

[19] Patents Registry
The Hong Kong Special Administrative Region
香港特別行政區
專利註冊處

[11] 40029552 B
CN 111182891 B

[12] **STANDARD PATENT (R) SPECIFICATION**
轉錄標準專利說明書

[21] Application no. 申請編號 62020019061.4
[51] Int. Cl. A61K 47/02 (2006.01) A61K 47/30 (2006.01)
[22] Date of filing 提交日期 27.10.2020
A61K 9/14 (2006.01)

[54] FUNCTIONALIZED NANOPARTICLES AND METHODS OF MAKING AND USING SAME
官能化納米顆粒及其製備和使用方法

[30] Priority 優先權
19.05.2017 US 62/508,703
[43] Date of publication of application 申請發表日期
19.02.2021
[45] Date of publication of grant of patent 批予專利的發表日期
31.03.2023
[86] International application no. 國際申請編號
PCT/US2018/033755
[87] International publication no. and date 國際申請發表編號及日期
WO2018/213851 22.11.2018
CN Application no. & date 中國專利申請編號及日期
CN 201880047879.1 21.05.2018
CN Publication no. & date 中國專利申請發表編號及日期
CN 111182891 19.05.2020
Date of grant in designated patent office 指定專利當局批予專利日期
09.08.2022

[73] Proprietor 專利所有人
CORNELL UNIVERSITY
康奈爾大學
Suite 310, Center for Technology and Licensing at Cornell
University
395 Pine Tree Road, Ithaca, NY 14850
UNITED STATES OF AMERICA
[72] Inventor 發明人
MA, Kai K·馬
WIESNER, Ulrich, B. U·B·威斯納
[74] Agent and / or address for service 代理人及/或送達地址
JUN HE LAW OFFICES
Suite 3701-10, 37th Floor, Jardine House
1 Connaught Place, Central
HONG KONG



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111182891 B

(45) 授权公告日 2022.08.09

(21) 申请号 201880047879.1

(22) 申请日 2018.05.21

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111182891 A

(43) 申请公布日 2020.05.19

(30) 优先权数据
62/508,703 2017.05.19 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.01.17

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/033755 2018.05.21

(87) PCT国际申请的公布数据
W02018/213851 EN 2018.11.22

(73) 专利权人 康奈尔大学
地址 美国纽约州

(72) 发明人 K·马 U·B·威斯纳

(74) 专利代理机构 北京市君合律师事务所
11517
专利代理师 顾云峰 何箐

(51) Int.Cl.
A61K 47/02 (2006.01)
A61K 47/30 (2006.01)
A61K 9/14 (2006.01)

审查员 秦林燕

权利要求书1页 说明书39页 附图32页

(54) 发明名称

官能化纳米颗粒及其制备和使用方法

(57) 摘要

描述了一种通用的表面修饰方法用于,例如,以纳米颗粒(NP)表面上的各种类型的不同官能配体(官能团)以模块化和正交的方式官能化NP,例如,PEG化的纳米颗粒。它能够合成,例如,五官能的PEG化纳米颗粒,其将多种特性整合到单个NP中,所述多种特性例如荧光检测、特异性细胞靶向、放射性同位素螯合/标记、比率型pH传感和药物递送,同时整个NP尺寸保持为,例如,低于10nm。

1. 一种形成官能化聚乙二醇(PEG)化二氧化硅纳米颗粒的方法,所述方法包括:
通过插入修饰PEG化后表面(PPSMI)的步骤,其中所述PPSMI步骤包括将具有正交官能团的硅烷共价插入到纳米颗粒的PEG链之间和二氧化硅表面上,并且其中所述方法包括使用水性反应介质。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述纳米颗粒是PEG化的核或核-壳二氧化硅纳米颗粒。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述纳米颗粒是小于10 nm的PEG化的核或核-壳二氧化硅纳米颗粒。
4. 根据权利要求1所述的方法,其包括在所述纳米颗粒表面上用1到5种类型的不同官能配体对经过PPSMI步骤后的PEG化二氧化硅纳米颗粒进行模块化地和正交地官能化。
5. 根据权利要求1所述的方法,其包括在所述纳米颗粒表面上用2种类型的不同官能配体对经过PPSMI步骤后的PEG化二氧化硅纳米颗粒进行模块化地和正交地官能化。
6. 根据权利要求1所述的方法,其包括在所述纳米颗粒表面上用3、4或5种类型的不同官能配体对经过PPSMI步骤后的PEG化二氧化硅纳米颗粒进行模块化地和正交地官能化。
7. 根据权利要求4-6中任一项所述的方法,其中所述官能配体包含选自下组的反应性基团:胺基、硫醇基、NHS酯基、马来酰亚胺基、炔基、叠氮基和DBCO基。
8. 根据权利要求1所述的方法,其中除了10%或更高的极性非质子溶剂之外,所述水性反应介质不含有有机溶剂。
9. 根据权利要求1所述的方法,其中所述水性反应介质不含有5%或更高的醇。
10. 根据权利要求1所述的方法,其包括将水性反应混合物的pH调节至所需值或所需范围内。
11. 根据权利要求10所述的方法,其中调节所述水性反应混合物的pH包括添加碱。
12. 根据权利要求11所述的方法,其中所述碱是氢氧化铵。
13. 根据权利要求1所述的方法,其中所述纳米颗粒包含包封于其中的一种或多种荧光染料分子。
14. 根据权利要求1所述的方法,其中涉及PPSMI步骤的方法发生在纳米颗粒PEG化和纯化步骤之间。

官能化纳米颗粒及其制备和使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2017年5月19日提交的美国临时申请号62/508,703的优先权,其公开内容通过引用并入本申请。

[0003] 关于联邦资助研究的声明

[0004] 本发明是在美国国立卫生研究院授予的授权号为CA199081的政府支持下完成的。政府拥有本发明的某些权利。

发明领域

[0005] 本公开总体上涉及表面官能化的纳米颗粒及其制备和使用方法。更具体地,本公开涉及表面官能化的二氧化硅和铝硅酸盐纳米颗粒。

背景技术

[0006] 虽然,二氧化硅纳米颗粒(SNP)由于其较大的表面积、惰性和较高的生物相容性,在潜在的治疗/诊断应用方面颇具吸引力。但是,大多数SNP具有 $>10\text{nm}$ 的尺寸。

[0007] 大于 12nm 的颗粒无法从体内有效清除,并且还有不利的一点是分布于肝脏和其他器官/组织,从而潜在地使这些组织暴露于有毒元素之下(特别是如果这些大于 10nm 的SNP具有药物和/或放射性修饰时更是如此)。直径为约 8nm 的颗粒能在体内停留约1天, $10\text{-}11\text{nm}$ 的约3-5天,但是如果大于 12nm ,则不会被清除或清除得非常缓慢。

[0008] 目前,超小无机纳米颗粒作为用于癌症诊断治疗的纳米药物正迅速受到关注。由于具有多官能性和多价效应,某些有机纳米药物已经比常规化疗药物更具竞争力。无机纳米颗粒还使纳米药物的构建元素多样化,并可能具有一些优势,这些优势与其固有的物理特性和较低的制造成本相关。将纳米颗粒从实验室安全地转化到临床需要克服许多重大的科学和法规上的障碍。最重要的标准是良好的生物分布及其时间演变(药代动力学,PK)曲线。肾脏清除的尺寸阈值低于 10nm 。直到今天,仅合成了少数无机纳米颗粒平台,其具有小于 10nm 的尺寸,能允许实现有效的肾脏清除。在这其中只有被称为Cornell点或简称为C点的尺寸 $<10\text{nm}$ 的聚乙二醇包被的(PEG化)荧光核-壳二氧化硅纳米颗粒(SNP)获得了美国食品药品监督管理局(FDA)的批准,能作为研究型新药(IND)首次用于人体临床试验。虽然黑色素瘤患者的首个临床试验结果让人充满希望,但是对于这种尺寸小于 10nm 的荧光有机-无机杂化SNP来说,仍然存在一些合成方面的困难。

[0009] 首先,所有以前关于C点型SNP合成的努力都遵循改良的Stöber方法,这个方法将醇用作溶剂。然而,对于在生物学或临床应用中使用的材料,优选水作为反应介质。这将大大简化合成和清洁流程,减少挥发性废物,从而大大加快颗粒的生产并且使其更具成本效益。此外,虽然Stöber方法被广泛用于生产直径从数十纳米到微米级的SNP,但是由于醇中的反应动力学限制, 10nm 及以下的粒径处于该合成方法对尺寸控制的极限。

[0010] 其次,用PEG共价覆盖二氧化硅颗粒表面可能比较棘手,因为在PEG化的过程中表面电荷的损失可能会导致颗粒聚集或至少扩大粒径的分布。对于超小颗粒,由于颗粒表面

能的增加,这种效应更为明显,因此限制了颗粒的单分散性和尺寸控制能力。

[0011] 第三,由于在高于其等电点、pH 2-3时二氧化硅表面荷负电,因此在二氧化硅和荧光团之间的静电斥力的作用下,将带负电基团的硅烷缀合的有机荧光染料共价包封于SNP的效率很低。这对于活体组织中成像应用最需要的近红外(NIR)发射染料来说尤其如此。NIR染料具有较大的离域 π 电子体系,要溶于水通常需要在其外围形成多个带负电的官能团(例如硫酸盐)。这些染料的包封效率低是一个问题,因为它们的一般成本为\$200-\$300/毫克,并且在初始合成后对通常使用的硅烷-染料缀合物进行重新使用是比较困难的。

[0012] 最后,对于尺寸小于10nm的荧光SNP和核-壳SNP,除二氧化硅外,还没有报道过其他无机元素组合物。特别地,希望能找到能够导致有机染料环境具有更高的刚性的组合物,因为刚性的升高与非辐射率降低导致的每种染料荧光产量的增加直接相关。在这里,作为添加剂衍生自烷醇铝(aluminum alkoxides)的二氧化硅组合物特别令人感兴趣,因为它们已知是烷氧基硅烷衍生的二氧化硅中的硬化组分,并且氧化铝是批准的佐剂,可添加到肌肉内和皮下注射的大剂量(high-volume)疫苗中。

[0013] 这些困难表明,要重新研究原始的荧光核-壳SNP(C点)合成方法,以便系统地开发出一种水基方法,以产生<10nm的有机-无机杂化点,该有机-无机杂化点具有改进的尺寸控制、先前未知的组合物和增强的性能特征。

[0014] 发明概述

[0015] 本公开提供了纳米颗粒(例如,核或核-壳纳米颗粒)。本公开还提供了制备和使用所述纳米颗粒的方法。

[0016] 在一个方面,本公开提供了一种制备官能化纳米颗粒(例如,超小的官能化纳米颗粒)的方法。所述方法可包括通过插入修饰PEG化后表面(PPSMI)的方法,例如本文所述的(PPSMI)方法。

[0017] 所述方法以2至15nm(例如,2至10nm)的纳米颗粒(例如,具有例如最长维度的尺寸)与一种或多种包含至少一种反应性基团的官能化前体的反应为基础,所述纳米颗粒可以是尺寸小于10nm(例如,尺寸为2至9.99nm)的超小纳米颗粒,其包含多个聚乙二醇(PEG)基团,其中的一些或全部可以用一种或多种官能团或能够反应形成官能团的基团进行官能化,所述官能团与所述纳米颗粒(其可被称为PEG化的纳米颗粒)的表面共价结合。随后使所得的具有一种或多种反应性基团的纳米颗粒与官能团前体反应,所述反应性基团与所述纳米颗粒的表面共价结合,所述官能团前体能与反应性基团反应,从而产生具有一种或多种与纳米颗粒的表面共价结合的官能团的纳米颗粒。

[0018] 在一个方面,本公开提供了包含本公开所述纳米颗粒的组合物。所述组合物可以包含一种或多种类型(例如,具有不同的平均尺寸和/或一种或多种不同的组成特征)。所述组合物可以包含官能化的纳米颗粒,所述官能化的纳米颗粒具有位于NP表面上(例如,与NP表面共价结合)的1至5种(例如,1、2、3、4或5种)类型的不同官能配体。

[0019] 在一个方面,本公开提供了本公开所述纳米颗粒和组合物的用途。所述纳米颗粒所携带的配体(官能团)可以包括诊断性和/或治疗性试剂(例如药物)。因此,纳米颗粒或包含所述纳米颗粒的组合物用于递送(例如,治疗方法)和/或成像方法。

[0020] 附图简述

[0021] 为了更全面地理解本公开的本质和目的,应当结合附图来参考以下详细描述。

[0022] 图1显示了C'点合成系统的示意图,所述C'点合成系统引入了通过插入修饰PEG化后表面(PPSMI)的方法。可以通过以下任一方式实现用另外的官能配体对C'点进行表面修饰:(i)在PEG化步骤中将不同的异双官能PEG-硅烷共缩合,随后在PEG化后将官能配体共价附着于所述异双官能PEG上,或者(ii)在PEG化后的步骤(PPSMI)中,将具有官能团(例如,胺或硫醇)的硅烷共价插入PEG链之间和二氧化硅表面上。使用虚线显示每个反应步骤中的替代途径。对于不同的多官能C'点,反应途径的具体选择取决于应用需求。用黑色实线中的断点显示用于将SH-药物-c(RGDyC)-PEG-C'点转换为DF0-药物-c(RGDyC)-PEG-C'点的硫醇-烯反应(右下图)。右上角的插入图显示了五官能C'点的分子图,其合成途径以浅蓝色突出显示。这五种官能包括通过二氧化硅核内部的NIR荧光Cy5染料发出荧光,通过特定的c(RGDyC)肽靶向癌细胞,与一些PEG链附着的小型治疗性EFV药物,通过特定DF0螯合剂进行放射性同位素标记,以及通过第二种传感分子FITC染料的附着进行pH传感,后两者在PEG链之间进行。硅、氧、碳、氮、硫、氯和氟原子分别为紫色、红色、灰色、蓝色、黄色、绿色和浅绿色。为了方便观察,没有显示氢原子。

[0023] 图2显示了每一NP的c(RGDyC)肽数量升高的c(RGDyC)-PEG-Cy5.5-C'点。(A至C)使用标准C'点合成方案(A)合成的,或在c(RGDyC)-PEG-硅烷浓度升高的条件下(B)合成的,或在c(RGDyC)-PEG-硅烷和氢氧化铵的浓度同时升高的条件下(C)合成的c(RGDyC)-PEG-Cy5.5-C'点的GPC洗脱图。(D和E)纯化的c(RGDyC)-PEG-Cy5.5-C'点的GPC洗脱图(D)和FCS相关曲线(E),所述纯化的c(RGDyC)-PEG-Cy5.5-C'点平均含有58个c(RGDyC)肽/颗粒。(F)每种NP具有不同数量的cRGDY配体的c(RGDyC)-PEG-Cy5.5-C'点的UV-vis吸收光谱的比较,每种NP的cRGDY配体数量示于插图中。

[0024] 图3显示了对在PEG化过程中(左)或之后(右)用胺基官能化的c(RGDyC)-PEG-C'点的表征。(A和B)在四轮GPC纯化之前(A)和之后(B),c(RGDyC)-PEG-NH₂-Cy5-C'点的GPC洗脱图,其胺官能化在PEG化步骤中进行。(C)纯化的c(RGDyC)-PEG-NH₂-Cy5-C'点的FCS相关曲线和拟合。(D)在PEG化过程中具有(红色)和不具有(黑色)胺官能化的c(RGDyC)-PEG-Cy5-C'点的UV-vis光谱比较。(E和F)在纯化之前(E)和之后(F)NH₂-cRGDY-PEG-Cy5-C'点的GPC洗脱图,其胺官能化在PEG化之后进行。(G)纯化的NH₂-cRGDY-PEG-Cy5-C'点的FCS相关曲线和拟合。(H)在PEG化步骤之后具有(红色)和不具有(黑色)胺官能化的c(RGDyC)-PEG-Cy5-C'点的UV-vis光谱的比较。

[0025] 图4显示了用放射性同位素螯合剂对c(RGDyC)-PEG-C'点进行的基于PPSMI的表面官能化。(A和B)纯化之前(A)和之后(B)DF0-c(RGDyC)-PEG-Cy5-C'点的GPC洗脱图,对于所述DF0-c(RGDyC)-PEG-Cy5-C'点,通过进一步在一锅法NP合成过程中将DF0-NCS连接于PEG化后衍生的胺官能化的NH₂-cRGDY-PEG-Cy5-C'点来引入DF0配体。(C)纯化的DF0-c(RGDyC)-PEG-Cy5-C'点的FCS相关曲线和拟合。(D)使用两种不同的DF0-NCS浓度合成的纯化的DF0-c(RGDyC)-PEG-Cy5-C'点的UV-vis光谱的比较。(E和F)在纯化之前(E)和之后(F)DOTA-c(RGDyC)-PEG-Cy5-C'点的GPC洗脱图,对于所述DOTA-c(RGDyC)-PEG-Cy5-C'点,通过进一步在一锅法NP合成过程中将DOTA-NCS连接于PEG化后衍生的胺官能化的NH₂-c(RGDyC)-PEG-Cy5-C'点来引入DOTA配体。(G)纯化的DOTA-c(RGDyC)-PEG-Cy5-C'点的FCS相关曲线和拟合。(H)使用两种不同的DOTA-NCS浓度合成的纯化的DOTA-c(RGDyC)-PEG-Cy5-C'点的UV-vis光谱的比较。DF0-NCS和DOTA-NCS螯合剂的化学结构分别显示在(A)和(E)的

插图中。

[0026] 图5显示了在NP表面上含有三种类型官能配体的四官能C'点。(A)具有如插图中所示逐步增加的官能性的C'点的比较。(B和C)纯化的FITC-DF0-c(RGDyC)-PEG-C'点的GPC洗脱图(B)和FCS相关曲线与拟合(C)。(D和E)分别具有500nm(D)和650nm(E)激发波长的纯化的FITC-DF0-c(RGDyC)-PEG-C'点的发射光谱。(F)比率校准曲线,其通过将峰值传感发射强度(525nm)除以峰值参考发射强度(660nm),再对pH值作图得到。(A)中显示的UV-vis吸收光谱是在PBS缓冲溶液中针对所需的FITC信号测得的,用以估算每种NP的FITC染料数。

[0027] 图6显示了在NP表面含有四种类型官能配体的五官能C'点。(A至C)五官能的FITC-DF0-EFV-c(RGDyC)-PEG-Cy5-C'点的GPC洗脱图(A),FCS相关曲线(B)和UV-vis光谱及拟合(C)。EFV药物的化学结构在(A)中。(D至H)反卷积UV-vis光谱(C)至来自PEG-Cy5-C'点(D)、c(RGDyC)(E)、EFV(F)、DF0(G)和FITC(H)的贡献。所述反卷积(deconvolution)通过使用由每个单独组分组成的一组标准光谱(图12B至D,图15E和图17C)拟合UV-vis光谱(C)获得。

[0028] 图7显示了多官能C'点的命名法。以三官能DF0-c(RGDyC)-PEG-Cy5-C'点为例,其颗粒结构图插于左下角。

[0029] 图8显示了用不同NIR染料官能化的靶向癌症的c(RGDyC)-PEG-C'点。(A和B)对封装有Cy5.5染料的c(RGDyC)-PEG-Cy5.5-C'点纯化之前(A)和之后(B)的GPC洗脱图。(C)纯化的c(RGDyC)-PEG-Cy5.5-C'点的FCS相关曲线及拟合。(D)具有和不具有c(RGDyC)官能化的PEG-Cy5.5-C'点的UV-vis吸光度比较。(E和F)对封装有Cy5染料的c(RGDyC)-PEG-Cy5-C'点的NP纯化之前(E)和之后(F)的GPC洗脱图。(G)纯化的c(RGDyC)-PEG-Cy5-C'点的FCS相关曲线及拟合。(H)具有和不具有c(RGDyC)官能化的PEG-Cy5-C'点的UV-vis吸光度比较。(I和J)对封装有CW800染料的c(RGDyC)-PEG-CW800-C'点的NP纯化之前(I)和之后(J)的GPC洗脱图。(K)纯化的cRGDY-PEG-CW800-C'点的FCS相关曲线及拟合。(L)具有和不具有c(RGDyC)官能化的PEG-CW800-C'点的UV-vis吸光度比较。在大约655nm(D)、657nm(H)和795nm(L)处的不同吸收峰表明成功封装了不同类型的NIR染料。

[0030] 图9显示了对多官能的c(RGDyC)-mal-PEG-Cy5-C'点的表征,所述c(RGDyC)-mal-PEG-Cy5-C'点通过在NP的PEG化过程中引入mal-PEG-硅烷制得。(A和B)在纯化之前(A)和之后(B)的GPC洗脱图。虽然典型的C'点纯化是通过两个GPC循环进行的,但是对于c(RGDyC)-mal-PEG-Cy5-C'点,总共需要进行四个GPC循环才能获得所需的产物纯度(如(B)中所示)。(C)纯化的c(RGDyC)-mal-PEG-Cy5-C'点的代表性FCS相关曲线及拟合。(D)使用不同的mal-PEG-硅烷浓度合成的纯化的c(RGDyC)-mal-PEG-Cy5-C'点的UV-vis吸收光谱的比较。(D)中的插图显示了在较短波长处的吸收,其随着mal-PEG-硅烷浓度的升高而升高,这可以归因于NP的马来酰亚胺基团负载的增多。

[0031] 图10显示了对多官能的c(RGDyC)-DBC0-PEG-Cy5-C'点和c(RGDyC)-DF0-PEG-Cy5-C'点的表征,所述c(RGDyC)-DBC0-PEG-Cy5-C'点和c(RGDyC)-DF0-PEG-Cy5-C'点通过在NP的PEG化过程中引入DF0-硅烷和DBC0-PEG-硅烷制得。(A和B)在纯化c(RGDyC)-DBC0-PEG-Cy5-C'点之前(A)和之后(B)的GPC洗脱图,所述c(RGDyC)-DBC0-PEG-Cy5-C'点通过在PEG化过程中将DBC0-PEG-硅烷与c(RGDyC)-PEG-硅烷和PEG-硅烷共缩合而合成得到。(C)纯化的c(RGDyC)-DBC0-PEG-Cy5-C'点的代表性FCS相关曲线及拟合。(D)使用不同的DBC0-PEG-硅烷浓度合成的纯化的c(RGDyC)-DBC0-PEG-Cy5-C'点的UV-vis吸收光谱的比较。(E和F)在纯化

c (RGDyC) -DF0-PEG-Cy5-C' 点之前 (E) 和之后 (F) 的GPC洗脱图, 所述c (RGDyC) -DF0-PEG-Cy5-C' 点通过在PEG化过程中将DF0-硅烷与c (RGDyC) -PEG-硅烷和PEG-硅烷共缩合而合成得到。(G) 纯化的c (RGDyC) -DF0-PEG-Cy5-C' 点的代表性FCS相关曲线及拟合。(H) 使用不同的DF0-硅烷浓度合成的纯化的c (RGDyC) -DF0-PEG-Cy5-C' 点的UV-vis吸收光谱的比较。DBC0-硅烷和DF0-PEG-硅烷的化学结构分别示于 (A) 和 (E) 中的插图。虽然可以通过这种方法产生单分散的c (RGDyC) -DBC0-PEG-Cy5-C' 点和c (RGDyC) -DF0-PEG-Cy5-C' 点, 但由于有限的配体可及性和不想要的配体分布, 所得的NP表现出较弱的缀合活性。

[0032] 图11显示了通过使用各种方法进行了DF0官能化的c (RGDyC) -PEG-Cy5-C' 点的UV-vis吸收光谱的比较。当c (RGDyC) -PEG-Cy5-C' 点与DF0-硅烷缀合物混合时, 与未官能化的c (RGDyC) -PEG-Cy5-C' 点相比, 所得NP的吸收光谱没有实质性差异, 提示了较低的反应效率。另外, cRGDY肽带有一个伯胺基, 其可以潜在地与DF0-NCS反应。c (RGDyC) -PEG-Cy5-C' 点与DF0-NCS之间的合成反应产物的吸收光谱在245nm附近也没有表现出任何其他吸收特征, 表明这种DF0缀合的转化产率可忽略不计 (结果也表明c (RGDyC) 肽上的伯胺基团与DF0-NCS的反应性有限)。这些实验中每个C' 点的平均DF0基团数低于0.5。相比之下, 当将DF0-NCS与源自PEG化后用胺基-硅烷表面修饰反应的胺官能化NH₂-c (RGDyC) -PEG-Cy5-C' 点混合时, 最终的C' 点产物会表现出低于300nm的明显的吸光度, 表明存在显著的DF0附着, 其数量通过校准可以达到每个C' 点平均~20个DF0分子。这些数据表明, DF0-c (RGDyC) -PEG-Cy5-C' 点上的DF0基团主要通过PEG化后引入的胺基进行附着, 而不是附着于c (RGDyC) 肽上的伯胺基。

[0033] 图12显示了通过反卷积吸收光谱估算每种多官能C' 点的配体数量, 所述多官能C' 点的表面上含有多于一种类型的官能配体。(A) 具有逐步增加的官能的C' 点的UV-vis吸收光谱的比较, 在此基础上生成DF0-c (RGDyC) -PEG-Cy5-C' 点的每种组分的吸收光谱 (B到D)。通过从c (RGDyC) -PEG-Cy5-C' 点的吸收信号 (A中的绿色曲线) 减去PEG-Cy5-C' 点的吸收信号 (A/B中的红色曲线) 获得C' 点表面上c (RGDyC) 肽的吸收信号 (C中的绿色曲线)。通过从DF0-c (RGDyC) -PEG-Cy5-C' 点的吸收信号 (A中的蓝色曲线) 减去cRGDY-PEG-Cy5-C' 点的吸收信号 (A中的绿色曲线) 获得C' 点表面上DF0螯合剂的吸收信号 (D中的蓝色曲线)。随后, 将所得的c (RGDyC) 和DF0的光谱分别与游离c (RGDyC) 肽 (C中顶部绿色曲线) 和DF0-硅烷分子 (D中顶部蓝色曲线) 的吸收信号进行比较 (C和D), 以确认光谱的一致性。之所以使用缀合的DF0-硅烷代替DF0-NCS分子来与NP上的DF0进行比较, 是因为DF0-NCS与胺官能化的配体 (例如, 胺基-硅烷) 的缀合会导致吸收光谱发生巨大变化 (数据未显示)。因此, 与游离的DF0-NCS相比, DF0-硅烷的吸收值与C' 点上的DF0基团更加一致。将所得的PEG-Cy5-C' 点 (B)、C' 点上的c (RGDyC) (C中的下方绿色曲线) 和C' 点上的DF0 (D中的下方蓝色曲线) 标准光谱进行归一化, 然后将其用作标准来拟合其他DF0-c (RGDyC) -PEG-Cy5-C' 点样品的吸收光谱 (E)。拟合方程为不同组分的吸收强度的线性组合, 即 $F(A, B, C, D) = A * I_{\text{PEG-Cy5-C' 点}} + B * I_{\text{c (RGDyC)}} + C * I_{\text{DF0}} + D$, 其很好地描述了样品光谱 (E)。将参数D添加到拟合方程中, 以校正UV-vis设置的可能的基线偏移。拟合将样品光谱 (E) 反卷积至单个组分的贡献 (F至H), 根据其中通过使用Cy5游离染料、游离c (RGDyC) 肽和游离DF0-硅烷分子的消光系数, 分别估算每个NP的Cy5、c (RGDyC) 和DF0分子的数量为约1.6、23和4。虽然按照制造商的报告使用了Cy5的消光系数, 但是使用 (C) 和 (D) 中插入的结果, 分别对游离的c (RGDyC) 肽和游离的DF0-硅烷分子的消光

系数进行了单独的校准。

[0034] 图13显示了通过使用其他类型的缀合化学使PEG化后的表面修饰通用化(generalization)。(A至C)纯化的硫醇官能化SH-PEG-Cy5-C'点的GPC洗脱图(A),FCS相关曲线及拟合(B)和UV-vis吸收光谱(C),所述纯化的硫醇官能化SH-PEG-Cy5-C'点通过在NP PEG化之后但在纯化之前向PEG-Cy5-C'点的反应混合物中引入硫醇-硅烷合成得到。与不具有另外的硫醇官能化的NP相比,观察到在250nm以下吸收略有增加(C)。(D至F)纯化的FITC-PEG-Cy5-C'点的GPC洗脱图(D),FCS相关曲线及拟合(E)和UV-vis吸收光谱(F),所述纯化的FITC-PEG-Cy5-C'点通过进一步在加入硫醇-硅烷之后但在NP纯化之前向硫醇官能化的SH-PEG-Cy5-C'点的反应混合物中引入FITC-NCS染料合成得到。与使用不具有硫醇官能化的PEG-Cy5-C'点进行相同合成得到的产物相比,FITC-PEG-Cy5-C'点的吸收信号在约450nm波长处显著增加(F)。该信号对应于FITC染料在DI水中的吸收信号,这证实了FITC的成功附着以及SH-PEG-Cy5-C'点上硫醇基的可及性。请注意,在不具有硫醇官能化的样品中也观察到了较低的FITC信号,这很可能是由于FITC染料非特异性吸附到C'点上或由于Cy5染料硅烷缀合步骤中使用的过量硫醇-硅烷导致在标准C'点合成中产生残留硫醇基团所致。

[0035] 图14显示了胺官能化的多官能C'点的稳定性。在NP制造后的6个月时间点,纯化的NH₂-c(RGDyC)-PEG-Cy5-C'点(A)和DF0-c(RGDyC)-PEG-Cy5-C'点(B)的GPC洗脱图。在两种情况下,在稳定性测试过程中,NP均存储在4°C的PBS缓冲液中。NH₂-c(RGDyC)-PEG-Cy5-C'点的洗脱图(A)显示出较小的附加峰,其与较小的摩尔质量产物相关,表明NP降解可能是由二氧化硅表面上的伯胺基引起的。相比之下,DF0-c(RGDyC)-PEG-Cy5-C'点(B)在稳定性测试的整个过程中保持稳定。

[0036] 图15显示了对在NP表面上含有三种类型官能配体的多官能C'点的吸收光谱的反卷积。(A)FITC-DF0-c(RGDyC)-PEG-Cy5-C'点的UV-vis吸收光谱,其可以通过使用PEG-Cy5-C'点、c(RGDyC)、DF0和FITC的吸收信号的线性组合很好地拟合。该反卷积与图12中针对DF0-c(RGDyC)-PEG-Cy5-C'点描述的反卷积相似,但在分析中还包括FITC的UV-vis信号。根据拟合,将光谱(A)反卷积至来自PEG-Cy5-C'点(B)、c(RGDyC)(C)、DF0(D)和FITC(E)的贡献。根据拟合的这些贡献,估算每个NP的Cy5,c(RGDyC),DF0和FITC分子的数量分别为约1.7、23、19和4。

[0037] 图16显示了对四官能C'点的表征,所述四官能C'点通过正交表面官能化以及对吸收光谱的反卷积合成得到。(A至C)来自四官能FITC-DF0-c(RGDyC)-PEG-Cy5-C'点的反卷积的GPC洗脱图(A),FCS相关曲线及拟合(B),以及UV-vis光谱(C)及拟合,其中同时引入,而不是逐步连接FITC和DF0基团(与图15中的结果比较)。(D至G)将UV-vis光谱(C)反卷积至来自PEG-Cy5-C'点(D)、c(RGDyC)(E)、DF0(F)和FITC(G)的贡献。根据拟合中的这些贡献,估算每个NP的Cy5,c(RGDyC)、DF0和FITC分子的数量分别为约1.9、22、4和3。

[0038] 图17显示了用于制备五官能C'点的小型治疗药物的附着情况。(A)EFV和叠氮基-PEG-硫醇的缀合反应,从而用硫醇基官能化EFV药物分子。然后,在NP PEG化之后且在引入DF0和FITC之前,通过硫醇-烯反应使所得的EFV-PEG-硫醇分子与c(RGDyC)-mal-PEG-Cy5-C'点连接。(B)FITC-DF0-EFV-c(RGDyC)-PEG-Cy5-C'点和FITC-DF0-c(RGDyC)-mal-PEG-Cy5-C'点的UV-vis光谱比较。这两个样品获自添加或不添加EFV-PEG-硫醇的相同反应批次。(C)C'点上EFV的标准吸收光谱,其通过从FITC-DF0-EFV-c(RGDyC)-PEG-Cy5-C'点的吸

收值中减去FITC-DF0-c (RGDyC) -mal-PEG-Cy5-C' 点的吸收值得到。得到的光谱与游离EFV药物的UV-vis光谱一致,表明EFV成功地附着在C' 点上。游离EFV药物分子的消光系数的校准插在(C)图中。

[0039] 图18显示了对DBC0-PEG-Cy5-C' 点的表征。(A) 具有不同DBC0配体数的DBC0-PEG-Cy5-C' 点的UV-vis吸收光谱和反卷积拟合的比较。(B至G) 每种颗粒分别具有32 (B、D和F) 和64 (C、E和G) 个DBC0基团的DBC0-PEG-Cy5-C' 点的UV-vis吸光度反卷积 (B和C)、GPC洗脱图及拟合 (D和E)、以及FCS相关曲线及拟合 (G和G)。

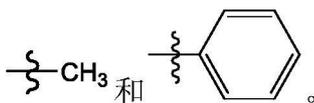
[0040] 图19显示了对DBC0-DF0-PEG-Cy5-C' 点的表征。(A) UV-vis吸收光谱及反卷积拟合。(B) UV-vis吸光度反卷积。(C) GPC洗脱图及拟合。(D) FCS相关曲线及拟合。

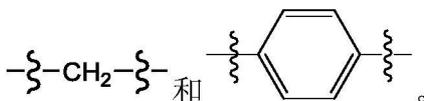
[0041] 发明详述

[0042] 本公开提供了纳米颗粒(例如,核或核-壳纳米颗粒)。在各种实例中,所述纳米颗粒为超小纳米颗粒。本公开还提供了制备和使用所述纳米颗粒的方法。

[0043] 除非另有说明,否则本文提供的所有范围包括落在小数点后十位范围内的所有值。

[0044] 除非另有说明,否则本文使用的术语“基团”在化学结构的上下文中使用时,是指具有可以与其他化学物质共价键合的一个或多个末端的化学实体。基团的非限制性说明性实例包括:

[0045]  基团的其他非限制性说明性实例包括:

[0046] 。

[0047] 除非另有说明,否则本文使用的术语“烷基”是指支链或非支链的饱和烃基。烷基的实例包括,但不限于,甲基、乙基、丙基、丁基、异丙基、叔丁基等。例如,烷基可以是C₁至C₈烷基,其包括所有整数碳原子数和其间碳原子数的范围(例如,C₁、C₂、C₃、C₄、C₅、C₆、C₇和C₈)。烷基可以是未取代的或者被一个或多个取代基取代。取代基的实例包括,但不限于,各种取代基,例如,卤素(-F、-Cl、-Br和-I)、脂肪族基团(例如烷基、烯基、炔基)、芳基、烷氧基、胺基、羧酸酯基、羧酸、醚基、醇基、炔基(例如,乙炔基)等,及其组合。

[0048] 本文公开的技术提供了超小官能性PEG化荧光二氧化硅纳米颗粒的水相合成方法,所述方法在多个方面对控制进行了改进,所述多个方面包括粒径、粒径分布、荧光波长、荧光亮度、组成、颗粒PEG化、颗粒表面官能化、合成产率、产品纯度和制造可靠性。以前从未实现在单个有机-无机杂化纳米材料合成系统中涵盖这些方面的系统性的精确控制,从而阻止了有机-无机杂化纳米材料从实验室到临床的安全转化。因此,本文公开的技术提供了获得定义明确的并且在系统水平可以进行调节的基于二氧化硅的纳米材料的途径,这些材料在纳米医学应用中显示出巨大的潜力。

[0049] 本文公开了一种通用的表面修饰方法,以例如模块化地以及正交地官能化纳米颗粒(例如,康奈尔素点(Cornell prime dots)(C' 点),其可以是例如,在NP表面上具有一到五种(例如1、2、3、4或5种)不同官能配体的本公开所述纳米颗粒(例如,超小的10nm以下的PEG化核或核壳二氧化硅或铝硅纳米颗粒))。所述表面修饰方法利用位于纳米颗粒表面上

的PEG基团中的间隙和通过使用,例如,可以用各种官能配体官能化的胺和/或硫醇官能化的硅烷分子进行插入的锚定基团。

[0050] 在一个实例中,所述修饰方法提供了五官能纳米颗粒(例如C'点)的合成,所述合成将多种特性整合到单个NP中,同时整个NP尺寸保持为,例如,低于10nm(例如,低于8nm或低于7nm),所述多种特性例如,荧光检测、特异性细胞靶向、放射性同位素螯合/标记、比率型pH传感、药物递送或其组合。这是通过利用C'点的PEG层可被小分子穿透这一事实来实现的。

[0051] 例如,可以将胺和/或硫醇官能化的硅烷分子插入PEG链之间和纳米颗粒(例如,C'点)的二氧化硅表面上,随后可以将另外的官能配体连接至所述胺和/或硫醇官能化的硅烷分子。这种通过插入修饰PEG化后表面(PPSMI)的方法仅需在一锅型水基合成中在纳米颗粒(例如,C'点)的PEG化和纯化之间夹几个另外的步骤,同时不会减少高质量NP的产生。所得的具有另外官能性的纳米颗粒(例如C'点)显示出物理化学性质,比如其大小和PEG密度接近于临床转化的纳米颗粒(例如C点),从而为其临床应用的多元化打开了大门。纳米颗粒合成(例如,C'点合成)的修饰使得,例如,每种颗粒具有大量的靶向肽,以及简便且通用的光谱方法通过将吸收光谱反卷积至单个组分来定量地评估不同表面配体的具体数量。

[0052] 在一个方面,本公开提供了一种制备官能化的纳米颗粒(例如,超小的官能化的纳米颗粒)的方法。所述方法可包括PPSM方法,例如,本文所述的PPSMI方法。所述方法基于水性反应介质(例如水)的使用。在一个实例中,本公开所述的一种或多种纳米颗粒(例如,组合物的纳米颗粒)通过本公开所述方法制得。

[0053] 所述方法以2至15nm(例如2至10nm)的纳米颗粒(例如,具有例如最长维度的尺寸)与一种或多种包含至少一种反应性基团的官能化前体的反应为基础,所述纳米颗粒可以是尺寸小于10nm(例如,尺寸为2至9.99nm)的超小纳米颗粒,其包含多个聚乙二醇(PEG)基团,其中的一些或全部可以用一种或多种官能团或能够反应形成官能团的基团进行官能化,所述PEG基团与所述纳米颗粒的表面共价结合(其可被称为PEG化的纳米颗粒)。使所得的具有一种或多种反应性基团的纳米颗粒与官能团前体反应,从而产生具有一种或多种与纳米颗粒的表面共价结合的官能团的纳米颗粒,所述反应性基团与所述纳米颗粒的表面共价结合,所述官能团前体能与反应性基团反应。

[0054] 所述方法可以是“一锅法”反应。所述方法还可以包括单独的反应。所述单独的反应可以具有含相同或不同反应物的反应混合物(例如,纳米颗粒、官能化前体、官能团前体、溶剂等、及其各种组合)。所述纳米颗粒可以在任何单独反应之间分离。

[0055] 在一个实例中,使PEG化的纳米颗粒与一种或多种官能化前体以及一种或多种官能团前体反应。所述反应可以以任何顺序进行,只要首先使所述纳米颗粒与至少一种官能化前体反应即可。例如,使具有单一类型的反应性基团的纳米颗粒与一种或多种官能团前体反应。在另一个实例中,使具有两种或更多种在结构和/或化学上不同的反应性基团(例如,2、3、4或5种在结构和/或化学上不同的反应性基团)的纳米颗粒与两种或更多种不同的官能团前体反应(例如,2、3、4或5种在结构和/或化学上不同的官能团前体),其中所述各个反应性基团/官能团前体可能具有正交反应性。

[0056] 可以使用各种缀合化学/反应来将官能团共价连接到纳米颗粒的表面。因此,官能化前体可包含各种反应性基团。许多合适的缀合化学和反应是本领域已知的。在各种实例

中,反应性基团是本领域已知的在特定缀合化学或反应中反应的反应性基团,并且所述官能团前体包含本领域已知的特定缀合化学/反应的互补基团。

[0057] 官能化前体包含一种或多种反应性基团和可以与纳米颗粒的表面反应以形成共价键的基团(例如,硅烷基)。反应性基团可以与官能团前体反应形成与所述纳米颗粒表面共价结合的官能团。反应性基团的非限制性实例包括胺基、硫醇基、羧酸基、羧酸酯基、酯基(例如活化的酯基)、马来酰亚胺基、烯丙基、末端炔基、叠氮基、硫氰酸酯基,及其组合。官能化前体的实例是本领域已知的,并且是可商购的,或者可以使用本领域已知的方法制得。

[0058] 在各种实例中,官能化前体包含硅烷基团和至少一种反应性基团(例如1、2或3种反应性基团),所述硅烷基团包含一种或多种-Si-OH基团(例如1、2或3种Si-OH基团)。硅烷基团和反应性基团可以通过连接基团共价连接,所述连接基团例如,烷基(例如,C₁、C₂、C₃、C₄、C₅、C₆、C₇或C₈烷基)。不受任何特定理论的束缚,认为官能化前体的Si-OH基团能与纳米颗粒的表面羟基基团(例如,表面Si-OH基团)反应。

[0059] 可以使一种纳米颗粒或多种纳米颗粒反应以形成各种数量的反应性基团和/或官能团。例如,使一种纳米颗粒或多种纳米颗粒反应以形成1至100个反应性基团和/或官能团,包括所有整数个反应性基团和它们之间的范围(例如,使多种纳米颗粒反应,使得对于多种纳米颗粒中的每一种纳米颗粒,形成平均1到100个基团和/或官能团,包括所有整数个反应性基团和它们之间的范围),所述反应性基团和/或官能团与所述一种纳米颗粒或多种纳米颗粒的表面共价结合。在各种实例中,使一种纳米颗粒或多种纳米颗粒反应以形成20至100、25至100、30至100、35至100、40至100或50至100个基团和/或官能团(例如,可以使多种纳米颗粒反应以形成平均20至100、25至100、30至100、35至100、40至100或50至100个基团和/或官能团,所述基团和/或官能团与每个所述纳米颗粒的表面共价结合。确定反应条件(例如,反应物浓度、反应时间、反应温度等、或其组合)以形成所需数量的基团和/或官能团是在本领域技术人员的能力范围内的。

[0060] 官能团前体可以与纳米颗粒的反应性基团反应,以形成与所述纳米颗粒的表面共价结合的官能团。官能团前体包含官能团(例如,染料基团、螯合基团、靶向基团、药物基团、放射性标记/同位素基团等,其可以衍生自染料分子、螯合剂分子、靶向分子等)和能够与纳米颗粒的反应性基团反应的基团。与反应性基团反应的基团的非限制性实例包括胺基、硫醇基、羧酸基、羧酸酯基、酯基(例如活化的酯基)、马来酰亚胺基、烯丙基、末端炔基、叠氮基、硫氰酸酯基及其组合。在各种实例中,官能团前体包含本领域已知的在特定缀合化学或反应中反应的一种或多种基团(例如,所述官能团前体包含本领域已知的在特定缀合化学/反应(如点击化学)中与纳米颗粒的反应性基团(例如,末端炔基)互补的一种或多种基团(例如,叠氮基))。官能团前体的实例是本领域已知的,并且可以商购获得,或者可以使用本领域已知的方法制得。

[0061] 各种官能团在本领域是已知的。官能团在本文中也被称为配体。官能团具有多种官能性(例如,吸收/发射行为,例如荧光和磷光,其可用于成像,传感官能性(例如,pH传感、离子传感、氧传感、生物分子传感、温度传感等),螯合能力,靶向能力(例如抗体片段、适配体、蛋白质/肽(天然的、截短的或合成的),核酸(如DNA和RNA等)),诊断能力(例如,放射性同位素),治疗能力(例如,药物、核酸等)等,及其组合。官能团可以具有成像和治疗官能性。官能团可以由表现出官能性的化合物形成,这通过使用本领域已知的缀合化学和反应使所

述化合物衍生化而完成。

[0062] 由纳米颗粒携带的官能团可以包括诊断和/或治疗剂(例如,放射性同位素、药物、核酸等)。纳米颗粒可以包含不同官能团的组合。

[0063] 治疗剂(可以是药物)的非限制性实例包括,但不限于,化学治疗剂、抗生素、抗真菌剂、抗寄生虫剂、抗病毒剂,及其组合,以及其衍生基团。合适的药物/试剂的实例是本领域已知的。

[0064] 纳米颗粒可以包含各种染料(例如,由各种染料形成的官能团)。在各种实例中,染料为有机染料。在一个实例中,染料不包含金属原子。染料的非限制性实例包括荧光染料(例如,近红外(NIR)染料)、磷光染料、非荧光染料(例如,显示出小于1%的荧光量子产率的非荧光染料)、荧光蛋白(例如,EBFP2(蓝色荧光蛋白的变体)、mCFP(青色荧光蛋白)、GFP(绿色荧光蛋白)、mCherry(红色荧光蛋白的变体)、iRFP720(近红外荧光蛋白))等,及其衍生基团。在各种实例中,染料吸收于电磁谱的UV可见部分。在各种实例中,染料在电磁谱的近红外部分(例如650-900nm)具有激发和/或发射。

[0065] 有机染料的非限制性实例包括花青染料(例如,Cy5[®]、Cy3[®]、Cy5.5[®]、Cy7[®]等),碳硼丹明(carborhodamine)染料(例如,ATTO 647N(可从ATTO-TEC和SigmaAldrich[®]获得),BODIPY染料(例如,BODIPY 650/665等),氧杂蒽(xanthene)染料(例如,荧光素染料如异硫氰酸荧光素(FITC),玫瑰红等),曙红(例如曙红Y等)和罗丹明(例如TAMRA,四甲基罗丹明(TMR)、TRITC、DyLight[®] 633、Alexa 633、HiLyte 594等),Dyomics[®] DY800、Dyomics[®] DY782和IRDye[®] 800CW等,以及其衍生基团。

[0066] 纳米颗粒可以包含各种传感基团。传感基团的非限制性实例包括pH传感基团、离子传感基团、氧传感基团、生物分子传感基团、温度传感基团等。合适的传感化合物/基团的实例是本领域已知的。

[0067] 纳米颗粒可以包含各种螯合基团。螯合基团的非限制性实例包括去铁胺(DFO)、1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)、1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸(NOTA)、乙二胺四乙酸(EDTA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)、卟啉等,以及其衍生基团。螯合基团可包含放射性同位素。放射性同位素的实例在本文中有描述并且是本领域已知的。

[0068] 放射性同位素可以是官能团。放射性同位素可以是诊断剂和/或治疗剂。例如,将放射性同位素,例如¹²⁴I,用于正电子发射断层扫描(PET)。放射性同位素的非限制性实例包括¹²⁴I、¹³¹I、²²⁵Ac、¹⁷⁷Lu等。放射性同位素可被螯合至螯合基团。

[0069] 靶向基团也可以缀合至纳米颗粒以允许靶向递送一种纳米颗粒或多种纳米颗粒。靶向基团可以由靶向分子形成(衍生自靶向分子)。例如,将能够结合与特定细胞类型相关的细胞组分(例如,在细胞膜上或在细胞内隔室中)的靶向基团与纳米颗粒缀合。靶向基团可以是肿瘤标志物或信号传导通路中的分子。靶向基团可以对某些细胞类型(例如肿瘤细胞)具有特异性结合亲和力。在某些实例中,靶向基团可用于将纳米颗粒引导至特定区域,例如肝脏、脾脏、脑等。成像可用于确定纳米颗粒在个体中的位置。靶向基团的实例包括,但不限于,线性和环状肽(例如,靶向 $\alpha_v\beta_3$ 整联蛋白的环状(精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-酪氨酸-半胱氨酸)肽、c(RGDyC)等)、抗体片段、各种DNA和RNA片段(例如,siRNA)。

[0070] 除非另有说明,否则本文使用的术语“衍生”是指通过化合物的天然官能团的反应

形成基团(例如,通过化合物的胺与羧酸的反应形成基团)或对化合物进行化学修饰,以在所述化合物上引入新的化学反应性基团,所述新的化学反应性基团反应形成基团。

[0071] 本文所述的方法可以线性放大,例如,从10ml反应到1000ml或更大,而产物质量没有任何实质性改变。这种可放大性对于大规模制造纳米颗粒很重要。

[0072] 所述方法可以在水性反应介质(例如水)中进行。例如,水性介质包含水。将某些反应物以极性非质子溶剂(例如DMSO或DMF)中的溶液的形式添加到各种反应混合物中。在各种实例中,除了10%或更高、20%或更高、或30%或更高的极性非质子溶剂之外,水性介质不含有有机溶剂(例如,醇,如C₁至C₆醇)。在一个实例中,水性介质不含有1%或更高、2%或更高、3%或更高、4%或更高、或5%或更高的醇。在一个实例中,水性介质不含有任何可检测到的醇。例如,本文公开的任何方法的任何步骤的反应介质基本上由水以及,任选地,极性非质子溶剂组成。

[0073] 在方法的各个点上,可以将pH调节至所需值或所需范围内。可以通过添加碱来提升反应混合物的pH。合适的碱的非限制性实例包括氢氧化铵。

[0074] 可以使用各种纳米颗粒。纳米颗粒的非限制性实例包括二氧化硅纳米颗粒和硅铝酸盐纳米颗粒。纳米颗粒可以是核-壳纳米颗粒。纳米颗粒用聚乙二醇基团进行了表面官能化(例如,PEG化),其中一些或全部可以用一种或多种官能团或能够反应形成官能团的基团进行官能化。纳米颗粒可以包含PEG基团,所述PEG基团具有能够反应形成官能团的基团。这些纳米颗粒可以用一种或多种官能团进行官能化。例如,使官能化配体(官能团前体)与PEG基团的反应性基团反应。用于在纳米颗粒合成后对PEG基团进行官能化的合适的反应化学和条件的实例是本领域已知的。合适的纳米颗粒及制备此类纳米颗粒的方法公开在2017年11月2日提交的美国专利申请号15/571,420中,所述申请有关此类纳米颗粒和方法的公开内容通过引用并入本文。

[0075] 例如,一种制备用聚乙二醇基团进行了表面官能化(即PEG化)的纳米颗粒或核-壳纳米颗粒表面的方法,所述方法包括:a)在室温(例如,15°C至25°C,视位置而定)下形成反应混合物,所述反应混合物包含水和TMOS(形成二氧化硅核的单体)(例如,浓度为11mM至270mM),其中所述反应混合物的pH(其可以使用碱例如氢氧化铵进行调节)为6至9(其导致形成核前体纳米颗粒,所述核前体纳米颗粒具有例如1nm至2nm的平均尺寸(例如最长维度));b) i)保持反应混合物在时间(t¹)和温度(T¹)下(例如在室温至95°C(T¹)下,(t¹)为0.5天至7天),从而形成具有2至15nm平均尺寸(例如最长维度)的纳米颗粒(核纳米颗粒),或ii)如有必要,将反应混合物冷却至室温,并向来自a)的反应混合物中添加壳形成单体(除TMOS以外,还有例如,原硅酸四乙酯,如TEOS或TPOS)(进行所述添加以使得壳形成单体的浓度低于二次成核的阈值),从而形成具有2至50nm(例如2至15nm)平均尺寸(例如最长维度)的核-壳纳米颗粒;c)如有必要,将反应混合物的pH调节至pH为6至10,所述反应混合物包含来自b) i)或b) ii)的核纳米颗粒或核-壳纳米颗粒;和d)任选地,在室温下向包含来自b) i)或b) ii)的核纳米颗粒或核-壳纳米颗粒的反应混合物中分别添加PEG-硅烷缀合物(其包含与硅烷基团共价结合的PEG基团)(例如,浓度为10mM至60mM)(例如,溶解在极性非质子溶剂如DMSO或DMF中的PEG-硅烷缀合物)(以此来对核纳米颗粒或核-壳纳米颗粒进行PEG化),并保持所得的反应混合物在时间(t²)和温度(T²)下(例如,在室温(T²)下,(t²)为0.5分钟至24小时)(从而PEG-硅烷缀合物分子的至少一部分被吸附在来自b)的核纳米颗粒或核-壳纳米

颗粒的至少一部分表面上);e)在时间(t^3)和温度(T^3)下加热来自d)的混合物(例如在40°C至100°C(T^3)下, (t^3)为1小时至24小时),从而形成被聚乙二醇基团官能化的纳米颗粒表面或者被聚乙二醇基团官能化的核-壳纳米颗粒表面。

[0076] 可以对纳米颗粒进行合成后的处理步骤。例如,在合成之后(例如,在以上实例中的e)之后),将溶液冷却至室温,然后转移至透析膜管(例如,截留分子量为10,000的透析膜管,其可以商购得到(例如,从Pierce商购))。将透析管中的溶液在DI水中透析(水的体积是反应体积的200倍,例如,对于10ml的反应,使用2000ml水),并且每天都更换水,共1至6天,以洗去剩余的试剂,例如氢氧化铵和游离的硅烷分子。然后将颗粒通过200nm针筒式过滤器(品牌为fisher)过滤,以除去聚集体或粉尘。如有必要,可以将包括凝胶渗透色谱法和高效液相色谱法在内的另外的纯化方法应用于纳米颗粒,以进一步确保合成颗粒的高度纯化(例如,具有1%或更少的未反应试剂或聚集体)。在任何纯化过程之后,如果在另外的方法中使用其他溶剂,则可以将纯化的纳米颗粒转移回去离子水中。

[0077] 核可以是硅核。用于硅核形成的反应混合物可以包含TMOS作为唯一的硅核形成单体。

[0078] 核可以是硅铝酸盐核。用于铝硅酸盐核形成的反应混合物可包含TMOS作为唯一的硅核形成单体以及一种或多种氧化铝核形成单体(例如,烷醇铝如三仲丁醇铝或烷醇铝的组合)。

[0079] 对于合成硅铝酸盐核的情况,在添加形成氧化铝核的单体之前,将反应混合物的pH调节至pH为1至2。在形成硅铝酸盐核之后,将溶液的pH调节至pH为7至9,并任选地,在将反应混合物的pH调节至pH为7至9之前,将分子量在100和1,000g/mol之间(包括所有整数值和其间的范围)的PEG以10mM至75mM的浓度(包括所有整数mM值和其间的范围)加入到反应混合物中。

[0080] 用于形成核纳米颗粒的反应混合物还可以包含染料前体。在这种情况下,所得的核或核-壳纳米颗粒具有被包封或并入其中的一种或多种染料分子。例如,核纳米颗粒具有包封于其中的1、2、3、4、5、6或7种染料分子。可以使用染料前体的混合物。染料前体是与硅烷缀合的染料。例如,具有马来酰亚胺官能性的染料与硫醇官能化的硅烷缀合。在另一个实例中,具有NHS酯官能性的染料与胺官能化的硅烷缀合。合适的硅烷和缀合化学的实例是本领域已知的。该染料可以具有400nm(蓝色)至800nm(近红外)的发射(例如荧光)波长。例如,染料为NIR染料。合适的染料的实例在本文中有描述。在各种实例中,用聚乙二醇基团官能化的纳米颗粒表面或用聚乙二醇基团官能化的核-壳纳米颗粒表面具有包封于其中的一种或多种荧光染料分子。

[0081] 可以在核纳米颗粒上形成二氧化硅壳。例如,在形成核之后形成二氧化硅壳。形成二氧化硅壳的前体的实例包括正硅酸四烷基酯,例如TEOS和TPOS。可以使用形成二氧化硅壳的前体的混合物。TMOS不是形成二氧化硅壳的前体。可以将形成二氧化硅壳的前体以在极性非质子溶剂中的溶液的形式添加到反应混合物中。合适的极性非质子溶剂的实例包括DMSO和DMF。

[0082] 需要以分开的等分试样形式添加形成二氧化硅壳的前体。例如,以分开的等分试样形式(例如40至500个等分试样)添加形成壳的单体。该等分试样可以包括一种或多种形成壳的前体(例如TEOS和/或TPOS)和极性非质子溶剂如DMSO。每个等分试样可以具有1至20

微摩尔的形成壳的单体。等分试样添加之间的间隔可以为1至60分钟,包括所有整数分钟值和其间的范围。反应混合物的pH可以在二氧化硅壳形成的过程中变化。需要调节pH以保持pH为7-8。

[0083] 在形成核或核-壳纳米颗粒之后,可以使核或核-壳纳米颗粒与一种或多种PEG-硅烷缀合物反应。可以将各种PEG-硅烷缀合物一起添加或按各种顺序进行添加。该过程在本文中也被称为PEG化。PEG-硅烷的转化百分比在5%至40%之间,并且聚乙二醇表面密度为1.3至2.1个聚乙二醇分子/nm²。配体官能化的PEG-硅烷的转化百分比为40%至100%,并且与每个颗粒反应的配体官能化的PEG-硅烷前体的数量为3至90。

[0084] 可以以不同的时间在不同的温度下进行PEG化。例如,对于二氧化硅核或核-壳纳米颗粒,可通过使纳米颗粒在室温下接触0.5分钟至24小时(例如过夜)来进行PEG化。例如,对于氧化铝-硅酸盐纳米颗粒(例如,氧化铝-硅酸盐核纳米颗粒或二氧化硅核二氧化硅壳纳米颗粒),温度为80℃过夜。

[0085] 可以将PEG-硅烷的PEG基团的链长(即PEG基团的分子量)调整为3至24个乙二醇单体(例如3至6、3至9、6至9、8至12或8至24个乙二醇单体)。可以对PEG-硅烷的PEG链长进行选择,以调整围绕颗粒的PEG层的厚度和PEG化颗粒的药物动力学曲线。可以使用配体官能化的PEG-硅烷的PEG链长来调整颗粒的PEG层表面上配体基团的可及性,从而改变结合和靶向性能。

[0086] PEG-硅烷缀合物可以包含配体。所述配体与PEG-硅烷缀合物的PEG基团共价结合(例如,经由PEG-硅烷缀合物的羟基末端共价结合)。配体可以与PEG基团的末端缀合,所述末端和与硅烷基团缀合的末端相对。可以使用异双官能PEG化合物(例如,马来酰亚胺官能化的异双官能PEG,NHS酯官能化的异双官能PEG,胺官能化的异双官能PEG,硫醇官能化的异双官能PEG等)形成PEG-硅烷缀合物。合适的配体(官能团)的实例在本文中有描述。

[0087] 例如,除了PEG-硅烷之外(例如,上述实例d)中所述),还添加包含配体的PEG-硅烷缀合物。在这种情况下,形成纳米颗粒表面或核-壳纳米颗粒表面,所述纳米颗粒表面用聚乙二醇基团和包含配体的聚乙二醇基团进行了官能化,所述核-壳纳米颗粒表面用聚乙二醇基团和包含配体的聚乙二醇基团进行了官能化。配体官能化的或反应性基团官能化的PEG-硅烷的转化百分比为40%至100%,并且与每个颗粒反应的配体官能化的PEG-硅烷前体的数量为3至600。

[0088] 例如,在添加PEG-硅烷缀合物(例如,上述实例d)中所述)之前或之后(例如,在之前或之后的20秒至5分钟),在室温下向包含核纳米颗粒或核-壳纳米颗粒(例如,分别来自上述实例b i)或b ii))的反应混合物中添加包含配体的PEG-硅烷缀合物(例如,浓度在0.05mM至2.5mM之间)。将所得到的反应混合物保持在时间(t^4)和温度(T^4)下(例如在室温(T^4)下, t^4 为0.5分钟至24小时),其中PEG-硅烷缀合分子的至少一部分被吸附在核纳米颗粒或核-壳纳米颗粒(例如,来自上述实例中的b))的至少一部分表面上。随后,在时间(t^5)和温度(T^5)下加热反应混合物(例如在40℃至100℃(T^5)下, t^5 为1小时至24小时),其中形成纳米颗粒表面或核-壳纳米颗粒表面,所述纳米颗粒表面用包含配体的聚乙二醇基团进行了官能化,所述核-壳纳米颗粒表面用包含配体的聚乙二醇基团进行了官能化。任选地,随后在室温下向所得的反应混合物中添加PEG-硅烷缀合物(PEG-硅烷无配体的浓度在10mM至75mM之间)(例如,溶解在极性非质子溶剂如DMSO或DMF中的PEG-硅烷缀合物),所述反应

混合物包含纳米颗粒表面或核-壳纳米颗粒表面,所述纳米颗粒表面用包含配体的聚乙二醇基团进行了官能化,所述核-壳纳米颗粒表面用包含配体的聚乙二醇基团进行了官能化,保持所得反应混合物在时间(t^6)和温度(T^6)下(例如室温(T^6)下, (t^6)为0.5分钟至24小时)(从而PEG-硅烷缀合分子的至少一部分被吸附在纳米颗粒表面的至少一部分表面上或核-壳纳米颗粒表面的至少一部分上,所述纳米颗粒表面用包含配体的聚乙二醇基团进行了官能化,所述核-壳纳米颗粒表面用包含配体的聚乙二醇基团进行了官能化),并在时间(t^7)和温度(T^7)下加热所得的混合物(例如在40°C至100°C(T^7)下, (t^7)为1小时至24小时),从而形成纳米颗粒表面或核-壳纳米颗粒表面,所述纳米颗粒表面用聚乙二醇基团和包含配体的聚乙二醇基团进行了官能化,所述核-壳纳米颗粒表面用聚乙二醇基团和包含配体的聚乙二醇基团进行了官能化。

[0089] 在另一个实例中,PEG-硅烷的至少一部分或全部在PEG基团的末端上具有反应性基团,所述PEG基团的末端与缀合至PEG-硅烷缀合物的硅烷基团的末端相对(从异双官能化的PEG化合物形成),并且是在在形成纳米颗粒表面或核-壳纳米颗粒表面之后,所述纳米颗粒表面用具有反应性基团的聚乙二醇基团和任选的聚乙二醇基团进行了官能化,所述核-壳纳米颗粒表面用具有反应性基团的聚乙二醇基团进行了官能化。任选地,使聚乙二醇基团与用第二反应性基团(所述第二反应性基团可以与纳米颗粒表面或核-壳纳米颗粒表面的反应性基团相同或不同,所述纳米颗粒表面用聚乙二醇基团和包含配体的聚乙二醇基团进行了官能化,所述核-壳纳米颗粒表面用聚乙二醇基团和包含配体的聚乙二醇基团进行了官能化)官能化的第二配体(所述第二配体可以与纳米颗粒表面或核-壳纳米颗粒表面的配体相同或不同,所述纳米颗粒表面用聚乙二醇基团和包含配体的聚乙二醇基团进行了官能化,所述核-壳纳米颗粒表面用聚乙二醇基团和包含配体的聚乙二醇基团进行了官能化)反应,从而形成用被第二配体官能化的聚乙二醇基团以及任选的聚乙二醇基团进行了官能化的纳米颗粒表面,用被第二配体和聚乙二醇基团官能化的聚乙二醇基团以及任选地聚乙二醇基团进行了官能化的核-壳纳米颗粒表面。

[0090] 在另一个实例中,PEG-硅烷的至少一部分或全部在PEG基团的末端上具有反应性基团,所述PEG基团的末端与缀合至PEG-硅烷缀合物的硅烷基团的末端相对(从异双官能化的PEG化合物形成),并且在纳米颗粒表面或核-壳纳米颗粒表面形成之后(所述纳米颗粒表面用任选的具有反应性基团的聚乙二醇基团以及任选的聚乙二醇基团进行了官能化,所述核-壳纳米颗粒表面用具有反应性基团的聚乙二醇基团以及任选的聚乙二醇基团进行了官能化),与被第二反应性基团(所述第二反应性基团可以与纳米颗粒表面或核-壳纳米颗粒表面的反应性基团相同或不同,所述纳米颗粒表面用聚乙二醇基团和包含配体的聚乙二醇基团进行了官能化,所述核-壳纳米颗粒表面用聚乙二醇基团和包含配体的聚乙二醇基团进行了官能化)官能化的第二配体反应(所述第二配体可以与纳米颗粒表面或核-壳纳米颗粒表面的配体相同或不同,所述纳米颗粒表面用聚乙二醇基团和包含配体的聚乙二醇基团进行了官能化,所述核-壳纳米颗粒表面用聚乙二醇基团和包含配体的聚乙二醇基团进行了官能化),从而形成纳米颗粒表面或核-壳纳米颗粒表面,所述纳米颗粒表面用被第二配体官能化的聚乙二醇基团和任选的聚乙二醇基团进行了表面官能化,所述核-壳纳米颗粒表面用被第二配体官能化的聚乙二醇基团和聚乙二醇基团进行了官能化,和任选的用聚乙二醇基团进行了官能化,其中至少一部分PEG-硅烷的PEG基团的末端上具有反应性基团,所

述PEG基团的末端与缀合至PEG-硅烷缀合物的硅烷基团的末端相对(从异双官能PEG化合物形成),并且在下述纳米颗粒表面或核-壳纳米颗粒表面形成后:被具有反应性基团的聚乙二醇基团官能化的纳米颗粒表面,被具有反应性基团的聚乙二醇基团官能化的核-壳纳米颗粒表面,被具有反应性基团的聚乙二醇基团和包含配体的聚乙二醇基团官能化的纳米颗粒表面,或被具有反应性基团的聚乙二醇基团和包含配体的聚乙二醇基团官能化的核-壳纳米颗粒表面,使所述反应基团与被反应性基团官能化的第二配体反应(所述第二配体可以与纳米颗粒表面或核-壳纳米颗粒表面的配体相同或不同,所述纳米颗粒表面用聚乙二醇基团和包含配体的聚乙二醇基团进行了官能化,所述核-壳纳米颗粒表面用聚乙二醇基团和包含配体的聚乙二醇基团进行了官能化),从而形成用聚乙二醇基团和被第二配体官能化的聚乙二醇基团官能化的纳米颗粒表面,用聚乙二醇基团和被第二配体官能化的聚乙二醇基团官能化的核-壳纳米颗粒表面,用包含配体的聚乙二醇基团官能化的纳米颗粒表面,或用聚乙二醇基团和包含配体(所述配体被第二配体官能化)的聚乙二醇基团官能化的核-壳纳米颗粒表面。

[0091] 纳米颗粒可以具有较窄的尺寸分布。在各种实例中,在不包括外部物质如未反应的试剂、粉尘颗粒/聚集体的条件下,纳米颗粒的尺寸分布(在PEG化之前或之后)为平均粒径(例如,最长维度)的 ± 5 、10、15或20%。粒径可以通过本领域已知的方法确定。例如,粒径通过TEM、GPS或DLS确定。DLS包含系统偏差,因此DLS尺寸分布可能与TEM或GPS测定的尺寸分布不相关。

[0092] 纳米颗粒可包含衍生自除官能团以外的染料分子的一种或多种基团(例如,每个纳米颗粒包含1至7种染料)。例如,本文所述的染料分子或染料分子的衍生物与纳米颗粒的网状系统共价结合(例如,经由接头部分结合,其可以是染料前体的部分)。所得的共价结合的染料基团衍生自原始染料分子。衍生自染料分子的基团的说明性非限制性实例在本文中有描述。在一个实例中,使用染料前体将染料并入二氧化硅或硅铝酸盐网状系统中,所述染料前体包含与溶胶-凝胶二氧化硅前体(例如, $-\text{Si}(\text{OR})_3$ 基团,其中R为烷基)缀合的染料。

[0093] 在一个方面,本公开提供了包含本公开所述纳米颗粒的组合物。所述组合物可以包含一种或多种类型(例如,具有不同的平均尺寸和/或一种或多种不同的组成特征)。所述组合物可以包含官能化的纳米颗粒,所述官能化的纳米颗粒具有位于(例如,共价结合到)NP表面上的一到五种(例如,1、2、3、4或5种)类型的不同官能配体。(例如,五官能纳米颗粒(例如,C'点)将多种特性整合到单个NP中,所述多种特性即荧光检测、特异性细胞靶向、放射性同位素螯合/标记、比率型pH传感和药物递送,同时整个NP尺寸保持在7nm以下)。

[0094] 例如,组合物包含多种核和/或核-壳纳米颗粒(例如,二氧化硅核纳米颗粒、二氧化硅核-壳纳米颗粒、硅铝酸盐核纳米颗粒、硅铝酸盐核-壳纳米颗粒)。所述纳米颗粒中的任一种都可以用一种或多种类型的聚乙二醇基团(例如,聚乙二醇基团,官能化的(例如,被一种或多种配体和/或反应性基团官能化的)聚乙二醇基团,及其组合)进行表面官能化。所述纳米颗粒中的任一种可以具有包封于其中的染料或染料(例如,NIR染料)的组合。染料分子与纳米颗粒共价结合。纳米颗粒可以通过本公开所述的方法制得。

[0095] 组合物中的纳米颗粒可以具有多种尺寸。纳米颗粒可以具有2至15nm的核尺寸,包括所有0.1nm值和其间的范围。在各种实例中,纳米颗粒的核具有2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5或15nm的尺

寸。在各种实例中,至少90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%或100%的纳米颗粒(例如,核和/或核-壳纳米颗粒)具有2至15nm的尺寸(例如,最长维度)。纳米颗粒可以是超小纳米颗粒。在各种实例中,超小纳米颗粒(例如,超小核和/或核-壳纳米颗粒)具有10nm或更小(例如,2-8nm或2-7nm)的尺寸。在各种实例中,至少90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%或100%的超小纳米颗粒(例如,超小核和/或核-壳纳米颗粒)具有10nm或更小(例如2-8nm或2-7nm)的尺寸(例如最长维度)。对于示例性的尺寸分布,组合物可以不进行任何粒径区分(粒径选择/去除)过程(例如,过滤、透析、色谱法(例如,GPC)、离心等)。例如,本公开所述的纳米颗粒是组合物中仅有的纳米颗粒。

[0096] 组合物可以包含其他组分。例如,组合物还可包含适合施用给个体(例如哺乳动物,例如人)的缓冲液。缓冲液可以是药学上可接受的运载体。

[0097] 在合成时以及在任何合成后的加工/处理之前,组合物可以具有纳米颗粒、颗粒(例如2-15nm)、粉尘颗粒/聚集体(>20nm)、未反应的试剂(<2nm)。

[0098] 在一个方面,本公开提供了本公开所述纳米颗粒和组合物的用途。例如,纳米颗粒或包含所述纳米颗粒的组合物用于治疗(例如递送)和/或诊断(例如成像)方法中。

[0099] 纳米颗粒携带的配体(官能团)可以包括诊断剂和/或治疗剂(例如药物)。治疗剂的实例包括,但不限于,化学治疗剂、抗生素、抗真菌剂、抗寄生虫剂、抗病毒剂、及其组合。也可以使亲和配体与纳米颗粒缀合以允许靶向递送纳米颗粒。例如,纳米颗粒可以与配体缀合,所述配体能够结合与特定细胞类型相关的细胞组分(例如,在细胞膜上或在细胞内隔室中的组分)。被靶向的分子可以是肿瘤标志物或信号传导通路中的分子。配体可以具有针对某些细胞类型(例如肿瘤细胞)的特异性结合亲和力。在某些实例中,配体可用于将纳米颗粒引导至特定区域,例如肝脏、脾脏、脑等。成像可用于确定纳米颗粒在个体中的位置。

[0100] 纳米颗粒或包含纳米颗粒的组合物可以例如被放在药学上可接受的运载体中施用给个体,所述运载体有助于将所述纳米颗粒从身体的一个器官或部分运送到身体的另一个器官或部分。个体的实例包括动物,如人和非人动物。个体的实例还包括哺乳动物。

[0101] 药学上可接受的运载体通常是水溶性的。可以在药学上可接受的运载体中使用的材料的一些实例包括糖,例如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,例如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物,例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素;西黄蓍胶粉;麦芽;明胶;滑石粉;赋形剂,例如可可脂和栓剂蜡;油,例如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;二醇,例如丙二醇;多元醇,例如甘油、山梨醇、甘露糖醇和聚乙二醇;酯,例如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂,例如氢氧化镁和氢氧化铝;海藻酸;无热原水;等渗盐水;林格氏溶液;乙醇;磷酸盐缓冲溶液;以及药物制剂中使用的其他无毒相容性物质。(参见REMINGTON'S PHARM.SCI.,第15版(Mack Publ.Co.,Easton(1975)))。例如,其他无毒的合适的运载体或赋形剂可以包括缓冲剂,例如乙酸盐、Tris、磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和蛋氨酸;防腐剂,例如十八烷基二甲基苄基氯化铵;六甲基氯化铵;苯扎氯铵、苄索氯铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,例如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;以及间甲酚;氨基酸,例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,例如EDTA;张力剂(tonicifier),例如海藻糖和氯化钠;糖,例如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;表面活性剂,例如,聚山梨酯;成盐抗衡离子,例如钠;和/或非离

子型表面活性剂,例如吐温或聚乙二醇(PEG)。药物组合物可以包含其他治疗剂。

[0102] 包含本申请所述纳米颗粒的组合物可以通过任何适当的途径单独地或与其他试剂组合施用给个体。施用可以通过任何方式完成,例如通过肠胃外、粘膜、肺部、局部、基于导管的或口服的递送方式。肠胃外递送可包括,例如,皮下、静脉内、肌内、动脉内以及注入器官组织。粘膜递送可包括,例如,鼻内递送。肺部递送可包括吸入试剂。基于导管的递送可以包括通过基于离子电渗导管的递送。口服递送可以包括肠溶衣丸的递送,或口服液体的施用。透皮递送可以包括通过使用皮肤贴剂的递送。

[0103] 在施用了包含本申请所述纳米颗粒的组合物之后,可以使用一种或多种成像技术监测NP的路径、位置和清除。合适的成像技术的实例包括Artemis荧光照相系统。

[0104] 本公开提供了一种对生物材料(例如细胞、细胞外组分或组织)进行成像的方法,所述方法包括使所述生物材料与包含一种或多种染料的纳米颗粒或包含所述纳米颗粒的组合物接触;将激发电磁(e/m)辐射(例如光)引导到所述组织或细胞上,从而激发所述染料分子;检测由所述被激发的染料分子发射的e/m辐射;以及捕获和处理检测到的e/m辐射以提供所述生物材料的一个或多个图像。这些步骤中的一个或多个可以在体外或在体内进行。例如,所述细胞或组织可以存在于个体中或可以存在于培养物中。细胞或组织暴露于e/m辐射可以在体外(例如,在培养条件下)进行或在体内进行。为了将e/m辐射引导至个体内的细胞、细胞外物质、组织、器官等或个体身体不易接触到的任何部位,可以使用光纤仪器。

[0105] 例如,用于对个体内的区域进行成像的方法包括:(a)向所述个体施用本公开所述的纳米颗粒或组合物,所述纳米颗粒或组合物包含一种或多种染料分子;(b)将激发光引导到所述对象中,从而激发所述一种或多种染料分子中的至少一种;(c)检测被激发的光,所述检测到的光是由所述激发光的激发导致的所述个体中的所述染料分子发出的;和(d)处理与所述检测到的光相对应的信号,以提供所述对象内区域的一个或多个图像(例如,实时视频流)。

[0106] 由于荧光颗粒比游离染料更亮,因此荧光颗粒可用于组织成像以及对转移瘤成像。另外地或可替代地,放射性同位素可以进一步附着于配体官能化颗粒的配体基团(例如,酪氨酸残基或螯合剂)或不具有特定配体官能化的PEG化颗粒的二氧化硅基质,以进行光诱导的电子转移成像。如果选择放射性同位素用于治疗,例如²²⁵Ac或¹⁷⁷Lu,则这又将导致颗粒具有另外的放射治疗特性。

[0107] 例如,可以将药物-接头缀合物共价连接至颗粒上的官能配体以进行药物递送,在所述药物-接头缀合物中,所述接头基团可以被酶或肿瘤中的酸性条件特异性地裂解以释放药物。例如,可以在合成马来酰亚胺基-PEG-颗粒之后,通过硫醇-马来酰亚胺基的缀合反应将药物-接头-硫醇缀合物连接至马来酰亚胺基-PEG-颗粒。另外,药物-接头缀合物和癌症靶向肽都可以连接至颗粒表面,以将药物特异性地递送至肿瘤。

[0108] 在本文公开的各种实施方案和实施例中描述的方法的步骤足以实施所述方法并产生本公开所述的组合物。因此,在一个实施方案中,所述方法基本上由本文公开方法的步骤的组合组成。在另一个实施方案中,所述方法由该步骤组成。

[0109] 在以下陈述中,描述了本公开的方法和组合物,以及使用组合物的方法的各种实施例:

[0110] 陈述1.一种形成本公开所述官能化纳米颗粒的方法,所述方法包括:

[0111] 使纳米颗粒,例如,二氧化硅纳米颗粒或硅铝酸盐颗粒,(例如,具有2至15nm(例如,10nm或更小,例如2至10nm或2至9.99nm)的尺寸(例如,最长维度))与一种或多种官能化前体接触,所述纳米颗粒包含与所述纳米颗粒的表面共价结合的多个聚乙二醇(PEG)基团,所述一种或多种官能化前体包含至少一种反应性基团,其中形成官能化纳米颗粒,所述官能化纳米颗粒包含与所述官能化纳米颗粒的表面共价结合的至少一种反应性基团。

[0112] 陈述2.根据陈述1所述的方法,其中所述接触在水性介质(例如水)中进行。

[0113] 陈述3.根据陈述1或2所述的方法,其中,如果所述纳米颗粒与两种或更多种官能化前体(例如,2、3、4或5种官能化前体,每种具有至少一种反应性基团,其中,每种单独的官能化前体的至少两种或全部反应性基团在结构上与其他官能化前体的反应性基团不同)接触,则所述接触在单一反应混合物中进行。

[0114] 陈述4.根据前述陈述中任一项所述的方法,其中,如果所述纳米颗粒与两种或更多种官能化前体(例如2、3、4或5种官能化前体,每种具有至少一种反应性基团,其中,每种单独的官能化前体的至少两种或全部反应性基团在结构上与其他官能化前体的反应性基团不同)接触,则所述接触在至少两种不同的反应混合物中进行。

[0115] 陈述5.根据前述陈述中任一项所述的方法,其还包括:使所述官能化纳米颗粒与至少一种另外的官能化前体接触,所述另外的官能化前体包含至少一种、至少两种反应性基团,每个单独的官能化前体的所有反应性基团在结构上与其他官能化前体基团的反应性基团不同,其中所述至少一种另外的官能化前体的官能团在结构上与所述官能化前体的反应性基团不同,和在所述官能化纳米颗粒与两种或更多种另外的官能化前体接触的情况下,每个单独的官能化前体的反应性基团在结构上与其他官能化前体的反应性基团不同,并且形成官能化纳米颗粒,所述官能化纳米颗粒包含与所述官能化纳米颗粒的表面共价结合的两种或更多种反应性基团。

[0116] 陈述6.根据前述陈述中任一项所述的方法,其还包括使所述官能化纳米颗粒与包含一种或多种官能团的一种或多种官能团前体接触,其中形成包含所述官能团的官能化纳米颗粒,并且每个官能团与所述官能化纳米颗粒的表面共价结合。

[0117] 陈述7.根据陈述6所述的方法,其中每种官能团前体的接触在单一反应混合物中进行。

[0118] 陈述8.根据陈述6所述的方法,其中对于单独的官能团前体的每次接触,所述接触在单独的反应混合物中进行。

[0119] 陈述9.根据前述陈述中任一项所述的方法,其中将用聚乙二醇(PEG)官能化的纳米颗粒表面与第一官能化前体接触,所述第一官能化前体包含至少一个第一反应性基团,其中形成第一官能化纳米颗粒,所述第一官能化纳米颗粒包含与所述官能化纳米颗粒的表面共价结合的所述至少一个反应性基团。

[0120] 陈述10.根据陈述9所述的方法,其还包括使所述官能化纳米颗粒与包含至少一个第二反应性基团的第二官能化前体接触,其中所述第一反应性基团和所述第二反应性基团在结构上是不同的,其中形成第二官能化纳米颗粒,所述第二官能化纳米颗粒包含所述至少一个第一反应性基团和所述至少一个第二反应性基团,其每个分别与所述官能化纳米颗粒的表面共价结合。

[0121] 陈述11.根据陈述10所述的方法,其还包括使所述第二官能化纳米颗粒与包含至

少一个第三反应性基团的第三官能化前体接触,其中所述第一反应性基团、第二反应性基团和所述第三反应性基团在结构上彼此不同,其中形成第三官能化纳米颗粒,所述第三官能化纳米颗粒包含所述至少一个第一反应性基团、所述至少一个第二反应性基团和所述至少一个第三反应性基团,其每个分别与所述官能化纳米颗粒的表面共价结合。

[0122] 陈述12.根据陈述11所述的方法,其还包括使所述第三官能化纳米颗粒与包含至少一个第三反应性基团的第三官能化前体接触,其中所述第一反应性基团、所述第二反应性基团和所述第三反应性基团在结构上彼此不同,其中形成第三官能化纳米颗粒,所述第三官能化纳米颗粒包含所述至少一个第一反应性基团、所述至少一个第二反应性基团和至少一个第三反应性基团,其每个分别与所述官能化纳米颗粒的表面共价结合。

[0123] 陈述13.根据陈述12所述的方法,其还包括使所述第三官能化纳米颗粒与包含至少一个第四反应性基团的第四官能化前体接触,其中所述第一反应性基团、所述第二反应性基团、所述第三反应性基团和所述第四反应性基团在结构上彼此不同,其中形成第四官能化纳米颗粒,所述第四官能化纳米颗粒包含所述至少一个第一反应性基团、所述至少一个第二反应性基团和所述至少一个第三反应性基团,以及所述至少一个第四反应性基团,其每个分别与所述官能化纳米颗粒的表面共价结合。

[0124] 陈述14.根据陈述13所述的方法,其还包括使所述第四官能化纳米颗粒与包含至少一个第五反应性基团的第五官能化前体接触,其中所述第一反应性基团、所述第二反应性基团、所述第三反应性基团、所述第四反应性基团和第五反应性基团在结构上彼此不同,其中形成第五官能化纳米颗粒,所述第五官能化纳米颗粒包含所述至少一个第一反应性基团、所述至少一个第二反应性基团、所述至少一个第三反应性基团、所述至少一个第四反应性基团和所述至少一个第五反应性基团,其每个分别与所述官能化纳米颗粒的表面共价结合。

[0125] 陈述15.根据陈述9-14中任一项所述的方法,其还包括使所述官能化纳米颗粒与包含一种或多种官能团的一种或多种官能团前体(例如,第一官能团前体、第二官能团前体、第三官能团前体、第四官能团前体、第五官能团前体,或其组合)接触,其中形成包含所述官能团的官能化纳米颗粒,并且每种官能团与所述官能化纳米颗粒的表面共价结合。

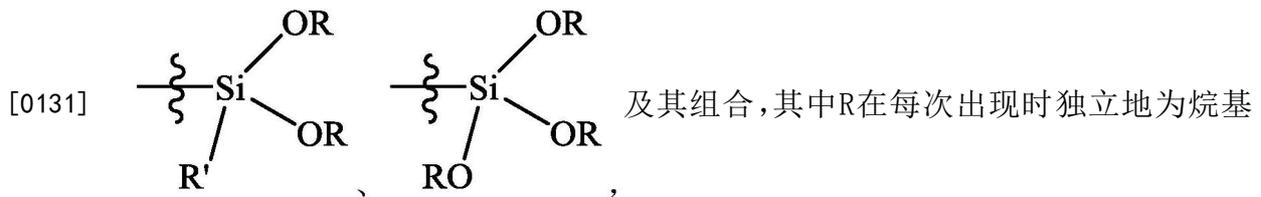
[0126] 陈述16.根据陈述15所述的方法,其中每种官能团前体的接触在单一反应混合物中进行。

[0127] 陈述17.根据陈述15所述的方法,其中对于单个官能团前体的每次接触,所述接触在单独的反应混合物中进行。

[0128] 陈述18.根据前述陈述中任一项所述的方法,其中所述官能化前体包含选自以下的反应性基团:胺基、硫醇基、羧酸基、羧酸酯基、酯基(例如,活化的酯基)、马来酰亚胺基、烯丙基、末端炔基、叠氮基、硫氰酸酯基及其组合。

[0129] 陈述19.根据前述陈述中任一项所述的方法,其中所述官能化基团前体包含一个或多个硅烷基和一个或多个反应性基团。

[0130] 陈述20.根据前述陈述中任一项所述的方法,其中所述硅烷基选自以下:



(例如, C₁、C₂、C₃或C₄烷基),并且R在每次出现时独立地为H或烷基(例如, C₁、C₂、C₃或C₄烷基)。

[0132] 陈述21.根据前述陈述中任一项所述的方法,其中所述官能化前体中的一种或多种具有以下结构:



羧酸基、羧酸酯基、酯基(例如,活化的酯基)、马来酰亚胺基、烯丙基、末端炔基、叠氨基或硫氰酸酯基),n为,例如,1、2、3、4、5、6、7或8,并且R在每次出现时独立地为烷基(例如, C₁、C₂、C₃或C₄烷基)。

[0134] 陈述22.根据陈述6-8或15-20中任一项所述的方法,其中至少一个官能团或所有所述官能团通过连接基团与所述纳米颗粒的表面共价结合。

[0135] 陈述23.根据陈述22所述的方法,其中在每个单独的情况下,所述连接基团选自烷基(例如, C₁、C₂、C₃或C₄烷基)。

[0136] 陈述24.根据陈述6-8或15-20中任一项所述的方法,其中所述官能团选自本文描述的官能团及其组合。

[0137] 陈述25.一种组合物,其包含多个本文所述的纳米颗粒(例如,多个纳米颗粒,每个纳米颗粒包含与所述纳米颗粒的表面共价结合的多个聚乙二醇(PEG)基团和与所述官能化纳米颗粒的表面共价结合的至少一种官能团(例如1、2、3、4或5种不同类型的官能团)),其中至少95%(例如,至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的所述纳米颗粒具有本文所述的尺寸(例如,尺寸为2至15nm(例如10nm或更小,例如2-8或2-7nm),或2至10nm或2至9.99nm)),并且所述组合物未经过任何粒度区分过程。

[0138] 陈述26.根据陈述25所述的组合物,其中所述纳米颗粒为核纳米颗粒(例如,具有2至15nm(例如10nm或更小,例如2至10nm或2至9.99nm)的尺寸(例如,最长维度))、核-壳纳米颗粒(例如,具有2至15nm(例如10nm或更小,例如2至10nm或2至9.99nm)的尺寸(例如,最长维度)),或其组合。

[0139] 陈述27.根据陈述26所述的组合物,其中所述核纳米颗粒为硅铝酸盐核纳米颗粒或二氧化硅核纳米颗粒。

[0140] 陈述28.根据陈述26或27所述的组合物,其中所述核为二氧化硅核,或者所述核-壳纳米颗粒的核和壳为二氧化硅壳。

[0141] 陈述29.根据陈述26-28中任一项所述的组合物,其中所述核壳纳米颗粒的核为硅铝酸盐核,并且所述核壳纳米颗粒的壳为二氧化硅壳。

[0142] 陈述30.根据陈述25-29中任一项所述的组合物,其中所述官能团选自本文所述的官能团及其组合。

[0143] 陈述31.根据陈述25-30中任一项所述的方法,其中至少一种或所有所述官能团

通过连接基团与所述纳米颗粒的表面共价结合。

[0144] 陈述32. 根据陈述31所述的方法, 其中在每个单独的情况下, 所述连接基团选自烷基(例如, C₁至C₄烷基)。

[0145] 陈述33. 根据陈述25-32中任一项所述的组合物, 其中1至100个(例如, 20至100个、25至100个、30至100个、35至100个、40至100个、或50至100个) 官能团(例如, 平均1至100个官能团) 与每个所述纳米颗粒的表面共价结合。

[0146] 陈述34. 根据陈述25-33中任一项所述的组合物, 其中所述聚乙烯基团的至少一部分或全部包含一个或多个官能团。

[0147] 陈述35. 根据陈述34所述的方法, 其中所述官能团选自本文所述的官能团及其组合。

[0148] 陈述36. 根据陈述25-35中任一项所述的组合物, 其中所述纳米颗粒还包含包封于其中的一种或多种本文所述染料分子或其组合。

[0149] 陈述37. 根据陈述36所述的组合物, 其中每个核的染料分子的数目为1至7。

[0150] 陈述38. 根据陈述25-37中任一项所述的组合物, 其中所述组合物是稳定的(例如, 通过凝胶渗透色谱法(GPC) 或荧光相关光谱法(FCS) 和GPC的组合没有观察到聚集和/或分解(例如, 失去官能团) 的情况)(例如, 稳定至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、18或24个月)。

[0151] 陈述39. 本文公开的一种诊断方法(例如, 成像方法), 其使用根据陈述25-38中任一项所述的组合物(例如, 本文公开的一种用于对个体内的区域进行成像的方法, 所述方法包括: 向所述个体施用根据陈述25-38中任一项所述的组合物, 其中所述纳米颗粒包含一种或多种染料分子和/或一种或多种染料基团; 将激发电磁辐射引导到所述对象中, 从而激发所述一种或多种染料分子和/或一种或多种染料基团中的至少一种; 检测激发的电磁辐射, 所述检测到的电磁辐射是由所述激发电磁辐射的激发导致的所述个体中的所述染料分子发出的; 和处理与所述检测到的电磁辐射相对应的信号以提供所述对象内区域的一个或多个图像)。

[0152] 陈述40. 本文公开的一种治疗方法(例如, 将药物递送给个体的方法), 所述方法使用根据陈述25-38中任一项所述的组合物, 所述组合物包含具有官能团的一种或多种纳米颗粒, 所述官能团包含药物或衍生自药物的官能团(例如, 本文公开的一种用于将药物递送给个体的方法, 所述方法包括向所述个体施用根据陈述25-38中任一项所述的组合物, 所述组合物包含具有官能团的一种或多种纳米颗粒, 所述官能团包含药物或衍生自药物的官能团, 其中所述药物在所述个体内释放)。

[0153] 陈述41. 根据陈述40所述的治疗方法, 所述方法还包括本文公开的对个体内的区域进行成像(例如, 根据陈述39所述的方法)。

[0154] 提供以下实施例以说明本公开内容。它们无意于在任何情况下进行限制。

[0155] 实施例1

[0156] 本实施例提供了本公开所述的方法和组合物的实例及其用途。

[0157] 在纳米生物技术和纳米医学领域中, 将不同的官能组分组合到单个NP平台中的多官能纳米颗粒(NP) 非常瞩目。在这个实施例中, 我们描述了一种通用的表面修饰方法, 以模块化地以及正交地官能化康奈尔素点(Cornell prime dots) (C' 点), 即超小的10nm以下的

PEG化荧光核-壳二氧化硅纳米颗粒,在NP表面上具有多达四种不同类型的官能配体。它能够合成五官能C'点,所述五官能C'点将多种特性(即荧光检测,特异性细胞靶向,放射性同位素螯合/标记,比率型pH传感和药物递送)整合到单个NP中,同时整个NP尺寸仍低于7nm。这是通过利用C'点的PEG层可被小分子穿透这一事实来实现的。可以将胺和/或硫醇官能化的硅烷分子插入PEG链之间和C'点的二氧化硅表面上,随后可以将另外的官能配体连接至所述胺和/或硫醇官能化的硅烷分子。这种通过插入修饰PEG化后表面(PPSMI)的方法仅需在一锅型水基合成中在C'点的PEG化和纯化之间夹几个另外的步骤,同时不会减少高质量NP的产生。所得的具有另外官能性的C'点显示出物理化学性质,比如其尺寸和PEG密度接近于临床转化的C点,从而为其临床应用的多元化打开了大门。我们还证实,C'点合成的修饰使得每种颗粒具有大量的靶向肽,以及简便且通用的光谱方法通过将吸收光谱反卷积至单个组分来定量评估不同表面配体的具体数量。从合成性的PEG化和PEG化后表面修饰方法的这个研究中获得的经验可被转移至用于生物医学应用和临床转化的其他PEG化NP平台的开发中。

[0158] 在这个实施例中,我们描述了模块化和正交的,通过插入修饰PEG化后表面(PPSMI)的方法,所述方法能够实现这一目标(图1)。它由以下组成:在NP PEG化和纯化之间进行的合成步骤中,将具有正交官能团(例如,胺和硫醇)的硅烷共价插入到PEG链之间和C'点的二氧化硅表面上(图1)。我们证实,通过这种方式可以克服现有官能化策略的局限性,包括在PEG化过程中引入这些基团时观察到的颗粒聚集。PPSMI方法保留了水性介质中C'点合成的一锅法性质。此外,我们将显示这些模块化和正交的表面修饰反应对颗粒的整体物理化学特性(包括大小和PEG密度)仅有微小的影响,从而最大程度地提高了其临床转化的机会。通过使用这种方法,可以产生各种多官能的C'点(表1)。特别地,合成了五官能C'点颗粒,其总共具有与NP表面附着的四种官能配体,使得可以同时进行荧光示踪、肿瘤靶向、比率型pH传感、放射性同位素螯合和疾病治疗(图1)。这种表面修饰方法利用了以下事实:良好PEG化的NP的PEG层仍可被其他分子穿透。为了恰当地说明此类颗粒的化学复杂性,并彼此区分不同的多官能NP化学,我们开发了一种命名系统,其中包含有关以下方面的信息:(i) NP平台,例如C'点与介孔C点(mC点)相比较,(ii) 包封的荧光染料,(iii) 特定的表面官能性及其与所述颗粒的连接性,(iv) 特定的附着化学,(v) 特定的PEG链长等(例如,图7)。我们最终证实了一种光谱方法,所述光谱方法通过将吸收光谱反卷积至单个组分来定量评估引入到所述颗粒表面的不同配体的具体数量。我们希望在这项研究中获得的经验也能为生物医学应用中的其他PEG化NP平台的开发开辟道路。

[0159]

表 1. 具有不同官能性的所有合成的 C'点的表征结果总结

C'点产物	完整命名	核形成中的 添加物	PEG化中的添加物	PEG化后表面改性 中的添加物	流体动力 学尺寸	每个 NP 中官能配体的 数目
c(RGDyC)-PEG-Cy 5.5-C'点	C'点(Cy5.5)-PEG12-mal-硫 醇- c(RGDyC)_PEG6	Cy5.5	c(RGDyC)-PEG-硅烷 PEG-硅烷	NA	6.4 nm	1.6 个 Cy5.5, 24 个 c(RGDyC)
c(RGDyC)-PEG-Cy 5.5-C'点	C'点(Cy5.5)-PEG12-mal-硫 醇- c(RGDyC)_PEG6	Cy5.5	(高浓度) PEG-硅烷	NA	6.8 nm	1.7 个 Cy5.5, 58 个 c(RGDyC)
c(RGDyC)-PEG-Cy 5-C'点	C'点(Cy5)-PEG12-mal-硫醇- c(RGDyC)_PEG6	Cy5	c(RGDyC)-PEG-硅烷 PEG-硅烷	NA	6.5 nm	1.7 个 Cy5, 21 个 c(RGDyC)
c(RGDyC)-PEG-cw 800-C'点	C'点(cw800)-PEG12-mal-硫 醇- c(RGDyC)_PEG6	cw800	c(RGDyC)-PEG-硅烷 PEG-硅烷	NA	6.1 nm	14 个 cw800, 8 个 c(RGDyC)
c(RGDyC)-mal-PEG -Cy5-C'点	C'点(Cy5)-PEG12-mal-硫醇- c(RGDyC)_PEG12-mal_PE G6	Cy5	mal-PEG-硅烷 c(RGDyC)-PEG-硅烷 PEG-硅烷	NA	6.8 nm	1.6 个 Cy5, 22 个 c(RGDyC), mal 未知
c(RGDyC)-DFO-PE G-Cy5-C'点	C'点(Cy5)-PEG12-mal-硫醇- c(RGDyC)_胺基 -NCS-DFO-PEG6	Cy5	DFO-PEG-硅烷 c(RGDyC)-PEG-硅烷 PEG-硅烷	NA	6.4 nm	1.7 个 Cy5, 21 个 c(RGDyC), 2 个 DFO

[0161]

FITC-PEG-Cy5-C'点	C'点(Cy5)-PEG6_硫醇-mal-FITC	Cy5	PEG-硅烷	硫醇-硅烷 FITC-mal	6.7 nm	1.6 个 Cy5, 6 个 FITC
FITC-DFO-c(RGDyC)-PEG-Cy5-C'点	C'点(Cy5)-PEG12-mal-硫醇-c(RGDyC)_PEG6_胺基-NCS-DFO_硫醇-mal-FITC	Cy5	PEG-硅烷	胺基-硅烷 DFO_NCS 硫醇-硅烷 FITC-mal	6.8 nm	1.7 个 Cy5, 23 个 c(RGDyC), 19 个 DFO, 4 个 FITC
FITC-DFO-EFV-c(RGDyC)-PEG-Cy5-C'点	C'点(Cy5)-PEG12-mal-硫醇-c(RGDyC)_PEG6_胺基-醇-PEG10-EVP_PEG6_胺基-NCS-DFO_硫醇-mal-FITC	Cy5	PEG-硅烷 mal-PEG-硅烷 PEG-硅烷	EFV-PEG-硫醇 胺基-硅烷 DFO_NCS 硫醇-硅烷 FITC-mal	6.9 nm	1.9 个 Cy5, 25 个 c(RGDyC), 3 个 DFO, 4 个 FITC, 25 个 EFV

[0162] 结果与讨论。c(RGDyC)-PEG-Cy5.5-C'点的合成和纯化。先前报道的C'点的合成是一种通用方法,其使得能够用不同类型的染料和癌症靶向肽对C'点进行官能化(图8)。例

如,要生成用NIR染料Cy5.5和靶向 $\alpha_v\beta_3$ 整合蛋白的环状(精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-D-酪氨酸-半胱氨酸)肽(c(RGDyC))官能化的C'点(其被称为c(RGDyC)-PEG-Cy5.5-C'点),首先在室温下将原硅酸四甲酯(TMOS)和Cy5.5硅烷缀合物(Cy5.5-硅烷)加入到pH约为8的氢氧化铵水溶液中。水解的TMOS和Cy5.5-硅烷分子缩合在一起,形成超小的二氧化硅NP,其中Cy5.5染料共价包封在二氧化硅基质中。在下一步中,将硅烷官能化的PEG(PEG-硅烷)和经c(RGDyC)肽修饰的PEG-硅烷(c(RGDyC)-PEG-硅烷)一起加入到反应混合物中。在加入后,c(RGDyC)-PEG-硅烷和PEG-硅烷通过表面硅烷醇基团和PEG之间的氢键迅速吸附在NP表面上,从而终止了纳米颗粒的生长。在将反应混合物在室温下放置过夜后,将反应温度升高至80°C,在该温度下保持过夜,以增强PEG-硅烷和c(RGDyC)-PEG-硅烷与NP表面的共价连接。然后将反应混合物冷却至室温,并最终使用凝胶渗透色谱法(GPC)纯化c(RGDyC)-Cy5.5-C'点,随后通过无菌过滤器过滤以进行最终使用。

[0163] c(RGDyC)-PEG-Cy5.5-C'点的GPC洗脱图显示在纯化前有三个峰(图2A和图8A)。在大约9分钟时的主峰对应于c(RGDyC)-PEG-Cy5.5-C'点纳米颗粒产物,而在大约5分钟和16分钟时的峰分别对应于来自PEG试剂和未反应的Cy5.5-硅烷的杂质。收集对应于纳米颗粒产物的洗脱体积,并再次在跑过GPC柱以确保有最高的纯度。在GPC纯化后,最终C'点溶液的洗脱图仅显示9分钟左右的一个单峰,表明GPC纯度为约100%(图8B)。此外,产物峰显示出很窄且高度对称的形状,并且没有可检测到的偏斜,并且可以使用单组分高斯分布进行拟合,其表明NP产物具有很窄的粒径分布。

[0164] 随后将纯化的c(RGDyC)-PEG-Cy5.5-C'点进行吸收和荧光相关光谱(FCS)表征。c(RGDyC)-PEG-Cy5.5-C'点的吸收光谱显示在约675nm处出现对应于Cy5.5染料的一个峰以及在约275nm处出现一个小峰(图8D),而没有c(RGDyC)官能化的PEG化Cy5.5-C'点(PEG-Cy5.5-C'点)没有该小峰。因此,这个峰的存在是c(RGDyC)肽的特征,表明c(RGDyC)成功连接到了C'点表面。使用单模态FCS相关函数很好地拟合了c(RGDyC)-PEG-Cy5.5-C'点的FCS曲线,从而证实了NP产物具有很窄的粒径分布(图8C)。通过FCS拟合,可以确定水合粒径和颗粒浓度。通过将吸光度测量获得的Cy5.5和c(RGDyC)的浓度分别除以从FCS获得的颗粒浓度,可以估算每个C'点的Cy5.5染料和c(RGDyC)配体的数量。结果表明,c(RGDyC)-PEG-Cy5.5-C'点的平均直径为约6.4nm,并且每个NP约有1.6个Cy5.5染料和24个c(RGDyC)肽(表1)。最后,通过组合FCS和吸光度测量还可以估算颗粒的亮度,这表明在FCS设置的激发条件下,水溶液中c(RGDyC)-PEG-Cy5.5-C'点的亮度比游离Cy5.5染料高约三倍。最终的c(RGDyC)-PEG-Cy5.5-C'点产物储存在4°C的去离子(DI)水中,以备进一步使用。

[0165] 通过调节PEG化条件增加c(RGDyC)表面配体密度。在先前报道的临床转化C'点的合成方法中,在PEG化步骤中,通过将c(RGDyC)-PEG-硅烷和PEG-硅烷两者缩合到NP表面上引入c(RGDyC)癌症靶向肽。考虑到c(RGDyC)-PEG-硅烷比PEG-硅烷贵得多,因此总是在添加PEG-硅烷之前将c(RGDyC)-PEG-硅烷添加到反应混合物中,使得能与原始NP表面发生反应,以实现所需的转换效率。尽管这个方法可用于产生每个NP具有多达约20-25个c(RGDyC)配体的C'点,但是我们观察到进一步提升c(RGDyC)-PEG-硅烷的浓度不会产生窄分布的C'点。取而代之的是,在加入这些高浓度的c(RGDyC)-PEG-硅烷后,合成混合物立即变得浑浊,这表明NP发生聚集。事实上,反应产物的GPC洗脱图显示在5-11分钟之间具有较宽的峰,这归因于NP的聚集(图2B)。即使经过无数个GPC纯化循环后,NP产物的GPC洗脱图仍然分布较宽,

表明合成失败。

[0166] 我们发现在不引起NP聚集的前提下,在合成中可接受的c(RGDyC)-PEG-硅烷的数量对氢氧化铵[NH₃OH]的浓度高度敏感。如果[NH₃OH]从标准的2mM升高到6mM,则c(RGDyC)-PEG-硅烷的浓度可以升高到三倍,与此同时还能保持良好的NP产物质量。在[NH₃OH]为6mM以及在三倍的c(RGDyC)-PEG-硅烷浓度的条件下合成的C'点的GPC洗脱图(图2C)显示出了与常规条件下相似的特征(图2A)。结果表明了高质量的NP产物,其使得能够如前所述通过使用GPC将C'点与其他杂质分离开来。在纯化后,成功制得了窄分布的c(RGDyC)-PEG-Cy5.5-C'点,其每个NP估计有58个配体(图2D至F)。如所预期的,与具有较低配体数的c(RGDyC)-PEG-Cy5.5-C'点相比,UV-vis光谱中275nm处的吸收得到增强(图2F)。根据FCS表征,与具有较低配体数(即24c(RGDyC)'s)的颗粒相比,这些颗粒还具有略微升高的水合粒径,即6.8nm相比于6.4nm(图2E和表1),这可能归因于每个颗粒的c(RGDyC)数升高(图2D),而不是归因于较大的二氧化硅核。

[0167] 对于成功的c(RGDyC)表面官能化,对[NH₃OH]的高敏感性可能是由于c(RGDyC)肽快速吸附到裸露的二氧化硅表面并导致了NP之间静电相互作用的变化。对于C'点的合成,已经证明,在PEG化步骤中,PEG和PEG-肽缀合物都可能通过氢键迅速吸附到裸露的二氧化硅NP表面上。这种快速的PEG吸附被用于C'点的合成中,以有效地终止NP的生长并提高c(RGDyC)-PEG-硅烷添加物的转化效率。但是,由于每个c(RGDyC)肽都含有几个在反应pH下带有正电荷的胺基,即它们为弱碱,因此c(RGDyC)肽的吸附可以有效地筛选出裸露的二氧化硅NP的净负电荷,从而导致NP失去静电稳定性,从而产生NP聚集。相反,当[NH₃OH]略微增加时,c(RGDyC)肽的平均净正电荷降低,从而使超小二氧化硅NP在PEG化过程中吸附更多的c(RGDyC)-PEG-硅烷,并且同时不会失去NP稳定性。虽然需要更系统的研究来证实关于这一机制的假说,但是将癌症靶向肽的表面配体密度提高两倍以上的能力可能会进一步增强C'点的肿瘤靶向效率。

[0168] 在PEG化过程中通过使配体-PEG-硅烷缀合物共缩合,将二级官能团引入C'点表面。将针对用多达58个c(RGDyC)配体官能化C'点表面而开发的反应条件也被用于将多种类型的其他官能配体引入C'点表面。这是通过在PEG化步骤中用不同的配体-PEG-硅烷和/或配体-硅烷缀合物的组合代替c(RGDyC)-PEG-硅烷来实现的。但是,所合成的多官能C'点的质量,以及因此使用此方法的成功率很大程度上取决于官能配体的特征。

[0169] 例如,PEG化步骤中将c(RGDyC)-PEG-硅烷,马来酰亚胺(mal)官能化的PEG-硅烷(mal-PEG-硅烷)和PEG-硅烷的组合按照此顺序加入到基于Cy5的C'点的反应混合物中。除了c(RGDyC)肽外,所得的c(RGDyC)-mal-PEG-Cy5-C'点在PEG化的NP表面上还含有马来酰亚胺基团,从而使得C'点能够进一步与例如硫醇官能化的药物-接头缀合物反应,用于治疗诊断学的应用(图1)。虽然合成时的c(RGDyC)-mal-PEG-Cy5-C'点(即在GPC纯化之前)的GPC洗脱图显示出稍微偏斜的NP峰(图9A),但是在四个GPC纯化循环后获得了对称的NP峰以及令人满意的FCS表征结果(图9B和C),表明NP合成产物的质量是可以接受的。从不同的mal-PEG-硅烷浓度下获得的纯化的c(RGDyC)-mal-PEG-Cy5-C'点的吸收光谱显示,不仅具有归因于c(RGDyC)配体的约275nm处的一个强峰,而且与对照NP相比在250nm以下的吸收也升高了,我们将其归因于马来酰亚胺官能团的存在(图9D)。根据FCS,c(RGDyC)-mal-PEG-Cy5-C'点的水合粒径约为6.8nm(表1)。

[0170] 当使用其他类型的配体时,多官能C'点的合成可能不会同等成功。例如,用能与叠氮基反应的二苯并环辛基(DBCO)基团取代马来酰亚胺基团,从而使得通过点击化学用其他配体对C'点进行修饰。虽然根据GPC、UV-vis和FCS表征,可以使用这种方法生产单分散的DBCO-c(RGDyC)-PEG-C'点(图10A至D,表1),但是在尝试使DBCO-c(RGDyC)-PEG-C'点与叠氮官能团缀合时,未观察到DBCO的反应性。这表明C'点表面上的DBCO配体的可及性较低。反过来,这可能要归因于DBCO配体与马来酰亚胺基团相比具有升高的疏水性。DBCO配体的较差的水溶性可能会导致它们即使在NP PEG化后仍与C'点的二氧化硅表面保持缔合,从而限制了它们的可及性和反应性。

[0171] 在我们的原始试验中,c(RGDyC)-PEG-Cy5-C点在c(RGDyC)肽的酪氨酸残基上标记有¹²⁴I,从而可以使用正电子发射断层扫描(PET)成像。要想用其他放射性同位素例如锆(⁸⁹Zr)或镥(¹⁷⁷Lu)来标记C'点,就非常需要用特定的螯合剂配体官能化C'点。例如,去铁胺(DFO)是针对用⁸⁹Zr进行放射性标记的最有效螯合剂之一。要想用DFO官能化C'点,首先将异硫氰酸酯(NCS)官能化的DFO(NCS-DFO)与胺基-硅烷缀合以产生DFO-硅烷,然后在PEG化过程中将其与c(RGDyC)-PEG-硅烷和PEG-硅烷一起添加到反应混合物中。尽管通过这种方法产生了窄分布的DFO-c(RGDyC)-PEG-C'点(图10E至H和表1),但这些NP在生物学实验中显示出了不利的结果,我们暂时将其归因于DFO基团在不同的C'点中的不均匀分布(数据未显示)。

[0172] 最后一个实例是用胺基官能化c(RGDyC)-PEG-C'点,从而可以用胺反应性官能配体修饰C'点。当在PEG化过程中将胺基硅烷(如胺基丙基-三甲氧基-硅烷(APTMS))与c(RGDyC)-PEG-硅烷和PEG-硅烷一起引入时,所得的c(RGDyC)-NH₂-PEG-C'点在GPC洗脱图中显示出了增宽的颗粒峰(图3A)。即使在四个GPC纯化循环后,该峰仍保持偏斜(图3B)。偏斜的GPC洗脱图表明NP的聚集,这很可能是由所连接的胺基引起的,所述胺基催化Si-O-Si键的形成,从而导致NP稳定性丧失。虽然FCS表征表明,在GPC纯化后平均粒径仍保持在6.8nm左右(图3C和表1),但是由于对于纯化的NP仍能观察到母聚集峰,表明这种NP聚集极大地影响了最终C'点产物的产率和质量(图3B)。此外,与标准的c(RGDyC)-PEG-Cy5-C'点相比,使用这个方法合成的c(RGDyC)-NH₂-PEG-Cy5-C'点的吸光度显示在约480nm处有一个附加峰(图3D)。这种吸光度可归因于Cy5染料的降解产物,这可能是由于胺基团和靠近二氧化硅表面的Cy5分子之间的相互作用所致。Cy5染料的这种降解降低了颗粒的荧光亮度,并且对于生物医学应用来说是非常不利的。

[0173] 通过插入修饰PEG化后表面(PPSMI)将第二官能团引至C'点表面。通过在PEG化过程中共缩合不同的配体-硅烷缀合物将第二官能团引至C'点表面的挑战来源于不同的官能团和裸露的二氧化硅NP表面之间亲和力的巨大变化。生物医学应用中许多重要的官能配体携带有大量的胺和/或羟基,它们对二氧化硅具有很高的亲和力。如前一部分所述,此类配体与二氧化硅之间的强缔合可能会导致其难以接近且分布不均。

[0174] 这个挑战的一种可能的解决方案是控制配体与二氧化硅之间缔合的动力学。在理想情况下,最好配体和裸露的二氧化硅之间具有一定程度的亲和力以提高反应转化率。另一方面,亲和力太高会导致阻碍配体的可及性以及配体分布不均匀。依赖于控制缔合动力学不是最佳方案,这其中有多种原因。首先,配体和二氧化硅之间的缔合对配体分子结构的细节高度敏感。单独地针对每个不同的配体优化PEG化条件会使效率大大降低。第二,由于

水中裸露的二氧化硅NP是静电稳定的,并且其稳定性对包括离子强度和pH在内的反应条件高度敏感,所以调整PEG化条件可能会干扰NP的稳定性,从而导致合成失败(参见上文)。

[0175] 为了克服这些问题,我们没有继续在PEG化步骤中对C'点进行官能化,相反,我们尝试了通过插入修饰PEG化后表面(PPSMI)的反应。这种PPSMI方法利用了成熟的C'点PEG化方案。颗粒的PEG化会减慢其他配体与二氧化硅NP表面之间的缔合,使这些配体在与二氧化硅NP反应之前有更多的时间均匀分散在反应混合物中。此外,定义明确的PEG化赋予C'点独特的空间稳定性,从而即使在更极端的合成条件下也可以保护其免于聚集。因此,它为调节反应参数提供了更广的窗口,从而能用其他配体进行有效的表面修饰。最重要的是,最近有报道称,PEG化NP的PEG层仍可能被蛋白质等生物分子穿透,具体取决于一些参数,包括表面PEG密度和NP表面曲率。同时,即使在PEG化之后,在二氧化硅核与PEG化二氧化硅纳米颗粒的PEG层之间的界面上也总是残留有硅烷醇基,从而潜在地使得与小硅烷分子的进一步缩合成为可能。

[0176] 为此,我们首先尝试在PEG化步骤之后将DF0-硅烷添加到c(RGDyC)-PEG-Cy5-C'点的反应混合物中。不幸的是,最终产物在低于300nm的范围内未表现出预期的吸光度信号增加,表明与DF0-硅烷的反应效率较低(图11)。这要归因于几种原因。首先,由于DF0-硅烷缀合物的摩尔质量甚至比C'点PEG化中使用的PEG-硅烷还要大,因此它可能无法有效地扩散通过PEG层并与下面的二氧化硅表面硅烷醇基发生反应。这表明了PEG化的C'点的PEG层相当致密,这与我们先前的研究一致。其次,水解的DF0-硅烷的自缩合和其与C'点的附着相竞争。由于DF0-硅烷穿过PEG层的渗透很慢,因此自缩合是主要的反应。根据这些初步的结果和结论,我们选择了一种替代方法来用DF0对c(RGDyC)-PEG-Cy5-C'点进行官能化,其中将表面修饰分为两个步骤(图1)。在第一步中,将胺基-硅烷加入到反应混合物中。胺基-硅烷是一种相对较小的分子,因此有望更快地扩散到PEG层中并附着在下面的二氧化硅表面上。与相应的c(RGDyC)-PEG-Cy5-C'点相比,所得的NH₂-c(RGDyC)-PEG-Cy5-C'点在颗粒特征方面未显示任何实质性变化(表1,另外将图3E-H与图8E-H进行比较)。例如,c(RGDyC)-PEG-Cy5-C'点和NH₂-c(RGDyC)-PEG-Cy5-C'点的吸收光谱几乎完全重叠,表明胺基-硅烷附着至c(RGDyC)-PEG-Cy5-C'点对这些颗粒的光学特征没有任何影响(图3H)。

[0177] 随后可用其他的表面胺基将第二官能配体引至C'点二氧化硅的表面。为了验证这一想法,在添加胺基硅烷之后,在随后的步骤中添加了DF0-NCS,以经由胺基-NCS反应与位于PEG层下的胺基反应(图1)。该方法的优势在于,现在可以施加相对较高的DF0浓度以推动DF0-NCS分子穿透PEG层,而在最终的纯化步骤中可以通过离心和GPC轻松去除多余的DF0。所得的DF0-c(RGDyC)-PEG-Cy5-C'点的GPC洗脱图表明样品相对干净,只有一个NP产物主峰(图4A)。纯化后,获得直径为6.4nm的窄分布的C'点(图4B和C,表1)。与NH₂-c(RGDyC)-PEG-Cy5-C'点相比,纯化的DF0-c(RGDyC)-PEG-Cy5-C'点在200至300nm之间具有独特的吸光度特征(图4D)。该吸光度信号对应于DF0分子的吸光度,并且随着反应中使用的DF0-NCS浓度的升高而升高。通过使用一组吸光度标准拟合光谱,将DF0-c(RGDyC)-PEG-Cy5-C'点的吸光度反卷积至每个组分的独立贡献(图12)。对于使用浓度为约0.2mM的DF0-NCS合成的C'点,每个颗粒的Cy5、c(RGDyC)和DF0分子数估计分别为约1.6、23和4(图12和表1)。这些光谱结果表明,DF0已成功附着于NH₂-c(RGDyC)-PEG-Cy5-C'点,并证实NH₂-c(RGDyC)-PEG-Cy5-C'点上的胺基的可及性,能进行进一步反应。除了DF0分子的附着外,相对于c(RGDyC)-PEG-

Cy5-C' 点或NH₂-c(RGDyC)-PEG-Cy5-C' 点,在进一步的基于GPC和FCS的C' 点表征中未观察到实质性变化(表1),表明这种室温下的PEG化后的修饰对常规c(RGDyC)-PEG-Cy5-C' 点的特性仅有微小的影响,从而最大程度地提高了临床转化的机率。

[0178] PPSMI方法的通用化。也可以使用将DF0附着于c(RGDyC)-PEG-C' 点的类似的方法来引入其他类型的官能配体。例如,1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)是用放射性同位素(如¹⁷⁷Lu)进行放射性标记的最有效的螯合剂之一。通过用DOTA-NCS代替DF0-NCS,可产生窄分布的DOTA官能化的c(RGDyC)-PEG-C' 点,即DOTA-c(RGDyC)-PEG-C' 点,从而使得能够进行例如¹⁷⁷Lu放射性标记(图4E至H)。该方法也可用于其他类型的缀合化学。例如,通过在PEG化后的表面修饰步骤中用硫醇-硅烷代替胺基-硅烷,可以产生硫醇官能化的C' 点,在所述C' 点中另外的硫醇基团可以通过例如硫醇-烯点击反应进一步与例如马来酰亚胺基官能化的配体反应。为了进行证明,通过这种方法将硫醇-硅烷引入到PEG-Cy5-C' 点的二氧化硅表面上,生成了窄分布的SH-PEG-Cy5-C' 点(图13A至C,表1)。然后,在纯化步骤之前,将马来酰亚胺官能化的FITC染料(mal-FITC)加入到SH-PEG-Cy5-C' 点的反应混合物中,以通过硫醇-马来酰亚胺的缀合用pH传感FITC染料对NP进行官能化(图1)。得到的FITC-PEG-Cy5-C' 点在纯化后显示出干净的GPC洗脱图,表明是高质量的NP产物(图13D)。FCS表征表明平均粒径为6.7nm(图13E,表1)。与PEG-Cy5-C' 点相比,纯化的FITC-PEG-Cy5-C' 点在约450nm波长处显示出另外的吸收特征,所述特征对应于FITC染料的特征性吸收(图13F)。结果表明,FITC染料通过硫醇-烯点击反应成功进行了附着,以及硫醇-PEG-Cy5-C' 点上的硫醇基的可及性。

[0179] 除了上述的胺基-硅烷/NCS-配体和硫醇-硅烷/mal-配体化学以外,还可以使用类似的方法来应用其他类型的缀合化学,例如叠氮基-硅烷/炔炔-配体(见下文)。

[0180] PPSMI合成方法可以产生具有不同官能性的C' 点家族,包括胺基和硫醇基官能化的C' 点。这些反应性C' 点可能会成为有用平台以允许进行后续修饰,即在NP制备后,根据目标应用使用各种配体。但是,特别是在用NH₂-c(RGDyC)-Cy5-C' 工作时,有个缺点是它们显示出降低的NP稳定性。对于NH₂-c(RGDyC)-Cy5-C' 点,与小摩尔质量物质相关的峰在NP制备后6个月开始出现在GPC洗脱图中(图14A)。这可能归因于例如从NP表面释放的肽基团。相比之下,常规的c(RGDyC)-PEG-C' 点在至少两年的时间内表现出独特的NP稳定性,无论NP特征还是体内性能均未改变。因此,我们怀疑胺化C' 点的降解可能是由于伯胺基周围的局部高pH环境加速了硅烷水解而引起的。

[0181] 相反,在使用基于胺的PPSMI方法制备NP后6个月,在DF0-c(RGDyC)-Cy5-C' 点的GPC洗脱图和FCS表征中未观察到实质性变化,表明具有所需的NP稳定性(图14B)。这可能是由于DF0-NCS在PEG化后的修饰反应过程中封端了伯胺基,从而缩短了具有活性伯胺基的C' 点的寿命。由于这个原因,虽然原则上可以在NP制备后单独制备胺基和硫醇基官能化的C' 点,以进行进一步修饰,但最理想的是通过在NP制备过程中引入其他官能性NP配体来直接使这些官能团反应,以快速转化这些反应性基团以获得所需的NP稳定性和较长的产品保质期。

[0182] 具有三种类型的官能表面配体的四官能C' 点:PPSMI方法的模块化。可以在PEG化后的表面修饰反应过程中组合上述不同的缀合化学,从而为多官能C' 点提供模块化途径,所有都在一锅法合成内进行。

[0183] 为了进行证明,在PEG化后,首先用胺基官能化c (RGDyC) -PEG-Cy5-C' 点,从而生成NH₂-c (RGDyC) -PEG-Cy5-C' 点。然后将DF0-NCS螯合剂通过胺基-NCS缀合连接到这些C' 点上,从而封端伯胺基团。然后,将所得的DF0-c (RGDyC) -PEG-Cy5-C' 点进一步用硫醇基-硅烷官能化,生成SH-DF0-c (RGDyC) -PEG-Cy5-C' 点。最后,将FITC-ma1 pH传感染料插入PEG层中,并通过硫醇-烯点击反应使其附着在C' 点二氧化硅表面,从而封端反应性硫醇基团(图1)。吸光度测量结果证实,所得的窄分布的FITC-DF0-c (RGDyC) -PEG-Cy5-C' 点总共整合了四种官能团(图5A),同时GPC和FCS表征都提示6.8nm的粒径仍保持窄分布且低于7nm(图5B和C)。根据上述的反卷积方法,使用针对每个单独组分的一套吸光度标准估算每种NP的Cy5、c (RGDyC)、DF0和FITC基团的数量(图15和表1)。c (RGDyC) 肽附着在C' 点PEG层的外部,从而能够主动靶向肿瘤。将分别能够进行放射性同位素螯合和pH传感的DF0和FITC配体插入PEG层。这种设计可确保它们可与小离子接触,但同时减少了对C' 点的体内性能的潜在负面效应。当在488nm处激发时,NP在不同的pH值下在约525nm处显示出多样的荧光强度(图5D)。这种荧光可归因于插入PEG层的pH敏感FITC染料的发射。相比之下,当在645nm处激发时,NP在约675nm处显示出独立于pH的荧光(图5E)。该荧光与二氧化硅核内部的Cy5染料相对应。这种明亮的NIR荧光不仅可以使C' 点进行光学成像(例如用于图像引导的手术),也可用作比率型pH传感的参考信号。为此,通过将峰传感器发射强度(525nm)除以峰参考发射强度(660nm)作为pH的函数,得出比率型校准曲线(图5F)。

[0184] 有趣的是,与先前报道的pH传感C点相比(即从pH 4.5到pH 8,中间pH为约6.5)⁴¹,FITC-DF0-c (RGDyC) -PEG-Cy5-C' 点的pH应答涵盖了更宽的pH范围(图5E)(即从pH 4到pH 10,中间pH为约7)。这很可能是由FITC-DF0-c (RGDyC) -PEG-Cy5-C' 点的PEG层下面的封端仲胺基引起的,其影响FITC染料周围的局部酸度。除了其他颗粒官能外,PEG层中FITC和胺基的共定位赋予C' 点独特的pH敏感性。这种设计策略还提供了一个概念用于通过仔细调整染料周围的化学环境(即二氧化硅核和PEG层)来进一步调整C' 点的光学特性。

[0185] PPSMI方法的正交性。上述PPSMI方法最显著的优点之一是,它受完善的、模块化和正交的缀合化学的丰富工具箱支持。例如,除了上述胺基-硅烷/NCS-配体和硫醇-硅烷/ma1-配体化学外,还可以使用类似的方法来应用其他类型的缀合化学,例如,叠氮基-硅烷/炔烃-配体。此外,由于这些使用不同化学的缀合反应通常不会互相干扰,因此可以将不同的官能配体同时附着于C' 点上。

[0186] 为了进行证明,与按次序添加胺基-硅烷,DF0-NCS,硫醇-硅烷和FITC-ma1相反,将胺基-硅烷和硫醇-硅烷一起添加到c (RGDyC) -PEG-Cy5-C' 点反应中,以同时用胺基和硫醇基官能化C' 点。随后一起添加DF0-NCS和FITC-ma1以同时将胺和硫醇基团转化为官能配体。纯化后,所得的FITC-DF0-c (RGDyC) -Cy5-C' 点显示出了所需的GPC洗脱图,并且每次FCS表征都具有约6.7nm的平均直径(图16A和B)。通过拟合纯化颗粒的UV-vis光谱(图16C),将每个单独组分的吸收进行反卷积,包括Cy5、c (RGDyC)、DF0和FITC(图16D至G)。这表明通过用DF0和FITC同时进行缀合反应,成功地进行了表面修饰。PPSMI方法是对PEG化二氧化硅NP进行官能化的强大方法,因为使用PPSMI进行缀合的正交性显著缩短了表面修饰所需的反应时间,从而进一步简化了多官能二氧化硅NP的制备。

[0187] 在PEG化期间和之后,通过进行表面修饰的组合得到的具有四种类型官能表面配体的五官能C' 点。我们已经描述过可以在PEG化步骤期间或通过PEG化后的表面修饰,将不

同类型的官能团引入C'点表面。这两种方法的组合提供了模块化和正交的途径来使多官能C'点具有最多的表面官能团数量,所有都在水性介质中的一锅法合成内进行。为此,为了进行证明,我们合成了五官能C'点,其在NP表面上具有总共四种不同的官能配体(图1),从而可以同时进行光学示踪、特异性细胞靶向、比率型传感、放射性金属整合和潜在的药物递送。

[0188] 为了合成五官能C'点,首先在PEG化步骤中如上所述通过将c(RGDyC)-PEG-硅烷、mal-PEG-硅烷和PEG-硅烷共缩合到二氧化硅核的表面上来用特定的细胞靶向基团(即c(RGDyC)肽)和马来酰亚胺基团对NP表面进行修饰。在PEG化后,将硫醇基修饰的药物小分子加入到反应混合物中,以通过硫醇-烯点击反应附着于(从而终止)C'点表面上的马来酰亚胺基团。为了进行证明,我们选择依法韦仑(EFV,分子结构见图6A)作为小型治疗药物的一个实例,这是一种众所周知的用于治疗 and 预防HIV/AIDS的抗逆转录病毒药物。EFV含有炔基,所述炔基在一个单独的步骤中通过点击化学反应与异双官能的叠氮基-PEG-硫醇反应,以用硫醇基团修饰EFV(图17A)。另外,EFV在低于300nm的波长范围内表现出独特的吸收特性,这与五官能C'点上的其他官能团的吸收不同(图17B和C)。应当注意,这里可以使用其他药物接头缀合策略,包括我们先前描述的酶可裂解的药物-接头缀合物。在将硫醇修饰的EFV附着于c(RGDyC)-mal-PEG-Cy5-C'点后,以遵循上文描述的四官能C'点的PPSMI合成方法的顺序,将胺基-硅烷、DFO-NCS、硫醇-硅烷和FITC-mal加入到反应混合物中,以进一步将DFO和FITC基团引入EFV-c(RGDyC)-PEG-Cy5-C'点,从而分别实现放射性金属整合和比率型pH传感。

[0189] 所得的FITC-DFO-EFV-c(RGDyC)-PEG-Cy5-C'点在纯化后显示出所需的GPC洗脱图,表明颗粒纯度较高(图6A)。使用单模式相关函数很好地拟合了FCS自相关曲线,表明其粒径分布较窄(图6B)。FITC-DFO-EFV-c(RGDyC)-PEG-Cy5-C'点的吸光度在整个光谱中显示出了多个峰,通过使用一组吸收光谱标准对光谱进行拟合,可以成功地将其反卷积至每个组分的独立贡献(图6D至H)。随后通过将每种组分的浓度除以从FCS获得的NP的浓度(表1和图6C至H),估算出C'点上每种官能团的具体平均数,方法与上述类似。虽然在C'点表面上总共附着了四种类型的不同官能团,但是平均粒径为6.9nm,仍低于7nm,仍非常接近临床转化的C'点的尺寸(表1)。

[0190] 在这个实施例中,我们描述了一锅型合成方法,用于以模块化和部分正交的方式将多种(此处:多达四种)类型的官能配体引入至荧光超小(直径<10nm)的基于PEG化二氧化硅的纳米颗粒(此处为C'点)的表面。可以通过将不同的异双官能PEG-硅烷共缩合到二氧化硅核的表面上来在PEG化步骤中引入不同类型的官能团。但是,我们已经证实,涉及在PEG化步骤中引入官能团的这种及类似的方法受到一些限制,并且经常导致产生不想要的特性,例如颗粒聚集。这些限制可以通过插入修饰PEG化后表面(PPSMI)的反应来克服。在PEG化后,可以将小的以及正交反应性的配体(例如胺基-和/或硫醇-硅烷分子)插入到PEG层中,并通过硅烷缩合附着于二氧化硅表面,从而实现模块化的NP修饰,其官能性超出了用于追踪颗粒的荧光和肿瘤靶向配体。例如,对于例如,⁸⁹Zr和¹⁷⁷Lu标记,一些最有效的螯合剂DFO和DOTA,可以分别通过与胺或硫醇基团反应来附着于PEG链之间和C'点的二氧化硅表面。可通过采用其他类型的广泛使用的缀合化学方法(包括硫醇-烯和叠氮基-炔基点击反应)来使将C'点型PEG化二氧化硅纳米颗粒官能化的PPSMI方法通用化。此外,可以将通过用不同

的缀合化学方法进行的PEG化后表面插入修饰组合起来,以模块化和正交的方式提供多官能C'点。最后,为了使表面官能性最大化,可以将通过在PEG链之间插入配体而进行的PEG化后表面修饰与在PEG化步骤期间进行的表面修饰相结合,从而在结合有PEG链的表面的外部产生表面配体。为了进行证明,我们合成了五官能DF0-FITC-EFV-c(RGDyC)-PEG-Cy5-C'点,其在单个颗粒上结合了总共五种类型的配体基团/官能性:用于进行光学颗粒成像的颗粒核中的NIR荧光染料,用于进行特定肿瘤细胞靶向的肽配体,用于进行定量比率型传感的pH传感染料,用于进行正电子发射断层扫描(PET)成像以及放射疗法的放射性金属螯合剂,以及使得颗粒具备治疗诊断性和使得具有疾病治疗能力的配体-药物缀合物。所有的这些在实现的同时,还保持了纳米颗粒的特性,例如低于7nm的超小粒径,较高的PEG化密度,良好的胶体稳定性以及对各个配体数量/表面密度的控制,其应保持颗粒转化进入临床所需的良好生物分布以及PK特性。虽然有多个特定的C'点已被FDA批准作为IND用于人体临床试验,但是这项工作为C'点临床应用的进一步多样化打开了大门。

[0191] 化学品和试剂。所有材料均按原样使用。二甲基亚砜(DMSO)、异丙醇、(3-巯基丙基)三甲氧基硅烷(MPTMS)、(3-氨基丙基)三乙氧基硅烷(APTES)、(3-氨基丙基)三甲氧基硅烷(APTMS)、原硅酸四甲酯(TMOS)、依法韦仑(EFV)和2.0M的氨的乙醇溶液购自Sigma Aldrich。甲氧基封端的聚(乙二醇)链(PEG-硅烷,摩尔质量为约500)购自Gelest。具有马来酰亚胺和NHS酯基的异双官能PEG(mal-PEG-NHS,摩尔质量为约870)购自Quanta BioDesign。异官能叠氨基-PEG-硫醇(摩尔质量为约600)购自Nanocs Inc。Cy5和Cy5.5荧光染料购自GE,以及CW800荧光染料购自Li-cor。S-2-(4-异硫氰酸苄酯)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷基四乙酸(DOTA-NCS)和1-(4-异硫氰酸苄酯)-3-[6,17-二羟基-7,10,18,21-四氧代-2,7-(N-乙酰基羟胺基)-6,11,17,22-四氮杂庚烷二十碳四烯基(tetraazaheptaicosine)]硫脲(DF0-NCS)购自Macrocyclics。环状(精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-D-酪氨酸-半胱氨酸)肽(c(RGDyC))购自Peptide International。使用Millipore Milli-Q系统生成去离子水(DI水)。

[0192] 用于描述不同C'点化学的综合命名法。此处介绍的以及下文用于区分不同的C'点化学的命名法示于图7中(还参见表1)。具体地,从左边起第一个术语表示NP产物平台,例如,基于水的C'点或单孔介孔二氧化硅纳米颗粒,mC点。³⁴在NP平台后面的括号中给出了被共价包封在二氧化硅基质中的特定染料(例如,图7中的Cy5)。括号右侧的内容按附着顺序描述了附着于NP表面的组分(由于点是最先合成的,因此它们出现在最左边,而不是像现有的缩写名称一样出现在右边)。为了突出颗粒表面上的官能团的关联性,我们引入了以下区别:出现在虚线右侧的组分表示它直接附着于该虚线左侧的组分。相反,如果组分出现在下划线的右侧,则该组分直接附着于二氧化硅NP的表面,而不是附着于该下划线左侧的在前组分。与用于缀合化学的基团(例如,mal-硫醇,其描述了马来酰亚胺和硫醇基团之间的缀合)相反,用粗体和斜体表示限定功能的组分,例如,靶向性配体或其他荧光染料(参见图7和表1)。如果官能团通过PEG链与二氧化硅NP表面连接,则示出乙二醇单体单位的数目,例如PEG6或PEG12。如引言所述,纳米颗粒的名称以这种方式携带有关以下方面的准确信息:(i) NP平台;(ii) 被包封的荧光染料;(iii) 特定的表面官能性及其与颗粒的连接性;(iv) 特定的缀合化学,(v) 合成顺序,或(vi) 特定的PEG链长。

[0193] 用不同类型的NIR染料官能化的C'点(染料)-PEG12-mal-硫醇-c(RGDyC)-PEG6的

合成。c (RGDyC) 官能化的C' 点的详细合成在我们以前的出版物中有所描述。为了包封不同类型的NIR染料,在C' 点合成的第一步中,将硅烷官能化的染料(例如,Cy5-硅烷、Cy5.5-硅烷和CW800-硅烷)与TMOS一起加入到反应混合物中。其余的NP合成与先前报道的c (RGDyC) 官能化C' 点的方案相同。

[0194] 合成C' 点(染料)-PEG12-mal-硫醇-c (RGDyC)_PEG6,其每种颗粒具有数量增加的c (RGDyC)。c (RGDyC)-PEG-硅烷的浓度从最初的0.69mM(其一般使每个C' 点中c (RGDyC) 肽数量在16到25之间)升高到1.73mM,以进一步增加每个NP中c (RGDyC) 的数量。为了防止NP聚集,还将氢氧化铵的反应浓度从2mM升高到6mM。实现方法可以是在6mM的氢氧化铵浓度下开始C' 点合成,或在PEG化步骤之前立即添加额外的氢氧化铵以将氢氧化铵的浓度提升至6mM。观察到通过这两种略有不同的方法产生的最终C' 点产物仅有细微的差异。因此,为了简化制备过程,优选以6mM的铵浓度开始合成。

[0195] C' 点(染料)-PEG12-mal-硫醇-c (RGDyC)_PEG12-mal_PEG6,C' 点(染料)-PEG12-mal-硫醇-c (RGDyC)_胺基-NCS-DF0_PEG6和C' 点(染料)-PEG12-mal-硫醇-c (RGDyC)_PEG4-DBC0_PEG6的合成。为了向C' 点(染料)-PEG12-mal-硫醇-c (RGDyC)_PEG6引入其他官能配体,在PEG化步骤中将配体-硅烷缀合物与c (RGDyC)-PEG-硅烷和PEG-硅烷一起添加到反应混合物中。这些配体-硅烷缀合物包括马来酰亚胺官能化的异双官能PEG-硅烷(mal-PEG-硅烷)、DF0-官能化的硅烷(DF0-NCS-胺基-硅烷)和DBC0-官能化的异双官能PEG-硅烷(DBC0-PEG-硅烷)。这些配体-硅烷缀合物的浓度范围为0.01mM至0.34mM,具体取决于对表面配体密度的要求。通过这种方法产生的C' 点(染料)-PEG12-mal-硫醇-c (RGDyC)_PEG12-mal_PEG6显示出对硫醇官能化的配体具有想要的反应性。但是,C' 点(染料)-PEG12-mal-硫醇-c (RGDyC)_胺基-NCS-DF0_PEG6和C' 点(染料)-PEG12-mal-硫醇-c (RGDyC)_PEG4-DBC0_PEG6表现出了不想要的特性谱或不均匀的配体分布。

[0196] C' 点(染料)-胺_PEG12-mal-硫醇-c (RGDyC)_PEG6和C' 点(染料)-PEG12-mal-硫醇-c (RGDyC)_PEG6_胺的合成。为了在C' 点上引入胺基,在C' 点合成的不同步骤中将胺基-硅烷(即APTMS)引入到反应混合物中。一种方式是,在剧烈搅拌下将浓度为1.7mM的APTMS加入反应混合物中,紧接着添加c (RGDyC)-PEG-硅烷和PEG-硅烷,其余合成过程保持不变。所得的C' 点(染料)-胺_PEG12-mal-硫醇-c (RGDyC)_PEG6显示出了较宽的NP尺寸分布。同时,观察到了Cy5染料的降解。在PEG化后方法中,在PEG化步骤之后添加APTMS。进行方式为首先在PEG化步骤结束时将反应温度从80℃降至室温,然后在剧烈搅拌下以2.3mM的浓度添加APTMS。然后在剧烈搅拌下将反应混合物于室温下放置过夜,然后进行纯化。GPC和UV-vis表征显示,所得的C' 点(染料)-PEG12-mal-硫醇-c (RGDyC)_PEG6_胺表现出了想要的NP尺寸分布和良好的吸收特性。用这种方法,可以以低至0.3mM的APTMS浓度成功制备C' 点(染料)-PEG12-mal-硫醇-c (RGDyC)_PEG6_胺,同时NP产物不会失去与胺反应性配体的反应性。

[0197] C' 点(染料)-PEG12-mal-硫醇-c (RGDyC)_PEG6_胺基-NCS-DF0和C' 点(染料)-PEG12-mal-硫醇-c (RGDyC)_PEG6_胺基-NCS-DOTA的基于PPSMI的合成。通过在加入胺基-硅烷一天后,在剧烈搅拌下于室温将DF0-NCS或DOTA-NCS分别加入C' 点(染料)-PEG12-mal-硫醇-c (RGDyC)_PEG6_胺的反应混合物中来合成C' 点(染料)-PEG12-mal-硫醇-c (RGDyC)_PEG6_胺基-NCS-DF0和C' 点(染料)-PEG12-mal-硫醇-c (RGDyC)_PEG6_胺基-NCS-DOTA。在纯化之前,将反应在剧烈搅拌下室温放置过夜。使DF0-NCS和DOTA-NCS的浓度在0.02mM至

0.4mM之间变化,以改变每种NP的DF0或DFCO的数量。APTMS和DF0的浓度均可改变,以控制每种NP的DF0数量。

[0198] C'点(染料)-PEG6_硫醇和C'点(染料)-PEG6_硫醇-mal-FITC的基于PPSMI的合成。为了将硫醇基团引入PEG-C'点以生成硫醇官能化的C'点(染料)-PEG6_硫醇,通过用硫醇-硅烷取代胺基-硅烷以及使用C'点(染料)-PEG6作为基础NP而不使用C'点(染料)-PEG12-mal-硫醇-c(RGDyC)_PEG6来调整C'点(染料)-PEG12-mal-硫醇-c(RGDyC)_PEG6_胺的合成。NP合成的其余部分仍与C'点(染料)-PEG12-mal-硫醇-c(RGDyC)_PEG6_胺的合成相同。为了进一步将FITC染料附着于C'点(染料)-PEG6_硫醇以生成C'点(染料)-PEG6_硫醇-mal-FITC,通过用FITC-mal取代DF0-NCS以及使用C'点(染料)-PEG6_硫醇作为基础NP而不使用C'点(染料)-PEG12-mal-硫醇-c(RGDyC)_PEG6_胺来调整C'点(染料)-PEG12-mal-硫醇-c(RGDyC)_PEG6_胺基-NCS-DF0的合成。NP合成的其余部分与C'点(染料)-PEG12-mal-硫醇-c(RGDyC)_PEG6_胺基-NCS-DF0的合成相同。

[0199] 四官能C'点(Cy5)-PEG12-mal-硫醇-c(RGDyC)_PEG6_胺基-NCS-DF0_硫醇-mal-FITC的基于PPSMI的合成。通过经由所述针对C'点(染料)-PEG12-mal-硫醇-c(RGDyC)_PEG6_胺基-NCS-DF0的合成方法首先将DF0基团引入C'点(Cy5)-PEG12-mal-硫醇-c(RGDyC)_PEG6来合成C'点(Cy5)-PEG12-mal-硫醇-c(RGDyC)_PEG6_胺基-NCS-DF0_硫醇-mal-FITC。然后,通过所述合成方法将硫醇基团添加到C'点(染料)-PEG6_硫醇中,生成C'点(Cy5)-PEG12-mal-硫醇-c(RGDyC)_PEG6_胺基-NCS-DF0_硫醇。在最后一步中,通过所述合成方法将FITC染料附着于C'点(染料)-PEG6_硫醇-mal-FITC。最终通过GPC纯化所得的C'点(Cy5)-PEG12-mal-硫醇-c(RGDyC)_PEG6_胺基-NCS-DF0_硫醇-mal-FITC并进行FCS和光学表征。还通过一种替代性方法合成了相同的C'点(Cy5)-PEG12-mal-硫醇-c(RGDyC)_PEG6_胺基-NCS-DF0_硫醇-mal-FITC,在所述方法中,将胺基-硅烷和硫醇-硅烷一起添加到反应混合物中,而不是依次添加。然后将反应物于室温在剧烈搅拌下放置4小时,然后同时添加DF0-NCS和FITC-mal。其余反应保持不变。

[0200] C'点(Cy5)-PEG12-mal-硫醇-c(RGDyC)_PEG12-mal-硫醇-PEG10-EVF_PEG6_胺基-NCS-DF0_硫醇-mal-FITC的合成。首先通过经叠氮基-炔烃点击化学使EFV与叠氮基-PEG-硫醇以4EFV:1叠氮基-PEG-硫醇的摩尔比在DMSO中(EFV浓度为约0.021M)缀合来合成C'点(Cy5)-PEG12-mal-硫醇-c(RGDyC)_PEG12-mal-硫醇-PEG10-EVF_PEG6_胺基-NCS-DF0_硫醇-mal-FITC。将该反应混合物在氮气下放置6天,以达到所需的缀合产率。然后在PEG化步骤之后(即80°C热处理步骤之后)将所得的硫醇官能化的EFV以1.15mM的浓度加入C'点(Cy5)-PEG12-mal-硫醇-c(RGDyC)_PEG12-mal_PEG6的反应混合物中。然后将反应混合物在室温剧烈搅拌下再放置6天,以将硫醇官能化的EFV附着于C'点(Cy5)-PEG12-mal-硫醇-c(RGDyC)_PEG12-mal_PEG6上的马来酰亚胺基团上,生成C'点(Cy5)-PEG12-mal-硫醇-c(RGDyC)_PEG12-mal-硫醇-PEG10-EVF_PEG6。随后,按照与上述C'点(Cy5)-PEG12-mal-硫醇-c(RGDyC)_PEG6_胺基-NCS-DF0_硫醇-mal-FITC的相同的过程引入DF0和FITC。

[0201] c(RGDyC)-PEG-C'点的GPC表征和纯化。C'点的详细的GPC表征和纯化步骤已在之前我们的出版物中进行了描述。

[0202] UV-vis和FCS测量。在Varian Cary 5000分光光度计上测量了样品的吸收光谱。如前所述,使用自制的FCS/FCCS设置进行了FCS测量。使用635nm固态激光器激发Cy5和Cy5.5

点,并且使用785nm固态激光器激发cw800点。

[0203] 用于描述不同C'点化学的综合命名法。此处介绍的以及下文用于区分不同的C'点化学的命名法示于图7中(还参见表1)。具体地,从左边起第一个术语表示NP产物平台,例如,基于水的C'点或单孔介孔二氧化硅纳米颗粒,mC点。在NP平台后面的括号中给出了被共价包封在二氧化硅基质中的特定染料(例如,图7中的Cy5)。括号右侧的内容按附着顺序描述了附着于NP表面的组分(由于点是最先合成的,因此它们出现在最左边,而不是像我们现有的名称一样出现在右边)。为了突出颗粒表面上的官能团的关联性,我们引入了以下区别:出现在虚线右侧的组分表示它直接附着于该虚线左侧的组分。相反,如果组分出现在下划线的右侧,则该组分直接附着于二氧化硅NP的表面,而不是附着于该下划线左侧的在前组分。与用于缀合化学的基团(例如,ma1-硫醇,其描述了马来酰亚胺和硫醇基团之间的缀合)相反,用粗体和斜体表示限定功能的组分,例如,靶向性配体或其他荧光染料(参见图7和表1)。如果官能团通过PEG链与二氧化硅NP表面连接,则示出乙二醇单体单位的数目,例如PEG6或PEG12。如导言所述,纳米颗粒的名称以这种方式携带有关以下方面的准确信息:(i) NP平台;(ii) 被包封的荧光染料;(iii) 特定的表面官能性及其与颗粒的连接性;(iv) 特定的缀合化学,(v) 合成顺序,或(vi) 特定的PEG链长。

[0204] 实施例2

[0205] 本实施例提供了本公开所述方法和组合物的实例及其用途。

[0206] 描述了通过PPSMI方法合成的官能性C'点的实例,即DBC0-PEG-Cy5-C'点(图18)。DBC0-PEG-Cy5-C'点在C'点表面的PEG链之间含有DBC0反应性基团。DBC0基团可以通过点击化学进一步与叠氮基缀合的官能配体反应,从而将另外的官能团引入C'点。为了产生DBC0-PEG-Cy5-C'点,首先在形成C'点二氧化硅核的过程中将硅烷缀合的Cy5荧光染料共价包封在二氧化硅纳米颗粒中。然后将PEG-硅烷共价附着于二氧化硅纳米颗粒的表面,形成PEG化的PEG-Cy5-C'点。在PEG化步骤之后,将胺基-硅烷添加到反应混合物中,以通过硅烷缩合共价附着于C'点PEG层下方的剩余硅烷醇基团,从而引入反应性胺基。随后加入DBC0-PEG4-NHS酯,以通过胺基-NHS酯缀合反应与C'点PEG层下面的胺基进一步反应。使用不同浓度的DBC0-PEG4-NHS酯来改变DBC0-PEG-Cy5-C'点的DBC0配体数。

[0207] 实施例3

[0208] 本实施例提供了本公开所述方法和组合物的实例及其用途。

[0209] 描述了通过PPSMI方法合成的官能性C'点的实例,即DBC0-DF0-PEG-Cy5-C'点(图19)。DBC0-DF0-PEG-Cy5-C'点在C'点表面的PEG链之间含有DBC0反应性基团和DF0螯合基团。虽然DBC0基团可以通过点击化学进一步与叠氮基缀合的官能配体反应,以向C'点引入另外的官能团,但是DF0基团可以螯合放射性金属,从而使C'点可用作正电子发射断层扫描(PET)的探针。为了产生DBC0-DF0-PEG-Cy5-C'点,首先在形成C'点二氧化硅核的过程中,将硅烷缀合的Cy5荧光染料共价包封在二氧化硅纳米颗粒中。随后将PEG-硅烷共价附着于二氧化硅纳米颗粒的表面,形成PEG化的PEG-Cy5-C'点。在PEG化步骤之后,将胺基-硅烷添加到反应混合物中,以通过硅烷缩合共价附着于C'点PEG层下方的剩余硅烷醇基团,从而引入反应性胺基。随后将SCN官能化的DF0(DF0-SCN)添加到反应混合物中,以通过胺基-SCN缀合反应与C'点PEG层下方的胺基反应。使用低浓度的DF0-SCN来向每个C'点引入少于5个的DF0螯合剂。因此,如上所述,C'点表面上剩余的胺基可用于DBC0的附着。在加入DF0-SCN一天

后,随后将DBCO-PEG4-NHS酯加入到反应混合物中,以通过胺基-NHS酯缀合反应进一步与C'点PEG层下方的剩余胺基反应。结果,DF0和DBCO都通过PPSMI方法共价附着于了PEG链之间的C'点表面。

[0210] 实施例4

[0211] 本实施例提供了本公开所述反应条件的总结。

[0212] 合成系统可以扩展到至少九种正交的和模块化的官能化路径,以选择性地将不同的官能团组合到单个纳米颗粒平台上。这些官能化方法适用的纳米颗粒平台包括,但不限于,C'点、A1C'点和mC点。(表2中的¹)

[0213] 除了Cy5、Cy5.5和cw800以外,其他类型的染料也可以通过缀合化学用硅烷基团官能化,所述缀合化学包括但不限于,硫醇-烯,胺基-NHS酯,叠氮基-炔烃化学。随后可以在核形成步骤中添加染料-硅烷缀合物,以赋予纳米颗粒不同的荧光特性。不同类型的染料包括,但不限于,DACM、DEAC、RHG、TMR、TRITC、FITC、Cy3、ATT0647N、ATT0680和DY782。(表2中的²)

[0214] 除了c(RGDyC)癌症靶向肽以外,也可以通过缀合化学使具有特定应用功能的其他配体附着于异双官能PEG-硅烷,所述缀合化学包括但不限于,硫醇-烯、胺基-NHS酯、叠氮基-炔烃化学。随后可以在PEG化步骤中添加所得的配体-PEG-硅烷缀合物,以赋予纳米颗粒不同的功能。不同的官能配体包括,但不限于,肽、抗体片段、DNA分子、RNA分子、荧光染料、传感分子、药物分子和螯合剂分子。(表2中的³)

[0215] 除了马来酰亚胺官能化的异双官能PEG-硅烷外,在PEG化步骤中,可以将含有反应性基团的其他异双官能PEG-硅烷附着于纳米颗粒表面,从而允许用另外的官能配体在PEG链末端上对纳米颗粒做进一步修饰。反应性基团包括,但不限于,马来酰亚胺基团、NHS酯基、叠氮基、胺基、硫醇基、炔基和DBCO基。(表2中的⁴)

[0216] 除了EFV-PEG-SH外,在PEG化之后,可以通过缀合化学使具有特定应用功能的其他配体附着于已经存在于纳米颗粒表面PEG链末端的反应性基团,所述缀合化学包括但不限于,硫醇-烯反应,胺基-NHS酯反应或叠氮基-炔烃反应。不同的官能配体包括,但不限于,肽、抗体片段、DNA分子、RNA分子、荧光染料、传感分子、药物分子和螯合剂分子。(表2中的⁵)

[0217] 除了硫醇-硅烷和胺基-硅烷外,可以在PEG化之后将含有反应性基团的其他硅烷缀合物插入PEG层中并附着在其下面的二氧化硅表面上,从而允许用另外的官能配体在PEG链之间对纳米颗粒做进一步修饰。反应性基团包括,但不限于,马来酰亚胺基团、NHS酯基、叠氮基、胺基、硫醇基、炔基和DBCO基。(表2中的⁶)

[0218] 除了DF0、DOTA和FITC之外,在PEG化之后,可以使具有特定应用功能的其他配体附着于已经插入PEG层的反应性基团。不同的官能配体包括,但不限于,肽、抗体片段、DNA分子、RNA分子、荧光染料、传感分子和螯合剂分子。(表2中的⁷)

[0219] 可以在PEG化后将包含具有特定应用功能的小配体的其他硅烷缀合物插入PEG层中,并附着在下面的二氧化硅表面上。不同的官能配体包括,但不限于,肽、抗体片段、DNA分子、RNA分子、荧光染料、传感分子和螯合剂分子。(表2中的⁸)

[0220]

表2. 在每个正交的官能化途径中使用的反应条件的总结。

合成步骤	正交途径 ¹	官能性	第1配体		第2配体 (如果适用的话)		每个颗粒的配体数	
			类型	浓度	类型	浓度		
核的形成	第1	荧光染料	Cy5-硅烷	0-0.6 mM			0-4个Cy5	
			Cy5.5-硅烷	0-0.6 mM			0-4个Cy5.5	
			Cw800-硅烷	0-0.6 mM			0-4个cw800	
		其它染料-硅烷缀合物 ²	0-0.6 mM			0-4个染料		
	第2	癌症靶向	C(RGDyC)-PEG-硅烷	0-2.1 mM			0-70个c(RGDyC)肽	
	第3	其它官能性包括, 但不限于, 光学示踪、疾病靶向、放射性同位素螯合、传感和治疗	附着于异双官能PEG-硅烷的其它官能配体 ³	0-2.1 mM			0-70个官能配体	
PEG化	第4	使得能够用官能配体进行进一步的改性治疗	mal-PEG-硅烷	0-2.1 mM			0-70个mal基团	
		其它官能性包括, 但不限于, 光学示踪、疾病靶向、放射性同位素螯合、传感和治疗	mal-PEG-硅烷	0-2.1 mM	EFV-PEG-SH	0-6 mM		0-50个EFV药物
	使得能够用官能配体进行进一步的改性	附着于异双官能PEG-硅烷的其它反应性基团 ⁴	0-2.1 mM	能够附着于马来酰亚胺基团的其它官能配体 ⁵	0-6 mM		0-50个官能配体	
	第5	其它官能性包括, 但不限于, 光学示踪、疾病靶向、放射性同位素螯合、传感和治疗	附着于异双官能PEG-硅烷的其它反应性基团 ¹	0-2.1 mM	能够附着于首先引入的反应性基团的其它官能配体 ⁵			0-70个反应性基团
				0-2.1 mM		0-6 mM		0-50个官能配体

[0221]

第6	使得能够用官能配体进行进一步的改性	胺基-硅烷	0-2.3 mM			0-40个胺基团
	放射性同位素螯合	胺基-硅烷	0-2.3 mM	DFO-NCS	0-1.3 mM	0-40个DFO螯合剂
	放射性同位素螯合	胺基-硅烷	0-2.3 mM	DOTA-NCS	0-1.3 mM	0-40个DOTA螯合剂
第7	其它官能性包括, 但不限于, 光学示踪、疾病靶向、放射性同位素螯合、传感和治疗	胺基-硅烷	0-2.3 mM	能够附着于胺基的其它官能配体	0-1.3 mM	0-40个反应性基团
	使得能够用官能配体进行进一步的改性	硫醇-硅烷	0-2.3 mM			
	传感	硫醇-硅烷	0-2.3 mM	FITC-NCS	0-1.3 mM	0-20个FITC染料
第8	其它官能性包括, 但不限于, 光学示踪、疾病靶向、放射性同位素螯合、传感和治疗	硫醇-硅烷	0-2.3 mM	能够附着于硫醇基的其它官能配体 ⁷	0-1.3 mM	0-40个官能配体
	使得能够用官能配体进行进一步的改性	附着于硅烷的其它反应性基团 ⁶	0-2.3 mM			0-40个反应性基团
	其它官能性包括, 但不限于, 光学示踪、疾病靶向、放射性同位素螯合、传感和治疗	附着于硅烷的其它反应性基团 ⁶	0-2.3 mM	能够附着于首先引入的反应性基团的其它官能配体 ⁷	0-1.3 mM	0-40个官能配体
第9	其它官能性包括, 但不限于, 光学示踪、疾病靶向、放射性同位素螯合、传感和治疗	附着于硅烷的其它官能配体 ⁸	0-2.3 mM			0-40个官能配体

PEG化后的表面改性

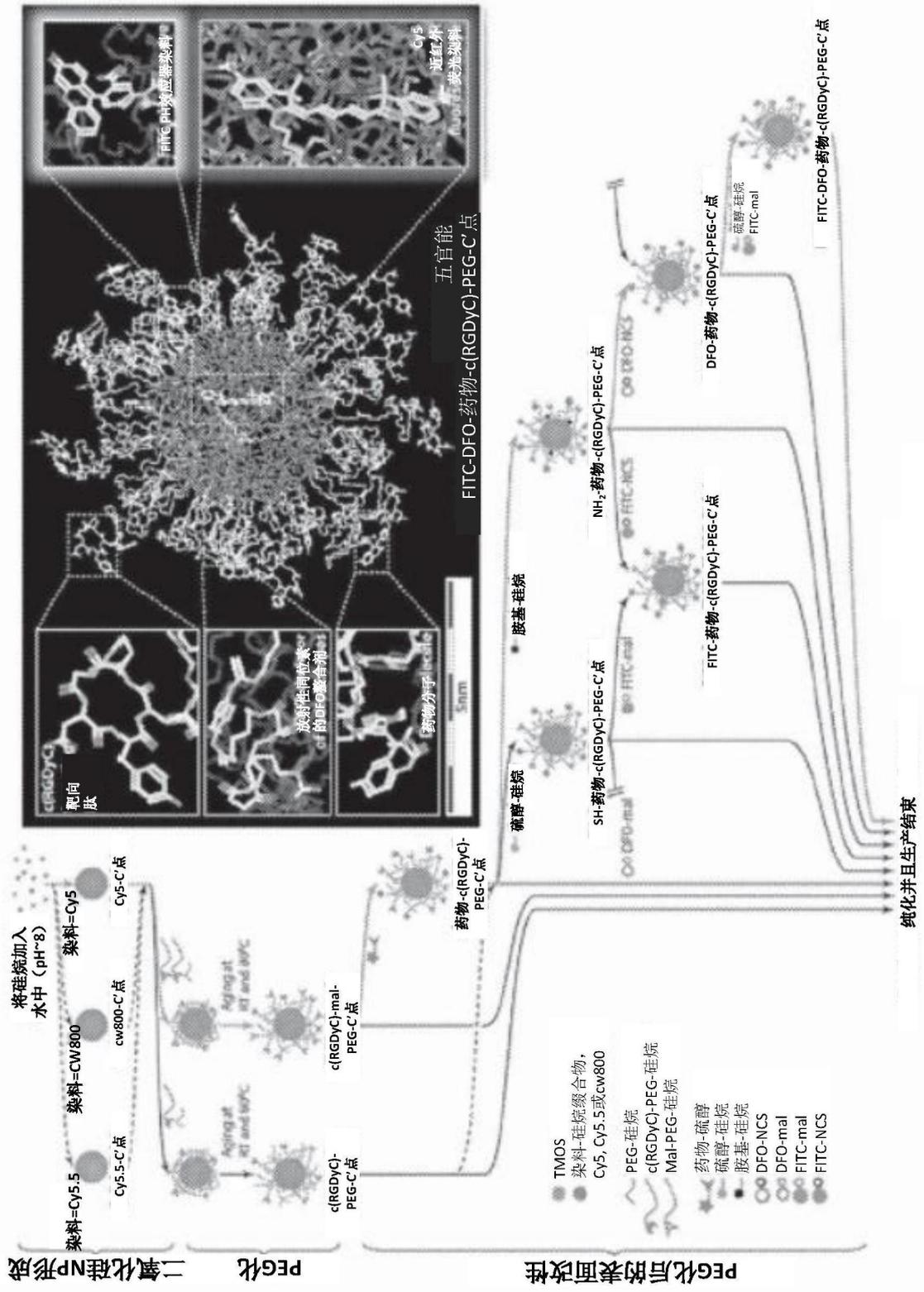


图1

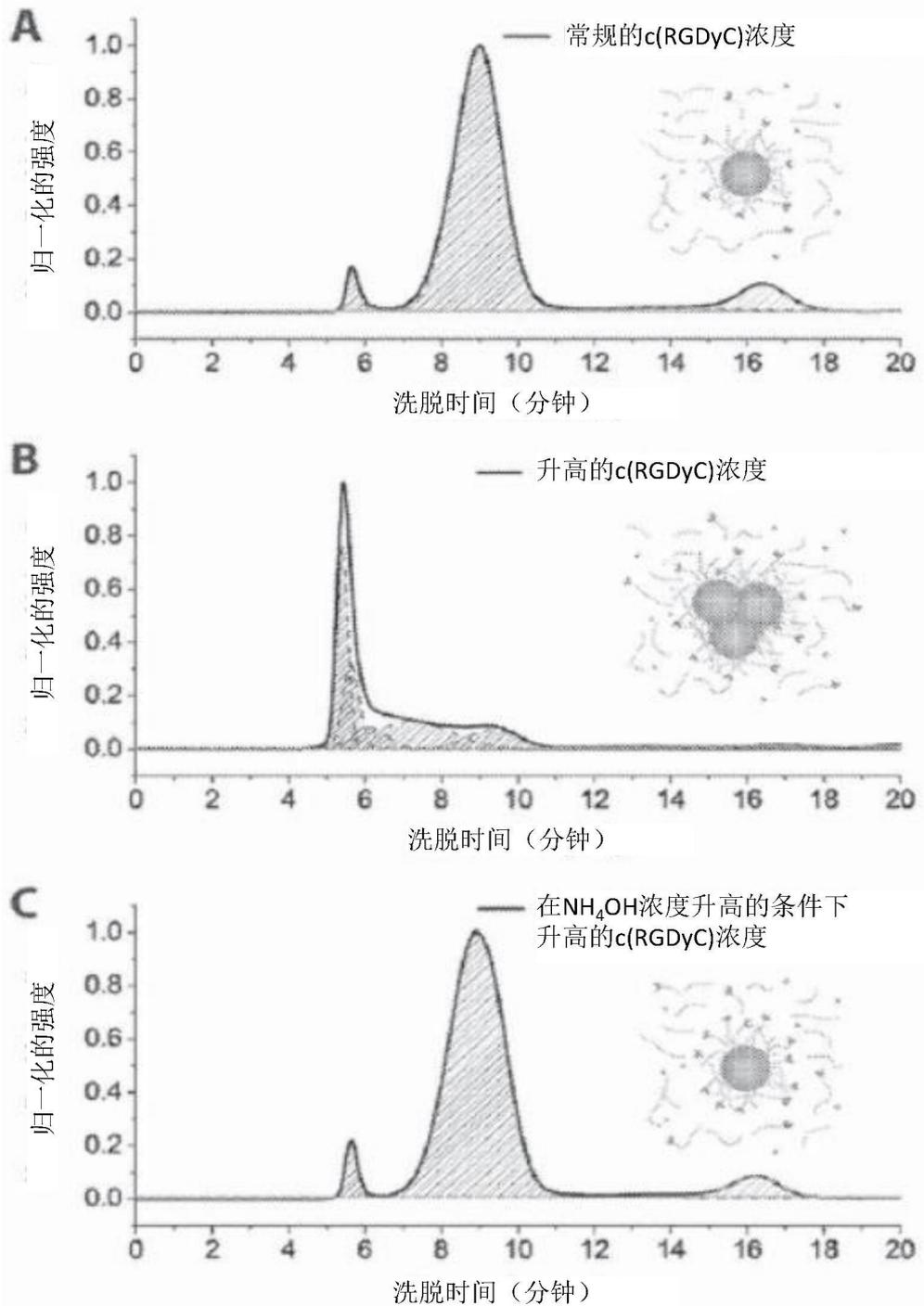


图2

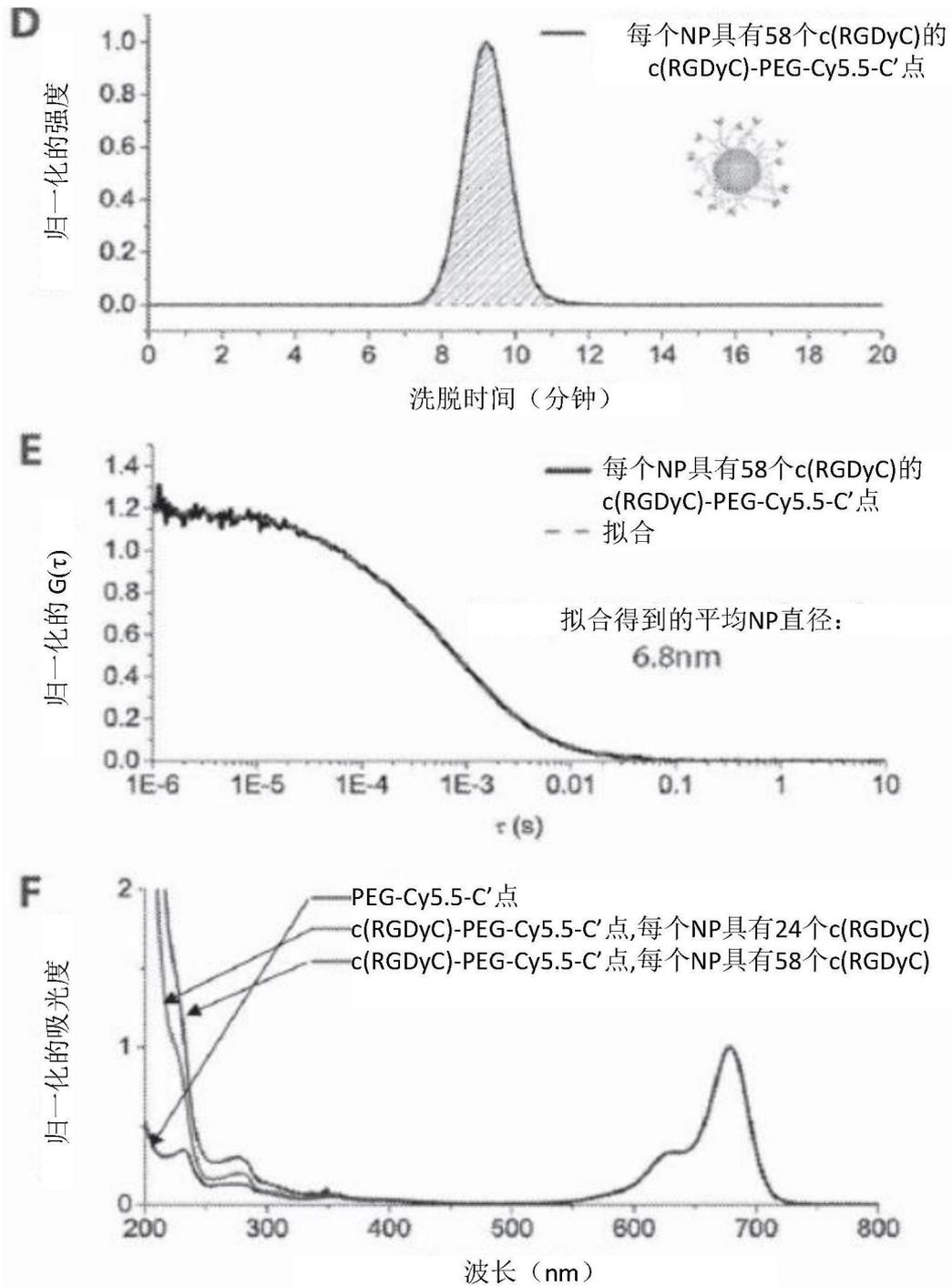


图2 (续)

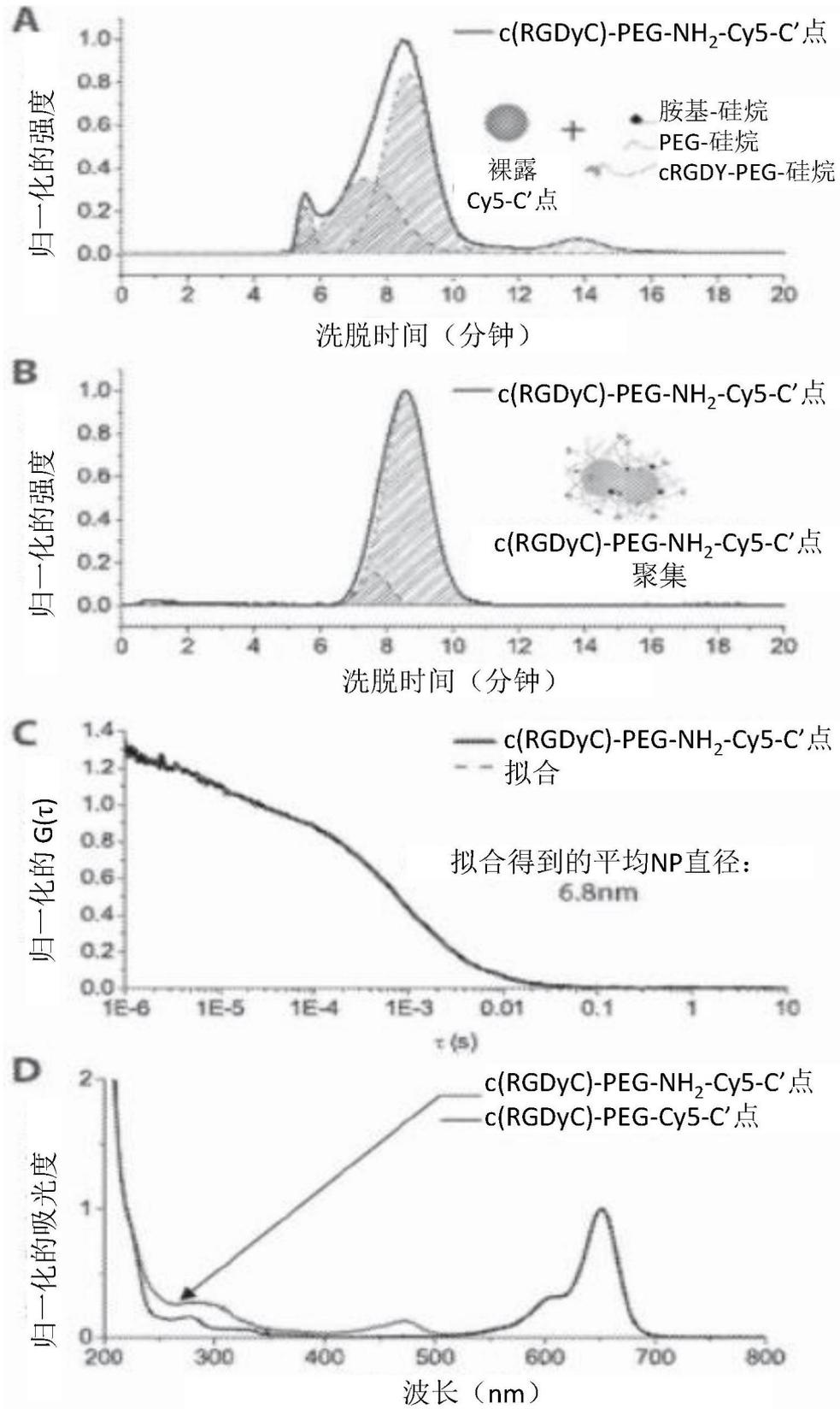


图3

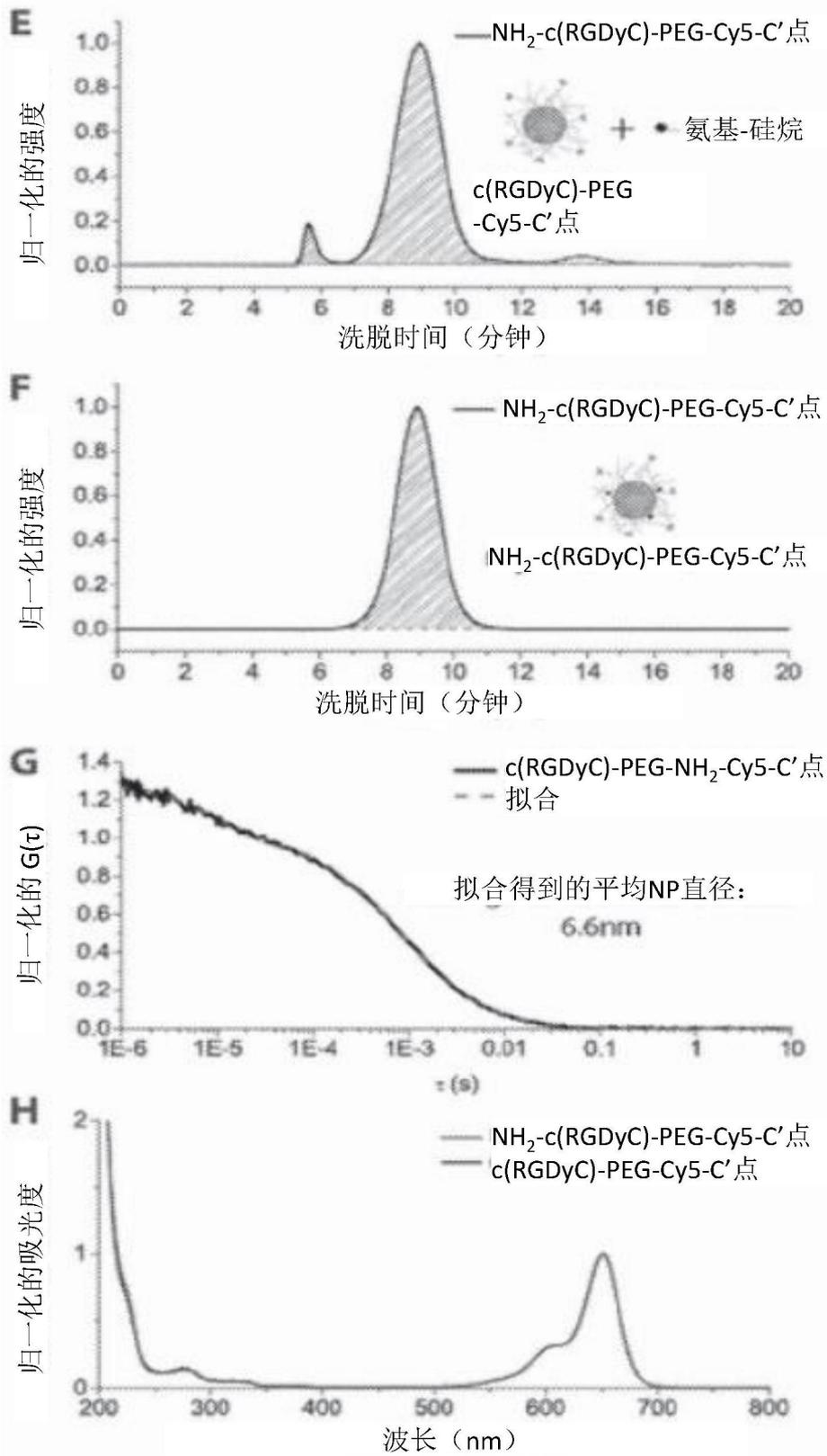


图3(续)

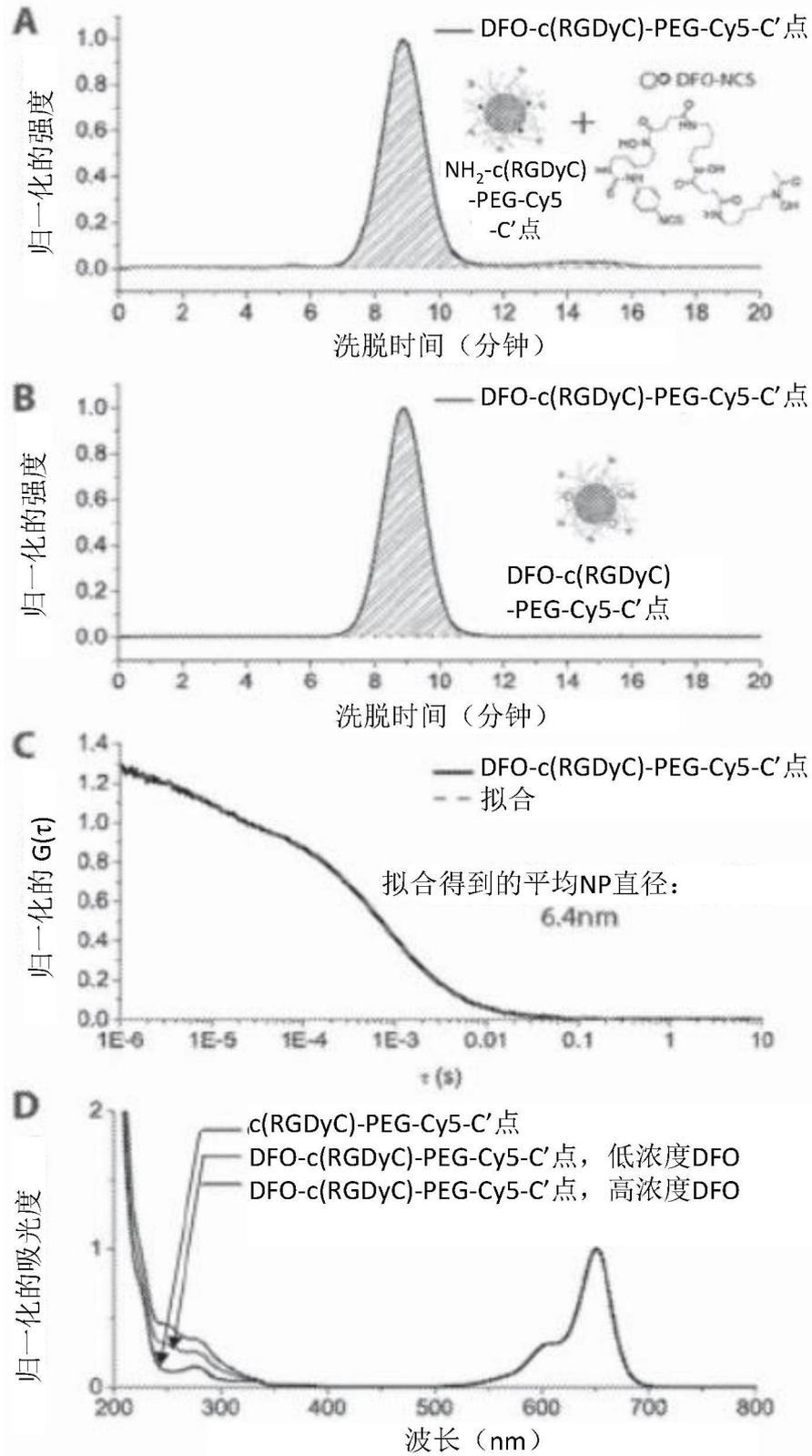


图4

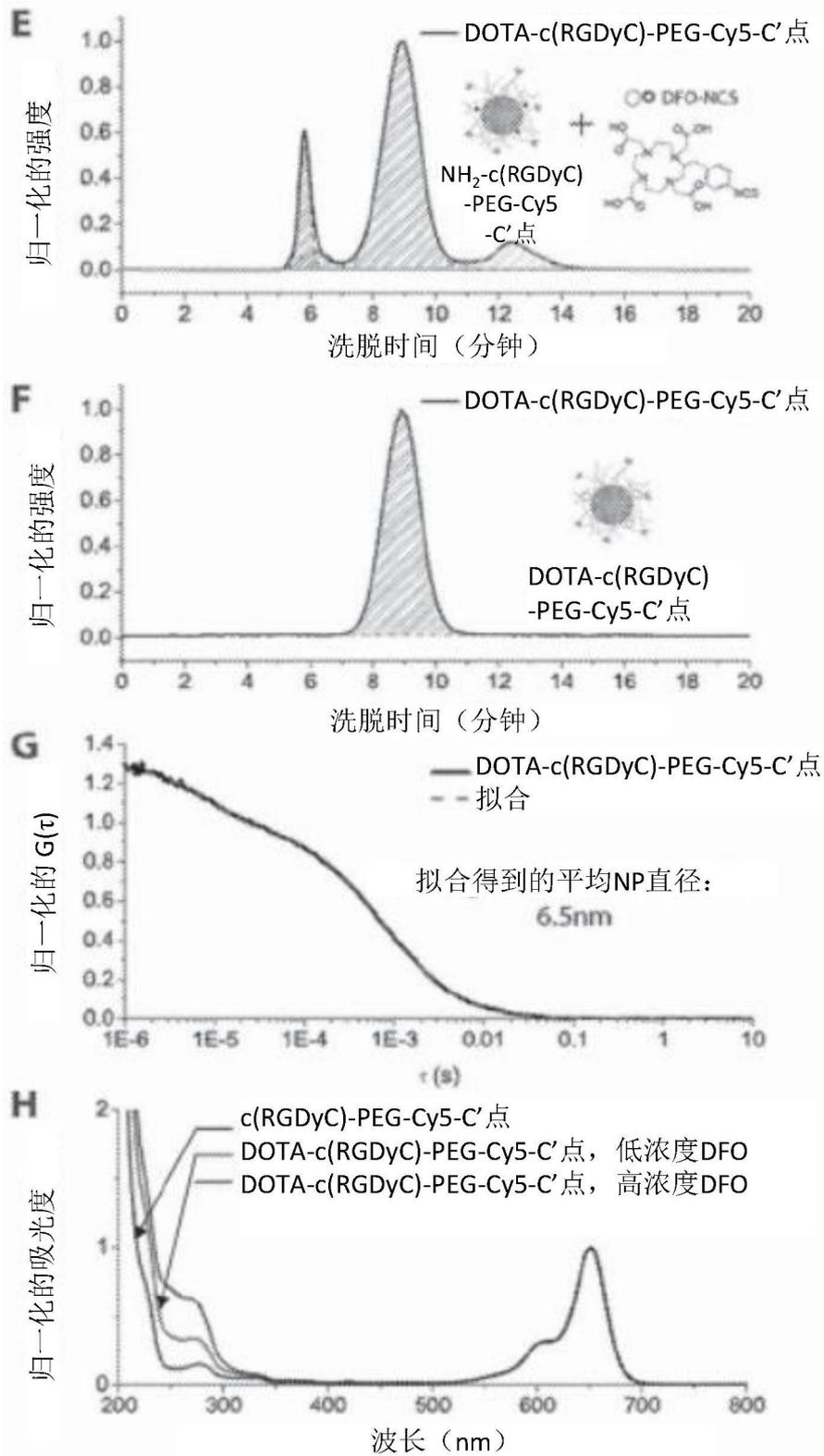


图4 (续)

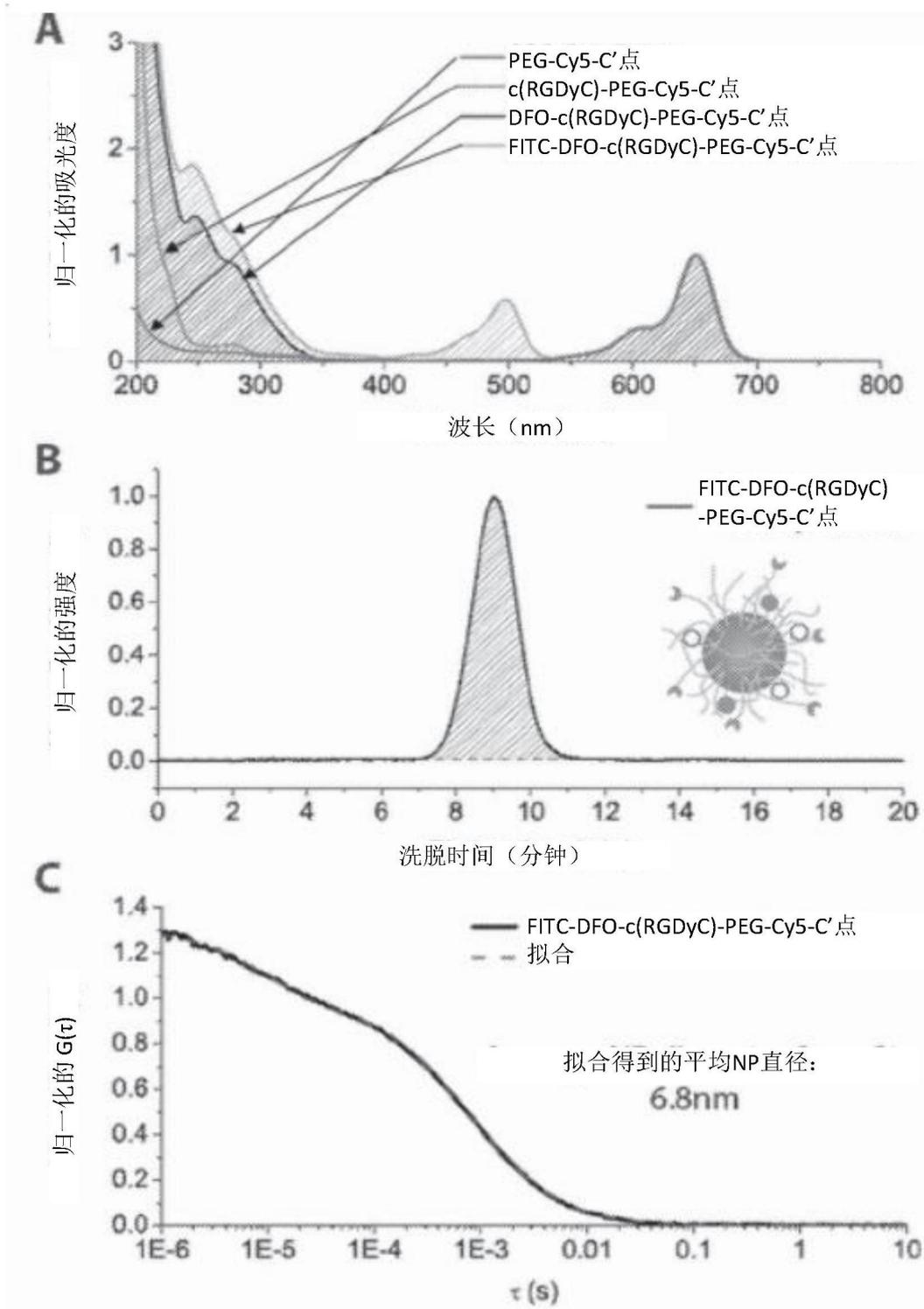


图5

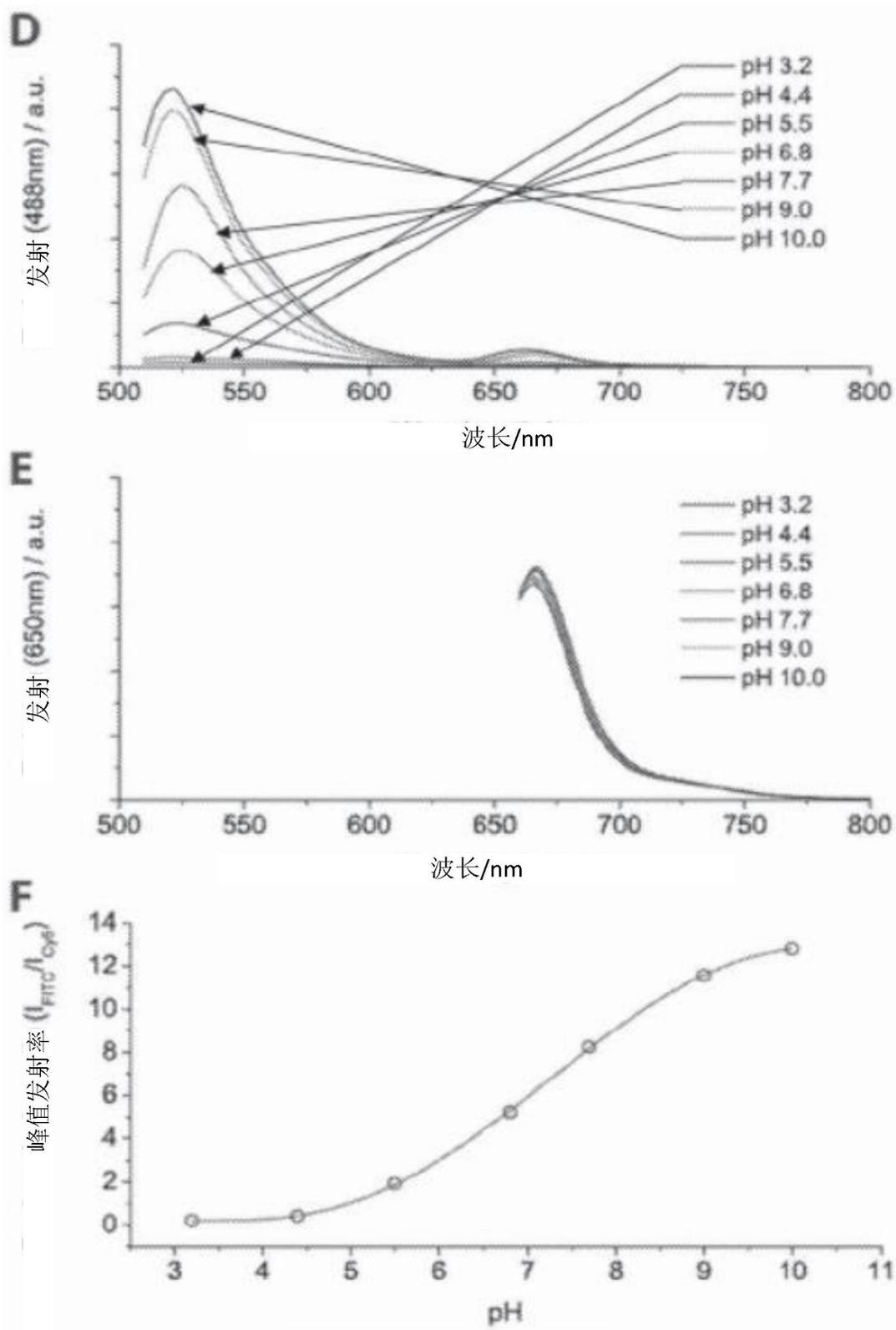


图5(续)

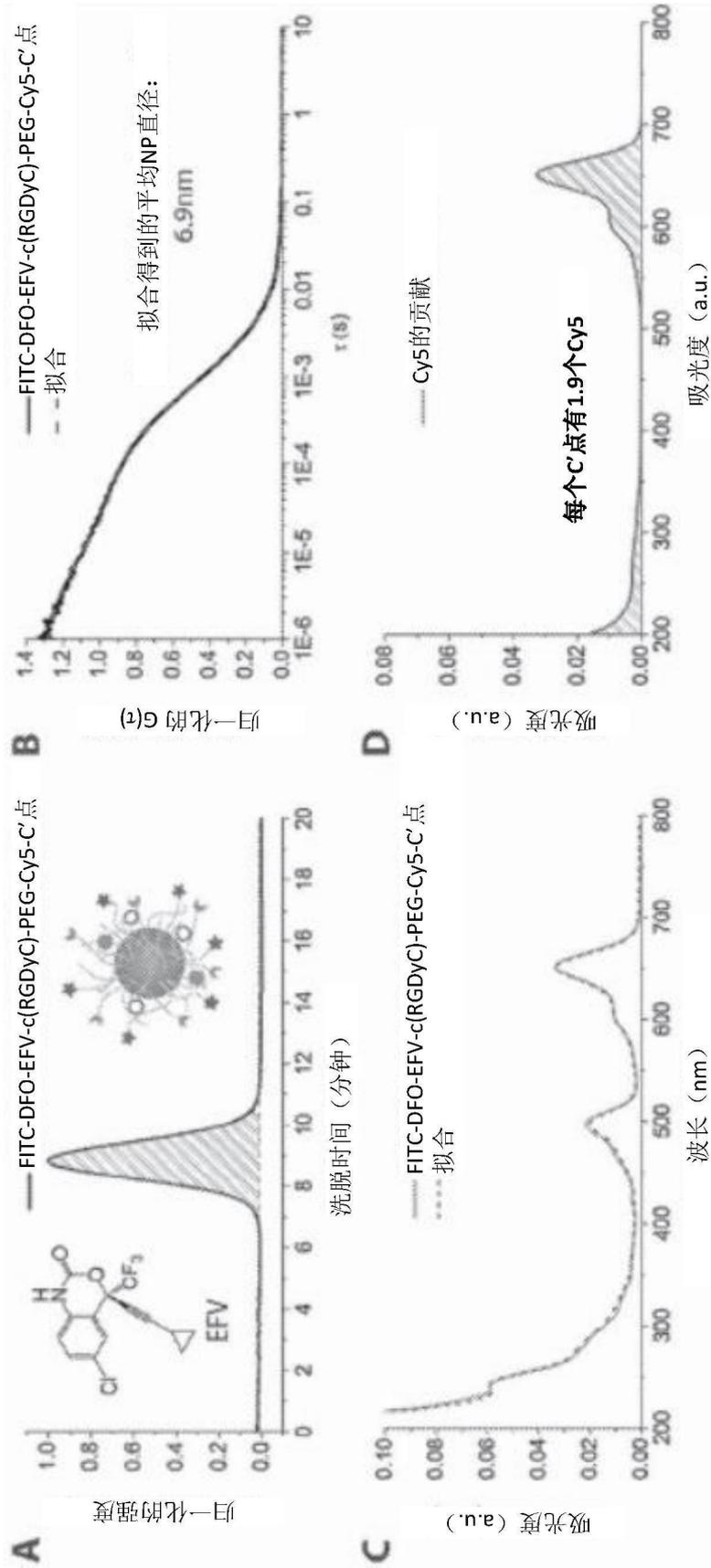


图6

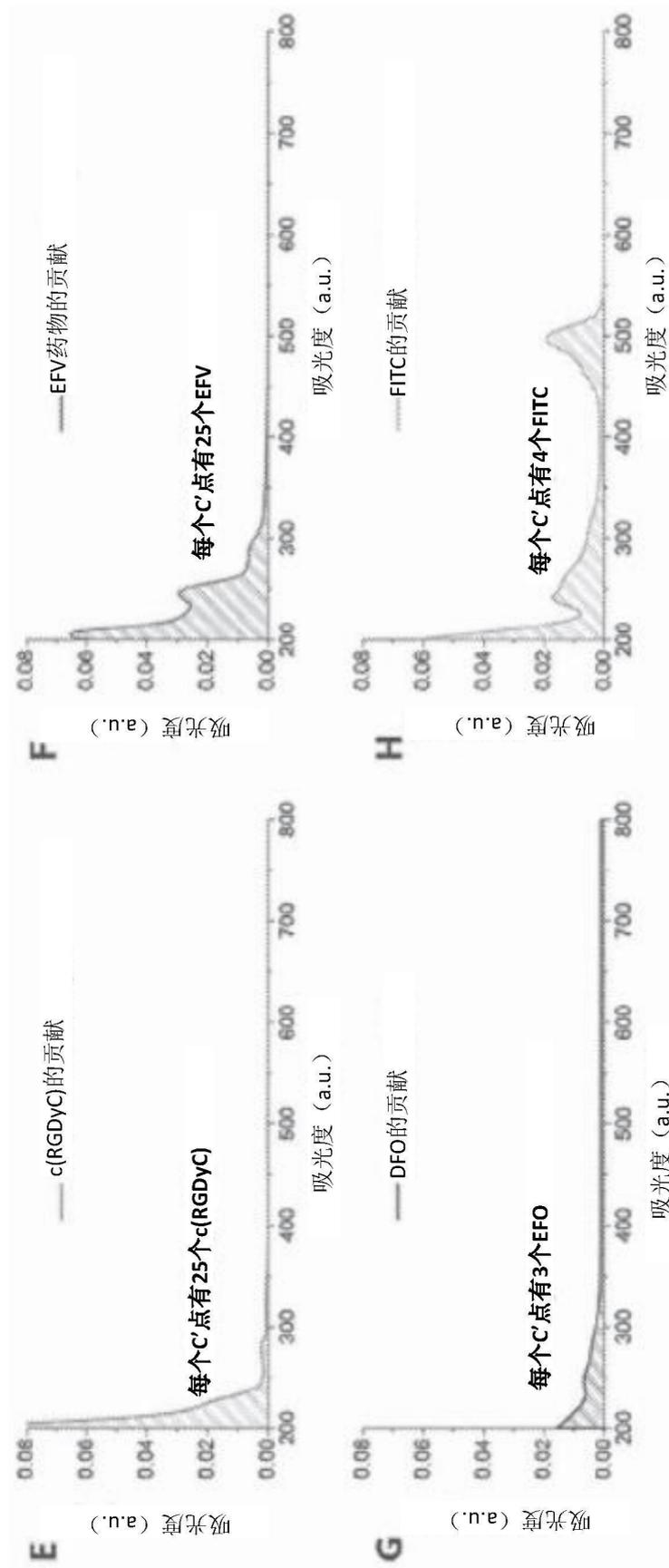


图6(续)

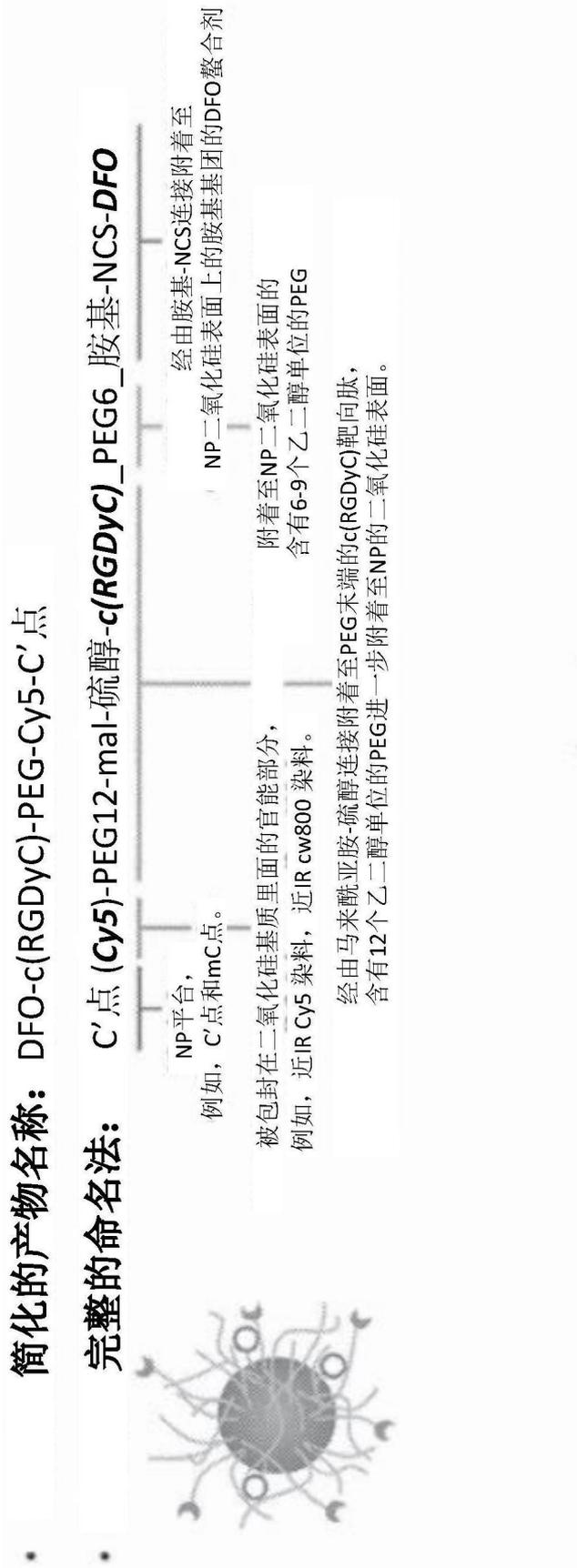


图7

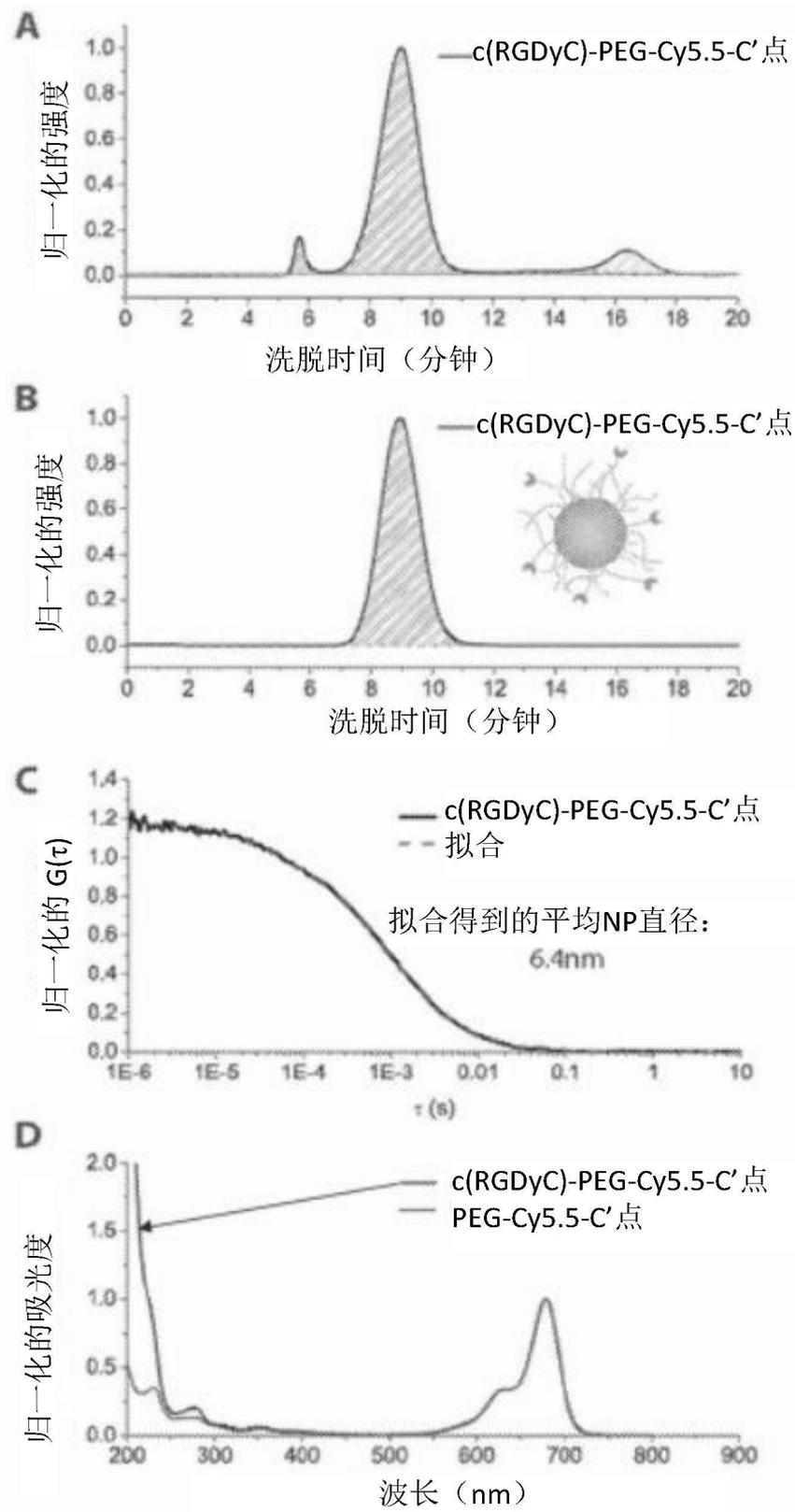


图8

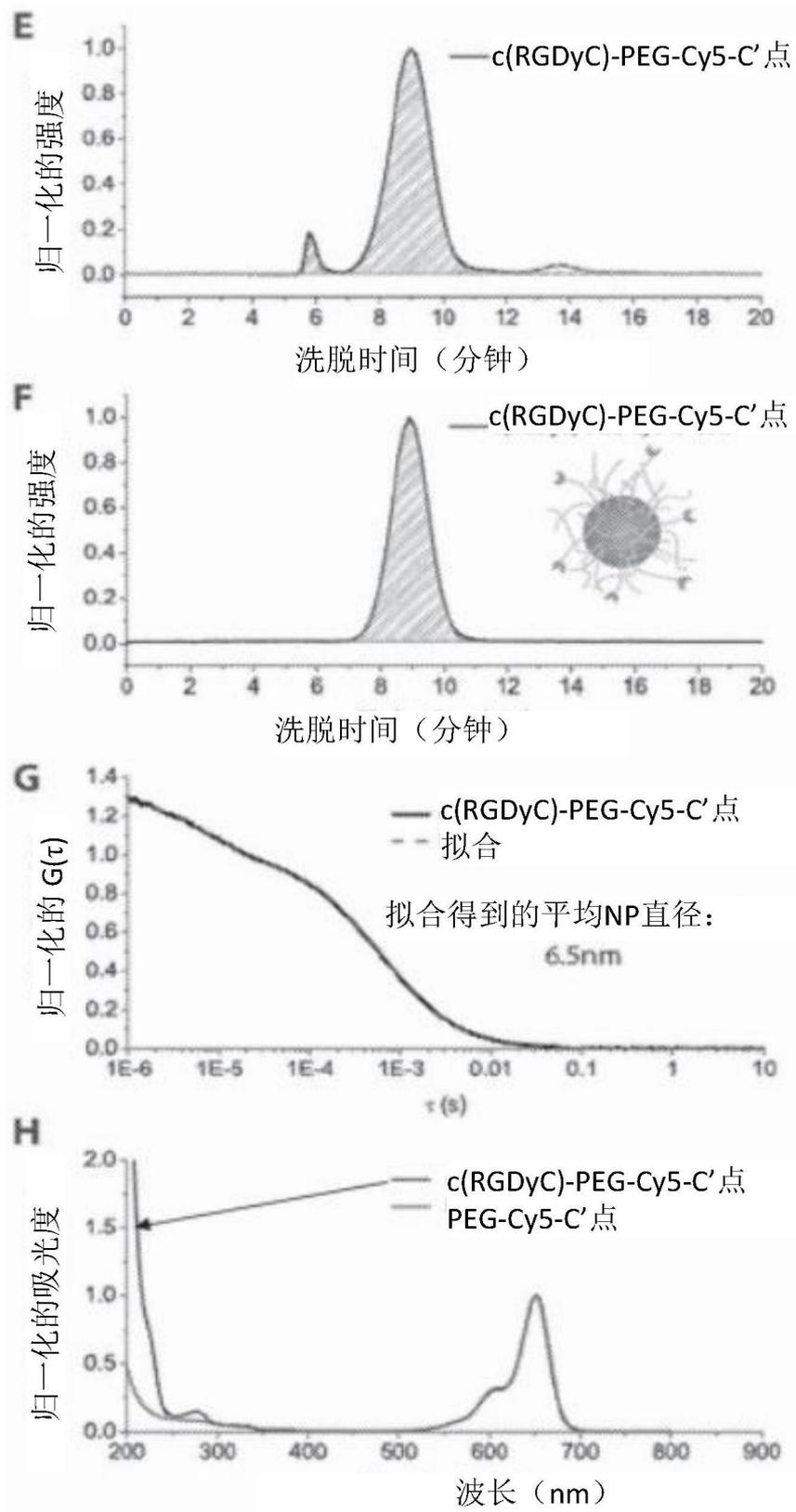


图8 (续)

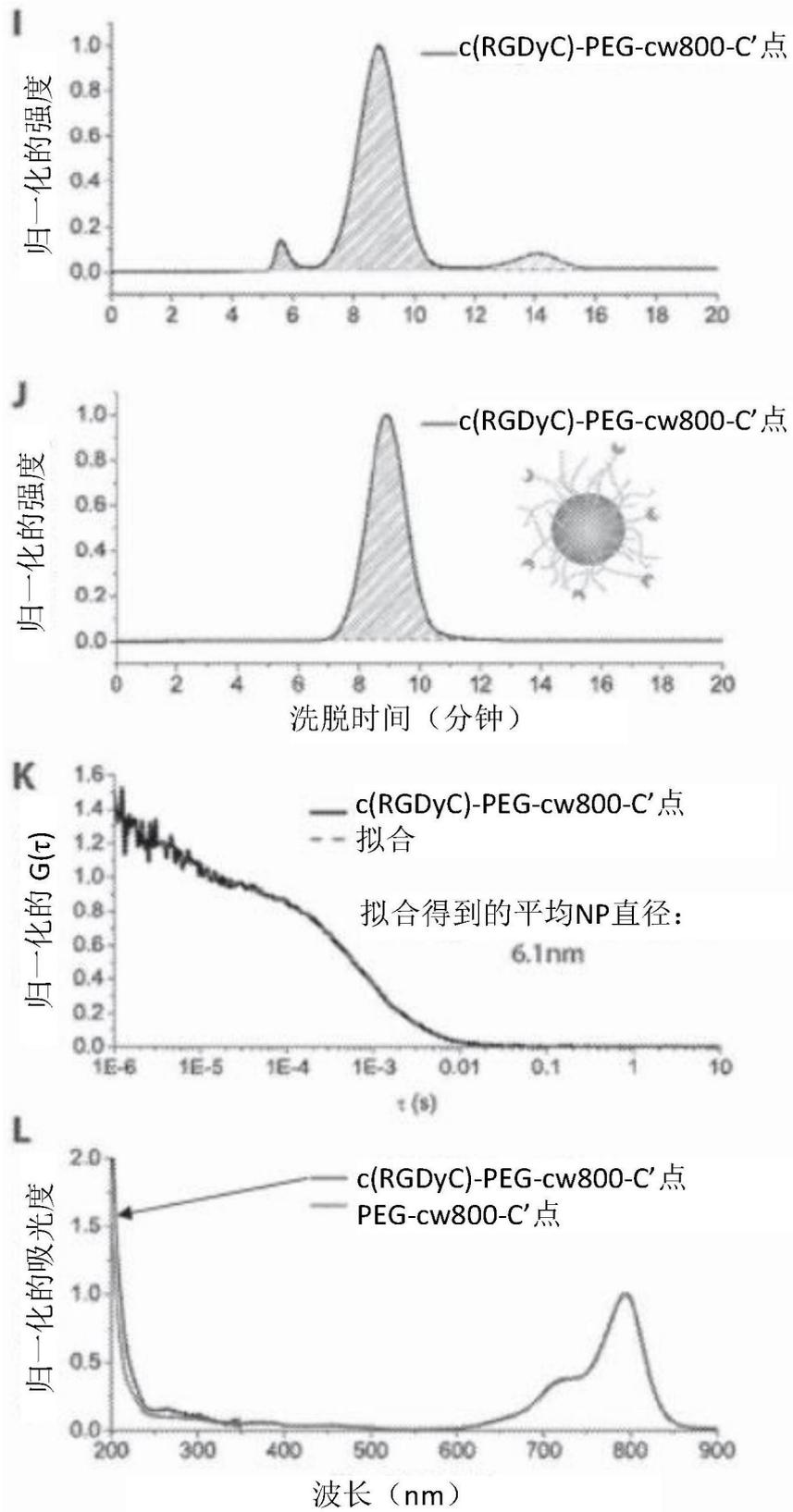


图8(续)

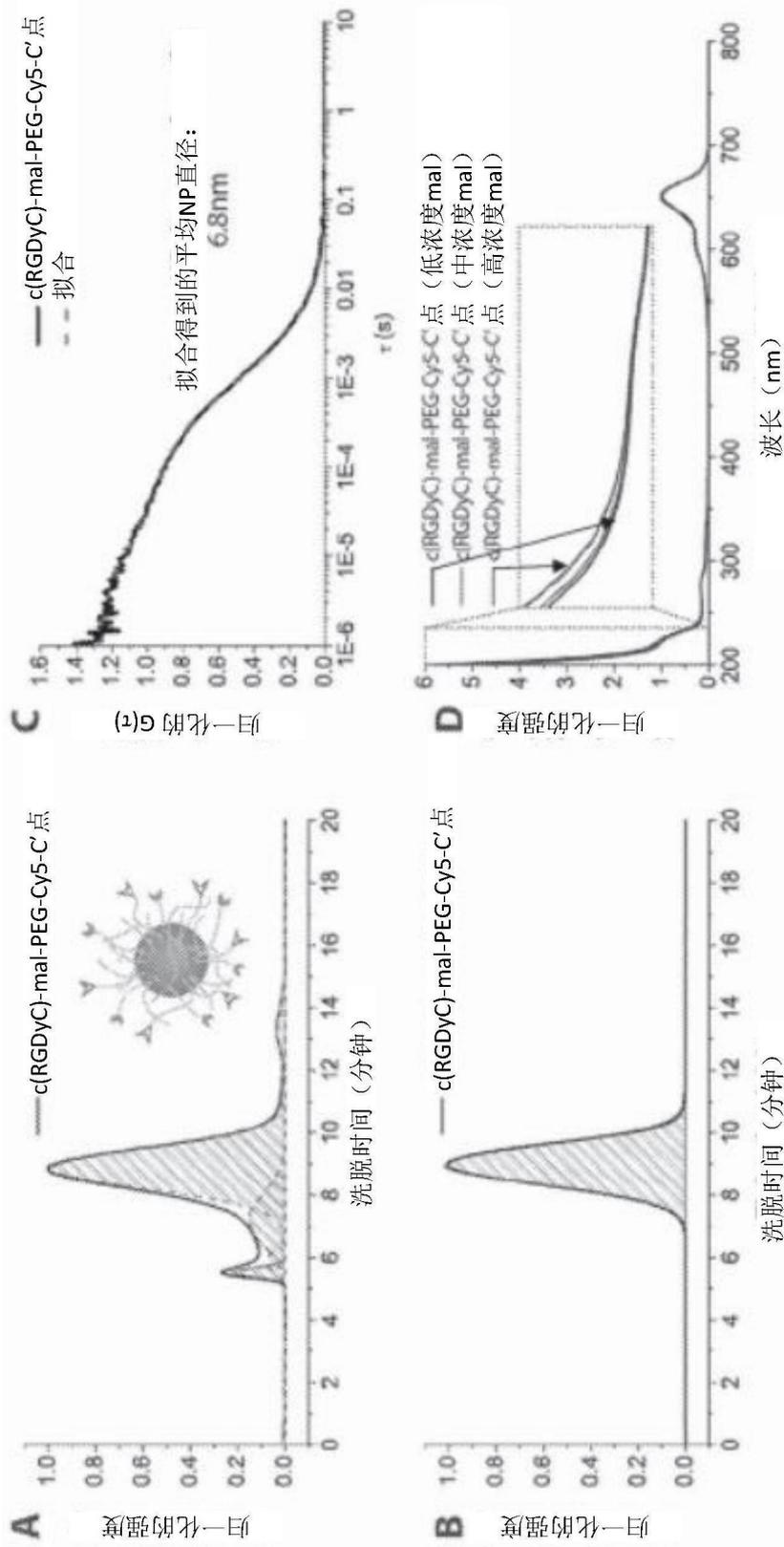


图9

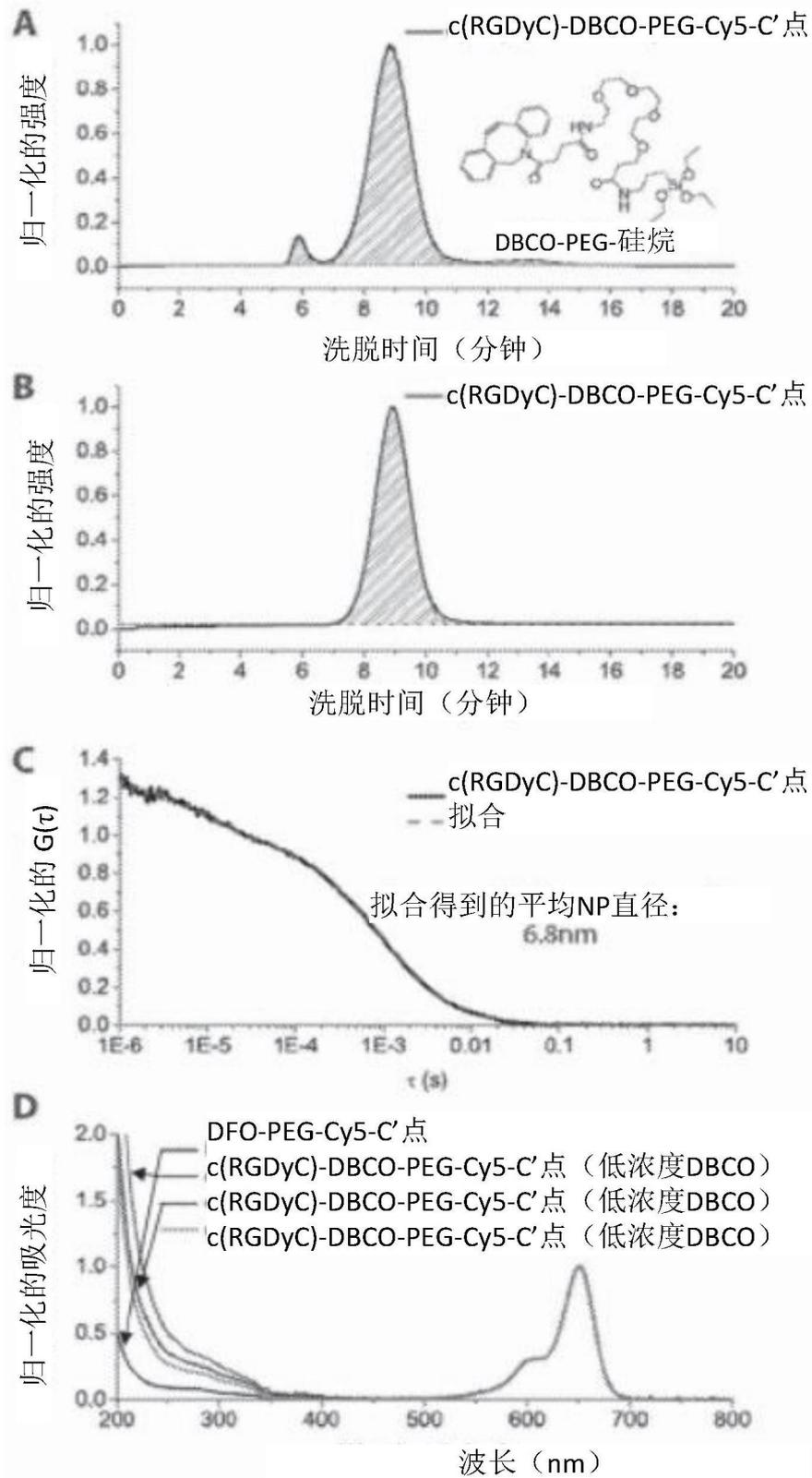


图10

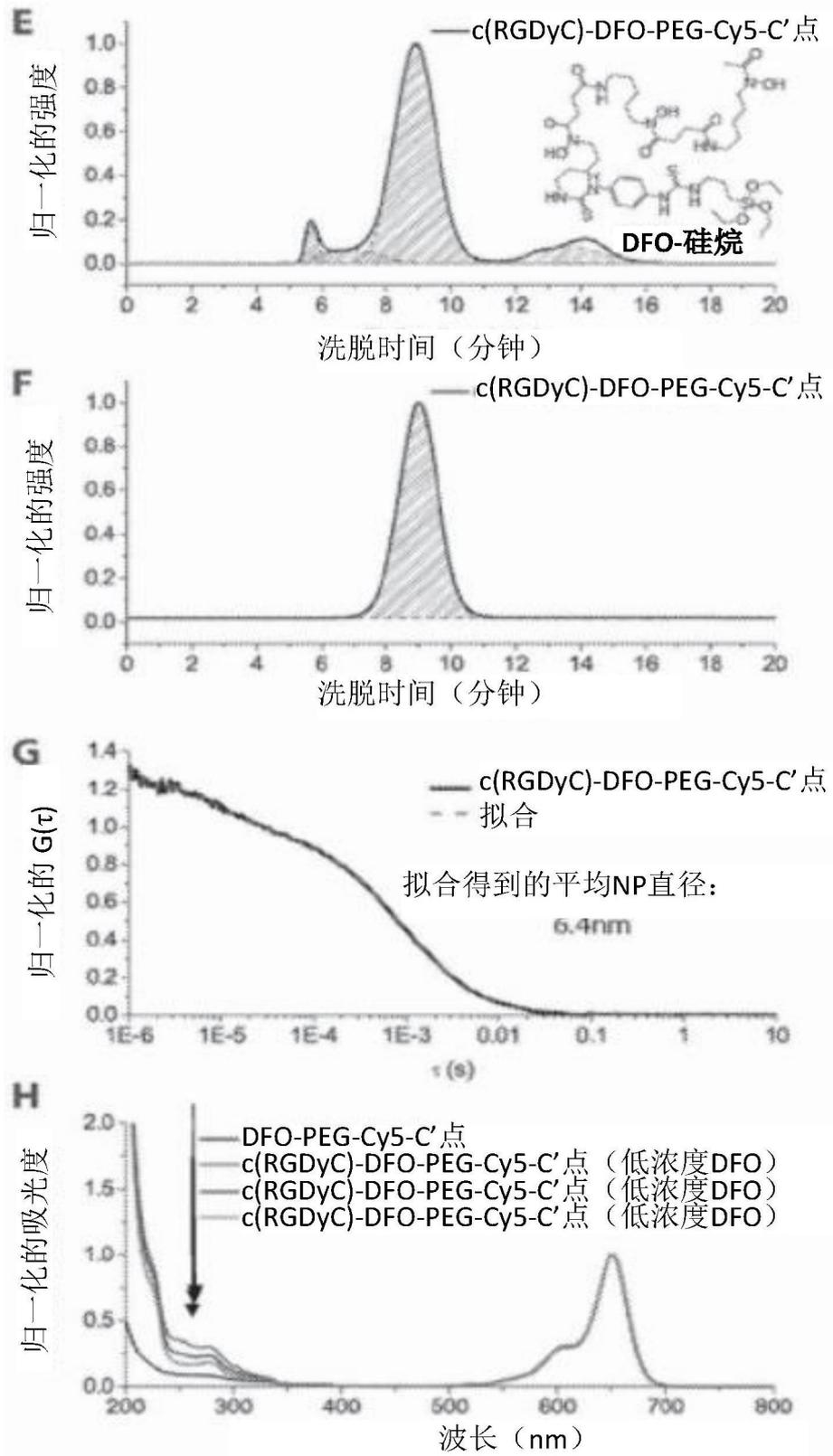


图10(续)

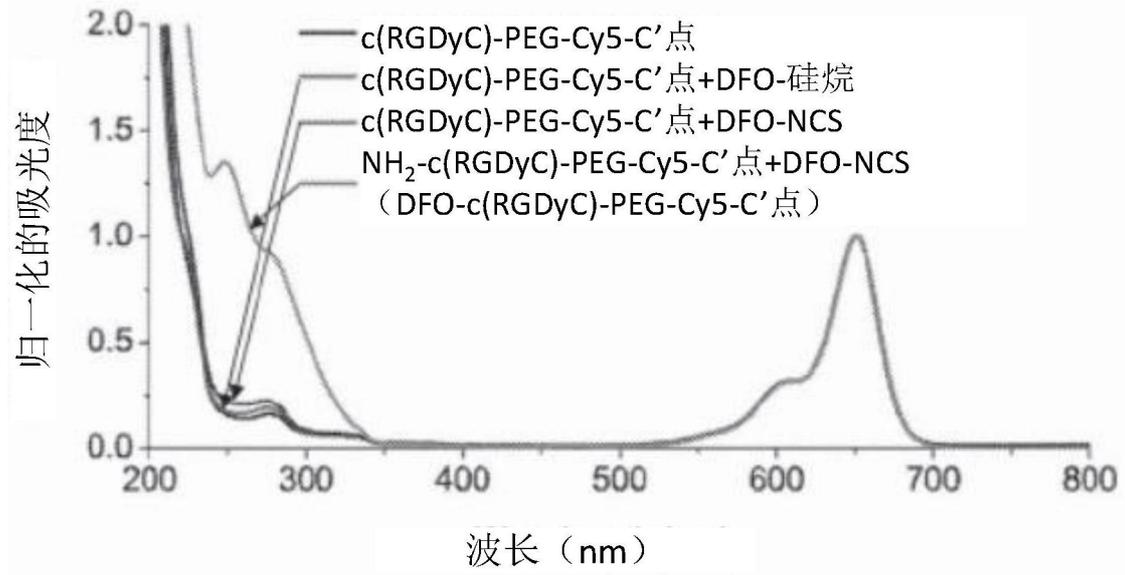


图11

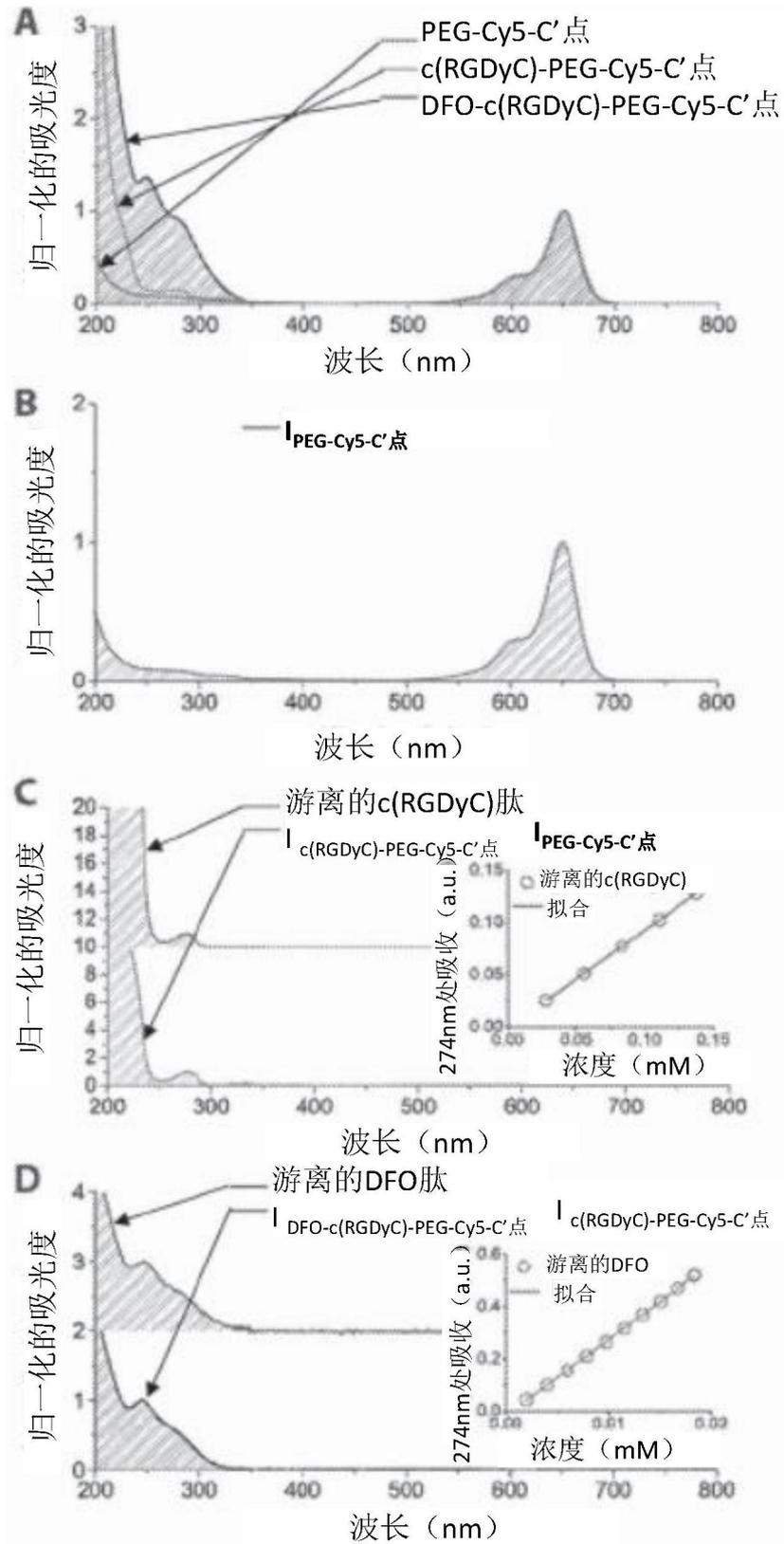


图12

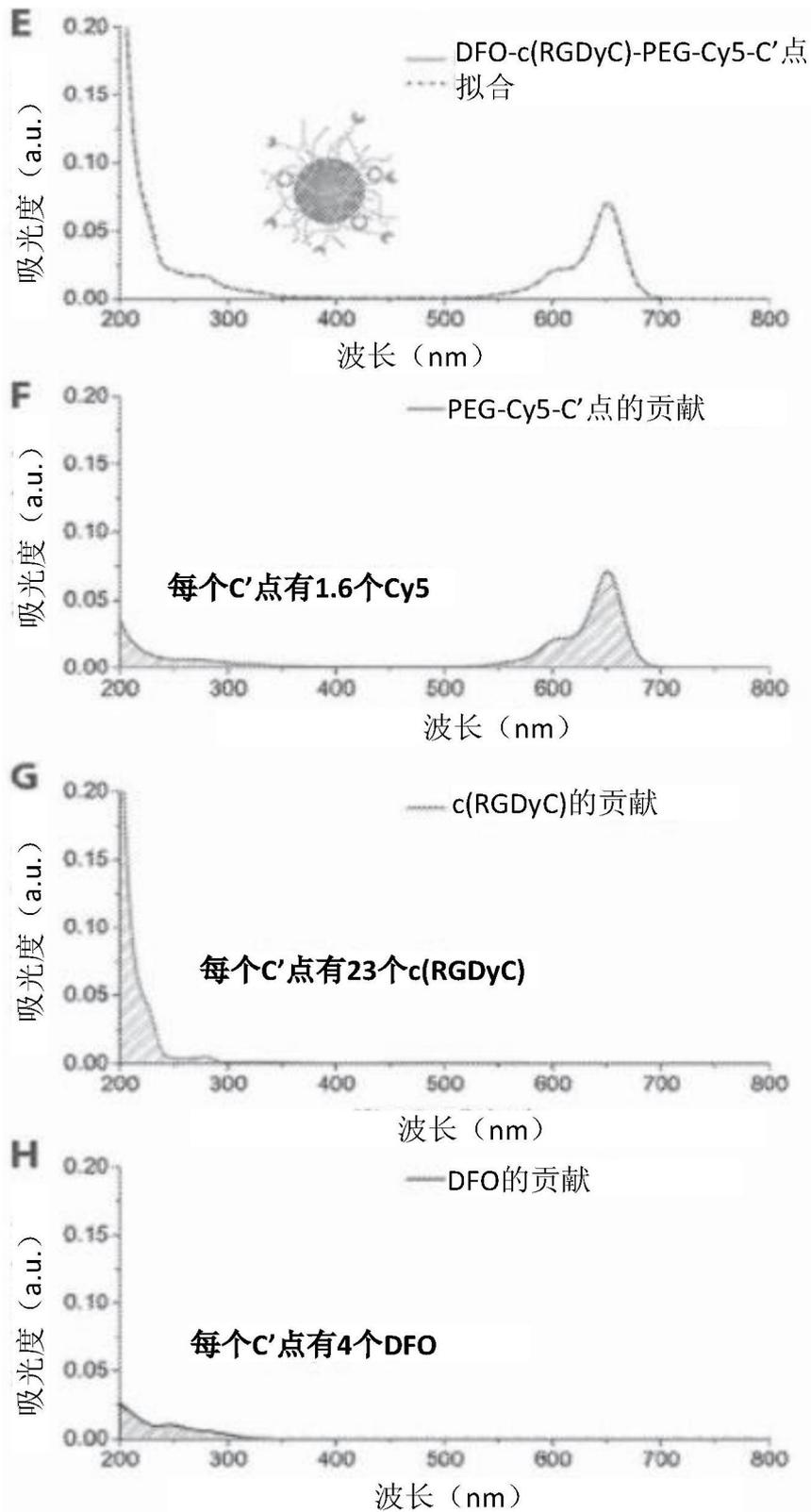


图12(续)

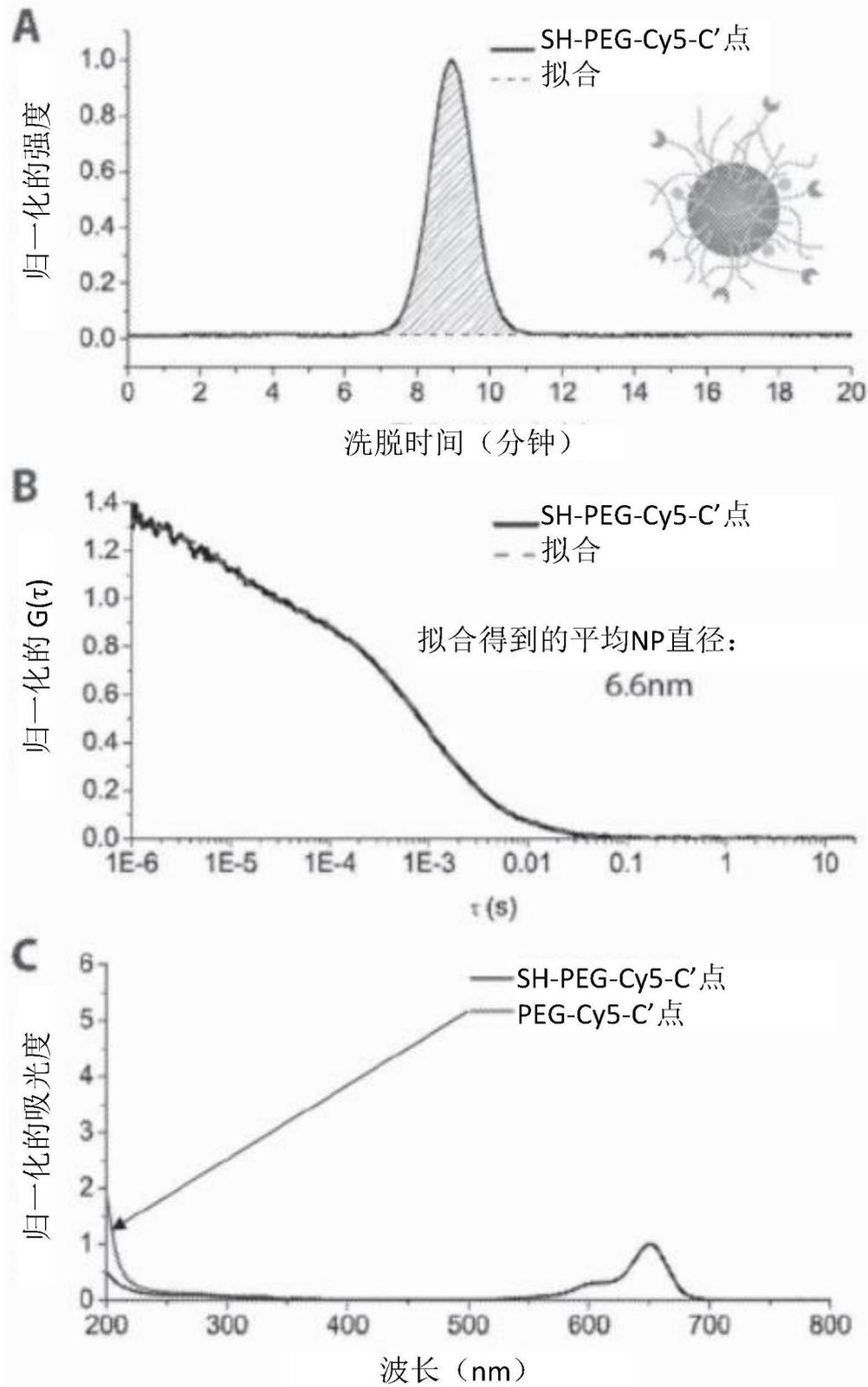


图13

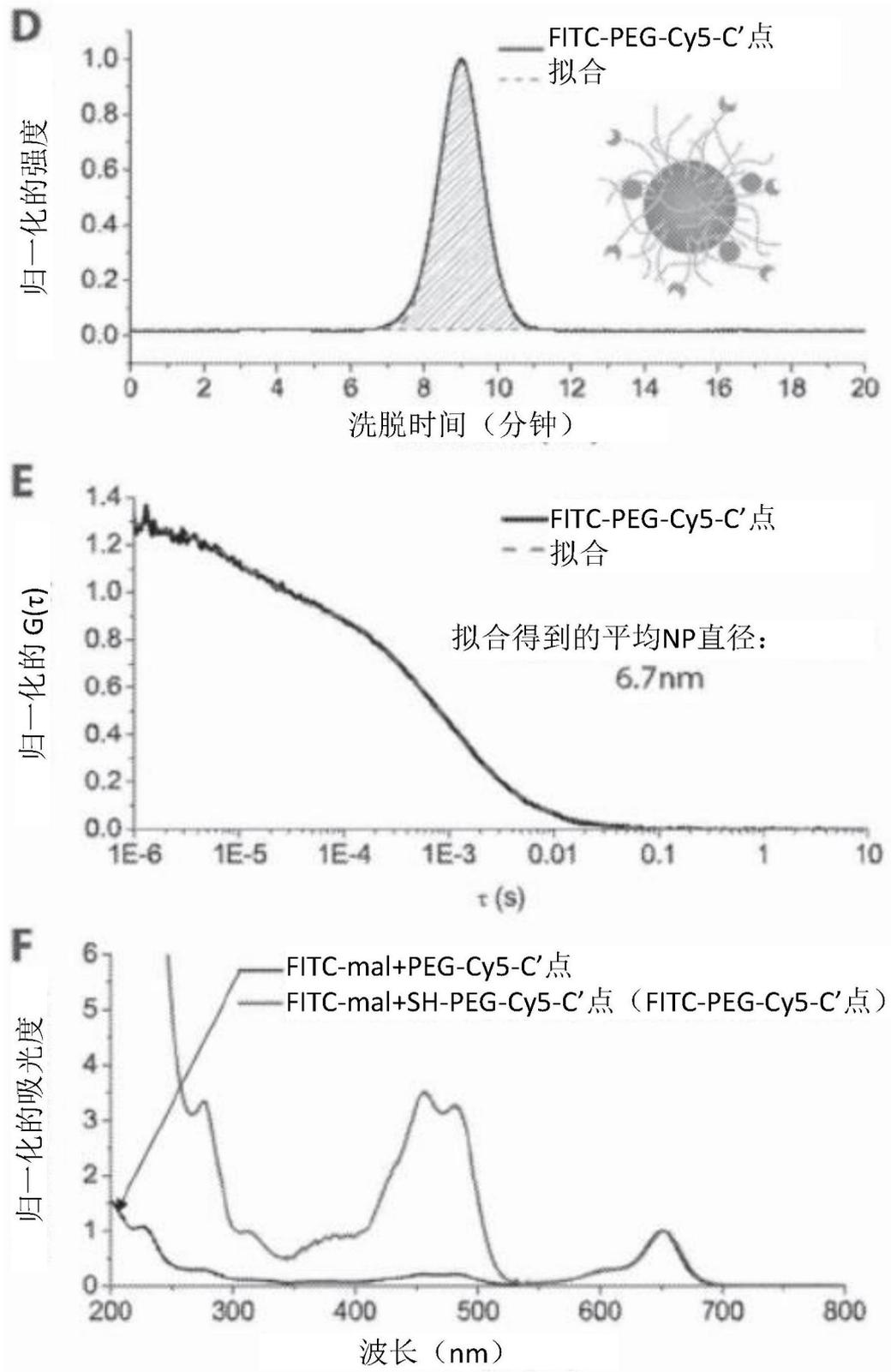


图13(续)

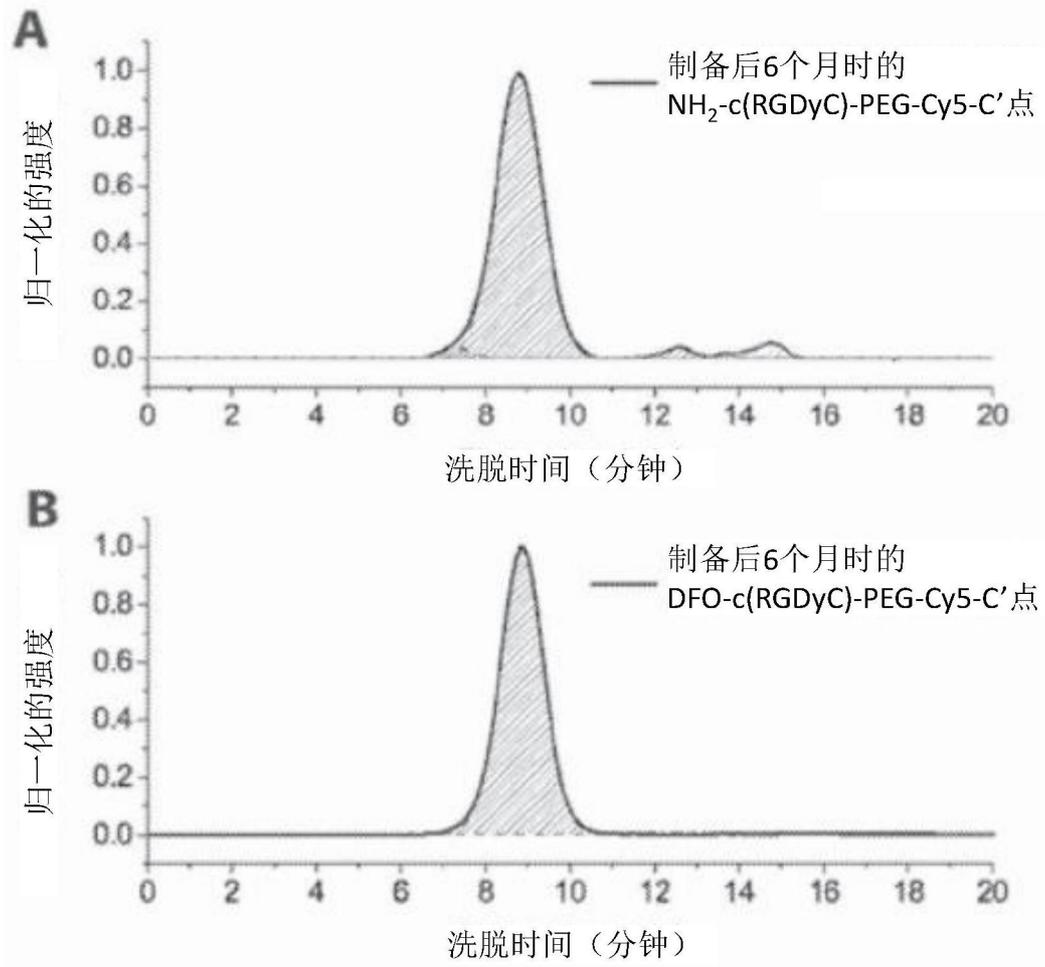


图14

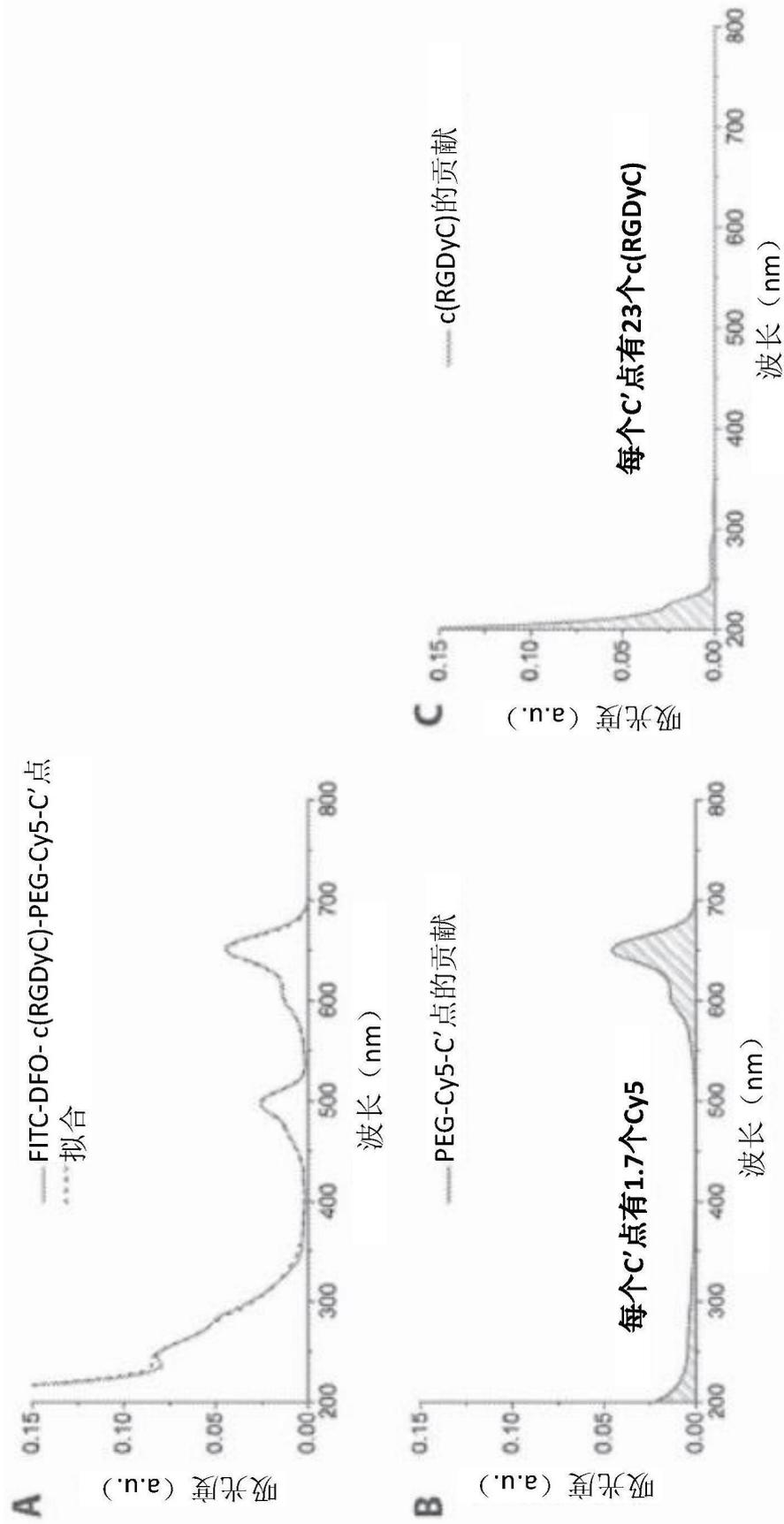


图15

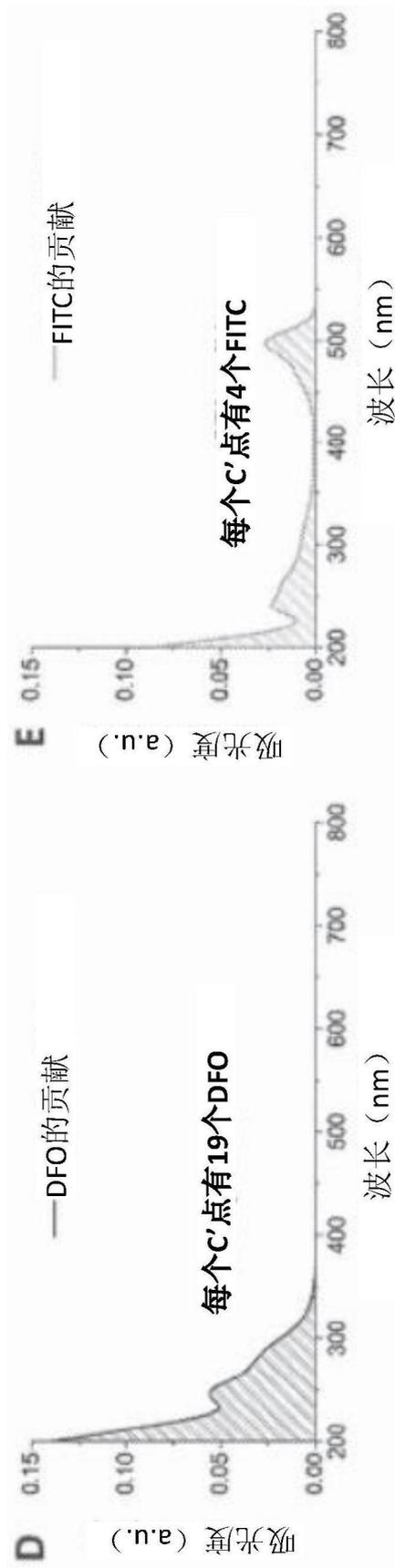


图15(续)

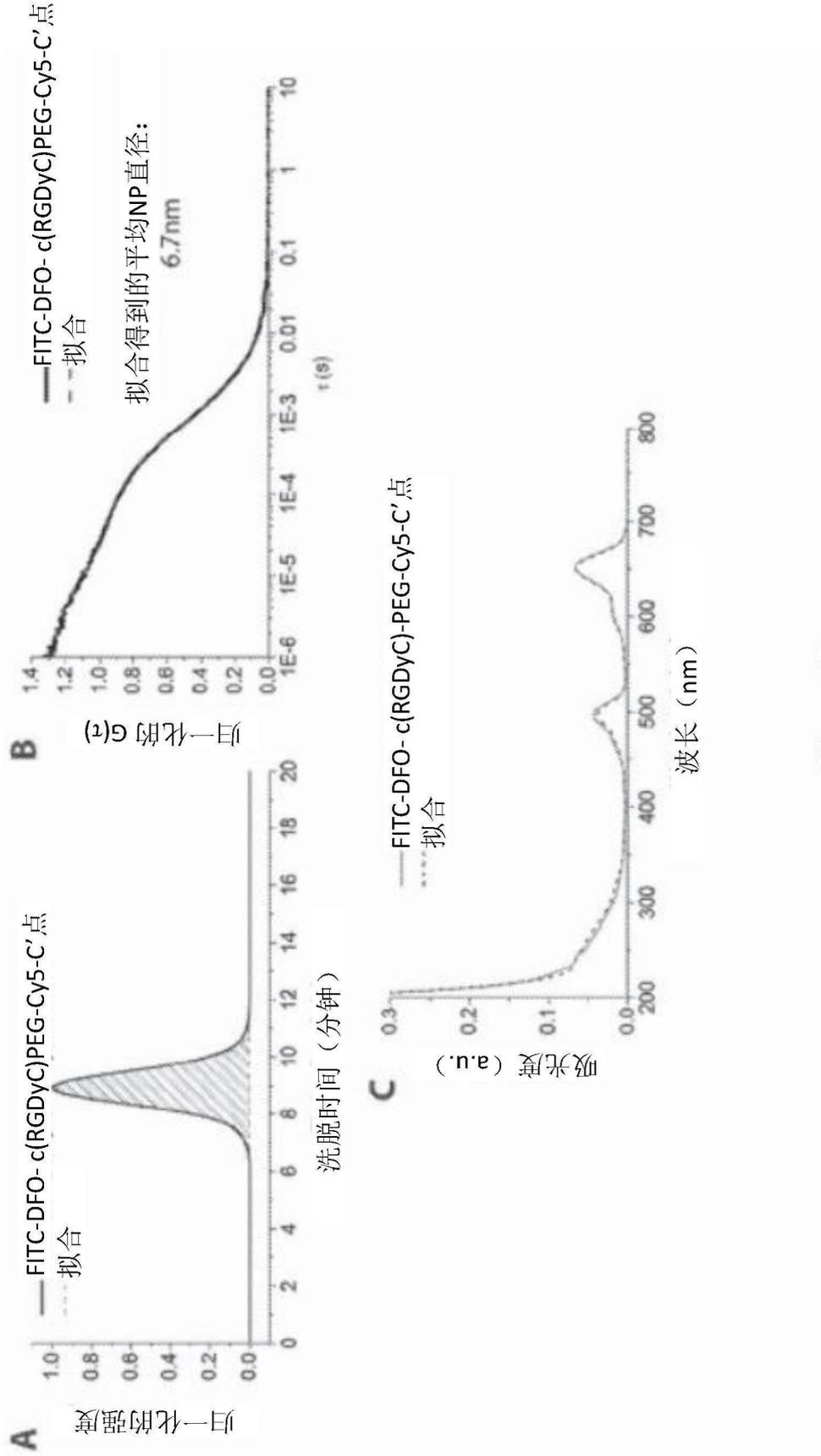


图16

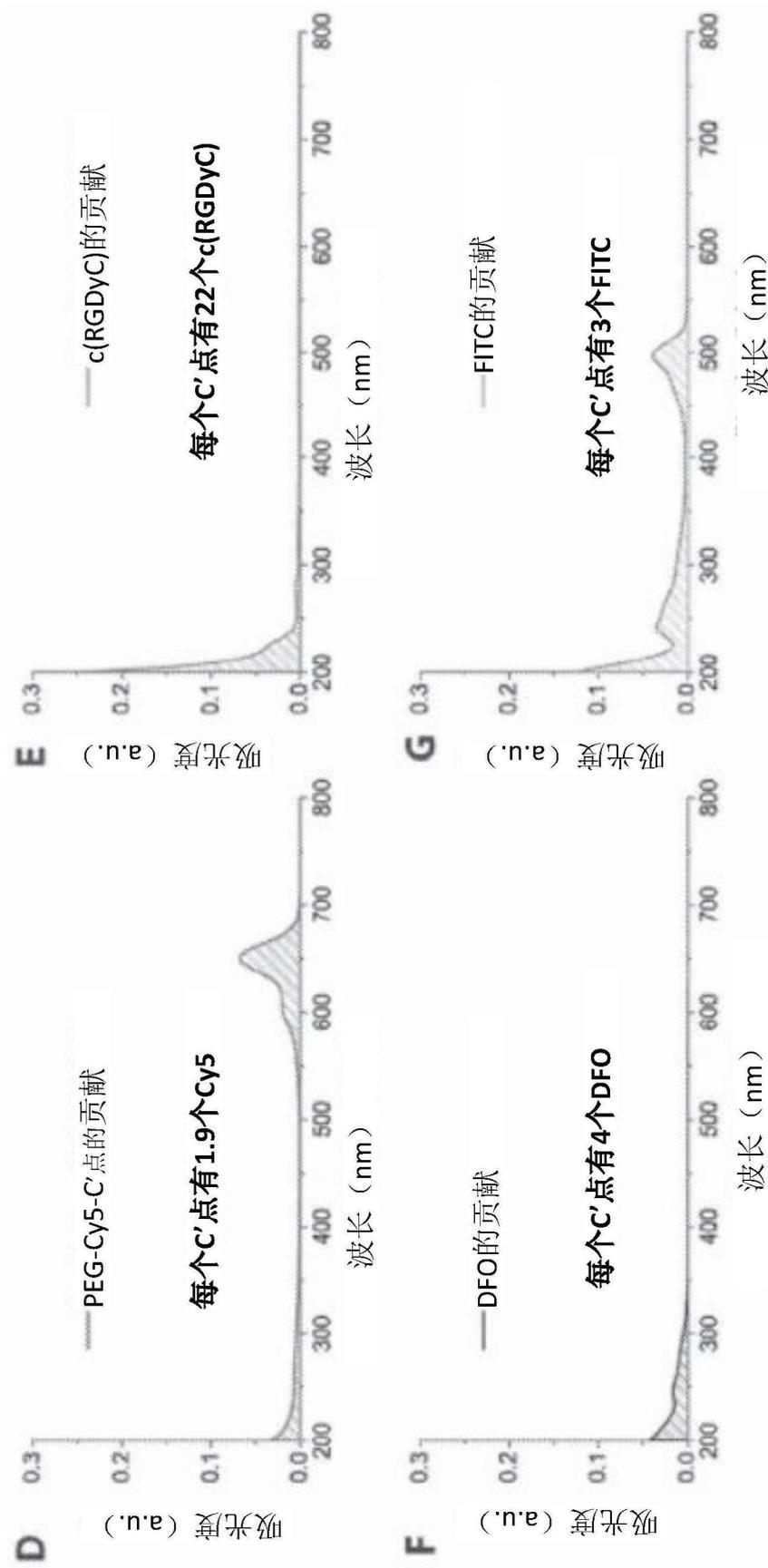


图16(续)

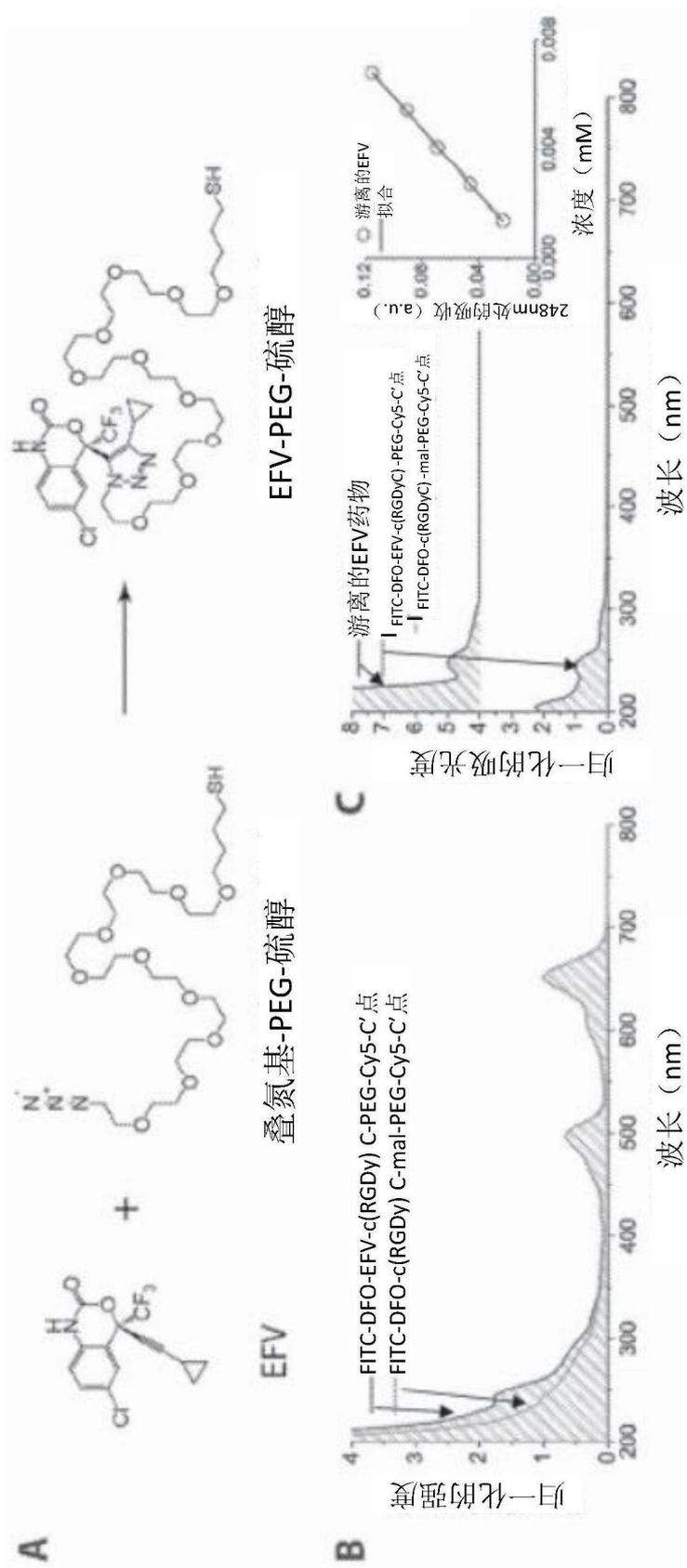


图17

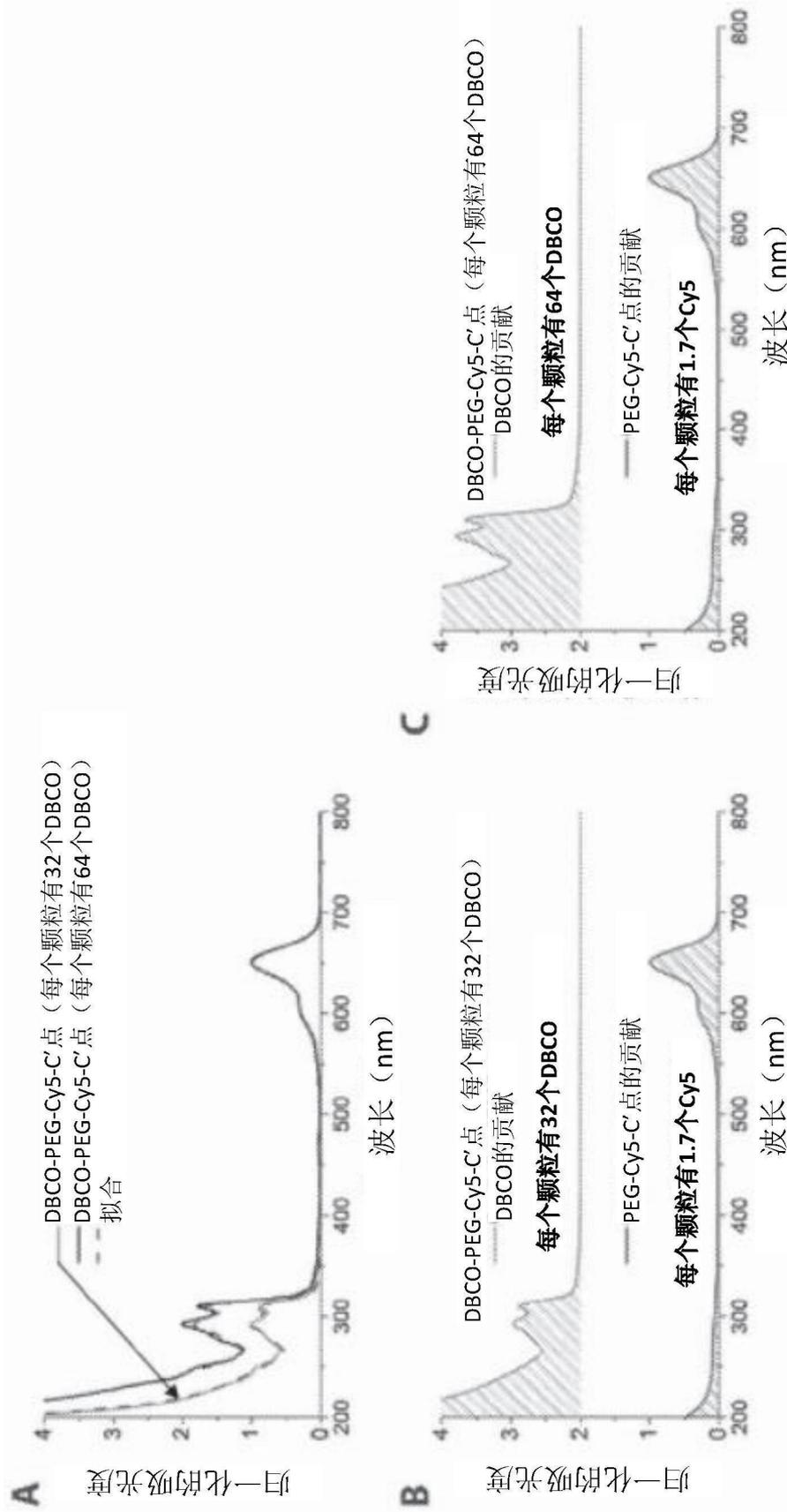


图18

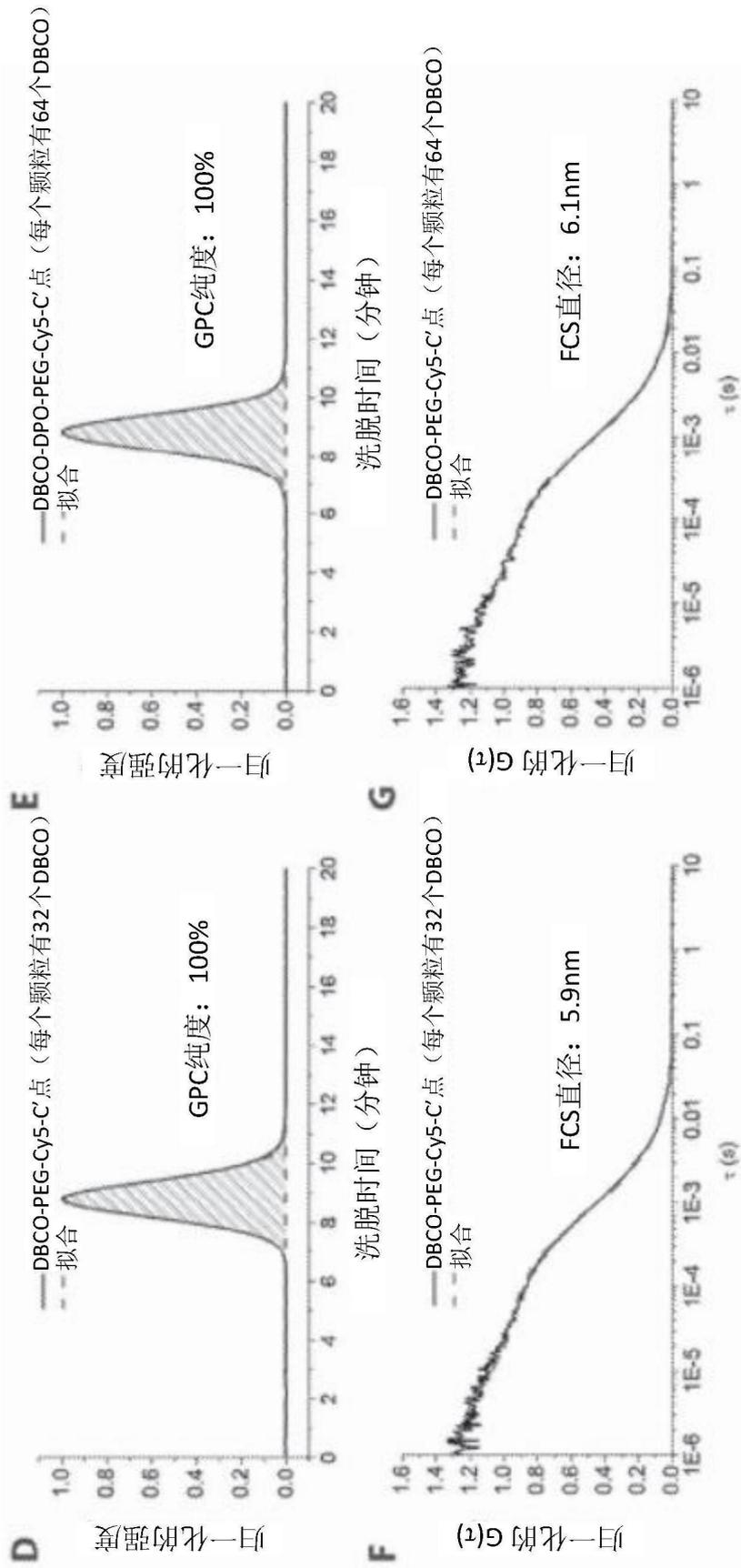


图18(续)

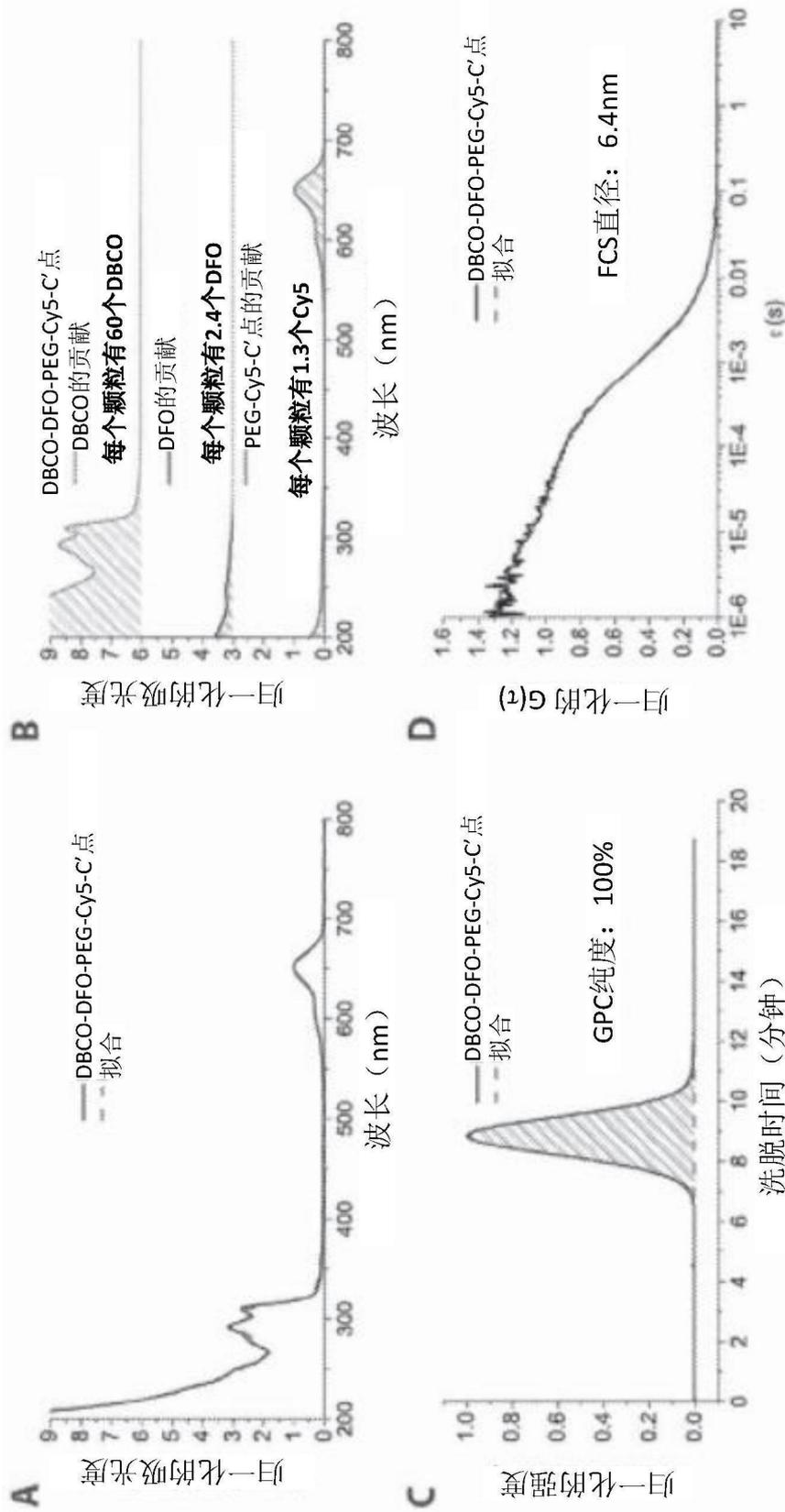


图19