

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl<sup>6</sup>

A61K 31/35

A61K 9/22

A61K 47/44

[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 92105395.9

[45]授权公告日 1999 年 12 月 1 日

[11]授权公告号 CN 1046852C

[22]申请日 92.6.30 [24]颁证日 99.10.9

[21]申请号 92105395.9

[30]优先权

[32]91.7.23 [33]US [31]734,430

[73]专利权人 美国氰胺公司

地址 美国新泽西州

[72]发明人 苏珊·曼奇尼·卡迪

威廉·戴维·斯蒂伯

菲利普·韦恩·海斯

玛丽·埃勒斯·德舍尔

库尔特·A·施温哈默

[56]参考文献

EP0257368 1988. 3. 2 A61K37/00

EP0329460 1989. 8.23 A61K31/365

审查员 安佩东

[74]专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 张恒康

权利要求书 1 页 说明书 11 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 对恒温动物非肠胃施用的微球组合物的制备方法

[57]摘要

本发明涉及一种稳定的微球体组合物,它含有:脂肪或蜡或它们的混合物;从 LL-F282492 $\alpha$ - $\lambda$  化合物、LL-F282492 $\alpha$ - $\lambda$  化合物的 23-氧代和 23-亚氨基衍生物、milbemycin 和阿弗米丁中选出的一种活性成分;一种油、半软脂、脂肪酸衍生物或它们的混合物;和一种抗氧化剂。本发明也涉及通过对恒温动物非肠胃道施用本发明的化合物,预防和治疗在恒温动物中由蠕虫、线虫、螨和内、外寄生节肢动物引起的感染的方法。

ISSN 1008-4274

1.一种对恒温动物非肠胃施用的微球体组合物的制备方法，其特征在于：

(a) 以重量计，把 1—50%从 LL-F282492 $\alpha$ - $\lambda$ 、F282492 $\alpha$ - $\lambda$  的 23-氧化或 23-亚氨基衍生物、米尔倍霉素和阿弗米丁中选出的一种化合物；0.05—10%抗氧化剂；0—20%随机选用的表面活性剂、盐、缓冲剂或它们的混合物；与 20—95%熔融的脂肪、蜡或它们的混合物混和；

(b) 加入 1—30%油、半软脂、脂肪酸衍生物或它们的混合物以形成熔融的混和物；

(c) 通过乳化、雾化、或离心盘加工熔融的混和物形成微球体；或冷却熔融的混和物并磨碎或研磨冷却好的混和物以形成微球体。

2.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于 (a) 步骤和 (b) 步骤可同时进行。

3.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于所述的化合物是从 23-(O-甲基肟)-F282492 $\alpha$  和 LL-F282492 $\alpha$  中选出的，所述的脂肪是三硬脂酸甘油酯，所述的油是中性三甘油酯油，所述的抗氧化剂是丁基化羟基甲苯，所述微球体组合物的重量平均直径是在约 25—300 微米范围内。

## 对恒温动物非肠胃施用的微球组合物的制备方法

大分子如 LL-F28249 $\alpha$ - $\lambda$  化合物、LL-F28249 $\alpha$ - $\lambda$  化合物的 23-氧代和 23-亚氨基衍生物、米尔倍霉素化合物和阿弗米丁化合物，对温血动物在肠胃外施用，对预防和治疗由于蠕虫、线虫、螨和內、外寄生节肢动物引起的感染是有用的。肠胃外施用的组合物在对动物施用前须进行消毒， $\gamma$  辐射是消灭微生物污染物的有效消毒方法。但是在辐射时，某些大分子如 LL-F28249 $\alpha$ - $\lambda$  化合物、LL-F28249 $\alpha$ - $\lambda$  化合物的 23-氧代和 23-亚氨基衍生物、米尔倍霉素化合物和阿弗米丁化合物会降解并失去大部分生物活性。 $\gamma$  辐射所引起的破坏和降解性的后果妨碍了  $\gamma$  辐射作为对某些含大分子的组合物的消毒方法的应用。

本发明的目的是提供稳定的组合物，它能被辐射，在对温血动物非肠胃施用，可防止和治疗由蠕虫、线虫、螨虫和內、外寄生节肢动物引起的感染和侵扰。

本发明的另一目的是提供一种在一段长时间内，把 LL-F28249 $\alpha$ - $\lambda$  化合物及它的 23-氧代和 23-亚氨基衍生物、米尔倍霉素化合物和阿弗米丁化合物引入至温血动物的血液中并在延长的时间内，保持一定药物浓度的方法。

本发明涉及能被辐射消毒而在肠胃外施用的稳定微球状组合物。此组合物含重量约 20%—95% 的脂肪或蜡或它们的混合物，约 1%—50% 的 LL-F28249 $\alpha$ - $\lambda$  化合物，LL-F28249 $\alpha$ - $\lambda$  化合物的 23-氧代或 23-亚氨基衍生物、米尔倍霉素化合物或阿弗米丁化合物，约 1%—30% 的油、半软脂或脂肪酸衍生物或它们的混合物，还有约

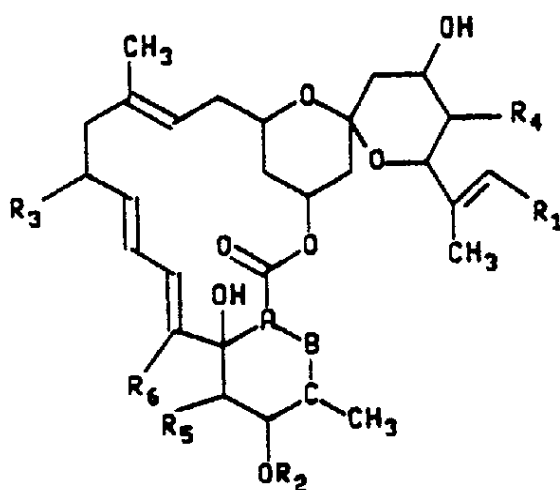
人们出人意料地发现本发明的微球组合物可被 $\gamma$ 射线消毒而不减低生物活性。

本发明的稳定微球组合物可通过分散在适于药物学和药理学的载体中并在肠胃外使用，且也可使分散于上述载体中的微球组合物释放缓慢。本发明也包括一种在一段延长的时间里把 LL-F28249  $\alpha$ - $\lambda$  化合物及它的 23-氧代或 23-亚氨基衍生物、milbemycin 化合物或阿弗米丁化合物引入温血动物血液中并保持在血液中药物的浓度水平的方法。

本发明较好的稳定微球组合物含重量为约 50%—90% 的脂肪或蜡或它们的混合物；约 5%—25% 的 LL-F28249  $\alpha$ - $\lambda$  化合物，它的 23-氧代或 23-亚氨基衍生物、milbemycin 化合物或阿弗米丁化合物；约 1%—20% 的油、半软脂、脂肪酸衍生物或它们的混和物和约 1%—5% 的抗氧化剂。

在 NRRL 存储, 存储登记号为 No.15773 的菌属中, 花青灰链霉菌 (*Streptomyces cyaneogriseus*) 的亚种 *noncyanogenus* 的发酵液中分离得到的系列化合物。定名为 LL-F28249  $\alpha$ - $\lambda$ 。

LL-F28249  $\alpha$ - $\lambda$  化合物以下面的结构式来代表:

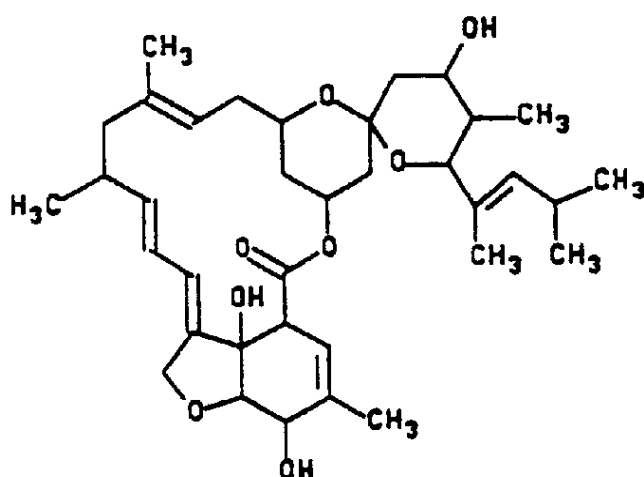
LL-F28249  $\alpha$ - $\lambda$

| LL-F28249  | R <sub>1</sub>                    | R <sub>2</sub>  | R <sub>3</sub>                  | R <sub>4</sub>                  | R <sub>5</sub> | R <sub>6</sub>     | R <sub>5</sub> +R <sub>6</sub> | A-B   | B-C   |
|------------|-----------------------------------|-----------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------|--------------------|--------------------------------|-------|-------|
| alpha(α)   | CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | H               | CH <sub>3</sub>                 | CH <sub>3</sub>                 |                |                    | -O-CH <sub>2</sub> -           | CH-CH | CH=C  |
| beta(β)    | CH <sub>3</sub>                   | H               | CH <sub>3</sub>                 | CH <sub>3</sub>                 |                |                    | -O-CH <sub>2</sub> -           | CH-CH | CH=C  |
| gamma(γ)   | CH <sub>3</sub>                   | CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub>                 | CH <sub>3</sub>                 |                |                    | -O-CH <sub>2</sub>             | CH-CH | CH=C  |
| delta(δ)   | CH <sub>3</sub>                   | CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub>                 | CH <sub>3</sub>                 | OH             | CH <sub>2</sub> OH |                                | CH-CH | CH=C  |
| epsilon(ε) | CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | H               | H                               | CH <sub>3</sub>                 |                |                    | -O-CH <sub>2</sub>             | CH-CH | CH=C  |
| zeta(ζ)    | CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>   | H               | CH <sub>3</sub>                 | CH <sub>3</sub>                 |                |                    | -O-CH <sub>2</sub>             | CH-CH | CH=C  |
| eta(η)     | CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | H               | CH <sub>3</sub>                 | CH <sub>3</sub>                 |                |                    | -O-CH <sub>2</sub>             | C=CH  | CH-CH |
| theta(θ)   | CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | H               | CH <sub>3</sub>                 | CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> |                |                    | -O-CH <sub>2</sub>             | CH-CH | CH=C  |
| iota(ι)    | CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | H               | CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub>                 |                |                    | -O-CH <sub>2</sub> -           | CH-CH | CH=C  |
| kappa(κ)   | CH <sub>3</sub>                   | CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub>                 | CH <sub>3</sub>                 | H              | CH <sub>3</sub>    |                                | CH-CH | CH=C  |
| lambda(λ)  | CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub>                 | CH <sub>3</sub>                 |                |                    | -O-CH <sub>2</sub>             | CH-CH | CH=C  |

本发明的稳定微球组合物 LL-F28249  $\alpha$ - $\lambda$  化合物的 23-氧代和 23-亚氨基衍生物在美国专利 No. 4,916,154 中已有所揭示, 在此作为参考结合加以应用。

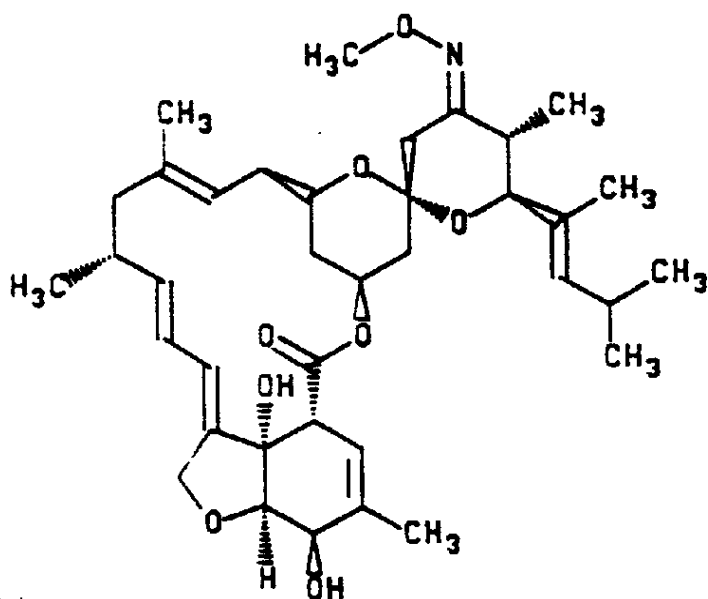
本发明微球组合物较好的为 LL-F28249  $\alpha$ - $\lambda$  化合物和它的 23-亚氨基衍生物, 结构式如下:

F28249 $\alpha$



和

23-(O-甲基肟)-F28249 $\alpha$



适于本发明所用的蜡和脂类其熔点应高于 40℃。此蜡可以根据

第十一版 Hawley 的《浓缩化学词典》(The Condensed chemical Dictionary) 所定义的来描述, 它是一低熔点有机混和物或高分子量化合物, 室温下为固体, 除不含甘油酯外, 成份通常与脂类和油类相同。有些是烃; 还有些是脂肪酸的酯和醇。这些化合物包括饱和或不饱和长链  $C_{10}$ — $C_{24}$  的脂肪酸、醇、酯、盐、醚或它们的混和物。它们在类脂类中分级。蜡是热塑性的, 但由于它不是高聚物, 所以不认为属塑料范畴。通常的特征是拒水性。质地光滑, 无毒、无有害颜色和气味。它可燃并具有良好的绝缘性能, 能溶于大多数有机溶剂并不溶于水。主要类型如下:

### I. 天然的

1. 动物 (蜂蜡、羊毛脂、紫胶蜡、中国虫蜡)
2. 植物 (巴西棕榈, 小烛树蜡, 月桂子、甘蔗)
3. 矿物 (a) 化石或地蜡 (地蜡 (ozocerite)、纯地蜡、耦煤蜡)  
(b) 石油蜡 (石蜡、微晶蜡) (矿渣腊或鳞状腊)

### II. 合成的

1. 乙烯多聚物和多羟基醚-酯化合物 (“聚乙二醇”)
2. 氯化萘 (“卤蜡”)
3. 通过费-托 (Fischer-Tropsch) 合成的烃类

本发明的脂可如第十一版 Hawley 的《浓缩化学字典》(The Condensed chemical dictionary) 中描述的, 用一高级脂肪酸如硬酯酸和棕榈酸的甘油酯。这种酯和它们的混和物在室温下为固体, 且显示晶体结构, 猪脂和牛脂就是例子。术语“脂肪”(fat) 通常特指三甘油酯, 脂类 (Lipid) 是把所有的脂都包括在内。

脂肪最好是由长链  $C_{10}$ — $C_{14}$  脂肪酸的单-、双-, 或三甘油酯组成, 单、双或三甘油酯最好由硬酯酸酯类、棕榈酸类、月桂酸酯类、亚油酸酯类、亚麻酸酯类、油酸酯类和其余或它们的混和物组成, 熔点高于  $50^{\circ}\text{C}$  就更好了。甘油三硬酯酸酯是最适用的脂肪。另外脂肪酸的亲

油盐如硬脂酸镁等也可适用。

本发明的油、半软脂或脂肪酸衍生物是可溶于熔融硬脂中的物质，当溶于熔融的硬酯或蜡被雾化后，它们可促进硬脂晶体在室温或接近室温下从较不稳定状态向较稳定状态的物理转化。较佳地这种油或半软脂可含有混和物或带有短到中级脂肪酸的链长，即  $C_2$ — $C_{18}$  的相对纯态的单-，双-或三甘油酯。半软脂指的是熔点在或接近室温的甘油酯，脂肪酸衍生物包含短的和中级的链长脂肪酸、醇、酯、醚、盐或它们的混和物。由于甘油酯油和半软脂是身体的生理成份，且有生物相容性，可生物降解，所以它们尤其适用。

本发明所用的抗氧化剂可用 Hawley 的第十一版《浓缩化学词典》(The Condensed Chemical Dictionary) 中提出的来描述，它作为一种有机化合物被分别加入到橡胶、自然脂肪和油、食物产品、汽油和润滑油中以阻止相应的氧化、变质、酸败和胶质形成。橡胶抗氧化剂通常是一种芳香胺如二- $\beta$ -萘基对苯二胺和苯基- $\beta$ -萘胺。许多抗氧化剂是取代酚化合物（丁基化的羟基苯甲醚），二-叔丁基-对甲酚和榕酸丙酯）。食物抗氧化剂在低浓度是有效的，它不仅阻酸败，而且通过把主要的脂肪酸和维生素的破坏降至最低程度而保持其营养价值。

出人意料的是本发明的抗氧化剂可使所述的微球成份用  $\gamma$  射线消毒，并在不明显损失生物活性下保持半衰期。在不存在抗氧化剂时，大分子例如 LL-F28249  $\alpha$ - $\lambda$  化合物、LL-F28249  $\alpha$ - $\lambda$  化合物的 23-氧代和 23-亚氨基衍生物、milbemycin 化合物和阿弗米丁化合物在被辐射时要降解并失去大部分生物活性。适于本发明微球组合物的抗氧化剂包括丁基化的羟基甲苯，丁基化的羟基苯甲醚，叔-丁基羟基喹啉，榕酸丙酯， $\alpha$  维生素 E，6-乙氧基-1,2-二氢-2,2,4-三甲基喹啉等，较好的抗氧化剂是丁基化的羟基甲苯。

本发明的稳定微球在一药物学和药理学适用的溶液中分散，得

到肠胃外使用的缓释组合物。载体可以是水缓冲系统或油系统。油系统可从动物或植物源或合成得到，较佳的载体包括中性单-，双-或三甘油液体或它们的混合物。中性油中不含剩余酸。本发明适用的载体还包括水系统如缓冲的食盐水，有机溶剂如 1,2-亚乙基二醇和醇；以及和水不混溶液体如油，取决于所适用活性组份的溶解性。

赋形剂如表面活性剂、盐类、缓冲剂或它们的混和物也被包括在本发明的范围中。本发明适用的所述赋形剂用量为约 0.1%—20%（重量）。

通过给动物注射在一适当载体中的本发明组合物可使 LL-F28249  $\alpha$ - $\lambda$  化合物及它的 23-氧化和 23-亚氨基衍生物、milbemycin 化合物和阿弗米丁化合物在血液达到一定浓度并能保持一段延长的时间。保持血液中活性化合物的浓度水平与预防或治疗温血动物的蠕虫、线虫、螨和内、外寄生节肢动物感染是能联系起来的。此保持的水平是活性成份缓慢释放的一个标志。本发明把组合物引入至动物血流。并保持 LL-F28249  $\alpha$ - $\lambda$  化合物及它的 23-氧化和 23-亚氨基衍生物，milbemycin 化合物和阿弗米丁化合物在动物血流中的浓度。

本发明组合物通过肠胃外施用于温血动物，如狗、猫、牛、绵羊、马、猪、山羊、家禽等时，对防止和治疗蠕虫、线虫、螨虫和内、外寄生节肢动物引起的感染及困扰有很高效率。

蠕虫病是一种动物普遍疾病，在整个世界中造成了很大经济损失。最常见的蠕虫是线虫组。线虫可在肠道、心脏、肺、血管和动物其它身体组织中发现，是被感染动物的贫血、失重和营养不良的主要原因。它对被寄生器官的组织和壁都造成严重危害，如不加治疗，可导致被感染动物的死亡。

线虫最常见为反刍类的感染剂，包括常见于皱胃中的血矛线虫

属和胃线虫属；常见于肠道中的雨百合属、毛圆线虫属和细颈线虫属和见于肺中的网尾线虫属。非反刍动物的重要线虫包括肠中的弓蛔虫属和钩口线虫属；狗心中的恶丝虫属；猪肠中的蛔虫属；家禽肠中的鸡蛔虫属和异刺线虫属以及马类的大、小圆虫类。因此，本发明治疗动物以阻止它们被上述线虫感染或减少、控制这些动物中的感染剂的繁殖有着重要的令人希望的优点。

本发明除可控制蠕虫的线虫外，还可控制节肢动物内寄生感染比如牛皮蝇和外寄生感染比如动物痒螨疹癬。

本发明的微球可这样来制备：把活性组份，抗氧化剂和其它赋形剂与熔融的脂类、蜡或它们的混和物混合，再加入油、半软脂、脂肪酸衍生物或它们的混合物，然后通过各种技术，例如乳化或雾化上述得到的混和物或把成份的混和物和溶解的脂、蜡或它们的混和物进行机械处理并冷却。例如用一离心盘进行而得到微球体。或者，活性成份的混和物、抗氧化剂、赋形剂和脂类、蜡和它们的混和物和油可被冷却至固态，然后进行比如粉碎、研磨等的过程。微球体特别是脂肪微球体，可达1000微米的直径，对肠胃外施用最好重量平均尺寸范围为约25微米到300微米。

为把本发明说明得更清楚，下列实施例主要是更具体地描写其细节。除权利要求书所规定的以外，本发明不在此作限定。

### 实施例 1

非肠胃使用的23-(O-甲基肟)-F28249 $\alpha$ 微球体的制备。

将三硬脂酸酯甘油(72.8g)和三甘油酯油(8.7g)放在一烧杯中并在一热板上加热到85°—90°，再将23(O-甲基肟)-F28249 $\alpha$ (12.0g)和丁基化羟基甲苯(1.1g)在不停地搅拌下加入，直到23-(O-甲基肟)-F28249 $\alpha$ 和丁基化羟基甲苯溶解。然后，溶液被倒入实验室喷射成球机的进料杯中。进料杯、输料管、供气管和一两液体喷雾嘴用热空气使在85°—90°保持恒温。用1磅/平方吋的压力将液

体送至喷嘴，雾化空气压力是 10 磅/平方吋(psi)。雾化的混和物用旋风分离器从球舱的出口收集。微球体然后被筛除大于 180 微米的颗粒，那些大于 180 微米的微球体被收集再循环。

从上述过程得到的微球体有下列的成份：

|                            | % (W/W) |
|----------------------------|---------|
| 23-(O-甲基肼)-F28249 $\alpha$ | 12.0    |
| 三硬脂酸甘油酯                    | 78.2    |
| 三甘油酯油                      | 8.7     |
| 丁基化羟基甲苯(BHT)               | 1.1     |

## 实施例 2

### 微球体对辐射的稳定性

将下面列出的微球体组合物放入 20ml 的血清小管瓶中，其中两个用干燥氮气冲洗去氧气，管瓶然后用合成橡胶隔膜和卷曲铝帽封住。接着，微球体在环境温度下用钴 60 ( $\gamma$  射线辐射) 以下表 I 中指定的辐射剂量被辐射。微球体被提取至乙腈/水(1:1) 中，用高效液相色谱法分析 23-(O-甲基肼)-F28249 $\alpha$ ，实验结果如下表 1 所示。

### 微球组合物

| 成份                         | A <sup>1</sup><br>(%W/W) | B <sup>2</sup><br>(%W/W) |
|----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 23-(O-甲基肼)-F28249 $\alpha$ | 12.0                     | 12.0                     |
| 甘油三硬脂酸酯                    | 79.2                     | 78.2                     |
| 中链的三甘油酯油                   | 8.8                      | 8.7                      |
| 丁基化羟基甲苯                    | 0                        | 1.1                      |

1. 除不使用乙基化羟基甲苯之外，按实施例 1 的过程制备。

2. 实施例 1 中制备的微球组合物

表 I

从辐射后的微球组合物回收 23-(O-甲基肼)-F28249 $\alpha$  的百分率  
成份

| <u>辐射量(mrad)</u> | <u>A</u>  |           | <u>B</u>  |           |
|------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|                  | <u>空气</u> | <u>氮气</u> | <u>空气</u> | <u>氮气</u> |
| 0                | 94.5      | 94.5      | 96.5      | 96.5      |
| 0.55             | 68.5      | 92.5      | 95.0      | 96.5      |
| 2.1              | 27.5      | 90.5      | 96.0      | 95.0      |

此实验表明，在空气或氮气中用  $\gamma$  射线辐射时，微球体中存在的活性成份（没有 BHT 时）有降解，当 BHT 在配方中时，活性组份是稳定的。

### 实施例 3

#### 本发明组合物对狗的持续释放

狗被分成每三条或四条的组，整个试验中，所有狗都喂同样饲料配份。狗被称重并且注射入一组合物，此组合物含有标准盐溶液 (2ml)，其中溶入 2.5% 的甲基纤维素，以及将实施例 1 的组合物微球体混和在内，所用剂量为达到每公斤体重所要求的有效成份量。狗血液中的 23-(O-甲基肼)-F28249 $\alpha$  浓度定期用 HPLC 技术测得。本实验结果如下表 I 所示，它表明了本发明组合物对引入和保持血液中 23-(O-甲基肼)-F28249 $\alpha$  浓度的有效性。

表            II

对狗试验时 23-(O-甲基肼)-F28249 $\alpha$

在血浆中的平均浓度 (用 HPLC 测, 单位 ppb)

| <u>时间</u>  | <u>剂量 (mg/kg)</u>    |                        |
|------------|----------------------|------------------------|
| <u>(天)</u> | <u>5<sup>1</sup></u> | <u>1.7<sup>2</sup></u> |
| 1          | 111                  | 39                     |
| 3          | 197                  | 80                     |
| 8          | 340                  | 100                    |
| 15         | 133                  | 50                     |
| 21         | 80                   | 29                     |
| 28         | 68                   | 21                     |
| 35         | 51                   | 14                     |
| 42         | 33                   | 10                     |
| <u>49</u>  | 20                   | 7                      |

1.    3 条狗

2.    4 条狗