



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109789226 B

(45) 授权公告日 2021.11.26

(21) 申请号 201780059649.2

CN 105283174 A, 2016.01.27

(22) 申请日 2017.09.27

WO 2014035206 A2, 2014.03.06

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 105288639 A, 2016.02.03

申请公布号 CN 109789226 A

WO 03022265 A1, 2003.03.20

WO 2015123082A1, 2015.08.20

(43) 申请公布日 2019.05.21

Min Jeong Jeon, et al..Transcatheter

(30) 优先权数据

intra-arterial infusion of doxorubicin loaded porous magnetic nano-clusters with iodinated oil for the treatment of liver cancer.《Biomaterials》.2016,第88卷

10-2016-0124304 2016.09.27 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

S. Dreis, et al..Preparation,

2019.03.27

(86) PCT国际申请的申请数据

characterisation and maintenance of drug efficacy of doxorubicin-loaded human serum albumin (HSA) nanoparticles.

PCT/KR2017/010744 2017.09.27

(87) PCT国际申请的公布数据

《International Journal of Pharmaceutics》.2007,第341卷 (续)

W02018/062865 KO 2018.04.05

(73) 专利权人 艾姆戈特株式会社

审查员 张素芳

地址 韩国京畿道

(72) 发明人 金铉喆 郑镇旭 郑奎珂

(74) 专利代理机构 北京德崇智捷知识产权代理

有限公司 11467

代理人 陈丽丽

(51) Int.Cl.

A61K 49/14 (2006.01)

(续)

(56) 对比文件

WO 2015141917A1, 2015.09.24

权利要求书3页 说明书12页 附图6页

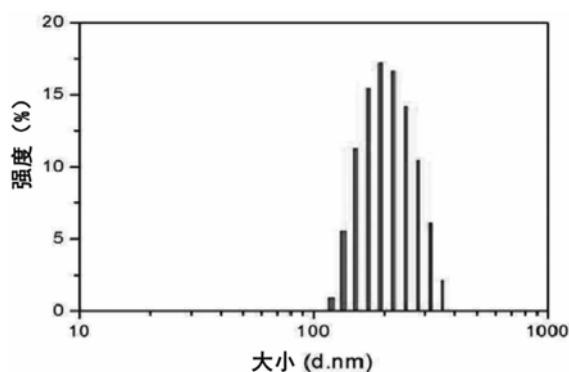
(54) 发明名称

利用携带抗癌剂的人血清白蛋白纳米粒子的肝动脉化疗栓塞术用组合物及其制造方法

(57) 摘要

本发明的目的在于,通过开发基于有效携带阿霉素的生物蛋白即人血清白蛋白的纳米粒子代替用于肝动脉化疗栓塞术的抗癌剂即阿霉素,从而显著提高肝动脉化疗栓塞术的效果。这种携带阿霉素的人血清白蛋白纳米粒子具有如下协同效果,即不仅能够使药物有效地集中渗透到细胞内,而且还能够利用粒子持续释放药物的效

果,诱导长期的治疗效果。



[转续页]

[接上页]

(51) Int.Cl.

A61K 49/04 (2006.01)

A61K 49/10 (2006.01)

A61K 31/7068 (2006.01)

A61K 31/396 (2006.01)

A61K 31/337 (2006.01)

(56) 对比文件

Ine Lentacker, et al.. Design and Evaluation of Doxorubicin-containing

Microbubbles for Ultrasound-triggered Doxorubicin Delivery: Cytotoxicity and Mechanisms Involved.《Molecular Therapy》.2009,第18卷(第1期),

信涛等.碘化油紫杉醇白蛋白磁性纳米颗粒治疗大鼠肝癌的疗效.《中国肿瘤生物治疗杂志》.2011,第18卷(第6期),

信涛等.阿霉素白蛋白磁性纳米颗粒栓塞治疗大鼠原发性肝癌的实验研究.《中国肿瘤临床》.2007,第34卷(第24期),

1. 一种肝动脉栓塞术用组合物,其特征在于,包含:
栓塞物质;及
携带有带正电荷的水溶性抗癌剂的人血清白蛋白纳米粒子,
所述组合物为在所述栓塞物质上混合携带有带正电荷的水溶性抗癌剂的人血清白蛋白纳米粒子的乳剂形态,
其中,所述栓塞物质相对纳米粒子的体积比为3:1-4:1,所述栓塞物质为碘油。
2. 根据权利要求1所述的肝动脉栓塞术用组合物,其特征在于,
所述带正电荷的水溶性抗癌剂是从由丝裂霉素、顺铂、阿霉素及吉西他滨构成的组中选择的一个以上。
3. 根据权利要求1所述的肝动脉栓塞术用组合物,其特征在于,
所述带正电荷的水溶性抗癌剂的浓度为1~20mg/mL。
4. 根据权利要求1所述的肝动脉栓塞术用组合物,其特征在于,
所述纳米粒子的浓度为10~50mg/mL。
5. 一种肝动脉栓塞术用组合物,其特征在于,包含:
栓塞物质;
微泡;及
与所述微泡表面结合并携带有带正电荷的水溶性抗癌剂的人血清白蛋白纳米粒子,
所述组合物为在所述栓塞物质上混合与所述微泡表面结合并携带有带正电荷的水溶性抗癌剂的人血清白蛋白纳米粒子的乳剂形态,
其中,所述栓塞物质相对纳米粒子与微泡的体积比为2:1,所述栓塞物质为碘油。
6. 根据权利要求5所述的肝动脉栓塞术用组合物,其特征在于,
所述带正电荷的水溶性抗癌剂是从由丝裂霉素、顺铂、阿霉素及吉西他滨构成的组中选择的一个以上。
7. 根据权利要求5所述的肝动脉栓塞术用组合物,其特征在于,
所述带正电荷的水溶性抗癌剂的浓度为1~20mg/mL。
8. 根据权利要求5所述的肝动脉栓塞术用组合物,其特征在于,
所述纳米粒子的浓度为10~50mg/mL。
9. 一种肝动脉栓塞术用组合物的制造方法,其特征在于,包含:
使携带有带正电荷的水溶性抗癌剂的人血清白蛋白纳米粒子分散到计算机断层扫描及X射线造影剂中的步骤;及
将所述分散的纳米粒子与栓塞物质混合的步骤,
所述组合物为在所述栓塞物质上混合携带有带正电荷的水溶性抗癌剂的人血清白蛋白纳米粒子的乳剂形态,
其中,所述栓塞物质相对纳米粒子的体积比为3:1-4:1,所述栓塞物质为碘油。
10. 根据权利要求9所述的肝动脉栓塞术用组合物的制造方法,其特征在于,
所述计算机断层扫描及X射线造影剂是从由碘帕醇及Pamiray构成的组中选择一个以上。
11. 根据权利要求9所述的肝动脉栓塞术用组合物的制造方法,其特征在于,
所述带正电荷的水溶性抗癌剂是从由丝裂霉素、顺铂、阿霉素及吉西他滨构成的组中

选择的一个以上。

12. 根据权利要求9所述的肝动脉栓塞术用组合物的制造方法,其特征在于,所述纳米粒子通过包括以下步骤的方法制造:

制造人血清白蛋白与带正电荷的水溶性抗癌剂的混合物的步骤;

对所述制造的混合物的酸度进行调节的步骤;

将所述酸度经过调节的混合物用去溶剂化物质进行滴定的步骤;

向所述滴定的混合物中添加粒子稳定化物质的步骤;

添加所述粒子稳定化物质后使去溶剂化物质汽化的步骤;及

离心分离所述汽化的混合物的步骤。

13. 根据权利要求9所述的肝动脉栓塞术用组合物的制造方法,其特征在于,所述纳米粒子通过包括以下步骤的方法制造:

使人血清白蛋白溶解于蒸馏水中的步骤;

对所述溶解物质的酸度进行调节的步骤;

将所述酸度经过调节的物质用去溶剂化物质滴定的步骤;

向用所述去溶剂化物质滴定的混合物中添加粒子稳定化物质的步骤;

使所述去溶剂化物质汽化的步骤;

离心分离所述汽化的混合物的步骤;及

向所述离心分离的物质中添加带正电荷的水溶性抗癌剂进行反应的步骤。

14. 根据权利要求9所述的肝动脉栓塞术用组合物的制造方法,其特征在于,所述纳米粒子通过包括以下步骤的方法制造:

使人血清白蛋白溶解于蒸馏水中的步骤;

对所述溶解物质的酸度进行调节的步骤;

向所述酸度经过调节的物质中添加2-亚氨基-噻唑烷的步骤;

添加所述2-亚氨基-噻唑烷的步骤之后进行离心分离的步骤;

完成所述离心分离之后,添加带正电荷的水溶性抗癌剂的步骤;及

添加所述带正电荷的水溶性抗癌剂之后,用去溶剂化物质进行滴定的步骤。

15. 根据权利要求12至14中的任意一项所述的肝动脉栓塞术用组合物的制造方法,其特征在于,

所述纳米粒子的制造方法,还包括:

在真空状态下进行冻结干燥形成粉末剂型纳米粒子的步骤。

16. 一种肝动脉栓塞术用组合物的制造方法,其特征在于,包含:

使携带有带正电荷的水溶性抗癌剂的人血清白蛋白纳米粒子分散到计算机断层扫描及X射线造影剂中的步骤;

将所述分散的纳米粒子与微泡混合的步骤;及

将所述纳米粒子与微泡的混合物和栓塞物质混合的步骤,

所述组合物为所述纳米粒子与微泡的混合物混合至所述栓塞物质的乳剂形态,其中,所述栓塞物质相对纳米粒子与微泡的体积比为2:1,所述栓塞物质为碘油。

17. 根据权利要求16所述的肝动脉栓塞术用组合物的制造方法,其特征在于,

所述计算机断层扫描及X射线造影剂是从由碘帕醇及Pamiray构成的组中选择一个

以上。

18. 根据权利要求16所述的肝动脉栓塞术用组合物的制造方法,其特征在于,
所述带正电荷的水溶性抗癌剂是从由丝裂霉素、顺铂、阿霉素及吉西他滨构成的组中选择的一个以上。

19. 根据权利要求16所述的肝动脉栓塞术用组合物的制造方法,其特征在于,
所述纳米粒子通过包括以下步骤的方法制造:
制造人血清白蛋白与带正电荷的水溶性抗癌剂的混合物的步骤;
对所述制造的混合物的酸度进行调节的步骤;
将所述酸度经过调节的混合物用去溶剂化物质进行滴定的步骤;
向所述滴定的混合物中添加粒子稳定化物质的步骤;
添加所述粒子稳定化物质后使去溶剂化物质汽化的步骤;及
离心分离所述汽化的混合物的步骤。

20. 根据权利要求16所述的肝动脉栓塞术用组合物的制造方法,其特征在于,
所述纳米粒子通过包括以下步骤的方法制造:
使人血清白蛋白溶解于蒸馏水中的步骤;
对所述溶解物质的酸度进行调节的步骤;
将所述酸度经过调节的物质用去溶剂化物质滴定的步骤;
向用所述去溶剂化物质滴定的混合物中添加粒子稳定化物质的步骤;
使所述去溶剂化物质汽化的步骤;
离心分离所述汽化的混合物的步骤;及
向所述离心分离的物质中添加带正电荷的水溶性抗癌剂进行反应的步骤。

21. 根据权利要求16所述的肝动脉栓塞术用组合物的制造方法,其特征在于,
所述纳米粒子通过包括以下步骤的方法制造:
使人血清白蛋白溶解于蒸馏水中的步骤;
对所述溶解物质的酸度进行调节的步骤;
向所述酸度经过调节的物质中添加2-亚氨基-噻唑烷的步骤;
添加所述2-亚氨基-噻唑烷的步骤之后进行离心分离的步骤;
完成所述离心分离之后,添加带正电荷的水溶性抗癌剂的步骤;及
添加所述带正电荷的水溶性抗癌剂之后,用去溶剂化物质进行滴定的步骤。

22. 根据权利要求19至21中的任意一项所述的肝动脉栓塞术用组合物的制造方法,其特征在于,

所述纳米粒子的制造方法,还包括:

在真空状态下进行冻结干燥形成粉末剂型纳米粒子的步骤。

利用携带抗癌剂的人血清白蛋白纳米粒子的肝动脉化疗栓塞术用组合物及其制造方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种肝动脉化疗栓塞术。具体为,通过开发基于能够有效携带抗癌剂的生物蛋白即人血清白蛋白(human serum albumin)的纳米粒子,从而显著提高肝动脉化疗栓塞术的效果。

背景技术

[0002] 最近,随着影像技术的发展,可以找到隐藏在体内的癌的准确位置,并通过放射线照射、内窥镜手术等多种方法将其清除。但是,即使准确地发现了癌的位置,有时也会因为癌扩散到整个脏器或者与其它脏器连在一起等多种原因而不能实施手术清除。比如:肝癌、胰腺癌等,即使发现了,往往也不可能实施手术根治。

[0003] 现在,治疗肝肿瘤最常用的治疗方法就是化疗栓塞术,其是一种找出向肝肿瘤供给营养的动脉,施用抗癌剂之后将血管堵塞的治疗方法。肝脏组织通过绕着小肠及大肠等等出来的门静脉(portal vein)和直接从大动脉出来的肝动脉获得氧气与营养,正常肝脏组织主要从门静脉获得血液供给,肿瘤组织主要从肝动脉获得血液供给。因此,如果向为肿瘤供给营养的肝动脉施用抗癌剂将血管堵塞,就能够在不损伤正常肝脏组织的情况下选择性地仅使肿瘤坏死。这种治疗方法具有很多优点,包括:不会受到癌症发展程度的制约,适用范围广泛,对治疗对象的限制较小等。因此,其是一种目前对提高肝癌治愈率做出最大贡献的方法。化疗栓塞术,首先向位于腹股沟的大腿动脉插入导管,接近肝动脉之后,注射血管造影剂,获得肿瘤的位置、大小及血液供给情态等治疗所需的信息,确定治疗方案之后,再将粗细约1mm的细管插入导管内,找到靶动脉实施治疗。

[0004] 但是,现有肝动脉化疗栓塞术存在以下问题,即栓塞物质经过一定时间之后就会被冲走,然后沿着血管循环,将药物向全身扩散,从而产生杀死正常细胞等副作用。

[0005] 为了解决这一问题,本发明人确认了以下内容后完成了本发明:即,不使用现在用于肝动脉化疗栓塞术的抗癌剂即阿霉素,而是开发基于能够有效携带阿霉素的生物蛋白即人血清白蛋白(human serum albumin)的纳米粒子(大小约100-300nm),将其用于肝动脉化疗栓塞术,从而显著提高肝动脉化疗栓塞术的效果。

发明内容

[0006] 所要解决的技术问题

[0007] 本发明的一个目的在于,解决现有用于肝动脉化疗栓塞术的物质在实施栓塞后栓塞物质经过一定的时间就会被冲洗走的局限,同时通过持续释放药物长时间保持药效,从而提高抗癌治疗的效果。

[0008] 本发明的另一个目的在于,解决以下问题,即因上述局限沿血管循环,将药物向全身扩散,从而产生杀灭正常细胞等副作用。

[0009] 具体地,本发明的目的在于,提供一种用于肝动脉化疗栓塞术的新组合物及其制

造方法,其不使用现在用于肝动脉化疗栓塞术的抗癌剂,而是开发基于能够有效携带抗癌剂的生物蛋白即人血清白蛋白(human serum albumin)的纳米粒子(大小约100-300nm),将其用于肝动脉化疗栓塞术。

[0010] 解决技术问题方法

[0011] 本发明的一个实现例,提供一种肝动脉栓塞术用组合物,其包含:栓塞物质;以及携带有水溶性抗癌剂的人血清白蛋白(Human Serum albumin)纳米粒子。

[0012] 本发明的另一实现例,提供一种肝动脉栓塞术用组合物,其包含:栓塞物质;微泡;以及与所述微泡表面结合并携带有水溶性抗癌剂的人血清白蛋白(Human Serum albumin)纳米粒子。

[0013] 优选地,所述栓塞物质为碘油。

[0014] 所述水溶性抗癌剂可以是选自由丝裂霉素、顺铂、阿霉素及吉西他滨构成的组中的一个以上。

[0015] 所述栓塞物质相对纳米粒子的体积比为1:1~4:1。

[0016] 另外,所述栓塞物质相对纳米粒子与微泡的体积比为1:1~4:1。

[0017] 所述水溶性抗癌剂的浓度为1~20mg/mL。

[0018] 所述纳米粒子的浓度为10~50mg/mL。

[0019] 本发明的另一实现例,提供一种肝动脉栓塞术用组合物的制造方法,其包括:使携带水溶性抗癌剂的人血清白蛋白(Human Serum albumin)纳米粒子分散到计算机断层扫描(Computed Tomography)及X射线(X-ray)造影剂中的步骤;以及将所述分散的纳米粒子与栓塞物质混合的步骤。

[0020] 本发明的又一实现例,提供一种肝动脉栓塞术用组合物的制造方法,其包括:使携带水溶性抗癌剂的人血清白蛋白(Human Serum albumin)纳米粒子分散到计算机断层扫描(Computed Tomography)及X射线(X-ray)造影剂中的步骤;将所述分散的纳米粒子与微泡混合的步骤;以及将所述纳米粒子与微泡的混合物和栓塞物质混合的步骤。

[0021] 所述计算机断层扫描(Computed Tomography)及X射线(X-ray)造影剂可以是选自由碘帕醇(Iopamidol)及Pamiray构成的组中的一个以上。

[0022] 另外,所述纳米粒子可以通过包括以下步骤的方法制造:

[0023] 制造人血清白蛋白与水溶性抗癌剂混合物的步骤;对所述制造的混合物酸度(pH)进行调节的步骤;将所述酸度经过调节的混合物用去溶剂化物质(desolvation material)进行滴定的步骤;向所述滴定的混合物中添加粒子稳定化物质的步骤;添加所述粒子稳定化物质后使去溶剂化物质汽化的步骤;以及将所述汽化的混合物进行离心分离的步骤。

[0024] 另一方面,所述纳米粒子的制造方法包括以下步骤:

[0025] 使人血清白蛋白溶解于蒸馏水中的步骤;对所述溶解物质的酸度进行调节的步骤;将所述酸度经过调节的物质用去溶剂化物质滴定的步骤;向用所述去溶剂化物质滴定的混合物中添加粒子稳定化物质的步骤;使所述去溶剂化物质汽化的步骤;将所述汽化的混合物进行离心分离的步骤;以及向所述离心分离的物质中添加水溶性抗癌剂使之发生反应的步骤。

[0026] 或者,所述纳米粒子的制造方法包括以下步骤:

[0027] 使人血清白蛋白溶解于蒸馏水中的步骤;对所述溶解物质的酸度进行调节的步

骤;向所述酸度经过调节的物质中添加2-亚氨基-噻唑烷(2-imino-thiazolidine)的步骤;添加所述2-亚氨基-噻唑烷(2-imino-thiazolidine)的步骤之后进行离心分离的步骤;完成所述离心分离之后,添加水溶性抗癌剂的步骤;以及添加所述水溶性抗癌剂之后,用去溶剂化物质进行滴定的步骤。

[0028] 或者,所述纳米粒子的制造方法包括以下步骤:

[0029] 使水溶性抗癌剂溶解于氯仿(chloroform)中的步骤;向所述溶解的物质中添加人血清白蛋白的步骤;添加所述人血清白蛋白之后进行涡旋(vortexing)的步骤;完成所述涡旋步骤之后,进行超声波处理(ultrasonification)的步骤;完成所述超声波处理步骤之后,使氯仿蒸发(evaporation)的步骤;以及将所述蒸发的物质进行离心分离的步骤。

[0030] 另外,所述纳米粒子的制造方法,还包括:在真空状态下进行冻结干燥形成粉末剂型纳米粒子的步骤。

[0031] 发明的效果

[0032] 与现有发明相比,本发明显著提高了肝动脉化疗栓塞术的效果。具体地,人血清白蛋白纳米粒子不仅能够使药物有效地集中渗透到细胞内,而且还能够利用粒子持续释放药物的效果,诱导长期的治疗效果。

[0033] 另外,肝癌患者一般不能生产白蛋白,而本发明利用基于人血清白蛋白的纳米粒子,可以诱导向肝癌患者注入白蛋白的效果,从而抑制腹水的产生。

附图说明

[0034] 图1是显示携带阿霉素的人血清白蛋白纳米粒子1的大小分布的图表。

[0035] 图2是显示携带阿霉素的人血清白蛋白纳米粒子2的大小分布的图表。

[0036] 图3是显示携带阿霉素的人血清白蛋白纳米粒子3的大小分布的图表。

[0037] 图4是显示携带多西他赛的人血清白蛋白纳米粒子大小分布的图表。

[0038] 图5是显示携带紫杉醇的人血清白蛋白纳米粒子大小分布的图表。

[0039] 图6是示出Group 1随着时间的药物释放举动分析的图表。

[0040] 图7是示出Group 2随着时间的药物释放举动分析的图表。

[0041] 图8是显示Group 2的荧光图像(Red:阿霉素)的照片。

[0042] 图9是对实施肝动脉化疗栓塞术3日、7日后的抗癌效果进行比较分析的照片。

[0043] 图10是在体外(in vitro release)全部结束的状态下利用携带阿霉素人血清白蛋白纳米粒子执行细胞活性(cell viability)的结果照片。

[0044] 图11示出依据本发明一个实现例剂型的DIC图像。

[0045] 图12图示依据本发明一个实现例剂型的肝癌治疗效能数据。

具体实施方式

[0046] 首先,对实施本发明所需的概念进行简要说明。

[0047] 蒸馏水的种类根据蒸馏水的提纯次数分为1次、2次、3次蒸馏水。用于本发明的蒸馏水为3次蒸馏水,是一种将有机物及离子清除的水。本发明是一项对有机物影响大的生物学相关发明,因此使用3次蒸馏水。

[0048] 肝脏是一种接受肝动脉与门静脉双重血流供给的器官。正常的肝组织70-80%的

血流与50%的所需氧气量由门静脉供给。相反,肝细胞癌大部分都属于多血管性肿瘤,90%以上的血液由肝动脉供给。因此,如果通过肝动脉注入治疗物质,则与正常肝组织相比以高浓度施用至肝细胞癌中,注入栓塞物质从而非选择性地阻断肝动脉血流的情况下,仅会导致肝细胞癌的严重缺血。因此,能够相对有选择性地对肿瘤实施治疗。这是共同适用于通过肝动脉的肝细胞癌治疗方法的理论根据。

[0049] 具体地,就本发明而言,为了解决上述课题,本发明提供一种肝动脉栓塞术用组合,其包含:栓塞物质与携带抗癌剂的人血清白蛋白(Human Serum albumin)。

[0050] 依据本发明,携带阿霉素的人血清白蛋白纳米粒子使携带的抗癌剂持续从粒子中释放,同时通过利用纳米大小粒子的癌症肿瘤周边血管壁与癌细胞中过表达的受体【例如:糖蛋白60(glycoprotein60)】的转胞吞作用(Transcytosis)机制有效渗透到癌肿瘤组织及癌细胞内,由此产生如下协同效应:能够最小化现有肝动脉化疗栓塞术的缺点即向正常组织的抗癌剂露出,且诱导长期的治疗效果。

[0051] 用于所述栓塞物质的油性(Oil)造影剂最优选为碘油。

[0052] 所述抗癌剂可以为难溶性抗癌剂或水溶性抗癌剂。

[0053] 所述水溶性抗癌剂为:丝裂霉素、顺铂、阿霉素。

[0054] 所述水溶性抗癌剂通过静电引力与人血清白蛋白结合。

[0055] 所述难溶性抗癌剂为:多西他赛(Docetaxel)、紫杉醇(Paclitaxel)、喜树碱(Camptothecin)、它莫西芬(Tamoxifen)、5-氟尿嘧啶(5-FU)、亮丙瑞林(Leuprolide)、氟他胺(Flutamide)、长春新碱(Vincristine)、长春瑞滨(Vinorelbine)、戊柔比星(Valrubicin)、氮芥(Mechlorethamine)、白消安(Busulfan)等,其与人血清白蛋白通过疏水性-疏水性引力结合。

[0056] 所述栓塞物质与携带抗癌剂的人血清白蛋白纳米粒子的体积比为1:1~4:1。

[0057] 另外,为了解决上述课题,携带水溶性抗癌剂的人血清白蛋白纳米粒子的第一种制造方法,包括:将人血清白蛋白与抗癌剂溶解于3次蒸馏水中制造混合物的步骤;对所述制造的混合物酸度(pH)进行调节的步骤;将所述酸度经过调节的混合物用去溶剂化物质(desolvation material)进行滴定的步骤;向所述滴定的混合物中添加粒子稳定化物质的步骤;添加所述粒子稳定化物质之后,使去溶剂化物质汽化的步骤;以及所述汽化后混合物离心分离的步骤。

[0058] 另一方面,包括:使人血清白蛋白溶解于3次蒸馏水中的步骤;对所述溶解的物质酸度进行调节的步骤;将所述酸度经过调节的物质利用去溶剂化物质进行滴定的步骤;向利用所述去溶剂化物质滴定的混合物中添加粒子稳定化物质的步骤;添加所述粒子稳定化物质之后,使去溶剂化物质汽化的步骤;将所述汽化后混合物离心分离的步骤;以及向所述离心分离的物质中添加抗癌剂使之发生反应的步骤。

[0059] 所述抗癌剂的浓度为1~20mg/mL。

[0060] 所述人血清白蛋白的浓度为10~50mg/mL。

[0061] 在对所述酸度进行调节的步骤中,酸度为8~8.5。

[0062] 所述去溶剂化物质为乙醇,所述粒子稳定化物质为醛类(aldehyde)、胺类(amine)、羧基类(carboxyl)、巯基类(thiol)。

[0063] 在所述离心分离步骤中,以10000~15000rpm离心分离8~12分钟。优选地,重复进

行离心分离2~4次为佳。

[0064] 另外,为了解决上述课题,提供作为携带水溶性抗癌剂的人血清白蛋白纳米粒子的第三种制造方法的肝动脉栓塞术用组合物的制造方法,包括:使人血清白蛋白溶解于3次蒸馏水中的步骤;对所述溶解的物质酸度进行调节的步骤;向所述酸度经过调节的物质中添加2-亚氨基-噻唑烷(2-imino-thiazolidine)的步骤;添加所述2-亚氨基-噻唑烷(2-imino-thiazolidine)的步骤之后,进行离心分离的步骤;所述离心分离的步骤之后,添加抗癌剂的步骤;以及添加所述抗癌剂的步骤之后,利用去溶剂化物质进行滴定的步骤。

[0065] 所述抗癌剂为水溶性抗癌剂。具体地,优选为丝裂霉素、顺铂、阿霉素,其浓度为1~10mg/mL。

[0066] 所述人血清白蛋白纳米粒子的浓度为10~50mg/mL。

[0067] 在对所述酸度进行调节的步骤中,酸度为8~8.5。

[0068] 在添加所述2-亚氨基-噻唑烷(2-imino-thiazolidine)的步骤中使用的2-亚氨基-噻唑烷(2-imino-thiazolidine)的量按照人血清白蛋白与2-亚氨基-噻唑烷(2-imino-thiazolidine)摩尔比为1:10-30的标准确定。

[0069] 在所述离心分离步骤中,以3000~5000rpm离心分离2~4分钟。

[0070] 另外,为了解决上述课题,携带难溶性抗癌剂的人血清白蛋白纳米粒子制造方法,包括:使抗癌剂溶解于氯仿(chloroform)中的步骤;向所述溶解的物质中添加人血清白蛋白的步骤;添加所述人血清白蛋白之后,进行涡旋(vortexing)的步骤;完成所述涡旋的步骤之后,进行超声波处理(ultrasonification)的步骤;完成所述超声波处理的步骤之后,使氯仿蒸发(evaporation)的步骤;以及离心分离所述蒸发的物质的步骤。

[0071] 所述抗癌剂为难溶性抗癌剂。具体地,优选为:多西他赛(Docetaxel)、紫杉醇(Paclitaxel)、喜树碱(Camptothecin)、它莫西芬(Tamoxifen)、5-氟尿嘧啶(5-FU)、亮丙瑞林(Leuprolide)、氟他胺(Flutamide)、长春新碱(Vincristine)、长春瑞滨(Vinorelbine)、戊柔比星(Valrubicin)、氮芥(Mechlorethamine)、白消安(Busulfan)等,其浓度为1~10mg/mL。

[0072] 所述人血清白蛋白纳米粒子的浓度为10~50mg/mL。

[0073] 在所述离心分离步骤中,以10000~15000rpm离心分离8~12分钟,并将这一过程重复执行2~4次。

[0074] 通过上述4种方法制造出了携带水溶性抗癌剂或难溶性抗癌剂的人血清白蛋白纳米粒子。

[0075] 这种人血清白蛋白纳米粒子的大小为100~300nm。优选地,其大小为200nm。

[0076] 另外,为了将其用于肝动脉化疗栓塞术,需要将溶剂替换为计算机断层扫描(Computed Tomography)及X射线(X-ray)造影剂。因此,为了使粒子冻结干燥使剂型转变为粉末形式(powder form),添加1-5%的低温保护材料(cryo-protection materials)之后,就应当首先在-70℃以下使其冻结,然后再在-70℃、真空状态下使其冻结干燥,从而使剂型转变为粉末形式(powder form)。这种情况下使用的低温保护材料(cryo-protection materials)可以使用聚乙二醇【polyethylene glycol (PEG)】、蔗糖(sucrose)、右旋糖酐(dextran)等。

[0077] 使含有冻结干燥的抗癌剂的人血清白蛋白粒子再次分散的计算机断层扫描

(Computed Tomography) 及X射线 (X-ray) 造影剂有: 碘帕醇 (Iopamidol)、Pamiray等, 根据比重可以进行多样地选择。关于比重的选择, 应当选择确保碘油与含有抗癌剂的人血清白蛋白纳米粒子能够均匀地分散到乳剂中的比重的造影剂, 从而使含有粉末剂型抗癌剂的人血清白蛋白纳米粒子溶解。

[0078] 使含有冻结干燥的抗癌剂的人血清白蛋白粒子再次分散到上述造影剂中之后, 将其与碘油按照1:1~4的比例 (Vol:Vol) 混合。然后, 再通过3通抽吸 (3way pumping) 制造出含有抗癌剂的人血清白蛋白粒子/碘油乳剂。

[0079] 本发明的另一实现例, 提供一种肝动脉栓塞术用组合物, 其包含: 栓塞物质; 微泡; 以及人血清白蛋白 (Human Serum albumin) 纳米粒子, 其与所述微泡表面结合, 携带水溶性抗癌剂。通过将纳米粒子结合至微泡, 由此可以获得利用微泡的造影效果, 因此是优选的。

[0080] 本发明的另一实现例, 提供一种肝动脉栓塞术用组合物的制造方法, 包括: 使携带水溶性抗癌剂的人血清白蛋白 (Human Serum albumin) 纳米粒子分散到计算机断层扫描 (Computed Tomography) 及X射线 (X-ray) 造影剂中的步骤; 将所述分散的纳米粒子与微泡混合的步骤; 以及将所述纳米粒子和微泡的混合物与栓塞物质混合的步骤。

[0081] 对于与所述肝动脉栓塞术用组合物及其制造方法相关的具体构成来说, 可以采用与前面探讨部分相同的内容。

[0082] 下面, 将通过实施例对本发明进行更加详细的说明。这些实施例只是为了对本发明进行更加详细的说明而列举, 根据本发明的要点, 本发明的范围并不受这些实施例的限制。这一点对于具有本领域一般知识的技术人员来说是不言自明的。

[0083] 实施发明的形态

[0084] 制造例1

[0085] 携带亲水性抗癌剂之一即阿霉素的人血清白蛋白纳米粒子的制造方法1

[0086] 携带阿霉素的人血清白蛋白纳米粒子可以利用蛋白质受极性差异影响而凝聚的效果进行制造。进一步地, 可以利用带有正电荷的阿霉素与带有负电荷的人血清白蛋白的特性诱导产生静电结合, 从而能够更加有效地携带阿霉素。根据实验方法, 携带阿霉素的人血清白蛋白纳米粒子可以按照3种形态进行制作。

[0087] 1.1制造方法.

[0088] 将150mg人血清白蛋白与5mg阿霉素溶解于3mL的3次蒸馏水中之后, 执行约2小时的搅拌 (stirring), 确保阿霉素能够有效地与人血清白蛋白结合。然后, 为了将人血清白蛋白、阿霉素混合液的pH调整为约8.0-8.5, 利用酸度计 (pH meter) 添加NaOH的同时进行调节。然后, 滴定乙醇, 确保结合有阿霉素的人血清白蛋白能够按照纳米大小的标准凝聚。凝聚的程度可以通过溶液浊度的变化进行观察。滴定5mL观察到溶液浊度的变化之后, 为了使结合有阿霉素的凝聚的人血清白蛋白执行交联 (cross-linking) 诱导稳定化而添加戊二醛 (glutaraldehyde)。添加的戊二醛 (glutaraldehyde) 可添加8%的溶液10 μ l。携带阿霉素的人血清白蛋白纳米粒子的稳定性可以根据戊二醛 (glutaraldehyde) 的添加量进行调节。然后, 在过夜 (overnight) 期间实施搅拌 (stirring), 使其充分反应的同时, 执行使滴定的乙醇汽化的过程。为了只获取经过充分反应而稳定化的携带有阿霉素的人血清白蛋白纳米粒子, 以12000rpm进行离心分离10分钟, 将未粒子化的结合有阿霉素的人血清白蛋白清除, 重复执行三次上述操作, 提高纯度。

[0089] 携带有阿霉素的人血清白蛋白纳米粒子的大小可以利用动态光散射 (dynamic light scattering) 方法进行测定,并可以通过电子显微镜图像观察到纳米粒子形态的形状 (morphology)。另外,携带阿霉素的人血清白蛋白纳米粒子中携带的阿霉素的定量分析可以通过最初施用的阿霉素量与未被携带的阿霉素量之差进行计算,未被携带的阿霉素可以利用HPLC进行定量分析。

[0090] 1.2特征分析

[0091] 通过动态光散射 (Dynamic light scattering) 方法对粒子大小进行分析的结果显示,其大小为 $200.4 \pm 50.7\text{nm}$ 。大小分布图也显示出均匀的粒子分布。另外,关于粒子内携带阿霉素的效果,显示出约为89.64%的携带效果。

[0092] 制造例2

[0093] 携带亲水性抗癌剂之一即阿霉素的人血清白蛋白纳米粒子的制造方法2

[0094] 2.1制造方法

[0095] 该携带阿霉素的人血清白蛋白纳米粒子2作为上述开发的携带阿霉素的人血清白蛋白纳米粒子1稍微变化的剂型,其是一种诱导二硫键 (disulfide bond) 替代为了稳定化而施用的戊二醛 (glutaraldehyde) 从而制作的剂型。二硫键 (Disulfide bond) 是通过在人血清白蛋白中反应2-亚氨基噻唑烷 (2-imino thiazolidine) 诱导巯基 (thiol基) 而执行的。为了诱导巯基 (thiol基),首先将150mg人血清白蛋白溶解于3mL的3次蒸馏水中。然后,将pH调整到8.0-8.5。接着,加入6mg的2-亚氨基噻唑烷 (2-imino thiazolidine),使其反应1小时,从而将巯基 (thiol基) 导入到人血清白蛋白中。充分反应之后,为了将未导入的2-亚氨基噻唑烷 (2-imino thiazolidine) 除去,利用3000Da膜 (membrane) 以4000rpm离心分离3分钟,从而将其清除。向诱导了未分离巯基 (thiol基) 的人血清白蛋白中添加5mg阿霉素,执行1小时的搅拌 (stirring),从而有效地使其与诱导了巯基 (thiol基) 的人血清白蛋白结合。然后,滴定约5mL乙醇,执行过夜 (overnight) 搅拌。

[0096] 然后,提高携带阿霉素的人血清白蛋白纳米粒子纯度而进行采集的过程及分析方法与携带阿霉素的人血清白蛋白纳米粒子1的工序相同。

[0097] 2.2特征分析

[0098] 通过动态光散射 (Dynamic light scattering) 方法对粒子大小进行分析的结果显示,其大小为 $193.8 \pm 69.7\text{nm}$,大小分布图中也显示出均匀的粒子分布。另外,关于粒子内携带阿霉素的效果,显示出约为70.35%的携带效果。

[0099] 制造例3

[0100] 携带亲水性抗癌剂之一即阿霉素的人血清白蛋白纳米粒子的制造方法3

[0101] 3.1制造方法.

[0102] 携带阿霉素的人血清白蛋白纳米粒子3通过以下方法制造,该方法为:利用阿霉素借助静电的力量有效地与人血清白蛋白结合的性质而进行携带的方法。首先,为了制造出未携带阿霉素的人血清白蛋白纳米粒子,将150mg人血清白蛋白溶解于3mL的3次蒸馏水中,持续进行搅拌 (stirring)。充分溶解之后,再利用NaOH将pH调整到8.0-8.5。然后,为了使入血清白蛋白凝聚,滴定约5mL乙醇。接着,为了执行交联 (cross-linking),再添加10 μl 的8%-戊二醛 (glutaraldehyde),在过夜 (overnight) 期间执行搅拌 (stirring)。在过夜 (overnight) 期间充分进行交联 (cross-linking) 反应后,为了只获取制作的人血清白蛋白

粒子,以12000rpm离心分离10分钟,将未粒子化的人血清白蛋白清除。为了将阿霉素携带在获取的人血清白蛋白纳米粒子上,向人血清白蛋白纳米粒子中添加5mg阿霉素,使其反应1小时。

[0103] 3.2特征分析

[0104] 通过动态光散射 (Dynamic light scattering) 方法对粒子大小进行分析的结果显示,其大小为 $246.9 \pm 79.3\text{nm}$,大小分布图中也显示出均匀的粒子分布。另外,关于粒子内携带阿霉素的效果,显示出约为45.95%的携带效果。

[0105] 制造例4

[0106] 携带难溶性抗癌剂(多西他赛:Docetaxel)的人血清白蛋白纳米粒子的制造方法

[0107] 有效携带疏水性抗癌剂的人血清白蛋白纳米粒子制造方法如下。将疏水性抗癌剂即多西他赛 (Docetaxel) 以10mg/mL的浓度溶解于氯仿 (chloroform) 中,制造出储备溶液 (stock solution)。另外,按照50mg/mL的浓度标准制造出3mL人血清白蛋白溶液之后,再追加100-200 μl 之前准备的多西他赛储备溶液 (docetaxel stock solution),以高速 (high speed) 执行涡旋 (vortexing)。通过涡旋 (Vortexing) 处理制造出溶解于氯仿 (chloroform) 中的尺寸小的多西他赛乳剂 (docetaxel emulsion) 之后,紧接着将在1循环 (cycle) 条件下按照100%振幅 (amplitude) 标准执行2分钟的声波降解法 (ultrasonication),从而制造出内部携带抗癌剂溶液且由人血清白蛋白壳 (shell) 构成的乳剂。确认制造的乳剂 (emulsion) 由HSA涂覆之后,在真空状态下在过夜 (overnight) 期间使氯仿 (chloroform) 蒸发 (evaporation)。这时,重要的是必须防止氯仿 (chloroform) 快速汽化而爆炸。将氯仿 (Chloroform) 完全清除之后,在12000rpm的条件下执行10分钟离心分离 (centrifugation),将未形成粒子的人血清白蛋白与多西他赛 (docetaxel) 清除。将这一过程重复执行3次,确保只获取含有制造的多西他赛 (docetaxel) 的人血清白蛋白纳米粒子。

[0108] 制造例5

[0109] 携带难溶性抗癌剂(紫杉醇:Paclitaxel)的人血清白蛋白纳米粒子的制造方法

[0110] 有效携带疏水性抗癌剂的人血清白蛋白纳米粒子制造方法如下。将疏水性抗癌剂即紫杉醇 (Paclitaxel) 以10mg/mL的浓度标准溶解于氯仿 (chloroform) 中,制造出储备溶液 (stock solution)。另外,按照50mg/mL的浓度标准制造出3mL人血清白蛋白溶液之后,再追加100-200 μl 之前准备的紫杉醇储备溶液 (paclitaxel stock solution),以高速 (high speed) 执行涡旋 (vortexing)。通过涡旋 (Vortexing) 制造出溶解于氯仿 (chloroform) 中的尺寸小的紫杉醇乳剂 (Paclitaxel emulsion) 之后,紧接着在1循环 (cycle) 条件下按照100%振幅 (amplitude) 标准执行2分钟的声波降解法 (ultrasonication),从而制造出内部携带抗癌剂溶液且由人血清白蛋白壳 (shell) 构成的乳剂。确认制造的乳剂 (emulsion) 由HSA涂覆之后,真空状态下在过夜 (overnight) 期间使氯仿 (chloroform) 蒸发 (evaporation)。这时,重要的是必须防止氯仿 (chloroform) 快速汽化而引起的爆炸。将氯仿 (Chloroform) 完全清除之后,在12000rpm的条件下执行10分钟离心分离 (centrifugation),将未形成粒子的人血清白蛋白与紫杉醇清除。将这一过程重复执行3次,确保只获取含有制造的紫杉醇 (Paclitaxel) 的人血清白蛋白纳米粒子。

[0111] 实验例1-药物释放举动实验分析

[0112] 为了对用于肝动脉化疗栓塞术与阿霉素结合的人血清白蛋白纳米粒子在足够长

时间内释放药物持续产生药效的效果进行验证,首先,对在体外(in vitro)分析结合有阿霉素的人血清白蛋白纳米粒子1、2、3的药物释放举动。另外,通过与肝动脉化疗栓塞术中采取的方法相同的方法,对与作为栓塞物质的碘油按照不同比例混合变化为乳剂形态释放的阿霉素进行定量分析,从而对药物释放举动进行测定。

[0113] 1.1实验方法

[0114] 为了对与阿霉素结合的人血清白蛋白纳米粒子释放的阿霉素进行分析,向2000Da大小的透析膜(dialysis membrane)中注入制造的样品1mL(阿霉素含有量:5mg),将其完全密封。然后,将其放入装有10mL的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline)的试管(tube)中,在37℃的条件下执行摇动(shaking),在指定的时间点(time point)将透析膜(dialysis membrane)转移到装有10mL的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline)的试管(tube)内,并在每个时间点(time point)获取样品(sample)。准备的样品group如下。

[0115] group 1.-磷酸盐缓冲液(游离DOX(PBS))或造影剂中的游离阿霉素(游离DOX(Pamiray))【free Adriamycin in phosphate buffer saline(free DOX(PBS)) or contrast media(free DOX(Pamiray))】。

[0116] -体积比为1:4的游离阿霉素&碘油(游离DOX(1:4))【free Adriamycin&lipiodol with volume ratio of 1:4(free DOX(1:4))】。

[0117] -磷酸盐缓冲液(DOX-HSA-NPs(PBS))或造影剂(DOX-HSA-NPs(Pamiray))内携带有阿霉素的人血清白蛋白纳米粒子。

[0118] -按照1:4(DOX-HSA-NPs(1:4))的体积比,携带有阿霉素的人血清白蛋白纳米粒子&碘油。

[0119] group 2.-按照1:1、1:2、1:3及1:4的体积比携带有阿霉素的人血清白蛋白纳米粒子&碘油。

[0120] 1.2实验结果

[0121] <图6>中显示了对group 1的药物释放举动进行分析的结果。从图中可以得出以下结论,对于游离(free)阿霉素组(free DOX)来说,在3小时内大部分药物都释放出来了;对于比重高的造影剂(pamiray)中分散的游离(free)阿霉素组(free DOX(Pamiray))来说,药物释放时间稍微延迟。另外,对于与碘油混合形成乳剂形态的游离(free)阿霉素组(free DOX(1:4))来说,是由碘油包裹的乳剂形态,与游离DOX(PBS)(freeDOX(PBS))组与游离DOX(Pamiray)(free DOX(Pamiray))组相比,药物释放的速度下降,显示出了持续释放的效果。

[0122] 与游离(free)阿霉素组比较,携带有阿霉素的人血清白蛋白纳米粒子组大体上受人血清白蛋白纳米粒子的特性影响全部为能够诱导在长时间内产生持续释放效果的物质,因此全部显示了持续释放药物的效果。与大部分在短时间内释放的游离(free)阿霉素组相反,携带有阿霉素的人血清白蛋白纳米粒子组在初期释放的药物量全部都在1mg以内,处于微乎其微的状态,由此判断其是一种能够持续释放药物,可以获得长期治疗效果的剂型。特别是,与碘油按照1:4的比例混合形成乳剂的携带阿霉素人血清白蛋白纳米粒子,在初始时间点几乎没有显示出释放的效果,其缓慢持续释放的效果最优秀,能够获得长期的药效。

[0123] 为了得出能够适用于肝动脉化疗栓塞术的、与碘油之间的最佳混合比例,将其与碘油之间的混合比例按照1:1、1:2、1:3、1:4的标准调整后,其结果如<图7>所示,得出了1:3与1:4的比例是最佳比例的结论。得出的结果是,与1:3、1:4的比例相比,1:1、1:2比例的乳

剂能够在短时间内释放出更多的药物。进一步地,如<图8>所示,1:1、1:2比例的乳剂,并非是一种碘油从外部包裹携带阿霉素人血清白蛋白纳米粒子形态的乳剂,而是一种携带阿霉素人血清白蛋白纳米粒子从外部包裹碘油的形态,这种剂型不能期待其栓塞效果。由此,可以得出以下结论,即能够最大限度地发挥栓塞效果及药物持续释放效果的剂型为1:4比例的乳剂。

[0124] 实验例2-利用疾病动物模型分析借助肝动脉化疗栓塞术的抗癌效果

[0125] 通过动物实验对以下两种乳剂的抗癌效果进行了验证,一是将开发的携带有阿霉素的人血清白蛋白纳米粒子与碘油按照1:4比例混合形成的乳剂,二是在当前肝动脉化疗栓塞术中采用的方法,即将阿霉素与碘油按照1:4比例混合形成的乳剂。动物模型采用VX2癌兔子模型(VX2carcinoma rabbit model),将癌细胞直接移植到肝脏内使其生长,从而制作出肝癌疾病动物模型,并进行了评估。

[0126] 2.1实验方法

[0127] 利用VX2癌兔子模型(VX2carcinoma rabbit model)通过查看X射线(X-ray)影像将导管(catheter)置于兔子(rabbit)的动脉(artery),分别注入200 μ l的游离(free)阿霉素&碘油乳剂(1:4比例)与携带阿霉素的人血清白蛋白纳米粒子&碘油乳剂(1:4比例),执行肝动脉化疗栓塞术。这时,分别传输的阿霉素含量相同,均为1mg。碘油也是按照相同的用量注入,从而将栓塞术对抗癌效果的影响调整到相同标准。分别注入样品在3日后和7日后采集肿瘤对抗癌效果进行了分析。实验组如下。

[0128] group-携带阿霉素的人血清白蛋白纳米粒子&碘油乳剂(1:4比例)在3日后采集(001)。

[0129] -携带阿霉素的人血清白蛋白纳米粒子&碘油乳剂(1:4比例)在7日后采集(002)。

[0130] -游离(free)阿霉素&碘油乳剂(1:4比例)在3日后采集(003)。

[0131] -游离(free)阿霉素&碘油乳剂(1:4比例)在7日后采集(004)。

[0132] 2.2实验结果

[0133] <图9>中显示了分别在3日后和7日后的抗癌效果。将游离(Free)阿霉素与携带阿霉素的人血清白蛋白用于栓塞术的情况下,两组均显示能够有效杀灭肝癌的结果。但是,在用游离(free)阿霉素进行处理的情况下,根据7日后的结果(004),在外围(Peripheral)部位可以看到存活的癌细胞。相反,对于用携带阿霉素的人血清白蛋白处理的组(002)来说,则得出了均有效地将肝癌细胞杀灭的结果,显示出最大化的通过肝动脉化疗栓塞术的效果。另外,作为将药物持续释放的效果可以期待长期的抗癌效果。

[0134] 实验例3

[0135] 结束在体外释放(In vitro release)的状态下对细胞活力(cell viability)执行结果数据进行分析。

[0136] 上述实验是在体外释放(in vitro release)全部结束的状态下利用携带阿霉素的人血清白蛋白纳米粒子执行细胞活性(cell viability)的结果。如图10中左侧照片所示,在释放(release)不再进行的时间点,携带阿霉素的人血清白蛋白纳米粒子呈现红色,由此可知,其仍然携带有阿霉素。

[0137] 利用这时的粒子对抗癌效果进行定量分析的结果如图10中间的图表所示。由此可知,以仍然携带阿霉素的状态存在的粒子进入到细胞内时就会分解,因此仍然具有抗癌效

果,从而诱导癌细胞的杀灭。

[0138] 以图10右侧照片中的荧光图像为根据,证实细胞核中检测出了阿霉素。即,由此可知,在细胞内阿霉素人血清白蛋白粒子分解之后,就会使携带的阿霉素流出,然后,流出的阿霉素就会向细胞核渗透,从而诱发了抗癌效果。

[0139] 因此,对于携带阿霉素的人血清白蛋白纳米粒子来说,不仅从粒子中流出的阿霉素显示出抗癌效果,而且粒子渗透到细胞内之后,白蛋白粒子就会分解,阿霉素就会第二次流出,从而显示抗癌效果。

[0140] 制造例6-微泡的制造

[0141] 作为脂质,将二硬脂酰磷脂酰胆碱【1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC)】、DSPE-PEG₂₀₀₀-NHS(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-n[poly(ethyleneglycol)]₂₀₀₀-N-hydroxysuccinimide)的比例进行调整,使其摩尔比(mole ratio)达到9:1。然后,将其溶解于氯仿(chloroform)中。接着,利用旋转式汽化器(rotary evaporator)使氯仿(chloroform)完全蒸发,从而形成脂质薄膜。

[0142] 然后,将0.01M的磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4)【phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)】添加到脂质薄膜中,将温度保持在55-60℃,使脂质溶解,然后,将C₃F₈气体(gas)放入装有混合液的容器中,进行填充之后,执行45秒的机械搅拌(mechanical agitation),从而制作出微泡。

[0143] 制造例7-alb-MB-TACE形成。

[0144] 7.1.制造方法

[0145] 1.为了确保负载亚德里亚霉素·HCl(Doxorubicin·HCl)的人血清白蛋白纳米粒子(DOX-HSA NPs)小球(pellet)达到一定浓度(例如:6.25mg/ml),使其分散到造影剂(contrast medium)即pamiray中。利用涡旋(vortexing)确保纳米粒子能够充分地分散。

[0146] 2.制作微泡(0.5mg/ml或者1mg/ml),然后将其装入5ml注射器(syringe)中,再向装过微泡的玻璃小瓶(vial)中追加放入PBS 1ml,将剩余的微泡回收之后装入5ml注射器(syringe)中。

[0147] 3.将装有微泡的5ml注射器(syringe)放入离心分离器内,然后在(225g、10分钟)的条件下使微泡聚集到上层部。然后,将最上层部的微泡留下,并将注射器(syringe)内的溶液丢弃。

[0148] 4.为了确保将所需使用量的DOX-HSA NPs与微泡混合后能够充分发生反应而执行移液(Pipetting)。然后,在常温条件下使其反应1小时。

[0149] 5.为了形成alb-MB-TACE剂型,将溶解于pamiray中的DOX-HSA NPs-MB装入一定量e-试管(e-tube)或者玻璃小瓶(vial)中。然后,将碘油(Lipiodol)也按匹配比例放入相同的1.5ml塑料试管或者玻璃小瓶(vial)内,执行涡旋(vortexing)。通过肉眼确认没有分层的充分混合,与此同时,执行15~20秒的涡旋(vortexing)处理(例如:pamiray中的DOX-HSA NPs-MBs:碘油=1:2,v/v(DOX-HSA NPs-MBs in pamiray:lipiodol=1:2,v/v))。

[0150] 7.2.特征分析

[0151] 有关所述alb-MB-TACE剂型的DIC图像及模式图显示在下述图11中。另外,总共5次以上获得DIC图像之后,通过显微镜程序利用针对各个倍率的比例尺(scale bar)获得剂型

的平均大小。结果显示,其平均直径为 $17.69 \pm 6.83 \mu\text{m}$ 。

[0152] 实验例4-利用疾病动物模型对借助肝动脉化疗栓塞术的抗癌效果进行分析。

[0153] 通过动物实验对所述开发的alb-MB-TACE剂型乳剂的抗癌效果进行了验证。动物模型采用VX2癌兔子模型(VX2carcinoma rabbit model),将癌细胞直接移植到肝脏内使其生长,从而制作出肝癌疾病动物模型,并进行了评估。

[0154] 4.1实验方法

[0155] alb-MB-TACE剂型的乳剂是以向每1只兔子施用DOX 0.5mg为目标制作的。将所述剂型向兔子注入后,立即利用成人用凸状探头(中心频率1.8MHz)【convex probe(center frequency 1.8MHz)】施加15分钟超声波。

[0156] 4.2实验结果

[0157] 评估alb-MB-TACE对动物模型的治疗效果,肿瘤体积变化(体积抑制率)【tumor volume change(volume inhibition ratio)】结果如图12所示。从图12中可以看出,未作任何处理的对照(Control)组与初期相比肿瘤体积约增加了380%。与此相比,用alb-MB-TACE与初期相比肿瘤体积增加约未满足20%,几乎没有增加。

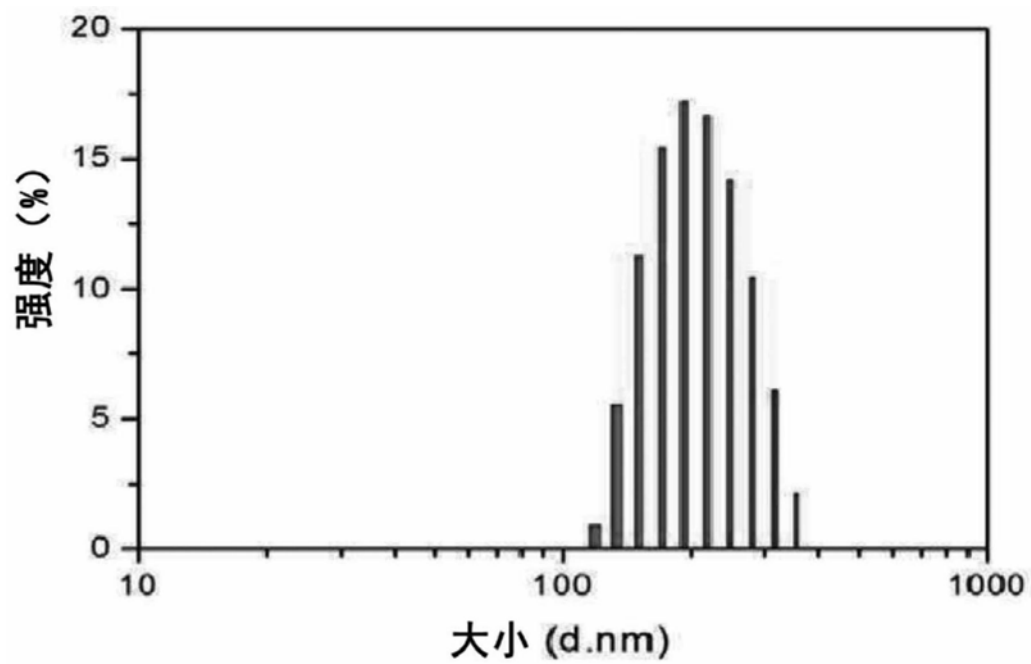


图1

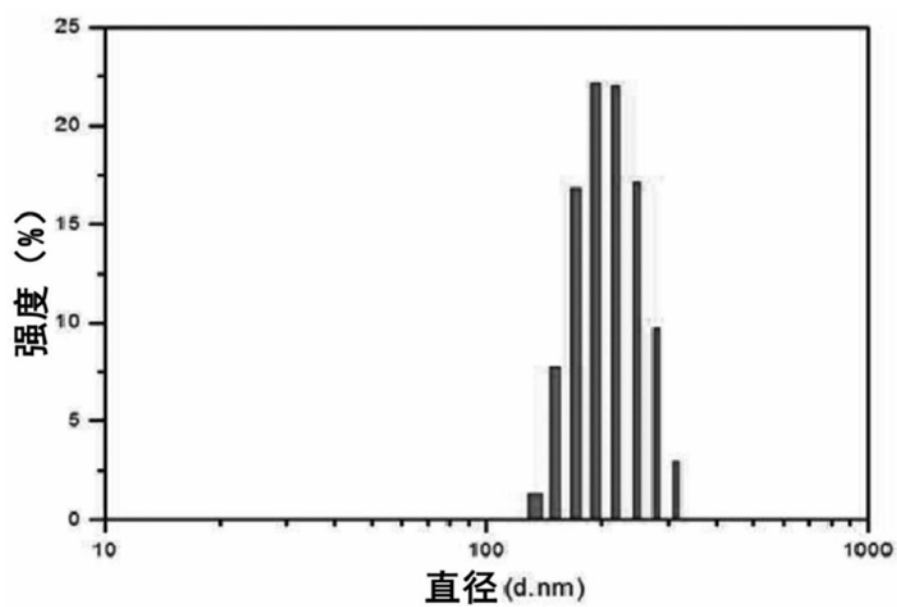


图2

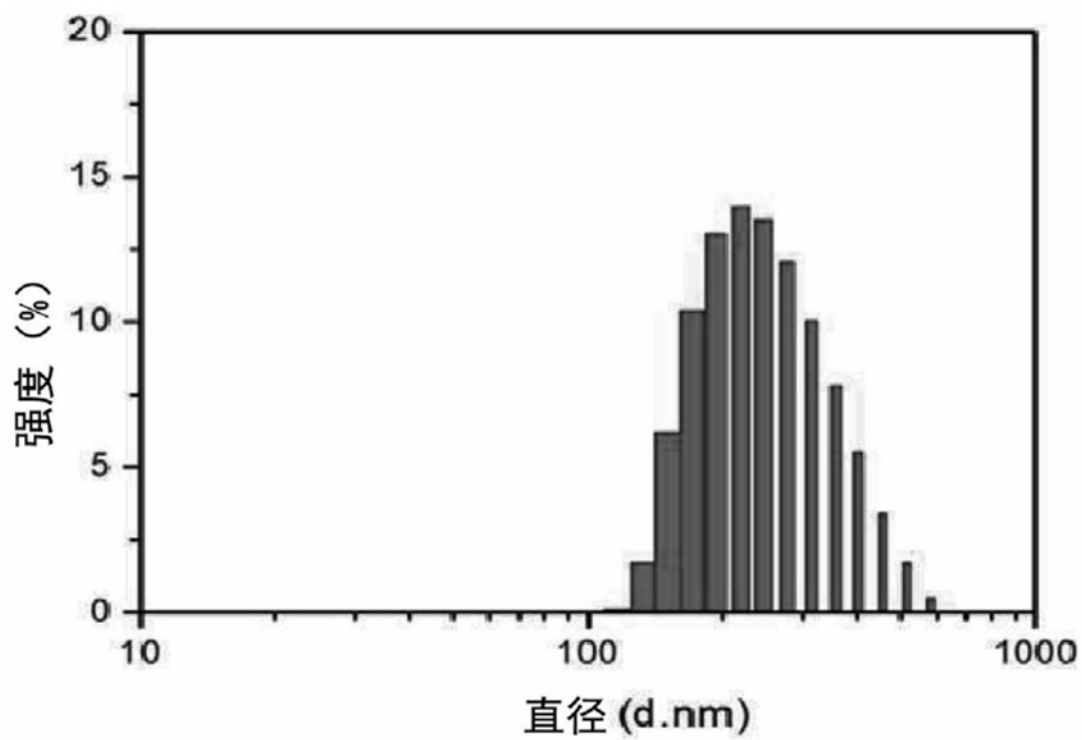


图3

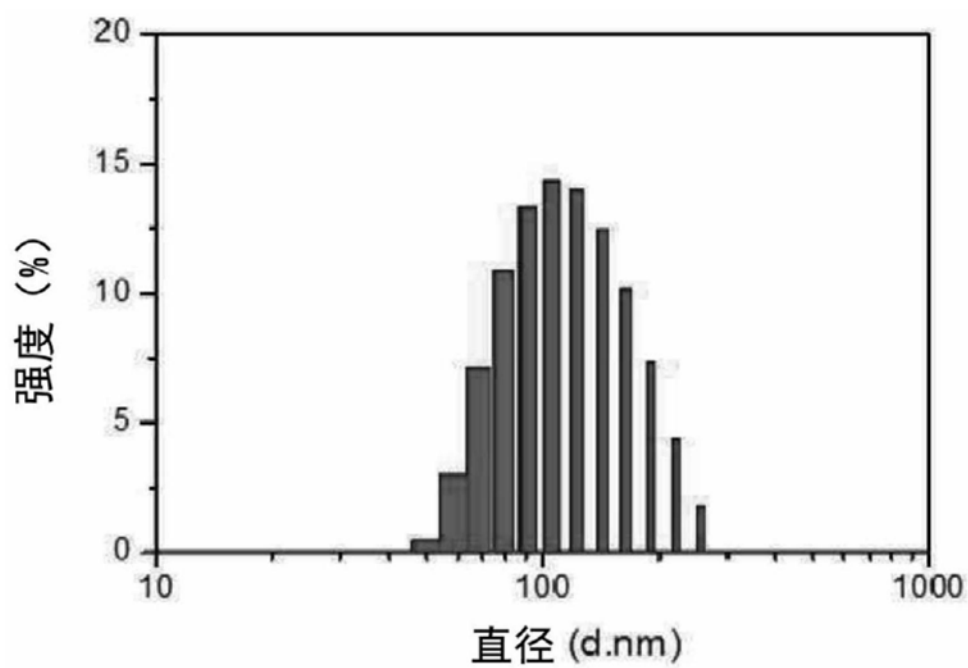


图4

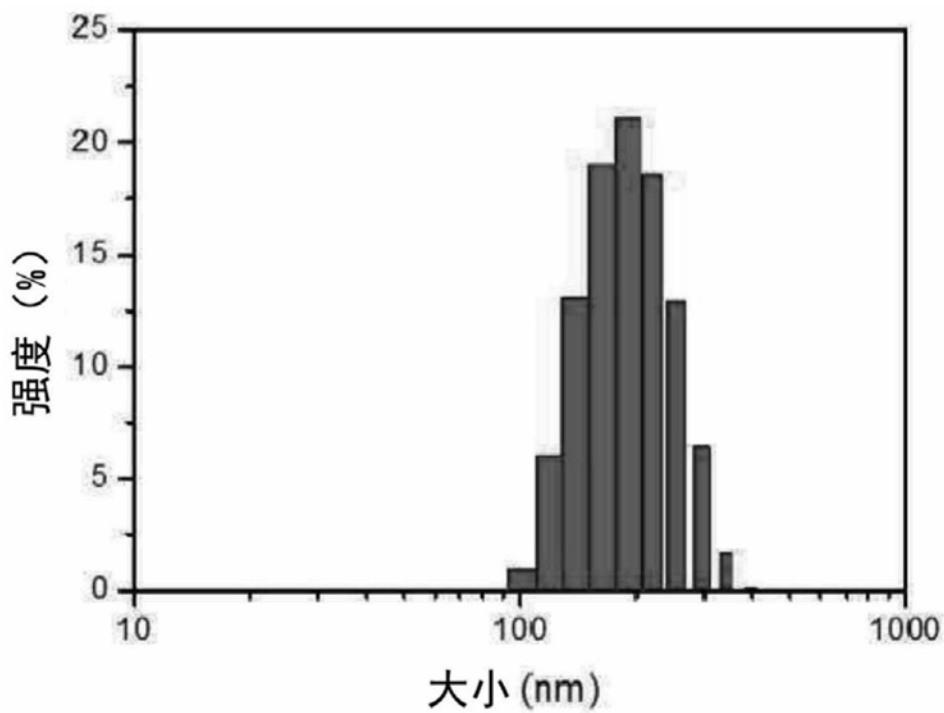


图5

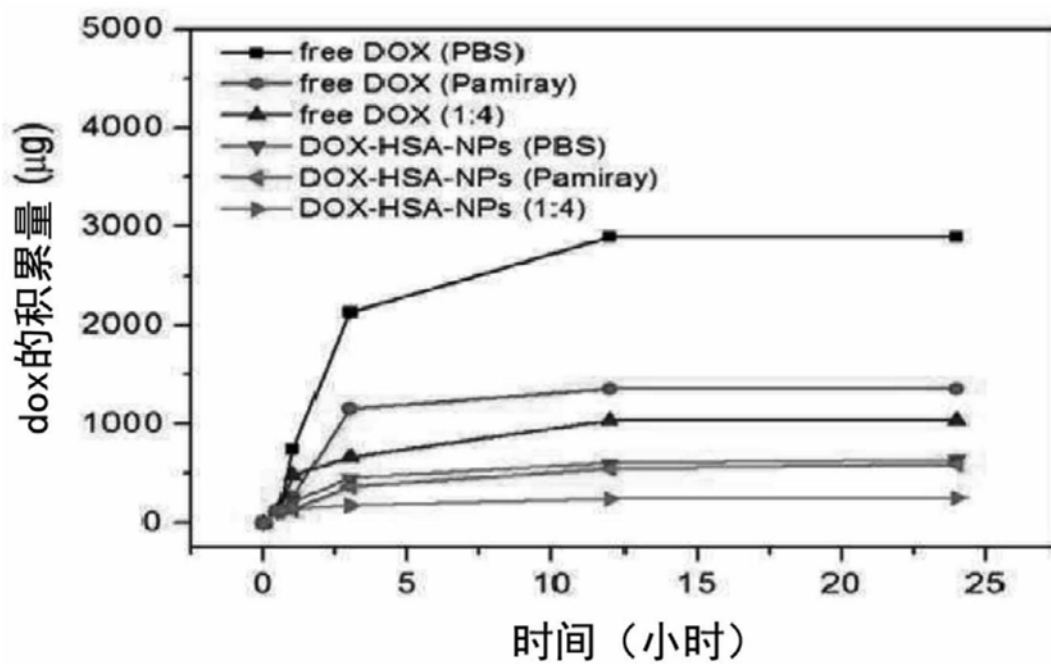


图6

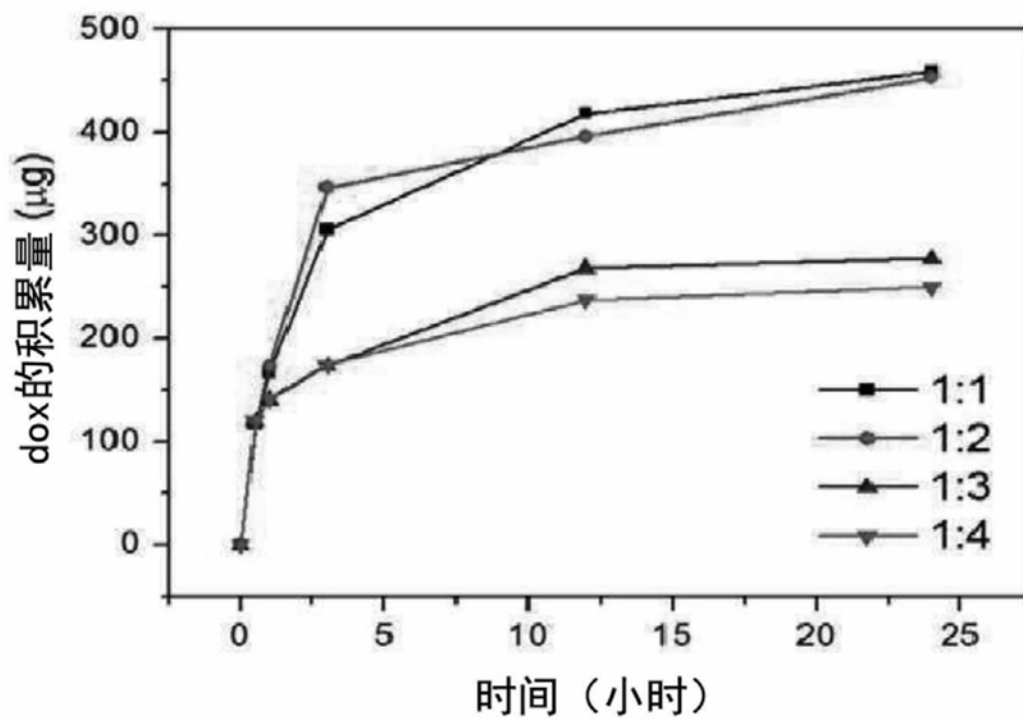


图7

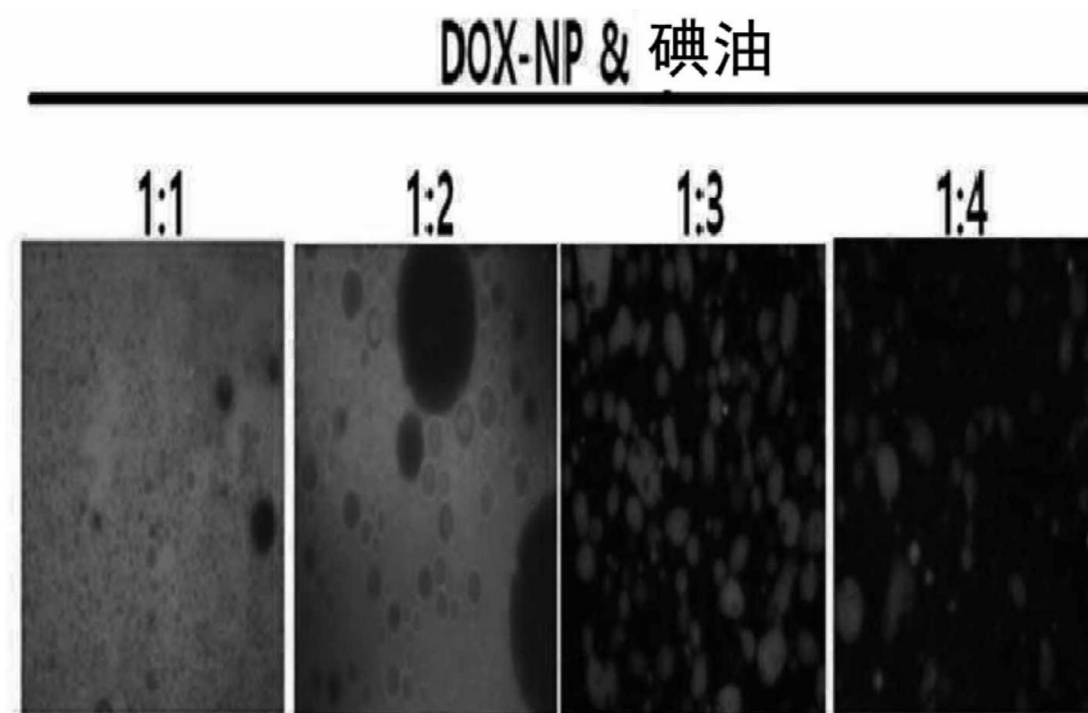


图8

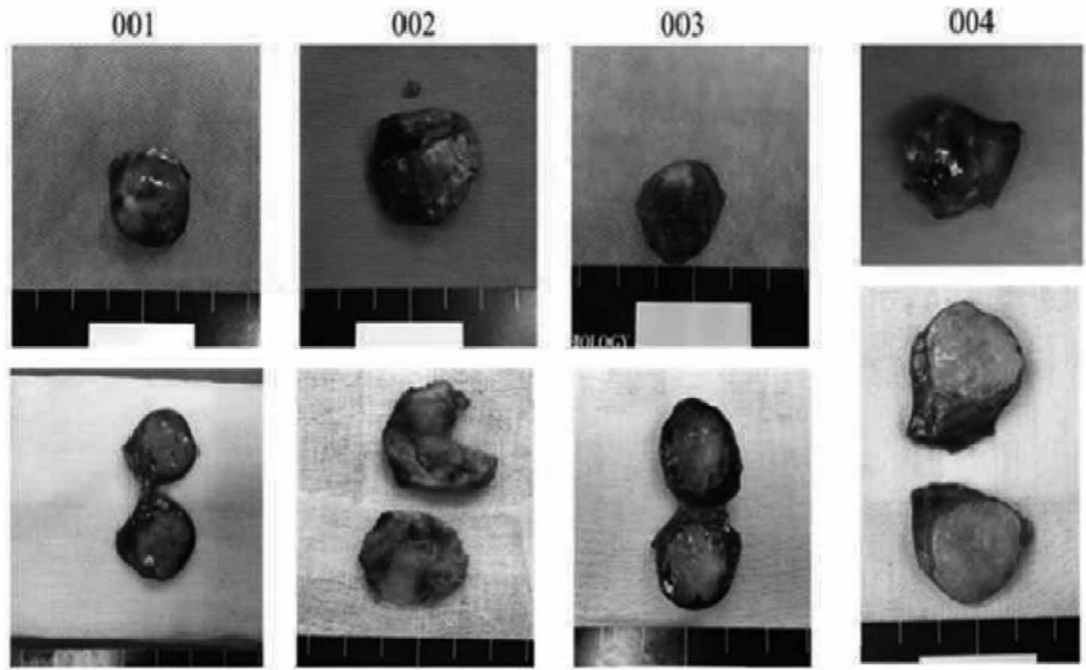


图9

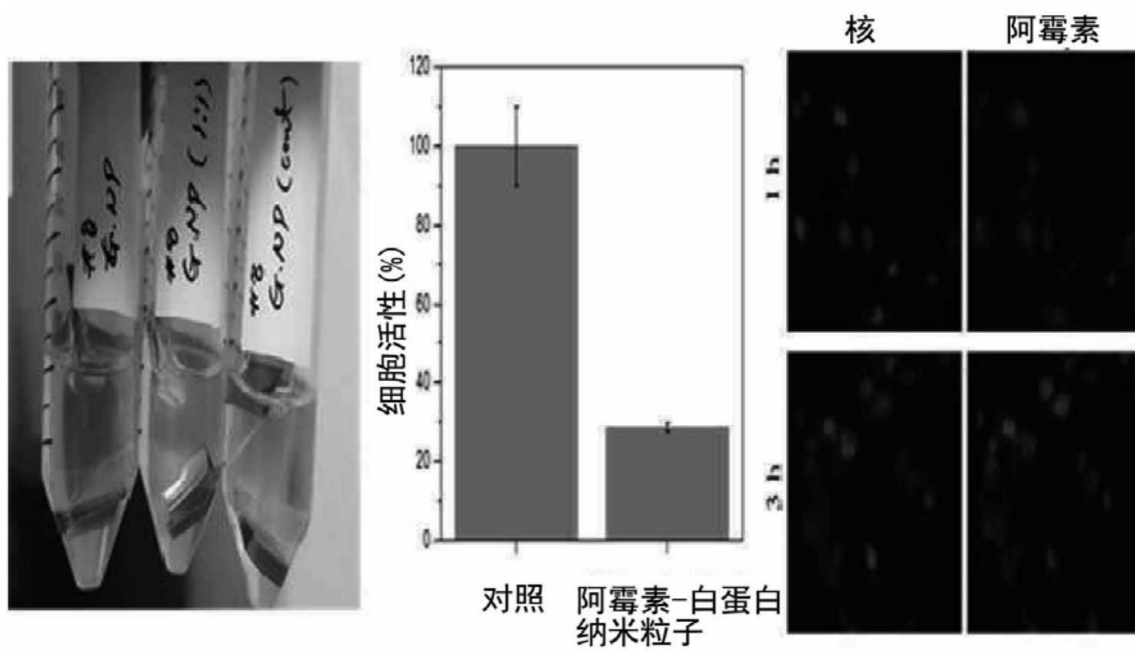


图10

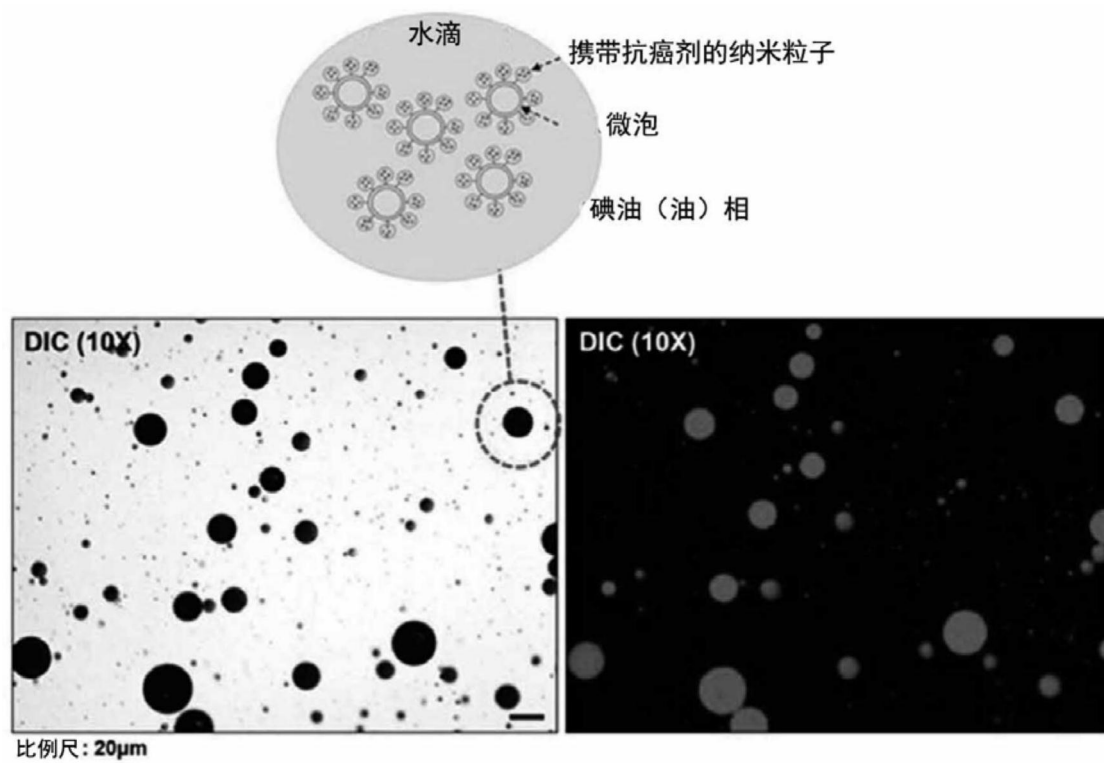


图11

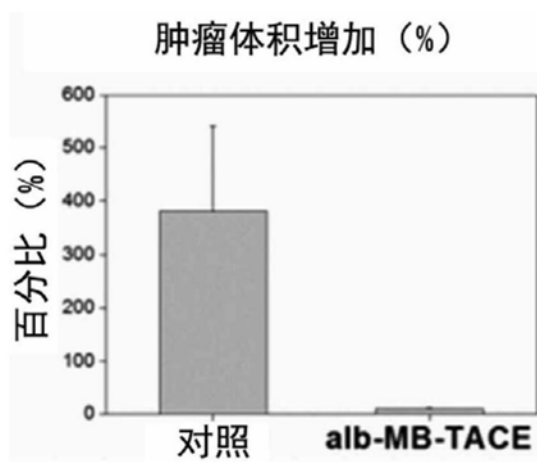


图12