

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl.⁷
C08B 37/02 A61K 31/716
A61P 35/04

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 00115752.3

[45]授权公告日 2002年12月4日

[11]授权公告号 CN 1095472C

[22]申请日 2000.5.18 [21]申请号 00115752.3

[30]优先权

[32]2000.4.17 [33]CN [31]00115400.1

[73]专利权人 上海复康医药科技发展有限公司

地址 200031 上海市肇嘉浜路446弄1号1604室

共同专利权人 复旦大学

[72]发明人 陆伟跃 刘敏 潘俊

[56]参考文献

CN1081688A 1994. 2. 9

EP383170A 1990. 8. 22

GB1201014A 1970. 8. 5

US4857505 1989. 8. 15

US5045535 1991. 9. 3 C08B1/10

US5547668 1996. 8. 20

WO92/11037A 1992. 7. 9 A61K47/48

审查员 朱芳

[74]专利代理机构 上海正旦专利代理有限公司

代理人 吴桂琴

权利要求书1页 说明书13页 附图5页

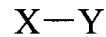
[54]发明名称 叶酸-多聚糖复合物,其制备方法和以该复合物为活性成分的药物组合物

[57]摘要

本发明涉及叶酸与多聚糖的复合物及其制备方法,特别是涉及叶酸与右旋糖酐的复合物及其制备、以该复合物为活性成分的药物组合物,以及该复合物在肿瘤治疗中的应用。本发明涉及的叶酸-多聚糖复合物的通式为:X-Y 其中:X 可以是叶酸及其衍生物或其它可循细胞膜上叶酸受体途径进入细胞的物质;Y 可以是各种类型的多聚糖。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

- 1、一种叶酸-多聚糖复合物，其特征在于具有以下通式：



其中：X 为叶酸及其衍生物或其它可循细胞膜上叶酸受体途径进入细胞的物质；Y 为葡聚糖类、聚蔗糖类、果聚糖类、杂聚多糖类、单或杂聚多糖硫酸酯类、单或杂聚糖醛酸多糖类、聚乙二醇或甲氧基聚乙二醇。

- 2、按权利要求 1 所述的叶酸-多聚糖复合物，其特征在于 X 选自叶酸、亚叶酸、二氢叶酸、四氢叶酸、四氢蝶呤、蝶酰多谷氨酸、2-去氨基-羟基叶酸、1-去氮叶酸、3-去氮叶酸和 8-去氮叶酸。
- 3、按权利要求 1 所述的叶酸-多聚糖复合物，其特征在于所述的多聚糖分子量范围为 4,000-2,000,000。
- 4、按权利要求 1 所述的叶酸-多聚糖复合物，其特征在于所述的葡聚糖类多聚糖为右旋糖酐。
- 5、按权利要求 4 所述的叶酸-多聚糖复合物，其特征在于所述的右旋糖酐分子量范围为 10,000-2,000,000。
- 6、按权利要求 5 所述的叶酸-多聚糖复合物，其特征在于所述的右旋糖酐分子量范围为 10,000-105,000。
- 7、按权利要求 6 所述的叶酸-多聚糖复合物，其特征在于所述的右旋糖酐分子量为 105,000。
- 8、一种权利要求 1~7 之一的叶酸-多聚糖复合物的制备方法，其特征在于按下述方法制备：取叶酸和多聚糖，在吡啶类催化剂和碳二亚胺脱水剂作用下，缩合成叶酸-多聚糖复合物，其中叶酸/多聚糖分子比是 26~80:1。
- 9、一种抗肿瘤的药物组合物，其特征在于含有权利要求 1~7 之一所述的叶酸-多聚糖复合物和药用辅料。
- 10、按权利要求 9 的药物组合物，其特征在于将所述的药物组合物制成冻干粉针剂、干糖浆剂和肠溶胶囊剂形式。
- 11、一种权利要求 1~7 之一的叶酸-多聚糖复合物在制备抗肿瘤药物中的应用。

叶酸-多聚糖复合物,其制备方法 和以该复合物为活性成分的药物组合物

本发明涉及叶酸与多聚糖的复合物及其制备方法,特别是涉及叶酸与右旋糖酐的复合物及其制备、以该复合物为活性成分的药物组合物,以及该复合物在肿瘤治疗中的应用。

自从提出特异性叶酸结合蛋白(FBP)概念[Johns et al: J Clin Invest 1961;40:1684]以后, Rothenberg 等人首先在人体细胞内发现 FBP [Proc Soc Expl Biol Med 1970;133:428. J Clin Invest 1971;50:717], Lesli 等人也从细胞膜中分离出 FBP[Biochem 1972;11:1696]。而 Antony 等人通过对胎盘细胞的系统研究,明确提出了这种 FBP 在细胞膜上具备叶酸受体(FR)功能[J Biol Chem 1981;256(18):9684],并陆续系统地阐明了 FR 的生物化学特性[Blood 1992;79(11):2807. Annu Rev Nutr 1996;16:501]。FR 是一种被锚在细胞膜中甘油磷脂酰肌醇(GPI)上的 FBP,其可被 GPI 特异性磷脂酶 C 或 D 从细胞膜上切除[Lee et al: Biochem 1992;31:3236. Verma et al: J Biol Chem 1992;267(6):4119]。FR 较均匀散布于细胞膜表面,结合叶酸后,在促发剂作用下移入被膜小凹(coated pits)或凹穴(coveolae)内集束[Mayor et al: Science 1994;264:1948],随之发生细胞内吞,将叶酸传输至胞内[Anderson et al: Science 1992;255:410]。

人的 FR 主要有三种异构形式,即 FR- α 、FR- β 和 FR- γ ,其中 FR- γ 是一种表达在造血细胞上的分泌蛋白 [Shen et al: Biochem 1995;34:5660]。动物细胞表面也存在 FR-1 和 FR-2 异构体,FR-1 主要表达在肿瘤细胞和肾细胞上,FR-2 表达在肝细胞上。叶酸对细胞的亲和性和密度具有一定调节作用,限制叶酸食用量,FR-1 对叶酸亲和性降低,但其在肿瘤细胞中密度增加,而在肾细胞中减少,FR-2 则影响不大[Gates et al: Clin Cancer Res 1996;2:1135]。

随着多数肿瘤细胞表面 FR 表达数目或活性显著高于正常细胞的事实逐渐被揭示[Campbell et al: Cancer Res 1991;51:5329. Coney et al: Cancer Res 1991;51:6125. Weitman et al: Cancer Res 1992;52:3396]。以叶酸介导靶向肿瘤细胞的研究得到了迅速发展。

叶酸作为 FR 配体与放射性核素直接或间接连接而成的复合物,在肿瘤影像诊断方面的动物实验结果表明,肿瘤部位靶向效果显著 [Low et al: WO 96/36367 Nov.21,1996; USA 5688488 Nov.18,1997]。

叶酸间接与脂质体表面结合生成的叶酸-PEG-脂质体细胞培养结果表明,其靶向肿瘤细胞效果明显好于 PEG-脂质体或普通脂质体 [Lee et al: J Biol Chem 1994;269(5):3198. Wang et al: Proc Natl Acad Sci USA 1995;92:3318. Lee et al: Biochim Biophys Acta 1995;1233:134. Vogel et al: J Am Chem Soc 1996;118(7):1581. Thompson et al: WO 97/31624 Sep.4,1997. 陆伟跃等:上海医科大学学报 2000;27(1):4]。

叶酸与高分子复合物也可通过 FR 将高分子完整地传释至细胞内的非溶酶体浆质中。与叶酸复合的牛血清白蛋白、牛免疫球蛋白、辣根过氧化酶、核糖核酸酶、豆丝氨酸酶抑制剂和抗 DNA 寡核苷酸均能明显导入 KB 细胞(人鼻咽癌细胞)、HeLa 细胞(人宫颈癌细胞)和 XC 细胞(Rous 肉瘤病毒转染的成纤维细胞)发挥其相应效果 [Leamon et al: Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:5572. Low et al: WO 90/12096 Oct.18,1990]。结合叶酸的抗 T 细胞受体单克隆抗体或抗 Fc 受体单克隆抗体能将肿瘤细胞与 T 细胞或天然杀伤细胞、单核细胞、巨噬细胞紧密地撮合在一起,达到有效溶解肿瘤细胞目的 [David et al: WO 96/34630 Nov.7,1996]。而具有抑制蛋白合成功能的毒素[木鳖子皂甙(Momordin)—一种只有透过核糖体到达细胞浆才表现出细胞毒性的蛋白毒素;假单胞菌外毒素片段(LysPE38 和 CysPE35)]与叶酸复合后,其抑制肿瘤细胞生长能力极大增强 [Leamon et al: J Biol Chem 1992; 267(35):249666. 1993;268(33):24847]。

右旋糖酐(又名葡聚糖)是一种由蔗糖通过肠膜状明串珠菌发酵而制成的 D-葡萄糖聚合物 [Gronwall et al: Acta Physiol Scand 1944;7:97. 1945;9:1. USA 2437518. USA 2644815]。所用菌种不同,产生的右旋糖酐中葡萄糖基连接方式有所差异,但主要以 α -1,6 键连接为主,其余为 α -1,4 或 α -1,3 键 [Van Cleve et al: J Am Chem Soc 1956;78:4435. 许丹枫等:药学学报 1986;21(3),204]。动物实验和临床试验追踪结果均表明,输注右旋糖酐后,动物实质性器官未见异常和组织损伤 [Boyd et al: Lancet 1953;1:59. Gronwall et al: Acta Physiol Scand 1945;9:1], 人体肝、脾、肾、肺等器官未见右旋糖酐蓄积 [Wilkinson et al: J Internat chir 1951;11:186]。临床上,右旋糖酐主要作为血容量扩张剂 [Gelin et al: Acta Chir Scand 1961;122:309]和血液流动性改善剂 [Gelin: Sock Pathogenesis and Therapy 1962;P332], 用于:失血性休克、烧伤和肝肾综合征,急性血栓、血栓性闭塞脉管炎,心肌梗塞,全身性硬化症等。

鉴于右旋糖酐生物特性及其分子结构的多羟基特点,其曾被作为各种药物的载体,以达到增强药物的化学稳定性,或提高药物生物有效性,或用于淋巴系统疾患诊断的目的。这些右旋糖酐-药物复合物包括:右旋糖酐锑 [Mikhail et al: Exptl Parasitol 1975;37:348], 右

旋糖酐铁[Beresford et al: Brit J Pharmacol 1957;12:107], 右旋糖酐-胰岛素[Armstrong et al: Biochim Biophys Res Comm 1972;47:354], 右旋糖酐-柔毛霉素[Bernsten et al: J Nalt Cancer Inst 1978;60(2):379], 右旋糖酐-丝裂霉素 C[Kojima et al: J Pharmacol 1980;32:30], 右旋糖酐-维生素 B₁₂[Scrollini et al: Eur J Med Chem 1974;9:621], 右旋糖酐-甲氨喋呤[Hubert et al: EP 0383170A2], 右旋糖酐- α (或 β)-淀粉糖化酶(或胰蛋白酶)[Marshall et al: Arch Biochem Biophys 1975;167:777], 右旋糖酐硫酸酯[Kozo Yamada et al: Jap Circul J 1961; 25:570,575,579], 放射性锝(^{99m}Tc)-右旋糖酐[Henze et al: J Nucl Med 1982;23:923. Ercan et al: Eur J Nucl Med 1985;11:80. 陆伟跃等:上海医科大学学报 1991;18(4):246. 刘永昌等:中华核医学杂志 1993;13(3):143]。其中发明人研制开发的主要用于淋巴系统疾患定位和肿瘤淋巴转移辅助诊断的 ^{99m}Tc-右旋糖酐 105 注射液及其注射用亚锡右旋糖酐 105 已正式生产和临床使用。

综上所述, 肿瘤细胞膜表面 FR 是一条可通过叶酸将包括放射性核素、脂质体和高分子等药物导入肿瘤细胞内的有效途径; 右旋糖酐的研究历史悠久, 主要用作血容量扩张剂和作为抗肿瘤药物、放射性核素等药物的载体研究, 未见其本身具有抗肿瘤作用。迄今为止, 叶酸与多聚糖的复合物, 尤其是与右旋糖酐的复合物及其作为抗肿瘤药物研究尚未见任何文献或专利报道。

本发明目的是提供一类叶酸-多聚糖复合物, 其可循细胞膜上叶酸受体途径入胞, 杀死体内肿瘤细胞、抑制肿瘤组织生长, 同时又不损伤正常组织; 本发明也提供叶酸-多聚糖复合物的制备方法; 本发明还提供一种以该复合物为活性成分的药物组合物; 本发明进一步提供该复合物在制备抗肿瘤药物中的用途。

为实现本发明和达到上述发明目的, 采用了如下技术方案。

1. 叶酸-多聚糖合成: 将叶酸或叶酸衍生物或其它可循细胞膜上叶酸受体途径进入细胞的物质与不同种类、分子量从 4,000 到 2000,000 的多聚糖在吡啶类催化剂和碳化二亚胺类脱水剂作用下, 缩合成叶酸-多聚糖复合物。本发明用下述通式表示:



其中: X 代表叶酸及其衍生物或其它可循细胞膜上叶酸受体途径进入细胞的物质; Y 代表不同种类多聚糖。

本发明所涉及的叶酸及其衍生物或其它可循细胞膜上叶酸受体途径进入细胞的物质, 其对动物或人体细胞无明显毒副作用, 它们

包括：叶酸、亚叶酸、二氢叶酸、四氢叶酸、四氢蝶呤、蝶酰多谷氨酸、2-去氨基-羟基叶酸、1-去氮叶酸、3-去氮叶酸、8-去氮叶酸等。其中，某位“去氮”是指叶酸中该位氮原子被碳原子取代的意思。

本发明所涉及的不同种类多聚糖，其对动物或人体肿瘤细胞或肿瘤组织生长无明显直接抑制活性，本身也不具备受体的配体性质，这些多聚糖包括：**①**葡聚糖类，如：右旋糖酐，黑曲霉多糖，茁霉多糖，小核菌葡聚糖，香菇多糖，云芝多糖，茯苓多糖，茯苓异多糖，痂囊腔多糖，虫草多糖，猪苓多糖，蘑菇多糖，裂褶多糖，亮菌多糖，猴头菇多糖，银耳多糖，粗糙脉孢多糖，鬼伞多糖，地衣多糖，异地衣多糖，昆布多糖，许长卿多糖，当归多糖，汉防己多糖，黄芪多糖，海带胶多糖，直链淀粉，糊精等；**②**聚蔗糖类，如：聚蔗糖；**③**果聚糖类，如：黄精多糖、石蒜多糖、大麦多糖和海滨海葱多糖等的菊糖，梯牧草多糖和匍匐冰草多糖等的左旋糖酐；**④**杂聚多糖类，如：枝孢多糖，变异青霉多糖，犁头霉多糖，粗糙脉孢外多糖，灵芝多糖，紫菜多糖，刺五加多糖，魔芋多糖，人参多糖，箬竹多糖，蔗渣多糖，枸杞多糖，女贞子多糖，竹黄多糖，茶叶多糖等；**⑤**单或杂聚多糖硫酸酯类，如：琼脂多糖，角叉多糖，银杏藻多糖，绿藻多糖，岩藻多糖，肝素，硫酸软骨素等；**⑥**单或杂聚糖醛酸多糖类，如：人参果胶多糖及其它果胶多糖，阿拉伯胶，西黄蓍胶，印度胶，黄芪胶，海藻酸盐等；**⑦**其它亲水性醇类高聚物，如：聚乙二醇，甲氧基聚乙二醇等。

2. 叶酸-多聚糖循叶酸受体途径导入肿瘤细胞的论证：叶酸-右旋糖酐标记上荧光素作为模型药物，进行体外肿瘤细胞培养。通过测定肿瘤细胞对不同培养浓度下的叶酸-右旋糖酐摄取量变化及其与单纯右旋糖酐摄取量的区别、相同培养浓度和不同培养时间下的叶酸-右旋糖酐摄取量变化，了解肿瘤细胞对叶酸-右旋糖酐的摄取是否有明显的饱和趋势及其摄取量明显高于右旋糖酐程度；通过测定肿瘤细胞对相同培养浓度和相同培养时间下的培养液中含不同游离叶酸的叶酸-右旋糖酐摄取量变化，了解游离叶酸是否能明显竞争性抑制叶酸-右旋糖酐的摄取；通过用不同浓度磷脂酶 D 对肿瘤细胞预处理后，测定肿瘤细胞对叶酸-右旋糖酐摄取量变化，了解细胞膜上叶酸受体数量减少会否影响肿瘤细胞对叶酸-右旋糖酐的摄取。最后，综合评估叶酸-多聚糖是否能够通过细胞膜上叶酸受体途径导入肿瘤细胞。

3. 体内肿瘤细胞对叶酸-多聚糖选择性摄取的观察：通过在荷瘤裸小鼠瘤旁注射标记上荧光素的叶酸-右旋糖酐或右旋糖酐后 24 小时处死，观察瘤组织中肿瘤细胞内荧光强度和分布范围，了解叶酸-

多聚糖被在体肿瘤细胞选择性摄取的优劣。

4. 叶酸-多聚糖在体内的抑瘤效果：荷瘤裸小鼠设定空白对照组、右旋糖酐组和叶酸-右旋糖酐组后，分别在瘤旁不注射、注射叶酸-右旋糖酐或右旋糖酐。观察小剂量和大剂量给药后的在体瘤体大小变化、结束后的瘤体重量、瘤组织内的形态和结构变化及其肿瘤细胞内 DNA 倍体改变程度，了解叶酸-聚多糖对荷瘤裸小鼠的抑瘤效果强弱。

5. 叶酸-多聚糖的安全性评价：肿瘤化疗药物最大的缺点就是毒副作用大，叶酸-聚多糖是否同样存在这样的问题，为此需要进行叶酸-聚多糖急性毒性试验加以论证。通过小鼠静脉注射最大浓度叶酸-右旋糖酐溶液后，观察小鼠活动程度、体重变化、死亡情况和处死后的主要脏器损伤情况，初步了解叶酸-多聚糖作为抗肿瘤药物的安全程度。

在上述叶酸-多聚糖的实验基础上，本发明可采用药剂学上允许的赋形剂、粘合性、助悬剂、崩解剂、稀释剂、润滑剂、肠溶包衣材料、生物粘附材料、非水溶性骨架材料等辅料与叶酸-多聚糖配伍，制备成相应药物组合物制剂。本发明药物组合物的各种剂型可以按照药学领域的常规生产方法制备，或用特定的生产方法制备。

· 本发明采用前述葡聚糖类、聚蔗糖类、单或杂聚多糖硫酸酯类、单或杂聚糖醛酸多糖类等的分子量为 4,000~2000,000 的多聚糖与叶酸共价复合成叶酸-多聚糖复合物。选择分子量为 105,000 右旋糖酐的叶酸-右旋糖酐复合物作为模型药物进行如下系统研究。

1. 体外肿瘤细胞培养 叶酸-右旋糖酐的体外 HeLa229 细胞培养结果表明：①叶酸-右旋糖酐摄取量随培养浓度增大而增加，但递增幅度逐渐减缓(见图 1)，叶酸-右旋糖酐浓度为 4.5mg/ml 时的摄取量为右旋糖酐的 2.7 倍；②叶酸-右旋糖酐摄取量随培养时间延长而增加，但递增幅度也逐渐减缓(见图 2)；③叶酸-右旋糖酐摄取量随培养液中叶酸浓度增大而显著降低(见图 3)；④叶酸-右旋糖酐摄取量随 HeLa229 细胞预先所用磷脂酶 D 处理的浓度升高而明显降低(见图 4)。由此可见，叶酸-右旋糖酐可循细胞膜上叶酸受体途径导入 HeLa229 细胞内，且导入量显著高于右旋糖酐。

2. 荷瘤裸小鼠体内肿瘤细胞靶向和抑瘤试验 叶酸-右旋糖酐在接种 HeLa229 细胞的荷瘤裸小鼠瘤旁向瘤内肿瘤细胞靶向试验结果表明，叶酸-右旋糖酐扩散至瘤组织后导入肿瘤细胞内的量显著高于右旋糖酐(见图 5)，对体内肿瘤细胞靶向明显。叶酸-右旋糖酐对接种 HeLa229 细胞的荷瘤裸小鼠抑瘤试验结果表明：①小剂量时，显著减缓肿瘤生长；大剂量时，显著抑制肿瘤生长(见图 6)；②给药 33

天后处死，与空白对照组和右旋糖酐组比较，叶酸-右旋糖酐组的肿瘤体积明显小(见图7和8)，抑瘤率可达75%左右；③与空白对照组和右旋糖酐组比较，叶酸-右旋糖酐对瘤组织具有十分明显的破坏作用(见图9a、9b和9c)；④叶酸-右旋糖酐对瘤组织中肿瘤细胞内的DNA指数(即肿瘤细胞内DNA质量与正常细胞内DNA质量的比值，用DI表示)具有明显的降低作用，其中空白对照组DI值为3.5，右旋糖酐组DI值为3.1，叶酸-右旋糖酐组DI值为2.3。

3. 急性毒性试验 叶酸-右旋糖酐在小鼠体内急性毒性试验结果表明，雌雄小鼠静脉各注射1.5g/kg叶酸-右旋糖酐(因溶解度较低，只能配制该最大浓度进行最大耐受剂量试验)后，观察7天，小鼠活动正常、体重增加、无一死亡，且主要脏器未见明显异常。

上述实验结果证实，本发明具有如下优点：①右旋糖酐本身不具备抗肿瘤效果；②叶酸-右旋糖酐可循叶酸受体途径导入细胞，具有显著抑制肿瘤组织生长作用，而本身毒副作用小、安全程度高；③叶酸-右旋糖酐抗肿瘤作用与传统化疗药物不同，故本发明为肿瘤的药物治疗提供一种新的方略。

组合物制剂包括：肿瘤内、肿瘤旁或静脉注射用的叶酸-多聚糖冻干品，含碳酸氢钠或氢氧化铝和三硅酸镁的口服用叶酸-多聚糖干糖浆，口服用叶酸-多聚糖肠溶胶囊。也可制备成口服用叶酸-多聚糖肠溶片、动脉栓塞用叶酸-多聚糖微球、口服用结肠释药的叶酸-多聚糖小丸、以及鼻腔、子宫腔和其它腔器喷射给药用的或腹腔注射用的叶酸-多聚糖生物粘附微球等。

附图说明

图1显示：HeLa229细胞对不同培养浓度的F-Dx105和Dx105(37℃培养4h)摄取。

图2显示：HeLa229细胞对不同培养时间的F-Dx105(37℃，培养浓度4.5mg/ml)摄取。

图3显示：HeLa229细胞对培养液中不同F浓度时的F-Dx105(37℃培养4h，培养浓度4.5mg/ml)摄取。

图4显示：HeLa229细胞经不同浓度磷脂酶D预处理后，对F-Dx105(37℃培养4h，培养浓度4.5mg/ml)摄取。

图5显示：接种HeLa229细胞的荷瘤裸小鼠瘤旁注射F-Dx105-FITC(左)或Dx105-FITC(右)24h后，肿瘤组织切片的荧光照片(圆形亮点为肿瘤细胞内荧光)。

图6显示：接种HeLa229细胞的荷瘤裸小鼠(每组6只)瘤旁分别注射F-Dx105和Dx105(第1~6天：56mg/kg，第19天：526mg/kg)后的肿瘤体积($V=\pi ab^2/6$)动态变化。

图 7 显示: 三组接种 HeLa229 细胞的荷瘤裸小鼠瘤旁给药 33 天后处死的在体瘤体大小比较(上图:空白组; 左下图:Dx105; 右下图:F-Dx105)。

图 8 显示: 三组接种 HeLa229 细胞的荷瘤裸小鼠瘤旁给药 33 天后处死的离体瘤体大小比较。

图 9a 显示: 接种 HeLa229 细胞的荷瘤裸小鼠空白对照组饲养 33 天后瘤体组织切片。

图 9b 显示: 接种 HeLa229 细胞的荷瘤裸小鼠 Dx105 组给药 33 天后瘤体组织切片。

图 9c 显示: 接种 HeLa229 细胞的荷瘤裸小鼠 F-Dx105 组给药 33 天后瘤体组织切片。

以下借助非限制性实施例进一步描述本发明。

实施例 1 叶酸-多聚糖(F-PS)制备

1. F-PS 制备

①叶酸-右旋糖酐(F-Dx)

* Dx 分子量影响

• 0.74g 二甲氨基吡啶溶于 12ml 甲酰胺/N,N-二甲基甲酰胺/二氯甲烷(10:9:1)混合溶剂, 加入 0.25g F 和 1.16g 二环己基碳化二亚胺, 然后加入溶于上述混合溶剂的 Dx (分子量 10,000)溶液(0.1g/ml)6ml, 25°C 避光反应 20h, 反应终止后抽滤, 滤液注入丙酮中, 产生淡黄色沉淀, 抽滤收集沉淀物, 真空干燥, 得 F-Dx 粗品。用 Sephadex G-15 柱纯化, 重蒸水洗脱, 收集第一色谱段洗脱液, 冷冻干燥, 得 F-Dx 纯品。

- Dx (分子量 70,000)与 F 如上反应和处理。
- Dx (分子量 105,000)与 F 如上反应和处理。
- Dx (分子量 500,000)与 F 如上反应和处理。
- Dx (分子量 2000,000)与 F 如上反应和处理。

* F 与 Dx 质量比影响

- Dx (分子量 105,000)与 F 反应质量比为 2.4:1(g/g)。如上反应和处理。
- Dx (分子量 105,000)与 F 反应质量比为 1.71:1(g/g)。如上反应和处理。
- Dx (分子量 105,000)与 F 反应质量比为 1.33:1(g/g)。如上反应和处理。
- Dx (分子量 105,000)与 F 反应质量比为 1.20:1(g/g)。如上反应和处理。

②叶酸-聚蔗糖(F-Ficoll)

以 0.6g Ficoll (分子量 400,000)替代 0.6g Dx (分子量 10,000), Ficoll 与 F 的反应质量比为 2.4:1(g/g), 进行与 F-Dx 制备完全相同的反应和处理。

③叶酸-糊精(F-Dextrin)

0.74g 二甲氨基吡啶溶于 8ml 二甲基亚砷, 加入 0.25g F 和 1.16g 二环己基碳化二亚胺, 然后加入溶于二甲基亚砷的 Dextrin (分子量 4,500)溶液(0.15g/ml)4ml, 后续制备及纯化方法与 F-Dx 制备及纯化方法相同。

④叶酸-肝素(F-Heparin)

0.37g 二甲氨基吡啶、0.125g F 和 0.58g 二环己基碳化二亚胺, 混合溶解于 6ml 甲酰胺/N,N-二甲基甲酰胺/二氯甲烷(10:9:1)混合溶剂中, 然后加入溶于上述混合溶剂的肝素钠(分子量 2,000-6,000)溶液(0.03g/ml)10ml, 后续反应与 F-Dx 制备相同, 纯化方法除用洗脱液为 5mM 碳酸氢钠与 0.1M 氯化钠混合液外, 其余均相同。

⑤叶酸-阿拉伯胶(F-Acacia)

以 0.6g Acacia (分子量 240,000-580,000)替代 0.6g Dx (分子量 10,000), Acacia 与 F 的反应质量比为 2.4:1(g/g), 除滤液注入乙醇中沉淀外, 进行与 F-Dx 制备的反应和纯化方法相同。

⑥二氢叶酸-右旋糖酐(F₂-Dx)

0.74g 二甲氨基吡啶溶于 12ml 甲酰胺/N,N-二甲基甲酰胺/二氯甲烷(10:9:1)混合溶剂, 加入 0.25g F₂和 1.16g 二环己基碳化二亚胺, 然后加入溶于上述混合溶剂的 Dx (分子量 105,000)溶液(0.1g/ml)6ml, 后续反应和纯化方法与 F-Dx 制备相同。

⑦四氢叶酸-右旋糖酐(F₄-Dx)

0.74g 二甲氨基吡啶溶于 12ml 甲酰胺/N,N-二甲基甲酰胺/二氯甲烷(10:9:1)混合溶剂, 加入 0.25g F₄和 1.16g 二环己基碳化二亚胺, 然后加入溶于上述混合溶剂的 Dx (分子量 105,000)溶液(0.1g/ml)6ml, 后续反应和纯化方法与 F-Dx 制备相同。

2. F-PS 检测

用高效硅胶板作载体, 氯仿:甲醇:乙酸(5/3/2)为展开系统, 上行展开后晾干, 碘蒸气显色, 未见样品中游离 F 点存在。分别将 F-PS 和 F 的 0.4%氢氧化钠溶液样品在同上波长范围内扫描, F-PS 样品在 258、285 和 365nm 处均与 F 有完全相同的特征吸收峰, 且 A₂₅₈/A₃₆₅ 比值均在 2.9~3.1 之间。以 F 为标准品, 在 365nm 处测得 F-PS 样品中 F 结合率, 结果如下:

不同分子量 Dx 的 F 结合率[Dx/F 投料比:2.4/1(W/W)]

Dx 分子量	10,000 (Dx10)	70,000 (Dx70)	105,000 (Dx105)	500,000(Dx500)	2000,000(Dx2000)
F 结合率(W/W)	8.51%	6.38%	8.98%	8.54%	8.41%
分子比(F/Dx)	2 : 1	11 : 1	23 : 1	105 : 1	416 : 1

Dx/F 投料比对 F 结合率影响(Dx105)

Dx/F(W/W)	2.4:1	1.71:1	1.33:1	1.20:1
F 结合率(W/W)	10±1%	16±1%	23±1%	25±1%
分子比(F/Dx)	26 : 1	45 : 1	71 : 1	80 : 1

Ficoll-400 (分子量 400,000) / F 投料比 2.4:1(W/W):
F 结合率为 12.04% (F / Ficoll 分子比 109 : 1)

Dextrin-4.5 (分子量 4,500) / F 投料比 2.4:1(W/W):
F 结合率为 18.38% (F / Dextrin 分子比 1.87 : 1)

Heparin(分子量 2,000-6,000) / F 投料比 2.4:1(W/W):
F 结合率为 7.86% (F / Heparin 分子比 0.39-1.16 : 1)

Acacia(分子量 240,000-580,000) / F 投料比 2.4:1(W/W):
F 结合率为 4.53% (F / Acacia 分子比 25-62 : 1)

实施例 2 叶酸-右旋糖酐-异硫氰荧光素(F-Dx105-FITC)制备

1. 右旋糖酐-异硫氰荧光素(F-Dx105-FITC)制备

① 乙酰丙酮铁(FAA)制备: 1.84g 乙酸钠和 2g 三氯化铁溶于 6ml 蒸馏水, 加入 12ml 乙酰丙酮后, 抽滤, 真空干燥, 得 FAA 粗品。将该粗品溶于蒸馏水, 乙醚萃取三次, 合并后减压蒸去乙醚, 用 60% 甲醇溶液重结晶, 得棕红色 FAA 结晶。m.p.183~184℃。

② Dx105-FITC 制备: 0.2g Dx105、20mg FITC 和 20mg FAA 溶于 2ml 二甲亚砜, 95℃ 避光反应 2h, 抽滤, 80~90℃ 真空干燥 2h, 得 Dx105-FITC 粗品。用 Sephadex G-15 柱层析纯化, 冻干, 得 Dx105-FITC 纯品。

③ Dx105-FITC 检测: 用高效硅胶板作载体, 氯仿: 甲醇: 氨水(6/3.5/0.5) 为展开系统, 上行展开后晾干, 在 254nm 波长灯光下观察, 未见样品中游离 FITC 点存在。分别将 Dx105-FITC 和 FITC 的 0.4% 氢氧化钠溶液样品在 230~550nm 波长范围内扫描, Dx105-FITC 样品与 FITC 在 492nm 处均有完全相同的特征吸收峰。以 FITC 为标准品, 在 492nm 处测得 Dx105-FITC 样品中 FITC 结合率为 3.6‰(w/w)。

2. 叶酸-右旋糖酐-异硫氰荧光素(F-Dx105-FITC)制备

① F-Dx-FITC 制备: Dx105-FITC 与 F 投料质量比为 2.4:1, 制备方法与实例 1 中 F-Dx 制备方法相同。粗品用 Sephadex G-15 柱层析纯化, 冻干, 得 F-Dx105-FITC 纯品。

② F-Dx105-FITC 检测: F-Dx105-FITC 中游离 F 的定性检测和结

合F的定量测定方法与实例1中F-PS检测方法相同。F-Dx105-FITC样品中F结合率为7.43%(w/w)。

实施例3 体外 HeLa229 细胞通过 F 受体对 F-Dx105 选择性摄取

用10%小牛血清(NCS)/RPMI-1640培养液对HeLa229细胞(一种人子宫颈癌细胞,中国科学院上海细胞研究所提供)在六孔培养板上贴壁预先培养(37℃的CO₂培养箱)24h。每孔(φ33mm)含2×10⁵HeLa细胞。临用前弃去原培养液。

1. 样品浓度对摄取影响

分别加1ml RPMI-1640培养液配制的各浓度F-Dx105-FITC溶液(0.612、1.125、2.25、4.50mg/ml)和Dx105-FITC溶液(0.585、1.17、2.34、4.68mg/ml)于含预先培养HeLa229细胞的孔内,37℃的CO₂培养箱各培养4h。每孔用2ml磷酸盐缓冲液洗涤4次,1.5ml 1%Triton X-100磷酸缓冲液(pH 7.4)破细胞。用荧光分光光度计在492nm/512nm处测定细胞溶解液荧光值(OD)。结果表明,随着F-Dx105-FITC浓度增大,HeLa229细胞摄取量明显增加,而递增幅度逐渐减缓,但均显著高于Dx105-FITC(见图1)。

2. 培养时间对摄取影响

加1ml RPMI-1640培养液配制的4.50mg/ml F-Dx105-FITC溶液于预先培养HeLa229细胞的孔内,37℃的CO₂培养箱分别培养0.5、1、2和4h。同上处理后测定荧光值(OD)。结果表明,随着培养时间延长,HeLa229细胞摄取F-Dx105-FITC量明显增加,但递增幅度逐渐减缓(见图2)。

3. 游离叶酸对摄取影响

分别加1ml RPMI-1640培养液配制的内含游离F 2.3×10⁻⁶、3.3×10⁻⁵、1.2×10⁻⁵、1.0×10⁻⁴、1.0×10⁻³、1.0×10⁻² mol/l的4.50mg/ml F-Dx105-FITC溶液于预先培养HeLa229细胞的孔内,37℃的CO₂培养箱分别培养4h。同上处理后测定荧光值(OD)。结果表明,随着培养液中F加入量增加,HeLa229细胞摄取F-Dx105-FITC量显著降低(见图3)。

4. 酶处理对摄取影响

分别先用内含磷脂酶D(PLD,卷心菜内提得)0、0.075、0.15、0.30和0.60mg/ml的RPMI-1640培养液处理15min,弃去后用1ml RPMI-1640培养液洗涤二次。分别加1ml RPMI-1640培养液配制的4.50mg/ml F-Dx105-FITC溶液于处理后的HeLa229细胞的孔内,37℃的CO₂培养箱分别培养4h。同上处理后测定荧光值(OD)。结果表明,随着处理液中PLD浓度提高,HeLa229细胞摄取F-Dx105-FITC量显著降低(见图4)。

实施例4 体内 HeLa229 细胞对 F-Dx105 选择性摄取

1. HeLa229 荷瘤裸小鼠模型建立

BALB/C 裸小鼠(18±1g; 雌性; 上海市肿瘤研究所提供)右前肢近腋下皮下接种 0.1ml(1×10^7)HeLa 细胞(中国科学院上海细胞研究所提供)后,饲养于 SPF 屏障系统内,使 HeLa 细胞在体内连续传代生成较大瘤块后处死,在无菌条件下,取瘤块切成直径约 2mm 大小,用 20 号套管针移植于同规格裸小鼠的相同部位,饲养 10 天,待用。

2. 体内 HeLa229 细胞摄取 F-Dx105

HeLa229 荷瘤裸小鼠二组(每组 3 只),分别于瘤旁皮下注射 0.1ml F-Dx105-FITC(5.7mg)和 Dx105-FITC(5.7mg),饲养 24h 后处死,取瘤块,组织切片,在相同视野内用荧光和相差显微镜对比观察并与摄片记录。结果表明, F-Dx105-FITC 扩散至肿瘤组织后能明显进入 HeLa229 细胞内(见图 5)。

实施例5 F-Dx105 抑瘤作用

HeLa229 荷瘤裸小鼠三组(每组 6 只),其中二组分别于瘤旁皮下每天每只注射 0.1ml F-Dx105(1.12mg)和 Dx105(1.12mg),连续给药 6 天,第 20 天再分别每只一次性各补注射 0.3ml F-Dx105(10.52mg)和 Dx105 (10.52mg); 空白对照组不注射任何药液。三组动物均共饲养 33 天。

1. 瘤体动态变化

三组 HeLa229 荷瘤裸小鼠于给药后每隔一定天数测定瘤体大小,即用卡尺测量瘤体长径(a)和垂直于长径的最大横径(b),按 $V = \pi ab^2/6$ 经验公式计算瘤体大小。结果表明, F-Dx105 组瘤体生长速率明显慢于 Dx105 组和空白对照组; 补加高浓度药液后, F-Dx105 组瘤体生长显著受到抑制,且在饲养期内未见瘤体反跳(见图 6)。

2. 抑瘤率

三组 HeLa229 荷瘤裸小鼠于给药 33 天后处死(见图 7),取瘤体(见图 8)称重,按 $(1 - \text{实验组瘤重} / \text{空白对照组瘤重}) \times 100\%$ 式计算。结果表明, F-Dx105 抑瘤率可达 70%以上,而 Dx105 未表现出明显抑瘤率(见下表)。

组别	动物数(始/末)	瘤重(mg)	抑瘤率(%)
空白对照	6/6	393.6 ± 201.6	---
Dx105	6/6	416.1 ± 286.7	-1.03
F-Dx105	6/6	98.4 ± 38.3	74.36

3. 瘤组织形态观察

三组瘤体组织固定后分别取材,常规切片和染色后封固在载玻

片上,用相差显微镜观察并摄片记录(见图 9a、9b 和 9c)。结果表明,与空白对照组相比, F-Dx105 组的瘤组织中肿瘤细胞大量死亡或崩解,并出现许多空心囊泡,而 Dx105 组的瘤组织仅见部分纤维化和少量肿瘤细胞死亡。

4. 瘤组织中癌细胞 DNA 指数测定

三组瘤体组织固定后分别取材,梯度酒精脱水、石蜡包埋、切成 5 μ m 厚白片置于载玻片上,用改良的 Feulgen-天兰 A 法染色后封固。用图象细胞光度计(Image Cytometer, CAS-200)测定每张组织切片中 50 个肿瘤细胞和淋巴细胞(作为正常对照细胞)DNA 含量,并按下式计算瘤组织中肿瘤细胞 DNA 指数(DI; DI 值越接近于 1,癌细胞恶性程度越低或疗效越好):

$$DI = \frac{\text{被测定癌细胞内 DNA 质量}}{\text{被测定正常细胞内 DNA 质量}}$$

结果表明, F-Dx105 组和 Dx105 组的 DI 值分别为为空白对照组 DI 值的 66%和 89%(见下表)。

组别	切片(份)	DNA 主峰质量(mg)	DI
空白对照	6	25.59 \pm 2.95	3.51 \pm 0.33
Dx105 对照	6	22.35 \pm 0.58	3.11 \pm 0.08
F-Dx105	6	16.74 \pm 0.83	2.33 \pm 0.12

实施例 6 F-Dx105 对小鼠毒性试验

昆明种小鼠(20~22g)20 只,按雌雄分组,每组 10 只。给药前禁食 3 小时,称重。小鼠尾静脉注射 F-Dx105(浓度 50mg/ml),给药剂量为 1500mg/kg,注射容量为 0.3ml/10g。给药后,每天观察小鼠外观、活动、行为和中毒鼠数,7 天后处死,检查主要脏器。结果表明,小鼠静脉注射 1500mg/kg 的 F-Dx105 后,未见小鼠异常反应,一周内活动正常,体重增加,无一小鼠死亡,主要脏器未见异常。

实施例 7 F-Dx105 组合物制剂

1. 冻干剂

在搅拌条件下,将 1.25g F-Dx105 溶解于注射用水中,稀释至 25ml,配制成浓度为 50mg/ml 溶液。每 10ml 管子瓶分装 2ml 溶液,在冷冻干燥机内干燥 48 小时,制成有良好形状的疏松絮状冻干品,加塞后压铝盖。

2. 干糖浆剂

① 33.0g 叶酸-右旋糖酐、7.4g 氢氧化铝、3.2g 三硅酸镁,充分混匀

后，灌装于10瓶各150ml容积的瓶内。临用时，每瓶加100ml温水，振摇至混悬。

② 33.0g 叶酸-右旋糖酐、5.0g 碳酸氢钠，充分混匀后，灌装于10瓶各150ml容积的瓶内。临用时，每瓶加100ml水，振摇至溶解。

3. 肠溶胶囊剂

10.0g 叶酸-右旋糖酐、0.2g 硬脂酸镁，充分混匀后，灌装于1号肠溶胶囊内。每粒含叶酸-右旋糖酐100mg。

图 1:

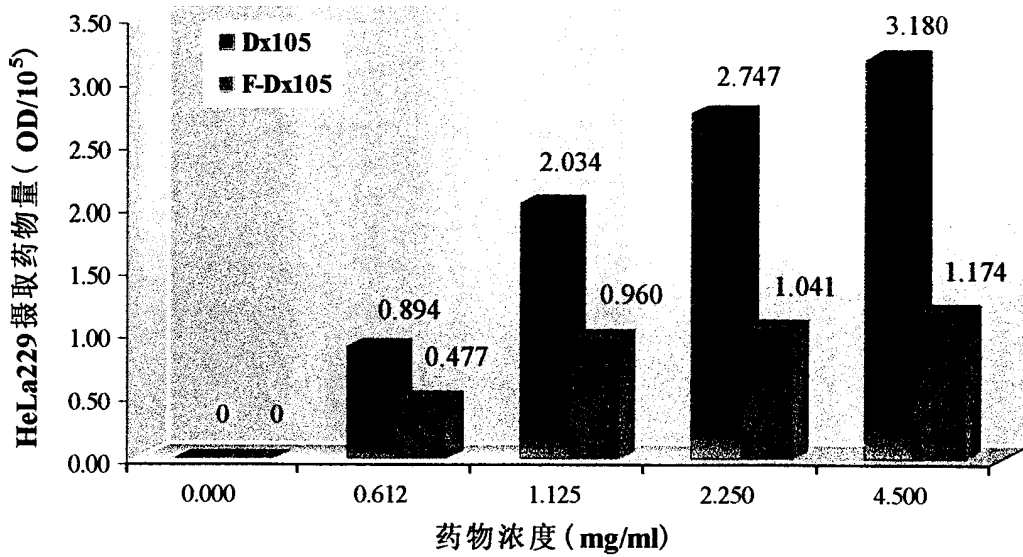


图 2:

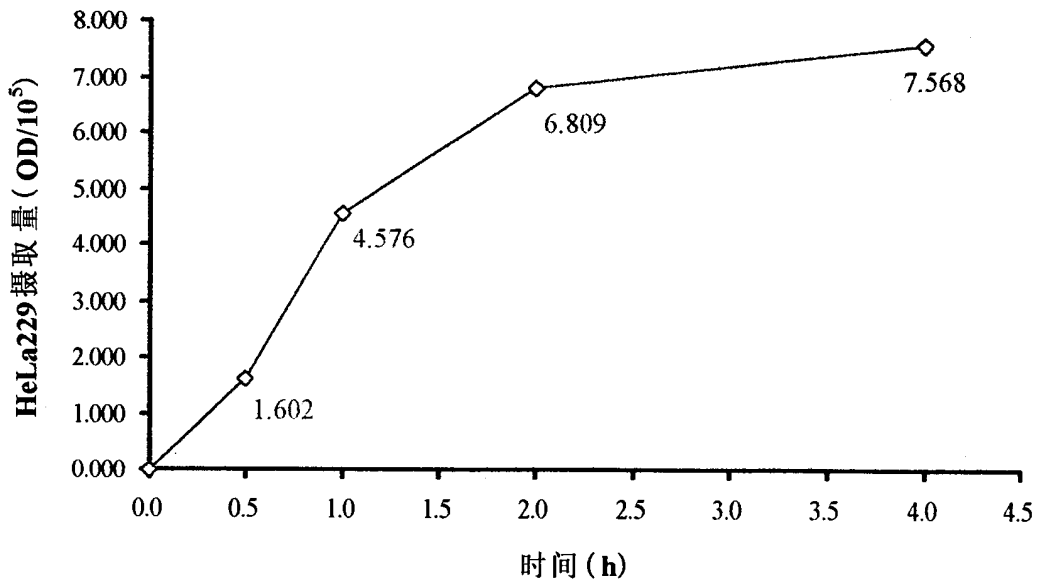


图 3:

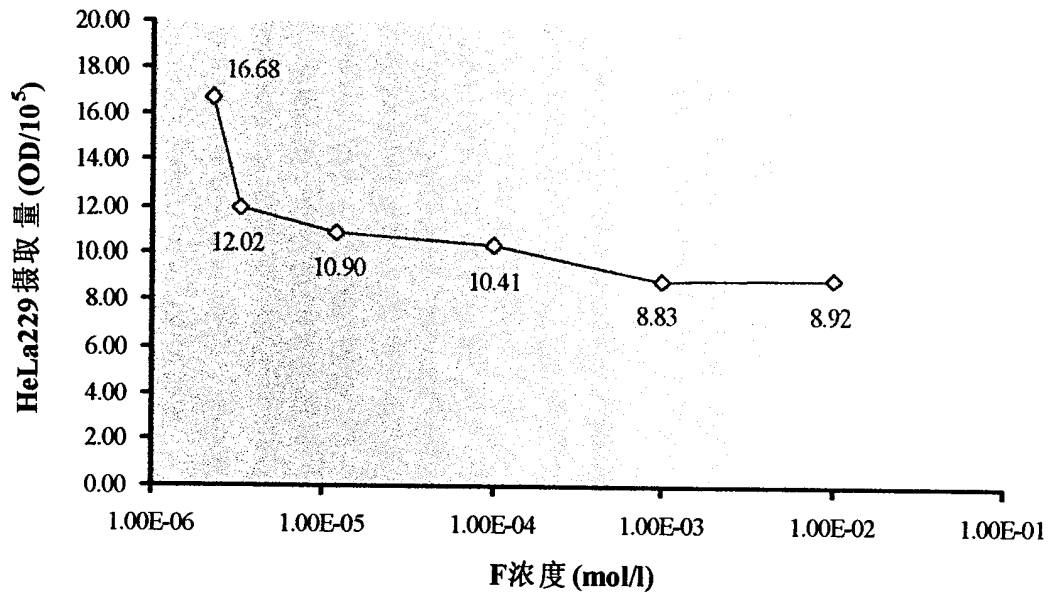


图 4:

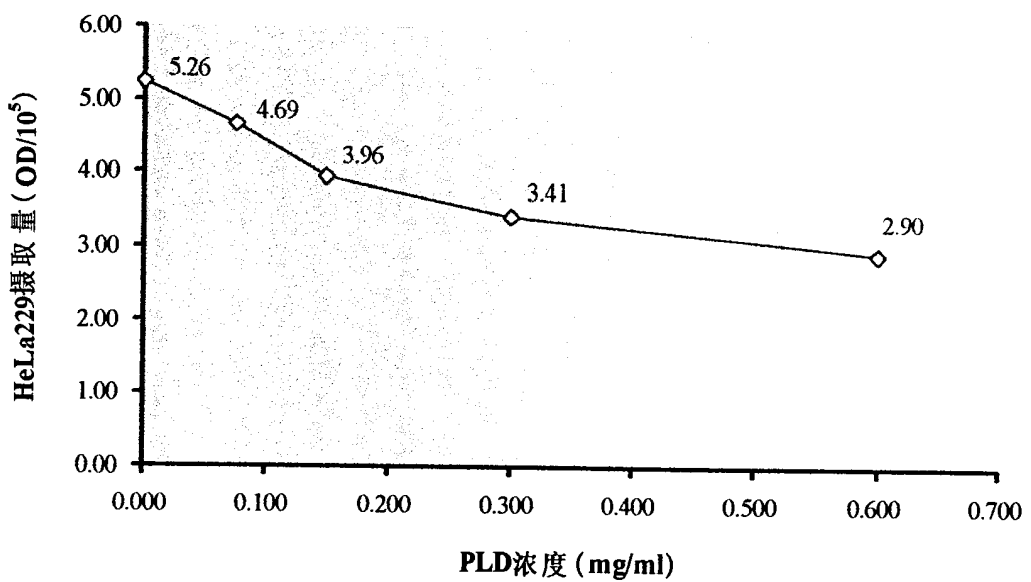


图 5:

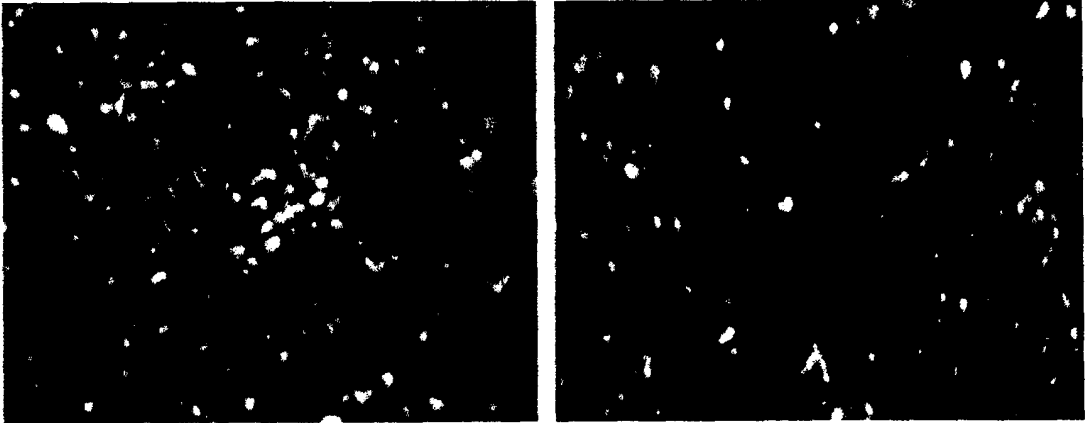


图 6:

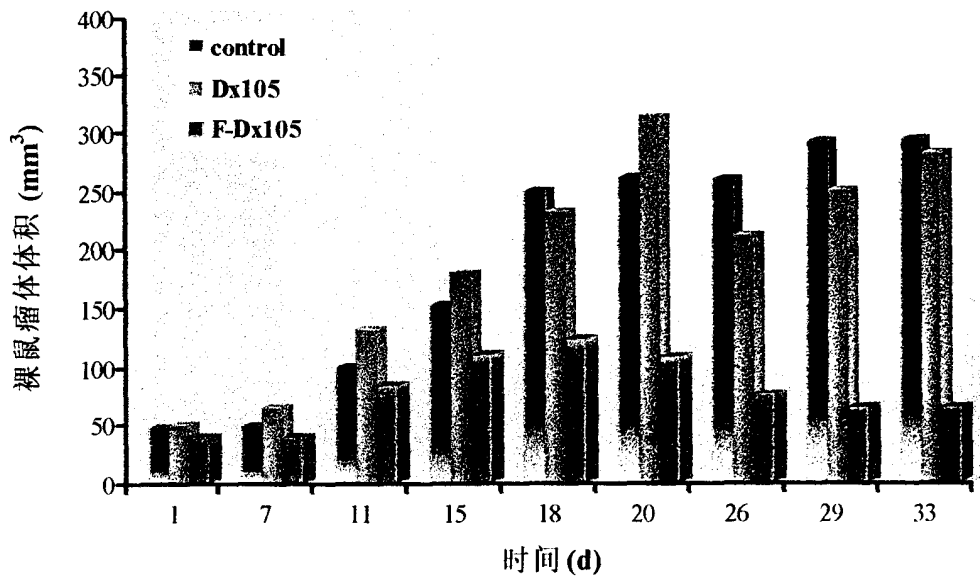


图 7:

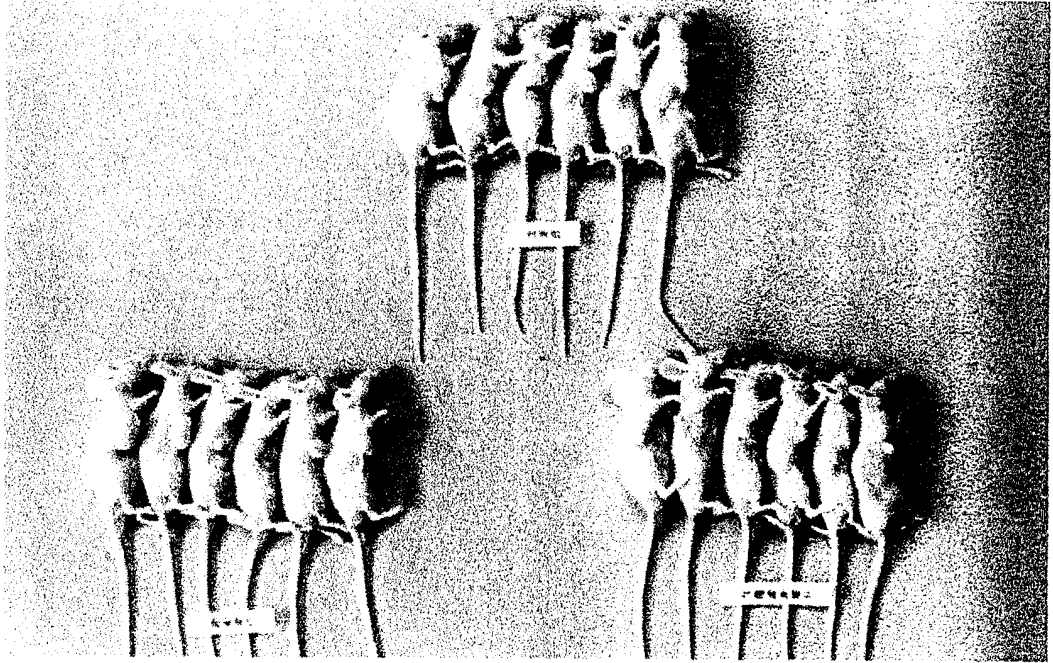


图 8:

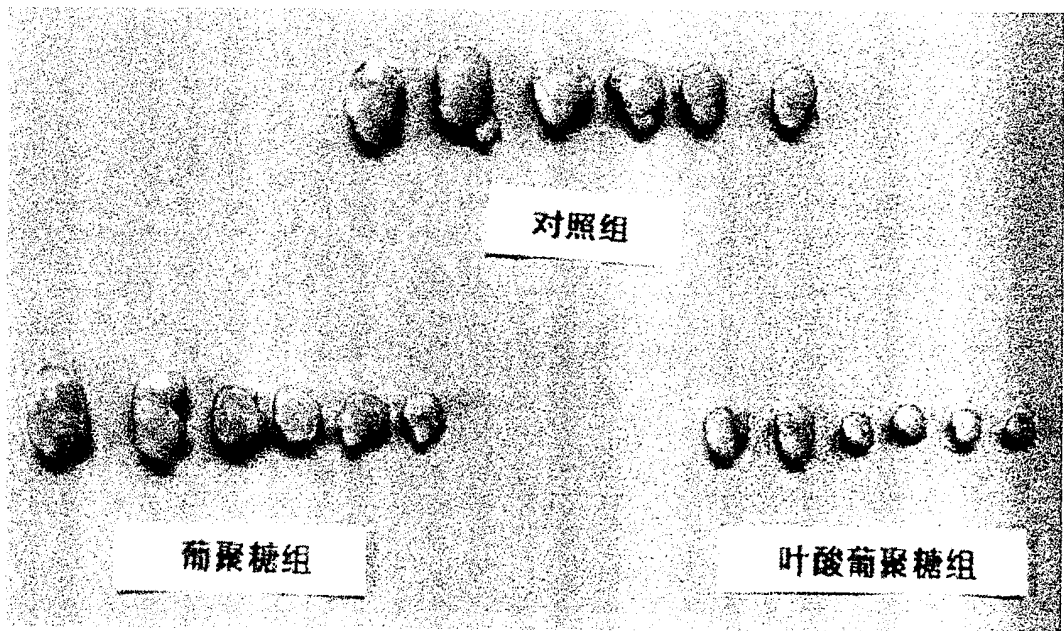


图 9a:

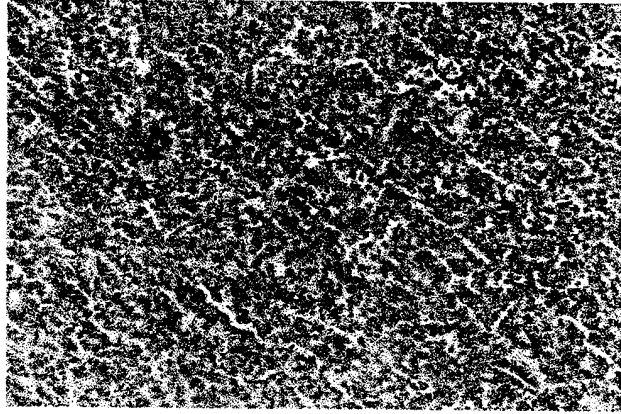


图 9b:

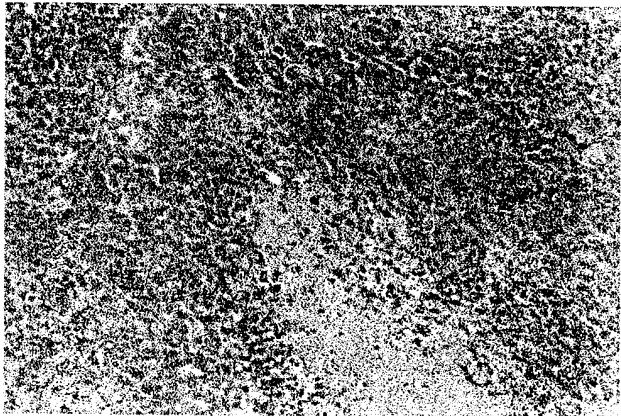


图 9c:

