



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107848827 B

(45)授权公告日 2020.08.04

(21)申请号 201680037713.2

(22)申请日 2016.07.01

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107848827 A

(43)申请公布日 2018.03.27

(30)优先权数据
15175318.3 2015.07.03 EP
14/791,313 2015.07.03 US
14/798,258 2015.07.13 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2017.12.26

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2016/065573 2016.07.01

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2017/005648 EN 2017.01.12

(73)专利权人 昂科因凡特公司
地址 挪威奥斯陆

(72)发明人 莎拉·威斯特罗姆
罗伊·H·拉森

(74)专利代理机构 上海申新律师事务所 31272
代理人 董科

(51)Int.Cl.
A61K 51/10(2006.01)
A61K 51/12(2006.01)
A61K 51/02(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件
JP 2000337216 A,2000.12.05

审查员 杨艳波

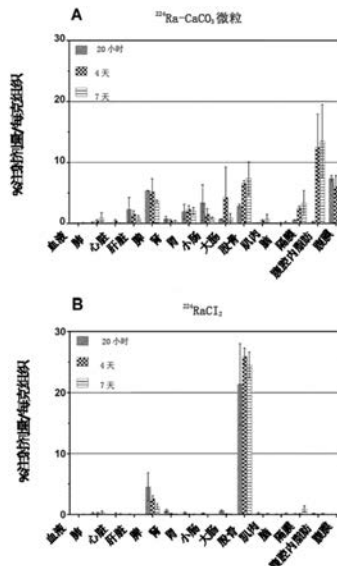
权利要求书1页 说明书24页 附图10页

(54)发明名称

一种包括一种或多种颗粒的用于癌症的组合物

(57)摘要

本发明涉及一种颗粒,或包含一个或多个颗粒的药物组合物,或一种相同或不同颗粒的悬浮液,所述颗粒包含一可降解化合物和一发射α射线的放射性核素和/或一产生α射线的放射性核素子体核素。所述颗粒有益于癌症的治疗。



1. 一种包括一种或多种颗粒的用于癌症的组合物,其特征在于,包含:
CaCO₃;
发射α射线的放射性核素²²⁴Ra;以及
选自²²⁰Rn, ²¹⁶Po, ²¹²Pb的放射性核素²²⁴Ra的子代;
所述组合物用每剂1kBq 至10GBq的放射性核素的量来制备;
或适用于多剂量工业规模生产的50 MBq 至100 GBq的放射性核素的量来制备所述组合物。
2. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,所述碳酸钙选自碳酸钙、PEG改性的碳酸钙、蛋白质改性的碳酸钙、碳水化合物改性的碳酸钙、脂质改性的碳酸钙、维生素改性的碳酸钙、聚合物改性的碳酸钙、和/或无机晶体改性的碳酸钙。
3. 根据权利要求1-2中任一项所述的组合物,其特征在于,所述颗粒为医疗器械或包含于医疗器械中。
4. 根据权利要求1-2中任一项所述的组合物,其特征在于,所述颗粒包含在药物组合物中,所述药物组合物还包括一稀释剂、载体、和/或表面活性剂。
5. 根据权利要求4中所述的组合物,其特征在于,所述载体选自生理盐水(0.9%),半生理盐水,乳酸林格氏液,溶解的蔗糖,左旋糖,和3.3%葡萄糖/ 0.3%盐水。
6. 一种用于制备根据权利要求1-5中任一项所述的组合物的方法,其特征在于,所述方法包括在使用或不使用一放射性核素载体的情况下,使发射α射线的放射性核素²²⁴Ra和CaCO₃相互接触。
7. 一种试剂盒,其特征在于,包含:
一包含碳酸钙的组合物;
一包含所述发射α射线的放射性核素²²⁴Ra,和所述放射性核素²²⁴Ra的子体核素的组合物,所述子体核素选自²²⁰Rn、²¹⁶Po和²¹²Pb;
所述组合物用每剂1kBq 至10GBq的放射性核素的量来制备;
或适用于多剂量工业规模生产的50 MBq 至100 GBq的放射性核素的量来制备所述组合物。

一种包括一种或多种颗粒的用于癌症的组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及一种颗粒,或包含一种或多种颗粒的药物组合物,或一种相同或不同颗粒的悬浮液,所述颗粒包含一可降解化合物和一发射 α 射线的放射性核素和/或一产生发射 α 射线子体的放射性核素。所述颗粒有益于癌症的治疗。

背景技术

[0002] 发射 β 射线的放射性胶质及微粒子能够有效对抗腹膜腹水及微小肿瘤种子,已在临床使用多年。然而,延迟效应及由于肠道毒性引起的致病率已导致这些治疗过时,例如在卵巢癌中,化疗已成为标准的辅助疗法。但面对存在的相当大的医疗需求,仍然需要一种新方法对抗腔内癌症。

[0003] α 射线发射体作为腹膜内癌的治疗手段以前已经被提出过。提出的两种化学类型为(1)放射性免疫缀合物和(2)微-或纳-大小的悬浮液。放射性免疫缀合物的优点为具有细胞特异性靶向的潜力,缺点为产品大量渗透进入血液有可能会造成患者全身的毒副作用。

[0004] 微纳米颗粒和胶质的优点是局部滞留的改善会降低远距离毒素的潜力。缺点是可能会产生不均匀剂量的沉积,放射性热点形成以及颗粒本身由于降解惰性引起炎症等。

[0005] 如果是要使用微颗粒或纳米颗粒的话,要看他们是否是完全稳定的或降解缓慢的。

[0006] 使用完全稳定的颗粒的优点在于对全身性毒副作用的危害低。缺点包括潜在的更多异质辐射剂量的分布和一些来自热点辐射的局部毒副作用风险。稳定的放疗颗粒已经用于放射性栓塞治疗原发性肿瘤及肝转移,所述放射性栓塞为用高能 β 发射体核素 ^{90}Y 稳定标记的不可降解的玻璃球(TheraSphere™)或树脂基球(SIR-Spheres™)。在这种情况下,所述肝组织会屏蔽对肠道等的有毒辐射。

[0007] 另一种使用可降解颗粒缓慢释放某些放射性核素的方式:潜在优点包括由于母体核素扩散的改善和/或短寿命子体核素而导致的更多同质放射剂量的分布,以及热点辐射引起局部毒素的倾向更小。潜在缺点为由于释放的放射性核素有可能输送进入血液从而进一步地再分配而可能造成患者全身性毒副作用。目前,可降解颗粒大多数用于对其他细胞有毒副作用的化合物像化疗药物而不用于放射性核素。

[0008] 因此,有必要改进针对腔内癌症的 α 颗粒辐射的递释系统。

发明内容

[0009] 本发明涉及一种颗粒,其包含可降解化合物和发射 α 射线的放射性核素和/或产生发射 α 射线子体的放射性核素。

[0010] 在本发明的一个实施方案中,所述放射性核素选自 ^{224}Ra , ^{212}Bi , ^{212}Pb , ^{223}Ra , ^{225}Ra , ^{225}Ac , ^{213}Bi , ^{211}At , ^{227}Th 。

[0011] 在本发明的另一个实施方案中,所述可降解化合物选自碳酸钙、PEG改性的碳酸钙、蛋白质改性的碳酸钙、碳水化合物改性的碳酸钙、脂质改性的碳酸钙、维生素改性的碳

酸钙、有机化合物改性的碳酸钙、聚合物改性的碳酸钙、和/或无机晶体改性的碳酸钙。

[0012] 在本发明进一步的实施方案中,所述颗粒的大小为1纳米至500微米。

[0013] 在本发明另一个实施方案中,所述颗粒包括一种或多种化合物,所述化合物选自一单克隆抗体、一多克隆抗体、一放射性免疫缀合物、一免疫缀合物、一螯合抗体缀合物、包括叶酸和叶酸衍生物的维生素、肽、微型抗体以及亲和体。

[0014] 本发明的另一方面涉及一种药物组合物,包含一个或多个本发明所述的颗粒以及一稀释剂、载体、表面活性剂、和/或赋形剂。

[0015] 在本发明另一个实施方案中,所述药物组合物用每剂1kBq至10GBq的放射性核素的量来制备。

[0016] 在本发明另一个实施方案中,用适用于多剂量工业规模生产的50MBq至100GBq的放射性核素的量来制备所述药物组合物。例如,如果每天在一个批次中要生产100个病人的剂量,则将1-10GBq的总量分成100个单剂量药水瓶或即用注射器。

[0017] 在本发明另一个实施方案中,所述药物组合物为一颗粒悬浮液,包含用放射 α 射线的放射性核素和/或产生放射 α 射线子体的放射性核素标记的单分散或多分散颗粒。

[0018] 在本发明另一个实施方案中,所述药物组合物适用于静脉注射或体腔内注射。

[0019] 本发明另一方面涉及用作药物的一种颗粒或药物组合物。

[0020] 在本发明的一个方面中,根据本发明所述的颗粒是医疗器械或包含在医疗器械中。

[0021] 本发明另一方面涉及用于腔体内治疗、放射性栓塞术或放射性滑膜切除术的一种颗粒或药物组合物。

[0022] 本发明另一方面涉及用于癌症的治疗的一种颗粒或药物组合物。

[0023] 在本发明的一个实施方案中,所述癌症选自腹膜内癌症、颅内癌症、胸膜癌、膀胱癌、贲门癌和蛛网膜下腔中的癌症。

[0024] 本发明的另一个方面涉及一种治疗或改善的方法,包括将本发明所述的颗粒或药物组合物给药至有需要其的个体。

[0025] 本发明的另一方面涉及一种制备本发明所述颗粒的方法,所述方法包括在使用或不使用放射性核素的载体的情况下,使发射 α 射线的放射性核素和可生物降解的化合物彼此接触。

[0026] 本发明的另一个方面涉及一种试剂盒,包含本发明所述的一种纳米或微米颗粒,一发射 α 射线的放射性核素或一产生发射 α 射线子体的放射性核素,一载体,稀释剂和/或赋形剂,以及任选地所述试剂盒的使用说明。

[0027] 本发明的另一方面涉及一种试剂盒,所述试剂盒包含根据本发明所述的一种纳米或微米颗粒,一发射 α 射线的放射性核素或一产生发射 α 射线子体的放射性核素,一载体,稀释剂和/或赋形剂,以及任选地所述试剂盒的使用说明以制备包含颗粒悬浮液和放射免疫缀合物溶液的双功能药物溶液。

[0028] 在本发明的一个实施方案中,所述试剂盒包含一螯合缀合分子,所述螯合缀合分子包括一单克隆抗体。

附图说明

[0029] 图1为在裸鼠腹腔中注射²²⁴Ra标记的CaCO₃微粒(A)和溶解的²²⁴RaCl₂(B)后在历时20小时,4天和7天后的组织分布图。

[0030] 在牺牲动物后至少3天后进行放射性测量,即留出时间允许子体核素衰变从而与²²⁴Ra平衡。

[0031] 图2为用盐水,冷颗粒或²²⁴Ra-标记的碳酸钙微粒开始治疗后的第44天和第45天腹膜内SKOV-3肿瘤的重量。

[0032] 图3为用盐水或²²⁴Ra标记的碳酸钙微粒治疗后,患有腹膜内ES-2腹水癌动物的存活数。

[0033] 图4为中值粒径为1.1和8.9 μ m的CaCO₃微粒的²²⁴Ra和²¹²Pb标记效率的柱状图。

[0034] 这些条分别代表小颗粒和大颗粒的14个和12个独立实验的平均值,误差线代表标准偏差。

[0035] 图5为在不同时间点,中值粒径为1.1和8.9 μ m的CaCO₃微粒上保留的²²⁴Ra活性的百分比柱状图。

[0036] 这些条分别代表小颗粒和大颗粒的5个和4个独立实验的平均值,误差线代表标准偏差。

[0037] 图6为向腹膜内注射 1×10^6 的ES-2细胞,在历时22小时后用盐水或²²⁴Ra标记的CaCO₃微粒治疗后的存活数。

[0038] 图7为²²⁴Ra标记的CaCO₃微粒对血液学指标:白血细胞(WBC),红细胞(RBC)和血小板(PLT)随治疗开始后时间的变化而产生的影响。在每个时间点从每组取样3-5只小鼠。该图显示了每个鼠的单个数据点以及由一个水平条表示的每个组的平均值。误差线对应于标准偏差。

[0039] 图8为在细胞接种后的不同时间点,用盐水或²²⁴Ra标记的CaCO₃微粒治疗的腹膜内ES-2卵巢癌腹水模型小鼠的存活率。

[0040] 图9为与盐水治疗对照组相比,对腹膜内注射 1×10^5 ES-2细胞的小鼠,在1小时后用²²⁴Ra标记的两种大小不同的CaCO₃微粒治疗后的存活率。

[0041] 图10为向裸鼠腹膜内注射²²⁴Ra标记的CaCO₃微粒(A)和游离²²⁴Ra溶液(B)之后的20小时,4天和7天,用在每克组织内的平均²²⁴Ra活度Bq来表示的生物分布。注射的活度标准为每只小鼠10kBq。误差线代表标准偏差。

[0042] 图11为向裸鼠腹膜内注射²²⁴Ra标记的CaCO₃微粒(A)和游离²²⁴Ra溶液(B)之后的20小时,4天和7天,用在每克组织内的平均²²⁴Ra活度Bq来表示的生物分布。注射的活度标准为10kBq/小鼠。误差线代表标准偏差。

[0043] 图12为向腹膜内注射用 10×10^6 ES-2细胞的小鼠,在25小时后接受盐水或²²⁴Ra标记的CaCO₃微粒治疗的存活率。

具体实施方式

[0044] 本发明的发明人已经确定了一种基于短程 α 发射体的,对肠道产生毒副作用的风险较小的癌症治疗方法。

[0045] 本发明是基于包含发射 α 射线的放射性核素和/或放射性核素生成发射 α 射线的子

体,例如 ^{224}Ra 的缓慢可降解的纳米微米颗粒。

[0046] 因此,本发明涉及一种颗粒,其包括一可降解化合物和发射 α 射线的放射性核素和/或一产生发射 α 射线子体的放射性核素。

[0047] 本发明的一个方面涉及一种颗粒,包括碳酸钙,发射 α 射线的放射性核素 ^{224}Ra ,和选自 ^{220}Rn 、 ^{216}Po 、 ^{212}Pb 和 ^{212}Bi 的放射性核素 ^{224}Ra 的子代。 ^{220}Rn 是放射性核素 ^{224}Ra 的第一代, ^{216}Po 是放射性核素 ^{224}Ra 的第二代, ^{212}Pb 是放射性核素 ^{224}Ra 的第三代等。

[0048] 本发明的一个方面涉及一种颗粒,包括碳酸钙,发射 α 射线的放射性核素 ^{224}Ra ,和选自 ^{220}Rn 、 ^{216}Po 、 ^{212}Pb 的放射性核素 ^{224}Ra 的子代。 ^{220}Rn 是放射性核素 ^{224}Ra 的第一代, ^{216}Po 是放射性核素 ^{224}Ra 的第二代, ^{212}Pb 是放射性核素 ^{224}Ra 的第三代。

[0049] 放射性核素

[0050] 本发明所述的放射性核素可以是任何放射 α 射线的放射性核素和/或一种产生放射 α 射线子体的放射性核素。

[0051] 在例如腹膜腔内的局部治疗中,发射 α 颗粒的化合物的主要优点在于射程更短,相比于诸如 ^{90}Y 、 ^{131}I 和 ^{32}P 的医用 β 发射体发射的 β 颗粒射程在mm至cm范围, α 颗粒通常小于0.1mm。

[0052] 在腹膜腔内注射案例中,将 α -发射体设置在体腔内能够降低更深的内部器官区域(例如对辐受敏感的肠隐窝细胞)受到辐射引起毒副作用的风险。并且发射的 α 颗粒的优势是高线性能量转移,即杀死一个细胞只需要极少的 α 命中,以及像DNA链断裂的高修复能力这样的细胞抗性机制不太成问题,因为有很大的概率会产生不可修复的双重链断裂(里特及其他人,1977)。

[0053] 每次衰减的高效性意味着需要较少的放射性,从而减少医院工作人员和亲属的屏蔽需要,因为大多数 α 和 β 发射体也发射一些需要被屏蔽的X射线和 γ 射线。

[0054] 表1显示了 ^{224}Ra 的主要辐射特性。 ^{224}Ra 和子体的完全衰变总共产生4个 α 颗粒。一个重要方面是所述 ^{220}Rn 的特性在于由于对晶体中的键合具有潜在的化学惰性,这种核素可能会从母体中扩散出去。

[0055] 这意味着 ^{224}Ra 的主要衰变过程为,先衰变为 ^{220}Rn (第一代子体核素),再衰变为 ^{216}Po (第二代子体核素),再依次衰变为长生命周期的 ^{212}Pb (第三代子体核素),再次衰变为 ^{212}Bi 。

[0056] 子体被理解为放射性核素,是由一母体核素衰变而成。因此,当 ^{224}Ra 作为母体核素时, ^{220}Rn (第一代子体核素)、 ^{216}Po (第二代子体核素)、 ^{212}Pb (第三代子体核素)和所有列于表1的核素则被认为是子体核素。

[0057] 因此,在一个实施方案中,所述放射 α 射线的放射性核素是 ^{224}Ra 和第一代子体 ^{220}Rn ,第二代子体 ^{216}Po 和第三代子体 ^{212}Pb 。在本发明所述颗粒中,当 ^{224}Ra 为发射 α 射线的放射性核素时,上述子体都将被包含在内。

[0058] 在本发明的一个方面中,本发明所述颗粒是医疗器械或包含在医疗器械中。

[0059] 医疗器械是指任何单独或组合使用的仪器,设备,器具,软件,材料或其他物品,包括其制造商为了诊断和/或治疗目的而特意使用以及设备的正确使用所必需的软件,所述医疗器械用于人类疾病的诊断,预防,监测,治疗或缓解;用于伤害或障碍的诊断,监测,治疗,缓解或功能补偿;用于生理结构或生理过程的调查、更换或修改;用于妊娠控制;效用主

要通过物理方式获得,不是通过药理学,免疫学或代谢方式获得,或者虽然有这些方式参与但只是起辅助作用。

[0060] 医疗器械根据其预期用途和适应症而变化。例如,从压舌板、医用温度计和一次性手套等简单设备到高级设备比如计算机,在医学检测,移动和假体移植上给予协助。

[0061] 根据美国食品药品监督管理局(FDA)的定义,医疗器械是指“器械,仪器,器具,机器,设备,植入物,体外试剂或其他类似或相关的物品,包括一组件部分或附件:官方认可的的国家处方集或美国药典或其附录;目的在于疾病或其他症状的诊断,或用于人或其他动物疾病的治愈,缓解,治疗和预防,或用于影响人体或其他动物的结构或任一功能;在人体或其他动物体内或体上无法通过化学作用达到其主要预期目的,以及那些不依赖于被代谢来实现任一其主要预期目的的物体”。

[0062] 本发明所述颗粒为在体内既不会被代谢,也没有明显化学作用的颗粒。所述颗粒是被设计为不被代谢的放射性载体,在体内不具有任何化学作用,这使得放射疗法具有非常有限的副作用例如毒副作用。

[0063] 因此,在一个实施例中,所述“医疗器械”为上述FDA所定义的含义。

[0064] 表1. 来自²²⁴Ra系列的主要放射性能

放射性核素 (半衰期)	α 和 β (平均能量, MeV)	X射线和 γ 射线 能量和丰度射线
²²⁴ Ra (3.6 天)	α 5.6	241 keV, 4.1%
²²⁰ Rn (55.6 秒)	α 6.3	
²¹⁶ Po (145 毫秒)	α 6.8	
²¹² Pb (10.6 小时)	β 0.1	75 keV, 10.3% 77 keV, 17.1% 87 keV, 6.0% 90 keV, 1.5% 239 keV, 43.6% 300 keV, 3.3%
²¹² Bi (1.0 小时)	α 6.1 \times 0.36 (2.2 有效 ¹) β 0.7 \times 0.64 (0.4 有效)	727 keV, 6.7% (4.3%有效)
²¹² Po (299 纳秒) (64% 分支)	α 8.8 (5.6 有效)	
²⁰⁸ Tl (3.1 分) (36%分支)	β 0.6 (0.2 有效)	75 keV, 3.4% (1.2%有效) 511 keV, 22.6% (8.1%有效) 583 keV, 85.0% (30.6%有效) 860 keV, 12.5% (4.5%有效) 2615 keV, 99.8% (35.9%有效)

[0066] 1由于分支引起的单个²²⁴Ra的转变平均值。只有X射线或超过1%有效丰度的伽马射线的占比。每²²⁴Ra及其子体完成衰变,产生的 α 总能量约为26.5MeV, β 总能量约为0.7MeV的有效能量。

[0067] 镭-²²⁴是一种优选的 α -发射体,但是其他核素也可以应用于本发明。

[0068] 因此,在本发明的一个实施方案中,所述放射性核素选自²²⁴Ra,²¹²Bi,²¹²Pb,223Ra,225Ra,225Ac,213Bi,211At,227Th。

[0069] 实施例中非常有利的发现是产生显着治疗效果所需的放射性量低至100kBq每kg的体重,相当于每只小鼠仅2-2.5kBq。这与小鼠实验中(Gustafsson等,2012;Boudousq等,2013),用 α -放射免疫疗法对抗腹膜癌所需要的每只小鼠数百kBq的 ^{211}At 和 ^{212}Pb 相比,具有很大优势。这种性质可以在施用和使用本发明所述颗粒(例如 $^{224}\text{Ra}-\text{CaCO}_3$)期间大大减少X射线和 γ 射线的暴露问题。

[0070] 每个患者使用的 ^{224}Ra 的量可以在1kBq至10GBq的范围内,优选于100kBq至100MBq的范围,更优选的范围在0.5MBq至25MBq。

[0071] 剂量取决于癌症类型,例如疾病的侵袭性。在一个实施方案中,剂量为10-100kBq/kg,例如20-50kBq/kg。在另一个实施方案中剂量为10-1000kBq/kg,例如25-300kBq/kg。在另一个实施方案中,剂量为100-500kBq/kg,例如150-300kBq/kg。

[0072] 在本发明的一个实施方案中,制备的药物组合物所需要的是放射性核素量为每剂量1kBq-10GBq。

[0073] 例如,如果每天在一个批次中生产100个患者剂量,则可以将总计1-10GBq分成100个单剂量药水瓶或即用注射器。

[0074] 在本发明的另一个实施方案中,制备的药物组合物所需要的是放射性核素量适用于多剂量工业规模生产的,例如50MBq至100GBq。

[0075] 可降解的化合物

[0076] 本发明的可降解化合物可以是任何可降解的化合物。

[0077] 降解可以通过各种途径来完成,例如高pH,低pH,蛋白酶,酶,核酸酶和/或通过细胞过程如细胞内吞,还包括细胞吞噬。

[0078] 在本发明的一个实施方案中,可降解化合物选自 CaCO_3 ,PEG改性的 CaCO_3 ,蛋白质改性的 CaCO_3 ,碳水化合物改性的 CaCO_3 ,脂质改性的 CaCO_3 ,维生素改性的 CaCO_3 ,有机化合物改性的 CaCO_3 ,聚合物改性的 CaCO_3 和/或无机晶体改性的碳酸钙。

[0079] 在本发明的一个优选实施方案中,可降解化合物为 CaCO_3 (CC)。

[0080] 碳酸钙(CC)颗粒可以与其它盐或蛋白质或肽一起作为复合物使用,并通过表面活性剂如油酸盐和类似物进行表面改性。

[0081] 在一个特殊的实施方案中,CC与一化合物共同使用,例如聚乙二醇改性的碳酸钙颗粒或无机晶体改性的CC。

[0082] 在一个特殊的实施方案中,用功能性受体和/或抗原结合组对CC颗粒进行改性,包括单克隆抗体、衍生物、维生素和允许颗粒的受体或抗原结合组进入单个靶细胞和患病组织的衍生物。这意味着对颗粒的修改涉及将化合物添加到CC中。这可以通过各种方式来实现,例如通过偶极-偶极相互作用,离子偶极和离子诱导偶极力,氢键,范德华力和力的相对强度。

[0083] 当使用与子核素平衡的 ^{224}Ra 溶液来标记颗粒时,一个特殊的实施方案是在与CC颗粒接触之前首先向溶液中添加 ^{212}Pb 的螯合剂,由此产生双功能放射治疗混合物。螯合剂优选与靶亲和分子如单克隆或多克隆抗体或抗体衍生物,维生素或维生素衍生物缀合。

[0084] 特点

[0085] 颗粒可以具有多种特性。

[0086] 颗粒的大小可以根据预期的用途和应用而变化。

[0087] 晶体的类型可以是任何已知形式的CC,并且可以使用从1nm到500 μ m变化的尺寸。更具体地说,尺寸在100nm至50 μ m的范围内,并且更优选地在1-10 μ m的范围内。

[0088] 在一个优选实施例中,尺寸为1-10 μ m。

[0089] 在本发明的一个实施例中,颗粒的尺寸为1nm至500 μ m。

[0090] 在鼠中,基于腹膜表面,CC-颗粒的量应该在0.1mg到50mg的范围内,更有利的可能是1mg到15mg。在人类中,相比于更有利的例如小鼠0.1-10克腹膜内治疗,人类所使用的量应该乘以10到10 000。对于其他腔体,可以根据相对表面积或存在的流体体积来调整量。

[0091] 在本发明的实施例中,发现²²⁴Ra可用于对可降解碳酸钙进行放射性标记。碳酸钙的密度比羟基磷灰石低约14%,并且与大小相同的羟基磷灰石颗粒相比,可以更容易保持悬浮而不沉淀。使用碳酸钙作为主要成分,可加入或不加入少量共沉淀物例如硫酸钡,所述硫酸钡用作²²⁴Ra的载体。

[0092] 因此,在一个实施方案中,加入共沉淀物。所述共沉淀物选自硫酸钡,硫酸锶和铬酸钡。其量相对于碳酸钙通常为0.01%至10%,优于碳酸钙0.1%至1%。

[0093] 在添加放射性核素之前,颗粒中碳酸钙的总量可以根据例如是否添加共沉淀物而变化。在一个实施方案中,碳酸钙的量大于90%。范围可以是90-95%,或90-99%。用量也可以超过98或超过99%。

[0094] 颗粒中的其他化合物

[0095] 可降解颗粒可以包含许多不同的其他化合物。这些可以用于各种目的,包括靶向性,稳定性,溶解度和降解速率。

[0096] 在本发明的一个实施方案中,颗粒包含一种或多种化合物,所述化合物选自单克隆抗体,多克隆抗体,放射免疫缀合物,免疫缀合物,螯合抗体缀合物,维生素包括叶酸和叶酸衍生物,肽,微型抗体和亲和体。

[0097] 在本发明的一个实施方案中,抗体包括一种或多种,选自曲妥珠单抗,利妥昔单抗,HH1,西妥昔单抗,贝伐单抗,达托木单抗,阿仑单抗,哌姆单抗,依帕珠单抗,L19,F8,F16,加利西单抗,托来珠单抗,阿仑单抗,奥法木单抗,维妥珠单抗,阿夫土珠单抗,托西莫单抗,利妥昔单抗和替伊莫单抗。

[0098] 在本发明的另一个实施方案中,所述化合物对靶向具有特异性,选自CD19,CD20,CD22,CD33,CD37,CD38,CD45,CD74,CD138,PSMA,HER-2,EGFR,MUC-1,MUC-18,CEA,FBP,NG2,EPCAM,配聚糖-1,Ca-125,LK-26,HMFG,CS-1和BCMA。

[0099] 在一个特定的实施方案中,²²⁴Ra-标记的药物悬浮液包括²¹²Pb-标记的抗体,抗体片段或蛋白质或肽或维生素衍生物(靶向缀合物),其对受体包括肿瘤细胞上的抗原具有亲和性,由此²²⁴Ra-标记的颗粒会将一般 α 颗粒辐射场射到腹膜表面上包括腹膜内器官表面上,以及²¹²Pb标记的抗体或类似物通过受体或抗原结合给予肿瘤细胞特定的 α 颗粒剂量。

[0100] 本发明中所述放射性核素可以通过使用双功能螯合剂与靶向分子缀合。

[0101] 所述螯合剂可以是环状,线性或分支螯合剂。可以特别参考所述聚氨基多酸螯合剂,所述聚氨基多酸螯合剂包括一直链,环状或支链聚链烷骨架通过酸性(例如羧基烷基)基团连接于主链氮上。

[0102] 合适的螯合剂的实例包括DOTA衍生物如对异硫氰酸苄基-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(p-SCN-Bz-DOTA)和被称为TCMC的DOTA化合物的四丙酰胺变体,以

及诸如对异硫氰基苄基-二亚乙基三胺五乙酸 (p-SCN-Bz-DTPA) 的DTPA衍生物,第一种是环状螯合剂,后一种是线性螯合剂。

[0103] 络合部分的金属化可以在络合部分与靶向部分缀合之前或之后进行。

[0104] 如果螯合剂在放射性标记发生之前缀合到抗体上,则放射性标记程序就时间使用上将会更加便利。

[0105] 使用连接于抗体的螯合剂制备放射性标记缀合物的原理在例如2008年刘等人发表的文献中被广泛描述。

[0106] 药物组合物

[0107] 本发明的一个方面涉及一种组合物,所述组合物包含一种根据本发明所述的颗粒。所述组合物可以是一种颗粒悬浮液,包含用²²⁴Ra和/或放射性核素子代标记的单分散或多分散颗粒。

[0108] 优选地,所述组合物为水性复合物。

[0109] 进一步地,本发明的另一方面涉一种组合物或一种药物组合物,包括一种或多种本发明所述颗粒,和稀释剂,载体,表面活性剂,抗絮凝剂和/或赋形剂。

[0110] 可接受载体和药物载体包括但不限于无毒缓冲剂,填充剂,等渗溶液,溶剂和共溶剂,抗微生物防腐剂,抗氧化剂,润湿剂,消泡剂和增稠剂等。更具体地说,药物载体可以是不限于生理盐水(0.9%),半生理盐水,乳酸林格氏液,溶解的蔗糖,右旋糖例如3.3%葡萄糖/0.3%盐水。生理上可接受的载体可以含有放射性稳定剂例如抗坏血酸,人血清白蛋白,其在储存和运输期间保护放射性药物的完整性。

[0111] 所述药物组合物可以包含多个颗粒。这些可以是相同的或不同的。

[0112] 因此,在本发明的另一个实施方案中,药物组合物是包含用放射 α 射线的放射性核素标记的单分散或多分散颗粒和/或产生放射 α 射线子体的放射性核素的颗粒悬浮液。

[0113] 给药

[0114] 在本发明的另一个实施方案中,所述药物组合物适用于静脉内,肿瘤内或腔内注射。

[0115] 应用

[0116] 发射 α 微粒对腹腔癌症的效用先前已经提出过。Archer等人(US4970062A)建议使用氢氧化铁胶体作为 α 发射体的载体,重点强调²¹²Pb,但也列出了几种其他潜在有用的 α 发射体,包括²²⁴Ra。Bloomer等(1981)建议使用²¹¹At标记的碲胶体,而Vergote等(1992)建议使用²¹¹At标记的单分散聚合物颗粒。Larsen Salberg(US8142758B2)建议使用用²²³Ra或其他 α 发射体(包括²²⁴Ra)标记的羟基磷灰石颗粒。在Archer等人的情况下,上述存在一个问题,氢氧化物可能不利于制备镭标记的碱土金属氢氧化物,特别是镭在水中具有较高的溶解度(Kirby等人,1964)。

[0117] ²¹¹At-211碲胶体被发现是不稳定的,会暴露于甲状腺(Vergote等,1992),并且²¹¹At标记的聚合物颗粒是不可生物降解的,再加上由于半衰期短和²¹¹At的现有生产能力有限,使之在大规模临床使用中变得昂贵及不切实际。同样由于阳离子镭的化学惰性和低络合性,碲胶体或聚合物颗粒的使用并不被认为是镭的载体。使用羟基磷灰石作为镭的载体可以产生良好的标记产率,但是羟基磷灰石具有高密度,当以微粒悬浮液的形式被用于腔体治疗时,可能导致较快的沉降和不理想辐射剂量分布。

[0118] 对于本文涉及的以²²⁴Ra标记的碳酸钙(CC)颗粒为例的新型颗粒,在对其进行测试和研究过程中有一些意想不到的发现:有可能在体外获得高的标记产率和产物的相关稳定性,与²²⁴Ra半衰期相容的腹膜滞留,体内²²⁴Ra的缓慢释放,小鼠对颗粒的良好耐受性和小鼠肿瘤模型中显著的抗肿瘤活性。一个特别有趣和意外的发现是能够较好地吸收腹膜脂肪,这点很重要,因为腹膜脂肪包括网膜在内是转移性肿瘤生长的基础(Gerber等,2006)。人们可能认为摄取腹膜内脂肪需要更亲脂的结构,因此这里使用的碳酸钙颗粒会出现如此大量的摄取是惊人的。

[0119] 本发明的另一方面涉及一种颗粒或药物组合物,作为一种药物使用。

[0120] 所述颗粒和组合物或本发明可以作为放射性治疗化合物和/或放射性治疗混合物来使用。

[0121] 本发明所述颗粒的医疗用途包括人和兽医用途,可以用在(1)腔内治疗(2)放射栓塞(3)放射性脊柱切除术中。

[0122] 腔内治疗可包括治疗例如腹膜内癌症,颅内癌症,胸膜癌,膀胱癌,贲门癌,蛛网膜下腔中的癌症。可以使用所述颗粒的腔体有,如颅腔,胸腔,肺腔,脊柱腔,盆腔,心包膜,胸膜腔,膀胱腔或癌症扩散在腹膜或脑膜上的上述组合,以及上述腔体内的任一器官。

[0123] 在使用本发明所述一特定实施方案中,所述颗粒用于腔体内疾病的治疗或改善,所述疾病为感染或炎症而不是癌症或与癌症组合。

[0124] 在本发明的一个实施方案中,所述感染为细菌感染和病毒感染。

[0125] 放射栓塞可以用于在例如肝脏器官中的原发性或转移性癌症的治疗,通过将本发明所述颗粒输送到导致肿瘤进入肝脏或肿瘤组织浸润其他固体器官的血管中来实现。

[0126] 放射性滑膜切除术用于包括慢性炎症的关节疾病,使用放射性物质对关节疼痛部位进行靶向放射治疗。其用途包括血友病性关节炎的治疗。

[0127] 今天,大多是用发射β颗粒的化合物来治疗炎症或类风湿疾病,或者各种关节特别是膝关节、手和脚踝的滑膜关节病。本文所述的可降解的²²⁴Ra-CC颗粒在放射滑性膜切除术中可能是非常有用的。

[0128] 优选地,所述颗粒通过局部注射例如体腔内来执行。

[0129] 在一个特殊的实施方案中,所述颗粒直接注射到肿瘤中。

[0130] 制品可以分散在与医用注射剂相容的各种缓冲液中,所述医用注射剂可以为溶解的盐和/或蛋白质和/或脂质和/或糖。

[0131] 进一步地,本发明的另一方面涉及一种颗粒或药物组合物,用于腔内治疗,放射栓塞或放射性滑膜切除术。

[0132] 本发明的另一个方面涉及一种颗粒或药物组合物,用于癌症的治疗。

[0133] 在本发明的一个实施方案中,所述癌症可以是腹腔内癌,颅内癌,胸膜癌,膀胱癌,贲门癌和蛛网膜下腔中的癌症。

[0134] 在本发明的一个实施方案中,所述癌症为转移癌,肺癌,卵巢癌,结肠直肠癌,胃癌,胰腺癌,乳腺癌,肿瘤性脑膜炎,腹膜癌,胸腔积液,恶性间皮瘤,乳腺癌,肉瘤,脑癌如胶质母细胞瘤和星形细胞瘤,膀胱癌和肝癌。

[0135] 本发明的另一个方面涉及一种治疗或改善的方法,包括将本发明所述颗粒或药物组合物给予需要其的个体。

[0136] 制备的方法和试剂盒

[0137] 本发明的另一方面涉及一种制备本发明所述颗粒的方法,所述方法包括使发射 α 的放射性核素和生物可降解化合物在使用或不使用放射性核素载体的情况下彼此接触。

[0138] 包含 α 发射体的溶液或组合物(例 ^{224}Ra 溶液或混有子代 ^{212}Pb 的混合物)可以在颗粒标记之前用螯合物-抗体缀合物预处理至组合物 ^{212}Pb ,以产生含有用于 ^{212}Pb 抗原特异性治疗的放射性免疫缀合物和用于一般腔体治疗的 α 发射体例 ^{224}Ra -颗粒的双组分治疗系统。

[0139] 本发明一个实施方案涉及一种两组分系统或试剂盒,包括一用于 ^{212}Pb 抗原特异性治疗的放射免疫缀合物和一本发明所述颗粒。

[0140] 使用这种方法的优选方式是通过试剂盒,所述试剂盒包含具有螯合物缀合的抗体的小瓶A和具有 α 发射体(例如与子体核素平衡的 ^{224}Ra)的小瓶B和具有微粒的小瓶C,将A中的物质添加到小瓶B中,也可将小瓶B中的物质添加到小瓶A中,孵育几分钟至几小时,然后将混合物转移至小瓶C,再次孵育几分钟到几小时,然后将之转移至注射器并注射给患者。

[0141] 该原理可以显著降低治疗所需的 ^{212}Pb -放射性免疫缀合物的水平,因为 ^{224}Ra -CC-颗粒预期对这种系统中的抗肿瘤活性有强烈的贡献。

[0142] 本发明的另一个方面涉及一种试剂盒,所述试剂盒包含根据本发明所述纳米或微米颗粒,发射 α 射线的放射性核素或产生发射 α 射线子体的放射性核素,一载体,稀释剂和/或赋形剂,以及可选择的试剂盒使用说明。

[0143] 本发明的另一方面涉及一种试剂盒,所述试剂盒包含一含有 CaCO_3 的组合物,一包含发射 α 射线的放射性核素 ^{224}Ra 的组合物,以及可选地该试剂盒使用说明书。

[0144] 本发明的另一个方面涉及一种试剂盒,其包含本发明所述纳米或微米颗粒,发射 α 射线的放射性核素或产生发射 α 射线子体的放射性核素,一载体,稀释剂和/或赋形剂,以及可选地试剂盒使用说明书;以制备包含颗粒悬浮液和放射免疫缀合物溶液的双功能药物溶液。

[0145] 在本发明的一个实施方案中,所述试剂盒包含一螯合剂缀合分子,所述螯合剂缀合分子包括单克隆抗体。

[0146] 由于放射性核素有几天的半衰期,目前的方法和产品允许集中生产和运送到最终用户。本发明的另一方面是使用缓慢溶解成钙和碳酸盐的生物可降解颗粒,由此产生已经大量存在于身体内的少量产品。值得注意的还有以下特点:当碳酸钙颗粒表面吸附了 α 射线,例如 ^{224}Ra 时,短寿命的 ^{220}Rn ($t_{1/2}=56\text{s}$)会有明显的释放,与超短寿命的 ^{216}Po ($t_{1/2}=0.16\text{s}$)一起产生两个 α 颗粒,然后衰变到长寿命 β 发射体 ^{212}Pb ($t_{1/2}=10.6$ 小时)。铅与碳酸钙具有很高的可沉淀性,因此腹膜流体中的 ^{212}Pb 将倾向于重新结合到减少 ^{212}Pb 泄漏到体循环中的颗粒。

[0147] 这是一个非常特殊的技术特征, ^{224}Ra 衰变成可以扩散出颗粒的气体,然后进一步衰变成沉淀有碳酸钙的 ^{212}Pb 。

[0148] 如果从微粒中释放的 ^{220}Rn 是高度亲脂性的,这种情况也许有利,因为能够显著降低例如腹膜癌症在网膜上的生长,所述网膜为在腹部上覆盖着肠子的大块脂肪垫组(Gerber等人,2006)。

[0149] 预先制造的颗粒及伴随的表面沉降或放射性核素共同沉积以更深入地包含放射性核素是两种用于生产治疗产品的方法。第一种方法将允许一些子体核素 ^{220}Rn 的释放,其

可以减少来自不均匀颗粒分布的剂量不均匀性。由于 ^{220}Rn 半衰期短(56秒),它不会从腔体中显著地重新分布,也不会扩散到组织表面的更深层。而且,放射性核素的量太小,不能引起产物氡在腔体中的任何显著的物理或化学效应,例如气体压力。在一定程度上,使用大量的颗粒将是有益的,即降低比活性以改善 ^{224}Ra 系列中放射性核素的表面分布。

[0150] 可以制备双功能悬浮液,例如通过如下方式将 ^{224}Ra 溶液在pH5-6缓冲液中加入1mg/ml的TCMC-标记的抗体,培养2分钟至几小时,然后将溶液添加到装有碳酸钙(CC)颗粒的小瓶,培养2分钟至数小时。应尽快给予混合物以避免 ^{212}Pb 标记产物的比活性降低。上述操作最好使用试剂盒套件,其中, ^{224}Ra 在小瓶A中,螯合剂结合的蛋白质在小瓶B中,CC颗粒在小瓶C中。

[0151] 在 ^{224}Ra -CC颗粒的混合物中添加 ^{212}Pb 以提供额外的强靶向缀合物也是可能的。通常,在这样的系统中 ^{224}Ra 和 ^{212}Pb 之间的比率可以接近1:1,但是在某些治疗情况下,将 ^{212}Pb 缀合物相对于 ^{224}Ra 颗粒的量增加至多达10:1或更高可能更有益。在最后一种情况下,需要在制备靶向缀合物之前添加额外的 ^{212}Pb ,或者在施用治疗混合物之前撤出一些 ^{224}Ra -CC颗粒。

[0152] 本发明涉及基于具有子体放射性核素的类似 ^{224}Ra 的 α -发射体的新型放疗化合物。在制备过程中使用载体,例如硫酸钡的踪迹,镭- 224 会被吸收到碳酸钙颗粒的表面上或者可以共同沉积。

[0153] 在一个特殊的实施方案中, ^{224}Ra 可以与钙共结晶以形成碳酸盐晶体,由此 ^{224}Ra 在晶体内而不在表面上以避免子体核素逸出。

[0154] 然而,在一些情况下,放射性核素的部分缓慢释放可能是有益的,因为这可以实现更好的剂量均匀性例如在腹膜表面,以及由局部的晶体颗粒聚集体产生的辐射“热点”的递减。

[0155] ^{224}Ra 系列的主要剂量组分(α 颗粒)的辐射范围在组织中典型地小于0.1mm,从而允许将治疗相关的辐射剂量水平递送到存在于腔体中的腹膜和器官的表面而不造成对更深的组织和腹膜区域的损害。从以往的研究可知,在腹腔内作为辅助使用的情况下, β 型胶体和颗粒显示出一定的抗肿瘤活性,但是由于肠内放射等的后期影响使得这些产品的成本效益比不可观。

[0156] 副作用的主要原因是由辐射范围为几毫米引起的辐射穿透到较深的肠道区域。通过切换到 α 发射器,可以避免照射到组织表面以下照射深的问题。使用 α 颗粒的另一方面是 α 的高线性能量转移,导致细胞中高比例的致死性双链断裂,并减少氧气状态对细胞生存的影响。另外,相对生物学效能通常认为 α 高于 β 。

[0157] 本发明与以前描述的发射 α 的胶体在几个方面有所不同,(1) ^{224}Ra 及其子体核素的释放较缓慢,这可能具有剂量“平滑”效应,减少了 α 颗粒在给药区域中不均匀分布的问题。(2) ^{212}Pb ,在短寿命 ^{220}Rn ($t_{1/2}=56\text{s}$.)和 ^{216}Po ($t_{1/2}=0.15\text{s}$.)衰减之后, ^{212}Pb 是寿命较长的子体($t_{1/2}=10.6\text{h}$),容易被测试的颗粒重新吸收,这可以减少 ^{212}Pb 进入体循环的泄漏。因此发现碳酸钙颗粒特别适合作为 ^{224}Ra 的载体。(3) 颗粒材料本身在可使用的水平下是无毒的,并且颗粒可缓慢降解成无毒离子,因此具有高生物相容性。

[0158] 该颗粒可以生产成纳米至几十微米的大小,并以高标记产率进行放射性标记,并且可以储存数日,这点是重要的,因为它允许集中生产即用的颗粒悬浮液并运送到医院。可

以使用几种不同类型的CC晶体,包括六角形 β -CaCO₃,斜方晶体 λ -CaCO₃。

[0159] 总结

[0160] 应当能够意识到凡运用本发明说明书及图示内容所作出的等同替换和显而易见的变化所得到的方案,均应当包含在本发明的保护范围内。

[0161] 以下提供附图和实例以说明本发明。它们旨在对本发明进行说明,不应被解释为以任何方式进行限制。

[0162] 实施例

[0163] 实施例1²²⁴Ra的生产

[0164] 所有参与高浓度放射性制剂的工作,包括溶剂的蒸发等都在一手套箱中进行。在1M HNO₃中²²⁸Th的来源是从商业供应商处获得的。Ac-树脂以预装盒的形式从Eichrom Technologies LLC处(Lisle,IL,USA)获得。

[0165] 为了使用较小体积的溶剂,将盒(盒1)中约30%的材料提取并重新包装在由1ml过滤柱(Isolute SPE,Biotage AB,Uppsala,Sweden)制造的较小柱中(柱2)。代表原始盒含量的20%的浆液用于固定在500 μ L的1M HNO₃中的²²⁸Th,其中加入500 μ L的1M HCl并通过摇动小瓶(4ml小瓶,E-C样品,Wheaton,Millville,NJ,USA)培养至少4小时。在盒2中加入少量(约0.1ml)Ac-树脂。之后,使用预填充材料作为捕集层将浆料添加到盒2中。在2ml的1M HCl中可以从盒2中洗脱镭。使用加热器块将2ml镭溶液蒸干,氮气通过位于小瓶上的橡胶/聚四氟乙烯隔膜聚四氟乙烯管的入口和出口,冲洗小瓶,并通过氮气蒸汽将酸蒸汽导入到饱和NaOH烧杯中。

[0166] 将残余物溶解在0.5ml的1M HNO₃中并装载到盒3中,所述盒3含有填充有约250mg Dowex阴离子交换剂的1ml Isolute柱。盒3用7ml 1M HNO₃洗涤,除去²¹²Pb,最后用3-4ml 8M HNO₃洗脱²²⁴Ra。用加热器块和N₂-气流将²²⁴Ra洗脱液蒸干,残余物可溶于0.1M HCl中。典型地,使用该方法可以提取和纯化存在于²²⁸Th源中的²²⁴Ra的超过70%。

[0167] 之后放弃阴离子交换步骤,使用不蒸发的2ml原油1M HCl,装入到第二个Ac树脂盒上,所述树脂盒用另外的0.5ml HCl洗涤,得到含²²⁴Ra的洗脱液2.5ml。将其蒸发至干,溶于0.2ml或更多的0.1M HCl中。在用于标记颗粒之前,用5M乙酸铵将²²⁴Ra溶液加入相当于10%体积的量以将pH调节至5-6。

[0168] 实施例2放射性样品的测量

[0169] 在Cobra II γ 射线自动计数器(帕卡德仪器,Downer Grove,IL,USA)或者Hidex γ 射线自动计数器(Hidex,Turku,芬兰)上计算放射性样品数。在从²²⁸Th源中提取²²⁴Ra期间,使用CRC-25R剂量校准器(Capintec Inc.,Ramsey,NJ,USA)。

[0170] 为了在样品中实时确定²²⁴Ra,²¹²Pb和²¹²Bi的分布,使用液氮冷却的高纯度锗(HPGe)检测器(GWC6021,Canberra Industries,Meriden CT,USA),与DSA 1000数字信号分析仪和Genie 2000软件(堪培拉)相结合使用。

[0171] 实施例3制备微粒

[0172] 碳酸钙微粒通过自发沉淀法制备。将0.33M Na₂CO₃(Merck,德国)溶液快速倒入等体积的0.33M CaCl₂(Merck,德国)中。在剧烈涡旋30秒后,将颗粒悬浮液放置5分钟。在滤纸上滤出颗粒,用约30ml水洗涤之后,放在室温下晾一夜。过滤和洗涤在具有0.45 μ m硝化纤维素过滤器(Whatman)的玻璃真空过滤装置(Whatman)中进行。干燥了的微粒放在室温下储

存。所获得的微粒的形状为球形,根据在Countess™自动细胞计数器(Invitrogen)中的分析仪提供的显微镜,可以知道直径在1-10 μm 之内,中值为3-5 μm 。

[0173] 实施例4微粒的放射性标记

[0174] 将所需量的CaCO₃-颗粒转移到Eppendorf管中并悬浮在1ml水中。在超声波浴中超声处理颗粒悬浮液10-15分钟,然后进行4个洗涤步骤;首先用1ml水洗2次,然后用1ml 0.1M Na₂SO₄ (Alfa Aesar, Germany) 洗涤2次。通过离心法从洗涤液中分离颗粒。洗涤后,将颗粒悬浮在补充有0.5%牛血清白蛋白DPBS (GIBCO, Life Technologies公司, 卡尔斯巴德, 加利福尼亚州, 美国) (0.1毫升/每15毫克的颗粒), 并在室温下培养于HulaMixer (Invitrogen公司, 生命技术, 卡尔斯巴德, CA, USA) 30分钟。混合程序如下: 轨道旋转范围为14rpm, 倒数范围为20°, 振动范围为3°。将相当于每mg颗粒(0.3%) 3 μg SO₄的0.1M Na₂SO₄溶液加入到颗粒悬浮液中。此外, 将²²⁴Ra-溶液转移至具有颗粒悬浮液的管中, 随后立即加入对应于3mg Ba/mg颗粒(0.3%)的0.07M BaCl₂·2H₂O (Merck, Germany) 溶液。在添加不同的溶液之间, 在涡旋混合器上将颗粒悬浮液充分混合。如果放射性和/或BaCl₂·2H₂O溶液的添加量超过10 μl , 则逐步添加(每次5-10 μl , 彻底涡旋)。总放射性标记体积相当于每15mg颗粒0.1ml溶液, 即加入SO₄-溶液之前除去的上清液的体积根据待加入的其它溶液的体积来调整。使用与前述相同的混合程序, 放射性标记溶液中的颗粒在Hula混合器上在室温下培养至少1小时30分钟。最后, 用蔗糖缓冲液将颗粒洗涤1-3次。蔗糖缓冲液含有94mg/ml蔗糖 (Sigma Ultra, St. Louis, MO, USA) 和2.1mg/ml Na₂SO₄。通过用HPGe检测器测量颗粒和洗涤溶液来确定标记效率。

[0175] 结论: 对于来自三个不同颗粒批次的颗粒的八个单独实验, 标记产率如下: ²¹²Pb 96.5 \pm 1.9%, ²¹²Bi 96.7 \pm 2.1%, ²²⁴Ra 95.5 \pm 3.2% (平均值 \pm SD)。结论表明带有子体核素的²²⁴Ra被微粒有效地吸收。在室温下以粉末形式储存2个月的碳酸钙颗粒以与新鲜制备的颗粒相似的效率吸收²²⁴Ra及其子体核素。

[0176] 实施例5放射性标记的微粒的体外稳定性

[0177] 在2种不同的溶液中研究如实施例4所述制备的放射性标记的微粒的体外稳定性。将颗粒培养在室温下1-1.4ml蔗糖缓冲液中或在37°C下0.5ml胎牛血清中培育。在不同的时间点, 将悬浮液离心, 测量上清液和颗粒状颗粒的活性。之后, 如果稳定性研究要持续到较晚的时间点, 则将粒状颗粒重新悬浮于新的蔗糖缓冲液或胎牛血清等分试样中, 进行进一步培育。

[0178] 表2. 碳酸钙颗粒在体外对²²⁴Ra的保留。

溶液	时间点	%释放活性
		²²⁴ Ra
[0179] 胎牛血清	22 小时	4.13 \pm 3.01 %
	3 天数	1.18 \pm 0.69 %
	7 天数	1.76 \pm 0.34 %
蔗糖缓冲液	16 小时	1.07 %
	3 天数	1.70 \pm 1.81 %

[0180] 数据显示了²²⁴Ra在体外保留在碳酸钙颗粒上的天数,表明放射治疗的效用是可观的。这也表明该产品可能有几天的保质期,从而允许集中生产和运送到远端最终用户。

[0181] 实施例6 ²¹²Pb再吸收/缔合到微粒上

[0182] 除了不加入放射性溶液之外,如放射性标记程序所述制备CaCO₃微粒。相反,颗粒在混合450μL胎牛血清中和50μL ²²⁴ra溶液(预先加热到37°C)中培养,为了测量²¹²pb吸收到“冷”微粒上的量,使放射性标记在相同条件下进行。颗粒悬浮液在37°C以800rpm的转速培养。10分钟后,将颗粒悬浮液离心,将250μl上清液转移至Eppendorf管并测量活性。之后,将颗粒重新悬浮在上清液中,延长研究并在1小时和24小时后进行测量。表3给出了研究的结论。

[0183] 表3. 从溶液中吸收²¹²Pb到碳酸钙颗粒

时间	在上清液中测量的总 ²¹² Pb活性的 %
	堪培拉锗检测器
0 分	100 %
10 分	25.4 %
1 小时	17.9 %
24 小时	29.0 %

[0185] 这些数据表明,²¹²Pb在培养基中被显著吸收,表明在碳酸钙颗粒的微环境²²⁰Rn扩散之后可能会出现子代²¹²Pb的显著吸收。这可以减少全身毒性从²¹²pb吸收进入血液。

[0186] 实施例7放射性标记的微粒体内生物分布和稳定性。

[0187] 背景:为了评估²²⁴Ra标记的碳酸钙颗粒在体腔内使用的有效性,将颗粒悬浮液注射在小鼠腹膜内,并测量随后的²²⁴Ra的生物分布。方法:如实施例4所述制备放射性标记的微粒。洗涤后,将粒状颗粒重新悬浮于pH7-7.5的蔗糖缓冲液中至颗粒浓度达到约13mg/ml。将培育到6-19周龄的雌性无胸腺裸体Foxn1nu小鼠(体重17.1-28.3g)用于生物分布研究。通过腹膜内注射给予小鼠0.4ml颗粒悬浮液,其含有与约5mg微粒结合的11-18kBq ²²⁴Ra。杀死小鼠,收集各种组织,注射后20小时(n=2),4天(n=3)和7天(n=3)时进行放射性测量。作为对照,用游离²²⁴Ra(溶解的RaCl₂)进行生物分布实验,通过向每只小鼠腹腔内施用0.25ml含有约12kBq ²²⁴Ra的0.9%NaCl溶液。²²⁴RaCl₂溶液的pH值为5.5。为了比较,在注射后的同一时间点处死3只小鼠的组,如同放射性标记的微粒的生物分布研究(图1A)。

[0188] 结论:图1A和B分别显示了²²⁴Ra标记的碳酸钙和游离的²²⁴Ra的生物分布图。基于股骨摄取,从²²⁴Ra标记的碳酸钙释放²²⁴Ra是缓慢的,20小时后约五分之一,在施用7天后增加至约三分之一。放射性核素的这种有限的释放在一个方面可能是有益的,因为它可以减少来自放射性标记的颗粒的剂量不均匀性。值得注意的是,考虑到腹膜脂肪在癌转移在腹腔内传播所扮演的角色,腹膜脂肪的摄取量相当大这一点是很有利的。总之,²²⁴Ra标记的碳酸钙在腔内放疗方面具有非常有希望分布特性。

[0189] 实施例8. ²²⁴Ra标记的微粒在裸鼠腹膜内癌症模型中的抗肿瘤活性。

[0190] 背景:为了测试²²⁴Ra标记的碳酸钙微粒的治疗活性,使用腹膜内微转移的裸小鼠

肿瘤模型。材料与方法：向体质量为17.7\23.6g的6周龄雌性无胸腺Foxn1nu小鼠腹腔内注射SKOV-3-luc细胞(5×10⁶个细胞/0.25ml RPMI)。三天后,向小鼠腹腔内注射活性分别为200kBq/kg(0.25-0.3ml),600kBq/kg(0.35-0.4ml)的位于蔗糖缓冲液中的²²⁴Ra标记的碳酸钙微粒,或3次注射200kBq/kg(0.25-0.4ml)。后一组在每个注射部分之间有48小时。对照动物接受生理盐水(0.4ml)或200mg/kg(0.35-0.4ml)在蔗糖缓冲液中未标记的微粒。在细胞接种之前将小鼠随机分入治疗组,每组由8只小鼠组成。在治疗开始后的第44天和第45天,所有动物通过颈椎脱臼安乐死。在解剖过程中,通过仔细目视检查每只动物评估肉眼可见的肿瘤的存在,并除去腹膜腔内所有可见的肿瘤并称重。

[0191] 结论:数据如图2所示。接受盐水或未标记的碳酸钙微粒的两个对照组的平均肿瘤重量之间没有显著差异。接受²²⁴Ra标记的微粒的所有组与对照组相比,对肿瘤的生长有强烈的抑制功能,从肿瘤重要的强烈减少可知,具有统计学意义。尽管²²⁴Ra治疗组之间没有统计学差异,但²²⁴Ra剂量越高和分次治疗越有助于抑制肿瘤生长。

[0192] 总之,²²⁴Ra标记的碳酸钙微粒在患有腹膜内肿瘤小鼠中显示出强而一致的抗肿瘤活性。

[0193] 实施例9在侵袭性癌症腹水模型中的治疗效果。

[0194] 背景:人类卵巢癌通常会导致腹腔内腹水。人类卵巢癌细胞系ES-2在裸鼠中产生侵袭性肿瘤细胞生长和癌性腹水。

[0195] 材料与方法:在向体重为18.1~23.2g的6周龄雌性无胸腺Foxn1nu裸鼠腹腔内注射ES-2细胞(10×10⁶细胞/0.3ml RPMI)25小时后,向小鼠腹膜内注射活性为100kBq/kg(0.3ml),300kBq/kg(0.3-0.35ml)或500kBq/kg(0.3-0.35ml)的在蔗糖缓冲液中的²²⁴Ra标记的碳酸钙微粒。对照动物施受0.35ml盐水。在细胞接种之前将小鼠随机分入治疗组,每组由7-8只小鼠组成。每周至少3次对动物进行称重并监测以观察疾病的进展,当它们每天都出现临床迹象时,表示疾病最后阶段的临近。所有小鼠在他们到达健康损失的终点时考虑到腹部膨胀对移动性或呼吸的损害,体重的快速丧失或增加以及一般动物的现象和反应,从而通过颈椎脱臼使之安乐死。在安乐死之后,对小鼠进行尸检以进行大体病理学检查。

[0196] 结论:肿瘤细胞接种后的存活时间以天数的形式来记录,如图3所示呈现初步存活曲线直到第20天后。在肿瘤细胞接种后第19天,使生理盐水中的和最低剂量组中的(100kBq/kg)所有小鼠安乐死,而在培养基(300kBq/kg)中的86%小鼠(6/7)和高(500kBq/kg)剂量组尚未达到研究终点。这些剩余的动物在第20天被检查。各组的中值存活数列于表4中。

[0197] 表4.用盐水或²²⁴Ra标记的碳酸钙治疗腹膜内ES-2癌腹水的小鼠的中位生存期。

治疗组	每组小鼠的数量	在细胞接种后的中值生存时间
NaCl	8	12 天
100 kBq/kg ²²⁴ Ra-CaCO ₃ 微粒	8	13 天
300 kBq/kg ²²⁴ Ra-CaCO ₃ 微粒	7	大于 20 天

[0198]

[0199]	500 kBq/kg ²²⁴ Ra-CaCO ₃ 微粒	7	大于 20 天
--------	--	---	---------

[0200] 总结:使用²²⁴Ra标记的碳酸钙微粒获得相当大的无病生命延长期,表明治疗腹腔内腹水的潜力巨大。

[0201] 实施例10A制备双组分放射治疗混合物。

[0202] 在一些方面,将²²⁴Ra标记的碳酸钙颗粒与细胞特异性放射性药物组合可能是有益的。在与碳酸钙颗粒接触之前,将与子体核素平衡的²²⁴Ra溶液与²¹²Pb结合螯合物缀合物组合时,获得这种结论。

[0203] 方法:与子体核素平衡的0.2ml和0.5M的²²⁴Ra乙酸铵溶液中加入1mg/ml TCMC标记的单克隆抗体(mAb)(曲妥珠单抗,西妥昔单抗或OI-3),并培育60分钟。此后,将反应混合物加入到在0.2ml 1%牛血清白蛋白中的30mg碳酸钙微粒中,混合30分钟。之后将混合物离心,并将上清液和沉淀物分别在 γ 计数器上计数并用锗检测器分析。

[0204] 制备由²¹²Pb标记的抗体和²²⁴Ra-CaCO₃微粒组成的放射治疗混合物。为了用²¹²Pb标记抗体,首先将抗体西妥昔单抗缀合至螯合剂TCMC。

[0205] 为制备放射免疫缀合物,将含有0.5M乙酸铵(pH5-6)的²²⁴Ra-溶液与TCMC-Cetuximab混合,并在37°C、350rpm的转速下反应30分钟。用色谱条(Biodex)评价所得产物的放射化学纯度,发现²¹²Pb在95%以上。如所述放射性标记程序所述制备CaCO₃微粒,不同之处在于所添加的放射性为上述同时含有游离的²²⁴Ra和²¹²Pb标记的TCMC-西妥昔单抗的溶液。在HulaMixer上在室温下培育1.5小时后,将放射性标记溶液中的颗粒离心,分离上清液和颗粒部分。用HPGe检测器测定颗粒沉淀中和上清液中²²⁴Ra和²¹²Pb的活性分布。对等分的上清液进行放射化学纯度分析。

[0206] 如表5和表6中的数据所示。表6显示在上清液中发现总²¹²Pb活性的66.39%,而²²⁴Ra的98.41%保留在颗粒上。在释放的²¹²Pb中,至少98%是蛋白质结合的(表5),其表示在抗体与颗粒混合之前,与部分²¹²Pb抗体结合。在表6中显示了部分²¹²Pb-抗体缀合物和在游离循环中的²²⁴Ra与碳酸钙颗粒的结合。数据显示²²⁴Ra与颗粒结合,而²¹²Pb-缀合物的主要部分自由地在介质中循环。从而获得适用于注射的双功能放射治疗混合物。

[0207] 总之,可以使用与²¹²Pb-TCMC-抗体缀合物混合的²²⁴Ra溶液来制备²²⁴Ra-CC微粒,产生双组分治疗混合物,包括具有放射免疫缀合物(RIC),和放射性标记的具有抗原靶向性质的颗粒以及放射治疗性质的颗粒。这在产生一般空腔照射和针对癌症的靶向RIC治疗的特定肿瘤细胞的组合中可能是有利的。RIC的加入可以增强 α 辐射的微分布以提高对抗癌细胞的治疗效果。

[0208] 表5.在吸收碳酸钙颗粒之前和之后²¹²Pb-TCMC-抗体缀合物的薄层色谱分析。

蛋白质结合率的 RCP 分析						
	配方缓冲时间	堪培拉锗探测器 伽马光谱			Cobra II Naly 计数器	
			^{212}Pb		70-80 keV	$^{220}\text{-260 keV}$
[0209] 与颗粒混合前	13 分钟		98,2 %		97,2 %	95,2 %
	20 分钟				99,6 %	98,1 %
颗粒标记之后	10 分钟				100,0 %	98,1 %
	20 分钟				98,2 %	100,0 %

[0210] 表6. 含有 ^{212}Pb -TCMC-抗体的 ^{224}Ra 溶液的颗粒吸收

	% 总活性	
	^{212}Pb	^{224}Ra
[0211] 颗粒	33,61 %	98,41 %
上清/抗体部分	66,39 %	1,59 %

[0212] 实施例10B用于制备 ^{212}Pb 放射免疫缀合物和 ^{224}Ra 微粒放射治疗混合物的试剂盒的描述。

[0213] 将有在水溶液(例如0.5M乙酸铵, pH5-6)中的 ^{224}Ra 溶液的小瓶(A)放置1天或更长时间以衰变产生 ^{212}Pb 。一TCMC-抗体缀合物或类似螯合物缀合抗体的水溶液小瓶(B)和一干燥或带水的碳酸钙微粒的小瓶(C)。将小瓶A和B的内容物混合在一个小瓶中并培育1分钟至4小时。然后与小瓶C混合再培育1分钟至4小时。在培育的每个步骤之后,进行可行或不可行的质量控制。最后,A,B和C的组合混合物被吸入注射器并施用于患者。

[0214] 实施例11不同大小的放射性标记微粒以及 ^{224}Ra 和子体 ^{212}Pb 的滞留

[0215] 研究了在不同大小的放射性标记的 CaCO_3 微粒中, ^{224}Ra 及其子代 ^{212}Pb 的标记效率和保留时间,其在1-10 μm 的优选大小范围内。通过单颗粒光学传感发现颗粒的数量加权中值大小为1.1和8.9 μm ,因此其代表颗粒的优选大小范围的两个极端值。如实施例3所述制备最大颗粒,较小颗粒购自德国柏林的PlasmaChem GmbH。如实施例4中所述用 ^{224}Ra 标记颗粒,不包括超声治疗步骤和在DPBS中的0.5%BSA中培育。在完成标记程序后,在Hidex γ 计数器中测量颗粒和洗涤溶液1分钟。由于 ^{224}Ra 衰变导致 γ 辐射非常小,所以 ^{224}Ra 的活性的测定主要通过测量其衰变产物 ^{212}Pb 的 γ 辐射来进行。选择65-345keV的计数,其中包括 ^{224}Ra 的 γ 活性和 ^{212}Pb 的 γ 和X射线活性,并将其总结用于进一步的计算。在标记后,使样品衰减最少24小时,以在 ^{224}Ra 和 ^{212}Pb 之间建立平衡,然后重新测量。标记效率被确定为结合活性:在标记程序之后被添加到与微粒结合的颗粒上的总活性百分比。

[0216] 标记效率(%) = $A_{\text{颗粒}} / (A_{\text{颗粒}} + W_{\text{溶液}}) \times 100$

[0217] 其中A颗粒是洗涤后颗粒悬浮液的活性,W是洗涤溶液的总活性。测量在完成颗粒标记之后进行,目的在于通过假定在65-345keV窗口中 ^{224}Ra 伽玛辐射的可忽略贡献来估计 ^{212}Pb 标记效率。当 ^{212}Pb 的衰变等于 ^{224}Ra 的生产速率时, ^{224}Ra 和子体 ^{212}Pb 之间达到平衡。 ^{224}Ra 的纯源在大约2天后达到平衡条件。这里假定样品中 ^{224}Ra 和 ^{212}Pb 之间的平衡是在24小时后达到的,因为样品在标记之后预期具有相对均匀的两种核素分布,即平衡将比来自 ^{224}Ra 的纯源更快地达到。因此使用平衡的样品的测量来估计在时间0时的 ^{224}Ra 标记效率。

[0218] 为了确定标记后颗粒上 ^{224}Ra 和 ^{212}Pb 的保留,在室温下将颗粒在1ml蔗糖缓冲液(94mg/ml蔗糖,2.1mg/ml Na₂SO₄)中温育。24小时后,3,5和7天后,离心颗粒悬浮液,测量上清液和颗粒状颗粒的活性。之后,如果稳定性研究要持续到较晚的时间点,则将颗粒沉淀物重新悬浮于新的蔗糖缓冲液等分试样中并进一步温育。将保留的活性估计为在去除上清液(A_{sup})之后没有从颗粒中释放的给定时间的样品的总活性的百分比保留活性(%) = $A_{\text{颗粒}} / (A_{\text{颗粒}} + A_{\text{sup}}) \times 10$

[0219] 样品在重新测量前保存最少24小时,如上所述,保留的 ^{212}Pb 活性是通过去除上清液后直接进行的测量来估计的,而保留的 ^{224}Ra 活性是通过平衡测量计算的。

[0220] 结论:对于1.1 μm (8.9 μm)颗粒的12(14)个体放射性标记实验,放射性标记效率如下(平均值 \pm 标准偏差): ^{224}Ra :93.6 \pm 5.8%(88.8 \pm 6.5%) 和 ^{212}Pb :87.6 \pm 7.7%(84.3 \pm 7.7%)。结论如图4所示,并且显示 ^{224}Ra 和子核 ^{212}Pb 被微粒高产率地吸收,而不管它们在大小上的差异。

[0221] 保留实验(图5)的结论显示 ^{224}Ra 和 ^{212}Pb 在蔗糖缓冲液中体外保留在CaCO₃颗粒上几天,这可能是放射性标记颗粒的相关药物载体。两种粒径的所有时间点的平均保留活性均在95%以上。这表明该产品可能有几天的保质期,允许集中生产并运送给远端的最终用户。

[0222] 实施例12 ^{224}Ra 标记的CaCO₃微粒在腹水小鼠中的治疗和血液学作用

[0223] 背景:人类卵巢癌通常会导致腹腔内腹水。人卵巢癌细胞系ES-2在裸鼠中产生侵袭性肿瘤细胞生长和癌性腹水。

[0224] 方法:将ES-2细胞(0.35ml RPMI中的 1×10^6 个细胞)腹腔注射到体重为17.0~23.9g的5-6周龄雌性无胸腺裸小鼠体内。22小时后,用蔗糖缓冲液腹腔注射 ^{224}Ra 标记的CaCO₃微粒(中值粒径8.9 μm ,通过单颗粒光学传感测定),其活性为150kBq/kg(0.25-0.35ml),300kBq/kg(0.3-0.35ml),1000kBq/kg(0.4ml)或2次150kBq/kg(0.3-0.4ml)注射。后者在每个注射部分之间有1周。对照动物接受0.35ml盐水。在细胞接种之前将小鼠随机分入处理组,每组由3-10只小鼠组成。如实施例9中所述,当动物达到预定终点时,通过颈椎脱臼将动物安乐死。它们也如实施例9所述相似地进行监测。此外,最大量100 μl 的血液是在术前13天从外侧静脉采集血液治疗开始后13天和26天。在每个时间点从每组取样3-5只小鼠。通过在自动化兽医血液分析仪(scil Vet abc, ABX Diagnostics, Montpellier, 法国)中计数白血细胞,红细胞和血小板来评估潜在的血液毒性。

[0225] 结论:存活时间记录为肿瘤细胞接种后数天,并且作为图6中的存活曲线呈现,并作为表7中的中值存活时间。与盐水相比,所有剂量的 ^{224}Ra -标记的CaCO₃微粒给出的中值存活最小化为双倍控制组。这些结论表明, ^{224}Ra 标记的CaCO₃微粒即使在相对低的剂量

(150kBq/kg组为2.6-3.6kBq/小鼠)下也具有治疗腔内腹水的显著潜力。血液学分析结论(图7)显示与治疗开始前相比白细胞计数没有减少。对比组在第13天和在第26天的150kBq/kg组白细胞计数与早期时间点相比增加可能是由于对腹部癌细胞累积的免疫反应,因为这些时间点与这些组中的小鼠开始经历沉重的腹水负荷并且接近达到研究的终点相关。所有处理组的平均血小板计数与由种鸡(Envigo)提供的该小鼠品系的参考值($1100 \pm 143 \times 10^9/L$)没有显著差异。对于红细胞,与盐水对照相比,在任何治疗组中没有观察到显著的计数差异。这些结论表明, ^{224}Ra 标记的 CaCO_3 微粒在本研究中测试的治疗有效剂量水平具有良好的耐受性并且没有显示引起血液学毒性的迹象。

[0226] 结论:用 ^{224}Ra 标记的 CaCO_3 微粒处理后可获得相当的无病生存期。观察到对血液学参数没有治疗相关的影响,总而言之, $^{224}\text{Ra}-\text{CaCO}_3$ 微粒治疗在剂量下耐受性良好,导致显著的治疗效果。

[0227] 表7:用 1×10^6 ES-2细胞腹膜内注射并用盐水或 ^{224}Ra 标记的 CaCO_3 微粒22小时后处理的小鼠的中位存活时间。

治疗组	每组小鼠数	细胞接种后中位存活数
NaCl	10	17
150 kBq/kg $^{224}\text{Ra}-\text{CaCO}_3$ 颗粒	9	34
300 kBq/kg $^{224}\text{Ra}-\text{CaCO}_3$ 颗粒	9	40
2×150 kBq/kg $^{224}\text{Ra}-\text{CaCO}_3$ 颗粒	9	36
1000 kBq/kg $^{224}\text{Ra}-\text{CaCO}_3$ 颗粒	3	46

[0229] 实施例13在不同疾病发展阶段用腹膜内腹水治疗小鼠

[0230] 背景:恶性腹水在腹腔晚期癌症中很常见,并且与患者的预期寿命和生活质量降低相关,并且医疗需要改善治疗策略。在细胞接种后的不同日期,通过在裸鼠的ES-2腹水模型中评估 $^{224}\text{Ra}-\text{CaCO}_3$ 微粒的抗腹水活性。

[0231] 方法:体外培养5~6周龄雌性无胸腺裸小鼠,体重17.0~23.9g,腹腔注射ES-2细胞($1 \sim 10^6$ 细胞,0.2~0.35ml RPMI)。在细胞接种后22小时,2,5,7和9天,在蔗糖缓冲液中腹膜内注射 ^{224}Ra 标记的 CaCO_3 微粒(8.9 μm 中值大小,通过单颗粒光学传感测定)来处理由5-10只小鼠组成的随机组。除了施用300kBq/kg(0.3-0.35ml)的细胞接种后22小时处理的组之外,所有处理组均接受700kBq/kg(0.29-0.4ml)的剂量。对照组小鼠在细胞接种后第1天(10只小鼠),5只(5只小鼠)和9只(10只小鼠)接受盐水(0.35-0.4ml)。如实施例9中所述,当动物达到预定的终点时,通过颈椎脱臼使动物安乐死。也如实施例9所述类似地监测动物。

[0232] 结论:存活时间记录为肿瘤细胞接种后数天,并作为图8中的存活曲线呈现,并作为表8中的中值存活时间。当用 ^{224}Ra 处理小鼠时观察到与盐水对照组相比增加的中值存活时间细胞接种后1-7天标记的 CaCO_3 微粒。治疗效果与治疗日相关,即在细胞接种后的最早时间点观察到存活最显著的增加。如表8中所示,与对照相比,在 $^{224}\text{Ra}-\text{CaCO}_3$ 微粒处理组中处死的小鼠中具有腹水的小鼠也有减少。尽管在肿瘤接种后处理组具有较长的存活时间,因此有更多时间发生腹水。

[0233] 结论: ^{224}Ra 标记的 CaCO_3 微粒治疗ES-2细胞腹腔接种小鼠具有显著的抗腹水作用。

[0234] 表8:细胞接种后在不同时间用盐水或²²⁴Ra-标记的CaCO₃微粒处理的具有腹膜内ES-2卵巢癌腹水模型的小鼠的中位存活率。

治疗组	细胞接种后的中位存活数	腹水所致小鼠死亡数	每组小鼠数	%腹水所致小鼠死亡率
天数 1+5+9: NaCl	16	25	25	100 %
天数 1: 300 kBq/kg ²²⁴ Ra-CaCO ₃ 颗粒	40	4	9	44 %
天数 2: 700 kBq/kg ²²⁴ Ra-CaCO ₃ 颗粒	33	4	5	80 %
天数 5: 700 kBq/kg ²²⁴ Ra-CaCO ₃ 颗粒	26	1	5	20 %
天数 7: 700 kBq/kg ²²⁴ Ra-CaCO ₃ 颗粒	20	2	5	40 %
天数 9: 700 kBq/kg ²²⁴ Ra-CaCO ₃ 颗粒	16.5	7	10*	78 %

[0235] 实施例14 ²²⁴Ra标记的碳酸钙微粒在小鼠腹膜内微转移模型中的治疗作用

[0237] 背景:最大减瘤手术治疗的卵巢癌患者由于剩余的腹腔肿瘤细胞和微小转移灶而具有复发倾向。为了模拟患者残留腹腔疾病的情况,在裸鼠中接种1×10⁵个产生腹水细胞系ES-2的细胞,在细胞后1小时给予²²⁴Ra标记的CaCO₃微粒处理。

[0238] 方法:体重18.5~28.8g的6~9周龄雌性Athymic Nude-Foxn1nu小鼠腹腔注射ES-2细胞(0.2ml RPMI中的1×10⁵细胞)细胞接种1小时后,用蔗糖缓冲液(0.31-0.5ml)腹腔内注射750kBq/kg ²²⁴Ra标记的2种不同大小的CaCO₃微粒处理小鼠。对照组接受0.4ml盐水。通过单颗粒光学传感发现颗粒的数量加权中值尺寸为1.1和8.9μm,因此代表颗粒的优选尺寸范围的两个极端值。如实施例3所述制备最大的颗粒,较小的颗粒购自PlasmaChem GmbH。在细胞接种之前将小鼠随机分为处理组,每组由12-13只小鼠组成。如实施例9中所述,当动物达到预定的终点时,通过颈椎脱臼使动物安乐死。也如实施例9所述类似地监测动物。

[0239] 结论:存活时间记录为肿瘤细胞接种后数天,并作为存活曲线呈现,包括直到图9中的第80天的数据和作为表9中的中值存活时间。中值存活时间延长了42天(3.2倍)和36天(2.9倍),分别用盐水对照组处理²²⁴Ra标记的大和小CaCO₃颗粒。在第80天,与对照组的1/13(7.7%)相比,用8.9μm和1.1μm大小的颗粒处理的小鼠的4/12(33.3%)和3/12(25%)存活。两个²²⁴Ra处理组的存活曲线之间没有统计学显著差异。

[0240] 结论:结论显示,²²⁴Ra标记的CaCO₃颗粒具有治疗残余腹膜疾病的显著潜力,与盐水对照组相比,中位生存期增加约3倍,并产生几个长期存活者。结论还表明,在这个模拟微转移疾病的模型中,在1-10μm的优选尺寸范围的两个极端的颗粒具有相似的治疗功效。

[0241] 表9:与盐水对照组相比,用1×10⁵ ES-2细胞腹膜内注射并用1个小时后用²²⁴Ra标记的两种不同大小的CaCO₃微粒处理的小鼠的中值存活时间。

治疗组	每组小鼠数	细胞接种后小鼠的中位存活数	% 随访 80 天的存活情况
NaCl	13	19	7.7 %
[0242] 750 kBq/kg ²²⁴ Ra-CaCO ₃ 颗粒 (8.9 μm)	12	61	33.3 %
750 kBq/kg ²²⁴ Ra-CaCO ₃ 颗粒 (1.1 μm)	12	55	25.0 %

[0243] 实施例15 ²¹²Pb在碳酸钙微粒上的吸收

[0244] 为了确定从24小时期间吸收到非放射性颗粒上的²²⁴Ra标记的CaCO₃微粒中释放的²¹²Pb的量,使用透析装置。如实施例4中所述,用²²⁴Ra标记CaCO₃微粒,除了超声处理步骤和在DPBS中的0.5%BSA中温育被省略。此外,非放射性颗粒的制备方法完全相同,不包括添加放射性溶液的步骤。将非放射性颗粒(50mg)在锥形15ml离心管中在DPBS(pH 7)中稀释至总体积14ml。在透析装置(Slide-A-Lyzer MINI透析装置,20kDa MWC0,ThermoFisher)中加入大约5mg DPBS中的放射性颗粒(0.15-0.40ml),并放入含有非放射性颗粒的管中,透析缓冲液。插入透析装置的管在室温下振荡孵育24小时。温育后,将15ml试管旋转离心,除去上清液。透析装置(AD)中的活性,透析缓冲液(AS)的上清液和来自15ml试管(AP)的沉淀颗粒在Hidex γ计数器中测量。在24小时内释放²¹²Pb的百分比估计如下:

$$[0245] \text{ 发布活动}(\%) = (A_S + A_P) / (A_P + A_S + A_P) \times 100$$

[0246] 已经吸收到非放射性CaCO₃颗粒上的释放的²¹²Pb活性的百分比如下确定:

$$[0247] \text{ 吸附在颗粒上的活性}(\%) = A_P / (A_P + A_S) \times 100$$

[0248] 表10给出了研究结论,其显示从放射性标记的颗粒释放到DPBS的²¹²Pb被高度吸收到CaCO₃颗粒上。释放的²¹²Pb活性中有一半以上倾向于与颗粒重新结合。这表明如果²²⁴Ra女儿(²²⁰Rn,²¹⁶Po或²¹²Pb)由于反冲能量或由于²²⁰Rn扩散而从颗粒中释放,则可能随后显著重吸收女儿²¹²Pb。这是一个非常有益的概念,因为它可以减少来自腹腔内的子体核素的再分布的系统毒性,通过阻止²¹²Pb进入血流。总之,碳酸钙微粒特别适合于保留²²⁴Ra和后代,因为它可以重吸收从²²⁴Ra标记的碳酸钙颗粒中扩散²²⁰Rn产生的游离²¹²Pb。

[0249] 表10从²²⁴Ra标记的CaCO₃微粒释放并吸收到非放射性颗粒上的²¹²Pb的量。

颗粒大小	% ²¹² Pb活性释放比	% of ²¹² Pb的活性吸附在颗粒上的百分比
1.1 μm	6.6%	75.3%
8.9 μm	5.9%	56.7%

[0251] 实施例16放射性标记的微粒的生物分布和体内稳定性

[0252] 在这个例子中,来自实施例7的数据再次呈现为每克不同组织的Bq。注射剂量标准化为每只小鼠10kBq。使用小鼠处死后大约2.5-3小时的样品的测量值来估计²¹²Pb的量,而使用小鼠处死后3-4天的样品的重新测量值来确定²²⁴Ra的量。²²⁴Ra的数据经过衰减校正以显示处死时样品中的活性。

[0253] 结论:与游离²²⁴Ra溶液相比,注射后20小时,4天和7天²²⁴Ra标记的CaCO₃颗粒的组织分布在图10中表示为每克组织的平均活性。图11显示了子体核素²¹²Pb的生物分布。当放射性标记与颗粒结合时,它表现出组织辐射暴露的显著变化,强烈地减少了对骨骼的暴露,并且推测暴露于腹腔器官的表面。总之,²²⁴Ra标记的碳酸钙微粒显示出作为局部放射治疗剂在腹腔中的有前景的性质。

[0254] 实施例17在侵袭性癌症腹水模型中的治疗效果

[0255] 在这个例子中,来自实施例9的数据已经用小鼠的延长的随访时间和在Capintec CRC-25R剂量校准器的重新校准之后调整的剂量水平进行了更新。给予小鼠的剂量已经调整到35kBq/kg,100kBq/kg和165kBq/kg。

[0256] 结论:存活时间记录为肿瘤细胞接种后数天,并作为存活曲线呈现,包括直到图12中第30天的随后数据的存活曲线,以及表11中的中值存活时间。中和高剂量的²²⁴Ra-CaCO₃颗粒给出在这种侵袭性腹水模型中,与盐水对照相比,中位生存时间几乎增加了一倍。最高剂量组中的一只小鼠在细胞接种后生存138天并被处死而没有显示任何疾病迹象。

[0257] 表11:用10×10⁻⁶ ES-2细胞腹膜内注射并在25小时后用盐水或²²⁴Ra标记的CaCO₃微粒处理的小鼠的中值存活时间。

治疗组	每组小鼠数	细胞接种后的中位存活时间
NaCl	8	12
[0258] 35 kBq/kg ²²⁴ Ra-CaCO ₃ 颗粒	8	13
100 kBq/kg ²²⁴ Ra-CaCO ₃ 颗粒	7	21
165 kBq/kg ²²⁴ Ra-CaCO ₃ 颗粒	7	21

[0259] 总之,²²⁴Ra标记的碳酸钙微粒在具有侵袭性腹膜内癌症的小鼠中显示出实质的抗肿瘤活性,但是高于35kBq/kg的剂量对于获得显著的抗侵袭性癌症的抗肿瘤作用是优选的。

[0260] 参考文献

[0261] Atcher RW and Hines JJ. Colloid labelled with radionuclide and method US 4970062 A (1989年提交)。

[0262] Bloomer, W.D., McLaughlin, W.H., Neirinckx, R.D., Adelstein, S.J., Gordon, P.R., Ruth, T.J., Wolf, A.P. Astatine-211-tellurium radiocolloid cures experimental experimental abdominal. Science. 1981; 212: 340-341.

[0263] Boudousq V1, Bobyk L, Busson M, Garambois V, Jarlier M, Charalambatou P, Pellegrin A, Paillas S, Chouin N, Quenet F, Maquaire P, Torgue J, Navarro-Teulon I, Pouget JP. Comparison between internalizing anti-HER2 mAbs and non-internalizing anti-CEA mAbs in alpha-radioimmunotherapy of small volume peritoneal carcinomatosis using 212Pb. PloS One. 2013 Jul 29; 8(7).

[0264] Gustafsson AM1, Bäck T, Elgqvist J, Jacobsson L, Hultborn R, Albertsson P, Morgenstern A, Bruchertseifer F, Jensen H, Lindegren S. Comparison of therapeutic efficacy and biodistribution of 213Bi- and 211At-labeled monoclonal antibody MX35 in an ovarian cancer model. Nucl Med Biol. 2012 Jan; 39(1): 15-22.

[0265] Kirby, H.W.; Salutsky, Murrell L (1964). The Radiochemistry of Radium (PDF). National Academies Press, pp 5. Larsen RH and Salberg G. Alpha-emitting hydroxyapatite particles. US patent No. 8142758B2 (2005年提交)。

[0266] Liu S. Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules

and target specific delivery of metallic radionuclides. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008, 60 (12), 1347-1370.

[0267] Ritter MA, Cleaver JE, Tobias CA. High-LET radiations induce a large proportion of non-rejoining DNA breaks. *Nature.* 1977 Apr 14; 266 (5603): 653-5. Scott A. Gerber, *Viktoriya Y. Rybalko, *Chad E. Bigelow, †Amit A. Lugade, *Thomas H. Foster, †John G. Frelinger, *and Edith M. Lord* Preferential Attachment of Peritoneal Tumor Metastases to Omental Immune Aggregates and Possible Role of a Unique Vascular Microenvironment in Metastatic Survival and Growth. *Am J Pathol.* 2006 Nov; 169 (5): 1739-1752. Vergote I, Larsen RH, de Vos L, Nesland JM, Bruland O, Bjørgum J, Alstad J, Tropé C, Nustad K. Therapeutic efficacy of the alpha-emitter ^{211}At bound on microspheres compared with ^{90}Y and ^{32}P colloids in a murine intraperitoneal tumor model. *Gynecol Oncol.* 1992 Dec; 47 (3): 366-72.

[0268] 本发明的产品

[0269] 1. 一种颗粒, 包含: 一可降解化合物和发射 α 射线的放射性核素和/或一产生发射 α 射线子体的放射性核素。

[0270] 2. 根据产品1所述的颗粒, 所述放射性核素选自 ^{224}Ra , ^{212}Bi , ^{212}Pb , ^{223}Ra , ^{225}Ra , ^{225}Ac , ^{213}Bi , ^{211}At , ^{227}Th 。

[0271] 3. 根据产品1-2中任一项所述的颗粒, 可降解化合物选自碳酸钙、PEG改性的碳酸钙、蛋白质改性的碳酸钙、碳水化合物改性的碳酸钙、脂质改性的碳酸钙、维生素改性的碳酸钙、有机化合物改性的碳酸钙、聚合物改性的碳酸钙、和/或无机晶体改性的碳酸钙。

[0272] 4. 根据产品1-3中任一项所述的颗粒, 所述颗粒的大小为1纳米至500微米。

[0273] 5. 根据产品1-4中任一项所述的颗粒, 进一步地包括一种或多种化合物, 所述化合物选自一单克隆抗体、一多克隆抗体、一放射性免疫缀合物、一免疫缀合物、一螯合抗体缀合物、包含叶酸和叶酸衍生物的维生素、肽、微型抗体和亲和体。

[0274] 6. 一种药物组合物, 包含一种或多种根据产品1-5中任一项所述的颗粒以及一稀释剂、载体、表面活性剂、和/或赋形剂。

[0275] 7. 根据产品6所述的药物组合物, 用每剂1kBq到10GBq的放射性核素的量来制备。

[0276] 8. 根据产品6-7中任一项所述的药物组合物, 用适用于多剂量工业规模生产的50MBq到100GBq的放射性核素的量来制备。

[0277] 9. 根据产品6-8中任一项所述的药物组合物, 所述组合物为一种颗粒混合物, 包含用发射 α 射线的放射性核素或发射 α 射线子体的放射性核素标记的单分散或多分散颗粒。

[0278] 10. 根据产品6-9中任一项所述的药物组合物, 适用于静脉内或体腔内注射。

[0279] 11. 根据产品1-5中任一项所述颗粒, 或根据产品6-9中任一项所述药物组合物, 作为一种药物来使用。

[0280] 12. 根据产品1-5中任一项所述颗粒, 或根据产品6-9中任一项所述药物组合物, 用于体腔内治疗, 放射性栓塞术或放射性滑膜切除术。

[0281] 13. 根据产品1-5中任一项所述颗粒, 或根据产品6-9中任一项所述药物组合物, 用于癌症的治疗。

[0282] 14. 根据产品1-5中任一项所述颗粒,或根据产品6-9中任一项所述药物组合物,用于根据产品12-13中任一项所述使用目的,所述癌症选自腹膜内癌,颅内癌,胸膜癌,膀胱癌,贲门癌和蛛网膜下腔癌。

[0283] 15. 一种治疗或改善方法,包括将根据产品1-5中任一项所述的颗粒或根据产品6-9中任一项所述的药物组合物给药至需要其的个体,通过单次治疗或重复给药。

[0284] 16. 一种制备根据产品1-6中任一项所述颗粒的方法,所述方法包括在使用或不使用放射性核素的载体的情况下,使发射 α 射线的放射性核素和可生物降解的化合物彼此接触。

[0285] 17. 一种试剂盒,包含:

[0286] 根据产品1-6中任一项所述的一纳米或微米颗粒;

[0287] 一发射 α 射线的放射性核素或产生发射 α 射线子体的放射性核素;一载体,稀释剂和/或赋形剂;

[0288] 任选地,所述试剂盒的使用说明。

[0289] 18. 一种试剂盒,包含:

[0290] 根据产品1-6中任一项所述的一纳米或微米颗粒;

[0291] 一发射 α 射线的放射性核素或产生发射 α 射线子体的放射性核素;

[0292] 一载体,稀释剂和/或赋形剂;

[0293] 任选地,所述试剂盒的使用说明,以制备颗粒悬浮液和放射性免疫缀合物溶液的双功能药物溶液。

[0294] 19. 根据产品18所述的试剂盒,还包含一整合剂-缀合分子,所述整合剂-缀合分子包括单克隆抗体。

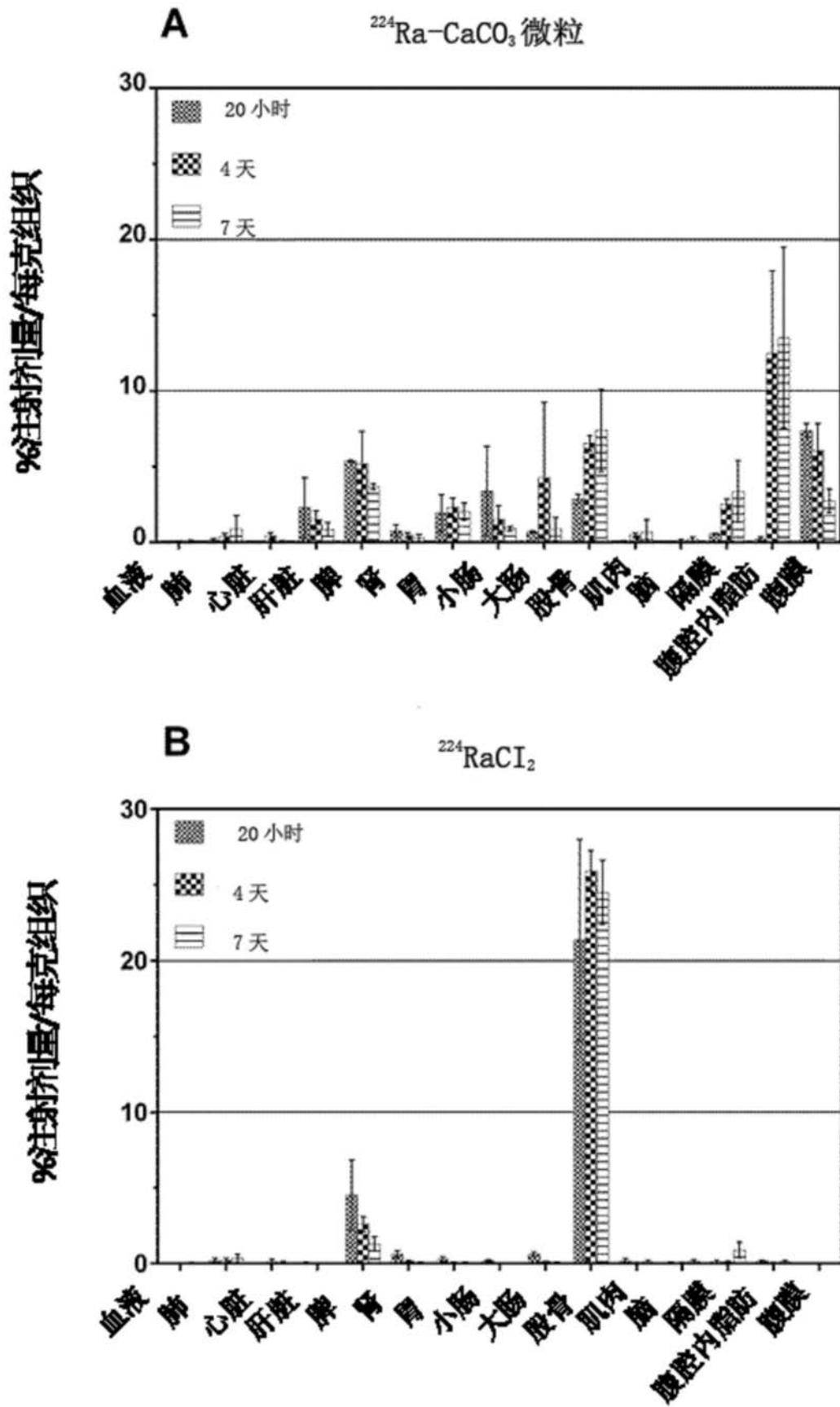


图1



图2

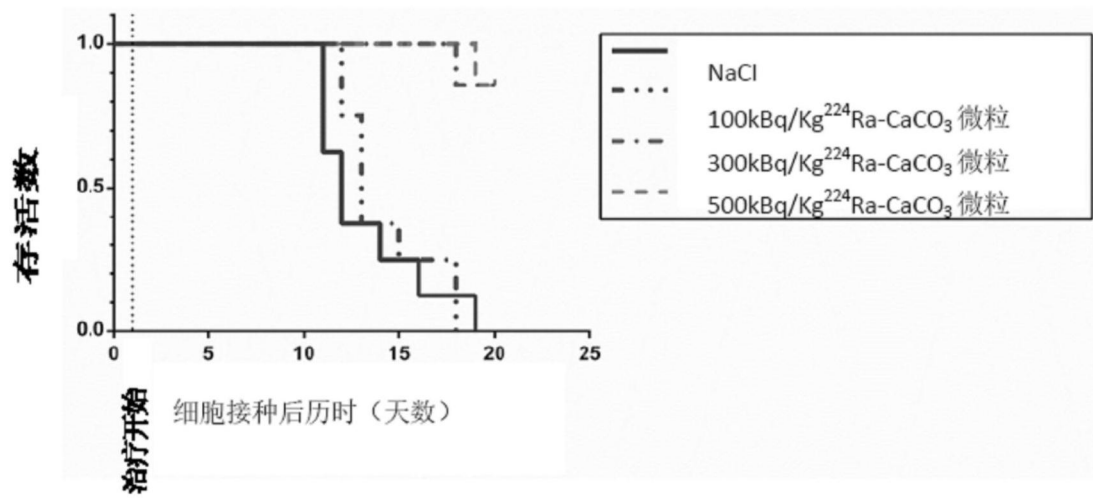


图3

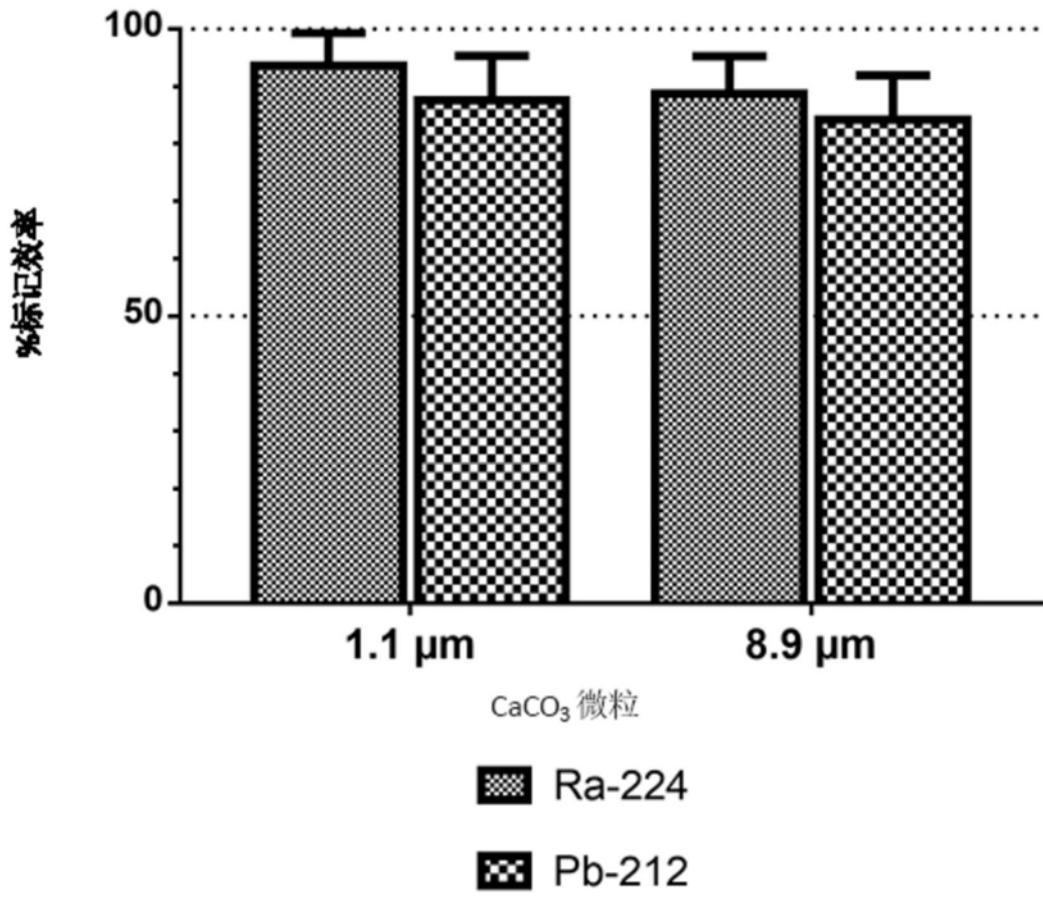


图4

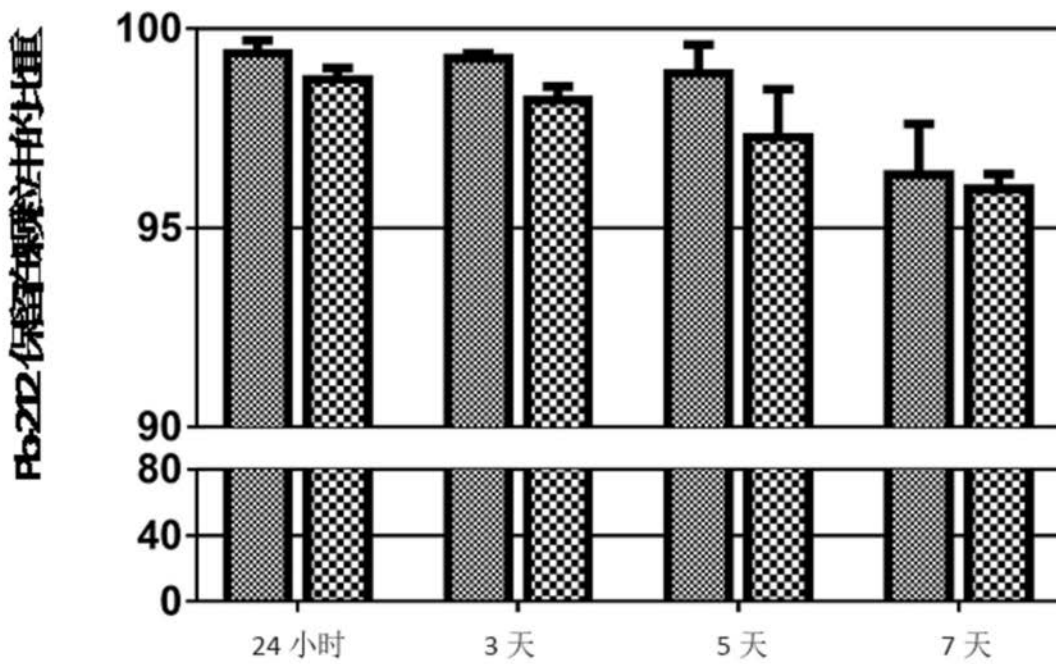
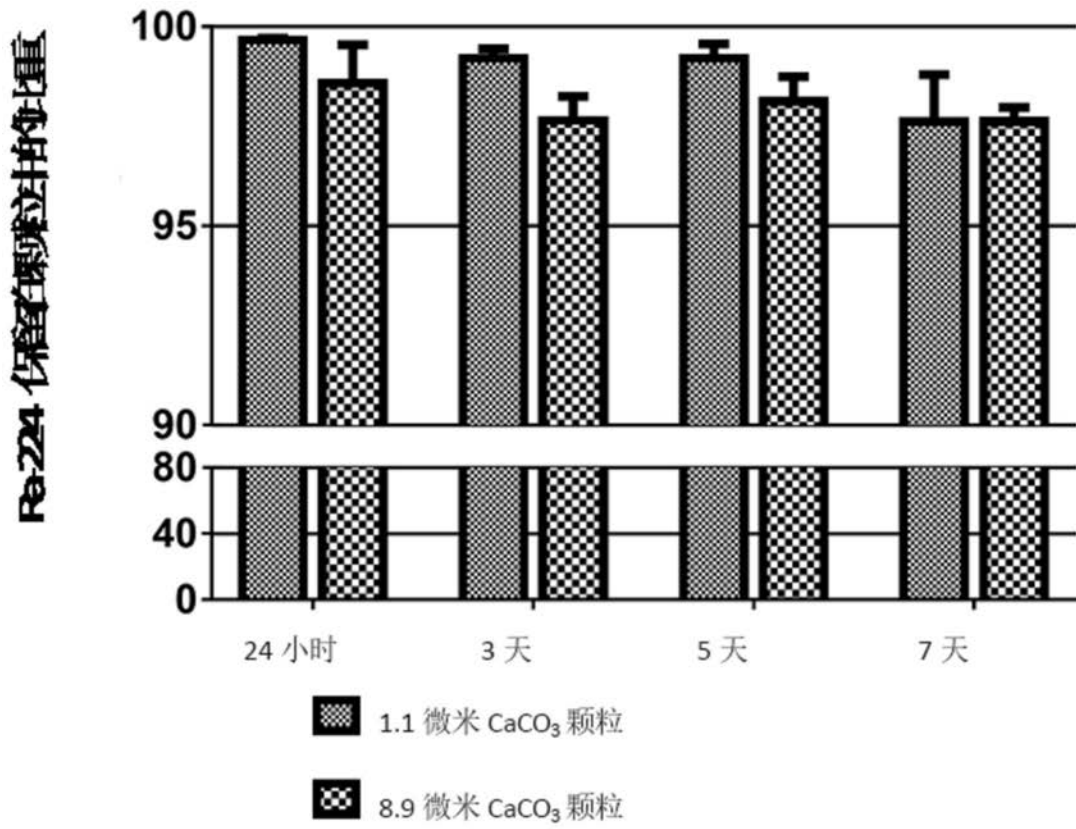


图5

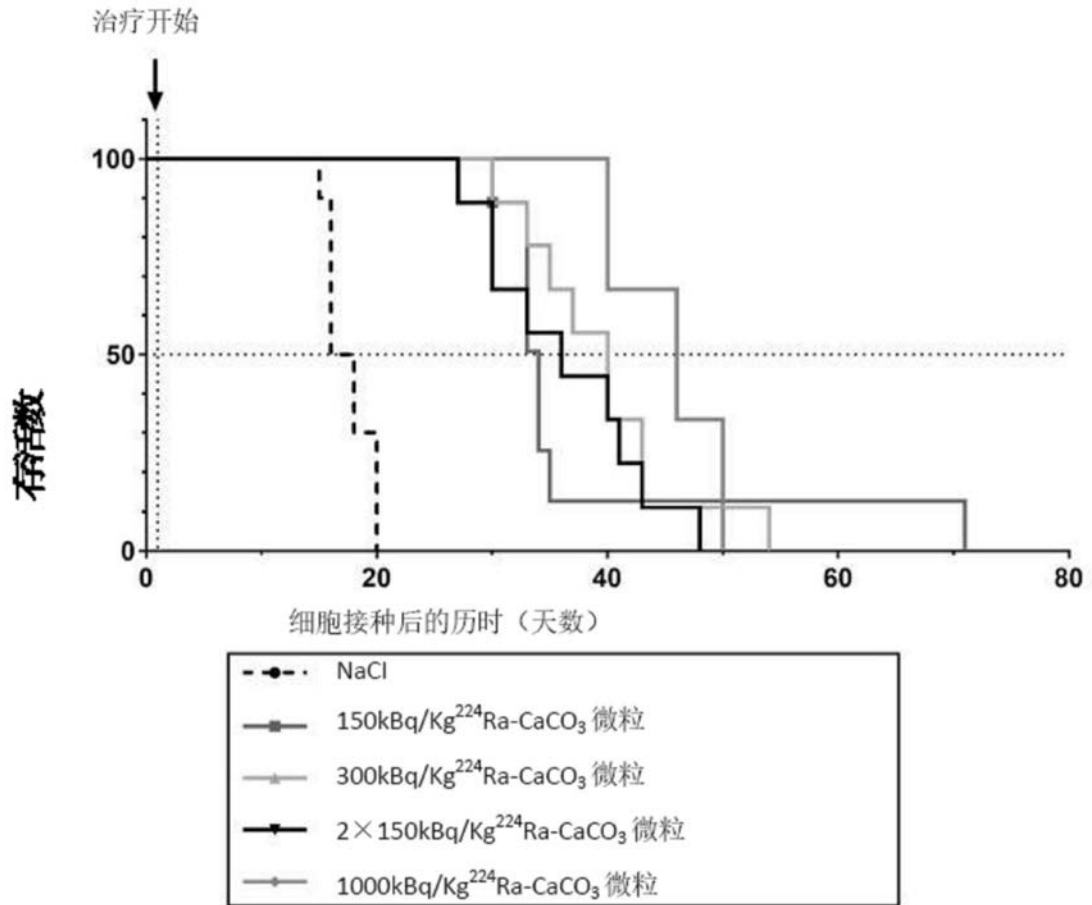


图6

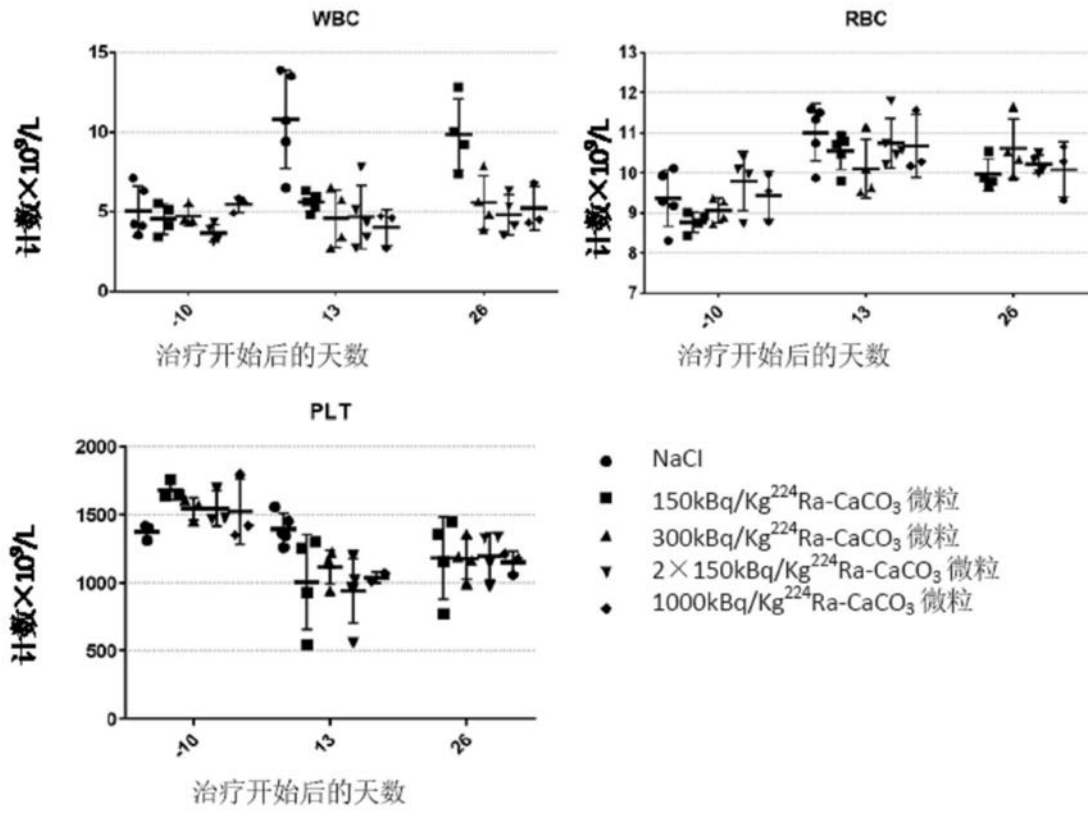


图7

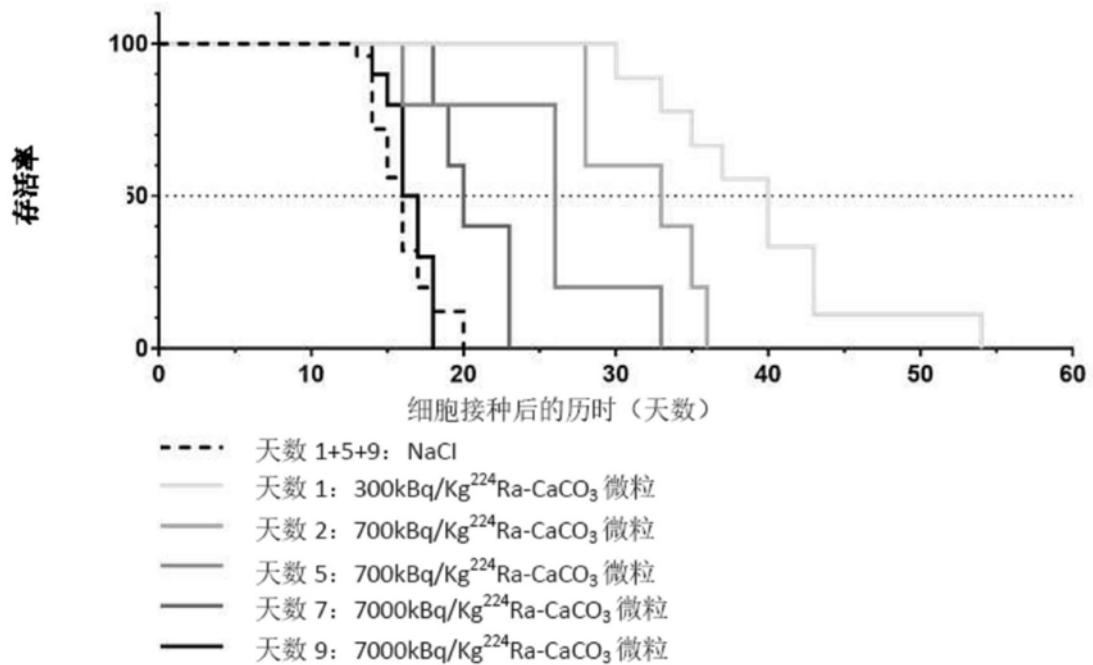


图8

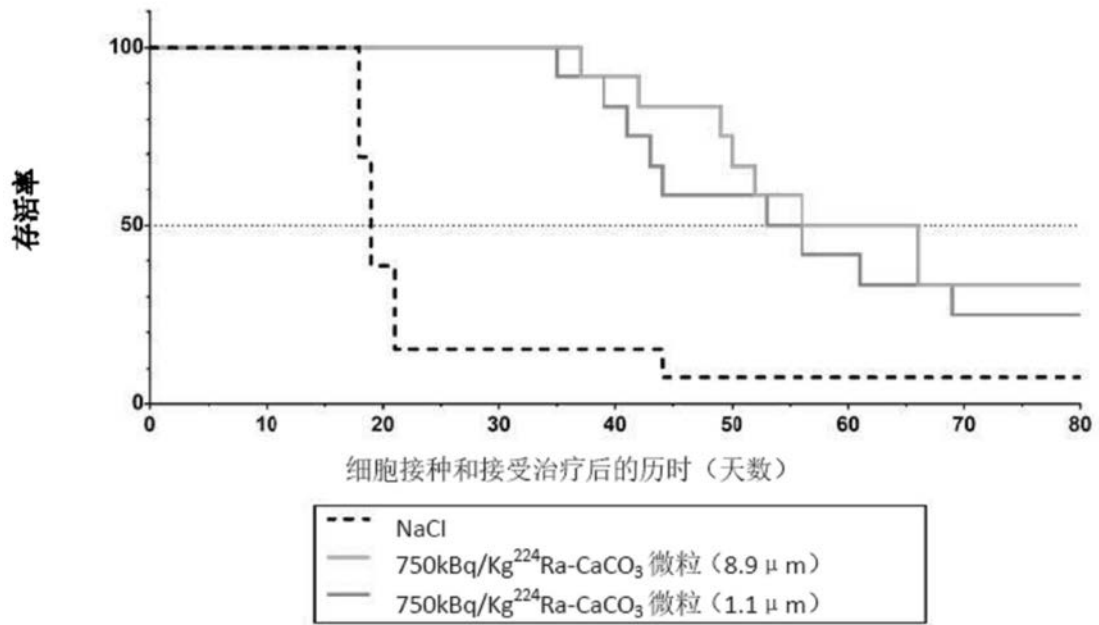


图9

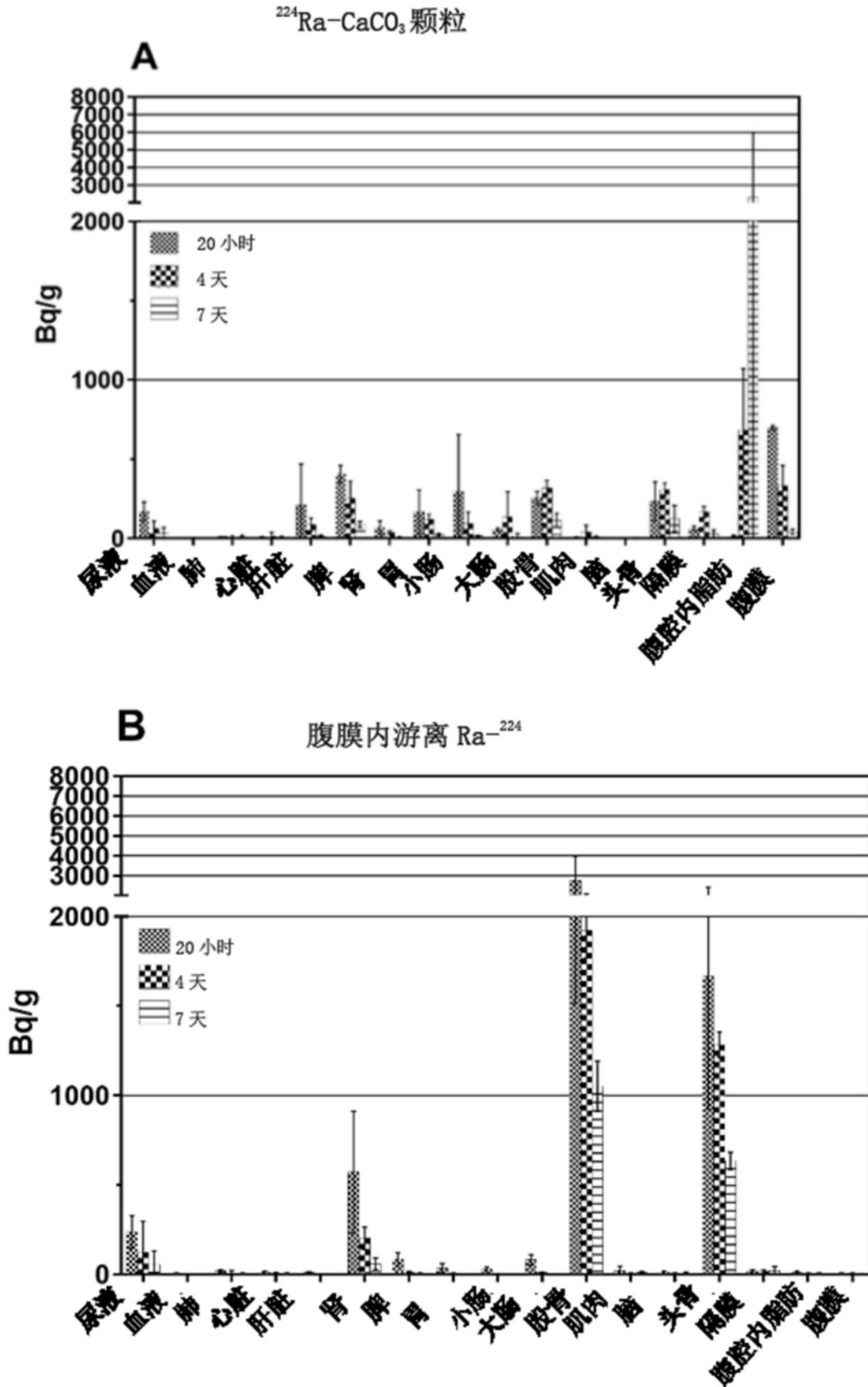


图10

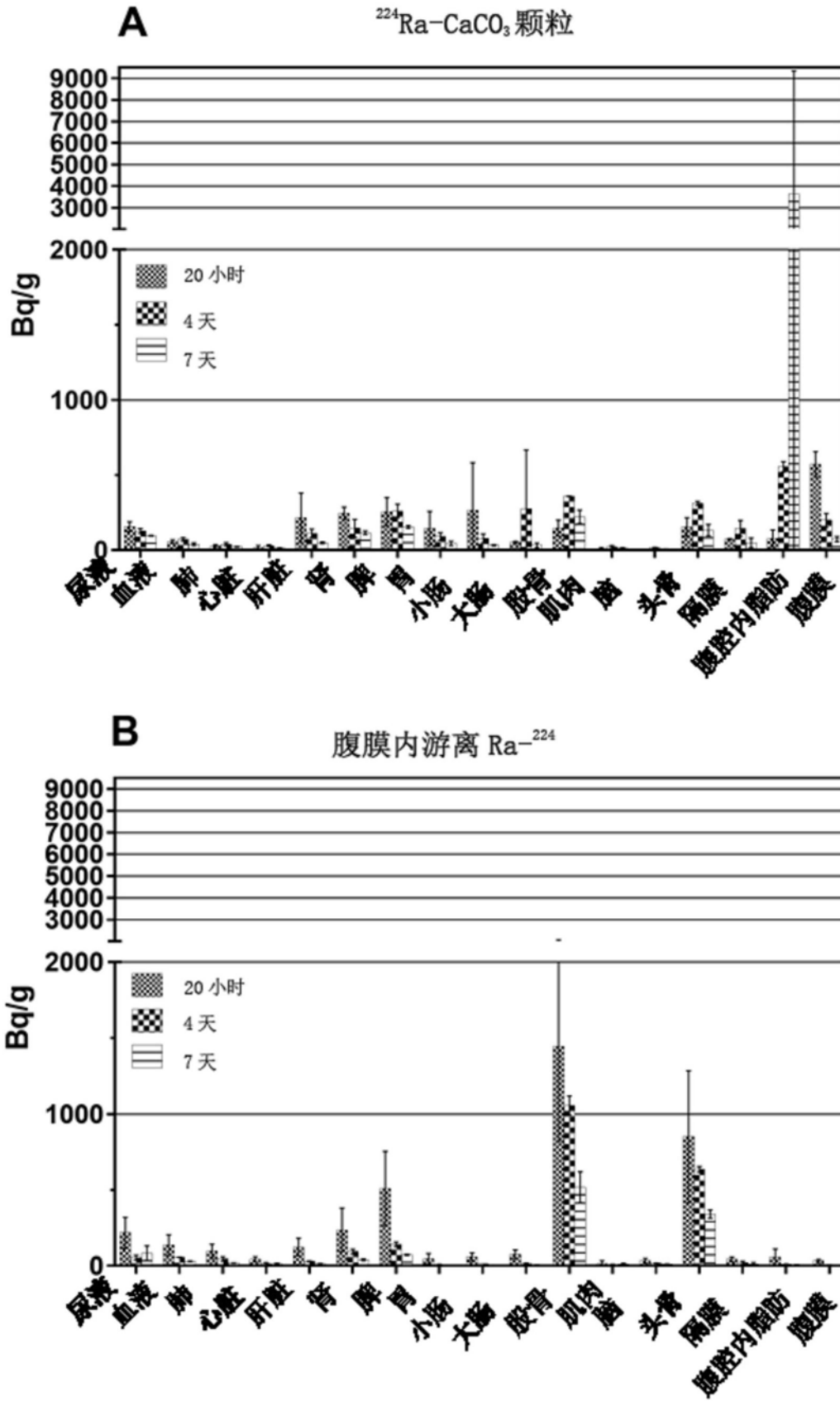


图11

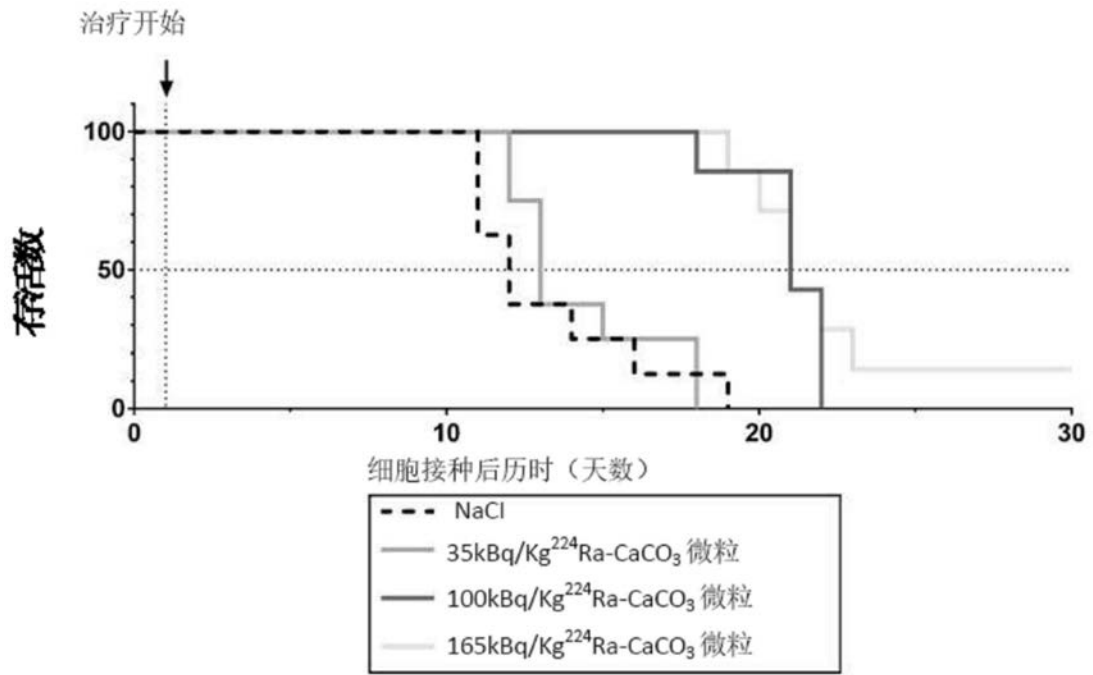


图12