



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 117982687 A

(43) 申请公布日 2024.05.07

(21) 申请号 202311346292.X

(22) 申请日 2014.03.14

(30) 优先权数据

61/790,373 2013.03.15 US

(62) 分案原申请数据

201480024766.1 2014.03.14

(71) 申请人 生物兼容英国有限公司

地址 英国萨里郡

申请人 美利坚合众国- 由健康及人类服务
部部长代表

(72) 发明人 马修·R·德勒埃

布拉德福·J·伍德

阿耶莱·H·内古西埃

安德鲁·勒纳德·刘易斯 Y·唐

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 封新琴

(51) Int.Cl.

A61K 49/04 (2006.01)

A61K 31/704 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

C08L 29/04 (2006.01)

C08F 116/06 (2006.01)

权利要求书1页 说明书12页 附图6页

(54) 发明名称

可成像栓塞微球

(57) 摘要

本发明涉及可成像、不透射线的栓塞珠粒，特别是用于监视栓塞过程。珠粒包括含有共价结合到预成形水凝胶珠粒的聚合物网络的化合物的碘化合物，所述珠粒通过亲核攻击激活预成形的的水凝胶珠粒，然后共价连接碘化合物到聚合物网络来制备。不透射线的珠粒可以用化疗剂装载以及用于栓塞增生组织或实体瘤的方法中。

1. 一种不透射线的水凝胶珠粒,其包含在预先形成的交联的聚乙烯醇(PVA)水凝胶珠粒上的官能团,所述水凝胶珠粒已朝着与羰基咪唑或碳化二亚胺亲核取代反应活化,其中所述羰基咪唑或碳化二亚胺配置为与含碘化合物反应并将所述含碘化合物共价结合到所述水凝胶珠粒。

2. 根据权利要求1所述的不透射线的水凝胶珠粒,其中所述含碘化合物是碘化苄基醇或苯基醇或是碘化苯甲酸。

3. 根据权利要求1所述的不透射线的水凝胶珠粒,其中所述含碘化合物是2,3,5-三碘苯甲酸。

4. 根据权利要求1所述的不透射线的水凝胶珠粒,其中所述水凝胶珠粒已经由具有醇羟基取代基或酰基衍生物的聚合物预形成。

5. 根据权利要求1所述的不透射线的水凝胶珠粒,其中所述水凝胶珠粒由交联的聚乙烯醇预形成,所述交联的聚乙烯醇已经通过烯基不饱和聚乙烯醇大分子单体与烯基不饱和共聚单体共聚形成。

6. 根据权利要求5所述的不透射线的水凝胶珠粒,其中所述烯基不饱和聚乙烯醇大分子单体具有侧链烯基,是由与N-丙烯酰氨基乙醛缩二甲醇反应,与相邻羟基的氧原子发生环缩醛交联形成的。

7. 根据权利要求1所述的不透射线的水凝胶珠粒,其中所述水凝胶珠粒包含用N-甲酰基甲基丙烯酰胺部分缩醛化的聚乙烯醇与2-丙烯酰胺基-2-甲基丙烷磺酸钠盐的共聚产物。

8. 根据权利要求1所述的不透射线的水凝胶珠粒,其进一步包含所述不透射线的水凝胶珠粒内吸收的药理学活性剂。

9. 根据权利要求8所述的不透射线的水凝胶珠粒,其中所述药理学活性剂是抗血管生成或化学治疗药物。

10. 根据权利要求8所述的不透射线的水凝胶珠粒,其中所述药理学活性剂是阿霉素。

可成像栓塞微球

[0001] 本发明申请是基于申请日为2014年3月14日,申请号为201480024766.1(国际申请号为PCT/US2014/027395),发明名称为“可成像栓塞微球”的专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及一种可成像栓塞微球,特别是,不透射线的微球,即具有阻断或衰减辐射的特性,诸如X射线。所述微球具有特别有用的放射学特性,并且可以被用于在医疗过程中实时或接近实时的增强X射线图像。可成像的微球特定应用于血管的栓塞,且无添加附加造影剂的要求。此外,可成像的微球可装载治疗剂以提供局部药物递送至栓塞的点,使它们对化疗栓塞过程特别有用。

背景技术

[0003] 作为动脉密封剂和作为补胎剂,栓塞微球(或珠粒)可用于各种应用,如闭塞性血管和其他血管,如输卵管,充填动脉瘤囊。血管栓塞因多种原因而表现,比如减少血流量以促进肿瘤萎缩,例如在肝中,减少血流量并诱发子宫肌瘤萎缩,用于治疗血管畸形,如动静脉畸形(AVMs)和动静脉瘘(AVFs),以进入动脉瘤囊密封内漏,停止无法控制的出血,或手术之前减缓出血。

[0004] 化疗栓塞或化疗栓塞治疗,是指提供机械堵塞和高度局部,原位,治疗剂的递送,常用的化疗药物的组合。在实体瘤的治疗中,化疗剂作为栓塞的一种附属物。这是特别有利的,因为药物直接递送至肿瘤同时最小化对药物的全身性暴露。

[0005] 虽然化疗栓塞已经被证明在改善生存率方面是有效的,该过程的一个缺点是在可视化中的困难,在实时中,载药微球的施用确保了在靶部位的精确运送。可视化栓塞粒子的能力是非常重要的,不仅在监测注射和沉积到栓塞的血管部位方面,而且对临床随访监测栓塞的影响、并确保栓塞性和在所需位置的药物保持以及确定进行进一步的治疗存在风险的区域是非常有用的。

[0006] 射线不透性一般通过使用固有不透射线的栓塞材料或通过用不透射线的材料混合非不透射线的栓塞颗粒提供。

[0007] 碘化聚乙烯醇(I-PVA)是一种粘性液体形式的不透射线的栓塞材料,其在水性条件如那些在体内遇到的条件下析出。然而,使用沉淀液体的栓塞是不可再现的并且总有沉淀发生在目标区域外的不希望的位置的危险。

[0008] 造影剂是固有的不透射线的。常见的造影剂包括乙碘油,例如Ethiodol®(法国加柏股份公司;以商标名Lipiodol®在欧盟销售)。Ethiodol是由约40%的碘化罂粟种子油(以重量计40%碘)组成的碘化油状X射线造影介质。

[0009] Ethiodol®可以直接用作栓塞剂。由于其粘滞性,乙碘油趋向于在毛细血管床积聚和减慢血流速度。因此,它已经被描述为“微栓子”。然而,这样的使用是被美国食品药品监督管理局禁忌的,并且,在任何情况下,它不能提供栓塞的可再现水平。其结果是,在使用乙碘油的栓塞之后,通常是用颗粒或微球进行常规栓塞。

[0010] 然而,造影剂,如Ethiodol[®],被经常与栓塞颗粒混合以赋予对可注射组合物的射线不透性。然而,这样的组合物往往是不稳定的,因为栓塞粒子的水性悬浮液和油状造影剂的不同物理性质。这意味着,注射组合物需要注射前立即制备。甚至给药后,然而,是造影剂可视而非栓塞粒子并且造影剂和栓塞颗粒可以不驻留在组织中相同的位置。

[0011] EP1810698描述了一种用于形成稳定的不透射线的栓塞珠粒的方法,其中PVA水凝胶栓塞珠粒装载有碘化油以使它们不透射线。在EP1810698描述的方法中需要珠粒干燥或被干燥以便从任何多余的额外颗粒载液中回收油负载的珠粒之前用碘化油装载,在含水存储液体中溶胀珠粒并通过加热到至少90°C的温度消毒所述珠粒。

[0012] 在EP1810698的过程中,最终产品通过有水存在的加热过程灭菌是一个重要步骤。灭菌是通过加热到适当升高的至少90°的温度实施的,但优选在压力下高于100°C的温度。据透露,非透射油在约120°C的温度下进行的优选的减压灭菌条件下不会被不利影响。但是,这种方法不提供控制造影剂从所述珠粒的溶出,也没有考虑造影剂在装载时和药物洗脱的影响。

[0013] W02011/110589描述了碘化聚(乙烯醇)通过碘苯甲酰氯由酯键接枝到与聚(乙烯醇)的合成。虽然这种聚合物被证明是不透射线的,它导致其后水不溶性聚合物不能通过通常用于产生具有期望的栓塞性的水凝胶微球的油包水聚合法过程形成微球。同样的出版物中提到了微球,但没有揭示如何实现这一点。本申请人已经发现,用这种方法碘化原料PVA聚合物导致由于所得到的碘化的聚合物的疏水性,该碘化的聚合物不能通过油包水的聚合形成微球。

[0014] Mawad等人(生物大分子2008,9,263-268)也描述了PVA类降解水凝胶中共价结合的碘被引入到聚合物主链,以使所述聚合物不透射线的化学修饰。碘是通过用4-碘代苯酰氯与聚乙烯醇上0.5%的悬垂醇基反应而被引入。所得到的聚合物是可生物降解的,通过沉淀栓塞,并且不形成微球。

[0015] 因此,对于结合了栓塞效率和栓塞珠粒的再现性的不透射线的栓塞显然有需要,该栓塞珠粒具有造影剂如乙碘油的射线不透性。射线不透性(或放射密度)可根据亨斯菲尔德标度进行定量,亨斯菲尔德标度原则的核心是X射线计算机断层扫描(CT扫描)应用程序。在亨斯菲尔德标度中,蒸馏水为0菲尔度单位(HU)的值,而空气被指定为-1000HU。除了良好的射线不透性,这样的栓塞珠粒将理想地具有使负载药物有效装载和洗脱的化疗栓塞过程可被确信监测的特性。

发明内容

[0016] 申请人已经确定,通过利用相对简单的化学,有可能后期处理预先形成的水凝胶微球以使它们永久地不透射线,而不对微球的物理性质产生不利影响(即大小,球形,高含水量,溶胀性和可压缩性),使得他们适合栓塞。不透射线的微球比形成它们的非不透射线的珠粒具有相同的,或更好的,载药量和溶出性质。所述微球的射线不透性也是永久的或足够长寿命的,以允许临床跟进监测。预形成珠粒的后处理以制造的方式提供了一定程度的灵活性,相同的制造工艺可用于不透射线和非不透射线的珠粒,并且大小选择或筛选能提至后处理之前,因此只有特定尺寸或尺寸范围的珠粒可被制为不透射线的。

[0017] 因此,在第一方面,所述本发明提供一种活性的水凝胶珠粒已朝着与羰基二咪唑

或碳化二亚胺亲核取代反应活化的。活化珠粒的特征在于,预先形成的水凝胶珠粒已由羰基,羰基或碳化二亚胺的类似物的反应激活。

[0018] 羰和羰基的类似物是N-酰基咪唑,是行之有效的试剂,如碳化二亚胺,传统上用来提供特定的和实际的偶联羧酸,胺和醇。碳化二亚胺(或聚碳化二亚胺)包括选自由下式组成的官能团: $RN=C=NR$ 。典型的碳化二亚胺包括N,N'-二异丙基("DIC"),1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐,("EDC"或"EDAC"),N',N'-二环己基,("DCC")。羰基二咪唑是碳化二亚胺的可选试剂,它执行类似的功能,尽管它们对水分敏感。羰基类似物已在文献中报道,包括carbonylditriazole变体(贝尔曼,H.C.,荷兰皇家化学学会的荷兰高校化学工程纲要化学荷兰(1961)80,1372)和其他变体(阿姆斯特朗,A.在有机合成试剂百科全书,帕克特,洛杉矶版;威利:奇切斯特,英国(1995年);P1010)。

[0019] 本文所用的水凝胶是指交联的亲水聚合物链的超吸收网络,其能够吸收相当于自身质量的非常大量的水。水凝胶可以含有多达99.9%的水。典型的水凝胶是多羟基的聚合物,如乙烯醇,聚丙烯酸酯聚合物,如聚丙烯酸或聚甲基丙烯酸酯的聚合物和任何这些聚合物的共聚物。

[0020] 水凝胶珠粒的活化被认为通过整个松散的水凝胶网络的悬垂羧酸,胺或羟基部分与亲核攻击激活水凝胶聚合物的活化剂反应而发生。

[0021] 特别是,从多羟基聚合物如聚乙烯醇(PVA)或乙烯醇的共聚物制成的水凝胶珠粒是特别有用的,并很容易通过聚合物网络的侧链羟基部分与活化剂如羰基的反应激活。改性PVA水凝胶,拥有1,2-二醇和/或1,3-二醇结构的聚合物主链是特别有用的,因为二醇基团与丙烯酸及类似的单体交联以提供高的水含量,可压缩微球具有良好的栓塞性。这种类型的特别优选的聚合物水凝胶是一种丙烯酰胺的PVA(聚乙烯醇用N-甲酰基甲基丙烯酰胺部分缩醛化)用丙烯酸类单体,如2-丙烯酰氨基-2-甲基丙烷磺酸(AMPS)共聚。这样的PVA-AMPS水凝胶珠粒商业可购(栓塞珠粒®,LC Bead™,DC Bead®生物相容产品(英国)有限公司)。

[0022] 活化珠粒由在合适的有机溶剂中悬浮预先形成的珠粒直到它们溶胀而制成。极性非质子溶剂,如二甲基亚砷(DMSO),四氢呋喃(THF),乙酸乙酯(EtOAc),丙酮($CH_3-C(=O)-CH_3$),二甲基甲酰胺(DMF)和乙腈(MeCN)中)是合适的溶剂。DMSO由于其溶胀水凝胶珠粒的能力和其与宽范围的有机溶剂及水互溶而被优选。活化剂,如羰基,随后被加入到溶剂中的溶胀的珠粒悬浮液,在催化量的碱的存在和无水条件下达到活化。碱典型地是中等强度的(共轭酸的pKa在10-13左右)并且合适的碱将是有机化学公知的以及将包括各种吡啶类,胺类和含氮杂环,三乙胺,N,N'-二异丙基乙胺,DMAP及其类似物。该反应通常在微热(30-80℃)24小时下进行,尽管这可以用本领域常规的做法进行改变以改进反应时间。反应完成后,活化的珠粒可以被简单地过滤和用有机溶剂清洗,以提供纯化的活化珠粒。

[0023] 活化的珠粒是稳定的,是特别有用的,因为它们很容易受到亲核取代反应,其可用于以受控的方式官能化珠粒,以提供已共价结合其整个网络的水凝胶珠粒,不透射线的材料,以及使整个珠粒呈现射线不透性。

[0024] 因此,在第二方面,本发明提供了一种不透射线的水凝胶珠粒包含权利要求1至5中任一项所述的活化水凝胶珠粒结合由活化珠粒的咪唑或二酰亚胺功能性反应的碘化化合物。不透射线的水凝胶珠粒通过上述活化水凝胶珠粒与碘化有机材料的反应形成。以这

种方式,所述珠粒包含共价结合到水凝胶珠粒的聚合物网络的碘化化合物。典型地,碘化材料是一个碘化的芳基化合物,但不是任何对活化珠粒的咪唑或二酰亚胺官能度反应的碘化化合物(根据情况,取决于所选活化化学反应)是合适的。

[0025] 因此碘化醇,碘化胺或碘化羧酸都是合适的反应物,用于使活化珠粒不透射线。碘化醇,尤其是,碘化芳基醇如三碘苯甲醇或三碘醇因为相对高的可碘化度又同时保留对活化珠粒的反应性的适当水平而特别合适。

[0026] 在一个特别优选实施方案中,不透射线的水凝胶珠粒为如上所述的活化的PVA或PVA-AMPS水凝胶结合2,3,5-三碘苯甲醇。以这种方式修饰的珠粒有良好水平的射线不透性,同时保持保证它们在化疗栓塞中使用的物理性质如大小,可压缩性和药物装载效率。

[0027] 活化珠粒与碘化材料的反应是特别有用的,因为它可以在单个反应容器中进行,珠粒,或活化的珠粒活化后立即按上述方法制备,可以被过滤,用溶剂冲洗然后立即加入到一个含有碘化材料如三碘苯甲醇的容器中,在合适的无水溶剂中和碱的存在下进行。如上所述,该反应通常在搅拌下进行,在微热(30-80°C)下进行24小时或更少。所得的不透射线的珠粒是稳定的,并且可以通过过滤分离和用溶剂洗涤。珠粒保留水凝胶珠粒的特点并且反应溶剂可换为水,此时珠粒吸收其特性的高量的水或注射用的水量。

[0028] 根据第二方面的方法制备的不透射线的珠粒的尺寸可以通过选择大小或在初始活化步骤中激活的预成形珠粒尺寸的范围,和所得到的不透射线的珠粒尺寸来控制,尽管可能是较小的,然而在反应后不显著改变。然而,如果需要的话,一个窄的尺寸范围可以通过筛分或选择性地过滤所得的不透射线的珠粒而选出。在这种方式中,提供了精确校准透射线的珠粒,其可被直接用于栓塞过程或可以装载有化疗药物,如阿霉素,依立替康,表阿霉素及其类似物。

[0029] 然而,本领域技术人员应当理解,一旦活化的水凝胶珠粒已经制备,聚合物网络中高度的选择性是可得,其中主要是不反应的,这样,其他化学物质可能通过定制并控制不透射线的碘化化合物如何共价结合到水凝胶网络。例如,活化的珠粒可进一步官能化以使其具有化学性,除了那些用标准的碳二亚胺或亲核取代的carbonyldimidazole可得的化学物质。例如,反应性间隔物或连接体分子可以接枝到活化的水凝胶珠粒,只要其具备至少一种功能(即官能团),其对活化珠粒的活化的酰亚胺或咪唑功能是反应性的。间隔基或连接分子之后具有使进一步反应以使珠粒不透射线的第二功能。发明人发现这在定制珠粒化学例如考虑到可能阻碍激活珠粒的直接反应的空间位阻效应中是特别有用的。

[0030] 因此,在第三方面,本发明提供一种反应性的水凝胶珠粒包含上述活化水凝胶珠粒并具有结合到其酰亚胺或咪唑官能团,包括具有至少2个碳的脂族碳链的双官能连接体。双官能连接体的官能团优选,但不是必需,位于所述接头的末端。双官能连接体,其特征在于所述接头的一个官能团必须是活化珠粒,而且,优选两个官能团都是与酰亚胺或咪唑有反应活性的,以能够进一步反应。因此,反应性的水凝胶珠粒通过简单地活化水凝胶珠粒的反应而形成,如上所述制备,通过包括两个官能团都与酰亚胺和/或咪唑反应的具有至少2个碳的脂族碳链的双官能团制备形成。在一个优选结构中,接头的官能团都在分子的末端。

[0031] 为了保留使用进一步的激活策略的能力,功能性或双官能连接体的反应性部分方便地包括一个或多个胺,羧酸和醇。在一个优选的实施方案中,这两个部分是相同的,并且特别优选的是双官能连接体是通式 $H_2N(CH_2)_nNH_2$ 的二氨基烷烃化合物,其中n包括2和20之

间的任何数目。优选在脂族碳链的碳原子数为2至10之间的碳数,理想的在2和4个碳原子之间。

[0032] 一个第三方面的特别的实施例提供了包含上述反应性的水凝胶珠粒且具有通过双官能连接体共价偶联的不透射线水凝胶珠粒,碘化化合物。便利地,不透射线的水凝胶珠粒由反应性水凝胶珠粒(即共价连接到所述珠粒的连接体的反应性末端)进一步活化而形成,随后用碘化的化合物使该珠粒不透射线。通过这种方式,相同的激活化学反应可以利用两次:首先通过与双功能连接体反应激活预成型的水凝胶珠粒;第二,通过与碘化的化合物反应激活双官能连接体的末端。再一次,优选的双官能连接体是脂族的二氨基烷烃连接基,如1,3-二氨基丙烷。活化末端胺后,珠粒,通过其连接体,是对碘化醇,胺或羧酸有反应活性的。在本实施例中,优选碘化材料是碘化苄基或苯基醇或是碘化苯甲酸,如2,3,5-三碘苯甲酸。2,3,5-三碘苯甲酸在本实施例中是特别优选的。

[0033] 通过在相对惰性的栓塞水凝胶珠粒上进行活化化学反应,本发明人已经生产了一种不透射线的水凝胶珠粒,其特征在于预先形成的水凝胶珠粒上的官能团已经被含碘的化合物反应。该含碘的化合物适宜的是碘化苄基或苯基醇或是碘化苯甲酸,如2,3,5-三碘苯甲酸。该化学反应在已经从交联的聚乙烯醇预形成的水凝胶珠粒上效果特别好。如此交联的PVA的具体实例在W02004/071495中有描述,其描述了一种水凝胶珠粒,形成于交联的聚乙烯醇,而交联的聚乙烯醇本身,已经通过共聚合烯属不饱和聚乙烯醇大分子单体与乙烯不饱和共聚单体形成。包括侧链烯基团的大分子单体通过环状缩醛键与来自相邻羟基的氧原子交联,由N-acrylaminoacetaldehyde二甲基乙缩醛和烯属不饱和共聚单体的反应形成,是2-丙烯酰胺-2-甲基丙磺酸钠盐。如在本段落中所述的不透射线的珠粒形成本发明的第四方面。

[0034] 在第五方面,本发明提供如上所述的不透射线的水凝胶珠粒,其包含珠粒内吸收的药理学活性剂。优选的是药理活性珠粒是抗血管生成或化学治疗药物,如本领域中所公知的。特别合适的药物类别是蒽环类抗生素,如阿霉素,柔红霉素,表柔比星和伊达比星,喜树碱和喜树碱类似物,例如伊立替康。其他特别合适的药物包括雷帕霉素,紫杉醇,布洛芬,顺铂,舒尼替尼,血管抑素KL-3,血管生成抑制因子,DL- α -二氟甲基鸟氨酸,烟曲霉素,染料木黄酮,星形孢菌素,沙利度胺,肿瘤抑素,阿西替尼,硼替佐米,波舒替尼,吉非替尼,帕唑帕尼,司马沙尼,索拉非尼,凡德他尼,瓦他拉尼,卡奈替尼,多韦替尼,达沙替尼,厄洛替尼,伊马替尼,拉帕替尼,马苏替尼,穆比替尼,来他替尼,帕唑帕尼,坦度替尼和维莫德吉。

[0035] 上述的不透射线的珠粒在栓塞或化疗栓塞过程中特别有用。因此,在第六方面,本发明提供如本文所述的不透射线珠粒施用于患者,以栓塞实体瘤的治疗方法。

[0036] 珠粒的固有不透射线性能意味着临床医生可以在给药期间和之后自信地形成图像,图像是代表珠粒本身,而不是异质造影剂。在特定实施例中,不透射线珠粒配制和在组合物中给药,组合物进一步包含传统的造影剂,如乙碘油。这个实施例是有利的,因为两个离散的不透射线的材料的组合给出临床医生对组合物和该组合物内的栓塞珠粒进一步的辨别力。因此,本发明更进一步的方面提供了通过在患者的血管中施用如上所述不透射线的水凝胶珠粒和使用X射线在组织中检测所述珠粒的存在来监控栓塞过程的方法。

附图说明

[0037] 现在本发明将通过举例的方式来描述,参照以下附图,其中:

[0038] 图1示出在活化前(A)预形成的水凝胶珠粒的大小和外观,和根据实施例2中描述的反应制备(B)的可成像珠粒。

[0039] 图2显示了临床的CT。(A)和根据实施例1的反应制备的可成像珠粒的显微CT图像(B)。

[0040] 图3A示出了按照实施例5制备的可成像珠粒光镜图像。图3B示出与实施例6中所述用阿霉素装载后相同的小珠。

[0041] 图4A示出了根据实施例5(A)制备的不透射线的珠粒在3.1%,6.2%和12.5%填充的珠粒体积的临床CT显微照片。图4B示出琼脂糖幻影为3.1%填充的珠粒体积的微CT图像。图4C示出了珠粒已经装载有盐酸阿霉素的相同珠粒体积的微CT图像。

[0042] 图5示出100-300微米珠粒按照实施例8中描述的碘化反应后过筛的显微照片。

[0043] 图6示出根据实施例8制备的碘化的珠粒大小在(A)70-150微米,(B)100-300微米,(C)300-500微米,和(D)500-700微米的范围的微CT图像。

具体实施方式

[0044] 实施例中使用的材料和方法

[0045] 材料

[0046] 如W02004/071495中实施例1所述的方法制备的磺酸盐改性的聚乙烯醇AMPS微球(LC/DC-Bead™,生物相容产品(英国)有限公司)。无水二甲亚砜(DMSO),1,1'-羰基二咪唑(CDI),2,3,5-三碘苯甲醇,2,3,5-三碘苯甲酸,N,N'-二异丙基(DIC),1-羟基苯并三唑水合物(添加HOBt),4-(二甲氨基)吡啶(DMAP),1,3-二氨基丙烷,三乙胺(三乙胺),和无水二氯甲烷(DCM)于西格玛奥德里奇公司购得。多柔比星(阿霉素)从贝德福德实验室获得。从密理博纯化系统获得的去离子水(DI水)。

[0047] 通用方法

[0048] PVA-AMPS水凝胶珠粒的形成

[0049] 微球合成的第一阶段涉及水凝胶材料Nelfilcon B—一种来源于广泛使用的水溶性聚合物PVA的可聚合大分子单体的制备。Mowiol 8-88的聚(乙烯醇)(PVA)粉末(88%水解,12%酯含量,平均分子量约67,000D)(150克)和(美国北卡罗来纳,夏洛特,科莱恩)加入到一个2升的玻璃反应容器中。温和搅拌下,加入1000ml水并且搅拌增速至400RPM。为了确保PVA的完全溶解,将温度升高到 $99 \pm 9^\circ\text{C}$ 下进行2-3小时。在冷却到室温时将N-acryloylaminoacetaldehyde(NAAADA)(德国视康)(2.49克或0.104mmol/克的PVA)混入到PVA溶液,然后加入浓盐酸(100ml),其催化NAAADA通过酯交换到PVA上的加成。将反应在室温下进行6-7小时,然后通过用2.5M氢氧化钠溶液中和pH至7.4停止反应。所得氯化钠和任何未反应的NAAADA通过使用层叠有具有切断为3000的分子量的孔径的 $0.1\mu\text{m} < 163 > 2 < / 163 >$ 的纤维素膜的不锈钢Pellicon2微型固定器(美国马萨诸塞,贝德福德,密理博公司)渗滤除去。完成后,将大分裂球溶液浓缩至20-23%固含量并在 25°C 时具有1700-3400cp的粘度。

[0050] 水凝胶微球通过悬浮聚合法合成,其中包括该改性PVA大分子单体的水相被加入到含有2-丙烯酰胺基-2-甲基丙烷磺酸(AMPS)的不混溶的有机相,并迅速混合,以使得水相

被分散形成液滴,其尺寸和稳定性可通过搅拌速率,粘度,水/有机相的比率以及稳定剂和影响相之间的界面能的表面活性剂的使用来控制。将所得的水凝胶微球通过过滤和洗涤回收,并且可以筛分,以提供特定的尺寸范围。除非另有说明,预成型的水凝胶珠粒直径为300-500 μm 。

[0051] 可成像珠粒的显微镜评价

[0052] 在合成的各个步骤和阿霉素装载过程中检查珠粒的大小以及外观,并拍摄了一室内幻灯片(电子显微镜科学;~150 μL 珠粒和去离子水悬浮液)。亮场图像由配备了彩色CCD照相机(金相软件,蔡司)的正置显微镜上的5倍物镜(蔡司,金相显微镜M1,索恩伍德,纽约)中获得。

[0053] 幻影的制备

[0054] 为了评估射线不透性,珠粒悬浮在珠粒浓度(珠粒体积%)相关体内应用的琼脂糖基质中。含有不同浓度(珠粒体积百分比范围从0,3.1,6.2到12.5%)的琼脂糖幻影的珠粒(0.5%重量/体积)是通过加入1%的琼脂糖混合物至有等体积珠粒悬浮的去离子水中。混合溶液的同时允许琼脂糖凝胶缓慢(在冰上),产生均匀分布的珠粒。珠粒体积百分比是由于单独重力和不考虑填充珠粒之间填充的水溶液的珠粒体积或改变的珠粒填料效率。

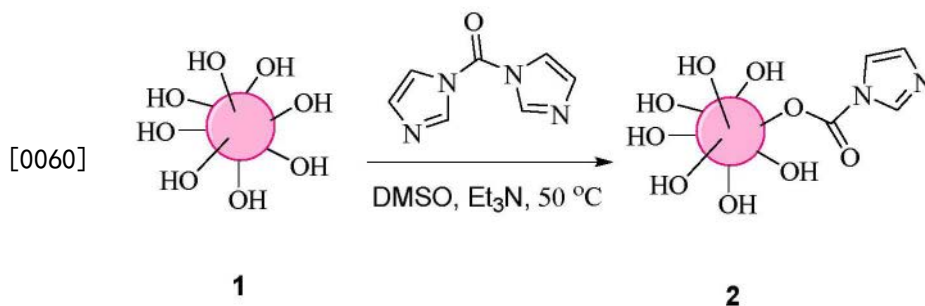
[0055] 可成像珠粒的临床CT体外评价

[0056] 不透射线的微球内的钆碘造影剂的分布成像到临床256切片CT(飞利浦,马萨诸塞州安多弗),以确定使用以下设置的整体衰减:465mAs的管电流,80千电子伏管电压,1mm厚,0.5毫米重叠。给出模型的中间薄片的80mm²矩形区域的平均衰减通过OsiriX检测

[0057] 通过显微CT检测的可成像珠粒的体外评价

[0058] 显微CT成像以及可成像珠粒的分析包括:SkyScan1172高分辨率显微CT(Sk+D232yscan,Konitch,BE)模型成像以诊断/评价每个珠粒的不透性,以及珠粒内部的碘分布。使用0.5mm的铝过滤器将不透性微球在5 μm 分辨率,78kV,127微安条件下成像。每个珠粒的平均衰减作为平均数和标准误差被测量和报告。

[0059] 实施例1可成像栓塞珠粒的制备通过将2,3,5-三碘苯甲基醇引入以形成聚乙烯醇-2-丙烯酰胺-2-甲基丙磺酸水凝胶栓塞珠粒。

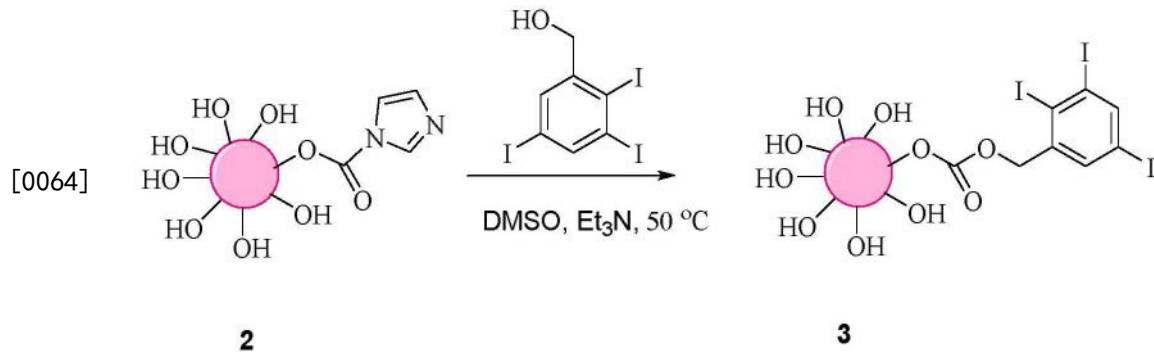


[0061] 方案I

[0062] 预形成的聚乙烯醇基水凝胶栓塞珠粒[方案1中描述的1]使用二甲基亚砜(3次X5毫升)洗涤(200毫克),珠粒在50 $^\circ\text{C}$ 下,允许在二甲基亚砜(20毫升)中溶胀30分钟。在催化当量的三乙胺存在的情况下,通过在50 $^\circ\text{C}$ 条件下通过羰基二咪唑(CDI)(800毫克)(CDI:OH的比例约为1.2:1)中搅拌悬浮珠粒24小时从而活化珠粒以得到被活化的珠粒。(方案II)反应混合物冷却到室温,并使用二甲基亚砜和二氯甲烷混合物快速洗涤,并最终使用二甲基

亚砷单独洗涤以获得被活化的珠粒[2]。珠粒在温和的条件下被成功活化珠粒储存在二甲基亚砷中以备用

[0063] 实施例2可成像栓塞珠粒的制备通过将2,3,5-三碘苯甲基醇直接引入以形成聚乙烯醇-2-丙烯酰胺-2-甲基丙磺酸水凝胶栓塞珠粒。



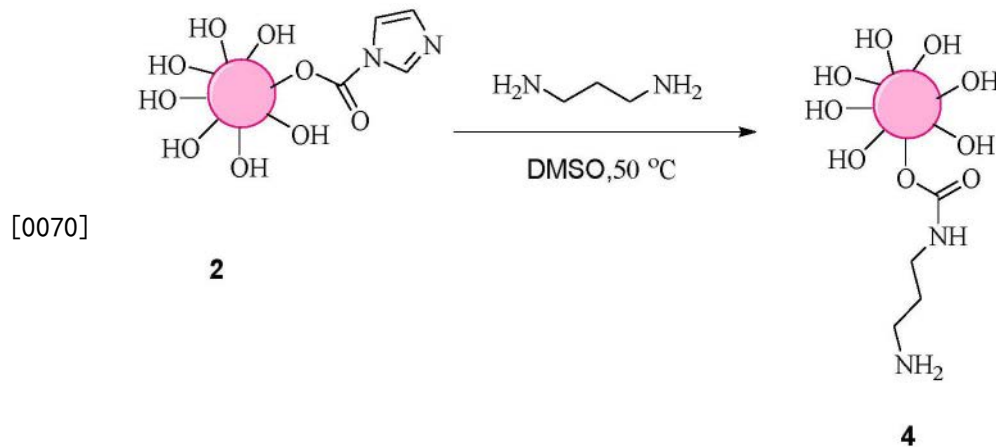
[0065] 方案II

[0066] 根据实施例1制备活化珠粒。活化珠粒立即转移到一个反应烧瓶中,烧瓶中含有溶于二甲基亚砷(10毫升)的2,3,5三碘苯甲基醇(971.7毫克)溶液,并在50°C下搅拌24小时。得到的产品在室温下冷却,先使用二甲基亚砷:二氯甲烷(1:1)混合溶液充分洗涤,然后单独使用二甲基亚砷洗涤。最后,使用去离子水置换二甲基亚砷,使用盐水和去离子水连续地充分洗涤可成像珠粒。清洗后的可成像珠粒分散在去离子水中直到进一步的分析。珠粒成功与2,3,5-三碘苯甲基醇偶联(如方案II中所示)预形成的水凝胶珠粒(活化之前)与珠粒和2,3,5-三碘苯甲基醇偶联之后的珠粒(可成像珠粒)的显微图像比较显示,可成像珠粒的尺寸略微减小,如图1所示,在光学显微镜下,珠粒可以更容易的被观察到。

[0067] 实施例3可成像水凝胶珠粒不透性的评估

[0068] 根据实施例2制备的可成像珠粒的射线不透性通过在临床上和显微CT进行评估,且在两种影像学技术下均为可视的。在临床CT上,可视化基于可成像珠粒在每个给定体积的琼脂模型上的射线不透性3.1%填充体积的可成像珠粒显示出 26 ± 15 HU(亨斯菲尔德单位)的平均衰减,而当填充体积分别增加到6.2%和12.5%时,平均衰减增加到 41 ± 16 HU and 74 ± 25 HU在显微CT中,单个珠粒显示为 952.3 ± 93.9 HU($n=10$)的平均衰减。图像展示在图2中

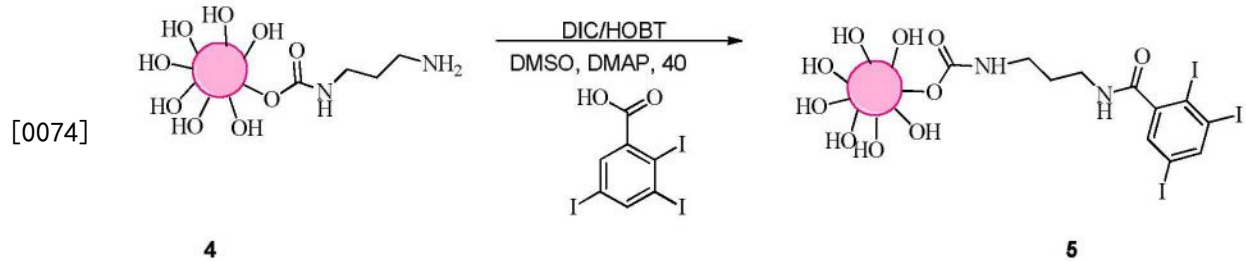
[0069] 实施例4氨基反应活化水凝胶珠粒的制备



[0071] 方案III

[0072] 根据实施例1制备的活化珠粒,与二胺基烷烃交联剂,1,3-二氨基丙烷反应,在50°C下混合24小时(方案III)。反应完成之后,反应混合物冷却并使用二甲基亚砜:二氯乙烷为1:1的混合溶液充分洗涤,随后使用二甲基亚砜洗涤得到氨基反应性水凝胶珠粒(如在方案III中描述的)[4]氨基反应珠粒显示出了阳极茛三酮响应,确认了末端伯胺基团的存在。

[0073] 实施例5由反应性的水凝胶珠粒制备可成像水凝胶珠粒



[0075] 方案IV

[0076] 2,3,5-三碘苯甲酸(2.4克)的二甲基亚砜(20毫升)溶液,用N,N-二异丙基碳二酰亚胺(DIC)(604.5毫克),1-羟基苯并三唑(634.2毫克)和4-二甲氨基吡啶(586.4毫克)在室温下活化30分钟,然后加入实施例4[4]中氨基反应性珠粒。得到的反应混合物在40°C下搅拌3天。冷却之后,可成像珠粒[5]使用二甲基亚砜/二氯甲烷混合溶液以及二甲基亚砜充分洗涤,最后,使用去离子水置换溶剂。不透射线的珠粒的光学显微镜图像见图3

[0077] 实施例6阿霉素装载到可成像珠粒

[0078] 将阿霉素装载在实施例5制备的可成像珠粒上,根据之前报道的方法(Lewis,A.L.等,Journal of Materials Science-Materials in Medicine 2007,18,1691)。简言之,在室温下,将250微升的用去离子水充分洗涤的珠粒浸没在0.5毫升阿霉素(20毫克/毫升)溶液中,振荡3小时。由图3B光学显微镜图像可以看出,装载在放射不透性珠粒上的阿霉素,似乎在尺寸上略有减少。

[0079] 实施例7可成像珠粒和装载药物的可成像珠粒的射线不透性

[0080] 实施例6和7制备的珠粒在临床和显微CT的评估射线不透性,或者射线密度在临床CT上,可视化基于可成像珠粒在每个给定体积上的射线不透性。3.1%填充体积的可成像珠粒显示出 129 ± 33 HU(亨斯菲尔德单位)的平均衰减,而当填充体积分别增加到6.2%和12.5%时,平均衰减增加到 269 ± 53 HU and 444 ± 83 HU这显示在图4A中。在显微CT中,单个“未负载”和负载阿霉素的珠粒分别显示出 7903.99 ± 804 HU($n=10$)和 11873.96 ± 706.12 的平均衰减。这相应的显示在图4B和4C。

[0081] 实施例8通过激活碘化苯甲酸制备不透射线的水凝胶珠粒。

[0082] 在反应容器中,将10克丙酮干燥的聚乙烯醇珠粒与200毫升无水二甲基亚砜混合,并在50°C下搅拌30分钟。接着,在氮气保护下,加入41.6克1,1'-羰基二咪唑和4.1毫升三乙胺到珠粒悬浮液中。在反应完成后,将温度降至室温,大约22°C。然后将200毫升无水二乙醚加入到反应混合物中并搅拌10分钟,然后除去溶剂。然后将活化的珠粒用二甲基亚砜和乙醚(1:1,体积/体积)混合溶液洗涤三次。活化珠粒的元素分析证实了通过1,1'-羰基二咪唑活化,羟基转化了大约30%。

[0083] 然后双功能交联剂接枝到活化珠粒上。在50°C下,活化珠粒悬浮于200毫升无水二甲基亚砜中,然后加入18.5克1,3-二氨基丙烷加入到珠粒的悬浮液。反应完成后,将反应容

器冷却至室温,将得到的珠粒用二乙醚和二甲基亚砷混合溶液洗涤三次,然后除去溶剂。

[0084] 在最后的步骤中,三碘苯甲酸活化的珠反应活化在圆底烧瓶中,将40克2,3,5-三碘苯甲酸(TIBA), (相当于初始的OH珠上1/3的浓度),溶解在100毫升无水DMSO中。然后通过加入13克1,1'-羰基二咪唑粉末活化该化合物,致使其稳定释放CO₂(在室温下),搅拌30-60分钟,溶液开始浑浊变粘。然后将混合物加入到100毫升二甲基亚砷溶解的活化珠粒悬浮液中在50°C下,悬浮液搅拌24小时,同时避免光照。最终,珠粒用乙醚和二甲基亚砷的混合液和去离子水洗涤。

[0085] 图5显示了得到的过筛之后的珠粒的光学显微镜图像图6显示了珠粒模型显微CT图像通过元素分析,真空干燥之后的珠粒的碘含量为42-45%。表1给出了测量的珠粒的固含量,碘含量和特征参数。

[0086] 实施例9温度对活化化学的影响

[0087] 作为比较,除了三个步骤中的反应温度为70°C、第三步骤中使用的三碘苯甲酸的量对应于珠粒上初始羟基的量的2/3以外,其他反应条件与实施例8相同。在这些更高温度条件下,珠粒显现了更加褐色的颜色。干燥后的珠粒的碘含量列于表1中,表明其偶联效果略有下降。珠粒进一步的在121°C下高压灭菌20分钟,消毒后未发现破坏或者降解。

[0088] 实施例10不透射线的珠粒的载药效率。

[0089] 通过加入2.87毫升阿霉素溶液(24.4毫克/毫升)到1毫升珠粒中(过筛,100-300微米),伴随偶尔的搅拌,测试根据实施例9制备的珠粒的载药量。24小时后,通过紫外分光光度法,在483nm波长下的测量溶液中残余的阿霉素的量,计算得到装载量为99.6%。

[0090] 实施例11珠粒的碳二亚胺偶联

[0091] 本实施例除了第三步中,在与三碘苯甲酸反应时使用替代的交联剂N,N-二异丙基碳二酰亚胺(DIC),且使用三碘苯甲酸与N,N-二异丙基碳二酰亚胺的量与珠粒上的初始羟基相匹配,其他的反应条件与实施例9相同。通过元素分析,最终干燥的珠粒的碘含量为17.7%,显示出较实施例8和9中观察到的较低的偶联率。

[0092] 表1碘含量和根据实施例8和9制备的不透射线的珠粒的射线密度

实施例编号/珠粒尺寸 (μm)	固含量 (%)	碘含量 (%)	显微 CT 衰减	
[0093] 4	70-150 μm	27.2	41.9	9758 \pm 1476
	100-300 μm	24.8	44.3	8037 \pm 1142
	300-500 μm	23.7	45.1	8243 \pm 1240
	500-700 μm	23.0	45.6	7326 \pm 773
5	70-150 μm	37.8	32.4	-
	100-300 μm	34.1	38.5	-
	300-500 μm	32.0	40.1	-

[0094] 本发明包括以下实施方式:

[0095] 1.一种活化的水凝胶珠粒,通过与羰基二咪唑或碳化二亚胺亲核取代反应活化。

- [0096] 2. 根据项1所述的活化的水凝胶珠粒,其中水凝胶包含多羟基聚合物,如,聚乙烯醇(PVA)或者乙烯基醇的共聚物。
- [0097] 3. 根据项1或2所述的活化的水凝胶珠粒,其中,水凝胶具有1,2-二醇或1,3-二醇结构的聚合物骨架以便能够与丙烯酸类单体发生交联反应。
- [0098] 4. 根据项3所述的活化水凝胶珠粒,其中所述丙烯酸类单体是2-丙烯酰氨-2-甲基丙磺酸(AMPS)。
- [0099] 5. 根据项1-4任意一项所述的活化水凝胶珠粒,其中,预形成的水凝胶珠粒表面和/或内部的羟基部分通过与N,N'-羰基咪唑反应被活化。
- [0100] 6. 一种通过亲核取代活化水凝胶珠粒的方法,包含以下步骤:(i) 将水凝胶珠粒悬浮于有机溶液中直至其溶胀,(ii) 在催化当量的碱和无水条件下,在悬浮的溶胀珠粒的溶剂中加入N,N'-羰基咪唑,碳化二亚胺,完成活化。
- [0101] 7. 根据项6所述的方法,其进一步包括步骤(iii),将活化的珠粒过滤并使用有机溶剂进行洗涤以获得纯化的活化珠粒。
- [0102] 8. 一种不透射线的水凝胶珠粒,包含项1-5任意一项中的活化水凝胶珠粒,其与含碘化合物交联,所述的含碘化合物与活化珠粒的咪唑或二酰亚胺官能团反应。
- [0103] 9. 根据项8所述的不透射线的水凝胶珠粒,其中所述的含碘化合物是含碘的醇,含碘的胺或含碘的羧酸。
- [0104] 10. 根据项8或9所述的不透射线的水凝胶珠粒,其中的含碘化合物是含碘的醇。
- [0105] 11. 根据项10所述的不透射线的水凝胶珠粒,其中所述的含碘的醇是三碘苯甲醇或者三碘苯基醇。
- [0106] 12. 根据项10所述的不透射线的水凝胶珠粒,其中所述的含碘化合物是2,3,5-三碘苯甲醇。
- [0107] 13. 一种反应性水凝胶珠粒,包含项1-5任一项所述的活化水凝胶珠粒以及与珠粒的酰亚胺或咪唑官能团交联的、具有至少2个碳原子脂肪族碳链的末端双官能团交联剂。
- [0108] 14. 根据项13所述的反应性水凝胶珠粒,其中末端双官能团交联剂的两个官能团均可以与酰亚胺或咪唑反应。
- [0109] 15. 根据项13-14所述的反应性水凝胶珠粒,其中双官能团交联剂的功能性或者反应活性包含一个或多个胺,羧酸或醇。
- [0110] 16. 根据项13-15所述的反应性水凝胶珠粒,其中所述的双官能团交联剂是二氨基烷烃。
- [0111] 17. 根据项16所述的一种反应性水凝胶珠粒,其中的双官能团交联剂具有通式 $H_2N(CH_2)_nNH_2$,其中n是位于2-20之间的自然数。
- [0112] 18. 根据项16所述的一种反应性水凝胶珠粒,其中n介于2-10个碳原子。
- [0113] 19. 根据项16所述的一种反应性水凝胶珠粒,其中n介于2-4个碳原子。
- [0114] 20. 一种不透射线的水凝胶珠粒,包含根据项13-19任一项所述的反应性水凝胶珠粒,通过双官能团交联剂与含碘化合物共价交联。
- [0115] 21. 根据项20所述的不透射线的水凝胶珠粒,其中所述的含碘化合物是含碘的醇,含碘的胺或含碘的羧酸。
- [0116] 22. 根据项20或21所述的不透射线的水凝胶珠粒,其中所述的含碘的化合物是2,

3,5-三碘苯甲酸。

[0117] 23.一种活化的放射不透性水凝胶珠粒,其预形成水凝胶珠粒包含官能团,与芳族含碘化合物反应的官能团。

[0118] 24.根据项23所述的不透射线的水凝胶珠粒,其中的含碘化合物是含碘的苯甲基或苯基醇,或是含碘的苯甲酸。

[0119] 25.根据项23或24所述的不透射线的水凝胶珠粒,其中含碘化合物是2,3,5-三碘苯甲酸。

[0120] 26.根据项23-25任一项所述的不透射线的水凝胶珠粒,其中的水凝胶珠粒由具有醇羟基取代基或酰基衍生物的聚合物预形成。

[0121] 27.根据项23-26任一项所述的不透射线的水凝胶珠粒,其中的水凝胶珠粒由交联的聚乙烯醇聚合物预形成。

[0122] 28.根据项23-27任一项所述的不透射线的水凝胶珠粒,其中的水凝胶珠粒由交联的聚乙烯醇聚合物预形成,所述的交联聚乙烯醇由乙烯基不饱和聚乙烯醇大分子单体与乙烯基不饱和共聚单体共聚形成。

[0123] 29.根据项23-28所述的放射不透性水凝胶珠粒,其中烯基不饱和聚乙烯醇大分子单体具有侧链烯基,是由与N-氨基乙醛缩二甲醇反应,与相邻羟基的氧原子发生环缩醛交联形成的。

[0124] 30.根据项23-29所述的不透射线的水凝胶珠粒,其中水凝胶珠粒包含用N-甲酰基丙烯酰胺部分缩醛化的聚乙烯醇与2-丙烯酰胺基-2-甲基丙烷磺酸钠盐的共聚物。

[0125] 31.根据项8-12或20-30任一项所述的放射不透性水凝胶珠粒,其包含吸收了药理活性试剂的珠粒。

[0126] 32.根据项31所述的放射不透性水凝胶珠粒,其中药理活性珠粒是抗血管增生或化学治疗的药物。

[0127] 33.一种栓塞血管化组织的方法,包括给予有需要的患者提供包含有项8-12或20-30任一项所述的放射不透性珠粒的组合物。

[0128] 34.根据项33所述的一种栓塞血管化组织的方法,其中所述血管化组织是增生组织或是实体瘤。

[0129] 35.根据项34所述的一种栓塞血管化组织的方法,其中所述的实体瘤是肝细胞癌。

[0130] 36.一种检测栓塞过程的方法,包括将项8-12或20-30中任一项所述的不透射线的水凝胶珠粒投入到病人的血管中,通过使用X射线检测珠粒在组织中的存在位置。

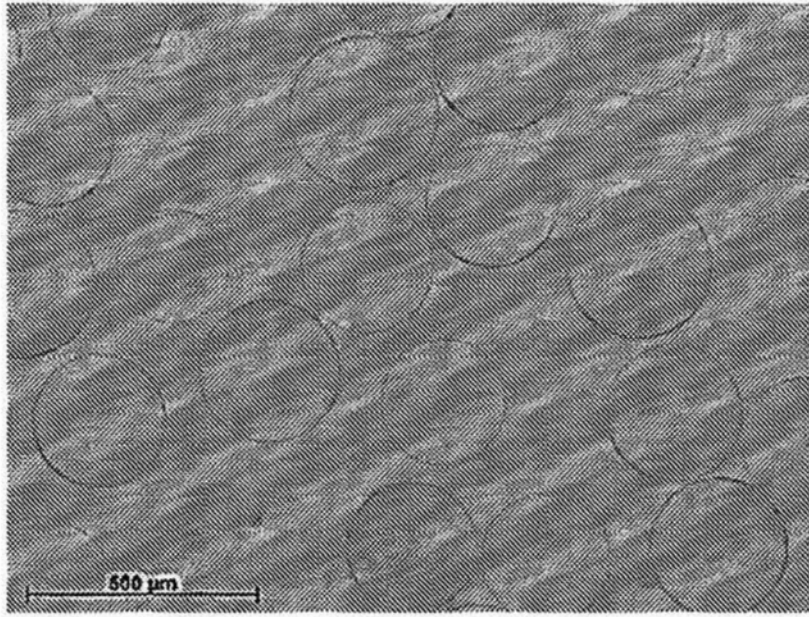


图1A

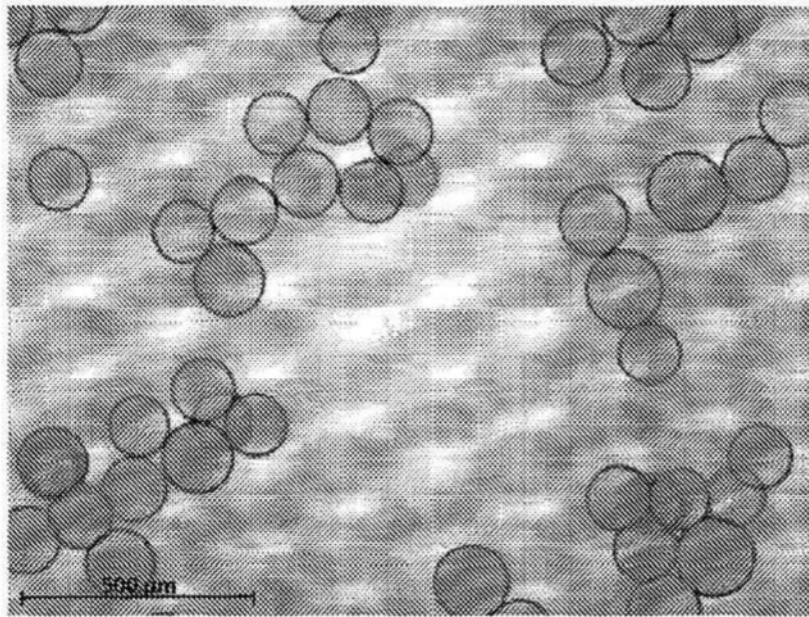


图1B

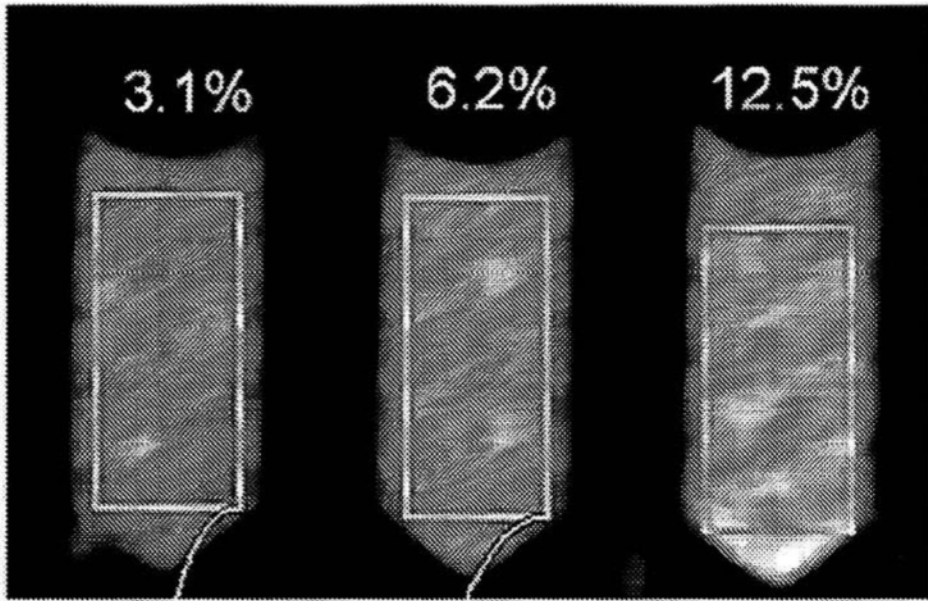


图2A

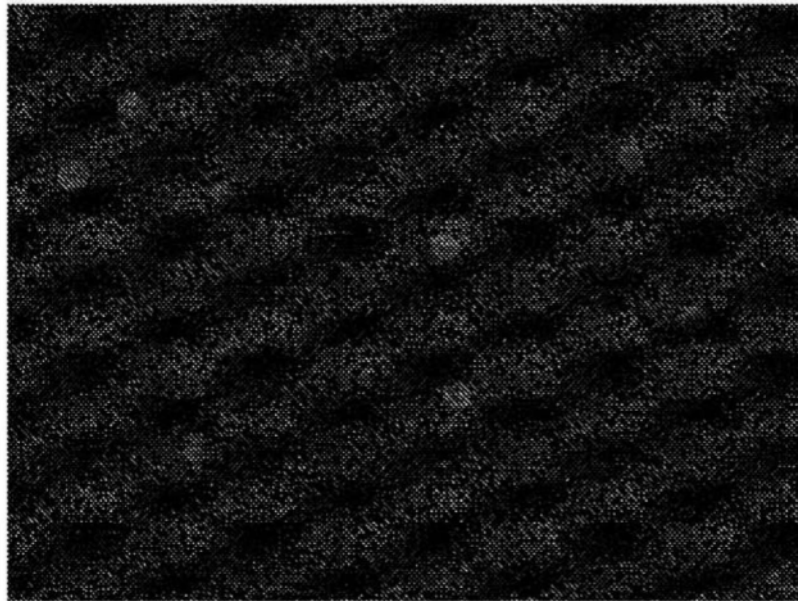


图2B

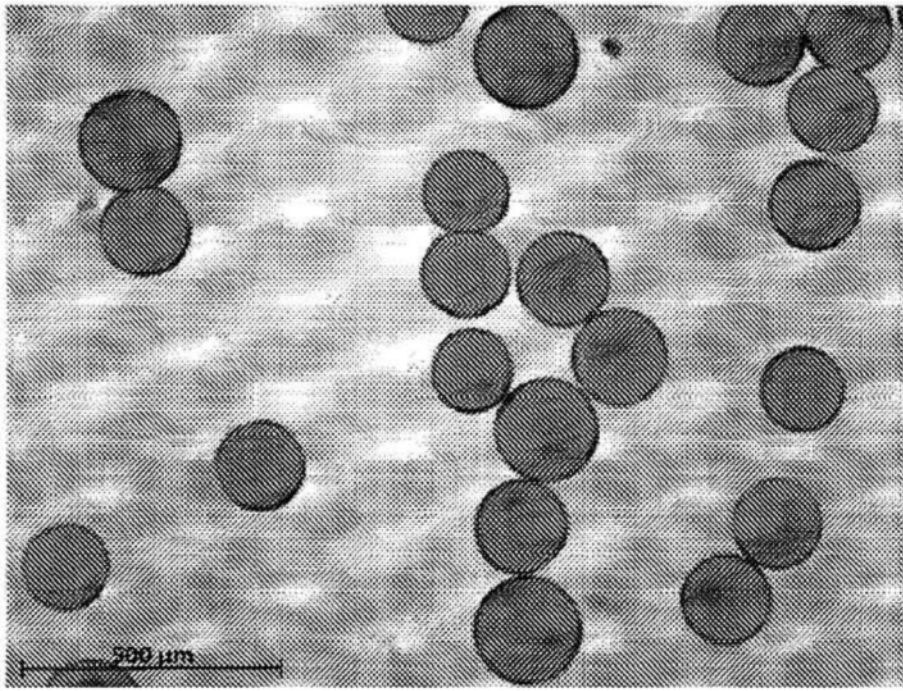


图3A

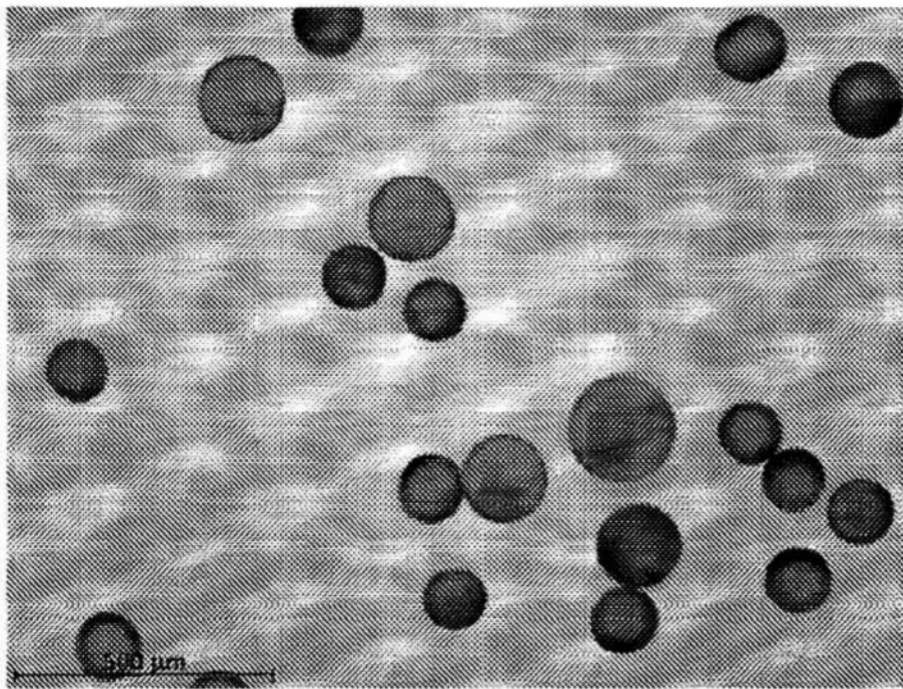


图3B

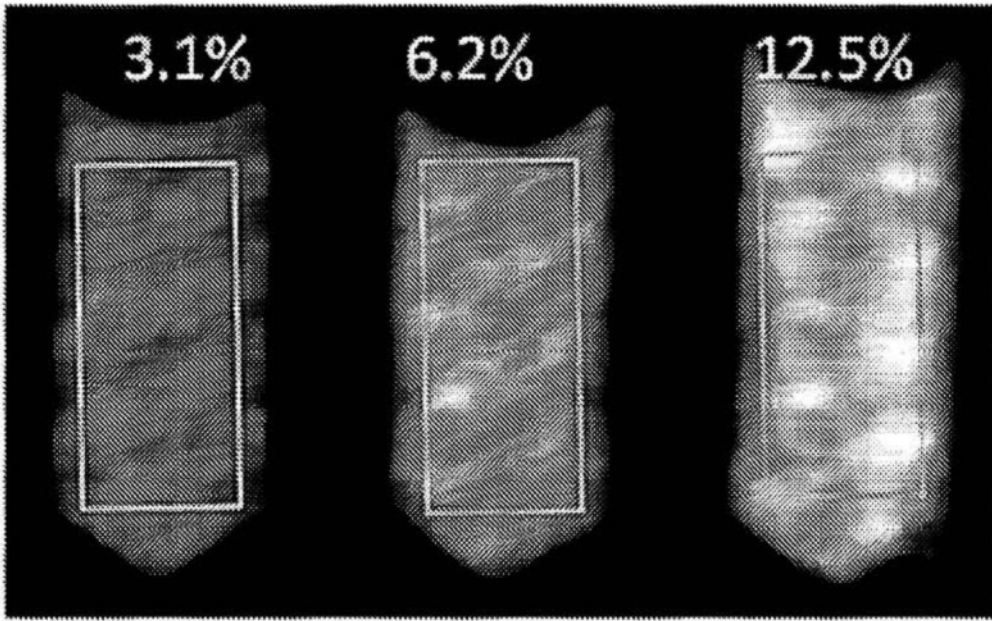


图4A

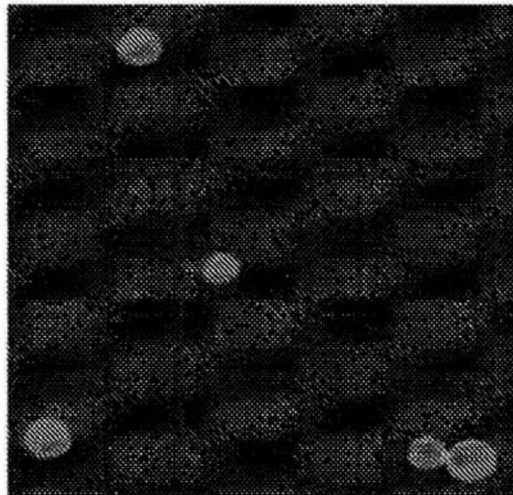


图4B

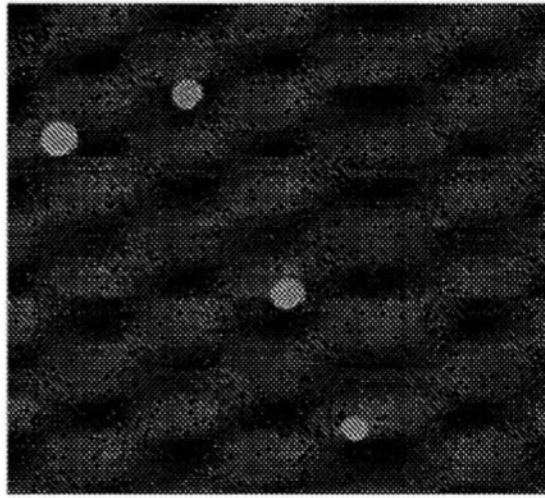


图4C

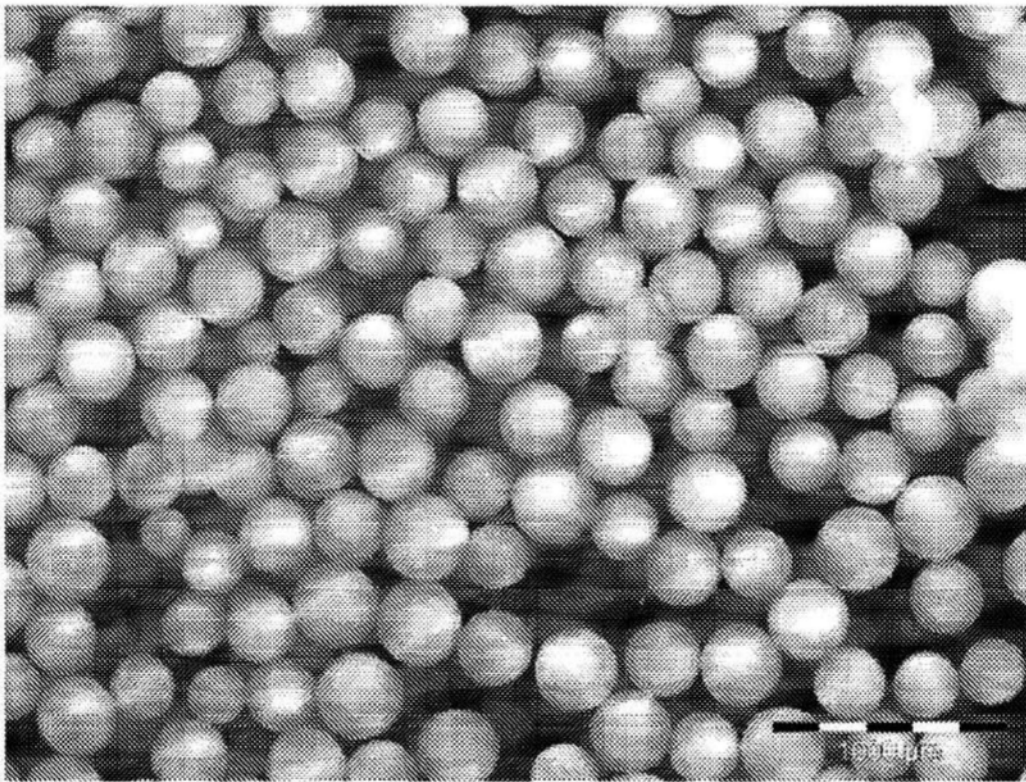


图5

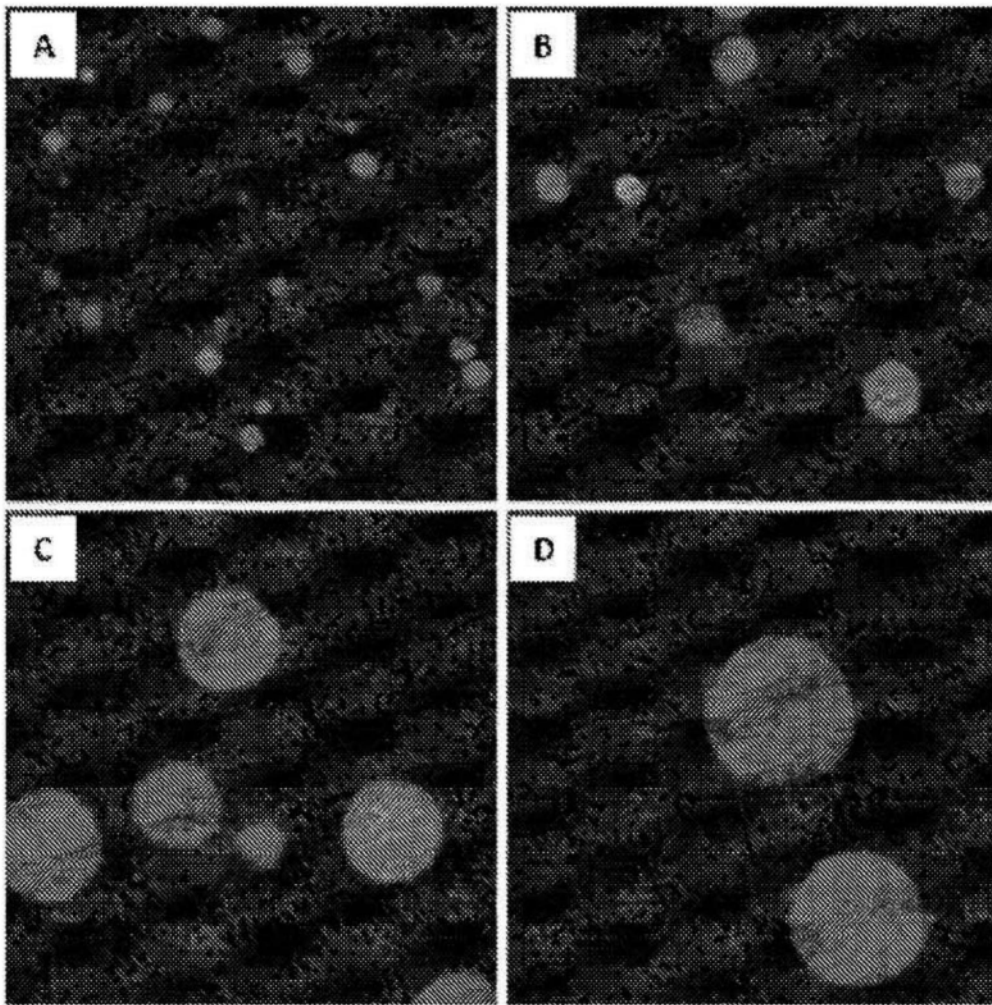


图6