



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1704121 B

(45) 授权公告日 2010.08.18

(21) 申请号 200510082207.9

A61P 35/00(2006.01)

(22) 申请日 1994.07.19

A61P 9/00(2006.01)

(30) 优先权数据

A61P 11/00(2006.01)

08/094, 536 1993.07.19 US

A61P 13/02(2006.01)

(62) 分案原申请数据

A61P 7/02(2006.01)

94193379.2 1994.07.19

A61P 1/16(2006.01)

(73) 专利权人 血管技术药物公司

(56) 对比文件

地址 加拿大不列颠哥伦比亚省

Marie-Helene Bartrtoli 等. In
vitro and in vivo antitumoral activity
of free, andencapsulated taxol. J.

专利权人 不列颠哥伦比亚大学

Microencapsulation7 2.1990, 7(2), 第 191–
192 页.

(72) 发明人 W·L·亨特 L·S·马单

审查员 李钢

A·L·阿森奥特 J·K·约翰

(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 顾颂迦

(51) Int. Cl.

权利要求书 1 页 说明书 42 页 附图 42 页

A61K 45/08(2006.01)

A61K 45/00(2006.01)

A61K 47/34(2006.01)

A61K 47/42(2006.01)

A61K 9/16(2006.01)

A61K 9/70(2006.01)

A61K 31/337(2006.01)

A61L 31/10(2006.01)

(54) 发明名称

抗血管生长组合物及使用方法

(57) 摘要

本发明提供了含有抗血管生长因子及聚合物载体的组合物。抗血管生长因子的代表性例子包括抗侵袭性因子、视黄酸及其衍生物以及红豆杉醇。同时也提供了用于栓塞血管、消除胆管、尿道、食管及气管 / 支气管阻塞的方法。

1. 非磁性组合物, 其包含 :
 - (a) 红豆杉醇 ; 以及
 - (b) 聚合物载体, 其中所述的聚合物载体是非可生物降解的。
2. 组合物, 其包含
 - (a) 红豆杉醇 ; 以及
 - (b) 聚合物载体, 其中所述的聚合物载体是非可生物降解的,其中所述组合物为喷雾剂或包衣形式。
3. 组合物, 其包含
 - (a) 红豆杉醇 ; 以及
 - (b) 聚合物载体, 其中所述的聚合物载体是非可生物降解的,其中所述组合物为丝、套筒或筛网形式。
4. 权利要求 1-3 任一项的组合物, 其中所述的组合物形成厚度为 $100 \mu\text{m}$ - 2mm 的薄膜。
5. 权利要求 1-3 任一项的组合物, 其中所述的聚合物载体为 EAV 共聚物、硅氧烷橡胶或聚(甲基丙烯酸甲酯)。
6. 权利要求 1-3 任一项的组合物, 其中所述的聚合物载体为 EVA 共聚物。
7. 组合物, 其由以下物质组成 :
 - (a) 稳定微管结构的化合物, 所述化合物为红豆杉醇 ;
 - (b) 聚合物载体, 其中所述的聚合物载体是非可生物降解的。

抗血管生长组合物及使用方法

[0001] 本发明是申请日为 1994 年 7 月 19 日的中国专利申请 200310119882.5 的分案申请，原申请的发明名称为“抗血管生长组合物及使用方法”。

[0002] 本发明涉及治疗癌症和其它血管生长依赖疾病的组合物及方法，更具体地，涉及含有抗血管生长因子和聚合载体的组合物、用这些组合物包衣的斯坦特固定模，以及使用这些斯坦特固定模和组合物的方法。

[0003] 癌症是在美国引发死亡的第二种主要原因，并且占总死亡数的五分之一强。简而言之，癌症以细胞群的分裂不可控制为特征，其一般导致形成一种或几种肿瘤。尽管癌症一般比过去更易于诊断，甚至更早发现，但其仍然不能治愈。

[0004] 目前有许多方法用于治疗癌症，包括例如各种外科方法。如果单独使用外科，很多患者（尤其是那些患有某些癌症的患者，例如乳腺癌、脑癌、结肠癌和肝癌）会复发。除了外科，许多癌症可以用联合治疗法治疗，包括细胞毒性化疗药物（如长春新碱、长春碱、顺氯氨铂、甲氨喋呤、5-FU 等）和 / 或放射疗法。这种方法的困难在于，放疗和化疗药物对正常组织也有毒性，并且经常产生致命的副作用。此外，这些方法通常具有特别高的失败 / 缓解率。

[0005] 除了外科、化学和放射疗法，有人试图用个人的自身免疫系统来消除癌细胞。例如，一些人建议用细菌或病毒成分作为佐剂来刺激免疫系统，从而破坏肿瘤细胞。（见“Principles of Cancer Biotherapy,” Oldham (ed.), Raven Press, New York, 1987。）这些药物通常在动物肿瘤模型中用作佐剂和非特异性刺激剂，但是还没有证明其在人体中普遍有效。

[0006] 淋巴因子也用来治疗癌症。简而言之，淋巴因子通过各种细胞分泌，并且通常在产生免疫应答中对特定细胞有作用。淋巴因子的例子有白细胞介素 (IL)-1, -2, -3 和 -4，以及白细胞集落刺激因子如 G-CSF、GM-CSF 和 M-CSF。近来，有人用 IL-2 刺激外周血细胞从而扩大并产生大量对肿瘤细胞有胞毒性的细胞 (Rosenbergetal., N. Engl. J. Med. 313 : 1485-1492, 1985)。

[0007] 另外有人建议用抗体治疗癌症。简而言之，抗体可以识别特定的细胞表面抗原（其可以是独特的，或者与正常细胞相比在癌细胞中占多数）。这些抗体，或者称“魔术子弹”，可以单独或与一种毒素联合使用，从而特异识别并杀死肿瘤细胞 (Dillman, "Antibody Therapy," Principles of Cancer Biotherapy, Oldham (ed.), Raven Press, Ltd., New York, 1987)。但是，困难在于大多数单克隆抗体为鼠源，这样对鼠抗体的高度敏感性限制了其的有效性，尤其是在重复治疗后。常见的副作用包括发热、出汗和寒战、皮疹、关节炎和神经麻痹。

[0008] 现有方法的另外一个难点是，局部复发及局部疾病的控制仍然是治疗恶性肿瘤的一个主要挑战。特别地，每年有总数为 630,000 的患者（美国）在疾病出现时疾病已定位（没有远距离迁移传播的迹象）；其代表了 64% 所有被诊断为恶性肿瘤的患者（不包括非黑瘤皮肤癌或原位癌）。对这些患者的大多数而言，外科切除是治愈的最主要的机会，并且的确有 428,000 患者在最初治疗后会治愈。不幸的是，202,000 位患者（即 32% 的患者疾病已确定）在最初治疗后会复发。在这些复发者中，每年有 133,000 人是由于疾病的局部复

发而引起的（占所有定位疾病的 21%）。每年因疾病远距离迁移引发的数目是 68,000 人（占所有定位疾病的 11%）。另外 102,139 位患者每年将由于不能控制疾患的局部发展而死亡。

[0009] 这一问题在乳腺癌中更明显，其在美国每年影响 186,000 个妇女并且其的死亡率经 50 年仍保持不变。通过乳房彻底切除术、修饰的基本乳房切除术或者肿块切除术进行外科切除疾患是这种疾病的主要治疗方法。不幸的是，单独施用肿块切除术的 39% 的患者会局部复发疾病，令人吃惊的是，发现 25% 的患者在切除的边缘清楚地留有原始肿瘤（组织学上）。局部复发的 90% 发生在先前切除位点 2 厘米之内。

[0010] 类似地，1991 年，单单在北美就报道了逾 113,000 例死亡和 238,000 例新型肝转移。患有肝转移患者在发生肝损害后的平均生存时间仅为 6.6 个月。对肝性转移的非外科治疗包括系统化疗、放射化学栓塞、肝动脉化疗及动脉内化疗。但是，尽管这些治疗可以暂时减小肝损害灶的大小（例如，系统化疗和肝动脉化疗最初分别减小了损害的 15–20% 和 80%），损害在不同程度又复发。外科切除肝转移仅代表了治愈的可能性，但是这种方法仅对 5% 患有癌转移的患者以及 15–20% 患有原发肝癌的患者是可能的。

[0011] 一种试图治疗肿瘤的具有有限成功率的方法是治疗性栓塞。简而言之，通过向血管注入一种栓塞物而将滋生肿瘤的血管完全堵塞。已尝试了许多物质，包括自身性物质例如脂肪、血块和切下的肌肉碎片以及人造物质如棉、毛、钢球、塑料或玻璃球、肽粉、硅酮化合物、放射性颗粒、无菌吸收性明胶海绵 (Sterispon, Gelforam)、氧化纤维素 (oxycel)、钢圈、乙醇、冻干人硬脑脊膜 (Lyodura)、微原纤维胶原蛋白 (Avitene)、胶原纤维 (Tachotop)、聚乙烯醇海绵 (PVA ; Ivalon)、充盈钡剂的硅球 (Biss) 和可分离的气囊。通过使用这类物质可暂时减小肝转移的大小，但是肿瘤一般却以引起新的血管生长成肿瘤而作为应答。

[0012] 与肿瘤形成有关的一个问题是形成抑制物质通过体内通道（如胆管、气管、食管、脉管系统和尿道）的癌性阻断。已开发了一种装置 - 斯坦特固定模以固定已被肿瘤或其它物质阻塞的开放通道。普通斯坦特固定模的代表性的例子包括 Wall 斯坦特固定模、Streckers 斯坦特固定模、Gianturco 斯坦特固定模和 Palma 斯坦特固定模。然而斯坦特固定模的主要问题是它们不能阻止肿瘤或炎性物质通过斯坦特固定模的小间隙向内生长。如果这种物质到达斯坦特固定模的内部并且损害斯坦特固定模腔，其可以导致插入斯坦特固定模的体内通道的阻塞。此外，体内存在斯坦特固定模可以诱导反应性或炎性组织（例如血管、成纤维细胞和白细胞）进入斯坦特固定模腔，从而导致斯坦特固定模部分或全部阻塞。

[0013] 本发明提供了适用于治疗癌症及其它血管生长依赖性疾病的组合物和方法，其致力于有关上述讨论的问题，并且进一步提供了其它相关的优点。

[0014] 简而言之，本发明提供了抗血管生长组合物以及使用该组合物治疗癌症和其它血管生长依赖性疾病的方法和装置。本发明一方面提供了含有 (a) 一种抗血管生长因子和 (b) 一种聚合物载体的组合物（此后称为“抗血管生长组合物”）。许许多多的分子可用作本发明范围内的抗血管生长因子，包括例如抗侵袭因子、视黄酸及其衍生物、红豆杉醇、红豆杉醇类似物及红豆杉醇衍生物、包括苏拉明、金属蛋白酶 -1 的组织抑制剂、金属蛋白酶 -2 的组织抑制剂、纤溶酶原激活剂 -1 和纤溶酶原抑制物激活剂 -2。类似地，也可使用

许许多多的聚合物载体,代表性的例子有与 40% 乙烯乙酸酯交联的聚(乙烯乙酸乙烯酯)、聚(乳酸-联-乙醇酸)、聚己内酯聚乳酸、与 40% 乙烯乙酸酯交联的聚(乙烯乙酸乙烯酯)及聚乳酸的共聚物和聚乳酸及聚己内酯的共聚物。本发明的一个实例是组合物的平均粒度为 15 至 200 μm 。

[0015] 本发明另一方面提供了栓塞血管的方法,其包括将治疗活性量的抗血管生长组合物释入血管中(如上所述),这样有效地堵塞了血管。其中一个实例是,将抗血管组合物释入滋生肿瘤的血管中。

[0016] 本发明另外还提供了包括管状结构、表面用一种或多种抗血管生长组合物的斯坦特固定模。本发明也提供了扩充体内通道腔的方法,其包括将斯坦特固定模插入通道,固定膜一般具有管状结构,该结构的表面包衣有如上所述的抗血管生长组合物,这样通道就被扩充。本发明的各种实例中,提供了包括将胆斯坦特固定模插入胆管而消除胆梗阻的方法;将尿道斯坦特固定模插入尿道而消除尿道梗阻的方法;将食道斯坦特固定模插入食道而消除食道梗阻的方法;将气管/支气管斯坦特固定模插入气管或支气管而消除气管/支气管梗阻的方法。在每一个实例中,斯坦特固定模一般为管状结构,其表面用如上所述的抗血管生长组合物包衣。

[0017] 本发明另一方面还提供了治疗肿瘤切除部位的方法,其包括将上述抗血管生长组合物施于切除肿瘤后的切除边缘,这样就抑制了癌症的局部复发及该部位新血管的形成。本发明还提供了治疗角膜新血管形成的方法,其包括将治疗有效量的抗血管生长组合物施于上述角膜,这样就抑制了血管的形成。其中一个实例中,抗血管组合物进一步包括一种局部皮质甾类化合物。

[0018] 本发明另一方面提供了抑制患有非致瘤性血管生长依赖疾病患者血管生长的方法,其包括对患有非致瘤性血管生长依赖性疾病的患者给予治疗有效量的含有红豆杉醇的组合物,这样就抑制了新的血管的形成。另一方面,本发明提供了在非致瘤性血管生长依赖性疾病中使用栓塞血管的方法,其包括将治疗有效量的含有红豆杉醇的组合物转运至血管中,这样就有效地阻塞了血管。

[0019] 本发明另一方面提供了扩充体内通道腔的方法,其包括将斯坦特固定模插入通道中,该斯坦特固定模一般具有管状结构,并且结构的表面包衣有含红豆杉醇的组合物,这样通道就被扩充。在本发明各种实例中,提供了包括将胆斯坦特固定模插入胆管而消除胆梗阻的方法;将尿道斯坦特固定模插入尿道而消除尿道梗阻的方法;将食道斯坦特固定模插入食道而消除食道梗阻的方法;将气管/支气管斯坦特固定模插入气管或支气管而消除气管/支气管梗阻的方法。在每一个实例中,斯坦特固定模一般为管状结构,其表面用含有红豆杉醇的组合物包衣。

[0020] 本发明另一方面还提供了治疗肿瘤切除部位的方法,其包括将含红豆杉醇的组合物施于切除肿瘤后的切除边缘,这样就抑制了癌症的局部复发及该部位新血管的形成。本发明还提供了治疗角膜新血管形成的方法,其包括将治疗有效量的含红豆杉醇的组合物施于上述角膜,这样就抑制了新血管的形成。

[0021] 本发明另一方面还提供了药用产品,其包括(a)红豆杉醇(在容器中)及(b)与容器有关的一个由政府机构许可的关于药物的生产、使用和销售的通告,该通告表明有关机构同意将红豆杉醇用于人用或兽用来治疗非致瘤性血管生长依赖性疾病。简而言之,

联邦法律要求一种用于治疗人体的药剂必须获得联邦政府机构的许可。实施职责（美国）由 FoodandDrugAdministration 决定，其颁布了保证这种许可的适当规则，详见 21U.S.C. § 301-392。在 42U.S.C. § 262 下也提供了含有来源于动物组织产品的生物材料的规则。大多数国家要求类似的许可，尽管每个国家的规则有所不同。

[0022] 本发明的这些方面在参考了以下细节描述及附图后会更明显。此外，其后列出的各种参考文献在细节上描述了某些方法或组合物，并且其作为参考。

[0023] 图 1A 表示第 6 天的无壳蛋培养物图。图 1B 是用立体显微镜对活的未染色毛细管的一个数字转换计算机成像 (1040×)。图 1C 为一个腐蚀模型，其表示由较大的血管提供的 CAM 微脉管系统 (箭头 ;1300×)。图 1D 是横向切开 CAM 的一个 0.5mm 厚的塑性部分 (光学显微镜水平记录)。本图显示了 CAM 的组成，包括外部的双层外胚层 (Ec)、具有毛细管 (箭头) 和散在外膜细胞的中胚层 (M) 以及单层内胚层 (En) (400×)。图 1E 是一个电子显微镜水平 (3500×) 图，其中显示出典型的毛细管结构 (薄壁内皮细胞，箭头) 和相关的外膜细胞。

[0024] 图 2A、2B、2C 及 2D 是 4 个不同的未染色 CAM 在接触红豆杉醇 48 小时后的系列数字化成像。

[0025] 图 3A、3B 及 3C 是在无血管区于 3 个不同位置通过红豆杉醇处理的 CAM 横向切开的 0.5mm 塑性部分系列图。

[0026] 图 4A。4B 及 4C 是电子显微摄影拍摄到的分别类似于上述图 3A、3B 及 3C 部位的系列图。

[0027] 图 5 是一个通过 (10mg 苏拉明钠结合到 5% PVA 中的 5% ELVAX) 个数表达的微球粒度条形分布图。

[0028] 图 6 是一个通过 (10mg 苏拉明钠结合到 5% PVA 中的 5% ELVAX) 重量表达的微球粒度条形分布图。

[0029] 图 7 表示苏拉明钠在 1ml 5% ELVAX 中的包囊重量线性图。

[0030] 图 8 表示苏拉明钠在 ELVAX 中的包囊百分比线性图。

[0031] 图 9 表示含有 10mg 苏拉明钠 (在含有 10% 氯化钠的 5% PVA 中制备) 的 5% ELVAX 微球粒度分布条形图。

[0032] 图 10 表示含有 10mg 苏拉明钠 (在含有 10% 氯化钠的 5% PVA 中制备) 的 5% 重量的 PLL 微球粒度分布条形图。

[0033] 图 11 表示含有 10mg 苏拉明钠 (在含有 10% 氯化钠的 5% PVA 中制备) 的 5% 个数的 PLL 微球粒度分布条形图。

[0034] 图 12 表示苏拉明钠释放时间线性图。

[0035] 图 13 表示肝肿瘤栓塞的代表性实例图。

[0036] 图 14 表示用本发明抗血管生长组合物包衣的代表性斯坦特固定模插入图。

[0037] 图 15A 表示在微球聚集时 EVA : PLA 混合比例的影响图。图 15B 是一个扫描电子显微摄影图，其表示出“小”微球的大小。图 15C 是一个扫描电子显微摄影图，其表示出“大”微球的大小。图 15D 表示于在体外红豆杉醇从 0.6% w/v 装载红豆杉醇的 50 : 50EVA : PLA 聚合物混合物微球中释放入于 37°C 磷酸盐缓冲盐水 (pH7.4) 中的时间图。圆圈为“小”颗粒的微球，黑点是“大”颗粒的微球。图 15E 是一个 CAM 图，其表示红豆杉醇从微球 (“MS”)

释放的结果。图 15F 是 15E 在放大倍数的类似图。

[0038] 图 16 表示从含有 1%、2%、5% 或 10% 红豆杉醇的聚己内酯微球到磷酸盐缓冲盐水中 (37°C) 的释放速率图。图 16B 表示用对照组微球处理的 CAM 图。图 16C 表示用装载 5% 红豆杉醇的微球处理的 CAM 图。

[0039] 图 17A 及 17B 分别表示红豆杉醇从 EVA 薄膜的释放图及残留在同一薄膜中红豆杉醇百分数的时间图。图 17C 表示不含红豆杉醇时 EVA/F127 薄膜膨胀的时间图。图 17D 表示不含红豆杉醇时 EVA/Span80 薄膜膨胀的时间图。图 17E 表示不同 EVA/F127 混合物的应力对张力曲线图。

[0040] 图 18A 和 18B 表示 PCL/MePEG 聚合物混合物的熔点图 (MePEG 在制剂中的 %) (图 18A)，及 PCL 糊剂在 60°C 开始固化时所需时间的增加百分数 (MePEG 在制剂中的重量) (18B)。图 18C 表示不同 PCL/MePEG 聚合物混合物的脆性图。图 18D 表示不同 MePEG 浓度的聚合物混合物百分重量变化时间图。图 18E 表示红豆杉醇从装载 1% 红豆杉醇的不同聚合物混合物中的释放速率时间图。图 18F 和 18G 表示不同量红豆杉醇对从 20% MePEG/PCL 聚合物中释放红豆杉醇总量的影响。图 18H 表示 MePEG 对 MePEG/PCL 聚合物抗拉强度的影响。

[0041] 图 19A 表示 CAM 上的对照组热糊 (未带有) 图。图 19B 表示 CAM 上的带有 20% 红豆杉醇的热糊图。

[0042] 图 20A 和 20B 是两个用对照组热糊 (未带有) 处理 CAM 肿瘤的图。图 20C 和 20D 表示两个用带有红豆杉醇热糊处理 CAM 肿瘤的图。

[0043] 图 21A 表示红豆杉醇 /PCL 对肿瘤生长的影响。图 21B 和 21C 表示对照组、带有 10% 及 20% 红豆杉醇热糊对肿瘤生长的影响。

[0044] 图 22A 表示注射 PBS 的关节滑膜。图 22B 表示注射微球的关节滑膜。图 22C 表示注射 PBS 的关节软骨，图 22D 表示注射微球的关节软骨。

[0045] 如上所述，本发明提供了使用抗血管生长因子的方法及组合物。简而言之，在本发明的范围内，抗血管生长因子应理解为包括任何蛋白质、肽、可用于抑制血管生长的化学或其它分子。可以利用各种方法确定给定因子的抗血管生长活性，包括例如鸡绒毛膜尿囊膜 ("CAM") 测定。简而言之，如下述实施例 2A 和 2C 中所述，除去新鲜鸡受精卵的部分蛋壳，将待检测的含有抗血管生长因子试样的甲基纤维素盘置于膜上。几天后 (例如 48 小时)，待测试样的血管生长抑制性即可通过包围甲基纤维素盘区域的鸡绒毛膜尿囊膜的显影来确定。血管生长的抑制性也可以定量确定，例如通过将包围甲基纤维素盘的血管的数量和大小与一个对照甲基纤维素盘比较。适用于本发明范围内的特别优选的抗血管生长因子可完全抑制上述测定中新血管的形成。

[0046] 也可使用各种测定方法来确定体内抗血管生长因子的有效性，包括例如已发展用于此目的的鼠模型 (见 Roberston et al., Cancer. Res. 51 :1339-1344, 1991)。此外，与本发明不同方面有关的各种代表性体内测定详细描述于下述实施例 5 至 7 及 17 至 19。

[0047] 如上所述，本发明提供了含有抗血管生长因子和聚合物载体的组合物。简而言之，在本发明范围内可使用许许多多的抗血管生长因子。代表性的例子包括抗侵袭因子、视黄酸及其衍生物、红豆杉醇、含有苏拉明、金属蛋白酶-1 的组织抑制剂、金属蛋白酶-2 的组织抑制剂、纤维蛋白溶酶原激活剂抑制剂-1 和纤维蛋白溶酶原激活剂抑制剂-2 的物质。这

些以及其它抗血管生长因子将在下面详细讨论。

[0048] 简而言之,已知了从软骨萃取物中制备的抗侵袭因子或者“AIF”含有抗新血管生长的成分。这些成分包括7种低分子量的蛋白质(<50,000)(KuettnerandPauli, “Inhibitionofneovascularizationbyacartilagefactor(通过软骨因子抑制新血管生长)”inDevelopmentoftheVascularSystem, PitmanBooks(CibaFoundationSymposium100), 第163-173页, 1983), 其包括对各种蛋白酶有抑制作用的各种蛋白质(Eisenteinetal, Am. J. Pathol. 81: 337-346, 1975; Langeretal., Science193: 70-72, 1976; and Hortonetal., Science199: 1342-1345, 1978)。适用于本发明范围内的AIF可以通过本领域已知的技术制备(例如Eisenteinetal, supra; KuettnerandPauli, supra; and Langeretal., supra)。AIF的纯化成分例如软骨来源的抑制剂(“CDI”)(见Mosesetal., Science248: 1408-1414, 1990)在本发明范围内也易于制备和使用。

[0049] 视黄酸改变了细胞外基质组分的代谢,从而抑制血管生长。可以使用脯氨酸类似物的加成物、血管稳定甾类化合物或肝素来协同增加转视黄酸的抗血管生长作用。在本发明范围内也可使用视黄酸及其衍生物,其易于从商业途径获得,包括例如SigmaChemicalCo. (#R2625)。

[0050] 红豆杉醇是一种高度衍生化的双萜(Wanietal., J. Am. Chem. Soc. 93: 2325, 1971), 其从成熟干燥的TaxusBrevifolia(PacificYew.)和TaxomycesAndreanaeandEndophyticFungusofthePacificYew.(Stierleetal., Science60: 214-216, 1993)的树皮获得。一般地,红豆杉醇的作用是通过结合微管蛋白形成异常有丝分裂纺锤体来稳定微管结构。“红豆杉醇”(在此应理解为包括红豆杉醇的类似物和衍生物,例如浆果赤霉素和taxotere也可以利用本领域技术人员已知的技术制备(见W094/07882, W094/07881, W094/07880, W094/07876, W093/23555, W093/10076, 美国专利5294637, 5283253, 5279949, 5274137, 5202448, 5200534, 5229526 和 EP590267)或由各种商业途径获得,包括例如SigmaChemicalCo., St. Louis, Missouri(T7402-来自Taxus brevifolia)。

[0051] 苏拉明是一个聚磺化萘基脲化合物,其一般用作杀锥虫剂。简而言之,苏拉明阻断了结合各种生长因子例如血小板来源的生长因子(“PDGF”)、表皮生长因子(“EGF”)、转化生长因子(“TGF- β ”)、类胰岛素生长因子(“IGF-1”)、成纤维母细胞生长因子(“ β FGF”)的特异细胞表面。苏拉明可以按照已知技术制备,或者由各种商业途径获得,包括例如MobayChemicalCo., New York(见Gagliardietai., CancerRes. 52-5073-5075, 1992; and Coffey, Jr., et al., J. of Cell Phys. 132: 143-148, 1987)。

[0052] 金属蛋白酶-1组织抑制剂(“TIMP-1”)分泌MPT酶的内皮细胞分泌。TIMP为糖基化,且分子量为28.5kDa。TIMP-1通过结合到活化的金属蛋白酶上调节血管生长,因此抑制了血管向细胞外基质侵袭。金属蛋白酶-2组织抑制剂(“TIMP-2”)也可用来抑制血管生长。简而言之,TIMP-2是一个21kDa的非糖基化蛋白质,其可以活化的或潜伏的酶原形式结合到金属蛋白酶上。TIMP-1和TIMP-2都可以从商业途径例如Synergen、Boulder和Colorado获得。

[0053] 纤溶酶原激活物抑制剂-1(PAI-1)是一个存在于血小板中的50kDa的糖蛋白,其可通过内皮细胞和肌细胞合成。PAI-1在内皮的嗜碱侧抑制t-PA和尿激酶纤溶酶原激活物,并且还调节纤维蛋白溶解过程。纤溶酶原激活物抑制剂-2(PAI-2)一般仅发现于特定

情况下的血液中,例如怀孕和肿瘤存在时。简而言之,PAI-2 是由单核细胞和巨噬细胞分泌的 56kDa 的蛋白质。认为其可调节纤维蛋白溶解活性,并且特别抑制尿激酶纤溶酶原激活物和组织纤溶酶原激活物,因此防止了纤维蛋白溶解。

[0054] 在本发明的范围内也可使用许许多多其它抗血管生长因子。代表性的例子包括血小板因子 4(SigmaChemicalCo. , #F1358) ;硫酸鱼精蛋白(鲱精蛋白)(SigmaChemicalCo. , #P4504) ;硫酸壳多糖衍生物(由 queencrabshells 制备)(SigmaChemicalCo. , #C3641 ;Murataetal. , CancerRes. 51 :22-26,1991) ;硫酸多糖肽聚糖配合物(SP-PG)(此化合物的功能可以通过甾类化合物如雌激素和枸橼酸三苯氧胺的存在而加强);Staurosporine(SigmaChemicalCo. , #S4400) ;基质代谢调节剂,包括例如脯氨酸类似物{[(L- 氨杂环丁烷 -2- 羧酸 (LACA) (SigmaChemicalCo. , #A0760)), 顺羟基脯氨酸, d, L-3,4- 去氢脯氨酸 (SigmaChemicalCo. , #D0265), 硫脯氨酸 (SigmaChemicalCo. , #T0631)], α, α- 二吡啶基 (SigmaChemicalCo. , #D7505), β- 氨基丙腈富马酸 (SigmaChemicalCo. , #A3134)]} ;MDL27032(4- 丙基 -5-(4- 吡啶基)-2(3H)- 恶唑酮;MerionMerrelDowResearchInstitute) ;氨甲喋呤 (SigmaChemicalCo. , #A6770 ;Hirataetal. , ArthritisandRheumatism32 :1-65-1073,1989) ;

[0055] Mitoxantrone(PoliveriniandNovak, Biochem. Biophys. Res. Comm. 140 : 901-907) ;肝素(Folkman, Bio. Phar. 34 :905-909,1985 ;SigmaChemicalCo. , #P8754) ;干扰素(如 SigmaChemicalCo. , #13265) ;2 巨球蛋白血清(SigmaChemicalCo. , #M7151) ;ChIMP-3(Pavloffetal. , J. Bio. Chem. 267 :17321-17326,1992) ;抑糜蛋白酶素(SigmaChemicalCo. , #C7268 ;Tomkinsonetal. , BiochemJ. 286 :475-480,1992) ;β- 环糊精十四硫酸酯(Tetradecasulfate)(SigmaChemicalCo. , #C4767) ;Eponemycin ;雌氮芥(可从 Sigma 得到;WangandStearnsCancerRes. 48 :6262-6271,1988) ;烟曲霉素(SigmaChemicalCo. , #F6771 ;加拿大专利 2024306 号;Ingberetal. , nature348 :555-557, 1990) ;硫代苹果酸金钠(“GST”, SigmaG4022 ;MatsubaraandZiff, J. Clin. Invest. 79 : 1440-1446,1987) ;(D- 青霉胺(“CDPT”;SigmaChemicalCo. , #P4875orP5000(HC1)) ;β-1- 抗胶原蛋白酶 - 血清;α 2- 抗纤维蛋白溶酶(SigmaChem. Co. :A0914 ;Holmesetal. , J. Biol. Chem. 262(4) :1659-1664,1987) ;葱双咪腙(NationalCancerInstitute) ;Lobenzarit 二钠(N-(2)- 羧苯基 -4- 氯代氨基酸二钠或“CCA”:Takeuchieta. , AgentsActions36 :312-316,1992) ;酞胺哌啶酮,Angiostatic 甾类化合物,AGM-1470,羧氨基咪唑,金属蛋白酶抑制剂例如 BB94 和肽 CDPGYIGSR-NH2 (SEQUENCE ID NO. 1) (IwakiGlass, Tokyo, Japan) 。

[0056] 本发明的抗血管生长组合物可另外含有除抗血管生长因子和聚合物载体以外的许多化合物。例如,本发明的抗血管组合物也可以(在本发明的某些实例中)含有一种或几种抗生素、抗炎剂、抗病毒剂、抗真菌剂和 / 或抗原虫剂。在此所述组合物中抗生素的代表性例子包括:青霉素;头孢菌素如头孢羟氨苄、头孢唑啉、头孢氯;氨基糖甙类如庆大霉素和妥布霉素;磺胺类如新诺明;和灭滴灵。抗炎剂的代表性例子包括:甾类化合物如强的松、强的松龙、氢化可的松、促肾上腺皮质激素和柳氮磺胺吡啶;非甾类抗炎药(“NSAID”)如阿司匹林、布洛芬、萘普生、苯氧苯丙酸、消炎痛和保泰松。抗病毒剂的代表性例子包括无环鸟苷、ganciclovir 和 zidovudine。抗真菌剂的代表性例子包括:致霉菌素、酮哌恶咪唑、

氟胞嘧啶、双氯苯咪唑和克霉唑。抗原虫剂的代表性例子包括：羟乙磺酸戊烷脒、奎宁、氯喹和甲氟喹。

[0057] 本发明抗血管生长组合物也可含有一种或几种激素例如甲状腺激素、雌激素、去氢表雄酮、可的松和/或生长素，其它生物活性分子例如胰岛素及 T_{H2}(如白细胞介素-2,-12 和 -15)，γ 干扰素或 TH2(如白细胞介素-4, 和 -10) 细胞因子。

[0058] 本发明的抗血管组合物也可含有其它成分例如表面活性剂(亲水或疏水，见实施例 13)、抗肿瘤或化疗药物(例如 5-氟尿嘧啶、长春碱、doxycycline、阿霉素和三苯氧胺)，放射性药物(例如 Cu-64, Ga-67, Ga-68, Zr-89, Ru-97, Tc-99m, Rh-105, Pd-109, In-111, I-123, I-125, Re-186, Re-188, Au-198, Au-199, Pb-203, At-211, Pb-212 和 Bi-212) 或者毒素(例如蓖麻毒蛋白、相思豆毒蛋白、白喉毒素、霍乱毒素、gelonin、美洲商陆抗病毒蛋白、tritin、志贺菌属毒素和假单胞菌属外毒素 A)。

[0059] 如上所述，本发明的抗血管生长组合物包括一种抗血管生长因子和一种聚合物载体。除了以上讨论的许多抗血管生长因子和其它化合物外，本发明的抗血管生长组合物还包括各种聚合物载体，例如包括生物可降解的和生物不可降解的组合物。生物可降解的组合物的代表性例子包括白蛋白、明胶、淀粉、纤维素、葡聚糖、多糖、血纤维蛋白原、聚(d, l 丙交酯)、聚(d, l-丙交酯-co-乙交酯)、聚(乙交酯)、聚(羟丁酸)、聚(碳酸烷基酯)和聚(原酸酯)(见 Illum, L., Davids, S. S. (eds.) "Polymers in controlled Drug Delivery" Wright, Bristol, 1987; Arshady, J. Controlled Release 4 :155-0180, 1986)。非降解聚合物的代表性例子包括 EVA 共聚物、硅氧烷橡胶和聚(甲基丙烯酸甲酯)。特别优选的聚合物载体包括 EVA 共聚物(例如 ELVAX40, 与 40% 乙烯基乙酸酯交联的聚(乙烯乙酸乙烯酯)；DuPont)，聚(乳酸-联-乙醇酸)、聚己内酯、聚乳酸、与 40% 乙烯基乙酸酯和聚乳酸交联的聚(乙烯乙酸乙烯酯)共聚物以及聚乳酸和聚己内酯的共聚物。

[0060] 可以使用各种形式的聚合物载体，包括例如毫微球或微球、棒型装置、丸、板或胶囊(见如 Goodellet al., Am. J. Hosp. Pharm. 43 :1454-1461, 1986; Langer et al., "大分子从聚合物中的控释"，in Biomedicinal polymers, Polymeric materials and pharmaceuticals for biomedical use, Goldberg, E. P., Nakagim, A. (eds.) Academic Press, pp. 11-137, 1980; Rhine et al., J. Pharm. Sci. 69 :265-270, 1980; Brown et al., J. Pharm. Sci. 72 :1181-1185, 1983; and Bawa et al., J. Controlled Release 1 :259-267, 1985)。

[0061] 优选地，本发明抗血管生长组合物(包括一种或多种抗血管生长因子和聚合物载体)可以适用于预想用途的方式使用。在本发明优选的实例中，抗血管生长组合物应是生物相容性的，并且经几周至月余的时期应释放一种或多种的抗血管生长因子。此外，本发明的抗血管生长组合物优选经数月应是稳定的，并且能在无菌条件下生产和保留。

[0062] 在本发明某些方面，抗血管生长组合物的粒度范围可以按照特殊需要从毫微球到微球不等(例如从 0.1 μm 至 500 μm)。例如，当用于肿瘤栓塞时(如下讨论)，一般优选抗血管生长组合物为 15 至 500 μm 之间的毫微球，优选 15 至 200 μm，更优选 25 至 150 μm。这种毫微粒易用作“喷雾剂”，其固化为膜或包衣。毫微粒(也称作“毫微球”)可以制备成不同的粒度，例如从 0.1 μm 至 3 μm，从 10 μm 至 30 μm，以及从 30 μm 至 100 μm(见实施例 8)。

[0063] 如本文所公开的，抗血管生长组合物也可以制备成其它用途。例如，为了将抗血

管生长组合物用于角膜,本发明的组合物可以结合到聚合物中成为毫微粒(见 kreuter J. Controlled Release 16 :169-176, 1991 ; Couvreur and Vauthier, J. Controlled Release 17 : 187-198, 1991)。这种毫微粒易用作“喷雾剂”,其固化为膜或包衣。毫微粒(也称作“毫微球”)可以制备成不同的粒度,例如从 0.1 μm 至 3 μm,从 10 μm 至 30 μm,以及从 30 μm 至 100 μm(见实施例 8)。

[0064] 本发明抗血管生长组合物也可以制备成各种“糊剂”或凝胶型。例如,本发明的一个实例提供了在一定温度(例如高于 37°C 的温度,如 40°C、45°C、50°C、55°C 或 60°C)液化并且在另一温度(如体温或低于 37°C 的任意温度)固化或半固化的抗血管生长组合物。这种“热糊剂”可通过本文的公开易于制备(见实施例 10 和 14)。

[0065] 本发明的另一方面,本发明的抗血管生长组合物可以形成膜。优选地,这种膜的厚度一般小于 5, 4, 3, 2 或 1mm, 更优选厚度小于 0.75mm 或 0.5mm, 尤为优选厚度小于 500 μm 至 100 μm。这种膜优选具有良好抗拉强度(如大于 50, 优选大于 100, 更优选大于 150 或 200N/cm²)的柔韧性,良好的粘合性(即,易于粘合到潮湿或湿表面上),并且可以控制渗透性。这种膜的代表性实例见下面的实施例(如实施例 13)。

[0066] 将抗血管生长组合物结合到聚合物载体上的代表性实例详见下面的实施例 3, 4 和 8-15。

[0067] 动脉栓塞

[0068] 除了上述的组合物,本发明还提供了使用上述抗血管生长组合物的各种方法。特别地,本发明其中一方面提供了栓塞血管的方法,其包括将治疗有效量的抗血管生长组合物(如上所述)释入血管中,这样就有效地阻塞了血管。适于阻塞血管的治疗有效剂量可以通过如下的公开确定,如实施例 6 所述。在一个特别优选的实例中,将抗血管生长组合物释入滋养肿瘤的血管中(见图 13)。

[0069] 简而言之,有许多需要对器官或区域减少或切断血液供给的临床情况(如出血、肿瘤生长)。正如下面详细描述的那样,其通过一种选择性定位导管将本发明抗血管生长组合物注射到所需血管中而实现(见图 13)。组合物通过血流直到其楔入脉管系统,因此物理(或化学)阻塞了血管。对选择区域减少或切断血流导致了梗塞(细胞由于氧和养料供应不足而死亡)或者从受损血管减少血液流失。

[0070] 为了用于栓塞治疗,本发明抗血管生长组合物优选为无毒、可形成血栓并易于沿血管导管注射、不透射线、迅速及持久的作用、无菌并在生产中可以是不同的形状或大小。此外,组合物优选可缓慢(理想为经过几周至月余的时间)释放抗血管生长因子。特别优选的抗血管生长组合物在注入血管后应具有 15-200 μm 的粒度。优选地,其在溶液中或注射时不应聚结成大颗粒。此外,优选的组合物在使用前的贮存过程中不应改变形状或物理性质。

[0071] 栓塞治疗以至少 3 种基本方式用于肿瘤的治疗:(1) 肿瘤的绝对治疗(通常为良性);(2) 术前栓塞;及(3) 治标栓塞。简而言之,良性肿瘤有时通过单独栓塞治疗即可成功治愈。这种肿瘤的例子包括血管源的简单肿瘤(如血管瘤),内分泌肿瘤例如甲状旁腺瘤和良性骨瘤。

[0072] 对于其它肿瘤而言(例如肾腺癌),在手术切除前数小时或数天应施用术前栓塞以减少手术性失血、缩短手术时间并且减少由于对肿瘤的外科手术而造成的活恶性细胞扩

散的危险。许多肿瘤可以成功地进行术前栓塞，例如鼻咽瘤、颈静脉球瘤、脑脊膜瘤、化学感受器瘤和迷走神经瘤。

[0073] 栓塞也可用作治疗不宜手术恶性肿瘤的主要方式来延长晚期患者的生命。栓塞可通过减轻不良症状如出血、静脉阻塞和气管压迫而显著改善恶性肿瘤患者的生活质量。遭受恶性内分泌瘤体液影响（其中来自类癌瘤及其它内分泌瘤如胰岛素瘤和胰高血糖素瘤的转移瘤可缓慢生长，从而导致由于其产生的内分泌综合症的巨大痛苦）的患者最受益于治标肿瘤栓塞。

[0074] 一般地，使用本发明抗血管生长组合物的栓塞治疗不论其部位通常以相似的方法进行。简而言之，通过沿插入照射 X 射线的动脉或静脉（依栓塞部位而定）的导管注入不透射线的造影剂首先进行预栓塞区域的血管造影术（血管图）。导管可以经皮或者手术插入。然后通过从导管回流本发明抗血管生长组合物栓塞血管，直至观察到停止流动。通过重复血管造影照片确证闭塞。

[0075] 栓塞治疗通常导致含抗血管生长因子的组合物分布在待治疗肿瘤或血管团块的小间隙。阻塞动脉腔的栓塞颗粒块导致了供血闭塞。除此之外，抗血管生长因子的存在阻止了供给肿瘤或血管团块的新血管的形成，提高了切断血液供应的失活作用。

[0076] 因此，很明显许许多多的肿瘤可用本发明组合物栓塞。简而言之，肿瘤一般可分为两类：良性和恶性。在良性肿瘤中，细胞保持其各自特征，并且不以完全不能控制的方式分化。而且，肿瘤可定位同时不迁徙。在恶性肿瘤中，细胞变得无差异，对机体生长和激素信号不应答，并且以不可控制的方式增殖；肿瘤具有侵害性而且可传播到远部位（迁徙）。

[0077] 本发明的一个方面，肝转移瘤（继发性肿瘤）可利用栓塞疗法治疗。简而言之，导管经骨肱动脉插入并在荧光屏检查下通过动脉系统深入肝动脉。导管尽可能地深入到肝动脉树中以完全阻断供给肿瘤的血管，同时尽可能多地剩出供给正常结构的动脉分支。理想的是其为肝动脉分支，但是需要阻断的也可以是末端为胃十二指肠动脉开端的整个肝动脉，或者甚至是许多分离的动脉，其依肿瘤的大小及其单独的血液供应而定。当达到了所需的导管位置，经动脉导管注入抗血管生长组合物（如上所述）栓塞动脉直至需阻断动脉的血流停止，优选观察 5 分钟后。经导管注入不透射线的造影剂确证动脉闭塞，并通过荧光屏检查或 X 射线胶片证明先前充满造影剂的血管不再如此。

[0078] 如上所述，良性及恶性肿瘤都可以用本发明组合物栓塞。良性肝肿瘤的代表性例子包括肝细胞腺瘤、海绵状血管瘤和灶性小结增生 (Focal Nodular Hyperplasia)。其它少见的通常没有临床表现的良性肿瘤也可以治疗。其包括胆管腺瘤、胆管囊腺瘤、纤维瘤、脂肪瘤、平滑肌瘤、间皮瘤、畸胎瘤、粘液瘤和小结退化性增生 (Nodular Regenerative Hyperplasia)。

[0079] 恶性肿瘤一般分支为两类：原发性和继发性。原发性肿瘤直接产生于发现其的组织。因此，原发性肝癌最初源于组成肝组织的细胞（如肝细胞和胆囊细胞）。可用动脉栓塞治疗的原发性肝癌的代表性例子包括肝细胞癌、胆管癌、血管肉瘤、囊腺癌、鳞状细胞癌和肝胚细胞瘤。

[0080] 继发性肿瘤或转移瘤是一种起源于机体的其它部位但已扩散到远器官的肿瘤。转移瘤的一般路径是直接生长入邻接结构，通过血管或淋巴系统扩散并沿组织平面和体内间隙（腹膜液、脑脊液等）行进。继发性肝癌是癌症患者最常见的死因之一，也是最常见的肝

肿瘤形式。尽管实质上任何癌都可能迁徙到肝脏,最可能扩散到肝脏的肿瘤包括:胃癌、结肠癌、胰腺癌、黑素瘤、肺肿瘤、口咽瘤和膀胱瘤、何杰金及非何杰金淋巴瘤、乳腺癌、卵巢癌和前列腺癌。上述每一种原发性肿瘤都具有许多不同的可以通过动脉栓塞治疗的肿瘤类型(例如,有超过32种不同类型的卵巢癌)。

[0081] 如上所述,利用本发明抗血管生长组合物的栓塞疗法也可用于各种其它需要阻塞血管的临床情况。本发明其中一方面,通过给予上述组合物之一可以治疗动静脉畸形。简而言之,动静脉畸形(血管畸形)是指至少一种(最常见的是许多)动脉和静脉之间异常联系的一类疾病,其导致了主要由血管组成的局部肿瘤样团块。这种疾病可以是天生的,也可以是后天的。

[0082] 本发明的一个实例中,通过将导管经股动脉或肱动脉插入并在荧光指导下深入喂养(feeding)动脉而治疗动静脉畸形。优选导管尽可能地深入以完全阻断血管畸形的供给,同时尽可能多地剥出供给正常结构的动脉分支(理想的是其为单个动脉,但是通常需要阻断的是许多分离的动脉,其依血管畸形的程度及其单独的血液供应而定)。当达到了所需的导管位置,每支动脉可以用本发明抗血管生长组合物栓塞。

[0083] 本发明另一方面,栓塞可以处理过量出血的情况。例如,月经过多(行经过多出血)可以通过子宫动脉的栓塞治疗。简而言之,子宫动脉是双侧内髂骨动脉的分支。在本发明的一个实例中,将导管经股动脉或肱动脉插入并在荧光指引下通过动脉系统深入每个子宫动脉。导管尽可能地深入以完全阻断至子宫的血管,同时尽可能多地剥出供给正常结构的动脉分支。理想的是将每侧的子宫动脉栓塞,但是偶尔需要阻断的是许多分离的动脉,其依单独的血液供应而定。当达到了所需的导管位置,每支动脉可以给予上述抗血管生长组合物进行栓塞。

[0084] 类似地,动脉栓塞可以在其它许多情况下进行,包括例如急性出血、血管畸形、中枢神经系统障碍和脾机能亢进。

[0085] 将抗血管生长组合物用于包衣斯坦特固定模的用途

[0086] 如上所述,本发明也提供了斯坦特固定模,其包括普通的管状结构(包括例如螺旋型),其表面用上述的组合物包衣。简而言之,斯坦特固定模是一种脚手架,通常为圆筒型,其可插入到由于疾病(如肿瘤向内生长)而变窄的体内通道内(如胆管),从而防止了通道的闭合或再闭合。斯坦特固定模通过物理性维持插入其的体内通道壁的开放而发挥作用。

[0087] 在本发明的范围内可使用各种斯坦特固定模,包括例如食道斯坦特固定模、血管斯坦特固定模、胆管斯坦特固定模、胰管斯坦特固定模、输尿管和尿道斯坦特固定模、泪管斯坦特固定模、咽鼓管斯坦特固定模、输卵管斯坦特固定模和气管/支气管斯坦特固定模。

[0088] 斯坦特固定模易于从市售获得,或者按照熟知的技术制造。斯坦特固定模代表性的例子包括描述于美国专利4776337中,题为“扩张性腔内移植片,移植扩张性腔内移植片的方法和装置”;美国专利5176626,题为“内置斯坦特固定模”;美国专利5147370,题为“用于中空体内导管的镍钛金属互化物斯坦特固定模”;美国专利5064435,题为“具有稳定轴长的自身扩张性修复术”;美国专利5052998,题为“内置斯坦特固定模及使用方法”以及美国专利5041126,题为“血管内斯坦特固定模及转运系统”,以上所有作为本文的参考文献。

[0089] 可以用各种方法将斯坦特固定模用本发明抗血管生长组合物或抗血管生长因子

包衣,包括例如:(a) 将抗血管生长组合物直接粘附到斯坦特固定模上(如用聚合物/药物膜喷雾斯坦特固定模,或者将斯坦特固定模滴入聚合物/药物溶液),(b) 用水明胶等可吸收抗血管生长组合物(或上述抗血管生长因子)的物质包衣斯坦特固定模,(c) 将抗血管生长组合物包衣的丝(或聚合物本身形成丝)织入斯坦特固定模结构中,(d) 将斯坦特固定模插入含有或用抗血管生长组合物包衣的套筒或筛网中,或者(e) 用抗血管生长组合物制造斯坦特固定模。本发明优选的实例中,组合物在贮存及插入时应牢固地粘附在斯坦特固定模上,同时在其直径由皱缩扩张至膨胀时不应从斯坦特固定模上掉下。抗血管生长组合物优选在贮存过程中、插入前或者在体内膨胀后升温至体温时不应降解。此外,其应光滑、平整地包衣斯坦特固定模(抗血管生长抑制物均匀分布,同时不改变斯坦特固定模的外形)。本发明优选的实例中,抗血管生长组合物应均匀、可预见的、持续地将抗血管生长组合物释放入放置斯坦特固定模周围的组织中。对于血管斯坦特固定模而言,除了上述性质外,组合物不应使斯坦特固定模形成血栓(造成血栓形成),或者在血流中引起明显的湍流(比未包衣的斯坦特固定模更易于引起这些现象)。

[0090] 本发明的另一方面提供了扩张体内通道腔的方法,其包括将斯坦特固定模插入通道,斯坦特固定模一般为管状结构,其表面用抗血管生长组合物(或单独的抗血管生长因子)包衣,这样就扩张了通道。各种实例如下所述,其中体内通道腔被扩张从而消除了胆管、食道、气管/支气管、尿道或血管的阻塞。另外,代表性的实施例详述于实施例7。

[0091] 一般地,斯坦特固定模不论部位或待治疗的疾病都以类似的方式插入。简而言之,一般首先进行插入前的检查,通常为一种诊断性成像-内成像,或者外科手术时直接观察以确定斯坦特固定模插入的准确位置。然后将一导线经损伤或预插入部位深入,其上穿过一个可使斯坦特固定模以皱缩形式插入的转运导管。一般地,斯坦特固定模可以压缩,这样其可经小导管从小腔插入,然后在其预计的位置膨胀至较大的直径。一旦膨胀后,斯坦特固定模物理性迫使通道壁分开,并维持其张开状态。这样,其能经小孔插入,然而仍可以维持在较大直径的腔或通道。斯坦特固定模可以是自身膨胀(例如Wallstent和Gianturcostent)、球膨胀(如PalmaZ斯坦特固定模和Strecker斯坦特固定模),或者通过温度的变化移植(如镍钛金属互化物斯坦特固定模)。

[0092] 斯坦特固定模一般在放射性或直接的视觉控制下置入,特别小心地将斯坦特固定模准确穿过待治疗器官的窄口。移去转运导管,使斯坦特固定模作为脚手架。通常使用X射线进行位点插入的检查以确证准确的位置。

[0093] 本发明一个优选的实例中,提供了消除胆管阻塞的方法,其包括将胆管斯坦特固定模插入胆管中,斯坦特固定模一般为管状结构,其表面用上述组合物包衣,这样就消除了胆管阻塞。简而言之,肿瘤长满正常的胆管会导致危及生命的进行性胆汁郁积性黄疸。一般地,将胆汁从肝脏引流入十二指肠的胆管体系最易被(1)由胆管细胞组成的肿瘤(胆管癌),(2)侵入胆管的肿瘤(例如胰腺癌)或者(3)对胆管施加外部压力并压缩其的肿瘤(肿大的淋巴结)。

[0094] 原发性胆管肿瘤和其它可引起胆管树压迫的肿瘤可以用本文所述的斯坦特固定模治疗。一个原发性胆管肿瘤的例子是腺癌(当其存在于正常肝管分支处时也称Klatskin肿瘤)。这些肿瘤也称作胆管癌、胆总管腺癌或者胆管系统腺癌。影响胆管的良性肿瘤(如胆管系统的腺瘤)以及少见的胆管鳞状细胞腺癌和胆囊腺癌也可以引起胆管树的压迫,从

而导致胆管阻塞。压迫并阻塞胆管的肝和胰肿瘤是压迫胆管树最常见的原因。胰腺的大多数肿瘤由胰管的细胞产生。这是一种致命的癌症（占癌症死亡的 5%；在美国每年有 26,000 例新患者），患者的平均生存时间为 6 个月，生存率为 1 年的只有 10%。当这些肿瘤位于胰腺的上端时，其经常会引起胆管阻塞，因而显著降低了患者的生活质量。所有的胰肿瘤一般都称作“胰腺癌”，一些组织学亚型包括：腺鳞癌、囊腺癌和 acinar 细胞癌。上述的肝肿瘤也可以引起胆管树的压迫，从而导致胆管阻塞。

[0095] 本发明的一个实例中，首先将胆管斯坦特固定模以几种方式插入胆管中：自顶端穿过腹壁和肝脏将针插入（经皮肝穿刺胆道造影或“PTC”）；自低端通过从口腔、胃或十二指肠插入的内窥镜插入胆管套管（内窥镜逆行胆管造影或“ERCP”）；或者在外科手术过程中直接切开。一般应进行 PTC、ERCP 或外科手术时直接观察等插入前的检查以确定斯坦特固定模插入的准确位置。然后将一导线经损伤部位深入，其上穿过一个可使斯坦特固定模以皱缩形式插入的转运导管。如果诊断检查为 PTC，导线和转运导管经腹壁插入；如果初始检查为 ERCP，则经口腔置入斯坦特固定模。接着在放射、内窥镜或直接观察的控制下放置斯坦特固定模（特别小心地将其穿过导管窄口准确放置）。移去转运导管，使斯坦特固定模作为脚手架维持胆管的张开状态。再进行一次胆道造影以确证斯坦特固定模准确定位。

[0096] 本发明的另一实例中提供了消除食道阻塞的方法，其包括将食道斯坦特固定模插入食道中，斯坦特固定模一般为管状结构，其表面用上述抗血管生长组合物包衣，这样就消除了食道阻塞。简而言之，食道是一个将食物和液体从口腔转运至胃的中空管道。食道癌或者被来自邻接器官的癌（例如胃癌或肺癌）侵入会导致不能吞咽食物或唾液。在这一实例中，应进行插入前的检查，通常是吞咽钡或者内窥镜检查以确定斯坦特固定模插入的准确位置。然后通过口腔置入导管或内窥镜，经阻塞处深入导线。在放射或内窥镜控制下将斯坦特固定模转运导管穿过导线，经食道中的窄口小心放置斯坦特固定模。插入后的检查，通常为钡餐 X 射线应用于确证准确的定位。

[0097] 本发明的另一实例中提供了消除气管 / 支气管阻塞的方法，其包括将气管 / 支气管斯坦特固定模插入气管或支气管中，斯坦特固定模一般为管状结构，其表面用上述抗血管生长组合物包衣，这样就消除了气管 / 支气管阻塞。简而言之，气管和支气管是将空气从口鼻载入肺的通道。由于癌、被来自邻接器官的癌（例如肺癌）侵入或者由于软骨软化（软骨环削弱）导致的气管或支气管塌陷而引起的气管阻塞会导致不能呼吸。本发明的这一实例中，应进行插入前的检查，通常是内窥镜检查以确定斯坦特固定模插入的准确位置。然后通过口腔置入导管或内窥镜，经阻塞处深入导线。然后将转运导管穿过导线以插入皱缩的斯坦特固定模。在放射或内窥镜控制下放置斯坦特固定模以使其穿过窄口准确放置。接着移去转运导管，使斯坦特固定模作为脚手架。插入后的检查，通常为支气管镜检查应用于确证准确的定位。

[0098] 本发明的另一实例中提供了消除尿道阻塞的方法，其包括将尿道斯坦特固定模插入尿道中，斯坦特固定模一般为管状结构，其表面用上述抗血管生长组合物包衣，这样就消除了尿道阻塞。简而言之，尿道是将通过阴茎排空膀胱的通道。几乎每个年过 60 的男人都会有由于前列腺肥大而导致的前列腺尿道外部狭窄，其可引起进行性排尿困难。在这一实例中，首先应进行插入前的检查，通常是内窥镜检查或尿道内径扫描以确定斯坦特固定模插入的准确位置（其在下端的外尿道括约肌上，在上端接近充盈的膀胱颈）。然后通过阴

茎口置入内窥镜或导管，将导线深入膀胱。然后将转运导管穿过导线以插入斯坦特固定模。接着移去转运导管，斯坦特固定模膨胀定位。插入后的检查，通常为内窥镜或逆行尿道内径扫描检查应用于确证准确的定位。

[0099] 本发明另一实例提供了消除血管阻塞的方法，其包括将血管斯坦特固定模插入血管中，斯坦特固定模一般为管状结构，其表面用上述抗血管生长组合物包衣，这样就消除了血管阻塞。简而言之，斯坦特固定模可置于各种血管（动脉和静脉）中用以防止在失败的血管成形术处复发狭窄，治疗用血管成形术处理可能失败的狭窄以及治疗术后狭窄（如透析移植狭窄）。适当部位的代表性例子包括髂骨、肾和冠状动脉、上腔静脉以及透析移植植物中。其中一个实例，首先进行血管造影术以确定斯坦特固定模插入的位置。这通常通过经插入动脉或静脉（照射）的导管注射不透射线的造影剂而完成。然后经皮或经外科手术将导管插入股动脉、肱动脉、股静脉或肱静脉，并在荧光屏检查下通过动脉系统深入确定的血管中。然后穿过血管狭窄处定位斯坦特固定模。插入后的血管造影术也可以用以确证准确的定位。

[0100] 抗血管生长组合物在外科手术过程中的用途

[0101] 如上所述，抗血管生长组合物可用于各种外科手术过程中。例如，本发明的抗血管生长组合物（如喷雾剂或膜的形式）可在去除肿瘤前用以包衣或喷雾特定区域，从而将正常的周围组织与恶性组织隔离开来，并且 / 或者防止疾病向周围组织扩散。本发明的另一方面，抗血管生长组合物（如喷雾剂形式）可以通过内窥镜检查方式转运以包衣肿瘤或者在预定部位抑制血管生长。本发明的另一方面，用本发明组合物包衣的外科手术用筛网可用于其可使用的任何过程。例如，本发明的一个实例中，装满抗血管生长组合物的外科手术用筛网可用于腹部癌切除手术（如结肠切除术后）以支持结构，同时释放一些抗血管生长因子。

[0102] 本发明另一方面提供了处理肿瘤切除部位的方法，其包括将上述抗血管生长组合物施于切除后的肿瘤切除边缘，从而抑制了癌症复发以及该部位新血管的形成。本发明的一个实例中，将抗血管生长组合物（或单独的抗血管生长因子）直接施于肿瘤切除部位（例如用拭抹、刷擦或其它方法用抗血管生长组合物或因子包衣肿瘤的切除边缘）。同样，在给药前也可将抗血管生长组合物或因子制成已知的外科手术用糊剂。在本发明特别优选的实例中，在切除肝恶性肿瘤后及神经外科术后施用抗血管生长组合物。

[0103] 本发明的另一本方面，抗血管生长组合物（如上所述）可用于各种肿瘤的切除边缘，包括例如乳腺瘤、结肠肿瘤、脑和肝肿瘤。例如，本发明的一个实例中，抗血管生长组合物可在切除后的神经瘤部位施用，从而抑制了该部位新血管的形成。简而言之，大脑是高度功能定位的，即每一特定的解剖区域执行特定的功能。因此，大脑病理的部位通常比其类型更为重要。在关键区域中一个相对小的损伤比不太重要区域中较大的损伤更具有破坏性。类似地，大脑表面的损伤或许易于手术切除，但是位于大脑深层的相同肿瘤可能不能（预切除需通过太多的重要结构才能到达）。同样，甚至良性肿瘤由于几种原因也可以有危险：其可能长在关键区域而引起显著损伤；尽管其通过手术切除可能治愈这也是不可能的；最后，如果未控制，其可能引起颅内压的升高。头颅骨是一个不能扩充的封闭空间。因此，如果在某一部位有东西生长，在另外的部位就会受压 - 结果头颅骨内的压力就升高或者是颅内压升高。如果不处理这种状况，就会压迫重要结构而导致死亡。CNS（中枢神经系统）恶

性肿瘤的发生率为每 100,000 人 8-16。大脑早期恶性肿瘤的预后是致命的,存活中数少于一年,甚至在手术切除后。这些肿瘤,特别是神经胶质瘤是主要的一种手术切除后在原始病灶 2 公分内复发的局部疾病。

[0104] 可以用此所述组合物及方法治疗的脑肿瘤的代表性例子包括神经胶质瘤(如多形性成胶质细胞瘤、多态恶性胶质瘤、纤维性星性细胞瘤、少突神经胶质瘤、室管膜瘤、粘液乳头室管膜瘤、亚室管膜瘤、脉络丛乳头瘤);神经瘤(例如成神经细胞瘤、成神经节细胞瘤、神经节瘤和成神经管细胞瘤)松果体腺瘤(如成松果体细胞瘤和松果体瘤);脑脊膜肿瘤(如脑脊膜瘤、脑脊膜血管外皮细胞瘤、脑脊膜肉瘤);神经鞘细胞瘤(如神经鞘瘤和神经纤维瘤);淋巴瘤(如何杰金及非何杰金淋巴瘤(包括各种亚型,原发性和继发性))、变态瘤(如颅咽管瘤、表皮样囊肿、皮样囊肿和胶质囊肿)以及转移瘤(其可来源于任何肿瘤,最常见的来自肺、乳腺、黑素瘤、肾及胃肠道肿瘤)。

[0105] 抗血管生长组合物的其它治疗性用途

[0106] 除了肿瘤,许多其它非致瘤性血管生长依赖疾病(其的特征为血管的异常生长)也可以用本发明的抗血管生长组合物或抗血管生长因子治疗。这种非致瘤性血管生长依赖疾病的代表性例子包括角膜新生血管形成、肥大瘢痕和瘢痕瘤、增生性糖尿病视网膜病、类风湿性关节炎、动静脉畸形(上面已讨论)、动脉粥样硬化斑、伤口愈合延迟、血友病性关节、骨不连合骨折、Osler-Weber 综合症、牛皮癣、生脓肉芽肿、硬皮病、沙眼、痛经(上面已讨论)以及血管粘连。

[0107] 特别地,本发明的其中一方面提供了治疗角膜新生血管形成(包括角膜移植植物新生血管形成)的方法,其包括将治疗有效量的抗血管生长组合物(如上所述)给予角膜,从而抑制了血管的形成。简而言之,角膜是一种一般缺乏血管的组织。在特定的病理状态下,毛细管可以从角膜缘的角膜周血管丛深入到角膜。当角膜形成血管时,其也变得模糊不清,结果患者的视力敏锐性下降。如果角膜完全混浊,则视力丧失。

[0108] 血管可以以各种形式和深度进入角膜,其取决于促成新生血管形成的过程。眼科学家将这些形式传统地定义为以下几类:角膜翳沙眼、角膜翳 leprosus、角膜翳 phylctenulus、角膜翳变性和青光眼角膜翳。角膜基质也可以通过睫前动脉分支而被侵袭(称为间质血管化),其可引起几种独特的临床损伤:末端襻、刷子样图案、伞型、格子型、间质连拱(从巩膜外层血管)和迷行不规则血管。

[0109] 许许多多的疾病都可以导致角膜新生血管形成,包括例如角膜感染(如沙眼、单纯疱疹性角膜炎、利什曼病和盘尾丝虫病)、免疫过程(如移植物排斥和 Stevens-Johnson's 综合症)、碱灼伤、创伤、发炎(任何起因)、毒性和营养不足状态以及配戴隐形眼镜引起的并发症。

[0110] 尽管角膜新生血管形成的原因有很多,但是角膜对损伤的反应以及随后的血管向内生长不论什么原因都是类似的。简而言之,只有那些位于缘重要距离内的受伤的部位似乎很重要,其会促发血管生长应答。这可能是由于激发血管侵袭的抗血管生长因子是在损伤部位产生的,其必然会扩散到最邻近的血管(缘)以发挥其的作用。从缘越过一定距离,这就不可能发生,并且不会诱导缘内皮长入角膜。一些血管生长因子可能与此过程有关,它们许多是炎性反应的产物。的确,角膜新生血管的形成似乎仅发生在炎性细胞浸润过程中,并且血管生长的程度与炎性反应的程度成正比。角膜水肿通过松弛角膜基质韧带及提供

“最小阻力”的毛细管生长通道而进一步助长了血管的向内生长。

[0111] 初期炎性反应后,毛细管以其在其它组织中相同的方式长入角膜。缘毛细管和小静脉的通常静止性内皮细胞受到刺激而分化并迁移。内皮细胞从其原来的血管突出,消化周围的基膜及其将通过的组织,并且向血管生长刺激源迁移。盲端的新芽具有了腔,然后吻合在一起形成毛细管襻。最后的结果是在角膜内建立了血管丛。

[0112] 本发明的抗血管生长组合物通过阻断血管生长助催化剂的刺激作用、减少内皮细胞分化、减少内皮细胞迁移并且破坏内皮分泌的蛋白水解酶的活性而发挥作用。

[0113] 本发明特别优选的实例中,抗血管生长因子可以在盐水中制备成局部用药的形式(含有通常用于眼用制剂的任何防腐剂和抗菌剂),并且以滴眼剂的形式给药。抗血管生长因子溶液可以其纯净形式制备,每天给药数次。同样,抗血管生长组合物(如上制备)也可直接用于角膜。在优选的实例中,抗血管生长组合物用可结合到角膜的粘液附着性聚合物制备。在另外的实例中,抗血管生长因子或抗血管生长组合物可以用作常规甾类化合物治疗的佐剂。

[0114] 局部治疗也可用于角膜损伤,角膜损伤极有可能诱导血管生长应答(如化学灼烧)。在这些情况下,立即进行治疗(可能与类固醇一起)可有助于防止随后的并发症。

[0115] 在其它实例中,上述抗血管生长组合物可以在显微镜指引下由眼科医生直接注射入角膜基质。注射优选部位可随患者个人损伤的形态学的不同而不同,但是用药的目的是将组合物置于脉管系统的前方(即,散布在血管和正常角膜间)。在多数情况下,进行角膜缘注射以“防止”角膜生长血管。这一方法也可在角膜损伤后立刻施用以预防性防止角膜新生血管形成。在这种情况下,药物应注射入散布在角膜损伤及其不希望的?角膜缘中。在防止毛细管侵袭移植角膜中也可类似使用这种方法。如果使用持续释放的制剂,每年仅需注射2-3次。也可在注射液中加入类固醇以减少由注射剂本身导致的发炎。

[0116] 本发明另一方面提供了治疗肥大瘢痕和瘢痕瘤的方法,其包括将上述一种抗血管生长组合物用于肥大瘢痕或瘢痕瘤。

[0117] 简而言之,伤口的愈合及瘢痕的形成发生在三个阶段中:发炎,增殖和成熟。第一阶段-发炎出现在对严重到?的应答中。在这一阶段(持续3到4天),血液和组织液形成粘性凝块和纤维网,其可将伤口表面连接到一起。然后是增殖阶段,其中伤口边缘的毛细管和结缔组织向内生长,并且闭合皮肤的缺陷。最后,一旦毛细管和成纤维细胞的增殖停止,成熟阶段就开始,其中瘢痕收缩并且变得少细胞、少血管,并且看起来平坦和白净。这一最后的阶段要花费6至12个月。

[0118] 如果产生了太多的结缔组织并且伤口仍不断地细胞化,瘢痕会变红并且高出来。如果瘢痕保持在最初伤口的边界内,其是指肥大瘢痕,但是如果其延伸出最初的瘢痕并进入周围的组织,则损伤是指瘢痕瘤。肥大瘢痕和瘢痕瘤产生于瘢痕形成的第二和第三阶段。一些伤口特别容易过度的内皮和成纤维细胞增殖,包括灼烧、开放伤口和感染伤口。随肥大瘢痕一起,产生不同程度的成熟并且逐渐改善。在瘢痕瘤中,则产生一种能变得很大的实实在在的肿瘤。这种情况下少见自发性改善。

[0119] 因此,在本发明一个实例中,如上所述的单独的抗血管生长因子或者抗血管生长组合物直接注射入肥大瘢痕或瘢痕瘤中以防止损伤的发展。注射的频率取决于所用聚合物(如果有的话)的释放动力学及临床应答。这一治疗在预防性治疗(一些已知可导致肥大

瘢痕和瘢痕瘤生长的情况(如灼烧))中尤其有用,并且优选在增殖阶段有时间进展后开始(在最初损伤后约14天)。

[0120] 本发明另一方面提供了治疗新生血管性青光眼的方法,其包括将治疗有效量的抗血管生长组合物用于眼,这样就抑制了血管的形成。

[0121] 简而言之,新生血管性青光眼是一种病理状态,其中在眼虹膜中生长新的毛细管。血管生长一般源于瞳孔边缘的血管,沿虹膜根生长并进入角膜滤帘。成纤维细胞及其它结缔组织成分与毛细管的生长有关,纤维血管膜沿虹膜的前表面生长。最后,该组织到达前房角,并在此形成角膜粘连。角膜粘连依次连接、成瘢痕及收缩,直至最后闭合前房角。瘢痕的形成阻止了水样液从前房角的充分排出及进入角膜滤帘,从而导致眼内压升高而可能失明。

[0122] 新生血管性青光眼一般作为视网膜局部缺血为主的疾病的一种并发症。特别地,患有这种疾病的约三分之一患者具有糖尿病视网膜疾病,28%的患者具有中心视网膜静脉阻塞。其它的还有慢性视网膜脱落、晚期青光眼、颈动脉阻塞性疾病、晶状体后纤维组织化、镰刀性细胞贫血、眼内瘤和颈动脉多孔瘤。在早期阶段,新生血管性青光眼可以通过高倍缝灯生物显微镜诊断,即在虹膜表面出现了小的、膨胀的混乱毛细管(漏荧光)。后来的前房角镜通过纤维血管带证实了前房角的进行性闭塞。如果前房角仍是开放状态,保留性治疗会有帮助。但是,一旦前房角关闭,就需要进行手术以减轻眼内压。

[0123] 因此,本发明的一个实例中,抗血管生长因子(单独或者在抗血管生长组合物中,如上所述)可局部用于眼以治疗早期的新生血管性青光眼。

[0124] 本发明的另一实例中,抗血管生长组合物可以通过将该组合物注入前房角部位而移植。其可提供一种持续集中增加的抗血管生长因子,并防止血管长入该区域。移植或注射的抗血管生长组合物(置于虹膜的前毛细管和前房角之间)可以“保护”开放的前房角不进行新生血管化。当毛细管不在抗血管生长组合物的明显半径内生长时,即可维持前房角的开放性。另一个实例中,抗血管生长组合物也可置于任何地方,这样抗血管生长因子就连续地释放入水样液中。这可以增加水样液中抗血管生长因子的浓度,其反过来可浸泡虹膜表面及其异常的毛细管,从而提供了另一种转运药物的机制。这些治疗形式也可用于预防,并且可与现有的治疗方法结合。

[0125] 本发明的另一方面提供了治疗增生性糖尿病视网膜疾病的方法,其包括将治疗有效量的抗血管生长组合物用于眼,从而抑制了血管的形成。

[0126] 简而言之,糖尿病视网膜疾病的病理学被认为与上述新生血管性青光眼类似。特别地,认为糖尿病视网膜疾病的背景是在视网膜缺氧的影响下转化为增生性糖尿病视网膜疾病。一般地,新生血管组织从视神经(通常在边缘的10mm内)长出,以及从组织灌注缺乏部位的视网膜表面长出。最初,毛细管在视网膜内部有限的膜及玻璃体的后表面之间生长。最后,血管长入玻璃体并穿过内部有限的膜。当玻璃体收缩时,牵引力施加在血管上,通常会导致血管断裂并遮蔽玻璃体(由于出血)。视网膜中瘢痕的纤维牵引力也可产生视网膜脱落。

[0127] 选择的常规治疗是全视网膜光凝固以减少视网膜组织,从而降低视网膜的氧需求量。尽管其最初是有效的,但是会有高的复发率(新的损伤在视网膜其它部位形成)。这一治疗的并发症包括周围视觉的下降(50%的患者)、角膜的机械性磨损、激光诱导的白内障

形成、急性青光眼及亚视网膜新生血管生长的刺激（其会导致视力的丧失）。因此，这一方法只是在存在一些危险因素并且危险 - 有益的比例明显有利于干涉治疗时才进行。

[0128] 因此，本发明特别优选的实例中，增生性糖尿病视网膜疾病可以通过将抗血管生长因子（或抗血管生长组合物）注射入水样液或玻璃体中以增加视网膜内抗血管生长因子的浓度而进行治疗。优选地，这种治疗应在患上严重疾病（需要光凝固）之前开始。本发明的另一个实例中，可以栓塞供给新生血管损伤的动脉（使用如上所述的抗血管生长组合物）。

[0129] 本发明的另一方面提供了治疗晶状体后纤维组织化的方法，其包括将治疗有效量的抗血管生长因子（或抗血管生长组合物）用于眼，从而抑制血管的形成。

[0130] 简而言之，晶状体后纤维组织化是一种发生在接受氧治疗的早产婴儿中的疾病。周围视网膜脉管系统（特别是太阳穴边）直到胎儿生命末才完全形成。过量的氧气（甚至在分娩期为生理性的水平）及氧游离基的形成被认为是引起未成熟视网膜血管损伤的重要原因。这些血管收缩，然后由于暴露在氧气中其变得结构性阻塞。因此，周围视网膜不能形成血管，结果产生视网膜局部缺血。由于局部缺血，在正常的及局部缺血的视网膜连接处产生新生血管形成。

[0131] 在 75% 的病例中，这些血管自动退化。但是，剩下的 25% 仍继续毛细管生长、纤维血管成分的收缩及血管和视网膜的牵引。这会导致玻璃体出血和 / 或视网膜脱落而引起失明。新生血管角闭合性青光眼也是这一疾病的并发症。

[0132] 确定哪种疾病会自愈及哪种将更为严重通常是可能的，一般仅在患有确定疾病及具有充分发展的病理学的患者中进行治疗。这种“等候查看”的方法阻止了早期治疗干涉，使得疾病进一步发展（25% 的患者病情复杂化）。因此，本发明的一个实例中，可在婴儿（其中该疾病的进展具有高度的危险性）中局部施用抗血管生长因子（或抗血管生长组合物，如上所述）以切断晶状体后纤维组织化进展的影响。另一实例中，可以进行玻璃体内注射和 / 或眼内移植抗血管生长组合物。在已确定的疾病中这些方法尤为优选，从而减少手术的需求。

[0133] 本发明的另一方面提供了治疗类风湿性关节炎的方法，其包括将治疗有效量的抗血管生长组合物用于关节，从而抑制了血管的形成。

[0134] 简而言之，在类风湿性关节炎中，关节的损伤是由于炎症（包括白细胞和白细胞产物）和关节翳组织（一种由新生血管组织、结缔组织和炎症细胞组成的组织）的发展。一般地，慢性炎症其本身不足以导致关节表面的损伤，但是一旦纤维血管组织消化了软骨组织就会产生永久的缺陷。

[0135] 本发明的一个优选的实例中，抗血管生长因子（包括抗血管生长组合物，如上所述）可以通过关节内注射、作为外科手术用糊剂或口服制剂（例如，含有抗血管生长因子的反应停）而应用，从而抑制了关节内血管的形成。这一方法代表性例子详见下面的实施例 9。

[0136] 如上所述，本发明另一方面提供了含有一个合成管（其表面包衣有如上所述的抗血管生长组合物）的血管移植物。简而言之，血管移植物是一种合成管（通常由涤纶或 Gortex 制得），经手术插入而绕过动脉阻塞，最常见的是从主动脉至股动脉，或者从股动脉至腿弯部动脉。使股动脉 - 腿弯部动脉旁道移植物复杂化的一个主要问题是血管壁中亚内

皮类瘢痕反应的形成(称为新生内膜增生)。其可使邻接移植物任一末端的管腔变窄,并且其可能为进行性的。包衣有或含有抗血管生长因子(或抗血管生长组合物,如上所述)的移植物可用于在移植物任一末端限制新生内膜增生的形成。然后可以通过常规的旁道技术将移植物手术置入。

[0137] 本发明的抗血管生长组合物也可以各种其它方式应用。例如,其可以结合到手术缝线中以防止缝线肉芽瘤;移植到子宫内(像宫内节育器那样)来治疗痛经或者作为一种控制女性生育的方式;作为腹膜灌注液或在治疗子宫内膜异位时用于腹膜移植;作为一种系统化疗形式附着在对抗活化内皮细胞的单克隆抗体上;或者附着在放射性标记的识别活化内皮细胞的单克隆抗体上而用于诊断性成像。

[0138] 下述实施例用于说明,而非限定。

[0139] 实施例

[0140] 实施例 1 :抗侵袭性因子的制备

[0141] 切开角鲨的肩胛带和颅骨,然后用手术刀刮以除去软骨上所有的肌肉及相关的结缔组织。然后用组织研磨机使软骨均匀,在含有 2.0M 盐酸胍和 0.02MMES 的溶液(pH6.0) 中于室温连续搅拌 2 至 5 天来萃取。

[0142] 2 至 5 天后,将软骨萃取物通过网状丝布除去大的成分。然后将滤液通过使用螺旋形筒的 Amicon 超滤器(其可切去分子量 100,000)。滤液(含有分子量小于 100,000 道尔顿的蛋白质) 在 0.02MMES 缓冲液(pH6) 中渗析,其用 Amicon 超滤器保留住分子量大于 3,000 道尔顿的蛋白质。通过使用这一方法可除去低分子量的蛋白质和成分,以及过量的盐酸胍。将渗析液浓缩至终浓度 9mg/ml。

[0143] 实施例 2 :各种药物的抗血管生长活性分析

[0144] A :鸡绒毛膜尿囊膜(“Cam”)试验

[0145] 将受精的家养鸡胚在无壳培养前孵育 3 天。在此过程中,通过除去位于空气中的蛋壳而倒空蛋的内容物。然后分离里面的蛋壳膜,将蛋壳的另一末端穿孔以使蛋内容物缓慢滑出钝端。将蛋内容物倒入圆底无菌玻璃碗中,用陪替氏培养皿盖上。然后将其置于孵育箱(90% 的相对湿度,3% CO₂) 中孵育 3 天。

[0146] 将红豆杉醇(Sigma, St. Louis, MI) 在浓度为 1,5,10,30mg 每 10ml 等分试样的 0.5% 含水甲基纤维素中混合。由于红豆杉醇不溶于水,所以使用玻璃珠来产生细颗粒。将该溶液的 10 微升等分试样在间隔膜上干燥 1 小时形成直径 2mm 的圆盘。然后将含有红豆杉醇的干燥圆盘小心置于孵育 6 天的每一 CAM 的生长边缘。通过将不含红豆杉醇的甲基纤维素圆盘放置在经过相同时间的 CAM 上而获得对照。放置 2 天后(孵育的第 8 天),用立体显微镜检查脉管系统。将 LiposynII—一种白色不透明溶液注入 CAM 中以增加血管细节的可见度。用一个与摄像机接口的 Zeiss 立体显微镜(Dage-MTI Inc., Michigan City, IN) 将未染色的活鸡胚的脉管系统成像。然后将这些视频信号放大 160 倍并用影像分析系统(Vidas, Kontron; Etching, Germany) 捕捉。然后在图形记录仪(Model 3000; Matrix Instruments, Orangeburg, NY) 上制作影像底片。

[0147] 用 2% 戊二烯的 0.1M 二甲胂酸钠缓冲液灌注 8 天的无壳鸡胚膜;在 CAM 下注射另外的固定剂。10 分钟后,除去 CAM 并置于室温下新鲜的固定剂中 2 小时。将该组织在含有 6% 蔗糖的二甲胂酸盐缓冲液中洗涤过夜。将待用区域在 1% 的四氧化锇中于 4°C 再固

定 1.5 小时。然后将该组织于分级乙醇中脱水,用氧化丙烯交换溶剂并包埋在 Spurr 树脂中。用金刚刀切下薄的部分,置于铜栅上,染色,用 Joel1200EX 电子显微镜检查。类似地,将 0.5mm 部分切下,用甲苯兰染色以用于光学显微镜检查。

[0148] 进行 11 天后,将鸡胚用于腐蚀浇铸技术。用 30 规皮下针将 Mercox 树脂 (TedPella, Inc., Redding, CA) 注入 CAM 脉管系统中。浇铸材料由 2.5 克 MercoxCL-2B 聚合物及 0.05 克具有 5 分钟聚合时间的催化剂 (55% 的过氧化苯甲酰) 组成。注射后,将该塑料在室温下放置 1 小时,然后在 65°C 的烘箱中过夜。接着将 CAM 置于 50% 氢氧化钠水溶液中以消化所有的有机成分。在蒸馏水中彻底洗涤塑料模子,空气中干燥,以金 / 钯包衣,用 Philips501B 扫描电子显微镜观察。

[0149] 上述实验的结果如图 1-4 所示。简而言之,正常鸡无壳蛋培养物的一般特征如图 1A 所示。在孵育的第 6 天,在鸡胚中心有一个径向扩展的血管网;CAM 在鸡胚旁发育。这些生长的血管紧靠表面,并且用该系统易于观察,其是一个研究血管生长的理想模型。活的未染色的 CAM 毛细管网可以用立体显微镜非侵袭性成像。图 1B 表明了一种血管区,其中毛细管内的细胞性血液元素用视频 / 计算机接口记录。这种 CAM 毛细管网的三维构造可通过腐蚀浇铸法显示,并且可用扫描电子显微镜观察 (图 1C)。这些浇铸显示了伸向 CAM 表面的下层血管,在 CAM 表面其可形成单层 吻合毛细管。

[0150] CAM 的横向部分显示出由双细胞层组成的外胚层、含有毛细管 (位于外胚层下) 的较宽的中胚层、外膜细胞及内部的单内胚层细胞层 (图 1D)。在电子显微镜水平显示 CAM 毛细管的典型结构细节。一般地,这些血管与外胚层的内部细胞层紧密相连 (图 1E)。

[0151] 置于浓度为 1, 5, 10 或 30mg 的红豆杉醇 48 小时后,在生存条件下用配有视频 / 计算机接口的立体显微镜检查每一 CA 以评估血管生长的效应。在放大 160 倍下 (目的是直接观察毛细管内的血细胞) 使用这种成像设备;这样待查区域的血流可易于评价和记录。对于这一研究,将血管生长的抑制定义为在直径 2-6mm 的范围内缺少血管网的 CAM 区域。抑制区缺乏血管血流,因此只有在含有红豆杉醇的甲基纤维素的实验条件下才能观察到;在不含红豆杉醇圆盘的对照条件下,对生长的毛细管系统没有作用。剂量依赖的、在不同浓度红豆杉醇作用的实验数据如表 II 所示。

[0152] 表 II

[0153] 红豆杉醇的血管生长抑制作用

红豆杉醇浓度 μg	鸡胚的评价 (阳性 / 总数)	% 抑制
30	31/31	100
10	16/21	76
5	18/25	72
1	6/15	40
对照	0/30	0

[0161] 用中心放置有直径为 6mm 的无血管区的透明的甲基纤维素圆盘中显示典型的红豆杉醇处理的 CAM (图 2A 和 2B)。在稍高的倍数,这种无血管区的边界非常明显 (图 2C);周围的功能性血管通常从红豆杉醇源改向 (图 2C 和 2D)。在正常条件下从未观察到这种血流的多角改向。红豆杉醇作用的另一特征是在无血管区形成血液岛,其表示血细胞的聚集。

[0162] 用红豆杉醇处理 CAM 的相关形态学改变在光学及电子显微镜下很明显。为方便起见,显示出从正常转变到无血管状态的 3 个不同阶段。在靠近无血管区的边缘,通过所有三个胚层内的有丝分裂细胞将 CAM 标记(图 3A 和 4A)。这种增加的有丝分裂也可连续观察毛细管内皮细胞。但是,内皮细胞仍保持连接完整,没有血细胞的外渗。进一步降解后,CAM 便以毛细管的破裂和溶解为特征(图 3B 和 4B)。假想的内皮细胞(一般在有丝分裂中抑制)仍然保持与血细胞的紧密空间联系,并且位于外胚层下;但是,这些细胞没有连接。无血管区的最中心处为加厚的外胚层和内胚层(图 3C 和 4C)。尽管这些层加厚了,细胞连接处仍保持完整,同时各层仍保持其结构特征。在中胚层内充满散在的有丝分裂抑制的细胞,这些细胞没有显示出前一阶段观察到的内皮细胞极化作用。同时,在整个无血管区常见降解的细胞,其为电子密集的液泡和细胞碎片(图 4C)。

[0163] 概括而言,本项研究证实了对 CAM 使用红豆杉醇 48 小时后抑制了血管生长。血管抑制作用形成了一个无血管区,其由红豆杉醇作用的 3 个转变阶段代表。无血管区中心最受影响的区域含有外渗红细胞的破裂的毛细管;其表明在内皮细胞间没有了细胞内的连接。内胚层细胞和外胚层细胞保留了其的细胞内连接,因此这些胚层是完整的;但是其稍微加厚了。接近正常血管区,血管保持了其连接复杂性,因此也是完整的。在红豆杉醇处理区的边缘,进一步的血管生长受到抑制,其特征是血管典型的改向或者是“弯头”作用(图 24D)。

[0164] 红豆杉醇处理的无血管区也呈现出 CAM 所有 3 个胚层的大量细胞在有丝分裂中的抑制;这是红豆杉醇所特有的,因为以前的研究没有说明这一现象。由于在有丝分裂中受到抑制,内皮细胞不能进行其正常的血管生长代谢功能。相比而言,由苏拉明和醋酸可的松形成的无血管区在 CAM 中不产生有丝分裂抑制的细胞;其只是阻止了血管进一步长入处理过的区域。因此,尽管都是抗血管生长的药物,血管生长过程的靶位有许多位点。

[0165] 同时也花费了 48 小时的时间观察红豆杉醇的作用,并且注意到血管生长的抑制发生在用药后 9 小时。组织学部分表明了如 48 小时无血管区第一个转变阶段出现的类似的形态学(如图 3a 和 4a 所示)。同样,观察到了先前观察的无血管区重新血管化过程。已发现由肝素和血管稳定性类固醇形成的无血管区在用药后 60 小时重新血管化。本项研究中,用红豆杉醇处理的无血管区在用药后至少 7 天未发生重新血管化,其表明了一种更有力的长期作用。

[0166] 实施例 3: 苏拉明的包囊

[0167] 将 1 毫升 5% ELVAX(与 5% 乙烯基乙酸酯交联的聚(乙烯乙酸乙烯酯))的二氯甲烷(“DCM”)与固定重量的苏拉明钠亚微细粒粉末混合。将该混合物注入 30ml 平底试管中的 5ml 5% 聚乙烯醇(“PVP”)水溶液中。然后将含有不同重量药物的试管悬浮在 40°C 自动搅拌的多试样水浴中 90 分钟。移去混合物,将微球试样用于粒度分析。将试管在 1000g 离心 5 分钟。除去 PVA 上清液,留作分析(未包囊药物)。然后在 5ml 水中洗涤(漩涡)微球并重新离心。5ml 洗液留作分析(表面结合的药物)。然后在 50ul 甲醇中润湿微球,在 1ml DCM 中涡旋以溶解 ELVAX。接着将微球升温至 40°C, 搅拌下缓缓加入 5ml 50°C 的水。此过程导致 DCM 迅速蒸发,因此使苏拉明钠释放入 5ml 水中。然后将所有 5ml 试样用于测定药物含量。

[0168] 苏拉明钠在 λ_{\max} 312nm 吸收紫外/可见光。该吸收在 0 至 100ug/ml 的范围内(水

及 5% PVA 中) 成线性。药物在 312nm 的最大激发波长处及 400nm 的最大发射波长处有强烈的荧光。这种荧光在 0 至 25ug/ml 的范围内可定量。

[0169] 结果如图 5-10 所示。简而言之,微球的粒度分布似乎不受 DCM 中药物内含物的影响(见图 5 和 6)。在 20 至 60um 范围内可获得很好的微球产率。

[0170] 苏拉明的包囊非常低(<1%) (见图 8)。但是,随着 DCM 中药物重量的增加,包囊药物的总量也增加,尽管包囊的百分数下降。如图 7 所示,在 50mgELVAX 中可包囊 50ug 药物。苏拉明钠在含有 10% NaCl 的 5% PVA 中的包囊如图 9-10 所示。

[0171] 实施例 4 :红豆杉醇的包囊

[0172] 将 500 毫克的红豆杉醇或浆果赤霉素(一种红豆杉醇类似物,可从 Inflazyme Pharmaceuticals Inc., Vancouver, British Columbia, Canada 获得)溶于 1ml50 : 50 的 ELVAX : 聚乳酸混合物(dcm)中。然后在溶解器(六锭子溶解测试仪, VanKill Industries Inc., U.S.A.)中以 200 转 / 分的速率于 42°C 制备 3 份微球(3 小时)。所制得的微球在水中洗涤两次,于显微镜上测定大小。

[0173] 在紫外 / 可见试验(紫外 / 可见 λ_{max} 237nm, 在激发波长 237 及发射波长 325nm 处进行荧光试验:荧光结果用方括号 [] 表示)下确定红豆杉醇的包囊。使用上述的方法, 58ug (+/-12ug) [75ug (+/-25ug)] 的红豆杉醇可从 500ug 起始材料中包囊。其表示 12% (+/-2.4%) [15% (+/-5%)] 的原始重量, 或者 1.2% (+/-0.25%) [1.5% (+/-0.5%)] 重量的聚合物。在烘箱中于 37°C 转动 18 小时后, 10.3% (+/-10%) [6% (+/-5.6%)] 总量的红豆杉醇从微球中释放出。

[0174] 对于浆果赤霉素而言, 100+/-15ug [83+/-23ug] 的浆果赤霉素可从 500ug 总量的起始材料中包囊。其表示 20% (+/-3%) [17% (+/-5%)] 的浆果原始重量, 及 2% (+/-0.3%) [1.7% (+/-0.5%)] 重量的聚合物。在烘箱中于 37°C 转动 18 小时后, 55% (+/-13%) [60% (+/-23%)] 的浆果赤霉素从微球中释放出。

[0175] 实施例 5 :含有抗血管生长组合物的手术用糊剂的分析

[0176] 将重量约为 300 克的 Fisher 大鼠麻醉, 横向切开 1cm 的上腹部。将十分之二毫升含有 1×10^6 活的 9L 神经胶质肉瘤(在用于组织培养前立即洗脱)的盐水注入 2 个肝叶中(共 5 个, 通过将一个 27 规针穿入肝囊 1cm 处)。用 6.0 吸收缝线和皮肤钳闭合腹部伤口, 并用全身麻醉剂终止。

[0177] 2 周后, 肿瘤沉积处约有 1cm。这时, 切除肝肿瘤, 并且将止血药施于肝暴露的边缘。大鼠分为两组:一半单独给予聚合物载体, 另一半接受抗血管生长组合物。

[0178] 肝切除后 2, 7, 14, 21 及 84 天处死大鼠。特别地, 将 Euthanyl 注入尾背静脉而使大鼠安乐死去。除去肝、脾及肺, 进行组织学分析以研究肿瘤作为抗血管生长活性的证据。

[0179] 实施例 6 :大鼠动脉的栓塞

[0180] 将重量约为 300 克的 Fisher 大鼠麻醉。在无菌条件下, 横向切开 1cm 的上腹部。将十分之二毫升含有一百万活的 9L 神经胶质肉瘤(在用于组织培养前立即洗脱)的盐水分别注入 5 个肝叶中(通过将一个 27 规针穿入肝囊 1cm 处)。在退出针时, 将十分之一毫升普通盐水注入针中以确保没有溢出的细胞流入腹膜腔中。把一个明胶海绵小拭子置于每个穿针部位以止血。用 6.0 吸收缝线和皮肤钳闭合腹部伤口, 并用麻醉剂终止。使大鼠返回到动物房, 进行 14 天标准饮食, 此时测得肿瘤沉积处的直径为 1cm。用 Wester 大鼠及一

种结肠癌细胞系 (RadiologicOncologyLab, M. D. Anderson, Houston, Texas) 重复同样的步骤。在这种情况下,注射后需 3 周的时间测得每个肿瘤沉积处的直径为 1cm。

[0181] 2 或 3 周后,进行相同的全身麻醉并沿腹中线切开 (由大鼠的种类而定)。翻出十二指肠,识别胃十二指肠动脉并使之活动。在胃十二指肠动脉 (GDA) 切口的上方和下方结扎,利用手术显微镜将 0.038 英寸的聚乙烯管逆行引入该动脉。插入点下方的线会结扎动脉,而上方的线可将导管固定住。经导管注入 0.5ml 60% 的不透射线的造影剂 (X 射线照射) 施行血管造影术。然后通过从胃十二指肠动脉导管回流 15–200um 的颗粒而栓塞肝动脉,直到观察 (通过手术显微镜) 到停止流动至少 30 秒为止。通过 GDA 导管重复血管造影照片以确证肝动脉的阻塞。使用这一方法,一半的大鼠接受单一的 15–200um 的聚合物颗粒,另一半接受 15–200um 的聚合物 – 抗血管生长因子组合物颗粒。撤出导管时,系紧 GDA 上部的结扎线以阻塞 GDA 并止血,肝动脉 (尽管栓塞) 仍是完整的。用 6.0 吸收缝线及手术钳闭合腹部。

[0182] 栓塞后 2, 7, 14, 21 及 84 天时处死大鼠以确定抗血管生长因子的效应。简而言之,进行全身麻醉,使用无菌预防措施,施行中线切开。再一次活动 GDA, 在接近 GDA 与肝动脉连接处 (即,先前切口的正上方) 放置一结扎线后,经血管切口插入 0.038 英寸的聚乙烯管,施行血管造影术。然后通过将 Euthanyl 注入尾背静脉使大鼠安乐死去。确证安乐死后,除去整个肝脏,连同胃、脾和两肺。

[0183] 在一个用苏木紫和曙红 (“H 和 E”) 染色的制备幻灯上进行组织学分析。简而言之,将肺在 1cm 间隔处切开以评价栓塞物质通过肝静脉进入右侧循环的通道。同样也切开胃和脾以评价从颗粒回流入副循环的腹腔入口的非特意固定术。

[0184] 实施例 7 :大鼠胆管斯坦特固定模移植术

[0185] 将 300 克 Fisher 大鼠进行全身麻醉。在上腹部切开一个横向切口,识别肝脏。在其最上面的一叶,将 0.2ml 含有一百万活的 9L 神经胶质肉瘤 (在使用前立即从组织培养物中洗脱) 的盐水用一个 27 规针注入 1cm 深的肝囊处。在退出针后,将一个明胶海绵小拭子置于穿针部位以止血。在退出针时,注射盐水以确保没有溢出的细胞流入腹膜腔中或者沿针眼溢出。用全身麻醉终止,将动物返回到动物房,进行正常饮食。

[0186] 2 周后,施用全身麻醉,采用无菌预防措施,通过中线切口识别含有肿瘤的肝叶。然后将一个 16 规血管造影术用针经肝囊插入肿瘤,把一个 0.038 英寸的导线穿过针,在导线上方退出针。将一 5 号 French 扩张器穿过导线进入肿瘤并退出。然后再将一 5 号 French 转运导管穿过含有自身膨胀性不锈钢 Wall 斯坦特固定模 (直径 5mm, 长 1cm) 的导线。将斯坦特固定模深入肿瘤,除去导线转运导管。1/3 的大鼠是将常规用不锈钢斯坦特固定模插入肿瘤,1/3 的大鼠是一包衣有聚合物的斯坦特固定模,另外 1/3 的为一种用聚合物 – 抗血管生长因子化合物包衣的斯坦特固定模。用全身麻醉终止,将大鼠返回到动物房中。

[0187] 第 2 天用普通腹部 X 射线照射以评价斯坦特固定模张开的程度。插入斯坦特固定模后第 2, 7, 14, 28 及第 56 天时注射 Euthanyl 处死大鼠,一旦确证安乐死后,将肝脏整个移去。于福尔马林中固定 48 小时后,在每 0.5mm 间隔处切开肝脏 (包括用一个新刀片横向切开斯坦特固定模)。然后分析 H 和 E 染色的组织学部分,评价肿瘤长入斯坦特固定模腔的程度。

[0188] 实施例 8 :微球的制备

[0189] 生产微球的优选设备如下所述 :200ml 水夹套烧杯 (Kimax 或 Pyrex), Haake 循环水浴, 直径为 2 英寸的架空搅拌器和控制器 (4 叶, 螺旋桨型不锈钢搅拌器 -Fisher 牌), 500ml 玻璃烧杯, 热板 / 搅拌器 (Corning 牌), 4×50ml 聚丙烯离心管 (Nalgene), 塑料插入盖的玻璃闪烁瓶, 台式离心机 (GPRBeckman), 高速离心机 - 落地式 (JS21Beckman), Mettler 分析天平 (AJ100, 0.1mg), Mettler 数字顶加载天平 (AE163, 0.01mg), 自动吸量管 (Gilson)。试剂包括聚己内酯 (“PCL”- 分子量 10,000 到 20,000, Polyscience, WarringtonPennsylvania, USA), “洗涤后”的乙烯乙酸乙烯 (“EVA”, 洗涤是为了除去抗氧剂 BHT), 聚 (DL) 乳酸 (“PLA”- 分子量 15,000 到 25,000, Polyscience), 聚乙烯醇 (“PVA”- 分子量 124,000 到 186,000, 99% 水解; AldrichChemicalCo., MilwaukeeWI, USA), 二氯甲烷 (“DCM”; HPLCgradeFisherscientific) 及蒸馏水。

[0190] A :5% (重量 / 体积, w/v) 聚合物溶液的制备

[0191] 依赖于预制备的聚合物溶液, 称重 1.00g 的 PCL 或 PLA, 或者 0.50g 的 PLA 及洗涤后的 EVA, 将其直接倒入 20ml 玻璃闪烁瓶中。然后加入 20 毫升 DCM, 盖紧瓶。将此瓶子于室温下 (25°C) 贮存 1 小时 (可以偶尔振摇), 或者直至所有的聚合物都溶解了 (溶液应澄清)。将溶液于室温贮存至少两周。

[0192] B :5% (重量 / 体积) 储备液的制备

[0193] 称重 25 克 PVA, 直接倒入 600ml 玻璃烧杯中。加入 500 毫升蒸馏水及涂有 3 英寸特氟隆的搅拌条。用玻璃罩盖上烧杯以减少蒸发, 并且放入盛有 300ml 水的 2000ml 玻璃烧杯中 (作为水浴)。将 PVA 在 300 转 / 分下于 85°C 搅拌 (Corning 热板 / 搅拌器) 2 小时或者至完全溶解。PVA 的溶解可以观察确定, 溶液应澄清。然后将溶液转入一个玻璃螺旋塞的容器中, 在 4°C 最长可贮存 2 个月。但是该溶液在使用或稀释前应升至室温。

[0194] C :生产微球的步骤

[0195] 基于预制备微球的粒度 (见表 1), 将 100ml PVA 溶液 (浓度如表 III 所示) 放入 200ml 的水夹套烧杯中。Haake 循环水浴与该烧杯连接, 将内容物在 27°C (+/-10°C) 平衡 10 分钟。基于预制备微球的粒度 (见表 III), 调节架空搅拌器的初始速率, 将架空搅拌器的桨叶置于 PVA 溶液的中间。然后开启搅拌器, 接着用 5ml 自动吸量管经 2 分钟将 10ml 聚合物溶液 (使用的聚合物溶液基于预制备微球的类型) 滴加到搅拌着的 PVA 中。3 分钟后, 调整搅拌速率 (见图 III), 继续搅拌溶液 2.5 小时。然后从微球制剂溶液中移去搅拌桨叶, 用 10ml 蒸馏水漂洗以使漂洗液并入微球制剂溶液中。然后将微球制剂液倒入 500ml 烧杯中, 用 70ml 蒸馏水洗涤夹套水浴, 将其也并入微球制剂溶液中。然后用玻璃棒搅拌 180ml 的微球制剂溶液, 分别等量倒入四个 50ml 聚丙烯离心管中。然后盖好离心管, 离心 10 分钟 (离心力见表 1)。用 5ml 的自动吸量管或者真空吸管将微球丸中 45ml 的 PVA 溶液吸掉。

[0196] 表 III

[0197] PVA 浓度, 搅拌速率及用于微球不同直径范围的离心力

[0198] 制备阶段微球直径范围

[0199]	30um 至	10um 至	0.1um 至
[0200]	100um	30um	3um
[0201]	PVA 浓度	2.5% (w/v) (即 即, 用蒸馏水稀释,	5% (w/v) (即 未稀释的储备)
[0202]			3.5% (w/v) (即 即, 用蒸馏水稀释)

[0203]	的 5% 储备液)	液)	的 5% 储备液)
[0204]	初始搅拌速	500 转 / 分	500 转 / 分
[0205]	率	+/-50 转 / 分	+/-50 转 / 分
[0206]	调节后的搅	500 转 / 分	2500 转 / 分
[0207]	拌速率	+/-50 转 / 分	+/-50 转 / 分
[0208]	离心力	1000g+/-	10000g+/-
[0209]		100g(台式)	1000g(高速式)

[0210] 将 5 毫升蒸馏水分别加入每个离心管中, 然后将其涡旋以再悬浮微球。将四种微球悬浮液连同 20ml 蒸馏水一起倒入一个离心管中, 再离心 10 分钟 (离心力见表 1)。另外重复两次这一过程, 总共洗涤 3 次。然后最后一次离心微球, 于 10ml 蒸馏水中再悬浮。最后洗涤后, 将微球制剂转入一个事先称重的玻璃闪烁瓶中。塞好瓶, 于室温 (25°C) 放置过夜以使微球在重力作用下沉降。粒度范围是 0.1μm 至 3μm 的微球不会在重力作用下沉降, 因此其留在 10ml 的悬浮液中。

[0211] D : 直径为 10μm 至 30μm 或者 30μm 至 100μm 微球的干燥

[0212] 微球在室温下放置过夜后, 用 5ml 的自动吸量管或真空吸管吸去沉降后微球的上清液。在抽屉中的一个敞口瓶中将微球干燥 1 星期或者直至其完全干燥 (瓶恒重)。可以通过将敞口瓶放置在通风橱中缓慢流动的氮气流 (流速约为 10ml / 分钟) 下以加速干燥。当完全干燥后 (瓶恒重), 称重瓶, 盖上塞。将标记好的加塞瓶子室温下存放在抽屉中。微球一般保存期不超过 3 个月。

[0213] E : 直径为 0.1μm 至 3μm 微球的干燥

[0214] 这一范围内的微球不会沉降下来, 因此其可以在 4°C 悬浮 4 周。为确定 10ml 悬浮液中微球的浓度, 将 200ul 悬浮液试样吸入 1.5ml 事先称重的微型离心管中。然后在 10,000g 离心 (Eppendorf 台式微型离心管), 除去上清液, 将离心管在 50°C 放置过夜。然后再称重离心管以确定管中干燥微球的重量。

[0215] F : 装有红豆杉醇微球的制备

[0216] 为制备含有微球的红豆杉醇, 将适量的称重红豆杉醇 (基于预包囊红豆杉醇的百分比) 直接放入 20ml 玻璃闪烁瓶中。然后向含有红豆杉醇的瓶中加入 10 毫升适当的聚合物溶液, 使之涡旋直至红豆杉醇溶解。

[0217] 然后如上述步骤 (C) 至 (E) 制备含有红豆杉醇的微球。

[0218] 实施例 9 : 斯坦特固定模包衣的制备

[0219] 用于下述实验的试剂和设备包括 (从许多生产商获得的医用级斯坦特固定模, 如 “Stecker” 斯坦特固定模) 固定装置, 20ml 带塞玻璃闪烁瓶 (塑料插入型), TLC 喷雾器, 氮气缸, 玻璃试管 (1ml 以上不同的不同刻度), 玻璃烧杯 (各种型号), Pasteur 吸量管, 镊子, 聚己内酯 (“PCL” - 分子量 10,000 到 20,000, Polyscience), 红豆杉醇 (SigmaChemicalCo., St., Louis, Mo., 95% 纯度), 乙烯乙酸乙烯 (“EVA”, 洗涤, 见前), 聚 (DL) 乳酸 (“PLA” - 分子量 15,000 到 25,000, Polyscience), 二氯甲烷 (“DCM”; HPLC grade Fisher Scientific) 。

[0220] A : 喷雾斯坦特固定模的制备

[0221] 下面描述了使用长约 3cm 的 3mm 卷曲直径隔离金属线斯坦特固定模的典型方法。如果是较大直径的斯坦特固定模, 则用大容积的聚合物 / 药物溶液。

[0222] 直接称重足量聚合物到 20ml 玻璃闪烁瓶中,加入足量 DCM 而得到 2% w/v 的溶液。盖好瓶,混合溶液以溶解聚合物(用手振摇)。用一块尼龙并把斯坦特固定模放在曲颈瓶中而将其置于垂直方向。将此斯坦特固定模固定装置放在距通风橱底 6 至 12 英寸的一个适当的支持物上(例如,倒扣的 2000ml 玻璃烧杯)以进行水平喷雾。用一自动吸量管将适量(最少 5ml)2% 聚合物溶液转入另外一个 20ml 玻璃闪烁瓶中。将适量红豆杉醇加入溶液中,手摇带塞瓶以溶解之。

[0223] 开始喷雾时,拿下瓶盖,将 TLC 喷雾器的吸管(仅此)浸入聚合物溶液中。注意在本过程中不需使用喷雾器的储蓄器:20ml 的玻璃瓶作为储蓄器。将氮气缸连接到喷雾器的气体入口。逐渐增加压力直至开始喷雾。记录这一压力,并且在此整个过程中都使用该压力。用 5 秒种振动喷雾(每次喷雾间有 15 秒种的干燥时间)来喷雾斯坦特固定模。喷雾 5 次后,将斯坦特固定模旋转 90° 后喷雾该部分。重复直至已喷雾斯坦特固定模所有的面。干燥期间,用手指卷曲气体线以避免浪费喷雾。继续喷雾直至在斯坦特固定模上沉积了适量(基于用于体内的特定斯坦特固定模)的聚合物。为确定该数量,完成喷雾及干燥斯坦特固定模后称重斯坦特固定模。从终重减去斯坦特固定模的初始重量即为斯坦特固定模上聚合物的量(加红豆杉醇)。在密封容器中贮存包衣好的斯坦特固定模。

[0224] B : 浸渍斯坦特固定模的制备

[0225] 下面描述了使用长约 3cm 的 3mm 卷曲直径隔离金属线斯坦特固定模的典型方法。如果是较大直径的斯坦特固定模,则用大号试管的聚合物 / 药物溶液。

[0226] 直接称重 2gEVA 到 20ml 玻璃闪烁瓶中,加入足量 20mlDCM。盖好瓶,放置 2 小时以溶解(不断用手振摇瓶以帮助溶解)。直接称重已知重量的红豆杉醇到 1ml 玻璃试管中,加入 0.5ml 聚合物溶液。用一个玻璃 Pasteur 吸量管轻轻抽吸聚合物溶液以溶解红豆杉醇。红豆杉醇溶解后,将试管放在近乎水平的地方(粘稠的聚合物溶液不会流出)。用镊子将斯坦特固定模插入试管的底部。倾斜试管口于水平面下以使聚合物溶液几乎流至管口,然后再将试管稍稍倾斜到水平面上。一边缓缓转动试管中的斯坦特固定模,一边缓缓移去斯坦特固定模(约 30 秒种)。

[0227] 在垂直位置干燥斯坦特固定模。一些封闭的孔可能会爆裂,因此在聚合物连续层中会有一个洞。其可以通过重复前面的浸渍步骤而修复,但是重复步骤也可能导致进一步爆裂及产生不平整的聚合物。一般地,最好就浸渍斯坦特固定模一次,切下没有爆裂孔的斯坦特固定模。在密闭容器中贮存浸渍斯坦特固定模。

[0228] 实施例 10 : 手术用“糊”的生产

[0229] 如上所述,本发明提供了各种含有聚合物的药物组合物,其可用于各种临床情况。例如,可以制备如下的组合物:(1)作为“热糊”以液态形式用于所需部位,在特定温度下(如体温)硬化成所需形状的固态;(2)作为喷雾剂(即“毫微喷雾剂”)直接或通过一个特殊装置(如内窥镜)喷在所需部位,随后硬化成固体,其可以粘附在施用其的组织上;(3)作为一种粘附、柔韧、弹性的血管生长抑制剂聚合物膜直接或通过一个特殊装置施用于所需部位,并且其优选粘附在施用其的部位上;及(4)作为一种在适当载体介质中由微球悬浮液组成液体的直接或通过一个特殊装置施用于所需部位,并且其可以在施用部位留下一微球层。上述实例的代表性例子如下详述。

[0230] A : 生产热糊的方法

[0231] 用于下述实验的试剂和装置包括无菌玻璃注射器 (1ml), Corning 热板 / 搅拌器, 20ml 玻璃闪烁瓶, 塑模 (如 50ulDSC 盘或 50ml 离心管的塞内部分), 手术刀和镊子, 聚己内酯 (“PCL” - 分子量 10,000 至 20,000 ;Polysciences, Warrington, Pennsylvania USA), 及红豆杉醇 (Sigma 级, 至少 95% 的纯度)。

[0232] 直接称重 5.00g 聚己内酯到 20ml 玻璃闪烁瓶中。将瓶放在一个含有 50ml 水的 600ml 烧杯中。缓缓加热烧杯至 65°C, 在此温度下放置 20 分钟。其可使聚合物熔化。于 65°C 彻底将已知重量的红豆杉醇或其它血管生长抑制剂混合到熔化的聚合物中。在倾倒过程中可借助一刮铲。冷却塑模以使聚合物固化。将聚合物切成小块 (大小约为 2mm)。这些小块必须和 1ml 玻璃注射器匹配。从 1ml 玻璃注射器外抽柱塞 (不要抽去塞头), 使之平衡。调零。

[0233] 直接称重 0.5g 小块到注射器的开口端。在 65°C (corning 热板) 将玻璃注射器朝上放置 (塞端朝下) 在含有蒸馏水的 500ml 玻璃烧杯中, 这样水不会加入注射器。10 分钟内聚合物在该装置中完全熔化。当聚合物小块熔化后, 将注射器移出水浴, 水平放置, 拔去塞。把柱塞插入注射器中, 在注射器末端将熔化的聚合物压成粘稠团。塞好注射器, 于室温冷却。

[0234] 当使用时, 需再将注射器加热至 60°C, 以液体形式用药, 其可在冷至体温时固化。

[0235] B : 生产毫微喷雾剂的方法

[0236] 毫微喷雾剂是已知盐水中的小微球。如果微球非常小 (即直径在 1um 以下), 其形成胶体, 一次悬浮液在重力作用下不会沉降。正如下面的详述, 可以制备适用于通过指泵气溶胶沉积在组织上的 0.1um 至 1um 微粒的悬浮液。用于生产毫微喷雾剂的设备及材料包括 200ml 水夹套烧杯 (Kimax 或 Pyrex), Haake 循环水浴, 直径为 2 英寸的架空搅拌器和控制器 (4 叶, 螺旋桨型不锈钢搅拌器 -Fisher 牌), 500ml 玻璃烧杯, 热板 / 搅拌器 (Corning 牌), 4×50ml 聚丙烯离心管 (Nalgene), 塑料插入盖的玻璃闪烁瓶, 台式离心机 (GPRBeckman), 高速离心机 - 落地式 (JS21Beckman), Mettler 分析天平 (AJ100, 0.1mg), Mettler 数字顶加载天平 (AE163, 0.01mg), 自动吸量管 (Gilson)、无菌吸量管头、泵气溶胶 (Pfeifferpharmaceuticals) 20ml、层流通风橱、聚己内酯 (“PCL” - 分子量 10,000 到 20,000, Polyscience, WarringtonPennsylvania, USA), “洗涤后” (见前) 的乙烯乙酸乙烯 (“EVA”), 聚 (DL) 乳酸 (“PLA” - 分子量 15,000 到 25,000, Polyscience), 聚乙烯醇 (“PVA” - 分子量 124,000 到 186,000, 99% 水解; AldrichChemicalCo., MilwaukeeWI, USA), 二氯甲烷 (“DCM”; HPLCgradeFisherscientific)、蒸馏水及无菌盐水 (BectonandDickinson norequivalent)。

[0237] 1.5% (w/v) 聚合物溶液的制备

[0238] 依赖于预制备的聚合物溶液, 称重 1.00g 的 PCL 或 PLA, 或者 0.50g 的 PLA 及洗涤后的 EVA, 将其直接倒入 20ml 玻璃闪烁瓶中。然后用量筒加入 20 毫升 DCM, 盖紧瓶。将此瓶于室温下 (25°C) 放置 1 小时或者直至所有的聚合物都溶解 (可以偶尔振摇)。聚合物的溶解可以观察确定, 溶液应澄清。标记溶液的名称和生产日期。将溶液于室温贮存, 于两周内使用。

[0239] 2. 3. 5% (w/v) 储备液的制备

[0240] 可以通过下述的步骤制备溶液, 或者通过稀释用于制备微球的 5% (w/v) PVA 储备

液（见实施例 8）。简而言之，直接称重 17.5 克 PVA 到 600ml 玻璃烧杯中，加入 500 毫升蒸馏水。在烧杯中放置一个涂有 3 英寸特氟隆的搅拌条。用玻璃罩盖上烧杯以减少蒸发。将烧杯放入盛有 300ml 水的 2000ml 玻璃烧杯中（作为水浴）。将 PVA 在 300 转 / 分下于 85°C 搅拌（Corning 热板 / 搅拌器）2 小时或者至完全溶解。PVA 的溶解可以观察确定，溶液应澄清。然后用吸量管将溶液转入一个玻璃螺旋塞的容器中，在 4°C 最长可贮存 2 个月。该溶液在使用或稀释前应升至室温。

[0241] 3. 毫微球的生产方法

[0242] 将搅拌装置置于通风橱中。将 100ml PVA 溶液（浓度如表 III 所示）放入 200ml 的水夹套烧杯中。Haake 循环水浴与该烧杯连接，将内容物在 27°C (+/-10°C) 平衡 10 分钟。将架空搅拌器的初始速率调节到 3000 转 / 分 (+/-200 转 / 分)。把架空搅拌器的桨叶置于 PVA 溶液的中间，开启搅拌器。用 5ml 自动吸量管经 2 分钟将 10ml 聚合物溶液（使用的聚合物溶液基于预制备毫微喷雾剂的类型）滴加到搅拌着的 PVA 中。3 分钟后，调整搅拌速率至 2500 转 / 分 (+/-200 转 / 分)，继续搅拌 2.5 小时。然后从毫微喷雾剂制剂溶液中移去搅拌桨叶，用 10ml 蒸馏水漂洗。将漂洗液并入毫微喷雾剂制剂溶液中。

[0243] 将毫微喷雾剂制剂液倒入 500ml 烧杯中。用 70ml 蒸馏水洗涤夹套水浴，将其也并入毫微喷雾剂制剂溶液中。然后用玻璃棒搅拌 180ml 的毫微喷雾剂制剂溶液，分别等量倒入四个 50ml 聚丙烯离心管中。然后盖好离心管，在 10000g (+/-1000g) 离心 10 分钟。用 5ml 的自动吸量管或者真空吸管将毫微喷雾剂丸中 45ml 的 PVA 溶液吸出弃去。将 5 毫升蒸馏水分别加入每个离心管中，然后将其涡旋以再悬浮微球。用 20ml 蒸馏水将四种微球悬浮液冲入一个离心管中。为了洗涤微球，于 10000g (+/-1000g) 将毫微喷雾剂离心 10 分钟。除去微球丸的上清液。加入 40ml 蒸馏水，用涡旋再悬浮微球。另外重复两次这一过程，总共洗涤 3 次。进行第四次洗涤，但是只用 10ml（不是 40ml）蒸馏水再悬浮微球。第四次洗涤后，将微球制剂转入一个事先称重的玻璃闪烁瓶中。

[0244] 塞好瓶，于室温 (25°C) 放置 1 小时以使直径为 2um 及 3um 的微球在重力作用下沉降。1 小时后，用一 5ml 自动吸量管吸去上部 9ml 的悬浮液。将此 9ml 放入无菌带塞的 50ml 离心管中。在 10000g (+/-1000g) 将悬浮液离心 10 分钟。弃去上清液，在无菌盐水中再悬浮球丸。所用盐水的量取决于所需悬浮液的终浓度（通常为 10% w/v）。在无菌盐水中彻底漂洗气溶胶装置，将毫微喷雾剂悬浮液加入到气溶胶中。

[0245] C :装有红豆杉醇微球的制备

[0246] 为制备含有红豆杉醇的毫微喷雾剂，使用红豆杉醇（Sigma 级 95% 纯度）。为制备聚合物药物储备液，直接称取适量的红豆杉醇到 20ml 玻璃闪烁瓶中。直接放入 20ml 玻璃闪烁瓶中。适量的确定基于毫微喷雾剂中红豆杉醇的百分比。例如，如果需要含有 5% 红豆杉醇的毫微喷雾剂，则需称取的红豆杉醇量为 25mg，因为所加入的聚合物的量为 10ml 15% 的聚合物 DCM 溶液（见下一步骤）。

[0247] 向含有红豆杉醇的瓶中加入 10 毫升适当的 5% 聚合物溶液。盖好塞并涡旋或者手振荡以溶解红豆杉醇（观察确定红豆杉醇的溶解）。标记生产日期。当天使用。

[0248] 按上述步骤，除了用聚合物 / 药物（如红豆杉醇）储备液代替聚合物溶液。

[0249] D :生产薄膜的方法

[0250] 术语“薄膜”是指可形成各种几何形状其中一种的聚合物。薄膜可以是薄的聚合

弹性层或者 2mm 厚的聚合物圆盘。将薄膜设计为可以放在暴露的组织上，因此任何包囊的药物在该组织部位可以经过很长的时间从聚合物释放出。可以通过几种方法制备薄膜，包括例如浇铸和喷雾。

[0251] 浇铸技术中，将聚合物熔化并倒入塑模中，或者将其溶于二氯甲烷并倒入塑模中。然后将聚合物冷却固化或者将溶剂蒸发而固化。喷雾技术中，将聚合物溶于溶剂中，喷雾到玻璃上，当溶剂蒸发后，聚合物就固化在玻璃上。重复喷雾能使聚合物形成可从玻璃上剥离下来的薄膜。

[0252] 用于下述实验的试剂和设备包括小烧杯，corning 热板搅拌器，浇铸塑模（如 50ml 离心管塞）及塑模支持装置，20ml 带塞玻璃闪烁瓶（塑料插入型），TLC 喷雾器，氮气缸，聚己内酯（“PCL”- 分子量 10,000 到 20,000, Polyscience），红豆杉醇（Sigma95% 纯度），乙醇，“洗涤后”（见前）乙烯乙酸乙烯（“EVA”），聚（DL）乳酸（“PLA”- 分子量 15,000 到 25,000, Polyscience），二氯甲烷（HPLCgradeFisherscientific）。

[0253] 1. 生产薄膜的方法 - 熔融浇铸

[0254] 直接称取已知重量的 PCL 到一个小烧杯中。将该烧杯放在含有水的较大的烧杯中（作为水浴），置于 70°C 的热板上 15 分钟或者直至聚合物完全熔化。将已知重量的药物加入熔化的聚合物中，充分搅拌混合物。为了协助药物在熔化 PCL 中的分散，可以将药物悬浮 / 溶解在少量 (<10% 体积的熔化 PVL) 的 100% 乙醇中。然后将乙醇悬浮液混合到熔化的聚合物中。将熔化的聚合物倒入塑模中，使其冷却。冷却后，在一个容器中贮存薄膜。

[0255] 2. 生产薄膜的方法 - 溶剂浇铸

[0256] 直接称取已知重量的 PCL 到 20ml 玻璃闪烁瓶，加入足量的 DCM 得到 10% w/v 的溶液。盖好瓶塞，混合溶液。将足量的红豆杉醇加入溶液中以获得所需的红豆杉醇终浓度。用手振摇或者涡旋以溶解溶液中的红豆杉醇。将溶液放置 1 小时（直至没有气泡），然后缓缓倒入塑模中。所用的塑模基于所需的形状。在通风橱中将塑模放置过夜以蒸发 DCM。将薄膜留在塑模中贮存或者刮下贮存在密闭的容器中。

[0257] 3. 生产薄膜的方法 - 喷雾

[0258] 直接称取足量的聚合物到 20ml 玻璃闪烁瓶中，加入足量的 DCM，得到 2% w/v 的溶液。盖好瓶塞，混合溶液以溶解聚合物（手振

[0259] 摆）。在通风橱中于适当的塑模支持装置中垂直方向放置塑模。将此塑模固定装置放在距通风橱底 6 至 12 英寸的一个适当的支持物上（例如，倒扣的 2000ml 玻璃烧杯）以进行水平喷雾。用一自动吸量

[0260] 管将适量（最少 5ml）2% 聚合物溶液转入另外一个 20ml 玻璃闪烁瓶中。将足量红豆杉醇加入溶液中，手摇带塞瓶以溶解之。开始喷雾时，

[0261] 拿下瓶盖，将 TLC 喷雾器的吸管（仅此）浸入聚合物溶液中。注意：在本过程中不需使用喷雾器的储蓄器 -20ml 的玻璃瓶作为储蓄器。

[0262] 将氮气缸连接到喷雾器的气体入口。逐渐增加压力直至开始喷雾。记录这一压力，并且在此整个过程中都使用该压力。用 5 秒种振动喷雾（每次喷雾间有 15 秒种的干燥时间）来喷雾塑模。继续喷雾直至适当厚度的聚合物沉积在塑模上。厚度基于所需量。使喷雾薄膜留在塑模上，将其贮存在密闭容器中。

[0263] E :毫微糊的制备过程

[0264] 毫微糊是一种悬浮在亲水胶中的微球悬浮液。本发明的一方面，作为将装有药物的微球紧置于靶组织上的一种方法，可以将胶或糊涂敷在组织上。由于糊是水性的，其可以很快被体液稀释，因此导致糊稠度的下降，使微球易于沉积在邻近的组织上。因此微球包裹的药物池就定位在靶组织周围。

[0265] 用于本实验的试剂和烧杯包括玻璃烧杯、聚羧乙烯 925(药用级, GoodyerChemicalCo.)、蒸馏水、氢氧化钠(1M)水溶液、氢氧化钠(5M)水溶液、悬浮在水中的 20% w/v, 0.1um 至 3um 粒度范围的微球(见前)。

[0266] 1.5% 聚羧乙烯胶的制备

[0267] 将足量的聚羧乙烯加入 1M 的氢氧化钠，得到 5% w/v 的溶液。为了溶解 1M 氢氧化钠中的聚羧乙烯，放置混合液约 1 小时，在此期间，用玻璃棒搅拌混合物。1 小时后，测定混合液的 pH 值。低 pH 值表示聚羧乙烯尚未完全溶解。所需达到的 pH 值应为 7.4。用 5M 的氢氧化钠调节 pH 值(将 5M 氢氧化钠缓缓滴加到混合液中，不断搅拌混合液并测定混合液的 pH 值)。将 pH 值调至 7.4 通常要花约 1 个小时的时间。一旦 pH 值成为 7.4，盖好凝胶并放置 2 至 3 小时。然后，检测 pH 值以确保其仍为 7.4。重复该过程，直至达到了所需的稳定的 pH 值。在容器上标记凝胶名称及日期。在下一周用此凝胶制备毫微糊。

[0268] 2. 生产毫微糊的方法

[0269] 将足量 0.1um 至 3um 的微球加入水中，得到 20% 微球悬浮液。将 8ml 15% w/v 聚羧乙烯胶放在一个玻璃烧杯中。加入 2ml 20% 的微球悬浮液。用玻璃棒或混合铲搅拌混合液以充分分散凝胶中的微球。这需 30 分钟。一旦微球分散在凝胶中，将混合液放在一个储存罐中。于 4°C 贮存。其必须在一个月内使用。

[0270] 实施例 11：红豆杉醇从微球中(由乙烯乙酸乙烯酯共聚物及聚(D, L 乳酸)混合组成)的控制性释放。微球在 CAM 试验中的体内实验

[0271] 本实施例描述了制备装有红豆杉醇的微球(由生物降解性聚(d, l-乳酸)(PLA)聚合物及非生物降解性乙烯乙酸乙烯酯(EVA)共聚物组成)。此外，表明了红豆杉醇从 CAM 上的微球中的体外释放率及抗血管生长活性。

[0272] 用于本实验的试剂包括红豆杉醇(从 SigmaChemicalCo. (St. Louis, MO) 购买)；PLA(分子量 15,000–25,000) 及 EVA(60% 乙酸乙烯酯)(从 Polyscience(Warrington, PA) 购买)；聚乙烯醇(PVA)(分子量 124,000–186,000, 99% 水解掉，从 AkdrichChemicalCo. (Milwaukee, WI) 购买)以及二氯甲烷(DCM)(HPLC 级，来自 FisherScientificCo.)。蒸馏水用于整个过程。

[0273] A : 微球的制备

[0274] 如实施例 8 用溶剂蒸发法制备微球。简而言之，用 EVA : PLA 为 35 : 65 至 90 : 10 之间的混合物制备 5% w/v 聚合物的 20ml DCM 溶液。向 20ml 玻璃瓶中 5ml 2.5% w/v 的 PVA 水溶液中边搅拌边滴加 1ml 的聚合物溶液。将 6 个类似的瓶放在架空搅拌器、溶解测试仪(Vanderkamp)的 6 个位置，在 200 转 / 分搅拌。将瓶温经 15 分钟从室温升至 40°C，并在 40°C 保持 2 小时。于 500×g 离心瓶，在水中洗涤微球三次。在一些 EVA : PLA 聚合物的混合物中，由于除去了分散剂或乳化剂-PVA，微球试样在洗涤过程中会聚集。可以半定量分析聚集作用，因为聚集的微球会熔融并且熔融后的聚合物团块漂浮在洗液的表面。在洗涤过程中弃去这层表面聚合物层，将剩下的丸状微球称重。聚集百分数(%)由下式得到：

[0275] 聚集百分数 (%) = 1-(丸状微球的重量) × 100

[0276] 初始聚合物重量

[0277] 将红豆杉醇溶解在 5% w/v 聚合物的 DCM 溶液中制备装有红豆杉醇的微球 (0.6% w/w 红豆杉醇)。所用的聚合物混合物为 50 : 50 的 EVA : PLA。通过将红豆杉醇 / 聚合物溶液分别滴加到 2.5% w/vPVA 及 5% w/vPVA 中而制备微球的“大”颗粒部分及“小”颗粒部分。在 200 转 / 分于 40°C 搅拌分散液 2 小时, 离心并在水中洗涤 3 次 (如前所述)。空气中干燥微球, 用带有分级测微计的光学显微镜测量试样的粒度。每个试样计数逾 300 个微球。制备对照组微球 (不含红豆杉醇), 如前测定大小。

[0278] B : 包囊效率

[0279] 将已知重量的装有红豆杉醇的微球溶于 1mlDCM 中, 于 50°C 加入 20ml40% 的乙腈水溶液, 涡旋直至 DCM 蒸发掉。用 HPLC (流动相为水 : 甲醇 : 乙腈 (37 : 5 : 58), 流速 1ml/ 分钟, (Beckmanisocratic 泵), C8 反相柱 (Beckman), 232nmUV 检测) 测定 40% 乙腈中红豆杉醇的浓度。为确定提取过程的回收率, 将已知重量 (100–1000ug) 的红豆杉醇溶于 1mlDCM 中, 如前再进行相同的提取过程。回收率总大于 85%, 适当校正包囊率的数值。

[0280] C : 药物释放研究

[0281] 在 15ml 螺旋塞玻璃试管中放入 10ml10mM 磷酸盐缓冲盐水 (PBS) (pH7.4) 及 35mg 装有红豆杉醇的微球。在 37°C 转动试管, 于给定间隔在 1500×g 离心 5 分钟, 留下上清液以作分析。于 37°C 在新鲜的 PBS (10ml) 中再悬浮微球丸并保温。将红豆杉醇吸入 1mlDCM 中来确定其的浓度, 随后在氮气流下蒸发干燥, 在 1ml40% 乙腈水溶液中再生, 用如前所述的 HPLC 分析。

[0282] D : 扫描电子显微镜 (SEM)

[0283] 将微球放在试样架上, 用金喷镀包衣, 用 Philips501BSEM (在 15kV 操作) 进行显微摄影。

[0284] E : CAM 研究

[0285] 将受精的家养鸡胚在无壳培养前孵育 4 天。在 90% 相对湿度及 3% CO₂ 中孵育蛋内容物。孵育的第 6 天, 将 1mg 等分试样的装有 0.6% 红豆杉醇或对照组微球 (不含红豆杉醇) 直接置于 CAM 表面。暴露 2 天后, 用一个与摄像机接口的立体显微镜检查脉管系统; 然后将视频信号显示在计算机上并打印。

[0286] F : 结果

[0287] 由 100% EVA 制得的微球可自由悬浮在 PVA 溶液中, 但是在随后于水中洗涤以除去 PVA 的过程中则发生凝聚及结合或者彻底的熔融。与不断增加比例的 PVA 混合的 EVA 所制得的微球, 当在水中洗涤时, 则表现出下降的凝聚力及结合力 (如图 15A 所示)。由 50 : 50 混合的 EVA : PLA 形成的微球具有良好的物理稳定性, 即, 微球可保持分离状态, 并且可以很好的悬浮而不发生聚集及结合 (可忽略)。

[0288] “小”颗粒部分微球的粒度范围确定为 >95% 的微球试样 (重量) 在 10–30mm 之间, 而“大”颗粒部分的微球则为 >95% 的微球试样 (重量) 在 30–100mm 之间。装有红豆杉醇的 50 : 50EVA : PLA 微球的“小”和“大”粒度范围的代表性扫描电子显微摄影分别如图 15B 及 15C 所示。微球为表面光滑的球体, 并且在微球的表面没有固体药物。将红豆杉醇装入 50 : 50EVA : PLA 微球的效率在 95–100% 之间 (红豆杉醇的初始浓度为每 50mg

聚合物 100–1000mg 的红豆杉醇)。在“小”或“大”微球的包囊效率之间没有显著的差异 (Studentt- 检验, $p < 0.05$)。

[0289] 红豆杉醇从 0.6% w/v 装载的 50 : 50EVA : PLA 微球中释放的时间如图 15D 所示 (“小”颗粒微球是圆圈, “大”颗粒微球是黑点)。在三个试管中用 3 项不同的实验进行释放速率的研究。释放图为双相, 即红豆杉醇最初的快速释放或“突发”相 (发生在两种粒度范围微球的最初 4 天)。随后是一个非常慢的释放相。在“小”或“大”微球的释放速率之间没有显著的差异。在含有 10–13% 红豆杉醇的微球中, 红豆杉醇在 50 天释放完。

[0290] 用 CAM 试验测试装有红豆杉醇的微球 (0.6% w/v 的装载量), 结果示于图 15E 中。红豆杉醇微球将足量的药物释放出, 从而在周围组织中产生一个无血管区 (图 15F)。注意紧接微球 (图 15E 及 15F 中的“MS”) 的是一个完全没有血管的区域 (区 1); 离微球再远一些的地方是一个萎缩的无功能毛细管区 (区 2); 只有在离微球约 6mm 远的地方毛细管才恢复正常。在用对照组微球 (不含红豆杉醇) 处理的 CAM 中, 血管网为正常。

[0291] 讨论

[0292] 动脉化学性栓塞是一种侵袭性外科技术。因此, 理想地, 抗血管生长药物及抗癌药物 (如红豆杉醇) 化学性栓塞的形成可以在肿瘤部位以长时间 (几个月) 发挥活性的足够浓度释放药物。EVA 是一种组织相容性非降解聚合物, 其已用于长期 (>100 天) 控制释放大分子。

[0293] 最初选择 EVA 作为制备微球的聚合物生物材料, 其中红豆杉醇分散在聚合物基质中。但是, 用 100% EVA 制备的微球在洗涤过程中几乎会全部聚集及结合。

[0294] 以乳酸和羟基乙酸为基础的聚合物及其共聚物是生理惰性和生物相容性的, 并且可以通过水解而降解为毒理学上可接受的产物。乳酸及羟基乙酸的共聚物比 PLA 具有更快的降解率, 用这些共聚物制备的药物装载微球不适于几个月的长期控制性释放。Dollinger 和 Sawan 将 PLA 与 EVA 混合发现 PLA 的降解周期随 EVA 在混合物中比例的增加而增加。他们设想 EVA 与 PLA 的混合可以提供给聚合物基质比 PLA 更好的机械稳定性及更好的药物释放速率的控制。

[0295] 图 15A 表 EVA : PLA 基质中混合 50% 或更少的 EVA 可生产出在水或 PBS 中物理稳定的微球悬浮液。选择 50 : 50EVA : PLA 的混合用于随后所有的研究。

[0296] 不同粒度范围的微球可以通过改变乳化剂 -PVA 在水相中的浓度而制备。“小”微球在 5% w/v 的高 PLA 浓度制备, 而“大”微球在 2.5% w/v 的 PVA 中制备。所有其它生产变量对于两种粒度微球都相同。高浓度的乳化剂得到稍粘稠的水性分散介质, 并且制得乳化在水相中的聚合物 / 红豆杉醇 / DCM 小滴, 这样即为小微球。将含有 95–100% 初始红豆杉醇的微球加入有机相中在固态微球中包囊。红豆杉醇低的水溶性有利于其分散到含有聚合物的有机相中。

[0297] 红豆杉醇从 50 : 50EVA : PLA 微球中的释放速率非常慢, 在 50 天中释放出少于 15% 的装载红豆杉醇。药物释放的最初突发相是由于微球表层 (靠近微球的表面) 药物的分散。

[0298] 药物从非降解性聚合物基质 (如 EVA) 的释放机制认为是水通过聚合物中分散的药物相而扩散, 药物的溶解及溶质通过一系列中间连接 (充满液体的孔) 而扩散。EVA 和 PLA 的混合物在 PLA 中 30–70% EVA 的范围内是不混溶的或者是双连续的。37°C 在 PBS 缓

冲液中进行的降解研究中（在诱导或滞后期后），PLA 进行水解性降解并且从 EVA : PLA 聚合物混合基质中浸蚀下来，残留下一个惰性海绵状空架。尽管诱导期及 PLA 降解的速率以及从混合基质的浸蚀取决于 PLA 在基质中的比例及所经历的过程，但是直至 40–50 天后几乎没有或没有 PLA 的损失。

[0299] 尽管在 50 天的体外释放速率研究中可能发生 PLA 从 50 : 50EVA : PLA 微球的某些浸蚀（图 15C），但是很可能药物从聚合物混合体释放的原始机制是溶质通过聚合物基质中多孔网的扩散。

[0300] 在总结释放速率的研究时，分析微球中残留的药物量。保留在 50 天孵育微球试样中的红豆杉醇的百分数值分别为 94% +/-9%（“大”微球）和 89% +/-12%（“小”微球）。

[0301] 装载 6mg 每 mg 聚合物 (0.6%) 的微球当其置于鸡胚 CAM 上时显示出强烈的血管生长抑制作用（图 15E 和 15F）。

[0302] 实施例 12：红豆杉醇在聚 (E- 己内酯) 微球中的包囊。装载红豆杉醇微球在 CAM 试验中的血管生长抑制作用

[0303] 本实施例阐述了聚 (e- 己内酯) 的生物可降解微球中红豆杉醇的体外释放速率，并且表明了在 CAM 上从这些微球中释放出的红豆杉醇的抗血管生长活性。用于本实验的试剂包括：聚 (e- 己内酯)（“PCL”）（分子量 35,000–45,000；从 Polysciences (Warrington, PA) 购买）；二氯甲烷（“DCM”）（购自 FisherScientificCo., 加拿大；聚乙烯醇 (PVA)（分子量 12,000–18,000, 99% 水解掉，从 AkdrichChemicalCo. (Milwaukee, Wis.) 购买）以及来自 SigmaChemicalCo. (St. Louis, MO) 的红豆杉醇。除非另有说明，所用的化学试剂都使用所提供的。蒸馏水用于整个过程。

[0304] A : 微球的制备

[0305] 如实施例 8 用溶剂蒸发法制备微球。简而言之，通过将 10mg 红豆杉醇及 190mgPCL 溶于 2mlDCM 中、加入 100ml1% PVP 水溶液并在 1000 转 / 分子 25°C 搅拌 2 小时而制备装载 5% w/w 红豆杉醇的微球。将微球悬浮液在 1000×g 离心 10 分钟 (BeckmanGPR)，除去上清液，用水洗涤微球 3 次。洗涤后的微球空气干燥过夜，在室温下储存。对照组微球（不含红豆杉醇）如上制备。用一个带有分级测微计的光学显微镜测定微球的粒度。

[0306] B : 包囊效率

[0307] 将已知重量的装载药物微球（约 5mg）溶于 8ml 乙腈中，加入 2ml 蒸馏水沉淀聚合物。混合物在 1000g 离心 10 分钟，包囊的红豆杉醇量从上清液中的吸收计算（用 UV 分光光度计 (Hewlett-Packard8452ADiodeArraySpectrophotometer) 在 232nm 测定）。

[0308] C : 药物释放研究

[0309] 将约 10ml 装载红豆杉醇的微球悬浮在一个螺旋塞玻璃试管中 10ml10mM 磷酸盐缓冲盐水中 (PBS) (pH7.4)。在 37°C 转动（开口及管底方向）试管，于给定间隔除去 19.5ml 上清液（微球沉积在管底后），通过 0.45mm 的膜滤器过滤后留作红豆杉醇分析。在每个试管中放入等体积的 PBS 以在整个研究中保持下降的状态。用 3×1mlDCM 萃取滤液，将 DCM 萃取物于氮气流下蒸发干燥，再溶于 1ml 乙腈中，用 HPLC（流动相为水：甲醇：乙腈 (37 : 5 : 58)，流速 1ml/ 分钟，(Beckmanisocratic 泵)，C8 反相柱 (Beckman)，232nmUV 检测 (ShimadzuSPDA)）分析。

[0310] D : CAM 研究

[0311] 将受精的家养鸡胚在无壳培养前孵育 4 天。孵育的第 6 天,将 1mg 等分试样的装载 5% 红豆杉醇或对照组微球(不含红豆杉醇)直接置于 CAM 表面。暴露 2 天后,用一个与摄像机接口的立体显微镜检查脉管系统;然后将视频信号显示在计算机上并打印。

[0312] E : 扫描电子显微镜 (SEM)

[0313] 将微球放在试样架上,用金喷镀包衣,用 Philips50 1B 扫描电子显微镜(在 15kV 操作)进行显微摄影。

[0314] F : 结果

[0315] 微球试样的粒度范围在 30–100mm 之间,尽管在所有装载红豆杉醇或者对照组微球中发现一些微球落在此范围外。PCL 微球装载红豆杉醇的效率在所有装载药物的微球中通常大于 95%。扫描电子显微镜检查表明所有的微球都是球体,形态上许多为粗糙或纹孔表面。在微球表面没有发现固体药物。

[0316] 红豆杉醇从装载 1%、2% 及 5% 红豆杉醇 PCL 微球中的释放时间如图 16A 所示。释放图为双相。在所有装载的药物中有一个红豆杉醇最初的快速释放或“突发”相。突发相在 1% 和 2% 红豆杉醇的装载中发生 1–2 天,在 5% 装载的微球中发生 3–4 天。继最初的快速释放相后是一个非常慢的药物释放相。含有 1% 或 2% 红豆杉醇的微球在 21 天后就没有更多的药物释放了。在装载 5% 红豆杉醇的微球中,21 天后微球已释放出全部药量的 20%。

[0317] 图 16B 表明用对照组 PCL 微球处理的 CAM,图 16C 表明用装载 5% 红豆杉醇微球处理的 CAM。用对照组微球处理的 CAM 具有正常的毛细管网。用红豆杉醇 -PCL 微球处理的 CAM 显示出明显的血管退化及缺乏血管网的区域。

[0318] G : 讨论

[0319] 制备装载红豆杉醇微球的溶剂蒸发法具有很高的红豆杉醇包囊效率 ~95–100%。这是由于红豆杉醇难溶于水,其憎水特性有利于其在含有聚合物的有机溶剂相中分配。

[0320] 红豆杉醇的双相释放图是许多药物从生物可降解聚合物基质中释放的典型方式。聚(ϵ -己内酯)是一个酯族聚酯,其在生理条件下通过水解而降解,无毒,同时其是组织相容性的。PCL 的降解比已做过详细研究的乳酸和羟基乙酸的聚合物及其共聚物的降解要慢得多,因此其适用于长期药物释放体系。红豆杉醇释放的最初快速或突发相认为是由于微球表层(靠近微球的表面)药物的分散。红豆杉醇在第二相(慢)的释放方式不可能归因于 PCL 的降解或浸蚀,因为研究表明在体外的条件下,经过 7.5 星期的时间,PCL 在水中没有明显的重量损失或表面浸蚀。红豆杉醇释放的慢相可能是由于药物溶解在聚合物基质充满液体的孔隙中以及在孔隙中的扩散。在装载红豆杉醇较多的微球中较高的释放速率可能是聚合物基质中更多孔隙网的结果。

[0321] 已表明含有 5% 红豆杉醇的微球当置于 CAM 上时能释放出足量的可产生血管生长强烈抑制作用的药物。对血管生长的抑制导致了图 16C 中所示的无血管区。

[0322] 实施例 13:由乙烯乙酸乙烯酯及表面活性剂组成的装载红豆杉醇的聚合物薄膜

[0323] 如实施例 10 制备两种类型的薄膜:装载红豆杉醇的纯 EVA 薄膜及装载红豆杉醇的 EVA/ 表面活性剂混合薄膜(即,PluronicF127,Span80 和 PluronicL101)。

[0324] 检测的表面活性剂是两种憎水表面活性剂(Span80 和 PluronicL101)和一种亲水表面活性剂(PluronicF127)。Pluronic 表面活性剂本身是聚合物,这一点很吸引人,因为其可与 EVA 混合而使各种释放性质最佳化。Span80 的分子稍小,其可以某种方式分散

在聚合物基质中，但是不形成混合物。

[0325] 表面活性剂可以用于调节红豆杉醇从薄膜的释放速率，并且可以优化薄膜的某些物理参数。表面活性剂混合的薄膜（其表明药物释放速率可以控制）具有改变速率及化合物在水中膨胀程度的能力。水在聚合物 - 药物基质中的扩散对药物从载体中的释放很重要。图 17C 和 17D 表明了当表面活性剂水平在混合物中改变时薄膜膨胀的程度。纯 EVA 薄膜在 2 个月内没有显著程度的膨胀。但是，当增加加入 EVA 中表面活性剂的水平时，可以增加混合物的膨胀程度，增加亲水性也可以增加膨胀。

[0326] 这些薄膜的实验结果如图 17A-E 所示。简而言之，图 17A 表明红豆杉醇从纯 EVA 薄膜中的释放量 (mg) 与时间。图 17B 表明留在同一薄膜中的药物百分数。从这两个图中可看出，当装载红豆杉醇的量增加时（即红豆杉醇的重量百分数增加），药物的释放速率也增加，其表明了预计的浓度依赖性。当装载红豆杉醇的量增加时，保留在薄膜中的红豆杉醇百分数也增加，这表明高装载量更适用于长期释放的制剂。

[0327] 薄膜物理强度和弹性的评价如图 17E 所示。简而言之，图 17E 表示纯 EVA 和 EVA- 表面活性剂混合膜的应力 / 张力曲线。这一应力的粗测量表明，表明的弹性随 PluronicF127 的加入而增加，抗拉强度（断裂时的应力）随 PluronicF127 的加入而增加（浓度依赖性）。在设计薄膜时弹性和强度是重要的考虑因素，薄膜可设计为特殊的临床应用形式而不引起化合物的形变。

[0328] 上述数据表明了一些表面活性剂添加剂控制药物释放速率的能力，以及改变赋形剂物理性质的能力。

[0329] 实施例 14：结合甲氧基聚乙二醇 350 (MePEG) 到聚 (E- 己内酯) 中以制备红豆杉醇糊剂的控制释放制剂

[0330] 用于本实验的试剂和设备包括甲氧基聚乙二醇 350 (“MePEG” -UnionCarbide, Danbury, CT)。MePEG 在室温下呈液态，凝固点为 10 到 -5°C。

[0331] A : 含有红豆杉醇的 MePEG/PCL 糊剂的制备

[0332] MePEG/PCL 糊剂的制备首先将定量的红豆杉醇溶于 MePEG，然后将其结合到熔化的 PCL 中。这一方法的优点在于不需要 DCM。

[0333] B : 熔点分析

[0334] PCL/MePEG 聚合物混合物的熔点通过差示扫描量热法从 30 °C 到 70 °C 以每分钟 2.5 °C 的加热速率来确定。实验结果如图 18A 和 18B 所示。简而言之，图 18A 中所示的聚合物混合物熔点（热分析确定）以一种 MePEG 浓度依赖的方式而降低。MePEG 浓度对聚合物混合物的熔点的作用如图 18A 所示。这种低熔点也可平移到聚合物混合物由熔化到固化的增加时间中（如图 18B 所示）。30 : 70 混合的 MePEG : PCL 从液态熔化物到固化所需的时间比单独的 PCL 从液态熔化物到固化所需的时间长两倍多。

[0335] C : 脆性测定

[0336] 将 MePEG 结合到 PCL 中与单独的 PCL 相比似乎可产生脆性低的固体。作为一种“粗”定量方法，将已称重的针从相同的高度落入含有 0% 至 30% MePEG 的 PCL 聚合物混合物中，然后测量针穿入固体的距离。实验结果图如图 18C 所示。实验点是 4 次测量的平均值 +/- 标准偏差 (S. D.)。

[0337] D. 红豆杉醇释放的测试

[0338] 将聚合物丸(含有0%, 5%, 10%或20% MePEG的PCL)在磷酸盐缓冲盐水中(PBS, pH7.4)保温, 随时间测量聚合物重量的百分数(%)变化。从图18D中可看出, 当MePEG开始出现在混合物中时, 重量损失的量即增加。这种重量的损失可能是由于MePEG从聚合物基质释放入保温液。这表明红豆杉醇易于从MePEG/PCL混合物中释放, 因为红豆杉醇在结合到PCL前首先溶于MePEG中。

[0339] E: 不同量MePEG对红豆杉醇释放的影响

[0340] 制备在PCL中含有0.8%~20% MePEG的热糊。其用1%的红豆杉醇装载。用HPLC监测37°C在PBS缓冲液中红豆杉醇从10mg丸的释放。如图18E所示, 制剂中MePEG的量不影响释放出的红豆杉醇量。

[0341] F: 不同量红豆杉醇对红豆杉醇从20% MePEG/PCL混合物中释放总量的影响

[0342] 制备在PCL中含有0.8%~20% MePEG的热糊。红豆杉醇的释放量如上测量。如图18F所示, 红豆杉醇的释放量随装载红豆杉醇量的增加而增加。但是当绘制为总红豆杉醇释放量的百分数时, 顺序则反过来(图18G)。这表明在糊剂中仍残留有红豆杉醇(如果假设外推这些数据是有效的), 其也可延长一段时间, 期间红豆杉醇将从20% MePEG热糊中释放出。

[0343] G: 不同MePEG/PCL混合物的强度分析

[0344] 用CT_40机械强度检测仪测量直径为0.88cm、平均厚度为0.560cm的固态聚合物“片”的强度。聚合物片是浓度为0%, 5%, 10%或20%的MePEG在PCL中的混合物。

[0345] 试验结果如图18H所示, 其中抗拉强度和断裂时间绘制为% MePEG在混合物中的功能。单一变量ANOVA表明每组中的片厚是相同的。从图18H可看出, PCL中MePEG的加入降低了所得固体的硬度。

[0346] 实施例15: 装载红豆杉醇的热糊对体内血管生长的作用

[0347] 将受精的家养鸡胚在无壳培养前孵育4天(如实施例2所述)。将蛋内容物从壳中倒入圆底无菌玻璃碗中, 用陪替氏培养皿盖好。

[0348] 将如上所述(见实施例10)的5%、10%及20%(w/v)浓度的红豆杉醇结合到热糊中用于下述实验。然后将干燥后切下的热糊加热至60°C, 并且在两层parafilm中挤压成扁平状, 冷却。6个胚胎接受20%的装载红豆杉醇热糊, 6个胚胎接受用此方法制备的无装载热糊。每组中都有一个胚胎死去, 因此在每个对照组及处理组中留下5个胚胎。

[0349] 将无装载热糊及含有20%红豆杉醇的热糊加热至60°C, 直接放在孵育6天的CAM生长边缘; 以此方式每次处理两个胚胎。

[0350] 采用不同方法所得到的结果中没有明显不同, 这表明糊剂在施用时的温度对所得结果不是一个原因。

[0351] 将含有10%红豆杉醇的热糊置于11个CAM上, 无装载热糊置于另外11个CAM上, 同时将装载5%红豆杉醇的热糊置于10个CAM上, 无装载热糊置于另外10个CAM上。暴露2天后(孵育的第8天), 在立体显微镜的协助下检查脉管系统。将LiposynII(一种白色不透明溶液)注入CAM中以增加血管细节的可见度。

[0352] 装载20%红豆杉醇的热糊在所有接受此处理的5个CAM中显示出广泛的无血管区(见图19B)。抑制作用的最高程度定义为6mm×6mm的无血管区域。用装载20%红豆杉醇热糊处理的所有CAM都显示出这一程度的血管生长抑制作用。

[0353] 相比而言,对照组(无装载)热糊不抑制CAM的血管生长(见图19A);这一高倍影像(注意在影像的顶部可看到热糊的边缘)说明邻接糊剂的血管不受热糊的影响。其表明所观察到的作用归因于红豆杉醇的持续释放,而不是由于聚合物本身或者是糊剂对生长中的脉管系统的辅助压力。

[0354] 本项研究证实了热糊能释放出可以抑制CAM脉管系统正常生长的足量血管生长抑制剂(本实验中为红豆杉醇)。

[0355] 实施例16:装载红豆杉醇的热糊对体内肿瘤生长及肿瘤血管生长的作用

[0356] 将受精的家养鸡胚在除去期蛋壳前孵育3天。通过除去位于空气中的蛋壳而倒空蛋的内容物,分离里面的蛋壳膜,将蛋壳的另一末端穿孔以使蛋内容物缓慢滑出钝端。将蛋内容物倒入圆底无菌玻璃碗中,用陪替氏培养皿盖上。于90%的相对湿度及3%CO₂的条件下孵育(见实施例2)。

[0357] 将MDAY-D2细胞(一种鼠淋巴瘤)注入鼠中使其长成重量为0.5-1.0g的肿瘤。处死鼠,用酒精擦拭肿瘤部位,切开,置于无菌组织培养基中,在层流通风橱中切成1mm见方的小块。在将切好的肿瘤放到9天大的鸡胚之前,用30规的针轻刮CAM表面以保证肿瘤的移植。然后将肿瘤置于孵育8天(脱壳后4天)的CAM上,使其在CAM上生长4天用以建立血管供给。用此方法制备4个胚胎,每个胚胎接种3个肿瘤。在这些胚胎中,一个肿瘤接受装载20%红豆杉醇的热糊,一个接受无装载的热糊,另一个没有任何处理。处理持续2天后,记录结果。

[0358] 移植的MDAY-D2肿瘤分泌血管生长因子,其诱导毛细管(来自CAM)向肿瘤块内的生长,并且使其的大小继续长大。由于肿瘤所有的血管都来自CAM,同时所有的肿瘤细胞都来自移植物,因此可以独立评价两个过程中的治疗效果。本试验已用于确定装载红豆杉醇的热糊在(a)抑制肿瘤血管化及(b)抑制肿瘤本身生长的效果。

[0359] 本实验中直接进行的体内立体显微镜检查及组织固定后的组织学检查如下阐述。在用装载20%红豆杉醇的热糊处理的肿瘤中,与对照组肿瘤相比,供给肿瘤的血管数量有所下降(见图20C和20D),肿瘤内血管的数量也有所下降,同时肿瘤周围的血管(该区域在实心瘤中具有最多的血管)数量有所下降。进行研究两天中肿瘤开始减小其的大小及质量。另外,观察到许多内皮细胞在细胞分裂中受到抑制,其表明内皮细胞的增殖受到影响。也不断发现肿瘤细胞在有丝分裂中的抑制。所有4个胚胎都表明装载红豆杉醇的热糊可以抑制肿瘤血管生长,而无装载的热糊没有作用。

[0360] 相比而言,在用无装载热糊处理的CAM中,肿瘤高度血管化,即与正常的周围组织相比,在数量及密度上增加,同时与用装载红豆杉醇的糊剂处理的肿瘤相比,可观察到明显增多的血管。新形成的血管从各种角度进入肿瘤,就象辐条连接到轮子的中心(见图20A和20B)。在研究过程中,对照组肿瘤继续在大小和质量上增加。从组织学而言,在质量周围观察到许多膨胀的薄壁毛细管,并且在细胞分裂中几乎没有发现内皮细胞。肿瘤组织在整个过程中高度血管化并且是活动的。

[0361] 作为一个例子,在置于相同CAM上的两个近似大小(最初移植时)的肿瘤中,得到下述数据。对于用装载20%红豆杉醇的热糊处理的肿瘤而言,测得肿瘤为330mm×597mm;肿瘤最邻近的四周有14条血管,肿瘤块中只有3-4条小毛细管。对于用无装载热糊处理的肿瘤而言,肿瘤大小为623mm×678mm;肿瘤最邻近的四周有54条血管,而肿瘤块中有12-14

条小毛细管。此外,与红豆杉醇处理的肿瘤四周区域相比,CAM 的四周含有更多的血管。

[0362] 本项研究证实了热糊能释放出可以抑制伴有肿瘤生长及进展的病理性血管生长的足量血管生长抑制剂(本实验中为红豆杉醇)。在这种情况下,血管生长通过肿瘤细胞被最大程度地激化,该肿瘤细胞可以产生诱导毛细管从四周组织向肿瘤块内生长的血管生长因子。装载红豆杉醇的热糊可以阻滞这一过程,并且限制了肿瘤组织维持足量血液供给的能力。其导致了通过药物对肿瘤细胞的细胞毒作用以及通过剥夺组织生长和扩大的营养物质而使肿瘤块减小。

[0363] 实施例 17 :血管生长抑制物对鼠肿瘤模型体内肿瘤生长的作用

[0364] 用鼠 MDAY-D2 肿瘤模型检查化疗用以及抗血管生长化合物(如红豆杉醇)对肿瘤生长、肿瘤迁徙及动物存活率的局部慢释放作用。MDAY-D2 细胞系在含有 5% 小牛血清的 α mem 培养基的细胞悬浮液中生长。细胞在 37°C 于含有 5% 二氧化碳的潮湿气中孵育,每隔 3 天用因子 15 稀释直至得到足够数目的细胞,孵育期后,用光学显微镜检查细胞的生活性,然后在 1500 转 / 分离心 5 分钟。将 PBS 加入到细胞中,得到每毫升 1,000,000 个细胞的稀释液。

[0365] 使新到的 10 周大的 DBA/2j 雌性鼠适应环境 3-4 天。然后在每只鼠的后侧肋腹皮下注射 100,000MDAY-D2 细胞的 100mlPBS 溶液。先前的研究已表明这一过程可在 3-4 天内于注射部位产生可见的肿瘤,14 天后肿瘤大小达 1.0-1.7g ;并且在注射后 19 到 25 天可在肝脏产生可见的转移瘤。基于本研究的目的,可以在疾病进展中的任何时候进行治疗性干预。

[0366] 使用上述动物模型,将 140,000 相同的 MDAY-D2 细胞注射到 20 只鼠中,使肿瘤生长。在第 5 天将鼠分成 5 组。麻醉下手术切开肿瘤,用装载药物的热糊或者对照组热糊处理局部区域而不干扰现存的肿瘤组织,缝合伤口。5 个组或者不接受任何处理(只是缝合了伤口),或者只接受聚合物(PCL),或者是装载 10% 的热糊,亦或是植入到肿瘤附近的装载 20% 红豆杉醇的热糊(只注射 4 只)。在第 16 天处死鼠,切开肿瘤并检查(总体及组织学)肿瘤的生长、迁徙、由于该处理所导致的局部及全身毒性、伤口的愈合作用、肿瘤血管化作用以及残留在切开处的糊剂的状况。

[0367] 每只动物中肿瘤的重量如下表所示:

[0368]

表 N
肿瘤重量 (g m)

动物号	对照组 (空)	对照组 (PCL)			10%红豆 杉醇热糊			20%红豆 杉醇热糊		
		1	2	3	4	5	平均值	标准差	卫值	
1	1.387	1.137	0.487	0.114						
2	0.589	0.763	0.589	0.192						
3	0.461	0.525	0.447	0.071						
4	0.606	0.282	0.274	0.042						
5	0.353	0.277	0.362							
		0.6808	0.6040	0.4318	0.1048					
		0.4078	0.3761	0.1202	0.0653					
			0.7647	0.358	0.036					

[0369] 装载 20% 红豆杉醇的热糊与对照组动物（平均重量为 0.618）相比降低了肿瘤生长的 85%（平均重量为 0.105）。单独用热糊或者含有 10% 红豆杉醇的热糊处理的动物对肿瘤生长只有中度的作用；肿瘤的重量分别仅减少了 10% 和 35%（图 21A）。因此，含有 20% 红豆杉醇的热糊比含有 10% 红豆杉醇的热糊在减少肿瘤生长中更有效（见图 21C 及图 21B）。

[0370] 在一些动物的用药部位检测到了热糊。15 至鼠中有 8 只检测到了重量在 0.026g 至 0.078g 不等的聚合物。实验组中每只含有装载 20% 红豆杉醇热糊的动物都含有残留的聚合物，表明其不易于溶解。在组织学上，用装载红豆杉醇热糊处理的肿瘤比对照组肿瘤含有更少的细胞构成及更多的组织坏死。脉管系统减少并且不断观察到细胞分裂中内皮细胞的抑制。装载红豆杉醇的热糊没有表现出影响肿瘤四周皮肤或组织的完整性或细胞构成。总体上看，伤口的愈合未受到影响。

[0371] 实施例 18：装载血管生长抑制物的手术用薄膜在癌切除手术中用于防止肿瘤细胞的医源性迁移

[0372] 作为一种无菌、柔韧、可伸展的药物 - 聚合物化合物，其可用于癌切除过程。在切

除手术中通常希望将正常的周围组织与恶性组织隔离以防止疾病向邻近器官的医源性扩展（通过癌细胞的不经意污染）。装载药物的 parafilm 可以在肿瘤控制前伸展到正常组织。如果在肠癌切除术中将其置于肝脏及其它腹部内脏周围会特别有用，因为其可防止疾病经腹膜扩散到肝脏。将生物可降解性薄膜置于该部位可以提供持续的防护。

[0373] 切口处也是一种常见的术后恶性肿瘤复发部位。认为其是由于手术过程中肿瘤细胞对伤口的污染。为阐明这些问题，进行实验来确定装载血管生长抑制物薄膜阻止这一现象发生的能力。

[0374] A :材料和方法

[0375] 手术用薄膜的制备。如实施例 10 制备手术用薄膜。制备测得约 1cm×1cm 的薄膜，其含有单独的聚合物 (PCL) 或用 5% 红豆杉醇装载的 PCL。

[0376] 大鼠肝肿瘤模型。在初始研究中，将体重约为 300g 的 Wistar 大鼠进行全身麻醉，沿腹中线切开一个 3-5cm 的切口。在最大的肝叶的肝实质中切开一个 1cm 的切口，切下肝脏边缘部分。将悬浮在 100ml 磷酸盐缓冲盐水中的一百万活的 9L 神经胶质肉瘤（在使用前立即从组织培养物中洗脱）用一个 30 规针沉积在切下的肝脏边缘。然后在含有肿瘤细胞的切下的肝脏边缘施行手术，用明胶海绵固定。两只动物接受含有 5% 红豆杉醇 PCL 薄膜，另外两只动物接受仅含有 PVL 的薄膜。用 3.0Dexon 及皮肤钳闭合腹壁。用全身麻醉终止，使动物恢复。10 天后，处死动物，组织学检查肝脏。

[0377] B :结果

[0378] 在用单独聚合物处理的 2 个肝脏中观察到了局部肿瘤的生长。用聚合物加红豆杉醇处理的 2 个肝脏当进行组织学检查时完全没有肿瘤。同样重要的是，肝囊已退化并且完全生长在聚合物薄膜及肝脏的切口表面上，这表明其对伤口的愈合没有明显的作用。在任何手术薄膜（装载药物的及不含药物的）周围都没有发现局部肝毒性。

[0379] C :讨论

[0380] 本项研究表明，手术中置于正常组织及切口部位的手术用薄膜可以降低恶性肿瘤切除术中肿瘤细胞意外移植入正常周围组织的发生率。这有助于降低术后疾病局部复发的重要问题。

[0381] 实施例 19 :在治疗关节炎时向关节内注射装载血管生长抑制物的生物可降解性的微球

[0382] 关节在关节炎中的损伤是由于炎症（包括白细胞及白细胞产物）和关节翳组织的进展（一种由新生血管组织、结缔组织和炎性细胞组成的组织）。已选择红豆杉醇用于初始研究，因为其是一种新生血管形成的强烈抑制剂。就此而言，红豆杉醇的局部高浓度将是一种关节炎中的病症减缓剂。

[0383] 为了确定是否微球对关节具有有害作用，进行下述实验。简而言之，如前述实施例 8 制备普通的 PCL 和装载红豆杉醇的微球。

[0384] 将 3 只兔子关节内注射总量为 0.2ml 的 0.5-5.0um, 10-30um 或 30-80um 的微球（含有 0.5mg 微球）。每日观察（临床）评价关节。两周后，处死动物，组织学检查关节的发炎迹象及蛋白多糖的亏空。

[0385] 使用兔子炎性关节炎及骨关节炎模型来评价微球在减轻滑膜炎及软骨降解中的作用。退化性关节炎是由于十字性韧带及膝关节半月板的部分裂缝引起的。4 到 6 周后，免

子发生了与在人骨关节中观察到的类似的软骨浸蚀。炎性关节炎是通过弗氏完全佐剂中用小牛血清白蛋白 (BSA) 进行免疫而引起的。3 周后, 将含有高滴度抗 -BSA 抗体的兔子进行关节内注射 BSA (5mg)。7 天后, 发生明显的关节肿胀及滑膜炎, 7-14 天可观察到蛋白多糖的亏空, 4-6 周可观察到软骨浸蚀。

[0386] 如上所述诱导炎性关节炎。4 天后, 用含有 5% 红豆杉醇或赋形剂的微球注射关节。在 14 天时处死一组动物, 第 28 天时处死另一组。进行组织学检查关节的炎症及软骨降解。该实验被设计为确定红豆杉醇微球是否能影响关节的发炎及软骨基质的降解。

[0387] 在骨关节炎模型中进一步检查含血管生长抑制剂的微球。简而言之, 如上所述诱导兔子的降解性关节炎, 第 4 天时, 关节内注射微球 (含有 5% 红豆杉醇或只有赋形剂)。在 21 天及 42 天时处死动物, 进行组织学检查软骨降解的迹象。

[0388] 进行研究以评价作为软骨保护剂的经关节内微球释放的血管生长抑制剂。

[0389] 结果

[0390] 将不同粒度的无装载 PCL 微球 (0.5-5.0um, 10-30um 或 30-80um) 关节内注射到兔子的膝关节中。实验结果如图 22A 至 D 所示。简而言之, 图 22A 是注射 PBS 的关节滑膜图。图 22B 是注射微球的关节图。图 22C 是注射 PBS 的关节软骨图。图 22D 是注射微球的关节软骨图。

[0391] 从这些图中可看出, 在组织学上, 注射微球的关节与没有注射其的关节无差异。在临幊上, 在进行实验的 14 天中, 没有发现关节发炎的迹象。总体上, 与未处理的正常关节相比, 在注射微球的关节中没有关节发炎或软骨损伤的迹象。

[0392] 结论

[0393] 微球可以关节内注射而在关节表面引起任何可见的改变。这表明该方法是一种将靶向的、持续释放的病症减缓剂转运到患病关节的有效方式, 同时使与这种生物活性化合物全身给药有关的毒性降为最低。

[0394] 如上所述, 可以将微球制成为具有给定药物释放动力学的特殊粒度。同时也证实了红豆杉醇是一种强烈的血管生长抑制剂, 其以足以阻滞 CAM 试验中新生血管形成的量从微球中释放出。因此, 关节内给予装载血管生长抑制剂 (如装载红豆杉醇) 的微球可以阻滞出现在诸如类风湿性关节炎等疾病中的新生血管形成及其导致的关节内软骨的毁坏。就此而言, 装载药物的微球可以作为一种“软骨保护”剂而防止软骨的不可逆损坏 (由于侵入的新生血管关节翳组织)。

[0395] 由上可得, 尽管本文为了阐明已描述了特殊的实例, 在不偏离本发明的宗旨及范围下可以进行各种修饰。因此, 本发明除了权利要求书以外并无限定。

[0396] 序列表

[0397] (1) 总的信息 :

[0398] (i) 申请人 :

[0399] Hunter, William L.

[0400] Machan, Lindsay S.

[0401] Arsenault, A. Larry

[0402] Burt, Helen M.

[0403] (ii) 发明题目 : 抗血管生长组合物及使用方法

- [0404] (iii) 序列数 :1
- [0405] (iv) 有关地址 :
- [0406] (A) 收信人 :SEED and BERRY
- [0407] (B) 街道 :701Fifth Avenue, 6300Columbia Center
- [0408] (C) 城市 :Seattle
- [0409] (D) 州 :Washington
- [0410] (E) 国家 :USA
- [0411] (F) ZIP :98104
- [0412] (v) 计算机类型 :
- [0413] (A) 介质类型 :软盘
- [0414] (B) 计算机 :IBM PC 兼容机
- [0415] (C) 操作系统 :PC-DOS/MS-DOS
- [0416] (D) 软件 :Patent In Release#1.0, Version#1.25
- [0417] (vi) 目前的申请数据 :
- [0418] (A) 申请号 :
- [0419] (B) 申请日 :
- [0420] (C) 分类 :
- [0421] (viii) 律师 / 代理人信息 :
- [0422] (A) 姓名 :McMasters. David D
- [0423] (B) 登记号 :33, 963
- [0424] (C) 对照 / 存档号 :110129, 401
- [0425] (ix) 通讯信息 :
- [0426] (A) 电话 :(206) 622-4900
- [0427] (B) 传真 :(206) 682. 6031
- [0428] (C) 电传 :3723836
- [0429] (2) SEQ ID NO :1 的信息 :
- [0430] (i) 序列特征 :
- [0431] (A) 长度 :9 个氨基酸
- [0432] (B) 类型 :氨基酸
- [0433] (C) 股 :单股
- [0434] (D) 拓扑 :线性
- [0435] (ii) 分子类型 :肽
- [0436] (v) 片段类型 :N- 末端
- [0437] (xi) 序列描述 :SEQ ID NO :1 :
- [0438]

Cys Asp Pro Gly Tyr Ile Gly Ser Arg
1 5

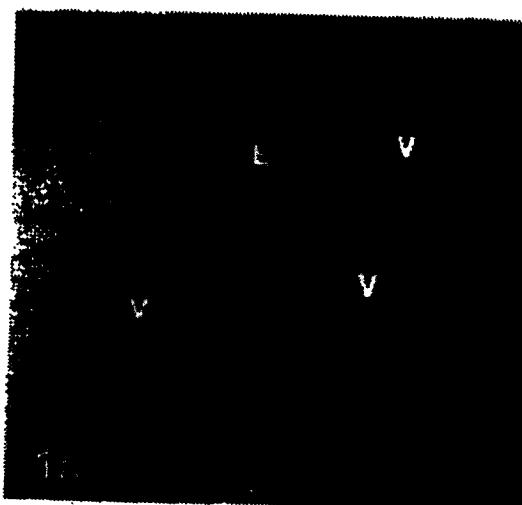


图 1A



图 1B

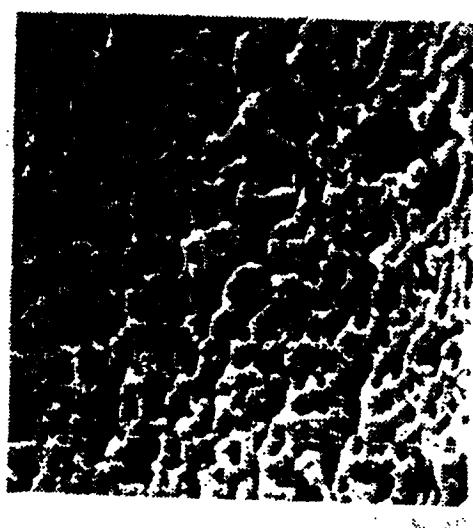


图 1C

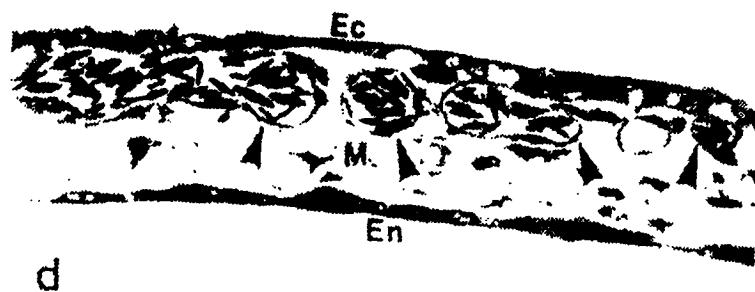


图 1D



图 1E



图 2A



图 2B



图 2C



图 2D

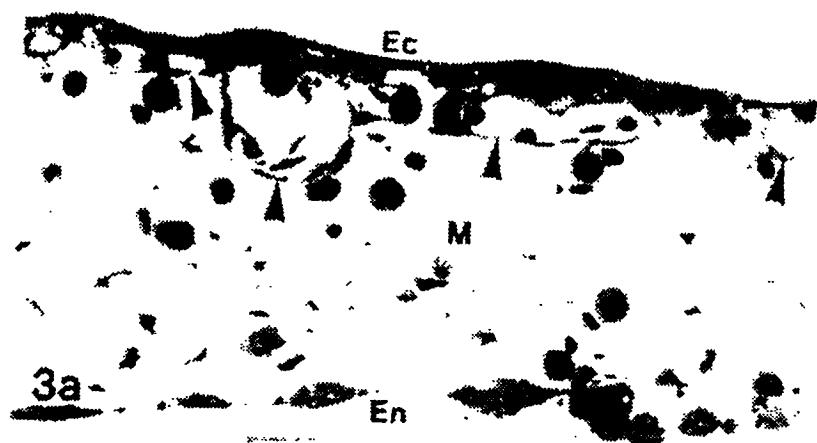


图 3A

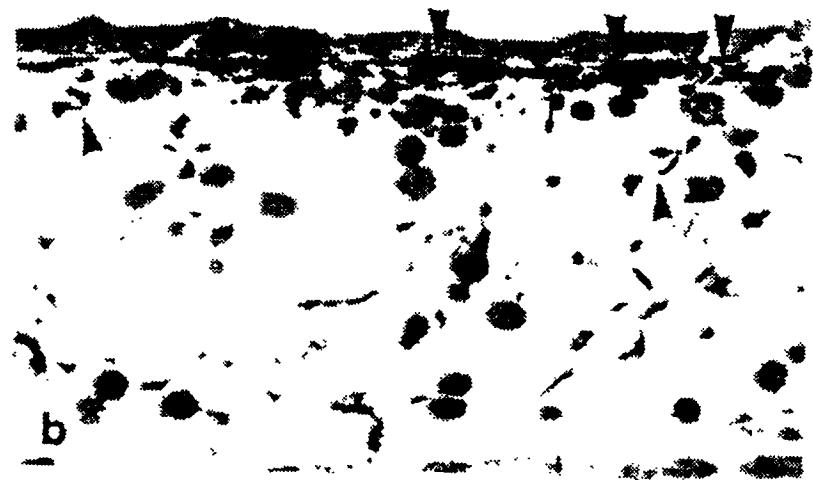


图 3B



图 3C



图 4A



图 4B

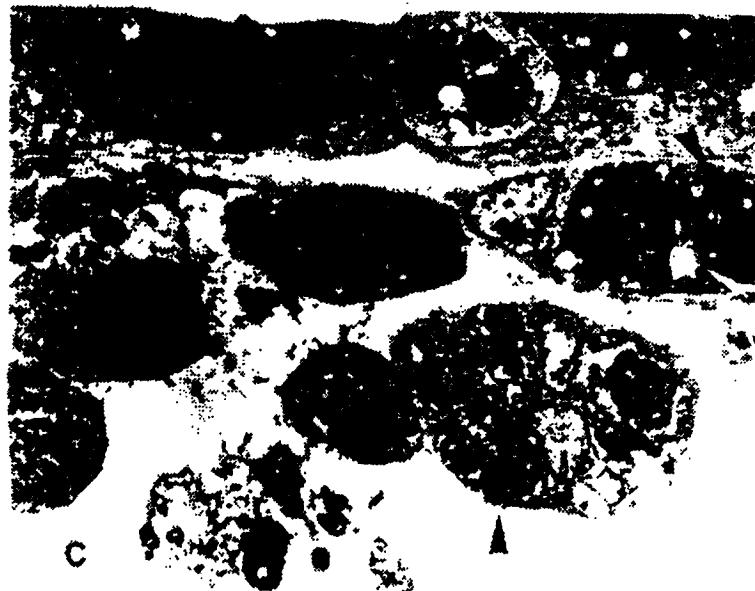
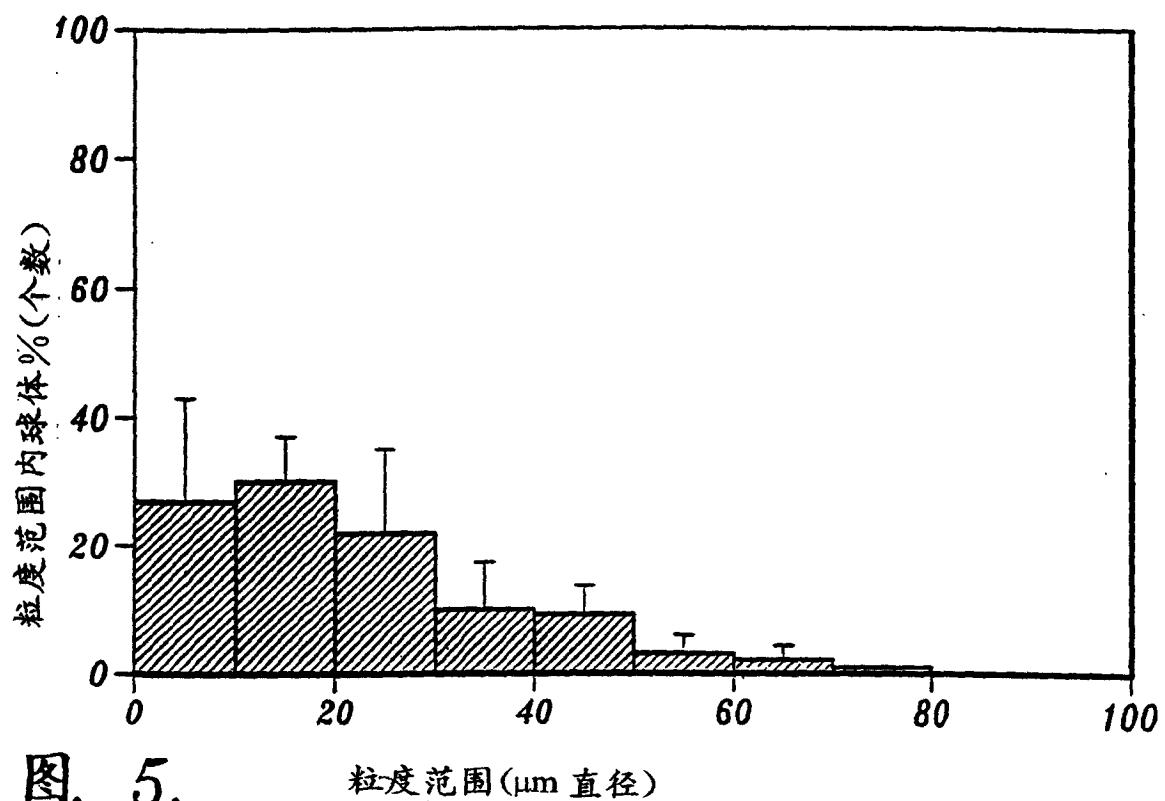


图 4C

图. 5. 粒度范围 (μm 直径)

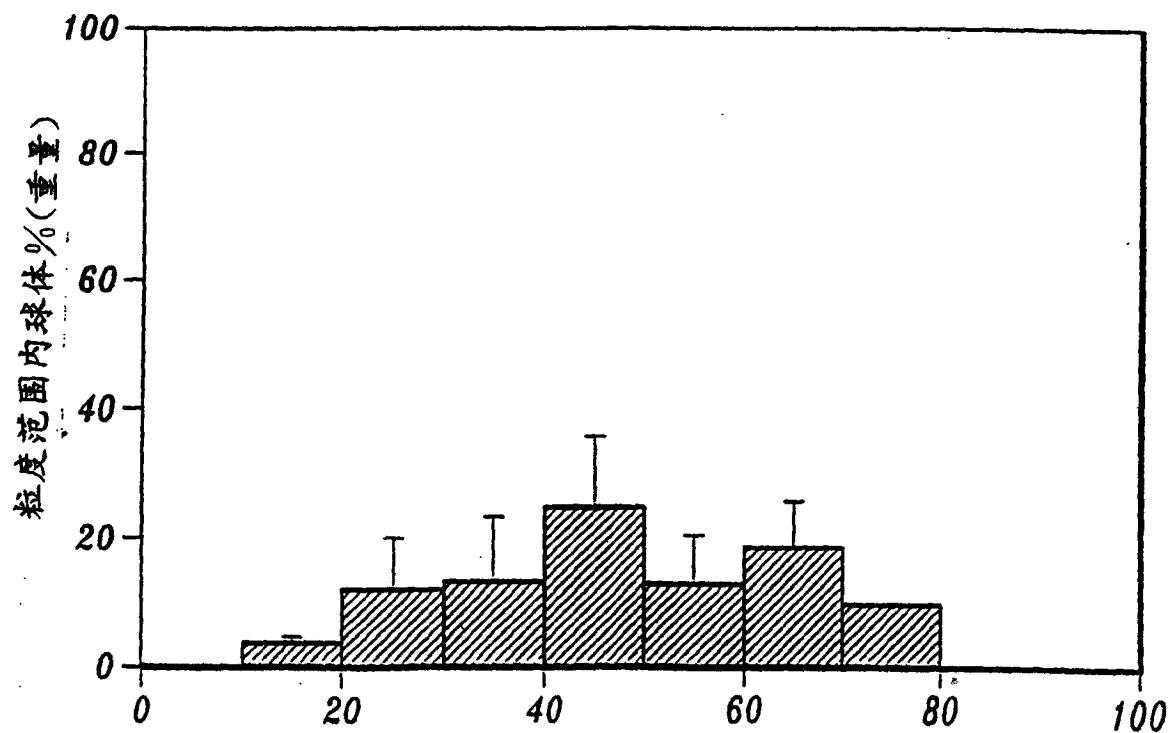


图. 6. 粒度范围 (μm 直径)

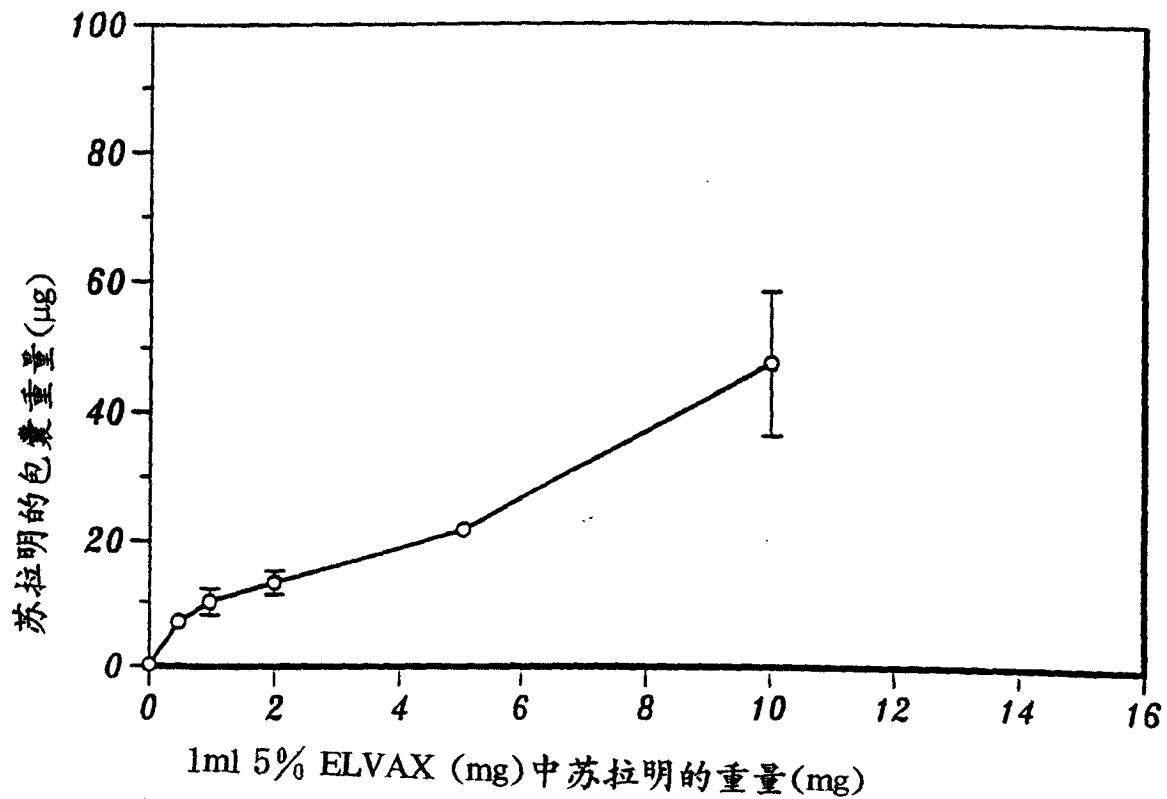


图 7

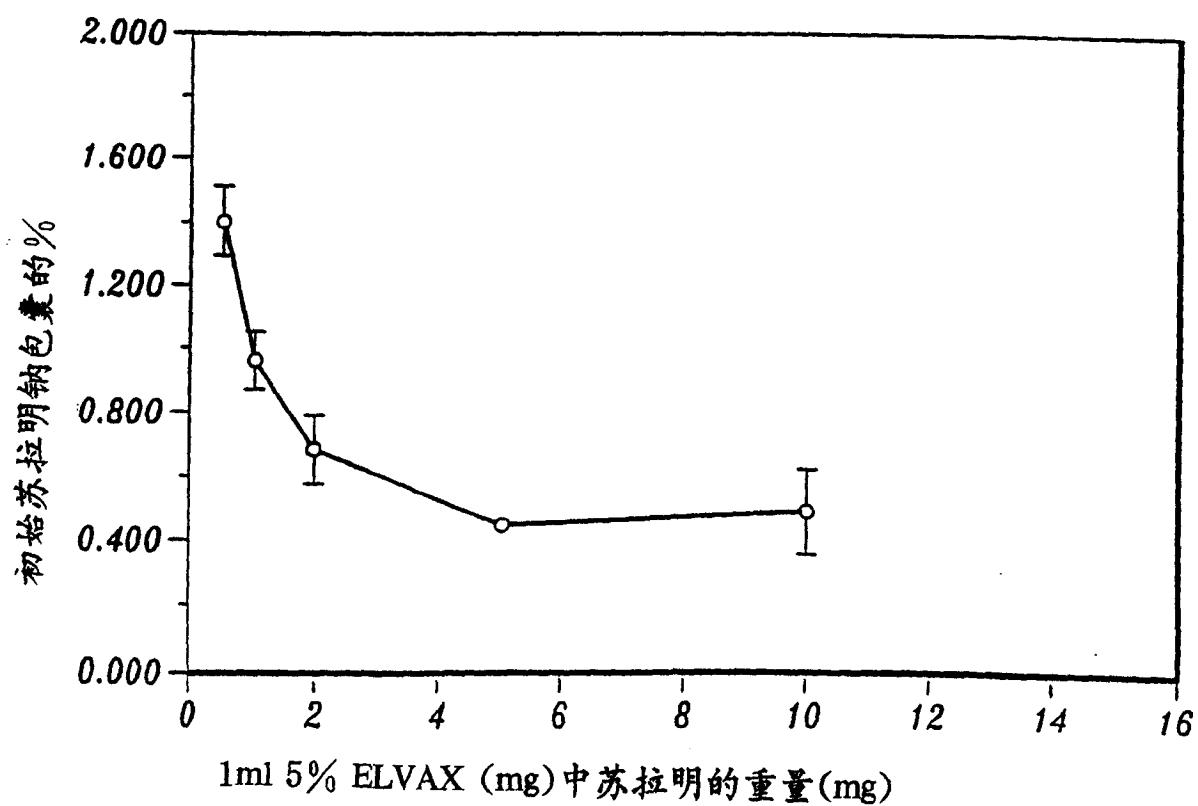


图 8

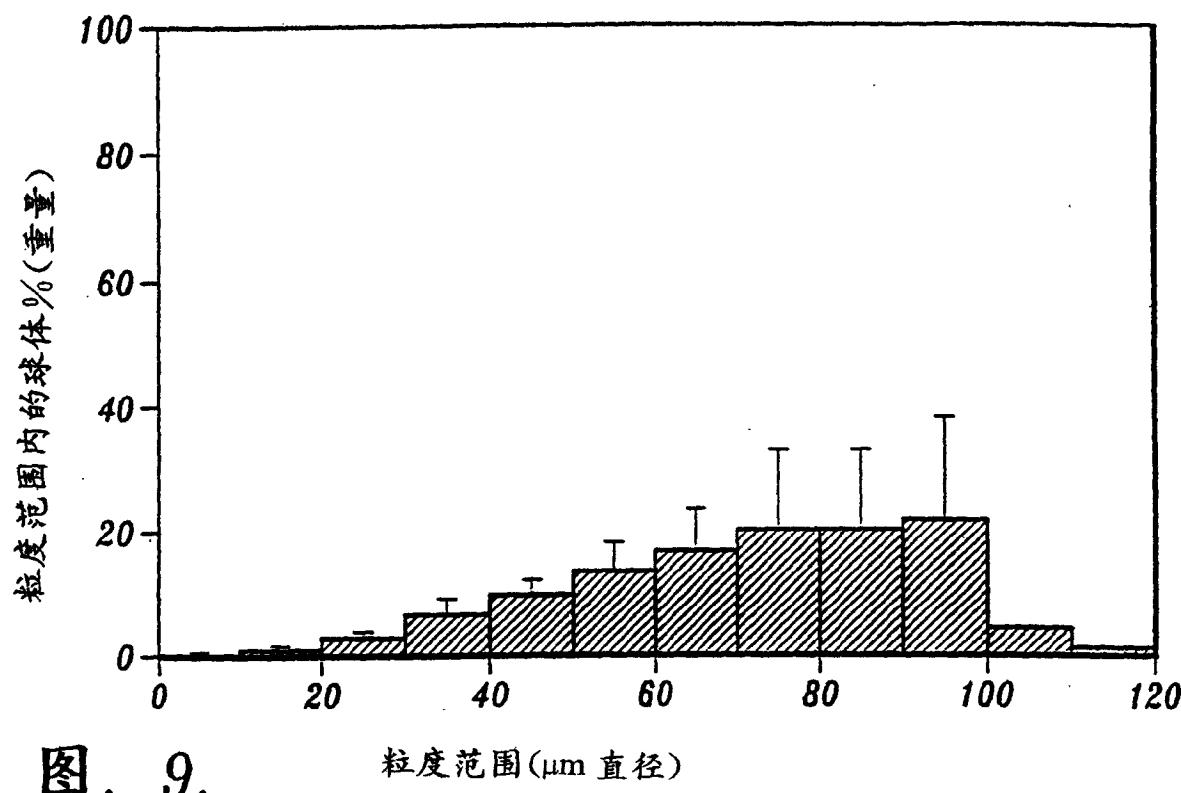


图. 9.

粒度范围(μm 直径)

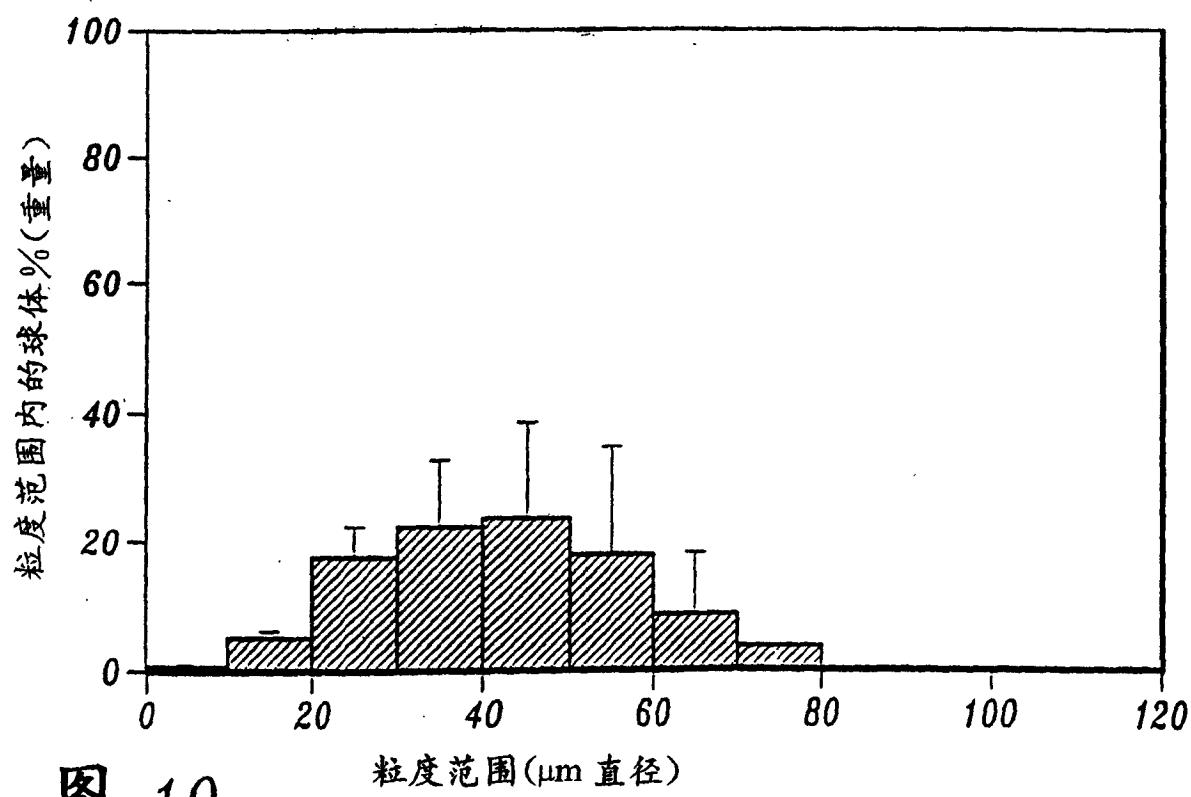


图 10.

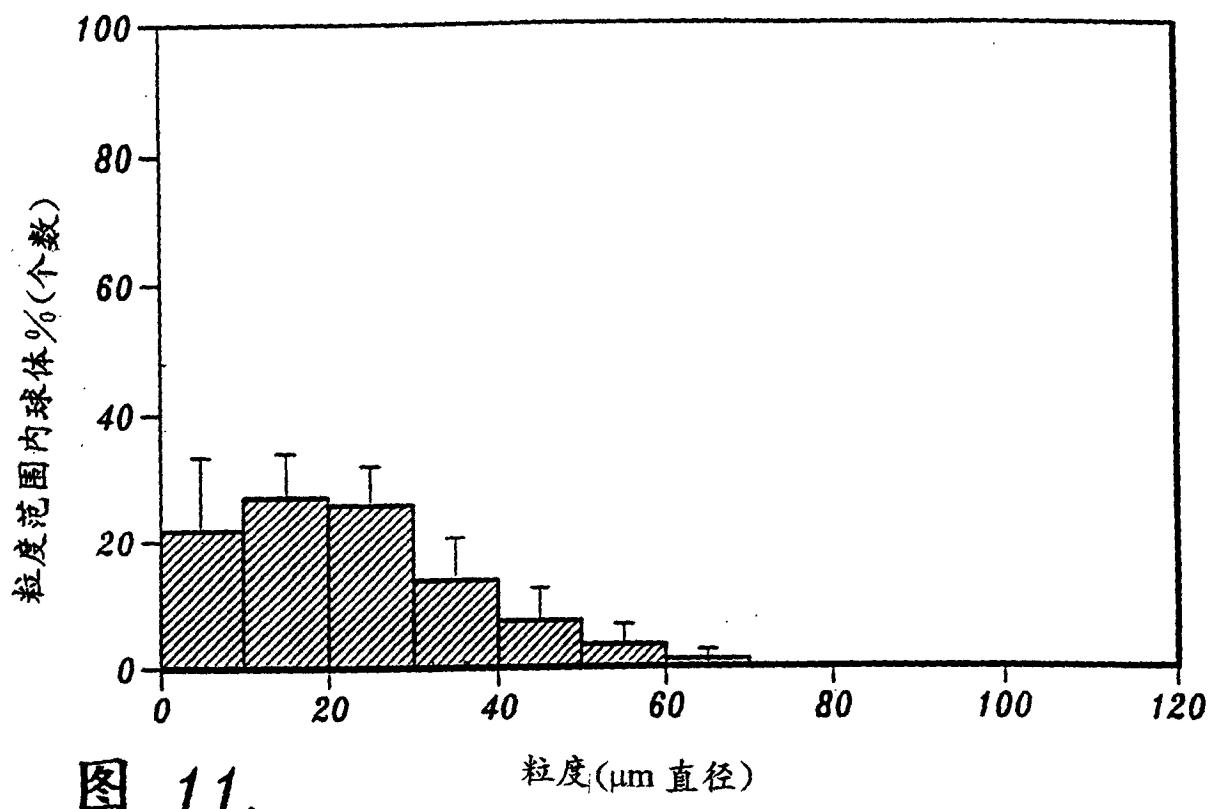


图 11.

粒度(μm 直径)

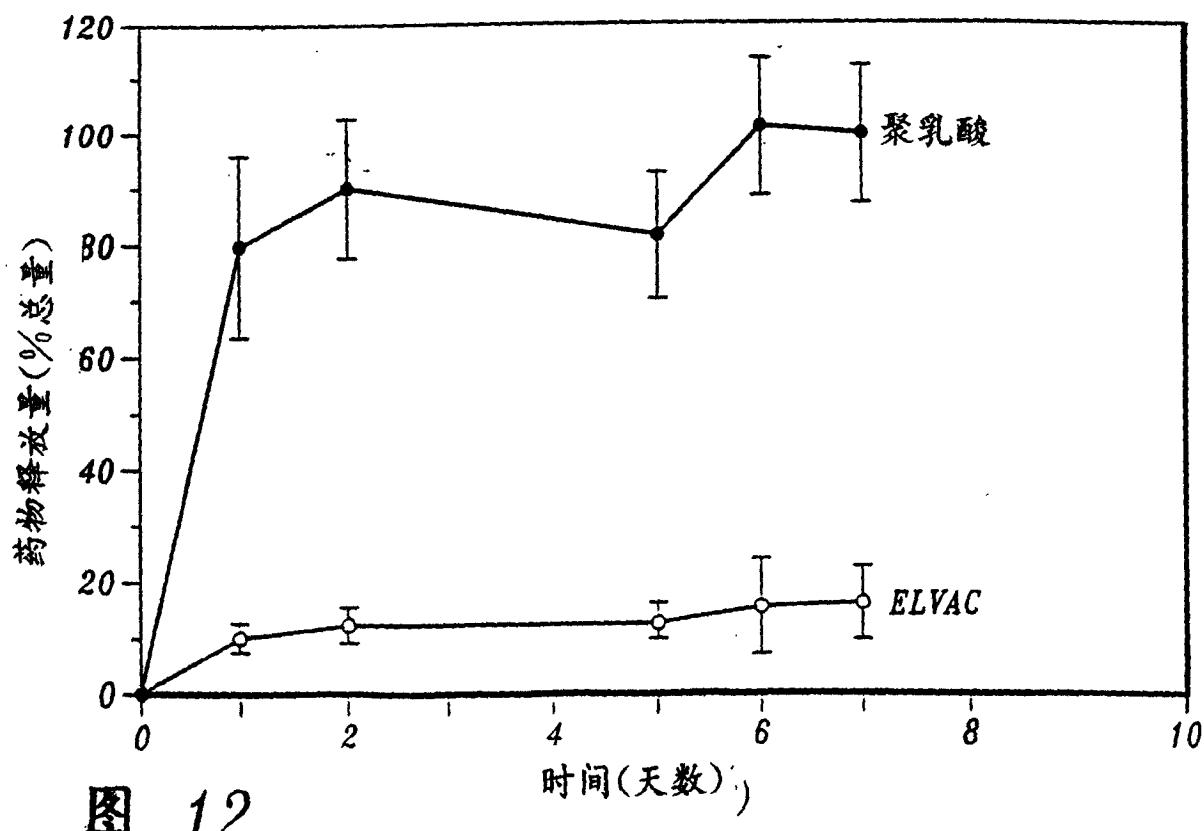


图 12.

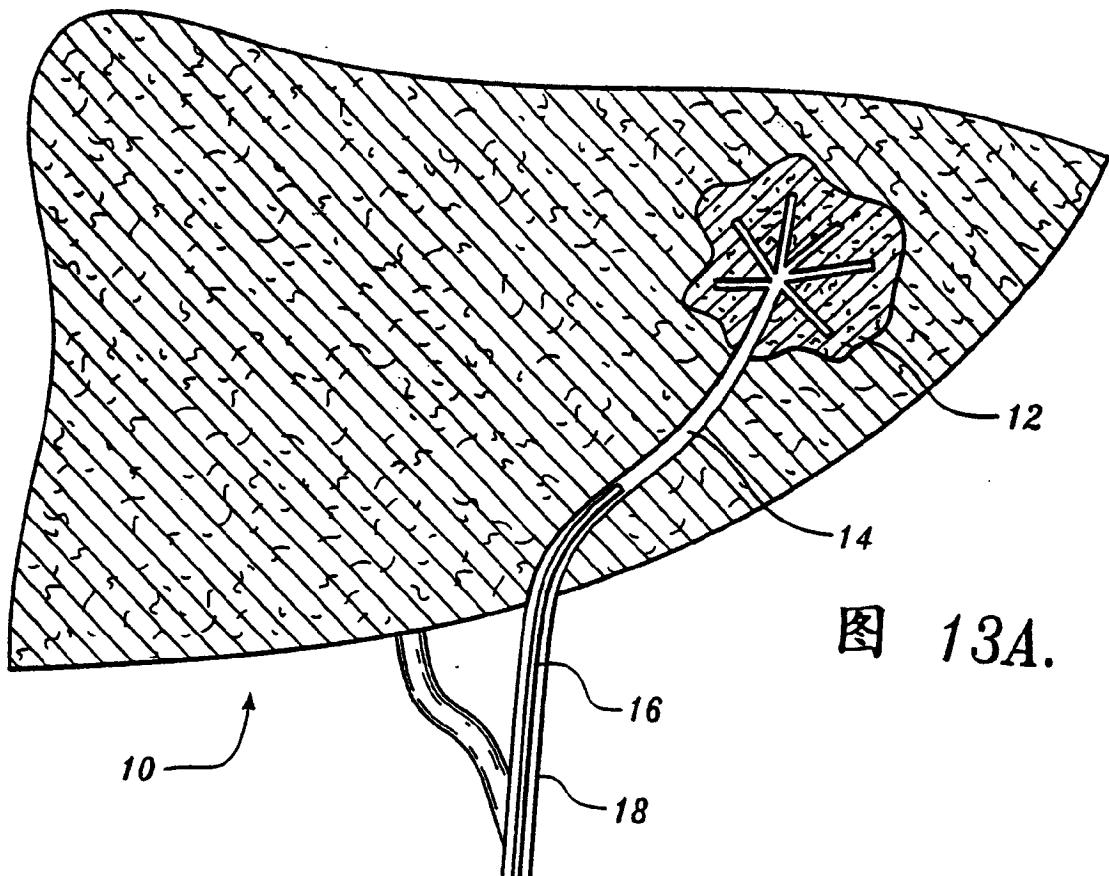


图 13A.

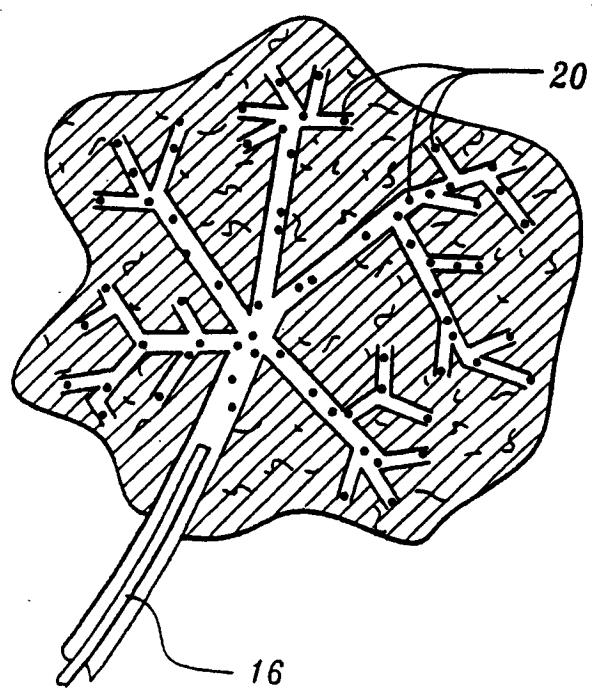


图 13B

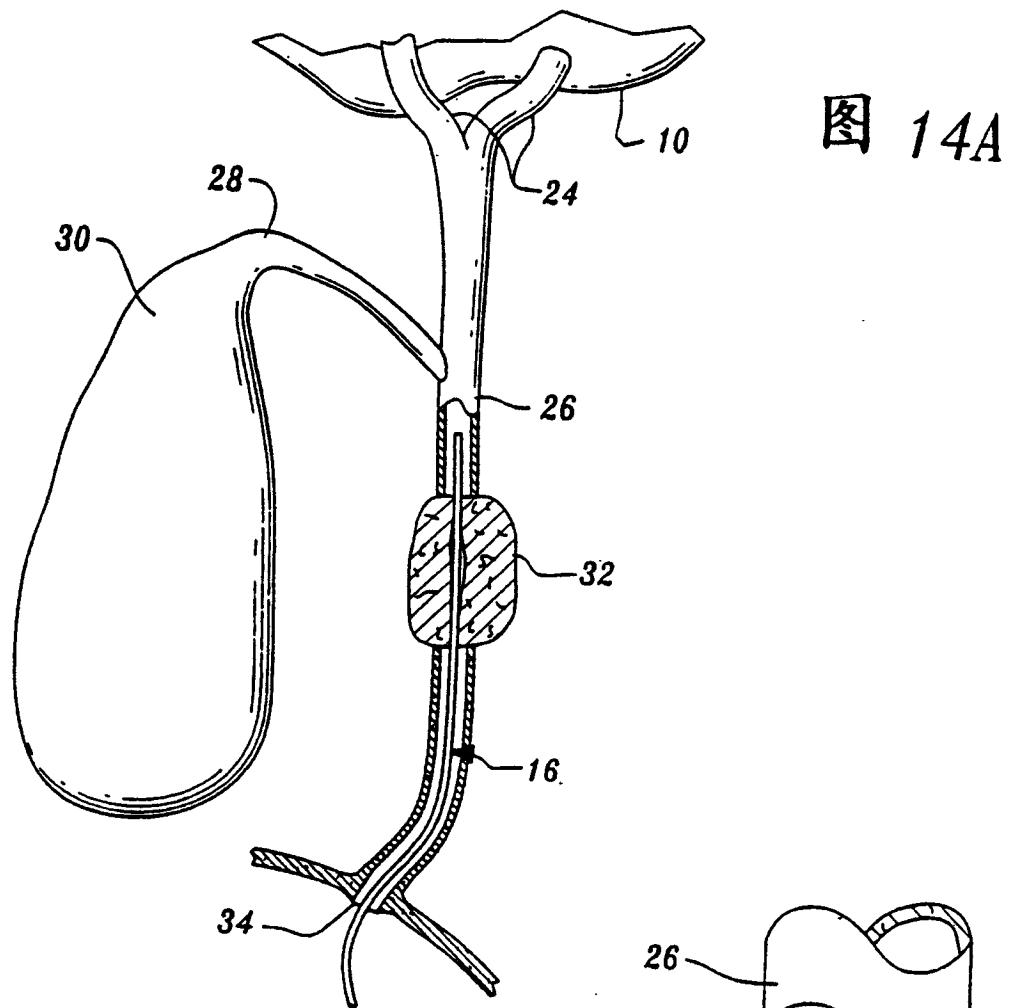
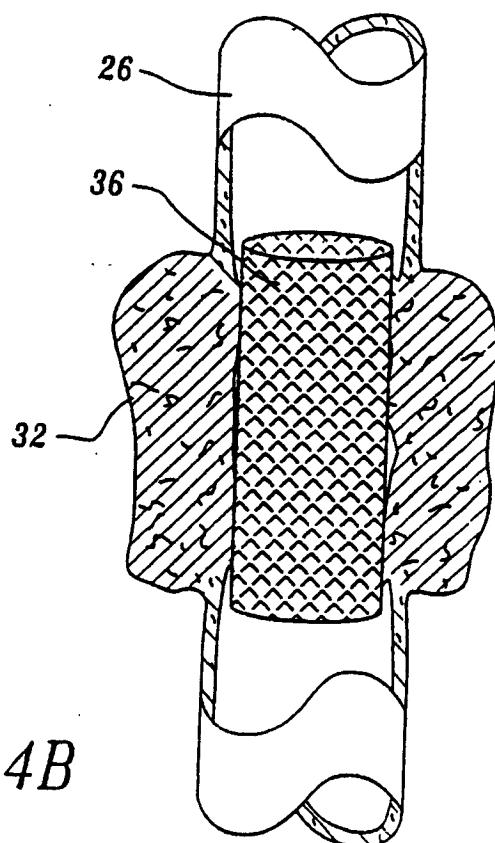


图 14B



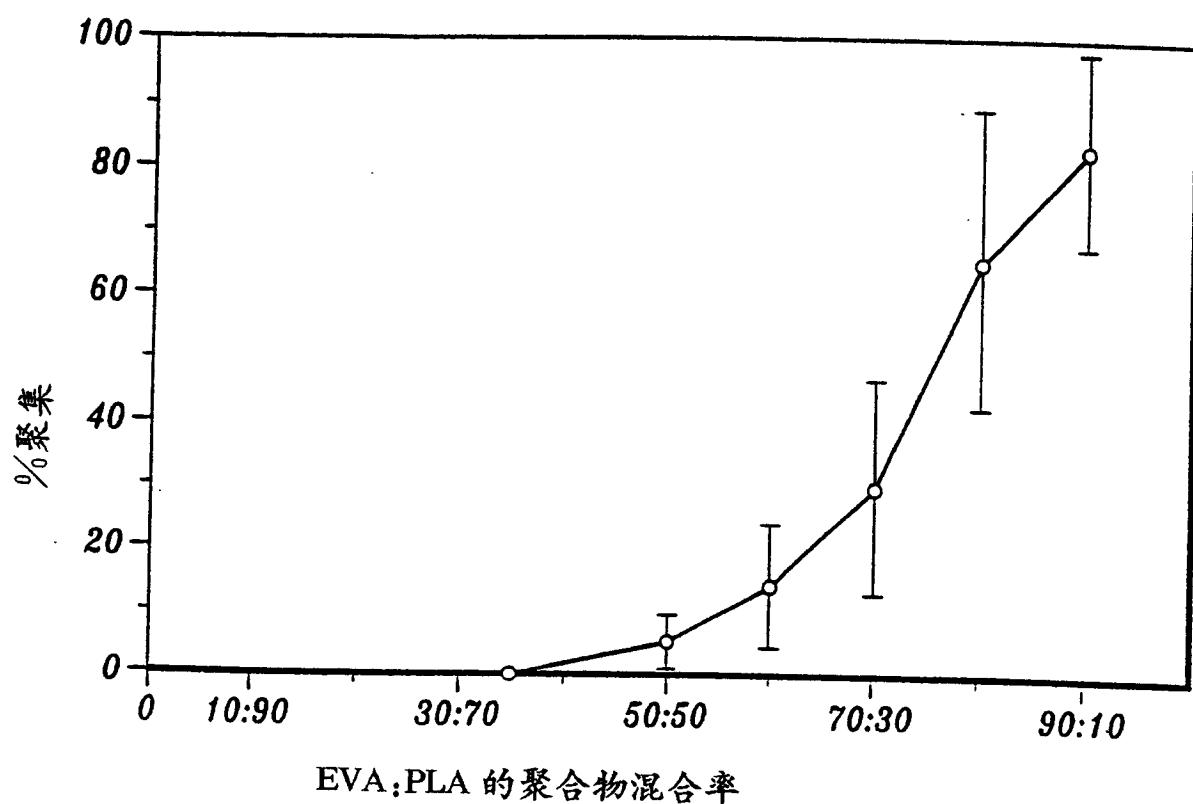
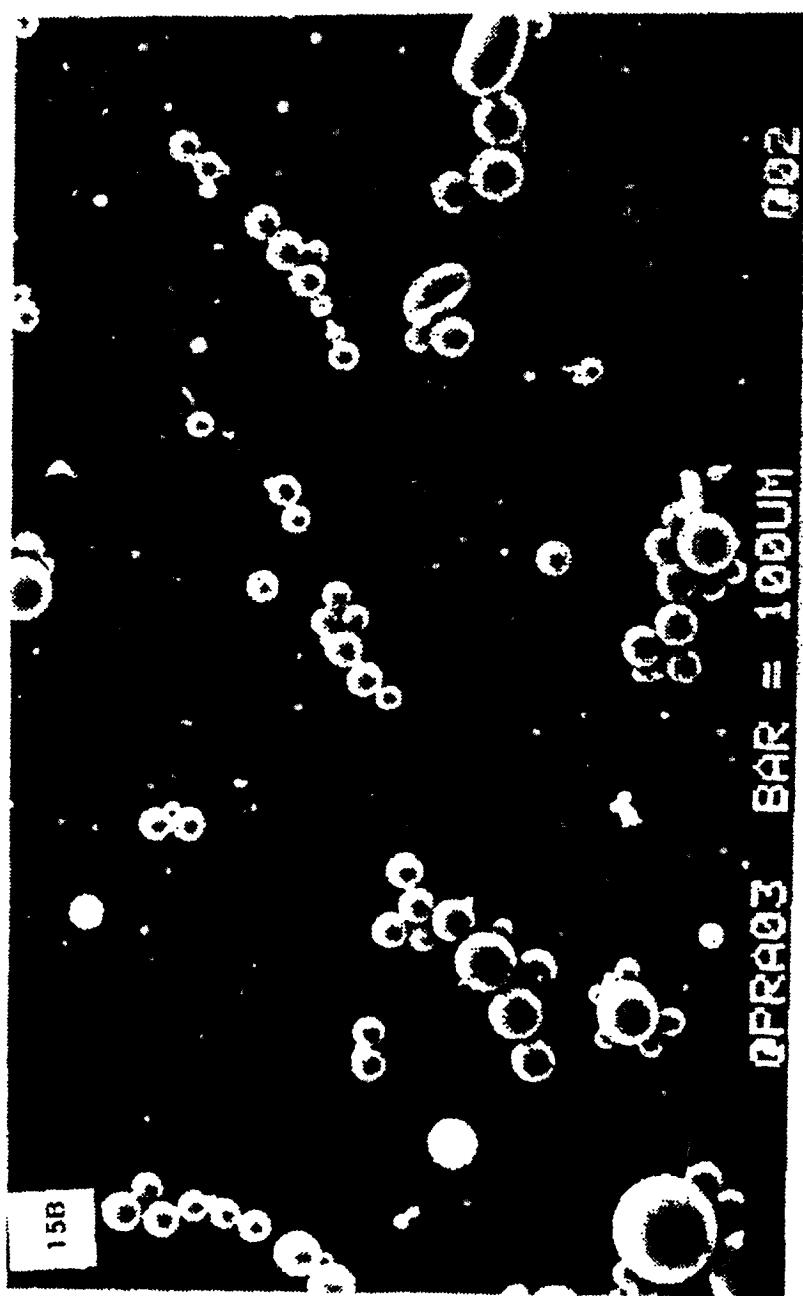


图 15A



图。15B

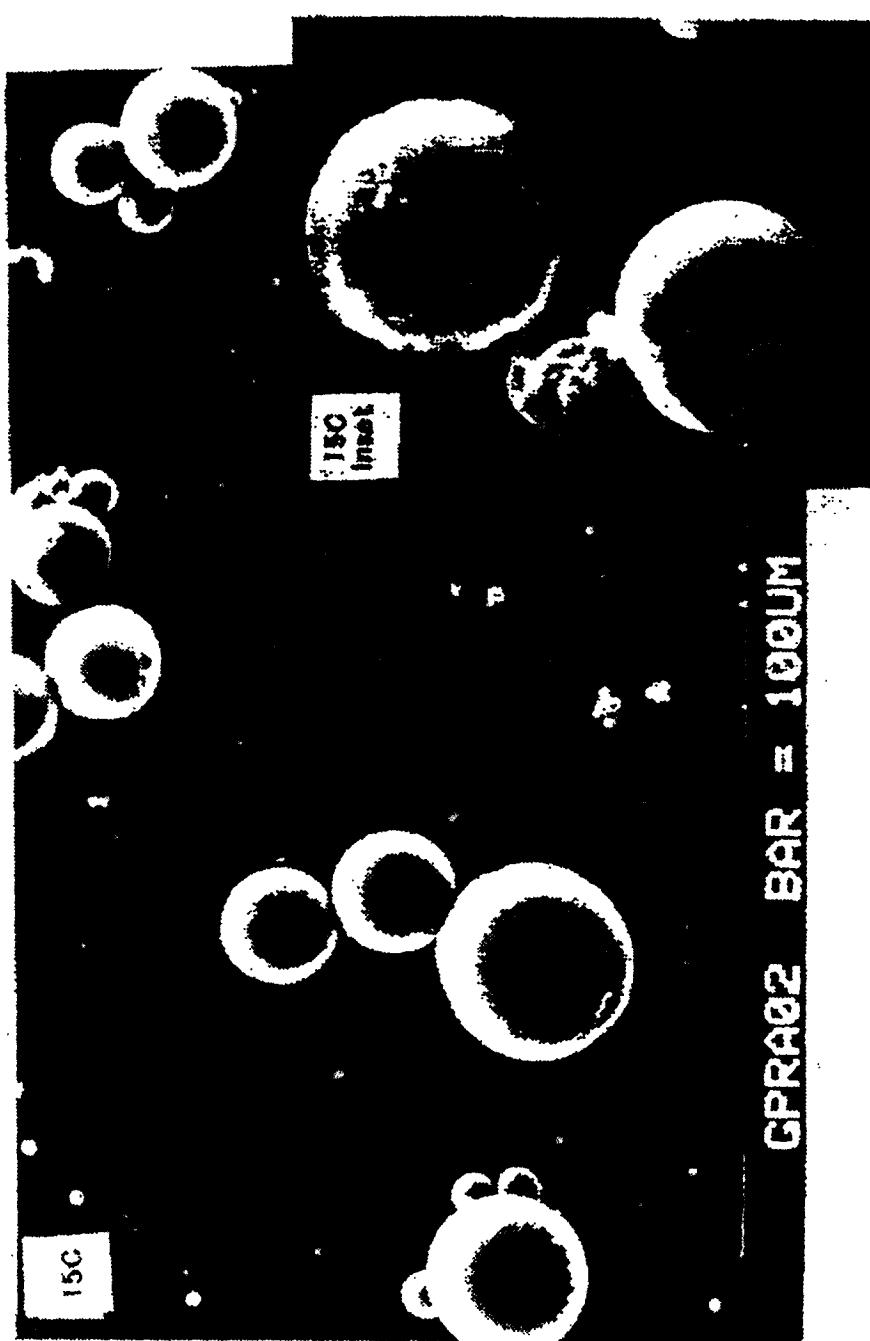


图 15C

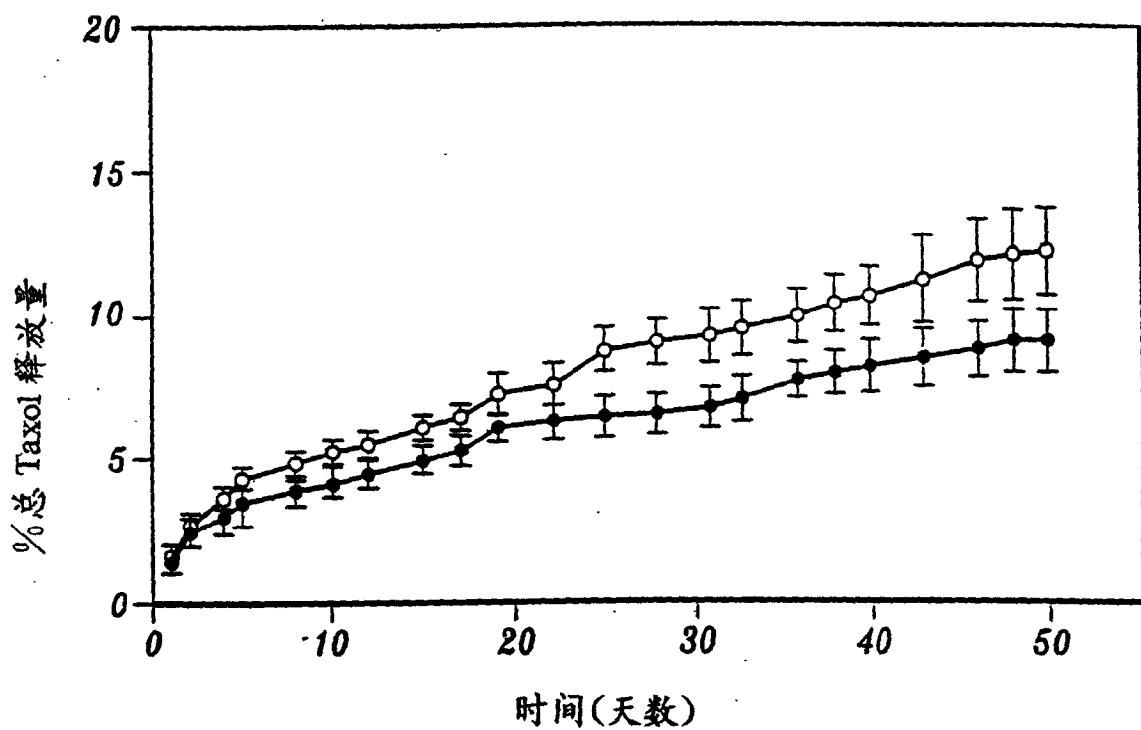
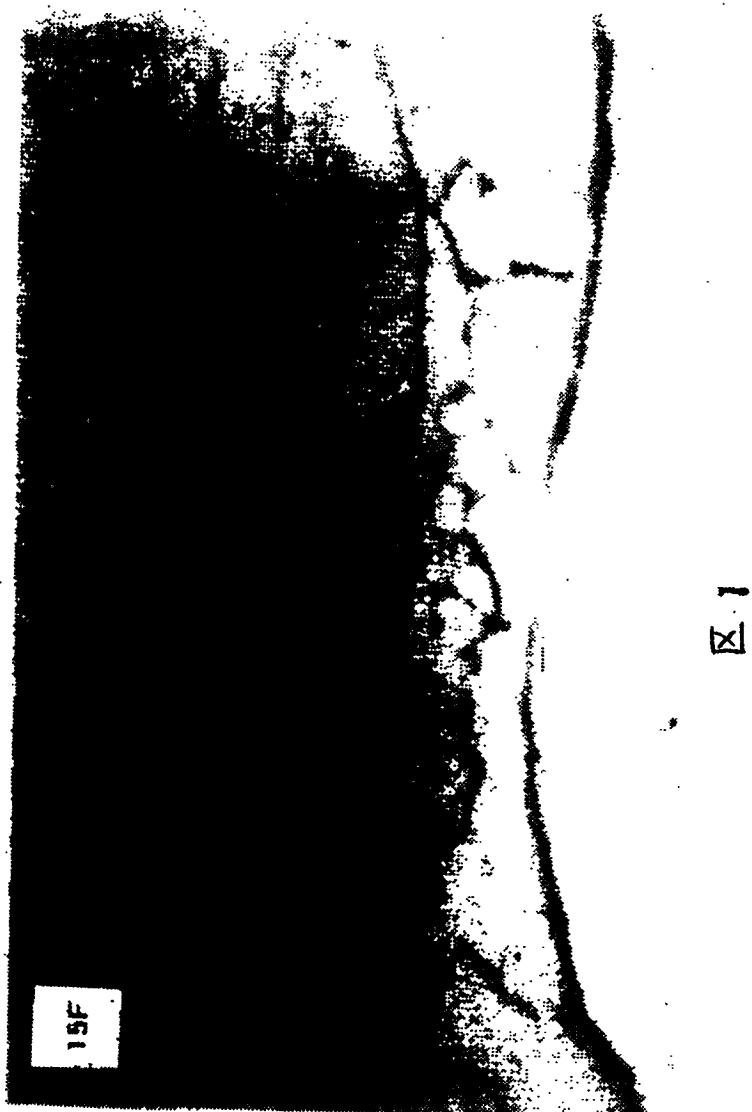


图 15D



图。15E



图。15F

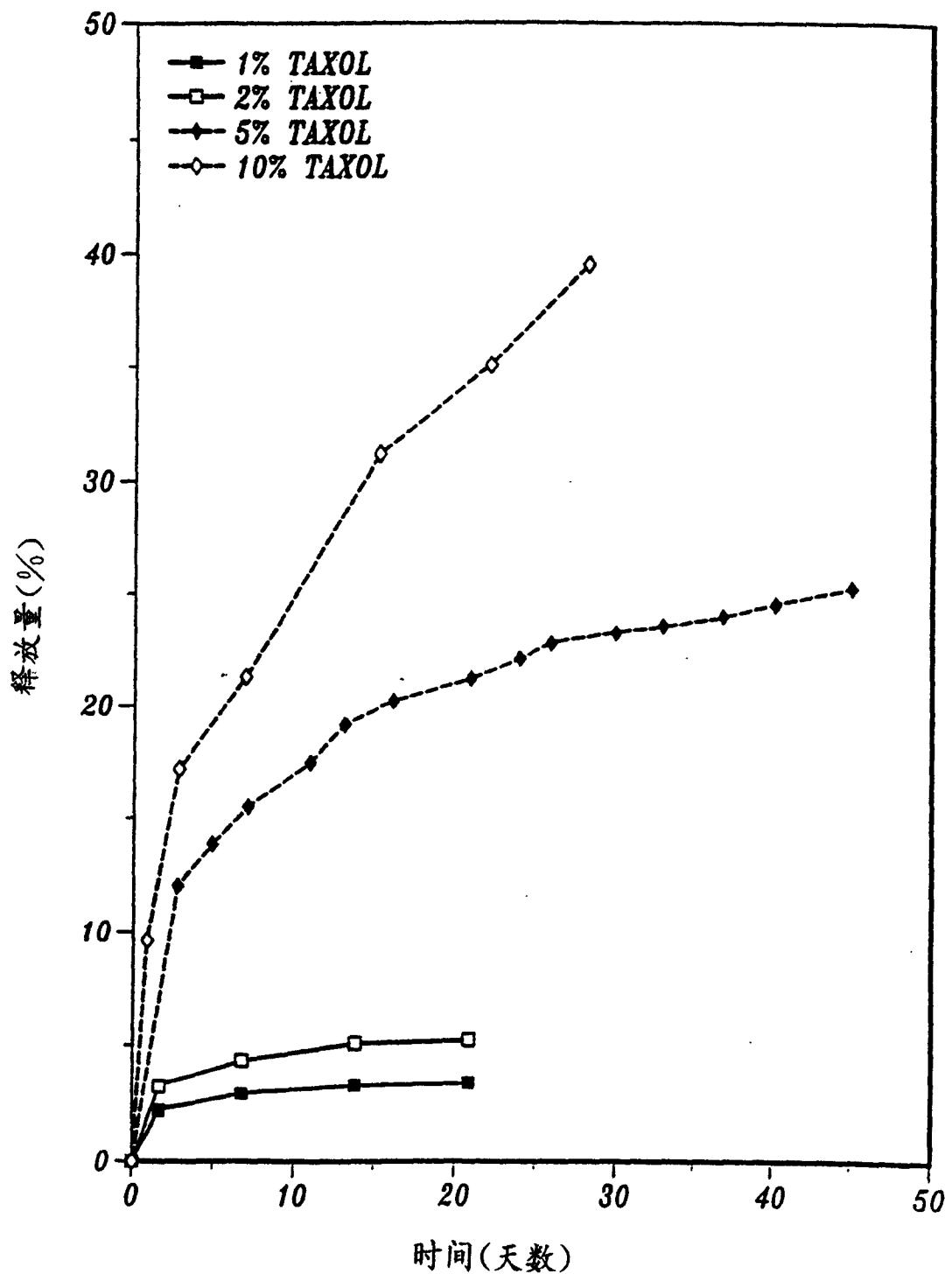


图 16A

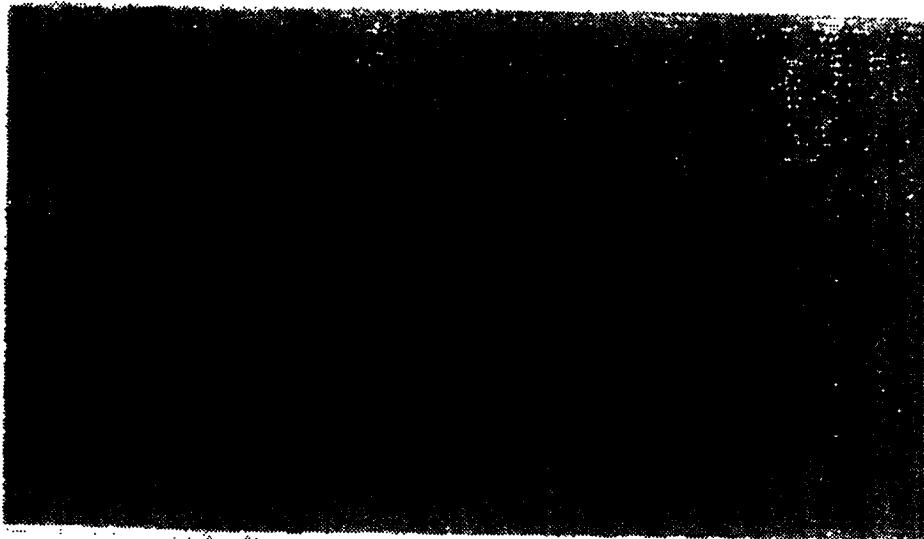


图 16B



图 16C

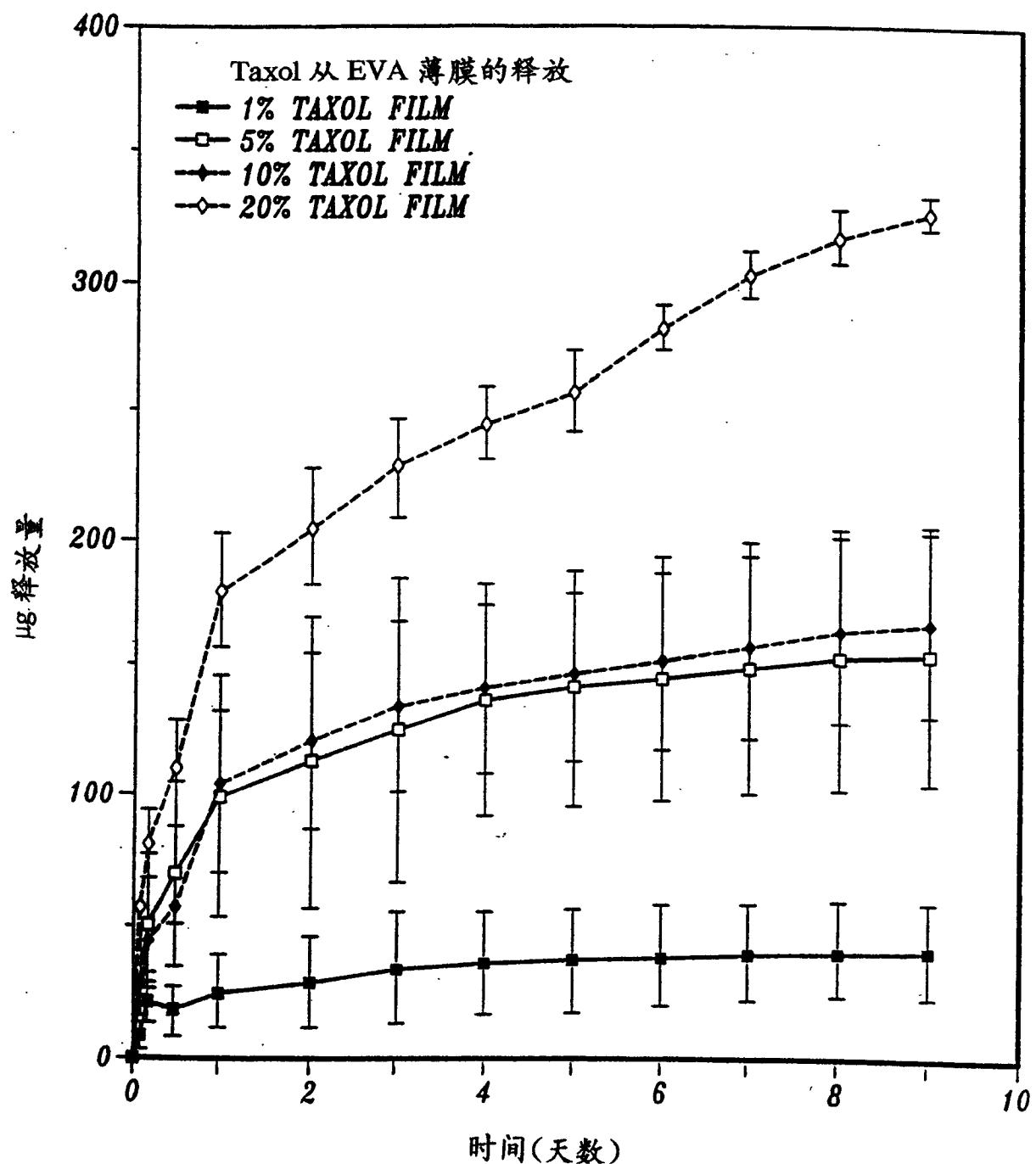


图 17A

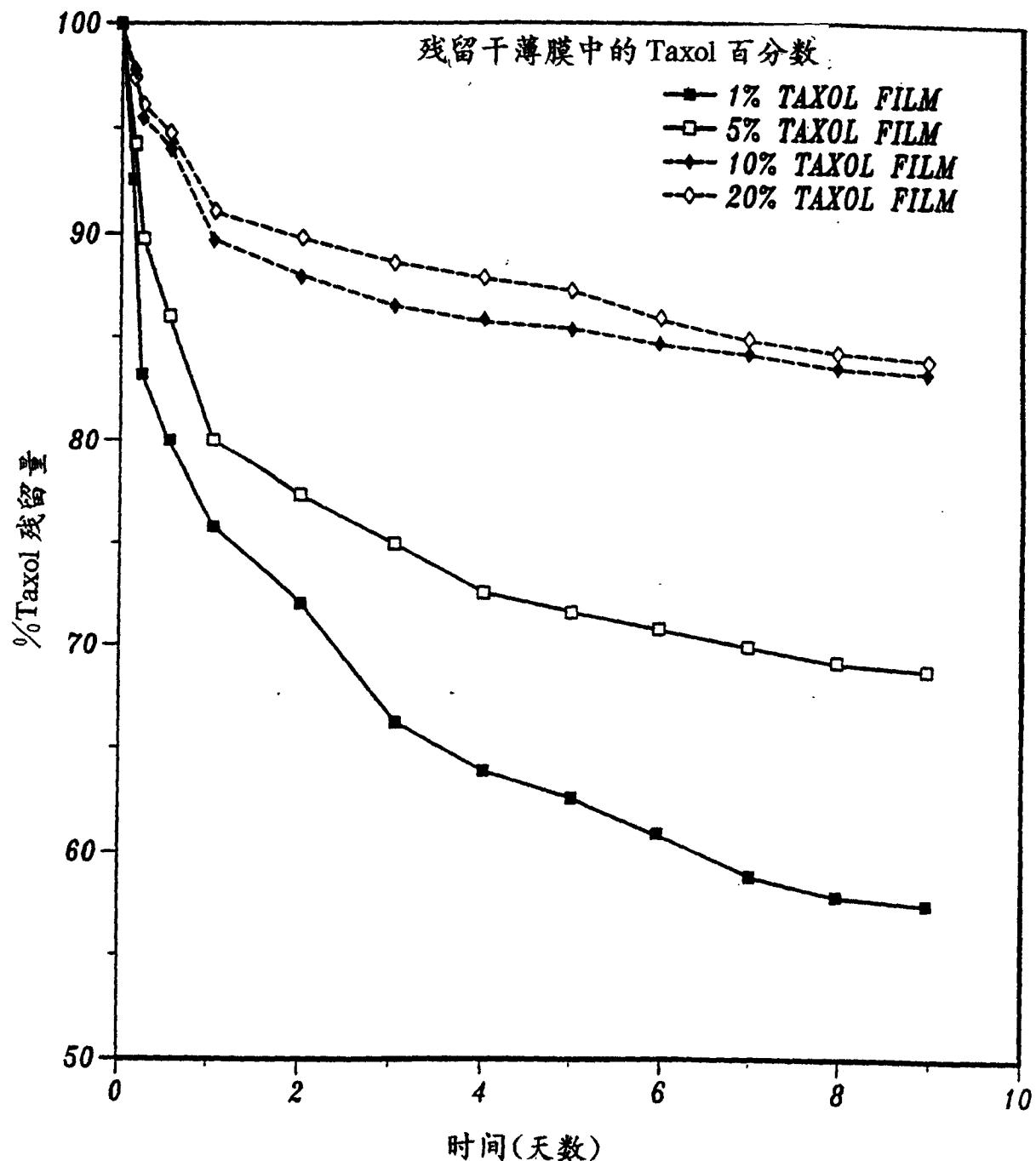


图 17B

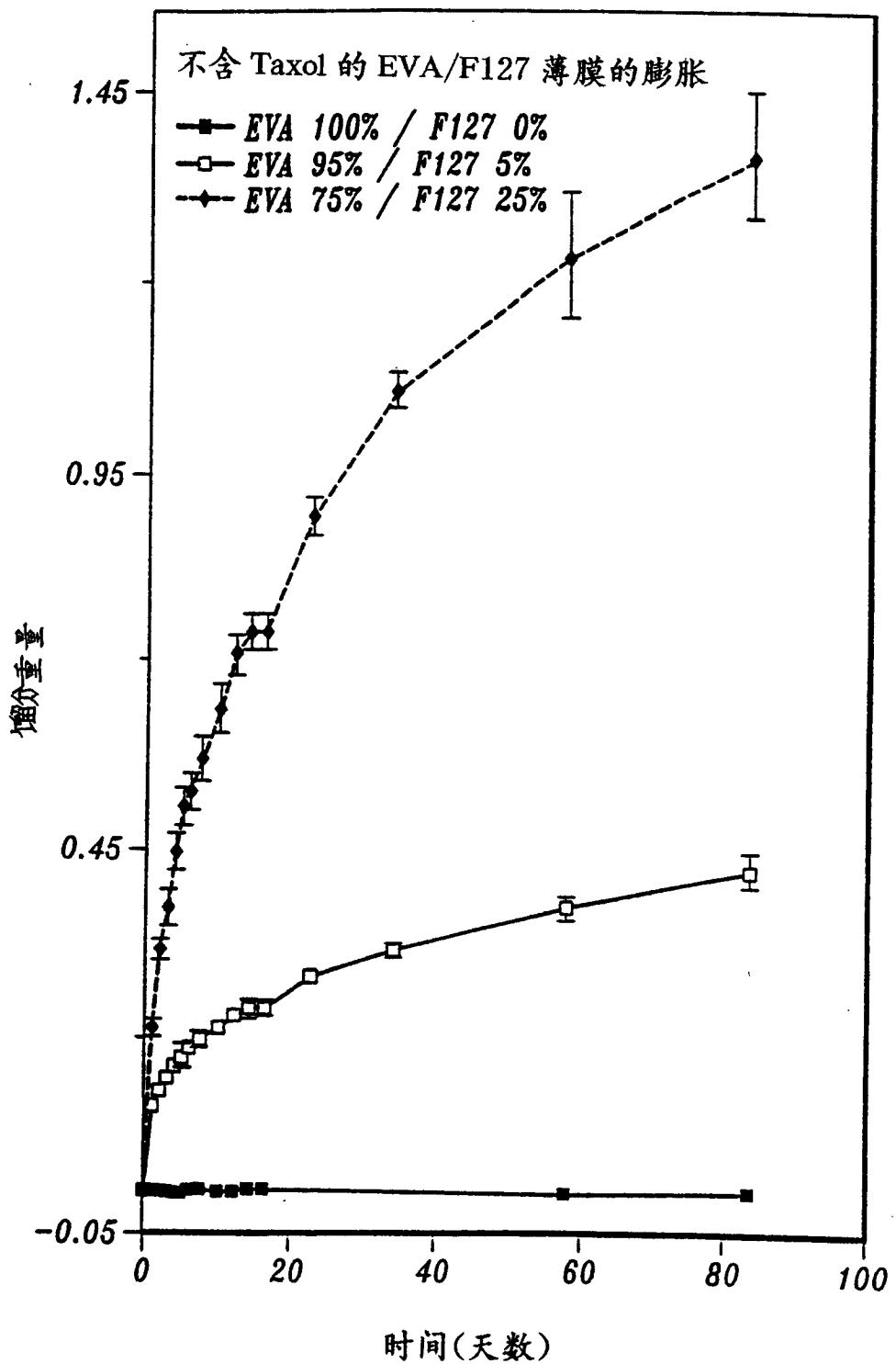


图 17C

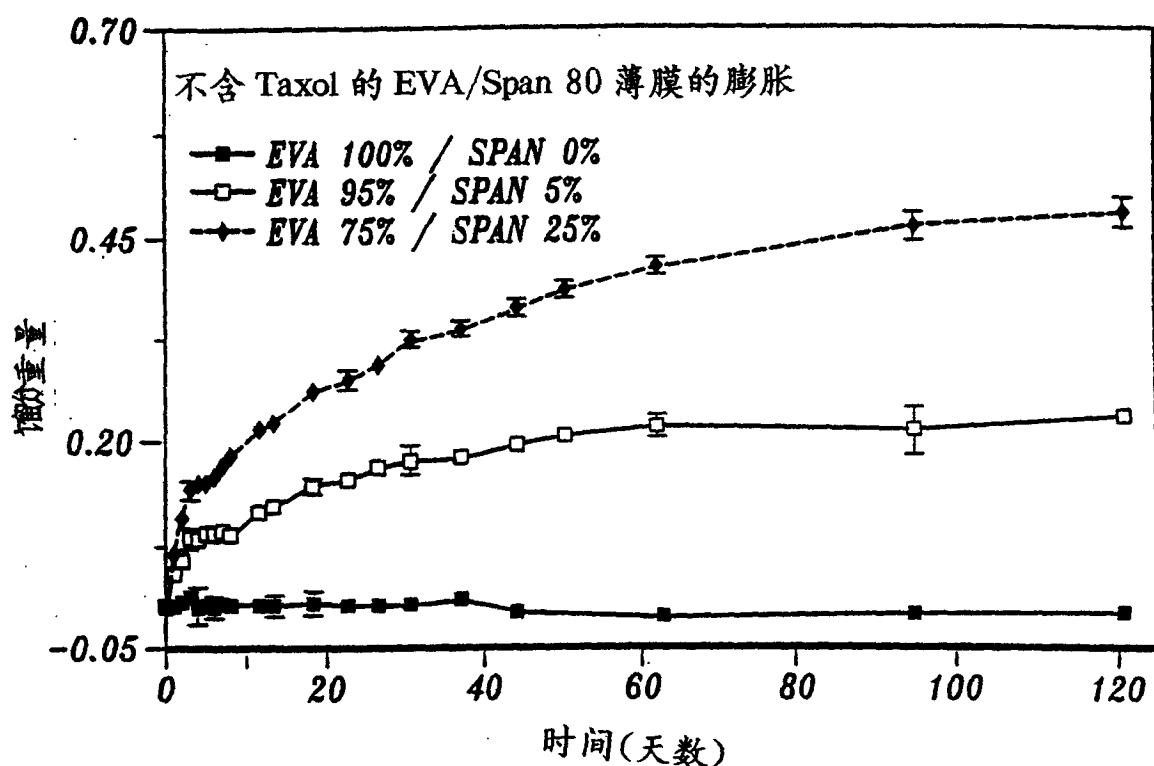


图 17D

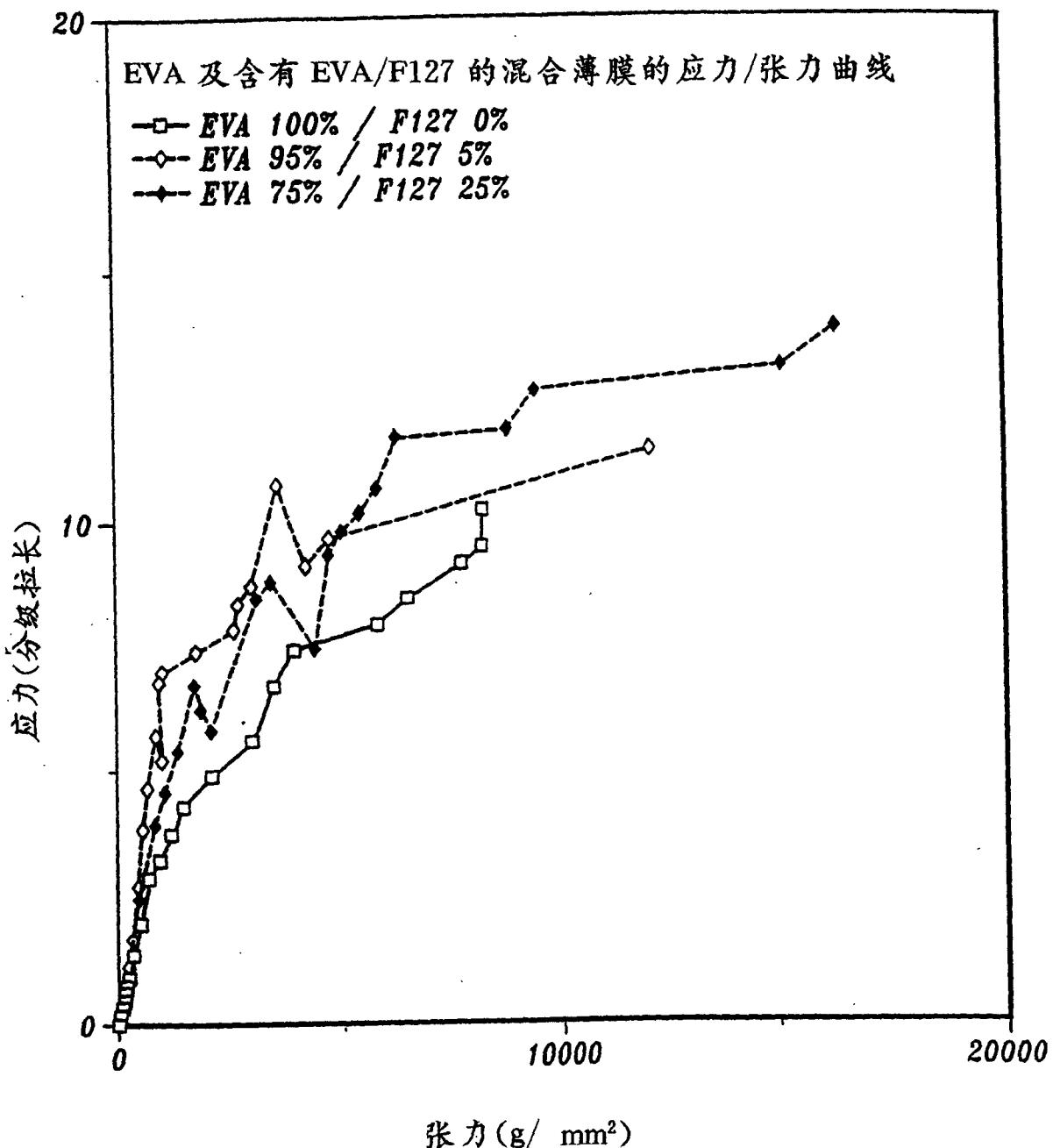


图 17E

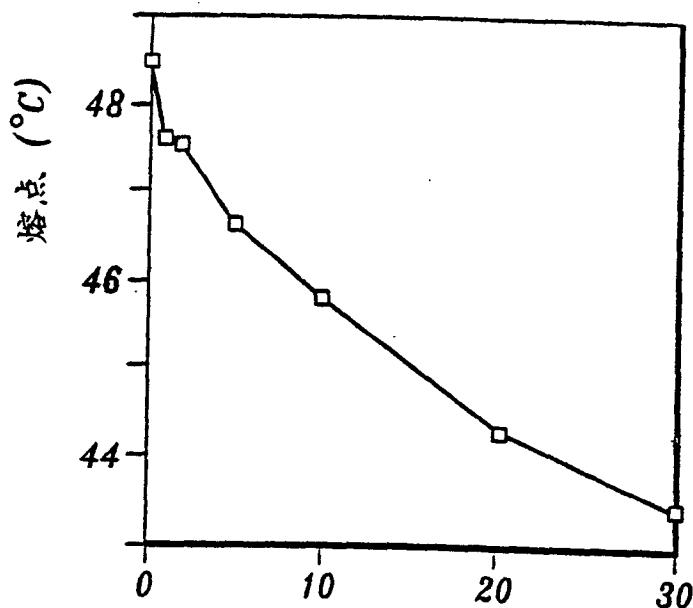


图 18A. % MePEG

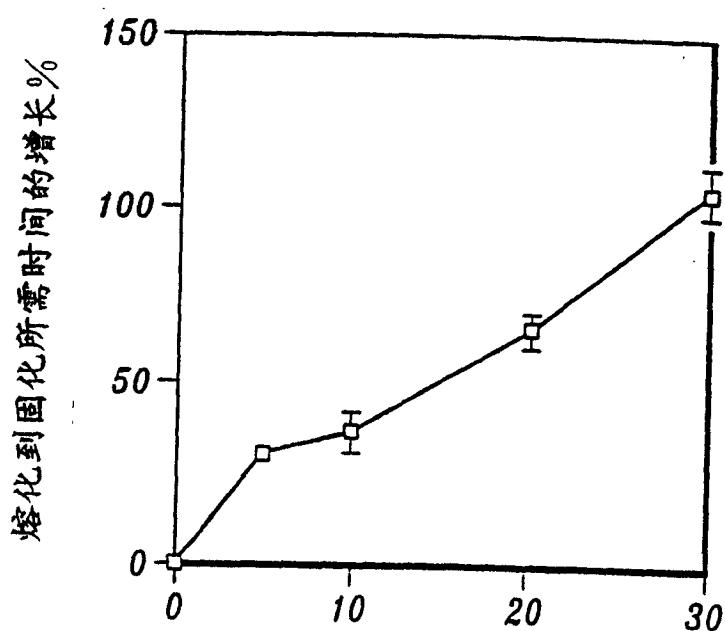


图. 18B. % MePEG

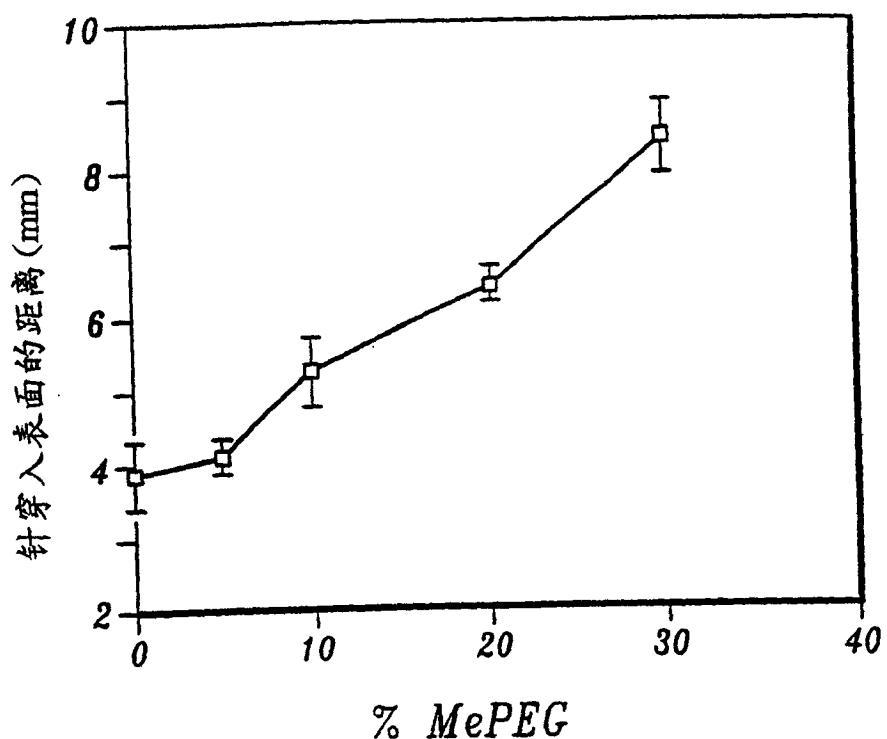


图 18C

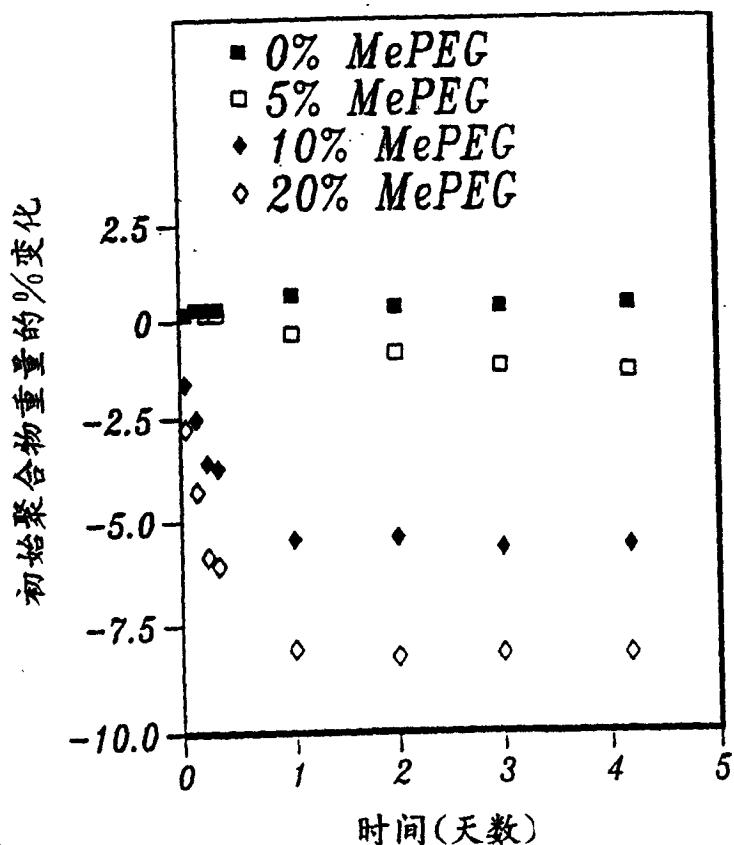


图. 18D.

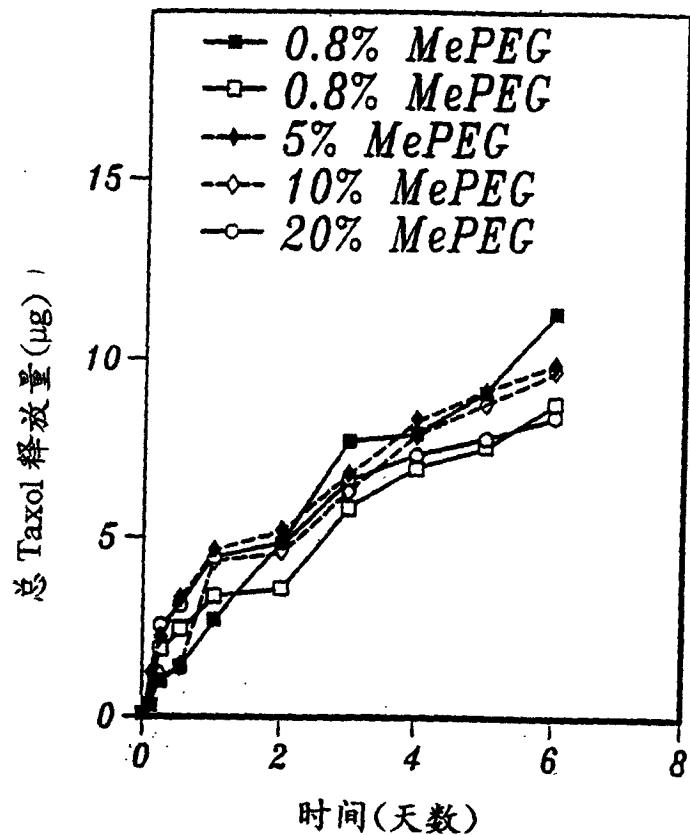


图 18E

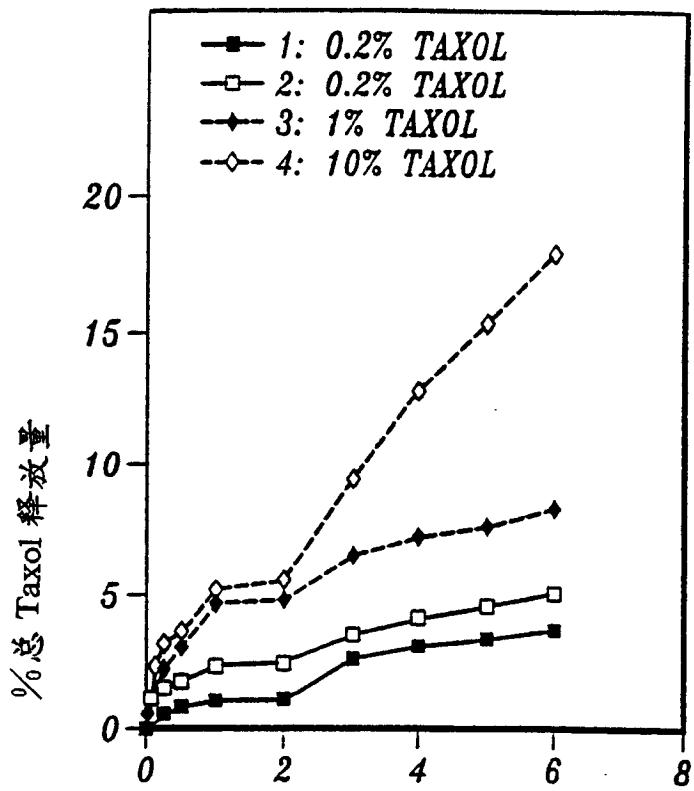


图. 18F.

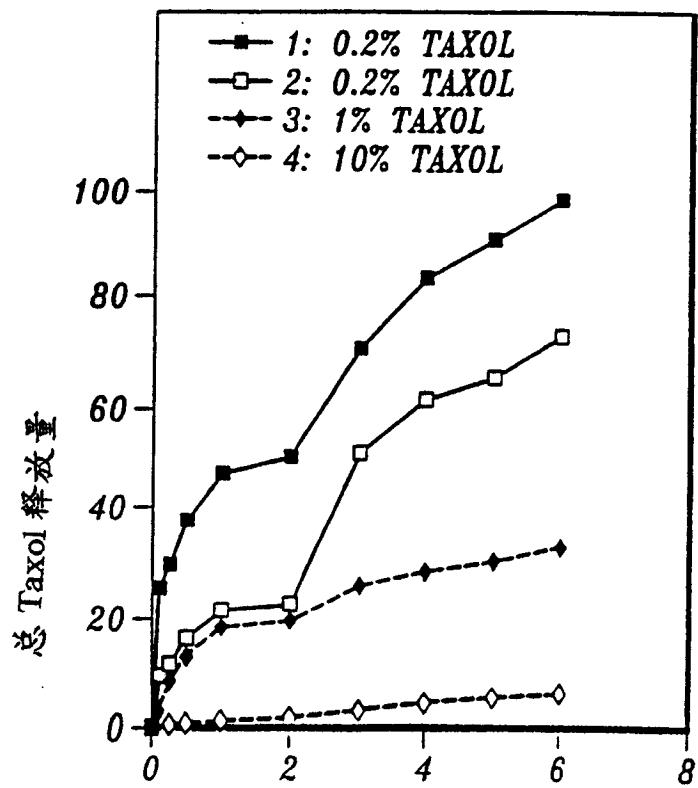


图. 18G.

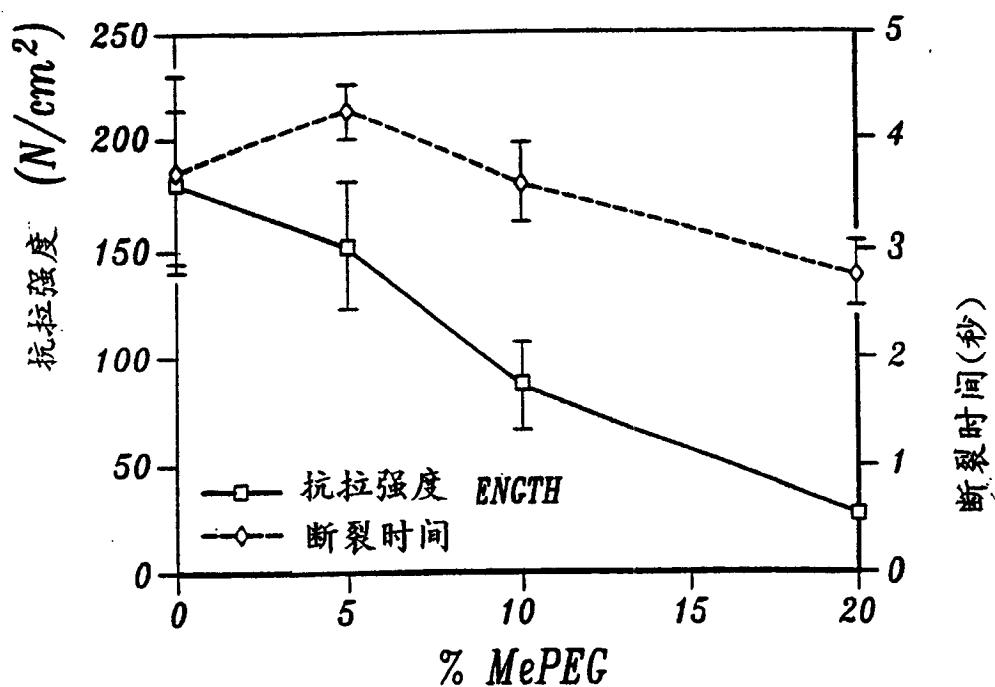


图 18H



图 19A

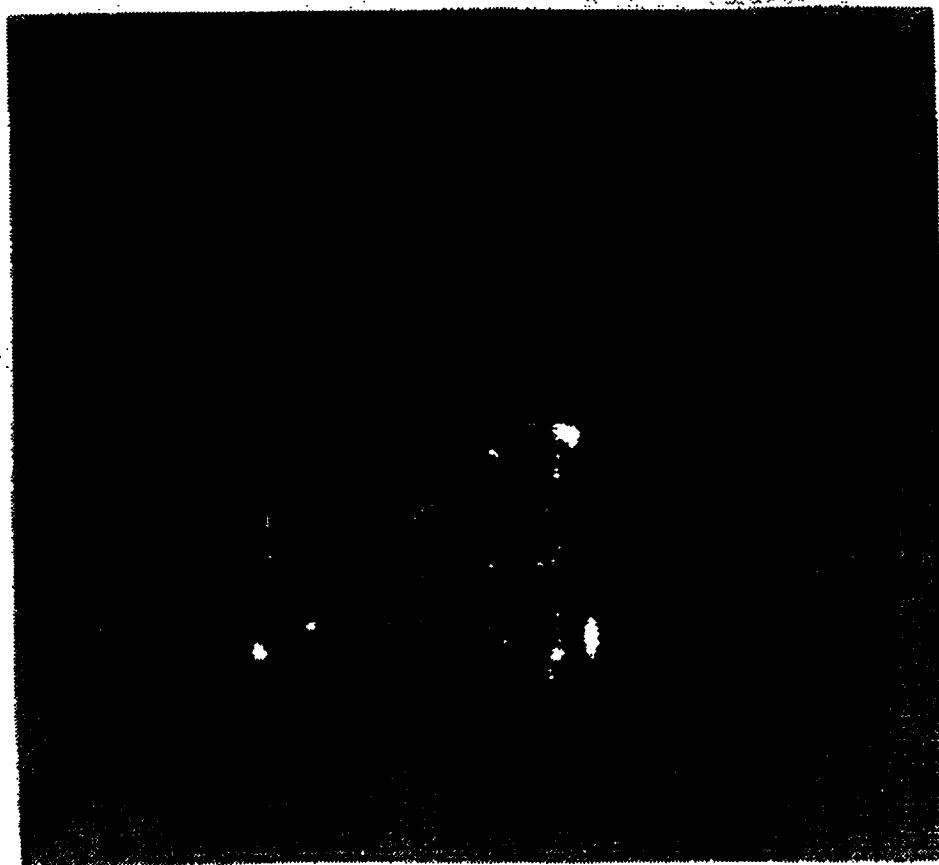


图 19B

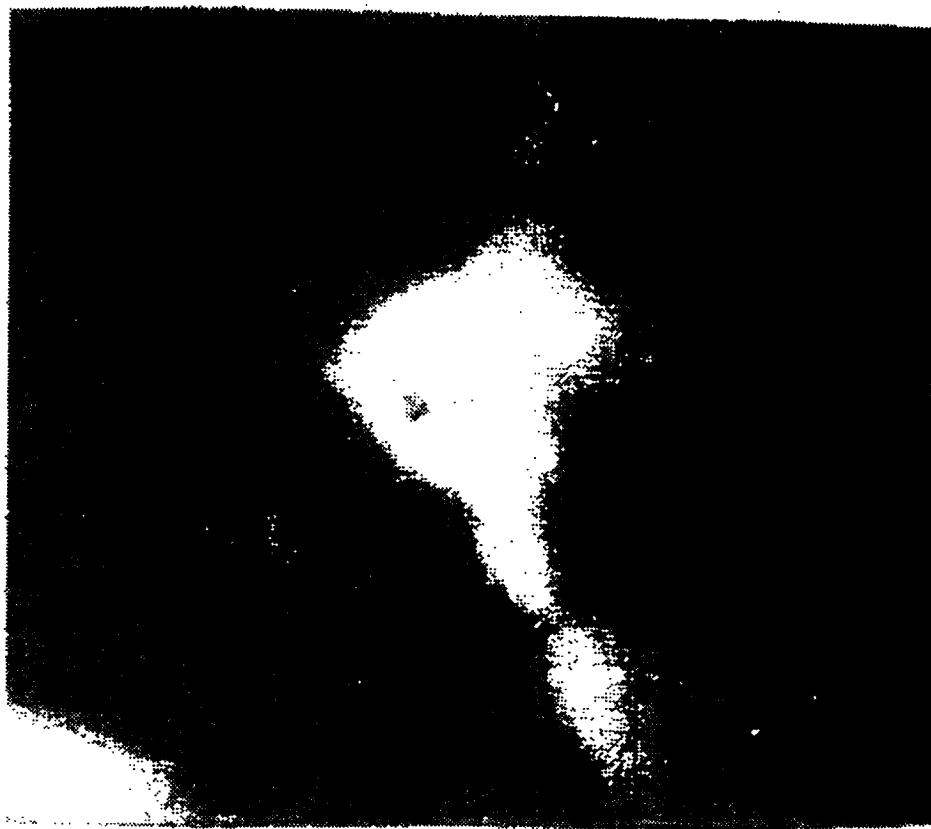


图 20A

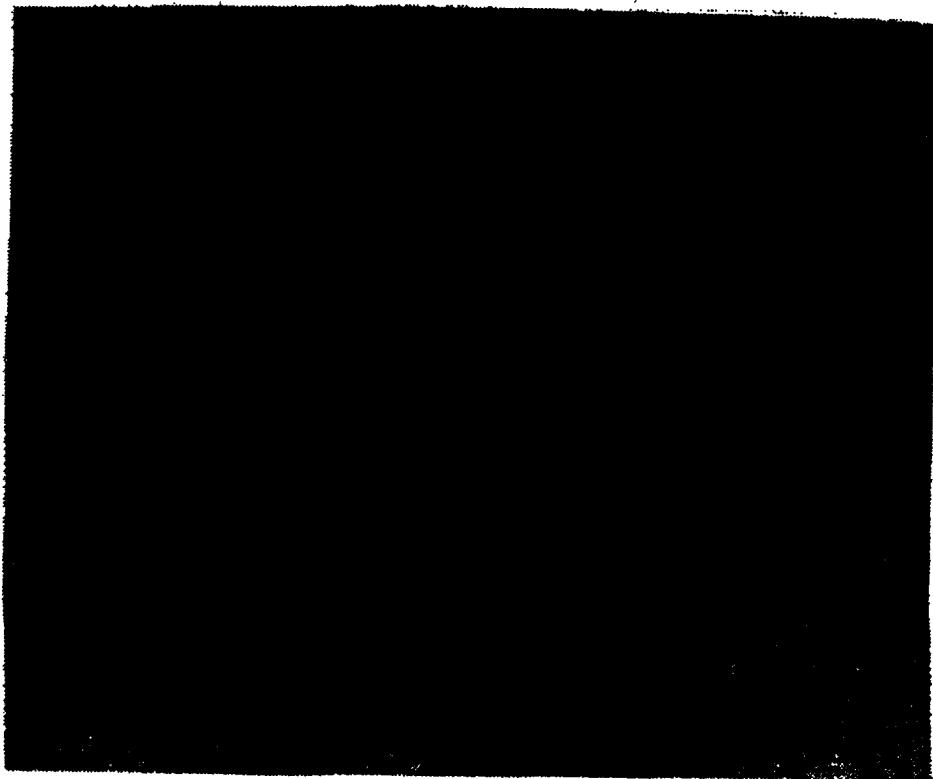


图 20B



图 20C



图 20D

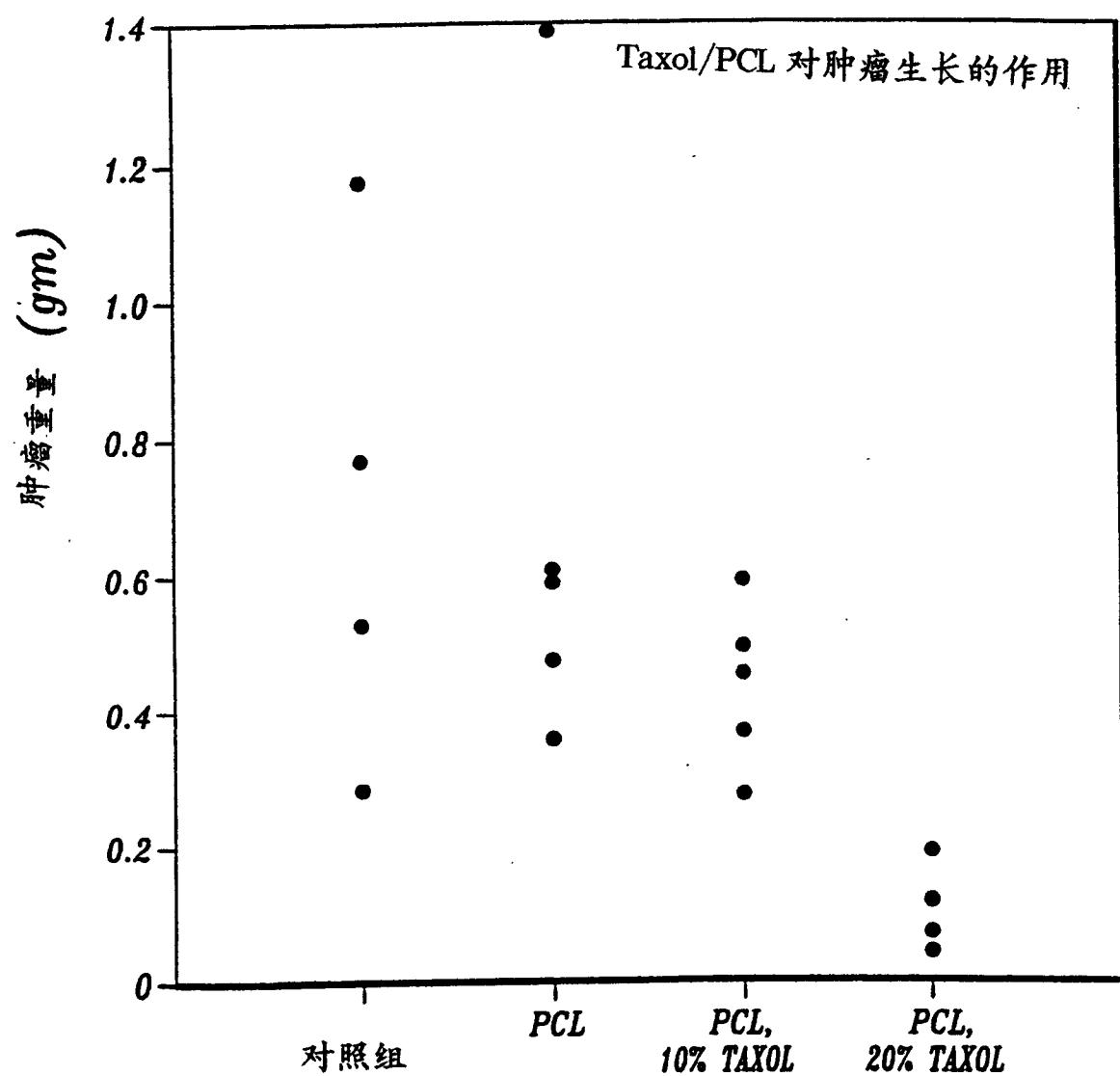


图 21A

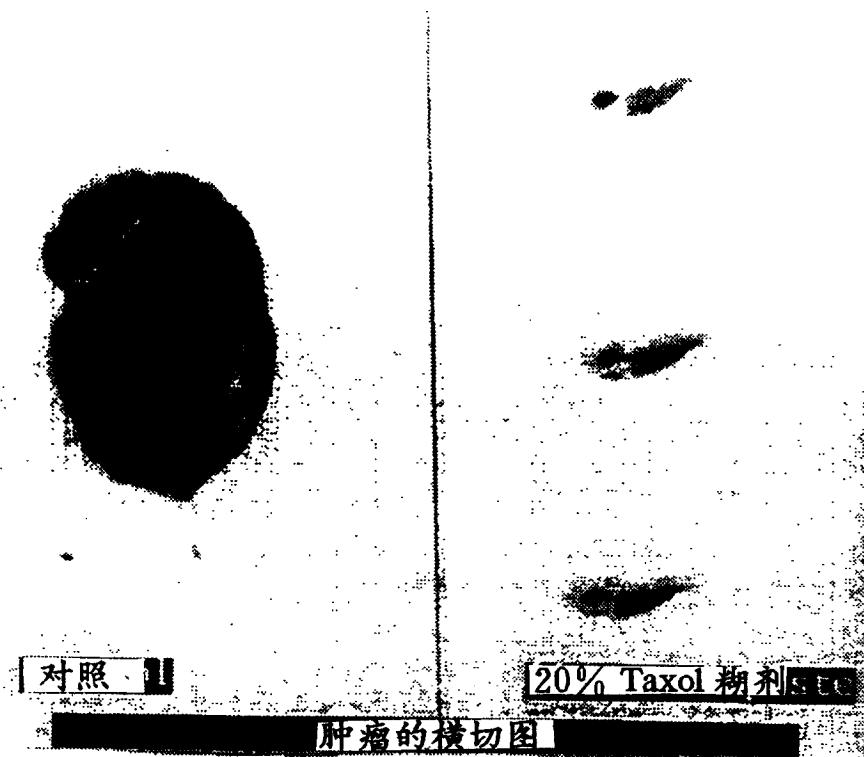


图 21B

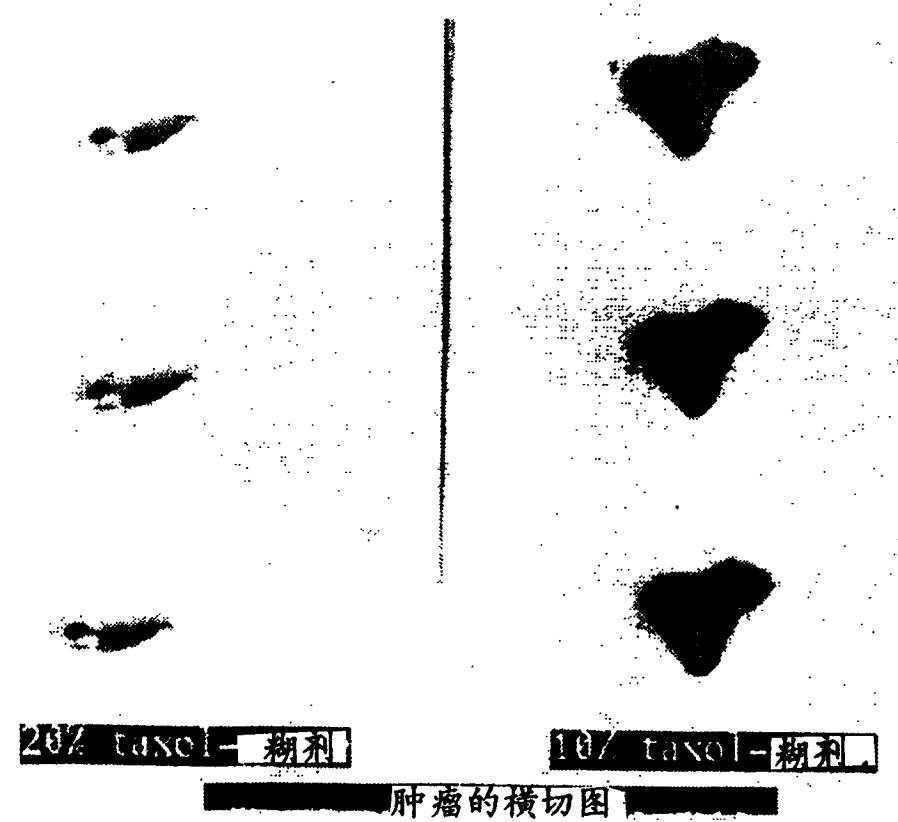


图 21C

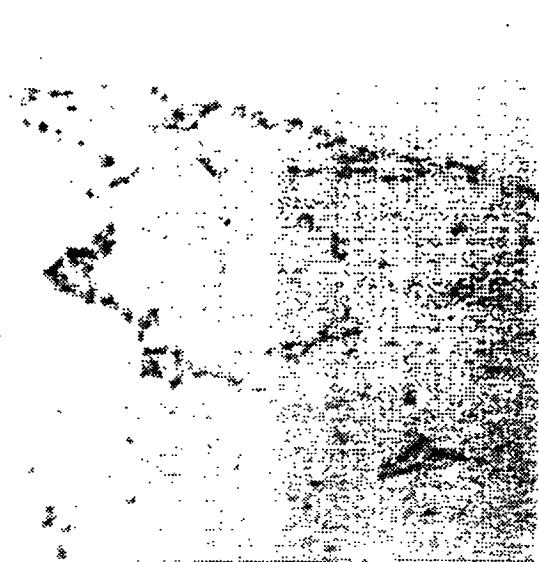


图 22A

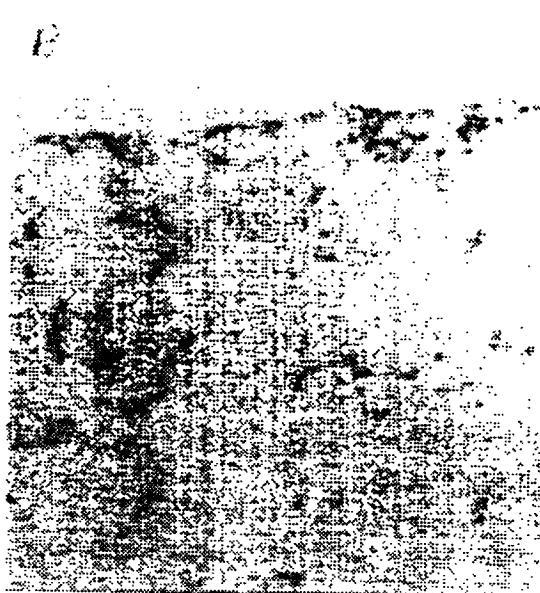


图 22B

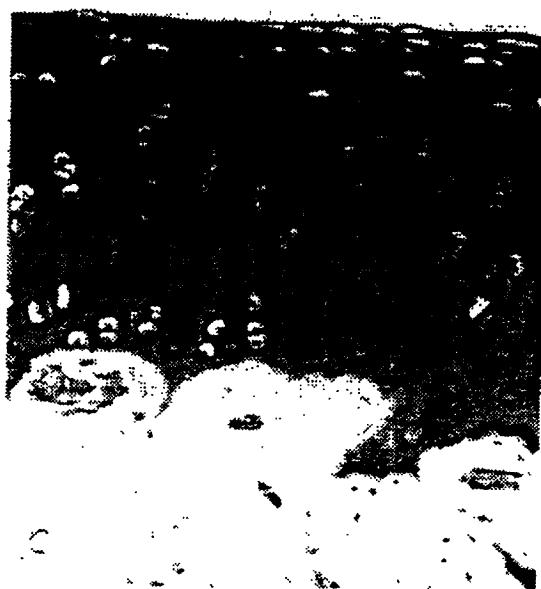


图 22C



图 22D