



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102973604 B

(45) 授权公告日 2015. 05. 27

(21) 申请号 201210557846. 6

(22) 申请日 2011. 06. 02

(62) 分案原申请数据

201110147809. 3 2011. 06. 02

(73) 专利权人 江苏省中医药研究院

地址 210028 江苏省南京市栖霞区红山路十
字街 100 号

(72) 发明人 陈彦 张振海 贾晓斌 王晋艳
贺俊杰

(74) 专利代理机构 江苏致邦律师事务所 32230
代理人 徐蓓

(51) Int. Cl.

A61K 35/65(2015. 01)

A61K 9/72(2006. 01)

A61K 47/26(2006. 01)

A61P 11/00(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1634577 A, 2005. 07. 06, 说明书发明内
容.

CN 102058566 A, 2011. 05. 18, 说明书发明内
容.

CN 1931190 A, 2007. 03. 21, 全文.

CN 101322723 A, 2008. 12. 17, 全文.

审查员 周俊清

权利要求书1页 说明书9页

(54) 发明名称

一种蟾皮提取物干粉吸入剂及其制备方法、
应用

(57) 摘要

本发明涉及干粉吸入剂, 具体的说是一种蟾皮提取物制成的干粉吸入剂、所述干粉吸入剂的制备方法和在制备治疗肺部肿瘤药物中的应用。一种蟾皮提取物干粉吸入剂, 其特征在于它是由蟾皮提取物与医学上可接受的辅料组成, 蟾皮提取物与所述的辅料的质量比为 1:0-1:110。将一种蟾皮提取物制成干粉吸入剂, 可直接作用于肺部病患, 降低毒副作用的发生, 提高药物的生物利用度, 既可克服口服制剂起效慢, 具有肝脏首过效应, 及全身性毒副作用, 制剂生物利用度较低等缺点; 同时也可解决针剂的使用不便, 病人顺应性差等问题。

1. 一种蟾皮提取物干粉吸入剂,其特征在于它是由蟾皮提取物与医学上可接受的辅料组成;

所述蟾皮提取物的制备为:取蟾皮洗净,加 12 倍量 60% 的乙醇,回流提取 2 次,每次 2 小时,合并提取液,回收乙醇至无醇味,低温冷藏 48 小时,滤过,加入 0.3% 的活性炭,煮沸 30 分钟,滤过,喷雾干燥,得到蟾皮提取物粉末;

所述吸入剂的制备为:将蟾皮提取物粉末、乳糖、甘露醇、甘氨酸、二月桂酰磷脂酰胆碱、卵磷脂、硬脂酸镁按质量比 1:5:5:2:0.5:0.5:0.1 的比例进行混合,气流粉碎至粉末 D_{50} 在 5 微米以下,将药物粉末包装入胶囊或泡罩或干粉吸入器内,获得吸入剂。

一种蟾皮提取物干粉吸入剂及其制备方法、应用

[0001] 技术领域：

[0002] 本发明涉及干粉吸入剂，具体的说是蟾皮提取物制成的干粉吸入剂、所述干粉吸入剂的制备方法和在制备治疗肺部肿瘤药物中的应用。

[0003] 背景技术：

[0004] 华蟾素为蟾蜍科 (Bufonidae) 动物中华大蟾蜍 *Bufo gargarizans* Cantor 的干燥皮经提取纯化制得的提取物，具有解毒、消肿、止痛之功效，用于治疗中、晚期肿瘤、慢性乙型肝炎等症，其生理活性物质主要是蟾蜍毒素类 (bufotoxins) 及其水解产物蟾毒配基类 (bufagenins)、蟾毒色胺类 (bufoteinins) 等。目前华蟾素注射剂、口服液、片剂已应用于临床，对肝癌、肺癌、胃癌等具有较好的疗效。尤其华蟾素注射液，是从中华大蟾蜍皮经加工制成的水溶性制剂，治疗原发性肝癌和中晚期肺癌分别获得 44% 和 56% 的综合有效率，瘤体缩小率分别为 10% 和 16%，且对化疗和放疗具有协同作用。华蟾素注射液临床虽然不良反应较少，但仍存在静脉滴注会出现局部静脉反应，引起滴注静脉收缩痉挛而致疼痛，长期刺激致静脉非特异性炎症；皮肤反应，主要表现为荨麻疹和皮肤水疱样损害；其次，少部分患者出现早搏、窦性心动过缓、窦性心动过速、房室传导阻滞等心血管系统反应，产生的可能原因是华蟾素中少量的蟾毒配基所产生的心脏毒性反应。此外，针剂需要在医院内使用，病人顺应性差。而华蟾素口服制剂需经过肝脏的首过效应，起效慢，制剂生物利用度较低。

[0005] 肺具有极大的表面积，肺泡壁是由单层细胞组成，使得药物分子极易进入血液，因此肺吸入给药具有起效快、不良反应小等诸多优点。肺吸入给药中干粉吸入剂 (dry powder inhalers, DPIs) 不使用抛射剂和溶剂，靠患者自主呼吸产生的气流使药物粉末雾化，进而使药物粉末传递到肺部，具有应用方便、吸收迅速、无肝脏首过、速释和靶向定位的特点，是一种新型的给药系统。

[0006] 肺癌的发病率在全世界范围内正在迅速上升，已经成为癌症死因的第一位。当前的抗肿瘤药物大多数都是注射给药，这种全身给药方式不利于药物蓄积于肿瘤部位，导致药物的疗效降低，不良反应增多。

[0007] 采用定位给药将抗肿瘤药物运送到人体的肿瘤病患部位，使药物在病患部位的浓度提高，对降低药物的毒副作用、提高药物的治疗效果具有重大的临床应用价值。采用经肺给药方式的吸入剂可将蟾皮提取物直接传递肺癌的病灶，有利于提高蟾皮提取物对肺癌的疗效并降低其对正常组织的毒副作用。目前具有抗肺部肿瘤作用的蟾皮提取物干粉吸入剂的研究未见报道。

[0008] 发明内容：

[0009] 发明目的：本发明的一个目的是提供蟾皮提取物的肺部干粉吸入制剂及其制备方法。本发明的另一个目的是提供本发明所述干粉吸入剂在制备治疗肺部肿瘤药物中的应用。

[0010] 针对上述发明目的，本发明提供以下技术方案：

[0011] 一种蟾皮提取物干粉吸入剂，其特征在于它是由蟾皮提取物与医学上可接受的辅

料组成,蟾皮提取物(按照干燥后所得固体物质量)与所述的辅料的质量比为 1:0-1:110。

[0012] 所述的一种蟾皮提取物干粉吸入剂,是由蟾皮提取物加入辅料制成的粉末,粉末团聚形成可再分散颗粒;或者是蟾皮提取物负载在辅料颗粒表面形成颗粒;上述两种颗粒的粒径以 D_{50} 计在 0.5-1000 微米之间。

[0013] 所述的蟾皮提取物,为蟾蜍科动物中华大蟾蜍或黑眶蟾蜍等的皮经提取纯化制得的提取物。蟾皮提取物的制备方法为:

[0014] 取蟾皮 1 份,加 2-100 倍量水,回流或者煎煮或者超声或者微波或者浸提或者渗漉提取 1-10 次,每次 0.1-48 小时,合并水提液,浓缩至相对密度为 1.01-1.50(60-100℃),加乙醇(65%-100%,W/W)沉淀,使乙醇含量达到 50% (W/W) 以上,静置或离心或过滤处理,取上清液回收乙醇,得到蟾皮提取物或者浓缩、干燥后得到蟾皮提取物。

[0015] 或者,取蟾皮 1 份,加 2-100 倍量水,回流或者煎煮或者超声或者微波或者浸提或者渗漉提取 1-10 次,每次 0.1-48 小时,合并水提液,浓缩至相对密度为 1.01-1.50 (60-100℃),加乙醇(65%-100%,W/W)沉淀,使乙醇含量达到 50% (W/W) 以上,静置或离心或过滤处理,取上清液回收乙醇至无醇味,加乙醇(65%-100%,W/W)沉淀,使乙醇含量达到 60% (W/W) 以上,静置或离心或过滤处理,取上清液回收乙醇至无醇味,得到蟾皮提取物或者浓缩、干燥后得到蟾皮提取物。

[0016] 或者,取蟾皮 1 份,加 2-100 倍量水,回流或者煎煮或者超声或者微波或者浸提或者渗漉提取 1-10 次,每次 0.1-48 小时,合并水提液,经分子量 500-5000 的超滤膜超滤,得到蟾皮提取物或者浓缩、干燥后得到蟾皮提取物。

[0017] 或者,取蟾皮 1 份,加 2-100 倍量的一定浓度的乙醇(1%-100%,W/W),回流或者超声或者微波或者浸提或者渗漉提取 1-10 次,每次 0.1-48 小时,合并提取液,回收乙醇至无醇味,加 0-100 倍水,静置或离心或过滤处理,得到蟾皮提取物或者浓缩、干燥后得到蟾皮提取物。

[0018] 或者,取蟾皮 1 份,加 2-100 倍量的一定浓度的乙醇(1%-100%,W/W),回流或者超声或者微波或者浸提或者渗漉提取 1-10 次,每次 0.1-48 小时,合并提取液,回收乙醇至无醇味,加 0-100 倍水,经分子量 500-5000 的超滤膜超滤,得到蟾皮提取物或者浓缩、干燥后得到蟾皮提取物。

[0019] 所述的辅料选用糖、醇、氨基酸、磷脂、表面活性物质、环糊精、高分子物质、硬脂酸镁、硬脂酸、硬酯富马酸钠、微粉硅胶、滑石粉中的一种或几种混合物。

[0020] 所述的糖,可选用半乳糖、乳糖、葡萄糖、果糖、蔗糖、海藻糖、棉子糖中的一种或几种混合物;所述的醇,可选用甘露醇、木糖醇、麦芽糖醇、山梨醇中的一种或几种混合物;所述的氨基酸,可选用甘氨酸、门冬氨酸、丙氨酸、色氨酸、异亮氨酸、苏氨酸、谷氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸、胱氨酸、赖氨酸、脯氨酸、精氨酸中的一种或几种;所述的磷脂,可选用大豆磷脂、卵磷脂、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、合成磷脂中的一种或几种;所述的表面活性物质,可选用肺源性表面活性物质如二棕榈酰磷脂酰胆碱、二月桂酰磷脂酰胆碱、胆固醇中的一种或几种混合物;所述的高分子物质,可选用符合安全要求的高分子,优选可生物降解的高分子物质例如白蛋白、淀粉、聚乳酸、聚乳酸-羟基乙酸、聚乙二醇、泊洛沙姆、透明质酸、透明质酸钠、海藻酸钠中的一种或几种混合物。

[0021] 优选的方式为所述辅料为吸入用乳糖颗粒平均粒径在 45-220 微米与微粉化乳糖

平均粒径在 1-10 微米的混合物,其中乳糖颗粒与微粉化乳糖的质量比为 1000:1-1:1。最优选的方式为乳糖颗粒与微粉化乳糖的质量比为 100:1-7:1。

[0022] 一种制备蟾皮提取物干粉吸入剂的方法,其制备步骤如下:

[0023] 将蟾皮提取物通过粉碎或喷雾干燥制成粉末,包装入胶囊或泡罩或干粉吸入器内;将蟾皮提取物通过粉碎或喷雾干燥制成粉末,粉末与辅料混合均匀制成吸入用粉末,包装入胶囊或泡罩或干粉吸入器内;或者将蟾皮提取物与辅料混合均匀,通过粉碎或喷雾干燥制成吸入用粉末,包装入胶囊或泡罩或干粉吸入器内;或者将蟾皮提取物和处方中部分辅料混合均匀,通过粉碎或喷雾干燥制成粉末,粉末与处方中剩余辅料混合均匀制成吸入用粉末,包装入胶囊或泡罩或干粉吸入器内。

[0024] 一种制备蟾皮提取物干粉吸入剂的方法,其制备步骤如下:

[0025] 将蟾皮提取物通过粉碎或喷雾干燥制成粉末,粉末与辅料混合均匀,团聚形成可再分散颗粒,包装入胶囊或泡罩或干粉吸入器内;或者将蟾皮提取物与辅料混合均匀,通过粉碎或喷雾干燥制成粉末,团聚形成可再分散颗粒,包装入胶囊或泡罩或干粉吸入器内;或者将蟾皮提取物和处方中部分辅料混合均匀,通过粉碎或喷雾干燥制成粉末,粉末与处方中剩余辅料混合均匀,团聚形成可再分散颗粒,包装入胶囊或泡罩或干粉吸入器内;或者将蟾皮提取物通过粉碎或喷雾干燥制成粉末,粉末负载在辅料颗粒表面形成颗粒,包装入胶囊或泡罩或干粉吸入器内。

[0026] 一种蟾皮提取物干粉吸入剂在制备肺部肿瘤药物中的应用。

[0027] 有益效果:

[0028] 1、肺具有极大的表面积,肺泡壁是由单层细胞组成,使得药物分子极易进入血液,因此肺吸入给药具有起效快、不良反应小等诸多优点。肺吸入给药中干粉吸入剂(drypowder inhalers, DPIs)不使用抛射剂和溶剂,靠患者自主呼吸产生的气流使药物粉末雾化,进而使药物粉末传递到肺部,具有应用方便、吸收迅速、无肝脏首过、速释和靶向定位的特点,是一种新型的给药系统。目前有关于干粉吸入剂多用于治疗呼吸道和肺部的感染,但未见在肺部肿瘤的治疗。同时,具有抗肺部肿瘤作用的蟾皮提取物干粉吸入剂的研究也未见报道。目前蟾皮提取物注射剂、口服液、片剂已应用于临床,对肝癌、肺癌、胃癌等具有较好的效果。尤其是华蟾素注射液,是从中华大蟾蜍皮经加工制成的水溶性制剂,治疗原发性肝癌和中晚期肺癌分别获得 44% 和 56% 的综合有效率,瘤体缩小率分别为 10% 和 16%,且对化疗和放疗具有协同作用。华蟾素注射液临床虽然不良反应较少,但仍存在静脉滴注会出现局部静脉反应,引起滴注静脉收缩痉挛而致疼痛,长期刺激致静脉非特异性炎症;皮肤反应,主要表现为荨麻疹和皮肤水疱样损害;其次,少部分患者出现早搏、窦性心动过缓、窦性心动过速、房室传导阻滞等心血管系统反应,产生的可能原因是华蟾素中少量的蟾毒配基所产生的心脏毒性反应。此外针剂需要在医院内使用,病人顺应性差。而蟾皮提取物口服制剂需经过肝脏的首过效应,起效慢,制剂生物利用度较低。使用蟾皮提取物的干粉吸入剂主要是针对肺部肿瘤,直接作用于患处,同时不存在肝脏的首过效应,起效快,并且没有上述的不良反应,对新药开发具有极大的前景。

[0029] 2、由于蟾皮提取物是混合物,其中含有吡啶碱类物质、华蟾酥毒基,脂蟾毒配基等,在实际操作中发现,加入一定配比的特定辅料能够克服提取物粉碎到一定粒径时而产生的静电作用、内聚力等引起的团聚,减小吸湿性。申请人经过大量实验获知,特别是辅料

选用乳糖颗粒与微粉化乳糖的混合物或者采用粉末团聚技术可以做成吸入性能优良的干粉吸入剂。

具体实施方式

[0030] 下面结合实例对本发明作进一步详细说明,但本发明的范围并不受这些实例的任何限制。

[0031] 实施例 1

[0032] 1、蟾皮提取物的制备:取干蟾皮洗净,加 10 倍量水,煎煮 2 次,每次 1.5 小时,合并滤液,浓缩至相对密度为 1.1-1.2(85℃),冷却至 40℃,加乙醇沉淀,使含醇量达 60%,静置 24 小时,取上清液回收乙醇至无醇味,浓缩液加乙醇使含醇量达 85%,静置 48 小时,滤过,回收乙醇至稠膏,60℃干燥,得到蟾皮提取物。

[0033] 2、吸入剂的制备:将蟾皮提取物采用气流粉碎至 D_{50} 在 5 微米以下,与粒径在 45-70 微米的乳糖按质量比 1:10 进行混合,将药物粉末包装入胶囊或泡罩或干粉吸入器内,获得吸入剂。

[0034] 实施例 2

[0035] 1、蟾皮提取物的制备:取干蟾皮洗净,加 12 倍量水,煎煮 2 次,每次 2 小时,合并滤液,浓缩至相对密度为 1.2-1.3(85℃),冷却至 40℃,加乙醇沉淀,使含醇量达 70%,静置 24 小时,取上清液回收乙醇至无醇味,浓缩液加乙醇使含醇量达 85%,静置 48 小时,滤过,回收乙醇至无醇味,喷雾干燥,得到蟾皮提取物粉末,粉末 D_{50} 在 5 微米以下。

[0036] 2、吸入剂的制备:将蟾皮提取物粉末、粒径在 45-80 微米的乳糖、粒径在 20-50 微米的亮氨酸按质量比 10:100:1 的比例进行混合,包装入胶囊或泡罩或干粉吸入器内,获得吸入剂。

[0037] 实施例 3

[0038] 1、蟾皮提取物的制备:取干蟾皮洗净,加 30 倍量水,微波辅助提取 3 次,每次 1 小时,合并提取液,经分子量 1000 的超滤膜超滤,超滤液喷雾干燥得到蟾皮提取物粉末,粉末 D_{50} 在 5 微米以下。

[0039] 2、吸入剂的制备:将蟾皮提取物粉末包装入胶囊或泡罩或干粉吸入器内,获得吸入剂。

[0040] 实施例 4

[0041] 1、蟾皮提取物的制备:取蟾皮洗净,加 12 倍量 60% (W/W) 的乙醇,回流提取 2 次,每次 2 小时,合并提取液,回收乙醇至无醇味,低温冷藏 48 小时,滤过,加入 0.3% 的活性炭 (W/V),煮沸 30 分钟,滤过,喷雾干燥,得到蟾皮提取物粉末。

[0042] 2、吸入剂的制备:将蟾皮提取物粉末、乳糖、甘露醇、甘氨酸、二月桂酰磷脂酰胆碱、卵磷脂、硬脂酸镁按质量比 1:5:5:2:0.5:0.5:0.1 的比例进行混合,气流粉碎至粉末 D_{50} 在 5 微米以下,将药物粉末包装入胶囊或泡罩或干粉吸入器内,获得吸入剂。

[0043] 实施例 5

[0044] 1、蟾皮提取物的制备:取蟾皮洗净,加 20 倍量的无水乙醇,回流提取 2 次,每次 1 小时,合并提取液,回收乙醇,经分子量 3000 的超滤膜超滤,超滤液真空浓缩至比重为 1.20(45℃),浸膏 50℃真空干燥,得到蟾皮提取物。

[0045] 2、吸入剂的制备：将蟾皮提取物、乳糖、胆固醇按 1:8:1 的比例进行混合，气流粉碎至粉末 D_{50} 在 5 微米以下，将药物粉末包装入胶囊或泡罩或干粉吸入器内，获得吸入剂。

[0046] 实施例 6

[0047] 1、蟾皮提取物的制备：取蟾皮洗净，加 15 倍量的 60% (W/W) 乙醇，回流提取 3 次，每次 1 小时，合并提取液，回收乙醇至无醇味，浓缩液加 2 倍量水沉，静置 24 小时，高速离心，取上清液得到蟾皮提取物。

[0048] 2、吸入剂的制备：分别将上述蟾皮提取物中所含固形物质量 5 倍、1 倍、2 倍的乳糖、聚乙二醇 6000、白蛋白加入蟾皮提取物中，喷雾干燥，粉末 D_{50} 在 5 微米以下，将药物粉末包装入胶囊或泡罩或干粉吸入器内，获得吸入剂。

[0049] 实施例 7

[0050] 1、蟾皮提取物的制备：取蟾皮洗净，加 10 倍量的 10% (W/W) 乙醇，回流提取 2 次，每次 1 小时，合并提取液，回收乙醇至无醇味，浓缩液高速离心，取上清液得到蟾皮提取物，喷雾干燥，得到蟾皮提取物，粉末 D_{50} 在 5 微米以下。

[0051] 2、吸入剂的制备：将蟾皮提取物药物粉末、粒径在 10-90 微米的甘露醇、微粉化硅胶按质量比 10:89:1 的比例进行混合，混合均匀后包装入胶囊或泡罩或干粉吸入器内，获得吸入剂。

[0052] 实施例 8

[0053] 1、蟾皮提取物的制备：取蟾皮洗净，加 10 倍量的 50% (W/W) 乙醇，回流提取 2 次，每次 1 小时，合并提取液，回收乙醇至无醇味，浓缩液高速离心，取上清液得到蟾皮提取物，喷雾干燥，得到蟾皮提取物粉末。

[0054] 2、吸入剂的制备：将蟾皮提取物药物粉末、甘露醇、亮氨酸按质量比 10:100:3 的比例进行混合，混合后加水适量，喷雾干燥得到 D_{50} 为 4.8 微米的粉末，用有聚合物内衬的旋转混合机混合，制成疏松的团聚物，团聚物的 D_{50} 为 390 微米，包装入胶囊或泡罩或干粉吸入器内，获得吸入剂。

[0055] 实施例 9

[0056] 1、蟾皮提取物的制备：取蟾皮洗净，加 10 倍量的 40% (W/W) 乙醇，回流提取 3 次，每次 0.5 小时，合并提取液，回收乙醇至无醇味，浓缩液高速离心，取上清液得到蟾皮提取物，喷雾干燥，粉末 D_{50} 在 5 微米以下。

[0057] 2、吸入剂的制备：将蟾皮提取物粉末、甘露醇、亮氨酸按质量比 10:80:2 的比例进行混合，用有聚合物内衬的旋转混合机混合，制成疏松的团聚物，团聚物的 D_{50} 为 120 微米，包装入胶囊或泡罩或干粉吸入器内，获得吸入剂。

[0058] 实施例 10

[0059] 1、蟾皮提取物的制备：取干蟾皮洗净，加 20 倍量水，煎煮 2 次，每次 2 小时，合并滤液，浓缩至相对密度为 1.2-1.3 (85℃)，冷却至 40℃，加乙醇沉淀，使含醇量达 70%，静置 24 小时，取上清液回收乙醇至无醇味，浓缩液加乙醇使含醇量达 85%，静置 48 小时，滤过，回收乙醇至无醇味，喷雾干燥，粉末 D_{50} 在 5 微米以下。

[0060] 2、吸入剂的制备：将蟾皮提取物粉末、德国美剂乐 InhaLac® 70 乳糖、微粉化乳糖 (D_{50} =5.1 微米) 按质量比 5:90:5 的比例进行混合，混合均匀后包装入胶囊或泡罩或干粉吸入器内，获得吸入剂。

[0061] 3、吸入剂肺部沉积率考察

[0062] 按照中华人民共和国 2010 年版药典规定方法考察,以制剂中蟾蜍噻啉含量计,其肺部沉积率达到 32.6%,室温条件下放置 18 个月后,制剂中蟾蜍噻啉的肺部沉积率没有显著变化。

[0063] 实施例 11

[0064] 1、蟾皮提取物的制备:取干蟾皮洗净,加 20 倍量水,煎煮 2 次,每次 2 小时,合并滤液,浓缩至相对密度为 1.2-1.3(85℃),冷却至 40℃,加乙醇沉淀,使含醇量达 70%,静置 24 小时,取上清液回收乙醇至无醇味,浓缩液加乙醇使含醇量达 85%,静置 48 小时,滤过,回收乙醇至无醇味,喷雾干燥,粉末 D_{50} 在 5 微米以下。

[0065] 2、吸入剂的制备:将蟾皮提取物粉末、德国美剂乐 InhaLac® 70 乳糖、微粉化乳糖(D_{50} =4.9 微米)按质量比 3:95:1 的比例进行混合,混合均匀后包装入胶囊或泡罩或干粉吸入器内,获得吸入剂。

[0066] 3、吸入剂肺部沉积率考察

[0067] 按照中华人民共和国 2010 年版药典规定方法考察,以制剂中蟾蜍噻啉含量计,其肺部沉积率达到 30.2%,室温条件下放置 18 个月后,制剂中蟾蜍噻啉的肺部沉积率没有显著变化。

[0068] 实施例 12

[0069] 1、蟾皮提取物的制备:取干蟾皮洗净,加 20 倍量水,煎煮 2 次,每次 2 小时,合并滤液,浓缩至相对密度为 1.2-1.3(85℃),冷却至 40℃,加乙醇沉淀,使含醇量达 70%,静置 24 小时,取上清液回收乙醇至无醇味,浓缩液加乙醇使含醇量达 85%,静置 48 小时,滤过,回收乙醇至无醇味,喷雾干燥,粉末 D_{50} 在 5 微米以下。

[0070] 2、吸入剂的制备:将蟾皮提取物粉末、德国美剂乐 InhaLac® 70 乳糖、微粉化乳糖(D_{50} =5.5 微米)按质量比 3:77:11 的比例进行混合,混合均匀后包装入胶囊或泡罩或干粉吸入器内,获得吸入剂。

[0071] 3、吸入剂肺部沉积率考察

[0072] 按照中华人民共和国 2010 年版药典规定方法考察,以制剂中蟾蜍噻啉含量计,其肺部沉积率达到 29.8%,室温条件下放置 18 个月后,制剂中蟾蜍噻啉的肺部沉积率没有显著变化。

[0073] 实施例 13

[0074] 1、蟾皮提取物的制备:取干蟾皮洗净,加 10 倍量水,煎煮 2 次,每次 1 小时,合并滤液,浓缩至相对密度为 1.3-1.4(85℃),冷却至 40℃,加乙醇沉淀,使含醇量达 60%,静置 48 小时,取上清液回收乙醇至无醇味,浓缩液加乙醇使含醇量达 80%,静置 48 小时,滤过,回收乙醇至无醇味,喷雾干燥,粉末 D_{50} 在 5 微米以下。

[0075] 2、吸入剂的制备:将蟾皮提取物粉末、亮氨酸按 1:5 的比例进行混合,混合后颗粒的 D_{50} 为 292 微米,包装入胶囊或泡罩或干粉吸入器内,获得吸入剂。

[0076] 实施例 14

[0077] 1、蟾皮提取物的制备:取干蟾皮洗净,加 6 倍量水,煎煮 5 次,每次 1 小时,合并滤液,浓缩至相对密度为 1.05(70℃),冷却至 40℃,加乙醇沉淀,使含醇量达 65%,静置 48 小时,取上清液回收乙醇至无醇味,浓缩液加乙醇使含醇量达 70%,静置 48 小时,滤过,回收乙

醇至无醇味,减压浓缩,真空干燥得到蟾皮提取物。

[0078] 2、吸入剂的制备:将蟾皮提取物与亮氨酸按 1: 1 的比例进行混合,气流粉碎,粉末 D_{50} 在 5 微米以下,将该粉末再与 9 倍量的甘露醇混合,混合后颗粒的 D_{50} 为 328 微米,包装入胶囊或泡罩或干粉吸入器内,获得吸入剂。

[0079] 实施例 15

[0080] 1、蟾皮提取物的制备:取干蟾皮洗净,加 30 倍量水,煎煮 1 小时,提取液浓缩至相对密度为 1.30 (60℃),冷却至 20℃,加乙醇沉淀,使含醇量达 70%,静置 24 小时,取上清液回收乙醇至无醇味,浓缩液加乙醇使含醇量达 90%,静置 48 小时,滤过,回收乙醇至无醇味,减压浓缩,真空干燥得到蟾皮提取物。

[0081] 2、吸入剂的制备:将蟾皮提取物与泊洛沙姆按质量比 10: 1 的比例进行混合,气流粉碎,粉末 D_{50} 在 5 微米以下,将该粉末再与 8 倍量的乳糖颗粒、1 倍量的硬脂酸镁混合,混合后颗粒的 D_{50} 为 653 微米,包装入胶囊或泡罩或干粉吸入器内,获得吸入剂。

[0082] 实施例 16

[0083] 1、蟾皮提取物的制备:取蟾皮洗净,加 10 倍量水,煎煮 1 小时,提取液浓缩至相对密度为 1.20 (50℃),冷却至室温,加乙醇沉淀,使含醇量达 50%,静置 24 小时,取上清液回收乙醇至无醇味,浓缩液加乙醇使含醇量达 70%,静置 48 小时,滤过,回收乙醇至无醇味,减压浓缩,真空干燥得到蟾皮提取物。

[0084] 2、吸入剂的制备:将蟾皮提取物气流粉碎,粉末 D_{50} 在 5 微米以下,将该粉末再与 20 倍量的乳糖颗粒混合,混合后颗粒的 D_{50} 为 286 微米,包装入胶囊或泡罩或干粉吸入器内,获得吸入剂。

[0085] 实施例 17

[0086] 按照实施例 1-16 获得吸入剂,进行药效学实验,其中对比药物为华蟾素注射液(市售)、蟾皮注射液 A 和 B,蟾皮注射液 A 和 B 按照以下方法制备:

[0087] 蟾皮注射液 A:

[0088] 取干蟾皮洗净,加 15 倍量水,煎煮 2 次,每次 2 小时,合并滤液,浓缩至相对密度为 1.2 (85℃),冷却至 20℃,加乙醇沉淀,使含醇量达 60%,静置 24 小时,取上清液回收乙醇至无醇味,浓缩液加乙醇使含醇量达 85%,静置 48 小时,滤过,回收乙醇至无醇味,加水至每毫升相当于原生药 5g,调节 pH 至 6.5,0.45 微米滤膜过滤,灌封,热压灭菌即得。

[0089] 蟾皮注射液 B:

[0090] 取干蟾皮洗净,加 20 倍量 60% 乙醇,回流提取 2 次,每次 2 小时,合并提取液,回收乙醇至无醇味,加入 3 倍量水,低温冷藏 48 小时,滤过,加入 0.3% 的活性炭 (W/V),煮沸 30 分钟,滤过,加水至每毫升相当于原生药 5g,调节 pH 至 7,0.45 微米滤膜过滤,灌封,热压灭菌即得。

[0091] 药效实验:

[0092] 苯并芘经皮穿刺肺内注射的方法建立大鼠肺肿瘤动物模型,取建模大鼠 200 只,随机分为 20 组,每组 10 只。每天 1 次,用药 7 天。给药方式:第 1-16 组为实施例 1-16 的吸入剂吸入给药,给药剂量为 15g 生药/kg;第 17 组腹腔注射华蟾素注射液(市售),给药剂量:15g 生药/kg;第 18 组腹腔注射蟾皮注射液 A,给药剂量:15g 生药/kg;第 19 组腹腔注射蟾皮注射液 B,给药剂量:15g 生药/kg;第 20 组为生理盐水对照组,腹腔注射 10mL/kg。

停药次日处死大鼠,解剖大鼠肺脏,观察肺脏病变情况。

[0093] 实验结果:吸入剂给药各组的大鼠的肺部出现肿块或结节病变的发生率最低为 10.5%,最高为 30.3%;华蟾素注射液组(市售)为 60.5%,蟾皮注射液 A 组为 50.1%,蟾皮注射液 B 组为 60.8%,生理盐水组为 100%,吸入剂给药各组与华蟾素注射液组(市售)、蟾皮注射液 A 组、蟾皮注射液 B 组、生理盐水组在肺部病变发生率上有显著性差异($P<0.05$)。

[0094] 实施例 18

[0095] 按照实施例 1-16 获得吸入剂,进行药效学实验,其中对比药物为华蟾素注射液(市售)、蟾皮注射液 A 和 B,蟾皮注射液 A 和 B 按照以下方法制备:

[0096] 蟾皮注射液 A:

[0097] 取干蟾皮洗净,加 15 倍量水,煎煮 2 次,每次 2 小时,合并滤液,浓缩至相对密度为 1.2 (85℃),冷却至 20℃,加乙醇沉淀,使含醇量达 60%,静置 24 小时,取上清液回收乙醇至无醇味,浓缩液加乙醇使含醇量达 85%,静置 48 小时,滤过,回收乙醇至无醇味,加水至每毫升相当于原生药 5g,调节 pH 至 6.5,0.45 微米滤膜过滤,灌封,热压灭菌即得。

[0098] 蟾皮注射液 B:

[0099] 取干蟾皮洗净,加 20 倍量 60% 乙醇,回流提取 2 次,每次 2 小时,合并提取液,回收乙醇至无醇味,加入 3 倍量水,低温冷藏 48 小时,滤过,加入 0.3% 的活性炭 (W/V),煮沸 30 分钟,滤过,加水至每毫升相当于原生药 5g,调节 pH 至 7,0.45 微米滤膜过滤,灌封,热压灭菌即得。

[0100] 药效实验:

[0101] 1、家兔 VX2 原位肺癌模型的建立

[0102] 1) 荷瘤种兔的制作 常规复苏 VX2 肿瘤冰冻细胞悬液,制成 $10^6/\text{mL}$ 的活细胞悬液,取 1mL 接种于 1 只兔右后腿外侧肌肉内,3 周后于接种部位可扪及一直径约 30cm 的肿块,即制成荷瘤种兔。

[0103] 2) 组织块悬液的制备 无菌条件下切取荷瘤种兔腿外侧肌肉内的肿瘤,取呈鱼肉样生长旺盛的肿瘤组织,剪成泥状。RPMI 1640 培养液冲洗下过 30 目筛,去除单个细胞和过小的组织块,筛上部分在 RPMI 1640 培养液冲洗下过 20 目筛,去除过大的组织块。取筛下部分,离心沉淀后,取沉淀物 2mL,加 RPMI 1640 培养液配制成组织块悬液 20mL。

[0104] 3) 肺内接种 所有家兔右胸壁脱毛,肌肉注射速眠新合剂 0.8mL/kg 麻醉后固定,常规消毒,取无菌三通接头,分别接 12 号注射针头、吸有兔自身血凝块的 1mL 注射器及吸有 VX2 肿瘤组织块悬液或细胞悬液 1mL 的注射器。在 X 线透视下,将 12 号针头刺入兔右肺下叶内,回吸无血后,注入 0.4mL 组织块悬液或细胞悬液,然后注入 0.2mL 兔自身血凝块,拔出针头,接种完毕。

[0105] 4) 移植瘤生长情况的观测 全部家兔自接种后第 3 天起,每日对胸部进行层宽、层厚均为 5mm 的 CT 扫描,观察肿瘤生长、胸腔内转移情况。

[0106] 5) 家兔 VX2 原位肺癌模型建立结果 家兔全部有肺内肿瘤生长,接种成功率 100%。

[0107] 2、药效实验:

[0108] 取成功建模家兔 200 只,随机分为 20 组,每组 10 只。每天 1 次,用药 12 天。给药方式:第 1-16 组为实施例 1-16 的吸入剂吸入给药,给药剂量:15g 生药/kg;第 17 组腹腔

注射华蟾素注射液(市售),给药剂量:15g 生药/kg;第 18 组腹腔注射蟾皮注射液 A,给药剂量:15g 生药/kg;第 19 组腹腔注射蟾皮注射液 B,给药剂量:15g 生药/kg;第 20 组为生理盐水对照组,腹腔注射 10mL/kg。停药次日处死家兔,解剖家兔肺脏,剥离肿瘤组织,称重。

[0109] 实验结果:吸入剂给药各组的家兔的抑瘤率最小为 58.7%,最高为 64.3%;华蟾素注射液组(市售)为 56.3%,蟾皮注射液 A 组为 45.1%,蟾皮注射液 B 组为 48.9%,生理盐水对肿瘤几乎无抑制作用,吸入剂给药各组与华蟾素注射液组(市售)、蟾皮注射液 A 组、蟾皮注射液 B 组、生理盐水组的抑瘤率有显著性差异($P<0.05$)。