

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 31/337 (2006.01)

A61K 9/16 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410085185.7

[43] 公开日 2006 年 4 月 5 日

[11] 公开号 CN 1754535A

[22] 申请日 2004.9.30

[21] 申请号 200410085185.7

[71] 申请人 中国人民解放军军事医学科学院毒物
药物研究所

地址 100850 北京市海淀区太平路 27 号

[72] 发明人 梅兴国 王辰允

[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 陈 昕

权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 3 页

[54] 发明名称

紫杉醇类物质的局部注射用缓释微球、其制备
方法及应用

[57] 摘要

本发明提供了一类用于肿瘤组织、病灶部位局部治疗的缓释微球制剂，包括紫杉醇类物质的新型局部注射用缓释微球，是由微球重量的 0.2 - 40% 的紫杉醇类物质和微球重量 50 - 99.8% 的可生物降解性的分子量为 5,000 - 70,000 道尔顿的可生物相容性药用高分子辅料组成。由于该微球在局部停留较长时间，从而达到延长药物的作用时间，减少给药次数并提高药物的生物利用度，降低药物的毒副作用。紫杉醇类物质局部注射用缓释微球适合治疗实体癌和眼部增殖性玻璃体视网膜病变 (PVR) 等疾病。

1. 一种紫杉醇类物质的缓释微球，其特征在于它主要由微球重量 0.2 - 40 % 的紫杉醇类物质和微球重量 50 - 99.8 % 的分子量范围在 5, 000 - 70, 000 道尔顿之间的可生物降解且具有生物相容性的药用高分子辅料以及其他药学上可接受辅料组成。

2. 按照权利要求 1 所述的缓释微球，其中所述的紫杉醇类物质包括紫杉萜、紫杉烷、前体紫杉醇以及基于紫杉醇结构进行修饰的各类化合物。

3. 按照权利要求 1 或 2 所述的缓释微球，其中所述的药用高分子材料选自于聚丙交酯 - 乙交酯、聚乙二醇/聚对苯二甲酸丁二醇酯、聚乳酸、聚乙醇酸、聚 - 3 - 羟基丁酸酯、聚邻酯、聚内酯、聚酐、聚羟基丁酸酯 - 羟基戊酸酯共聚物、聚丙烯葡聚糖、聚乙二醇/聚对苯二甲酸丁二醇酯、聚乳酸 - 聚乙二醇、聚羟基乙酸 - 聚乙二醇的一种或其中的两种或两种以上混合。

4. 按照权利要求 3 所述的缓释微球，其中所述的药用高分子辅料选自于聚丙交酯 - 乙交酯、聚乙二醇/聚对苯二甲酸丁二醇酯、聚乳酸、聚乙醇酸、聚邻酯、聚内酯、聚酐、聚乙二醇、聚羟基丁酸酯 - 羟基戊酸酯共聚物、聚乳酸 - 聚乙二醇或聚羟基乙酸 - 聚乙二醇中的其中一种或其中两种或两种以上的混和。

5. 根据权利要求 4 所述的缓释微球，其中的药用高分子辅料为分子量在 5, 000 - 70, 000 道尔顿之间的聚丙交酯 - 乙交酯。

6. 根据权利要求 4 所述的缓释微球，其中的药用高分子辅料为分子量在 5, 000 - 50, 000 道尔顿之间的聚乙二醇/聚对苯二甲酸丁二醇酯。

7. 按照权利要求 5 所述的缓释微球，其中聚丙交酯 - 乙交酯的丙交酯和乙交酯聚合比例在 20: 80 - 80: 20 之间。

8. 按照权利要求 1 所述的缓释微球，所述紫杉醇类物质为紫杉醇，所述药用高分子辅料为聚丙交酯 - 乙交酯。

9. 按照权利要求 1 或 2 所述的缓释微球，其中所述的紫杉醇类物质

缓释微球是用于局部治疗卵巢癌、乳腺癌、肺癌、肝癌、胃癌、肠癌以及其他实体癌症，和局部治疗增殖性玻璃体视网膜病变（PVR）的。

10. 权利要求 1~9 任一项所述的含有紫杉醇类物质的缓释微球的制备方法，其特征在于用二氯甲烷、氯仿、乙酸乙酯、乙醇、甲醇、丙酮将紫杉醇类物质和可生物降解的药用辅料以及肉豆蔻酸异丙酯溶解，其中药用辅料在有机溶剂中的重量体积百分数为 3-35%，肉豆蔻酸异丙酯或与其类似的高级脂肪酸或酯在有机溶剂中的重量体积百分数为 0-30%；另外配制连续水相采用的是聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸钠、聚甲基丙烯酸钠，其中它们在水相中的重量百分数为 0.1-10%，水相中的乳化剂为非离子型的乳化剂，用量为水相的 0.1-12%；首先将分散相通过细管慢慢注入到少量高浓度连续相中，乳化；第二步，将该乳化溶液用 5-50 倍低浓度连续相稀释，继续搅拌挥发溶剂，然后洗涤、离心、冷冻干燥即得。

紫杉醇类物质的局部注射用缓释微球、其制备方法及应用

技术领域

本发明涉及紫杉醇类物质的缓释制剂，具体来说，本发明涉及平均粒径在 1.0 - 50 μm 之间，能稳定释药 7 天以上或 15 天以上或 30 天以上，乃至 60 天以上，优选 7 天以上，更优选 15 天以上或 30 天以上的紫杉醇类物质的缓释注射微球、其制备方法及应用。

背景技术

紫杉醇类物质作为一种具有独特抗癌活性的天然药物，已成为当今抗癌药物研究的热点。紫杉醇类物质的抗癌作用效果显著，现已成为治疗卵巢癌和乳腺癌的常用药物。对铂类等药物有抗药性顽固性卵巢癌也有效。对黑色素瘤结肠癌和 HIV 引起的卡波济肉瘤亦有较好的疗效。也适合用于实体肿瘤和眼部增殖性玻璃体视网膜病变（PVR）的治疗。它可能的作用机制主要为：第一，微管动力学稳定机制。通常认为有丝分裂过程中需要胞质微管解聚以形成纺锤体微管。而染色体在纺锤丝的作用下向两极移动。紫杉醇类物质能于细胞内的微管网直接结合作用位点为 β 亚基 N 端第 31 个氨基酸。这样抑制了细胞质微管的解聚，从而抑制肿瘤细胞纺锤体的形成，使肿瘤细胞停止在 G₂ 期（分裂前期）和 M 期（分裂期），直至死亡。第二，免疫机制。紫杉醇类物质和脂多糖（PLS）均可以为激活巨噬细胞杀灭肿瘤细胞提供信号。并且免疫调节因子 As101 和紫杉醇类物质合用，可以促进巨噬细胞杀灭肥大细胞。因此，紫杉醇类物质还具有激活巨噬细胞来杀灭肿瘤的作用。此外，它与 γ 干扰素合用时，对激活巨噬细胞溶解肿瘤有增强作用。第三，诱导肿瘤坏死因子 TFN- α 的产生。TFN- α 主要由革兰氏阴性细菌的活性成分脂多糖激活单核吞噬细胞而产生的，其他细胞则产生 TFN- γ 。TFN- α 具有抗肿瘤效应而 TFN- γ 可以增加 TFN- α 的生物效应。对紫杉醇类物质研究结果表明，

它可以增加 TFN- γ 诱导 NO 的合成与分泌并且诱导 TFN- α 基因表达。第四，紫杉醇类物质还抑制肿瘤细胞迁移。用紫杉醇类物质处理过的鼠成纤维细胞只能产生扁平尾状突起和丝状假足，不能移动。

就紫杉醇类物质已经进行了大量研究，目前已经上市或者待上市的紫杉醇类物质的药物包括紫杉醇、多西紫杉醇、PEG 紫杉醇、乳糖酰胺紫杉醇、胍丁胺紫杉醇等等。以及其它紫杉醇衍生物。这类物质作为一种具有独特抗癌活性的药物，已成为当今抗癌药物研究的热点。

紫杉醇类药物作为化疗药物，由于其结构等的特点，不适宜采用口服制剂，一般都采用注射剂型，但是现用于临床的紫杉醇制剂多是用 Cremopher EL（聚氧乙基蓖麻油+乙醇，各 50 %）制成的油剂。这种药物载体会引发一些副作用，其中包括严重的过敏反应。因此，选择一种无毒高效的给药系统是发展紫杉醇临床应用的关键。

本发明的目的就是提供一种紫杉醇类物质的局部注射用制剂，这种制剂能够延长药物作用时间、减少用药次数、提高紫杉醇类物质的生物利用度，降低药物的毒副作用。

发明内容

本发明的上述目的可以通过以下的紫杉醇类物质的局部注射用缓释微球实现。也就是说，本发明人等发现，通过制备一种含有紫杉醇类物质的微球制剂，特别是具有特定粒径范围的微球，可以实现药物的缓释和控释，减少给药次数、提高紫杉醇类物质的生物利用度，降低药物的毒副作用，对于治疗肺、肝、脾部的实体肿瘤以及眼部的 PVR 是有意义的。本发明的紫杉醇的缓释微球以往并无公开。

由于该微球可以在局部停留较长时间，从而达到延长药物的作用时间，减少给药次数并提高药物的生物利用度，降低药物的毒副作用。

具体来说，本发明的紫杉醇类物质的局部给药用缓释微球是主要由占微球总重量的 0.2 - 40 % (w/w) 的紫杉醇类物质和占微球总重量 50 - 99 % (w/w) 的分子量在 5000 - 70000 道尔顿之间的可生物降解型高分子药用辅料以及其他药学上可接受辅料组成。

优选的,本发明的紫杉醇类物质的局部给药用缓释微球的粒径范围为:1.0-50 μm 。其中所述的可生物降解的高分子药用辅料选自聚丙交酯-乙交酯、聚乙二醇/聚对苯二甲酸丁二醇酯、聚乳酸、聚乙醇酸、聚-3-羟基丁酸酯、聚邻酯、聚内酯、聚酐、聚羟基丁酸酯-羟基戊酸酯共聚物、聚丙烯葡聚糖、聚乳酸-聚乙二醇、聚羟乙酸-聚乙二醇中的一种;优选聚丙交酯-乙交酯、聚乙二醇/聚对苯二甲酸丁二醇酯、聚乳酸、聚羟基丁酸酯-羟基戊酸酯共聚物,更优选,分子量为5000-70000道尔顿的聚丙交酯-乙交酯或分子量为5,000-50,000道尔顿的聚乙二醇/聚对苯二甲酸丁二醇酯。当为聚丙交酯-乙交酯时,丙交酯-乙交酯的比例优选为20:80-80:20。

另外本发明所述的紫杉醇类物质包括已知和未知的具有紫杉烷类母核结构的各种紫杉醇、紫杉醇衍生物、类紫杉醇、紫杉醇前药以及基于紫杉醇结构进行修饰的各类化合物,如紫杉醇、多西紫杉醇、PEG紫杉醇、乳糖酰胺紫杉醇、胍丁胺紫杉醇等,但不限于此。

上述其它药学上可接受的辅料包括助溶剂、防腐剂、稳定剂的常见的制剂必需的药用赋形剂等。对此,本发明不拟作出限制。

本发明所述的紫杉醇类物质的缓释微球,从保持一定时效、生物降解性和注射入体内后不影响血液循环来看,粒径应当处于1.0-50 μm 之间。粒径过小,难以维持长时间的药效,同时有可能穿越毛细血管,难以实现局部缓释的目的;粒径过大,初期释放太慢,达不到治疗有效血药浓度。

本发明的缓释微球中,只要能够实现缓释的目的,紫杉醇类物质的含量没有特别限制,但是从保证足够长时间的有效血药浓度的缓释效果和保证缓释效果的平衡角度来说,优选紫杉醇类物质占微球的0.2~50重量%,再优选不低于5重量%;可生物降解的药用高分子辅料占50~99重量%,优选不低于60重量%。如果紫杉醇类物质含量少于0.2重量%,不能保证足够高的血药浓度;反之,如果高于50重量%,则有可能不能保证药物平稳释放,可能造成副作用的发生,同时紫杉醇类物质难于溶解,制备上也有难度。

本发明所述的微球可以采用微球的常规制备方法制得，如采用单乳-液中干燥法、喷雾干燥法等。

当采用单乳-液中干燥法制备本发明的微球时，可以采用以下方式：按照一定的比例分别称取紫杉醇类物质、可生物降解高分子药用辅料和肉豆蔻酸异丙酯（IPM）之类的高级脂肪酸或酯，溶解于有机溶剂中形成油相，在高速机械搅拌下，将此溶液注入少量高浓度连续水相，之后用一定量低浓度连续水相溶液稀释，继续搅拌一定时间以挥发溶剂，之后进行洗涤、冷冻离心，冷冻干燥后得到微球。

其中形成油相的有机溶剂为具有足够挥发性、低残留的低沸点有机溶剂，例如可以选自二氯甲烷、三氯甲烷、二甲基甲酰胺、二甲基亚砷、乙酸乙酯、二氧六环、乙醚、丙酮、四氢呋喃、乙醇中的一种或其中的两种或两种以上的混合物。药用辅料在有机溶剂中的浓度优选为 10-1000mg/ml，紫杉醇类物质的浓度为达到 10-500mg/ml。

连续水相采用聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚甲基丙烯酸钠、聚丙烯酸钠、聚羧甲基纤维素钠等的水溶液，浓度为 0.5-25%(w/v)。

为了形成乳液，水相中还应具有乳化剂，优选为非离子表面活性剂。其含量为水相的 0.1-12%(w/v)。

高浓度与低浓度的联系水相间的浓度比为 5-50 倍。

当采用喷雾干燥法时，用有机溶剂将可生物降解的辅料和紫杉醇类物质溶解，其中所述的有机溶剂选自于二氯甲烷、三氯甲烷、二甲基甲酰胺、二甲基亚砷、乙酸乙酯、二氧六环、乙醚、丙酮、四氢呋喃、乙醇其中的一种或其中的两种或两种以上的混合物，其中药用辅料在有机溶剂中的浓度为 10-1000mg/ml，紫杉醇类物质的浓度为 10-500mg/ml，制备时，采用喷雾干燥法制得微球。通过控制喷枪的喷雾口大小、喷雾的速率来控制微球的粒径。喷雾口越小，喷雾速率越大，制得的微球粒径越小。

上述方法中，从控制微球大小、调整释放效果出发，优选单乳-液中干燥法。

本发明所述的紫杉醇类物质的微球给药是将制备好的微球无菌粉

末混悬于含有 CMC - Na、吐温 80 和甘露醇的溶媒中，进行局部注射给药。按照制备微球的降解速率设定给药频率，即释放 2 周的微球，每 2 周给药一次；释放 1 个月的微球，每月给药一次。

附图说明

图 1 表示实施例 1 的紫杉醇缓释微球的粒径分布。

图 2 表示实施例 2 的紫杉醇缓释微球的粒径分布。

图 3 是实施例 1 的紫杉醇缓释微球体外释放曲线。

图 4 是实施例 1 的紫杉醇缓释微球在兔体内释放曲线。

图 5 是实施例 1 的紫杉醇缓释微球比格犬体内释放曲线。

具体实施方式

以下通过实施例来进一步说明本发明所述的紫杉醇类物质的局部注射用缓释微球的制备方法、粒径控制、突释情况和缓释效果。

测试方法：

微球粒径、载药量和包封率的测定：

实施例 1、2 中的微球粒径的测定

实验方法：称取适当实验样品，使用 BT-9300H 型激光粒度测定仪进行测定。

实施例 1、2 中的微球载药量和包封率的测定

实验方法：精密称取实验样品约 3mg，置于 3ml 二氯甲烷中，加入乙腈：水的混合溶液（1：1），涡旋，离心后采用高效液相色谱仪测定药物的含量，并计算微球的载药量和包封率。色谱条件：色谱型号，Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector，Waters 1525 Binary HPLC Pump，USA；色谱柱，Symmetry C18 5 μ m 4.6 \times 150mm Column，USA；流动相，乙腈：水（1：1）；检测波长 227nm；流速 1ml/min。

实施例 1：单乳法制备紫杉醇缓释微球

按照分别称取紫杉醇 40mg、PLGA（75：25，20000）500mg 和肉

豆蔻酸异丙酯 (IPM) 100mg, 溶解于 2ml 二氯甲烷中, 在 2500rpm 机械搅拌, 用 9 号针头将此溶液注入 5% 聚乙烯醇 (PVA) 中, 5 分钟后用 20 倍量 2% PVA 溶液稀释, 继续搅拌 4 小时以上。之后进行洗涤、冷冻离心, 冷冻干燥后得到微球, 收率为 80%。所得紫杉醇缓释微球的包封率为 93.10%; 所得微球的主要粒径范围: 5~10 μ m, 外形圆整, 分散均匀。在控制好搅拌速率、针头注入速率和针头大小后可控制微球粒径。所得结果如图 1 所示。

实施例 2: 单乳法制备紫杉醇缓释微球

按照分别称取紫杉醇 30mg、PLGA (75: 25, 30000) 500mg 和肉豆蔻酸异丙酯 (IPM) 100mg, 溶解于 2ml 二氯甲烷中, 用 9 号针头将此溶液注入 5% 聚乙烯醇 (PVA) 中, 同时以 10000rpm 机械搅拌, 5 分钟后将 5% PVA 溶液稀释为 2%, 继续搅拌 4 小时以上。之后进行洗涤、冷冻离心, 冷冻干燥后得到微球。所得紫杉醇缓释微球的包封率为 91%; 所得微球的主要粒径范围: 10~50 μ m, 外形圆整, 分散均匀。所得结果如图 2 所示。

实施例 3: 紫杉醇微球体外释放实验

将如本发明实施例 1 所制备的紫杉醇微球冻干粉末 10 μ g 溶于 10ml 溶出介质磷酸盐缓冲溶液 (PBS, pH=7.4) 中, 37 $^{\circ}$ C 恒温水平振摇, 定时取样, HPLC 测定释放结果。

实验方法: 精密称取实验样品约 10mg, 置于 10ml 的 pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲溶液中, 置于恒温振荡器中保持一定温度和转速, 按时取样。

取样方法: 每批样品每时间点分别取三次样品, 取出其中的溶液, 3000rpm 条件下离心 10 分钟, 取上清液进行 HPLC 测定。取样时间点分别为: 0 天、1 天、3 天、5 天、10 天、15 天、20 天、25 天、30 天。

所得结果如图 3 所示。在长达 30 天的时间内, 本发明的紫杉醇缓释微球可以实现平稳地释放。

实施例 4: 紫杉醇微球体内释放实验

将入本发明实施例 1 所制备的紫杉醇微球冻干粉末 100mg, 经 Co^{60} 照射灭菌后, 溶于含有 CMC - Na、吐温 80 和甘露醇的溶媒 2ml 中, 进行兔皮下注射, 分别于第 1.5h、3h、6h、10h、1d、2d、7d、14d、21d、28d、35d 进行耳缘静脉取血, 以快诺酮为内标进行 HPLC 测定。所得结果如图 4 所示。从图中可见, 在长达 3 周的时间内, 血药浓度基本保持恒定。

实施例 5: 紫杉醇微球体内药效学实验

将入本发明实施例 1 所制备的紫杉醇微球冻干粉末 100mg, 经 Co^{60} 照射灭菌后, 溶于含有 CMC - Na、吐温 80 和甘露醇的溶媒 2ml 中, 对已建立实体肿瘤模型的昆明鼠进行皮下注射。给药后第 10 天取肿瘤称重, 与对照组昆明鼠肿瘤进行比较, 利用公式[瘤重抑制率 % = $(1-T/C) \times 100\%$] 计算紫杉醇微球体内抑瘤率。实验结果得到抑瘤率为 50 ~ 85 %。

组别	平均瘤重	抑瘤率(均以阴性对照组为对照) %
高剂量组	0.52	52.94
中剂量组	0.63	42.74
低剂量组	0.93	15.85
阳性对照组	1.01	8.34
阴性对照组	1.10	-

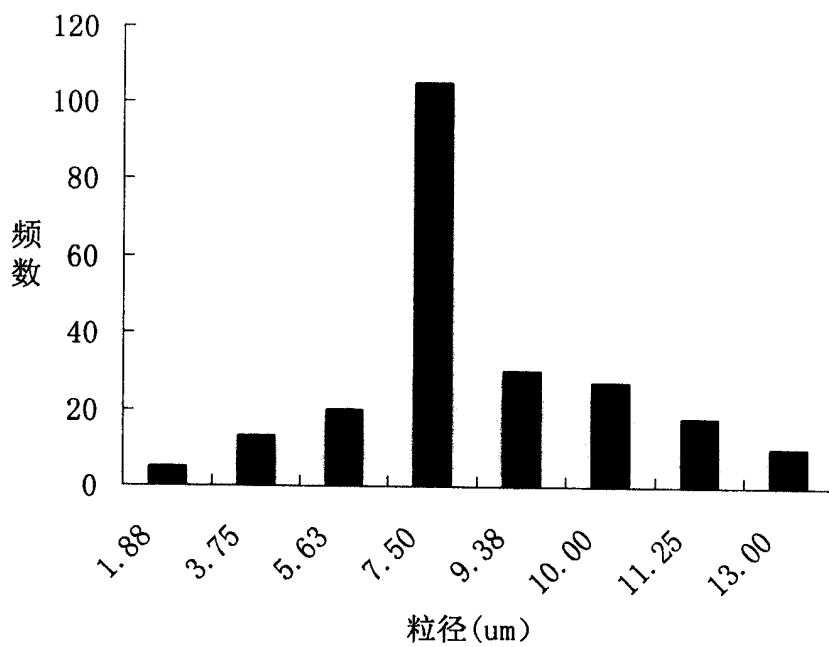


图 1

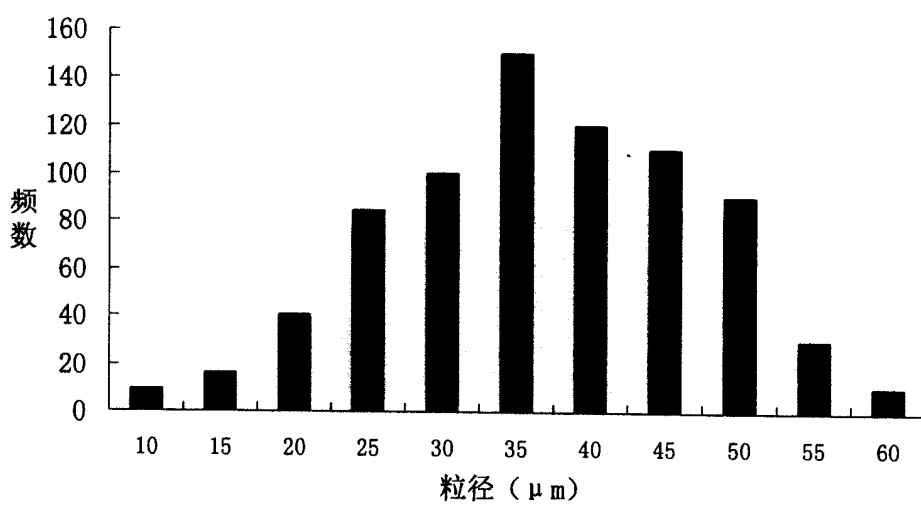


图 2

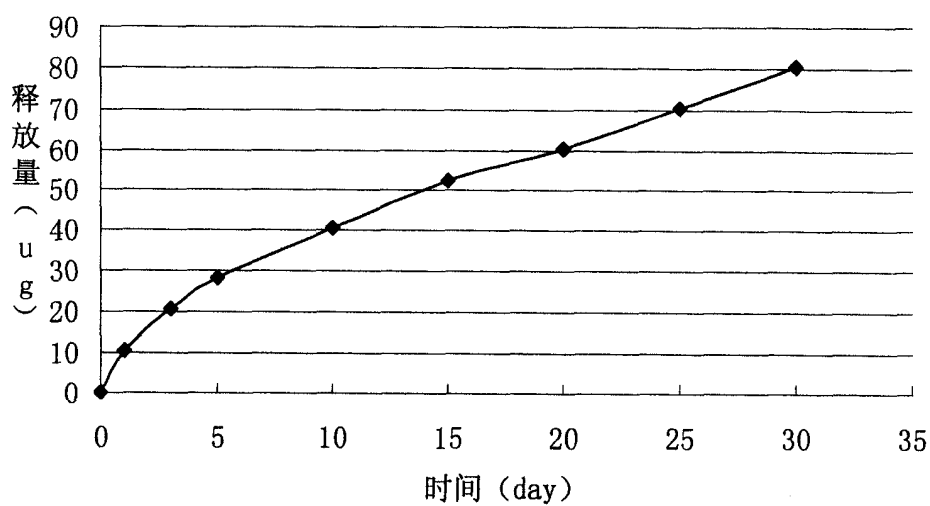


图 3

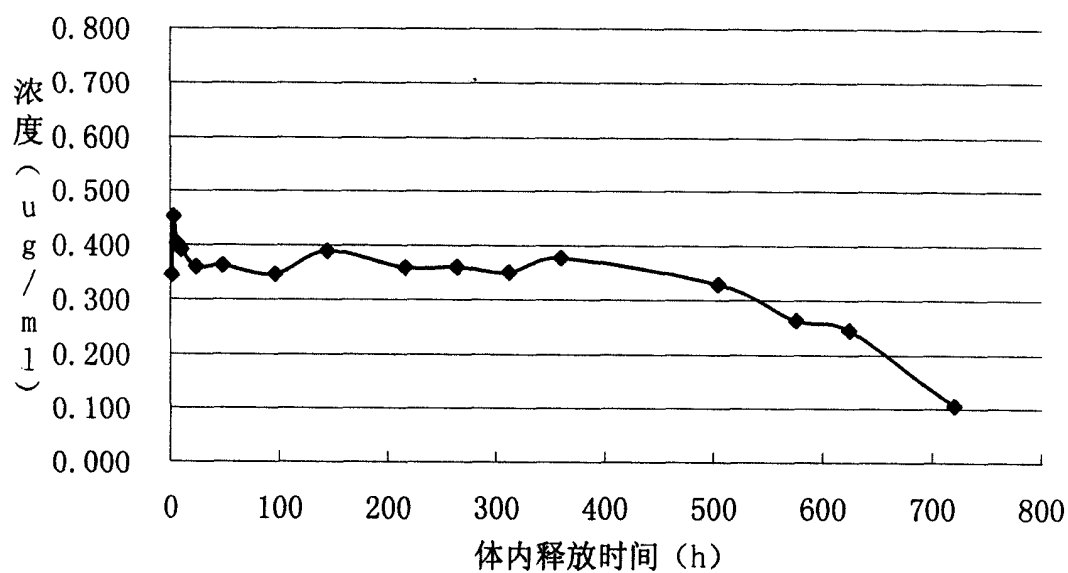


图 4

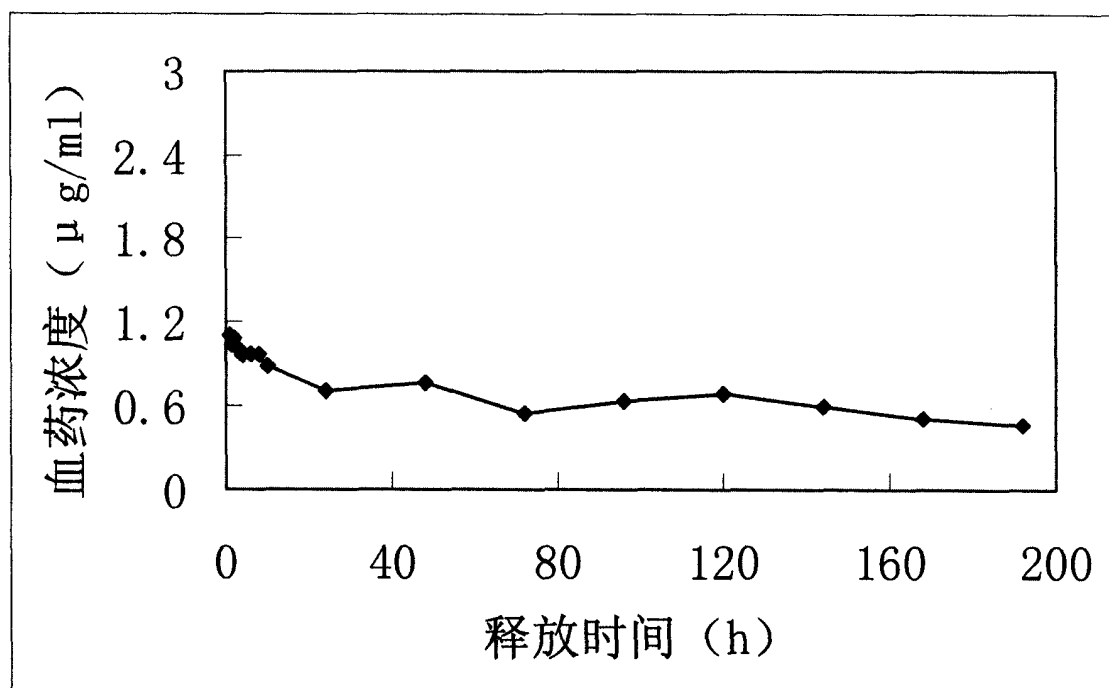


图 5