



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本

(11) 證書號數：TW I655017 B

(45) 公告日：中華民國 108 (2019) 年 04 月 01 日

(21) 申請案號：102143932

(22) 申請日：中華民國 102 (2013) 年 11 月 29 日

(51) Int. Cl. : A61N2/00 (2006.01)

(30) 優先權：2012/11/29 美國 61/731,385

(71) 申請人：微美德桑提亞公司 (美國) MICROMED SCIENTIA, INC. (US)  
美國

(72) 發明人：倪九祥 NI, JIU XIANG (US)

(74) 代理人：陳長文

(56) 參考文獻：

TW	201008543A	US	4665898A
US	5183456A	US	7297100B2
US	20100063346A1		

審查人員：李國隆

申請專利範圍項數：17 項 圖式數：14 共 41 頁

(54) 名稱

含穩定磁場之方法、設備及分析方法

METHODS, DEVICES, AND ASSAYS WITH STABILIZED MAGNETIC FIELD

(57) 摘要

本發明提供一種通過施加穩定的人工磁場來干擾體內和體外分子間偶極作用的方法，以及治療與不正常的細胞生長有關的病症的方法。本發明還提供一種涉及穩定的人工磁場的篩選方法。此外，在上述治療方法和篩選方法中，暴露於穩定的人工磁場可與其他非磁場療法聯合使用。

Provided are methods for disrupting dipolar interactions in vivo and in vitro, as wells as treating conditions associated with abnormal cell growth, by subjecting to an artificial, stable magnetic field. Also provided are assays involving an artificial, stable magnetic field. Additionally, the exposure of an artificial, stable magnetic field may be combined with other non-magnetic therapy in treatment or assays.

指定代表圖：

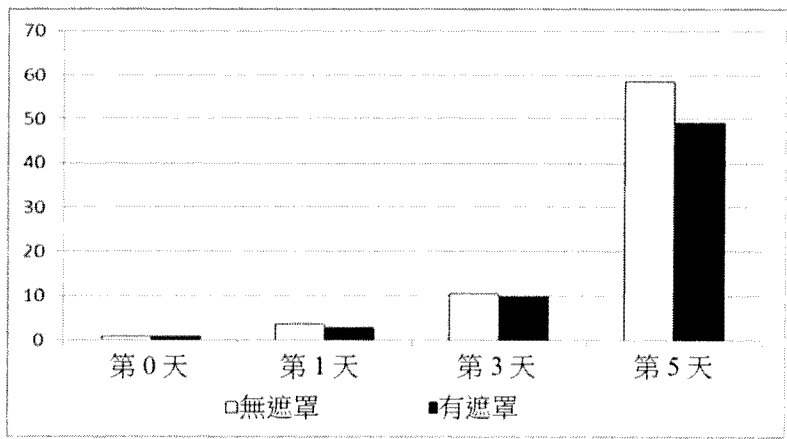


圖 4

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

## 【發明名稱】

含穩定磁場之方法、設備及分析方法

METHODS, DEVICES, AND ASSAYS WITH STABILIZED MAGNETIC  
FIELD

## 相關申請的交叉引用

本申請要求2012年11月29日提交的美國臨時專利申請第61/731,385號的優先權，該在先申請的全部內容在此通過引用併入本文。

## 【技術領域】

本發明涉及穩定磁場在醫療中的應用以及使用穩定磁場的篩選方法，所述磁場通過例如遮罩周圍環境磁場而得以穩定。

## 【先前技術】

在先研究表明，靶向癌細胞中的微管動態不穩定性和癌細胞中的微管動態行為可作為研製新的抗癌藥物的重要策略<sup>1,2</sup>。例如，紫杉醇(一種人HeLa細胞和小鼠成纖維細胞複製過程的有效抑制劑)與癌細胞中的微管結合，從而阻斷細胞週期的G2期和M期的細胞複製並穩定細胞質微管<sup>3,4</sup>。

人們知曉范德華力在蛋白質之間的相互作用和細胞中的所有分子間的相互作用方面發揮重要作用。傳統觀點認為蛋白折疊和膠束形成由非極性殘基的疏水性(稱為范德華力)驅動<sup>5-9</sup>。此外，范德華力有助於分子簇的形成及其穩定性。

因此，對范德華力的干擾或控制可通過改變分子間偶極作用和蛋白折疊而發揮治療作用。雖然，許多藥物至少部分以這種方式起效，但是，理想的做法是不使用藥物而實現這種干擾/控制，從而產

生療效。更為理想的做法是使非藥物誘導的對范德華力的干擾/控制以協同作用的方式與藥物聯合，從而產生更好的療效。

### 【發明內容】

本發明提供一種干擾細胞中分子間偶極作用從而干擾或控制細胞中分子間相互作用的方法。一方面，本發明的方法包括將穩定的人工磁場施加於所述細胞持續足夠的時間段，導致所述細胞中分子間偶極作用發生改變，從而使細胞生理學發生改變。在一些實施方式中，所述時間段為至少18小時、至少24小時、至少36小時、至少48小時、至少60小時或至少72小時。

在一種實施方式中，所述細胞為正在快速分裂的癌細胞或腫瘤細胞，所述細胞的生理學發生改變，從而使分裂速度降低。在另一實施方式中，所述細胞是受損的細胞，所述細胞的生理學發生改變，從而防止細胞過早死亡。在一些實施方式中，所述穩定的人工磁場由磁遮罩設備或磁場穩定化設備提供，例如，核磁共振儀(NMR)。

在另一實施方式中，本發明涉及降低哺乳動物體內不期望的細胞增殖的方法。所述方法包括將所述哺乳動物置於穩定的人工磁場內，所述穩定的人工磁場使增殖細胞的生理學發生改變，從而降低所述細胞的增殖速度。

在一些實施方式中，將穩定的人工磁場施加於哺乳動物持續足夠的時間段，導致增殖細胞的生理學發生改變，所述時間段例如，至少18小時、至少24小時、至少36小時、至少48小時、至少60小時或至少72小時。本領域普通技術人員能夠對哺乳動物的狀態以及增殖細胞的生理學的改變進行監測，使施加於哺乳動物的穩定的人工磁場所持續的時間段不會誘導哺乳動物體內的不良反應。

另一方面，本發明涉及用於治療哺乳動物的設備，所述設備包括產生穩定的人工磁場的單元。所述設備允許將定位的穩定的人工磁

場施加於哺乳動物持續治療有效時間段。

在一些實施方式中，所述設備為固定式。在其他實施方式中，所述設備為可攜式。在一種實施方式中，所述設備將穩定的人工磁場施加於哺乳動物的整個身體。可選地，所述設備使穩定的人工磁場施加於哺乳動物的一部分身體。優選地，可攜式設備依附於或植入哺乳動物的至少一部分身體，從而將穩定的人工磁場施加於哺乳動物的該部分身體。

治療有效時間段可由本領域技術普通技術人員通過監測哺乳動物的狀態和療效來確定。例如，治療有效時間段為至少18小時、至少24小時、至少36小時、至少48小時、至少60小時或至少72小時。優選地，所述時間段是不誘導哺乳動物的不良反應的時間段。

再一方面，本發明涉及一種用於確定使病變細胞生長的治療結果達到最優的人工磁場療法的最佳條件的篩選方法。所述方法包括如下步驟：

(a)從哺乳動物中分離病變細胞進行體外培養；

(b)對步驟(a)得到的細胞培養物施加多個人工磁場，其中，每個人工磁場保持在各不相同的條件下；

(c)比較每個人工磁場中的細胞培養物的生長；

(d)任選地，重複步驟(a)至(c)；

(e)基於步驟(a)至(d)的結果確定所述人工磁場的最佳條件。

優選地，對人工磁場療法的條件進行優化，從而使與治療有關的不良反應最小化。

在相關方面，本發明涉及一種用於開發體內個性化治療的方法，所述方法包括：

(a)進行體外篩選，用於確定使病變細胞生長的治療結果最優的人工磁場治療的最佳條件，其中，所述體外篩選包括：

(i)從哺乳動物中分離病變細胞進行體外培養；

(ii)對步驟(i)得到的細胞培養物施加多個人工磁場，其中，每個人工磁場保持在各不相同的條件下；

(iii)比較每個人工磁場中的細胞培養物的生長；

(iv)任選地，重複步驟(i)至(iii)；

(v)基於步驟(i)至步驟(iv)的結果，確定所述人工磁場的最佳條件；

(b)將基於體外篩選的最佳條件與體內治療的條件相關聯。

在另一相關方面，本發明涉及一種評價用於降低哺乳動物體內不期望的細胞增殖的非磁場治療的療效的方法，所述方法包括：

(a)對所述哺乳動物進行非磁場治療；

(b)將所述哺乳動物置於穩定的人工磁場內，所述穩定的人工磁場在進行所述非磁場治療之前、進行所述非磁場治療的過程中或者在進行所述非磁場治療之後，使增殖細胞的生理學發生改變；

(c)比較步驟(a)之前的不期望的細胞生長與步驟(b)之後的不期望的細胞生長，從而選擇使步驟(b)之後的不期望的細胞生長降低的非磁場治療。

在一些實施方式中，所述非磁場治療為化療、放療、熱療和單克隆抗體療法。在其他實施方式中，在所述治療之後，不期望的細胞增殖與治療之前相比降低至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或約100%。

又一方面，本發明涉及體外篩選抗腫瘤藥劑的方法。所述方法包括：

(a)從哺乳動物中分離病變細胞進行體外培養；

(b)在施加穩定的人工磁場和沒有所述磁場的條件下，在抗腫瘤

藥劑存在的情況下，培養步驟(a)得到的細胞培養物；

(c)比較上述兩種條件下的細胞培養物的生長；

(d)選擇導致在施加所述磁場的條件下的細胞死亡率比在沒有所述磁場的條件下的細胞死亡率高的抗腫瘤藥劑。

又一方面，本發明涉及一種用於治療有此需要的患者的聯合療法，所述聯合療法包括：

(a)將一種或一種以上抗腫瘤藥劑給藥于患者，以及

(b)在抗腫瘤藥劑治療之前、抗腫瘤藥劑治療過程中或者抗腫瘤藥劑治療之後，將穩定的人工磁場施加于所述患者，所述穩定的人工磁場使增殖的細胞的生理學發生改變，從而使增殖的細胞的增殖速度降低。

在一些實施方式中，所述抗腫瘤藥劑選自：化療用藥劑、放療用藥劑、熱療用藥劑以及單克隆抗體療法用藥劑。在其他實施方式中，抗腫瘤藥劑的不良副作用或對抗腫瘤藥劑的耐藥性由於抗腫瘤藥劑劑量的降低和/或由於聯合治療過程中暴露於穩定的人工磁場之後抗腫瘤藥劑的療效提高而得到降低。在其他實施方式中，所述患者已經對一種或一種以上抗腫瘤藥劑產生耐藥性。

在相關方面，本發明涉及一種用於確定抗腫瘤藥劑的最低有效劑量的方法，所述方法包括：

(a)從哺乳動物中分離病變細胞進行體外培養；

(b)在施加穩定的人工磁場和沒有所述磁場的條件下，在抗腫瘤藥劑以各種不同劑量存在的情況下，培養步驟(a)得到的細胞培養物；

(c)比較上述兩種條件下由各種不同劑量的抗腫瘤藥劑處理的細胞培養物的生長；

(d)確定在施加穩定的人工磁場條件下的抗腫瘤藥劑的劑量，所

述劑量實現相同的細胞生長的降低，但是比在沒有所述磁場的條件下的劑量小。

在一些實施方式中，所述抗腫瘤藥劑選自：化療用藥劑、放療用藥劑、熱療用藥劑和單克隆抗體療法用藥劑。

另一方面，本發明涉及一種用於抑制哺乳動物體內腫瘤轉移的方法，所述方法包括將所述哺乳動物置於穩定的人工磁場內持續足夠的時間段，使在不同於所述哺乳動物的原發部位的繼發部位發生不期望的增殖的細胞的生理學發生改變，從而降低所述繼發部位的不期望的細胞增殖的速度。優選地，在所述哺乳動物暴露於穩定的人工磁場之後或過程中對哺乳動物進行活檢。

所述時間段可由本領域普通技術人員通過監測哺乳動物的狀態和繼發部位細胞的生理學的改變來確定。例如，所述時間段為至少18小時、至少24小時、至少36小時、至少48小時、至少60小時、或至少72小時。優選地，所述時間段為不誘導哺乳動物的不良反應的時間段。

### 【圖式簡單說明】

圖1表示周圍環境磁場效應的研究結果並歸納了磁場遮罩的樣品的相對NOE測量結果。該圖為溶劑層相對NOE強度隨溫度的變化。在該研究中，溶劑為50%DMSO-50%DMSO-d<sub>6</sub>，甲苯濃度為0.8 M，水的濃度為0.10 M。

圖2表示暴露于周圍環境磁場的樣品的相對NOE強度的測量結果。該圖為溶劑層相對NOE強度隨溫度的變化。在該研究中，溶劑為50%DMSO-50%DMSO-d<sub>6</sub>，甲苯濃度為0.8 M，水的濃度為0.10 M。

圖3為遮罩周圍環境磁場(方形)和不遮罩周圍環境磁場(圓形)條件下，DMSO 1H(T1)<sub>M</sub>弛豫隨溫度變化的節點曲線。

圖4比較了鐵遮罩盒(有遮罩)和塑膠盒(無遮罩)中的非小細胞肺



癌細胞的體外生長情況。

圖5比較了鐵遮罩盒(有遮罩)中和塑膠盒(無遮罩)中的非小細胞肺癌細胞A549的體外生長情況。

圖6比較了鐵遮罩盒(有遮罩)中和塑膠盒(無遮罩)中非小細胞肺癌細胞A549在紫杉醇存在的情況下的體外生長情況。

圖7比較了在鐵遮罩盒(有遮罩)中和塑膠盒(無遮罩)中非小細胞肺癌細胞A549在不同濃度的紫杉醇存在的情況下的體外生長情況。

圖8比較了在鐵遮罩盒(有遮罩)和塑膠盒(無遮罩)中對紫杉醇具有耐藥性的非小細胞肺癌細胞A549-T24的體外生長情況。

圖9比較了在鐵遮罩盒(有遮罩)和塑膠盒(無遮罩)中對紫杉醇具有耐藥性的非小細胞肺癌細胞A549-T24在紫杉醇存在的情況下的體外生長情況。

圖10比較了在鐵遮罩盒(有遮罩)和塑膠盒(無遮罩)中對紫杉醇具有耐藥性的非小細胞肺癌細胞A549-T24在不同濃度的紫杉醇存在的情況下的體外生長情況。

圖11顯示39°C下由熱休克而導致的非小細胞肺癌細胞A549的進行性細胞死亡。

圖12比較了在鐵遮罩盒(有遮罩)和塑膠盒(無遮罩)中熱休克後非小細胞肺癌細胞A549的體外生長情況。

圖13比較了在鐵遮罩盒(有遮罩)和塑膠盒(無遮罩)中乳腺癌細胞MCF-7的體外生長情況。

圖14比較了在鐵遮罩盒(有遮罩)和塑膠盒(無遮罩)中熱休克後乳腺癌細胞MCF-7的體外生長情況。

### **【實施方式】**

需要理解的是本發明不限於本文描述的具體實施方式，本領域技術人員可對其進行改變。還需要理解的是本文使用的術語僅僅意在

描述本發明的具體方面和具體實施方式，無意限定本發明的範圍。

必須注意的是，除非在上下文中有明確說明，本文和所附的權利要求中使用的不指明具體數目的單數形式包括複數指代物。

## 定義

除非另有說明，本文使用的所有技術和科學術語與本發明所屬技術領域普通技術人員一般理解的含義相同。本文所使用的下列術語具有如下含義。

數值(例如，溫度、時間、含量和濃度，包括範圍值)之前使用的詞語「約」表示該數值變化正負10%、正負5%或正負1%的近似值。

本文使用的術語「治療有效時間」是指如本文所定義的，對有需要的患者進行治療時，足以起到治療作用的時間段。所述治療有效時間可取決於受治者和所治療的疾病、受治者的體重和年齡、疾病的嚴重程度而發生改變，本領域普通技術人員容易確定受治者和所治療的疾病、受治者的體重和年齡、疾病的嚴重程度。

本文使用的術語「治療」是指受治者或患者的一些不期望的病症得到好轉，包括：

- 預防疾病或病症或者不受疾病或病症的影響，即，例如，使臨床症狀不在處於患上這種疾病或病症的風險中的受治者體內產生，從而，本質上避免疾病或病症的發作；

- 抑制疾病或病症，即，阻止或抑制臨床症狀的惡化；和/或

- 緩解疾病或病症，即，使臨床症狀復原。

本文使用的術語「患者」或「受治者」是指哺乳動物並且包括人類和非人類的靈長類哺乳動物。

## 概況介紹

本發明的發明人意外地發現環境磁場影響溶液中的分子間偶極作用。而且，發明人發現對環境磁場的遮罩意外地引起了磁性偶極的

重新定向並且改變了分子間偶極作用力，從而影響活細胞的生理學和其他生物學方面的性質。

### 使用穩定的人工磁場的療法

一方面，本發明涉及一種干擾細胞中分子間偶極作用的方法。所述方法包括將穩定的人工磁場施加於所述細胞持續足夠的時間段，導致所述細胞中分子間偶極作用發生改變，從而使細胞生理學發生改變。在一些實施方式中，所述時間段為至少18小時、至少24小時、至少36小時、至少48小時、至少60小時或至少72小時。

在一些實施方式中，所述細胞是正在進行不期望的細胞增殖或快速分裂的細胞，例如，癌細胞。當將穩定的人工磁場施加於所述細胞時，細胞增殖或分裂的速度降低。在一種實施方式中，穩定的人工磁場由保護所述細胞不受環境磁場影響的設備提供。環境磁場的主要來源為地球的地磁場，而其他來源可為輸電線、電器，等等。環境磁場是不斷變化的。通過採用一些金屬材料遮罩環境磁場使細胞免受環境磁場的影響，從而向細胞提供穩定的人工磁場。可選地，穩定的人工磁場可由磁場穩定化設備(例如，NMR儀)提供。

在其他實施方式中，所述細胞是受損的細胞，使受損的細胞暴露於穩定的人工磁場對細胞的凋亡產生影響並且延長細胞的存活。例如，細胞死亡之前通常先發生細胞內蛋白質聚集。在細胞內產生熱休克蛋白以對抗這種聚集。然而，如果細胞是受損的細胞，蛋白質聚集仍然會進行並且導致細胞死亡。本發明的方法抑制蛋白質聚集，從而延長細胞壽命。

本領域普通技術人員能夠通過監測細胞生長情況來確定細胞暴露於穩定的人工磁場所持續的時間段。優選地，所述時間段足以導致細胞中分子間偶極作用發生改變，從而使細胞的生理學發生改變。更加優選地，將所述時間段調節至使細胞的任何不良反應最小化。

本發明尤其在抑制哺乳動物體內的腫瘤轉移方面有用。腫瘤轉移是腫瘤從一個器官或身體部位(原發部位)擴散至另一非鄰近器官或身體部位(繼發部位)<sup>11,12</sup>。本發明的方法包括將哺乳動物置於穩定的人工磁場持續一段足夠的時間，使得在不同于哺乳動物的原發部位的繼發部位上發生不期望的增殖的細胞的生理學發生改變，從而使繼發部位的不期望的細胞增殖速度降低。

所述時間段可由本領域普通技術人員通過監測哺乳動物的狀態和繼發部位的細胞的生理學的改變來確定。例如，所述時間段為至少18小時、至少24小時、至少36小時、至少48小時、至少60小時或至少72小時。優選地，所述時間段為不誘導哺乳動物的不良反應的時間段。

### **使用穩定的人工磁場的治療設備**

本發明還包括一種用於治療哺乳動物的設備。所述設備包括產生穩定的人工磁場的單元並且所述設備將穩定的人工磁場施加於哺乳動物持續治療有效時間段。

在一種實施方式中，所述設備為固定式。例如，所述設備可為由一些遮罩磁場的材料構成的腔室或房間。哺乳動物的整個身體或者一個或一個以上哺乳動物可被關在所述腔室或房間中持續治療有效時間段，這樣，保護所述哺乳動物不受環境磁場的影響持續一段連續的時間段。

在另一實施方式中，所述設備為可攜式。例如，所述設備可為將穩定的人工磁場施加於哺乳動物的整個身體或一部分身體的容器、束身衣、緊身連衫褲、手套、襪子，等等。優選地，可攜式設備依附於或植入哺乳動物的至少一部分身體，從而將穩定的人工磁場施加於所述哺乳動物的該部分身體持續一段較長的時間段。

治療有效時間段可由本領域普通技術人員通過監測哺乳動物的

狀態和治療效果來確定。例如，所述治療有效時間段為至少18小時、至少24小時、至少36小時、至少48小時、至少60小時或至少72小時。優選地，所述時間段為不誘導哺乳動物的不良反應的時間段。

### **使用穩定的人工磁場的篩選方法**

本發明還涉及一種用於確定使病變細胞生長的治療結果達到最優的人工磁場療法的最佳條件的體外篩選方法。所述方法包括如下步驟：

(a)從哺乳動物中分離病變細胞進行體外培養；

(b)對步驟(a)得到的細胞培養物施加多個人工磁場，其中，每個人工磁場保持在各不相同的條件下；

(c)比較每個人工磁場中的細胞培養物的生長；

(d)任選地，重複步驟(a)至(c)；以及

(e)基於步驟(a)至(d)的結果確定所述人工磁場的最佳條件。

優選地，對人工磁場的治療條件進行優化，從而使與治療有關的不良反應最小化。

不同的靶細胞對應於不同的治療條件。可對用於特定類型的病變細胞的治療條件進行優化。這種篩選方法被發展為通過比較在各種不同條件下處理的多種細胞培養物的體外生長來優化治療條件。

### **使用穩定的人工磁場的個性化治療**

在相關的方面，本發明涉及一種用於開發體內個性化治療的方法，所述方法包括：

(a)進行體外篩選，用於確定使病變細胞生長的治療結果最優的人工磁場治療的最佳條件，其中，所述體外篩選包括：

(i)從哺乳動物中分離病變細胞進行體外培養；

(ii)對步驟(i)得到的細胞培養物施加多個人工磁場，其中，每個人工磁場保持在各不相同的條件下；

(iii)比較每個人工磁場中的細胞培養物的生長；

(iv)任選地，重複步驟(i)至(iii)；

(v)基於步驟(i)至步驟(iv)的結果，確定所述人工磁場的最佳條件；

(b)將基於體外篩選的最佳條件與體內治療的條件相關聯。

當對用於特定類型的病變細胞的治療條件進行優化並將治療條件個性化用於特定受治者時，療效得到顯著提高並且體內治療的安全性得到改善。這是因為不同的受治者和不同的細胞對各種不同的治療條件產生不同的回應。本發明提供使用穩定的人工磁場，通過將體外細胞生長條件與體內治療條件相關聯，從而開發體內個性化治療的方法。

### **與非磁場治療聯合的療法**

在另一相關方面，本發明涉及一種評價用於降低哺乳動物體內不期望的細胞增殖的非磁場治療的療效的方法，所述方法包括：

(a)對所述哺乳動物進行非磁場治療；

(b)將所述哺乳動物置於穩定的人工磁場內，所述穩定的人工磁場在進行所述非磁場治療之前、進行所述非磁場治療的過程中或者在進行所述非磁場治療之後，使增殖細胞的生理學發生改變；

(c)比較步驟(a)之前的不期望的細胞生長與步驟(b)之後的不期望的細胞生長，以選擇使步驟(b)之後的不期望的細胞生長降低的非磁場治療。

暴露於穩定的人工磁場可單獨使用或與不涉及磁場治療的其他療法聯合使用，從而提高非磁場治療的療效。在一些實施方式中，非磁場治療為化療、放療、熱療和單克隆抗體療法。

同樣地，本發明涉及一種體外篩選抗腫瘤藥劑的方法。所述方法包括：

(a)從哺乳動物中分離病變細胞進行體外培養；

(b)在施加穩定的人工磁場和沒有所述磁場的條件下，在抗腫瘤藥劑存在的情況下，培養步驟(a)得到的細胞培養物；

(c)比較上述兩種條件下的細胞培養物的生長；

(d)選擇導致在施加所述磁場的條件下的細胞死亡率比在沒有所述磁場的條件下的細胞死亡率高的抗腫瘤藥劑。

進一步地，本發明涉及一種用於治療有此需要的患者的聯合療法。所述聯合療法包括：

(a)將一種或一種以上抗腫瘤藥劑給藥于患者，以及

(b)在抗腫瘤藥劑治療之前、抗腫瘤藥劑的治療過程中或者抗腫瘤藥劑治療之後，將穩定的人工磁場施加于所述患者，所述穩定的人工磁場使增殖的細胞的生理學發生改變，從而降低細胞的增殖速度。

在一些實施方式中，所述抗腫瘤藥劑選自：化療用藥劑、放療用藥劑、熱療用藥劑和單克隆抗體療法用藥劑。在其他實施方式中，抗腫瘤藥劑的不良副作用或者對抗腫瘤藥劑的耐藥性由於抗腫瘤藥劑劑量的降低和/或在聯合治療中暴露於穩定的人工磁場之後抗腫瘤藥劑的療效的提高而降低。在其他實施方式中，所述患者已對一種或一種以上抗腫瘤藥劑產生耐藥性。

本發明的發明人意外地發現暴露於穩定的人工磁場使常規抗腫瘤藥劑的療效得到提高，並且穩定的人工磁場影響對常規抗腫瘤藥劑具有耐藥性的癌細胞的生長。這對於聯合治療而言是至關重要的，因為常規抗腫瘤藥劑的劑量可被降低，從而降低對抗腫瘤藥劑產生耐藥性的可能性和/或消除與抗腫瘤藥劑有關的其它不良副作用。

在相關的方面，本發明涉及一種用於確定抗腫瘤藥劑的最低有效劑量的方法，所述方法包括：

(a)從哺乳動物中分離病變細胞進行體外培養；

(b)在施加穩定的人工磁場和沒有所述磁場的條件下，在抗腫瘤藥劑以各種不同劑量存在的情況下，培養步驟(a)得到的細胞培養物；

(c)比較上述兩種條件下由各種不同劑量的抗腫瘤藥劑處理的細胞培養物的生長；

(d)確定在施加穩定的人工磁場條件下的抗腫瘤藥劑的劑量，所述劑量實現相同的細胞生長的降低，但是比在沒有所述磁場的條件下的劑量小。

在一些實施方式中，所述抗腫瘤藥劑選自：化療用藥劑、放療用藥劑、熱療用藥劑和單克隆抗體療法用藥劑。

如本領域已知的，許多非磁場療法具有副作用。本發明提供的方法與其他療法聯合使用時，不僅僅提高其他療法的療效，而且在保持相同療效水準的前提下還降低其他療法的劑量。優選地，本發明提供一種選擇有效抗腫瘤藥劑的篩選方法。在另一優選的實施方式中，本發明提供一種確定抗腫瘤藥劑的最低有效劑量的方法，從而降低所述抗腫瘤藥劑的不良副作用。

本發明進一步通過下列實施例來說明。顯然，本領域技術人員在不背離本發明的範圍的條件下可對本發明的方法和材料進行多種改變。

## **實施例1. 環境磁場對溶液中分子間偶極作用的影響**

本實施例說明環境磁場對溶液中分子間偶極作用的影響。

### **1.1 奧氏核效應(NOE)研究**

#### **材料和設備：**

鍍鋅鐵管設備用於使NMR管中的被研究「溶液」不受環境磁場的影響。所述鍍鋅鐵管設備由長為18英寸、外徑(O.D.)為1」的鍍鋅鐵管、長為18英寸、外徑(O.D.)為3/4」的鍍鋅鐵管和長為16英寸、外徑



(O.D.)為3/8」的銅管構成並且兩端覆蓋有帶螺紋的、鍍鋅鑄鐵管帽。

甲苯(99.7%，Fisher Scientific)，對二甲苯(99+%，Aldrich)，4-叔丁基吡啶(99%，Aldrich)和DMSO(99.9%，Aldrich)使用前在氬氣條件下蒸餾並在4A分子篩上乾燥。DMSO-d<sub>6</sub>(D99.9%)獲自Cambridge Isotope Laboratories, Inc。研究中使用HPLC、UV分光光度測試級別的H<sub>2</sub>O(Mallinckrodt)。

在該研究中使用甲苯濃度為0.8M、水含量為0.10 M的50%DMSO-50%DMSO-d<sub>6</sub>的甲苯樣品。樣品經過三個「降低和回升」活化溫度階段(35°C、55°C和75°C)以及85°C至95°C的「平衡溫度」。

#### **NMR研究：**

將0.75 ml 50%DMSO-50%DMSO-d<sub>6</sub>溶劑和64.1 μl(研究用濃度為0.8 M)甲苯加至氬氣吹掃乾燥的JYoung NMR管中。DMSO溶劑層的NOE強度變化通過1D選擇性NOESY(NOESY1D)NMR實驗(激發7.182ppm的甲苯上的鄰位質子)進行研究，該NMR實驗由Bruker Topspin 1.3軟體提供並且在Bruker Avance 400 MHz光譜儀上進行。所有實驗在298.0 K(25°C)下進行。該研究中的「1D 選擇性NOESY」(NOESY1D)NMR實驗的參數基於「Bruker NMR實驗指南」的推薦：迴圈延遲D1[s]=8，假掃描數DS = 8，獲取時間AQ[s] = 3.9584243，混合時間D8[s] = 0.750。NOE通過將D8[s]從0.750降低至0.500，0.300以及隨後降低至0.200而進行驗證，觀察到NOE信號強度的減弱，並且通過從3、4、6、8、16秒至36秒的改變來檢測D1[s]，這不影響基於NOE測量所觀察到的DMSO溶劑層NOE強度「降低和回升」的結果。1H T1和(T1)<sub>M</sub>馳豫的測量和資料處理根據同樣由Bruker Topspin 1.3軟體和「Bruker NMR 實驗指南」提供的方法(逆向-回升)和步驟進行。在研究過程中監測甲苯甲基基團上的質子和苯環上的甲基基團鄰位的質子的T1馳豫時間。這兩種質子的馳豫時間保持恆定，平均偏差小於

2%。因此，甲基基團上的質子和苯環上甲基基團鄰位的質子之間的NOE可用作內標(單元)以評價溶劑層NOE的變化並表徵所研究的系統。

具體而言，在35°C的水浴中將樣品加熱6分鐘之後，將樣品冷卻至室溫持續1小時，隨後照例記錄其溶劑層相對NOE強度，當樣品從NMR磁鐵中彈出時，立即將其插入鐵管設備中並在該設備中保留22小時。隨後，從鐵管設備中取出樣品以繼續進行NMR研究。

### 結果：

所製備的樣品置於室溫下並過夜暴露於環境磁場，隨後測量溶劑層相對NOE強度。原始強度為2.65和2.71。儲存在鐵管設備中以遮罩環境磁場持續22小時之後強度為2.69。因此，在室溫下遮罩環境磁場不能顯著改變樣品的溶劑層相對NOE強度。

測量起始強度之後，將樣品再暴露於環境磁場持續22小時，隨後在35°C的水浴中加熱持續6分鐘，隨後冷卻至室溫持續1小時。溶劑層相對NOE強度為2.37和2.36。隨後，將一組樣品儲存於鐵管設備中以遮罩環境磁場，而將另一組樣品暴露於環境磁場。在不同的溫度條件下儲存一段時間之後測量樣品的溶劑層相對強度。圖1和表1總結了磁場遮罩的樣品的相對NOE測量結果。

表 1 (磁場遮罩)		
步驟	樣品條件 甲苯濃度: 0.8M, 含水量: 0.1M	溶劑層相對強度 (NOE的比)
1	室溫 (RT, 23-24°C) 起始	2.65
2	室溫下, 儲存在鐵管設備中之後22小時	2.69
3	再暴露於環境磁場22小時, 隨後加熱至35°C	2.37
4	儲存在鐵管設備中之後再持續22小時 (室溫)	2.39
5	再暴露於環境磁場22小時 (室溫)	2.38
6	再暴露於環境磁場22小時 (室溫)	2.54
7	再暴露於環境磁場22小時 (室溫)	2.68
8	再暴露於環境磁場22小時 (室溫)	2.71
9	加熱至45°C	2.69
10	再儲存在鐵管設備中22小時 (室溫)	2.70
11	再暴露於環境磁場22小時, 隨後加熱至55°C	2.69
12	在室溫條件下, 再暴露於環境磁場22小時	2.66
13	加熱至55°C	2.68
14	再儲存在鐵管設備中22小時 (室溫)	2.73
15	再暴露於環境磁場22小時, 隨後加熱至55°C	2.69
16	在室溫條件下, 再暴露於環境磁場22小時	2.71

表2和圖2詳細描述了暴露於環境磁場的樣品的相對NOE強度的測量結果。

表 2 (暴露於環境磁場)		
步驟	樣品條件 甲苯濃度: 0.8M, 含水量: 0.1M	溶劑層相對強度 (NOE的比)
1	室溫 (RT, 23-24°C) 起始	2.71
2	室溫條件下在鐵管設備中儲存之後22小時	2.69
3	再暴露於環境磁場22小時，隨後加熱至35°C	2.36
4	冷卻至室溫並暴露於環境磁場22小時	2.70
5	加熱至45°C	2.67
6	冷卻至室溫並暴露於環境磁場22小時	2.69
7	加熱至55°C	2.32
8	冷卻至室溫並暴露於環境磁場22小時	2.69
9	加熱至65°C	2.70
10	冷卻至室溫並暴露於環境磁場22小時	2.70
11	加熱至75°C	2.38
12	冷卻至室溫並暴露於環境磁場22小時	2.71
13	加熱至85°C	2.70
14	冷卻至室溫並暴露於環境磁場22小時	2.70
15	加熱至95°C	2.73
16	冷卻至室溫並暴露於環境磁場22小時	2.72

如上所說明的，暴露於環境磁場的樣品的原始溶劑層相對強度在24小時內恢復其原始強度。形成鮮明對比的是，加熱至35°C之後在鐵管設備中儲存22小時的樣品的恢復時間長得多，約72小時恢復至原始溶劑層相對強度，如下表3所示。

表3. 溶劑層相對NOE強度隨時間的變化					
儲存條件	0小時	在鐵管設備中儲存22小時之後	24小時	48小時	72小時
儲存於鐵管設備中	2.37	2.39	2.38	2.54	2.68

此外，對於暴露於環境磁場的樣品而言，甲苯-DMSO系統在85°C至95°C條件下達到熱力學平衡。形成鮮明對比的是，對於磁場遮罩的樣品而言，甲苯-DMSO系統在低得多的溫度(55°C)條件下達到熱力學平衡。

該研究表明環境磁場影響溶液中分子間偶極作用，這種影響可通過溶劑層NOE強度從其「活化強度」恢復至其「平衡/原始強度」的延遲來檢測以及通過降低系統的熱力學平衡溫度來檢測。

## 1.2 DMSO $^1\text{H}(T_1)_M$ 馳豫研究

DMSO  $^1\text{H}(T_1)_M$  馳豫研究以類似於上述1.1節中所述的NOE研究的方式進行。在該研究中，測量DMSO  $^1\text{H}(T_1)_M$ 馳豫時間，而不測量NOE強度。在DMSO  $^1\text{H}$   $T_1$ 和 $(T_1)_M$ 實驗中所使用的NMR參數為 $D_1[\text{s}] = 30$ ， $TD = 10$ ， $DS = 2$ ， $AQ[\text{s}] = 0.9893436$ ， $NS = 8$ 。樣品製備和 $T_1$ 測量按照NOE研究中所進行的加熱/冷卻步驟和程式進行。本文所表示的 $T_1$ 和 $(T_1)_M$ 馳豫資料為六次 $T_1$ 測量的平均值並且通過新樣品的另一組獨立實驗予以驗證以確保資料的可重複性。

具體而言，使含水量為0.10 M的0.8 M甲苯-50% DMSO-50% DMSO- $d_6$ 溶液經過不同的降低和回升活化溫度階段以及85°C至95°C的平衡溫度。

### 結果：

在第一個加熱至35°C和冷卻的迴圈中DMSO  $^1\text{H}(T_1)_M$ 馳豫降低至最低點。然而，當將樣品再次加熱至35°C，隨後置於鐵管設備中持續20小時，DMSO  $^1\text{H}(T_1)_M$ 馳豫沒有回到最低水準。該觀察結果與NOE研究結果一致。隨後，當將樣品從鐵管設備中取出時，樣品分別在45°C、55°C、65°C、75°C和85°C條件下再次經過加熱和冷卻迴圈。當樣品在55°C的水浴中加熱6分鐘之後，樣品在室溫至85°C的研究溫度範圍內達到「平衡」。該觀察結果也與NOE研究一致。結果在圖3中予以

總結。

形成鮮明對比的是，經過加熱至35°C和冷卻的起始迴圈並暴露於環境磁場的樣品在加熱至55°C之後繼續增加至最高馳豫時間。

該研究表明暴露於環境磁場的樣品的DMSO  $1H(T1)_M$ 馳豫與遮罩環境磁場的樣品的DMSO  $1H(T1)_M$ 馳豫不同，這說明環境磁場對分子間偶極作用和DMSO-甲苯分子組裝的形成有影響，這與NOE研究得到的結果一致。

### **實施例2. 在正常生長條件下環境磁場對細胞生長的影響**

本實施例說明在37°C條件下環境磁場對細胞體外生長的影響。

#### **材料和設備：**

在暴露於環境磁場或遮罩環境磁場的條件下研究非小細胞肺癌細胞系的生長。將該細胞系分為三等份。第一份樣品在遮罩了環境磁場的盒(鐵遮罩盒)中培養，該鐵遮罩盒由鍍鋅的鐵和銅製成，並帶有蓋子。該盒的結構允許孵育器中的自然空氣流通，所述空氣含有5%的二氧化碳。第二份樣品在塑膠盒中培養，所述塑膠盒的結構與鐵遮罩盒相同。第三份樣品不在盒中培養。

所有三種樣品在相同的孵育器中按照相同的標準細胞培養步驟在相同時間同時孵育。孵育器的溫度維持在37°C。

#### **結果：**

如圖4所示，在孵育5天之後，在每個時間點，在鐵遮罩盒中培養的非小細胞肺癌細胞群相對於在塑膠盒中培養的對照減少。然而，在塑膠盒中培養的細胞群與不在盒中培養的細胞群基本相同。重複實驗以確保可重複性。

本實施例表明遮罩環境磁場影響細胞的體外生長。

### **實施例3. 在正常生長條件下環境磁場對細胞生長的影響**

本實施例說明37°C條件下環境磁場對細胞體外生長的影響。

## 原料和方法

### 原料和儀器

非小細胞肺癌細胞(A549)和乳腺癌細胞(MCF-7)由中國科學院上海生命科學研究所細胞資源中心提供。所使用的其他材料如下：RPMI 1640培養基(R-6504-1L, SIGMA-ALDRICH公司)；胰蛋白酶(T4424-100ml, SIGMA-ALDRICH公司)；胎牛血清(FBS)(500ml, Gibco實驗室, Grand Island, NY)；青黴素和鏈黴素(100ml, Lonza Walkersville Inc.)；紫杉醇(紫杉醇, T7191-5 mg, SIGMA-ALDRICH公司)；細胞計數試劑盒-8(DOJINDO)；酶標儀RT-6000(Rayto Life and Analytical Sciences Co., Ltd)；恆溫水浴(Fisher Scientific)。

### 磁場遮罩設備

本試驗中使用的環境磁場遮罩設備和塑膠盒與上面實施例2中所述的那些相同。

### 細胞培養

人非小細胞肺癌細胞(A549)和人乳腺癌細胞(MCF-7)由中國科學院上海生命科學研究所細胞資源中心提供。使細胞保持單層形式並且在37°C條件下，含5%CO<sub>2</sub>且具有濕度的氣氛中，在補充有10%胎牛血清的RPMI 1640培養基中使細胞生長。所述培養基還含有100 U/L青黴素和100mg/L鏈黴素。在實驗中使用指數生長期的細胞。

### 對紫杉醇具有耐藥性的細胞系A549-T24的培養

根據Kavallaris等人在*J. Clin. Invest.*, 100(5): 1282-1293(1997)<sup>13</sup>中描述的規程培養對紫杉醇具有耐藥性的人肺癌細胞A549。在含有10%FBS和1%青黴素-鏈黴素的RPMI 1640中培養人非小細胞肺癌細胞A549。將紫杉醇逐步加入培養基中以誘導人非小細胞肺癌細胞A549對紫杉醇的耐藥性，同時定期提高紫杉醇的濃度。A549細胞最初與

3nM紫杉醇接觸，一旦達到正常生長，就將細胞保持在該濃度。兩周內，將紫杉醇的劑量提高兩倍(例如，3nM、6nM、12nM)，直至最終藥物濃度為24nM的條件下，產生對紫杉醇具有耐藥性的細胞。將所獲得的細胞保持在紫杉醇濃度為24nM的條件下。將這些對紫杉醇具有耐藥性的細胞命名為A549-T24。

## 實驗方法

在96孔平板中生長人非小細胞肺癌細胞(A549)或人乳腺癌細胞(MCF-7)。研究在暴露於環境磁場或遮罩環境磁場的條件下非小細胞肺癌細胞系和乳腺癌細胞系的生長。將每種細胞培養物分為三等份。在遮罩了環境磁場的盒(鐵遮罩盒)中培養第一樣品。在塑膠盒中培養第二樣品。第三樣品不在盒中培養作為對照。將所有樣品放置於其中含5%CO<sub>2</sub>的氣氛且溫度為37°C的孵育器中。通過收穫細胞並使用細胞計數試劑盒-8和酶標儀RT-6000確定細胞活力來定期檢測細胞生長速度。根據細胞類型和各自的生長速度的不同，實驗持續四天至七天。

## 細胞活力的確定

細胞計數試劑盒-8(CCK-8)(由Dojindo Molecular Technologies, Inc.製造的酶標儀)使用靈敏的比色法確定細胞活力。CCK-8用於確定細胞計數並且根據廠商推薦的標準規程測量活細胞在450nm的吸光度以確定遮罩磁場和不遮罩磁場對細胞活力和細胞生長速度的影響，從而研究環境磁場對細胞生長的影響。

## 加熱過程

水浴細胞加熱過程在Alfieri等人在*Cancer Research* 41: 1301-1305(1981)和Herman等人在*Cancer Research* 41: 3519-1523(1981)<sup>14,15</sup>中發表的文章中詳細描述。具體而言，將指數生長的A549細胞或MCF-7細胞擴散、分離並懸浮于離心管中的細胞培養基中，隨後將管浸沒于恒溫水浴(39°C±0.02°C)中。將溫度計放置于管中的培養基中。



當內部培養基的溫度達到39°C時，開始計算加熱時間並且持續加熱20分鐘。

## 統計學分析

使用「檢測資料是否來自於正態分佈群的正態曲線以及推斷兩個平均值為相同或顯著不同的t-檢驗」<sup>16,17</sup>來測試資料的統計學意義。

## 結果

### A. 37°C下環境磁場對非小細胞肺癌細胞A549的體外生長的影響

如圖5所示，孵育5天后，在每個時間點，與在塑膠盒中培養的對照相比，在鐵遮罩盒中培養的非小細胞肺癌細胞的細胞群減少了33.3%(A549，第5天， $P < 0.0005$ ， $Std \leq 5\%$ )。然而，在塑膠盒中培養的細胞群與不在盒中培養的細胞群基本相同。該結果為7次試驗結果的平均值，並且重複試驗以確保可重複性。

該結果說明，遮罩環境磁場對細胞體外生長產生影響。

### B. 37°C下，在紫杉醇存在的情況下，環境磁場對非小細胞肺癌細胞A549的體外生長的影響

在37°C下，在含有5nM紫杉醇的培養基中培養和孵育非小細胞肺癌細胞A549。如圖6所示，孵育3天后，鐵遮罩盒中A549細胞的生長比塑膠盒中培養的對照細胞的生長慢16.3%( $P < 0.001$ ， $Std \leq 5\%$ )；孵育5天后，鐵遮罩盒中A549細胞的生長比塑膠盒中培養的對照下降了47.3%( $P < 0.0005$ ， $Std \leq 5\%$ )。該結果說明5nM的紫杉醇濃度接近IC50(IC50：抑制50%細胞生長的藥物濃度)。如Georgiadis等人在*Clinical Cancer Research*, 3: 449-454(1997)<sup>18</sup>中所報導的，對於對紫杉醇最敏感的非小細胞肺癌細胞而言的紫杉醇的IC50為0.0099 $\mu$ M。因此，在遮罩環境磁場的情況下，紫杉醇的療效至少加倍。該結果為七次實驗結果的平均值，並且重複試驗以確保可重複性。

在不同的紫杉醇濃度條件下，重複上述實驗以評價遮罩環境磁場條件下紫杉醇的IC50。實驗結果在圖7中總結。

該實驗說明遮罩環境磁場聯合抗腫瘤藥劑顯著提高抗腫瘤藥劑在體外對腫瘤的療效。

### **C. 37°C 下，環境磁場對具有耐藥性的非小細胞肺癌細胞A549-T24的體外生長的影響**

培養對紫杉醇具有耐藥性的非小細胞肺癌細胞A549-T24，然後用於研究37°C 條件下環境磁場對非小細胞肺癌細胞的體外生長的影響。實驗方法如上所述。

#### **(1) 37°C 下環境磁場對具有紫杉醇耐藥性的非小細胞肺癌細胞A549-T24的體外生長的影響。**

如圖8所示，孵育3天或4天之後，在每個時間點，與在塑膠盒中培養的對照相比，在鐵遮罩盒中培養的A549-T24細胞群減少了25.0%(第3天， $P < 0.01$ ， $Std \leq 5\%$ )或32.4%(第4天， $P < 0.0005$ ， $Std \leq 5\%$ )。這些結果與從A549細胞中得到的結果一致。實驗資料為12次實驗結果的平均值，並且重複實驗以確保可重複性。

該實驗說明遮罩環境磁場對耐藥性細胞的體外生長也有影響。

#### **(2) 37°C 下，在12nM紫杉醇存在的情況下，環境磁場對具有紫杉醇耐藥性的非小細胞肺癌細胞A549-T24的體外生長的影響**

在37°C 下，在含有12nM紫杉醇的培養基中培養和孵育對紫杉醇具有耐藥性的非小細胞肺癌細胞A549-T24。如圖9所示，孵育3天或4天之後，在鐵遮罩盒中A549-T24的生長比在塑膠盒中培養的對照A549-T24細胞的生長慢11.2%(第3天， $P < 0.01$ ， $Std \leq 5\%$ )或10.7%(第4天， $P < 0.001$ ， $Std \leq 5\%$ )。該結果為七次實驗結果的平均值，並且重複實驗以確保可重複性。

在不同的紫杉醇濃度下進行如上所述的實驗以評價不同濃度的

紫杉醇的療效並確定在遮罩環境磁場的影響的條件下A549-T24細胞的IC50。圖10總結了在不同的紫杉醇濃度條件下對紫杉醇具有耐藥性的A549-T24非小細胞肺癌細胞在第四天的實驗結果。

在遮罩環境磁場的條件下，紫杉醇能夠有效抑制對紫杉醇具有耐藥性的非小細胞肺癌細胞的生長。紫杉醇對具有紫杉醇耐藥性的非小細胞肺癌細胞的IC50為約10nM(<12nM)。

#### **實施例4 環境磁場對熱休克後的細胞生長的影響**

本實施例說明環境磁場在37°C下對39°C熱休克後的細胞的體外生長的影響。

39°C下對非小細胞肺癌細胞培養物進行熱休克持續30分鐘，隨後在37°C下，在與上述實施例2相同的條件下孵育48小時。

#### **結果：**

在37°C下孵育48小時後，與起始點相比，在鐵遮罩盒中培養的細胞群沒有發生顯著改變。然而，與起始點相比，在塑膠盒中培養的細胞群減少，這說明熱休克後的進行性細胞損傷導致細胞逐漸死亡。

本實施例說明遮罩環境磁場對體外延長受損細胞的存活產生影響。

#### **實施例5：環境磁場對熱休克後的細胞生長的影響**

本實施例證明環境磁場在37°C下對39°C熱休克後的細胞的體外生長的影響。

#### **加熱過程**

加熱過程與上述實施例3所述的過程相同。當在瓊脂中進行實驗時，加熱時間為30分鐘。

#### **材料與方法**

材料與方法與上述實施例3中所述的相同。

## 結果

### A. 熱休克產生的細胞損傷

使非小細胞肺癌細胞A549培養物在39°C下經歷熱休克20分鐘。隨後，在37°C下，在沒有遮罩盒的情況下，孵育細胞6天。同樣地，同時在37°C下孵育未加熱的A549培養物作為對照。

由於熱休克後產生的進行性細胞損傷，相對於未加熱的細胞(對照)，在第5天經歷了熱休克的細胞A549的生長降低了21.1%( $P<0.15$ )且在第6天降低了36.7%( $P<0.0005$ )。該結果為6次實驗結果的平均值，並且在圖11中總結實驗結果。重複實驗以確保可重複性。

### B. 環境磁場對熱休克後的細胞生長的影響

當在瓊脂中進行實驗時，熱休克後，在37°C下孵育A549非小細胞肺癌細胞48小時。在鐵遮罩盒中培養的細胞群相對於起始點的細胞群沒有發生顯著改變。然而，在塑膠盒中培養的細胞群相對於起始點發生降低，這說明熱休克後產生的進行性細胞損傷導致細胞逐漸死亡，並且由於分子熱運動，熱休克改變了細胞中的分子方向和分子間相互作用。

如圖12所示，第5天塑膠盒中的細胞生長比在鐵遮罩盒中的細胞生長慢17.1%( $P<0.01$ )。該結果為12次實驗的平均值，並且重複實驗以確保可重複性。

本實驗說明遮罩環境磁場對體外延長受損細胞的存活有影響，並且本實驗也說明改變細胞中分子間相互作用誘導環境磁場對細胞作用的改變。

### 實施例6. 在正常生長情況下和熱休克後，環境磁場對乳腺癌細胞MCF-7的生長的影響

#### A. 37°C下，環境磁場對MCF-7細胞的體外生長的影響(正常細胞生長情況下)

## 材料和方法

材料和方法與上述實施例3所述的相同。

## 結果

在細胞培養基(第3天和第5天更換培養基)中孵育7天后，在鐵遮罩盒中培養的乳腺癌細胞MCF-7的生長在第5天下降了5.5%且在第7天下降了7.4%。在塑膠盒中培養的細胞的生長與不在盒中培養的細胞的生長大致相同。該結果為6次試驗結果的平均值並且重複試驗以確保可重複性。結果在圖13中顯示。遮罩環境磁場看起來對乳腺癌細胞MCF-7的體外生長沒有顯著影響。

## B. 37°C 下，環境磁場對39°C 熱休克後的乳腺癌細胞MCF-7的體外生長的影響

### 加熱過程

加熱過程與上述實施例3所述的相同。

## 材料和方法

材料和方法與上述實施例3所述的相同。

## 結果

熱休克後，在細胞培養基(第3天和第5天更換培養基)中孵育乳腺癌細胞MCF-7持續7天。如圖14所示，在每個時間點，與塑膠盒中培養的對照相比，在鐵遮罩盒中培養的乳腺癌細胞(MCF-7)的生長在第5天下降了16.5%(MCF-7，第5天， $P < 0.0005$ )且在第7天下降了20.7%(MCF-7，第7天， $P < 0.0005$ )。該結果為5次實驗結果的平均值並且重複實驗以確保可重複性。

本實驗說明遮罩環境磁場對熱休克後的乳腺癌細胞MCF-7的體外生長具有顯著影響。

## 參考文獻

所引用的文獻的全部內容通過引用併入本文。

1. Jordan et al., 「Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy,」 *Current Opinion in Cell Biology*, 10: 123-130 (1998).
2. Jordan et al., 「Microtubules as a target for anticancer drugs,」 *Nat. Rev. Cancer*, 4: 253-265 (2004).
3. Schiff et al., 「Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells,」 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 1561-1565 (1980).
4. Yvon et al., 「Taxol suppresses dynamics of individual microtubules in living human tumor cells,」 *Molecular Biology of the Cell*, 10: 947-959 (1999).
5. Lingderstrom-Lang et al., Lane Medical Lectures, vol. 6: 53, Standford University Press (1952).
6. Lumry et al., 「The conformation changes of proteins,」 *J. Phys. Chem.* 58: 110 (1954).
7. Kauzmann, The mechanism of enzyme action, P 70, Johns Hopkins Press, (1954).
8. Dill, 「Dominant forces in protein folding,」 *Biochemistry*, 29: 7133-7155 (1990).
9. Debye, 「Light scattering in soap solutions,」 *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51: 575 (1949).
10. Michl, 「Special issue on van der Waals clusters II,」 *Chem. Rev.*, 94: 1721-2160 (1994).
11. Klein, 「Cancer. The metastasis cascade,」 *Science* 321 (5897): 1785–7 (2008).
12. Chiang et al., 「Molecular basis of metastasis,」 *The New England Journal of Medicine* 359 (26): 2814–23 (2008).

13. Kavallaris *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 100(5): 1282-1293 (1997);
14. Alfieri *et al.*, *Cancer Research* 41: 1301-1305 (1981);
15. Herman *et al.*, *Cancer Research* 41: 3519-1523 (1981);
16. J.A. Rice, *Mathematical Statistics and Data Analysis*, 3<sup>rd</sup>. ed., Duxbury Advanced (2006);
17. D.S. Yates, D.S. Moore, D.S. Starnes, *The Practice of Statistics*, W.H. Freeman and Company (2003); and
18. Georgiadis *et al.*, *Clinical Cancer Research*, 3: 449-454, (1997).

**【符號說明】**

無



I655017

# 發明摘要

公告本

※ 申請案號：102143932

※ 申請日：102年11月29日

※IPC 分類：A61K

## 【發明名稱】

含穩定磁場之方法、設備及分析方法

METHODS, DEVICES, AND ASSAYS WITH STABILIZED MAGNETIC  
FIELD

## 【中文】

本發明提供一種通過施加穩定的人工磁場來干擾體內和體外分子間偶極作用的方法，以及治療與不正常的細胞生長有關的病症的方法。本發明還提供一種涉及穩定的人工磁場的篩選方法。此外，在上述治療方法和篩選方法中，暴露於穩定的人工磁場可與其他非磁場療法聯合使用。

## 【英文】

Provided are methods for disrupting dipolar interactions in vivo and in vitro, as wells as treating conditions associated with abnormal cell growth, by subjecting to an artificial, stable magnetic field. Also provided are assays involving an artificial, stable magnetic field. Additionally, the exposure of an artificial, stable magnetic field may be combined with other non-magnetic therapy in treatment or assays.



**【代表圖】**

**【本案指定代表圖】**：第（ 4 ）圖。

**【本代表圖之符號簡單說明】**：

無

**【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】**：

無

## 申請專利範圍

1. 一種干擾細胞中偶極分子交互作用的方法，該方法包括將人工之穩定磁場施加於該細胞持續一段時間，其足以導致該細胞中分子間偶極交互作用發生改變，從而使細胞生理學發生改變，其中該人工之穩定磁場透過遮罩細胞使其不受環境磁場影響而提供。
2. 如請求項1之方法，其中該一段時間為至少18小時，至少24小時，至少48小時或至少72小時。
3. 如請求項1之方法，其中該細胞為快速分裂的細胞。
4. 如請求項3之方法，其中該快速分裂的細胞是癌細胞。
5. 如請求項1之方法，其中該細胞為受損的細胞。
6. 如請求項1之方法，其中遮罩該細胞使其不受環境磁場影響重新定向(re-orient)自該人工之穩定磁場中之核自旋或電子自旋產生之磁性偶極。
7. 一種用於哺乳動物治療的設備，該設備包括人工之穩定磁場，其中該設備使該哺乳動物經受該人工之穩定磁場並持續治療有效的時間，其中該人工之穩定磁場係藉由遮罩該哺乳動物使其不受環境磁場影響致使該人工之穩定磁場中之磁性偶極經重新定向而產生。
8. 如請求項7之設備，其中該設備為固定式或可攜式。
9. 如請求項8之設備，其中該設備為可附著於哺乳動物身體的至少一部分的可攜式設備，其中，該設備產生施加於該哺乳動物身體的至少一部分之人工之穩定磁場。
10. 如請求項7之設備，其中該設備可遮罩環境磁場，該環境磁場可干擾該人工之穩定磁場中之磁性偶極。

11. 如請求項7之設備，其中該設備可穩定磁場。
12. 一種確定人工磁場療法的最佳條件以使針對病變細胞生長的治療結果達到最優的分析方法，其中，該分析方法包括：
  - (a)從哺乳動物分離病變細胞以進行體外培養；
  - (b)對步驟(a)的細胞培養物施加多個人工磁場，其中該人工磁場之各者係保持在異於其他人工磁場的條件下，其中該人工之穩定磁場係藉由遮罩該哺乳動物使其不受環境磁場影響致使該人工之穩定磁場中之磁性偶極經重新定向而產生；
  - (c)比較該人工磁場中各者的細胞培養物生長；
  - (d)重複步驟(a)至(c)；及
  - (e)基於步驟(a)至(d)的結果確定人工磁場的最佳條件。
13. 如請求項12之分析方法，其中該最佳條件使與治療有關的副作用最小化。
14. 一種用於開發體內個人化治療的方法，該方法包括：
  - (a)進行體外分析，以確定使針對病變細胞生長的治療結果最優的人工磁場療法的最佳條件，其中該分析包括：
    - (i)從哺乳動物分離病變細胞以進行體外培養；
    - (ii)對步驟(i)的細胞培養物施加多個人工磁場，其中該人工磁場之各者係保持在異於其他人工磁場的條件下，其中該人工之穩定磁場透過遮罩該細胞培養物不受環境磁場影響提供；
    - (iii)比較該人工磁場中各者的細胞培養物生長；
    - (iv)重複步驟(i)至(iii)；及
    - (v)基於步驟(i)至步驟(iv)的結果，確定人工磁場的最佳條件；
  - (b)將基於該體外分析的最佳條件與體內治療的條件相關聯。

15. 一種抗腫瘤藥劑的體外分析方法，該方法包括：
- (a) 從哺乳動物分離病變細胞以進行體外培養；
  - (b) 在施加人工之穩定磁場的條件下和在沒有該磁場的條件下，在該抗腫瘤藥劑存在的情況下，培養步驟(a)的細胞培養物，其中該人工之穩定磁場透過遮罩該細胞培養物不受環境磁場影響提供；
  - (c) 比較各條件下的細胞培養物的生長；
  - (d) 選擇導致在施加該磁場的條件下的細胞死亡率比在沒有該磁場的條件下的細胞死亡率高的抗腫瘤藥劑。
16. 一種測定抗腫瘤藥劑的經降低有效劑量的方法，該方法包括：
- (a) 從哺乳動物分離病變細胞以進行體外培養；
  - (b) 在施加人工之穩定磁場的條件下和在沒有該磁場的條件下，在該抗腫瘤藥劑以各種不同劑量存在的情況下，培養步驟(a)的細胞培養物，其中該人工之穩定磁場透過遮罩該細胞培養物不受環境磁場影響提供；
  - (c) 比較各條件下由不同劑量的該抗腫瘤藥劑處理的細胞培養物的生長；
  - (d) 測定在施加人工之穩定磁場條件下的該抗腫瘤藥劑的劑量，該劑量達到相同的細胞生長的降低，但是比在沒有該磁場的條件下的劑量小。
17. 如請求項16之方法，其中該抗腫瘤藥劑選自由以下組成之群：化學療法、放射治療、熱療法和單株抗體療法。