

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

A61K 9/16

A61K 9/50

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99803728.1

[43]公开日 2002年5月8日

[11]公开号 CN 1348362A

[22]申请日 1999.1.6 [21]申请号 99803728.1

[86]国际申请 PCT/US99/00243 1999.1.6

[87]国际公布 WO99/34779 英 1999.7.15

[85]进入国家阶段日期 2000.9.6

[71]申请人 费克斯公司

地址 美国加利福尼亚州

[72]发明人 V·A·沃尔孔斯基

S·D·久克舍尔斯特诺夫

S·V·切尔尼亚科夫 L·M·阿伦

T·B·肯特

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

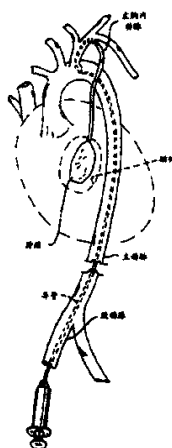
代理人 卢新华 周慧敏

权利要求书5页 说明书26页 附图页数5页

[54]发明名称 磁响应组合物

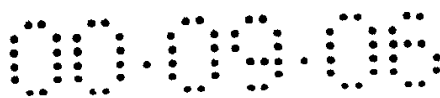
[57]摘要

本发明公开了磁控或定向的铁碳颗粒组合物,及其应用和制备方法。本发明组合物还可携带吸附在颗粒上面的生物活性物质。本发明组合物包含尺寸为 $0.1 - 0.5\mu\text{m}$ 、优选为 $0.5 - 5.0\mu\text{m}$ 的体积混合的颗粒,所述颗粒含有 $1.0 - 95.0\%$ (重量)的碳,优选含有约 $20\% - 约60\%$ (重量)的碳。所述颗粒可通过将铁和碳粉混合物机械碾磨来制得。还可将所得颗粒置于生物活性物质的溶液中,以将生物活性物质吸附到颗粒上。本发明组合物通常是以悬浮剂形式给药。



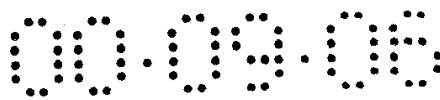
知识产权出版社出版

ISSN 1008-4274



权 利 要 求 书

1. 一种包含颗粒的磁响应组合物，其中所述颗粒包含碳和铁，其中碳基本上均匀地分布在颗粒的整个体积内，每一颗粒的横截面尺寸
5 低于约 5 μm ，并且碳选自 A 型碳、B 型碳、E 型碳、K 型碳、KB 型碳、及其化学改性型。
2. 权利要求 1 的组合物，其中所述颗粒的横截面尺寸为约 0.1 μm - 5.0 μm ，每一颗粒包含的铁:碳重量比为约 95:5 - 50:50，并且其上吸附有治疗量的阿霉素。
- 10 3. 权利要求 2 的组合物，其中铁:碳的重量比为约 80:20 - 60:40。
4. 权利要求 3 的组合物，其中阿霉素的平均含量高达颗粒重量的 20%。
5. 权利要求 1 的组合物，其中所述颗粒的横截面尺寸为约 0.1 μm - 5.0 μm ，每一颗粒包含的铁:碳重量比为约 95:5 - 50:50，并且其上吸
15 附有治疗量的喜树碱或其类似物。
6. 权利要求 5 的组合物，其中铁:碳的重量比为约 80:20 - 60:40。
7. 权利要求 6 的组合物，其中喜树碱的平均含量高达颗粒重量的 20%。
8. 权利要求 5 的组合物，其中所述喜树碱类似物是托泊替堪。
- 20 9. 权利要求 8 的组合物，其中铁:碳的重量比为约 80:20 - 60:40。
10. 权利要求 9 的组合物，其中托泊替堪的平均含量高达颗粒重量的 20%。
11. 权利要求 5 的组合物，其中所述喜树碱类似物是伊立替康。
12. 权利要求 11 的组合物，其中铁:碳的重量比为约 80:20 - 60:40。
- 25 13. 权利要求 12 的组合物，其中伊立替康的平均含量高达颗粒重量的 20%。
14. 权利要求 5 的组合物，其中所述喜树碱类似物是氨基喜树碱。
15. 权利要求 14 的组合物，其中铁:碳的重量比为约 80:20 - 60:40。
16. 权利要求 15 的组合物，其中氨基喜树碱的平均含量高达颗粒
30 重量的 20%。
17. 权利要求 1 的组合物，其中所述颗粒的横截面尺寸为约 0.1 μm - 5.0 μm ，每一颗粒包含的铁:碳重量比为约 95:5 - 50:50，并且其上吸



附有治疗量的紫杉醇或其类似物。

18. 权利要求 17 的组合物，其中所述紫杉醇类似物是 taxotere。

19. 权利要求 18 的组合物，其中铁:碳的重量比为约 80:20 - 60:40。

20. 权利要求 19 的组合物，其中 taxotere 的平均含量高达颗粒重量的 20%。

21. 权利要求 17 的组合物，其中所述紫杉醇类似物是紫杉醇 (paclitaxel)。

22. 权利要求 21 的组合物，其中铁:碳的重量比为约 80:20 - 60:40。

23. 权利要求 22 的组合物，其中紫杉醇 (paclitaxel) 的平均含量高达颗粒重量的 20%。

24. 权利要求 1 的组合物，其中所述颗粒的横截面尺寸为约 0.1 μm - 5.0 μm ，每一颗粒包含的铁:碳重量比为约 95:5 - 50:50，并且其上吸附有治疗量的维拉帕米或其类似物。

25. 权利要求 24 的组合物，其中铁:碳的重量比为约 80:20 - 60:40。

26. 权利要求 25 的组合物，其中维拉帕米的平均含量高达颗粒重量的 20%。

27. 权利要求 1 的组合物，其中所述颗粒的横截面尺寸为约 0.1 μm - 5.0 μm ，每一颗粒包含的铁:碳重量比为约 95:5 - 50:50，并且其上吸附有治疗量的叶酸拮抗剂。

28. 权利要求 27 的组合物，其中所述叶酸拮抗剂是甲氧蝶呤。

29. 权利要求 28 的组合物，其中铁:碳的重量比为约 80:20 - 60:40。

30. 权利要求 29 的组合物，其中甲氧蝶呤的平均含量高达颗粒重量的 20%。

31. 权利要求 27 的组合物，其中所述叶酸拮抗剂是氨基蝶呤。

32. 权利要求 31 的组合物，其中铁:碳的重量比为约 80:20 - 60:40。

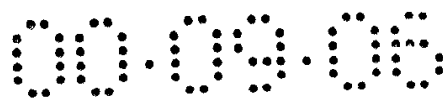
33. 权利要求 32 的组合物，其中氨基蝶呤的平均含量高达颗粒重量的 20%。

34. 权利要求 27 的组合物，其中所述叶酸拮抗剂是 pyritrexin。

35. 权利要求 34 的组合物，其中铁:碳的重量比为约 80:20 - 60:40。

36. 权利要求 35 的组合物，其中 pyritrexin 的平均含量高达颗粒重量的 20%。

37. 权利要求 27 的组合物，其中所述叶酸拮抗剂是 10-乙基-10-去



氮杂氨基蝶呤。

38. 权利要求 37 的组合物, 其中铁:碳的重量比为约 80:20 - 60:40。

39. 权利要求 38 的组合物, 其中 10-乙基-10-去氮杂氨基蝶呤的平均含量高达颗粒重量的 20%。

5 40. 权利要求 27 的组合物, 其中所述叶酸拮抗剂是曲美沙特。

41. 权利要求 40 的组合物, 其中铁:碳的重量比为约 80:20 - 60:40。

42. 权利要求 41 的组合物, 其中曲美沙特的平均含量高达颗粒重量的 20%。

10 43. 权利要求 27 的组合物, 其中所述叶酸拮抗剂是 5,10-去氮杂-10-炔丙基叶酸。

44. 权利要求 43 的组合物, 其中铁:碳的重量比为约 80:20 - 60:40。

45. 权利要求 44 的组合物, 其中 5,10-去氮杂-10-炔丙基叶酸的平均含量高达颗粒重量的 20%。

15 46. 权利要求 27 的组合物, 其中所述叶酸拮抗剂是 5,10-二去氮杂四氢叶酸盐。

47. 权利要求 46 的组合物, 其中铁:碳的重量比为约 80:20 - 60:40。

48. 权利要求 47 的组合物, 其中 5,10-二去氮杂四氢叶酸盐的平均含量高达颗粒重量的 20%。

20 49. 权利要求 1 的组合物, 其中所述颗粒的横截面尺寸为约 0.1 μm - 5.0 μm , 每一颗粒包含的铁:碳重量比为约 95:5 - 50:50, 并且其上吸附有治疗量的放射性同位素。

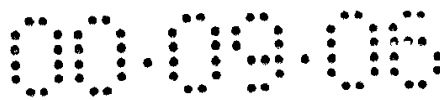
50. 权利要求 49 的组合物, 其中所述放射性同位素的量为约 10 pgm - 700 ng。

25 51. 权利要求 1 的组合物, 其中所述颗粒的横截面尺寸为约 0.1 μm - 5.0 μm , 每一颗粒包含的铁:碳重量比为约 95:5 - 50:50, 并且其上吸附有诊断量的放射性同位素。

52. 权利要求 51 的组合物, 其中所述放射性同位素的量为约 10 pgm - 700 ng。

30 53. 权利要求 1 的组合物, 其中所述颗粒的横截面尺寸为约 0.1 μm - 5.0 μm , 每一颗粒包含的铁:碳重量比为约 95:5 - 50:50, 并且其上吸附有治疗量的生物活性物质。

54. 权利要求 53 的组合物, 其中所述生物活性物质是药物、放射



性物质、或遗传物质。

55. 权利要求 54 的组合物，其中所述放射性物质是 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、或 ^{90}Y 。

56. 权利要求 1 的组合物，其中所述颗粒的横截面尺寸为约 $0.1\ \mu\text{m}$ - $5.0\ \mu\text{m}$ ，每一颗粒包含的铁:碳重量比为约 95:5 - 50:50，并且其上吸附有诊断量的生物活性物质。

57. 权利要求 56 的组合物，其中所述生物活性物质是放射性同位素、造影剂、染料或遗传物质。

58. 权利要求 57 的组合物，其中所述放射性物质是 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{99}Tc 。

59. 一种用于将生物活性物质给到患者体内位点的药盒，它包含受器，所述受器包含：

a) 单位剂量的干燥铁碳颗粒，其中所述颗粒的横截面尺寸为约 $0.1\ \mu\text{m}$ - $5.0\ \mu\text{m}$ ，每一颗粒包含的铁:碳重量比为约 95:5 - 50:50，并且碳分布在颗粒的整个体积内；和

b) 一种或多种干燥的赋形剂，其中所述赋形剂的量为，当在水溶液中使用该含量的赋形剂能促进生物活性物质吸附到颗粒上。

60. 权利要求 59 的药盒，其中单位剂量为约 0.05 - 约 0.5 克颗粒。

61. 权利要求 59 的药盒，其中所述赋形剂包括当加到水溶液中时用于把颗粒分开的生物相容性聚合物，

62. 权利要求 59 的药盒，其中所述赋形剂包括甘露醇、羧甲基纤维素钠、或它们的组合物。

63. 权利要求 59 的药盒，其中药盒的内含物是与生物活性物质的市售制剂组合的。

64. 一种用于将生物活性物质给到患者体内位点的药盒，它包括：

a) 第一个受器，该受器包含单位剂量的干燥铁碳颗粒，其中所述颗粒的横截面尺寸为约 $0.1\ \mu\text{m}$ - $5.0\ \mu\text{m}$ ，每一颗粒包含的铁:碳重量比为约 95:5 - 50:50，并且碳分布在颗粒的整个体积内；和

b) 第二个受器，该受器包含一种或多种干燥的赋形剂，其中所述赋形剂的量为，当在水溶液中使用该含量的赋形剂能促进生物活性物质吸附到颗粒上。

65. 权利要求 64 的药盒，其中单位剂量为约 0.05 - 约 0.5 克颗粒。

66. 权利要求 64 的药盒, 其中所述赋形剂包括当加到水溶液中时用于把颗粒分开的生物相容性聚合物,

67. 权利要求 64 的药盒, 其中所述赋形剂包括甘露醇、羧甲基纤维素钠、或它们的组合物。

5 68. 权利要求 67 的药盒, 其中甘露醇的量为 10%, 羧甲基纤维素的量为 5%。

69. 权利要求 64 的药盒, 其中药盒的内含物是与生物活性物质的市售制剂组合的。

10 70. 权利要求 64 的药盒, 其中单位剂量的铁碳颗粒已经 γ 辐射灭菌。

71. 权利要求 64 的药盒, 其中含有赋形剂的水溶液已经高压灭菌器灭菌。

72. 一种将包含铁碳颗粒的组合物灭菌的方法, 其中包括使用 γ 辐射。

15 73. 权利要求 71 的方法, 其中所用 γ 辐射的量为 2.5 - 3.5 Mrad。

74. 一种用于将生物活性物质给到患者体内位点的药盒, 它包含单位剂量的干燥铁碳颗粒, 其中所述颗粒的横截面尺寸为约 0.1 μm - 5.0 μm , 每一颗粒包含的铁:碳重量比为约 95:5 - 50:50, 并且碳分布在颗粒的整个体积内。



说明书

磁响应组合物

5

技术领域

本发明涉及用于将生物相容性颗粒递送到体内选择位点的组合物和方法，更具体来说，本发明涉及能携带生物活性化合物的颗粒，它能保证颗粒的靶向磁性运输并保持在预定位点以定位诊断或治疗疾病。

10

背景技术

迄今为止，已经有人提出和/或使用用于治疗各种疾病的金属载体组合物（参见例如 US 4849209 和 US 4106488），并且包括通过对外加磁场起响应而在体内被定向或受控的组合物（参见例如 US 4501726、US 4652257 和 US 4690130）。这类组合物不能总是被证实是实用和/或完全有效的。例如，这类组合物可能缺乏将所需生物活性剂运送到治疗位点的足够能力，磁敏性不足，和/或难以生产、贮存和/或使用。

15

一种通过血管内注射给药的已知组合物包含微球，其中所述微球是由铁磁成分组成的，并且覆盖有生物相容性聚合物（白蛋白、明胶、和多糖），所述聚合物还含有药物（Driscoll C.F.等人的 Prog. Am. Assoc. Cancer Res., 1980, p. 261）。

20

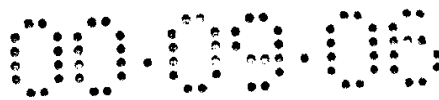
可以生产出含有磁性材料（磁铁矿 Fe_3O_4 ）和抗肿瘤性抗生素阿霉素、粒径高达 $3.0\ \mu\text{m}$ 的白蛋白微球（Widder K.等人的 J. Pharm. Sci., 68:79-82 1979）。这种微球是使白蛋白在乳液（油包水乳液）中经热和/或化学变性而制得的，其中具有在药用溶液中含磁铁矿悬浮体的输入相。类似技术已被用来制备覆盖有包含抗生素丝裂霉素-E 的乙基纤维素、磁控或定向的微胶囊（Fujimoto S.等人的《癌症》(Cancer), 56:2404-2410, 1985）。

25

另一方法是制备可溶解动脉粥样硬化形成物、携带粒径为 $200\ \text{nm}$ - $800\ \text{nm}$ 的磁性控脂质体的制剂。该方法的基础是，在水存在下磷脂能产生封闭膜结构（Gregoriadis G., Ryman B.E., 《生物化学杂志》(Biochem. J., 124:58, 1971)）。

30

上述组合物需要通量密度非常高的磁场以控制它们，并且多少难



以在不改变其指定特性的条件下以工业化规模稳定地生产、灭菌和贮存。

为了克服这些缺点，有人提出了一种制备磁控分散剂的方法（参见 Kholodov L.E., Volkonsky V.A., Kolesnik N.F.等人的第 0451299 A1 号欧洲专利公开物），其中是使用铁碳颗粒作为铁磁材料。所述铁碳颗粒是通过将由粒径为 $100\ \mu\text{m} - 500\ \mu\text{m}$ 的颗粒组成的铁粉在含氧空气中于 $800^\circ\text{C} - 1200^\circ\text{C}$ 加热而制得的。然后将混合物在 $400^\circ\text{C} - 700^\circ\text{C}$ 用一氧化碳处理，直至在表面上开始出现约 $10\% - 90\%$ （重量）的碳颗粒为止。之后将生物活性物质吸附到颗粒上。

制备铁碳颗粒的该方法相当复杂，并且需要大量能量。因为在含氧空气中于高温下合成铁碳颗粒使得铁磁组分被氧化，所以与金属铁相比，所得分散剂的磁敏性平均下降了约 1 半。吸附在所得颗粒上的生物活性物质的量的上限一般为铁磁颗粒重量的 $2.0\% - 2.5\%$ 。

通过上述方法制得的磁控颗粒具有球形铁磁组分，该球形铁磁组分具有从其延伸的线状碳链，并且其大小通常约为 $2.0\ \mu\text{m}$ 。据信该结构预先决定了该复合材料具有相当低的吸附能力，并且在贮存和转运期间还导致来自铁磁组分的易碎线状碳链的破碎。

因此，仍然需要能磁性输运、相对易于生产、贮存和使用的生物相容的有效组合物。

发明简述

本发明提供了可携带生物活性物质、或者可单独使用的磁响应组合物。迄今为止，已经提出了多种可携带的溶解物质。例如但不限于烷化剂、抗代谢物、抗真菌剂、抗炎剂、抗肿瘤剂、和化疗剂、以及它们的适当组合可被吸附到颗粒上。通过使用本发明磁控载体颗粒，还可体内携带和给药其它治疗剂和药物，例如系统毒性抑制剂、抗生素和氢化可的松等。本发明还提供了所述颗粒的制备方法和应用。

本发明的目的是改善用于靶向运送生物相容性颗粒的磁控组合物的一些参数，包括提高相对吸附能力，提高磁敏性，增强诊断与治疗效果和使用方便性，以及简化磁控组合物的生产技术，并保证其长时间贮存后所需特性不发生改变。

通过使用适当的体积混合的铁碳复合颗粒作为磁控组合物的磁敏性材料，可实现本发明的目的。这些颗粒的主要尺寸（即最大直径）



为约 $0.2\ \mu\text{m}$ - 约 $5.0\ \mu\text{m}$ (优选为 $0.5\ \mu\text{m}$ - $5.0\ \mu\text{m}$) , 含有约 1.0% - 约 95.0% (重量) 的碳, 其中碳与铁紧密地结合在一起。颗粒是通过将铁和碳粉混合物共同变形 (即碾磨) 获得的。在某些情况下, 成品颗粒含有微量碳化铁 (Fe_3C) 。

- 5 用于体内局部治疗疾病的组合物包含主要尺寸约为 $0.5\ \mu\text{m}$ - $5\ \mu\text{m}$ 的颗粒, 每一颗粒分别含有碳和铁, 并且可任选含有吸附在颗粒上、被选择用来诊断或治疗疾病的生物活性物质。

10 制备本发明组合物的方法包括, 将铁和碳粉机械混合物共同变形, 采用的变形时间足以使粉末结合到平均主要尺寸低于 $5\ \mu\text{m}$ 的铁:碳复合颗粒内, 并且颗粒的主要部分包含约 1.0% - 95.0% (重量) 的碳分散到每一颗粒体积内。优选将颗粒分离, 以选择主要尺寸为约 $0.5\ \mu\text{m}$ - 约 $5.0\ \mu\text{m}$ 的颗粒, 之后高达 20% (重量) 的生物活性物质颗粒可吸附到所选颗粒上。

15 所用方法包括体内局部诊断或治疗疾病的方法, 包括提供吸附有被选择用来诊断或治疗疾病的生物活性物质的磁响应铁碳载体 (例如本发明载体), 把载体注射到患者体内。例如, 载体通过将给药装置插到距离被治疗体内位点很近、并在把血液运送到该位点的动脉网的分支处 (优选最接近的) 的动脉内来注射。把载体通过给药装置注射到血管内。就在注射前, 在体外邻近治疗位点处建立足够场强的磁场, 20 以将大量注射载体引导到治疗位点, 并使大量载体保留在治疗位点。磁场优选具有足以将载体引导到邻近血管网的位点处的软组织内的强度, 由此就防止了任一较大血管被载体颗粒栓塞。

因此本发明的目的是提供一种任选用来携带生物活性物质的改进的磁响应组合物, 及其制备方法和应用。

- 25 本发明的另一目的是提供一种用于携带生物活性物质的磁响应载体, 所述载体具有改善了的磁响应性, 在贮存和使用期间也持久耐用, 并且含有高达 20% (重量) 的吸附在其上面的生物活性物质。

30 本发明的另一目的是提供一种包含主要尺寸为约 $0.5\ \mu\text{m}$ - $5.0\ \mu\text{m}$ 的颗粒的磁响应组合物, 其中每一铁:碳复合颗粒含有约 1.0% - 95.0% (重量) 的分散在颗粒体积内的碳。

本发明的另一目的是提供一种用于体内局部诊断或治疗疾病的组合物, 所述组合物包含主要尺寸为约 $0.5\ \mu\text{m}$ - $5.0\ \mu\text{m}$ 的铁:碳颗粒, 其



中每一铁:碳复合颗粒含有碳和铁, 碳分散在颗粒体积内, 并任选含有吸附在颗粒上的、被选择用来诊断或治疗疾病的生物活性物质。

5 本发明的另一目的是提供一种制备磁响应载体组合物的方法, 其中所述组合物包含铁:碳复合颗粒, 所述颗粒含有碳和铁, 其中碳分散在颗粒体积内。

本发明的另一目的是提供一种为组合物给药的液态或干燥药盒, 以用于体内局部诊断或治疗疾病, 其中所述组合物包含铁碳颗粒, 所述颗粒具有任选的吸附在其上面、并被选择用来诊断或治疗疾病的生物活性物质。

10 本发明的另一目的是提供一种用于为组合物给药的药盒部件的灭菌方法, 其中所述组合物是用于体内局部诊断或治疗疾病, 并包含铁碳颗粒, 所述颗粒具有任选的吸附在其上面、并被选择用来诊断或治疗疾病的生物活性物质。

15 通过阅读下述说明, 本发明这些和其它目的对于本领域技术人员来说将变得显而易见, 本发明提供了基本上如下文所述的部分的构造、组合、排列和方法, 并且通过权利要求书对其作了更特别的限定, 应当理解, 如果在本发明中公开的具体实施方案中的变化在本发明权利要求范围内的话, 则这些变化也包括在本发明范围内。

附图的简要说明

20 附图 1 是本发明载体组合物的复合颗粒的放大照片 (12000 倍)。

附图 2A 是本发明载体组合物的颗粒的放大照片 (30000 倍)。

附图 2B 是附图 2A 颗粒的截面图。

附图 3A - 3H 是用吸附在载体组合物上、用本发明方法输送并维持在肿瘤位点中的药物治疗期间肿瘤的例图。

25 附图 4 是举例说明施用并磁定向本发明载体组合物的一个实例的图。

附图 5 是举例说明在病理结构处的载体组合物 (具有吸附在其上的药物) 的图。

30 附图 6 是说明结合到载体颗粒上的 PAC 的 Langmuir (朗缪尔) 吸附的曲线图, 其中所述颗粒具有 70:30 E 型碳的铁:碳比例, 和仅有(-□-)E 型碳。数据是通过简单未加权线性回归拟合的。



发明详述

本发明的磁可控或定向的载体组合物包含平均主要尺寸为约 0.1 μm - 约 5.0 μm 、优选为约 0.5 μm - 约 5.0 μm 的体积混合的铁碳复合颗粒，所述颗粒含有约 1.0% - 约 95.0%、例如约 10% - 60% (重量) 的碳。已经发现约 20% - 约 40% (重量) 的碳是在许多应用中表现出有用特性的优选范围。

所述颗粒是通过不采用外加热将铁和碳粉混合物机械碾磨制得的。然后将所制得的铁:碳复合载体颗粒置于生物活性物质的溶液中，以使生物活性物质吸附到颗粒上。分离出具有所需尺寸和磁敏性的复合颗粒。可在将颗粒露置于生物活性物质之前或之后分离颗粒。

如附图 1 和 2A 所示，通过本发明方法制得的铁:碳颗粒 8 通常是球形，其中包含碳沉积物 10，所述碳大概位于每一颗粒的整个体积内 (在每一颗粒的表面和内部)。在将本发明磁控组合物长时间贮存、运输、存储、包装和直接使用期间，组分 (铁 12 和碳 10) 之间的强连接没有被打破。在铁和碳之间可能会发生化学结合，例如在碾磨过程中形成的碳化铁(Fe_3C)的微量夹层。

本发明铁:碳颗粒还可用作在外加磁场控制下把一种或多种吸附的生物活性物质递送到特定体内位点的载体。本说明书所用术语“生物活性物质”包括用于体内诊断和/或治疗的物质。

生物活性物质包括但不限于抗肿瘤剂、血液制品、生物响应改性剂、抗真菌剂、抗生素、激素、维生素、肽、酶、染料、抗过敏剂、抗凝剂、循环剂、代谢加强剂、抗结核剂、抗病毒剂、抗心绞痛剂、抗炎剂、抗原生动物剂、抗风湿剂、麻醉剂、鸦片制剂、诊断造影剂、强心甙、神经肌肉阻断剂、镇静剂、麻醉剂、以及顺磁性和放射性颗粒。其它生物活性物质可包括但不限于单克隆抗体和其它抗体、天然或合成遗传物质和前药。

本说明书所用术语“遗传物质”一般是指核苷酸和多核苷酸，包括天然或合成核酸、RNA 和 DNA，包括重组有义和反义 RNA 和 DNA。遗传物质的类型可包括例如携带在表达载体例如质粒、噬菌粒、酵母人工染色体和缺损(辅助)病毒上的基因，单链和双链 RNA 和 DNA 及其类似物，以及其它蛋白和聚合物。

对于体内诊断造影，在选择给定放射性同位素方面，可使用的检



测仪器的类型是主要因素。所选放射性同位素必须具有对于给定类型仪器可检测的衰变类型。 γ 射线通常是必需的。在选择放射性同位素方面，另一重要因素是半衰期，它应当长至使得在靶位点最大量摄取同位素时放射性同位素仍能被检测，而短至使得对宿主的有害辐射最小。选择适当放射性同位素对于本领域技术人员来说是显而易见的。

可采用的放射性同位素包括但不限于 ^{99}Tc 、 ^{142}Pr 、 ^{161}Tb 、 ^{186}Re 、和 ^{188}Re 。另外，其它诊断有用的化合物的典型实例是金属离子，包括但不限于 ^{111}In 、 ^{97}Ru 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{72}As 、 ^{89}Zr 和 ^{201}Tl 。此外，特别适用于磁共振造影和电子自旋共振技术的顺磁性元素包括但不限于 ^{157}Gd 、 ^{55}Mn 、 ^{162}Dy 、 ^{52}Cr 、和 ^{56}Fe 。

还要指出，放射性同位素也适用于放射治疗技术。通常情况下， α 和 β 放射被认为可用于治疗。治疗化合物的实例包括但不限于 ^{32}P 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{90}Y 、 ^{166}Ho 、 ^{153}Sm 、 ^{142}Pr 、 ^{143}Pr 、 ^{149}Tb 、 ^{161}Tb 、 ^{111}In 、 ^{77}Br 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{223}Ra 、 ^{210}Po 、 ^{195}Pt 、 $^{195\text{m}}\text{Pt}$ 、 ^{255}Fm 、 ^{165}Dy 、 ^{109}Pd 、 ^{121}Sn 、 ^{127}Te 、和 ^{211}At 。放射性同位素通常作为自由基团存在于盐中，然而有些肿瘤和甲状腺可直接摄取碘。适用的诊断和治疗放射性同位素可单独使用或组合使用。

在不损失颗粒在本申请所述治疗方案中的效用的情况下，通过提高碳在颗粒中的比例，被吸附的水溶性生物活性物质的量一般可增加到最多占复合颗粒重量的约 40%。已经发现，在许多情况下，生物活性物质质量的增加与碳含量的增加大约呈线性关系。然而，当碳含量增加时，复合颗粒对磁场的敏感性或响应能力也下降了，因此它们在体内的控制条件恶化了（虽然吸附能力增强了）。因此，为了获得改善的治疗或诊断结果，需要在铁:碳比例中达到平衡。在治疗期间，为了提高活性剂的量，可将大剂量颗粒给予患者，但是增加剂量不能使颗粒更有磁性。本领域技术人员可确定适当比例。

已经确定出，用于如本申请所述在体内治疗的颗粒的适用铁:碳比例范围通常为约 95:5 - 约 50:50，例如约 80:20 - 约 60:40。对于具有任意给定碳浓度的铁:碳复合载体颗粒，其所吸附的生物活性物质的最大量也将由于生物活性物质的化学性质、以及在某些情况下组合物所用碳的类型（例如活性炭(AC)）的不同而不同。例如，已经发现，对于用来递送吸附的阿霉素以在体内进行治疗的载体颗粒，最佳铁:碳比例



约为 75:25。

然而，基本上不溶于水的生物活性物质（即在水中的溶解度低于约 0.1%（重量））的吸附需要使用特殊方法来把有用量药物吸附到颗粒上。本申请人已经发现，可通如下所述将基本上不溶于水的生物活性物质吸附到本发明载体颗粒上，不使用其中有许多种是有毒性的表面活性剂，将不溶于水的生物活性物质溶解在液态吸附介质（例如含水液态吸附介质）中，其中所述介质含有被选择用来将颗粒和溶液间的疏水范得华力减至最小、以阻止颗粒在介质中聚结的赋形剂。例如，如果生物活性物质是高度非极性分子例如喜树碱，并且吸附介质是高度非极性液体例如氯仿-乙醇，则药物就不能优选离开吸附介质而吸附到碳上。然而，在极性更强的吸附介质中，吸附到载体颗粒上是完全可接受的。例如，使用含柠檬酸的乙醇作吸附介质，虽然紫杉醇是一种高度水不溶性药物基本上不溶于水，也能将治疗水平的紫杉醇结合到铁:碳比例为 70:30 的载体颗粒上。在许多情况下，如果液态吸附介质含有生物相容性和生物可降解增粘剂（例如生物相容性聚合物）如羧甲基纤维素钠以促进颗粒在介质中分离，则是有利的。

通过使用本发明方法，已经将阿霉素以占颗粒平均重量约 0.0% - 约 20% 的量吸附到铁:碳比例为 80:20 - 60:40（A 型活性炭）的载体颗粒上。实施例 5 举例说明了用于增强阿霉素吸附到载体颗粒上的赋形剂的配方。采用对于本领域技术人员来说是显而易见的类似技术，也可将其它生物活性剂吸附。

为了便于制备和将载体颗粒以干燥形式销售，可将赋形剂制成干燥形式，并且当在液体溶液中时，将用于溶解药物和生物活性物质用的一种或多种干燥赋形剂的吸附促进量与单位剂量的载体颗粒包装在一起。为了克服在水溶液中导致有关生物活性物质不溶和颗粒聚结的化学力，根据生物活性物质的化学性质，本领域技术人员可确定出干燥赋形剂的吸附促进量。最优选将包含干燥赋形剂和干燥载体颗粒的包装或药盒与包含单位剂量药物和足量生物相容性水溶液的小瓶按药物生产商的指示说明混合配制，以使药物达到所需药用浓度。通过将含有被稀释药物的溶液与包括干燥组分（即干燥载体颗粒和干燥赋形剂）的药盒组分混合，药物被吸附到载体颗粒上，形成了含有吸附到载体颗粒上的治疗量的生物活性物质的、适用于体内治疗或诊断的磁



控组合物。

或者，可使用液态药盒。在这种药盒中，载体颗粒是作为一个单元包含在例如小瓶中，而上述赋形剂是以水溶液形式包含在另一单元中。在给药时，按照药物生产商的指示说明将包含单位剂量药物的小瓶组分与足量的生物相容性水溶液例如盐水混合，以使药物达到所需药用浓度。然后，把其上面吸附有生物活性物质的所得颗粒与在水溶液中包含赋形剂的另一单元混合。可采用任意合适的灭菌技术。例如，可采用 γ 幅射将铁碳颗粒灭菌，可通过高压灭菌器将赋形剂的水溶液灭菌。使用高压灭菌器会将铁碳颗粒氧化，这是不利的。

通过考虑多种因素，例如患者的体重、年龄、全身健康状况、药物的诊断或治疗特性、疾病的性质和严重程度，本领域技术人员可确定出吸附到载体颗粒上的生物活性物质的诊断或治疗量，即对具体疾病或病症的诊断或治疗所需的量。

确定用于任一具体治疗的载体颗粒的尺寸要考虑很多因素。颗粒尺寸的选择部分是由在生产大小低于 $0.2\ \mu\text{m}$ 的颗粒所固有的技术约束决定的。此外，对于大小低于约 $1.0\ \mu\text{m}$ 的颗粒，在血流中的磁控以及携带能力下降了。较大的粒度在注射期间会导致血管不利栓塞，或者由于机械地或者由于生理机制促使形成凝块。分散剂可能会凝结，这使得更加难以注射，并且在靶病理区域生物活性物质从颗粒上解吸附的速率也可能下降。将铁和碳粉混合物一起碾磨的方法（例如下述方法）使得颗粒呈具有粒状表面的近似球形，并且生成了平均主要尺寸为约 $0.1\ \mu\text{m}$ - 约 $5.0\ \mu\text{m}$ 的颗粒群体。

因为铁在本发明颗粒中不是以氧化铁形式存在，如在一些现有技术中公开的磁控分散剂中那样，所以铁碳颗粒 8 的磁敏性或响应性保持高水平。

本发明铁碳颗粒的特征是，具有健全的子结构（参见附图 2B），所述结构具有铁形成的连接网络，网络填充有截留在其中的碳沉积物 10。与具有其它类型子结构的铁颗粒相比，在把铁和碳粉机械混合物连接变形的过程中形成的颗粒的这种特征子结构也提高了包含在铁碳颗粒 8 中的铁的磁敏性。例如，通过本发明方法制得的铁碳复合颗粒的磁敏性比在第 0451299 A1 号欧洲专利公开物中公开的颗粒的磁敏性要好，虽然这两种颗粒中的铁磁组分含量是大约相同的。在有些情况



下，铁碳颗粒 8 的高磁响应性使得其能采用低于约 250 高斯的磁场来把颗粒定向到所需解剖学位点。

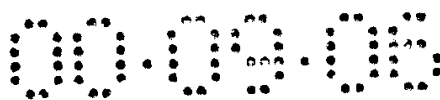
因为在颗粒 8 中的碳沉积物 10 具有大表面，所吸附的生物活性物质的量可占颗粒 8 重量的高达约 20.0%；或者，换句话说，每克颗粒 8 可吸附高达约 200 mg 生物活性物质。因此，在使用中，与一些现有技术已知载体相比，可注射更少量的载体就能达到给定剂量的生物活性物质，或者每次注射能达更高剂量的生物活性物质。

下面描述制备少量本发明铁碳组合物的方法，应当理解，为了使包含制备载体的基本原料的铁和碳粉共同变形，除了碾磨之外，也可使用其它方法和机制。所用方法对碳和铁颗粒混合物施加机械压力，以将铁颗粒变形和形成捕获碳的基本结构。在该方法中，不加热就形成了铁碳颗粒（虽然在机械变形步骤中混合物温度升高），并且是在液体例如乙醇存在下进行的，以抑制铁氧化，并确保生成的颗粒是干净的（无菌）的。在将铁和碳粉碾磨过程中，液体还起润滑剂作用，并且可降低处理期间碳的压缩。结果是，维持了在组合物中碳沉积物的密度，以使颗粒有最大吸附能力。

例如，为了制备平均铁:碳重量比约为 75:25 的颗粒，将一部分平均直径为 $0.1\ \mu\text{m}$ - $5\ \mu\text{m}$ 的基本上纯的铁颗粒与约 0.1 - 1.0 重量份基本上纯的碳颗粒（直径一般约为 $0.1\ \mu\text{m}$ - $5.0\ \mu\text{m}$ ）混合。将所述铁颗粒和碳颗粒剧烈混合，以使其在整个体积中良好分布。碳颗粒优选为活性炭。为了确定最佳的可逆的活性炭结合，应当用各种类型的碳独立地评价每一生物活性物质。因素例如 pH、温度、粒度、盐溶液粘度、和溶液中其它潜在竞争性化学品可影响吸附能力、速率和解吸参数。可使用的活性炭类型包括但不限于 A、B、E、K 和 KB 及其化学改性变型。

将混合物置于标准实验室用行星式球磨机、或者在粉末冶金中使用的磨碎机中。例如，碾磨机可具有直径为 6 mm 的球。加入适当量的液体例如乙醇以进行润滑。将该混合物碾磨 1 - 12 小时，或者碾磨能产生本文所述颗粒所需的时间。根据所用碾磨机，碾磨机的速度可以介于约 120 rpm - 约 1000 rpm 之间（通常约 350 rpm），加工效果对碾磨速度并不过度敏感。

将铁:碳混合物共同变形后，把颗粒从碾磨机中取出来，并通过例



如粗滤器与碾磨球分开。可将颗粒重悬在乙醇中并均化，以将颗粒彼此分开。通过例如旋转蒸发将乙醇除去，然后真空干燥。可使用任一干燥技术。应当在例如氮气气氛下处理颗粒以防止铁被氧化。

干燥后，应当根据适当尺寸收集颗粒。例如，可将颗粒过 20 μm 筛并在气体旋流器中收集以除去大于 20 μm 的颗粒。旋流器仅收集一定粒径和密度的颗粒，这提供了除去细小和散粒碳的方法。可在氮气下包装筛分颗粒，并在室温贮存。

可将颗粒再等分成剂量单位，例如每单位剂量 50 - 500 μg ，并可进一步用例如氮气覆盖。可将剂量单位密封，例如用丁基橡胶塞子和铝卷边密封。然后可通过适当灭菌技术将配量单元灭菌，例如用 2.5 - 3.5 Mrads (百万拉特) 的 γ 辐射灭菌。

当准备使用时，或在包装之前，如果要制备具有吸附在其上面的预选择的生物活性物质的载体，则将在溶液中的约 50 mg - 150 mg (为了完全保证最大吸收，优选约 75 mg - 约 100 mg) 生物活性物质加到 1 g 载体中。当准备用于患者时，用标准方法将该组合物置于生物相容性液体例如水或盐水的悬浮液中 (例如约 5 - 10 ml)。

实验证据表明，与现有技术中已知的磁控分散剂相比，使用具有抗肿瘤制剂的本发明磁控载体组合物，使得对肿瘤的治疗效力增加了。

实施例 1

用 Wistar Line 雄性大鼠 (在 Stolbovaya Station of the USSR Academy of Medical Sciences 饲养的) 进行测试。在大鼠尾部皮肤下灌输癌肉瘤 Walker 256。当肿瘤平均体积为 $986 \pm 98 \text{ mm}^3$ 时，将大鼠分成 4 组，每组 10 只。第一组 (组 I) 是对照组，组 II - IV 是实验组。

在 5 天期间内，给组 II 大鼠静脉注射 2 mg/kg 体重的 rubomicine (变红菌素) 的水溶液 (按临床传统使用该抗癌制剂的模型)。给组 III 大鼠注射通过第 0451299 A1 号欧洲专利公开物中描述的现有技术已知方法制得的铁碳分散剂的悬浮液。该颗粒包含体积百分比为 60:40 的铁/碳。铁碳颗粒的剂量为 160 mg/kg 体重，吸附其上面的 rubomicine 的剂量为 3.2 mg/g 颗粒。在把磁场强度为 6000 奥斯特的永久磁铁置于肿瘤表面之后，将该悬浮液注射到尾静脉内。通过 X-射线照片监视在外置磁场控制下该悬浮液在肿瘤生长区域的定位。

使用相同注射技术和磁定位，包括将磁场强度为 600 奥斯特的永

久磁铁置于肿瘤表面并监视。给组 IV 大鼠一次性静脉内注射依据本发明方法制得的磁控分散剂，并通过 X-射线观察颗粒的定位。载体颗粒的剂量为 160 mg/kg 体重。在分散剂中各颗粒的铁:碳比例为 60:40，类似于在实验组 III 中使用的通过现有技术已知方法制得的分散剂中的铁:碳比例。

由于颗粒 8 的改善的吸附能力，吸附到本发明磁控载体颗粒上的 rubomycin 的剂量为 9.96 mg rubomycin /g 颗粒，这是在实验组 III 大鼠中使用的现有技术已知载体颗粒吸附的 rubomycin 量的 3.1 倍。达到该结果仅是由于该给定载体颗粒的较特定的吸附能力。

观察大鼠获得了下述结果。在对照组 I 中，大鼠的生命期限平均为 21 ± 1.5 天。在组 II 中，作为将 rubomycin 的水悬浮液静脉内注射到按临床传统使用抗肿瘤药物的模型中的结果，治疗后，大鼠的生命期限平均增加了 4.5 天 ($P < 0.05$)。治疗后，实验组 III 大鼠的平均生存了 46 ± 4.3 天，比对照组大鼠的生命期限多 2.2 倍。

在组 IV 中，在一次性注射磁控组合物的悬浮液后 5-7 天期间内，10 只大鼠中有 6 只（即 60%）被证实肿瘤完全消失。此外，治疗后，该组剩余 4 只大鼠平均存活了 57.4 ± 5.9 天，因此超过了组 III 大鼠的生命期限 25.0%。治疗后它们的平均生命期限比对照组 I 的大鼠长 2.7 倍。在 157 天的观察期间内，在表现出肿瘤完全消退的组 IV 大鼠中没有看见任何肿瘤生长复发，该结果与在这些大鼠中肿瘤的完全消失是一致的。

实施例 2

进一步临床观察已经证实了本发明的有效性。附图 4 和 5 举例说明了使用本发明组合物对在 1992 年 2 月 13 号住入 Zil Hospital in Moscow, Russia (CIS)（俄罗斯莫斯科 Zil 医院）、并被诊断出患有左乳腺癌 $T_3N_1M_1$ 的 61 岁妇女进行治疗和观察的结果。

在 1989 年，通过作活组织检查进行第一次诊断。在 1991 年 12 月，局部放射治疗（10 戈瑞）使肿瘤部分减小了。决定用其上吸附有作为生物活性剂的阿霉素（Adriamycin）的本发明载体的动脉内选择性定位进行化学治疗。

在治疗前，肿瘤的尺寸（如附图 3A 和 3B 所示）为 $44 \text{ mm} \times 33 \text{ mm} \times 37 \text{ mm}$ （ $65 \text{ mm} \times 45 \text{ mm}$ ，手工）。在 1992 年 2 月 24 日，在局部麻



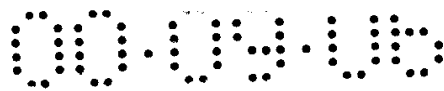
醉下 (0.5 % 奴佛卡因, 30 ml) 将股动脉 (附图 4) 穿刺, 并依据 Seldinger 法把血管导管插到主动脉内。在 X 射线和对比监控下, 将导管置于距离左胸内动脉 (a. mammaria interna sinisra) 分支 25 mm 处。经由该血管注射新制备的在其上吸附有 15 mg 阿霉素 (Adriamycin) 的铁碳颗粒 8 的明胶醇 (gelatinol) 悬浮液。同时将磁场强度为 15000 奥斯特的磁体在肿瘤上面放置 20 分钟, 结果, 注射的悬浮液由磁场保持在肿瘤区域就位 20 分钟 (足以将供给肿瘤营养的毛细血管完全微栓塞的时间)。在治疗时, 患者的症状令人满意。

到 1992 年 2 月 28 日时, 患者的症状已经改善了。对左乳腺的超声检查表明, 如附图 3C 和 3D 所示, 肿瘤的尺寸为 42 mm × 33 mm × 40 mm。肿瘤有清晰的轮廓。到 1992 年 3 月 12 日, 肿瘤的尺寸已经减小了 66.3 %, 降至 32 mm × 27 mm × 21 mm (附图 3E 和 3F)。到 1992 年 4 月 14 日, 肿瘤的尺寸已经减小了 99.22 %, 降至 10 mm × 6 mm × 7 mm (附图 3G 和 3H)。

据信, 通过将载体直接释放到肿瘤位点上流 (或其它病理位点), 而不是穿过肿瘤, 能同样有效地施加生物活性物质, 同时限制了由于肿瘤组织穿刺而引起的肿瘤扩散, 这对患者是有利的。同时在上述治疗实例中采用了更大的磁场, 已经发现本发明载体组合物在小至 250 奥斯特/cm 的磁场中开始发挥作用 (在感应前, 许多现有技术载体需要 500 奥斯特/cm 的磁场)。

附图 5 图示说明了在治疗位点、在磁控制下发生了什么。在施加的磁场的感应下, 载体颗粒被引到供给肿瘤营养的毛细血管网中。颗粒被引到毛细血管腔的软组织邻近处 (或者也许甚至是进入软组织), 因此就降低或消除了载体颗粒栓塞血管的可能性。生物活性物质通过动力学过程从载体颗粒中释放出来, 其中载体中的物质被体内产生的物质代替。例如肿瘤自身的坏死产物可能替代生物活性物质, 而吸附到颗粒上, 例如蛋白、葡萄糖、脂质、肽等。因此, 生物活性物质就象字面意思所讲的那样从载体颗粒上释放出来。

通常有低于约 10 % 的生物活性物质被血流中的体内物质替代。因此, 据信置换的物质一定比生物活性物质具有更高的比重。少量颗粒也许不能被磁场吸引到治疗位点, 或者会从治疗位点脱逸。这部分颗粒可能也在血液以及其它地方发挥抗肿瘤细胞的治疗活性。在某些病



例中，用本发明方法治疗后，已经观察到了转移的减少。因为载体组合物是由生物可降解或可被身体轻易代谢的材料形成的，所以也许在施用 30 天内，所有载体颗粒都能被排泄或代谢。

可以理解，本发明提供了用于生物活性物质的改善的磁响应载体、和制备以及使用所述载体的方法。本发明载体颗粒对磁场表现出改善的响应性，具有改善的药物吸附能力，在贮存和使用期间更持久耐用。

实施例 3

最近用吸附到本发明载体颗粒上的放射性铟(Tc)作为造影剂在猪动物模型中进行了一系列萤光屏检查指导的器官造影实验。为了评价带碳(C) 的 Tc 以及铁:碳载体颗粒的物理化学性质以及相互作用，使用铼(Re)作为 Tc 的非放射性替代品。在元素周期表中，Re 是刚好在 Tc 下面的 VIIB 族元素。Re 有两种人工同位素， ^{186}Re 和 ^{188}Re ，如下表 1 所示，二者的半衰期比 Tc 长，放射大约相同的 γ 射线。

表 1

同位素源	$t_{1/2}$ (小时)	γ 能量(keV)
^{99}Tc 人工	7	140
^{186}Re 人工	90	137
^{188}Re 天然	17	155

将在冶金领域中使用的比色 Re 分析作适应性改动来测定 Re 在铁:碳比例为 70:30 的载体颗粒上的吸附。简言之，将 0.1 - 0.5 ml 样品置于含有 1.0 ml HCl、1.3 ml 糠偶酰二肼（60% 丙酮溶液）、0.5 ml 10% 氯化亚锡以及足量水的溶液中，以达到 5.0 ml。将该混合物在 45°C 加热 20 分钟，然后冷却至室温。在 532 nm 测定 Re 在该溶液中的吸光度。该分析的灵敏度为约 5 mcg 的 Re。这些实验表明，当在室温培养时，结合到一系列碳上的 Re 从在吸附介质中有 30 mg 碳时的约 35% 到有 180 mg 碳时的约 90% 不等。如其它药物一样，Re 在吸附介质中的 % 结合率随 Re 与碳比例的增加而减小。然而，Re 与碳的结合与朗缪尔等温线的平衡结合不一致，并且与温度和 pH 无关。在室温将 Re 在生理盐水中从各种预载有吸附 Re 的碳上释放 24 小时，结果释放了 50%（重量比）。

通过将颗粒在含有缓冲的氯化钠的吸附介质中于室温培养，将 Re



分别吸附到铁:碳比例分别为 70:30 和 85:15 的载体颗粒上。通过分光光度分析法测定 Re 在颗粒上的结合量。这些实验表明, 在吸附介质中, Re 在载体颗粒上的结合量随碳(即颗粒中的碳)与 Re 比例的增加而增加。吸附放射性同位素的适用量将随所需特定结果的不同而不同, 例如为 10 pgm - 700 ng。本领域技术人员可轻易地确定出正确用量。两种不同铁:碳载体颗粒组合物的结合参数如下表 2 所示:

表 2

颗粒的铁:碳 比例	颗粒量(mg)	介质中的 Re (μ g)	% 结合	Q (ng/mg)
80:15	100	140	25.9	360
70:30	100	140	40.3	560

通过在盐水中于流动条件下培养 24 小时, 释放了不到 10% 的 Re。Re 在载体颗粒上的低结合量与其它带电小离子分子在活性炭上的低结合量相一致, 而疏水性芳香分子具有高亲合力结合。这些发现与使用吸附有 Re 或 Tc 的本发明载体颗粒作为造影剂和治疗剂的应用相一致。

实施例 4

如上所述制备铁:碳比例为 80:20 的载体颗粒。在吸附溶液中让颗粒吸附不同浓度的各种药物, 以确定下述每种化合物的吸附曲线和吸附常数:

A.反义寡聚核苷酸

用于反义基因指导治疗的 16-mer 抗-C-Myc 寡聚核苷酸是在 5' 末端用荧光素标记的寡聚脱氧核苷酸全硫代磷酸酯 (Macromolecular Resources, Fort Collins, CO)。将该寡聚核苷酸溶于在 TE 缓冲液(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)中制成的吸附贮备液中。依据制造商的使用说明, 以 $1 \text{ AU}_{260} = 33 \mu\text{g}$ 寡聚核苷酸的假设测定该寡聚核苷酸在缓冲液中的浓度。使用标准曲线, 由荧光素荧光 (Exc. 495 nm, em. 549 nm) 确定未结合药物在吸附上清液中的浓度。

B.光敏剂

血卟啉二盐酸盐 (Sigma Chemical, USA, H-1875. Lot # 23H0879)



是用于肿瘤治疗的光敏剂。该化合物通过生物过程聚集在一些类型的肿瘤组织中。当暴露于光、例如通过激光提供的光下时，该化合物会经历化学变化过程，以产生对其所聚集在其中的细胞有毒性的氧的单线态。制备吸附贮备液，依据 G. Garbo 等人 Anal. Biochem. (分析生物化学) 151: 70-81, 1985 的方法，通过分光光度法测定药物浓度 ($\lambda_{403} = 327 \text{ mM}^{-1}$ ，在 1 N 盐酸中)，该文献引入本发明以作参考。在 1 N 盐酸吸附溶液中通过分光光度法测定未结合药物在吸附上清液中的浓度。用市售软件通过计算机分析确定的吸附方程是：在 403 nm 处， $C (\mu\text{g/ml}) = 0.0984A^2 + 1.85A$ 。

10 C. 抗炎剂

6-巯基嘌呤钠盐 (Dr. Gruber, Burroughs Wellcome, Lot # 7P2774 提供) 是抗炎剂。通过将含有该化合物的小瓶组分溶于 10 ml MilliQ 水中来制备吸附贮备液。通过分光光度法测定在吸附上清液中的药物浓度 (标准曲线：在 311 nm 处， $C (\mu\text{g/ml}) = 9.0 A - 0.035$ ， $R=0.0999$ ，在 0.9 % NaCl 中，用 NaOH 将 pH 调节至 10.4)。

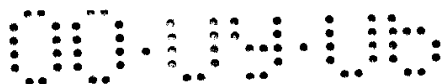
15 D. 抗真菌剂

两性霉素 B (Sigma Chemicals, A-4888, Lot 64H4005) 是用于抗真菌感染的治疗活性剂。在 0.9 % NaCl、10 mM KOH、pH 为 12 的溶液中制备贮备液，其浓度由修正为主要化合物含量 (80 %) 的药物重量得出。通过分光光度法测定吸附上清液中的药物浓度，获得了下述浓度曲线方程：在 403 nm， $C (\mu\text{g/ml}) = 3.61A^2 + 18.1 A + 0.14$ ， $R = 0.9997$ ，在 0.9 % NaCl、10 mM KOH 中。

20 E. 抗癌剂

喜树碱 (Sigma Chemical, C-9911, Lot # 34H0956) 是用于一些类型肿瘤治疗的抗增殖剂。通过把精确重量的药物溶于体积比为 1:1 (C/E 1:1) 的氯仿和乙醇混合物中，制得了浓度为 2 mg 喜树碱/ml 的贮备液。通过分光光度法测定吸附上清液中的药物浓度，获得了下述浓度曲线方程：在 360 nm， $C (\mu\text{g/ml}) = (16.7 \pm 0.26)A$ ，在 C/E 1:1 中。

还将喜树碱以 1 mg/ml 的浓度溶于 pH 为 3.0 的 DMSO 和 0.9 % 盐水溶液中。以 253 nm 处的吸光度测定浓度 ($\lambda_{\text{max}} = 253 \text{ nm}$ ，在盐水溶液中)。用 0.9 % 盐水溶液制备稀释液，加入 MTC 颗粒以确定 Langmuir



结合等温线。

将测定的吸附参数总结在下表 3 中：

表 3

药物	铁:碳比例	吸附介质	平衡时间 (hrs)	最大吸附 (% 载体重量)	吸附常数 (mg/ml) ⁻¹
寡聚核苷酸	80:20 K 型	TE 缓冲液	1	1.48 ± 0.10	(1.0 ± 2.1)10 ⁻²
寡聚核苷酸	80:20 K 型	HEPES-NS ¹	2	5.42 ± 0.34	(3.4 ± 2.3)10 ⁻²
血卟林	80:20 K 型	0.9%NaCl	1	5.97 ± 0.24	(3.0 ± 1.8)10 ⁻⁴
6 - Mp 巯基嘌呤	80:20 K 型	0.9%NaCl pH 10.4	2	11.0 ± 0.97	0.24 ± 0.064
两性霉素B	80:20 K 型	0.9%NaCl pH12(KOH)	24	10.4 ± 0.55	(1.1 ± 0.4)10 ⁻²
喜树碱	80:20 K 型	C/E 1:1	3	0 ²	--
喜树碱	75:25 K 型	盐水溶液	0.5	11	521

¹0.15M NaCl, 20mM HEPES-Na, pH 7.4

5 ² 在检测限之下

表 3 中的结果表明，药物在载体颗粒上的结合量受吸附溶液或介质组成的明显影响。喜树碱是一种高度非极性分子。在高度非极性介质（氯仿/乙醇）中，药物不优先离开吸附介质以吸附到碳上。然而，在极性更强的吸附介质中，据信药物吸附到载体颗粒上是完全可能的。

10 影响药物在吸附介质中吸附到载体颗粒碳上的一个因素是药物和颗粒之间的疏水性范德华相互作用。或者，可通过蒸发技术将药物干燥到颗粒上，例如将紫杉醇（PAC）吸附到颗粒上。

实施例 5

15 用于吸附紫杉醇（PAC）的载体颗粒具有 70:30 的铁:碳组分。所述碳是 E 型活性炭。为了分析测定铁含量，采用下述方法。称重一部分样品（预先在真空干燥器中干燥过），并在 2000℃ 洗涤，以氧化所

有存在的碳和铁。在该处理过程中，碳定量地转化成了二氧化碳并挥发了，剩余的是 Fe_2O_3 残余物。假定最初不存在任何 Fe_2O_3 ，通过公式 $\text{Fe} = \text{Fe}_2\text{O}_3 / 1.42977$ 计算铁含量。假定碳是剩余部分。用 LECO 碳燃烧分析仪对另一部分样品进行第二分析。将样品燃烧，然后测定二氧化碳的量，并计算碳总含量。通过这两种方法计算铁和碳含量，获得了可比结果，即颗粒中含有约 69% 重量的铁元素。

A. 紫杉醇对复合颗粒的结合特性

用两种方法测定药物吸附：1) 先通过 UV 分光光度法测定结合到不同活性炭上的药物。自始至终使用 HPLC (高压液相色谱) 或分光光度级的溶剂。在乙醇中测定的 λ_{max} 是 220 nm。使用具有 3 mL 石英比色杯的 Milton Roy Spectronic 21 分光光度计。选择 254 nm 波长进行 UV 分析，因为该波长能对药物提供良好灵敏度。在该波长几乎未发现或未发生各种分析技术或材料有的污染。HPLC 分析使用同一波长。对于紫杉醇，在 0.05 - 3.0 mg/ml 之间 UV 分析是线性的。

在一个测试中，载体颗粒含有 KB 型碳。其具有小的孔径 (约 40 nm 有效半径)、 $> 1000 \text{ cm}^2/\text{gm}$ 的表面积、和良好硬度。然而，PAC 吸附能力是有限的。测定 20 种其它候选活性炭，最后选择了 3 种预示有药物递送特性的活性炭，即 A、B 和 E 型碳。也测定了单独的铁粉。这些材料都是在含柠檬酸的乙醇中以 30 mg 的浓度使用的。对于 3 mg PAC，通过 UV 方法分析给出了下述结合结果。A 型碳 = 74%，B 型碳 = 65%，E 型碳 = 33%，铁粉 = 0% (没有结合)。A 型碳和 B 型碳都是具有与 E 型碳相同的药物释放特征的大孔、大表面积 ($1800 \text{ m}^2/\text{gm}$) 碳。E 型碳是具有较小表面积的硬度更大的碳，因此其具有更好的碾磨特性。

B. 紫杉醇对不同活性炭的结合特性

A、B 和 E 型活性炭的分数结合(fb) (结合量占最初 PAC 量的分数) 随碳量的增加而增加 (在固定 PAC 浓度下)。据显示，A 型和 B 型碳可以结合 100% PAC，并且在结合曲线中于高活性炭含量下出现平稳段。E 型碳的分数结合仅为 68%。据显示，结合能力 Q (以 % 重量/药物载体重量表示) 随活性炭量的增加而下降。对于 A 型碳，当碳的量从 40 mg 下降到 5 mg 时，结合能力 Q 从 8% 增加到 44%。对于 E 型 AC 碳，相应的 Q 值约为 5% - 7%。

置于一组包含颗粒的两个试管上，在对照组试管上不加任何磁场。在药物被磁保持的载体颗粒与没有施加磁场的载体颗粒之间，没有发现 PAC 释放特性有任何统计学意义上的不同（数据未显示）。

用不同量的 PAC 将吸附有 PAC 的载体颗粒和 E 型活性炭预附载。

- 5 在猪血清(4 ml)中于 37℃放置 72 小时后，用 5 ml 乙酸乙酯将游离 PAC 萃取一次。将乙酸乙酯萃取液分别在空气中干燥，重新配制在 5 ml 甲醇中，并经由 Millex GV 滤器过滤。随后进行的 HPLC 分析表明，对于载体颗粒，在 24 小时内和 72 小时后药物累积释放了平均 67%（介于 53% 和 86% 之间），对于 E 型碳，平均 64%。通过下述生物分析系统独立地验证了低水平释放的 PAC。

C. 磁场在流动物流中捕获载体颗粒

- 15 使用与 Senyei 等人 (J. Appl. Phys. (应用物理杂志) 49(6):3578, 1978) 所述相似的动力学流体流动循环模型，来评价在低(水)和高(35% 甘油)粘度下的流动流体中将载体颗粒或铁捕获、保持、和聚集所需的力和距离。使用甘油模拟血液粘度。用流量和管直径模拟静脉和动脉流量。用精密注射泵来获得校准流体流动。磁体是钕-铁-硼磁体 (2.4 × 3.5 cm)。用高斯计在离磁场表面不同距离处测定磁场。将磁体置于流出口上 5 cm 处，并水平地移入和移出，以捕获铁和载体颗粒。完全 (100%) 捕获或保持是本项实验的终点。将悬浮液形式的载体颗粒或铁粉通过注射器阀从距离泵注射器约 40 cm、且距离流出口 40 cm 处引入。在甘油中将铁或吸附有 PAC 的颗粒 100% 保持所需的磁场强度比在水中高约 10%。

- 25 用人鳞状癌细胞系 SCC-9 进行附载有 PAC 的载体颗粒的肿瘤细胞毒性生物分析。分别用下述物质培养 6 天后独立地测定细胞生存力：1) 紫杉醇，2) 附载有 PAC 的载体颗粒，3) E 型活性炭，4) 不含有药物的载体颗粒，和 5) 铁元素。该分析是 Mosmann's MTT 细胞毒性技术的轻微变型。该分光光度法分析测定了活细胞的线粒体将黄色四唑盐 3-[4,5-二甲基噻唑-2-基]2,5-二苯基四唑溴化物定量还原成其紫色甲簪衍生物。在这些实验中使用的载体的量是 0.5 - 117 g/ml。包括 DMSO (用于单独的紫杉醇) 在内，没有任何对照组对 SCC-9 有细胞毒性。

同时评价单独的长期 CF 克隆遗传分析。在该分析中，将细胞铺在 35 mm 培养皿上，并置于上述药物和对照中。将处理细胞培养 2 - 3 周，

以能形成菌落。将这些菌落固定在 2% 乙酸和 8% 乙醇中，并用结晶紫染色。将菌落在 Bella Glass Plate Reader 上计数。对于附载有紫杉醇的微载体，用于 CF 分析的 IC_{50} 是 1×10^{-2} g/mL，对于单独的紫杉醇， IC_{50} 是 3×10^{-3} g/mL。对于从载体颗粒中释放的 PAC 和单独的紫杉醇，在 500 和 1000 个铺展细胞时，通过 MTT 分析测得的 IC_{50} 相等，是 9×10^{-3} g/孔。测定药物或化学诱导的细胞毒性的 MTT 分析是“真正”细胞杀死的代用品。因此，使用菌落形成（CF）分析通常需要更多的药物来证实给定水平的细胞杀死。因此，剂量反应曲线转移到了更高浓度水平的紫杉醇上。

此外，在培养物肿瘤细胞上的不含药物的载体颗粒的磁场保留，没有发现任何不利作用。单独游离紫杉醇的 IC_{50} (5 ng/ml) 与使用或不使用磁铁从载体颗粒上释放的紫杉醇的 IC_{50} (5 ng/ml) 相等。在这两种情况中，在体外细胞毒性评价期间载体颗粒对细胞没有表现出任何不利作用。

这些结果表明，药理活性紫杉醇可从本发明载体上释放，吸附和释放的药物的化学分析可通过生物方法证实。从游离紫杉醇和从载体颗粒上释放的紫杉醇获得了类似剂量反应曲线。

如本说明书所述，用 A 型活性炭作为碳原料制备具有介于 95:5 - 45:55 之间的不同铁:碳比例的铁碳载体颗粒。将颗粒置于盐水-柠檬酸盐缓冲液(pH 7.4)中含有 0.67 mg/ml 阿霉素(Dox)的吸附溶液中培养，以确定具有不同组成的复合颗粒对 Dox 的结合能力和结合。下表 5 表示了这些实验的结果。

表 5

铁:碳比例	95:5	85:15	75:25	65:35	60:40	55:45	45:55
*结合能力	10.9%	12.2%	14.1%	15.6%	15.9%	15.8%	15.7%
** % 结合	69.0%	78.7%	89.4	99.5%	100%	100%	99.7%
堆积密度 (gm/cm ³)	1.39	0.90	0.46	0.48	0.49	0.48	0.62
平均大小 (μ)	0.73	0.80	0.74	0.74	0.76	0.71	0.82

*结合能力 = mg Dox/mg 载体颗粒%



**结合 = 4 mg Dox/25 mg 所加载体颗粒

表 5 中的数据表明了颗粒的铁:碳组成与其对药物的结合之间的关系。

实施例 6

5 进行其它实验以比较吸附溶液的组成对 Dox 在铁:碳比例介于 60:40 - 80:20 之间的载体颗粒上的结合的影响。配制下述 6 种测试吸附介质组合物, 以提供足够粘度将载体颗粒在吸附 Dox 期间保持实体分开。先将颗粒置于粘性剂中, 然后加入 Dox/盐水溶液。

1. 10% 甘露醇; 2% 羧甲基纤维素钠(CMC) (粘性介质); 2% 聚
10 乙烯吡咯烷酮 (在 50 mM 柠檬酸盐磷酸盐缓冲液中的 PVP)。

2. 5% 甘露醇; 2% CMC; 2% PVP, 在 50 mM 柠檬酸盐磷酸盐缓冲液中。

3. 5% 甘露醇; 2% CMC; 2% PVP; 5% 山梨醇, 在柠檬酸盐磷酸盐缓冲液中。

15 4. 10% 甘露醇; 1% CMC; 2% PVP (K15), 在 10 mM 磷酸钾缓冲液(pH 7.4)中。

5. 10% 甘露醇; 1% CMC 钠; 磷酸钾缓冲液(pH 7.4)。

6. 5% 山梨醇; 1% CMC 钠; 2% PVP (K15); 5% 甘露醇; 在磷酸钾缓冲液(pH 7.4)中。

20 用每一上述吸附介质进行的吸附实验表明, 使用上面第 4、5 和 6 组的制剂, 载体颗粒对 Dox 有最高吸附。

或者, 可先将颗粒与 Dox/盐水溶液混合, 然后再加入粘性剂。在该方法中, 10% 甘露醇和 5% CMC 提供了理想结果。

实施例 7

25 一些卟啉是用于光动力治疗肿瘤的光敏化合物。所谓的“第二代”光敏剂在 650 nm 波长处表现出主要吸附峰, 在美国、日本和欧洲, 有许多这类化合物正在进行临床试验。筛选出几类光敏剂用于对具有不同组成的铁:碳颗粒进行比较结合。使用在特定光敏剂激活波长 (通常是主要波长)附近的波长来定量测定药物。结果发现, 以 80 mcg/ml (0.11
30 mM) 浓度在磷酸盐缓冲盐水(PBS)pH 7.4 中的各种卟啉便于进行初始结合实验。测试的光敏剂是血卟啉衍生物 (HPD); 苯并卟啉衍生物单酸 A (BPD-ma); Photofrin porfimer sodium (PF2); 和 clorin e6。

对于结合实验, 10 mg 碳或 50 mg 铁:碳颗粒是最适的。这 4 种化合物的辛醇/缓冲液(pH 7.4)分配系数如下: HPD = 1; clorin e6 = 1.1; PF2 = 0.1; BPD-ma = 4000。

这些结合实验的结果总结在下表 6 中:

5

表 6

铁:碳比例	HPD %结合 mg/mg%	%	Clorin e6 %结合 mg/mg%	%	PF2 %结合 mg/mg%	%	BPD-ma %结合 mg/mg%	%
30:70E 型	0.4	37.0	0.7	68.8	0.08	7.2	0.25	23.0
30:70A 型	0.5	41.9	0.8	69.9	0.13	11.4	0.33	30.1

为了获得更高负载水平的 BPD-ma, 用 1.4 mM 在异丙醇 (含有 0.5 % 0.02 M 乙酸) 中的药物作为吸附介质, 采取 18 小时的长平衡时间, 测定 4 种原型铁碳颗粒载体 (MTCs, 或磁靶向化合物) 对该药物的结合能力和分数结合。如下表 7 所示, 通过该技术, 将药物的初始浓度增加 10 倍以后, 结合能力提高了 30 倍。

10

表 7

BPD-ma 结合和释放的总汇

碳类型	A MTC26.2	A MTC15.1	E MTC5241	E MTC5273
铁: 碳比例	70:30	60:40	70:30	60:40
结合能力(mg/mg%)	9.5	13.9	11.0	11.7
分数结合%	43.5	63.5	53.6	57.7
%释放(mg/mg 结合的)	54.7	13.7	9.1	7.9

15

这些结果表明, 在结合能力和所用药物总量的分数结合方面, 使用 A 型碳、且铁:碳比例为 60:40 的载体颗粒 (MTC 15.1) 与其它测试颗粒显著不同。当使用磁场来帮助把未结合的 BPD-ma 从每一载体上洗掉时, MTC 15.1 载体颗粒没有给出其它溶液所给出的澄清溶液。据假定, 在结合过程中, 有大量碳从颗粒表面上释放了出来。与之相反, 使用 A 型碳、且铁:碳比例为 70:30 的载体颗粒 (MTC 26.2) 比其它测

20

试载体颗粒更有效地去掉了未结合的 BPD-ma，同时保持了良好水平的初始吸附。

实施例 8

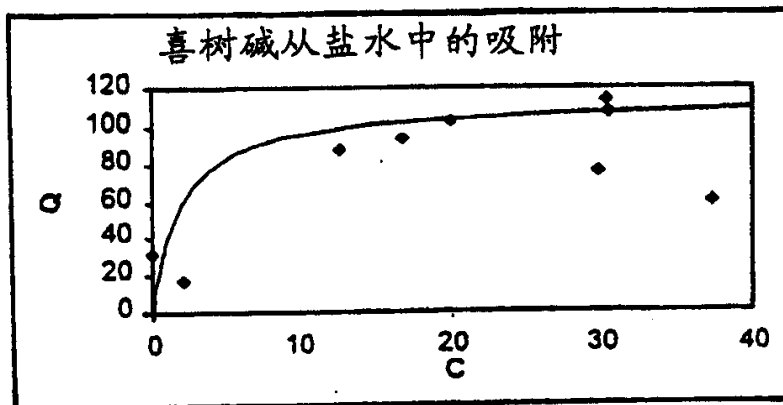
在一种灭菌技术中，可用 γ 放射将颗粒在玻璃瓶中灭菌。在该系统中，用发自钴放射源的 2.5 - 3.5 Mrad γ 射线把至少 1000 个小瓶同时灭菌。例如，可以以该方式把批量颗粒 0198（用 A 型碳制得的）和 0498（用 KB 型碳制得的）灭菌。灭菌后分别进行测试，发现颗粒保留了所有制备的特性，例如粒径分布和阿霉素结合能力。相类似的是，可将赋形剂水溶液通过在 121℃ 用高压灭菌器处理 30 分钟来灭菌。例如，将批量 0398（100 ml/瓶）和批量 0598（20 ml/瓶）以这种方式灭菌。灭菌后分别进行测试，发现保留了所有制备的特性，例如能在适于对人给药的载体中将颗粒悬浮。

实施例 9

已经表明喜树碱能结合到用 K 型碳制备的、且铁:碳重量比为 75:25 的 MTC 颗粒上。喜树碱可从 0.9% 盐水溶液或 10% 乳糖溶液中结合到颗粒上，但是优选从盐水中结合。下图表示的是在一定范围溶液浓度下的结合，并表明从盐水中的最大结合能力为大约 110 $\mu\text{g}/\text{mg}$ MTC（11%）。

表 8

喜树碱从盐水中的吸附



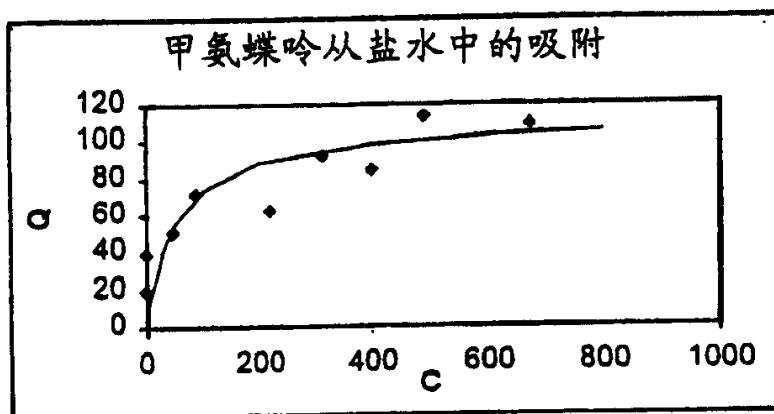
喜树碱有两种市售衍生物，托泊替堪和伊立替康，正在进行临床试验的第三种化学衍生物称为氨基喜树碱。这些衍生物是对喜树碱分子作了较小化学改变。这些和其它化学衍生物应当也能结合。

实施例 10

5 已经表明甲氨蝶呤能结合到用 K 型碳制备的、且铁:碳重量比为 75:25 的 MTC 颗粒上。甲氨蝶呤可从 0.9% 盐水溶液或 10% 乳糖溶液中结合到颗粒上，但是优选从盐水中结合。下图表示的是在一定范围溶液浓度下的结合，并表明从盐水中的最大结合能力为大约 100 $\mu\text{g}/\text{mg}$ MTC (10%)。

表 9

甲氨蝶呤从盐水中的吸附



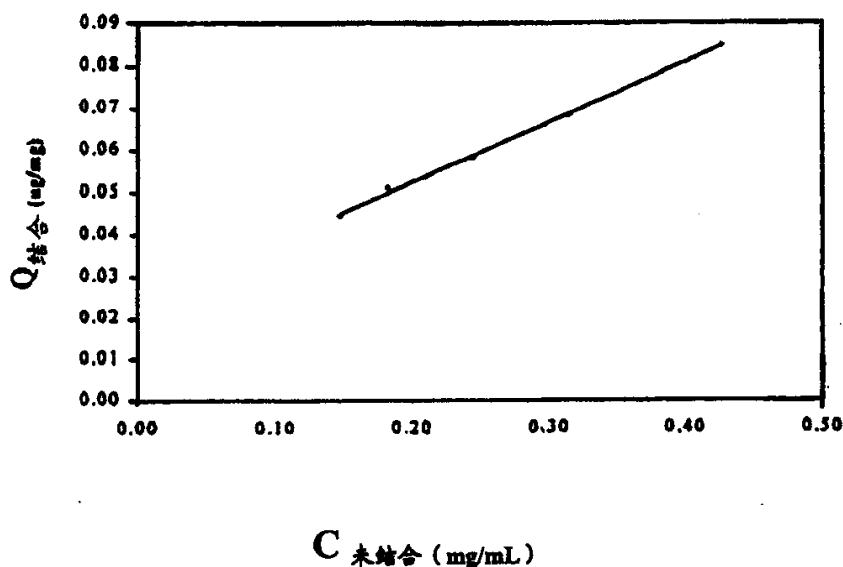
15 甲氨蝶呤有一种化学衍生物，氨基蝶呤，该衍生物是对甲氨蝶呤分子作了较小化学改变。这些和其它化学衍生物应当也能结合。甲氨蝶呤属于叶酸拮抗剂类分子。这些分子干扰叶酸在癌细胞中的合成。叶酸拮抗剂在结构上是类似的，因为它们的作用方式需要它们结合并抑制特定酶的作用。叶酸拮抗剂的实例有 pyritrexin、10-乙基-10-去氮杂氨基蝶呤、曲美沙特、5,10-去氮杂-10-炔丙基叶酸、和 5,10-二去氮杂四氢叶酸盐。
20 这些和其它叶酸拮抗剂应当也能结合。

实施例 11

已经表明紫杉醇能结合到用 K 型碳制备的、且铁:碳重量比为 75:25 的 MTC 颗粒上。紫杉醇可从乙醇或 cremaphor EL 制剂中结合到颗粒上，但是优选从柠檬酸盐缓冲水乙醇混合物中结合。下图表示的是在

一定范围溶液浓度下的结合, 并表明从柠檬酸盐缓冲水乙醇混合物中的最大结合能力为大约 $160 \mu\text{g}/\text{mg}$ MTC (16%)。结合延伸到 0% - 16% 之间的所有浓度。

表 10
Langmuir 等温线
Darco KB



紫杉醇已经结合到由其它 3 种碳组成的颗粒上。在每种颗粒中观测到的最大结合如下表所示:

表 11

碳类型	最大结合 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
A	190
B	174
E	82
KB	160

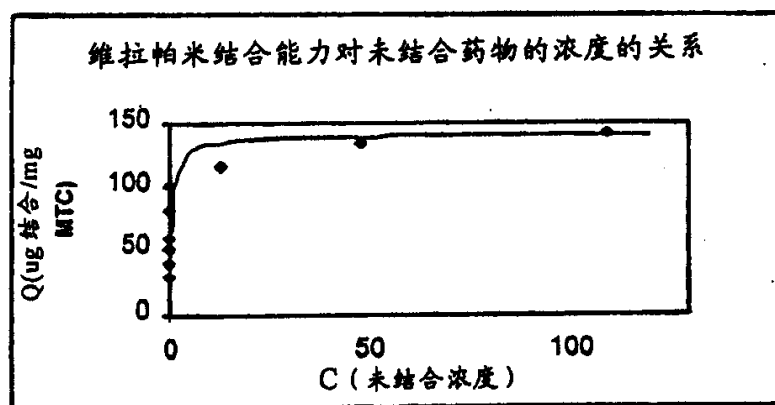
紫杉醇是紫杉醇(taxol)的化学衍生物, 紫杉醇(taxol)有另一种化学衍生物—taxotere。存在其它紫杉醇(taxol)衍生物 (大多数是半合成得到的), 杉醇(taxol)和紫杉醇有类似的结构。这些衍生物是对紫杉醇(taxol)分子作了较小化学改变。这些和其它化学衍生物应当也能结合。

实施例 12

已经表明维拉帕米能结合到用 K 型碳制备的、且铁:碳重量比为 75:25 的 MTC 颗粒上。维拉帕米可从乳糖或盐水溶液中结合到颗粒上，但是
5 优选从盐水中结合。下图表示的是在一定范围溶液浓度下的结合，并表明从盐水中的最大结合能力为大约 140 $\mu\text{g}/\text{mg}$ MTC (14%)。结合延伸到 0% - 14% 之间的所有浓度。

表 12

维拉帕米结合能力对未结合药物的浓度的关系



C (未结合浓度)

实施例 13

制备铁碳颗粒，并吸附阿霉素以制备 0.4 mg/ml 阿霉素和 5.0 mg/ml 载体的所得剂量溶液。对 Yorkshire 驯养猪的肝脏动脉选择性地插入导管以给药。每 10 - 30 分钟给动物进行 3 - 6 脉冲的输注，以给予 14.2 - 18
20 mg 累积剂量的阿霉素。在输注期以及输注后 15 - 30 分钟期间放置外置磁体。将动物评价 28 天，然后处死。病理组织学评价表明，每 15 分钟在 7.5 ml 输注循环中给予的 18 mg 阿霉素是最大耐受剂量。该测定主要是基于肝脏坏死和肝门区域发生改变作出的。

说明书附图



图 1

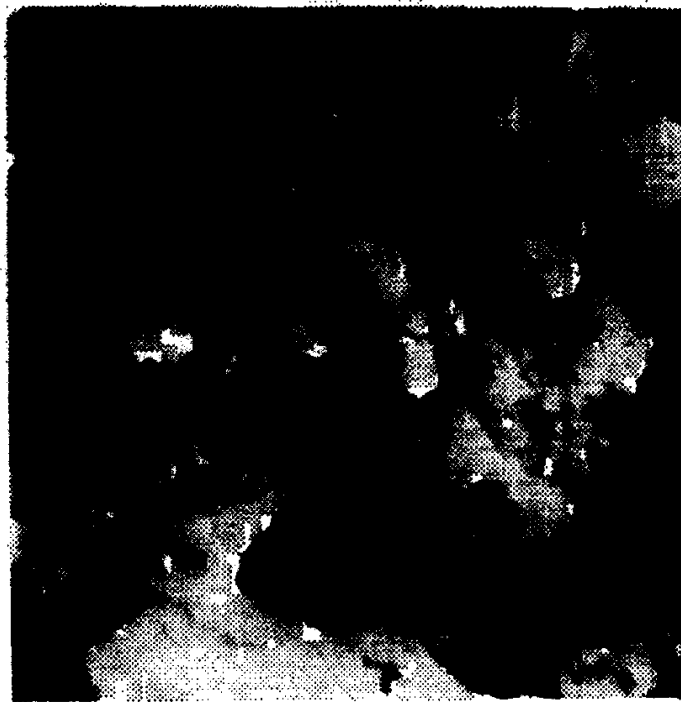


图 2a

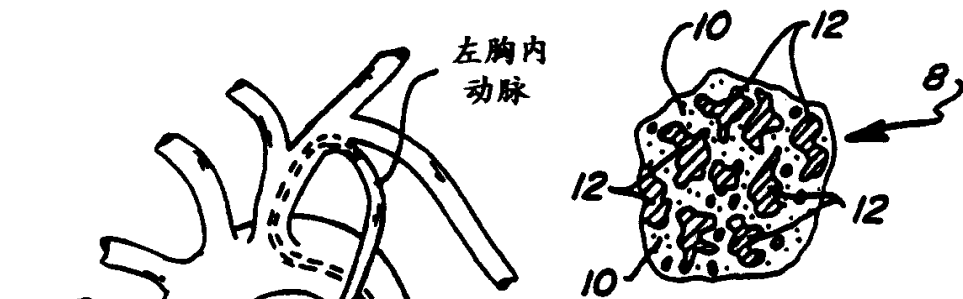


图 2b

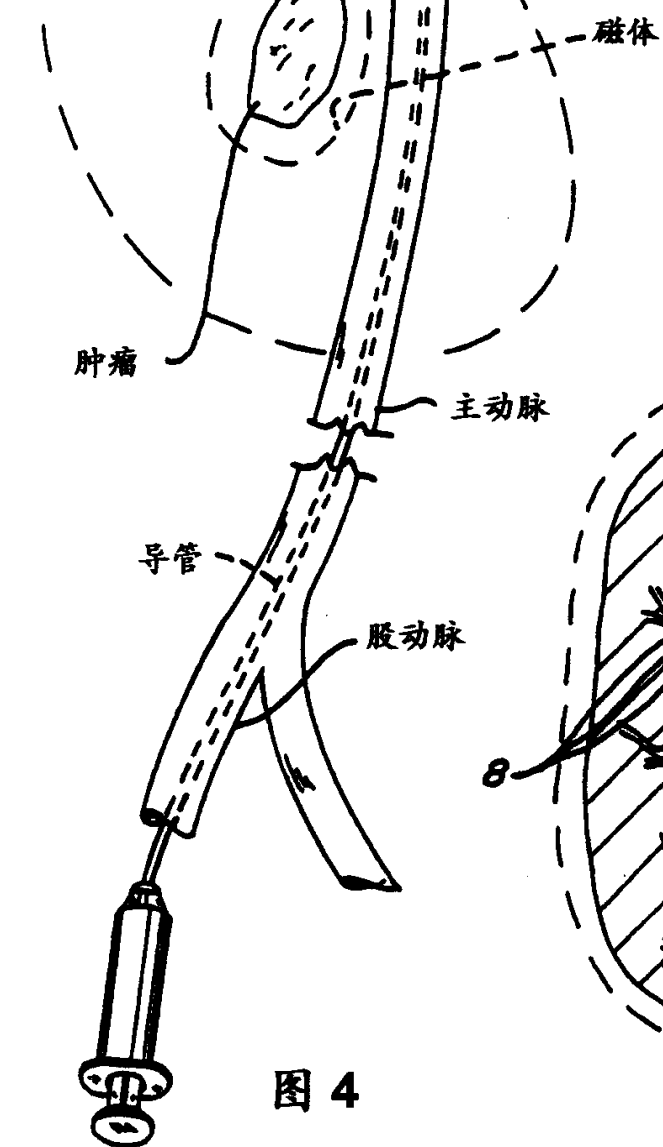


图 4

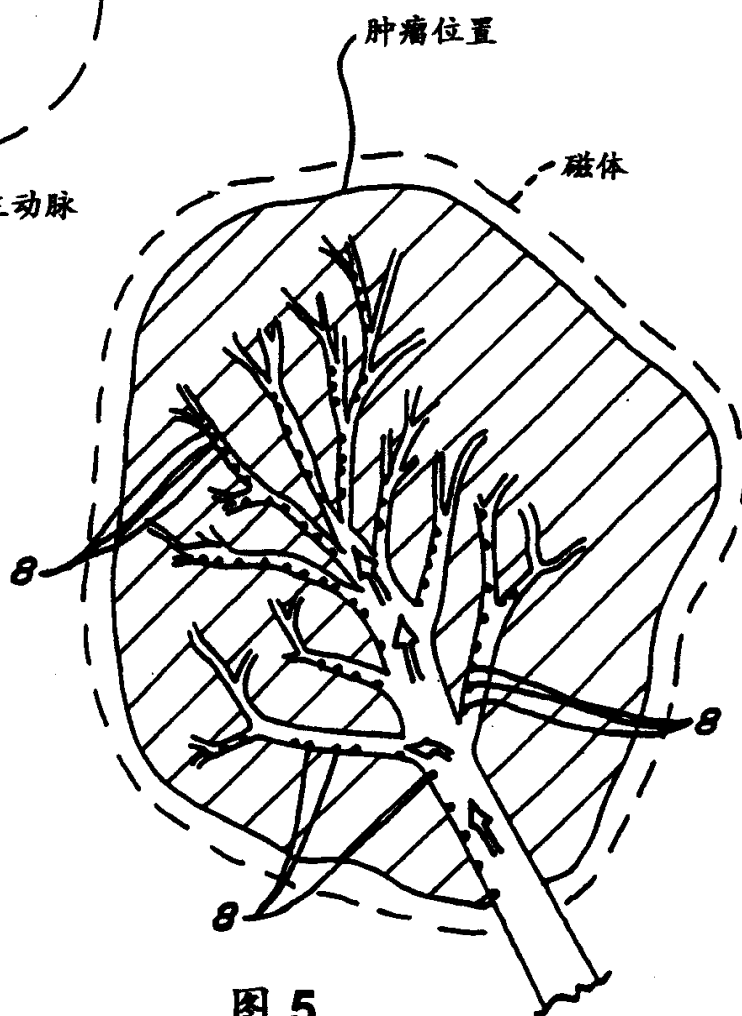


图 5

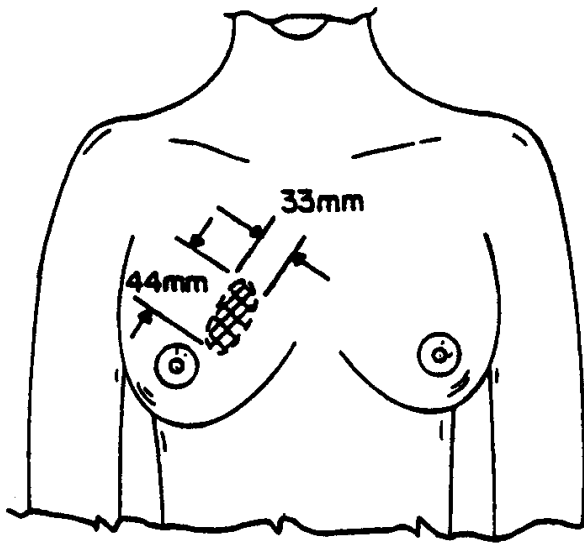


图 3a

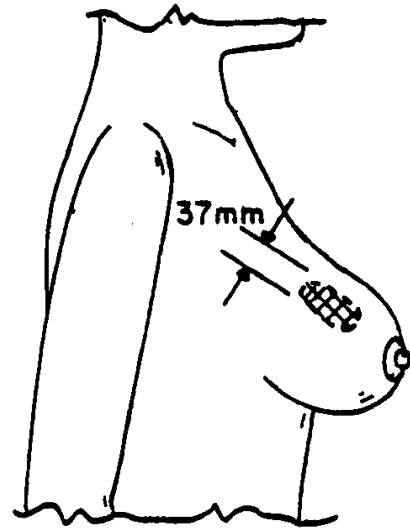


图 3b

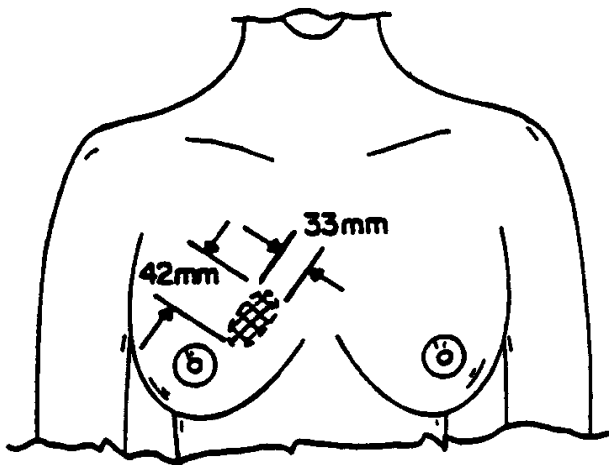


图 3c

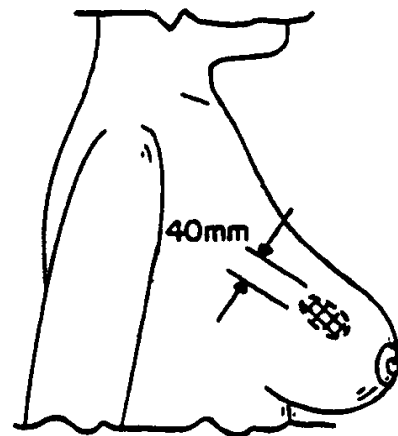


图 3d

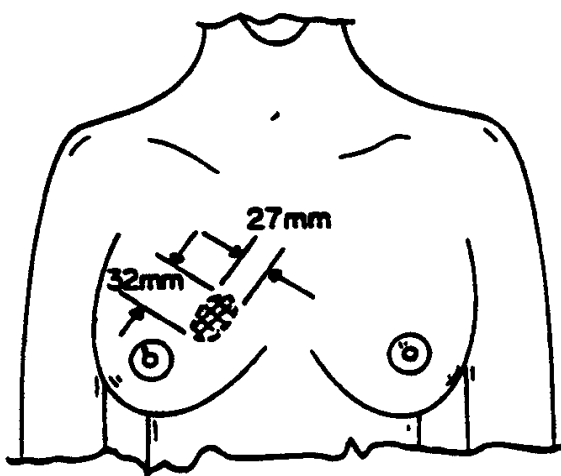


图 3e

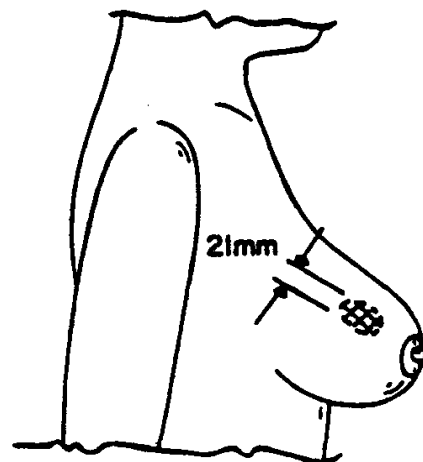


图 3f

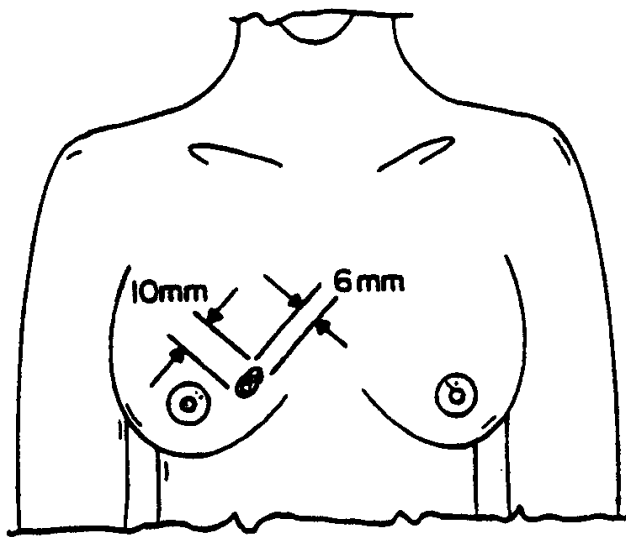


图 3g

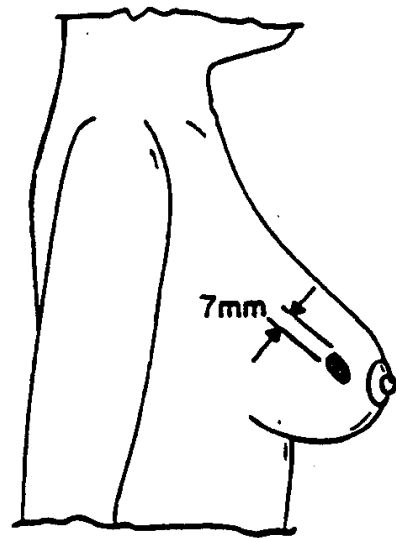


图 3h

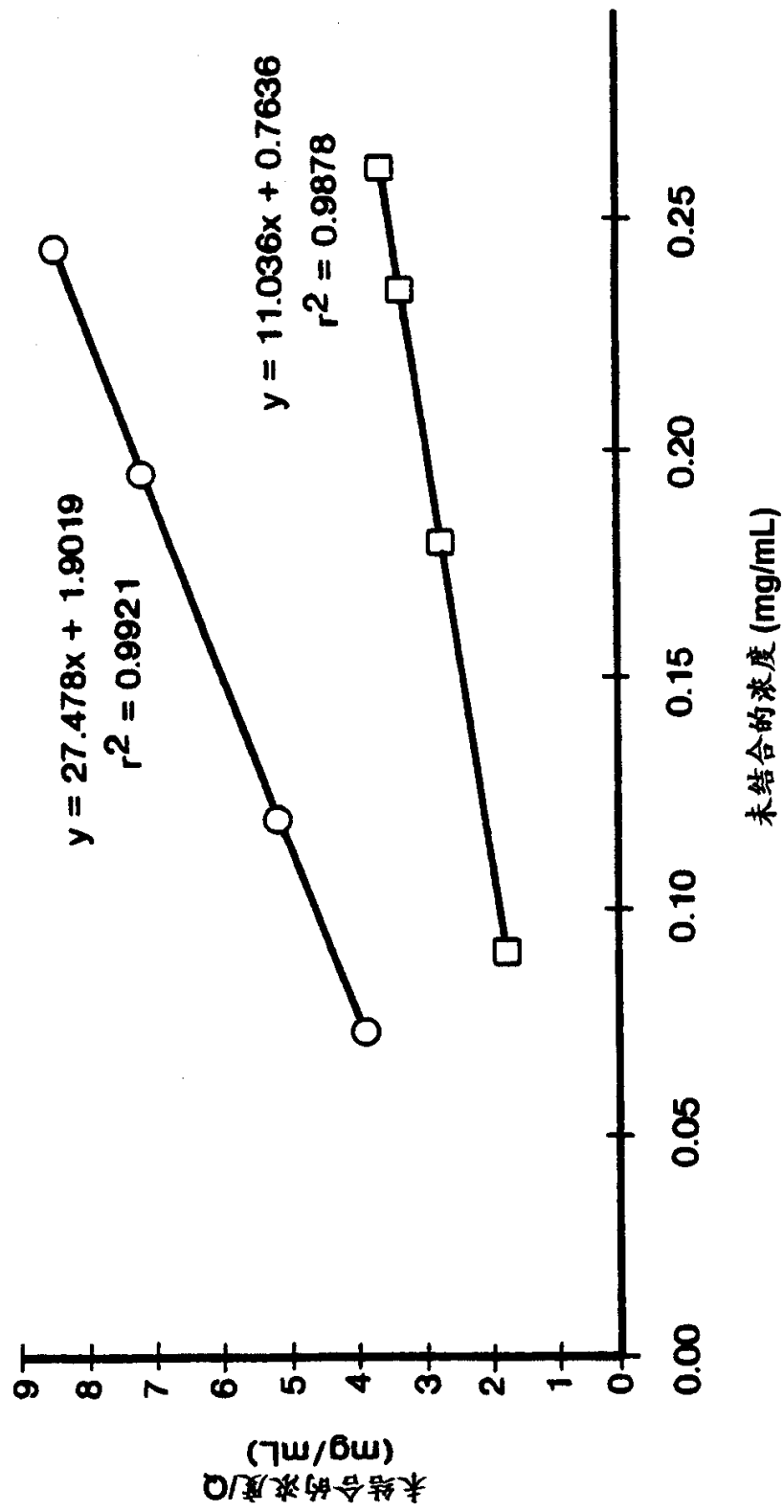


图 6