

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 49/22
A61K 9/50

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 93118159.3

[45] 授权公告日 2002 年 2 月 6 日

[11] 授权公告号 CN 1078815C

[22] 申请日 1993.9.25 [24] 颁证日 2002.2.6

[21] 申请号 93118159.3

[30] 优先权

[32] 1992.9.26 [33] DE [31] P4232755.5

[73] 专利权人 舍林股份公司

地址 联邦德国柏林

[72] 发明人 T·福里西 D·海德曼 W·瓦西斯

[56] 参考文献

EP0327490A 1989.8.9 A61K48/00

EP0327490A 1989.8.9 A61K48/00

EP0441468A 1991.8.14 A61K49/00

EP0458745A 1991.11.27 A61K49/00

审查员 马文霞

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所

代理人 黄泽雄

权利要求书 4 页 说明书 20 页 附图页数 0 页

[54] 发明名称 由可生物降解的共聚物制成的微粒制剂

[57] 摘要

本发明涉及作为治疗和诊断、特别是超声诊断应用的微粒制剂,这些微粒制剂是由可生物降解共聚物组成的,本发明还涉及到微粒的制备方法。

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

权 利 要 求 书

1. 具有一种核心的微胶囊，核心由壁材料限定而成，壁材料包含一种由至少一种合成聚合材料和至少一种蛋白质或多肽组成的共聚物，其中

a) 蛋白质或多肽具有位点特异、结构特异或组织特异性质，或者

b) 蛋白质或多肽具有功能基，通过这些功能基，任选的螯合配位体或它们的金属复合物和/或位点-、结构-或组织特异物质结合起来，此外，

c) 壁材料还可以任选地含有一种或多种药物活性组分，且微胶囊的核心包括：

a) 一种气体或气体混合物，和/或

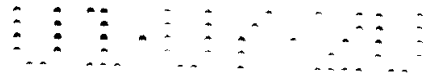
b) 一种或多种药物活性组分，或者

c) 与微胶囊壁相同的材料，

其条件是，合成的聚合材料不是由可聚合的醛组成的，且蛋白质或多肽与合成聚合物的重量比为 10:90 到 80:20，微胶囊的大小为 0.5 ~ 8 μ m。

2. 按权利要求 1 的微胶囊，其中，合成的聚合物是由单体丙烯酸、丙烯酰胺、丙烯酸酰氨、丙烯酸缩水甘油酯或单体烷基氨基丙烯酸酯制成的。

3. 按权利要求 1 的微胶囊，其中，蛋白质或多肽是一种任选糖基化的多肽。



4. 按权利要求 3 的微胶囊，其中所说的蛋白质或多肽选自清蛋白、纤维蛋白原、纤维结合素、聚-L-赖氨酸或一种胶原蛋白的分解产物。

5. 按权利要求 1 的微胶囊，其中所说的蛋白质或多肽是选自白明胶、聚明胶肽或氧聚白明胶的一种胶原蛋白的分解产物。

6. 按权利要求 1 的微胶囊，其中被蛋白质或多肽功能基任选结合的位点、结构和组织特异物质是抗体、偶合抗体、激素、铁传递蛋白、纤维结合素、肝素、运钴胺素、表皮生长因子、脂蛋白、血浆蛋白、肽、寡肽。

7. 按权利要求 6 的微胶囊，其中，特异物质含有 RGD、RGDS、RGDV 或 RGDT 氨基酸序列。

8. 按权利要求 1 的微胶囊，其中，蛋白质或多肽是一种具有位点、结构和组织特异性的多肽。

9. 用于超声诊断的按权利要求 1~8 中任一项的微胶囊，其壁物质包含有一种气体。

10. 按权利要求 9 的微胶囊，其中，气体是空气、氮气、二氧化碳、氧气、氦气、氟气、氩气、氪气或最少二种上述气体的混合物。

11. 按权利要求 1~8 中任一项的微胶囊，其中，被蛋白质或多肽功能基结合的基团是螯合配位体或一种金属离子的螯合复合物。

12. 按权利要求 1~8 中任一项的微胶囊，它含有亚乙基二胺五乙酸基团或它们的衍生物作为螯合配位体。

13. 按权利要求 1~8 中任一项的微胶囊，其中，被蛋白质或

多肽功能基结合的基团是一种金属离子的螯合复合物。

14. 按权利要求 1-8 中任一项的微胶囊, 其中, 复合键合的金属离子是顺磁的。

15. 按权利要求 14 的微胶囊, 其中, 复合键合的金属离子是钆离子。

16. 按权利要求 11 的微胶囊, 其中, 螯合配合体中的金属离子是钆离子。

17. 按权利要求 12 的微胶囊, 其中, 螯合配合体中的金属离子是钆离子。

18. 按权利要求 13 的微胶囊, 其中, 螯合配合体中的金属离子是钆离子。

19. 按权利要求 1-8 中任一项的微胶囊, 其中复合键合的金属离子是放射性同位素。

20. 按权利要求 19 的微胶囊, 其中复合螯合的金属离子是钐-99m 或铟-111 离子。

21. 按权利要求 11 的微胶囊, 其中, 螯合配合体中的金属离子是钐-99m 或铟-111 离子。

22. 按权利要求 12 的微胶囊, 其中, 螯合配合体中的金属离子是钐-99m 或铟-111 离子。

23. 按权利要求 13 的微胶囊, 其中, 螯合配合体中的金属离子是钐-99m 或铟-111 离子。

24. 按权利要求 1 的微胶囊的制备方法, 其中, 单体分散在气体饱和的、任选高压消毒的水相中, 以制备溶液总体积的 0.01-10% (m/v) 的浓度使单体聚合, 所述水相溶液中含有浓度为 0.5

- 20% (m/v) 的溶解的蛋白质或多肽, 同时, 任选含有磁性颗粒, 其条件是, 蛋白质或多肽对合成聚合物的重量比为 10:90 到 80:20, 完成聚合后, 根据密度和粒径, 由一次或多次离心、过滤、沉淀或浮选方法对所得微粒进行分离, 任选透析进一步提纯, 并在生理相容的悬浮剂中悬浮化, 然后任选地同螯合剂、金属螯合物和/或位点、结构或组织特异物质反应, 最后对该悬液进行冷冻-干燥。

25. 按权利要求 24 的方法, 其中, 单体分散在气体饱和的水相中的浓度为占溶液总体积的 0.1 - 10% (m/v)。

26. 按权利要求 24 的方法, 其中, 水相溶液中含有浓度为 1 - 15% (m/v) 的溶解的蛋白质或多肽。

27. 按权利要求 24 的方法, 其中在加入骨架形成物时对该悬液进行冷冻-干燥。

28. 显影剂, 其中按权利要求 1 的微胶囊重新悬浮在可药用的悬浮剂中。

29. 按权利要求 28 的显影剂, 其中, 作为适合药用的悬浮剂为注射用水, 水中可任选地加入普通食盐、葡萄糖、甘露醇和/或乳糖, 此外也可任选加入一种多元醇。

30. 按权利要求 27 的方法可制得的显影剂, 其中, 可以省去最后的冷冻-干燥。

说明书

由可生物降解的共聚物制成的

微粒制剂

本发明涉及能够由生物聚合物发生聚合的单体有效成分和/或诊断上可检测的成分制成的微粒制剂、它们的制备方法、及在诊断和治疗中特别是在超声诊断中作为造影剂的应用。

已经知道,这种微粒其直径小于或者与红血球大体相同,当注射进入循环途径时,可以在循环系统中循环。这种微粒的药用制品适用于作为经循环系统注射医用有效成份或诊断剂的运载物用。作为运载物,原则上所有可生物降解物、亲和的和非水溶性物质均适用。迄今已叙述了所有脂肪、蜡、脂类(如大豆卵磷脂)、变性的生物聚合物(如清蛋白,白明胶)、以及合成的可生物降解聚合物(如聚乳酸,聚羟丁酸,聚烷基氰基丙烯酸酯,聚L-赖氨酸)。

已经确认,在循环途径中,微粒循环的速度和数量是不同的,作为它们物理与化学性质的一种功能,可以被单核吞噬系统(MPS)细胞摄取(主要在肝、肺、脾)。吸附物颗粒表面的颗粒电荷、颗粒大小、性质(分子量,两亲性)以及颗粒表面和血液的成份如纤维结合素、

清蛋白等的亲合力均作为主要因素进行了考虑,这些因素决定了单核吞噬细胞吸附颗粒的动力学。通过微粒表面物理化学性质的特有变化,吞噬作用动力学会受到单核吞噬系统细胞及相应器官中(如肝、肺、脾、骨髓)颗粒浓度的影响(被动靶向)。除了在网状内及系统外的靶组织和机体结构中,不可能有特定浓度的微粒。微粒唯一只能通过和具有特异位点、特异结构或特异组织的物质相结合的方式才能达到上述目的(导向方式)。但是用于上述超声诊断的颗粒作为制剂尚不完全,只有和导向物结合才是合适的。

因此不得不接受在 EP0458079 和 DE3803972 所叙造影剂条件,只能采用昂贵的生产方法,这就必须采用有机溶剂,这对于环境保护和工作场所安全而言是有害的。此外,在应用制品前,必须确认所用过的有机溶剂不存在于药用产品中。对于生产而言必须采用表面活性辅助物(如表面活性剂),但是对于注射制品是有害的。在不同器官中,这些颗粒的浓度分布是不能控制的,DE3803972 中颗粒和选择性累积化合物(所谓导向物,如单克隆抗体)是不可能结合的。DE4004430 所叙由聚乙醛制成的微粒不适于作为特定物或特定结构物的运载物,因为生物降解性质不清楚。这种情况的不足还在于生产颗粒必须加入表面活性辅助物。

EP0224934 所叙蛋白质、特别是清蛋白微粒在体内外活性很差。

因此,本发明的目标是提供微粒制剂,特别是适用于超声诊断的

制剂,其制造过程不需使用生理有害溶剂或辅助物质(如表面活性剂),易于生产和可生物降解,在其壁材料中含有具有位点特异、结构特异或组织特异结合性质的物质,或它能共价地进行上述结合,并呈现出足够的体内外稳定性。

根据本发明,上述目标是由这样的微粒制剂达到的,其微粒壁是由生物聚合物、最好是多肽(也可是糖基化的)与在制备过程中聚合得到的合成物质结合而成的。

因此,由至少一种合成聚合物和至少一种生物聚合物的共聚物制成的微粒制剂是本发明的一个目标。多肽最好是天然来源的或者是合成或部分合成的、以及通过基因工程获得的生物聚合物,如清蛋白、胶原降解物、白明胶、纤维蛋白原、纤维结合素、聚明胶肽、氧聚白明胶、它们的分解产物以及聚-L-赖氨酸是适宜的。生物聚合物也可以被糖基化。适用的聚合物单体最好选用烷基氰基丙烯酸酯、丙烯酸、丙烯酰胺、丙烯(酸)酰氯以及丙烯酸缩水甘油酯。

本发明微粒制剂在通过包合气体来制备气饱和溶液的过程中是适用的,特别适于作为超声诊断的显影剂。由于所含的气体,它们在超声场中可以作为高效分散成份。此外,它们可被超声波激发,发射出独立的信号,借助彩色多普勒技术可对这些信号进行分析。

气体如空气、氮气、二氧化碳、氧、氮、氩、氦及其混合物均适用。用相应气体或气体混合物充气的过程发生在一种用有关气体或气体混合物饱和的水溶液中生产微粒的时候。

微粒也可以(任选地)含有其他物质,它们是可以借助医学诊断方法例如磁共振 X—线断层图、磁共振光谱、闪烁法、或采用适当的磁强计(生物磁)进行高敏感磁场测定检测的,可以是微胶囊化的且在壁材料中或(任选地借助适当物质如螯合剂)可以结合到壁材料上。因此,当采用放射性同位素时,可以利用闪烁法检测微粒。同样地,当采用微胶囊化或在壁材料中掺入适当的顺—、超顺—、铁—或亚铁磁性物质时,就可能将本发明微粒作为显影剂用于磁共振 X—线断层图、磁共振光谱、或测量强磁场中。

值得惊讶的是,在生产本发明颗粒时(维持足够浓度的生物聚合物),不需要加入表面活性物质如表面活性剂。与以往已知基于合成的聚合物来生产微粒的生产过程相比较,本方法具有决定性的优越性,因为通常为了减少界面张力和防止颗粒凝聚,需要加入表面活性剂,考虑到其生理有害性,因此在应用于抗体前,要从制剂中再次除去,直至允许的残存量。

本发明微粒制剂的另一个优点是,可以改变颗粒性质以更加符合特定用途所提及的要求,这可通过改变各种生产参数而容易进行控制。因此,微粒制剂的药物动力学参数(器官分布、在循环途径中滞留时间)会因特定选择的生物聚合物或生物聚合物功能基团的改变而受到影响(例如,采用二羧酸酐如琥珀酸的、二甘醇酸(*diglycolic acid*)的、谷氨酸的、马来酸的酐或甲酸酐进行酰化作用或用一元羧酸酐例如乙酸酐或丙酸酐进行乙酰化作用)。

进一步,壁材料中生物聚合物的含量可在大范围内变化,因此可能在体内影响胶囊物质的生物降解时间,以使其符合预定的用途。可以直接通过控制制备溶液中生物聚合物的比例来控制该含量。例如,根据例1,由一种高压消毒、含有1%(V/V)丁基氰基丙烯酸和5%白明胶的水溶液制成的本发明微粒,其壁材料由55%(M/M)生物聚合物构成,丁基氰基丙烯酸用量相同但用2.5%高压消毒白明胶水溶液生产的微粒,其壁材料由35%(M/M)生物聚合物构成,用7.5%高压消毒白明胶水溶液生产的微粒,其壁由65%(M/M)生物聚合物构成。

令人惊讶的是,本发明的微粒可以在不加入其他辅助物质如乳糖、甘露糖醇或山梨醇的情况下进行冷冻干燥,这些物质通常作为冷冻干燥的成型框架。在干燥后,相当数量的微粒由于这些成型框架的作用而受到机械损伤,因此不能再用作造影。与此相比,采用本发明的微粒时,壁材料中过量的生物聚合物用作一种成型框架,令人意外的结果是,完好的与被破坏的微胶囊之比得到奇迹般的改善。由于该十分有利的比例,预计的造影用剂量可明显降低。。

但是本发明微粒也可能有(任选再)含掺入的药物活性成分,例如不透明剂(在作为超声研究的显影剂时,包含有一种气体或气体混合物)和一种或多种存在于微胶囊化颗粒中的活性成份。最好是,采用用于所叙位点特异、结构物异或组织物异物质的方法,将活性成分掺入到壁材料中。如果活性成分是生物聚合体,它们也可部分

地形成壁材料,其作法是,在微粒制备中,它们或单独地或与其它生物聚合物(如白明胶,清蛋白,纤维结合素、聚-L-赖氨酸)混合而用作起始物料、再加入一种可聚合的单体或低聚物而制备。将活性成分掺入到胶囊材料的生物聚合物中的特别的优点是,例如通过肽键与胶囊材料的生物聚合物部分结合的活性成分可以通过体内酶分解后释放出来。

本发明微粒特别用于检测或治疗血栓和动脉粥样硬化变化。在这种情况下,应用抗体或抗体片段抗血纤维蛋白、血纤维结合清蛋白或它们的部分结构、组织纤维蛋白溶酶原活化因子或其部分结构(例如 I 型同源和躯壳序列)、脂蛋白的蛋白部分(也是部分结构)作为导向物具有独特优点。

本发明微粒应用的其他领域也可以是,作为诊断或治疗激素功能损伤(在这种情况下,采用能够与受体结合而作为导向物的肽激素或其改进的产物)、或者诊断或治疗血管内壁损伤(在这种情况下,抗体或抗体片段作为抗氧基哌啶啉、特别是选择素(*Selectins*)如 *LAM-1* *ELAM-1* 和 *GMP-140* 的导向物的应用,或者受体或它们的不成对结合片段向氧基哌啶啉类、尤其是选择素如 *LAM-1*、*ELAM-1* 和 *GMP-140* 给键(*bond-imparting*)的片段作为导向物的应用,具有独到优点)。进一步,本发明微粒也可以用于诊断或治疗肿瘤,它采用抗体或抗体混合物作攻击肿瘤表面抗原的导向物。

按照本发明,采用适当的反应性单体或低聚体聚合制备微粒(单

体或低聚物例如是氰基丙烯酸丁酯、氰基丙烯酸异丁酯、氰基丙烯酸异丙酯、氰基丙烯酸丙酯、氰基丙烯酸异己酯、氰基丙烯酸己酯、氰基丙烯酸甲酯、丙烯酸、丙烯酰胺、丙烯酸二甘醇酯、丙烯(酸)酰氯),单体或低聚物的浓度相对于制备溶液总体积而言为 0.01—10% (m/v)、最好为 0.1—10%,反应在适合的条件下(通过加入自由基、调节 pH 并进行紫外幅射)、在含有分散的生物聚合物的水相中进行,例如以 0.5—20% (m/v) 浓度、最好为 1%—15% (m/v) 的浓度加入清蛋白、白明胶、氧聚白明胶、聚明胶肽、纤维结合素、聚-L-赖氨酸并溶解。在制备微粒前,采用胶原分解物例如白明胶、聚明胶肽或氧聚白明胶时,对溶液高压消毒常常是有益的。在完成聚合后,获得的微粒可以根据其密度和颗粒大小采用一次或多次重复离心、过滤或漂洗来进行分离,任选进一步通过透析和悬浮在一种生理相容悬浮剂中(最好是注射水)进一步纯化,直至达到希望的浓度。通过加入合适的水溶性物质如葡萄糖、甘露醇山梨醇、普通盐、半乳糖、乳糖、果糖、海藻糖,可以使悬液等渗。

在制备中,微粒的大小分布可以通过广泛类型的搅拌装置和转数来控制。

在饱和有所希望气体的一种溶液中进行反应,制备出充气的微粒。与此相关的是,所得到的微粒密度、即微粒壁材料和气体的比例可以通过搅拌条件、尤其是通过制备过程中生物聚合物含量来控制。

如果所得到的微粒其核心和外壳是由同种材料构成的,必须注意在生产中选择适当的搅拌装置和搅拌速度,避免反应溶液产生泡沫。

和位点特异、结构特异或组织特异物质结合所需的能力—它被认为是用于保证在 RES(导向物)的组织之外的靶区有一个微粒的附加浓度—通过以下两种方式获得,其一是使所说特异物质和多肽结合,共同形成外壳物质,这是在制备微粒之前或之后发生的,采用已知的结合氨基酸的生物化学方法(如 W. König, R. Geiger: 多肽合成的一种新方法: 加入 1-羟基-苯并三唑,用二环己羰二亚胺活化羧基, *Chem. Ber.* 103, 788—798, 1970), 其二是在位点特异、结构特异或组织特异物质的一种水溶液中制备微粒, 如果该物质为一种多肽的话, 那么这种物质可以直接用作外壳物质。

能够结合到微粒上或共同形成外壳材料的位点特异、结构特异或组织特异物质最好选择抗体、结合抗体、激素(特别是肽激素)、铁传递蛋白纤维结合素、肝素、运钴胺素蛋白、表皮生长因子、脂蛋白、血清蛋白及其赋予特性的部分结构和寡肽如 RGD、RGDS、RGDV 和 RGGT。

二亚乙三胺五乙酸及其衍生物适于用作可与微粒结合的螯合配位体。这种与颗粒的配位连接是以一种已知方式进行的。[Hanatowich 等 *Sciences*, 220(1983)613]。然后这些颗粒再与所需金属离子反应、形成预期的颗粒—固定金属复合物。

选用的金属离子取决于所需应用范围。进行核磁共振诊断时，根据本发明，顺磁金属离子、优选为其原子序号为21—29和59—70的元素的离子，尤其是钆离子(Ⅲ)。当应用于闪烁图法时，合适的放射源优先采用¹¹¹铯、^{99m}钼、¹²³碘、¹³¹碘。

最终的微粒悬液可以直接用于各个预定用途，为了改进储存稳定性，在加入支撑成型物如海藻糖、聚乙烯吡咯烷酮、乳糖、甘露醇、山梨醇、甘氨酸(这些物质也可以用于产生张力)时冷冻且然后冷冻—干燥悬液被证明是有利的。过量使用生物聚合物作为支撑物也证明是特别有利的。无论那种情况下，在冷冻时需要移动悬液，以防止由于沉淀或漂浮使颗粒在冷冻物中的不均匀分布。从冷冻干燥制剂制备可直接用于注射的悬液时，是将冷干品再悬浮于合于药用和符合质量的悬浮介质如水、含一种或多种无机盐例如生理电解质的水溶液、单糖或双糖如葡萄糖或乳糖、糖醇如甘露醇的水溶液中，但是最好选用注射用水。任选溶解的物质总浓度为(重量)0—20%。

直接可用的显影剂浓度确定在0.01—20毫克、最好0.5—6mg颗粒/ml显影剂为宜。注射剂量取决于具体用途。在对血管进行超声诊断研究时，剂量范围为1—500 μ g、最好是10至100 μ g颗粒/公斤体重。若用彩色多普勒仪、声图仪研究肝和脾时，用量为50—1000 μ g，最好为200—600 μ g/公斤体重。本发明由下列实施例进行解释。

实施例1

在 300ml 蒸馏水中溶解 15 克白明胶 (300bloom), 用盐酸调节 pH 至 3.0。溶液于 121°C 高压消毒 30 分钟, 冷却至室温后将 pH 校正至 pH5.0 (用氢氧化钠溶液), 并在 2000ml 烧杯中用一种快速旋转搅拌器以每分钟 1000 转进行搅拌。将 3ml 氰基丙烯酸丁酯在搅拌下缓慢 (10 分钟) 滴入溶液中。生成的微粒继续搅拌 60 分钟。然后将该悬液漂浮在分离漏斗中, 放置 2 天。将下层液排放出来, 上清液用蒸馏水加至 100ml。该悬液中含有充气的和对声音活性的微粒, 大小为 0.1—8 μm , 需要时, 经过进一步漂浮或过滤, 可以使颗粒大小集中 (例如 0.5—3 μm)。微粒的胶囊壁由 55% (M/M) 多肽和大约 45% (M/M) 聚氰基丙烯酸丁酯构成。不需加入表面活性剂物质, 颗粒便可分散在水中。它们不会发生凝聚。加入适当辅助物 (例如葡萄糖, 氯化钠, 甘露醇, 半乳糖, 乳糖), 悬液可以等渗化。

必要时该悬液可以被冷冻—干燥, 以增加储存稳定性而不丧失其作为超声研究显影剂的功用, 最好是加入一种低温防护剂例如乳糖、聚乙烯吡咯烷酮、甘露醇、甘氨酸后再冷冻—干燥。

实施例 2

将 500mg 聚-L-赖氨酸 (分子量 5000) 溶于 20ml 蒸馏水中, 用磷酸缓冲液将 pH 调至 4.5。加入 100mg 丙烯酸缩水甘油酯, 冷却至 20°C 后, 采用一种快速搅拌器搅拌该混合液。加入 10mg 过二硫酸铵和 0.1ml N,N,N',N'-四亚甲基二胺。再搅拌 90 分钟。通过漂洗分离充气的微粒。微粒的粒径为 0.2—6 μm 。

实施例 3

7.5 克聚明胶肽溶于 200ml 水中, 用磷酸将 pH 调至 3.0, 为用于注射, 加水至 300ml。用 0.22 μ m 滤器无菌过滤该溶液, 再用一种快速搅拌器以每分钟 6000 转搅拌。在搅拌下, 1.5ml 氰基丙烯酸异丙酯和 1.5ml 氰基丙烯酸丁酯的混合物逐滴缓慢加入。连续搅拌 120 分钟。所得悬液用一种分离漏斗漂洗 3 天。随后的操作过程按照例 1。所得到的微粒中含有气体, 它们适用于作为超声研究的显影剂。其壁材料由约 22%(M/M) 生物聚合物、约 40%(M/M) 聚氰基丙烯酸丁酯和将近 38%(M/M) 聚氰基丙烯酸异丙酯构成。无需加入表面活化辅助物质, 它们便可以在水中分散, 不会发生凝聚。粒径为 0.2—6 μ m。

实施例 4

为注射用, 10 克人血清蛋白溶于 200ml 水。用盐酸将 pH 调至 4.0, 加水至 300ml 作注射用。用 0.22 μ m 滤器对溶液进行无菌过滤, 用一种快速助溶器以每分钟 10000 转搅拌。在搅拌条件下, 缓慢逐滴加入 2ml 氰基丙烯酸异丙酯。再连续搅拌 60 分钟。得到的悬液在一种分离漏斗中漂洗 3 天。随后步骤同例 1。制得的微粒含有气体, 它们适于作为超声研究的显影剂。其壁材料由大约 30%(M/M) 人血清蛋白和约 70%(M/M) 聚氰基丙烯酸异丙酯组成。无需加入表面活化辅助物质, 它们可以分散在水中, 不发生凝聚。粒径平均为 0.2—3 μ m。

实施例 5

250ml 氧聚白明胶溶液用盐酸调至 pH2.5, 为用于注射, 加水至 300ml。采用 0.22 μ m 滤器无菌过滤该溶液, 用一种快速定子搅拌器以每分 8000 转进行搅拌。在搅拌下, 缓慢逐滴加入 3ml 氰基丙烯酸丁酯。再连续搅拌 90 分钟。制备液于分离漏斗中漂洗 3 天。以下步骤同例 1。制得的微粒含有气体。它们适于用作超声研究的显影剂。其壁材料由大约 25%(M/M) 氧聚白明胶和大约 75%(M/M) 聚氰基丙烯酸丁酯组成。无需加入表面活化辅助物质, 它们在水中便可以分散, 不发生凝聚。粒径约为 0.2—4 μ m。

实施例 6

将 500mg 纤维结合素溶于 5ml 蒸馏水, 用盐酸将 pH 调至 3.5。溶液用 0.22 μ m 滤器无菌过滤。并采用一种快速定子搅拌器以每分钟 8000 转在冷却的 15ml 容器(15 $^{\circ}$ C)中进行搅拌, 在搅拌下缓慢滴入 0.3ml 氰基丙烯酸丁酯。连续搅拌 90 分钟。将制得的悬液置于分离漏斗中漂洗 3 天。为了用于注射, 将上清液悬浮于 2ml 水中, 其中含有 100mg 甘露醇。于 -50 $^{\circ}$ C 进行振荡, 将悬液冷冻并冷冻—干燥。在使用前, 将微粒再分散于 2ml 水中以用于注射。微粒的粒径平均为 0.8 μ m。它们适于作为超声分析的显影剂。微粒壁材料中大约 35%(M/M) 为纤维结合素和 65%(M/M) 聚氰基丙烯酸丁酯。

实施例 7

将 100mg 抗血纤维蛋白的一种抗体溶于 4ml 磷酸缓冲液(

pH4.5)。溶液用 $0.22\mu\text{m}$ 滤器无菌过滤，并在一种双层壁的搅拌容器中(10ml 体积)、于冷却下以快速旋转助溶搅拌器每分钟 6000 转搅拌。在搅拌期间，缓慢逐滴加入 0.2ml 氰基丙烯酸丁酯。连续搅拌 60 分钟。将制得的悬液置于一个分离漏斗中漂洗 2 天。将底层液排放出来，上清液与 200mg 乳糖和 2ml 水混合以作注射用。该悬液在 -40°C 于冷浴中振荡冷冻，然后冷冻—干燥。在使用前，将微粒再悬浮于 2ml 水中以作注射用。它们是充气的，并且适于作为超声研究的显影剂用。其粒径平均为 $1\mu\text{m}$ 。微粒壁材料是由大约 20%(M/M) 抗体和大约 80%(M/M) 聚氰基丙烯酸丁酯组成。

实施例 8

15 克聚明胶肽溶于 50 毫升注射用水中，在控制 pH 的情况下，逐滴加入 2N 氢氧化钠。再逐渐加入 2 克无水二乙醇酸酐，使 pH 保持在 7.5~8.0。反应完成后，用反复超滤法(排除限度 MG1000)从溶液中除去过量二乙醇酸。该酸化的聚白明胶肽溶液加注射用水至 300ml，然后经过 $0.22\mu\text{m}$ 的滤器过滤。在每分钟 10000 转的情况下搅拌并慢慢加入 3ml 氰基丙烯酸丁酯。加完后继续搅拌 60 分钟。所得充气的微粒在每分钟 1500 转下离心分离 30 分钟，然后取出放入 50ml 注射水中。在不加表面活性助剂的情况下，这些微粒可以分散在水中而不凝聚。其粒径约为 $0.1\sim 6\mu\text{m}$ 。微粒壁由大约 45%(M/M) 酰化的聚明胶肽和 55%(M/M) 聚氰基丙烯酸丁酯组成。

实施例 9

按例3方法制成的20ml含气体的微粒放入pH4.5的磷酸缓冲液中。于4℃每分钟100转搅拌该悬液,然后把25mg 3-二甲胺基丙基-N'-乙基碳二亚胺的盐酸盐加至该混合液中。60分钟后,再把已溶解在10ml磷酸缓冲液中的25mg血纤维生成素加至微粒悬液中。于4℃搅拌60分钟,再在室温下搅拌120分钟。然后悬液在pH4.5的磷酸缓冲液中透析3次(排除限定MG1000)并置于分离漏斗中漂浮2天。将上清液溶解在20ml注射用水中,混入5%聚乙烯吡咯烷酮(m/v),在振动下于-40℃冷冻,再进行冷冻-干燥。

实施例10

例9的冷冻干燥制品再悬浮于20ml 5%的葡萄糖溶液中。把0.1ml上述溶液加至10ml 37℃磷酸缓冲液(PBS)中,该混合液含有一个新制成的血纤维蛋白凝块(直径1mm)。在水浴中振荡培养10分钟后,取出凝块,用PBS洗涤5次,每次PBS用量为10ml (PH7.4),然后进行声图描记法研究。在彩色多普勒仪上,粘着的微粒信号能够被清楚地检测出来。用例3的颗粒类似地重复该步骤(例3中没有例9中的与纤维结合素的反应)。在例3凝块的声图描记研究中,没有粘着微粒被检测出来。用彩色多普勒仪也同样。

实施例11

将按例3方法制得的5ml含气微粒放入5ml pH4.5的磷酸缓冲液中。于4℃对该悬液搅拌(每分钟100转),然后将10mg(3-二甲胺基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐加到混合液中。5分钟

后,把预先溶解在 1ml 磷酸缓冲液中的 2.5mg 抗血纤维蛋白抗体(No. 0541 Clone E8), Immunotech, Marseilles, france) 加到微粒悬液中。4℃下搅拌 60 分钟,再于室温下搅拌 120 分钟。然后悬液在 pH4.5 的磷酸缓冲液中透析 3 次(排除限度 MG1000),再在分液漏斗中漂浮 2 天。上清液溶解在 2ml 注射用水中,混入 5% 聚乙烯吡咯烷酮(m/v),于 -40℃ 振荡冷冻,然后冷冻—干燥。

实施例 12

把例 11 的冷冻干燥制品再悬浮在 2ml 5% 葡萄糖溶液中。取 0.1ml 加到 10ml 37℃ 的 PBS 液中。该混合液含有一个新制得的血纤维蛋白凝块(直径 1mm),在水浴中振荡培养 10 分钟后,取出凝块,每次用 10ml PBC(pH7.4)洗涤 5 次,然后进行声图谱的研究。在彩色多普仪上,粘着微粒信号能被清楚地检测出来。用例 3 的颗粒(例 3 中没有例 11 中的与纤维蛋白抗体的反应)并用相似步骤,在凝块声图描记研究中(例 3)不能检测出粘着微粒(在彩色多普仪上也同样)。

实施例 13

采用类似于例 11 的实验步骤,检验例 6 中 0.1ml 再悬浮颗粒的纤维蛋白键。在声图描记研究中,与凝块结合的微粒能被清楚地检测出来。

实施例 14

用类似于例 11 的实验步骤,测检例 7 中 0.1ml 再悬浮液颗粒

的纤维蛋白键。在声图描记研究中,结合到凝块的微粒能被清楚检测出来。

实施例 15

取出将根据例 8 制得的 10ml 微粒放入 10ml pH4.5 的磷酸缓冲液中,加入 20mg 1-羟基苯并三唑。冷却到 4℃后,搅拌(每分钟 100 转)下加入 10mg(3-二甲氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐,于 4℃下继续搅拌 60 分钟。随后再在室温下搅拌 60 分钟。室温下把预先溶解的 5ml 磷酸缓冲液中的 10mg 肠促酶素肽加到悬液中。室温下搅拌 120 分钟。然后,在 pH4.5 的磷酸缓冲液中,把悬液透析 5 次(排除限度 MG1000),再于分液漏斗中漂浮 2 天。将上清液溶解在 10ml 注射用水中,与 5% 聚乙烯吡咯啉酮(m/v)混合,于 -40℃振荡冷冻,然后冷冻-干燥。

实施例 16

把例 15 的冷冻干燥制品再悬浮在 10ml 注射水中。用 0.1ml 该悬液注射至大鼠尾静脉。10 分钟后,取出胰腺,在水浴中进行声图描记研究。在彩色多普勒仪上,微粒的超声信号能被检测出来。

实施例 17

取出例 3 生产的含气微粒 5ml,加到 5ml pH4.5 的磷酸缓冲液中。于 4℃搅拌该悬液(每分钟 100 转),将 10mg(3-二甲氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐加至混合液中。5 分钟后,把预先溶解在 1ml 磷酸缓冲液的 5mg 组织纤维蛋白溶酶原激活因子(TPA)

加至微粒悬液中。4℃下继续搅拌24小时。然后,用pH4.5的磷酸缓冲液将悬液透析3次(排除限度为MG1000),并于分液漏斗中漂浮2天。将上清液溶解在2ml注射用水中。

实施例18

将制成的两个纤维蛋白凝块(每块重约50mg)加至20ml血浆中。将例17制得的0.05ml颗粒悬液加至凝块中。10分钟后,从血浆中取出凝块,在声图描记研究中,粘着微粒的信号出现在彩色多普勒仪上。

实施例19

0.6克白明胶溶于20ml磁铁颗粒水悬液中(铁含量大约为20mmol/ml,颗粒直径约2nm)。用盐酸调节溶液pH至3.0。搅拌(每分3000转)下,缓慢加入0.2ml氰基丙烯酸异丁酯。加完后,继续搅拌90分钟。离心该悬液(每分2000转,60分钟)。弃掉上清液,将下部液溶解在10ml pH7.4的PBS中(10mmol)。悬液冷至4℃并搅拌(每分钟100转),加入10mg(3-二甲氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐。于4℃下继续搅拌60分钟。然后加入5mg抗纤维蛋白的抗体(No. 0541 Clone E8 Immunotech, Marseilles, France)。于4℃继续搅拌60分钟,然后室温下搅拌120分钟。在pH7.4的PBS中(10mmol),将该悬浮液超滤5次(排除限度MG5000)。然后离心悬液(每分钟2000转,60分钟)。取下层液加至5ml含有5%甘露醇(m/v)的注射用水中,通过5μm滤膜过滤。将

滤液于 -40°C 冷冻,再进行冷冻—干燥。

实施例 20

15克白明胶(300bloom)于 80°C 溶于150ml注射用水中。冷却后,用0.1N盐酸将溶液pH调至2.5,加注射用水至300ml。用高压消毒溶液(方法A121,德国药典第九版)。控制消过毒的溶液pH,必要时调至pH2.5。在搅拌下加入3ml氨基丙烯酸异丁酯,继续搅拌90分钟。所得微粒悬液于每分钟1000转离心60分钟,将上清液溶解在50ml注射用水中,再于每分钟1000转离心60分钟。重复上述步骤5次。将最后离心的上清液溶解在50ml PBS中(pH7.0),搅拌下加入0.1mg固体二亚乙基三胺五乙酸二酐(参看Hnatowich等,Science 220:613,1983)。再搅拌5分钟。悬液于每分钟1000转离心60分钟,将上清液加至50ml注射用水中。为注射目的,水液要再离心4次。最后离心的上清液溶解在50ml注射水中,并用孔径70、40、20和 $10\mu\text{m}$ 的HDC微孔滤柱进行过滤。滤液中大约含有 2×10^9 颗粒/ml,颗粒表面有二亚乙基三胺五乙酸基团。平均粒径为 $2\mu\text{m}$ 。采用已知方法,颗粒可以被放射性金属离子(例如铟-111或镍-99)标记。

实施例 21

纤维蛋白凝块作为回声应用研究的样品,仅能用r—计数器代替多普勒仪而检测出来。

实施例 22

7.5克聚明胶肽在80℃溶于150ml注射用水中。冷却后,用0.1N盐酸将溶液调至pH3.0,加注射用水至300ml。高压消毒溶液(方法A121,德国药典第9版)。消过毒的溶液校正至pH为2。搅拌下加入3ml氰基丙烯酸丁酯。继续搅拌90分钟。所得微粒悬液于每分钟1000转离心60分钟,上清液溶解在50ml注射水中,并且再以每分钟1000转离心60分钟。上述步骤总共重复五次。最后离心得到的上清液溶解在50ml PBS(pH7.4)中并冷却至4℃。搅拌下于4℃加入50mg 抗生蛋白链霉素和5mg 持久霉素(EDC)。继续搅拌1小时。将悬液离心3次(每分钟1000转,60分钟)。离心后,上清液溶解在50ml PBS中(pH7.0,10mmol磷酸盐)。根据D. J. Hnatovitch等人的方法:J. Nucl. Med. 28(1987)1294—1302,用硫代琥珀酰亚胺基—6—(生物素酰胺基)—己酸酯(NHS—LC—生物素)以1:5摩尔比例对抗纤维蛋白的抗体进行标记。

实施例23

用例22中的生物素标记的抗纤维蛋白抗体0.5mg对一只喂食食物中含有胆固醇的兔子进行静脉注射。3小时后,再注射例22中的颗粒。10分钟后,从杀死的动物身上取出颈动脉,在水浴中,用多勒仪测定动脉粥样硬化的动脉部分的造影剂信号。粘着颗粒的回声信号能被清楚地检测出来。

实施例24

a)根据例8制备的20ml微粒悬液用5ml磷酸缓冲液调pH至

4.5, 然后混入 50mg^{125} 碘标记的抗纤维蛋白 ($5\mu\text{ci}$) 的抗体。于 4°C 搅拌, 将 500mg (3-二甲胺基丙基)- N' -乙基碳二亚胺盐酸盐加到反应混合液中。在冷却下继续搅拌 8 小时, 通过离心分离微粒, 再用注射水洗 3 次, 每次用 20ml 。每次洗涤时, 都使颗粒再悬浮于水中然后离心。洗涤全部完成后, 将颗粒悬浮于 20ml 注射水中。基于用 r -计数器对 125 碘活性的测定, 可以确定抗体对颗粒的结合度。抗体起始用量的 93% 已永久性结合至颗粒的表面。

b) 根据例 4 (DE 3803972) 制得的微粒以相当于 24a) 的量在其余条件相同时用 50mg^{125} 碘标记的纤维蛋白抗体 ($5-\mu\text{ci}$) 进行反应。用例 24a) 的方法对微粒结合度进行比较, 发现结合度很低, 仅有 1%。