



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104619310 A

(43) 申请公布日 2015. 05. 13

(21) 申请号 201380006011. 4

(22) 申请日 2013. 01. 17

(30) 优先权数据

61/588783 2012. 01. 20 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 07. 18

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/021903 2013. 01. 17

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/109732 EN 2013. 07. 25

(71) 申请人 免疫光子学公司

地址 美国密苏里州

(72) 发明人 托马斯·霍德 罗伯托·诺德奎斯特

陈伟 拉乌尔·卡鲁贝利

卢西亚诺·奥尔勒鲁佐

彼得·詹金斯 克里斯多佛·韦南特

约瑟夫·雷克

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 周齐宏 万雪松

(51) Int. Cl.

A61K 9/00(2006. 01)

A61K 31/715(2006. 01)

A61K 47/36(2006. 01)

权利要求书1页 说明书31页

(54) 发明名称

壳聚糖衍生组合物

(57) 摘要

与瘤(例如恶性肺肿瘤、甲状腺肿瘤和肾肿瘤, 以及其它类型的恶性肿瘤和其它疾病)的治疗方法结合使用的含有壳聚糖衍生成分的治疗组合物。糖化壳聚糖是壳聚糖游离氨基糖化作用(非酶糖基化作用)的产物, 随后通过还原反应使其稳定。糖化作用得到的壳聚糖具有有利的溶解度和粘度特性, 能促进衍生物与激光辅助免疫疗法的结合使用, 以及衍生物的其他应用。壳聚糖的糖化作用也提供了亲水性更强的壳聚糖, 由此, 与其它情况相比来说, 聚合物吸收和维持了更多的水。

1. 一种粘弹性糖化壳聚糖制剂,基本上由糖化壳聚糖聚合物组成,其中糖化壳聚糖聚合物的分子量为大约 50,000 道尔顿至大约 1,500,000 道尔顿,进一步地,其中壳聚糖聚合物的游离氨基的糖化程度在大约 0.1% 到大约 30% 的范围内。

2. 根据权利要求 1 的粘弹性糖化壳聚糖制剂,其中粘弹性糖化壳聚糖的分子量为大约 250,000 道尔顿,粘弹性糖化壳聚糖的甲壳素母体的脱乙酰度为大约 80%,并且壳聚糖的游离氨基的糖化程度为大约 7%。

3. 根据权利要求 1 的粘弹性糖化壳聚糖制剂,其中糖化壳聚糖聚合物的游离氨基的糖化作用为大约 2%。

4. 根据权利要求 1 的粘弹性糖化壳聚糖制剂,其中将最终的粘弹性制剂制成 pH 在大约五(5)到大约七(7)的水溶液。

5. 根据权利要求 1 的粘弹性糖化壳聚糖制剂,其中将粘弹性制剂制成含有缓冲生理盐水溶液的水溶液。

6. 根据权利要求 1 的粘弹性糖化壳聚糖制剂,其中粘弹性制剂含有分散于水溶液中的大约 1% 重量的糖化壳聚糖聚合物,所述水溶液在大约 25 摄氏度测量的粘度在大约 1 到大约 100 厘沱之间。

7. 根据权利要求 1 的粘弹性糖化壳聚糖制剂,其中粘弹性制剂含有分散于水溶液中的大约 1% 重量的糖化壳聚糖聚合物,所述水溶液含有大约 1% 重量的糖化壳聚糖,并且所述糖化壳聚糖的游离氨基的糖化作用为大约 0.1% 到大约 30%,进一步地,其中水溶液的粘度在大约 1 厘沱到大约 100 厘沱。

8. 根据权利要求 1 的粘弹性糖化壳聚糖制剂,含有分散于水溶液中的至少大约 1% 重量的糖化壳聚糖聚合物,其中糖化壳聚糖聚合物的游离氨基的糖化作用为大约 5%,进一步地,其中水溶液的粘度使其易于对主体进行注射和给药。

9. 一种治疗癌症的方法,包括给予根据权利要求 1 的粘弹性糖化壳聚糖制剂。

10. 一种用于光物理和免疫结合治疗调节肿瘤的组合物,其包含一种免疫佐剂,其中所述免疫佐剂包含根据权利要求 1 的粘弹性糖化壳聚糖制剂。

11. 一种用于光物理和免疫结合治疗调节肿瘤的组合物,其包含一种免疫佐剂,其中所述免疫佐剂包含根据权利要求 1 的粘弹性糖化壳聚糖制剂,进一步地,其中所述免疫佐剂与肿瘤特异性抗原结合。

12. 一种含有根据权利要求 1 的粘弹性糖化壳聚糖制剂的免疫佐剂。

13. 一种在带有肿瘤的宿主中光物理破坏肿瘤并同时产生原位自体疫苗的方法,包括:

a. 用波长在可见、近红外或红外范围内的激光,以足以产生光热反应,诱发肿瘤细胞破坏并产生破裂的肿瘤组织和肿瘤分子的功率和持续时间照射肿瘤;

b. 通过瘤内注射将免疫佐剂引入肿瘤中,其中所述免疫佐剂含有根据权利要求 1 的粘弹性糖化壳聚糖制剂,进一步地,其中原位疫苗含有破裂的肿瘤组织和细胞分子的混合物以及免疫佐剂;和

c. 通过局部存在的疫苗刺激自身免疫防御系统对抗肿瘤细胞增殖从而诱发宿主内全身性抗肿瘤反应。

## 壳聚糖衍生组合物

### [0001] PCT 国际专利申请

发明人:Robert Nordquist; Wei Chen; Raoul Carubelli; Tomas Hode; Kristopher Waynant; Luciano Alleruzzo; Peter Jenkins 和 Joseph Raker。

### [0002] 优先权要求

本 PCT 国际专利申请具有 2012 年 1 月 20 日申请的、序列号为 61/588, 783, 题为“壳聚糖衍生生物材料及其应用”的美国临时专利申请的优先权,其全部内容通过引用整体地结合于本文中。

### 技术领域

[0003] 本发明主要涉及与瘤(例如恶性的肺、乳腺、前列腺、皮肤、甲状腺和肾等肿瘤,和其它类型的恶性肿瘤,以及其它疾病)的治疗方法结合使用的含有壳聚糖衍生成分的组合物。

### 背景技术

[0004] 壳聚糖是甲壳素的一种衍生物,通常,甲壳素是从一些甲壳纲动物如螃蟹、龙虾和虾的壳中分离出的一种化合物。甲壳素是一种线性均聚物,由  $\beta$  1  $\rightarrow$  4 糖苷键连接的 N-乙酰葡糖胺单元构成。甲壳素、壳聚糖(尤其是部分脱乙酰甲壳素)及它们的衍生物具有令人感兴趣的化学和生物性质,这些性质已促成了多样和大量的工业和医学应用。美国专利 5, 747, 475 (“壳聚糖衍生生物材料”)中所述的糖化壳聚糖,在此通过引用结合到本文中,成为这样的一种壳聚糖衍生物。

[0005] 癌症可以在任何年龄,任何器官的任何组织中产生。一旦做出了癌症的明确诊断,治疗决定就变得至关重要。然而,单一的治疗方法不适用于所有的癌症,成功的治疗必须集中于原发肿瘤及其转移灶。过去,局部和区域性治疗(例如外科手术或放射治疗)都已和全身性治疗(化疗药物)一起用于癌症的治疗中。尽管传统的治疗有一些成功的病例,但是有效性达不到所需的治疗程度,所以仍在继续研究以获得更有效的治疗方法。显而易见,更有效的癌症治疗方法的需求仍未得到满足。

[0006] 传统的糖化壳聚糖配制品,如美国专利 5, 747, 475 (“壳聚糖衍生生物材料”)中所述,作为一种免疫佐剂已在动物转移瘤模型的治疗中显示出了显著有效性。

[0007] 然而,传统的糖化壳聚糖分散、悬浮或溶解于水溶液而制成制剂时,通常很难注射或很难在其注入的机体内扩散。此外,传统的糖化壳聚糖配制品,如美国专利 5, 747, 475 (“壳聚糖衍生生物材料”)中所述,几乎不可能无菌过滤,这表明它们不适合于遵循现行《药品生产质量管理规范(cGMP)》的工业化生产,因而不适合于人类使用。因此,本发明的一个目的是提供改良的粘弹性糖化壳聚糖配制品,从而很大程度上减少上述的缺点。

### 发明内容

[0008] 根据一个实施方式,本发明主要涉及与瘤和其它疾病的治疗方法结合使用的含有

壳聚糖衍生组合物的治疗用制剂。本发明另外的方面和优点将在以下说明中阐明,且在部分上(一定程度上)从该描述可显而易见,或者可以通过实施本发明而认知。

### 附图说明

[0009] 结合附图和对本发明的多种实施例的以下说明,可更清晰容易地理解本发明的优点。

[0010] 图 1 描述了糖化壳聚糖,例如半乳壳聚糖的一个传统实例。

[0011] 图 2 描述了本发明的粘弹性糖化壳聚糖的一个实例结构,其中,专利壳聚糖的脱乙酰化为 80%,并且可获得的总脱乙酰氨基的糖化作用为 12.5%。

[0012] 通过以下的详细描述,本领域技术人员更容易理解本发明的优选实施方式的其它目的和优点,其中描述了本发明的某些优选实施方式,以及用于图解目的的实例。

### 具体实施方式

[0013] 本发明主要涉及与肿瘤和其它疾病的治疗方法结合使用的含有壳聚糖衍生组合物的治疗用制剂。应理解,此处引用的参考文献都通过引用整体地结合于本文中。

[0014] 本发明的某些实施方式中详细引用,其中的实例将在附图中说明,其中相似的参考数码表示相似的成分。应理解,本发明能在各方面进行修改,所有修改都不偏离本发明的精神和范围。因此,该描述应该被认为是解释性的,并且不是限制性的。

#### [0015] 糖化壳聚糖

糖化壳聚糖是壳聚糖游离氨基糖化作用(即非酶糖基化作用)的产物,随后通过还原反应使其稳定。糖化作用得到的壳聚糖具有有利的溶解度和粘度特性,能促进衍生物与激光辅助免疫疗法的结合使用,以及衍生物的其它应用。壳聚糖的糖化作用也提供了亲水性更强的壳聚糖,由此,与其它情况相比来说,聚合物吸收和维持了更多的水。

[0016] 根据本发明的优选实施方式,一种含有脱乙酰甲壳素(壳聚糖)线性均聚物的壳聚糖衍生生物材料,其中脱乙酰甲壳素具有大量的游离氨基,与一个还原单糖或低聚糖的一个羰基结合形成糖化壳聚糖。因此,糖化壳聚糖能作为一个还原单糖或低聚糖的羰基与脱乙酰甲壳素的游离氨基之间的反应产物获得。因此,这里所用的术语“糖化壳聚糖”指的是壳聚糖游离氨基的糖化作用,即非酶糖基化作用的一种产物,随后通过还原反应使其稳定。总体来说,糖化作用(或非酶糖基化作用)指的是一个糖分子,比如果糖或葡萄糖,与一种基质,比如一种蛋白质或脂质分子,在没有酶的作用下发生的一个反应过程。这样的一个实例为,一种糖和一种蛋白质的一个氨基基团的非酶反应形成一种糖蛋白。

[0017] 因此,糖化壳聚糖主要包括壳聚糖的游离氨基和还原单糖和/或低聚糖的羰基反应生成的产物。此反应的产物,主要为 Schiff 碱(即来自羰基的碳原子与来自游离氨基的氮双键结合来释放一个水分子)和 Amadori 产物(即上述羰基的碳原子与上述氨基的氮原子单键结合,同时一个相邻的碳原子与一个氧原子双键结合)的一种混合物,可以这样使用,或在用氢化物(比如硼-氢还原剂,例如  $\text{NaBH}_4$ ,  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ,  $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$  等)还原或在适当的催化剂存在下将其暴露于氢中还原使其稳定后使用。

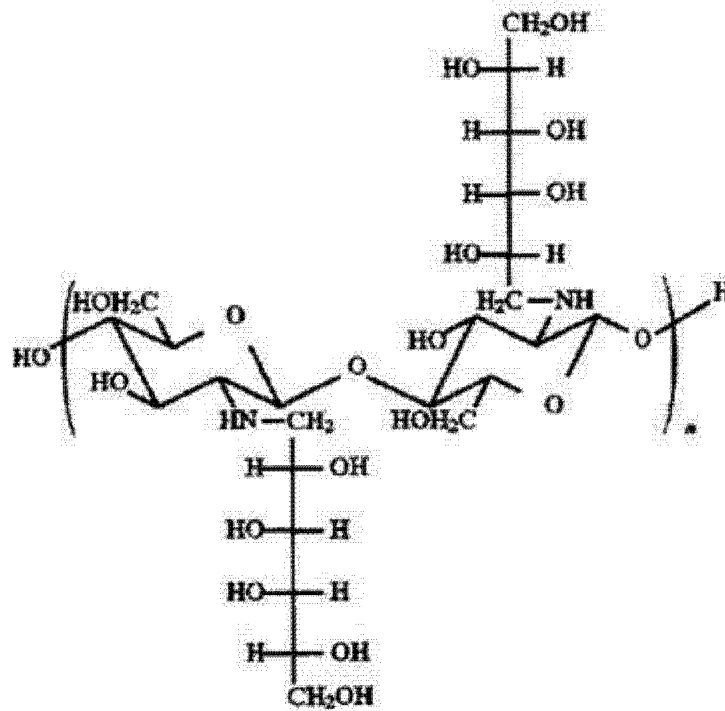
[0018] 壳聚糖中伯醇和仲醇基团,以及伯胺基团的存在,促成了大量化学修饰的方法,这些修饰主要设计用于达到它们的增溶,并影响特殊应用的特殊性质。

[0019] 甲壳素和壳聚糖的增溶作用能通过部分水解成低聚糖而实现。对于壳聚糖,用各种酸(有机和无机都可)处理,通过游离氨基的质子化作用来促成水溶性壳聚糖盐的形成。另外的氨基修饰包括化学基团,如羧甲基、甘油基、N-羟甲基和其它基团的引入。壳聚糖游离氨基的糖化作用,即非酶糖基化作用,以及随后的还原稳定,为制备本发明中所用的各种药物制剂提供了一种优选的方法。

[0020] 出于解释之目的,糖化壳聚糖,例如半乳壳聚糖的一个传统实例如下图 1 所示,美国专利 5,747,475 也对其进行了描述和图解。

[0021] 半乳壳聚糖的结构图(GC)

结构



分子量(大约) 150 万

图 1. 传统糖化壳聚糖的实例结构,其中分子量大约为 1,500,000 道尔顿,并且所有的氨基都是糖化的。

[0022] 美国专利 5,747,475 的描述极其有限,只在分子量方面描述了一种特殊的半乳壳聚糖;尤其是,美国专利 5,747,475 只描述了分子量为 1500kDa 的半乳壳聚糖。

[0023] 与美国专利 5,747,475 中描述的分子量为 1500kDa 的传统半乳壳聚糖不同,应清楚地理解,本发明所述的糖化壳聚糖包括分子量小于 1500kDa 的糖化壳聚糖。此外,与传统的壳聚糖不同,本发明的糖化壳聚糖是完全不同的,此物质的新型组合物具有大量出人意料的性质、益处和优点,包括出人意料的有利粘弹性。

[0024] 本发明的糖化壳聚糖是一种 Schiff 碱的形式、一种 Amadori 产物的形式,或优选的,分别为它们的还原仲胺或仲醇形式。在另外的实施方式中,糖化壳聚糖包括一个羰基反应基团。优选的是,本发明的糖化壳聚糖是通过壳聚糖与一个单糖和/或低聚糖,优选在一种酸化剂的存在下反应足够的时间来完成糖的羰基和壳聚糖的伯胺基团之间 Schiff 碱的形成,直到壳聚糖聚合物的氨基的糖化作用达到一个大约 0.1% 到大约 30%(最优选在 2% 以上)的程度来获得。优选的是,之后有 Schiff 碱及其重排衍生物(Amadori 产物)将其还原

成仲胺或仲醇使其稳定。

[0025] 本发明是首次证明,达到了大约 0.1% 到大约 30% (最优选在 2% 以上)的壳聚糖聚合物的糖化作用。与本发明相反,其它的发明未达到或未确认这个显著结果。因此,根据一个优选的实施方式,本发明提供了一个粘弹性的糖化壳聚糖制剂,主要由糖化壳聚糖聚合物构成,其中,糖化壳聚糖聚合物的分子量在大约 50,000 道尔顿到大约 1,500,000 道尔顿之间,并且更优选,其中的糖化壳聚糖聚合物占其游离氨基糖化作用的大约 0.1% 到大约 30%。

[0026] 因此,壳聚糖游离氨基的非酶糖基化作用得到的产物主要是 Schiff 碱(即原始羰基的碳原子与氨基的氮原子(又名亚胺官能团)双键结合)和 Amadori 产物(即原始羰基的碳原子与上述氨基的氮原子单键结合,同时一个相邻的碳原子与一个氧原子双键结合来形成一种酮基)的一种混合物。这些产物(由非酶糖基化过程产生)可这样使用,或在用氢化物(比如硼-氢还原剂,例如  $\text{NaBH}_4$ ,  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ,  $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$  等)还原或在适当的催化剂存在下将其暴露于氢中还原使其稳定后使用。

[0027] 亚硝酸的壳聚糖脱氨基作用可用于生成适用于壳聚糖糖化作用的还原醛糖和低聚糖。脱乙酰基葡萄糖胺基残基通过亚硝酸的脱氨基作用可促成它们糖苷键的定位断裂和 2,5-酞-D-甘露糖残基的形成。根据壳聚糖链特定区域的组成,脱水己糖可作为单糖释放,或占据低聚糖的还原端。游离 N-乙酰葡萄糖胺的释放也能从壳聚糖链的一些区域发生。使用 N-脱乙酰基糖蛋白和 N-脱乙酰基糖脂的类似处理能获得针对糖化壳聚糖特殊配制品的有明确化学组成和生物活性的低聚糖。

[0028] 壳聚糖糖化作用获得的各种产物可这样使用或与其它天然或合成材料(比如糖化壳聚糖含醛衍生物)与含 2 个或以上游离氨基的物质(比如赖氨酸残基如胶原中富含的氨基酸的侧链上、壳聚糖和脱乙酰基糖缀合物中的己糖胺残基上、或在天然和合成二元胺和聚胺上)反应。我们预期这能通过 Schiff 碱的形成和随后的重排、冷凝、脱水作用等形成交联。修饰的糖化壳聚糖材料的稳定化能通过化学还原或通过涉及重排、冷凝或脱水的固化作用(自发的或通过各温度、湿度和压力条件下的培养)完成。Amadori 重排、Schiff 碱和 Leukart-Wallah 反应的化学过程在默克索引,第九版(1976) pp. ONR-3, ONR-55 和 ONR-80,国会图书馆卡号 76-27231 中详述,在此通过引用结合于本文中。本发明适用的亲核加成反应的化学过程在莫里森和博伊德,有机化学,第二版(第八次印刷 1970),国会图书馆卡号 66-25695 的第 19 章中详述,通过引用结合于本文中。

[0029] 正如进一步的描述,我们惊奇地发现糖化作用的特殊类型(例如还原糖的特殊类型)和程度可提供具有意料之外的有利溶解度特性的壳聚糖,能促进衍生物与激光辅助免疫疗法的结合使用,以及其它的治疗用途。壳聚糖的糖化作用也有利地提供了亲水性更强的壳聚糖,由此,与其它情况相比来说,聚合物吸收和维持了更多的水。壳聚糖的 D-半乳糖衍生物,特别优选的范围如 D-半乳糖,其开链形式的自然产生率相对更高。糖化壳聚糖能制成很多适合的制剂,包括,例如一种粉末形式,如一种粘性制剂,或任何其它的适当形式。

[0030] 根据本发明中其它的优选实施方式,能使用很多相同或不同的还原糖,例如相同或不同的单糖和 / 或低聚糖对壳聚糖进行非酶糖基化。这些单糖糖基化剂的实例为更自然产生的 D-丙糖、D-丁糖、D-戊糖、D-己糖、D-庚糖,及类似物,如 D-葡萄糖、D-半乳糖、D-果糖、D-甘露糖、D-阿洛糖、D-阿卓糖、D-艾杜糖、D-塔罗糖、D-岩藻糖、D-阿拉伯糖、

D- 古洛糖、D- 金缕梅糖、D- 来苏糖、D- 核糖、D- 鼠李糖、D- 蔗糖、D- 木糖、D- 阿洛酮糖、D- 山梨糖、D- 塔格糖、D- 甘油醛、二羟基丙酮、D- 赤藓糖、D- 甘露庚酮糖、D- 景天庚酮糖和类似物。适合的低聚糖包括低聚果糖(FOS)、低聚半乳糖(GOS)、甘露寡糖(MOS)和类似物。

#### [0031] 优选的粘弹性

根据 GMP 标准,传统生产的壳聚糖产物,在水溶液中分散、悬浮或溶解时,非常难于生产,在给药和其它应用方面有大量的缺点。

[0032] 本发明的优选实施方式,通过提供改良的粘弹性糖化壳聚糖配制品克服了长期未满足的对改良治疗壳聚糖产物的需求,这种粘弹性糖化壳聚糖配制品没有传统方法的缺点。

[0033] 本文中所述的术语“粘弹性”指的是一种特殊成分、配制品或制剂的粘度。粘度作为一种液体对抗剪应力或拉伸应力变形的量度已被我们熟知。换言之,粘度说明了一种液体的内在抗流动性,并被认为是液体摩擦力的一种量度。

#### [0034] a. GC配制品可注射性中出人意料的提高

我们惊奇地、出乎意料地发现糖化壳聚糖(GC)制剂,例如溶液或悬浮液的可注射性对GC的粘度和流变性质的依赖性并不明显。反过来,这些性质高度依赖于糖化壳聚糖(GC)的分子量、甲壳素到壳聚糖的聚合度、甲壳素的脱乙酰度以及壳聚糖的糖化程度。这些后面的性质决定了糖化壳聚糖(GC)聚合物链的缠绕程度,以及糖化壳聚糖(GC)分子(即乙酰基和糖)上存在的取代基的数量和性质引发的分子内的氢键结合程度,这两者对由此制备的溶液粘度和其它流变性质有显著的作用。

[0035] 我们惊奇地、出乎意料地发现本发明的粘弹性糖化壳聚糖配制品具有很多优点,例如,(i)用于治疗患者肿瘤的一种无毒性配制品的给药;(ii)与传统治疗相比,在临床环境中更优的可注射性(即穿过不同针规的针);(iii)改良粘弹性配制品的无菌过滤;和(iv)减轻的疼痛及因此改进的患者治疗选择。本发明中所用的术语“可注射性”指的是制剂或配制品,例如一种含有糖化壳聚糖(GC)制剂可容易地注射到一个受试者体内。

[0036] 根据一个优选的实施方式,本发明提供了一种可注射的粘弹性配制品,它含有分散、悬浮或溶解于一种水溶液的大约 1% 重量比的上述糖化壳聚糖。

[0037] 本发明的优选实施方式包括糖化壳聚糖的配制品,例如溶液或悬浮液,其粘度使其能通过一个具有较大针规(G)的针快速注射,从而减轻受试者的疼痛和不适。较大针规的优选实例包括以下尺寸的针:标称内径从 0.337mm (23G)到大约 0.210mm (27G)。

[0038] 根据一个实例,一个粘弹性糖化壳聚糖配制品能用一个直径大约为 20G 到大约 22G 的注射针头通过注射进行给药,并且注射针管的有效长度为大约 1,000 mm 或更长,这样在一个大约 2 到大约 3 的大气压下通过上述注射针注射时,可注射配制品的入流率范围为大约 0.05ml/秒到 0.1ml/秒。根据另外一个实例,一个粘弹性糖化壳聚糖配制品也能用一个直径大约为 25G 到大约 27G 的注射针通过注射进行给药。也应该理解,根据本发明,一种粘弹性糖化壳聚糖配制品也能用其它适合针规的针或仪器进行给药。

[0039] 我们惊奇地发现,本发明的粘弹性糖化壳聚糖,例如溶液或悬浮液,能以一个较广范围的浓度通过最常用针规的注射器或针头进行注射。

[0040] 我们也发现改良的粘弹性糖化壳聚糖配制品(即改进了糖化壳聚糖成分的粘度和流变性质)也出乎意料地提高了配制品对一个受试者给药的整体容易程度;通过个人给药

的制剂(例如,护士、医生或其它保健医师)的给药效率,以及糖化壳聚糖制剂的依从性和有效性也能得到提高。

#### [0041] b. 生产和过滤中出乎意料的改进

我们也惊奇地发现,使用本发明的改良粘弹性糖化壳聚糖出乎意料地提高了无菌过滤。传统的糖化壳聚糖配制品,如美国专利 5,747,475 (“壳聚糖衍生生物材料”)中所述,显示出很难通过一个 0.22  $\mu\text{m}$  无菌过滤器进行无菌过滤,这使得它不适合于商业化的 cGMP 生产。与之相反,改良的粘弹性糖化壳聚糖(我们发现其流变性质不明显)显示出非常适合于无菌灭菌、cGMP 生产和人类使用。

[0042] 此外,我们惊奇地发现,使用本发明的改良粘弹性糖化壳聚糖出乎意料地提高了渗滤和超滤作用。传统的糖化壳聚糖很难渗滤和超滤,致使过滤器堵塞,从而使其不适合于商业化的 cGMP 生产。另一方面,改良的粘弹性糖化壳聚糖非常适合于渗滤和超滤,从而显著改进了生产工艺。

#### [0043] 粘度测定的实例方法

化学文献中任何适用的技术都能用于可靠和准确地测定一个糖化壳聚糖制剂的粘度。

[0044] 应理解,粘度可用各种类型的仪器,例如粘度计和流变计进行可靠地测量。用于这些液体的一个流变计,不能通过一个单独的粘度值进行定义,并因此要求设置和测量比在粘度计情况下更多的参数。液体的精密温度控制对于准确的测量来说是至关重要的,尤其在如润滑剂的材料中,其粘度在仅有 5°C 的变化时就能翻倍。

[0045] 根据本发明,一种糖化壳聚糖的粘度可按照文献中任何适用的已知方法进行测定。

[0046] 例如,粘度能以厘泊单位进行可靠的测量。泊是一种动态粘度单位,以厘米-克-秒单位制计。厘泊是泊的百分之一,在 SI 单位中为 1 毫帕斯卡-秒(mPaS) ( $1 \text{ cP}=10^{-2} \text{ P}=10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{S}$ )。厘泊正确的缩写为 cP,但是通常减到的另外缩写为 cps, cp 和 cPs。粘度计可用于测量厘泊。在测定厘泊时,典型的,所有其它液体都以水的粘度来校准。

#### [0047] 糖化壳聚糖配制品粘度的实例测定

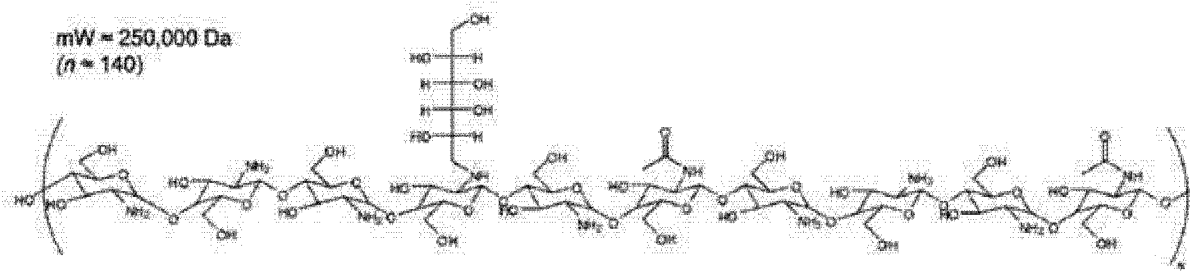
有很多因素会影响溶液的粘度,尤其是聚合物的溶液,而不仅是分子量。在糖化壳聚糖(GC)的情况下,GC 溶液的可注射性取决于 GC 在溶液中的粘度和流变性质。反过来,这些性质依赖于糖化壳聚糖(GC)的分子量、甲壳素到壳聚糖的聚合度、甲壳素的脱乙酰度以及壳聚糖的糖化程度。这些后面的性质决定了糖化壳聚糖(GC)聚合物链的缠绕程度,以及糖化壳聚糖(GC)分子上存在的取代基(例如乙酰基和糖)的数量和性质引发的分子内的氢键结合程度,这两者对由此制备的溶液粘度和其它流变性质有显著的作用。

[0048] 我们惊奇地发现,反过来,糖化壳聚糖配制品改进的粘度和流变性质高度依赖于糖化壳聚糖的物理化学性质。本文中所用的术语“物理化学性质”包括但不限于一个分子结构,例如糖化壳聚糖,的任何物理、化学或物理-化学性质。正如本文进一步的描述,这些物理化学性质的一些实例如下:

- (i) 糖化壳聚糖的分子量
- (ii) 甲壳素到壳聚糖的聚合度
- (iii) 甲壳素的脱乙酰度;
- (iv) 壳聚糖的糖化程度。



[0049] 图 2 显示了本发明的一种粘弹性糖化壳聚糖的一个实例,其分子量大约为 250kDa,甲壳素的脱乙酰度为大约 80%,并且壳聚糖上游离氨基的糖化程度大约为 12.5%。



[0050] 图 2. 本发明的粘弹性糖化壳聚糖的实例结构,其中壳聚糖的脱乙酰度大约为 80%,并且可获得的总脱乙酰氨基的糖化程度大约为 12.5%。

[0051] (i) 糖化壳聚糖的分子量

化学文献中任何适用的技术都能用于可靠和准确地测定糖化壳聚糖制剂的分子量(MW)。

[0052] 优选的是一个粘弹性糖化壳聚糖配制品制备为一种含有分子量(MW)小于大约 1500kDa 的糖化壳聚糖的可注射制剂。优选的粘弹性糖化壳聚糖配制品实例含有分子量(MW)在大约 50 千道尔顿(kDa)和大约 1500kDa 之间的糖化壳聚糖。

[0053] 在某些实施方式中,一种粘弹性糖化壳聚糖含有分子量(MW)在大约 100 kDa 和大约 1000kDa 之间的糖化壳聚糖;更优选的,在大约 100 kDa 和大约 300kDa 之间。各种技术都可用于准确地测定分子量。

[0054] 本发明涵盖了含有壳聚糖衍生物(水溶性或水分散性)的壳聚糖衍生成分。根据本发明,我们也惊奇地发现在某些实施方式中,随着分子量(MW)的增大,就要求更多的水来溶解糖化壳聚糖(GC)。反过来,这意味着更少量的水是“游离的”,即没有与糖化壳聚糖(GC)氢键结合(假设没有额外的水加入到溶液中),其自身提供了更高的粘度。如以下的实例 3 中所示,我们惊奇地发现此结果增加了粘度的提高,即通过分子尺寸的增大,给出粘度和分子量之间的一个指数关系(或类似的)而不是线性关系(当浓度补偿时)。

[0055] (ii) 甲壳素到壳聚糖的聚合度(DP)

甲壳素到壳聚糖的聚合度(DP)能根据化学文献中任何适当的已知方法或技术进行可靠和准确地测定。

[0056] 在一个方法中,优选的是通过葡糖胺链的分子量分割壳聚糖的分子量,从而测定聚合度(DP)。

[0057] (iii) 甲壳素的脱乙酰度

另一个物理化学性质为甲壳素的脱乙酰度。化学文献中任何适用的技术都能用于可靠和准确地测定甲壳素的脱乙酰度。

[0058] NMR 是用于测定甲壳素或壳聚糖的脱乙酰度的技术。

[0059] (iv) 壳聚糖的糖化程度

化学文献中任何适用的技术都能用于可靠和准确地测定甲壳素的糖化程度。

[0060] NMR 是一种用于检测和测量单糖和 / 或低聚糖与壳聚糖聚合物结合的技术。

[0061] C/N 元素燃烧分析是另外一种通过对比糖化壳聚糖 vs 壳聚糖的 C/N 比率来测定糖化壳聚糖的糖化百分比的技术。

[0062] 酶消化结合 HPLC 也是另外一种测定糖化百分比的技术。

[0063] 应理解,其它适用的分析方法和仪器可用于一个样品中多种成分的同时检测、测量和鉴别,例如,对于同一样品中糖化和非糖化的壳聚糖的同时检测、测量和鉴别。

[0064] 与残留游离氨基结合的化学品的比色法测量,比如通过一个茚三酮反应,可用于评估糖化的程度。

[0065] 因此,我们发现具有优选的分子量、优选的甲壳素到壳聚糖的聚合度、优选的甲壳素的脱乙酰度和优选的壳聚糖的糖化程度的糖化壳聚糖能改进糖化壳聚糖溶液的制备,这样的改进溶液能以一个较广范围的浓度通过最常用针规的注射器或针头进行注射。

[0066] 优选的糖化壳聚糖制备方法

本发明的一些其它实施方式涉及糖化壳聚糖制剂的制备方法。优选的是,糖化壳聚糖通过壳聚糖与一个单糖和 / 或低聚糖,优选在一种酸化剂的存在下反应足够的时间来完成糖的羰基和壳聚糖的伯胺基团之间 Schiff 碱的形成(也称为氨基的糖化作用),直到壳聚糖聚合物的糖化作用达到至少几个百分比(例如,2% 或更高)的程度来获得。优选地,之后有 Schiff 碱及其重排衍生物(Amadori 产物)将其分别还原成仲胺或仲醇使其稳定。NMR 追踪能用于确认单糖和 / 或低聚糖与壳聚糖聚合物的结合,而残留游离氨基的化学测量,比如通过一个茚三酮反应,可用于评估糖化的程度。

[0067] 在优选的实施方式中,可以按需求调节条件,来改进糖化壳聚糖生产期间所需的结果。例如,我们出乎意料地发现,根据本发明,糖化壳聚糖生产中的改进能通过控制 pH 条件达到,如实例 4 中所述。

[0068] 根据本发明中所用的糖化壳聚糖制备的一个实例,在一个锥形烧瓶中,伴随温和的磁力搅拌,将大约 3 克的一种还原单糖(比如葡萄糖、半乳糖、核糖),或等量的一种还原低聚糖溶解于 100ml 的蒸馏水。随后,加入大约 1g 的壳聚糖,然后进行适当的工艺步骤来产生具有所需粘弹性和所需纯度特性的糖化壳聚糖配制品。

[0069] 壳聚糖工业规模生产的一个实例方法涉及以下四个步骤:去矿化作用(DM)、脱蛋白作用(DP)、脱色作用(DC)和脱乙酰作用(DA)。甲壳素是通过一种碱-酸处理进行方法从甲壳纲动物壳中提取的。通过用碱制剂处理将样品脱蛋白、用酸去矿化和用有机溶剂(例如丙酮)脱色,之后将其漂白(例如用次氯酸钠)。使用例如氢氧化钠制剂进行甲壳素的脱乙酰作用。通过解聚合作用调节壳聚糖的聚合度;最方便的程序为(1)重水中亚硝酸的降解。该反应是选择性的、GlcN 相关的化学计量的、快速和简单控制,(2)通过酸水解的解聚合作用,或(3)使用一种商业化配制品(Pectinex Ultra Sp1)的酶降解。酶方法产生了具有更短片段和一个更高比例的完全脱乙酰化的壳低聚糖。相反地,与酶程序相比,初始壳聚糖的酸水解产生了聚合度高达 16 的片段以及更多的单乙酰化残基。

[0070] 聚合糖化的氨糖

如本文所述,壳聚糖(部分脱乙酰化的甲壳素)是甲壳素(由  $\beta$  1  $\rightarrow$  4 糖苷键连接的 N-乙酰葡糖胺单元构成的一种线性均聚物)的一种衍生物。因此,壳聚糖衍生成分含有部分脱乙酰化甲壳素的一种均聚物,其中部分脱乙酰化的甲壳素具有大量的游离氨基,与一种还原单糖或低聚糖的一个羰基结合来产生一种亚胺键(Schiff 碱)或相关产物(Amadori 重排),并释放一个分子的水。

[0071] 由于甲壳素和壳聚糖是葡糖胺的聚合物,本发明也考虑了非酶糖化的葡糖胺,例

如糖化的葡糖胺单体或糖化的葡糖胺单位。换言之,本发明通常也考虑了氨糖单体的非酶糖化作用。

[0072] 例如,一个实例为一种糖化的葡糖胺,其中 N- 取代基为一种半乳糖。最好是,在至少 1 个百分比的葡糖胺单体开始脱乙酰化之后进行葡糖胺单体的糖化作用。

[0073] 此外,本发明也考虑了(1)糖化葡糖胺单位的聚合物(聚合糖化的氨糖),(2)糖化和非糖化葡糖胺的结合聚合物,和(3)糖化和非糖化葡糖胺聚合物的结合,其中:

(i) 非脱乙酰化葡糖胺单体的百分比为大约 1% 到大约 30%;

(ii) (脱乙酰化、非脱乙酰化、糖化和非糖化葡糖胺单位的各种结合的)聚合度为大约  $x_n=300$  到大约  $x_n=8000$ , 最优选是大约  $x_n=1500$ ; 和 / 或

(iii) 脱乙酰化聚合葡糖胺的游离氨基的糖化半百分比为大约 0.1% 到大约 30%。

[0074] 本发明也考虑了聚合糖化葡糖胺聚合物的使用,它与糖化壳聚糖的使用相同或类似。这些包括,例如,免疫佐剂在例如原位肿瘤疫苗(inCVAX)的环境中,比如激光辅助免疫疗法(LIT)的性质和使用。

[0075] 实例制剂和应用

根据本发明所用的制药上可接受的各种制剂或配制品类型的实例包括,例如,用于可注射粘弹性糖化壳聚糖配制品的溶液、悬浮液和其它类型的液体或半液体制剂。例如,制药上可接受的制剂或配制品包括分散、悬浮或溶解于水溶性制剂中的糖化壳聚糖。通过术语“水溶性制剂”的使用,应理解,某些实施方式中的制剂或配制品,可能包括一些百分比的一种或多种无水成分,以及一种或多种制药上可接受的辅料。

[0076] 根据一个实例,一种粘弹性配制品优选制成一种水溶液,其 pH 为大约 5.0 到大约 7。

[0077] 一种粘弹性配制品也能制成一种含有缓冲生理盐水溶液的水溶液,该溶液含有充分的糖化壳聚糖。

[0078] 也能制成主要由糖化壳聚糖(GC)聚合物组成的一种粘弹性配制品,其中糖化壳聚糖聚合物占其游离氨基糖化作用的大约 0.1% 到 30%。

[0079] 在另外的实施方式中,能制成主要由糖化壳聚糖聚合物组成的一种粘弹性配制品,其中糖化壳聚糖聚合物的游离氨基的糖化作用为大约 2%。

[0080] 在另外的实施方式中,能制成主要由糖化壳聚糖聚合物组成的一种粘弹性配制品,其中糖化壳聚糖聚合物的分子量在大约 50,000 到大约 1,500,000 道尔顿之间。

[0081] 另外的实例包括一种含有大约 1% 重量比的糖化壳聚糖分散于一种水溶液中的粘弹性糖化壳聚糖(GC)配制品,所述的水溶液在 25 摄氏度测量的粘度为大约 1 到大约 100 厘沱。

[0082] 另外的实例包括一种水溶液,它含有大约 1% 重量比的糖化壳聚糖和上述糖化壳聚糖的大约 0.1% 到大约 30% 的游离氨基,其中,水溶液的粘度在大约 1 厘沱到大约 100 厘沱。

[0083] 在另外的实例中,能制成主要由糖化壳聚糖聚合物组成的一种粘弹性配制品,它含有分散于一种水溶液中的大约 1% 或以上重量比的糖化壳聚糖聚合物,其中,糖化壳聚糖聚合物的游离氨基的糖化作用为大约 2%,并且该水溶液的粘度使其易于对受试者进行注射和给药。

[0084] 在另外的实例中,能制成主要由糖化壳聚糖聚合物组成的一种粘弹性配制品,它另外含有可混溶于一种水溶液的一种或多种不同的粘弹性材料。适当粘弹性材料的实例包括,但不限于透明质酸、硫酸软骨素和羧甲基纤维素。

[0085] 粘弹性配制品包括糖化壳聚糖聚合物,含有与一种游离氨基结合的一种单糖。糖化壳聚糖聚合物能以任何适当的形式存在,比如一种 Schiff 碱、一种 Amadori 产物或它们的混合物。糖化壳聚糖聚合物也能以一种还原 Schiff 碱(仲胺)、一种还原 Amadori 产物(醇)及其混合物的形式存在。

[0086] 粘弹性配制品也可制成为,其中的糖化壳聚糖聚合物具有许多化学修饰的单糖或低聚糖取代基。在一个实施方式中,单糖包含半乳糖。

[0087] 发明的制剂或配制品也优选含有在一个生理学相容载体中的糖化壳聚糖。应理解,本文中所用的“生理学相容”指的是在体内与组织接触,而不会产生危害的材料。本文中的该术语包括,但不限于,与感兴趣的生理环境近似等渗的水制剂(例如溶液)。非等渗制剂(例如,溶液)有时也是临床有用的,例如脱水剂。本发明溶液的附加成分可能包括各种盐,例如氯化钠、氯化钾、氯化钙、氯化镁和钠盐缓冲液。

[0088] 上述目的和其它目的可通过本发明实现,与糖化壳聚糖相关的某些优选实施方式具有特殊的物理化学性质,能提供出乎意料的、令人惊奇的有益性质。

[0089] 本发明也包含粘弹性糖化壳聚糖配制品的一个广范围的使用,作为免疫佐剂它具有令人惊奇的、出乎意料的性质,例如,与原位自体肿瘤疫苗结合使用,如本文要进一步描述的癌症激光辅助免疫疗法。

[0090] 本发明的优选实施方式提供了含有一种可注射粘弹性配制品的免疫佐剂。因此,本发明的另一个目的是提供用于其它治疗用途的改良粘弹性糖化壳聚糖配制品,包括作为一种免疫佐剂和免疫调节剂的治疗用途。

[0091] 本发明也包括粘弹性糖化壳聚糖免疫佐剂的各种给药途径,例如注射。在优选的制备方法中,免疫佐剂优选制成一种可注射到肿瘤质中或周围的制剂。然而,我们应该认识到,其它方法也足以将免疫佐剂在肿瘤部位中定位另一个此类药物输送方式为,免疫佐剂与一个组织特异性抗体或组织特异性抗原结合,从而提高对肿瘤部位的药物输送。将免疫佐剂在肿瘤中定位的任何一个方法,或各种方法的一个结合都是可以接受的,只要输送机制能确保免疫佐剂在肿瘤中的足够浓度。

[0092] 根据某些优选的实施方式,本发明提供了含有粘弹性糖化壳聚糖的各种药物制剂,与原位自体肿瘤疫苗(inCVAX)结合使用,如本文要进一步描述的激光辅助免疫疗法、光动力癌症疗法(PDT)和/或其它肿瘤免疫疗法。我们发现这需要利用有一个适当粘度的糖化壳聚糖配制品,使其能作为一种可注射的或其它制剂的免疫佐剂在其它用途(如在inCVAX和/或PDT和/或肿瘤免疫疗法)中使用。这样的用途通常涉及将粘弹性糖化壳聚糖制剂注射到一名患者的身体中。本文中所用的术语“免疫佐剂”指的是用于提高对一种抗原的免疫系统反应的任何分子、成分或物质;例如,用于提高对一个肿瘤抗原的免疫系统反应的糖化壳聚糖。

[0093] 免疫佐剂成分还包括与糖化壳聚糖结合的一种肿瘤特异性抗体。免疫佐剂成分也能包括与糖化壳聚糖结合的一种肿瘤特异性抗原。糖化壳聚糖能进一步包括一种羰基反应基团。

[0094] 根据一个优选的实施方式,本发明提供了一种免疫佐剂,包括粘弹性糖化壳聚糖的一种悬浮液或一种溶液。此优选实施方式中的粘弹性糖化壳聚糖与一个肿瘤的光热治疗结合使用,无需使用一种发色团,其中光能是直接输送到肿瘤。通常,如果肿瘤接近组织表面(例如黑色素瘤)或通过手术的方式将其暴露,那么就可以输送光能。光能也可以通过纤维光学的方式输送到肿瘤,例如,如果肿瘤存在于组织表面以下(例如乳腺癌)并且不能通过手术暴露。

[0095] 根据另外的实施方式,以及本文中会进一步描述的,本发明的免疫佐剂还包括一种适当的发色团。适当发色团的选择主要是将其与一种可接受的激光放射波长进行协调。当然,所用的放射波长必须能与发色团的光学性质(即吸收峰)互补。其它的发色团选择标准包括创造热能的能力,来形成单态氧和其它活性分子,或自身成为有毒性的如顺铂。在本发明中,一个优选的放射波长为 $805\pm 10\text{nm}$ 。对于较透明的组织,所需的发色团在红或近红外光谱区中有强烈吸收。此波长另外的优点是可以避免遇到紫外激发的光敏剂时可能导致突变作用。然而,在个案中,150 和 2000nm 之间的波长被证明是有效的。优选的发色团为吲哚菁绿。其它发色团也可以使用,然而,它们的选择是根据光敏作用效率和光细胞毒性所需的光物理和光化学性质,。供选择的发色团的实例包括,但不限于,单壁碳纳米管(SWNT)、巴基球( $C_{60}$ )、吲哚菁绿、亚甲基蓝、DHE(聚血卟啉酯/醚)、mm-THPP(四(间-羟苯基)卟啉)、AlPcS<sub>4</sub>(四磺基铝酞菁)、ZnET2(初卟啉锌)和 Bchl<sub>a</sub>(细菌叶绿素· $\alpha$ )。

[0096] 在一个实施方式中,免疫佐剂成分制成一种溶液或悬浮液。该溶液或悬浮液包括,例如 0.25% 重量比的一种发色团和大约 1% 重量比的糖化壳聚糖。

[0097] 根据其它的优选实施方式,本发明提供了用于光物理和免疫结合治疗调节肿瘤的组合物,它包含一种免疫佐剂,其中免疫佐剂与一种肿瘤特异性抗原结合,并且其中的免疫佐剂为糖化壳聚糖。

[0098] 根据其它的实施方式,本发明提供了用于光物理和免疫结合治疗调节肿瘤的组合物,它包含一种发色团和一种免疫佐剂的一种组合物,其中发色团和免疫佐剂与一种肿瘤特异性抗原结合,并且其中的免疫佐剂为糖化壳聚糖。

[0099] 根据另一个优选实施方式,本发明提供了用于光物理和免疫结合治疗调节肿瘤的组合物,它包含一种免疫佐剂,其中免疫佐剂与一种肿瘤特异性抗体结合,并且其中的免疫佐剂为糖化壳聚糖。在某些例子中,免疫佐剂主要由糖化壳聚糖组成。糖化壳聚糖也能包括一种羰基反应基团。

[0100] 根据另一个实施方式,本发明提供了用于光物理和免疫结合治疗调节肿瘤的组合物,它包含一种发色团和一种免疫佐剂的一种组合物,其中发色团和免疫佐剂与一种肿瘤特异性抗体结合,并且其中的免疫佐剂为糖化壳聚糖。在某些例子中,免疫佐剂主要由糖化壳聚糖组成。糖化壳聚糖也能包括一种羰基反应基团。

[0101] 因此,本发明提供了用于光物理和免疫结合治疗调节肿瘤的可注射制剂,在某些例子中它可能包括一种发色团和一种免疫佐剂的一种组合物,或一种混合物,其中的免疫佐剂为糖化壳聚糖。

[0102] 此外,可制备用于光物理和免疫结合治疗调节肿瘤的组合物,它包含一种免疫佐剂,其中免疫佐剂与一种肿瘤特异性抗原结合,并且其中的免疫佐剂为分子量在大约 100kDa 到大约 1000kDa 之间的粘弹性糖化壳聚糖;更优选的,在大约 100kDa 到大约 300kDa

之间。

[0103] 也可制备用于光物理和免疫结合治疗调节肿瘤的组合剂，它包含一种发色团和一种免疫佐剂的一种组合剂，其中发色团和免疫佐剂与一种肿瘤特异性抗原结合，并且其中的免疫佐剂为分子量(MW)在大约 100kDa 到大约 1000kDa 之间的粘弹性糖化壳聚糖；更优选的，在大约 100kDa 到大约 300kDa 之间。

[0104] 此外，可制备用于光物理和免疫结合治疗调节肿瘤的可注射溶液，它包含一种免疫佐剂，其中的免疫佐剂为分子量在大约 100kDa 到大约 1000kDa 之间的粘弹性糖化壳聚糖；更优选的，在大约 100kDa 到大约 300kDa 之间。

[0105] 也可制备用于光物理和免疫结合治疗调节肿瘤的可注射溶液，它包含一种发色团和一种免疫佐剂的一种混合物，其中的免疫佐剂为分子量(MW)在大约 100kDa 到大约 1000kDa 之间的粘弹性糖化壳聚糖；更优选的，在大约 100kDa 到大约 300kDa 之间。

[0106] 在一个实例中，本发明的粘弹性糖化壳聚糖组合剂作为一种免疫佐剂用于一种新型的癌症治疗中。光热疗法和免疫疗法通过直接辐射肿瘤结合，无发色团的使用，随后将壳聚糖衍生免疫佐剂引入辐射的肿瘤中或其周围。在使用一种激光充分辐射来引发肿瘤细胞破坏之后，由此释放的细胞介导的对肿瘤抗原的体液免疫反应可由免疫佐剂成分刺激(提高)。

[0107] 在另外一个实例中，光动力疗法和免疫疗法通过将一种发色团和一种壳聚糖衍生免疫佐剂(也称为免疫调节剂或免疫强化剂)引入肿瘤中结合。在使用一种激光充分辐射来引发肿瘤细胞破坏之后，由此细胞介导免疫及体液免疫反应可利用释放的肿瘤抗原由免疫佐剂刺激(提高)。

[0108] 发色团和免疫佐剂能合并成一种溶液注射到肿瘤质的中心，或单独注射到肿瘤质中。然而，我们应认识到，其它方法也足以将发色团和免疫佐剂在肿瘤部位中定位。这样一个供选择的输送方式为发色团或免疫佐剂或这两者与一个组织特异性抗体或组织特异性抗原结合，从而提高了对肿瘤部位的输送。将发色团和免疫佐剂在肿瘤中定位的任何一个方法，或各种方法的一个结合都是可以接受的，只要输送机制能确保成分在肿瘤中的足够浓度。

[0109] 根据另外的实施方式，用于治疗人类或其它动物宿主中一个肿瘤的方法包括：(a) 选择一种免疫佐剂，其中该免疫佐剂包含粘弹性糖化壳聚糖；(b) 辐射调节过的肿瘤，从而诱发已调节肿瘤的肿瘤细胞破坏，产生破裂的肿瘤细胞组织和细胞分子；(c) 将免疫佐剂引入肿瘤中或其周围，刺激宿主的自身免疫防御系统来处理破裂的肿瘤细胞和细胞分子，比如肿瘤抗原，从而创造对肿瘤细胞增殖的免疫力。

[0110] 根据另外的实施方式，用于治疗人类或其它动物宿主中一个肿瘤的方法包括：(a) 选择一种发色团和一种免疫佐剂，其中的免疫佐剂含有粘弹性糖化壳聚糖；(b) 将发色团和免疫佐剂引入肿瘤中或其周围，获得一种调节过的肿瘤；和(c) 辐射调节过的肿瘤，从而诱发已调节肿瘤的肿瘤细胞破坏，产生破裂的肿瘤细胞组织和细胞分子，在免疫佐剂的存在下刺激宿主对肿瘤细胞增殖的自身免疫系统。

[0111] 在另外的实施方式中，一种在带有肿瘤的宿主中产生肿瘤特异性抗体的方法包括，用一个波长在可见光、近红外或红外范围内的激光辐射肿瘤来诱发肿瘤细胞的破坏并产生破裂的肿瘤细胞和细胞分子，随后通过注射的方式将一种免疫佐剂引入肿瘤中或其周

围,从而刺激宿主的免疫系统与破裂的肿瘤细胞和细胞分子相互作用,并对它们进行处理,由此诱发一种全身性的抗肿瘤反应。

[0112] 在另外的实施方式中,一种在带有肿瘤的宿主中产生肿瘤特异性抗体的方法包括,通过瘤内注射将一种发色团和一种免疫佐剂同时引入一个肿瘤中来获得一种调节过的肿瘤,该发色团在近红外或红外波长范围内激活后将适合于产生热能;用一个波长在近红外或红外范围内的激光将发色团激活到一个足以激活发色团产生一个光热反应的程度,从而诱发肿瘤细胞的破坏并产生破裂的肿瘤细胞和细胞分子。

[0113] 一个光物理破坏在带有肿瘤的宿主中的肿瘤并同时产生一种原位自身疫苗的实例,包括:(a)选择一种免疫佐剂;(b)用一个波长在可见光、近红外或红外范围内的激光辐射肿瘤,其功率和辐射时间足以产生一种光热反应,从而诱发肿瘤细胞的破坏并产生破裂的肿瘤细胞和细胞分子;(c)通过瘤内注射将免疫佐剂引入肿瘤中来形成原位疫苗,其中原位疫苗含有一种破裂组织和破裂细胞分子的混合物以及免疫佐剂;和(d)通过局部存在的疫苗刺激对肿瘤细胞增殖的自身免疫系统抵抗,从而诱导宿主体内全身性的抗肿瘤反应。

[0114] 一个光物理破坏在带有肿瘤的宿主中的肿瘤并同时产生一种原位自身疫苗的实例,包括:(a)选择一种发色团和一种免疫佐剂,该发色团在近红外或红外波长范围内激活后将适合于产生热能;(b)通过瘤内注射将所述的发色团引入肿瘤中(c)用一个波长在可见光、近红外或红外范围内的激光辐射肿瘤,其功率和辐射时间足以产生一种光热反应,从而诱发肿瘤细胞的破坏并产生破裂的肿瘤细胞和细胞分子;(d)通过瘤内注射将免疫佐剂引入肿瘤中来形成原位疫苗,其中原位疫苗含有一种破裂组织和破裂细胞分子的混合物以及免疫佐剂;和(e)通过局部存在的疫苗刺激对肿瘤细胞增殖的自身免疫系统抵抗,从而诱导宿主体内全身性的抗肿瘤反应。

[0115] 一个光物理破坏在带有肿瘤的宿主中的肿瘤并同时产生一种原位自身疫苗的实例,包括:(a)选择一种发色团和一种免疫佐剂,该发色团在近红外或红外波长范围内激活后将适合于产生热能;(b)通过瘤内注射将发色团和免疫佐剂同时或单独引入,来获得一种调节过的肿瘤;(c)用一个波长在可见光、近红外或红外范围内的激光辐射肿瘤来形成原位疫苗,其功率和辐射时间足以激活发色团产生一种光热反应,从而诱发肿瘤细胞的破坏并产生破裂的肿瘤细胞和细胞分子;其中原位疫苗含有一种破裂组织和破裂细胞分子的混合物以及免疫佐剂;和(d)通过局部存在的疫苗,以及使疫苗在宿主体内全身性分散来刺激对肿瘤细胞增殖的自身免疫系统抵抗。

[0116] 如本文其它部分所述,该方法能进一步地包括将免疫佐剂与一种肿瘤特异性抗体结合,从而形成一种共轭物,并将该共轭物给药至宿主。或者,该方法能进一步地包括将免疫佐剂与一种肿瘤特异性抗原结合,从而形成一种共轭物,并将该共轭物给药至宿主。很多适当的发色团都可以使用,例如,吡啶菁绿、DHE、m-THPP, AlPcS<sub>4</sub>, ZnET2 和 Bchl<sub>a</sub>。

[0117] 此外,该方法能包括将一种发色团和一种免疫佐剂的一种组合物与一种肿瘤特异性抗体结合,从而形成一种共轭物,并将该共轭物给药至宿主。或者,该方法能进一步地包括将一种发色团和一种免疫佐剂的一种组合物与一种肿瘤特异性抗原结合,从而形成一种共轭物,并将该共轭物给药至宿主。很多适当的发色团都可以使用,例如,吡啶菁绿、DHE、m-THPP, AlPcS<sub>4</sub>, ZnET2 和 Bchl<sub>a</sub>。

[0118] 本发明的配制品和制剂,包括粘弹性糖化壳聚糖(GC)配制品,也能与光动力疗法(PDT)结合使用。光敏化合物在暴露于光中时会显示出一种光化学反应。光动力疗法(PDT)使用这样的光敏化合物和激光来产生肿瘤的坏死。通常,用光动力疗法(PDT)治疗实体瘤涉及肿瘤定位光敏化合物的全身性给药,以及随后用激光将其激活。在吸收了适当波长的光后,光敏剂将从一种稳定的原子结构转换成一种激发状态。通过治疗的组织中光敏剂和分子氧的相互作用来调节细胞毒性和最终的肿瘤破坏,从而产生细胞毒性的单态氧。

[0119] 与光动力疗法(PDT)、生物医学激光和光敏化合物(包括光输送和剂量参数)有关的两种通用参考为,光敏化合物:它们的化学、生物和临床使用,由英国奇切斯特 John Wiley and Sons Ltd., 于1989年公布,ISBN 0 471 92308 7,以及光动力疗法和生物医药激光:关于光动力疗法和医学激光应用的国际会议论文集,米兰,1992年6月24-27日,由荷兰阿姆斯特丹埃尔塞维尔科学出版社出版,ISBN 0 444 81430 2,这两者都通过引用结合于本文中。

[0120] 与光动力疗法(PDT)有关的美国专利包括,美国专利 5,095,030 号和 5,283,225, Levy 等人;美国专利 5,314,905 号, Pandey 等人;美国专利 5,214,036 号, Allison 等人和美国专利 5,258,453 号, Kopecek 等人;所有这些都通过引用结合于文本中。Levy 专利公开了 670-780nm 的波长结合肿瘤特异性抗体(例如,受体特异性配体、免疫球蛋白或免疫球蛋白的免疫特异性部分)会影响光敏剂的使用。Pandey 专利是针对标准光动力疗法中所用的焦脱镁叶绿酸。Pandey 也公开了将其组合物与配体和抗体结合。Allison 专利与 Levy 专利在绿卟啉与脂复合物结合提高卟啉化合物对肿瘤靶细胞的特异性方面类似。Kopecek 专利也公开了治疗癌细胞的组成。这些组合物由两种药物构成,一种抗癌药物和一种光激活药物,这两种药物都附在一个共聚物载体上。该组合物通过吞饮进入靶细胞。在靶细胞侵入后,抗癌药物就会起作用。在一段时间后,用一种光源激活光敏取代基。

#### [0121] 肿瘤免疫疗法的进一步应用

本发明的配制品和制剂,包括粘弹性糖化壳聚糖(GC)配制品,能作为例如免疫佐剂,在肿瘤免疫疗法的环境中使用。

[0122] 免疫系统的主要功能在于发展“自身”的概念,并消除“非自身”的。尽管微生物是免疫系统每天要遇到的主要非自身实体,但是免疫系统也能消除肿瘤和移植物。

[0123] 有一些独特类型的免疫力。非特异性,或先天的免疫力指的是一个物种显现出的固有抗性,已通过之前的感染或疫苗进行免疫(敏化或致敏)。它的主要细胞成分为吞噬细胞系统,其功能是摄取和消化侵入的微生物。吞噬细胞包括血液中的中性粒细胞和单核细胞以及组织中的巨噬细胞。补体蛋白是非特异性免疫力的主要可溶性成分。急性期的反应物和细胞因子,例如干扰素,也是先天免疫的一部分。

[0124] 特异性免疫是一种免疫状态,其中有一种改变的反应单独定向对抗抗原决定簇(致病因子或其它),从而刺激免疫。它有时也称为获得性免疫。自然获得(表观或非表观)的感染或目的性的接种疫苗会将其激活和专一化;或者由于抗体从另外的人或动物转移而获得时,它可能为被动的。特异性免疫具有学习、适应性和记忆的特点。细胞成分为淋巴细胞(例如,T-细胞、B-细胞、天然杀伤(NK)细胞),免疫球蛋白为可溶性成分。

[0125] T-细胞和NK细胞在识别和破坏寄生或外源细胞中的作用被称为细胞介导免疫。与细胞介导免疫相比,体液免疫与B-细胞的一个复合物识别过程之后产生的循环抗体有



关。

[0126] 关于肿瘤免疫学,肿瘤免疫中淋巴细胞的重要性已反复出现。对肿瘤的一种细胞介导宿主反应包括免疫监视的概念,通过这个免疫监视,在识别了肿瘤相关的抗原(在普通细胞上没有出现的与肿瘤细胞相关的抗原)后,与细胞介导免疫相关的细胞机制能破坏新转化的癌细胞。在人类中,患者的外周血淋巴细胞与肿瘤细胞的混合悬浮液已经体内抑制了肿瘤结节的生长,这表明了一种对肿瘤的细胞介导反应。体外研究表明,某些肿瘤患者的淋巴细胞显示出对培养的相应人类肿瘤细胞的细胞毒性。这些细胞毒性细胞,通常为 T- 细胞,已经在成神经细胞瘤、恶性黑色素瘤、肉瘤、和结肠癌、乳腺癌、子宫癌、子宫内膜癌、卵巢癌、睾丸癌、鼻咽癌和肾癌中发现。在肿瘤相关抗原、淋巴因子或干扰素的存在下,对肿瘤的细胞介导宿主反应也涉及巨噬细胞。

[0127] 与体外肿瘤细胞反应的体液抗体已经在化学致癌物质或病毒诱发的各种动物肿瘤的反应中产生。体外杂交瘤技术允许检测和产生直接对抗各种动物和人肿瘤的单克隆抗肿瘤抗体。然而,对抗体内肿瘤生长的抗体介导保护只在某些动物白血病和淋巴瘤中得到了证明。相比之下,体内细胞介导保护能在广范围的各种动物肿瘤系统中发生。

[0128] 癌症的免疫疗法已被视为一个更宽泛领域的一部分。该领域被称为生物疗法或生物反应改性剂的给药。这些药剂通过各种机制中的一个或多个机制作用(1)通过提高效应细胞的数量或产生一个或多个可溶性调节剂来刺激宿主的抗肿瘤反应;(2)作为一种效应物或调节剂作用;(3)减少宿主抑制机制;(4)改变肿瘤细胞,提高它们的免疫原性或使其更能被免疫过程破坏;或(5)提高宿主对细胞毒性或放射疗法的耐受性。迄今为止,细胞介导的肿瘤免疫疗法集中于通过暴露于白介素-2 进行体外扩张后的患者淋巴细胞的再输注上。一个包括淋巴细胞种群(具有体内浸润肿瘤)的分离和扩张的变化,称为肿瘤浸润淋巴细胞。另外一个干扰素共同使用,它被认为能提高肿瘤细胞上组织相容性抗原和肿瘤相关抗原的表达,从而增加灌注效应细胞对肿瘤细胞的杀死。

[0129] 体液疗法长时间集中于将抗肿瘤抗体作为一种被动免疫疗法的形式使用,与宿主自身免疫系统的激活刺激相反。另外的一个变化是单克隆抗肿瘤抗体与毒素(如蓖麻毒素或白喉),或与放射性同位素的结合,这样抗体就能将毒性药物特定地输送到肿瘤细胞中。在放射、神经氨酸酶疗法、半抗原结合或杂交之后,我们也尝试了使用一种宿主自身肿瘤细胞的激活免疫。在少数这样治疗的患者中,也观察到了临床提高。在缓解之后,用放射结合急性淋巴细胞白血病和急性髓细胞白血病中的佐剂后,使用其它的肿瘤细胞。缓解的时间延长或提高的再诱导率已在一些而不是大多数系列研究中报告。干扰素、肿瘤坏死因子和淋巴毒素也用于影响免疫介导的机制。现在,共同使用细胞和体液机制的一种方法,是“杂交抗体”的发展,包括一种抗体与肿瘤细胞反应,结合一种第二抗体与一种细胞毒性效应细胞反应,使得后者对肿瘤的靶向性更为专一。已经报告过将宿主免疫细胞浸润至一个 PDT 治疗的鼠科肿瘤中。

[0130] PDT 和免疫疗法的结合

根据本发明,需要使用一种有适当粘度的糖化壳聚糖(GC)配制品,这种粘度使它们在另外的用途(例如光动力癌症疗法(PDT)和肿瘤免疫疗法的结合疗法)中能作为一种可注射的材料使用。

[0131] 光动力癌症疗法(PDT)与免疫疗法结合的可能性已由 Korbélik、Kros1、

Dougherty 和 Chaplin 探讨。见光动力疗法和生物医学激光,第 518-520 页。在他们的研究中,他们研究了将一种免疫反应放大到光动力癌症疗法(PDT)的可能性,以及它对治疗肿瘤造成更大渗透破坏的方向。肿瘤,一种鳞状细胞癌 SCCVII,在雌性 C3H 小鼠上生长。将一种免疫激活剂 SPG(一种高分子量的 B-葡聚糖,能刺激巨噬细胞和淋巴样细胞对来自细胞因子和其它免疫信号的刺激物的反应增强)进行肌肉给药,七日剂量,在 PDT 前一天结束或在 PDT 后立即开始。使用以光敏素为基础的 PDT;光敏素在光治疗前的 24 小时静脉给药。SPG 免疫疗法显示出提高了 PDT 的直接杀死作用。然而,间接杀死作用(看起来似乎是原位遗留的肿瘤细胞存活的减少)在未接受 SPG 的动物肿瘤中更为显著。在 PDT 之前和之后进行 SPG 免疫疗法时,其有效性差异表明在光输送时或输送之后即刻的免疫激活峰时达到最大的相互作用。随着 PDT 之后 SPG 的开始(并在 5-7 天后达到一个最佳的免疫激活),它对于一个有益的反应来说明显太晚。

[0132] 在另外的研究中,研究了在缺氧情况下使用 PDT 加强生物反应性药物(生物毒性的)的作用。见光动力疗法和生物医学激光,第 698-701 页。研究发现,当这种药物与提高肿瘤缺氧的疗法结合使用时,其抗肿瘤活性能在体内提高。

[0133] 光动力疗法结合一种免疫佐剂的癌症治疗

根据本发明,需要使用一种有适当粘度的糖化壳聚糖(GC)配制品,作为可注射的材料用于癌症的治疗中。这可以通过任何适用的方式达到,例如,与其它应用结合,比如将光热或光动力癌症疗法(PDT)与肿瘤免疫疗法结合。本文中所述的术语癌症,是一种通用的术语,包括很多各种类型的恶性肿瘤,其中大部分都侵入了周围的组织,除非得到足够的治疗,还可能转移到多个部位,并可能在试图解除后复发,并导致患者的死亡。这里所用的瘤,指的是异常的组织,能通过细胞增殖生长,比普通组织更快。甚至在用刺激物阻止其生长之后,它仍可继续生长。瘤显示出部分或完全缺乏与普通组织相同的结构组织和功能,通常能形成不同的性质,可能为良性或恶性。

[0134] 根据本发明,可以将有一个适当粘度的糖化壳聚糖(GC)配制品作为可注射材料用来治疗的癌症实例包括,但不限于,子宫癌、乳腺癌、膀胱癌、结肠癌、前列腺癌、喉癌、子宫内膜癌、卵巢癌、肾癌、睾丸癌(非精原细胞)和肺癌(非小细胞)。

[0135] 此外,根据本发明,治疗也可以以一种适当的方式与其它类型的癌症治疗结合进行,例如,辐射治疗。辐射在例如,霍奇金病、结节状和弥散性非霍奇金淋巴瘤、头和颈的鳞状细胞癌、纵隔生殖细胞肿瘤、精原细胞瘤、前列腺癌、早期乳腺癌、早期非小细胞肺癌和成神经管细胞瘤的治疗中起到了一个关键的作用。辐射也可作为姑息疗法用于存在骨转移的前列腺癌和乳腺癌、多发性骨髓瘤、晚期肺癌和咽食管癌、胃癌、肉瘤和脑转移。可以治疗的癌症包括,例如,霍奇金病、早期非霍奇金淋巴瘤、睾丸癌(精原细胞瘤)、前列腺癌、喉癌、子宫癌,在较小的程度上为鼻咽癌、鼻窦癌、乳腺癌、食道癌和肺癌。

[0136] 治疗也可以以一种适当的方式与其它类型的抗肿瘤药结合进行。抗肿瘤药物包括那些防止肿瘤细胞的细胞分裂(有丝分裂)、发育、成熟、或扩散的药物。理想的抗肿瘤药物能破坏癌细胞,但对普通的细胞无副作用或毒性,但是不存在这样的药物。尽管很多药物的治疗指数狭窄,但是仍能治疗一些患者,甚至治愈也是可能的。绒毛膜癌、霍奇金病、弥漫性大细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤和白血病的某些阶段易受抗肿瘤药的影响,正如在睾丸癌(非精原细胞)和肺癌(非小细胞)中所发现的。抗肿瘤药的常见种类包括,但不限于,烷化剂、

抗代谢物、生物碱、抗生素、亚硝基脲、无机离子、酶和激素。

**[0137] 原位自体肿瘤疫苗,如激光辅助免疫疗法**

本发明的壳聚糖衍生成分,尤其是粘弹性糖化壳聚糖配制品,在治疗瘤和其它疾病中是有效的。另外的糖化壳聚糖使用,无论是单独还是与其它药物结合,包括作为一种免疫刺激物用于免疫功能不全的患者的治疗中,包括但不限于癌症和获得性免疫缺乏综合症。

**[0138]** 因此,本发明的壳聚糖衍生成分在很多应用中都是有用的,包括,例如作为一种免疫佐剂或作为一种免疫佐剂的一种成分,如本文中详细描述。尽管有其它的用途,壳聚糖衍生成分的主要用途是作为一种免疫佐剂用于与原位自体肿瘤疫苗(inCVAX),例如激光辅助免疫疗法(LIT),并且壳聚糖衍生成分将在本文中详细描述。

**[0139]** 正如本文要进一步描述的,本发明的另外实施方式为,直接将本发明的糖化壳聚糖配制品作为免疫佐剂用于原位自体肿瘤疫苗(inCVAX)(通常情况下),或用于激光辅助免疫疗法(LIT)(特别情况下)用于癌症的治疗。使用激光辅助免疫疗法的本发明优选包括,对该肿瘤进行光热辐射后,将一种含有粘弹性壳聚糖衍生成分的免疫佐剂引入到一个肿瘤中或其周围。光热作用在一个足以诱发肿瘤细胞破坏的辐照度上进行,它的进行伴随或不伴随一种发色团的瘤内注射或其它方式的输送,结合本发明的粘弹性壳聚糖配制品的注射或其他方式的输送,从而诱发细胞介导和体液的抗肿瘤免疫反应。

**[0140]** 在优选的实施方式中,提供改进的激光辅助免疫疗法(LIT),其中的改进包括本文描述的、本发明的可注射粘弹性壳聚糖配制品的使用。本发明也包括将免疫系统特殊成分的体内激活与原位自体肿瘤疫苗(inCVAX)结合(通常情况下),或与激光辅助免疫疗法(LIT)结合(特别情况下)结合的方法,包括用一种粘弹性壳聚糖配制品治疗。

**[0141]** 正如本文要进一步描述的,已经确定激光辅助免疫疗法(LIT)提供了一种原位自体肿瘤疫苗(inCVAX),克服了现在的免疫疗法和癌症疫苗的局限性。通常,激光辅助免疫疗法(LIT)下的两个原则为(1)用一个激光将原位肿瘤局部加热,使肿瘤丧失活力并释放出肿瘤抗原,和(2)含有糖化壳聚糖(GC)的一种有效和无毒的免疫佐剂的局部注射,与释放的肿瘤抗原相互作用来诱发一种对抗癌症的免疫反应。因此,激光辅助免疫疗法(LIT)能作为一种原位自体肿瘤疫苗(inCVAX)有效地发挥作用,这种疫苗能将整个肿瘤细胞作为每个患者的肿瘤抗原来源使用,不需要肿瘤抗原或体外配制品的预选择。

**[0142]** 根据本发明,将如本文所述的本发明的可注射粘弹性壳聚糖配制品用于激光辅助免疫疗法(LIT)的另外优点是,通过使用这个激光辅助免疫疗法(LIT),可以激活树突状细胞(DC),并随后将激活的树突状细胞暴露于体内肿瘤抗原。由此,激光辅助免疫疗法(LIT)代表了一种有利的其它整体细胞癌接种疫苗的方法,通过消除体外配制品的需求,以及通过将激光辅助免疫疗法(LIT)与粘弹性壳聚糖配制品(作为免疫佐剂)结合使用。

**[0143]** 一种粘弹性壳聚糖配制品制剂的一个实例为《保护素》。已经观察到,《保护素》用于LIT刺激了免疫系统并诱发了肿瘤特异性免疫,通过1)激活树突状细胞,2)提高肿瘤细胞和树突状细胞之间的相互作用,和3)提高肿瘤抗原在免疫系统中的引入。

**[0144]** 本发明的其它粘弹性壳聚糖配制品也能刺激免疫系统并诱发肿瘤特异性免疫,通过1)激活树突状细胞,2)提高肿瘤细胞和树突状细胞之间的相互作用,和3)提高肿瘤抗原在免疫系统中的引入。

**[0145]** 因此,根据本发明的一个优选实施方式,粘弹性壳聚糖配制品的制剂激活了一个

或多个免疫系统成分,介导了所需的治疗作用。

[0146] 正如本文要进一步描述的,激活的免疫系统成分包括,非特异性或先天免疫的成分(称为吞噬细胞系统,其中包括血液中的中性粒细胞和单核细胞以及组织中的巨噬细胞)和补体蛋白(非特异性免疫力的主要可溶性成分)。急性期的反应物和细胞因子,例如干扰素,也是先天免疫的一部分。有很多不同的特异性免疫成分,例如,淋巴细胞(例如,T-细胞、B-细胞、天然杀伤(NK)细胞)和免疫球蛋白。本发明的粘弹性壳聚糖配制品制剂也与淋巴样细胞相互作用,促进肿瘤的免疫。在肿瘤相关抗原、淋巴因子或干扰素的存在下,巨噬细胞也参与了肿瘤的细胞介导宿主反应。

[0147] 免疫系统的特殊成分在“光热”疗法后激活。当光热破坏发生时,在免疫增强材料的存在下,例如壳聚糖,破裂的组织和细胞分子在宿主体内被识别。实际上,形成了一种原位疫苗。随后,这种材料混合物在宿主体内循环,并通过免疫监视系统检测。在此之后,是一种细胞介导免疫的即时调动,包括天然杀伤(NK)细胞和杀伤 T-细胞。这些细胞迁移至类似的抗原或化学品部位。细胞介导免疫及时地转变为体液免疫,伴随细胞毒性抗体的产生。这些抗体能在身体中自由循环,并附着于它们编码的细胞和材料上。如果这种附着在补体因子的存在下发生,那么结果是细胞的死亡。

[0148] 本发明的可注射粘弹性壳聚糖配制品在“原位肿瘤疫苗”中有出乎意料的功用,它是基于一种抗原呈递细胞(例如树突状细胞和巨噬细胞)的原位激活,以及随后的将肿瘤抗原暴露于抗原呈递细胞。本发明的可注射粘弹性壳聚糖配制品也能激活其它的细胞调节物,包括但不限于,肿瘤坏死因子(例如, TNF $\alpha$ )和有助于治疗作用的一氧化氮。

[0149] 将如本文所述的本发明的可注射粘弹性壳聚糖配制品用于激光辅助免疫疗法(LIT)的另外优点是,通过这个方式,该方法能独立引发每个个体中的免疫反应,并且它不依赖于宿主间肿瘤特异性抗原的表达中的交叉反应(如传统抗体免疫疗法和接种疫苗中所需的)。组织化学研究已经揭示出,从激光辅助免疫疗法(LIT)治愈的带有肿瘤的大鼠中获得的血清中含有抗体,该抗体附在存活和保藏的肿瘤细胞的质膜上。将血清(来自LIT成功治疗的大鼠)作为第一抗体来源的肿瘤细胞蛋白的蛋白印迹法显示出不同的带型,表明了肿瘤选择性抗体的诱发。它也表明成功治疗的大鼠获得了长期的肿瘤激发抗性,并且使用从成功治疗的大鼠中获得的脾细胞能将继承性免疫进行转移,表明了肿瘤特异性免疫。

[0150] 因此,使用如本文所述的本发明的可注射粘弹性壳聚糖配制品,其某些优点能满足提供有效癌症治疗中所需的关键需求。这对于癌症患者是特别的优点,因为本发明也提供了令人惊奇的、出乎意料的有益配制品,易于通过注射给药,并因此提高了依从性,并提供了传统方法的有效替代治疗,传统的方法不能为晚期转移癌提供(1)有效的,(2)无毒的,和(3)实用性的治疗。乳腺癌治疗中的一个关键问题是,不是所有的患者都能用现在的传统方法治疗,并且对于那些诊断为晚期的具有不良预后的患者,其有效的治疗选择甚至更少。并且,虽然近几年在乳腺癌治疗中已经有了很多改进和发展,但是关键的问题仍然存在。如本文所述的本发明的可注射粘弹性壳聚糖配制品,它提供的某些优点能满足提供有效癌症治疗中的关键需求。

[0151] 激光辅助免疫疗法(LIT)已经显示出能诱发树突状细胞的成熟(由 CD80 表达评估),提高 T-细胞的增殖、增加 IFN- $\gamma$  分泌并提高 HSP70 的表达。此外,激光辅助免疫疗法(LIT)的结合作用(例如按照本发明用一种激光加热肿瘤和糖化壳聚糖配制品的注射)显示

出能诱发肿瘤特异性免疫,以及治疗后肿瘤特异性细胞毒性 CD4 和 CD8 细胞在肿瘤中的一种浸润。

[0152] 正如本文要进一步描述的,激光辅助免疫疗法(LIT)因此提供了许多优点包括,但不限于:

- 消除了已治疗的原发肿瘤
- 消除了未治疗的转移灶
- 诱发了长期免疫和生存
- 创造了对肿瘤激发的抗性
- 是无毒的,能以治疗剂量安全地被人类使用。

[0153] 根据本发明的一个方面,一种瘤,例如一种恶性肿瘤,用可见光、近红外光或红外光谱辐射,其功率和时间足以使瘤的温度达到了一个能诱发细胞破坏和刺激对抗肿瘤细胞增殖的自身免疫防御系统的水平。为了促进肿瘤的加热,可在进行光治疗之前,注射一种吸收峰与所用光的波长一致的发色团。在光辐射之后,立即将一种粘弹性壳聚糖衍生免疫佐剂给药(例如通过注射)至肿瘤中或肿瘤周围的组织中。

[0154] 根据本发明的另外一个方面,以吲哚菁绿(ICG)对糖化壳聚糖(GC)为 0.1 到 2% 的一个浓度制备 ICG-GC 溶液。将该溶液注射到瘤中,随后,用一种功率为大约 5 瓦特的激光辐射该瘤,该辐射的波长能快速穿透普通的细胞组织,并不对其造成明显的破坏。辐射持续一个大约 1 到 10 分钟的时间,这个时间足以使瘤的温度达到了一个能诱发细胞破坏和刺激对抗肿瘤细胞增殖的自身免疫防御系统的水平。

[0155] 正如本文要进一步描述的,本发明有一些比传统和非传统治疗方法更好的优点。肿瘤破坏与免疫刺激佐剂的结合是关键。最重要的优点是急性与慢性肿瘤破坏的结合。急性肿瘤损失是由瘤组织的光汽化、光切除或热杀死引起,在一个控制的大范围内,在中间区域,降低了肿瘤负荷和增殖的基础,这样自身防御系统就能对抗一个更弱的“敌人”。当局部肿瘤破坏发生时,在免疫增强材料的存在下,例如壳聚糖,破裂的组织 and 细胞分子在宿主体内被识别。实际上,形成了一种原位疫苗。在此之后,是一种细胞介导免疫的即时调动,包括天然杀伤(NK)细胞和杀伤 T- 细胞。这些细胞迁移至类似的抗原或化学品部位。细胞介导免疫及时地转变为体液免疫,伴随细胞毒性抗体的产生。这些抗体能在身体中自由循环,并附着于它们编码的细胞和材料上。如果这种附着在补体因子的存在下发生,那么结果是细胞的死亡。对于细胞介导反应,这两种免疫模式的作用时间为 0 到 2 个星期,然而,体液抗体成分成熟为大约 30 天,并应该能持续很长的时间,达到宿主的寿命。

[0156] 总之,通过使用本发明的粘弹性壳聚糖配制品能达到长期的生存和整个肿瘤的消除。这是由于光治疗(例如光热)作用降低了肿瘤负荷,以及糖化壳聚糖或其它免疫调节剂的存在提高了免疫系统反应的合并结果。

[0157] 根据其它的实施方式,本发明的糖化壳聚糖配制品也能用于抗菌和 / 或止血的用途。因此,可制成糖化壳聚糖(GC)配制品,例如,一种抗菌止血喷雾,其中 GC 制剂有一种粘性,并且显示出流变性,使其能从传统的容器中喷射出。此外,其它制剂中也能包括糖化壳聚糖(GC),它以抗菌和 / 或止血的有效浓度,及合适的粘度 / 流变性质使其能从适用的容器中释放使用。

[0158] 本发明由以下实例进一步阐明。这些实例通过演示的方式提供,并不是要限制发

明范围的方式。因此,这些实例不应该作为对发明范围的限制解释,而是作为优选的实施方式的范例看待。也可能有很多其它的变形。

[0159] 实例

实例 1

糖化壳聚糖(GC)制备的实例工艺

糖化壳聚糖是通过壳聚糖与一个单糖和 / 或低聚糖,优选在一种酸化剂的存在下反应足够的时间来完成糖的羰基和壳聚糖的伯胺基团之间 Schiff 碱的形成(也称为氨基的糖化作用),使其达到一个预定的程度,由此使壳聚糖聚合物的糖化作用达到一个预定的百分比(%),随后,通过 Schiff 碱及其重排衍生物(Amadori 产物)还原使其稳定。NMR 追踪能用于确认单糖和 / 或低聚糖与壳聚糖聚合物的结合,而残留游离氨基的化学测量,比如通过一个茚三酮反应,可用于评估糖化的程度。

[0160] 实例 2

无菌过滤

美国专利 5,747,475 中描述的分子量为 1500kDa 的传统半乳壳聚糖相对易于合成,但使用例如一个 0.22 微米过滤器的灭菌,如果不降低过滤器的完整性标准,就不可能完成,由此,使得糖化壳聚糖不适合于 GMP 生产和人类使用。与之相反,本文中所述的新型粘弹性糖化壳聚糖具有明显的 GMP 生产和无菌灭菌的优点,这是由于它出乎意料的有利生理化学性质。例如,在 250,000Da (250kDa)的分子量,用一个 0.22 微米的过滤器进行无菌过滤是非常可行的,在 100ml/ 分钟的流速下,过滤期间无材料损失。

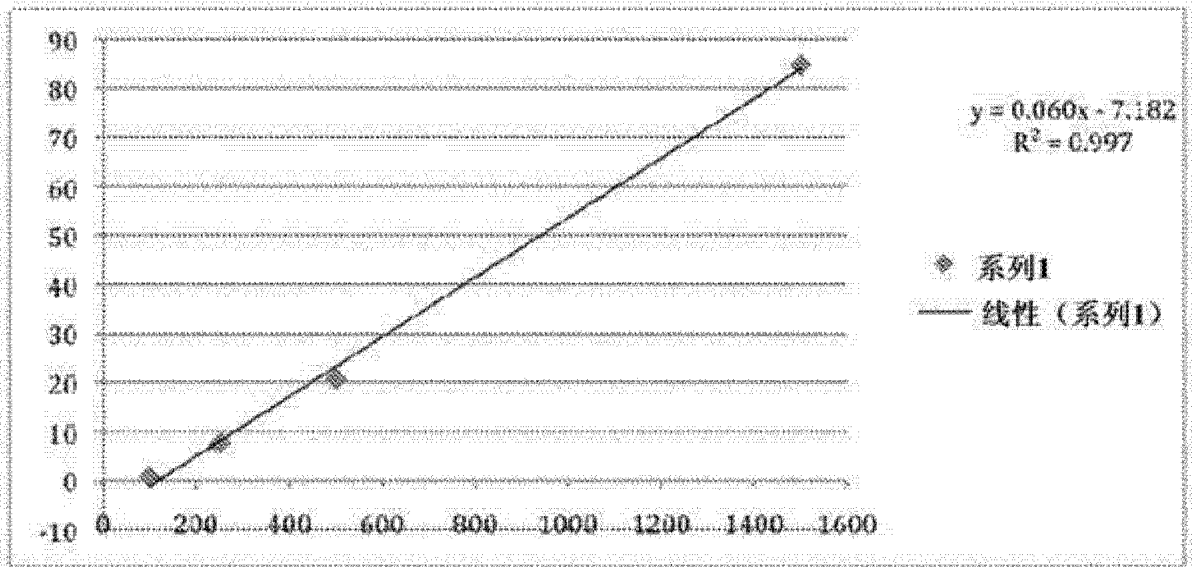
[0161] 实例 3

糖化壳聚糖(GC)的粘度

较高分子量的糖化壳聚糖(GC)配制品显示出了更高的粘度(以 Cp 计):

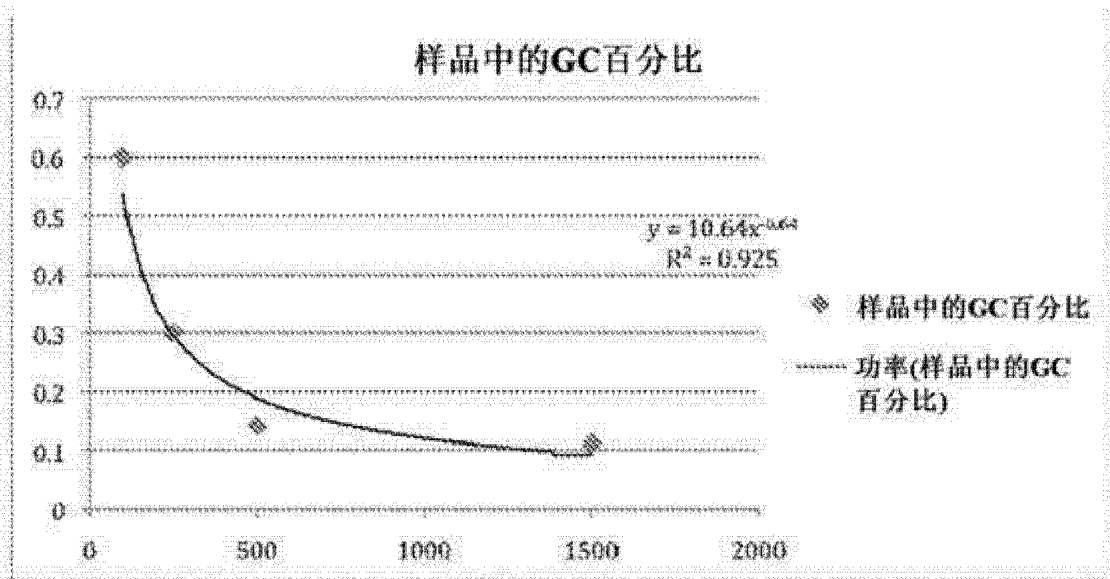
<u>GC的 kDa</u>	<u>Cp</u>
100	0.914
250	7.68
500	20.79
1500	84.7。

[0162] 下图显示了分子量在 100kDa 到 1,500kDa 之间的糖化壳聚糖(GC)样品中的粘度(以 Cp 计, y 轴) vs 分子量(以 kDa 计 ;x 轴)。此实验中,溶液中的 GC 浓度随着分子量的增大而降低,范围从 0.6% (100kDa) 到 0.11% (1,500kDa)。



[0163] 非常惊奇地是,我们发现只有在样品中的 GC 浓度随着分子量的增大而降低时,粘度才会随着在分子量的增大而线性增大。以下表格和图显示了上述粘度试验中所用的样品溶液中 GC 的百分比:

分子量 kDa	样品中的 GC 百分比
100	0.6
250	0.3
500	0.14
1500	0.11。



[0164] 结果清楚地显示了 1) 更高分子量的 GC 配制品与更高的粘度对应(以 Cp 计), 和 2) 如果浓度保持恒定, 那么粘度和分子量之间的关系就不是线性的。换言之, 粘度的增大与分子量的增大不成比例, 这致使了更高分子量的糖化壳聚糖(如美国专利 5, 747, 475 中公开的那些) 不适合于注射或无菌过滤。

[0165] 粘弹性壳聚糖配制品含有较低分子量(即 ~400kDa 以下) 的糖化壳聚糖, 由此提供

了改良的可注射性；这些配制品是有用的，例如，对于使用光动力疗法和激光辐射免疫疗法的癌症治疗，诱发了肿瘤细胞的破坏，并刺激了对抗肿瘤细胞的自身免疫防御系统。

#### [0166] 实例 4

##### 生产的改进

在此实例研究中，我们确定了可以按需要调节实验条件，来提高糖化壳聚糖生产期间的整体产率。我们出乎意料地发现 GC 的生产可通过控制 pH 条件改进，并由此控制糖化的百分比。具体来说，我们确定了由于硼氢酸钠( $\text{NaBH}_4$ )的半衰期与 pH 值成比例，意味着在较低的 pH 时，硼氢酸钠( $\text{NaBH}_4$ )的半衰期极短，并且只在较高的 pH 时，硼氢酸钠( $\text{NaBH}_4$ )才会稍微更稳定些。由此，可以确定在较低的 pH 下，通过 Schiff 碱和 Amidori 产物的还原使糖化壳聚糖稳定时，硼氢酸钠( $\text{NaBH}_4$ )是无效的。例如，当 pH 值保持在 5 以下时( $<5$ )，硼氢酸钠( $\text{NaBH}_4$ )的半衰期极短，因此 Schiff 碱和 Amidori 产物的还原效率更低，且 GC 的糖化百分比因此下降。

[0167] 然而，可以确定“凝胶”制剂具有更高的 pH，并且是非牛顿的。例如，当 pH 值保持在 6 以上时( $>6$ )，制剂为凝胶，并因此该批必须丢弃。换言之，为了达到有效 GC 生产的目的，pH 值不能保持那么高，否则制剂将为“凝胶”型，但是 pH 值也不能保持那么低，否则由于硼氢酸钠( $\text{NaBH}_4$ )的短半衰期会使糖化的百分比降到最低。

#### [0168] 实例 5

##### 一项人类试验中的激光辅助免疫疗法(LIT)

在 10 名患有晚期乳腺癌(5 名 IV 期, 5 名 III 期)的患者中进行一个研究员发起的乳腺癌试验。大部分患者对传统疗法的反应不足，或根本没反应，并接受过至少一次激光辅助免疫疗法(LIT)，其中将粘弹性糖化壳聚糖作为免疫佐剂使用。两名(2)患者由于不相关的原因提早退出，留下 8 名可评估的患者。在试验之前，每个研究人员都获得了 IRB 和政府的批准。活体组织检查和医学成像(CT 扫描等)用于评估原发病灶。

[0169] 由研究人员使用实体瘤治疗疗效评价标准(RECIST)进行的评估中，主要的有效性参数为总体缓解。完全缓解(CR)定义为所有靶病灶的代谢活性消失或缺乏。部分缓解 3 (PR)定义为靶病灶基线活性或最长直径之和的一个 $\geq 30\%$ 的降低。进展(PD)定义为靶病灶最长直径之和的一个 $\geq 20\%$ 的升高或出现 1 个或多个新病灶。稳定(SD)定义为既无 PR 的足够降低，也无 PD 的足够升高。

[0170] 在 8 名可评估的乳腺癌患者中，在 1 名患者中观察到 CR，在 4 名患者中观察到 PR 以及在 1 名患者中观察到 SD。在可评估的患者中，目标的缓解率(CR+PR)为 62.5%，临床有益的缓解率(CR+PR+SD)为 75%。在 2 名患者中观察到 PD。激光辅助免疫疗法(LIT)缓解了所有经过了激光辐射的局部病灶。另外，激光辅助免疫疗法(LIT)缓解了这些患者的大部分远端转移。在一些患者中，淋巴结、肺和肝中转移的直径和活性都得到了显著降低。

[0171] 根据国家癌症研究所通用毒性标准，3.0 版本将局部和全身毒性分级。实验室评估和体检定期进行。在整个研究期间，对不良反应进行严密监控和记录。在乳腺癌患者中，激光辅助免疫疗法(LIT)只在治疗部位内诱发了局部反应，其中大部分与局部激光治疗的热效应有关。治疗部位的发红、疼痛、水肿和溃疡是常见的不良反应(AE)。未观察到 3 级或 4 级的不良反应。对于之前未接受放射疗法的患者，肿胀程度很低。对于之前接受过放射疗法的患者，肿胀较为明显，并且时间较长。



## [0172] 实例 6

使用糖化壳聚糖的激光辅助免疫疗法证实了它在小鼠中产生对抗 B16 黑色素肿瘤的抗肿瘤免疫

将 B16-F1 黑色素瘤皮下接种至雌性 C57BC/6 小鼠(8 周龄 ;12 只 / 组)的背部区域。在输注后大约 7 天,肿瘤达到了治疗的尺寸(直径 7 到 8mm)。此研究中包含 5 个治疗组(12 只雌性小鼠 / 组):一个未治疗的对照组 ;激光辅助免疫疗法对照组 ;以及激光辅助免疫疗法,激光疗法的 24 小时前,用药后立即或 24 小时后用 0.2mL 1% 的糖化壳聚糖进行癌周注射。用 805nm 的二极管激光器进行激光辐射,其参数设定为 2 瓦辐射 10 分钟。激光直接穿过一个终端带扩散透镜的光纤到达治疗部位,且激光尖端维持在皮肤以上 4mm 处。

[0173] 评估动物的存活率。在激光疗法后,我们观察到治疗部位的小鼠皮肤变黑、变硬。肿瘤复发通常在治疗的几天后发生。热治疗结合糖化壳聚糖的应用致使动物存活率的显著提高,在激光辐射前 24 小时进行糖化壳聚糖给药显示出了最显著的提高(见以下表格)。

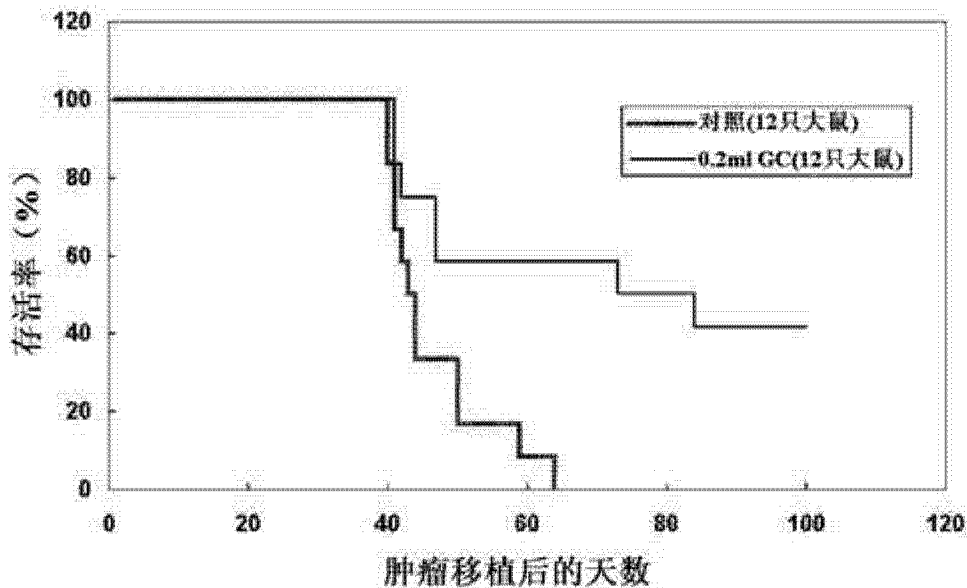
激光和糖化壳聚糖疗法对患有 B16 黑色素瘤的小鼠的作用	
治疗注射 <sup>a</sup>	长期 (>90 天) 存活率 (%) <sup>b</sup>
未治疗的对照	0.0
只做激光辐射	16.7
激光+激光后 24 小时的 0.2mL 1%GC	16.7
激光+激光后即时的 0.2mL 1%GC	25.05
激光+激光前 24 小时的 0.2mL 1%GC	41.7
<sup>a</sup> = 805nm 的二极管激光器, 其能量 (2W, 10 分钟) 直接穿过一个带扩散透镜的光纤到达治疗部位, 其激光尖端维持在皮肤以上 4mm 处。 <sup>b</sup> = 长期存活定义为接种后 >90 天且无肿瘤的复发。 GC = 糖化壳聚糖 n = 12 只雌性 C57BC/6 小鼠	

## [0174] 实例 7

在一个转移性乳腺癌模型中使用 805nm 激光和糖化壳聚糖的介入性激光辅助免疫疗法

进行了一项研究来测定最佳的介入性激光剂量和最佳的糖化壳聚糖剂量。将可移植的转移性乳腺肿瘤,DMBA-4 ( $10^5$ 活肿瘤细胞)皮下注射到雌性 Wistar Furth 大鼠(5-6 周龄, 100 -125g)的背部区域。DMBA-4 肿瘤,最初为化学诱发,是高转移和低免疫性的。肿瘤随淋巴细胞转移,并在远端部位快速形成多发性转移,在肿瘤移植后 30 到 40 天,所有的大鼠死亡。当原发肿瘤达到 0.2 到 0.5cm<sup>3</sup>时,剪除覆盖肿瘤的毛发,并在麻醉的动物(2% 异氟烷)上进行激光辅助免疫疗法。使用一种 805nm 的二极管激光器为靶肿瘤输送近红外光。用一种有效的圆柱形光漫射尖端的光纤将持续的激光功率输送。有效尖端长为 1.0cm,它带有一种透明的塑料护套来保护有效的尖端。为了插入有效的纤维尖端,可使用导针或穿刺辅助的插入方法。光纤的瘤内位置可通过一种数码照相机确定,这种相机能从 805nm 的激光中捕捉到红外光谱。在一个至少 100 天的期限内,对治疗后的大鼠进行每日观察,并对肿瘤进行每周两次的测量。成功治疗的标准是肿瘤移植后可存活 100 天。通过评估对照组(9 只大鼠,无治疗)、1、1.5、2、2.5 和 3W/cm<sup>2</sup>的介入性激光功率辐射 10 分钟(14 只 / 组)以及 2W/cm<sup>2</sup>的介入性激光功率辐射 30 分钟(14 只 / 组)的作用,测定最佳的介入性激光剂量。在 3W

辐射 10 分钟和在 2W 辐射 30 分钟的大鼠呈现出的平均存活率高于其它组。最佳的糖化壳聚糖剂量通过评估在 2.5W 辐射 20 分钟的介入性激光辅助免疫疗法后进行 0.1、0.2、0.4 和 0.6mL 1% 的糖化壳聚糖给药后的存活率来测定。未接受治疗的一组大鼠作为一个对照组。在一个 0.2mL 的糖化壳聚糖剂量后所观察到的最佳存活率为 42% (见下图)。



[0175] 介入性激光辅助免疫疗法加上 0.2ml 糖化壳聚糖 (GC) 之后的存活率

#### 实例 8

使用激光辅助免疫疗法在大鼠中诱发的对 DMBA-4 转移性乳腺的抗肿瘤免疫

将 DMBA-4 可移植的转移性乳腺肿瘤 ( $10^5$  活肿瘤细胞) 接种至雌性 Wistar Furth 大鼠 (6 到 7 周龄, 110g 到 130g) 的腹股沟区。通常, 原发肿瘤在接种后 7 到 10 天出现, 并且在 3 个星期内达到大约 1g 到 5g。肿瘤通过淋巴转移到腹股沟和腋淋巴结。当原发肿瘤为 0.2 到  $0.5\text{cm}^3$  (通常在接种的 10 到 15 天后达到) 时开始治疗。辐射之前, 将 0.25% 的吲哚菁绿和 1% 的糖化壳聚糖溶液 (0.20mL) 直接注射到大鼠肿瘤的中心。使用一种 805nm 的二极管激光器进行激光辐射, 其参数设定为 2 瓦辐射 10 分钟。激光直接穿过一个光纤到达治疗部位。辐射后, 将动物单独饲养和观察, 记录肿瘤的生长值, 每周两次。成功治疗的大鼠 (治愈的大鼠) 用相同的肿瘤细胞, 以每只大鼠  $10^5$  到  $10^7$  活肿瘤细胞的剂量进行重复激发, 观察动物的肿瘤发展 4 个月。在 32 只激光辅助免疫疗法治疗的大鼠中, 有八只成功治疗, 接种后 >120 天无肿瘤出现。在所有治愈的大鼠中, 治疗后转移持续发展, 随后逐渐降低并在无任何附加治疗的情况下最终消失。7 只已成功治疗的大鼠用每次注射在  $10^5$  到  $10^7$  活肿瘤细胞范围的剂量水平激发三次。这些动物中无任何原发肿瘤或转移肿瘤的再度出现, 且动物能存活 >120 天, 然而未治疗的对照组大鼠的原发肿瘤和转移肿瘤发展, 且平均存活为 30 天。

#### [0176] 实例 9

通过一种壳聚糖衍生物免疫佐剂增强激光辅助免疫疗法

用四种不同的免疫佐剂在大鼠中评估激光辅助免疫疗法期间免疫佐剂的作用。在治疗前的 7 到 10 天, 将 DMBA-4 可移植的转移性乳腺肿瘤 ( $10^5$  活肿瘤细胞) 皮下接种至雌性 Wistar Furth 大鼠 (6 到 8 周龄, 150g 到 200g) 的腹股沟脂肪垫中。通常, 原发肿瘤在接种后

5 到 7 天内变得明显,并且远端的腹股沟和腋淋巴结转移在接种后 15 到 20 天出现。当原发肿瘤达到 0.2 到 0.5cm<sup>3</sup>时开始激光辅助免疫疗法。通常,激光治疗在第 10 天进行。免疫佐剂包括 1% 糖化壳聚糖水溶液(0.2mL 剂量;两个实验中 n=48 只)、50% 弗氏完全佐剂(0.2mL 剂量; n=33 只) 50% 弗氏不完全佐剂(0.2mL 剂量; n=30 只) 和短棒状杆菌(*C. parvum*; 35 μg/ 大鼠的剂量; n=32 只)。将免疫佐剂与 0.25% 的吲哚菁绿混合,并在使用一种 805nm 的二极管激光器进行激光辐射前的 2 小时将其直接注射到肿瘤的中心。辐射之前将动物麻醉,并将覆盖原发肿瘤的发毛剪除。激光参数为 2 瓦辐射 10 分钟,以及一个 3mm 直径的激光治疗部位,从而 1cm 直径肿瘤得到 96J/cm<sup>2</sup>的注量。将动物单独饲养,每日观察,并收集肿瘤负荷的测量值,每周 2 次。

[0177] 将此研究获得的数据与从一些不同实验中带有肿瘤的对照大鼠(n=38 只)中获得的数据进行对比。与对照组的数据相比,所有的免疫佐剂在存活率中都有一个统计学显著的提高(p<0.05)。1% 糖化壳聚糖看起来是最有效的免疫佐剂,它具有一个 29% 的长期存活率(见下表)。当糖化壳聚糖与 *C. parvum* (p=0.009) 和弗氏不完全佐剂(p=0.03) 相比时,可观察到统计学意义。当与弗氏完全佐剂(有一个可比较的治愈率,18%) 相比时,可观察到存活率中的一个明显提高,但不具有显著性。在用弗氏不完全佐剂和 *C. parvum* 治疗后,观察到的存活率相对较差。

用四种不同的免疫佐剂治疗后的长期存活率		
治疗	大鼠数量	长期存活率 (%)
对照	38 <sup>a</sup>	0
激光+ICG+糖化壳聚糖	48 <sup>b</sup>	29
激光+ICG+弗氏完全佐剂	33	18
激光+ICG+弗氏不完全佐剂	30	7
激光+ICG+ <i>C. parvum</i>	32	9

<sup>a</sup> = 从不同研究中的一些对照组中收集的带有肿瘤的对照大鼠的数据  
<sup>b</sup> = 从两个单独实验中收集的数据  
**ICG** = 吲哚菁绿

#### [0178] 实例 10

通过一种壳聚糖衍生物免疫佐剂增强光动力疗法

为了评估光动力疗法作为一种直接破坏肿瘤的方法与糖化壳聚糖的结合,分别在 EMT6 乳腺癌和 Line-1 肺腺癌的小鼠模型中研究以光动力疗法和糖化壳聚糖注射为基础的光敏素和中位取代四(间-羟苯基)氯-(mTHPC)的一种组合物。在每种模型中,将 10<sup>6</sup>活肿瘤细胞皮下接种至 BALB/c 小鼠的下段背区域。7 天后,肿瘤达到治疗尺寸(7 到 8mm)。

[0179] 在 EMT6 乳腺癌模型中,评估的治疗组如下表所示。在 5% 的无菌葡萄糖中制备光敏素(mont-saint-hilaire, Quebec, 加拿大)至 1mg/ml 的浓度。辐射前的 24 小时,将一个 5mg/kg 剂量的光敏素进行静脉给药。在注射光敏剂后立即使动物远离光直射,直至光动力治疗后 3 天。在光治疗期间,将未麻醉的小鼠限制在固定器中,将其背部暴露。光(630nm)通过一个 8mm 直径的液芯光导管输送。功率密度设置在 100mW/cm<sup>2</sup>,总的光剂量为 60J/cm<sup>2</sup>。如果适用,在光辐射后立即对动物进行癌周剂量为 0.5 或 1.5% 糖化壳聚糖的给药。观察动物的肿瘤出现,每 2 天一次直至光动力治疗后 90 天,并测定肿瘤体积的变化,每周三次。

在患有 EMT6 乳腺癌的小鼠中进行以光敏素为基础的光动力和糖化壳聚糖疗法后的存活率			
治疗	小鼠数量	小鼠长期存活数量	长期存活率 (%)
对照	8	0	0.0
只有非热激光	8	0	0.0
非热激光+1.5%GC <sup>a</sup>	8	0	0.0
非热激光+光敏素	8	3	37.5
非热激光+光敏素+0.5%GC	8	5	62.5
非热激光+光敏素+1.5%GC	8	6	75.0

<sup>a</sup> = 应该注意到激光疗法不能加热肿瘤，因为没有使用光吸收剂并且激光功率不足以加热肿瘤。因此，此组不是激光附注免疫疗法系统的代表。

GC = 糖化壳聚糖

激光疗法的注量率为  $100\text{mW}/\text{cm}^2$ ，总的光剂量为  $60\text{J}/\text{cm}^2$

在辐射前的 24 小时，将  $5\text{mg}/\text{kg}$  的光敏素进行静脉给药。

在辐射后立即将  $0.1\text{mL}$  0.5 或 1.5% 糖化壳聚糖进行癌周注射。

[0180] 在治疗的次日，所有的光动力和光动力糖化壳聚糖治疗的大鼠都具有完全的肿瘤消退。通常，在治疗后 2 个星期内可以检测出肿瘤的复发。标准光动力疗法的有效性为 37.5%，在 0.5 和 1.5% 糖化壳聚糖的给药后，它会分别提高 62.5% 和 75%。与只用光动力疗法的小鼠相比，糖化壳聚糖显著提高了带有肿瘤的小鼠的存活率 ( $p < 0.05$ )。

[0181] 在 Line-1 肺腺癌模型中，治疗组如下表所示。在乙醇、聚乙二醇 400 和水的一种 2:3:5 的混合物中制备 mTHPC，其最终浓度为  $0.02\text{mg}/\text{mL}$ 。辐射前的 24 小时，将一个  $0.1\text{mg}/\text{kg}$  剂量的 mTHPC 进行静脉注射。在注射光敏剂后立即使动物远离光直射，直至光动力治疗后 3 天。在光治疗期间，将未麻醉的小鼠限制在固定器中，将其背部暴露。来自一个  $0.25\text{W}$  二极管激光器的一个  $652\text{nm}$  光通过一个  $8\text{mm}$  直径的液芯光导管输送。功率密度设置在  $110\text{mW}/\text{cm}^2$ ，总的光剂量为  $30\text{J}/\text{cm}^2$ 。如果适用，在光辐射后立即对动物进行癌周剂量为 1.67% 糖化壳聚糖的给药。观察动物的肿瘤出现，每 2 天一次直至光动力治疗后 90 天，并测定肿瘤体积的变化，每周三次。

在患有 Line-1 肺腺癌的小鼠中进行以 mTHPC 为基础的光动力和糖化壳聚糖疗法后的存活率			
治疗	小鼠数量	小鼠长期存活数量	长期存活率 (%)
对照	8	0	0.0
只有非热激光	8	0	0.0
激光+GC	8	0	0.0
激光+mTHPC	8	0	0.0
激光+mTHPC+1.67%GC	8	3	37.5

GC = 糖化壳聚糖

mTHPC = 以中位取代四(间-羟苯基)氯为基础的光动力疗法

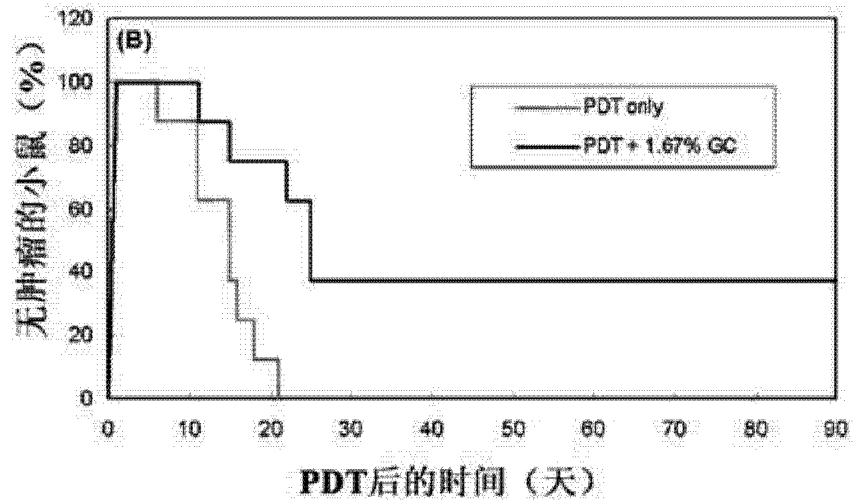
激光疗法的注量率为  $110\text{mW}/\text{cm}^2$ ，总的光剂量为  $30\text{J}/\text{cm}^2$

在辐射前的 24 小时，将  $0.1\text{mg}/\text{kg}$  的 mTHPC 进行静脉给药。

在辐射后立即将  $0.09\text{mL}$  1.67% 糖化壳聚糖进行癌周注射。

[0182] 在 3 周内所有的小鼠都观察到了肿瘤的复发。在以 mTHPC 为基础的光动力疗法后，给药 1.67% 的糖化壳聚糖会致使一个 37.5% 的存活率，而其它的结合疗法都无效。Line-1

肺腺癌模型被认为是一种缺乏免疫的肿瘤模型。肿瘤局部糖化壳聚糖疗法对 mTHPC 为基础的光动力疗法缓解小鼠 Line-1 肿瘤的作用如下图所示。



[0183] 肿瘤局部糖化壳聚糖疗法对 mTHPC 为基础的 PDT 缓解小鼠 Line-1 肿瘤的作用

GC= 糖化壳聚糖

mTHPC= 中位取代四（间-羟苯基）氯

PDT= 光动力疗法

这些研究的结果表明，增大光疗法的有效性需要一种活性免疫刺激。

[0184] 实例 11

激光辅助免疫疗法的不同成分对治疗大鼠转移瘤的作用

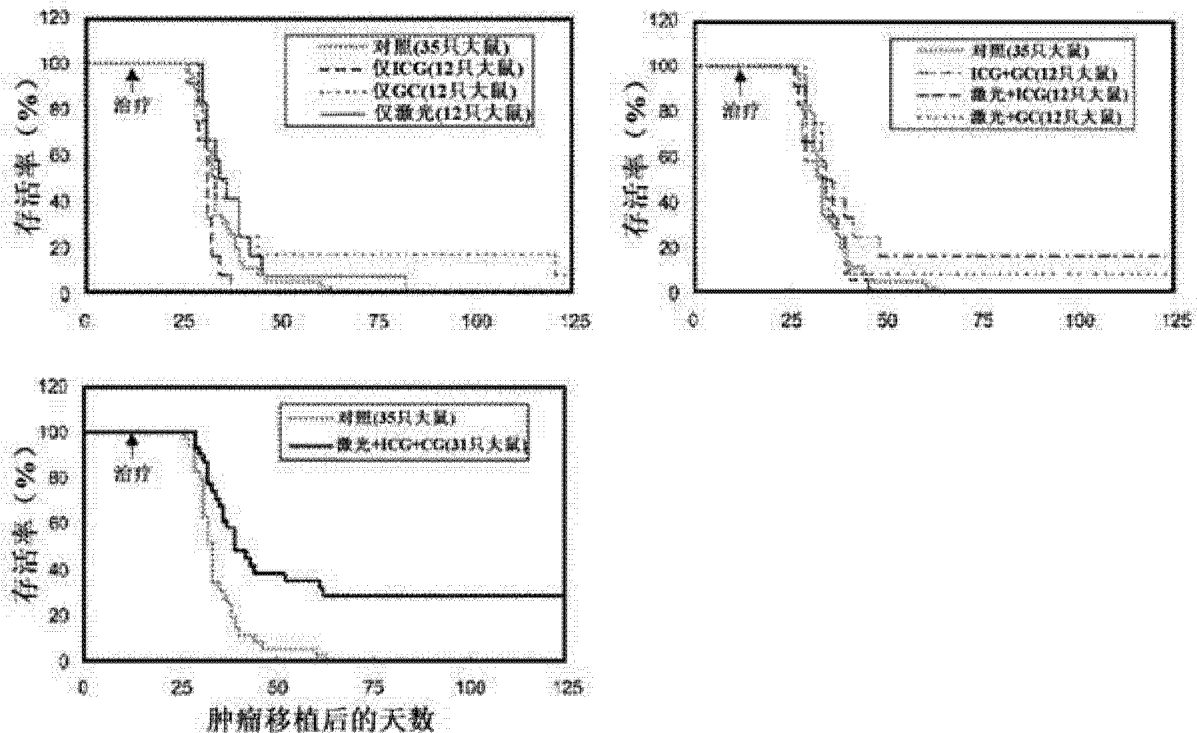
在此研究中，分别使用患有转移性乳腺肿瘤和前列腺肿瘤的雌性和雄性大鼠来评估激光辅助免疫疗法系统的三种成分的各种组合物疗法。激光辅助免疫疗法系统由一个近红外激光二极管激光器，最大输出功率为 25W；激光吸收染料，吲哚菁绿；和免疫佐剂，糖化壳聚糖构成。当原发肿瘤达到 0.2 到 0.5 cm<sup>3</sup>时，开始在带有肿瘤的大鼠中进行激光辅助免疫疗法。在所有组中，将 0.2mL 的一种 GC 和 / 或 ICG 溶液注射至原发肿瘤的中心。在接受激光疗法的大鼠中，在辐射前 2 小时进行注射，将动物麻醉并剪除覆盖肿瘤的毛发。激光设置为 2W 和 10 分钟，激光光纤的尖端维持在皮肤以上 4mm 处，激光能量通过光纤直接到达治疗部位。

[0185] 治疗后将动物单独饲养。在存活率研究中，患有乳腺或前列腺肿瘤的大鼠每日观察，每个肿瘤的三种尺寸每周测量。将 DMBA-4 可移植的转移性乳腺肿瘤（10<sup>5</sup>活肿瘤细胞）皮下接种至每只雌性 Wistar Furth 大鼠（5 到 6 周龄，100g 到 125g）的一个腹股沟脂肪垫中。接种后 7 到 10 天，原发肿瘤出现。通常，在大约 2 个星期内转移瘤随淋巴细胞转移，并在远端区变得明显。在没有治疗的情况下，带有肿瘤的大鼠的平均存活时间为 35 天。用激光辅助免疫疗法系统的不同成分治疗 8 组患有转移性乳腺癌的大鼠，如下表所示。对单个的成分和成分的各种组合物，进行存活率以及原发肿瘤和转移瘤的特性数据的测定。另外，用 0.5、1.0 和 2.0% 的糖化壳聚糖治疗三组雌性大鼠（n=16 只 / 组），以评估免疫佐剂的浓度对大鼠存活率的影响。

组别	激光	染料/佐剂	大鼠数量
对照	—	—	35 <sup>a</sup>
仅 ICG 注射	—	0.25% ICG <sup>b</sup>	12
仅 GC 注射	—	1.0% GC <sup>b</sup>	12
仅激光	2W,10min	—	12
激光+ICG	2W,10min	0.25% ICG <sup>b</sup>	12
激光+GC	2W,10min	1.0% GC <sup>b</sup>	12
ICG+GC	—	0.25% ICG/1.0% GC <sup>b</sup>	12
激光+ ICG+GC	2W,10min	0.25% ICG/1.0% GC <sup>b</sup>	31 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> = 从两个单独实验中收集的数据  
<sup>b</sup> = 直接注射到原发肿瘤中心的注射量 (0.2mL)  
 GC = 糖化壳聚糖  
 ICG = 吲哚菁绿  
 — = 不适用

[0186] 在患有转移性乳腺癌肿瘤的大鼠中，单一成分的治疗组(吲哚菁绿组和仅激光组)的所有大鼠全部死亡，其平均存活时间与对照组的相似。糖化壳聚糖组的两只大鼠存活，其中一只大鼠被认为是长期存活，另外一只大鼠为延长的存活期(>120 天)。在用两种成分治疗后，在激光加上糖化壳聚糖组以及吲哚菁绿加上糖化壳聚糖组中分别有 1 个和 2 个长期存活者。当单成分治疗组或双成分治疗组与对照组相比时，存活时间中无统计学意义。在三成分的激光辅助免疫疗法(即光热应用结合糖化壳聚糖)后九只大鼠长期存活，致使 31 只大鼠的两个单独试验中有一个大约 30% 的治愈率。与对照大鼠相比，在治疗大鼠的中位存活时间中观察到一个显著的差异(p<0.0001)。在用激光辅助免疫疗法的一种、两种或三种成分治疗后，大鼠的存活率如下图所示。通常，在原发肿瘤接种后的 2 个星期出现转移瘤，并在肿瘤消退之前达到一个最大尺寸。



[0187] 用激光辅助免疫疗法的一种、两种或三种成分治疗后的大鼠存活率。

[0188] GC=1.0% 糖化壳聚糖

ICG=0.25% 吲哚菁绿。

[0189] 实例 12

激光辅助免疫疗法诱发的抗肿瘤免疫及其继承性转移

为了调查激光辅助免疫疗法诱发抗肿瘤免疫的机制,用免疫脾细胞进行继承性转移。在激光辅助免疫疗法前的 7 到 10 天,将 DMBA-4 可移植的转移性乳腺肿瘤( $10^5$ 活肿瘤细胞)皮下接种至每只雌性 Wistar Furth 大鼠的一个腹股沟脂肪垫中。在没有治疗的情况下,带有肿瘤的大鼠的平均存活时间为 30 天。在激光治疗之前,将 0.2mL 的一种含有 0.25% 吲哚菁绿和 1% 糖化壳聚糖的溶液直接给药至激光治疗大鼠的原发肿瘤中。一种 805nm 的激光器(2W, 10 分钟)用于辐射。在一些成功治疗的带有肿瘤的大鼠中评估诱发免疫的保护能力,这些成功治疗的大鼠用一个增大的活肿瘤细胞接种剂量出现重复激发。另外,在首次试验的大鼠中评估激光辅助免疫疗法后对肿瘤激发的抗性以及对肿瘤生长的抑制。

[0190] 用激光辅助免疫疗法成功治疗的 15 只大鼠,在初次接种后的 120 天,用  $10^6$ 活肿瘤细胞进行激发。基于比较的目的,用  $10^6$ 活肿瘤细胞对 18 只首次实验的鼠龄相符(25 周龄)的大鼠进行接种。所有成功治疗的大鼠显示出了对激发的完全抗性,并且未观察到原发肿瘤和转移;然而,年龄相符的对照大鼠有原发和转移肿瘤的发展,并在接种后的 30 天内死亡。在一个单独的年轻大鼠(大约 8 周龄)组,用  $10^5$ 活肿瘤细胞接种。看起来,存活率取决于肿瘤剂量,对照大鼠用  $10^5$ 和  $10^6$ 活肿瘤细胞接种,其存活时间分别为 33 和 28 天。通常,成功治疗的大鼠的原发肿瘤和未治疗的转移中都有一个逐渐的消退。

[0191] 在首次激发后,来自一些实验组的大鼠在 1 到 5 个月的时间间隔内,用  $10^6$ 活肿瘤细胞进行两个后续的激发。用激光辅助免疫疗法成功治疗的大鼠能完全抵抗三次肿瘤激发。数据如下表所示。与之相反,对于年龄相符的带有肿瘤的对照大鼠,其远端腹股沟和腋域中发展了多发性转移,并在 35 天内死亡。在用  $10^5$ 活肿瘤细胞接种的所有 20 只对照大鼠中,发展了多发性转移;然而,与用更高的  $10^6$ 活肿瘤细胞剂量接种的年龄符合的对照大鼠相比,这些大鼠的存活时间有轻微提高。成功治疗的大鼠中对肿瘤激发的抗性表明了肿瘤选择性免疫。

组	大鼠数量	肿瘤细胞的数量	肿瘤率	30 天的 死亡率	40 天的 死亡率	存活 (天)
治愈的大鼠 <sup>a</sup>	15	10 <sup>6</sup>	0%	0%	0%	>120
治愈的大鼠 <sup>b</sup>	15	10 <sup>6</sup>	0%	0%	0%	>120
治愈的大鼠 <sup>c</sup>	15	10 <sup>6</sup>	0%	0%	0%	>120
年龄相符的肿瘤 <sup>d</sup>	18	10 <sup>6</sup>	100%	83%	100%	28.2±2.8
对照大鼠 <sup>e</sup>	20	10 <sup>5</sup>	100%	20%	100%	32.7±3.5

<sup>a</sup> = 首次激发。由激光辅助免疫疗法治愈的带有肿瘤的大鼠，在初次接种后的 120 天，用活肿瘤细胞进行激发。

<sup>b</sup> = 第二次激发。由激光辅助免疫疗法治愈的带有肿瘤的大鼠，在首次激发后，用活肿瘤细胞进行第二次激发。

<sup>c</sup> = 第三次激发。由激光辅助免疫疗法治愈的带有肿瘤的大鼠，在第二次激发后，用活肿瘤细胞进行第三次激发。

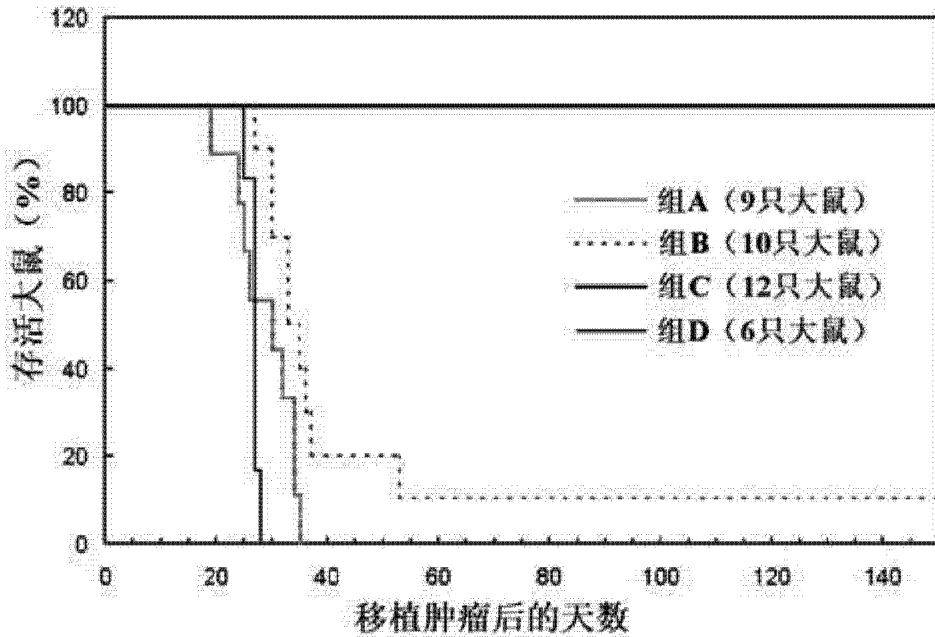
<sup>d</sup> = 接种时，与已治愈的大鼠年龄相同的未治疗的大鼠（之前没有肿瘤暴露）

<sup>e</sup> = 接种时，未治疗的大鼠为 8 周大（之前没有肿瘤暴露）

[0192] 对于继承性免疫实验，通过在一个宽底玻璃均化器中碾磨，将从活的患有 DMBA-4 肿瘤的大鼠中获得的活肿瘤组织分散到一个单细胞的悬浮液中。长期存活的大鼠在用 10<sup>6</sup> 活肿瘤细胞进行肿瘤激发后 28 天时，将其处死，并切除其脾脏，剥离脂肪。用来自带有肿瘤的对照大鼠的脾细胞进行两个单独的实验。在第一和第二个实验中，分别在肿瘤接种的 22 和 39 天获得脾细胞。通过机械破坏，在 10% 的胎牛血清介质中制备细胞悬浮液。脾细胞也在之前没有暴露于肿瘤细胞的一个首次实验的大鼠中收集。在以一个脾细胞：肿瘤细胞为 400:1 的比例混合之前，在一个血细胞计数器上对脾细胞和活肿瘤细胞进行计数。用体积为 0.2mL 的含有 4×10<sup>7</sup> 脾细胞和 10<sup>5</sup> 活肿瘤细胞的混合物对首次实验的大鼠进行接种。对于继承性免疫转移实验，4 组首次实验的雌性 Wistar Furth 大鼠用肿瘤细胞接种。治疗组为：组 A 用 10<sup>5</sup> 活肿瘤细胞接种的未经治疗的带有肿瘤的对照大鼠；组 B 用肿瘤细胞与从一个带有肿瘤的对照大鼠中获得的脾细胞的混合物接种大鼠；组 C 肿瘤激发后 28 天，用肿瘤细胞与从一个激光辅助免疫疗法成功治疗的带有肿瘤的大鼠中获得的脾细胞的混合物接种大鼠；和组 D 用肿瘤细胞与从一个之前没有肿瘤暴露的、首次实验的大鼠中获得的脾细胞的混合物接种大鼠。将实验重复进行两次，将这两个实验中存活的大鼠合并，如下图所示。组 C 的大鼠中未观察到原发肿瘤或转移瘤，表明从激光辅助免疫疗法成功治疗的大鼠中获得的脾细胞为受体提供了 100% 的保护。在所有组 A 的带有肿瘤的对照大鼠中，在肿瘤接种的 35 天内观察到多发性转移和死亡。从组 D 中的健康大鼠中获得的脾细胞不能提供保护。组 B 中 10 只大鼠中有一只存活；然而，这只大鼠随后发展了原发肿瘤和转移瘤。所有的组 C 大鼠在继承性免疫转移 60 天后再次进行肿瘤细胞注射，所有大鼠都抵抗住了肿瘤细胞再激发。收集组 C 中大鼠的免疫脾细胞，并以首次继承性转移中相同的比例与肿瘤细胞混合，以评估这些动物的脾细胞保护接种了此种混合物的 Wistar Furth 大鼠 (n=6) 的能力。从组 C 的大鼠中获得的免疫细胞保护了 6 只首次实验的大鼠中的 5 只，未观察到原发肿瘤和转移瘤。与对照组相比，死亡的大鼠有一个延长的存活时间 (60 vs 30 天)，并且接种后肿瘤出现的时间推迟 (37 vs 7 到 10 天)。

[0193] 当肿瘤激发时，已成功治疗的大鼠对激发的强烈抗性，表明肿瘤选择性免疫有一个长时间的持续效应。





[0194] 将大鼠脾细胞作为免疫细胞使用的继承性免疫转移实验中的大鼠存活曲线。

[0195] 组 A= 来自肿瘤对照大鼠的结果

组 B= 用肿瘤细胞与从一个未治疗的带有肿瘤的大鼠中获得的脾细胞的混合物注射大鼠, 所获得的结果

组 C= 用肿瘤细胞与从一个激光辅助免疫疗法成功治疗的带有肿瘤的大鼠中获得的脾细胞的混合物注射大鼠, 所获得的结果

组 D= 使用从一个首次实验的大鼠中获得的脾细胞, 所获得的结果

备注: 将来自 2 个单独实验的数据合并, 并一起绘图。

[0196] 实例 13

激光辅助免疫疗法和低剂量化疗的结合

在一个实例临床研究中, 两名乳腺癌患者每周(在 inCVAX 治疗后) 接受一个 150 和 200mg/m<sup>2</sup>之间剂量的环磷酰胺。最初, 患者的缓解良好, 其肿瘤缩小且不良反应最少。在几个月后, 缓解减慢, 所以肿瘤学家将低剂量化疗改变到每周紫杉醇的剂量为 75 mg/m<sup>2</sup>, 缓解再一次变得非常好, 并伴随肿瘤的缩小。没有新的转移出现。患者继续接受低剂量化疗。在低剂量化疗后, 第三名患者变得可做手术, 对其进行一个乳房切除术, 所以与外科手术结合也是一个选择。