



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102027019 A

(43) 申请公布日 2011. 04. 20

(21) 申请号 200880126584. X

(22) 申请日 2008. 12. 12

(30) 优先权数据

61/013, 233 2007. 12. 12 US

61/104, 506 2008. 10. 10 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 08. 11

(86) PCT申请的申请数据

PCT/CA2008/002203 2008. 12. 12

(87) PCT申请的公布数据

W02009/073984 EN 2009. 06. 18

(71) 申请人 大学健康网络

地址 加拿大安大略

(72) 发明人 郑岗 张智红 艾安·科尔宾

陈涓

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司 11240

代理人 李丙林 张英

(51) Int. Cl.

C07K 17/02 (2006. 01)

A61K 47/48 (2006. 01)

A61K 48/00 (2006. 01)

A61K 49/00 (2006. 01)

A61K 51/04 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

C12N 15/10 (2006. 01)

C12N 15/11 (2006. 01)

G01N 33/566 (2006. 01)

G01N 33/574 (2006. 01)

C07K 14/485 (2006. 01)

C07K 14/71 (2006. 01)

C12N 15/87 (2006. 01)

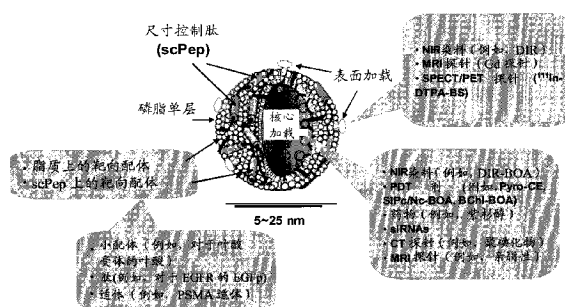
权利要求书 6 页 说明书 36 页 附图 25 页

(54) 发明名称

高密度脂蛋白样肽磷脂支架 ("HPPS") 纳米颗粒

(57) 摘要

本发明提供了一种非天然存在的高密度脂蛋白样肽-磷脂支架 ("HPPS") 纳米颗粒。更具体地, 本发明提供了一种非天然存在的肽-脂质纳米支架, 包括: (a) 至少一种磷脂; (b) 至少一种不饱和脂质, 优选不饱和固醇酯, 进一步优选不饱和胆固醇酯, 进一步优选胆固醇油酸酯; 以及 (c) 至少一种肽, 所述肽包括能够形成至少一个两亲性 α -螺旋的氨基酸序列; 其中使成分 a)、b) 和 c) 结合以形成肽-磷脂纳米支架。在本发明的实施方式中, 细胞表面受体配体被并入 HPPS 中。在一个实施方式中, 细胞表面受体配体共价结合至 HPPS 纳米颗粒的肽支架。在另一实施方式中, 细胞表面受体配体偶联至脂质锚, 并通过将脂质锚并入 HPPS 纳米颗粒的磷脂单层中而呈现在 HPPS 纳米颗粒的表面上。本发明还提供了一种包括 HPPS 纳米颗粒的药物剂型以及制备 HPPS 纳米颗粒的方法。



1. 一种非天然存在的肽-脂质纳米支架, 包括:
 - a) 至少一种磷脂;
 - b) 至少一种不饱和脂质, 优选不饱和固醇酯, 进一步优选不饱和胆固醇酯, 进一步优选胆固醇油酸酯; 以及
 - c) 至少一种肽, 所述肽包括能够形成至少一个两亲性 α -螺旋的氨基酸序列;其中, 使成分 a)、b) 和 c) 结合以形成肽-磷脂纳米支架。
2. 根据权利要求 1 所述的肽-脂质纳米支架, 进一步包括:
 - d) 至少一种归巢分子; 并且其中, 使成分 a)、b)、c) 以及 d) 结合以形成所述肽-磷脂纳米支架。
3. 根据权利要求 2 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述至少一种归巢分子共价结合至所述至少一种磷脂。
4. 根据权利要求 2 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述至少一种归巢分子共价结合至所述至少一种肽。
5. 根据权利要求 4 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述至少一种归巢分子在所述两亲性 α -螺旋的亲水面与疏水面之间的过渡处或附近在氨基酸处结合至所述肽。
6. 根据权利要求 5 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 结合至所述归巢分子的所述肽的氨基酸选自赖氨酸、半胱氨酸、苏氨酸和丝氨酸组成的组, 优选赖氨酸。
7. 根据权利要求 2-6 中任一项所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述至少一种归巢分子为至少一种活性细胞表面受体配体。
8. 根据权利要求 7 所述的肽-脂质纳米支架, 进一步包括:
 - e) 至少一种活性剂; 并且其中, 使成分 a)、b)、c)、d) 以及 e) 结合以形成所述肽-脂质纳米支架。
9. 根据权利要求 8 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述肽选自类 A、H、L 和 M 两亲性 α -螺旋, 其片段, 以及包括所述类 A、H、L 和 M 两亲性 α -螺旋的反向肽序列的肽或其片段组成的组。
10. 根据权利要求 8 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述肽选自 2F、4F、2F 的反向序列以及 4F 的反向序列组成的组。
11. 根据权利要求 8-10 中任一项所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述至少一个两亲性 α -螺旋或肽的长度在 6 到 30 个氨基酸之间。
12. 根据权利要求 11 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述至少一个两亲性 α -螺旋或肽的长度在 8 到 28 个氨基酸之间。
13. 根据权利要求 12 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述至少一个两亲性 α -螺旋或肽的长度在 10 到 24 个氨基酸之间。
14. 根据权利要求 13 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述至少一个两亲性 α -螺旋或肽的长度在 11 到 22 个氨基酸之间。
15. 根据权利要求 14 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述至少一个两亲性 α -螺旋或肽的长度在 14 到 21 个氨基酸之间。
16. 根据权利要求 15 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述至少一个两亲性 α -螺旋或肽的长度在 16 到 20 个氨基酸之间。

17. 根据权利要求 16 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述至少一个两亲性 α -螺旋或肽的长度为 18 个氨基酸。

18. 根据权利要求 8-17 中任一项所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述磷脂选自自由磷脂酰胆碱(优选 DMPC(1, 2-二肉豆蔻酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱)、POPC(1-棕榈酰-1-油酰基-磷脂酰胆碱)和 EYPC(卵黄磷脂酰胆碱))、溶血磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇以及前述的组合组成的组。

19. 根据权利要求 8-18 中任一项所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述纳米支架的直径在 5-50nm 之间。

20. 根据权利要求 19 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述纳米支架的直径在 5-40nm 之间。

21. 根据权利要求 20 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述纳米支架的直径在 5-30nm 之间。

22. 根据权利要求 21 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述纳米支架的直径在 5-25nm 之间。

23. 根据权利要求 22 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述纳米支架的直径在 5-20nm 之间。

24. 根据权利要求 23 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述纳米支架的直径在 10-15nm 之间。

25. 根据权利要求 8-24 中任一项所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述至少一种活性剂结合至至少一个脂质锚。

26. 根据权利要求 25 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述至少一种活性剂通过酯键结合至所述至少一个脂质锚。

27. 根据权利要求 25 和 26 中任一项所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述至少一个脂质锚选自自由胆固醇油酸酯部分、胆固醇月桂酸酯部分、植醇部分以及优选油酸酯部分和不饱和胆固醇酯部分组成的组。

28. 根据权利要求 8-27 中任一项所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述细胞表面受体配体是对于在癌细胞中过度表达的受体的配体。

29. 根据权利要求 8-27 中任一项所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述细胞表面受体配体是对于心血管斑块中过度表达的受体的配体。

30. 根据权利要求 28 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述细胞表面受体配体是对于选自叶酸、Her-2/neu、整联蛋白、EGFR、metastin、ErbB、c-Kit、c-Met、CXCR4、CCR7、内皮素-A、PPAR- δ 、PDGFR A、BAG-i、以及 TGF β 组成的组中的受体的配体。

31. 根据权利要求 30 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述整联蛋白受体为 α 133。

32. 根据权利要求 30 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述细胞表面受体配体为叶酸受体配体。

33. 根据权利要求 8-27 中任一项所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 细胞表面受体靶向特定组织。

34. 根据权利要求 33 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述组织为肺、皮肤、血液、

胰腺、视网膜、前列腺、卵巢、淋巴结、肾上腺、肝脏、乳腺、消化系统、以及肾脏。

35. 根据权利要求 8 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述归巢分子选自自由肽、适体、抗体以及抗体片段组成的组。

36. 根据权利要求 35 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述细胞表面受体配体是所述抗体片段并且包括 Fab 区。

37. 根据权利要求 8-36 中任一项所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述活性剂为亲脂性化合物。

38. 根据权利要求 37 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述亲脂性化合物选自自由乙酰苯胺、苯胺、氨基喹啉、二苯甲基化合物、苯并二氮杂~~革~~类、苯并呋喃、大麻酯、环肽、二苯氮杂~~革~~类、毛地黄糖苷、麦角生物碱类、类黄酮、咪唑、喹啉、大环内酯、萘、鸦片剂(或吗啡喃)、噁嗪、噁唑、苯烷基胺、哌啶、多环芳香烃、吡咯烷、吡咯烷酮、均二苯代乙烯、磺酰脲、砒、三唑、莨菪烷、以及长春花生物碱组成的组。

39. 根据权利要求 38 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述亲脂性化合物包括至少一个包含至少 10 个碳的烃链, 其中所述烃链包括至少一个顺式-双键或通过至少一个侧链支化。

40. 根据权利要求 38 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述亲脂性化合物包括至少一个油酸酯部分、胆固醇油酸酯部分、胆固醇月桂酸酯部分或植醇部分。

41. 根据权利要求 8-36 中任一项所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述活性剂为包括亲脂性成分和亲水性成分分子。

42. 根据权利要求 8-36 中任一项所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述活性剂为诊断剂、成像剂或治疗剂。

43. 根据权利要求 42 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述活性剂为诊断剂。

44. 根据权利要求 43 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述诊断剂选自自由对比剂、放射性标记和荧光标记组成的组。

45. 根据权利要求 44 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述诊断剂为对比剂。

46. 根据权利要求 45 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述对比剂选自自由光学对比剂、MRI 对比剂、超声对比剂、X-射线对比剂和放射性核素组成的组。

47. 根据权利要求 46 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述对比剂为光学对比剂。

48. 根据权利要求 46 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述对比剂为 MRI 对比剂。

49. 根据权利要求 48 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述 MRI 对比剂为氧化铁或镧系元素的碱。

50. 根据权利要求 49 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述 MRI 对比剂为镧系元素的碱。

51. 根据权利要求 50 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述镧系元素的碱为钆(Gd³⁺)金属。

52. 根据权利要求 42 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述活性剂为治疗剂。

53. 根据权利要求 52 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述治疗剂为抗癌剂。

54. 根据权利要求 53 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述抗癌剂选自自由化疗剂、光动力学治疗剂、硼中子俘获治疗剂或用于放射治疗的放射性核素组成的组。

55. 根据权利要求 54 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述抗癌剂为光动力学治疗剂。

56. 根据权利要求 55 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述光动力学治疗剂选自自由卟啉、卟啉异构体、和扩展的卟啉组成的组。

57. 根据权利要求 56 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述光动力学治疗剂选自自由 SiNc-BOA、SiPc-BOA、和焦脱镁叶绿酸-胆固醇酯 (Pyro-CE) 组成的组。

58. 根据权利要求 54 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述抗癌剂为化疗剂。

59. 根据权利要求 53 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述抗癌剂选自自由烷基化剂、蒽环类药、抗生素、芳香酶抑制剂、双磷酸盐类、环加氧酶抑制剂、雌激素受体调节剂、叶酸拮抗剂、无机砷酸盐、微管抑制剂、修饰剂、亚硝基脲、核苷类似物、破骨细胞抑制剂、含铂化合物、类维生素 A、拓扑异构酶 1 抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、表皮生长因子抑制剂和组蛋白脱乙酰基酶抑制剂组成的组。

60. 根据权利要求 58 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述化疗剂选自自由紫杉醇、环磷酰胺、二十二碳六烯酸 (DHA)-紫杉醇结合物、桦木酸、和阿霉素组成的组。

61. 根据权利要求 52 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述治疗剂为抗青光眼药、抗凝剂、消炎药、平喘药、抗生素、抗真菌药或抗病毒药。

62. 根据权利要求 61 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述治疗剂为抗青光眼药。

63. 根据权利要求 62 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述抗青光眼药选自自由 β -阻滞剂如噻吗洛尔-碱、倍他洛尔、阿替洛尔、左布诺洛尔、肾上腺素、二新戊酰、oxonolol、乙酰唑胺-碱和醋甲唑胺组成的组。

64. 根据权利要求 61 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述治疗剂为消炎药。

65. 根据权利要求 64 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述消炎药为甾族药。

66. 根据权利要求 65 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述甾族药为可的松或地塞米松。

67. 根据权利要求 64 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述消炎药为非甾族药。

68. 根据权利要求 67 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述非甾族消炎药 (NTHE) 选自自由吡罗昔康、吲哚美辛、萘普生、苯基丁氮酮、布洛芬和双氯芬酸组成的组。

69. 根据权利要求 61 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述治疗剂为平喘药。

70. 根据权利要求 69 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述平喘药为泼尼松龙或泼尼松。

71. 根据权利要求 61 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述治疗剂为抗生素。

72. 根据权利要求 71 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述抗生素为氯霉素。

73. 根据权利要求 71 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述抗生素为选自自由制霉菌素、两性霉素 B、咪康唑、AcyclovirTM 组成的组。

74. 根据权利要求 1-73 中任一项所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述氨基酸序列包括正向或反向方向上的脱辅基蛋白的连续氨基酸。

75. 根据权利要求 74 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述脱辅基蛋白选自自由 apoB-100、apoB-48、apoC、apoE 和 apoA 组成的组。

76. 根据权利要求 8-28 中任一项所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述至少一种活性

剂为适体。

77. 根据权利要求 8-36 中任一项所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述至少一种活性剂为双链 RNA。

78. 根据权利要求 77 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述至少一种活性剂为 siRNA。

79. 根据权利要求 1-78 中任一项所述的肽-脂质纳米支架, 进一步包括一个或多个三酰甘油。

80. 根据权利要求 1-78 中任一项所述的肽-脂质纳米支架, 进一步包括固醇、固醇酯、或它们的组合。

81. 根据权利要求 80 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述固醇或固醇酯选自胆固醇、胆固醇油酸酯以及不饱和胆固醇酯组成的组。

82. 一种药物剂型, 包括根据权利要求 1-81 中任一项所述的非天然存在的肽-脂质纳米支架。

83. 一种制备根据权利要求 8-82 中任一项所述的非天然存在的肽-脂质纳米支架的方法, 包括在适于形成所述肽-脂质纳米支架的条件下结合成分 a)-e)。

84. 一种非天然存在的肽-脂质纳米支架, 包括:

a) 至少一种磷脂;

b) 至少一种不饱和脂质, 优选不饱和固醇酯, 进一步优选不饱和胆固醇酯, 进一步优选胆固醇油酸酯;

c) 至少一种肽;

d) 至少一种归巢分子; 以及

e) 至少一种活性剂, 所述活性剂包括双链 RNA;

其中, 活性细胞表面受体配体共价结合至所述至少一种肽, 并且成分 a)、b)、c)、d) 和 e) 结合以形成肽-磷脂纳米支架。

85. 根据权利要求 84 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述双链 RNA 为 siRNA。

86. 根据权利要求 85 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述双链 RNA 结合至选自胆固醇油酸酯部分、胆固醇月桂酸酯部分、植醇部分以及优选油酸酯部分和不饱和胆固醇酯部分组成的组中的至少一个脂质锚。

87. 根据权利要求 84-86 中任一项所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述至少一种肽包括能够形成两亲性 α -螺旋的氨基酸序列。

88. 根据权利要求 84-86 中任一项所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述至少一种肽为脱辅基蛋白, 并且所述活性细胞表面受体配体不是低密度脂蛋白受体配体或高密度脂蛋白受体配体。

89. 根据权利要求 8-27 中任一项所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述细胞表面受体配体为针对在 HIV 感染的细胞中表达的受体的配体。

90. 根据权利要求 89 所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述活性剂为 siRNA。

91. 一种预防或治疗疾病的方法, 包括给予治疗量的根据权利要求 52-73 中任一项所述的肽-脂质纳米支架, 其中, 所述疾病是可用所述治疗剂预防或治疗的。

92. 根据权利要求 52-73 中任一项所述的肽-脂质纳米支架在用于预防或治疗疾病中

的应用，其中，所述疾病是可用所述治疗剂预防或治疗的。

93. 根据权利要求 52-73 中任一项所述的肽 - 脂质纳米支架在制备用于预防或治疗疾病的药物中的应用，其中，所述疾病是可用所述治疗剂预防或治疗的。

94. 一种诊断受治疗者体内疾病的方法，包括给予所述受治疗者根据权利要求 43-51 中任一项所述的肽 - 脂质纳米支架。

95. 根据权利要求 43-51 中任一项所述的肽 - 脂质纳米支架在用于诊断受治疗者体内疾病中的应用。

96. 一种预防或治疗与 SR-B 1 受体的过度表达相关的疾病的方法，包括给予根据权利要求 1 所述的肽 - 脂质纳米支架，所述肽 - 脂质纳米支架进一步包括治疗剂，并且其中所述疾病是可用所述治疗剂预防或治疗的。

97. 根据权利要求 96 所述的方法，其中，所述疾病为癌症，优选乳腺癌。

98. 根据权利要求 1 所述的肽 - 脂质纳米支架在用于预防或治疗与 SR-B1 受体的过度表达相关的疾病中的应用，所述肽 - 脂质纳米支架进一步包括治疗剂，并且其中所述疾病是可用所述治疗剂预防或治疗的。

99. 根据权利要求 1 所述的肽 - 脂质纳米支架在制备用于预防或治疗与 SR-B1 受体的过度表达相关的疾病的药物中的应用，所述肽 - 脂质纳米支架进一步包括治疗剂，并且其中所述疾病是可用所述治疗剂预防或治疗的。

100. 根据权利要求 98 或 99 所述的应用，其中，所述疾病为癌症，优选乳腺癌。

101. 根据权利要求 8-36 中任一项所述的肽 - 脂质纳米支架，其中，所述至少一种活性剂为基因或其功能等效物。

高密度脂蛋白样肽磷脂支架（“HPPS”）纳米颗粒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于肽稳定化超小纳米颗粒的药物递送系统，该药物递送系统允许用于检测和治疗（处理）癌症和其他疾病的活性剂的靶向递送。所述活性剂可以位于纳米平台的核心或表面，而细胞表面受体配体附着于所述纳米平台的表面。

背景技术

[0002] 纳米平台

[0003] 纳米平台是纳米级（纳米尺度）结构，该结构被设计为一般平台以形成不同组的多功能诊断和治疗装置。这样的纳米级装置通常具有小于 100nm 的尺寸，由此大小与其他生物实体相当。它们小于人类细胞（人类细胞的直径为 10,000 到 20,000nm）和细胞器，并且大小类似于较大的生物大分子，如酶和受体。血红素（血红蛋白）的直径，例如为大约 5nm，而围绕细胞的脂质双层为大约 6nm 厚。小于 50nm 的纳米级装置可以容易地进入大多数细胞，而那些小于 20nm 的纳米级装置可以运出血管（NIH/NCI Cancer Nanotechnology.NZH Publication No 04-5489(2004)）。结果，纳米装置可以经常以不改变那些分子的行为和生物化学性质的方式在细胞表面上和细胞内部与生物分子容易地相互作用。因此，纳米装置提供了通过其观察和操纵基础生物途径和过程的完整地独特优势。迄今为止报道的大多数多功能纳米平台由合成的纳米结构制成，如树枝状高分子（树形化合物）（球状，支化聚合物）（Quintana, A. et al. Journal of the American Chemical Society. 2003 125 (26) : 7860-5）、聚合（Xu, H., Aylott, J.W. & Kopelman, R. Analyst. 2002 Nov ; 127 (11) : 1471-7, Pan, D., Turner, J.L. & Wooley, K.L. Chemical Communications, 2400-2401 (2003)）和陶瓷（Kasili, P.M., Journal of the American Chemical Society. 2004 126 (9) : 2799-806, Ruoslahti, E. Cancer Cell. 2002 ; 2 (2) : 97-8）纳米颗粒、全氟化碳乳剂（Anderson, S.A. et al., Magnetic Resonance in Medicine. 2000 Sep ; 44 (3) : 433-9）和交联脂质体（Hood, J.D. et al., Science. 2002 ; 296 (5577) : 2404-7, Li, L. et al., International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics. 2004 15 ; 58 (4) : 1215-27）。

[0004] 在这些合成纳米平台设计中的一个常见问题是生物相容性问题，其与短期和长期毒性密切相关。天然纳米结构可以为该生物相容性问题提供一种解决方案。然而，由天然存在的纳米结构制成的纳米平台是稀少的。

[0005] 对于理想的纳米平台的一些特征如下：1) 均一的尺寸分布（< 100nm）；2) 较大的有效载荷；3) 对于高结合亲和力的多效价；4) 经由模块性和多功能性的平台技术；5) 稳定和长期的循环时间；以及 6) 生物相容的、生物可降解的和无毒的。虽然一些现有的合成纳米平台符合这些标准中的一些，但是这些纳米平台设计中的一个常见问题是生物相容性问题，其与短期和长期毒性密切相关。天然纳米结构可以为生物相容性问题提供一种解决方案。然而，由天然存在的纳米结构制成的纳米平台是少见的。在一个实例中，来自豇豆花叶病毒和兽棚病毒的空 RNA 病毒胶囊用作潜在的纳米装置（Raja K.S. et

al., *Biomacromolecules* 2003 ; 4(3) : 472-6)。前提是装配入功能性病毒胶囊的 60 个拷贝的外壳蛋白提供了宽范围的化学功能性，其可以用于将归巢（寻靶，homing）分子 - 如单克隆抗体或癌细胞 - 特异性受体拮抗剂和报道分子 - 如磁共振成像 (MRI) 对比剂（造影剂）附着至胶囊表面，并且用于将治疗剂加载到胶囊内。不幸的是，即使人体对植物来源的病毒具有相当的容忍性；与这些纳米装置相关的免疫结果还是不期望的。

[0006] 在另一实例中，脂蛋白纳米平台用于活性剂的靶向递送 (PCT 申请公开号 WO 2006/073419(公开日：2006 年 7 月 13 日))。

[0007] 靶向递送

[0008] 虽然特定病理的结果在整个受折磨的人的身体中经常是明显的，但是通常，潜在的病理学可以仅影响单一器官或组织。然而，少见的是，药物或其它治疗将仅靶向患病的器官或组织。更常见地，治疗导致不期望的副作用，例如，由于遍及患者身体的广泛的毒性作用。期望的是选择性靶向器官或组织，例如，用于与靶器官或组织相关的疾病的治疗。还期望的是选择性靶向体内相对正常组织的癌组织。

[0009] 大多数治疗物质通过循环被递送至靶器官或组织。衬在血管的内表面的内皮是在靶器官或组织中循环治疗物质所遇到的第一细胞类型。这些细胞提供了用于将治疗选择性引导至器官或组织的靶标。

[0010] 内皮在不同组织中可以具有不同的形态和生物化学标记物。淋巴系统的血管，例如，表达各种粘附蛋白，其用于指导淋巴细胞归巢。例如，存在于淋巴结中的内皮细胞表达作为用于 L- 选择蛋白的配体的细胞表面标记物，而集合淋巴小结小静脉中的内皮细胞表达用于 $\alpha_4\beta_7$ 整联蛋白的配体。这些配体涉及特定淋巴细胞归巢到它们各自的淋巴器官。因此，将药物连接到 L- 选择蛋白或连接到 $\alpha_4\beta_7$ 整联蛋白可以提供用于将所述药物分别靶向到患病的淋巴结或集合淋巴小结的方式，只要这些分子不结合到在显著数量的其他器官或组织中存在的类似配体。淋巴细胞循环的一些观察表明存在器官和组织特异性内皮标记物。类似地，特定类型的肿瘤细胞归巢或转移到特定器官或组织进一步表明存在器官和组织特异性标记物。

[0011] 需要靶向递送至特定组织，包括癌组织，以消除与非特异性递送相关的不期望的副作用。

[0012] 认识到对于特异性地靶向期望的组织的递送载体的迫切需求，本申请的发明人开发了一种基于独特的肽稳定化超小纳米颗粒的药物递送系统，其多功能性使其可用于各种应用。

发明内容

[0013] 根据本发明的一个方面，提供了一种非天然存在的肽 - 脂质纳米支架，其包括至少一种磷脂、至少一种不饱和脂质（优选不饱和固醇酯、进一步优选不饱和胆固醇酯、进一步优选胆固醇油酸酯）和至少一种肽，所述肽包括能够形成至少一个两亲性 α - 螺旋的氨基酸序列；其中使前述成分关联以形成肽 - 磷脂纳米支架。在特别的实施方式中，所述肽选自类别 A、H、L 和 M 两亲性 α - 螺旋、其片段、以及包括类别 A、H、L 和 M 两亲性 α - 螺旋的反向肽序列的肽、或其片段组成的组。

[0014] 优选地，所述肽 - 脂质纳米支架进一步包括至少一种归巢分子。在一个方面，

所述归巢分子可以共价连接至所述至少一种肽（优选地在氨基酸处，特别是赖氨酸，在两亲性 α -螺旋的亲水面与疏水面之间的过渡处或附近）和所述至少一种脂质之一。在另一方面，所述肽-脂质纳米支架包括至少一种活性剂。

[0015] 在一个方面，所述至少一种归巢分子为至少一种活性细胞表面受体配体。

[0016] 根据另外的方面，提供了一种包括本文描述的非天然存在的肽-脂质的药物剂型（配方）。

[0017] 根据另外的方面，提供了一种制备本文描述的非天然存在的肽-脂质纳米支架的方法，包括在适合于形成所述肽-脂质纳米支架的条件下合并（组合，结合）其成分。

[0018] 根据另外的方面，提供了一种非天然存在的肽-脂质纳米支架，包括至少一种磷脂、至少一种不饱和固醇酯（优选不饱和胆固醇酯、进一步优选胆固醇油酸酯）、至少一种肽、至少一种归巢分子和至少一种包括双链 RNA 的活性剂；其中所述活性细胞表面受体配体共价连接至所述至少一种肽，并且使前述成分关联以形成肽-磷脂纳米支架。在一个方面，所述双链 RNA 为 siRNA。

附图说明

[0019] 图 1 本发明的基于肽-稳定化超小纳米颗粒的药物递送系统的实施方式的示意图。

[0020] 图 2 用于并入 HPPS 纳米颗粒中以用于诊断和 / 或治疗应用的化合物。

[0021] 图 3 用于制备 EGFp-(DiR-BOA)-HPPS (类型 1EGFR-靶向的 HPPS) 的合成方案。

[0022] 图 4 用于制备 (DiR-BOA)HPPS (类型 2EGFR-靶向的 HPPS) 的合成方案。

[0023] 图 5 未靶向的 DiR-BOA 加载的 HPPS 的 FPLC、DLS 和 CD。

[0024] 图 6 EGFp (DiR-BOA)-HPPS 的 FPLC 分布和 TEM。

[0025] 图 7 DiR-BOA 加载对 HPPS 大小的影响。A：制剂 #1 和 #2 的 FPLC 分布；B：从 FPLC 收集的部分。C：HPPS 大小与货物有效载荷之间的关联 ($R = 0.91$)。

[0026] 图 8(a) FPLC 分布和 (b) 与 4F 和 -4F 形成的 (DiR-BOA)HPPS 的 TEM。

[0027] 图 9 EGFp (DiR-BOA)-HPPS 的共聚焦成像研究。

[0028] 图 10 通过流式细胞术的 EGFp (DiR-BOA)-HPPS 的时间-依赖性摄取。

[0029] 图 11 EGFp (DiR-BOA)HPPS 的抑制研究。

[0030] 图 12 EGFp (DiR-BOA)-HPPS 的体内成像研究。

[0031] 图 13 通过流式细胞术的 EGFp-脂质 (DiR-BOA)HPPS 在 A549 与 H520 细胞中的时间依赖性摄取。

[0032] 图 14 在具有不同水平的 EGFR 表达的细胞系中 EGFp-脂质 (DiR-BOA)HPPS 的时间-依赖性摄取的流式细胞术研究。

[0033] 图 15 通过 EGFp 的 EGFp (DiR-BOA)HPPS 和 EGFp-脂质 (DiR-BOA)HPPS 的摄取抑制的流式细胞术研究。

[0034] 图 16 通过 MTT 和流式细胞术研究的 EGFp-脂质 (DiR-BOA)HPPS 的初步毒性研究。a) 通过 MTT 分析研究的细胞存活能力显示在甚至 6 倍的 HPPS 对照处（在所有先前的体外研究中使用的标准剂量）没有毒性；b) 通过流式细胞术研究的细胞存活能力显

示在 6 倍的 HPPS 对照处没有毒性；c) 通过流式细胞术研究的 HPPS 细胞摄取显示在 2 倍的 HPPS 对照处（标准剂量）摄取饱和。

[0035] 图 17 具有 EGFp- 脂质 (DiR-BOA) HPPS (i.v.) 的 MT1 肿瘤异种移植物的体内成像。箭头指示肿瘤。

[0036] 图 18 在具有人类肺原发肿瘤异种移植物的老鼠中 EGFp- 脂质 (DiR-BOA) HPPS 的体内成像，表明 EGFR- 靶向特异性。

[0037] 图 19 利用 KB (叶酸受体阳性) 和 HT1080 (叶酸受体阴性) 癌细胞中的叶酸受体-靶向的 HPPS 的共聚焦成像研究。注意：绿色来自 DiR-BOA 荧光，而蓝色来自 DAPI 核染色)。

[0038] 图 20 多成分荧光标记。HPPS 颗粒的每种成分 (肽、磷脂、核心货物) 可以用荧光标签标记用于详细的颗粒表征和颗粒降解的评估。

[0039] 图 21 (a) IdlA (mSR-B1) 和 LdLA7 细胞的 SR-B1 受体含量的蛋白质印迹分析。

[0040] (b) (DiR-BOA) HPPS 对于 SR-B1 受体的特异性。共聚焦图像显示 (DiR-BOA) HPPS 在 SR-B1 阳性细胞 (IdlA (mSR-B1)) 中的强摄取，但是在 SR-B1 阴性细胞 (LDLA7) 中不存在。此外，过量的 HDL 有效地抑制 IdlA (mSR-B1) 细胞中的 (DiR-BOA) HPPS 摄取，但是对于 LDLA7 中的摄取没有影响。

[0041] 图 22 利用 FITC- 脂质 (DiR-BOA) HPPS 和 FITC-(-4F) (DiR-BOA) HPPS 和 IdlA (mSR-B1) 细胞的共聚焦成像研究。

[0042] 图 23 利用 FITC-(-4F) (DiR-BOA) HPPS 和 IdlA (mSR-B1) 细胞的共聚焦成像研究。

[0043] 图 24 流式细胞术研究用于评估 SR-B1⁺ 和 SR-B1⁻ 细胞系中 (DiR-BOA) HPPS 的摄取。

[0044] 图 25 流式细胞术研究用于评估 SR-B1⁺ 细胞系中 (DiR-BOA) HPPS 浓度-依赖性的摄取。

[0045] 图 26 流式细胞术研究用于评估 SR-B1⁺ 细胞系中 (DiR-BOA) HPPS 摄取的 HDL 浓度-依赖性的抑制。

[0046] 图 27 流式细胞术研究用于评估 SR-B1⁺ 和 SR-B1⁻ 细胞系中 (DiR-BOA) HPPS 的差异摄取和 SR-B1⁺ 细胞系中 (DiR-BOA) HPPS 摄取被 HDL 的抑制。

[0047] 图 28 流式细胞术用于评估 (-4F) (DiR-BOA) HPPS 与 (4F) (DiR-BOA) HPPS 被 IdlA (mSR-B1) 细胞的摄取。

[0048] 图 29 在具有人类 KB (SR-B1⁺) 肿瘤异种移植物的裸鼠上进行体内成像以研究 -4F (DiR-BOA) HPPS 的定位。

[0049] 图 30 (a) 进行共聚焦研究以评估 (-4F) EGF (DiR-BOA) HPPS 和 (-4F) (DiR-BOA) HPPS 在 A549 和 H520 细胞中的差异摄取。

[0050] (b) A549 和 H520 细胞的表面受体分布的蛋白质印迹分析。

[0051] 图 31 使用流式细胞术来评估 (DiR-BOA) HPPS 和 EGF (DiR-BOA) HPPS (1.0 μ M) 被 H520、A549 和 EGFR-GFP-A549 细胞的摄取。

[0052] 图 32 在转染有 EGFR- 绿色荧光蛋白 (GFP) 的融合基因的 LDLA7 细胞中进行 EGF-HPPS 研究。该实验去除 SR-B1 可能对 EGF-HPPS 的细胞摄取具有的任何贡献。在

用 (-4F) EGF (DiR-BOA) HPPS 孵育 3 小时后, EGFR-GFP-LDLA7 细胞呈现出细胞溶质内的 DiR-BOA 的强信号, 表明 EGF-HPPS 通过 EGFR 的急切摄取。对于 EGFR 的 GFP 信号在外质膜上被可视化。

[0053] 图 33 进行共聚焦研究以评估 HDL 对 (-4F) EGF (DiR-BOA) HPPS 在 EGFR-GFP-LDLA7 细胞中的摄取的作用。

[0054] 图 34 用 EGF (DiR-BOA) HPPS 孵育的 EGFR-GFP-A549 和 H520 细胞的共聚焦成像。

[0055] 图 35 进行共聚焦研究以评估 HDL 对 (-4F) EGF (DiR-BOA) HPPS 在 A549 和 H520 细胞中的摄取的作用。

[0056] 图 36 在具有双肿瘤 (A549 和 H520) 的裸鼠上进行体内成像以确定 (-4F) EGF (DiR-BOA) HPPS 的靶向能力。

[0057] 图 37 (-4F) EGF (DiR-BOA) HPPS 的体内确认。体内成像 (A) 和生物分布 (B) 显示 HPPS 的改善的递送特异性和效能。C) HPPS 匹配 HDL 的长循环时间 ($t_{1/2}$ 214h)。D) HPPS 荧光信号 (DiRBOA) 在肿瘤组织中的积聚匹配肿瘤细胞荧光 (转染有红色荧光蛋白)。

[0058] 图 38 KB 肿瘤和 H520 肿瘤中 (-4F) EGF (DiR-BOA) HPPS 的细胞摄取。白色条代表每 mg 组织的荧光单位, 而黑色条代表每百万个细胞的荧光单位。数据反映了来自两个具有肿瘤的小鼠的平均值。

具体实施方式

[0059] 图 1 示出了本发明的实施方式。具体地, 图 1 示出了基于肽-稳定化超小纳米颗粒的药物递送系统, 称为“HPPS”(高密度脂蛋白样肽-磷脂支架), 其允许用于检测和治疗癌症和其它疾病的活性剂的靶向递送。所述 HPPS 纳米颗粒包括三种成分: 1) 特异性两亲大小-对照肽 (scPep) 和磷脂, 其形成超小纳米载体 (5 至 25nm), 2) 疾病-特异性靶向配体, 其可以被直接结合至纳米载体上的 scPep、结合至纳米载体上的表面磷脂、或者疾病-特异性靶向配体如蛋白质或其片段, 其可以被并入所述纳米载体中而无需结合至 scPep 或磷脂 (图 1 中未示出), 以及 3) 诊断或治疗剂, 加载在所述纳米载体核心内或并入所述纳米载体内使得它们被显示在纳米载体的表面上。为了形成优选的球状纳米颗粒, 饱和和固醇酯也被合并在其中。多种靶向可以通过将一些靶向配体, 如肿瘤-归巢分子 (例如, 叶酸), 结合至暴露在肽的表面的可结合的氨基酸如赖氨酸残基来实现。HPPS 纳米颗粒因此靶向癌症和 / 或特定组织的期望的细胞表面标记物处, 即, 在各种类型的癌细胞或组织中选择性过度表达的分子。在特定的实施方式中, HPPS 纳米颗粒提供了活性剂, 包括但不限于, 诊断剂、成像剂 (显像剂, 显影剂) 和 / 或治疗剂的靶向递送。

[0060] 这样的试剂包括, 但不限于, 磁共振成像 (MRI) 剂、近红外荧光 (NIRF) 探针和光动力学治疗 (PDT) 剂。

[0061] 在特定的实施方式中, HPPS 脂质核心内的胆固醇酯被亲脂性药剂代替。在另外的实施方式中, 活性剂连接至本发明的 HPPS 纳米颗粒的表面。

[0062] 因此, MRI/NIRF 探针在靶细胞中的积聚提供了一种用于 MRI/NIRF 可检测信号

的扩大的容易的机制并提供了结合 MRI(高分辨率/解剖)和 NIRF(高敏感性)的强度的机会,而经由这些途径将 PDT 剂选择性地递送至肿瘤也提供了检测与治疗之间的容易的过渡。最后, HPPS 纳米颗粒不期待是免疫原性的,并应当避免被网状内皮系统识别,因此 HPPS 平台提供了一种与大多数合成纳米装置相关的常见问题,即生物相容性和毒性的解决方案。

[0063] 术语“纳米颗粒”、“纳米平台”和“纳米支架”在本文中可互换地使用。

[0064] 本发明提供了包括脂质如磷脂酰胆碱(如 DMPC(优选 1, 2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱)、POPC(1-棕榈酰-1-油酰基-磷脂酰胆碱)和 EYPC(卵黄磷脂酰胆碱))、溶血磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、和磷脂酰肌醇的 HPPS 纳米颗粒。

[0065] 天然存在的脂蛋白颗粒每个具有特有的脱辅基蛋白、以及一定百分比的蛋白、三酰甘油、磷脂和胆固醇。VLDL 颗粒可以包含约 10%蛋白、约 60%三酰甘油、约 18%磷脂和约 15%胆固醇。LDL 颗粒可以包含约 25%蛋白、约 10%三酰甘油、约 22%磷脂和约 45%胆固醇。HDL 颗粒可以包含约 50%蛋白、约 3%三酰甘油、约 30%磷脂和约 18%胆固醇。同样地,本发明的 HPPS 纳米颗粒包含不同百分比的上述组分。HPPS 纳米颗粒还可以包含一个或多个三酰甘油。HPPS 纳米颗粒可以另外包含固醇、固醇酯、或其组合。在另外的实施方式中,固醇或固醇酯选自胆固醇、胆固醇油酸酯和不饱和胆固醇-酯组成的组。

[0066] 在特定的实施方式中,本发明的 HPPS 纳米颗粒包含靶向在癌细胞中过度表达的受体的细胞表面受体配体。在另外的实施方式中,本发明的 HPPS 纳米颗粒包含作为对于心血管斑块中过度表达的受体的配体的细胞表面受体配体。

[0067] 在另外的实施方式中,本发明的 HPPS 纳米颗粒包含靶向特定组织上的受体的细胞表面受体配体。

[0068] 在一些实施方式中,本发明的 HPPS 纳米颗粒包含在 HPPS 纳米颗粒的核心内的亲脂性化合物。

[0069] 在一些实施方式中,本发明的 HPPS 纳米颗粒包含(部分)位于 HPPS 纳米颗粒的表面上的活性剂,所述活性剂是包含亲脂性和亲水性成分分子。

[0070] 在特定的实施方式中,本发明的 HPPS 纳米颗粒包含作为诊断剂、成像剂或治疗剂的活性剂。优选地,所述成像或诊断剂为对比剂、放射性标记和/或荧光标记。

[0071] 在一些实施方式中,本发明的 HPPS 纳米颗粒包含抗癌剂。这样的活性剂可以为化疗剂、光动力学治疗剂、硼中子俘获治疗剂或用于放射治疗的放射性核。在实施方式中,所述抗癌剂选自烷基化剂(烷化剂)、蒽环类药、抗生素、芳香酶抑制剂、双磷酸盐类、环加氧酶抑制剂、雌激素受体调节剂、叶酸拮抗剂、无机砷酸盐、微管抑制剂、修饰剂、亚硝基脲(nitrosureas)、核苷类似物、破骨细胞抑制剂、含铂化合物、类维生素 A、拓扑异构酶 1 抑制剂、激酶抑制剂(诸如,但不限于酪氨酸激酶抑制剂)、抗血管生成剂、表皮生长因子抑制剂和组蛋白脱乙酰基酶(脱乙酰基转移酶)抑制剂组成的组。

[0072] 在另外的实施方式中,本发明的 HPPS 纳米颗粒包含选自抗青光眼药、抗凝剂、消炎药、平喘药、抗生素、抗真菌药或抗病毒药组成的组中的治疗剂。

[0073] 在另外的实施方式中,本发明的 HPPS 纳米颗粒包含选自以下的组中的治疗剂,

所述组包括，但不限于：止痛剂、麻醉剂、抗心绞痛剂、抗风湿剂、抗心律失常剂、平喘剂、抗菌剂、抗-BPH剂、抗癌剂、抗胆碱剂、抗凝血剂、抗惊厥剂、抗抑郁剂、抗糖尿病剂、止泻剂、抗癫痫剂、抗真菌剂、抗痛风剂、抗驱虫剂、抗组胺剂、抗高血压剂、消炎剂、抗疟剂、抗偏头痛剂、抗毒蕈碱剂、止恶心剂、抗肿瘤剂、抗肥胖剂、抗骨质疏松剂、抗帕金森病剂、抗原虫剂、止痒剂、抗精神病剂、退热剂、止痉挛剂、抗甲状腺剂、抗结核剂、止咳剂、抗溃疡剂、抗尿失禁剂、抗病毒剂、抗焦虑剂、食欲抑制剂、注意力缺陷障碍（ADD）和注意力缺陷多动症（ADHD）药、钙通道阻滞剂、心变力剂、 β -阻滞剂、细胞粘附抑制剂、中枢神经系统兴奋剂、认知增强剂、皮质类固醇、COX-2抑制剂、细胞因子受体活性调节剂、解充血剂、利尿剂、勃起功能异常改善剂、必需脂肪酸、肠胃剂、遗传物质、组胺受体拮抗剂、hormonolytics、安眠药、降血糖剂、免疫抑制剂、keratolyses、白三烯抑制剂、脂质-调节剂、大环内酯类、有丝分裂抑制剂、肌肉松弛剂、麻醉药拮抗剂、神经安定剂、尼古丁、硝酸盐类、非必需脂肪酸、非固醇类平喘剂、营养油、类鸦片镇痛药、副交感神经阻滞剂、镇静剂、性激素、兴奋剂、类交感神经剂、镇定剂、血管扩张剂、维生素、以及它们的组合。

[0074] 本发明还提供了包括本发明的 HPPS 纳米颗粒的药物剂型。

[0075] 本发明进一步提供了制备 HPPS 纳米颗粒的方法。

[0076] 脂蛋白颗粒

[0077] 脂蛋白颗粒为一类天然存在的纳米结构。胆固醇和三酰甘油在体液中以脂蛋白颗粒的形式被转运。每个颗粒包括由更极性的脂质和蛋白的壳包围的疏水性脂质的核心。这些大分子的积聚体的蛋白成分具有两个作用：它们溶解疏水性脂质并且包含细胞-靶向信号。脂蛋白颗粒根据增加的密度被分为：乳糜微粒、乳糜微粒残余物、极低密度脂蛋白（VLDL）、中间-密度脂蛋白（IDL）、低-密度脂蛋白（LDL）、和高密度脂蛋白（HDL）（参见表 1）。因此，它们中的每个的大小不同，并且除了乳糜微粒和乳糜微粒残余物，它们中的大多数具有纳米结构（ $< 100\text{nm}$ ）。

[0078] 表 1. 脂蛋白的大小和类别

[0079]

脂蛋白	主要核心脂质	脱辅基蛋白	大小
乳糜微粒	饮食三酰甘油，胆固醇酯	B-48, C, E	75-1200 nm
VLDL	内源性三酰甘油	B-100, C, E	30-80 nm
IDL	内源性胆固醇酯	B-100, E	25-35 nm
LDL	内源性胆固醇酯	B-100	18-25 nm
HDL	内源性胆固醇酯	A, C, E	8-12 nm

[0080] 低密度脂蛋白（LDL）颗粒

[0081] LDL 是人血浆中胆固醇的主要载体，并经由 LDLR（低密度脂蛋白受体）通过胞吞作用将外源性胆固醇递送到细胞。LDL 颗粒是通常具有约 22nm 直径的天然存在的纳米结构。它包含一些 1500 酯化胆固醇分子和甘油三酯的脂质核心。磷脂和未酯化的胆固醇的外壳包围该高度疏水的核心。所述外壳还包含被 LDLR 识别的单一拷贝的 apoB-100（分

子量 550kDa)。

[0082] 高密度脂蛋白 (HDL) 颗粒

[0083] 血浆 HDL 是作为大约一半脂质和一半蛋白质的较小的、球状、致密的脂蛋白复合体。脂质成分由磷脂、游离胆固醇、胆固醇酯、和甘油三酯组成。蛋白质成分包括 apo A-I (分子量, 28,000 道尔顿) 和 apo A-II (分子量, 17,000 道尔顿)。其它较小但是重要的蛋白质为 apo E 和 apo C, 包括 apo C-I、apo C-II、和 apo C-III。

[0084] HDL 颗粒是异质的。它可以被分为较大、较小致密的 HDL2 或较小、更致密的 HDL3。通常, 大多数血浆 HDL 在 HDL3 中被发现。HDL 每个颗粒由 4 个载脂蛋白构成。HDL 可以由 apo A-I 和 apo A-II 构成或仅由 apo A-I 构成。HDL2 主要仅是 apo A-I, 而 HDL3 由 apo A-I 和 apo A-II 制成。比 HDL2 更少致密的 HDL 颗粒富含 apoE。

[0085] HPPS 纳米颗粒

[0086] 因此, 本发明提供了可以由多种不同的肽支架制成的具有不同尺寸的一系列纳米平台。下面描述适于生产 HPPS 纳米颗粒的肽成分。

[0087] HPPS 纳米颗粒可以靶向多种受体。此外, 在一些实施方式中, HPPS 疏水核心和磷脂单层均可以被修饰以携带诊断和 / 或治疗剂的较大的有效载荷, 使得它们成为特别多功能的纳米平台。在一些实施方式中, 本发明的 HPPS 纳米颗粒包含一个或多个归巢分子。所述 HPPS 纳米颗粒还可以携带一种或多种活性剂的有效载荷。HPPS 纳米颗粒还可以包含细胞死亡传感器, 使得 HPPS 纳米颗粒可以同时进行诊断、处理以及治疗反应监测功能。

[0088] 本发明提供了基于具有如下描述的特定性能的肽的非天然存在的纳米平台。术语“非天然存在的”是指不是固有地存在于人体内的纳米平台。这样的非天然存在的 HPPS 纳米颗粒可以包含一种或多种天然存在的脂蛋白颗粒的成分。例如, 存在于天然存在的 LDL 和 HDL 颗粒的核心中的胆固醇酯可以被活性剂替换。同样地, 如在天然存在的脂蛋白颗粒中发现的核心可以保持完整, 但是活性剂被连接于 HPPS 纳米颗粒的表面。

[0089] 在一些实施方式中, 对于 HPPS 纳米颗粒用于靶向递送存在几个不同的优点。在一些实施方式中, 本发明的 HPPS 纳米颗粒的一个优点是它们被预期与宿主免疫系统完全相容, 并且它们也是生物可降解的。它们还可以提供用于大量诊断或治疗剂的积聚的回收系统, 所述诊断或治疗剂用于利用受体介导的胞吞作用的靶向细胞。本发明的 HPPS 纳米颗粒不被预期是免疫原性的, 并且应当逃避被网状内皮系统 (RES) 识别。

[0090] 其它优点可以包括: 1) 本发明的 HPPS 纳米颗粒与生理载体具有的相似之处在于它们均具有理想的尺寸范围, 该尺寸范围足够大以避免肾清除率, 但足够小以减少网状内皮系统 (RES) 摄取, 因此药物 / 探针的血清半衰期可以通过并入这些纳米颗粒中被延长; 2) 药物 / 探针停留在脂质核心空间提供了保护以免受血清酶和水; 3) HPPS 纳米颗粒的阵列的可利用性提供了具有 5nm 到 80nm 范围的大小的一系列纳米平台。

[0091] 优选地, 本发明的非天然存在的 HPPS 纳米颗粒的直径是 (以增加的优选性): 5nm 到 50nm, 5nm 到 40nm; 5nm 到 30nm, 5nm 到 25nm; 5nm 到 20nm, 以及 10nm 到 15nm。

[0092] HPPS 纳米颗粒的起始物质还包含在例如所述颗粒的外层上的至少一种脂质。可用在本发明的 HPPS 纳米颗粒中的脂质包括, 但不限于, 两亲性脂质。可用在本发明中

的磷脂包括,但不限于,磷脂酰胆碱(优选 DMPC(1, 2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱、POPC(1-棕榈酰-1-油酰基-磷脂酰胆碱)和 EYPC(卵黄磷脂酰胆碱))、溶血磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇以及它们的组合。

[0093] 支架肽

[0094] 用于形成所述 HPPS 纳米颗粒的合适的支架肽包括能够形成至少一个两亲性 α -螺旋的氨基酸序列。

[0095] 在优选的实施方式中,所述两亲性 α -螺旋或肽的长度(以增加的优选性)在 6-30 个氨基酸、8-28 个氨基酸、10-24 个氨基酸、11-22 个氨基酸、4-21 个氨基酸、16-20 个氨基酸和 18 个氨基酸的范围内。

[0096] 用于检测和表征具有假定的两亲性螺旋结构的蛋白结构域的方法陈述在 Segrest, J.P. et al. in *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics* (1990) 8: 103-117 中,将其内容以引用方式并入本文。Segrest 等人已经鉴定了七种不同类别的两亲性螺旋并鉴定了与每个类别相关的肽/蛋白质。在七种不同的类别中,存在四个脂质-相关两亲性螺旋类别(A、H、L 和 M)。其中,类别 A,指定的载脂蛋白类别,具有用于形成基于磷脂的颗粒的最佳性能。

[0097] 合适的支架肽可以选自由类别 A、H、L 和 M α -螺旋或其片段组成的组。合适的支架肽还可以包括类别 A、H、L 和 M 两亲性 α -螺旋的反向肽序列或其片段,因为形成两亲性 α -螺旋的性能通过所述肽序列内氨基酸残基的相对位置确定。

[0098] 在一个实施方式中,所述支架肽具有包括脱辅基蛋白的连续氨基酸的氨基酸序列,优先选自由 apoB-100、apoB-48、apoC、apoE 和 apoA 组成的组。

[0099] 本发明中所用的“氨基酸”,以及如在说明书和权利要求书中所用的术语,包括已知天然存在的蛋白质氨基酸,其通过它们常见的的三字母缩写和单字母缩写被提及。通常参见 *Synthetic Peptides: A User's Guide*, G A Grant, editor, W.H. Freeman & Co., New York, 1992, 将其教导以引用方式并入本文,包括第 11 页到第 24 页陈述的正文和表。如上所述,术语“氨基酸”还包括天然存在的蛋白质氨基酸的立体异构体和修饰物、非-蛋白质氨基酸、翻译后修饰的氨基酸、酶促合成的氨基酸、衍生的氨基酸、设计为模拟氨基酸的构建物或结构等。修饰的和罕见的氨基酸通常描述在 *Synthetic Peptides: A User's Guide*, cited above; Hruby V J, Al-obeidi F and Kazmierski W: *Biochem J* 268: 249-262, 1990; and Toniolo C: *Int J Peptide Protein Res* 35: 287-300, 1990 中;将其全部教导以引用方式并入本文。

[0100] “ α 螺旋”在本文中用来指蛋白质的二级结构中常见的基序。 α -螺旋是卷曲的构象,类似于弹簧,其中每个骨架 N-H 基团向早期的氨基酸四个残基的骨架 C=O 基团贡献氢键。典型地,由天然存在的氨基酸形成的 α -螺旋将是右旋的,但是左旋构象也是已知的。

[0101] “两亲的”是描述具有亲水性和疏水性性能的化合物的术语。两亲性 α -螺旋通常是生物活性肽和蛋白质中通常遇到的二级结构基序,并指的是具有沿着螺旋的长轴定向的相对的极性和非极性面的 α -螺旋。

[0102] 具有许多 apoA-I 的脂质结合性能的较小的两亲性螺旋肽的实例包括 2F,具有两个苯丙氨酸氨基酸残基的 18-氨基酸肽序列(D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K

-E-A-F) (Ananthaaramaiah et al.JBC.1985 ; 260 : 10248-10255)。早期研究表明这个序列显示出强脂质结合并且能够形成稳定的盘状磷脂颗粒。随后的研究继续表明两个另外的 F 残基的并入 (总共 4F ; D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F), 进一步提高所述肽的脂质结合性能 (Ananthaaramaiah et al.Arterioscler Thromb Vasc Biol.2005 ; 25 : 1325-1331)。

[0103] 归巢分子

[0104] 如本文所用的, 术语“归巢”或“选择性归巢”是指特定分子在给予受试者后相对特异地结合至特定器官或组织中存在的分子。通常, 选择性归巢的特征部分在于, 检测比对照器官或组织至少两倍更大的所述分子与器官或组织的选择性结合。在一些实施方式中, 选择性结合比对照器官或组织至少三倍或四倍更大。

[0105] 在肿瘤归巢分子的情况中, 这样的分子结合到在特定的癌组织中选择性过度表达的受体。过度表达是指在肿瘤组织中的表达比正常组织多至少一倍和一倍半。在实施方式中, 与非肿瘤相比, 肿瘤中的表达多至少五倍。

[0106] 在本发明的实施方式中, 归巢分子连接于靶向特定组织和肿瘤的本发明的 HPPS 纳米颗粒的肽。“归巢分子”指的是可以促进本发明的组合物体外或体内靶向组织和/或受体的任何材料或物质。所述靶向部分可以是合成的、半合成的、或天然存在的。所述靶向部分可以为蛋白质、肽、寡核苷酸、或其它有机分子。在一个实施方式中, 所述靶向部分可以为到达细胞表面受体的内源性配体(或其部分)。所述靶向部分可以为抗体(该术语包括保持结合区或高变区的抗体片段和单链抗体)。可以用作靶向部分的材料或物质包括, 但不限于, 表 2 中列出的那些物质:

[0107] 表 2

[0108]

靶向部分	靶
抗体（以及片段如 Fab、F(ab)'2、Fv、Fc 等）	RES 系统
表皮生长因子（EGF）	细胞受体
胶原蛋白	细胞受体
明胶	细胞受体
血纤蛋白-结合蛋白	血纤蛋白
纤溶酶原活化剂	血栓
尿激酶抑制剂	侵袭性细胞
抑生长素类似物	细胞受体
凝集素（WGA）	轴突
f-Met-Leu-Phe	嗜中性白细胞
选择蛋白活性片段	糖基结构
ELAM, GMP 140	白细胞受体
“RGD” 蛋白	整联蛋白、粒细胞
IL-2	活化的 T 细胞
CD4	HIV 感染的细胞
阳离子化的白蛋白	成纤维细胞
肉碱	线粒体
乙酰基-、马来酰基-蛋白	巨噬细胞清除受体
透明质酸	细胞受体
乳糖神经酰胺	肝细胞

[0109]

无唾液酸胎球蛋白	肝细胞
阿拉伯半乳聚糖	肝细胞
半乳糖基化的颗粒	枯否细胞
末端岩藻糖	枯否细胞
甘露糖	枯否细胞、巨噬细胞
乳糖	肝细胞
二胞壁酰基-三肽	枯否细胞、巨噬细胞
岩藻多糖-葡聚糖硫酸酯	枯否细胞、巨噬细胞
硫脑苷脂	脑
糖基-类固醇	
鞘糖脂	其它糖基化的结构
缺氧介质	梗塞的组织
苯丙胺	神经系统
巴比妥酸盐	神经系统
磺胺类药	
单胺氧化酶抑制剂底物	脑
趋化性肽	炎症部位
毒蕈碱和多巴胺受体底物	神经系统

[0110] 肿瘤归巢分子

[0111] 肿瘤归巢分子选择性地结合至肿瘤组织与相同类型的正常组织。这样的分子通常是在肿瘤组织中过度表达的细胞表面受体的配体。在肿瘤组织与正常组织中过度表达的细胞表面受体包括，但不限于，在未分化甲状腺癌、结肠直肠癌、头和颈癌、卵巢癌、肾细胞癌、以及乳腺和肺肿瘤中过度表达的表皮生长因子受体 (EGFR)；在乳头状甲状腺癌中过度表达的转移抑素受体；在乳腺癌的重要亚类中过度表达的 ErbB 家族受体酪氨酸激酶；在乳腺癌中过度表达的人类表皮生长因子受体-2 (Her2/neu)；在肉瘤样肾癌中过度表达的酪氨酸激酶受体 (c-Kit)；在食道腺癌中过度表达的 HGF 受体 c-Met；在乳腺癌中过度表达的 CXCR4 和 CCR7，；在前列腺癌中过度表达的内皮素 (内皮缩血管肽)-A 受体；在大多数结肠直肠癌肿瘤中过度表达的过氧化物酶体增生物活化的受体 δ (PPAR- δ)；在卵巢癌中过度表达的 PDGFR A；在各种肺癌中过度表达的 BAG-I；在胰腺癌中过度表达的可溶的 II 型 TGF β 受体；叶酸；以及整联蛋白 (如 $\alpha_v\beta_3$)。

[0112] 叶酸受体是具有对于维生素叶酸高亲和性 (K_d 约 $10^{-9}M$) 的糖基磷脂酰肌醇 - 锚定的糖蛋白 (Leamon, CP.et al., BiochemicalJournal.1993 May 1 ; 291 (Pt.3) : 855-60)。叶酸受体已经被鉴定为肿瘤 - 标记物，其在上皮恶性肿瘤 (如卵巢癌、结肠直肠癌和乳腺癌) 上相对于正常组织以提高的水平表达 (Wang, S.et al., Journal ofControlled Release.1998 Apr 30 ; 53(1-3) : 39-48)。已经表明当叶酸经由其 g- 羧基部分共价连接至单一分子或分子的集合时，其对于细胞表面受体的亲和力仍然基本不变。在胞吞作用和囊泡转运后，许多物质被释放到细胞胞质中。未连接的叶酸受体可以随后再循环到细胞表面；因此，每个叶酸受体可以将许多叶酸结合物带入细胞中。

[0113] 器官或组织归巢分子

[0114] 本发明提供了选择性归巢到多种器官或组织的分子的应用，所述器官或组织包括肺、皮肤、血液、胰腺、视网膜、前列腺、卵巢、淋巴结、肾上腺、肝脏、乳腺、消化系统或肾脏组织。例如，本发明提供了使用肺归巢肽，如包含 GFE 基序的那些，包括肽 CGFECVRQCPCRC 和 CGFELETC；皮肤归巢肽如 CVALCREACGEGC；胰腺归巢肽如肽 SWCEPGWCR；以及视网膜归巢肽如包含 RDV 基序的那些，包括肽 CSCFRDVCC 和 CRDVVSVC。

[0115] 本发明还提供了通过给予包括归巢到具有或怀疑有病状的受试者的选择的器官或组织的分子的 HPPS，利用本发明的器官归巢分子来诊断或治疗肺、皮肤、胰腺、视网膜、前列腺、卵巢、淋巴结、肾上腺、肝脏或肠的病状的方法。例如，肺、皮肤、胰腺、视网膜、前列腺、卵巢、淋巴结、肾上腺、肝脏或肠的病状可以通过给予具有所述病状的受试者包含连接到治疗剂的适当的器官归巢分子的 HPPS 纳米颗粒。类似地，通过给予受试者包含连接到可检测的药剂的适当的器官归巢分子的 HPPS 纳米颗粒鉴定选择的器官或组织或诊断选择的器官中的病状的方法。

[0116] 本发明的 HPPS 纳米颗粒可以与器官和组织归巢分子一起使用以使部分靶向到选择的器官或组织。本发明中使用的归巢分子包括归巢到各种正常器官或组织的肽，所述器官包括肺、皮肤、胰腺、视网膜、前列腺、卵巢、淋巴结、肾上腺、肝脏或肠，以及归巢到具有肿瘤的器官，包括具有肺肿瘤的肺和具有胰腺肿瘤的胰腺。例如，本发明包括使用肺归巢肽，包括肽 CGFECVRQCPCRC 和 CGFELETC，其每一个包含三肽 GFE 基序，以及肽 GIGEEVC。本发明还包括使用皮肤归巢肽如肽 CVALCREACGEGC；胰腺归巢肽，如肽 SWCEPGWCR 和视网膜归巢肽如肽 CSCFRDVCC 和 CRDVVSVC，其每一个包含三肽 RDV 基序。也提供了归巢到前列腺、卵巢、淋巴结、肾上腺、肝脏和肠的肽的实例（参见下面的表 3）。在一个实施方式中，归巢分子可以为 EGFR- 特异性肽，如全长 EGF 蛋白 (EGF) 或其片段。

[0117] 为了方便，术语“肽”在本文中概括地用来指代肽、多肽、蛋白质和蛋白质的片段，并且包括，例如，单链肽。本发明中使用的其它分子包括类肽、肽模拟物等。关于本发明的器官或组织归巢肽，肽模拟物，其包含化学修饰的肽、包含非天然存在的氨基酸的肽样分子、类肽等，具有肽模拟物来源地器官归巢肽的结合活性（参见，例如，“Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery” 5th ed., vols.1 to 3 (ed.M.E.Wolff; Wiley Interscience 1995)，将其通过引用方式并入本文中）。肽模拟物相对于肽提供了多个优点，包括肽模拟物在给予受试者时，例如在通过消化道期间是稳定的，因此，可用于口服给药。

[0118] 用于鉴定肽模拟物的方法在本领域中是熟知的，并且包括，例如，筛查包含潜在的肽模拟物的文库的数据库。例如，CambridgeStructural Database 包含多于 300,000 个具有已知的晶体结构的化合物的收集物 (Allen et al., Acta Crystallogr. Section B, 35: 2331 (1979))。该结构存放处在新的晶体结构被测定时持续更新，并且可以筛查具有合适的形状的化合物，例如，与器官或组织归巢分子相同形状的化合物，以及潜在的几何和化学互补于由器官或组织归巢分子束缚的靶分子的化合物。当没有归巢肽或靶分子（其结合器官或组织归巢分子）的晶体结构可获得时，可以利用，例如程序

CONCORD (Rusinko et al., J.Chem.Inf.Comput.Sci.29 : 251 (1989)) 产生结构。另一数据库, Available Chemicals Directory (Molecular Design Limited, Informations Systems ; San Leandro Calif.), 包含约 100,000 个商业上可获得的化合物, 并且还可以被检索以鉴定器官或组织归巢分子的潜在肽模拟物。

[0119] 分子的选择性归巢到选择的器官或组织可以是由于通过器官或组织中的细胞上存在的特定细胞靶分子的分子如细胞表面蛋白的选择性识别。归巢的选择性取决于在仅仅一种或几种不同的细胞类型上表达的特定靶分子, 使得所述分子归巢到仅仅一个或几个器官或组织。在这方面, 大多数不同的细胞类型, 特别是对于器官或组织独特的细胞类型, 可以表达独特的靶分子。

[0120] 已经被鉴定为可用于归巢到特定器官或组织的肽基序的实例包括表 3 中列出的那些。

[0121] 表 3

[0122]

器官/基序	
肠 YSGKWGK GISALVLS SRRQPLS MSPQLAT VRRGSPQ MRRDEQR QVRRVPE GGRGSWE FRVRGSP RVRGPER	前列腺 SMSIARL VSFLEYR RGRWLAL
肝脏 VKSVCRT WRQNMPL SRRFVGG ALERRSL ARRGWTL	肾上腺 LMLPRAD LPRYLLS
胰腺 SWCEPGWCR	卵巢 EVRSRLS VRARLMS RVGLVAR RVRLVNL
皮肤 CVALCREACGEGC CSSGCSKNCLEMC CIGEEVC CKWSRLHSC CWRGDRKIC CERVVGSSC CLAKENVVC	肺 CTLRDRNC CGKRYRNC CLRPYLNC CGFELETC CTVNEAYKTRMC CRLRSYGTLSC CRPWHNQAHTC CGFECVRQCPERC

[0123] 本发明包括肺归巢肽的应用，如 CGFECVRQCPERC 和 CGFELETC，其分享 GFE 基序；CTLRDRNC；以及 CIGEEVC，其包含类似于 CGFELETC 中存在的 ELE 基序的 EVE 基序。

[0124] 优选地，本发明还可以使用皮肤归巢肽如 CVALCREACGEGC。本发明进一步提供了具有胰腺归巢肽如 SWCEPGWCR 的 HPPS 纳米颗粒。视网膜归巢肽如 CSCFRDVCC 和 CRDVVSVC 也可以与本发明的 HPPS 纳米颗粒一起使用。前列腺归巢肽如 SMSIARL 和 VSFLEYR 也可以与本发明的 HPPS 纳米颗粒一起使用。还提供了卵巢归巢肽如 RVGLVAR 和 EVRSRLS。本发明还可以使用肾上腺归巢肽如分享 LPR 基序的 LMLPRAD 和 LPRYLLS，或分享基序 LAGG 的肽 R(Y/F)LLAGG 和 RYPLAGG。此外，淋巴结归巢肽，如 AGCSVTVC 可以与本发明一起使用。本发明还可以使用肠归巢肽如 YSGKWGK 和 YSGKWGW。

[0125] 心血管斑块归巢分子

[0126] 动脉粥样硬化斑块已知过度表达一些受体，如 CX3CL1。本发明因此包括对于在这样的斑块上过度表达的受体的配体。

[0127] 感染的组织归巢分子

[0128] 感染有各种感染性试剂如病毒、寄生虫、和 / 或细菌（如，HIV、疟疾 ... 等）的组织通常表达（或过度表达）细胞表面标记物 / 受体（如，蛋白质）。因此本发明的归巢分子包括对于在这样的感染的组织上表达的所述细胞表面标记物 / 受体的配体。

[0129] 活性剂

[0130] 将活性剂修饰和包装入 LDL 的方法由 Krieger, M. 在 MethodsEnzymol. (1986) 128 : 608-13 中描述，在这方面将其内容以引用方式并入本文。类似的方法可以与本发明一起使用。

[0131] 亲脂性化合物

[0132] 各种活性剂可以经由本发明的 HPPS 纳米颗粒递送。在实施方式中，活性剂位于 HPPS 纳米颗粒的核心中，其通常是亲脂的。亲脂性化合物由此能够经由本发明的 HPPS 纳米颗粒递送。本发明的 HPPS 纳米颗粒可以与固有地亲脂的或可以通过化学修饰成为亲脂的活性剂一起使用，在下面更详细地讨论。

[0133] 术语“亲脂性化合物”或“亲脂性药物”定义为处于其非离子化的形式时在脂质或脂肪中比在水中更可溶的化合物或药物。亲脂性化合物的实例包括，但不限于，乙酰苯胺、苯胺、氨基喹啉、二苯甲基化合物、苯并二氮䓬类、苯并呋喃、大麻酯（大麻素）、环肽、二苯丙氮䓬类、毛地黄糖苷、麦角生物碱类、类黄酮、咪唑、喹啉、大环内酯、萘、鸦片（或吗啡喃）、噁嗪、噁唑、苯烷基胺、哌啶、多环芳香烃、吡咯烷、吡咯烷酮、均二苯代乙烯（1, 2- 苯乙烯，芪）、磺酰脲、砒、三唑、莨菪烷、以及长春花生物碱。

[0134] 多种测试可以用于确定亲脂性。常见的测试方案是测量辛醇 - 水分配系数 (P_{ow} , K_{ow})，其是通过确定辛 -1- 醇与水之间的平衡分布来测量亲脂性。亲脂性药物是那些优先分配入辛醇成分中的药物。

[0135] 可以被并入本发明的靶向的药物递送复合体的药物活性亲脂性药物包括用于治疗癌症和青光眼的药物、免疫活性剂、抗肿瘤剂、抗胆碱能和类胆碱剂、抗蕈毒碱和蕈毒碱剂、抗肾上腺素能药和抗心律失常药、抗高血压剂、消炎药、抗生素药、抗真菌药、类固醇类、抗组胺药、平喘药、镇静剂、抗癫痫药、麻醉剂、安眠药、抗精神病剂、神经安定药、抗抑郁剂、抗焦虑药、抗惊厥剂、神经元阻断剂、抗麻醉剂、止痛剂、抗增生剂、抗病毒药、激素类、和营养剂。

[0136] 抗癌药的实例包括，但不限于紫杉醇（红豆杉醇）、二十二碳六烯酸 (DHA) - 紫杉醇结合物、环磷酰胺、桦木酸、和阿霉素（参见，例如授予 Strelchenok 的美国专利第 6,197,809 号）。

[0137] 抗青光眼药的实例包括，但不限于， β - 阻滞剂如噻吗洛尔 - 碱、倍他索洛尔、阿替洛尔、左布诺洛尔、肾上腺素、二新戊酰、oxonolol、乙酰唑胺 - 碱和醋甲唑胺。

[0138] 消炎药的实例包括，但不限于，甾族药物如可的松和地塞米松以及非甾族消炎药 (NSAID) 如吡罗昔康、吲哚美辛、萘普生、苯基丁氮酮、布洛芬和双氯芬酸。平喘药的实例包括但不限于泼尼松龙和泼尼松（也参见美国专利第 6,057,347 号）。

[0139] 抗生素药的实例包括但不限于氯霉素。抗真菌药的实例包括但不限于制霉菌素、两性霉素 B、和咪康唑。抗病毒药的实例包括但不限于 AcyclovirTM (Glaxo Wellcome, U.K.)。

[0140] 类固醇的实例包括但不限于睾丸激素、雌激素、和孕酮。抗过敏药的实例包括但不限于非尼拉敏衍生物。镇静剂的实例包括但不限于地西洋和异丙酚。

[0141] 通常不是亲脂性的被递送的化合物可以通过将它们融合或共价偶联到一个或多个亲脂性分子以产生两亲化合物而用在本发明中。例如，这样的亲脂性分子优选地包含至少一个长烃链 ($> C_{10}$)，其或者通过顺式 - 双键弯曲或者通过至少一个侧链支化。这样的分子包括，但不限于，胆固醇油酸酯、油酸酯、胆固醇月桂酸酯或植醇。也可以使用固醇和脂肪酸。

[0142] 核酸，如 siRNA，以及核酸和肽适体，可以通过复合核酸与阳离子脂质以形成亲脂性复合体来作为“亲脂性”化合物递送，所述复合体可以随后被并入颗粒的核心，或相反与本发明的磷脂结合。核酸还可以经由与脂质锚的共价键而被并入 HPPS 纳米颗粒，如下指出的。

[0143] 具有脂质锚的药剂

[0144] 除了为亲脂性的并且可以被加载入本发明的 HPPS 纳米颗粒的核心的活性剂外，本发明还包括可以加载到本发明的 HPPS 的表面上的活性剂。这样的活性剂可以是具有脂质锚的亲水性的。本发明的 HPPS 纳米颗粒也可以被修饰成包括亲脂性螯合剂，这样的亲脂性螯合剂是熟知的。例如，亲脂性螯合剂，DTPA Bis(硬脂酰胺)，可以利用标准技术被并入到 HPPS 纳米颗粒中。同样地，1, 1- 双十八烷基 -3, 3, 3, 3- 四甲基吡啶羧花青高氯酸盐 (DiI) 可以被用作已知插入 LDL 磷脂单层的脂质 - 锚定的、基于羧花青的光学探针，并且可用在本发明的 HPPS 纳米颗粒中。

[0145] 类似地，近红外 (“NIR”) 探针如三羧花青染料，其是 NIR 荧光团，可以被修饰以包括允许这样的探针被锚定到本发明的 HPPS 纳米颗粒的脂质 - 螯合锚。可以使用任何这样的脂质 - 螯合锚，例如，胆固醇月桂酸酯部分可以被连接到 NIR 探针以将它们锚定到本发明的 HPPS 纳米颗粒。(Zheng et al., Bioorg.&Med.Chem Lett.12 : 1485-1488 (2002)。

[0146] 如上说明的，胆固醇部分也可以用于锚定 HPPS 纳米颗粒内的 siRNA (和另外的适体) 和其它活性剂。已经确定，胆固醇 - 结合的 siRNA 可以在体内沉默基因表达，并且这些结合物结合到 LDL 和 HDL 颗粒 (Wolfrum, C. et al. Nature Biotech. published online 16 September 2007)。用于活性剂的合适的锚包括油酸酯 (盐) 和不饱和的胆固醇酯部分。这样的锚可以利用本领域技术人员已知的合成方法共价连接至活性剂。在一个实施方式中，所述锚可以经由酯键共价连接至活性剂。

[0147] 成像 / 诊断剂

[0148] 在一个实施方式中，活性剂可以是可检测的试剂 (药剂)，如放射性核素或成像剂，其允许所选器官或组织的检测或可视化。因此，本发明提供了包括肺、皮肤、血液、胰腺、视网膜、前列腺、卵巢、淋巴结、肾上腺、肝脏或肠归巢分子的 HPPS 纳米颗粒。选择的可检测试剂的类型将取决于应用。例如，为了受试者中肺的体内诊断性成像研究，肺归巢分子可以被连接到包含在给予受试者后对于受试者外部可检测的试剂的

HPPS 纳米颗粒。为了检测这样的内部器官或组织，例如，前列腺，发射放射性核素如镭-113、镭-115 或镭-99 的 γ 射线可以与连接到前列腺归巢分子的 HPPS 纳米颗粒结合，并且在给予受试者后，可以利用固体闪烁检测器被可视化。可替换地，对于受试者的外表面处或附近的器官或组织，例如，视网膜，可以使用荧光素-标记的视网膜归巢分子，使得视网膜的内皮结构可以利用检眼镜和适当的光学系统被可视化。

[0149] 选择性归巢到器官或组织中的病理损害的分子类似地可以用在本发明的 HPPS 纳米颗粒中以递送适当的可检测试剂，使得损害的大小和分布可以被可视化。例如，当器官或组织归巢分子归巢到正常器官或组织，但是不归巢到器官或组织中的病理损害时，可以通过鉴定器官或组织中的异常或非典型图像，例如，损害区中可检测试剂的缺乏，来检测病理损害的存在。

[0150] 可检测的试剂还可以是方便体外检测的试剂。例如，包含归巢分子和酶的 HPPS 纳米颗粒（其在存在适当的底物时产生可见信号）可以检测归巢分子针对的器官或组织或细胞的存在。可以包含例如碱性磷酸酶或荧光素酶等的这样的 HPPS 纳米颗粒可以用在如免疫组织化学的方法中。这样的 HPPS 纳米颗粒还可以用于检测例如，在靶分子的纯化期间在样品中，结合了器官归巢分子的靶分子的存在。

[0151] 另外的诊断剂包括对比剂、放射性标记和荧光标记。优选的对比剂为光学对比剂、MRI 对比剂、超声对比剂、X-射线对比剂和放射性核素。

[0152] 治疗剂

[0153] 治疗剂可以为在选择的器官或组织的部位处发挥其功能的任何生物学上有用的试剂（药剂），如先前提及的活性剂和亲脂性化合物。例如，治疗剂可以为小的有机分子，其在由于连接的器官归巢分子结合到靶细胞后，被细胞内在化，在那里它可以影响其功能。治疗剂可以为编码涉及所选的器官或组织中，如希望的，刺激或抑制细胞存活、细胞增殖或细胞死亡的蛋白质的核酸分子。例如，编码蛋白质如 Bcl-2（其抑制凋亡）的核酸分子可以用于促进细胞存活，而编码蛋白质如 Bax（其刺激凋亡）的核酸分子可以用于促进靶细胞的细胞死亡。

[0154] 刺激细胞死亡的特别有用的治疗剂是蓖麻毒素，其，当连接到包含本发明的器官归巢分子的 HPPS 时，可以用于治疗高增殖性障碍，如，癌症。包含本发明的器官归巢分子和抗生素，如氨苄西林或抗病毒剂，如病毒唑的 HPPS 纳米颗粒，例如，可以用于治疗选择的器官或组织中的细菌或病毒感染。

[0155] 治疗剂还可以抑制或促进生物分子的产生或活性，其表达或缺乏与病状相关。因此，蛋白酶抑制剂可以为这样的治疗剂，其在连接到包含器官归巢分子的 HPPS 时，可以抑制选择的器官或组织，如胰腺处的蛋白酶活性。基因或其功能等价物如 cDNA（其可以补充或恢复选择的器官或组织中的蛋白质的产生）也可以为用于改善病状的严重性的治疗剂。治疗剂还可以为反义核酸分子，其表达抑制有害蛋白质的产生，或者可以为编码显性阴性蛋白质或其片段的核酸分子，其可以抑制有害蛋白质的活性。如上所述，核酸，以及核酸和肽适体，可以通过复合核酸与阳离子脂质以形成亲脂性复合体来作为“亲脂性”化合物递送，所述复合体随后可以被并入颗粒的核心，或相反与本发明的磷脂结合。胆固醇部分或其它脂质锚还可以用于将这些和其它活性剂锚定在 HPPS 纳米颗粒的核心内。

[0156] 光动力学治疗 (PDT) 剂

[0157] PDT 是涉及光和光敏剂的组合的有希望的癌症治疗。每个因素本身是无害的, 但是当组合在一起时, 它们可以产生杀死肿瘤细胞的致死性活性氧物质 (Dougherty, T.J.et al.Journal of the National Cancer Institute.90, 889-905(1998))。单态氧 ($^1\text{O}_2$) 是与多种生物分子和集合反应的有力的、相当不加区别的氧化剂。通常公认 $^1\text{O}_2$ 是 PDT 诱导的肿瘤坏死的关键试剂 (Niedre, M.et al.Photochemistry&Photobiology.75, 382-391(2002))。 $^1\text{O}_2$ 的扩散范围限于细胞介质内的大约 45nm (Moan, J.Photochem.Photobiol.53, 549-553(1991))。因此, O_2 的主要产生的部位决定哪个亚细胞结构可以被到达和攻击, 换句话说, 如果光敏剂优先位于肿瘤细胞内, 则 PDT 诱导的细胞损害是高度肿瘤特异性的。

[0158] 优选的光动力学治疗剂为卟啉、卟啉异构体、和扩展的卟啉。

[0159] 在实施方式中, 光动力学治疗剂选自叔丁基硅酞菁二油酸酯 (SiNc-BOA)、叔丁基硅酞菁二油酸酯 (SiPc-BOA)、和焦脱镁叶绿酸-胆固醇酯 (Pyro-CE) 组成的组。SiNc-BOA、SiPc-BOA、和 Pyro-CE 是产生用于光动力学治疗的毒性氧物质的光敏剂化合物。

[0160] 用于荧光成像的近红外 (NIR) 染料和 PDT 剂

[0161] NIR 荧光成像 (NIRF) 是非放射性的、高度敏感的、和便宜的癌症检测模式 (Weissleder, R.et al.Nature Medicine 9, 123-128(2003), Frangioni, J.V.Current Opinion in Chemical Biology 7, 626-634(2003)), 其允许基于肿瘤和健康组织的荧光之间的差异检测肿瘤和健康组织的非侵入性区别。NIR 染料目前作为用于癌症检测的 NIRF 探针和作为用于通过 PDT 的癌症治疗的光敏剂吸引相当大的兴趣。NIR 染料的吸引力在于在 600nm 到 900nm 之间的光谱窗口中的组织光学性能。对于这样的波长, 组织吸收系数较低; 因此光的传播主要由散射事件控制, 并且几厘米的穿透深度是可达到的。因此, NIR 染料的独特能力能够使表面下的肿瘤, 包括乳腺癌荧光成像和 PDT 治疗。

[0162] NIRF 和 PDT 模式的目前的限制是它们由于将染料递送至肿瘤的相对非特异性性质而缺乏足够的肿瘤与组织对比, 其已经导致对于 NIRF 的假阴性和对于 PDT 的不足的肿瘤与正常组织治疗比率。因此, 靶向“肿瘤标记”的试剂, 即, 在癌细胞中选择性积聚的分子, 是特别有吸引力的。本发明提供了将 NIRF/PDT 试剂锁定在核心内的肿瘤-靶向 HPPS 纳米颗粒, 使得实现更高的探针/蛋白质摩尔比率和肿瘤特异性。

[0163] 磁共振成像剂

[0164] 现在已经确立 MRI 是目前可利用的各种诊断形式中优秀的方法, 因为其通过体内取样水质子的量、流量、和环境提供了绘制软组织中的结构和功能的有力方式。通过使用对比剂可以增大固有的对比。靶向的 MRI 试剂, 虽然概念上非常有吸引力, 但是仅存在于一些潜在有用的实例中。因为敏感性限制, 目前有效的识别需要非常高容量的靶标, 如血纤蛋白, 其以足够的量存在以致可以用简单靶向的 Gd(钆)螯合剂看见, 或者可以用与 Gd 簇、聚合物或铁颗粒连接的到达血流的靶标。这是目前非常有限的靶标集。此外, 胞内 MRI 成像是特别有挑战性的, 因为用于 MRI 检测限所需的 MRI 剂的最小浓度大大高于 (约 1mM) 胞外靶向阈值 ($40 \mu\text{M}$)。 (Aime, S.et al.Journal of Magnetic Resonance Imaging.200216(4): 394-406, Nunn, A.D.et al.Quarterly Journal of

Nuclear Medicine.199741(2) : 155-62)。一个值得注意的尝试被 Wiener et al. 在 1995 年报道 (Wiener, E.C.et al.Investigative Radiology.1997Dec, -32(12) : 748-54)。利用基于叶酸-结合的 DTPA 的树枝状高分子, 它们实现由与叶酸受体的存在相关的肿瘤细胞的摄取。注射后 24h, 它们还获得 17% 的 MRI 对比增强。本发明提供了递送 MRI 和 NIRF/PDT 剂的 HPPS 纳米颗粒。

[0165] 在本发明的一些实施方式中, MRI 对比剂为氧化铁或镧系元素的碱(镧系元素碱, lanthanide base), 如钆(Gd^{3+}) 金属。

[0166] 在神经系统中活跃的试剂

[0167] 在神经系统上活跃的药物也可以经由本发明的 HPPS 纳米颗粒被递送。这样的药物包括抗精神病药、兴奋剂、镇静剂、麻醉剂、鸦片剂、镇定剂、抗抑郁剂、如 MAO 抑制剂、三环物和四环物、选择性血清素再摄取抑制剂和安非他酮。在神经系统中活跃的药物还包括神经肽。由于低代谢稳定性、被肝脏的高清除率和血脑屏障的存在, 肽药物的递送通过它们到脑的不良生物利用率被限制。本发明的 HPPS 纳米颗粒能够将这样的药物递送至中枢神经系统。

[0168] 药物组合物

[0169] 当给予受试者时, 本发明的纳米平台作为药物组合物给予, 所述药物组合物包含, 例如, HPPS 纳米颗粒和药用载体。药用载体在本领域中是熟知的, 并且包括, 例如水溶液如水或生理缓冲盐水或其它溶剂或载体(媒介)如乙二醇、甘油、油如橄榄油或可注射的有机酯类。

[0170] 药用载体可以包含生理上可接受的化合物, 所述化合物起作用, 从而例如稳定或增加复合体的吸收。这样的生理上可接受的化合物包括, 例如, 碳水化合物如葡萄糖、蔗糖或右旋糖, 抗氧化剂, 如抗坏血酸或谷胱甘肽, 螯合剂, 低分子量蛋白或其它稳定剂或赋形剂。本领域技术人员将已知药用载体的选择, 包括其中任何生理上可接受的化合物, 取决于, 例如给予药物组合物的途径。所述药物组合物还可以包含这样的 HPPS 纳米颗粒, 所述 HPPS 纳米颗粒进一步包括癌治疗剂、或希望的其它活性剂, 包括亲脂性化合物、具有脂质锚的试剂、成像/诊断剂、治疗剂、光动力学治疗(PDT)剂、用于荧光成像和 PDT 剂的近红外(NIR)染料、磁共振成像剂、以及在神经系统中活跃的试剂。

[0171] 如上所述, 本发明的纳米平台可以在生理或药用载体中提供, 或可以以用于随后应用的冻干形式提供。组合物在打算用于肠胃外给予等时可选地是无菌的, 但是在打算用于一些局部应用时不需要总是无菌的。可以使用任何药用载体, 包括但不限于含水载体。用于肠胃外注射的含水载体包括水、酒精/水溶液、乳剂或悬浮液, 包括盐水和缓冲介质。肠胃外载体包括氯化钠溶液、林格氏右旋糖、右旋糖和氯化钠、乳化的林格氏或固定油。静脉内载体包括流体和营养补充剂、电解质补充剂(如基于林格氏右旋糖的那些)等等。也可以存在防腐剂和/或其它添加剂, 如, 例如, 抗菌剂、抗氧化剂、螯合剂、和惰性气体等。

[0172] 本领域技术人员将已知包含本发明的 HPPS 纳米颗粒的药物组合物可以通过多种途径给予受试者, 例如, 口服或肠胃外, 如静脉内。所述药物组合物可以通过注射或通过插管给予。

[0173] 在进行如本文披露的诊断、成像或治疗方法中，必须给予受试者治疗有效量的本发明的 HPPS 纳米颗粒。“治疗有效量”是产生期望的效果的 HPPS 纳米颗粒的量。有效量将取决于，例如活性剂和计划的用途。例如，与用于治疗目的（其中期望杀死细胞）给予的放射性同位素标记的分子的量相比，对于成像可能需要较少量的放射性同位素标记的 HPPS 纳米颗粒。用于具体目的的特定 HPPS 纳米颗粒的治疗有效量可以利用本领域中熟知的方法来确定。

[0174] 原则上，作为本发明的 HPPS 纳米颗粒的部分的器官归巢分子可以具有固有的生物学性能，使得所述分子的给予提供直接的生物学效应。例如，器官归巢分子可以充分地类似于对于靶分子的天然存在的配体，以便所述器官归巢分子模拟天然配体的活性。这样的器官归巢分子可以用作具有天然配体的活性的治疗剂。例如，当所述器官归巢分子模拟结合通过选择的器官或组织表达的受体的生长因子的活性时，如模拟表皮生长因子的活性的皮肤归巢分子，所述器官归巢分子的给予可以导致所述器官或组织的细胞增殖。本发明的器官归巢分子的这样的固有的生物学活性可以通过使选择的器官或组织的细胞与所述归巢分子接触并检验细胞的生物学效应的证据，例如，细胞增殖或当固有活性是毒性作用时细胞死亡来鉴定。

[0175] 此外，作为本发明的 HPPS 纳米颗粒的部分的器官归巢分子可以具有结合特定靶分子的固有活性，使得相应的配体不能结合受体。已知，例如，各种类型的癌细胞转移到特定器官或组织，显示癌细胞表达结合其转移的器官中靶分子的配体。因此，例如，给予具有转移到肺的肿瘤的受试者肺归巢分子可以提供防止潜在的转移性癌细胞变成在肺中建立的方式。然而，通常，本发明的器官归巢分子特别用于将 HPPS 纳米颗粒靶向选择的器官或组织。因此，本发明提供了通过给予具有病状的受试者本发明的 HPPS 纳米颗粒来治疗选择的器官或组织中病状的方法。

[0176] 肺的特定疾病，例如，可以通过给予受试者包括肺归巢分子和治疗剂的 HPPS 纳米颗粒来治疗。因为肺归巢分子可以定位于肺的毛细管和肺泡，与这些区域相关的疾病特别适用于用包含肺归巢分子的结合物治疗。例如，细菌性肺炎通常起源于肺的肺泡和毛细管 (Rubin and Farber, Pathology 2nd ed., (Lippincott Co., 1994))。因此，具有肺归巢分子和合适的抗生素的 HPPS 纳米颗粒可以给予受试者以经由本发明的 HPPS 纳米颗粒来治疗肺炎。类似地，由于 CFTR 中的缺陷，囊性纤维化造成肺中的病理损害。因此，给予具有肺归巢分子和编码 CFTR 的核酸分子的 HPPS 纳米颗粒提供了作为体内基因治疗处理方法的用于使所述核酸分子到达肺的方式。

[0177] 本发明还提供了通过给予具有病状的受试者包含皮肤归巢分子和治疗剂的 HPPS 纳米颗粒来治疗皮肤的病状的方法。例如，烧伤受害者可以被给予包含皮肤归巢分子和表皮生长因子或血小板衍生的生长因子的 HPPS 纳米颗粒，使得所述生长因子被定位于皮肤，在此处它可以加速表皮和下面的真皮的再生或修复。此外，通过给予受试者包含皮肤归巢分子和抗生素的 HPPS 纳米颗粒，本发明的方法可以用于治疗由细菌感染引起的皮肤病状，特别是在整个皮下组织和真皮扩散的感染或者定位在这些组织中的感染。

[0178] 本发明还提供了通过给予具有病状的受试者包含胰腺归巢分子和治疗剂的 HPPS 纳米颗粒来治疗胰腺的病状的方法。尤其是，由于本发明的胰腺归巢分子可以定位于外分泌胰腺，因此与外分泌胰腺相关的病状可以被治疗，并且在一些情况中，可能会不利

地影响内分泌腺。本发明的方法还可以特别用于治疗急性胰腺炎，其是由损害所述器官的分泌的蛋白酶造成的外分泌腺的炎性状况。包含胰腺归巢分子和蛋白酶抑制剂的 HPPS 纳米颗粒可以用于抑制蛋白酶介导的组织破坏，由此减轻病状的严重性。可用于这样的 HPPS 纳米颗粒中的适当的蛋白酶抑制剂是抑制与胰腺炎相关的酶的那些抑制剂，包括，例如，胰岛素、胰凝乳蛋白酶、弹性蛋白酶、羧肽酶和胰脂肪酶的抑制剂。本发明的方法还可以用于通过给予受试者包含连接到归巢到胰腺的分子的治疗剂的 HPPS 纳米颗粒来治疗具有胰腺癌的受试者，例如，导管腺癌。

[0179] 本发明的方法还可以用于通过给予具有病状的受试者包含视网膜归巢分子和治疗剂的 HPPS 纳米颗粒来治疗眼，尤其是视网膜的病状。例如，增生性视网膜病与对于由于例如糖尿病的视网膜局部缺血的应答的视网膜的心血管形成相关。因此，给予包含连接到刺激凋亡的基因，例如 Bax 的视网膜归巢分子的结合物可以用于治疗增生性视网膜病。类似地，本发明的方法可以用于利用如本文披露的适当的器官或组织归巢分子来诊断或治疗前列腺、血液、卵巢、乳腺、淋巴结、肾上腺、肝脏、或肠病状。

[0180] 本发明进一步提供了用于治疗受到多种感染物如病毒、寄生虫、和 / 或细菌（如 HIV、疟疾 ... 等）感染的组织的方法。与 HPPS 纳米支架一起使用的归巢分子将通常包括到达感染组织中表达（或过度表达）的细胞表面标记物 / 受体（例如，蛋白质）的配体。

[0181] 本发明进一步提供了将亲脂性化合物、诊断剂或药物递送到受试者、靶组织、或器官的方法，包括以下步骤：制备 HPPS 的药物剂型，所述剂型包括与脂质结合的亲脂性药物，所述脂质的量为根据本发明的方法足以与所述亲脂性药物形成复合体的量；以及给予所述靶组织治疗有效量的药物剂型。本发明的药物剂型可以静脉内、动脉内、鼻内给予，诸如通过气溶胶给予、雾化、吸入、或喷洒、气管内、关节内、经口、经皮、皮下、直肠、或局部。

[0182] “有效的”或“治疗有效的”量是指（在某种程度上）缓解患者中的疾病或状况中的一种或多种症状的量。此外，“治疗有效量”是指将与疾病相关或是疾病成因的生理或生物化学参数部分或完全返回到正常的量。此外，有效量可以为足以实现某个其它计划的目的的量，如放射性成像剂或其它诊断剂递送到器官或组织。

[0183] 此外，本发明提供了一种鉴定选择的器官或组织或诊断选择的器官或组织中的病状的方法，包括以下步骤：制备包含适当的靶向部分和与脂质结合的诊断剂的 HPPS 的药物剂型，所述脂质的量足以根据本发明的方法与所述诊断剂形成颗粒，以及给予受试者到达所述靶器官或组织的药物剂型。

[0184] “诊断剂”是指可以与用于使患者的内部区域成像和 / 或诊断患者中疾病的存在或缺乏的方法结合使用的任何试剂。示例性的诊断剂包括，例如，用于与患者的超声成像、磁共振成像或计算机断层成像结合使用的放射性和荧光标签以及对对比剂。诊断剂还可以包括用于促进患者中疾病或其它状况的诊断的任何其它试剂，不管是否采用成像方法。

[0185] 本发明还提供了一种治疗经受选自以下组成的组中的障碍的受试者的方法：皮肤癌、牛皮癣、痤疮、湿疹、红斑痤疮、光化性角化病、脂溢性皮炎、和先天性角化障碍，其中根据本发明的方法的任何组合物通过局部应用而给予需要这样的治疗的受试者。

[0186] 本发明的 HPPS 纳米颗粒可以，如上所述，用于局部应用。因此，本发明进一步提供了一种治疗皮肤的一种或多种状况的方法，所述状况选自干性皮肤、光损害皮肤、老年斑、老化皮肤、增加的角质层柔软性、皱纹、细纹、光化性斑点、皮肤变色、以及鱼鳞癣组成的组，所述方法包括将根据本发明的任何组合物施加至具有所述一种或多种状况的皮肤，其中要被递送的所述化合物是用于治疗这样的状况的已知化合物，以其用于治疗这样的状况的已知的量递送。如本文中所述的，术语“局部应用”是指将本发明的组合物施加或涂布到皮肤的表面上。

[0187] 要在本发明的局部组合物中递送的化合物可以包括皮肤活性成分。这样的皮肤活性成分的非限制性实例包括维生素 B3 化合物，如授予 Oblong 等人的 1997 年 10 月 30 日公开的 PCT 申请 WO97/39733 中描述的那些，将其全部内容以引用方式并入本文中；类黄酮化合物；羟基酸如水杨酸；表皮脱落或脱皮剂如两性离子表面活性剂；防晒油如 2-乙基己基 -p- 甲氧基肉桂酸酯、4, 4' -叔丁基甲氧基二苯甲酰甲烷、奥克立林、苯基苯并咪唑磺酸；防晒乳如氧化锌和二氧化钛；消炎剂；抗氧化剂/自由基清除剂如生育酚及其酯；金属螯合剂，尤其是铁螯合剂；类维生素 A 如视黄醇、棕榈酸视黄酯、乙酸视黄酯、丙酸视黄酯、及视黄醛；N-乙酰基-L-半胱氨酸及其衍生物；羟基酸如乙醇酸；酮酸如丙酮酸；苯并咪唑衍生物；脱毛剂（如巯基化合物）；皮肤光亮剂（如，熊果苷、曲酸、对苯二酚、抗坏血酸及衍生物如抗坏血酸磷酸盐，胎盘提取物等）；抗脂肪团剂（如咖啡因、茶碱）；湿润剂；抗微生物剂；抗雄激素剂；以及护肤剂。也可以使用上面提及的皮肤活性物的任何的混合物。这些活性成分的更详细的描述在授予 Blank 等人的美国专利第 5,605,894 号中发现。优选的皮肤活性成分包括羟基酸如水杨酸、防晒油、抗氧化剂及其混合物。可以通过施加旨在置于皮肤上的润肤液、乳剂、凝胶、乳化液、喷雾、调理物、化妆品、唇膏、粉底、指甲油或类似物形式的本发明的组合物来实施局部应用，用于一些美容、预防性、治疗性或其它益处。

[0188] 用于制备本发明的 HPPS 纳米颗粒的方法

[0189] 纳米平台核心负载

[0190] 本发明提供了制备本发明的 HPPS 纳米颗粒的方法。用于将药剂并入 LDL 和 HDL 颗粒中的现有技术方法在授予 Zheng 等人的 PCT 申请公开号 WO 2006/073419（公开日：2006 年 7 月 13 日；PCT 申请号 PCT/US2005/011289）中概述，将其内容以引用方式并入本文中。

[0191] 在优选的实施方式中，通过在有机溶剂如，例如甲苯、苯、二氯甲烷，以及优选地氯仿中合并适当的磷脂与不饱和胆固醇酯，接着蒸发溶剂和真空干燥来制备 HPPS 纳米颗粒。在约 40-60℃ 超声处理后加入缓冲剂产生乳液。向乳液中加入如上所述的适当的支架肽导致球状 HPPS 纳米颗粒的优先形成。如果期望 HPPS 纳米颗粒的核心-负载，则要被加载到核心中的药剂最初与磷脂和油酸胆固醇酯合并，并且随后是同样的程序。

[0192] 细胞表面受体配体的连接

[0193] 在用活性剂加载 HPPS 纳米颗粒的核心后，HPPS 纳米颗粒的表面可以被修饰以连接细胞表面受体配体。可替换地，也可以在加载活性剂的同时并入所述细胞表面受体配体，在一些实施方式中，所述细胞表面受体配体共价地结合至本发明的 HPPS 纳米颗粒的支架肽。

[0194] 将细胞表面受体配体连接至本发明的 HPPS 纳米颗粒可以经由标准技术发生。HPPS 纳米颗粒的支架肽可以包含可结合的氨基酸残基如赖氨酸、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸等。在一个实施方式中，存在赖氨酸残基，并利用已知的化学被偶联至所述细胞表面受体配体。例如，配体叶酸可以通过针对缓冲剂，即 $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{BO}_3$ 缓冲剂透析 HPPS 纳米颗粒，经由增加的 pH 连接到具有包含赖氨酸的支架肽的 HPPS 纳米颗粒。叶酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯然后在室温下与 HPPS 纳米颗粒反应 10 小时。在反应完成后，对混合物进行离心以去除任何降解的 HPPS 纳米颗粒。在最后的步骤中，可以针对 EDTA 缓冲剂透析粗 HPPS-FA 以将 pH 调节至 7.4。

[0195] 显著地，细胞表面受体配体如叶酸和 EGFR 特异性肽结合至 HPPS 纳米颗粒的支架肽并不影响它们与磷脂结合并形成纳米载体的能力。并且，优选地，叶酸和 EGFR 特异性肽与支架肽的赖氨酸残基的结合将归巢分子放置在两亲性 α -螺旋的亲水面与疏水面之间的过渡处或附近。

[0196] 在另一实施方式中，除了细胞表面受体配体共价连接至 HPPS 纳米颗粒的支架肽外，细胞表面受体配体还可以经由将这些细胞表面受体配体锚定到被并入 HPPS 纳米颗粒的磷脂单层的脂质被呈现在 HPPS 纳米颗粒的表面上。在一个实施方式中，所述脂质锚可以为 1, 2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[叶酸(聚乙二醇)-2000] (DSPE-PEG(2000); Avanti)。

[0197] 在另一实施方式中，所述 HPPS 纳米颗粒可以通过 SR-B1 受体介导的途径由细胞摄取。HDL 靶向 SR-B1 (净化剂受体类型 1，还称作 HDL 受体)，并且不受理论的约束，认为 HPPS 模拟 HDL's SR-B1 特异性。由于癌症(如乳腺癌)的一些类型显著过度表达 SR-B1 受体，因此 HPPS 具有选择性靶向恶性细胞的潜力。此外，HPPS 纳米颗粒可以用于以基于 HDL 的 Gd-MRI 探针相同的方式使脆弱的斑块成像 (Fayad group, Mt.Sinai New York: Frias et al.J.Am.Chem.Soc.2004; 126: 16316-7; Frias et al.Nano Lett.2006; 6: 220-4)。

[0198] 下面的实施例说明通过 SR-B1-介导的途径在体外和体内由细胞摄取 HPPS 纳米颗粒。没有 HPPS 内在化的货运的初步证据表明 HPPS 纳米载体特别可用于癌症诊断剂和治疗剂的直接细胞溶质递送。

[0199] 下面的实施例更详细地解释本发明。给出了下面的制备和实施例以使得本领域的技术人员更清楚地理解和实施本发明。然而，本发明并不限于示例的实施方式的范围，所述实施方式仅旨在作为本发明的单一方面的说明，并且功能上等效的方法在本发明的范围内。确实通过前面的描述和附图，本发明的除了本文描述的那些外的各种修改对于本领域技术人员来说变得显而易见。这样的修改旨在落入所附权利要求的范围内。

[0200] 将本文引用的每一参考文献的全部内容以引用方式明确地并入。

[0201] 实施例

[0202] 实施例 1

[0203] 起始原料的制备

[0204] 1) 大小对照肽 (scPep)

[0205] 利用商业上可获得的 N- α -Fmoc 保护的氨基酸、Sieber 酰胺树脂作为固体载体，以及使用 HBTU/HOBt 作为羧基活化剂，通过利用 Fmoc 固相肽合成 (SPPS)

方案 (Novabiochem, Resource for peptidesynthesis : <http://www.emdbiosciences.com/g.asp?f=NBC/peptideres.htm>), 在肽合成仪 PS-3 (Protein Technologies, Inc.) 上合成两亲性螺旋的一些短肽类似物, 如 Ac-DWLKAFYDKVAEKLKEAF ("2F"), AC-DWFKAFYDKVAEKFKEAF ("4F", 在本文中也称为 "+4F") 和 Ac-FAEKFKEAVKDYFAKFWD (-4F)。在合成受保护的序列后, 用 N, N-二甲基甲酰胺 (DMF) 中 20% 的哌啶去除肽-树脂的 N 末端 Fmoc 以暴露末端胺。随后用在具有 10% 乙酸酐的四氢呋喃中的 10% 吡啶帽化 NH₂-肽-树脂。用 95% 三氟乙酸和 5% 三异丙基硅烷进一步处理 Ac-肽-树脂以去除肽序列上受保护的基团并劈开固体载体。在通过过滤去除劈开的固体树脂后, 滤液被浓缩并通过加入无水醚沉淀以产生 scPep。色氨酸 (W) 的荧光被用于确定 HPPS 的 scPep 含量。本领域技术人员已知的其他方法, 如氨基酸分析, 可以用于确定 HPPS 的肽含量。具有自由侧链胺基团的赖氨酸 (K) 被用于结合靶向配体。

[0206] 2) 作为对于 EGFR 的靶向配体的 EGFR-特异性肽 (EGFp)

[0207] 合成肽序列, Fmoc-YHWYGYTPQNV I。在最终的 Fmoc 去除后, 具有 N-末端 NH₂ 基团的肽 NH₂-YHWYGYTPQNV I 从固体载体被切开。三个等摩尔量的辛二酸二-(N-羟基琥珀酰亚胺酯) (SigmaAldrich) 随后被结合至 DMSO 中的 EGFp 的 N 末端, 以形成 EGFp-NHS。

[0208] 3) 结合至磷脂的 EGFp (EGFp-脂质)

[0209] 首先在 DIPEA 存在的情况下, 在无水二甲亚砜 (DMSO) 中, 以 1 : 5 的摩尔比使 EGFp 与辛二酸二-(N-羟基琥珀酰亚胺酯) 反应以产生 EGFp-N-羟基琥珀酰亚胺酯 (EGFp-NHS)。随后在 DMSO 中, 产物 EGFp-NHS 与 1, 2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]胺 (DSPE-PEG(2000)胺, 来自 Avanti) 以 1 : 2 的摩尔比孵育。在室温下伴随温和的混合的 6 小时孵育后, 用过量二乙醚冲洗样品。用二乙醚冲洗沉淀物 3 次以上, 以去除任何未反应的 DSPE-PEG(2000)胺。包含终产物的沉淀物被干燥并重新悬浮在甲醇中。

[0210] 4) 适于并入用于诊断和/或治疗应用的 HPPS 纳米颗粒的化合物在图 2 中阐述并包括近红外荧光 (NIRF) 成像探针 DiR-BOA (1, 1'-双十八烷基-3, 3, 3', 3'-四甲基吡啶三碳菁碘二油酸酯) 和 DIR (1, 1'-双十八烷基-3, 3, 3', 3'-四甲基吡啶三碳菁碘化物)。DiR-BOA 和 DIR 可以分别作为核心-负载和表面-加载的 NIRF 探针合成用于 HPPS。这两种染料具有类似的吸收和发射波长激发 (ex.748nm, em.782nm)。

[0211] 5) 磷脂

[0212] 适合于 HPPS 制备的磷脂包括但不限于 DMPC (1, 2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱)、POPC (1-棕榈酰基-1-油酰基-磷脂酰胆碱) 和 EYPC (卵黄磷脂酰胆碱)。所有磷脂均从 Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, Alabama, USA) 购买。

[0213] 实施例 2

[0214] 用于 HPPS 纳米颗粒制备的方法

[0215] HPPS 是完全溶于含水缓冲剂, 如 tris 盐水 (10mM tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA, pH 7.5) 中的大分子复合体。Tris 盐水缓冲剂在下面概述的所有试验中被用作用于 HPPS 的溶剂。

[0216] 1) HPPS: 将 $3\ \mu\text{mol}$ 的 DMPC 和 $0.3\ \mu\text{mol}$ 的胆固醇油酸酯溶解在试管中的 0.5mL 氯仿中。用 N_2 缓慢蒸发掉溶剂并通过高真空进一步干燥。随后将 1mL 的缓冲剂 (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 包含 0.1M KCl, 1mM EDTA) 加入到干燥试管中并在 50°C 超声处理 1 小时以形成乳液。将 scPep $0.8\ \mu\text{mol}$ 加入到溶液中以形成 HPPS 颗粒。所述颗粒随后通过快速蛋白质液体层析法 (FPLC) 纯化。FPLC 方法将在下面描述。

[0217] 2) DiR-BOA 核心 - 加载的 HPPS ((DiR-BOA)HPPS): 将 $3\ \mu\text{mol}$ 的 DMPC 和 $0.3\ \mu\text{mol}$ 的胆固醇油酸酯和 $0.25\ \mu\text{mol}$ 的 DiR-BOA 溶解在试管中的 0.5mL 氯仿中。用 N_2 缓慢蒸发而去除溶剂并通过高真空进一步干燥。将 1mL 的缓冲剂 (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 包含 0.1M KCl, 1mM EDTA) 随后加入到干燥的试管中并在 50°C 超声处理 1 小时以形成乳液。将 scPep $0.8\ \mu\text{mol}$ 加入到溶液中以聚集 (DiR-BOA)HPPS 颗粒。所述颗粒随后通过 FPLC 纯化。

[0218] 3) DiR 表面 - 标记的 HPPS (DiR-HPPS): 利用基于由 Pitas 等人 [J.Cell Biol.1985, 100, 103-117] 描述的初始方法的修改的程序, 用亲脂性近红外染料 DiR (1, 1' - 双十八烷基 -3, 3', 3' - 四甲基吡啶三碳菁碘化物) (ex.748nm, em.782nm) (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) 标记 HPPS。简单地说, 通过将 3mg ($3.2\ \mu\text{mol}$) 的 DiR 溶解在 1mL 二甲亚砜 (DMSO) 中来制备 DiR 的储备溶液; 将 0.1mL 的储液加入到 0.5mL 的 HPPS 溶液 ($30\ \mu\text{M}$) 中以产生 40DiR 与 1 颗粒的最终摩尔比率。在黑暗中在 37°C 孵育该混合物 18 小时后, DiR 表面 - 标记的 HPPS (DiR-HPPS) 通过超速离心 ($49,000\text{rpm}$, 20 小时, 4°C , Beckman 50Ti 旋转器) 进行分离, 针对包含 0.01% EDTA 的盐水透析, 并且过滤灭菌 ($0.45\ \mu\text{m}$, Water Millex HV 单位)。通过检查 HPPS 浓度 (基于 320nm 处色氨酸荧光的肽浓度) 和 DiR 浓度 (基于 782nm 处 DiR 荧光) 来确定 DiR-HPPS 上的 DiR 加载。

[0219] 4) 作为对于 (DiR-BOA)HPPS 的靶向配体的 EGFp 结合的 scPep, EGFp-(DiR-BOA)-HPPS (类型 1EGFR-靶向的 HPPS): 根据图 3 中描述的方案来合成 EGFp-结合的 DiR-BOA 核心 - 加载的 HPPS ((DiR-BOA)HPPS)。简单地说, 在试管中将 $3\ \mu\text{mol}$ 的 DMPC、 $0.2\ \mu\text{mol}$ 的胆固醇油酸酯和 $0.40\ \mu\text{mol}$ 的 DiR-BOA 溶解在氯仿中。通过用 N_2 缓慢蒸发来去除溶剂并通过高真空进一步干燥。随后将 1mL 的缓冲剂加入到干燥的试管中并在 50°C 超声处理 1 小时以形成乳液。然后将 scPep 加入到溶液中以聚集 (DiR-BOA)HPPS 颗粒。通过在 4°C 下, 分别针对 pH = 9.0、10.0、10.9 的 0.1M NaH_2PO_4 , 0.1M H_3BO_3 缓冲剂进行透析, 该颗粒溶液的 pH 逐步从 8.0 增加到 10.9。随后将无水 DMSO 中的活性配体分子 ($1.8\ \mu\text{mol}$), 如 EGFp-NHS 或 FA-NHS 加入到颗粒溶液中, 并且将反应混合物在室温下置于振荡器上。在 6 小时反应后, 混合物随后在 4°C 下以 500rpm 进行离心以去除任何沉淀物, 随后在 4°C 下针对 EDTA 缓冲剂 (0.3mM EDTA, 0.9% NaCl, pH 7.4) 透析过夜。在透析过程中, EGFp-(DiR-BOA)-HPPS 的 pH 返回到 7.4, 并且除去未反应的配体起始原料。重复该透析过程直到不存在分光光度上可检测的游离配体。所述颗粒然后通过 FPLC (FPLC 法将在下面描述) 纯化。

[0220] 5) 作为对于 (DiR-BOA)HPPS 的靶向配体的 EGFp-脂质, EGFp-脂质 (DiR-BOA)HPPS (类型 2EGFR-靶向的 HPPS): 如图 4 所示, 制备 EGFp-脂质 (DiR-BOA)HPPS 的过程类似于 (DiR-BOA)HPPS 的制备过程。仅有的差别是在纳米颗

粒配制中将 $0.18 \mu\text{mol}$ EGFp- 脂质 (EGF 肽结合的磷脂) 加入到 $3 \mu\text{mol}$ 的 DMPC 中。

[0221] 6) 作为对于 (DiR-BOA)HPPS 的靶向配体的叶酸结合的 scPep, FA-(DiR-BOA)-HPPS (类型 1FR- 靶向的 HPPS): 按照图 3 中描述的方案来合成 FA-(DiR-BOA)-HPPS (用叶酸-NHS 替换 EGFp)。

[0222] 7) 作为对于 (DiR-BOA)HPPS 的靶向配体的叶酸-脂质, FA-脂质 (DiR-BOA)HPPS (类型 2FR- 靶向的 HPPS): 按照图 4 中描述的方案来合成 FA-脂质 (DiR-BOA)-HPPS (用叶酸-脂质替换 EGFp-脂质)。

[0223] 8) 作为对于 (DiR-BOA)HPPS 的靶向配体的全长 EGF, (-4F)EGF (DiR-BOA)HPPS: 全长重组人类 EGF 从 R&D Systems, Inc. (Minneapolis, Minnesota, USA) 购买。如上所述, 配制 HPPS, 具有 30% 的作为 1, 2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]马来酰亚胺 (DSPE-PEG(2000)马来酰亚胺) 的磷脂含量。将 EGF 与 Traut's 试剂 (2-亚氨基硫烷-盐酸盐) (Sigma) 在 pH 9.0 下一起孵育以将反应性巯基基团引入至 EGF。然后在室温下, 在 1mL 的反应容积中, 使巯基-EGF (16nmol) 与 HPPS (DSPE-PEG(2000)马来酰亚胺) ($0.1 \mu\text{mol}$) 反应 24 小时。孵育期后, 通过 FPLC 来纯化 EGF-HPPS。

[0224] 实施例 3

[0225] 利用 4F 制备的 HPPS 纳米颗粒的表征

[0226] 1. 颗粒和有效载荷稳定性: 颗粒和有效载荷稳定性对于所有的基于纳米颗粒的药物递送系统是重要的。常规的基于脂质的纳米载体 (如, 脂质体和脂质乳液) 在超小尺寸 ($< 25\text{nm}$) 时不能维持稳定性。本发明的 HPPS 纳米载体系统表现出显著的稳定性。如表 4 所示, 在一个月期间, HPPS 维持它们的尺寸和 DiR-BOA 有效载荷, 如通过动态光散射 (参见下文) 和荧光分光光度法所确定的。在 4°C 下储存后, 没有观察到有效载荷泄漏。可以注意到, 下面表中的百分比表明具有所示尺寸的纳米颗粒的群体的比例。

[0227] 表 4. 颗粒稳定性

[0228]

2007 年 7 月 3 日的 HPPS 制剂	7 月 9 日的尺寸测量	7 月 14 日的尺寸测量	8 月 4 日的大小测量	7 月 19 日的荧光 DIRBOA	8 月 4 日的荧光 DIRBOA
	12.4 nm, 99%	10.9 nm, 99%	13.7 nm, 99%	$\text{Em}=1.07 \times 10^7$ (777 nm 处)	$\text{Em}=1.14 \times 10^7$ (777 nm 处)

[0229] 注意: 该表示出了平均尺寸、百分比组成和 DiR-BOA 荧光强度

[0230] 当使用 EGF 肽、全长 EGF、和 FA 作为靶向配体时, 全部三个剂型 (配方) 的稳定性似乎在一个月期间相当。

[0231] 2. 颗粒表征: 四种方法已经用于表征 HPPS 纳米载体: 1) 快速蛋白质液相层析 (FPLC), 2) 动态光散射 (DLS) (纳米分级机), 3) 透射电子显微术 (TEM) 以及 4) 圆二色性 (CD)。

[0232] 方法

[0233] 电子显微镜研究。 装备有数字图像获取系统的现代 HitachiH-7000 透射电子显微镜用于确定 HPPS 纳米颗粒的含水分散体的形态和大小。 将 5 微升的 HPPS 纳米颗粒悬浮液置于碳-涂覆的 200 目铜网上并且使得放置 5 分钟。 用拭镜纸除去过多的样品, 并且施加 5 μ L 的 2% 饱和含水醋酸双氧铀并使得放置 20 秒。 随后用滤纸排出着色剂, 并在采集数字图像之前对铜网进行风干。 所有的电子显微镜设备从 Electron Microscopy Sciences (Fort Washington, PA) 购买。

[0234] 动态光散射。 通过光散射光子相关光谱学 (Zetasizer Nano-ZS90 ; Malvern Instruments, Malvern, UK), 利用在 633nm 处操作的 4.0mW He-Ne 激光器和 90° 的检测器角度, 测量 HPPS 颗粒的粒度分布。 假定球形颗粒经历布朗运动来模型化数据。

[0235] 快速蛋白质液相层析。 在颗粒形成后, 通过凝胶过滤层析, 利用具有 Akta 快速蛋白质液相层析 (FPLC) 系统 (Amersham Biosciences, Pittsburgh, PA) 的 Superdex 200 柱 (60 $\times$ 16cm) 来纯化期望尺寸的 HPPS 颗粒。 用 Tris 缓冲盐水 (10mM Tris-HCl, pH 7.5, 包含 0.15M NaCl, 1mM EDTA) 以 1mL/ 分钟的流速来洗提颗粒。 洗提的颗粒的大小通过比较它们的保留时间与具有已知直径的蛋白质的保留时间来确定: 甲状腺球蛋白 (17.0nm)、脱铁铁蛋白 (12.2nm)、过氧化氢酶 (10.4nm)、牛血清白蛋白 (7.1nm)、 α -胰凝乳蛋白酶 (4.2nm)、以及核糖核酸酶 A (3.8nm)。

[0236] 圆二色性 (CD) 分光镜检查。 利用 Jasco J-815CD 分光计来记录 HPPS 颗粒的远-UV CD 光谱。 在 25°C 下, 以 1nm 步长, 从 260 到 190nm 记录 CD 光谱。 在 5 个连续的扫描上收集数据并取平均数。 ScPep 的 α 螺旋二级结构通过在 222nm 处椭圆率的变化来监测。

[0237] 图 5 示出了利用 4F 制备的未靶向的 DiR-BOA 加载的 HPPS 的 FPLC、DLS 和 CD。 从 FPLC (图 5A), 可以收集 HPPS 颗粒的不同群体, 如图 5B 中所示。 FPLC 部分的 CD 分析揭示 scPep 的强结合 (α -螺旋标志的存在)。 对于较小的颗粒可以看出朝向 α 螺旋的更高含量的趋势。 图 6 示出了 FPLC 测量与 TEM 一致。 TEM 显示在 60 分钟洗提的颗粒。 FPLC 示出了具有狭窄分布的颗粒的高产率。 TEM 证实 HPPS 颗粒具有单分散的球形形态。 FPLC、TEM 和 DLS 数据 (未示出) 表明 EGFp 结合的 HPPS 颗粒的直径在 11-14nm 的范围内。

[0238] 3.DiR-BOA 加载和靶向配体对 HPPS 大小的影响: 发现 HPPS 的大小可以通过它们的 DiR-BOA 有效载荷来控制。 这里是实例: 如下所示, 制备了 2 个 HPPS 配方 (剂型)。

[0239]	制剂 #1	制剂 #2
[0240]	3 μ mol DMPC	3 μ mol DMPC
[0241]	0.2 μ mol 胆固醇油酸酯	0.2 μ mol 胆固醇油酸酯
[0242]	0.2 μ mol DiR-BOA	0.4 μ mol DiR-BOA
[0243]	0.8 μ mol 4F	0.8 μ mol 4F

[0244] 如图 7 所示, 从每个制剂收集 FPLC 分布的单个部分。 具有较低的 DiR-BOA 加载 (#1) 的配方产生较小的 HPPS 颗粒的更均匀的分布。 配方 #2 具有较高的 DiR-BOA 有效载荷 (通过收集的部分的更强的蓝色着色表明) 和更不均匀的颗粒群体。 这些 HPPS 颗粒的大小大于配方 #1 的大小。 这些发现表明 HPPS 颗粒的大小可以通过货物 (DiR-BOA)

加载来控制 / 调节。

[0245] 考虑到在配制具有较高剂量的 DiR-BOA 的颗粒时, HPPS 颗粒的大小增大, 对于 HPPS “最终产物” 的大小的一些控制可以通过调节加入到配方中的核心成分 (DiR-BOA& 胆固醇酯) 的量来实现。因此, 增加 / 减少剂量的核心成分将导致增大 / 减小的尺寸的 HPPS 颗粒。这在图 7C 中示出。强正相关系数在 HPPS 的大小与其 DiRBOA 有效载荷 ($R = 0.91$) 之间确定。

[0246] 当使用 EGF 肽和全长 EGF 作为用于 HPPS 的靶向配体时, 形成的 HPPS 颗粒比用 FA 制备的 HPPS 颗粒稍小 (3-5nm)。所述肽和全长 EGF 似乎限制 HPPS 的大小。

[0247] 4. 用 4F 和 -4F 形成的 (DiR-BOA)HPPS 的比较:

[0248] 利用 $3.0 \mu\text{mol}$ DMPC、 $0.2 \mu\text{mol}$ 胆固醇油酸酯、 $0.2 \mu\text{mol}$ DiR-BOA、和 2mg 的 4F 或 -4F, 如上所指出的, 制备 (DiR-BOA)HPPS 纳米颗粒。

[0249] 如图 8(a) 所示, FPLC 分布显示出对于 -4F (DiR-BOA)HPPS 仅一个峰, 而对于 4F (DiR-BOA)HPPS 有两个峰。因此, 4F 和 -4F 均用于形成均匀的纳米颗粒。

[0250] 如图 8(b) 所示, TEM 成像揭示用 -4F 形成的 (DiR-BOA)HPPS 的球形比用 4F 形成的 (DiR-BOA)HPPS 更均匀。

[0251] 实施例 4

[0252] HPPS 的体外和体内评估

[0253] 除非另外指明, 否则在这些研究中所用的 scPep 为 4F。

[0254] 在下面提及 HPPS 的浓度的情况下, 这些指的是由 HPPS 携带的 DiR-BOA 的浓度。为了确定 [DiR-BOA], 绘制了 DiR-BOA 荧光与 DiR-BOA 浓度的标准曲线。用氯仿-甲醇 (2 : 1, v : v) 从 HPPS 颗粒提取 DiR-BOA。重复提取两次, 并收集氯仿层, 然后用快速真空干燥。将残留物重新悬浮在 1mL 的氯仿-甲醇 (2 : 1, v : v) 中, 并在荧光计上读取荧光。根据荧光读数, 可以从标准曲线确定 HPPS 颗粒中的 DiR-BOA 的浓度。

[0255] HPPS 的浓度还可以基于肽浓度来确定。可以通过 Bradford 分析试剂盒 (Bio-Rad Laboratories, Inc.Hercules, CA) 来确定 HPPS 的肽浓度。在这样的计算中, 假定每个 HPPS 颗粒包含 22 个肽。

[0256] 对于体内试验, tris 盐水是用于给予 HPPS 的缓冲剂。注射的体积通常为 250-350 μL 。

[0257] 实验动物和异位肿瘤的诱导。下面描述了各种肿瘤异种移植模型。这里我们介绍了用于制备具有肿瘤异种移植物的老鼠的一般方法。成年雌性裸鼠 (8-12 周大) 在整个研究中被允许自由获取食物和水。将癌细胞 (通常在 PBS 中 3×10^6 个) 皮下接种到裸鼠的右侧中。将肿瘤接种后 1 到 3 周小鼠 (具有约 5mm 的肿瘤尺寸) 用于指定的研究。

[0258] A.EGFp (DiR-BOA)HPPS (类型 1EGFR- 靶向的 HPPS) 的体外研究:

[0259] 利用共聚焦显微镜研究, 在具有不同 EGFR 表达水平的癌细胞上 (A549 和 MT1: 高表达, HepG₂: 中等表达, H520: 低表达) 检测 EGFp (DiR-BOA)HPPS 的 EGFR- 靶向特异性。利用 OlympusFV1000 激光扫描共聚焦显微镜进行共聚焦研究。在具有 10% 胎牛血清 (FBS) 的 0.2mL 的 RPM11640 细胞培养介质中, A549、MT1 和 H520 细胞与 $3 \mu\text{M}$ 的 EGFp (DiR-BOA)HPPS (这里和下面的体外和体内试验中表达的浓度是

DiR 的浓度) 孵育。如图 9 所示, 在 5 小时和 24 小时孵育后, A549 和 MT1 细胞呈现出具有高于 H520 细胞的 EGFP(DiR-BOA)HPPS 摄取, 表明 HPPS 的 EGFR- 靶向特异性。

[0260] 利用流式细胞术研究来进一步确认 EGFP(DiR-BOA)HPPS 的 EGFR- 特异性, 在这些研究中, 细胞与 EGFP(DiRBOA)HPPS 孵育 3 到 24 小时, 随后在 FV 500 流式细胞仪上进行分析。图 10 表明在与 $1.1 \mu\text{M}$ 的 EGFP(DiR-BOA)HPPS 孵育后在 MT-1 与 H520 细胞中 HPPS 的较高摄取。图 11 示出了利用过量的 EGFP($10 \mu\text{M}$) 作为竞争性抑制剂, MT-1 细胞中 HPPS 的摄取减少。

[0261] B.EGFP(DiR-BOA)HPPS 的体内研究

[0262] 体内 NIR 荧光成像。EGFP(DiR-BOA)HPPS 经由尾静脉以 $250 \mu\text{L}$ Tris- 盐水中 5.2nmol 的浓度被给予小鼠。在注射前、注射后 1、5、和 24 小时进行体内荧光成像。用 CRI Maestro™ 体内成像系统获得荧光图像。用氯胺酮 / 乙酰丙嗪 ($50/5\text{mg/kg i.p.}$) 麻醉小鼠并将其俯卧放置入 Maestro 成像仪的避光室中。用深红滤光镜 ($\text{ex} = 671-705\text{nm}$, $\text{em} = 750\text{nm}$ 长度穿过 ($730-950$, 10nm 步中)) 和 150msec 的曝光时间来获得荧光图像。代表性图像示于图 12 中。到 24 小时, MT1 肿瘤内的荧光强度清楚地可见, 表明 HPPS 被 EGFR- 表达的肿瘤的优先摄取。

[0263] 为了生物分布研究, 收获小鼠 (EGFP(DiR-BOA)HPPS 注射后 24 小时) 的器官 / 组织 (MT-1 肿瘤、肝脏、脾脏、心脏、肌肉、肾和肾上腺)、称重并在 PBS 中匀化。随后将匀浆与 3 倍过量的 CHCl_3 : MeOH ($2 : 1$) 混合物合并, 并涡旋 2 分钟。随后将溶液以 $3,000\text{rpm}$ 离心 2 分钟。利用 Horiba JobinYvon Fluoromax-4 荧光分光光度计, 测量各种样品的荧光强度 ($\text{ex.}748\text{nm}$; $\text{em.}782\text{nm}$)。荧光信号对于样品重量被规格化, 并且比率相对于肌肉和肿瘤组织表示 (参见图 12)。

[0264] C.EGFP- 脂质 (DiR-BOA)HPPS (类型 2EGFR- 靶向的 HPPS) 的体内研究: 用 Cytomics FC 500Series Flow Cytometry System (Beckman Coulter, Inc.Mississauga, Ontario, Canada) 进行一系列流式细胞术试验, 以评估 EGFP- 脂质 (DiR-BOA)HPPS 的 EGFR- 特异性。细胞培养实验在具有 10% 胎牛血清 (FBS) 中的 0.2mL 的 RPM11640 细胞培养介质中进行。首先, 如图 13 中所示, 在与 $1.1 \mu\text{M}$ 的 EGFP- 脂质 (DiR-BOA)HPPS 孵育 3 小时后, A549 细胞具有比 H520 细胞更高的 HPPS 摄取。这些结果表明 EGFP- 脂质 (DiR-BOA)HPPS 在 A549 细胞中的 EGFR- 特异性积聚。EGFR- 特异性被进一步呈现在图 14 中, 表明在具有不同 EGFR 表达水平的细胞系中 HPPS 的时间依赖性摄取。

[0265] EGFP- 脂质 (DiR-BOA)HPPS 的 EGFR- 特异性的进一步证据示于图 15 中。9 倍过量的 EGFP 的使用明显地抑制表达高或中等水平 EGFR 的细胞中该类型 2EGFR- 靶向的 HPPS (右) 的摄取, 其与从类型 1EGFR- 靶向的 HPPS (左) 获得的结果一致。

[0266] D.EGFP- 脂质 (DiR-BOA)HPPS 的体外初步毒性研究: 为了证实这些生物相容的纳米载体确实是无毒的, 利用 MTT 和流式细胞术分析进行体外毒性研究。为了评估毒性, 通过流式细胞术在 A549 细胞中研究浓度依赖性 HPPS 摄取。细胞培养实验在具有 10% 胎牛血清 (FBS) 的 0.2mL 的 RPM11640 细胞培养介质中进行。由于在所有先前研究中使用的 EGFP- 脂质 (DiR-BOA)HPPS 的标准药物剂量是 $1.1 \mu\text{M}$, 所以 EGFP- 脂质 (DiR-BOA)HPPS 的药物- 剂量依赖性细胞内摄取通过增加药物剂量来检验。如图 16c 所示, 2 倍的标准剂量 ($2.2 \mu\text{M}$) 导致摄取饱和。因此, 决定使用直到 6 倍剂量 ($6.6 \mu\text{M}$)

用于毒性评价。如在图 16a(MTT 分析)和图 15b(流式细胞术分析)中看到的,在 MTT 和流式细胞术试验中没有观察到毒性。

[0267] E.EGFP-脂质 (DiR-BOA)HPPS 的体内研究:为了评价 EGFP-脂质 (DiR-BOA)HPPS 的体内表现,检验了几个肿瘤模型。

[0268] 1)MT1 肿瘤异种移植:具有 MT1 肿瘤的雌性裸鼠在静脉内注射 1.8nmol(250 μ l tris-盐水)的 EGFP-脂质 (DiR-BOA)HPPS(图 17)后的几个时间点通过 CRI Maestro™ 成像仪进行检验。对于成像方法,参见体内 EGFP(DiR-BOA)HPPS 研究部分 4B。观察到在所述时间过程期间,纳米颗粒显示出优先在 MT1 肿瘤异种移植中积聚,在 24-48h 达到最大。在 72h, HPPS 开始从肿瘤区清除。

[0269] 2)人类肺原发肿瘤异种移植:EGFP-脂质 (DiR-BOA)HPPS(1.8nmol)的体内表现还在表达 EGFR 的原发肿瘤异种移植中进行评价。如图 18 所示,顶行示出了肾上的原发肿瘤,而底行示出了胸部上的原发肿瘤。利用体内实时 NIR 荧光成像,清楚的是, HPPS 颗粒在注射后 24 小时期间在两个原发肿瘤部位积聚。结果还通过成像切除的组织 and 肿瘤来证实。来自体内的组织/肿瘤成像以类似于整个动物成像的方式进行。(荧光图像在 Maestro 成像仪上用深红色滤光镜(ex = 671-705nm, em = 750nm 长度穿过(730-950, 10nm 步中)和 150msec 的曝光时间获得)。

[0270] F.FA(DiR-BOA)HPPS 的体外研究:为了证实 FA(DiR-BOA)HPPS 的叶酸受体 (FR)-靶向, HPPS 与表达 FR 的细胞 (KB 细胞, 人类表皮样癌细胞)和缺乏 FR 的细胞 (HT-1080 细胞, 人类纤维肉瘤细胞)孵育。在 0.2mL 具有 10%胎牛血清 (FBS)的 RPMI1640 细胞培养介质中进行细胞培养实验。共聚焦成像研究(图 19)表明,在与 FA(DiR-BOA)HPPS(1100ng/mL)孵育 4h 后,在整个 KB 细胞的细胞质看到强 DiR-BOA 荧光,表明 FR 靶向的 HPPS 纳米颗粒的高摄取(顶行)。FA(DiR-BOA)HPPS 的 FR-介导的摄取通过另外的对照实验来确认。首先,当 KB 细胞与伴随过量 FA 的 FA(DiR-BOA)HPPS 孵育时,FA(DiR-BOA)HPPS 的摄取被 FA 竞争性抑制(中行)。第二,HT-1080 细胞 (FR 阴性)中显著荧光的缺乏,表明 FA(DiR-BOA)HPPS 的急切摄取依赖于 FR 介导的过程(底行)。共同地,这些结果提供了 FA(DiR-BOA)HPPS 有效靶向 FR 的强大证据。

[0271] G.与 -4F 形成的 (DiR-BOA)HPPS (“(-4F) (DiR-BOA)HPPS”)的体外研究:HDL 靶向并结合至 SR-B1(净化剂受体类型 1,还称作 HDL 受体)。认为, HPPS 可以模拟 HDL 的 SR-B1 特异性,并且 HPPS 的核心成分可以经由 SR-B1 受体-介导的途径被细胞摄取。

[0272] (-4F) (DiR-BOA)HPPS 纳米颗粒如实施例 3, 部分 4 所述制备。两个细胞系被用于证实 HPPS(DiRBOA)的核心材料通过 SR-B1 途径由细胞摄取的假说:称为 Id1A(mSR-B1)的 SR-B1+细胞系和称为 LDLA7 的 SR-B1-细胞系(Krieger, MIT)。羧基荧光素标记的磷脂 (DSPE-PEG-CF)(1, 2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺-N-[聚(乙二醇)2000-N'-羧基荧光素])被用于追踪结合至 SR-B1 后 HPPS 的磷脂成分的命运(结局)。类似地,荧光素标记的 4F 肽被用于追踪肽成分的命运(图 20)。

[0273] DSPE-PEG-CF 从 Avanti Lipids 购买。HPPS 的荧光素标记如制造商的说明所建议的进行。简单地说,如上所述制备 HPPS,并针对 0.1M 碳酸钠缓冲剂 (pH 9)

透析。将 FITC(Sigma) 以 1mg/mL 的浓度溶解在无水 DMSO 中。然后将 FITC 以 1 : 1(FITC : HPPS 肽) 的摩尔比加入到 HPPS 中。在缓和和持续地搅拌 HPPS 溶液的同时, 非常缓慢地加入 FITC。HPPS-FITC 溶液在黑暗中被孵育, 并且反应在 4℃ 下持续 8 小时。在该反应期间后, HPPS 针对 Tris- 缓冲盐水进行透析, 并且未结合的 FITC 通过 FPLC 去除。

[0274] 同时, 将近红外荧光探针 DiR-BOA 核心 - 加载到具有胆固醇油酸酯的 HPPS 中, 以追踪货物的命运。HPPS 货物被 SR-B1⁺ 细胞的特异性 - 摄取通过流式细胞仪, 利用基于 HDL 的竞争性抑制来量化。每个 HPPS 成分的亚细胞命运通过共聚焦成像来可视化。通过共聚焦显微镜产生的三维图像允许定位每个标记的组件的命运, 不管它是在细胞的表面还是内部(亚细胞区室)。

[0275] 图 21 示出了 (DiR-BOA)HPPS 对于 SR-B1 受体的特异性。简单地说, SR-B1 阳性和阴性细胞(分别为 IdIA(mSR-B1)) 和 LDLA7), 每种 20,000 个, 对于 LDLA7 在 Hams F-12 介质(1% 青霉素 / 链霉素, 2mM L- 谷氨酰胺和 5% FBS) 中被培养, 并且对于 IdIA(mSR-B1) 在 Hams F-12 和 +300 μg/mL G418 中被培养。随后这些细胞与 (DiR-BOA)HPPS 颗粒(1100ng/mL) 孵育 3 小时。在另外的抑制实验中, 细胞暴露于 (DiR-BOA)HPPS 和 HDL(50 摩尔过量的; 400 μg; 2.2×10^{-4} M)。在 3 小时孵育后, 共聚焦图像显示 (DiR-BOA)HPPS 在 SR-B1 阳性细胞(IdIA(mSR-B1)) 中的强摄取, 但是在 SR-B1 阴性细胞(LDLA7) 中没有显示。此外, 过量的 HDL 有效抑制 (DiR-BOA)HPPS 在 IdIA(mSR-B1) 细胞中的摄取。

[0276] 图 22 示出了在结合至 SR-B1 后 HPPS 的每个组件的命运。类似地, 20,000 个细胞(IdIA(mSR-B1)) 在具有 10% 胎牛血清的 RPMI1640 细胞培养介质中进行培养。FITC- 脂质或 FITC-(-4F) (DiRBOA)HPPS(1100ng/mL) 与所述细胞孵育 1 小时。

[0277] 其后, 共聚焦成像被用于鉴定与 IdIA(mSR-B1) 细胞孵育后 FITC- 脂质 (DiR-BOA)HPPS 和 FITC-(-4F) (DiR-BOA)HPPS 的每个组件的亚细胞定位。发现 HPPS 可以与 SR-B1 结合并将 DiR-BOA 直接释放到细胞溶质中, 而大多数标记的 -4F 肽和磷脂停留在细胞的表面上。

[0278] 来自 HPPS 纳米颗粒的 DiR-BOA 的释放在图 23 中进一步示出。在 IdIA(mSR-B1) 与 (DiR-BOA)HPPS 的 3 小时孵育后, 来自 DiR-BOA 的荧光信号仅在未冲洗的细胞的细胞溶质内可以观察到。由于 DiR-BOA 在 HPPS 的小核心内经历自我 - 猝灭作用, 因此在细胞外部, 对于 DiR-BOA 很少到没有信号可以被看到。一旦 (DiR-BOA)HPPS 结合至 SR-B1 并在靶细胞中释放 DiR-BOA, DiR-BOA 信号的信号强度增加。所述细胞的非常大的胞内体积允许 DiR-BOA 分子分散在整个细胞溶质中, 并因此克服自我 - 猝灭作用。

[0279] 流式细胞术研究被用于评价 (-4F) (DiR-BOA)HPPS 在 SR-B1⁺ 和 SR-B1⁻ 细胞系中的摄取。 5×10^5 个细胞 / 孔在 12- 孔板中被培养 2-3 天。使用具有 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基作为细胞培养基。细胞在各种条件下被处理 5 小时。FC500 被用于测量细胞的荧光强度。

[0280] 为了研究 -4F 肽对颗粒摄取的影响, 在 SR-B1⁺ 和 SR-B1⁻ 细胞系中, 由 DiR-BOA、DMPC 和 -4F 制备的 HPPS 与由 DiR-BOA 和 DMPC 制备的乳液进行比较。

DiR-BOA 的最终浓度为 1,100ng/mL。

[0281] 图 24 示出了 -4F 对于 (DiR-BOA)HPPS 颗粒的有效细胞摄取的要求。将 1100ng/mL 的 (DiR-BOA)HPPS 的溶液和 DiR-BOA 的无肽乳液暴露于 IdIA (SR-B1) 和 LDLA7 细胞 3 小时。细胞培养实验对于 LDLA7 在 Hams F-12 介质 (1%青霉素 / 链霉素, 2mM L-谷氨酰胺和 5% FBS) 中进行, 并且对于 IdIA (mSR-B1) 在 Hams F-12 和 +300 μ g/mL G418 中进行。在孵育期后, 细胞通过流式细胞仪进行检验。SR-B1 阳性细胞 (IdIA (mSR-B1)) 内在化比 DiR-BOA 乳液高得多的水平的 (DiR-BOA)HPPS (3.5x)。LDLA7 (SR-B1 阴性细胞) 摄取最小量的 (DiR-BOA)HPPS 或乳液。

[0282] 图 25 示出了 IdIA (mSR-B1) 细胞中 -4F (DiR-BOA)HPPS 的浓度 - 依赖性摄取。对于 IdIA (mSR-B1), 细胞培养实验在 0.2mL 的 HamsF-12 和 +300 μ g/mL G418 中进行。SR-B1 阳性细胞 (IdIA (mSR-B1)) 与从 13.8 到 1100ng/mL 范围的不同浓度的 -4F (DiR-BOA)HPPS 孵育 3 小时。流式细胞术分析揭示 -4F (DiR-BOA)HPPS 的摄取与颗粒的孵育剂量成比例。增加量的 -4F (DiR-BOA)HPPS 导致增加量的伴随 IdIA (mSR-B1) 细胞的 DiR-BOA。IdIA (mSR-B1) 细胞中 -4F (DiR-BOA)HPPS 的饱和摄取发生在 440ng/mL 处。

[0283] HDL 以剂量依赖方式抑制 (-4F) (DiR-BOA)HPPS 的摄取 (图 26)。对于 IdIA (mSR-B1), 细胞培养实验在 0.2mL 的 Hams F-12 和 +300 μ g/mL G418 中进行。IdIA (mSR-B1) 细胞与 HDL 和 (-4F) (DiR-BOA)HPPS (摩尔比从 0 : 1 到 50 : 1 范围; HDL 浓度从 9.0×10^{-7} 到 2.2×10^{-4} 摩尔范围) 孵育 3 小时。增加浓度的 HDL 抑制 IdIA (mSR-B1) 细胞中 (-4F) (DiR-BOA)HPPS 摄取, 具有增加的效率。在 50 : 1 摩尔过量的 HDL 处观察到 (-4F) (DiR-BOA)HPPS 细胞摄取的接近完全的抑制。这些结果进一步证实 (-4F) (DiR-BOA)HPPS 的 SR-B1 介导的摄取。

[0284] 图 27 进一步示出了 (-4F) (DiR-BOA)HPPS 在 SR-B1⁺ 细胞中的选择性摄取, 以及该摄取被 HDL 的抑制。 2×10^4 个细胞 / 孔 SR-B1⁺ 和 SR-B1⁻ 细胞在 8 孔盖玻片室中被培养 2-3 天。具有 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基被用作细胞培养基。在共聚焦研究前 1 天, 所述细胞培养基被变成没有 FBS 的 RPMI 1640 培养基。细胞在各种条件下被处理 5 小时。

[0285] 扫描共聚焦显微镜也被用于评价细胞中 (-4F) (DiR-BOA)HPPS 的摄取 (图 27)。细胞培养实验对于 LDLA7 在 Hams F-12 介质 (1%青霉素 / 链霉素, 2mM L-谷氨酰胺和 5% FBS) 中进行, 并且对于 IdIA (mSR-B1) 在 Hams F-12 和 +300 μ g/mL G418 中进行。简单地, 2.39 μ g/mL 的 (-4F) (DiR-BOA)HPPS 与 IdIA (mSR-B1) 和 LDLA7 细胞孵育 3 小时。孵育期后, 在 IdIA (mSR-B1) 中观察到显著的荧光信号, 但在 LDLA7 中没有观察到。在类似的抑制研究中, HDL (50 倍过量; 2.2×10^{-4} M) 与 (-4F) (DiR-BOA)HPPS 一起孵育。3 小时孵育后, 在 IdIA (mSR-B1) 中没有检测到荧光, 表明 HDL 完全阻断 IdIA (mSR-B1) 中 (-4F) (DiR-BOA)HPPS 的摄取。在 LDLA7 细胞中没有检测到荧光。

[0286] 图 28 示出了 IdIA (mSR-B1) 细胞中 (4F 和 -4F) (DiR-BOA)HPPS 摄取的效能。细胞培养实验对于 IdIA (mSR-B1) 在 0.2mL 的 Hams F-12 和 +300 μ g/mL G418 中进行。14 到 220ng/mL 的 (4F 和 -4F) (DiR-BOA)HPPS 与 IdIA (mSR-B1) 细胞孵育 3 小时。流

式细胞术揭示 HPPS 的两个剂型均以剂量依赖的方式在 1d1A (mSR-B1) 细胞中被摄取。(-4F) (DiR-BOA) HPPS 显示出比其 4F 对应物稍高的细胞摄取。

[0287] H. 与 -4F 形成的 (DiR-BOA) HPPS (“(-4F) (DiR-BOA) HPPS”) 的体内研究：利用 Maestro 系统的体内成像在具有人类 KB (SR-B1⁺) 肿瘤异种移植物的裸鼠上进行 (图 29)。在 -4F (DiR-BOA) HPPS (5.2nmol ; 350 μ L tris- 盐水) 注射后直到 72 小时收集光学图像。可以看到 DiR-BOA 荧光信号在早到注射后 8 小时选择性地定位在 KB 肿瘤异种移植植物中。也示出了切除的器官的荧光图像。

[0288] I. (-4F) EGF (DiR-BOA) HPPS (全长 EGF 作为靶向配体) 的体外研究：利用共聚焦显微镜研究在具有不同 EGFR 表达水平 (A549 : 高表达, H520 : 低表达) 的癌细胞上检验 (-4F) EGF (DiR-BOA) HPPS 的 EGFR- 靶向特异性。细胞培养实验在 0.2mL 具有 10% 胎牛血清 (FBS) 的 RPM11640 细胞培养介质中进行。简单地说, 共聚焦研究在与 1.0 μ M 的 (-4F) EGF (DiR-BOA) HPPS (这里表示的浓度和下面的体外和体内试验中的浓度是 DiR 的浓度) 孵育的 A549 和 H520 细胞上进行。图 30(a) 示出了 A549 细胞具有高于 H520 细胞的 (-4F) EGF (DiR-BOA) HPPS 摄取。然而, 应当注意, (-4F) (DiR-BOA) HPPS 的摄取在 A549 中比在 H520 细胞中也明显更高。对于 A549 和 H520 进行多个表面受体蛋白的蛋白质印迹分析 (图 30b)。相对于 H520 细胞, EGFR 在 A549 细胞中过度表达。SR-B1 表达在两个细胞系之间是相当的, 而叶酸受体水平与 A549 相比似乎在 H520 中过度表达。

[0289] (-4F) (DiR-BOA) HPPS 和 (-4F) EGF (DiR-BOA) HPPS (1.0 μ M) 与 H520、A549 和 EGFR-GFP-A549 细胞孵育 3 小时。如前所述, 细胞培养实验在具有 10% 胎牛血清 (FBS) 的 0.2mL 的 RPM1 1640 细胞培养介质中进行。流式细胞术数据表明 (-4F) (DiR-BOA) HPPS 在所有 3 种细胞中相等地被摄取。HDL (400 μ g) 也相等地抑制这些颗粒在这些细胞中的摄取 (参见图 31)。(-4F) EGF (DiR-BOA) HPPS 在 A549 和 EGFR-GFP-A549 中的摄取大大地超过 H520 的摄取。HDL 的存在减少但是不消除 (-4F) EGF (DiR-BOA) HPPS 在三个细胞系中的摄取。(-4F) EGF (DiR-BOA) HPPS 在 A549 和 EGFR-GFP-A549 细胞中的残余摄取反映了在 EGFR/SR-B1 阳性细胞中该颗粒的 EGFR 介导的摄取。

[0290] 为了确定什么角色 SR-B1 可以有助于 EGF-HPPS 的摄取, SR-B1 阴性细胞、LDLA7 被共转染有助于 EGFR 和绿色荧光蛋白 (GFP) 的基因。该实验去除了 SR-B1 可以对于 EGF-HPPS 的细胞摄取进行的任何贡献。如前所述, 细胞培养实验在 Hams F-12 介质 (1% 青霉素 / 链霉素, 2mM L- 谷氨酰胺和 5% FBS) 中进行。在与 (-4F) EGF (DiR-BOA) HPPS (1.0 μ M) 孵育 3 小时后, EGFR-GFP-LDLA7 细胞显示出在细胞溶质内的 DiR-BOA 的强信号, 而对于 EGFR 的 GFP 信号在外质膜上被可视化 (图 32)。进行共聚焦研究以评价 HDL 对 (-4F) EGF (DiR-BOA) HPPS 在 EGFR-GFP-LDLA7 细胞中摄取的作用 (图 33)。如在 GFP 道中可以看到, 被成功转染有 EGFR 和 GFP 的 LDLA7 细胞构成性地表达荧光。在用 (-4F) EGF (DiR-BOA) HPPS (1.0 μ M) 处理后, 可以在细胞内检测到 DiRBOA 信号 (DiR 道)。当用 (-4F) EGF (DiR-BOA) HPPS 处理的期间加入过量的 HDL (400 μ g) 时, 来自 DiRBOA 的荧光信号在整个处理的细胞中仍可看到。EGFR-GFP-LDLA7 细胞中 (-4F) EGF (DiR-BOA) HPPS 摄取的程度在有或没有 HDL 竞争

的情况下是类似的。因此, HDL 对于 EGFR-GFP-LDLA7 细胞中 (-4F) EGF (DiR-BOA) HPPS 的摄取没有影响。这些发现表明 EGFR-GFP-LDLA7 细胞中 (-4F) EGF (DiR-BOA) HPPS 的特异性 EGFR 介导的摄取。

[0291] EGFR-GFP-A549 和 H520 细胞与 $1.0\ \mu\text{M}$ (-4F) EGF (DiR-BOA) HPPS 孵育 3 小时。细胞培养实验在具有 10% 胎牛血清 (FBS) 的 0.2mL 的 RPM11640 细胞培养介质中进行。3 小时孵育期后, 共聚焦成像显示 EGFR-GFP-A549 细胞中的强荧光 (图 34)。过量 HDL 的存在稍微减少这些细胞中的荧光信号。过量 HDL 和 EGF 的组合将 EGFR-GFP-A549 细胞中的荧光信号显著减少到类似于在单独的细胞对照中看到的水平。没有 H520 处理组呈现出 DiR-BOA 荧光。这表明 H520 并不摄取任何 (-4F) EGF (DiR-BOA) HPPS。

[0292] 在图 35 中, (-4F) EGF (DiR-BOA) HPPS ($1.0\ \mu\text{M}$) 与 A549 和 H520 细胞孵育。细胞培养实验在具有 10% 胎牛血清 (FBS) 的 0.2mL 的 RPM11640 细胞培养介质中进行。在该孵育期期间还加入 HDL ($400\ \mu\text{g}$) 以消除 SR-B1 对于摄取过程可能具有的任何贡献。所述细胞在 HPPS 暴露后 1、3 和 6 小时被监测。在 HDL 存在的情况下, A549 表现出大大高于 H520 的 (-4F) EGF (DiR-BOA) HPPS 的摄取, 然而, 在 HDL (插入物) 缺乏时, A549 和 H520 之间的荧光信号的差异显著减少。这些发现表明 SR-B1 有助于 SR-B1/EGFR 阳性细胞中 (-4F) EGF (DiR-BOA) HPPS 的摄取。

[0293] J. (-4F) EGF (DiR-BOA) HPPS (作为靶向配体的全长 EGF) 的体内研究: 图 36 示出了在 (-4F) EGF (DiR-BOA) HPPS (在 tris- 盐水中的 5.2nmol) 静脉内注射后多个时间处具有 A549 和 H520 肿瘤异种移植物的裸鼠的体内光学图像。在注射后早期, 荧光信号在整个动物中被看到。到 22 小时, 聚焦信号可以在 A549 和 H520 中被看到, 而身体的其余部位中的荧光信号极大地减少。该强荧光信号在整个研究期间保持在 A549 肿瘤中; 然而, 到 3 天, H520 肿瘤中的信号被清除。这些结果表明 A549 肿瘤中的 EGFR 有助于积聚和保持 (-4F) EGF (DiR-BOA) HPPS, 而 H520 中的摄取是非特异性和短暂的。

[0294] K. KB 肿瘤异种移植体中 (-4F) EGF (DiR-BOA) HPPS 的体内研究: 图 37A 示出了在 (-4F) EGF (DiR-BOA) HPPS (5.2nmol , tris- 盐水中) 的 i.v. 注射后多个时间处具有 KB 肿瘤异种移植体的裸鼠的体内光学图像。仅肿瘤组织被 DiR-BOA 荧光增强, 其在 48h 处达到最大。图 37B 中, (-4F) (DiR-BOA) HPPS (HPPS) (5.2nmol , tris- 盐水中)、(-4F) EGF (DiR-BOA) HPPS (EGF-HPPS) (5.2nmol , tris- 盐水中) 和 EGF-HPPS+HDL (5.2nmol 和 $0.14\ \mu\text{mol}$, tris- 盐水中) 颗粒的生物分布在具有 KB 异种移植体的小鼠中被评估。生物分布图均显示 DiR-BOA 在肿瘤中的高摄取, 超过除了肝脏的所有其他正常器官。EGF-HPPS 的肿瘤摄取高于 HPPS 或 EGF-HPPS+HDL 的摄取。在图 37C 中, HPPS、(-4F) PEG (DiR-BOA) HPPS (PEG-HPPS) (PEG-HPPS 按照图 3 中描述的方案合成 (用 1, 2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000] (DSPE-PEG(2000) 代替 EGFp) 和 EGF-HPPS 的循环半衰期在正常裸鼠中进行确定。所有动物接受 tris- 盐水中 5.2nmol 的各自的纳米颗粒的静脉内注射。在纳米颗粒注射前和注射后的多个时间收集血液样品。DiR-BOA 从血液样品提取, 并且其荧光在荧光计上进行确定。循环半衰期被测定为大约 14h, 与迄今最佳设计的纳米载体相当。最后, 图 37D 示出了具有已经用红色荧光蛋白稳定转染的双 KB 肿瘤异种移植体的小鼠。在注射

EGF-HPPS (5.2nmol, tris- 盐水中) 后, 可以看到, DiR-BOA 的荧光与红色荧光蛋白的信号紧密重叠。 这些结果表明 EGF-HPPS 纳米颗粒可以有效地靶向表达 EGFR 的肿瘤。

[0295] L.(-4F)EGF (DiR-BOA)HPPS 的特异性 EGFR 介导的细胞摄取与非特异性组织积聚的体内确认

[0296] 具有 KB (EGFR+ ' ve) 和 H520 (EGFR- ' ve) 肿瘤异种移植物的裸鼠被天然 HDL (0.14 μ mol, tris- 盐水中) 随后紧接 (-4F)EGF (DiR-BOA)HPPS (5.2nmol, tris- 盐水中) 静脉内共注射。 注射后 48 小时, 杀死小鼠, 并切除肿瘤。 用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 冲洗组织, 然后将 40mg 的每个组织用于“组织分析”。 类似地, 将 150mg 的每个组织用于“细胞分析”。

[0297] 组织分析。 组织样品在 PBS 中被匀化, 接着如先前在 B 部分中 (“EGFp (DiR-BOA)HPPS 的体内研究”) 描述的进行氯仿; 甲醇提取。 测量提取物的组织荧光并表示为每单位 (mg) 组织的荧光。

[0298] 细胞分析。 在匀化后, 利用尼龙筛 (孔径大小 70 μ m) 过滤样品以去除碎片。 随后用 PBS 冲洗过滤的样品 (释放的细胞) 两次, 并用红血球裂解缓冲液 (0.1% 碳酸氢钾、0.8% 氯化铵、0.1mM EDTA) 处理 10 分钟以去除红血球。 利用倒置显微镜用血细胞计对细胞计数。 其后, 用氯仿; 甲醇提取细胞 (如上所述)。 测量细胞提取物的荧光并表示为每百万个细胞的荧光。

[0299] 在组织和细胞水平上 (-4F)EGF (DiR-BOA)HPPS 摄取的比较在图 38 中示出。 当从组织水平观察时, KB 和 H520 肿瘤异种移植物将 (-4F)EGF (DiR-BOA)HPPS 积聚到相等的程度。 相反地, 当在细胞水平检查时, KB 细胞比 H520 摄取更高程度 (2x) 的 (-4F)EGF (DiR-BOA)HPPS。

[0300] (-4F)EGF (DiR-BOA)HPPS 的组织积聚反映了由于增强的渗透性和保留机制的颗粒的细胞外诱捕以及上皮细胞中颗粒的胞内摄取的复合。 当分离细胞并去除来自胞外因素的贡献时, 出现不同的结果。 HPPS 的 EGFR 介导的摄取的较清楚的图片被显示, 此外, 由于天然 HDL 的共注射, SRBI 对 HPPS 摄取的贡献也被最小化。 共同地, 这些结果证实 (-4F)EGF (DiR-BOA)HPPS 纳米颗粒的 EGFR 靶向特异性。

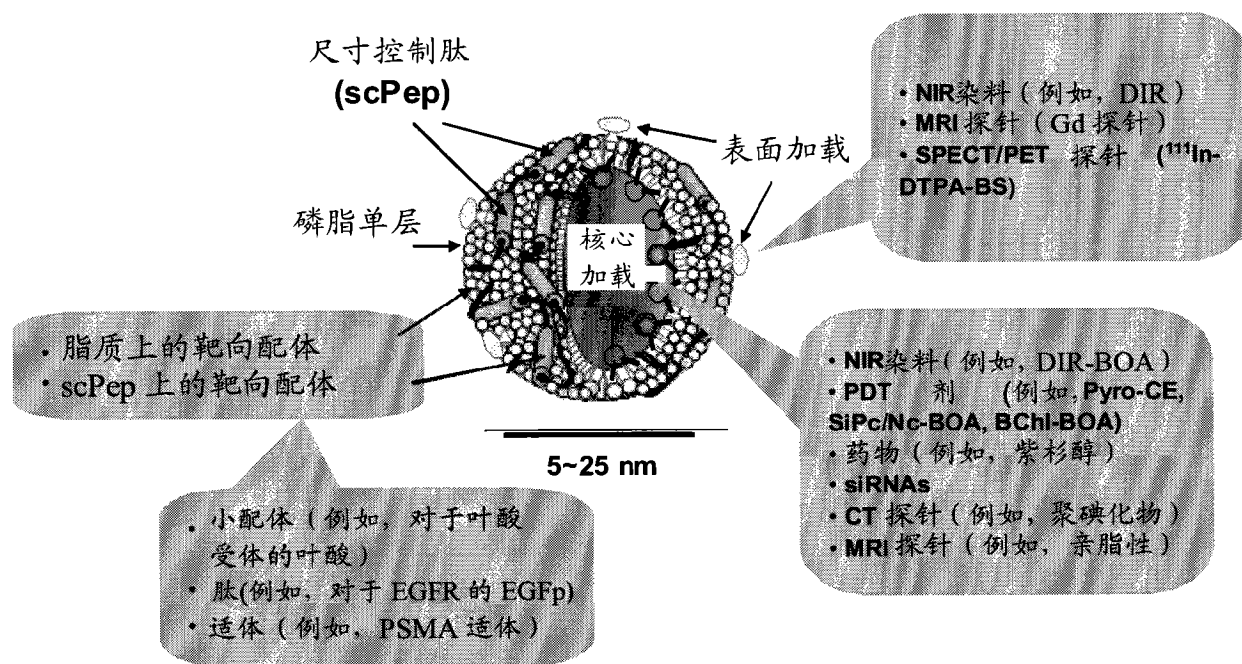


图 1

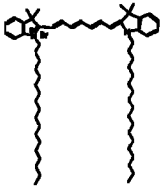
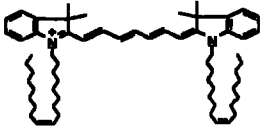
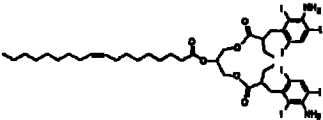
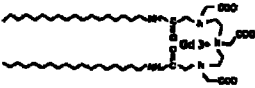
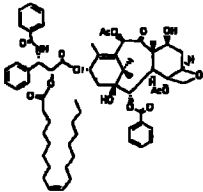
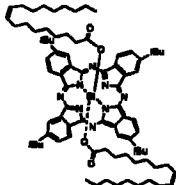
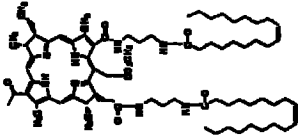
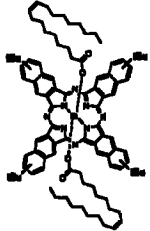
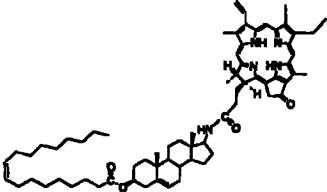
结构	功能	标记类型	简写
	NIR 光学成像	表面标记	DiR
	NIR 光学成像	核心加载的	DiRBOA
	CT 剂	核心加载的	ITG-OL
	MRI 剂	表面标记的	Gd-DTPA
	化疗药	核心加载的	PTX-OL
	PDT 剂	核心加载的	SiPcBOA
	PDT 剂	核心加载的	BchlBOA
	PDT 剂	核心加载的	SiNcBOA
	PDT 剂	核心加载的	Pyro-CE

图 2

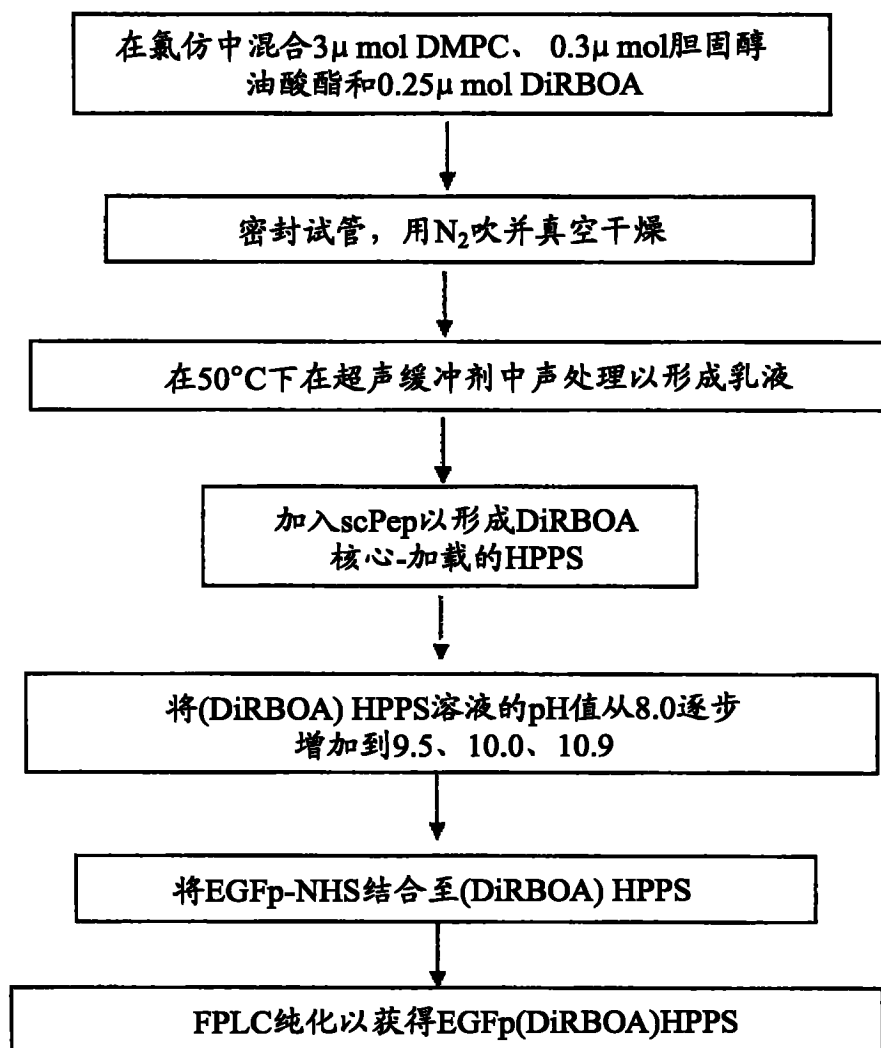


图 3

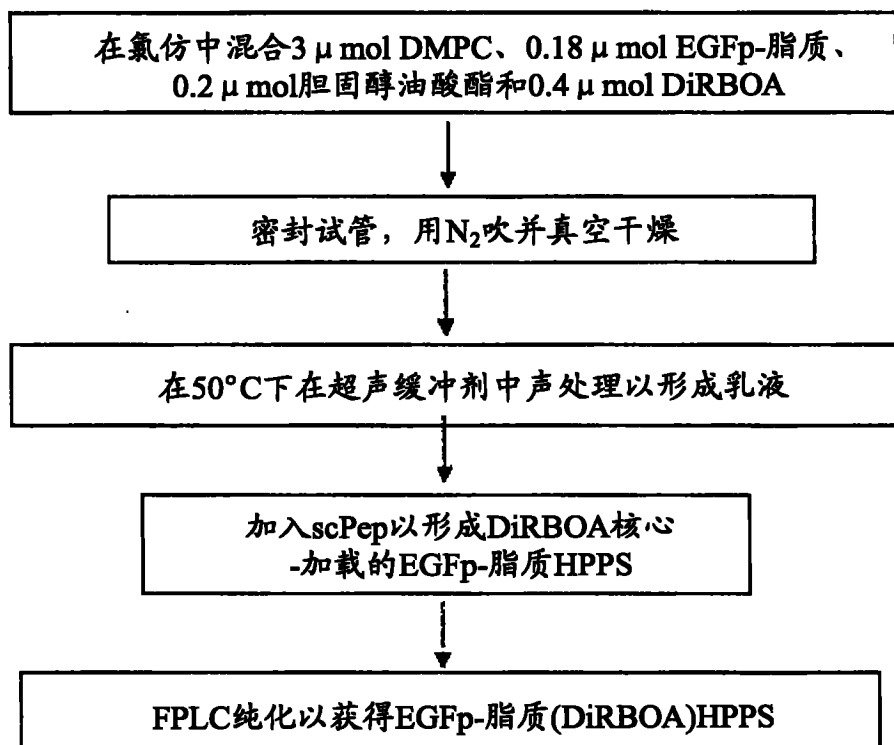


图 4

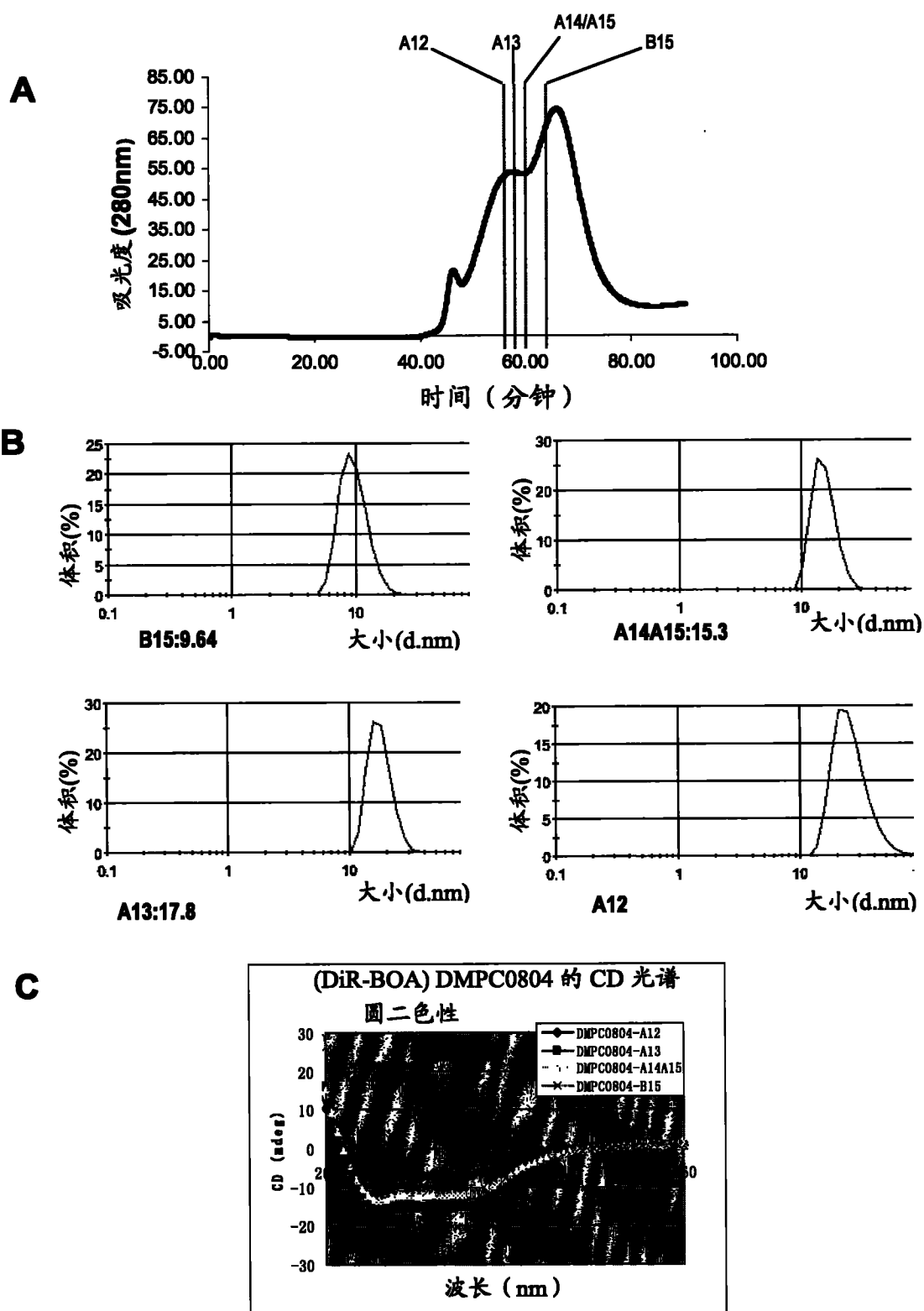


图 5

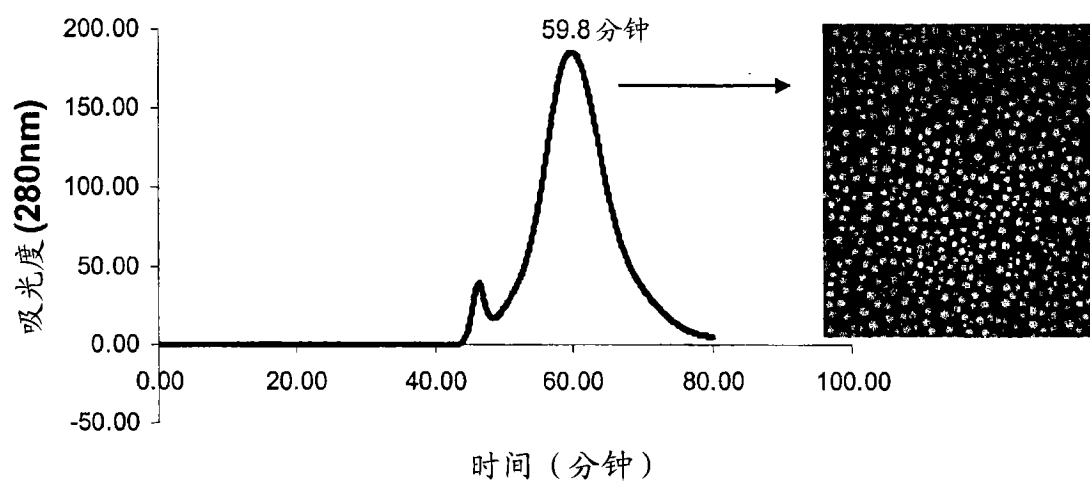


图 6

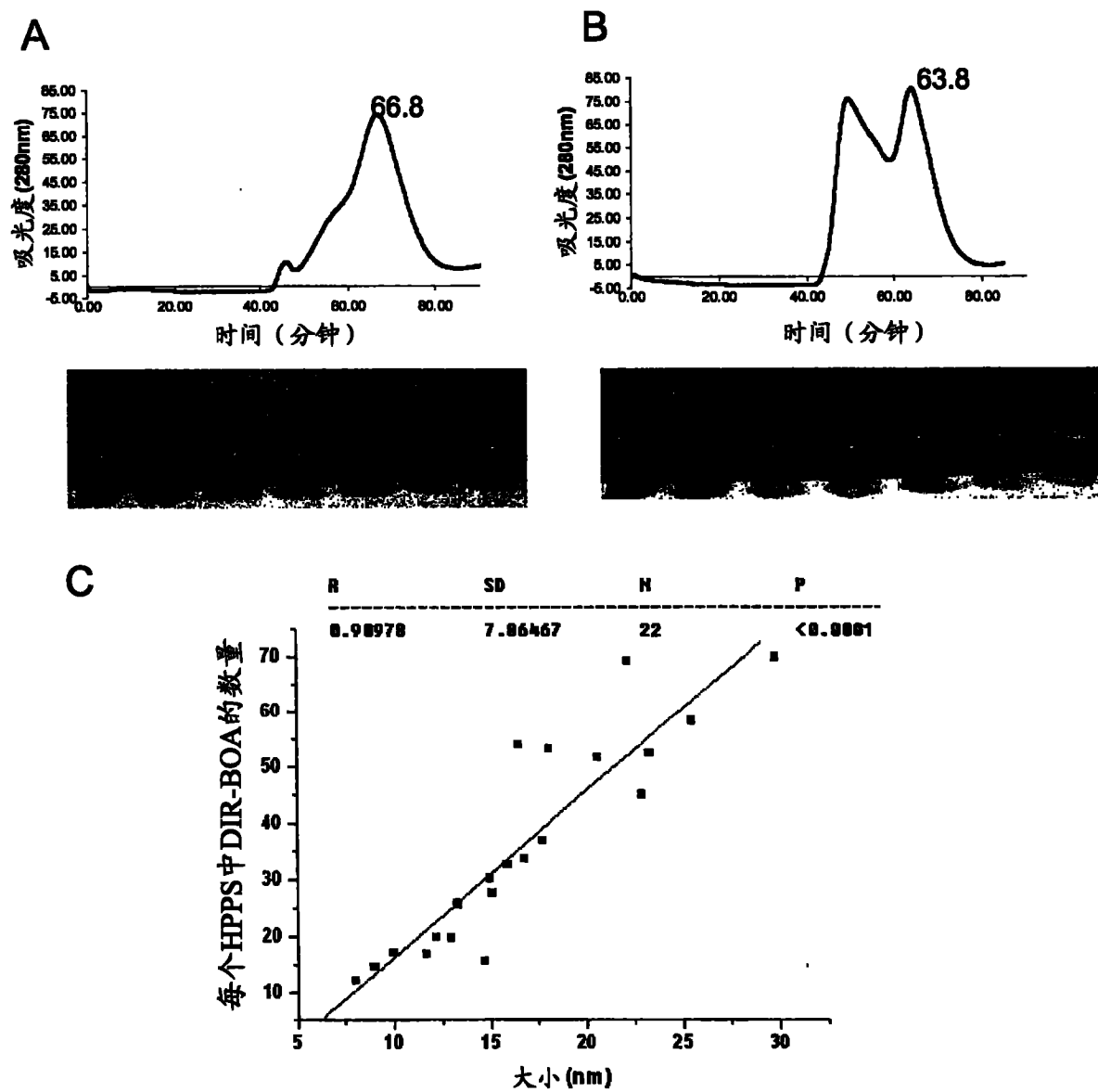


图 7

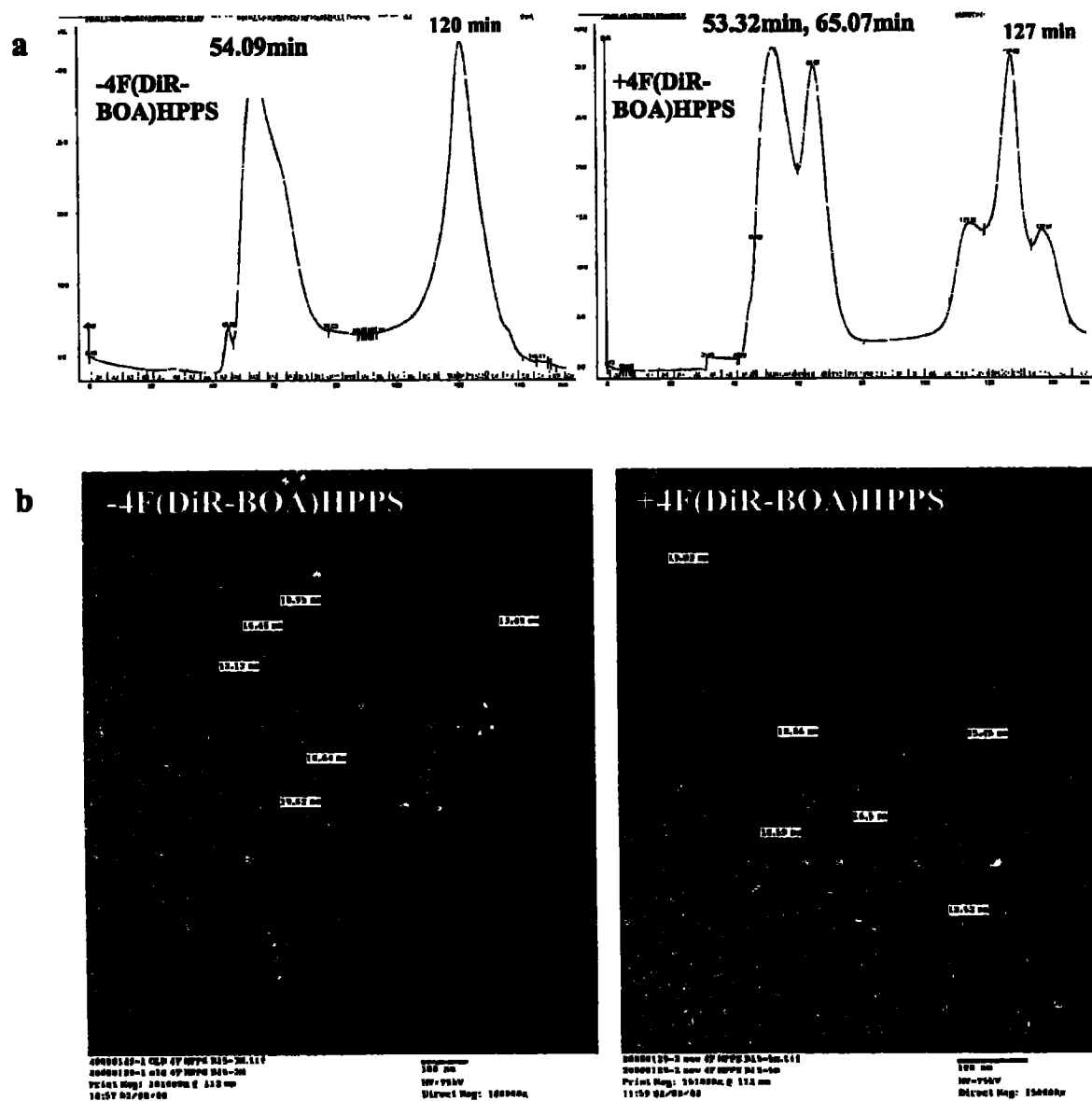


图 8

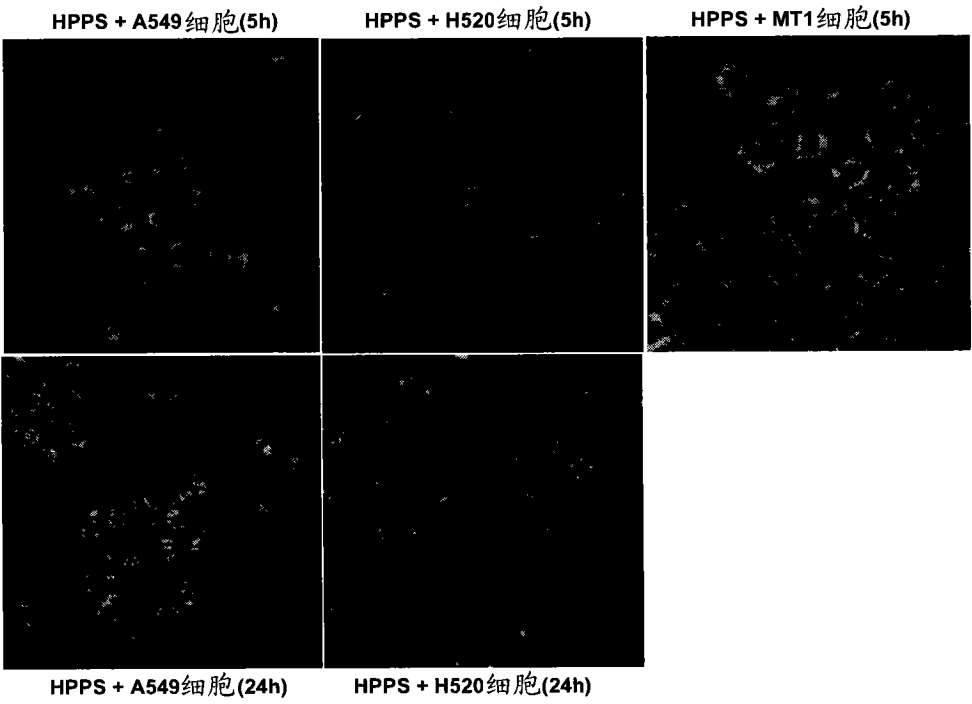


图 9

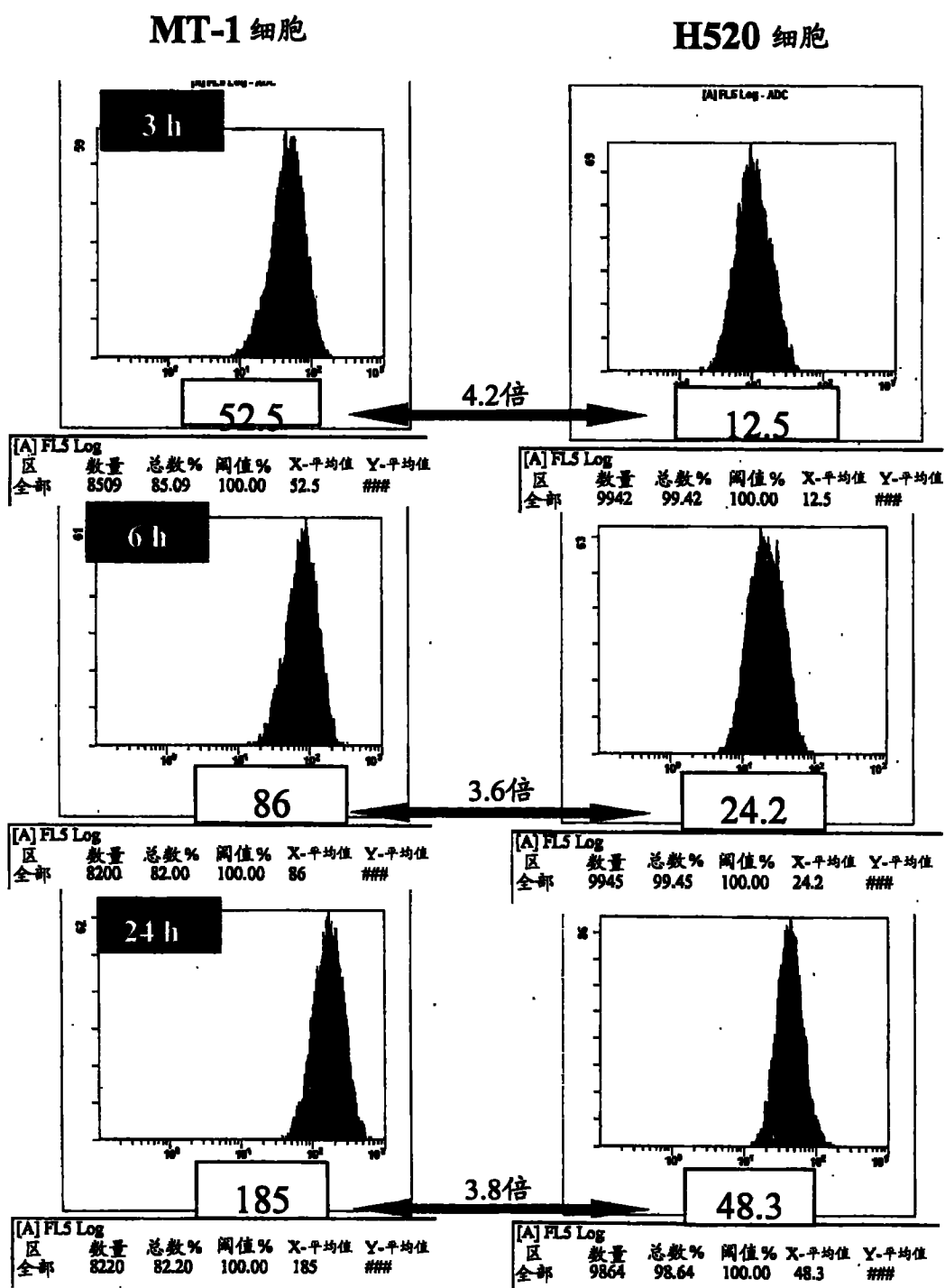


图 10

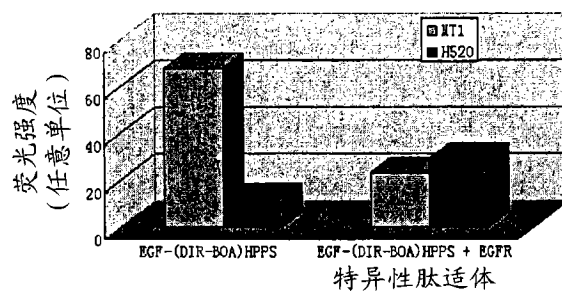
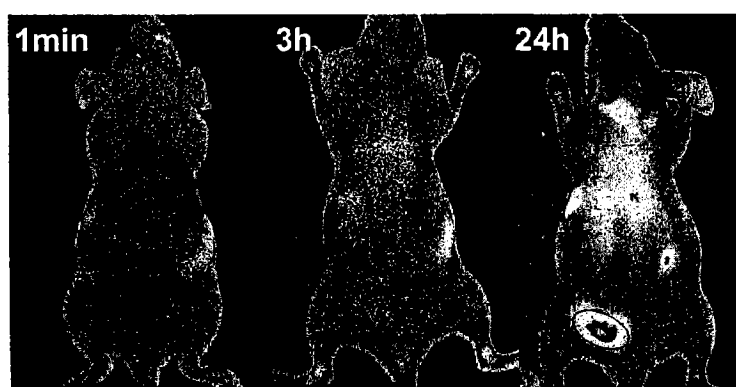


图 11



器官	重量 (mg)	荧光强度 (FI, $\times 10^5$)	规格化的 FI (FI/g)	器官与肌肉的 FI 比	器官与肿瘤的 FI 比
肌肉	127.7	0.4	0.0031	1.00	
肺	69.9	1.76	0.0252	8.04	
MT-1	122.3	2.42	0.0198	6.32	
肾脏	247	2.54	0.0103	3.28	
脾脏	128.5	22.8	0.1774	56.65	8.97
肝脏	178.6	18.06	0.1011	32.28	5.11
心脏	139.7	3.45	0.0247	7.88	
肾上腺	6.9	0.947	0.1372	43.82	6.94

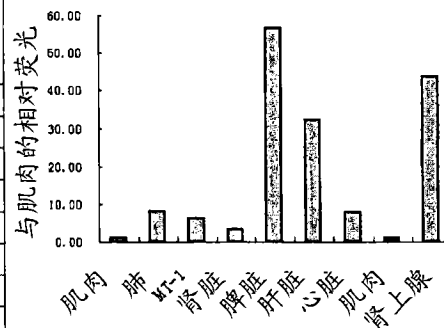


图 12

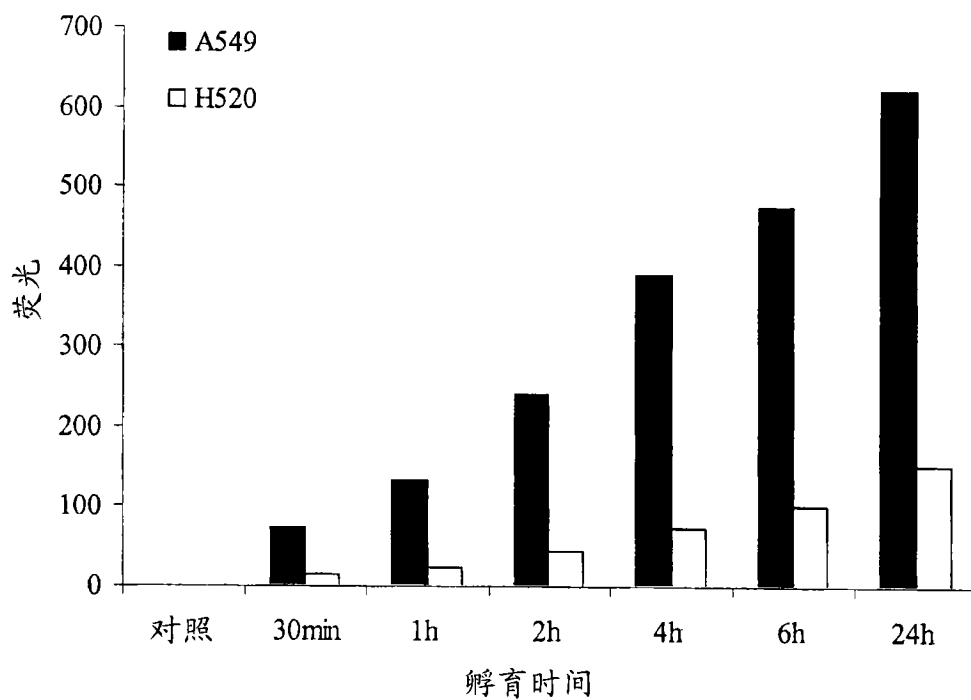


图 13

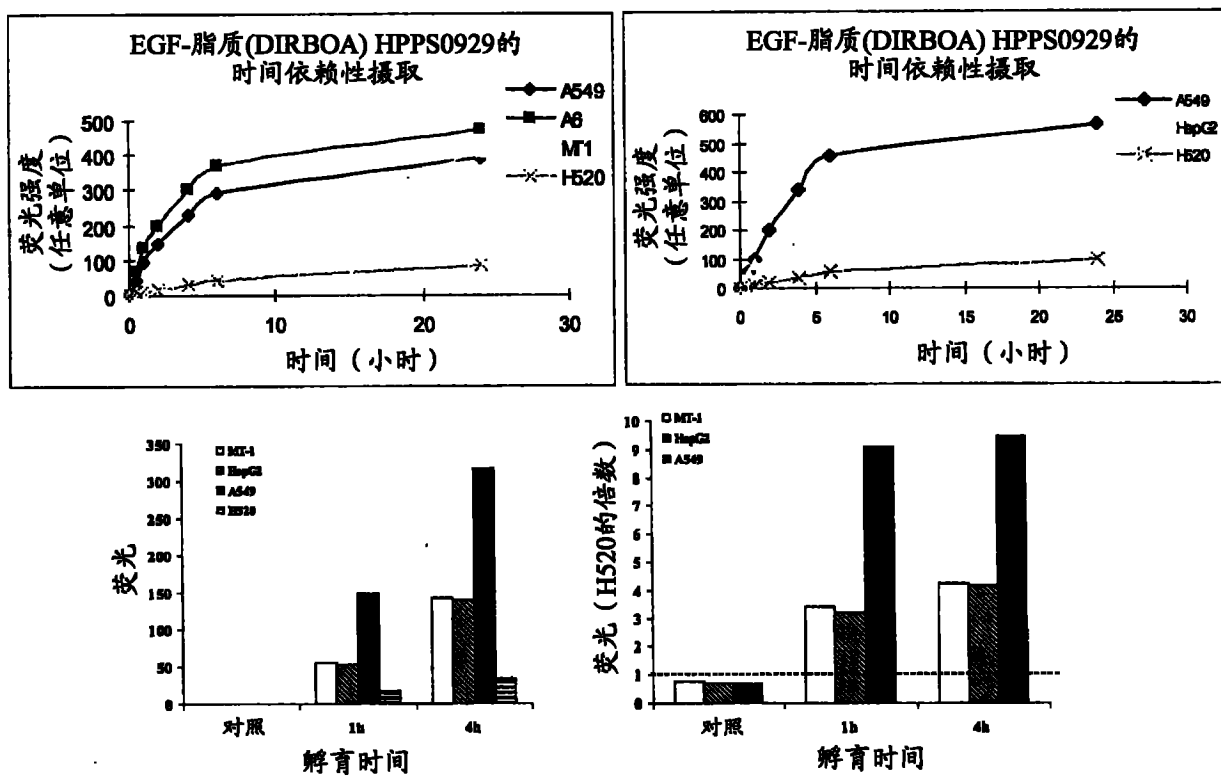


图 14

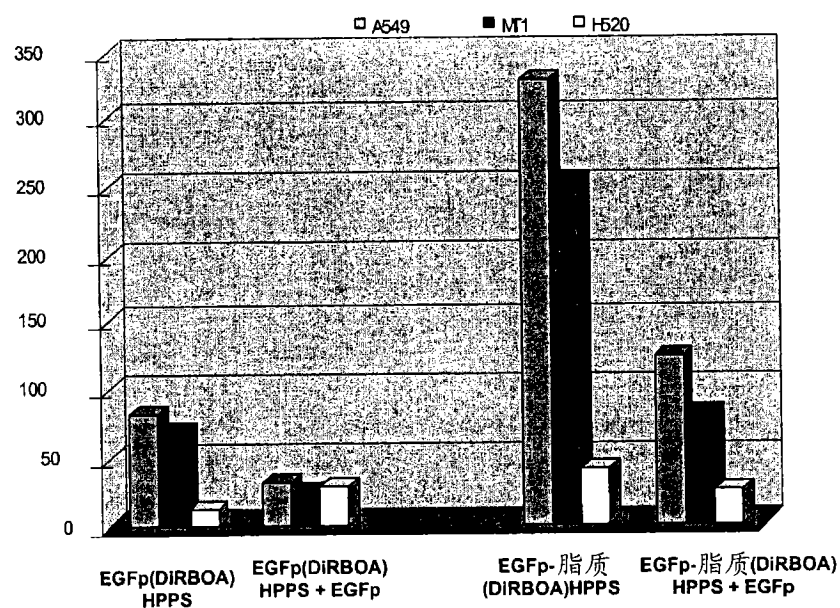


图 15

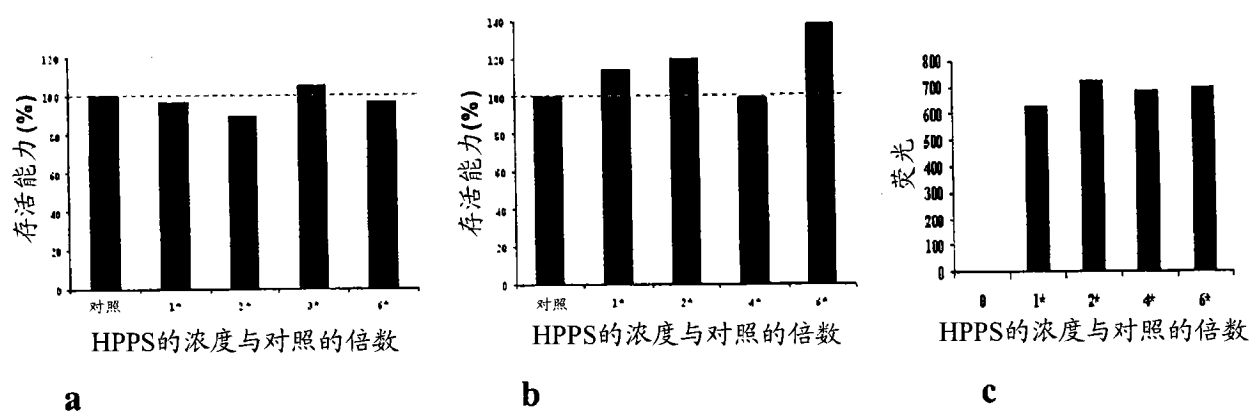


图 16

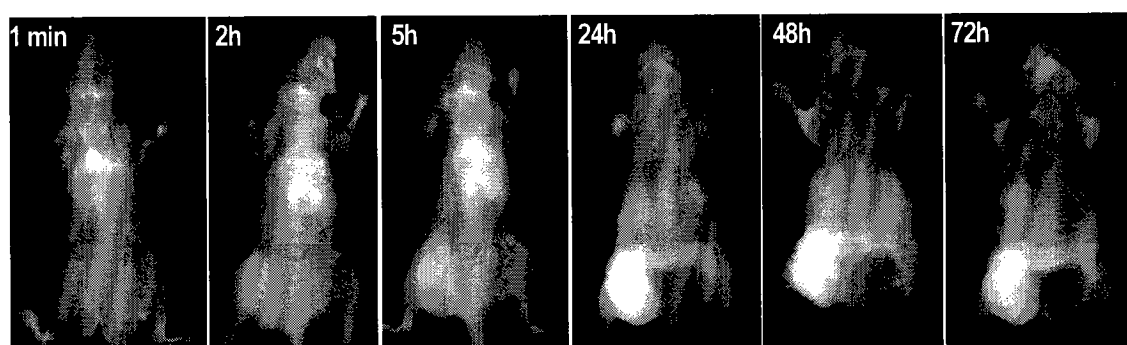


图 17

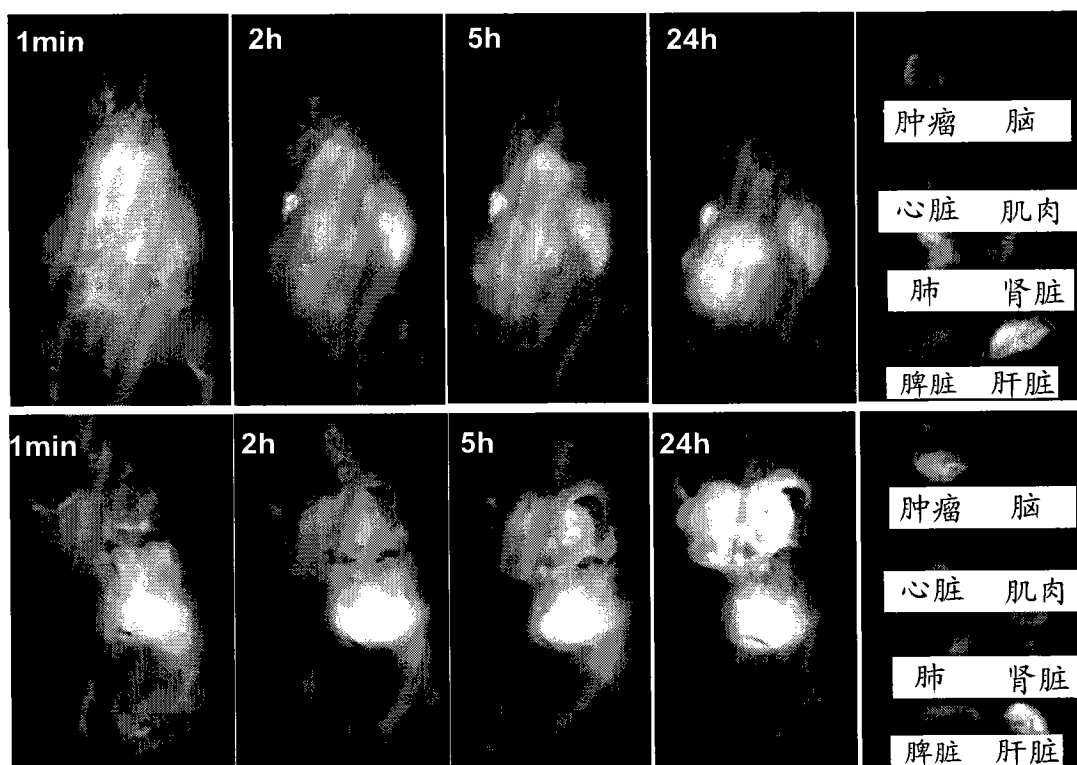


图 18

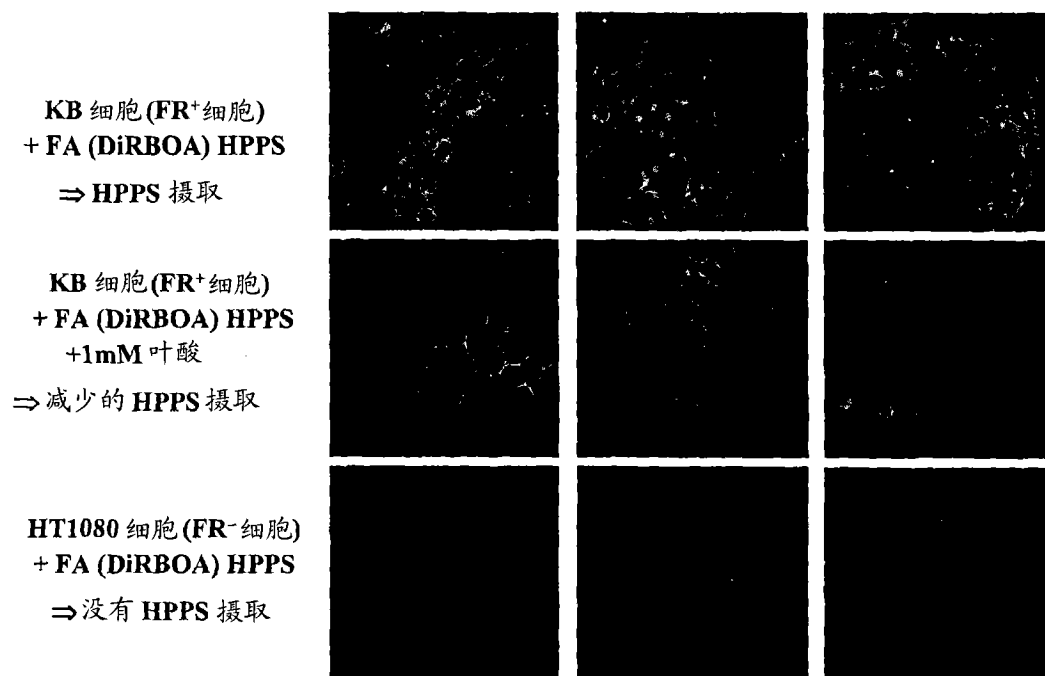


图 19

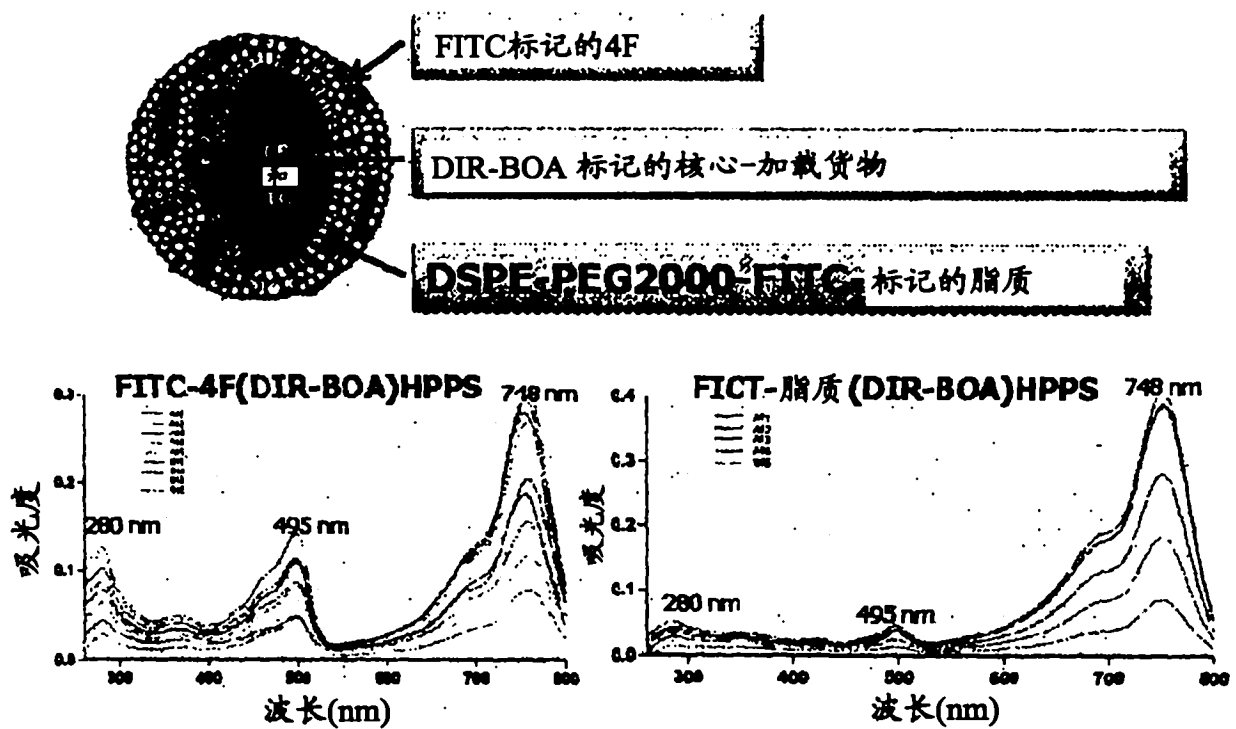


图 20

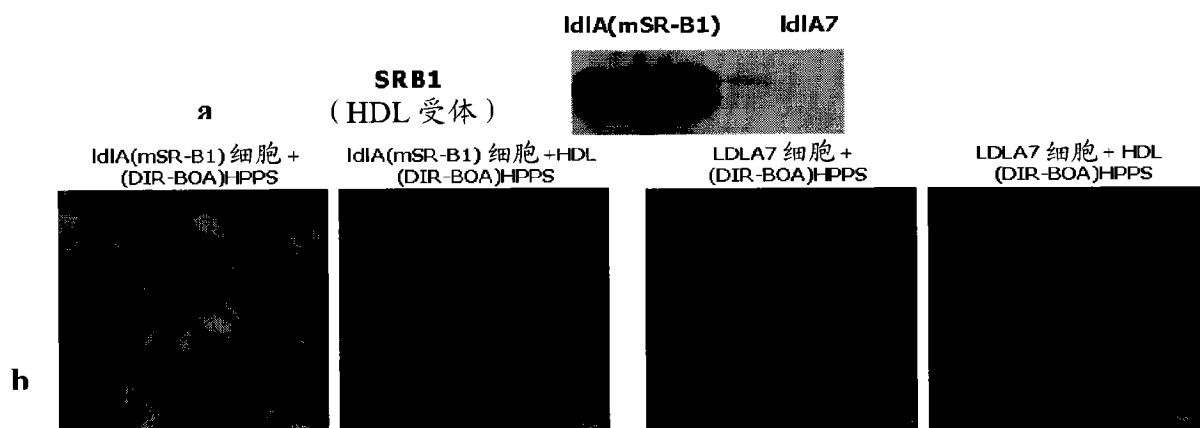


图 21



图 22

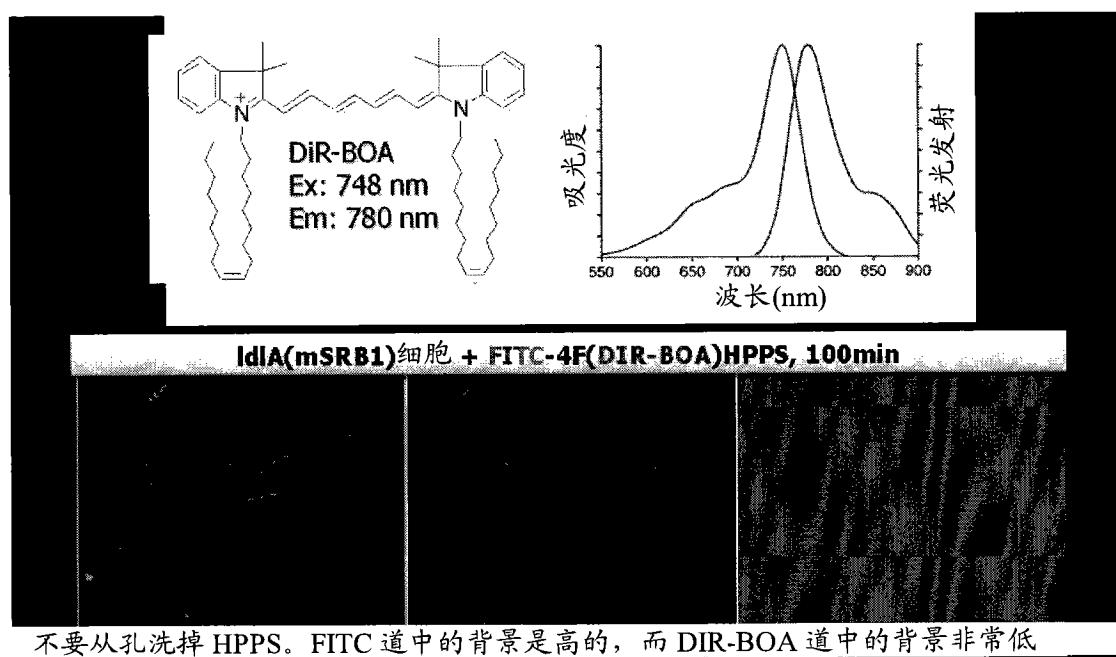


图 23

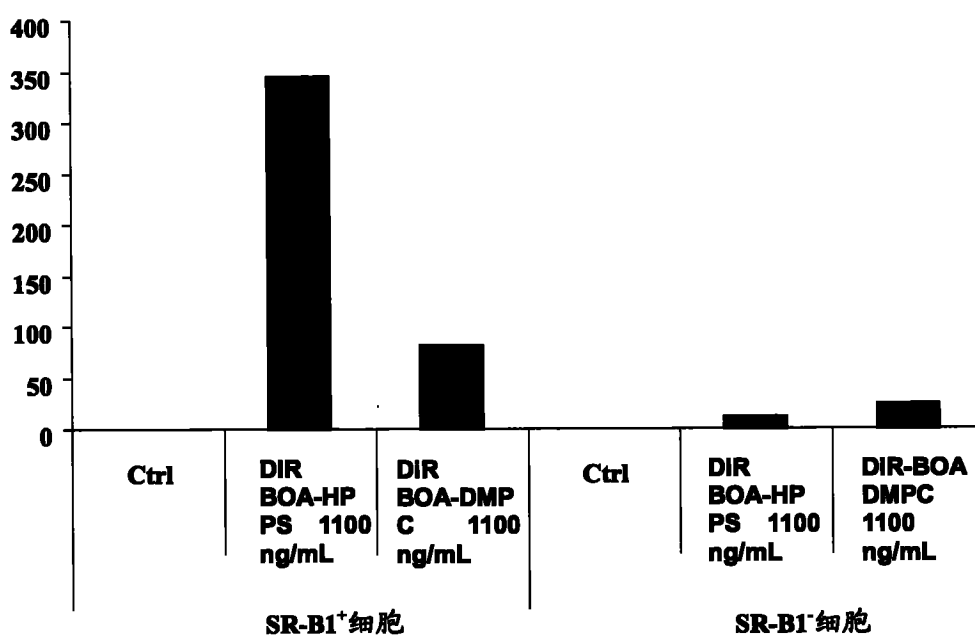


图 24

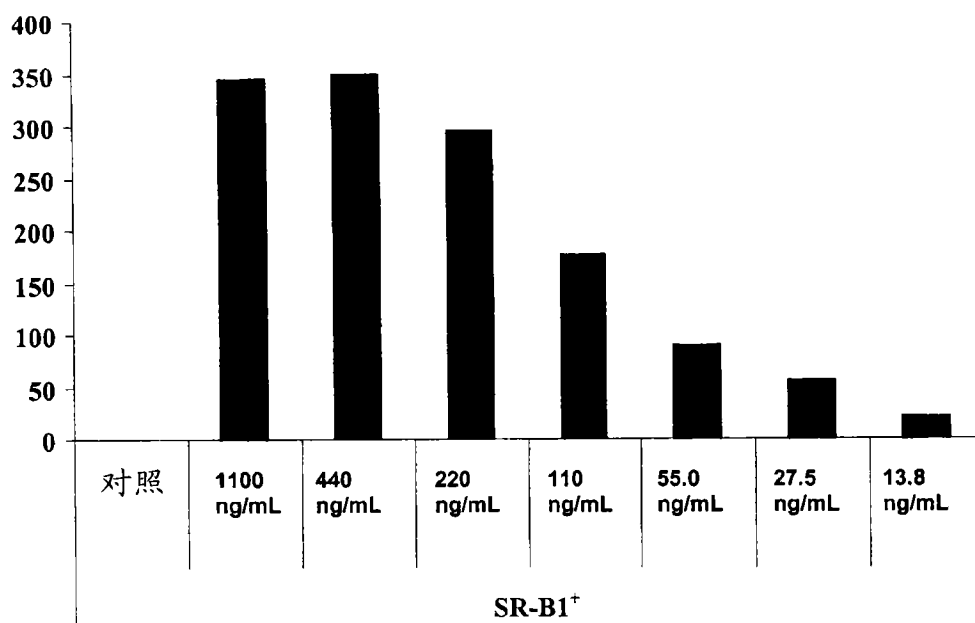


图 25

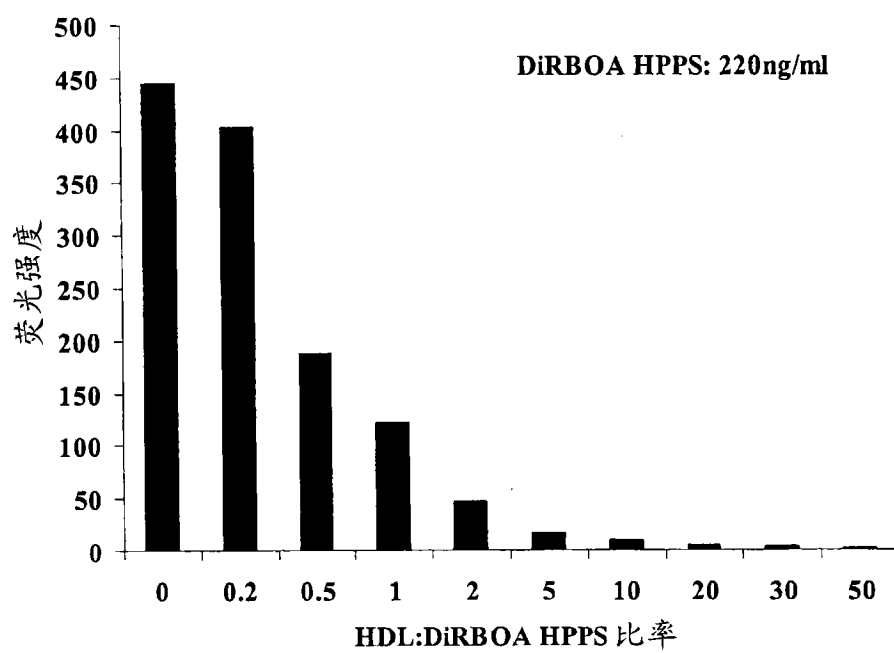


图 26

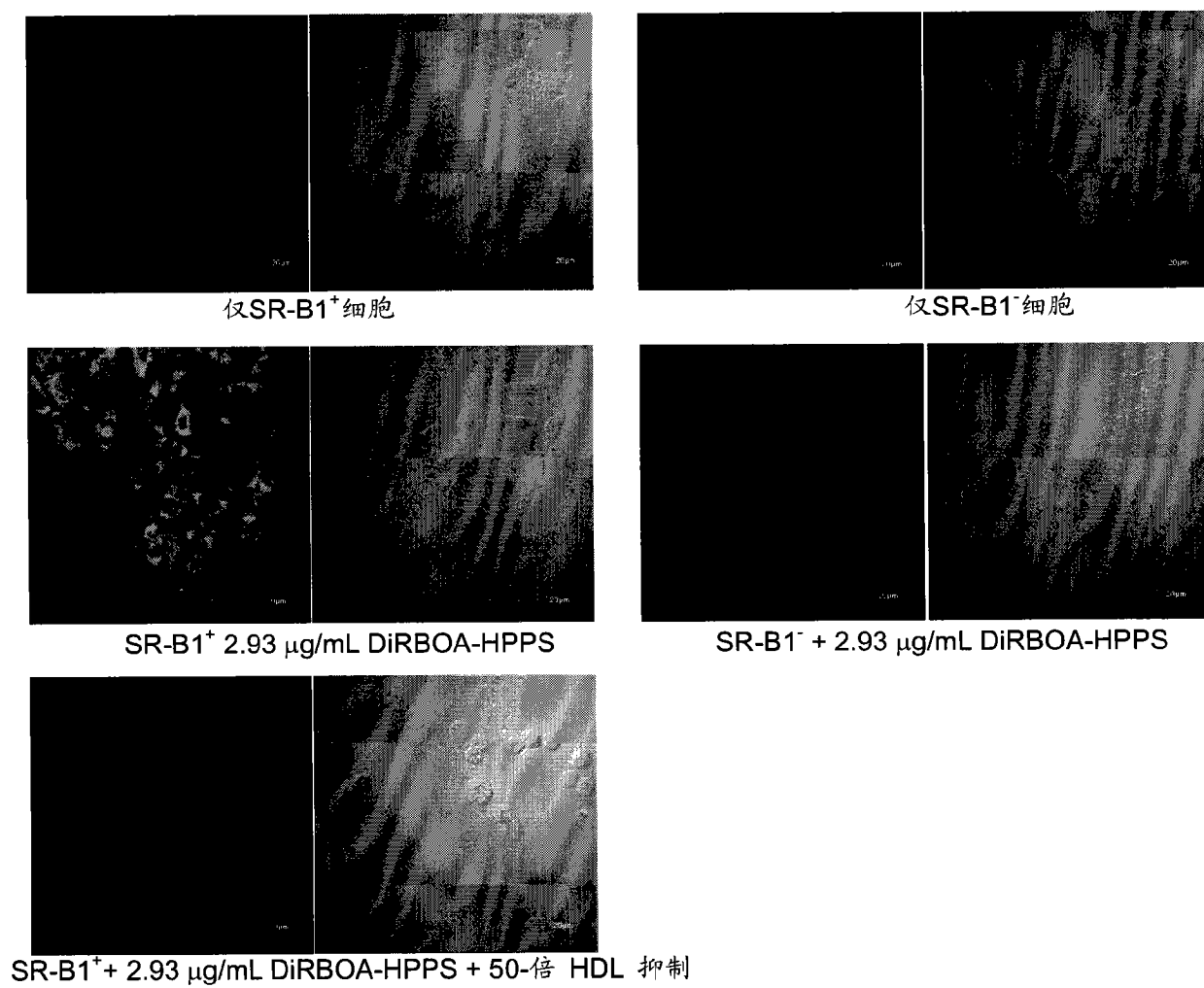


图 27

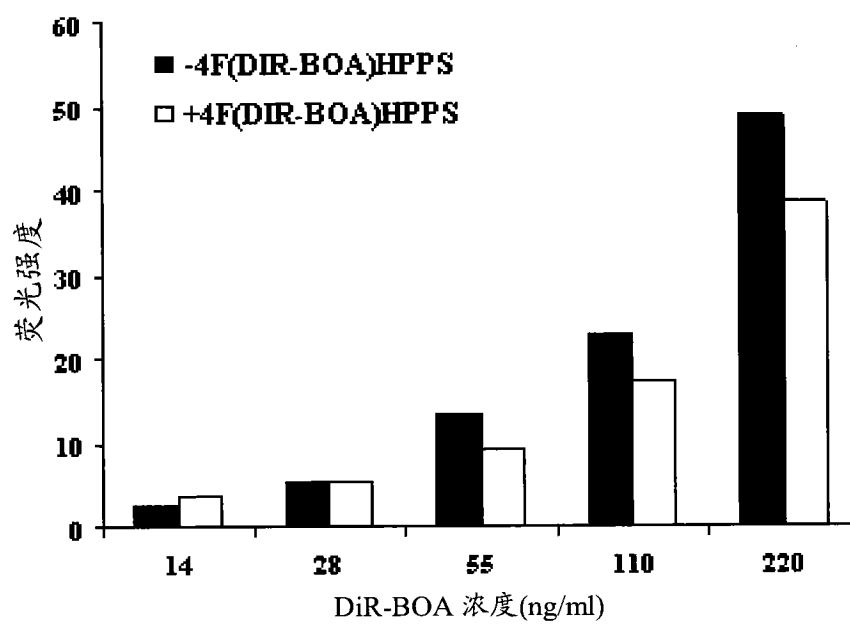


图 28

20080904 将 350ul 16 (DIRBOA) HPPS0826 注射到带有 KB 的小鼠中

Spectral library: #2 mouse spectral library to 72hr&260msec

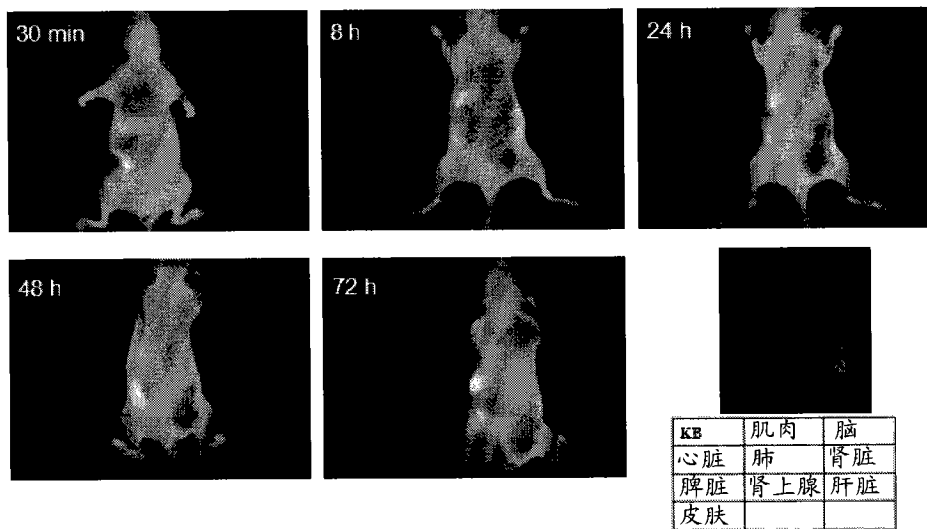


图 29



图 30(a)

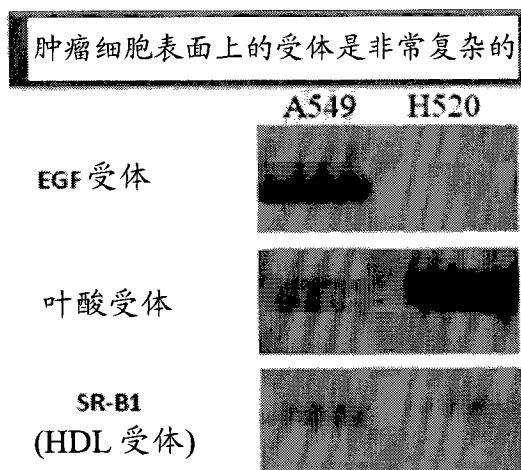


图 30(b)

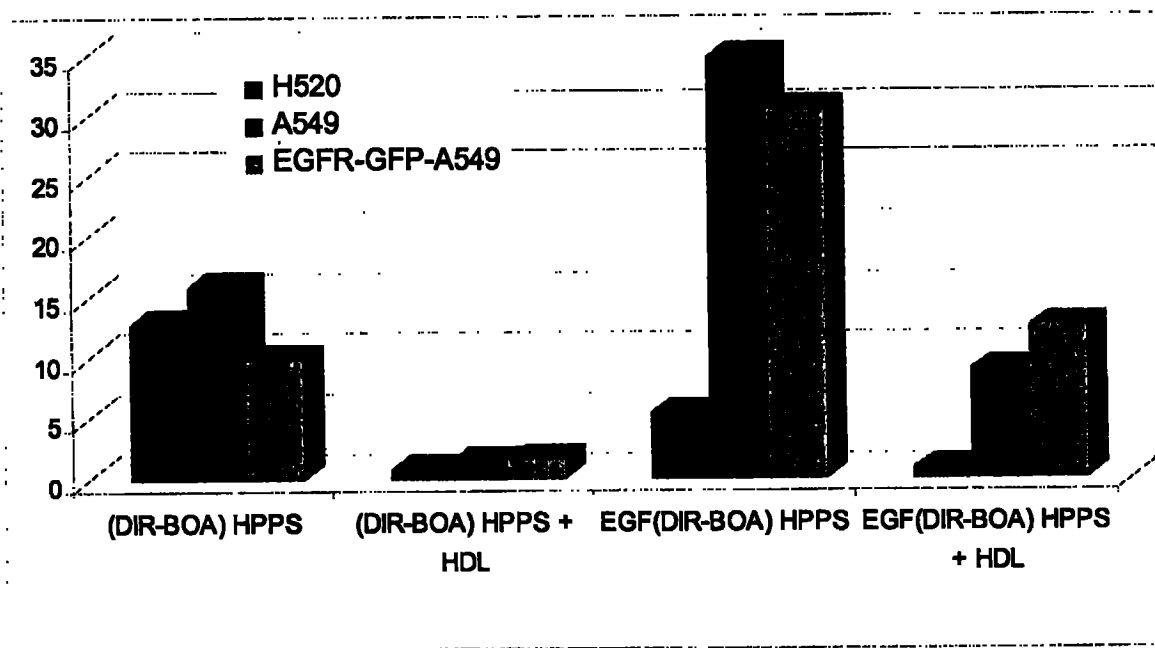


图 31

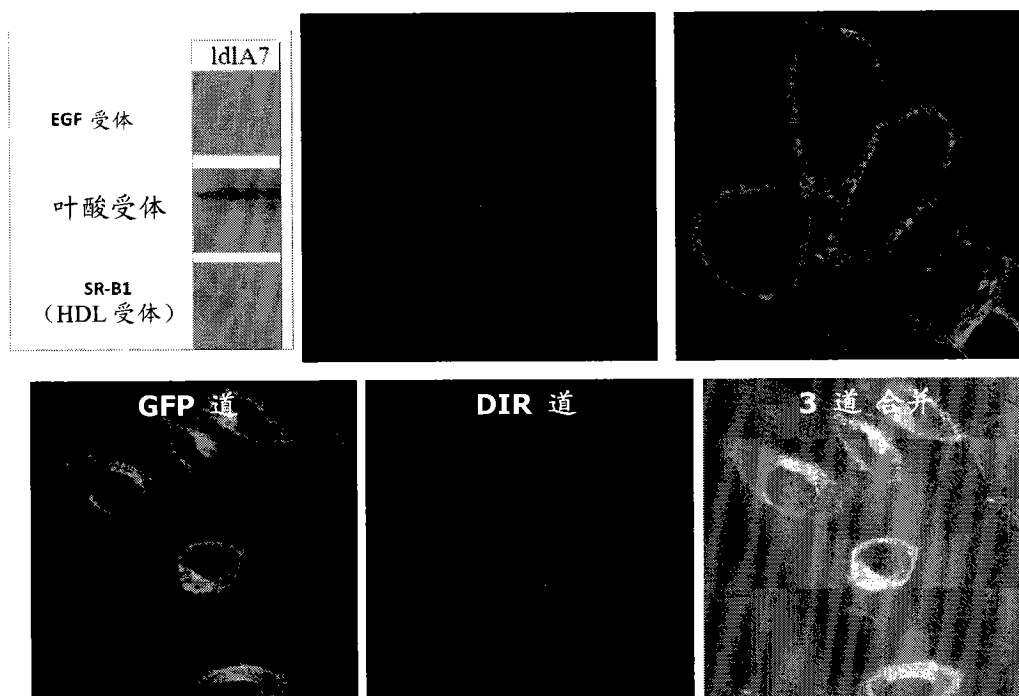


图 32

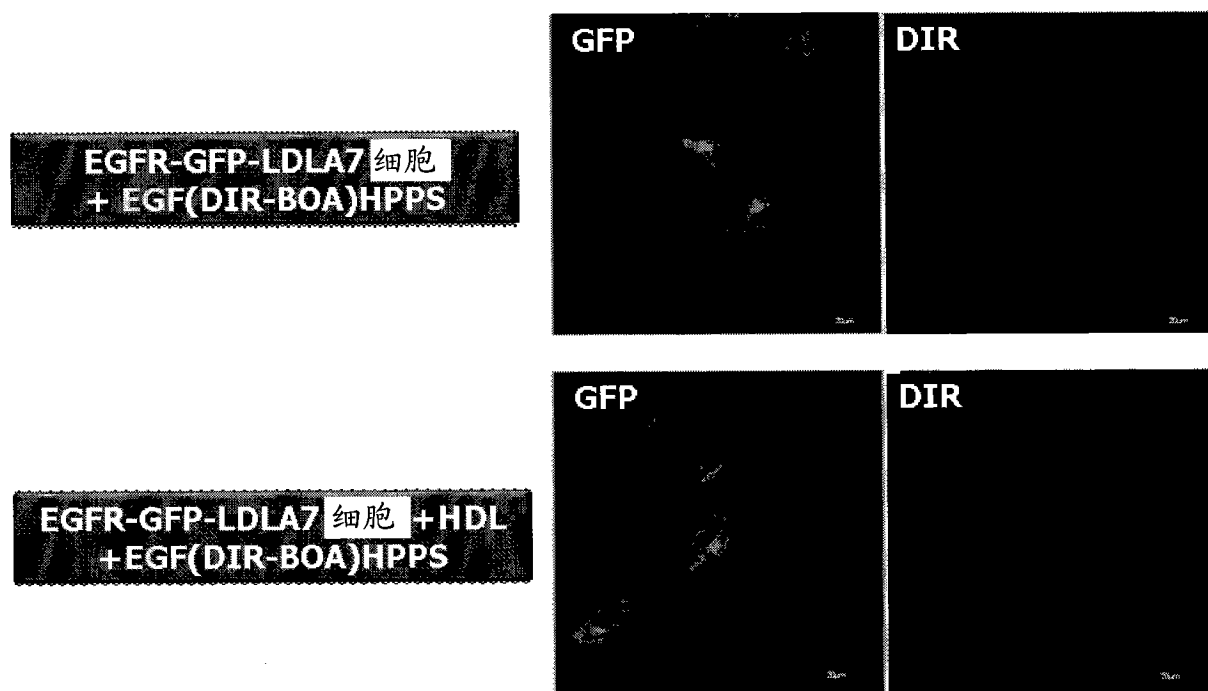


图 33

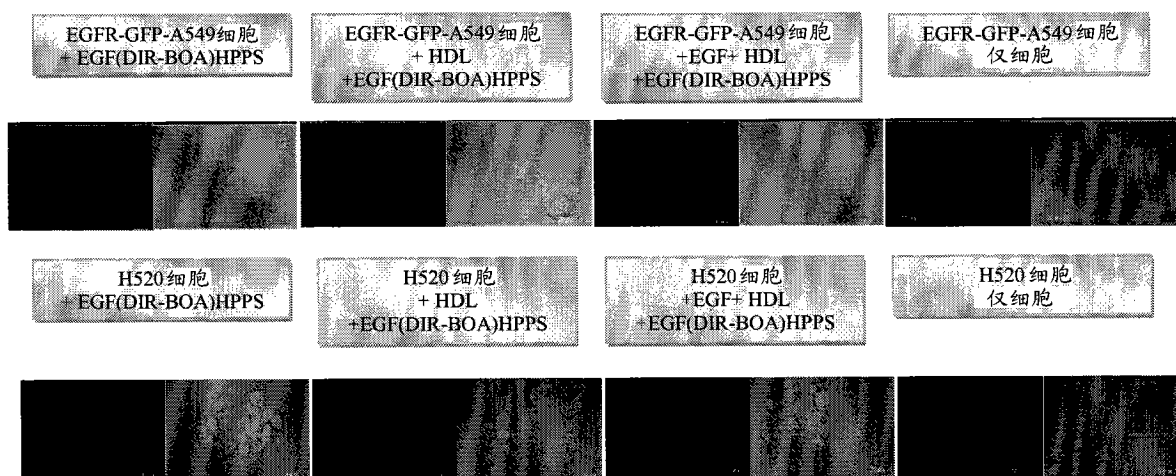


图 34



图 35

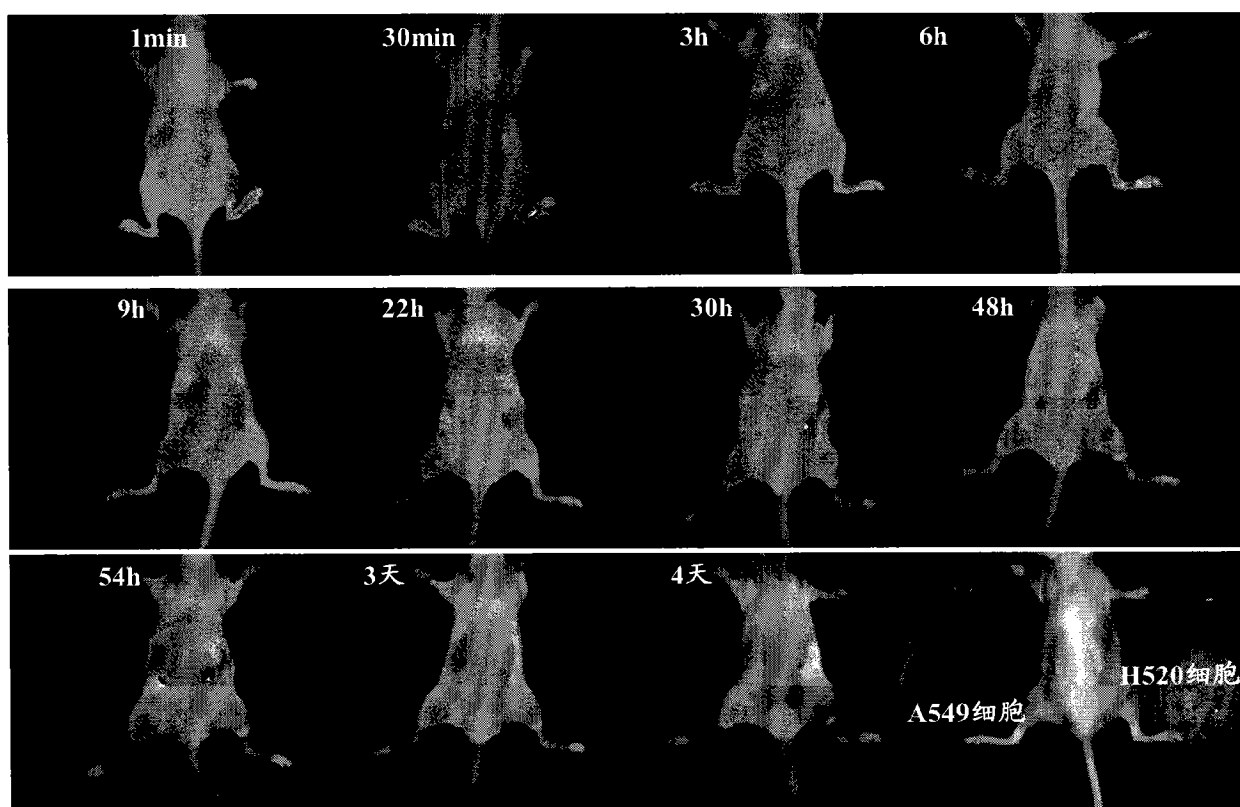


图 36

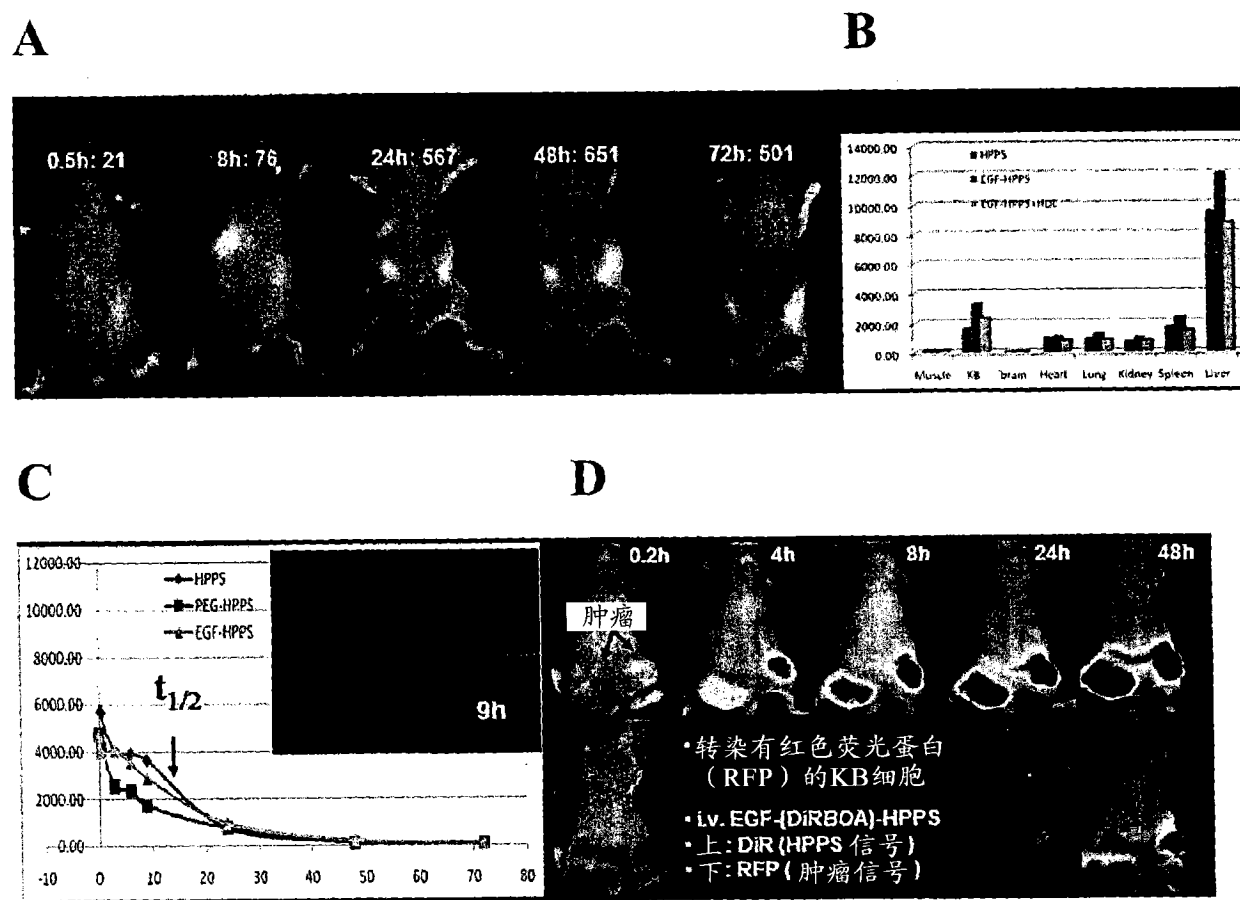


图 37

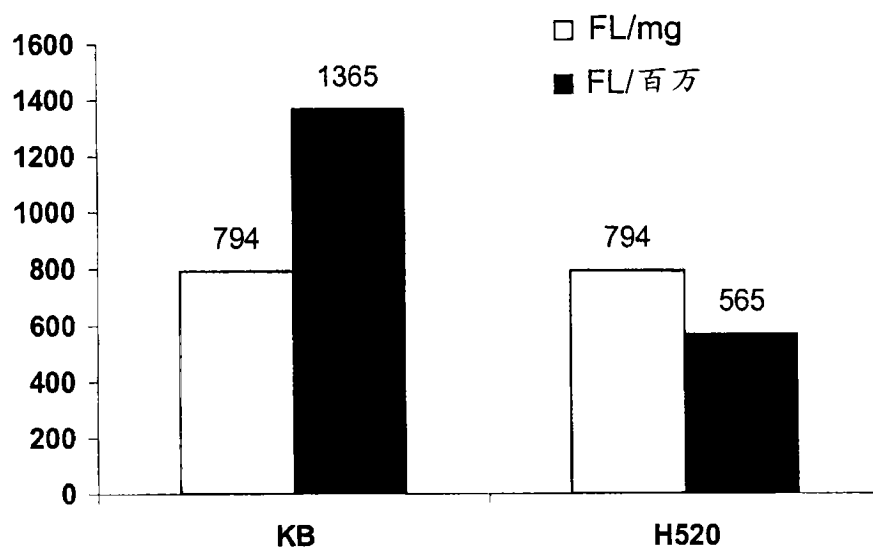


图 38