

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200410097150.5

[51] Int. Cl.

A61K 47/04 (2006.01)

C01B 31/08 (2006.01)

A61K 33/44 (2006.01)

A61K 9/20 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 9 月 13 日

[11] 授权公告号 CN 1274366C

[22] 申请日 2004.12.13

[21] 申请号 200410097150.5

[71] 专利权人 杨维稼

地址 100029 北京市朝阳区樱花东路樱花
园 8 楼 4 单元 101 号

共同专利权人 孙逸萍 孙汉翔

[72] 发明人 杨维稼 孙逸萍 孙汉翔

审查员 修 文

权利要求书 1 页 说明书 9 页

[54] 发明名称

药用纳米碳球及其在制备治疗癌症药物中的
应用

[57] 摘要

本发明涉及药用纳米碳球及其在制备治疗癌症
药物中的应用，本发明提供的药用纳米碳球以及以
药用纳米碳球为载体的具有生物导向性质的抗肿瘤
药物可明显增强抗肿瘤疗效，降低化疗、放疗药的
毒副作用，能最大限度减少抗肿瘤药物对机体正常
细胞和免疫系统的损害。

1、一种具有生物导向性质可用作抗肿瘤药物的药用纳米碳球在制备治疗癌症药物中的应用，其特征在于该药用纳米碳球为活性成份，其粒径为2nm-1000nm，其中90%的微粒粒径为 $\leq 300\text{nm}$ ，其比表面积为 $100-3000\text{M}^2/\text{g}$ ，灰份低于8%，干燥失重应低于5%，铅、镉、砷、汞含量低于20ppm，异常毒性检查法检查应无毒性；微生物限度检查法检查总含菌数每克应低于100个。

药用纳米碳球及其在制备治疗癌症药物中的应用

技术领域

本发明涉及药用纳米碳球及其在制备治疗癌症药物中的应用。更确切地说，本发明涉及一种具有生物导向性质、用作抗肿瘤药物的药用纳米碳球，一种以药用纳米碳球为载体的具有生物导向性质的抗肿瘤药物及其制备方法，还涉及该药用纳米碳球在制备治疗癌症药物、治疗心脑血管疾病的药物以及治疗风湿类风湿疾病药物中的应用。

背景技术

全世界每年因恶性肿瘤死亡达 700 万人，中国每年新发病约 200 万人，肿瘤已成为人类死亡的主要原因之一，癌症的预防与治疗任务十分艰巨。目前治疗癌症的主要手段是早期发现，手术切除，但手术切除并不能解决转移病灶的问题。由于转移往往造成术后复发，所以一般在手术后都加用化疗或放疗以防止转移。但化疗和放疗的效果也不理想，原因是药物的治疗剂量和中毒剂量的差别不大，尤其是造血功能细胞对化、放疗极度敏感，在治疗中不可避免地造成严重的全身性副作用，因而不能长期使用或大剂量使用。

理想的药物是最大限度地有目标地将药物引导到病灶区，使病灶区和正常细胞区的药物浓度出现很大的差别，从而有效地保护正常细胞和组织不受伤害，这就是导向药物。在这方面最近出现了淋巴靶向药的剂型，如使用以活性炭为载体的靶向制剂，但国内外文献未见有关以药用纳米碳球为载体的靶向制剂的报道。本发明人经长期研究和大量试验，结果表明，药用纳米碳球具有生物导向性质，对肿瘤有明显的抑制作用，并具有良好的载药作用，在此基础上完成了本发明。

发明内容

本发明的第一个目的是提供一种具有生物导向性质、可用作抗肿瘤药物或载体的药用纳米碳球。

本发明第二个目的是提供一种以药用纳米碳球为载体的具有生物导向性质的抗肿瘤药物及其制备方法。

本发明第三个目的是提供药用纳米碳球在制备治疗癌症药物中的应用。

本发明第四个目的是提供药用纳米碳球在制备治疗心脑血管疾病药物中的应用。

本发明还有一个目的是提供药用纳米碳球在制备治疗风湿、类风湿疾病药物中的应

用。

本发明提供一种具有生物导向性质可用作抗肿瘤药物或载体的药用纳米碳球，其特征在于该药用纳米碳球粒径为 2nm-1000nm，其中 90%的微粒粒径为 $\leq 300\text{nm}$ ，其比表面积为 100-3000 M^2/g ，灰份低于 8%，干燥失重应低于 5%，铅、镉、砷、汞含量低于 20ppm，异常毒性检查法检查应无毒性；微生物限度检查法检查总含菌数每克应低于 100 个。

用于制备该药用纳米碳球的原料可选自纳米碳材料，例如市售的美国卡博特 (Carbot) 公司生产的 VXC72 纳米碳球，其特性如表 1 所示：

表 1

性能项目	单位	指标
比表面积	M^2 / g	254
吸油值	$\text{ML}/100\text{g}$	192/174
着色力	% ITRB	87
粒径	nm	30
灰分	%	1.0
干燥失重	%	1.0

本发明的药用纳米碳球的制备方法如下：

将市售药用纳米碳球 0.1g，加入 0.1N 盐酸 5mL，浸泡处理 8 小时，加水 50mL，过滤，反复水洗至 PH 为 6，加 0.1N 氢氧化钠 5mL，处理 8 小时，过滤，水洗至 PH 为 8-9，加入 0.1N 盐酸 5mL，过滤，干燥，直至获得符合质量要求的药用纳米碳球。

本发明提供一种以药用纳米碳球为载体的具有生物导向性质的抗肿瘤药物（简称 A 制剂），其特征在于它的组成及配比如下：

药用纳米碳球	5—100mg
导向剂	0—10mg
助悬剂	0—30mg
表面活性剂	0—15mg
赋形剂	0—500mg
水	适量。

上述抗肿瘤药物，其特征还在于制备药用纳米碳球的原料选自纳米碳材料，例如 VXC-72；导向剂选自叶酸及其盐类，如亚叶酸钙；助悬剂选自聚乙烯吡咯烷酮、阿拉伯胶、西黄芪胶、聚乙烯醇羧甲基纤维素钠、羟丙基甲基纤维素等，优选为聚乙烯吡咯烷酮；表面活性剂选自吐温、聚氧乙烯蓖麻油、博洛沙姆等，优选为博洛沙姆；赋形剂选自血清白蛋白或丙种球蛋白。

上述抗肿瘤药物的制备方法，包括如下步骤：

- (1) 制备符合质量要求的药用纳米碳球；
- (2) 按配比加入助悬剂和/或表面活性剂；
- (3) 按配比加入导向剂，超声振荡处理 30～60 分钟，高压灭菌 30～60 分钟，分装，灌封，高压灭菌 45 分钟，得到液体型制剂成品；
- (4) 按配比加入赋形剂，在无菌条件下冷冻干燥即得冻干粉型成品。

本发明还提供另一种以药用纳米碳球为载体的具有生物导向性质的抗肿瘤药物（简称 B 制剂），其特征在于它的组成及配比如下：

药用纳米碳球	5—100mg
导向剂	0—20mg
抗肿瘤活性成分	1—100mg
助悬剂	0—30mg
表面活性剂	0—15mg
赋形剂	0—500mg
水	适量。

上述抗肿瘤药物，其特征还在于药用纳米碳球的原料选自纳米碳材料，如 VXC72；导向剂选自叶酸及其盐类，如亚叶酸钙；抗肿瘤活性成分选自抗肿瘤化疗药、抗肿瘤放疗药、抑制肿瘤血管生成的物质、抗肿瘤抗体或半抗体类、干扰素或抗癌的多肽类等，优选为抗肿瘤化疗和放疗药；助悬剂选自聚乙烯吡咯烷酮、阿拉伯胶、西黄芪胶、聚乙烯醇羧甲基纤维素钠、羟丙基甲基纤维素等，优选为聚乙烯吡咯烷酮；表面活性剂选自吐温、聚氧乙烯蓖麻油、博洛沙姆等，优选为博洛沙姆；赋形剂选自血清白蛋白或丙种球蛋白。

上述抗肿瘤药物的制备方法，其特征还在于该方法包括如下步骤：

- (1) 制备符合质量要求的药用纳米碳球；
- (2) 按配比加入助悬剂和/或表面活性剂以及抗肿瘤活性成分，混合均匀；
- (3) 按配比加入导向剂，超声振荡处理 30～60 分钟，高压灭菌 30～60 分钟，分装，灌封，高压灭菌 45 分钟，得到液体型制剂成品；
- (4) 按配比加入赋形剂，在无菌条件下冷冻干燥即得成品。

本发明还提供该药用纳米碳球在制备治疗癌症药物中的应用。

本发明还提供该药用纳米碳球在制备治疗心脑血管疾病药物中的应用。

本发明还提供该药用纳米碳球在制备治疗风湿、类风湿疾病药物中的应用。

对于后二种应用,所使用的制剂为未吸附抗肿瘤活性成分的药用纳米碳球,其剂量和原理同抗癌制剂,它是通过网状内皮系统向动脉硬化区和风湿类风湿病灶定向聚集,然后通过吞噬作用剥离、消除病灶。

本发明制剂的给药途径如下:本发明制剂需通过血流和网状内皮系统才能起作用,任何能直接或间接进入血流或淋巴系统的给药途径都适用,优选为静脉给药和腹腔给药,此外可以肌肉给药和粘膜给药;由于肠壁中的M细胞有胞饮小于100nm微粒的能力,所以本发明制剂也可以口服给药。剂量视所载药物的种类和给药方式而定,静脉或肌肉给药时的推荐剂量:成人每次用量(指药用纳米碳球含量)10—80mg,隔天一次或每周两次,三个月为一疗程;腹腔给药剂量可增加到5000mg;由于本发明制剂毒性很小,口服剂量可以根据病情使用0.1—5克/次。以上均为药用纳米碳球的剂量,在其加载抗肿瘤活性成分的情况下所载的药量均需低于临床使用的常规剂量,视病情而灵活掌握,一般为1/10~2/10。

下面对药用纳米碳球及其应用的有益效果说明如下:

动物试验结果表明,粒径为2—300nm的药用纳米碳球具有良好的生物导向性质,其导向作用是通过网状内皮系统中的吞噬细胞向炎症区运动、聚集和固定而实现的。这种趋向性可以通过加载癌细胞增殖嗜好物质而大为加强。因此药用纳米碳球会在免疫系统的作用下自动透过血管壁而向肿瘤的病灶区富集。癌细胞由于其分化程度低于正常细胞,故具有较强的吞噬能力,药用纳米碳球被癌细胞吞噬后,癌细胞的代谢被扰乱而导致死亡,因此药用纳米碳球本身具有抑制肿瘤生长和杀死肿瘤细胞的作用。如果以药用纳米碳球为载体吸附并载带抗肿瘤活性成分则更加强了杀灭癌细胞的作用,从而制备出各种抗肿瘤的靶向药物,使得在肿瘤微血管内部和肿瘤细胞间质中的药物浓度达到常规治疗方法的几十甚至上百倍,极大地增强了抗肿瘤疗效,降低了化疗、放疗药物的毒副作用。因此在使用药用纳米碳球的基础上,临床常规化疗和放疗的剂量可以下降到原使用剂量的10—20%,却反而达到比常规剂量更好的治疗效果,而能最大限度减少通常所见的放、化疗中难于避免的损害正常细胞和免疫系统的副作用。此外研究结果还表明,本发明的药用纳米碳球对血管动脉粥样硬化、冠心病、脑血栓均有防治效果,对风湿类风湿等感染性疾病也有明显治疗效果,其机理是由于所有病灶区存在有炎症,药用纳米碳球有向这些病灶区运动的趋向性,在病灶区的吞噬细胞视药用纳米碳球为异物,激发出吞噬特性,则在吞噬的过程中逐渐地剥离病灶。

下面通过动物试验来说明本发明的有益效果:

(一) 药用纳米碳球的急性毒性试验:

1、抗肿瘤剂:以美国Carbot公司生产的VXC72为原料先制备药用纳米碳球,不加抗肿瘤活性成分,得到药用纳米碳球制剂。

2、试验动物：CD-1 小鼠由北大医院动物中心提供。

3、给药剂量及给药方式：取清洁级雄性 CD-1 小鼠，18—22 克，共 60 只，分成 6 组，每组 10 只，在无菌条件下按各组剂量尾静脉注射给药，每周 2 次，0.1ml/只/次，计算累计剂量。

试验结果如表 2 所示

表 2

	动物数	产品 A 剂量 (mg/KG)	死亡数 (n)	死亡%	剂量对数	概率单位
1	10	160	1	10	2.204	3.720
2	10	180	1	10	2.255	3.720
3	10	200	2	20	2.301	4.160
4	10	220	4	40	2.342	4.475
5	10	240	5	50	2.380	5.000
6	10	260	5	50	2.415	5.000

回归方程为： $Y = -12.6303 + 7.3487X$ ，（ $r = 0.9586$ ）

当 $a = 0.01$ 时， r 为 0.9170，（其中 Y 为概率单位加 5 后的值， X 为剂量的对数 $\log x$ ）
计算得到 LD_{50} 为 250.6801mg/kg

置信系数 $a = 0.05$ 时的置信区间为： $201.4321 \leq LD_{50} \leq 311.9688$ ，0.0950

结果显示本发明药用纳米碳球对小鼠的急性毒性 LD_{50} 为 250.68mg/Kg，这表明本发明制剂的毒性较低，非常安全。

（二）药用纳米碳球（A 制剂）的抑瘤试验：

本试验的目的是评价药物对 S180 荷瘤小鼠的抑瘤作用。

材料和方法

受试物

受试物名称：	S2
受试物来源：	Velgene 公司
受试物收到时状态：	安剖瓶封装
收样日期：	2004 年 10 月 26 日
试验日期：	2004 年 10 月 26 日至 2004 年 11 月 08 日

实验动物：实验动物为 CD 小鼠，SPF-VAF 级，共 70 只，雄性，18g-22g，由本部提供，合格证号：SCXK(京)2002-0001。

饲养环境：饲养于 SPF 级动物实验室，温度为 $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，相对湿度为 $55\% \pm 15\%$ 。
合格证号：SYXK(京)2002-0002。

饲料：小鼠生长专用饲料，由北京科澳协力饲料有限公司提供，
合格证号：京动（2000）第 015 号。

动物分组及分组方法

根据接种肿瘤时间先后和体重大小，进行随机分组，共分为 5 组，每组 14 只。

阴性对照：灭菌生理盐水组（大同惠达药业有限公司，生产批号：0311081，规格：10ml:90mg）

阳性对照：环磷酰胺组（江苏恒瑞医药股份有限公司，批号 04070821，规格：0.2g/支）

低剂量组：1mg/kg 体重组

中剂量组：2mg/kg 体重组

高剂量组：4mg/kg 体重组

实验方法：

1、接种瘤液的制备：无菌操作解剖荷瘤小鼠，显微镜下细胞记数，制备成浓度为 2×10^7 个细胞/ml，共 20ml 用于接种。

2、肿瘤接种：无菌操作，腋皮下接种瘤液 0.2ml/只，即 4×10^6 个细胞/只小鼠。

3、给药方法：除阳性对照组外各组于接种第 1 天、第 3 天、第 6 天、第 8 天、第 10 天进行尾静脉注射给药；阳性对照组腹腔注射环磷酰胺，按 30mg/kg 的剂量，于接种第 1 天、第 3 天、第 6 天、第 8 天、第 10 天给药。

检测指标：

- 1、每日观察动物健康状况及死亡情况。
- 2、实验结束时称动物体重及瘤重。
- 3、剖检动物，观察主要脏器病理变化。

数据统计：

实体瘤的疗效以瘤重抑制百分率表示。

瘤重抑制率% = $(1 - T/C) \times 100\%$

抑瘤率大于 40%，并经统计学处理有显著差异时，认为有苗头。

统计学处理采用 SPSS for windows 进行分析。

若治疗期间给药组鼠死亡超过 20%，或平均体重下降超过 15%者，表示药物有毒性反应。

结果

1、药物对动物体重及生存状况的影响，见表 3

表 3 药物对动物体重及生存状况的影响

组别	动物初始体重 (克)	实验结束时动物体 重(克)	死亡率%
阴性对照组	21.8±1.01	27.2±3.74	14.3
阳性对照组	21.3±0.98	29.7±1.45	—
低剂量组	21.0±1.23	28.5±2.88	5.1
中剂量组	21.6±1.11	29.3±1.83	6.4
高剂量组	21.2±1.17	27.9±5.08	7.4

2、药物对荷瘤小鼠的抑瘤作用 见表 4

表 4 药物对荷瘤小鼠的抑瘤作用

组别	瘤重 (克)	抑瘤率 %
阴性对照组	1.23±0.28	—
阳性对照组	0.60±0.23**	51.3
低剂量组	0.31±0.22**	75.1
中剂量组	0.69±0.32**	44.2
高剂量组	0.65±0.55**	47.3

**p<0.01，与阴性对照组相比，有极显差异。

3、主要脏器大体病理观察

高、中、低 剂量组实验结果表明肝脏各脏器形、质地、色等正常。

结论

在本实验条件下，治疗低剂量组、中剂量组和高剂量组均有抑瘤作用，以低剂量组抑瘤率最高，认为该药有苗头；而高、中、低 剂量组实验结果表明该药物毒性较小。

（三）药用纳米碳球体外杀伤癌细胞的试验：

使用肾癌细胞 R11，在 1640 培养液中培养，将 A 制剂在无菌条件下以 2mg/50ml 培养液的比例加入细胞培养瓶中观察 R11 细胞的变化，观察的结果显示，当天癌细胞就停止生长，次日癌细胞吞噬大量的微粒，然后开始膨胀破裂。在培养瓶中均匀分布的微粒被富集

到细胞内部（对比培养瓶背景中几乎看不到微粒），说明微粒被癌细胞主动吞噬，细胞数量开始减少，经一周细胞完全溶解成空壳，这证明癌细胞主动吞噬微粒后，细胞代谢被扰乱而导致细胞死亡。

具体实施方式

下面的实施例仅为了进一步说明本发明，而不是限制本发明的范围。

实施例 1

药用纳米碳球的制备：

选用美国 CARBOT 公司 VXC72 药用纳米碳球 0.1g，加入 0.1N 盐酸 5mL，浸泡处理 8 小时，加水 50mL，过滤，反复水洗至 PH6，加 0.1N 氢氧化钠 5mL，处理 8 小时，过滤，水洗至 PH8-9，加入 0.1N 盐酸（约）5mL，水洗至 PH=6-7，过滤，干燥，得到成品药用纳米碳球。

干燥称重为 0.08 克，收率为 80 %。经检测符合本发明药用纳米碳球的要求。

实施例 2

取实施例 1 制得的药用纳米碳球 40mg，加入水 35mL，搅拌，加入表面活性剂 Tween-80 约 0.5g，搅拌均匀，加入聚乙烯吡咯烷酮 K30 助悬剂 2g；搅拌均匀，加水定容到 50mL，超声振荡 30 分钟，停 5 分钟，在振荡 4 分钟，使药用纳米碳球充分分散成为均匀的纳米混悬液，分装、灌封、高压灭菌 45 分钟，冷冻干燥即得冻干粉。

实施例 3

取实施例 1 制得的药用纳米碳球 40mg，加入水 35mL，搅拌，加入表面活性剂 Tween-80 约 0.5g，搅拌均匀，加入聚乙烯吡咯烷酮 K30 助悬剂 2g 和加入 5-Fu 3mg，搅拌均匀，加水定容到 50mL，超声振荡 15 分钟，停 5 分钟，再振荡 15 分钟，使药用纳米碳球充分分散成为均匀的纳米混悬液，分装、灌封、高压灭菌 45 分钟，得到液体型制剂的成品。

实施例 4

取实施例 1 制得的药用纳米碳球 40mg，加入水 35mL，搅拌，加入表面活性剂 Tween-80

约 0.5g，搅拌均匀，加入聚乙烯吡咯烷酮 K30 助悬剂 2g；加入赋形剂血清白蛋白 2 mg，搅拌均匀，加水定容到 50mL，超声振荡 15 分钟，停 5 分钟，再振荡 15 分钟，使药用纳米碳球充分分散成为均匀的纳米混悬液，冷冻干燥即得冻干粉成品。

实施例 5

取实施例 1 制得的药用纳米碳球 40mg，放抽滤瓶中，抽真空后，注入 1%亚叶酸钙水溶液 2ml。振荡器充分振摇，溶液中再加入水 35mL，搅拌，加入表面活性剂 Tween-80 约 0.5g，搅拌均匀，加入聚乙烯吡咯烷酮 K30 助悬剂 2g；加入赋形剂血清白蛋白 2 mg，搅拌均匀，加水定容到 50mL，超声振荡 5 分钟，停 5 分钟，再振荡 4 分钟，使药用纳米碳球充分分散成为均匀的纳米混悬液，分装、灌封、高压灭菌 45 分钟，冷冻干燥即得冻干粉成品。