



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106573031 B

(45) 授权公告日 2021.05.28

(21) 申请号 201580032239.X

(22) 申请日 2015.04.14

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106573031 A

(43) 申请公布日 2017.04.19

(30) 优先权数据
61/979,997 2014.04.15 US(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2016.12.15(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2015/025700 2015.04.14(87) PCT国际申请的公布数据
W02015/160770 EN 2015.10.22(73) 专利权人 加利福尼亚大学董事会
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 S·H·豪斯纳 J·L·萨克利夫

(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266

代理人 陆凤 崔佳佳

(51) Int.Cl.

A61K 38/00 (2006.01) (续)

(56) 对比文件

CN 102985086 A, 2013.03.20

Sven H. Hausner等.Targeted in vivo
Imaging of Integrin $\alpha_v\beta_6$ with an
Improved Radiotracer and its Relevance in
a Pancreatic Tumor Model.《Cancer Res.》
.2009,第69卷(第14期),5843-5850.Ian W. Hamley.PEG-Peptide Conjugates.
《American Chemical Society》.2014,第15卷
(第5期),1543-1559.Tapas K. Paira等.Fluorescent
Amphiphilic PEG-Peptide-PEG Triblock
Conjugate Micelles for Cell Imaging.
《Macromol. Biosci》.2014,第14卷(第7期),
929-935. (续)

审查员 邓雪霞

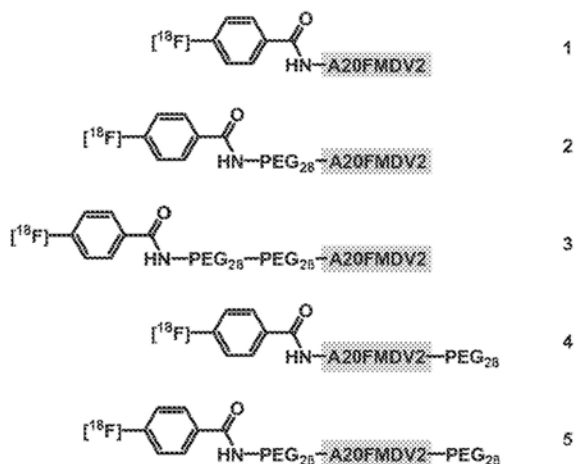
权利要求书3页 说明书63页 附图26页

(54) 发明名称

双末端聚乙二醇化整合素-结合肽及其使用方法

(57) 摘要

本发明提供了靶向整合素(例如 $\alpha_v\beta_6$ 整合素)的双末端PEG化肽偶联物。在具体实施方案中,本发明的肽偶联物还包含生物试剂,例如成像剂或治疗剂,例如它们共价连接至PEG部分之一。本发明的肽偶联物可特别用于成像肿瘤、器官或组织,并用于治疗整合素-介导的疾病和病症,例如癌症、炎症性疾病、自身免疫性疾病、慢性纤维化、慢性阻塞性肺病(COPD)、肺气肿和慢性创伤性皮肤病。包含本发明的肽偶联物的组合物和试剂盒有广泛的应用,包括例如体内成像和免疫治疗。



[转续页]

[接上页]

(51) Int.Cl.

A61K 39/385 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

(56) 对比文件

William J. King等.Facile Formation of Dynamic Hydrogel Microspheres for Triggered Growth Factor Delivery.《Acta Biomater》.2011,第7卷(第3期),975-985.

Jordan S. Miller.Bioactive Hydrogels

Made from Step-Growth Derived PEGPeptide Macromers.《Biomaterials》.2010,第31卷(第13期),3736-3743.

Iain D. Campbell等.Integrin Structure, Activation, and Interactions.《Cold Spring Harb Perspect Biol》.2011,第3卷(第3期),1-14.

史嘉玮等.RGD肽在组织工程领域的应用.《中华实验外科杂志》.2005,第22卷(第9期),1150-1152.

1. 一种偶联物,其包含:

(a) 结合整合素的肽,其中所述肽包含氨基酸序列RGDLX₁X₂X₃,其中X₁和X₂是独立选择的氨基酸,且X₃是L或I;

(b) 共价连接到所述肽的氨基末端的第一聚乙二醇(PEG)部分;和

(c) 共价连接到所述肽的羧基末端的第二PEG部分,

其中所述偶联物还包含与所述肽、所述第一PEG部分或所述第二PEG部分共价连接的成像剂或治疗剂;并且,

所述第一PEG部分和所述第二PEG部分各自具有小于3000道尔顿(Da)的分子量。

2. 如权利要求1所述的偶联物,其中所述整合素是 $\alpha_v\beta_3$ 整合素、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 整合素或 $\alpha_v\beta_6$ 整合素。

3. 如权利要求2所述的偶联物,其中所述整合素是 $\alpha_v\beta_6$ 整合素。

4. 如权利要求1所述的偶联物,其中X₁是Q,X₂是V,且X₃是L。

5. 如权利要求1所述的偶联物,其中所述肽包含氨基酸序列RGDLX₁X₂X₃AQX₆,其中X₆是R或K。

6. 如权利要求5所述的偶联物,其中X₆是R。

7. 如权利要求3所述的偶联物,其中所述肽包含选自下组的氨基酸序列: NAVPNLRGDLQVLAQQRVART (A20FMDV2K16R) 和 NAVPNLRGDLQVLAQKVART (A20FMDV2)。

8. 如权利要求1至7中任一项所述的偶联物,其中所述肽结合所述整合素以及与整合素共表达的受体。

9. 如权利要求8所述的偶联物,其中与整合素共表达的受体是CXCR4。

10. 如权利要求1至7中任一项所述的偶联物,其中所述肽的长度为8至45个氨基酸,8至25个氨基酸,或者21或更多个氨基酸。

11. 如权利要求1至7中任一项的偶联物,其中所述第一PEG部分和所述第二PEG部分各自独立地选自下组: PEG₁₂, PEG₂₈和 (PEG₂₈)₂。

12. 如权利要求1至7中任一项所述的偶联物,其中所述第一PEG部分和所述第二PEG部分是相同的。

13. 如权利要求12所述的偶联物,其中所述第一PEG部分和所述第二PEG部分都是PEG₂₈。

14. 如权利要求1至7中任一项所述的偶联物,其中所述第一PEG部分和所述第二PEG部分是具有确定链长的单分散PEG部分。

15. 如权利要求14的偶联物,其中所述单分散PEG部分具有大于95%的低聚物纯度。

16. 如权利要求1至7中任一项所述的偶联物,其中所述成像剂选自下组: 放射性核素、生物素、荧光团、荧光蛋白、抗体、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、及其组合。

17. 如权利要求16所述的偶联物,其中所述放射性核素选自下组: ¹¹C、¹³N、¹⁵O、¹⁸F、¹⁹F、⁶¹Cu、⁶²Cu、⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、⁶⁸Ga、¹¹¹In、¹²⁴I、¹²⁵I和¹³¹I。

18. 如权利要求16所述的偶联物,其中所述放射性核素通过辅基连接到所述肽、所述第一PEG部分或所述第二PEG部分。

19. 如权利要求1至7中任一项所述的偶联物,其中所述治疗剂选自下组: 放射性核素、促凋亡肽、纳米颗粒、化疗剂、纳米滴、脂质体药物、细胞因子、及其组合。

20. 如权利要求19所述的偶联物,其中所述放射性核素选自下组: ⁹⁰Y和¹⁷⁷Lu。

21. 如权利要求19所述的偶联物,其中所述放射性核素通过螯合剂连接到所述肽、所述第一PEG部分或所述第二PEG部分。

22. 如权利要求19所述的偶联物,其中所述促凋亡肽包含_D(KLAKLAK)₂。

23. 如权利要求19所述的偶联物,其中所述促凋亡肽通过甘氨酸接头连接到所述肽、所述第一PEG部分或所述第二PEG部分。

24. 如权利要求19所述的偶联物,其中所述纳米颗粒包含负载有化疗剂的PEG^{5K}CA₈。

25. 如权利要求19所述的偶联物,其中所述化疗剂是紫杉醇(PTX)、吉西他滨、或其组合。

26. 如权利要求1至7中任一项所述的偶联物,其中所述偶联物还包含与所述肽、所述第一PEG部分或所述第二PEG部分共价连接的白蛋白结合基序。

27. 如权利要求26所述的偶联物,其中所述白蛋白结合基序是4-(4-碘苯基)丁酸。

28. 一种组合物,其包含权利要求1至7中任一项所述的一个或多个偶联物。

29. 如权利要求28所述的组合物,其中多个偶联物中存在具有确定链长的单分散PEG部分。

30. 如权利要求28所述的组合物,其中多个偶联物彼此连接以形成多聚体偶联物。

31. 如权利要求30所述的组合物,其中所述多聚体偶联物是所述多个偶联物的二聚体或四聚体。

32. 如权利要求30所述的组合物,其中多个偶联物通过至少一个赖氨酸残基在每个偶联物的第二PEG部分彼此连接。

33. 如权利要求28所述的组合物,其中所述组合物还包含药物载体或赋形剂。

34. 一种用于成像或治疗的试剂盒,所述试剂盒包括:

- (a) 如权利要求1至7中任一项所述的偶联物或如权利要求28所述的组合物;和
- (b) 偶联物或组合物在成像或治疗中的使用说明。

35. 一种权利要求1-7中任一项所述的偶联物或权利要求28所述的组合物的用途,用于制备一试剂盒,所述的试剂盒用于靶组织体内成像,其中成像剂共价连接至所述肽、所述第一PEG部分或第二PEG部分。

36. 如权利要求35所述的用途,其中所述靶组织是癌性组织或器官。

37. 如权利要求36所述的用途,其中所述癌性组织与胰腺癌、乳腺癌、结肠直肠癌、前列腺癌或口腔鳞状细胞癌相关。

38. 如权利要求35所述的用途,其中所述成像剂选自下组:放射性核素、生物素、荧光团、荧光蛋白、抗体、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、及其组合。

39. 如权利要求35所述的用途,其中所述成像剂是放射性核素,并且其中来自所述放射性核素的辐射用于确定所述偶联物在所述受试者中何处聚集。

40. 如权利要求35所述的用途,其中所述偶联物通过磁共振成像(MRI)、磁共振光谱(MRS)、单光子发射计算机断层扫描(SPECT)、正电子发射断层扫描(PET)或光学成像进行检测。

41. 如权利要求35所述的用途,其中检测所述偶联物以用于诊断或预后由所述整合素介导的疾病或病变。

42. 如权利要求41所述的用途,其中所述疾病或病变与整合素的表达、过表达或活化相

关。

43. 如权利要求41所述的用途,其中所述疾病或病变是 $\alpha_v\beta_6$ 整合素介导的疾病或病变。

44. 一种权利要求1-7中任一项所述的偶联物或权利要求28所述的组合物的用途,用于制备一制剂,所述的制剂用于在有需要的受试者中治疗整合素-介导的疾病或病变,其中治疗剂共价连接至所述肽、所述第一PEG部分或所述第二PEG部分。

45. 如权利要求44所述的用途,其中所述疾病或病变与所述整合素的表达、过表达或活化相关。

46. 如权利要求44所述的用途,其中所述疾病或病变选自下组:癌症、炎性疾病、自身免疫疾病、慢性纤维化、慢性阻塞性肺病(COPD)、肺气肿和慢性创伤性皮肤病。

47. 如权利要求44所述的用途,其中所述治疗剂选自下组:放射性核素、促凋亡肽、纳米颗粒、化疗剂、纳米滴、脂质体药物、细胞因子、及其组合。

48. 如权利要求44所述的用途,其中所述疾病或病变是 $\alpha_v\beta_6$ 整合素-介导的疾病或病变。

49. 如权利要求48所述的用途,其中所述 $\alpha_v\beta_6$ 整合素-介导的疾病或病变是胰腺癌、乳腺癌、结肠直肠癌、前列腺癌或口腔鳞状细胞癌。

50. 如权利要求44所述的用途,其中所述制剂包含治疗有效量的偶联物或所述组合物,所述的治疗有效量是足以将所述治疗剂靶向递送至表达所述整合素的细胞的量。

双末端聚乙二醇化整合素-结合肽及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2014年4月15日提交的美国临时申请No. 61/979,997的优先权,其内容通过引用整体纳入本文用于本文所有目的。

[0003] 关于联邦资助的研究和开发下所作发明的权利的声明

[0004] 本发明是在由能源部授予的第DE-SC0002061号基金的政府支持下进行的。政府对本发明享有一定权利。

背景技术

[0005] 整合素是一个负责介导细胞-细胞和细胞-细胞外基质 (ECM) 粘附的细胞表面受体的大家族。存在至少24种不同的整合素,每种都是由 α 和 β 亚基组成的异二聚体,其表达由包括组织类型、发育阶段和各种组织病理学(例如炎症和癌症)的数种因素决定。虽然它们不具有任何内在酶活性,但是在与配体结合后,整合素通过使细胞质结构和信号分子的复合物并置,然后这些分子相互作用并决定细胞反应,从而将细胞外的线索转化为细胞内信号。由于整合素参与细胞行为的大多数方面,其中包括运动性、增殖、侵袭和存活,因此它们在疾病中的作用已被广泛报道。事实上,一些整合素被认为在促进某些疾病(包括癌症)中起到了积极的作用。例如, $\alpha_v\beta_3$ 整合素涉及促进黑色素瘤和成胶质细胞瘤的侵袭性表型,这是由于其所具有的多种能力,其中包括上调原侵袭性金属蛋白酶以及提供原迁移性存活信号。由于 $\alpha_v\beta_3$ 在血管生成的血管的内皮细胞上也被上调,并且可以为癌中新血管的发展提供类似的信号,因此这样的数据已经导致许多药物和学术中心开发用于治疗目的的 $\alpha_v\beta_3$ 的拮抗剂,其中许多已经是肽或肽模拟物。因此,理解整合素-配体相互作用的结构基础,将有助于设计改进的整合素拮抗剂。

[0006] $\alpha_v\beta_6$ 整合素受体仅在上皮细胞上表达。该整合素涉及正常和病理组织过程。例如, $\alpha_v\beta_6$ 在伤口愈合和炎症期间被上皮细胞上调。很可能 $\alpha_v\beta_6$ 通过与其保护性原肽(即潜伏相关肽(LAP))结合从而局部激活TGF- β 的能力,解释了这种整合素在这些瞬时病理中的功能。因此,TGF- β 可以抑制炎症反应和上皮增殖,这表明 $\alpha_v\beta_6$ 作为抑制这些过程的阴性对照。然而,慢性炎症可导致过量的TGF- β 被 $\alpha_v\beta_6$ -依赖性地活化,从而导致实验动物的肺中的纤维化。因此,导致人纤维化的一些病理学也可能涉及 $\alpha_v\beta_6$ -依赖性的TGF- β 活化。小鼠皮肤中组成型 $\alpha_v\beta_6$ 过表达,导致在大量转基因动物上出现慢性伤口。因此,与人类疾病(例如,某些形式的表皮松解大疱)相关的慢性伤口,也可以通过由伤口的角质形成细胞表达的 $\alpha_v\beta_6$ 的上调来促进或加重。

[0007] 最近,已经清楚 $\alpha_v\beta_6$ 整合素是癌症中的主要新靶。虽然 $\alpha_v\beta_6$ 是上皮特异性的,在大多数静息的上皮组织中它是弱的或不可检测的,但在许多类型的癌症中强烈上调,通常位于侵入前沿。例如, $\alpha_v\beta_6$ 在口腔鳞状细胞癌(OSCC)、胰腺癌、卵巢癌和结肠癌中高度上调。已经表明, $\alpha_v\beta_6$ 可以通过上调金属蛋白酶和促进增加的运动性来促进癌侵袭,从而使得通过Akt的上调来促进癌细胞的存活。这些数据表明, $\alpha_v\beta_6$ 积极促进侵入性表型。还已经显示, $\alpha_v\beta_6$ 的高表达与结肠癌患者的中值存活率的显著下降是相关的。

[0008] 此外, $\alpha_v\beta_6$ 整合素已经在体外通过与病毒衣壳蛋白VP1中RGD基序结合而被鉴定为口蹄疫病毒(FMDV)的受体。结构研究已经揭示,FMDV与细胞结合的模式之一是通过其蛋白质-壳上的含有31个氨基酸的小环。该FMDV环高选择性和特异性地结合于 $\alpha_v\beta_6$ 。PCT公开号W007/039728描述了放射性标记的 $\alpha_v\beta_6$ 靶向肽A20FMDV2,其由FMDV环的20个核心氨基酸组成,其在竞争性ELISA结合测定中以高特异性和选择性结合固定的人 $\alpha_v\beta_6$ 。在无胸腺nu/nu小鼠模型中,用PET评估了放射性标记的A20FMDV2对表达 $\alpha_v\beta_6$ 的人肿瘤进行成像的能力。然而,这些体内研究显示,放射性标记的 $\alpha_v\beta_6$ 靶向肽发生了快速代谢。事实上,1小时后,尿中的放射性大致相等地分布在三种代谢物之间并且未检测到未代谢的肽。也观察到来自 $\alpha_v\beta_6$ 表达肿瘤的放射性被清除。特别地,在注射后1、2和4小时,每克肿瘤的肽注射剂量的百分比(% ID/g)分别为0.66、0.28和0.06。

[0009] 鉴于上述,本领域需要肿瘤靶向剂,其不仅对表达 $\alpha_v\beta_6$ 的肿瘤具有高肿瘤选择性和特异性,而且能够在 $\alpha_v\beta_6$ 表达的肿瘤中具有增加的代谢稳定性和滞留性。本发明满足这种需要并具有相关的优点。

发明内容

[0010] 本发明提供了靶向整合素(例如 $\alpha_v\beta_6$ 整合素)的双末端PEG化肽偶联物。在具体实施方案中,本发明的肽偶联物还包含生物试剂,例如成像剂或治疗剂,例如共价连接至PEG部分之一。本发明的肽偶联物特别适用于成像肿瘤、器官或组织以及用于治疗整合素介导的疾病和病症,例如癌症、炎症性疾病、自身免疫性疾病、慢性纤维化、慢性阻塞性肺病(COPD)、肺气肿和慢性创伤性皮肤病。包含本发明的肽偶联物的组合物和试剂盒,可用于广泛的应用,包括例如体内成像和免疫治疗。

[0011] 一方面,本发明提供了一种偶联物,其包含:

[0012] (a) 结合整合素的肽;

[0013] (b) 共价连接到所述肽的氨基末端的第一聚乙二醇(PEG)部分;和

[0014] (c) 共价连接到所述肽的羧基末端的第二聚乙二醇(PEG)部分。

[0015] 在一些实施方案中,所述肽包含选自下组的氨基酸序列:RGD、LDV和GFOGER,其中,O是羟脯氨酸。在其他实施方案中,所述整合素是 $\alpha_v\beta_3$ 整合素, $\alpha_{IIB}\beta_3$ 整合素或 $\alpha_v\beta_6$ 整合素。在优选的实施方案中,所述整合素是 $\alpha_v\beta_6$ 整合素。在某些实施方案中, $\alpha_v\beta_6$ 整合素-结合肽包含氨基酸序列RGDLX₁X₂X₃,其中X₁和X₂是独立选择的氨基酸,X₃是L或I。在某些实施方案中,X₁是Q,X₂是V,X₃是L。在具体实施方案中,所述肽包含氨基酸序列RGDLX₁X₂X₃AQX₆,其中X₆是K或R。在某些实施例中,X₆是R。在其它实施方案中,所述 $\alpha_v\beta_6$ 整合素-结合肽包含氨基酸序列RSDLTPLFX₇,其中X₇不存在或者是任意氨基酸。在某些实施例中,X₇不存在(即,所述肽包含氨基酸序列RSDLTPLF)。在某些其他实施例中,X₇是K(即,所述肽包含氨基酸序列RSDLTPLFK)。在优选的实施方案中,所述肽包含选自下组的氨基酸序列或由选自下组的氨基酸序列组成:NAVPNLRGDLQVLAQKVART(A20FMDV2)和NAVPNLRGDLQVLAQVRVART(A20FMDV2K16R)。在可替换的实施方案中,所述肽是结合于靶目标整合素(例如 $\alpha_v\beta_6$ 整合素)的肽模拟物。

[0016] 在其它实施方案中,所述肽结合于整合素以及与整合素共表达的受体。在某些实施例中,所述与整合素共表达的受体是C-X-C趋化因子受体4型(CXCR4)。在另外的实施方案

中,所述肽的长度为约8至约45个氨基酸。在某些实施例中,所述肽的长度为20个氨基酸。

[0017] 在一些实施方案中,所述第一PEG部分和所述第二PEG部分各自具有小于约5000道尔顿(Da),例如小于约3000Da的分子量。在优选的实施方案中,所述第一PEG部分和所述第二PEG部分是具有确定链长的单分散PEG部分。具有确定链长的PEG部分的非限制性实例包括:具有大于约95%寡聚体纯度的小的单分散PEG分子。在某些实施例下,所述第一PEG部分和所述第二PEG部分各自独立地选自下组:PEG₁₁,PEG₁₂(PEG800),PEG₂₈(PEG1500)和(PEG₂₈)₂(PEG1500x2)。在具体实施方案中,所述第一PEG部分和所述第二PEG部分是相同的。在优选的实施方案中,所述第一PEG部分和所述第二PEG部分都是PEG₂₈(PEG 1500)。

[0018] 在某些实施方案中,所述偶联物进一步包含与肽、第一PEG部分和/或第二PEG部分共价连接的成像剂或治疗剂。在具体实施方案中,所述成像剂或治疗剂共价连接到第一PEG部分。在某些实施例中,所述成像剂或治疗剂作为偶联物中最N-末端的部分被共价连接。

[0019] 在一些实施方案中,所述成像剂选自下组:放射性核素、生物素、荧光团、荧光蛋白、抗体、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、及其组合。在某些实施方案中,放射性核素选自下组:¹¹C、¹³N、¹⁵O、¹⁸F、¹⁹F、⁶¹Cu、⁶²Cu、⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、⁶⁸Ga、¹¹¹In、¹²⁴I、¹²⁵I和¹³¹I。在某些实施例中,放射性核素通过辅基连接到肽、第一PEG部分或第二PEG部分。在一些实施例中,放射性核素通过辅基作为偶联物中最N-末端的部分被连接。

[0020] 在一些实施方案中,所述治疗剂选自下组:放射性核素、促凋亡肽、纳米颗粒、化疗剂、纳米滴、脂质体药物、细胞因子、及其组合。在某些实施方案中,所述治疗剂是选自⁹⁰Y和¹⁷⁷Lu的放射性核素。在某些实施例中,放射性核素通过螯合剂连接到肽、第一PEG部分或第二PEG部分。在一些实施例中,放射性核素通过螯合剂作为偶联物中最N-末端的部分被连接。

[0021] 在其它实施方案中,所述治疗剂是包含氨基酸序列_D(KLAKLAK)₂的促凋亡肽。在某些实施例中,促凋亡肽通过甘氨酸接头连接到肽、第一PEG部分或第二PEG部分。在具体实施例中,促凋亡肽例如通过甘氨酸接头连接到第一PEG部分。

[0022] 在其它实施方案中,所述治疗剂是包含末端树枝状聚合物(telodendrimer)支架或其它基于胶束的纳米载体系统的纳米颗粒。在具体实施方案中,所述末端树枝状聚合物支架是PEG^{5K}CA₈。在某些实施例中,所述纳米颗粒负载有化疗剂。化疗剂的非限制性实例包括紫杉醇(PTX)和本文所述的其它细胞毒性化疗剂。

[0023] 在某些实施方案中,所述偶联物还包含与肽、第一PEG部分或第二PEG部分共价连接的白蛋白结合基序。在具体实施方案中,白蛋白结合基序是4-(4-碘苯基)丁酸(IPA)或其具有较短烷基链的同系物,例如4-(4-碘苯基)丙酸或4-(4-碘苯基)乙酸。在某些实施例中,白蛋白结合基序通过接头(例如谷氨酸(E)接头或本领域技术人员已知的其它合适接头(例如氨基酸或肽接头))与第一和/或第二PEG部分共价连接。在某些实施方案中,白蛋白结合基序是ε-(4-(4-碘苯基)丁基酰胺)赖氨酸-谷氨酸("K(IPA)E"),其对应于这样的IPA,其中所述IPA共价连接到赖氨酸-谷氨酸肽接头的赖氨酸残基的侧链。在一些实施方案中,K(IPA)E白蛋白结合基序共价连接到第一PEG部分。在其它实施方案中,所述成像剂或治疗剂共价连接于(例如,通过辅基,螯合剂或接头)与第一PEG部分连接的白蛋白结合基序。

[0024] 在另一方面,本发明提供了包含一个或多个本文所述的双末端PEG化的肽偶联物的组合物。在具体实施方案中,多个偶联物含有具有确定的链长(例如,大于约95%寡聚体

纯度)的单分散PEG部分。在某些实施例中,多个偶联物中的每一个的第一PEG部分和第二PEG部分各自独立地选自下组:PEG₁₁,PEG₁₂(PEG800),PEG₂₈(PEG1500)和(PEG₂₈)₂(PEG1500x2)。在具体实施方案中,多个偶联物中的每一个的第一PEG部分和第二PEG部分是相同的。在优选的实施方案中,多个偶联物的每一个的第一PEG部分和第二PEG部分都是PEG₂₈(PEG 1500)。

[0025] 在一些实施方案中,本发明提供了多聚肽偶联物,其中多个偶联物彼此连接。在具体实施方案中,所述多聚体偶联物是多个偶联物的二聚体或四聚体。在某些实施方案中,所述多聚肽偶联物通过每个偶联物的第二PEG部分之间的连接而形成。在一些实施例中,所述偶联物通过至少一个赖氨酸残基在第二PEG部分彼此连接。在其它实施方案中,所述组合物还包含药物载体或赋形剂。

[0026] 在另一方面,本发明提供了用于成像或治疗的试剂盒,所述试剂盒包括:

[0027] (a) 本文所述的双末端PEG化肽偶联物或其组合物(例如,多个偶联物或多聚体偶联物);和

[0028] (b) 偶联物或组合物在成像或治疗中的使用说明。

[0029] 在另一方面,本发明提供了用于靶组织体内成像的方法,所述方法包括:

[0030] (a) 向需要这种成像的受试者施用本文所述的双末端聚乙二醇化肽偶联物或其组合物(例如,多个偶联物或多聚体偶联物),其中成像剂共价连接至所述的肽、第一PEG部分或第二PEG部分;和

[0031] (b) 检测偶联物以确定偶联物在受试者中何处集中。

[0032] 在一些实施方案中,所述靶组织是癌性组织或器官。癌性组织的非限制性实例包括:与胰腺癌、乳腺癌、结肠直肠癌、前列腺癌、子宫颈癌和口腔鳞状细胞癌相关的癌性组织或肿瘤。在优选的实施方案中,施用肽偶联物用于成像肿瘤,例如胰腺肿瘤。

[0033] 在其它实施方案中,通过磁共振成像(MRI)、磁共振波谱(MRS)、单光子发射计算机断层扫描(SPECT)、正电子发射断层扫描(PET)或光学成像检测肽偶联物。在其它实施方案中,检测偶联物以用于诊断或预后由整合素介导的疾病或病变。在某些实施方案中,所述疾病或病变与整合素的表达、过表达和/或活化相关。在优选的实施方案中,所述疾病或病变是 $\alpha_v\beta_6$ 整合素-介导的疾病或病变。

[0034] 在一相关方面,本发明提供了在有需要的受试者中治疗整合素-介导的疾病或病变的方法,所述方法包括:

[0035] 给受试者施用治疗有效量的本文所述的双末端聚乙二醇化肽偶联物或其组合物(例如,多个偶联物或多聚体偶联物),其中治疗剂共价连接于所述的肽、第一PEG部分或第二PEG部分。

[0036] 在某些实施方案中,所述疾病或病变与整合素的表达、过表达和/或活化相关。整合素-介导的疾病或病变的非限制性实例包括:癌症、炎症性疾病、自身免疫疾病、慢性纤维化、慢性阻塞性肺病(COPD)、肺气肿和慢性创伤性皮肤病。在具体实施方案中,所述疾病或病变是 $\alpha_v\beta_6$ 整合素-介导的疾病或病变。在一些实施例中,所述 $\alpha_v\beta_6$ 整合素-介导的疾病或病变是选自下组的癌症:胰腺癌、乳腺癌、结肠直肠癌、前列腺癌、子宫颈癌和口腔鳞状细胞癌。

[0037] 从以下详细描述和附图看,本发明的其他目的、特征和优点对于本领域技术人员

将是显而易见的。

附图说明

[0038] 图1显示了在本文所述的研究中评估的示例性PEG化变体的结构。获得的所有化合物为C-末端酰胺。

[0039] 图2显示了化合物1 (^{18}F -FBA-A20FMDV2) 在整合素 $\alpha_v\beta_6$ -表达的DX₃puro β_6 肿瘤和非表达的DX₃puro对照肿瘤中的生物分布数据。

[0040] 图3显示了化合物1 (^{18}F -FBA-A20FMDV2) 在BxPC-3 (和MIA PaCa-2) 肿瘤中的生物分布数据。

[0041] 图4显示了化合物2 (^{18}F -FBA-PEG₂₈-A20FMDV2) 在DX₃puro6和DX₃puro肿瘤中的生物分布数据。

[0042] 图5显示了化合物2 (^{18}F -FBA-PEG₂₈-A20FMDV2) 在BxPC-3肿瘤中的生物分布数据。

[0043] 图6显示了化合物3 (^{18}F -FBA-PEG₂₈-PEG₂₈-A20FMDV2) 在DX₃puro6和DX₃puro肿瘤中的生物分布数据。

[0044] 图7显示了化合物3 (^{18}F -FBA-PEG₂₈-PEG₂₈-A20FMDV2) 在BxPC-3 (和MIA PaCa-2) 肿瘤中的生物分布数据。

[0045] 图8显示了化合物4 (^{18}F -FBA-A20FMDV2-PEG₂₈) 在DX₃puro6和DX₃puro肿瘤中的生物分布数据。

[0046] 图9显示了化合物5 (^{18}F -FBA-PEG₂₈-A20FMDV2-PEG₂₈) 在DX₃puro6和DX₃puro肿瘤中的生物分布数据。

[0047] 图10显示了化合物5 (^{18}F -FBA-PEG₂₈-A20FMDV2-PEG₂₈) 在BxPC-3肿瘤中的生物分布数据。

[0048] 图11显示了使用整合素 $\alpha_v\beta_6$ -表达的DX₃puro β_6 细胞系(+) 和其非表达DX₃puro对照(-), 体外放射性示踪剂的结合和内化。显示总放射性分数的图, 表示了一式四份实验, 其中对于每个放射性示踪剂/细胞系用 3.75×10^6 个细胞, 并且在60分钟孵育期后测试。实心柱: 在细胞样品中检测到的总放射性的百分比(黑色: 总结合; 灰色: 内化); 线: S.D. 对于DX₃puro66/DX₃puro对的Student氏非配对双尾t检验: 对于每个实验的两个细胞系之间的相应数据集(总结合和内化数据), $P \leq 0.0001$ 。化合物1-3的数据按Hausner等人, Cancer Res 2009; 69: 5843-50进行再现。

[0049] 图12显示了通过异种移植小鼠模型中的生物分布研究测定的化合物1的体内数据。肿瘤异种移植摄取(A) 和摄取比率(B) 和肾摄取(C)。摄取数据以%注射剂量/克(%ID/g) 表示。数据点: %ID/g; 线: S.D; n=3/时间点。

[0050] 图13显示了通过异种移植小鼠模型中的生物分布研究测定的化合物2的体内数据。肿瘤异种移植摄取(A) 和摄取比率(B) 和肾摄取(C)。摄取数据以%注射剂量/克(%ID/g) 表示。数据点: %ID/g; 线: S.D; n=3/时间点。

[0051] 图14显示了通过异种移植小鼠模型中的生物分布研究测定的化合物3的体内数据。肿瘤异种移植摄取(A) 和摄取比率(B) 和肾摄取(C)。摄取数据以%注射剂量/克(%ID/g) 表示。数据点: %ID/g; 线: S.D; n=3/时间点。

[0052] 图15显示了通过异种移植小鼠模型中的生物分布研究测定的化合物4的体内数

据。肿瘤异种移植摄取 (A) 和摄取比率 (B) 和肾摄取 (C)。摄取数据以 % 注射剂量/克 (% ID/g) 表示。数据点: % ID/g; 线: S.D; n=3/时间点。

[0053] 图16显示了通过异种移植小鼠模型中的生物分布研究测定的化合物5的体内数据。肿瘤异种移植摄取 (A) 和摄取比率 (B) 和肾摄取 (C)。摄取数据以 % 注射剂量/克 (% ID/g) 表示。数据点: % ID/g; 线: S.D; n=3/时间点。

[0054] 图17显示了使用整合素 $\alpha_v\beta_6$ -表达的DX₃puro β_6 细胞系和其非表达DX₃puro对照, 体外具有赖氨酸取代的单PEG化和二聚PEG化放射性示踪剂的结合和内化。显示总放射性分数的图, 表示了一式四份实验, 其中对于每个放射性示踪剂/细胞系用 3.75×10^6 个细胞, 并且在60分钟孵育期后测试。实心柱: 在细胞样品中检测到的总放射性的百分比 (黑色: 总结合; 灰色: 内化); 线: S.D。

[0055] 图18显示了通过异种移植小鼠模型中的生物分布研究测定的化合物5R的体内数据。肿瘤异种移植摄取 (A) 和摄取比率 (B) 和肾摄取 (C)。摄取数据以 % 注射剂量/克 (% ID/g) 表示。数据点: % ID/g; 线: S.D; n=3/时间点。

[0056] 图19显示了制备的化合物5 (A) 和5R (B) 的代表性HPLC迹线。放射性HPLC迹线是顶部迹线; 还显示了220nm (中间迹线) 和254nm (底部迹线) 的UV迹线。注意, 化合物5的产物峰周围的升高的基线 (指示部分分解, 可能是由于氧化或放射性分解); 通过比较, 化合物5R的产物峰周围的基线保持平坦。在220nm迹线中的早期尖峰由注入溶剂引起; “溶剂前沿”。缩写: 对于紫外吸收, 单位为毫吸光度单位 [mAU]; 对于放射性 [RA] 信号, 单位是毫伏特 [mV], 重叠于UV标度上。

[0057] 图20显示了配对的 $\alpha_v\beta_6$ (+) / $\alpha_v\beta_6$ (-) 肿瘤小鼠模型中 [¹⁸F] FBA-PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) -PEG₂₈的细胞结合、内化、 $\alpha_v\beta_6$ 肿瘤靶向和肾清除情况。

[0058] 图21显示了向整合素 $\alpha_v\beta_6$ -表达的DX₃puro β_6 细胞和 $\alpha_v\beta_6$ -阴性DX₃puro对照内的结合和内化情况。显示的数据是每种放射性示踪剂 (n=4/细胞系和条件) 的平均值 (实心柱) \pm 标准偏差 (线段)。

[0059] 图22显示了本发明的肽-胶束的组装。

[0060] 图23显示了本发明的肽偶联物的单体、二聚体和四聚体的示意图。

[0061] 图24显示了示例性烯丙基保护的白蛋白结合物。

[0062] 图25显示了配对的 $\alpha_v\beta_6$ (+) / $\alpha_v\beta_6$ (-) 肿瘤小鼠模型中, 在注射后 (p.i.) 1、2和4小时的A1 [¹⁸F]NOTA-PEG₂₈-A20FMDV2和 [¹⁸F]FBA-PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) -PEG₂₈的生物分布数据。

[0063] 图26显示了放射性标记的白蛋白结合剂修饰的肽的逐步组装的方案1。所示为螯合剂结合肽的方案。对于固相放射性标记 (例如, 使用 [¹⁸F]FBA), 在TFA切割和放射性-HPLC纯化之前, 辅基可以偶联到游离N-末端。

[0064] 图27显示了向整合素 $\alpha_v\beta_6$ -表达的DX₃puro β_6 细胞和 $\alpha_v\beta_6$ -阴性DX₃puro对照的结合和内化情况。显示的数据是每种放射性示踪剂的平均值 (实心柱) \pm 标准偏差 (线段) (n=4/细胞系和条件)。

[0065] 图28显示了在健康恒河猴中用 [¹⁸F]FBA-PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) -PEG₂₈获得的共焦PET/CT扫描图像。动物在注射后 (p.i.) 指定时间以仰卧并排成像。

具体实施方式

[0066] 一. 介绍

[0067] 本发明部分地基于惊人的发现,整合素-结合肽上的PEG部分的尺寸和位置显著影响所得肽偶联物的靶向和药代动力学特征。具体来说,实施例1和2说明了双末端PEG化(即,在肽的N-和C-末端连接PEG单元),能够赋予示例性 $\alpha_v\beta_6$ 整合素-结合的A20FMDV2肽及其变体(例如,K16R变体)优异的靶向特征和体内药代动力学。值得注意的是,双末端PEG化A20FMDV2和A20FMDV2(K16R)肽显示出大大改善的药代动力学曲线,其超过基于单个N或C末端PEG化的预测情况。事实上,两个PEG单元协同作用以实现大大改善的稳定性以及 $\alpha_v\beta_6(+)$ -肿瘤的高摄取和高保留。与通常用于医疗目的的PEG单元(例如,MW=约5000至约50,000)相比,用相对小的单分散PEG链,例如,在N-和C-末端具有精确定义数目的乙二醇重复单元‘n’的PEG链(例如,MW<约3000),来实现这些效果。

[0068] 如实施例3所示,本发明还提供了具有改善的亲力和药代动力学的新型分子成像和治疗剂,其基于用促凋亡肽、治疗性放射性核素、基于胶束的纳米载体、多聚化和/或添加血白蛋白结合基序来修饰本文所述的双末端PEG化肽偶联物,以进一步改善肽偶联物的亲和力、体内稳定性、靶向能力和/或清除行为。

[0069] 此外,实施例4中呈现的结果证明,与母体肽序列、环状肽和N-或C-端各自PEG化的肽相比,具有甚至更短的PEG单元(例如,PEG₁₁)的短至8个氨基酸的整合素-结合肽的双末端PEG化,可将有利的性质赋予肽,例如高选择性、改善的血清稳定性、放射性标记产率和亲脂性。因此,具有短肽序列(例如,长度约8个氨基酸)和短PEG单位(例如,PEG₁₁)的本发明的双末端PEG化肽偶联物,具有有利的靶向和药代动力学特征,这使得它们适于体内成像和治疗。

[0070] 本发明的双末端PEG化肽偶联物可以使用标准方法制备。仅需要相对短的PEG聚合物,因此允许在固相上合成。这确保了直接的制备和纯化。与其它可显示位置异构性并含有具有平均长度的PEG链的混合物的PEG化的化合物相比,所述的肽偶联物可作为具有精确组成和分子量的单一化合物形式获得。

[0071] 总之,用本发明的肽偶联物在肿瘤中整合素(例如 $\alpha_v\beta_6$)表达进行成像和靶向,可对原本会忽视的肿瘤进行检测和治疗,并且还用作非侵入方式的癌症预后的指示剂。

[0072] II. 定义

[0073] 除非另有特别说明,本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。此外,与本文所述的方法或材料相似或等同的任何方法或材料可用于本发明的实践中。为了本发明的目的,定义以下术语。

[0074] 术语“偶联物”旨在包括通过结合或连接两种或更多种化合物所形成的化合物。特别地,本发明的偶联物包括“双末端PEG化的肽偶联物”,其包含整合素-结合肽并且在肽的氨基末端共价连接第一聚乙二醇(PEG)部分和在肽的羧基末端共价连接第二PEG部分。本发明的偶联物可以进一步包含与肽、第一PEG部分或第二PEG部分共价连接的成像剂或治疗剂。

[0075] 术语“整合素-结合肽”和“结合整合素的肽”是指偶联物中肽基序的结合/相互作用,其显示与特定整合素或整合素的特定基团的特异性相互作用的能力。在某些实施方案中,所述术语是指肽或其部分与靶整合素相互作用和/或结合,并且不与相似序列或结构的

分子发生交叉反应的能力。在一些实施例中,当肽以实质上更低的解离常数结合于(即,更紧密地结合于)靶整合素(与具有相似序列或结构的分子相比)时,肽就特异性结合于靶整合素。例如,在某些实施例中,与相关分子相比,当肽以约2、3、4、5、6、8、10、15、20、25、30、40、50、100、或1000倍或更高的亲和力结合整合素时,就发生特异性结合。肽与靶整合素上的位点的结合,可以通过分子间力(例如离子键、氢键、疏水作用、偶极-偶极键和/或范德华力)发生。可以例如通过评估在常规条件下肽与靶整合素以及多个或多或少(例如结构上和/或功能上)密切相关的分子的结合,来测试交叉反应性。这些方法可包括但不限于:结合研究、具有密切相关分子的封闭和竞争研究、FACS分析、表面等离子体共振(例如,用BIAcore)、分析超速离心、等温滴定量热法、荧光各向异性、荧光光谱、放射性标记的配体结合测定、及其组合。

[0076] 如本文所使用的,术语“PEG化”是指将聚乙二醇(PEG)分子共价偶联到例如肽、多肽、蛋白质、抗体等的另一分子的方法,其然后被称为“PEG化的”。作为非限制性实例,整合素-结合肽可以在氨基末端和羧基末端用具有确定链长的单分散PEG分子聚乙二醇化,以产生本发明的双末端PEG化的肽偶联物。单分散PEG分子通常包含具有确切数目的重复乙二醇单元的离散分子量。适合用于本发明的PEG部分可从Polypure AS公司(奥斯陆,挪威)商购获得,其提供单分散PEG分子及其由基本上仅一种低聚物(例如大于约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%寡聚体纯度)组成的PEG衍生物。在具体实施方案中,整合素-结合肽在两端用单一类型的或不同类型的单分散PEG部分的混合物聚乙二醇化,所述PEG部分的分子量小于约3000道尔顿(Da),例如PEG₁₁、PEG₁₂(PEG800)、PEG₂₈(PEG1500)和/或(PEG₂₈)₂(PEG1500X₂)。

[0077] “肽模拟物”是指具有与现有肽的一般结构不同的结构,但是以类似于现有肽的方式起作用的化合物,例如通过模拟该肽的生物活性。肽模拟物通常包含天然存在的氨基酸和/或非天然氨基酸,但也可包含对肽主链的修饰。与现有肽相比,肽模拟物可以表现出增加的亲和力、特异性和/或稳定性。

[0078] 术语“氨基酸”包括天然存在的 α -氨基酸及其立体异构体,以及非天然氨基酸及其立体异构体。氨基酸的“立体异构体”是指氨基酸的镜像异构体,例如L-氨基酸或D-氨基酸。例如,天然存在的氨基酸的立体异构体是指天然存在的氨基酸的镜像异构体,即D-氨基酸。

[0079] 天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的那些,以及随后被修饰的那些,例如 γ -羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸。天然存在的 α -氨基酸包括但不限于:丙氨酸(Ala)、半胱氨酸(Cys)、天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)、苯丙氨酸(Phe)、甘氨酸(Gly)、组氨酸(His)、异亮氨酸(Ile)、精氨酸(Arg)、赖氨酸(Lys)、亮氨酸(Leu)、甲硫氨酸(Met)、天冬酰胺(Asn)、脯氨酸(Pro)、谷氨酰胺(Gln)、丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)、缬氨酸(Val)、色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)、及其组合。天然存在的 α -氨基酸的立体异构体包括但不限于:D-丙氨酸(D-Ala)、D-半胱氨酸(D-Cys)、D-天冬氨酸(D-Asp)、D-谷氨酸(Glu)、D-苯丙氨酸(D-Phe)、D-组氨酸(D-His)、D-异亮氨酸(D-Ile)、D-精氨酸(D-Arg)、D-赖氨酸(D-Lys)、D-亮氨酸(D-Leu)、D-甲硫氨酸(D-Met)、D-天冬酰胺(D-Asn)、D-脯氨酸(D-Pro)、D-谷氨酰胺(D-Gln)、D-丝氨酸(D-Ser)、D-苏氨酸(D-Thr)、D-缬氨酸(D-Val)、D-色氨酸(D-Trp)、D-酪氨酸(D-Tyr)、及其组合。

[0080] 非天然氨基酸包括但不限于:L-构型或D-构型的氨基酸类似物、氨基酸模拟物、合

成氨基酸、N-取代甘氨酸和N-甲基氨基酸,其以类似于天然存在的氨基酸的方式起作用。例如,“氨基酸类似物”是具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构的非天然氨基酸,即与氢、羧基、氨基结合但具有修饰的R(即,侧链)基团的 α 碳。

[0081] 非天然氨基酸的非限制性实例包括:1-氨基环戊烷-1-羧酸(Acp)、1-氨基环丁烷-1-羧酸(Acb)、1-氨基环丙烷-1-羧酸(Acpc)、瓜氨酸(Cit)、高瓜氨酸(HoCit)、 α -氨基己二酸(Aad)、3-(4-吡啶基)丙氨酸(4-Pal)、3-(3-吡啶基)丙氨酸(3-Pal)、炔丙基甘氨酸(Pra)、 α -氨基异丁酸(Aib)、 α -氨基丁酸(Abu)、正缬氨酸(Nva)、 α,β -二氨基丙酸(Dpr)、 α,γ -二氨基丁酸(Dbu)、 α -叔丁基甘氨酸(Bug)、3,5-二硝基酪氨酸(Tyr(3,5-二NO₂))、正亮氨酸(Nle)、3-(2-萘基)丙氨酸(Nal-2)、3-(1-萘基)丙氨酸(Nal-1)、环己基丙氨酸(Cha)、二正丙基甘氨酸(Dpg)、环丙基丙氨酸(Cpa)、高亮氨酸(Hle)、高丝氨酸(HoSer)、高精氨酸(Har)、高半胱氨酸(Hcy)、甲硫氨酸亚砷(Me(O))、甲硫氨酸甲砷盐(Me(S-Me))、 α -环己基甘氨酸(Chg)、3-苯并噻吩丙氨酸(Bta)、牛磺酸(Tau)、羟脯氨酸(Hyp)、O-苄基羟脯氨酸(Hyp(Bzl))、高脯氨酸(HoPro)、 β -高脯氨酸(β HoPro)、噻唑烷-4-羧酸(Thz)、哌啶酸(Nip)、异哌啶酸(IsoNip)、3-羧甲基-1-苯基-1,3,8-三氮杂螺[4,5]癸-4-酮(Cptd)、四氢-异喹啉-3-羧酸(3-Tic)、5H-噻唑并[3,2-a]吡啶-3-羧酸(Btd)、3-氨基苯甲酸(3-Abz)、3-(2-噻吩基)丙氨酸(2-Thi)、3-(3-噻吩基)丙氨酸(3-Thi)、 α -氨基辛二酸(Asu)、二乙基甘氨酸(Deg)、4-氨基-4-羧基-1,1-二氧化-四氢噻喃(Acdt)、1-氨基-1-(4-羟基环己基)羧酸(Ahch)、1-氨基-1-(4-酮基环己基)羧酸(Akch)、4-氨基-4-羧基四氢吡喃(Actp)、3-硝基酪氨酸(Tyr(3-NO₂))、1-氨基-1-环己烷羧酸(Ach)、1-氨基-1-(3-哌啶基)-羧酸(3-Apc)、1-氨基-1-(4-哌啶基)羧酸(4-Apc)、2-氨基-3-(4-哌啶基)丙酸(4-App)、2-氨基茛满-2-羧酸(Aic)、2-氨基-2-萘基乙酸(Ana)、(2S,5R)-5-苯基吡咯烷-2-羧酸(Ppca)、4-噻唑基丙氨酸(Tha)、2-氨基辛酸(Aoa)、2-氨基庚酸(Aha)、鸟氨酸(Orn)、氮杂环丁烷-2-羧酸(Aca)、 α -氨基-3-氯-4,5-二氢-5-异唑乙酸(Acdi)、噻唑烷-2-羧酸(Thz(2-COOH))、烯丙基甘氨酸(Agl)、4-氰基-2-氨基丁酸(Cab)、2-吡啶基丙氨酸(2-Pal)、2-喹啉基丙氨酸(2-Qal)、环丁基丙氨酸(Cba)、苯丙氨酸类似物、赖氨酸衍生物、鸟氨酸(Orn)和 α,γ -二氨基丁酸(Dbu),其立体异构体,及其组合物(参见,例如Liu等人,Anal.Biochem.,295:9-16(2001))。因此,非天然 α -氨基酸以非天然的L- α -氨基酸、非天然的D- α -氨基酸、或其组合存在。

[0082] “氨基酸模拟物”是具有与氨基酸的一般化学结构不同的结构,但以与天然存在的氨基酸类似的方式起作用的化合物。合适的氨基酸模拟物包括但不限于: β -氨基酸和 γ -氨基酸。在 β -氨基酸中,氨基键合到羧基的 β -碳原子上,使得在氨基和羧基之间有两个碳原子。在 γ -氨基酸中,氨基键合到羧基的 γ -碳原子上,使得在氨基和羧基之间有三个碳原子。用于 β -或 γ -氨基酸的合适R基团包括但不限于:存在于天然存在的氨基酸和非天然氨基酸中的侧链。

[0083] “N-取代甘氨酸”是基于甘氨酸的非天然氨基酸,其中氨基酸侧链连接到甘氨酸氮原子。合适的氨基酸侧链(例如R基团)包括但不限于:存在于天然存在的氨基酸中的侧链和存在于非天然氨基酸(例如氨基酸类似物)中的侧链。N-取代甘氨酸的非限制性实例包括:N-(2-氨基乙基)甘氨酸、N-(3-氨基丙基)甘氨酸、N-(2-甲氧基乙基)甘氨酸、N-苄基甘氨酸、(S)-N-(1-苯基乙基)甘氨酸、N-环己基甲基甘氨酸、N-(2-苯基乙基)甘氨酸、N-(3-苯基丙基)甘氨酸、N-(6-氨基半乳糖基)甘氨酸、N-(2-(3'-吡啶基乙基))甘氨酸、N-(2-(对-甲

氧基苯乙基))甘氨酸、N-(2-(对-氯苯基乙基)甘氨酸和N-[2-(对-羟基苯乙基)]甘氨酸。N-取代甘氨酸低聚物(本文中被称为“类肽”),已被证明是耐受蛋白酶的(参见,例如Miller等人,Drug Dev.Res.,35:20-32(1995))。

[0084] 在本文中氨基酸,可以通过其通常已知的由IUPAC-IUB生物化学命名委员会推荐的三字符或单字符来表示。例如,在本文中L-氨基酸可以通过其通常已知的三字符(例如,Arg表示L-精氨酸)或通过大写的单字母氨基酸符号(例如,R表示L-精氨酸)表示。在本文中,D-氨基酸可以通过其通常已知的三字符(例如,D-精氨酸用D-Arg表示)或小写的单字母氨基酸符号(例如,D-精氨酸用r表示)表示。

[0085] 关于氨基酸序列,本领域技术人员将认识到肽、多肽或蛋白质序列中取代,添加或缺失单个氨基酸,即在编码序列中改变、添加或删除单个氨基酸或低百分比的氨基酸,是“保守修饰的变体”,其中所述改变导致氨基酸被化学上类似的氨基酸取代。化学上类似的氨基酸包括但不限于:天然存在的氨基酸例如L-氨基酸,天然存在的氨基酸的立体异构体例如D-氨基酸,和非天然氨基酸例如氨基酸类似物、氨基酸模拟物、合成氨基酸、N-取代甘氨酸和N-甲基氨基酸。

[0086] 具有功能相似的氨基酸的保守取代表是本领域公知的。例如,一个脂族氨基酸(例如G、A、I、L或V)可以被该组中的另一个成员取代。类似地,一个脂族极性不带电基团,例如C、S、T、M、N或Q,可以被该组的另一个成员取代;以及碱性残基,例如K、R或H,可以彼此取代。在一些实施方案中,具有酸性侧链的氨基酸,例如E或D,可以被其不带电荷的对应物,例如Q或N,分别取代;相反亦然。以下八个组中的每一组包含其他示例性氨基酸,它们彼此是保守取代:

[0087] 1) 丙氨酸(A),甘氨酸(G);

[0088] 2) 天冬氨酸(D),谷氨酸(E);

[0089] 3) 天冬酰胺(N),谷氨酰胺(Q);

[0090] 4) 精氨酸(R),赖氨酸(K);

[0091] 5) 异亮氨酸(I),亮氨酸(L),甲硫氨酸(M),缬氨酸(V);

[0092] 6) 苯丙氨酸(F),酪氨酸(Y),色氨酸(W);

[0093] 7) 丝氨酸(S),苏氨酸(T);和

[0094] 8) 半胱氨酸(C),甲硫氨酸(M)

[0095] (参见,例如,克赖顿,《蛋白质》(Proteins),1993)。

[0096] 术语“肽”是指一化合物,它由D-或L-氨基酸或D-和L-氨基酸混合氨基酸通过肽键连接的单链组成。通常,肽的长度为约2至约50个氨基酸。作为非限制性实例,存在于本文所述的偶联物中的整合素-结合肽长度为约5至约45个氨基酸,约8至约45个氨基酸,约8至约25个氨基酸,约8至约20个氨基酸,约12至约45个氨基酸,约12至约30个氨基酸,约8个氨基酸或约20个氨基酸。

[0097] “环肽”是指其中肽的氨基末端或具有游离氨基的肽(例如赖氨酸)上的侧链通过肽键与肽的羧基末端或具有游离羧基的肽(例如天冬氨酸、谷氨酸)上的侧链连接的肽。然而,本领域技术人员将理解,由二硫键、酯键或醚键形成的杂环肽也在本发明的范围内。

[0098] 术语“促进螺旋的残基”包括在 α -螺旋中间发现的构象偏好大于1.0的氨基酸(参见,例如,克赖顿,《蛋白质》(Proteins),1993;和Pace等人,Biophysical J.,75:422-427

(1998))。然而,非传统的促进螺旋的氨基酸组合也在本发明的范围内,如果它们增强结合靶整合素(例如 $\alpha_v\beta_6$ 整合素)的特异性和/或亲和力。

[0099] 术语“治疗有效量”是指能够在有需要的受试者中实现治疗效果的本发明的偶联物或组合物的量。例如,本发明的偶联物或组合物的治疗有效量可以是能够预防或减轻与疾病或病变相关的一种或多种症状的量。本领域技术人员将理解,本发明的偶联物和组合物可以与其它治疗剂,如抗癌剂、抗炎剂、免疫抑制剂、抗病毒剂、抗生素和/或抗真菌剂共同施用。

[0100] 如本文所用,术语“施用”包括给受试者口服施用,局部接触,作为栓剂施用,静脉内、腹膜内、肌内、损害内、鞘内、鼻内或皮下施用,或植入缓释装置,例如,微型渗透泵。施用可通过任何途径,包括肠胃外和经粘膜(例如颊、舌下、腭、龈、鼻、阴道、直肠或经皮)。肠胃外施用包括,例如静脉内、肌内、小动脉内、皮内、皮下、腹膜内、心室内和颅内。其它递送模式包括但不限于:使用脂质体制剂、静脉输注、透皮贴剂等。本领域技术人员将知道,施用治疗有效量的本发明偶联物或组合物以用于预防或缓解与疾病或病变(例如癌症或炎性或自身免疫疾病)相关的一种或多种症状的其它方法。“共同施用”是指本发明的偶联物或组合物在施用第二药物(例如抗癌剂、抗炎剂、免疫抑制剂、抗病毒剂、抗生素、抗真菌剂等)的同时施用,之前或之后立即施用。

[0101] 术语“放射性核素”旨在包括任何显示放射性的核素。“核素”是指由其原子数、原子质量和能量状态指定的原子类型,例如碳14(^{14}C)。“放射性”是指放射性物质发射的辐射,包括 α 粒子、 β 粒子、核子、电子、正电子、中微子和 γ 射线。适用于本发明的放射性核素的实例包括但不限于:氟18(^{18}F)、氟19(^{19}F)、磷32(^{32}P)、钪47(^{47}Sc)、钴55(^{55}Co)、铜60(^{60}Cu)、铜61(^{61}Cu)、铜62(^{62}Cu)、铜64(^{64}Cu)、镓66(^{66}Ga)、铜67(^{67}Cu)、镓67(^{67}Ga)、镓68(^{68}Ga)、铷82(^{82}Rb)、钇86(^{86}Y)、钇87(^{87}Y)、锶89(^{89}Sr)、钇90(^{90}Y)、铑105(^{105}Rh)、银111(^{111}Ag)、铟111(^{111}In)、碘124(^{124}I)、碘125(^{125}I)、碘131(^{131}I)、锡117m($^{117\text{m}}\text{Sn}$)、锝99m($^{99\text{m}}\text{Tc}$)、钷149(^{149}Pm)、钐153(^{153}Sm)、钬166(^{166}Ho)、镱177(^{177}Lu)、铼186(^{186}Re)、铼188(^{188}Re)、铊201(^{201}Tl)、砷211(^{211}At)和铋212(^{212}Bi)。如本文所用, $^{117\text{m}}\text{Sn}$ 和 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 中的“m”代表间位状态。另外,天然存在的放射性元素例如铀、镭和钍,其通常代表放射性同位素的混合物,是放射性核素的合适实例。 ^{67}Cu 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 和 ^{186}Re 是 β -和 γ -发射放射性核素。 ^{212}Bi 是 α -和 β -发射放射性核素。 ^{211}At 是 α -发射放射性核素。 ^{32}P 、 ^{47}Sc 、 ^{89}Sr 、 ^{90}Y 、 ^{105}Rh 、 ^{111}Ag 、 $^{117\text{m}}\text{Sn}$ 、 ^{149}Pm 、 ^{153}Sm 、 ^{166}Ho 和 ^{188}Re 是 β -发射放射性核素的实例。 ^{67}Ga 、 ^{111}In 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 和 ^{201}Tl 是 γ -发射放射性核素的实例。 ^{55}Co 、 ^{60}Cu 、 ^{61}Cu 、 ^{62}Cu 、 ^{66}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{82}Rb 和 ^{86}Y 是正电子-发射放射性核素的实例。 ^{64}Cu 是 β -和正电子-发射放射性核素。

[0102] 术语“受试者”或“患者”通常是指人,但也可包括其它动物,例如其它灵长类动物、啮齿动物、犬、猫、马、绵羊、猪等。

[0103] III. 具体实施方式

[0104] 本发明提供了靶向整合素例如 $\alpha_v\beta_6$ 整合素的双末端PEG化肽偶联物。在具体实施方案中,本发明的肽偶联物还包含生物试剂,例如成像剂或治疗剂,例如共价连接至PEG部分之一。本发明的肽偶联物特别适用于成像肿瘤、器官或组织,并用于治疗整合素-介导的疾病和病症,例如癌症、炎性疾病、自身免疫疾病、慢性纤维化、慢性阻塞性肺病(COPD)、肺气肿和慢性创伤性皮肤病。包含本发明的肽偶联物的组合物和试剂盒可用于广泛的应用,包

括例如体内成像和免疫治疗。

[0105] 在一方面,本发明提供了一种偶联物,其包含:

[0106] (a) 结合整合素的肽;

[0107] (b) 共价连接到所述肽的氨基末端的第一聚乙二醇(PEG)部分;和

[0108] (c) 共价连接到所述肽的羧基末端的第二PEG部分。

[0109] 在一些实施方案中,肽包含选自下组的氨基酸序列:RGD,LDV和GFOGER,其中O是羟脯氨酸。在其他实施方案中,整合素是 $\alpha_v\beta_3$ 整合素、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 整合素或 $\alpha_v\beta_6$ 整合素。在优选的实施方案中,整合素是 $\alpha_v\beta_6$ 整合素。

[0110] 在某些实施方案中, $\alpha_v\beta_6$ 整合素-结合肽包含氨基酸序列RGDLX₁X₂X₃,其中X₁和X₂是独立选择的氨基酸,X₃是L或I。在一些实施例中,X₁和X₂独立地选自下组:Glu、Ala、Leu、Met、Gln、Lys、Arg、Val、Ile、His、Thr、Trp、Phe和Asp。在某些实施方案中,X₁为Q,X₂为V,且X₃为L。在具体实施方案中,肽包含氨基酸序列RGDLX₁X₂X₃AQX₆,其中X₆为K或R。在一些实施例中,X₆为R。在优选的实施方案中, $\alpha_v\beta_6$ 整合素-结合肽包含选自NAVPNLRGDLQVLAQKVART (A20FMDV2)和NAVPNLRGDLQVLAQRVART (A20FMDV2K16R)的氨基酸序列或由其组成。

[0111] 在其它实施方案中, $\alpha_v\beta_6$ 整合素-结合肽包含氨基酸序列RSDLTPLFX₇,其中X₇不存在或为任何氨基酸。在某些实施例中,X₇不存在(即,肽包含氨基酸序列RSDLTPLF或由氨基酸序列RSDLTPLF组成)。在某些其他实施例中,X₇是K(即,肽包含氨基酸序列RSDLTPLFK或由氨基酸序列RSDLTPLFK组成)。

[0112] 在其它实施方案中,所述肽结合于整合素以及与整合素共表达的受体。在某些实施例中,与整合素共表达的受体是C-X-C趋化因子受体4型(CXCR4)。在特定实施例中,肽结合 $\alpha_v\beta_6$ 整合素和CXCR4。在某些其它实施例中,与整合素共表达的受体是另一种整合素,例如与 $\alpha_v\beta_5$ 整合素共表达的 $\alpha_v\beta_3$ 整合素。在特定实施例中,肽结合于 $\alpha_v\beta_3$ 整合素和 $\alpha_v\beta_5$ 整合素。在另外的实施方案中,肽长度为约8至约45个氨基酸。在某些实施例中,肽长度为20个氨基酸。

[0113] 在一些实施方案中,第一PEG部分和第二PEG部分各自具有小于约5000道尔顿(Da)的分子量。在具体实施方案中,第一PEG部分和第二PEG部分各自具有小于约3000道尔顿(Da)的分子量。在优选的实施方案中,第一PEG部分和第二PEG部分是具有确定链长的单分散PEG部分。具有确定链长度的PEG部分通常包括具有不同分子量的PEG分子,其具有精确限定数目的重复乙二醇单元。具有确定链长的PEG部分的非限制性实例包括:具有大于约90%、91%、92%、93%、94%或95%寡聚体纯度的小的单分散PEG分子。在具体实施方案中,具有平均分子量的PEG化合物的混合物不用于本发明的偶联物中。

[0114] 在某些实施例中,第一PEG部分和第二PEG部分独立地选自下组:PEG₁₁,PEG₁₂(PEG800)、PEG₂₈(PEG1500)和(PEG₂₈)₂(PEG1500x2)。在具体实施方案中,第一PEG部分和第二PEG部分是相同的。在优选的实施方案中,第一PEG部分和第二PEG部分都是PEG₂₈(PEG1500)。适合用作本发明的偶联物中的第一和/或第二PEG部分的PEG单元的其它非限制性实例包括:PEG 200、PEG 300、PEG400、PEG 500、PEG 600、PEG 700、PEG 900、PEG 1000、PEG 1100、PEG 1200、PEG 1300、PEG 1400、PEG 1600、PEG 1700、PEG 1800、PEG 1900、PEG 2000、PEG 2100、PEG 2200、PEG 2300、PEG 2400、PEG 2500、PEG 2600、PEG 2700、PEG 2800、PEG 2900、PEG 3000、PEG 3250、PEG 3350、PEG 3500、PEG 3750、PEG 4000、PEG 4250、PEG 4500、PEG 4750和PEG 5000,以及其衍生物,如支链化的PEG衍生物。在优选的实施方案中,这些

PEG分子含有精确限定数量的重复单元“n”，并且是单分散的（例如，具有大于约95%的低聚物纯度）。适用于本发明的PEG部分可从EMD化学品有限公司（圣地亚哥，加利福尼亚）和Polypure AS公司（奥斯陆，挪威）商购获得。

[0115] 在某些实施方案中，偶联物还包含与所述肽、第一PEG部分和/或第二PEG部分共价连接的成像剂或治疗剂。在具体实施方案中，成像剂或治疗剂共价连接到第一PEG部分。在某些实施例中，成像剂或治疗剂作为偶联物中最N-末端的部分共价连接。

[0116] 在一些实施方案中，成像剂选自下组：放射性核素、生物素、荧光团、荧光蛋白、抗体、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶及其组合。在某些实施方案中，放射性核素选自下组： ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{18}F 、 ^{19}F 、 ^{61}Cu 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{68}Ga 、 ^{111}In 、 ^{124}I 、 ^{125}I 和 ^{131}I 。在某些实施例中，放射性核素通过辅基连接到所述肽、第一PEG部分或第二PEG部分。在具体实施方案中，放射性核素通过辅基连接到第一PEG部分。在其他实施方案中，放射性核素通过辅基作为偶联物中最N-末端的部分连接。辅基的非限制性实例包括：苯甲酰基（例如，氟苯甲酸（FBA）），氟丙酸（FPA），吡啶（Py），联吡啶基四嗪（Tz），反式环辛烯（TCO），或其衍生物，及其组合物。在优选的实施方案中，放射性核素是通过苯甲酰基（例如FBA）与第一PEG部分共价连接的 ^{18}F 或 ^{19}F 。例如，4- ^{18}F -氟苯甲酸（ ^{18}F -FBA）或4- ^{19}F -氟苯甲酸（ ^{19}F -FBA）可用于放射性标记本发明的肽偶联物。

[0117] 在一些实施方案中，治疗剂选自下组：放射性核素、促凋亡肽、纳米颗粒、化疗剂、纳米滴、脂质体药物、细胞因子、及其组合。在某些实施方案中，治疗剂是选自 ^{90}Y 和 ^{177}Lu 的放射性核素。在某些实施例中，放射性核素通过螯合剂连接到所述肽、第一PEG部分或第二PEG部分。在具体的实施方案中，放射性核素通过螯合剂连接到第一PEG部分。在其他实施方案中，放射性核素通过螯合剂作为偶联物中最N-末端的部分连接。螯合剂的非限制性实例包括：大环金属螯合剂，例如DOTA（1,4,7,10-四氮杂环十二烷-N,N',N'',N'''-四乙酸），NOTA（1,4,7-三氮杂环壬烷-N,N',N''-三乙酸），DTPA（二亚乙基三胺五乙酸酐），TETA（1,4,8,11-四氮杂环十四烷-N,N',N'',N'''-四乙酸）和DTTA（N-（对异硫氰酸苄基）-二亚乙基三胺-N,N',N'',N'''-四乙酸）。

[0118] 在其它实施方案中，治疗剂是包含氨基酸序列 $_{\text{p}}$ （KLAKLAK） $_2$ 的促凋亡肽。在某些实施例中，促凋亡肽通过甘氨酸接头连接到所述肽、第一PEG部分或第二PEG部分。在具体实施方案中，促凋亡肽通过甘氨酸接头连接到第一PEG部分。甘氨酸接头的非限制性实例包括：单个甘氨酸残基或至少约2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或20个连续的甘氨酸残基或被其他氨基酸残基分隔的甘氨酸残基。在优选的实施方案中，甘氨酸接头是甘氨酸（glyciny）甘氨酸接头。本领域技术人员将知道适于将促凋亡肽连接到本发明的肽偶联物的其它接头，例如，不显著干扰每个单独组分的靶向性质和功能的其他接头。

[0119] 在其它实施方案中，治疗剂是包含末端树枝状聚合物支架或其它基于胶束的纳米载体系统的纳米颗粒。在具体的实施方案中，所述末端树枝状聚合物支架是PEG $^{5\text{K}}$ CA $_8$ 。适用于本发明的末端树枝状聚合物描述于美国专利公开号20130164369中，其公开内容出于所有目的通过引用整体并入本文。在某些实施例中，纳米颗粒负载有化疗剂。化疗剂的非限制性实例包括：紫杉醇（PTX）和本文所述的其它细胞毒性化疗剂。

[0120] 在某些实施方案中，偶联物还包含与所述肽、第一PEG部分或第二PEG部分共价连接的白蛋白结合基序。在具体实施方案中，白蛋白结合基序是4-（4-碘苯基）丁酸（IPA）或其

具有较短烷基链的同系物,例如4-(4-碘苯基)丙酸或4-(4-碘苯基)乙酸。在其它实施方案中,白蛋白结合基序是4-(4-甲基苯基)丁酸或4-(4-溴苯基)丁酸或其具有较短烷基链的同系物,例如,其丙酸或乙酸同系物。在具体实施方案中,白蛋白结合基序共价连接到第一和/或第二PEG部分。在某些实施例中,白蛋白结合基序通过接头,例如谷氨酸(E)接头或本领域技术人员已知的其它合适接头(例如氨基酸或肽接头)与第一和/或第二PEG部分共价连接。在某些实施方案中,白蛋白结合基序是 ϵ -(4-(4-碘苯基)丁基酰胺)赖氨酸-谷氨酸(“K(IPA)E”),其对应于这样的IPA,其中所述IPA共价连接到赖氨酸-谷氨酸肽接头的赖氨酸残基的侧链。在一些实施方案中,K(IPA)E白蛋白结合基序共价连接到第一PEG部分。在其它实施方案中,成像剂或治疗剂与共价连接到第一PEG部分的白蛋白结合基序共价连接(例如,通过辅基、螯合剂或接头),使得成像剂或治疗剂是偶联物中最N-末端的部分。

[0121] 在另一方面,本发明提供了一种组合物,其包含本文所述的双末端PEG化的肽偶联物的一个(或一种)或多个(或多种)(例如,至少约2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30或更多个本发明的肽偶联物,这些肽偶联物的不同之处可在于例如它们的整合素-结合肽序列、第一和/或第二PEG部分、成像剂和/或治疗剂、或其组合)。在具体的实施方案中,多个偶联物(即,多个偶联物的每一个中的第一和第二PEG部分)包含具有限定链长(例如大于约90%、91%、92%、93%、94%或95%寡聚体纯度)的单分散PEG部分。在某些实施例中,多个偶联物的每一个中的第一PEG部分和第二PEG部分独立地选自下组:PEG₁₁、PEG₁₂(PEG800)、PEG₂₈(PEG1500)和(PEG₂₈)₂(PEG1500x2)。在具体实施方案中,多个偶联物的每一个中的第一PEG部分和第二PEG部分是相同的。在优选的实施方案中,多个偶联物的每一个中的第一PEG部分和第二PEG部分都是PEG₂₈(PEG 1500)。

[0122] 在一些实施方案中,本发明提供了多聚肽偶联物,其中多个偶联物彼此连接。在具体实施方案中,多聚体偶联物是多个偶联物的二聚体或四聚体。在某些实施方案中,多聚肽偶联物通过每个偶联物的第二PEG部分之间的连接而形成。在一些实施例中,偶联物通过至少一个赖氨酸残基(例如,至少1、2、3、4、5或多个赖氨酸(K)残基)在第二PEG部分彼此连接。在其它实施例中,一个或多个赖氨酸残基包含成像剂或治疗剂,例如与其连接的放射性核素(例如,用作放射性标记)。在其它实施方案中,所述组合物还包含药物载体或赋形剂。

[0123] 在另一方面,本发明提供了用于成像或治疗的试剂盒,所述试剂盒包括:

[0124] (a) 本文所述的双末端PEG化肽偶联物或其组合物(例如,多个偶联物或多聚体偶联物);和

[0125] (b) 偶联物或组合物在成像或治疗中的使用说明。

[0126] 在另一方面,本发明提供了用于靶组织的体内成像的方法,所述方法包括:

[0127] (a) 向需要这种成像的受试者施用本文所述的双末端聚乙二醇化肽偶联物或其组合物(例如,多个偶联物或多聚体偶联物),其中成像剂共价连接至所述肽、所述第一PEG部分或第二PEG部分;和

[0128] (b) 检测偶联物以确定偶联物在受试者中何处集中。

[0129] 在一些实施方案中,靶组织是癌性组织或器官。癌性组织的非限制性实例包括:与胰腺癌、乳腺癌、结肠直肠癌、前列腺癌、子宫颈癌和口腔鳞状细胞癌相关的癌性组织或肿瘤。在优选的实施方案中,施用肽偶联物用于成像肿瘤,例如胰腺肿瘤。适合于根据本发明成像的胰腺肿瘤的实例包括但不限于:腺癌、浆液性囊腺瘤、腺泡细胞癌、胰腺神经内分泌

肿瘤(例如胰岛素瘤)等。

[0130] 在某些实施例中,成像剂包括放射性核素(例如,与如苯甲酰基的辅基或螯合剂结合)、生物素、荧光团、荧光蛋白、辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶。在成像剂包含放射性核素的情况下,当来自放射性核素的辐射用于确定肽偶联物在受试者中何处聚集时,就进行了检测。在成像剂包含荧光团或荧光蛋白的情况下,当来自荧光团或荧光蛋白的荧光用于确定肽偶联物在受试者中何处聚集时,就进行了检测。

[0131] 在其它实施方案中,通过磁共振成像(MRI)、磁共振光谱(MRS)、单光子发射计算机断层扫描(SPECT)、正电子发射断层扫描(PET)或光学成像,检测肽偶联物。在其它实施方案中,检测偶联物以用于由整合素介导的疾病或病变的诊断或预后。在某些实施方案中,疾病或病变与整合素的表达、过表达和/或活化相关。在优选的实施方案中,疾病或病变是 $\alpha_v\beta_6$ 整合素-介导的疾病或病变,例如,检测肽偶联物用于 $\alpha_v\beta_6$ -介导的疾病或病变的诊断或预后。

[0132] 在一个相关方面,本发明提供了在有需要的受试者中治疗整合素-介导的疾病或病变的方法,所述方法包括:

[0133] 向受试者施用治疗有效量的本文所述的双末端PEG化肽偶联物或其组合物(例如,多个偶联物或多聚体偶联物),其中治疗剂共价连接至所述肽、第一PEG部分或第二PEG部分。

[0134] 在某些实施方案中,所述疾病或病变与整合素的表达、过表达和/或活化相关。整合素-介导的疾病或病变的非限制性实例包括:癌症、炎性疾病、自身免疫疾病、慢性纤维化、慢性阻塞性肺病(COPD)、肺气肿和慢性创伤性皮肤病。在具体实施方案中,所述疾病或病变是 $\alpha_v\beta_6$ 整合素-介导的疾病或病变。在一些实施例中, $\alpha_v\beta_6$ 整合素-介导的疾病或病变是胰腺癌、乳腺癌、结肠直肠癌、前列腺癌、子宫颈癌或口腔鳞状细胞癌。在其它实施方案中,偶联物或组合物的治疗有效量是足以在受试者中实现治疗益处的量。在其它实施方案中,偶联物或组合物的治疗有效量是足以将治疗剂靶向递送至表达整合素的细胞的量。

[0135] 在另一方面,本发明提供了用于在受试者体内成像表达或过表达感兴趣的整合素(例如 $\alpha_v\beta_6$ 整合素)的上皮细胞的方法,所述方法包括:向受试者施用治疗有效量的本发明所述的肽偶联物或组合物。该方法特别适用于慢性纤维化、慢性阻塞性肺病(COPD)、肺气肿、慢性创伤性皮肤病(例如大疱性表皮松解症)或上皮肿瘤细胞的成像。例如,成像 $\alpha_v\beta_6$ -过表达上皮细胞的方法可以包括将偶联物的肽或PEG组分之一与荧光探针连接,并将所得肽偶联物掺入合适的剂型中;这样,一旦施用, $\alpha_v\beta_6$ 整合素-结合偶联物就可以通过其荧光标签被观察到。

[0136] 在另一方面,本发明提供了用于在受试者中将治疗剂递送至表达或过表达感兴趣的整合素(例如, $\alpha_v\beta_6$ 整合素)的细胞或至包含表达或过表达感兴趣的整合素(例如, $\alpha_v\beta_6$ 整合素)的细胞的肿瘤、器官或组织的方法,所述方法包括:向受试者施用如本文所述的肽偶联物或包含所述治疗剂组合物。

[0137] A. 整合素-结合肽

[0138] 在某些方面,本发明提供双末端PEG化的结合整合素的肽偶联物。整合素是细胞粘附受体的超级家族,其结合细胞外基质配体、细胞表面配体和可溶性配体。整合素是跨膜 $\alpha\beta$ 异二聚体,并且在人类中至少已知18种 α 和8种 β 亚基,产生24种异二聚体。 α 和 β 亚基具有不同的结构域结构,来自每个亚基的胞外结构域对异二聚体的配体结合位点有贡献。整合素

的非限制性实例包括： $\alpha_1\beta_1$ 、 $\alpha_2\beta_1$ 、 $\alpha_3\beta_1$ 、 $\alpha_4\beta_1$ 、 $\alpha_5\beta_1$ 、 $\alpha_6\beta_1$ 、 $\alpha_7\beta_1$ 、 $\alpha_8\beta_1$ 、 $\alpha_9\beta_1$ 、 $\alpha_{10}\beta_1$ 、 $\alpha_{11}\beta_1$ 、 $\alpha_v\beta_1$ 、 $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_v\beta_5$ 、 $\alpha_v\beta_6$ 、 $\alpha_v\beta_8$ 、 $\alpha_{IIB}\beta_3$ 、 $\alpha_4\beta_7$ 、 $\alpha_E\beta_7$ 、 $\alpha_6\beta_4$ 、 $\alpha_L\beta_2$ 、 $\alpha_M\beta_2$ 、 $\alpha_X\beta_2$ 、 $\alpha_D\beta_2$ 、及其组合。在一些实施方案中，整合素是 $\alpha_v\beta_3$ 整合素、 $\alpha_{IIB}\beta_3$ 整合素或 $\alpha_v\beta_6$ 整合素。在其它实施方案中，整合素-结合肽包含选自RGD、LDV和GFOGER的氨基酸序列，其中O是羟脯氨酸。

[0139] 在具体的实施方案中，肽结合（例如靶向）于 $\alpha_v\beta_6$ 整合素。在某些实施例中， $\alpha_v\beta_6$ 整合素-结合肽包含氨基酸序列RGDLX₁X₂X₃，其中X₁和X₂是独立选择的氨基酸，X₃是Leu (L) 或Ile (I)。在某些实施例中，X₁是Q，X₂是V，且X₃是L。除非另有说明，本文的氨基酸位置从肽的氨基末端向羧基末端编号。

[0140] 在一些实施方案中，残基LX₁X₂X₃存在于 α -螺旋内。 α -螺旋被理解为肽中一组连续的氨基酸，其以特定的氢键模式相互作用并因此限定螺旋结构。例如，标准 α -螺旋中的氢键模式是在残基n的羰基氧和残基n+4的酰胺氢之间。对于 3_{10} -螺旋，该氢键模式是在残基n和n+3之间。对于 π -螺旋，该氢键模式是在残基n和n+5之间。对于标准 α -螺旋、 3_{10} -螺旋和 π -螺旋，每种 α -螺旋中每个转角（per turn）的残基数分别为3.6、3.0和4.4。在一实施方案中，肽的 α -螺旋使得残基LX₁X₂L/I的疏水侧链从螺旋的一侧突出。在另一实施方案中， α -螺旋具有至少一个转角。可用于本发明的 α -螺旋可以是 α -螺旋模拟物，例如如PCT公开号W095/00534中所述。 α -螺旋模拟物是 α -螺旋结构物，它能够稳定天然存在的或合成的肽的结构。

[0141] 用于本发明的偶联物中的 $\alpha_v\beta_6$ 整合素-结合肽，可以包含标准螺旋、 3_{10} -螺旋、 π -螺旋、或其任何组合。例如，螺旋可以包含形成“帽”结构的氨基酸，例如侧接螺旋的氨基末端帽和/或羧基末端帽。

[0142] 在其它实施方案中， $\alpha_v\beta_6$ 整合素-结合肽包含序列RGDLX₁X₂LX₄X₅X₆，其中X₁、X₂、X₄、X₅和X₆是独立选择的氨基酸。在某些实施例中，X₁、X₂、X₄、X₅和X₆是促进螺旋的残基。例如，促进螺旋的残基可以独立地选自下组：Glu、Ala、Leu、Met、Gln、Lys、Arg、Val、Ile、His、Thr、Trp、Phe和Asp。螺旋促进残基可以包含天然存在的氨基酸或非天然氨基酸，例如人工或修饰的氨基酸。在一些实施方案中，肽包含序列RGDLX₁X₂LX₄X₅X₆Z_n，其中Z是促进螺旋的残基，n是1和20之间的任意数。优选地，n在5和15之间或在8和12之间。螺旋的延伸包括Z位置中的螺旋残基，可以进一步增加螺旋偶极并提供增强的与 $\alpha_v\beta_6$ 整合素的结合。

[0143] 在进一步的实施方案中， $\alpha_v\beta_6$ 整合素-结合肽可以由下式表示：B_mRGDLX₁X₂LX₄X₅X₆Z_n，其中B是m个氨基酸，其增强与由LX₁X₂L定义的螺旋的疏水相互作用，并且还增强用于结合的RGD结构域；Z是促进螺旋的残基，n是1至35之间的数，并且m是1至35之间的数。优选地，选择m使得B足够长以促进疏水/非共价相互作用的核心。这些残基的确切性质取决于该区域的总体设计。特别地，优选具有混合型的疏水相互作用（来自例如Val，Ile，Leu的残基）和/或静电相互作用（使用Asp，Glu，Lys和/或Arg以及它们在X₁和/或X₂的对应物离子对）。

[0144] 在具体的实施方案中， $\alpha_v\beta_6$ 整合素-结合肽包含氨基酸序列RGDLX₁X₂X₃AQX₆，其中X₆是Lys (K) 或Arg (R)。在优选的实施方案中，X₆是R。

[0145] 在某些实施方案中， $\alpha_v\beta_6$ 整合素-结合肽包含选自下组的氨基酸序列或由选自下组的氨基酸序列构成：NAVPNLRGDLQVLAQKVART (A20FMDV2)、NAVPNLRGDLQVLAQVRVART (A20FMDV2K16R)、GFTTGRRGDLATIHGMNRPF (A20LAP)、YTASARGDLAHLTTTHARHL (A20FMDV1)、及其组合。

[0146] 在其它实施方案中， $\alpha_v\beta_6$ 整合素-结合肽包含氨基酸序列RSDLTPLFX₇，其中X₇不存在或为任意氨基酸。在某些实施例中，X₇不存在（即，肽包含氨基酸序列RSDLTPLF或由氨基酸序列RSDLTPLF组成）。在某些其它实施例中，X₇是K（即，肽包含氨基酸序列RSDLTPLFK或由氨基酸序列RSDLTPLFK组成）。

[0147] $\alpha_v\beta_6$ 整合素是用于纤连蛋白、腱生蛋白（tenascin）、玻连蛋白、TGF- β 的潜伏相关肽（LAP）和口蹄疫病毒（FMDV）的病毒衣壳蛋白（VP1）的受体，仅在正常成体组织中一个上皮细胞子集中以非常低或不可检测的水平表达（Breuss等人，J.Cell Sci., 108:2241-2251（1995））。然而， $\alpha_v\beta_6$ 整合素的表达在发育期间、在损伤或炎症之后、或在多种上皮肿瘤中是显著增加的。例如，角质形成细胞显示， $\alpha_v\beta_6$ 整合素在口腔和皮肤伤口中的从头表达（Breuss等人，同上；Clark等人，Am.J.Path., 148:1407-1421（1996））。此外， $\alpha_v\beta_6$ 整合素在肿瘤侵袭中起着积极作用，因为其在口腔鳞状细胞癌的侵袭边缘的表达通常更高。因此， $\alpha_v\beta_6$ 整合素是用于诸如胰腺癌、口腔癌、卵巢癌、乳腺癌和结肠癌的疾病或病变的成像和治疗的很好的靶标。因此， $\alpha_v\beta_6$ 整合素-结合肽用具有确定链长（例如，PEG₂₈）的小的单分散PEG分子进行双末端PEG化，可用于产生本发明的偶联物，当与具有单独的N-或C-末端PEG化的肽相比时，本发明偶联物通过提供高肿瘤选择性和对表达 $\alpha_v\beta_6$ 的肿瘤的高特异性以及具有增加的代谢稳定性和在肿瘤位点的高保留性，显示出显著更好的定位和/或靶向潜力。

[0148] 在一些实施方案中，所述肽是结合整合素以及与整合素共表达的受体的二价肽。共表达的受体的非限制性实例包括CXCR4。在具体实施方案中，二价肽结合于 $\alpha_v\beta_6$ 整合素和CXCR4。在其他实施方案中，与整合素共表达的受体是另一种整合素，例如与 $\alpha_v\beta_5$ 整合素共表达的 $\alpha_v\beta_3$ 整合素。在具体的实施方案中，二价肽结合于 $\alpha_v\beta_3$ 整合素和 $\alpha_v\beta_5$ 整合素。在某些实施例中，肽包含与整合素结合的第一肽片段，该第一肽片段连接到与共表达受体结合的第二肽片段。在其它实施例中，肽包含与共表达的受体结合的第一肽片段，该第一肽片段连接到与整合素结合的第二肽片段。第一肽片段和第二肽片段可以彼此直接连接或可以通过本领域已知的甘氨酸接头或其他合适的接头连接。在一些实施例中，第一肽片段在N-末端PEG化，第二肽片段在C-末端PEG化，从而形成本发明的双末端PEG化的二价肽偶联物。

[0149] 在其它实施方案中，本发明的肽长度为约5至约45个氨基酸，约8至约45个氨基酸，约8至约25个氨基酸，约12至约45个氨基酸，约5至约40个氨基酸，约10至约40个氨基酸，或约35、30、25、20、15或10个氨基酸。例如，肽长度可以是约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45个或更多个氨基酸。通常，肽不应超过允许形成三级结构的长度，例如，大于45个氨基酸，如果作为分离的分子存在。然而，如果与更大的分子（例如抗体或另一种可以防止肽内形成三级结构形成的蛋白质或大分子）融合，则肽可以超过45个氨基酸。如果肽是具有结合不同受体的第一肽片段和第二肽片段的二价肽，则肽也可以超过45个氨基酸。优选地，肽的长度为约20个氨基酸。

[0150] 用于本发明的偶联物中的肽还可以是如上定义的肽的功能变体，包括具有至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更高的序列同一性。在某些实施例中，肽可以包含天然存在的氨基酸和/或非天然氨基酸。非天然氨基酸的实例包括但不限于：D-氨基酸、鸟氨酸、二氨基丁酸鸟氨酸、正亮氨酸鸟氨酸、吡啶丙氨酸、噻吩丙氨酸、萘基丙氨酸、苯基甘氨酸、 α 和 α -二取代氨基酸、N-烷基氨基酸、乳酸、天然存在的氨基酸的卤

化物(例如三氟酪氨酸、对-C1-苯丙氨酸、对-Br-苯丙氨酸、对-I-苯丙氨酸等)、L-烯丙基-甘氨酸、b-丙氨酸、L- α -氨基丁酸、L-g-氨基丁酸、L- α -氨基异丁酸、L-e-氨基己酸、7-氨基庚酸、L-甲硫氨酸砒、L-正亮氨酸、L-正缬氨酸、对-硝基-L-苯丙氨酸、L-羟脯氨酸、L-硫代脯氨酸、苯丙氨酸的甲基衍生物(例如1-甲基-Phe、五甲基-Phe、L-Phe(4-氨基)、L-Tyr(甲基)、L-Phe(4-异丙基)、L-Tic(1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸)、L-二氨基丙酸、L-Phe(4-苄基)等)。所述肽可以进一步修饰。例如,一个或多个酰胺键可以被酯或烷基骨架键替代。可以是N-或C-烷基取代、侧链修饰、或例如二硫键桥连或侧链酰胺或酯连接的约束。

[0151] 用于本发明的偶联物的肽可以包括修饰的肽和合成的肽类似物。肽可以被修饰以改善制剂和储存性质,或通过掺入非肽结构来保护不稳定的肽键。本发明的肽可以使用本领域已知的方法制备。例如,肽可以通过化学合成生产,例如使用固相技术和/或自动化肽合成仪,或通过重组方法。在某些实施例中,可以在自动化多肽合成仪(Abimed AMS 422)上,使用固相策略,使用9-苄基甲氧基羰基(Fmoc)化学法来合成肽。然后可以通过反相-HPLC纯化肽并冻干。或者,肽可以通过切割较长的肽或全长蛋白质序列来制备。例如,包含纤连蛋白、腱生蛋白、玻连蛋白、TGF- β 的潜伏相关肽(LAP)或口蹄疫病毒(FMDV)的病毒衣壳蛋白(VP1)的 $\alpha_v\beta_6$ 整合素-结合结构域的片段,可通过切割全长蛋白质来分离。

[0152] 在其它实施方案中,本发明的偶联物的肽组分可以被环化。用于将环状结构引入肽中,以便为结构选择和提供构象约束,从而导致增强的稳定性,这些方法是本领域公知的。例如,可以将C-或N-末端半胱氨酸加入到肽中,使得当被氧化时,肽将含有二硫键,并产生环肽。其它肽环化方法包括形成硫醚和羧基-和氨基-末端酰胺和酯。已经开发了许多合成技术来产生合成的环状肽(参见例如,Tarn等人,Protein Sci.,7:1583-1592(1998);Romanovskis等人,J.Pept.Res.,52:356-374(1998);Camarero等人,J.Amer.Chem.Soc.,121:5597-5598(1999);Valero等人,J.Pept.Res.,53(1):56-67(1999))。通常,环化肽的作用是双重的:(1)减少体内水解;和(2)在热力学上使得未折叠状态变得不稳定和促进二级结构形成。

[0153] IV. 施用方法

[0154] 本发明的双末端PEG化的整合素-结合肽偶联物在人和兽医成像、治疗、预后和诊断应用中具有特别的用途。例如,所述偶联物可用于肿瘤成像,诸如胰腺的恶性肿瘤(例如腺癌、浆液性囊腺瘤、腺泡细胞癌、如胰岛素瘤的胰腺神经内分泌肿瘤等)或任何其它组织或器官的恶性肿瘤。所述偶联物也可用于治疗疾病和病症,例如癌症(例如胰腺癌、乳腺癌、结肠癌、子宫颈癌、肺癌等)、炎症疾病、自身免疫疾病、慢性纤维化、慢性阻塞性肺病(COPD)、肺气肿和慢性创伤性皮肤病。

[0155] 根据需要,本发明的肽偶联物与合适的药物赋形剂的施用可以通过任何可接受的施用方式进行。因此,施用可以是,例如静脉内、局部、皮下、经皮、透皮、肌肉、口服、关节内、肠胃外、动脉内、皮内、心室内、颅内、腹膜内、病灶内、鼻内、经直肠、经阴道或通过吸入。此外,当注射是治疗肿瘤时,可以直接施用到肿瘤和/或到肿瘤周围的组织中。

[0156] 包含本发明的偶联物或偶联物的组合的组合物可以重复施用,例如至少2、3、4、5、6、7、8,或更多次,或者可以通过连续输注施用该组合物。合适的施用部位包括但不限于真皮、粘膜、支气管、胃肠、肛门、阴道、眼和耳。制剂可以采取固体、半固体、冻干粉末或液体剂型的形式,例如片剂、丸剂、锭剂、胶囊、粉剂、溶液、悬浮液、乳剂、栓剂、保留灌肠剂、霜剂、

软膏、洗剂、凝胶、气溶胶等,优选以适于精确剂量的简单施用的单位剂型。

[0157] 术语“单位剂型”是指适合作为人受试者和其它哺乳动物(例如狗)的单位剂量的物理上离散的单位,每个单位含有预定量的活性物质与合适的药物赋形剂(例如,安瓿),所计算的该预定量为产生起效、耐受和/或治疗效果所需。此外,可以制备更浓的组合物,然后可以从其制备更稀的单位剂量组合物。因此,更浓的组合物将含有基本上超过例如偶联物或偶联物组合的量的至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多倍的量。

[0158] 制备这些剂型的方法是本领域技术人员已知的(参见例如雷明顿药学大全—REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES,第18版,Mack出版公司,伊斯顿,PA(1990))。当根据本发明的教导施用时,待施用的组合物含有用于肿瘤、器官或组织成像或用于缓解所治疗病症的药学有效量的一些偶联物或偶联物组合。此外,可以使用合成有机化学领域技术人员已知的以及描述于例如高等有机化学:反应、机理和结构(March著,威利-跨学科公司出版)-March,Advanced Organic Chemistry:Reactions,Mechanisms and Structure,第四版,纽约,Wiley-Interscience(1992)的标准程序制备本发明的偶联物的药学上可接受的盐(例如酸加成盐)并将其包括在组合物中。

[0159] 所述组合物通常包括常规的药物载体或赋形剂,并且可以另外包括其它药剂、载体、佐剂、稀释剂、组织渗透促进剂、增溶剂等。优选地,所述组合物将含有约0.01%至约90%、约0.1%至约75%、约0.1%至50%、或约0.1%至10%(按重量计)的本发明偶联物或其组合,其余部分由合适的药物载体和/或赋形剂组成。可以通过本领域熟知的方法使适当的赋形剂适应具体的组合物和给药途径,参见,例如,雷明顿药学大全,同上。

[0160] 合适的赋形剂的实例包括但不限于乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、淀粉、阿拉伯胶、磷酸钙、藻酸盐、黄蓍胶、明胶、硅酸钙、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、水、盐水、糖浆、甲基纤维素、乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素,以及如Carbopol的聚丙烯酸,例如Carbopol 941,Carbopol 980,Carbopol 981等。所述组合物可另外包括润滑剂,例如滑石、硬脂酸镁和矿物油;润湿剂;乳化剂;悬浮剂;防腐剂,如甲基-、乙基-和丙基-羟基-苯甲酸酯(即对羟基苯甲酸酯);pH调节剂,如无机和有机酸和碱;甜味剂;着色剂;和调味剂。所述组合物还可以包含可生物降解的聚合物珠,葡聚糖和环糊精包合物。

[0161] 对于口服施用,所述组合物可以是片剂、锭剂、胶囊、乳剂、混悬剂、溶液剂、糖浆剂、喷雾剂、粉剂和缓释制剂的形式。用于口服施用的合适的赋形剂包括药物级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石、纤维素、葡萄糖、明胶、蔗糖、碳酸镁等。

[0162] 在一些实施方案中,所述药物组合物采取丸剂、片剂或胶囊的形式,因此,所述组合物可以与偶联物或偶联物组合一起含有以下物质:稀释剂,如乳糖、蔗糖磷酸二钙等;崩解剂,如淀粉或其衍生物;润滑剂,如硬脂酸镁等;和粘合剂,如淀粉、阿拉伯胶、聚乙烯吡咯烷酮、明胶、纤维素及其衍生物。偶联物也可以配制成栓剂,例如,置于聚乙二醇(PEG)载体中。

[0163] 液体组合物可以通过将偶联物或偶联物的组合和任选的一种或多种药学上可接受的佐剂溶解或分散在载体中,例如盐水(例如,0.9%w/v氯化钠)、葡萄糖水溶液、甘油、乙醇等,以形成溶液或悬浮液,例如用于口服、局部或静脉内施用。本发明的偶联物也可以配制成保留灌肠剂。

[0164] 对于局部施用,本发明的组合物可以是乳液、洗剂、凝胶、霜剂、胶冻、溶液、悬浮

液、软膏和透皮贴剂的形式。对于通过吸入递送,所述组合物可以作为干粉或液体形式经由喷雾器递送。对于胃肠外施用,所述组合物可以是无菌可注射溶液和无菌包装粉末的形式。优选地,可注射溶液在约4.5至约7.5的pH下配制。

[0165] 本发明的组合物也可以冻干形式提供。这样的组合物可以包括用于在施用前重构的缓冲液,例如碳酸氢盐,或者可以包括在冻干组合物中用于和例如水重构的缓冲液。冻干组合物还可包含合适的血管收缩剂,例如肾上腺素。冻干组合物可以在注射器中提供,任选与用于重构的缓冲液组合包装,使得重构的组合物可以立即施用于患者。

[0166] 通常,施用的剂量将有效地将皮摩尔至微摩尔浓度的偶联物递送至适当的部位。然而,本领域普通技术人员理解,所施用的剂量将根据许多因素而变化,包括但不限于,待施用的特定偶联物或偶联物组、施用模式、应用类型(例如,成像、诊断、预后、治疗等)、患者的年龄和患者的身体状况。优选地,应使用产生所需结果所需的最小剂量和浓度。剂量应为儿童、老年人、衰弱的患者和心脏和/或肝脏疾病患者作适当调整。可以使用用于评价剂量的实验动物模型从本领域已知的研究中获得进一步的指导。然而,与本发明的偶联物相关的增加的代谢稳定性、肿瘤保留和肿瘤与血液比率允许剂量浓度和重复给药的更宽的安全范围。

[0167] V. 治疗应用

[0168] 在某些方面,本发明的双末端PEG化整合素-结合肽偶联物用于在有需要的受试者中治疗整合素-介导的疾病或病变。适于用本文所述的肽偶联物治疗的疾病或病变的实例包括但不限于,过敏、焦虑症、自身免疫性疾病、行为障碍、出生缺陷、血液病、骨病、癌症、慢性纤维化、慢性阻塞性肺病(COPD)、慢性创伤性皮肤病循环系统疾病、牙病、抑郁障碍、分离性障碍、耳病、进食障碍、眼病、食物过敏、食源性疾病、胃肠疾病、遗传性疾病、心脏病、荷尔蒙失调症、免疫缺陷、感染性疾病、炎性疾病、昆虫传播性疾病、营养障碍、肾脏疾病、脑白质营养不良、肝脏疾病、肺气肿、精神健康障碍、代谢疾病、心境障碍、肌肉变性障碍、神经障碍、神经退行性病变、神经肌肉障碍、人格障碍、恐怖症、妊娠并发症、朊病毒病、前列腺疾病、心理障碍、精神病症、呼吸系统疾病、性障碍、皮肤病症、睡眠障碍、言语障碍、运动损伤、热带疾病、前庭障碍和消耗性疾病。优选地,所述 $\alpha_v\beta_6$ -介导的疾病或病变是癌症、炎性疾病、自身免疫疾病、慢性纤维化、慢性阻塞性肺病(COPD)、肺气肿和慢性创伤性皮肤病(例如大疱性表皮松解症)。

[0169] 癌症通常包括各种恶性新生物中的任何一种,表征为倾向于侵袭周围组织并转移至新的身体部位的间变性细胞的增殖。适合于使用本发明的偶联物或组合物治疗的不同类型的癌症的非限制性实例包括卵巢癌、乳腺癌、肺癌、膀胱癌、甲状腺癌、肝癌、胸膜癌、胰腺癌、子宫颈癌、前列腺癌、睾丸癌、结肠癌、肛门癌、胆管癌、胃肠道类癌、食道癌、胆囊癌、直肠癌、阑尾癌、小肠癌、胃(胃部的)癌、肾癌(如肾细胞癌)、中枢神经系统癌症、皮肤癌、绒毛膜癌、头颈癌、骨癌、骨肉瘤、纤维肉瘤、神经母细胞瘤、胶质瘤、黑素瘤、白血病(例如急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞性白血病、急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、或毛细胞白血病)、淋巴瘤(例如非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、B细胞淋巴瘤、或伯基特氏淋巴瘤),和多发性骨髓瘤。

[0170] 本领域技术人员还将理解,本发明的偶联物可以与用于治疗癌症的其它治疗剂共同施用。用于联合治疗的合适的抗癌剂包括但不限于细胞毒素和试剂(例如抗代谢物、烷化

剂、蒽环类、抗生素、抗有丝分裂剂、丙卡巴肼、羟基脲、天冬酰胺酶、皮质类固醇、干扰素、放射性药物,具有抗肿瘤活性的肽,例如TNF- α ,其药学上可接受的盐;其衍生物,其前药,及其组合。例如,包含一种或多种本发明偶联物的药物组合物可以在化疗之前、期间或之后的抗癌剂或抗癌剂的组合施用之前、期间或之后施用给患者。在化疗后用偶联物治疗对于减少和/或预防肿瘤的复发或转移可能是特别有用的。在一些实施方案中,抗癌剂可以直接或间接共价连接(例如,通过脂质体或纳米颗粒)至本文所述的双末端PEG化整合素-结合肽。

[0171] 炎症性疾病通常包括由炎症表征或引起的疾病或病变。炎症可以由对细胞损伤的局部反应引起,所述细胞损伤以毛细血管扩张、白细胞浸润、发红发热和作为启动消除有害物质和受损组织机制的疼痛为标志。炎症部位可包括例如肺、胸膜、肌腱、淋巴结或腺、悬雍垂、阴道、脑、脊髓、鼻和咽粘膜、肌肉、皮肤、骨或骨组织、关节、膀胱、视网膜、子宫颈、眼角膜、肠道、椎骨、直肠、肛门、粘液囊、卵泡等。适用于使用本发明偶联物治疗的炎症性疾病的实例包括但不限于炎症肠病(例如克罗恩病或溃疡性结肠炎)、类风湿性疾病(如类风湿性关节炎)、纤维组织炎、盆腔炎性疾病、痤疮、银屑病、放线菌病、痢疾、胆汁性肝硬化、莱姆病、热疹、史蒂文斯-约翰逊综合征、腮腺炎、寻常型天疱疮和芽生菌病。

[0172] 自身免疫性疾病通常包括由针对自身组织或组织成分的免疫应答(例如自身抗体应答或细胞介导的应答)引起的疾病或病变。适合于使用本发明偶联物治疗的自身免疫性疾病的实例包括但不限于自身免疫应答针对单一组织的器官特异性自身免疫性疾病,例如I型糖尿病、重症肌无力、白癜风、格雷夫斯疾病、桥本氏病、阿狄森氏病、自身免疫性胃炎和自身免疫性肝炎;和自身免疫应答针对存在于全身的几个或许多器官中的组分的非器官特异性自身免疫性疾病,例如系统性红斑狼疮、进行性系统性硬化症和变体、多发性肌炎和皮肌炎。另外的自身免疫性疾病包括例如恶性贫血、原发性胆汁性肝硬化、自身免疫性血小板减少症、干燥综合征和多发性硬化。

[0173] 本领域技术人员将理解,本发明的偶联物可以与用于治疗炎性或自身免疫性疾病的其它治疗剂共同施用。用于组合治疗的合适的抗炎剂包括但不限于皮质类固醇、非类固醇抗炎剂,抗体(如英夫利昔单抗)、5-氨基水杨酸盐、抗生素,其药学上可接受的盐;其衍生物、其前药,及其组合。用于组合治疗的合适的免疫抑制剂包括但不限于硫唑嘌呤及其代谢物,抗代谢物(如甲氨蝶呤)、免疫抑制抗体,单磷酸咪唑立宾、环孢霉素、滨蒿内酯(scoparone)、FK-506(他克莫司)、FK-778、雷帕霉素(西罗莫司),格拉替雷乙酸盐,霉酚酸盐,其药学上可接受的盐、其衍生物、其前药,及其组合。

[0174] 在另一个实施方案中,本发明的偶联物可用于治疗由例如病毒、细菌、真菌、寄生虫或任何其它感染剂引起的感染或感染性疾病。适合治疗的感染性疾病的非限制性实例包括但不限于获得性免疫缺陷综合征(AIDS/HIV)或HIV相关疾病,阿尔佩斯综合征、炭疽、牛海绵状脑病(疯牛病)、水痘、霍乱、结膜炎、克雅氏病(CJD)、登革热、埃博拉病、象皮病、脑炎、致死性家族性失眠、第五病(Fifth's disease)、格施谢三氏症(Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome)、汉坦病毒、幽门螺杆菌、肝炎(甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎)、疱疹、流感(例如禽流感A(禽流感))、库鲁病、麻风病、莱姆病、疟疾、出血热(例如裂谷热、克里米亚-刚果出血热、拉沙热、马尔堡病毒病和埃博拉出血热)、麻疹、脑膜炎(病毒、细菌)、单核细胞增多症、院内感染、中耳炎、盆腔炎(PID)、鼠疫、肺炎、脊髓灰质炎、朊病毒病、狂犬病、风湿热、红疹、罗斯河病毒感染、风疹、沙门氏菌病、脓毒性关节炎、性传播疾

病(STD)、带状疱疹、天花、链球菌性咽炎、破伤风、中毒性休克综合征、弓形体病、沙眼、结核病、兔热病、伤寒、谷热、百日咳和黄热病。

[0175] 在某些实施方案中,本发明的偶联物可用于治疗神经性或肌肉骨骼疾病。这种疾病的实例包括但不限于阿尔茨海默氏病、艾卡迪综合征、健忘症、肌萎缩性侧索硬化(卢格里格病(Lou Gehrig's Disease))、无脑畸形、失语症、蛛网膜炎、阿-希畸形(Arnold Chiari malformation)、共济失调毛细血管扩张症、巴滕病、贝尔麻痹、臂丛损伤、脑损伤、脑肿瘤、腓骨肌萎缩症(Charcot-Marie-Tooth disease)、脑炎、癫痫、特发性震颤、格林-巴利综合征、脑积水、多汗症、克拉伯病(Krabbes disease)、脑膜炎、莫比斯综合征、肌营养不良、多发性硬化、帕金森病、周围神经病、姿势性或直立性心动过速综合征、进行性核上性麻痹、雷氏综合征、带状疱疹、Shy-Drager综合征、痉挛性斜颈、脊柱裂、脊髓性肌萎缩、Stiff Man综合征、共感觉失调(synesthesia)、脊髓空洞症、胸廓出口综合征、图雷特(Tourette)综合征、弓形体病和三叉神经神经痛。

[0176] 当用于治疗应用时,本发明的偶联物通常具有与一个或多个肽或第一或第二PEG部分共价或非共价连接的治疗剂。在某些实施例中,治疗剂是细胞毒性的。合适的治疗剂为受试者具有有益的、预防和/或治疗性质,并且包括但不限于放射性核素、化学治疗剂、纳米颗粒、纳米滴、脂质体药物和细胞因子。本领域技术人员将熟悉将治疗剂连接到存在于肽或PEG部分上的官能团的方法。例如,治疗剂可以通过将治疗剂共价连接到存在于肽或PEG部分中的伯胺基团而直接连接到偶联物的肽或PEG部分。本领域技术人员将理解,治疗剂还可以通过非共价相互作用(例如,离子键、疏水相互作用、氢键、范德华力、偶极-偶极键,等等)和肽或PEG部分结合。

[0177] 在一些实施方案中,所述治疗剂是细胞毒性化疗剂。细胞毒性化疗剂是本领域公知的,并且包括抗癌剂,例如烷化剂(例如,氮芥,例如氮芥(HN2)、环磷酰胺、异环磷酰胺、美法仑(L-肌节蛋白)和苯丁酸氮芥),乙烯亚胺和甲基三聚氰胺(例如,六甲基三聚氰胺、三胺硫磷、烷基磺酸盐(如白消安)、亚硝基脲(例如卡氮芥(BCNU))、洛莫司汀(CCNLJ)、司莫司汀(甲基-CCN-U)和链脲霉素(链脲佐菌素),和三氮烯类,例如十溴咪唑(DTIC;二甲基三唑并咪唑甲酰胺)),抗代谢物(例如叶酸类似物,例如甲氨蝶呤(氨甲蝶呤),嘧啶类似物,例如氟尿嘧啶(5-氟尿嘧啶;5-FU),氟尿苷(氟脱氧尿苷;FdR)和阿糖胞苷(胞嘧啶阿拉伯糖苷),以及嘌呤类似物以及相关的抑制剂,例如巯基嘌呤(6-巯基嘌呤;6-MP),硫鸟嘌呤(6-巯鸟嘌呤;6-TG)和喷司他丁(2'-脱氧羰基霉素)),天然产物(例如长春花生物碱,如长春花碱(VLB)和长春新碱,表鬼臼毒素,如依托泊苷和替尼泊苷,抗生素,如更生霉素(放线菌素D),柔红霉素(道诺霉素;红比霉素),多柔比星,博来霉素,普卡霉素(光神霉素),和丝裂霉素(丝裂霉素Q),酶,如L-天冬酰胺酶,和生物反应调节剂,如干扰素a(interferon alphas)),其它试剂(例如铂配位络合物,如顺铂(cis-DDP)和卡铂,蒽二酮类,如米托蒽醌和蒽环霉素,取代的脲,如羟基脲,甲基胍衍生物,如甲基胍(N-甲基胍;MIH),肾上腺皮质抑制剂,如米托坦(o,p'-DDD)和氨鲁米特、紫杉酚(紫杉醇)和类似物/衍生物,以及激素激动剂/拮抗剂,如氟他胺和他莫昔芬),及其组合。

[0178] 在其它实施方案中,偶联物的一个或多个肽或第一或第二PEG部分连接到含有治疗剂的颗粒。在这种情况下颗粒包括但不限于纳米颗粒和基于脂质的囊泡,例如脂质体或由脂质组成的其它类似结构。脂质体通常是包含磷脂双层的球形囊泡,其可以用作递送

例如药物或其他化合物的物质的试剂。脂质体可以由具有混合脂质链的天然衍生的磷脂(卵磷脂酰乙醇胺)或如二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)的纯组分组成。现在脂质体的合成和使用在本领域中已经建立得很好。脂质体通常通过在合适的介质(如水)中磷脂的超声处理产生。低剪切速率产生具有多层结构的多层脂质体。持续的高剪切超声处理易于形成较小的单层脂质体。研究也已能够使脂质体避免免疫系统的检测,例如通过用聚乙二醇(PEG)包被脂质体。也可能在脂质体中掺入物质,例如本发明的肽偶联物,以帮助将它们靶向递送至位点,例如细胞、肿瘤、器官、组织等。

[0179] 纳米颗粒作为与纳米颗粒缔合或结合材料递送剂的用途是本领域已知的。一些类型的纳米颗粒包含核,通常为金属和/或半导体原子的核,偶联物的一个或多个肽或第一或第二PEG部分可以连接到其上(参见,例如PCT公开号W002/32404,W005/10816和W005/116226)。其它类型的纳米颗粒可以由诸如脂质体的材料形成。在一些实施例中,纳米颗粒可以是量子点,例如半导体材料的纳米晶体,其具有与本体固体明显不同的化学和物理性质(参见,例如格莱特-Gleiter,Adv.Mater.,4:474-481 1992)。现在他们的量子尺寸效应被理解,对这些系统的基本和应用研究已经变得越来越流行。有趣的应用是使用纳米晶体作为生物系统的发光标记(参见,例如Brucher等人,Science,281:2013-2016 (1998);Chan等人,Science,281:2016-2018 (1998);Mattousi等人,J.Am.Chem.Soc.,122:12142-12150 (2000);和Alivisatos,Pure Appl.Chem.,72:3-9 (2000))。量子点具有优于常规荧光染料的几个优点。例如,量子点根据它们的尺寸在各种精确的波长发光,并且具有长发光寿命。

[0180] 在另外的实施方案中,治疗剂是能够促进细胞死亡的细胞毒性肽或多肽。细胞毒性肽和多肽是本领域熟知的,包括,例如,蓖麻毒素、相思豆毒素、假单胞菌外毒素、组织因子等。Burrows等人,P.N.A.S.USA,90:8996-9000 (1993)中描述了蓖麻毒素作为细胞毒剂的用途。Ran等人,Cancer Res.,58:4646-4653 (1998)和Huang等人,Science,275:547-550 (1997)中描述了导致局部血液凝固和肿瘤梗死的组织因子的使用。Tsai等人,Colon Rectum,38:1067-1074 (1995)描述了与单克隆抗体偶联的相思豆毒素A链。其它核糖体灭活蛋白在PCT公开号W096/06641中被描述为细胞毒性剂。假单胞菌外毒素也可以用作细胞毒性多肽(参见,例如,Aiello等人,P.N.A.S.USA,92:10457-10461 (1995))。某些细胞因子,例如TNF- α 和IL-2,也可用作细胞毒性剂和/或治疗剂。

[0181] 如果以足够的剂量递送,某些放射性原子也可以是细胞毒性的。因此,治疗剂可以包含放射性原子,其在使用中将足够量的放射性递送至靶位点以便具有细胞毒性。用于本发明肽偶联物的合适的放射性原子包括本文所述的任何放射性核素或任何其它能够发射足够能量以破坏靶细胞、肿瘤、器官或组织的同位素。优选地,所述偶联物中放射性原子的同位素和密度使得将至少约4000,6000,8000或10000cGy的剂量递送至靶位点,并且优选递送至靶位点处的细胞及其细胞器,特别是细胞核。放射性原子可以以已知方式连接到偶联物的一个或多个肽或第一或第二PEG部分。例如,EDTA或另外的螯合剂可以连接到肽或PEG部分,并用于连接 ^{111}In 或 ^{90}Y 。在一些实施例中,存在于肽中的酪氨酸残基可以用 ^{125}I 或 ^{131}I 标记。优选地,苯甲酰基连接到肽或PEG部分,并用于连接 ^{18}F 或 ^{19}F 。例如,4-[^{18}F]-氟苯甲酸或4-[^{19}F]-氟苯甲酸可用于放射性标记本发明的肽偶联物。

[0182] VI. 成像应用

[0183] 在某些其它方面,在各种生物医学应用中,本发明的双末端PEG化结合整合素的肽

偶联物被用作组织和器官的体内光学成像剂(例如,放射性示踪剂或成像探针),包括但不限于,肿瘤成像、器官断层摄影成像、器官功能监控、冠状动脉血管造影术、荧光内窥镜检查、激光引导手术、光声和声荧光方法等。在一实施方案中,本发明的偶联物通过监控特定偶联物在受试者中何处聚集而用于检测肿瘤和其它异常的存在。在另一实施方案中,偶联物可用于激光辅助引导手术,用于在腹腔镜检查时检测肿瘤的微转移。在另一实施方案中,偶联物可用于诊断动脉粥样硬化斑块和血块。

[0184] 在进一步的实施方案中,本发明的偶联物可用于以下的成像:(1)眼科中的眼部疾病,例如,通过直接显微成像以改善脉络膜视网膜疾病,例如血管疾病,视网膜病变,新血管形成和肿瘤的可视化;(2)皮肤疾病,例如皮肤肿瘤通过直接显微成像;(3)胃肠道、口腔、支气管、宫颈和泌尿疾病和肿瘤通过内窥镜成像;(4)动脉粥样硬化斑块和其他血管异常通过柔性内镜导管成像;和(5)胰腺肿瘤、乳腺肿瘤、脑肿瘤,灌注和中风通过2D或3D图像重建成像。

[0185] 在成像程序之前,本发明的偶联物可以全身或局部施用于待成像的肿瘤、器官或组织。通常,偶联物以有效实现肿瘤、组织或器官的所需光学图像的剂量施用。这样的剂量可以广泛变化,这取决于使用的具体偶联物,成像程序中肿瘤、组织或器官,使用的成像设备等。

[0186] 在一些实施方案中,本文所述的偶联物用于直接染色或标记样品,使得可以鉴定或定量样品。例如,可以添加特异性偶联物作为生物学靶分析物(例如,抗原)的测定的一部分,作为生物或非生物流体中的可检测的示踪元素,或用于本领域技术人员已知的其它体外目的。通常,样品直接从液体源获得,或作为从固体材料(有机的或无机的)或其中已引入细胞用于培养的生长培养基、或其中已放置细胞用于评价的缓冲溶液中获得。当样品包含细胞时,细胞任选为单细胞,包括微生物,或与二维或三维层中的其它细胞相关的多个细胞,所述二维或三维层包括多细胞生物体、胚胎、组织、活检、细丝、生物膜等。

[0187] 可检测的响应通常是指可通过观察或仪器可检测的光学信号的变化或发生。在某些实施例中,可检测的响应是放射性(即辐射),包括由放射性物质(如放射性核素)发射的 α 粒子, β 粒子,核子,电子,正电子,中微子和 γ 射线。在某些其它实施例中,可检测的响应是荧光或荧光的变化,例如荧光强度、荧光激发或发射波长分布、荧光寿命和/或荧光偏振的变化。本领域技术人员将理解,受试者或样品中标记的程度和/或位置可与标准或对照(例如,健康组织或器官)进行比较。

[0188] 当用于成像应用时,本发明的偶联物通常具有共价或非共价连接到一个或多个肽或第一或第二PEG部分的成像剂。合适的成像剂包括但不限于放射性核素、可检测标签、荧光团、荧光蛋白、酶蛋白等。本领域技术人员将熟悉将成像剂连接到存在于肽或PEG部分上的官能团的方法。例如,成像剂可以通过成像剂与存在于肽或PEG部分中的伯胺基团共价连接而直接连接到偶联物的肽或PEG部分。本领域技术人员将理解,成像剂还可以通过非共价相互作用(例如,离子键、疏水相互作用、氢键、范德华力、偶极-偶极键等等。)连接到偶联物的肽或PEG部分。

[0189] 在某些实施例中,通过将放射性核素直接连接到偶联物的一个或多个肽或第一或第二PEG部分,用放射性核素放射性标记偶联物。在某些其它实施例中,用放射性核素标记的苯甲酰基直接连接到偶联物的肽或PEG部分。例如,4- $[^{18}\text{F}]$ -氟苯甲酸($[^{18}\text{F}]$ FBA)或4-

[¹⁹F]-氟苯甲酸 (“[¹⁹F]FBA”) 可用于放射性标记本发明的偶联物。在另外的实例中,放射性核素结合到与偶联物连接的螯合剂或螯合剂-连接体上。用于直接偶联的合适的放射性核素包括但不限于¹⁸F、¹⁹F、¹²⁴I、¹²⁵I、¹³¹I,及其混合物。与螯合剂一起使用的合适的放射性核素包括但不限于⁴⁷Sc、⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、⁸⁹Sr、⁸⁶Y、⁸⁷Y、⁹⁰Y、¹⁰⁵Rh、¹¹¹Ag、¹¹¹In、^{117m}Sn、¹⁴⁹Pm、¹⁵³Sm、¹⁶⁶Ho、¹⁷⁷Lu、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、²¹¹At、²¹²Bi,及其混合物。合适的螯合剂包括但不限于DOTA、NOTA、NOTA-TCO、BAD、TETA、DTPA、EDTA、NTA、HDTA、它们的磷酸酯类似物,及其混合物。本领域技术人员将熟悉将放射性核素、螯合剂和螯合剂-连接体连接到本发明的偶联物上的方法。特别地,可以使用例如市售双官能连接基团(通常为异双功能连接基团)方便地实现连接,所述双官能连接基团可以连接到存在于偶联物上的非干扰位置上的官能团,然后进一步连接到放射性核素、螯合剂或螯合剂-连接体。

[0190] 适合用作成像剂的荧光团或荧光染料的非限制性实例包括Alexa Fluor®染料(英杰公司;卡尔斯巴德,加利福尼亚)、荧光素、异硫氰酸荧光素(FITC), Oregon Green™;罗丹明、德克萨斯红、异硫氰酸四氮杂异喹啉(TRITC)、CyDye™荧光剂(例如Cy2, Cy3, Cy5)等。

[0191] 适合用作成像剂的荧光蛋白的实例包括但不限于绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白(例如DsRed)、黄色荧光蛋白、青色荧光蛋白、蓝色荧光蛋白及其变体(参见,例如,美国专利号6,403,374, 6,800,733和7,157,566)。GFP变体的具体实例包括但不限于增强型GFP(EGFP), 去稳定化的EGFP, Doan等人在Mol. Microbiol., 55:1767-1781 (2005)中描述的GFP变体, Cramer等人在Nat. Biotechnol., 14:315-319 (1996)中描述的GFP变体, Rizzo等人在Nat. Biotechnol., 22:445 (2004)和钱等人在Annu. Rev. Biochem., 67:509 (1998)中描述的天蓝色荧光蛋白, 和Nagal等人在Nat. Biotechnol., 20:87-90 (2002)中描述的黄色荧光蛋白。DsRed变体描述于例如Shaner等人, Nat. Biotechnol., 22:1567-1572 (2004)中, 并且包括m草莓红(mStrawberry)、m樱桃红(mCherry)、m橘色(mOrange)、m香蕉黄(mBanana)、m浅粉红(mHoneydew)和m橘黄(mTangerine)。另外的DsRed变体描述于例如王等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 101:16745-16749 (2004)中, 并且包括m覆盆子色(mRaspberry)和m紫红色(mPlum)。DsRed变体的其他实例包括Fischer等人在FEBS Lett., 577:227-232 (2004)中描述的mRFP火星色(mRFPmars)和Fischer等人在FEBS Lett., 580:2495-2502 (2006)中描述的mRFP红宝石色(mRFPruby)。

[0192] 在其它实施方案中,与本发明的偶联物结合的成像剂包含可检测标签,例如生物素、抗生物素蛋白、链霉亲和素、或中性抗生物素蛋白。在另外的实施方案中,成像剂包括酶蛋白,包括但不限于荧光素酶、氯霉素乙酰转移酶、β-半乳糖苷酶、β-葡糖醛酸酶、辣根过氧化物酶、木聚糖酶、碱性磷酸酶等。

[0193] 本领域已知的用于检测受试者中放射性核素的放射性发射的任何装置或方法都适用于本发明。例如,诸如单光子发射计算机断层扫描(SPECT)的方法,其使用旋转γ照相机检测来自单光子γ发射放射性核素的辐射,以及放射性核素闪烁扫描的方法,其获得使用闪烁γ照相机获得的在组织、器官或身体系统中的放射性核素分布的图像或一系列连续图像,这些方法可用于检测从本发明的放射性标记的偶联物发射的辐射。正电子发射断层摄影(PET)是另一种适用于检测受试者中的辐射的技术。此外,美国专利5,429,133描述了一种用于检测集中在实体组织肿瘤中的辐射的腹腔镜探头。用于医疗用途的微型和柔性辐射检测器由Intra-Medical公司(圣莫尼卡,加利福尼亚)生产。磁共振成像(MRI)或本领域

技术人员已知的任何其它成像技术也适合于检测放射性核素的放射性发射。不管使用何种方法或装置,这种检测旨在确定偶联物在受试者何处聚集,这种浓度是肿瘤或肿瘤细胞的位置的指示。

[0194] 动物和人的非侵入性荧光成像还可以提供体内诊断或预后信息,并且可用于多种临床专业。例如,多年来已经开发了用于使用先进设备在UV激发到复杂光谱成像之后的简单目测技术(参见例如Andersson-Engels等人,Phys.Med.Biol.,42:815-824(1997))。用于体内荧光(例如来自荧光团或荧光蛋白)检测的本领域已知的具体装置或方法,包括但不限于检测体内近红外荧光(参见,例如Frangioni,Curr.Opin.Chem.Biol.,7:626-634(2003)),MaestroTM体内荧光成像系统(Cambridge Research&Instrumentation有限公司;沃本,马萨诸塞州),使用飞点扫描仪的体内荧光成像(参见,例如,Ramanujam等人,生物工程IEEE处理(IEEE Transactions on Biomedical Engineering),48:1034-1041(2001))等。

[0195] 用于检测光学响应的其它方法或装置包括但不限于视觉检查、CCD相机、摄像机、摄影胶片、激光扫描装置、荧光计、光电二极管、量子计数器、落射荧光显微镜、扫描显微镜、流式细胞仪、荧光酶标仪、和使用光电倍增管的信号放大器。

[0196] VII. 本发明的试剂盒

[0197] 本发明还提供了用于促进和/或标准化本文所述的偶联物和组合物的使用以及促进本文所述方法的试剂盒。实施这些各种方法的材料和试剂可以在试剂盒中提供以促进所述方法的执行。如本文所用,术语“试剂盒”包括促进过程、测定、分析或操作的制品的组合。特别地,包含本发明的偶联物或组合物的试剂盒具有广泛的应用,包括例如免疫治疗和体内成像细胞、肿瘤、器官、组织、生物聚集物、生物膜等。

[0198] 试剂盒可以包含化学试剂以及其他组分。此外,本发明的试剂盒可以包括但不限于试剂盒使用者的说明书(例如,免疫治疗中偶联物或组合物的使用说明,偶联物或组合物在细胞、肿瘤、器官或组织成像中的使用说明等)、用于样品收集和/或纯化的装置和试剂、用于产物收集和/或纯化的装置和试剂、用于细菌细胞转化的试剂、用于真核细胞转染的试剂、预先转化或转染的宿主细胞、样品管、台、托盘、架、盘、板、溶液、缓冲液或其他化学试剂、用于标准化、归一化和/或对照样品的合适样品。本发明的试剂盒也可以进行包装,以便于存储和安全运输,例如包装在具有盖的盒中。

[0199] VIII. 实施例

[0200] 提供以下实施例以说明但不限制所要求保护的发明。

[0201] 实施例1. 双末端PEG化以改善靶向肽的药代动力学和体内稳定性。

[0202] 该实施例说明本发明的肽-基分子显像探针(偶联物)FBA-PEG₂₈-A20FMDV2-PEG₂₈选择性靶向 $\alpha_v\beta_6$ 整合素,并且具有有利的药代动力学特征。该探针基于称为A20FMDV2的20-氨基酸核心,其源自口蹄疫病毒的外壳蛋白的肽片段(Jackson等人,Virus Res.,2003;91:33-46;Logan等人,Nature,1993;362:566-8),其具有氨基酸序列NAVPNLRGDLQVLAQKVART(使用单字母氨基酸标识符,从N到C末端从左到右书写)。值得注意的是,该肽已经用单分散性PEG链修饰(Roberts等人,Adv.Drug Deliver.Rev.,2002;54:459-76;Knop等人,Angewandte Chemie.,2010;49:6288-308),即在N末端和C末端的具有精确限定数目的乙二醇重复单元‘n’的PEG链,以改善 $\alpha_v\beta_6$ -靶向的肿瘤摄取和药代动力学。成像探针还携带含氟-

¹⁸F 的氟苯甲酸 (¹⁸F FBA) 辅基, 用于通过 γ -探针或在正电子发射断层扫描 (PET) 扫描仪内检测。

[0203] 介绍

[0204] 整合素是一组异二聚体双向跨膜细胞表面受体 (Hynes, Cell, 2002; 110: 673-87)。尽管大多数整合素对于适当的生物学功能是必需的, 但是其中一些是高度局部化的并且仅在患病组织中显著上调。其中, 整合素 $\alpha_v\beta_6$, $\alpha(v)\beta(6)$ 已被认为是肿瘤发生期间的重要标记 (Bandyopadhyay 等人, Current drug targets, 2009; 10: 645-52), 并且甚至被鉴定为用于挑战恶性肿瘤的与疾病严重程度相关的预后指标, 例如肺癌 (Elayadi 等人, Cancer Res., 2007; 67: 5889-95)、结肠直肠癌 (Bates, Cell Cycle, 2005; 4: 1350-2)、子宫颈癌 (Hazelbag 等人, J Pathol., 2007; 212: 316-24) 和胃癌 (Zhang 等人, Clin Oncol-UK, 2008; 20: 61-6)。

[0205] 因此, $\alpha_v\beta_6$ 表达水平的可靠体内定位和定量可以对疾病的适当检测、表征和 (个性化) 管理做出显著贡献。它还将提供关于恶性肿瘤的同质性 (或异质性) 的信息, 并且有助于检测对 $\alpha_v\beta_6$ -靶向治疗敏感的远距离疾病 (转移)。为了实现这一点, 需要在细胞水平上选择性靶向整合素 $\alpha_v\beta_6$ 的分子探针。

[0206] 先前我们已经显示, 用正电子发射放射性同位素辅基 (放射) 标记的用于通过 γ -探针检测或在正电子发射断层扫描 (PET) 扫描仪内检测的 A20FMDV2 肽可以在体外和在体外成功检测整合素 $\alpha_v\beta_6$ (Hausner 等人, Cancer Res., 2007; 67: 7833-40)。虽然这种探针 ¹⁸F FBA-A20FMDV2 从非靶组织中快速清除并通过尿液中的优先肾途径排出, 然而, 它仍然具有一些药代动力学缺点, 特别是非常快速的血流清除、低稳定性, 以及当用表达 $\alpha_v\beta_6$ 的胰腺癌 BxPC-3 异种移植物的老鼠模型中进行评价时从靶肿瘤组织中的清除 (Hausner 等人, 同上; Hausner 等人, Cancer Res., 2009; 69: 5843-50)。

[0207] 向肽的 N-末端添加中等大小的聚 (乙二醇) (PEG) 可明显改善肿瘤中的摄取并影响药代动力学。值得注意的是, 单个 PEG₂₈ 单元的添加将肿瘤摄取从 <1% ID/g 增加至接近 2% ID/g, 并消除了从肿瘤中的清除, 导致大大改善了信号/背景比, 尤其是在后期的时间点。然而, 这种探针 ¹⁸F FBA-PEG₂₈-A20FMDV2 也显示了肾脏中初始摄取的增加, 但在随后的时间点清除。向 N 末端添加第二 PEG₂₈ 单元不会导致肿瘤中摄取的进一步显著增加。事实上, 添加第二 PEG 单元是不利的, 因为探针 ¹⁸F FBA-(PEG₂₈)₂-A20FMDV2 也以高水平 (40% ID/g) 在肾脏中捕获, 并且没有显示任何释放。同样, PEG 单元向 C-末端的转移仅具有边际效应。虽然探针 FBA-A20FMDV2-PEG₂₈ 显示出一些初始肿瘤摄取 >1% ID/g, 但其也被清除, 因此不会导致信号/背景比随时间被改善。

[0208] 此外, 所有这些探针都显示出快速的体内代谢。例如, 当评估尿样品时, 确定了将 PEG 引入 N 末端时动物模型中的主要放射性代谢物的数目从三个 (无 PEG) 减少至一个 (具有 PEG), 两种情况中都没有发现完整的探针。当 PEG 在 C 末端时, 发现三种代谢物也没有发现完整的探针。

[0209] 结果

[0210] 与在 N-末端带有 PEG 基团或在 C-末端带有 PEG 基团的探针相反, 本发明的双末端 PEG 化探针 (例如 FBA-PEG₂₈-A20FMDV2-PEG₂₈) 在 N-末端有一个 PEG 以及在 C-末端有一个 PEG, 极大地改善了药代动力学曲线。主要特点包括高肿瘤摄取和保留, 以及高代谢稳定性。与其他策略 (例如, 非天然氨基酸的环化、使用) (Kimura 等人, Clin Cancer Res., 2012; 18: 839-

49; Briand等人, Proc Natl Acad Sci USA, 1997; 94: 12545-50; Fletcher等人, Chem Rev., 1998; 98: 763-95; Fischer, Curr Protein Pept Sci., 2003; 4: 339-56) 相比, 我们意外发现本发明靶向肽的PEG化是实现意想不到的高目标亲和力、选择性、肿瘤摄取和保留以及高代谢稳定性和优良的肾脏清除的简单和直接的实验方式。

[0211] 在小鼠模型中, 对于BxPC-3异种移植瘤, 我们发现4.7% ID/g (1小时) 的高肿瘤摄取和良好的保留 (4小时为3.4% ID/g)。这些摄取值显著高于任何其它探针观察到的, 并且它们在20-80mg非常小范围的BxPC-3异种移植肿瘤上获得。这些结果使得通常难以检测小的早期病变被观察到。

[0212] 此外, 双末端PEG化极大地改善了代谢稳定性。超过三分之二的探针在1小时内尿中保持完整 (并且大约一半在4小时保持完整)。对DX₃puroB6和BxPC-3肿瘤的另外研究表明, 在1小时>80%的探针在肿瘤中保持完整, 并且接近90%的探针从肾脏完整回收。

[0213] 值得注意的是, 基于所评估的其它PEG化模式, 本文所述的观察和结果是不可预测的, 并且与所评估的其它PEG化模式明显不同, 所评估的其它PEG化模式例如, 仅在N末端的一个或两个PEG链, 仅在C末端的一个PEG链, 没有PEG化, 其中没有一种能够接近或匹配用双末端PEG化实现的优异的药代动力学和稳定性特征, 正如通过探针FBA-PEG₂₈-A20FMDV2-PEG₂₈所示例的。

[0214] 图1显示了在本文所述的研究中评价的A20FMDV2PEG化变异的结构。图2-10提供了这些A20FMDV2 PEG化变异的生物分布和成像探针稳定性的关键参数的详细比较。表1提供了每种PEG修饰的A20FMDV2变体的选择的关键药代动力学和稳定性数据的总结。

[0215] 表1. A20FMDV2 PEG化化合物的生物分布和稳定性实验数据的总结。

动物模型	肿瘤异种移植 生物分布数据	稳定性数据	代谢物数据
(1) 18F-FBA-A20FMDV2			
小鼠 (nu/nu, ♂)	Dx3puroB6/Dx3puro (配对) 1, 2, 4 h		尿
小鼠 (nu/nu, ♂)	BxPC-3/MIA PaCa-2 (配对) 1, 2, 4 h		
(2) 18F-FBA-PEG28-A20FMDV2			
小鼠 (nu/nu, ♂)	Dx3puroB6/Dx3puro (配对) 1, 2, 4 h		尿
小鼠 (nu/nu, ♂)	BxPC-3 1, 2, 4 h		
(3) 18F-FBA-PEG28-PEG28-A20FMDV2			
小鼠 (nu/nu, ♂)	Dx3puroB6/Dx3puro (配对) 1, 2, 4 h		尿
小鼠 (nu/nu, ♂)	BxPC-3 1, 2, 4 h		
(4) 18F-FBA-A20FMDV2-PEG28			
小鼠 (nu/nu, ♀)	Dx3puroB6/Dx3puro (配对) 1, 2, 4 h		尿
(5) 18F-FBA-PEG28-A20FMDV2-PEG28			
小鼠 (nu/nu, ♀)	Dx3puroB6/Dx3puro (配对) 1, 2, 4 h	血清	尿, 肿瘤
小鼠 (nu/nu, ♀)	BxPC-3 1, 2, 4 h ; 1 h 封闭		尿, 肿瘤, 肾脏

[0217] “PEG28”和“PEG1500”同义使用并描述完全相同的分子实体, 使用“Fmoc-氨基PEG丙酸” (分子量=1544.8Da, PolyPure#15137-2790或Novabiochem#851033) 作为试剂掺入探

针。“PEG1500”是指化合物的大约分子量；“PEG28”是指试剂中乙二醇单元的数目。

[0218] 通过在有意识摄取后的给定时间点通过动物解剖(通常 $n \geq 3$ /时间点或条件),然后在 γ 计数器中测量累积活性和称量器官来测定生物分布数据。数据表示为每克组织的衰减校正的注射剂量的% (% ID/g)。

[0219] 通过在给定培养基中孵育等分试样,通常在室温(PBS)或37°C(血清),然后在放射性HPLC上分析,从而离体测定PBS和血清中的稳定性。数据表示为样品中保持完整的探针%。

[0220] 测定体内尿、肾和肿瘤中的代谢物。有意识摄取后静脉内注射探针,之后在给定时间点从动物中收集组织/器官。根据需要将样品均化并提取,并通过放射性HPLC分析。数据表示为组织/器官样品中保持完整的探针%。

[0221] 肿瘤模型-DX₃puro β_6 /DX₃puro:人黑素瘤细胞系。DX₃puro β_6 已稳定转染以表达整合素 $\alpha_v\beta_6$ 。DX₃puro是阴性对照细胞系。两者表达相等水平的其他整合素(包括 $\alpha_v\beta_3$)。BxPC-3:具有内源性 $\alpha_v\beta_6$ -表达的胰腺细胞系。MIA PaCa-2:胰腺细胞系,无 $\alpha_v\beta_6$ -表达。

[0222] 图2显示化合物1(¹⁸F-FBA-A20FMDV2)在DX₃puroB6和DX₃puro肿瘤中的生物分布数据。主要观察结果包括快速血液清除:(1)肾脏清除(1、2小时的尿非常高(>900% ID/g)),肾脏相对较低,并且随着时间明显清除(<6% ID/g@1小时,<0.5% ID/g@4小时);(2)GI清除较少(胆囊初始高,然后清除;胃低清除(<4% ID/g@1小时));(3)肺1.6% ID/g@1小时-减至0.4% ID/g@2、4小时。肿瘤为中等至大。如果肿瘤尺寸对% ID/g有影响,似乎影响最小(最大影响可能是坏死):POS:0.88->0.23% ID/g@1、4小时->中等,以及清除;NEG:0.49->0.19% ID/g@1、4h->低,以及清除。中等POS/NEG比,在4小时时达到接近相等。

[0223] 图3显示BxPC-3(和MIA PaCa-2)肿瘤中化合物1(18F-FBA-A20FMDV2)的生物分布数据。主要观察结果包括快速血液清除:(1)肾脏清除(1、2小时的尿高(>300% ID/g)),肾脏相对较低,并且随着时间明显清除(<4% ID/g@1小时,<0.2% ID/g@4小时);(2)GI清除较少(胆囊初始高,然后清除;胃低清除(0.5% ID/g@1小时));(3)肺0.8% ID/g@1小时-减至<0.1% ID/g@2、4小时。BxPC-3肿瘤为中等大小(MIA PaCa-2肿瘤为中度至大),如果肿瘤尺寸对% ID/g有影响,似乎影响最小:POS:0.69->0.12% ID/g@1、4小时->中等,清除,相当于DX₃puroB6;NEG:0.16->0.01% ID/g@1、4小时->低、快速清除。良好的POS/NEG比例,随着时间增加,好于DX₃puroB6/DX₃puro配对。

[0224] 图4显示化合物2(18F-FBA-PEG28-A20FMDV2)在DX₃puroB6和DX₃puro肿瘤中的生物分布数据。主要观察包括快速血液清除:(1)肾脏清除(1小时的尿清除高(约200% ID/g));肾脏相对较低,随着时间的推移很好地清除(25% ID/g->2.7% ID/g@1小时、4小时);(2)基本上没有GI清除(胆囊<3% ID/g;肝<0.1% ID/g胃低清除(7% ID/g->1.8% ID/g@1小时、4小时));(3)肺2.0% ID/g@1小时-减至1.4% ID/g@4小时。肿瘤大小中等至大。如果肿瘤尺寸对% ID/g有影响,似乎影响最小(最大影响可能是坏死):POS:0.49->0.49% ID/g@1、4小时->稳定,无清除;NEG:0.11->0.07% ID/g@1、4h->低,清除。良好POS/NEG比,在随后的时间点增加,在2小时时最高。

[0225] 图5显示化合物2(18F-FBA-PEG28-A20FMDV2)在BxPC-3肿瘤中的生物分布数据。主要观察包括快速血液清除:(1)肾脏清除(1小时的尿清除高(约400% ID/g));肾脏相对较低,随着时间的推移很好地清除(19% ID/g->3.3% ID/g@1小时、4小时);(2)基本上没有GI

清除(胆囊<4% ID/g; 肝脏<0.2% ID/g 胃低清除(2.6% ID/g->1.9% ID/g@1小时、4小时); (3) 肺2.1% ID/g@1小时-减至1.7% ID/g@4小时。肿瘤大小中等。如果肿瘤大小对% ID/g有影响, 似乎影响最小。摄取: 1.9->1.5% ID/g@1、4小时->1小时后下降, 然后稳定; 比DX₃puroB6摄取更高。

[0226] 图6显示化合物3 (18F-FBA-PEG28-PEG28-A20FMDV2) 在DX₃puroB6和DX₃puro肿瘤中的生物分布数据。主要观察结果包括快速血液清除: (1) 肾脏清除(1小时的尿清除中等(约60% ID/g)-清除); 肾脏高-未清除(41% ID/g->46% ID/g@1小时、4小时); (2) GI清除较少(胆囊<3% ID/g; 肝<0.1% ID/g 胃中度-稳定(5.5% ID/g->5.5% ID/g@1小时、4小时); (3) 肺1.1->1.3% ID/g@1小时、4小时。肿瘤大小中度至大。如果肿瘤大小对% ID/g有影响, 似乎影响最小(最大可能是坏死): POS: 0.52->0.54% ID/g@1、4小时->稳定, 无清除; NEG: 0.11->0.07% ID/g@1、4小时->低, 以及清除。良好的POS/NEG比, 随着时间增加。

[0227] 图7显示BxPC-3 (和MIA PaCa-2) 肿瘤中化合物3 (18F-FBA-PEG28-PEG28-A20FMDV2) 的生物分布数据。主要观察结果包括快速血液清除: (1) 肾脏清除(1小时的尿清除中等(约1500% ID/g)); 肾脏高-未清除(43% ID/g->42% ID/g@1小时、4小时); (2) GI清除较少(胆囊<1.5% ID/g; 肝<0.2% ID/g 胃中等-稍微上升(2.3% ID/g->6.6% ID/g@1小时、4小时); (3) 肺1.7->1.3% ID/g@1小时、4小时。肿瘤大小适中。肿瘤大小似乎对% ID/g无影响: POS: 1.6->2.1% ID/g@4小时->稳定, 增加, 比DX₃puroB6摄取和保留更高; NEG: 0.22->0.12% ID/g@1、4小时->低, 并清除。良好的POS/NEG比, 随时间显著增加。

[0228] 图8显示DX₃puroB6和DX₃puro肿瘤中化合物4 (18F-FBA-A20FMDV2-PEG28) 的生物分布数据。主要观察结果包括快速血液清除: (1) 肾脏清除(1、2小时的尿非常高(>1000% ID/g)), 肾脏相对较低, 随着时间的推移充分清除至约2% ID/g; (2) GI清除较少(胆囊<10% ID/g-清除; 胃约12% ID/g->2% ID/g-清除; LgInt约9->2% ID/g-清除; 肝脏低(!)<0.5% ID/g和减少); (3) 肺约3->2% ID/g-少量减少。大多数是小肿瘤。肿瘤大小似乎对% ID/g无影响/影响最小(1小时的POS): POS: 在1、2、4小时为1.3、1.0、0.3% ID/g->中度), 并清除; NEG: 在1、2、4小时的0.5、0.3、0.1% ID/g->低, 并清除。随时间的推移中度、相对稳定的POS/NEG。

[0229] 图9显示化合物5 (18F-FBA-PEG28-A20FMDV2-PEG28) 在DX₃puroB6和DX₃puro肿瘤中的生物分布数据。主要观察包括快速血液清除: (1) 主要肾清除(尿: 高, 清除, 396->135% ID/g@1小时、4小时); 肾: 高, 清除, 58->20% ID/g@1小时、4小时); (2) 一些GI清除(胆囊7->2.7% ID/g@1小时、4小时; 胃11%->8% ID/g@1小时、4小时ID/g-缓慢清除; LgInt约5% ID/g稳定; 肝脏<0.5% ID/g@1小时, 减少); (3) 肺约2% ID/g稳定。主要评价小肿瘤。肿瘤大小似乎对% ID/g没有影响: POS: 2.3->1.4% ID/g@1小时、4小时->1小时后下降, 然后稳定; NEG: 0.39->0.14% ID/g@1小时、4小时->低, 并清除。良好的POS/NEG比, 随时间增加。

[0230] 图10显示BxPC-3肿瘤中化合物5 (18F-FBA-PEG28-A20FMDV2-PEG28) 的生物分布数据。主要观察包括非常迅速的血液清除: 主要排泄途径是肾脏, 一些肝胆排泄。肿瘤摄取: 非常好(4.7% ID/g@1小时), 轻微下降至3.4% ID/g@4小时。其他注意器官: 尿早期非常高(482% ID/g@1小时), 减至(223% @4小时), 肾脏较高(76% ID/g@1小时), 清除(19.3% ID/g@4小时), 一些GI清除: 胆囊、胃、肠(所有<20% ID/g@1小时, <10% ID/g@4小时), 肺稍微升高(约2% ID/g, 随时间稳定), 肝脏, 胰腺: 低(<1% ID/g)。清除: 肿瘤低, 大多数器官良好。肺、胰腺、肌肉和骨骼似乎更稳定。肿瘤大小: 20-80mg (小)。肿瘤摄取: 4.7->3.4% ID/g@1小时、

4小时->高,然后轻微下降。比DX₃puroB6摄取更高。最小的肿瘤似乎具有稍低的摄取(在每个群组内)。肿瘤/器官比:从良好到优异,除了肿瘤/肾脏。所进行的封闭实验:封闭剂/量/时间:30mg/kg FBA-PEG28-A20FMDV2@T=-10min;观察:大大减少了肿瘤摄取(相对于未封闭减少92%);尿中完整示踪剂的% ID/g略高于未封闭的样品;所有器官,包括肾、肺、肠和胃显示% ID/g下降,除了尿和胆囊。

[0231] 通过分析尿代谢物评价化合物的稳定性。化合物1 (18F-FBA-A20FMDV2) 用更短的R_t代谢为3种代谢物。放射性示踪剂在15.9分钟洗脱。化合物1的尿代谢物在9.0分钟(44%), 10.4分钟(30%)和10.8分钟(26%)洗脱。比率在动物/时间点之间变化。化合物2 (18F-FBA-PEG28-A20FMDV2) 以稍短的R_t代谢为一个主要代谢物。放射性示踪剂在16.2分钟洗脱。1小时的尿:化合物2的代谢物在15.4分钟洗脱(估计90%);16.4(估计10%;不太可能完整)。4小时的尿:与1小时相同。化合物3 (18F-FBA-PEG28-PEG28-A20FMDV2) 用稍长的R_t代谢。放射性示踪剂在17.4分钟洗脱。1小时的尿:化合物3的代谢物在17.8分钟洗脱,具有小的18.1分钟肩峰。化合物4 (18F-FBA-A20FMDV2-PEG28) 用更短的R_t代谢为3种代谢物。放射性示踪剂在17.0分钟洗脱。化合物4的尿代谢物在10.3分钟、11.7分钟和12.1分钟洗脱。与化合物1-4相反,大部分化合物5 (18F-FBA-PEG28-A20FMDV2-PEG28) 保持完整,用稍长的R_t代谢为仅一种代谢物。放射性示踪剂在17.4分钟洗脱。尿:17.4分钟(1小时69%, 1小时67%, 2小时78%, 4小时45%完整);18.6分钟(1小时31%, 1小时29%, 2小时16%, 4小时55%主要代谢物)。

[0232] 对化合物5 (18F-FBA-PEG28-A20FMDV2-PEG28) 进行另外的稳定性研究。在DX₃puroB6肿瘤中,尽管肿瘤小,仍然存在良好的HPLC信号。化合物5保持大部分完整,具有一些导入(lead-in)代谢物。峰图形与血清稳定性图形相似。在17.4分钟,观察到约82-84%的化合物5是完整的,而在17.0-17.2分钟,观察到约14-18%的具有小峰的可能代谢物。在BxPC-3肿瘤中,化合物5在注射后1小时达到81.45%的稳定性(R_t在17.46分钟),在17.19分钟(17.88%)和17.91分钟(0.67%)具有少量代谢物。在肾脏中,化合物5在注射后1小时达到88.5%稳定性,为尖锐的单峰(R_t在17.4分钟),在14.5分钟(0.4%), 14.9分钟(1.3%), 15.2分钟(2.3%)和18.6分钟(7.5%)具有少量代谢物。在血清中,化合物5在2小时达到大于或等于约80%的稳定性。特别地,在37℃用血清温育,保持完整的化合物5的量如下:30分钟为81.7%, 60分钟为80.4%, 120分钟为79.6% (R_t为17.4分钟)。此外,在约6小时,≥92%的化合物5在PBS中保持完整。

[0233] 方法

[0234] 探针合成

[0235] 可以使用固相肽合成和固相放射性标记技术来合成探针。因此,肽的合成、PEG化以及用固体支持物上的含有氟-18的氟代苯甲酸(¹⁸F FBA)辅基进行放射性标记(固相肽合成和固相放射性标记)。该制备与标准肽化学品(chemistries)完全相容,因此允许在肽中位点特异性引入PEG链(例如,在N末端,C末端,或两者)。此外,该制备也与固相放射性标记化学品完全相容,产生精确定义的高纯度放射成像探针。

[0236] 固体支持物包含带有Rink-酰胺接头表面修饰的肽合成树脂珠。氨基酸是具有三氟乙酸不稳定侧链保护的Fmoc-保护的天然(L-)氨基酸。单分散PEG链,即具有精确限定数目的乙二醇重复单元‘n’的PEG链,用于PEG化(使用的试剂:“Fmoc-氨基PEG丙酸”,88个原

子,分子量=1544.8Da,PolyPure#15137-2790或Novabiochem#851033),而不是由平均分子量周围的聚合物混合物组成的多分散PEG。在HATU/DIPEA活化下,在N,N-二甲基甲酰胺中使用标准固相Fmoc/哌啶化学法完成肽合成和PEG单元的引入。为了引入PEG单元,偶联时间延长至几小时。通过苦基磺酸试验监控反应进程。对于非放射性参考标准,4-氟苯甲酸以与氨基酸相同的方式连接。后处理包括从固体支持物上切割并用三氟乙酸(TFA)/1,2-乙二硫醇(EDT)/三异丙基硅烷(TIPS)/水(94/1/2.5/2.5v/v/v/v)或TFA/TIPS/水(95/2.5/2.5v/v/v)在室温处理3小时后除去侧链保护基,在半制备型反相HPLC色谱上纯化并除去溶剂。产物通常以>95%纯度(UV,220nm)获得,为无色固体。通过MALDI质谱鉴定。

[0237] 当前放射合成

[0238] 在当前方法中,将4- $[^{18}\text{F}]$ 氟苯甲酸连接到固相上的探针,其中使用HATU/DIPEA活化(30分钟,室温,5mg H_2N -肽基树脂),然后用TFA混合物进行处理(2×15 分钟)并进行HPLC纯化(Sutcliffe-Goulden等人,Bioorg Med Chem Lett.,2000;10:1501-3;Sutcliffe-Goulden等人,Eur J Nucl Med Mol I.,2002;29:754-9;Hausner等人,J Med Chem.,2008;51:5901-4)。在来自 $[^{18}\text{F}]$ F-氟化物的轰击(EoB)结束后,在4小时合成时间内以5%衰变校正的放射化学产率,获得放射性标记的肽 $[^{18}\text{F}]$ FBA-PEG₂₈-A20FMDV2-PEG₂₈(作为磷酸盐缓冲盐水(PBS)的溶液形式)。放射性化学纯度>95%。通过与非放射性标准物共注射并观察UV和放射HPLC曲线的共洗脱,来鉴定种类。

[0239] 体外评价

[0240] 在PBS中的稳定性

[0241] 为了证实在PBS中的稳定性,在室温下储存之后的多个时间点通过分析型HPLC分析配制的探针的等分试样。

[0242] 在血清中的稳定性

[0243] 为了证实在血清中的稳定性,从安乐死后的小鼠中收集血液,使其在室温下凝结1小时,并离心。收集血清并与微量离心管中配制的放射性示踪剂(0.74MBq)的等分试样合并。轻轻振荡测试管并保持在37℃。在选定的时间点取出等分试样,与无水乙醇(4℃)混合并离心以沉淀血清蛋白。进行上清液样品的HPLC分析以测定完整放射性示踪剂的百分比。

[0244] 细胞结合

[0245] 为了证实维持的 $\alpha_v\beta_6$ -靶向结合,用成像探针进行细胞结合研究。在实验之前,通过流式细胞术分析细胞系以确认整合素表达的水平。对于细胞结合实验,将无血清培养基(pH7.2)中的放射性示踪剂的7.4KBq等分试样加入细胞悬浮液(3.75×10^6 在无血清DMEM中的DX₃puroB6,DX₃puro,BxPC-3细胞),并在室温下在封闭的微量离心管($n=4$ /细胞系)中孵育1小时。定期搅拌用牛血清白蛋白预处理以阻断非特异性结合的测试管,以防止细胞沉降。离心后,除去上清液,用无血清培养基洗涤细胞沉淀。合并上清液,将细胞重悬于游离培养基中。用 γ -计数器(细胞沉淀对合并的上清液)测定结合放射性的分数。为了测定在60分钟时间点的内化放射性的分数,随后用酸性洗涤缓冲液(pH 2.5,4℃)处理细胞以释放表面结合的活性(Reilly等人,J.Nuclear Medicine,2000;41:429-38),然后用PBS洗涤。用 γ -计数器(细胞沉淀对释放到上清液中的放射性)测定内化分数。

[0246] 体内评价

[0247] 小鼠模型

[0248] 用于体内成像的小鼠模型由在其肩部附近的侧腹皮下注射人癌细胞系的无胸腺 nu/nu 小鼠组成。对于具有内部对照的动物模型,使用一对人黑色素瘤细胞系 (DX₃), 其中之一已预先转染以表达整合素 $\alpha_v\beta_6$ (DX₃PuroB6), 而另一个用作阴性对照 (DX₃Puro)。对于胰腺癌研究,选择 BxPC-3 (天然表达 $\alpha_v\beta_6$) 细胞系。在所有情况下,通过流式细胞术证实注射的细胞系的整合素表达水平。当肿瘤具有约 2 至 8mm 的最大跨度时,将动物用于成像和生物分布研究。

[0249] 成像和生物分布

[0250] 在专用高分辨率小动物 PET/CT 系统 (Siemens Inveon) 上进行成像。使用附带的软件包进行数据分析。根据标准小动物成像方案进行实验。将成像探针 (100-250 μ Ci) 静脉内 (iv) 注射到被麻醉动物 (异氟烷) 的尾静脉中后,在注射后的最初 15 分钟内对被麻醉动物 (异氟烷) 进行动态 4 \times 15 分钟扫描,随后在以后的时间点 (2、4 小时) 扫描 15 分钟。每次扫描后,分别进行透射扫描和 CT 扫描用于衰减校正和解剖学配准。

[0251] 对于生物分布研究,动物用如上所述成像探针 (约 50 μ Ci) 注射,并在给定时间点 (1、2、4 小时 pi, n=3 只动物/时间点) 处死动物。切开后,测量每个器官、组织或肿瘤的放射性水平,并计算衰减校正的归一化摄取值,并表示为每克组织的注射剂量百分比 (% ID/g)。

[0252] 稳定性研究

[0253] 从尿液中回收成像探针:在可能的情况下,在生物分布研究期间收集尿液用于 HPLC 分析。通过用十倍过量的无水乙醇沉淀并随后离心除去尿液等分试样中的蛋白质。通过 HPLC 评价上清液样品。

[0254] 从肿瘤中回收成像探针:注射成像探针 (1mCi),并在 1 小时时间点收集 $\alpha_v\beta_6$ -阳性肿瘤。将肿瘤在 PBS 中匀浆,通过加入无水乙醇沉淀蛋白质。离心后,收集上清液,通过加入乙腈沉淀剩余的蛋白质。通过 HPLC 评价稀释的上清液等分试样。

[0255] 从肾脏中回收成像探针:在稳定性研究期间与肿瘤一起收集肾脏。将肾脏在 PBS 中匀浆,通过加入无水乙醇沉淀蛋白质。离心后,收集上清液,通过加入乙腈沉淀剩余的蛋白质。通过 HPLC 评价稀释的上清液等分试样。

[0256] 额外的体内实验

[0257] 肿瘤组织的放射自显影和免疫组织化学染色:注射成像探针 (1mCi),并在 1 小时收集肿瘤。将肿瘤包埋在冷冻培养基中并立即切片 (20 μ m 用于放射自显影,5 μ m 用于组织学)。将放射自显影样品暴露于储存荧光屏过夜。使用磷光成像仪 (GE Healthcare Storm 860) 以 50 μ m 分辨率读取屏幕。为了组织学检测 $\alpha_v\beta_6$ 整合素,保存冷冻切片直至放射性衰退,用高碘酸-赖氨酸-多聚甲醛溶液固定 5 分钟,并在 Tris 缓冲盐水中洗涤。内源性过氧化物酶用 PBS 中的 3% 过氧化氢封闭,然后与 2.5% 正常马血清温育。将切片与抗整合素 β_6 抗体 (PBS) 一起温育 1 小时,在 TBS 中洗涤,并与过氧化物酶标记的二抗 (抗山羊 Ig) 一起温育。用 3,3'-二氨基联苯胺 (DAB) 染色,用 Mayer's 苏木精复染,脱水并用 DPX 封片介质封片。所有温育在室温下进行。

[0258] 实施例 2. 归巢 (肿瘤靶向) 肽的双末端 PEG 化和肽的氨基酸修饰对于改善整合素 $\alpha_v\beta_6$ 的靶向的阳性体内作用。

[0259] 该实施例说明双末端 PEG 化能够赋予 A20FMDV2 肽及其变体 (例如 K16R 变体) 优异的靶向性和体内药代动力学。特别地,双末端 PEG 化 A20FMDV2 和 A20FMDV2 (K16R) 肽显示出超过

从单个N-或C-末端PEG化预测的大大改善的药代动力学曲线。事实上,两个PEG单元协同作用以实现大大改善的稳定性以及高 $\alpha_v\beta_6$ (+) -肿瘤摄取和保留。同样地,该实施例证明PEG化是生物相容的,并且与其它策略(例如环化)相比,不会施加构象限制,合成简单和直接,并且可以容易地与一系列其它肽修饰组合。

[0260] 介绍

[0261] 在本实施例中描述的研究从含有20个氨基酸的模型肽A20FMDV2开始进行,所述肽选择性靶向细胞表面受体整合素 $\alpha_v\beta_6$ 的肽。这种整合素已被确定为几种挑战性癌的预后指标;在所有情况下,高水平的表达与疾病的严重性和不良预后相关(Ahmed等人,J Histochem Cytochem.,2002;50:1371-80;Elayadi等人,Cancer Res.,2007;67:5889-95;Liu等人,Head Neck Oncol.,2013;5:7;Bandyopadhyay等人,Curr Drug Targets,2009;10:645-52;Bates,Cell Cycle,2005;4:1350-2;Sipos等人,组织病理学(Histopathology),2004;45:226-36),使其成为诊断(例如,使用放射性示踪剂的非侵入性成像)和治疗的重要靶标。在之前用4- $[^{18}\text{F}]$ 氟苯甲酸(即 $[^{18}\text{F}]$ FBA)标记的A20FMDV2-肽的小动物成像研究中,已经显示引入聚(乙二醇)(PEG)单元可以改善药代动力学,包括增加 $\alpha_v\beta_6$ -表达的肿瘤中的摄取(Hausner等人,Cancer Res.,2007;67:7833-40;Hausner等人,Cancer Res.,2009;69:5843-50)。基于与在C-或N-末端带有PEG的 $[^{18}\text{F}]$ FBA-标记的A20FMDV2放射性示踪剂相比的放射性示踪剂的稳定性和 $\alpha_v\beta_6$ -靶向肿瘤摄取,这些研究评价了位点特异性(N-和/或C-末端)PEG化的作用(图1),产生作为前导化合物的双末端PEG化放射性示踪剂 $[^{18}\text{F}]$ FBA-PEG₂₈-A20FMDV2-PEG₂₈(5)。还评估氨基酸取代,目的是实现对肽序列的修饰的进一步益处。特别地,这些研究显示,在化合物5中16位用精氨酸置换赖氨酸以产生 $[^{18}\text{F}]$ FBA-PEG₂₈-A20FMDV2K16R-PEG₂₈(5R),在体外提供意想不到的高 $\alpha_v\beta_6$ -亲和力/保留/选择性并产生改善的体内结果,显示了良好的肾清除,并且显示高放射性示踪剂稳定性。

[0262] 方法

[0263] 使用标准肽化学制备放射性示踪剂并在固相上进行放射性标记(Hausner等人,Cancer Res.,2007;67:7833-40;Sutcliffe-Goulden等人,Eur J Nucl Med Mol Imaging,2002;29:754-9)。使用三种细胞系,DX3puro β_6 [$\alpha_v\beta_6$ (+)],匹配的阴性对照DX3puro[$\alpha_v\beta_6$ (-)]和具有内源性 $\alpha_v\beta_6$ (+) -表达的胰腺癌BxPC-3,在体外(细胞结合和内化)和在携带配对的DX3puro β_6 /DX3puro或BxPC-3异种移植物的鼠模型体内评价放射性示踪剂。

[0264] 结果

[0265] PEG化。PEG单位的大小和位置显著影响 $\alpha_v\beta_6$ -靶向和药代动力学。在细胞结合研究中,PEG化通常大大提高了 $\alpha_v\beta_6$ -表达细胞系的亲和力和选择性,并且导致高度内化到 $\alpha_v\beta_6$ -表达细胞中,如放射性示踪剂2-5所示(与非PEG化的1相比;图11)。

[0266] PEG化也证实了在体内是有益的(通过 $\alpha_v\beta_6$ (+) -肿瘤摄取和保留,以及非靶组织清除测定),但它证明了对PEG基团的大小和布置的敏感性。从3(在N-末端带有两个PEG₂₈单元)与2(在N-末端带有一个PEG₂₈单元,图13和14)相比肾脏摄取和捕获大大增加可以看出,增加大小超过某一点确实导致药代动力学性能降低。将(单)PEG₂₈单元移到C-末端(4)对肾保留影响最小,但不幸的是,减少了 $\alpha_v\beta_6$ -阳性异种移植物中的保留(图13和15)。

[0267] 出人意料地,当在N-末端连接一个PEG₂₈单元并在C-末端连接一个PEG₂₈单元(产生5)时,阳性作用被保留或甚至被改善(高 $\alpha_v\beta_6$ -亲和力/保留/选择性),而在很大程度上避免

了阴性体内副作用(即肾捕获)。在体外,5分别以 $51.0 \pm 0.9\%$ 和 $37.2 \pm 1.9\%$ 与 $\alpha_v\beta_6$ (+)-表达细胞系DX3puro β_6 和BxPC-3结合,并伴随大量放射性内化(DX3puro β_6 :为总放射性的 $33.5 \pm 1.8\%$,BxPC-3:为总放射性的 $28.4 \pm 0.9\%$;图11)。通过比较,对照细胞系DX3puro显示 $3.5 \pm 0.2\%$ 结合和 $0.9 \pm 0.1\%$ 内化。在体内,5在配对的DX3puro β_6 /DX3puro模型中维持高的 $\alpha_v\beta_6$ -定向结合(比率:1小时:5.8/1;4小时:9.8/1)。即使存在非常小的肿瘤($43 \pm 19\text{mg}$;图16),也在胰腺BxPC-3模型中观察到高摄取(摄取:1小时: $4.71 \pm 0.88\% \text{ID/g}$;4小时: $3.39 \pm 1.34\% \text{ID/g}$)。这些研究表明,5有利于检测小的 $\alpha_v\beta_6$ -阳性原发性肿瘤和转移。这些研究还表明,与其他A20FMDV2示踪剂相比,5保持大部分完整(在肿瘤中1小时时 $>80\%$)。

[0268] 氨基酸取代;置换Lys16。因多个因素,靶向置换位置16处的赖氨酸,特别是(1)赖氨酸侧链氨基排除了位点特异性的基于酰胺键的放射性标记的可能性(例如,用 $[^{18}\text{F}] \text{FBA}$ 肽的溶液,因为这种氨基将与N末端氨基竞争与辅基结合(这在固相放射性标记过程中不是问题,因为氨基酸侧链,包括赖氨酸的氨基,在放射性标记前是保持被保护的),和(2)通过类似的碱性氨基酸(但缺少胺)置换可以增加稳定性,同时保持靶标亲和力和选择性。通过细胞结合实验评价第16位赖氨酸的重要性的初步研究用单PEG化的2进行:用简单的烷基氨基酸丙氨酸(取代:K16A;2A)进行取代;酸性氨基酸谷氨酸(K16E;2E);和碱性氨基酸精氨酸(K16R;2R)。如图17所示,只有K16R取代(2R)维持对 $\alpha_v\beta_6$ (+)-表达细胞系DX3puro β_6 的亲力和选择性,这表明在该位置的碱性(但不一定是胺)侧基是重要的。相比之下,非功能化(K16A)和酸性(K16E)修饰导致性能的显著降低。

[0269] K16R修饰与双末端PEG化(产生 $[^{18}\text{F}] \text{FBA-PEG}_{28}$ -A20FMDV2K16R-PEG $_{28}$;5R)的组合显示对 $\alpha_v\beta_6$ (+)-表达细胞系DX3puro β_6 保持极好的亲和力和选择性(图17)。因此,还在配对的DX3puro β_6 /DX3puro异种移植小鼠模型体内测试化合物5R。如图18所示,5R表现出比其母体5中所见到的(图16)更好的药代动力学曲线:对于所有评估的时间点(在4小时时达到12.9/1),DX3puro β_6 /DX3puro异种植物摄取比率更高,而肾脏中的放射性浓度整体较低。K16R突变的总体益处还通过表2中列出的生物分布数据来说明:大多数组织显示出5R比5更低的 $\% \text{ID/g}$ 摄取(例外:胆囊(更高,但可接受的绝对摄取),肺(约等于)和DX3puro β_6 肿瘤(更高-期望),并且,相应地,5R的关键DX3puro β_6 /器官比率增加显著高于5。作为另外的益处,K16R替换对放射性示踪剂稳定性也具有积极作用,如图19所示:对于配制的5R,没有观察到部分分解(指示辐射分解/氧化),而母体5通常在放射性示踪剂制剂中显示约5%的分解。

[0270] 表2. 注射后2小时的配对的DX3puro β_6 /DX3puro小鼠模型中5和5R的生物分布数据。器官摄取被列为 $\% \text{ID/g} \pm \text{S.D.}$ ($n=3$ /放射性示踪剂/时间点;除了 $\alpha_v\beta_6$ -阳性靶DX3puro β_6 肿瘤,低摄取是理想的)。还列出了每种器官(除了 $\alpha_v\beta_6$ -阳性靶DX3puro β_6 肿瘤,减少是理想的)中5R和5之间的差异(相对 $\%$ 变化)和 $\alpha_v\beta_6$ -阳性DX3puro β_6 肿瘤和各种器官之间的摄取比率(高比率是理想的)。

示踪剂	5		5R		相对%平均值(或值) 的改变 对 5	
结构	18FFBA-PEG28-A20FMDV2-PEG28		18FFBA-PEG28-A20FMDV2 K16R-PEG28		(% ID/g [5] = 100%) (比率 [5] = 100 %)	
模型	雌性 nu/nu 小鼠中 DX3 配对		雌性 nu/nu 小鼠中 DX3 配对			
时间点	2 小时		2 小时			
器官	平均值	SD	平均值	SD		
尿	348.755	164.277	106.913	13.124	-69	
血液	0.305	0.021	0.104	0.017	-66	
胆囊	6.637	2.647	11.480	7.200	73	
肝脏	0.298	0.124	0.094	0.017	-69	
心脏	0.875	0.164	0.502	0.175	-43	
肺	1.737	0.563	1.831	0.237	5	
脾	0.072	0.012	0.054	0.025	-26	
肾脏	33.319	2.790	12.398	2.939	-63	
胰腺	0.333	0.092	0.135	0.054	-60	
胃	9.222	0.196	4.576	0.439	-50	
Sm 肠	2.561	0.537	1.231	0.184	-52	
膀胱	2.396	0.365	1.387	0.429	-42	
皮肤	1.100	0.350	0.833	0.168	-24	
肌肉	0.726	0.111	0.528	0.093	-27	
骨	0.608	0.051	0.587	0.082	-4	
尾	0.565	0.370	0.413	0.084	-27	
Lg 肠	6.299	0.759	3.975	1.001	-37	
脑	0.039	0.002	0.023	0.002	-42	
肿瘤(+)	1.416	0.195	1.756	0.359	24	
肿瘤(-)	0.233	0.011	0.178	0.084	-23	
(% ID/g 栏: 1、2、4 小时-尿)		(% ID/g 栏: 1、2、4 小时-尿)		对 5(相同器官&时间)		
摄取比率						
器官 1/器官 2						
TUM(+)/TUM(-)	6.08		9.85		62	
TUM(+)/血液	4.64		16.83		262	
TUM(+)/肾脏	0.04		0.14		233	
TUM(+)/肝脏	4.74		18.68		294	
TUM(+)/肌肉	1.95		3.33		70	
TUM(+)/胰腺	4.25		13.01		206	
				对 5(相同器官&时间)		

[0272] 结论

[0273] 关于PEG单元的加入,如对化合物5所示,仅双末端PEG化能够赋予A20FMDV2-基放射性示踪剂良好的靶向特性和良好的总体体内特征:其显示出大大改善的药代动力学曲线,超过了从单独N-或C-末端PEG化预测的结果。两个PEG单元协同作用以实现大大改善的稳定性以及高 $\alpha_v\beta_6$ (+) - 肿瘤摄取和保留。这种双末端PEG化策略也可以有利于其他归巢肽,类似于环化(White等人,Nat Chem.,2011;3:509-24;Okarvi,Med Res Rev.,2004;24:357-97;Roxin等人,Future Med Chem.,2012;4:1601-18)。值得注意的是,PEG化是生物相容的,并且与其它策略(例如环化)相比,不施加构象限制,是合成简单和直接的,并且可以容易地与一系列其它肽修饰组合。

[0274] 当基于A20FMDV2评价 $\alpha_v\beta_6$ (+) - 靶向肽的双末端PEG化策略时,研究赖氨酸残基处的修饰,发现K16R替换是特别有益的。化合物5R在体外保持高 $\alpha_v\beta_6$ -亲和力/保留/选择性,并且产生改善的体内结果(包括12.9/1的最佳的 $\alpha_v\beta_6$ (+) DX3puro β_6 / $\alpha_v\beta_6$ (-) DX3puro异种移植瘤比率),显示良好的肾清除,和高放射性示踪剂稳定性。

[0275] 实施例3.开发具有针对 $\alpha_v\beta_6$ -靶向分子成像和治疗的改善的亲和力和药代动力学的双末端PEG化肽。

[0276] 该实施例说明了具有改善的亲和力和药代动力学的新分子成像剂的开发以及几种新的 $\alpha_v\beta_6$ -靶向治疗策略的开发和功效测试。特别地,该实施例提供了基于PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈作为三种治疗策略的递送载体的 $\alpha_v\beta_6$ -靶向治疗:(i)促凋亡肽_D

(KLAKLAK)₂; (ii) 治疗性放射性核素⁹⁰Y; 和 (iii) 胶束-基紫杉醇 (PTX) 纳米载体。该实施例还提供了修饰, 包括多聚化和/或添加血白蛋白结合基序, 以进一步改善PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R)-PEG₂₈的亲合力, 体内稳定性, 靶向能力和/或清除行为。

[0277] 背景和临床意义

[0278] $\alpha_v\beta_6$ 整合素作为癌症成像和治疗的分子靶标: 具有显著且快速增长的文献, 其表明 $\alpha_v\beta_6$ 整合素是用于成像和治疗的极具吸引力的分子。 $\alpha_v\beta_6$ 是上皮特异性细胞表面受体, 其在健康成人上皮中检测不到, 但在广泛的上皮衍生的癌症中显著上调 (1-12)。这种受体通常位于肿瘤的侵袭性前沿和浸润边缘, 并在侵袭和转移中起关键作用, 并且其表达通常与不良预后有关 (13-19)。由于 $\alpha_v\beta_6$ 作为降低的无进展存活 (PFS), 反应率 (RR) 和总体存活 (OS) 的预测因子的独特表达 (20, 21), 我们和其他人认为很需要这种负相关的一线希望来利用 $\alpha_v\beta_6$ 作为诊断和治疗措施。恶性和健康组织之间的高对比度和 $\alpha_v\beta_6$ 的功能相关性, 特别是在具有更具侵袭性表型的那些疾病中, 一起将 $\alpha_v\beta_6$ 直接放置在优秀的靶标列表上, 对此开发诊断和治疗化合物对于非常广泛的侵袭性疾病的未来管理是至关重要的。

[0279] 靶向 $\alpha_v\beta_6$ 分子成像剂和治疗剂的临床影响: 除了由于 $\alpha_v\beta_6$ 的异常但是特异性表达而获得的高对比度之外, 表现出该对比度的疾病的范围不限于对一小群患者的应用。当然, 这些 $\alpha_v\beta_6$ -靶向成像和治疗剂具有在几种恶性肿瘤的治疗和管理中显著的潜力, 所述恶性肿瘤通过起源或分级位于我们目前的治疗潜能之外。支持这些权利要求的文献报道 (22-25) 是众多的并且随着 $\alpha_v\beta_6$ 的广泛的生物学影响和临床效用成为教条而呈几何级数增长。在这里, 我们强调最近的在结肠直肠癌和乳腺癌中的适应症/应用, 其累积证明 $\alpha_v\beta_6$ 靶向诊断和治疗的发展必须发生的直接性。

[0280] 结肠直肠癌 (CRC) 是癌相关死亡的第二最常见原因, 高度归因于肝转移 (11, 18, 26)。许多报告显示 $\alpha_v\beta_6$ 在CRC模型中的细胞迁移、增殖和侵入中的明确作用以及 $\alpha_v\beta_6$ 和CXCR4之间的被报道的相互作用, 进一步定义 $\alpha_v\beta_6$ 在肝转移中的作用 (25)。在最近的II期试验中, 研究了阿比妥珠单抗 (Abituzumab) 联合西妥昔单抗/伊立替康标准治疗 (SoC) 在治疗患有KRAS w/t转移性结直肠癌患者的疗效 (27)。这项研究证实 $\alpha_v\beta_6$ 对接受SoC的患者的OS具有负面预后。此外, 增加的 $\alpha_v\beta_6$ 表达通过回顾性生物标记物分析确定与OS增加 (死亡风险比SoC降低高达59%) 呈正相关, 并且还可能是组合的阿比妥珠单抗/SoC治疗方案的PFS和RR的阳性预测因子。在该随机研究中未满足主要终点 (PFS); 作者建议的结果可以通过选择更可能受益于联合治疗的患者群体 (即患有 $\alpha_v\beta_6$ +转移的患者) 来逆转。在作者的话中并在对 $\alpha_v\beta_6$ 靶向诊断的关键但未满足的需要的强调中, “开发伴随诊断测试以选择适当的患者群体对于进一步的试验将是至关重要的”。

[0281] 导管原位癌 (DCIS) 占乳腺癌的25-30%, 其中只有一小部分将发展为侵袭性癌症; 然而, 缺乏对DCIS妇女的预后指标导致过度诊断和过度治疗。诊断后, DCIS患者立即面临关于治疗的重大决定; 没有相关的生物标志物来帮助指导这些决策是必须纠正的医疗保健失败。患者仍然存在的大问题是, “我的DCIS会在我的一生中发展成侵袭性癌症吗?” 目前, DCIS患者被视为它们会发展因为没有强的标志物来因为侵袭性癌区分DCIS。“我们正在治疗DCIS不是因为DCIS本身导致任何问题, 而是因为它是发展为侵袭性癌症的主要风险因素。”MSKCC乳腺癌服务中心 (Breast Service) 的主任Monica Morrow医学博士说。其疾病可能需要几十年发展的50岁以上的妇女的困境是是否观察和等待是比根治性乳房切除术更

好的选择。“如果我们可以确定一个分子标记物,其可以预测哪些DCIS会发展到侵袭性癌症而哪些会永远停留在DCIS,这将是一个巨大的临床进步。”Monica Morrow医学博士(28)。显然,如果成功,该成像剂将对晚期疾病患者以及对于鉴定那些疾病可能永远不会发展的患者具有显著的影响和益处,并且可以预测和预后的方式使用,为面临非常困难的治疗决定的妇女给出极度需要的信息和选项。针对这一具有挑战性的情况,对预测性生物标志物的研究已经加速,并且 $\alpha_v\beta_6$ 是最有希望的候选者之一。回顾性分析显示DCIS中肌上皮细胞中的 $\alpha_v\beta_6$ 表达是发展和复发的预测因子,100%的 $\alpha_v\beta_6$ +DCIS与侵袭性疾病相关(14)。因此, $\alpha_v\beta_6$ 靶向成像剂的开发将显著增强临床医生通过发展为侵袭性癌症的风险对患者分层的能力,并且当他们考虑治疗选项时提供DCIS患者非常需要的信息。

[0282] 在被诊断患有乳腺癌的那些患者中,约25-30%是HER2+,一个更具侵袭性的亚组。曲妥珠单抗被用作HER2+患者的辅助治疗,但不幸的是超过70%的患者发展抗性,并且迫切需要新的治疗。最近的证据表明 $\alpha_v\beta_6$ +HER2+疾病是最具破坏性的乳腺癌类型之一,OS仅略高于50%(HER2+患者的OS,独立于 $\alpha_v\beta_6$ 状态,为65.1%)。虽然曲妥珠单抗抗性的病理是异种的,通常涉及PI3K信号传导轴的成员,并且存在显示 $\alpha_v\beta_6$ 和该途径之间的直接连接和串扰的实质数据。此外,这种观察至少允许基于 $\alpha_v\beta_6$ 表达对患者进行划分,并可基于告知进行更多治疗考虑,这两者当然取决于 $\alpha_v\beta_6$ 靶向诊断的可用性。在治疗HER2+疾病的上下文中,获得曲妥珠单抗抗性是关键临床问题。对于其疾病最终避开曲妥珠单抗作用的那些患者,直接靶向 $\alpha_v\beta_6$ 信号传导或简单靶向 $\alpha_v\beta_6$ +细胞的疗法在缺乏替代物的阶段提供了额外的治疗选项。

[0283] 虽然已经鉴定出 $\alpha_v\beta_6$ 的疾病的列表继续大量扩大,但 $\alpha_v\beta_6$ 最初在胰腺癌中被鉴定。Sipos等人证实在胰腺导管腺癌(PDAC)中显示高水平的 $\alpha_v\beta_6$ -表达,94%(32/34)的样品收到最大分数(29)。胰腺癌在美国是最致命的恶性肿瘤,其中超过98%的被诊断患有该疾病的人最终死于该疾病(30)。当局部疾病被确定时,存在胰腺癌的唯一治疗性治疗;然而,当癌症局限于胰腺或局部淋巴结时,仅20%的患者被诊断,此时手术切除提供治愈的机会。结合当前管理的困难,基于当前可用的成像模式(对比度增强的计算机断层(CT)扫描或 ^{18}F FDG-正电子发射断层扫描-PET/CT),高达50%的被认为患有局部疾病的患者将在探查手术时具有转移性疾病(31,32)。显然需要非侵入性成像以准确地确定疾病的程度,使得患有局部肿瘤的患者可以进行具有经历潜在治愈性切除的高可能性的探查手术,而患有晚期癌症的那些患者可以避免进行仅用来确定疾病程度的探查手术。NCI发起的PDAC智囊团确定早期检测的方法属于对抗这种疾病的最关键的未满足的需求。共识是允许早期检测、患者分层和在较早时间点评估治疗功效的工具是至关重要的。显然,对于改进的成像剂和治疗存在未满足的需求,而 $\alpha_v\beta_6$ -靶向化合物具有满足该需要的巨大希望。

[0284] 总之, $\alpha_v\beta_6$ -指导的成像和治疗将提供关键的阶段和分级(惰性/攻击性)信息,指导难以在目前的诊断方法上做出的治疗决定,并且对于治疗不足和过度治疗的癌症患者具有显著的结果。本实施例中描述的方法的临床影响对于广谱的疾病是直接的,并且在当今临床医生面临的一些最致命的恶性肿瘤的治疗中具有突破障碍的潜力。

[0285] $\alpha_v\beta_6$ 特异性分子成像剂:迄今为止,没有用于 $\alpha_v\beta_6$ 的分子成像剂已经使其进入临床,并且少数正在开发中。通过在肺腺癌细胞系上的无偏噬菌体生物淘选,Brown等人鉴定了20个氨基酸的肽H2009.1,随后鉴定了结合靶标为 $\alpha_v\beta_6$ (33)。他们证实 $\alpha_v\beta_6$ 在许多非小细

胞肺癌 (NSCLC) 患者中上调, 是一种独立的阴性预后指标, 并且报道 $\alpha_v\beta_6$ 在NSCLC的疾病发展中为“开启” (2)。2013年, Brown描述了使用这种肽作为四聚体来改善多柔比星脂质体制剂的靶向性 (34)。Gambhir组采用的另一种方法是工程化的胱氨酸结 $\alpha_v\beta_6$ 肽, 并且他们报道了用 ^{18}F -氟放射性标记的两种肽。虽然在一小时后在人血清 (离体) 中肽 $>80\%$ 完整, 但是这些结肽 (knottin peptides) 的体内评价显示肾摄取 $>27\%$ ID/g (35, 36)。

[0286] 我们的方法: 我们已经选择了两种方法来鉴定 $\alpha_v\beta_6$ 特异性肽配体。我们使用基于口蹄疫病毒 (FMDV) 的包膜蛋白的GH环和组合一珠一化合物 (OBOC) 库方法 (37) 的“合理的”方法。该合理的方法提供了成功的结果, 如下所示。尽管例如OBOC的库方法和噬菌体在鉴定许多先导物 (lead) 方面具有巨大潜力, 但是从展示平台 (珠或噬菌体) 中分离肽通常导致脱离后需要进一步优化的具有中等亲和力的单体 (34, 38)。这也是我们对于OBOC库的经验, 其中从筛选鉴定的先导物在它们将对我们目前A20FMDV2-基肽的高亲和力和体内选择性匹配之前保留相当多的优化。

[0287] 使用A20FMDV2-基肽的数据: $\alpha_v\beta_6$ 整合素是纤连蛋白, 腱生蛋白, 玻连蛋白, TGF β 的潜伏相关肽 (LAP) 和FMDV的VP1外壳蛋白的受体。我们的第一代 $\alpha_v\beta_6$ 靶向肽是A20FMDV2, 一种20个氨基酸的肽, NAVPNLRGDLQVLAQKVART, 基于FMDV的VP1蛋白的GH环的序列。A20FMDV2对固定化 $\alpha_v\beta_6$ 显示出3nM的高亲和力, 与其他RGD结合整合素相比, 具有至少1000倍的选择性 (39, 40)。我们最初证实了A20FMDV2以 ^{18}F FBA-A20FMDV2作为 $\alpha_v\beta_6$ 体内成像剂的前景。虽然观察到体内 $\alpha_v\beta_6$ 特异性靶向, 快速肿瘤清除 (1小时时0.66% ID/g, 4小时时0.06% ID/g) 和差的体内稳定性排除了其进一步应用并导向一系列改进 (主要通过所使用的PEG和放射性标记辅基的大小和位置) 以得到偶联物 ^{18}F FBA-PEG $_{28}$ -A20FMDV2 (K16R) -PEG $_{28}$ (39-44)。 ^{18}F FBA-PEG $_{28}$ -A20FMDV2 (K16R) -PEG $_{28}$, 特征为赖氨酸被精氨酸替换的双PEG化肽, 4小时具有2.64% ID/g的 $\alpha_v\beta_6$ -阳性肿瘤保留, 显示4小时时肾含有 $<8\%$ ID/g的优先肾排泄, 2小时时在血清中90%完整, 并且4小时时 $\alpha_v\beta_6$ -阳性与阴性肿瘤比率为12.5:1 (图20)。赖氨酸的替换导致肽在N-末端仅带有单个胺基团, 也因此允许用 ^{18}F SFB或类似的活化酯进行位点特异性溶液相放射性标记。总之, ^{18}F FBA-PEG $_{28}$ -A20FMDV2 (K16R) -PEG $_{28}$ 显示出作为 $\alpha_v\beta_6$ 靶向肽的极好潜能。

[0288] 创新

[0289] $\alpha_v\beta_6$ 表达的广泛流行和与癌症的侵袭性表型的相关性, 以及患者存活的负相关性, 清楚地表明 $\alpha_v\beta_6$ 是疾病成像和治疗的特别有吸引力的靶标。尚未有任何 $\alpha_v\beta_6$ 特异性分子成像剂进入临床, 且据我们所知, 仅正在评估一种基于抗体的 $\alpha_v\beta_6$ 靶向治疗 (NCT01371305; clinicaltrials.gov, 特发性肺纤维化), 显然开发诊断成像剂和靶向治疗策略存在未满足的需求。因此, 对于诊断成像剂以及新的靶向治疗的开发都需要作出重大的努力。该实施例描述了具有改善的亲和力和药代动力学的新型分子成像剂的开发以及几种新的 $\alpha_v\beta_6$ 靶向治疗策略的功效的测试, 总结如下:

[0290] 1. PEG $_{28}$ -A20FMDV2 (K16R) -PEG $_{28}$ 作为递送载体 $\alpha_v\beta_6$ 靶向治疗。PEG $_{28}$ -A20FMDV2 (K16R) -PEG $_{28}$ 用作三种治疗策略的载体: i) $(\text{KLAKLAK})_2$ (促凋亡肽); ii) 治疗性放射性核素 ^{90}Y (β^- 发射体, 适合治疗大肿瘤的能量); 和iii) 胶束-基的紫杉醇 (PTX) 纳米载体。在细胞测定中体外评估和在小鼠模型中体内评估所有三种策略的功效。用正电子发射断层扫描 (PET), 生物发光成像 (BLI) 和切伦科夫发光成像 (CLI) 跟踪体内生物分布和量化治疗功效。

[0291] 2. 通过改善PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) -PEG₂₈的药代动力学性质来进行首次人类研究。血白蛋白结合基序的多聚化和/或添加用于进一步改善PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) -PEG₂₈的亲合力,体内稳定性,靶向能力和清除行为。用各种共价辅助基团,螯合剂和“点击”化学来设计最佳的放射性标记方法。产生总体选择标准,合成的容易性和速度,位点特异性标记,亲合力和选择性,以及体内肿瘤靶向保留和非肿瘤组织清除。

[0292] 方法

[0293] 1. $\alpha_v\beta_6$ -靶向治疗

[0294] 原理:癌症的成功治疗需要治疗剂的有效靶向递送,靶向上的细胞内渗透,并且将来最有可能从不同机制的疗法的组合中获益。 $\alpha_v\beta_6$ 受体在正常成人上皮中不表达的事实表明其作为治疗的良好分子靶标(正常的邻接组织不应受影响)。肽PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) -PEG₂₈对 $\alpha_v\beta_6$ 受体的独特“归巢”及其快速内化使其成为 $\alpha_v\beta_6$ 靶向治疗的理想载体。PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) -PEG₂₈用作三种不同机制的治疗的载体:i) $(KLAKLAK)_2$ (通过破坏线粒体膜引起细胞毒性的促凋亡肽)的递送;ii) 治疗性放射性核素⁹⁰钪(β^- 发射体,适合治疗大肿瘤的能量);和iii) 紫杉醇的胶束基纳米载体制剂(PTX,其通过微管的异常稳定引起有丝分裂停滞,其又导致细胞死亡)。在细胞测定(例如,WST-1,TUNEL和半胱天冬酶3/7)的体外评价和小鼠模型(例如配对的阳性和阴性皮下异种移植物和抗原阳性原位异种移植物)中体内评价所有三种策略的功效。用正电子发射断层扫描(PET),生物发光成像(BLI)和切伦科夫发光成像(CLI)来跟踪体内生物分布和测量这些靶向治疗的治疗功效。

[0295] 模型描述:体外研究:除非另有说明,DX₃/mTFL/ITGB6和DX₃/mTFL(均源自亲本DX₃黑素瘤细胞系)用作所有体外测定的阳性和阴性对照。DX₃/mTFL/ITGB6在CMV启动子的控制下稳定表达 β_6 整合素(不在亲本细胞系或DX₃/mTFL中表达)。由于 α_v 整合素(唯一能够与 β_6 异源二聚化的整合素)通常在DX₃细胞系中表达, β_6 的外源性表达导致细胞表面存在 $\alpha_v\beta_6$ 。小鼠模型:配对的DX₃/mTFL/ITGB6和DX₃/mTFL系还允许体内检查三种治疗的基于 $\alpha_v\beta_6$ 的选择性作用。因此,使用配对的DX₃/mTFL/ITGB6和DX₃/mTFL异种移植物模型来确定所有三种PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) -PEG₂₈靶向治疗的最大耐受剂量(MTD)和治疗效果。对于MTD研究,使用非荷瘤小鼠以避免对药物的分布,整体健康和体重以及肿瘤的快速生长的混杂解释的影响。为了建立配对的异种移植物,被麻醉的(异氟烷)小鼠接受DX₃/mTFL/ITGB6和DX₃/mTFL细胞(3×10^6 在100 μ L无血清培养基中)的两侧,皮下(SC)注射到肩胛下方区域。当通过卡尺测量和BLI测定配对的肿瘤达到100-200mg时,将小鼠分成如下所述的群组。在配对SC研究结束时,在使用BxPC-3/mTFL(具有天然存在的、升高的ITGB6表达的人胰腺腺癌细胞系)的原位异种移植模型中选择单一先导治疗剂用于进一步分析。将BxPC-3/mTFL细胞(1×10^6 在100 μ L盐水中)通过肋下切口注射到远端胰腺中。保持压力1分钟以促进穿刺部位的止血以及防止细胞悬浮液的溢出。然后用5-0尼龙缝线或止血夹封闭外科手术切口,一周后取出。考虑到麻醉快速消除,恢复发生在前10分钟和继续观察小鼠呼吸活动,皮肤膨胀和运动1小时。手术后施用丁丙诺啡,并且在手术后继续用药,每12小时一次,总共48小时。将小鼠饲养在动物园中并每天监控直到发展为可感知的肿瘤,此时将小鼠分成如下所述的群组。在研究过程完成后,将所有动物安乐死(在麻醉下颈椎脱臼)。所有细胞系和得到的异种移植物表达mTFL,异种萤火虫荧光素酶的热稳定变体,其可用于纵向研究所得肿瘤的生物发光成像。

[0296] 1.1 用PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) -PEG₂₈选择性靶向促细胞凋亡肽 $(KLAKLAK)_2$

[0297] 14个氨基酸两亲性肽_D (KLAKLAK)₂最初被描述为破坏细菌细胞膜的抗菌肽 (56)。考虑到线粒体和细菌膜结构的进化相似性,当被内化到真核细胞中时,_D (KLAKLAK)₂破坏线粒体膜,其反过来触发细胞凋亡 (57)。当偶联到“归巢”肽_D (KLAKLAK)₂已经证明成功在细胞中特异性累积并导致细胞死亡的 (58-60)。评估了_D (KLAKLAK)₂和PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) -PEG₂₈偶联物的功效和特异性。对 $\alpha_v\beta_6$ 受体的独特“归巢”和PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) -PEG₂₈的快速内化 (1小时时,在 $\alpha_v\beta_6$ 细胞中,>70%结合和>50%内化) 使其成为_D (KLAKLAK)₂的理想递送载体 (图20)。

[0298] 在具体的实施方案中,使用固相肽合成 (SPPS) 合成_D (KLAKLAK)₂-GG-PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) -PEG₂₈偶联物。在其它实施方案中,可以使用两种肽之间的会聚叠氮化物-炔烃胡伊斯根 (Huisgen) 1,3-偶极环加成 (“点击”反应) 方法来合成_D (KLAKLAK)₂-GG-PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) -PEG₂₈偶联物。在某些实施方案中,可以用纳米制剂来实现期望的治疗效果,例如,如果单独_D (KLAKLAK)₂被证明是有毒的。

[0299] 1.1.a) _D (KLAKLAK)₂-GG-PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) -PEG₂₈偶联物的合成

[0300] 使用标准Fmoc化学法在Rink-树脂上手动合成所用的所有肽。对于_D (KLAKLAK)₂和PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) -PEG₂₈偶联物,甘氨酸-甘氨酸 (GG) 接头掺入两种肽之间,以最小化可能阻止结合和内化的空间位阻。使用标准RP-HPLC方法纯化所有肽并使用MALDI-MS表征。使用 [¹⁸F]FBA制备、表征并放射性标记PEG₂₈-A20FMDV2-GG-_D (KLAKLAK)₂-K和_D (KLAKLAK)₂-GG-PEG₂₈-A20FMDV2-K,并进行细胞结合研究 (图21)。结果表明_D (KLAKLAK)₂与PEG₂₈-A20FMDV2-PEG₂₈的偶联不影响其对整合素 $\alpha_v\beta_6$ 的亲合力、特异性和内化潜力。在24小时期间评估肽偶联物的血清稳定性。在37℃下用血清温育_D (KLAKLAK)₂-GG-PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) -PEG₂₈偶联物,在1、2、4、12和24小时取等分试样,用乙醇沉淀血浆蛋白,通过HPLC分析上清液,确定完整偶联物的百分比。

[0301] 1.1.b) _D (KLAKLAK)₂-GG-PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) -PEG₂₈偶联物的体外功效

[0302] 使用水溶性四唑 (WST-1, 罗氏) 细胞增殖,末端脱氧核苷酸转移酶dUTP切口末端标记 (Click-iT TUNEL, Life Technologies) 和半胱天冬酶3/7测试 (半胱天冬酶-Glo, 普洛麦格公司 (Promega)) 测定_D (KLAKLAK)₂-GG-PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) -PEG₂₈的治疗功效。用范围为0-500μM的20个浓度或与以下对照之一匹配的浓度的_D (KLAKLAK)₂-GG-PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) -PEG₂₈处理在96孔板 (WST-1, 半胱天冬酶3/7) 或8孔腔室玻片 (TUNEL测定) 上培养的细胞:i) _D (KLAKLAK)₂和PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) -PEG₂₈未偶联;ii) 单独的_D (KLAKLAK)₂;iii) 单独的PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) -PEG₂₈;或iv) 单独的媒介物 (盐水)。在处理2、6、24和48小时,根据制造商的建议完成测定。使用Prism 6.0软件 (GraphPad) 完成数据的非线性回归分析,以确定偶联物和对照的半数最大抑制浓度 (IC₅₀)。

[0303] 1.1.c) 最大耐受剂量 (MTD) 的测定

[0304] MTD取决于所递送的治疗和完成研究所处的模型,并且必须根据所提出的每种治疗的经验确定。将非荷瘤小鼠分为六组,其通过尾静脉注射接受一系列浓度_D (KLAKLAK)₂-GG-PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) -PEG₂₈偶联物 (0、5、10、15、20或25μg/g) 中的一个作为单个剂量。然后监控动物30天的时间,以观察不适、不可接受的副作用或体重减轻的迹象。在研究结束时,计算MTD,并且该数据用于确定在下面描述的疗效研究中使用的治疗剂量。

[0305] 1.1.d) _D (KLAKLAK)₂-GG-PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) -PEG₂₈偶联物的治疗功效

[0306] 将携带配对的DX₃/mTFL/ITGB6和DX₃/mTFL-衍生的异种移植物(100-200mg)的小鼠分成6组并接受单次注射偶联物(实验组#1),未偶联的_D(KLAKLAK)₂和PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈(对照组#1),单独的_D(KLAKLAK)₂(对照组#2),单独的PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈(对照组#3),或盐水(对照组#4)。在处理96小时后,将来自每个组的三只小鼠安乐死,并保留组织、肿瘤和器官用于形态学(H&E)和其他不适/死亡指标(胱天蛋白酶-3,TUNEL等)的免疫组织化学(IHC)分析。对于剩余的小鼠,通过BLI每周两次测定肿瘤大小。为了完成BLI,在图像采集前15分钟向被麻醉的(异氟烷)小鼠腹膜内注射D-荧光素(150mg/kg)。在该摄取期后,将小鼠(一次高达5只)置于预热的成像表面并用持续的异氟烷处理。以总扫描时间<1分钟采集照相和发光图像。在每个成像时间点,记录动物体重以确保在治疗后没有动物显示不可接受的体重减轻(大于10%动物体重)。所有动物遵循该计划,直到肿瘤达到由IACUC人道终点策略定义的最大尺寸。

[0307] 1.2 用⁹⁰Y-DOTA-PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈的 $\alpha_v\beta_6$ 靶向放疗

[0308] 肽已经在临床上证明了其作为用于放射性核素治疗的靶向递送载体的成功,或者称为肽受体靶向治疗(PRTT)。迄今为止,PRTT最成功的报道是使用生长抑素受体(SSTR)肽类似物,⁹⁰Y-DOTA-TOC和¹⁷⁷Lu-DOTA-TATE来治疗神经内分泌肿瘤(NET)患者(66-68)。PRTT的成功需要:i)肽的特异性靶向以递送有效放射剂量;ii)肽的良好体内稳定性和内化;和iii)放射性核素的适当物理性质。与¹¹¹In-Octreoscan(用于SSTR表达肿瘤的诊断剂)一样, $\alpha_v\beta_6$ -靶向治疗可以包括用治疗性放射性核素放射性标记PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈(69)。⁹⁰Y由于 β^- 粒子的高能量(2.3MeV)和组织中的12mm的最大范围(非常适合于治疗较大的肿瘤)以及使用CLI成像 β^- 发射以监控肿瘤部位累积的能力,是一种示例性的有用的放射性核素。对于PRTT,同时输注碱性氨基酸如赖氨酸,已在患者中被用作肾保护剂并成功降低肾毒性(70,71)。多聚化和/或向具有改善肽的药代动力学性质的潜力的PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈添加白蛋白结合基序也可以减少肾脏保留。在某些实施方案中,使用PRTT与多重放射性核素方法以及多受体/白蛋白载体方法两者的组合。在其他实施方案中,利用⁹⁰Y和¹⁷⁷Lu的不同物理性质,可以在不同肿瘤大小范围内进行广泛靶向,这一点已经用⁹⁰Y/¹⁷⁷Lu-DOTA-TATE在NET患者中得到证实(72)。

[0309] 1.2.a) ⁹⁰Y-DOTA-PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈的合成

[0310] 使用标准方法用⁹⁰Y标记PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈,并使用DOTA作为螯合剂。将乙酸铵水溶液(1M,pH 8.0-8.5)和DOTA-PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈(20nmol)的溶液加入到[⁹⁰Y]Cl₃(1-5mCi)的0.05M盐酸水溶液中。用乙酸铵(1M)将pH调节至7至8,反应混合物在室温下温育1小时。添加DTPA以清除任何剩余的游离⁹⁰Y³⁺。⁹⁰Y-DOTA-PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈经C-18Sep-Pak纯化,配制在PBS/盐水中,并通过RP-HPLC分析。

[0311] 1.2.b) 细胞结合和内化

[0312] 使用标准方法评估细胞结合和内化。将200nCi等分的⁹⁰Y-DOTA-PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈加入细胞(3.75×10⁶DX3/mTFL/ITGB6或DX3/mTFL)中并在室温下孵育1小时(n=4/细胞系)。离心后,除去上清液,用0.5mL无血清DMEM洗涤细胞沉淀。用 γ -计数器测定结合放射性的分数(细胞沉淀对合并的上清液)。为了测定内化放射性的分数,随后用酸性洗涤缓冲液处理细胞以释放表面结合的活性,然后用PBS洗涤。用 γ -计数器测定内化分数(细胞沉淀对释放到上清液中的放射性)。

[0313] 1.2.c) 体外血清稳定性

[0314] 为了评估稳定性,将 ^{90}Y -DOTA-PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) -PEG₂₈ (27 μCi) 与血清在37℃ (或与PBS对照) 温育,在0、4、24、48和144小时取等分试样,用乙醇沉淀血浆蛋白。用 γ -计数器测定蛋白质结合放射性的分数(沉淀对上清液),并进行上清液的分析HPLC以测定完整 ^{90}Y -DOTA-PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) -PEG₂₈的百分比。

[0315] 1.2.d) ^{90}Y -DOTA-PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) -PEG₂₈的体外功效

[0316] ^{90}Y -DOTA-PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) -PEG₂₈的体外分析覆盖每个样品0-1 μCi 的范围,并如上文1.1.b) 中完成和分析(WST-1, TUNEL和半胱天冬酶3/7测定)。对照是[^{90}Y]Cl₃和DOTA-PEG₂₈-A20FMDV2-PEG₂₈的匹配浓度。

[0317] 1.2.e) 最大耐受剂量(MTD)的测定

[0318] MTD如上文1.1c) 中所述测定。携带配对的SC异种移植物的老鼠接受0、5、8.75、12.5、16.25或20 $\mu\text{Ci/g}$ 的 ^{90}Y -DOTA-PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) -PEG₂₈,并如上所述进行监控。由于该放射性核素允许CLI,获取注射(PI) 后0-72小时的图像,以非侵入性地监控肿瘤部位的 ^{90}Y -DOTA-PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) -PEG₂₈的积累和保留。CLI图像采集过程与BLI (上面1.1.d) 中概述的) 相同,总扫描时间<15分钟。

[0319] 1.2.f) ^{90}Y -DOTA-PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) -PEG₂₈的治疗功效

[0320] ^{90}Y -DOTA-PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) -PEG₂₈治疗功效通过上述1.1.d) 中描述的方法测定。将携带配对的SC异种移植物的老鼠分成2组,接受 ^{90}Y -DOTA-PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) -PEG₂₈ (MTD) 或盐水对照,其中每一个通过单次尾静脉注射递送。对老鼠进行成像,并如上文1.1.d) 中所述在治疗后进行监控。

[0321] 1.3通过PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) PEG₂₈-PEG^{5K}CA₈靶向递送紫杉醇

[0322] 纳米颗粒(NP) 显示出作为用于治疗剂和分子成像剂的递送载体重要前景(61)。通过增强新药物的耐受性和/或功效,纳米颗粒对临床结果做出显著贡献。第一代纳米药物之一Abraxane® (白蛋白稳定的紫杉醇, nab-PTX), 最近被FDA批准与吉西他滨联合作为转移性胰腺癌患者的一线治疗(62)。因为我们努力治疗各种侵略性疾病,很可能更多的具有改善的抗癌作用的组合方案将被批准。由于当被动靶向效率低时主动靶向显示出在肿瘤位点纳米颗粒积聚增加的前景[参见(63)], $\alpha_v\beta_6$ -靶向-NP用于递送化疗剂, PTX。将PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) -PEG₂₈ 连接到NP (即, 治疗载体), 而不是如上所述将肽直接连接到治疗剂。末端树枝状聚合物支架PEG^{5K}CA₈, 基于胶束的纳米载体, 可以用作载体(NP) 并与肽偶联以实现PTX的 $\alpha_v\beta_6$ 靶向递送(64, 65)。该纳米载体系统是两亲性线性树状嵌段共聚物, 其使用三种生物相容性构件: 聚乙二醇(PEG), L-赖氨酸和胆酸(CA)。PEG^{5K}CA₈可溶于水并自组装成具有高PTX负载能力(12mg/mL) 的胶束(21 \pm 4nm)。在卵巢癌小鼠模型中证明了负载PTX的PEG^{5K}CA₈的体内抗肿瘤功效并具有比Taxol® 和Abraxane® 更好的毒性。结合该NP系统与肽PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) -PEG₂₈对 $\alpha_v\beta_6$ 受体的独特“归巢”以及其快速内化的优点可以克服主动与被动挑战。在可选的实施方案中, 使用脂质体方法。在其它实施方案中, 使用二价和/或四价赖氨酸核心以将2和4个拷贝的肽添加到NP表面的多价方法被采用。在进一步的实施方案中, 使用马来酰亚胺-硫醇方法。

[0323] 1.3.a) PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) PEG₂₈-PEG^{5K}CA₈-PTX的合成和表征

[0324] 通过叠氮化物-炔烃胡伊斯根(Huisgen) 1,3-偶极环加成反应合成N₃-PEG^{5K}CA₈和

炔基-PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) -PEG₂₈以用于连接⁵N₃-PEG⁵KCA₈在溶液中合成,透析并冻干(图22)。使用SPPS合成炔基-PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) -PEG₂₈。使用TEM表征胶束。通过动态光散射(DLS)测量大小和大小分布。如前所述完成PTX的负载(例如,将PTX和PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) PEG₂₈-PEG⁵KCA₈溶解在氯仿中,干燥并随后在PBS缓冲液中超声处理,通过0.22μm过滤除去未负载的药物沉淀物,并从RP-HPLC计算负载)。如上文1.1.a)中所述研究了PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) PEG₂₈-PEG⁵KCA₈-PTX的血清稳定性,并使用透析和RP-HPLC评估PTX释放。

[0325] 1.3.b) PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) PEG₂₈-PEG⁵KCA₈-PTX的体外功效

[0326] PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) PEG₂₈-PEG⁵KCA₈-PTX的体外分析覆盖范围为0-25ng/mL的浓度,并且如上文1.1.b)中所述完成和分析(例如,WST-1,TUNEL和胱天蛋白酶3/7测定)。对照处理是三种对照的匹配浓度:i) PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) PEG₂₈-PEG⁵KCA₈;ii) PEG⁵KCA₈-PTX;和iii) PEG⁵KCA₈。

[0327] 1.3.c) 最大耐受剂量(MTD)的测定

[0328] 如上文1.1.c)中所述测定MTD。将非荷瘤小鼠分为6组,接受0、12、24、36、48或60μg/g PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) -PEG₂₈-PEG⁵KCA₈-PTX,并如前所述进行监控。

[0329] 1.3.d) PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) PEG₂₈-PEG⁵KCA₈-PTX的治疗功效

[0330] PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) PEG₂₈-PEG⁵KCA₈-PTX治疗功效通过上述1.1.d)中描述的方法测定。将携带配对的SC异种移植物的鼠分为5组,接受PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) PEG₂₈-PEG⁵KCA₈-PTX(实验组#1),PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) PEG₂₈-PEG⁵KCA₈(对照组#1),PEG⁵KCA₈-PTX(对照组#2),PEG⁵KCA₈(对照组#3)或盐水(对照组#4)。对小鼠进行成像,并如上文1.1.d)中所述在治疗后进行监控。

[0331] 1.4先导治疗在胰腺癌原位模型中的治疗功效

[0332] 在MTD和皮下异种移植研究结束后,基于肿瘤消退/非发展的最高分数(基于统计分析)选择一先导化合物用于在BxPC-3/mTFL原位模型上进一步分析。该模型中,损伤在其正常微环境中发展。另外,在该模型中将治疗剂递送至肿瘤部位可以更准确地确认所需的药代动力学。携带原位BxPC-3/mTFL肿瘤的小鼠分成4组:接受三种剂量的靶向治疗剂(例如0.25X、0.5X或1X MTD)之一或盐水对照。治疗效果的分析和小鼠的所有治疗后监控如上文1.1.d)中所述完成。

[0333] 1.5统计分析

[0334] 治疗效果可以主要通过降低肿瘤大小/生长速率和动物的存活来确定。第一个分析目标是估计每个候选治疗剂的最大耐受剂量(MTD),定义最高剂量不超过动物经历剂量限制毒性(DLT)的10%。我们可以拟合分对数-线性局量子的剂量-反应模型与小鼠经历DLT的数量,并通过校准估计MTD-10%,通过改进的Fieller氏定理方法,计算95%置信区间。如果没有观察到DLT,我们可以估计5个剂量范围内DLT的概率的上限,以获得MTD的下限。第二个分析目标是评估用⁹⁰Y放射性标记或与_D(KLAKLAK)₂或PEG⁵KCA₈偶联的靶向肽与在小鼠内配对的肿瘤模型中的合适对照(靶标阳性和靶标阴性)相比的功效。主要结果可以是肿瘤生长速率,由BLI每周测量两次。我们可以拟合混合效应重复测量生长曲线回归模型,使用结构化回归系数方法比较有效治疗下的生长率和盐水治疗肿瘤中的预期线性生长。主要比较可以在偶联/放射性标记治疗的靶标阳性肿瘤和未经治疗的靶标阳性肿瘤之间;次级比较可以评估适当对照的效果和靶向阳性对靶向阴性肿瘤中的效果差异。假设在未治疗动物中

线性肿瘤生长具有平均值的 $\pm 50\%$ 的范围,那么使用偶联/放射性标记形式的实验治疗剂,则在 $\alpha=0.05$ 下双侧测试有至少85%检验力检测到生长速率下降三分之二,这是临床上有意义的改善。如果违反假设,模型可以通过图形和分析法进行验证,并考虑替换(非线性拟合,变换)。

[0335] 2.通过改善PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) -PEG₂₈的药代动力学性质来进行首次人体内研究

[0336] 如本文所述,在体外(ELISA和细胞结合)和体内(小动物PET成像)中已证明PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) -PEG₂₈对 $\alpha_v\beta_6$ 受体的高亲和力和选择性。该肽偶联物具有特别有利的靶向性和药代动力学性质。如本部分所述,可对该肽进行关于其亲和性以及体内药代动力学和循环时间的进一步改进。例如,使用多聚化和/或添加非共价血白蛋白结合基序可以进一步改善亲和力、体内性能和靶向能力。可询各种共价辅基,螯合剂和“点击”化学,以设计用于放射性标记肽的最佳方法。

[0337] 2.1多聚方法

[0338] 与单体肽相比,多聚体衍生物已显示出对细胞表面受体靶亲和力的大幅增加。具体地,当从单体肽转变为二聚体肽和四聚体肽时,通常观察到亲和力的非线性改善,导致亲和力增加超过两倍/四倍(34)。额外的益处被认为是基于亲合力的,源自多聚体亚单位与多种细胞表面受体的协同(多价)相互作用。这可能诱导细胞表面受体的结构重组,导致通过病灶粘着热点的形成而使结合增加。这种基于多价的亲和力增强已经最彻底地证明了用于和环(RGD)肽的相关整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的靶向体内成像(45-47)。成功的关键参数是:i)起始单体的靶向亲合力和选择性;和ii)多聚体的大小(单体数量和它们之间的接头的长度-其中更长的接头促进多价结合)。此外,最近的初步报告显示了线性 $\alpha_v\beta_6$ -靶向肽,⁶⁴Cu-M10的类似的阳性作用,其中在早期时间点,对于二聚体⁶⁴Cu-(M10)₂,肿瘤摄取的增加多达接近3倍(0.55-1.6% ID/g, 1小时)(34)。值得注意的是,通过比较,我们当前的单体先导化合物(即PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) -PEG₂₈) 在1小时具有2.51% ID/g的肿瘤结合,并且在4小时内保持恒定。因此,通过PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R) -PEG₂₈衍生肽的多聚化在体外和体内对 $\alpha_v\beta_6$ 受体的亲和力增强的评价是如上所述的分子成像和治疗的一个重要步骤。在可选的实施方案中,可以使用不同长度的PEG-接头(例如,PEG₅,PEG₁₁)和头-尾多聚化(例如,使用溶液相点击化学)来确定亲合力效应。

[0339] 2.1.a) 合成

[0340] 可以制备单体、二聚和四聚肽及其放射性标记的类似物(图23)。通过连接到分支赖氨酸的C-末端PEG₂₈-间隔子使空间拥挤最小化。使用标准Fmoc化学法在Rink-树脂上合成所有肽。在 β -丙氨酸间隔子之后,在用Pd(PPh₃)₄(“Pd”)脱保护后,在肽合成结束时引入Lys(Alloc)残基用于位点特异性放射性标记。通过使用Fmoc-Lys(Fmoc)-OH,一次(对于二聚体)或两次(对于四聚体;参见图23)实现分支;对于单体,使用Fmoc-Lys(ivDde)-OH,其在用肼选择性脱保护后,用乙酸酯(使用乙酸酐)封端以提供具有与多聚体相同的C末端的对照。剩余的肽组装体使用Fmoc-氨基酸和Fmoc-PEG₂₈-COOH和乙酸酐(用于末端封端),采用为多聚体调整的试剂当量。

[0341] 2.1.b) 放射性标记方法

[0342] 在某些实施例中,用于放射性标记肽的辅基可以影响总体药代动力学。因此,标记

方法(共价对基于螯合剂的)不是偏向的,而是呈现了一种模板策略,其促进了采用包括 ^{18}F , ^{64}Cu 和 ^{90}Y 的放射性同位素的放射性标记。利用已建立的方法,包括使用4- ^{18}F 氟苯甲酸(^{18}F FBA)的固相放射性标记方法(48)。一旦建立 ^{18}F -放射性标记的肽对 $\alpha_v\beta_6$ 受体的体外和体内稳定性、亲和力和选择性,需要更长的放射性半衰期,因为靶标中的体内循环或保留增加,可使用替代的放射性同位素和策略。在某些实施方案中,可靠的金属螯合剂如DOTA、NOTA和NOTA-TCO(TCO=反式环辛烯)用于较长寿命的放射性同位素。对于金属放射性标记,偶联DOTA(OtBu) $_3$ -COOH或NOTA(OtBu) $_2$ -COOH,然后进行TFA切割,HPLC纯化和溶液中的金属螯合。

[0343] 2.1.c) 体外分析(竞争性ELISA)

[0344] 可用竞争性ELISA来测定经纯化的整合素 $\alpha_v\beta_6$ 的亲和力和选择性。整合素 $\alpha_v\beta_3$ 可以并行用作对照以确定选择性。整合素被捕获在96孔板(α_v -捕获抗体P2W7)上。对于竞争实验,一式三份的孔用等体积的生物素化纤连蛋白(BtFn; $\alpha_v\beta_6$ 的生物素化天然配体)或玻连蛋白(BtVn;用于 $\alpha_v\beta_3$)和一系列稀释的肽(非放射性类似物;原液:2mM;终浓度范围10pM至100 μ M)包被1小时。对照:i)没有肽,ii)没有肽和没有抗体,iii)没有肽和没有Bt-配体。通过加入ExtrAvidin-辣根过氧化物酶,然后加入四甲基联苯胺(TMB)溶液检测结合的BtFn(或BtVn)。用1N硫酸终止反应,在450nm测量吸光度。通过绘制%-Bt配体结合对肽浓度的曲线测定 IC_{50} 值。 $\text{IC}_{50}<5\text{nM}$ 且 $\alpha_v\beta_6$ 相对于 $\alpha_v\beta_3$ 的选择性 >1000 倍的所有化合物可以进行细胞结合研究。该方法允许鉴定 $\alpha_v\beta_6$ 特异性靶向肽,并排除结合整合素家族的其它密切相关成员(例如 $\alpha_v\beta_3$)的那些。使用该策略,A20FMDV2显示对固定化 $\alpha_v\beta_6$ 的高亲和力(例如3nM),与其他RGD结合整合素相比具有至少1000倍的选择性(40)。

[0345] 型号说明。体外研究:除非另有说明,DX $_3$ /mTFL/ITGB6和DX $_3$ /mTFL(二者都衍生自亲本DX $_3$ 黑素瘤细胞系并且分别等价于DX $_3$ puro6和DX $_3$ puro,还表达mTFL,mTFL是萤火虫荧光素酶的热稳定变体,其允许动物研究中肿瘤的生物发光成像[BLI])分别用作所有体外测定的阳性和阴性对照。DX $_3$ /mTFL/ITGB6在CMV启动子的控制下稳定表达 β_6 整合素。由于 α_v 整合素(唯一能够使 β_6 异源二聚化的整合素)通常在DX $_3$ 细胞系中表达, β_6 的外源性表达导致细胞表面存在 $\alpha_v\beta_6$ 。整合素 $\alpha_v\beta_6$ 不在DX $_3$ /mTFL(或亲本系)中表达,并且两种细胞系表达 $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_v\beta_5$ 和 $\alpha_5\beta_1$,以及整合素家族的其它密切相关的成员。小鼠模型:配对的DX $_3$ /mTFL/ITGB6和DX $_3$ /mTFL系允许体内检查基于 $\alpha_v\beta_6$ 的对放射性标记肽和上述潜在治疗剂的选择性。为了建立配对的异种移植物,经麻醉的(异氟烷)小鼠接受DX $_3$ /mTFL/ITGB6和DX $_3$ /mTFL细胞(在100 μ L无血清培养基中 3×10^6)在肩胛下的双侧皮下(SC)注射。当通过触诊确定配对的肿瘤达到100-200mg时,将小鼠用于成像或治疗研究。

[0346] 2.1.d) 体外分析(细胞结合)

[0347] 可以使用如上所述的DX $_3$ /mTFL/ITGB6和DX $_3$ /mTFL评估每种放射性标记的肽的细胞结合。将放射性标记的肽的等分试样可与细胞悬浮液(例如 3.75×10^6 个细胞/100 μ L;n=4/细胞系)温育1小时。以前的研究表明细胞结合发生迅速,在前30分钟发生(39)。离心后,除去上清液,用0.5mL SF-DMEM洗涤细胞沉淀。用 γ -计数器测定结合放射性的分数。为了测定内化放射性的分数,随后用酸性洗涤缓冲液处理细胞以释放表面结合的活性并在 γ -计数器中测量。具有 $>50\%$ 结合和 $>40\%$ 内化和对于DX $_3$ /mTFL/ITGB6具有10倍选择性的所有放射性标记的肽可以进行血清稳定性研究。

[0348] 2.1.e) 体外分析(血清稳定性)

[0349] 可以通过在37℃下与血清温育(对照:在PBS中),在2小时(^{18}F)或24小时(^{64}Cu)的时间段内评估每种放射性标记的肽的血清稳定性。可以在0.5、1、2小时(^{64}Cu :也是4、12和24小时)取等分试样,用乙醇沉淀血浆蛋白,并通过HPLC分析上清液以测定完整的放射性标记的肽的百分比。在2小时后>95%完整且满足所有上述细胞结合标准的所有放射性标记的肽可以进行体内研究。

[0350] 2.1.f) 小动物PET/CT成像

[0351] 上文描述了配对的DX₃/mTFL/ITGB6和DX₃/mTFL异种移植物模型。对于每种放射性标记的肽,当肿瘤达到100-200mg时,在IACUC批准的方案之后,将动物用于成像(PET/CT)和生物分布研究。对于成像研究,在麻醉的小鼠(异氟烷)中通过尾静脉注射递送放射性标记的肽(约200 μCi),并对小鼠成像(例如, ^{18}F :0-1、2、4小时; ^{64}Cu :1、4、24小时)。每个发射扫描可以伴随有传输扫描(用于衰减校正)和CT扫描(用于解剖参考)。基于CT参考数据,通过在感兴趣的肿瘤和器官(肾脏,膀胱,肝脏,心脏,肌肉)周围绘制感兴趣区域(RoI),可以对图像数据进行二进位化(binned)、重建、共注册和分析,并绘制成时间-活性曲线。对于生物分布研究,如上所述注射放射性标记的肽(约20 μCi)。快速收集组织、器官和肿瘤(例如, ^{18}F 的时间点:1、2、4小时; ^{64}Cu :1、4、24小时),用PBS冲洗,并在 γ -计数器中测量放射性。经校准,衰变校正的放射性浓度可以表示为每克样品的注射剂量的百分比(%ID/g)。另外,对于封闭实验,可以在放射性示踪剂前10分钟将所证明的 $\alpha_v\beta_6$ 靶向肽 ^{19}F -FBA-PEG₂₈-A20FMDV2静脉内注射(30mg/kg,10mg/ml,在盐水中);解剖和分析可以在如上所述的1小时时间点进行。为了评价体内示踪剂稳定性,分析肿瘤、肾脏和尿样品。为了评估肿瘤和肾脏中的稳定性,可以如上所述注射放射性标记的肽。可以收获 $\alpha_v\beta_6$ 阳性肿瘤和肾脏(1小时),并在PBS中匀浆。用乙醇沉淀蛋白质,测量放射性并通过HPLC分析上清液以确定完整的放射性标记肽的百分比。适用时,在生物分布研究期间收集过量尿液用于HPLC分析。另外,两组肿瘤可以包埋在冷冻培养基中并立即切片(20 μm 用于放射自显影,5 μm 用于IHC,交替进行)。放射自显影样品暴露于储存荧光屏过夜并使用磷光成像仪读数。一旦放射性衰退,可以进行IHC;切片固定(甲醛),封闭(3%aq.H2O2),与抗整合素 β_6 抗体和过氧化物酶标记的第二抗体温育,然后用3-氨基-9-乙基咔唑(AEC)显色并用Mayer's苏木精复染。

[0352] 2.2白蛋白结合基序以改善体内药代动力学

[0353] “归巢”肽应用于肿瘤靶向的一个缺点是其体内半衰期短。以前提高半衰期的努力包括在施用前与载体分子例如纯化的白蛋白共价连接(49,50)。还研究了其他非共价方法;Dennis等人描述了白蛋白和偶联至白蛋白结合肽的抗体片段之间的非共价相互作用(51)。这里,药代动力学益处通过放射性示踪剂与存在于血流中的白蛋白的非共价相互作用实现。在这种方法中,不仅观察到肿瘤摄取片段的增加,而且没有肾保留。最近,通过筛选结合HSA的DNA编码化学库发现的基于4-(4-碘苯基)丁酸的小分子被用于通过使用小叶酸偶联物促进叶酸受体的优先靶向(52)。如Schibli等人的研究中所述,当该白蛋白结合物(图24)与 ^{177}Lu 标记的叶酸偶联时,观察到高肿瘤摄取和显著降低的肾累积(53,54)。这种非共价方法可以用于改善PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈和其它类似物的血液半衰期。基于螯合剂的放射性标记方法在放射性同位素的选择以及最终纯化的容易性方面提供了最大的灵活性。另外,认为在肾脏捕获中起作用的辅基放射性标记的形式电荷可以通过选择具有不同数量

的负电荷的螯合剂(例如DOTA,NOTA,CB-TE2A)来修饰。除了增加肽的循环时间之外,该方法还具有减少用放射性标记的螯合物类似物观察到的问题性肾脏保留的潜力。A1 [^{18}F]-NOTA-PEG₂₈-A20FMDV2在4小时时显示肾脏摄取为229% ID/g,而 [^{18}F]FBA-PEG₂₈-A20FMDV2 (K16R)-PEG₂₈在4小时时的肾脏摄取仅为7.87% ID/g (图25)。

[0354] 在某些实施例中,4-(4-碘苯基)丁酸中的碘被诸如甲基或溴的基团替代,和/或烷基链缩短,因为白蛋白结合剂对白蛋白的亲合力已经显示是可微调的。在其它实施例中,引入肽的单半胱氨酸修饰,因为已显示单个半胱氨酸残基与白蛋白的Cys34形成暂时的二硫键,有助于肽示踪剂的肿瘤靶向(55)。

[0355] 2.2.a) 合成

[0356] 白蛋白结合物可以使用Fmoc化学法(图26中的方案1)由4-(4-碘苯基)丁酸(IPA)和Fmoc-Lys-OA11组装。除去Fmoc后,可将烯丙基保护的白蛋白结合物(图24)可偶联至固相上的第一氨基酸(Fmoc-Glu(OH)-)的侧链,然后进行标准肽组装。(在三氟乙酸(TFA)切割之前,烯丙基保护可以从白蛋白结合物上除去)。对于放射性标记,引入螯合剂(DOTA,NOTA)作为单未保护的酸,随后是酸,随后切割,HPLC纯化和溶液相放射性标记(图26中的方案1)。对于固相放射性标记(例如,使用 [^{18}F]FBA),可以在切割之前将辅基偶联至游离N-末端(而不是螯合剂),然后进行放射性HPLC纯化。

[0357] 使用引入在双末端PEG化的A20FMDV2肽的称为K(IPA)E(即 ϵ -(4-(4-碘苯基)丁基酰胺)赖氨酸-谷氨酸)的白蛋白结合基团(即FBA-K(IPA)E-PEG₂₈-NAVPNLRGDLQVLAQKVART-PEG₂₈)的研究在ELISA中显示出对靶标的高亲和力($\text{IC}_{50}=1\text{nM}$),与不带有K(IPA)E的PEG化A20FMDV2的亲和力($\text{IC}_{50}=2\text{nM}$)相当。在使用整合素 $\alpha_v\beta_6$ -表达的DX₃puro β_6 细胞和 $\alpha_v\beta_6$ -阴性DX₃puro对照的基于细胞的结合和内化测定中也显示了靶标特异性和选择性(图27)。含有K(IPA)E放射性示踪剂和其无K(IPA)E的对照都以52%与DX₃puro β_6 细胞结合;对于含有K(IPA)E的放射性示踪剂,56%的结合放射性被内化(相对于对照的44%)。相比之下,在 $\alpha_v\beta_6$ -阴性DX₃puro对照中,两种放射性示踪剂的结合和内化低。

[0358] 2.2.b) 体外分析(蛋白结合测定)

[0359] 采用超滤测定法通过先前描述的方法测定放射性标记的白蛋白结合物-肽的结合。离心式超滤装置可用于在温育期结束时从血浆白蛋白结合部分分离游离放射性标记的肽。可以在 γ -计数器中测量滤液并测定结合百分比。可以对用肽孵育的血浆样品(37°C;5、15、30、60m)进行尺寸排除HPLC,以评估结合动力学。所有其它体外和体内筛选可如上文1.2.b),1.2.c)和2.1节所述进行。

[0360] 2.2.c) 非人灵长类动物研究

[0361] 可以在体外和体内清楚地定量多聚化和添加白蛋白结合基序的影响,可以鉴定出具有高亲和力(例如<1nM)、良好 $\alpha_v\beta_6$ 选择性(例如超过1000倍的高于其他整合素的亲和力)以及良好的体内行为和显著改善的体内稳定性的化合物。用于进一步选择化合物以继续用于在非人灵长类动物(NHP)如恒河猴中的进一步评估,可以考虑其它标准,例如总肿瘤摄取、器官(例如肾)的快速清除、合成速度、简单性、位点特异性标记、放射化学产率和特异活性。为了评估优化的肽的生物分布和安全性,可以进行NHP研究。NHP是必要的和预测性转译的和临床前模型,因为与人相比时,其是生殖、发育、生理、遗传和免疫相似的。对于这些研究,可以选择基于 $\alpha_v\beta_6$ -亲和力和选择性鉴定的2个先导肽,并且可以使用已经建立的方法,

在4只恒河猴(2只雄性和2只雌性)中评估体内 $\alpha_v\beta_6$ (+) - 肿瘤靶向和保留以及非肿瘤组织的清除。在广泛的小鼠研究后对每种肽测试包括四只恒河猴(猕猴(Macaca mulatta))作为两对(每对,一只雄性,一只雌性)。这种方法允许同时研究雄性/雌性配对,消除混杂变量,同时保存动物数量。这些研究还允许动物同时成像。

[0362] 可以进行全身剂量测定。将动物禁食过夜,然后使用标准化方案并用特拉唑尔(telazol)/氯胺酮镇静用于这些程序。将它们仰卧放置在PET/CT扫描床上,静脉内(IV)注射放射性标记的肽(两者同时注射),并成像30分钟,然后在2小时和4小时重复。在每个时间点收集血液(外周血管;约2ml)和尿液样品(超声引导的胞囊穿刺;约1mL)用于HPLC分析。在成像期间使用脉冲血氧计监控氧饱和度,并使用循环水加热垫来维持体温。成像后,将动物置于指定的代谢室进行放射性监控,然后,一旦清除,就返回其常规住房。从所产生的丰富的鼠类和灵长类动物数据中选择,可以选择先导成像剂以达到 $\alpha_v\beta_6$ 靶向肿瘤摄取和保留(小鼠模型)的最优平衡和有利的总体药代动力学,特别是肾脏清除(灵长类动物成像)。图28显示了健康恒河猴中 $[^{18}\text{F}]$ FBA-PEG₂₈-A20FMDV2(K16R)-PEG₂₈的扫描的冠状PET/CT图像。

[0363] 概要

[0364] 本实施例说明了新型 $\alpha_v\beta_6$ 整合素靶向分子成像剂和治疗策略的设计、合成和评价。该受体在癌症上的优势、其与转移潜能的关联性和与患者存活的负相关性以及在引用 $\alpha_v\beta_6$ 作为成像和治疗的靶标的增加的文献报道使得这些新型分子成像剂和治疗策略及时和高度地与临床相关。

[0365] 参考文献

[0366] 1.Ahmed等人;“用于评估上皮性卵巢癌的恶性潜力 $\alpha_v\beta_6$ 整合素-A标志物”(Alpha(v)beta(6)integrin-A marker for the malignant potential of epithelial ovarian cancer.),《组织化学和细胞化学杂志》(The journal of histochemistry and cytochemistry)2002;50(10):1371-80

[0367] 2.Elayadi等人;“通过生物淘选选择的肽识别整合素 $\alpha_v\beta_6$ 作为非小细胞肺癌的预后生物标志物”(A peptide selected by biopanning identifies the integrin alphavbeta6 as a prognostic biomarker for nonsmall cell lung cancer.),《癌症研究》(Cancer research)2007;67(12):5889-95

[0368] 3.Liu等人;“ $\alpha_v\beta_6$ 整合素作为甲状腺癌的诊断和转移潜力的新标记”(Integrin alphavbeta6 as a novel marker for diagnosis and metastatic potential of thyroid carcinoma.),《头颈部肿瘤科》(Head&neck oncology)2013;5(1):7

[0369] 4.Jones等人;“ADAM10在口腔鳞状细胞癌中过表达,并通过与 $\alpha_v\beta_6$ 整合素的功能性关联而有助于侵袭性行为”(ADAM 10 is over expressed in oral squamous cell carcinoma and contributes to invasive behaviour through a functional association with alphavbeta6 integrin.),《FEBS杂志》(FEBS letters)2013;587(21):3529-34

[0370] 5.Zhuang等人;“ $\alpha_v\beta_6$ 整合素表达的影响对胃癌侵袭和癌症相关成纤维细胞进展的临床意义”(Clinical significance of integrin alphavbeta6 expression effects on gastric carcinoma invasiveness and progression via cancer-associated fibroblasts.),《医学肿瘤学》(Medical oncology)2013;30(3):580

- [0371] 6.Vogetseder等人;“ α_v -整合素亚型在原发性人类肿瘤和脑转移中的表达”(alphav-Integrin isoform expression in primary human tumors and brain metastases.),《国际癌症杂志》(International journal of cancer Journal international du cancer)2013;133(10):2362-71
- [0372] 7.Ahmed等人;“ $\alpha_v\beta_6$ 整合素,一种上皮性卵巢癌的恶性潜能的标志物”($\alpha_v\beta_6$ Integrin-A Marker for the Malignant Potential of Epithelial Ovarian Cancer.),《化学与细胞化学杂志》(Journal of Histochemistry&Cytochemistry)2002;50(10):1371-9
- [0373] 8.Ahmed等人;“ $\alpha_v\beta_6$ 整合蛋白表达,p42/44kDaMAPK升高和卵巢癌中纤溶酶原依赖性基质降解之间的关联”(Association between alphavbeta6integrin expression, elevated p42/44kDa MAPK,and plasminogen-dependent matrix degradation in ovarian cancer.),《细胞生物化学杂志》(Journal of cellular biochemistry)2002;84(4):675-86
- [0374] 9.Kawashima等人;“ α_v 整合素家族在胃癌中的表达:增加的 $\alpha_v\beta_6$ 与淋巴结转移相关”(Expression of alphav integrin family in gastric carcinomas:increased alphavbeta6is associated with lymph node metastasis.),《病理,研究和实践》(Pathology,research and practice)2003;199(2):57-64
- [0375] 10.Hsiao等人;“具有治疗头颈鳞状细胞癌临床潜力的选自生物淘选的环状 α/β 靶向肽”(Cyclic alphavbeta6-targeting peptide selected from biopanning with clinical potential for head and neck squamous cell carcinoma.),《头和颈》(Head&neck)2010;32(2):160-72
- [0376] 11.Bates,“ $\alpha_v\beta_6$ 整合素作为结肠直肠癌的新型分子靶点”(The alphaVbeta6 integrin as a novel molecular target for colorectal cancer.),《未来肿瘤学》(Future oncology)2005;1(6):821-8
- [0377] 12.Bandyopadhyay等人;“定义 $\alpha_v\beta_6$ 整合素在癌症中的作用”(Defining the role of integrin alphavbeta6in cancer.),《当前药物靶点》(Current drug targets)2009;10(7):645-52
- [0378] 13.Thomas等人;“ $\alpha_v\beta_6$ 整合素在伤口愈合和口腔癌中的作用”($\alpha_v\beta_6$ integrin in wound healing and cancer of the oral cavity.),《口腔病理学杂志》(Journal of Oral Pathology&Medicine)2006;35(1):1-10
- [0379] 14.Allen等人;“改变的微环境促进侵袭前的乳腺癌的进展: $\alpha_v\beta_6$ 整合素在DCIS中的肌上皮表达识别高风险患者和预测复发”(Altered Microenvironment Promotes Progression of Preinvasive Breast Cancer:Myoepithelial Expression of alphavbeta6Integrin in DCIS Identifies High-risk Patients and Predicts Recurrence.),《临床癌症研究》(Clinical cancer research)2014;20(2):344-57.
- [0380] 15.Dutta等人;“ $\alpha_v\beta_6$ 整合素通过上调MMP2促进癌细胞中的溶骨细胞程序”(Integrin $\alpha_v\beta_6$ promotes an osteolytic program in cancer cells by upregulating MMP2.),《癌症研究》(Cancer research)2014
- [0381] 16.Prudkin等人;“上皮-间质转化在肺腺癌和鳞状细胞癌的发展和进展中”

(Epithelial-to-mesenchymal transition in the development and progression of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung.),《现代病理学》(Modern pathology) 2009;22 (5) :668-78

[0382] 17. Annes等人;“整合素 α v β 6介导的休眠TGF- β 的活化需要潜伏的TGF- β 结合蛋白-1”(Integrin α v β 6-mediated activation of latent TGF- β requires the latent TGF- β binding protein-1.),《细胞生物学杂志》(The Journal of cell biology) 2004;165 (5) :723-34

[0383] 18. Bates等人;“在上皮-间充质转换期间整合素 β 6的转录激活定义侵袭性结肠癌的新型预后指标”(Transcriptional activation of integrin β 6 during the epithelial-mesenchymal transition defines a novel prognostic indicator of aggressive colon carcinoma.),《临床调查杂志》(The Journal of clinical investigation) 2005;115 (2) :339-47

[0384] 19. Berghoff等人;“实体癌的脑转移中的入侵模式”(Invasion patterns in brain metastases of solid cancers.),《神经肿瘤学》(Neuro-Oncology) 2013;15 (12) :1664-72

[0385] 20. Peng等人;“ α v β 6整合素和转录因子Ets-1作为结肠直肠癌的预后指标”(Integrin α v β 6 and transcriptional factor Ets-1 act as prognostic indicators in colorectal cancer.),《细胞与生物科学》(Cell & bioscience) 2014;4 (1) :53

[0386] 21. Moore等人;“ α v β 6整合素在乳腺癌中的治疗靶向”(Therapeutic targeting of integrin α v β 6 in breast cancer.),《国家癌症研究所杂志》(Journal of the National Cancer Institute) 2014;106 (8)

[0387] 22. Berghoff等人;“在肺癌的脑转移中的 α v β 3, α v β 5和 α v β 6整合素”(Integrins α v β 3, α v β 5 and α v β 6 in brain metastases of lung cancer.),《临床和实验性癌转移》(Clinical & experimental metastasis) 2014;31 (7) :841-51

[0388] 23. Niu等人;“结肠癌中eIF4E和整合素 α / β 蛋白表达的蛋白表达可以预测临床意义,揭示其相关性并暗示相互作用的可能机制”(Protein expression of eIF4E and integrin α v β 6 in colon cancer can predict clinical significance, reveal their correlation and imply possible mechanism of interaction.),《细胞与生物科学》(Cell & bioscience) 2014;4:23

[0389] 24. Sun等人;“白细胞介素-8通过结肠直肠癌中的 α v β 6整合素上调而促进细胞迁移”(Interleukin-8 promotes cell migration through integrin α v β 6 upregulation in colorectal cancer.),《癌症信件》(Cancer letters) 2014;354 (2) :245-53

[0390] 25. Wang等人;“SDF-1/CXCR4轴通过 α v β 6整合素的上调促进结肠直肠癌细胞的定向迁移”(SDF-1/CXCR4 axis promotes directional migration of colorectal cancer cells through upregulation of integrin α v β 6.),《癌发生》(Carcinogenesis) 2014;35 (2) :282-91

- [0391] 26.Bates;“结肠直肠癌进展:αvβ6整合素和上皮-间质转化(EMT)”(Colorectal cancer progression:integrin alphavbeta6and the epithelial-mesenchymal transition (EMT).),《细胞周期》(Cell cycle)2005;4(10):1350-2
- [0392] 27.Elez等人;“Abituzumab联合西妥昔单抗加伊立替康与西妥昔单抗加伊立替康单独用于KRAS野生型转移性结直肠癌患者:随机I/II期POSEIDON试验”(Abituzumab combined with cetuximab plus irinotecan versus cetuximab plus irinotecan alone for patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer:the randomised phase I/II POSEIDON trial.),《肿瘤学杂志:欧洲肿瘤内科学会官方杂志/ESMO》(Annals of oncology:official journal of the European Society for Medical Oncology/ESMO)2014
- [0393] 28.Nelson,“DCIS预后标志物:几个新的候选物出现”(DCIS prognostic markers:a few new candidates emerge.),《国家癌症研究所杂志》(Journal of the National Cancer Institute)2010;102(9):588-90
- [0394] 29.Sipos等人;“使用新型单克隆抗体在腺癌中的β6整合素亚基表达的免疫组织化学筛选,揭示了在体内和体外的胰腺导管腺癌中的强上调”(Immunohistochemical screening for beta6-integrin subunit expression in adenocarcinomas using a novel monoclonal antibody reveals strong up-regulation in pancreatic ductal adenocarcinomas in vivo and in vitro.),《组织病理学》(Histopathology)2004;45(3):226-36
- [0395] 30.Siegel等人;“癌症统计,2014”(Cancer statistics,2014.),《CA:临床医生的癌症杂志》(CA:a cancer journal for clinicians)2014;64(1):9-29
- [0396] 31.Chari,“检测早期胰腺癌:问题和前景”(Detecting early pancreatic cancer:problems and prospects.),《肿瘤学研讨会》(Seminars in oncology)2007;34(4):284-94
- [0397] 32.Pelaez-Luna等人;“前期症状性胰腺癌的可切除性及其与糖尿病发病的关系:CT诊断前的CT扫描和空腹血糖值的回顾性回顾”(Resectability of presymptomatic pancreatic cancer and its relationship to onset of diabetes:a retrospective review of CT scans and fasting glucose values prior to diagnosis.),《美国胃肠病学杂志》(The American journal of gastroenterology)2007;102(10):2157-63
- [0398] 33.McGuire等人;“噬菌体展示的肽文库的生物淘选用于分离细胞特异性配体”(Biopanning of phage displayed peptide libraries for the isolation of cell-specific ligands.),《分子生物学方法》(Methods in molecular biology)2009;504:291-321
- [0399] 34.Gray等人;“从噬菌体展示到纳米粒子给药:功能化脂质体与多肽多肽改善靶向癌症生物标记”(From Phage Display to Nanoparticle Delivery:Functionalizing Liposomes with Multivalent Peptides Improves Targeting to a Cancer Biomarker.),《生物共轭化学》(Bioconjugate Chemistry)2012;24(1):85-96
- [0400] 35.Miao等人;“用18F标记的工程化的Knottin肽,用于整合素表达的PET成像”(An engineered knottin peptide labeled with 18F for PET imaging of integrin

expression.),《生物偶联物化学》(Bioconjug Chem) 2009;20 (12):2342-7

[0401] 36.Hackel等人;“用于 $\alpha\text{v}\beta 6$ 整合素的PET成像的 ^{18}F -氟苯甲酸酯标记的胱氨酸结合肽”(18F-fluorobenzoate-labeled cystine knot peptides for PET imaging of integrin $\alpha\text{v}\beta 6$.),《核医学杂志》(Journal of nuclear medicine) 2013;54 (7): 1101-5

[0402] 37.Gagnon等人;“高通量体内筛选靶向分子成像剂”(High-throughput in vivo screening of targeted molecular imaging agents.),《美利坚合众国国家科学院院报》(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America) 2009;106 (42):17904-9

[0403] 38.Gray等人;“组合肽库:细胞结合肽的开发”(Combinatorial Peptide libraries:mining for cell-binding peptides.),《化学评论》(Chemical reviews) 2014;114 (2):1020-81

[0404] 39.Hausner等人;“有针对性的体内成像的 $\alpha\text{v}\beta 6$ 整合素与改善放射性示踪剂及其在胰腺肿瘤模型中的相关性”(Targeted in vivo imaging of integrin $\alpha\text{v}\beta 6$ with an improved radiotracer and its relevance in a pancreatic tumor model.),《癌症研究》(Cancer research) 2009;69 (14):5843-50

[0405] 40.Hausner等人;“使用源自口蹄疫病毒的肽用于人类癌症的非侵袭性成像:使用正电子发射断层扫描来产生和评价4-[^{18}F]氟苯甲酰基A20FMDV2用于 $\alpha\text{v}\beta 6$ 整合素表达的体内成像”(Use of a peptide derived from foot-and-mouth disease virus for the noninvasive imaging of human cancer:generation and evaluation of 4-[^{18}F] fluorobenzoyl A20FMDV2 for in vivo imaging of integrin $\alpha\text{v}\beta 6$ expression with positron emission tomography.),《癌症研究》(Cancer research) 2007;67 (16): 7833-40

[0406] 41.Hausner等人;“体外和体内评价铝[^{18}F]氟化物放射性标记对整合素 α 病毒(6)特异性肽的影响”(In vitro and in vivo evaluation of the effects of aluminum [1] (8) F] fluoride radiolabeling on an integrin $\alpha\text{v}\beta 6$ -specific peptide.),《核医学和生物学》(Nuclear medicine and biology) 2014;41 (1):43-50

[0407] 42.Hausner等人;“通过无铜,应激促进的点击化学评价用[^{18}F]氟标记的 $\alpha\text{v}\beta 6$ 整合素特异性肽”(Evaluation of an integrin $\alpha\text{v}\beta 6$ -specific peptide labeled with[^{18}F]fluorine by copper-free, strain-promoted click chemistry.),《核医学和生物学》(Nuclear medicine and biology) 2013;40 (2):233-9

[0408] 43.Hausner等人;“评价[^{64}Cu]Cu-DOTA和[^{64}Cu]Cu-CB-TE2A螯合物:用于具有 $\alpha\text{v}\beta$ 特异性肽的靶向正电子发射断层扫描”(Evaluation of[^{64}Cu]Cu-DOTA and[^{64}Cu]Cu-CB-TE2A chelates for targeted positron emission tomography with an $\alpha\text{v}\beta 6$ -specific peptide.),《分子成像》(Molecular imaging) 2009;8 (2):111-21

[0409] 44.Hausner等人;“使用 ^{18}F -“点击”化学放射性标记的 $\alpha\text{v}\beta 6$ 特异性肽进行体内正电子发射断层扫描(PET)成像:评价并与相应的4-[^{18}F]氟苯甲酰基-和2-[^{18}F]氟丙酰基肽进行比较”(In vivo positron emission tomography(PET) imaging with an $\alpha\text{v}\beta 6$ specific peptide radiolabeled using ^{18}F -“click”chemistry:

evaluation and comparison with the corresponding 4-[18F]fluorobenzoyl- and 2-[18F]fluoropropionyl-peptides.),《药物化学杂志》(Journal of medicinal chemistry) 2008;51 (19):5901-4

[0410] 45.Semmler等人;“分子成像II前言”(Molecular Imaging II.Preface.),《实验药理学手册》(Handbook of experimental pharmacology) 2008(185 Pt 2):vii-ix

[0411] 46.Li等人;“(64)Cu标记的四聚体和八聚体RGD肽用于肿瘤 $\alpha(v)\beta(3)$ 整合素表达的小动物PET”((64)Cu-labeled tetrameric and octameric RGD peptides for small-animal PET of tumor $\alpha(v)\beta(3)$ integrin expression.),《核医学杂志》(Journal of nuclear medicine) 2007;48 (7):1162-71

[0412] 47.Zhou等人;“放射性标记的环状RGD肽,作为用于通过SPECT成像肿瘤和血栓形成的放射性示踪剂”(Radiolabeled Cyclic RGD Peptides as Radiotracers for Imaging Tumors and Thrombosis by SPECT.),Theranostics 2011;1:58-82

[0413] 48.White等人;“用于正电子发射断层扫描的[18F]放射性标记肽的固相合成的优化”(Optimization of the solid-phase synthesis of[18F]radiolabeled peptides for positron emission tomography.),《应用辐射和同位素:包括用于农业,工业和医学的数据,仪器和方法》(Applied radiation and isotopes:including data, instrumentation and methods for use in agriculture,industry and medicine) 2012;70 (12):2720-9

[0414] 49.Dou等人;“用巴斯德毕赤酵母中的两种人胰高血糖素样肽-1突变体表达,纯化和表征重组人血清白蛋白融合蛋白”(Expression,purification,and characterization of recombinant human serum albumin fusion protein with two human glucagon-like peptide-1 mutants in *Pichia pastoris*.),《蛋白表达和纯化》(Protein expression and purification) 2008;61 (1):45-9

[0415] 50.Smith等人;“与白蛋白相关的抗体片段导致延长的体内停留时间”(Prolonged in vivo residence times of antibody fragments associated with albumin.),《生物偶联物化学》(Bioconjug Chem) 2001;12 (5):750-6

[0416] 51.Nguyen等人;“白蛋白结合Fab(AB.Fab)的药代动力学可以作为对白蛋白亲和力的函数进行调节”(The pharmacokinetics of an albumin-binding Fab(AB.Fab) can be modulated as a function of affinity for albumin.),《蛋白质工程,设计与选择:PEDS》(Protein engineering,design&selection:PEDS) 2006;19 (7):291-7

[0417] 52.Dumelin等人;“来自DNA编码化学文库的便携式白蛋白结合物”(A portable albumin binder from a DNA-encoded chemical library.),《应用化学》(Angewandte Chemie) 2008;47 (17):3196-201

[0418] 53.Muller等人;“DOTA偶联物与白蛋白结合复合物首次在小鼠中进行叶酸靶向¹⁷⁷Lu-放射性核素肿瘤治疗”(DOTA conjugate with an albumin-binding entity enables the first folic acid-targeted ¹⁷⁷Lu-radionuclide tumor therapy in mice.),《核医学杂志》(Journal of nuclear medicine) 2013;54 (1):124-31

[0419] 54.Fischer等人;“使用具有白蛋白结合物的新型(18)F-叶酸偶联物的改进的小鼠肿瘤的PET成像”(Improved PET imaging of tumors in mice using a novel (18)F-

folate conjugate with an albumin-binding entity.),《分子成像和生物学》(Molecular imaging and biology)2013;15(6):649-54

[0420] 55.Pang等人;“游离半胱氨酸延长了归巢肽的半衰期并改善其肿瘤穿透活性”(A free cysteine prolongs the half-life of a homing peptide and improves its tumor-penetrating activity.),《控制释放杂志》(Journal of controlled release)2014;175:48-53

[0421] 56.Ellerby等人;“靶向促凋亡肽的抗癌活性”(Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides.),《自然医学》(Nature medicine)1999;5(9):1032-8

[0422] 57.Barbu等人;“抗菌肽模拟物通过线粒体介导的细胞凋亡诱导癌细胞死亡”(An Antimicrobial Peptidomimetic Induces Mucorales Cell Death through Mitochondria-Mediated Apoptosis.),《PLOS ONE》(PLOS ONE)2013;8(10):e76981

[0423] 58.Arap等人;“通过血管址的破坏而靶向前列腺”(Targeting the prostate for destruction through a vascular address.),《美利坚合众国国家科学院院报》(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)2002;99(3):1527-31

[0424] 59.Fantin等人;“一种双功能靶向肽,其阻断HER-2酪氨酸激酶并使HER-2阳性癌细胞中的线粒体功能失效”(A bifunctional targeted peptide that blocks HER-2 tyrosine kinase and disables mitochondrial function in HER-2-positive carcinoma cells.),《癌症研究》(Cancer research)2005;65(15):6891-900

[0425] 60.Karjalainen等人;“靶向神经毡蛋白-1在人类白血病和淋巴瘤中的作用”(Targeting neuropilin-1 in human leukemia and lymphoma.),《血液》(Blood)2011;117(3):920-7

[0426] 61.Bertrand等人;“癌症纳米技术:在现代癌症生物学时代被动和主动靶向的影响”(Cancer nanotechnology:The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology.),《高级药物递送评论》(Advanced Drug Delivery Reviews)2013(0)

[0427] 62.Von Hoff等人;“用nab-紫杉醇加吉西他滨增加了胰腺癌的生存”(Increased Survival in Pancreatic Cancer with nab-Paclitaxel plus Gemcitabine.),《新英格兰医学杂志》(New England Journal of Medicine)2013;369(18):1691-703

[0428] 63.Friedman等人;“纳米颗粒的智能靶向”(The smart targeting of nanoparticles.),《当前药物设计》(Current pharmaceutical design)2013;19(35):6315-29

[0429] 64.Luo等人;“明确限定的、大小可调、多功能胶束将紫杉醇有效输送用于癌症治疗”(Well-defined, size-tunable, multifunctional micelles for efficient paclitaxel delivery for cancer treatment.),《生物偶联物化学》(Bioconjug Chem)2010;21(7):1216-24

[0430] 65.Li等人;“一种用于靶向抗癌药物递送的新型尺寸可调纳米载体系统”(A novel size-tunable nanocarrier system for targeted anticancer drug delivery.),《控制释放杂志》(Journal of Controlled Release)2010;144(3):314-23

[0431] 66.Waldherr等人;“在7.4GBq (90)Y-DOTATOC后,在神经内分泌肿瘤中的肿瘤反应和临床获益”(Tumor response and clinical benefit in neuroendocrine tumors after 7.4 GBq (90)Y-DOTATOC.),《核医学杂志》(Journal of nuclear medicine)2002;43(5):610-6

[0432] 67.Bodei等人;“用90Y-[DOTA]0-Tyr3-奥曲肽(90Y-DOTATOC)在神经内分泌肿瘤中的受体放射性核素治疗”(Receptor radionuclide therapy with 90Y-[DOTA]0-Tyr3-octreotide (90Y-DOTATOC) in neuroendocrine tumours.),《欧洲核医学分子成像杂志》(Eur J Nucl Med Mol Imaging)2004;31(7):1038-46

[0433] 68.Van Essen等人;“肽受体放射性核素在患有生长抑素受体阳性肿瘤的患者中用放射性标记的生长抑素类似物的治疗”(Peptide Receptor Radionuclide Therapy with radiolabelled somatostatin analogues in patients with somatostatin receptor positive tumours.),《肿瘤学》(Acta oncologica)2007;46(6):723-34

[0434] 69.Norenberg等人;“在临床前动物模型中,用213Bi-[DOTA0,Tyr3]奥曲肽肽受体放射性核素治疗胰腺肿瘤”(213Bi-[DOTA0,Tyr3]octreotide peptide receptor radionuclide therapy of pancreatic tumors in a preclinical animal model.),《临床癌症研究》(Clinical cancer research)2006;12(3Pt 1):897-903

[0435] 70.Imhof等人;“用放射性标记的生长抑素类似物[90Y-DOTA]-TOC治疗转移性神经内分泌癌中后的反应、存活和长期毒性”(Response,survival,and long-term toxicity after therapy with the radiolabeled somatostatin analogue[90Y-DOTA]-TOC in metastasized neuroendocrine cancers.),《临床肿瘤学杂志》(Journal of clinical oncology)2011;29(17):2416-23

[0436] 71.Rolleman等人;“通过赖氨酸和精氨酸的组合,安全有效地抑制肾摄取放射性标记的奥曲肽”(Safe and effective inhibition of renal uptake of radiolabelled octreotide by a combination of lysine and arginine.),《欧洲核医学分子成像杂志》(Eur J Nucl Med Mol Imaging)2003;30(1):9-15

[0437] 72.Kunikowska等人;“用90Y-DOTATATE和串联90Y/177Lu-DOTATATE对神经内分泌肿瘤进行放射性核素治疗的临床结果:哪一个是一个更好的治疗选择?”(Clinical results of radionuclide therapy of neuroendocrine tumours with 90Y-DOTATATE and tandem 90Y/177Lu-DOTATATE:which is a better therapy option?),《欧洲核医学分子成像杂志》(Eur J Nucl Med Mol Imaging)2011;38(10):1788-97

[0438] 实施例4.对于 $\alpha_v\beta_6$ 靶向分子成像和治疗而言,具有改善的稳定性、放射性标记产率和亲脂性的双末端PEG化肽。

[0439] 该实施例说明,使用较短PEG部分例如PEG₁₁(即11个重复单元的聚乙二醇)的双末端PEG化,通过改善其在血清中的稳定性、放射性标记产率和亲脂性,能够赋予与结合 $\alpha_v\beta_6$ 整合素的8个氨基酸的肽(即,RSDLTPLF)更好的体外特征。尽管母体肽H-RSDLTPLFNH₂具有7nM的高亲和力,并且对 $\alpha_v\beta_6$ 的选择性是 $\alpha_v\beta_3$ 的100倍,但是该肽的血清稳定性研究显示差的体外稳定性。因此,该实施例证明了,该肽的双末端PEG化形式有利地提供了用于体内成像和治疗的对 $\alpha_v\beta_6$ 整合素的高选择性和高血清稳定性。

[0440] I,材料与方法

[0441] 材料

[0442] 除非另有说明,所有化学品均购自西格玛奥瑞奇公司(圣路易斯,密苏里州),Acros公司(新泽西州),Fluka公司(圣路易斯,密苏里州)和飞世尔科技公司(Fisher Scientific)(沃尔瑟姆,马萨诸塞州)。NovaSyn TGR树脂购自Novabiochem公司(拉荷亚,加利福尼亚)。9-芴基甲氧羰基(Fmoc)氨基酸和肽合成试剂购自Novabiochem公司和GLS-中国公司(中国上海)。11个重复单元的聚乙二醇(PEG₁₁)购自Polypure公司(奥斯陆,挪威)。使用的所有氨基酸是L-氨基酸。

[0443] 在购自Breakwood Enterprises公司(亚克朗市,俄亥俄州)和飞世尔科技公司的1mL或5mL烧结的(fritted)反应器小瓶中,使用标准Fmoc化学法,进行手动固相肽合成。使用具有220nm和254nm的二极管阵列UV检测器以及32Karat软件包的Beckman-Coulter(布雷亚,加利福尼亚)色谱系统,或使用由Dionex公司(森尼维耳,加利福尼亚)提供的其具有二极管阵列UV检测器的和Chromeleon软件包的Ultimate 3000 RP-HPLC系统,进行反相高效液相色谱(RP-HPLC)。使用具有由0.05%三氟乙酸(TFA)水溶液(溶剂A)和100%乙腈(溶剂B)组成的流动相的Jupiter C-12柱(250×460mm,4微米,菲罗门)进行纯化和分析。使用线性梯度:9%溶剂B两分钟以及在30分钟内增加至81%溶剂B,并以1.5mL/分钟的恒定流速洗脱产物。使用ABI 4700高分辨率基质辅助激光解吸/电离飞行时间(MALDI-TOF)系统(应用生物系统公司(Applied Biosystems),福斯特城,加利福尼亚)获得纯化化合物的质谱(MS)。

[0444] 用于放射性标记的[¹⁸F]氟化物,使用11MeV西门子RDS 111负离子回旋加速器在分子和基因组成像中心(戴维斯,加利福尼亚)内通过¹⁸O(p,n)¹⁸F反应制得,或购自PETNET Solutions公司(萨克拉门托,加利福尼亚)。使用Capintec剂量校准器(Capintec公司,拉姆齐,新泽西)测量放射性。使用与Gabistar辐射检测器(Raytest公司,施特劳本哈尔特,德国)串联的HPLC金168(Beckman-Coulter公司)分别测量样品的纯度和放射化学纯度。将检测器串联连接,从而可以观察到对于放射性化合物及其相应的冷标准的保留时间的微小差异。

[0445] 在Nunc Maxisorp平底96孔板(affymetrix ebioscience公司,圣地亚哥,加利福尼亚)上,通过ELISA评估每种肽的亲合力。整合素αV抗体P2W7购自Novus Biologicals公司(立托顿,科罗拉多州)。牛血清白蛋白(BSA)购自VWR公司(兰多市(Randor),宾夕法尼亚州),TMB一溶液购自普洛麦格公司(Promega)(麦迪逊,威斯康辛州)。α_vβ₆整合素购自安迪生物(明尼阿波里斯,明尼苏达州)。蛋白质生物素化试剂盒购自Amersham plc公司(阿莫仙,英国),而竞争性天然配体纤连蛋白购自英杰公司(卡尔斯巴德,加利福尼亚)。通过具有相关Ascent软件(赛默飞世尔,沃尔瑟姆,马萨诸塞州)的Thermo Multiscan读板仪,测量亲合力(以吸光度单位表示)。

[0446] NH₂肽的固相合成

[0447] 使用标准Fmoc固相技术(表3)(Chan等人,(2003) Fmoc固相肽合成,实用方法,牛津大学出版社),手动进行肽合成。称取Novasyn TGR树脂(300mg)并转移到5ml反应器小瓶中。1.5小时内将N,N-二甲基甲酰胺(DMF)加入到反应器小瓶中,以允许树脂溶胀,然后在真空下排干。通过将3当量的O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐(HATU)和(Fmoc)-保护的氨基酸,和6当量的N,N-二异丙基乙胺(DIPEA)加入到反应器小瓶

中,并在自动旋转器上偶联1.5小时,以进行氨基酸偶联反应。

[0448] 表3.合成的肽列表。不用 $[^{19}\text{F}]$ FBA合成的肽(左栏),用FBA合成的肽合成的肽(右栏)。

NH ₂ -肽	$[^{19}\text{F}]$ FBA肽
H-RSDLTPLF-NH ₂	FBA-RSDLTPLF-NH ₂
Boc-RSDLTPLFK (NH ₂)-NH ₂	Boc-RSDLTPLFK (FBA)-NH ₂
H-RSDLTPLFK (Boc)-NH ₂	FBA-RSDLTPLFK (Boc)-NH ₂
H-PEG ₁₁ -RSDLTPLF-NH ₂	FBA-PEG ₁₁ -RSDLTPLF-NH ₂
H-RSDLTPLF-PEG ₁₁ -NH ₂	FBA-RSDLTPLF-PEG ₁₁ -NH ₂
H-PEG ₁₁ -RSDLTPLF-PEG ₁₁ -NH ₂	FBA-PEG ₁₁ -RSDLTPLF-PEG ₁₁ -NH ₂
c (RSDLTPLFE) K (IvdDe)-NH ₂	c (RSDLTPLFE) K (FBA)-NH ₂

[0450] 除了脯氨酸使用氯醌试验之外,所有氨基酸的偶联反应通过苦味酸(PSA)试验监控(Chan等人,2003)。将树脂珠的样品置于陶瓷测试板上,向样品中加入一滴由100 μL DMF,10 μL DIPEA和一滴PSA组成的PSA测试溶液。在仲胺的情况下,在用DMF(3x)洗涤后进行氯醌测试;一滴由53mg对四氯苯醌和50 μL 乙醛在2.5mL DMF中组成的氯醌溶液(Chan等人,2003)。未反应的游离胺的存在产生用于PSA测试的红色珠粒;蓝色的用于氯醌试验。完全偶联反应后,将珠用DMF(3x)冲洗并排干。使用DMF中的20%哌啶15分钟(2x),实现Fmoc去除。随后用DMF(3x)、甲醇(3x)和DMF(3x)洗涤树脂,然后通过PSA测试或氯醌测试。重复偶联氨基酸的过程,直到完成所需的肽序列。

[0451] 在Boc-RSDLTPLFK (NH₂)-NH₂的例子中,通过添加DMF中的Fmoc-Lys (ivDde)-OH(3当量)、HATU(2.99当量)和DIPEA(6当量),并且用与针对固相肽合成所述的条件进行偶联,从而将Fmoc-Lys (ivDde)-OH先偶联至树脂。剩余的序列使用带有标准保护基团的氨基酸偶联,除了对于添加精氨酸时使用Boc-Arg (Pbf)-OH代替Fmoc-Arg (Pbf)-OH,从而在从树脂上切割后产生游离的N-末端胺。在序列延长完成后,通过将肽与60 μL 的胍在2.94mL的DMF中混合15分钟(2x),进行赖氨酸上的1-(4,4-二甲基-2,6-二氧化代环己-1-亚基)异戊酰(ivDde)保护基的脱保护(Conroy等人,(2008),Dmab保护基的有效使用:N-连接糖肽的固相合成的应用(Efficient use of the Dmab protecting group:applications for the solid-phase synthesis of N-linked glycopeptides),Organic&Biomolecular Chemistry 7(11):2255-2258)。用DMF(3x)、MeOH(3x)和DMF(3x)冲洗树脂并用PSA溶液测试,以确定游离胺的存在。

[0452] 在H-RSDLTPLFK (Boc)-NH₂的例子中,通过加入DMF中的Fmoc-Lys (Boc)-OH(3当量)、HATU(2.99当量)和DIPEA(6当量),并且用针对固相肽合成所述的条件进行偶联,从而先将Fmoc-Lys (Boc)-OH偶联至树脂。剩余的偶联使用具有标准保护基团的氨基酸。

[0453] 对于H-RSDLTPLF-PEG₁₁-NH₂和H-PEG₁₁-RSDLTPLF-PEG₁₁-NH₂的合成,通过加入DMF中的Fmoc-PEG₁₁-OH(1.1当量)、HATU(1.1当量)和DIPEA(2当量),并将Fmoc-PEG₁₁-OH置于自动旋转器上16小时,然后第二次偶联6小时,从而先将Fmoc-PEG₁₁-OH偶联至树脂。通过PSA测试监控偶联反应。完全偶联反应后,将珠用DMF(3x)冲洗并排干。除去Fmoc。剩余的序列通过将具有标准保护基团的氨基酸偶联来完成。在N-末端精氨酸的成功偶联和Fmoc脱保护后,进行H-PEG₁₁-RSDLTPLF-NH₂和H-PEG₁₁-RSDLTPLF-PEG₁₁-NH₂的N-末端PEG化。将Fmoc-PEG₁₁-OH

偶联到树脂(肽基树脂)上的肽,其中通过加入DMF中的Fmoc-PEG₁₁-OH(1.1当量)、HATU(1.1当量)和DIPEA(2当量),并置于自动旋转器16小时,然后第二次偶联6小时。通过苦味酸(PSA)试验监控偶联反应。

[0454] c(RSDLTPLFE)K的合成和环化通过固相肽合成实现。c(RSDLTPLFE)K-NH₂的合成如下实现:首先通过加入DMF中的Fmoc-Lys(ivDde)-OH(3当量)、HATU(2.99当量)和DIPEA(6当量),并且与针对固相肽合成所述的条件偶联,从而将Fmoc-Lys(ivDde)-OH先偶联至树脂。然后,通过加入DMF中的Fmoc-Glu(OA11)-OH(3当量)、HATU(2.99当量)和DIPEA(6当量),偶联Fmoc-Glu(OA11)-OH。剩余的偶联使用具有标准保护基团的氨基酸。在序列完全组装后,将树脂通过冷冻干燥器干燥过夜。将肽基树脂冲洗并在二氯甲烷(DCM)中溶胀。通过在大约2-3mL的DCM中加入20当量的苯基硅烷和0.5当量的四(三苯基膦)钯(0),将谷氨酸的烯丙基侧链去保护。

[0455] 苯基硅烷/四(三苯基膦)钯(0)溶液用氮气短暂鼓泡,移液到反应容器中,以加入到肽基树脂中,并置于旋转器上30分钟(2x)。然后用含1%DIPEA的DMF(v/v)(3x)、100%DMF(3x)、含有5%二乙基二硫代氨基甲酸(wt/v)钠盐的DMF溶液(3x)和100%DMF(3x)洗涤肽基树脂(Chan等人,2003)。然后用MeOH(3x)和DMF(3x)洗涤肽基树脂。除去Fmoc保护基。为了环化肽,将HATU(0.99当量)和DIPEA(2.0当量)与2mL DMF混合,加入到肽基树脂中并置于旋转器上16小时。通过PSA测试法,测量完全偶联。环化后,通过将肽基树脂与2%胍的DMF溶液混合15分钟(2x),从而除去(ivDde)的侧链。用DMF(3x)、MeOH(3x)和DMF(3x)冲洗肽基树脂并用PSA溶液测试,以确定游离胺的存在。

[0456] 为了测试纯度,将肽的样品从树脂(10mg)上切下,通过使用94:2.5:1:2.5(v/v/v/v)的三氟乙酸(TFA)/1,2-乙二硫醇/TIPS/水3小时,除去侧链保护基。切割后处理包括:通过低压空气流蒸发TFA,然后加入1mL水。然后将粗肽溶于水和乙醚中,轻轻混合,除去醚层。混合醚,并除去醚(3x),将粗肽分离到水层中。将水层冻干。通过RP-HPLC在线性梯度下进行分析纯化,所述线性梯度包括在溶剂B下2分钟,以及在30分钟内溶剂B从9%增加到81%。收集产物,冻干,并使用MALDI-TOF确认那产物的质量。

[0457] [¹⁹F]FBA肽的合成

[0458] NH₂肽序列完成后,[¹⁹F]FBA(冷FBA)与每个肽进行位置特异性偶联(表3)。将10mg的每种肽基树脂与[¹⁹F]FBA(10当量)、HATU(20当量)和DIPEA(40当量)偶联1.5小时。然后切割肽。通过RP-HPLC分析产物并通过MALDI-TOF确认质量。

[0459] [¹⁹F]FBA肽对整合素 $\alpha_v\beta_6$ 的ELISA

[0460] 通过竞争性结合ELISA,比较每种[¹⁹F]FBA肽对 $\alpha_v\beta_6$ 和 $\alpha_v\beta_3$ 的亲合力(Gagnon等人,(2009)靶向性分子成像试剂的体内筛选的高通量筛选(High-throughput in vivo screening of targeted molecular imaging agents)。美国科学院院报(Proceedings of the National Academy of Sciences)106(42):17904-17909)。使肽与生物素化的纤连蛋白($\alpha_v\beta_6$ 的天然配体)竞争1小时;或当与 $\alpha_v\beta_3$ 竞争时,与生物素化玻连蛋白竞争1小时。简言之,在37℃,96孔板用50μL/孔的5μg/mL磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的P2W7包被1小时。板用PBS洗涤三次,然后在4℃用含有5%牛血清白蛋白(BSA;V级分;w/v)和1%吐温20(v/v)的PBS处理16小时,以封闭非特异性结合。板用PBS洗涤并用50μL/孔在洗涤缓冲液(WaB)中的整合素包被1小时,然后用WaB洗涤3次。WaB由去离子水中的2mmol/L Tris缓冲液(pH 7.6)、

150mmol/L氯化钠、1mmol/L氯化锰和0.1%吐温20 (v/v) 的溶液组成。一式三份的孔,用50μL/孔的等体积的用于 $\alpha_v\beta_6$ 的生物素化纤连蛋白 (BtFn) 或用于 $\alpha_v\beta_3$ 的生物素化玻连蛋白 (BtVn) 的偶联物缓冲液的与一系列肽原液 (2mmol/L; 10% DMSO (v/v) 的水溶液) 的从1μM至1pM的系列稀释液的混合物进行包被,其中所述偶联物缓冲液由Wa B中的1% BSA (V级; w/v) 组成。不含肽、不含肽和抗体、或不含肽和不含配体的孔,作为对照。板在室温下孵育1小时,并在加入ExtrAvidin-辣根过氧化物酶偶联物 (50μL/孔,在偶联物缓冲液中1:1,000稀释) 之前,在室温下孵育1小时并用WaB洗涤3次。用WaB洗涤后,通过加入TMB (50μL/孔) 并温育10至15分钟,来检测结合的BtFn或BtVn。通过加入50μL/孔的1N硫酸终止反应,并在450nm处测量吸光度 (酸化的氧化的TMB的黄色,表明纤连蛋白结合)。IC₅₀值的计算基于使用Prism软件 (GraphPad软件) 的数据分析。

[0461] 用 [¹⁸F]FBA固相放射性标记 $\alpha_v\beta_6$ 靶向肽

[0462] 固相放射性标记技术采用以前公开的方法 (Hausner等人, (2009) 使用改进的放射性示踪剂靶向整合素的体内成像及其在胰腺肿瘤模型中的相关性 (Targeted In vivo imaging of integrin $\alpha_v\beta_6$ with an improved radiotracer and its relevance in a pancreatic tumor model), Cancer Research, 69:5843)。通过回旋加速器产生 [¹⁸F]氟化物 (0.6-2.8Ci) 并递送到离子交换阱和释放柱 (ORTG, 奥克戴尔, 田纳西州) 上。然后将 [¹⁸F]氟化物洗脱入含2mL 4,7,13,16,21,24-六氧杂-1,10-二氮杂双环[8.8.8]二十六烷 (K₂₂₂) 和碳酸钾 (K₂CO₃) 溶液 (100mg K₂₂₂在9.4mL ACN中, 20mg K₂CO₃在0.6mL H₂O中) 的5mL锥形小瓶中。通过在100℃下使用氮气流蒸发除去残余水,并通过加入1mL ACN (3x) 的共沸蒸馏进行干燥。将 [¹⁸F]FBA前体溶液 (在0.5mL无水DMSO中的5mg 4-(三甲基三氟甲磺酸铵) 苯甲酸乙酯) 加入到锥形小瓶中 (15分钟, 100℃), 然后加入1.0mL 0.5N氢氧化钠 (NaOH) 并在100℃加热10分钟。然后将溶液吸入含有2mL 1N盐酸 (HCL) 和6mL H₂O的注射器中。将产物捕获在C-18SepPak柱 (沃特斯 (Waters), 米尔福德, 马萨诸塞州) 上,用5mL H₂O洗涤,用2.2mL ACN洗脱到含有50μL DMF的5mL锥形小瓶中。蒸发剩余的溶剂,在DMF中留下 [¹⁸F]FBA。

[0463] 使用固相偶联技术将 [¹⁸F]FBA (500mCi) 偶联到每种肽基树脂上。将肽基树脂 (3-5mg) 置于1mL烧结的注射器中,并在放射性标记之前在DMF中溶胀1小时。从每个肽注射器中排出DMF,并将0.5-1.0μCi的在DMF中的 [¹⁸F]FBA抽至每个肽注射器中,以偶联到树脂结合的肽上。然后将HATU (15-30当量,在30μL DMF中) 和DIPEA (30-60当量,在20μL DMF中) 抽入注射器中,并在室温下反应30分钟。在 [¹⁸F]FBA偶联后,用DMF (3x)、MeOH (3x) 和空气 (3x) 彻底洗涤肽基树脂的偶联,并记录放射性。通过加入250μL 95:2.5:2.5 (v/v/v) 的TFA/TIPs/水处理15分钟 (2x),从树脂上切割下最终产物。通过Capintec剂量校准器测量放射性,并在合成开始时、偶联后和TFA蒸发 (合成终止) 后记录。然后在氮气下蒸发切割下的混合物,并将最终产物在50/50 (v/v) 的0.5mL HPLC溶剂A/ACN的混合物中重构。记录HPLC前的总合成时间和最终产物的放射性。使用放射性-RP-HPLC并采用前述RP-HPLC所述条件进行纯化。然后将每个HPLC纯化的 [¹⁸F]FBA肽捕获到C18SepPak plus上 (条件: 10mL无水EtOH, 10mL水, 3×10mL空气)。SepPak用5mL水和20mL空气洗涤,随后用250μL无水EtOH和20mL空气洗涤。然后用100:1的1mL无水EtOH/冰醋酸从SepPak洗下 [¹⁸F]FBA肽,干燥 (50℃, 25分钟),然后配制在1mL PBS中。

[0464] [¹⁸F]FBA肽的血清稳定性

[0465] 测定对小鼠血清中的蛋白酶的肽敏感性。将配制的 $[^{18}\text{F}]$ FBA肽(100 μCi)与1mL小鼠血清在37℃下温育1小时。在1小时取100 μL 等分试样并转移至含有500 μL 无水EtOH(4℃)的Eppendorf管中以沉淀血清蛋白。样品短暂混合并在干冰上冷却3分钟,然后以10,000g离心2.5分钟。然后将100 μL 上清液与700 μL HPLC溶剂A(0.05%TFA/水)和20 μL 冰乙酸(HOAc)混合,并通过放射性-RP-HPLC分析。

[0466] $\alpha_v\beta_6$ 靶向肽的分布系数

[0467] 分布系数(logD)代表了化合物在电离溶液中的亲脂性。将配制的 $[^{18}\text{F}]$ FBA肽稀释到PBS中至4 $\mu\text{Ci/mL}$ 的浓度,以形成放射性标记的肽原液。将50 μL 放射性标记的肽原溶液的等分试样转移到Eppendorf管(1.5mL)中。加入450 μL PBS(亲水层)和500 μL 正辛醇(亲脂层)。将Eppendorf管涡旋3分钟(实验一式四份进行)。样品以10,000rpm离心6分钟,形成由顶层(正辛醇)和底层(PBS)组成的两个单独的层。每层吸取100 μL ,并测量每层中的放射性并通过 γ 计数器记录。logD由下式计算:

$$[0468] \quad \log D = \text{Log}\left(\frac{\text{正辛醇每分钟的计数}}{\text{PBS 每分钟的计数}}\right)$$

[0469] II. 结果

[0470] $[^{19}\text{F}]$ FBA肽的ELISA

[0471] 用ELISA测量 $\alpha_v\beta_6$ 和 $\alpha_v\beta_3$ 对 $[^{19}\text{F}]$ FBA肽序列的亲合力。肽对 $\alpha_v\beta_6$ 的 IC_{50} 范围为1.97nM(H-RSDLTPLFK($[^{19}\text{F}]$ FBA)-NH₂)至>300nM(c(RSDLTPLFE)K($[^{19}\text{F}]$ FBA)-NH₂(表4)。

[0472] 表4.通过PRISM计算的来自针对 $\alpha_v\beta_6$ 的ELISA的 $[^{19}\text{F}]$ FBA肽的 IC_{50} 值,nM。

[0473]

序列	IC_{50}
$[^{19}\text{F}]$ FBA-RSDLTPLF-NH ₂	7nM
H-RSDLTPLFK($[^{19}\text{F}]$ FBA)-NH ₂	34nM
$[^{19}\text{F}]$ FBA-RSDLTPLFK(NH ₂)-NH ₂	1.97nM
$[^{19}\text{F}]$ FBA-PEG ₁₁ -RSDLTPLF-NH ₂	40nM
$[^{19}\text{F}]$ FBA-RSDLTPLF-PEG ₁₁ -NH ₂	40nM
$[^{19}\text{F}]$ FBA-PEG ₁₁ -RSDLTPLF-PEG ₁₁ -NH ₂	25nM
c(RSDLTPLFE)K($[^{19}\text{F}]$ FBA)-NH ₂	>300nM

[0474] 所有肽对 $\alpha_v\beta_3$ 的 IC_{50} >100 μM 。相对于 $\alpha_v\beta_3$, $[^{19}\text{F}]$ FBA肽对 $\alpha_v\beta_6$ 选择性为300至10,000倍,偏向选择 $\alpha_v\beta_6$ 。除了c(RSDLTPLFE)K($[^{19}\text{F}]$ FBA)-NH₂外, $[^{19}\text{F}]$ FBA肽的ELISA显示对 $\alpha_v\beta_6$ 的高亲和力, IC_{50} 在一位数至双位数的低纳摩尔范围内。

[0475] 用 $[^{18}\text{F}]$ FBA进行 $\alpha_v\beta_6$ 靶向肽的固相放射性标记

[0476] 合成最终纯度>95%纯度的 $[^{18}\text{F}]$ FBA。以 $80.5 \pm 12\%$ 的产率合成 $[^{18}\text{F}]$ FBA,并通过放射性RP-HPLC证实为>95%的纯度。在从 $[^{18}\text{F}]$ FBA偶联开始到TFA蒸发结束的衰减校正后,以从 $6.8 \pm 1.0\%$ 至 $65.9 \pm 5.5\%$ 的放射性标记产率合成 $[^{18}\text{F}]$ FBA肽(表5)。

[0477] 表5. $[^{18}\text{F}]$ FBA肽及经衰减校正至 $[^{18}\text{F}]$ FBA偶联开始的放射性标记产率。

[0478]

肽序列	放射标记产率
$[^{18}\text{F}]$ FBA-RSDLTPLF-NH ₂	$9.2 \pm 4.1\%$
H-RSDLTPLFK($[^{18}\text{F}]$ FBA)-NH ₂	$32.6 \pm 1.0\%$

$[^{18}\text{F}] \text{FBA-RSDLTPLFK}(\text{NH}_2) - \text{NH}_2$	$22.4 \pm 0.3\%$
$[^{18}\text{F}] \text{FBA-PEG}_{11}\text{-RSDLTPLF-NH}_2$	$17.0 \pm 7.1\%$
$[^{18}\text{F}] \text{FBA-RSDLTPLF-PEG}_{11}\text{-NH}_2$	$42.2 \pm 5.5\%$
$[^{18}\text{F}] \text{FBA-PEG}_{11}\text{-RSDLTPLF-PEG}_{11}\text{-NH}_2$	$65.9 \pm 5.5\%$
c (RSDLTPLFE) K ($[^{18}\text{F}] \text{FBA}) - \text{NH}$	$6.8 \pm 1.0\%$

[0479] 加入 PEG_{11} 提高了放射性标记产率2至7倍。在 $[^{18}\text{F}] \text{FBA-PEG}_{11}\text{-RSDLTPLF}$ 的N-末端加入 PEG_{11} ,几乎使放射性标记产率从9.2%加倍至17%,而当C末端加入 PEG_{11} 时放射性标记产率从9.2%增加42.2%,提高了四倍。双PEG化肽 $[^{18}\text{F}] \text{FBA-PEG}_{11}\text{-RSDLTPLF-PEG}_{11}\text{-NH}_2$ 将放射性标记产率从9.2%提高到65.9%,提高了七倍。不受任何特定理论的束缚,相信通过添加PEG单元,游离胺从树脂进一步延伸,从而潜在地使其更容易接近 $[^{18}\text{F}] \text{FBA}$,从而增加放射性标记产率。

[0480] $[^{18}\text{F}] \text{FBA}$ 肽的血清稳定性

[0481] 在小鼠血清中温育1小时后,测量每种 $[^{18}\text{F}] \text{FBA}$ 肽的完整肽水平(表6)。1小时后未修饰的肽 $[^{18}\text{F}] \text{FBA-RSDLTPLF-NH}_2$ 在小鼠血清中显示66%完整度。总体上,完整的 $[^{18}\text{F}] \text{FBA}$ 肽的百分比范围为18.6至99.7%。

[0482] 表6. $[^{18}\text{F}] \text{FBA}$ 肽及其通过放射性RP-HPLC测量的1小时血清稳定性。

肽序列	血清稳定性
$[^{18}\text{F}] \text{FBA-RSDLTPLF-NH}_2$	66.0%
H-RSDLTPLFK ($[^{18}\text{F}] \text{FBA}) - \text{NH}_2$	18.6%
$[^{18}\text{F}] \text{FBA-RSDLTPLFK}(\text{NH}_2) - \text{NH}_2$	95.2%
$[^{18}\text{F}] \text{FBA-PEG}_{11}\text{-RSDLTPLF-NH}_2$	94.6%
$[^{18}\text{F}] \text{FBA-RSDLTPLF-PEG}_{11}\text{-NH}_2$	99.1%
$[^{18}\text{F}] \text{FBA-PEG}_{11}\text{-RSDLTPLF-PEG}_{11}\text{-NH}_2$	99.7%
c (RSDLTPLFE) K ($[^{18}\text{F}] \text{FBA}) - \text{NH}$	98.4%

[0484] 第一种修饰, $\text{NH}_2\text{-RSDLTPLFK}([^{18}\text{F}] \text{FBA}) - \text{NH}_2$,显示较差的结果,因为肽在小鼠血清中1小时后降解至18.6%。暴露的N-末端对如氨基和内肽酶的酶是敏感的,导致肽快速降解。对于 $[^{18}\text{F}] \text{FBA-RSDLTPLFK}(\text{NH}_2) - \text{NH}_2$ 中的 $[^{18}\text{F}] \text{FBA}$ 标记的N-末端,在小鼠血清中1小时后,几乎没有观察到肽被蛋白酶降解,95.2%的肽是完整的。

[0485] 在H-RSDLTPLF-NH₂的C末端添加赖氨酸似乎在减少肽序列的蛋白酶识别中发挥作用,从而潜在地使得肽大体保持完整。类似地,在N或C末端的PEG化或双PEG化显示血清稳定性的显著改善,血清稳定性分别为94.6%、99.1%和99.7%。在N或C末端添加 PEG_{11} 在防止蛋白酶相互作用中起作用;因此双PEG化的 $[^{18}\text{F}] \text{FBA-PEG}_{11}\text{-RSDLTPLF-PEG}_{11}\text{-NH}_2$ 进一步延续了该趋势,其小鼠血清中温育1小时后具有最大百分比的完整肽。

[0486] α_{β_6} 靶向肽的分布系数

[0487] 对每种修饰形式,测量每种放射性标记肽的亲脂性。 $\log D$ 范围为 -1.86 ± 0.26 至 0.45 ± 0.03 (表7)。基础肽 $[^{18}\text{F}] \text{FBA-RSDLTPLF-NH}_2$ 具有0.45的初始 $\log D$ 值,显示轻微的亲脂性。亲脂性的肽通常与肝胆清除有关,导致体内图像在腹部中具有更高信号(Hosseini et al., (2012) 放射性标记的靶向蛋白和肽的肝摄取:靶向肽缀合设计的考虑(Liver uptake of radiolabeled targeting proteins and peptides: considerations for targeting

peptide conjugated design), 今日药物发现 (Drug Discovery Today) 17 (21-22):1224-32)。所有的修饰都降低了亲脂性, 最小的是logP为0.02的c (RSDLTPLFE) K (^{18}F) FBA) -NH₂, 最高的是logP为-1.86的双PEG化。亲脂性的降低具有几个潜在的药代动力学优势, 例如从肝胆清除转移到肾清除, 并可以期望的快速肾排泄, 潜在地减少体内成像的腹部背景 (Hosseinimehr等人, 2012)。

[0488] 表7. ^{18}F FBA肽的LogD值。

肽序列	LogD
^{18}F FBA-RSDLTPLF-NH ₂	0.45±0.03
H-RSDLTPLFK (^{18}F) FBA) -NH ₂	-0.49±0.09
^{18}F FBA-RSDLTPLFK (NH ₂) -NH ₂	-1.44±0.10
^{18}F FBA-PEG ₁₁ -RSDLTPLF-NH ₂	-1.18±0.22
^{18}F FBA-RSDLTPLF-PEG ₁₁ -NH ₂	-1.29±0.09
^{18}F FBA-PEG ₁₁ -RSDLTPLF-PEG ₁₁ -NH ₂	-1.86±0.26
c (RSDLTPLFE) K (^{18}F) FBA) -NH ₂	0.02±0.04

[0490] 总之, 本实施例证明, 与母体肽序列、肽的环状形式、和肽的单个N-或C-末端PEG化形式相比, 本发明的具有结构PEG₁₁-RSDLTPLF-PEG₁₁的双末端PEG化肽有利地提供了对 $\alpha_v\beta_6$ 整合素的高选择性和改善的血清稳定性、放射性标记产率和亲脂性。

[0491] 本说明书中引用的所有出版物、专利和专利申请通过引用并入本文, 如同每个单独的出版物、专利或专利申请被具体地和单独地指明通过引用并入。尽管为了清楚理解的目的通过说明和实施例相当详细地描述了前述发明, 但是根据本发明的教导, 本领域普通技术人员将容易明白, 可以在不脱离所附权利要求的精神或范围的情况下作出某些改变和修改。

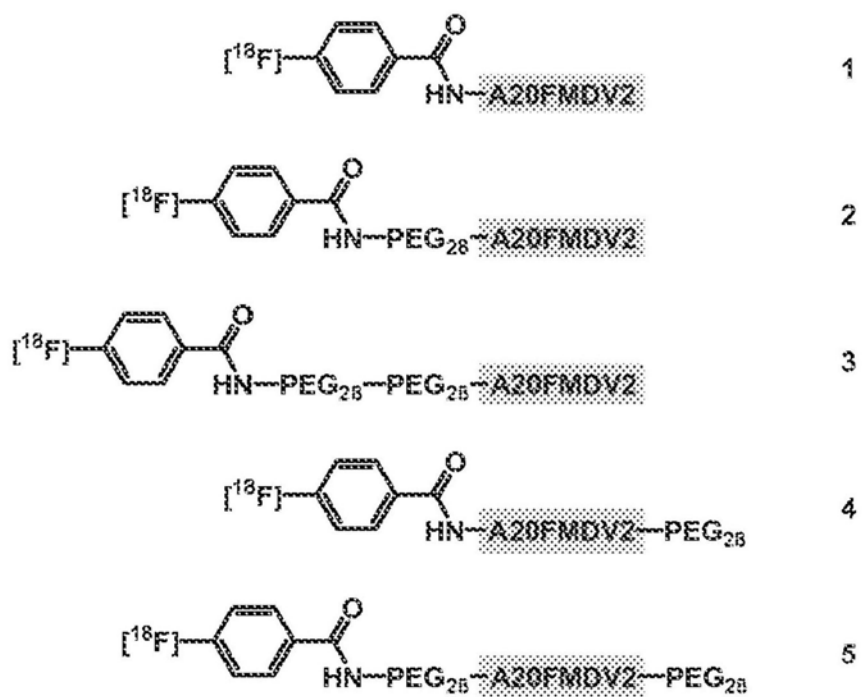


图1

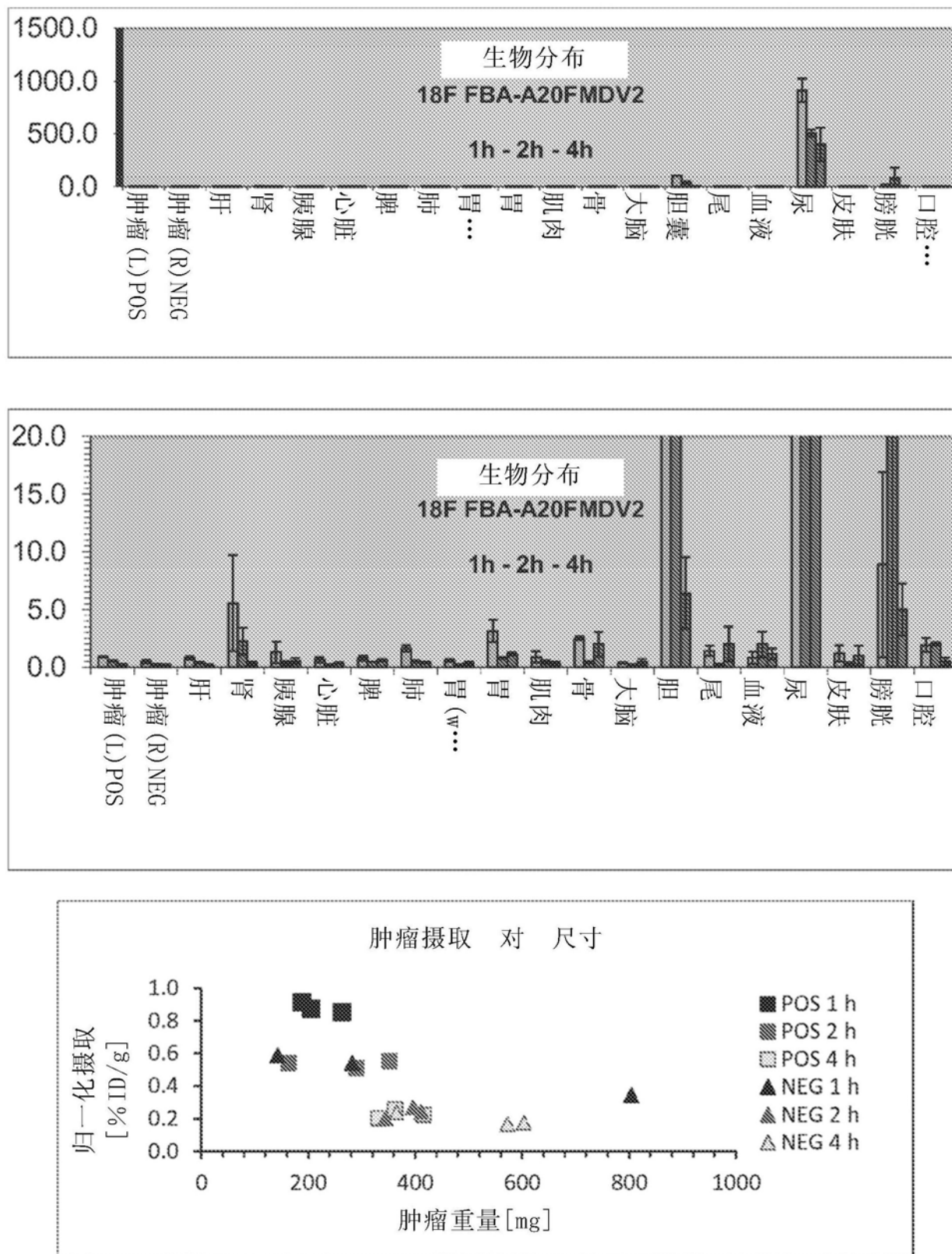


图2

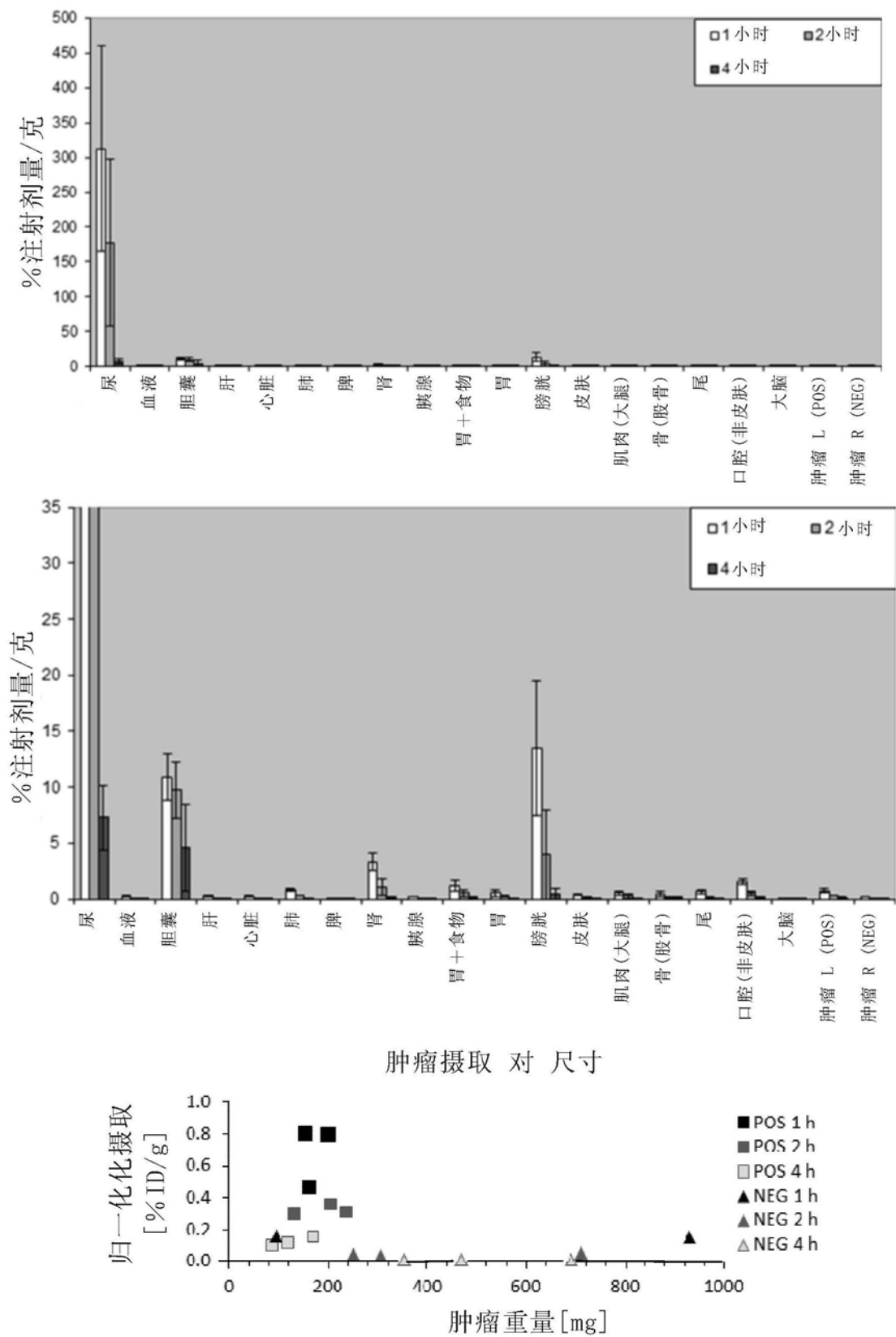


图3

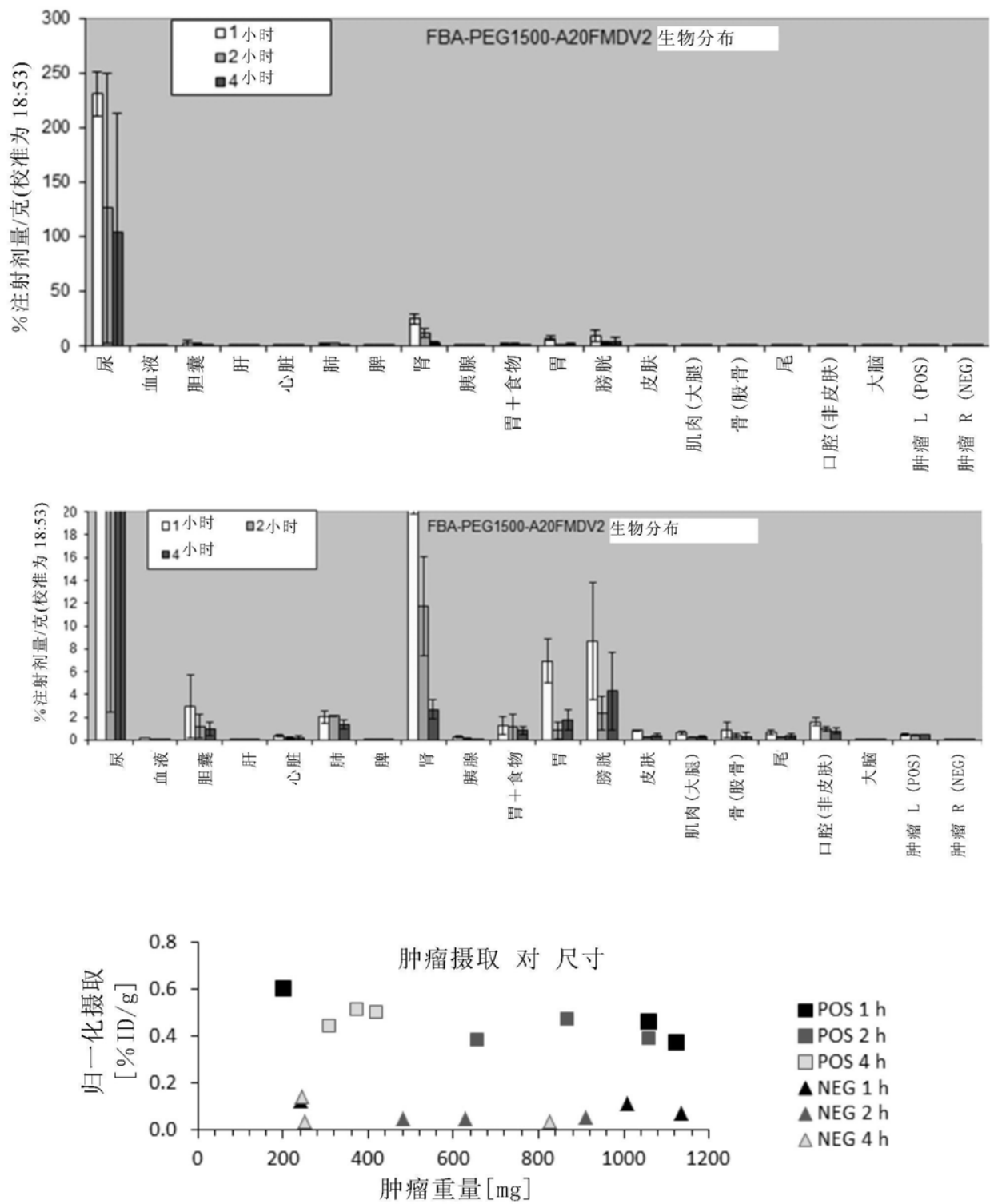


图4

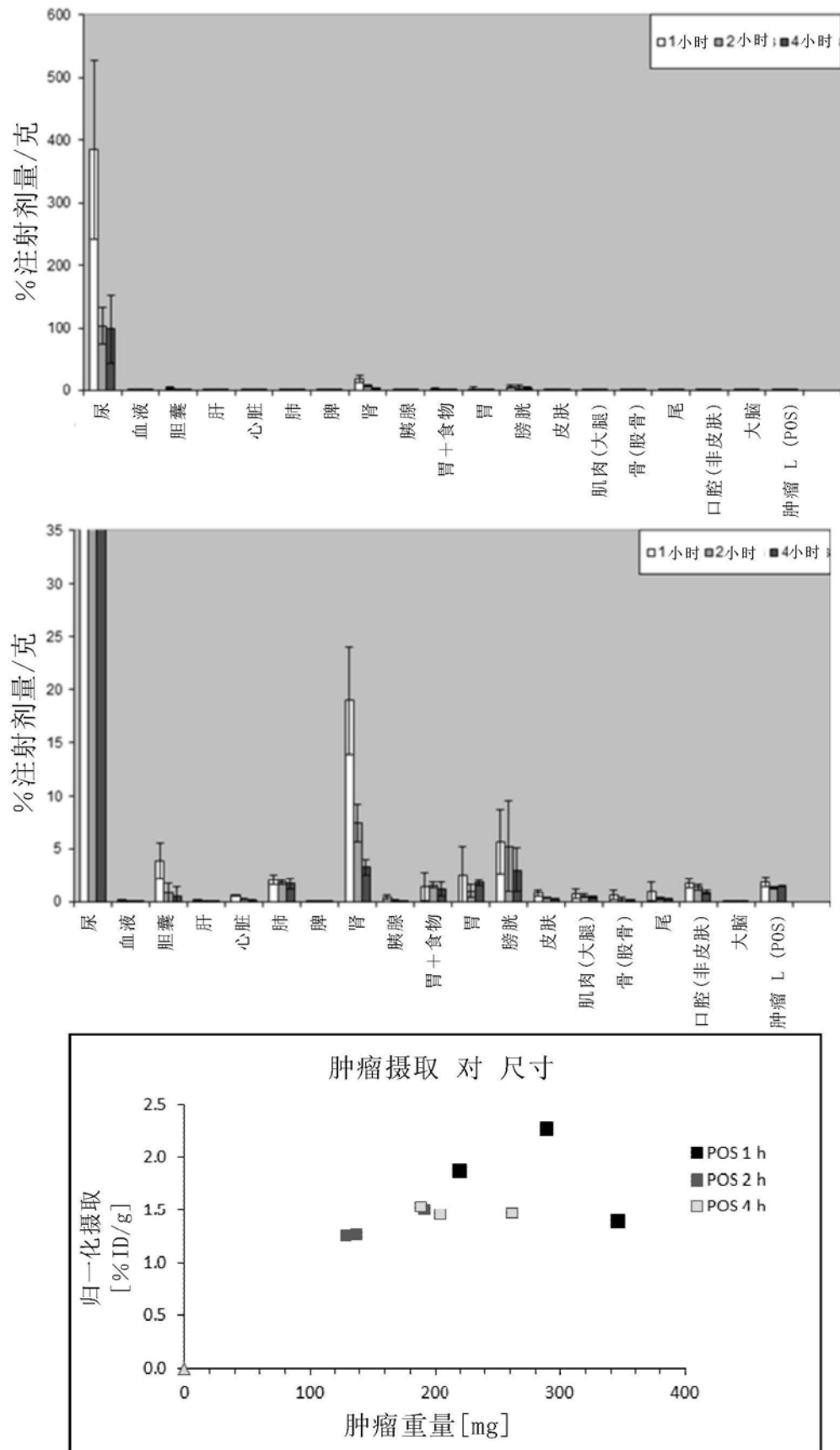


图5

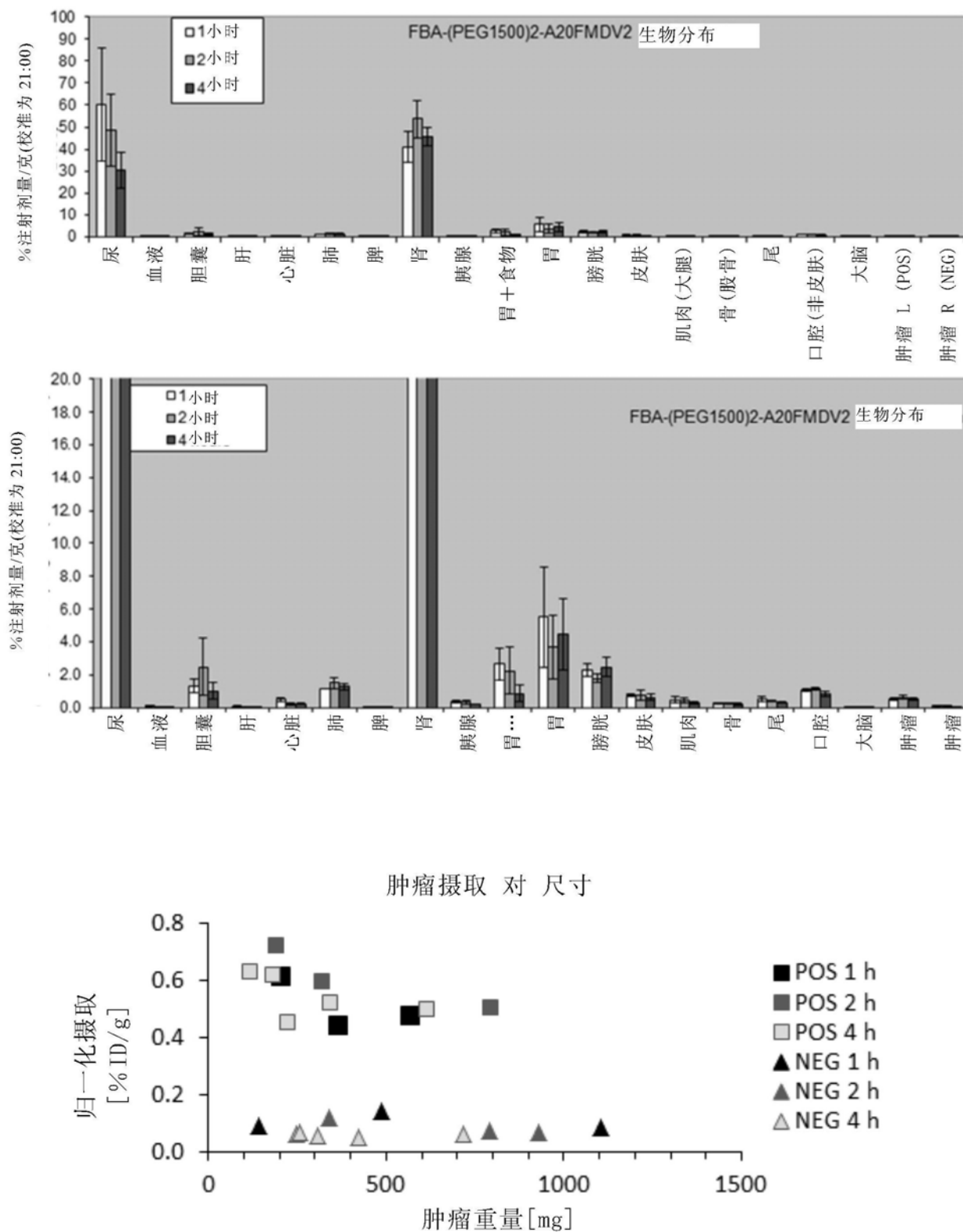


图6

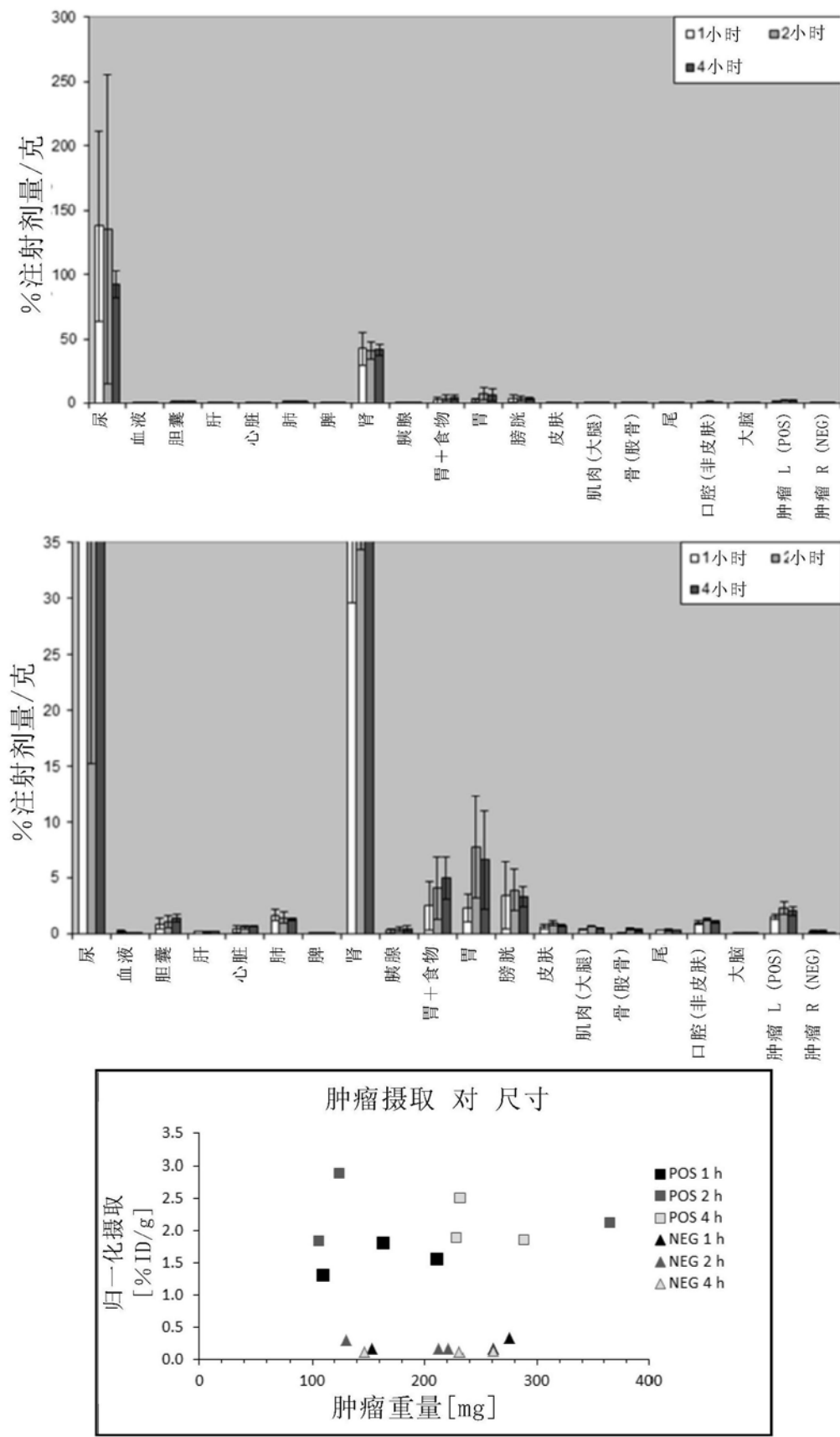


图7

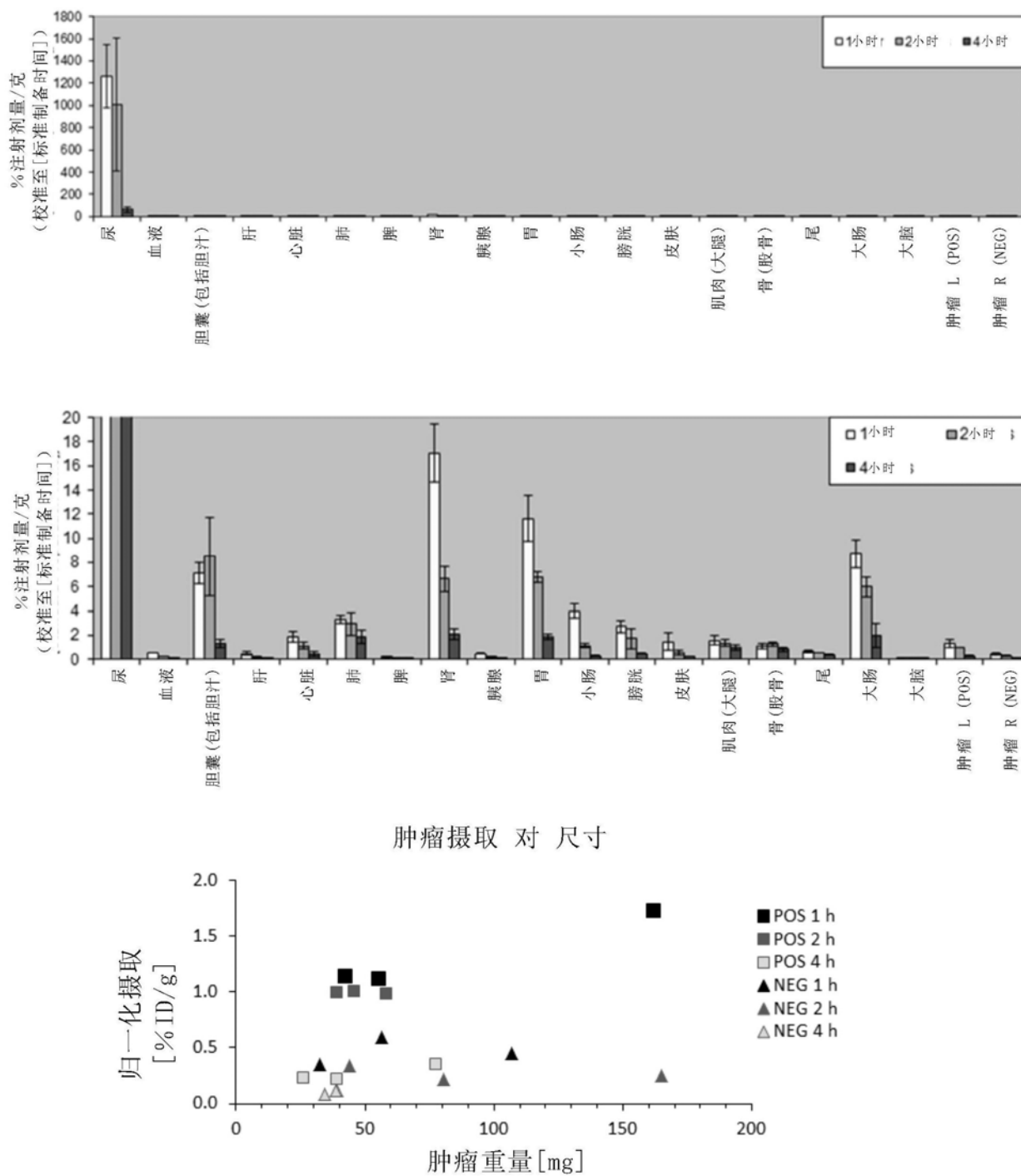


图8

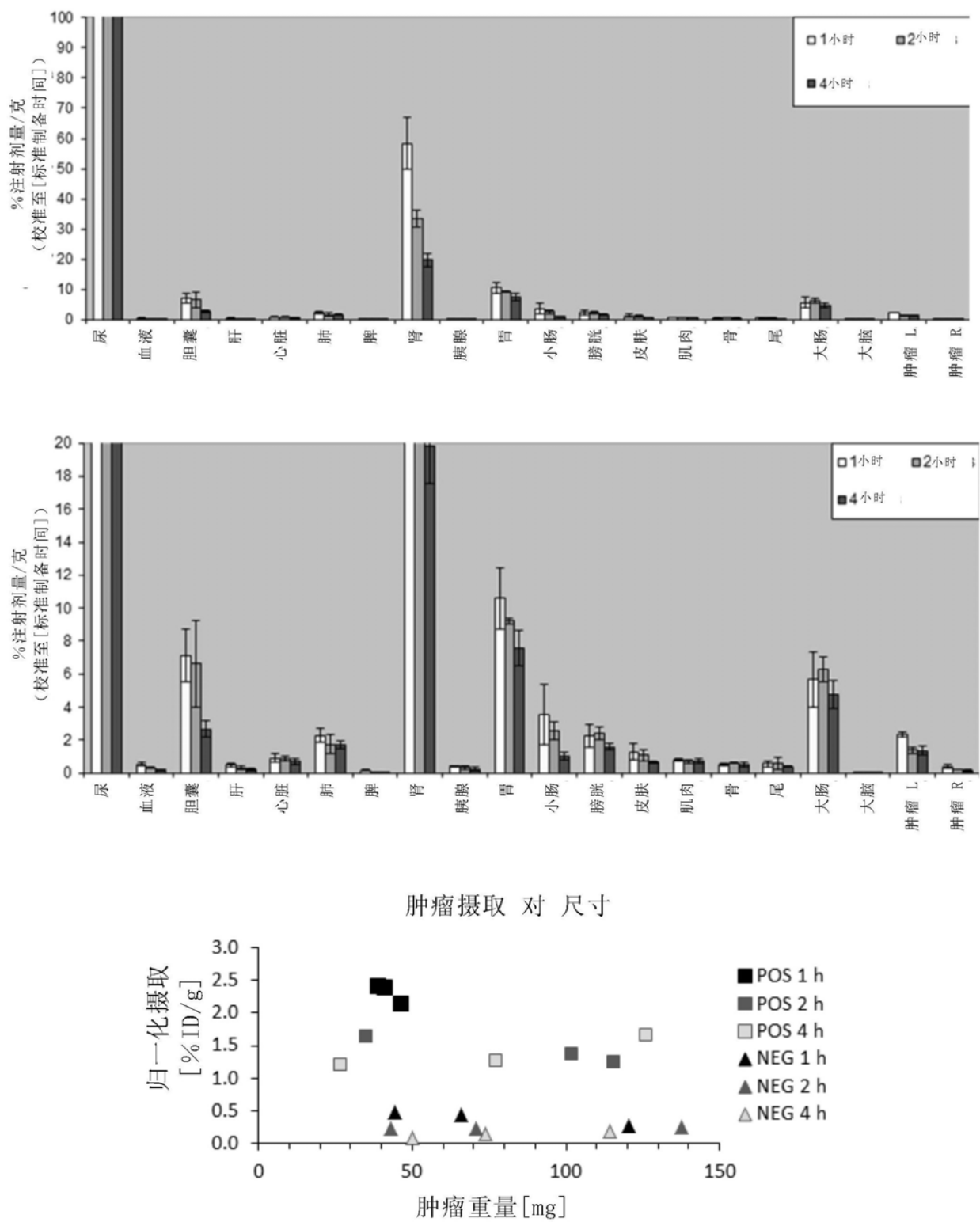


图9

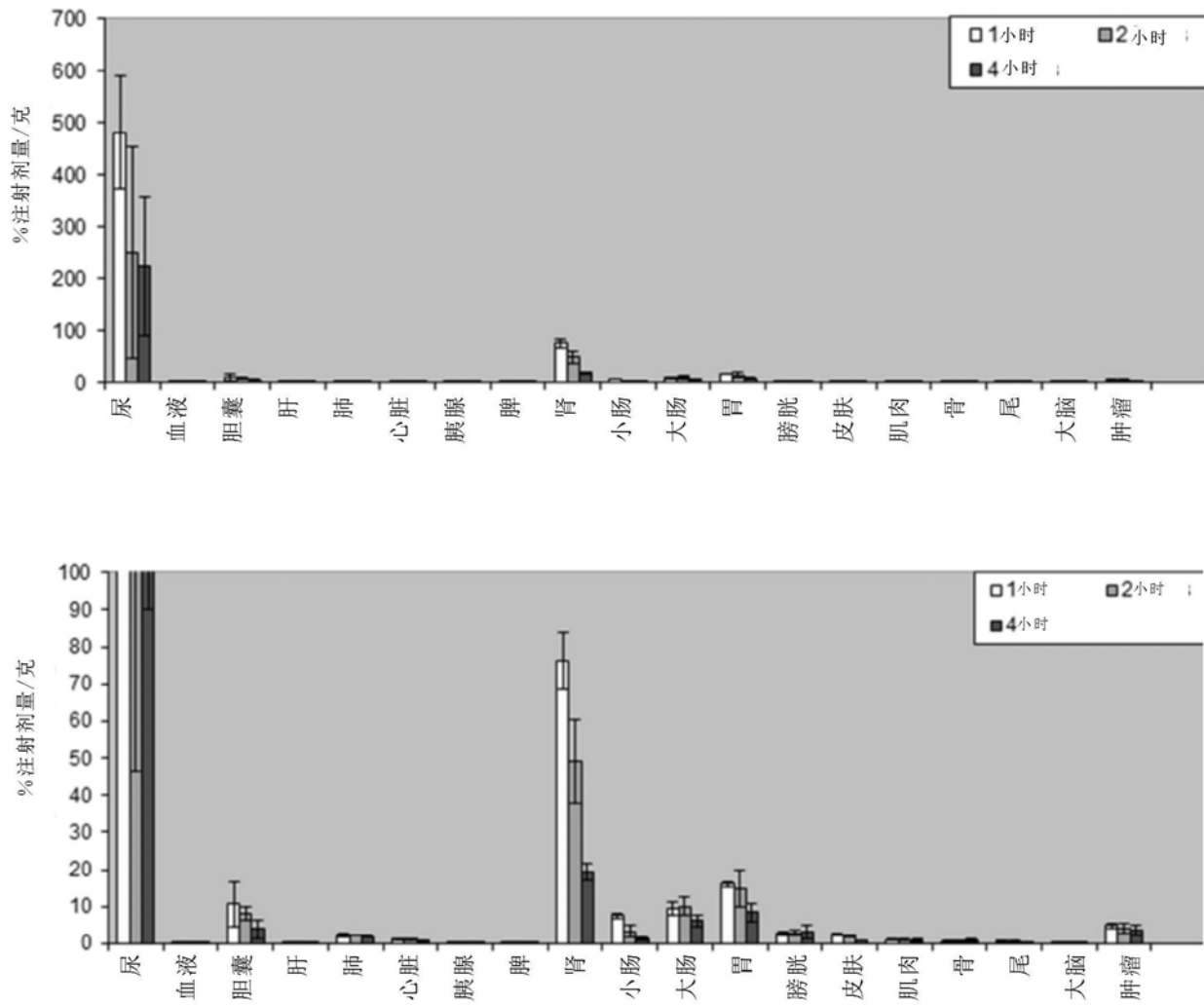


图10

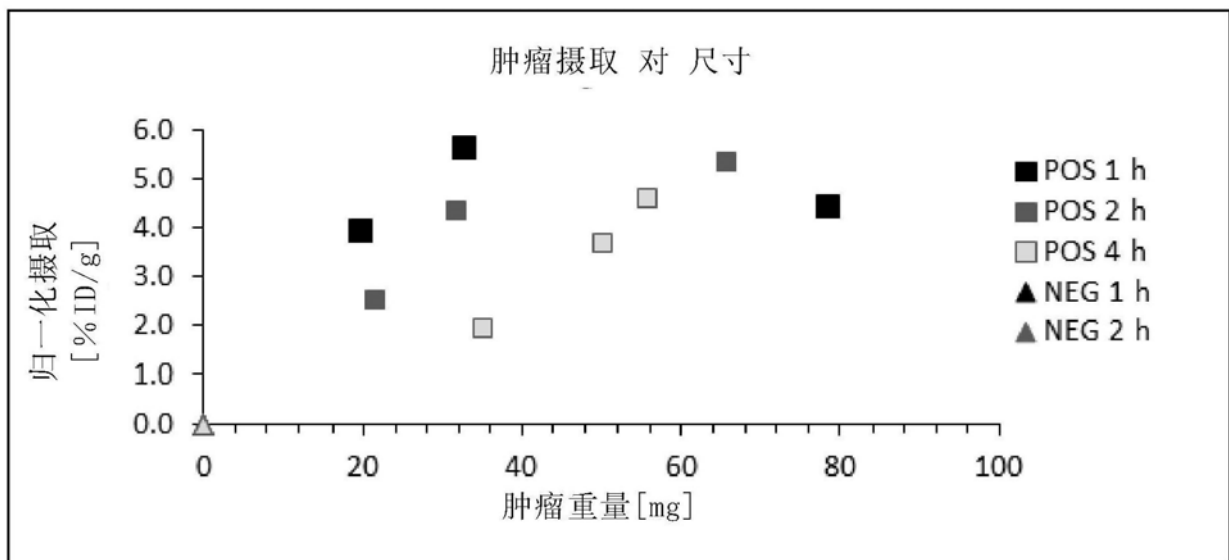
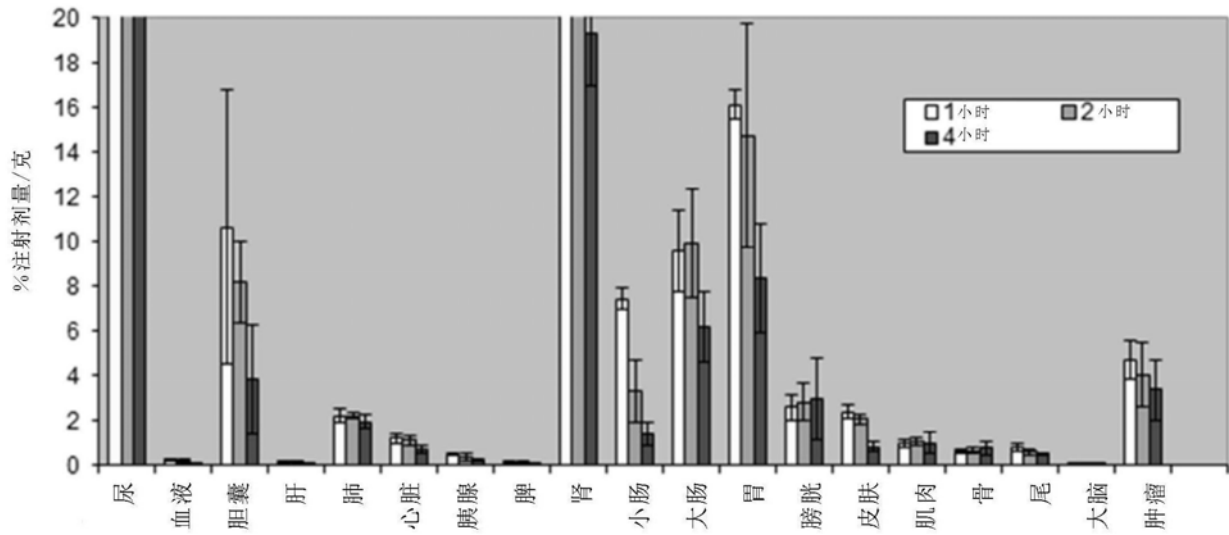


图10(续)

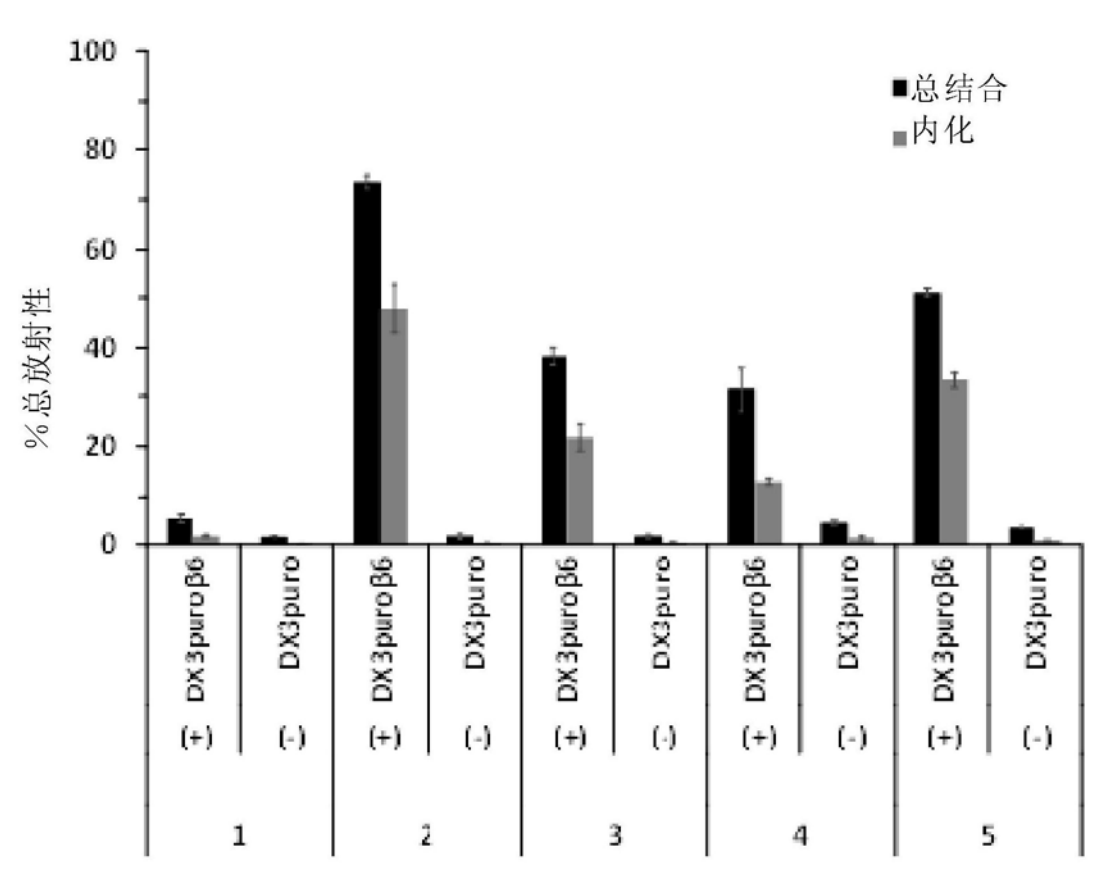
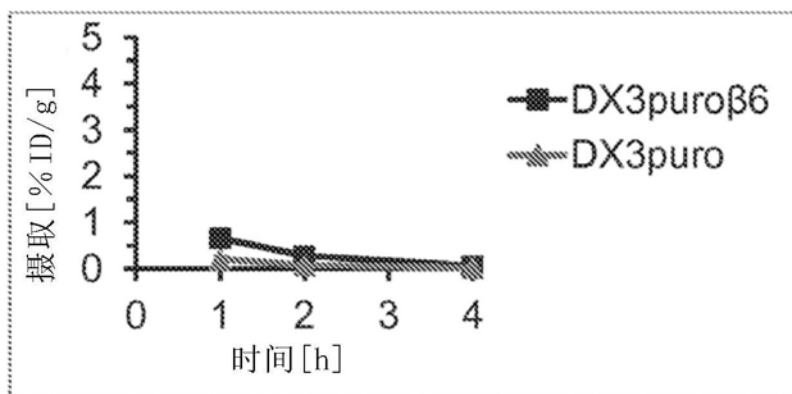
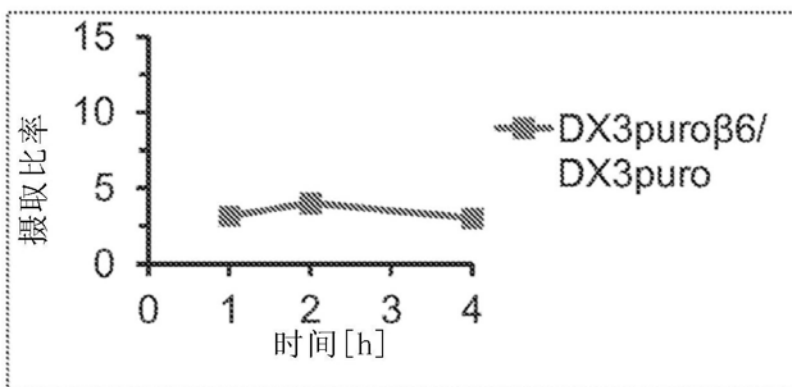


图11

A



B



C

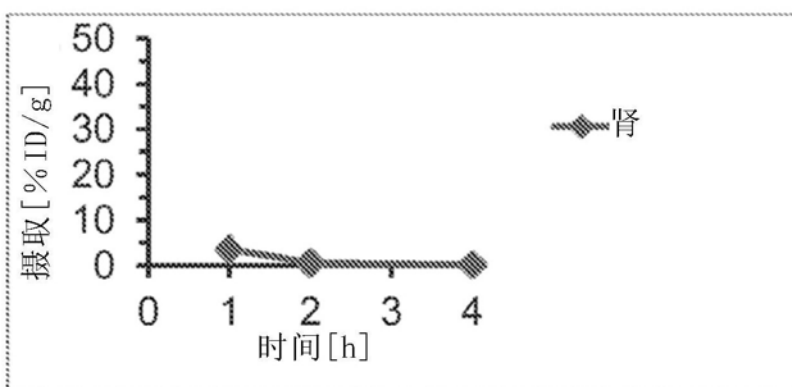
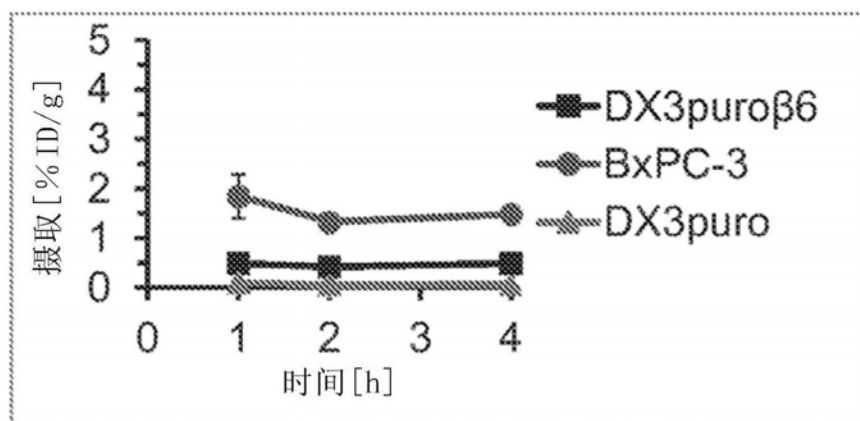
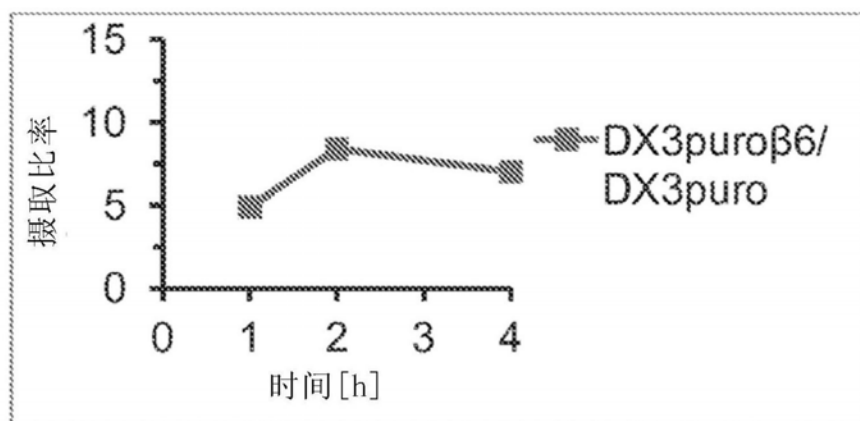


图12

A



B



C

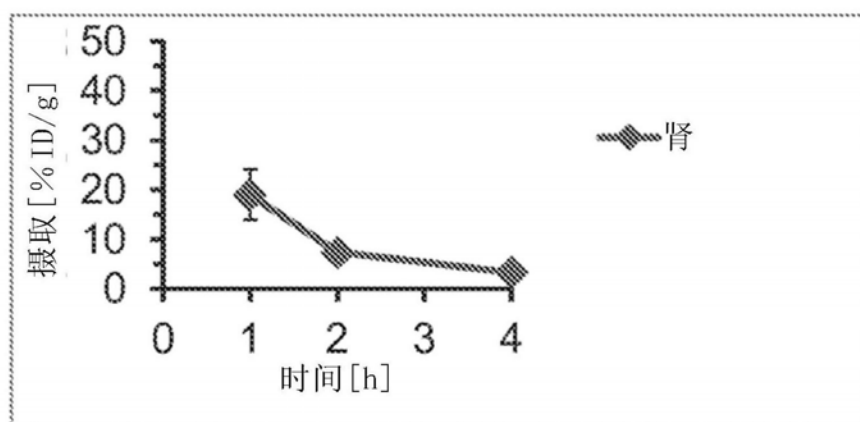
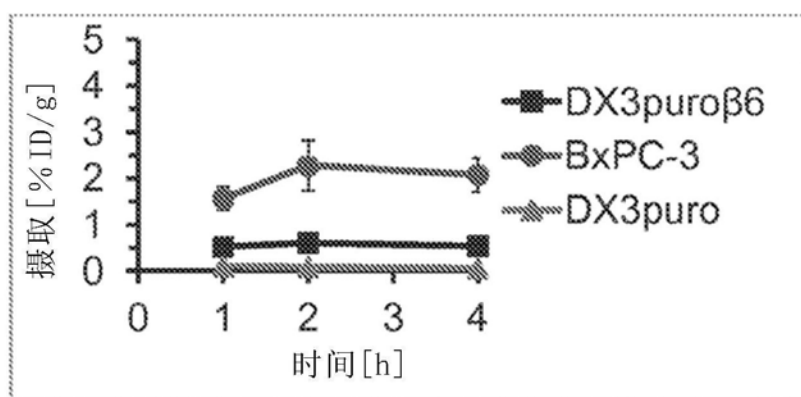
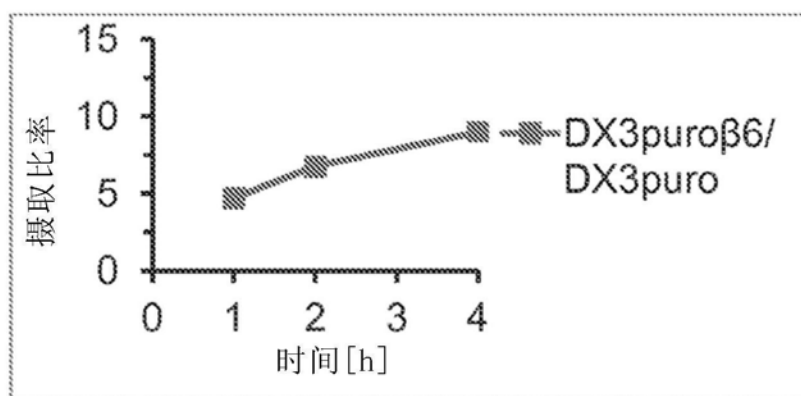


图13

A



B



C

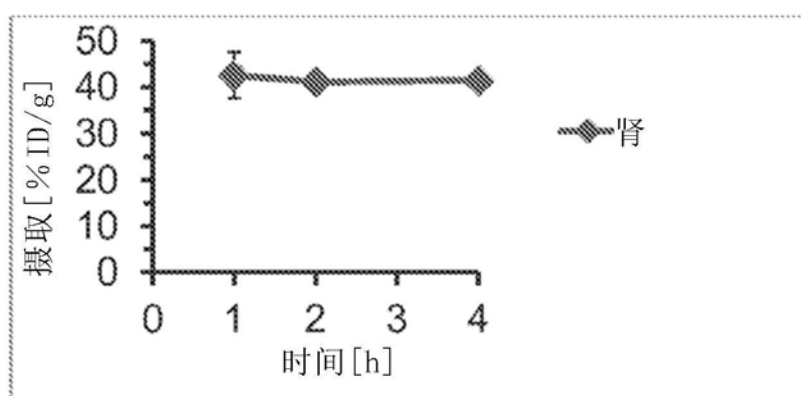


图14

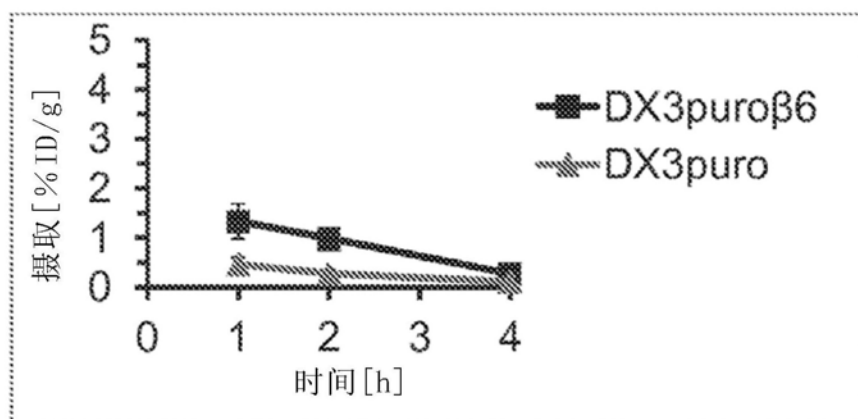
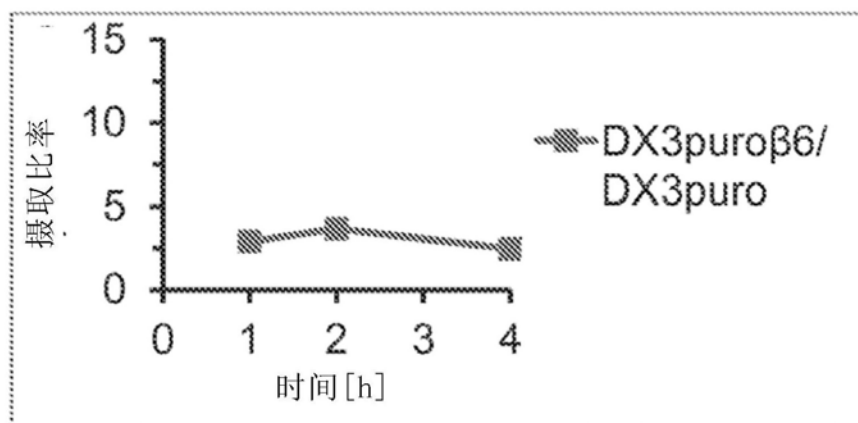
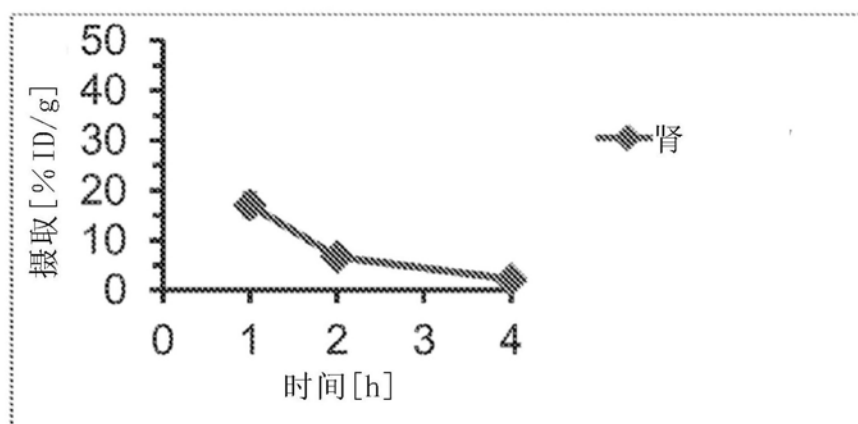
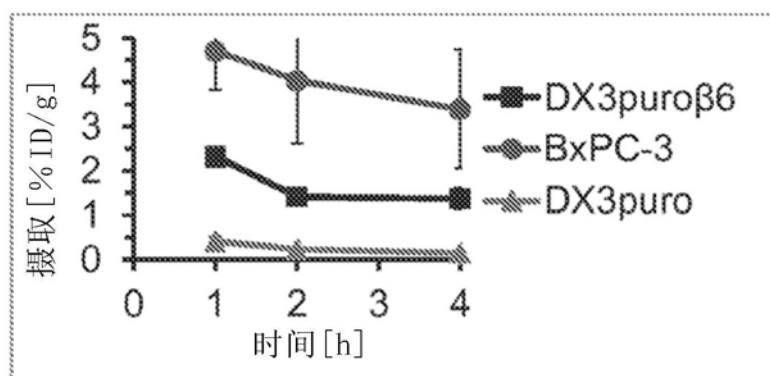
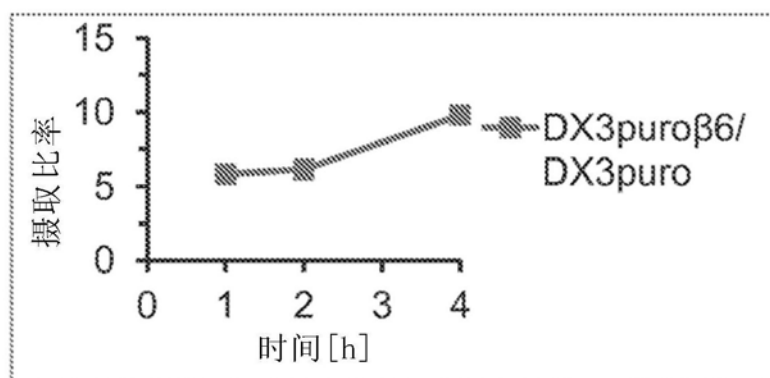
A**B****C**

图15

A



B



C

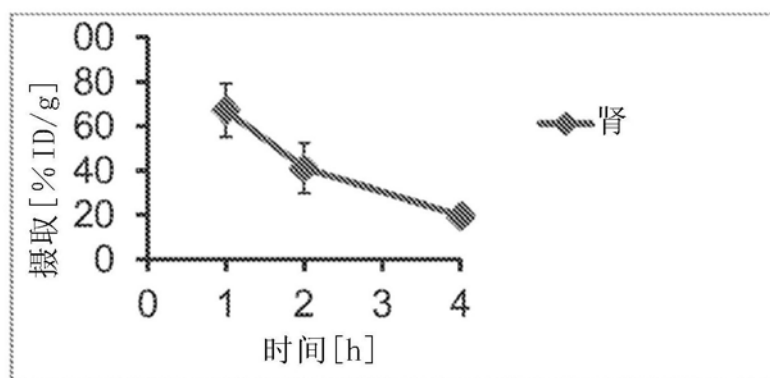


图16

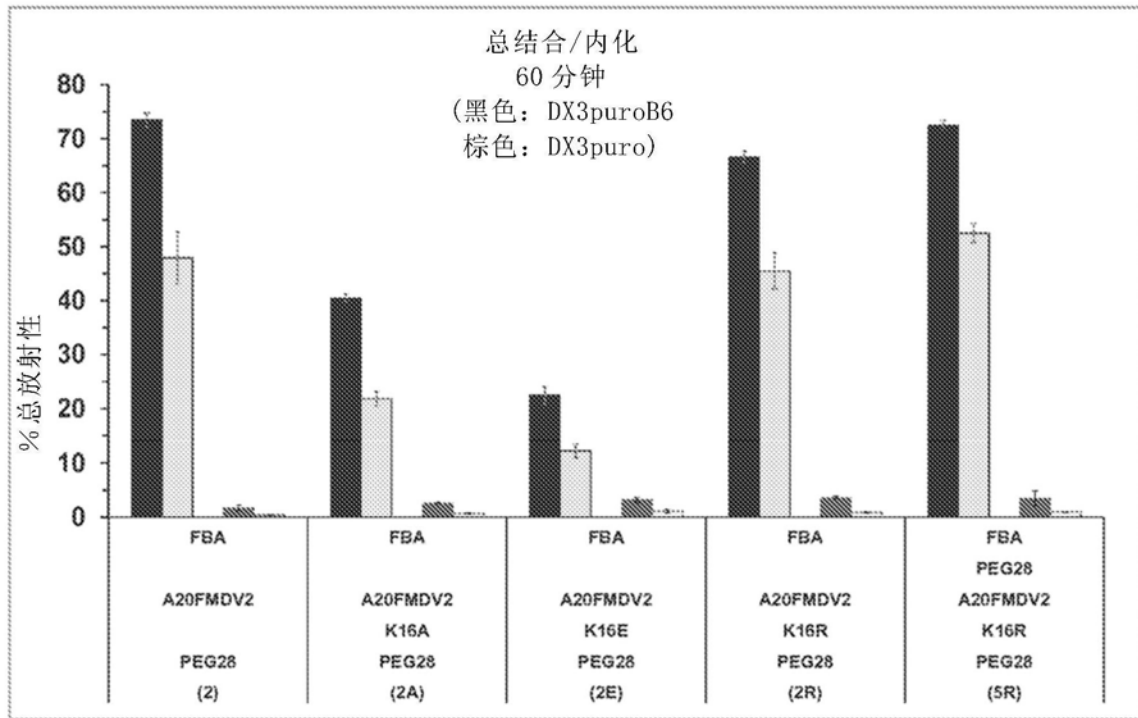


图17

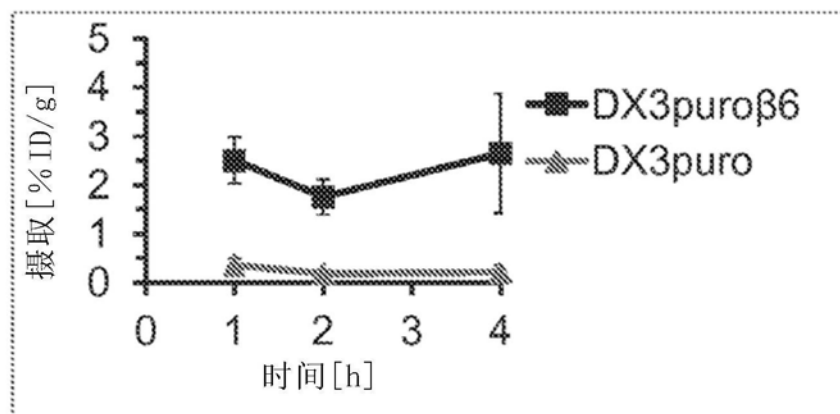
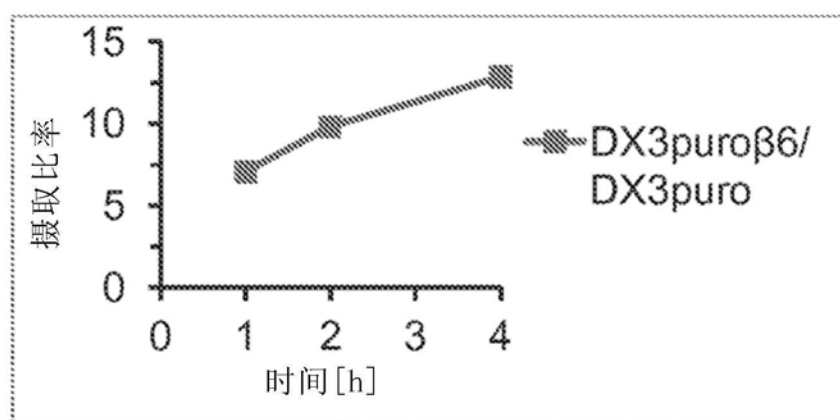
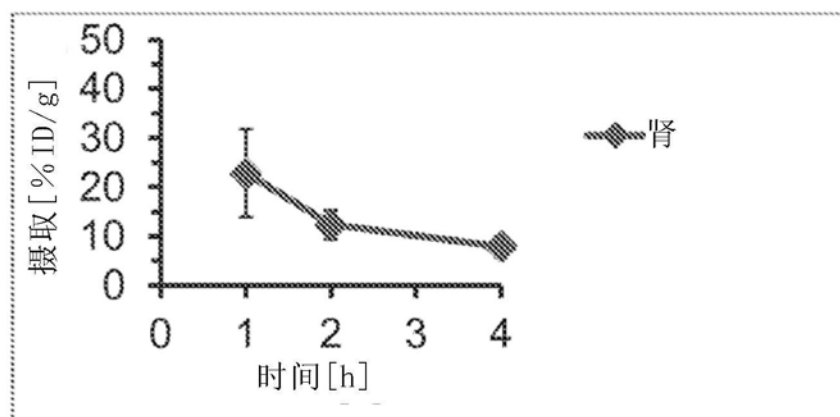
A**B****C**

图18

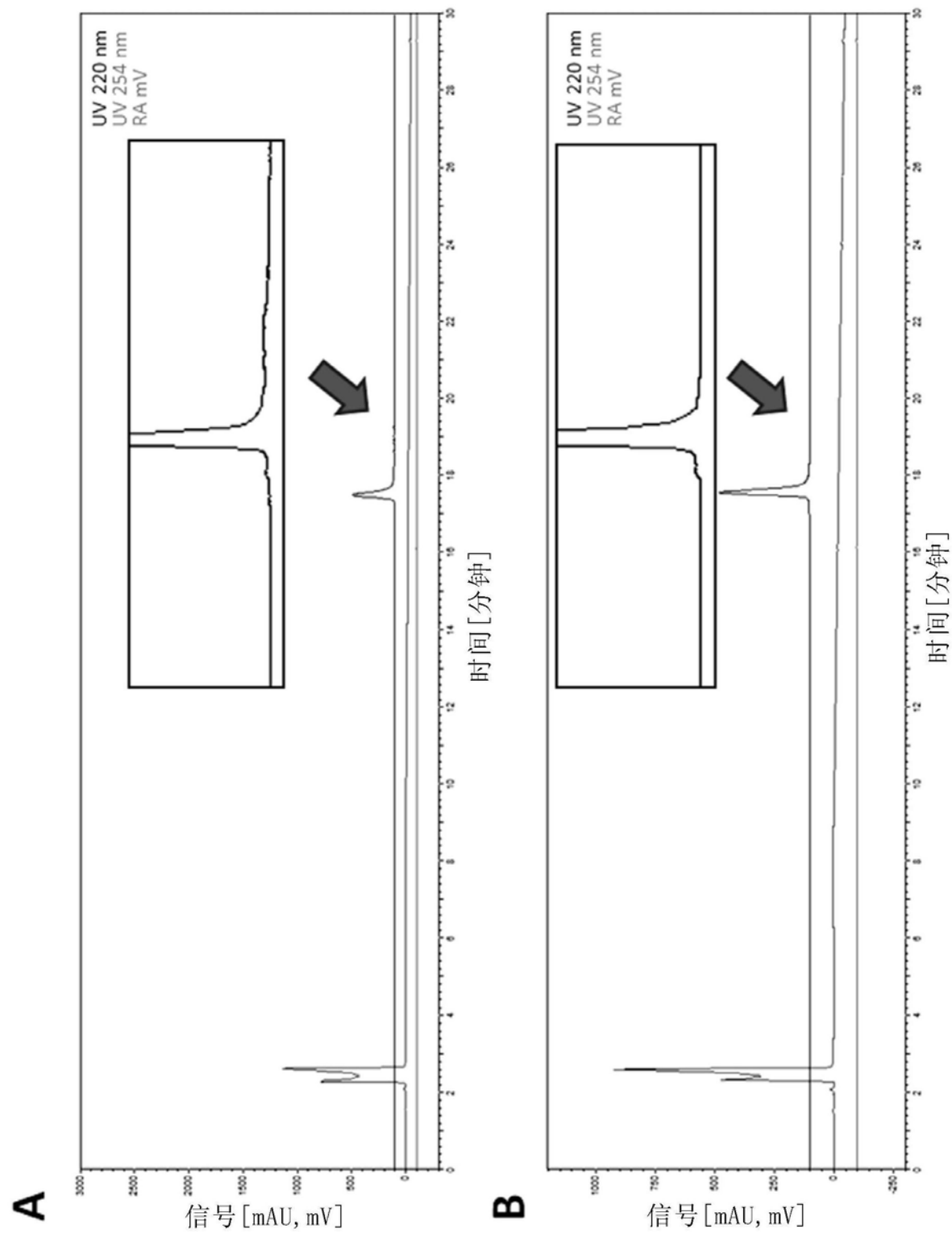


图19

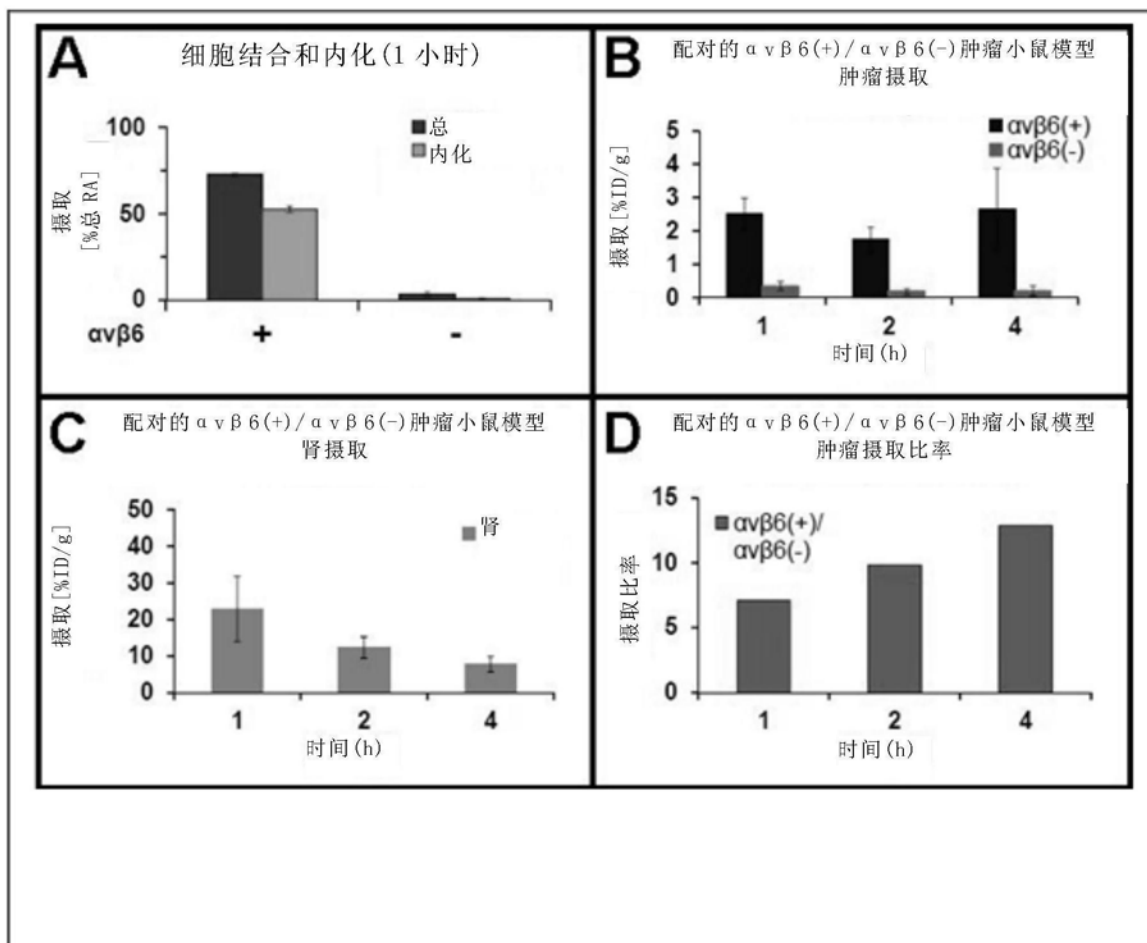


图20

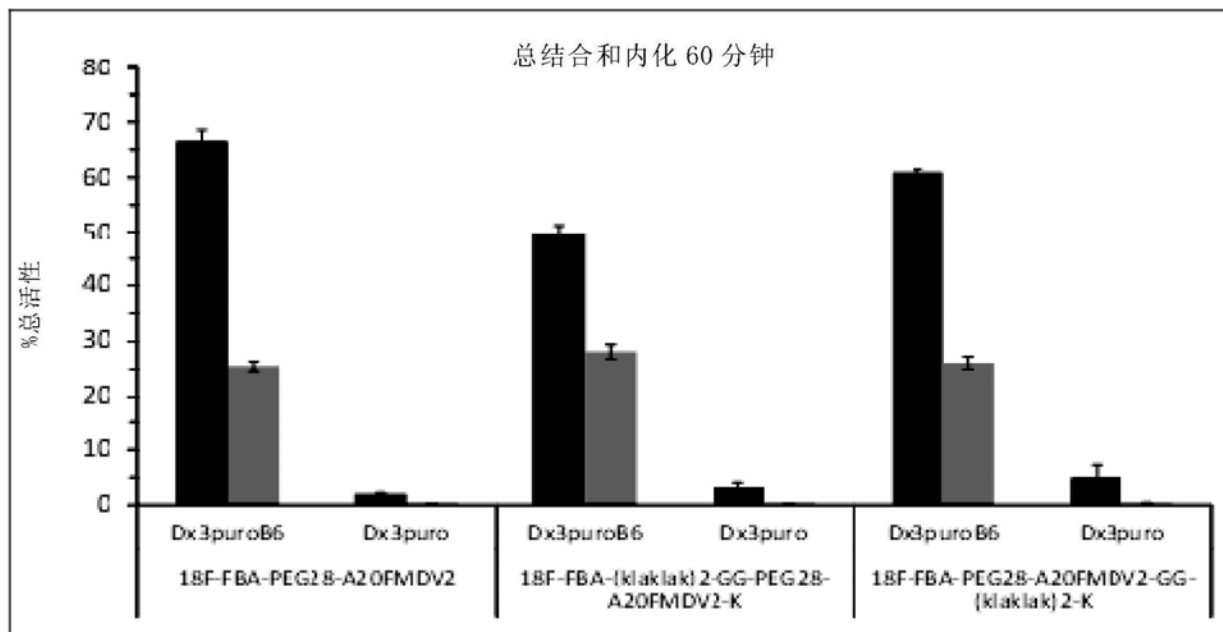


图21

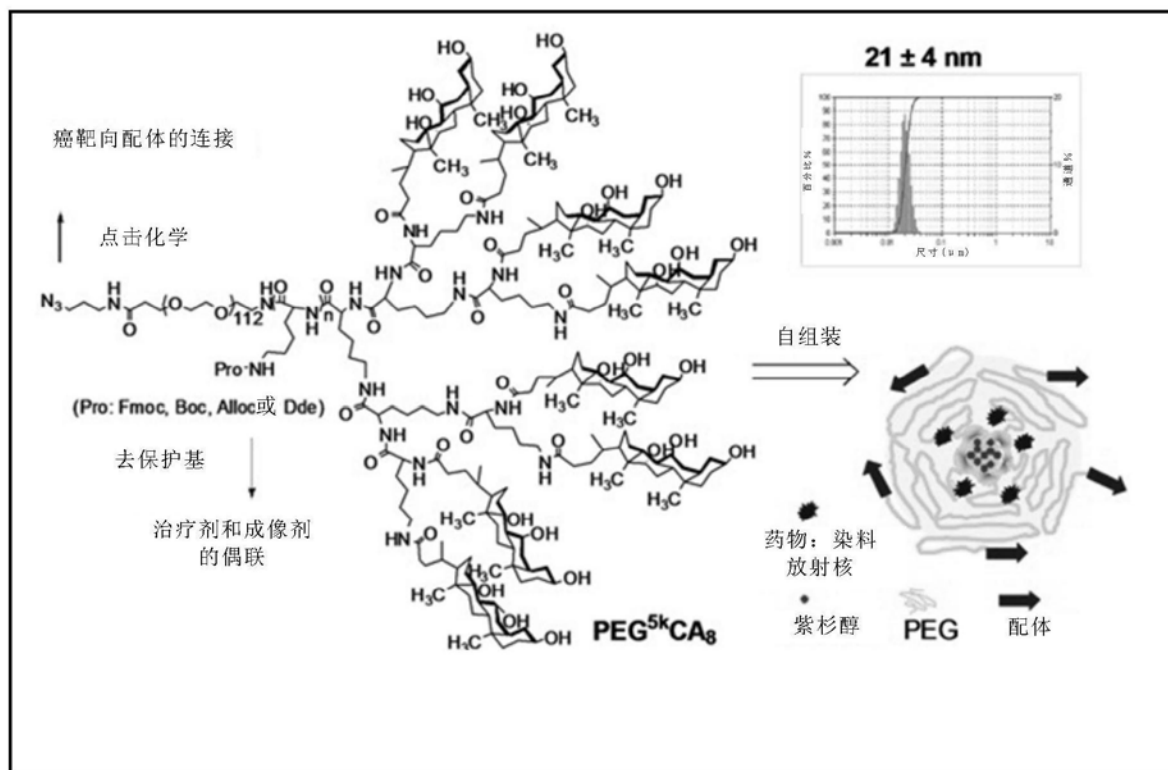


图22

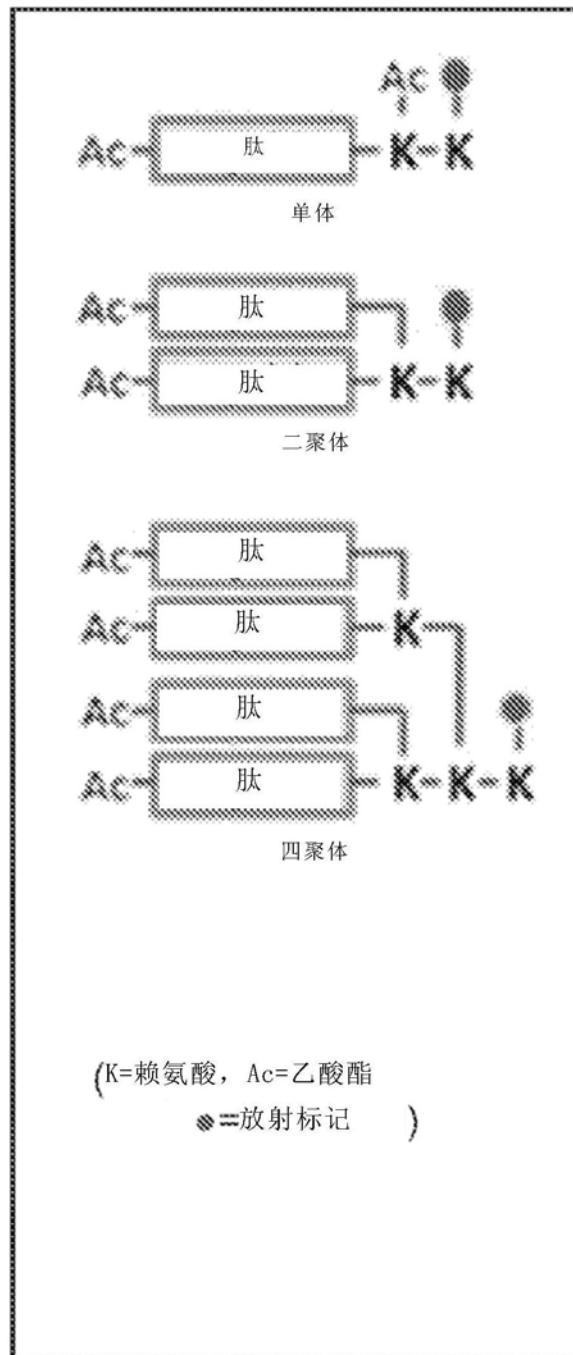


图23

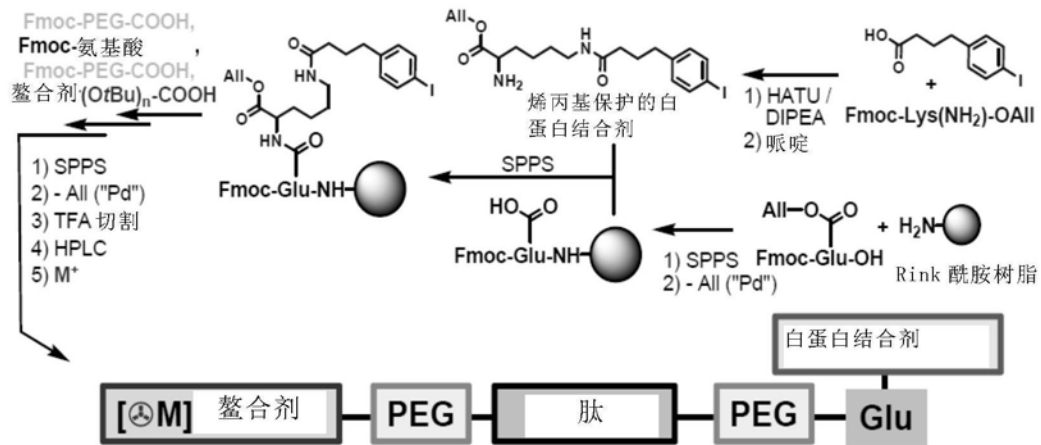


图26

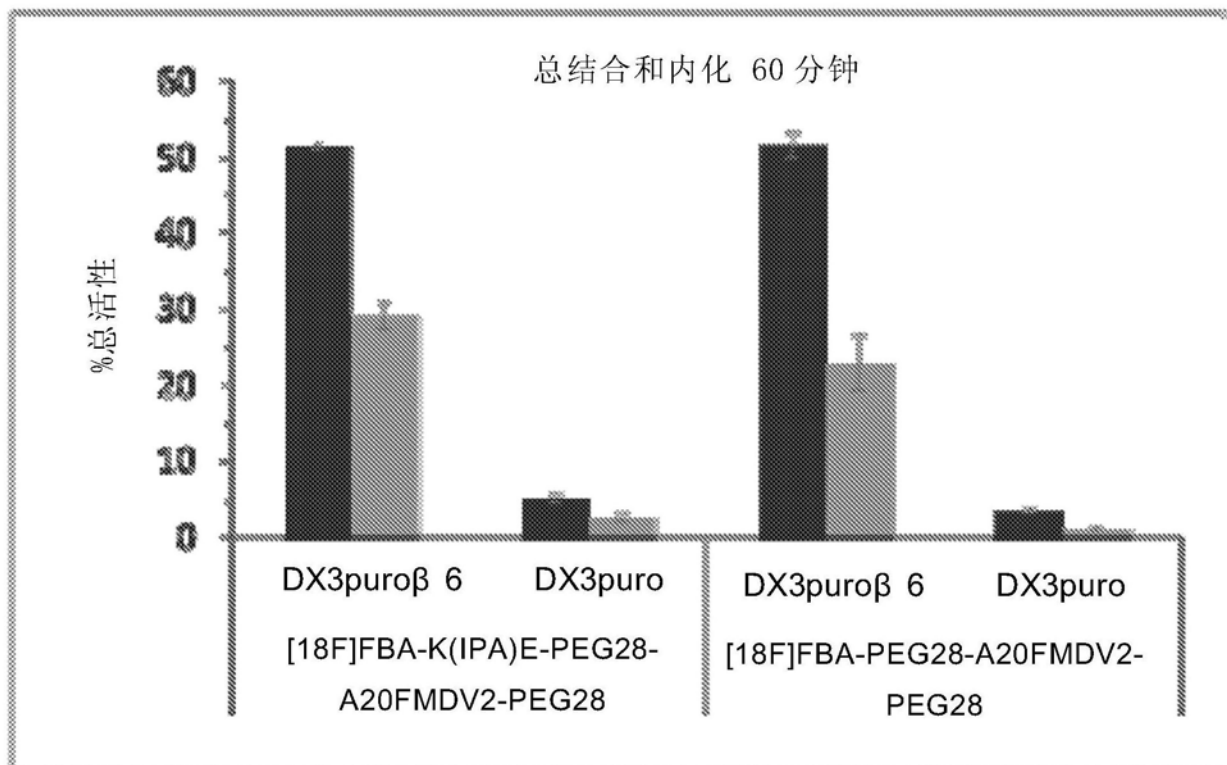


图27

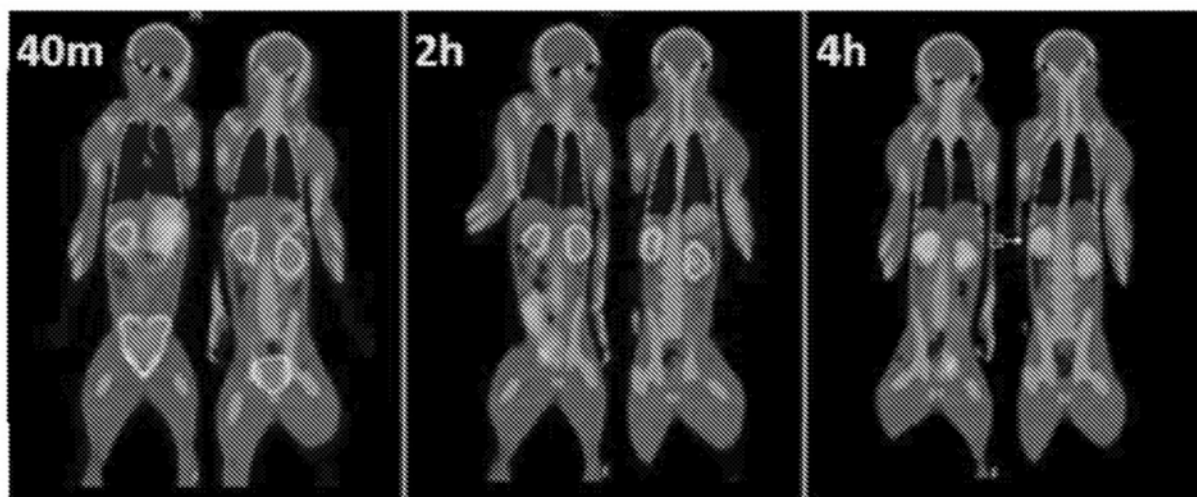


图28