



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105452481 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 30

(21) 申请号 201480044141. 1

C07K 14/00(2006. 01)

(22) 申请日 2014. 06. 06

A61K 38/36(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 38/39(2006. 01)

61/832, 766 2013. 06. 07 US

A61K 49/00(2006. 01)

A61M 37/00(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 9/70(2006. 01)

2016. 02. 04

B82Y 5/00(2006. 01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/041370 2014. 06. 06

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/197840 EN 2014. 12. 11

(71) 申请人 麻省理工学院

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 S·N·巴哈蒂亚 D·K·伍德

G·A·黄 A·D·瓦尔林 K·Y·林

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 韩威威

(51) Int. Cl.

C12Q 1/37(2006. 01)

C12Q 1/25(2006. 01)

C12Q 1/34(2006. 01)

权利要求书4页 说明书47页

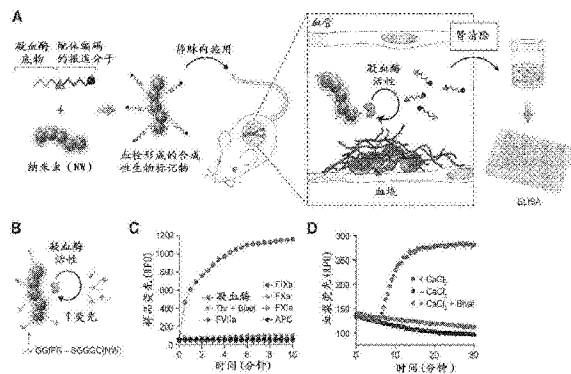
序列表2页 附图12页

(54) 发明名称

基于亲和力检测配体编码的合成性生物标记物

(57) 摘要

本发明涉及与体内酶概况分析相关的方法和产物。特别地,描述了能够在体内定量检测酶活性的生物标记物纳米粒子。这些纳米粒子可以用来在体内检测酶活性。本发明也涉及用于本发明方法中的产品、试剂盒和数据库。



1. 一种方法,其包括:

向受试者施用生物标记物纳米粒子,其中生物标记物纳米粒子包含具有与酶敏感可检测标记物连接的载体结构域(module)的模块结构,其中酶敏感可检测标记物由连接于可检测标记物的酶敏感结构域组成,其中可检测标记物能够在暴露于酶时从生物标记物纳米粒子释放并且其中可检测标记物包含由接头连接的捕获配体和检测配体;

确定用于检测标志物的生物样品,其中生物样品在这样的身体部位处,所述身体部位远离其中可检测标记物从生物标记物纳米粒子释放的身体部位;并且

使用捕获测定法分析生物样品以检测可检测标记物的存在,其中可检测标记物在生物样品中的存在表示酶以活性形式存在于受试者中。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中捕获配体与酶敏感结构域连接。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中检测配体与酶敏感结构域连接。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中捕获测定法涉及捕获配体与亲和剂结合。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中捕获配体是蛋白质、肽、多糖、核酸、荧光分子或小分子。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中捕获配体是生物素并且亲和剂是链霉亲和素。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中接头是聚合物如PEG、蛋白质、肽、多糖、核酸或小分子。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中接头是10-100个氨基酸长度的蛋白质或肽。

9. 根据权利要求7所述的方法,其中接头是GluFib(SEQ ID NO.1)。

10. 根据权利要求1所述的方法,其中检测配体是蛋白质、肽、多糖、核酸、荧光分子或小分子。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中检测配体或捕获配体选自链霉亲和素、Alexa488、TAMRA、DNP、荧光素、俄勒冈绿、德克萨斯红、丹磺酰、BODIPY、Alexa405、瀑布蓝、荧光黄、硝基酪氨酸、HA标签、FLAG标签、His标签、Myc标签、V5标签、S标签、生物素。

12. 根据权利要求1所述的方法,其中捕获测定法涉及选自ELISA,包括荧光ELISA、比色ELISA、生物发光ELISA和化学发光ELISA,试纸条法、基于珠的荧光测定法和无标记物检测如表面等离子体共振(SPR)的检测步骤。

13. 根据权利要求4所述的方法,其中亲和剂选自抗体、抗体片段、适配体、与Ab缀合的磁珠、亲和柱上的蛋白质或肽。

14. 根据权利要求4所述的方法,其中亲和剂固定在表面上。

15. 根据权利要求14所述的方法,其中所述表面是珠。

16. 根据权利要求4所述的方法,其中亲和剂处于溶液中。

17. 根据权利要求1所述的方法,其中将生物标记物纳米粒子静脉内、经口、经皮或通过植入物施用。

18. 根据权利要求1所述的方法,载体是蛋白质、肽或多糖。

19. 根据权利要求1所述的方法,载体是合成聚合物。

20. 根据权利要求1所述的方法,酶是癌症相关酶。

21. 根据权利要求1所述的方法,其中酶是蛋白酶或糖苷酶。

22. 根据权利要求1-21中任一项所述的方法,还包括从受试者采集生物样品,其中生物

样品是尿、血液、唾液或粘液分泌物。

23. 根据权利要求1-21中任一项所述的方法, 其中将具有多个酶敏感可检测标记物的多个生物标记物纳米粒子施用至受试者。

24. 根据权利要求1-21中任一项所述的方法, 其中生物标记物纳米粒子具有多个酶敏感可检测标记物。

25. 根据权利要求24所述的方法, 其中多个酶敏感可检测标记物包含多个捕获配体和单一类型的检测配体。

26. 根据权利要求24所述的方法, 其中多个捕获配体包括2-1000个不同的捕获配体。

27. 根据权利要求24所述的方法, 其中多个捕获配体包括2-100个不同的捕获配体。

28. 根据权利要求24所述的方法, 其中多个酶敏感可检测标记物包含单一类型的捕获配体和多个检测配体。

29. 根据权利要求1-28中任一项所述的方法, 其中酶敏感可检测标记物易受与疾病或病状相关的酶修饰。

30. 根据权利要求1-28中任一项所述的方法, 其中酶敏感可检测标记物易受与疾病或病状相关的蛋白酶切割。

31. 根据权利要求1-28中任一项所述的方法, 其中酶敏感可检测标记物易接受与疾病或病状相关的酶添加可检测组分。

32. 根据权利要求1-28中任一项所述的方法, 其中酶敏感可检测标记物易受与疾病或病状不相关、而与正常状况相关的酶修饰。

33. 根据权利要求1-28中任一项所述的方法, 其中酶敏感可检测标记物易受与疾病或病状不相关、而与正常状况相关的蛋白酶切割。

34. 根据权利要求33所述的方法, 其中疾病或病状是癌症、心血管疾病、关节炎、病毒性、细菌性、寄生虫性或真菌性感染、阿尔茨海默病气肿、血栓形成、血友病、卒中、器官功能障碍、任何炎性病症、血管疾病、器质性疾病或药理所致状态。

35. 根据权利要求1-34中任一项所述的方法, 其中分析方法是多重分析方法。

36. 根据权利要求1-35中任一项所述的方法, 还包括纯化步骤, 其中可检测标记物与生物样品中的其他组分分离。

37. 根据权利要求1-36中任一项所述的方法, 其中所述方法是用于诊断受试者中疾病的方法并且可检测标记物在受试者中的存在表示受试者患有所述疾病。

38. 根据权利要求1-36中任一项所述的方法, 其中所述方法是用于诊断受试者中疾病的方法并且可检测标记物在受试者中不存在表示受试者患有所述疾病。

39. 根据权利要求1-38中任一项所述的方法, 还包括向受试者施用游离报道分子以归一化检测信号。

40. 一种方法, 包括:

从疑似患有病症或病状的受试者采集尿样, 其中已经对受试者施用生物标记物纳米粒子, 其中生物标记物纳米粒子包含具有与酶敏感可检测标记物连接的载体结构域模块结构, 其中酶敏感可检测标记物由连接于可检测标记物的酶敏感结构域组成, 其中可检测标记物能够在暴露于酶时从生物标记物纳米粒子释放并且其中可检测标记物包含由接头连接的捕获配体和检测配体; 并且

使尿样经历采用捕获测定法的分析方法,其中捕获测定法涉及其中亲和剂与捕获配体结合的亲和步骤和其中检出检测配体以检测配体标记物的存在的检测步骤,并且其中配体标记物在生物样品中的存在或不存在的指示受试者中的病症或病状。

41. 根据权利要求40所述的方法,其中检测步骤选自ELISA测定法,包括化学发光ELISA和生物发光ELISA,试纸条法、基于珠的荧光测定法和无标记物检测如表面等离子体共振(SPR)。

42. 根据权利要求40所述的方法,其中亲和剂选自抗体、抗体片段、适配体、与Ab缀合的磁珠、亲和柱上的蛋白质或肽。

43. 根据权利要求40所述的方法,还包括施用治疗药至受试者以治疗病症或病状。

44. 一种组合物,其包含:

具有药物递送区室的透皮贴剂,其中药物递送区室包含生物标记物纳米粒子,其中生物标记物纳米粒子包含具有载体结构域(module structure)的模块结构,所述载体结构域与能够在暴露于酶时从生物标记物纳米粒子释放的酶敏感可检测标记物连接。

45. 根据权利要求44所述的组合物,其中酶敏感可检测标记物由连接于可检测标记物的酶敏感结构域组成并且其中可检测标记物包含由接头连接的捕获配体和检测配体。

46. 一种试剂,包含:

生物标记物纳米粒子,其中生物标记物纳米粒子包含具有与酶敏感可检测标记物连接的载体结构域(module structure)的模块结构,其中酶敏感可检测标记物由连接于可检测标记物的酶敏感结构域组成,其中可检测标记物能够在暴露于酶时从生物标记物纳米粒子释放并且其中可检测标记物包含由接头连接的捕获配体和检测配体。

47. 根据权利要求46所述的试剂,其中捕获配体与酶敏感结构域连接。

48. 根据权利要求46所述的试剂,其中检测配体与酶敏感结构域连接。

49. 根据权利要求46所述的试剂,其中捕获测定法涉及捕获配体与亲和剂结合。

50. 一种组合物,其包含:

生物标记物纳米粒子,其中生物标记物纳米粒子包含具有载体结构域(module structure)的模块结构,所述载体结构域与能够在暴露于酶和游离报道分子时从生物标记物纳米粒子释放的酶敏感可检测标记物连接。

51. 根据权利要求50所述的组合物,其中酶敏感可检测标记物由连接于可检测标记物的酶敏感结构域组成并且其中可检测标记物包含由接头连接的捕获配体和检测配体。

52. 权利要求50的组合物,其中游离报道分子是蛋白质、肽或多糖。

53. 一种试剂盒,包含:

容纳生物标记物纳米粒子的容器,其中生物标记物纳米粒子包含具有与酶敏感可检测标记物连接的载体结构域(module structure)的模块结构,其中酶敏感可检测标记物由连接于可检测标记物的酶敏感结构域组成,其中可检测标记物能够在暴露于酶时从生物标记物纳米粒子释放并且其中可检测标记物包含由接头连接的捕获配体和检测配体;和

用于向受试者施用纳米粒子和用于分析受试者的生物样品以通过捕获测定法检测因施用纳米粒子而生成的配体标记物的存在或不存在的说明书。

54. 根据权利要求53所述的试剂盒,还包含容纳游离报道分子的容器。

55. 根据权利要求53所述的试剂盒,还包含容纳亲和剂的容器。

56. 根据权利要求55所述的试剂盒,其中亲和试剂选自抗体、抗体片段、适配体、与Ab缀合的磁珠、亲和柱上的蛋白质或肽。

57. 根据权利要求53所述的试剂盒,还包含容纳检测试剂的容器。

58. 根据权利要求57所述的方法,其中检测试剂是用于测定法的试剂,所述测定法选自ELISA测定法,包括化学发光ELISA和生物发光ELISA,试纸条法、基于珠的荧光测定法和无标记物检测如表面等离子体共振(SPR)。

59. 一种方法,其包括:

向受试者施用微小剂量的生物标记物纳米粒子,其中可检测标记物在暴露于酶时从生物标记物纳米粒子释放;并且使用捕获测定法分析生物样品以检测可检测标记物的存在,其中可检测标记物在生物样品中的存在表示酶以活性形式存在于受试者中。

60. 根据权利要求59所述的方法,其中微小剂量是小于100微克。

61. 根据权利要求59所述的方法,其中生物样品在这样的身体部位处,所述身体部位远离其中可检测标记物从生物标记物纳米粒子释放的身体部位。

62. 根据权利要求59所述的方法,其中生物样品是尿。

63. 根据权利要求59所述的方法,其中生物标记物纳米粒子包含具有与酶敏感可检测标记物连接的载体结构域(module structure)的模块结构,其中酶敏感可检测标记物由连接于可检测标记物的酶敏感结构域组成。

64. 根据权利要求59所述的方法,其中可检测标记物包含由接头连接的捕获配体和检测配体。

65. 一种制品,包含

包含膜的壳体,所述膜具有与检测试剂结合的限定区域、能够容纳生物样品的储器,所述储器与膜如此接触从而生物样品可以被输送至膜并且沿膜移动,膜上的结合垫,其中用于结合至捕获配体的亲和剂与结合垫接合,其中生物样品不包含妊娠蛋白。

66. 根据权利要求65所述的制品,其中膜是硝酸纤维素膜。

67. 根据权利要求65所述的制品,其中亲和剂是与金纳米粒子结合的链霉亲和素。

68. 根据权利要求65所述的制品,其中捕获配体是生物素。

69. 根据权利要求65所述的制品,其中储器是纤维素垫。

70. 根据权利要求65所述的制品,其中检测试剂是对检测配体特异的抗体。

71. 根据权利要求65所述的制品,其中抗体是 α -FAM抗体。

基于亲和力检测配体编码的合成性生物标记物

[0001] 相关申请

[0002] 根据35 U.S.C. §119(e), 本申请要求2013年6月7日提交的题为“基于亲和力检测配体编码的合成性生物标记物”的美国临时申请系列号61/832,766的优先权, 所述文献通过引用的方式完整并入本文。

发明领域

[0003] 本发明涉及与使用亲和力测定法检测并监测体内蛋白酶活性相关的方法和产品。这些方法和产品形成超灵敏诊断平台的基础并且可以作为超灵敏诊断平台使用。本发明也涉及用于本发明方法中的产品、试剂盒和数据库。

背景技术

[0004] 尿具有作为监测发育状况的来源的丰富及悠久临床历史并且仍是健康检验的有机组成部分。^[1]可以进行超过一百项检查以显示诸多状况, 如妊娠^[2]、糖尿病^[3]、肾脏疾病^[4]、代谢紊乱及其它。受到肾系统——其具有演化出数分钟内选择性过滤成数升血液以移除生物学过程副产物的能力——的精细生理学启发, 我们最近开发了一类蛋白酶敏感性纳米粒子, 称作‘合成性生物标记物’, 所述纳米粒子响应于疾病部位处失调的蛋白酶活性, 释放报道分子至循环中, 所述报道分子随后浓缩入宿主尿以利用多种检测技术(如质谱法)进行非侵入性监测。^[6]癌症中蛋白酶的失调在细胞信号传导中具有重要结果并有助于驱动癌细胞增殖、侵入、血管生成、避免凋亡和转移。在鼠肝纤维化和癌症模型中, 合成性尿生物标记物免除了通过芯取活组织检查侵入性监测的需求, 并且与肿瘤分泌的血液生物标记物相比, 显著地改进癌症早期检测。

[0005] 发明简述

[0006] 在一些方面, 本发明是一种涉及向受试者施用生物标记物纳米粒子的方法, 其中生物标记物纳米粒子包含具有与酶敏感(susceptible)可检测标记物连接的载体结构域的模块结构, 其中酶敏感可检测标记由连接于可检测标记物的酶敏感结构域组成, 其中可检测标记能够在暴露于酶时从生物标记物纳米粒子释放并且其中可检测标记物包含由接头连接的捕获配体和检测配体; 确定用于检测标志物的生物样品, 其中生物样品在这样的身体部位处, 所述身体部位远离其中可检测标记从生物标记物纳米粒子释放的身体部位; 并且, 使用捕获测定法分析生物样品以检测可检测标记物的存在, 其中可检测标记物在生物样品中的存在表示酶以活性形式存在于受试者中。

[0007] 在一些实施方案中, 捕获配体与酶敏感结构域连接。在其他实施方案中, 检测配体与酶敏感结构域连接。接头可以例如是聚合物如PEG、蛋白质、肽、多糖、核酸或小分子。在一些实施方案中, 接头是10-100个氨基酸长度的蛋白质。在其他实施方案中, 接头是GluFib (SEQ ID NO.1)。

[0008] 在一些实施方案中, 捕获测定法涉及选自ELISA(包括荧光ELISA、比色ELISA、生物发光ELISA和化学发光ELISA)、试纸条法、基于珠的荧光测定法和无标记物检测如表面等离子

子体共振(SPR)的检测步骤。捕获测定法可以例如涉及捕获配体与亲和剂结合。在一些实施方案中,捕获配体是蛋白质、肽、多糖、核酸、荧光分子或小分子。例如,捕获配体可以是生物素并且亲和剂可以是链霉亲和素,或捕获配体可以是链霉亲和素并且亲和剂可以是生物素。在一些实施方案中,分析方法是多重分析方法。

[0009] 在一些实施方案中,检测配体是蛋白质、肽、多糖、核酸、荧光分子或小分子。在其他实施方案中,检测配体或捕获配体选自Alexa488、TAMRA、DNP、荧光素、俄勒冈绿、德克萨斯红、丹磺酰、BODIPY、Alexa405、瀑布蓝、萤光黄、硝基酪氨酸、HA标签、FLAG标签、His标签、Myc标签、V5标签、S标签、生物素。

[0010] 亲和剂可以选自抗体、抗体片段、适配体、与Ab缀合的磁珠、亲和柱上的蛋白质或肽。在一些实施方案中,亲和剂固定在表面(例如,珠)上。在其他实施方案中,亲和剂处于溶液中。

[0011] 生物标记物纳米粒子可以通过任何途径施用至受试者。例如,可以将其静脉内、经口、经皮或通过植入物施用。

[0012] 在一些实施方案中,载体是粒子(如纳米粒子)、蛋白质、肽或多糖或合成聚合物。

[0013] 在一些实施方案中,酶是癌症相关酶。在其他实施方案中,酶是蛋白酶或糖苷酶。

[0014] 该方法还可以包括步骤:从受试者采集生物样品,其中生物样品是尿、血液、唾液或粘液分泌物。

[0015] 在一些实施方案中,将具有多个酶敏感可检测标记物的多个生物标记物纳米粒子施用至受试者。在其他实施方案中,生物标记物纳米粒子具有多个酶敏感可检测标记物。例如在一些实施方案中,多个酶敏感可检测标记物包含多个捕获配体和单一类型的检测配体。多个捕获配体包含2-1,000、2-100或2-10个不同的捕获配体。在其他实施方案中,多个酶敏感可检测标记物包含单一类型的捕获配体和多个检测配体。

[0016] 在一些实施方案中,酶敏感可检测标记物易受酶修饰、易受蛋白酶切割或易接受与酶添加可检测组分,所述酶与疾病或病状相关。在一些实施方案中,酶敏感可检测标记物易受酶修饰、易受蛋白酶切割或易接受与酶添加可检测组分,所述酶与疾病或病状不相关,而与正常状况相关。

[0017] 在一些实施方案中,疾病或病状是癌症、心血管疾病、关节炎、病毒性、细菌性、寄生虫性或真菌性感染、阿尔茨海默病气肿、血栓形成、血友病、卒中、器官功能障碍、任何炎症病症、血管疾病、器质性疾病或药理所致状态。

[0018] 在一些实施方案中,该方法涉及纯化步骤,其中可检测标记物与生物样品中的其他组分分离。

[0019] 在其他实施方案中,该方法是用于诊断受试者中疾病的方法并且可检测标记物在受试者中的存在表示受试者患有该疾病并且可检测标记物在受试者中的不存在表示受试者未患该疾病。

[0020] 在其他实施方案中,该方法包括向受试者施用游离报道分子以归一化检测信号。

[0021] 根据本发明的多个方面,提供一种涉及从疑似患有病症或病状的受试者采集尿样的方法,其中已经对受试者施用生物标记物纳米粒子,其中生物标记物纳米粒子包含具有与酶敏感可检测标记物连接的载体结构域(module structure)的模块结构,其中酶敏感可检测标记物由连接于可检测标记物的酶敏感结构域组成,其中可检测标记物能够在暴露于酶时从生物标记物纳米粒

子释放并且其中可检测标记物包含由接头连接的捕获配体和检测配体；并且，使尿样经历采用捕获测定法的分析方法，其中捕获测定法涉及其中亲和剂与捕获配体结合的亲和步骤和其中检出检测配体以检测配体标记物的存在的检测步骤，并且其中配体标记物在生物样品中的存在或不存在指示受试者中的病症或病状。

[0022] 在一些实施方案中，检测步骤选自ELISA测定法(包括化学发光ELISA和生物发光ELISA)、试纸条法、基于珠的荧光测定法和无标记物检测如表面等离子体共振(SPR)。在其他实施方案中，亲和剂选自抗体、抗体片段、适配体、与Ab缀合的磁珠、亲和柱上的蛋白质或肽。在其他实施方案中，该方法涉及施用治疗药至受试者以治疗病症或病状。

[0023] 根据本发明的其他方面，提供一种组合物，所述组合物包含具有药物递送区室的透皮贴剂，其中药物递送区室包含生物标记物纳米粒子，其中生物标记物纳米粒子包含具有载体结构域(module structure)的模块结构，所述载体结构域与能够在暴露于酶时从生物标记物纳米粒子释放的酶敏感可检测标记物连接。酶敏感可检测标记物可以由连接于可检测标记物的酶敏感结构域组成并且其中可检测标记物包含由接头连接的捕获配体和检测配体。

[0024] 根据本发明的其他方面提供一种试剂。该试剂包含生物标记物纳米粒子，其中生物标记物纳米粒子包含具有与酶敏感可检测标记物连接的载体结构域(module structure)的模块结构，其中酶敏感可检测标记物由连接于可检测标记物的酶敏感结构域组成，其中可检测标记物能够在暴露于酶时从生物标记物纳米粒子释放并且其中可检测标记物包含由接头连接的捕获配体和检测配体。

[0025] 在一些实施方案中，捕获配体与酶敏感结构域连接并且在其他实施方案中，检测配体与酶敏感结构域连接。捕获测定法可以涉及捕获配体与亲和剂结合。

[0026] 根据本发明的其他方面提供一种组合物。该组合物包含生物标记物纳米粒子，其中生物标记物纳米粒子包含具有载体结构域(module structure)的模块结构，所述载体结构域与能够在暴露于酶和游离报道分子时从生物标记物纳米粒子释放的酶敏感可检测标记物连接。酶敏感可检测标记物可以由连接于可检测标记物的酶敏感结构域组成并且其中可检测标记物包含由接头连接的捕获配体和检测配体。在一些实施方案中，游离报道分子是蛋白质、肽或多糖。

[0027] 在另外其他方面，本发明是一种试剂盒，所述试剂盒具有容纳生物标记物纳米粒子的容器，其中生物标记物纳米粒子包含具有与酶敏感可检测标记物连接的载体结构域(module structure)的模块结构，其中酶敏感可检测标记物由连接于可检测标记物的酶敏感结构域组成，其中可检测标记物能够在暴露于酶时从生物标记物纳米粒子释放并且其中可检测标记物包含由接头连接的捕获配体和检测配体；和用于向受试者施用纳米粒子和用于分析受试者的生物样品以通过捕获测定法检测因施用纳米粒子而生成的配体标记物的存在或不存在的说明书。

[0028] 在一些实施方案中，试剂盒进一步包括一种或多种容器，所述容器容纳游离报道分子、亲和剂如抗体、抗体片段、适配体、与Ab缀合的磁珠、亲和柱上的蛋白质或肽，和用于测定法的试剂，所述测定法选自ELISA测定法(包括化学发光ELISA和生物发光ELISA)、试纸条法、基于珠的荧光测定法和无标记物检测如表面等离子体共振(SPR)。

[0029] 在另一个方面，本发明是一种涉及向受试者施用微小剂量的生物标记物纳米粒子的方法，其中可检测标记物在暴露于酶时从生物标记物纳米粒子释放；并且使用捕获测定法分析生物样品以检测可检测标记物的存在，其中可检测标记物在生物样品中的存在表示酶以活性形式存在于受试者中。在一些实施方案中，微小剂量是小于100微克。在其他实施

方案中,生物样品在这样的身体部位处,所述身体部位远离其中可检测标记从生物标记物纳米粒子释放的身体部位,如尿。在另外的其他实施方案中,生物标记物纳米粒子包含具有与酶敏感可检测标记物连接的载体结构域(module)的模块结构,其中酶敏感可检测标记物由连接于可检测标记物的酶敏感结构域组成。任选地,可检测标记物包含由接头连接的捕获配体和检测配体。

[0030] 在其他方面,本发明是用于本文所述的任何用途的组合物。该组合物是本文所述的任何组合物,例如,微小剂量的具有可检测标记物的生物标记物纳米粒子,或生物标记物纳米粒子,其中生物标记物纳米粒子包含具有载体结构域(module)的模块结构,所述载体结构域与能够在暴露于酶和游离报道分子时从生物标记物纳米粒子释放的酶敏感可检测标记物连接。

[0031] 本发明的每个实施方案可以涵盖其中所作的各种引用。因此,预计涉及任一个要素或要素组合的每次本发明引用可以任选地纳入本发明的每个方面。

[0032] 附图简述

[0033] 图1A-D显示(A)方案示意图。合成性生物标记物由与凝血酶敏感性底物缀合的NW组成,所述凝血酶敏感性底物与配体编码的报道分子串联。这些试剂调查血管系统的血凝块形成,其中凝血酶活性切割报道分子并将释放入尿以便由ELISA分析。(B)用于检测蛋白酶活性的示意性荧光NW测定法。(C)响应于凝血蛋白酶的荧光活性的动力学(每种条件 $n=3$)。Thr,凝血酶;Bival,比伐芦定。(D)在添加CaCl₂以激活凝血后血浆中荧光活性的动力学(每种条件 $n=3$)。

[0034] 图2A-D显示ELISA检出配体编码的报道分子。(A)配体编码的报道分子R₁和R₂的设计,连同所结合配体的化学结构。(B)ELISA夹心复合物的示意图和显色的96孔板的照片,所述照片显示特异性检出内标入对照尿样中的R₁和R₂。(C)抗Flsc抗体包被的各孔的吸光度值($\lambda=450\text{nm}$),所述抗Flsc用来检测尿中R₁、R₁+R₂和R₂的连续稀释物(每种条件 $n=3$,s.d.)。(D)与渐增浓度的凝血酶温育后从NW释放的已切割的报道分子(R₁)的水平定量(每种条件 $n=3$,s.d.)。

[0035] 图3A-D显示促凝血酶原激酶所致血栓形成的表征。(A)对切除的器官进行近红外荧光扫描以监测静脉内注射促凝血酶原激酶(2 $\mu\text{L/g}$ b.w.)或PBS后VT750标记纤维蛋白原的沉积。(B)从血栓形成小鼠和对照小鼠收获的器官中沉积的VT750-纤维蛋白(原)的水平定量(* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.005$,Student t检验; $n=3$ /组,s.d.)。(C)肺的苏木精和伊红染色(比例尺=100 μm)。蓝色箭头指示纤维蛋白凝块。(D)肺中响应于递增剂量的促凝血酶原激酶所沉积的纤维蛋白的定量。Bival,比伐芦定(* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.005$,单因素方差分析及Tukey事后检验; $n=3-5$ 只小鼠,s.e.)。

[0036] 图4A-E显示肺栓塞的非侵入性尿检测。(A)从促凝血酶原激酶或PBS处理的小鼠切下的器官中VT750标记NW的分布的定量($n=3$ 只小鼠,s.d.)。(B)向小鼠输注与(用VT750标记的)猝灭的底物缀合的NW和促凝血酶原激酶的混合物或PBS后器官荧光信号的定量(** $P<0.01$,Student t检验; $n=3$ 只小鼠,s.d.)。插图显示肾和肺的代表性荧光扫描结果。(C)在施用NW后显示荧光信号增加的体内荧光图像,所述荧光信号定位至用促凝血酶原激酶攻击的小鼠的膀胱。(D)响应于促凝血酶原激酶的归一化尿报道分子水平(R₁/R₂)。Bival,比伐芦定(*** $P<0.005$,两因素ANOVA及Bonferroni事后检验; $n=5$ 只小鼠,s.e.)。(E)肺中沉积的

VT750-纤维蛋白(原)相对于正常尿生物标记水平的曲线。

[0037] 图5A-C显示使用(A)抗F1sc捕获抗体或(B)抗AF488捕获抗体时比色检测尿中内标的R1、R1+R2和R2的照片。(C)在450nm测量的来自(B)的抗AF488ELISA平板的吸光度值(每种条件n=3,s.d.)。

[0038] 图6显示与NW缀合的生物素-eGvndneeGffsar(K-F1sc)GGfPRSGGGC(SEQ ID NO:2)的结构。

[0039] 图7显示从施用促凝血酶原激酶后30分钟的小鼠收获的器官切片的苏木精和伊红染色(比例尺=100 μ m)。

[0040] 图8显示肺中响应于递增剂量促凝血酶原激酶和比伐芦定(Bival)抑制而沉积的VT750-纤维蛋白(原)水平的近红外荧光扫描结果。

[0041] 图9显示在促凝血酶原激酶所致的血栓形成后器官中VT750-NW分布的近红外扫描后结果。

[0042] 图10显示在促凝血酶原激酶所致的血栓形成后器官中VT750-底物-报告分子(R1)分布的近红外扫描后结果。

[0043] 图11显示在促凝血酶原激酶所致的血栓形成之后肺切片的免疫荧光染色。显示肺中纤维蛋白沉积、R1蓄积和胞核的染色(比例尺=100 μ m)。

[0044] 图12A-B显示水化状态对尿报道分子水平的影响。(A)通过ELISA定量来自未补水小鼠与补水小鼠的尿中的R2(**P<0.005,Student t检验;n=5只小鼠)。(B)在施用后2小时,从未补水小鼠与采用10%体重等同的PBS皮下注射补水的小鼠收集的尿体积(**P<0.005,Student t检验;n=5只小鼠)。

[0045] 图13显示本发明的生物标记物纳米粒子和使用方法的示意图。半抗原编码的串联肽与纳米虫(NW)纳米粒子缀合。当静脉内施用,这些物质在疾病部位积累并释放报道分子入尿中,以便由低成本亲和力测定法如ELISA或纸基测试条检测。

[0046] 图14A-D显示蛋白酶敏感性纳米粒子从尿检测疾病。(A和B)是一组曲线,所述曲线显示用针对凝血酶或MMP9(B)(B7)特异的肽底物(A)(B6)包被的荧光团标记纳米粒子、其抗蛋白酶d-异构体(dB6、dB7)和在蛋白酶抑制剂(阿加曲班和马立马司他)存在下的蛋白酶解作用。(C)是显示方法的示意图。(D)显示切割的肽在携带腹侧肿瘤的小鼠中尿蓄积的完整动物荧光成像。

[0047] 图15A-F显示基于亲和力的合成性尿生物标记物检测。(A)抗体和半抗原-报道分子夹心复合物的示意图和显示pM灵敏度的检测下限。(B)显色的96孔板的图片,所述图片显示吸附的抗体对4种不同半抗原编码的报道分子的特异性。(C)平板测定法的光学定量揭示非同族抗体-半抗原对之间可忽略的交叉反应性。(D)纸基横向流测定法的示意图。(E)单一报道分子在纸(顶部)上的检测下限的定量和其强度谱(底部)。(F)暴露于用不同报道分子内标的不同尿样的空间编码型试纸条。检验线似乎仅处于印刷有特异性抗体的区域中。

[0048] 图16A-B显示合成性尿生物标记物区分疾病。ELISA分析来自接受NW注射的小鼠的尿样,显示检出血栓形成(A)或癌症(B)的尿生物标记物升高超过健康对照。

[0049] 发明详述

[0050] 根据本发明提供了评估关于生物学过程或系统的信息的快速、简单和可靠测定法。可以使用本发明的方法,通过确定与酶活性相关的分子特性,评估受试者生理状况的状

态。可以现在使用本发明的方法,在广泛可用的测定法背景下实现这一点,其中所述测定法不像质谱法那样有局限性。酶活性检测可用于诊断疾病如癌症、血栓形成、纤维化、感染性疾病、类风湿性关节炎和动脉硬化,以及用作预后指标。用途还包含监测酶活性如激酶、磷酸酶、核酸酶和其他酶。目前通过体检和各种临床成像模式监测大部分癌症对医学干预的反应。通过利用血液中的单一生物标记物,监测一些癌症如前列腺和卵巢癌。例如使用荧光检测特定疾病状态下激活的分子标记,实现这类诊断技术。更复杂的测定法一般涉及使用精密技术和设备如以质谱法进行。因此,本发明在分子诊断学中具有广泛类型的商业应用(例如癌症早期检测)以及基础科学研究中的应用(例如剖析蛋白酶活性)。例如,癌症的ELISA检查可以直接临床应用于早期筛查或监测复发。类似地,纸基检验将具有众多的居家监测商业应用(类似于居家妊娠检验)以及为全球健康提供低成本诊断。总之,本发明能够实现受限于现有技术和方法的商业应用。

[0051] 通过利用生物标记物纳米粒子循环并感测局部微环境的能力,我们已经工程化了可以在体内检测酶活性并对生理过程非侵入性定量的合成性生物标记物。例如,如本文实施例中所示,可以评估凝血酶活性以测定活动血凝块的聚集量。不同于通过产生局限化信号发挥作用的其他纳米粒子传感器^[9-10,23],本发明的组合物通过在目的部位局部释放报道分子感测蛋白酶活性,即,在所述目的部位,血栓形成,但随后被滤除并从尿中远端检出。通过使用不同配体和它们的同族结合分子,还开发了可以使用多种测定法如标准化96孔板测定法检出的一组异双官能化报道分子,从而如我们的先前研究中所述,消除对质谱法的需求。^[6]通过并入额外的配体-捕获剂对,这种系统容易地可扩展,并且可服务于采用其他方法检测,包括在重点照护时的纸基测试条(横向流测定法),多种测定法,包括基于珠的测定法(例如,免疫沉淀法)、表面等离子体共振、纳米电子学(例如,纳米导线)等。

[0052] 本发明的方法具有胜过现有技术方法的多个优点。例如,使用本发明的方法时,现在可能在活的受试者中用允许在受试者中微量定量的超灵敏检测平台检测酶活性。目前,实施了微量定量研究,其中将痕量药物(通常药理学剂量的1%至最大100 μ g)施用至人类受试者以获得基本参数如清除率、器官分布、血浆半寿时间和用临床前动物模型不可获得的其他参数。以微剂量施用给受试者或患者的大部分药物是安全的。因此,与传统的FDA指导的临床试验相比,可以在法规较少的情况下实施在‘0期’研究。然而,为了使微量定量研究可行,需要超灵敏分析方法检测靶分析物。本发明的方法提供配体编码的报道分子的平台,其中可以通过已建立和正在浮现的超灵敏分析性平台容易检测到所述报道分子。甚至对于微量定量而言,先前涉及基于质谱法检测体内酶活性的方法的发明人先前工作仍不足够灵敏。例如,基于质谱法的方法需要1mg/kg定量基线用于精确检测。本发明的方法能够以这种基线水平1/100以下以及低于100微克的水平定量,结果极其精确。这些结果相当出乎意料。

[0053] 在一些方面,本发明测定法的灵敏度源自生物标记物纳米粒子的独特结构和捕获-检测技术的组合。生物标记物纳米粒子的结构由饰以标记物的芯部或载体组分组成,所述标记物具有这样的结构,所述结构具有通过接头彼此连接并通过酶敏感组分与载体连接的双重配体。在体内暴露于功能酶,该标记物被切并与载体分离。随后它行进至身体外周部位如尿,在那里,可以使用本发明的技术捕获并检测它。捕获步骤包括捕获试剂和配体之一之间的结合相互作用。随后可以通过多种方法检出另一个配体。使用简单、容易可及测定法促进释放及随后捕获并检测标记物的能力导致本文所述的超灵敏技术。

[0054] 目前,检测活生物中的蛋白酶活性一般用‘基于活性的’探针进行,所述探针设计成在肽切割后发射荧光信号(Baruch等人,Trends Cell Biol 2004;Blum等人,Nat Chem Biol 2007;Nomura等人,Nat Rev Cancer 2010)。这些试剂同时或多重监测不同切割事件的能力部分地受如下难题限制:设计其发射光谱各自不同并处于近红外窗口(600-900nm)以最大限度减少信号因组织散射而衰减。令人惊讶地,已经用本发明的方法实现工程化数百种独特编码试剂的能力一并因此实现许多新诊断试验。

[0055] 发明人先前开发了一种利用质量‘条形码’标记纳米粒子并允许通过质谱法多重监测蛋白酶活性的方法。尽管现代质谱仪可以容易地检出复杂样品中数百种独特肽的存在(即,多重法并非主要的限制因素),但是这些仪器昂贵,需要专用技术专业知识并且在大部分临床环境下不可容易获得。根据本发明,发现可以使用基于亲和力的测定法如ELISA和横向流测定法(LFA),实现基于纳米粒子的用于高灵敏度和快速检测体内酶状态的系统。

[0056] 作为妊娠的标准检查,横向流测定法(LFA)(本文中称作试纸条测定法)已经使用几乎40年。LFA的一个额外优点是它们不需要实验室基础设施该测定法在测试条上自动化,仅需要使用者向样品垫施加样品,并且结果可以用肉眼通过观察不同的有色条带来读取。出于这些原因,LFA可以用于几乎任何环境下。在发达国家中,一种潜在应用包括在门诊部注射生物标记物纳米粒子并且随后由该患者稍后居家测量。已经开发LFA或快速诊断试验RDT用于众多疾病,包括疟疾和艾滋病。然而,对于大多数发展中国家而言,感染性疾病的负担不断减轻,而非传染性疾病(如癌症)不断增加。不过,用于许多疾病的LFA因内源生物标记物的低水平而仍难以企及。使用LFA测量蛋白酶敏感性合成探针,本发明的方法提供了在多地如印度和中国乡村显著更早诊断癌症的独特机会,在那里医疗基础设施匮乏,使得早期诊断难进行。

[0057] 本发明涉及一种用于功能性表征疾病或病状特异性酶组库(repertoire)的平台作为监测疾病进展和消退及治疗药反应的方法。该方法提供数量级比现有技术更高的体内酶-底物信息或就质谱技术而言提供更简单、更高效的方法。该平台提供功能地监测癌症和其他疾病进展和疗法反应的独特机会。它特别可用于其中发现预后性功能特征标识将大大有助于干预措施并且其中酶特征标识直接与治疗功效相关的长期治疗方案。

[0058] 通过施用生物标记物纳米粒子(如外源可检测底物文库)至疾病的动物模型中,可以获得关于与疾病如癌症、心血管疾病、关节炎和其他相关的底物特异性酶活性的信息。该项技术允许例如使用伴侣蛋白化、酶敏感性可检测化合物(称作生物标记物纳米粒子的一个化合物例子),可能同时在体内剖析数百种酶-底物活性。该方法利用模块结构和小标记肽、任选地亲水性标记肽的不同药代动力学(分别是RES和肾清除率)。生物标记物纳米粒子具有长循环时间并且因此保留在循环中或借助多孔性生血管血管网络渗入肿瘤中,在那里,依赖本地分子,如酶(MMP、激肽释放酶、组织蛋白酶、纤维蛋白溶酶原激活物、ADAM)接近生物标记物纳米粒子的酶敏感区域,或底物接近生物标记物纳米粒子的酶。

[0059] 当生物标记物纳米粒子(例如,包含酶敏感结构域的试剂)暴露于酶(例如,蛋白酶)时,试剂如此遭受切割,从而标记物(在本文中称作酶敏感可检测标记物)释放。标记物经肾清除并且因此作为酶活性的“信使”发挥作用。尿分析可以产生组织成例如癌症酶活性条形码的数据。在酶活性不存在的情况下,生物标记物纳米粒子保持未切割并且在不产生尿标记物的情况下,包含可检测标记物的完整试剂由RES器官(肝、脾和淋巴结)清除。本发

明捕获测定法鉴定底物的用途允许结合可及性和易用性的前所未有的多路复用能力,同时可能快速地并以极端低的量分析超过1,000种底物。

[0060] 因此,在一些方面,本发明包括向受试者施用生物标记物纳米粒子,从待检测可检测标记物的受试者确定生物样品和任选地采集样品;并且使生物样品经历分析方法以检测一种或多种可检测标记物的存在。可检测标记物在生物样品中的存在表示受试者中的活性酶或底物。尽管本文中就载体中所包含的用于检测体内酶存在的酶敏感结构域而言描述本发明,但是当需要检测体内底物时,本发明的每种方法也有用。在这种情况下,酶敏感结构域将含有能够在体内作用于底物的酶,前提是酶底物反应导致可检测标记物释放。例如,如果与体内底物反应时,酶发生导致可检测标记物释放的构象变化,则标记物可以作为存在该底物的信号检出。

[0061] 例如在一些方面,本发明涉及一种向受试者施用生物标记物纳米粒子的方法,其中生物标记物纳米粒子包含具有与酶敏感可检测标记物连接的载体结构域(module)的模块结构,其中酶敏感可检测标记物由连接于可检测标记物的酶敏感结构域组成,其中可检测标记物能够在暴露于酶时从生物标记物纳米粒子释放并且其中可检测标记物包含由接头连接的捕获配体和检测配体;确定用于检测标志物的生物样品,其中生物样品在这样的身体部位处,所述身体部位远离其中可检测标记物从生物标记物纳米粒子释放的身体部位;并且,使用捕获测定法分析生物样品以检测可检测标记物的存在,其中可检测标记物在生物样品中的存在表示酶以活性形式存在于受试者中。

[0062] 生物标记物纳米粒子包含具有与酶敏感可检测标记物连接的载体结构域(module)的模块结构。如本文所用,模块结构,指具有多个结构域(multiple domains)的分子。

[0063] 酶敏感可检测标记物是模块结构的与载体连接的部分。其是由连接于可检测标记物酶敏感结构域(domain)的组成。

[0064] 可检测标记物能够在体内在暴露于酶时从生物标记物纳米粒子释放。一旦释放,可检测标记物自由行进至远端部位以便检测。远端部位在本文中用来指与容纳酶的身体组织区别的体内部位,在那里酶促反应发生。可检测标记物由接头连接的捕获配体和检测配体组成。

[0065] 捕获配体是能够被结合配偶体捕获的分子。检测配体是能够通过多种方法的任何一种检出的分子。尽管捕获配体和检测配体将在特定的可检测标记物中彼此区别,但是构成捕获和检测配体的分子类别显著地重叠。例如,能够捕获和检出许多分子。在一些情况下,这些分子可以因被捕获或通过捕获探针检出。捕获和检测配体各自独立地可以例如是以下一种或多种:蛋白质、肽、多糖、核酸、荧光分子或小分子。在一些实施方案中,检测配体或捕获配体可以是以下之一,但不限于此:Alexa488、TAMRA、DNP、荧光素、俄勒冈绿、得克萨斯红、丹磺酰、BODIPY、Alexa405、瀑布蓝、萤光黄、硝基酪氨酸、HA标签、FLAG标签、His标签、Myc标签、V5标签、S标签、生物素或链霉亲和素。

[0066] 捕获配体和检测配体由接头连接。接头的目的是防止两个配体之间的空间位阻。因此,接头可以是实现这种目的的任何类型分子。接头可以例如是聚合物如PEG、蛋白质、肽、多糖、核酸或小分子。在一些实施方案中,接头是10-100个氨基酸长度的蛋白质。在其他实施方案中,接头是GluFib(SEQ ID NO.1)。任选地,接头长度可以是8nm-100nm、6nm-100nm、8nm-80nm、10nm-100nm、13nm-100nm、15nm-50nm或10nm-50nm。

[0067] 载体结构域可以包括单一类型的酶敏感可检测标记物,如,单一类型的酶敏感结构域和或可检测标记物或它可以包括多个类型的酶敏感可检测标记物,如,不同的酶敏感结构域和可检测标记物。例如,每个载体可以包括1个类型的酶敏感可检测标记物或它可以包括2-1,000个或其之间任何整数个不同的酶敏感可检测标记物。备选地,每个载体可以包括大于1,000个酶敏感可检测标记物。将生物标记物纳米粒子的多重副本施用至受试者。一些生物标记物纳米粒子混合物可以包括作为酶的酶敏感可检测标记物,其他可以是酶敏感结构域,并且其他可以是这二者的混合物。另外,多个不同生物标记物纳米粒子可以向受试者施用以确定是否存在多种酶和/或底物。在这种情况下,多个不同生物标记物纳米粒子如此包含多个可检测标记物,从而每个酶敏感结构域与特定的可检测标记物或分子结合。

[0068] 载体结构域可以充当纳米粒子的芯部。载体结构域目的将充当酶敏感可检测标记物的平台。因此,载体可以是任何材料或规格,只要它可以充当载体或平台。优选地,材料无免疫原性,即在对其施用它的受试者的身体内不诱发免疫反应。另一个目的是它可以作为导引装置发挥作用以导引模块结构至组织细胞或分子。在一些实施方案中,载体结构域是粒子。粒子,例如,纳米粒子,可以例如导致由循环被动导引至肿瘤。其他类型的载体,例如包括,造成主动导引至组织细胞或分子的化合物。载体的例子包括但不限于微粒子、纳米粒子、适配体、肽(RGD、iRGD、LyP-1、CREKA等)、蛋白质、核酸、多糖、聚合物、抗体或抗体片段(例如赫赛汀、西妥昔单抗、帕尼单抗等)和小分子(例如厄洛替尼、吉非替尼、索拉替尼等)。

[0069] 如本文所用,术语“粒子”包括纳米粒子以及微粒子。纳米粒子定义为直径小于1.0 μm 的粒子。纳米粒子的制品包括具有直径小于1.0 μm 的平均粒度的粒子。微粒子是直径大于1.0 μm 但小于1mm的粒子。微粒子的制品包括具有直径大于1.0 μm 的平均粒度的粒子。微粒子因此可以具有至少5微米、至少10微米、至少25微米、至少50微米或至少75微米的直径,包括以下范围内的规格:5-10微米、5-15微米、5-20微米、5-30微米、5-40微米或5-50微米。粒子的组合物可以具有范围从10nm至mm规格的不均均大小分布。在一些实施方案中,直径是约5nm至约500nm。在其他实施方案中,直径是约100nm至约200nm。在其他实施方案中,直径是约10nm至约100nm。

[0070] 粒子可以由多种材料组成,所述材料包括铁、陶瓷、金属、天然高分子材料(包括脂质、糖、壳聚糖、透明质酸等)、合成高分子材料(包括聚-丙交酯-聚乙交酯、聚-甘油癸二酸酯等)和非高分子材料或其组合。

[0071] 粒子可以完全或部分地由聚合物或非高分子材料组成。例如,非高分子材料,可以用于制备粒子。示例性材料包括氧化铝、碳酸钙、硫酸钙、磷硅酸钙、磷酸钠、铝酸钙、磷酸钙、羟基磷灰石、磷酸三钙、磷酸氢钙、磷酸三钙、磷酸四钙、非晶态磷酸钙、磷酸八钙和硅酸盐。在某些实施方案中,粒子可以包含钙盐如碳酸钙、锆盐如二氧化锆、锌盐如氧化锌、镁盐如硅酸镁、硅盐如二氧化硅或钛盐如氧化钛或二氧化钛。

[0072] 众多生物可降解的和生物不可降解的生物相容性聚合物是聚合生物材料、受控药物释放和组织工程化领域已知的(参见,例如,授予Vacanti的美国专利号6,123,727;5,804,178;5,770,417;5,736,372;5,716,404;授予Shastri的美国专利号6,095,148;5,837,752;授予Anseth的美国专利号5,902,599;授予Mikos的美国专利号5,696,175;5,514,378;5,512,600;授予Barrera的美国专利号5,399,665;授予Domb的美国专利号5,019,379;授予Ron的美国专利号5,010,167;授予d'Amore的美国专利号4,946,929;和授予Kohn的美国专

利号4,806,621;4,638,045;还参见Langer, Acc. Chem. Res. 33:94, 2000; Langer, J. Control Release 62:7, 1999; 和Uhrich等人, Chem. Rev. 99:3181, 1999; 全部文献均通过引用方式并入本文)。

[0073] 聚合物包括但不限于:聚酰胺、聚碳酸酯、聚亚烷基类、聚二醇、聚亚烷基氧化物、聚对苯二甲酸亚烷基酯、聚乙烯醇、聚乙烯醚、聚乙烯酯、聚卤乙烯、聚乙交酯、聚硅氧烷、聚氨酯及其共聚物、烷基纤维素、羟烷基纤维素、纤维素醚、纤维素酯、硝基纤维素、丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯的聚合物、甲基纤维素、乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基-丙基甲基纤维素、羟丁基甲基纤维素、醋酸纤维素、丙酸纤维素、醋酸丁酸纤维素、醋酸纤维素邻苯二甲酸酯、羧乙基纤维素、三乙酸纤维素、纤维素硫酸钠盐、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(甲基丙烯酸乙酯)、聚(甲基丙烯酸丁酯)、聚(甲基丙烯酸异丁酯)、聚(甲基丙烯酸己酯)、聚(甲基丙烯酸异癸酯)、聚(甲基丙烯酸月桂酯)、聚(甲基丙烯酸苯酯)、聚(丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸异丙酯)、聚(丙烯酸异丁酯)、聚(丙烯酸十八酯)、聚乙烯、聚丙烯聚(乙二醇)、聚(环氧乙烷)、聚(对苯二甲酸乙二醇酯)、聚(乙醇醇)、聚(醋酸乙烯酯)、聚氯乙烯和聚苯乙烯。

[0074] 生物不可降解聚合物的例子包括乙烯醋酸乙烯酯、聚(甲基)丙烯酸、聚酰胺、共聚物及其混合物。

[0075] 生物可降解聚合物的例子包含合成聚合物如乳酸和乙醇酸的聚合物、聚酐、聚(原酸)酯、聚氨酯、聚(丁酸)、聚(戊酸)、聚(己内酯)、聚(羟丁酸酯)、聚(丙交酯-共-乙交酯))和聚(丙交酯-共-己内酯)、和天然聚合物如藻酸盐和其他多糖、包括葡聚糖和纤维素、胶原蛋白、其化学衍生物(置换、添加化学基团,例如烷基、亚烷基、羟化、氧化和其由本领域技术人员常规做出的其他修饰)、白蛋白和其他亲水性蛋白质、玉米醇溶蛋白和其他谷醇溶蛋白和疏水性蛋白质、共聚物及其混合物。通常而言,通过侵蚀表面或本体侵蚀,这些材料因酶促水解或在体内暴露于水而降解。前述材料可以单独使用,作为物理混合物(掺混物)使用或作为共聚物使用。在一些实施方案中,聚合物是聚酯、聚酐、聚苯乙烯、聚乳酸、聚乙醇酸、乳酸和乙醇酸的共聚物及其掺混物。

[0076] PVP是不电离的亲水聚合物具有范围从大约10,000至700,000的平均分子量和化学式(C₆H₉NO)_[n]。PVP也称作聚[1-(2-氧代-1-吡咯烷基)乙烯]、聚维酮TM、PolyvidoneTM、RP143TM、KollidonTM、Peregal STTM、PeristonTM、PlasdoneTM、PlasmosanTM、ProtagentTM、SubtosanTM和VinisilTM。PVP无毒、高度吸湿并容易溶解在水或有机溶剂中。

[0077] 聚乙二醇(PEG),也称作聚(氧亚乙基)二醇,是环氧乙烷和水的缩合物聚合物,具有HO(CH₂CH₂O)_[n]H的一般化学式。

[0078] 聚乙烯醇(PVA)是通过将乙酸酯基团更换为羟基从聚醋酸乙烯酯制备并具有式(CH₂CHOH)_[n]的聚合物。大部分聚乙烯醇可溶于水中。

[0079] PEG、PVA和PVP是从化学供应商如Sigma Chemical Company(St. Louis, Mo.)可商业获得的。

[0080] 在某些实施方案中,粒子可以包含聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)。

[0081] 载体可以由无机物质组成。无机物质例如包含磁性材料、导电材料和半导体材料。

[0082] 除粒子之外,载体还可以由任何有机载体组成,所述有机载体包括生物载体和活载体如细胞、病毒、细菌、以及使酶底物可能暴露于疾病中的酶(包含胞外酶、膜结合型酶和胞内酶)的任何非生命有机载体或任何组合物。

[0083] 在一些实施方案中,粒子多孔。多孔粒子可以是粒子具有从其外表面延伸入粒子芯部的一条或多条通道。在一些实施方案中,通道可以如此贯穿粒子,从而其两端位于粒子表面处。这些通道一般在合成粒子期间通过在粒子中纳入通道形成剂随后移除通道形成剂而形成。

[0084] 孔的大小可以取决于粒子的大小。在某些实施方案中,孔具有小于15微米、小于10微米、小于7.5微米、小于5微米、小于2.5微米、小于1微米、小于0.5微米、或小于0.1微米的直径。多孔粒子中的孔隙度可以从大于0至小于100%的粒子体积。孔隙度可以小于1%、小于5%、小于10%、小于15%、小于20%、小于25%、小于30%、小于35%、小于40%、小于45%或小于50%。可以按许多方式确定孔隙度。例如,孔隙度可以基于载体的合成方案(例如,基于水溶液或其他通道形成剂的体积)或通过合成后显微镜检查载体确定。

[0085] 多个粒子可以对一项或多项参数或特征而言均一的。对给定参数或特征而言均一的多个,在一些情况下,意指在所述多个范围内的粒子彼此偏差不超过该参数的给定定量量值的约 $\pm 10\%$ 、优选地不超过约 $\pm 5\%$ 和最优选地不超过约 $\pm 1\%$ 。作为一个例子,粒子可以是均一多孔的。这意味着多个粒子内部的孔隙度相差不超过平均孔隙度的 $\pm 10\%$ 。在其他情况下,均一的多个意指在所述多个范围内的全部粒子以相同方式处理或加工,例如包括暴露于相同的试剂,无论每个粒子是否最终均具有相同特性。在另外的实施方案中,均一的多个意指对给定参数而言,至少80%、优选地至少90%和更优选地至少95%的粒子是相同的。

[0086] 多个粒子可以对一项或多项参数或特征而言不均一的。对给定参数或特征而言不均一的多个,在一些情况下,意指在所述多个范围内的粒子偏离平均数超过约 $\pm 10\%$,包括超过约 $\pm 20\%$ 。不均一粒子可以在多项参数方面不同,所述参数包括其大小或直径、其形状、其组合物、其表面电荷、其降解谱,试剂是否由粒子组成并且何种类型试剂由粒子组成,这类试剂的位置(例如,在表面上或内部)、由粒子组成的试剂的数目等本发明构思了独立合成各种类型的粒子,所述粒子随后在与样品接触之前按众多预定比率的任一比率混合。作为一个例子,在一个实施方案中,粒子可以相对于形状是均一的(例如,至少95%呈球状形状),但可以就大小、降解谱和/或其中所含试剂而言是不均一的。

[0087] 也可以通过调节粒子形成条件控制粒度、形状和释放动力学。例如,可以优化粒子形成条件以产生更小或更大的粒子,或可以增加总温育时间或温育温度,产生具有延长的释放动力学的粒子。

[0088] 粒子也可以用一种或多种稳定性物质包被,所述稳定性物质可以特别可用于肠胃外施用时长期贮备或通过允许粒子在不溶解情况下穿扩胃或消化道而用于口服递送。例如,意图口服递送的粒子可以用(如黏蛋白)包衣稳定化用物质,所述黏蛋白是一种含有由肠杯状细胞、颌下腺和其他粘液腺细胞产生的粘多糖的分泌物。

[0089] 为了增强递送,可以例如将粒子并入脂质体、病毒体、阳离子脂质或其他基于脂质的结构中。术语“阳离子脂质”指在生理pH携带净正电荷的脂质。这类脂质包括但不限于DODAC、DOTMA、DDAB、DOTAP、DC-Chol和DMRIE。另外,可获得多种阳离子脂质商业制品。这些例如包括**LIPOFECTIN®**(包含DOTMA和DOPE的市售阳离子脂质体,来自GIBCO/BRL, Grand Island, N.Y., 美国);脂质转染胺(**LIPOFECTAMINE®**)(包含DOSPA和DOPE的

市售阳离子脂质体,来自GIBCO/BRL);和**TRANSFECTAM®**(乙醇中包含DOGS的市售阳离子脂质,来自Promega Corp.,Madison,Wis.,美国)。可获得用于制备脂质体的多种方法,例如,美国专利号4,186,183、4,217,344、4,235,871、4,261,975、4,485,054、4,501,728、4,774,085、4,837,028、4,946,787和PCT公开号W091/17424。粒子也可以完全或部分地由GRAS组分组成。即,成分是按照美国FDA公认安全(GRAS)的那些。可用作粒子材料的GRAS组分包括基于不可降解食物的粒子如纤维素。

[0090] 载体结构域可以发挥几种功能。如上文讨论,它可以用于导引产品至特定区域,如组织。在这种情况下,它可以包含导引剂如糖蛋白、抗体或结合蛋白。

[0091] 进一步,载体结构域的大小可以基于生物标记物纳米粒子的特定用途调整。例如,载体结构域可以设计成具有大于5nm的大小。例如大于5nm的粒子不能够进入尿,而是由网状内皮系统(RES;肝、脾和淋巴结)清除。通过免于由肾移除,将在分析步骤期间尿中不检出任何未切割的生物标记物纳米粒子。另外,较大粒子可以用于维持粒子处于血液或肿瘤部位中,其中大粒子更容易经血管系统往返。在一些实施方案中,载体结构域的尺寸是500微米-5nm、250微米-5nm、100微米-5nm、10微米-5nm、1微米-5nm、100nm-5nm、100nm-10nm、50nm-10nm或其间的任何整数大小范围。在其他情况下,载体结构域的尺寸小于5nm。在这种情况下,生物标记物纳米粒子将被清除入尿中。然而,例如使用质谱法时,仍然可以检出游离可检测标记物的存在。在一些实施方案中,载体结构域的尺寸是1-5nm、2-5nm、3-5nm或4-5nm。

[0092] 任选地,载体结构域可以包含生物药物。在一个实施方案中,可以将生物药物并入载体结构域或它可以组成载体结构域。例如,它可以形成与蛋白酶解性结构域连接的支架或平台。因此,本发明的组合物可以同时实现两个目的:诊断方法和递送治疗药。在一些实施方案中,生物药物可以是酶抑制剂。在这种情况下,生物药物可以在局部位点抑制蛋白酶解活性并且可检测标记物可以用来检验这种特定治疗药在作用部位处的活性。HIV是其中可以监测活性蛋白酶的疾病例子。在这个实施方案中,组合物可以包括携带蛋白酶抑制剂的微粒子或其他输送装置。蛋白酶敏感部位可能对HIV蛋白酶敏感,从而可以提供关于特定蛋白酶抑制剂活性的反馈。

[0093] 生物药物包括诊断药、化妆品和治疗药,如可释放药物。因此,任何生物药物可以并入粒子中,所述粒子可以局部地或全身性递送或在施用或施加至受试者之后维持掺入的试剂。利用本领域技术人员已知的技术,可以将任何生物相容性或药理学可接受材料并入粒子中或截获在粒子的孔中。生物药物包括但不限于合成性无机化合物和有机化合物、蛋白质和肽、多糖和其他糖、脂质和具有治疗活性、预防活性、美容活性或诊断活性的DNA核酸序列和RNA核酸序列。核酸序列包含基因、质粒、载体、与互补性DNA结合以抑制转录的反义分子、siRNA、shRNA和核酶。

[0094] 在某些情况下,生物药物是抗微生物药。抗微生物药,如本文所用,指能够杀死或抑制传染性微生物的天然存在化合物或合成性化合物。根据本发明可用的抗微生物药的类型将取决于受试者遭其感染或面临遭其感染风险的微生物的类型。抗微生物药包括但不限于抗菌药、抗病毒药、抗真菌药和抗寄生虫药。短语如“抗感染药”、“抗菌药”、“抗病毒药”、“抗真菌药”、“抗寄生虫药”和“寄生虫药”具有本领域普通技术人员充分建立的意思并且在标准医学文本中定义。

[0095] 生长因子也可以并入载体中。如本文所用,术语“生长因子”指刺激细胞增殖和/或分化的任何物质。生长因子包括但不限于成纤维细胞生长因子(FGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)、胰岛素样生长因子(IGF) I和II、TGF- β 、TGF- α 、骨形态发生蛋白(BMP)(例如,BMP-2、BMP-3、BMP-4、BMP-6、或BMP-7)、刺猬因子蛋白、生长分化因子、造血集落刺激因子(CSF)、血管内皮生长因子(VEGF)、骨样诱导因子(OIF)、血管生成素、内皮素、肝细胞生长因子、角质形成细胞生长因子、ADMP-1、白介素(IL)(例如,IL-3和IL-6)、上皮生长因子、地塞米松、瘦蛋白、分选素(sortilin)、转谷氨酰胺酶、前列腺素E₁、25-二羟基维生素D₃、抗坏血酸、前胶原蛋白、甘油磷酸酯、TAK-778、他汀类、生长激素、青灰因子(SF)、活化素A(ACT)、视黄酸(RA)、表皮生长因子(EGF)、造血的生长因子、肽生长因子、促红细胞生成素、肿瘤坏死因子(TNF)、干扰素(IFN)、肝素结合生长因子(HBGF)、神经生长因子(NGF)和肌肉形态发生因子(MMP)。

[0096] 生物药物也可以是抗癌疗法。抗癌疗法例如包括放疗法、化疗、辅助疗法或前述任何组合。

[0097] 载体结构域也可以如此设置,从而它可以在分析期间在身体内检出。例如,可以将氧化铁并入粒子,从而可以使用MRI追踪生物标记物纳米粒子,以提供非侵入成像数据。

[0098] 载体与酶敏感可检测标记物连接。如本文所用,酶敏感可检测标记物,是模块结构的部分,其促进受试者中的酶促反应,造成可检测标记物释放。酶敏感可检测标记物是与可检测标记物连接的酶敏感结构域。

[0099] 酶敏感位点依赖于在特定疾病状态下有活性的酶。例如,肿瘤与特定的酶集合相关。如果正在分析的疾病状态是肿瘤,则产品设计有匹配于肿瘤或其他患病组织表达的酶的酶敏感位点。备选地,酶特异性位点可以与寻常存在但在特定疾病状态下不存在的酶结合。在这个例子中,疾病状态将与缺少与该酶相关的信号或相比于正常参考而言信号水平降低相关。

[0100] 如本文所用,酶指活细胞中产生的加速或催化生物代谢过程的多种蛋白质的任一种。酶作用于底物。在紧邻酶催的化学反应发生前,底物与酶在称作活性部位的位置结合。酶包括但不限于蛋白酶、糖苷酶、脂肪酶、肝素酶、磷酸酶。

[0101] 可以优化酶敏感位点以提供对所指定靶酶的高催化活性(或其他酶活性),而且还释放优化的检测用可检测标记物。在分子水平,患者结局取决于各个疾病的表型,并且这经常反映在酶表达方面。生物信息学的近期爆发性发展已经促进探索人组织中的复杂基因表达模式(Fodor, S.A. Massively parallel genomics. *Science* 277, 393-395 (1997))。最近已经开发了复杂的计算机算法,这些算法能够使用通过表达概况分析生成的庞大数据集对肿瘤进行分子诊断(Khan J, Wei JS, Ringner M, Saal LH, Ladanyi M, Westermann F等人, Classification and diagnostic prediction of cancers using gene expression profiling and artificial neural networks. *Nat Med* 2001;7:673-679)。可以访问这种信息以鉴定与特定疾病相关的酶和底物。基于这种信息,技术人员可以鉴定适宜酶或底物以并入生物标记物纳米粒子中。表1提供了与疾病相关(相对于正常而言增加或降低)的酶和在一些情况下特异性底物的非限制性清单。表2提供了与疾病或其他病状相关的底物非限制性清单。与特定疾病或病状相关的多种其他酶/底物组合是技术人员已知的并且根据本发明使可用。

[0102] 表1

[0103]

疾病	酶	底物
癌症	MMP	胶原蛋白、明胶、各种 ECM 蛋白
癌症	MMP-2	IV 型胶原蛋白和明胶
癌症	MMP-9	IV 型和 V 型胶原蛋白和明胶
癌症	激肽释放酶	激肽原、纤维蛋白溶酶原
癌症	组织蛋白酶	宽底物谱
癌症	纤维蛋白溶酶原 激活物, tPA	纤维蛋白溶酶原

[0104]

疾病	酶	底物
癌症	ADAM(解整合素和金属蛋白酶, 又称作 MDC、去整合素 (Adamalysin))	跨膜蛋白的各种胞外结构域
胰腺癌	MMP-7	例如, 各种胶原蛋白 18、FasL、HLE、DCN、IGFBP-3、MAG、纤维蛋白溶酶原、其他 MMP
胰腺癌	ADAM9、ADAM15	跨膜蛋白的各种胞外结构域
前列腺腺癌	Matriptase, 一种 II 型跨膜丝氨酸蛋白酶	无特异性, 在 Lys 或 Arg 残基后切割
前列腺癌	激肽释放酶 3	激肽原、纤维蛋白溶酶原
前列腺癌	ADAM15	跨膜蛋白的各种胞外结构域
卵巢癌	激肽释放酶 6	激肽原、纤维蛋白溶酶原
上皮衍生的肿瘤(乳房、前列腺、卵巢、结肠、口腔)	Matriptase, 一种 II 型跨膜丝氨酸蛋白酶	无特异性, 在 Lys 或 Arg 残基后切割
卵巢癌	MMP-2、MMP-9、激肽释放酶-10(hk-10)	IV 型和 V 型胶原蛋白和明胶、激肽原、纤维蛋白溶酶原
乳腺癌、胃癌、前列腺癌	组织蛋白酶 B、L 和 D	宽底物谱
子宫内膜癌	组织蛋白酶 B	广谱底物的非特异性切割, 无明显序

[0105]

疾病	酶	底物
		列特异性
食管腺癌	组织蛋白酶 B	广谱底物的非特异性切割, 无明显序列特异性
扩散性癌、转移灶	II 型整合型丝氨酸蛋白酶(二肽基肽酶 IV (DPP4/CD26)、seprase/成纤维细胞活化蛋白 α (FAP α) 和相关的 II 型跨膜脯氨酰丝氨酸肽酶))	
扩散性癌、转移灶	Seprase	各种 ECM 蛋白
病毒性感染		
全部逆转录病毒	病毒蛋白酶	前体 GagPol 融合物
HIV	HIV 蛋白酶(HIV PR, 一种天冬氨酸蛋白酶)	前体 Gag 和 GagPol 蛋白
丙型肝炎	NS3 丝氨酸蛋白酶	病毒前体多聚蛋白
登革热	登革热蛋白酶	自我切割(NS2B/NS3)、NS3/NS4A 和 NS4B/NS5 切割
西尼罗河	NS2B/NS3pro	病毒前体多聚蛋白
细菌性感染		

[0106]

疾病	酶	底物
军团菌属物种 (<i>Legionella</i> spp.)	锌金属蛋白酶	Me-Arg-Pro-Tyr
脑膜脑炎	溶组织性半胱氨酸蛋白酶	
化脓性链球菌 (<i>Streptococcus</i> <i>pyogenes</i>)(A 型 链球菌)	链球菌致热性外 毒素 B (SpeB)	胞外基质、免疫球蛋白、补体组分
艰难梭菌 (<i>Chlostridium</i> <i>difficile</i>)	Cwp84	纤连蛋白、层粘连蛋白、玻连蛋白和 其他 ECM 蛋白
阿尔茨海默病	BACE-1,2(阿 尔茨海默分泌酶)	β -淀粉样前体蛋白
卒中和康复	MMP、tPA	
心血管疾病	血管紧张素转化 酶(ACE)	血管紧张素 I、缓激肽
动脉粥样硬化	组织蛋白酶 K、 L、S	宽底物谱
关节炎	MMP-1	三螺旋原纤维胶原蛋白
类风湿性关节 炎	凝血酶	骨桥蛋白
骨关节炎	凝血酶	骨桥蛋白
骨质疏松症/骨	组织蛋白酶 K、S	宽底物谱

[0107]

疾病	酶	底物
性关节炎		
关节炎、炎性关节疾病	聚集蛋白聚糖酶 (ADAMTS4、ADAMTS11)	聚集蛋白聚糖(蛋白聚糖)
血栓形成	因素 Xa (凝血酶原激酶)	凝血酶原
血栓形成	ADAMTS13	血管性血友病因子(vWF)
血栓形成	纤维蛋白溶酶原激活物, tPA	纤维蛋白溶酶原
应激诱导的肾压力钠尿增多	前列腺蛋白酶	上皮 Na 通道亚基

[0108] 表2

[0109]

疾病	靶底物	酶
炎症	白介素 1 β	MMP-2、MMP-3、MMP-9、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、Lys-C、Glu-C、Asp-N、Arg-C
脑垂体功能障碍、异常骨密度、生长紊乱	IGFBP-3	MMP-1、MMP-3、MMP-9、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、Lys-C、Glu-C、Asp-N、Arg-C
癌症	TGF- β	MMP-9、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、Lys-C、Glu-C、Asp-N、Arg-C

[0110]

疾病	靶底物	酶
癌症、自身免疫疾病	TNF	MMP-7、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、Lys-C、Glu-C、Asp-N、Arg-C
癌症、自身免疫疾病	FASL	MMP-7、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、Lys-C、Glu-C、Asp-N、Arg-C
伤口愈合、心脏病	HB-EGF	MMP-3、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、Lys-C、Glu-C、Asp-N、Arg-C
Pfeiffer 综合征	FGFR1	MMP-2、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、Lys-C、Glu-C、Asp-N、Arg-C
癌症	Decorin	MMP-2、MMP-3、MMP-7、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、Lys-C、Glu-C、Asp-N、Arg-C
癌症	肿瘤相关糖抗原	内切糖苷酶
癌症	唾液酸化路易斯抗原 ^a	O-聚糖酶
癌症	唾液酸化路易斯抗原 ^x	O-聚糖酶
癌症/类风湿性关节炎、肺性高血压	VEGF	胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、Lys-C、Glu-C、Asp-N、Arg-C
癌症	EGF	胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、Lys-C、Glu-C、Asp-N、Arg-C
癌症	IL2	胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、

[0111]

疾病	靶底物	酶
		Lys-C、Glu-C、Asp-N、Arg-C
癌炎症/血管生成	IL6	胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、Lys-C、Glu-C、Asp-N、Arg-C
癌症	IFN- γ	胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、Lys-C、Glu-C、Asp-N、Arg-C
癌炎症/血管生成、类风湿性关节炎	TNF- α	胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、Lys-C、Glu-C、Asp-N、Arg-C
癌症、肺纤维化、哮喘	TGF- β	胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、Lys-C、Glu-C、Asp-N、Arg-C
癌症、肺性高血压	PDGF	胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、Lys-C、Glu-C、Asp-N、Arg-C
癌症、肺囊腺瘤	成纤维细胞生长因子(FGF)	胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、Lys-C、Glu-C、Asp-N、Arg-C
癌症	脑衍生神经营养因子(BDNF)	胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、Lys-C、Glu-C、Asp-N、Arg-C
癌症	干扰素调节因子(IRF-1、IRF-2)	胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、Lys-C、Glu-C、Asp-N、Arg-C
肿瘤抑制基因的抑制剂	MIF	胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、Lys-C、Glu-C、Asp-N、Arg-C
淋巴瘤/癌、肺泡蛋白沉积症	GM-CSF	胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、Lys-C、Glu-C、Asp-N、Arg-C
癌症侵入	M-CSF	胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、Lys-C、Glu-C、Asp-N、Arg-C
化学致癌作用，多发性硬化、类	IL-12	胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、Lys-C、Glu-C、Asp-N、Arg-C

[0112]

疾病	靶底物	酶
风湿性关节炎、 Crohn 病		
天然杀伤 T 细胞白血病、炎性肠病、类风湿性关节炎	IL-15	胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、 Lys-C、Glu-C、Asp-N、Arg-C
肝硬化	MMP 的组织抑制物(TIMP)	胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、 Lys-C、Glu-C、Asp-N、Arg-C
肝硬化	胶原蛋白 I、III	MMP-1、MMP-8、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、Lys-C、Glu-C、 Asp-N、Arg-C
肝硬化	胶原蛋白 IV、V	MMP-2、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、 胃蛋白酶、Lys-C、Glu-C、Asp-N、 Arg-C

[0113] 上文描述的几种酶/底物在下文出版物中描述,所述文献均通过引用的方式完整并入本文:Parks,W.C.和R.P.Mecham(编著):Matrix metalloproteinases.San Diego:Academic Press;1998;Nagase,H.和J.F.Woessner,Jr.(1999)J.Biol.Chem.274:21491;Ito,A.等人(1996)J.Biol.Chem.271:14657;Schonbeck,U.等人(1998)J.Immunol.161:3340;Rajah,R.等人(1999)Am.J.Cell Mol.Biol.20:199;Fowlkes,J.L.等人(1994)Endocrinology 135:2810;Manes,S.等人(1999)J.Biol.Chem.274:6935;Mira,E.等人(1999)Endocrinology 140:1657;Yu,Q.和I.Stamenkovic(2000)Genes Dev.14:163;Haro,H.等人(2000)J.Clin.Invest.105:143;Powell,C.P.等人(1999)Curr.Biol.9:1441;Suzuki,M.等人(1997)J.Biol.Chem.272:31730;Levi,E.等人(1996)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:7069;Imai,K.等人(1997)Biochem.J.322:809;Smith,M.M.等人(1995)J.Biol.Chem.270:6440;和Dranoff,G.(2004)Nat.Rev.Cancer 4:11-22。

[0114] 酶敏感可检测标记物可以直接连接至载体。例如,可以使用已知技术,将它直接涂覆在微粒子的表面上。备选地,如果载体是蛋白质材料,则它可以直接通过肽键连接。另外,酶敏感可检测标记物可以通过使用接头与载体结构域连接。如本文所用,“连接的”或“键合”意指两个实体通过任何物理化学手段彼此结合。包括本领域普通技术人员已知的任何键,共价键或非共价键。因此,在一些实施方案中,载体具有与可以用来连接酶敏感可检测标记物的外部表面连接的接头。另一个分子也可以与接头连接。

[0115] 酶敏感可检测标记物优选地是由多个化学单元组成的聚合物。如本文所用的“化

学单元”是可以直接或间接地与其他结构单元或单体连接以形成聚合物的结构单元或单体。在一些实施方案中,酶敏感可检测标记物是易受酶切割或造成与疾病或病状相关的底物裂解的肽。上表中提供了当蛋白酶剪切位点是肽时的多种例子。

[0116] 酶敏感结构域也可以是多糖。一些多糖特异性降解酶与肿瘤、血管生成和其他病状相关。“多糖”是生物聚合物由连接的糖或糖单元组成。作为蛋白酶解敏感性结构域使用的多糖可以分离或从头合成。例如,多糖可以从天然来源分离,例如纯化,如通过切割和凝胶分离,或可以例如通过化学合成法合成并且并入生物标记物纳米粒子中。

[0117] 例如,HSGAG降解酶是可以根据本发明方法分析的酶。HSGAG降解酶包含肝素酶-I、肝素酶-II、肝素酶-III、D-葡糖醛酸糖苷酶和L-艾杜糖苷酸酶。肝素酶在糖醛酸前的糖苷键处切割。肝素酶I在2-O硫酸化艾杜糖酸前的糖苷键处切割。肝素酶-III在非硫酸化葡糖醛酸前的糖苷键切割。肝素酶-II同时在Hep-I和Hep-III可切割位点处切割。如其名称提示,葡糖醛酸糖苷酶和艾杜糖苷酸酶分别在葡糖醛酸和艾杜糖酸后的糖苷键处切割。亚硝酸随机地在N-硫酸化己糖胺后的糖苷键处切割并将六元己糖胺环转化成5元脱水甘露醇环。适宜的酶敏感结构域可以基于这些酶的已知底物和切割位点设计。

[0118] 生物标记物纳米粒子还可以包括容纳模块结构的植入式微量递送装置。植入式微量递送装置是大小适于植入身体中并且可以保留模块结构的任何类型的装置。例如装置可以是含有容纳于其中的模块结构的植入式胶囊。胶囊可以具有半透膜,从而模块结构不能通过该膜,但是所述膜是内源分子如酶和底物以及可检测标记物可透过的。备选地,植入式微量递送装置是具有与之连接的模块结构的芯片。植入式微量递送装置的例子包括但不限于植入式胶囊、芯片、缓释制剂、多脉冲式药物递送可再吸收式聚合物微芯片装置(Grayson等人,Nature Materials,第2卷,2003年11月,第767页)和控释微芯片(Santini等人,Nature,第397卷,1999,第335页)。这些装置可以由多种材料制成,所述材料包括本文所述的多种高分子材料。优选地,植入式装置是生物相容和无毒的。

[0119] 体内酶对酶敏感结构域的修饰导致可检测标记物产生。备选地,当酶敏感可检测标记物是酶时,该酶切割内源底物,从内源底物产生可检测标记物。可检测标记物是可检测分子。它可以是酶敏感结构域的部分,例如切割时释放或添加的片段,或它可以是独立实体。优选地,可检测标记物由通过接头连接的两个配体组成,如上文所述。可检测标记物可以由例如具有促进最佳检测的编码特征的以下一种或多种组成:肽核酸、小分子、荧光团/猝灭剂、糖、粒子、放射标记物、MRI活性化合物、无机材料、有机物质。

[0120] 可检测标记物可以通过任何已知的检测方法检出以实现捕获/检测步骤。取决于可检测标记物的性质,可以使用多种方法。在捕获后,可检测标记物可以通过光密度、放射性发射、非放射性能量转移直接检出,或可检测标记物可以间接地用抗体缀合物、亲和柱、链霉抗生物素蛋白-生物素缀合物、PCR分析、DNA微阵列和荧光分析检出。

[0121] 在一些实施方案中,捕获测定法涉及选自ELISA,包括荧光ELISA、比色ELISA、生物发光ELISA和化学发光ELISA、试纸条法或LFA、基于珠的荧光测定法和无标记物检测如表面等离子体共振(SPR)的检测步骤。捕获测定法可以例如涉及捕获配体与亲和剂结合。

[0122] 分析步骤可以直接对生物样品进行或特征标识组分可以首先纯化至某个程度。例如,纯化步骤可以涉及将可检测标记物与生物样品中的其他组分分离。纯化步骤包括多种方法如亲和层析。如本文所用,“分离的分子”或“纯化的分子”是从其天然环境分离至一定

程度的可检测标记物。在分析之前,分离或纯化的分子不必是100%纯的或甚至不必是基本上纯的。

[0123] 通过确定可检测标记物的存在分析可检测标记物的方法可以用来提供分子的定性评定(例如,可检测标记物是否存在或不存在)或定量评定(例如,存在的可检测标记物的量提示可比酶活性水平。可以通过任何手段计算定量值,如,通过确定样品中存在的每种部分的相对量百分数计算。用于产生这些类型计算值的方法是本领域已知的。

[0124] 当可检测标记物是核酸时,也可以使用PCR和微阵列分析它。PCR方法是本领域熟知。例如,授予Mullis等人的美国专利号5,333,675描述了用于执行自动化PCR的装置和方法。通常,通过提供两个DNA引物,PCR方法的执行导致所选择DNA区域扩增,其中所述DNA引物各自与所选择DNA区域内部的一条链的一部分互补。在脱氧核糖核苷酸三磷酸(dATP、dCTP、dGTP和dTTP)和链延伸酶如DNA聚合酶存在下,引物与核酸的模板链杂交。引物与分离的链杂交,形成除与引物杂交的区域(它们在此为双链)之外为单链的DNA分子。双链区域因链延伸酶(例如DNA聚合酶)的作用延伸以在原始两个引物之间形成延长的双链分子。分离双链DNA分子以产生单链,所述单链随后可以与引物再杂。该过程重复多个循环以产生一系列在引物之间(并包括引物)具有相同核苷酸序列的DNA链。

[0125] 链延伸酶是本领域熟知的并且例如包括大肠杆菌DNA聚合酶I、大肠杆菌DNA聚合酶I的Klenow片段、T4 DNA聚合酶、T7 DNA聚合酶、重组修饰的T7 DNA聚合酶、逆转录酶和其他酶。热稳定性酶是特别优选的,因为它们可用于自动化热循环设备中。热稳定性聚合酶例如包括DNA聚合酶从嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)(Bio-Rad)、嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*)(finzyme, ATCC编号27634)、栖热菌属物种(ATCC编号31674)、水生栖热菌(*Thermus aquaticus*)菌株TV11518(ATCC编号25105)、嗜酸热硫化叶菌(*Sulfolobus acidocaldarius*)、由Bukhrashuili等人, *Biochem. Biophys. Acta.*, 1008: 102-07(1909)描述、*thermus filiformis*(ATCC编号43280)、Taq DNA聚合酶,从Perkin-Elmer-Cetus(Norwalk, Connecticut)、Promega(Madison, Wis.)和Stratagene(La Jolla, Calif.)可获得,和AmpliTaq™ DNA聚合酶,一种重组*Thermus equitus* Taq DNA聚合酶,从Perkin-Elmer-Cetus可获得并且在美国专利号4,889,818中描述。

[0126] 优选地,根据本发明进行的基于PCR的方法自动化并使用热循环仪执行。许多类型的热循环仪是本领域熟知。例如, M. J. Research(Watertown, MA)提供具有波尔帖热泵以在热循环仪中提供精确均匀温度控制的热循环仪;来自Ericomp(San Diego, CA)的DeltaCycler热循环仪也基于波尔帖效应并且包括自动升温控制、时间/温度延长编程和管或微量平板布局选择。Stratagene(La Jolla, CA)的RoboCycler™并入机器人以产生循环期间快速的温度转变及样品之间孔对孔均一性;并且特别优选的循环仪是借助可编程界面运行的Perkin-Elmer Applied Biosystems(Foster City, CA)ABI Prism™ 877集成式热循环仪,其中所述可编程界面将用于荧光DNA测序和PCR反应的液体处置和热循环过程自动化。

[0127] 也可以使用杂交技术确定受试者中酶的存在或不存在。利用微阵列技术的标准杂交技术评估在生物样品中核酸的存在。微阵列技术,也由其他名称(包括DNA芯片技术、基因芯片技术和固相核酸阵列技术)已知,是本领域普通技术人员熟知的并且基于但不限于获得在固定的底物上的已鉴定核酸探针的阵列,用报道分子(例如,放射标签、化学发光标签或荧光标签如荧光素、Cye3-dUTP或Cye5-dUTP)标记靶分子,靶核酸与探针杂交并且评价

靶-探针杂交。具有与靶序列完全匹配的核酸序列的探针通常将导致检出比具有较差完美匹配的探针更强的报道分子-分子信号。核酸微阵列技术中利用的多种组分和技术在The Chipping Forecast, Nature Genetics, Vol. 21, Jan 1999中提出, 所述文献的完整内容是通过引用的方式并入本文。

[0128] 根据本发明, 微阵列基材可以包括但不限于玻璃、二氧化硅、硅酸铝、硼硅酸盐、金属氧化物如氧化铝和氧化镍、各种黏土、硝酸纤维素或尼龙。在全部实施方案中, 玻璃基板是优选的。如本文所用的“阵列”是相对于某表面以特定顺序布置的一组分子。优选地, 阵列由与该表面连接的多核苷酸组成。寡核苷酸阵列可以用来对核酸样品筛选靶核酸, 所述靶核酸可以用可检测标记物标记。通过参考基材上阵列中寡核苷酸的位置, 因靶核酸和底物结合的寡核苷酸之间杂交产生的荧光信号提供与靶核酸身份相关的信息。这种杂交测定法可以产生显示不同信号强度的数千个信号。这些信号对应于阵列的特定寡核苷酸。不同信号强度将基于与阵列的寡核苷酸杂交的标记靶核酸的量而产生。

[0129] 最佳杂交条件是已知的。杂交条件通常是本领域常用的那些, 如在Sambrook等人, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, (1989), 第2版, Cold Spring Harbor, NY; Berger and Kimmel, “Guide to Molecular Cloning Techniques”, Methods in Enzymology, (1987), 第152卷, Academic Press, Inc., San Diego, CA; 以及Young和Davis, (1983), PNAS(USA)80:1194中描述的那些。通常, 用于核酸杂交的温育温度是约20°C至75°C。对于17个核苷酸残基和更长的探针, 用于杂交的优选温度是约50°C至54°C。用于较长探针的杂交温度优选地是约55°C至65°C并且用于较短探针的杂交温度是小于52°C。可以按多种时间期限进行再杂交。优选地, SNP和RCG的杂交进行至少30分钟。

[0130] 可以标记可检测标记物。例如, 当分离的可检测标记物经历PCR时, 可以将标记物直接添加至核酸。例如, 使用标记引物或标记核苷酸进行的PCR反应将产生标记的产物。标记的核苷酸(例如, 荧光素标记的dCTP)是可商业获得的。用于标记物与核酸结合的方法是本领域普通技术人员熟知的并且除PCR方法之外, 例如包括切刻平移法和末端标记法。

[0131] 适用于本发明中的可标记物包括通过标准方法可检测的任何类型的标记物, 所述标准方法包括光谱方法、光化学方法、生物化学方法、电学方法、光学手段或化学方法。优选类型的标记物包括荧光标记物如荧光素。荧光标记物是包含至少一种荧光团的化合物。市售荧光标记物例如包括荧光素磷酸亚胺如fluoreprime(Pharmacia, Piscataway, NJ)、fluoredate(Millipore, Bedford, MA)、FAM(ABI, Foster City, CA)、罗丹明、polymethadine染料衍生物、磷光团、德克萨斯红、绿色荧光蛋白、CY3和CY5。多核苷酸可以用一种或多种光谱不同的荧光标记物标记。“光谱不同的”荧光标记物是可以基于其一个或多个特征性吸收谱、发射光谱、荧光寿命等彼此区分的标记物。光谱不同的荧光标记物具有可以组合使用(“多路复用”)的优点。根据本发明的方法, 放射性核素如³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C或³²P也是有用的标记物。可以使用多种放射可区分的放射性核素。这类放射性核素可以例如, 基于放射性核素发射的辐射的类型(例如α、β或δ辐射)区分。³²P信号可以使用目前具有大约50微米分辨率的磷光成像仪检出。也可以使用其他已知技术, 如化学发光或比色(酶促颜色反应)技术。

[0132] 也可以使用猝灭剂组合物, 其中“供体”荧光团通过充当酶结合位点的短桥与“接纳体”发色团连接。供体荧光团的信号被接纳体发色团通过据信涉及共振能量转移(RET)的过程猝灭。肽的切割导致发色团和荧光团分离、解除猝灭和产生从供体荧光团测量的后续

信号。

[0133] 一旦获得数据,例如作为二维图像获得,则计算机可以用来将数据转换成显示的图像,所述图像在颜色方面根据特定位置处光发射的强度变动。可以使用可执行这种类型数据分析的任何类型的商业软件。通常,数据分析包括步骤:确定随基材上位置变化的发射荧光的强度,移除离群值并计算相对结合亲和力。与标记物相对应的信号的存在、不存在和强度中一者或多者用来评估可检测标记物的存在或不存在。一种或多种可检测标记物存在和不存在可以用来基于酶的存在或不存在,确定个体的疾病状态。

[0134] 也可以观察并手工分析数据。例如,可以观察荧光标记物的存在或不存在,以从数据提供诊断信息或预后信息。

[0135] 根据本发明方法评估的疾病或病状是与酶相关的任何疾病或病状。例如,癌症、心血管疾病、关节炎、病毒性、细菌性、寄生虫性或真菌性感染、阿尔茨海默病气肿、血栓形成、血友病、卒中,器官机能异常、任何炎性病征、血管疾病、器质性疾病或药理所致状态均已知与酶相关。药理所致状态是其中酶抑制剂和其他试剂直接或间接影响酶活性的状态。因此,可以根据本发明的方法评估或监测或研究上述这些的每一者。

[0136] 能够区分非转移性原发肿瘤与转移性肿瘤是有用的,因为转移是癌症患者中治疗失败的主要病因。如果可以早期检出转移,则可以激进治疗它以延缓疾病进展。转移是一个涉及细胞从原发肿瘤脱落、细胞穿过循环移动和肿瘤细胞最终在本地或远处组织部位定植的复杂过程。另外,需要能够检测形成特定癌症的易感性,从而可以启动监测并早期治疗。例如,已经描述了血液学恶性病如淋巴瘤和白血病的综合细胞遗传分析,参见例如, Solomon等人, *Science* 254,1153-1160,1991。使用本发明的非侵入性方法早期检测或监测可能是有用的。

[0137] 实体肿瘤从肿瘤形成经转移性阶段进展并且进入可能涉及几种不同活性蛋白酶的阶段。一些蛋白酶据信如此改变肿瘤,从而肿瘤可以进展到下一个阶段,即,通过赋予增殖优势、形成耐药或增强型血管生成的能力、蛋白酶解或转移能力来做到。

[0138] 阿尔茨海默病造成进行性痴呆,伴随后续形成淀粉样蛋白斑、神经原纤维缠结物、神经胶质增生和神经元丢失。该疾病以其临床病程和病理学特征非常相似的遗传形式和散发形式发生。迄今已经发现突变时造成阿尔茨海默病的常染色体显性形式的三个基因。这些基因编码淀粉样蛋白前体(APP)和两个相关的蛋白质:早衰蛋白-1(PS1)和早衰蛋白-2(PS2)。已经观察到三种蛋白质中任何一者的突变通过下述胞内途径增强APP的蛋白酶解加工,所述胞内途径产生淀粉样蛋白 β 肽(A β 肽)(一种长40-42个氨基酸的肽,它是阿尔茨海默病中淀粉样蛋白斑的主要组分)。在分别位于 α -分泌酶位点N末端和C末端的 β -分泌酶位点和 γ -分泌酶位点处病理加工APP产生了与 α 位点处加工完全不同的结果。在 β -分泌酶位点和 γ -分泌酶位点的依次加工释放A β 肽,一种在阿尔茨海默病发病机制中可能非常重要的肽。认为 β 分泌酶酶(称作蛋白酶2(Asp2))介导这种加工。Asp2活性的存在对于阿尔茨海默病的诊断和预后重要。这种酶及其底物也可以用于本发明的方法中以监测治疗药在延缓阿尔茨海默病进展方面发挥作用的能力。

[0139] 所述方法也可以用于通过分析凝血酶活性检测受试者中血凝块的存在。尽管MRI或超声法可以精确地解析凝块的相对负担和解剖学位置,但它们目前不能区分生物活跃血凝块与稳定血凝块。例如,如果证据表明出现DVT的患者的血凝块正在延伸——一种需要连续

监测其血块负担超过数周时间的诊断过程一,则向这些患者开具抗凝血药,这可能通过升高的凝血酶活性在血栓对溶纤维蛋白治疗药作出最大反应时的早期阶段潜在地预测[27]。动脉粥样硬化斑块成像方面的相关研究显示,测量凝血酶活性可以充分预示分期并区分单独基于解剖特征不能区别的重度斑块与稳定斑块[9c]。

[0140] 如本文所用,受试者是人、非人灵长类、牛、马、猪、羊、山羊、犬、猫、或啮齿类。在全部实施方案中,人类受试者是优选的。在涉及癌症诊断的本发明方面,通常受试者优选地是疑似患有癌症的人或先前已经诊断为患有癌症的人。用于确定受试者疑似患有癌症的方法可以包括体格检查、受试者的家族医疗史、受试者病史、活组织检查或多种成像技术如超声检查、计算机断层成像、磁共振成像、磁共振光谱法或正电子发射断层摄影术。

[0141] 如本文所用,生物样品是组织样品。可以在身体内检查生物样品,例如,通过在在组织部位即尿处检测标记物。备选地,生物样品可以从受试者采集并在体外检查。生物样品包括但不限于尿、血液、唾液或粘液分泌物。在优选的实施方案中,非侵入地获得组织样品,如尿。

[0142] 如遍及本申请各处使用,“多个”要素指2个或更多个要素。

[0143] 将本发明的生物标记物纳米粒子以用于检测酶活性的有效量施用至受试者。例如,“有效量”是必需或足以在酶存在下造成可检测水品的可检测标记物释放的量。本文所述的本发明化合物的有效量可以根据所用的具体化合物、递送化合物的模式和它是单独使用或组合使用而变动。任何具体应用的有效量也可以根据此类因素变动,如正在评估或治疗的疾病、正在施用的具体化合物、受试者体格大小或者疾病或病状的严重程度以及检测方法。本领域的普通技术人员可以经验性地确定本发明特定分子的有效量,而无须过度实验。结合本文中提供的教导内容,通过在各种活性化合物中选择并权衡多种因素如效力、相对生物利用度、患者体重、不利副作用的严重程度和优选的施用方式,可以计划有效的方案。

[0144] 本发明的药物组合物包含有效量的溶解或分散于可药用载体中的一种或多种药物。短语“可药用或药理学可接受的”指当施用至动物(如果适宜,例如人)时不产生不良、变应性或其他不利反应的分子实体和组合物。另外,对于动物(例如,人类)施用,应当理解制品应当满足如FDA生物学标准办公室所要求的无菌性、致热原性、总体安全性和纯度标准。

[0145] 如本文所用,“可药用载体”包括任何和全部溶剂、分散介质、包衣、表面活性剂、抗氧化剂、防腐剂(例如,抗菌药、抗真菌药)、等渗剂、吸收延迟剂、盐、防腐剂、药物、药物稳定剂、凝胶、粘合剂、赋形剂、崩解剂、润滑剂、甜味剂、矫味剂、染料、此类相似材料及其组合,如本领域普通技术人员将已知(见例如,Remington's Pharmaceutical Sciences(1990),所述文献通过引用方式并入本文)。除了任何常规载体与有效成分不相容的情况下之外,构思了所述载体在治疗组合物或药物组合物中的用途。该试剂可以包含不同类型的载体,这取决于它是否将以固态、液态或气溶胶形式施用及作为注射剂对这类施用途径而言它是否需要是无菌的。

[0146] 优选地,将材料注入身体,不过也可能通过其他途径施用。例如,本发明的化合物可以按静脉内、真皮内、动脉内、病灶内、瘤内、颅内、关节内、前列腺内、胸膜内、气管内、鼻内、玻璃体内、阴道内、直肠内、局部、瘤内、肌内、腹腔内、皮下、结膜下、囊内、粘膜、心包内、脐内、眼内、经口、局部、局限、吸入(例如,气溶胶吸入)、注射、输注、连续输注、直接局限化

灌流浸浴靶细胞、通过导管、通过灌洗、在乳膏剂中、在脂质组合物(例如脂质体)中或通过其他方法或前述任何组合来施用,如本领域普通技术人员将会已知(参见,例如Remington's Pharmaceutical Sciences(1990),所述文献通过引用方式并入本文)。

[0147] 在某些实施方案中,药物组合物可以包含例如至少约0.1%的活性化合物。在其他实施方案中,活性化合物可以例如占到约2%至约75%之间、或约25%至约60%之间以及其间任何可推导范围的单位重量。

[0148] 可以将试剂以游离酸或碱、中性盐或盐形式配制到组合物中。可药用盐包括酸加成盐,例如,与蛋白质组合物的游离氨基形成的或与无机酸例如氢氯酸或磷酸或这类有机酸如乙酸、草酸、酒石酸或扁桃酸形成的那些盐。与游离羧基形成的盐也可以源自无机碱例如,氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁或这类有机碱如异丙胺、三甲胺、组氨酸或普鲁卡因。

[0149] 在组合物为液体形式的实施方案中,载体可以是溶剂或分散介质、其包括但不限于水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等)、脂质(例如,甘油三酯、植物油、脂质体)和其组合。可以例如通过使用包衣如卵磷脂;通过分散在载体(例如液态多元醇或脂质)中维持所要求的粒度;或通过使用表面活性剂(如羟丙基纤维素),维持适宜的流动性。在许多情况下,将优选包括等渗剂,例如,糖、氯化钠或其组合。

[0150] 根据本发明的方法,可以在药物组合物中施用化合物。通常,药物组合物包含本发明的化合物和可药用载体。肽、单克隆抗体和抗体片段的可药用载体是本领域普通技术人员熟知的。如本文所用,可药用载体意指无毒材料,所述材料不干扰有效成分的生物活性的有效性。

[0151] 药学可接受载体包含稀释剂、填料、盐、缓冲液、稳定剂、增溶剂和本领域熟知的其他材料。肽的示例性药学可接受载体尤其在美国专利号5,211,657中描述。这类制品可以常规地含有盐、缓冲剂、防腐剂、相容的载体,和任选地其他治疗药。在药物中使用时,这些盐应当是可药用的,但是不可药用的盐可以方便地用来制备其可药用盐并且不从本发明范围中排除。这类药理学可接受和可药用的盐包括但不限于从以下酸制备的那些盐:氢氯酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸,马来酸、乙酸、水杨酸、柠檬酸、甲酸、丙二酸、琥珀酸等。另外,可药用盐也可以作为碱金属盐或碱土金属盐如钠盐、钾盐或钙盐制备。

[0152] 本发明的化合物可以配制成固态、半固态、液态或气态形式的制品,如片剂、胶囊剂、散剂、颗粒剂、油膏剂、溶液剂、栓剂、吸入剂和注射剂和用于口服、肠胃外或手术施用的寻常形式。本发明还包括为局部施用如通过植入所配制的药物组合物。

[0153] 适于口服施用的组合物可以作为各自含有预定量活性物质的分立单位提出,如胶囊、片剂、锭剂。其他组合物包含含水液体或非水液体中的混悬剂,如糖浆剂、酏剂或乳剂。

[0154] 本发明的化合物可以直接施用至组织。可以通过直接注射实现直接组织施用。可以将化合物施用一次,或备选地,它们可以按多次施用法施用。如果施用多次,则化合物可以通过不同途径施用。例如,首次(或头几次)施用可以直接对受累组织进行,而稍后可以全身性施用。

[0155] 对于口服施用,可以通过将活性化合物与本领域熟知的可药用载体组合容易地配制化合物。这类载体能够使本发明的化合物配制为片剂、丸剂、锭剂、胶囊剂、液体剂、凝胶剂、糖浆剂、膏剂、混悬剂等,用于由待治疗的受试者口服摄入。用于口服用途的药物制品可

以通过以下方式作为固体赋形剂获得：任选地碾磨所产生的混合物，并且如果需要，在添加合适的助剂后加工颗粒混合物，以获得片剂或锭芯。合适的赋形剂尤其是填料，如糖，包括乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨醇；纤维素制备物，例如，玉米淀粉、小麦淀粉、稻淀粉、马铃薯淀粉、明胶、黄蓍胶、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和/或聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。如果需要，可以添加崩解剂，如交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或海藻酸或其盐如藻酸钠。任选地，口服制剂也可以配制在盐水或缓冲液中以抵消内部酸性条件或可以在无任何载体情况下施用。

[0156] 锭剂芯提供有合适的包衣。为此目的，可以使用浓缩的糖溶液，其可以任选地含有阿拉伯树胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、卡波普凝胶、聚乙二醇和/或二氧化钛、漆溶液和合适的有机溶剂或溶剂混合物。可以将染料或颜料添加至片剂或锭剂包衣以便确定或表征不同的活性化合物剂量组合。

[0157] 可以经口使用的药物制品包括由明胶制成的硬胶囊剂(push-fit capsule)、以及由明胶和增塑剂如甘油或山梨醇制成的密封软胶囊剂。硬胶囊可以含有与填料如乳糖、粘合剂如淀粉和/或润滑剂如滑石或硬脂酸镁和任选地与稳定剂混合的有效成分。在软胶囊剂中，活性化合物可以溶解于或悬浮于合适的液体，如脂肪油、液体石蜡或液体聚乙二醇中。此外，可以添加稳定剂。也可以使用配制用口服施用的微球。这类微球已经在本领域充分定义。用于口服施用的全部制剂应当处于适于这种施用的剂量。

[0158] 对于颊含施用，组合物可以采取以常规方式配制的片剂或锭剂形式。

[0159] 对于吸入施用，根据本发明使用的化合物可以在使用合适推进剂(例如，二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其他合适气体)的情况下，以从加压的包装或雾化器中提供的气溶胶喷雾剂形式便利地递送。在加压气雾剂的情况下、可通过提供阀门、确定剂量单位、以提供经计量的量。可以配制用于吸入器或吹入器中的由例如明胶组成的胶囊和匣，其含有所述化合物及合适粉末基底(如乳糖或淀粉)的粉末混合物。用于制备气溶胶递送系统的技术是本领域技术人员熟知的。通常，这类系统应当利用将不会显著破坏活性物质的生物学特性的组分(参见，例如，Sciarrà和Cutie、“Aerosols,”引自Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,1990,第1694-1712页；所述文献通过引用的方式并入)。本领域技术人员可以在不求助于过多实验的情况下容易地确定产生气溶胶的各种参数和条件。

[0160] 当希望全身性递送时，可以将化合物配制用于通过注射(例如通过快速推注或连续输注)进行肠胃外施用。用于注射的制剂可以按单位剂量形式提供，例如，在安瓿或多剂量容器中，伴有添加的防腐剂。所述组合物可以采用多种形式，如在油性或水性溶媒中的混悬剂、溶液剂或乳剂形式、并且可以含有配制剂，如助悬剂、稳定剂和/或分散剂。

[0161] 用于肠胃外施用的制品包括无菌的水溶液剂或非水溶液剂、混悬剂和乳剂。非水溶剂的例子是丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油和可注射用有机酯如油酸乙酯。含水载体包括水、醇/水溶液、乳剂或悬液，包括盐水和缓冲的介质。肠胃外溶媒包括氯化钠溶液、Ringer右旋糖液、右旋糖和氯化钠、乳酸化Ringer液或不挥发性油。静脉内溶媒可以包括流体和营养补充物、电解质补充物，如基于Ringer右旋糖的那些等。防腐剂和其他添加物也可以存在，如，例如抗微生物药、抗氧化物质、络合剂和惰性气体等。较低剂量将因其它形式的施用(如静脉内施用)而产生。当受试者中的反应在施加的初始剂量不充分时，可以使用更

高的剂量(或借助一种不同的更为局限化的递送途径所致的有效更高剂量)至患者耐受性允许的程度。构思每日多剂量实现化合物的适宜全身水平。

[0162] 根据本发明生成的数据可以任选地转换成条形码或其他的人类可读取形式或机器可读取形式。例如,条形码的每列可以表示特定受试者的特定酶或特定酶群组存在或不存在。条形码数据可以与其他受试者的信息或疾病信息的数据库比较,以辅助诊断、预后或其他分析试验受试者。

[0163] 在本发明的一个实施方案中,本文中生成的数据用来选择癌症的临床治疗模式。如本文所述,治疗选项可以包括但不限于:放疗法、化疗、辅助疗法或前述方法的任何组合。可以变动的治疗的方面包括但不限于:剂量、施用时程或治疗的持续时间;并且可以与他治疗组合或可以不组合,所述其他治疗还可以在剂量、施用时程或持续时间方面变动。另一种癌症疗法是手术,所述手术可以单独或与前述治疗方法的任何一种组合使用。医学领域普通技术人员可以基于评价通过本文所述方法生成的数据,确定适宜治疗模式。

[0164] 在某些实施方案中,可以在计算机上提供用于计算并处理如本文所述的数据的软件,所述计算机由数据链连接至数据产成装置,如质谱仪、微阵列读数仪或PCR仪。可以使用任何标准数据链,包括串行或并行电缆、射频或红外遥测链、LAN连接、WAN连接等。备选地,数据可以通过计算机可读取介质(例如,磁性介质或光介质)转移并由软件读取。数据还可以由使用者借助用户界面如键盘、显示器、鼠标、图形用户界面如触摸屏等直接输入。计算机可以含有于数据生成装置内部,提供生成原始数据、计算比率并显示这类比率的集成系统。一台或多台计算机还可以与一个或多个数据生成装置和一个或多个显示装置,如在局域网或广域网络中连接。

[0165] 在本发明的一个实施方案中,直观显示设备用来显示数据用于预后的分类、诊断、预测和/或治疗性监护。直观显示设备可以是图形用户界面,如显示器或打印机。

[0166] 数据可以单独或通过计算机处理。例如,可以根据本发明进行用于生成数据结构的计算机执行方法,所述数据结构有形地体现在计算机可读取介质中,代表一组可检测标记物的定量值。定量值可以与参考数据库比较。备选地,定性样式可以与参考数据库比较。

[0167] 可以执行作为计算机程序的以上内容的计算机系统一般可以包括主单元,所述主单元与向用户显示信息的输出装置和从用户接受输入的输入装置连接。主单元通常包括通过互联机构与存储系统连接的处理器。输入装置和输出装置也可以通过互联机构与处理器和存储系统连接。

[0168] 一个或多个输出装置可以与计算机系统连接。输出装置的例子包括阴极射线管(CRT)显示器、液晶显示器(LCD)、打印机、通讯装置如调制解调器和音频输出。一个或多个输入装置也可以与计算机系统连接。输入装置的例子包括键盘、小键盘、跟踪球、鼠标、书写笔和书写板、通讯装置和数据输入装置如传感器。本文公开的主体不限于与计算机系统组合使用特定输入或输出装置或不限于本文所述的那些。

[0169] 计算机系统可以是使用计算机程序语言如C++、Java或其他语言如脚本语言或汇编语言可编程的通用目的计算机系统。计算机系统还可以包括专用编程、专用目的硬件,例如,专用集成电路(ASIC)。在通用目的计算机系统中,处理器一般是市售处理器,其例子是从Intel可获得的x86系列、赛扬(Celeron)和奔腾(Pentium)处理器和从AMD和Cyrix可获得的相似装置、从摩托罗拉可获得的680X0系列微处理器、从IBM可获得的PowerPC微处理器和

从Digital Equipment Corporation可获得的Alpha系列处理器。许多其他处理器是可获得的。这种微处理器执行称作操作系统的程序,其例子是Windows NT、Linux、UNIX、DOS、VMS和OS8,所述程序控制其他计算机程序的执行并提供调度、排出故障、输入/输出控制、账户、编译、存储指定、数据管理和存储器管理和通讯控制及相关服务。处理器和操作系统限定了可以用高级编程语言编写应用程序的计算机平台。

[0170] 存储系统一般包括计算机可读取介质和可写入非易失性记录介质,其例子是磁盘、闪存和磁带。磁盘可以是移动的,如“软盘”,或固定,称作硬盘。磁盘具有多条磁道,其中存储信号,一般以二进制形式存储,即作为一串1和0解读的形式。这类信号可以定义由微处理器待执行的应用程序或存储在磁盘上由应用程序待处理的信息。一般,在运行中,处理器造成数据从非易失性记录介质读入集成电路存储元件,其一般是易失性、随机存取存储器如动态随机存取存储器(DRAM)或静态存储器(SRAM)。集成电路存储器单元一般比磁盘允许处理器更快地访问信息。处理器通常在集成电路存储器内部操作数据并且随后在处理完成后将数据复制到磁盘。多种机构已知管理数据运动在之间的磁盘和集成电路存储器单元,并且本文公开的主体不限于这类机构。另外,本文公开的主体不限于特定存储系统。

[0171] 本文公开的主体不限于特定计算机平台、特定处理器、或特定高级编程语言。另外,计算机系统可以是多处理器计算机系统或可以包括经计算机网络连接的多台计算机。应当理解,每种模块可以是计算机程序的独立模块、或可以是独立的计算机程序。这类模块可以在独立的计算机上可运行。数据可以存储在存储系统中或在计算机系统之间传输。本文公开的主体不限于使用软件或硬件或防火墙或其任意组合的任何具体执行。系统的种单元可以单独或组合地作为计算机程序产品执行,所述计算机程序产品有形地体现在机器可读储存装置中以便由计算机处理器执行。方法的多个步骤可以由计算机处理器执行,计算机处理器执行在计算机可读介质上有形地体现的程序以通过操作输入和产生输出执行功能。适于执行这种系统的计算机程序语言包括程式编程语言、面向对象的编程语言和这二者的组合。

[0172] 本发明还提供确定体内有活性的药物的药理学物质或先导化合物的高效方法。通常,筛选方法包括分析在体内有益改变酶活性的化合物。根据本发明的这类方法适应于自动化、高通量筛选化合物。

[0173] 这类方法可以用于任何受试者中。例如,疾病的动物模型可以用来筛选多种假定治疗药以评估假定治疗药对疾病相关的特定酶的活性水平。例如,可以将具有与载体相关的不同假定治疗药的生物标记物纳米粒子文库施用至该动物模型。如果每治疗药与独特可检测标记物相关,则可以通过如本文所述那样分析可检测标记物在尿中的水平,评估假定治疗药的活性。

[0174] 另外,所述方法可以用于推进个体化医疗。例如,可以将具有多种治疗药(每种治疗药与不同可检测标记物结合)的一组生物标记物纳米粒子施用至患有疾病的受试者以评估哪种治疗药在个体受试者中最有效。基于这些数据,可以设计适宜的治疗策略。这种例子可以见于HIV中。治疗性使用蛋白酶抑制剂以抑制与HIV存活和活性相关的关键蛋白酶的活性。可以生成一组生物标记物纳米粒子,其具有不同酶抑制剂作为载体或载体的组成部分。每种酶抑制剂与特定可检测标记物结合,从而可以通过监测在尿中特征标识的水平评估,特定抑制剂对酶的活性。例如,特别有活性的抑制剂将造成输送至尿的可检测标记物的水

平降低。

[0175] 一般,已知的有效治疗药可以充当阴性对照,即,将已知的治疗药并入生物标记物纳米粒子中。假定治疗药、本文也称作候选药物,涵盖多种化学类别,不过它们一般是有机化合物。优选地,候选药理学物质是小分子有机化合物,即,具有多于50、还小于约2500、优选地小于约1000和更优选地小于约500分子量的那些。候选物质包含对于与多肽和/或核酸发生结构性相互作用必需的功能性化学基团,并且一般包含至少胺、羰基、羟基或羧基、优选地包含至少两个功能性化学基团和更优选地至少三个功能性化学基团。候选物质可以包含经一个或多个用以上确定的官能团取代的环状碳或杂环结构和/或芳族或多芳族结构。候选物质还可以是生物分子如肽、糖、脂肪酸、固醇、类异戊二烯、嘌呤、嘧啶、前述的衍生物或结构类似物或其组合等。在物质是核酸的情况下,该物质一般是DNA分子或RNA分子,虽然还构思了如本文定义的修饰核酸。

[0176] 候选物质从多种来源获得,所述来源包括合成或天然化合物文库。例如,众多手段可用于随机和定向合成多种有机化合物和生物分子,所述手段包括表达随机化的寡核苷酸、合成性有机组合文库、随机肽的噬菌体展示文库等。备选地,可获得或容易产生处于细菌提取物、真菌提取物、植物提取物和动物提取物形式的天然化合物文库。另外,可以通过常规化学、物理和生物化学手段容易修饰天然的和合成产生的文库及化合物。另外,已知的药理学物质可以经历定向或随机化学修饰,如酰化、烷基化、酯化、酸化等,以便产生所述物质的结构类似物。

[0177] 本发明还包括具有容纳生物标记物纳米粒子的容器的试剂盒,其中生物标记物纳米粒子包含与酶敏感可检测标记物连接的载体结构域。试剂盒还可以包含容纳分析性试剂的第二容器。

[0178] 试剂盒,也称作制品,在一个或多个容器中包含药物级或诊断级的本发明化合物。制品可以包括推广或描述本发明化合物用途的说明书或标签。例如,试剂盒可以包括用于施用生物标记物纳米粒子至受试者和用于分析受试者的生物样品中生物标记物纳米粒子的可检测标记物的说明书。

[0179] 如本文所用,“推广”包括与本发明组合物相关的全部经营业务方法,所述方法包括教育、医院和其他临床教学方法、制药业活动(包括药物销售)和任何广告或其他推广活动,包括任何形式的书面、口述和电子交流。

[0180] “说明书”可以确定推广的组分,并且一般包括在本发明组合物的包装上或与之结合的书面说明书。说明书还可以包含以任何方式提供的任何口述或电子说明书。

[0181] 因此在一些实施方案中,本文所述的试剂可以装配成药物试剂盒或诊断试剂盒或研究试剂盒以促进它们用于治疗性、诊断的或研究应用中。试剂盒可以包括容纳本发明组分和使用说明书的一个或多个容器。具体而言,这类试剂盒可以包含本文所述的一种或多种试剂,连同描述这些试剂的预期治疗性应用和正确施用的说明书。在某些实施方案中,试剂盒中的试剂可以处于适于特定应用和适于试剂施用方法的药物制剂和剂量中。

[0182] 试剂盒可以设计成促进医师使用本文所述的方法并且可以采取多种形式。在施用情况下,试剂盒的每种组合物可以按液态形式(例如,在溶液中)或以固态形式(例如,干燥粉末)提供。在某些情况下,某些组合物可以是可构成的或否则可加工的(例如,成为活性形式),例如,通过添加可能或可能不向该试剂盒配给的合适溶剂或其他种类(例如,水或细胞

培养基)。如本文所用,“说明书”可以确定说明和/或推广的组分,并且一般包括在本发明组合物的包装上或与之结合的书面说明书。说明书还可以包括任何方式的任何口述说明书或电子说明书,从而用户将清楚意识到,说明书将与试剂盒相关,例如,音视频(例如,录像带、DVD等)、互联网和/或基于网络的通讯等。书面说明书可以处于管理药物产品和生物产品制造、使用或销售的政府机构规定的形式,所述说明书还可以反映该机构批准制造、使用或销售用于人类施用。

[0183] 试剂盒可以在一个或多个容器中含有本文所述的任一种或多种组分。作为一个例子,在一个实施方案中,试剂盒可以包括用于混合试剂盒的一种或多种组分和/或分离和混合样品并施加至受试者的说明书。试剂盒可以包括容纳本文所述试剂的容器。试剂可以无菌制备,包装在注射器中并冷藏运送。备选地,它可以容纳于小瓶或其他储存用容器中。第二容器可以具有无菌制备的其他试剂。备选地,试剂盒可以包括预混和并在注射器、小瓶、管、或其他容器中运送的活性物质。

[0184] 试剂盒可以具有多种形式,如泡罩小袋、收缩包装小袋、真空可密封小袋、可密封热成型托盘或相似的小袋或托盘形式,其中辅料松散装填在小袋、一个或多个、容器、盒或袋中。试剂盒可以在添加辅料后消毒,因而允许不额外打开容器中的各个辅料。试剂盒可以使用任何适宜的消毒技术消毒,如照射消毒、加热消毒或本领域已知的其他消毒方法。根据特定应用,试剂盒还可以包括其他组分,例如,容器、细胞培养基、盐、缓冲剂、试剂、注射器、针头、用于施加或移除消毒剂的织物(如纱布)、一次性手套、在施用前用于试剂的支持物等

[0185] 可以将试剂盒的组合物作为任何合适的形式提供,例如,作为液态溶液或作为干燥的粉末提供。当提供的组合物是干燥粉末时,可以通过添加也可以提供的合适溶剂复溶该粉末。在其中寻求液体形式的组合物的实施方案中,液态形式可以是浓缩的或可直接使用。溶剂将取决于化合物和使用或施用模式。药物组合物的合适溶剂是熟知的并且是文献中可获得。溶剂将取决于化合物和使用或施用模式。

[0186] 在一组实施方案中,试剂盒,可以包含载体装置(carrier means),所述区载体装置被区室化以严格限制接受一个或多个容器装置如小瓶、管等,所述容器装置各自包含一种待用所述方法中的独立要素。例如,一个容器可以包含用于测定法的阳性对照。另外,试剂盒可以包含可用于测定法中的其他组分(例如缓冲剂)的容器。

[0187] 本发明还涵盖成品包装的和加标签的药物产品。这种制造品包括在适宜器皿或容器如玻璃小瓶或其他全密封容器中的适宜单位剂量形式。在剂型适于肠胃外施用的情况下,有效成分是无菌的并且适于作为无粒子的溶液施用。换言之,本发明涵盖肠胃外溶液和冻干粉末,它们各自是无菌的并且后者适于注射之前复溶。备选地,单位剂量形式可以是适于口服、透皮、局部或粘膜递送的固体。

[0188] 在一个优选实施方案中,单位剂量形式适于静脉内、肌内或皮下递送。因此,本发明涵盖适于每种递送途径的溶液剂,优选地无菌溶液剂。

[0189] 在另一个优选实施方案中,本发明的组合物与生物相容去垢剂或其他蛋白质一起储存在容器中,所述的生物相容去垢剂包括但不限于卵磷脂、牛磺胆酸和胆固醇;所述的其他蛋白质包括但不限于 γ 球蛋白和血清白蛋白。

[0190] 与任何药物产品一样,包装材料和容器设计成在储存和运送期间保护产品的稳定性。另外,本发明的产品包括建议医师、技术员或患者如何适当地预防或治疗所讨论疾病或

病症的使用说明书或其他信息材料。换言之，制造品包括说明工具，其指示或提示施用给药，包括但不限于实际剂量、监测程序。

[0191] 更具体地，本发明提供制造品，其包含包装材料，如盒、瓶、管、小瓶、容器、喷雾器、吹入器、静脉输液(iv)袋、封套等；和至少一个单位剂量形式的含于所述包装材料内部的药剂(pharmaceutical agent)。本发明还提供制造品，所述制造品包含用于注射制剂的针头或注射器、优选地无菌形式包装的针头或注射器，和/或包装的酒精片。

实施例

[0192] 实施例1:方法

[0193] 生物标记物纳米粒子的合成：根据先前公开的方案合成氧化铁纳米虫(NW)。^[12]凝血酶敏感底物-报道分子肽(生物素-eGvndneeGffsar(K-Flsc)GGfPRSGGGC, SEQ ID NO:2, 小写=D-异构体)由Tufts大学核心设施肽合成服务机构合成。胺封端的NW首先与琥珀酰亚胺基碘乙酸酯(Pierce)反应以引入巯基反应性柄状物。半胱氨酸封端的肽和20kDa聚乙二醇-SH(LaysanBio.)随后在室温与NW混合(95:20:1摩尔比)1小时(RT)并且通过蛋白质快速液相色谱纯化。将母液在4°C储存于PBS中。对于药代动力学研究，NW首先与VT750(PerkinElmer)反应，之后如上文那样PEG化。对于荧光测定法，在荧光素替代配体编码的报道分子情况下合成肽。为了监测体内蛋白酶活性，用VT750替代N末端生物素合成肽。

[0194] 通过用捕获配体(荧光素、二硝基苯基、四甲基罗丹明或Alexa Fluor 488)在C末端上衍生化谷氨酸-纤维蛋白肽B并且用检测配体(生物素)在对侧末端上衍生化之，合成了异双官能配体编码的报道分子R1-4。如先前所述，从氯化铁(III)六水合物和氯化铁(II)物四水合物与葡聚糖(15-25kDa)反应合成纳米虫(NW, 约60nm)^[28,29]。胺化的NW用N-琥珀酰亚胺基碘乙酸酯衍生化并与巯基封端的蛋白酶敏感报道分子反应。通过吸光度或ELISA对报道分子价态(约20-30)定量。

[0195] 通过用NHS-荧光素(R1, Pierce)、NHS-罗丹明(R3, Pierce)或NHS-Alexa Fluor 488(R4, Invitrogen)按1:10肽:染料比率衍生化谷氨酸-纤维蛋白肽B-生物素的N末端(GluFib-生物素, 序列=eGvndneeGffsar-生物素, SEQ ID NO:1, 小写=D-异构体、New England Peptide)合成异双官能配体编码的报道分子R1-4, 或将报道分子合成(R2, New England Peptide)。通过A488-马来酰亚胺(Invitrogen)与NHS-生物素(Pierce)和NH₂-PEG-硫醇(5kDa, Laysan)按10:10:1染料:生物素:PEG比率反应, 合成Alexa Fluor 488-PEG-生物素(R4, PEG)并将它用illustra NAP-25柱(GE Healthcare)纯化。通过HPLC(Gilson)纯化所得到的缀合物。根据染料特定消光系数, 在96孔板中由平板读数仪(Molecular Devices SpectraMax Plus)通过吸光度对报道分子浓度定量。

[0196] 如先前所述, 通过氯化铁(III)六水合物和氯化铁(II)四水合物(Sigma)与葡聚糖(M_r 15-25kDa, Fluka)反应, 形成纳米虫(NW)^[28,29]。通过动态光散射(DLS; Malvern Instruments Nano ZS90)测得的平均流体动力大小是60nm。

[0197] 胺化的NW与500倍摩尔过量的N-琥珀酰亚胺基碘乙酸酯(SIA, Pierce)在20°C在50mM硼酸钠, pH 8.3, 5mM EDTA中过夜反应以促进连接至巯基封端的肽。在通过快速高效液相色谱(FPLC, GE Healthcare)纯化之后, SIA衍生化的NW与底物缀合的报道分子(MIT Swanson生物技术中心, Tufts大学肽合成核心设施, New England Peptide)和mPEG-巯基

(20kDa;Laysan)按1:95:20NW:肽:PEG比率在相同的硼酸盐缓冲液中在20°C反应过夜。再次纯化报道分子编码的底物官能化的NW并且通过FPLC交换入1x PBS并贮存在4°C。通过吸光度或ELISA对NW上的底物-报道分子价态(一般20-30)定量(下文描述)。

[0198] 体外蛋白酶测定法:将NW(按肽计200nM)与人凝血酶(2 μ M)、FVIIa(10nM)、FIXa(90nM)、FXa(160nM)、FXIa(31nM)混合和活化的蛋白C(60nM,Haematologic Technologies)在37°C在384孔平板中于活性缓冲剂中根据制造商的说明书混合并且用微量平板读数仪(SpectroMax Gemini EM)监测。对于血浆研究,将NW在监测荧光生成之前与50 μ L对照人血浆(Thermo Scientific)和50 μ L 80mM CaCl₂(Sigma)或PBS混合。对于凝血酶抑制实验,添加比伐芦定(Anaspec)至终浓度5mg/mL并在添加NW之前预温育2分钟。对于ELISA分析,将NW(按肽计100nM)与凝血酶在37°C温育10分钟并且通过离心大小过滤,将切割的报道分子(R₁)从NW纯化。

[0199] 将荧光报道分子结合的凝血酶敏感性或MMP敏感性NW(分别是底物PLGLRSW, SEQ ID NO:3,或PLGVRGK, SEQ ID NO:4,)(分别地)向重组凝血酶或MMP9引入。将蛋白酶解时同源猝灭的荧光团的释放通过平板读数仪在37°C作为增加的荧光读取。将抑制剂阿加曲班或马立马司他以100 μ M与蛋白酶-NW混合物温育。为了通过LFA定量报道分子释放,使报道分子官能化的NW与同族蛋白酶温育,穿过30kDa MW截止值滤器,通过LFA定量,并通过Mann-Whitney检验分析。

[0200] 根据制造商的说明书,将荧光素官能化的MMP敏感性或凝血酶敏感性NW(按肽计2.5 μ M)在1%w/v BSA(Sigma)中与重组凝血酶(15nM;Haematologic Technologies)或MMP9(15nM;R&D Systems)按100 μ L终体积在384孔平板中混合,并且在37°C监测因酶促释放同源猝灭的报道分子所致的荧光信号增加(SpectroMax Gemini EM微量平板读数仪)。将抑制剂阿加曲班(Sigma)或马立马司他(Tocris)以100 μ M与NW-蛋白酶混合物温育。为了通过LFA分析蛋白酶解性报道分子释放,使报道分子官能化的酶敏感NW与MMP9或凝血酶在37°C如上文温育4小时并穿过30kDa MW截止值离心滤器。将过滤的报道分子稀释至LFA动态范围内部和如下文所述通过LFA测定。使用在1%w/v BSA中与重组凝血酶或MMP9(均15nM)如上文那样混合至100 μ L终体积的报道分子3(1 μ M)进行报道分子稳定性实验并且在37°C温育1小时。此后,使报道分子如上文那样穿过30kDa MW截止值离心滤器并且通过R3ELISA测定。

[0201] ELISA检测双官能化报道分子:将96孔板(Thermo Scientific)与稀释于PBS中的0.8 μ g/mL抗Flsc(GeneTex,GTX19224)或0.4 μ g/mL抗Alex Fluor 488(Invitrogen,A11094)在4°C温育过夜。平板用PBS中的1%w/v牛血清白蛋白(Sigma)封闭1小时,此后就添加100 μ L样品。随后通过以下方式检出平板上捕获的报道分子:添加100 μ L 0.2 μ g/mL中性抗生物素蛋白-HRP(Pierce),用50 μ L TMB溶液(Thermo Scientific)显色5-15分钟并用50 μ L HCl猝灭,之后通过微量平板分析(SpectraMax Plus,Molecular Devices)在450nm测定各孔的吸光度。除非另外声明,否则将平板在每个步骤之间用PBST洗涤3次并且温育在室温进行。

[0202] 促凝血酶原激酶所致血栓形成的表征:将每个小瓶含有3-4mg促凝血酶原激酶(来自兔脑,Sigma)溶解于2mLPBS中。为了定量纤维蛋白沉积,将牛纤维蛋白原(Sigma)在室温与3倍摩尔过量的VT750反应1小时,并且通过离心式大小过滤法(大小截止值,Millipore)纯化。将Swiss Webster小鼠(Taconic)用异氟烷轻度麻醉并经尾静脉注射施用VT750-纤维蛋白原(按VT750计1nmol)与促凝血酶原激酶的混合物(每剂量n=3只小鼠)。在30分钟后,

通过CO₂窒息法使小鼠安乐死并且在LI-COR Odyssey红外成像系统上扫描器官。使用ImageJ软件(NIH)对每个器官中的纤维蛋白(原)荧光定量。为了检验凝血酶抑制作用,对小鼠作静脉内比伐芦定(10mg/kg)施用5分钟,之后共注射促凝血酶原激酶。对于组织学,将肺用4%多聚甲醛灌洗,而将全部其他器官在室温在4%多聚甲醛中温育1-2小时。全部器官均储存在70%乙醇中直至石蜡包埋、切片和染色(Koch Institute Histology Core)。

[0203] NW药代动力学。为了分析NW和肽药代动力学,将VT750标记的NW或与VT750标记肽缀合的NW(按肽计600nM)联合促凝血酶原激酶(剂量)给予小鼠,并且切下单器官在IVIS成像系统(Xenogen)上成像。为了通过免疫染色法分析组织切片,将NW(按肽计600nM)和促凝血酶原激酶(2 μ L/g体重)施用至小鼠并且30分钟后收获主要器官。将肺用4%多聚甲醛灌洗,之后在OCT冷冻和切片。将代表性切片对NW(抗Flsc第一抗体,GenetexGTX19224),纤维蛋白(Nordic GAM/Fbg/Bio)和Hoechst(Invitrogen,H3569)染色,之后通过荧光显微术(Nikon Eclipse Ti)分析。

[0204] 水化状态对尿浓度的影响游离报道分子R₂(生物素-eGvndneeGffsar(K-AF488), SEQ ID NO:1)由Tufts大学核心设施肽合成服务机构合成。将小鼠(n=5只小鼠)麻醉并且皮下注射等同于其10%体重的PBS弹丸。在2小时后,将R₂(125nm)通过尾静脉注射施用至小鼠。NW注射后,将小鼠置于圆柱形套管包围的96孔板上30分钟以允许小鼠排泄。尿样贮存在-80°C直至ELISA分析。

[0205] 血栓形成的尿监测。以配对设置实施实验。将凝血酶敏感性NW(按肽计600nM)和R₂(125nM)共注入健康小鼠(n=5-10只小鼠)以确定蛋白酶活性背景水平(第0日)并将小鼠置于96孔板上以收集尿。5天后,对小鼠再次给予NW、R₂和促凝血酶原激酶,接着在NW注射后30分钟,从小鼠采集尿。对于凝血酶抑制实验,在注射NW/R₂前5分钟,对小鼠作静脉内比伐芦定(10mg/kg)施用。尿样贮存在-80°C直至ELISA分析。

[0206] 统计分析用GraphPad 5.0(Prism)计算ANOVA分析和Student t检验。Excel(Microsoft Office)计算Pearson's r系数。

[0207] 体内成像全部动物研究均由MIT动物护理委员会批准(研究方案0411-036-14)。将凝血酶敏感性或MMP敏感性NW用红外荧光报道分子VT-750官能化。在对照小鼠和患病小鼠中,对蛋白酶解地释放的荧光报道分子的膀胱和/或肺局部化成像。通过在雌性Swiss Webster小鼠中共注射胶原蛋白和肾上腺素与合成性生物标记物诱导血栓形成;通过在雌性Ncr裸鼠中皮下注射人细胞系LS147T诱导结直肠肿瘤。

[0208] 通过MMP敏感性或凝血酶敏感性NW上(底物N末端上和NW上)的游离胺基团与VivoTag 750-NHS(Perkin Elmer)反应,制备用于体内成像的合成性生物标记物,并通过FPLC纯化。

[0209] 在补充有10%FBS(Gibco)和1%青霉素-链霉素(CellGro)的Dulbecco改良Eagle培养基(ATCC)中培育人LS174T结直肠癌细胞。对雌性Ncr裸鼠(4-6wk;Taconic)用5x 10⁶个LS174T细胞/腹侧皮下接种并允许其生长至大约0.5cm³总负荷(体积=长度*宽度*高度/2)。携瘤和年龄匹配的对照小鼠用200 μ L Vivo Tag标记和FAM标记的MMP敏感性NW(按底物计1.67 μ M)静脉内输注,从而允许输注后5-60分钟通过体内成像系统(IVIS,Xenogen)可视化。对于组织学,输注后1小时处死小鼠。将肿瘤摘出,在4%多聚甲醛中固定,在OCT(Tissue-Tek)中冷冻,切片,并用大鼠抗CD31(Santa Cruz)、DAPI(Invitrogen)和山羊抗

FAM(GeneTex)染色,之后通过荧光显微术(Nikon Eclipse Ti)成像。

[0210] 为了模拟血栓形成,将雌性Swiss Webster(4-6周;Taconic)小鼠用200 μ L VivoTag标记的和FAM标记的凝血酶敏感性NW(按肽计0.84 μ M)、10 μ g/kg肾上腺素(Sigma)和280 μ g/kg胶原蛋白(Chronolog)共输注。诱导后15分钟,处死小鼠并且将它们的肺用PBS灌洗并切下。使用LI-COR Odyssey红外成像仪,拍摄肺的红外荧光像。凝血酶的肽底物是PLGLRSW(SEQ ID NO:3)并且MMP的肽底物是PLGVRGK(SEQ ID NO:4)^[30]。

[0211] ELISA测定表征。将96孔板以捕获抗体吸附并用1x PBS中的1%BSA封闭。施加报道分子标准物并通过添加中性抗生物素蛋白-辣根过氧化物酶检出。氧化生色底物TMB 1-5分钟允许报道分子浓度的定量。全部温育均为1小时,并且在各步骤之间,用含0.5%w/v Tween 20的1x PBS洗涤平板。通过将R1按1:100内标对照小鼠尿分析尿干扰。通过定量针对全部报道分子的每种抗体的捕获特异性并且对同族报道分子系列归一化信号,测量分析特异性。

[0212] 将小鼠抗荧光素(GeneTex)、兔抗DNP和兔抗A488(Invitrogen)和小鼠抗罗丹明(Rockland)抗体在1x PBS中以浓度0.4-0.8 μ g/mL吸附至96孔Bacti平板(Thermo)1小时。随后用含有1%w/v BSA(Sigma)的1x PBS封闭平板1小时。将报道分子标准物以2倍连续稀释度按100 μ L体积施加至封闭的平板1小时以表征分析线性度。为了检测报道分子,将100 μ L 0.4 μ g/mL中性抗生物素蛋白-HRP(Pierce)应用1小时。结合的HRP暴露于50 μ L Ultra-TMB(Pierce)1-5分钟,随后用50 μ L 1N HCl猝灭。在每个步骤之间,将平板用含有0.5%v/v Tween 20的1x PBS(Sigma)洗涤3次。在450nm测量吸光度,将它对已知的报道分子浓度作图并用来在测定法的线性吸光度区域产生线性拟合。将分析检测限(LOD)计算为高于平均背景信号的三个标准偏差。

[0213] 为了检验归因于尿的干扰作用,将来自未处理小鼠的尿按1:100稀释度添加至R1标准物。为了定量分析特异性,在每种报道分子的线性区域的峰处的报道分子浓度应用于4种捕获抗体的每一者,并且ELISA如通常那样完成。通过与标准梯比较,对4种捕获抗体类型的各自信号定量,并将该信号针对源自其同族抗体所捕获的报道分子的最大信号归一化。

[0214] 纸横向流测定法表征。将捕获抗体(与ELISA相同)或对照抗体(α -链霉亲和素)抗体按间隔2mm的线以50nL液滴以0.5mm点距印刷到纤维素酯膜上。将该膜层压于具有玻璃纤维结合垫和吸收垫的塑料背衬上。将所得到的结构切割成4mm条并贮存在4 $^{\circ}$ C。将尿中1:1稀释的报道分子施加至结合垫并用洗涤缓冲液(含有1%w/v Tween 80的1x PBS)冲洗。使用40nm链霉亲和素-金纳米粒子检出报道分子。将干燥的条扫描并通过订制脚本处理,所述订制脚本将条带强度积分并定量。

[0215] 将抗体(同上文)按间隔2mm的线使用50nL液滴以0.5mm点距(Digilab MicroSys)印刷到HiFlow Plus纤维素酯膜(240秒/4cm流速,Millipore)上。对照线是0.5mg/mL的抗链霉亲和素抗体(Abcam),而报道捕获抗体与用于ELISA的相同并且以1mg/ml(α R1, α R3, α R4)和2mg/mL(α R2)应用。将纤维素膜(Millipore)层压至塑料背衬。将10mm玻璃纤维结合垫(Millipore)层压至纤维素膜的样品侧面并且20mm纤维素纤维垫层压至结合垫的两个样品侧面及纤维素膜的运行结束端。将所得到的结构切割成4mm条,所述条贮存在4 $^{\circ}$ C。

[0216] 将含有1%w/v BSA的用对照尿1:1内标的1x PBS中的标记物标准物两倍稀释物施加至结合垫并且在样品垫上用200 μ L洗涤缓冲液(含有1%w/v Tween 80的1x PBS)洗涤。为

了检测标记物,将5 μ L链霉亲和素缀合的金纳米粒子(40nm;BBI International)施加至结合垫并且用额外的200 μ L洗涤缓冲液洗涤。使得测试条干燥并且可以用眼观察或施加至定标模板并扫描(600dpi;Epson V330 Photo)或由手机(Samsung Galaxy Nexus)成像。所得到的图像载入MATLAB(MathWorks)并且由订制脚本处理,所述订制脚本对每种抗体株之间超过背景的信号积分。通过以下方式表征标记物正交性:比较通过施加单一报道分子由每种抗体捕获的报道分子并且对每种抗体株之间超过背景的信号定量。至少一式三份测试全部条。

[0217] 收集和分析尿肽。注射后,从静脉内输注合成性生物标记物混合物(游离R4plus或者检测血栓形成的R3官能化凝血酶敏感性NW或检测CRC的R2官能化MMP敏感NW)的小鼠收集尿30分钟或60分钟(以分别检测血栓形成或CRC)。尿收集时间从使用这些疾病模型的先前研究^[30,31]优化并且依赖于疾病部位和酶底物切割速率。通过上文方案从1:10²-10⁴稀释用于ELISA的尿或1:4-5稀释用于LFA的尿分析未加工尿中的报道分子浓度。使用接受者-操作者特征(ROC)曲线(两者)和Wilcoxon符号秩检验(CRC)或Mann-Whitney检验(血栓形成)分析数据。

[0218] 小鼠用200 μ L作为注射对照的含有R4(A488-PEG-生物素,血栓形成模型:0.125 μ M,CRC模型:1 μ M)的PBS和R2官能化MMP敏感性NW(按肽计1.67 μ M;肿瘤体积约0.5cm³)或R3官能化凝血酶敏感性NW(按肽计0.84 μ M;血栓形成模型)静脉内输注。输注后立即将鼠置于圆柱形管包围的96孔板上以收集尿30分钟(血栓形成模型)或1小时(肿瘤模型)。尿收集时间从使用这些疾病模型的先前研究^[30,31]优化并且依赖于疾病部位和酶底物切割速率。尿在收集后立即贮存在-80 $^{\circ}$ C。

[0219] 将未加工的尿在含有1%w/v BSA的1x PBS中(1:100-1:10000)稀释并且如上文所述,使用标准物通过ELISA(至少2次重复)定量报道分子。将尿以5 μ L体积按1:4稀释度(血栓形成模型)或1:5稀释度(CRC模型)施加至横向流测试条。如上文所述一式三份进行横向流试验,并且允许测试条干燥并如上文所述,通过自动化脚本定量。使用Wilcoxon符号秩检验(CRC)和Mann-Whitney检验(血栓形成)分析ELISA数据和LFA数据。

[0220] 注射用诊断药和伴随诊断药。已经从广泛使用的材料针对多种商业目的设计示例性合成性生物标记物。许多这些材料广泛用于药物和医用产品中并且可容易和价廉地获得(氧化铁、葡聚糖,聚(乙二醇)、荧光素、生物素和与固相合成相容的25聚肽)。在设计合成性生物标记物平台时,使用与固相合成相容的标准化偶联策略(将肽上含巯基的半胱氨酸残基与氧化铁纳米虫上的胺化葡聚糖偶联的异双官能交联剂琥珀酰亚胺基碘乙酸酯(SIA))。全球化和因肽药物商业成功所致的合成量增长已经导致肽合成成本骤降。从小鼠研究中外推人剂量是约0.16mg/kg。

[0221] 将本文所述的示例性合成性生物标记物在小鼠中以约12nmol/kg(25g小鼠中以200 μ L约1.5 μ M)给予,如通过报道分子价态定量(按氧化铁芯计0.4pmol/kg)。每种合成性生物标记物近似在每个115kDa纳米虫上具有肽价态30(各自3kDa)和包衣用聚(乙二醇)(PEG)价态10(各自20kDa)。在平均62kg个体(Walpole等人,BMC Public Health 2012)中,这是10.0mg总剂量,其中2.9mg是纳米虫,5.0mg是PEG,并且2.2mg是肽。

[0222] 实施例2:生物标记物纳米粒子特异性感测复杂血浆环境内部凝血酶的蛋白酶解活性。

[0223] 设计了合成性生物标记物,这些标记物设计成针对急性血栓形成(协调指导阻塞性血凝块在血管内形成的蛋白酶活性级联的激活)调查血管内位点(图1A)。血栓是多种血管疾病(包括急性冠状动脉综合征、卒中和静脉血栓栓塞)的关键病理生理特征^[7]。凝血级联反应中最重要的丝氨酸蛋白酶凝血酶,该酶不仅催化纤维蛋白原转化成充当血块的结构支架的纤维蛋白,还通过正反馈和负反馈回路调节止血。^[8]迄今,多项研究已经描述利用近红外荧光探针检测血栓形成背景下的凝血酶活性以及其他凝血酶依赖性疾病如动脉粥样硬化^[9]。最近,已经修饰这些探针以包括细胞渗透机制,所述细胞渗透机制在切割后激活以改善成像剂的停留和检测信号的维持^[9c,10]临床上,经常使用血液生物标记物D-二聚体(纤维蛋白降解副产物)作为血栓形成的指示;然而,这个试验高度易受抽血引入的人为假象影响,具有差的特异性,并且更精确反映纤溶酶活性(即纤维蛋白溶解)而非凝血酶活性^[11]。

[0224] 已经开发了就血栓而言研究宿主血管系统的纳米粒子。响应于凝血酶活性,本发明的这些纳米粒子释放报道分子入尿中,作为全身性血凝块合计负荷的综合量度。这里描述了用结构不同的配体编码这些报道分子的方法,所述配体允许在标准化96孔板中基于抗体的酶联免疫吸附测定(ELISA)检测,这使得该平台容易可用于临床实验室。

[0225] 构建用于血栓形成的合成性生物标记物涉及用底物-报道分子串联肽修饰氧化铁纳米虫(NW)的表面,所述的底物-报道分子串联肽可由凝血酶切割并通过ELISA可检测(图1A)^[6,12]。图13中显示了合成和使用本发明生物标记物纳米粒子的一般示意图。为了首先开发合适的底物,将凝血酶可切割序列fPR-x-S(x=切割位点, k_{cat}/K_m 约 9.33×10^6)^[13]延长以包含甘氨酸间隔团和C末端半胱氨酸以允许通过巯基化学偶联于NW^[12]。为了检验底物专一性,将荧光团标记的衍生物以足够产生同源猝灭型底物的价态缀合到NW上(每个NW约40个肽)并且随后NW与纯化的凝血酶或一组凝血蛋白酶(FXa、APC、FIXa、FVIIa、FXIa)温育,所述凝血蛋白酶在血栓形成期间各自以其最大生理学浓度存在(图1B)。因凝血酶活性释放的自由发射性肽片段在10分钟内增加样品荧光超过25倍(红色,图1C)。相反,从一组非同族蛋白酶观察到可忽略的蛋白酶解作用,以及在比伐芦定(Bival)(一种临床批准的直接凝血酶抑制剂)存在下因凝血酶所致的可忽略蛋白酶解作用。

[0226] 为了进一步研究感测来自血液的凝血酶活性的能力,将NW内标至柠檬酸钠(一种螯合辅因子钙的抗凝血药)灭活的人血浆样品中并且在添加过量氯化钙($CaCl_2$)以触发凝血或磷酸盐缓冲盐水(PBS)作为对照后监测血浆荧光。当凝血级联反应激活时,血浆荧光明显增加,但是在对照样品中或在比伐芦定存在下不增加(图1D)。总体上,这些结果确立了NW特异性感测复杂血浆环境内部凝血酶的蛋白酶解活性的能力。

[0227] 实施例3:本发明的结构物能够监测蛋白酶活性

[0228] 我们建立了配体编码的报道分子系统,所述系统将允许通过ELISA(许多临床试验的主要检测平台)以96孔样式定量蛋白酶活性。常规ELISA通过夹心复合物检测靶分析物,所述夹心复合物由结合分析物上不同表位的两种亲和试剂组成(图2A)。为了建立合成性报道分子,将抗蛋白酶的肽谷氨酸-纤维蛋白肽B(Glu-fib,序列=eGvndneeGffsar(SEQ ID NO:1),小写=D-异构体)——我们因其高肾清除率效率而选择它^[14]——在末端用结构不同的配体(即F1sc或AF488)和生物素(分别是标记的R₁和R₂;图2A)修饰。随后将这些报道分子内标入尿中并施加至捕获抗体(α -F1sc或 α -AF488)预包被的96孔板,此后,通过添加中性抗生物素蛋白-辣根过氧化物酶(HRP)及其催化3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)显色,检出R₁或R₂

的存在。如从抗体的特异性预测,明显颜色变化仅出现在含有匹配抗体-配体对的孔中(+/-孔或-/+孔,图2B)并且不受非同族报道分子的存在影响(+/+孔)。在两种捕获抗体的检测限(约3pM,图2C、图5)均观察到相同趋势,这表明按照与基于蛋白质的ELISA相当的高特异性和高灵敏度检出合成性报道分子^[15]。代之以优化的凝血酶底物和报道分子系统,以最终串联肽构建体(序列=生物素-eGvndneeGffsar(K-F1sc)GGfPRSGGGC,SEQ ID NO:2,图6)修饰的NW随后与递增水平的凝血酶温育并且发现,释放入溶液的切割产物(通过大小过滤法分离)的量相应为剂量依赖的,从而建立了通过ELISA监测凝血酶活性的能力(图2D)。总之,这些结果表明,配体-抗体相互作用的特异性可以用来建立成组正交性报道分子以通过标准化96孔测定法监测蛋白酶活性。

[0229] 实施例4:生物标记物纳米粒子检测体内血栓形成。

[0230] 接下来,我们研究了合成性生物标记物检测活小鼠中通过静脉内(i.v.)施用促凝血酶原激酶诱导的血栓形成的能力。已经在血液学文献中摸索这个模型以探索不同血管受体在宿主血栓形成易感性中发挥的作用并探测新型抗血栓药的效力^[16]。促凝血酶原激酶经外源途径通过组织因子与因子VII的复合触发凝血级联反应,并且血凝块大多栓塞于肺,总结了肺栓塞(PE)的致命临床状况。为了定量PE形成,将小鼠用促凝血酶原激酶和血块前体纤维蛋白原(用近红外荧光团VT750标记)共注射,从而可以通过荧光分析完整器官,对因凝血酶介导的蛋白酶解纤维蛋白原所致的纤维蛋白血凝块的形成定量(图3A)。在施用(剂量=2 μ l/g体重)30分钟以内,观察到肺内部沉积的纤维蛋白(原)水平超过6倍增加并且在肾和肝中显著减低($P<0.005$,通过Student t检验, $n=3$ 只小鼠;图3B),与将静脉内施用形成的血栓从心脏直接输送至肺的静脉血流动模式一致。组织切片的组织化学分析通过揭示肺切片中血凝块的存在(箭头,图3C)确证了这些研究结果,所述血凝块不存在于其他主要器官(脑、心脏、肾、肝和脾;图7)和对照动物中。给定递增但亚致死剂量(观测的LD₅₀约3 μ l/g体重)的促凝血酶原激酶的动物与剂量成比例地在肺中积累纤维蛋白(原),并且在用比伐芦定预处理的动物中容易地防止PE(通过单因素方差分析连同Tukey事后检验, $P<0.005$, $n=3-5$ 只小鼠;图3D,图8),证实血块形成大多受凝血酶的活性驱动。总之,这些结果确立了在类似于静脉血栓形成临床病理学的模型中精确控制总血块负荷的能力^[16b,17]。在动脉血栓形成中,活化的血小板可能在召集纤维蛋白原方面发挥比凝血酶更大的作用,如其以抗血小板治疗药治疗所佐证^[18]。可以通过使用基于全身注射血小板聚集药物(如胶原蛋白/肾上腺素或ADP)的模型,检验这个平台对血小板驱动型血栓形成的适用性^[16b,19]。

[0231] 实施例5:生物标记物纳米粒子可以系统研究血管系统的凝血酶活性并且在血栓形成部位释放随后被高效清除至宿主尿中的报道分子。

[0232] 接着,我们在血栓形成背景下表征合成性生物标记物的药代动力学。将用VT750和促凝血酶原激酶直接标记的NW混合物注射至小鼠中,并且在全部切下的器官(包括肺)中均未观察到促凝血酶原激酶组和对照组之间NW分布的显著差异—这表明,血栓形成不改变NW支架的生物分布(通过Student t检验, $P>0.05$, $n=3$ 只小鼠;图4A,图9)。为监测肽切割和已切割的片段的运输,我们共施用与荧光猝灭的底物缀合的NW(用VT750标记),并且观察到肺和肾中的荧光显著增加分别超过健康动物约1.8倍和约2.5倍(通过Student t检验, $P<0.01$, $n=3$ 只小鼠;图4B,图10)。与我们的早期观察结果(显示促凝血酶原激酶不改变NW和局限于肺的所诱导血凝块的生物分布(即血凝块不存在于肾中))匹配,这项研究结果提供

以下证据:肺中肽切割(由肺荧光增加)和肾蓄积自由发射荧光的片段。肺切片的免疫荧光染色进一步显示NW与纤维蛋白(凝集位点)共定位,这在对照切片中不存在(图11),从而支持以下假设:循环的NW可以抵达局部血栓。为了可视化肽片段的清除效率,通过体内荧光成像法监测小鼠,并且观察到定位至血栓形成小鼠的膀胱的荧光信号相对于对照增加(图4C)。总之,本发明的生物标记物纳米粒子可以系统研究血管系统的凝血酶活性并且在血栓形成部位释放随后被高效清除至宿主尿中的报道分子。

[0233] 实施例6:生物标记物纳米粒子可以通过ELISA监测活小鼠中的凝血酶活性并定量测量来自尿的亚致死性PE的合计负荷。

[0234] 尿中分析物的浓度主要地依赖于宿主水化状态(人类中范围从50-1200mOsm/kg H₂O)^[20]并受诸多外部因素(例如昼夜节律、膳食、活动和其他)影响。确定尿浓度的方法包括测量休息时稳态下滤入尿中的肌酐(肌肉代谢的副产物)水平^[21]或静脉内施用菊糖(一种不由肾主动吸收或分泌并且其在尿中出现与尿产生速率直接相关的多糖)^[22]。假设因为游离报道分子(R₁、R₂)从同样生物学惰性的Glu-fib累积^[14],所以它们在静脉内施用之后滤入尿中将表示尿的浓度。为了检验这个建设,在接受皮下快速推注等同于其10%体重的盐水以产生体内水分过多状态的小鼠中测量R₂的尿水平,并且发现与允许随意饮水的未补水小鼠相比,R₂稀释约50%(通过Student t检验,P<0.005,图12A)。在实验时间(约2.5小时)期间收集的尿的体积也增加超过2.5倍(P<0.005通过Student t检验,图12B),这共同显示游离报道分子可以用来监测动物的水化状态和尿浓度。接下来,我们寻求通过尿分析合成性生物标记物对凝血酶活性的反应,监测促凝血酶原激酶所致的PE。为了模拟住院患者背景下经常出现的连续监测,我们首先确定在健康动物队列中的基础活性,所述动物各自接受凝血酶敏感性NW和用于尿归一化的游离报道分子(R₂)(图4D)。在5天以允许NW完全清除(半寿期约6小时)后^[6],将促凝血酶原激酶、NW和R₂的混合物施用至相同的小鼠中并通过ELISA定量报道分子水平。与其健康状态(第0日)相比时,PE的诱导(第5日)导致尿切割片段的水平显著升高直至3倍(通过两因素ANOVA连同Bonferroni事后检验,P<0.005,n=5只小鼠;图4D)。在在血栓形成刺激前比伐芦定处理(剂量=2μl/g体重)的小鼠中,报道分子水平消除,这与先前研究结果一致,所述先前研究结果显示比伐芦定能够抑制凝血酶活性并防止PE形成。当来自促凝血酶原激酶刺激的小鼠的尿生物标记物水平对其从第0日(图13)收集的健康尿样归一化并且与相同剂量的促凝血酶原激酶下沉积的纤维蛋白(原)的量直接比较(图3D)时,发现与疾病负荷的惊人相关性,相关系数为0.99(Pearson's r,图4E)。总之,研究结果显示合成性生物标记物可以通过ELISA监测活小鼠中的凝血酶活性并定量测量来自尿的亚致死性PE的合计负荷。

[0235] 实施例7:使用ELISA展示体内特异性切割作用。

[0236] 为了开发蛋白酶敏感性纳米粒子,我们选择了以往报道对凝血酶和MMP9特异的两种肽底物(分别是B6和B7)并且在荧光纳米粒子测定法中展示了受重组蛋白酶(即凝血酶和MMP9)切割的相应能力(图14a、b)。凝血酶(一种参与凝血的循环型蛋白酶)在血栓形成期间强烈地激活,而基质降解酶MMP9经常在许多实体癌中失调。在血栓形成或结直肠癌的小鼠模型中,在静脉内输注凝血特酶异性或MMP9特异性纳米粒子后,观察到宿主尿中荧光标记的切割片段显著蓄积(图14c)。

[0237] 为了构建基于配体的报道分子,我们首先在一个末端用半抗原荧光素(FAM)修饰

原型肽支架谷氨酸-纤维蛋白肽B(GluFib,EGVNDNEEGFFSAR,SEQ.ID.NO.1)并且在对侧末端用生物素修饰以产生报道分子1(R1)。因为半抗原(如FAM)可以容易被抗体捕获,我们首先通过ELISA检验了探测报道分子的能力(图15a)。类似于常规夹心测定法,将96孔板用 α -FAM抗体包被,敷设在R1上以通过 α -FAM捕获,并且通过添加与生物素结合的链霉亲和素-HRP完成夹心复合物。在平板用生色底物TMB显色之后,检出R1以亚pM浓度存在(图15a),从而建立了针对配体修饰的报道分子构建亲和力测定的能力。为了建立正交报道分子家族,通过产生在对侧末端用独特半抗原(即,FAM、TAMRA、DNP或Alexa488)和生物素(分别是标记的R1-R4分别地;图15b)修饰的GluFib衍生物,合成四种不同试剂。为了试验交叉反应性,施加以R1、R2、R3或R4内标的溶液至96孔板中用 α -FAM、 α -DNP、 α -TAMRA或 α -Alexa488抗体包被的不同区域。与其特异性一致,最强信号强度仅在含有匹配的抗体-半抗原对的孔中出现,而相反,来自不匹配组合的信号强度可忽略(图15b、c)。总之,这些研究显示半抗原-抗体相互作用的特异性可以用来建立正交性报道分子家族。

[0238] 实施例8:使用纸基测定法展示体内特异性切割作用。

[0239] 开发一种纸基横向流测定法(LFA)以根据本发明的方法检测报道分子。LFA的生物化学类似于ELISA测定中所用的生物化学,因此,不需要改变报道分子结构。对于LFA,抗体结合至硝酸纤维素膜,而非塑料平板,并且链霉亲和素结合至金纳米粒子结合,后者促进报道分子的光学检测(图15d)。首先,施加含有报道分子的样品至纤维素垫,充当储器以递送样品指测试条的其余部分。样品穿过含有用链霉亲和素包被的金纳米粒子(直径10-100nm在中的)的“结合垫”。报道分子上的生物素部分与纳米粒子上的链霉亲和素结合。含有纳米粒子-报道分子缀合物的样品随后向下芯吸到硝酸纤维素膜上,其上已经沉积有 α -FAM抗体条带。报道分子上的FAM部分在样品穿过该条带时与 α -FAM抗体及条带上积累的纳米粒子-报道分子缀合物结合。如果报道分子以足够浓度存在,则金纳米粒子将作为硝酸纤维素膜上的红线是肉眼可见的。使用这种测定法,可以使用LFA检出内标样品中低至约100nM浓度的R1(图15e)。另外,我们已经通过使用多个条带,成功地在相同测试条上测量多个正交性报道分子(图15f),其中所述条带含有针对报道分子文库中多种半抗原的抗体。相对ELISA样式,未观察到特异性丧失,显示LFA样式作为诊断工具同等有效,附带“不费力”的益处。

[0240] 为了展示通过亲和力测定法检测活动中蛋白酶活性的能力,底物B6和B7用半抗原编码的报道分子与纳米粒子缀合。在施用纳米粒子之后,通过ELISA或LFA分析尿并且检出相对健康动物而言患病尿样中存在的切割的报道分子的量明显增加,从而展示从尿中非侵入性区分疾病的能力(图16a、b)。总之,这些研究显示要求保护的发明的实用性并凸显本发明组合物作为可以由既定和低成本亲和力测定法容易检出的配体编码的‘合成性生物标记物’使用的能力。

[0241] 实施例9:监测尿疾病的蛋白酶敏感性纳米粒子

[0242] 为了开发用于血栓形成和癌症的合成性生物标记物,首先设计用于感测蛋白酶凝血酶和基质金属蛋白酶9(MMP9)活性的纳米粒子。将聚(乙二醇)包覆的氧化铁纳米虫(NW)——一种事先由合作者和实验室表征的长时间循环型纳米粒子制剂^[28,29]——用凝血酶可切割和MMP9可切割底物(分别是PLGLRSW,SEQ ID NO:3,和PLGVRGK,SEQ ID NO:4^[30])的荧光素标记衍生物按20-30个肽/NW的表面价态官能化以诱导分子间猝灭(图1A)。将凝血酶敏感性NW与凝血酶温育并且随着释放入溶液中的已切割肽片段自由发荧光以检验肽切割效

率,观察到样品荧光快速增加。在阿加曲班(直接凝血酶抑制剂)存在下或当底物用抗蛋白酶D-立体异构体合成时未观察到荧光增加,这表明激活NW需要凝血酶活性。当MMP敏感性NW与MMP9温育时,观察到样品荧光类似地增加,并且当使用广谱MMP抑制剂马立马司他或D-异构体底物时,未观察到活性。综上,这些研究结果显示在NW表面上的肽可以被凝血酶或MMP9高效切割。

[0243] 用下述底物合成NW,所述底物用载体肽连接的近红外荧光团标记以通过体内荧光成像监测肽转移和切割。近红外荧光团VT750(N末端)与肽谷氨酸-纤维蛋白肽B(GluFib,序列eGvndneeGffsar,SEQ ID NO:1)缀合,所述肽用D-氨基酸(小写)合成以赋予抗蛋白酶活性的稳定性,以促进肾清除并且能够实现由底物蛋白酶解释放的肽-荧光报道分子的体内荧光可视化^[30,31,32]。

[0244] 选择一个血栓形成鼠模型,其中凝血起始受静脉内施用激活血小板和凝血酶的胶原蛋白和肾上腺素控制,形成栓塞肺部的血凝块肺^[33]。与此前研究结果一致,共施用NW至用胶原蛋白和肾上腺素攻击的小鼠导致它们的尿荧光和肺荧光相对健康对照明显增加,显示肽的体内切割和肾清除。为了应用于CRC,将MMP9敏感性NW输注至携带皮下人结直肠肿瘤(LS174T)的裸鼠中,所述肿瘤由分泌MMP9的细胞系形成^[34],并且观察定位于膀胱的荧光类似地增加。肿瘤切片的免疫荧光染色证实NW血管从血管系统外渗入肿瘤间质。这些结果验证了合成性生物标记物探查疾病部位并释放切割的肽片段进入宿主尿的能力。

[0245] 实施例10:通过夹心复合物检测配体编码的报道分子

[0246] 接下来,我们寻求设计一组配体编码的报道分子,这些报道分子可以通过基于蛋白质的夹心复合物检出。夹心复合物的形成需要靶抗原表达分别与捕获剂和检测剂结合的两个不同表位;配体荧光素(FAM;捕获剂)和生物素(检测剂)与同一个D-立体异构体GluFib的对侧末端缀合以构建合成性异双官能报道分子R₁。GluFib作为分子间隔团发挥作用,使得FAM和生物素分别与它们的同族蛋白质 α -FAM抗体(α -R₁)和链霉亲和素自由结合,并且如前文,促进报道分子清除,因为GluFib为生物学惰性的并且由肾高效过滤^[30,31,32]。首先确定是否可以通过夹心ELISA检出(临床实验室中使用的标准测定法)检出R₁内标的尿样。将R₁的连续稀释物施加至包被 α -R₁抗体的96孔板以固定R₁,之后将中性抗生物素蛋白-辣根过氧化物酶(NA-HRP)添加至催化生色底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)显色,显示从约6pM下至约0.1pM检测限(LOD)的线性剂量依赖性。这有利地将LOD与可以通过ELISA检出天然存在性生物标记物如前列腺特异性抗原的灵敏度比较^[35],从而确立通过利用配体-蛋白质相互作用设计出合成性夹心测定法的能力。可以在下表3中找到不同报道分子的线性区域的分析结果。

[0247] 表3

[0248]

报道分子	报道分子结构	线性范围 (pM)	斜度	截距	R ²
1	FAM-GluFib-生物素	0.09 - 6.25	0.01832 +/- 0.001611	0.05723 +/- 0.003875	0.9486
2	DNP-GluFib-生物素	7.35 - 87	0.001832 +/- 0.00007243	0.06115 +/- 0.002290	0.9877
3	TMR-GluFib-生物素	54.5 - 700	0.001163 +/- 0.00003436	0.09762 +/- 0.008225	0.9922
4	AF488-GluFib-生物素	23 - 200	0.001259 +/- 0.00003604	0.07760 +/- 0.002649	0.9911

[0249] 为了归纳方案并构建多个报道分子文库,通过将捕获配体二硝基苯基(DNP)、四甲

基罗丹明(TMR)和Alexa Fluor 488(AF488)与生物素配对以分别产生报道分子R2-R4,合成了额外的GluFib异双官能衍生物。与荧光素相似,选择这些配体,原因在于它们由活生物耐受良好、稳定并且除非与强免疫原偶联,否则不激发免疫反应^[36]。通过使用抗体 α -DNP(α -R2)、 α -TMR(α -R3)或 α -AF488(α -R4)以分别捕获R2、R3或R4开发出独立的夹心ELISA,并且鉴定这些夹心ELISA各自的LOD和工作线性范围,它们也在对夹心ELISA期望的常见值内。对特异性的分析揭示,在含有匹配抗体-配体对的孔中样品强度增加,而在非匹配的孔中的交叉反应性低于同族检测信号的LOD。结果显示配体编码的报道分子可以通过夹心ELISA灵敏地和特异性在尿中检出。

[0250] 实施例11:蛋白酶活性检测和纸测定法开发

[0251] 二十多年前作为居家妊娠检测开发以检测人绒毛膜促性腺素释放激素的纸基LFA已经扩展用于各种环境以检测病原体、药物、激素和代谢物^[37]。LFA通过夹心复合物检测抗原,在所述夹心复合物中,捕获抗体吸附到高度多孔性测试条(如硝酸纤维素膜)上,所述测试条起到芯吸流体并将分析物从样品垫转运至捕获区的作用。固定的分析物随后通过与纳米粒子(一般金纳米球或乳胶纳米球)偶联的检测剂可视化,所述纳米粒子在无酶促放大的情况下产生肉眼可检测的有色线。

[0252] 这里,我们寻求确定配体编码的报道分子是否可以是在纸上检出。使用低容量机器人液体处理器,沉积 α -R1和 α -链霉亲和素抗体以分别在硝酸纤维素纸条上产生检测线和对照线。随后施加用R1内标的未加工小鼠尿样至样品垫,随后施加含有金纳米粒子缀合的链霉亲和素的溶液。有色线在印有试验抗体的地方出现,显示从尿捕获R1并作为夹心复合物检出。定量扫描用来分析R1连续稀释物揭的LFA显示LOD为约1nM并且工作线性范围是约1-7nM。对定制用于剩余报道分子的独立LFA,观察到相似的性能指标。可以在下表4中找到R1-4标准曲线的线性区域的统计结果。

[0253] 表4

[0254]

报道分子	报道分子结构	线性范围 (pM)	斜度	截距	R ²
1	FAM-GluFib-生物素	0.09 - 0.25	0.01632 +/- 0.001611	0.05723 +/- 0.003875	0.9486
2	DNP-GluFib-生物素	7.35 - 87	0.001832 +/- 0.00007243	0.06115 +/- 0.002290	0.9977
3	TMR-GluFib-生物素	54.5 - 700	0.001163 +/- 0.00003436	0.09762 +/- 0.008225	0.9922
4	AF488-GluFib-生物素	23 - 200	0.001259 +/- 0.00003604	0.07760 +/- 0.002649	0.9911

[0255] 将捕获抗体印刷成相对对照线平行的4条检验线并分析含有能够进行多重报道分子检测的四种报道分子之一的尿样。仅用同族捕获抗体印刷的检验线形成正向信号,这凸显LFA的特异性和用空间编码的单一纸条检测不同报道分子的能力,类似于来自ELISA的结果。

[0256] 凝血酶敏感性底物与R3串联地缀合到NW上以通过LFA检测蛋白酶活性。在通过凝血酶体外切割底物之后,通过大小排阻过滤法收集肽片段。切割的R3由LFA容易地从滤液检出,未暴露于凝血酶的对照样品相比时,形成明显更深的检验线($p=0.0022$)。当通过LFA分析R2编码的MMP敏感性NW与MMP9温育后收集的滤液时,获得类似的结果($p=0.0022$)。这些结果显示,可以通过纸基LFA检出不同蛋白酶的活性。

[0257] 实施例12:在具有合成性尿生物标记物纸上检测疾病

[0258] 尿浓度依赖于诸多宿主因素和环境因素(例如膳食、活性水平、病史、昼夜节律);因此,我们寻求开发归一化策略用于试验。假设共施用的游离报道分子将与疾病状态无关情况下进入尿中并且可以用来归一化通过蛋白酶活性释放的报道分子的水平。将游离R4和凝血酶敏感性NW(用R3标记)的混合物输注至健康小鼠队列或血栓形成小鼠队列中并且收集注射后30分钟的全部尿以研究这种方法。通过ELISA测得的R4的尿浓度在两个组之间统计地等同,显示游离报道分子的无偏清除($p=0.25$)。相反,当独立定量($p<10^{-4}$)时或当针对R4归一化时($p<10^{-4}$),R3(凝血酶活性的报道分子)的尿水平在携带血栓的小鼠中显著增加。使用印刷有多种捕获抗体的纸条,同时分析R3和R4的尿水平并且与健康对照相比,类似地观察到尿样中R3/R4比统计显著地增加($p=0.0015$)。通过接受者操作特征曲线(ROC)曲线分析真阳性率(灵敏度)和假阳性率(1-特异性)并且发现多重试纸检测准确地区分来自血栓形成小鼠与对照小鼠的尿,曲线下面积(a.u.c)为0.92($p=0.0015$)。

[0259] 采用通过以下方式开发用于血栓形成的归一化策略以确立检测实体癌的能力:输注含有游离R4和R2编码的MMP敏感性纳米粒子的溶液至携带皮下LS174T结肠肿瘤的裸鼠中并收集注射后至多1小时的全部尿。患病小鼠以统计上等同于健康动物的效率($p=0.92$)清除R4,而通过ELISA确定,R2(体内MMP活性的报道分子)的尿浓度或其归一化强度(R2/R4)在携瘤小鼠尿中均显著升高($p=0.0039$, $p=0.0098$)。通过ROC分析,这种尿检验是高度准确的并且以0.90的a.u.c区分CRC($p=0.0025$)。通过LFA分析相同的尿样显示,从携瘤小鼠收集的尿中R2/R4比显著增加,但是从收集的对照小鼠尿中并非如此($p=0.002$)。这些结果显示,LFA可以直接从尿中检出合成性生物标记物并且以显著预测力区分各种非传染性疾病。

[0260] 参考文献

[0261] [1]a)T.Pisitkun,R.Johnstone,M.A.Knepper,Molecular&Cellular Proteomics 2006,5,1760;b)J.Barratt,P.Topham,Canadian Medical Association Journal 2007,177,361;c)J.Adachi,C.Kumar,Y.Zhang,J.V.Olsen,M.Mann,Genome Biol 2006,7,R80.

[0262] [2]a)L.Wide,C.A.Gemzell,Acta Endocrinologica 1960,XXXV,261;b)L.A.Cole,A.Kardana,D.B.Seifer,H.C.Bohler,Journal of Clinical Endocrinology& Metabolism 1994,78,497.

[0263] [3]a)Y.Hinokio,S.Suzuki,M.Hirai,M.Chiba,A.Hirai,T.Toyota,Diabetologia 1999,42,995;b)T.Nishikawa,T.Sasahara,S.Kiritoshi,K.Sonoda,T.Senokuchi,T.Matsuo,D.Kukidome,N.Wake,T.Matsumura,N.Miyamura,M.Sakakida,H.Kishikawa,E.Araki,Diabetes Care 2003,26,1507;c)L.L.Wu,C.C.Chiou,P.Y.Chang,J.T.Wu,Clinica Chimica Acta 2004,339,1;d)K.Rossing,H.Mischak,M.Dakna,P.Zürbig,J.Novak,B.A.Julian,D.M.Good,J.J.Coon,L.Tarnow,P.Rossing,o.b.o.t.P.Network,Journal of the American Society of Nephrology 2008,19,1283.

[0264] [4]a)G.H.Tesch,Nephrology 2010,15,609;b)R.G.Fassett,S.K.Venuthurupalli,G.C.Gobe,J.S.Coombes,M.A.Cooper,W.E.Hoy,Kidney Int 2011,80,806;c)J.Mishra,Q.Ma,A.Prada,M.Mitsnefes,K.Zahedi,J.Yang,J.Barasch,P.Devarajan,Journal of the American Society of Nephrology 2003,14,2534.

[0265] [5]a)M.A.Moses,D.Wiederschain,K.R.Loughlin,D.Zurakowski,C.C.Lamb,

M.R.Freeman, *Cancer Research* 1998, 58, 1395; b) R.Roy, J.Yang, M.A.Moses, *Journal of Clinical Oncology* 2009, 27, 5287.

[0266] [6] G.A.Kwong, G.von Maltzahn, G.Murugappan, O.Abudayyeh, S.Mo, I.A.Papayannopoulos, D.Y.Sverdlov, S.B.Liu, A.D.Warren, Y.Popov, D.Schuppan, S.N.Bhatia, *Nature Biotechnology* 2013, 31, 63.

[0267] [7] S.L.Robbins, V.Kumar, R.S.Cotran, *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*, Saunders/Elsevier, Philadelphia, PA, 2010.

[0268] [8] a) E.W.Davie, J.D.Kulman, *Semin Thromb Hemost* 2006, 32, 003; b) J.A.Huntington, *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2005, 3, 1861.

[0269] [9] a) F.A.Jaffer, C.-H.Tung, R.E.Gerszten, R.Weissleder, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2002, 22, 1929; b) C.-H.Tung, R.E.Gerszten, F.A.Jaffer, R.Weissleder, *ChemBioChem* 2002, 3, 207; c) E.S.Olson, M.A.Whitney, B.Friedman, T.A.Aguilera, J.L.Crisp, F.M.Baik, T.Jiang, S.M.Baird, S.Tsimikas, R.Y.Tsien, Q.T.Nguyen, *Integrative Biology* 2012, 4, 595.

[0270] [10] M.Whitney, E.N.Savariar, B.Friedman, R.A.Levin, J.L.Crisp, H.L.Glasgow, R.Lefkowitz, S.R.Adams, P.Steinbach, N.Nashi, Q.T.Nguyen, R.Y.Tsien, *Angewandte Chemie International Edition* 2013, 52, 325.

[0271] [11] a) H.Bounameaux, P.de Moerloose, A.Perrier, G.Reber, *Thromb Haemost* 1994, 71, 1; b) J.S.Ginsberg, P.S.Wells, C.Kearon, D.Anderson, M.Crowther, J.I.Weitz, J.Bormanis, P.Brill-Edwards, A.G.Turpie, B.MacKinnon, M.Gent, J.Hirsh, *Annals of Internal Medicine* 1998, 129, 1006; c) R.Becker, F.Spencer, *J Thromb Thrombolysis* 1998, 5, 215.

[0272] [12] J.-H.Park, G.von Maltzahn, L.Zhang, A.M.Derfus, D.Simberg, T.J.Harris, E.Ruoslahti, S.N.Bhatia, M.J.Sailor, *Small* 2009, 5, 694.

[0273] [13] a) G.A.Mitchell, R.J.Gargiulo, R.M.Huseby, D.E.Lawson, S.P.Pochron, J.A.Sehuanes, *Thrombosis Research* 1978, 13, 47; b) K.Asai, M.Asai, *Clin Chim Acta* 1984, 144, 163; c) M.L.Larsen, U.Abildgaard, A.N.Teien, K.Gjesdal, *Thrombosis Research* 1978, 13, 285; d) D.S.Rijkers, S.J.H.Wielders, G.I.Tesser, H.C.Hemker, *Thrombosis Research* 1995, 79, 491.

[0274] [14] T.A.Morris, J.J.Marsh, C.M.Burrows, P.G.Chiles, R.G.Konopka, C.A.Pedersen, *Thrombosis Research* 2003, 110, 159.

[0275] [15] N.L.Rosi, C.A.Mirkin, *Chemical Reviews* 2005, 105, 1547.

[0276] [16] a) E.J.Weiss, J.R.Hamilton, K.E.Lease, S.R.Coughlin, *Blood* 2002, 100, 3240; b) N.Lenain, M.Freund, C.Léon, J.P.Cazenave, C.Gachet, *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2003, 1, 1144; c) S.S.Smyth, E.D.Reis, H. **Väänänen**, W.Zhang, B.S.Coller, *Blood* 2001, 98, 1055.

[0277] [17] N.Mackman, *Nature* 2008, 451, 914.

[0278] [18] S.P.Jackson, *Nat Med* 2011, 17, 1423.

[0279] [19] a) G.DiMinno, M.J.Silver, *Journal of Pharmacology and Experimental*

Therapeutics 1983,225,57;b)A.Angelillo-Scherrer,P.G.de Frutos,C.Aparicio, E.Melis,P.Savi,F.Lupu,J.Arnout,M.Dewerchin,M.F.Hoylaerts,J.-M.Herbert, D.Collen,B.Dahlback,P.Carmeliet,Nat Med 2001,7,215;c)A.D.Warren,G.A.Kwong, D.K.Wood,S.N.Bhatia,Manuscript in preparation.

[0280] [20]B.M.Koeppen,B.A.Stanton,Renal physiology,Mosby Elsevier, Philadelphia,2007.

[0281] [21]a)P.Vestergaard,R.Leverett,J Lab Clin Med 1958,51,211;b)M.Wyss, R.Kaddurah-Daouk,Physiol Rev 2000,80,1107.

[0282] [22]a)J.H.Roe,J.H.Epstein,N.P.Goldstein,Journal of Biological Chemistry 1949,178,839;b)F.Gaspari,N.Perico,G.Remuzzi,Kidney Int Suppl 1997, 63,S151;c)Z.Qi,I.Whitt,A.Mehta,J.Jin,M.Zhao,R.C.Harris,A.B.Fogo,M.D.Breyer, American Journal of Physiology-Renal Physiology 2004,286,F590.

[0283] [23]a)J.E.Ghadiali,M.M.Stevens,Advanced Materials 2008,20,4359;b) K.Welser,R.Adsley,B.M.Moore,W.C.Chan,J.W.Aylott,Analyst 2011,136,29;c)R.de la Rica,D.Aili,M.M.Stevens,Advanced Drug Delivery Reviews 2012,64,967.

[0284] [24]a)P.Yager,G.J.Domingo,J.Gerdes,Annu Rev Biomed Eng 2008,10,107;b) A.W.Martinez,S.T.Phillips,G.M.Whitesides,E.Carrilho,Analytical Chemistry 2009,82,3.

[0285] [25]B.J.Backes,J.L.Harris,F.Leonetti,C.S.Craik,J.A.Ellman,Nat Biotechnol 2000,18,187.

[0286] [26]a)R.M.Botnar,A.S.Perez,S.Witte,A.J.Wiethoff,J.Laredo,J.Hamilton, W.Quist,E.C.Parsons,A.Vaidya,A.Kolodziej,J.A.Barrett,P.B.Graham, R.M.Weisskoff,W.J.Manning,M.T.Johnstone,Circulation 2004,109,2023;b) D.Simberg,T.Duza,J.H.Park,M.Essler,J.Pilch,L.Zhang,A.M.Derfus,M.Yang, R.M.Hoffman,S.Bhatia,M.J.Sailor,E.Ruoslahti,Proceedings of the National Academy of Sciences 2007,104,932;c)T.Hara,B.Bhayana,B.Thompson,C.W.Kessinger, A.Khatri,J.R.McCarthy,R.Weissleder,C.P.Lin,G.J.Tearney,F.A.Jaffer,JACC Cardiovasc Imaging 2012,5,607.

[0287] [27]a)J.Hirsh,A.Y.Y.Lee,Blood 2002,99,3102;b)B.R.Robinson,A.K.Houng, G.L.Reed,Circulation 2000,102,1151.

[0288] [28]Park J-H等人(2008)Magnetic Iron Oxide Nanoworms for Tumor Targeting and Imaging.Adv Mater 20:1630-1635.

[0289] [29]Park J-H等人(2009)Systematic Surface Engineering of Magnetic Nanoworms for In vivo Tumor Targeting.Small 5:694-700.

[0290] [30]Kwong GA等人(2013)Mass-encoded synthetic biomarkers for multiplexed urinary monitoring of disease.Nature Biotechnology 31:63-70.

[0291] [31]Lin KY,Kwong GA,Warren AD,Wood DK,Bhatia SN(2013)Nanoparticles that sense thrombin activity as synthetic urinary biomarkers of thrombosis.ACS Nano 7:9001-9009.

[0292] [32]Morris TA等人(2003)Urine and plasma levels of fibrinopeptide B in patients with deep vein thrombosis and pulmonary embolism.Thrombosis Research 110:159-165.

[0293] [33]Smyth SS,Reis ED,Vaananen H,Zhang W,Coller BS(2001)Variable protection of beta3-integrin-deficient mice from thrombosis initiated by different mechanisms.Blood 98:1055-1062.

[0294] [34]Brand K等人(2000)Treatment of colorectal liver metastases by adenoviral transfer of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 into the liver tissue.Cancer Research 60:5723-5730.

[0295] [35]Giljohann DA,Mirkin CA(2009)Drivers of biodiagnostic development.Nature 462:461-464.

[0296] [36]Hermanson GT(2008)Bioconjugate Techniques(Academic Press,New York).2nd Ed.

[0297] [37]Posthuma-Trumpie GA,Korf J,Amerongen A(2008)Lateral flow (immuno) assay:its strengths,weaknesses,opportunities and threats.A literature survey.Analytical and Bioanalytical Chemistry 393:569-582.

[0298] 相信此前的书面说明足以使本领域技术人员实施本发明成为可能。本发明在范围方面不受所提供的实施例限制,因为这些实施例意在作为本发明各个方面的说明并且功能上等同的其他实施方案处于本发明的范围内。除了本文显示和描述的那些修改之外,本发明的各种修改将因前面的描述而对本领域技术人员是显而易见的并且落于所附权利要求书的范围内。本发明的优点和目的并不必然地由本发明的每个实施方案涵盖。

[0299] 本申请中援引的全部参考文献、专利和专利出版物均通过引用方式完整并入本文。

序列表

- <110> 麻省理工学院
 S·巴哈蒂亚
 D·K·伍德
 G·A·黄
 A·D·瓦尔林
 K·Y·林
- <120> 基于亲和力检测配体编码的合成性生物标记物
- <130> M0656.70304W000
- <140> 未分配
 <141> 同时附上
- <150> US 61/832,766
 <151> 2013-06-07
- <160> 4
- <170> PatentIn 3.5 版
- <210> 1
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成性多肽
- <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> D-异构体
- [0001] <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (3)..(8)
 <223> D-异构体
- <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (10)..(14)
 <223> D-异构体
- <400> 1
 Glu Gly Val Asn Asp Asn Glu Glu Gly Phe Phe Ser Ala Arg
 1 5 10
- <210> 2
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成性多肽
- <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> D-异构体
- <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (3)..(8)
 <223> D-异构体
- <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (10)..(14)
 <223> D-异构体

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(15)
 <223> 以Flsc修饰

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (18)..(18)
 <223> D-异构体

 <400> 2

 Glu Gly Val Asn Asp Asn Glu Glu Gly Phe Phe Ser Ala Arg Lys Gly
 1 5 10 15

 Gly Phe Pro Arg Ser Gly Gly Gly Cys
 20 25

[0002]

<210> 3
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成性多肽

 <400> 3

 Pro Leu Gly Leu Arg Ser Trp
 1 5

<210> 4
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成性多肽

 <400> 4

 Pro Leu Gly Val Arg Gly Lys
 1 5

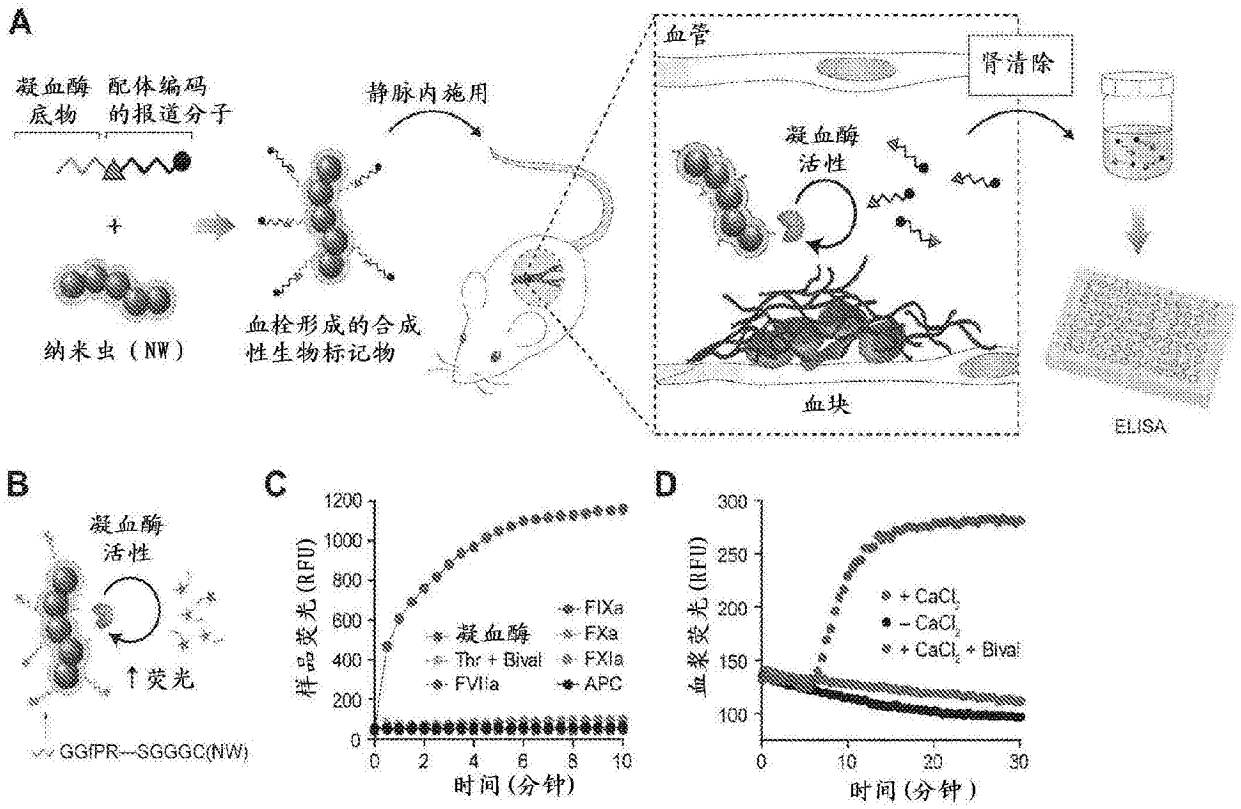


图1

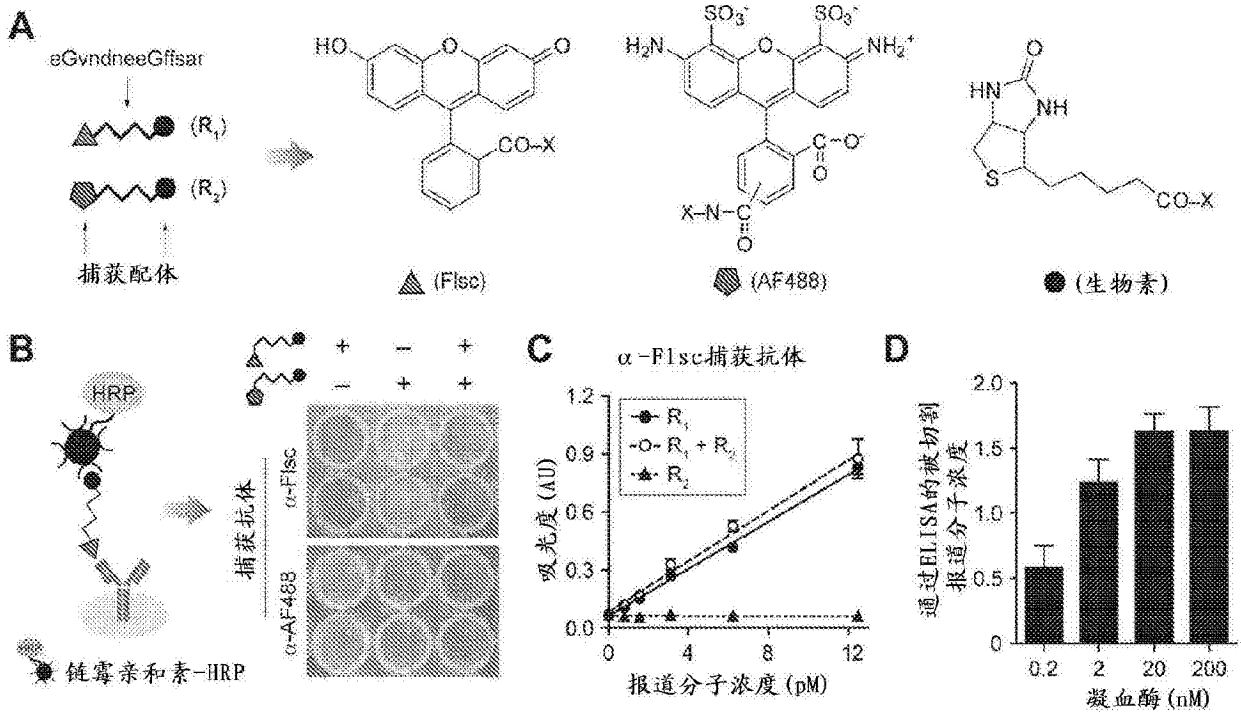


图2

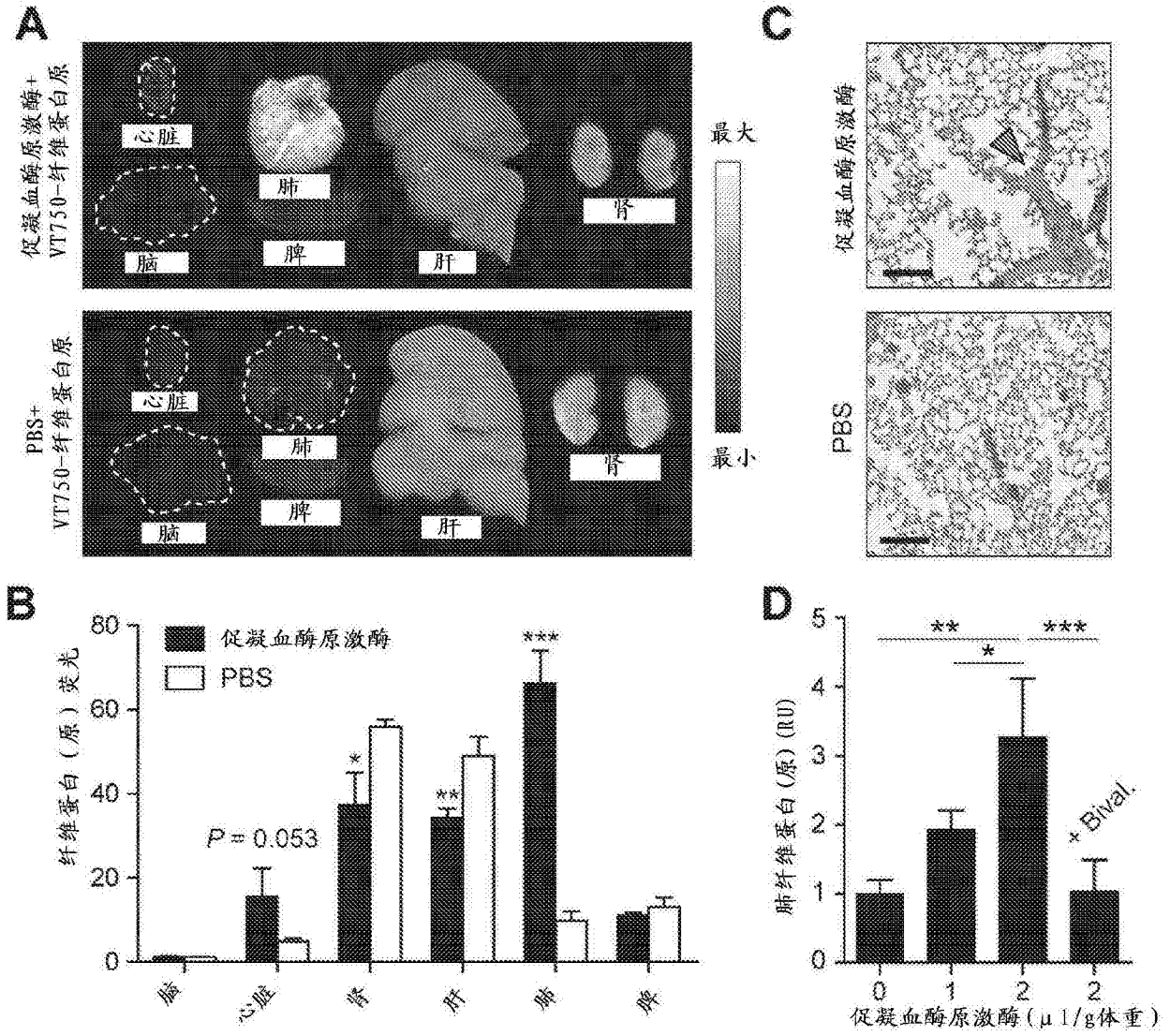


图3

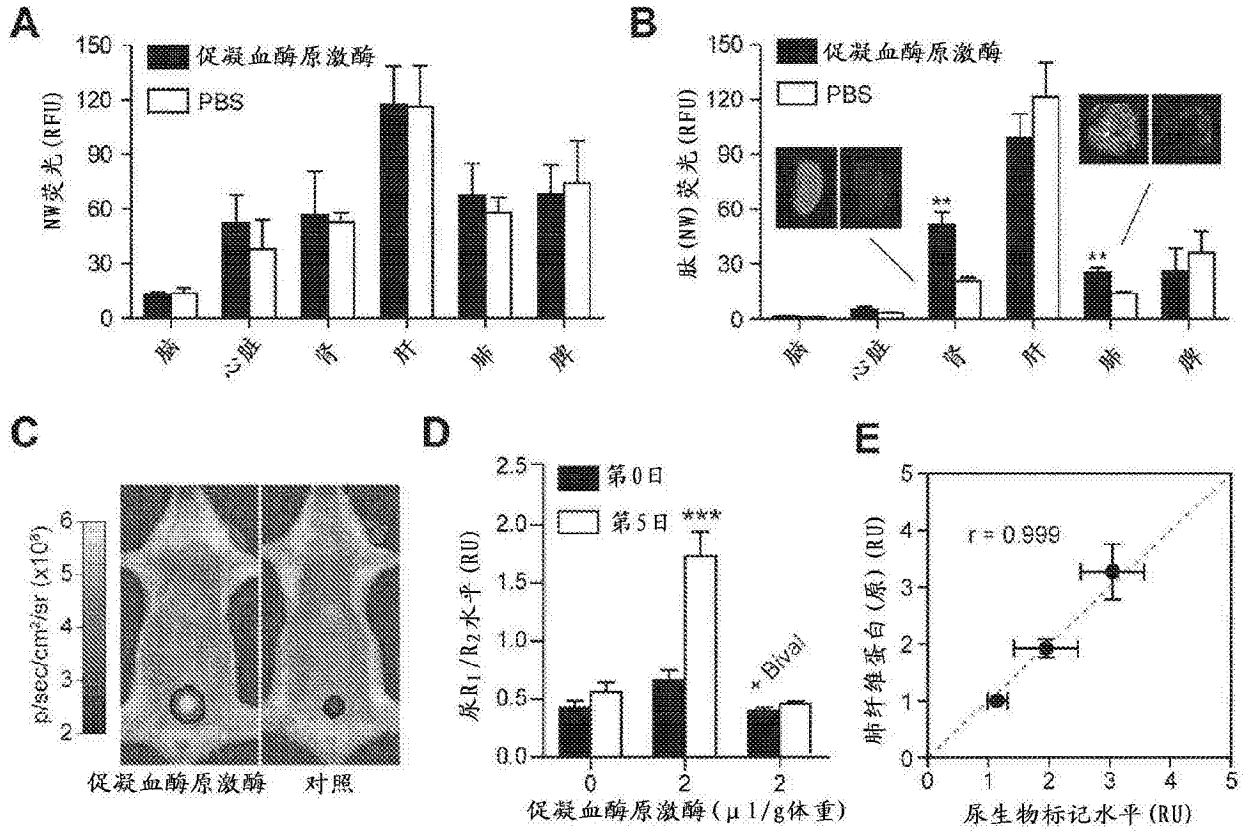


图4

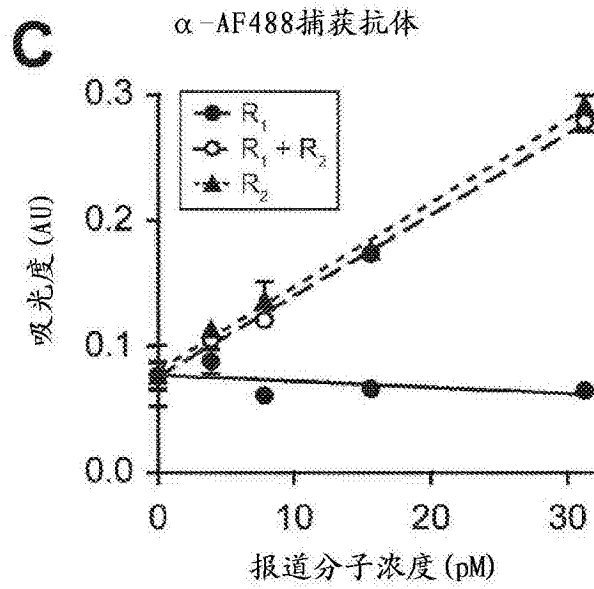
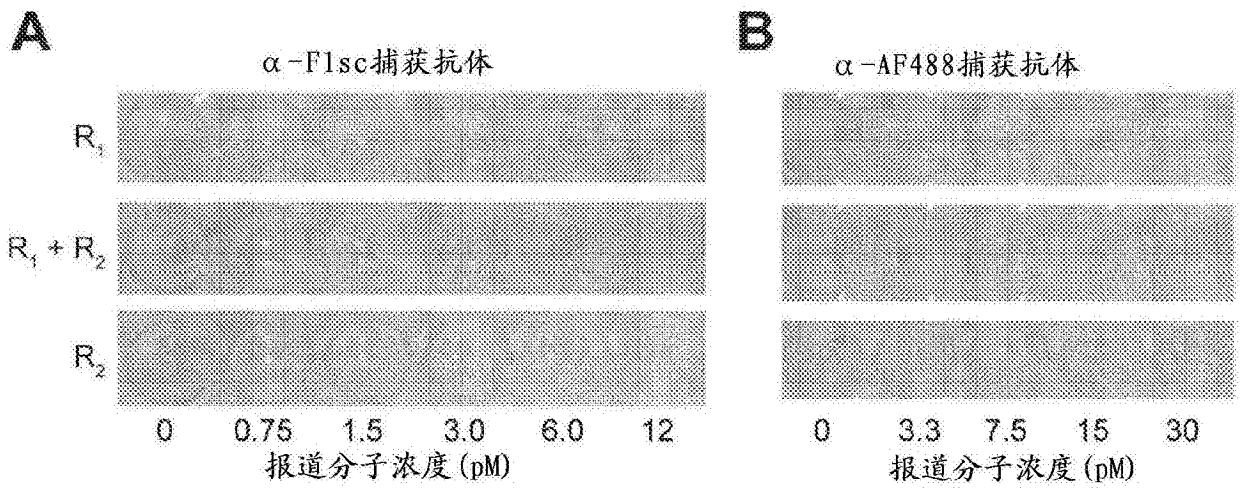


图5

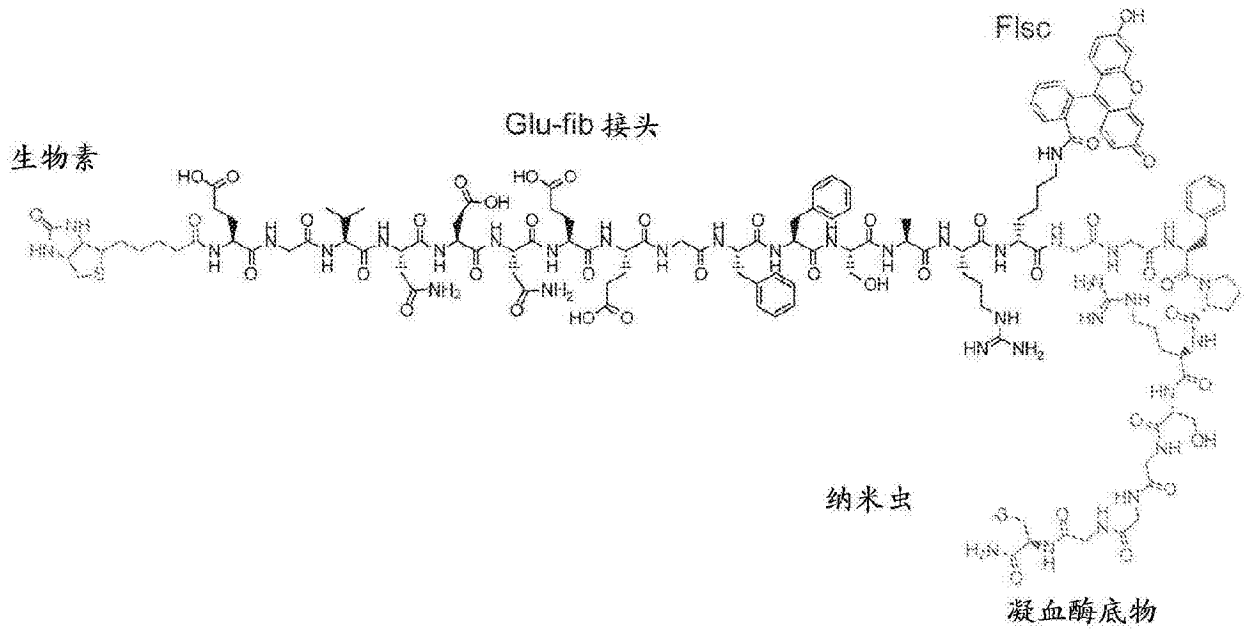


图6

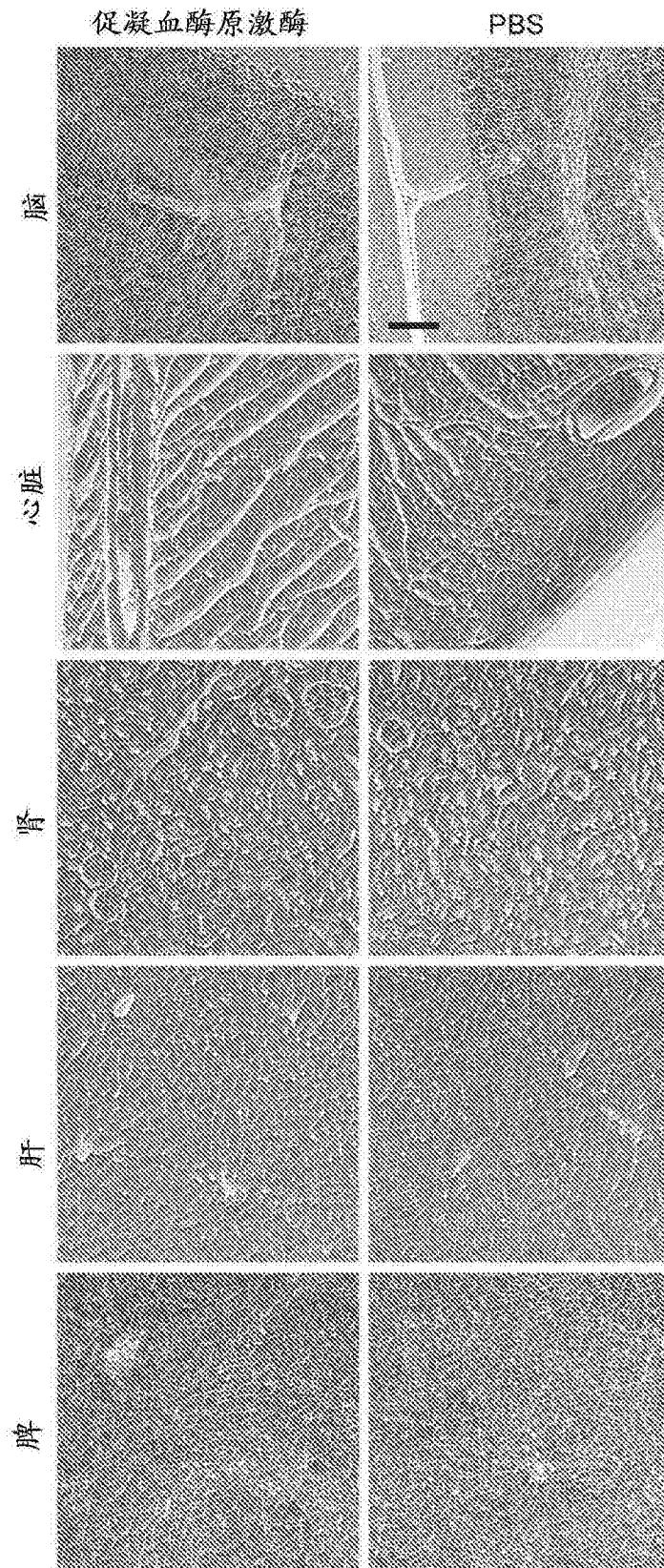


图7

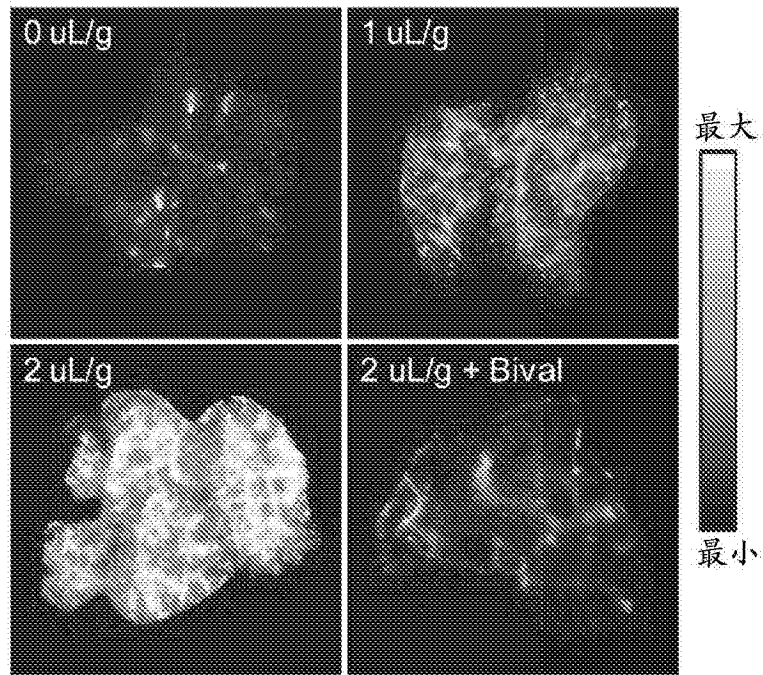


图8

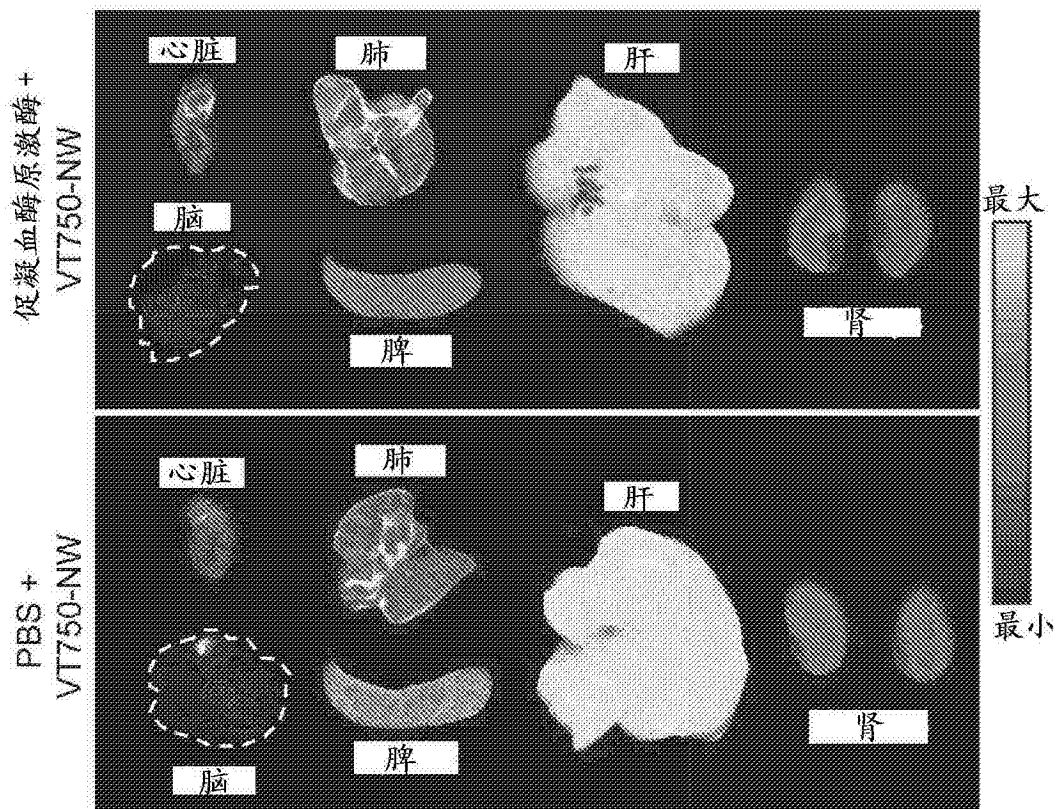


图9

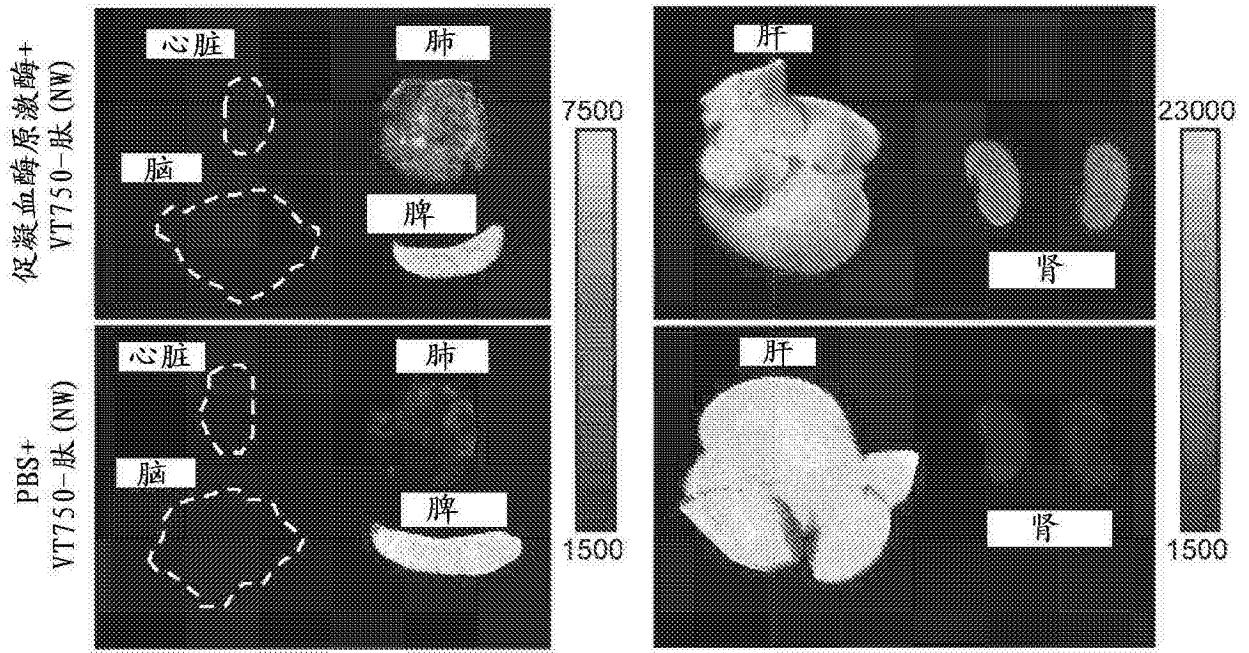


图10

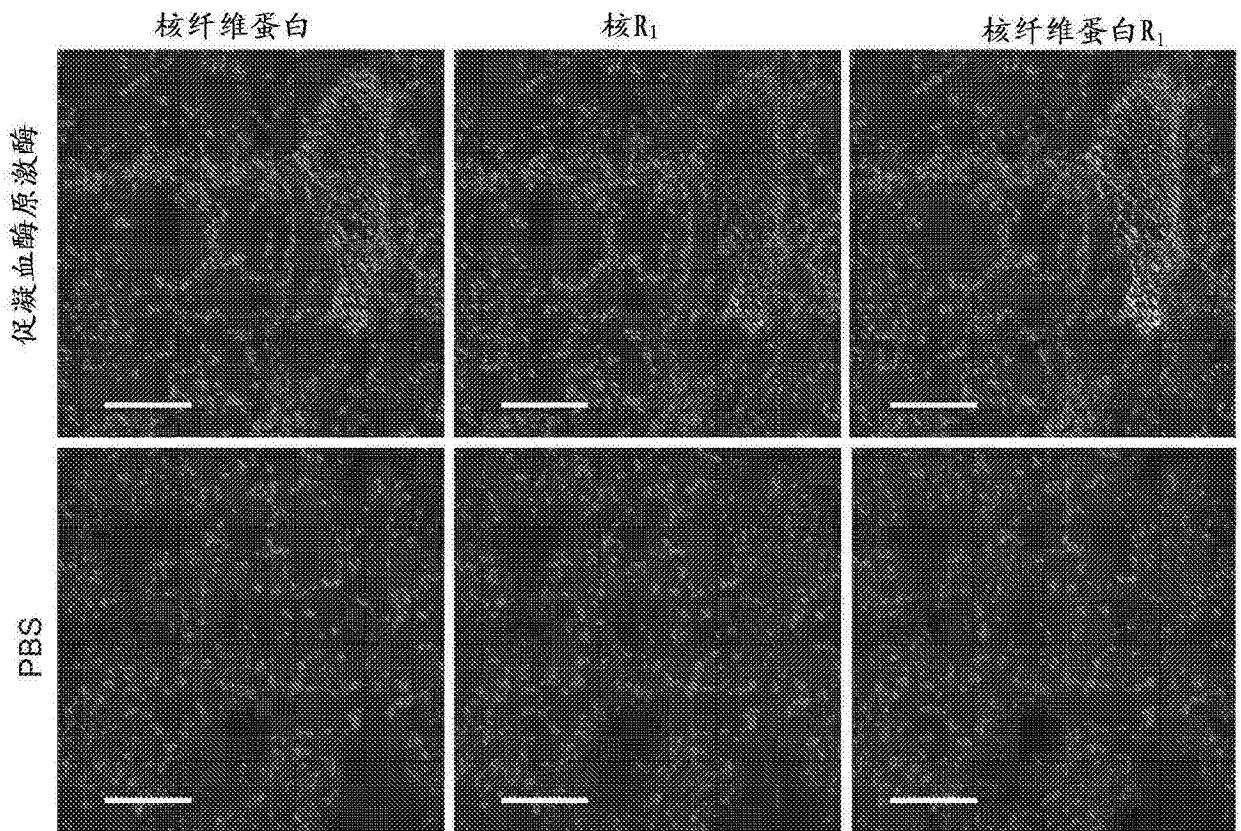


图11

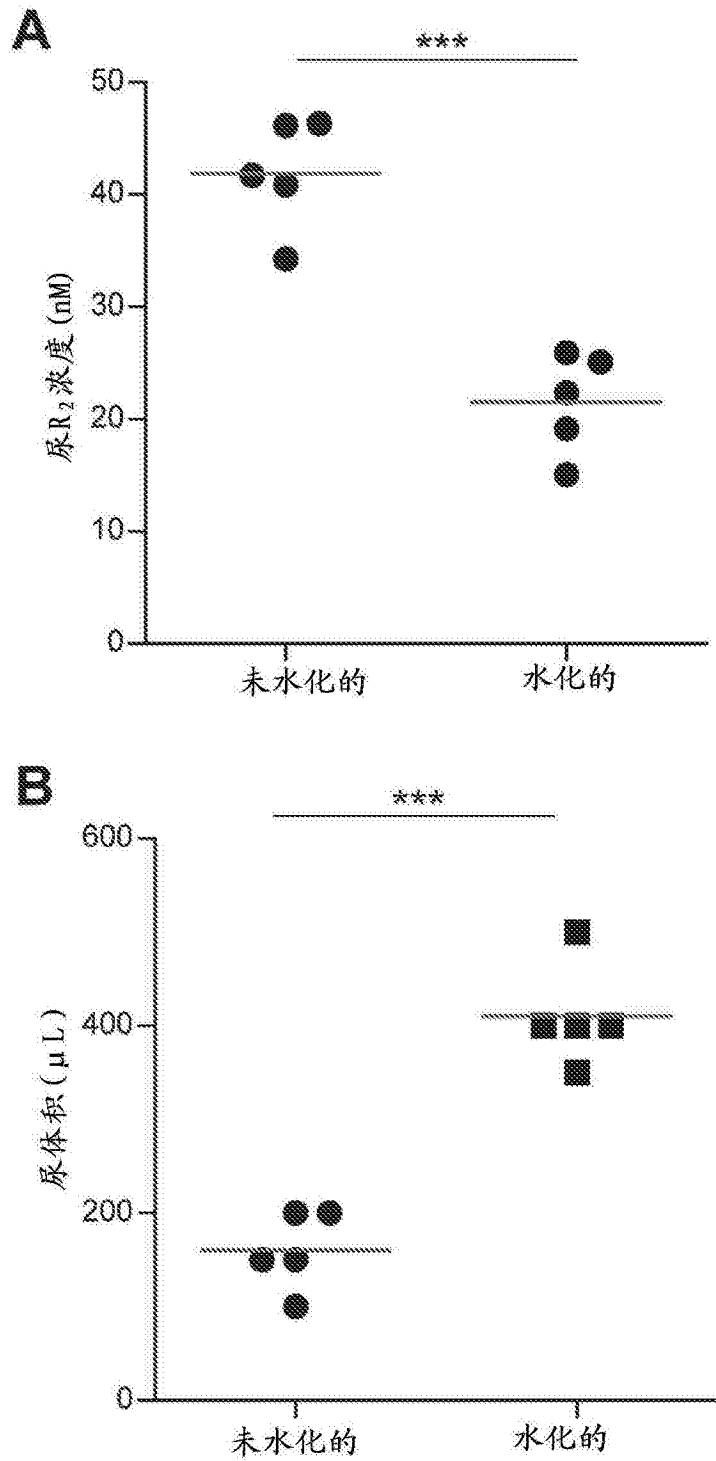


图12

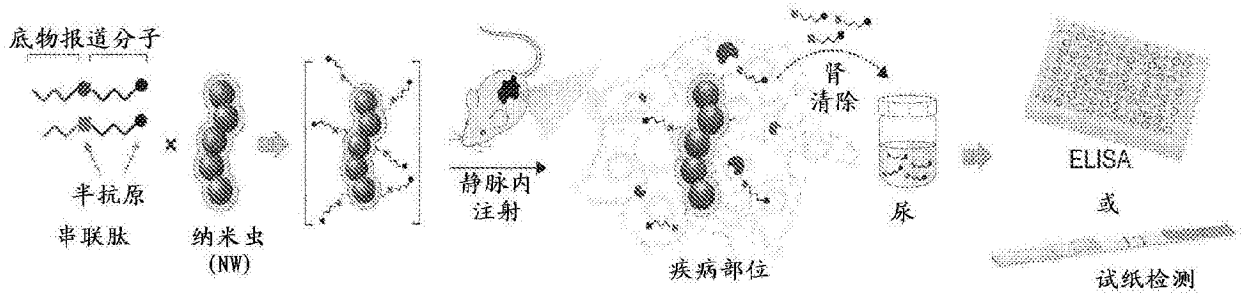


图13

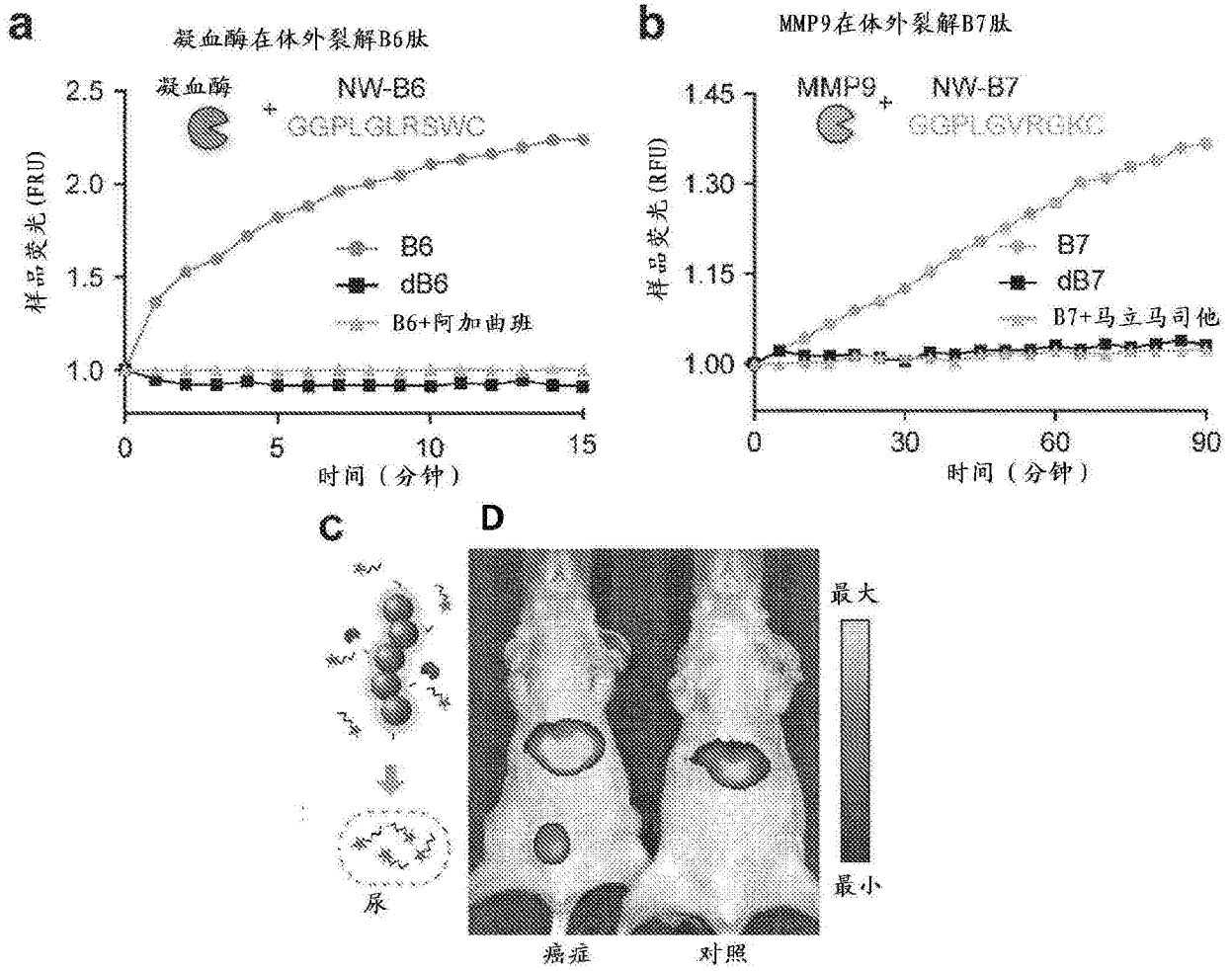


图14

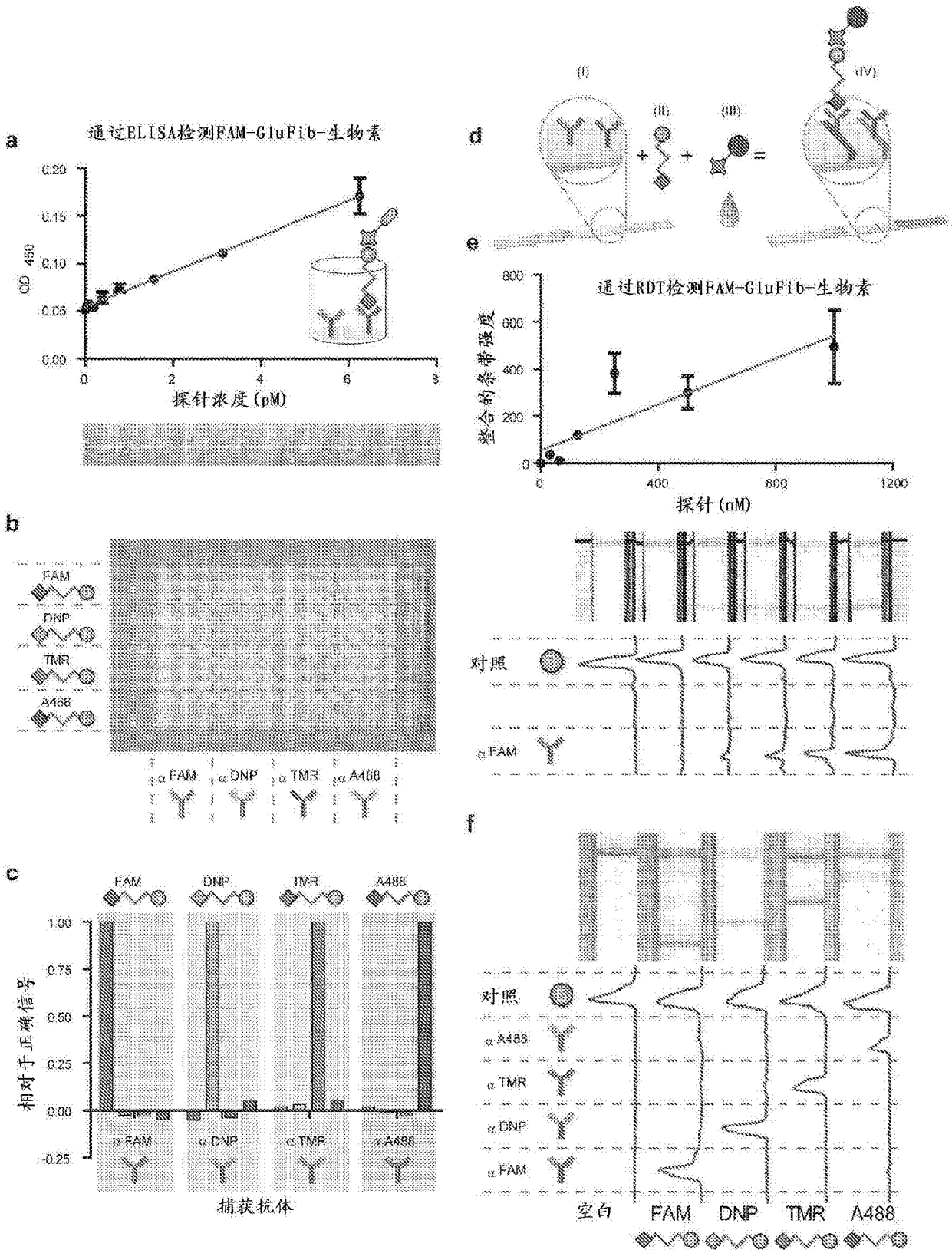


图15

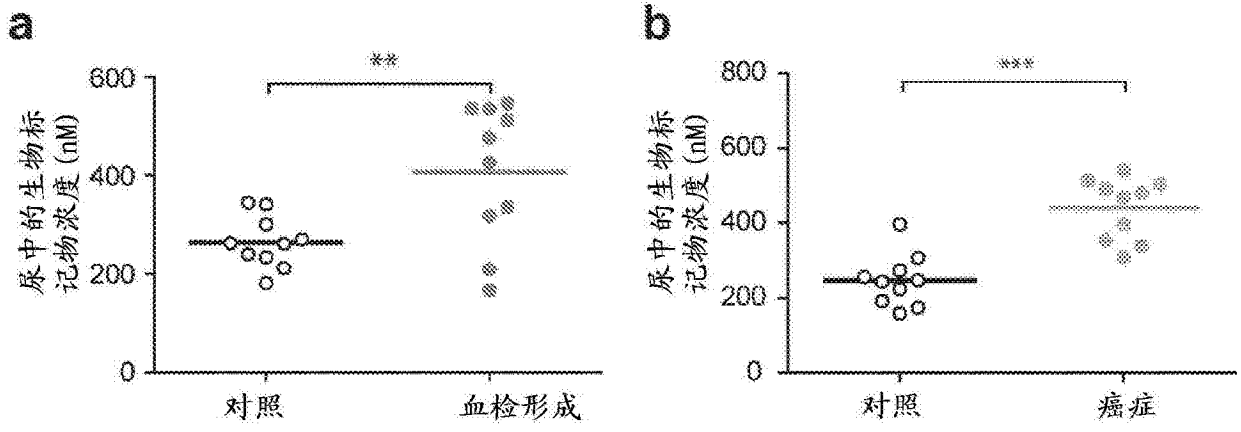


图16