



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104620334 A

(43) 申请公布日 2015. 05. 13

(21) 申请号 201280038864. 1

代理人 顾晋伟 彭鲲鹏

(22) 申请日 2012. 08. 07

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

H01F 1/00(2006. 01)

61/522, 217 2011. 08. 10 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 02. 08

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2012/003381 2012. 08. 07

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/020701 EN 2013. 02. 14

(71) 申请人 马格福斯股份公司

地址 德国柏林

(72) 发明人 诺贝特·瓦尔多夫纳

安德烈亚斯·乔丹

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限

公司 11227

权利要求书2页 说明书15页 附图3页

(54) 发明名称

团聚的烷氧基硅烷涂覆的磁性纳米颗粒

(57) 摘要

本发明涉及用于生产磁性烷氧基硅烷涂覆的金属纳米颗粒团聚体的悬液的方法, 其中将磁性金属纳米颗粒的水性悬液与烷氧基硅烷一起孵育, 其中所述孵育基本在无有机溶剂存在下进行。本发明还涉及可通过本发明方法得到的含磁性烷氧基硅烷涂覆的金属的纳米颗粒团聚体的悬液, 并且涉及包括磁性烷氧基硅烷涂覆的金属纳米颗粒团聚体的组合物, 其中所述团聚体通过光散射测定的平均尺寸为 30nm 至 450nm, 优选 50nm 至 350nm 并且尤其是 70nm 至 300nm。

1. 一种用于生产磁性烷氧基硅烷涂覆的金属纳米颗粒团聚体的悬液的方法, 其中将磁性金属纳米颗粒的水性悬液与烷氧基硅烷一起孵育,

其特征在于所述孵育基本在无有机溶剂存在下进行。

2. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述金属纳米颗粒包括铁、铁络合化合物、羰基铁化合物或铁盐, 优选铁盐。

3. 根据权利要求 2 所述的方法, 其中所述铁盐是氧化铁, 优选磁铁矿和 / 或磁赤铁矿。

4. 根据权利要求 3 所述的方法, 其中通过以下方法提供氧化铁纳米颗粒的水性悬液:

a) 通过用氢氧化钠使包含氯化铁(III)和氯化铁(II)的混合物的溶液沉淀, 或者

b) 通过使铁盐或铁络合化合物热分解。

5. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的方法, 其中在所述孵育之前用  $H_2O_2$  处理所述磁性金属纳米颗粒。

6. 根据权利要求 1 至 5 中任一项所述的方法, 其中所述烷氧基硅烷是三烷氧基硅烷, 优选选自 3-(2-氨基乙基氨基)-丙基-三甲氧基硅烷、3-氨基丙基三乙氧基硅烷、三甲氧基甲硅烷基丙基-二亚乙基三胺和 N-(6-氨基己基)-3-氨基丙基三甲氧基硅烷, 尤其是 3-(2-氨基乙基氨基)-丙基-三甲氧基硅烷。

7. 根据权利要求 1 至 6 中任一项所述的方法, 其中每 0.9mol 金属添加  $0.3 \times 10^{-3} \text{mol}$  至  $0.6 \times 10^{-3} \text{mol}$ 、优选  $0.4 \times 10^{-3} \text{mol}$  至  $0.5 \times 10^{-3} \text{mol}$ 、尤其是  $0.43 \times 10^{-3} \text{mol}$  至  $0.45 \times 10^{-3} \text{mol}$  三烷氧基硅烷。

8. 根据权利要求 1 至 7 中任一项所述的方法, 其中所述孵育在 2 至 6 的 pH 下进行。

9. 根据权利要求 1 至 8 中任一项所述的方法, 其中在与烷氧基硅烷进行所述孵育之前使所述金属磁性纳米颗粒崩解。

10. 根据权利要求 1 至 9 中任一项所述的方法, 还包括在开始与烷氧基硅烷进行所述孵育之后使所述磁性纳米颗粒崩解的步骤。

11. 根据权利要求 1 至 10 中任一项所述的方法, 还包括移除不完全涂覆的纳米颗粒的步骤。

12. 根据权利要求 9 至 11 中任一项所述的方法, 其中使所述团聚体崩解直至实现通过光散射测定的平均尺寸为 30nm 至 450nm、优选 50nm 至 350nm、尤其是 70nm 至 300nm。

13. 根据权利要求 1 至 12 中任一项所述的方法, 其中使所述团聚体的悬液浓缩至根据其金属含量测定的浓度为至少约 2M、优选至少约 3M、更优选至少约 4M、甚至更优选至少约 5M、尤其是至少约 6M。

14. 一种磁性烷氧基硅烷涂覆的含金属的纳米颗粒团聚体的悬液, 其可通过根据权利要求 1 至 13 中任一项所述的方法得到。

15. 一种包含磁性烷氧基硅烷涂覆的金属纳米颗粒团聚体的组合物, 其中所述团聚体的通过光散射测定的平均尺寸为 30nm 至 450nm、优选 50nm 至 350nm、尤其是 70nm 至 300nm。

16. 根据权利要求 15 所述的组合物, 其中所述组合物基本不含有机溶剂。

17. 根据权利要求 15 或 16 中任一项所述的组合物, 其中所述金属纳米颗粒具有金属核, 所述金属核的通过电子显微镜测定的尺寸为 5nm 至 25nm、优选 7nm 至 20nm、尤其是 9nm 至 15nm。

18. 根据权利要求 15 至 17 中任一项所述的组合物, 其中所述金属纳米颗粒还具有如权

利要求 2 至 4 中任一项所限定的特征。

19. 根据权利要求 15 至 18 中任一项所述的组合物,其中在 pH5.2 和导电率 2.0mS / cm 下,所述金属纳米颗粒的  $\zeta$  电势为 25mV 至 80mV、优选 35mV 至 70mV、尤其是 45mV 至 60mV。

20. 根据权利要求 15 至 19 中任一项所述的组合物,其中所述团聚体悬于基于水的可生理接受的缓冲液中。

21. 根据权利要求 20 所述的组合物,其中所述纳米颗粒的根据金属含量测定的浓度为至少约 2M、优选至少约 3M、更优选至少约 4M、更优选至少约 5M、尤其是至少约 6M。

22. 根据权利要求 20 或 21 中任一项所述的组合物,其中所述悬液通过旋转流变测定在剪切速率为 100 / s 下的粘度等于或大于 0.005Pa s、优选等于或大于 0.01Pa s、更优选等于或大于 0.1Pa s、尤其是等于或大于 1Pa s。

23. 根据权利要求 20 至 22 中任一项所述的组合物,其中在磁场强度 3.5kA / m 和频率 100kHz 下测定的所述纳米颗粒在悬液中的比吸收率 (SAR) 大于或等于 2W/gMe、优选大于或等于 3W / g Me、尤其是 4W / g Me 至 12W/gMe。

24. 根据权利要求 20 至 23 中任一项所述的组合物,其中将所述悬液注射到同基因肿瘤模型中之后,在注射后第 7 天或 7 天之后,至少 90%、优选至少 93%、更优选至少 95%、尤其是至少 98% 的施用的金属保留在所注射的肿瘤内。

25. 根据权利要求 20 至 24 中任一项所述的组合物,其可通过根据权利要求 1 至 12 中任一项所述的方法得到。

26. 一种医疗装置,包括根据权利要求 14 所述的悬液或根据权利要求 15 至 25 中任一项所述的组合物。

27. 一种药剂,包括根据权利要求 14 所述的悬液或根据权利要求 15 至 25 中任一项所述的组合物。

28. 根据权利要求 14 所述的悬液或根据权利要求 15 至 25 中任一项所述的组合物,用于治疗或预防患者的增生性疾病、癌症、肿瘤、风湿病、关节炎、关节病和细菌感染的方法中。

29. 一种治疗或预防增生性疾病、癌症、肿瘤、风湿病、关节炎、关节病和细菌感染的方法,包括向人或动物患者施用根据权利要求 14 所述的悬液或根据权利要求 15 至 25 中任一项所述的组合物的步骤。

30. 根据权利要求 28 所述用于用途的悬浮体或组合物或者根据权利要求 29 所述的方法,其中所述方法还包括使所述患者暴露于交变磁场。

## 团聚的烷氧基硅烷涂覆的磁性纳米颗粒

[0001] 尽管最近在实体肿瘤的肿瘤治疗例如抗体中有了进展,但是仍然需要更有效且成本有效的治疗选择。

[0002] 温热疗法或更具体地过热疗法 (hyperthermia) 是用于治疗癌症的吸引人的途径,原因是与化学疗法或放射疗法相比,因其物理作用方式而预计对多种肿瘤疾病的副作用较小。但是,目前可用的模式仍然是次优的 (Moroz 等 2002) 并且需要改进。

[0003] 温热疗法的一种优选模式是其中将磁性纳米颗粒直接引入肿瘤中的方法。随后在交变磁场中加热纳米颗粒。根据治疗的持续时间和所达到的瘤内温度,使肿瘤细胞直接破坏 (热消融) 或者对于伴随的化学或放射疗法 (过热疗法) 敏感。通过该新方法,可由内而外地对抗肿瘤,从而不伤害周围的健康组织。该治疗模式在治疗成胶质细胞瘤中显示出了有前景的治疗效果 (Maier-Hauff 等 2011)。

[0004] 尽管通过第一次临床试验得到了阳性结果,但是仍然有提高效率和 / 或降低疗法的副作用或限制的空间。另一个未解决的问题是,在滴注纳米颗粒期间,在周围组织中发生磁性颗粒在靶区域外侧的沉积。由于这些外部贮库 (depot) 在交变磁场中加热后导致了在交变磁场中进行加热后靶区域外侧的温度升高,或者其限制了用于加热纳米颗粒贮库的可施加磁场强度 (如果要避免周围组织的这种加热的话),所以其造成了不需要的副作用。该问题的原因可以是注射肿瘤组织内的高压,其导致沉积的纳米颗粒在注射期间或者在注射之后立即流出。此外,虽然需要纳米级颗粒以具有高的比吸收率 (SAR),但是这样的纳米颗粒可在组织间隙中容易移动并从而可靶组织中损失。此外,由于迄今为止用于临床的纳米颗粒 / 磁性流体的次优比吸收率 (SAR),所以通过首先使纳米颗粒沉积并随后通过交变磁场将其激发可在肿瘤中“沉积”的热量受到限制。

[0005] 另外,这样的纳米颗粒需要以受控方式大规模且以合理成本制造,并且需要能够配制成稳定制剂以变为可销售产品。

[0006] 现有技术描述了这种纳米颗粒的多种方法和用途,如 Gupta 和 Gupta (2005) 所综述的。

[0007] Lesniak 等 (1997) 描述了用于制备不含团聚体的纳米颗粒的方法。所述方法包括 (i) 制备部分形成团聚体的氧化铁纳米颗粒的水性悬液, (ii) 添加三烷氧基硅烷和水混溶性极性有机溶剂例如乙二醇, (iii) 用超声处理所得悬液以减少团聚, (iv) 在超声作用下通过蒸馏移除水,以及 (v) 移除剩余的团聚体。所述方法基于烷氧基硅烷得到了具有耐水解涂层的不含团聚体的纳米颗粒。但是,如果将这些纳米颗粒局部施用于实体肿瘤,则由于其不含团聚体的性质而仅可部分保留在注射位点。这些纳米颗粒广泛分布在身体中,从而限制了纳米颗粒在靶区域中的剩余量,并且由于纳米颗粒在身体的周围组织或其他地方中的积累而增加了副作用风险。此外,由于使用的乙二醇与烷氧基硅烷涂层的氨基基团相互作用以及其高沸点 (197°C),所以其去除是非常困难的。因此,最终产物中乙二醇的存在在安全性和监管方面限制了纳米颗粒的适用性。

[0008] Ruefenacht 等 (2006) 公开了液体载剂中生成热纳米颗粒的可注射的基于聚合物的制剂,其在与体液或组织接触后能够形成原位植入体。然而该制剂似乎解决了纳米颗

粒从肿瘤中流出的问题,该系统优选地使用溶剂 N-甲基-2-吡咯烷酮 (NMP) 或二甲亚砜 (DMSO)。两种溶剂一般都被认为具有低毒性并且频繁用于药物的口服和透皮制剂。但是,关于将所述溶剂注射到组织或肿瘤中(尤其是在脑肿瘤中注射到脑中)了解的很少。因此,应避免这样的溶剂。此外,这样的制剂在注射后形成限定的植入体,然而在本发明的上下文中,设想要实现注射纳米颗粒在肿瘤/组织中的某些分布,但是这局限于肿瘤/组织。该系统的另一个缺点是如果将这些可注射的基于聚合物的制剂注射到肿瘤中,肿瘤中的预期体积增加,这可在某些肿瘤适应症(尤其是在其中结壳(scull)的空间有限的脑组织中)造成问题。总之,这种基于聚合物的制剂不适合于治疗不能动手术的肿瘤。

[0009] 因此,本发明的目的是提供改进的生物相容性磁性纳米颗粒。特别地,本发明的目的是提供用于治疗肿瘤的改进的生物相容性磁性纳米颗粒。

[0010] 如实施例所示,本发明人现已出乎意料地发现,在无有机溶剂存在下使氧化铁纳米颗粒进行受控的氨基硅烷化导致了表面氨基硅烷不完全缩合的磁性纳米颗粒,导致了可高度浓缩的磁性纳米颗粒(磁性流体)的稳定水基制剂。在注射到组织或肿瘤中之后,这些磁性流体在靶组织中形成具有高保留率的有利贮库。因此,本发明人提供了一种用于制造改进的纳米颗粒的改进方法,以及具有改进的生物相容性、靶区域中改进的贮库形成和副作用较小(由于不存在有机溶剂和/或沉积纳米颗粒从治疗区域中流出减少)的合适的悬液和组合物(磁性流体)。

[0011] 因此,本发明提供了具有高比吸收率(SAR)的生物相容性磁性纳米颗粒,其可以按日常惯例注射到肿瘤组织中,停留在目的治疗区域(例如肿瘤)中的注射位点处或注射位点附近并且基本不扩散至周围组织。此外,本发明提供了用于这种生物相容性磁性纳米颗粒的稳健且成本有效的制造方法。

[0012] 定义

[0013] “比吸收率”(SAR)是纳米颗粒在暴露于交变磁场之后吸收能量率的度量。其取决于磁场强度和磁场极化的交变频率。优选地根据由 Jordan 等(1993)开发的方法在 100kHz 频率和高至 18kA / m、优选 3.5kA / m 的场强度下测定 SAR 并且其涉及所使用金属例如铁的质量(单位 W / g 金属)。

[0014] “ $\zeta$  电势”是指用仪器例如 Malvern ZetaSizer3000HSA 在 pH5.2 和 2.0mS / cm 的电导率(各自在 25°C 下进行测定)下测量的水性环境中胶体纳米颗粒的测量电势。 $\zeta$  电势描述了本体溶液与水力剪切或扩散层区域之间的边界处的电势。

[0015] 在本发明的上下文中,术语“约”意指由给定数目或值的偏差为  $\pm 10\%$ , 优选  $\pm 5\%$  并且尤其是  $\pm 1\%$ 。

[0016] 术语“磁性”包括磁性、顺磁性、铁磁性、抗铁磁性、亚铁磁性、抗亚铁磁性和超顺磁性。优选地,根据本发明的纳米颗粒是顺磁性的,更优选是铁磁性的、亚铁磁性的、抗亚铁磁性的或超顺磁性的。

[0017] 在一个特别优选的实施方案中,纳米颗粒是超顺磁性的。

[0018] 术语“纳米颗粒”应意指纳米范围的纳米颗粒,意指如可通过电子显微镜所测定的纳米颗粒相对于其金属核为 1nm 至 100nm。优选地,纳米颗粒的尺寸为 5nm 至 25nm,更优选 7nm 至 20nm 并且尤其是 9nm 至 15nm。

[0019] “金属纳米颗粒”是指磁性纳米颗粒,其包含金属或金属离子。

[0020] “有机溶剂”意指液体有机化合物（即，烃），其能够溶解固体、气体或液体。根据本发明的有机溶剂的实例包括但不限于乙二醇、丙酮、甲苯及等同物。

[0021] 术语“烷氧基硅烷涂覆”是指由烷氧基硅烷缩聚造成的涂覆——也称为“氨基硅烷涂覆”的方法。本文使用的术语“缩聚”一般意指具有两个官能团的单体的任意缩合反应，其导致形成聚合物。

[0022] 在第一方面中，本发明涉及一种用于生产磁性烷氧基硅烷涂覆的金属纳米颗粒团聚体的悬液的方法，其中使磁性金属纳米颗粒水性悬液与烷氧基硅烷一起孵育，其特征在于所述孵育基本在无有机溶剂存在下进行。

[0023] 在本发明的上下文中，术语“孵育 (incubating 或 incubation)”意指允许烷氧基硅烷缩聚并从而用于纳米颗粒的氨基硅烷涂覆的任何实验设置、实验条件或反应混合物。

[0024] 如实施例所示，发现在本发明的上下文中，对于治疗肿瘤和其他疾病，与不形成团聚体的磁性烷氧基硅烷涂覆的金属纳米颗粒相比，磁性烷氧基硅烷涂覆的金属纳米颗粒的团聚体可在靶区域内更好地形成贮库，并且较少的纳米颗粒损失到循环中或在靶区域外侧形成贮库。“团聚”在本文中意指几个单独的纳米颗粒形成纳米颗粒的团聚体或簇。“团聚体”是指团聚的纳米颗粒或纳米颗粒的簇。

[0025] 本发明的必要步骤是基本在无有机溶剂存在下与烷氧基硅烷孵育 / 反应。在有机溶剂背景下的“基本在无……存在下”意指可存在痕量的有机溶剂，优选有机溶剂的量小于 10 体积%，更优选小于体积 5%，更优选小于 1 体积%，尤其是小于 0.5 体积%。例如，在反应期间可产生少量的甲醇，因此在一定程度上可保留在产物中。在一个优选实施方案中，在无有机溶剂存在下进行涂覆，尤其在无添加的有机溶剂存在下进行涂覆。用于涂覆反应的优选溶剂是水。不受任何科学理论束缚，本发明人假设这些反应条件导致烷氧基硅烷的明确但不完全的缩合反应，其转化成纳米颗粒的团聚性质。

[0026] 本发明的方法优选在无乙二醇存在下进行。乙二醇干扰本发明的涂覆反应。此外，如果不是不可能的话，至少非常难以将其从纳米颗粒制备物中移除，因为通常有相对大量的乙二醇仍然与纳米颗粒的涂层连接并且由于其 197°C 的高沸点。这也适用于根据 Lesniak 等 (1997, 见上) 制备的制备物。根据欧洲药典，在最终药品中仅允许 600ppm 的乙二醇，这使得具有较高量乙二醇的纳米颗粒制备物不被接受用于商业临床使用。

[0027] 在一个实施方案中，金属纳米颗粒包括铁、铁络合化合物、羰基铁化合物或铁盐，而铁盐是优选的。含铁纳米颗粒是优选的，因为其与其他磁性金属例如钴或镍相比较低的毒性。在一个优选实施方案中，铁络合化合物、羰基铁化合物或铁盐基本不含其他金属和其他污染物以避免毒性。在本领域公知的是，化学品可包含痕量的污染物。因此，“基本不含”在本上下文中优选地意指铁络合化合物、羰基铁化合物或铁盐中包含小于 1 重量%，优选小于 0.1 重量%的其他污染物。尤其优选的是基本不含其他污染物的铁盐。

[0028] 在一个尤其优选的实施方案中，铁盐是氧化铁，优选磁铁矿和 / 或磁赤铁矿。由氧化铁制成的这种铁纳米颗粒可通过用氢氧化钠使包含氯化铁 (III) 和氯化铁 (II) 混合物的溶液沉淀来制造。根据本发明的“铁纳米颗粒”是包含 Fe 原子或 Fe 离子的纳米颗粒。

[0029] 因此，在一个优选实施方案中，通过用氢氧化钠使包含氯化铁 (III) 和氯化铁 (II) 混合物的溶液沉淀来提供氧化铁纳米颗粒的水性悬液。

[0030] 此处，氯化铁 (III) 与氯化铁 (II) 的比优选为约 2 : 1。

[0031] 在本发明的上下文中,术语“铁纳米颗粒”和“氧化铁纳米颗粒”等价使用。

[0032] Massart(1981) 描述并且 Mohapatra 和 Anand(2010) 综述了合适的沉淀反应和条件。沉淀反应的优选条件是 (i) 氯化铁 (III) 与氯化铁 (II) 的比为约 2 : 1 ;(ii) 将氯化铁 (III) 和氯化铁 (II) 溶液倾倒入浓度为约 2.13M 的氢氧化钠溶液中 ;(iii) 沉淀温度为约 25°C ;以及 (iv) 沉淀反应的时间为约 52 分钟。任选地,在约 15°C 下在约 39 分钟的时间期间将氢氧化钠溶液倾倒入氯化铁溶液中 (而不是反之亦然)。例如,实施例 1.1 举例说明了通过使溶液中的铁盐沉淀的方式来产生涂覆的氧化铁纳米颗粒的方法。

[0033] 或者,可通过使铁盐或铁络合化合物的热分解来提供氧化铁纳米颗粒的水性悬液。本文使用的术语“铁络合化合物”一般意指包含铁的任意络合物,优选包含络合铁的任意化合物。Waldoefner 和 Stief(2011) 描述了合适的方法。简言之,使含铁化合物和有机溶剂在 50°C 至低于反应温度 50°C 的温度下维持 10 分钟。接着,将溶液加热至 200°C 至 400°C 以产生纳米颗粒。用氧、过氧化物或叔胺氧化物使纳米颗粒氧化,并用硝酸和硝酸铁处理以产生磁赤铁矿纳米颗粒。Guardia 等 (Guardia 等 2010a ;Guardia 等 2010b ;Guardia 等 2012) 描述了通过热分解制备氧化铁纳米颗粒的另一种合适方法。简言之,使乙酰丙酮铁 (III) 与癸酸在二苯醚中混合。将溶液持续加热至 200°C。在 200°C 维持 2 小时后,将溶液加热至回流并在该温度下维持 1 小时,最后冷却至室温,洗涤并通过离心收集。由于所得纳米颗粒的高 SAR,所以两种方法均是优选的。例如,实施例 1.2 描述了根据本发明的通过热分解的方式来产生氧化铁纳米颗粒的方法。

[0034] 因此,在一个替代优选的实施方案中,通过使铁盐或铁络合化合物热分解来提供氧化铁纳米颗粒的水性悬液。

[0035] 可在本发明方法中的铁盐和铁络合物对于本领域技术人员是公知的并且包括但不限于,氯化铁 (III)、氯化铁 (II)、乙酰丙酮铁 (III)、羰基铁及等同物。

[0036] 在一个优选实施方案中,在与烷氧基硅烷孵育 / 反应之前用  $H_2O_2$  处理金属纳米颗粒。由于在限定条件下铁被充分氧化为  $Fe_2O_3$  (磁赤铁矿) 并因此可在无保护气体 (例如,氩气) 存在下进行后续反应步骤,所以该任选步骤是优选的。而在无  $H_2O_2$  存在下,优选在保护气体例如氩气下进行以控制反应条件。

[0037] 烷氧基硅烷优选是三烷氧基硅烷。其优选选自 3-(2-氨基乙基氨基)-丙基-三甲氧基硅烷 (DIAMO)、3-氨基丙基三乙氧基硅烷 (APTES)、三甲氧基甲硅烷基丙基-二亚乙基三胺 (TRIAMO) 和 N-(6-氨基己基)-3-氨基丙基三甲氧基硅烷。在一个尤其优选的实施方案中,烷氧基硅烷是 3-(2-氨基乙基氨基)-丙基-三甲氧基硅烷。

[0038] 在另一个优选实施方案中,通过每 0.9mol 金属添加  $0.3 \times 10^{-3}$  mol 至  $0.6 \times 10^{-3}$  mol, 优选  $0.4 \times 10^{-3}$  mol 至  $0.5 \times 10^{-3}$  mol 并且尤其是  $0.43 \times 10^{-3}$  mol 至  $0.45 \times 10^{-3}$  mol 的三烷氧基硅烷来进行涂覆反应。

[0039] 根据本发明的一个优选实施方案,与烷氧基硅烷孵育 / 反应在 2 至 6 (其意指 2 或 6 的 pH 也包括在该范围中) 的 pH, 优选 2.5 至 5.5 的 pH, 尤其是  $4.5 \pm 1$  的 pH 下进行。在孵育 / 反应期间,如果需要则可将 pH 调节为所述值。因此可使用乙酸来调节 pH。

[0040] 优选地,在与烷氧基硅烷孵育 / 反应之前使金属磁性纳米颗粒崩解。优选地通过超声处理使纳米颗粒崩解以生成球形或立方体的高电子密度的纳米颗粒悬液,然后可使其经历涂覆反应。在一个实施方案中,在 45kHz 的超声浴中 30 分钟至 2 小时尤其是 1 小时来

完成超声处理。该崩解方法优选地在酸性条件（优选 pH2.5 至 3.0）下进行。例如，实施例 1.1 描述了根据本发明的纳米颗粒的崩解。

[0041] 崩解纳米颗粒的另一种合适方法是基于激光的解团聚 / 激光破碎技术 (Schnoor 等 2010)。

[0042] 本发明的方法可还包括在开始与烷氧基硅烷孵育 / 反应之后使团聚体崩解的步骤，其可如上所述地进行。在一个实施方案中，使纳米颗粒崩解与涂覆步骤一起或在其之后开始。然而，在一个更优选的实施方案中，崩解步骤在涂覆步骤之前开始，并且还同时或在涂覆步骤同时或在涂覆步骤之后进行。尤其是，使崩解在涂覆步骤之前开始并且在涂覆步骤期间和之后继续。优选地，使崩解进行总计约 24 小时或更多。

[0043] 在涂覆和崩解之后，可生成可稳定贮库在室温下的悬液，使得其成为一个优选实施方案。不受任何科学理论束缚，假定大多数单独的纳米颗粒完全地涂覆有烷氧基硅烷，其容易地与邻近的纳米颗粒粘附并形成根据本发明的团聚体，如可由图 1 看到的。另外，悬液足够流畅以易于通过注射器并且可注射到肿瘤组织中。

[0044] 在一个优选实施方案中，进行了另外用于将不完全涂覆和 / 或非常大的团聚体（例如，多于 2000 个纳米颗粒的团聚体）从悬液中移除的步骤。用于该步骤的合适方法是离心（例如，以 2000rpm 离心 10 分钟）和过滤（例如，通过孔尺寸为 12 至 25  $\mu\text{m}$  的褶皱式过滤器）。在一个尤其优选的实施方案中，进行离心和过滤二者。观察到主要并且完全被烷氧基硅烷涂覆的纳米颗粒不从悬液中沉降，例如如果以 2000rpm 离心 10 分钟。因此，离心的上清液和 / 或过滤器的流过物 (flow-through) 是根据本发明的悬液，其在一天、优选一周、尤其是一个月期间不显示出沉降，并因此可长时间贮库。

[0045] 另一方面，可例如通过这种离心从悬液中很大程度地移除不完全涂覆的纳米颗粒。由于不完全涂覆的纳米颗粒的 SAR 降低并因此使悬液的体积 SAR 降低，所以不完全涂覆颗粒的这种移除是优选的。

[0046] 优选进行崩解步骤和任选的移除步骤直至金属纳米颗粒团聚体的如通过光散射所测定的平均尺寸 (z-平均) 为 30nm 至 450nm，优选 50nm 至 350nm 并且尤其是 70nm 至 300nm。在本上下文中，根据实施例 3 在水中测定平均尺寸。通过该光散射测量，测定了纳米颗粒团聚体的尺寸——与形成这种团聚体的球形或立方体的高电子密度单个纳米颗粒尺寸形成对照。相对于团聚体尺寸的“z-平均”意指如实施例 3 所进行的光散射尺寸测定的读数。高于所提供范围的 z-平均值导致纳米颗粒沉降，并因此一般不适用于这些纳米颗粒的预知用途。即使分散体可在灌输到肿瘤之前再造，较大的团聚体也可导致严重的问题，原因是分散体在通过针时可部分地分离成缓冲液和团聚体，导致了纳米颗粒在组织中的不均匀分布。

[0047] 在本发明的另一个优选实施方案中，使团聚体的悬液浓缩至根据其金属含量所测定的浓度为至少约 2M、优选至少约 3M、更优选至少约 4M、更优选至少约 5M 并且尤其是至少约 6M。可通过在旋转蒸发器中使水蒸发来调节根据本发明的悬液中的期望金属浓度。可使用以下公开的方法对悬液样品关于固体含量和金属浓度进行分析（参见例如实施例 2）。

[0048] 出乎意料地发现，可使根据本发明的组合物中的纳米颗粒浓缩至 2M 金属含量及以上的高浓度，而不损失其作为医疗装置或药剂的可用性。这些高度浓缩的悬液可仍然以日常惯例灌输或注射，并且重要的是可贮库几个月。在将悬液高压灭菌之后，可观察到一些



凝胶化,然而其可通过强烈涡旋(例如约 12 小时)逆转。与具有较低金属浓度的悬液相比,这些悬液具有基于体积的较高比吸收率(SAR)和高粘度。出乎意料地,本发明纳米颗粒显示出,这种纳米颗粒在目的组织例如肿瘤中的贮库形成取决于纳米颗粒的浓度,即增加纳米颗粒浓度导致贮库形成增加。该结果是不期望的,因为人们可合理地假设注射纳米颗粒的浓度在组织中快速平衡为不同浓度,使得不同浓度的相同纳米颗粒没有不同表现。

[0049] 本发明的另一个方面是磁性烷氧基硅烷涂覆的金属纳米颗粒团聚体的悬液,其可通过上述方法得到。如以下实施例所示,该悬液可以以日常惯例注射到肿瘤中,停留在肿瘤组织中并因此可用于过热疗法和热消融。出乎意料地发现,根据本发明的烷氧基硅烷涂覆导致了纳米颗粒团聚的性质,以这种方式使得在注射到组织中之后团聚体主要停留在靠近注射位点处而仍然容易操作。这使得这些团聚体尤其适合于注射到肿瘤组织中例如用于过热疗法和/或热消融。

[0050] 本发明的另一个方面是包含磁性烷氧基硅烷涂覆的金属纳米颗粒团聚体的组合物,其中所述团聚体的如通过光散射所测定的平均尺寸为 30nm 至 450nm,优选 50nm 至 350nm 并且尤其是 70nm 至 300nm。例如,实施例 3 描述了根据本发明的团聚纳米颗粒的尺寸测量。

[0051] 优选地,该包括团聚体的组合物基本不含有机溶剂。“基本不含有机溶剂”在本上下文中优选地意指可存在痕量的有机溶剂,例如有机溶剂的量小于 5 体积%,优选小于 1 体积%,更优选小于 0.5 体积%,尤其是小于 0.1 体积%。在一个尤其优选的实施方案中,通过常规方法在纳米颗粒制备物中检测不到有机溶剂。

[0052] 这种组合物的金属纳米颗粒优选是具有金属核的纳米颗粒,所述金属核的如通过电子显微镜所测定的尺寸为 5nm 至 25nm,优选尺寸为 7nm 至 20nm 并且尤其是尺寸为 9nm 至 15nm。如在透射电子显微镜法(TEM)中所测定的,悬液的团聚体优选由几十个至几百个这种单个纳米颗粒构成,而任意或仅非常少数的是少于 10 个纳米颗粒的小团聚体,优选在以 700×700nm 和至少 1000 个纳米颗粒展示的代表性 TEM 图片中 10 个或更少纳米颗粒的团聚体小于 3 个。例如,实施例 6 描述了根据本发明的透射电子显微镜法。

[0053] 进而,在以 700×700nm 和至少 1000 个纳米颗粒展示的代表性 TEM 图片中,可检测到小于 10 个的单个纳米颗粒,优选小于 5 个的单个纳米颗粒,尤其是一个或没有单个纳米颗粒。纳米颗粒在本上下文中是在透射电子显微图中可见的一种基本为球形或立方体的高电子密度的纳米颗粒。单个纳米颗粒是不与至少一个其它纳米颗粒连接的纳米颗粒。

[0054] 优选地,单个纳米颗粒的形状是球形或立方体的。可通过调节 pH、离子强度、温度、盐的性质(高氯酸盐、氯化物、硫酸盐和硝酸盐)、或 Fe(II) / Fe(III) 浓度比来修改纳米颗粒的尺寸和形状(如 Mohapatra 和 Anand2010 所综述)。

[0055] 优选地,所述金属纳米颗粒包括铁、铁络合化合物、羰基铁化合物或铁盐,优选铁盐。铁盐优选是氧化铁,尤其是磁铁矿。优选的纳米颗粒可通过如上所述方法得到,优选地通过用氢氧化钠使包含氯化铁(III)和氯化铁(II)混合物的溶液沉淀来提供氧化铁纳米颗粒的悬液而得到。

[0056] 在一个优选实施方案中,包含本发明磁性烷氧基硅烷涂覆的金属纳米颗粒团聚体的组合物的  $\zeta$  电势为 25mV 至 80mV,优选 35mV 至 70mV,尤其是 45mV 至 60mV。组合物的  $\zeta$  电势如实施例 4 所描述在 pH5.2 和导电率 2.0mS / cm  $\zeta$  各自在 25°C 下测定) 下测定。 $\zeta$

电势依赖于纳米颗粒的成功涂覆,因为其依赖于烷氧基硅烷的氨基。较低的  $\zeta$  电势指示纳米颗粒的不充分涂覆。在所提供范围内的正确  $\zeta$  电势有助于纳米颗粒在注射到组织中之后的性质,即所注射的纳米颗粒停留在例如肿瘤中的注射位点处或注射位点附近,并且不扩散到周围组织,这将限制可施加的磁场并从而进行治疗。此外,所提供范围中的  $\zeta$  电势确保了最佳的胶体稳定性,并因此延长了纳米颗粒组合物的贮藏寿命。

[0057] 本发明的另一个优选实施方案是包含磁性烷氧基硅烷涂覆的金属纳米颗粒团聚体的组合物,其中所述团聚体悬于基于水的可生理接受的缓冲液中。可生理接受的缓冲液在本领域中是已知的并且包括例如乙酸盐、柠檬酸盐、碳酸盐或磷酸盐,其 pH(25°C 下) 为 5 至 8、优选 5 至 6 并且尤其是 5.1 至 5.8, 并且导电率 (25°C 下) 为 1.5 至 2.5mS / cm、优选为 1.7 至 2.3mS / cm。合适悬液的渗透压为 0.01 至 0.050smol / kg、优选 0.02 至 0.040smol / kg。这样的悬液优选备用作用于全身治疗的输液或用于组织间质或瘤内施用的注射液。

[0058] 本发明组合物的如通过其金属含量所测定的纳米颗粒浓度优选为至少约 2M、优选至少约 3M、更优选至少约 4M、更优选至少约 5M 并且尤其是至少约 6M。优选地,纳米颗粒浓度为约 8M 以下,因为太高浓度对于某些应用可导致注射期间由于分散体的高粘度而造成的困难。关于铁,2M 等于 112mg / ml。可通过光度测定某些金属络合物来测定金属浓度,例如,可如实施例 2 所描述在转化为铁 (II) 邻二氮杂菲络合物之后测定铁。

[0059] 出乎意料地发现,可使根据本发明的组合物中的纳米颗粒浓缩至 2M 金属含量及以上的高浓度,而不损失其作为医疗装置或药剂的可用性。这些高度浓缩的悬液可仍然以日常惯例灌输或注射,并且重要的是可贮库几个月。在将悬液高压灭菌之后,可观察到一些凝胶化,但是其可通过强烈涡旋 (例如约 12 小时) 逆转。与具有较低金属浓度的悬液相比,这些悬液具有基于体积的较高 SAR 和高粘度。出乎意料地,本发明的纳米颗粒显示出,这种纳米颗粒在目的组织例如肿瘤中的贮库形成取决于纳米颗粒的浓度,即增加纳米颗粒浓度导致贮库形成增加。该结果是不期望的,因为人们可合理地假设注射纳米颗粒的浓度在组织中快速平衡为不同浓度,使得不同浓度的相同纳米颗粒没有不同表现。

[0060] 如可由实施例 9 看到的,对于高度浓缩的组合物在肿瘤中可沉积更多的纳米颗粒 (例如,在第 0 天,对于 6M 悬液为 95% 注射铁,而对于 2M 悬液为 90%)。该发现与以下结果相一致:与 2M 悬液相比,对于 6M 悬液,在肺、肝和脾中发现了较少的铁 (例如,在第 0 天为 14% 和 3%)。因此,推断出浓度越高,则越少的纳米颗粒进入循环并且到达其他器官。

[0061] 此外,发现较高度浓缩的本发明纳米颗粒在 7 天的时间范围中完全保留在肿瘤中 (对于 6M 悬液在第 0 天为 95% 而在第 7 天为 96%), 而对于较低浓缩的悬液在相同时间范围中可观察到一些铁含量的损失 (对于 2M 悬液在第 0 天为 90% 而在第 7 天为 86%)。该发现是特别出乎意料的,因为人们预期纳米颗粒在注射到肿瘤组织中之后快速稀释并且在较长时间段中不表现出不同的行为。

[0062] 如通过旋转流变测定所测定的,本发明组合物优选在 100 / s 剪切速率下的粘度等于或大于 0.005Pa s, 优选等于或大于 0.01Pa s, 更优选等于或大于 0.1Pa s 并且尤其是等于或大于 1Pa s。例如,实施例 8 举例说明了根据本发明的旋转流变测定。根据本发明的悬液的粘度随着纳米颗粒或铁浓度增加而增加。

[0063] 在一个优选实施方案中,如根据 Jordan 等 (1993) 所描述的方法在 3.5kA / m 磁

场强度和 100kHz 频率下所测定的,本发明组合中纳米颗粒的比吸收率 (SAR) 大于或等于 2W/g 各金属 (例如,铁),优选大于或等于 3W / g 各金属,并且尤其是 4 至 50W / g 各金属。一般地,因为最终在暴露于交变磁场期间可实现较高的温度,所以高 SAR 值是优选的。如果纳米颗粒的 SAR 值太低 (即低于所提供数值),则可在暴露于交变磁场之后在整个肿瘤中实现的温度太低而不能达到治疗效果。

[0064] 本发明的另一个优选实施方案是根据本发明的组合物,其中将组合物注射到同基因肿瘤模型中之后,在注射后第 7 天或 7 天之后,至少 90%、优选至少 93%、更优选至少 95% 并且尤其是至少 98% 的所施用金属停留在注射肿瘤中。根据本发明的同基因肿瘤模型是其中用于诱导肿瘤的肿瘤细胞与宿主动物从基因方面匹配的肿瘤模型。例如,C3H RS1 乳腺癌细胞系用于在小鼠株 C3H-HeN 中生成肿瘤。可通过使用光谱仪 (例如,通过 Tecan Infinite M200 光谱仪) 测量金属回收来测定肿瘤中剩余的金属。

[0065] 本发明的另一个实施方案是可通过本发明任一种方法得到的组合物。

[0066] 本发明的另一个方面是包括根据本发明的悬液或组合物的医疗装置。因为磁性纳米颗粒在暴露于交变磁场之后通过生成热作为物理作用方式发挥其治疗作用并且不直接与患者的代谢直接相互作用,所以这些纳米颗粒被在多个管辖区中被归类为医疗装置。另外,它们可被用于通过过热疗法和 / 或热消融治疗或预防肿瘤疾病和其他疾病的有力工具,其中使细胞在身体的某些区域中功能失常。

[0067] 可根据本发明治疗的这些其他疾病的实例是风湿病、关节炎、关节病和细菌感染。可用根据本发明的纳米颗粒治疗的肿瘤疾病优选是实体肿瘤,尤其是局部肿瘤或局部晚期肿瘤或者可造成局部问题的全身肿瘤疾病例如不能动手术的转移。实例是脑肿瘤,例如成胶质细胞瘤和星形细胞瘤、脑转移瘤、前列腺癌、胰腺癌、肝细胞癌、头颈癌、膀胱癌、胃癌、肾细胞癌、卵巢癌、宫颈癌、肉瘤、基底细胞癌和黑素瘤。

[0068] 本发明的另一个方面是包括根据本发明的悬液或组合物的药剂。可将本发明的悬液或组合物与活性药物例如抗癌剂,例如化学治疗剂 (可分组为烷基化剂、抗肿瘤抗生素、抗代谢物、天然来源衍生物)、激素 / 生长因子或激素 / 生长因子类似物或抑制剂、信号转导抑制剂和免疫治疗剂配制。例如 Waldoefner 和 Stief (2011, 第 [0096] 至 [0102] 段) 中列出了合适的药物。因此,本发明的一个方面是将根据本发明的纳米颗粒与这些活性药物组合。

[0069] 在另一个方面中,本发明涉及根据本发明的悬液或组合物,其用于治疗或预防如上下文所限定患者的如上下文另外描述的增生性疾病、癌症、肿瘤、风湿病、关节炎、关节病和细菌感染的方法。

[0070] 本发明的另一个方面是一种治疗或预防增生性疾病、癌症、肿瘤、风湿病、关节炎、关节病和细菌感染的方法,其包括向如上下文另外描述的人或动物患者施用本发明悬液或组合物的步骤。

[0071] 优选地,用于根据本发明的用途的悬液或组合物或根据本发明的治疗或预防疾病的方法还包括使患者暴露于交变磁场。通常,在将悬液或组合物注射到患者的靶区域 (例如肿瘤) 中之后几小时或几天施加交变磁场 (Johannsen 等 2007 ;Thiesen 和 Jordan 2008 ; Maier-Hauff 等 2011)。

[0072] 与 Jordan 等 (2008) 类似,本发明的悬液或组合物还可用于增加抗癌剂活性的方

法,其包括向有此需要的对象施用包括本文所描述纳米颗粒团聚体的药物组合物的步骤,并且在分开步骤中施用至少一种抗癌剂和至少一种可药用赋形剂、载体和 / 或溶剂。虽然两种施用可以是同时的或者一个在另一个之后(首先是纳米颗粒,第二是抗癌剂或者反之亦然),然而以这种方式使得纳米颗粒和抗癌剂同时存在于患者身体中,以便能够一起起作用并且增加彼此的治疗效果。然而,根据本发明,纳米颗粒团聚体在组织中在靶区域中停留数月或数年并且可在暴露于交变磁场后生成热,所使用的抗癌剂通常起数小时或数天的作用。因此“一起起作用”在本文中意指,抗癌剂的足够的药理学活性水平仍然存在于组织中。因此,本发明的另一个方面是本发明的纳米颗粒,其用于预防和 / 或治疗肿瘤疾病的方法,其中将纳米颗粒与抗癌剂一起施用,以这样的方式使得纳米颗粒和抗癌剂同时存在于患者身体中。

[0073] 在一个优选实施方案中,使根据本发明的纳米颗粒团聚体与活性药剂或靶向剂(例如本领域已知的抗体、抗体片段或配体)络合或共价偶联。例如, Jordan 等(2008), Gao 等(2011); Waldoefer 和 Stief(2011) 以及 Ivkov 等(2005) 中描述了活性药物和 / 或配体与纳米颗粒的偶联。

[0074] 与悬液相比,根据本发明的纳米颗粒团聚体的另一些合适药物或医疗装置是粉末(例如用于吸入或冻干,其可在输注或注射之前再造)或者是包括根据本发明的纳米颗粒团聚体的植入体(例如固体或凝胶样医疗装置、海绵体或膜,例如 Jordan(2009) 另外描述的)。

[0075] 一般地,根据本发明的药剂或医疗装置可容易地与用于分别治疗或预防疾病的常规疗法(例如化学疗法或放射疗法)联用。如果它们与本发明的药剂或医疗装置结合,则它们可用于增加各个治疗的有效性和 / 或通过降低其剂量降低常规疗法的副作用。

[0076] 鉴于以上的一般讨论,以下示出的具体附图和实施例仅是说明性的并且不旨在限制本发明的范围。其它一般的和特定的配置对于本领域技术人员将是显而易见的。

## 附图说明

[0077] 图 1:根据实施例 1 制造的磁性氧化铁纳米颗粒的 2M 悬液的透射电子显微图。

[0078] 图 2:通过根据实施例 8 的旋转流变测定法测定了根据实施例 1 的三种不同氧化铁纳米颗粒制备物的粘度。对于 AS1(6M Fe) [ 填充菱形 (filled diamond) ]、AS2(3M Fe) [ 开圆 (open circle) ] 和 AS1(2M Fe) [ 填充方形 (filled square) ], 根据剪切速率 (以 / s 为单位) 描绘了剪切粘度 (以 Pa s 为单位)。

[0079] 图 3:根据实施例 5 测定了根据实施例 1 的三种不同纳米颗粒制备物的 SAR。对于 AS1(6M Fe) [ 填充菱形 ]、AS2(3M Fe) [ 开圆 ] 和 AS1(2M Fe) [ 填充方形 ], 根据交变磁场强度 (以 kA / m 为单位) 描绘了 SAR (以 W / g Fe 为单位)。

## 实施例

[0080] 1. 制造涂覆的磁性氧化铁纳米颗粒

[0081] 1.1. 通过使氧化铁从铁盐溶液 (AS1 和 AS2) 中沉淀

[0082] 沉淀和洗涤:对 NaOH 称重,放入烧瓶中,溶于纯化水中至浓度为 2.13M 并随后冷却至 25℃。将氯化铁 (III) 和氯化铁 (II) (比率 2 : 1) 填充到玻璃瓶中并溶解于纯化水中

以得到 0.48M 氯化铁 (III) / 0.24M 氯化铁 (II) 溶液。将氯化铁溶液倾倒入 NaOH 溶液中并混合约 53 分钟的时间,同时使温度恒定保持在 25°C。使所生成的纳米颗粒沉积并移除上清液。用脱气水洗涤纳米颗粒直至上清液导电率达到 <math>5\text{mS} / \text{cm}</math>。

[0083] 任选地,在 15°C 经约 39 分钟的时间将 NaOH 溶液倾倒入氯化铁溶液中 (而不是反之亦然)。对于 AS2 纳米颗粒进行了所述方法的这种修改。

#### [0084] 涂覆和崩解

[0085] 用稀 HCl 调节来自以上的纳米颗粒悬液直至 pH 为 2.5 至 3.0。其后将烧瓶置于超声浴中,用 45kHz 的超声处理 1 小时并同时搅拌。现在在 90 分钟的时间内逐滴添加 3-(2-氨基乙基氨基)-丙基)-三甲氧基硅烷 (Fluka, 48mi / 1,21 纳米颗粒悬液),同时通过添加数滴酸性酸使 pH 维持在 5.5 阈值以下,但是 pH 不应低于 5.0。在该步骤之后,用稀 HCl 将 pH 调节至 4.65 并用超声再处理悬液 23 小时。根据该方案 (没有任选的步骤) 制造的颗粒称为 AS1 纳米颗粒。

[0086] 任选地,在涂覆之前用  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理纳米颗粒 2 天以实现纳米颗粒的更细分散体和更好的胶体稳定性。可使用另一些  $\text{H}_2\text{O}_2$  以在控制条件下使 Fe 完全氧化成  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ 。因此,可在无保护气体 (例如,氩气) 存在下进行后续反应。对来自以上的 AS2 纳米颗粒进行了该任选步骤。

[0087] 透析:用血液透析柱体 (Fresenius F8HPS) 针对脱气超纯水纯化悬液直至达到  $400\ \mu\text{S} / \text{cm}$  的导电率。

[0088] 离心和浓缩:将所得悬液的一半填充到离心机吊桶中并以 2,000rpm 离心 10 分钟。接着使上清液通过褶皱式过滤器 (12 至  $25\ \mu\text{m}$ ) 过滤到预先用氩气冲洗 5 分钟的玻璃瓶中。对第二部分悬液同样地重复该步骤。然后,用旋转蒸发器使纳米颗粒悬液浓缩至期望的 Fe 浓度 (例如,112mg / ml Fe 等于 2M Fe,168mg / ml Fe 等于 3M Fe,或 335mg / ml Fe 等于 6M Fe)。可分析纳米颗粒样品的固体含量和 Fe 浓度。

[0089] 1.2. 通过使铁络合物 (AS4 和 AS5) 热分解

[0090] 与 Waldoefner 和 Stief (2011) 所述方法类似地产生了 AS4 颗粒。简言之,在三颈烧瓶中将氯化铁 (III)、乙酸钠、二氨基己烷和乙二醇组合并搅拌直至得到均匀溶液。然后强烈加热混合物直至接近沸腾并回流 5 小时。在洗涤并且通过离心收集颗粒之后,将干燥的颗粒与氧杂环丁烷在乙二醇中混合并加热至 130°C 维持 2 小时。然后将混合物在回流下加热 1 小时。为了进行接下来的氧化步骤,将经洗涤的颗粒重悬于硝酸中并用硝酸铁进行处理。然后,在洗涤并在通过离心收集颗粒之后,用四烷氧基硅烷涂覆颗粒以形成厚的  $\text{SiO}_2$  壳体。通过离心收集所得颗粒并重悬于水中。最终的涂覆、崩解和纯化 (透析、离心和浓缩) 可以以与以上对于 AS1- 颗粒所公开的相同方式来完成。

[0091] 与 Guardia 等 (Guardia 等 2010a ;Guardia 等 2010b ;Guardia 等 2012) 所述方法类似地制备了 AS5 颗粒。

[0092] 将乙酰丙酮铁 (III) 和癸酸的二苯醚溶液在搅拌下迅速加热至 200°C。然后将混合物在该温度下搅拌 2 小时并在 15 分钟内加热至 298°C。使该温度维持另外的一小时。最后使悬液冷却至室温。

[0093] 然后,向混合物中添加丙酮并使沉淀物风干。将颗粒重悬于水中。最终的涂覆、崩解和纯化可以以与以上对于 AS1- 颗粒所公开的相同方式来完成。

## [0094] 2. 铁浓度 / 固体含量测定

[0095] 悬液中铁浓度的测定是基于铁 (II) 邻二氮杂菲络合物消失的光度测量。通过使用盐酸提取纳米颗粒直至如通过目测观察测定的提取完成来生成络合物。使用羟胺 - 盐酸将所含的所有铁还原为铁 (II) 并在乙酸 / 乙酸盐缓冲液中使其转变为邻二氮杂菲络合物。使用 Shimadzu UV-1700Pharmaspec 在 513nm 针对乙二胺硫酸铁 (II) 标准 (Merck, Darmstadt) 测定络合物的消失。

[0096] 通过对例如在使溶剂 (例如水) 蒸发之前和之后的 1ml 悬液进行称重测定悬液的固体含量。

## [0097] 3. 粒径测量

[0098] 为了测量纳米颗粒的平均尺寸,使用光散射方法来测定纳米颗粒制备物 (例如, Malvern ZetaSizer3000HSA 或 Malvern Zetasizer Nano ZS) 的水力尺寸。主要参数是通过散射强度加权的 z- 平均值。因此,在多分散分布的情况下,较大的纳米颗粒比较小的加权更强。此外,该方法测定了纳米颗粒团聚体的平均尺寸,但是没有测定单个或最初纳米颗粒的尺寸。

[0099] 原理:如果用激光照射纳米颗粒或分子,则散射光强度以取决于纳米颗粒 / 团聚体尺寸的速率波动,因为较小的纳米颗粒被溶剂分子“反冲”得更远并且移动地更快。这些强度波动的分析产生了布朗运动的速度并因此使用 Stokes-Einstein 关系产生了纳米颗粒尺寸。

[0100] 步骤:根据其浓度稀释小部分的测试物质 (1 : 1000 至 1 : 3000)。将稀释的悬液样品放置在测量装置上并根据 Malvern ZetaSizer3000HSA 的建议进行处理。

[0101] 4.  $\zeta$  电势测量

[0102] 为了测量纳米颗粒的  $\zeta$  电势,将样品涡旋 30 秒。制备了超纯水中 Fe (或其他金属) 的浓度为约 0.11mg / ml 的溶液的 75ml : 1000 稀释液,并用超声处理 15 分钟。将 20ml 溶液注射到 Malvern ZetaSizer3000HSA (或 Malvern Zetasizer Nano zS) 的测量元件中并根据制造商的建议进行测量。用单独的 pH 计测定溶液的 pH。

## [0103] 5. SAR 测量

[0104] 根据由 Jordan 等 (1993) 开发的方法在 100kHz 频率和高达 3.5kV / m 的场强下测定来自实施例 1 的样品的 SAR。对于 3.5kV / m 和较高场强的结果示于表 1 中。

## [0105] 表 1 :比吸收率

[0106]

	100kHzF 的场强 (W / g)	SAR
AS1112mg / ml Fe	3.5	3.5
AS1112mg / ml Fe	7.5	9.45
AS2168mg / ml Fe	3.5	4.0
AS2168mg / ml Fe	6.0	8.56

AS1335mg / mlFe	6.0	7.22
AS4112mg / mlFe	3.0	4.02
AS4112mg / mlFe	4.0	15.69
AS5112mg / ml Fe	6.0	11.99

[0107] 不同交变磁场强度下 AS1 和 AS2 纳米颗粒的几轮制造的 SAR 平均示于图 3 中。

[0108] 6. 透射电子显微镜

[0109] 可通过与 Jordan 等 (1996, 第 712 页, 3. 2. 2) 所述方法类似的 TEM 分析完成纳米颗粒的电子显微镜检查。

[0110] 通过 TEM 分析了根据实施例 1 制造的磁性氧化铁纳米颗粒的 2M 悬液。所得显微图如图 1 所示。在显微图上, 可看到大的纳米颗粒团聚体 (单个纳米颗粒由箭头指出)。在所描绘区域中观察不到单个纳米颗粒——所有的纳米颗粒彼此连接。

[0111] 7. 悬液特性

[0112] 根据实施例 1 的一轮生产导致了如表 2 所述的物理 / 化学特性。

[0113] 表 2: 代表性物质的特性

[0114]

	AS1	AS4	AS5
粒径 (z-平均)	89 nm	179.6	180.8 nm
$\zeta$ 电势	53.5 mV	47.8 mV	42.5 mV
导电率 (25°C)	2.16 mS/cm	0.90 mS/cm	--
pH (25°C)	5.28	4.38	--
渗透压	0.03 Osmol/kg	0.08 Osmol/kg	--
SAR (在给定场强下, 100kHz下)	10 W/g Fe (7.5 kA/m)	14 W/g Fe (4 kA/m)	12 W/g Fe (6 kA/m)
总金属含量 (Fe)	15 重量%	18 重量%	--
浓度 (Fe)	1.99 mol/l	1.70 mol/l	1.88 mol/l

[0115] 8. 旋转流变测定 / 粘度测量

[0116] 使用旋转流变测定在 20°C 下通过 Malvern 物质表征服务测定纳米颗粒样品的粘度, 其中根据剪切速率 (7 至 1500 / s) 测定剪切粘度 (以 Pa s 为单位)。根据实施例 1 的纳米颗粒制备物的结果示于图 2 中。

[0117] 9. 体内磁性流体的贮库形成 (depot formation)

[0118] 将 C3H RS1 乳腺癌细胞系的  $1 \times 10^6$  个肿瘤细胞注射到 C3H-HeN 株 (Harlan Laboratories, Borchon) 小鼠的右后肢中。诱导的肿瘤体积为 0.57 至 0.85 cm<sup>3</sup> 后, 将动物随机化 (15 只动物 / 组) 并向右后肢的肿瘤注射 Fe 浓度为 112 或 335mg / ml 的实施例 1 的磁性流体。通过在注射之前和之后通过对注射器称重并且计算差值来确定精确的注射体积分含量 (平均为  $31 \mu\text{l} \pm 5.8 \mu\text{l}$ )。

[0119] 使用 Spektroquant14761test (Merck, Darmstadt) 和 Cary50 (Agilent Technologies, Santa Clara, Ca, USA) 和 Tecan Infinite M200 (Tecan Group Ltd, **Männedorf**, Switzerland) 分光仪在 565nm 通过 UV-vis 测量在 0 天或 7 天之后测定小鼠组织 / 肿瘤的总 Fe 含量。通过由组织中的最初含量 (通过测量未接种左腿的 Fe 含量测定) 减去肿瘤 / 组织的总 Fe 含量和接种期间被所使用棉签吸收的磁性流体损失, 确定了最初施用的 Fe 含量。Fe 回收 (平均为 15 个肿瘤 / 组) 计算为总 Fe 含量除以最初施用的 Fe 含量。

[0120] 表 3 : 如通过 Cary50 测定的 Fe 回收

[0121]

Cary		Fe回收 肿瘤 [%]	Fe回收 肺/肝/脾 [%]	Fe回收 肿瘤/肺/肝/脾 [%]
112 mg/ml Fe	第0天	90	14	104
	第7天	86	10	96
335 mg/ml Fe	第0天	95	3	98
	第7天	96	3	99

[0122] 表 4 : 如通过 Tecan Infinite M200 测量的 Fe 回收

[0123]

Tecan		Fe回收 肿瘤 [%]	Fe回收 肺/肝/脾 [%]	Fe回收 肿瘤/肺/肝/脾 [%]
112 mg/ml Fe	第0天	95	16	111
	第7天	93	13	106
335 mg/ml Fe	第0天	98	4	102
	第7天	98	4	102

[0124] 考虑到最初的 Fe 含量 (如在左腿中测定的) 和由于磁性流体的较小接种体积的损失, 所有四组的平均总 Fe 回收率对于 Cary50 为 99% 并且对于 Tecan Infinite M200 为 104%。一般来说, 相对于 Cary50 (表 3), 使用 Tecan Infinite M200 (表 4) 的回收数较高。

[0125] 比较 112mg/ml Fe 制剂与 335mg/ml Fe 制剂之间的 Fe 回收率, 两个测定都表明如下趋势: 在第 0 天, 对于 335mg/ml 制剂有更多的 Fe 纳米颗粒停留在肿瘤中 (如通过 Cary 所测定的 95% 与 90%, 并且如通过 Tecan 所测定的 98% 与 95%)。另一方面, 在第 0 天在其他组织 (肺、肝和脾) 中发现的 Fe 纳米颗粒的量对于 112mg/ml Fe 制剂要高得多 (对于 112mg/ml 为 14%/16%, 而对于 335mg/ml 为 3%/3%)。因此, 可推断出与较高浓度的制剂相比, 对于较低浓度的制剂, 更多的 Fe 纳米颗粒在第 0 天中在施用期间并且可能在施用之后立即从肿瘤中流出。

[0126] 为了确定与有效施用至肿瘤在第 0 天的 Fe 相比 Fe 在肿瘤中 7 天之后保留的比率, 用第 0 天的 Fe 回收率除以第 7 天的 Fe 回收率, 并且在通过 Cary50 和 Tecan Infinite M200 的测定值之间进行平均 (结果示于表 5 中)。类似地, 通过比较所述量与在第 7 天仍



然存在于肺、肝和脾中的 Fe 相比,分析了在第 0 天在这些器官中积累的 Fe 的命运。

[0127] 表 5:7 天之后肿瘤 / 器官中剩余的 Fe(第 0 天与第 7 天之比,在 Cary 和 Tecan 之间进行平均)

	剩余的 Fe 肿瘤 [%]	剩余的 Fe 肺/肝/脾 [%]
[0128] 112 mg/ml Fe	97%	75%
335 mg/ml Fe	101%	100%

[0129] 虽然对于 112mg / ml Fe 制剂,从第 0 天到第 7 天进一步损失了约 3%的 Fe,但是对于 335mg / ml Fe 制剂, Fe 含量在该时间范围中保持恒定。有趣的是,对于在一周内消失的 112mg / ml Fe 制剂,约 1 / 4 的 Fe 达到肺、肝和脾;而在第 0 天在这些器官中发现的来自 335mg / ml Fe 制剂的所有 Fe 一直保留到第 7 天(虽然认为对于 335mg / ml Fe 制剂在这些器官中发现的 Fe 总量总计仅为对于 112mg / ml Fe 制剂在这些器官中发现的 Fe 量的约 1 / 4,参见表 3 和表 4,列“Fe 回收肺 / 肝 / 脾脏”)。

[0130] 因此,较高浓度的纳米颗粒制剂另外地表明在 7 天时间段中纳米颗粒在肿瘤中提高的保留率,如果用几周或几个月的磁场使患者经历多次治疗,则这是非常重要的。

[0131] 参考文献

[0132] Gao, J., et al. (2011). W02011 / 082796.

[0133] Guardia, P., et al. (2012). ACS Nano6(4) :3080-91.

[0134] Guardia, P., et al. (2010a). Chem Commun(Camb) 46(33) :6108-10.

[0135] Guardia, P., et al. (2010b). Langmuir26(8) :5843-7.

[0136] Gupta, A. K. and M. Gupta(2005). Biomaterials. 26(18) :3995-4021.

[0137] Ivkov, R., et al. (2005). Therapy via Targeted Delivery of Nanoscale Particles. US2005 / 0090732.

[0138] Johannsen, M., et al. (2007). Eur Urol. 52(6) :1653-61. Epub2006Nov17.

[0139] Jordan, A. (2009). Implantable Products comprising Nanoparticles. W02009 / 100716.

[0140] Jordan, A., et al. (2008). Nanoparticle / Active Ingredient Conjugates. US2008 / 0268061.

[0141] JoFdan, A., et al. (2008). Method of Carrying Therapeutic Substances into Cells. US2008 / 0187595.

[0142] Jordan, A., et al. (1993). IntJ Hyperthermia. 9(1) :51-68.

[0143] Jordan, A., et al. (1996). Int J Hyperthermia. 12(6) :705-22.

[0144] Lesniak, C., et al. (1997). US6,183,658.

[0145] Maier-Hauff, K., et al. (2011). J Neurooncol1103(2) :317-24.

[0146] Massart, R. (1981). IEEE Trans. Magn. 17(2) :1247-48.

[0147] Mohapatra, M. and S. Anand(2010). Int J of Engineering, Science and

Technology. 2(8) :127-46.

[0148] Moroz, P., et al. (2002). Int J Hyperthermia. 18(4) :267-84.

[0149] Ruefenacht, D., et al. (2006). W02006 / 125452.

[0150] Schnoor, A., et al. (2010). Chemie Ingenieur Technik82(3) :317-26.

[0151] Thiesen, B. and A. Jordan (2008). Int J Hyperthermia. 24(6) :467-74.

[0152] Waldoefner, N. and K. Stief (2011). Magnetic Transducers. US2011/0052609.

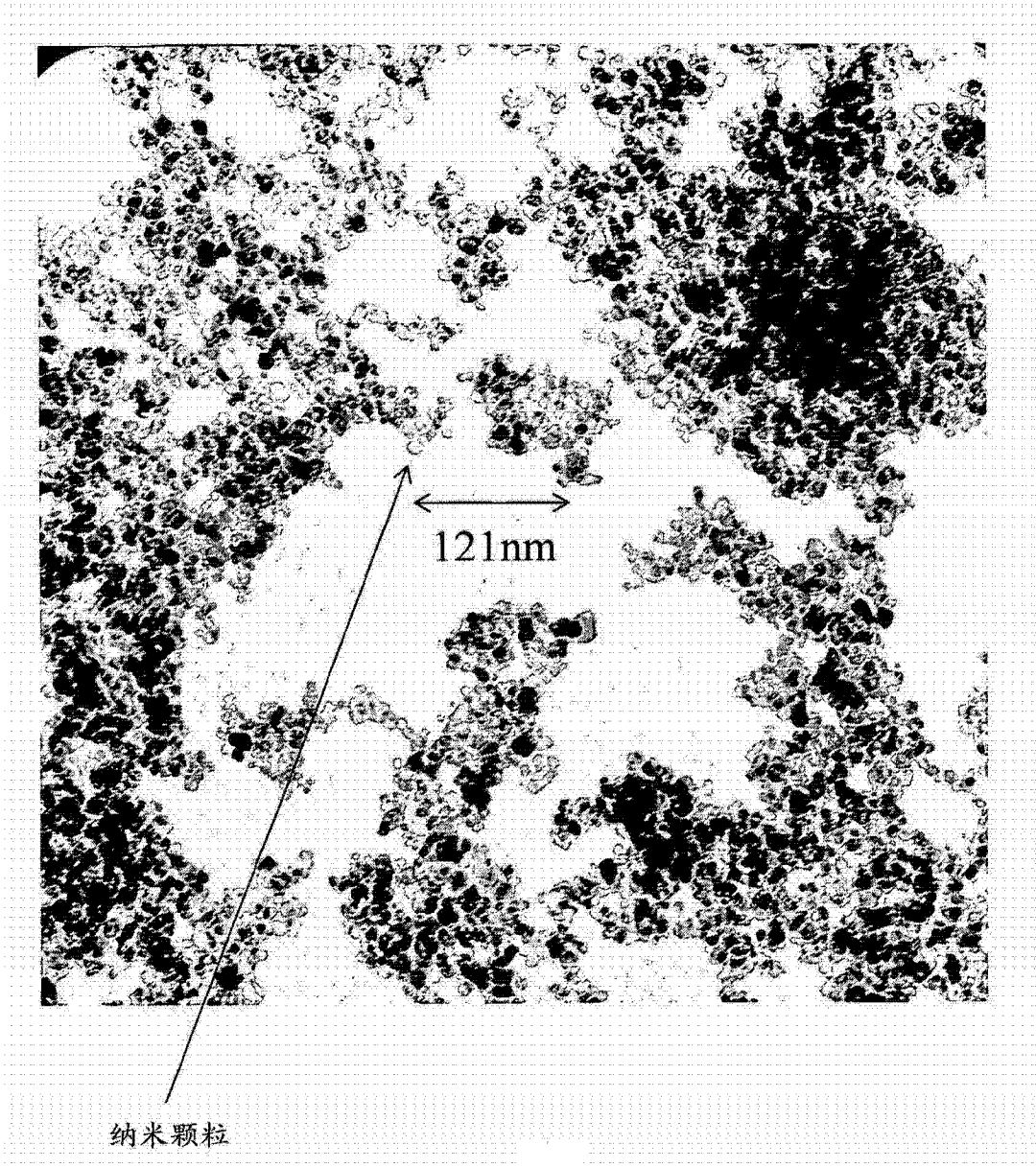


图 1

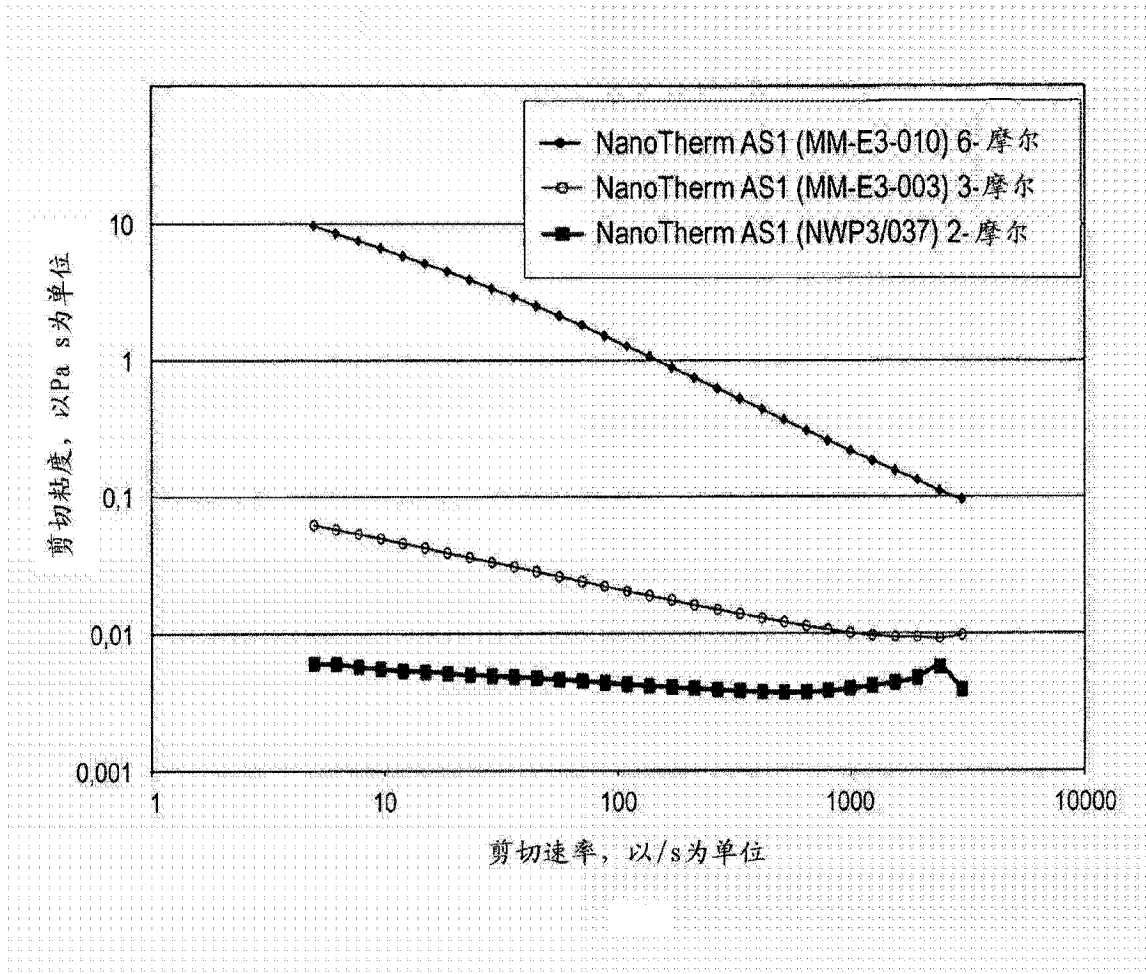


图 2

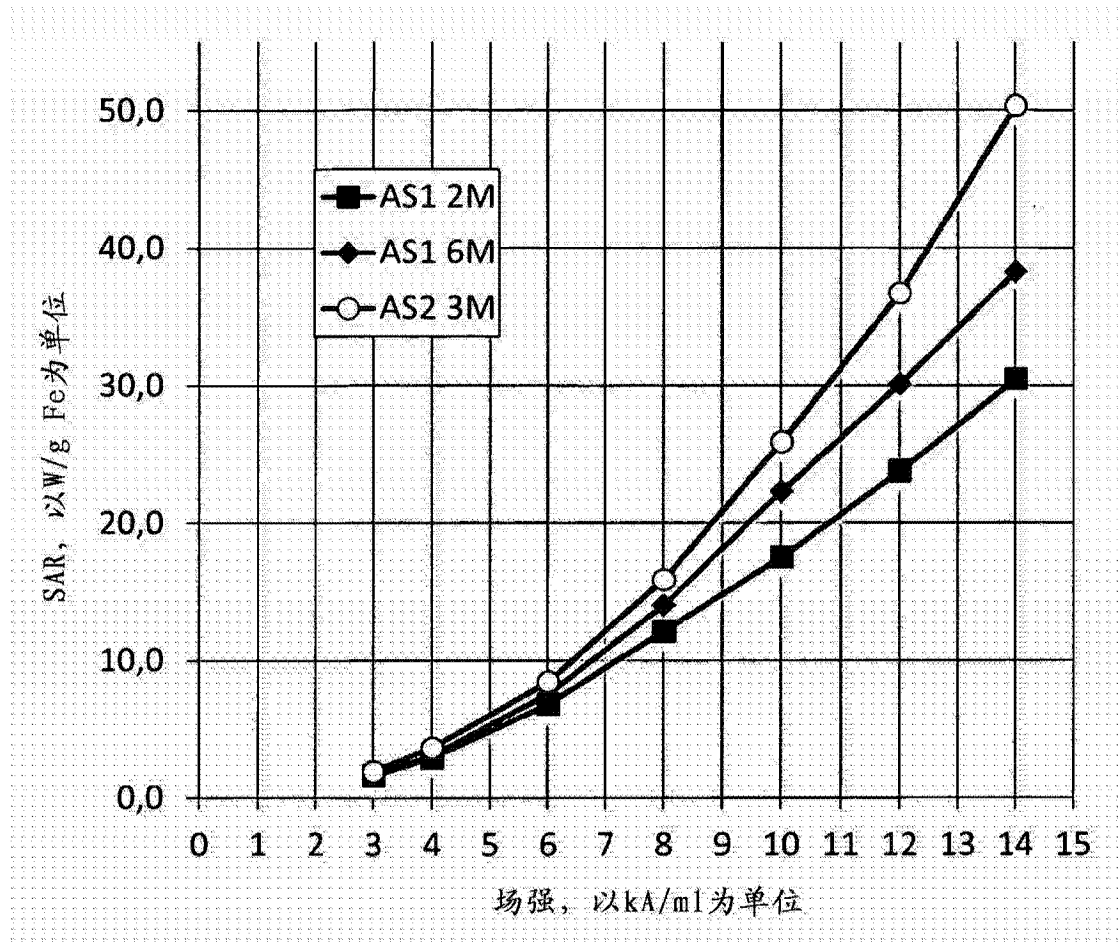


图 3