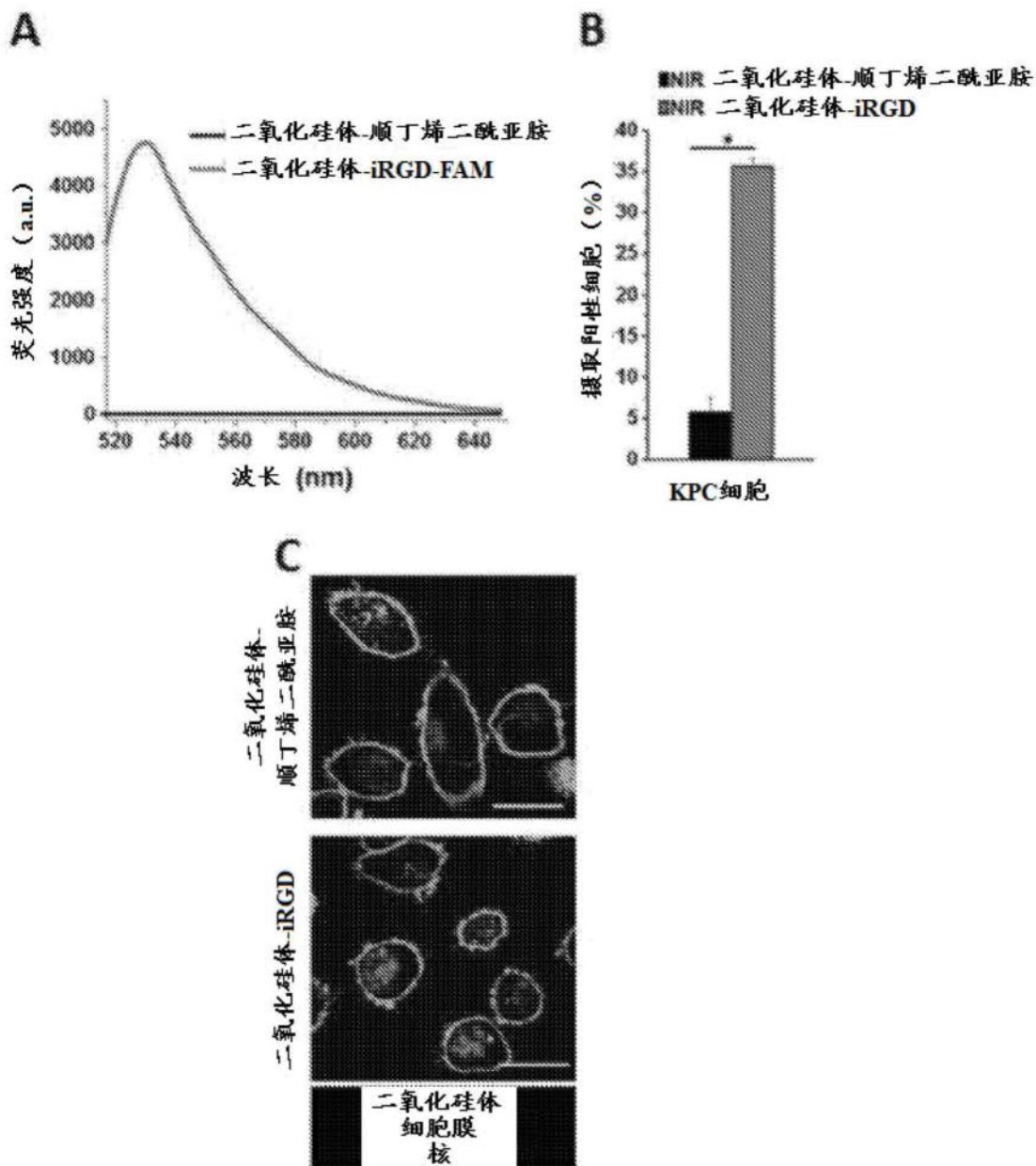


图27

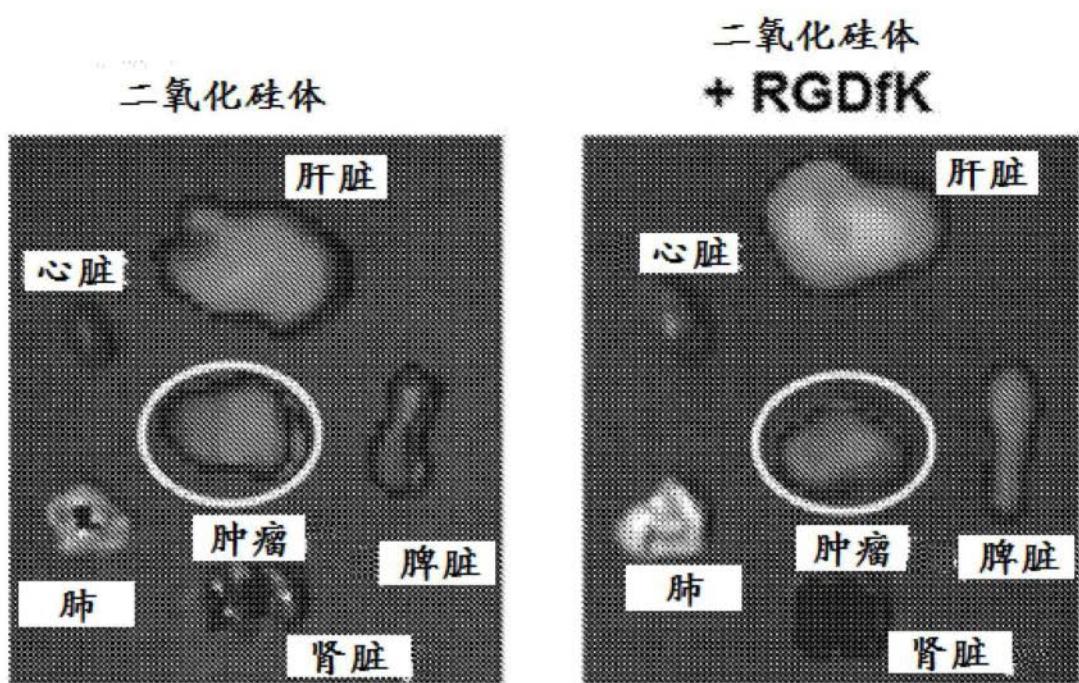
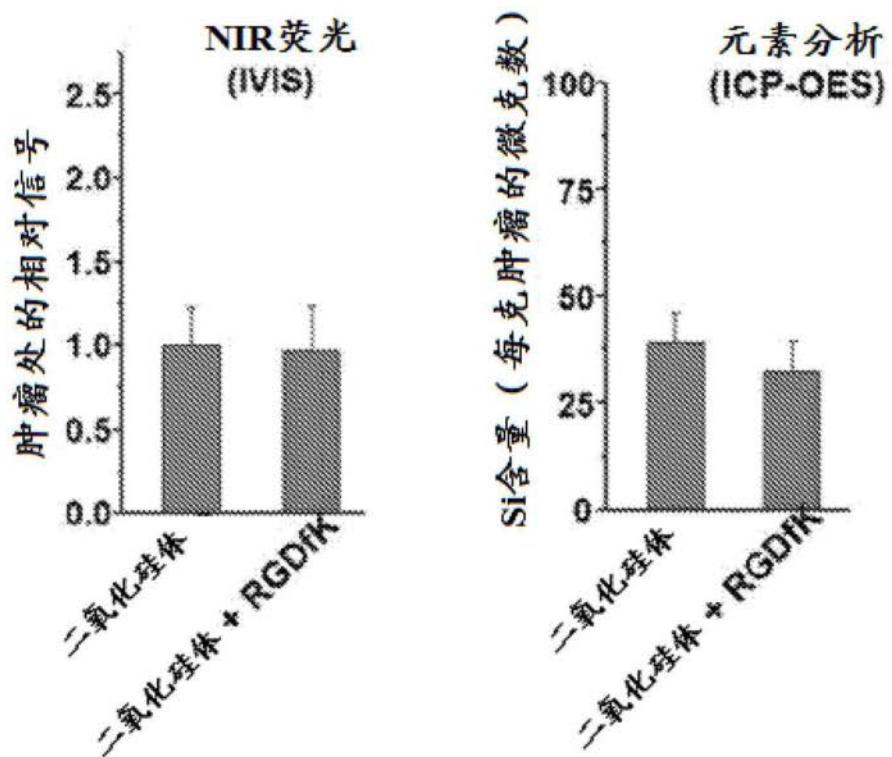
A**B**

图28

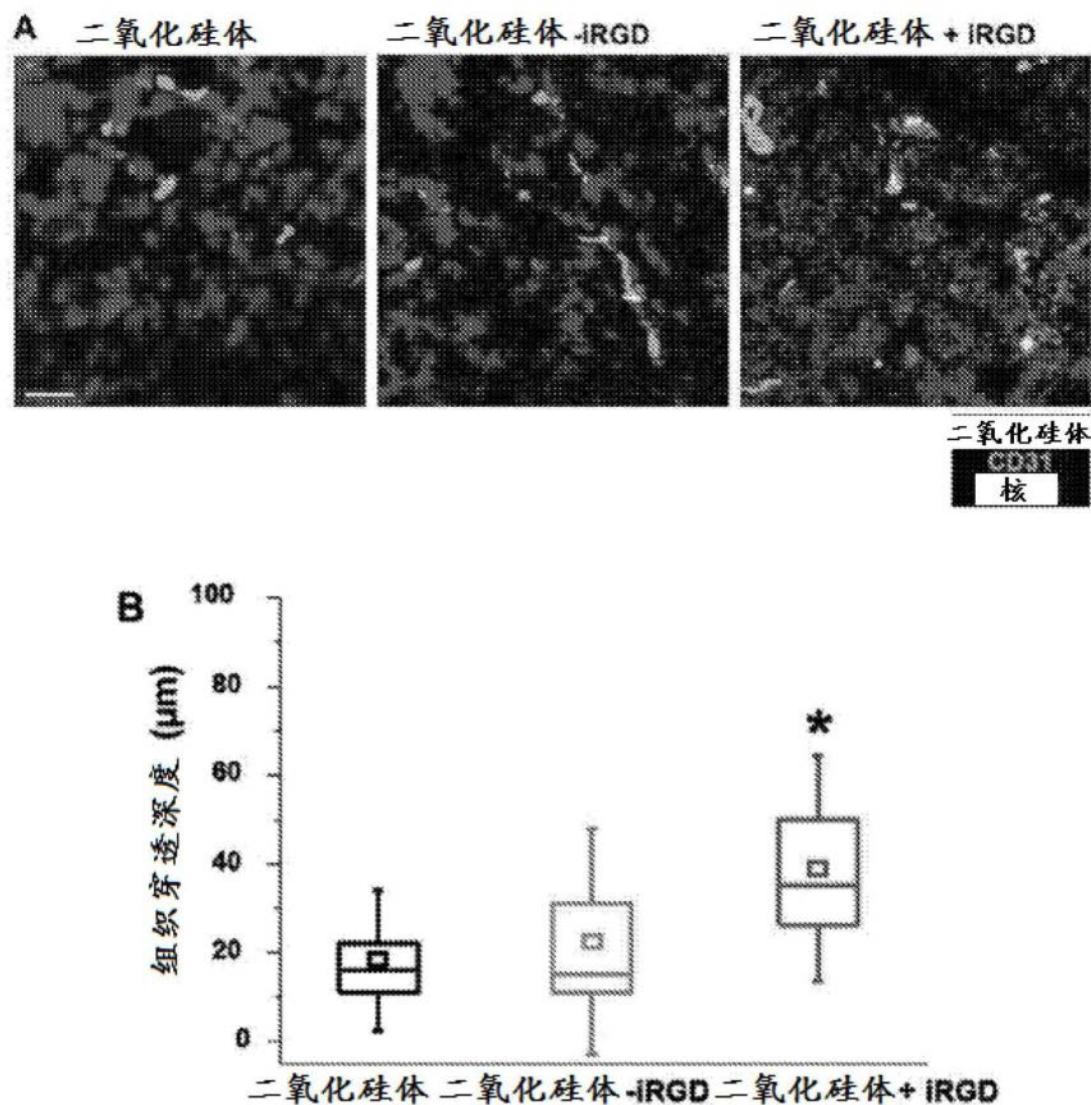


图29

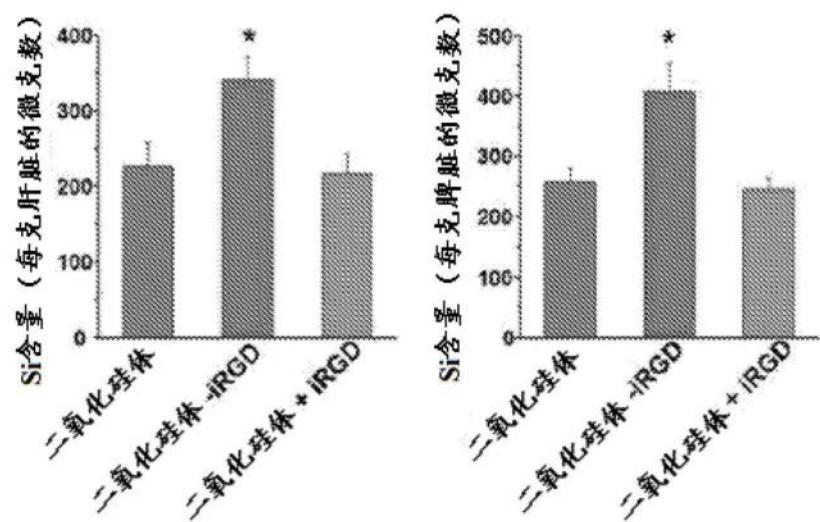


图30

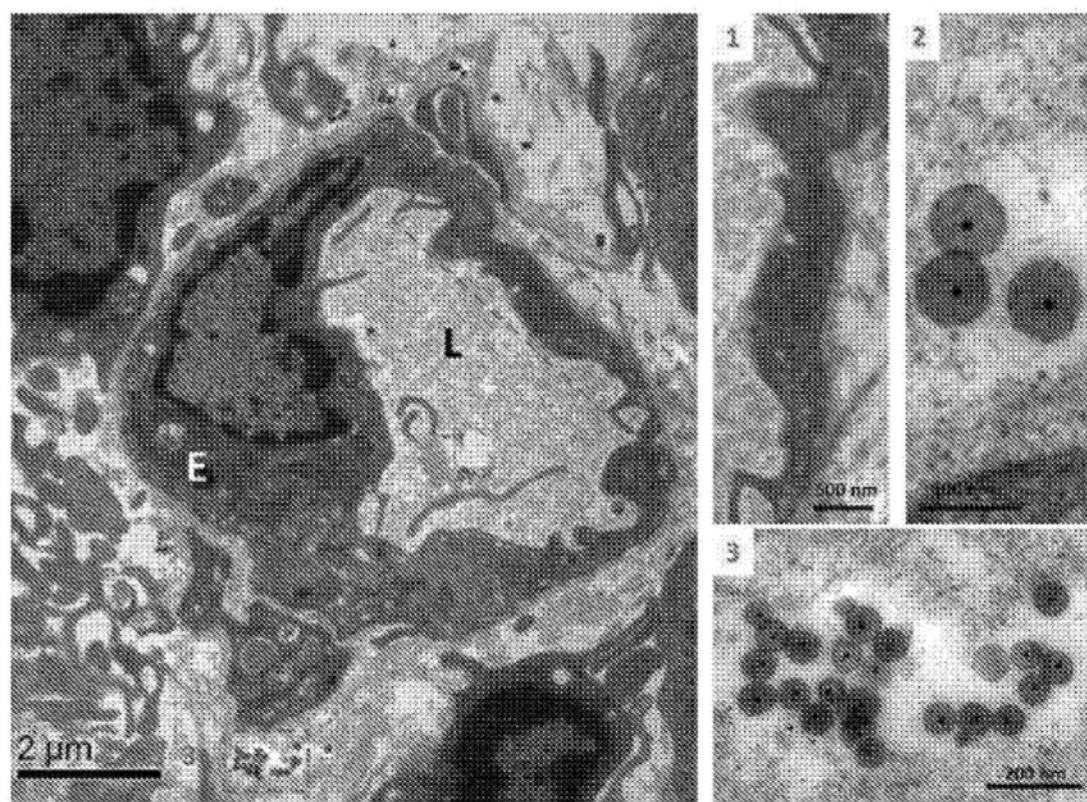


图31

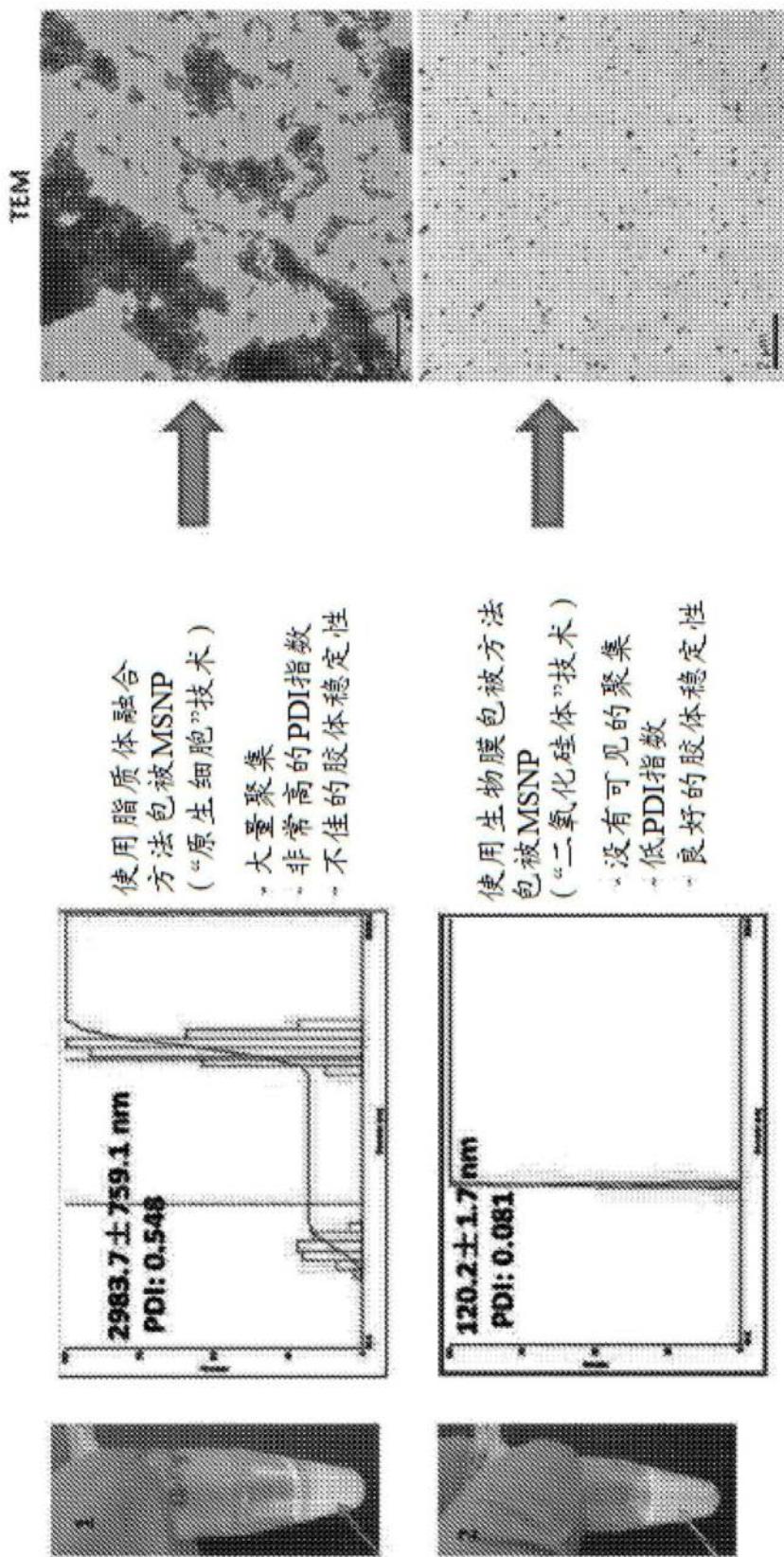


图32