



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109843336 A

(43)申请公布日 2019.06.04

(21)申请号 201780064784.6

(22)申请日 2017.08.31

(30)优先权数据

62/382,635 2016.09.01 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.04.19

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/049745 2017.08.31

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/045238 EN 2018.03.08

(71)申请人 梅约医学教育与研究基金会

地址 美国明尼苏达州

(72)发明人 斯韦托米尔·N·马尔科维奇

温迪·K·内瓦拉

(74)专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限公司 11713

代理人 康健 王思琪

(51)Int.Cl.

A61K 47/69(2006.01)

A61K 47/68(2006.01)

A61K 47/64(2006.01)

A61K 9/51(2006.01)

A61K 31/337(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

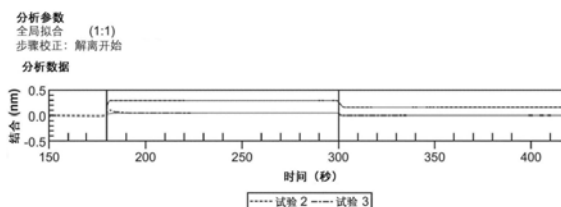
权利要求书3页 说明书25页 附图1页

(54)发明名称

用于靶向T细胞癌症的方法和组合物

(57)摘要

本文描述了结合剂和载体蛋白以及至少一种治疗剂的组合物,其中所述结合剂能够结合T细胞上表达的抗原;以及其制备和使用方法,特别是作为T细胞癌症治疗剂。还描述了结合剂和载体蛋白以及至少一种治疗剂的冻干组合物以及其制备和使用方法,特别是作为T细胞癌症治疗剂。



1. 一种纳米颗粒组合物,所述纳米颗粒组合物包含具有外表面的纳米颗粒,其中所述纳米颗粒中的每一个包含:

- (a) 载体蛋白,
- (b) 具有T细胞抗原结合部分的结合剂,以及
- (c) 治疗有效量的紫杉醇;

其中经用水溶液复原,所述结合剂的抗原结合部分能够在体内与T细胞抗原结合。

2. 如权利要求1所述的纳米颗粒组合物,其中所述纳米颗粒包含约100个至约1000个结合剂。

3. 如权利要求1所述的纳米颗粒组合物,其中所述抗原结合部分能够与T细胞受体结合。

4. 如权利要求3所述的纳米颗粒组合物,其中所述抗原结合部分与选自以下各项的抗原结合:CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD25、CD30、CD40、CD52、CD122或CCR4。

5. 如权利要求1所述的纳米颗粒组合物,其中所述纳米颗粒是冻干的。

6. 如权利要求1-5中任一项所述的纳米颗粒组合物,其中所述组合物在约20℃至约25℃下稳定长达约12个月或更长时间。

7. 如权利要求1-5中任一项所述的纳米颗粒组合物,其中所述结合剂包括希普利珠单抗、莫罗单抗-CD3 (OKT3)、Leu1、扎木单抗、扎木单抗、本妥昔单抗-维度汀、Mik-β1、KW-0761或其组合。

8. 如权利要求1-5中任一项所述的纳米颗粒组合物,其中所述结合剂是莫罗单抗-CD3 (OKT3)。

9. 如权利要求1-5中任一项所述的纳米颗粒组合物,其中所述抗原结合部分包括适体、受体配体、Fab片段或其组合。

10. 如权利要求1-5中任一项所述的纳米颗粒组合物,其中所述组合物包含一种或多种另外的癌症治疗剂。

11. 如权利要求10所述的纳米颗粒组合物,其中所述另外的癌症治疗剂包括阿比特龙、苯达莫司汀、硼替佐米、卡铂、卡巴他赛、顺铂、苯丁酸氮芥、达沙替尼、多西他赛、多柔比星、表柔比星、埃罗替尼、依托泊苷、依维莫司、吉非替尼、伊达比星、伊马替尼、羟基脲、伊马替尼、拉帕替尼、亮丙瑞林、美法仑、甲氨蝶呤、米托蒽醌、奈达铂、尼罗替尼、奥沙利铂、帕唑帕尼、培美曲塞、吡铂、罗米地辛、赛特铂、索拉非尼、威罗菲尼、舒尼替尼、替尼泊苷、三铂、长春花碱、长春瑞滨、长春新碱或环磷酰胺。

12. 如权利要求1-11中任一项所述的纳米颗粒组合物,其中少于约50%的所述纳米颗粒是低聚的。

13. 如权利要求1-11中任一项所述的纳米颗粒组合物,其中少于40%的存在于所述组合物中的纳米颗粒是低聚的。

14. 如权利要求1-11中任一项所述的纳米颗粒组合物,其中少于30%的存在于所述组合物中的纳米颗粒是低聚的。

15. 如权利要求1-11中任一项所述的纳米颗粒组合物,其中少于20%的存在于所述组合物中的纳米颗粒是低聚的。

16. 如权利要求1-11中任一项所述的纳米颗粒组合物,其中少于10%的存在于所述组

合物中的纳米颗粒是低聚的。

17. 如权利要求1-11中任一项所述的纳米颗粒组合物,其中少于5%的存在于所述组合物中的纳米颗粒是低聚的。

18. 如权利要求1-5中任一项所述的纳米颗粒组合物,其中所述纳米颗粒的平均尺寸是90nm至800nm。

19. 如权利要求1所述的纳米颗粒组合物,其中所述载体蛋白包括白蛋白、明胶、弹性蛋白、麦醇溶蛋白、豆球蛋白、玉米醇溶蛋白、大豆蛋白、乳蛋白、乳清蛋白或其组合。

20. 如权利要求19所述的纳米颗粒组合物,其中所述载体蛋白包含抗体结合基序。

21. 如权利要求20所述的纳米颗粒组合物,其中所述载体蛋白是白蛋白。

22. 如权利要求21所述的纳米颗粒组合物,其中所述白蛋白是人血清白蛋白。

23. 如权利要求21中任一项所述的纳米颗粒组合物,其中所述白蛋白是重组人血清白蛋白。

24. 如权利要求1-23中任一项所述的纳米颗粒组合物,其中所述组合物被配制用于静脉内递送。

25. 如权利要求1-5中任一项所述的纳米颗粒组合物,其中所述纳米颗粒具有约 1×10^{-11} M至约 1×10^{-8} M的解离常数。

26. 一种用于治疗T细胞癌细胞的方法,所述方法包括使所述癌细胞与有效量的纳米颗粒组合物接触,维持所述纳米颗粒组合物与所述细胞接触足够的一段时间以治疗所述癌细胞,其中所述纳米颗粒组合物包含具有外表面的纳米颗粒,所述纳米颗粒中的每一个包含:

(a) 载体蛋白,

(b) 具有T细胞抗原结合部分的结合剂,以及

(c) 治疗有效量的紫杉醇;

其中所述结合剂的抗原结合部分能够在体内与T细胞抗原结合。

27. 如权利要求26所述的方法,其中所述纳米颗粒包含约100个至约1000个结合剂。

28. 如权利要求26所述的方法,其中所述抗原结合部分与T细胞受体 (TCR) 结合。

29. 如权利要求26所述的方法,其中所述抗原结合部分与选自以下各项的抗原结合: CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD25、CD30、CD40、CD52、CD122或CCR4。

30. 如权利要求29所述的方法,其中所述抗原是CD2或CD3。

31. 如权利要求27所述的方法,其中所述纳米颗粒组合物是冻干的纳米颗粒组合物,其在施用之前在水溶液中被复原。

32. 如权利要求27所述的方法,其中所述组合物在约20℃至约25℃下稳定长达约12个月或更长时间。

33. 如权利要求27-32中任一项所述的方法,其中所述结合剂包括希普利珠单抗、OKT3、Leu1、扎木单抗、扎木单抗、本妥昔单抗-维度汀、Mik-β1、KW-0761或其组合。

34. 如权利要求27-32中任一项所述的方法,其中所述结合剂是莫罗单抗-CD3 (OKT3)。

35. 如权利要求27-32中任一项所述的方法,其中所述抗原结合部分是适体、受体配体或Fab片段。

36. 如权利要求27-32中任一项所述的方法,其中所述组合物包含一种或多种另外的癌症治疗剂。

37. 如权利要求36所述的方法,其中所述另外的癌症治疗剂选自阿比特龙、苯达莫司汀、硼替佐米、卡铂、卡巴他赛、顺铂、苯丁酸氮芥、达沙替尼、多西他赛、多柔比星、表柔比星、埃罗替尼、依托泊苷、依维莫司、吉非替尼、伊达比星、伊马替尼、羟基脲、伊马替尼、拉帕替尼、亮丙瑞林、美法仑、甲氨蝶呤、米托蒽醌、奈达铂、尼罗替尼、奥沙利铂、紫杉醇、帕唑帕尼、培美曲塞、吡铂、罗米地辛、赛特铂、索拉非尼、威罗菲尼、舒尼替尼、替尼泊苷、三铂、长春花碱、长春瑞滨、长春新碱或环磷酰胺。

38. 如权利要求27-37中任一项所述的方法,其中少于约50%的所述纳米颗粒是低聚的。

39. 如权利要求27-37中任一项所述的方法,其中少于40%的存在于所述组合物中的纳米颗粒是低聚的。

40. 如权利要求27-37中任一项所述的方法,其中少于30%的存在于所述组合物中的纳米颗粒是低聚的。

41. 如权利要求27-37中任一项所述的方法,其中少于20%的存在于所述组合物中的纳米颗粒是低聚的。

42. 如权利要求27-37中任一项所述的方法,其中少于10%的存在于所述组合物中的纳米颗粒是低聚的。

43. 如权利要求27-37中任一项所述的方法,其中少于5%的存在于所述组合物中的纳米颗粒是低聚的。

44. 如权利要求27-43中任一项所述的方法,其中所述纳米颗粒的平均尺寸是90nm至800nm。

45. 如权利要求27-32中任一项所述的方法,其中所述纳米颗粒的平均尺寸是约90nm至约160nm。

46. 如权利要求27-45中任一项所述的方法,其中所述载体蛋白包括白蛋白、明胶、弹性蛋白、麦醇溶蛋白、豆球蛋白、玉米醇溶蛋白、大豆蛋白、乳蛋白、乳清蛋白或其组合。

47. 如权利要求46所述的方法,其中所述载体蛋白是白蛋白。

48. 如权利要求47所述的方法,其中所述白蛋白是人血清白蛋白。

49. 如权利要求47所述的方法,所述白蛋白是重组人血清白蛋白。

50. 如权利要求27-49中任一项所述的方法,其中所述组合物被配制用于静脉内递送。

51. 如权利要求27-32中任一项所述的方法,其中所述纳米颗粒具有约 1×10^{-11} M至约 1×10^{-8} M的解离常数。

52. 如权利要求27-32中任一项所述的方法,其中所述治疗有效量的所述纳米颗粒组合物包含约75mg/m²至约175mg/m²的紫杉醇。

53. 如权利要求27-52中任一项所述的方法,其中所述T细胞癌症包括外周T细胞淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤、血管免疫母细胞性淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、成人T细胞白血病/淋巴瘤(ATLL)、肠病型T细胞淋巴瘤、肝脾 γ - δ T细胞淋巴瘤、母细胞性NK细胞淋巴瘤、成淋巴细胞性淋巴瘤、鼻型NK/T细胞淋巴瘤、治疗相关的T细胞淋巴瘤或其组合。

54. 如权利要求27-52中任一项所述的方法,其中所述T细胞癌症是T细胞淋巴瘤。

用于靶向T细胞癌症的方法和组合物

技术领域

[0001] 本申请涉及结合剂和载体蛋白质的新型组合物以及其制备方法和使用方法,特别是作为T细胞癌症治疗剂。

背景技术

[0002] 化疗仍然是包括黑色素瘤的许多类型癌症的全身治疗的主要方法。大多数化疗剂仅些微地对肿瘤细胞具有选择性,并且对健康增殖细胞的毒性可能很高(Allen TM. (2002) Cancer2:750-763),这往往需要减小剂量并且甚至中止治疗。在理论上,克服化疗毒性问题以及提高药物功效的一种方式是使用对肿瘤细胞选择性表达(或过表达)的蛋白质具有特异性的抗体使化疗药物靶向肿瘤以将靶向药物吸引到肿瘤,从而改变化疗的生物分布并且使转向肿瘤的药物更多并且对健康组织的影响更小。然而,尽管进行了30年的研究,但是特异性靶向在治疗背景下很少成功。

[0003] 常规的抗体依赖性化疗(ADC)是使用经由合成的蛋白酶可切割的接头与靶向抗体连接的毒性剂来设计的。这样的ADC治疗的功效取决于靶细胞与抗体结合的能力、待切割的接头以及靶细胞中毒性剂的摄取。Schrama, D. 等(2006) Nature reviews. Drug discovery5:147-159。

[0004] 抗体靶向化疗相对于常规治疗具有优势,这是因为它提供了靶向能力、多种细胞毒性剂以及提高的治疗能力的组合而具有潜在更小的毒性。尽管进行了广泛的研究,但是临床上有效的抗体靶向化疗仍然遥不可及:主要障碍包括抗体与化疗药物之间的接头的不稳定性、当与抗体结合时化疗剂的肿瘤毒性降低以及缀合物不能结合和进入肿瘤细胞。此外,这些治疗不允许控制抗体-药物缀合物的尺寸。

[0005] 在本领域中仍然需要基于抗体的癌症治疗剂,其对于靶向药物递送保留细胞毒性作用以提供相对于先前的治疗剂可靠的和提高的抗肿瘤功效。

[0006] 此外,对于任何治疗应用,还仍需要组合物在它的物理特性、化学特性以及生物学特性上是稳定的。

[0007] T细胞淋巴瘤(“TCL”)是占淋巴瘤的约15%的一组异质性的血液癌症。每年在美国有约6,500例新TCL病例。TCL包括外周T细胞淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、成人T细胞白血病/淋巴瘤、成淋巴细胞性淋巴瘤等。研究显示TCL可以影响儿童和成人,尽管在TCL的一些亚型中,主要是青少年和儿童受到这种血液疾病的影响,例如成淋巴细胞性淋巴瘤。患有TCL的患者表现出淋巴结肿大、高级别病变以及全身症状,例如严重的皮疹、发热以及疲劳。

[0008] TCL患者在传统上使用与用于B细胞淋巴瘤的化疗相同的化疗(例如蒽环类药物(anthracycline))来治疗。然而,与它们针对B细胞淋巴瘤的功效相比,基于蒽环类药物的方案在提高TCL患者的存活率方面无效。Vose J等, J Clin Oncol. 2008;26(25):4124-30。基于蒽环类药物的方案伴有TCL患者的响应率更低和进展时间更短。鉴于传统化疗的结果不佳,TCL患者非常需要基于非蒽环类药物的治疗方案。

[0009] 因此,需要更有效的组合物或免疫治疗来治疗T细胞癌症而具有最低限度的副作用或没有副作用。

发明内容

[0010] 本公开涉及一种纳米颗粒组合物,所述纳米颗粒组合物包含具有外表面的纳米颗粒,其中所述纳米颗粒中的每一个包含:载体蛋白、具有靶向T细胞上表达的抗原的抗原结合部分的结合剂以及治疗有效量的治疗剂。在一个方面,所述结合剂能够与T细胞或T细胞癌症上表达的抗原结合(例如OKT3),而同时,减少或消除与抗体(例如OKT3)的免疫原性和促有丝分裂潜在限制相关的严重副作用。因此,与具有严重副作用和/或毒性的常规ADC相比,如本文所述的纳米颗粒因此是显著的改进。

[0011] 基于抗体的治疗已经成为淋巴瘤患者的新治疗选择方案。举例来说,单克隆抗体利妥昔单抗(rituximab)(**Rituxan®**)已经用于治疗B细胞淋巴瘤,其具有显著改善的临床结果。对于T细胞赘生物,许多抗体已经显示出它们的功效。其中,莫罗单抗-CD3(muromonab-CD3)(**Orthoclone®**,“OK T3”)针对T细胞上的CD3受体的鼠类IgG2a单克隆抗体,例如可以诱导来自外周循环和淋巴组织的CD3+T细胞的补体诱导的裂解。Chatenoud, L.等, Nat. Rev. Immunol. 3, 123-32 (2003)。然而,与OKT3的免疫原性和促有丝分裂潜在限制相关的严重副作用在将它用于治疗TCL患者的情况下广泛存在。举例来说,OKT3的治疗益处受到由所述抗体与CD3受体的接合所引起的基于细胞因子的炎症响应的阻碍。Abramowicz D等, Transplantation, 1989; 47: 606-608。此外,OKT3对T细胞的强效促有丝分裂特性可能增加恶性免疫细胞的增殖,从而加剧TCL患者的T细胞赘生物。Landergrén U等, Eur J Immunol. 1984年4月; 14(4): 325-8。

[0012] 不受理论所束缚,认为结合剂由载体蛋白经由疏水性相互作用结合,根据它们的性质,所述疏水性相互作用是弱的。然而,单个组分的活性以及它们在纳米颗粒中的相对关系被保持,即使是经冻干和复原所述组合物也是这样,如下文所述。还进一步考虑的是,与载体蛋白的结合,例如结合剂与载体蛋白的复合经由结合剂上的白蛋白结合基序和/或载体蛋白上的抗体结合基序发生。在一个实施方案中,经用水溶液复原,所述结合剂的抗原结合部分能够结合(识别)T细胞癌症上的抗原。在另一个实施方案中,所述纳米颗粒中少于约50%是低聚的。

[0013] 由于所述纳米颗粒被用于治疗中,因此提出了进一步的挑战。

[0014] 虽然纳米颗粒中组分的重排可以通过组分之间的共价键来减轻,但是这些共价键对纳米颗粒在癌症治疗中的治疗用途提出了挑战。结合剂、载体蛋白以及另外的治疗剂通常在肿瘤中的不同位置处并且经由不同的机制起作用。非共价键容许纳米颗粒的组分在肿瘤处解离。因此,虽然共价键对于冻干可能是有利的,但是它对于治疗用途可能是不利的。

[0015] 本公开涉及一种纳米颗粒组合物,所述纳米颗粒组合物包含具有外表面的纳米颗粒,其中所述纳米颗粒中的每一个包含:载体蛋白、具有靶向T细胞上表达的抗原的抗原结合部分的结合剂以及任选的治疗有效量的治疗剂。

[0016] 纳米颗粒的尺寸和尺寸分布也是重要的。纳米颗粒可以根据它们的尺寸而表现不同。在大尺寸下,纳米颗粒或颗粒的团聚可能会阻塞血管,其中任何一种都可能影响组合物

的性能和安全性。在一个实施方案中,纳米颗粒的平均尺寸是90nm至800nm。在另一个实施方案中,纳米颗粒的平均尺寸是300nm至500nm。在又一个实施方案中,纳米颗粒的平均尺寸是约90nm至约160nm。

[0017] 最终,冷冻保护剂和有助于冻干过程的试剂对于治疗用途来说必须是安全的和耐受的。

[0018] 在一个方面,所述结合剂能够在体内与T细胞或T细胞癌症上表达的抗原结合。在另一个实施方案中,所述结合剂的抗原结合部分与T细胞或T细胞癌症上表达的抗原结合。在一个实施方案中,所述抗原是T细胞癌症上表达的蛋白质,包括但不限于CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD25、CD30、CD40、CD52、CD122以及CCR4。在另一个实施方案中,所述抗原是T细胞癌症(例如T细胞淋巴瘤)中过表达的生物标志物。所述生物标志物可以包括PD-L1、Ly6E、HER3/EGFR DAF、ERBB-3受体、CSF-1R、HER2、STEAP1、CEA、OX40、Ang2-VEGF或VEGF。在一个优选的实施方案中,所述结合剂的结合部分能够与CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD25、CD30、CD40、CD52、CD122或CCR4结合。在另一个实施方案中,所述结合剂的结合部分能够与PD-L1、Ly6E、HER3/EGFR DAF、ERBB-3受体、CSF-1R、HER2、STEAP1、CEA、OX40、Ang2-VEGF或VEGF结合。在一个实施方案中,所述T细胞癌症是T细胞淋巴瘤。在另一个实施方案中,所述T细胞癌症是外周T细胞淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤、血管免疫母细胞性淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、成人T细胞白血病/淋巴瘤(ATLL)、肠病型T细胞淋巴瘤、肝脾 γ - δ T细胞淋巴瘤、成淋巴细胞性淋巴瘤、鼻型NK/T细胞淋巴瘤、治疗相关的T细胞淋巴瘤或其组合。在一个方面,所述抗原可以不包括本文所述的抗原中的一种或多种。在一个实施方案中,所述抗原不是VEGF、HER2或EGFR。

[0019] 在一个方面,本文提供了纳米颗粒组合物,所述纳米颗粒组合物包含纳米颗粒,其中所述纳米颗粒中的每一个包含载体蛋白、具有T细胞抗原结合部分的结合剂以及任选的至少一种治疗剂,其中经用水溶液复原,所述结合剂的抗原结合部分能够在体内与T细胞上表达的抗原结合。

[0020] 当静脉内施用,大颗粒(例如大于1 μ m)通常是不利的,这是因为它们可能会滞留在肺的微血管系统中。同时,更大的颗粒可能会在肿瘤或特定器官中积聚。举例来说,被注射到供养肝脏肿瘤的肝动脉中以用于递送放射性元素(也被称为放疗性栓塞)的**THERASPHERE®**20微米-60微米玻璃颗粒在临床上用于肝癌。

[0021] 因此,对于静脉内施用,使用小于1 μ m的颗粒。超过1 μ m的颗粒更通常被直接施用到肿瘤中(“直接注射”)或输送到肿瘤部位中的动脉中。

[0022] 在一个方面,所述纳米颗粒包含约100个至约1000个结合剂,优选地约400个至约800个结合剂。所述组合物中结合剂的数量还取决于颗粒的数量。当纳米颗粒多聚化时,结合剂的数量成比例增加。举例来说,如果160nm的纳米颗粒含有400个结合剂,那么预期320nm的二聚体含有约800个结合剂。

[0023] 在其它实施方案中,所述纳米颗粒多聚化或低聚化,例如二聚化。多聚化可以作为单位分子的重量或尺寸的倍数来观测,例如160nm颗粒多聚化到约320nm、480nm、640nm等。在一些实施方案中,群体中少于40%的纳米颗粒是低聚化的。在一些实施方案中,少于30%的纳米颗粒是低聚化的。在另一个实施方案中,少于20%的纳米颗粒是低聚化的。在另一个实施方案中,存在的少于10%的纳米颗粒是低聚化的。在一个优选的实施方案中,少于5%

的纳米颗粒是低聚化的。

[0024] 在一个实施方案中,与载体结合的药物与结合剂(例如与白蛋白结合的紫杉醇与OKT3)的重量比是约5:1至约1:1。在一个实施方案中,与载体结合的药物与结合剂的重量比是约10:4。在一个实施方案中,所述结合剂是在所述纳米颗粒的表面的全部或一部分上的基本上单层。在一个实施方案中,所述组合物中少于0.01%的纳米颗粒具有选自以下各项组成的组的尺寸:大于200nm、大于300nm、大于400nm、大于500nm、大于600nm、大于700nm以及大于800nm。认为更大的尺寸是几个纳米颗粒的多聚化(或低聚化)的结果。

[0025] 本发明还包括冻干组合物以及与新鲜制备的纳米颗粒的特性没有实质差异或相同的冻干组合物。具体来说,所述冻干组合物经重悬于水溶液中与新鲜组合物在粒度、粒度分布、对癌细胞的毒性、结合剂亲和力以及结合剂特异性方面是相似的或相同的。惊人的是,冻干的纳米颗粒在重悬之后保留新鲜制备的纳米颗粒的特性,尽管在这些颗粒中存在两种不同的蛋白质组分。

[0026] 在一个实施方案中,平均复原纳米颗粒尺寸是约90nm至约1 μ m。在一个优选的实施方案中,平均复原纳米颗粒尺寸是约90nm至约200nm,并且更优选地是约100nm至约160nm。在一个实施方案中,平均复原纳米颗粒尺寸是大于800nm至约3.5 μ m,包含更小纳米颗粒的多聚体,例如100nm-200nm纳米颗粒的多聚体。在一个实施方案中,核心与结合剂的重量比是从大于1:1到约1:3。在一个实施方案中,平均复原纳米颗粒尺寸是约160nm至约225nm。

[0027] 在一个方面,本发明涉及一种冻干纳米颗粒组合物,其包含纳米颗粒,其中所述纳米颗粒中的每一个包含与载体结合的药物核心和结合剂。在一个实施方案中,经用水溶液复原,所述结合剂保持它们与纳米颗粒的外表面的缔合。在一个实施方案中,在复原之后,所述结合剂被布置在核心的表面上以使得所述结合剂的结合部分从该表面被引导向外。在一个实施方案中,所述冻干组合物在室温下稳定至少约3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月或更长时间。在一个实施方案中,所述冻干组合物在室温下稳定至少3个月。在一个实施方案中,复原的纳米颗粒保留治疗剂的活性并且能够在体内与靶标结合。在另一个实施方案中,所述组合物在约20℃至约25℃稳定长达约12个月或更长时间。

[0028] 在一些实施方案中,至少一种治疗剂位于纳米颗粒内部。在其它实施方案中,至少一种治疗剂位于纳米颗粒的外表面上。在另外的其它实施方案中,至少一种治疗剂位于纳米颗粒内部和纳米颗粒的外表面上。在另一个实施方案中,所述治疗剂是用于癌症的治疗剂。

[0029] 在一些实施方案中,所述纳米颗粒含有超过一种类型的治疗剂。在一个实施方案中,所述治疗剂可以是阿比特龙(abiraterone)、苯达莫司汀(bendamustine)、硼替佐米(bortezomib)、卡铂(carboplatin)、卡巴他赛(cabazitaxel)、顺铂(cisplatin)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、达沙替尼(dasatinib)、多西他赛(docetaxel)、多柔比星(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、埃罗替尼(erlotinib)、依托泊苷(etoposide)、依维莫司(everolimus)、吉非替尼(gefitinib)、伊达比星(idarubicin)、伊马替尼(imatinib)、羟基脲(hydroxyurea)、伊马替尼(imatinib)、拉帕替尼(lapatinib)、亮丙瑞林(leuprorelin)、美法仑(melphalan)、甲氨蝶呤(methotrexate)、米托蒽醌(mitoxantrone)、奈达铂(nedaplatin)、尼罗替尼(nilotinib)、奥沙利铂(oxaliplatin)、

紫杉醇、帕唑帕尼 (pazopanib)、培美曲塞 (pemetrexed)、吡铂 (picoplatin)、罗米地辛 (romidepsin)、赛特铂 (satraplatin)、索拉非尼 (sorafenib)、威罗菲尼 (vemurafenib)、舒尼替尼 (sunitinib)、替尼泊苷 (teniposide)、三铂 (triplatin)、长春花碱 (vinblastine)、长春瑞滨 (vinorelbine)、长春新碱 (vincristine) 或环磷酰胺 (cyclophosphamide)。在一个优选的实施方案中,所述治疗剂是紫杉醇。

[0030] 在另一个方面,所述结合剂包括希普利珠单抗 (Slipizumab)、OKT3、Leu1、扎木单抗 (Zanolimumab)、本妥昔单抗-维度汀 (Brentuximab vedotin)、Mik- β 1、KW-0761或其组合。在一些实施方案中,所述结合剂是莫罗单抗-CD3 (OKT3)。

[0031] 在又一个实施方案中,所述抗原结合部分包括适体、受体配体、Fab片段或其组合。在一个优选的实施方案中,所述抗原结合部分是抗体或其部分。

[0032] 在一些实施方案中,所述载体蛋白包括明胶、弹性蛋白、麦醇溶蛋白、豆球蛋白、玉米醇溶蛋白、大豆蛋白、乳蛋白以及乳清蛋白。在其它实施方案中,所述载体蛋白是白蛋白,例如人血清白蛋白。在一些实施方案中,所述白蛋白是人血清白蛋白 (HSA)。在一些实施方案中,所述白蛋白是重组白蛋白,例如重组人血清白蛋白。

[0033] 在一些实施方案中,所述组合物被配制用于静脉内递送。

[0034] 在一些实施方案中,所述纳米颗粒具有约 1×10^{-11} M 至约 1×10^{-9} M 的解离常数。

[0035] 本文还提供了用于杀死T细胞癌症中的癌细胞的方法,所述方法包括使所述细胞与有效量的本文所公开的纳米颗粒组合物接触足够的一段时间以杀死所述癌性T细胞。在其它实施方案中,静脉内施用所述纳米颗粒组合物。

[0036] 在一些实施方案中,本文提供的方法包括以下步骤:a) 每周一次施用所述纳米颗粒组合物,持续三周;b) 停止施用所述纳米颗粒组合物,持续一周;以及c) 根据需要重复步骤a) 和步骤b) 以治疗所述肿瘤。

[0037] 在相关的实施方案中,所述治疗包括在施用所述纳米颗粒之前施用靶向结合剂。在一个实施方案中,所述靶向结合剂在施用所述纳米颗粒之前的约6小时至48小时或12小时至48小时施用。在另一个实施方案中,所述靶向结合剂在施用所述纳米颗粒之前的6小时至12小时施用。在又一个实施方案中,所述靶向结合剂在施用所述纳米颗粒之前的2小时至8小时施用。在另外的其它实施方案中,所述靶向结合剂在施用所述纳米颗粒之前的一周施用。举例来说,在施用纳米颗粒之前的24小时施用一剂OKT3。在另一个实例中,在施用纳米颗粒之前施用OKT3。在纳米颗粒之前施用的结合剂可以作为亚治疗剂量施用,如通常被认为具有治疗性的量的1/2、1/10或1/20。因此,在人类中,用OKT3预处理可以包括施用1mg/kg的OKT3,其是常用剂量的1/10,继而施用纳米颗粒。

[0038] 在一些实施方案中,治疗有效量包括约75mg/m²至约175mg/m²的载体蛋白 (即每m²患者的载体蛋白的毫克数)。在其它实施方案中,治疗有效量包括约75mg/m²至约175mg/m²的治疗剂 (例如紫杉醇)。在其它实施方案中,治疗有效量包括约30mg/m²至约70mg/m²的结合剂。在另外的其它实施方案中,治疗有效量包括约30mg/m²至约70mg/m²的OKT3。

[0039] 在一个具体实施方案中,所述冻干组合物包含约75mg/m²至约175mg/m²的载体蛋白,所述载体蛋白优选地是白蛋白;约30mg/m²至约70mg/m²的结合剂,所述结合剂优选地是OKT3;以及约75mg/m²至约175mg/m²的紫杉醇。

[0040] 本发明的一个实施方案包括用于延长癌细胞摄取化疗剂的持续时间的方法,所述

方法是通过施用纳米颗粒中的化疗剂来实现的,所述纳米颗粒包含载体蛋白和与抗体,例如特异性结合所述癌细胞上的抗原或由所述癌细胞脱落的抗原的抗体具有表面复合的化疗剂,其中所述癌细胞是T细胞。

[0041] 本文还提供了制备纳米颗粒组合物的方法,其中所述方法包括使载体蛋白和任选的至少一种治疗剂与抗体在具有5.0至7.5的pH值的溶液中并且在约5℃至约60℃、约23℃至约60℃或约55℃至约60℃的温度下、在将允许形成所期望的纳米颗粒的条件和组分比率下接触。在一个实施方案中,在55℃至60℃和pH7.0下制备所述纳米颗粒。在另一个方面,本文提供了制备纳米颗粒组合物的方法,其中所述方法包括(a)使载体蛋白和任选的至少一种治疗剂接触以形成核心;以及(b)使所述核心与抗体在具有约5.0至约7.5的pH值的溶液中在约5℃至约60℃、约23℃至约60℃或约55℃至约60℃的温度下、在将允许形成所期望的纳米颗粒的条件和组分比率下接触。

[0042] 控制组分(例如载体蛋白、抗体、治疗剂、其组合)的量以提供所期望的纳米颗粒的形成。其中组分的量太稀的组合物将不会形成如本文所述的纳米颗粒。在一个优选的实施方案中,载体蛋白与结合剂的重量比是10:4。在一些实施方案中,载体蛋白的量是约1mg/mL至约100mg/mL。在一些实施方案中,结合剂的量是约1mg/mL至约30mg/mL。举例来说,在一些实施方案中,载体蛋白:结合剂:溶液的比率是在1mL的溶液(例如盐水)中约9mg的载体蛋白(例如白蛋白)比4mg的结合剂(例如OKT3)。例如在接触所述抗体之前,还可以将一定量的治疗剂,例如像紫杉醇添加到载体蛋白中。

附图说明

[0043] 以下附图仅代表本发明而不意图作为限制。为了一致性,使用**ABRAXANE®**和贝伐珠单抗(bevacizumab)的本发明的纳米颗粒使用首字母缩写“AB”并且在AB之后的数字(如AB160)意在赋予这些纳米颗粒的平均粒度(以纳米为单位)。同样,当结合剂是利妥昔单抗时,首字母缩写是“AR”,而之后的数字仍相同。

[0044] 图1示出了如通过光吸收生物层干涉测量(BLItz)技术所测定的Abraxane和OKT3的结合亲和力。解离常数(K_d)是 2.246×10^{-9} 。

具体实施方式

[0045] 在阅读本说明书之后,对于本领域技术人员来说,如何在各种替代性实施方案和替代性应用中实现本发明将变得显而易见。然而,在本文将不会描述本发明的所有各种实施方案。应当了解的是,在此呈现的实施方案仅以举例方式,而非以限制方式来呈现。因而,该对各种替代性实施方案的详细说明不应当被解释为限制如下文所述的本发明的范围或广度。

[0046] 在公开和描述本发明之前,应当了解的是,下文所述的方面不限于具体的组合物、制备这些组合物的方法或其用途,这是因为当然,这些可以变化。还应当理解的是,本文所用的术语仅仅是为了实现描述具体方面的目的,而并非意图具有限制性。

[0047] 本发明的详细说明仅仅是为了方便读者而被分成各个部分并且在任何部分中找到的公开内容可以与另一个部分中的公开内容组合。为了方便读者,可以在本说明书中使用标题或副标题,其不意图影响本发明的范围。

[0048] 定义

[0049] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语所具有的含义与本发明所属领域的普通技术人员通常所了解的含义相同。在本说明书和所附的权利要求中,将提到许多术语,这些术语应当被定义为具有以下含义:

[0050] 本文所使用的术语仅旨在描述具体实施方案,而不意图限制本发明。除非上下文另外明确表示,否则如本文所用的单数形式“a/an(一)”和“所述”同样意图包括复数形式。

[0051] “任选的”或“任选地”意指随后描述的事件或情形可能发生或可能不发生,并且所述说明包括了其中所述事件或情形发生的情况以及其中它没有发生的情况。

[0052] 当在例如温度、时间、量、浓度等数值指定(包括范围在内)之前使用时术语“约”表示近似值,其可以变化(+)或(-)10%、5%、1%或其间的任何子范围或子值。

[0053] 优选的是,当关于剂量使用时,术语“约”意指所述剂量可以变化 $\pm 10\%$ 。举例来说,“约400个至约800个结合剂”表示纳米颗粒的外表面含有360个至880个颗粒的量的结合剂。

[0054] “包含(comprising)”或“包含(comprises)”意图意指组合物和方法包括所述的要素,但是并不排除其它要素。“基本上由……组成”在用于限定组合物和方法时应当意指排除对用于所述目的的组合具有任何重要意义的其它要素。因此,基本上由如本文所限定的要素组成的组合物将不排除不会实质上影响要求保护的发明的一个或多个基本和新颖特征的其它材料或步骤。“由……组成”应当意指排除多于痕量元素的其它成分和实质性方法步骤。由这些过渡术语中的每一个过渡术语所限定的实施方案落入本发明的范围内。

[0055] 如本文所用的术语“纳米颗粒”指的是具有至少一个维度小于5微米的颗粒。在优选的实施方案中,诸如对于静脉内施用,所述纳米颗粒小于1微米。对于直接施用,所述纳米颗粒更大。本发明明确考虑了甚至更大的颗粒。

[0056] 在一群颗粒中,各颗粒的尺寸分布在平均值附近。群体的粒度因此可以由平均值表示并且也可以由百分位数表示。D50是如下粒度,50%的颗粒小于所述粒度。10%的颗粒小于D10值并且90%的颗粒小于D90。在不清楚的情况下,“平均”尺寸等同于D50。

[0057] 术语“纳米颗粒”还可以包括更小的单位纳米颗粒的离散多聚体。举例来说,320nm颗粒可以包含单位160nm纳米颗粒的二聚体。对于160nm纳米颗粒,多聚体因此将是约320nm、480nm、640nm、800nm、960nm、1120nm等。

[0058] 如本文所用的术语“载体蛋白”指的是功能为转运结合剂和/或治疗剂的蛋白质。本公开的结合剂可以可逆地结合载体蛋白。载体蛋白的实例更详细地论述于下文中。

[0059] 如本文所用的术语“核心”指的是纳米颗粒的中心部分或内部部分,其可以包含载体蛋白、载体蛋白和治疗剂或其它试剂或试剂的组合。在一些实施方案中,结合剂的疏水性部分可以掺入核心中。

[0060] 如本文所用的术语“治疗剂”意指在治疗上有用的药剂,例如用于治疗、缓解或减轻疾病状态、生理状况、症状或病因因素或用于其评价或诊断的药剂。治疗剂可以是化疗剂,例如有丝分裂抑制剂、拓扑异构酶抑制剂、类固醇、抗肿瘤抗生素、抗代谢物、烷基化剂、酶、蛋白酶体抑制剂或其任何组合。

[0061] 如本文所用的术语“结合剂”、“对……具有特异性的结合剂”或“特异性结合……的结合剂”指的是与靶抗原结合并且不与无关化合物显著结合的药剂。可以有效用于所公

开的方法中的结合剂的实例包括但不限于凝集素、蛋白质以及抗体,如单克隆抗体,例如人源化单克隆抗体、嵌合抗体或多克隆抗体或其抗原结合片段以及适体或融合蛋白。在一个实施方案中,所述结合剂包含白蛋白结合基序。白蛋白结合基序的非限制性实例可以见于2017年8月4日提交的PCT申请号PCT/US2017/045643中,其以引用的方式整体并入本文。在一个实施方案中,所述结合剂是外源性抗体。外源性抗体是并非在哺乳动物中(例如在人类中)由哺乳动物免疫系统天然产生的抗体。

[0062] 如本文所用的术语“抗体(antibody)”或“抗体(antibodies)”指的是免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分(即含有免疫特异性结合抗原的抗原结合位点的分子)。所述术语还指的是包含两条免疫球蛋白重链和两条免疫球蛋白轻链的抗体以及多种形式,包括全长抗体和其部分;包括例如免疫球蛋白分子、单克隆抗体、嵌合抗体、CDR移植抗体、人源化抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、二硫键连接的Fv、scFv、单结构域抗体(dAb)、双体抗体、多特异性抗体、双重特异性抗体、抗独特型抗体、双特异性抗体、其功能活性表位结合片段、双功能杂合抗体(例如Lanzavecchia等, *Eur. J Immunol.* 17, 105 (1987))以及单链(例如Huston等, *Proc. Natl. Acad. Sci. US A.*, 85, 5879-5883 (1988) 以及Bird等, *Science* 242, 423-426 (1988), 这些文献以引用的方式并入本文)。(一般参见Hood等, *Immunology* (《免疫学》), 纽约州的本杰明(Benjamin, N.Y.), 第2版(1984); Harlow和Lane, *Antibodies. A Laboratory Manual* (《抗体:实验室手册》), 冷泉港实验室(Cold Spring Harbor Laboratory) (1988); Hunkapiller和Hood, *Nature*, 323, 15-16 (1986), 这些文献以引用的方式并入本文)。抗体可以是任何类型(例如IgG、IgA、IgM、IgE或IgD)。优选的是,抗体是IgG。抗体可以是非人类的(例如来自小鼠、山羊或任何其它动物)、完全人类的、人源化的或嵌合的。一种抗体或多种抗体包括本文公开的抗体的任何一种或多种生物仿制药。如本文所用的生物仿制药指的是被认为在质量、安全性以及功效方面与由创新公司销售的参照产品相当的生物药物(公共卫生服务法(Public Health Service Act) (42 U.S.C. 262 (i)) 第351 (i) 节)。

[0063] 术语“解离常数”也被称为“K_d”,指的是表示特定物质分离成单个组分(例如蛋白质载体、抗体以及治疗剂)的程度的量。

[0064] 如本文所用的术语“冻干的”、“冻干”等指的是将待干燥的材料(例如纳米颗粒)首先冷冻,然后通过真空环境中升华来去除冰或冷冻溶剂的过程。在冻干前制剂中任选地包括赋形剂以增强冻干产品经储存的稳定性。在一些实施方案中,在用作治疗剂之前,纳米颗粒可以由冻干的组分(载体蛋白、抗体以及任选的治疗剂)形成。在其它实施方案中,首先将载体蛋白、结合剂(例如抗体)以及任选的治疗剂组合成纳米颗粒,然后冻干。冻干样品还可以含有另外的赋形剂。

[0065] 术语“增量剂”包括提供冷冻干燥产品的结构的试剂。用于增量剂的常见实例包括甘露糖醇、甘氨酸、乳糖以及蔗糖。除了提供药学上优雅的饼之外,增量剂还可以在改变塌陷温度、提供冻融保护以及增强蛋白质在长期储存中的稳定性方面赋予有用的品质。这些试剂也可以用作张力调节剂。在一些实施方案中,冻干组合物包含增量剂。在一些实施方案中,冻干组合物不包含增量剂。

[0066] 术语“缓冲剂”包括在冻干之前将溶液pH值维持在可接受的范围内的那些试剂并且可以包括丁二酸盐(丁二酸钠或丁二酸钾)、组氨酸、磷酸盐(磷酸钠或磷酸钾)、Tris(三

(羟甲基)氨基甲烷)、二乙醇胺、柠檬酸盐(柠檬酸钠)等。本发明的缓冲剂具有约5.5至约6.5范围的pH值;并且优选地具有约6.0的pH值。将pH值控制在该范围内的缓冲剂的实例包括丁二酸盐(如丁二酸钠)、葡萄糖酸盐、组氨酸、柠檬酸盐以及其它有机酸缓冲剂。

[0067] 术语“冷冻保护剂”一般包括为蛋白质提供稳定性以对抗冷冻诱导的应力的试剂,推测是通过优先从蛋白质表面排除而实现的。它们还可以在一次干燥和二次干燥以及长期产品储存期间提供保护。实例是聚合物,例如葡聚糖和聚乙二醇;糖,例如蔗糖、葡萄糖、海藻糖以及乳糖;表面活性剂,例如聚山梨酸酯;以及氨基酸,例如甘氨酸、精氨酸以及丝氨酸。

[0068] 术语“冻干保护剂”包括在干燥或‘脱水’过程(一次干燥循环和二次干燥循环)期间为蛋白质提供稳定性的试剂,推测是通过提供无定形玻璃状基质以及通过经由氢键键合与蛋白质结合,从而置换在干燥过程期间去除的水分子而实现的。这有助于维持蛋白质构象,使冻干循环期间的蛋白质降解减到最低限度并且改进长期产品。实例包括多元醇或糖,例如蔗糖和海藻糖。

[0069] 术语“药物制剂”指的是呈容许活性成分有效的形式并且不含对将接受所述制剂施用的受试者有毒的另外的组分的制品。

[0070] “药学上可接受的”赋形剂(媒介物、添加剂)是可以合理地向受试哺乳动物施用以提供有效剂量的所用活性成分的那些。

[0071] “复原时间”是将冻干制剂再水化成溶液所需的时间。

[0072] “稳定”制剂是其中的蛋白质经储存基本上保持它的物理稳定性和/或化学稳定性和/或生物活性的制剂。举例来说,用于测量蛋白质稳定性的各种分析技术在本领域中是可获得的并且综述于Peptide and Protein Drug Delivery(《肽和蛋白质药物递送》),247-301,Vincent Lee编著,纽约州纽约的马塞尔·德克尔公司(Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.)出版,(1991)以及Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10:29-90 (1993)中。稳定性可以在所选温度下在所选的时间段内测量。

[0073] 如本文所用的术语“表位”指的是抗原中由例如抗体的结合剂识别的部分。表位包括但不限于使得能够与蛋白质(例如抗体)或配体发生特异性相互作用的短氨基酸序列或肽(任选地糖基化或以其它方式修饰)。举例来说,表位可以是与结合剂的抗原结合位点连接的分子中的部分。

[0074] 术语“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”涵盖了在诸如人类的受试者中治疗疾病或病症(例如癌症),并且包括:(i)抑制疾病或病症,即阻止它发展;(ii)减轻疾病或病症,即引起疾病或病症消退;(iii)减慢疾病或病症的进展;和/或(iv)抑制、减轻或减慢疾病或病症的一个或多个症状的进展。在一些实施方案中,“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”指的是杀死癌细胞。

[0075] 关于癌症治疗的术语“杀死(kill)”或“杀死(killing)”指的是包括将引起该癌细胞或癌细胞群体的至少一部分死亡的任何类型的操作。

[0076] 术语“适体”指的是能够结合靶分子例如多肽的核酸分子。举例来说,本发明的适体可以特异性结合T细胞癌症上表达的抗原,例如CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD20、CD38、CD25、CD30、CD40、CD52、CD122或CCR4。具有特定结合特异性的抗体的产生和适体的治疗用途是本领域公认的。参见例如美国专利号5,475,096、美国专利号5,270,163、5,582,981、5,840,

867、6,011,020、6,051,698、6,147,204、6,180,348和6,699,843以及**Macugen®** (纽约的 Eyetech公司 (Eyetech, New York)) 用于治疗年龄相关性黄斑变性的治疗功效。

[0077] 如本文所用的术语“低聚物”或“低聚”或“低聚化”指的是由两个或更多个单体构成的低聚物。

[0078] 融合蛋白是生物工程化的多肽,其使蛋白质的一部分(例如抗体的可结晶片段(Fc)结构域;或抗体的白蛋白结合基序)与另一种生物活性剂(例如蛋白质结构域、肽、或者核酸或肽适体)连接以产生具有所期望的结构-功能特性和显著的治疗潜力的分子。由于诸如募集效应子功能和延长血浆半衰期的有利特征, γ 免疫球蛋白(IgG)同种型常用作产生Fc融合蛋白的基础。鉴于可以用作融合配偶体的适体(肽和核酸)的范围,融合蛋白具有许多生物和药物应用。

[0079] 此外,本说明书中使用的一些术语更具体地定义于下文中。

[0080] 概述

[0081] 本发明部分地基于以下惊人发现:任选冻干的纳米颗粒为肿瘤提供靶向治疗,同时使对患者的毒性最小化,所述纳米颗粒包含载体蛋白、能够与T细胞或T细胞癌症上表达的抗原结合的结合剂、以及治疗剂,所述结合剂例如抗体、适体或具有白蛋白结合基序和抗原结合结构域的融合蛋白,例如与适体或细胞受体的配体融合的白蛋白结合基序。在一个方面,所述结合剂是OKT3,其能够与T细胞或T细胞癌症上表达的抗原结合,而同时减少或消除与OKT3的免疫原性和促有丝分裂潜在限制相关的严重副作用。因此,与具有严重副作用和/或毒性的常规ADC相比,如本文所述的纳米颗粒是显著的改进。

[0082] 如将由本领域技术人员所了解的那样,为了使常规ADC有效,关键的是,接头足够稳定而不在体循环中解离,但是允许在肿瘤部位处释放足够的药物。Alley, S.C.等(2008) *Bioconjug Chem* 19:759-765。这已经被证明是开发有效药物缀合物中的主要障碍(Julien, D.C.等(2011) *MAbs* 3:467-478; Alley, S.C.等(2008) *Bioconjug Chem* 19:759-765);因此,纳米免疫缀合物的吸引人的特征是不需要生化接头。

[0083] 当前ADC的另一个缺点是在人类肿瘤中尚未充分证明药物向肿瘤中的渗透更高。在小鼠模型中对ADC的早期测试表明使用抗体靶向肿瘤将使得肿瘤中活性剂的浓度更高(Deguchi, T.等(1986) *Cancer Res* 46:3751-3755);然而,这与人类疾病的治疗无关,这可能是由于人类肿瘤比小鼠肿瘤在渗透性方面更加异质。Jain, R.K.等(2010) *Nat Rev Clin Oncol* 7:653-664。此外,纳米颗粒的尺寸对于从血管系统外渗到肿瘤中是关键。在使用人类结肠腺癌异种移植模型的小鼠研究中,血管孔隙对于最多400nm的脂质体是可渗透的。Yuan, F.等(1995) *Cancer Res* 55:3752-3756。关于肿瘤孔径和渗透性的另一项研究证实这两种特征都取决于肿瘤位置和生长状态,其中消退中的肿瘤和颅内肿瘤对于小于200nm的颗粒是可渗透的。Hobbs, S.K.等(1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:4607-4612。本文所述的纳米免疫缀合物通过以下事实克服了这个问题,即在完整时小于200nm的大复合物在体循环中部分解离成能够容易地渗透肿瘤组织的更小的功能单元。此外,一旦缀合物到达肿瘤部位,就可以释放更小的毒性有效负载并且只有毒性部分而不是整个缀合物需要被肿瘤细胞摄取。

[0084] 抗体(即**AVASTIN®**)包被的含有治疗剂(即**ABRAXANE®**)的白蛋白纳米颗粒的出现已经产生了将两种或更多种治疗剂定向递送到体内预定部位的新范例。参见PCT

专利公开号WO 2012/154861和WO 2014/055415,它们中的每一件以引用的方式整体并入本文。

[0085] 当将白蛋白和结合剂(例如抗体)的组合物在水溶液中以特定的浓度和比率混合在一起时,可用于本发明中的结合剂自发自组装到白蛋白中和白蛋白上以形成具有多个拷贝的结合剂(多达500个或更多个)的纳米颗粒。

[0086] 虽然包含单一来源蛋白质的蛋白质组合物通常以其中它们表现出显著的保存期的冻干形式储存,但是这样的冻干组合物不含通过疏水性-疏水性相互作用整合在一起的两种不同蛋白质的自组装纳米颗粒。此外,其中结合剂的大部分结合部分暴露在纳米颗粒的表面上的纳米颗粒构型使其自身易于被原本将被认为是良性的条件移位或重构。举例来说,在冻干期间,蛋白质上的离子电荷被脱水,从而暴露下面的电荷。暴露的电荷允许两种蛋白质之间的电荷-电荷相互作用,这可以改变每一种蛋白质对另一种的结合亲和力。此外,在溶剂(例如水)被去除时,纳米颗粒的浓度显著增加。这样的增加的纳米颗粒浓度可能引起不可逆的低聚化。低聚化是蛋白质的已知特性,与单体形式相比,其降低了低聚物的生物学特性并且增加颗粒的尺寸,有时会增加到超过1微米。

[0087] 另一方面,对于其中需要至少3个月的保存期并且大于6个月或9个月的保存期是优选的临床用途和/或商业用途,需要稳定形式的纳米颗粒组合物。这样的稳定组合物必须易于静脉内注射,必须在经静脉内注射后保持它的自组装形式以将所述纳米颗粒引导到体内预定部位,必须具有小于1微米的最大尺寸以在递送到血流中时避免任何缺血事件,并且最终必须与用于注射的含水组合物相容。

[0088] 化合物

[0089] 如对于本领域技术人员来说经阅读本公开将显而易见的是,本公开涉及含有载体蛋白、结合剂以及至少一种治疗剂的纳米颗粒的组合物,其中所述组合物是任选冻干的。

[0090] 在一些实施方案中,所述载体蛋白可以是白蛋白、明胶、弹性蛋白(包括弹性蛋白原)或弹性蛋白衍生多肽(例如 α -弹性蛋白和弹性蛋白样多肽(ELP))、麦醇溶蛋白、豆球蛋白、玉米醇溶蛋白、大豆蛋白(例如大豆蛋白分离物(SPI))、乳蛋白(例如 β -乳球蛋白(BLG)和酪蛋白)或乳清蛋白(例如乳清蛋白浓缩物(WPC)和乳清蛋白分离物(WPI))。在优选的实施方案中,所述载体蛋白是白蛋白。在优选的实施方案中,所述白蛋白是蛋清(卵清蛋白)、牛血清白蛋白(BSA)等。在甚至更优选的实施方案中,所述载体蛋白是人血清白蛋白(HSA)。在一些实施方案中,所述载体蛋白(例如白蛋白)是重组蛋白(例如重组HSA)。在一些实施方案中,所述载体蛋白是由美国食品和药品管理局(United States Food and Drug Administration, FDA)批准的公认安全(GRAS)的赋形剂。在一个实施方案中,所述载体蛋白包含抗体结合基序。抗体结合基序的非限制性实例可以见于2017年8月4日提交的PCT申请号PCT/US2017/045643中,其以引用的方式整体并入本文。

[0091] 在一些实施方案中,所述结合剂是选自由以下各项组成的组的抗体:ado-曲妥珠单抗-艾美坦辛(ado-trastuzumab emtansine)、阿仑单抗(alemtuzumab)、贝伐珠单抗、西妥昔单抗(cetuximab)、地诺单抗(denosumab)、地努图希单抗(dinutuximab)、伊匹木单抗(ipilimumab)、纳武单抗(nivolumab)、奥比妥珠单抗(obinutuzumab)、奥法木单抗(ofatumumab)、帕尼单抗(panitumumab)、派姆单抗(pembrolizumab)、帕妥珠单抗(pertuzumab)、利妥昔单抗以及曲妥珠单抗。在一些实施方案中,所述结合剂是抗体,包括

希普利珠单抗、OKT3、Leu1、扎木单抗、扎木单抗、本妥昔单抗-维度汀、Mik-β1、KW-0761或其组合。在一些实施方案中，明确排除这些抗体中的一种或多种。在一些实施方案中，所述抗体是在纳米颗粒的表面的全部或一部分上的基本上单层抗体。

[0092] 在一个方面，所述抗体的结合部分能够与T细胞或T细胞癌症上表达的抗原结合。在一个实施方案中，所述抗原是T细胞癌症上表达的蛋白质，包括但不限于CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD25、CD30、CD40、CD52、CD 122以及CCR4。在另一个实施方案中，所述抗原是在T细胞癌症（例如T细胞淋巴瘤）中过表达的生物标志物。在T细胞癌症中过表达的生物标志物可以包括PD-L1、Ly6E、HER3/EGFR DAF、ERBB-3受体、CSF-1R、HER2、STEAP1、CEA、OX40、Ang2-VEGF或VEGF。在一个优选的实施方案中，所述抗体的结合部分能够结合CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD25、CD30、CD40、CD52、CD 122或CCR4。在另一个实施方案中，所述抗体的结合部分能够结合PD-L1、Ly6E、HER3/EGFR DAF、ERBB-3受体、CSF-1R、HER2、STEAP1、CEA、OX40、Ang2-VEGF或VEGF。

[0093] 表1描绘了用于治疗T细胞白血病和淋巴瘤的单克隆抗体的非限制性列表的列表。

[0094] 表1. 用于治疗T细胞癌症的单克隆抗体。

[0095]	靶抗原	说明	单克隆抗体
	CD2	LFA-3 (CD58)	希普利珠单抗(MEDI-507)
	CD3 (CD3ζ)	TcR 信号传导链	莫罗单抗-CD3 (Orthoclone®、OKT3)
	CD4	TcR 辅助受体	扎木单抗(HuMax-CD4®)
	CD5	清道夫受体家族成员	抗 Leu1/T101
	CD25	IL-2 受体 α-亚基	达利珠单抗(Daclizumab) (Zenapax®)
	CD30	TNF 受体家族成员	本妥昔单抗-维度汀 (Adcetris®)
	CD52	GPI 锚定糖蛋白	阿仑单抗(Campath®)
	CD122	IL-2 和 IL-15 受体的 β-亚基	Mik-β1
	CCR4	趋化因子受体-4	KW-0761

[0096] 在一些实施方案中，所述至少一种治疗剂或所述至少一种另外的治疗剂选自由以下各项组成的组：阿比特龙、苯达莫司汀、硼替佐米、卡铂、卡巴他赛、顺铂、苯丁酸氮芥、达沙替尼、多西他赛、多柔比星、表柔比星、埃罗替尼、依托泊苷、依维莫司、吉非替尼、伊达比星、伊马替尼、羟基脲、伊马替尼、拉帕替尼、亮丙瑞林、美法仑、甲氨蝶呤、米托蒽醌、奈达铂、尼罗替尼、奥沙利铂、紫杉醇、帕唑帕尼、培美曲塞、吡铂、罗米地辛、赛特铂、索拉非尼、

威罗菲尼、舒尼替尼、替尼泊苷、三铂、长春花碱、长春瑞滨、长春新碱以及环磷酰胺。在一个实施方案中,所述治疗剂包括阿霉素(Adriamycin)、博莱霉素(bleomycin)、硫酸长春花碱(vinblastine sulfate)、硫酸长春新碱(vincristine sulfate)、依托泊苷、泼尼松(prednisone)、环磷酰胺以及达卡巴嗪(dacarbazine)中的一种或多种。在一个实施方案中,所述治疗剂包括以下一种或多种:阿仑恩(arranon)(奈拉滨(Nelarabine))、甲氨蝶呤钠(abitrexate)、阿霉素(盐酸多柔比星)、ambochlorin(苯丁酸氮芥)、Zydelig(艾代拉利司(Idelalisib))、维卡萨(Vincasar)PFS(硫酸长春新碱)、Velsar(硫酸长春花碱)、万珂(Velcade)(硼替佐米)、Velban(硫酸长春花碱)、Treanda(盐酸苯达莫司汀)、罗米地辛(Romidepsin)、Rheumatrex(甲氨蝶呤)、Revlimid(来那度胺(Lenalidomide))、盐酸丙卡巴肼(Procarbazine Hydrochloride)、泼尼松、普拉曲沙(Pralatrexate)、普乐沙福(Plerixafor)、Neosar(环磷酰胺)、Mustargen(盐酸氮芥)(盐酸二氯甲二乙胺(Mechlorethamine Hydrochloride))、甲氨蝶呤、盐酸二氯甲二乙胺、Matulane(甲基苄肼)(盐酸丙卡巴肼)、洛莫司汀(Lomustine)、Linfolizine(瘤可宁)或Leukeran(瘤克宁)(苯丁酸氮芥)、Istodax(罗米地辛)、Imbruvica(依鲁替尼(Ibrutinib))、DTIC-Dome(达卡巴嗪)、盐酸多柔比星、地尼白介素2(Denileukin Diftitox)、Cytosan(环磷酰胺)、卡莫司汀(Carmustine)、Beleodaq(贝利司他(Belinostat))或阿仑恩(奈拉滨)。在一个实施方案中,所述治疗剂包括一种或多种氮芥衍生物(例如环磷酰胺、二氯甲二乙胺或异环磷酰胺(Ifosfamide))、多柔比星、长春花碱、长春新碱、博莱霉素、依托泊苷以及泼尼松中的一种或多种。本领域技术人员将了解的是,这些仅仅是实例,并且可以包括任何化疗剂或癌症治疗剂。

[0097] 优选的是,所述纳米颗粒包含紫杉醇作为治疗剂。

[0098] 应当了解的是,所述治疗剂可以位于纳米颗粒内部、纳米颗粒的外表面上或这两者。所述纳米颗粒可以含有多于一种治疗剂,例如两种治疗剂、三种治疗剂、四种治疗剂、五种治疗剂或更多种。此外,纳米颗粒可以在纳米颗粒的内部和外部含有相同的或不同的治疗剂。

[0099] 在一个方面,所述纳米颗粒包含与纳米颗粒的表面非共价结合的至少100个结合剂。在一个方面,所述纳米颗粒包含与纳米颗粒的表面非共价结合的至少200个结合剂。在一个方面,所述纳米颗粒包含与纳米颗粒的表面非共价结合的至少300个结合剂。在一个方面,所述纳米颗粒包含与纳米颗粒的表面非共价结合的至少400个结合剂。在一个方面,所述纳米颗粒包含与纳米颗粒的表面非共价结合的至少500个结合剂。在一个方面,所述纳米颗粒包含与纳米颗粒的表面非共价结合的至少600个结合剂。

[0100] 在一个方面,所述纳米颗粒包含与纳米颗粒的表面非共价结合的约100个至约1000个结合剂。在一个方面,所述纳米颗粒包含与纳米颗粒的表面非共价结合的约200个至约1000个结合剂。在一个方面,所述纳米颗粒包含与纳米颗粒的表面非共价结合的约300个至约1000个结合剂。在一个方面,所述纳米颗粒包含与纳米颗粒的表面非共价结合的约400个至约1000个结合剂。在一个方面,所述纳米颗粒包含与纳米颗粒的表面非共价结合的约500个至约1000个结合剂。在一个方面,所述纳米颗粒包含与纳米颗粒的表面非共价结合的约600个至约1000个结合剂。在一个方面,所述纳米颗粒包含与纳米颗粒的表面非共价结合的约200个至约800个结合剂。在一个方面,所述纳米颗粒包含与纳米颗粒的表面非共价结

合的约300个至约800个结合剂。在优选的实施方案中,所述纳米颗粒包含与纳米颗粒的表面非共价结合的约400个至约800个结合剂。预期值包括任一个所述范围内的任何值或子范围,包括端点。

[0101] 在一个方面,纳米颗粒组合物中的平均粒度小于约 $1\mu\text{m}$ 。在一个方面,纳米颗粒组合物中的平均粒度是约90nm至约 $1\mu\text{m}$ 。在一个方面,纳米颗粒组合物中的平均粒度是约90nm至约900nm。在一个方面,纳米颗粒组合物中的平均粒度是约90nm至约800nm。在一个方面,纳米颗粒组合物中的平均粒度是约90nm至约700nm。在一个方面,纳米颗粒组合物中的平均粒度是约90nm至约600nm。在一个方面,纳米颗粒组合物中的平均粒度是约90nm至约500nm。在一个方面,纳米颗粒组合物中的平均粒度是约90nm至约400nm。在一个方面,纳米颗粒组合物中的平均粒度是约90nm至约300nm。在一个方面,纳米颗粒组合物中的平均粒度是约90nm至约200nm。在一个优选的实施方案中,纳米颗粒组合物中的平均粒度是约100nm至约180nm。在一个特别优选的实施方案中,纳米颗粒组合物中的平均粒度是约100nm至约160nm。预期值包括任何所述范围内的任何值、子范围或范围,包括端点。

[0102] 在一个方面,所述纳米颗粒组合物被配制用于静脉内注射。为了避免缺血事件,被配制用于静脉内注射的纳米颗粒组合物应当包含具有小于约 $1\mu\text{m}$ 的平均粒度的纳米颗粒。

[0103] 在一个方面,纳米颗粒组合物中的平均粒度大于约 $1\mu\text{m}$ 。在一个方面,纳米颗粒组合物中的平均粒度是约 $1\mu\text{m}$ 至约 $5\mu\text{m}$ 。在一个方面,纳米颗粒组合物中的平均粒度是约 $1\mu\text{m}$ 至约 $4\mu\text{m}$ 。在一个方面,纳米颗粒组合物中的平均粒度是约 $1\mu\text{m}$ 至约 $3\mu\text{m}$ 。在一个方面,纳米颗粒组合物中的平均粒度是约 $1\mu\text{m}$ 至约 $2\mu\text{m}$ 。在一个方面,纳米颗粒组合物中的平均粒度是约 $1\mu\text{m}$ 至约 $1.5\mu\text{m}$ 。预期值包括任何所述范围内的任何值、子范围或范围,包括端点。

[0104] 在一个方面,所述纳米颗粒组合物被配制用于直接注射到肿瘤中。直接注射包括注射到肿瘤部位中或肿瘤部位附近、灌注到肿瘤中等。当被配制用于直接注射到肿瘤中时,所述纳米颗粒可以包括任何平均粒度。不受理论所束缚,认为更大的颗粒(例如大于500nm、大于 $1\mu\text{m}$ 等)更可能固定在肿瘤内,从而提供有益的作用。更大的颗粒可以积聚在肿瘤或特定器官中。参见例如被用于注射到供养肝脏肿瘤的肝动脉中的20微米-60微米玻璃颗粒,其被称作“TheraSphere®”(在临床上用于肝癌)。因此,对于静脉内施用,通常使用小于 $1\mu\text{m}$ 的颗粒。超过 $1\mu\text{m}$ 的颗粒更通常被直接施用到肿瘤中(“直接注射”)或供养到肿瘤部位的动脉中。

[0105] 在一个方面,所述组合物内少于约0.01%的纳米颗粒具有大于200nm、大于300nm、大于400nm、大于500nm、大于600nm、大于700nm或大于800nm的粒度。在一个方面,所述组合物内少于约0.001%的纳米颗粒具有大于200nm、大于300nm、大于400nm、大于500nm、大于600nm、大于700nm或大于800nm的粒度。在一个优选的实施方案中,所述组合物内少于约0.01%的纳米颗粒具有大于800nm的粒度。在一个更优选的实施方案中,所述组合物内少于约0.001%的纳米颗粒具有大于800nm的粒度。

[0106] 在一个优选的方面,本文所述的尺寸和尺寸范围涉及复原的冻干纳米颗粒组合物的粒度。也就是说,在将冻干纳米颗粒重悬在水溶液(例如水、其它药学上可接受的赋形剂、缓冲剂等)中之后,粒度或平均粒度在本文所述的范围内。

[0107] 在一个方面,至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%的纳米颗粒作为单个纳米颗粒存在于复原的组合物中。也就是说,少于约

50%、40%、30%等的纳米颗粒二聚化或多聚化(低聚化)。

[0108] 在一些实施方案中,所述组合物中的纳米颗粒具有以数量计少于20%的二聚化、以数量计少于10%的二聚化并且优选地少于5%的二聚化。

[0109] 在一些实施方案中,可以通过调节载体蛋白与结合剂的量(例如比率)来控制纳米颗粒的尺寸。纳米颗粒的尺寸和尺寸分布也重要。本发明的纳米颗粒可以根据它们的尺寸而表现不同。在大尺寸下,团聚可能会阻塞血管。因此,纳米颗粒的团聚可以影响组合物的性能和安全性。另一方面,更大的颗粒在某些条件下(例如当不静脉内施用)可能更具治疗性。

[0110] 在一个方面,所述纳米颗粒组合物包含至少一种另外的治疗剂。在一个实施方案中,所述至少一种另外的治疗剂与纳米颗粒的外表面非共价结合。在一个实施方案中,所述至少一种另外的治疗剂被布置在纳米颗粒的外表面上。在一个实施方案中,所述至少一种另外的治疗剂选自以下各项组成的组:阿比特龙、苯达莫司汀、硼替佐米、卡铂、卡巴他赛、顺铂、苯丁酸氮芥、达沙替尼、多西他赛、多柔比星、表柔比星、埃罗替尼、依托泊苷、依维莫司、吉西他滨(gemcitabine)、吉非替尼、伊达比星、伊马替尼、羟基脲、伊马替尼、拉帕替尼、亮丙瑞林、美法仑、甲氨蝶呤、米托蒽醌、奈达铂、尼罗替尼、奥沙利铂、帕唑帕尼、培美曲塞、吡铂、罗米地辛、赛特铂、索拉非尼、威罗菲尼、舒尼替尼、替尼泊苷、三铂、长春花碱、长春瑞滨、长春新碱以及环磷酰胺。在一个实施方案中,所述至少一种另外的治疗剂是抗癌结合剂,例如抗癌抗体。

[0111] 制备纳米颗粒的方法

[0112] 在一些方面,本发明涉及制备如本文所述的纳米颗粒组合物的方法。如本文所述的纳米颗粒可以通过任何方法来制备。制备纳米颗粒、纳米颗粒组合物以及冻干纳米颗粒组合物的方法的非限制性实例可以见于PCT公开号W02014/055415和W02016/057554中,它们中的每一件以引用的方式整体并入本文。

[0113] 在一个方面,所述纳米颗粒组合物的纳米颗粒是通过使载体蛋白颗粒或载体蛋白-治疗剂颗粒与结合剂以约10:1至约10:30的载体蛋白颗粒或载体蛋白-治疗剂颗粒与结合剂的比率接触而形成的。在一个实施方案中,所述比率是约10:2至约10:25。在一个实施方案中,所述比率是约10:2至约1:1。在一个优选的实施方案中,所述比率是约10:2至约10:6。在一个特别优选的实施方案中,所述比率是约10:4。预期比率包括任何所述范围内的任何值、子范围或范围,包括端点。

[0114] 在一个实施方案中,用于形成纳米颗粒的溶液或其它液体介质的量特别重要。在载体蛋白(或载体蛋白-治疗剂)和抗体的过稀溶液中不会形成纳米颗粒。过度浓缩的溶液将产生非结构化的聚集体。在一些实施方案中,所用的溶液(例如无菌水、盐水、磷酸盐缓冲盐水)的量是约0.5mL的溶液至约20mL的溶液。在一些实施方案中,载体蛋白的量是约1mg/mL至约100mg/mL。在一些实施方案中,结合剂的量是约1mg/mL至约30mg/mL。举例来说,在一些实施方案中,载体蛋白:结合剂:溶液的比率是在1mL的溶液(例如盐水)中约9mg的载体蛋白(例如白蛋白)比4mg的结合剂,例如抗体(例如OKT3)。还可以将一定量的治疗剂(例如紫杉醇(Taxol))添加到载体蛋白中。举例来说,可以将1mg的紫杉醇添加于1mL溶液中9mg的载体蛋白(10mg载体蛋白-治疗剂)和4mg的结合剂(例如抗体、Fc融合分子或适体)中。当使用典型的静脉注射袋时,例如,在使用约1升的溶液的情况下,与在1mL中使用的量相比,将

需要使用 $1000\times$ 量的载体蛋白/载体蛋白-治疗剂和抗体。因此,不能在标准静脉注射袋中形成本发明的纳米颗粒。此外,当将组分以本发明的治疗量添加到标准静脉注射袋中时,所述组分不会自组装形成纳米颗粒。

[0115] 在一个实施方案中,使载体蛋白颗粒或载体蛋白-治疗剂颗粒与结合剂在具有约4至约8的pH值的溶液中接触。

[0116] 在一个实施方案中,使载体蛋白颗粒或载体蛋白-治疗剂颗粒与结合剂在具有约4的pH值的溶液中接触。在一个实施方案中,使载体蛋白颗粒或载体蛋白-治疗剂颗粒与结合剂在具有约5的pH值的溶液中接触。在一个实施方案中,使载体蛋白颗粒或载体蛋白-治疗剂颗粒与结合剂在具有约6的pH值的溶液中接触。在一个实施方案中,使载体蛋白颗粒或载体蛋白-治疗剂颗粒与结合剂在具有约7的pH值的溶液中接触。在一个实施方案中,使载体蛋白颗粒或载体蛋白-治疗剂颗粒与结合剂在具有约8的pH值的溶液中接触。在一个优选的实施方案中,使载体蛋白颗粒或载体蛋白-治疗剂颗粒与结合剂在具有约5至约7的pH值的溶液中接触。

[0117] 在一个实施方案中,将载体蛋白颗粒或载体蛋白-治疗剂颗粒与结合剂在约 5°C 至约 60°C 或该范围内的任何范围、子范围或值(包括端点在内)的温度下孵育。在一个优选的实施方案中,将载体蛋白颗粒或载体蛋白-治疗剂颗粒与结合剂在约 23°C 至约 60°C 的温度下孵育。

[0118] 不受理论所束缚,认为纳米颗粒组合物内纳米颗粒的稳定性至少部分取决于形成纳米颗粒的温度和/或pH值以及溶液中组分(即载体蛋白、结合剂以及任选的治疗剂)的浓度。在一个实施方案中,纳米颗粒的 K_d 是约 1×10^{-11} M至约 2×10^{-5} M。在一个实施方案中,纳米颗粒的 K_d 是约 1×10^{-11} M至约 2×10^{-8} M。在一个实施方案中,纳米颗粒的 K_d 是约 1×10^{-11} M至约 7×10^{-9} M。在一个优选的实施方案中,纳米颗粒的 K_d 是约 1×10^{-11} M至约 3×10^{-8} M。预期值包括任何所述范围内的任何值、子范围或范围,包括端点。

[0119] 冻干

[0120] 本发明的冻干组合物是通过标准冻干技术在存在或不存在稳定剂、缓冲剂等等的情况下制备的。惊人的是,这些条件不会改变纳米颗粒的相对脆弱的结构。此外,最好,这些纳米颗粒在冻干后保持它们的尺寸分布并且更重要的是,可以如同新鲜制备基本上相同的形式和比率复原用于体内施用(例如静脉内递送)。

[0121] 冻干或冷冻干燥从组合物中去除水。在所述过程中,首先将待干燥的材料冷冻,然后通过真空环境中升华来去除冰或冷冻的溶剂。在冻干前制剂中可以包括赋形剂以增强在冷冻干燥过程期间的稳定性和/或提高冻干产品在储存时的稳定性。Pikal, M. Biopharm. 3 (9) 26-30 (1990) 以及Arakawa等, Pharm. Res. 8 (3) :285-291 (1991)。

[0122] 虽然蛋白质可以被冻干,但是冻干和复原的过程可能影响蛋白质的特性。由于蛋白质比传统的有机药物和无机药物更大并且更复杂(即除了复杂的三维结构之外,还具有多个官能团),因此这样的蛋白质的制剂带来了特殊的问题。为了使蛋白质保持生物活性,制剂必须保持蛋白质氨基酸的至少核心序列的构象完整性是完整无缺的,而同时保护蛋白质的多个官能团免于降解。蛋白质的降解途径可以涉及化学不稳定性(即涉及通过键形成或裂解修饰蛋白质,从而产生新的化学实体的任何过程)或物理不稳定性(即蛋白质的更高阶结构的变化)。化学不稳定性可以由脱酰胺、外消旋化、水解、氧化、 β 消除或二硫键交换引

起。物理不稳定性可以由例如变性、聚集、沉淀或吸附引起。三种最常见的蛋白质降解途径是蛋白质聚集、脱酰胺以及氧化。Cleland等, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 10 (4):307-377 (1993)。

[0123] 制剂

[0124] 在一个方面,所述纳米颗粒组合物被配制用于全身递送,例如静脉内施用。

[0125] 在一个方面,所述纳米颗粒组合物被配制用于直接注射到肿瘤中。直接注射包括注射到肿瘤部位中或肿瘤部位附近、灌注到肿瘤中等。由于纳米颗粒组合物不被全身施用,因此被配制用于直接注射到肿瘤中的纳米颗粒组合物可以包括任何平均粒度。不受理论所束缚,认为更大的颗粒(例如大于500nm、大于1 μ m等)更可能被固定在肿瘤内,从而提供被认为是更好的有益作用。

[0126] 在另一个方面,本文提供了一种组合物,所述组合物包含本文提供的化合物和至少一种药学上可接受的赋形剂。

[0127] 一般来说,本文提供的化合物可以被配制用于通过任何公认的施用方式向患者施用。各种制剂和药物递送系统在本领域中是可获得的。参见例如Gennaro, A.R. 编著 (1995) *Remington's Pharmaceutical Sciences* (《雷明顿药物科学》), 第18版, 麦克出版公司 (Mack Publishing Co)。

[0128] 一般来说,本文提供的化合物将作为药物组合物通过以下途径中的任一种施用:口服、全身(例如透皮、鼻内或通过栓剂)或肠胃外(例如肌内、静脉内或皮下)施用。

[0129] 所述组合物一般包含本发明的化合物与至少一种药学上可接受的赋形剂的组合。可接受的赋形剂是无毒的,有助于施用,并且不会不利地影响要求保护的化合物的治疗益处。这样的赋形剂可以是任何固体、液体、半固体,或者在气溶胶组合物的情况下,可以是本领域技术人员一般可获得的气态赋形剂。

[0130] 固体药物赋形剂包括淀粉、纤维素、滑石、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸镁、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、氯化钠、脱脂奶粉等。液体赋形剂和半固体赋形剂可以选自甘油、丙二醇、水、乙醇以及各种油,包括石油、动物、植物或合成来源的油,例如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。优选的液体载体,特别是用于可注射溶液的液体载体包括水、盐水、右旋糖水溶液以及二醇。其它合适的药物赋形剂和它们的制剂描述于 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (《雷明顿药物科学》), E.W.Martin 编著 (麦克出版公司 (Mack Publishing Company), 第18版, 1990) 中。

[0131] 如果需要的话,本发明的组合物可以存在于包装或分配器装置中,其容纳含有活性成分的一个或多个单位剂型。这样的包装或装置可以例如包括金属箔或塑料薄膜,例如泡罩包装,或玻璃和橡胶塞,例如在小瓶中。所述包装或分配器装置可以附用于施用的说明书。还可以制备包含配制于相容的药物载体中的本发明的化合物的组合物,将其放置在适当的容器中,并且贴标签用于所示病症的治疗。

[0132] 治疗方法

[0133] 如本文所述的纳米颗粒组合物可用于在哺乳动物中治疗癌细胞和/或肿瘤。在一个优选的实施方案中,所述哺乳动物是人类(即人类患者)。优选的是,在施用之前将冻干的纳米颗粒组合物复原(悬浮在水性赋形剂中)。

[0134] 在一个方面,提供了一种用于治疗癌细胞的方法,所述方法包括使所述细胞与有

效量的如本文所述的纳米颗粒组合物接触以治疗所述癌细胞。治疗癌细胞包括但不限于减少增殖、杀死细胞、防止细胞转移等。

[0135] 在一个方面,提供了一种用于在有需要的患者中治疗T细胞或T细胞癌症的方法,所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的如本文所述的纳米颗粒组合物以治疗所述T细胞癌症,其中所述T细胞癌症是外周T细胞淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤、血管免疫母细胞性淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、成人T细胞白血病/淋巴瘤(ATLL)、肠病型T细胞淋巴瘤、肝脾 γ - δ T细胞淋巴瘤、母细胞性NK细胞淋巴瘤、成淋巴细胞性淋巴瘤、鼻型NK/T细胞淋巴瘤、治疗相关的T细胞淋巴瘤或其组合。

[0136] 在一个方面,提供了一种用于在有需要的患者中治疗肿瘤的方法,所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的如本文所述的纳米颗粒组合物以治疗所述肿瘤。在一个实施方案中,所述肿瘤的尺寸减小。在一个实施方案中,肿瘤尺寸在治疗期间和/或之后至少一段时间内不增加(即进展)。

[0137] 在一个实施方案中,静脉内施用所述纳米颗粒组合物。在一个实施方案中,将所述纳米颗粒组合物直接施用于肿瘤。在一个实施方案中,通过直接注射或灌注到肿瘤中来施用所述纳米颗粒组合物。

[0138] 在一个实施方案中,所述方法包括:a)每周一次施用所述纳米颗粒组合物,持续三周;b)停止施用所述纳米颗粒组合物,持续一周;以及c)任选地如有需要重复步骤a)和步骤b)以治疗所述肿瘤。

[0139] 在一个实施方案中,治疗有效量的本文所述的纳米颗粒包含约 $1\text{mg}/\text{m}^2$ 至约 $200\text{mg}/\text{m}^2$ 的抗体、约 $2\text{mg}/\text{m}^2$ 至约 $150\text{mg}/\text{m}^2$ 、约 $5\text{mg}/\text{m}^2$ 至约 $100\text{mg}/\text{m}^2$ 、约 $10\text{mg}/\text{m}^2$ 至约 $85\text{mg}/\text{m}^2$ 、约 $15\text{mg}/\text{m}^2$ 至约 $75\text{mg}/\text{m}^2$ 、约 $20\text{mg}/\text{m}^2$ 至约 $65\text{mg}/\text{m}^2$ 、约 $25\text{mg}/\text{m}^2$ 至约 $55\text{mg}/\text{m}^2$ 、约 $30\text{mg}/\text{m}^2$ 至约 $45\text{mg}/\text{m}^2$ 或约 $35\text{mg}/\text{m}^2$ 至约 $40\text{mg}/\text{m}^2$ 的抗体。在其它实施方案中,治疗有效量包含约 $20\text{mg}/\text{m}^2$ 至约 $90\text{mg}/\text{m}^2$ 的抗体。在一个实施方案中,治疗有效量包含 $30\text{mg}/\text{m}^2$ 至约 $70\text{mg}/\text{m}^2$ 的抗体。在一个实施方案中,治疗有效量的本文所述的纳米颗粒包含约 $50\text{mg}/\text{m}^2$ 至约 $200\text{mg}/\text{m}^2$ 的载体蛋白或载体蛋白和治疗剂。在一个优选的实施方案中,治疗有效量包含约 $75\text{mg}/\text{m}^2$ 至约 $175\text{mg}/\text{m}^2$ 的载体蛋白或载体蛋白和治疗剂。预期值包括任何所述范围内的任何值、子范围或范围,包括端点。

[0140] 在一个实施方案中,治疗有效量包含约 $20\text{mg}/\text{m}^2$ 至约 $90\text{mg}/\text{m}^2$ 的结合剂,例如抗体、适体或融合蛋白。在一个优选的实施方案中,治疗有效量包含 $30\text{mg}/\text{m}^2$ 至约 $70\text{mg}/\text{m}^2$ 的结合剂,例如抗体、适体或融合蛋白。预期值包括任何所述范围内的任何值、子范围或范围,包括端点。

[0141] 在一个方面,所述癌症是T细胞癌症。在一些实施方案中,所述癌症是T细胞淋巴瘤。在另一个实施方案中,所述癌症是外周T细胞淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤、血管免疫母细胞性淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、成人T细胞白血病/淋巴瘤(ATLL)、肠病型T细胞淋巴瘤、肝脾 γ - δ T细胞淋巴瘤、母细胞性NK细胞淋巴瘤、成淋巴细胞性淋巴瘤、鼻型NK/T细胞淋巴瘤、治疗相关的T细胞淋巴瘤或其组合。

[0142] 一般来说,本发明的化合物将通过用于发挥相似效用的药剂的任何公认的施用方式以治疗有效量施用。本发明的化合物(即纳米颗粒)的实际量将取决于许多因素,例如待治疗的疾病的严重程度、受试者的年龄和相对健康情况、所使用的化合物的效力、施用途径和形式以及本领域技术人员公知的其它因素。

[0143] 这样的药剂的有效量可以容易地通过常规实验确定,如最有效和方便的施用途径和最适当的制剂所能够的那样。各种制剂和药物递送系统在本领域中是可获得的。参见例如Gennaro,A.R.编著(1995)Remington's Pharmaceutical Sciences(《雷明顿药物科学》),第18版,麦克出版公司。

[0144] 药剂(例如本发明的化合物)的有效量或治疗有效量或剂量指的是引起受试者的症状改善或存活期延长的药剂或化合物的量。这样的分子的毒性和治疗功效可以通过标准药物程序在细胞培养物或实验动物中确定,例如通过确定LD50(对50%的群体致死的剂量)和ED50(在50%的群体中具有治疗有效性的剂量)。毒性作用与治疗作用的剂量比是治疗指数,其可以被表示为比率LD50/ED50。表现出高治疗指数的药剂是优选的。

[0145] 有效量或治疗有效量是将引起正由研究人员、兽医、医生或其它临床医生寻求的组织、系统、动物或人类的生物或医学响应的化合物或药物组合物的量。剂量可以在该范围内变化,这取决于所使用的剂型和/或所利用的施用途径。确切的制剂、施用途径、剂量以及给药时间间隔应当根据本领域已知的方法,鉴于受试者的病症的具体情况来选择。

[0146] 剂量和时间间隔可以单独调整以提供足以实现所期望的作用的活性部分的血浆水平;即最低有效浓度(MEC)。每一种化合物的MEC将不同,但是可以根据例如体外数据和动物实验来估计。实现MEC所需的剂量将取决于个体特征和施用途径。在局部施用或选择性摄取的情况下,药物的有效局部浓度可能与血浆浓度无关。

[0147] 实施例

[0148] 使用纳米颗粒来说明本公开,所述纳米颗粒由作为核心的与白蛋白结合的紫杉醇(即ABRAXANE®)或顺铂和识别癌性T细胞上的或由癌性T细胞表达的一种或多种抗原的抗体(例如OKT3)构成。

[0149] 本领域技术人员将了解的是,制备和使用实施例的纳米颗粒仅仅是为了说明的目的,并且本公开不受该说明的限制。

[0150] 本文所用的任何缩写都具有常规的科学含义。除非另有说明,否则所有温度都是℃。在本文,除非另外定义,否则以下术语具有以下含义:

[0151]	ABX	=	ABRAXANE®/(与白蛋白结合的紫杉醇)
	ACN	=	乙腈
	ADC	=	抗体依赖性化疗

[0152]

BEV	=	贝伐珠单抗
BSA	=	牛血清白蛋白
dH ₂ O	=	蒸馏水
nM	=	纳摩尔
EdU	=	5-乙炔基-2'-脱氧尿苷
FCB	=	流式细胞术缓冲液
FITC	=	荧光素
kD	=	千道尔顿
Kd	=	解离常数
kg	=	公斤
KV	=	千伏
L/hr	=	升/小时
M	=	摩尔
mCi	=	毫居里
mg	=	毫克
ml 或 mL	=	毫升
m ²	=	平方米
mm ³	=	立方毫米
OKT3	=	莫罗单抗-CD3
μg	=	微克
μl	=	微升
μm	=	微米(micrometer/micron)
PBS	=	磷酸盐缓冲盐水
pK	=	药物代谢动力学

[0153]	RT	=	室温
	rpm	=	转/分钟
	v	=	伏特
	×g	=	重力倍数

[0154] 实施例1:纳米颗粒制备

[0155] 将ABRAXANE® (ABX) 悬浮在含有0.9%盐水的莫罗单抗-CD3 (OKT3) 中。将混合物在室温下(或在所示的温度下) 孵育30分钟以允许颗粒形成。为了进行Mastersizer实验以测量ABX:OKT3复合物的粒度,将10mg的ABX悬浮在OKT3中,浓度为0mg/ml至25mg/ml。

[0156] 为了用于人类,可以通过获得剂量适当数量的OKT3并且按照以下指示将每一个小瓶稀释到各种浓度来制备ABX:OKT3复合物。可以通过复原到含有10mg/mL ABX纳米颗粒的最终浓度来制备剂量适当数量的100mg ABX小瓶。使用无菌3mL注射器,可以抽出OKT3并且在最少1分钟内缓慢注射到含有100mg ABX的每个小瓶的内壁上。不应当将OKT3溶液直接注射到冻干饼上,这是因为这将引起发泡。然后,使用无菌12mL无菌注射器,可以抽出8.4mL的0.9%氯化钠注射液 (USP) 并且在最少1分钟内将8.4mL缓慢注射到含有100mg ABX和0mg至40mg OKT3的每一个小瓶的内壁上。一旦完成OKT3和0.9%氯化钠注射液USP8.4mL的添加,就可以将每一个小瓶平缓旋动和/或缓慢翻转至少2分钟直到任何饼/粉末完全溶解为止。应当避免产生泡沫。应当将含有ABX和OKT3的小瓶静置60分钟。应当每10分钟将一个或多个小瓶平缓旋动和/或翻转以继续混合复合物。在经过60分钟之后,应当从每一个小瓶中抽出计算的给药体积的ABX和OKT3并且缓慢添加到空的viaflex袋中。然后将等体积的0.9%氯化钠注射液 (USP) 添加到ABX和OKT3的混合物中。然后应当将袋平缓旋动和/或缓慢翻转1分钟以混合。ABX:OKT3纳米颗粒在最终稀释后可以在室温下储存长达4小时。

[0157] 实施例2:在体外ABX和OKT3的结合

[0158] 为了确定ABX和OKT3是否相互作用,通过流式细胞术和电子显微镜术分析实施例1中形成的纳米颗粒。

[0159] 方法

[0160] 流式细胞术:如上述实施例1中所述产生包含ABX和OKT3的纳米颗粒组合物。为了确定OKT3与ABX的结合,在Accuri C6流式细胞仪(新泽西州富兰克林湖的碧迪公司(BD Franklin Lakes,NJ))上进行组合物的可视化并且使用Accuri C6软件进行数据分析。用5μg的链霉亲和素PE(马萨诸塞州剑桥的Abeam公司(Abeam,Cambridge,MA))标记生物素化的(5μg)山羊抗小鼠IgG(马萨诸塞州剑桥的Abeam公司)。选择山羊抗小鼠IgG标记组合物,这是因为OKT3的Fab部分是小鼠来源的。在室温下将ABX和组合物与PE标记的山羊抗小鼠IgG一起孵育30分钟,洗涤并且通过流式细胞术可视化。

[0161] 电子显微镜术:将溶解在PBS中的ABX添加到300目的火棉胶片-碳包被的铜网中并且使其静置1分钟。将一片尖头的滤纸与液滴接触以去除多余的液体,从而在网格上留下薄膜。使网格干燥。为了溶解留在干燥网格上的缓冲剂晶体,将样品在dH₂O中洗涤三次。将一小滴1%磷钨酸(PTA)(pH7.2)添加到网格中。然后再次用一片尖头的滤纸与网格接触以去

除多余的液体,从而在网格上留下薄膜并且使其干燥。将于0.9%氯化钠溶液中的OKT3用PBS以1:10比率稀释。将OKT3加到聚乙烯醇缩甲醛(formvar)包被的镍网上并且使其风干30分钟至1小时。对于组合物,将溶解在PBS中的ABX和0.9%氯化钠溶液中的OKT3混合。将复合物进一步用PBS以1:5稀释。将复合物加到聚乙烯醇缩甲醛包被的镍网上并且风干30分钟至1小时。将这两个样品在用10%FCB/PBS1:30稀释的、具有6nm金缀合颗粒(Electron Microscopy Sciences公司)的山羊抗小鼠IgG中孵育1小时,用PBS洗涤6次(每一次2分钟),用dH₂O洗涤6次,然后用2%甲基纤维素和4%UA(9:1)的混合物染色5分钟。使用滤纸吸干染色剂并且将网格风干1小时。将这两个样品在用10%FCB/PBS1:25稀释的、具有6nm金缀合颗粒(杰克逊免疫研究公司(Jackson ImmunoResearch))的驴抗小鼠IgG中孵育过夜,用PBS洗涤6次(每一次2分钟),用dH₂O水洗涤6次,用1%PTA染色5分钟,风干,用2%甲基纤维素覆盖,并且风干1小时。在JEOL1400上在以80 KV操作时拍摄显微照片。

[0162] 实施例3:纳米颗粒组合物在体外的功能

[0163] 所述实验是为了确认复合物中的两个关键元素(即抗体和紫杉醇)在存在于复合物中时保留它们的功能。

[0164] 体外毒性:将HuT-78人类T细胞淋巴瘤细胞系(弗吉尼亚州马纳萨斯的ATCC(ATCC Manassas,VA))培养在补充有4.5g/L葡萄糖、L-谷氨酰胺以及10%胎牛血清(MG-72,CLS序号820702)的RPMI 1640培养基中。收获细胞并且以每孔10⁶个细胞平板接种到24孔板中。在37°C和5%CO₂下使细胞在0μg/ml至200μg/ml的紫杉醇浓度下暴露于ABX或组合物过夜。为了测量增殖,利用Click-iT EdU(俄勒冈州尤金的分子探针公司(Molecular Probes, Eugene,OR))试剂盒。简单地说,将10mM的EdU添加到孔中并且与细胞和ABX或纳米颗粒组合物孵育过夜。将细胞用1%皂苷透化并且用FITC缀合的抗体标记嵌入的EdU。通过用来自每一种处理的FITC阳性细胞除以未处理的EdU标记细胞的最大增殖来确定增殖指数。

[0165] VEGF ELISA:为了确定OKT3在与ABX结合时是否仍可以结合它的配体CD3,使用标准CD3 ELISA。如所述制备组合物并且将CD3-Ig融合蛋白添加到具有复合物或单独ABX的组合物中。将CD3-Ig融合蛋白在室温下与纳米颗粒孵育2小时。将悬浮液以6000rpm旋转15分钟,收集上清液并且通过ELISA测量游离的融合蛋白。通过Versamax ELISA板读数器(加利福尼亚州桑尼维尔的分子装置公司(Molecular Devices,Sunnyvale,CA))测量吸光度。使用从0pg/ml到2000pg/ml的标准曲线确定未结合的VEGF的浓度。

[0166] 实施例4:粒度

[0167] 为了了解在使OKT3与ABX结合时形成的纳米颗粒的特征,相对于ABX确定ABX:OKT3复合物的尺寸。

[0168] Mastersizer和Nanosight:在Mastersizer 2000(马萨诸塞州韦斯特伯鲁的马尔文仪器公司(Malvern Instruments,Westborough,MA))上通过动态光散射来测量ABX和抗体-ABX药物复合物的粒度。为了测量粒度,将2ml(5mg/ml) **ABRAXANE®**或复合物添加到样品室中。使用Malvern软件分析数据并且按体积计显示粒度分布。随后使用Nanosight系统(马萨诸塞州韦斯特伯鲁的马尔文仪器公司)验证粒度和稳定性。将ABX或复合物颗粒稀释到适当的范围以准确测量粒度。通过粒度分布显示数据;然而,纳米颗粒跟踪分析使用布朗运动(Brownian motion)来确定粒度。

[0169] 实施例5:蛋白质亲和力

[0170] 为了了解在使OKT3与Abraxane结合时形成的纳米颗粒的特征,通过生物层干涉测量(BLItz)测定来确定复合物的结合亲和力,所述测定是使用白光反射的干涉来确定2种蛋白质的结合亲和力的光学技术。

[0171] 在BLItz测定中,如果2种蛋白质结合,那么反射光以与这2种蛋白质的结合亲和力相关的方式改变波长。在此,将100 μ g/ml的生物素化的OKT3固定在含有链霉亲和素的探针上并且暴露于2个浓度的Abraxane——500 μ g/ml(试验2)和1000 μ g/ml(试验3)。

[0172] 在抗人类CD3抗体(OKT3)和Abraxane的情况下,将100 μ g/ml的生物素化的OKT3固定在含有链霉亲和素的探针上。然后将带有OKT3的探针浸入2个浓度(500 μ g/ml和1000 μ g/ml(试验2和试验3))的Abraxane中。然后,Abraxane以浓度依赖性方式与OKT3结合。通过BLItz软件计算蛋白质上的缔合常数和解离常数。参见图18。

[0173] 结果显示OKT3和Abraxane的解离常数是 2.246×10^9 ,这表明这两种蛋白质之间的强非共价键。

[0174] 实施例6:ABX:OKT3复合物在小鼠中的功效

[0175] 使用植入无胸腺裸小鼠体内的HuT-78人类T细胞淋巴瘤细胞的异种移植模型测试具有ABX:OKT3复合物的组合物在体内的功效。

[0176] 进行体内实验至少2次。那些实验所需的小鼠数目通过功效分析来确定。每周测量小鼠肿瘤2次-3次并且当肿瘤是按体重计10%时将小鼠处死。在处理组后监测具有完全肿瘤响应的小鼠60天-80天。小鼠研究的终点是中值存活率。产生卡普兰-迈耶曲线(Kaplan-Meier curve)并且进行曼特尔-考克斯检验(Mantle-Cox test)来确定处理组之间中值存活率的显著性。所呈现的体外结果代表至少5次重复实验。使用学生t检验(Student's t-test)对从基线实验的体外和体内百分比变化进行统计分析。

[0177] 小鼠模型:为了测试肿瘤功效,将 1×10^6 个HuT-78人类T细胞淋巴瘤细胞植入无胸腺裸小鼠(印第安纳州印第安纳波利斯的哈伦史泊格多利公司(Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN))的右侧腹中。当肿瘤达到约700mm³的尺寸时,将小鼠随机化并且用PBS; ABX;OKT3(12mg/kg);先用OKT3,之后用ABX;或用如上文所述的组合物以上述浓度处理。对于测试更大的纳米颗粒的小鼠实验,在仅OKT3处理组中使用产生更大颗粒所必需的最高剂量的OKT3。每周监测肿瘤尺寸3次并且使用以下方程式计算肿瘤体积:(长度 \times 宽度²)/2。当肿瘤尺寸等于小鼠体重的10%或约2500mm³时,将小鼠处死。如下计算从基线的第7天百分比变化:[(处理日的肿瘤尺寸-第7天的肿瘤尺寸)/处理日的肿瘤尺寸] \times 100。

[0178] 实施例7:紫杉醇在小鼠中的药物代谢动力学

[0179] 为了比较组合物和ABX的药物代谢动力学(pk),在0小时、4小时、8小时、12小时以及24小时在接受组合物或ABX施用的小鼠中测量血浆紫杉醇浓度。

[0180] 方法

[0181] 紫杉醇药物代谢动力学:使用与Agilent Poroshell 120 EC-C18分析柱(2.1mm \times 100mm,2.7 μ m,明尼苏达州苹果谷的Chrom Tech公司(Chrom Tech,Apple Valley,MN)附接的Agilent Poroshell 120 EC-C18前置柱(2.1mm \times 5mm,2.7 μ m,明尼苏达州苹果谷的Chrom Tech公司)在40 $^{\circ}$ C完成紫杉醇和d5紫杉醇的液相色谱分离,使用梯度流动相以0.5毫升/分钟的恒定流速洗脱,所述梯度流动相由含0.1%甲酸的水(A)和含0.1%甲酸的ACN(B)构成。洗脱以60%A和40%B开始0.5分钟,然后B从40%线性地增加到85%,持续4.5分钟,在85%B

保持0.2分钟,并且返回到初始条件,持续1.3分钟。自动进样器温度是10℃并且进样体积是2μl。使用质谱仪以正离子ESI模式,以毛细管电压1.75kV、源温150℃、脱溶剂温度500℃、锥孔气流速150升/小时、脱溶剂气流速1000升/小时,使用多反应监测(MRM)扫描模式以0.075秒的停留时间完成紫杉醇和内标d5-紫杉醇的检测。通过MassLynx-Intellistart第4.1版软件确定锥孔电压和碰撞能量并且分别在6 V-16 V和12eV-60eV之间变动。在m/z 854.3>105.2(紫杉醇)和m/z 859.3>291.2(d5紫杉醇)处监测MRM前体和产物离子。在4ml琥珀色硅烷化玻璃小瓶中制备紫杉醇(于EtOH中1mg/ml)和d5紫杉醇(于EtOH中1mg/ml)的基本储备溶液并且储存在-20℃。通过在2ml琥珀色硅烷化玻璃小瓶中用ACN稀释储备溶液来制备工作标准并且储存在-20℃。如下提取血浆样品,将100μl血浆样品添加到含有d5紫杉醇(116.4nM或100ng/ml)和300μl ACN的1.7ml微量离心管中,涡旋混合,在室温下孵育10分钟以使蛋白质沉淀,并且离心(14,000rpm)3分钟。在Agilent Captiva ND^脂板(明尼苏达州苹果谷的Chrom Tech公司)上过滤上清液,收集在深96孔板中,并且使用氮气干燥。使用100μl ACN将样品复原并且在板振荡器(高速)上振荡5分钟。每天制备血浆标准曲线,其含有紫杉醇(0.59nM-5855nM或0.5ng/ml-5000ng/ml)和d5紫杉醇(116.4nM)用于紫杉醇定量。将小鼠肿瘤在冰上解冻,称重,并且将2份(重量/体积)在1×PBS中稀释。然后使用PRO200组织匀浆器,使用锯齿形探针(5mm×75mm)将肿瘤匀浆。然后以与处理人类血浆样品的方式相同的方式处理肿瘤匀浆。

[0182] 小鼠成像:简单地说,将Tris缓冲液(0.125 M Tris-HCl (pH6.8)、0.15M NaCl)和5mCi Na¹²⁵I直接添加到碘化管(马萨诸塞州沃尔瑟姆的赛默飞世尔科技公司(ThermoFischer Scientific,Waltham,MA))中。使碘化物活化并且在室温下旋动。将活化的碘化物与蛋白质溶液混合。添加50μl清除缓冲液(10mg酪氨酸/毫升于PBS中,pH7.4)并且孵育5分钟。在添加Tris/BSA缓冲液并且混合之后,在4℃将样品施加到10K MWCO透析盒中,对预冷却的PBS持续30分钟、1小时、2小时以及过夜。通过γ计数器测定放射性,然后计算每分钟衰变数(DPM)和比活度。向小鼠的尾静脉中注射OKT3、ABX-OKT3、ABX-人类IgG、人类IgG以及单独的ABX。在施用后3小时、10小时、24小时以及72小时使用U-SPECT-II/CT扫描器(荷兰乌得勒支的MILabs公司(MILabs,Utrecht,The Netherlands))经由SPECT-CT成像对动物进行成像。使用POSEM(像素化的有序子集期望值最大化(pixelated ordered subsets by expectation maximization))算法执行SPECT重建。在Feldkamp算法期间重建CT数据。使用PMOD软件(瑞士苏黎世的PMOD技术公司(PMOD Technologies,Zurich,Switzerland))进一步渲染和可视化共配准图像。在注射后72小时将动物处死和解剖。使用放射性同位素剂量校准器(Capintec CRC-127R,Capintec公司)测量所选择的所关注的组织和器官。

[0183] 实施例8:纳米颗粒组合物的冻干

[0184] 通过将OKT3添加到 **ABRAXANE®**中来合成纳米颗粒组合物。然后添加0.9%盐水达到2ml的最终体积,并且将混合物在15ml聚丙烯锥形管中在室温下孵育30分钟。

[0185] 在室温孵育30分钟之后,将混合物分别在0.9%盐水中1:2稀释。这些是在由药房制备用于向患者施用2种药物的浓度。

[0186] 将纳米颗粒组合物在1.5ml聚丙烯微型离心管(eppendorf)中分成20个200μl等分试样并且冷冻在-80℃。

[0187] 一旦被冷冻,就用Virtis3L台式冻干器(宾夕法尼亚州沃明斯特的SP Scientific

公司 (SP Scientific, Warmister, PA)) 在制冷启动的情况下将等分试样冻干过夜。产生冻干制剂。

[0188] 将干燥的等分试样在室温下储存在相同的1.5ml聚丙烯微型离心管中。这些样品在室温下在盐水中容易地复原30分钟,继而以 $2000\times g$ 离心7分钟。然后根据需要,将所得的样品重悬在适当的缓冲液中。

[0189] 相比之下,使用热和快速真空干燥的样品不可能复原。

[0190] 实施例9:测试冻干制剂

[0191] 在冻干之后不同的时间点将样品复原并且相对于ABX和新鲜制备的纳米颗粒组合物测试它们的物理特性。

[0192] 如上文所述评价粒度分布。

[0193] 通过将样品与CD3-IgG融合蛋白在室温下孵育2小时来评价CD3结合,以 $2000\times g$ 离心7分钟。使用ELISA测量与沉淀物(对应于纳米颗粒)结合或保留在上清液中的CD3的量。

[0194] 通过在体外对HuT-78人类T细胞淋巴瘤细胞的细胞毒性来评估紫杉醇活性。

[0195] 实施例10:追踪研究以调查用OKT3预处理是否改进靶向

[0196] 遵循上述一般方案,向无胸腺裸小鼠的右侧腹中注射 1×10^6 个HuT-78细胞,然后用PBS、OKT3、ABX、纳米颗粒组合物处理或用OKT3预处理,并且在24小时后,用纳米颗粒组合物处理。数据在处理第7天和处理后第10天表示为肿瘤体积(mm^3)。在10天内跟踪肿瘤尺寸。

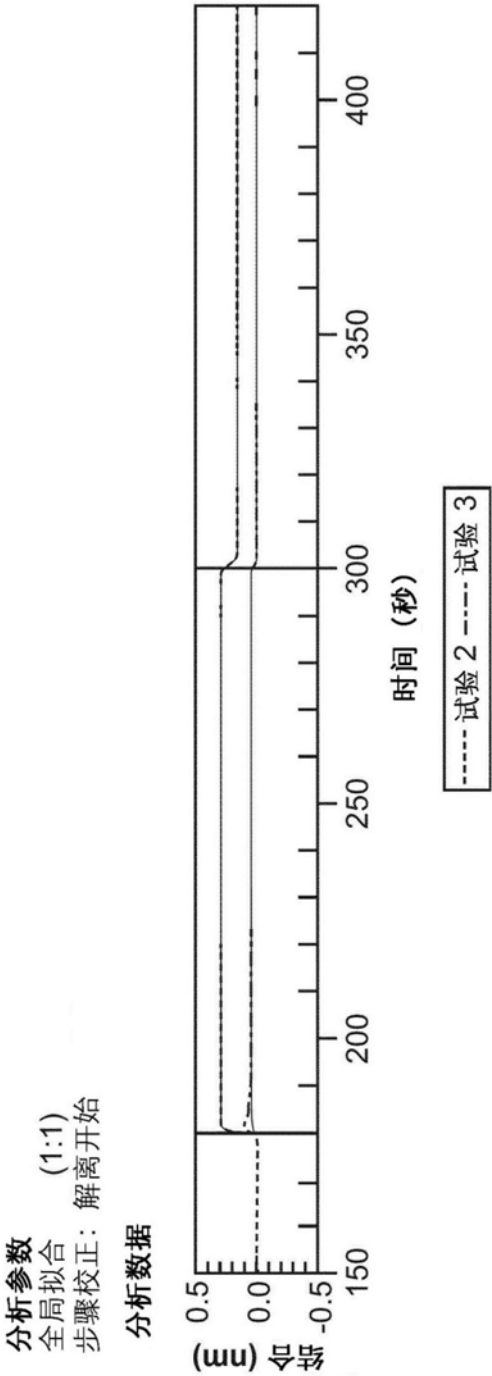


图1