



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102791294 A

(43) 申请公布日 2012. 11. 21

(21) 申请号 201080064009. 9

A61K 47/30 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 12. 16

A61K 9/22 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 9/20 (2006. 01)

61/287, 188 2009. 12. 16 US

A61P 35/00 (2006. 01)

A61P 25/28 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 08. 16

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/060814 2010. 12. 16

(87) PCT申请的公布数据

W02011/084620 EN 2011. 07. 14

(71) 申请人 布里格姆妇女医院股份有限公司

地址 美国马萨诸塞州

申请人 麻省理工学院

(72) 发明人 O. C. 法罗克扎德 N. 科利施蒂

S. 达尔 S. J. 利帕德 R. S. 兰格

P. M. 瓦伦西亚

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 王国祥

(51) Int. Cl.

A61K 47/48 (2006. 01)

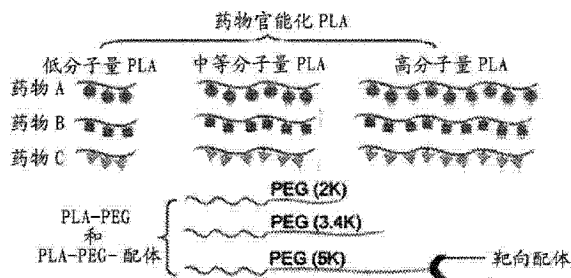
权利要求书 2 页 说明书 31 页 附图 16 页

(54) 发明名称

用于多种药物递送的粒子

(57) 摘要

本发明提供包含两种或更多种活性剂的递送组合物, 其中至少一种活性剂与聚合物结合。所述递送组合物允许控制释放多种活性剂, 包括具有不同溶解度、电荷和 / 或分子量的活性剂。



1. 包含聚合物基质的粒子,所述聚合物基质包含第一活性剂和第二活性剂,其中配置所述聚合物基质,提供所述第一和第二活性剂中的每种的释放动力学,使得所述第一和第二活性剂中的每种的少于50%在将所述粒子在约37°C悬浮在中性水溶液中的最初两个小时内释放。

2. 权利要求1的粒子,其中所述聚合物基质还包含一种或多种另外的活性剂。

3. 包含聚合物基质的粒子,所述聚合物基质包含第一活性剂和第二活性剂,其中配置所述聚合物基质,使得所述第一和第二活性剂中的每种在受试者的循环中具有至少两个小时的半衰期。

4. 权利要求3的粒子,其中所述聚合物基质还包含一种或多种另外的活性剂。

5. 权利要求1-4中的任一项的粒子,其中使所述第一活性剂与可生物降解聚合物结合。

6. 权利要求1-4中的任一项的粒子,其中使所述第一活性剂与具有侧链官能团的可生物降解聚合物结合。

7. 权利要求6或7的粒子,其中使所述第二活性剂与可生物降解聚合物结合。

8. 权利要求6或7的粒子,其中使所述第二活性剂与具有侧链官能团的可生物降解聚合物结合。

9. 具有多种活性剂的粒子,所述粒子包含

(a) 疏水聚合物核芯,其包含

(i) 与可生物降解聚合物结合的第一活性剂;和

(ii) 第二活性剂;和

(b) 表面暴露的亲水层。

10. 权利要求9的粒子,其中所述第一活性剂通过所述聚合物上的侧链官能团与所述可生物降解聚合物结合。

11. 权利要求9或10的粒子,其中所述可生物降解聚合物为具有相对疏水的第一末端和相对亲水的第二末端的嵌段共聚物,其中所述疏水核芯包含与所述第一活性剂结合的嵌段共聚物的第一末端,以及其中所述亲水层包含所述嵌段共聚物的第二末端。

12. 权利要求9或10的粒子,其中所述亲水层包含多种两性嵌段共聚物,每种包含与所述疏水聚合物核芯相互作用的相对疏水末端和表面暴露的相对亲水末端。

13. 权利要求1-12中的任一项的粒子,其还包含靶向剂。

14. 权利要求1-13中的任一项的粒子,其中所述第一活性剂和第二活性剂独立地选自生物分子、生物活性剂、小分子、药物、前药、药物衍生物、蛋白质、肽、疫苗、辅料、荧光分子或多核苷酸。

15. 权利要求1-14中的任一项的粒子,其中所述第一和第二活性剂分别为紫杉醇或多西紫杉醇和吉非替尼;吉非替尼和紫杉醇或多西紫杉醇;奥沙利铂(或奥沙利铂前药)和伊立替康;伊立替康和奥沙利铂(或奥沙利铂前药);紫杉醇和tubacin;tubacin和紫杉醇;氯尼达明、二氯乙酸盐/酯、琥珀酸 α -生育酚酯、桦木酸或白藜芦醇和己酸铂(IV);己酸铂(IV)和氯尼达明、二氯乙酸盐/酯、琥珀酸 α -生育酚酯、桦木酸或白藜芦醇;琥珀酸 α -生育酚酯或茉莉酸甲酯和多西紫杉醇;或者多西紫杉醇和琥珀酸 α -生育酚酯或茉莉酸甲酯。

16. 配制包含至少两种活性剂的粒子的方法,所述方法包括:

提供第一和第二活性剂;

使所述第一活性剂或其前药或衍生物与具有侧链官能团的可生物降解聚合物结合;和
制备包含所述结合的第一活性剂和所述第二活性剂的粒子。

17. 权利要求 16 的方法,其还包括使所述第二活性剂或其前药或衍生物与具有侧链官能团的可生物降解聚合物结合。

18. 权利要求 16 的方法,其中使所述第一活性剂和 / 或所述第二活性剂与具有侧链官能团的可生物降解聚合物结合给予所述第一和第二活性剂用于形成粒子的适应性。

19. 在时间空间上控制两种或更多种活性剂向受试者的给药的方法,所述方法包括:

提供包含聚合物基质的粒子,所述聚合物基质包含第一活性剂和第二活性剂,其中配置所述聚合物基质,提供所述第一和第二活性剂中的每种的希望的时间空间释放动力学;
和

向受试者给药所述粒子,使得所述第一和第二活性剂以所述希望的时间空间释放动力学从所述粒子释放。

20. 包含多个权利要求 1-15 中的任一项的粒子的药物组合物,用于静脉内、动脉内、口服、透皮、跨膜、腹膜内、颅内、眼内、硬膜外、鞘内、局部、灌肠、注射、肺途径或输注递送。

用于多种药物递送的粒子

[0001] 优先权要求

[0002] 本申请要求 2009 年 12 月 16 日提交的美国专利申请 61/287,188 的优先权,将其全部内容通过引用的方式并入本文。

[0003] 关于联邦政府委托研究的声明

[0004] 本发明由政府支持在授权号 EB003647 和 U54-CA119349 下进行,由国家卫生研究院 (National Institutes of Health) 赞助。政府在本发明中具有某些权利。

技术领域

[0005] 本发明涉及包含两种或更多种活性剂的微粒状药物递送组合物。

背景技术

[0006] 指向单个分子靶标的抗癌剂经常显示有限的效力、差的安全性和差的耐药性分布。基因组革命和系统生物学的进步已经识别出潜在的协同疗法,可同时用于更有效地治疗癌症。然而,多种治疗药物的靶向递送具有困难。尽管可非共价地将药物包胶在聚合物纳米粒子中并以调节的方式释放它们,但是对于组合药物递送,包胶策略的使用能够在包胶和释放多种药物中导致批次间差异性,尤其是当使用具有不同溶解度、电荷和分子量的药物时。

发明内容

[0007] 以时间空间调节的方式将多种药物或候选药物有效递送至特定疾病细胞和组织(例如,递送至癌细胞,例如,递送至特定器官或组织中的癌细胞)的纳米技术的发展能够潜在地克服当前面临的治疗挑战。本发明提供了用于控制递送组合物的形成和活性剂从药物递送组合物如粒子释放的方法和组合物。在一种实施方案中,本发明提供了用于制备药物递送组合物如粒子的方法,所述药物递送组合物包含与聚合物(例如,具有侧链官能团的聚合物)结合的活性剂。本发明的一个优点是,通过工程化和共混不同的药物官能化和配体官能化聚合物,可将能够递送两种、三种或更多种药物的粒子可再现地工程化和表征。另外,这些方法允许调整药物释放和药代动力学的特征,例如单独地对于每种类型的药物,例如,与活性剂的特征(例如,溶解度、电荷、分子量、半衰期和/或生物分布特征)无关。此外,通过靶向药物加载粒子至特定组织或细胞,例如,癌细胞,能够实现协同药物效果,其能够改变活性剂的生物分布。这能够转化成较好的效力和耐受性,从而使活性剂适合于潜在的临床发展。

[0008] 在一个方面,本发明的特征在于包含聚合物基质的粒子,所述聚合物基质包含第一活性剂和第二活性剂,其中将所述聚合物基质设置成提供所述第一和第二活性剂各自的释放动力学,使得所述第一和第二活性剂各自的少于 50% 在将粒子在约 37°C 悬浮在中性水溶液(例如,缓冲盐水溶液(例如, PBS))中的最初两个小时(例如,最初的 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 25, 或 30 小时)内释放。在一些实施方案中,所述聚合物基质还包含一种或多种

另外的活性剂,以及也可设置所述聚合物基质,提供另外活性剂中的一种或多种的控制的(例如,类似的)释放动力学。在一些实施方案中,将所述基质设置成独立地提供所述第一和第二活性剂各自的释放动力学,使得少于50%的第一活性剂在最初的两个小时(例如,最初的4,6,8,10,12,15,20,25,或30小时)内释放以及少于50%的第二活性剂在最初的两个小时(例如,最初的4,6,8,10,12,15,20,25,或30小时)内释放。

[0009] 在另一方面,本发明的特征在于包含聚合物基质的粒子,所述聚合物基质包含第一活性剂和第二活性剂,其中设置所述聚合物基质,使得所述第一和第二活性剂各自在受试者的循环中具有至少30分钟、至少一个小时或至少两个小时(例如,至少4,6,8,10,12,15,20,25,或30小时)的半衰期。在一些实施方案中,所述聚合物基质还包含一种或多种另外的活性剂,以及也可设置所述聚合物基质,提供另外活性剂中的一种或多种的类似的释放动力学。在一些实施方案中,设置所述聚合物基质,使得在粒子中时第一活性剂在受试者的循环中具有至少30分钟、至少一个小时或至少两个小时(例如,至少4,6,8,10,12,15,20,25,30小时)的半衰期,以及在粒子中时第二活性剂在受试者的循环中独立地具有至少30分钟、至少一个小时或至少两个小时(例如,至少4,6,8,10,12,15,20,25,30小时)的半衰期。在一些实施方案中,设置所述聚合物基质,使得与不存在所述聚合物基质的情况下的活性剂相比,所述第一活性剂和/或第二活性剂在受试者的循环中的半衰期至少长30分钟、至少一个小时或至少两个小时(例如,至少4,6,8,10,12,15,20,25,30小时)。

[0010] 在上述粒子的一些实施方案中,使第一和/或第二活性剂与可生物降解聚合物(例如,具有侧链官能团的可生物降解聚合物)结合。也可使任何另外的活性剂与可生物降解聚合物(例如,具有侧链官能团的可生物降解聚合物)结合。

[0011] 在一些方面,本发明的特征在于具有多种活性剂的粒子,其中所述粒子包含(a)疏水聚合物核芯,其包含(i)与可生物降解聚合物,例如,具有侧链官能团的可生物降解聚合物结合的第一活性剂,和;(ii)第二活性剂;和(b)表面暴露的亲水层。在一些实施方案中,所述可生物降解聚合物为嵌段共聚物,其具有相对疏水的第一末端和相对亲水的第二末端,其中所述疏水核芯包含与第一活性剂结合的嵌段共聚物的第一末端,以及其中所述亲水层包含嵌段共聚物的第二末端。在一些实施方案中,所述亲水层包含多种两性嵌段共聚物,每种具有与疏水聚合物核芯相互作用的相对疏水末端和表面暴露的相对亲水末端。在一些实施方案中,所述可生物降解聚合物和结合的活性剂完全包含在疏水核芯中。在其它实施方案中,所述可生物降解聚合物为两性的以及存在于疏水核芯和亲水层两者中。当然,这些实施方案不相互排斥。

[0012] 在一个方面,本发明的特征在于具有多种活性剂的粒子,其中所述粒子包含(a)疏水聚合物核芯,其包含(i)与可生物降解聚合物(例如,具有侧链官能团的可生物降解聚合物)结合的第一活性剂(例如,亲水活性剂或疏水活性剂),和;(ii)第二活性剂(例如,亲水活性剂或疏水活性剂);和(b)两性壳,其包含多种两性嵌段共聚物,所述两性嵌段共聚物具有与疏水聚合物核芯相互作用的疏水末端和表面暴露的亲水末端。在一些实施方案中,所述两性壳还包含多种靶向嵌段共聚物,每种具有与疏水聚合物核芯相互作用的疏水末端和与靶向剂结合的亲水末端。在一些实施方案中,所述第二活性剂也与可生物降解聚合物(例如,具有侧链官能团的可生物降解聚合物)结合。在一些实施方案中,所述第二活性剂为不与可生物降解聚合物结合的疏水活性剂。

[0013] 在上述粒子的一些实施方案中,所述靶向剂包括适体、核酸、核酸配体、多肽、蛋白质配体、小分子、生长因子、激素、细胞因子、白介素、抗体、抗体片段、整联蛋白、纤连蛋白受体、碳水化合物、p 糖蛋白受体、肽、素拟肽、烃、小模块免疫药物 (small modular immunopharmaceutical)、细胞结合序列、亲和体 (Affibody)、纳米体 (Nanobody)、Adnectin、域抗体 (Domain Antibody) 或 Avimer,或其任何组合。在一些实施方案中,所述靶向剂为包含小于 8 个氨基酸的肽。

[0014] 在上述粒子的一些实施方案中,所述靶向剂与前列腺特异性膜抗原 (PSMA) 结合。在一个非限制性实例中,所述靶向剂可为 A10 适体。

[0015] 在上述粒子的一些实施方案中,所述可生物降解聚合物包括聚乳酸、聚己内酯、聚乙醇酸、聚酐或聚(丙交酯-共聚-乙醇酸)或其任何衍生物。在上述粒子的一些实施方案中,所述具有侧链官能团的可生物降解聚合物包括聚乳酸、聚酸内酯、聚乙醇酸、聚酐或聚(丙交酯-共聚-乙醇酸)的衍生物。在一些实施方案中,所述可生物降解聚合物为共聚物,例如,嵌段共聚物。

[0016] 示例性亲水活性剂包括顺铂、卡铂、mitaplatin、奥沙利铂、茉莉酸甲酯、二氯乙酸盐/酯 (dichloroacetate) 或伊立替康 (irinotecan),及其衍生物或前药。示例性疏水活性剂包括紫杉醇、多西紫杉醇、吉非替尼 (gefitinib)、tubacin、桦木酸、白藜芦醇、琥珀酸 α -生育酚酯或考布他汀,及其衍生物或前药。

[0017] 在一些实施方案中,所述第一活性剂和第二活性剂独立地选自生物分子、生物活性剂、小分子、药物、前药、药物衍生物、蛋白质、肽、疫苗、辅料、成像剂(例如,荧光部分)或多核苷酸。

[0018] 可将本申请所述的任何活性剂与本申请所述的任何其它活性剂或其它活性剂一起包含在粒子中。在一些实施方案中,所述第一和第二活性剂分别为紫杉醇或多西紫杉醇和吉非替尼;吉非替尼和紫杉醇或多西紫杉醇;奥沙利铂(或奥沙利铂前药)和伊立替康;伊立替康和奥沙利铂(或奥沙利铂前药);紫杉醇和 tubacin;tubacin 和紫杉醇 (paclitaxel);氯尼达明、二氯乙酸盐/酯、琥珀酸 α -生育酚酯、桦木酸或白藜芦醇和己酸铂 (IV);己酸铂 (IV) 和氯尼达明、二氯乙酸盐/酯、琥珀酸 α -生育酚酯、桦木酸或白藜芦醇;琥珀酸 α -生育酚酯或茉莉酸甲酯和多西紫杉醇;或多西紫杉醇和琥珀酸 α -生育酚酯或茉莉酸甲酯。这些粒子还可包含第三活性剂,例如,考布他汀 (combretastatin)。

[0019] 本申请披露的粒子可包含另外的活性剂,例如,三种,四种,五种,六种或更多种活性剂。在一些实施方案中,另外活性剂中的一种或多种(例如,第三活性剂)与可生物降解聚合物(例如,具有侧链官能团的可生物降解聚合物)结合。

[0020] 在一些实施方案中,本申请披露的粒子的平均直径为约 100 μm 或更小,例如,约 10 μm 或更小,约 1000nm 或更小,约 800nm 或更小,约 600nm 或更小,约 500nm 或更小,约 400nm 或更小,约 300nm 或更小,约 250nm 或更小,约 200nm 或更小,约 100nm 或更小,约 80nm 或更小,约 60nm 或更小,约 50nm 或更小,或约 40nm 或更小。在一些实施方案中,提供多种本申请披露的粒子。所述多种粒子的平均特征尺寸 (average characteristic dimension) 可为约 100 μm 或更小,例如,约 10 μm 或更小,约 1000nm 或更小,约 800nm 或更小,约 600nm 或更小,约 500nm 或更小,约 400nm 或更小,约 300nm 或更小,约 250nm 或更小,约 200nm 或更小,约 100nm 或更小,约 80nm 或更小,约 60nm 或更小,约 50nm 或更小,或约 40nm 或更小。

在一些实施方案中,所述多种粒子的多分散指数为 0.8 或更小,例如,0.6 或更小,0.4 或更小,0.2 或更小,或 0.1 或更小。

[0021] 在一些实施方案中,本发明的特征在于药物组合物,其包含任何的上述粒子和任选的一种或多种可药用载体和 / 或稀释剂。可配制所述药物组合物,例如,用于静脉内,动脉内,口服,透皮,跨膜,腹膜内,颅内,眼内,硬膜外,鞘内,局部,灌肠,注射,肺途径或输注递送。

[0022] 在一些方面,本发明的特征在于制备具有多种活性剂的纳米粒子的方法。所述方法可包括在挥发性的水可混溶的有机溶剂中溶解与可生物降解聚合物(例如,具有侧链官能团的可生物降解聚合物)结合的第一活性剂(例如,亲水活性剂或疏水活性剂),以形成第一溶液;在挥发性的水可混溶的有机溶剂中溶解第二活性剂(例如,亲水活性剂或疏水活性剂),以形成第二溶液;在水可混溶的有机溶剂中溶解多种两性嵌段共聚物,以形成第三溶液;并合并第一、第二和第三溶液,使得形成纳米粒子,这种纳米粒子具有由两性嵌段共聚物包围的疏水聚合物核芯。

[0023] 在一些方面,本发明的特征在于配制包含至少两种活性剂的粒子的方法。所述方法可包括提供第一和第二活性剂;使第一活性剂或其前药或衍生物与可生物降解聚合物(例如,具有侧链官能团的可生物降解聚合物)结合;并制备包含结合的第一活性剂和第二活性剂的粒子。在一些实施方案中,所述方法还包括使第二活性剂或其前药或衍生物与可生物降解聚合物(例如,具有侧链官能团的可生物降解聚合物)结合。在一些实施方案中,所述第一和第二活性剂对于在不存在可生物降解聚合物的情况下形成粒子是不适合的。在这种情况下,使第一活性剂和 / 或第二活性剂与可生物降解聚合物结合能够给予所述第一和第二活性剂形成粒子的适应性。在上述方法的一些实施方案中,所述粒子可通过沉淀、乳化或乳化和溶剂蒸发形成。在一些实施方案中,所述粒子通过微流控技术设备(microfluidics apparatus)形成。

[0024] 在一些方面,本发明的特征在于将多种活性剂递送至受试者中的生物靶标的方法。所述方法可包括得到药物组合物,所述药物组合物包含多种本申请披露的包含靶向剂的粒子,其中所述靶向剂特异性地与生物靶标结合;并以有效地将粒子中的活性剂递送至生物靶标的量向受试者给药药物组合物。在一些实施方案中,所述靶向剂特异性地与肿瘤细胞或肿瘤脉管系统结合。

[0025] 在其它方面,本发明的特征在于将多种活性剂递送至受试者的方法。所述方法可包括得到药物组合物,所述药物组合物包含多种本申请披露的粒子;并以有效地递送活性剂的量向受试者给药药物组合物。

[0026] 在另外的方面,本发明的特征在于治疗需要治疗的受试者中的障碍(例如,癌症或本申请披露的其它障碍)的方法,所述方法包括向受试者给药有效量的上述粒子,其中选择所述第一和第二活性剂以治疗障碍。

[0027] 在一些方面,本发明的特征在于在时间空间上控制向受试者给药两种或更多种活性剂的方法。所述方法可包括提供包含聚合物基质的粒子,所述聚合物基质包含第一活性剂和第二活性剂,其中将所述聚合物基质设置成提供所述第一和第二活性剂各自的希望的时间空间释放动力学(temporalspatial release kinetic);并向受试者给药所述粒子,使得所述第一和第二活性剂以希望的时间空间释放动力学从粒子释放。在一些实施方案中,所

述希望的时间空间释放动力学包括在希望的位置（例如，器官、组织或细胞，或肿瘤或肿瘤脉管系统）释放药物。在一些实施方案中，所述希望的时间空间释放动力学包括释放所述第一和第二活性剂，使得将所述第一和第二活性剂各自希望的剂量提供至受试者。在一些实施方案中，使所述第一和第二活性剂中的一种或两种与可生物降解聚合物（例如，具有侧链官能团的可生物降解聚合物）结合。

[0028] 在任何上述给药方法中，可将粒子或多种粒子静脉内，动脉内，口服，透皮，跨膜，腹膜内，颅内，眼内，硬膜外，鞘内，局部，通过灌肠，通过注射，通过肺途径或通过输注递送。

[0029] 本申请使用的“亲水活性剂”是这样的活性剂：其在 20° C 和一个大气压下在水中的溶解度为 50mg/L 或更大，例如，100mg/L 或更大，200mg/L 或更大，500mg/L 或更大，1.0g/L 或更大，2.0g/L 或更大，或者 5.0g/L 或更大。

[0030] 本申请使用的“疏水活性剂”是这样的活性剂：其在 20° C 和一个大气压下在水中的溶解度为小于 50mg/L，例如，小于 20mg/L，小于 10mg/L，小于 5.0mg/L，小于 2.0mg/L，或者小于 1.0mg/L。

[0031] 在一些情况中，两种或更多种活性剂的亲水性可彼此相对地测量，即，第一活性剂可比第二活性剂更加亲水。例如，与第二活性剂相比，第一活性剂在水中的溶解度可较大。

[0032] 除非另有限定，本文所使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域技术人员所公知的相同的含义。尽管可以在本发明的实践或检测中使用相似于或等价于那些本文中描述的方法和材料，但在下文中描述了适当的方法和材料。将本申请提及的所有出版物、专利申请、专利和其它参考文献的全部内容通过引用的方式并入本文。在冲突的情况下，可以控制本申请，包括定义。此外，材料、方法、以及实例仅是示例性的而不意在限制。

[0033] 根据下列详述和权利要求，本发明的其它特征和优点将变得显而易见。

附图说明

[0034] 图 1A 是与药物（圆圈、正方形或三角形）结合的羟基官能化聚丙交酯（PLA-OH）和各种聚丙交酯-聚乙二醇（PLA-PEG）和与靶向配体结合的 PLA-PEG 的示意图。

[0035] 图 1B 是包含与药物（圆圈、正方形或三角形）结合的羟基官能化聚丙交酯的靶向纳米粒子和组合疗法对癌细胞死亡的效果的示意图。

[0036] 图 2 图示官能化聚丙交酯的转化的 ¹H-NMR 表征。PLA-OH 通过苄基的脱保护由 PLA-OBn 形成并且通过在 7.3ppm 处苯环强度的降低显现。在与单琥珀酸铂（IV）前药结合后，在 PLA-Pt 中铂前药的存在通过在 6.3ppm 处出现氨基质子显现。

[0037] 图 3 是示出 PLA-OH 纳米粒子（PLA-OH-NP）的体外毒性的线图。

[0038] 图 4A-4B 是示出含聚（乳酸-共聚-乙醇酸）-聚乙二醇-COOH（PLGA-PEG-COOH）的示例性纳米粒子的形成的示意图，PLA-OH 与单琥珀酸 Pt（IV）（Poly-Pt）和多西紫杉醇结合。纳米粒子可通过纳米沉淀（4A）或者通过微流控技术方法（4B）制备。

[0039] 图 5A 是示出通过动态光散射测定的 Poly-Pt-Doce-NP 的尺寸的柱状图。

[0040] 图 5B 是 Poly-Pt-Doce-NP 的透射电子显微镜照片。

[0041] 图 6A-6B 是 c, c, t[Pt(NH₃)Cl₂(OH)（琥珀酸盐）]/DMF-0.1M TBAPF₆（6A）和 Poly-Pt（IV）/DMF-0.1M TBAPF₆（6B）的在各种扫描速率的循环伏安图。

[0042] 图 6C-6D 分别为图 6A 和 6B 的各自的伏安图的还原峰值电位相对于伏安图扫描速

率的做图。

[0043] 图 7A-7B 示出铂 (7A) 和多西紫杉醇 (7B) 从双重药物 Poly-Pt-Doce-NP 的体外释放。

[0044] 图 8A-8B 是示出单琥珀酸 Pt(IV) (单琥珀酸盐)、顺铂、PolyPt-NP 和 PolyPt-NP-Apt 对 LNCaP (8A) 和 PC3 (8B) 细胞的细胞毒性的线图。

[0045] 图 9 是示出 PolyPt-NP 和靶向 PolyPt-NP-Apt 的 LNCaP 细胞摄取的一组显微照片。DIC, 差分干涉比较; FITC, 异硫氰酸荧光素; EEA1, 小鼠单克隆抗体。

[0046] 图 10A 是铂-DNA 加合物的形成的示意图。

[0047] 图 10B 是一组显微照片, 示出在用 PolyPt-Doce-NP-Apt 或 PolyPt-NP-Apt 处理细胞后在 LNCaP 细胞中 Pt-GG 加合物的检测。

[0048] 图 11 是 PLA-OH、PLA-COOH 和 PLA- 药物的示例性合成的示意图。对于与 PLA-OH 和 PLA-COOH 结合, 可使用其它化学品 (例如, T-NH₂)。

[0049] 图 12 是示出由 PLA-OH 形成 PLA-Pt 的示意图。

[0050] 图 13 是包含 PLA-Pt 和多西紫杉醇并任选与靶向配体 (A10 适体) 结合的双重药物纳米粒子的结构的示意图。

[0051] 图 14 是用于开发靶向聚合物纳米粒子的组合半自动方法的示意图。使用具有多个入口的微流体系统引入不同的药物官能化聚合物、配体官能化聚合物、游离聚合物和游离药物, 以混合希望的前体。混合速率由输入流量支配, 所述输入流量通过与 PC 连接的注射泵自动控制。通过在微流体通道中流动聚焦 (flow focusing), 所得聚合物和药物前体沉积在水溶液中。前体流动速率的每个组合导致不同的纳米粒子制剂, 其自动收集在 96 孔板中, 用于进一步纯化和分析。

[0052] 图 15A 是 PLA-COOH 的合成的示意图。

[0053] 图 15B 示出 PLA-COOH 的 ¹H-NMR 表征。

[0054] 图 16A 是 PLA- 氯尼达明的合成的示意图。

[0055] 图 16B 示出 PLA- 氯尼达明 (PLA-Loni) 的 ¹H-NMR 光谱堆积 (spectral stack)。

[0056] 图 17A 是 PLA- 二氯乙酸盐 / 酯 (PLA-DCA) 的合成的示意图。

[0057] 图 17B 示出在催化量的碱 N, N-二异丙基乙胺 (DIPEA) 的存在下使二氯乙酸酐与 PLA-OH 反应得到的 PLA-DCA 的 ¹H-NMR 光谱堆积。

具体实施方式

[0058] 本申请提供包含两种或更多种活性剂的药物递送组合物, 其中至少一种活性剂与可生物降解聚合物 (例如, 具有侧链官能团的可生物降解聚合物) 结合。所述递送组合物允许共同递送多种药物 (例如, 具有不同特征的药物, 例如, 亲水和疏水药物), 并且能够独立地控制每种药物的释放参数。另外, 所述递送组合物可包含用于将系统递送至希望的细胞靶标的靶向剂。作为一个实例, PLA- 官能化双重药物递送组合物通过以下方法开发: 将多西紫杉醇组合在铂改性的 PLA 聚合物中, 得到适度高的粒子载荷, 所述粒子具有适合的粒度, 用于将顺铂和多西紫杉醇同时递送至前列腺癌细胞。

[0059] 递送组合物

[0060] 在一个方面, 所述递送组合物是包含两种或更多种活性剂的粒子。活性剂可与可

生物降解聚合物（例如，具有侧链官能团的可生物降解聚合物）结合。所述粒子也可包含包围疏水核芯的两性外壳，所述两性外壳含有多种两性分子（例如，两性脂类或两性共聚物）。所述粒子可进一步在粒子表面上包含靶向剂。

[0061] 另外，可制造粒子（例如，聚合物微米和纳米粒子），使得它们可生物降解，使得它们包含已经由 FDA 批准的材料，以及使得它们导致亚微米粒度（例如，10nm–1000nm 或其它范围，例如，25nm–250nm，例如，15nm–50nm，10nm–500nm），或者微米级粒度。在本申请中认为，纳米级粒子的最大横截面尺寸最大为 1000nm。微米级粒子的最大横截面尺寸为超过 1.0 微米（例如，1.0 微米至最高 100 微米，或更大，例如，1.0–2.0 微米，1.0–10.0 微米，5–25 微米，和 25–50 微米），也可根据本申请所述方法制造。

[0062] 在一些情况中，所述粒子为纳米粒子，即，所述粒子具有小于 1 微米的特征尺寸，其中所述特征尺寸为粒子的最大横截面尺寸。例如，所述粒子的特征尺寸在一些情况中可小于约 500nm，小于约 400nm，小于约 250nm，小于约 200nm，小于约 150nm，小于约 100nm，小于约 50nm，小于约 30nm，小于约 10nm，小于约 3nm，或小于约 1nm。

[0063] 在一些情况中，可存在粒子群。本发明的多个实施方案涉及这种粒子群。例如，在一些实施方案中，所述粒子群的平均特征尺寸在一些情况中小于约 500nm，小于约 400nm，小于约 250nm，小于约 200nm，小于约 150nm，小于约 100nm，小于约 50nm，小于约 30nm，小于约 10nm，小于约 3nm，或小于约 1nm。在一些实施方案中，所述粒子各自可为基本相同的形状和 / 或粒度（“单分散的”）。例如，所述粒子可具有特征尺寸分布，使得不超过约 5% 或约 10% 的粒子的特征尺寸比粒子的平均特征尺寸大约 10%，以及在一些情况中，使得不超过约 8%，约 5%，约 3%，约 1%，约 0.3%，约 0.1%，约 0.03%，或约 0.01% 的粒子的特征尺寸比粒子的平均特征尺寸大约 10%。在一些情况中，不超过约 5% 的粒子的特征尺寸比粒子的平均特征尺寸大约 5%，大约 3%，大约 1%，大约 0.3%，大约 0.1%，大约 0.03%，或大约 0.01%。

[0064] 在一些实施方案中，不超过 25% 的制造粒子的直径与平均粒子直径相差超过平均粒子直径的 150%，100%，75%，50%，25%，20%，10%，或 5%。经常希望制造在粒度、形状和 / 或组成方面相对均匀的粒子群，使得每个粒子具有相似的性质。例如，使用本申请所述方法制造的至少 80%，至少 90%，或至少 95% 的粒子的直径或最大尺寸可落在平均直径或最大尺寸的 $\pm 5\%$ 内， $\pm 10\%$ 内，或 $\pm 20\%$ 内。在一些实施方案中，粒子群在粒度、形状和 / 或组成方面可为不均匀的。参见例如 PCT 公开 WO 2007/150030，将其全部内容通过引用的方式并入本文。

[0065] 在一些实施方案中，粒子群的多分散指数为 0.6 或更小，例如，0.5 或更小，0.4 或更小，0.3 或更小，0.2 或更小，0.1 或更小，或 0.05 或更小。

[0066] 在许多实施方案中，配制粒子用于控制释放。当将天然或合成聚合物与活性剂组合，使得药物保留在聚合物体系中，随后以预定方式释放时，发生控制释放。设计为粒子的聚合物药物递送组合物可通过表面或本体侵蚀、扩散和 / 或溶胀然后扩散，以时间或条件依赖性方式释放结合的活性剂。活性剂的释放可在长或短时间内恒定，可在长或短时间内循环，或者可由环境或其它外部事件触发（参见，例如，Langer 和 Tirrell, 2004, Nature, 428:487–492）。一般而言，与其它药物递送方法相比，控制释放聚合物系统可在较长的时间内提供特定范围内的药物水平，由此提高药物效力和最大化患者依从性。

[0067] 尽管可使用 PLA 和 PLGA 非共价地包胶药物和以调节的方式释放，但是使用这种组合药物递送策略在释放多种药物中可导致批次间的差异性，尤其是当使用具有不同特征

(例如,溶解度、电荷、分子量、半衰期、生物分布特征)的药物时。相反,包含本申请所述的药物-聚合物结合物的递送组合物的使用对药物的载荷和释放提供更多的控制,尤其是当递送具有不同溶解度、电荷和分子量的药物时。

[0068] 不希望受理论束缚,粒子参数(例如,粒度、电荷等)可改变活性剂从粒子的递送(例如,有效载荷的损失、药物流出、聚集、递送至希望的位置等)。在一些情况中,较大粒子倾向于比较小粒子更快地损失有效载荷和/或较小粒子的药物流出可比较大粒子更快。在一些情况中,较小粒子可比较大粒子更可能聚集。粒子的粒度可影响粒子在整个身体中的分布。例如,与较小粒子相比,注射到血流中的较大粒子可更可能停留在小血管中。在一些情况中,与较小粒子相比,较大粒子可较小可能地穿越生物屏障(例如,毛细血管壁)。在递送组合物中使用的粒子的粒度可基于应用来选择,以及将为本领域普通技术人员容易地获知。例如,如果希望在患者的整个血流中全身性地递送粒子,可选择较小粒度(例如,<200nm)的粒子。作为另一个实例,如果希望通过注射由患者的网状内皮系统整合粒子(例如,在肝、脾等中整合粒子),可选择较大粒度(例如,>200nm)的粒子。当选择粒子粒度时,也可考虑希望的递送时长。例如,与较大粒子相比,较小粒子倾向于在血流中循环较长的时长。

[0069] 在一些实施方案中,将所述粒子设计成基本上在特定靶标(例如肿瘤)的位置累积。在一些实施方案中,这可至少部分地由于与所述粒子相连的靶向部分的存在,如本申请所述。在一些实施方案中,这可至少部分地由于增强的渗透性和保留(EPR)效果,其允许粒子特异性地在肿瘤位置累积。EPR效果为本领域普通技术人员所知,是指这样的性质:通过这种效果,与正常组织相比,某些尺寸的材料(例如,粒子)倾向于更多地累积在肿瘤组织中。

[0070] 聚合物

[0071] 在一些实施方案中,所述递送组合物包含一种或多种聚合基础组分(例如,聚合物)。本申请使用的“聚合物”表示普通含义,即,包含由共价键连接的一种或多种重复单元(单体)的分子结构。所述重复单元可全部相同,或者在一些情况中,在聚合物中可存在超过一种类型的重复单元。在一些情况中,所述聚合物为生物来源的,即,生物聚合物。在一些情况中,在聚合物中也可存在另外的部分,例如靶向部分如本申请所述的那些。

[0072] 如果在聚合物中存在超过一种类型的重复单元,那么将聚合物称为“共聚物”。应理解的是,在使用聚合物的任何实施方案中,所使用的聚合物在一些情况中可为共聚物。形成共聚物的重复单元可按任何方式排列。例如,重复单元可按无规顺序排列,可按交替顺序排列,或者排列为“嵌段”共聚物,即,包含一个或多个区域,每个区域包含第一重复单元(例如,第一嵌段),和一个或多个区域,每个区域包含第二重复单元(例如,第二嵌段),等等。嵌段共聚物可具有两个(二嵌段共聚物),三个(三嵌段共聚物),或更多数目的不同嵌段。

[0073] 在一些实施方案中,聚合物为两性的,即,具有亲水部分和疏水部分,或者相对亲水部分和相对疏水部分。亲水聚合物是通常吸引水的聚合物以及疏水聚合物是通常排斥水的聚合物。亲水或疏水聚合物可例如通过以下方法识别:制备聚合物样品并测量它与水的接触角(通常,亲水聚合物的接触角小于约 50° ,而疏水聚合物的接触角大于约 50°)。在一些情况中,两种或更多种聚合物的亲水性可彼此相对地测量,即,第一聚合物与第二聚合

物相比可较亲水或较不亲水。例如,第一聚合物可具有比第二聚合物较小的接触角。在含有超过两种聚合物的实施方案中,可通过比较溶解度参数将聚合物按顺序评级。

[0074] 在一组实施方案中,聚合物基础组分(例如,聚合物)可为生物相容的,即,当嵌入或注射到活的受试者中时,聚合物通常不引发不利应答,例如,无显著发炎和/或免疫系统急性排斥聚合物,例如,通过T-细胞应答。当然,应承认的是,"生物相容性"是相对概念,甚至对于与活体组织高度相容的聚合物,一些程度的免疫应答也是可以预料的。然而,本申请使用的"生物相容性"是指不发生至少一部分免疫系统导致的材料的急性排斥,即,植入到受试者中的非生物相容材料在受试者中引起足够严重的免疫应答,使得免疫系统导致的材料的排斥不能被足够地控制,以及经常达到必须将材料从受试者移除的程度。测定生物相容性的一个简单试验是将聚合物暴露于体外细胞;可生物相容聚合物是在中等浓度,例如,在约50微克/10⁶细胞的浓度通常不导致大量细胞死亡的聚合物。例如,可生物相容聚合物当暴露于细胞如成纤维细胞或上皮细胞时可导致少于约20%细胞死亡,即使由这种细胞吞噬或以其它方式摄取。可用于本发明的各个实施方案中的可生物相容聚合物的非限制性实例包括聚二噁烷酮(PDO)、聚羟基脂肪酸酯、聚羟基丁酸酯、聚(癸二酸甘油酯)、聚乙醇酸交酯、聚丙交酯、聚己内酯、聚酐或包含这些和/或其它聚合物的共聚物或衍生物。

[0075] 在某些实施方案中,可生物相容聚合物是可生物降解的,即,所述聚合物能够在生理环境中例如在体内化学和/或生物地降解。例如,所述聚合物可通过暴露于水(例如,在受试者中)而自然地水解,所述聚合物可通过暴露于热(例如,在约37°C的温度)而降解。聚合物的降解能够以不同的速率进行,取决于使用的聚合物或共聚物。例如,聚合物的半衰期(50%的聚合物降解成单体和/或其它非聚合部分的时间)可大概为数天、数周、数月或数年,取决于聚合物。所述聚合物可生物降解,例如,通过酶促活性或细胞机理,在一些情况中,例如,通过暴露于溶菌酶(例如,具有相对低的pH)。在一些情况中,所述聚合物可分解成细胞能够重新使用或处置而对细胞没有明显毒性影响的单体和/或其它非聚合部分(例如,聚丙交酯可水解以形成乳酸,聚乙醇酸交酯可水解以形成乙醇酸等)。可生物降解聚合物的实例包括但不限于聚(丙交酯)(或聚(乳酸))、聚(乙交酯)(或聚(乙醇酸))、聚(原酸酯)、聚(己内酯)、聚赖氨酸、聚(乙烯亚胺)、聚(丙烯酸)、聚氨酯、聚(酸酐)、聚(酯)、聚碳酸丙二醇酯、聚(乙烯亚胺)、聚(丙烯酸)、聚氨酯、聚(β-氨基酯)等,以及这些和/或其它聚合物的共聚物或衍生物,例如,聚(丙交酯-共聚-乙交酯)(PLGA)。

[0076] 在另一组实施方案中,本发明聚合物能够控制免疫原性,例如聚(亚烷基二醇)(也称为聚(亚烷基氧化物)),例如聚(丙二醇),或聚(环氧乙烷),也称为聚(乙二醇)("PEG"),具有式-(CH₂-CH₂-O)_n-,其中n为任何正整数。在一些实施方案中,可使用支化PEG(参见,例如,Veronese et al, 2008, BioDrugs, 22:315-329; Hamidi et al, 2006, Drug Deliv., 13:399-409)。聚(乙二醇)单元能够以任何适合的形式存在于聚合基础组分中。例如,所述聚合基础组分可为嵌段共聚物,其中的一个嵌段是聚(乙二醇)。包含聚(乙二醇)重复单元的聚合物也称为"PEG化"聚合物。由于聚(乙二醇)基团的存在,这种聚合物能够控制炎症和/或免疫原性(即,引起免疫应答的能力)。在一些情况中,也可使用PEG化降低在聚合物和生物部分之间的电荷相互作用,例如,通过在聚合物表面上形成亲水层,其能够屏蔽聚合物,使聚合物不与生物部分相互作用。例如,可使用PEG化形成内部比外部更疏水的粒子。在一些情况中,聚(乙二醇)重复单元的添加能够提高聚合结合物的血

浆半衰期,例如,通过降低吞噬系统的聚合物摄取,同时降低细胞的转染/摄取效率。本领域普通技术人员将获知 PEG 化聚合物的方法和技术,例如,通过使用 EDC(1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐)和 NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)将聚合物反应至胺中的 PEG 基团末端,例如,通过开环聚合技术 (ROMP) 等。另外,本发明的某些实施方案涉及含聚(酯-醚)的共聚物,例如,具有通过酯键(例如, $R-C(O)-O-R'$ 键)和醚键(例如, $R-O-R'$ 键)接合的重复单元的聚合物。

[0077] 可制备本申请所述聚合物,使其侧链官能团,即,沿着聚合物(例如,聚合物的一部分)的长度存在的官能团与活性剂结合。在一些实施方案中,对于每 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,12,15,或 20 个聚合物单体单元,所述聚合物具有约一个官能团(例如,结合的官能团)。可将官能团限制于聚合物的一部分,例如,限制在嵌段共聚物中。在一些实施方案中,所述官能团为羟基、羧基、氨基、酰氨基、氨基甲酸酯基、马来酰亚胺基、硫醇基、卤素、叠氮基、propargyl、烯丙基等。另外,官能团可通过连接子与聚合物接合。

[0078] 已知多种方法使用共价键(例如包括 σ -键、 π -键、金属-非金属键、不可知相互作用、二硫键和三中心二电子键)使异官能连接子(heterofunctional linker)与活性剂结合。在一个实例中,键(例如,交联)可通过以下方法形成:通过使用 1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基]碳化二亚胺盐酸盐/N-羟基琥珀酰亚胺(EDC/NHS)或苯并三唑-1-基-氧基-三-吡咯烷子基-磷六氟磷酸盐/N-羟基苯并三唑(pyBOP/HOBt)在羧基(或马来酰亚胺)和伯胺之间形成酰胺键。所述反应可忍受水性溶剂和有机溶剂(例如但不限于,二氯甲烷、乙腈、氯仿、四氢呋喃、丙酮、甲酰胺、二甲基甲酰胺、吡啶、二噁烷或二甲基亚砷)。

[0079] 在另一个实例中,键合(例如,交联)在水性和有机溶剂中在马来酰亚胺和巯基(硫醇)基团之间形成。还原可断裂交联可在巯基(硫醇)基团之间通过吡啶巯基、3-硝基-2-吡啶巯基(Npys)基团和 Boc-S-叔丁基巯基(StBu)基团实现。所述反应可忍受水性溶剂和有机溶剂(例如但不限于,二氯甲烷、乙腈、氯仿、四氢呋喃、丙酮、甲酰胺、二甲基甲酰胺、吡啶、二噁烷或二甲基亚砷)。

[0080] 制备具有侧链官能团的官能化聚合物的方法是本领域已知的。例如,制备方法和官能化聚丙交酯、聚乙交酯、聚酯酰胺描述于 Gerhardt et al., 2006, *Biomacromolecules*, 7:1735-42。官能化双内酯的合成和在制备具有羟基官能团的聚酯、聚(乳酸-共聚-羟甲基乙醇酸)和聚(乳酸-共聚-乙醇酸-共聚-羟甲基乙醇酸)中的使用描述于 Leemhuis et al., 2007, *Biomacromolecules*, 8:2943-49; Leemhuis et al., 2003, *Eur. J. Org. Chem.*, 3344-49; 和 Leemhuis et al., 2006, *Macromolecules*, 39:3500-08。羟甲基和琥珀酰化 PLA 聚合物描述于 Noga et al., 2008, *Biomacromolecules*, 9:2056-62。聚己基取代的丙交酯披露于 Trimaille et al., 2005, *Chimia* 59:348-352; 和 Trimaille et al., 2007, *J. Biomed. Mater. Res.*, 80A:55-65。Jing 和 Hillmyer, 2008, *J. Am. Chem. Soc.*, 130:13826-27 描述了具有官能二环酯的 PLA。具有侧链羧基的聚(α -羟基酸)披露于 Kimura et al., 1988, *Macromolecules*, 21:3338-40。另外,可生物降解酯可衍生于氨基酸,如 Kolitz et al., 2009, *Macromolecules*, DOI:10.1021/ma900464g; Cohen-Arazi et al., 2008, 41:7259-63 中所述。在一些实施方案中,所述聚合物可通过"click"法官能化,如 Jiang et al., 2008, *Macromolecules*, 41:1937-44 中所述。

[0081] 聚合物的合成和结合的另外方法披露于 US 20080248126,将其全部内容通过引用

的方式并入本文。

[0082] 可改变与活性剂结合的例如具有侧链官能团的聚合物的长度,以提供希望的参数。通常,提高聚合物长度会降低活性剂释放速率。在一些实施方案中,所述聚合物在与活性剂结合之前的分子量为约 2000g/mol,例如,约 3000g/mol,约 4000g/mol,约 5,000g/mol,约 10,000g/mol,约 20,000g/mol,约 50,000g/mol,或约 100,000g/mol。

[0083] 结合能够形成键的反应性官能团允许结合不同的药物并随后在生理条件中水解这种键,从而导致受控方式的药物释放。图 11 示出用于开发具有侧链羟基的可生物降解聚丙交酯衍生物的示例性手段。简而言之,通过重氮化反应使用亚硝酸钠在酸的存在下将胺转化成羟基。所得单体 2 可连同乳酸直接用于缩聚,以得到聚丙交酯共聚物, Poly-OBn。相同的聚合物可通过环状丙交酯单体 3 的开环聚合 (ROP) 制备,环状丙交酯单体 3 通过 α -羟基酸在非常稀释的反应条件下在甲苯中用对甲苯磺酸进行脱水反应制备。对于高分子量聚合物的合成,ROP 手段有利。苄基保护基防止在聚合过程中羟基的副反应。然后羟基官能化可生物降解聚丙交酯 (PLA-OH) 可通过苄基脱保护使用 Pd/C 催化剂合成。对于合成羧基官能化聚丙交酯,可用酸酐处理 PLA-OH,例如,琥珀酸酐或衣康酸酐(参见图 15A)。

[0084] 图 12 示出用于结合顺铂前药的示例性策略。通过 DCC/HOBT 偶合使单琥珀酸铂 4(顺铂的前药)与 PLA-OH 聚合物结合,得到最终的 PLA-Pt(图 12)。相似的策略可用于结合其它药物分子。

[0085] 活性剂

[0086] 所述粒子包含两种或更多种活性剂,其中至少一种活性剂与聚合物(例如,具有侧链官能团的聚合物)结合。选择的活性剂可适用于宽范围的应用(例如,治疗、成像和诊断应用)以及包括蛋白质、肽、糖、脂类、甙类、DNA、RNA、小分子药物,和本申请所述的任何药物的前药。本申请所述的前药是在体内代谢成药物活性形式的药理物质。在一些情况中,与药物活性形式相比,前药为药物惰性的或活性显著较低的。

[0087] 在一些实施方案中,所述活性剂为小分子药物。术语“小分子”是本领域承认的,是指分子量小于约 2000g/摩尔,小于约 1500g/摩尔,小于约 1000g/摩尔,小于约 800g/摩尔,小于约 700g/摩尔,小于约 600g/摩尔,小于约 500g/摩尔,小于约 400g/摩尔,小于约 300g/摩尔,小于约 200g/摩尔,小于约 100g/摩尔,或更小的组分。本领域普通技术人员将能够测定小分子药物是否适于用聚合物(例如,具有侧链官能团的聚合物)进行官能化。

[0088] 在一些实施方案中,活性剂为亲水或疏水的。亲水或疏水活性剂可例如通过以下方法鉴别:测量活性剂在水中的溶解度。在一些情况中,两种或更多种活性剂的亲水性可彼此相对地测量,即,第一活性剂可比第二活性剂较亲水。例如,第一活性剂在水中的溶解度可大于第二活性剂。在含有超过两种活性剂的实施方案中,可通过比较溶解度参数将活性剂按顺序分级。

[0089] 在一些实施方案中,活性剂的组合对于治疗障碍而言是协同的。药物作用和应答的分子基础的深入研究已经得到了关于实验测定许多药物和化合物的药物介导的分子相互作用分布和调节活性的大量信息(参见,例如, Drews, 2000, Science, 287:1960-64; Imming et al., 2007, Nature Rev. Drug Discov. 5, :821-834; Robertson, 2005, Biochemistry, 44:5561-71; Zybarth et al., 2006, Curr. Drug Targets, 7:387-395; Wishart et al., 2006, Nucleic Acids Res., 34:D668-D672; Ya, et al., 2006, Appl.

Bioinformatics, 5:131-139; Liu et al., 2007, Nucleic Acids Res., 35:D198-D201; 和 Ji et al., 2003, Drug Disco v. Today, 8:526-529)。药物的分子相互作用分布描述药物与可归因于它的药效、毒理学、药代动力学和组合效果的单个生物分子、途径或过程的相互作用。分子相互作用可用于指导活性剂组合的开发。

[0090] 可使用的活性剂的适合的非限制性实例包括 5- 氟尿嘧啶 (5-FU) : 在癌症治疗中常用的抗代谢物药物。典型的给药首先是历时 15 分钟以弹丸形式的 $400\text{mg}/\text{m}^2$ 的 (即, 每平方米计算的体表面积) 静脉内治疗, 然后历时 46 小时以连续输注形式的携带泵递送 $2,400\text{mg}/\text{m}^2$ 。适合的化学治疗药物可分成下面的类别: 烷基化剂、抗代谢药、蒽环类、植物生物碱、拓扑异构酶抑制剂、单克隆抗体和其它抗肿瘤药物。除了上述化学治疗药物, 即, 多柔比星、紫杉醇, 其它适合的化学治疗药物包括酪氨酸激酶抑制剂甲磺酸伊马替尼 (Gleevec® 或 Glivec®)、顺铂、卡铂、奥沙利铂、二氯甲基二乙胺 (mechloethamine)、环磷酸胺、苯丁酸氮芥、硫唑嘌呤、巯嘌呤、嘧啶、长春新碱、长春碱、长春瑞滨、长春地辛、鬼臼毒素 (L01CB)、依托泊甙、多西紫杉醇、拓扑异构酶抑制剂 (L01CB 和 L01XX)、伊立替康、托泊替坎、安吡啶、依托泊甙、磷酸依托泊甙、替尼泊甙、更生霉素、氯尼达明和单克隆抗体, 例如曲妥珠单抗 (Herceptin®)、西妥昔单抗、贝伐单抗和利妥昔单抗 (Rituxan®) 等等。另外的示例性活性剂包括 PARP 抑制剂, 存活素抑制剂、雌二醇和二氯乙酸盐 / 酯。

[0091] 活性剂的其它实例包括但不限于抗微生物剂, 镇痛药, 抗炎剂, 抗刺激剂, 聚结改性剂, 利尿药, 拟交感神经药, 代谢调节剂, 减食欲剂, 抗酸药和其它胃肠病用药; 抗寄生虫药, 抗抑郁药, 抗高血压药, 抗胆碱药, 兴奋剂, 抗激素, 中枢和呼吸兴奋剂, 药物拮抗剂, 调血脂药, 排尿酸药, 强心甙类, 电解质类, 麦角及其衍生物, 祛痰药, 安眠药和镇静药, 抗糖尿病剂, 多巴胺能药, 止吐药, 肌肉松弛药, 拟副交感神经药, 抗惊厥药, 抗阻胺药, β - 阻断剂, 通便药, 抗心律不齐药, 对比剂, 放射性药物, 抗过敏剂, 安神药, 血管扩张剂, 抗病毒药, 和抗肿瘤或杀细胞药或具有抗癌性质的其它药物, 或其组合。其它适合的活性剂包括避孕药和维生素以及微量和大量营养素。另外的其它实例包括抗感染药如抗生素类和抗病毒药; 镇痛药和镇痛组合; 减食欲剂; 驱虫药; 抗关节炎药; 抗哮喘药; 抗惊厥药; 抗抑郁药; 抗利尿药; 抗痢疾药 (antidiarrheals); 抗阻胺药; 抗炎药; 抗偏头痛药; 止恶心药; 抗肿瘤药; 抗帕金森病药; 止痒药; 抗精神病药; 解热药, 镇痉药; 抗胆碱药; 拟交感神经药; 黄嘌呤衍生物; 心血管药 (包括钙拮抗药和 β - 阻断剂如吡啶洛尔和抗心律不齐药); 抗高血压药; 利尿药; 血管扩张剂 (包括一般冠状的、周围的和大脑的); 中枢神经系统兴奋剂; 咳嗽和感冒用药, 包括解充血药; 激素如雌二醇和其它甾类, 包括皮质类固醇; 催眠药; 免疫抑制药; 肌肉松弛药; 抗副交感神经药; 精神兴奋药; 镇静药; 和安神药; 以及天然生成或基因工程化的蛋白质、多糖类、糖蛋白或脂蛋白类。

[0092] 示例性代谢调节剂包括氯尼达明、二氯乙酸盐 / 酯、琥珀酸 α - 生育酚酯、茉莉酸甲酯、桦木酸和白藜芦醇。在一些实施方案中, 所述粒子包括抗癌剂和代谢调节剂。

[0093] 在某些实施方案中, 所述粒子可包含洛伐他汀, 一种胆固醇降低和心脏病活性剂, 其可包含在本申请所述的纳米粒子中。在另一方面, 包含在粒子核芯中的适合的活性剂为苯妥英 (Phenytoin), 一种抗惊厥剂 (Pfizer, Inc 在 USA 作为 Dilantin® 出售以及在 UK 作为 Epanutin® 出售)。可将抗生素结合在粒子中, 例如万古霉素, 其经常用于治疗感染, 包括抗甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 导致的感染。所述粒子任选包含环孢素, 一种亲脂药

物,其为免疫抑制剂,在同种异体器官移植后广泛使用,以降低患者免疫系统的活性和器官排斥的危险(原始制剂由 Novartis 在商标名称 Sandimmune®下出售,以及较新的微乳制剂在 Neoral®下出售)。同样,包含环孢素的粒子可在局部乳剂中用于治疗干燥性角结膜炎。在这点上,可将结合这种药物的具有多功能表面区域的粒子设计成将等剂量的各种药物直接递送至癌细胞,从而潜在地最小化通常递送至患者的量和最小化对其它组织的附带损害。

[0094] 在某些具体方面,本发明的粒子包含以下物质中的一种或多种:非甾类抗炎剂(NSAID)、镇痛药、COX-I 和 II 抑制剂等。例如,吲哚美辛是适合的 NSAID,适于结合到本发明的多相纳米组分中。

[0095] 呈治疗剂形式的其它活性剂描述于 WO 2008/124632 中,将其全部内容通过引用的方式并入本文。

[0096] 可用辅助相容性部分官能化的亲水药物的非限制性实例包括顺铂、卡铂、mitaplatin、奥沙利铂、pyriplatin、己酸铂(IV)、伊立替康、茉莉酸甲酯、磷酸地塞米松、盐酸尼卡地平、甲基水杨酸、二氯乙酸盐/酯、硝化甘油、亲水血清素 5-HT₃ 受体拮抗剂(例如,昂丹司琼、格拉司琼)、氨基四氢化萘(例如,S(-)-2-(N-丙基-N-2-噻吩基乙基胺)-5-羟基四氢化萘)、萘环类等。在一些实施方案中,所述药物或药物前体可包含无机或有机金属化合物,例如,铂化合物(如本申请所述)、钌化合物(例如,反式-[RuCl₂(DMSO)₄]、反式-[RuCl₂(咪唑)₂]⁻等)、钴化合物、铜化合物、铁化合物等。

[0097] 在一些实施方案中,将核酸修复抑制剂与 DNA 损害剂(例如,铂化合物)组合配制。

[0098] 作为实例,将顺铂前药(单琥珀酸铂)官能化至具有侧链羟基的 PLA(参见实施例 1)。另外,将多西紫杉醇与 PLA-Pt 组合(药物载荷 w/w%:多西紫杉醇 3%;Pt 5%),以及历经数天证实了顺铂和多西紫杉醇从纳米粒子的控制释放。

[0099] 相似的手段可用于结合其它活性剂。例如,对于开发具有侧链奥沙利铂的聚丙交酯,可合成羧基在轴向位置的奥沙利铂前药,其将与 PLA-OH 偶合。具有紫杉醇侧链基团的聚丙交酯通过以下方法制备:通过用琥珀酸酐处理 PLA-OH,产生含羧基的聚丙交酯,并将这种化合物直接与紫杉醇的羟基偶合。在 tubacin-官能化聚合物的情况中,可将相同的含羧基的聚丙交酯与 tubacin 的羟基结合。

[0100] 在一个方面,本发明提供能够将具有不同化学性质的多种活性剂以安全、有效和控制的方式给药于患者(例如,同时地)的组合物和方法。将多种活性剂组合至单一递送组合物也允许将活性剂靶向至特定细胞靶标,例如,肿瘤细胞。事实上,许多传统组合疗法(例如,使用两种或更多种药物的癌症治疗)的治疗效力经常是有限的,这是因为与单独给药相比,当将两种药物组合给药时,单个药物的剂量限制性毒性(DLT)较低。在这种情况下,在组合疗法中需要将每种药物的剂量降低,由此降低单独药物对总体治疗效力的贡献。另外,这阻碍了识别新的协同作用的机会。通过使用与可生物降解聚合物结合的活性剂作为组合治疗中的一种或多种,本发明解决了这个问题。因为这些结合物以靶向方式递送药物,它们与药物本身相比具有较高的剂量限制性毒性。通过使用结合物作为组合治疗的一种或多种,可因而提高一种或多种药物在组合中的剂量。在一种实施方案中,将两种或更多种结合物(每种携带不同的药物)组合给药。在一种实施方案中,将结合物与一种或多种

非结合药物一起给药。在任何这些实施方案中,应理解的是,可只提高一种或数种药物在组合中的剂量(例如,在两种药物的组合中的一种或两种药物)。还应理解的是,可提高结合的药物剂量和/或未结合的药物剂量。

[0101] 本发明的方法和组合物决不限于具体药物、具体药物组合或具体疾病,但是本申请披露的某些组合可提供有利和/或协同结果。

[0102] 例如,并且非限制性地,可将具有已知协同作用的某些药物组合至单一递送组合物中。例如,紫杉醇或多西紫杉醇与吉非替尼已证实在乳腺癌 MCF7/ADR 细胞中具有强协同效果;oxaloplatin 和伊立替康在 AZ-521 和 NUGC-4 细胞中具有协同抗癌效果;以及紫杉醇和 tubacin 协同地增强微管蛋白乙酰化。另外,可将考布他汀或阻断新生血管形成的其它药物结合至递送组合物中,包括包含对 PSMA 特异性的靶向剂的递送组合物。可结合的其它组合可参见,例如, Jia et al., 2009, Nat. Rev. Drug. Discov., 8:111-128, 以及包括 DL-环丝氨酸和表没食子儿茶素没食子酸酯;紫杉醇和 NU6140;吉非替尼和紫杉烷;吉非替尼和 PD98059;AZT 和非核苷 HIV-1 逆转录酶抑制剂;aplidin 和阿糖胞苷;吉非替尼和 ST 1926;西地那非和伊洛前列素;右美托咪啶和 ST-91;麦考酚酸莫酯和咪唑立宾;紫杉醇和 discodermolide;氨苄西林和达托霉素;坎地沙坦西酯和雷米普利;二氮嗪和二丁酰-cGMP;二异丙酚和七氟烷;氨苄西林和亚胺培南;青蒿素和姜黄素;多柔比星和曲贝替定;和阿奇霉素和亚胺培南。将 Jia et al., Nat. Rev. Drug. Discov., 8:111-128 的全部内容通过引用的方式并入本文。

[0103] 例如,并且非限制性地,目前用环磷酰胺、甲氨蝶呤和氟尿嘧啶的组合(CMF)或环磷酰胺、多柔比星和氟尿嘧啶的组合(CAF)治疗某些转移乳腺癌。因此,在一种实施方案中,在这些组合治疗中的上述药物中的两种或三种可在单一粒子中给药。

[0104] 膀胱癌、头颈癌和子宫内膜癌可类似地通过以下方法治疗:在单一粒子中给药 M-VAC(甲氨蝶呤、长春碱、亚德里亚霉素、顺铂)或 CMV(顺铂、甲氨蝶呤、长春碱)中的两种或更多种单独药物。

[0105] 普通技术人员将认识到用于其它传统组合疗法的这些实施方案的改变(例如,非限制性地,在“Combination Cancer Therapy:Modulators and Potentiators”, Schwartz, Ed., Humana Press, 2004; “Combination Therapy of AIDS”, Ed. by DeClerq et al., Birkhauser, 2004; 等中描述的那些)。

[0106] 靶向剂

[0107] 在某些实施方案中,可改性本发明结合物,以包含靶向剂,该靶向剂将本发明结合物导向特定细胞类型、细胞集合或组织。优选地,靶向剂与粒子表面关联。多种适合的靶向剂是本领域已知的(Cotten et al., Methods Enzym. 217:618, 1993; Torchilin, Eur. J. Pharm. Sci. 11:881, 2000; Garnett, Adv. Drug Deliv. Rev. 53:171, 2001)。例如,可使用大量与靶标细胞表面上的抗原结合的不同材料中的任何材料。靶标细胞表面抗原的抗体一般将呈现对靶标的必需特异性。除了抗体之外,也可使用适合的免疫反应片段,例如 Fab、Fab' 或 F(ab')₂ 片段。在形成靶向机制中适合使用的许多抗体片段已经是本领域可得到的。类似地,可适合地使用靶标细胞表面上的任何受体的配体作为靶向剂。这些包括任何小分子或生物分子(天然的或合成的),其特异性地与在希望的靶标细胞表面发现的细胞表面受体、蛋白质或糖蛋白结合。

[0108] 存在其它靶向剂,例如核酸配体,例如适体,其是小的寡核苷酸,其与某些靶标分子特异性结合并且是在癌细胞如前列腺癌细胞中过表达的靶标蛋白的有力候补。核酸配体是可用于与特定分子结合的核酸。例如,培加尼布是聚乙二醇化的抗 VEGF 适体,其是以高特异性与特定靶标结合的一种单链核酸。尽管培加尼布适体最初由 FDA 在 2004 年批准治疗年龄相关性黄斑变性 (AMD) 疾病,但是它具有治疗前列腺癌的潜力,因为它特异性地与 VEGF165 (确认为肿瘤血管发生的关键诱导物的蛋白质) 结合。Latil et al., Int. J. Cancer, 89, 167-171 (2000) 暗示, VEGF 表达可在早期肿瘤中用作预后标记物。具体适体包括,例如,适体 0-7,其与成骨细胞结合; A10RNA 适体,其与前列腺癌细胞结合; 适体 TTA1,其与乳腺癌细胞结合; 和长效 A9RNA 适体 (Javier et al., Bioconjug. Chem. 2008 June 18; 19(6): 1309-1312)。还可参见, Wilson 等人的美国已公布专利申请 20090105172。一般而言,适体在宽范围 pH (~4-9)、生理条件和溶剂中稳定。适体已知与抗体相比具有较低免疫原性并且因为尺寸的原因能够更容易地穿透肿瘤。适体结合位点的形状 (其包括沟槽和裂缝) 提供高度特异性特征和类药物能力。然而,主动靶向需要 RNA 适体从正常细胞分辨癌细胞。

[0109] 其它示例性靶向剂包括肽,例如 CLT1 和 CLT2,其与血块中的纤维蛋白-纤维连接素复合物结合。用于与脑、肾、肺、皮肤、胰腺、肠、子宫、肾上腺和前列腺中的细胞结合的各种肽是本领域公知的,例如包括在 Pasqualini et al., Mol. Psychiatry, 1: 421-2 (1996) 和 Rajotte et al., J. Clin. Invest., 102: 430-437 (1998) 中描述的那些。

[0110] 在本发明的一个方面,可存在两种或更多种不同的靶向剂与粒子表面结合。第一靶标可为免疫系统细胞,例如白细胞或 T- 细胞,以及第二靶标可为作为靶区的肿瘤中的恶性癌细胞。在粒子表面上的靶向剂以高选择性与第一靶标细胞结合,而第二部分具有一般肿瘤靶向表面区域。适于与和动物相关的靶标结合的部分包括本申请所述的那些。因此,在将本发明多功能粒子递送至靶标组织后,具有肿瘤靶向部分的粒子一旦从最初靶向细胞脱离能够与第二靶标 (例如,癌) 细胞结合。在某些方面,提供粒子递送组合物用于活性剂递送,所述活性剂递送为长循环的,高选择性的,并且能够以复杂释放动力学释放多种药物。

[0111] 其它靶向剂包括特异性地与生物靶标结合的靶向剂,例如特定免疫系统细胞 (例如, T 细胞或 B 细胞)、蛋白质、酶,或与受试者相关的其它循环剂 (circulating agent)。下面提供适用于本申请所述多官能化粒子的靶向部分的示例性和非限制性实例。蛋白质,例如用于树突细胞的热休克蛋白 HSP70 和靶向癌细胞的叶酸。多糖类或糖,例如用于靶向白血病的水杨酸 (silylic acid), 靶向毒素如皂草素,抗体,包括 CD 2、CD 3、CD 28、T- 细胞和其它适合的抗体列举在万维网上的 "researchd.com/rdicdabs/cdindex.htm" 的表中,将其通过引用的方式并入本文。

[0112] 本申请使用的术语 "结合" 指的是在呈现相互亲和性或结合能力的分子或其部分的相应的对之间的相互作用,通常是由于特异性或非特异性结合或相互作用,包括但不限于,生物化学、生理学和 / 或化学相互作用。"生物学结合" 定义了发生在分子 (包括蛋白质、核酸、糖蛋白、碳水化合物、激素等) 对之间的一类相互作用。术语 "结合配偶体" 是指能够与特定分子结合的分子。"特异性结合" 是指通过分子如多核苷酸、抗体和其它配体的结合,这种分子与其它相似的生物实体相比能够以高得多的程度与结合配偶体 (或有限数目的结合配偶体) 结合或识别结合配偶体 (或有限数目的结合配偶体)。在一组实施

方案中,靶向部分的特异性(如通过解离常数测量)小于约1微摩尔,至少约10微摩尔,或至少约100微摩尔。

[0113] 靶向剂的非限制性实例包括肽、蛋白质、酶、核酸、脂肪酸、激素、抗体、碳水化合物、肽多糖、糖肽等。下面详细地讨论这些和其它靶向剂。在一些情况中,生物靶向部分可相对大,例如,对于肽、核酸等。例如,生物部分的分子量可为至少约1,000Da,至少约2,500Da,至少约3000Da,至少约4000Da,或至少约5,000Da等。在一些情况中,相对大的靶向剂对于细胞之间的区别可为有用的。例如,在一些情况中,较小靶向剂(例如,小于约1000Da)对于某些靶向应用可能没有足够的特异性。相反,较大分子量靶向剂能够提供高得多的靶向亲和性和/或特异性。例如,靶向剂能够提供较小的解离常数,例如,更紧的结合。然而,在其它实施方案中,所述靶向剂可相对小,例如,分子量小于约1,000Da或小于约500Da。

[0114] 在一种实施方案中,所述靶向剂包含蛋白质或肽。“蛋白质”和“肽”是本领域中的公知术语,以及在本领域中没有精确定义各自包含的氨基酸数目。在本申请中使用时,这些术语具有本领域中的普通含义。一般地,肽是长度小于约100个氨基酸的氨基酸序列,但是可包含最多300个氨基酸序列。一般认为,蛋白质是具有至少100个氨基酸的分子。例如,蛋白质可为蛋白质药物、抗体、抗体片段、重组抗体、重组蛋白质、酶等。在一些情况中,可将蛋白质或肽中的一个或多个氨基酸改性,在一些情况中,例如,通过添加化学实体如碳水化合物基团、磷酸基团、法尼基(farnesyl)、异法尼基、脂肪酸基团、用于结合、官能化或其它改性的连接子等。

[0115] 肽或蛋白质的其它实例包括但不限于锚蛋白类、抑制蛋白类、细菌膜蛋白、网格蛋白、连接蛋白类、肌营养不良蛋白、内皮素受体、膜收缩蛋白、选择蛋白、细胞因子;炎症趋化因子类;生长因子、胰岛素、红细胞生成素(EPO)、肿瘤坏死因子(TNF)、神经肽类、神经肽Y、神经降压肽、转化生长因子 α 、转化生长因子 β 、干扰素(IFN)、和激素、生长抑制剂、例如染料木黄酮、甾类等;糖蛋白,例如ABC转运蛋白、血小板糖蛋白、GPIb-IX复合物、GPIIb-IIIa复合物、玻连蛋白、血栓调节蛋白、CD4、CD55、CD58、CD59、CD44、CD168、淋巴细胞功能相关抗原、胞间粘附分子、血管细胞粘附分子、Thy-1、反向转运物、CA-15-3抗原、纤连蛋白类、层粘连蛋白、髓鞘相关糖蛋白、GAP和GAP43。其它实例包括亲和体、纳米体、Avimers、Adnectins、域抗体和小分子免疫药物制剂(SMIPTM)(Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA)。

[0116] 本申请使用的“抗体”是指蛋白质或糖蛋白,由一个或多个基本由免疫球蛋白基因或免疫球蛋白基因片段编码的多肽组成。确认的免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ξ 、和 μ 恒定区基因,以及繁多的免疫球蛋白可变区基因。轻链分为 κ 或 λ 。重链分为 γ 、 μ 、 α 、 δ 、或 ξ ,其依次分别定义免疫球蛋白类别IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。典型免疫球蛋白(抗体)结构单元已知包含四聚体。每个四聚体包含两个相同的多肽链对,每个对具有一个“轻”链(约25kD)和一个“重”链(约50-70kD)。每个链的N-端定义约100-110或更多氨基酸的可变区,主要负责抗原识别。术语可变轻链(VL)和可变重链(VH)分别是指这些轻链和重链。抗体作为完整免疫球蛋白存在或作为大量充分表征的通过用各种肽酶消化产生的片段存在。

[0117] 抗体和其它适合的靶向剂的非限制性实例包括抗-分化簇抗原CD-1至CD-166和

这些分子的配体或反受体；抗-细胞因子抗体，例如，抗-IL-1至抗-IL-18和这些分子的受体；抗-免疫受体抗体、抗T细胞受体抗体、主要组织相容性复合物I和II、B细胞受体、选择蛋白杀伤抑制受体、杀伤活化受体、OX-40、MadCAM-1、Gly-CAM1、整联蛋白、钙粘蛋白、唾液酸粘附素、Fas、CTLA-4、Fc- γ 受体、Fc- α 受体、Fc- ξ 受体、Fc- μ 受体和它们的配体；抗-金属蛋白酶抗体，例如，胶原酶、MMP-1至MMP-8、TIMP-1、TIMP-2；抗-细胞溶解/促炎分子，例如，穿孔蛋白、补体成分、类前列腺素、氧化亚氮、血栓烷；或抗-粘连分子，例如，癌胚抗原、核纤层蛋白或纤连蛋白。

[0118] 靶向剂的其它实例包括细胞因子或细胞因子受体，例如白介素-1(IL-1)、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-1受体、IL-2受体、IL-3受体、IL-4受体、IL-5受体、IL-6受体、IL-7受体、IL-8受体、IL-9受体、IL-10受体、IL-11受体、IL-12受体、IL-13受体、IL-14受体、IL-15受体、IL-16受体、IL-17受体、IL-18受体、淋巴因子抑制因子、巨噬细胞集落刺激因子、血小板源性生长因子、干细胞因子、肿瘤生长因子 β 、肿瘤坏死因子、淋巴毒素、Fas、粒细胞集落刺激因子、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、干扰素 α 、干扰素 β 、干扰素 γ 。

[0119] 靶向剂的另外的其它实例包括生长因子和蛋白质激素，例如，红细胞生成素、血管生成素、肝细胞生长因子、成纤维细胞生长因子、角质形成细胞生长因子、神经生长因子、肿瘤生长因子 α 、血小板生成素、甲状腺刺激因子、甲状腺释放激素、神经营养蛋白、表皮生长因子、VEGF、睫状神经营养因子、LDL、生长调节素、胰岛素生长因子或胰岛素样生长因子I和II。

[0120] 靶向剂的另外的实例包括趋化因子，例如，ENA-78、ELC、GRO- α 、GRO- β 、GRO- γ 、HRG、LIF、IP-10、MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MIP-1 α 、MIP-1 β 、MIG、MDC、NT-3、NT-4、SCF、LIF、瘦素、RANTES、淋巴细胞趋化因子、嗜酸细胞活化趋化因子-1、嗜酸细胞活化趋化因子-2、TARC、TECK、WAP-1、WAP-2、GCP-1、GCP-2， α -趋化因子受体如CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CXCR7，或 β -趋化因子受体如CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6或CCR7。

[0121] 在另一个实施方案中，靶向剂包括核酸。本申请使用的术语“核酸”或“寡核苷酸”是指核苷酸的聚合物。本申请使用的“核苷酸”具有本领域中常用的普通含义，即，包含糖部分、磷酸基和碱基（通常含氮）的分子。通常，核苷酸包含一个或多个与糖-磷酸主链连接的碱基（仅与糖部分连接，不含磷酸基的碱是“核苷”）。在核苷酸中的糖可为，例如，核糖（“核糖核酸”或“RNA”）或脱氧核糖（“脱氧核糖核酸”或“DNA”）。在一些情况中，聚合物可包含核糖和脱氧核糖。碱基的实例包括但不限于天然存在的碱基（例如，腺苷或“A”、胸苷或“T”、鸟苷或“G”、胞苷或“C”或尿苷或“U”）。在一些情况中，聚合物也可包含核苷类似物（例如，阿糖胞苷、肌苷、异鸟嘌呤核苷、水粉蕈素、假尿苷、2,6-二氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、2-硫代胸苷、3-去氮杂-5-氮杂胞苷、2'-脱氧尿苷、3-硝基吡咯、4-甲基吡咯、4-硫脲苷、4-硫代胸苷、2-氨基腺苷、2-硫代胸苷、2-硫代尿苷、5-溴代胞苷、5-碘代尿苷、肌苷、6-氮杂尿苷、6-氯代嘌呤、7-去氮杂腺苷、7-去氮杂鸟苷、8-氮杂腺苷、8-叠氮基腺苷、苯并咪唑、M1-甲基腺苷、吡咯并嘧啶、2-氨基-6-氯代嘌呤、3-甲基腺苷、5-丙炔基胞苷、5-丙炔基尿苷、5-溴代尿苷、5-氟代尿苷、5-甲基胞苷、7-去氮杂腺苷、7-去氮杂鸟苷、8-氧代腺苷、8-氧代鸟苷、0(6)-甲基鸟嘌呤、2-硫代胞苷等）、

化学或生物改性的碱基（例如，甲基化碱）、嵌入的碱基、改性的糖（例如，2′-氟代核糖、2′-氨基核糖、2′-叠氮基核糖、2′-O-甲基核糖、L-对映异构核苷阿拉伯糖、己糖等）、改性的磷酸部分（例如，硫代磷酸或5′-N-亚磷酰胺连接），和/或可取代至聚合物中的其它天然和非天然存在的碱基，包括取代的和未取代的芳族部分。其它适合的碱基和/或聚合物改性是本领域技术人员公知的。在一些情况中，多核苷酸可包括DNA、RNA、改性DNA、改性RNA、反义寡核苷酸、表达质粒系统、核苷酸、改性核苷酸、核苷、改性核苷、完整基因或其组合。多核苷酸的其它实例包括干扰RNA、天然或非天然siRNAs、shRNAs、microRNAs、核酶、DNA质粒、反义寡核苷酸、随机寡核苷酸或核酶。

[0122] 可将肿瘤靶向粒子通过被动或主动方法递送至肿瘤中。在前者中，纳米粒子通过渗漏肿瘤毛细血管开窗术通过被动扩散或对流进入肿瘤间质和细胞。后者涉及基于分子识别将药物递送至特定位点。最普通的手段使靶向配体与纳米粒子结合。靶向配体增强在纳米粒子和靶标细胞位点处的受体之间的相互作用，从而提高局部药物浓度。许多配体已经成功地与纳米粒子结合，包括抗体、转铁蛋白受体、叶酸盐受体和宽范围的生物分子，如上所述。

[0123] 分子靶向胞外基质（“ECM”）的实例包括糖胺聚糖（“GAG”）和胶原。具有羧基官能团的粒子的外表面可与具有游离N-端的病原体相关分子模式（PAMP）连接。PAMP靶向细胞或组织表面上的Toll样受体（TLR），或者在内部向细胞或组织传递信号，由此潜在地提高摄取。与粒子表面结合或包含在粒子中的PAMP可包括：未甲基化CpG DNA（细菌）、双链RNA（病毒）、脂多糖（细菌）、肽多糖（细菌）、脂阿拉伯甘露聚糖（细菌）、酵母多糖（酵母）、支原体脂蛋白类如MALP-2（细菌）、鞭毛蛋白（细菌）、多聚肌苷酸多聚胞苷酸（细菌）、脂磷壁酸（细菌）或咪唑并喹啉（合成）。

[0124] 也可使用凝集素作为靶向剂，其可与新粒子的连接子共价连接以靶向粘蛋白和粘膜细胞层。这种凝集素可从以下物质分离：相思子（*Abrus precatorius*）、双孢子蘑菇（*Agaricus bisporus*）、鳗鲡（*Anguilla anguilla*）、花生（*Arachis hypogaea*）、西非单叶豆（*Pandeyraea simplicifolia*）、紫羊蹄甲（*Bauhinia purpurea*）、树锦鸡儿（*Caragana aurorescens*）、鹰嘴豆（*Cicer arietinum*）、刺松藻（*Codium fragile*）、曼陀罗草（*Datura stramonium*）、扁豆（*Dolichos biflorus*）、龙牙花（*Erythrina corallodendron*）、鸡冠刺桐（*Erythrina cristagalli*）、欧洲卫矛（*Euonymus europaeus*）、大豆（*Glycine max*）、陆地大蜗牛（*Helix aspersa*）、盖罩大蜗牛（*Helix pomatia*）、香豌豆（*Lathyrus odoratus*）、兵豆（*Lens culinaris*）、美洲螯（*Limulus polyphemus*）、番茄（*Lycopersicon esculentum*）、桑橙（*Maclura pomifera*）、苦瓜（*Momordica charantia*）、鸡败血性霉浆菌（*Mycoplasma gallisepticum*）、莫桑比克眼镜蛇（*Naja mocambique*），以及外源凝集素伴刀豆球蛋白A（Concanavalin A）、琥珀酰伴刀豆球蛋白A（Succinyl-Concanavalin A）、麦胚凝集素（*Triticum vulgare*）、荆豆凝集素I、II和III（*Ulex europaeus* I, II and III）、西洋接骨木（*Sambucus nigra*）、怀槐（*Maackia amurensis*）、黄蛞蝓（*Limax fluvius*）、美洲大螯虾（*Homarus americanus*）、黄道蟹（*Cancer antennarius*）和翅荚百脉根（*Lotus tetragonolobus*）。

[0125] 已经提出数种细胞表面标记物作为用于肿瘤寻靶治疗的潜在靶标，包括，例如，前列腺特异性膜抗原（PSMA）、HER-2、HER-3、EGFR和叶酸盐受体。PSMA为充分确立的肿瘤

标记物,其在前列腺癌中,特别是在沉重性、激素不依赖性和转移性疾病中上调 (Ghosh 和 Heston, 2004, J. Cell. Biochem., 91:528-539)。已经使用PSMA作为用于成像转移性前列腺癌的肿瘤标记物和作为实验性免疫治疗剂的靶标。PSMA是批准用于前列腺癌转移灶的诊断成像的ProstaScint®(一种基于单克隆抗体的成像剂)的分子靶标。已经将靶向PSMA的外部区域的J591(一种去免疫化单克隆抗体)作为用于放射免疫疗法和放射免疫成像的试剂进行临床评价。据报告,放射性标记的J591准确地靶向骨和软组织中的前列腺癌转移灶并显示抗肿瘤活性。有趣地,PSMA在大部分非前列腺实体瘤(包括乳腺癌和肺癌)的新血管系统上以高水平区别地表达,以及近来在两个不同的临床试验中证实了PSMA靶向非前列腺癌的临床可行性 (Morris et al., 2007, Clin. Cancer Res., 13:2707-13; Milowsky et al., 2007, J. Clin. Oncol., 25:540-547)。PSMA在前列腺癌细胞和非前列腺实体瘤新血管系统上高度受限的存在使它成为用于将细胞毒素剂递送至大部分实体瘤的有吸引力的靶标。

[0126] 另外的靶向剂描述于WO 2008/124632中,将其全部内容通过引用的方式并入本文。在本领域中已知或将开发的其它靶向部分预期用于本发明。

[0127] 制备递送组合物的方法

[0128] 本申请所述递送组合物可通过本领域已知的任何方法制备,例如,纳米沉积和乳液法。另外,可使用微流控技术方法制备该新型递送组合物。

[0129] 单步骤纳米沉积法描述于美国专利 5,118,528 中,将其全部内容通过引用的方式并入本文。通过将含物质的溶液混合至所述物质在其中具有差的溶解度的另一种溶液(即,非溶剂),这些方法可用于合成纳米粒子。例如,可制造聚合物(例如,PLGA-PEG)纳米粒子,其中将在水不可混溶或水可混溶的溶剂中的聚合物溶液添加至含水流体(即,非溶剂)。这种纳米沉积方法也描述于例如WO 2007/150030,将其全部内容通过引用的方式并入本文。在一个非限制性实例中,将与具有侧链官能团的可生物降解聚合物结合的亲水活性剂溶解在挥发性水可混溶的有机溶剂中,以形成第一溶液,以及将疏水活性剂溶解在挥发性水可混溶的有机溶剂中,以形成第二溶液。通过将多种两性嵌段共聚物溶解在水可混溶的有机溶剂中制备第三溶液,并合并第一、第二和第三溶液,使得通过沉积形成具有被两性嵌段共聚物包围的疏水聚合物核芯的纳米粒子。

[0130] 制备粒子的双乳液法(double emulsion methods)在Mundargi et al., 2008, Control. Release, 125:193-209中评论,将其全部内容通过引用的方式并入本文。

[0131] 我们已经开发了能够通过快速混合制备PLGA-PEG NP的微流体技术,其允许用于纳米粒子的成核和组装的均匀条件(Karnik et al., 2008, Nano. Lett., 8:2906-12)。而且,通过改变不同聚合前体进入微流体设备的流速,可系统地 and 可再现地控制所得纳米粒子的性质。这种技术可用于组合地混合药物官能化聚合物和配体官能化聚合物,以产生具有不同生物物理化学性质的不同的靶向聚合物纳米粒子的库,每种携带两种或更多种不同的活性剂,例如,抗癌药物。

[0132] 从充分定义的前体批次开始,可在单步骤中制备具有不同性质的纳米粒子(Anderson et al., 2004, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101:16028-33)。由于逐滴混合,使用微流体快速混合的单一受控纳米沉积步骤可提供可再现的自组装和除去差异性。所有化学结合步骤可在由聚合物配制纳米粒子之前进行,从而进一步最小化差异性。通过改

变不同前体的比例,可得到具有不同粒度、电荷、PEG 覆盖度和配体密度的纳米粒子。微流体设备使得能够将纳米粒子前体溶液快速混合至水中,从而导致可再现的纳米沉积。这种手段是稳健的并且在设计上极其简单,从而使它非常适于以自动化高生产力方式制备具有不同性质的均匀纳米粒子制剂。可控地和快速地混合试剂并提供均匀反应环境的能力使得微流体系统完美地适于合成单分散纳米粒子 (DeMello and DeMello, 2004, Lab on a Chip, 4:11N-15N)。与不控制混合时间的常规纳米沉积相比,微流控技术的使用能够提供所得纳米粒子均匀性的显著增强和再现能力的显著改善。所述方法得到具有较高药物载荷和较慢药物释放的纳米粒子,这可能是由于形成了具有更疏水核芯的更紧凑的纳米粒子。而且,所述方法的简单性使其适于自动化,其中可改变输入流速以控制纳米粒子的组成和性质。

[0133] 也可使用用于组合半自动纳米粒子合成的其它微流体系统,快速合成具有不同生物物理化学性质的纳米粒子的库。一种示例性系统由四个计算机控制的注射泵组成,其可将不同的前体聚合物、药物、溶剂和水递送至设计成摄入四种输入前体流(例如,PLA- 药物 A、PLA- 药物 B、药物 C 和 PLA-PEG- 配体)的微流体设备。首先取决于每种前体的流速以一定比例混合前体,导致不同的前体组合。在此混合步骤后,由所给的前体组合,通过纳米沉积,使用流动聚焦合成纳米粒子,得到具有由独特前体组合决定的特征的纳米粒子制剂。

[0134] 为了制备具有不同制剂的粒子库,在合成了一批纳米粒子后,改变流速以得到另一不同的制剂。可规划注射泵以系统地改变相对前体流动速率,以对于每组流速得到不同纳米粒子制剂。在一段短暂的时间(例如,1-5 分钟)之后,改变流速,以每小时 10 - 30 种不同制剂的速度连续地产生新的纳米粒子制剂。

[0135] 使用递送组合物的方法

[0136] 本发明还包含制品、制剂、试剂盒等,其包含本申请所述的任何组合物。在一些情况中,疾病(例如,癌症)的治疗可涉及使用本申请所述的组合物或"药物"。即,本发明的一个方面涉及用于治疗疾病(例如,癌症或肿瘤)的一系列组合物(例如,药物组合物)或药物。也可将这些组合物包装在试剂盒中,所述试剂盒任选地包含使用组合物治疗这种病症的使用说明书。本发明的这些和其它实施方案也可涉及根据本申请所述的任何技术和组合物以及组合物组合促进疾病(例如,癌症或肿瘤)的治疗。

[0137] 在一些实施方案中,也可使用本发明的组合物和方法预防肿瘤或癌症的生长,和/或预防肿瘤或癌症的转移。在一些实施方案中,本发明组合物可用于收缩或破坏癌症。应认识到,本发明组合物可单独使用或者与一种或多种另外的抗癌剂或治疗(例如,化学治疗剂、靶向治疗剂、拟靶向治疗剂、激素、辐射、外科手术等,或其两种或更多种的任何组合)组合使用。在一些实施方案中,可将本发明的组合物给药于已经历涉及外科手术、辐射和/或化学疗法的治疗的患者。在某些实施方案中,可将本发明组合物长期给药,以预防癌症复发,或者降低癌症复发的危险。

[0138] 在一些实施方案中,根据本发明的另一方面,可将包含本发明粒子的组合物与可药用载体组合以形成药物组合物。本领域技术人员应认识到,载体可基于如下所述的给药途径、靶标组织的位置、递送的药物、药物递送的时间过程等来选择。

[0139] 本申请使用的"药物组合物"或"可药用"组合物包含与一种或多种可药用载体(添加剂)和/或稀释剂配制在一起的治疗有效量的一种或多种本申请所述的组合物。

如详细描述,可专门配制本发明药物组合物用于以固体或液体形式给药,包括适于以下的形式:口服给药,例如,兽用顿服药(含水或非水的溶液剂或混悬剂),片剂,例如,目标为含服、舌下和全身吸收的那些,球剂、粉末剂、颗粒剂、用于施用至舌的糊剂;肠胃外给药,例如,通过皮下、肌内、静脉内或硬膜外注射,作为例如无菌溶液剂或混悬剂,或缓释制剂;局部施用,例如,作为乳膏剂、软膏剂或控释贴剂或喷雾剂,施用至皮肤、肺或口腔;阴道内或直肠内,例如,作为阴道栓剂、乳膏剂或泡沫剂;舌下;经眼;透皮;或经鼻,肺和其它粘膜表面。

[0140] 本申请使用的措辞“可药用”是指那些化合物、材料、组合物和/或剂型在合理的医药判断范围内适用于与人类和动物的组织接触而不引起过度的毒性、刺激性、变态反应或其它问题或并发症,这与合理的益处/风险比例相称。

[0141] 本申请使用的措辞“可药用载体”是指可药用材料、组合物或媒介物,例如液体或固体填料、稀释剂、赋形剂或溶剂材料,牵涉在将主体化合物从一个器官或身体的一部分携带或输送至另一个器官或身体的另一部分中。每种载体必须是“可接受的”,即,与制剂的其它成分相容并且对患者无害。可用作可药用载体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;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,例如丙三醇、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇;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;林格溶液;乙醇;pH缓冲溶液;聚酯、聚碳酸酯和/或聚酐;和在药物制剂中使用的其它非毒性可相容物质。

[0142] 也可在组合物中存在湿润剂、乳化剂和润滑剂如月桂基硫酸钠和硬脂酸镁,以及着色剂、剥离剂、包衣衣料、增甜、矫味和加香剂,防腐剂和抗氧化剂。

[0143] 可药用抗氧化剂的实例包括:水溶性抗氧化剂,例如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、偏亚硫酸氢钠、亚硫酸钠等;油溶性抗氧化剂,例如抗坏血酸棕榈酸酯(ascorbyl palmitate)、丁羟茴醚(BHA)、丁羟甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 α -生育酚(例如,琥珀酸 α -生育酚酯)等;和金属螯合剂,例如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷酸等。

[0144] 通常可按最大量的剂量给药本发明组合物,同时避免或最小化任何潜在的有害副作用。所述组合物可按有效量给药,单独地或在与其它化合物如可用于治疗疾病(例如,癌症)的其它化合物的混合物中。有效量通常是足以在受试者中抑制疾病(例如,癌症)的量。

[0145] 通过使用本申请所述的任何测定或其它已知测定筛选组合物,本领域技术人员可测定组合物的有效量。当然,有效量可取决于因素如所治疗的病症的严重性;个体患者参数,包括年龄、身体健康状况、尺寸和体重;同时进行治疗;治疗频率;或给药模式。这些因素是本领域普通技术人员公知的并且可用不超过常规实验解决。在一些情况中,使用最大剂量,即,根据合理医疗判断的最高安全剂量。

[0146] 在本发明药物组合物中的活性成分的实际剂量水平可改变,以得到对于特定患者、组合物和给药模式有效实现希望的治疗应答同时对患者无毒的活性成分的量。

[0147] 选择的剂量水平可取决于多种因素,包括使用的本发明具体化合物或其酯、盐或

酰胺的活性、给药途径、给药时间、所用的具体化合物的排泄或代谢的速度、治疗持续时间、与所用的具体化合物组合使用的其它药物、化合物和 / 或材料、所治疗患者的年龄、性别、体重、身体状况、一般健康和既往医药历史,和医疗领域公知的类似因素。

[0148] 具有本领域普通技能的医师或兽医能够容易地对所需药物组合物的有效量进行测定和开药方。例如,医师或兽医能够以低于实现希望的治疗效果所需的剂量的水平开始在药物组合物中使用的本发明化合物的剂量,然后逐渐提高剂量,直到达到希望的效果。

[0149] 在一些实施方案中,将本发明的化合物或药物组合物长期地提供至受试者。长期治疗包括任何形式的重复给药延长的时间,例如重复给药一个月或多个月、在一个月和一年之间、一年或更多年,或更长时间。在许多实施方案中,长期治疗涉及在受试者的整个生命期间重复给药本发明的化合物或药物组合物。例如,长期治疗可涉及规律地给药,例如一日一次或多次,一周一次或多次,或者一月一次或多次。一般而言,适合的剂量如本发明化合物的日剂量将是所述化合物有效产生治疗效果的最低剂量。这种有效剂量通常将取决于上述因素。

[0150] 如果希望,活性化合物的有效日剂量可作为两个、三个、四个、五个、六个或更多个亚剂量在一天中以适当的间隔分离地给药,任选地,以单位剂量的形式。

[0151] 尽管本发明组合物可单独给药,但是可如上所述作为药物制剂(组合物)给药。

[0152] 在一些实施方案中,本发明组合物可被促进用于治疗异常细胞增生、疾病(例如,癌症)或肿瘤,或者包含用于治疗伴随细胞增生、癌症或肿瘤的使用说明书,如上所述。在另一方面,本发明提供了方法,其涉及通过给药本发明组合物,及其同系物、类似物、衍生物、对映异构体和功能上等同的组合物中的任何一种,促进疾病(例如,癌症)的预防或治疗,其中所述组合物能够治疗疾病。”使用说明书”可限定促进组分,并且通常涉及书面指示,所述书面指示在本发明组合物的包装上或者与本发明组合物的包装相关联。使用说明书也可包含以任何方式提供的任何口头或电子指示。”试剂盒”通常限定包装,所述包装包含本发明组合物和使用说明书,或其同系物、类似物、衍生物、对映异构体和功能上等同的组合物中的任何一种或组合,但是也可包含本发明组合物和任何形式的使用说明书,所述使用说明书以与组合物相关的方式提供,使得临床专家将清楚地认识到,该使用说明书应与具体组合物有关。

[0153] 本申请所述的试剂盒也可含有一个或多个容器,其可含有化合物如所述种类、信号实体、生物分子和 / 或粒子。试剂盒也可含有用于混合、稀释和 / 或给药化合物的使用说明书。试剂盒也可含有具有一种或多种溶剂、表面活性剂、防腐剂和 / 或稀释剂(例如,生理盐水(0.9%NaCl)或5%右旋糖)的其它容器,以及用于混合、稀释或将组分给药于样品或给药于需要治疗的患者的容器。

[0154] 试剂盒的组合物可按任何适合的形式提供,例如,作为液体溶液或作为干燥粉末。当提供的组合物是干燥粉末时,通过添加适合的溶剂(其也可提供),可将粉末重建。在使用液体形式的组合物的实施方案中,所述液体形式可为浓缩的或直接使用的。溶剂可取决于化合物和使用或给药的模式。用于药物组合物的适合的溶剂是公知的并且可在文献中得到。

[0155] 在一组实施方案中,试剂盒可包含载体装置,将所述载体装置隔开以严格限制地接受一个或多个容器装置如小瓶、管等,每个容器装置包含特定的组合物。另外,试剂盒可

包含用于其它组分（例如，可用于测定中的缓冲剂）的容器。

[0156] 本申请使用的“受试者”或“患者”是指任何哺乳动物（例如，人类），例如可患疾病（例如，癌症）的哺乳动物。实例包括人类、非人灵长类、牛、马、猪、绵羊、山羊、狗、猫或啮齿类动物如小鼠、大鼠、仓鼠或荷兰猪。受试者可为诊断患有疾病或以其它方式已知患有疾病（例如，癌症）的受试者。在一些实施方案中，受试者可被诊断为处于患有疾病的危险中或者已知处于患有疾病的危险中。在某些实施方案中，可基于受试者中的已知疾病选择用于治疗受试者的受试者。在一些实施方案中，可基于受试者中的可疑疾病选择用于治疗受试者的受试者。在一些实施方案中，疾病可通过以下方法诊断：检测生物样品（例如，尿、唾液、全血、血清、大便等，或其任何组合）中的突变关联物。因此，可将本发明的化合物或组合物给药于受试者，至少部分地基于以下事实：在得自受试者的至少一种样品（例如，活组织检查样品或任何其它生物样品）中检测到突变。在一些实施方案中，癌症不能被检出或者位于受试者中，但是在至少一种生物样品中与癌症相关的突变的存在足以对受试者开处方或给予一种或多种本发明组合物。在一些实施方案中，可给药所述组合物以预防疾病如癌症的发展。然而，在一些实施方案中，可怀疑现存疾病的存在，但是还未确定，可给药本发明组合物以预防疾病的进一步生长或发展。

[0157] 应认识到，可使用任何适合的技术识别或检测与疾病如癌症相关的突变和/或过表达。例如，可使用核酸检测技术（例如，测序、杂交等）或肽检测技术（例如，测序、基于抗体的检测等）。在一些实施方案中，可使用其它技术检测或推断癌症的存在（例如，组织学等）。通过在与癌症的信号途径相关的一个或多个其它位点检测突变、过表达、扩增或其任何组合，可检测或推断癌症的存在。

[0158] 实施例

[0159] 在下列实例中进一步描述了本发明，其不限制在权利要求中描述的本发明的范围。

[0160] 实施例 1. PLA-Pt 的合成

[0161] 开发药物官能化聚合物的一个策略是基于氨基酸简单转化成它们的相应的 α -羟基酸 (i) (图 11)。第一步涉及通过使用亚硝酸钠在酸的存在下重氮化反应 6 小时，将胺转化成羟基。这是一个高收率反应，其中所得单体连同乳酸直接用于缩聚，得到聚丙交酯共聚物 Poly-OBn。缩聚通过本体反应条件在 150°C 在连续氩气吹扫下进行 3 小时，接着进一步在真空下进行 3 小时。相同聚合物通过环状丙交酯单体 (ii) 的开环聚合 (ROP) 制备，环状丙交酯单体 (ii) 通过以下方法制备： α -羟基酸在非常稀释的反应条件下在甲苯中使用 1% 对甲苯磺酸进行脱水反应。

[0162] 对于合成高分子量聚合物，ROP 手段更有利。苄基保护基防止羟基在聚合期间发生副反应。然后，羟基官能化可生物降解聚丙交酯 (PLA-OH) 通过以下方法合成：使用 Pd/C 催化剂在 50psi 压力苄基脱保护 8 小时。苄基的完全脱保护使用 $^1\text{H-NMR}$ 谱图通过监测在 7.3ppm 的峰证实（图 2）。为了合成羧基官能化聚丙交酯，用琥珀酸酐或衣康酸酐处理 PLA-OH。作为开发具有侧链亲水药物的可生物降解聚合物的演示，使用 DCC/HOBT 偶合使顺铂的前药（单琥珀酸铂）与聚合物结合，在 DMF 中于室温反应 12 小时后得到最终的 PLA-Pt（图 12）。在 PLA-Pt 中铂前药的存在通过 $^1\text{H-NMR}$ 谱图显现：在与前药结合后在 6.3ppm 出现胺质子（图 2）。

[0163] 实施例 2. PLA-OH 和 PLA-Pt 纳米粒子的合成和表征

[0164] PLA-OH 聚合物的体外毒性通过用聚(乳酸-共聚-乙醇酸)-聚乙二醇 (PLGA-PEG) 合成纳米粒子来测试。所述粒子相对无毒, IC_{50} 值高达 27mg/mL (图 3)。通过纳米沉积使用微流控技术手段制备了能够递送两种药物的纳米粒子 (图 4B)。在本发明中, 我们使用具有官能团如羧基的标准 PLGA-PEG, 连同含有亲水药物作为侧基的聚丙交酯, 并在疏水药物的存在下进行纳米沉积。一旦制备了纳米粒子, 将粒子通过偶合用靶向配体进行官能化。使用顺铂前药作为亲水药物, 多西紫杉醇作为疏水药物, 以及 A10- 适体作为靶向配体靶向过表达前列腺特异性膜抗原 (PSMA) 的前列腺癌系 (图 13)。

[0165] 游离 PLGA 的存在通常在 PLGA-PEG 的纳米沉积期间提高纳米粒子粒度。使用微流控技术手段实现较小粒度纳米粒子, 甚至在游离 PLGA 的存在下也是如此 (图 5A, 表 1)。本体纳米沉积 (bulk nanoprecipitation) 得到粒度超过 150nm 的粒子, 而通过使用微流控技术手段, 我们可得到约 100nm 的粒度。这些粒子进一步通过透射电子显微镜检查 (TEM) 表征 (图 5B)。TEM 结果证实了这些粒子的约 100nm 的粒度。在这些粒子中铂和多西紫杉醇载荷分别为 5% 和 1%。通过改变初始进料, 这些值可容易地改变。

[0166] 表 1. 纳米粒子的表征

[0167]

	粒度 (nm)	PDI
Poly-Pt-NP	93	0.06
Poly-Pt-Doce-NP	89	0.08
Doce-NP	112	0.17
NP	109	0.13

[0168] 实施例 3. Poly-Pt 的电化学

[0169] 电化学测量在具有电化学分析软件 270 的 EG&G PAR 263 型稳压器 / 恒流器和包含玻璃碳工作电极、铂丝辅助电极和 Ag/AgCl 参考电极的三电极装置上在 25° C 进行。电化学数据未针对接头电位校准。使用 KCl 作为支持电解质。Poly-Pt 具有氧化还原活性并且显示不可逆循环伏安应答, 在 pH 7.4 相对于 Ag/AgCl, Pt(IV)/Pt(II) 对为接近 -0.801V, 以及在相同的条件下相对于 Ag/AgCl, 单琥珀酸铂前药的值为 -0.850 (图 6A-6D)。这些还原电位暗示, 聚合物主链的存在不影响铂中心的电子或立体环境, 以及这种构造将有效地释放活性剂量的铂以加强抗癌活性。Poly-Pt 的还原电位值表明, 它具有避免在血液中过早还原的电势以及将在细胞内部还原。

[0170] 实施例 4. 铂和多西紫杉醇从 PolyPt-Doce-NP 的体外释放

[0171] 研究了铂 (IV) 和多西紫杉醇从纳米粒子的受控释放动力学。候选药物从纳米粒子的受控释放是该新型粒子的重要优势, 因为药物仅在从递送媒介物释放后才具有活性。为了释放研究, 我们在 37° C 针对 20 升 pH 为 7.4 的 PBS 透析了铂和多西紫杉醇-纳米粒子, 以模拟生理条件。将 PolyPt-Doce-NP 在水中的悬浮液等分 (每份 100 μ L) 至数个半透性小型透析管 (分子量截断值 100kDa, Pierce) 中并在 37° C 针对 20 升磷酸盐缓冲盐水

(PBS) (pH 7.4) 透析。在预定的时间,将纳米粒子悬浮液的等分试样移除并溶解在乙腈中。释放的铂含量通过原子吸收光谱分析法测定,以及多西紫杉醇释放通过 HPLC 使用用可商购紫杉醇 (taxol) 得到的标准校准曲线量化。观察到铂 (图 7A) 和多西紫杉醇 (图 7B) 从这些纳米粒子的受控释放。结果表明,所述系统能够以时间的方式 (in a temporal fashion) 释放药物,其中与共价连接的铂中心相比,多西紫杉醇较快地释放。释放的时间选择可通过增加聚合物主链的长度而进一步延长。

[0172] 实施例 5. 纳米粒子的细胞毒性

[0173] 靶向药物释放构造纳米粒子促进细胞死亡的能力通过 MTT 测定使用人前列腺癌 LNCaP 和 PC3 细胞进行测定,并针对标准化合物顺铂和单琥珀酸 Pt (IV) 前药进行了对比。人前列腺癌 LNCaP 和 PC3 细胞得自 ATCC。LNCaP 细胞过表达 PSMA,而 PC3 细胞不过表达 PSMA。在补充有 10% 胎牛血清和 1% 青霉素 / 链霉素的 RPMI 生长培养基中,在 5%CO₂ 中在 37° C 孵育细胞。将细胞每 3 - 4 天传代并在达到传代数 20 后从冷冻储液重新开始。使用 MTT 测定评价构造的细胞毒性。在使用前不同构造的溶液在无菌 PBS 中新鲜制备。所有铂构造通过原子吸收光谱分析法量化。将 LNCaP 和 PC3 细胞接种在 96 孔板上的 100 μ L RPMI 培养基中并孵育 24 小时。

[0174] 然后将细胞用不同构造以不同浓度处理并在 37° C 孵育 12 小时。在用纳米粒子孵育 12 小时后替换新鲜培养基,并将细胞再孵育 48 小时。然后将细胞用 20 μ L 3-(4, 5-二甲基噻唑-2-基)-2, 5-二苯基四唑鎓溴化物 (MTT) (5mg/mL, 在 PBS 中) 处理并孵育 5 小时。除去培养基,将细胞通过添加 100 μ L DMSO 溶解,并使用微量培养板分光光度计在 550nm 记录紫色甲月替的吸光度。对于每个细胞系,将每个样品在三个独立的实验中一式三份地测定。对于每个细胞系,单琥珀酸 Pt (IV)-前药 (单琥珀酸盐) 对生存力具有最小的影响 (图 8A-8B)。

[0175] 对于 PC3,未靶向粒子 (PolyPt-NP) 和靶向粒子 (PolyPt-NP-Apt) 的效力近似等于未结合的顺铂的效力 (图 8B)。对于过表达 PSMA 的 LNCaP 细胞,未靶向粒子 (PolyPt-NP) 的效力近似等于未结合的顺铂的效力,而靶向粒子 (PolyPt-NP-Apt) 的效力近似为五倍高 (图 8A)。靶向适体的添加也提高包含多西紫杉醇或多西紫杉醇和 PolyPt 二者的纳米粒子在 LNCaP 细胞中的效力 (表 2)。该实施例证实,靶向纳米粒子和靶向双重药物纳米粒子在杀灭表达 PSMA 的癌症细胞时有效。

[0176] 表 2. IC₅₀ 值的比较

[0177]

	在 LNCaP 细胞中的 IC ₅₀ (μ M)	在 PC3 细胞中的 IC ₅₀ (μ M)
单琥珀酸 Pt	106	36
顺铂	>5	9.9
PolyPt-NP	5	>10

[0178]

PolyPt-NP-Apt	0.95	>10
PolyPt-Doce-NP	0.22	0.2
PolyPt-Doce-NP-Apt	0.09	0.36
Doce-NP	0.1	0.01
Doce-NP-Apt	0.02	0.01
[Pt] = 25 * [Doce]		

[0179] 实施例 6. PolyPt-NP-Apt 的靶向胞吞

[0180] 聚合物纳米粒子可被细胞通过不同的过程摄取,包括吞噬和胞吞。为了研究 PolyPt-NP-Apt 的细胞内摄,将基于绿色荧光素的胆固醇 (22-NBD-胆固醇) 包含在粒子中。使用含 22-NBD-胆固醇的未靶向 Poly-Pt-NP 作为对照。将 LNCaP 细胞以每个盖玻片 1×10^5 个细胞的融合度接种在显微镜盖玻片 (1.0cm) 上,并在加湿孵育器中的 RPMI 中以 5%CO₂ 和 37° C 的条件生长过夜。改变培养基,并添加 NBD-胆固醇-PolyPt-NP-Apt 的悬浮液,达到 10 μM 的最终荧光团浓度。然后将细胞在 37° C 孵育 2.0 小时。除去培养基,并将细胞使用 2% 低聚甲醛溶液在室温固定 1 小时。将细胞用 PBS (pH 7.4) 洗涤三次。然后将细胞在 PBS 中用 0.1%TRITON-X 100 渗透化处理 10 分钟,接着使用 PBS 洗涤五次。然后将细胞在室温 (RT) 用阻断缓冲液 (PBS, 0.1% 山羊血清, 0.075% 甘氨酸) 阻断 30 分钟。将细胞根据制造商推荐的操作在湿盒中与早期胞内体标记物小鼠单克隆 EEA-1 一起在 37° C 孵育 1 小时。在用 PBS 洗涤两次后,将细胞用阻断缓冲液在室温阻断 30 分钟,然后用二次 Cy5 山羊抗小鼠抗体在 37° C 孵育 1 小时。在用 PBS 洗涤四次并用水洗涤两次后,将细胞使用封固溶液 [20mM Tris (pH 8.0), 0.5% 没食子酸丙酯, 和 70% 甘油] 封固在显微镜载玻片上用于成像。对于 FITC 和若丹明通道,以 500msec 收集图像。

[0181] 通过使用含绿色荧光标记的胆固醇衍生物 22-NBD-胆固醇的 PolyPt-NP-Apt, 观察到过表达 PSMA 的前列腺癌 LNCaP 细胞通过胞吞靶向摄取 PolyPt-NP-Apt 的明显证据 (图 9)。将 LNCaP 细胞与胆固醇 PolyPt-NP-Apt 一起孵育 2 小时并使用早期胞内体标记物 EEA-1 抗体,显示出这些纳米粒子通过适体靶向的纳米粒子胞吞在胞内体中的完整细胞内摄 (图 9)。相比之下,非靶向 Poly-Pt-NP 在整个细胞质中显示累积 (图 9)。该实施例证实,靶向纳米粒子被胞吞摄取。

[0182] 实施例 7. 释放细胞毒性剂量的顺铂和形成 Pt-GG 加合物

[0183] 顺铂的抗癌活性是基于在核 DNA 中形成铂酸化产物。已经在结构上识别出几种这些加合物,其中鸟嘌呤-鸟嘌呤链内交联顺式 -Pt (NH₃)₂d (GpG) (FIG. 10A), 其代表总的 DNA 铂酸化的 >75%。在细胞中 1, 2-d (GpG) 铂加合物的检测通过使用对此加合物具有特异性的抗体来实施。简而言之,将 LNCaP 细胞使用 RPMI 培养基接种在六孔板中并在 37° C 孵育过夜。将不同的构造添加至 20 μM 的终浓度并在 37° C 孵育 12 小时。然后将细胞用胰蛋白酶处理,用 PBS 洗涤,以 1×10^6 /mL 的密度重新悬浮在 HAES-STERIL-PBS 中并置于预涂载玻片 (ImmunoSelect, Squarix) 上风干。细胞固定在甲醇中于 -20° C 实施 45 分钟。将核 DNA 通过在 0° C 碱 (70mM NaOH, 140mM NaCl, 40% 甲醇 v/v) 处理 5 分钟变性,并将细胞蛋白通过涉及两个步骤的蛋白水解操作除去。

[0184] 将细胞首先用胃蛋白酶在 37° C 消化 10 分钟,然后用蛋白酶 K 在 37° C 消化 5 分钟。在用奶 (milk) (1%, 在 PBS 中, 30 分钟, 25° C) 阻断后,将载玻片用抗-(Pt-DNA)

Mabs (R-C180, 1mg/mL, 在奶中) 在 4° C 孵育过夜。在用 PBS 洗涤后, 免疫染色通过以下方法实施: 用 FITC 标记的山羊抗-(大鼠 Ig) 抗体在 37° C 孵育 1 小时。将细胞核通过使用 Hoechst (H33258) (250 μ g/L) 染色并使用封固溶液封固用于成像。我们使用对此加合物具有特异性的单克隆抗体 R-C18, 以获悉从 PolyPt-NP-Apt 释放的顺铂是否与核 DNA 形成这种加合物。在将 PSMA+LNCaP 细胞与 PolyPt-NP-Apt 一起孵育 12 小时后, 观察到 1, 2-d(GpG) 链内交联的形成: 在这些细胞的核中抗体产生的绿色荧光 (图 10B)。该实施例证实, 顺铂前药的细胞靶向纳米粒子的处理与核 DNA 形成预期的加合物。

[0185] 实施例 8. 筛选靶向纳米粒子库

[0186] 通过使用微流体系统, 制备约 500 种含药物的 PSMA- 适体靶向的纳米粒子的库, 并针对希望的特征进行筛选。纳米粒子通过纳米沉积法制备, 所述纳米沉积法涉及将前体 (共聚-嵌段聚合物、药物等) 的水可混溶的溶液混合至水中。由于水是药物和聚合物的不良溶剂, 导致纳米粒子的沉积。纳米粒子性质通过以下方法控制: (a) 控制前体溶液的组成, 和 (b) 控制混合条件如混合时间、温度和水流对前体流的流量比。然后使用结合在纳米粒子中的荧光染料, 测试这些制剂被表达 PSMA 的前列腺癌细胞系 (LNCaP) 优先摄取 (相对于 PSMA 阴性前列腺癌 (PC3) 和非前列腺 (HeLa) 细胞系)。这种手段可提供能够在全身性给药后规避巨噬细胞, 同时能够被前列腺癌细胞区别地摄取的最佳纳米粒子。

[0187] 通过将 PEG 添加至纳米粒子表面, 纳米粒子的循环半衰期急剧增加。识别实现最少巨噬细胞摄取和最大特异性地将药物递送至癌症细胞的纳米粒子的最佳物理和化学性质, 包括粒子粒度、表面改性、表面电荷和配体密度。使用的前体溶液为 (a) PLGA-mPEG3400 和 PLGA-PEG-COOH, 用于控制表面电荷和疏水性, (b) PLGA, 用于控制粒度, (c) 乙腈, 用于控制前体浓度, (d) 药物 / 荧光报道子, (e) PLGA-PEG- 配体结合物, 用于寻靶, (f) 药物-A 官能化 PLGA 和 (g) 药物-B 官能化 PLGA。也改变参数如前体浓度、混合时间、溶剂对水的比率等, 以研究这些制剂参数对纳米粒子粒度和 ζ 电位的影响。进一步评价了显示有利的 PCa 细胞的结合和摄取特征的那些制剂的药物载荷和释放动力学, 并通过 MTT 分析测定了基于细胞的细胞毒性。对于每种药物组合, 将至少 5 个候选制剂识别出并进一步测试优先 PCa 摄取。

[0188] 实施例 9. 在动物模型中评价递送组合物

[0189] 在前列腺癌的动物模型中评价了本申请所述递送组合物。将与 100 μ l 基质胶混合的 1×10^5 个 LNCaP 细胞皮下注射至重度联合免疫缺损 (SCID) 小鼠 (Taconic, Germantown, NY, USA) 的两个后肢中。在六天后当平均肿瘤体积达到约 150mm³ 时, 将小鼠分成组 (每组五只小鼠), 使得在每组中的平均肿瘤体积相当。在 6 天、9 天和 14 天时, 将动物用 PolyPt-Doce-NP、PolyPt-NP、Doce-NP、单琥珀酸 Pt、顺铂 (5mg/kg)、PolyPt-NP-Apt、PolyPt-Doce-NP-Apt 和 Doce-NP-Apt 通过腹膜内或静脉内注射进行处理。肿瘤体积测量在第 1 天 (肿瘤接种) 开始并继续一周两次, 直到肿瘤体积超过身体尺寸的 10%。对含有两种药物并且靶向至 LNCaP 细胞上的 PSMA 的 PolyPt-Doce-NP-Apt 观察到对肿瘤生长的最大效果。

[0190] 实施例 10. 体内表征

[0191] 实施了剂量上升研究, 以测定在异种移植物和基因工程化小鼠模型 (GEMM) 中肿瘤减小和 / 或肿瘤生长迟滞所需要的组合药物剂量。在生物结合物治疗之前和在生物结

合物治疗之后周期性地实施小鼠前列腺的 MRI 成像,用于原位肿瘤尺寸比较和效力测量。一旦测定了有效剂量,则在异种移植物模型和 GEMM 中实施对比效力研究,以将含药物的纳米粒子-适体生物结合物与缺乏适体靶向基团的相似纳米粒子、游离药物和安慰剂进行比较。也在带有肿瘤的小鼠中使用 ^{111}In 标记的生物结合物实施生物分布研究,以评价生物结合物在肿瘤组织中的存在和相对浓度。

[0192] 另外,实施研究以评价释放的药物在肿瘤组织中的浓度,以测定释放动力学。与由 PLGA 系统产生的相似生物结合物相比,由 PLA 系统产生的生物结合物预期具有较慢的释放动力学。聚合物 MW 也改变药物释放的动力学。开发了能够特异性地靶向 PCa 组织并导致针对肿瘤生长的效力的生物结合物。

[0193] 纳米粒子-适体生物结合物的体内急性剂量毒理学筛选:建立 18 只动物的队列(6 组,每组 3 只)以测定各种浓度的生物结合物聚合物的注射液的毒性效果。在随后的生物分布研究中使用小于 LD50 的浓度。

[0194] 生物分布:对于药代动力学和生物分布分析,将携带非肿瘤 BALB/c 小鼠的动物通过侧尾静脉注射给药 ^{111}In 标记的纳米粒子-适体生物结合物或不含适体靶向基团的相似纳米粒子。接着实施生物分布分析:首先在注射后 SPECT-CT 成像 (Gammamedica, X-SPECT) 1-24 小时,并处死动物。将脑、心脏、肠 (intestine)、肝、脾、肾、肌肉、骨、肺、淋巴结、原肠 (gut) 和皮肤切除,称重,均化,并在井式计数器 (Wallace, Turku, Finland) 中计数。将组织浓度表示为每克组织注射剂量的百分数 (%ID/g)。由在注射动物 (1、2、4、8、12、18 和 24 小时) 后的各个时间点的血液放射性计算血液半衰期。

[0195] 异种移植物肿瘤诱发:通过阿佛丁 (225-240mg/kg IP) 麻醉 BALB/cnu/nu 动物并通过施加压力至后足检查麻醉。在即将接种之前,将背上的皮肤位置用聚烯吡酮 (povidine) 或氯己定皂擦洗并用 70% 乙醇擦净。将小鼠侧身置于干净手术垫上。肾通过体壁可见以及制造一个侧面切口,该侧面切口沿着肾的长轴进入后面的皮下区域。通过锐性和钝性剥离,将肾从腹中取出并搁在体壁上。将由原发性肿瘤试样新鲜制备的约 $0.5-1.0\text{mm}^3$ 的肿瘤组织通过小袋植入肾下被膜中,所述小袋通过以下方法形成:制造锐利缺口,接着用烧制圆化的玻璃吸管钝性剥离。将肾放回体腔中并用创伤夹封闭皮肤。肿瘤预计在 3-4 周内形成并生长至 $\sim 5-10\text{mm}$ 的直径 (通过 MRI 测量)。该尺寸代表典型 25-30g 小鼠的质量的不到 1%。

[0196] PCa 的 GEMM:建立了 PCa 的基因工程化小鼠模型,其中潜在病毒癌基因 SV40Tag 在前列腺上皮细胞中特异性地表达。伴随着瘤形成的发展,在肿瘤细胞的表面上触发 hPSMA 的表达,如在人肿瘤中所见。

[0197] 剂量上升研究:在建立肿瘤后,药物 (两种或三种药物递送系统) 纳米粒子-适体生物结合物的上升剂量 ($0.5-5\text{mg}/0.1\text{mL}$) 通过以下方法给药:在 7 天间隔中侧尾静脉注射三次。通过 MRI 每 48 小时测量肿瘤体积,历时 28 天。

[0198] 比较效力研究:在建立肿瘤后,将四种不同类型的纳米粒子和两种另外的对照通过以下方法给药:在 7 天间隔中侧尾静脉注射三次:1) 药物纳米粒子-适体生物结合物,2) 安慰剂 (右旋糖酐) 纳米粒子-适体生物结合物,3) 不含适体的药物纳米粒子,4) 不含适体的安慰剂 (右旋糖酐) 纳米粒子,5) 单独的药物和 6) 单独的安慰剂。将动物通过侧尾静脉

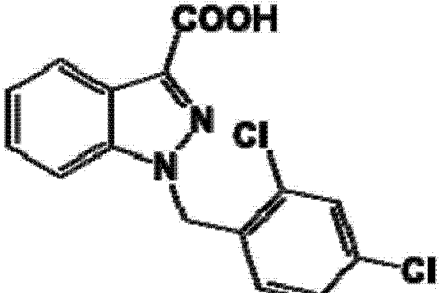
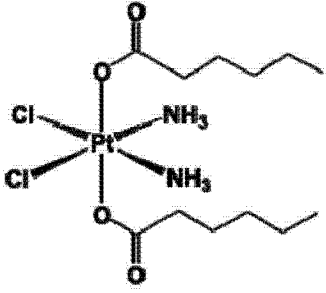
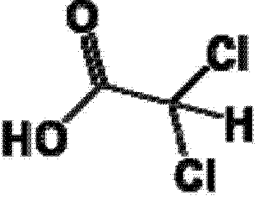
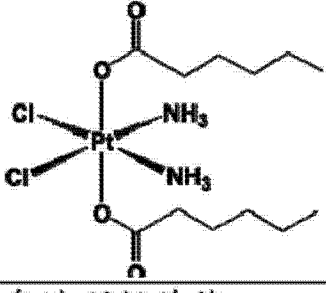
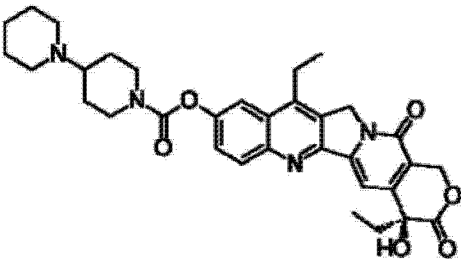
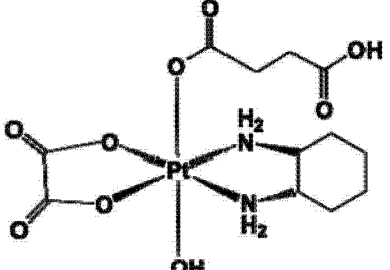
注射重新悬浮在 PBS 中的固定剂量的化合物（在剂量上升研究中测定的每 0.1mL 0.5-5mg 粒子,但是不超过 LD₅₀ 的 50%）或单独的 PBS。然后在分析之前允许动物在加热的恢复笼子中恢复。通过 MRI 每 48 小时测量肿瘤体积,历时 28 天。

[0199] 实施例 11. 组合粒子

[0200] 为了评价不同的代谢活化剂对基于铂的药物（顺铂和奥沙利铂）的作用的协同效果,通过使用官能化 PLA 衍生物（表 3）研究了一些组合。我们使用体外研究比较了奥沙利铂和顺铂在与氯尼达明、二氯乙酸盐 / 酯组合时的效果。

[0201] 表 3. 铂化合物与代谢调节剂的组合

[0202]

组合	药物 1	药物 2
顺铂-氯尼达明	氯 尼 达 明 	己酸 Pt(IV) 
顺铂-DCA	DCA 	己酸 Pt(IV) 
奥沙利铂-伊立替康	伊立替康 	奥沙利铂前药 

[0203]

[0204] 合成 PLA-COOH

[0205] 具有 -COOH 官能团的新的丙交酯衍生物通过 PLA-OH 和琥珀酸酐的反应合成（图 15A）。这种新的 PLA 衍生物提供了使不同药物与 -OH、-NH2 官能团结合的机会。使用 1H 图谱表征官能化丙交酯 PLA-COOH（图 15B）。

[0206] 顺铂-氯尼达明组合

[0207] 氯尼达明是一种抑制线粒体己糖激酶,从而选择性攻击癌细胞的改变的代谢的化

合物。研究证实,它在与数种其它化学治疗药物(包括顺铂)组合时具有协同效果。我们的目的是合成 PLA- 氯尼达明 (PLA-Loni) 结合物(图 16A)。通过在 PLGA-PEG-COOH 的存在下纳米沉积,将己酸 Pt(IV) 包封在 PLA- 氯尼达明聚合物核芯中。通过 ^1H NMR 表征了氯尼达明结合的 PLA(图 16B)。

[0208] 氯尼达明和己酸 Pt(IV) 共同包封的纳米粒子通过纳米沉积法合成。简而言之,将 PLA-Loni、PLGA-PEG-COOH 和己酸 Pt(IV) 溶解在乙腈中并混合在一起。将这种溶液缓慢添加至水中并在室温搅拌 3 小时。通过超速离心法纯化这些粒子,并最后将粒子分散在去离子水中。通过使用动态光散射测定粒子的粒度和多分散指数。铂和氯尼达明包封效率以及百分比载荷通过使用原子吸收光谱分析法(AAS)(对于铂)和反相液相色谱法(对于氯尼达明)测定。

[0209] 使用 MTT 测定评价双重药物组合在前列腺癌细胞中的体外细胞毒性(表 4)。与在纳米粒子中的单一药物相比,在纳米粒子中的氯尼达明和 Pt(IV) 前药的组合得到增强的细胞毒性。例如,双重药物组合在前列腺癌 LNCaP 细胞中的毒性增长到 Pt 的 5 倍。在 PC3 细胞中的毒性增长到 Pt 的约 2 倍。在 DU145 细胞中的毒性增长到 Pt 的约 2 倍。在所有这三种类型的细胞系中,效力增长到氯尼达明的 1000 倍以上。

[0210] 表 4. 通过 MTT 分析测定的各种 NP 和药物针对 LNCaP、PC3 和 DU145 细胞的 IC_{50} 值的比较

[0211]

	在 LNCaP 细胞中的 $\text{IC}_{50}(\mu\text{M})$		在 PC3 细胞中的 $\text{IC}_{50}(\mu\text{M})$		在 DU145 细胞中的 $\text{IC}_{50}(\mu\text{M})$	
	Pt 浓度	Loni 浓度	Pt 浓度	Loni 浓度	Pt 浓度	Loni 浓度
HexaPt-NP	0.5	--	1.4	--	0.64	00
Loni-NP	--	> 50	--	> 50	--	> 50
PLA-Loni-(HexaPt)-NP	0.103	0.556	0.85	22.1	0.31	2.1

[0212]

[0213] 顺铂 -DCA 组合

[0214] 二氯乙酸盐/酯(DCA)是一种有机小分子,其抑制线粒体丙酮酸脱氢酶激酶(PDK),并因此经由糖酵解促进葡萄糖氧化。这种现象促成肿瘤细胞的细胞凋亡。对于具有高比率 DCA 的顺铂 -DCA 组合,我们合成了 PLA-DCA 衍生物(图 17A)。在 PLGA-PEG-COOH 的存在下己酸 Pt(IV) 在 PLA-DCA 中的共同包封将得到具有铂和 DCA 的纳米粒子。通过 ^1H 光谱表征了 PLA-DCA 结合物(图 17B)。

[0215] 实施例 12. 官能聚合物的分子量

[0216] 除了上面的研究之外,进行了各种研究以改变官能聚合物(PLA-OBn)的分子量。为此目的,使用三种不同的变量,稀释度、催化剂浓度和引发剂浓度。下表总结了从研究得到的结果。根据结果,催化剂浓度的变化没有显著影响所得分子量,但是引发剂浓度相对于单体的变化显示出显著的变化。根据典型开环聚合动力学,通过降低引发剂浓度,所得聚合物的分子量提高(表 5)。另一方面,通过改变聚合的溶剂,分子量稍微改变,但是不遵循任

何趋势。

[0217] 表 5. 聚合物的分子量

[0218]

单体:官能 化单体 (重量比)	引发剂 (苶醇) (重量当 量)	催化剂 [Sn(Oct) ₂] (重量当 量)	溶剂 (甲苯) (重量当 量)	PLA-OBn	
				分子量	PDI
1:0.5	0.12	0.2	2	6100	1.4
1:0.5	0.09	0.2	2	6740	1.27
1:0.5	0.08	0.2	2	8950	1.3
1:0.5	0.12	0.2	2	6100	1.4
1:0.5	0.12	0.3	2	5900	1.41
1:0.5	0.12	0.2	2	6100	1.4
1:0.5	0.12	0.2	1.5	6560	1.33
1:0.5	0.12	0.2	1	5900	1.41

[0219] 其它实施方案

[0220] 已经描述了本发明的一些实施方案。不过,应理解的是,可进行各种改变而不脱离本发明的主旨和范围。因此,其它实施方案也在所附权利要求的范围内。

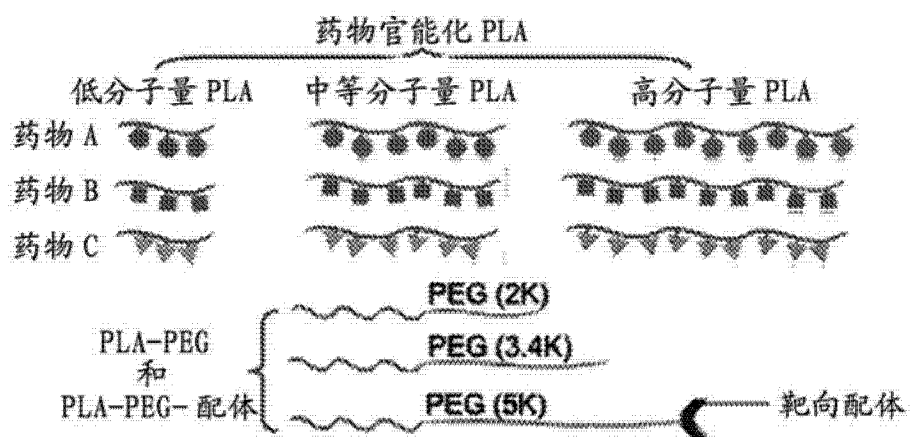


图 1A

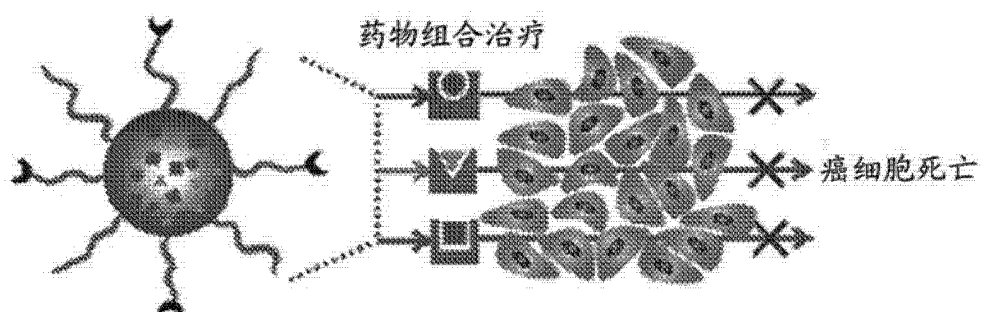


图 1B

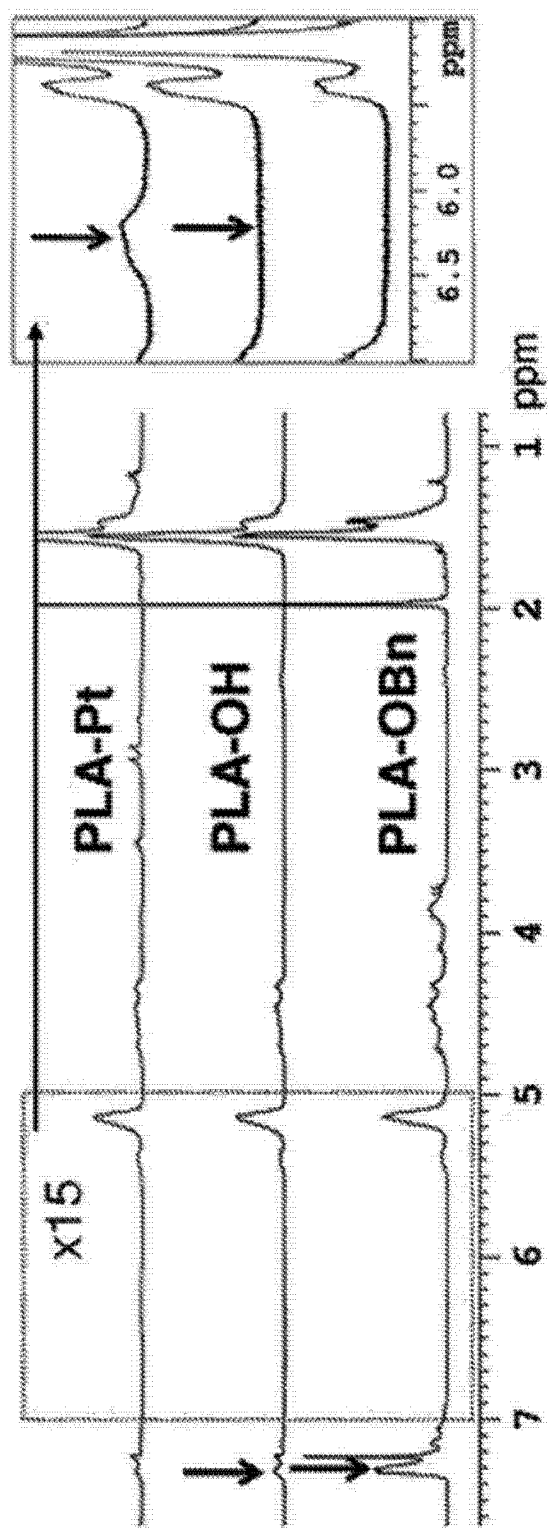


图 2

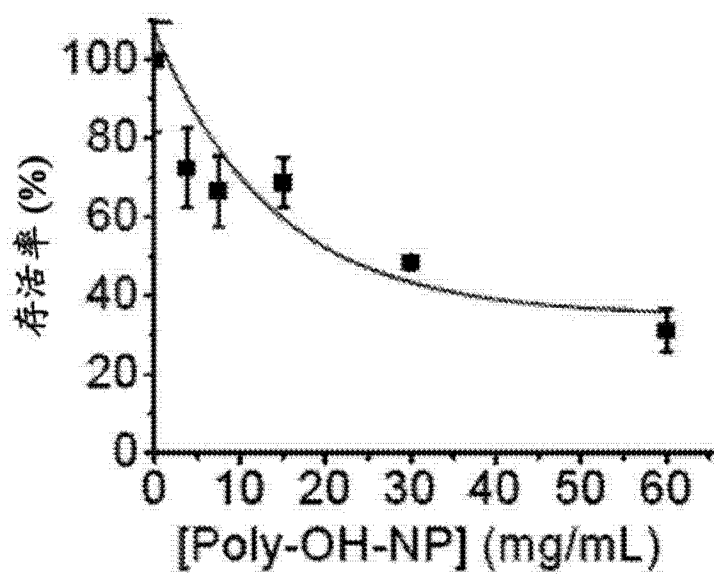


图 3

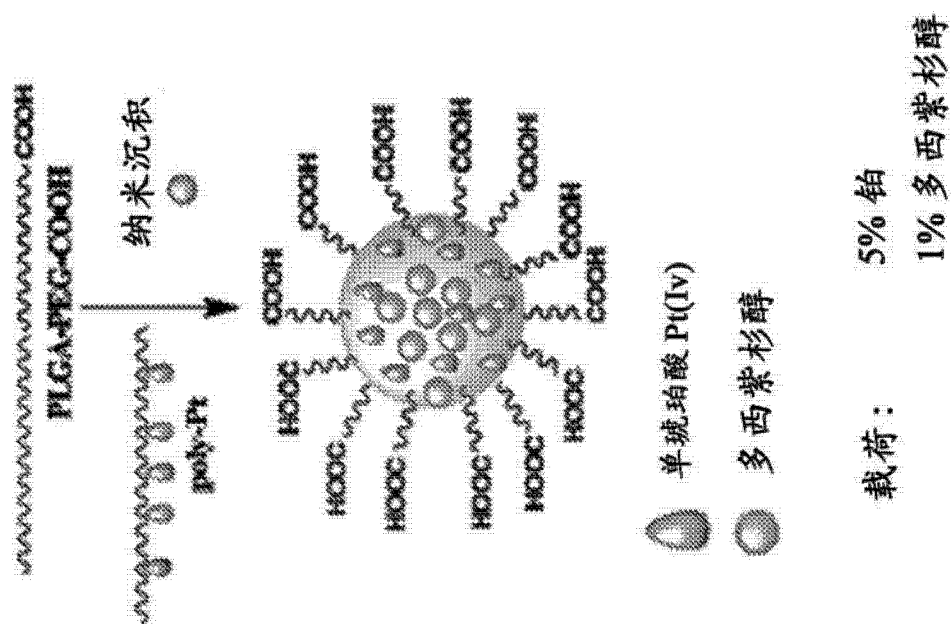


图 4A

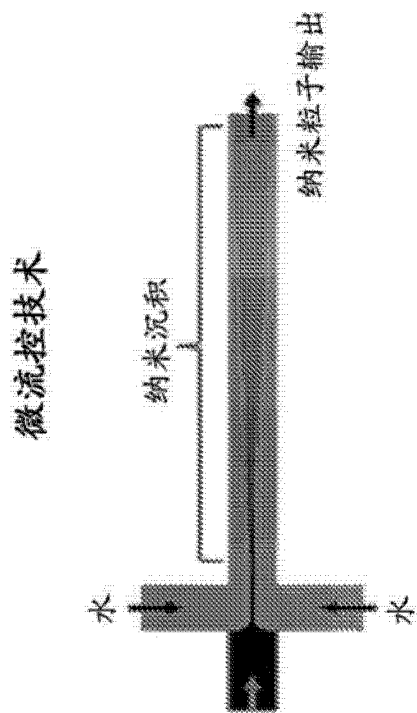


图 4B

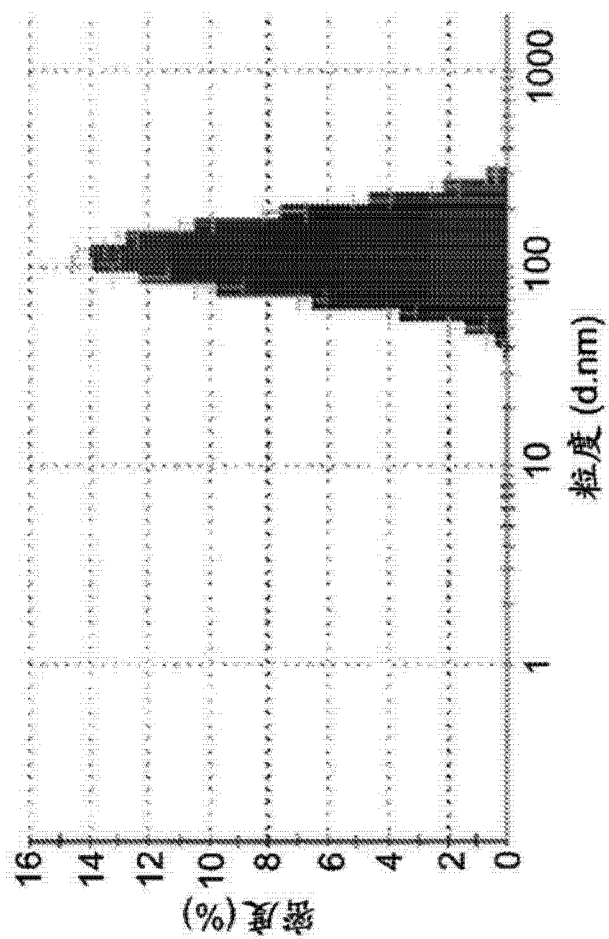


图 5A

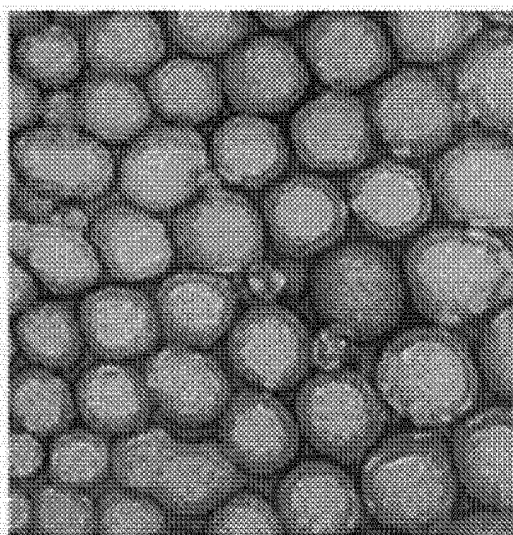


图 5B

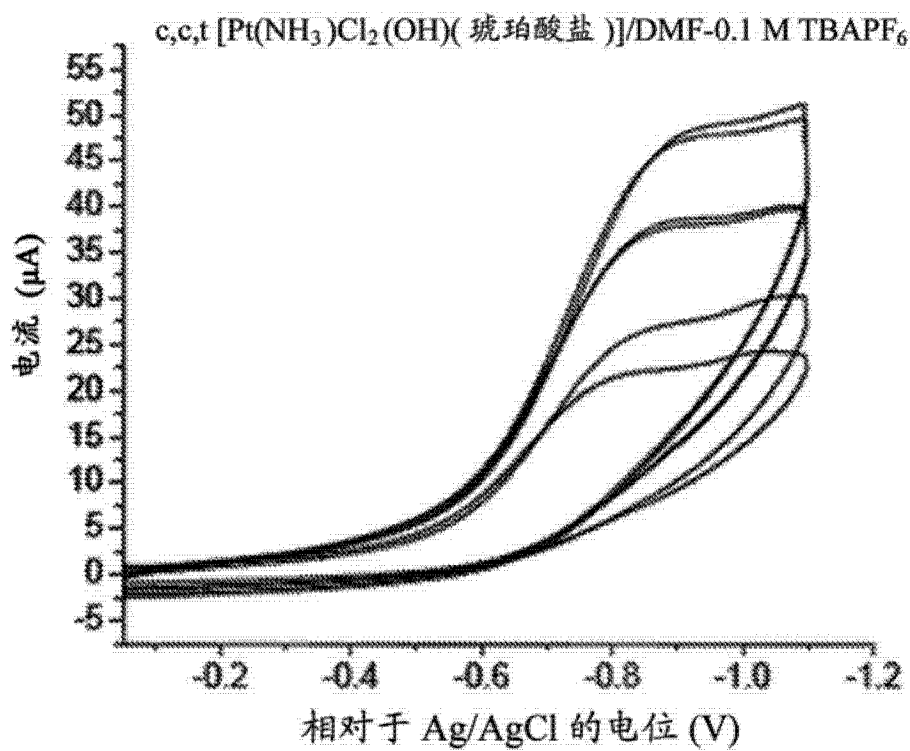


图 6A

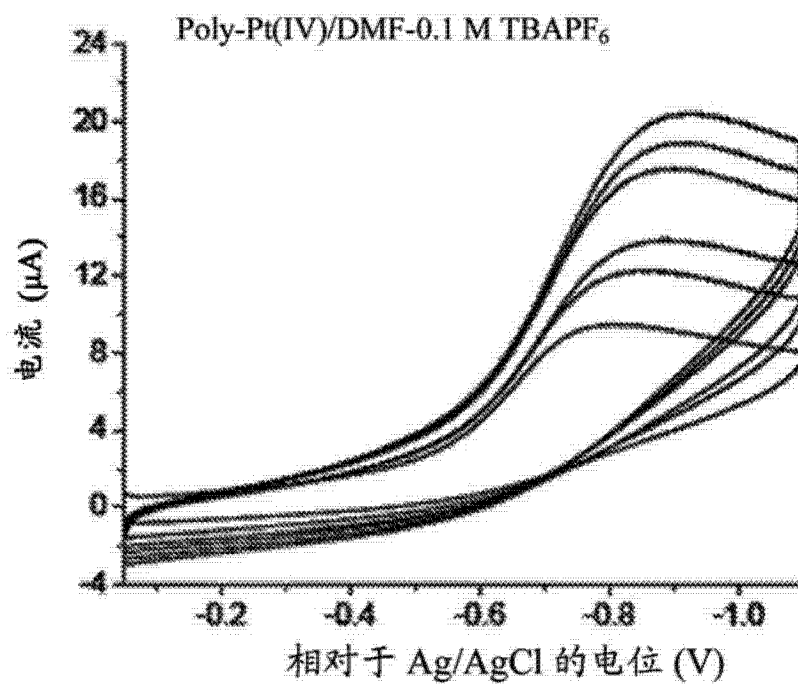


图 6B

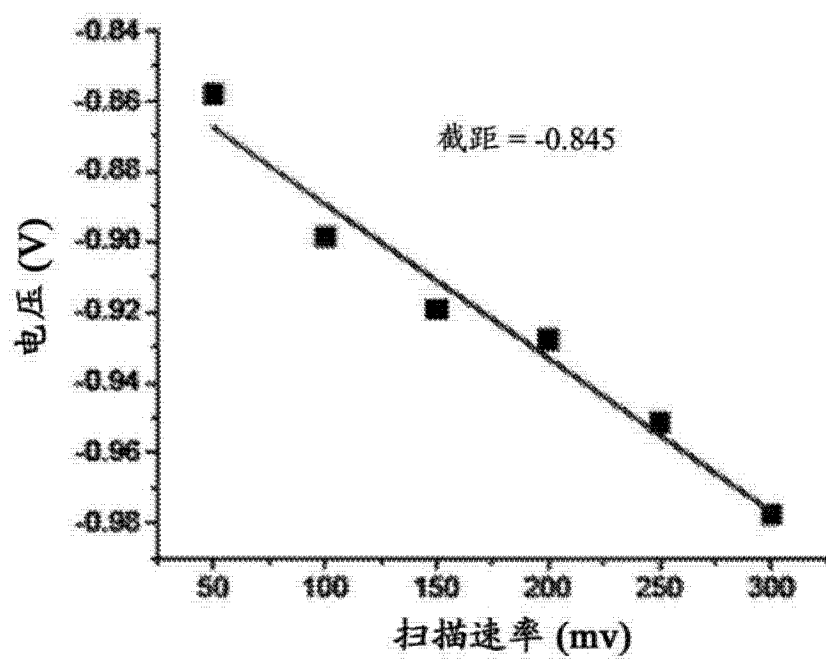


图 6C

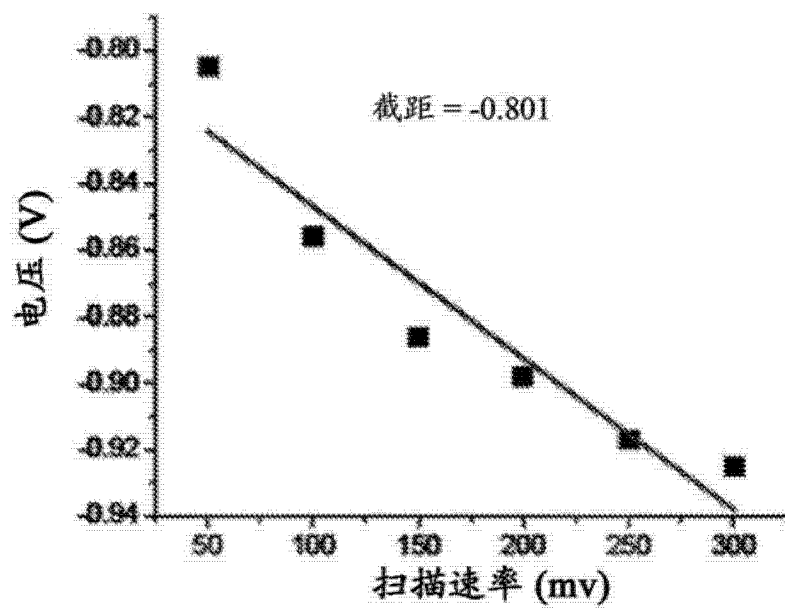


图 6D

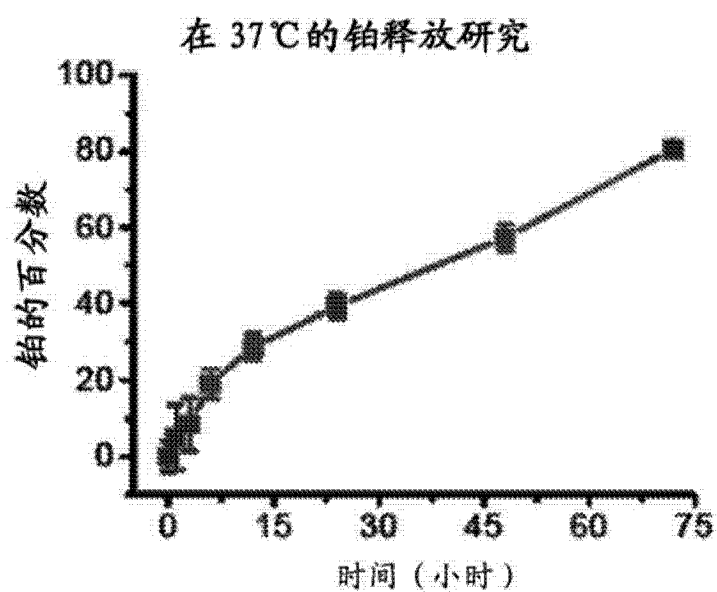


图 7A

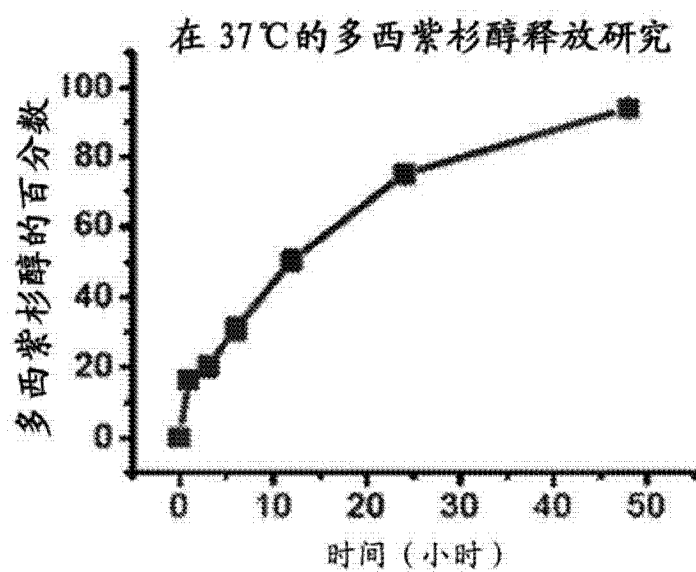


图 7B

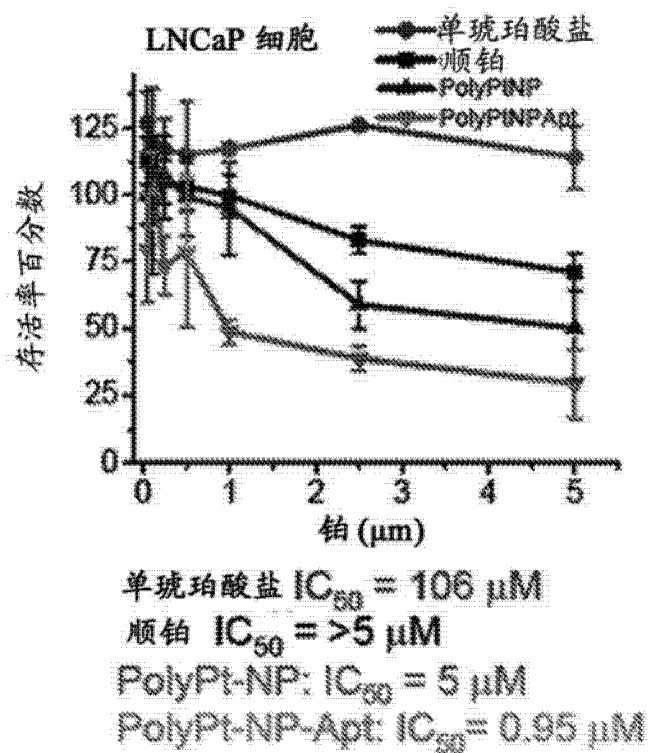


图 8A

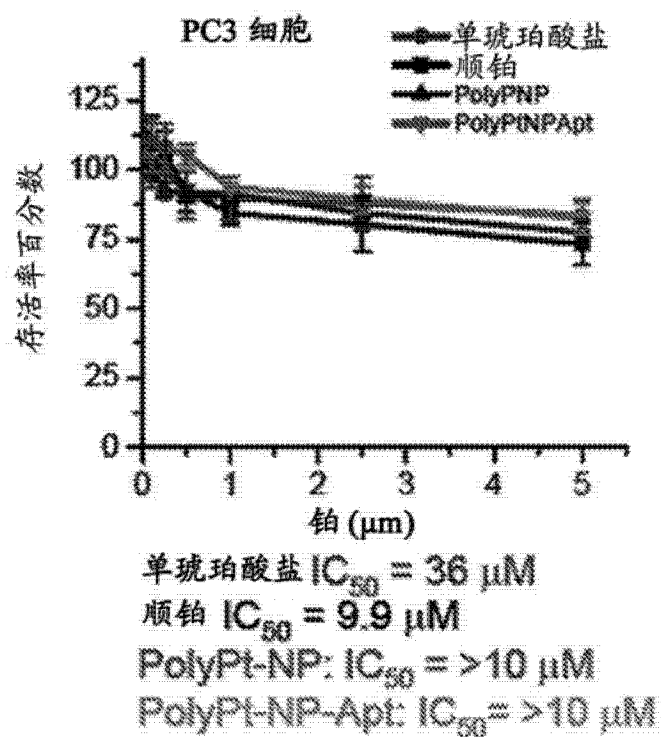


图 8B

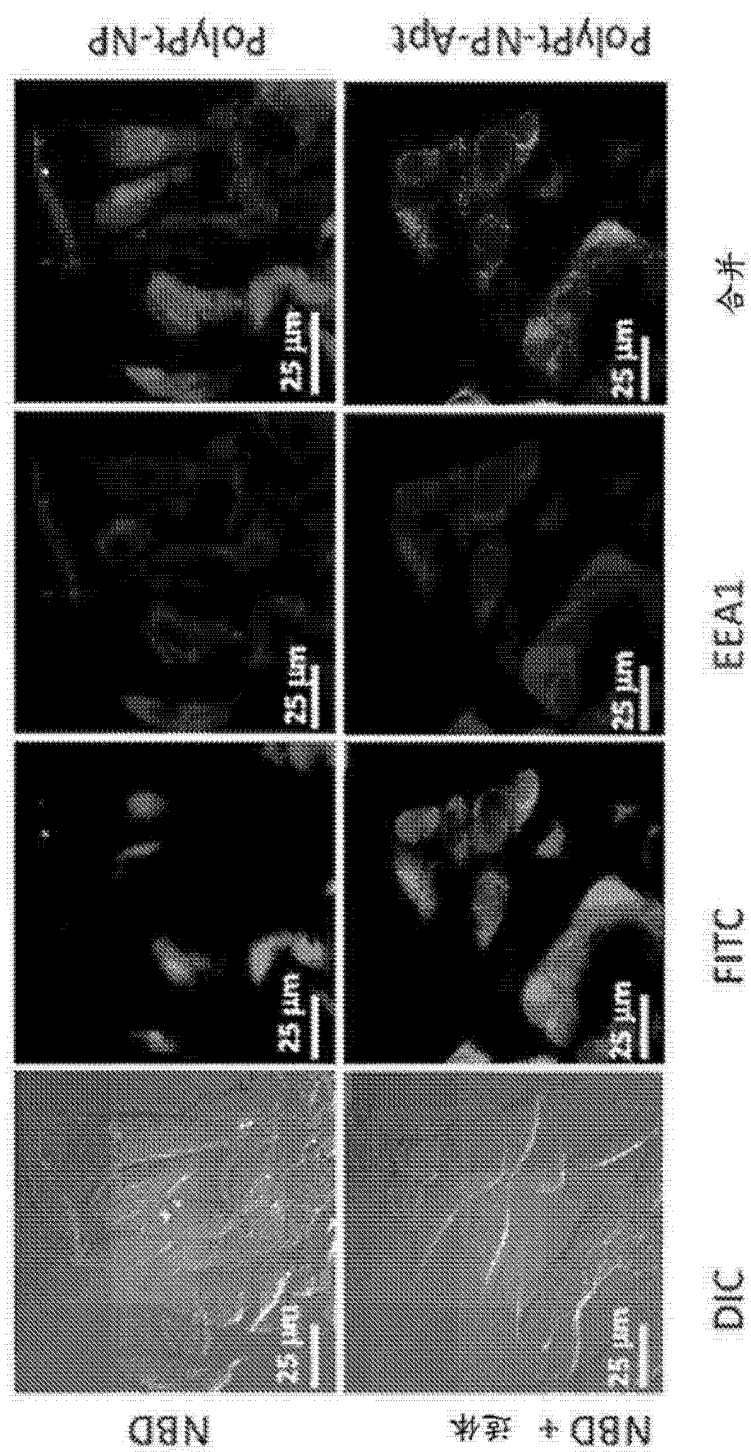


图 9

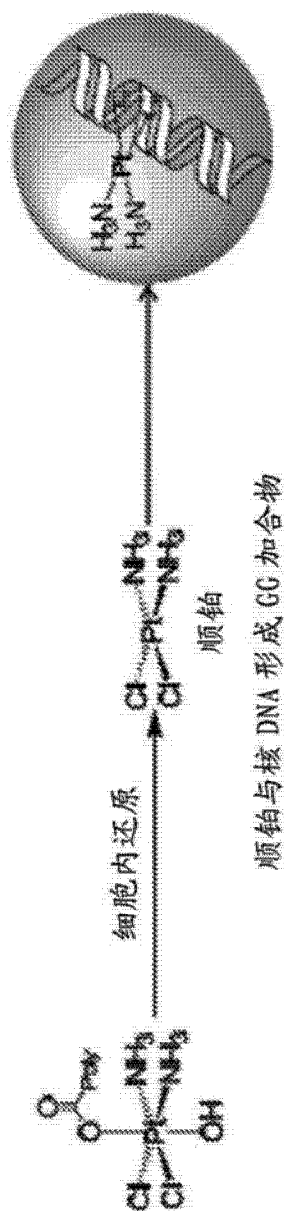


图 10A

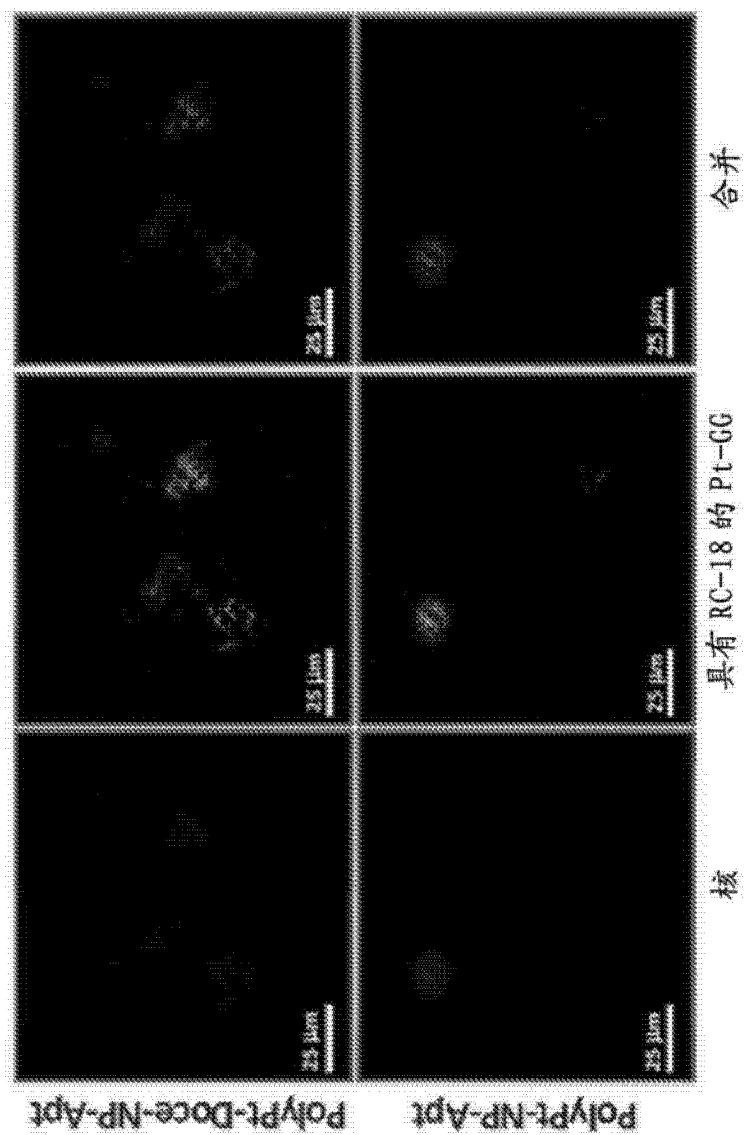


图 10B

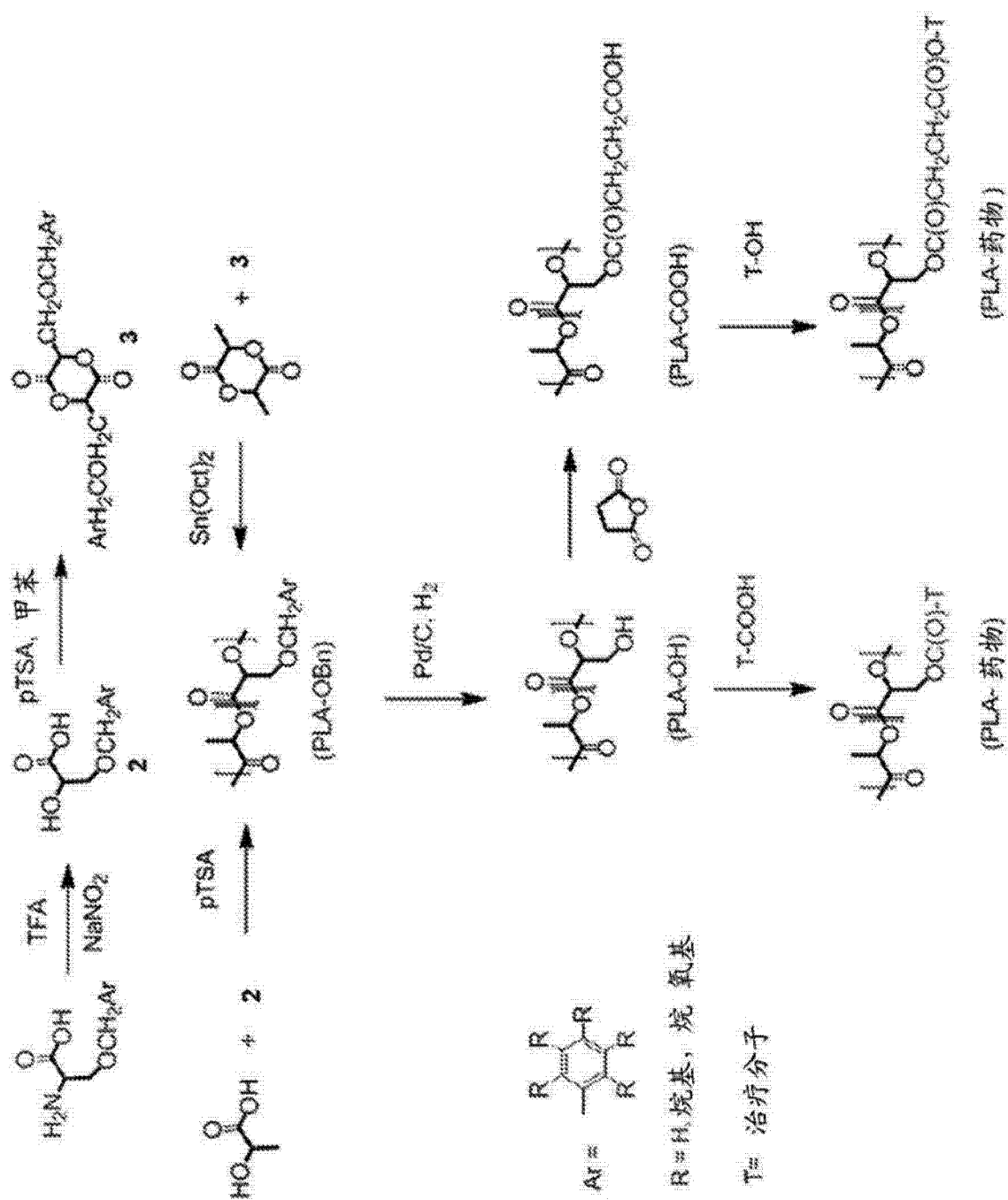


图 11

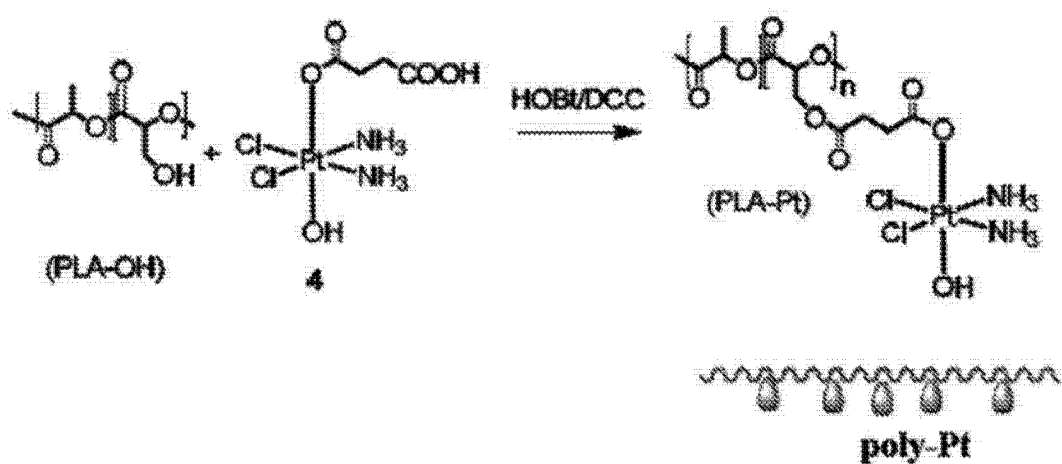


图 12

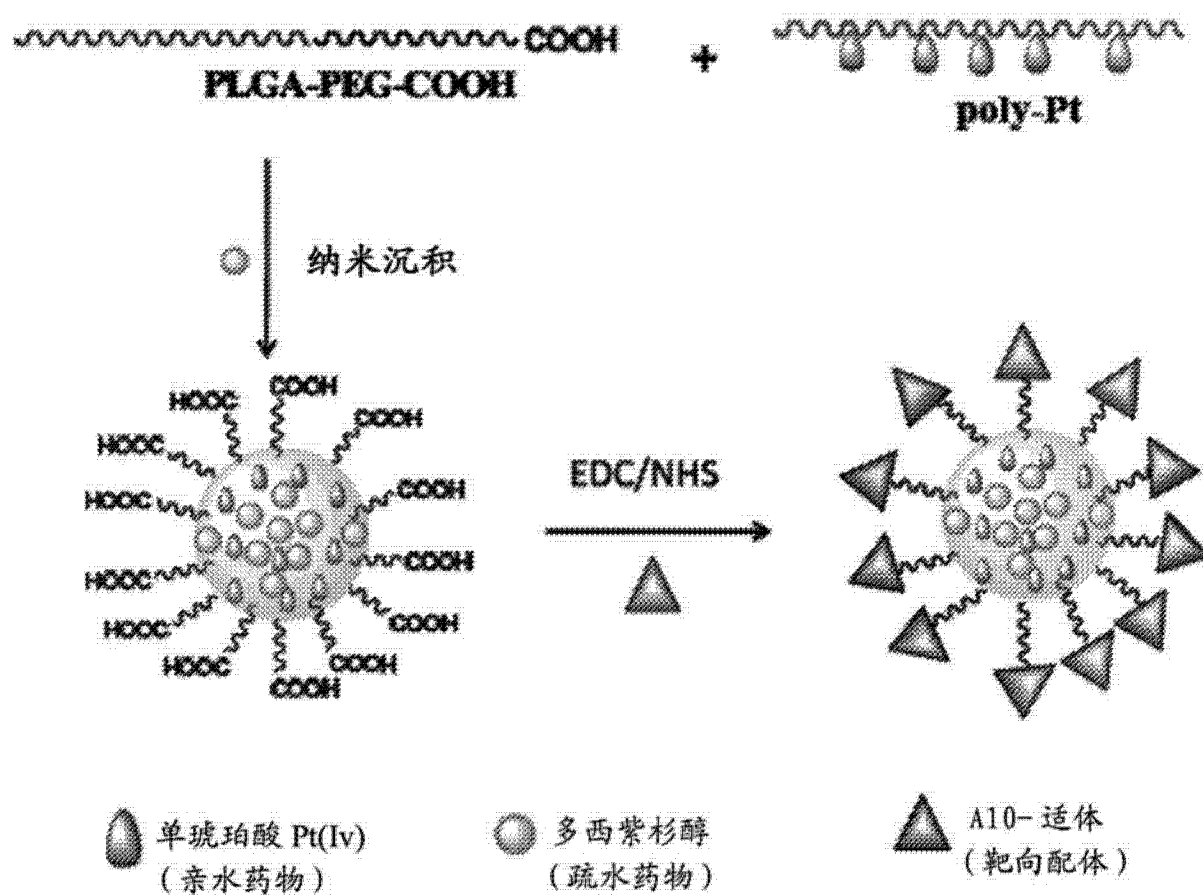


图 13

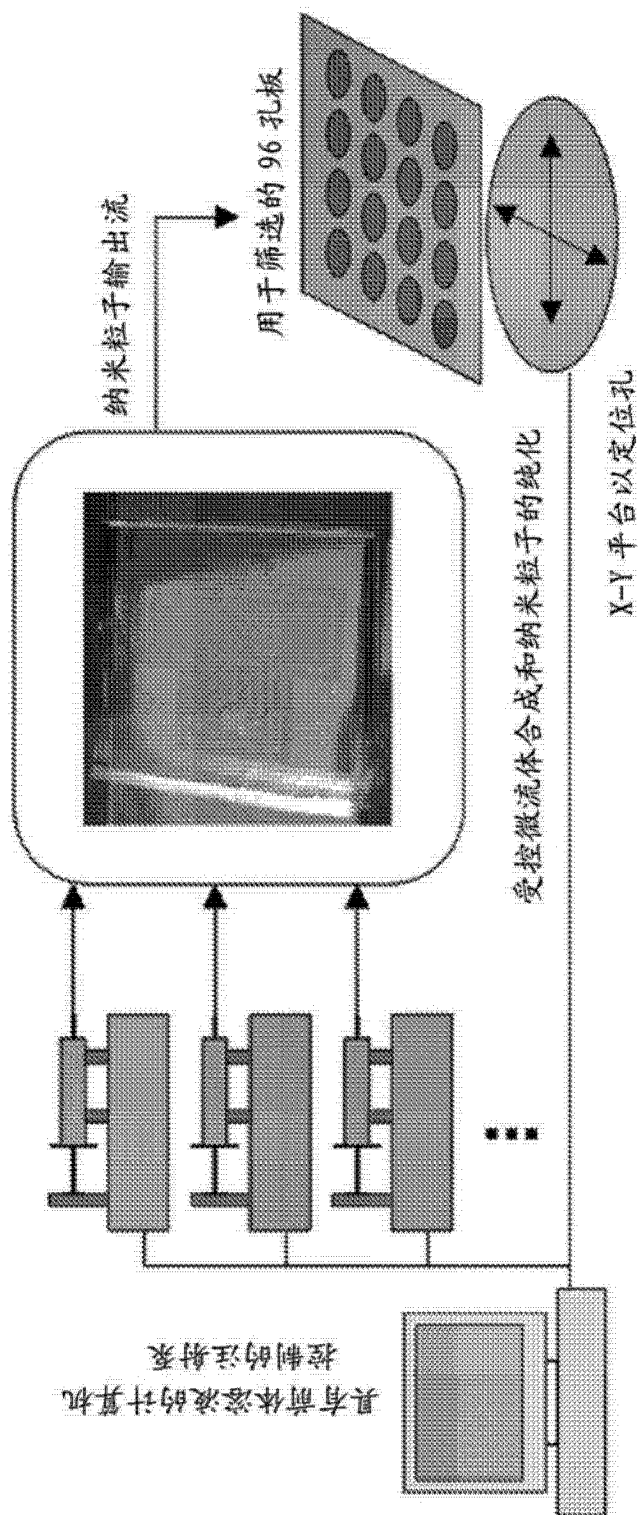


图 14

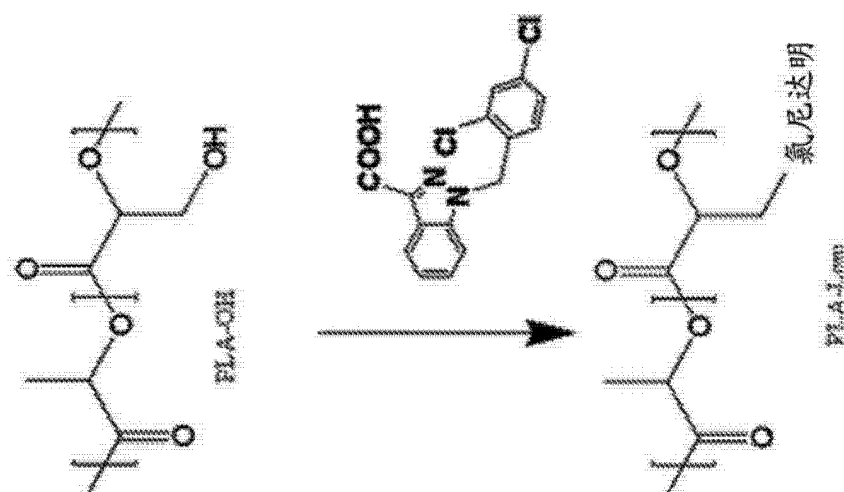


图 16A

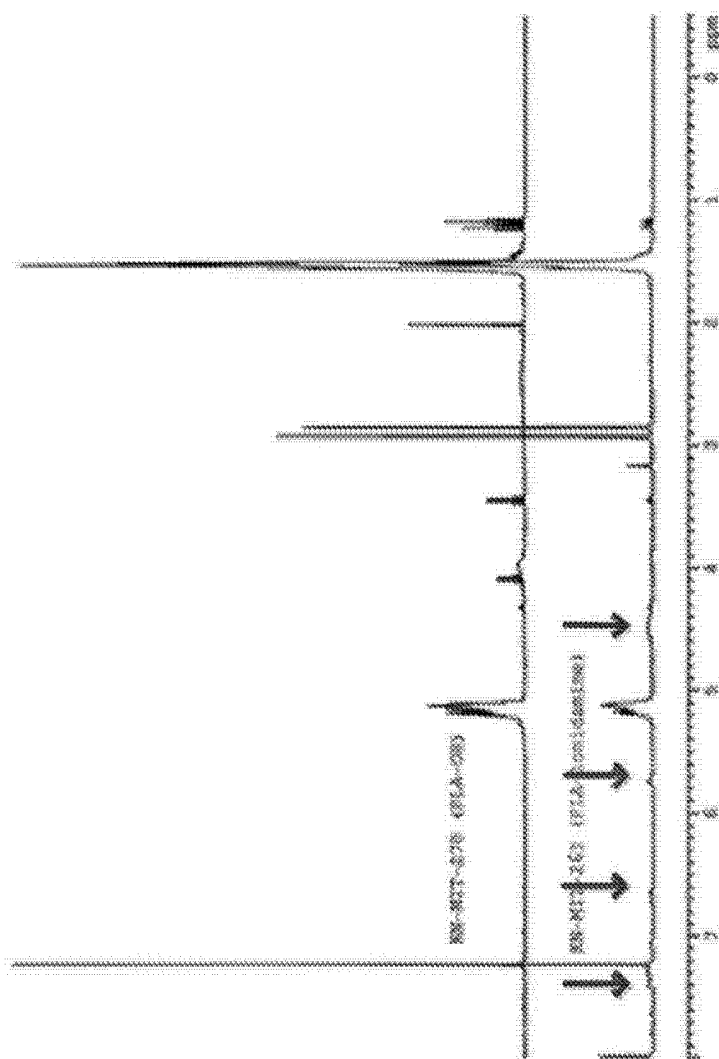


图 16B

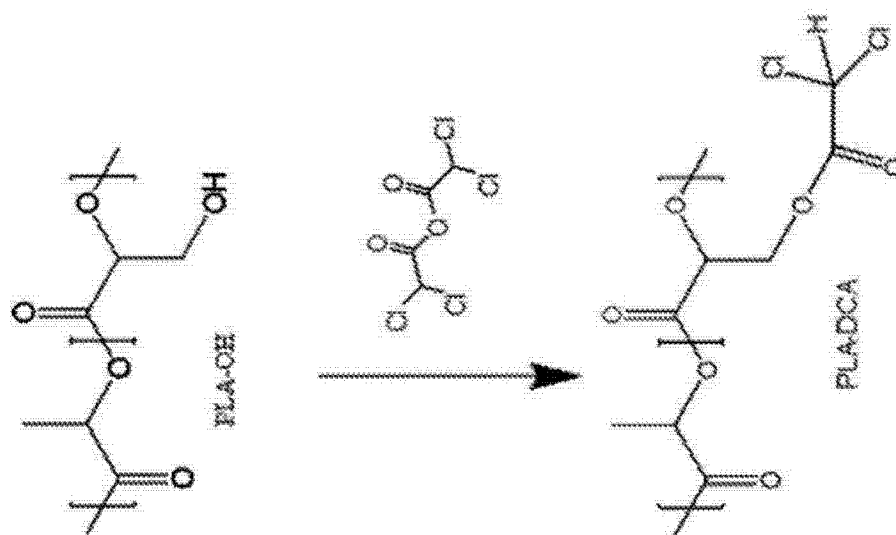


图 17A

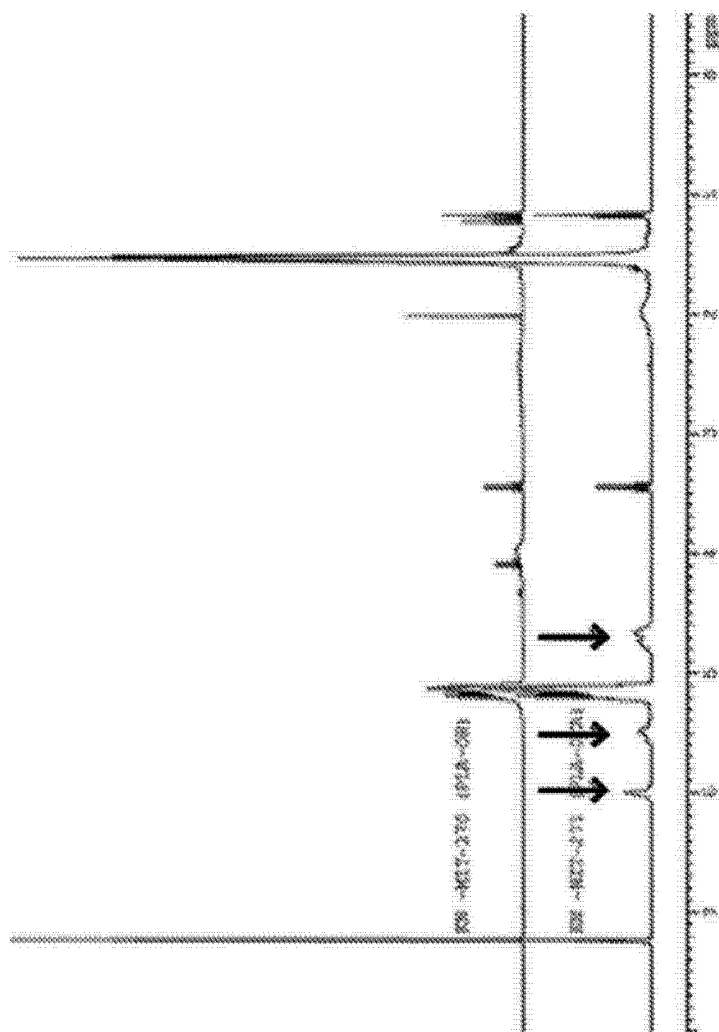


图 17B