

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610097359.0

[51] Int. Cl.

A61K 31/337 (2006.01)

A61K 9/107 (2006.01)

A61K 9/19 (2006.01)

A61K 47/32 (2006.01)

A61K 47/34 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 8 月 1 日

[11] 公开号 CN 101006998A

[22] 申请日 2006.11.1

[21] 申请号 200610097359.0

[71] 申请人 南京大学

地址 210093 江苏省南京市汉口路 22 号南京
大学科技处

[72] 发明人 蒋锡群 李 苑 张乐洋

[74] 专利代理机构 南京知识律师事务所

代理人 黄嘉栋

权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 3 页

[54] 发明名称

一种负载于高分子纳米微球的紫杉醇药物及其制法

[57] 摘要

一种负载于高分子纳米微球的紫杉醇药物，它是负载于可生物降解的、微球的粒径在 800 纳米以下的高分子纳米微球的紫杉醇药物的乳液或冻干粉。本发明的负载于高分子纳米微球的紫杉醇药物具有高载药量和高载药效率的特点。负载于高分子纳米微球的紫杉醇药物的载药量可达 50% 以上，载药效率也在 85% 以上，而且稳定性良好。在本发明所述的条件下得到的载药纳米微球尺寸约为 200nm 左右，且无须添加其它稳定剂，适合于静脉注射，并具有明显的缓释特点，具有与紫杉醇自由药相当的体外抗肿瘤活性，而且体内抗肿瘤效果也得到了增强。本发明公开了其制法。

1. 一种负载于高分子纳米微球的紫杉醇药物,其特征是:它是负载于可生物降解的、微球的粒径在 800 纳米以下的高分子纳米微球的紫杉醇药物的乳液或冻干粉。

2. 根据权利要求 1 所述的负载于高分子纳米微球的紫杉醇药物,其特征是:所述的可生物降解的高分子纳米微球的高分子是聚乙烯吡咯烷酮(PVP)或聚乙二醇,或者是它们与聚酯形成的二嵌段共聚物或三嵌段共聚物,它们的数均分子量是 500-200000。

3. 根据权利要求 2 所述的负载于高分子纳米微球的紫杉醇药物,其特征是:所述的聚酯是聚丙交酯、聚乙交酯、聚(乙交-丙交酯)、聚己内酯或聚(丙交酯-己内酯)。

4. 根据权利要求 1 所述的负载于高分子纳米微球的紫杉醇药物,其特征是:所述的紫杉醇的质量载药量是 0.1-80%。

5. 一种制备负载于高分子纳米微球的紫杉醇药物的方法,其特征是它基本上由下列步骤组成:

步骤 1. 将紫杉醇溶于乙醇中,制成浓度为 0.1mg/mL-50mg/mL 的溶液;

步骤 2. 将可生物降解的高分子加入步骤 1 配制的紫杉醇溶液中,使高分子的浓度为 0.1 mg/mL-100 mg/mL;

步骤 3 将步骤 2 配制的乙醇溶液加温或超声使可生物降解高分子和紫杉醇全部溶解,形成澄清透明的溶液 O;

步骤 4. 将水溶液 W 加入步骤 3 的溶液 O 中,混合均匀,所述的水溶液 W 可以为蒸馏水、生理盐水、磷酸缓冲液,还可以同时含有其它药物或水溶性高分子,如聚乙烯醇(PVA),聚乙二醇(PEG),壳聚糖,人血清蛋白(HSA),牛血清蛋白(BSA),明胶;

步骤 5. 将步骤 4 所得的混合均匀后的溶液以蒸馏水稀释 2~20 倍体积,通过加热,搅拌,减压挥发或透析等方法除去溶液中的残留的有机溶剂,即得负载于高分子纳米微球的紫杉醇药物的水分散液;

步骤 6. 将步骤 5 所得的水分散液进行冻干处理,即得负载于高分子纳米微球的紫杉醇药物的冻干粉。

6. 根据权利要求 5 所述的制备方法,其特征是:步骤 1 所述的乙醇为含有丙酮、乙酸乙酯、二氯甲烷或三氯甲烷的有机溶剂的乙醇溶液。

7. 根据权利要求 5 所述的制备方法,其特征是:步骤 1 所述的乙醇含有浓度为 0.1

mg/mL — 500 mg/mL 的稳定剂, 所述稳定剂为生物相容的两亲物质或可生物降解的两亲高分子。

8. 根据权利要求 5 所述的制备方法, 其特征是: 步骤 1 所述的乙醇含有浓度为 2 mg/mL—200 mg/mL 的稳定剂, 所述稳定剂为生物相容的两亲物质或可生物降解的两亲高分子。

9. 根据权利要求 5 所述的制备方法, 其特征是: 步骤 4 中, 水溶液 W 与溶液 O 的体积比为 1:1—100:1。

10. 根据权利要求 5 所述的制备方法, 其特征是: 步骤 4 中, 水溶液 W 与溶液 O 的体积比为 2:1—10:1。

一种负载于高分子纳米微球的紫杉醇药物及其制法

技术领域

本发明涉及紫杉醇药物的负载，具体而言，是涉及高分子纳米微球紫杉醇药物组合物及其制备方法和用途。

背景技术

紫杉醇 (Paclitaxel) 是一种从红豆杉属植物中提取出来的一种具有高效抗肿瘤活性的二萜类化合物，其通过与微管蛋白结合，促进微管蛋白聚合形成稳定的微管，并抑制微管的解聚最终导致形成微管束的功能丧失，从而抑制细胞的有丝分裂，同时紫杉醇还具有影响参与细胞凋亡的酶类，并激活与细胞凋亡有关的蛋白质从而具有强大的促进肿瘤细胞凋亡的能力。紫杉醇可以有效的杀灭多种肿瘤细胞，是一种广谱的抗癌药物，对乳腺癌、卵巢癌和肺癌等癌细胞都有很好的抗癌特性，现已作为卵巢癌和乳腺癌的一线用药，对铂类等已有抗药性的顽固性卵巢癌亦有效。然而紫杉醇在水中溶解度极低，小于 0.010mg/ml，因此大大制约了它的实际临床应用。目前国内及国外临床使用的紫杉醇注射剂均是由聚氧乙烯蓖麻油和无水乙醇的复合溶媒制备的，如美国的 BMS (百时美施贵宝) 公司开发的 Taxol 注射剂，是采用聚氧乙烯蓖麻油 (Cremophor EL) 和无水乙醇 (V/V 1:1) 作溶剂。然而这些复合溶媒中的聚氧乙烯蓖麻油在体内降解时能释放组织胺，从而引起机体产生严重的过敏反应，包括血管舒张、呼吸困难和低血压，严重时甚至导致死亡。其次与聚氯乙烯制成的静脉输药设备不相容，聚氧乙烯蓖麻油可将聚氯乙烯输液管中的增塑剂邻苯二甲酸二乙基己基酯 (DEHP) 溶解出来，使药液变浑浊，而溶解出来的 DEHP 进入机体也会引起毒副反应。目前在临床使用这类注射剂时，需先使用抗组胺药物以减轻聚氧乙烯蓖麻油造成的严重过敏反应，结果使得临床应用受到限制，给患者带来很大的痛苦。此外，尽管该制剂在稀释前密封条件下 4℃ 保持 5 年的稳定性，然而稀释后稳定性很差，只能维持几个小时，24 小时后就有颗粒析出，经过滤后使用，药效显著降低。

由于紫杉醇的抗癌活性较好，而现行制剂又存在很多问题，因此近年来人们一直在致力于研究紫杉醇新型给药系统，以期降低现行给药方式中的毒副作用，提高临床疗效。如制备紫杉醇的脂质体、大分子结合物给药系统和高分子纳米微球等。Sharma U S.等人

使用了许多环糊精及其衍生物来包合紫杉醇（参见Sharma U S.,Balasubramanian S V.,Straubinger R M.,J Pharm. Sci.,84,1995,781），使紫杉醇的水溶性都有了不同程度的提高，其中 β -环糊精可使紫杉醇的溶解度提高950倍甚至更高，并且可以很容易达到紫杉醇临床使用的浓度（1~4mmol/L）。但是研究中发现环糊精稀释时会有紫杉醇颗粒析出，解决这一问题可采用增加环糊精的浓度，但是高浓度的环糊精会导致红血球溶解，为生物体安全使用带来隐患。Paola Crossacro 等人研究了以磷脂和胆固醇为膜材的多室脂质体包封的紫杉醇微球，并比较了用聚乙二醇-棕榈酰磷脂酰乙醇胺（PEG-DPPE）对脂质体膜进行改性修饰后微球的性质和小鼠体内组织分布的变化等（参见Paola Crossacro,Maurizio Ceruti,Paola Brusa,and et al., J. Controlled Release 63,2000,19-30），结果显示修饰后的脂质体微球明显延长了紫杉醇在体内的循环时间，紫杉醇，脂质体微球和修饰后的脂质体微球的血浆清除半衰期 $t_{1/2\beta}$ 分别为1.31, 9.27, 48.76h, 修饰后脂质体微球的血液 AUC 是未修饰脂质体的 25 倍，同时体内分布结果显示修饰后的脂质体提高了对靶向组织的选择性，而且能够逃避网状内皮系统的捕获，可以称为长效脂质体。但是这种 PEG 修饰的脂质体在包封效率和体外稳定性等方面却难尽人意，其包封效率达不到 80%，在 4℃ 下其体外稳定性不超过1星期，有的甚至只能维持1天，因而无法成为临床使用的稳定制剂。而且脂质体成本较高，自身性质不够稳定，在体内容易降解，大量脂质在体内可能产生毒副作用，这些都制约了紫杉醇脂质体的临床实际应用。S.S. Feng 等报道了含有维生素 E 聚乙二醇琥珀酸酯（TPGS）的PLGA负载的紫杉醇纳米微粒（参见L.Mu ,S.S.Feng, J. Controlled Release 86,2003,33-48），负载率为2.4%，包封效率约为50%左右，纳米微粒的粒径在 300—1000nm 之间，虽然结果显示 TPGS 比其他的乳化剂具有更多的优势，诸如提高包封效率，控制纳米微粒的尺寸和粒径分布，以及具有潜在的提高纳米微粒与细胞的结合等优势，然而较低的药物负载率和在负载过程中使用二氯甲烷等毒性较大的有机溶剂使得临床应用难以实现。Zhang Xuefei等将紫杉醇与甲氧基聚乙二醇/聚乳酸共聚物（MPEG/PLA）以化学键连接（参见Xuefei Zhang,Yuxin Li,Xuesi Chen,and et al.,Biomaterials 26,2005,2121-2128），形成了紫杉醇与高分子的结合物，由于共聚物具有亲水的聚乙二醇可以改善紫杉醇的水溶性，而且体外细胞毒性显示紫杉醇结合物与自由药形式的紫杉醇有相同的细胞毒性，但是合成这种紫杉醇结合物的制备过程复杂，可控性不强，而且共聚物的改变可能影响药物在体内的代谢时间等因素，因而难以得到临床使用的稳定的和价格合理的制剂。

综上所述，尽管在紫杉醇给药系统与输送体系的研究中已经取得了一些振奋人心的

成果，但都存在一些问题，使得至今仍然无法采用常规的载体材料和工艺制备在载体尺寸，载药量，制备成本，稳定性及生物相容性等方面均令人非常满意的紫杉醇载药体系。

发明内容

本发明的目的是提供可以用于注射，静脉滴注或者口服的载药量大、载药效率高、制备成本低的负载于高分子纳米微球的紫杉醇药物及其制备方法。

本发明的技术方案如下：

一种负载于高分子纳米微球的紫杉醇药物，它是负载于可生物降解的、微球的粒径在 600 纳米以下的高分子纳米微球的紫杉醇药物的乳液或冻干粉。

上述的负载于高分子纳米微球的紫杉醇药物，所述的可生物降解的高分子纳米微球的高分子可以是聚乙烯吡咯烷酮（PVP）或聚乙二醇，或者是它们与聚酯形成的二嵌段共聚物或三嵌段共聚物，它们的数均分子量可以是 500-200000。

上述的负载于高分子纳米微球的紫杉醇药物，聚酯可以是聚丙交酯（PLA）、聚乙交酯（PGA）、聚（乙交—丙交酯）（PLGA）、聚己内酯（PCL）或聚（丙交酯—己内酯）。

上述的负载于高分子纳米微球的紫杉醇药物，所述的紫杉醇的质量载药量可以是 0.1-80%。

一种制备负载于高分子纳米微球的紫杉醇药物的方法，它基本上有下列步骤组成：

步骤 1. 将紫杉醇溶于乙醇中，制成浓度为 0.1mg/mL—50mg/mL 的溶液；

步骤 2. 将可生物降解的高分子加入步骤 1 配制的紫杉醇溶液中，使高分子的浓度为 0.1 mg/mL—100 mg/mL；

步骤 3 将步骤 2 配制的乙醇溶液加热或超声使可生物降解高分子和紫杉醇全部溶解，形成澄清透明的溶液 O；

步骤 4. 将水溶液 W 加入步骤 3 的溶液 O 中，混合均匀，所述的水溶液 W 可以为生理盐水、磷酸缓冲液，还可以同时含有其它药物或水溶性高分子，如聚乙烯醇（PVA），聚乙二醇（PEG），壳聚糖，人血清蛋白（HSA），牛血清蛋白（BSA），明胶；

步骤 5. 将步骤 4 所得的混合均匀后的溶液以蒸馏水稀释 2~20 倍体积，通过加热，搅拌，减压挥发或透析等方法除去溶液中的残留的有机溶剂，即得负载于高分子纳米微球的紫杉醇药物的水分散液；

步骤 6. 将步骤 5 所得的水分散液进行冻干处理，即得负载于高分子纳米微球的紫杉醇药物的冻干粉。

上述的制备方法，步骤1所述的乙醇可以为含有少量丙酮、乙酸乙酯、二氯甲烷或三氯甲烷等有机溶剂的乙醇溶液，其中也可含有浓度为0.1 mg/mL—500 mg/mL的稳定剂，优选的是含有2 mg/mL—200 mg/mL的稳定剂。所述稳定剂为生物相容的两亲物质或可生物降解的两亲高分子，包括：Tween系列乳化剂、Span系列乳化剂，Pluronic F68。

上述的制备方法，步骤4中，水溶液W与溶液O的体积比为1:1—100:1，优选为2:1—10:1。

本发明充分利用了紫杉醇的乙醇溶液以水稀释时会形成瞬时的纳米溶液的特点，以可溶解于乙醇的可生物降解高分子为载体，制备了高载药量和高载药效率的负载于高分子纳米微球的紫杉醇药物。所制得的纳米微球载药量可达50%以上，载药效率也在85%以上，而且稳定性良好。在本发明所述的条件下得到的载药纳米微球尺寸约为200nm左右，且无须添加其它稳定剂，适合于静脉注射。通过本发明公布的方法制备的负载紫杉醇的高分子纳米微球具有明显的缓释特点（参见图3），制备的负载于高分子纳米微球紫杉醇药物具有与紫杉醇自由药相当的体外抗肿瘤活性（参见表1），而且体内抗肿瘤效果也得到了增强（参见表2）。

附图说明

图1为不同载药量的紫杉醇载药纳米微球在水分散液中粒径随储存时间变化图。

图2为紫杉醇，空白微球和紫杉醇载药微球的红外图谱其中：a. 紫杉醇；b. 空白纳米微球；c. 负载了紫杉醇的纳米微球。

图3为紫杉醇载药纳米微球的体外释放曲线。

具体实施方式

下面结合实施例进一步阐明本发明的内容，但是这些实施例并不限制本发明的保护范围。

制备例1：聚乙烯吡咯烷酮—聚己内酯两亲嵌段共聚物（PVP-PCL）的制备

在装有适量端羟基聚乙烯吡咯烷酮（PVP-OH）的聚合管中加入计算量的己内酯（CL，美国Aldrich公司）和0.1%（w/w）的辛酸亚锡，其中PVP的数均分子量为30000，但是并不仅限于这种分子量。在真空下封管并将其放入100℃反应。反应时间分别为16，48小时和5天，得到的粗产物用二氯甲烷溶解后沉淀于大量冷乙醚中以除去未反应的单

体和其他低分子量的物质，然后将沉淀物收集用甲醇洗涤数次后减压干燥，得到 PVP-PCL 二嵌段聚合物。对应于不同的反应时间得到的聚合物分别为 PVP-PCL1，PVP-PCL2，PVP-PCL3，以上得到的共聚物数均分子量分别为 49000，110000，140000（通过核磁共振图谱计算）。

制备例 2：聚乙烯吡咯烷酮—聚己内酯两亲嵌段共聚物（PVP-PCL）的制备

在装有适量端羟基聚乙烯吡咯烷酮(PVP-OH)的聚合管中加入计算量的己内酯(CL, 美国 Aldrich 公司)以及 0.1% (w/w) 的辛酸亚锡，其中 PVP 的数均分子量根据对产物的要求不同，分别为 37900，34000 不等，但是并不仅限于以上几种分子量。在真空下封管并将其放入 100 °C 反应 48 小时。反应得到的粗产物用二氯甲烷溶解后沉淀于大量冷乙醚中以除去未反应的单体和其他低分子量的物质，然后将沉淀物收集用甲醇洗涤数次后减压干燥，得到 PVP-PCL 二嵌段聚合物。对应 PVP 分子量为 37900 和 34000，得到的聚合物分别命名为 PVP-PCLa，PVP-PCLb。以上得到的共聚物数均分子量均为 110000（通过核磁共振图谱计算）。

制备例 3：聚己内酯—聚乙二醇—聚己内酯两亲嵌段共聚物（PCL-PEG-PCL）的制备

在装有适量聚乙二醇（PEG）的聚合管中加入计算量的己内酯（CL，美国 Aldrich 公司）以及 0.1%（w/w）的辛酸亚锡，其中 PEG 的数均分子量根据对产物的要求不同，分别为 8000，10000 不等，但是并不仅限于以上几种分子量。在真空下封管并将其放入 130 °C 反应 24 小时。反应得到的粗产物用氯仿溶解后沉淀于大量冷乙醚中以除去未反应的单体和其他低分子量的物质，然后将沉淀物收集用水洗涤数次后减压干燥，得到 PCL-PEG-PCL 三嵌段聚合物。对应 PEG 分子量为 8000 和 10000，得到的聚合物分别命名为 PCL-PEG8K-PCL 和 PCL-PEG10K-PCL。以上得到的共聚物数均分子量均为 30000（通过核磁共振图谱计算）。

制备例 4：聚（丙交酯—己内酯）—聚乙二醇—聚（丙交酯—己内酯）两亲嵌段共聚物（PCLLA-PEG-PCLLA）的制备

在装有适量聚乙二醇（PEG）的聚合管中加入计算量的己内酯（CL，美国 Aldrich 公司）和丙交酯（LA，美国 Aldrich 公司）以及 0.1%（w/w）的辛酸亚锡，其中 PEG

的数均分子量根据对产物的要求不同,分别为 8000, 10000 不等,但是并不仅限于以上几种分子量。在真空下封管并将其放入 130 °C 反应 24 小时。反应得到的粗产物用氯仿溶解后沉淀于大量冷甲醇中以除去未反应的单体和其他低分子量的物质,然后将沉淀物收集用水洗涤数次后减压干燥,得到 PCLLA-PEG-PCLLA 三嵌段聚合物。对应 PEG 分子量为 8000 和 10000,得到的聚合物分别命名为 PCLLA-PEG8K-PCLLA 和 PCLLA-PEG10K-PCLLA。以上得到的共聚物数均分子量均为 30000 (通过核磁共振图谱计算)。

实施例 1: 负载紫杉醇 (Paclitaxel) 的高分子纳米微球的制备

先将 30 mg 紫杉醇溶解于 5 mL 的乙醇中,另将 60 mg PVP-PCL2 溶解于该乙醇溶液中,适当加温,得到澄清透明的醇溶液 O。将适量水溶液 W 加入醇溶液 O 中,混合均匀后降温,得到散射淡蓝色光的载药纳米粒子分散液,以 100ml 蒸馏水稀释后减压挥发除去乙醇,用滤纸过滤除去未包裹的药物沉淀和高分子聚集物后,即得负载紫杉醇的高分子纳米微球水分散液。通过动态光散射技术测得微球平均粒径为 203nm。将上述制得的负载紫杉醇的高分子纳米微球水分散液精密吸取适量,室温下挥干后以甲醇溶解并定容,采用高效液相色谱法检测 (HPLC),色谱条件为:流动相为乙腈-水 (58: 42),检测波长 227nm,检测器为紫外检测器,在上述条件下测得该药物载体的载药量为 29.1%,载药效率高于 85%,其红外光谱图见图 2。(以下实施例中如无特别说明,则对载药微球的基本性质表征与此实施例中相同。)

实施例 2: 负载紫杉醇的高分子纳米微球的制备

将 30 mg 紫杉醇溶解于 5 mL 的乙醇中,另将 60 mg PVP-PCL2 溶解于该乙醇溶液中,超声溶解 5min,功率为 800W,得到澄清透明的醇溶液 O,其余过程同实施例 1。通过动态光散射技术测得微球平均粒径为 250nm, HPLC 法测得该药物载体的载药量为 28.7%,载药效率高于 85%。

实施例 3: 负载紫杉醇的高分子纳米微球的制备

将 30 mg 紫杉醇溶解于 5 mL 的乙醇中,另将 60 mg PVP-PCL2 溶解于该乙醇溶液中,适当加温,得到澄清透明的醇溶液 O。将适量水溶液 W 加入醇溶液 O 中,混合均匀后降温,得到散射淡蓝色光的载药纳米粒子水分散液,以 100ml 蒸馏水稀释后,放在

透析袋（Cut-off 分子量为 12000）中，然后将透析袋完全浸入 1000 mL 蒸馏水中，每隔 4 小时换新鲜的蒸馏水，透析 48h 后，将透析袋内的溶液倾出，即得紫杉醇的高分子纳米水分散液，通过动态光散射技术测得微球平均粒径为 221nm，HPLC 法测得该药物载体的载药量为 28.8%，载药效率高于 85%。

实施例 4：负载紫杉醇的高分子纳米微球的制备

将 30 mg 紫杉醇溶解于 2 mL 的乙醇中，另将 20 mg PVP-PCL2 溶解于该乙醇溶液中，其余过程同实施例 1。通过动态光散射技术测得微球平均粒径为 230nm。HPLC 法测得该药物载体的载药量为 57.0%，载药效率高于 85%。

实施例 5：负载紫杉醇的高分子纳米微球的制备

将 30 mg 紫杉醇溶解于 5 mL 的乙醇中，另将 60 mg PVP-PCL1 溶解于该乙醇溶液中，其余过程同实施例 1。通过动态光散射技术测得微球平均粒径为 136nm。HPLC 法测得该药物载体的载药量为 28.4%，载药效率高于 85%。

实施例 6：负载紫杉醇的高分子纳米微球的制备

将 30 mg 紫杉醇溶解于 5 mL 的乙醇中，另将 60 mg PVP-PCLa 溶解于该乙醇溶液中，其余过程同实施例 1。通过动态光散射技术测得微球平均粒径为 168nm。HPLC 法测得该药物载体的载药量为 28.9%，载药效率高于 85%。

实施例 7：负载紫杉醇的高分子纳米微球的制备

将 10 mg 紫杉醇溶解于 5 mL 的乙醇中，另将 90 mg PCL-PEG10K-PCL 溶解于该乙醇溶液中，其余过程同实施例 1。通过动态光散射技术测得微球平均粒径为 267nm。HPLC 法测得该药物载体的载药量为 9.7%，载药效率高于 85%。

实施例 8：负载紫杉醇的高分子纳米微球的制备

将 10 mg 紫杉醇溶解于 5 mL 的乙醇中，另将 90 mg PCLLA-PEG10K-PCLLA 溶解于该乙醇溶液中，其余过程同实施例 1。通过动态光散射技术测得微球平均粒径为 274nm。HPLC 法测得该药物载体的载药量为 8.9%，载药效率高于 85%。

实施例 9：负载紫杉醇的高分子纳米微球水分散液的稳定性

先将 30 mg 紫杉醇溶解于 25 mL 的乙醇中，另将 60 mg PVP-PCL2 溶解于该乙醇溶液中，其余过程同实施例 1，制得负载紫杉醇的高分子纳米微球水分散液，通过动态光散射技术测得微球平均粒径为 198nm，并以粒径为指标考察分散液室温下的稳定性，实验结果表明微球在水分散液中非常稳定，参见图 1。

实施例 10：负载紫杉醇高分子纳米微球的冻干粉剂制备

按照实施例 1 中所述操作制备纳米微球的水分散液，在该分散液中加入 200 mg 葡萄糖，在 Freezone 6 冻干机上冷冻干燥 48 小时，得到白色的疏松冻干粉。用蒸馏水再分散后，得到的纳米微球尺寸为 217 nm，适合于静脉注射。

实施例 11：负载紫杉醇的高分子纳米微球的体外释放

将实施例 1 中制得的负载紫杉醇的高分子纳米微球水分散液精密吸取适量，用蒸馏水分散稀释至 1 mL（约相当于 60 $\mu\text{g/mL}$ 紫杉醇），放在透析袋（Cut-off 分子量为 12000）中，然后将透析袋完全浸入 200 mL 0.1 mol/L PBS，释放实验在缓慢搅拌下于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下进行。每隔一定时间取出 2 mL 释放介质，取出，置离心管中，加 2 mL 二氯甲烷涡旋提取 5 min，将得到的混悬液以 6000 rpm 离心 10 min，将二氯甲烷层精密吸出，重复上述提取步骤，合并两次吸出的二氯甲烷溶液，氮气下挥干，加 50 μL 甲醇溶解，按实施例 1 中所述 HPLC 方法进样测定样品中紫杉醇的含量。并根据含量计算释放百分率，结果如图 3 所示，可以看出负载于其中的药物表现出持续稳定的释放特性。

实施例 12：负载紫杉醇（Paclitaxel）高分子纳米微球的抗肿瘤效果测试

1. 细胞株为黑色素癌细胞 B-16。通过 MTT 法测定了实施例 1 中制备的纳米微球对 B-16 细胞的体外杀伤效果（如表 1 所示）。从表 1 可以看到制备的紫杉醇载药纳米微球对 B-16 细胞在 50 ng/mL 具有与紫杉醇自由药相当的体外杀伤力。

2. 选用 18-22 克雌性 ICR 小鼠及生长良好的 7-11 天的 Sarcoma 180 瘤种，将瘤种接种于小鼠右侧腋部皮下，约 $4.5-5 \times 10^6$ 细胞 / 只，接种 24 小时后随机分笼，每组 5 只。分别按照 2.5 mg/kg，5 mg/kg 和 10 mg/kg 的紫杉醇剂量给小鼠尾静脉注射负载紫杉醇的纳米微球，另外药物对照组按照 10 mg/kg 给药，阴性对照组注射生理盐水。给药时间为接种后的第二天、第四天和第五天。第 8 天处死动物，称体重、瘤重，计算各组平均

瘤重以及肿瘤抑制率并进行 T 检验，结果如表 2 所示。

可以看出，采用本专利公布的方法，可以将溶解性很差的紫杉醇药物以较高的载药量负载于生物相容的高分子纳米微球中，由此得到的药物组合物能够利用药物载体的被动靶向特性以及缓释特性，降低紫杉醇市售制剂的毒副作用，在较低的药物用量下便可获得比市售制剂更好的抗肿瘤效果。

表 1. 紫杉醇载药纳米微球对黑色素瘤 B16 体外细胞毒性实验结果。

浓度 ^a ($\mu\text{g/mL}$)	存活率 %		
	空白载体	紫杉醇	载药纳米微球
12.5	93.48	60.71	80.35
25	88.20	49.96	65.50
50	90.77	37.37	42.95

a:空白载体的浓度与载药纳米微球组的浓度相对应，为分别为 12.5, 25, 50 $\mu\text{g/mL}$ 。

表 2. 紫杉醇载药纳米微球的对接种了 Sarcoma-180 的小鼠的抑瘤效果。

制剂	肿瘤质量 $\bar{x} \pm \text{SD}$ (g)	抑制率(%)	P
阴性对照组	1.1 ± 0.21	N.A.	N.A.
紫杉醇市售制剂 10 mg/kg	0.35 ± 0.03	66.8	<0.01
载药纳米微球 10 mg/kg(Paclitaxel eq)	0.36 ± 0.07	67.3	<0.01
载药纳米微球 5 mg/kg (Paclitaxel eq)	0.22 ± 0.13	80.0	<0.01
载药纳米微球 2.5 mg/kg (Paclitaxel eq)	0.70 ± 0.13	36.4	<0.01

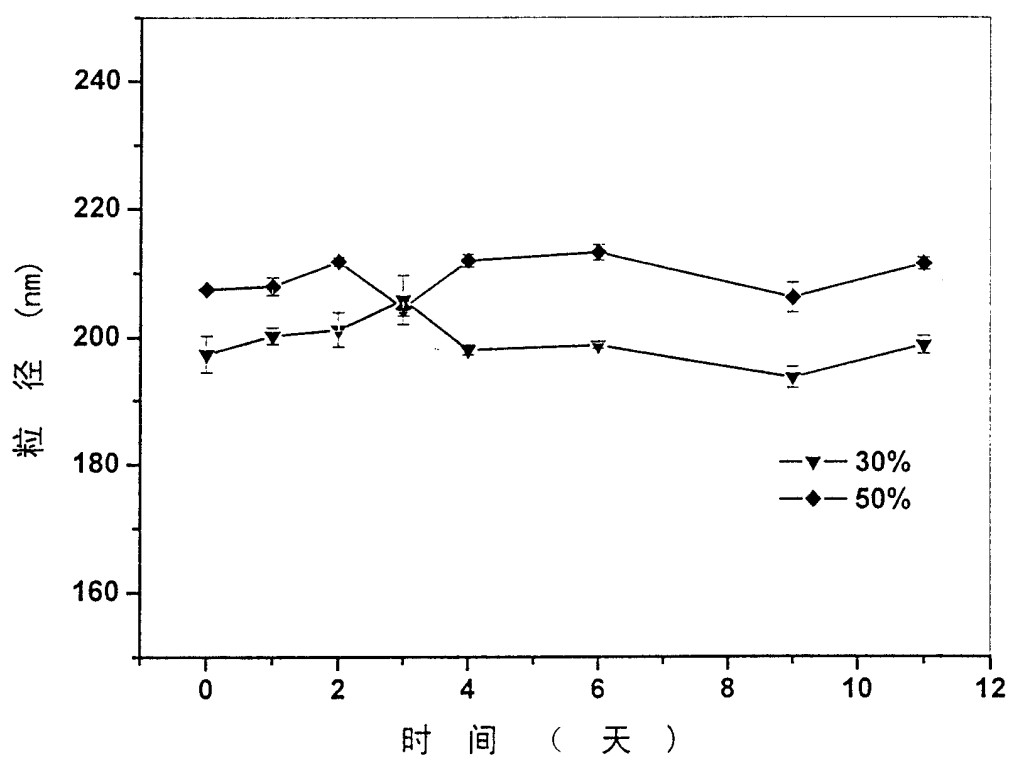


图 1

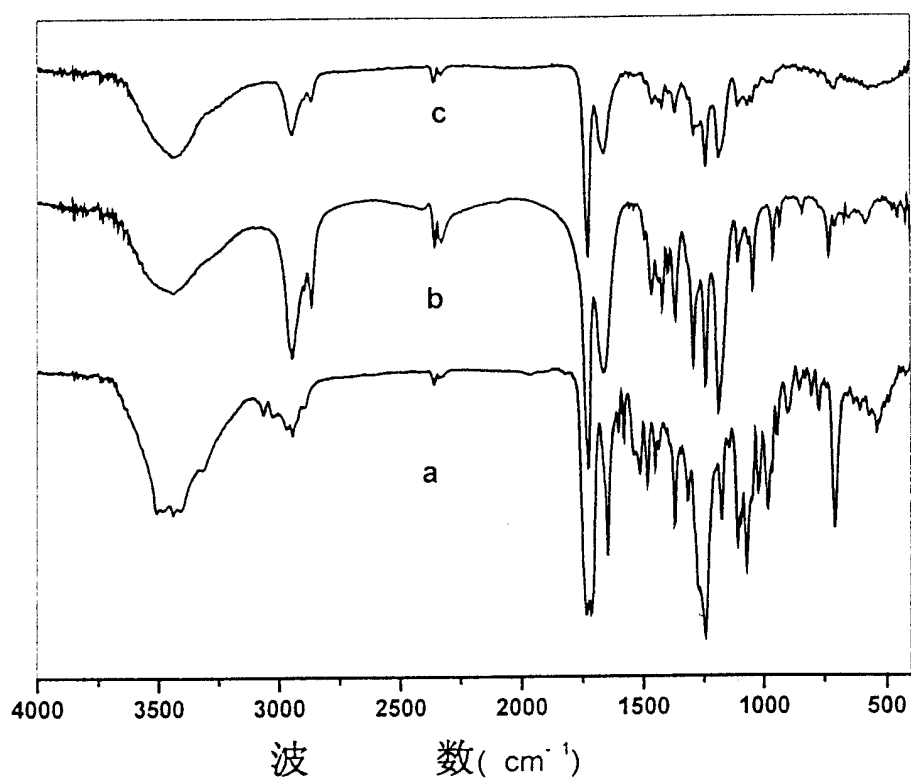


图 2

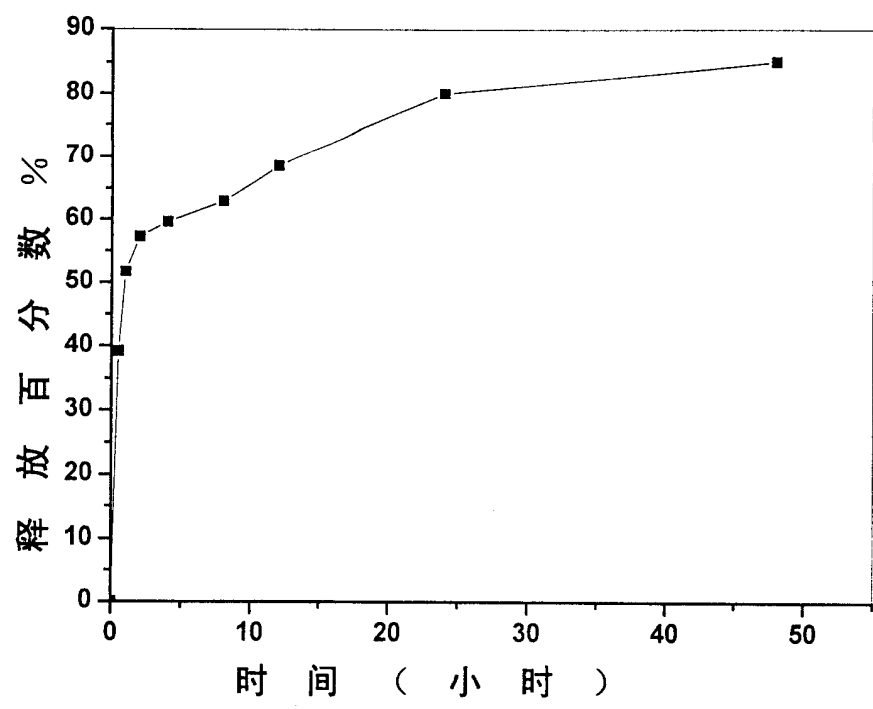


图 3