

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁶

A61K 49/00

A61K 9/51

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 97192723.5

[43]公开日 1999年3月31日

[11]公开号 CN 1212629A

[22]申请日 97.1.9 [21]申请号 97192723.5

[30]优先权

[32]96.1.10 [33]GB [31]9600427.0

[32]96.10.15 [33]US [31]08/729,836

[86]国际申请 PCT/GB97/00067 97.1.9

[87]国际公布 WO97/25073 英 97.7.17

[85]进入国家阶段日期 98.8.31

[71]申请人 耐克麦德英梅金公司

地址 挪威奥斯陆

[72]发明人 沃尔夫冈·冈瑟 肯尼斯·凯勒

丹尼斯·K·富吉伊 维纳·达萨

克里斯托弗·布莱克 马歇尔·毕勃

珍妮弗·韦伦斯 安妮·K·费尔维克

安妮·内维斯塔德 乔治·纳

巴巴拉·苑 杰克·史蒂文斯

布赖恩·威克利 托格里姆·恩格尔

迈克尔·盖赛克 戴维·L·拉德

贾斯比·辛 爱德华·R·培根

格雷戈里·L·麦克英泰尔

[74]专利代理机构 柳沈知识产权律师事务所

代理人 黄益芬

权利要求书 3 页 说明书 37 页 附图页数 1 页

[54]发明名称 造影剂

[57]摘要

本发明涉及含复合的纳诺颗粒的 MR 造影剂,优选包含具有涂层的超顺磁氧化铁芯,该涂层含氧化裂解的淀粉涂料和含或不含起延长血液停留作用的官能化聚氧化亚烃。

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 一种生产复合磁性颗粒的方法, 所述方法包括:
 - (i) 在含亲水性支化有机聚合物的水介质内形成磁性颗粒; 和
 - (ii)使所述聚合物裂解以释放复合颗粒。
2. 如权利要求 1 的方法, 其中所述介质为凝胶。
3. 如权利要求 2 的方法, 其中所述凝胶含阴离子位点。
4. 如权利要求 1 的方法, 其中所述磁性颗粒为氧化铁颗粒。
5. 如权利要求 1 的方法, 其中所述所述颗粒为超顺磁性的。
6. 如权利要求 1 的方法, 其中所述支化聚合物为淀粉。
7. 如权利要求 1 的方法, 其中所述聚合物为氧化裂解的。
8. 如权利要求 1 的方法, 其中所述聚合物的裂解是通过处理在所述聚合物基体内包括的多个所述磁性颗粒进行。
9. 如权利要求 1 的方法, 其中对所述复合颗粒进一步处理使其上涂布亲水性延长血液停留的聚合物。
10. 如权利要求 1 的方法, 其中所述亲水性延长血液停留的聚合物在步骤(ii)之前存在于所述介质中。
11. 如权利要求 9 和 10 任何一项的方法, 其中所述延长血液停留的聚合物为官能化的聚氧化亚烃。
12. 如权利要求 1 的方法, 其中所述含水介质还含有线性聚合物。
13. 如权利要求 1 的方法, 其中所述聚合物在磁性颗粒-聚合物复合颗粒形成后发生裂解。
14. 如权利要求 1 的方法, 包括如下后续步骤:
 - (i) 将淀粉、亚铁盐和铁盐及碱在加热的水溶液中混合,
 - (ii) 非必要地将所述溶液冷却至 15 °C 以下使胶体凝固;
 - (iii) 将 pH 降低至 6.0-8.5, 该步骤非必要地在步骤(ii)之前进行;
 - (iv) 用氧化剂处理使淀粉裂解并释放所述颗粒;
 - (v) 洗涤并过滤释放的颗粒;
 - (vi) 非必要地将释放的颗粒与官能化的聚氧化亚烃衍生物反应使所述衍生物与所述颗粒结合; 和
 - (vii) 非必要地高压釜消毒释放的颗粒。
15. 如权利要求 1 的方法, 其中如此释放的大部分所述复合颗粒含单一

磁性颗粒。

16. 如权利要求 1 的方法, 其中所述裂解步骤(ii)按两个步骤进行, 第二个裂解步骤从磁性颗粒中除去基本上所有的所述聚合物, 所述第二个裂解步骤是在与磁性颗粒结合的稳定剂存在下或加入后进行的。

5 17. 如权利要求 1 的方法, 其中所述方法步骤(i)和(ii)在相同的反应器中进行。

18. 复合颗粒, 其平均颗粒粒度为 4 至 30 nm 并包括具有裂解的亲水性聚合物涂料的超顺磁无机核的颗粒。

19. 如权利要求 18 的颗粒, 其中所述涂料为氧化的碳水化合物。

10 20. 如权利要求 18 和 19 任何一项的颗粒, 其中所述涂料为裂解淀粉。

21. 如权利要求 18 的颗粒, 还包括亲水性延长血液停留的聚合物涂料。

22. 一种颗粒平均粒度为 4 至 30nm 的超顺磁无机芯粒的水悬浮液, 所述颗粒基本上无有机涂料并具有结合静电稳定剂的表面。

15 23. 如权利要求 22 的悬浮液, 其中所述试剂为低聚或多聚磷酸盐。

24. 如权利要求 18 的颗粒, 其总平均颗粒粒度为 4 至 30nm, 包括具有与芯粒表面结合的生物分布改性剂的超顺磁无机芯粒, 通过多个铁离子结合基团或通过低聚或多聚磷酸盐基团或与所述改性剂连接的磷酸盐基团进行结合。

20 25. 如权利要求 24 的颗粒, 其中所述生物分布改性剂包括聚氧化亚烃部分。

26. 如权利要求 24 和 25 任何一项的颗粒, 还包括裂解的亲水性聚合物涂料。

25 27. 如权利要求 18 至 26 任何一项的颗粒, 具有与芯粒表面结合的可在诊断成像方法中检测的报道基团。

28. 如权利要求 27 的颗粒, 具有与芯粒表面结合的碘化有机磷酸盐。

29. 一种可注射的复合颗粒试剂, 含有无机粒芯, 其表面有化学或物理结合的亲水性延长血液停留的聚合物和具有屏蔽结合点的亲水性有机聚合物涂料。

30 30. 如权利要求 29 的试剂, 其中所述屏蔽聚合物涂料为裂解的支化碳水化合物化合物。

31. 如权利要求 29 和 30 任何一项的试剂, 其中所述亲水性延长血液停留的聚合物为官能化的聚氧化亚烃。
32. 一种诊断组合物, 包括根据权利要求 1 至 31 任一项的颗粒或其方法所生产的颗粒和至少一种生理上可接受的载体或赋形剂。
- 5 33. 一种造影介质组合物, 包括造影有效量的含超顺磁金属氧化物芯晶体和有机涂层的复合颗粒, 所述芯晶体平均直径为 2 至 10 nm, 所述颗粒平均直径至多 30 nm, 所述涂层包括氧化裂解的淀粉。
34. 如权利要求 33 的组合物, 其中所述涂层包括官能化的聚氧化亚烃。
- 10 35. 如权利要求 33 和 34 任何一项的组合物, 其中所述芯晶体具有平均直径 4 至 8 nm, 所述颗粒具有平均直径至多 15nm。
36. 一种使人体或动物体产生对比增强影像的方法, 所述方法包括给所述人体或动物体使用权利要求 32 至 35 任何一项的组合物, 并使其中分布所述试剂的人体或动物体的至少部分产生影像。
- 15 37. 一种测定造影剂在人体或动物体内分布的方法, 所述方法包括给所述人体或动物体使用权利要求 32 至 35 任何一项的组合物, 并检测由所述颗粒放射或改性的来自所述人体或动物体的信号。
38. 权利要求 1 至 31 任何一项的或其方法所生产的复合磁性颗粒用于制造诊断造影剂组合物的用途, 所述组合物用于对服用了所述组合物的人体
- 20 或动物体进行诊断的方法中。

说明书

造影剂

5 发明领域

本发明涉及超级顺磁颗粒造影剂,特别是用于磁共振成像(尤其是血管磁共振成像)的造影剂,还涉及它们的制备。

发明背景

在诊断成像方法中,如 X-射线和磁共振(MR)成像中,使用造影剂以增强不同组织或器官之间或健康与损伤组织之间的对比,是非常成熟的技术。对于不同成像模式,通过造影剂以不同的方式增强对比。因此,(例如)在质子 MR 成像中,造影剂通过改变成像核子(通常为水质子)的特征弛豫时间(T_1 和 T_2)达到其对比强化效果,获得用于生成影像的 MR 信号。

当具有磁性如顺磁性、超顺磁性、铁磁性和亚铁磁性的物质注射入活体中时,会造成组织中水质子的 T_1 和 T_2 (或 T_2^*)值降低,尽管 T_1 降低在 T_2 (或 T_2^*)不降低时不会出现,但 T_1 部分的降低与 T_2 (或 T_2^*)部分的降低不同。若 T_1 的降低部分大于 T_2 (或 T_2^*)的降低部分,则 MR 成像的强度增加,该材料称为 T_1 造影剂,或正造影剂。若 T_1 的降低部分低于 T_2 (或 T_2^*)的降低部分,则 MR 成像的强度降低,该物质称为 T_2 造影剂,或负造影剂。

具有顺磁性、超顺磁性、亚铁磁性和铁磁性的颗粒以下称为磁性颗粒。

在文献中第一个提出使用磁性材料作为 MR 造影剂是 1978 年由 Labuterbur 提出的,该文献提出可以使用锰盐作为造影剂。在专利文献中 Schering 在 EP-A-71564(和其同族专利 US-A-4647447)中第一个提出可以使用顺磁金属离子(如镧系离子 Gd(III))的螯合配合物。

早期用于 MR 成像的市售造影剂如购自 Schering、Nycomed 和 Bracco 的 GdDTPA、GdDTPA-BMA 和 GdHP-D03A(商标为 MAGNEVIST、OMNISCAN 和 PROHANCE)都是顺磁性镧系离子的可溶性螯合配合物,并用作增强其分布区域的影像强度的正造影剂。

此后,提出将铁磁性、高铁磁性和超顺磁性颗粒剂用作负 MR 造影剂。这些颗粒试剂的口服制剂(以下通常称为磁性颗粒)已是市场上可获得的用于消化道成像的制剂,例如购自 Nycomed Imaging 的产品 ABDOSCAN。然而,

这些颗粒试剂的非肠胃给药已被建议广泛用于肝和脾成像，因为这些器官起到从血液中相当快地除去外来颗粒物质的作用。例如，Widder 在 US-A-4859210 中提出用这些试剂进行肝和脾成像。

5 例如，最近 Pilgrim 在 US-A-5160725 和 WO/21240 中建议，可阻止网状内皮系统从血液中摄取非肠胃给药的磁性颗粒，从而通过将稳定剂物质化学键合到磁性颗粒表面使血液停留时间延长。

可按此方式用作稳定剂的物质的例子包括碳水化合物如低聚糖或多糖，以及聚氨基酸、寡核苷酸和多核苷酸、和聚氧化亚烃(包括聚羟体(poloxamers)和聚羟胺体(poloxamine))，以及由 Pilgrim 在 US-A-5160725 和
10 WO-94/21240 中、由 Nycomed 在 PCT/GB94/02097 中、由 Bracco 在 US-A-5464696 中和由 Illum 在 US-A-4904479 中提出的其它物质。

用这种方式涂布的磁性颗粒可用作血池剂(即用于血管成像)或用于淋巴结成像，或它们还可与生物目标试剂缀合并用于目标组织或器官成像。

当作为血池剂给药时，已发现若使用磁性颗粒，血质子的 T_1 部分降低可
15 大于 T_2 (或 T_2^*)部分降低，因此这些试剂可用作血管成像的正 MR 试剂。

对于非肠胃给药，复合物颗粒的粒度和粒度分布及整个颗粒的表面化学性质对于确定对比生成的效率、血液半衰期以及造影剂的生物分布和生物降解都是非常重要的。理想的是颗粒粒度(即磁性物质的晶粒大小)在单一区域
20 结构大小范围内(该颗粒为超顺磁性，因此无滞后性并具有降低附聚的趋势)，且总颗粒粒度分布窄，这样该颗粒具有均匀的生物分布、生物消除和对比作用。优选的是该磁性颗粒的表面应当涂有一种物质用以改善颗粒的生物分布(即通过延长血液半衰期、或通过提高稳定性)或起到导向介质的作用，使导向位点(如肿瘤点)具有最优的分布。

磁性的核心物质的平均晶体粒度通常应为 1 至 50 nm，优选 1 至 20 nm，
25 特别优选 2 至 15 nm。对于用作血池剂，包括任何涂布物质的平均总颗粒粒度优选应低于 30 nm(颗粒粒度可通过电子显微镜测定)。生产具有如此粒度的超顺磁晶体或复合物颗粒本身实际上不存在问题。但是，生产具有所需粒度、可接受的粒度分布且无过多的晶体附聚的颗粒的确存在问题，本发明的一个方面就是涉及解决这些问题。

30 磁性晶体的生产方法通常是通过在聚合物涂布试剂的溶液中进行液相沉淀(例如采用共沉淀技术，如 Molday 在 US-A-4452773 中描述的)。该技术

结果生产出的颗粒是相对多分散性的，这些颗粒随后需要(例如)通过离心或色谱法进行颗粒大小的分级。例如，高磁性的产品 AQMI 227 就是通过该技术生产的。

5 我们现在已发现，生产具有特别好性能的磁性颗粒，可通过在含支化聚合物的水介质中沉淀，然后使聚合物裂解释放出包括磁性颗粒和被裂解聚合物涂层的复合颗粒。

发明概述

本发明一方面提供用于生产复合磁性颗粒的方法，所述方法包括：

10 在含亲水性支化有机聚合物的水介质内形成磁性颗粒，优选超顺磁颗粒；和

使所述聚合物裂解以释放所述的复合颗粒，优选主要是单一的磁性颗粒。

附图的简要描述

15 图 1、2 和 3 显示对兔子使用本发明造影剂的强化前和强化后的 T_1 加权 MR 影像。

发明详细描述

20 用于本发明方法的亲水性支化有机聚合物可以是任何的天然、合成或半合成支化聚合物，并且(若需要)可通过对线性亲水聚合物接枝或交联来生产。

如果支化的亲水聚合物是大范围交联的聚合物，则本发明方法中的聚合物裂解将使交联聚合物母体破碎。因此，优选的是该交联键在不造成磁性颗粒显著降解的条件下应当易发生化学或生化裂解。因此，形成酯交联的水凝胶聚合物(例如通过交联带有羟基的聚合物，如线性碳水化合物(如葡聚糖)或聚乙醇)特别适合被选择作为这些交联聚合物。若需要，可适当地替换该聚合物以对酯裂解速率进行控制。关于酯裂解方面，可通过碱处理进行，例如用氨或碱金属氢氧化物处理。

30 尽管如此，在本发明方法中，亲水性支化聚合物特别优选为天然、合成或半合成碳水化合物，尤其是能够形成水凝胶的物质，更优选多糖物质，如糖元，或进一步更优选淀粉。若需要，在本发明方法中，可以使用亲水性聚合物的混合物，所述聚合物中至少一种为支化的。当淀粉用作聚合物时，它

可为天然淀粉或加工过的淀粉，例如酸处理、酶处理或加溶淀粉。天然淀粉，特别是植物衍生的淀粉如玉米、土豆、稻米或小麦淀粉是特别优选的。

天然淀粉是一般的线性直链淀粉和支化的支链淀粉多糖的混合物。为实施本发明，尽管含有直链淀粉是可接受的，但含量最好不要太高，因为这会使其变稠，即从分散状态不可逆地大量转化为基本上不可溶的微晶状态。因此，使用富支链的土豆淀粉优于玉米或小麦淀粉。

当本发明使用的聚合物材料是受溶于水介质和在其中进行热处理影响的物质时，例如颗粒淀粉物质，首先溶胀和部分溶解，这种反应介质的热过程可影响最终产品的性质。在这些情况下，可优选一种能更好地控制介质的粘度和结构的热过程。因此，对于淀粉，优选的是例如通过在 60-95 °C 下形成水分散体，冷却至 5 至 80 °C (例如 5 至 60 °C)，然后再加热至 45-85 °C (例如 45-80 °C) 的方式，使该反应介质生成、冷却、然后再加热。按照这种方式，可使该沉淀介质达到有益的结构。

一般认为支化亲水性有机聚合物在反应介质中具有分散的沉淀种子形成点，由此形成均匀的沉淀小颗粒。使用非支化的亲水聚合物，如明胶或葡聚糖，或使用无机凝胶如硅胶是无效的。

亲水性聚合物的浓度应足以使沉淀介质在室温或环境温度下(例如 0 至 60 °C)下为凝胶形式。使用的浓度还应适合于在高达 80 °C 的温度下形成凝胶。对于淀粉，浓度优选为 1 至 200 g/L，更优选 2 至 150 g/L，特别优选 20 至 100 g/L，更特别优选 40 至 90 g/L。

当沉淀介质是水时，还可以含水和助溶剂(如水混溶性醇、醚或酮)的混合物。

如上所述，特别优选的是本发明使用的沉淀介质为胶体状态的物质，称为凝胶。在这样的介质中，形成聚合物凝胶的物质形成一种被含水分散介质互穿的网络。这种凝胶通常比水分散介质本身更粘，但对于本发明，为使其处于刚性或半刚性自支撑状态，该凝胶不需要太粘。实际上，凝胶结构非常弱，以致于可将该沉淀介质简单视为可自由流动的溶液。而对于这种情况，该介质的凝胶性能容易从其触变性能(即介质的粘度通过搅拌降低)得到证实。

尽管沉淀介质必须含上述支化聚合物，但它还可含其它(例如)形成凝胶的线性聚合物。用于此目的合适聚合物的例子包括蛋白质、多糖、蛋白多

糖和形成凝胶的表面活性剂，如聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物(Pluronic)和四聚醇胺(Tetronic)系列嵌段共聚物表面活性剂，如 F-127、F-108 和 F-68。这些表面活性剂在水介质中在适合本发明方法的高温和 pH 值下形成凝胶。

5 例如，胶体形式的沉淀介质可用形成凝胶的线性嵌段共聚物表面活性剂和支化有机聚合物如支链淀粉的水分散体制备。

然而，沉淀介质的凝胶基体应为这样的凝胶，即可使至少一种聚合物组分发生化学(或生化)裂解，释放磁性颗粒，该聚合物优选至少一种支化聚合物。因此，使用过度交联的聚合物是不合适的。

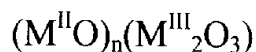
10 以刚性或半刚性凝胶形式的水介质可发生颗粒沉淀，例如用碱浸渍凝胶的介质。但最优选沉淀是在加热的、搅拌的水介质中发生，该水介质与水相比可以呈现或不呈现明显增强的粘度。特别优选的沉淀在 40 至 95 °C 温度下在轻微搅拌下发生。

通过控制含水沉淀介质的触变性能，可生产具有一定粒度范围的复合颗粒。

15 在本发明方法中磁性颗粒形成被认为可以分两步过程，其中首先形成无定形物质区域，然后例如在高温下，如在 40 至 95 °C，优选 50 至 93 °C 下转化为磁性颗粒。因此已发现，颗粒磁性的形成可控制在 1 分钟至 1 小时内，至多 3 小时内。然而实际上，已发现磁性形成在两小时内完成，并且在 20 分钟内明显发生磁化。

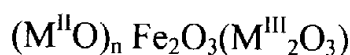
20 在水介质中形成的磁性颗粒可为任何可沉淀的磁性金属氧化物或氢氧化物，包括混合的金属化合物，例如在 US-A-4827945 (Groman)、EP-A-525189 (Meito Sangyo)、EP-A-580878 (BASF)和 PCT/GB94/02097 (Nycomed) 中或由 Pilgrimm (supra)讨论的化合物。对此特别提及如下通式的磁性氧化铁化合物：

25



其中 M^{II} 和 M^{III} 处于 II 或 III 价态的过渡金属或镧系金属，其中至少一个为 Fe，和 n 为 0 或正数，或尤其是如下通式的磁性氧化铁化合物：

30



其中 M^{II} 为二价金属, 如 Fe、Mg、Be、Mn、Zn、Co、Ba、Sr 和 Cu, M^{III} 为三价金属如 Al、Yb、Y、Mn、Cr 或镧系, n 和 m 各自为 0 或正数。

5 磁性颗粒优选的是通式 $(FeO)_n Fe_2O_3$ 的铁氧化物, 其中 n 为 0 至 1, (通常由磁赤铁矿($\gamma-Fe_2O_3$)或磁铁矿(Fe_3O_4)表示), 或是这些磁性铁氧化物的混合物。

许多种铁盐可用作 Fe^{III} 和 Fe^{II} 离子源, 所述铁盐的例子为 $FeCl_2$ 、 $FeCl_3$ 、柠檬酸 Fe^{III} 、葡糖酸 Fe^{II} 、 $FeSO_4$ 、 $Fe_2(SO_4)_3$ 、草酸 Fe^{II} 、 $Fe(NO_3)_3$ 、
10 乙酰丙酮酸 Fe^{II} 、硫酸乙酯二铵 Fe^{II} 、富马酸 Fe^{II} 、磷酸 Fe^{III} 、焦磷酸 Fe^{III} 、柠檬酸铵 Fe^{III} 、硫酸铵 Fe^{II} 、硫酸铵 Fe^{III} 和草酸铵 Fe^{II} 。 Fe^{II} 与 Fe^{III} 的比例优选应为 1:5 至 5:1。

沉淀的引发是通过设定水介质的 pH 高于沉淀引发临界值, 通常用加入碱的方法, 优选的碱是含水碱如碱金属氢氧化物(如氢氧化钠、氢氧化钾或氢氧化锂)或氢氧化铵, 特别优选浓氢氧化铵, 加入的碱的 pK_b 应足以使水介质的 pH 值高于沉淀引发临界值(例如达到 10 以上)。
15

优选将碱加入含金属离子和聚合物的水介质中。或者, 可将碱和聚合物合并, 然后加入金属离子。这些加料可方便地在高温, 如 40 至 95 $^{\circ}C$, 优选 50 至 60 $^{\circ}C$ 下搅拌混合这些组分的水溶液来进行。

20 人们认为沉淀开始后, 在由支化聚合物界定的金属离子或金属氢氧化物的无定形顺磁区域内形成种子磁性颗粒晶体, 并认为这些无定形区域转化为完全形成磁性颗粒。因此, 颗粒形成所需的时间可以选择数分钟至数天, 例如 1 分钟至 24 小时, 优选 20 分钟至 10 小时, 特别是 1 至 5 小时。

在温度趋于上述范围的上限(例如 90 $^{\circ}C$)时形成颗粒的情况下, 该介质优选在此高温下仅保持相当短的时间, 例如至多 2 小时。
25

若将碱、可沉淀的金属离子和聚合物在较低温度下混合, 然后将该介质加热至更高的温度以形成磁性颗粒, 则温度升高速率应小心控制在例如 10 - 100 $^{\circ}C$ /小时下。因此在颗粒形成期间, 对含水介质的温度升高速率要进行控制(例如, 温度升高基本上与时间呈线性关系), 例如在 2 小时内将混合温度
30 从 55 $^{\circ}C$ 升至最终温度 90 $^{\circ}C$ 。

在颗粒形成之后, 特别优选将反应介质中和以使其 pH 值变为例如 6.0-

8.5。例如，这可通过冷却介质以生产预定凝胶，可将该凝胶洗涤至中性，用酸(可接受的酸包括例如盐酸、硫酸和硝酸)或固体二氧化碳中和介质，或通过真空除去碱(若其具有高蒸气压，例如氢氧化铵)。中和后的介质可立即进一步处理。

- 5 对于此中和步骤，当已使介质形成预定的凝胶并用于除去过量的金属盐和碱时，洗涤是特别有效的。洗涤可方便地用优选预冷却至 3-15 °C 的去离子水进行，并优选连续进行直至 pH 变为大约中性。

10 由于可简单地超声处理洗涤过的凝胶使凝胶基体破碎而不使聚合物裂解，同时破碎释放的聚合物涂布的磁性颗粒，由于破坏聚合物分子结构使聚合物裂解释放出该涂布的颗粒，则该颗粒产品具有特别有利的性能。化学破坏可用活性化学试剂如氧化剂或碱进行，但也可用生化试剂(如酶)进行。对于碳水聚合物如淀粉，可用淀粉酶(如 α -淀粉酶)进行酶促裂解该聚合物。然而，用氧化剂进行聚合物裂解是特别优选的。痕量氧化剂本身是生物耐受的，或其还原产品是类似生物耐受的，所述氧化剂的例子是卤氧阴离子(如碱金属次氯酸盐(如次氯酸钠和次氯酸钙))、高碘酸盐(如高碘酸钠)、高锰酸盐(如 KMnO_4)、过氧化物(如 H_2O_2)、和酶氧化剂是优选的。使用的任何过量氧化剂优选随后(例如)通过加入尿素(当用次氯酸盐作为氧化剂时)失活。当用氧化剂进行聚合物裂解时，由此释放的磁性颗粒具有负表面电荷，因此进一步降低颗粒附聚。

- 20 用于聚合物裂解的化学试剂优选的应不是会腐蚀磁性颗粒或导致这些颗粒的磁性减弱的试剂。因此，使用酸性试剂是不合适的。

25 聚合物裂解的程度可按需要变化，以便将少量或大量的聚合物残余物作为颗粒上的涂料。还应注意的是，通常颗粒被包覆后，使复合颗粒的总颗粒粒度大于磁性颗粒核的粒度。根据选用的裂解技术，在颗粒上以涂料形式留下的残余物可以是聚合物、低聚物、或甚至单体。

聚合物裂解后，将产品优选膜过滤技术(如超滤或离析过滤)洗涤至无污染物。

30 所得总的颗粒粒度通常为 1 至 300 nm，优选 4 至 30 nm，特别优选 8 至 20 nm。在这种情况下可注意到，该聚合物的氧化裂解法与酶解方法相比能得到更小粒度的颗粒，同时这两种方法与简单的凝胶胶体超声处理相比，都得到更小的粒度。

在一个实施方案中，复合颗粒可用一釜反应法制备，该方法可降低总反应时间、免去中间体的制备和处理并降低磁性颗粒芯上的热应力。在本实施方案中，将 Fe^{III} 和 Fe^{II} 盐(例如氯化物)溶于淀粉-水溶液中并通过加入碱(例如氨水)使氧化铁颗粒沉淀。反应在70-90℃下进行1至3小时，然后降低过量的碱(例如，当使用氨时，用真空和/或用氮气清洗热反应混合物)。然后将pH降至8.2以下或降至反应混合物丧失其缓冲能力的pH值。然后在混合物仍热时(例如70-90℃)加入氧化剂(例如次氯酸钠)，并使氧化在70-90℃下进行，直至复合颗粒达到可接受的粒度。对于复合颗粒粒度10至20 nm，反应时间为约30至120分钟，在0.47特斯拉(tesla)和40℃时，磁饱和动量应适当高于50 EMU/g FeOx ， r_1 大于 $15 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ， r_2/r_1 小于2.3。然后将反应混合物用尿素淬灭并通过0.2 μm 过滤器过滤。然后通过离析过滤(例如用具有20至200 kD分子的UF膜)除去淀粉残余物。

磁性颗粒“芯”优选具有单一范围粒度的特性，该粒度例如1至50 nm，特别是1至20 nm，尤其是2至15 nm，最优选4至12 nm，实际上，在通过本发明方法生产的复合颗粒中，芯晶体一般基本上为单一粒度的，通常为4至12 nm。

本发明方法可用于生产具有足够窄粒度分布不必再进行粒度分级的复合颗粒(即裂解聚合物涂布的磁性颗粒)，例如，其中平均粒度至少90%的颗粒在10 nm内、优选5 nm内和特别优选2 nm内，通过光子相干谱测定。然而，这些颗粒通常通过相当大直径过滤器(如0.1至0.2 μm 过滤器)过滤，除去任何偶然出现的大聚合物部分或任何生物和颗粒污染物(颗粒度可通过电子显微镜测定)。

通过本发明方法生产的复合颗粒本身是新的，并形成本发明的另一方面。在该方面，本发明提供的复合颗粒(优选是带电颗粒)具有总平均颗粒粒度在4至30 nm，该颗粒包括具有裂解亲水性聚合物涂布的物质(优选氧化的碳水化合物，特别是裂解淀粉)的超顺磁无机芯粒。大部分复合颗粒优选含超顺磁单芯晶体。

在另一方面中，本发明提供的一种造影剂含有对比有效量的复合颗粒，所述复合颗粒包括超顺磁金属氧化物晶体芯和有机涂层，所述晶体芯的平均直径为2至10 nm，优选4至8 nm，所述颗粒的平均直径至多30 nm，优选至多15 nm，所述涂层包括氧化裂解淀粉，优选与官能化的聚氧化亚烃(如

磷氧化物末端的聚乙二醇，例如甲氧基 PEG 磷酸盐)并用。

5 本发明方法可按两个分离的阶段进行，其中首先制备复合颗粒，例如通过用于制备磁性淀粉微球(MSM)的常规共沉淀技术(例如，参见 Schorder WO89/03675)，然后将聚合物裂解产生本发明的复合颗粒。用这种方式处理的复合颗粒，每一颗粒都含许多磁性晶体，其中聚合裂解步骤通常起到释放涂布的单晶体的作用。这种方法构成本发明的再一方面。

10 对于某些应用，还需要从磁性颗粒中除去基本上所有裂解的聚合物涂料，并有可能用不同的表面改性剂取代。在这种情况下，可使用氧化剂(优选非离子氧化剂，如过氧化氢)或能够分解该裂解聚合物的酶(如淀粉酶)。使用离子氧化剂不十分优选，因为它们降低静电稳定性并促进磁性颗粒附聚，原因在于除去了空间稳定的裂解聚合物涂料。除去裂解聚合物之前，需要加入与磁性颗粒结合并使悬浮液具有静电稳定性的稳定剂，如静电稳定剂(例如二磷酸钠或三磷酸钠)。pH 应合适地维持中性或轻微碱性(例如，通过加入氢氧化钠)，因为酸性 pH 会因磷酸盐稳定剂的质子化而造成絮凝。已发现用二磷酸钠和过氧化氢在 50-60 °C 下将淀粉衍生的裂解聚合物涂布的磁性材料(通过下面的实施例方法生产)培养 3 至 24 小时，足以除去基本上所有的残余淀粉衍生的裂解聚合物涂料。所得颗粒的平均颗粒直径约 9 nm，并且在室温和蒸汽消毒条件下在悬浮液中是稳定的。

20 这些静电稳定的磁性颗粒的稳定悬浮液是新的并构成本发明的又一方面。在该方面，本发明提供一种超顺磁无机芯颗粒的水悬浮液，具有平均颗粒粒度为 4 至 30 nm，所述颗粒基本上无有机涂料并有结合无机静电稳定剂的表面。

25 聚合物裂解、并进行任何所需的洗涤和过滤后的这些颗粒优选的是有第二种物质的涂层，这是为了提高由于互补活化作用的减小而引起的增强生物耐受性，延长血池存留时间，提供组织靶向能力，增强贮存稳定性或改进可加压加热性。

或者，第二种涂层可在更早阶段加入，例如在磁性颗粒形成前或磁性颗粒形成后且聚合物裂解前加入。

30 特别优选的是，第二种涂层材料是为天然或合成结构型多糖、合成聚氨基酸或生理耐受的合成聚合物，如 PCT/GB94/02097 中描述的，或者是稳定剂物质，如 Pilgrimm 或 Illum(supra)描述的。第二种涂层材料特别优选的是

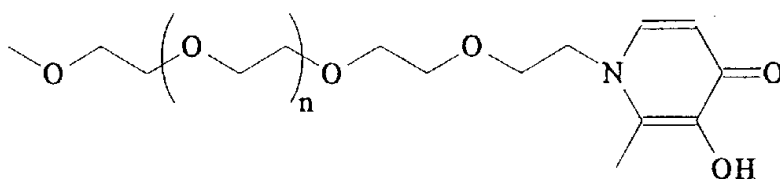
5 聚氧化亚烃(如聚羧体、聚羧胺、聚乙二醇等), 或肝素(heparinoid), 尤其优选那种带一个官能团的化合物, 如含氧酸(例如硫酸、碳酸或硫酸)官能团的物质, 该官能团可使涂料化学结合或吸附在复合颗粒上, 特别是磁性颗粒芯上。对此, 特别提及 Pilgrim 在 US-A-5160725 和 WO-94/21240 中描述的甲

10 氧基-PEG-磷酸盐(MPP)和其它聚氧化亚烃物质。MPP 的有益效果还可使用 MPP 的磷酸盐基团以外的其它亲铁基团末端官能化的亲水性聚合物来达到。这样的基团是水杨酸酯。可用这种亲铁基团通过与 4-氨基-水杨酸或 5-氨基-水杨酸共轭对 PEG 进行官能化, 该两种酸基本上无毒, 在生物学上已使用很长时间。

15 另一合适的第二种涂布试剂为在吡啶氮原子上带有 3-羟基-4-吡啶酮的亲水性聚合物如 PEG。简单的类似物, 例如 1,2-二甲基-3-羟基-4-吡啶酮, 已在临床上用于排除人体(例如输入过量的红细胞的人)的过量铁, 这些物质具有对于 Fe^{III} 有最大已知结合常数, 即 $\log\beta(3)$ 达到 35。这里可方便地使用多种合成路线。可通过对 2-甲基-3,4-二羟基吡啶的氮烷基化而连接聚合物

20 (PEG)。还可通过烷基化 2-甲基-3-羟基吡啶, 所得产品接着在 4 位氧化而连接聚合物(PEG)。还可通过将带有伯氨基的 PEG 与 3-羟基-2-甲基-4-吡喃酮的反应而连接聚合物(PEG), 其中的环氧原子在一个步骤中用氮取代并形成所需的 3-羟基-4-吡啶酮。

20



1-PEG-2-甲基-3-羟基-4-吡啶酮

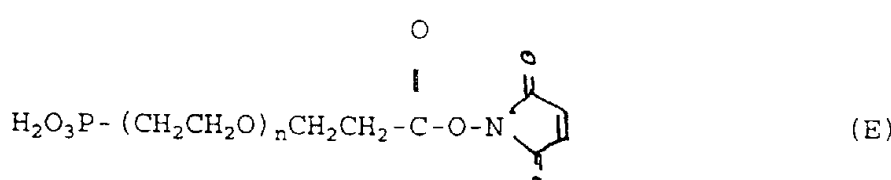
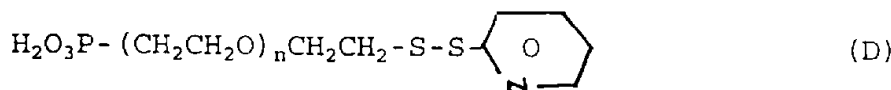
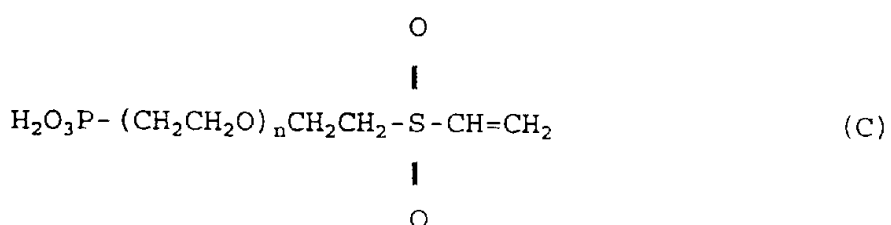
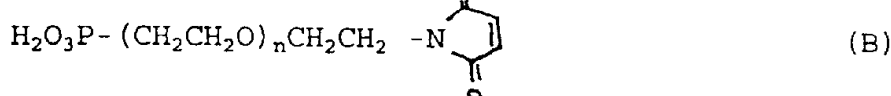
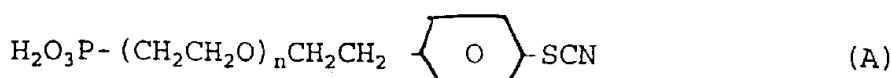
25 将 PEG 聚合物连接到氧化铁表面上的另一些方式是将这些聚合物连接至细菌含铁细胞(例如铁氧化还原蛋白/铁草氨酸素)的一个大基团上。铁草氨酸素具有一个氨基末端官能团, 该官能团可通过酰基化或烷基化用于连接合适的 PEG 衍生物。

30 将第二种涂料连接至氧化物表面的另一种方式是使用结合铁基团的低聚物或聚合物, 例如用磷酸盐, 如二磷酸盐、三磷酸盐和其更高级聚合物, 而不是 MPP 的单磷酸盐。这些低聚和多聚磷酸盐非常强地与氧化铁颗粒结

合(可能是由于存在多个结合点), 并且共轭反应简单且容易进行。因此, 例如在下面的例子中, 可以使用甲氧基-PEG-二磷酸盐或甲氧基-PEG-三磷酸盐取代这里的所谓甲氧基-PEG-磷酸盐。低聚和多聚磷酸盐、硫酸盐和磺酸盐还可用于将其它载体或报道基团(在下面讨论)共轭到磁性颗粒上。

5 作为使用上述各种磷酸盐结合基团将第二种涂料或其它载体和报道基团结合至氧化物表面上的另一方式, (例如)可以使用甲氧基-PEG-磷酸盐代替磷酸盐结合基团。这种方式提供多种可能的优点, 特别是由于用 P-C 键取代 MPP 的 P-O-C 键提高了水解稳定性, 有可能更紧密地与氧化物表面结合, 并增加了化学稳定性, 使得可更自由地生产杂双官能 PEG-磷酸盐, 该磷酸盐在
10 生产磁性晶体-连接剂-载体/报道基团共轭物。

因此, 例如下面这些杂双官能连接剂



可容易地用于将磁性颗粒偶合到蛋白质、蛋白质片段、低聚肽和其它肽载体上。因此, 通式 A 至 E 的连接剂可通过活性硫醇或胺基团偶合至这些肽化合物上, 然后通过磷酸盐基团偶合至磁性颗粒上。

30 用于将 PEG 或其它载体/报道基团连接至活性颗粒上的合适键合基团包括具有对铁离子有高键合亲和性的其它基团, 例如异羟肟酸盐、儿茶酚、抗坏血酸盐和去铁草氨酸基团。

已发现第二种涂料的分子量不特别重要，通常可以是 0.1 至 1000 kD，但优选的是具有分子量 0.3 至 20 kD，特别是 0.5 至 10 kD，尤其是 1 至 5 kD 的物质，如具有至少 60 个氧化亚烃重复单元的聚氧化亚烃物质。

5 第二种涂料与无机芯粒的重量比优选为 0.02 至 25 g/g，特别是 0.4 至 10 g/g，尤其是 0.5 至 8 g/g。

已发现本发明方法生产的二次涂布的复合颗粒的一个特殊优点是它们可用压热法消毒(例如在 121 °C 下消毒 15 分钟)，而无不可接受的对颗粒粒度或粒度分布的损害。这是特别重要的，因为该优点意味着前面方法的这些步骤不必在无毒条件下进行，因此大大改进了生产的经济性。

10 除了提供第二种涂料的涂层外，还可对本发明的生产的复合颗粒进行其它生产后改性。因此，这些颗粒特别可用官能试剂处理，以共轭或偶合残余碳水化合物涂料，同时，可用常规化学技术将生物导向部分(如抗体、抗体片段、肽或生物分子如胰岛素)或报道基因(如在诊断成像模式如 X-射线、MR、超声、光成像等中可检测的基因)共轭至一种涂料上。另一些合适的导
15 向载体或免疫反应性基团描述于(例如)WO-93/21957 中。

通常，磁性颗粒与所述生物导向载体和报道基因之间的轭合物可由如下通式表示：

MP-X-L-V

20

其中 MP 为磁性颗粒(非必要地具有如上所述除去的裂解聚合物涂料)；X 为能够与颗粒表面键合的基团(支撑点)(例如磷酸盐、低聚或多聚磷酸盐、磷酸盐、羧酸盐或其它亲铁盐，如上面讨论的)；L 为将至少一个 X 基团与至少一个 V 基团连接的一个键或更优选一个连接剂基团(优选分子量 1000 至
25 10^6 D 的有机链，例如分子量 2 至 50 kD 的 PEG 基团)；V 为载体或报道基团，即改进磁性颗粒生物分布(例如在选取的器官、组织或病变点形成最优积累)或可通过诊断成像技术检测的基团(例如一种螯合的重金属离子、重金属原子簇、顺磁金属离子或金属放射性核素，或一种气体微泡或微泡生成剂，一种非金属放射性核素、一种除氢外非金属非零核自旋原子(例如 F 原子)，
30 非金属重原子(例如 I)、生色团、荧光团、药物等)。

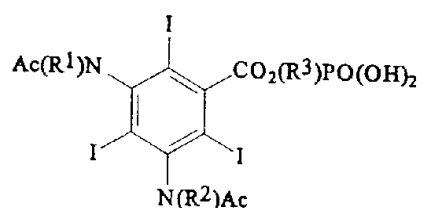
可按这种方式将各种载体和报道基因与磁性颗粒共轭。导向载体的例子

包括: PEG(造成延迟的血池停留); t-PA、链激酶、和尿激酶, 或者作为整个蛋白质, 或者作为选取的含键合区域的肽片段; 含 RGD 的肽和结合类似血小板受体的基元; 和结合动脉粥样硬化噬斑的肽(例如载脂蛋白 B 片段 SP-4)。t-PA 购自 Genentech。RGD 肽描述于专利文献如 US-A-45489881、
 5 US-A-4661111、US-A-4614517 和 US-A_5041380 中。可以使用的 RGD 肽的一个例子是 Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Ala-Ser-Ser-Ala-Tyr-Gly-Gly-Gly-Ser-Ala-Lys-Lys-CONH₂, 它可通过 Lys-Lys-CONH₂ 末端共轭。这可通过标准的低聚肽合成技术(如固态肽合成技术)生产。(Tyr)-Arg-Ala-Leu-Val-Asp-Thr-Leu-Lys-Phe-Val-Thr-Gln-Ala-Glu-Gly-Ala-Lys- CONH₂(其中加入(Tyr)以
 10 便使用碘进行放射性标记)形式的 SP-4 可用于通过 Lys-CONH₂ 末端共轭。同样这可通过标准工艺生产。

当 V 为螯合金属时, 连接剂含有合适的螯合部分, 如 DTPA、EDTA、TMT、DO3A 等残余物。这些基团是诊断成像造影剂领域公知的, 并可通过主链连接官能度(例如 CH₂ΦSCN)或通过一个金属配位基团(如 CH₂COOH)
 15 共轭。

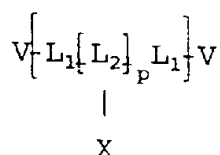
金属离子本身根据成像方式选取, 例如通过 TMT 螯合的 ⁹⁰Y(对于闪烁照相)或 TMT 螯合钷(对于荧光成像)。

对于 X-射线成像, 使用碘代有机磷酸盐(或膦酸盐或低聚或多聚磷酸盐)是合适的, 因为这些化合物既稳定磁性颗粒, 又起到 X-射线造影剂的作用(通
 20 过提高颗粒的放射性能)。合适的碘代有机磷酸盐的例子包括:

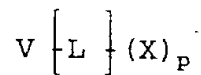


其中 R¹ 和 R² 是非必要的, 但优选为羟基化的 C₁₋₆ 烷基, R³ 为连接剂基团, 例如提供 1 至 6 个碳原子的链。

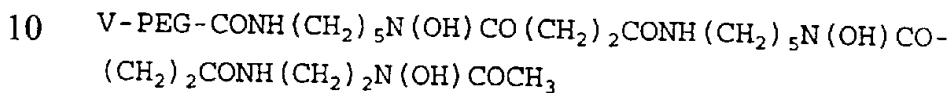
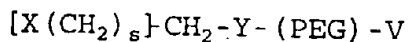
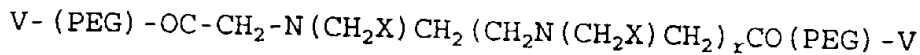
特别优选的是 X-L-V 化合物应提供用于连接至磁性颗粒上的多个固定
 30 点。因此优选的 X-L-V 化合物为如下通式的化合物:



或



其中 L_1 和 L_2 为连接剂 L 的组分, p 为 2 或更大, 例如 2、3、4 或 5。因此, 例如基于具有 1 至 4 个固定基团的结构 PEG 可为:



其中 r 为 1、2 或 3

s 为 1 至 6,

Y 为 CONH 或 NHCO,

15 (PEG) 为聚乙二醇链, 和

X 为 CONHOH、-CONH-双羟苯基或-CO-O-双羟苯基(其中两个羟基处于连接碳原子上)。

当报道分子或载体按这种方式共轭时, 要明确选取每种颗粒的数目和每种剂量的数目, 以便有足够的载体能有效地导向这些颗粒和/或有足够的报道分子以使这些颗粒可通过选取的方式检测。

因此, 本发明方法的一个优选实施方案包括如下顺序步骤:

- (i) 将淀粉、亚铁盐和铁盐及碱在加热的水溶液中混合,
- (ii) 非必要地将所述溶液冷却至 15 °C 以下使胶体凝固;
- (iii) 将 pH 降低至 6.0-8.5, 该步骤可以在步骤(ii)之前非必要地进行;
- 25 (iv) 用氧化剂, 如卤氧阴离子氧化剂处理使淀粉裂解并释放所述颗粒;
- (v) 洗涤并过滤释放的颗粒;
- (vi) 非必要地将释放的颗粒与官能化的聚氧化亚烃衍生物反应, 使所述衍生物与所述颗粒结合; 和
- (vii) 非必要地高压釜消毒释放的颗粒。

30 步骤(iii)例如可通过在步骤(ii)之前在减压下除去过量的水和碱(例如氢氧化铵)或通过步骤(iv)之前加入酸(如 HCl)调节过量的碱的方式进行。

已发现，裂解的亲水聚合物涂料和延长血液寿命的亲水聚合物与无机颗粒表面结合，这样的具有无机芯的复合颗粒与仅具有这两种涂料之一的颗粒相比，血液寿命明显延长。这是由于如下原因引起的：裂解聚合物屏蔽延长血液寿命的聚合物的颗粒表面结合点，由此在体内使延长血液寿命的聚合物延缓自无机颗粒上裂解，这样的颗粒形成本发明的一个方面。

因此，本发明提供一种可注射的复合颗粒试剂，含有一个无机颗粒芯(优选金属或混合金属氧化物，特别是超顺磁氧化铁颗粒)，在其表面键合有亲水性延长血液寿命的聚合物(优选官能化的聚氧化亚烃，如甲氧基-PEG-磷酸盐，特别优选末端官能化的线性聚合物，并优选其分子量低于肾脏阈值，例如分子量 0.2 至 30 kD，特别是 1 至 10 kD)，并具有屏蔽结合点的亲水性有机聚合物涂料(如裂解的支化碳水化合物，例如氧化淀粉)。

这些颗粒可用作血池剂或可与上述生物导向载体共轭。此外，这些颗粒可用于间接淋巴成像，例如在静脉注射或皮下注射之后。尽管这些颗粒的无机芯优选为超顺磁氧化铁，但若需要，其它金属化合物颗粒也可使用，所述金属化合物的例子包括含放射性核素或另一种治疗上或诊断上有效的金属的化合物。

含本发明颗粒的超顺磁晶体的弛豫性随颗粒芯和涂布后颗粒的粒度和组成(以及温度和施加的磁场)而变化。 T_1 弛豫值(r_1)可低至 5 和高达 200，而 T_2 弛豫值(r_2) 在 0.5T 时可为 5 至 500(弛豫值单位: $(\text{mMFe})^{-1}(\text{sec})^{-1}$)。 r_2/r_1 在 0.47T 和 40 °C 时可为 1 至 100 以上，例如 1 至 10，优选 1.2 至 3。小单晶颗粒的 r_2/r_1 比在更低范围内，而大颗粒和多晶颗粒显示更高的比例。若颗粒显示超顺磁性，则 0T 至约 1T 内的颗粒的磁化强度取决于晶体粒度，较大的晶体具有明显较大的磁化强度，在 1T 时，磁化强度为约 20-100，优选 30-90 emu/g 氧化铁。

当顺磁颗粒通过 Fe^{II} 和 Fe^{III} 的碱沉淀而生产时，比例 r_2/r_1 在 0.47T 和 40 °C 时通常低于 3。因此，在 T_1 -加权重成像中，根据本发明生产的颗粒作为正造影剂是有效的。同时，这些颗粒的悬浮液的磁化强度曲线显示，即使在磁场强度高达 4T 时，颗粒也未充分磁化。颗粒在通常用于 MR 成像仪器的磁场强度下不完全磁化，这就意味着在 MR 影像中存在的磁化率的大小降低了。同时，本发明颗粒的弛豫值不随磁场强度增加而快速降低(与常规氧化物颗粒不同)。

在常规 MR 成像中，多年以来，倾向于使用初始磁场强度 1 至 1.5T 的高
磁场强度仪器。然而，较低磁场强度仪器的使用正在增加，因此目前需要开
发可在某些市购成像仪的低磁场强度下，如在 0.1 至 0.3T 下使用的正 MR 造
影剂。这种需求可通过本发明颗粒满足，该颗粒在这些磁场强度下效果至少
5 是基于正 MR 造影剂(如 Mgnevist)的常规金属螯合物的三倍，因此本发明再
一方面，提供一种受体对比增强的磁共振成像方法，其中给受体使用正造影
剂，并用 MR 成像仪生成所述受体的至少一部分的影像，其特征在于所述仪
器具有低于 0.3 T 的初始磁场强度，所述正造影剂包括涂有生理耐受涂料的
磁性颗粒，所述颗粒在所述磁场强度下不完全磁化(例如磁化到其最大可能磁
10 化的至多 90 %)且优选在磁场强度高达 2T，特别是高达 4T 下不完全磁化。

再一方面，本发明提供诊断用的组合物，包括根据本发明生产的颗粒和
至少一种生理可接受的载体或赋形剂，如用于注射的水。

本发明的组合物可为任何常规药物形式，如悬浮液、乳液、粉末等，并
可以是含水载体(如用于注射的水)，和/或用于调节渗透压、pH、粘度和稳
15 定性的组分。理想的是该组合物为与血液等压和等氢离子的悬浮液形式。例
如，等压悬浮液可通过加入盐如氯化钠、低分子量糖如葡萄糖(右旋糖)、乳
糖、麦芽糖、或甘露糖醇或涂布剂的可溶部分或这些组分的混合物制备。若
仅需要微调 pH，则等氢离子可通过加入酸如盐酸、或碱如氢氧化钠实现。
还可以使用缓冲试剂如柠檬酸酯、乙酸酯、硼酸盐、酒石酸盐、葡糖酸盐、
20 两性离子和 Tris。颗粒悬浮液的化学稳定性可通过加入抗氧化剂如抗坏血酸或
焦亚硫酸钠改性。还可加入赋形剂改进制剂的物理稳定性。最通常使用的非
肠胃给药赋形剂是表面活性剂如聚山梨酯、卵磷脂或脱水山梨(糖)醇酯，粘
度改性剂如甘油、丙二醇和聚乙二醇(macrogols)，或浊点改性剂，优选非离
子试剂(浊点改性剂在非离子表面活性剂组合物进行可导致絮凝的相分离时
25 改变温度)。

本发明组合物有利的是含诊断有效的金属浓度(通常为 0.1 至 250 mg
Fe/ml，优选 0.5 至 100 mg Fe/ml，特别优选 1 至 75 mg Fe/ml)的磁性金属氧
化物。

本发明还提供一种使人体或动物体(优选哺乳动物体)产生对比增强影像
30 的方法，所述方法包括对所述人体或动物体，优选以非肠胃或特别优选血管
内给药形式使用本发明的造影剂悬浮液，并通过 MR 或磁力测定(例如使用

SQUID 检测器或一组 SQUID 检测器)使其中分布有所述试剂的所述人体或动物体的至少一部分产生影像。

另一方面,本发明还提供一种测定本发明造影剂在人体或动物人体(优选哺乳动物体)内分布的方法,所述方法包括对所述人体或动物体优选以非肠胃形式使用所述试剂,并检测受所述试剂辐射或改性的人体或动物体的信号,如放射活性衰减辐射、磁场畸变或磁共振信号。

特别优选的是,本发明方法涉及血管成像,特别是使用 T_1 -加权 MR 成像。影像可在肝或脾吸入任何明显的颗粒之前产生。对于具有延长血液寿命聚合物涂料,例如甲氧基 PEG 磷酸盐涂料的颗粒,通常在血管内给药的 24 小时内,优选 4 小时内产生影像。在本方法的另一实施方案中,局部注射后,可产生淋巴系统的 T_2 加权影像,或在注射入血管之后,可进行肝或脾的 T_2 -加权重研究或 T_2 加权扩散研究。

对于本发明方法,使用的剂量是所用成像方式的对比有效剂量。通常该剂量为 0.05 至 30 mg Fe/kg 体重,优选 0.1 至 15 mg Fe/kg,特别优选 0.25 至 8 Fe/kg。

本发明还提供了该新磁性晶体材料用于制备诊断用造影剂组合物的用途,该组合物用于对用了该组合物的人体或动物体进行诊断方法中。

除了用作造影剂外,本发明的复合颗粒还可用于局部热治疗或发热涂敷 - 利用它们的核磁性能,将能量转移至体内的颗粒上(例如通过暴露于变化方向或磁场强度的磁场中),并且从颗粒至周围组织的能量损失可用于治疗目的,例如获得细胞毒性作用。当其中颗粒与确定目标的载体(例如通过双官能连接剂如双官能聚氧化亚烃)共轭时,这是特别重要的。

同样,该颗粒可用于铁疗法中 - 在这种情况下不必使颗粒芯晶体产生磁性,并且这些颗粒可以是具有裂解的聚合物涂料和非必要的第二种涂料(例如 MPP 的)的顺磁氧化铁。

现有技术制备的各种氧化铁制剂是已知的,当进行血管内给药时有明显不良的作用。最常见的是抑制系统血压和血小板严重减少。看起来这些副作用可能是对诱导补体系统活化的颗粒起生理的和血液的反应。尽管常规氧化铁颗粒(如磁性淀粉微球(MSM))可强烈活化补体级连系统,但本发明的颗粒对循环血小板的数量无或仅具有微弱影响,而常规的制剂会引发急性的瞬时血小板明显减少症。

本本发明的颗粒无论有或无第二种涂料(如 MPP), 都已令人吃惊地证明对补体系统或补体相关的参数如血压和血小板数量无影响。选取的涂料在颗粒表面不与常规颗粒类似的方式触发补体活化。

5 这些颗粒可容易用第二种涂料涂布, 例如使用与氧化铁(FeO_x)表面发生化学或物理缔合的聚合物(如 MPP)。这些颗粒特别适合表面进一步改性或涂布, 原因在于其大表面积和薄碳水化合物涂层, 该涂层允许末端官能化的亲水聚合物(如 MPP)浸入或结合至或吸附在芯磁性颗粒上。

FeO_x 颗粒具有比常规氧化铁试剂低的磁化强度, 因此磁化强度在成像磁场范围内不完全饱和。此特点在高磁场强度时将减少磁性伪影的出现。

10 已发现本发明的颗粒与通过淀粉与 FeO_x 共沉淀生产的常规 MSM 颗粒相比, 在小鼠中具有明显延长的血液半衰期(延长 2 倍或更长)。

加第二种涂层可进一步改善颗粒的血液动力学性能。因此, 已证明 MPP 涂布的颗粒(即二次涂布颗粒)与无 MPP 涂料或具有甲氧基-PEG(MeO-PEG)作为赋形剂加入(MeO-PEG 用作赋形剂且不与 FeO_x 表面相互作用)的产品相比, 明显延长小鼠的血液半衰期(延长 2 倍或更长)。

已证明 MPP 涂布的颗粒, 与涂有 MPP 但无裂解聚合物初始涂层的纳诺粒度的 FeO_x 颗粒相比, 在小鼠中具有明显延长的血液半衰期(延长 2 倍或更长)。

20 已发现, 本发明的单一涂布和二次涂布的颗粒对大鼠血液无影响, 而常规多糖 FeO_x 制剂产生明显的血小板减少。

此外, 已发现, 本发明的单一涂布和二次涂布的颗粒对人补体无影响, 而常规淀粉- FeO_x (MSM)颗粒为有效的补体活化剂。

25 本发明的单晶芯粒是特别有利的, 因为它们附聚的趋势减少, 如此可减少本发明组合物中所需的稳定剂(如葡聚糖)量, 因此减少了可能出现的毒性问题。

为最大限度地减少贮存和运输问题, 根据本发明生产的特殊造影剂可以干粉形式, 例如通过喷雾干燥或冷冻干燥, 优选在无菌条件下生产。该干燥的造影剂形成本发明又一方面。

本文涉及的各种专利文献作为参考引入。

30 下面参考非限制性的实施例更详细地说明本发明:

实施例 1

凝胶的制备步骤是：制备淀粉溶液并加热至 50 °C，将氯化铁加入淀粉溶液中，将氢氧化铵加入铁/淀粉溶液中，将该反应混合物加热至 87-90 °C 并将产品冷却/中和凝胶。

5

A. 制备淀粉溶液

1. 将 50 g 可溶性土豆淀粉(CAS No. 9005-84-9)溶于 850 g 煮沸的去离子水中并混合。
2. 煮沸并立即趁沸腾将淀粉溶液放入 55 °C 的水浴中。

10 B. 将铁和氢氧化铵加入淀粉中

1. 将 9.0 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 3.3 g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Fe III 与 Fe II 摩尔比 2:1)溶于总体积 50 mL 去离子水中。
2. 淀粉溶液冷却至稳定 55 °C 后，将铁溶液倒入淀粉溶液中，充分混合并加入 50 ml 30 % (浓度)的 NH_4OH 。
3. 加热所得溶液以使其温度在 2 小时内升至 89 °C，并在 89 °C 下再保持 50 分钟。
4. 在水浴上加热 170 分钟后， a)在 4 °C 下冷冻过夜以使凝胶凝固，或 b)冷却至室温并用酸中和(见下面)。

20 C. 凝胶洗涤工艺(当凝胶不是酸中和的时)

用泵抽入冷却的去离子水使其通过沉降的凝胶悬浮液，洗涤凝固的凝胶直至 pH 低于 8.5。

D. 另一中和方法

将混合物冷却至 40 °C 以下，用酸中和。

25 E. 用次氯酸钠进行凝胶氧化裂解

可对一份新样进行每克凝胶的剂量滴定次氯酸钠(hypo)的量以优化生产。通过光子相干光谱(PCS)和通过测定水质子驰豫速率评估生产的磁性颗粒粒度和分散性。

- a. 例如，1.8 ml 5 % 次氯酸盐/12.5 mg Fe/5 g 凝胶。调节次氯酸盐的体积以在 5 g 凝胶中调节氯的浓度和 Fe 的浓度(单位 mg)
- b. 称量凝胶，加入次氯酸盐并在 70 °C 的水浴中加热 45 分钟。

c. 加热后, 加入 8M 尿素(0.8 ml/5 g 凝胶)。尿素使过量的次氯酸盐失活。

d. 用膜进行透析过滤(MW<100 kD)直至除去所有的游离 Fe 和 CHO。

F. 分析:

5 然后对样品进行分析, 按这种方式制备的物质具有表 1 中所列的特征:

表 1

分析	结果	最大规模***
组成		
铁(Fe)	6.4 mg/ml	至多 95 mg/L
Mossbauer 光谱	主要为 γ -Fe ₂ O ₃ 纳诺晶体	
碳水化合物(CHO)	3.6 mg/ml	
CHO:Fe(重量比)	0.57	0.2-0.3
纯度	(由颗粒以 CsCl 密度梯度 1.4 g/ml 离心的上层清液)	(凝胶渗透色谱)
% 游离 Fe	0 %	
% 游离 CHO	0 %	2 % 面积
粒度(氧化铁核)		
由 r_2/r_1 预测	9 nm	8 nm
NMRD*	8 nm	8 nm
LFI**	6.24±0.74 nm	
由磁化强度计算	5.7-5.8 nm	
粒度(整个颗粒)		
光子相干谱	11.5 nm	10-12 nm
沉降速率	42.6 Svedberg 单位	
弛豫性(在 40 °C 和 0.47 特斯拉)		
r_1	16.34 (mM.sec) ⁻¹	20-23 (mM.sec) ⁻¹
r_2	28.04 (mM.sec) ⁻¹	34-38 (mM.sec) ⁻¹
r_2/r_1	1.72	1.6-1.7
在 4 °C 时的稳定性	>6 月	
饱和磁化强度	60 emu/g FeO _x ⁺⁺⁺	80-90 emu/g Fe

+++ 1g FeO_x 为约 70 wt % 的 Fe

* 核磁弛豫分散体

** 晶格条纹成像

*** 以较大规模生产

++ 在对 1200 x g 离心 5 分钟时低于 5 % 的沉淀物沉降。

% 面积 = HPLC 图形下的总面积

用 NMRD 在 2.35 高斯至 1.2 泰斯拉范围内测量作为磁场强度的纵向弛豫速率($1/T_1$)。例如, 参见 Koenig 等人, 细胞和有机体的 NMR 谱, Vol. II, p75, R.K. Gupta (编), CRC press, 1987, 和 Koenig 等人, NMR 光谱进展 22: 487-567 (1990)。

5

实施例 2

按照实施例 1 制备磁性颗粒, 但用玉米淀粉取代土豆淀粉。

应注意, 使用除可溶性土豆淀粉外的物质需要改变用于凝胶形成和降解的物质用量。

10 实施例 3

按照实施例 1 制备磁性颗粒, 但用稻米淀粉代替土豆淀粉。

实施例 4

按照实施例 1 制备磁性颗粒, 但它们不用次氯酸盐处理(D 项)。取而代之的是, 用磷酸盐缓冲饱和盐水溶液稀释凝胶样品(4.8、12 g)并用 100 μg (每 μg 0.7 - 1.4 个活性单元) α 淀粉酶(EC 3.2.1.1)在室温下对淀粉凝胶进行酶水解 16 小时。将所得释放颗粒以低速度进行离心除去大的附聚物并通过 0.45 μm 过滤器进行过滤。本方法生产具有总粒度较大(范围 10 - 110 nm)但具有 6 nm 氧化铁芯的颗粒。

20

实施例 5

按照实施例 1 制备磁性颗粒, 但它们不用次氯酸盐处理(D 项)。取而代之的是, 用装有 1/4 英寸探针的 Branson 声波发生器对 10 g 凝胶进行声波处理连续 15 分钟。以低速度离心除去大的附聚物并通过 0.45 μm 过滤器进行过滤后, 发现所得释放的颗粒具有非常大的总粒度(范围 30 - 800 nm)但具有与实施例 4 类似粒度的氧化铁芯。

25

实施例 6

将甲氧基 PEG 磷酸盐(MPP)(分子量 5kD)以 MPP 与氧化铁(FeO_x)的所需比例(通常为 1 至 2 g MPP/g Fe)加入按照实施例 1 制备的颗粒的水悬浮液中, 在 37 $^\circ\text{C}$ 下在恒定旋转下保温 15 小时并在 4 $^\circ\text{C}$ 下贮存至使用。

30

若需要, 将这些颗粒在 121 °C 下进行高压釜消毒 15 分钟。

将这些颗粒类似地用硫酸软骨素涂布。

或者, 可将 MPP 涂布的颗粒在 75 °C 下保温 12 小时或可直接在 121 °C 下进行高压釜消毒 10 - 20 分钟。

5

实施例 7

与实施例 6 相似, 用不同分子量的 MPP(1.1、2.1、5.0 和 10.0 kD)和不同涂料比(0.02、0.2、0.4、0.5、0.8、1.0、1.2、1.5、1.6、2、2.5、3、4 和 8 g MPP/g FeO_x)生产 MPP 涂布的颗粒。

10

实施例 8

对实施例 1、6、7 的颗粒范围进行动物和人血浆试验的结果

对具有某一范围 MPP 涂布密度的本发明颗粒测定小鼠血液半衰期 ($T_{1/2}$)。通过尾静脉对小鼠注射 100 μ L 样品(以 1 mg Fe/mL 实施例 1、6 和 7 的制剂)。在时间间隔时, 使动物安乐死, 并从两只小鼠中收集血液样品。由 $1/T_1$ 值, 测定半衰期 $T_{1/2}$ 。结果在下表 2 中给出, 包括与未涂布的颗粒和常规 MSM 颗粒的结果进行对比

表 2

g MPP*/g FeO _x	$T_{1/2}$ (min)
0	27.9
0.02	28.0±3.2#
0.2	31.9±3.3
0.4	39.1±14.1
0.8	28.5±1.3
1.6	69.3±27.7
2	48.9±3.8
4	45.6±3.0
8	62.0±5.6
MSM	3.8

20 * 分子量 5 kD。

\pm 表示在 $T_{1/2}$ 曲线拟合线性关系中的估计标准偏差。

MSM：常规共沉淀磁性淀粉颗粒。

从表 2 中显而易见，MPP 涂料明显延长了血液半衰期，而本发明即使未涂布的颗粒与常规颗粒相比也具有更长的血液半衰期。

5 当使用非缔合二次涂布剂取代 MPP 时，发现小鼠的血液半衰期未明显延长。通过对未涂布和 MPP 涂布颗粒及用甲氧基 PEG(分子量 5 kD)和用淀粉衍生物 Hetastarch 处理的颗粒，对比检测的小鼠血液半衰期证明了这一点。与 MPP 不同，甲氧基 PEG 不与颗粒化学键合或缔合，因此仅以赋形剂形式存在。比较的结果在表 3 中给出

表 3

二次涂布剂/赋形剂	$T_{1/2}$
MPP, 分子量 5 kD, 8g/gFeO _x	62.0
MeO-PEG, 分子量 5000, 8 g/g FeO _x	26.3
HETASTARCH®, 6 % 溶液	28.1
无	27.9

10 在大鼠中对 MPP 涂布和未涂布 MPP 的颗粒进行血液影响试验。

通过室内喂养给药并将取样管插入右静脉中准备公大鼠。给药之前约 24 小时和给药后 3、10 和 60 分钟和/或 24 小时后，收集血液样品。测量的血液参数包括：白血细胞和血小板数。

15 与葡聚糖磁铁矿或 MSM 颗粒不同，用本发明的 MPP 涂布和未涂布 MPP 的颗粒未观察到暂时性血小板减小症发病率。

对人血浆试验 MPP 涂布的和未涂布 MPP 的颗粒以确定末端补体配合物的活化程度。

实施例 9

20 将实施例 6 生产的 MPP 涂布颗粒以 1mg Fe/kg 的剂量在 15 分钟后以 2 mg Fe/kg 的剂量对大鼠给药。在 1.5T、3D TOF、TR/TE 25/5.6、倒转角 60°下记录前后对照 T₁ 加权影像，得到附图中的图 1、2 和 3。血管强化在两个后对照影像中都是明显的，尽管高剂量和高磁场并用，但图 3 的影像显示出血管与组织的高对比，没有磁性伪影。

25 实施例 10

后复合颗粒形成聚合物裂解

(a) 合成 MSM

5 将具有平均分子量 70 kD 的淀粉(3g, Reppe Glycose, Sweden)溶于水 (10 mL)中。在温度 60 °C 时, 将 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2.7 g)和 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (4.5 g)溶于碳水化合物溶液中, 然后将混合物在 60 °C 下在超声处理下慢慢沉淀入 1.2 M NaOH (50 mL)中。将超声处理再继续进行 10 分钟, 接着在 5000 rpm 下离心 5 分钟。收集上层清液并相对于 0.9 % NaCl 进行离析。磁化强度曲线显示所得淀粉颗粒是超顺磁的并显示 400 nm 的平均流体半径。

(b) 用次氯酸钠处理 MSM

10 将平均颗粒粒度 400 nm 的 MSM 颗粒(15.5 mgFe/mL, 1.70 mL)加入次氯酸钠(Fluka # 71696, 13.8 % 游离氯)。将容器密封紧并在 70 °C 下加热 45 分钟。将反应混合物冷却, 加入 8M 尿素(0.17 mL)并将悬浮液过滤(0.2 μm)。将颗粒用 Macrosep 离心浓缩机(截止 100K)在 3000 rpm 下用水纯化。在下表 4 中给出作为次氯酸钠加入量函数所记录的颗粒粒度。

15

表 4

用次氯酸钠处理前后的 MSM 的颗粒粒度

NaOCl 的量 (mL)	颗粒粒度 (平均, nm)
0	400
0.063	88
0.100	76
0.300	70
0.500	68
1.000	附聚 1)

1): 所有淀粉都裂解, 裸露氧化铁晶体附聚物

20 实施例 11

按照实施例 1 和 7 配制产品

表 5 给出按照实施例 1 生产并用用于给药的赋形剂(Tris (50mM)、甘露糖醇(2.5 %)和氢氧化钠至 pH 6-8)配制的的颗粒(组合物 A)和(1.2 g MPP (2 kD)/g FeO_x) (组合物 B)的详细性能。

表 5

分析	组合物 1	组合物 2
组成		
铁(Fe)	30 mg/mL	30 mg/mL
碳水化合物 (CHO):Fe	0.8	1.2
MPP(2kD)	0	60 mg/mL
纯度	(凝胶渗透色谱)	(凝胶渗透色谱)
% 游离 CHO	10-12 %	10-12 % 面积
粒度(氧化铁芯)		
由 r_2/r_1 预测	7 nm	7 nm
NMRD	7 nm	7 nm
粒度(整个颗粒)		
光子相干谱	9-11 nm	11-13 nm
弛豫性(在 40 °C 和 0.47 泰斯拉)		
r_1	19-20 (mM.sec) ⁻¹	19-21 (mM.sec) ⁻¹
r_2	30-32 (mM.sec) ⁻¹	30-33 (mM.sec) ⁻¹
r_2/r_1	1.5-1.6	1.5-1.6
饱和磁化强度 0.45 泰斯拉	90-100 emu/g Fe	90-100 emu/g Fe
稳定剂	>3 月, 在 40 °C 时	>3 月, 在 40 °C 时

注:

NMRD = 核磁弛豫分散体

5 % 面积 = 在 HPLC 图下的 % 总面积

实施例 12

(MPP 涂布前制备颗粒的最佳方式)

10 (A) 在装有顶部搅拌器和冷凝器的 22 L 三颈烧瓶中, 将 12.8 L 去离子水加热至 95 °C, 然后在搅拌速率 80 - 100 rpm 下加入 800 g 可溶性土豆淀粉(Sigma, No. S-2630)在 1.6 L 去离子水中的悬浮液。将所得轻微浑浊溶液在室温下搅

拌 10 分钟然后在 30 分钟内冷却至 55 °C。加入 144 g FeCl₃·6H₂O 和 52.8 g FeCl₂·4H₂O 在 1.2 L 去离子水中的溶液, 然后在 3 分钟后一次加入 800 mL 28 % 氢氧化铵。将搅拌速率降至约 60 rpm, 并将黑色反应混合物在室温下搅拌 15 分钟, 然后在 60 分钟内逐渐加热至 92 °C。将温度在 92-94 °C 下保持 60 分钟, 并在反应期间和反应后通过磁敏感性测量值测定反应进展。通过真空蒸馏除去过量的氢氧化铵。将浓缩物冷却至约 20 °C 并冷冻形成凝胶。

总之, 用 800 g 土豆淀粉的最大批料制备四批凝胶。

表 6
制备的凝胶

批数	淀粉 (g)	FeCl ₃ 6H ₂ O (g)	FeCl ₂ 4H ₂ O (g)	NH ₄ O H (mL)	反应 体积 (L)	凝胶 重量 (kg)	Fe, 通过 XRF* (g/kg)	M (emu/ mg Fe)	M _{sus} (x10 ⁻⁴ emu/ Oe.cm ³)
1	600	108	39.6	600	12	9.8	3.33	0.0932	0.69
2	600	108	39.6	600	12	9.8	3.35	0.0954	0.71
3	600	108	39.6	600	12	9.8	3.36	0.0924	0.69
4	800	144	39.6	800	12	13.7	3.30	0.0955	0.70

*XFR - X 射线荧光光谱

(B) 用冷水洗涤凝胶以除去在氧化铁形成和残余氢氧化铵中获得的氯化铵。或者将这些化合物与在步骤(C)中用于分解淀粉的次氯酸钠反应, 对于次氯酸盐步骤需要更大量的次氯酸盐。

凝胶洗涤通过在搅拌反应器中反复加水/除水进行, 反应器保持接近 5 °C 以最大限度地降低淀粉溶解。将凝胶在约 2 体积冷却的去离子水中(轻轻和慢慢地)搅拌, 然后沉降(约 1 小时)。通过抽吸除去从非常黑的凝胶层中分离的上层黑色清液。重复加入等量的水、轻轻和慢慢地搅拌、沉降和分离, 最终获得 0.5 mmho 的导磁率。需要总计约 8 体积的水洗涤凝胶, 铁的回收率约为 80 %。

表 7

洗涤过的凝胶

批数	加料重 (kg)	水总量 (L)	重复	最终 重量 (kg)	Fe(g)	Fe 回收率 (%)	初始导磁 率 (mmho)	最终导磁 率 (mmho)
1	1.7	15	7	(离心)	6.1	78	4.8	0.3
2	9.5	80	5	14.5	26.5	81	5.2	0.5
3	9.5	80	4	11.2	24.1	77	4.7	0.5
4	13.3	106	5	16.4	36.9	83	4.8	0.3

- (C) 本步骤涉及将洗涤过的凝胶通过氧化淀粉基体转化为颗粒分散体。这
5 通过用次氯酸钠处理凝胶完成。用于氧化的次氯酸盐量通过小规模(50 - 100 g
凝胶)氧化实验并测量弛豫性(r_1 、 r_2 和 r_2/r_1)和颗粒粒度。

- 将洗涤过的凝胶加热至 45 °C 并用 12 % 的次氯酸钠溶液处理。反应混合
物的温度降低几度(由于加入冷冻的次氯酸盐)。将反应混合物的温度升至约
45 °C。将反应混合物在 30 分钟内加热至 55 °C, 在此点观察到放热反应。放
10 热减退后, 将反应混合物的温度调节至 70 °C 并保持 45 分钟。用 RCI 量热计
证实此步骤的危险性评估为适中的(15 °C), 但该反应的放热是可控制的。

将该反应混合物冷却至室温并经 Millipore 0.2 μm 标准过滤器滤芯过
滤。对 15 kg 凝胶(34 g Fe)进行最大氧化, 回收率是定量的。

15

表 8

颗粒分散体

批数	投入 的 重量 (kg)	12% NaOC 1 (L)	尿素 淬灭 (g)	最终 体积 (L)	Fe (g)	Brook haven (nm)	r_1 (mM.s) ⁻¹	r_1 (mM.s) ⁻¹	r_2/r_1
1	3.0	0.63	20	3.5	5.5	11.1	13.37	23.1	1.68
2	6.5	1.83	42	8	11.8	11.8	14.5	24.8	1.68
3	10	2.25	112	12	22	12.4	14.9	25.0	1.68
4	15	3.00	80	18	34	12.7	21.0	36.2	1.71

- (D) 本步骤涉及在次氯酸盐氧化后除去残余淀粉、游离铁和其它反应物。使

用 Millipore, prescale TM TFF 100K 再生纤维素膜滤芯过滤器获得所需的结果。颗粒纯度由 GPC 监测。超滤后的最终产品纯度为 97-99 % (GPC)。

5

表 9
最终产品

批次	投入的 体积 (L)	过滤介质	总水量 (L)	最终 重量 (kg)	Fe, 通过 ICP (g)	Fe 回收率 (%)
1	2	Millipore 100K, 1 ft ³ 再生 纤维素	25	670	2.2	67
2	6	Millipore 100K, 1 ft ³ 再生 纤维素	45	671	8.8	70
3	12	Millipore 100K, 1 ft ³ 再生 纤维素	60	980	13.7	73
4	18	Millipore 100K, 1 ft ³ 再生 纤维素	100	1674	27.7	82

对于所有 4 批的最终分析数据概列于下表 10 中。

(E) 后续 PEG 涂布

10 若需要, 将通过上面步骤(A)至(D)生产的颗粒用 PEG 涂布, 优选分子
量 2000 D 的甲氧基 PEG 磷酸盐(MPP)按涂布比例 1.2 g MPP/g FeO_x 涂布。

将具有或无这种 PEG 涂料的颗粒用 50 mM Tris 缓冲液和 2.5 % 甘露糖醇
进行配药(用氢氧化钠将 pH 调至 6-8)。

表 10

批数	1	2	3	4
纯度(%, GPC)	97.2	98.1	99.0	99.2
铁(mg/ml, (ICP))	3.3	13.1	13.7	16.5
r_2/r_1	1.67	1.66	1.65	1.64
r_1 (mM.s) ⁻¹	19.6	18.9	20.0	21.3
r_2 (mM.s) ⁻¹	32.7	31.3	33.0	35.0
磁场强度: (emu/mg Fe)	0.0762	0.0795	0.0801	0.0826
颗粒粒度 (nm, Brookhaven)	12	10	10	11
迁移率 (mV ⁻¹ s ⁻¹ xe08)	-3.02	-3.02	-3.04	-2.92
pH	4.1	4.0	4.0	4.0
碳/铁比例	0.52	0.28	0.30	0.28
外观	无粘性, 深红色至棕色	无粘性, 深棕色	无粘性, 深棕色	无粘性, 深棕色

实施例 13

5 制备二乙基 2-(3,5-二乙酰氨基-2,4,6-三碘代苯甲酰氧基)乙基膦酸盐

在室温下在氩气气氛下向搅拌的泛影酸钠(7.1 g, 11.2 mmol)在干燥二甲基甲酰胺(40 ml)中的溶液中加入二乙基 2-溴甲基膦酸酯(3.02 g, 12.3 mmol, 1.1 当量)在三甲基甲酰胺(10 ml)中的溶液。搅拌 12 小时后, 在真空下蒸出溶剂, 得到白色晶体, 将其用 300 ml 饱和碳酸氢钠水溶液洗涤, 然后用氯仿与乙醇的 1:2 混合物(3 x 200 ml)洗涤。将有机萃取物干燥(MgSO₄), 过滤, 并在真空下蒸发, 得到 3.16 g (41 %)白色固体产品。用乙醇重结晶得到分析纯物质; mp 249-251 °C; MH⁺ (779)。¹H-NMR (300 Mhz)与所需物质一致。

C₁₇H₂₂I₃PN₂O₇ 的计算值: C 26.24 ; H 2.85 ; I 48.93; N 3.60 ; 测定值: C 26.26 ; H 2.70 ; I 49.05 ; N 3.50 。

实施例 14

制备二乙基 2-(3,5-二乙酰氨基-2,4,6-三碘代苯甲酰氧基)乙基膦酸

在室温下在氮气气氛下向搅拌的二乙基 2-(3,5-二乙酰氨基-2,4,6-三碘代苯甲酰氧基)乙基膦酸酯(3.1 g, 3.98 mmol)在干燥二氯甲烷(40 ml)中的悬浮液加入 1.5 ml (10.56 mmol, 2.65 当量)三甲基甲硅烷基碘。搅拌 12-14 小时后, 观察到粘性淤浆, 接着加入 40 ml 二氯甲烷并连续搅拌 6 小时。然后加入水 (4 ml)并将反应混合物搅拌 10 分钟。加入甲醇(40 ml)并将所得红色溶液在真空下浓缩得到 3.42 g 所需粗产品, 为黄色固体。将粗产品溶于 20 ml 10 % 甲醇-90 % 水的溶液中并将所得溶液通过 C₁₈ 离子交换柱, 用 50 ml 甲醇水溶液洗脱。将滤液在真空下浓缩, 得到 0.48 g (14 %)所需膦酸, 为白色固体, mp > 220 °C(分解~250 °C); MH⁺(723)。¹H-NMR (300 Mhz)谱与所需物质符合。

C₁₃H₁₄I₃PN₂O₇的计算值: C 21.63 ; H 1.95 ; I 52.73; N 3.88 ; P 4.29; 测定值: C 21.29 ; H 1.95 ; I 52.44; N 3.71 ; P 4.31。

实施例 14 的化合物可用于涂布本发明生产的磁性颗粒。

实施例 15

合成甲氧基-PEG(2K)-膦酸酯

步骤 1: 将甲氧基-PEG(2K)-OH (21.60 g)在 108 ml 甲苯中回流数小时恒沸除水。将冷却的溶液通过滴加入酰氯(7.88 mL)与 DMF (0.313 mL)的混合物进行处理, 然后加热回流 4 小时。将反应混合物在减压下浓缩并将剩余的浅黄色固体倒入 108 mL 水中, 用乙醚洗涤两次。将水溶液用氯仿萃取两次, 将合并的萃取物在无水硫酸镁上干燥并浓缩得到 19.90 g 甲氧基-PEG (2K)-Cl。

步骤 2:

将甲氧基-PEG(2K)-Cl (18.51 g)与亚磷酸三乙酯(185 mL)的混合物回流 4 天。经冷却至室温后形成沉淀物; 将沉淀物通过过滤收集、用乙醚洗涤并真空干燥获得 18.16 g 甲氧基-PEG(2K)-P(O)(OEt)₂。 ¹H NMR(CDCl₃; 300MHz); 4.10 ppm (m, -P(O)(OCH₂CH₃)₂); 3.65 ppm (s, (-CH₂CH₂O-)_n); 3.38 ppm (s, OCH₃); 2.13 ppm (两个三重峰, -CH₂CH₂P(O) (OCH₂CH₃)₂);

1.33 ppm (t, -P(O)(OCH₂CH₃)₂).

步骤 3: 将甲氧基-PEG(2K)-P(O)(OEt)₂(5.02 g)在 100 mL 二氯甲烷中的溶液通过滴加入 28 mL 由 24.15 g 溴三甲基硅烷和 157 mL 二氯甲烷制备的溶液进行处理。将该反应混合物在室温下冷却 16 小时, 然后浓缩得到 4.57 g 产品。为白色固体。¹H NMR(CDCl₃; 300MHz); 8.20 ppm (br s, -P(O)(OH)); 3.65 ppm (s, (-CH₂CH₂O-)n); 3.38 ppm (s, OCH₃); 2.17 ppm (两个三重峰, -CH₂CH₂P(OH)₂).

10 实施例 16

制备甲氧基-PEG(2K)-磷酸酯/超顺磁氧化铁共轭物

将甲氧基-PEG(2K)-磷酸酯(0.448 g)、3.42 mL 93.7 mg Fe/mL 实施例 12 的氧化铁产品悬浮液和水的混合物在 37 °C 下保温 20 小时。将反应混合物放入装有 YM-30 膜的 50 mL Amicon 搅拌室中; 并对水离析过滤, 然后经 0.2 μm 尼龙过滤器过滤。通过 ICP 分析发现样品含 13.3 mg Fe/ml; 0.34 mg/ml 未键合的甲氧基-PEG(2K)-磷酸酯和 1.42 mg/ml 键合的甲氧基-PEG(2K)-磷酸酯。

20 实施例 17

制备甲氧基-PEG(5K)-磷酸酯/超顺磁氧化铁共轭物

将甲氧基-PEG(5K)-硫醇(0.438 g)、1.67 mL 93.7 mg Fe/mL 实施例 12 的氧化铁产品的悬浮液和水(10mL)的混合物在 37 °C 下保温 22 小时。将反应混合物放入装有 YM-30 膜的 50 mL Amicon 搅拌室中; 并对水离析过滤, 然后经 0.2 μm 尼龙过滤器过滤。通过 ICP 分析发现样品含 13.47 mg Fe/ml; 0.23 mg/ml 未键合的甲氧基-PEG(5K)-磷酸酯和 5.46 mg/ml 键合的甲氧基-PEG(5K)-磷酸酯。

30 实施例 18

制备有和无 MMP 涂料的氧化铁颗粒

无 MPP

首先将~70 % 批体积的注射用水加入玻璃或玻璃衬里的制备容器中。在恒定搅拌下，加入并溶解甘露糖醇。最终浓度可为 1 至 5 % w/v，3.5 % w/v 是典型的。在恒定搅拌下，加入并溶解三甲醇氨基甲烷。三甲醇氨基甲烷的最终浓度可为 10 至 100 mM，50mM 是典型的。在恒定混合下，加入氧化铁本体溶液(根据实施例 12 生产)。氧化铁的最终浓度可为 0.1 至 10 % w/v，3 % w/v 是典型的。测定本体悬浮液的 pH。若必要，用 0.1 N NaOH 或 0.1 N 盐酸调节 pH 至 8.1 - 8.3 (目标 8.2)。在连续混合下，用注射用水将本体悬浮液调节至 100 % 最终体积。将制备的悬浮液在 121 °C 下通过蒸汽加热消毒，达到 10 至 50F₀，15F₀ 是典型的。制备的最终悬浮液可具有 pH 5 至 8，7 至 7.5 是典型的范围。

有 MPP

首先将~25 % 总批体积的注射用水加入合适配衡的制备容器中。在连续混合下，加入甲氧基-聚乙二醇(2000)磷酸酯并溶解。最终 MPP/Fe 浓度可为 0.1 至 5 %，2.5 % 是典型的。在连续混合下，加入并溶解三甲醇氨基甲烷。三甲醇氨基甲烷的最终浓度可为 10 至 100 mM，50mM 是典型的。在混合下，加入并溶解甘露糖醇。最终浓度可为 1 至 5 % w/v，25 % w/v 是典型的。在合适的容器中称取合适量的氧化铁悬浮液(根据实施例 12 生产)。在混合下，将含 MPP、甘露糖醇和三甲醇氨基甲烷的溶液加入氧化铁悬浮液中。氧化铁的最终浓度可为 0.1 至 10 % w/v 铁，3 % w/v 是典型的。测定悬浮液的 pH。用 0.4 N NaOH 调节 pH 至 8.4 - 9.0。在连续混合下，用注射用水将本体悬浮液调节至 100 % 最终体积。将上述制备的悬浮液在 121 °C 下通过蒸汽加热消毒，达到 10 至 50F₀，15F₀ 是典型的。在蒸汽消毒期间完成 MPP 与氧化铁结合。此外，可将悬浮液在 60 至 95 °C 下保温 2-4 小时完成 MPP 与氧化铁结合。最终悬浮液可具有 pH 5 至 8，7 至 7.5 是典型的范围。

实施例 19

30 制备裸露氧化铁纳诺晶体

(a) 在不加稳定剂下除去淀粉衍生的聚合物涂料

进行试验以确定由实施例 12 生产的氧化铁悬浮液起始, 在无任何取代的稳定剂下是否可制备无聚合物涂料的氧化铁纳诺晶体的稳定悬浮液。将样品在恒定混合下在 55 °C 下保温并用 pH 电极监测其 pH 值。随着氧化反应的进行, 样品的 pH 值向下偏移。通过加入 1N NaOH 使样品的 pH 保持在 6.5 - 7.5 范围内。保温 3 小时后, 样品絮凝, 说明将其聚合物涂料剥离后, 氧化铁颗粒不稳定并形成大附聚体。

(b) 用单磷酸酯试验

为试验单磷酸酯作为稳定裸露氧化铁纳诺晶体(nions)的改性剂的效果, 进行研究, 其中将 0.5 等分试样的氧化铁悬浮液与各种浓度的磷酸三钠混合。然后将 0.5 ml 的过氧化氢加入各样品中。将这些样品在 50 °C 下保温以氧化淀粉衍生的聚合物涂料(SDPC)。

样品#	[Na ₂ HPO ₄] (mM)
0	0
1	1.7
2	8.3
3	16.6
4	33.3
5	50
6	66.7
7	83.3
8	166
9	250
10	333

15 所有样品在 55 °C 下保温 5 小时后絮凝, 表明单磷酸盐是裸露的氧化铁晶体(ferron)的不令人满意的表面改性剂和稳定剂。

(c) 二磷酸盐作为表面改性剂和稳定剂

用焦磷酸四钠(无水)和类似于使用单磷酸盐时的方法研究二磷酸盐(又称为焦磷酸盐)作为氧化铁颗粒的表面改性剂的效果。将样品在 55 °C 下保温以氧化淀粉衍生的聚合物涂料(SDPC)。在 55 °C 下保温 5 小时后, 样品 2-7

保持悬浮。测量它们的平均颗粒粒度并在下表中给出。

样品#	[Na ₄ P ₂ O ₇] (mM)	平均颗粒粒度 (nm)
0	0	*
1	2.5	11.6
2	6.3	9.5
3	12.5	9.3
4	18.8	9.7
5	25.1	9.1
6	25.1	9.6
7	62.7	9.7
8	125.4	*
9	188.1	*
10	250.7	*

*样品絮凝。

5 样品颗粒粒度反映除去了淀粉衍生的聚合物涂料。该数据表明浓度约 2 至 60 mM 的焦磷酸盐是裸露氧化铁样品晶体的满意表面改性剂和稳定剂。

(d) 三磷酸盐作为表面改性剂和稳定剂

10 进行研究以试验三磷酸盐作为稳定剂，使用购自 Sigma 的六水合三磷酸五钠。向 3.75 ml 氧化铁悬浮液中加入 5.25 mM 三磷酸钠、3.75 ml 水和 7.5 ml 30% 的过氧化氢。将该混合物在 60 °C 下保温 3 小时。该悬浮液未显示任何絮凝迹象，颗粒粒度测量为 9 nm。较小的平均颗粒粒度同样反映除去的涂布淀粉衍生物。该数据表明三磷酸钠是用于氧化铁晶体的满意表面改性剂和稳定剂。

(e) 四磷酸钠作为表面改性剂和稳定剂

15 进行类似研究以试验四磷酸盐。使用购自 Sigma 的四聚磷酸六铵。结果概列于下表中。

样品#	[P ₄ O ₁₃] (mM)	平均颗粒粒度 (nM)
0	0	*
1	2.5	27.3
2	5	9.5
3	10	10.1
4	20	9.3

*样品絮凝

保温后样品 2-4 小颗粒粒度反映除去了淀粉衍生的涂料。该数据表明三磷酸盐也是用于裸露氧化铁晶体的满意表面改性剂和稳定剂。

5

裸露氧化铁纳诺晶体的特征

用焦磷酸钠制备裸露氧化铁纳诺晶体的悬浮液。完成氧化后，将悬浮液相对于水离析过滤以除去淀粉片段和残余过氧化氢。所得悬浮液通过如下分析数据表征。

10

(a) GPC: 凝胶渗透色谱(GPC)表明裸露氧化铁纳诺颗粒(NION)显示无淀粉衍生的聚合物痕迹的尖峰。

(b) 总有机碳:

分析两种单独的纳诺制剂显示仅有基线量的总有机碳，表明基本上完全除去聚合物涂料。

15

样品	TOC(ppb)	Fe 浓度
水空白	159	-
Nion	156	2.6 µg/ml

样品	TOC(ppb)	Fe 浓度
水空白	144	-
Nion	211	30 µg/ml
实施例 12	4060	18 µg/ml

- (c) 毛细电泳: 分析纳诺颗粒显示电泳迁移率为 $-3.4 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ v}^{-1} \text{ s}^{-1}$, 它比实施例 12 的产品的电泳迁移率($-3.0 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ v}^{-1} \text{ s}^{-1}$)稍负。这与通过聚磷酸盐加入的颗粒的负静电荷一致。
- 5 (d) 弛豫性和磁性饱和: 测定磁弛豫性。 r_1 和 r_2 分别为 22.5 和 34.4 $\text{mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$, 得到 r_1/r_2 值为 1.53。这些值一般与实施例 12 的产品的那些值非常类似。
- (e) 在蒸汽消毒下的稳定性: 将纳诺悬浮液在 121 °C 下蒸汽消毒 20 分钟, 颗粒粒度未显示可检测到的变化。

说明书附图

图 1



图 2



图 3

