

205006

申請日期	78.11.17
案 號	78108860
類 別	A61K 49/02

公 告 A4本
C4

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

一、發明名稱	中 文	磁共振顯像用之方法及其組成物
	英 文	Methods and compositions for magnetic resonance imaging
二、發明人	姓 名	大衛弗蘭尼 Dr. David F. Ranney
	籍 貫 (國籍)	美國
	住、居所	美國德州 75234 達拉斯科特達爾大道 3539
三、申請人	姓 名 (名稱)	大衛弗蘭尼 Dr. David F. Ranney
	籍 貫 (國籍)	美國
	住、居所 (事務所)	美國德州 75234 達拉斯科特達爾大道 3539
	代表人 姓 名	

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

四、中文發明摘要(發明之名稱:磁共振顯像用之方法及其組成物)

對腫瘤部位(或其他內皮細胞變態部位)作選擇性接近用之改良組成物及其方法。此種能力提供核磁共振顯像用之強力的對比—增加劑。可在金屬原子間發生分子內鐵磁耦合之多原子絡合物與黏結於皮內細胞測定劑之聚合物或微球載體基質締合在一起。含有此種載體絡合物之溶液被注射於待顯像之人類(或其他動物)體內。載體絡合物將會優先在血管壁有增大多孔性或微血管表面變化之位置(特別是在腫瘤位置)自血管溢出。因此,載體絡合物之存在所誘發之鬆弛時間變化提供磁共振顯像之高增益標記。本發明揭述多重超順磁多原子絡合物,包括含有醋酸酯與甘胺酸酯架橋配合基及多原子金屬—原子—絡合物心部之新穎絡合物。

英文發明摘要(發明之名稱:Methods and compositions for magnetic resonance imaging)

Improved compositions and methods for selective access to tumor regions (or other regions of abnormal endothelial properties). This capability provides powerful contrast-enhancement agents for nuclear magnetic resonance imaging. A polyatomic complex which includes intramolecular ferromagnetic coupling between metal atoms is associated with a polymer or microsphere carrier matrix which will bind to endothelial determinants. A solution containing this carrier complex is injected into a human (or other) body to be imaged. The carrier complex will preferentially extravasate at locations where the blood vessel walls have increased porosity or microvascular surface changes, and especially at tumor sites. Thus, the changes in relaxation time induced by the presence of the carrier complex will provide a high-gain marker for magnetic resonance imaging.

Multiple superparamagnetic polyatomic complexes are described, including novel complexes which include acetate and glycinate bridging ligands with a polyatomic metal-atom-complex core.

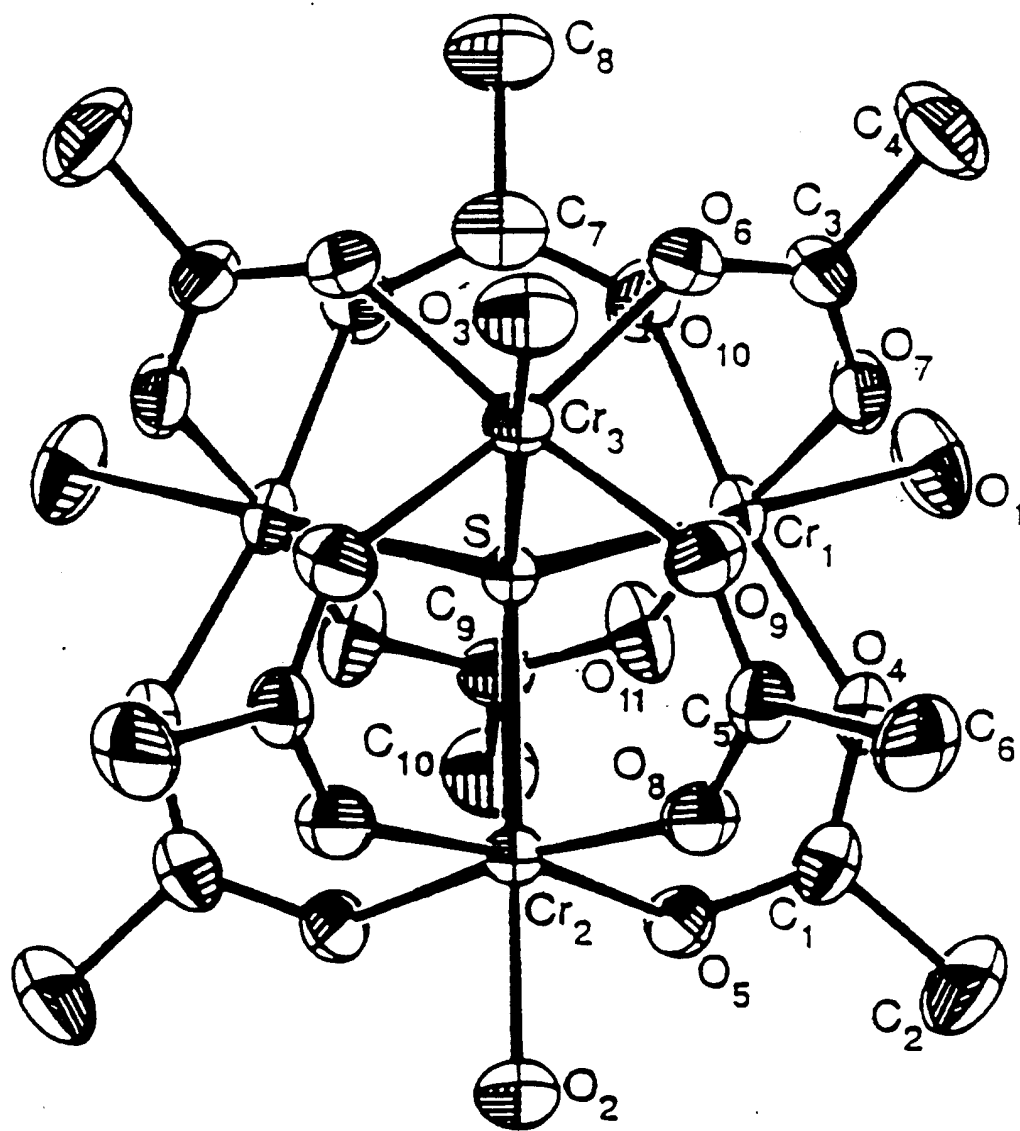
附註:本案已向 美 國(地區) 申請專利,申請日期:'88.9.29 案號:252,565

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

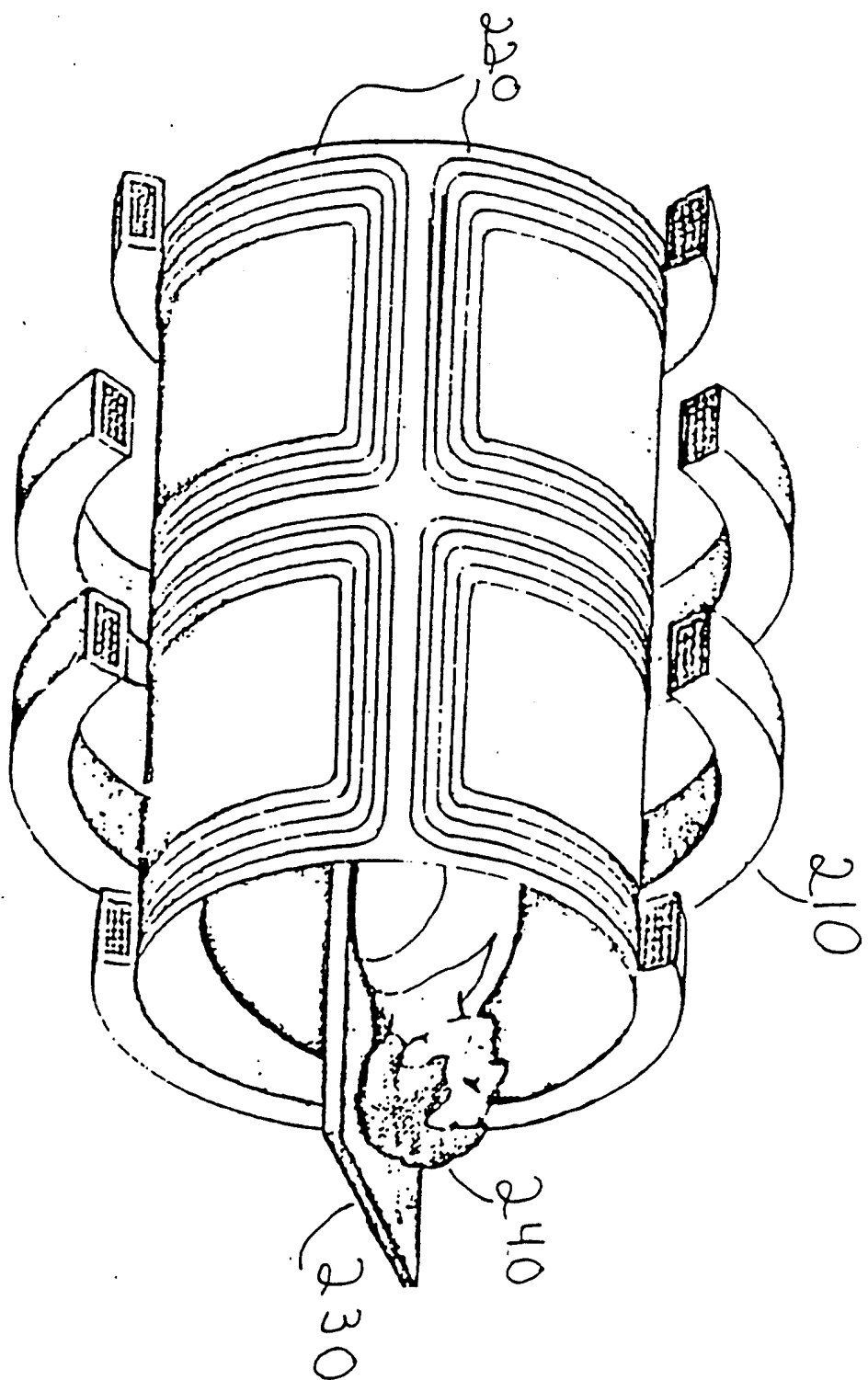
裝

訂

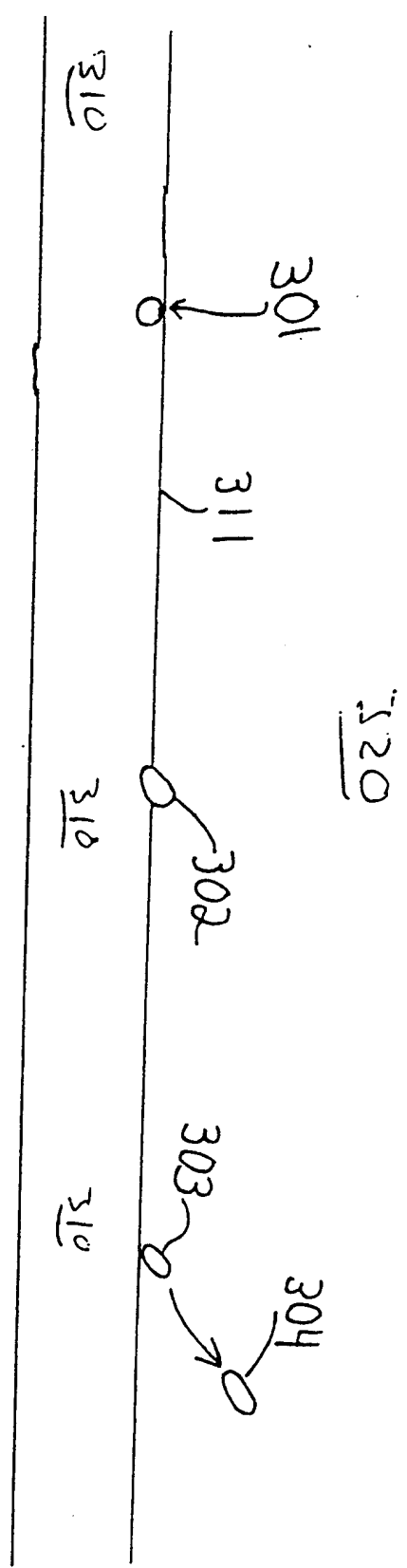
線



第 1 圖



第2圖



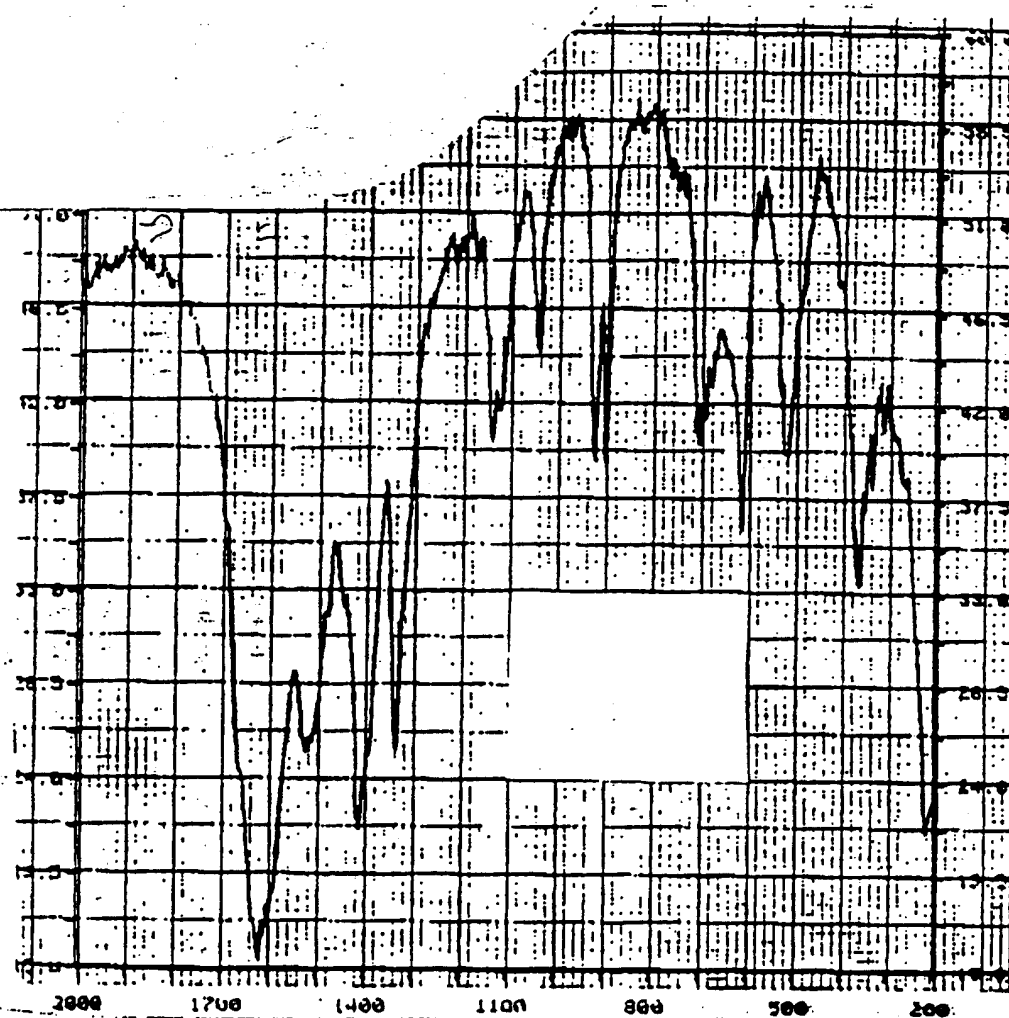
第 3 圖

205006

第 4 圖



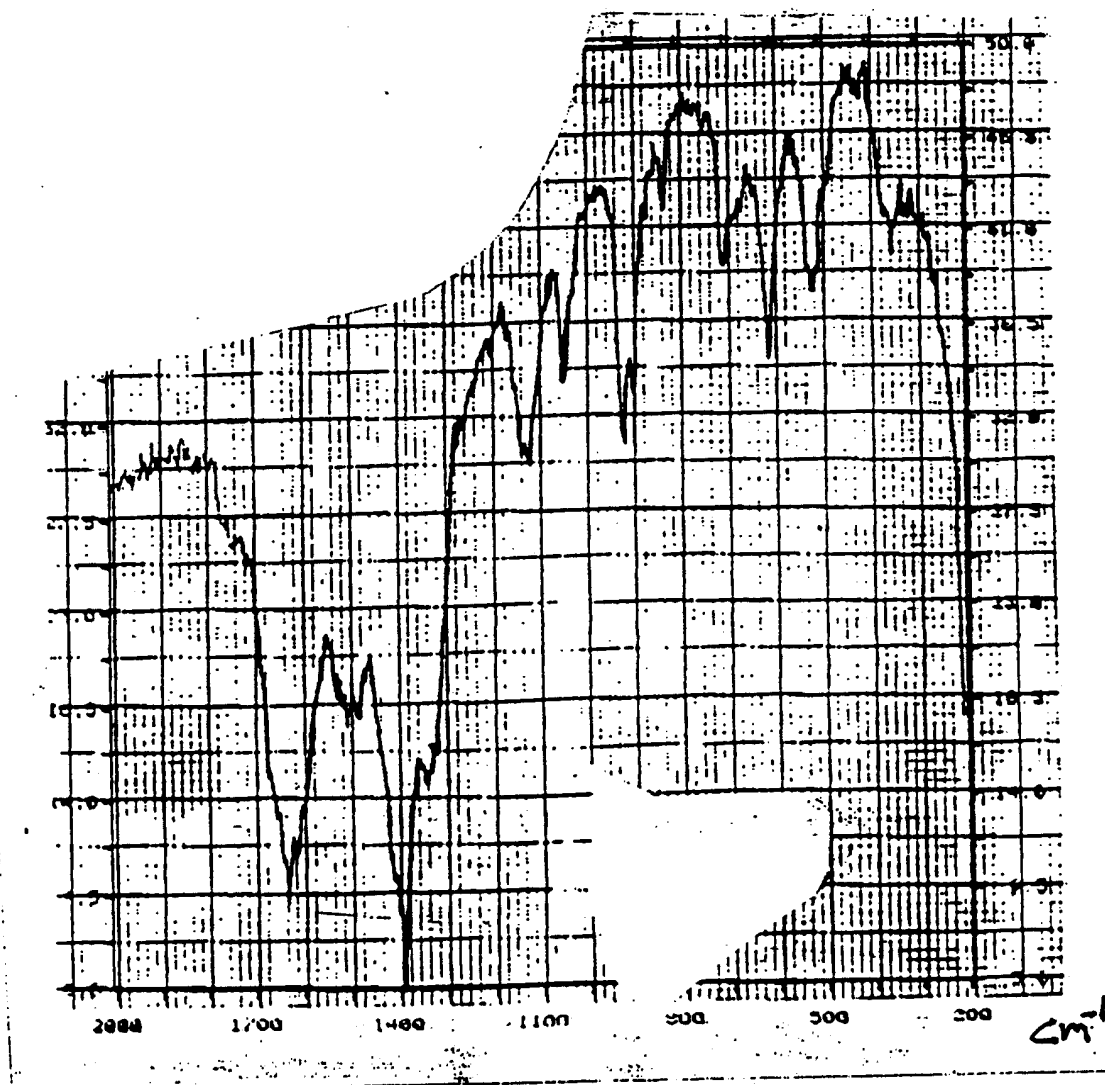
205006



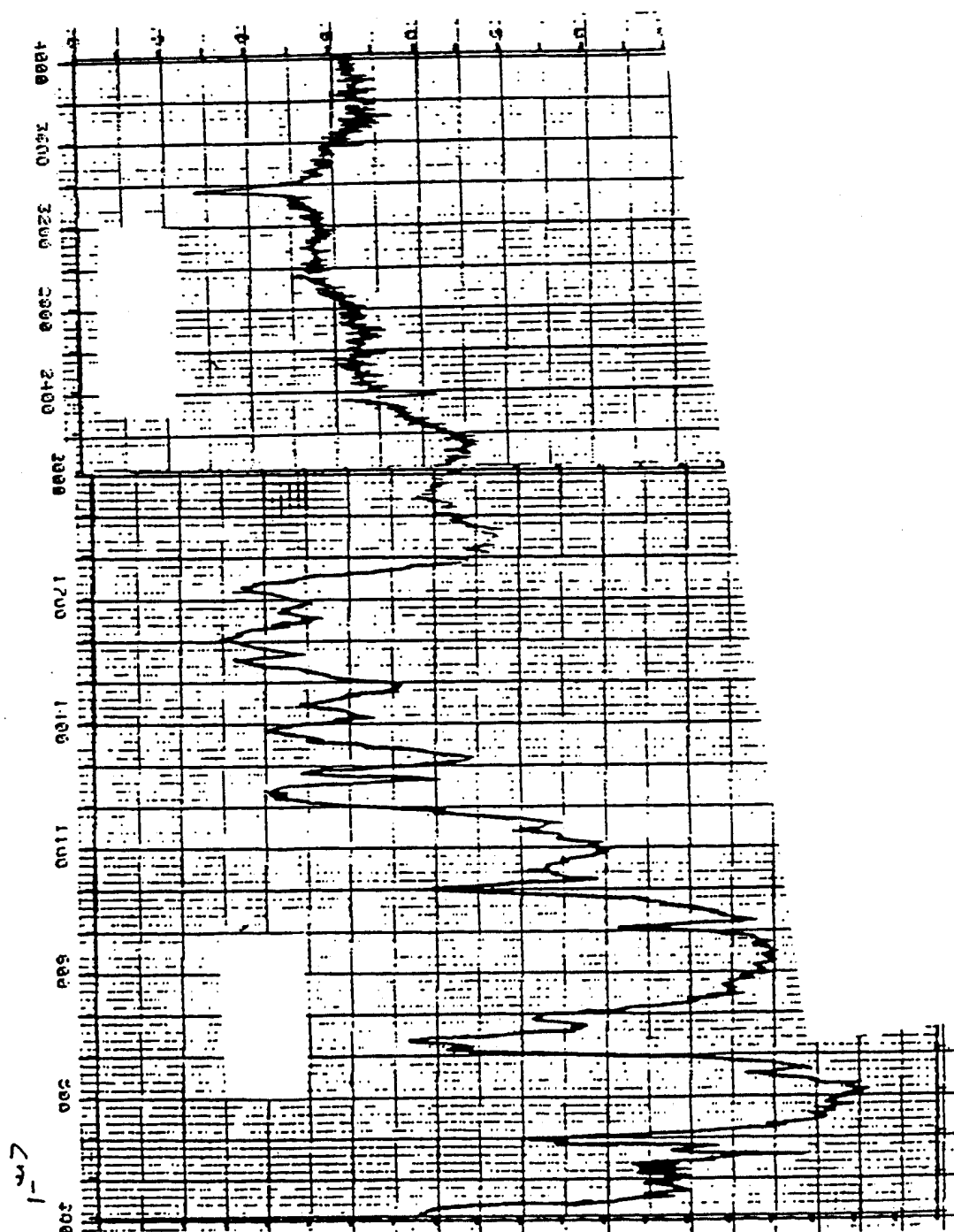
CH⁻¹

第 5A圖

205006



第 5B圖

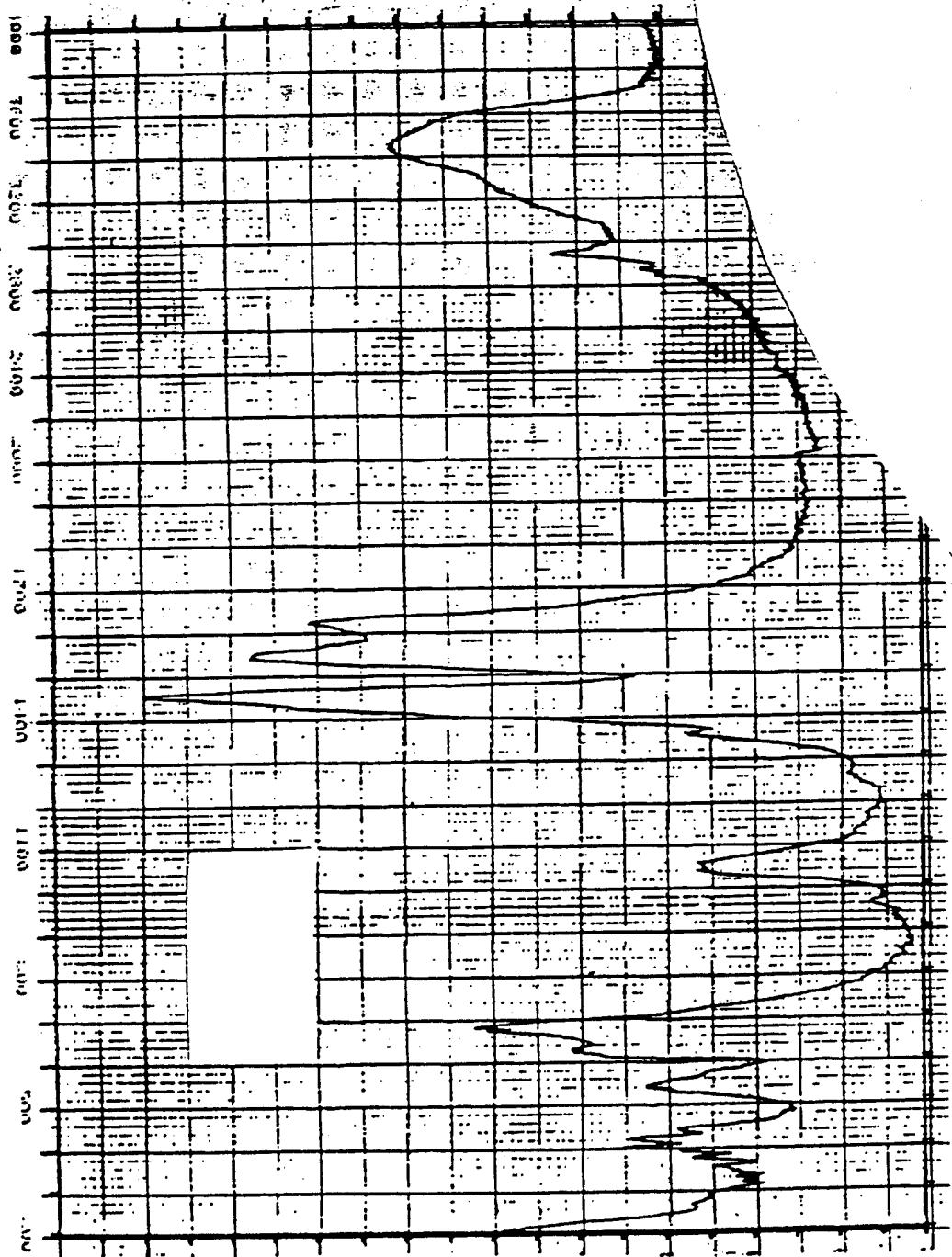


第 5C 圖

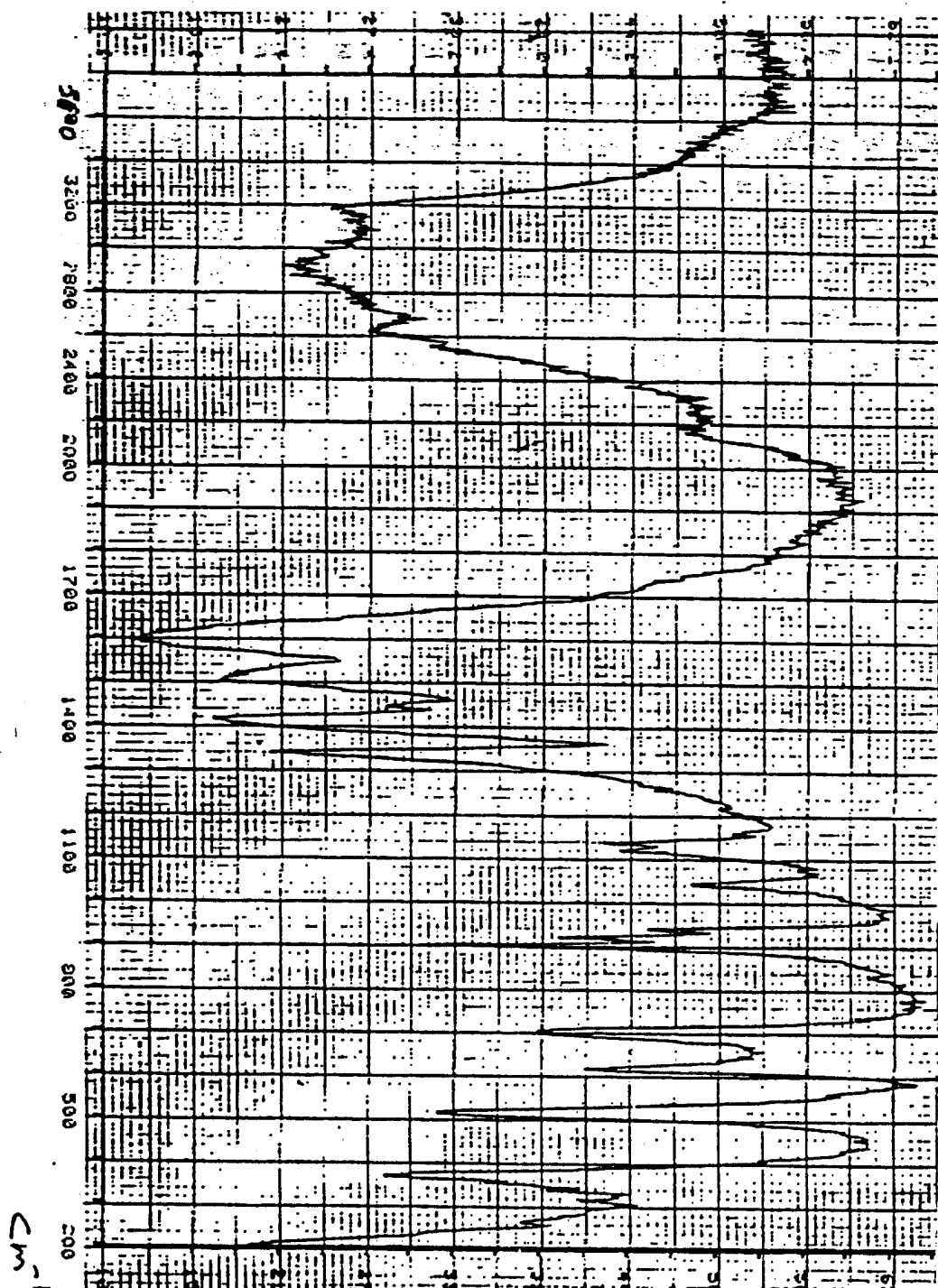
205006

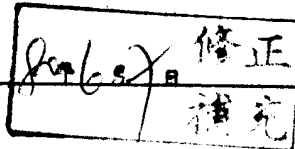
第5D圖

cm⁻¹



第 5E 圖





五、發明說明(1)

本發明係關於核磁共振顯像方法。

〔核磁共振顯像概述〕

具有磁距之原子在強磁場中會有明顯的核振盪頻率。此種現象被稱為「核磁共振」或 NMR。各原子核之振盪頻率決定於其質量，其偶極矩，原子之化學結合，原子之環境（由對於附近其他原子之電磁耦合予以影響者），以及，由原子所見之磁場強度。因此，振盪頻率不但是各種原子種類之特徵，而且是其分子環境之特徵。以共振方式激發此種振盪，可以準確測定原子種類及其環境（如果以某一種類與環境，例如氫原子在水環境中）之原子之共振頻率施加 RF（射頻）能量脈衝，則此種類與環境之原子核被激勵成為核振盪，而且在稍後躍遷回復至低的激勵狀態。此種躍遷時常伴隨著以激勵頻率或已知較低頻率之射頻信號發射。（此種發射被稱為「自旋回波」）。此等「回波」之空間分布提供預定種類與環境之原子之分布圖。又，自旋回波發射發生前之時間延遲亦提供有關原子之環境之重要資訊。（此種時間延遲被稱為鬆弛時間）。鬆弛時間分析通常被用來提供醫學用途 NMR 顯像之進一步的詳細資料。

在過去十年，此種技術已經被應用於醫學上之顯像。使用在水環境中之質子（通常）之已知的共振特性，可將活的生物體顯像而不會造成傷害。使用強的 DC 磁場，此等梯度場 B。以及梯度場^A被控制而使淨總磁場僅在所要的位置達

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

205006
發明說明(2)

到預定值。施加一系列之 RF 脈衝，同時（使用場梯度線圈）變化磁偏場並且偵測“自回旋波”。因為磁場等量線與質子之共振特性為準確已知，所以可準確測定發出自回旋波之源頭位置。藉由重複之脈衝與測量操作，可獲得水質子（而且在某些場合，類脂質子）之分布圖。此種顯像技術被稱為“磁共振顯像”或 MRI。

以上述一般技術為基礎，最近許多研究已開發更精良之技術。NMR 現象可被用來僅只根據強度形成影像，或者，時間領域窗孔化（Time-domain windowing）可被用來區別不同鬆弛時間之原子。另一種變化係精確區別由核之原子環境所決定之頻譜特性，而且此種技術被稱為頻譜移位顯像。

近年來已經證明，磁共振強度、鬆弛與頻譜移位圖像可以活的動物與人類體內構造、器官與病巢之非常高的空間解析度（典型地，小於 $0.6 \times 0.6 \text{ mm}$ 平面中解析 $\times 2 \text{ mm}$ 一厚切片）提供重要而安全的腦部與身體顯像模式。MRI 可在治療上偵測與監視之構造與腫瘤遠較小於電腦軸向斷層攝影術（CAT）或輻射核種顯像所能偵測與監視者，典型地，電腦軸向斷層攝影術或輻射核種顯像對於腫瘤塊之解析度僅為 1 至 2.5 cm^3 而已。

臨床 MRI 迅速地發展成為腦部與身體顯像之形式。此種技術已經證明為非常有用之診斷技術，而且其用途迅速擴大。此種技術之使用於身體顯像開始增加至總病例

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

線

五、發明說明(3)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

數之10%以上。改良技術例如更迅速、T1- 權重、窄狹- 反彈- 角度脈衝序列；有效率之資料處理；以及呼吸與心臟開控裝置等等之利用於許多標準臨床儀器，已導致此使用百分率加速增加。使用15秒（單一個屏息間隔）至2分鐘之近乎真時的資料取得，可獲得品質可接受之快速顯像。質子MRI將身體水分（主要地）與脂肪之可動質子周圍之緊鄰的環境中之化學參數偵測出。此等參數之變化通常較CAT所偵測者（組織密度）或輻射核種顯像所偵測者（在血液背景以上之充分濃度限於生病組織局部內之輻射核種所發生之珈瑪同位素放射）更為靈敏而且經常在疾病歷程之較早期發生。（參見Runge氏等人，141 Am. J. Radiol. 1209 (1983)）。然而，在對比劑不存在時，MRI甚難偵測非常小之腫瘤，特別是小於2 mm³之腦內腫瘤與小於5 mm³之體內腫瘤。

因為若干理由，身體MR顯像之解析度較低於腦部顯像。身體顯像需採用較大RF之線圈，而有較低之磁場均一性與較小之靈敏度（較小之信號-對-雜訊比）。身體顯像亦可受到身體運動等外來因素之影響。（對病人做
所需之時間典型地在1.5至7分鐘之範圍，視所使用之顯像
NMR身體顯像_{順序而定}）。又，已經證明MRI甚難以達成下列功用（除非利用非電子設備予以增強），即，1)

裝

訂

線

五、發明說明(4)

區別活的(灌注的)腫瘤與壞死的(非灌注的)腫瘤;
2)認出生物學上有關之腫瘤亞區(Subregions),在腫瘤小塊再生產至X-光可偵測到而且輻射核種可偵測到之大小以前,這些腫瘤亞區必須以非常小之尺寸(1mm^3)與3獲得早期療效所需之早期間隔(20至30小時)加以監視。RF脈衝序列之新開發技術作品無法完全補償身體運動等外來因素之影響。

NMR 圖像增強

早已有人建議強順磁性種類可使用為活有機體之核磁共振(NMR)顯像用之圖像增強劑。例如,已有人致力於將釷離子(當做螯合劑)送入顯像部位處,因為釷離子有強順磁性。然而,目前尚無法以高選擇性將適當之釷載體種類送至所要顯像之部位處。

利用有效力、無毒性、腫瘤選擇性MRI對比劑將圖像之對比增強,可克服許多問題,即,將重要關鍵之腫瘤構造(包括腫瘤邊緣)增強因而將圖像-取得時間縮短。

順磁性對比劑將可動rf脈動質子之鬆弛時間(最好為T1-時間)減短。此乃將對比劑變成局部化之組織、器官、腫瘤基質或腫瘤細胞之局部圖像強度增大。結果,以改進之選擇性、靈敏度與邊緣明確性將小的腫瘤(及其他病巢)顯像(或監測其頻譜)。

五、發明說明(5)

有七項因素迫切需要開發類似於CAT所用之非毒性MRI圖像增強劑。

1. 提高MRI診斷之特效性。

2. 提早確認組織上或器官上之較小的損害。

3. 圖像增強劑以不同於周圍水腫流體或膿瘍之方式將腫瘤塊增強顯像。此乃允許更精確地界定腫瘤之範圍與侵害程度。以滲透性型式生長之組織上或器官上損害(例如某些蔓延性癌與神經膠質真性瘤)需要有腫瘤與水腫流體分界用之對比劑(Felix氏等人, 2 Proc. Soc. Mag. Res. Med. 831 (1985))。

4. 圖像增強劑提高再發性腫瘤與手術和輻射線引起之纖維組織巷兩者間之區別。

5. 圖像增強劑可縮短每個掃描所需之時間而且可將每個程序所需之掃描次數減少。此乃增加程序之容量而降低其費用。

6. 身體顯像之解析度(典型地, 0.5-1.0cm)與靈敏度(減小之信號-對-雜訊比)顯著較低於腦部顯像(參見Wesbey氏等人, 149 Radiology 175 (1983), 於此併為參考文獻))。此等差異係由下列因素造成, 即, 磁場之較大的非均勻性; 較大的射頻線圈; 深的對淺的原子核之不相等相位脈動; 以及, 由呼吸, 心臟收縮、胃腸蠕動和隨意肌所產生之運動等外來因素。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(6)

7. 血液流動與組織灌注圖像和相關頻譜(相位)資訊之適當取得與解釋顯然需要高級之對比劑形式(聚合物與微球形式)(參見下文所述)。

圖像增強用物質之毒性本身不但不受歡迎,而且必需限制其可使用之最大劑量,因而限制可達成之圖像增強程度。

下列通式描述二向度傅立葉(Fourier)變換之離散的強度(針對自旋回波脈衝序列):

強度 = $N(H) \cdot f(v) \cdot \exp(-TE/T2) \cdot (1 - \exp(TE - TR/T1))$ 其中,

$N(H)$ = 在離散組織體積內之質子數量(自旋密度),

$f(v)$ = 質子速度與(例如因追隨血液而引起之)移動的質子部分之函數;

TE = 射頻(rf)脈衝與信號(自旋回波)檢出之間之時間;

TR = RF脈衝之重複之間隔;

$T1$ = 與質子能量轉移至周圍化學環境之速率(自旋格子鬆弛)有關之時間間隔;

$T2$ = 與質子能階轉移之速率(自旋-自旋鬆弛)有關之時間間隔。

$T1$ 與 $T2$ 時間對於圖像強度有互易效應。縮短 $T1$ 時間或加長 $T2$ 時間可以增加強度。組織之對比係自然地發生而且與水質子(主要貢獻者)和類脂質子(通常為次要貢

五、發明說明(7)

獻者) 周圍化學環境中之變化有關。化學劑已被用來增強此種自然對比。臨床上最廣泛試驗之一種化學劑係順磁性金屬離子, 釤。(參見 Runge 氏等人, 141 Am. J. Radiol. 1209 (1983) (於此併為參考文獻) 以及 Weinman 氏等人, 142 Am. J. Radiol. 619 (1984) (於此亦併為參考文獻)。雖然釤在臨床顯像用之較低劑量縮短 T1 與 T2 時間, 但是 T1 效應通常佔優勢而且圖像變成較明亮。又, RF 脈衝序列可被安排以加重 T1 變化而減弱 T2 變化 (Runge 氏等人, 141 Am. J. Radiol. 1209 (1983) (於此併為參考文獻))。因此, 藉由選擇最有利 Gd 之劑量 RF 與脈衝序列, 可達成 "T1-權重" 增強作用。

利用 Gd 縮短質子鬆弛時間係藉由未配對之電子與相鄰水質子間之偶極-偶極相互作用予以居間促成。Gd 磁偶極之有效性以其與質子之距離為函數 (半徑之六次方) 而非非常迅速地降低 (參見 Brown 氏, 3 Mag. Res. Imag. 3 (1985) (於此併為參考文獻))。結果, 當 RF 脈衝與信號檢出之間之時間隔內, 僅只有效鬆弛之質子能進入 Gd 之第一或第二座標球內。範圍由 10^5 至 10^6 質子 sec^{-1} 。(參見 Brown 氏, 3 Mag. Res. Imag. 3.)。更進者, 因為 Gd 在其 4f 軌道有最大之未配對電子數量 (7), 所以 Gd 有最大之順磁性偶極 (7.9 波耳磁子) 而且呈現任何單一元素之最大順磁鬆弛性 (Runge 氏等人, 141

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(8)

Am. J. Radiol. 1209 (1983), 以及, Weinman 氏等人, 142 Am. J. Radiol. 619 (1984))。因此, 在任何元素當中 Gd 有最大之潛能可增強圖像。然而, 自由形式之 Gd 頗富毒性。此係部分因身體 pH 之沉澱 (成為氫氧化物) 所引起。為提高可溶性與降低毒性, Gd 已利用小的有機分子了以化學螯合。

在 1988 年中, 第一代之低分子重量順磁性對比劑, 釷-二乙烯三胺五醋酸鹽 (Gd-DTPA) dimeglumine 被核准為一般臨床使用 (Berlex-Schering AG ; 由 Gries, Rosenberg 與 Weinman 氏所申請之西德專利: DE-OS 3129906 A1 (1981))。此化學劑已顯著改進腦部與腎臟腫瘤之評估。然而, 其小的分子尺寸使其: 1) 自由擴散進入正常的組織內以及病巢內, 因而減小腫瘤邊緣之圖像對比之大小與梯度; 而且 2) 迅速由腫瘤基質反擴散進入微血管內, 造成 10~45 分鐘之非常短的注射後對比時間間隔。此後者之特性使得, 無法在顯像室外面對病人預施藥物。腦部腫瘤周圍之正常的組織中之完整的血液-腦部障壁之存在, 使 Gd-DTPA 對正常腦部增強顯像之問題減小。

雖然有令人滿意之鬆弛性與毒性, 但是此種藥物有四項重大缺點。

(1) Gd 之螯合顯著降低其鬆弛性 (大小減半)。此乃因為螯合劑佔滿幾乎所有 Gd 內部配價位置, 這些 Gd 內部

五、發明說明(9)

配價位置係與順磁性偶極之最強部分重合之位置。(參見 Koenig 氏, 2 Proc. Soc. Mag. Res. Med. 833 (1985) (於此併為參考文獻) 以及, Gerald 氏等人, 2 Proc. Soc. Mag. Res. Med. 860 (1985) (於此併為參考文獻))。

(2) Gd - DTPA dimeglumine, 如同所有小順磁性金屬螯合劑, 在質子顯像臨床使用之較高的射頻 (典型地, 15MHz), 鬆弛性有緩和的降低。(參見 Gerald 氏等人, 2 Proc. Soc. Mag. Res. Med. 860)。

(3) 由於其分子重量低之故, Gd-DEPA dimeglumine 非常迅速地由血液中清除 (20分鐘內成為 1/2), 而且由組織上之損害部位 (腫瘤) 除去。(參見 Weinman 等人, 142 Am. J. Radiol. 619 (1984))。此乃限制顯像窗孔 (至大約 10~45 分鐘); 限制每次注射後之最適圖像數量 (至大約 2); 而且增加該化學劑所需劑量與相對毒性。

(4) Gd-DTPA 之生物分布於身體 (對腦部) 腫瘤與感染部位之顯像方面有欠理想。此乃因為其分子尺寸小之故。靜脈注射之 Gd-DTPA 迅速交換進入正常組織之細胞外水分內, 而且集中於腫瘤與感染部位內。身體器官中沒有 "血液-腦部" 血管障壁存在時, 更容易發生此現象。上述障壁部分地限制 Gd-DTPA 之交換進入正常 (對病變

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(10)

言) 腦部之細胞外水分內。結果, 身體器官中, 組織之正常部位與病變部位之間, Gd-DTPA 之濃度差異較小, 因此, 器官之正常部位與病變部位之間之圖像對比減小。又, Gd-DTPA 之不成比例之量 () 90%) 在腎臟中很快地消退。(參見 Weinman 氏等人, 142 Am. J. Radiol. 619 (1984))。與身體 MRI 更有關係的是腹部與肌肉骨骼柔軟組織部位之腫瘤 (特別是身體腫瘤、包括肝臟、脾臟、骨髓、結腸、胰臟和四肢) 之早期偵測與演變。

已有嘗試將順磁性 (主要為釧) 螯合劑連合於蛋白質載體 (主要為蛋白素), 即, 將反應性螯合劑母體分子 (主要為 DTPA 酐) 添加以所要載體蛋白質之外露的氨基。然而, 由於自然發生之蛋白質上之此種氨基之數量有限而且形成胺軛合物之困難, 此等蛋白質載體僅有低的衍生 (取代) 比。已有報告指出免疫球蛋白有比較低的取代比 (以分子重量正規化)。(參見 Lauffer 氏等人, 3 Magn. Res. Imaging 11 (1985) (於此併為參考文獻), 以及, Brady 氏等人, 1983 Soc. Magn. Res. 2nd Ann. Mtg., Works in Progress, San Francisco, CA)。亦有報告指出, 血纖維蛋白元有比較低之取代比。(參見 Layne 氏等人, 23 J. Nucl. Med. 627 (1982) (於此併為參考文獻))。此乃由下列因素造成, 即, 形成醯胺鍵比較困難, 可用於耦合之典型蛋白質上之外露氨基之數量較少, 以及, 當軛合反應期

五、發明說明(11)

間將蛋白質變性減至最小所需之水溶劑中發生DTPA酞耦合基材之較快速的水解。(參見Hnatowich氏等人, 33 Int. J. Appl. Rad. Isot. 327 (1982) (於此併為參考文獻), 以及, Krejcarek氏等人, 77 Biochem. Biophys. Res. Comm. 581 (1977) (於此併為參考文獻))。此等欠佳之條件之總效應為, 對MR圖像達成顯著效果所需之載體材料劑量非常大。於此種高的劑量, 載體藉由滲透機構產生受者血液體積之不可接受的急脹。確實地, 低的取代比已大略限制此種蛋白質螯合劑-金屬絡合物之使用於較敏感(低劑量)的輻射藥劑用途。(參見Layne氏等人, 23 J. Nucl. Med. 627 (1982) (於此併為參考文獻))。

為克服此種低的取代比, 已有嘗試DTPA將耦合於非蛋白質載體, 纖維素(不溶於水)。(參見Bulman氏等人, 40 Health Physics 228 (1981) (於此併為參考))。然而, 所採用之化學方法導致DTPA對於載體之連續欠佳的取代。纖維素(不溶於水)之非生物可降解性及其可溶於水之衍生物以及CNBr-由活化纖維素之有機溶劑耦合(在二甲基甲醯胺中)於將載體連結於DTPA之二氨基已基間隔基所造成之已揭述的分子聚集, 已使此類載體-耦合物無法以MR圖像增強所需之劑量實施靜脈注射使用。

利用聚合對比劑將實體腫瘤與發炎傷口部位之圖像增

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(12)

強有一項重要的考慮點，即，為使此等對比劑有效地由微循環滲出進入鄰近的病變組織內，對比劑必須為完全可溶。例如，必須不受分子間或超分子微聚集物所污染。最適之腫瘤接近與局部化需要使此種對比劑之分子尺寸大致較小於約2,000,000 Daltons（大約2至3 nanometers之分子直徑），而且最好較小於500,000 Daltons（大約0.5至1 nanometers之分子直徑；參見Jain氏，1 Biotechnology Progress 81 (1985)，於此併為參考文獻），而且，如本申請案所教示，最好較小於40,000至45,000 Daltons。基於此項原因，甚少例外（見下述之例6），對比劑之粒狀與微取集物類（包含脂肪體，膠體，乳液，粒子，微球與較大之微聚集物，如下文所述）不有效集中於大多數實體腫瘤與發炎傷口部位。

代之，在靜脈注射之後，此等超分子尺寸之對比劑發生下列現象：

a)首先在血液流中循環經過一段較短的時間（2分鐘至24小時，視尺寸大小而定），可允許血液池（血漿室）之直接圖像增強；以及

b)後來由網狀內皮組織（肝臟、脾臟及骨髓）之特殊化（噬菌）細胞予以清除，可允許此等正常組織之選擇性的增強，但產生此等組織內之損害部位之非直接的（負性）增強（由於對比劑由病變部位排除之故）。

五、發明說明(13)

又，在裝入胃腸消化道與其他體內腔道之後。此等對比劑之粒狀與微聚集物類可產生此等腔道內之流體之直接圖像增強，而可將侵入內腔與腔道之大量損害部分之輪廓描繪出。

微球與微聚集物兩者尺寸皆屬超分子的。對比劑之微聚集物類係以下述方式製成（有意的或無意的），即，a)個體聚合物分子之分子交連或b)先前單一（可溶性）聚合物之二次聚集，如由電荷吸引或疏水性結合機構予以誘發者。藉由其較小之粒子尺寸，由大約2,000,000 Daltons（大約2至3nanometers直徑）至0.1 micrometers（=100 nanometers直徑）。值得一提的是，微聚集物由網狀內皮噬菌細胞予以清除，其噬菌效率及速率顯著較小於微球者。一般而言，在注射後立即需要對比增強之普通臨床顯像條件下，此性質使微聚集物成為較不適用於將肝臟、脾臟與骨髓顯像用之對比劑。

Gd-DTPA 已經被捕集於脂肪體中以便選擇地將網狀內皮器官（肝臟、脾臟與骨髓）及可能的肺臟之圖像增強。（Buonocore氏等人，2 Proc. Soc. Mag. Res. Med. 838（1985）（於此併為參考文獻））。肝臟清除係由噬菌（Kupffer）細胞予以居間促成，噬菌細胞自然地將此等小的（0.05至0.1 micron）粒子由血液流中移除（Buonocore 氏等人（1985）2 Proc. Soc. Mag. Res.

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明(14)

Med. 838)。(較大於3至5microns之粒子選擇地被限於肺臟局部中，因為肺臟微血管中之栓塞所致)。最近之報告指出，小尺寸Gd-脂肪體產生肝臟T1之有效減小(如藉光譜測定而不顯像者)：參見Buonocore氏等人(1985) 2 Proc. Soc. Mag. Res. Med. 838。又，不可溶之Gd-DTPA膠體最近已有報告指出可在活的有機體條件下增強兔子肝臟MR之圖像。(Wolf氏等人，(1984)4 Radiographics 66 (於此併為參考文獻))。然而，三個大問題限制此等裝置之診斷效用。脂肪體之多層狀類脂包皮妨礙水質子之自由擴散進入此等載體之中央疏水性心部內，如由試管中鬆弛性所需Gd之較高劑量相當於Gd-DTPA dimeglumine 予以評估者(Buonocore氏等(1985) 2 Proc. Soc. Mag. Res. Med. 838)。此乃增加各Gd原子之相對毒性。

更重要者，此等相同的類脂成分使載體與目標器官之細胞膜互作用，而導致組織保留之顯著延長，使清除時間高達數個月。(參見Graybill氏等人，145 J. Infect. Dis. 748 (1982) (於此併為參考文獻)，以及Taylor氏等人，125 Am. Rev. Resp. Dis. 610 (1982) (於此併為參考文獻))。造成兩種不利後果。第一，圖像增強未適時回復至基線。此乃使急性疾病發展與治療效果之評估所需之短時間間隔(大約1至3星期)再顯像成為不可能。第二，脂肪體捕集之Gd-DTPA之

五、發明說明(15)

顯著之量可直接移入主細胞之膜內。(參見Blank氏等人, 39 Health Physic 913 (1980) (於此併為參考文獻); chan氏等人, 2 Proc. Soc. Mag. Res. Med. 846 (1985) (於此併為參考文獻))。此可顯著增加此種脂肪體對比劑之細胞保留與毒性。

Gd毒性之後果尚未有報告。捕集有Gd與Gd螯合劑之蛋白質(蛋白素)微球已被製備而且已被測定(由本發明人及其他人士: 參見Saini氏等人(1985) 2 Proc. Soc. Mag. Res. Med. 896)對於試管中T1鬆弛性僅有溫和之影響。此乃因為大多數Gd之及其他捕集物質最初被螯合於此等球體之內部, 而且當球體變成水合狀態時很慢地被釋放($t_{1/2}$ 小時)。(參見Widder氏等人, 40 Cancer Res. 3512 (1980) (於此併為參考文獻)。本發明人已發現此現象可將Gd原子之急劇(30至90分鐘)鬆弛性顯著降低至Gd-DEPA dimeglumine者之大約1/10。因此, 載體物質之量與Gd毒性皆過分高。

不溶性釷氧化物粒子之乳液已被注入實驗之動物體內, 對於肝臟有顯著之圖像增強效果。(Burnett氏等人(1985) 3 Magnetic Res. Imaging 65)。然而, 此等粒子之毒性頗高於前述物質之任何一種者, 而且不宜使用於人類用途。

顯像用之新穎組成物與方法

因為既有MR圖像對比劑有重大缺點, 本發明人乃提供

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (16)

改進之第二代原型對比劑，本發明之對比劑有降低之毒性、提高之腫瘤選擇性與器官吸收，以及可顯著增強血液流動圖像。

如本申請案所教示，一項非常重要的考慮係標記物質宜選擇地澱積於所要顯像之組織部位。更進者，本申請案亦含有意義之教示，有關順磁性標記物質如何緊密地黏結於聚合物，深信對以往之教示提供重大之改進。本申請案提供一種新穎的NMR顯像方法，其中，圖像對比由選擇性移送方法予以非常強力地增強，選擇性移送方法將超順磁性材料選擇地送入所要顯像之位置，特別是腫瘤部位內，本申請案亦提供可用於實施此方法之新穎組成物。

MRI對比增強可藉由增加腫瘤之對比劑吸收選擇性予以在腦部中適度地改進（而在沒有腦部之緊密血液-組織障壁之身體中，可大幅地改進）。

注射之釷在活的有機體中以緩慢但顯著之速率進行其DTPA螯合劑之交換。所造成之自由的釷形成不可溶氧化物，緩慢地由身體中清除，而可產生顯著之副作用。本申請案允許藉由改進的遞送過程中取代較少毒性、有效清除、高順磁性離子或多原子金屬-原子絡合物而獲得重大優點。

鉻，呈 $^{51}\text{CrO}_4^{-2}$ 之形式，已被廣泛使用當做血小板與紅血球之輻射核種標記用臨床藥劑。六價之鉻

五、發明說明(17)

酸鹽在紅血球內被變換成 Cr^{+3} 陽離子，緊密結合於血紅蛋白（但並非不可逆）。 ^{51}Cr 以每天 0.93% 之平均速率由紅血球排出。此並未被身體再利用，而是由排泄路徑予以有效清除。同時，在人類而言毒性低，甚至劑量較大時亦然。依據研究，其中，嗜中性白血球、腫瘤細胞及其他生物學標靶已在試管中被標記， $^{51}\text{CrO}_4$ 已被證明可結合於若干細胞骨骼與細胞質蛋白（肌動球蛋白及血紅蛋白），而且亦結合於腺嘌呤核甙酸。同時亦已證明，在較高濃度於試管中為無毒性，如藉由細胞之新陳代謝、DNA 合成與細胞分裂之靈敏的度量予以評估者。

當做 MRI 對比劑加以試驗時，與釷 (+3) 比較，鉻 (+3) 僅有中等之能力，在任何金屬離子中，釷有最大之未配對電子數量 (7)。以此基礎，低 - 分子 - 重量釷螯合劑， $\text{Gd}=\text{DTPA}$ 被開發當做第一臨床 MRI 對比劑，雖然其小的保留量（通常小於 0.5%）實質上較保留之鉻之相當量更有毒性而且鉻較釷更完全地被清除。

超順磁性化合物

有一類之高順磁性化合物其各個分子含有多數個高磁性離子，這些離子有平行自旋向量。雖然此種分子內順磁性耦合不表示可發生巨觀鐵磁性行為，但的確表示所形成之化合物有非常強之順磁性。因此，此種化合物被稱為“超順磁性化合物”。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

發明說明 (18)

Bino氏等人所作之最近的論文 "[Cr₄S(O₂CCH₃)₈(H₂O)₄]: 鐵磁性耦合Cr₄S 群有自旋6 基態", 於9/16/88 發行之 Science 第1479頁指出, 鉻之順磁能力可藉由重新配方成為四個配價鉻離子之分子內鐵磁性耦合群, Cr₄S(O₂CCH₃)₈(H₂O)₄⁺², 予以顯著提高。此種新的二價鉻-有機絡合物陽離子有12個未配對電子(為釷之1.7倍)以及磁性自旋S=6(基態)。分子中之Cr⁺³ 原子之有效磁矩被增大, 因為配價狀態之穩定化使分子內反鐵磁性減為最小之故。

Bino氏等人之論文提及將所揭示之陽離子當做"自旋標籤"使用。(自旋標記研究通常為試管中之研究)。Bino氏等人之論文亦說明, 陽離子上之水配合基係潛在地不安定, 因此, 水合位置可提供配合基結合位置。

此種4-鉻-硫-醋酸鹽絡化物非常有利於製備高效能而低毒性之MRI 對比劑。然而, 其小的分子尺寸將使之與總血管外(血漿+細胞外)水分自由地平衡(如Gd-DTPA之情形), 因而降低其效能與腫瘤選擇性。

聚合物載體之運送特性

本申請案揭示藉由絡合或輓合一個超順磁性絡合物例如Cr₄S(O₂CCH₃)₈(H₂O)₄⁺² 於聚合物或微球載體, 限制其生物分布、增加其腫瘤局部化之選擇性、與將其旋轉關連時間減慢而將其質子鬆弛性放大, 可獲得重大優點。

五、發明說明(19)

本發明人在較早期之申請案中已經描述一種方法，藉由對於水溶性生物相容性碳水化合物聚合物（包括葡聚糖）之輻合，將順磁性對比劑（包括Gd-DTPA）之化學效能（質子鬆弛性）與腫瘤選擇性提高，上述聚合物之分子尺寸分布由自正常微血管過濾出之截止尺寸（大約15,000 daltons）以上至迅速自腎臟清除之截止尺寸（大約45,000 Daltons）之範圍。

最適尺寸範圍

腫瘤吸收之選擇性係由聚合物尺寸以及微血管表面特性之特性變化與惡性腫瘤微血管之多孔性增加予以造成。此乃允許聚合物種類（介於15,000與45,000 Daltons之間）自微血管過濾出或更有效地移送進入血管外室（腫瘤內隙）。由於正常微血管有低的多孔性，聚合物對比劑無法過濾進入周圍正常的組織內。此種利用分子尺寸以達成選擇性分隔之性質：1）有利地導致較陡峭之對比梯度而且腫瘤與正常組織之間之強度差異提高，而且2）有利地產生腫瘤邊緣之高度分離的識別特徵。

內皮結合

腫瘤局部化亦藉由聚羧化與聚硫酸化聚葡萄糖和多元醇包括聚甘油之內皮結合特性予以容易化。（簡單之多糖通常不會黏附於內皮壁，除非多糖含有帶電荷之表面基例如硫酸鹽，羧基，或二羧基）。

在本案中新認識到，此種內皮結合係可逆的，而且，

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明(20)

之速率遠較慢於由正常組織之內皮釋放出
此種結合之物質由腫瘤微血管內皮釋放^A出者。此種在病
巢之長時間結合導致血管內皮結合位置附近有選擇性加
強吸收進入腫瘤間隙膠質內。

超內皮遷移

已經證明，小分子（例如葡萄糖與胰島素）有活性的
內表移送。然而，除了本申請案以外，尚無任何已知之
研究已證明較大的分子或以載貨格式被搭載之分子可有
此種移送。現在由本申請人之組織學研究得知粒子與分
子聚集物（直徑大於大約2nm）之超內皮遷移可藉由布
施適當之表面塗層（最好為糖氨基烯糖
(glycosaminoglycans)或陰離子多葡萄糖或聚甘油）予
以加速。（糖氨基烯糖宜包括肝素衍生物與肝素碎片但
亦可包括皮羥素硫酸鹽(dermatan sulfate)，軟骨素硫
酸鹽，及其他天然或改良糖氨基烯糖，包括半合成羧化
糖氨基烯糖）。此等表面塗層以多重方式黏結於受體或
抗體原，或由內皮予以合成或者雖在其他部位合成但緊
密連合於內皮表面者。（參見Ranney氏，35 Biochem.
Pharmacology 1063 (1986)，於此併為參考文獻）。此
種多重方式結合典型地包括：每個分子在5個位置以上
有互補分子互作用，而且被稱為黏附，表面黏附或生物
學上之黏附。

在滲出之後，此等聚合物對比劑經由腫瘤間隙膠質而
滲濾，其滲濾速率比小的分子（包括Gd-DTPA）之滲濾

五、發明說明(21)

速率慢大約3至8倍。此乃使聚合物對比劑在腫瘤間隙內保留較長之時間(超過2.5小時,而Gd-DTPA之保留時間僅約10~45分鐘而已),而且保存於活的(對壞死的)亞區部位內。此兩種特性:1)允許對比劑在顯像前之較早的時間被注入體內(因而允許在顯像室外面預先施用此對比劑);2)允許以早期之治療後時間間隔(大約6~30小時)在反應之腫瘤亞區監視腫瘤治療效果;以及3)允許以微米以下之解析度區別活的與非活的腫瘤。此乃因為死的亞區停止灌注(因而停止吸入圖像增強劑)而活的亞區繼續灌注而吸收圖像增強劑之故。部分損壞之亞區繼續灌注而且,因為其微血管典型地具有更進一步增大之多孔性(因治療引發之一次或二次血管損壞所致),所以可允許多分散聚合物之較大種類(以及較小者)外滲進入腫瘤膠質內。此部分損壞與可能復原之亞區形成最明亮之圖像強度,因為累積有最大量之聚合物對比增強劑。

本申請之另一個新的教示為,此等陰離子糖氨基烯糖,多葡萄糖與聚甘油(及類似化合物)由腫瘤細胞進行加強之吸收,與同一組織部位中之正常細胞之吸收速率相比較的話。此係根據多葡萄糖載體上之側基之陰離子(帶負電)性質,此等多葡萄糖載體接合於陰離子移送道(孔)之細胞吸收受體,而此等陰離子移送道(孔)典型地被誘發於肝細胞癌(肝癌)中。此種陰離子移送

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(22)

道亦已被發現於目前由本申請人及其他人士所測試之若干其他腫瘤型式中。此等相同的移送道較不發生於正常細胞對等部分中。陰離子小分子與大分子之此種性質促進生命體中之腫瘤細胞對於載體聚合物（及其結合的配合基）之積極的累積。在本文所揭之新方法中，此性質被充分利用來達成延長的腫瘤保留與顯像。

以下之表列揭示聚合物MRI對比劑之某些主要優點，以Gd-DEPA-dextran（40,000, 60,000, 或70,000 Dalton載體尺寸）為例：

1. 增加質子鬆弛性，因為聚合物對小分子組成物而言之較慢的轉動關聯時間（大約4至7倍於Gd-DTPA dimeglumine之T1鬆弛性）。

2. 生命體中之受限制的生物分布（大約10%對35%之體內水分一因為聚合物對小分子而言在正常組織之血漿室中之保留被改進之故）。此優點又導致：

a. 順磁性金屬之劑量減小，以及

b. 毒性減小（因為正常組織吸收量減小）。

3. 改進之身體與腦部顯像，因為腫瘤吸收之選擇性被改進之故。此有助於允許偵測與監視非常小的腫瘤（1-2 mm³）。

4. 在腫瘤邊緣有改進之圖像對比梯度與大小。此有助於允許偵測與監視非常小的腫瘤（1-2 mm³）。

5. 延長的腫瘤顯像增強（較長於2 1/2小時，Gd-

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明(23)

80年6月7日 修正
補充

DTPA dimeglumine僅10-45分鐘而已)。此延長之腫瘤圖像增強允許：

a. 在顯像室外面對病人預施藥劑(此有助於將非常昂貴之顯像設備之利用率最大化)；以及

b. 以不同脈衝參數取得多重依序的適當對比增強的圖像；以及

c. 在對比劑之單一個劑量施用之後將多數個身體部位顯像。

6. 完全可溶性。此提供下列優點：

a. 允許迅速自腎臟清除(如果小於45,000 Daltons)；以及

b. 避免正常肝臟之急劇吸收(不同於Gd-DTPA, Gd-DTPA以大約5-45分鐘進行急劇之肝臟吸收,因而當最適顯像期間內,內特別是當使用T1權重脈衝序列時,肝腫瘤之影像模糊不清)。

7. 將典型注射濃度之滲透性降低(例如,在100mg/ml之注射濃度,每Kg水大約285-330mOsmols)。

8. 可在生命體中以毫米以下之解析度清楚地監視腫瘤之響應(治療後20-30小時)。利用例如Gd-DTPA等低分子重量之對比劑,則不可能如此,因為它很快滲濾通過腫瘤膠質,使功用上重要的活部位與死部位模糊不清。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(24)

9. 每個蛋白質分子有多數個 (例如 25 至 100 個) 順磁性離子可迅速輻合於抗體及其他蛋白質與肽類。(某些例子包括: lymphokines (包括 interleukin 2); cytokines (包括腫瘤壞死因子與干涉因子) 及其他生物藥劑)。此種輻合係藉由下述予以達成, 即, 將整個聚合物 MRI 對比增強劑連結於抗體、蛋白質或肽, 使用簡單之化學反應, 例如 Schiff-base 與水溶性碳化二亞胺反應。此提供充分之放大作用 (因順磁性或超順磁性信號效應之故), 使 (多肽) 蛋白質分子 MRI 由對比增強予以偵測出, 甚至在典型的腫瘤間隙 (1-2 微摩爾) 達成之蛋白質之非常低的組織濃度亦可。

過去已由本發明人證明, 如前一個申請案 (國際申請案 PCT/US88/01096) 所述, IMFERONTM (此為緊密結合之鐵氧化物-葡聚糖絡合物, 大約 110,000 Daltons) 達成增加之分子內順^磁性 (變成超順磁性), 方式相似於 $\text{Cr}_4\text{S}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_8(\text{H}_2\text{O})_4^{+2}$ 。此絡合物被注入病人體內, 以便達成受控制之鐵釋放, 歷經數天至數星期之期間, 以便治療缺鐵貧血症。雖然已藉靜脈注射注入病人體內, 但必須藉由受控制的而非小塊的注入予以達成, 因為與劇毒性有關之離子鐵有小部分會釋放之故。因此, IMFERONTM 通常以肌肉內注射方式施用。在 MR 圖像增強方面, 較大劑量之對比劑之快速靜脈內施用之需求以及此等問題已使 IMFERONTM 不可能有效使用當做靜脈

(請先閱讀背面之注意事項再填寫此頁)

裝

訂

線

五、發明說明(25)

內超順磁性對比劑。然而，此實驗上之證據提供進一步之認同，即，如下文所述，高效能與低毒性之金屬配價組合物可被重新處方形成聚合物對比劑（利用軛合化學作用，幾乎類似於IMFERONTM者）。此種金屬-配價-聚合物對比劑可被使用於腫瘤選擇性MR圖像增強或者提供局部化滯後過熱之用途。

較佳實施例宜使用可生物降解之水溶性聚合物（合成的或由天然源衍生而得者），具有重複之親水性基體（最好為碳水化合物或糖殘餘物）有高頻度之羥基（及／或，在某些實施例，氨基或硫酸鹽）側基者。此聚合物亦包括附加之帶電性功能基，（絡合，螯合或配價形成用之功能基），可包括（但不限於）二胺；季銨或其他反應性氮基；羥基；羧基；醛；羧基；多羧基；氫硫基；硫酸鹽；銻；磷酸鹽；多磷酸鹽；鎂；或其他均同-或混雜-陰離子。此等帶電（或螯合或配價形成用）功能基對於二價或三價金屬陽離子（或對於含有此等二價或三價金屬陽離子之有機-金屬絡合物）在生理學上之溫度pH與有至少大約10⁻⁸（而典型地較大於10⁻⁸）之生成常數。螯合基之軛合於聚合物（或形成共聚物）係在化學條件下而且在溶劑中完成，此溶劑產生完全可溶性（單一）形式之載體而且避免被大聚集物顯著污染。螯合劑／單體之摩爾比宜介於大約1/5與大約1/25之間。螯合劑／單體之摩爾比宜介於1/5與大約1/25之間。此

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明(26)

修正
80年6月7日
補充

圖像增強劑可生物降解成為中間代謝物、快速排泄螯合物、聚合物，齊聚物、單^體或其組合，所有此等對比劑皆有低毒性而且可完經由腎道予以清除。此處所用“低毒性”一詞意謂，在圖像增強劑之可用劑之可用劑量僅有微小之毒效。

微聚集物或微粒子載體之用途

在一種類之實施例中，聚合物載體以微球之形式使用。如上所述，此等微球已被發現（當使其表面適當地與內皮決定因素互補時）可以高度優先性移送通過內皮壁之較多的多孔性部位。此乃特別有利於將所要物質之較高的劑量移送進入變態組織細胞內。

此種微球之直徑最好介於0.2與250微米(micron)之間。微球之基質以碳水化合物為宜，而且可為例如亦具有多價結合能力之肝素等等碳水化合物。聚葡萄糖(Dextran)。此種微球碳水化合物基質可依需要含有：露出的或隱藏的內鹽亞胺（或肽、多肽、或藥物），能夠結合於內皮表面決定劑、酶、表內皮或下內皮物質。（註：微球基質可被覆後以此種黏結物質）。

在此實施例中，本發明所揭述之新物質之微球會優先（而且以較長之存留時間）在腫瘤（或其他生物學上之損害部位）之附近結合於內皮細胞（或結合於上皮細胞及其密切關連之細胞外構造）。此種優先結合導致優先的感應，因為結合之微球可以在例如小於10至15分鐘內

五、發明說明(27)

80年6月7日 修正
補充

完全或部分地被包封。較可取之微球與內皮細胞之相互作用可產生內皮細胞之感應以進行暫態分離或開啓。內皮細胞之開啓乃使底下之物質露出以便發生結合(理想上)。

本申請案提供改進之方法與組成物，以便對鐵磁性耦合之圖像增強劑、對比劑或頻譜移位劑做選擇性腫瘤局部定位。此乃允許利用核磁共振顯像或光譜學技術由活的動物取得腫瘤、組織或器官圖像或光譜等資訊大有改進。

附加新穎組成物

應予注意者，本申請案不但揭述許多新方法，而且揭述許多新穎的組成物如下文更詳細說明。

本發明之新穎的教示包括：使用(I)鐵磁性耦合多層順磁性離子群(下文亦稱為"超順磁性絡合物")，此種離子群係藉絡合(包括離子配對)或共價軛合予以多重連合，(II)可溶性、親水性、生物相容性、可排泄之聚合物載體，包含重複之親水性單體，或(III)最終聚合物之單體或齊聚物子單元，當與順磁性離子群組合時可與此離子群連合而形成"鏈內"混雜聚合物，且其中，聚合物或聚合物子單元(或由天然源衍生而成或合成的)含有重複之單體，有高頻度之羥基、羧基、醛、羧基、硫酸鹽、磺酸鹽、銦、磷酸鹽、麟酸鹽、磷、胺、氨基或季銨基，單獨地或組合於聚合物上，而且，聚合物有

五、發明說明(28)

80年6月7日 修正
補充

小於大約 12 nanometers 之分子直徑而且含有小於大約 5% (W/W) 交連的或微聚集的種類，所有皆屬於低毒性。後述之基群係用以將超順磁性絡合物以非共價方式結合於標靶（包括腫瘤）微血管內皮細胞，或結合於前述兩者。

聚合物對比劑亦可視需要使用賦形劑抗衡離子予以組成以達成電荷平衡。此種賦形劑抗衡離子可包括例如有機胺，宜含有 N-甲基葡萄糖胺 (meglumine)。

主要較佳實施例之超順磁性絡合物使用一個以四面體方式配價之中心硫原子，周圍有四個以八面體方式配價之鉻原子，利用架橋配合基（連接成對 Cr 原子）予以穩定化。在例 10 之實施例中，使用八個架橋配合基，而且皆屬於醋酸鹽基。然而，在其他實施例而言，可使用其他架橋配合基，及／或不同數量之架橋配合基。

可選用之載體組成物

最宜使用之聚合物為肝素（或 heparan 硫酸鹽），DTPA- 羥乙基 - 澱粉 (DTPA-HES) 或 DTPA- 葡聚糖。然而，許多其他之載體聚合物當然可採用。應予注意者，較佳之聚合物分子係親水性的，此乃提供可靠 NMR 結果之必要環境所必需者。

某些其他較佳聚合物種類包括：其他葡聚糖、葡聚糖硫酸鹽、葡聚糖羧酸鹽、皮糖素硫酸鹽、軟骨素硫酸鹽，戊聚糖多硫酸鹽、羥乙基澱粉、羧化羥乙基澱粉或

五、發明說明(29)

80+6月7日 修正
補充

CARBETIMERTM (商標名), 羧化經乙基澱粉及羧化葡糖聚糖, 其中羧化反應基主要包括多數個緊密配置之羧化物, 因而能夠與二價或三價金屬離子發生螯合型或配價型之結合, 或與含有此等金屬離子之多原子有機金屬絡合構造相結合。

聚合物中之帶電基之位置可利用熟練於技術之人士所周知之方法容易地加以修改, 例如, 將丁二醯鹽基或戊二醯鹽基導入而使電荷離子基由聚合為基底之構造中伸出。因此, 如果需要將送給聚合物載體分子之多原子單元之親合性提高, 則聚合物之構造可依此方式隨意加以修改使達成較佳之配合。

可選用於超順磁性絡合物中之架橋配合基

超順磁性絡合物中之架橋配合基不需限於醋酸鹽基。可採用許多種有機羧化物。某些可選用之架橋配合基之例子包括: 甲酸鹽; 甲醯; 戊醯醯; 甘氨酸鹽; 丁二酸鹽; 乙醯丙酮鹽; 丙二酸鹽; 丙酸鹽; 戊二酸鹽; 氧肟酸鹽; 草酸鹽; 2-溴醋酸鹽; 2-硫醋酸鹽, 硫醇醋酸鹽; 以及, 硫代乙醇酸鹽。

反應性架橋配合基之用途

下述實施例, 含有至少某些甘氨酸鹽當做架橋配合基。下列優點, 即甘氨酸鹽含有可幫助結合之位置。因此, 另一個次要之教示為架橋配合基應含有帶電及/或可活化之位置。

可選用之順磁性種類

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(30)

80年6月7日 修正
充

使用於超順磁性絡合物中之順磁性離子最宜採用鉻，但亦可選用下列種類之一種或多種：鐵、鎳、錳、鈷、鈮、鉬、鎢、銅、鉑（特別是 ^{195}Pt ），鈾、釷、鎢、鎢、與鈦。

可採用之安定化陰離子

超順磁性絡化物 $\text{Cr}_4\text{S}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_8$ 宜利用水予以安定化，因此，此絡合物陽離子之完全化學式為 $\text{Cr}_4\text{S}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_8(\text{H}_2\text{O})_4^{+2}$ 。然而，可採用其他安定化種類，例如硫酸鹽，鹵化物、硝酸鹽、羧酸鹽、磷酸鹽、或其他安定化陰離子。（註：當結合物於內皮細胞或上皮細胞時，此等陰離子當中有某些陰離子會被置換）。

附加新穎方法

本申請案亦揭述一般可應用之方法，將所要之小的多原子構造作選擇性移送進入腫瘤或其他具有增強血管多孔性之部位內。應予注意者，此等新穎的教示不但可應用於所述之磁共振顯像方法，而且可應用於許多種其他之診斷與治療用途。

改進之過熱方法

本申請案亦提供改進之方法，將過熱劑作選擇性之腫瘤或腫瘤細胞局部定位。本申請案亦提供一種方法，利用腫瘤定位劑之微波遲滯過熱在腫瘤或腫細胞中誘發選擇性之過熱，使對於健康組織之損害減小。在此類之實施例中，未局限於變態組織內之過熱劑部分不可能誘發

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

打

線

五、發明說明(31)

其他局部性過熱，因為幾乎所有此剩餘部分會在血管壁上或非常靠近於血管壁，即，會在有效冷卻之區域內。

例如，揭述之一個實施例使用選擇性移送機構以提供選擇性局部化遲滯加熱。於此實施例，聚合物包封之超順磁性物質之移送被用以達成腫瘤組織中之選擇性澱積。在腫瘤組織中之順磁性物質之高密度使吸收RF能量之斷面大幅增強。因此，當RF能量被施用於誘發加熱時，腫瘤部位會優先被加熱，如吾人所希望。因此，癌細胞可被殺傷而對健康組織之損害為最小。

同樣地，所揭述之新穎的選擇性移送方法亦可被用以移送可強化X-光、輻射核種、或超音波顯像之物質。

改進之治療方法

在另一類可選用之實施例中，所揭述之新穎的移送方法可被用以將化學治療物質優先移送進入腫瘤內，如下文所述。

圖式之簡單說明

本發明將參考附圖加以詳細說明，附圖顯示本發明之重要的樣品實施例而且併為本說明書之參考文獻。附圖中：

圖1顯示可使用於所揭述方法之一個實施例中之樣品超順磁性絡合物之透視圖。

圖2以示意圖顯示適用於所揭述新方法中之核磁共振顯像系統。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(32)

80*6月7日 修正
補充

圖3 為微球完全移送橫過內皮(或上皮)組織示意圖

圖4 為經染色之組織之像片,顯示微球限於局部位置之情形。以此像片之比例尺,微球以1至2 μ m直徑之小的灰色圓形或橢圓形點顯現。

圖5A-5E 顯示有關於另一種超順磁性絡合物之製作之紅外線光譜資料,此種超順磁性絡合物可代替圖1所示者使用。圖5A顯示 $\text{Cr}_4\text{S}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_3$ 在92℃水中以甘氨酸加熱時之反應產物之紅外線光譜圖。圖5B顯示 $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$ 在92℃水中以甘氨酸加熱時之反應產物之紅外線光譜圖。圖5C顯示 $\text{Cr}_4\text{S}(\text{Ac})_3$ 在醋酸酐中回流若干次時之反應產物之紅外線光譜圖。圖5D顯示(僅只) $\text{Cr}_4\text{S}(\text{Ac})_3$ 之紅外線光譜圖(有藍色或綠色),而圖5E顯示(僅只)甘氨酸之紅外線光譜圖。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(33)

較佳實施例之說明

茲參照目前之較佳實施例說明本發明之許多新穎的教示，其中，此等新穎的教示有利地應用於利用超順磁性小分子之選擇性移送之 NMR 顯像之特殊問題。然而，應予瞭解者，此實施例僅為本發明新穎的教示之許多有利的用途之一例。例如，本發明之新方法有許多種型式可依需要使用於移送音波圖像增強劑或治療用物質。一般而言，本申請案之說明書所作之陳述不界定申請專利範圍所述之任何一項發明。又，某些陳述可適用於某些發明之特點但不適用於其他者。

圖.2 顯示核磁共振顯像 (MRI) 機器之一例，可用於病人之全身顯像。病人 240 在滑動枱 230 上被插入大型電磁圈繞組 210 之內部。大型線圈 210 (可為水冷却或超導的) 施加一定 (DC) 之磁場，典型地，0.5 至 1 Tesla。(此磁場成分被稱為 B₀ 場)。偏壓線圈 220 對此場施加一個梯度場，如上述。最後，使用探測線圈 (可動的而且在此圖中未顯示出) 施加上述之 RF 脈衝。採用不同形狀之探測線圈以將身體之不同部位顯像，而且，探測線圈之形狀通常幾乎配合於要顯像之部位之表面之形狀。

本發明提供一種改進之 NMR 顯像方法，藉此，使 NMR 系統偵測腫瘤之能力大幅增強。此係藉由選擇性地將圖像增強，頻譜移動響應劑導入變態組織內予以達成。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(34)

本發明之一個新穎的教示包含使用(I)鐵磁性耦合多層順磁性離子群(下文亦稱為"超順磁性絡合物"),此種離子群係藉絡合(包括離子配對)配位或共價軛合予以多重連合;(II)可溶性、親水性、生物相容性,可排泄之聚合物載體,包含重複之親水性單體;或(III)最終聚合物之單體或齊聚物子單元,當與順磁性離子群組合時可與此離子群連合而形成"鏈內"混雜聚合物,且其中,聚合物或聚合物子單元(或由天然源衍生而成或合成的)含有重複之單體,有高頻度之羥基、羧基、羰基、醛、硫酸塩、磺酸塩、釷、磷酸塩、砷酸塩、磷、胺、氨基或季銨基,單獨地或組合於聚合物上;而且,聚合物有小於大約12 nanometers之分子直徑而且含有小於大約5%(W/W)交連的或微聚集的種類,所有皆屬於低毒性。後述之基群係用以將超順磁性絡合物以非共價方式結合於標靶(包括腫瘤)微血管內皮細胞,或結合於前述兩者。聚合物對比劑可使用賦形劑抗衡離子予以組成以達成電荷平衡。此種賦形劑抗衡離子可包括有機胺,宜含有N-甲基葡萄糖胺(meglumine)。較佳之聚合物包括肝素、heparan硫酸塩、葡聚糖、葡聚糖羧酸鹽、^人皮素硫酸塩、軟骨素硫酸塩、葡聚糖硫酸塩、戊聚糖多硫酸塩、羥乙基澱粉、羧化羥乙基澱粉或CARBETIMERTM(商標名),而特別是肝素、羧化羥乙基澱粉與羧化葡聚糖,其中,羧化反應基主要包括多數個緊密配置之羧化物,因而能夠與二價或

五、發明說明 (35)

三價金屬離子發生螯合型或配價型之結合，或與含有此種金屬離子之多原子有機金屬結合構造相結合。

鐵磁性耦合順磁性結合物包括分子配價化合物，含有以每個分子配價有兩個或兩個以上之數量存在之順磁性金屬離子，其中，順磁性金屬離子包括下列之一種或多種：鉻、鐵、鎳、錳、鈷、鈾。鉬、鎢、銅、鉑（特別是¹⁹⁵Pt）、鈇、釷、鎢、鎢或鈦；而且利用外部絡合物質使配價結合之金屬離子在鐵磁性或超順磁性分子內絡合結構中安定化。較佳之金屬離子包括鉻與釷，而較佳之外部結合物質包括有機硫酸鹽及其衍生物，羧酸，特別是羧酸鹽離子。分子之配價基亦可含有中央之多價安定化離子或元素，於此場合，較可取之元素包括硫。鐵磁性耦合順磁性絡化物（超順磁性絡合物）宜有大於約3/2之淨核子自旋而且未配對之電子有7個以上。它有不安定之水基與靜電荷或反應基或結合位置，允許以化學方式，其價方式或非其價方式連合於載體聚合物。

在操作中，可在NMR顯像行程中執行時間領域窗孔化，而使最短鬆弛時間之原子優先被看見。或者，可採用高脈衝重複率，使最長鬆弛時間之組織保持飽和狀態。

化學連合之結合物特徵之一種較可取的基包括羧酸鹽，氧，金屬（特別是鉻“氫氧化物”）甘氨酸胺，以及，淨陽離子（正）電荷。

五、發明說明 (36)

一較佳實施例包含 " 提供超順磁性配價基 $\text{Cr}_4\text{S}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_8(\text{H}_2\text{O})_4^{+2}$ 當做與大約 22,000 Daltons 肝素之非共價絡合物，其中，超順磁性配價基經由其陽離子電荷結合於肝素之負電性硫酸鹽基，結合之摩爾比率為大約 1 個超順磁配價基對肝素之每 2 至 25 個單體，而所有或部分（或無）過剩自由硫酸鹽基藉由與 N-甲基葡萄糖胺之離子配對予以平衡。另一種較佳實施例包括類似之組成，其中，超順磁性配價基與低分子重量羥乙基澱粉（小於約 50,000 Daltons）相互絡合，此羥乙基澱粉亦載有藉共價鍵結合之二乙烯三胺五醋酸 (DTPA) 側基，其摩爾比率大約每至 25 個單體有 1 個側基。另一種較佳實施例包括類似之組成，其中，超順磁性配價基與 40,000 或 60,000 Daltons 之葡聚糖相互絡合，此亦載有藉共價鍵絡合之二乙烯三胺五醋酸 (DTPA) 側基，其摩爾比率大約每至 25 個單體有 1 個側基。在此類之另一個較佳實施例中，超順磁性結合物絡合於葡聚糖硫酸鹽或戊聚糖多硫酸鹽之硫酸鹽基。

剛剛說明之肝素超順磁性配對離子絡合物較適用於靜脈注射後由肺臟，肺臟腫瘤及其他肺臟損害部位作選擇性吸收以便達成 MR 圖像強或遲滯過熱，或在選擇性動脈注射後由實體腫瘤及其他病巢吸收。使肝素之硫酸鹽基有充分之部分（大於 30% 為宜）未被抗衡離子平衡掉，則可使肺臟吸收量增大。更完全地將肝素之負硫酸鹽

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明(37)

基以超順磁性絡合物或賦形劑抗衡離子(包括N-甲基葡
萄胺)或兩者完全平衡,則肺臟吸收量可降低而促進有
系統的接近。

有剛剛說明之超順磁性物質之 DTPA-葡聚糖各 DTPA-
羥乙基澱(DTPA - HES)粉較適用於靜脈或動脈注射時在
疾病(包括腫瘤)之有系統分布位置作選擇性吸收,MR
圖像增強或遲滯過熱。此係根據下列事實,即,較低酸
性羧酸(對硫酸鹽而言)側基有降低之肺臟清除,使對
於正常(對損周部位包括腫瘤而言)內皮細胞之黏結減
弱。此亦根據下列事實,即,DTPA-葡聚糖和 DTPA-HES
聚合物與其內皮細胞結合取代基(包含 HEPARAN 硫酸
鹽)之分子互補性較低。

第二較佳實施例包含:提供超順磁性配價基
 $\text{Cr}_4\text{S}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_8(\text{H}_2\text{O})_4^{+2}$ 當做與生物相容性水溶
性可排泄之碳水化合物聚合物(特別是大約 40,000 或
60,000 Daltons 之葡聚糖)或與小於約 50,000 Daltons
之羥乙基澱粉之共價絡合物,其中,超順磁性配價基經
由鉻之金屬氧化物鍵結合於葡聚糖^或羥乙基澱粉之羥基,
結合之摩爾比率為大約 1個超順磁性配價基對碳水化合
物之每 2 至 25個單體。另一種較佳實施例包括類似之共
價軛合物,即, $\text{Cr}_4\text{S}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_8(\text{H}_2\text{O})_4^{+2}$ 共價軛
合於羧化碳水化合物聚合物,特別是軛合於大約
40,000或 60,000 Daltons DTPA-之葡聚糖或軛合於大約

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (38)

50,000 Daltons 以下 DTPA-之羥乙基澱粉，其中，超順磁性配價基經由鉻之金屬氧化物鍵而結合於聚合物上之 DTPA 側基之羧基氧。

在某些例子中，可將結合之超順磁性物質與聚合物載體分離，使用鍵長度介於約 4 與 8 個碳原子之間之鍵合劑。在下述環撓下，此尤為可取，即，a) 超順磁性物質為大型分子，或 b) 須將聚合物與鍵合劑之間之鍵安定化防止溶解（包括水溶解與酯浴解），在不尋常情形下，可由超順磁性物質之取代基予以催化。

在另一種實施例中，提供一種方法將磁性物質對羧化碳水化合物聚合物之空間位置關係加以修改。此方法包括：以較高二官能酸（包括丁二酸為宜）衍生碳水化合物聚合物而形成丁二醯化聚合物，在聚合物與超順磁性物質之間有 4-碳間隔物，超順磁性物質經由各丁二酸鹽鍵合劑之自由羧酸鹽基而輻合於聚合物。

雖然前述較佳之輻合方法已集中於醯與羧酸鹽鍵合，但並不排除其他鍵合劑，而在某些場合較為可取。此等鍵合劑包括醛、胺、醯胺、碳化二亞胺、鹵素-活化碳水化合物基，及其組合。

第三較佳實施例包含：提供上述對比劑之物理上微球形式，其中，球之直徑在 0.1 至 250 微米之範圍，而且，粒子宜由其配對之聚合物-超順磁性離子絡合物形成或由聚合物與所要捕集之物質之簡單混合物予以形成。基

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

修正

80年6月7日

補充

五、發明說明(39)

質聚合物與賦形劑宜含有粒子重量之50-75%。粒子宜藉由下述方式予以製備，即，相乳化（較大者）或高壓均化（較小者），然後將聚合物基質加熱或化學方式安定化，以及，以有機溶劑將油相萃取出，有機溶劑包括丙酮、醚或己烷、而以丙酮為宜，丙酮亦可含有小量之生物相容性清潔劑便將表面安定化，最好為大約0.05至

0.5% (W/W) 之 Tween 80

或

(deoxycholate)。較小之粒子係藉高壓均化予以提供

。加熱或化學方式安定化之程度決定粒子在再水化之後維持其物理形狀以供生命體使用之維持時間有多長，而且亦決定內部捕集之超順磁性物質有多快速成為可用，水化、露出或釋放，以便修改血漿，細胞外基質（或基質水）或細胞內細胞質取代基（或水）之生物化學環境。最好，碳水化合物基質之加熱安定化進行約30秒至5分鐘，以便使基質充分安定化而捕集之物質變成化學上露出經過大約15分至30小時之時間。為達成MRI對比之

最好在注射大約15-20分鐘以內，但在某些環境下，尤其涉及監視由選擇性局部化微載體有控制地釋放藥物者，此 $t_{1/2}$

誘發與遲滯加熱之放大，捕集之物質之釋放 $t_{1/2}$ 可頗為較長。又，為達成MRI對比增強，捕集之物質必須被水化（釋出）以便影響周圍之可擴散水質子，然而，為達成遲滯加熱，捕集之物質完全不需釋出，而在仍被捕集狀態亦可作用，如果粒子內之平均超順磁澱積物之巨觀領域尺寸充分大而可以發生有效之遲滯（大於約0.5微米為宜）。或者，捕集之取代基被釋出而後藉由細胞外

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明(40)

80年6月7日 修正
補充

基質結合或細胞之處理予以再濃縮，以在組織中達成有效之遲滯反應。

較小之粒子尺寸（小於3微米，特別是小於0.8微米）適用於利用靜脈內注射作有系統的施用以及作選擇性之動脈施用於重要之動脈循環。大於5微米特別是大於100微米之較大粒子尺寸適用於有血液源之選擇的器官之化學栓塞，特別是包括肝臟，利用選擇性動脈施用，以及，適用於藉機械方式直接導入腫瘤塊內或體腔內。

例如在心臟或大腦血管中之血液流動（或灌注）圖像之顯著增強可藉由可溶性聚合物圖像增強劑予以達成，而且以微球形式實施更為有效。

利用聚合物微球超順磁性物質達成MRI增強作用之重大優點係進一步降低劑量與任何潛在的毒性，使其劑量與毒性皆較小於僅由簡單（低分子重量）超順磁性物質單獨達成者。

與其他聚合物與粒子狀金屬氧化物，螯合物與絡合物相較，本發明之特殊優點有較快速之生物降解與金屬清除時間，以及，因而達成之較短的再顯像時間間隔。

本發明之圖像增強劑，以可溶或微球形式，可容易重新組成以供動物與病人使用。此重新組成包括簡單之渦動式混合，與蛋白質基底之微球所用之清潔劑中之音波振動相對照。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明(41)

80年6月7日 修正
補充

本發明之圖像增強劑可容易使用於包含施用順磁性或鐵磁性之任何MRI偵測系統。與較新之快速RF脈衝序列配合，有特殊之優點，降低天然之組織對比以縮短圖像取得時間與增加診斷病人數量。本發明之圖像或光譜增強劑允許較短之圖像取得時間而有令人滿意之內部解析度。此等時間一般適宜產生令人滿意之內部圖像，因為超順磁性物質與總對比劑每單位所產生之增強效果與圖像對比較大之故。

小量之monoclonal抗體、非肽與肽^標質爾蒙，lymphokines, cytokines及其他受體結合物質被^標以一個或多個新穎的（而最好為聚合物）圖像增強劑，達成大量較無毒性超順磁性分子之選擇性局部化，是為診斷上之重大進步，可供將來使用。

小量之載體聚合物，微球達成大量較無毒性超順磁性分子之選擇性局部化，是為治療上之重大優點，供將來配合過熱增強而使用，利用遲滯加熱以及遞送與監視疾病部位中之標記治療藥劑局部化。

因為由此等超順磁性物質獲得高的MRI對比而且在損傷部位之存留時間大幅延長，所以本圖像增強劑之使用允許在單一次藥劑施用後以增強模式取得之一系列圖像之數量增加。

因為組成本圖像增強劑所用之載體有選擇性之保留，可獲得極清晰之腫瘤邊緣而且活的與非活的腫瘤亞區之

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明(42)

80年6月7日 修正
補充

區別可以顯著地改進。此有重大優點，即，允許對於化學治療與輻射治療之腫瘤反應可在較早期之治療後時間與毫米以下解析度予以監視，在小的腫瘤塊生長至可藉電腦軸向斷層攝影(CAT)與輻射核種掃描予以偵測出之體積以前數星期，即可提早監測。

由化學觀點，本發明之某些優點可摘述如下。當MR圖像增強劑含有超順磁性物質時，各超順磁性物質呈現鄰近磁核（例如，質子）之增大的鬆弛性，因而提供較大之T1信號增強。此增大的鬆弛性係有關於超順磁性物質受聚合物控制時由其較慢之分子轉動所引起之增大的偶極關連時間。在超順磁性物質與聚合物載體之間不需間隔物基才能獲得最佳之順磁性鬆弛效能，然而，其他用途如果被認為有利時亦可引用間隔物基。

較佳螯合劑-聚合物組合之化學上特性允許容易達成批次一對一批次間之均勻性，以改進製藥處方與容易獲得法規核准。

本發明之許多較佳聚合物，例如某些葡聚糖（40,000與70,000

HW形式），經乙基澱粉，以及肝素、已經個別獲得最後法規核准可供病人施用。此等聚合物之尺寸被最佳化以防止進入正常組織內，但仍允許快速之腎臟清除以及實質上完全之身體清除。又，由於多數個有效能之超順磁物質與各聚合物分子連合，所形成之絡合物與韃合物含

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(43)

80年6月7日 修正
補充

有低滲透性之藥劑，與低分子重量之對等物相比較的話。此種低滲透性藥劑已經證明在若干種類之高危險性（對於腸胃外之施用，此等藥劑宜被配方成為無菌，生理學上平衡的水溶液（或懸浮液），靜脈注射用時其PH為6.5至7.0。或者，此等藥劑可被親液化而且以乾的形式提供以便在施用之前再組合成為生理學上之溶液。對於注射進入體腔（例如膀胱、子宮、輸卵管、鼻竇或腦室-腦脊髓系統），此等藥劑可被配方成為生理學上之溶液（或懸浮液），含有添加之物質（賦形劑）以增加黏性或滲透性。其他添加劑與組成物亦可依據標準製藥程序予以加入。

對於腸胃外之施用，總活性劑（聚合物-超順磁性物質）之濃度介於約0.1%與30%（重量/體積）之間，典型地，介於約5%與25%之間，而最好約20%。可溶性聚合物微球藥劑之劑量視所用之超順磁性物質與施用路徑而變化。下述之劑量係供靜脈注射內。於包括可溶 $\text{Cr}_4\text{S}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_8(\text{H}_2\text{O})_4^{+2}$ 絡合於DTPA-經乙基澱粉，DTPA-葡聚糖或肝素之某些較佳實施例之腫瘤圖像增強，鉻（及硫）之劑量在每公升[△]像增強效果發生於每公升[△]大約0.01毫摩爾或以下。對於心臟血管血液池之增強[△]，較佳之可溶性對比劑之最適劑量發生於每公升[△]體大約0.04與0.02毫摩爾或以下之超順磁性物質。

對於遲滯加熱，微球形式之藥劑在每次治療前大約15分鐘至2小時施用一次或多次，即，利用有系統的靜脈

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明(44)

80年6月7日 修正
補充

注射直接施用於表面腫瘤，或利用動脈內灌注，而超順磁性物質之劑量為 1.0mmol/kg

。遲滯過熱以大約10至150KHZ之頻率由外部振盪磁源導出，其最大能量排代被集中於腫瘤之主要的外部或可成像之塊體。使用微球形式較佳實施例之主要優點在於透過血管施用後，集合（大領域）之金屬之高濃度被選擇地局限於標靶組織之病變的亞區內，此局部化之物質進一步集中於腫瘤之活的最強灌注之亞區內，此亞區需要最大之加熱增強以補償其由於血液流動散熱作用所造成之不成比例的熱量損失。

圖3以示意圖顯示微球如何橫越上皮細胞移送。圖中顯示小的血管310穿過組織320。四個微球301、302、303與304被顯示於不同的通過階段。

微球301最近黏附於內皮細胞壁311。因此，此微球被稱為處於內皮細胞黏附階段。

微球302處於內皮細胞封包階段。當壁311逐漸覆蓋已黏附其上之粒子（例如微球301）時，幾分鐘後即發生此封包階段。

微球303處於另一個滲出階段，在封包之後，完全越過內皮（或上皮）細胞壁311。

最後，微球處於另一個階段，即，經由組織中濾過之階段。

圖4為經染色之組織之像片，顯示塗覆有肝素之亞栓

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明(45)

80年6月7日 修正
補充

塞(0.1 - 0.8 微米)微球在經由尾部靜脈注射後5分鐘完全分布於齧齒類動物肺部組織之肺部局部化情形。以此像片之比例尺,微球以1至2 μ 直徑之小的灰色圓形或橢圓形點顯現。

下列例子係在舉例說明本發明之較佳實施例及其使用於MR顯像或遲滯加熱。此等例子純粹是舉例說明用,而決不限制本發明之範圍。

例 1

DTPA - 葡聚糖之製備

DTPA (二乙烯三胺五醋酸)之環二酐,由 Eckelman氏等人之方法所製備(J. Pharm. Sci. V64, PP 704-706(1975)),以高純度形式 Calbiochem Bhering 公司取得。葡聚糖之完全可溶性 DTPA 衍生物係在反應溶劑中逐步添加7.0g之DTPA環二酐於反應溶劑中之1.72g葡聚糖(Dextran T70, 平MW均70,000 Daltons, M_N 46,000, pharmacia Chemicals),此反應溶液含有 HEPES緩衝劑115 mg/100cc 蒸餾水, PH7.0至8.0。在周溫強烈攪拌1小時,在添加每一整份DTPA 二酐之後,使用NaOH重調整至PH7.0,完成反應作用。

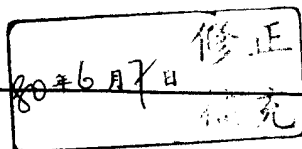
對200容積之0.15N NaCl而後對PH=6.5, 50容積之蒸餾水實施滲析,使葡聚-DTPA糖產品與非結合之DTPA分離。此步驟及後繼之步驟為對本發明人先前所申請之衍生方法之重大改進。(參見美國專利申請案

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線



五、發明說明(46)

799,757 與 086,692 以及 PCT申請案 PCT/US 86/02479, 於此併為參考文獻)。完成滲析之後, 聚合物又被帶至 HEPES 緩衝劑 115 mg/100 cc 蒸餾水, 而第二次與等量之 DTPA 二酐反應如上述。然後, 重複實施滲析如上述。

以分子過濾評估, 98% 之葡聚糖 - DTPA 產品有小於 100,000 Daltons 之分子重量。DTPA-葡聚糖之稀釋溶液 a) 藉由在室溫加強空氣濾過蒸餾予以濃縮至 10% 與 25% (v/v) 之間, 或 b) 冷凍乾燥, 以使長期儲存。依需要添加濃縮之鹽類與緩衝劑, 使最後之製劑在生理學上可以注射。PH 被維持於 6.5 與之間。藉銹合滴定法分析每一 DTPA 與 7 個糖基配合, 每一分子平均含 389 個葡萄糖單元有總共 55.5 個 DTPA。

由起始分子重量 = 10,000 Daltons 之葡聚糖 (Dextran T10 Pharmacia Chemicals 公司) 與 40,000 Daltons 之葡聚糖 (Dextran T40, Pharmacia Chemicals 公司) 合成另兩種可溶性 DTPA-葡聚糖衍生物。所有上述葡聚糖為可溶性而且沒有微聚集物, 如經由串列分子篩濾器 (Amicon 公司) 過濾予以了評估者。

例 2

DTPA-羥乙基澱粉之製備

低分子重量羥乙基澱粉以高純度與可溶性形式由 American Critical Care / DuPont 公司取得, 與 DTPA 之

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(47)

80年6月7日 修正 補充

環二酐反應，而且，聚合衍生物被分離、濃縮與滴定，如例1中所述。

例 3

丁二醯葡聚糖之製備

由Aldrich Chemicals公司取得之高純度形式之丁二醯葡聚糖，與40,000 MW與70,000 MW之葡聚糖反應，而且，聚合衍生物被分離、濃縮與滴定，如例1中所述。

例 4

配對離子金屬配價聚合物絡合物順式鉑-DTPA-葡聚糖(70,000力MW)之製備

減壓乾燥脫水PA-葡聚糖(70,000 MW)，如例1之方式製備，被溶於1.4 cc之無菌水中，在沸水浴中渦旋加熱30秒鐘，趁熱加至70 mg之Platinol™粉末(含3.33 mg之順式鉑， $Pt(NH_3)_2 \cdot Cl_2$ ，而其餘之重量包含賦形劑；Brisol Laboratories)，溶液被強烈渦旋30秒鐘將Platinol™ + 賦形劑溶解，而且，形成之溶液冷卻至室溫而且測其完全溶解為2.4 mg/ml。在鉑配價基與結合於葡聚糖之羧基之間之安定配對離子絡合物之形成利用三個試驗予以確立：a) 在較大於1.5 mg/cc之原始可溶性極限之濃度，順式鉑絡合物之連續可溶性；b) 利用DTPA-葡聚糖之DTPA基，使外來添加之鈣離子絡合減少(使用Orion Instruments離子化鈣分析

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(48)

80* 6月7日 修正
補充

器予以評估)；以及c)在靜脈注射結果混合物於CBA/J
老鼠(Jackson Laboratories)以10 mg/25 gm 體重之劑
消除。沒有搐搦
量後搐搦與發生搐搦相比及只注射相等劑量的DTPA聚葡
萄糖而死的老鼠，而且重要地，其中沒有鈣離子平衡量
，此結果形成之Ca-DTPA-葡聚糖在生命體中完全無毒性
。因此，以試管中與生命體中之判據，順式鉑(例如
PlatlonlTM)以充分之結合安定性絡合於DTPA-葡聚糖
，可媲美於添加之二價金屬陽離子(Ca^{+2})。所形成之順式
鉑-DTPA-葡聚糖絡合物之精確的配價狀態與化學構造未
被進一步闡釋。

例 5

配對離子金屬配價聚合物，順式鉑-肝素(22,000-26,000MW)
之製備

牛肺肝素(Upjohn 公司)以14 mg 乾式添加於280 mg
含有14 mg順式鉑之乾燥PlatlonolTM粉末(Bristol
Laboratories)，混合物溶解於14 cc之無菌水中而且被
渦旋1分鐘而將所有成分完全溶解。在鉑配價基與共價
結合於肝素之硫酸鹽基之間之安定的配對離子絡合物之
形成係藉由兩個試驗予以確立：a)順氏鉑以較高於1.5
mg/cc之自然可溶性極限之濃度(2.25
mg/cc)，順式鉑之連續可溶性；以及，b)在靜脈與動
脈注射於動物體內之後，順式鉑生物分布之改變(參見

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(49)

以下之例子)。

例 6

封包順氏鉑而且有肝素表面塗層之熱安定化羥乙基澱粉-基質微球之製備

羥乙基澱粉 605 mg (Sigma Chemicals) 懸浮於 5.5cc 之無菌水中而且在沸水浴中加熱3分鐘使它成為安定(半透明)乳液, 而且此乳液 5cc 被添加於 1000 mg 含有 50 mg 順式鉑之 PlatinolTM (Bristol Laboratories)。使用 Brinkmann

Instruments 超音波均化器將此混合物在 70cc 之加熱(100℃)棉子油(Sargent Welch)中微乳化處理30秒鐘, 在室溫水浴中將油冷卻, 再斷續均化處理2分鐘, 直到乳液本身到達室溫為止。利用含 .5% Tween 80 (Sigma Chemicals) 之丙^酮(Fisher Chemicals) 將之萃取4次, 而且利用離心處理予以收取而且利用空氣將之乾燥。形成之粒子直徑在 0.1-1.0 微米範圍。

依下述方式將肝素塗敷於粒子表面, 即, 添加 2cc 含有 50 mg 牛肺肝素 (Upjohn 公司) 之水溶液, 添加粒子懸浮液及肝素於 70 cc 之加熱(100℃)棉子油, 以及, 重複實施前節所述之乳化與萃取步驟。形成之粒子直徑在 0.1 至 0.8 微米範圍。肝素表面塗層之存在可藉由下述予以驗證, 即, 使該粒子懸浮於生理食鹽水中以及添加精蛋白質 (Sigma Chemicals)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(50)

修正
80年6月日
完

，一種多價肝素結合劑。此乃產生肝素-塗覆（但不是未塗覆）之粒子之聚集與凝集。

例 7

前述製劑在靜脈注射後之選擇性肺部局部化之生命體試驗

CBA/J 老鼠 (Jackson Laboratories) 經由尾部靜脈注射以 a) 含有肝素表面之微粒子 (如例 6 中者) 以及 b) 可溶性肝素-順式鉑絡合物 (如例 5 中製備者)。注射後 5 至 15 分鐘，動物被犧牲掉，將其肺臟取出並以導管內緩衝甲醛液固定，以 8 微米厚度切割成組織分段，而且此分段使用鉑用之新方法予以染色，包括：微波增強離子型染色 (60 °C x 2 分鐘 x 3 循環)，採用 2% 正亞鐵氰化物試劑與 4% HCL 之 1:1 混合物。藉此方法，微球 (見圖 4) 與順式鉑-肝素之可溶性配對離子絡合物之肺臟吸收以注射後 5 分鐘時間間隔取得資料作成檔案。發生於細胞外與細胞內空間之迅速吸收以及支氣管呼吸上皮細胞與副氣管 淋巴結之附加的組織化學上的陽性，於 10-15 分鐘觀測到。在 Platinol (Bristol Laboratories) 之標準製劑之靜脈注射後，並未觀察到顯著之染色。對於熟練技術之人士，可藉由下述獲得選擇性肺臟局部化之附加的證據，即，含有封包兩性^電素 B 之類似的 (亞栓塞) 肝素-塗覆微球以靜脈注射送入相同之老鼠體內，使肺臟均勻化，而且與注射後 1 至 3 小時回

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

205006

五、發明說明(51)

收之天然兩性素B(deoxycholate組成物, Fungizone; Squibb)相比較, 藥量曾加8倍。(參見美國專利申請案 No.07/033, 432 以及PCT申請案 PCT/US88/01096, 於此併為參考文獻)。因此, 前述組織染色與選擇性肺部載體與藥物局部化之大約增加1倍有關聯。

例 8

前述製劑在動脈注射後之選擇性腫瘤局部化之生命體試驗

順式鉑載體配對離子絡合物維持於生命體中之其他檔案資料依下述方式獲得。右後腿帶有VX2癌之兔子在螢光控制下被插入導管, 而且前述Platinol製劑, 以及標準Platinol之三者以一定之劑量15 mg (順式鉑) / 每隻兔子利用15分鐘之選擇性動脈灌注予注射進入帶有腫瘤之腿內。於15分鐘, 動物被犧牲掉, 而且, 腫瘤與器官被均化, 利用原子吸收作用予以萃取與分析組織鉑濃度, 如表1所示。

表 1

鉑含量 (ng/mg 組織, 濕重量) - Ipsilateral

<u>藥劑</u>	<u>血液</u>	<u>腫瘤</u>	<u>肌肉</u>	<u>肝臟</u>	<u>腎臟</u>
肝素 - 順式鉑 :	2.71	12.24	0.18	5.74	5.88
DTPA- 葡聚糖順式鉑 :	2.14	10.81	0.29	3.47	2.92
肝素 - 塗覆羥乙基澱粉微球順式鉑 :	2.43	14.07	0.20	4.64	5.91
標準 :	2.36	8.40	1.09	6.09	4.09

五、發明說明(52)

又，組織化學上之鉑染色在腫瘤組織上實施，如例 7 所述。此等染色在表 1 中之第 4 組以外之各組中皆顯露細胞內腫瘤細胞（但非正常細胞）鉑。更進者，在第 1-3 組中之腫瘤細胞之細胞內染色顯著較強於紅血球中之血紅素鐵之背景染色。因為血紅素鐵以大約 0.2 摩爾之平均微粒血紅素濃度^度（MCHC），此等結果強烈暗示，與利用標準 PlatinolTM 達成者相比較，腫瘤細胞鉑達於非常高之濃度。對於熟練技術之人士，此亦表示，藉由下述方式可達成遲滯加熱之選擇性腫瘤細胞增強，即，首先施用上述之載體組成物之一個或多個，但此載體組成物與強超順磁性物質穩定絡合，此種強超順磁性物質在其他場合則太小而無法被控制達成此種程度之選擇性局部化。

例 9

利用與葡聚糖⁷⁰共價連合之順磁性螯合劑將人體腫瘤（黑素瘤）裸體老鼠中之異體移植部位之長期增強

強順磁性金屬離子，釓（ Gd^{+3} ），以化學計量螯合於 DTPA-葡聚糖⁷⁰聚合物，其製備如例 1 第 2 節所述（改進之組成物）。瑞士裸體老鼠被注射以 BRO-系人類惡性黑素瘤，而且被允許長大至 1-1.5 CM 直徑。於標準 DasonicsTM 醫學顯像機與 30-cm RF 頭部線圈執行適度 T1-權重之 MR 顯像（TR=500 msec, TE=40 msec），在相當劑量^之 Gd-DTPA-Dextran 70（0.03 mmol Gd/kg）或 Gd-DTPA（0.1 mmol/kg）對比劑之靜脈注射之前與之後為之。Gd-

205006

五、發明說明(53)

DTPA-dextran 與 Gd-DTPA 開始以較短之對照後時間間隔(10分鐘)最適地將腫瘤增強,然而,經1個小時則 Gd-DTPA完全消退,而 Gd-DTPA-dextran 繼續將此等腫瘤強烈地增強,經2.5小時以上(顯像實驗之截止時間)。對於熟練技術之人士,可由此等結果認識到,螯合 Gd 與小的金屬配價基一般而言可由葡聚糖(dextran)或含類似的碳水化合物載體分子^{以共價鍵合成強烈之配對離子連合}大幅地有利於效能(至少增強1/2左右),腫瘤選擇性與腫瘤保留。同時亦可認識到,可使用遠較低劑量之較強的超順磁性物質(包括大約0.01 mmol/kg 以下之劑量,對 Gd-DTPA之0.1 mmol/kg)獲得有效之MRI對比增強;以及,在超順磁性聚合物、配對離子絡合物存在中,可施用較強 T1-權重之脈衝序列。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(54)

80+6月7日 修正
補充

在先前之研究(參見PCT專利申請案PCT/US88/01096)
) $^{153}\text{Gd-DTPA-dextran}$ 以大約50分鐘之 $t_{1/2}$ 由血液中清除
(對Gd-DTPA之 ^{20} 分鐘)。經24小時幾乎完成全身清除
(大於96%清除)。因此,對於熟練技術之人士,可認識
到金屬配價基與顯著較小於50,000MW之聚合碳水化合物
中強烈連合可以主要藉由腎臟通道予以迅速而完全地由
血液與身體內清除。

例 10

$\text{Cr}_4 \text{S}(\text{O}_2 \text{CCH}_3)_8 (\text{H}_2 \text{O})_4^{+2}$ 與帶負電聚合碳水
化合物載體之配對離子分子絡合物之製備

下列帶負電聚合載體供個別添加於與離子配對於鐵磁
性結合順磁性陽離子群, $\text{Cr}_4 \text{S}(\text{O}_2 \text{CCH}_3)_8 (\text{H}_2 \text{O})_4^{+2}$
(Exxon公司)(參見Bino氏等人之論文,如上文所引
述): 肝素(22,000-26,000 Daltons, Upjohn公司);
DTPA-dextrans (40,000與70,000 MW母體碳水化合物
, 如例1衍生而得); DTPA-羥乙基澱粉(50,000 MW母
體碳水化合物, 如例2製備); 以及丁二醛化一葡聚糖
(40,000與60,000 MW母體碳水化合物, 如例3衍生而
得)。各聚合物以濃縮水溶液形式以化學計算電荷當量
或以50%或25%電荷當量添加於 $\text{Cr}_4 \text{S}(\text{O}_2 \text{CCH}_3)_8 (\text{H}_2 \text{O})_4^{+2}$
之濃縮水溶液(以氯化物鹽形式)。於pH 7藉由強烈攪
拌直接混合與加熱1-5分鐘至100°C。N-甲基葡萄糖胺之濃
縮水溶液以足以達成電性中和之量添加以上述25%與
50%混合物之一小部分。對200容積之.15N NaCl

五、發明說明(55)

實施平衡滲析以及將保留之(聚合)物質分析T1鬆弛性(IBM PC 20 NMR 光譜分析器),測試離子配對之安定性。熟練於技術之人士可由順式鉑之絡合於肝素和DTPA-dextran(例4與5中所述)之結果認識到,本例之更帶正電之 $\text{Cr}_4\text{S}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_8(\text{H}_2\text{O})_4^{+2}$ 抗衡離子達成之肝素和DTPA-dextran離子配對較強於例4與5中所述順式鉑金屬-胺配價基所達成之令人滿意的(試管中與生命體中)配對。

例 11

共價軛合於中性聚合碳水化合物載體之

$\text{Cr}_4\text{S}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_8(\text{H}_2\text{O})_4^{+2}$ 之製備

下列兩種中性聚合物載體供個別添加於與離子配對於鐵磁性耦合順磁性陽離子群, $\text{Cr}_4\text{S}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_8(\text{H}_2\text{O})_4^{+2}$.

(Exxon 公司): 葡聚糖與羥乙基澱粉。各聚合物以50 mg/cc添加於 $\text{Cr}_4\text{S}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_8(\text{H}_2\text{O})_4^{+2}$ 之飽和水溶液(以氯化物鹽形式),以使反應接近於軛合。反應係在下述條件下完成,即,鹼性pH=8至10,最初溫度=4℃(而且在另一行程為室溫),輕度-至^中度加熱-(包括45-60℃)而且時間為30分鐘以上至10小時(最好為1-3小時)如先前使用於製造葡聚糖一氧化鐵(ImferonTM, Fisons 公司一參見Cox 氏等人208 Nature 237 (1965); Cox 氏與King 氏, 207 Nature 1202 (1965); 以及, Cox 氏等人, 24 J. Pharm. Pharmac. 513

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(56)

(1972)，於此皆併為參考文獻)者，以促進與葡聚糖或
 羥乙基澱粉之羥基形成鉻酸鹽一氧化物鍵。形成之軛合
 物被滲析與測試，求出安定性與NMR T1 鬆弛性，如例10
 中所述。熟練於技術之人士由ImferonTM 文獻與由知識
 可認識到 $\text{Cr}_4\text{S}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_8(\text{H}_2\text{O})_4^{+2}$ 之水質子不安
 定(參見上文引述之 Bino 氏等人之論文)，而鉻離子
 群頗為安定，因此可與具有中度-至-高度安定性之中性
 碳水化合物形成鉻酸鹽一羥基鍵，因而產生有用之共價
 軛合物。

例 12

共價軛合於聚合碳水化合物 - 羧化物載體之

$\text{Cr}_4\text{S}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_8(\text{H}_2\text{O})_4^{+2}$ 之製備

下列三種羧化聚合物載體個別軛合於鐵磁偶合順磁性
 陽離子群， $\text{Cr}_4\text{S}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_8(\text{H}_2\text{O})_4^{+2}$ (Exxon 公司)
 : DTPA-dextran (如例1中製備)，DTPA-羥乙基澱粉
 (如例2中製備)以及丁二醯葡聚糖(如例3中製備)
 。將飽和濃度之超順磁性離子個別添加至此三種羧化碳
 水化合物，達成 $\text{Cr}_4\text{S}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_8(\text{H}_2\text{O})_4^{+2}$ (以氯化
 物鹽形式)之酯基轉移軛合。反應係在下述條件下完成
 ，即，鹼性 pH=8至10，輕度-至-中度加熱(最好在45-
 80℃)而且時間為30分鐘以上至10小時(最好為1-3小
 時)，如酯基轉移程序之做法(參見Morrison & Boyd
 , Organic Chemistry (1959))。形成之軛合物被滲析

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(57)

與測試，求出安定性與NMR T1 鬆弛性，如例10中所述。熟練於技術之人士由酯基轉移有關文獻與由知識可認識到， $\text{Cr}_4\text{S}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_8(\text{H}_2\text{O})_4^{+2}$ 之水質子不安定，可與碳水化合物醋酸鹽或丁二醯配合基形成鉻-羧化合物鍵而且有充分之安定性可供生命體使用，因而產生有用之共價化合物。

圖1顯示 $\text{Cr}_4\text{S}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_8(\text{H}_2\text{O})_4^{+2}$ 陽離子(氫原子除外)之透視圖。原子以橢球體表示，以表示在室溫時之大致的熱振動範圍。

例 13

包括鐵磁耦合超順磁性絡合物等超順磁性物質之聚合物製劑之NMR顯像之優點

如前述例子所述製備之選擇的 $\text{Cr}_4\text{S}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_8(\text{H}_2\text{O})_4^{+2}$ 聚合物製劑被施以靜脈注射而獲得系統損害部位之吸收(經常使用於放射線科)，或動脈注射(較少用於放射線科)，而獲得區域性腫瘤之高選擇性吸收，特別是肝臟、骨盤、腦部與四肢之區域性腫瘤。熟練於技術之人士可認識到，包括 $\text{Cr}_4\text{S}(\text{O}_2\text{CCH}_2)_8(\text{H}_2\text{O})_4^{+2}$ 與含例如 Gd^{+3} 或 Fe^{+3} 之類似群化合物等超順磁性物質之聚合物製劑較有效能，較富選擇性，較少毒性(特別包括鉻無毒性)，有利地允許包括鉻等順磁性物質之劑量降低至大約0.005至0.01 mmol/每公斤體重。(參見Ranney氏，Contrast Agents in Magnetic Resonance

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

五、發明說明(58)

Imaging (磁共振顯像中之對比劑), Excerpta Medica, 第81頁(1986), 於此併為參考文獻)。亦可認識到, 包括快速顯像之MRI程序(參見Bluem氏等人, 157 Radiology 335(1985), 於此併為參考文獻)以及心臟血管MRI(包括MRI“脈管照像”)(參見Nagler氏等人, 157 Radiology 313(1985), 於此併為參考文獻)在縮短影像取得時間與改進品質而言可由超順磁性能之無毒性對比聚合物大幅獲益。又, 前述例子所述之聚合物順磁性物質標記可用於配合標記治療藥物載體(聚合物或微球)或治療劑本身, 其腫瘤(或其他損害部位)局部化需被監視而且其由載體釋放之速率(生物學上可用率)需在生命體中作非侵入性評估, 可在身體部位內不同深度之多數個損害部位中實施。於此方面, 聚合物超順磁性物質標記甚為有用而且效益提高, 因為效能與選擇性提高而且毒性降低。又, 效能提高可使藥物釋放在標靶組織、器官、腫瘤與感染部位內作較長時間之注射後監視。此等改進係根據本申請案而且部分根據本申請人之較早期所作有關部分類似而較低效能Gd-DTPA-dextran標記之藥物載體導致組織中之局部化與增強MRI偵測方面之研究。(參見Ranney與Huffaker氏之論文, 507 Proc. NY Acad. Sci. 104(1987), 於此併為參考文獻。

例 14

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

205006

五、發明說明(59)

包括鐵磁耦合順磁性絡合物等超順磁性物質之聚合物製劑之遲滯加熱之優點

組織加熱之微不均性代表腫瘤過熱處理之大問題。此乃大部分由鄰近於微血管（於此處因血液流動加大熱量損失）之腫瘤細胞之選擇性存活所造成。對此問題之部分有效辦法係將小的 Fe_2O_3 鐵磁性粒子直接注射進入腫瘤塊內，然後以 10-100 kHz 之頻率施加磁性遲滯加熱於整個局部區域。（參見 Borelli 氏等人，29 Phys. Med. Biol. 487 (1984)。如果注射之磁性物質有 1) 充分之量與 2) 有充分之大領域尺寸可發生有效遲滯增強（包括 0.5-2 微米粒子直徑）。因為前述例子所述之載體／離子群藥劑有顯著改進之腫瘤局部化選擇性與劑量、腫瘤之活的（灌注的）亞區中之保留，以及，改進之腫瘤細胞吸收，所以熟練於技術之人士^{可瞭解到}此等載體／離子群藥劑甚有益於增強由脈盪磁場所誘發之遲滯加熱之性，大小與腫瘤^均細胞選擇性，如果連合之超順磁性藥劑（可藉輻合、離子配對或包封予以連合）在標靶位置處或細胞中集中成為適當尺寸之大領域（至少大約 0.5 微米）的話。以肝素塗覆順式鉑-羥乙基澱粉微球（.1-0.8 微米直徑）灌注之 Vx2 兔子癌之順式鉑組織染色（例 7）顯示由選擇性動脈灌注予以定位之標靶部位中之許多腫瘤細胞，以斑點之圖案形成細胞內染色，其中，斑點染色陽性之直徑在 0.1 至 0.8 微米（= 原來粒子之直徑）之範圍。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

五、發明說明(60)

重要的是，在生命體中之 $Vx2$ 癌中，達成順式鉑之高的（包括大約 0.2 摩爾）細胞內濃度（參見例 8）。此等高濃度與細胞內聚集之組合係由施用肝素塗覆微粒子形式之順式鉑予以達成。此乃顯示超順磁性物質與細胞內累積與聚集之型式與程度，有用於局部放大外來的遲滯加熱。值得注意的，在標準（可溶性、低分子重量）順式鉑之動脈內灌注之後，沒有聚集之染色存在。因此，在本例中，肝素塗覆之 $Cr_4S(O_2CCH_3)_8(H_2O)_4^{+2}$ 經乙基澱粉微球（0.8-3.0 微米直徑）當以動脈注射施用時可當做遲滯加熱放大劑使用，因而可當做生命體中之增強的細胞死亡之誘發劑。

例 15

甘氨酸取代之新多原子 Cr 群

$Cr_4S(O_2CCH_3)_8(H_2O)_4^{+2}$ 基材被製備如 A. Bino 氏等人所述 (Science, Vol. 241, pp. 1479-1482, Sept. 16, 1988)。此基材 0.5 gm 被添加至 50cc 之醋酐，然後添加 0.1 gm 之甘氨酸。混合物在 142℃ 再回流 4 小時，形成黃綠色溶液，在仍然熱之際倒入冷水中。溶劑蒸發後形成黃色結晶體，當被再結晶時可提供紅外線 (IR) 光譜，顯示某些醋酸鹽架橋基之甘氨酸取代以及 $Cr-O$ 與 $Cr-S$ 鍵之保留（圖 5C，以圖 5D 與 5E 代表適當之控制）。特別地，在 1600 cm^{-1} 附近之 IR 帶（圖 5C）為離子化雙配位基甘氨酸之特徵，而 300 與 400 cm^{-1} 間之帶

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明(61)

亦與此一致。~~增加之300與400 cm 間之帶~~亦與Cr-O 和Cr-S 鍵之出現一致。圖 5A與5B顯示降解控制，其中，當使甘氨酸在含水的（質子化）溶劑，水，中於92℃加熱4小時， $\text{Cr}_4\text{S}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_8(\text{H}_2\text{O})_4^{+2}$ 降解到離子鉻（以IR 光譜判據）。此等結果提供很強之證據，顯示形成一般式 $\text{Cr}_n\text{S}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_x(\text{Gly})_y(\text{H}_2\text{O})_z$ 之新穎的多原子鉻原子群，其中，n 為Cr 原子數量，大於1，x 為醋酸鹽數量，介於大約3與7之間，y 為甘氨酸數量，介於大約1與5之間，而 z 為鬆結合之水之數量。在多原子鉻群中含有雙配位基甘氨酸當做新的架橋配合基，提供新的反應^基（帶電的反應基）結合於載體而使整個化合物全然新穎。

例 16

新的多原子鉍群化合物

氯化鉍(3.7 gm, Alpha)與 Na_2S (2.4 gm, Sigma)在冰醋酸與醋酐之1:1混合物25 cc中混合而且在138℃再回流3天。在移除暗紅色鉍陰性濾液之後，淺褐色沉澱物被回收，此對鉍而言在定性上呈陽性，而且，再結晶後，產生水溶性水-安定性化合物，其IR光譜與醋酸鉍一致。重要的是，在羰基(大約 1500 cm^{-1})與C-O(大約 1000 cm^{-1})鍵展延波長中出現若干個增加的帶，強烈地暗示此絡合物之多原子(聚合)特性，因而表示新穎之含鉍多原子絡合物，可配合所揭述之載體使用。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(62)

例 17

安定載體 / 多原子金屬原子絡合物之形成

羧甲基葡聚糖由市場取得而且與 $\text{Cr}_4\text{S}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_8$ (H_2O)₄ 混合。形成之絡合物其 T1 鬆弛性 (R1) 三倍於簡單鉻群，表示鉻群與載體之間之強烈的配對離子結合。 $\text{Cr}_4\text{S}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_8$ (H_2O)₄ 與 (a) 二羧乙基葡聚糖；(b) 肝素；和 (c) 葡聚糖硫酸鹽執行同樣之混合。形成之配對離子絡合物對於在 0.15 摩爾 (等滲壓) 至 0.5 摩爾鹽水中之滲析甚為安定。

進一步之修改與變化

熟練於技術之人士可認識到，本申請案描述之新觀念

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (63)

可廣方面應用。又，較佳實施例可依許多方式修改。因此，應予瞭解者，上述之修改與變化僅供舉例說明用。此等例子有助於顯示發明觀念之某些範圍，但此等例子並未完全涵蓋所揭新觀念之所有變化之整個範圍。

例如，雖然本較佳實施例主要針對顯像，但提供之選擇性移送優點亦可用以增強人體 NMR 光譜術之性能，如果需要的話。

另一例子，亦可能將載體基與小的治療絡合物結合。硼（或提供硼之一個位置之 boroleptic 基）或順式鉑（更精確地，順式 - 二氯二胺鉑）與諸如上述之載體基相結合是有利的。活性劑可被選用以提供化學治療衝擊或提供輻射治療之敏感化或增強。

例如，雖然所揭述之創新特別有利於作選擇性移送之腫瘤位置處，但亦可配合其他型式之疾病或症狀使用，以選擇地找出“血管 - 可滲透性 - 增強”之組織所在之位置。例如，所揭述之創新可用於關節炎、糖尿病患者之脈管疾病、視網膜炎、移植注射或其他發炎症狀。

同樣地，揭述之新觀念亦可用於硬化組織之選擇性顯像，因而可用於處理例如動脈硬化或多數性硬化等症狀。

又另一例，揭述之新觀念亦可用以監測藥物到達，釋放或逆擴散之速率。

依另一種例子，CARBETIMERTM 以外之合成聚合物亦

五、發明說明(64)

可採用。CARBETIMERTM為聚醛／聚胺合成聚合物，可當做載體提供有用之移送特性。已有許多其他之此種合成聚合物被提出，而且如果需要的话可當做載體中之聚合物使用。

亦應予注意者，載體可以聚合物之形成或以微球（或其他超分子聚集物）之形式使用。聚合物最宜給予15,000至40,000 Daltons 分子重量，如上述；但較大之聚合物尺寸可能有利於某些用途。特別地，在毒性非常低之場合（如鉻之情形），使用分子重量大於腎臟清除極限之聚合物是為有利。在此種場合，結果清除時間允許此組成物當做“血液池”使用，長時間有低的血液濃度可利用以擴散進入標靶位置處。（此點對於治療用途而言特別有用）。

微球更較大於最大之較佳聚合物尺寸。例如，200,000 Daltons 分子重量之聚合物有小於12 nm 之典型最大尺寸。而微球有100 nm或100 nm以上之直徑。本發明可依需要以250 微米大之微球使用。（較大之微球尺寸主要有用於肺臟與腫瘤之栓塞顯像，以及例如肺臟、膀胱、腸或中樞神經系統腔道等身體腔道之顯像。微球可包括表面塗層，提供可用之反應基例如羟基、羰基、醛、羧化物、硫酸鹽、磷酸鹽與胺基（單獨地或組合地），以結合於待移送之絡合物，而此等反應基不需存在於微球基質中。然而，應予注意者，微球基質之聚合物以完全

五、發明說明(65)

水溶性而容易由體內清除掉為宜。

亦應予注意者，微球之組成物，直徑介於大約0.1微米與大約4.0微米之間，以及，多原子金屬原子群，主要由結合於二乙烯三胺五醋酸鹽葡聚糖，二乙烯三胺五醋酸鹽-羥乙基澱粉、肝素、葡聚糖硫酸鹽或戊聚糖多硫酸鹽之 $(Cr_4 S(O_2 CCH_3)_8 (H_2 O)_4)^{+2}$ 所組成，確信特別有利於肝臟顯像。

應予進一步注意者，載體（例如葡聚糖）已經以離子方式耦合於活性劑而產生藥用鹽類；但如上述某些新穎例子中所揭述將活性劑螯合於載體，則尚未見示於習知技術。如上述例子所示，此種新穎的教示確信提供重大之益處。

應予注意者，超順磁性多原子構造方面，可採用雜多原子構以~~將~~低對於結合配合基之需要。例如，已知釩、鈷、或鎢可當做結合原子使用以將鉻原子之相對位置穩定化。

超順磁性多原子構造之另一種修改，預期該中心配價原子（在 $Cr_4 S(O_2 CCH_3)_8 (H_2 O)_4^{+2}$ 例中，此中心配價原子為硫）亦可為鎢或釩、鉬、鈷、或其他種類。

在另一種可行方式中已發現，利用聚合物載體達成甘油之移送，實際增加腫瘤區域中之血管之滲透性。因此，此效果可依需要使用以進一步提高所要藥劑之遞送選擇性。

五、發明說明(66)

更進者，各種用途之不同的需求可意指許多不同因素之重新平衡。例如，在希望移送非常無毒性金屬離子之場合，對於聚合物載體以鬆弛之結合即完全可接受。反之，在某些場合，共價結合可能特別有利。配對離子實施例對於改進之腎臟排泄較為有利。小於大約 45K Daltons 之聚合物特別有利於快速之腎臟排泄。（當然，在評估聚合物組成物之尺寸時，必須認識到，通常確實有尺寸之分布存在。本文提及聚合物之分子重量通常係指分子數重量或 M_N ，即，此分布之峰值）。

如熟練於技術之人士所認識者，本申請案所述之新觀念可在廣範圍之用途加以修改與變化，因此，其範圍除了受「申請專利範圍」限制外不受其他限制。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本)

裝

訂

線

六、申請專利範圍

81年11月24日 修正
補充

公告本

第 78108860 號「磁共振顯像用之方法及其組成物」專利案
(81年11月修正)

1. 一種組成物，主要組成包括 (一) 鐵磁性耦合多層順磁性離子群，其選自鉻、鉑、及釷之基團；(二) 可與生物相容相接、肝素可清除之載體，其為二伸乙三胺五醋酸一聚葡萄糖，二伸乙三胺五醋酸羥乙基澱粉，丁二醯基聚葡萄糖，羧甲基聚葡萄糖，二羧乙基聚葡萄糖，聚葡萄糖硫酸鹽或肝素及羥乙基澱粉的混合物；及 (三) 最終聚合物之單體或齊聚物或微球，其中鐵磁性耦合多層順磁性離子群對聚合物之單體單元或微球載體之莫耳比率為 1:2 至 1:25，包含具一中央四面體配位硫原子由四個八面體配位鉻原子以橋配位子穩定之錯合陽離子其通式： $(Cr_4SR_nC_m)$ ，此處，R 為含有下列之一種或一種以上之架橋配合基：醋酸鹽、甘氨酸鹽、丁二酸鹽、丙二酸鹽、戊二酸鹽、或草酸鹽；n 為每個金屬原子絡合物之 R 基之數量，n 為介於 4 與 12 之間；C 為由水與下列之一種或一種以上之離子組成之群中選出之安定化抗衡離子：鹵化物、硫酸鹽、硝酸鹽、羧酸鹽與磷酸鹽；而且 m 為介於 1 與 $2n$ 之間；其中陽離子及載體可與有機鹼，包括 N-甲基葡萄糖胺混合。
2. 根據申請專利範圍第 1 項之組成物，其中該載體之該反應性基在化學上互補於脊椎動物內皮細胞或上皮細胞之決定因素。

205006

六、申請專利範圍

3. 根據申請專利範圍第 1 項之組成物，其可用為生命體中之診斷劑，具有增強由感應共振信號引起之內部圖像或移動內部光譜之能力。
4. 根據申請專利範圍第 1 項之組成物，其中該載體之分子量係介於大約 1,000 與 200,000 Daltons 間。
5. 根據申請專利範圍第 1 項之組成物，其中該載體之分子量係介於大約 15,000 與 40,000 Daltons 間。
6. 根據申請專利範圍第 1 項之組成物，其中該多原子金屬原子絡合物利用強烈的離子，配對離子或電荷互作用予以非共價地結合於該載體。
7. 根據申請專利範圍第 6 項之組成物，其中該強烈的離子，配對離子或電荷互作用係藉由該多原子金屬原子絡合物之藉該聚合物之該反應性基之一予以形成之化學配價或螯合結合，該配價或螯合結合在該載體上之每一結合位置有介於 2 與 10（含 2 與 10）之配價數。
8. 根據申請專利範圍第 1 項之組成物，其中該多原子金屬原子絡合物係共價地輻合於該載體。
9. 根據申請專利範圍第 8 項之組成物，其中該多原子金屬原子絡合物對該載體之該共價輻合係利用對該載體結合之金屬氧化物鍵或直接金屬鍵。
10. 根據申請專利範圍第 1 項之組成物，其中該載體之分子直徑較小於大約 12 nm，而且該多原子金屬原子絡

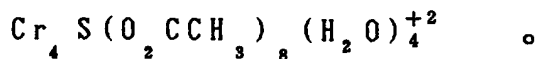
六、申請專利範圍

合物對該載體之該單體之莫耳比例介於大約 1:2 與大約 1:8 之間，而且該載體含有較少於大約 5% (w/w) 交連或微聚集之種類，全為低毒性者。

11. 根據申請專利範圍第 1 項之組成物，其中該多原子絡合物之該順磁性原子含有 Cr (III)。

12. 根據申請專利範圍第 1 項之組成物，其中該多原子金屬絡合物含有四個 Cr (III) 原子，結合於中心四面體的硫原子而且利用架橋配合基予以依八面體方式配位。

13. 根據申請專利範圍第 12 項之組成物，其中該架橋配合基為醋酸鹽基而且該多原子金屬原子絡合物為



14. 根據申請專利範圍第 1 項之組成物，其中該架橋配合基包含醋酸鹽與甘氨酸鹽基之組合，組合之莫耳比例為每個多原子群大約 1 與 3 個甘氨酸鹽之間，而且該甘氨酸鹽之氨基幫助結合於該載體。

15. 根據申請專利範圍第 1 項之組成物，其中該多原子金屬絡合有水溶性水安定性之化合物，此化合物中之該金屬原子含有結合於醋酸鹽基之釧原子。

16. 一種組成物，包含順式二氯二胺鉑連接到生物相容的、肝素可清除載體，其為二伸乙三胺五醋酸聚葡萄糖，或肝素及羥乙基澱粉的混合物。