



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1925867 B

(45) 授权公告日 2013.01.16

(21) 申请号 200480034146.2

代理人 楼仙英

(22) 申请日 2004.11.19

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

A61K 38/21 (2006.01)

0350888 2003.11.21 FR

A61K 9/10 (2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2006.05.22

WO 9918142 A, 2003.11.06, 说明书第1页, 第21页.

(86) PCT申请的申请数据

WO 0137809 A, 2003.02.26, 说明书第1、6-10、15-20页.

PCT/FR2004/050607 2004.11.19

(87) PCT申请的公布数据

WO 0309727 A, 2003.11.16, 说明书1、7、9、14页.

W02005/051418 FR 2005.06.09

(73) 专利权人 弗拉梅技术公司

WO 0030618 A, 2000.06.02, 说明书第1页, 4-8页, 13页.

地址 法国韦尼雪

WO 02078677 A, 2002.10.10, 说明书1、9-10、12-16、24页.

(72) 发明人 索菲·比尼翁 雷米·梅吕埃克斯

CN 1183040 A, 1998.05.27, 说明书1-10页.

奥利维耶·苏拉

审查员 豆波建

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

权利要求书 4页 说明书 19页 附图 1页

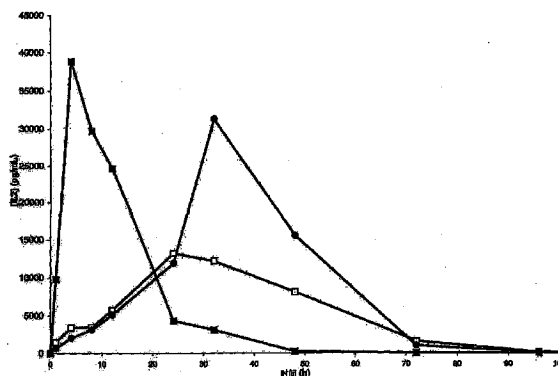
(54) 发明名称

引起。

持续释放的白细胞介素的药物制剂及其治疗学应用

(57) 摘要

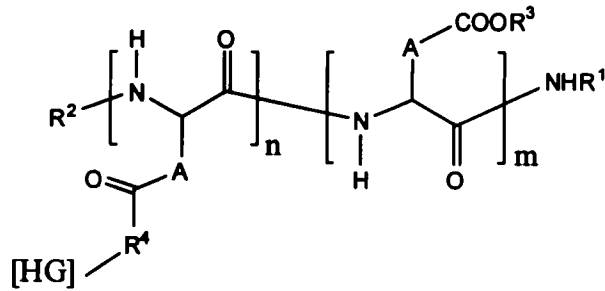
本发明涉及新颖的、基于稳定的、流态溶液胶体悬浮物的持续释放的白细胞介素 (IL) (和一种或多种其他可能的活性物质) 的药物配方, 本发明还涉及这些配方的应用, 尤其在治疗学上的应用。本发明的目标在于提供一种持续释放白细胞介素 (和一种或多种其他可能的活性成分) 的液体药物配方, 该配方在胃肠外注射后, 可以显著地延长 IL 在体内的释放时间, 同时减少 IL 的血浆浓度峰, 而且, 所述配方可以稳定存储, 并且是生物相容的, 可生物降解, 无毒和非致免疫性的, 并具有良好的局部耐受性。本发明配方是基于携带疏水基 (HG) 的水溶性可生物降解的聚合物的超微化颗粒的低粘度水溶胶体悬浮物, 所述颗粒非共价地与至少一种白细胞介素 (和一种或多种其他可能的活性成分) 结合, 并在注射位点形成胶凝体沉着物, 该胶凝由存在于生理介质的蛋白质而



1. 持续释放白细胞介素的液体药物制剂, 该制剂:

- 在大气环境下是液体,
- 在生理温度和 / 或生理 pH 和 / 或有下列物质存在情况下也是液体:
 - ▶处于生理浓度的生理电解质,
 - ▶和 / 或至少一种表面活性剂,

●且包含基于平均流体动力学直径为 1 到 500 纳米的颗粒的 20°C 时粘度小于或等于 5Pa. S 的水性胶体悬浮液, 所述颗粒由水可溶性可生物降解的聚氨基酸 (PO) 组成, 其单元选自谷氨酸根、天冬氨酸根及其组合, 且所述 PO 由以下通式 (I) 限定:



(I)

其中:

■ R^1 是 H、C2 到 C10 的直链烷基或 C3 到 C10 的支链烷基、苄基、末端氨基酸单元或 $-R^4-[HG]$;

■ R^2 是 H、C2 到 C10 的直链酰基或 C3 到 C10 的支链酰基基团, 焦谷氨酸根或 $-R^4-[HG]$;

■ R^3 是 H 或阳离子单元, 选自:

- 金属阳离子, 选自包括钠, 钾, 钙和镁的亚组,
- 有机阳离子, 选自亚组:

- 精氨酸阳离子,
- 聚乙烯亚胺阳离子,
- 聚赖氨酸阳离子,

■ R^4 是直接键或基于 1 到 4 个氨基酸单元的“间隔基”;

■ A 独立地是基团 $-\text{CH}_2-$ 或 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$;

■ $n/(n+m)$ 定义为摩尔接枝率, 为 1 到 25mol%;

■ $n+m$ 为 10 到 1000;

■ HG 来源于由维生素 E 形成的醇前体;

所述颗粒非共价地与至少一种活性成分 AP 连接, 且所述悬浮液的分散介质基本上由水组成,

其特征在于, 其 [PO] 的浓度是:

■ $[PO] \geq 0.9 \cdot C1$,

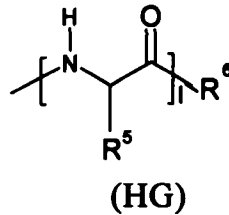
其中, C1 是 PO 颗粒的“诱导胶凝化”浓度, 以 IG 试验测定。

2. 如权利要求 1 所述的制剂, 其特征在于, 所述制剂包括至少另一种活性成分 AP。

3. 如权利要求 1 所述的制剂, 其特征在于, 所述白细胞介素在水溶液中。

4. 如权利要求 1 所述的制剂, 其特征在于, 该 PO 的 HG 基团彼此独立, 为下式的单价基

团：



其中，

-R⁵ 是甲基（丙氨酸），异丙基（缬氨酸），异丁基（亮氨酸），仲丁基（异亮氨酸）或苄基（苯基丙氨酸）；

-R⁶ 是含 6 到 30 个碳原子的疏水基团；

-l 为 0 到 6。

5. 如权利要求 4 所述的制剂，其特征在于，该 PO 的所有或部分疏水基 R⁶ 独立选自以下基团：

■ 含 6 到 30 个碳原子且含至少一个杂原子和 / 或至少一个不饱和单元的直链或支链烷氧基，所述杂原子选自 O 和 / 或 N 和 / 或 S，

■ 含 6 到 30 个碳原子的烷氧基，其具有一个或多个稠合碳环，且含至少一个不饱和单元和 / 或至少一个杂原子，所述杂原子选自 O 和 / 或 N 和 / 或 S，

■ 含 7 到 30 个碳原子且含至少一个不饱和单元和 / 或至少一个杂原子的烷氧芳基或芳氧烷基，所述杂原子选自 O 和 / 或 N 和 / 或 S。

6. 如权利要求 1 所述的制剂，其特征在于，该 PO 由 α-L- 谷氨酸根或 α-L- 谷氨酸均聚物组成。

7. 如权利要求 1 所述的制剂，其特征在于，该 PO 由 α-L- 天冬氨酸根或 α-L- 天冬氨酸均聚物组成。

8. 如权利要求 1 所述的制剂，其特征在于，该 PO 由 α-L 天冬氨酸根 / α-L- 谷氨酸根或 α-L- 天冬氨酸 / α-L- 谷氨酸共聚物组成。

9. 如权利要求 1 所述的制剂，其特征在于，PO 的分子量为 2000 到 100,000g/mol。

10. 如权利要求 4 所述的制剂，其特征在于，PO 的接枝的疏水基团 R₆ 来自于由维生素 E 形成的醇前体，其中：

◆ $1\% \leq [n/(n+m)] \times 100 \leq 10\%$ ，

◆ n+m 为 100 到 400。

11. 如权利要求 10 所述的制剂，其特征在于，[PO] 的浓度为 15 到 50mg/ml。

12. 如权利要求 1 所述的制剂，其特征在于，不结合所述颗粒的白细胞介素 [非结合白细胞介素] 的重量百分率%是：

□ [非结合白细胞介素] ≤ 1。

13. 如权利要求 1 所述的制剂，其特征在于，白细胞介素为白细胞介素 2。

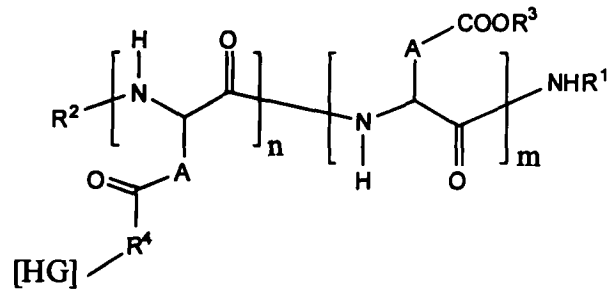
14. 如权利要求 1 所述的制剂，其特征在于，除了白细胞介素的其他活性成分是蛋白质，糖蛋白，与一个或多个聚亚烷基二醇链结合的蛋白质，聚糖，脂糖，寡聚核苷酸，多核苷酸或肽，这些其他活性成分选自血红蛋白，细胞色素，白蛋白，干扰素，细胞活素，抗原，抗体，促红细胞生成素，胰岛素，生长激素，凝血因子 VIII 和 IX，造血刺激因子，以及它们的混

合物。

15. 如权利要求 1 所述的制剂,其特征在于,该制剂可以胃肠外注射。

16. 如权利要求 1 所述的制剂,其特征在于,该制剂用于制备用于胃肠外给药的药物。

17. 持续释放白细胞介素的液体药物制剂,该制剂包含至少一种白细胞介素和基于平均流体动力学直径为 1 到 500 纳米的颗粒的 20°C 时粘度小于或等于 5Pa. S 的水性胶体悬浮液,所述颗粒由水可溶性可生物降解的聚氨基酸 (PO) 组成,其单元选自谷氨酸根、天冬氨酸根及其组合,且所述 PO 由以下通式 (I) 限定:



(I)

其中:

■ R^1 是 H、C2 到 C10 的直链烷基或 C3 到 C10 的支链烷基、苄基、末端氨基酸单元或 $-R^4-[HG]$;

■ R^2 是 H、C2 到 C10 的直链酰基或 C3 到 C10 的支链酰基基团,焦谷氨酸根或 $-R^4-[HG]$;

■ R^3 是 H 或阳离子单元,选自:

- 金属阳离子,选自包括钠,钾,钙和镁的亚组,

- 有机阳离子,选自亚组:

● 精氨酸阳离子,

● 聚乙烯亚胺阳离子,

● 聚赖氨酸阳离子,

■ R^4 是直接键或基于 1 到 4 个氨基酸单元的“间隔基”;

■ A 独立地是基团 $-CH_2-$ 或 $-CH_2-CH_2-$;

■ $n/(n+m)$ 定义为摩尔接枝率,为 1 到 25mol%;

■ $n+m$ 为 10 到 1000;

HG 来源于由维生素 E 形成的醇前体;

所述颗粒是非共价地与所述白细胞介素连接,其特征在于:

◆ 混悬液的分散介质基本上由水组成,

◆ 其 [PO] 的浓度是:

■ $[PO] \geq 0.9 \cdot C_1$,

其中, C_1 是 PO 颗粒的“诱导胶凝化”浓度,以 IG 试验测定;以允许该制剂被胃肠外注射,并在体内形成胶凝沉着物,这种胶凝沉着物的形成:

- 一方面,至少部分地由至少一种存在于体内的生理蛋白质所引起,

- 另一方面,能够使白细胞介素在给药后在体内的释放时间得以延长和控制至 24 小时以上,

- ◆所述制剂在注射条件下是液体，
- ◆且所述制剂在生理温度和生理 pH 或在有下列物质存在情况下仍是液体：
 - 处于生理浓度的生理电解质，
 - 或至少一种表面活性剂。

持续释放的白细胞介素的药物制剂及其治疗学应用

技术领域

[0001] 本发明涉及新颖的、基于稳定的、流态溶液胶体混悬液的持续释放的蛋白质活性成分的药物制剂,即白细胞介素(IL),本发明还涉及这些制剂在治疗学上的应用。这些活性药物制剂对人类和动物均有效。

背景技术

[0002] 白细胞介素是一组属于细胞因子家族的蛋白质。它们具有调节炎症反应和免疫反应的众多活性。然而,它们的主要作用是活化和诱导 T 淋巴细胞增殖。IL-1, IL-2, IL-11 和 IL-12 是该家族的重要成员之一。例如,IL-2 通过抗原激活 T 淋巴细胞而产生。IL-2 的用途在于激活其他的 T 淋巴细胞,以启动它们的活化作用和分化作用,从而调节细胞介导的免疫反应。

[0003] 白细胞介素用于治疗学,但是它们为众人所熟知的毒性是中断治疗的主要原因。例如,就 IL-2 来说,在临床使用过程中,观察到的主要副作用为发烧,恶心,腹泻,皮肤反应,关节疼痛和情感淡漠。在一些病例中,患者需要住院治疗以得到特护,并且,有人指出,在这些罕见的病例中,IL-2 注射剂和患者的死亡有关。

[0004] 撇开 IL 的毒性不谈,持续释放的治疗用蛋白质(白细胞介素为代表)的另一个需要考虑的因素是,要尽可能地确保患者的血浆蛋白质浓度,使之接近健康者的值。

[0005] 这个目标因为 IL 在血浆里存在的时间短而不能实现,因此必须重复注射 IL,而这样的作法是很受限制的。于是,治疗用蛋白质的血浆浓度具有“锯齿”形,特点是具有高浓度的峰和极低浓缩的谷。由于治疗用蛋白质的如白细胞介素等等(更精确的说,是白细胞介素 IL2)具有高毒性,浓度峰大大高于健康受试者的基础浓度,而具有非常显著的有害效应。另外,浓度谷又低于治疗所必需的浓度,所以患者得到的是不良的治疗效果,而承受的是严重的、长期的副作用。

[0006] 此外,为保证患者的血浆白细胞介素浓度接近治疗的理想值,所讨论的治疗用蛋白质的药物制剂必须是持续释放的,以限制血浆浓度随着时间的变化。

[0007] 而且,这个活性制剂优选应该符合以下为所属领域的技术人员所熟知的规范:

[0008] 1- 持续释放一种或多种活性的和非变性的(未修饰的)白细胞介素,以使血浆浓度保持在治疗学水平,

[0009] 2- 可充分流动的液态,用于容易地注射,并可在滤过器上通过滤过作用除菌,该滤过器的孔径小于或等于 0.2 微米,

[0010] 3- 稳定的液态,

[0011] 4- 生物适应性和生物可降解性,

[0012] 5- 无毒,

[0013] 6- 非致免疫性,

[0014] 7- 优良的局部耐受性。

[0015] 现有技术已经建议了一些方法,力求实现这些目标。

[0016] 在第一个方法中,将天然的治疗用蛋白质与一个或多个聚合物链共价连接,或与蛋白质例如人血清白蛋白(HSA)共价连接。经过这样改性的蛋白质和它的受体具有弱的亲和力,并且它在总循环中的半衰期可观地提高了。从而,血浆蛋白质浓度峰和谷之间的变化幅度可观地降低了。因此,在它的专利US-B-4766106里,Cetus建议将聚氧乙烯链与白细胞介素2连接,以提高它在血浆中的溶解度和半衰期。同样地,Human Genome Science建议(US-B-5876969)将白细胞介素与人血清白蛋白共价连接,以提高它们在血浆中的半衰期。这些对治疗用蛋白质的化学修饰的步骤通常具有两个主要的缺点。第一,从长远观点来看,这些蛋白质(如今不再是人类蛋白质)的不可逆转的改性可以导致毒性和致免疫问题。第二个缺点源于,白细胞介素IL2经这样改性后,生物活性的部分损失。

[0017] 第二个方法建议通过使用包含至少一种聚合物和一种活性成分的制剂来提高活性周期,这种制剂在室温和大气环境下为液体,是可注射的,并且在注射后变得更加粘稠,例如,在pH和/或温度改变的效果之下。

[0018] 在这种情况下,美国专利US-B-6143314公开了一种用于活性成分控释的有机聚合物溶液,该溶液在注射后形成一种固体植入物。该溶液包含:

[0019] (A) 重量百分比10到80%的热塑性聚合物基质,该基质是生物相容的,可生物降解的和可溶于水或生理液体(例如,一种聚乳和/或聚羟基聚合物);

[0020] (B) 有机溶剂,例如N-甲基吡咯烷酮,其分散在生理液体中;

[0021] (C) 活性成分(AP);

[0022] (D) 最后,重量百分比1到50%的控释剂,其由聚乳-羟基/聚乙二醇型的嵌段共聚物组成。

[0023] 经注射后,(B)散布或分散在生理液体中。(A)形成包封(C)的植入物,由于它不是共价结合到(A)或(D)上,因此有效成分在体内缓慢释放。

[0024] 这个方法的主要缺点是有机溶剂(B)的使用,它有可能使活性成分(C)(例如,治疗用蛋白质)变性以及对患者产生毒性。另外,聚合物(A)在体内水解产生的酸剂会引起局部耐受性的问题。

[0025] PCT申请WO-A-99/18142和WO-A-00/18821涉及一种聚合物水溶液,其包含溶解状态或胶体形态的活性成分,可用于恒温动物,特别是以注射方式,并且,由于生理温度高于它们的胶凝点,它们在体内形成一种活性成分(例如,胰岛素)的胶凝体沉淀。以这种方法成形的胶凝体以持续方式释放活性成分。这些特殊的可生物降解的聚合物是ABA或BAB三嵌段,其中A=聚乳-羟基共聚物(PLAGA)或聚乳聚合物(PLA),B=聚乙二醇。这些三-嵌段共聚物的液体向胶凝体的转变温度例如为36,34,30和26°C。根据美国专利US-B-6143314的聚合物(A),这些ABA或BAB三-嵌段共聚物在体内水解产生的酸剂不具有适当的局部耐受性。

[0026] PCT申请WO-A-98/11874描述的药物制剂包括一种脂性活性成分,一种胶凝聚合物(Gelrite®=脱乙酰基的洁冷胶或乙基羟基植物纤维质)和一种表面活性剂。聚合物/表面活性剂之间的相互影响,和以生理浓度存在的电解质,例如Ca⁺⁺离子,就聚合物**Gelrite®**来说,导致形成包含聚合物/表面活性剂聚结物,脂性活性成分非共价地与其结合。这个制剂计划局部给药到目标器官上(例如眼睛)。聚结物/活性成分结合体在位形成,使得活性成分缓慢释放到目标器官中。

[0027] 第三种方法力求在保留蛋白质的生物活性的同时延长它的活性时间，该方法使用一种非变性治疗用蛋白质，并将它加入到基于生物相容的聚合物的微球或植入物中。美国专利 US-B-6500448 和美国专利申请 US-A-2003/0133980 特别阐明了这种方法，其中描述了一种持续释放人生长激素 (hGH) 的组合物，该组合物中的激素蛋白质首先与一种金属络合而稳定，然后分散到一种生物相容的聚合母体中。这种生物相容的聚合物可以是聚交酯，聚乙醇酸交酯或聚(丙交酯-共聚-乙交酯)共聚体。该组合物可以以微球混悬液形式存在于羧甲基纤维素钠盐溶液中。这个方法有一些缺点：首先，在微球制备过程中，蛋白质接触到有可能使之变性的有机溶剂。其次，该微球很大(1 到 1000 微米)，用它做成注射剂以及在过滤器上灭菌时均受到了限制。最后，当聚合物在原位水解时，会出现局部耐受性的问题。

[0028] 第四种方法发展了治疗用蛋白质(特别是白细胞介素)的形状，其由载有蛋白质的纳米微粒液体悬浊液组成。后者使在低粘度的液体溶剂中给药天然蛋白质成为可能。

[0029] 根据持续释放的第一种方法，持续释放的纳米微粒混悬液由脂质体混悬液组成，其中包封了未修饰的天然治疗用蛋白质。注射后，蛋白质从脂质体种缓慢释放，从而延长了蛋白质存在于总循环中的时间。例如，Frossen 等人在 *Cancer Res.*, 43, P. 546, 1983 的论文中描述了抗肿瘤剂包封在脂质体中，以提高它们的治疗作用。然而，药物的释放非常快，以致不能提供一种理想的持续释放。在美国专利 US-B-5399331 里，Liposome 公司建议通过将白细胞介素 2 与脂质体共价连接，来改药物的善体外释放时间，因此该方法与上述第一种“改性的蛋白质”方法具有相同的缺点。

[0030] 为了克服脂质体缺乏稳定性的缺点，同时保持低粘度液体纳米微粒制剂的优势，Flamel Technologies 建议采用持续释放的第二种方法，其中治疗用蛋白质与一水可溶性聚合物亦即“疏水修饰”(即通过连接疏水基来修饰)的纳米微粒结合。该聚合物优选选自携带疏水基团的聚氨基酸(聚谷氨酸或聚天冬氨酸)。

[0031] 这些用疏水基团修饰的聚合物的一个显著的优点是它们自发地在水中自我组装以形成纳米微粒。

[0032] 这些系统的另一个优点是这些治疗用蛋白质或肽自发地与疏水改性的聚合物的纳米微粒结合，该结合体是非共价的，并且这种结合不依靠表面活性剂或有可能使之变性的转变方法而自行发生。它不需要将蛋白质包封在微球里，正好相反，如美国专利 US-B-6500448 和美国专利申请 US-A-2003/0133980 公开的那样，这些疏水修饰的共聚氨基酸的纳米微粒在溶液中自发地吸附蛋白质，不需要对它们进行化学修饰或使它们变性，并且不需要经过剧烈的处理步骤例如“乳化”和“溶剂蒸发”。这种制剂可以存贮在液体或冻干态中。

[0033] 注射后(例如皮下注射)，这些载有蛋白质的纳米微粒混悬液在体内缓慢释放生物活性的非变性蛋白。专利申请 WO-A-00/30618 公开了这种蛋白质活性成分(AP)与聚谷氨酸或聚天冬氨酸的非共价结合。

[0034] 该专利申请尤其描述了 pH 为 7.4 的胶体混悬液，其包括人类胰岛素制剂与“疏水修饰”聚谷氨酸盐的纳米微粒的结合体。下表显示了 WO-A-00/30618 的实施例中使用的“疏水修饰”聚氨基酸以及得到的结合等级。

[0035]

实施例	聚合物	结合等级 (%)
1	聚[(谷酰胺-0-Na) _{0.63} -嵌段-(谷酰胺-0-甲基) _{0.37}]	55
2	聚[(谷酰胺-0-Na) _{0.66} -嵌段-(谷酰胺-0-乙基) _{0.34}]	26
3	聚[(谷酰胺-0-Na) _{0.65} -嵌段-(谷酰胺-0-十六烷基) _{0.35}]	36
4	聚[(谷酰胺-0-Na) _{0.88} -嵌段-(谷酰胺-0-十二烷基) _{0.12}]	> 90

[0036] 这些胶体混悬液包含 1.4mg/ml 的胰岛素制剂和 10mg/ml 的“疏水修饰”聚氨基酸。

[0037] 图 1 显示了 WO-A-00/30618 中的被上述混悬液向量化的胰岛素制剂在体内的释放时间是 12 小时。这个释放时间可以有益地增加。

[0038] 因此,即使上述 PCT 申请已经意味着相当大的进展,就上列的说明而论,它的技术含量可以进一步最佳化,特别是在延长白细胞介素在体内的释放时间方面。

[0039] 未公布的法国专利申请 n0.0207008(07/06/2002),0209670(30/07/2002),0350190(28/05/2003) 和 015064(03/10/2003) 涉及新颖的水可溶两性分子的聚氨基酸,包括天冬氨酸单元和 / 或谷氨酸单元,其中至少一些单元携带疏水的基团。如专利申请 WO-A-00/30618 公开的疏水修饰的聚氨基酸一样,这些新颖的聚合物原材料在水溶液介质中自发地形成纳米微粒的胶体混悬液,其能用于活性成分(胰岛素)的持续释放。这些材料是生物相容的和可生物降解的,蛋白质(尤其是治疗用蛋白质)自发地吸附在这些纳米微粒上,无需进行化学修饰或使其变性。

[0040] 基于这些聚氨基酸,上述专利申请进一步涉及新颖的药物,化妆品,食品或植物检疫的组合物。

[0041] 根据法国专利申请 n0.0207008 的两性分子的“疏水修饰”聚氨基酸包含携带疏水基团的天冬氨酸单元和 / 或谷氨酸单元,这些基团包含至少一个 α -维生素 E 单元,例如,聚谷氨酸或聚天冬氨酸与合成的或天然来源的维生素 E 连接。

[0042] 上述未公布的专利申请特别地公开了一种胶体混悬液,其包含聚合物 / 活性蛋白质缔合形成的纳米微粒,通过混合 1mg 聚谷氨酸盐与 α -维生素 E 和 7mg 的胰岛素,在 pH 为 7.0 的 1ml 水中连接而得。

[0043] 根据法国专利申请 n0.0209670 的两性分子的“疏水修饰”的聚氨基酸包含携带疏水基团的天冬氨酸单元和 / 或谷氨酸单元,该基团包含至少一个疏水单元,其经由一包含两个酰胺基的旋转键合(更精确地,经由赖氨酸或鸟氨酸型的“间隔基”)与天冬氨酸和 / 或谷氨酸连接。

[0044] 上述未公布的专利申请特别地公开了一种胶体混悬液,其包含聚合物 / 活性蛋白质缔合形成的纳米微粒,通过在 pH 为 7.4 的 1ml 水中,混合 1mg 经由赖氨酸“间隔基”的聚谷氨酸盐联棕榈酸和 200IU 的胰岛素(7.4mg) 而得。

[0045] 根据法国专利申请 n0.0350190 的两性分子的“疏水修饰”的聚氨基酸包含天冬氨酸单元和 / 或谷氨酸单元,它们中的一些携带至少一个基团,其经由“氨基酸”“间隔基”与天冬氨酸或谷氨酸单元相连,该“氨基酸”“间隔基”基于亮氨酸和 / 或异亮氨酸和 / 或 α -氨基异戊酸和 / 或苯丙氨酸,C6-C30 疏水基通过酯键和“间隔基”连接。

[0046] 上述未公布的专利申请特别地公开了一种胶体混悬液,其包含聚合物 / 活性蛋白质缔合形成的纳米微粒,通过在 pH 为 7.4 下,混合 10mg 聚谷氨酸盐联-亮氨酸-0C8、- α -氨基异戊酸-0C12 或 - α -氨基异戊酸胆甾醇基和 200IU/毫升水的胰岛素

(7.4mg) 的水溶液而得。

[0047] 法国专利申请 n0.0150641 公开了阴离子的,两性分子的直线型均聚氨基酸,其包括天冬氨酸单元或谷氨酸单元,其末端携带包含 8 到 30 个碳原子的疏水基。

[0048] 特别是,“疏水修饰”远端的均聚氨基酸可以是带苯丙氨酸 OC18/C18 末端或苯丙氨酸 OC18 α -维生素 E 末端的聚[谷氨酸 ONa]。上述未公布的专利申请还描述了一种胶体混悬液,包含聚合物/活性蛋白质缔合形成的纳米微粒,其通过在 pH 为 7.4 下混合 10mg 上述的一种聚合物和 200IU/毫升水的胰岛素(7.4mg) 而得。

[0049] 由上述未公布专利申请的混悬液“向量化”的胰岛素,在体内的释放时间可以有益地增加。

[0050] 上述涉及疏水修饰的聚氨基酸的纳米微粒的胶体混悬液的现有技术公开的制剂中,没有一个可以做到以下两点:

[0051] (I) 在胃肠外注射,尤其是皮下注射后,充分延长活性蛋白质的释放时间;

[0052] (II) 和/或注射包含蛋白质的制剂之后,减少活性蛋白质的血浆浓度峰。

发明内容

[0053] 在这种情况下,本发明的一个重要的目的是提供一种持续释放白细胞介素的液体药物制剂,该制剂可以克服现有技术的缺陷,特别是,在胃肠外注射(例如,皮下注射)之后,延长非变性白细胞介素在体内的释放时间。

[0054] 本发明的另一个重要目标是提供一种在体内持续释放白细胞介素的液体药物制剂,其可充分流动,以便容易地注射,并可在过滤器上通过滤过作用除菌,该过滤器的孔径小于或等于 0.2 微米。

[0055] 本发明的另一个重要的目的是提供一种在体内持续释放白细胞介素的液体药物制剂,其可于物理化学和生物学环境下稳定存储。

[0056] 本发明的另一个重要的目的是提供一种在体内持续释放白细胞介素的液体药物制剂,其具有至少一个以下特性:生物适应性,生物可降解性,无毒,非致免疫性,好的局部耐受性。

[0057] 本发明的另一个重要的目的是提供一种在体内缓慢持续释放白细胞介素的药物制剂,该制剂是一种低粘度的液态胶体混悬液,包括聚合物的超微化颗粒,其可以和至少一个白细胞介素自发连接,聚合物是一种携带疏水基的水可溶性可生物降解的聚合物。

[0058] 本发明的另一个重要的目的是提供一种在体内缓慢持续释放白细胞介素的药物制剂,该制剂是一种低粘度的液态的胶体混悬液,包括 PO 聚合物的超微化颗粒,其可以和至少一个白细胞介素自发连接,PO 聚合物是一种带有疏水基的水溶性生物降解聚合物。

[0059] 本发明的另一个重要的目的是提供一种在体内缓慢持续释放白细胞介素的药物制剂,该制剂是一种低粘度的液态的胶体混悬液,包括 PO 聚合物的超微化颗粒,其可以和至少一个白细胞介素自发连接,PO 聚合物可以由天冬氨酸单元和/或谷氨酸单元形成的聚氨基酸,这些单元中的至少一些携带基团,该基团包含至少一个疏水基(HG),此外,该聚合物是可生物降解的,水可溶性和两性分子的。

[0060] 本发明的另一个重要目标是提供涉及上述目的衍生产品和/或前体。

[0061] 特别是,本发明的在生理温度下保持低粘度的水溶液药物制剂,在方便地胃肠外

给药于人类或恒温哺乳动物后,令人惊讶地在体内形成胶凝沉着物,这种胶凝沉着物的形成,无需改变在进行胃肠外注射时的 pH 或温度,也无需分散在生理介质里有机溶剂。以这种方式形成的胶凝体显著地延长了 IL 在体内的释放时间。

[0062] 因此本发明涉及一种持续释放白细胞介素的液体药物制剂,该制剂包括一种基于水可溶性可生物降解的聚合物 (PO) 的超微化颗粒的低粘度的液态胶体混悬液,所述的聚合物携带疏水基 (HG),所述颗粒是非共价地与至少一个白细胞介素连接,并且可选择地与至少一个活性成分 (AP) 连接,其特征在于:

[0063] ◆混悬液的分散介质基本上由水组成,

[0064] ◆所述制剂能够用于胃肠外注射,并在体内形成胶凝沉着物,这种胶凝沉着物的形成:

[0065] ●一方面,至少部分地由至少一种存在于体内的生理蛋白质所引起,

[0066] ●另一方面,能够使活性成分在给药后在体内的释放时间得以延长 和控制至 24 小时以上,

[0067] ◆它在注射条件下是液体,

[0068] ◆它在生理温度和 / 或生理 pH 和 / 在有下列物质存在情况下仍是液体:

[0069] ▶处于生理浓度的生理电解质,

[0070] ▶和 / 或至少一种表面活性剂。

[0071] 优选地,该在体内的胶凝不是由 pH 和 / 或温度的改变而引起,也不是由一种或一种以上可能存在于注射剂制剂中的有机溶剂在体内的分散而引起。

[0072] 实际上,人们也许认为,存在于体内的处于生理浓度的生理蛋白质使得 PO 纳米微粒与至少一个白细胞介素发生凝聚。这样的胶凝例如出现在一个小时或以上,尤其是 24 小时,48 小时或 72 小时以上。

[0073] 在本发明的一个优选实施例中,[PO] 的浓度可以在胃肠外注射之后在体内形成胶凝体沉积物。

[0074] 根据所定义的一种模式,其并非基于如上所指出的体内特性,而是基于体外特性,本发明涉及一种持续释放白细胞介素和可选的其他活性成分的液体药物制剂,该制剂:

[0075] ●在大气环境下是液体,

[0076] ●在生理温度和 / 或生理 pH 和 / 或有下列物质存在情况下也是液体:

[0077] ▶处于生理浓度的生理电解质,

[0078] ▶和 / 或至少一种表面活性剂。

[0079] ●和包括一种基于超微化颗粒的水可溶性可生物降解的聚合物 PO 的低粘度的液态胶体混悬液,所述聚合物携带疏水基 HG,所述颗粒非共价地与至少一种活性成分 AP 连接,混悬液的分散介质基本上由水组成。

[0080] 其特征在于,[PO] 浓度定在足够的高位值,以使胃肠外注射后,在至少一种蛋白质存在的情况下,胶凝沉着物在体外形成。

[0081] 优选地,本发明液体药物制剂的特征在于,[PO] 的浓度是:

[0082] ■ $[PO] \geq 0.9 \cdot C_1$,

[0083] ■ 优选 $20 \cdot C_1 \geq [PO] \geq C_1$,

[0084] ■ 更优选 $10 \cdot C_1 \geq [PO] \geq C_1$,

[0085] 其中, C1 是 PO 颗粒的“诱导胶凝化”浓度, 以 IG 测试计算。

[0086] 胃肠外注射该制剂之后得到的胶凝沉着物大大延长了蛋白质的释放时间, 同时减少了白细胞介素的血浆浓度峰。

[0087] 与现有技术的制剂相比较, 尤其是与那些公开的 PCT 申请 W0-A-00/30618 和未公开的法国专利申请 n0. 0207008, 0209670, 0350190 和 0150641 种所描述的相比较, 白细胞介素的释放时间显著地增加了。

[0088] 因为所释放的白细胞介素仍是完全具有生理活性和非变性, 所以由本发明的制剂引起的白细胞介素在体内释放时间的延长更具有价值。

[0089] 任意地, 目前公开的白细胞介素是未修饰的或修饰的白细胞介素, 例如与一种或多种聚氧乙烯族连接而改性的白细胞介素。可以是白细胞介素家族中的蛋白质 IL-1, IL-2, IL-11, IL-12 和 IL-18。

[0090] 贯穿目前所公开的, 聚合物 PO 的超分子组合与至少一种白细胞介素连接或非连接, 或者可选地, 与至少一种其他的活性成分连接, 将被任意地称为“超微化颗粒”或“纳米微粒”。这相当于平均流体的直径在 1 和 500 纳米之间, 优选为 5 和 250 纳米之间的颗粒 (通过 Md 方法测量, 该方法在下文实施例中会有详细说明)。

[0091] 而且, 值得注意的是, 这些制剂是液体, 即, 有利地, 它们具有极低的粘度, 便于它们注射。它们仅在体内是胶凝体。

[0092] 根据本发明, 有利地, “液体”, “低粘度”, 或“极低粘度”相当于动力粘度, 其在 20°C 时小于或等于 5Pa. S。粘度测量的可参考方法例如, 在 20°C 下, 使用一种配备有一个圆锥面和盘子几何结构 (4cm, 2°) 的 AR1000 流速计 (TA 仪器公司)。粘度 ν 由 10S⁻¹ 的剪切梯度测得。

[0093] 因此本发明制剂的粘度可以在 1. 10⁻³ 和 5Pa. S 之间, 优选在 1. 10⁻³ 和 0. 8Pa. S 之间, 更优选在 1. 10⁻³ 和 0. 5Pa. S 之间。

[0094] 低粘度不仅使本发明的制剂有利于胃肠外注射, 特别是肌注或皮下注射, 而且有利于在较低的成本之下通过滤过作用灭菌, 如用具有 0. 2 微米孔径大小的灭菌过滤器灭菌。

[0095] 本发明的制剂在相当于室温的注射温度 (例如在 4°C 和 30°C 之间) 和生理温度下保持液态或低粘度。

[0096] 优选地, 本发明制剂是一种纳米微粒与一种或多种白细胞介素和可选的一种或多种活性成分相连的液态的胶体混悬液。这意味着, 根据本发明, 该混悬液的分散剂基本上由水组成。在实践中, 水按重量计算, 至少可以占制剂总重量的 50%。

[0097] 就本发明而言, 术语“蛋白质”表示蛋白质或肽, 该蛋白质或肽可以是未修饰的或修饰的, 例如, 连接一种或多种聚氧乙烯族。

[0098] “生理蛋白质”就本发明而言, 应被理解为恒温哺乳动物的内源性蛋白质和 / 或肽, 其存在于注射部位。

[0099] “生理温度”就本发明而言, 应被理解为恒温哺乳动物的生理温度, 即 37. 42°C 左右。

[0100] “生理 pH”就本发明而言, 应被理解为 pH 值在 6 和 7. 6 之间。

[0101] “胶凝体”就本发明而言, 应被理解为一种半固态, 本发明的液体剂型仅在生理蛋

白质存在下自发地转变为半固态,无需生理 pH 和 / 或生理温度的实质介入,和 / 或生理电解质 (如 Ca^{++}) 的存在,和 / 或可能存在于注射剂制剂种的有机溶剂在体内的分散 (或弥散)。

[0102] “生理电解质”就本发明而言,应被理解为存在于恒温哺乳动物中的任何种类的电解质 (例如 Ca^{++} 离子)。

[0103] “生理浓度”就本发明而言,应被理解为存在于所述的恒温哺乳动物的生理介质中的任何生理浓度。

[0104] 另外,本发明的制剂是非毒性的,具有好的局部耐受性和稳定的。

[0105] 此外,发明人提供了一种体外 IG 试验,供选择本发明优选的制剂量,确定 PO 在制剂中的适当浓度。

[0106] 根据本发明,用于测定胶凝体浓度 C1 的 IG 试验是定义临界浓度 C1 的参考试验,下文称为诱导的胶凝体浓度 C1,其根据本发明检定每个胶体制剂。

[0107] 测定诱导胶凝化体浓度 C1 的 IG 试验如下:

[0108] 浓度 C1 通过制备本发明放入可变更浓度的两性分子聚合物和固定含量的治疗用蛋白质来测定。为了这个目的,将增量的聚合物干燥粉溶解在去离子水里。溶液在 25°C 下静置 6 小时后磁力搅拌,与治疗用蛋白质的浓溶液混合。该治疗用蛋白质溶液的体积和浓度调准到制剂所需的蛋白质浓度 [例如,白细胞介素 2 (IL2) 2.5mg/ml]。

[0109] 以这种方法制备的胶体制剂,与 30mg/ml 的牛血清清蛋白 (BSA) 的浓缩水溶液混合,然后在 3000rpm 条件下离心 15 分钟。缓和搅拌混合物 24 小时,然后回收鉴定。

[0110] 用 TA 公司仪器制造的配备有一圆锥面和盘子几何结构 (直径 4cm,角度 1.59) 的 AR 1000 流速计测量粘弹性。位于线性粘弹性域的 0.01rad 的变形位于正弦曲线 0.1 和 300rad/s 的频带内。样品温度通过 Peltier 室保持在 20°C。

[0111] 弹性模数 G' 频带,和粘度系数或损耗模量 G'' 定义特征释放时间 T_r , T_r 在这里定义为频率的倒数,弹性模数 G' 与粘度系数 G'' 在此相交。这些问题的详细描述在 Ferry 的论文 *Viscoelastic Properties of Polymers*, J. D. Ferry, J. Wiley, NY, 1980, 和 J. REGALADO 等人 *Macromolecules*, 1999, 32, 8580 中的论文。

[0112] 测定作为制剂的聚合物浓度的函数的释放时间 T_r , 以规定浓度 C1 为时间 T_r 超过 1 秒时的浓度。下文实施例 6 将给出胶凝浓度 C1 的值。

[0113] 同样地,也可以分别规定释放时间超过 0.1 秒和 10 秒时的浓度 $C_{0.1}$ 和 C_{10} , 这些浓度以以下次序递增: $C_{0.1} < C_1 < C_{10}$ 。

[0114] 在本发明的一个实施例制剂中,

[0115] ▶ $[PO] \geq C_{0.1}$,

[0116] ▶ 优选 $[PO] \geq C_1$,

[0117] ▶ 更优选 $[PO] \geq C_{10}$ 。

[0118] 根据优选的附加特性: $[PO] \leq 20 \cdot C_1$ 。

[0119] 根据本发明和目前所公开的情况,术语“结合”和“结合” (动词) 用来表示一种或多种活性成分和聚合物 PO (例如聚氨基酸) 之间的关系,特别是表示活性成分以非共价方式 (例如通过静电和 / 或疏水性相互作用和 / 或氢键和 / 或位阻) 结合到聚合物 PO (例如聚氨基酸) 上。

[0120] 本发明的聚合物 P0 为可溶于水的、携带疏水基 HG 的可生物降解的聚合物。疏水基可以相对于其余的链而减少数量,并可以与链侧连,或插入链中,疏水基可随意分布(无规共聚物)或按顺序或基团分布(嵌段共聚物或连续共聚物)。

[0121] 不受限制地,疏水改性的聚合物 P0 可以选自两性分子的共聚氨基酸,多糖类(优选那些包括卜多糖和/或壳聚糖和/或粘多糖的亚群),明胶以及它的混合物。

[0122] 在本发明的一个优选实施例中,聚合物 P0 选自两性分子的共聚氨基酸。

[0123] 根据本发明和目前所公开的情况,术语“聚氨基酸”覆盖包括 2 到 20 个“氨基酸”单元的氨基酸低聚物和包括超过 20 个“氨基酸”单元的聚氨基酸。

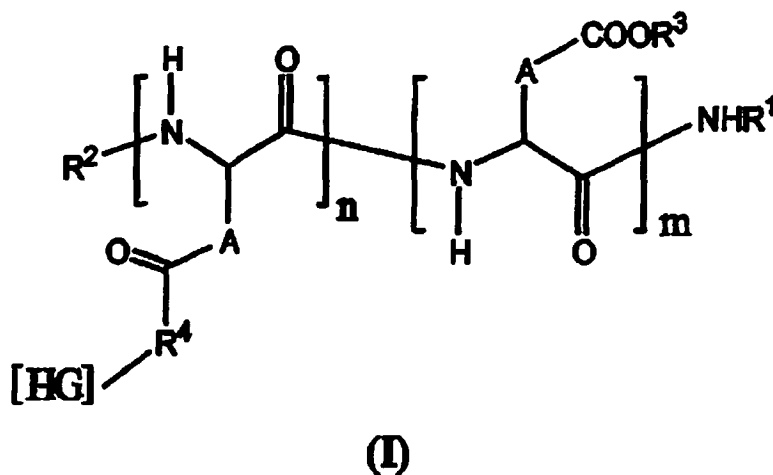
[0124] 优选地,本发明的聚氨基酸是低聚物或均聚物,包括谷氨酸或天冬氨酸重复单元,或共聚物,包括这两种类型“氨基酸”单元的混合物。这些聚合物中所述的单元是具有 D, L 或 D/L 构形的氨基酸,就谷氨酸来说,其通过它们的 α 或 γ 位结合,就天冬氨酸或天冬氨酸根单元来说,其通过它们的 α 或 β 位结合。

[0125] 主聚氨基酸链的优选的“氨基酸”单元是具有 L 构形和 α 型键合的那些。

[0126] 在本发明的一个特别优选的实施例中,聚合物 P0 是天冬氨酸单元和/或谷氨酸单元形成的聚氨基酸,至少一些这些单元中携带包含至少一个疏水基 HG 的基团。PCT 申请 WO-A-00/30618 中特别描述了这些类型的聚氨基酸。

[0127] 第一种可能,聚合物可以由下列通式 (I) 定义:

[0128]



[0129] ■ 其中, R^1 是 H, C2 到 C10 的直链烷基或 C3 到 C10 的支链烷基,苯基,末端氨基酸单元或 $-R^4-[HG]$;

[0130] ■ R^2 是 H, C2 到 C10 的直链酰基或 C3 到 C10 的支链酰基基团,焦谷氨酸或 $-R^4-[HG]$;

[0131] ■ R^3 是 H 或阳离子单元,优选选自:

[0132] - 金属阳离子,优选选自包括钠,碳酸氢钾,谷氨酸钙和镁的亚组,

[0133] - 有机阳离子,优选选自亚组:

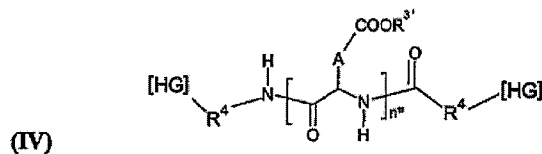
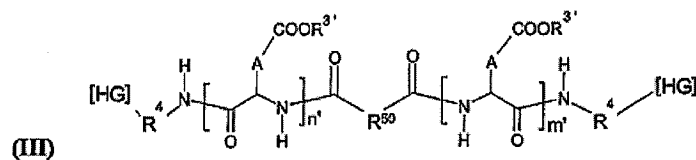
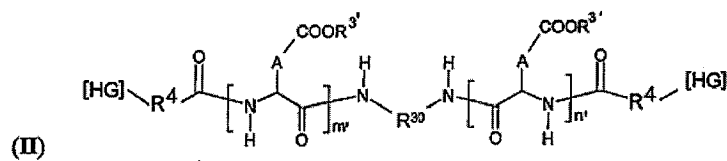
[0134] ● 基于胺的阳离子,

[0135] ● 基于低胺的阳离子,

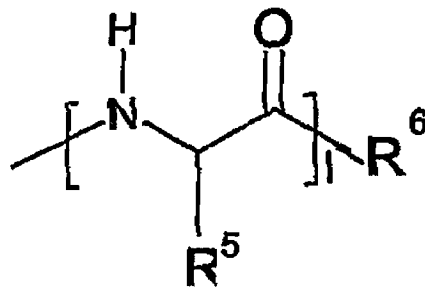
[0136] ● 基于聚胺的阳离子(优选聚乙烯亚胺)(polyethyleneimine),

[0137] ● 基于氨基酸的阳离子,优选选自包括基于赖氨酸或精氨酸的阳离子类,

- [0138] - 以及阳离子聚氨基酸, 优选选自包括聚赖氨酸和低赖氨酸的亚组;
- [0139] ■ R₄ 是直接键或基于 1 到 4 个氨基酸单元的“间隔基”;
- [0140] ■ 单独地, A 是基团 -CH₂- (天冬氨酸单元) 或 -CH₂-CH₂- (谷氨酸单元);
- [0141] ■ n/(n+m) 为摩尔连接率, pH 为 7, 25°C 时溶于水中的聚合物的摩尔连接率值是足够低的, 以形成 PO 超微化颗粒的胶体混悬液, n/(n+m) 优选在 1 和 25mol% 之间, 更优选在 1 和 15mol% 之间;
- [0142] ■ n+m 为聚合度, 其在 10 到 1000 之间, 优选在 50 和 300 之间;
- [0143] ■ HG 是疏水基。
- [0144] 第二种可能, PO 可以是以下通式 (II), (III) 和 (IV) 中的一种;
- [0145]



- [0146] 其中:
- [0147] ■ HG 是疏水基;
- [0148] ■ R³⁰ 是 C2 到 C6 的直链烷基;
- [0149] ■ R^{3'} 是 H 或阳离子单元, 优选选自:
- [0150] - 金属阳离子, 优选选自包括钠, 碳酸氢钾, 谷氨酸钙和镁的亚组,
- [0151] - 有机阳离子, 优选选自亚组:
- [0152] ● 基于胺的阳离子,
- [0153] ● 基于低胺的阳离子,
- [0154] ● 基于聚胺的阳离子 (优选聚乙烯亚胺),
- [0155] ● 基于氨基酸的阳离子, 优选选自包括基于赖氨酸或精氨酸的阳离子类。
- [0156] - 以及阳离子聚氨基酸, 优选选自包括聚赖氨酸和低赖氨酸的亚组;
- [0157] ■ R₅₀ 是 C2 到 C6 的烷基, 二烷基或二胺基;
- [0158] ■ R₄ 是直接键或基于 1 到 4 个氨基酸单元的“间隔基”;
- [0159] ■ 单独地, A 是基团 -CH₂- (天冬氨酸单元) 或 -CH₂-CH₂- (谷氨酸单元);
- [0160] ■ n' + m' 或 n 为聚合度, 其在 10 到 1000 之间, 优选在 50 和 300 之间。
- [0161] 有利地, PO 的 nHG 基团彼此独立, 为下式的单价基团:
- [0162]



(HG)

[0163] 其中，

[0164] $-R^5$ 是甲基（丙氨酸），异丙基（缬氨酸），异丁基（亮氨酸），仲丁基（异亮氨酸基）或苄基（苯基丙氨酸）；

[0165] $-R^6$ 是含 6 到 30 个碳原子的疏水基团；

[0166] -1 为 0 到 6。

[0167] 根据本发明的一个显著特征，PO 的所有或部分疏水基 R^6 是独立的，选自基团包括：

[0168] ■ 含 6 到 30 个碳原子的直链或支链烷氧基，可选地，含至少一个杂原子（优选 O 和 / 或 N 和 / 或 S）和 / 或至少一个不饱和单元，

[0169] ■ 含 6 到 30 个碳原子的烷氧基，其具有一个或多个融合碳环，可选地，含至少一个不饱和单元和 / 或至少一个杂原子（优选 O 和 / 或 N 和 / 或 S），

[0170] ■ 含 7 到 30 个碳原子的芳氧基芳烷氧基，可选地，含至少一个不饱和单元和 / 或至少一个杂原子（优选 O 和 / 或 N 和 / 或 S）。

[0171] 在实用中，PO 的疏水基团 R^6 来自于醇前体，选自包括辛醇，十二烷醇，十四醇，鲸蜡醇，十八碳醇，油醇，维生素 E 和胆固醇。

[0172] 在本发明的第一个实施例中，聚氨基酸的主链是 α -L- 谷氨酸根或 α -L- 谷氨酸均聚物。

[0173] 在本发明的第二个实施例中，聚氨基酸的主链是 α -L- 天冬氨酸根或 α -L- 天冬氨酸均聚物。

[0174] 在本发明的第三个实施例中，聚氨基酸的主链是 α -L 天冬氨酸根 / α -L- 谷氨酸根或 α -L 天冬氨酸 / α -L- 谷氨酸共聚物。

[0175] 有利地，PO 的聚氨基酸主链的天冬氨酸和 / 或谷氨酸单元的分布使得到的聚合物是无序的或嵌段型的或多嵌段型的。

[0176] 优选地，用于本发明制剂的 PO 的分子量在 2000 和 100,000g/mol 之间，优选在 5000 和 40,000g/mol 之间。

[0177] 在第一个优选的制剂实施例中，聚合物的疏水基团 R^6 来自于维生素 E 形成的醇前体：

[0178] ◆ $1\% \leq [n/(n+m)] \times 100 \leq 10\%$ ，

[0179] ◆ 优选 $3.5\% \leq [n/(n+m)] \times 100 \leq 7.5\%$ ，

[0180] ◆ $n+m$ 在 100 到 400 之间，优选在 120 和 300 之间。

[0181] 在第二个优选的制剂实施例中，PO 的疏水基团 R^6 来自于胆固醇形成的醇前体：

[0182] ◆ $1\% \leq [n/(n+m)] \times 100 \leq 10\%$,

[0183] ◆ 优选 $3.5\% \leq [n/(n+m)] \times 100 \leq 6.5\%$,

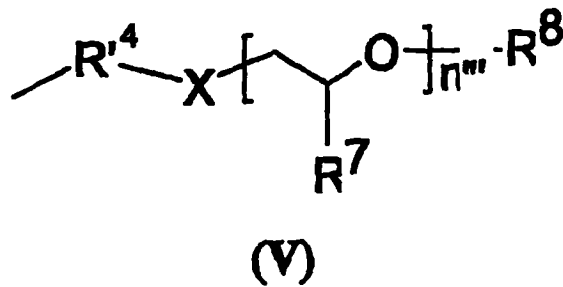
[0184] ◆ $n+m$ 在 100 到 400 之间, 优选在 120 和 300 之间。

[0185] 在本发明的这两个制剂的优选实施例中, 有利地, 聚合物 [P0] 的浓度在 15 和 50mg/ml 之间。

[0186] 在一个实施例中, 本发明聚合物制剂携带至少一个聚二醇类基团, 其与谷氨酸和 / 或天冬氨酸根单元结合。

[0187] 有利地, 该聚二醇类基团为下式 (V) 所示:

[0188]



[0189] 其中,

[0190] ---R^4 是直接键或 1 到 4 个氨基酸单元的“间隔基”;

[0191] ---X 是选自氧, 氮和硫的杂原子;

[0192] ---R^7 和 ---R^8 是 H 或直链 C1 到 C4 的烷基;

[0193] n^m 为 10 到 1000, 优选地, 为 50 到 300。

[0194] 在实践中, 聚二醇可以是聚乙二醇。

[0195] 根据本发明, 所需聚二醇基的摩尔百分率为 1 到 30%。

[0196] 此外, 聚氨基酸 PO 在下述方面非常有价值, 即它们以可调节的连接率分散在 pH 为 7.4 (如, 以磷酸盐缓冲液调节) 的水中, 形成胶态混悬液。

[0197] 而且, 选自蛋白质, 肽和小分子的干扰素活性成分或其他活性成分可以自发地与包括这些聚氨基酸 PO 的纳米微粒结合。

[0198] 基于包含羧基的聚氨基酸的聚合物 PO 可以是中性的 (COOH 形式) 或电离的 (COO⁻ 阴离子), 视 pH 和组合物而定。因此, 在水相中的溶解度是 PO 中的游离 COOH 基 (不与疏水单元连接) 和 pH 的比例的正函数。水溶液中的阳离子可以是金属阳离子 (例如钠, 谷氨酸钙或镁), 或有机阳离子 (例如三羟乙基胺, 三羟甲基氨基甲烷), 或聚胺 (如聚乙烯亚胺)。

[0199] 用于本发明制剂的聚氨基酸类的聚合物可以通过为本领域技术人员所知的方法得到。无序聚氨基酸可以通过普通的偶联反应, 将疏水基 (预先被“间隔基”功能化) 直接连接到聚合物上而得到。嵌段或复块聚氨基酸 PO 可以通过相应氨基酸 N-羧基酐 (NCA) 的连续聚合得到。

[0200] 例如, 共聚谷氨酸或共聚天冬氨酸聚氨基酸或嵌段, 复块或无序谷氨酸 / 天冬氨酸根共聚物由常规方法制备。

[0201] 为得到 α 型聚氨基酸, 最常用的方法是基于氨基酸 N-羧基酐 (NCA) 的聚合, 对该方法描述在题为“Biopolymers”, 1976, 15, 1869 的文章以及 H. R. Kricheldorf 所作

的题为“A-amino acid Ncarboxy anhydrides and related heterocycles”, Springer Verlag(1987) 中。NCA 衍生物优选为 NCA-O-Me, NCA-O-Et 或 NCA-O-Bz 衍生物 (Me = 甲基, Et = 乙基, Bz = 苯基)。然后将聚合物在适当的条件下水解, 以得到它的酸式聚合物。这些方法基于申请人的专利 FR-A-2801226。本发明使用的许多聚合物, 例如, 分子量不同的聚(α -L-天冬氨酸), 聚(α -L-谷氨酸), 聚(α -D-谷氨酸) 和聚(γ -L-谷氨酸) 类, 均可在市场上买到。 α - β 型的聚天冬氨酸聚合物经天冬氨酸的碱水解、凝聚(以得到聚琥珀酰亚胺) 得到(比较 Tomida 等人的 polymer, 1997, 38, 4733-36)。

[0202] 基团与聚合物酸根的偶合通过聚氨基酸在二亚胺碳作为偶联剂、以及可选地, 催化剂例如 4- 二甲基氨基吡啶的存在下, 于适当的溶剂中进行反应, 溶剂例如为二甲基甲酰胺(DMF), N- 甲基吡咯烷酮(NMP) 或二甲亚砜(DMSO)。二亚胺碳可以是二环己基碳二亚胺或二异丙基碳二亚胺。连接率由组分和反应物的化学当量控制, 或通过反应时间控制。通过常规的肽偶合或通过酸催化之下直接液化, 以“间隔基”功能化疏水基。这些技术均为所属领域的技术人员所熟知。

[0203] 由预先与疏水基接合的 NCA 衍生物来合成嵌段或复块共聚物。例如, 疏水 NCA 衍生物与 NCA-O- 苯基进行异分子聚合, 然后通过水解选择性除去苯甲基。

[0204] 聚氨基酸 PO 的合成优选产生聚合物纳米微粒的水悬浊液。

[0205] 这样的混悬液可以所属领域的技术人员所熟知的适当的途径, 通过干燥来转化成聚合物的粉状纳米微粒, 例如通过加热(干燥箱等等), 使用干燥剂, 抽空、干冻或雾化作用抽空。

[0206] 这些处于悬浮或粉末状态的 PO 的纳米微粒, 形成制备本发明制剂的原材料。

[0207] 本发明的制剂, 由基于至少一种 PO 和至少一种活性成分的纳米微粒在水溶液介质中, 通过非共价结合而得。

[0208] 制备时, PO 和 / 或白细胞介素(和 / 或任何其他活性成分) 可以是固态(优选为粉末) 和 / 或是液态(优选为胶体的水悬浊液)。

[0209] 就目前所公开的而言, 白细胞介素 / PO 结合体指, 白细胞介素通过一个或多个键(除一个共价化学键或多个共价化学键) 和聚合物 PO[例如, 一个或多个聚氨基酸] 相连。

[0210] 本发明的一种或多种白细胞介素与聚合物的结合技术, 特别描述在专利申请 WO-A-00/30618 中。这些技术将至少一种白细胞介素(和一种或多种其他可能的活性成分) 结合到包含聚合物纳米微粒的液体培养基中, 以得到载有一种或多种白细胞介素(和一种或多种其他可能的活性成分) 的纳米微粒的胶体混悬液。

[0211] 因此, 本发明进一步涉及上述制剂的制备方法。

[0212] 根据本发明的第一个优选模式, 该方法的特征在于, 它主要包括:

[0213] ◆取至少一种 PO 纳米微粒的胶体混悬液,

[0214] ◆优选在水溶液中, 将该聚合物纳米微粒的胶体混悬液与至少一种白细胞介素(和一种或多种其他可能的活性成分) 混合,

[0215] ◆可选地, 加入至少一种赋形剂,

[0216] ◆如有必要, 调节 pH 和 / 或摩尔渗透压浓度, 以及

[0217] ◆可选地, 过滤所得的混悬液。

[0218] 有利地, 白细胞介素(和一种或多种其他可能的活性成分) 是以水悬浊液或溶液

形式与聚合物纳米微粒的胶体混悬液混合。

[0219] 根据本发明的第二个优选模式,该方法的特征在于,它主要包括:

[0220] ◆取至少一种聚合物 PO 粉末,

[0221] ◆优选在水溶液中,将该粉末与至少一种白细胞介素(和一种或多种其他可能的活性成分)混合,

[0222] ◆可选地,加入至少一种赋形剂,

[0223] ◆如有必要,调节 pH 和 / 或摩尔渗透压浓度,以及

[0224] ◆可选地,过滤所得的混悬液。

[0225] 也可将以这种方法得到的制剂,通过本领域技术人员所熟知的常规方法转变为胶凝体,粉末或薄膜。例如通过渗滤或蒸发,包衣,雾化作用或冻态干燥法来浓缩。也可组合这些方法。

[0226] 根据制备本发明液体制剂的第三个优选模式,该方法的特征在于,它主要包括:

[0227] ◆取由上述的本发明的液体制剂干燥所得的粉末,

[0228] ◆优选用搅拌的方法,将该粉末与水溶液介质混合,

[0229] ◆可选地,加入至少一种赋形剂,

[0230] ◆如有必要,调节 pH 和 / 或摩尔渗透压浓度,以及

[0231] ◆可选地,过滤所得的混悬液。

[0232] 加入的赋形剂可以是本领域技术人员所熟知的抗微生物剂,缓冲剂,抗氧化剂以及调整等渗压性的试剂。可参考 P. K. Gupta 等人在 Interpharm Press, Denver, Colorado, 1999 中的文章 Injectable Drug Development。

[0233] 合适的话,液体制剂可在孔隙度为 0.2 微米的过滤器上过滤以除菌。然后该产品可以直接注射到患者体内。

[0234] 有利地,本发明的所有这些液体制剂的制备,在大气环境和室温(如 25°C)下进行。

[0235] 本发明制剂的一个优选实施例中,没有结合超微化颗粒白细胞介素[非结合白细胞介素]的重量百分率%是:

[0236] □ [非结合白细胞介素] ≤ 1 ,

[0237] □ 优选 [非结合白细胞介素] ≤ 0.5 ,

[0238] □ 更优选 [非结合白细胞介素] ≤ 0.1 。

[0239] 根据本发明,优选的白细胞介素是白细胞介素 2。

[0240] 根据本发明的另一个特征,本发明包括由上述本发明液体制剂所得的任何衍生产品,并且包括上述 PO/ 白细胞介素非共价结合体形成的超微化颗粒。

[0241] 实践中,这些衍生产品尤其包括粉末,胶凝体,植入物或薄膜。

[0242] 本发明还涉及该可注射液体制剂的任何前体。

[0243] 还是回到这些衍生产品的主题,必须强调的是本发明还涉及由上述制剂所得的粉末的制备方法,该方法的特征在于,所述粉末由上述制剂通过干燥而得。

[0244] 本发明的制剂优选用于药品,但不排除用于化妆品,饮食或植物检疫,该制剂包括至少一种上述 PO,至少一种白细胞介素和可选地至少一种其他的活性成分。

[0245] 根据本发明,除了白细胞介素的可能的其他活性成分可以是,蛋白质,糖蛋白,与

一个或多个聚亚烷基二醇链结合的蛋白质 [优选聚乙二醇 (PEG) 链 :“聚乙二醇化的蛋白质”], 聚糖, 脂糖, 寡聚核苷酸, 多核苷酸或肽。

[0246] 该其他活性成分可以选自血红蛋白, 胞色细胞, 白蛋白, 干扰素, 细胞活素, 抗原, 抗体, 促红细胞生成素, 胰岛素, 生长激素, 凝血因子 VIII 和 IX, 造血刺激因子, 以及它们的混合物。

[0247] 在一个实施例中, 该其他活性成分是“微”疏水的, 疏水的或两性分子的有机分子, 例如是肽 (亮丙瑞林或环孢子菌素), 或是小分子 (例如那些属于蕈环霉素, 紫杉醇或喜树碱家族), 以及它们的混合物。

[0248] 本发明制剂的主要的特性包括它的可注射性, 和它在体内通过纳米微粒的胶凝或凝聚, 在生理蛋白质或类似物的存在下, 在注射位形成沉着的能力。

[0249] 特别是, 本发明制剂可以胃肠外注射, 皮下注射, 肌注, 皮内注射, 腹腔内注射或脑内注射或注射到肿瘤中。

[0250] 本发明制剂可以口服, 经鼻给药, 经阴道给药, 经眼睛给药或口腔给药。

[0251] 优选地, 本发明制剂用于制备药物, 尤其用于胃肠外给药, 皮下给药, 肌内给药, 皮内给药, 腹内给药或脑内给药通路, 或注射到肿瘤中, 或口服, 经鼻给药, 经阴道给药或经眼睛给药。

[0252] 虽然本发明制剂优选用于药物, 但不排除用于化妆品, 饮食品或植物检疫制剂, 该制剂包括至少一种上述 PO 和至少一种相应的活性成分。

[0253] 另一方面, 本发明涉及该药物的制备方法, 该药物尤其用于胃肠外给药, 皮下给药, 肌内给药, 皮内给药, 腹内给药或脑内给药通路, 或注射到肿瘤中, 或口服, 经鼻给药, 经阴道给药或经眼睛给药, 其特征在于, 该方法主要使用至少一种上述制剂和 / 或所述制剂的任何衍生产品和 / 或任何前体物。

[0254] 本发明还涉及一种治疗方法, 该方法主要包括将上述制剂用于胃肠外给药, 皮下给药, 肌内给药, 皮内给药, 腹内给药或脑内给药通路, 或注射到肿瘤中, 或口服, 经鼻给药, 经阴道给药或经眼睛给药。

[0255] 在本发明的一个特别优选的实施例中, 该治疗法主要包括将上述制剂通过胃肠外注射, 皮下注射, 肌内注射, 皮内注射, 腹内注射或脑内注射或注射到肿瘤中给药, 优选该制剂在注射部位形成胶凝体 / 交联沉着物。

[0256] 下面将通过实施例具体描述本发明, 这些实施例描述了由聚氨基酸与疏水基连接合成 PO, 以及它们转变为白细胞介素的持续释放体系, 即本发明的制剂 (稳定的水溶胶体混悬液), 并阐述了这样的一种体系不仅可以和白细胞介素联合, 而且, 特别是可以形成胶凝体 / 交联, 以在体内持续释放白细胞介素。

附图说明

[0257] 图 1 : 给猴子皮下注射下述物质以后, 记录得到的血浆 IL2 浓度 (皮克 / 毫升) 曲线 :

[0258] • 根据本发明 (实施例 7) 的 IL2 制剂 (E) : - □ - □ - 曲线,

[0259] • 不是根据本发明 (实施例 7) 的 IL2 对照品制剂 (F) : - ● - ● - 曲线,

[0260] • 不是根据本发明 (实施例 7) 的 IL2 对照品制剂 (G) : - ■ - ■ - 曲线,

[0261] 作为时间（小时）的函数，IL2 剂量为 0.5mg/kg。

具体实施方式

[0262] 实施例 1：两性分子聚合物 P1

[0263] 连接聚谷氨酸与合成的 α -维生素的合成

[0264] 将 5.5g α -L-聚谷氨酸（分子量为 10,000 道尔顿左右，相对于标准化聚氧乙烯，通过水解并聚合 NCAGluOMe 得到，参考专利申请 FR-a-2801226）。在 40°C 加热两小时，溶解在 92ml 二甲基甲酰胺（DMF）里。聚合物溶解后，将温度下降到 25°C，连续加入预先溶解在 6ml DMF 里的 1.49g D, L- α -维生素（> 98%，**Fluka®**）、预先溶解在 6ml DMF 里的 0.09g 4-二甲基氨基吡啶和预先溶解在 6ml DMF 里的 0.57g 二异丙基碳二亚胺。在 25°C 搅拌后 8 小时后，将反应体系倒入 800ml 含有 15% 的氯化钠和盐酸（pH2）的水中。然后过滤聚合物沉淀物，用 0.1N 盐酸，然后用水洗涤后回收。然后，将聚合物重新溶解在 75ml DMF 中，并在包含盐和酸的 pH 为 2 的水中再次沉淀。沉淀物用水洗 2 遍之后，在用二异丙醚洗若干遍。然后将聚合物置于干燥箱中，40°C 干燥，得到的产率约为 85%。

[0265] 实施例 2：两性分子聚合物 P1, P2, P3, P4, P5 和 P6

[0266] 这些聚合物的制备方法同聚合物 P1。下表 1 概括了这些聚合物的特性。同时给出聚合物 P1 的特性用于比较。

[0267] 表 1

[0268]

聚合物	聚谷氨酸的分子量 g/mol	疏水基	% 连接率 (NMR) ²	聚合物的分子量 g/mol
P1	10000	α -维生素 ³	7	13900
P2	10000	α -维生素 ³	4	14400
P3	16900	α -维生素 ³	4	15200
P4	10000	胆固醇	5	11500
P5	16900	胆固醇	5	12900
P6	10000	n-十二烷醇	15	11500

[0269] ¹ 为聚氧乙烯当量

[0270] ² 由质子 NMR 评估的分子连接率

[0271] ³ 合成来源

[0272] 实施例 3：制备基于聚合物 P3 的本发明的长效白细胞介素 2 (IL2) 制剂

[0273] 将足量两性分子聚合物冻干粉末和无菌水置于烧瓶中，得到聚合物浓度 X 为所需的最后浓度的 1.3 倍。用磁力搅拌溶解聚合物，持续 16 小时。

[0274] 冻干 IL2 所需的量浓缩至所需的最后浓度的 X/(X-1) 倍。

[0275] 浓缩 IL2 溶液的精确的浓度由 Perkin Elmer Lambda 35UV 光谱光度计在 280 纳米时测定。

[0276] IL2 溶液在 0.8-0.2 微米的滤过滤器过滤并存储于 4°C。用 1M 的 NaOH 将溶液的 pH 调整到 11。该溶液的蛋白质浓度与制剂所需的浓度的比例称为 Y。

[0277] 然后将蛋白质溶液和聚合物溶液在室温下混合,每升聚合物加入 X-1 升的蛋白质溶液。分别将 pH 和摩尔渗透压浓度调整至 7.4 ± 0.2 和 $300 \pm 20 \text{mOsm}$ 。

[0278] 由此,基于浓度为 20mg/ml 的聚合物 P3 和 2.5mg/ml 的 IL2,制备本发明的长效 IL2 制剂,初始的聚合物溶液浓缩至 26mg/ml。初始的 IL2 溶液浓缩至 11mg/ml。每升聚合物中加入 0.3 升蛋白质溶液。

[0279] 实施例 4:本发明不同聚合物 P0 的纳米微粒的平均流体动力学直径的测量

[0280] 本发明不同聚合物 P0 的纳米微粒的平均流体动力学直径由下述的 Md 方法测量。

[0281] 浓度为 1 或 2mg/ml 的聚合物溶液于 0.15M 的 NaCl 介质中,通过搅拌 24 小时而得。然后将这些溶液在 0.8-0.2 微米的滤过滤器上过滤,接着使用一具有 488nm 波长的垂线偏振光激光束的 Brookhaven 仪,分析其动力学光散射。聚合物 P0 纳米微粒的流体动力学直径由电场自相关函数通过求和法计算,见 Ed. R. Zana 在 *Surfactant Solutions* (volume 22, chap. 3. Dekker 1984) 的文章 "Surfactant Science Series"。

[0282] 以下结果由实施例 2 的聚合物 P2, P3, P4 和 P6 得到:

[0283] 表 2

[0284]

聚合物	平均流体动力学直径 (nm)
P2	60

[0285]

P3	90
P4	30
P6	15

[0286] 实施例 5:蛋白质与聚合物 P0 纳米微粒的自发结合

[0287] 25mM 的磷酸盐缓冲液由粉状 NaH_2PO_4 (Sigma ref. S-0751) 制备,并用 1N 氢氧化钠溶液 (SDS ref. 3470015) 调节 pH 到 7.2。

[0288] 将 5mg/ml 的冻干聚合物溶解在上述磷酸盐缓冲液中一整夜,来制备聚合物 P1 纳米微粒的胶体混悬液。

[0289] 将 10mg/ml 的蛋白质溶解在相同的缓冲液中 2 小时,来制备 BSA (Sigma A-2934) 的母液。

[0290] 母液和缓冲液由 0.22 微米的滤过滤器滤过。

[0291] 加入两种母液的预定用量,以磷酸盐缓冲液稀释配制混合物,最终得到具有恒定聚合物浓度 (0.1mg/ml) 和增加的蛋白质浓度 (0 到 1.8mg/ml) 的样品。

[0292] 使样品在 25°C 下反应 5 小时,然后用前沿分析法 (可见蛋白质和蛋白质-聚合物组合物分离),通过毛细管电泳来分析。该方法的更多细节可以查阅以下论文:Gao J. Y., Dublin P. L., Muhoberac B. B., *Anal. Chem.*, 1997, 69, 2945。在配备有熔凝硅石气泡毛细管 (G1600-62-232 型) 的 Agilent G16000 仪上进行分析。第一个平台期的高度 (相当于

游离蛋白质)用于测定非结合 BSA 的浓度。经验显示,蛋白质的量在 0.1g 蛋白质 / 克聚合物以下时,蛋白质与聚合物的纳米微粒结合。

[0293] 实施例 6 :聚合物 P0 的 P1, P3 和 P6 的胶凝体浓度的测定

[0294] 对结合实施例 1 和 2 的聚合物 P1, P3 和 P6 的 IL2 进行 IG 测试。这些制剂的蛋白质浓度由下表所示。在 BSA (浓度为 30mg/ml) 存在下的制剂的释放时间通过 IG 测试测得。当释放时间超过 1 秒时, IL2 的临界浓度 C1 由下表 3 所示。

[0295] 表 3

[0296] IL2 制剂的诱导胶凝化浓度

[0297]

聚合物	P1	P3	P6
IL2 浓度 (mg/ml)	2.5	2.5	2.5
浓度 C1(mg/ml)	17	17	> 50

[0298] 实施例 7 :给猴子皮下注射基于两性分子的聚氨基酸的各种制剂之后,白细胞介素 2 (IL2) 的的药代动力学

[0299] 下列制剂由实施例 3 所述的方法制备 :

[0300] 表 4

[0301]

代号	聚合物	聚合物浓度 (mg/ml)	IL2 浓度 (mg/ml)
E	P1	30	2.5
F	P3	20	2.5
G	P6	40	2.5

[0302] 制剂 E 和 F,其聚合物浓度大于实施例 6 所测得的胶凝浓度 C1,因此属于本发明的选择。另一方面,制剂 G 的浓度小于胶凝浓度 C1,因此所述制剂不属于本发明的选择。

[0303] 将这些制剂以 0.5mg/kg 的剂量注射到短尾猴里。血浆样品在 1,5,11,24,36,48,72,96,120,144,168,和 240 小时取样。这些样品的血浆 IL2 浓度由 ELISA (Immunotech IM 3583kit) 测得。

[0304] 制剂 E, F 和 G 的时间 T_{max} 和 T₅₀ 由下表 5 所示。

[0305] 表 5

[0306]

制剂代号	T _{max} (h)	T ₅₀ (h)
E	32	34.5
F	32	37.5
G	4	10.5

[0307] 因此属于本发明选择的制剂 E 和 F 的释放时间远长于不属于本发明选择的制剂 G。

[0308] 实施例 8 :经皮下注射后,本发明制剂在体内的胶凝观察

[0309] 在国产猪中研究本发明制剂的皮下注射特性。将 0.3ml 下述制剂注入六头国产猪的腹部皮肤,深度 4 毫米 :

[0310] 制剂 A :实施例 2 的聚合物 P6 的等渗水溶液, pH 为 7.3,浓度为 45mg/ml。

[0311] 制剂 B :实施例 1 的聚合物 P1 的等渗水溶液, pH 为 7.3,浓度为 20mg/ml。

[0312] 给药 72 小时后,在注射部位取得样品。组织学检查显示了制剂 B 聚合物的胶凝沉着物的存在。它们显示为均匀的着色斑块。相反,制剂 A 中观察不到该现象,其中的聚合物

已浸润在胶原纤维之间。

[0313] 需要强调的是,聚合母体 B 是可生物降解的,因为 21 天后,组织完全地回到了它的正常状态。

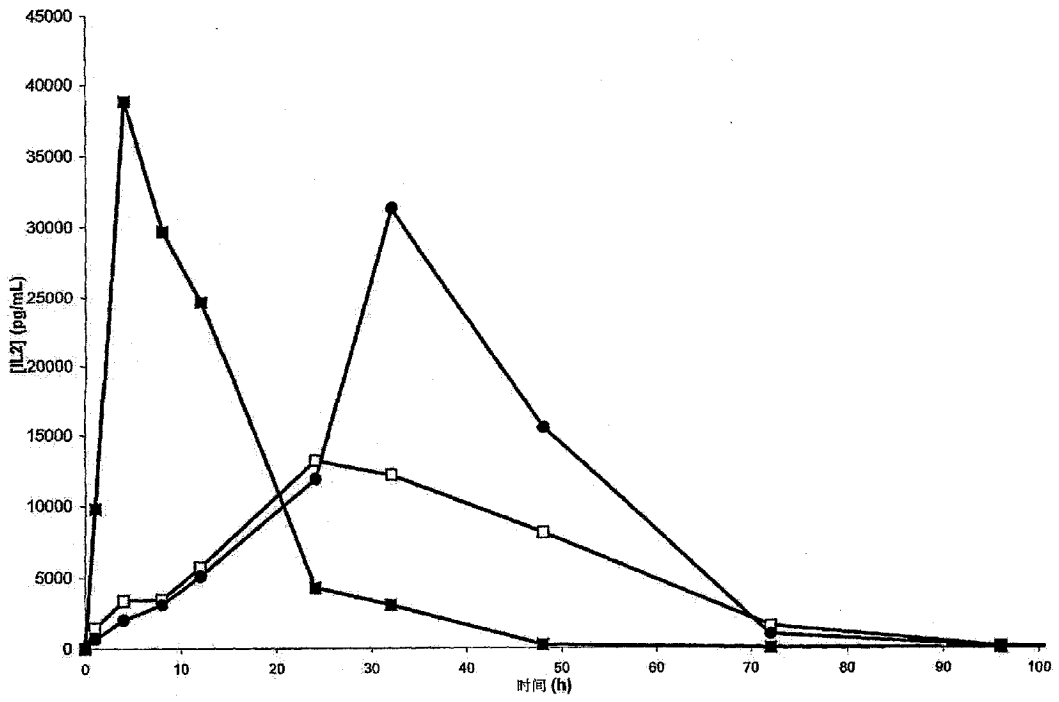


图 1