



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111867633 B

(45) 授权公告日 2023. 09. 22

(21) 申请号 201880085421.5
 (22) 申请日 2018.12.03
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 111867633 A
 (43) 申请公布日 2020.10.30
 (30) 优先权数据
 62/593,784 2017.12.01 US
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2020.07.03
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/US2018/063573 2018.12.03
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02019/109065 EN 2019.06.06
 (73) 专利权人 儿童医学中心公司
 地址 美国马萨诸塞州
 (72) 发明人 D·S·寇汉 赵超
 (74) 专利代理机构 上海德昭知识产权代理有限公司 31204
 专利代理师 郁旦蓉

(51) Int. Cl.
 A61K 47/60 (2006.01)
 A61K 47/10 (2006.01)
 A61P 29/02 (2006.01)
 (56) 对比文件
 WO 9634599 A1, 1996.11.07
 CN 104427987 A, 2015.03.18
 US 6326020 B1, 2001.12.04
 CN 105142625 A, 2015.12.09
 US 2010160375 A1, 2010.06.24
 CN 103857440 A, 2014.06.11
 CN 103932972 A, 2014.07.23
 CN 105748412 A, 2016.07.13
 US 2014364595 A1, 2014.12.11
 姚静主编. 注射剂中辅料的应用. 《药用辅料应用指南》. 中国医药科技出版社, 2011, 第303-304页.

审查员 陈晓真

权利要求书1页 说明书41页 附图14页

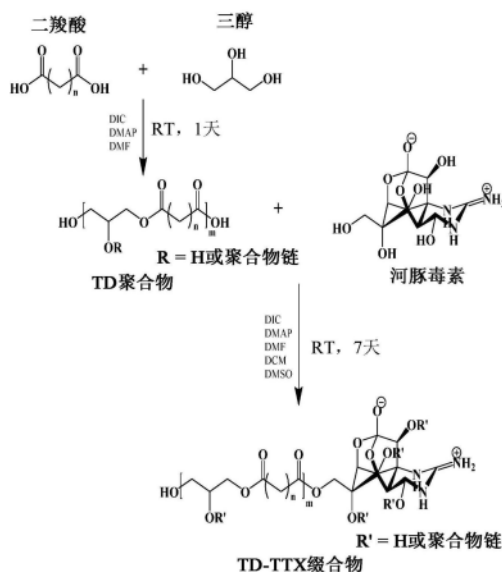
(54) 发明名称

用于实现延长的局部麻醉的共价麻醉药-聚合物缀合物

(57) 摘要

通过可水解键共价缀合到生物可降解且生物相容的亲水性聚合物上的麻醉药以相对于未缀合的麻醉剂降低的毒性以用于神经阻滞的有效量提供局部麻醉药在体内的控制释放。可以通过改变该聚合物的亲水性来调节麻醉药释放速率。提供了具有与河豚毒素(TTX)的缀合的聚(癸二酸甘油酯)(PGS), 任选地包含聚乙二醇(PEG)聚合物(PGS-PEG-TTX和PGS-TTX)的示例性调配物以及其使用方法。来自PGS-PEG-TTX和PGS-TTX的神经阻滞与对肌肉和周围神经的最小全身性和局部毒性相关。还描述了均匀分散到PEG200中的TDP-TTX缀合物。PEG200不仅充当介质, 而且充

当化学渗透增强剂(CPE)以增强TTX的有效性。



CN 111867633 B

[接上页]

(56) 对比文件

姚静主编.注射剂中辅料的应用.《药用辅料应用指南》.中国医药科技出版社,2011,第303-304页.

Diego A Gianoli等.Synthesis and evaluation of hydrolyzable hyaluronan-tethered bupivacaine delivery systems.《Bioconjugate Chemistry》.2005,第16卷(第6期),第1512-1518页.

Alpesh Patel等.Highly elastomeric poly(glycerol sebacate)-co-poly(ethylene glycol) amphiphilic block copolymers.《Biomaterials》.2013,第34卷(第16期),第3970-3983页.

Alpesh Patel等.Highly elastomeric poly(glycerol sebacate)-co-poly(ethylene glycol) amphiphilic block copolymers.《Biomaterials》.2013,第34卷(第16期),第3970-3983页.

Aaron L. Acton等.Janus PEG-Based Dendrimers for Use in Combination

Therapy: Controlled Multi-Drug Loading and Sequential Release.

《Biomacromolecules》.2013,第14卷(第2期),第564-574页.

Wu Yaobin等.Injectable biodegradable hydrogels and microgels based on methacrylated poly(ethylene glycol)-co-poly(glycerol sebacate) multi-block copolymers: synthesis, characterization, and cell encapsulation.《Journal of Materials Chemistry B》.2014,第2卷(第23期),第3674-3685页.

李勋等.缓释微球制剂的研究进展.《北京化工大学学报(自然科学版)》.2017,第44卷(第6期),第1-11页.

黄海真.罗哌卡因聚乙二醇-聚乳酸微球对大鼠切口痛模型坐骨神经阻滞的时效.《中国优秀硕士学位论文全文数据库 医药卫生科技辑》.2014,(第11期),第E066-52页.

陆蕾等.可生物降解缓释技术在镇痛释药系统的应用.《国际药学研究杂志》.2008,第35卷(第5期),第364-368页.

1. 一种用于实现持续时间延长的局部麻醉的共价麻醉剂-聚合物缀合物,所述缀合物包括:

(a) 麻醉剂,其中所述麻醉剂为部位1钠通道阻滞剂S1SCB;其中所述部位1钠通道阻滞剂选自自由以下组成的组:河豚毒素tetrodotoxin、石房蛤毒素saxitoxin、去氨基甲酰基石房蛤毒素decarbamoyl saxitoxin、新石房蛤毒素neosaxitoxin和膝沟藻毒素gonyautoxins以及

(b) 聚合物主链,其包括聚(甘油癸二酸酯)PGS,

其中所述麻醉剂通过可水解接头与所述聚合物主链共价缀合并且当与所述聚合物主链缀合时是无活性的,

其中在有需要的部位处向受试者施用之后,所述可水解接头在给药后裂解以从所述聚合物主链释放有效量的部位1钠通道阻滞剂以相对于未缀合的麻醉剂降低的毒性有效诱导局部神经阻滞。

2. 根据权利要求1所述的缀合物,其中所述聚合物主链进一步包括分子量为100Da到200,000Da,包含端值,的聚乙二醇PEG、甲氧基(聚乙二醇)或其组合。

3. 根据权利要求1所述的缀合物,其中在体内施用之后,所述缀合物在介于24小时与72小时之间、介于72小时与一周之间或介于一周与一个月之间的时间段内释放所述麻醉剂。

4. 根据权利要求1所述的缀合物,其进一步包括一种或多种活性剂,所述一种或多种活性剂与所述聚合物主链共价缀合。

5. 根据权利要求1所述的缀合物,其中所述缀合物进一步包括一种或多种共价结合的糖皮质激素。

6. 根据权利要求5所述的缀合物,其中所述糖皮质激素选自自由以下组成的组:地塞米松dexamethasone、可的松cortisone、氢化可的松hydrocortisone、泼尼松prednisone、倍氯米松beclomethasone、倍他米松betamethasone、氟尼缩松flunisolide、甲基泼尼松methyl prednisone、帕拉米松para methasone、泼尼松龙prednisolone、曲安西龙triamcinolone、阿氯米松alclometasone、安西奈德amcinonide、氯倍他索clobetasol、氟氢可的松fludrocortisone、二氟松二乙酸盐diflurosone diacetate、氟轻松缩丙酮fluocinolone acetonide、氟米龙fluoromethalone、氟氢缩松flurandrenolide、哈西奈德halcinonide、甲羟松medrysone和莫米松mometasone以及其药学上可接受的盐和混合物。

7. 根据权利要求1所述的缀合物,其中所述缀合物进一步包括共价结合的地塞米松。

8. 一种用于体内施用的调配物,所述调配物包括在药学上可接受的注射用赋形剂中的根据权利要求1所述的缀合物。

9. 根据权利要求8所述的调配物,其中所述调配物包括作为赋形剂的化学渗透增强剂。

10. 根据权利要求9所述的调配物,其中所述化学渗透增强剂是PEG。

11. 根据权利要求10所述的调配物,其中所述PEG是PEG200。

12. 根据权利要求8所述的调配物,其包括在剂量单位中,所述剂量单位包括量介于0.1 μg与200μg之间,包含端值的麻醉剂。

13. 根据权利要求12所述的调配物,其中所述剂量单位中的麻醉剂的量在向有需要的受试者施用之后有效诱导有效的局部神经阻滞长达一个月的时间段。

用于实现延长的局部麻醉的共价麻醉药-聚合物缀合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2017年12月1日提交的U.S.S.N.62/593,784的权益和优先权,该申请以全文引用的方式并入本文中。

技术领域

[0003] 这通常是在毒性降低的延长的神经阻滞、局部麻醉和镇痛领域,特别是与生物相容性聚合物共价连接用于控制释放的河豚毒素的调配物。

[0004] 政府支持

[0005] 本发明是根据由国家普通医学研究所(National Institute of General Medical Sciences)授予的授权号5R01GM073626-12和1R01GM116920-01在政府的支持下进行的。政府享有本发明的一定权利。

背景技术

[0006] 在过去的二十年中,在单次注射后持续时间延长的局部麻醉一直是临床和科学研究的重点。然而,有许多与目前临床上使用的常规氨基酯和氨基酰胺局部麻醉药化合物相关的限制。即使这些化合物引起有效的周围神经阻滞,但其相对短的作用持续时间通常不足,尤其是在慢性和神经性疼痛的管理中。这些化合物还会引起如对肌肉和周围神经的局部毒性等副作用,这随着浓度的升高和暴露持续时间的延长而增加。不幸的是,当使用持续释放的媒剂递送这些化合物(即使递送媒剂本身的毒性最小)时,这些副作用会加剧,并可能在神经上引起有时比神经阻滞的持续时间显著更长的炎性应答(Padera等人,《麻醉学(Anesthesiology)》108,921-928,doi:10.1097/ALN.0b013e31816c8a48(2008);Kohane等人,《疼痛学(Pain)》104,415-421,doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3959(03)00049-6(2003);Kohane等人,《生物医学材料研究杂志(Journal of Biomedical Materials Research)》59,450-459,doi:10.1002/jbm.1261(2002))。具体地,许多试剂对周围神经电压门控钠通道的低特异性可能引起严重的全身性副作用,这些全身性副作用主要是心血管的(例如,危及生命的心律不齐)和神经病学的(例如,癫痫)。

[0007] 鉴于这些限制,开发能够以最小的全身性和局部副作用增强或延长神经阻滞的局部麻醉药调配物是一个长期的目标。河豚毒素(TTX),一种天然存在的部位1钠通道阻滞剂(S1SCB),在过去的二十年中已被研究用作常规局部麻醉药的替代物(Lahaye等人,《麻醉学》123,741-742(2015))。即使TTX具有极其有效的局部麻醉药性质(Kohane等人,《区域麻醉与疼痛医学(Regional Anesthesia and Pain Medicine)》25,52-59,doi:http://dx.doi.org/10.1016/S1098-7339(00)80011-5(2000)),但是实现显著的周围神经阻滞所需的TTX剂量可能导致低血压和全身性肌无力,包含膈肌麻痹和呼吸衰竭。尽管TTX具有窄治疗窗,但是目前正在努力将其引入到临床实践中(Lahaye等人,《麻醉学》123,741-742(2015);PERE等人,《区域麻醉与疼痛医学》18,304-307(1993);Lobo等人,《麻醉学》123,873-885(2015)),并且期望一种用于延长TTX的神经阻滞持续时间的方法以供临床使用。

[0008] 虽然将药物包封到持续递送系统中可以实现延长的药物持续时间,但TTX非常亲水,这阻碍了其有效包封(Rwei等人,《美国国家科学院院刊(Proceedings of the National Academy of Sciences)》112,15719-15724,doi:10.1073/pnas.1518791112(2015);

[0009] Shankarappa等人,《美国国家科学院院刊》109,17555-17560,doi:10.1073/pnas.1214634109(2012)。脂质体先前已被报告为TTX控制释放的有效载体,其包封效率高达50%(Rwei等人,《美国国家科学院院刊》112,15719-15724,doi:10.1073/pnas.1518791112(2015);Epstein-Barash,H.等人,《美国国家科学院院刊》106,7125-7130,doi:10.1073/pnas.0900598106(2009);Zhan,C.等人,《纳米快报(Nano Letters)》16,177-181,doi:10.1021/acs.nanolett.5b03440(2016))。这些脂质体以最小的局部或全身性毒性在大鼠坐骨神经模型中实现了持续长达13.5个小时的周围神经阻滞。然而,TTX的初始突发释放预防了注射剂量进一步增加,并且由此预防了神经阻滞进一步延长。理想地,用于管理术后或慢性疼痛的可注射麻醉药将持续若干天到几周不等。此外,耗时且繁琐的制备方案使脂质体调配物对于临床使用是不方便的。

[0010] 因此,本发明的目的是提供生物相容性平台,这些生物相容性平台用于在单次施用后延长的时间段内递送具有降低的毒性的麻醉剂。

[0011] 本发明的另一个目的是提供特定部位一钠通道阻滞剂(S1SCB)的生物相容性调配物,这些生物相容性调配物延长具有降低的局部或全身性毒性的这些毒素的麻醉持续时间。

发明内容

[0012] 通过可水解酯键与生物可降解且生物相容的聚合物主链共价结合的包含麻醉剂,尤其是部位I钠通道阻滞剂(如河豚毒素)的缀合物提供延长的具有显著降低的毒性的局部麻醉。共价键足够稳定以预防麻醉剂的初始“突发释放”,而酯键的缓慢水解实现有效量的麻醉药的持续释放,从而在单次施用后阻滞体内疼痛持续长达72小时、或72小时以上、长达一个月。麻醉药以其天然形式释放。根据接受者的需要,通过改变聚合物主链的亲水性来调节缀合物内的酯键的水解速率。

[0013] 还已经确定,PEG充当增强缀合物内的麻醉药的功用的化学渗透增强剂。因此,描述了均匀分散到PEG200中的麻醉药-聚合物缀合物的调配物。在优选实施例中,将麻醉药-聚合物缀合物的调配物分散在PEG200中作为注射器可注射的调配物。还描述了制备共价麻醉药-聚合物调配物的方法以及其使用方法。

[0014] 在某些实施例中,麻醉剂是部位一钠通道阻滞剂(S1SCB)。示例性S1SCB包含河豚毒素(tetrodotoxin)(TTX)、石房蛤毒素(saxitoxin)(STX)、去氨基甲酰基石房蛤毒素(decarbamoyl saxitoxin)、新石房蛤毒素(neosaxitoxin)和膝沟藻毒素(gonyautoxin)。在示例性实施例中,该S1SCB是河豚毒素(tetrodotoxin)(TTX)。在一些实施例中,这些缀合物包含麻醉剂,该麻醉剂是香草素受体亚型1(TRPV1)激动剂。示例性TRPV1激动剂包含反式8-甲基-N-香草基-6-壬烯酰胺(辣椒素)、二氢辣椒素、降二氢辣椒素、高二氢辣椒素、高辣椒素和树脂毒素。

[0015] 缀合物包含与生物可降解的生物相容性聚合物共价结合的麻醉剂。聚合物的亲水

性可以以受控的方式进行修饰,例如通过添加亲水性聚合物。因此,缀合物使得能够通过改变缀合物中亲水性和疏水性聚合物与单体的浓度和相对比率可调节麻醉剂在体内的释放。优选的生物相容性聚合物主链包含聚酸酐。示例性聚酸酐聚合物是聚(癸二酸甘油酯)(PGS)。优选的亲水性聚合物包含聚环氧乙烷聚合物和共聚物,如聚(乙二醇)(PEG)。示例性PEG包含PEG100、PEG200、PEG300、PEG400、PEG500、PEG600、PEG700、PEG800、PEG900、PEG1000和PEG2000。优选的麻醉剂包含藻毒素(phyco toxin)和香草素。

[0016] 本领域的技术人员可以理解,可以根据接受者的需要来调整调配物内的麻醉剂的量。在一些实施例中,这些调配物包含剂量为每剂量介于0.1 μ g与200 μ g之间(包含端值),优选地介于1 μ g与100 μ g之间(包含端值)的麻醉剂。

[0017] 可以通过改变缀合物中的亲水性聚合物的量和比率来调整体内施用缀合物的调配物所产生的有效神经阻滞的持续时间。因此,在一些实施例中,根据接受者的需要,缀合物内的亲水性聚合物的量和比率足以在一小时到一个月的时间段内提供有效的神经阻滞。例如,在一些实施例中,调配物在体内递送一定量的麻醉药以提供有效的神经阻滞持续长达72小时。

[0018] 在其它实施例中,调配物在体内递送一定量的麻醉药以提供有效的神经阻滞持续至少72小时、长达两周或两周以上,例如长达一个月。调配物提供有效的神经阻滞,具有最小的全身性毒性并且对肌肉或周围神经几乎没有局部毒性。在一些实施例中,缀合物包含与两亲性聚合物共价连接的一种或多种另外的治疗剂、预防剂或诊断剂。在其它实施例中,将缀合物调配成脂质体或其它次级递送媒介,任选地包含一种或多种另外的治疗剂、预防剂或诊断剂。在其它实施例中,包含一种或多种另外的治疗剂、预防剂或诊断剂以通过掺合到注射剂中而与缀合物一起注射。另外的活性剂可以通过可水解酯键与聚合物主链共价连接。在一些实施例中,另外的活性剂是糖皮质激素,如地塞米松(dexamethasone)。

[0019] 提供了用于在有需要的受试者中单次施用后在不存在或显著降低局部毒性的情况下提供长达一个月持续时间的有效神经阻滞的方法。这些方法包含向该受试者施用有效量的调配物,该调配物包含共价缀合到PGS上的麻醉剂(任选地通过添加PEG修饰),在施用之后,该麻醉剂的有效量在施用部位处提供神经阻滞长达3天、长达一个月。在一些实施例中,这些方法有效治疗或预防该受试者的神经性疼痛。

附图说明

[0020] 图1A和1B是分别逐步地合成麻醉药(河豚毒素;TTX)和二羧酸/三醇聚合物(TD)的共价缀合物以形成TD-TXX缀合物(图1A)或包含PEG(P)以形成TDP-TXX缀合物(图1B)的示意图。图1C是PGS-PEG-TTX缀合物“晶格”的分子模型的示意图。TTX表示为(●),并且PGS-PEG表示为(-)。

[0021] 图2A-2C是分别示出随 f_{phii} (%)变化的接触角(度数)(图2A);随 f_{phii} (%)变化的 $T_{1/2}$ 质量损失(小时)(图2B);以及针对 T_gD_8 (-■-)、 $T_gD_8P_{200}$ (-●-)、 $T_gD_8P_{1000}$ (-▲-)和 $T_gD_8P_{2000}$ (-▼-)中的每一个随时间(小时)推移的质量损失(%) (图2C)的线形图。

[0022] 图3A和3B是分别示出与各自以0.001mg/ml(左条)、0.01mg/ml(中条)和0.1mg/ml(右条)的剂量的 T_gD_8 、 $T_gD_8P_{200}$ 、 $T_gD_8P_{1000}$ 和 $T_gD_8P_{2000}$ 中的每一种一起温育24小时的C2C12细胞(图3A)或PC12细胞(图3B)的细胞活力%的条形图。数据为平均值 \pm SD(n=4)。

[0023] 图4A-4B是分别示出了随 f_{phii} (%)变化的 $T_{1/2}$ 质量损失(小时)(图4A)和针对 T_gD_8 (-■-)、 $T_gD_8P_{200}$ (-●-)、 $T_gD_8P_{1000}$ (-▲-)和 $T_gD_8P_{2000}$ (-▼-)以及游离TTX(-◆-)中的每一种随时间(0-800小时)推移的累积的TTX释放(%) (图4B)的线形图。

[0024] 图5A和5B是分别逐步地合成麻醉药(河豚毒素; TTX)和二羧酸/三醇聚合物(TD)的共价缀合物,或包含一种或多种另外“连接”聚合物以形成TD聚合物-TXX缀合物(图5A),或包含地塞米松(Dex)以形成TD-Dex-TXX缀合物(图5B)的示意图。

[0025] 图6A-6E是线形图。图6A示出了分别针对 T_gD_8 (-■-)、 $T_gD_8P_{200}$ (-●-)、 $T_gD_8P_{1000}$ (-▲-)和 $T_gD_8P_{2000}$ (-▼-)以及游离TTX(-◆-)中的每一种随时间(小时)推移的累积的Dex释放(%)。图6B-6E分别示出了针对PGS-PEG2000-TTX/地塞米松(图6B)、PGS-PEG1000-TTX/地塞米松(图6C)、PGS-PEG200-TTX/地塞米松(图6D)和PGS-TTX/地塞米松(图6E)中的每一种随时间(小时)推移从25mg每种PGS-PEG-药物缀合物开始的累积的药物释放(%)和质量损失(%)。TTX表示为(-●-),地塞米松(Dex)表示为(-▲-),并且质量损失表示为(■)。

[0026] 图7是用于制备含PGS-PEG-TTX缀合物的PEG 200的可注射调配物的溶剂蒸发过程的示意图。

[0027] 图8A-8C是线形图。图8A示出了分别针对0.1rad/s (■)、1rad/s (●)和10rad/s (▲)的每一个随 f_{phii} 变化的复数粘度(Pa.s)。图8B示出了分别针对PEG200中的PGS-TTX (■)、PEG200中的PGS-PEG200-TTX (●)、PEG200中的PGS-PEG1000-TTX (▲)、PEG200中的PGS-PEG2000-TTX (▼)和PEG200 (◆)中的每一种随角频率(rad/s)变化的复数粘度(Pa.s)。图8C示出了分别针对 G'' (■)和 G' (●)中的每一个随角频率(rad/s)变化的模量 G' 、 G'' (Pa)。

[0028] 图9A-9D是分别示出了随TTX剂量(μg)变化的成功阻滞%(图9A);随TTX剂量变化的阻滞持续时间(小时)(图9B);随TTX剂量(μg)变化的对侧阻滞%(图9C);针对缀合的TTX/PEG200 (■)、游离TTX/PBS (●)、游离TTX/PEG200 (▲)中的每一种随TTX剂量(μg)变化的死亡率%(图9D)的线形图。

[0029] 图10A到10E是图。图10A是示出分别针对注射的腿部(■)和对侧腿部(-●-)中每一个,35mg T_gD_8 -TTX中的含10 μg TTX的25mg T_gD_8 TTX缀合物随时间(小时)推移的热潜伏期(秒)的线形图。图10B是示出分别针对注射的腿部(■)和对侧腿部(-●-)中每一个,含9.2 μg TTX的30mg $T_gD_8P_{200}$ -TTX缀合物随时间(小时)推移的热潜伏期(秒)的线形图。图10C是示出分别针对注射的腿部(■)和对侧腿部(-●-)中每一个,25mg $T_gD_8P_{1000}$ 中的含7 μg TTX的25mg TTX缀合物随时间(小时)推移的热潜伏期(秒)的线形图。图10D是示出分别针对注射的腿部(■)和对侧腿部(-●-)中每一个,25mg $T_gD_8P_{2000}$ 中的含4.8 μg TTX的30mg TTX缀合物随时间(小时)推移的热潜伏期(秒)的线形图。图10E是示出分别针对注射的腿部(■)和对侧腿部(-●-)中每一个,4.0 μg 游离TTX随时间(小时)推移的热潜伏期(秒)的线形图。

[0030] 图11是示出分别针对缀合的TTX/PEG200 (■)、游离TTX/PBS (-●-)和游离TTX/PEG200 (▲)中的每一个,随TTX剂量(μg)变化的阻滞持续时间(小时)的剂量响应曲线的线形图。

[0031] 图12A-12D是线形图。图12A和12B分别示出了10 μg TTX缀合物随 f_{phii} (%)变化的死亡率%(图12A)和阻滞持续时间(小时)(图12B)。图12C和12D分别示出了1 μg TTX缀合物随 f_{phii} (%)变化的成功阻滞%(图12C)和阻滞持续时间(小时)(图12D)。

[0032] 图13是示出相对荧光(%)随注射后时间(小时)推移的线形图。

[0033] 图14是示出针对PGS-Cap (■)、PGS-Cap-2 (-●-)、PGS-PEG-1000-Cap (▲) 和PGS-PEG-1000-Cap-2 (▼) 中的每一种,如由辣椒素的量表示(μg)的辣椒素随时间(天)推移从PGS-辣椒素缀合物中的释放的线形图。

具体实施方式

[0034] I. 定义

[0035] 术语“部位1钠通道阻滞剂”或“S1SCB”是指在称为“部位1”的位置处与钠通道的外开口结合的分子。在优选实施例中,部位1钠通道阻滞剂是天然存在的毒素或其衍生物。术语“其衍生物”包含部位1钠通道阻滞剂的任何衍生物,该衍生物与非衍生的部位1钠通道阻滞剂具有基本上相同的功能性质,如生物学和/或药理学的,即有效地阻滞钠通道。

[0036] 术语“麻醉”是指感觉丧失(局部的,不引起意识丧失;全身性的,意识丧失),并且通常是意识丧失而不丧失重要功能。术语“麻醉药”和“麻醉剂”是指在受试者中诱导麻醉的药剂。

[0037] 术语“血管收缩剂”是引起血管内腔变窄的药剂,尤其是由于血管舒缩作用。

[0038] 术语“浸润”是指注射到组织的多层或多个区域中。

[0039] 术语“注射”是指注射到组织或内腔的单个点中。

[0040] 术语“神经阻滞”是指由于沿神经干的冲动流的中断而产生的局部麻醉。

[0041] 术语“最低有效浓度”(MEC)是在给定位置中足以提供疼痛缓解的一种或多种药物的最低局部浓度。

[0042] 术语“个体”、“个体”、“受试者”和“患者”可互换使用并且是指哺乳动物,包括但不限于人、如小鼠和大鼠等啮齿动物以及其它实验室动物。

[0043] 术语“生物相容的”是指一种或多种本身对宿主(例如,动物或人)无毒,也不会会在宿主中以有毒浓度产生单体或低聚亚基或其它副产物的速率降解(如果聚合物降解的话)的材料。

[0044] 术语“主链聚合物”或“主链”是指与麻醉药共价连接的共价麻醉药-聚合物缀合物内包含的化学部分或聚合物。主链聚合物不形成赋形剂的一部分。示例性主链聚合物包含二羧酸/三醇衍生物。优选的主链聚合物是聚(癸二酸甘油酯)(PGS)-PEG共聚物(PGS-PEG)。

[0045] 术语“可水解接头”是指可以被水解降解的任何化学键或部分,如酯键。

[0046] 术语“突发释放”是指药剂的快速释放或递送,例如,从递送媒剂或结构中快速递送活性剂。例如,与药物通过递送系统扩散或降解的较慢释放相比,药物在体内从药物递送系统快速或“突发”释放可能归因于吸附或弱结合到递送系统的药物的级分。

[0047] 术语“药学上可接受的载剂”包含任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂以及吸收延迟剂等。药学活性物质的此类介质和药剂的使用在本领域中是众所周知的。除非任何常规介质或药剂与活性化合物不相容,否则考虑在治疗性调配物中使用它们。补充性活性化合物也可以并入到调配物中。

[0048] II. 组合物

[0049] 已经确定的是,包含共价缀合到生物可降解的生物相容性聚合物(如PGS和PGS-PEG主链)上的局部麻醉药的调配物在体内提供麻醉药的可调节释放。调配物使得能够局部递送具有降低的全身性和局部毒性的高浓度的麻醉药。可通过改变麻醉药的量、一种或多

种聚合物的分子量、组合物和浓度以及用于缀合分子的共价接头的类型控制在施用部位处释放麻醉药的速率和量。

[0050] 示例性麻醉剂包含部位一钠通道阻滞剂和香草素。麻醉剂与至少一种局部两亲性聚合物缀合。示例性两亲性聚合物包含聚(癸二酸甘油酯)(PGS)。在一些实施例中,PGS缀合物包含一种或多种亲水性聚合物。示例性亲水性聚合物包含聚乙二醇(PEG)。下面将详细讨论这些组分中的每一种。共价麻醉药-聚合物缀合物的调配物还可以包含另外的活性剂,如治疗剂或诊断剂以及赋形剂和防腐剂。

[0051] A. 麻醉剂

[0052] 麻醉剂包含在共价麻醉药-聚合物缀合物中。在缀合之前,麻醉剂包含一个或多个游离羟基或羧基。在一些实施例中,在缀合之前,将麻醉剂修饰为包含一个或多个游离羟基或羧基。在一些实施例中,麻醉剂是局部麻醉药。麻醉剂的示例性类别包含阻滞部位一钠通道(S1SCB)的药剂和香草素受体亚型1(TRPV1)激动剂。优选的麻醉剂是河豚毒素(TTX)。

[0053] 1. 部位1钠通道阻滞剂(S1SCB)

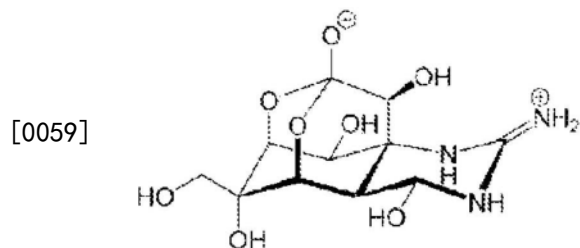
[0054] 部位1阻滞剂是因其对电压门控钠通道的有效和特异性阻滞而长期受到公认分子家族。部位1钠通道阻滞剂(S1SCB)包含藻毒素(石房蛤毒素(STX)、去氨基甲酰基石房蛤毒素、新石房蛤毒素(Neo)和膝沟藻毒素)、河豚毒素(TTX)和芋螺毒素(conotoxin)中的若干种。

[0055] i. 河豚毒素(TTX)

[0056] 河豚毒素(TTX)是阻滞人心肌细胞(肌肉的收缩细胞)中的快速Na⁺电流由此抑制其收缩的高效的神经毒素。化学上,其是氨基多氢喹啉(参见《药理学评论(Pharmacological Reviews)》,第18卷,第2期,第997-1049页)。

[0057] 单独的河豚毒素毒性太大,无法用作麻醉药。与单独的河豚毒素相比,河豚毒素与布比卡因(bupivacaine)的组合在大鼠中产生了长持续时间的坐骨神经阻滞,而没有增加全身性毒性(Kohane等人,《麻醉学》,1998:119-131)。尽管电压门控Na⁺通道的有效抑制对将单独用作药物的TTX来说太危险,但在治疗如帕金森氏病和晚期癌症患者的慢性疼痛等病状时,以受控方式阻滞此类通道可能是期望的。

[0058] 缀合物的形成将这种高毒性毒素转化为有用且安全的麻醉药。



[0060] 式I:河豚毒素的化学结构(C₁₁H₁₇N₃O₈)

[0061] a. 河豚毒素的来源

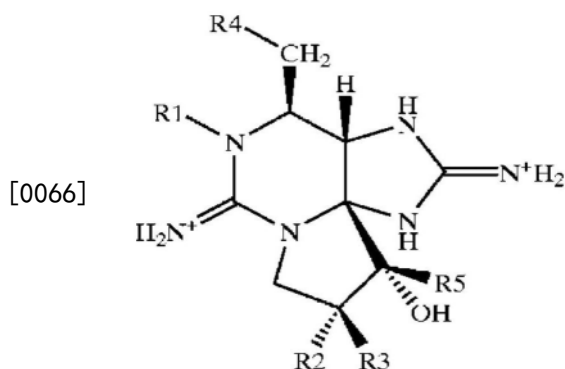
[0062] 河豚毒素已经从如蓝环章鱼等动物中分离出来,并且由细菌产生。与TTX产生相关的最常见细菌是弧菌属细菌(Vibrio Sp. bacteria),其中溶藻弧菌(Vibrio alginolyticus)是最常见的物种。已经示出河豚鱼、毛颚类动物和纽形动物含有溶藻弧菌和TTX,然而,这些事实与动物体内TTX的产生之间的联系尚未得到稳固确立,并且关于细菌

是否真正是动物体内TTX的来源,文献上仍存在很多争论。尽管河豚毒素可能是最广为人知的部位1毒素,但由于它必须来自河豚鱼,因此对临床使用来说非常昂贵;当制备TTX的内共生细菌离体生长时,其产生的TTX就会减少。河豚毒素可以从若干个物种的河豚鱼和某些物种的加利福尼亚州蝾螈的卵巢和卵子中获得。也已经报道了河豚毒素的全部化学合成的多种方案,包含通过狄尔斯-阿尔德反应(Diels-Alder Reaction)或从碳水化合物和同源物合成TTX(Ohyabu等人,《美国化学学会杂志(J Am Chem Soc.)》7月23;125(29):第8798-805页(2003);Nishikawa等人,《应用化学国际版(Angew.Chem.Int.Ed.)》,43,4782.DOI:10.1002/anie.200460293(2004);Chau和Ciufolini中的评论,《海洋药物(Mar Drugs)》,9(10):2046-2074(2011))。合成特征是使用对映体纯的亲二烯体(dienophile)通过狄尔斯-阿尔德环加成反应快速构建环己烯,早期引入胺化的四元中心,并使用此中心指导另外的功能化在环周围的相对构型。

[0063] ii. 藻毒素

[0064] 藻毒素充当可兴奋细胞中存在的电压依赖性钠通道的特异性阻滞剂(Kao,C.Y.,《药学评论(Pharm.Rev.)》,18:997-1049(1966))。由于钠通道的抑制作用,神经冲动的传递受到阻滞,并且在神经运动连接的水平上预防了神经递质的释放,这预防了肌肉收缩。由于这些生理效应,当用作与如肌肉痉挛和局灶性肌张力障碍等肌肉活动过度相关的病理学中的肌肉活动抑制剂时,这些化合物在以可注射形式局部施加时在药理学中可能有用。此外,由于在传递水平上的神经冲动的阻滞在这些化合物作为局部浸润应用时产生,因此它们不仅能够阻滞传出的神经传递通路,而且还能阻滞传入通路并引起感觉通路的抑制并且在这些化合物局部注射时产生麻醉效应。这是令人惊讶的效应,因为两种效应是同时发生的,如美国专利第4,001,413号所描述的。

[0065] 这些藻毒素的化学结构具有式II的一般结构:



[0067] 式II藻毒素的一般化学结构

[0068] 该结构的特定化学结构由根据表1.1的取代基R1到R5定义。

[0069] 表1.1:相对于式I的藻毒素的化学结构

[0070]

化合物	R1	R2	R3	R4	R5
石房蛤毒素	H	H	H	COONH ₂	OH
新石房蛤毒素	OH	H	H	COONH ₂	OH
膝沟藻毒素1	OH	H	OSO ⁻³	COONH ₂	OH
膝沟藻毒素2	H	H	OSO ⁻³	COONH ₂	OH
膝沟藻毒素3	OH	OSO ⁻³	H	COONH ₂	OH

膝沟藻毒素4	H	OSO ⁻³	H	COONH ₂	OH
膝沟藻毒素5	H	H	H	COONHSO ⁻³	OH

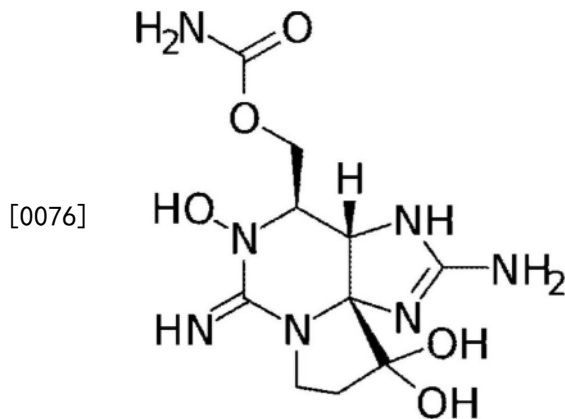
[0071] a. 石房蛤毒素

[0072] 石房蛤毒素 (STX) 首先从阿拉斯加奶油蛤 (butterclam, 大石房蛤 (*Saxidomus gigantcus*)) 中提取出来, 其中其存在于膝沟藻属中的藻类中。所报告的化学式为 C₁₀H₁₅N₇O₃·2HCl。其可自由溶于水和甲醇, 并且据信该毒素具有并入两个胍基部分的全氢嘌呤核 (perhydropurine nucleus)。STX 负责麻痹性贝类中毒。据报道, 它是已知的毒性最高的非蛋白质化合物之一, 其在小鼠中的毒性为 8μg/Kg (对人类来说, 大约 0.2-1.0mg 将是致命的), 并且因此被广泛认为毒性太大以致无法单独用作局部麻醉药。

[0073] b. 新石房蛤毒素和去氨基甲酰基石房蛤毒素

[0074] 新石房蛤毒素和去氨基甲酰基石房蛤毒素可能更有效, 并且可以具有优于调配物中的石房蛤毒素的优势。

[0075] 新石房蛤毒素 (“NeoSTX” 或 “Neo”) 作为持续时间延长的局部麻醉药正在临床开发中 (Rodriguez-Navarro 等人, 《麻醉学》, 2007; 106: 339-45; Rodriguez-Navarro 等人, 《神经毒性研究 (Neurotox. Res.)》, 2009; 16: 408-15; Rodriguez-Navarro 等人, 《区域麻醉与疼痛医学》, 2011; 36: 103-9)。对人类志愿者中的皮下浸润的 1 期研究表明, NeoSTX 造成有效的皮肤感觉减退 (Rodriguez-Navarro 等人, 《麻醉学》, 2007; 106: 339-45), 并且第二个 1 期研究表明, 与单独使用 NeoSTX 或布比卡因相比, 与布比卡因组合导致延长的镇痛 (Rodriguez-Navarro 等人, 《神经毒性 Res.》, 2009; 16: 408-15)。



[0077] 式 III: 新石房蛤毒素 (Neo)

[0078] (i). 藻毒素的来源

[0079] 石房蛤毒素 (STX) 和其衍生物可以在生物反应器中由藻类产生。藻毒素新石房蛤毒素、石房蛤毒素和膝沟藻毒素是由亚历山大藻属 (*Alexandrium* sp.)、多甲藻属 (*Piridinium* sp.) 和裸甲藻属 (*Gimnodinium* sp.) 的有害藻类水华产生的活性化合物 (Lagos, N., 《生物研究 (Biol. Res.)》, 31: 375-386 (1998))。在过去 15 年中, 已经证实, 这些藻毒素除由海洋沟鞭藻产生之外还可以由如光合蓝绿藻等淡水蓝藻细菌产生。

[0080] 已经鉴别出仅四个能够产生麻痹性藻毒素的蓝藻细菌属, 并且每一种产生不同 (藻毒素的量和类型两者都不同) 的藻毒素的混合物, 即其产生麻痹性藻毒素的不同图谱 (Lagos 等人, 1999, 《毒素 (TOXICON)》, 37: 1359-1373 (1999); Pereira 等人, 《毒素》, 38: 1689-1702 (2000))。

[0081] STX还可以根据至少三种不同的方法通过化学合成来产生(Kishi等人,《美国化学学会杂志》,98,2818(1977);Jacobi等人,《美国化学学会杂志》,106(19),第5594-5598页(1984);Fleming等人,《美国化学学会杂志》,3926(2006))。

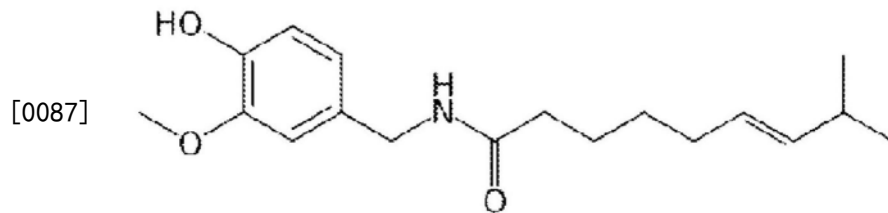
[0082] 新石房蛤毒素(NeoSTX)和去氨基甲酰基石房蛤毒素这两种石房蛤毒素衍生物在生产工艺和效力方面均具有优势。一项研究用石房蛤毒素系列的若几个成员(包含NeoSTX)检查大鼠坐骨神经阻滞(Kohane等人,《区域麻醉与疼痛医学》,25:52-9(2000))。当与布比卡因或肾上腺素组合时,石房蛤毒素和这两种衍生物都得到显著协同阻滞和延长的阻滞(在体内在大鼠坐骨神经中1-2天)。

[0083] 2. 香草素受体亚型1 (TRPV1) 激动剂

[0084] a. 辣椒素和其衍生物

[0085] 辣椒素是辣椒素类物质化合物组的成员,这些辣椒素类物质化合物表征为含有3-羟基-4-甲氧基-苄基酰胺(香草素环)药效团和疏水性烷基侧链。辣椒素是负责产生胡椒果实及其产物的刺激性的化合物。

[0086] 辣椒素于1876年首次分离,并且于1919年首次确定其经验结构为 $C_{18}H_{27}NO_3$ (8-甲基-N-香草基-反式-6-壬烯酰胺)。根据式IV,辣椒素的分子量为305道尔顿,并且含有具有11个碳的疏水性烷基侧链的香草素环药效团。疏水性烷基侧链内的双键结构预防内部旋转,并且分子显示顺式/反式异构。然而,顺式异构体的布置不太稳定,并且因此辣椒素作为反式异构体天然存在。



[0088] 式IV:辣椒素

[0089] 辣椒素的挥发性很低,而且其完全无味。纯化的辣椒素在室温下为蜡状无色物质,并且不溶于冷水,但自由地溶于醇、脂肪和油。延长的烃尾使辣椒素能够并入到富含脂质的细胞膜中,并且已知辣椒素可从皮肤和粘膜局部有效地吸收。发现辣椒素的药代动力学半衰期为大约24小时。

[0090] 辣椒素已经FDA批准作为慢性疼痛管理的局部药物。辣椒素结合瞬态受体电位香草素(TRPV1)(Caterina等人,《自然(Nature)》,389:816-824(1997)),这介导感觉神经元中的有害刺激。其在动物研究中显示是安全的(Park等人,《抗癌研究(Anticancer Res.)》,18:4201-4205(1998))。

[0091] 辣椒素类物质是天然存在的化合物,这些化合物是红辣椒的活性组分并以其在全世界的烹饪应用中的用途而闻名。辣椒素类物质在属于茄科辣椒属的植物果实内产生。“辣的”胡椒植物的果实(如通常被称为墨西哥胡椒或哈瓦那辣椒的果实)是辣椒素的丰富天然来源。辣椒素定位在胡椒果实的种子与肋状物之间,并保留在干燥和/或磨碎的胡椒果实内。以高辣椒素类物质含量而闻名的辣椒物种的实例包含彩椒(C. annum)(油性树脂红辣椒)、小米椒(C. frutescens)(墨西哥胡椒)和黄灯笼辣椒(C. chinense)(哈瓦那胡椒),这些被发现含有0.22-20mg总辣椒素类物质/克干重。辣椒素是胡椒植物中最丰富的辣椒素类物

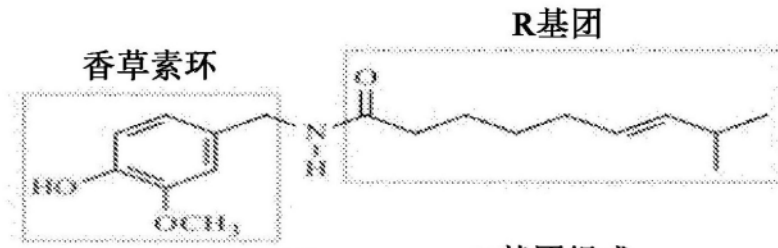
质,在大多数刺激性品种中占总辣椒素类物质的约71% (参见de Lourdes Reyes-Escogido等人,《分子学(Molecules)》,16:1253-1270(2011))。辣椒素生物合成涉及由酶辣椒素合酶(CS)引起的香兰素胺和8-甲基壬烯酸的缩合。

[0092] 纯化的辣椒素是可商购获得的(西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich) #M2808、CAS#404-86-4)。辣椒素和其类似物在中等压力下在介于140°C与170°C之间的温度下使用氯化脂肪酸和胺在工业上生产(参见Kaga等人,《有机化学杂志(J.Org.Chem.)》,54:3477-3478,1989和Kaga等人,《四面体(Tetrahedron)》1996,52,8451-8470)。然而,辣椒素的大规模化学合成的应用受到所需试剂的毒性的限制,这一缺点使酶合成成为传统化学合成的吸引人的替代方案。因此,已知使用酶催化反应从底物分子体外化学合成辣椒素类物质的若干种方法(参见例如Kobata等人,《生物科技快报(Biotechnol.Lett.)》,21,547-550(1999))。体外辣椒素的酶形成已经使用生长在液体培养基中的辣椒属彩椒植物的细胞和组织得到证明(参见Johnson,《植物科学(Plant Sci.)》70:223-229(1990))。来自固定在藻酸钙中在体外生长的果实的细胞和胎座组织在培养基中产生了辣椒素。观察到辣椒素合成潜在在固定的胎座组织中大于固定的细胞。在培养30天之后,观察到最大产率为2,400μg辣椒素/g固定胎座。

[0093] b. 辣椒素的类似物

[0094] i. 辣椒素类物质

[0095] 在一些实施例中,辣椒素是辣椒素的辣椒素类物质类似物。辣椒素的辣椒素类物质类似物是本领域中已知的。参见例如Reilly和Yost,《药物代谢作用与处置(Drug Metab.Disp.)》,33:550-536(2005)。Reilly和Yost描述了辣椒素的五种天然存在的辣椒素类物质类似物,这些化合物具有相同的3-羟基-4-甲氧基-苄基酰胺(香草素环)药效团,但疏水性烷基侧链部分具有差异,如C15-16(ω -2,3位置)的饱和度、在C17处的甲基的缺失(叔碳的损失)以及烃链长度的变化。辣椒素的天然存在的辣椒素类物质类似物包含但不限于高辣椒素、降二氢辣椒素、二氢辣椒素、高二氢辣椒素、n-香草基辛酰胺、香草壬酰胺和n-香草基癸酰胺,如在式V中。



辣椒素类物质类似物

辣椒素
高辣椒素

降二氢辣椒素
二氢辣椒素
高二氢辣椒素

[0096]

n-香草基辛酰胺
香草壬酰胺
n-香草基癸酰胺

R基团组成

$\text{CO}(\text{CH}_2)_8\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
 $\text{CO}(\text{CH}_2)_9\text{CH}(\text{CH}_3)_2$

$\text{CO}(\text{CH}_2)_7\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
 $\text{CO}(\text{CH}_2)_8\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
 $\text{CO}(\text{CH}_2)_9\text{CH}(\text{CH}_3)_2$

$\text{CO}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$
 $\text{CO}(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$
 $\text{CO}(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$



[0097] 式V

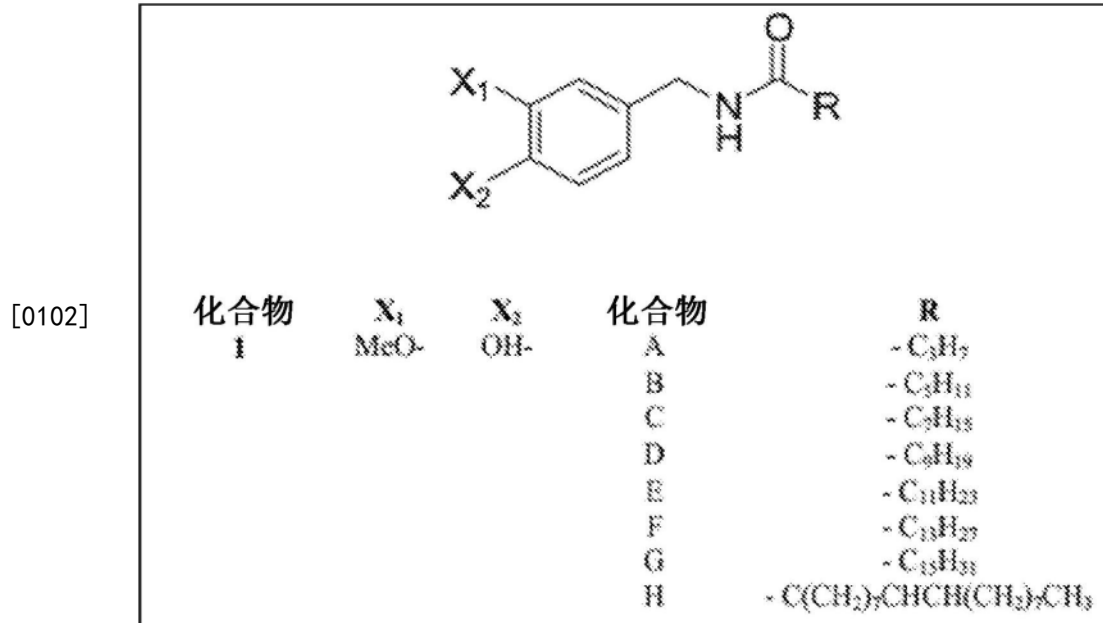
[0098] 在一些实施例中,辣椒素是辣椒素的辣椒酯类物质类似物。化合物的包含辣椒素酯、二氢辣椒素酯和降二氢辣椒素的辣椒酯类物质基团在结构上与辣椒素类物质类似,但是具有不同的中心键,该中心键是辣椒素类物质中的酰胺部分和辣椒酯类物质中的酯部分,如在式VI中。辣椒酯类物质是从几种非刺激性红辣椒植物中分离出来的,如CH19甜品种。辣椒素酯的生物效力与辣椒素类似,然而辣椒酯类物质没有展现出刺激性或感官刺激。



[0100] 式VI:辣椒素与辣椒素酯的差异。

[0101] 在一些实施例中,辣椒素是合成的辣椒素类物质或辣椒素的辣椒酯类物质类似物。辣椒素的多种合成(非天然存在)类似物是本领域中已知的(参见例如Sato等人,《生物

化学与生物物理学学报(Biochim.Biophys.Acta.)》,1273:21-30(1996)。刺激性和非刺激性类似物可以使用不同的酰基链长度和/或芳香族环中的化学取代来合成。具体地,可以通过修饰苯环上的取代图案和/或甲氧基的数量来合成修饰辣椒素类物质和辣椒酯类物质两者,该苯环可以叠加在泛醌的醌环上。另外,可以通过改变分子中偶极酰胺键单元的位置和/或此单元的其他化学修饰来修饰辣椒素。化学修饰的实例在式VII中给出。



[0103] 式VII:辣椒素的合成修饰的实例。

[0104] B. 聚合物

[0105] 用于体内麻醉药的控制释放的缀合物包含例如通过酯键与麻醉药共价缀合的一种或多种聚合物。麻醉药所结合的聚合物也可以被称为“主链”聚合物。

[0106] 麻醉药和聚合物的共价缀合物需要由合适聚合物(如二羧酸/三醇(TD)聚合物)形成的“主链”,麻醉药可以结合到该主链上。在图1A和1B中分别提供了产生和缀合此类聚合物的代表性方案。

[0107] 在一些实施例中,缀合物包含聚酯聚合物。在一些实施例中,缀合物包含多于一种聚酯聚合物的共混物。优选的聚酯聚合物是聚(癸二酸甘油酯)(PGS)。

[0108] 在一些实施例中,使PGS与一种或多种另外的聚酯聚合物共混以改变缀合物的材料性质中的一个或多个材料性质。用于包含在缀合物内的合适的聚酯聚合物包含生物可吸收的合成聚酯,如聚(丙交酯-共-己内酯)、聚(己内酯)(PCL)、聚二噁烷酮(PDO)、聚(原酸)酯、聚(乙醇酸)(PGA)、乳酸和乙醇酸的聚合物、聚(乳酸)(PLA)、聚丁酸酯、聚(丙交酯-共-乙交酯)、聚(羟基丁酸酯)以及其共聚物、共混物和化学衍生物(化学基团的取代、添加,例如烷基、亚烷基、羟基化、氧化和本领域的技术人员常规进行的其它修饰)。具有-COOH或-OH基团的任何天然或合成聚合物可以用于缀合麻醉剂。因此,如透明质酸、单宁酸、聚丙烯酸等天然和合成聚合物和其它包含羧基端或侧链部分的化合物可以包含在麻醉药缀合物中。通常,包含在共价麻醉药缀合物中的聚合物是生物可降解的且生物相容的。然而,在一些实施例中,一种或多种非生物可降解的聚合物包含在共价麻醉药缀合物中。当共价麻醉药缀合物包含一种或多种生物可降解的聚合物和一种或多种非生物可降解的聚合物的共混物

时,生物可降解的聚合物与非生物可降解的聚合物的比例可以根据接受者的需求而变化,例如以调整一种或多种麻醉剂的递送量和/或速率。

[0109] 1. 聚(癸二酸甘油酯) (PGS)

[0110] 在一些实施例中,将其它生物可吸收的聚酯与聚(癸二酸甘油酯) (PGS) 组合或取代PGS,以在共价麻醉药-聚合物缀合物中使用。与聚合物共价结合以用于体内麻醉药的控制释放的麻醉药的缀合物可以包含聚(癸二酸甘油酯) (PGS)。PGS是在多种生物医学应用中使用的生物可降解的聚酯聚合物。PGS通常通过甘油和癸二酸的缩聚制备。PGS是生物相容的且生物可降解的,并且可以通过控制如固化时间、固化温度、反应物浓度和丙烯酸化PGS的丙烯酸化程度等因素来调整PGS的机械性质和降解动力学(Rai等人,《聚合物科学进展(Progress in Polymer Science)》第37卷,(8),第1051-1078页(2012))。

[0111] 甘油是脂质的基本结构单元,而癸二酸是中链到长链脂肪酸的 ω -氧化中的天然代谢中间物。另外,甘油和含有癸二酸的共聚物已经食品药品监督管理局(Food and Drug Administration) (FDA) 批准用于其医学应用。由于其期望的机械性质、生物相容性和受控降解,因此已提出PGS用于组织工程化应用(Jia, Y. 等人,《聚合物化学(Polymer Chemistry)》7,2553-2564,doi:10.1039/c5py01993a(2016); Rai等人,《聚合物科学进展》37,1051-1078(2012); Wang等人,《生物医学材料研究杂志》A部分66A,192-197,(2003); Loh等人,《材料化学杂志(Journal of Materials Chemistry)》B 3,7641-7652(2015); Wang等人,《自然生物技术(Nat Biotech)》20,602-606(2002))。PGS以羟基和羧基终止,并且可以很容易地与肽、蛋白质和药物共价缀合。具有丰富内羟基分子结构的TTX可以通过酯键共价缀合到PGS上,并通过这些键的水解释放,如图1所描绘的。另外,PGS和基于PGS的共聚物的诱导TTX在接近零阶曲线后长期持续释放的表面易蚀性质使其在控制药物递送应用方面是独特的并且优选于其它聚酯(Wang等人,《生物医学材料研究杂志》A部分66A,192-197(2003))。PEG的并入允许调节所得缀合物的亲水性,并且因此调节其TTX释放速率。这些特性赋予这种缀合物以最小的全身性和局部毒性用于持续时间延长的局部麻醉的可能性。

[0112] 2. 可调节亲水性的聚合物

[0113] 与聚(癸二酸甘油酯) (PGS) 共价结合的麻醉药的缀合物任选地包含一种或多种另外的亲水性聚合物。亲水性聚合物延长PGS主链并改变缀合物的亲水性。增加亲水性聚合物相对于PGS的相对量会增加缀合物的亲水性。缀合物的亲水性与体内酯键的水解速率有关。PGS-麻醉药缀合物中的酯键的水解速率与体内麻醉剂从缀合物的释放有关。因此,共价结合的麻醉药在体内从聚酯缀合物中释放的速率受与PGS-麻醉药缀合物连接或缔合的亲水性聚合物的量和大小控制。

[0114] 在优选实施例中,一种或多种亲水性聚合物组分含有聚(亚烷基二醇)链。聚(亚烷基二醇)链可以含有介于1与500个之间的重复单元,更优选地介于40与500个重复单元。合适的聚(亚烷基二醇)包含聚乙二醇、聚丙烯1,2-二醇、聚(环氧丙烷)、聚丙烯1,3-二醇以及其共聚物。

[0115] 可以包含各种各样的亲水性聚合物,包含聚 β -氨基酯和1,2-氨基醇脂质。在一些实施例中,聚合物是烷基修饰的聚合物,如烷基修饰的聚(乙二醇)。其它示例性聚合物包含聚(亚烷基二醇)、多糖、聚(乙烯醇)、聚吡咯烷酮、聚氧乙烯嵌段共聚物(例如,

PLURONIC®)、聚乙二醇 (PEG) 以及其共聚物。优选的亲水性聚合物是生物相容的 (即, 不诱导显著的炎性或免疫应答) 并且是无毒的。合适的亲水性聚合物的实例包含但不限于: 聚(亚烷基二醇), 如聚乙二醇 (PEG)、聚(丙二醇) (PPG) 以及乙二醇和丙二醇的共聚物; 聚(氧乙基化多元醇)、聚(烯醇)、聚(乙烯吡咯烷酮)、聚(甲基丙烯酸羟烷酯)、聚(羟烷基甲基丙烯酰胺)、聚(糖)、聚(氨基酸)、聚(乙烯醇) 以及其共聚物; 三元共聚物及其混合物。

[0116] 在一些实施例中, 一种或多种亲水性聚合物组分是含有一个或多个聚环氧乙烷 (PEO) 嵌段以及由其它生物相容的聚合物 (例如, 聚(丙交酯)、聚(乙交酯)、聚(丙交酯-共-乙交酯) 或聚(己内酯)) 构成的一个或多个嵌段的共聚物。一种或多种亲水性聚合物区段可以是含有一个或多个 PEO 嵌段并且含有一个或多个聚环氧丙烷 (PPO) 嵌段的共聚物。具体实例包含 PEO-PPO-PEO 的三嵌段共聚物, 如 POLOXAMERS™ 和 PLURONICS™。

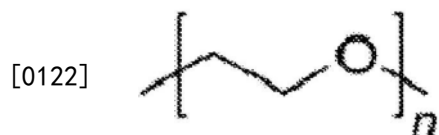
[0117] a. 聚(乙二醇) (PEG)

[0118] 与 PGS 共价结合的麻醉药的缀合物任选地包含所描述的一种或多种 PEG。

[0119] PEG 是常用的亲水性聚合物药剂。包含在 MDNP 中的两亲性 PEG 的大小、相对数量和分布可能影响所得的经过修饰的基于树枝状聚合物的纳米颗粒 (MDNP) 的生物物理特性, 如结构特征和电荷密度。

[0120] MDNP 的物理性质与两亲性 PEG 的大小、相对数量和分布 (即, 聚乙二醇化的程度) 直接相关。可以修饰的示例性性质包含通过一种或多种类型的真核细胞摄取的 MDNP 的功效、细胞内递送治疗剂、预防剂和诊断剂的速度和功效以及 MDNP 的免疫原性和细胞毒性。在某些实施例中, 聚乙二醇化导致 MDNP 的电荷中和。

[0121] 通常, 两亲性 PEG 包含短链寡核苷酸-乙二醇。示例性寡核苷酸-乙二醇包含二乙二醇、三乙二醇、四乙二醇、五乙二醇、六乙二醇等。



[0123] 式 VIII: 短链寡核苷酸-乙二醇 ($n=1-6$) PEG 单体的重复单元。

[0124] 在一些实施例中, 两亲性聚合物是与单甲氧基聚乙二醇 (mPEG) 缀合的磷脂。在某些实施例中, 脂质相关的 PEG 或 mPEG 是支化或“多臂”PEG。MDNP 可以包含具有至少两个带有巯基或硫代吡啶端基的支链的多臂聚乙二醇; 然而, 可以使用带有如琥珀酰亚胺或马来酰亚胺端等其它端基的 PEG 聚合物。

[0125] 共价麻醉药-聚合物缀合物可以包含具有不同分子量的聚乙二醇聚合物。例如, PEG 的分子量可以介于大约 100Da (即, PEG 100Da) 与大约 12,000kDa (即, PEG 12kDa) 之间, 包含端值。可以使用单一物种的两亲性 PEG 或由两种或更多种不同物种的两亲性 PEG 形成共价麻醉药-聚合物缀合物。例如, 可以用具有不同分子量的多种不同物种的 PEG 形成共价麻醉药-聚合物缀合物。

[0126] 共价麻醉药-聚合物缀合物可以使用单一两亲性聚合物物种或多种不同的两亲性聚合物物种的混合物形成。两亲性聚合物可以用加合物修饰。

[0127] 例如, 两亲性聚合物可以用相同或不同的一种或多种不同的加合物修饰。因此, 可以使用 PGS 和一种或多种 PEG 以及任选地包含相同或不同加合物的混合物的其它聚合物来形成共价麻醉药-聚合物缀合物。

[0128] 示例性PEG是具有一定分子量的那些PEG,如PEG(100)、PEG(200)、PEG(300)、PEG(400)、PEG(500)、PEG(600)、PEG(750)、PEG(800)、PEG(900)、PEG(1,000)、PEG(2,000)、PEG(3,000)、PEG(5,000)、PEG(6,000)、PEG(7,000)、PEG(8,000)、PEG(9,000)、PEG(10,000)、PEG(12,000)以及分子量大于12,000的PEG,如PEG(20,000)。脂质组分可以包含饱和或非饱和和脂肪酸部分。

[0129] 在一些实施例中,共价麻醉药-聚合物缀合物包含一个或多个物种的PEG或[甲氧基(聚乙二醇)](mPEG)分子。当采用多于单一物种的PEG和/或mPEG时,它们可以以相同或不同的摩尔比存在。可以并入在共价麻醉药-聚合物缀合物内的示例性PEG或mPEG包含的PEG或mPEG组分的分子量介于100Da与80,000Da之间,例如介于100Da与10,000Da之间,更优选地介于200Da与5,000Da之间,最优选地介于200Da与2,000Da之间。

[0130] 可以以介于1:01与1:1,000之间的聚酯:PEG摩尔比包含PEG和/或mPEG。例如,在一些实施例中,PEG以以下的PGS:PEG摩尔比存在于PGS-PEG-TTX缀合物中:1:1或大于1:1,如1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9或1:10,或大于1:10。在一些实施例中,PEG以以下的PEG:PGS摩尔比存在于PGS-PEG-TTX缀合物中:1:1或大于1:1,如1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9或1:10,或大于1:10。

[0131] 包含在缀合物内的PEG(或其它亲水性聚合物)的量和大小可以根据体内缀合物的期望的生理性质而变化。

[0132] C. 共价接头部分

[0133] 与PGS或PGS-PEG共价结合的麻醉药的缀合物或其它聚合物缀合物通过一种或多种类型的共价键结合一种或多种麻醉剂。在优选实施例中,共价键是生物可降解的键,使得该键在体内降解或以其它方式断裂,从而在降解部位处或其附近释放一种或多种麻醉剂。示例性生物可降解的共价键是可水解的键,如酯键。

[0134] 在一些实施例中,共价麻醉药-聚合物缀合物包含麻醉剂和/或另外的活性剂,该麻醉剂和/或另外的活性剂例如通过酯键直接与PGS或PGS-PEG或其它聚合物主链缀合或连接。任选地,麻醉剂或化合物通过不同的键(如二硫键、碳酸酯键、氨基甲酸酯键、硫酸酯键、胍键、酰胍键和酰胺键)通过一个或多个间隔子/接头与PGS或PGS-PEG或其它聚合物主链缀合。在一些实施例中,通过在药剂与PGS或PGS-PEG或其它聚合物主链之间提供二硫桥的适当的间隔子发生连接。在这种情况下,在身体中发现的还原条件下,共价麻醉药-聚合物缀合物能够通过硫醇交换反应在体内快速释放药剂。

[0135] 1. 间隔子

[0136] 在一些实施例中,麻醉剂通过一个或多个中间“间隔子”或“接头”分子偶联到聚合物主链。间隔子或接头可以增强分子的亲水性,并由此提高麻醉药/聚合物键的水解或降解的速率,从而使得体内麻醉剂的释放增加。因此,可以包含间隔子以更改体内麻醉药和/或另外的活性剂从聚合物释放的速率。

[0137] 术语“间隔子”包含用于将活性剂连接到PGS或PGS-PEG或其它聚合物主链的化合物。间隔子可以是单个化学实体,也可以是连接在一起以桥接聚合物和麻醉剂的两个或更多个化学实体。间隔子可以包含任何小的化学实体、肽或具有巯基、硫代吡啶、琥珀酰亚胺基、马来酰亚胺基、乙烯砜和碳酸酯端的聚合物。

[0138] 间隔子可以选自以巯基、硫代吡啶、琥珀酰亚胺基、马来酰亚胺基、乙烯砜和碳酸

酯基团封端的化合物。间隔子可以包含硫代吡啶封端的化合物,如二硫代二吡啶、3-(2-吡啶基二硫代)-丙酸N-琥珀酰亚胺酯(SPDP)、6-(3-[2-吡啶基二硫代]-丙酰胺基)己酸琥珀酰亚胺酯(LC-SPDP)或6-(3-[2-吡啶基二硫代]-丙酰胺基)己酸磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-LC-SPDP)。间隔子还可以包含肽,其中肽是线性或环状的,基本上具有巯基,如谷胱甘肽、高半胱氨酸、半胱氨酸及其衍生物、arg-gly-asp-cys (RGDC)、环(Arg-Gly-Asp-d-Phe-Cys) (c (RGdFC))、环(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Cys)、环(Arg-Ala-Asp-d-Tyr-Cys)。间隔子可以是巯基酸衍生物,如3巯基丙酸、巯基乙酸、4巯基丁酸、硫杂环戊烷-2-酮、6巯基己酸、5巯基戊酸和其它巯基衍生物,如2巯基乙醇和2巯基乙胺。

[0139] 在一些实施例中,间隔子是硫代水杨酸和/或其衍生物,(4-琥珀酰亚胺基氧基羰基-甲基- α -2-吡啶基硫代)甲苯、(3-[2-吡啶基硫代]丙酰基酰肼)。在一些实施例中,间隔子具有马来酰亚胺端,其中间隔子包含聚合物或小化学实体,如双马来酰亚胺二乙二醇和双马来酰亚胺三乙二醇、双马来酰亚胺乙烷、双马来酰亚胺己烷。在一些实施例中,间隔子包含乙烯砜,如1,6-己烷-双-乙烯砜。在一些实施例中,间隔子包含硫代糖苷,如硫葡萄糖。在一些实施例中,间隔子是由如牛血清白蛋白和人血清白蛋白等一种或多种还原蛋白形成的,是任何能够形成二硫键的硫醇封端的化合物。间隔子还可以包含具有马来酰亚胺基、琥珀酰亚胺基和硫醇端的聚乙二醇。

[0140] 在一些实施例中,间隔子/接头是 γ -氨基丁酸(GABA)接头、烯丙基接头、炔丙基接头、乙烷硫醇接头、吡啶二硫化物接头。在一些实施例中,间隔子/接头通过醚键、硫酯键、氨基甲酸酯键、碳酸酯键、肼键或酰胺键中的一个或多个与PGS或PGS-PEG或其它聚合物主链缀合,以改善生理条件下的稳定性(例如,与酯键相比)。

[0141] 在其它实施例中,不同接头(例如,烯丙基、炔丙基等)通过不同的键(例如,醚键、酯键、氨基甲酸酯键、碳酸酯键等)连接在PGS或PGS-PEG或其它聚合物主链表面上,这些键可以参与点击化学以缀合活性剂,如NAC。

[0142] 在另外的实施例中,PGS或PGS-PEG或其它聚合物主链通过一个接头与第一麻醉药或活性剂缀合,而通过不同的接头与第二麻醉药或活性剂缀合。

[0143] D. 渗透增强赋形剂

[0144] 已经确定,聚环氧乙烷充当麻醉药-聚合物缀合物的化学渗透增强剂(CPE)。

[0145] 实例中的数据表明,当麻醉药-聚合物缀合物分散到PEG200溶液中时,PEG200充当CPE。分散在PEG中的麻醉药-聚合物缀合物溶液可以增强进入神经中的药物通量,这可能归因于PEG200的两亲性质。CPE可以使麻醉药能够或促进其穿过神经束膜屏障以增强进入神经中的药物通量。

[0146] 如下文实例中所描述的,在0.5mL PEG200中剂量为1到3 μ g的非缀合麻醉药(例如,TTX)导致100%的测试动物发生完全的神经过度阻滞,阻滞持续时间长达 5.3 ± 0.3 小时;这比0.5%布比卡因的效果要长三倍—布比卡因是临床上常用的麻醉药。低毒性且已广泛用于各种药物调配物中的PEG200是临床上用于局部麻醉的合适递送介质。

[0147] 因此,在一些实施例中,麻醉药-聚合物缀合物的调配物包含含有PEG的赋形剂。优选的赋形剂是PEG200。赋形剂增强了麻醉药-聚合物缀合物的功效。

[0148] 由于具有良好的混溶性,TDP-TTX缀合物易于分散在PEG200中,从而形成均匀的、注射器可注射的TDP-TTX/PEG200调配物。制备的所有TDP-TTX/PEG200调配物均表现为粘度

低于10Pa.s的液体,从而使得能够通过注射器注射向患者施用。

[0149] 在一些实施例中,将麻醉药-聚合物缀合物和CPE整合在一个系统中。在示例性实施例中,在不存在PEG200赋形剂的情况下,与等量的PGS-PEG-TTX相比,包含在PGS-PEG-TTX的调配物内的PEG200具有更宽的治疗指数。

[0150] 因此,在一些实施例中,将与PGS或PGS-PEG共价结合的麻醉药的缀合物分散在PEG中(如PEG200)以增强可注射调配物的功效。

[0151] 在优选实施例中,将共价麻醉药缀合物调配成液体,以通过注射或浸润直接施用于疼痛部位上或疼痛部位附近。优选的赋形剂包含分子量介于1Da与1,000Da之间的聚乙二醇(PEG),如PEG 200。

[0152] 1. 注射器可注射的调配物

[0153] 对于PGS-TTX和PGS-PEG-TTX的注射器可注射的调配物,溶剂的选择必须考虑到恰当施用于患者受影响的区域所需的期望的流动性质(Mastropietro等人,《药物研发杂志(J Dev Drugs)》2,108(2013))。例如,PGS是热固性聚合物,并且PGS的弹性模量可以通过控制如反应时间、反应温度和固化时间等各种参数容易地调节。

[0154] 在一些实施例中,共价麻醉药-聚合物缀合物包含足够量的亲水性聚合物,以使缀合物能够分散在水性介质中,如磷酸盐缓冲盐水(PBS)。例如,主链中具有较高PEG百分比的PGS-PEG2000-TTX和PGS-PEG1000-TTX缀合物可以均匀地悬浮于PBS中。然而,一些PGS-PEG-TTX和PGS-TTX缀合物无法容易地均匀地悬浮于PBS中。因此,在一些实施例中,添加增溶剂以增加适合于可注射调配物的缀合物的亲水性。示例性增溶剂包含PEG。优选的PEG是PEG200。已经确定,PEG200不仅充当缀合物的增溶介质,而且充当渗透增强剂以增强缀合物作为麻醉剂的递送媒剂的有效性。

[0155] i. PEG

[0156] 在一些实施例中,通过均匀地悬浮于PEG中,将共价麻醉药缀合物调配成注射器可注射的形式。

[0157] 术语“注射剂”是指将有待注射的材料。在一些实施例中,注射剂包含一种或多种赋形剂材料,该赋形剂材料使得能够或增强作为流体介质的适合于通过注射或浸润施用的共价麻醉药缀合物的分散。因此,在一些实施例中,通过分散在PEG水溶液中,将共价麻醉药缀合物调配成可注射溶液。

[0158] 通常,将PEG添加到调配物中,以增加PGS-PEG-TTX缀合物的亲水性。PEG浓度的增加使共聚物溶解于PBS中。例如,在一些实施例中,使PGS-TTX缀合物均匀地悬浮于PEG 100、PEG-单甲基-醚(mPEG)、PEG200、PEG250、PEG300、PEG400或PEG500中。

[0159] 在优选实施例中,通过均匀地悬浮于PEG200中,将共价麻醉药缀合物调配成注射器可注射的形式。PEG 200是一种澄清、无色的粘稠液体。部分地由于其低毒性,PEG200被广泛用于各种药物调配物中。

[0160] 为了制备高质量且注射器可注射的调配物,PGS-PEG-TTX和PGS-TTX缀合物通过溶剂蒸发工艺调配到PEG200中,如图4中的图所描绘的。

[0161] 通过流变学研究了合成的调配物的粘弹性质。对于PGS-PEG200-TTX/PEG200(50mg/ml)的调配物,损耗模量(G'')高于储能模量(G'),表明复数模量的粘性组分主导材料的行为(图5A)。另外,尽管粘度随着缀合物中PEG浓度的降低而增加,但所有PGS-PEG-TTX/

PEG200调配物(50mg/ml)在测试的角频率下的粘度均小于10Pa.s(图5B)。具有粘性行为和低粘度的PGS-PEG-TTX/PEG200调配物剂都是注射器可注射的。

[0162] E. 共价麻醉药-聚合物缀合物和剂量单位

[0163] 与亲水性聚合物(如PGS或PGS-PEG)共价结合的麻醉药的缀合物包含:(i)用于提供神经阻滞的有效量的局部麻醉药;(ii)亲水性聚合物主链(优选地PGS);以及(iii)任选地以提供以下期望的功能元素所需的相对比率与聚合物主链结合的一种或多种PEG:(a)每单位剂量调配物装载的麻醉药的总量;以及(b)体内麻醉药从聚合物主链释放的速率。

[0164] 麻醉药的释放速率和每单位时间段的剂量(即,剂量/小时、剂量/天等)可以根据所施用的总量以及亲水性聚合物彼此间的速率(例如,PGS量与PEG量的比率)而变化。例如,在一些实施例中,将PEG添加到聚合物-麻醉药缀合物中确定了缀合物的总体亲水性。缀合物的总体亲水性确定了体内酯键的水解速率。体内酯键的水解速率确定了体内麻醉药的释放速率。因此,可以通过添加更多或更少的PEG来调节缀合物的总体亲水性,以减少或延长在体内发生缀合物内的酯键的水解的时间段。

[0165] 在一些实施例中,在暴露于体内生理条件之后,通过调节聚合物-麻醉药缀合物中的PEG区段的百分比来调整体内麻醉药的释放速率,以提供活性剂长达一个月时间段的释放。例如,可以通过调节PGS-TTX缀合物中的PEG区段的百分比来调整体内TTX的释放速率。在一些实施例中,TTX的释放速率相对于并入PGS-PEG主链中的PEG的分子量成比例地增加。因此,TTX-PGS-PEG1000将以比等摩尔量的TTX-PGS-PEG100高得多的速率在体内释放TTX。

[0166] 可以调配缀合物,使得体内释放速率为在1-30天的时间段内释放总麻醉药的大约50%、60%、70%、80%、90%或超过90%。在示例性实施例中,在28天后,从PGS-PEG200-TTX释放了99.7%的TTX;而PGS-PEG1000-TTX、PGS-PEG200-TTX和PGS-TTX表明在同一时间段内分别释放了89.5%、62.5%和43.7%的TTX。在PGS-PEG200-TTX和PGS-TTX缀合物的情况下,TTX遵循零阶释放曲线释放,这归因于在表面腐蚀机制下基于PGS的共聚物的降解。TTX释放随着PEG浓度的增加而增加归因于共聚物主链的亲水性的增加。亲水性的这种增加导致更大的水吸收,这加速了酯键的水解。实例中呈现的结果证实药物释放是由于酯键的水解而发生的。所关注化合物可调节持续释放若干周支持缀合物提供持续时间延长的局部麻醉的能力。

[0167] 在示例性实施例中,PEG-PGS的缀合物包含PGS相对于PEG的过量摩尔比。例如,用于PGS-PEG共聚物合成的-COOH基团与-OH之间的摩尔比通常为8:7。剩余的-COOH基团与麻醉药和任选地另外的活性剂缀合(参见表1和2)。PGS/聚合物混合物中的游离“-COOH”与游离“-OH”基团的比率可以用于计算并入PGS中的PEG的总量。通常,缀合物的设计允许并入至少一种麻醉药和任选地另外的活性剂。

[0168] F. 另外的药剂

[0169] 共价麻醉药-聚合物缀合物的调配物可以包含一种或多种另外的药物活性剂。如治疗剂、预防剂和/或诊断剂等活性剂可以与共价麻醉药-聚合物缀合物缔合。在一些实施例中,活性剂与共价麻醉药-聚合物缀合物共价或非共价缔合。例如,另外的活性剂可以通过酯键与聚合物主链共价结合。在其它实施例中,另外的活性剂例如通过一个或多个间隔子通过非酯共价接头与聚合物主链结合。

[0170] 当活性剂与聚合物主链共价缔合时,可以在与体内共价麻醉药的释放时间一致或

不同的时间在体内从主链释放药剂。因此,在一些实施例中,包含共价麻醉药-聚合物缀合物的调配物以贯穿相同或不同时间的相同或不同的速率在体内递送麻醉药和一种或多种另外的活性剂两者。在一些实施例中,另外的活性剂与麻醉药-聚合物缀合物共价或非共价缔合。例如,共价麻醉药-聚合物缀合物的调配物可以通过掺合包含一种或多种另外的活性剂。示例性另外的活性剂包含另外的局部麻醉剂、血管收缩剂、激素、抗炎剂和抗感染剂。

[0171] 1. 局部麻醉剂

[0172] 共价麻醉药-聚合物缀合物的调配物可以包含一种或多种另外的局部麻醉剂。术语“局部麻醉剂”意指提供局部麻木或疼痛缓解的药物。可以使用的局部麻醉药的种类包含:氨基乙酰苯胺(aminoacylanilide)化合物,如利多卡因(lidocaine)、丙胺卡因(prilocaine)、布比卡因、甲哌卡因(mepivacaine)和具有环系统上的各种取代基或胺氮的相关局部麻醉药化合物;氨基烷基苯甲酸酯化合物,如普鲁卡因(procaine)、氯普鲁卡因(chloroprocaine)、丙氧卡因(propoxycaine)、海克卡因(hexylcaine)、丁卡因(tetracaine)、环美卡因(cyclomethycaine)、奥布卡因(benoxinate)、布他卡因(butacaine)、丙美卡因(proparacaine)和相关局部麻醉药化合物;可卡因(cocaine)和相关的局部麻醉药化合物;氨基碳酸酯化合物,如地哌冬(diperodon)和相关局部麻醉药化合物;N-苯基脒化合物,如芬那卡因(phenacaine)和相关麻醉药化合物;N-氨基烷基酰胺化合物,如地布卡因(dibucaine)和相关局部麻醉药化合物;氨基酮化合物,如法立卡因(falicaïne)、达克罗宁(dyclonine)和相关局部麻醉药化合物;以及氨基醚化合物,如普莫卡因(pramoxine)、二甲异喹啉(dimethisoquien)和相关局部麻醉药化合物。优选的局部麻醉药是氨基酰胺和氨基酯,其中最优选的是布比卡因、丁卡因和罗哌卡因(ropivacaine),在期望局部麻醉药的血管收缩剂活性的情况下,优选的是布比卡因的左旋对映体,它们对感觉的选择性略高。

[0173] 当给予在不同部位和不同类型的外科手术中时,这些药物平均缓解疼痛六到十小时。对于许多类型的外科手术,疼痛缓解的持续时间持续两或三天将是优选的。与NeoSTX组合使用的优选的局部麻醉药为布比卡因、罗哌卡因、丁卡因和左旋布比卡因(levobupivacaine)。布比卡因是一种特别长效的局部麻醉药。它的其它优点包含足够的感觉麻醉,而不是仅部分的运动阻滞,并且具有广泛的可用性。

[0174] 2. 血管收缩剂

[0175] 共价麻醉药-聚合物缀合物的调配物可以包含一种或多种另外的血管收缩剂。有用的血管收缩剂是局部作用以限制血流并且由此将注射的药物保留在其施用的区域的那些血管收缩剂。这具有基本上降低全身性毒性的效果。

[0176] 优选的血管收缩剂是作用于如肾上腺素和苯肾上腺素等 α 肾上腺素能受体的那些血管收缩剂。其它药物和染料具有血管收缩副作用,如布比卡因和左旋布比卡因。

[0177] 在一些实施例中,用肾上腺素调配与PGS或PGS-PEG共价结合的麻醉药的缀合物或其它聚合物缀合物。例如,可以包含有效量的肾上腺素,以增强或延长由缀合物内的一种或多种麻醉剂引起的神经阻滞。

[0178] 3. 糖皮质激素

[0179] 共价麻醉药-聚合物缀合物的调配物可以包含一种或多种另外的糖皮质激素。示例性糖皮质激素包含地塞米松、可的松(cortisone)、氢化可的松(hydrocortisone)、泼尼

松(prednisone)、倍氯米松(beclomethasone)、倍他米松(betamethasone)、氟尼缩松(flunisolide)、甲基泼尼松(methyl prednisone)、帕拉米松(para methasone)、泼尼松龙(prednisolone)、曲安西龙(triamcinolone)、阿氯米松(alclometasone)、安西奈德(amcinonide)、氯倍他索(clobetasol)、氟氢可的松(fludrocortisone)、二氟松二乙酸盐(diflurosone diacetate)、氟轻松缩丙酮(flucinolone acetonide)、氟米龙(fluoromethalone)、氟氢缩松(flurandrenolide)、哈西奈德(halcinonide)、甲羟松(medrysone)和莫米松(mometasone)以及其药学上可接受的盐和混合物、抗炎剂。

[0180] 在一些实施例中,用地塞米松调配与PGS或PGS-PEG共价结合的麻醉药的缀合物或其它聚合物缀合物。地塞米松具有羟基,该羟基允许其通过与TTX缀合时使用的相同酯键共价缀合到PGS-PEG上。如实例中所描述的,对于所有PGS-PEG-药物缀合物,TTX和地塞米松的药物释放曲线是一致的。质量损失遵循与PGS-PEG-TTX缀合物的药物释放的趋势类似的趋势(图3A-3D)。28天后,PGS-TTX的质量损失为27.3%,而PGS-PEG200-TTX、PGS-PEG1000-TTX和PGS-PEG2000-TTX的质量损失分别为30.4%、70.4%和94.7%。

[0181] 4. 其它治疗剂

[0182] 在一些实施例中,用另外的活性剂(如抗炎剂、抗感染剂、抗增殖剂等)调配与PGS或PGS-PEG共价结合的麻醉药的缀合物或其它聚合物缀合物。示例性抗炎药包含非甾体药物(例如,吲哚美辛(indomethacin)、阿司匹林(aspirin)、对乙酰氨基酚(acetaminophen)、双氯芬酸钠(diclofenac sodium)和布洛芬(ibuprofen))和甾体抗炎药(例如,地塞米松)。

[0183] G. 其它赋形剂和防腐剂

[0184] 可以调配与PGS或PGS-PEG共价结合的麻醉药的缀合物或其它聚合物以包含一种或多种用于施用的赋形剂或防腐剂。通常,将组合物调配成包含用于通过肠胃外途径施用的赋形剂。将共价麻醉药缀合物的示例性药物组合物调配成通过肌内施用、腹膜内施用、静脉内(iv)施用或皮下注射、经皮施用(被动地或使用离子电渗或电穿孔)。

[0185] 与PGS或PGS-PEG共价结合的麻醉药的调配物包含一种或多种另外的药学上可接受的赋形剂。示例性另外的赋形剂包含防腐剂、pH调节剂、抗氧化剂和等渗剂。在一些实施例中,在任选地含有防腐剂的盐水或酸性缓冲溶液中调配共价麻醉药缀合物,例如以通过肠胃外途径施用。共价麻醉药缀合物的药物组合物被调配成通过肠胃外(肌内、腹膜内、静脉内(iv)或皮下注射)、经皮(被动地或使用离子电渗或电穿孔)、经粘膜(鼻、阴道、直肠或舌下)施用途径或使用生物可蚀解的插入物施用,并且可以调配成适合于每种施用途径的单位剂型。

[0186] 在一些实施例中,在水溶液中调配共价麻醉药-聚合物缀合物以通过肠胃外注射施用。调配物也可以呈悬浮液或乳剂的形式。通常,所提供的药物组合物包含有效量的共价麻醉药-聚合物缀合物,并且任选地包含药学上可接受的稀释剂、防腐剂、增溶剂、乳化剂、佐剂和/或载剂。此类组合物包含稀释剂,如无菌水、各种缓冲内含物(例如,Tris-HCl、乙酸盐、磷酸盐)、pH和离子强度的缓冲盐水;以及任选地添加剂,如洗涤剂 and 增溶剂(例如,TWEEN®20、TWEEN®80、聚山梨醇酯80)、抗氧化剂(例如,抗坏血酸、焦亚硫酸钠)和防腐剂(例如,硫柳汞(Thimersol)、苯甲醇)和增量物质(例如,乳糖、甘露醇)。

[0187] 非水溶剂或媒剂的实例是丙二醇、聚乙二醇、如橄榄油和玉米油等植物油、明胶以及如油酸乙酯等可注射有机酯。可以将调配物冻干并且在即将使用前重新溶解/重悬。调配

物可以通过例如通过细菌保留过滤器过滤、通过将灭菌剂并入调配物中、通过照射调配物或通过加热来灭菌。

[0188] 在一些实施例中,用一种或多种蛋白质或多肽在溶液中调配共价麻醉药-聚合物缀合物。在示例性实施例中,用蛋白质白蛋白在溶液中调配共价麻醉药-聚合物缀合物。可以将白蛋白(如牛白蛋白)添加到共价麻醉药-聚合物缀合物的混合物中,例如以使得能够或增强缀合物在水溶液中的增溶或分散。

[0189] H. 剂型

[0190] 在优选实施例中,以小瓶水溶液的形式提供共价麻醉药-聚合物缀合物。取决于调配物的类型,如之前和下文概述的,小瓶尺寸的范围可以为10 μ l-200ml,优选地约100 μ l到约10ml,并且1-5个小瓶可以在不同情况下用于单个患者。在另一个实施例中,在一个或多个小瓶中提供共价麻醉药-聚合物缀合物,任选地冻干,然后在使用前再水化并组合。

[0191] 优选地,剂型包含在不存在毒性的情况下有效减少或预防有需要的受试者的疼痛的麻醉药的量。在动物研究中,向350-400g大鼠施用共价麻醉药-聚合物缀合物,该缀合物包含大约80 μ g的缀合的TTX,而没有任何全身性毒性。设想用于向人施用的剂型包含具有至多并包含1.5mg的缀合的TTX的共价麻醉药-聚合物缀合物。

[0192] III. 使用方法

[0193] 提供了使用共价麻醉药-聚合物缀合物递送麻醉剂的方法。提供了通过向受试者施用共价麻醉药-聚合物缀合物在有需要的受试者中提供神经阻滞的方法。

[0194] 该方法可以包含使一个或多个神经周围的组织与相比于对照物的有效量的共价麻醉药-聚合物缀合物接触以减少或抑制神经中的感觉活性。该方法可以以最小的毒性或降低的毒性延长部位1钠通道(S1SC)的阻滞。

[0195] 在一些实施例中,活性剂结合或以其它方式抑制与感觉神经活性的生理过程相关的细胞表面受体的活性。例如,麻醉剂可以有效地阻滞离子通道,如部位1钠通道(S1SC)或TRPV1受体。在优选实施例中,与一种或多种聚合物共价偶联的麻醉剂是S1SCB河豚毒素(TTX)。提供了包含使一个或多个神经与相比于对照物的有效量的TTX接触以减少或抑制神经中的感觉活性的方法。麻醉剂作为共价结合的聚合物缀合物施用,并且随后通过聚合物主链的共价键的降解在施用部位处或其附近在体内释放。

[0196] 该方法可以持续释放一定量的处于生理活性状态的麻醉剂,以在延长的时间段内在施用部位处实现有效的神经阻滞。在不存在聚合物缀合物的情况下,相对于通过将等量的麻醉药施用于相同部位的实现方法,施用共价麻醉药-聚合物缀合物的方法可以在显著延长的时间段内提供有效的神经阻滞。因此,相对于将等量的部位1钠通道阻滞剂单独施用于相同部位,体内施用作为共价聚合物缀合物的部位1钠通道阻滞剂的方法可以在延长的时间段内有效地阻滞部位1钠通道。通常,这些方法不会引起血管收缩。

[0197] 可以调配在该方法中使用的共价麻醉药-聚合物缀合物,使得麻醉药在几分钟到几小时、几天、几周或几个月的时间段内释放。在一些实施例中,该方法使得能够安全地施用一定量的麻醉剂,如果在不存在共价-聚合物缀合物的情况下施用,则麻醉剂将对接受者有毒。例如,当将共价麻醉药-聚合物缀合物调配用于在延长的时间段内将麻醉药递送到施用部位处时,在任何给定时间的游离麻醉药的血清浓度将低于单独施用作为大丸药的麻醉药时的浓度。

[0198] 因此,在一些实施例中,该方法提供了来自TTX的延长的具有降低的毒性的神经阻滞。通常,麻醉剂以天然形式(即,以生理活性状态)在体内从聚合物主链释放。在一些实施例中,当与聚合物主链共价缀合时,麻醉剂是生理上无活性的。

[0199] A. 用于治疗或预防疼痛的方法

[0200] 提供了在受试者中提供感觉和/或运动神经阻滞的方法,该方法包含向受试者的神经或其附近施用有效量的与聚合物主链共价缀合的一种或多种麻醉剂,以减少或抑制神经中的感觉和/或运动功能。在优选实施例中,该受试者是人。在一些实施例中,该方法有效延迟受试者的疼痛的发作,如伤害性和/或神经性疼痛。在一些实施例中,该受试者是成人。在其它实施例中,该受试者是儿童。所描述的所有方法可以包含鉴别需要疼痛缓解的受试者的步骤。

[0201] 在一些实施例中,该方法包含施用共价麻醉药-聚合物缀合物与一种或多种另外的活性剂(如局部麻醉药等)的组合。术语“组合(combination)”或“组合(combined)”用于指两种或更多种不同药剂的伴随、同时或依次施用。因此,组合可以伴随地(例如,作为掺合剂)、单独但同时(例如,通过进入同一受试者体内的单独的应用)或依次(例如,先给予化合物或药剂中的一种,然后给予第二种)施用。例如,组合疗法可以包含将TTX-PGS-PEG和/或TTX-PGS与一种或多种另外的麻醉药或其它活性剂分别以两种不同的调配物或一起以相同的调配物(即,包含两种活性剂的单一药物组合物)共同施用。如果两种药剂以单独的调配物施用,则共同施用可以包含两种药剂的同时和/或依次施用。医师可以根据如患者的疾病的性质和患者的病状等此类因素选择在适当的时程依次施用。在某些实施例中,依次施用包含两种药剂在彼此间隔数小时、数天或数周的时间段内共同施用。例如,在一些实施例中,首先施用TTX-PGS-PEG和/或TTX-PGS,然后与 α -2-肾上腺素能激动剂组合施用。在其它实施例中,首先施用TTX-PGS-PEG和/或TTX-PGS,然后施用另外的活性剂。

[0202] 1. 剂量

[0203] 可以以有效量在离散疼痛部位处施用一种或多种共价麻醉药-聚合物缀合物,以在负责引起疼痛的离散局部区域产生选择性的高度局部神经阻滞,以便减轻或消除离散部位引起的疼痛。

[0204] 在一些实施例中,当施用用于一种或多种组织的浸润麻醉时,该剂量对治疗或预防疼痛有效。在一些实施例中,当施用用于传导或神经阻滞麻醉时,该剂量对治疗或预防疼痛有效。

[0205] 该方法使麻醉剂在疼痛部位之外的潜在不利后果最小化。例如,可以以有效量在离散疼痛部位处施用PGS-PEG和/或TTX-PGS,以在负责引起疼痛的离散局部区域产生选择性的高度局部神经阻滞,以便根据受试者的需要,在约一小时到约72小时的时间段内减轻或消除由受试者中的离散部位引起的疼痛。

[0206] 用于减轻有需要的人或动物的部位处的疼痛的共价麻醉药-聚合物缀合物的药物组合物可以包含1 μ g到1.5mg的与聚合物主链缀合的麻醉剂。例如,用于减轻有需要的人或动物的部位处的疼痛的共价麻醉药-聚合物缀合物的药物组合物可以包含1 μ g到5,000mg的缀合物。施用的缀合物的量将取决于聚合物主链的大小和类型以及缀合物内的麻醉剂。在某些实施例中,缀合物内的麻醉剂的剂量的范围为约1 μ g到约2000 μ g、约10 μ g到约200 μ g或约20 μ g到约50 μ g。通常,在施用后的期望的时间段内,至少75%、至少80%或90%、高达并包

含100%的麻醉剂的总量在体内从聚合物主链缀合物释放。

[0207] 所公开的用于延长的局部麻醉的调配物可以通过本领域已知的任何方式施用,包含通过人或动物的皮肤注射到离散部位;通过将剂量嵌入到人或动物的皮肤、组织、肌肉、肌腱、关节或其它身体部分中来植入到离散部位;通过浸润到开放的外科手术伤口的离散伤口、组织表面或手术部位中。

[0208] 对于动物和人的延长的麻醉,可以将受试者的体重用作确定适当剂量的指南(参见下表8)。不同的临床情况对局部麻醉药的安全性和功效提出了不同的要求。全身安全性确定了所公开的TTX或其它活性剂的总剂量(mg或mg/kg)的上限。基于摄取时程、血管分布等,总允许剂量之间的差异很小,但是总体而言,每种局部麻醉药都有最大允许总剂量。

[0209] 在身体的任何局部区域,局部麻醉药都需要足够的局部组织浓度来阻滞传入传递。在给定位置足以提供疼痛缓解的一种或多种药物的最低局部浓度被称为“最小有效浓度”(MEC)。

[0210] 因此,与涉及较小组织体积的临床情况相比,需要浸润到大组织体积中的临床情况需要总体积更大的在MEC下或高于其的局部麻醉药。如果在不同位置的MEC类似,则较大的组织体积比小的组织体积需要更大的总剂量。

[0211] 共价麻醉药-聚合物缀合物内的麻醉药的剂量将取决于所施用的麻醉药以及施用局部麻醉药的部位。通常,制备剂量单位以用于范围为约0.1ml到约120ml的体积。在某些实施例中,PGS或PGS-PEG缀合物内的一种或多种麻醉剂以介于0.01% (重量/体积) 与5% (w/v) 之间的浓度范围存在,并且一种或多种 α -2-肾上腺素能激动剂以介于0.01% (w/v) 与5% (w/v) 之间的浓度范围存在。通常,成人的总全身剂量不超过大约1mg/kg体重到大约200mg/kg体重。例如,在通过区域阻滞(例如,脚踝阻滞)施用局部麻醉药的实施例中,麻醉药的剂量范围为0.5% (w/v) 溶液的约1ml到约30ml。在其它实施例中,可以通过关节内浸润施用2% (w/v) 溶液的3mg/kg剂量(最大200mg)。在其它实施例中,局部麻醉药的剂量范围可以介于0.25%到5% (w/v) 溶液的0.5ml到约60ml之间。

[0212] 在优选实施例中,麻醉剂是TTX。缀合物内的TTX的浓度范围可以介于0.01mM与100mM之间内,优选地介于0.1mM与0.3mM之间,最优选地为0.21mM。在一些实施例中,单次应用中施用的缀合物的剂量足以减少或抑制感觉和/或运动功能持续一小时、两小时、三小时、四小时、五小时、六小时、十小时、12小时、一天、两天、三天、四天、五天、六天、一周、两周、三周、四周、一个月、两个月、六个月或六个月以上的时间段。在具体的实施例中,以足以减轻受试者在施用部位处或其周围的疼痛长达72小时的量以可注射调配物的形式施用TTX-PGS-PEG。在示例性方法中,将含有1.0 μ g TTX的包含PGS-PEG1000-TTX和/或PGS-PEG2000-TTX的调配物注射到受试者中对在受试者中产生时间段介于1小时到6小时之间的神经阻滞是有效的。下表1.2阐述了基于动物数据的实验确定的量:

[0213] 表1.2:实验确定的缀合物的剂量

	缀合物	每千克大鼠的实验最大安全 TTX 剂量 (μ g/kg) ^a	70 千克人的估计的安全剂量 (μ g)
[0214]	PGS-PEG2000-TTX	20.0	1400.0
	PGS-PEG1000-TTX	23.7	1660.0
	PGS-PEG200-TTX	35.1	2635.7
	PGM-TTX ^b	171.4	12000.0
	PGS-TTX	>342.9	>24000.0

[0215] ^a实验中使用的大鼠的质量=0.35kg^bPGM=聚(甘油丙二酸)

[0216] 2. 待治疗的疼痛

[0217] 包含部位1钠通道阻滞剂和/或其它麻醉药的麻醉剂的缀合物可以用于治疗许多可以向疼痛区域或其附近处施用麻醉药调配物的病状,包含但不限于治疗急性或慢性疼痛、伤害性和神经性疼痛、术前和术后疼痛、癌症疼痛、与神经递质失调综合征和骨科病症相关的疼痛、与运动有关的伤害、急性创伤性疼痛、伤害性疼痛和神经递质失调综合征。

[0218] i. 外科手术

[0219] 所公开的调配物可以用于预防或减轻与外科手术相关的疼痛。在一些实施例中,剂量单位包含与PGS或PGS-PEG缀合的一种或多种部位1钠通道阻滞剂的量,这对于以下是有有效的:治疗或预防与全长开放式剖腹术、胸腹联合切口或腰部切口的大外科手术伤口的多层相关的疼痛;剖腹产、开腹子宫切除术、食管胃切除术、肾切除术或大型腹部癌手术,如结肠切除术;全髌关节置换(髌关节置换术)或全膝关节置换(膝关节置换术)的伤口浸润;周围神经阻滞或神经丛阻滞(外周注射);浸润(沿伤口层注射);肩、手或手臂手术、浸润或用于腹股沟疝气修补的髂腹股沟/髂下腹阻滞、用于尿道下裂修补的阴茎阻滞、用于全膝关节置换或前交叉韧带修复的股骨阻滞、用于开胸手术的肋间神经阻滞或用于截肢或足踝手术的股骨和坐骨神经阻滞;为复杂的区域疼痛综合征/反射交感性神经营养不良或腿部血管功能不全提供腰部交感神经阻滞,或为胰腺炎或胰腺癌提供腹腔神经丛阻滞;用于关节置换手术的髌关节或膝关节的神经阻滞(股骨和坐骨神经、腰丛和坐骨神经);或在不需要快速运动恢复的情况下提供持续时间延长的坐骨神经阻滞,如小腿截肢。

[0220] 还提供了剂量单位,其含有与PGS和/或PGS-PEG缀合的一定量的一种或多种部位1钠通道阻滞剂,以在眼睛或眼腔中提供持续时间延长的麻醉。在其它实施例中,可以以有效预防、减少或抑制眼睛的角膜中的感觉和/或运动功能的量制备剂量单位。

[0221] 在一些实施例中,可以以有效预防、减少或抑制一个或多个周围神经的感觉和/或运动功能的量制备剂量单位。

[0222] 在其它实施例中,剂量单位含有与一种或多种聚合物共价缀合的一定量的一种或多种麻醉剂,以延长麻醉剂在坐骨神经中或其周围的递送或释放。

[0223] ii. 慢性疼痛

[0224] 在一些实施例中,所公开的调配物可以用于在延长的时间段内治疗或预防疼痛。该方法可以包含向受试者施用包含与一种或多种聚合物共价缀合的一种或多种麻醉剂的调配物,以在延长的时间段内在施用部位处控制或延迟释放麻醉剂。例如,提供了包含向受试者施用包含TTX-PEG-PGS的调配物以在延长的时间段内在施用部位处或其附近控制或延迟释放TTX的方法。提供了以有效进行以下的量在受试者的疼痛结构处或其附近施用含有一种或多种部位1钠通道阻滞剂和一种或多种其它麻醉药或其它药剂的共价麻醉药-聚合物缀合物的方法:减少或抑制感觉和/或运动功能持续一小时、两小时、三小时、四小时、五小时、六小时、十小时、12小时、一天、两天、三天、四天、五天、六天、一周、两周、三周、四周、一个月、两个月、六个月或六个月以上的时间段。

[0225] 在某些实施例中,该方法可以用于治疗或减轻慢性疼痛,例如与疾病或病症相关的慢性疼痛。例如,在患有慢性疼痛的患者中,从TTX-PGS和/或TTX-PGS-PEG释放的TTX的剂量高达100 μ g/小时、高达10 μ g/小时、高达1 μ g/小时、高达10 μ g/天、高达1 μ g/天等。可以根据

期望的每小时或每日剂量来计算在初次施用内向受试者施用的麻醉药的量。可以根据麻醉药的血清半衰期来计算总剂量和释放速率,使得血清浓度从不超过发生毒性和/或副作用的浓度。通常,在疾病或病症的直接部位处或其附近或在疼痛结构周围的区域一次施用总剂量。

[0226] IV. 调配物和其制备方法

[0227] 需要进行动物和人研究以确定治疗人的有效剂量和体积。例如,根据体外生理学实验的部位1钠通道阻滞剂的效力等级顺序无法预测这些化合物在体内的效力等级顺序(Kohane等人,《区域麻醉与疼痛医学》,25:52-9(2000))。

[0228] 不同的临床情况对局部麻醉药的安全性和功效提出了不同的要求。全身安全性确定了TTX或其它局部麻醉药的总剂量(mg或mg/kg)的上限。基于摄取时程、血管分布等,总允许剂量之间的差异很小,但是总体而言,每种局部麻醉药都有最大允许总剂量。如本文所描述的,将TTX作为共价缀合物包含到PGS或PGS-PEG聚合物主链中使得能够在体内通过酯键的水解延迟TTX的释放。延迟释放使得能够延长神经阻滞,提高功效和全身安全性,从而允许更大剂量或更大体积。

[0229] 在一些临床环境中,重要的是不要给予大剂量(即,大于20ml)的局部麻醉药,以预防麻木或无力扩散到身体中的这些效果不期望或甚至危险的其它位置。可以根据接受者所期望的剂量、释放速率和其它参数,以所期望的体积(例如,1ml到500ml)施用所描述的共价麻醉药-聚合物缀合物。

[0230] 如(下文)实例中所描述的,聚(三醇二羧酸)-共-聚(乙二醇)(TDP)聚合物是通过Steglich酯化反应在二羧酸的羧基与三醇和PEG的羟基之间形成酯键来合成的。

[0231] TDP聚合物可通过酯键的水解降解,并示出良好的生物相容性,具有最小的细胞毒性。合成了具有各种 f_{phil} 的TDP聚合物家族。表面和本体表征均表明,聚合物的 f_{phil} 确定了聚合物网络的酯键的水解速率。TDP聚合物具有药物可以共价缀合的多个活性端基(羟基和羧基)。这些特性表明,TDP聚合物具有用作各种治疗药物的控制释放的通用平台的潜力。

[0232] TTX与TDP聚合物的共价缀合是通过Steglich酯化反应通过在TDP聚合物的羧基与TTX的羟基之间形成酯键来实现的。Steglich酯化合成在室温下进行,以避免药物降解。合成的TDP-TTX缀合物逐渐降解为更小的聚合物-TTX片段,并最终通过酯键的水解降解为呈其天然形式的TTX,从而实现TTX的控制释放。TTX的释放速率与TDP聚合物的 f_{phil} 成反比。在 f_{phil} 低于37.8%的情况下,TDP-TTX缀合物可以在一个月的时间段内实现延长的体外TTX释放。

[0233] A. 制备共价聚合物-麻醉药缀合物的方法

[0234] 通常,聚(三醇二羧酸)-共-聚(乙二醇)(TDP)聚合物的合成在三步反应中进行。该反应通常在使麻醉药的破坏或变性最小化的条件下进行。

[0235] 在示例性方法中,PGS-PEG-TTX的合成在室温下以三步反应进行以避免药物变性。第一步是PEG和癸二酸的Steglich酯化,这导致形成线性预聚物链而没有任何交联。该反应的示意性图示描绘在图1A-1B中。最终共聚物的亲水性通过添加PEG进行调节。示例性方法使用不同分子量的PEG,如200Da、1,000Da和2,000Da。

[0236] 第二步是添加甘油,从而得到PGS-PEG的嵌段共聚物。如实例中所描绘的,对于PGS-PEG共聚物合成,-COOH基团与-OH基团之间的摩尔比为8:7,额外的-COOH基团用于药物

缀合(表1和2)。

[0237] 在第三步中,通过Steglich酯化在PGS-PEG共聚物的剩余-COOH基团与TTX的-OH基团之间获得PGS-PEG-TTX缀合物(图1A、1B)。

[0238] B. 制备注射器可注射的调配物的方法

[0239] 在一些实施例中,该方法包含制备注射器可注射的调配物。在示例性实施例中,将PGS-PEG-TTX和/或PGS-TTX缀合物完全溶解于DCM中,随后添加PEG200。由于PEG200与DCM很好地混溶,在涡旋混合后,获得均匀的溶液。通过旋转蒸发和冻干逐渐去除DCM。优选地,形成含有PGS-PEG-TTX和/或PGS-TTX缀合物和PEG200的均匀溶液。

[0240] 参考以下非限制性实例来进一步理解本发明。

[0241] 实例

[0242] 实例1:麻醉药与两亲性聚合物和PEG的缀合物

[0243] 根据以下方法设计、产生并测定聚(癸二酸甘油酯)(PGS)、PEG和TTX的两亲性、生物可降解的缀合物。

[0244] 方法

[0245] 材料

[0246] 癸二酸(99%)、聚(乙二醇)(PEG,200,1000,2000kDa)、N,N'-二异丙基碳二亚胺(DIC,99%)、4-二甲基氨基吡啶(DMAP,99%)、无水N,N-二甲基甲酰胺(DMF,99.8%)、无水二甲亚砜(DMSO,99.9%)、无水二氯甲烷(DCM,99.8%)、甘油(99%)、地塞米松(98%)、异硫氰酸荧光素异构体I(FITC,90%)、磷酸盐缓冲盐水(PBS,pH7.4,0.15M,138mM NaCl,2.7mM KCl)、氯仿-d(100%,99.96原子%D)、六亚甲基二异氰酸酯(99.0%)和二月桂酸二丁基锡(95.0%)购自西格玛奥德里奇公司(密苏里州圣路易斯)。花青5.5羧酸(Cy5.5,95%)购自Lumiprobe公司(佛罗里达州哈伦代尔海滩)。河豚毒素(TTX)获自艾博抗公共有限公司(Abcam plc)(马萨诸塞州剑桥);河豚毒素ELISA试剂盒购自雷根有限责任公司(Reagen LLC)(新泽西州莫里斯敦)。

[0247] TDP聚合物的合成。

[0248] 使用N,N'-二异丙基碳二亚胺(DIC)作为偶联剂并且4-二甲基氨基吡啶(DMAP)作为催化剂,通过Steglich酯化合成聚(三醇二羧酸)-共-聚(乙二醇)(TDP)聚合物。简而言之,将干燥的PEG(0.005mol)和癸二酸(2.02g,0.01mol)加入到圆底烧瓶中,并且在将烧瓶置于氮气下之前将任何剩余的水蒸发。在加入无水N,N-二甲基甲酰胺(DMF,8mL)和无水二氯甲烷(DCM,4mL)并超声处理混合物持续若干分钟后,加入DIC(4.336mL,0.028mol)和DMAP(0.489g,0.004mol)。将混合物在室温下放置24小时。加入甘油(184 μ l,0.0025mol)并将混合物在室温下放置24小时。反应后,通过旋转蒸发去除反应混合物中的DCM,并且然后将残留物用30mL DI水洗涤2次,并用30mL的10%乙醇洗涤2次。从水中沉淀出聚合物,并以20000rpm离心5分钟。干燥后,以88-96%的产率获得TDP聚合物。将干燥的TDP聚合物储存在干燥器中直到进一步使用。

[0249] TDP-药物缀合物的合成

[0250] TDP-药物缀合物是通过类似的Steglich酯化合成的。简而言之,将干燥的PEG(0.005mol)和癸二酸(2.02g,0.01mol)加入到圆底烧瓶中,并且在将烧瓶置于氮气下之前将任何剩余的水蒸发。在加入无水N,N-二甲基甲酰胺(DMF,8mL)和无水二氯甲烷(DCM,4mL)

并超声处理混合物持续若干分钟后,加入DIC (4.336mL, 0.028mol) 和DMAP (0.489g, 0.004mol)。将混合物在室温下放置24小时。加入甘油 (184 μ L, 0.0025mol) 并将混合物在室温下放置24小时。加入具有TTX (1mg, 0.003mmol) 和/或地塞米松 (10mg, 0.026mmol) 和/或FITC (1mg, 0.003mmol) 和/或Cy5.5 (1.6mg, 0.003mmol) 的无水DMSO (10mL) 溶液, 并将混合物在室温下放置7天。反应后, 通过旋转蒸发去除反应混合物中的DCM。为了消除未结合的药物并分离纯聚合物缀合物, 将残留物用30mL DI水洗涤2次, 并用30mL的10%乙醇洗涤2次。从水中沉淀出TDP-药物缀合物, 并以20000rpm离心5分钟。干燥后, 以88-96%的产率获得TDP-药物缀合物。将干燥的TDP-药物缀合物储存在干燥器中直到进一步使用。

[0251] T_gD_8 -异氰酸酯的合成

[0252] 通常, 将0.240g的 T_gD_8 ($M_n=6011, 0.4 \times 10^{-3}$ mol) 在100mL烧瓶中于高真空下干燥过夜。然后, 向烧瓶中加入5mL无水DMSO, 依次加入1.13g的HMDI (240 μ L, 1.5×10^{-3} mol) 和两滴二月桂酸二丁基锡 (8×10^{-3} g)。将反应混合物在氮气气氛下在60 $^{\circ}$ C下搅拌过夜。反应结束时, 将所得聚合物从二乙醚中沉淀出来, 并通过重新溶解于1,2-二氯乙烷中、随后在甲醇和二乙醚的混合物中沉淀 (5/95, v/v) 以去除剩余的二丁基锡来进一步纯化。干燥后, 以80-95%的产率获得 T_gD_8 -异氰酸酯。

[0253] T_gD_8 -TTX氨基甲酸酯的合成

[0254] 通常, 将0.325g的 T_gD_8 -异氰酸酯在100-mL烧瓶中于高真空下干燥过夜。然后, 将5mL无水DMSO加入到烧瓶中, 依次加入一滴二月桂酸二丁基锡 (4×10^{-3} g) 和0.1mg的TTX。将反应混合物在氮气气氛下在60 $^{\circ}$ C下搅拌过夜。反应结束时, 将所得聚合物从二乙醚中沉淀出来, 并通过重新溶解于1,2-二氯乙烷中、随后在甲醇和二乙醚的混合物中沉淀 (5/95, v/v) 以去除剩余的二丁基锡来进一步纯化。干燥后, 以90-95%的产率获得 T_gD_8 -TTX氨基甲酸酯。

[0255] 接触角程序

[0256] 使用配备有自动分配器 (莱姆哈特 (Rame-Hart), 型号500) 的测角仪, 对旋涂在硅晶片基板上的聚合物膜进行水接触角测量。应用静态静滴方法。将1 μ L的水体积沉积在样品表面上并基于高分辨率图像确定接触角。

[0257] 1H NMR测量

[0258] 使用核磁共振 (1H NMR) 光谱 (配备有5mm AutoX OneProbe和Varian 7600自动进样器的Varian 400MHz) 分析聚合物和聚合物-药物缀合物。将聚合物溶解在 $CDCl_3$ 中并在400MHz下记录光谱。提供了以下聚合物列表中与斜体的氢相对应的峰的化学位移 (δ , 以ppm为单位), s/d/m表示峰的形状 (即, 单峰、二重峰、三重峰)。 1H NMR (T_gD_8) (400MHz, $CDCl_3$) δ /ppm: 1.30 (2H, m, $-CH_2-$), 1.62 (2H, d, $-CH_2CH_2O(CO)-$), 2.35 (2H, m, $-CH_2O(CO)-$), 3.50-3.85 (2H, m, $OHCH_2CHO-$), 3.94 (1H, m, $-OCH_2CHOH$), 4.05-4.35 (2H, m, $-OCH_2CHO-$), 5.09 (1H, s, $OHCH_2CHO-$), 5.26 (1H, s, $-OCH_2CHO-$)。* 1H NMR (T_gD_8Pik) (400MHz, $CDCl_3$) δ /ppm: 1.30 (2H, m, $-CH_2-$), 1.62 (2H, d, $-CH_2CH_2O(CO)-$), 2.35 (2H, m, $-CH_2O(CO)-$), 3.64 (2H, m, $-OCH_2-$), 3.94 (1H, m, $-OCH_2CHOH$), 4.05-4.35 (2H, m, $-OCH_2CHO-$), 5.09 (1H, s, $OHCH_2CHO-$), 5.26 (1H, s, $-OCH_2CHO-$)。图1a示出了所有TDP聚合物的 1H NMR光谱, 其中分配了关键的结构元素。由于信号重叠无法分配一些峰。

[0259] FTIR测量

[0260] 使用Alpha Bruker光谱仪记录样品的傅立叶变换红外 (FTIR) 光谱。对于每个样

品,以 4cm^4 分辨率采集48次扫描的平均值。

[0261] 分子量测量

[0262] 使用沃特世(Waters)凝胶渗透色谱仪(GPC)型号440测量分子量。以1.0毫升/分钟的流速将THF用作流动相。用聚苯乙烯标准物校准大分子单体和共聚物的分子量和多分散性。

[0263] 聚合物的体外降解

[0264] 通过将聚合物置于截止点为10,000MW的Slide-A-Lyzer MINI透析装置(马萨诸塞州图克斯伯里赛默科技公司(Thermo Scientific))中、进一步地用14mL的PBS透析并在 37°C 下在平台振荡器上温育(新不伦瑞克(New Brunswick)Innova 40,60rpm)来进行质量损失研究。在每个时间点,将透析液换成新鲜的、预热的PBS。冷冻、冻干14mL的透析液,并且对残留物质量进行称重以进行质量损失分析。所有实验一式三份地进行。

[0265] 细胞培养

[0266] 据报道²,进行了C2C12小鼠成肌细胞(美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)(ATCC)CRL-1772)和PC12大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞(ATCC,CRL-1772)的细胞培养。简而言之,将C2C12细胞在具有20%FBS和1%青霉素链霉素(英杰公司(Invitrogen))的DMEM中培养。将细胞以50,000个细胞/毫升接种到24孔板上,并在具有2%马血清和1%青霉素链霉素的DMEM中温育10-14天,以分化为肌微管蛋白(myotubule)。使PC12细胞在具有12.5%马血清、2.5%FBS和1%青霉素链霉素的DMEM中生长。将细胞接种到24孔板上,并在接种后24小时加入50ng/mL神经生长因子(英杰公司)。

[0267] 细胞活力

[0268] 将细胞(1×10^4 /孔)与各种浓度的聚合物-TTX缀合物一起温育24小时。温育后,将细胞用PBS洗涤5次以去除聚合物,并通过MTT确定细胞活力。简而言之,收集来自对照孔和含聚合物孔的培养上清液,并将细胞与MTT一起温育(0.5mg/mL;3小时)。将形成物溶解在200 μl DMSO中,并在550nm下测量光密度。假定对照孔的吸光度为100%,并且确定经过处理的孔相对于对照孔的细胞活力。

[0269] 平衡溶解度方法¹

[0270] 通过平衡有机溶剂中过量的TTX来确定TTX的溶解度研究。在容量为2mL的塑料烧瓶中进行测定。在每个烧瓶中加入1mL有机溶剂和1mg TTX。TTX量足以使每种溶剂饱和,这由未经溶解的TTX的沉积表征。在测试期间,使用振荡温育箱将样品保持在 25°C 下,以150rpm搅拌72小时(直到样品达到平衡条件)。在此时间段之后,立即通过0.45 μm 孔径的一次性胶囊式过滤器(Dezani等人,《巴西药物科学杂志(Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences)》49,853-863(2013))过滤样品。

[0271] DMSO和DMF中的TTX溶解度

[0272] 将50 μl 滤液用450 μl PBS稀释。用TTX Elisa试剂盒测量混合物中的TTX浓度。对于TTX的定量过程,在每种溶剂的最大吸光度波长下使用TTX ELISA试剂盒,并使用针对每种物质确定的校准曲线计算溶解度值。将相同比率的DMSO或DMF加入到TTX Elisa试剂盒的标准溶液中,并测量标准曲线。该浓度被认为是TTX的饱和或平衡溶解度。

[0273] DCM中的TTX溶解度

[0274] 将1ml滤液转移到圆底烧瓶中,并通过旋转蒸发去除DCM。将0.1ml柠檬酸缓冲液加

入到圆底烧瓶中以溶解任何TTX。将50 μ l溶液用450 μ l PBS稀释。用TTX Elisa试剂盒测量混合物中的TTX浓度。

[0275] 药物结合度测量。

[0276] 酯化反应完成后,通过旋转蒸发去除反应混合物中的DCM,并且然后用30mL DI水洗涤反应混合物。将聚合物-药物缀合物以20000rpm离心5分钟,收集上清液作为上清液#1。用40mL DI水洗涤聚合物-药物缀合物,并再次离心。收集上清液作为上清液#2。通过ELISA测量所收集的上清液的TTX浓度。通过HPLC确定所收集的上清液的地塞米松浓度。

[0277] 药物结合度计算如下:

$$[0278] \quad \text{药物结合度} = \frac{\text{药物}_{\text{进料}} - \text{药物}_{\text{未结合}}}{\text{药物}_{\text{进料}}} \times 100\%$$

[0279] 体外药物释放

[0280] 通过将聚合物-药物缀合物置于截止点为10,000MW的Slide-A-Lyzer MINI透析装置(马萨诸塞州图克斯伯里赛默科技公司)中、进一步地用14mL PBS透析并在37°C下在平台振荡器上温育(新不伦瑞克Innova 40,60rpm)来进行药物释放和质量损失研究。在每个时间点,将透析液换成新鲜的、预热的PBS。保留0.5mL的透析液以供药物分析。通过ELISA定量TTX的浓度。使用C18柱(Poroshell 120EC-C18,4.6 \times 100mm,内径2.7 μ m,美国加利福尼亚州托伦斯菲罗门(Phenomenex))以及流动相乙腈/水(70:30)和0.5毫升/分钟的流速,通过HPLC(Agilent 1260Infinity,美国加利福尼亚州帕洛阿尔托安捷伦公司(Agilent Co.))确定地塞米松浓度。通过在 $\lambda=254\text{nm}$ 处的UV吸光度来检测地塞米松。

[0281] LC-MS仪器和条件

[0282] 在Waters® Xevo™ TQ MS ACQUITYUPLC®仪器上进行分析。使用Kinetex Hilic柱(100 \times 2.1mm,100 Å,2.6- μ m颗粒;菲罗门)通过内联过滤器组合件(沃特世)和作为流动相A的含0.05% (v/v) 甲酸的水和作为流动相B的含0.05% (v/v) 甲酸的甲醇来实现色谱分离。使用梯度洗脱,在0-2.2分钟内具有10%-30%B,然后斜升到95%B(2.2-2.5分钟)并平衡到10%B(2.5-3.0分钟)。流动相流速为500 μ l/分钟,柱温为25°C,并且样品管理器温度为10°C。注射容积为5 μ l;注射间时间为4分钟。

[0283] 溶剂蒸发方法

[0284] 为了制备注射器可注射的TDP-TTX/PEG200调配物,将预定量的TDP-TTX缀合物完全溶解在过量的DCM中,随后加入预定量的PEG200。将所得混合物涡旋1分钟以获得均匀溶液。DCM通过旋转蒸发来蒸发,随后在室温下真空过夜。

[0285] 流变测试

[0286] 使用配备有温度控制器的AR2000流变仪(美国热分析仪器公司(TA instruments))监测TDP-TTX/PEG200调配物的流变性质。针对所有测试,使用直径为20mm的平行板。这些板之间的间隙距离为0.3mm。

[0287] 在室温下进行范围为0.1到100rad/s的频率扫描。使用恒定的0.1Pa应力。

[0288] 动物研究

[0289] 根据国际疼痛研究协会(International Association for the Study of Pain)的指导,按照波士顿儿童医院动物护理和使用委员会(Boston Children's Hospital

Animal Care and Use Committee) 批准的方案进行动物研究。将重350-400g的成年雄性斯普拉格-多雷(Sprague-Dawley)大鼠(查尔斯河实验室(Charles River Laboratories))在12小时/12小时光照/黑暗循环下分组饲养,其中在6:00AM光照。

[0290] 在用异氟烷-氧气麻醉后,在左坐骨神经处进行注射。使用23-G针给动物注射药物/载体。将针引入大转子后中侧,指向前内侧方向,并在与骨骼接触时将调配物注射到坐骨神经上。

[0291] 神经阻滞的测试在由坐骨神经支配的皮节的远侧部位(即左脚底)处进行,而右腿(未注射)用作未经处理的对照,这将表明与全身性副作用相关的对侧阻滞的证据。为了评估感觉神经阻滞,将后爪依次(先左后右)暴露于56°C的热板上,并测量热潜伏期。热潜伏期定义为动物允许其爪子停留在热板上的时间。2秒的热潜伏期表示无神经阻滞(基线),并且12秒的热潜伏期表示深度神经阻滞。成功的神经阻滞定义为7秒以上的热潜伏期。12秒后从热板上去除后爪,以防止热伤害。

[0292] 通过负重测试评估运动神经阻滞,以确定大鼠后爪的运动强度。简而言之,将大鼠的一只后爪定位在数字天平上,并被允许承受其自身的重量。如前所述,记录了大鼠在踝关节未接触天平的情况下可以承受的最大重量,并且当运动强度小于最大值的一半时,就认为达到了运动阻滞。

[0293] 感觉阻滞的持续时间是通过热潜伏期返回到7秒所需的时间计算的,其中2秒为基线并且12秒为完全感觉阻滞。运动阻滞的持续时间定义为负重从最大阻滞返回到正常的一半所花费的时间。

[0294] 共聚焦成像

[0295] 在异氟烷-氧气麻醉下,向大鼠注射0.5mL测试调配物(PEG200中的25mg FITC-T_gD₈缀合物、PEG200中的0.25mg荧光素钠、PBS中的0.25mg荧光素钠),并在坐骨神经注射后的预定间隔内实施安乐死。采集坐骨神经及其周围组织,并将其包埋在OCT化合物中,然后冷冻并储存在-20°C下。使用恒冷箱切片机制备切片(10µm),并将其安装到载玻片上。然后,将载玻片在室温下用预冷的4%多聚甲醛固定20分钟,在PBS缓冲液(pH 7.4)中洗涤3次。最后,用具有DAPI的ProLong金色防褪色封固剂(ProLong Gold Antifade Mountant)(马萨诸塞州沃尔瑟姆赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific))和盖玻片封固载玻片。所有成像均使用Zeiss LSM 710多光子共聚焦显微镜进行。

[0296] IVIS成像

[0297] 在异氟烷-氧气麻醉下,对大鼠进行剃毛并注射0.5mL测试调配物(PEG200中的25mg Cy5.5-T_gD₈缀合物)。捕获体内荧光图像,并使用IVIS光谱(美国珀金埃尔默公司(PerkinElmer, Inc.))在注射后的不同时间点评估荧光强度。非侵入性地记录了全身动物图像。对于离体组织分布研究,在注射后1天对大鼠实施安乐死。为了记录图像,在每次测量之前将动物用异氟烷麻醉,并允许在测量之后恢复。675nm激发滤光片和700nm发射滤光片用于成像。

[0298] 组织采集和组织学

[0299] 注射后第4天和第14天(这些时间点用于评估炎症和肌肉毒性两者)处死大鼠,并将坐骨神经与周围组织一起去除。解剖器对每只大鼠已经注射了哪种溶液不知情。将神经和周围组织置于10%福尔马林中,并使用标准技术对其进行组织学处理(苏木精-伊红染色

的载玻片)。载玻片由对单独样品性质不知情的观察者(RP)分析。

[0300] 在这项研究中,肌肉毒性的主要形态学指标是再生纤维(中央核含有突出的核仁的小嗜碱性纤维)的存在,其中仅偶尔的肌纤维显示持续的退行性变化。

[0301] 对肌肉样品的炎症(0-4分)和肌肉毒性(0-6分)进行评分(Hirata,Y.在《纯粹与应用化学(Pure and Applied Chemistry)》第50卷979(1978)中)。炎症评分是对严重程度主观评估(0:无炎症,1:周围炎症,2:深层炎症,3:肌肉半束炎症,4:肌肉全束炎症)。肌肉毒性评分反映了局部麻醉肌肉毒性的两个特性特征:核内在化和再生。核内在化由肌细胞的正常大小和色度表征,但细胞核定位成远离其在细胞外围处的通常位置(Gewert,B.、Plassmann,M.M和MacLeod,M.“海洋环境中漂浮的塑料聚合物的降解途径(Pathways for degradation of plastic polymers floating in the marine environment)”《环境科学:过程和影响(Environmental Science:Processes&Impacts)》17,1513-1521(2015))。再生由具有嗜碱性细胞质的收缩的心肌细胞表征。评分如下:0.正常;1.束周内在化;2.深度内在化(>5个细胞层),3.束周再生,4.深度再生,5.半束再生,6.全束再生。样品的等级表示载玻片上存在的最差区域(最严重的损坏)。

[0302] 统计.数据表示为平均值±SD(在释放动力学、细胞工作和神经行为研究中n=4)。为了考虑多个比较,所有统计比较均使用Origin软件通过Tukey-Kramer测试进行。P<0.05被认为表示统计学显著性。

[0303] 结果

[0304] TDP聚合物的合成

[0305] TDP聚合物的合成是在室温(图1A)下通过三醇、二羧酸和PEG的Steglich酯化进行的。可以通过使用亲水性(甘油)或疏水性(PCL三醇)三醇、改变二羧酸的脂肪族链中的碳数量(1、5或8)并改变PEG的分子量来改变聚合物的亲水性。在此,合成的TDP聚合物的命名为 $T_xD_yP_z$,其中“x”表示三醇的类型(g为甘油,c为PCL三醇),“y”表示二羧酸的脂肪族链中的碳数量,“z”表示PEG的分子量(200、1000、2000kDa)(表1)。TDP聚合物内甘油和PEG的存在旨在增加聚合物的亲水性分数(f_{phil}),该亲水性分数定义为TDP聚合物内甘油与PEG的重量百分比。

[0306] 表1.TDP聚合物的表征

	名称 ^a	f_{phil} (%) ^b	二羧酸	三醇	PEG	Mn ^c	Mw ^c	PDI ^c
[0307]	T _g D ₈ P ₂₀₀₀	83.5	癸二酸	甘油	PEG ₂₀₀₀	6643	11234	1.691
	T _g D ₈ P ₁₀₀₀	72.1	癸二酸	甘油	PEG ₁₀₀₀	5578	7672	1.375
	T _g D ₈ P ₂₀₀	37.8	癸二酸	甘油	PEG ₂₀₀	4470	7081	1.584
	T _g D ₁	34.0	丙二酸	甘油	-	4567	11628	2.546
	T _g D ₅	28.9	戊二酸	甘油	-	5962	16595	2.783
[0308]	T _g D ₈	21.0	癸二酸	甘油	-	6011	16564	2.756
	T _c D ₈	0	癸二酸	PCL三醇 ^d	-	6126	17073	2.787

[0309] ^a聚合物名称如正文所描述的缩写或简化。

[0310] ^b聚合物的亲水性分数(f_{phil}):聚合物内PEG与甘油的重量百分比。

[0311] ^c如通过GPC所确定的。

[0312] ^d PCL三醇=聚己内酯三醇。

[0313] TDP聚合物的表征

[0314] 通过¹H NMR光谱研究了TDP聚合物的结构。在TDP聚合物的¹H NMR中,检测到二羧酸在1.30、1.62和2.35ppm下的亚甲基峰,并且检测到三醇的亚甲基峰介于4.05到4.35ppm之间。在T_gD₈P₂₀₀、T_gD₈P₁₀₀₀和T_gD₈P₂₀₀₀中,观察到介于3.45到3.60ppm之间的另一个亚甲基峰,表示存在PEG区段。TDP聚合物的分子量通过凝胶渗透色谱法(GPC)确定(表1)。TDP聚合物的Mn在4,000-7,000的范围内。

[0315] 通过评估表面和本体特性两者,研究了TDP聚合物的亲水性。通过光学张力测定学(测角术)测量聚合物薄膜的表面特性。在此技术中,确定了聚合物表面与固着水滴表面的切线之间的角度(接触角);接触角与亲水性相关。聚合物的 f_{phil} 的增加与接触角反相关(图2A):随着 f_{phil} 从0增加到83.5%,聚合物薄膜的接触角从 $73.9 \pm 1.3^\circ$ 减小到 $31.3 \pm 2.1^\circ$ 。通过比较聚合物在水中的溶解度来研究聚合物的本体特性。 f_{phil} 的增加导致在水中溶解。

[0316] 在生理条件下(PBS, pH 7.4, 37°C),聚合物的体外降解速率随 f_{phil} 的增加而增加(图2B),推测是因为更高的 f_{phil} 将导致更高的水吸收并加速酯键水解。当 f_{phil} 低于37.8%(T_gD₈和T_gD₈P₂₀₀)时,聚合物遵循近线性的质量损失(图2C)。细胞毒性

[0317] 在来自成肌细胞细胞系C2C12的肌管中评估了TDP聚合物的细胞毒性,以评估潜在的肌肉毒性以及通常用于神经毒性测定的嗜铬细胞瘤细胞系PC12。将TDP聚合物分散在PEG200(50mg/ml)中,并加入到细胞培养物中,并在24小时后通过MTT测定评估细胞活力(图3A和3B)。在任一细胞系的任何组中,细胞活力未降低。

[0318] TDP-TTX缀合物的合成

[0319] TDP-TTX缀合物的合成通过Steglich酯化反应进行,因为它们允许反应在室温下进行以避免药物降解(图1B)。TTX缀合的挑战来自其在有机溶剂中的低溶解度;尽管TTX具有高极性,但仅微溶于酸化的水。由于Steglich酯化反应必须在干燥的非水性溶剂中进行,因此需要用于TTX的合适有机溶剂以促进TTX与缀合物的键合。三种无水溶剂—DMF、DCM和DMSO用于Steglich酯化反应。对于二羧酸,DMF是良好溶剂,并且对于催化剂(DMAP)、偶联剂(DIC)、甘油、PEG和所得聚合物,DCM是良好溶剂。选择DMSO作为TTX的溶剂,因为在测试的有机溶剂中,TTX在DMSO中的溶解度最高(10 μ g/mL)(表2)。

[0320] 具体地,将1mg TTX加入到反应混合物中(参见方法)。由于其在DMSO中的溶解度低,最初只有少量的TTX溶解在DMSO中并参与了反应。然而,随着Steglich酯化反应的进行,溶解的TTX与TDP聚合物缀合,这打破了TTX在DMSO中的溶液平衡,并且随后更多的TTX溶解在DMSO中以参与反应。为了实现TTX与TDP的高度结合(相对于总进料TTX与聚合物缀合的TTX的质量分数),允许该反应在室温下进行7天。反应后,通过ELISA,通过测量反应混合物中未结合的TTX来确定结合程度。将>99.0%的TTX与TDP聚合物缀合(表3、表4、表5)。

[0321] 表2. 有机溶剂中的TTX溶解度

	有机溶剂	TTX 溶解度 (μ g/mL)
[0322]	DMSO	10.0
	DMF	1.7
	DCM	0

[0323] 请参见“方法”中针对确定溶解度的平衡溶解度方法的描述。

[0324] 5表3. TDP-TTX缀合物的表征

缀合物	二羧酸 (mmol)	三醇 (mmol)	PEG (mmol)	TTX (mg)	TTX 负载 ^a ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	结合度 ^b (wt %)
[0325] T _g D ₈ P ₂₀₀₀ -TTX	5	1.25	2.5	1	0.16	99.2
T _g D ₈ P ₁₀₀₀ -TTX	5	1.25	2.5	1	0.28	99.0
T _g D ₈ P ₂₀₀ -TTX	5	1.25	2.5	1	0.60	99.5
T _g D ₈ -TTX	5	2.9	-	2	1.60	99.4
T _g D ₅ -TTX	5	2.9	-	2	2.15	99.5
T _g D ₁ -TTX	5	2.9	-	2	2.55	99.4
T _c D ₈ -TTX	2.5	1.45	-	2	2.13	99.6

[0326] ^a如通过ELISA所确定的。

[0327] ^b结合度:相对于总进料TTX,与聚合物缀合的TTX的质量分数。

[0328] 表4. TTX结合度的测量

	DMSO (mL)	水 (mL)	TTX 浓度 (ng/mL) ^b	未结合的 TTX (μg)
[0329]				
[0330] 上清液 #1 ^a	10	30	150	6
上清液 #2 ^a	0	40	0	0

[0331] 请参见方法中针对药物结合度的测量的描述

[0332] ^asteglich酯化反应后,通过旋转蒸发去除反应混合物中的DCM,并且然后用30mL DI水洗涤含有10mL DMSO、聚合物-TTX缀合物和未结合的TTX的反应混合物。将聚合物-TTX缀合物以20000rpm离心5分钟,收集含有30mL DI水、10mL DMSO和未结合的TTX的上清液作为上清液#1。用40mL DI水洗涤聚合物-TTX缀合物,并再次离心。收集含有40mL DI水和未结合的TTX的上清液作为上清液#2。

[0333] ^b用TTX Elisa试剂盒测量上清液的TTX浓度。由于上清液#1中存在有机溶剂,因此将上清液#1用PBS稀释10倍,以避免有机溶剂对ELISA测量的影响。

[0334] TTX结合度的计算如下:

$$[0335] \frac{\text{TTX}_{\text{进料}} - \text{TTX}_{\text{未结合}}}{\text{TTX}_{\text{进料}}} \times 100\% = \frac{1000 \mu\text{g} - 6 \mu\text{g}}{1000 \mu\text{g}} \times 100\% = 99.4\%$$

[0336] 表5. TDP-TTX缀合物的合成和表征

名称	加入到反应中的量				PEG 浓度 (%)	百分比 产率 (%) ^b
	二羧酸 (mmol)	三醇 (mmol)	PEG (mmol)	TTX (mmol)		
[0337] T _g D ₈ P ₂₀₀₀ -TTX	5	1.25	2.5	0.003	68.4	88
T _g D ₈ P ₁₀₀₀ -TTX	5	1.25	2.5	0.003	60.8	90
T _g D ₈ P ₂₀₀ -TTX	5	1.25	2.5	0.003	26.7	94
T _g D ₈ -TTX	5	2.9	-	0.006	-	96
T _g D ₅ -TTX	5	2.9	-	0.006	-	94
T _g D ₁ -TTX	5	2.9	-	0.006	-	90
T _c D ₈ -TTX	2.5	1.45	-	0.006	-	95

[0338] ^a根据PEG和癸二酸内亚甲基氢的NMR比计算PEG浓度。

[0339] ^b反应后,将反应混合物用40mL DI水洗涤两次。以20,00 (rpm) 离心5分钟后收集聚合物-TTX缀合物,随后用液氮冷冻并冻干。通过对干燥的聚合物-TTX缀合物和所有反应物进行称重来计算聚合物-TTX缀合物的实际产率。聚合物-TTX缀合物的产率百分比(%)计算如下:

$$[0340] \quad \text{产率}\% = \frac{\text{实际产量}}{\text{理论产量}} \times 100\%$$

[0341] TDP-TTX缀合物的表征

[0342] 直接通过傅里叶变换红外光谱学 (FTIR) 证实TDP聚合物与TTX的缀合。TTX的胍基和TDP聚合物的羟基的特性为在3000-3600cm⁻¹范围的吸收峰。TDP-TTX展现了在3,000-3,600cm⁻¹范围内的吸收性比未改性的TDP聚合物的吸收性更强,表明存在TTX。

[0343] 实例2: TTX-PGS/PEG提供长持续时间的体外药物释放而无细胞毒性

[0344] 结果

[0345] 为了评估TDP-TTX缀合物提供持续神经阻滞的潜力,在生理条件下 (PBS, pH 7.4, 37°C) 体外研究了释放动力学。释放样品的HPLC显示在约5.0分钟出现峰。液相色谱-质谱法 (LC-MS) 证实,该分数中的分子的分子量与TTX的分子量相对应 (m/z 320.1是 [TTX+H]⁺), 从而证实TTX以其天然形式从TDP-TTX缀合物中释放。研究了TTX释放半衰期 (释放一半已加载TTX所花费的时间)。与游离TTX相比,所有TDP-TTX缀合物均显著增加了TTX释放的持续时间 (图4A和4B)。

[0346] TDP聚合物的 f_{Phil} 确定TTX的释放速率。随着 f_{Phil} 从83.5减小到0%, TTX释放半衰期从25±5小时增加到723±75小时。另外,在更低的 f_{Phil} 值 (T_gD_8 -TTX和 $T_gD_8P_{200}$ -TTX) 下, TTX释放遵循近线性曲线,这表明在持续时间延长的局部麻醉的恒定速率下以最小的全身性毒性释放TTX的潜力。

[0347] 为了说明TTX释放取决于酯键的断裂, TTX通过氨基甲酸酯键 (图5A) 共价结合到TDP上, 该键可以水解, 但速率比酯键慢得多 (Chaffin, K. A.、Chen, X.、McNamara, L.、Bates, F. S. 和Hillmyer, M. A., “暴露于脱氧水后的聚醚氨基甲酸酯水解稳定性 (Polyether Urethane Hydrolytic Stability after Exposure to Deoxygenated Water)” 《大分子 (Macromolecules)》47, 5220-5226, doi:10.1021/ma500904d (2014))。在体外, 在生理条件 (PBS, pH 7.4, 37°C) 下温育28天后, 从含有10μg TTX的25mg T_gD_8 -TTX氨基甲酸酯缀合物中未释放出ELISA可检测的TTX (图6)。

[0348] 从PGS-PEG-TTX和PGS-TTX缀合物的体外药物释放

[0349] 在28天时间段内在生理条件下 (PBS, 37°C) 研究了PGS-PEG-TTX和PGS-TTX缀合物的体外药物释放和降解。LC-MS分析证实, TTX以其天然形式从聚合物-TTX缀合物中释放。与游离TTX相比, 所有聚合物-TTX缀合物调配物显著增加了TTX释放的持续时间 (图6B、6C)。在PGS-TTX缀合物中加入PEG确定了聚合物主链的亲水性, 并且聚合物主链的亲水性确定了酯键的水解速率和TTX释放速率。因此, 可以通过调节聚合物-TTX缀合物中PEG区段的百分比来调整TTX释放速率。TTX的释放与并入的PEG的量成比例地增加。28天后, PGS-PEG2000-TTX示出99.7%的TTX释放, 而PGS-PEG1000-TTX、PGS-PEG200-TTX和PGS-TTX分别显示89.5%、62.5%和43.7%的TTX释放。在PGS-PEG200-TTX和PGS-TTX缀合物的情况下, TTX的释放遵循零阶释放曲线, 这归因于在表面腐蚀机制下基于PGS的共聚物的降解。TTX释放随着PEG浓度

的增加而增加可能归因于共聚物主链亲水性的增加。亲水性的这种增加导致更大的水吸收,这加速了酯键的水解。

[0350] 对于药物地塞米松示出类似的趋势,药物地塞米松的分子具有羟基,该羟基允许其通过与TTX缀合时使用的相同酯键共价缀合到PGS-PEG上。使用HPLC测量地塞米松的浓度。对于研究的所有PGS-PEG-药物缀合物,TTX和地塞米松的药物释放曲线是一致的(参见表6)。质量损失遵循与PGS-PEG-TTX缀合物的药物释放的趋势类似的趋势(图6A-6E)。28天后,PGS-TTX具有27.3%的质量损失,而PGS-PEG200-TTX、PGS-PEG1000-TTX和PGS-PEG2000-TTX分别具有30.4%、70.4%和94.7%的质量损失。这些结果证实药物释放是由于酯键的水解而发生的。所关注化合物可调节持续释放若干周支持缀合物提供持续时间延长的局部麻醉的潜力。

[0351] 数据显示,任何含有羟基或羧基的药物可以通过可水解酯键与TDP聚合物共价缀合。TDP聚合物具有用作通用平台的潜力,以控制释放各种治疗药物,如地塞米松(图5B、表6,图6A-6E)。

[0352] 表6. TDP-Dex缀合物的合成和表征

缀合物	进料量				Dex 负载 ^b ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	结合度 (%)
	癸二酸 (mmol)	三醇 (mmol)	PEG (mmol)	Dex ^a (mmol)		
T _g D ₈ P ₂₀₀₀ -Dex	5	1.25	2.5	0.025	1.6	99.1
T _g D ₈ P ₁₀₀₀ -Dex	5	1.25	2.5	0.025	2.8	99.0
T _g D ₈ P ₂₀₀ Dex	5	1.25	2.5	0.025	6.0	99.4
T _g D ₈ -Dex	5	2.9	-	0.05	16	99.4
T _g D ₅ -Dex	5	2.9	-	0.05	21.5	99.5
T _g D ₁ -Dex	5	2.9	-	0.05	25.5	99.5
T _c D ₈ -Dex	2.5	1.45	-	0.05	21.3	99.6

[0354] ^aDex=地塞米松。

[0355] ^b如通过HPLC所确定的。

[0356] 实例3:注射器可注射的调配物的制造

[0357] 结果

[0358] 可注射的溶液和混悬剂具有通过任何施用途径注射到体内的潜力(Mastropietro, D., Nimrooz, R. 和 Omidian, H. “药物调配物的流变学-一个视角(Rheology in pharmaceutical formulations-A perspective)”《药物研发杂志》2, 108(2013)), 然而, 尽管具有高 f_{phil} (83.5%)的T_gD₈P₂₀₀₀可以均匀地悬浮在PBS中以制成可注射的调配物, 但其它具有低 f_{phil} 的TDP聚合物不能均匀地悬浮在PBS中(图3A和3B)。为了通过注射到患者体内来施用TDP-TTX缀合物, 通过溶剂蒸发制成均匀的TDP-TTX/PEG200调配物(图7)。简而言之, 将TDP-TTX缀合物溶解在DCM中以制成均匀的溶液, 随后加入可与DCM混溶的PEG200。通过旋转蒸发和冻干去除DCM, 从而留下TDP-TTX于PEG200中的均匀悬浮液。

[0359] TDP-TTX/PEG200调配物的动态储能模量(G')和损耗模量(G'')以及复数粘度在角频率范围内进行了表征(图8A-8C)。当考虑到可注射性(syringeability/injectability)时, 粘度很重要。在测试的角频率范围内, 在50mg/mL下, 所有TDP-TTX/PEG200调配物的粘度均小于10Pa·s。 G'' 高于 G' , 表明复数模量的粘性成分主导了材料的行为, 即, 它们表现为液体(图8C)。TDP-TTX/PEG200调配物的粘性行为和低粘度表明它们是注射器可注射的。

[0360] 聚合物的 f_{phl} 与TDP-TTX/PEG200调配物的粘度反相关(图8A),推测是因为降低的亲水性意味着与PEG200的混溶性较低。 $T_{\text{c}}D_{\text{g}}$ -TTX/PEG200的粘度小于 $T_{\text{g}}D_{\text{g}}$ -TTX/PEG200的粘度,这可能归因于PCL-三醇与PEG200的混溶性优于甘油的混溶性。

[0361] 实例4:TDP-TTX缀合物在体内诱导坐骨神经阻滞

[0362] 结果

[0363] TTX剂量对神经阻滞的影响

[0364] 在左坐骨神经处向大鼠(每组4只)注射0.5mL的PBS或含有游离TTX的PEG200或0.5mL的含有TDP-TTX缀合物的PEG200。然后,对其进行神经行为测试,以确定两只后爪的功能缺陷(即,神经阻滞)的持续时间。注射侧(左侧)的缺陷的持续时间反映了神经阻滞的持续时间。未注射侧(右侧,对侧)的缺陷反映了全身性TTX分布。

[0365] 有和没有PEG200的游离TTX

[0366] 接受游离TTX的坐骨神经注射的大鼠组示出成功的神经阻滞频率和神经阻滞的中值持续时间的剂量依赖性增加(图9A和9B)。含低剂量TTX(分别为1或2 μg ;6或12 μM)的PBS不会引起可检测到的神经阻滞或毒性。在100%的动物中,来自含4 μg (24 μM)的游离TTX的PBS的阻滞是成功的,并且产生 1.9 ± 1.0 小时的感觉神经阻滞的中值持续时间;这相当于0.5%布比卡因的效果-布比卡因是临床上常用的麻醉药。然而,用含4 μg 的TTX的PBS进行的阻滞与显著的全身性毒性相关,如由未注射(对侧)腿的感觉缺陷所证明的(图9C和图10A-10E)。注射含5 μg (30 μM)的游离TTX的PBS会在所有动物中引起对侧缺陷,并且统一致命(图9D)。在PBS中任意剂量的游离TTX下,感觉神经阻滞和运动神经阻滞的持续时间之间在统计学上没有显著差异(图11)。

[0367] 与含TTX的PBS相比,含游离TTX的0.5mL PEG200导致更高的神经阻滞成功率和更长的神经阻滞的持续时间(图9A、9B)。含1 μg (6 μM)和3 μg (18 μM)的游离TTX的PEG200导致100%的阻滞,持续时间分别为 3.6 ± 0.3 小时和 5.3 ± 0.3 小时。PEG200不影响全身性毒性的发生率(图9C、9D)。通过PEG200改善神经阻滞的成功率和持续时间与化学渗透增强剂或纳米封装的作用一致。

[0368] $T_{\text{g}}D_{\text{g}}$ -TTX/PEG200

[0369] 通过在 $T_{\text{g}}D_{\text{g}}$ -TTX/PEG200中的调配物,神经阻滞持续时间显著延长(图9A、9B)。含1 μg (6 μM)缀合的TTX的 $T_{\text{g}}D_{\text{g}}$ -TTX/PEG200具有50%的成功阻滞,其中中值持续时间为 1.6 ± 1.1 小时。随着缀合的TTX剂量增加,感觉阻滞成功率和持续时间增加。通过含80 μg (480 μM)缀合的TTX的 $T_{\text{g}}D_{\text{g}}$ -TTX/PEG200进行的感觉神经阻滞持续 71.5 ± 6.9 小时(图9B),并且没有动物死亡或对侧缺陷(图9C、9D和图10A-10E)。显著地,在这种动物模型中,由于毒性有限,不可能在不存在以下的情况下通过TTX实现如此长的神经阻滞:持续释放(Rwei, A. Y. 等人,“通过可光触发脂质体的可重复且可调整的按需坐骨神经阻滞(Repeatable and adjustable on-demand sciatic nerve block with phototriggerable liposomes)”《美国国家科学院院刊》112,15719-15724,(2015))、化学渗透增强剂(Lahaye, L. A. 和Butterworth, I. V. J. F. “在部位-1钠通道阻滞剂作为局部麻醉药的情况下,新石房蛤毒素将代替对连续神经阻滞的需求吗?(Site-1 Sodium Channel Blockers as Local Anesthetics Will Neosaxitoxin Supplant the Need for Continuous Nerve Blocks?)”《麻醉学》123,741-742(2015))、或增强SISCB效果的药物(Rai, R.、Tallawi, M.、Grigore, A. 和Boccaccini,

A.R. “聚(甘油癸二酸酯) (PGS)的合成、特性及生物医学应用:综述(Synthesis, properties and biomedical applications of poly(glycerol sebacate) (PGS):A review)”

[0370] 《聚合物科学进展》37,1051-1078, (2012)。在所有剂量的缀合的TTX下,运动阻滞比感觉阻滞长。例如,用含80 μ g (480 μ M) 缀合的TTX的T_gD₈-TTX/PEG200进行的运动阻滞持续83.5 \pm 10.5小时(图11)。

[0371] 与PBS中游离TTX相比,T_gD₈-TTX/PEG200中低剂量的TTX(例如,1-3 μ g)具有更大的阻滞成功率,这一事实与调配物中赋形剂的CPE样效应一致。另外,人们通常将期望游离药物具有更高的阻滞成功率,因为药物的游离分数更高。为了确定PEG200或T_gD₈是否负责产生CPE样效应,在坐骨神经处注射3 μ g (18 μ M) 游离TTX和(但未与其缀合)在0.5mL PEG200中的25mg T_gD₈聚合物,从而导致100%的阻滞,持续时间为3.5 \pm 1.1小时。这比来自游离TTX的阻滞的持续时间更长($p < 0.05$),但不长于含TTX的PEG200,表明PEG200而非T_gD₈负责产生CPE样效应,在没有TTX的情况下,0.5mL PEG200中的T_gD₈聚合物不会引起神经阻滞(表7)。

[0372] 表7. PEG200对TTX神经阻滞的作用 (n=4)

功能	含 3 μ g 游离 TTX 的 0.5 ml PBS	含 3 μ g 游离 TTX 的 0.5 ml PEG200	含有 25 mg T _g D ₈ 的 含 3 μ g 游离 TTX 的 0.5 ml PEG200	含有 25 mg T _g D ₈ 的 0.5 ml PEG200
[0373] 成功阻滞 (%)	25	100	100	0
阻滞持续时间 (小时)	1	5.3 \pm 0.3	3.5 \pm 1.1	0
对侧阻滞 (%)	25	0	50	0
死亡率 (%)	0	0	0	0

[0374] 神经阻滞的持续时间的数据为平均值 \pm SD。

[0375] 为了研究PEG200可以用作CPE分子以增强进入神经中的TTX通量的可能性,荧光素钠(即激发波长为460nm并且发射波长为515nm的荧光染料)被用作TTX的替代物,因为两者均非常亲水的。在大鼠坐骨神经处给动物注射含0.25mg荧光素钠的0.5mL PEG200或PBS。一小时和四小时后,对动物实施安乐死,并采集坐骨神经和周围组织。产生组织的冷冻切片,并拍摄荧光图像。在注射含0.25mg荧光素钠的0.5ml PEG或PBS后,在1小时和4小时时,捕获坐骨神经和周围组织的切片的荧光图像。

[0376] 在用含荧光素钠的PEG200注射的动物中,注射后一小时观察到整个神经的荧光,但注射四小时后未观察到荧光。在任一时间点或未注射的肢体中,在注射相同剂量的含荧光素钠的PBS的动物的神经中未观察到荧光。这些结果显示,PEG200可以充当化学渗透增强剂,以帮助分子渗透到神经中。

[0377] 此工作背后的一个重要假设是,与聚合物结合的TTX将是无活性的,并且在释放时将具有活性。为了测试此假设,在坐骨神经处通过氨基甲酸酯键注射含10.0 μ g的缀合的TTX的T_gD₈。在所测试的任何动物中未产生感觉神经阻滞。这些结果表明,当TTX共价缀合到聚合物主链上时没有生物学活性。

[0378] 用PBS稀释的T_gD₈-TTX/PEG200

[0379] 排除由PEG200诱导的CPE效应并研究来自T_gD₈-TTX自身的持续释放TTX对神经阻滞的影响。将游离TTX/PEG200和T_gD₈-TTX/PEG200溶液在含有10wt%牛血清白蛋白(BSA)的PBS中稀释4倍。BSA用作表面活性剂,以避免T_gD₈-TTX从溶液中沉淀出来。含1 μ g (6 μ M) 游离TTX的0.5ml经过稀释的溶液没有引起可检测到的神经阻滞或毒性,表明CPE效应被排除,如同纯

PEG200的效应被排除一样(表8)。0.5ml经过稀释的溶液中含有40 μ g (240 μ M) TTX的25mg T_gD₈-TTX不会引起可检测到的神经阻滞或毒性,这表明来自T_gD₈-TTX的TTX的缓慢释放不会实现TTX产生神经阻滞的治疗剂量。这些结果进一步证实了T_gD₈-TTX/PEG200调配物中PEG200的CPE样功能。

[0380] 表8.PEG200/PBS溶液对周围神经阻滞的影响。通过在含有10wt%牛血清白蛋白(BSA)的PBS中将PEG200稀释4倍来制成PEG200/PBS溶液。

功能	含 1 μ g 游离 TTX 的 0.5 ml PEG/PBS	含 3 μ g 游离 TTX 的 0.5 ml PEG/PBS	含 25 mg T _g D ₈ 中的 40 μ g 缀合的 TTX 的 0.5 ml PEG/PBS
[0381] 成功阻滞 (%)	0	0	0
阻滞持续时间 (小时)	0	0	0
对侧阻滞 (%)	0	0	0
死亡率 (%)	0	100	0

[0382] 神经阻滞的持续时间的数据为平均值 \pm SD。

[0383] 实例5: f_{phil} 影响缀合的TTX的毒性和功效

[0384] 受到TDP聚合物的 f_{phil} 确定体外TDP-TTX缀合物的TTX释放速率这一事实的启发,我们的假设是TDP聚合物的 f_{phil} 还确定了特定剂量的体内缀合的TTX的毒性和功效:更高的 f_{phil} 会以其天然形式诱导TTX更快释放,因此增加了特定高剂量的缀合的TTX的毒性,同时增加了特定低剂量的缀合的TTX的功效。

[0385] 为了测试我们的假设,在大鼠左侧坐骨神经处注射含有两个剂量的缀合的TTX的TDP-TTX缀合物:10 μ g (60 μ M) 和1 μ g (6 μ M)。检查了 f_{phil} 对缀合的TTX的毒性和功效的影响。TDP聚合物的 f_{phil} 的增加增加了10 μ g (60 μ M)缀合的TTX的全身性毒性,如通过死亡率的增加所证明的(图12A-12D)。另一方面,TDP聚合物的 f_{phil} 的增加增加了1 μ g (6 μ M)缀合的TTX的功效,如通过成功阻滞率和阻滞持续时间的增加所证明的。

[0386] 实例6:TDP聚合物生物分布在体内神经处

[0387] 结果

[0388] 为了检查坐骨神经注射后TDP聚合物的局部分布,向动物注射T_gD₈(在0.5mL PEG200中),异硫氰酸荧光素(激发波长为488nm并且发射波长为519nm的荧光染料)共价缀合到该T_gD₈,使得该染料将不能独立扩散;该聚合物表示为FITC-T_gD₈。在注射后的预定时间点,对动物实施安乐死,并对神经和周围组织进行组织学处理。共聚焦荧光成像示出,注射24、48和168小时后肌肉与神经之间的结缔组织中的FITC荧光。在未注射的肢体中未观察到FITC荧光。

[0389] 为了评估TDP在组织动物中的局部保留的时程,向其注射了T_gD₈(在0.5mL PEG200中),Cy5.5(荧光染料发射适合在活动物中进行荧光测量的近红外信号)共价缀合到该T_gD₈;该聚合物表示为Cy5.5-T_gD₈。通过体内成像系统(IVIS)进行荧光成像,以评估Cy5.5-T_gD₈在组织中随时间推移的位置。在所有动物的坐骨神经处看见荧光信号,在其它地方没有可检测到的荧光。在4周内荧光信号降低,表明体内TDP逐渐降解(图13)。在注射后24小时的尸检中,可见的沉积物位于坐骨神经处;这些是荧光的,证实它们含有TDP。

[0390] 实例7:TDP-TTX缀合物不违反组织反应

[0391] 结果

[0392] 在坐骨神经注射后第4天和14天,对注射了具有各种 f_{phil} 的游离TTX和TDP-TTX缀合物的动物实施安乐死。图8示出了对 T_gD_8 -TTX缀合物的代表性组织反应。解剖时,通过共聚焦和IVIS检测到一些残留物质。该组织没有出现水肿或变色,并且没有其它明显的组织损伤迹象。切开并采集坐骨神经和周围组织以进行组织学评估。用苏木精-伊红染色处理肌肉组织,并用甲苯胺蓝染色处理神经组织。

[0393] 在注射游离TTX和TDP-TTX的动物中,在注射后4天和14天显微镜检查未发现显著的肌肉毒性和炎症。使用评分系统对肌肉毒性和炎症进行定量(表3)(Wang, Y., Kim, Y.M. 和 Langer, R. “聚(甘油癸二酸酯)的体内降解特性(In vivo degradation characteristics of poly(glycerol sebacate))”《生物医学材料研究杂志》A部分66A, 192-197, (2003))。具有各种 f_{phil} 的游离TTX和TDP-TTX缀合物的评分之间没有统计学上显著的差异。

[0394] 由于H&E染色对鉴定神经损伤相对不敏感,因此在注射TDP-TTX的动物体内获得了甲苯胺蓝染色的坐骨神经Epon嵌入切片。神经组织学和显微图像示出在所有注射的大鼠中正常的轴突分布和髓鞘结构。注射后第4天和第14天对神经进行的显微镜检查显示正常的无髓鞘纤维,没有受伤如肿胀、崩解或染黑的轴浆的迹象。在所有组中,偶尔发现有髓鞘纤维在其轴突内有沉积物或在其髓鞘内有圆形断裂,这是正常周围神经纤维的常见发现。

[0395] 表9. 游离TTX和TDP-TTX缀合物的肌肉毒性和炎症

调配物	聚合物的 剂量 (mg)	TTX 的剂 量 (μg)	中值		中值炎症评分 (范围)	
			肌肉毒性评分 (范围)		第 4 天	第 14 天
			第 4 天	第 14 天	第 4 天	第 14 天
游离 TTX	-	3 ^a	0 (0-0)	0.5 (0-1)	0.5 (0-1)	0 (0-0)
[0396] T_gD_8 -TTX	50 ^b	80.0	0 (0-0)	0 (0-0)	0.5 (0-1)	0.5 (0-1)
T_gD_1 -TTX	12.5 ^b	31.9	0.5 (0-1)	0 (0-0)	0.5 (0-1)	0.5 (0-1)
$T_gD_8P_{200}$ -TTX	32.5 ^b	10.0	0 (0-0)	0 (0-0)	0.5 (0-1)	0 (0-0)
$T_gD_8P_{1000}$ -TTX	25 ^b	6.9	0 (0-0)	0.5 (0-1)	0.5 (0-1)	0.5 (0-1)
$T_gD_8P_{2000}$ -TTX	25 ^b	3.5	0.5 (0-1)	0 (0-0)	0.5 (0-1)	0.5 (0-1)

[0397] ^a含 $3\mu\text{g}$ 游离TTX的0.5mL PBS, ^b将TDP-TTX缀合物调配在0.5mL PEG200中。数据中值为第25百分位和第75百分位($n=4$)。炎症评分范围:0-4;肌肉毒性评分范围:0-6(McAlvin, J.B., Reznor, G., Shankarappa, S.A., Stefanescu, C.F. 和 Kohane, D.S. “局部麻醉药聚合物微粒的局部毒性(Local Toxicity from Local Anesthetic Polymeric Microparticles)”《麻醉与镇痛(Anesthesia and analgesia)》116, 794-803, (2013); Padera, R., Tse, J., Bellas, E. 和 S Kohane, D.《用于以最小肌肉毒性实现延长的局部麻醉的河豚毒素(Tetrodotoxin for prolonged local anesthesia with minimal myotoxicity)》第34卷, (2006))。

[0398] 实例8:PGS-PEG-TTX缀合物为所有酒精或羧酸药物提供通用的治疗药物平台

[0399] 结果

[0400] 在可调整的亲水性的情况下,PGS-PEG共聚物可以用作所有酒精或羧酸药物的通用治疗药物平台。辣椒素(即含有一个羟基的常规局部麻醉药)通过酯键缀合到PGS-PEG共聚物中(图14)。

[0401] 为了在大鼠模型中产生神经阻滞,辣椒素的最小有效剂量为大约 $50\mu\text{g}$,其大大高于TTX27-28的剂量。因此,为了实现辣椒素的最小有效剂量,与TTX的注射剂量和辣椒素释

放速率,期望更高的注射剂量和更快的辣椒素释放速率。为了证明此概念,合成了PGS-辣椒素和PGS-PEG1000-辣椒素缀合物,并且它们各自具有两个移植密度:PGS-辣椒素和PGS-PEG1000-辣椒素的移植密度为44.4 $\mu\text{g}/\text{mg}$,并且PGS-辣椒素-2和PGS-PEG1000-辣椒素-2的移植密度为182.9 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (表10)。

[0402] 表10. PGS-PEG-辣椒素缀合物的合成

[0403] 缀合物	进料量 (毫摩尔)				缀合物中的 Cap ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
	癸二酸	甘油	PEG	Cap (mg)	
PGS-Cap	1.25	0.725	0	14.5	44.4
PGS-Cap-2	1.25	0.725	0	58	182.9
PGS-PEG1000-Cap	1.25	0.3125	0.625	40	44.4
PGS-PEG2000-Cap-2	0.625	0.1041	0.3125	100	182.9

[0404] 与TTX和地塞米松的释放趋势一致,从PGS-PEG1000-辣椒素缀合物中释放的辣椒素比从PGS-辣椒素缀合物中释放的快得多。在PBS中温育1天后,从25mg PGS-PEG1000-辣椒素-2缀合物中释放了70.8 μg 辣椒素,而分别从25mg PGS-辣椒素、PGS-辣椒素-2和PGS-PEG1000-辣椒素中仅释放5.3 μg 、21.2 μg 和15.2 μg 辣椒素(图10)。在体内,注射25mg PGS-PEG1000-辣椒素-2在所有受测试动物中产生神经阻滞,持续1天到27天。而注射25mg PGS-PEG1000-辣椒素、PGS-辣椒素和PGS-辣椒素-2并没有在所有受测试动物中产生神经阻滞(表11),表明未实现辣椒素的最低有效剂量。这些结果表明,尽管PGS是最适合TTX的平台,但PGS-PEG1000比PGS更适合用作辣椒素的控制释放平台以产生神经阻滞。

[0405] 表11. PGS-PEG-辣椒素缀合物的神经阻滞的持续时间

[0406] 聚合物-药物 缀合物	N	注射的剂量 (mg)	Cap (理论的)	神经阻滞的持续时间 (天)
PGS-Cap	7	25.0 ^a	287.5	0
PGS-Cap-2	2	25.0 ^a	1111.1	0
PGS-PEG1000-Cap	2	25.0 ^a	1110.3	0
PGS-PEG1000-Cap-2	3	25.0 ^a	4572.5	1天、3天、>23天

[0407] ^a调配在0.5ml PEG200中

[0408] PGS-PEG-TTX缀合物具有应用于大型动物(如人)的潜力。当用于更大的动物时,给定量的制剂的毒性将大大降低,因为局部麻醉药(包含TTX)的中值毒性剂量与接受者2的质量(分布体积)成正比。由于阻滞神经的剂量将随身体大小而变化,因此更大动物中TTX的注射剂量和释放速率两者应更高。由于TTX释放速率更快,PGS-PEG-TTX可能比PGS-TTX更适合更大的动物。

[0409] 总结

[0410] TDP聚合物是通过Steglich酯化反应在二羧酸的羧基与三醇和PEG的羟基之间形成酯键来合成的。TDP聚合物可通过酯键的水解降解,并示出良好的生物相容性,具有最小的细胞毒性。合成了具有各种 f_{phil} 的TDP聚合物家族。表面和本体表征均表明,聚合物的 f_{phil} 确定了聚合物网络的酯键的水解速率。TDP聚合物具有药物可以共价缀合的多个活性端基(羟基和羧基)。这些特性表明,TDP聚合物具有用作各种治疗药物的控制释放的通用平台的潜力。

[0411] TTX与TDP聚合物的共价缀合是通过Steglich酯化反应通过在TDP聚合物的羧基与TTX的羟基之间形成酯键来实现的。Steglich酯化合成在室温下进行,以避免药物降解。合

成的TDP-TTX缀合物逐渐降解为更小的聚合物-TTX片段,并最终通过酯键的水解降解为呈其天然形式的TTX,从而实现TTX的控制释放。TTX的释放速率与TDP聚合物的 f_{phil} 成反比。在低于37.8%的情况下,TDP-TTX缀合物可以在一个月的时间段内实现延长的体外TTX释放。

[0412] 首次证实了PEG200的CPE功能。PEG200可以穿过神经束膜屏障以增强进入神经中的药物通量,这可能归因于PEG200的两亲性质。在0.5mL PEG200中的1到3 μg 剂量的游离TTX导致100%阻滞,阻断持续时间长达 5.3 ± 0.3 小时;这比0.5%布比卡因的效果要长三倍—布比卡因是临床上常用的麻醉药。由于低毒性并且已经广泛用于各种药物调配物中(D'souza,A.A.和Shegokar,R.“聚乙二醇(PEG):用于制药应用的通用聚合物(Polyethylene glycol(PEG):a versatile polymer for pharmaceutical applications)”《药物递送专家观点(Expert Opinion on Drug Delivery)》13,1257-1275,doi:10.1080/17425247.2016.1182485(2016)),PEG200具有在临床上用作局部麻醉的TTX递送介质的巨大潜力。

[0413] 由于具有良好的混溶性,TDP-TTX缀合物易于分散在PEG200中,从而形成均匀的、注射器可注射的TDP-TTX/PEG200调配物。制备的所有TDP-TTX/PEG200调配物均表现为粘度低于10Pa.s的液体,这表明了通过注射器注射对患者的潜在施用。

[0414] 体内动物测试确定,实现延长的TTX释放的TDP-TTX/PEG200调配物可以显著扩大TTX的局部麻醉治疗指数,(i)TDP-TTX/PEG200允许TTX的注射剂量高达80 μg ,而不增加其全身性毒性。另外,TDP-TTX缀合物在神经周围的神经外膜组织中具有延长的保留,持续长达4周,这允许长期保持治疗TTX浓度以延长局部麻醉的持续时间;(ii)TDP-TTX/PEG200调配物能够增加TTX的疗效。TDP-TTX/PEG200调配物显著增强了低至1 μg 的TTX产生神经阻滞的有效性。总体而言,在1.0到80.0 μg 的各种TTX注射剂量范围内,TDP-TTX/PEG200调配物提供几小时到3天的神经阻滞的可调整的持续时间。

[0415] TDP-TTX缀合物可以应用于大型动物,如人。当用于更大的动物时,我们给定量的制剂的毒性将大大降低,因为局部麻醉药(包含TTX)的中值毒性剂量与接受者²的质量(分布体积)成正比。由于阻滞神经的剂量将随身体大小而变化,因此更大动物中TTX的注射剂量和释放速率两者应更高。在更快的TTX释放速率的情况下,具有更高的 f_{phil} 的TDP-TTX缀合物可能更适合更大的动物。

[0416] 合理设计了用于扩大TTX治疗指数的递送系统,旨在将TTX引入临床实践。TTX通过可水解酯键共价缀合到生物可降解且生物相容的TDP主链上。数据显示,TDP-TTX缀合物可以提供可调节的TTX释放。TTX可以通过酯键的水解以其天然形式释放,并且可以通过控制TDP主链的亲水性来调节释放速率。PEG200可以用作CPE分子以跨过神经束膜屏障并增强进入神经中的药物通量。PEG200可以显著增强TTX产生神经阻滞的有效性。TDP-TTX/PEG200,一种并入TDP-TTX缀合物的持续TTX释放和PEG200的CPE功能的注射器可注射的调配物,已被证实可显著扩大TTX的治疗窗。在1.0到80.0 μg 的各种TTX注射剂量范围内,在体内实验中,TDP-TTX/PEG200调配物提供几小时到3天的调神经阻滞的可调整的持续时间。此外,神经阻滞与最小的全身性毒性相关,并且对肌肉和周围神经几乎没有局部毒性。TDP-TTX/PEG200调配物为可调整且持续时间延长的局部麻醉提供了成功且安全的方法。

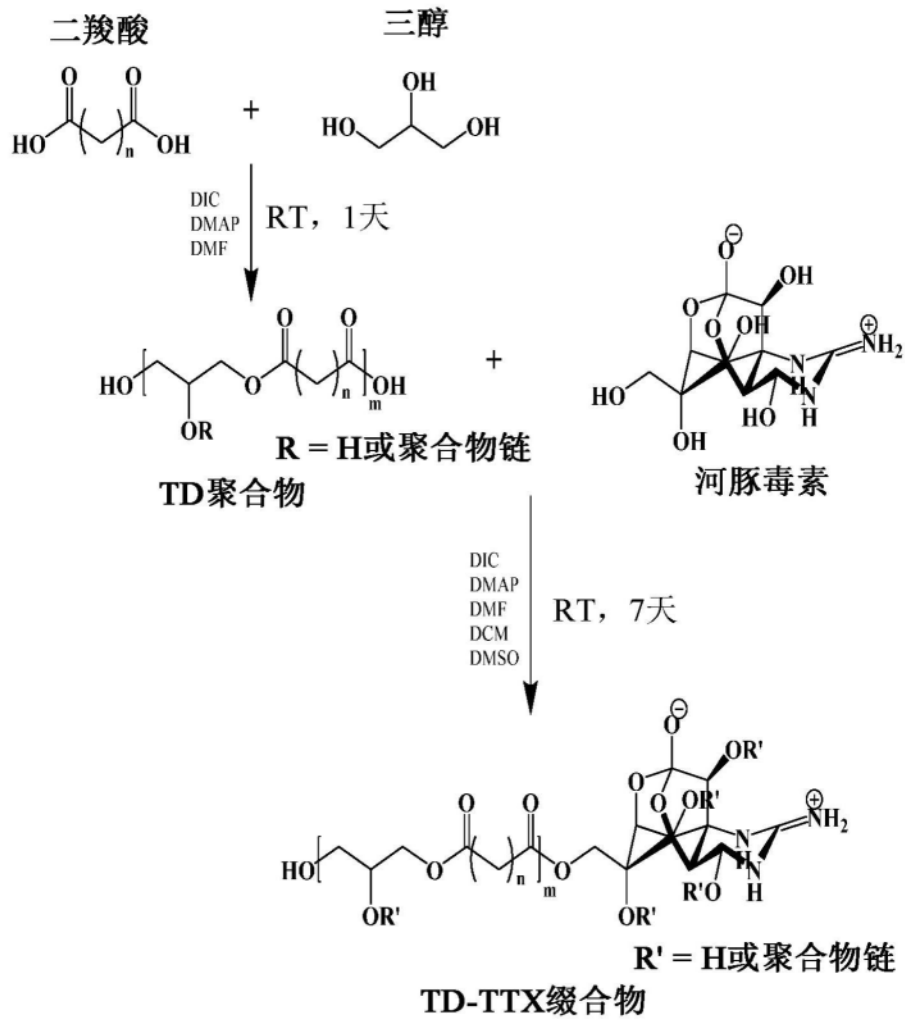


图1A

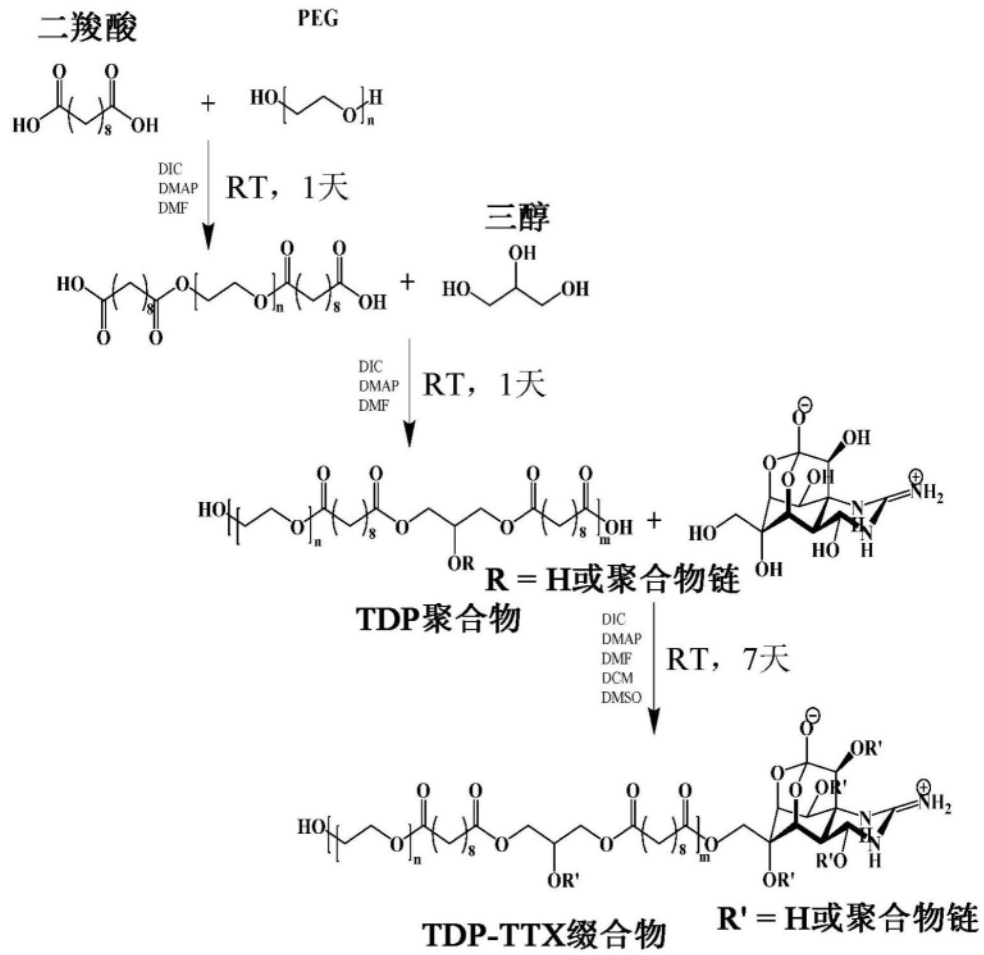


图1B

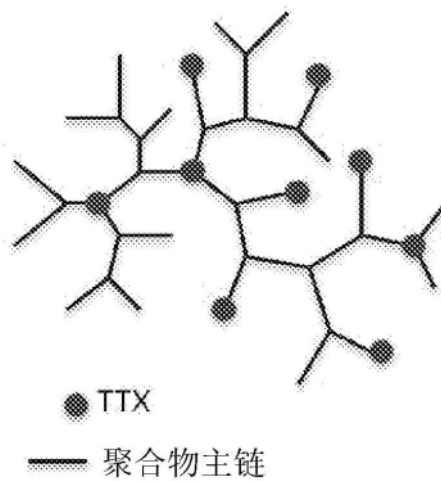


图1C

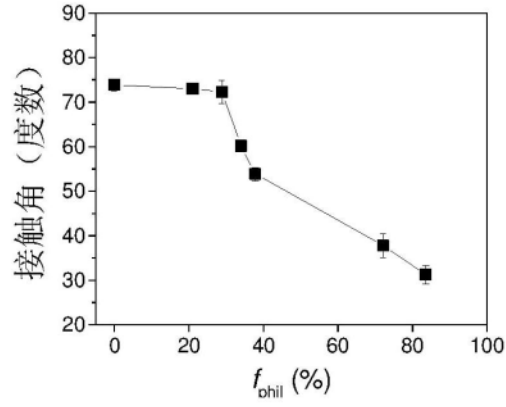


图2A

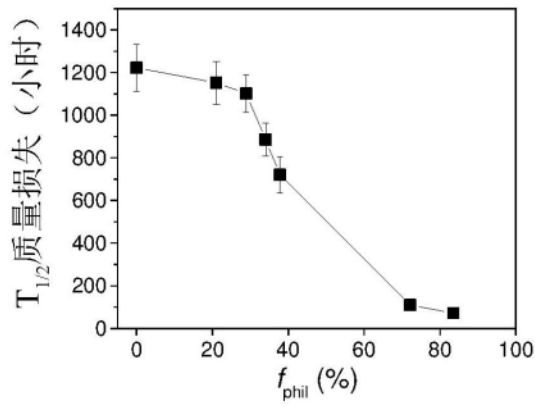


图2B

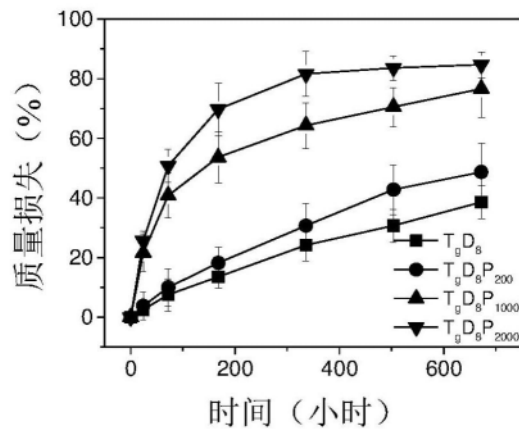
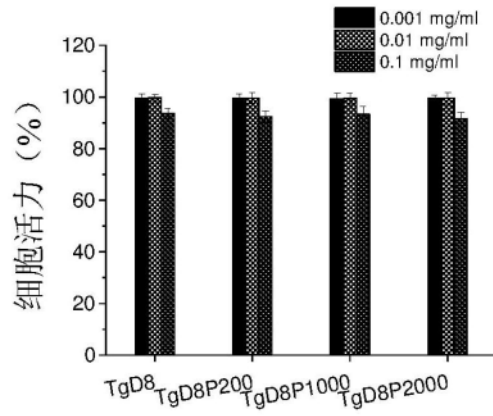
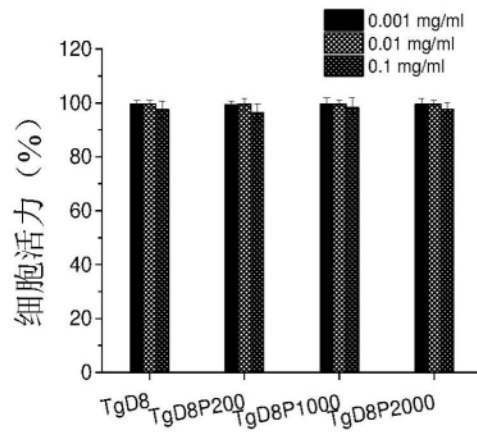


图2C



从左到右: 0.001 mg/l 0.01 mg/l 0.1 mg/l

图3A



从左到右: 0.001 mg/l 0.01 mg/l 0.1 mg/l

图3B

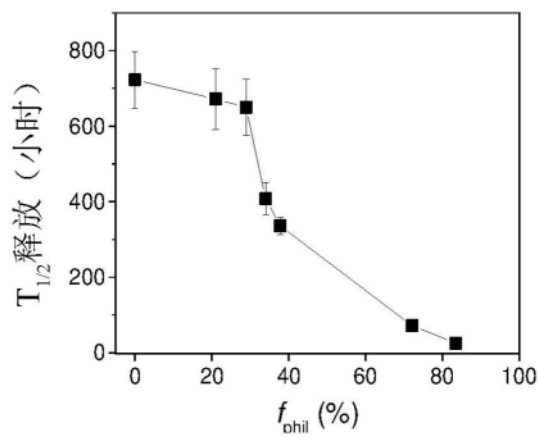


图4A

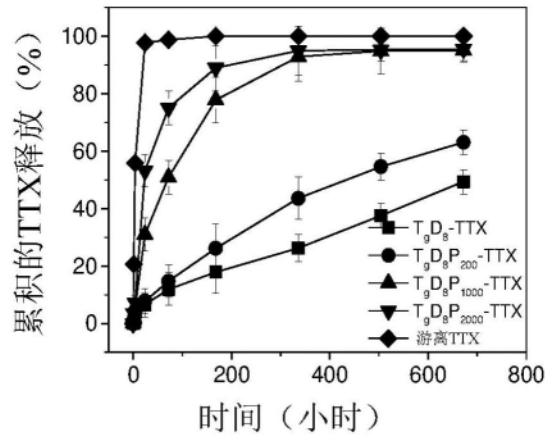


图4B

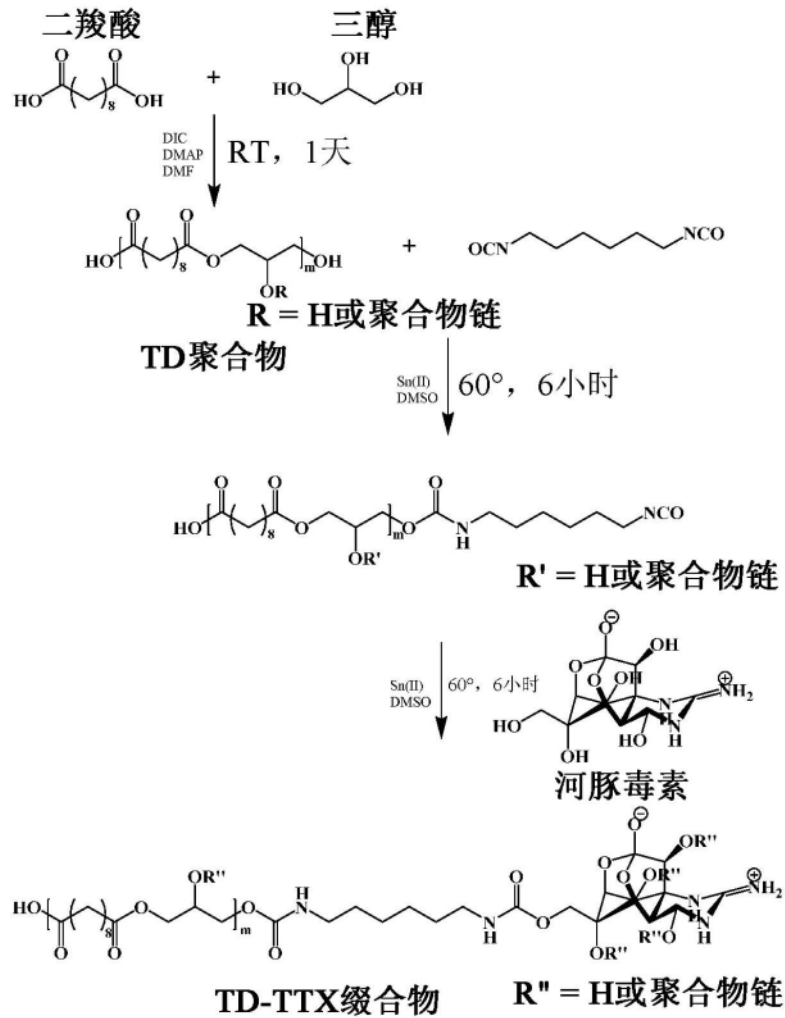


图5A

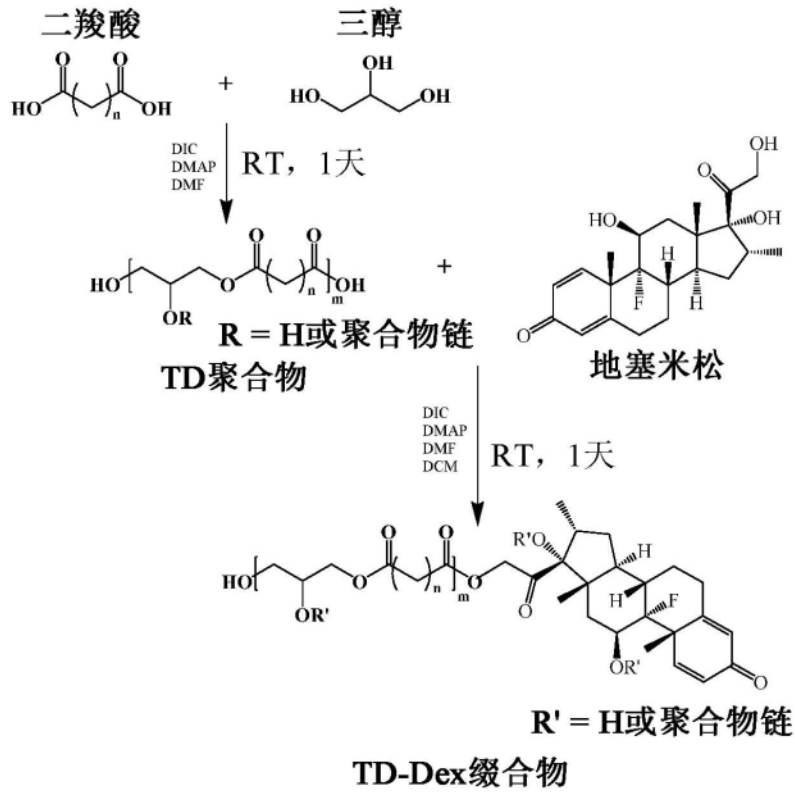


图5B

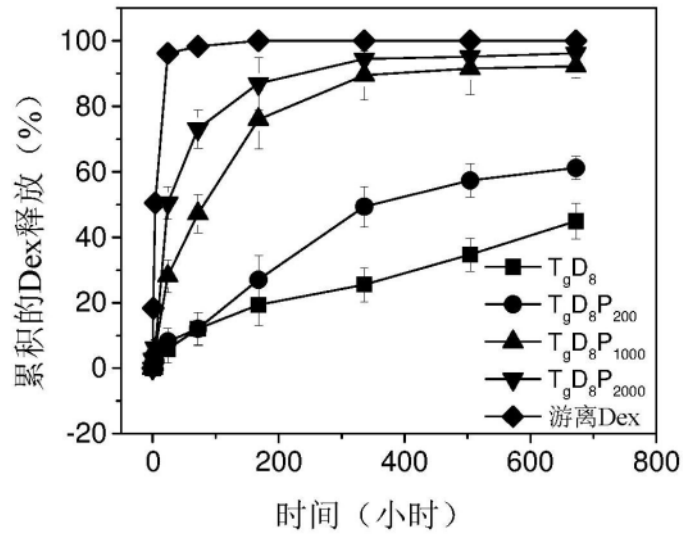


图6A

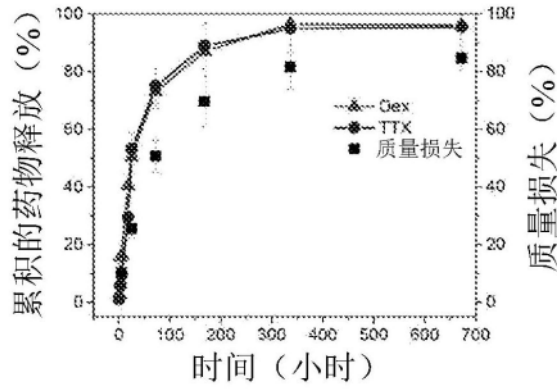


图6B

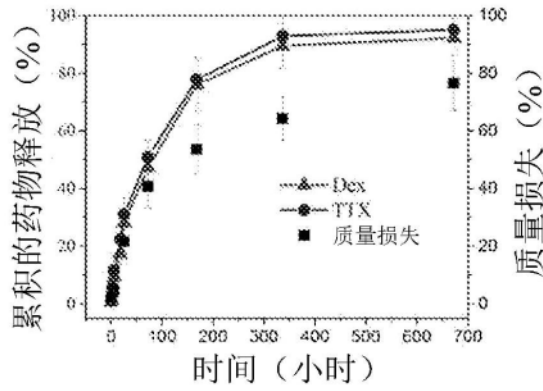


图6C

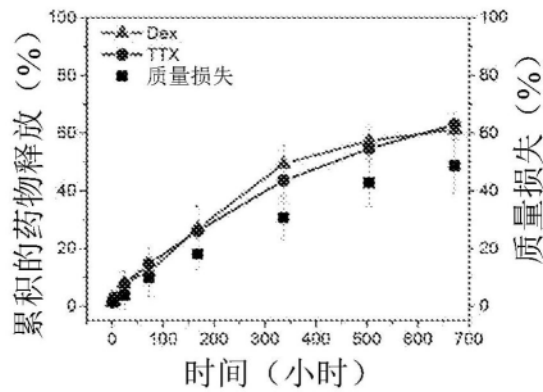


图6D

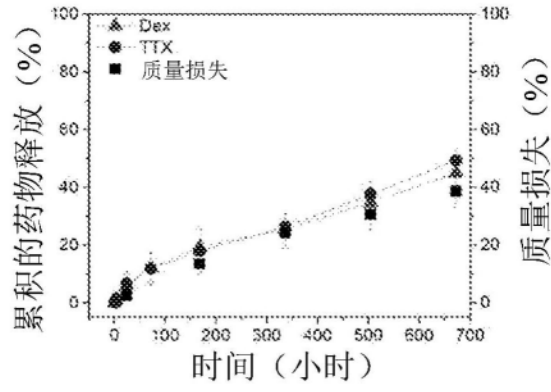


图6E

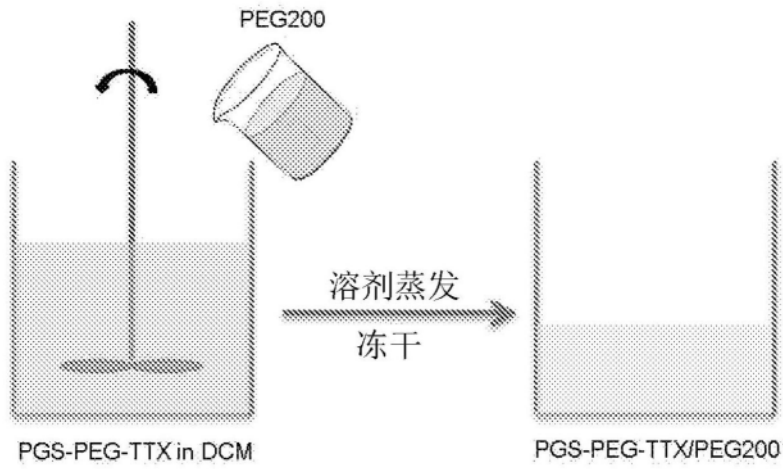


图7

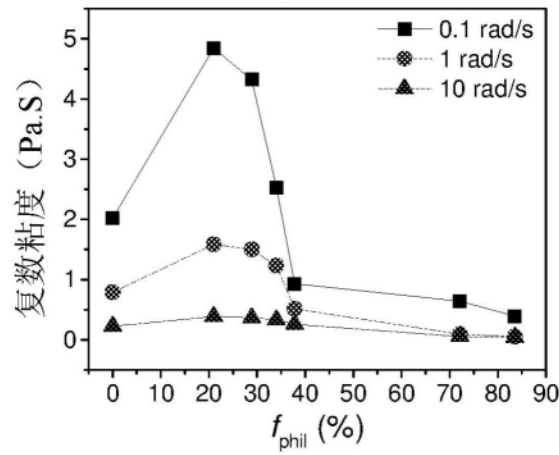


图8A

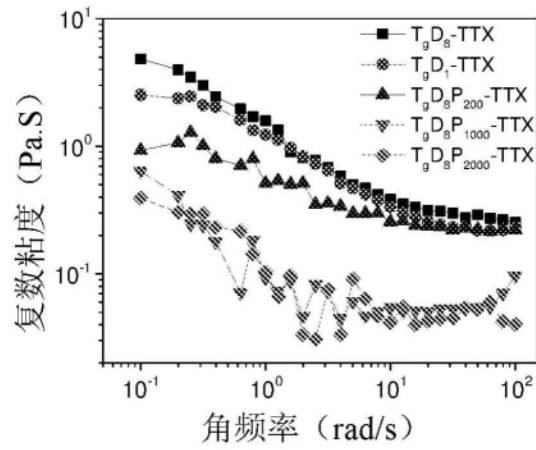


图8B

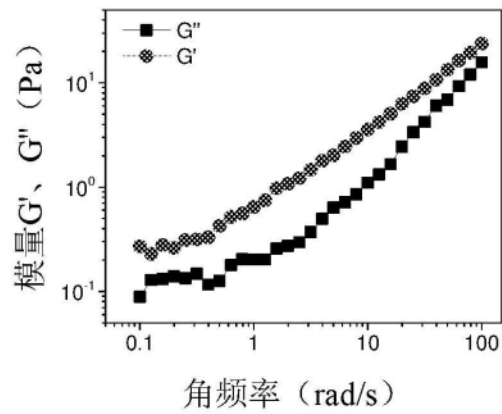


图8C

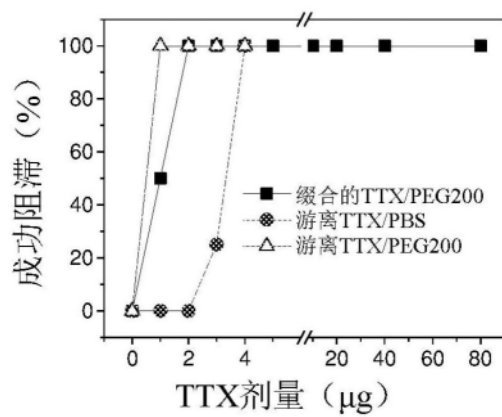


图9A

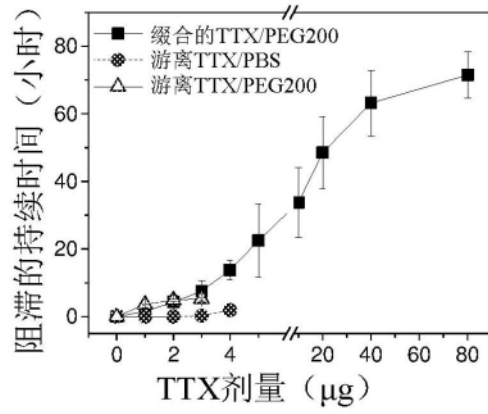


FIG. 9B

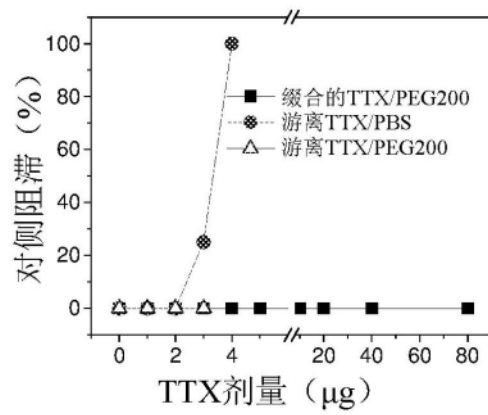


图9C

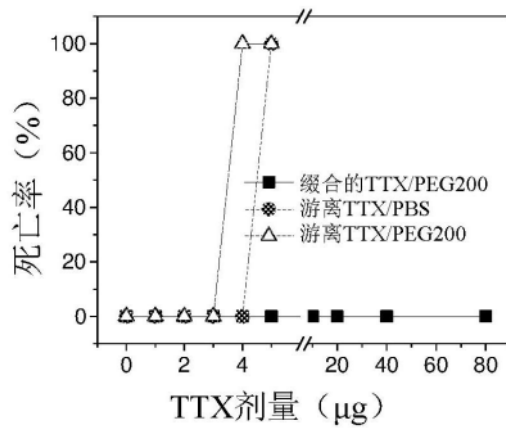


图9D

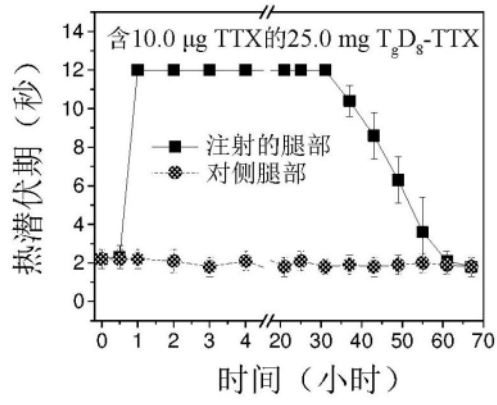


图10A

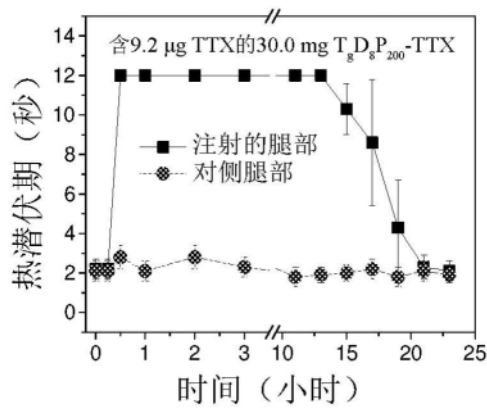


图10B

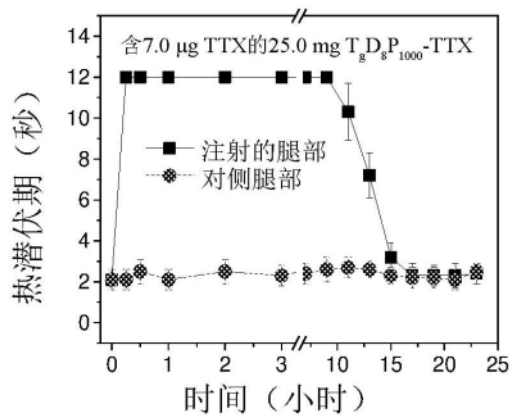


图10C

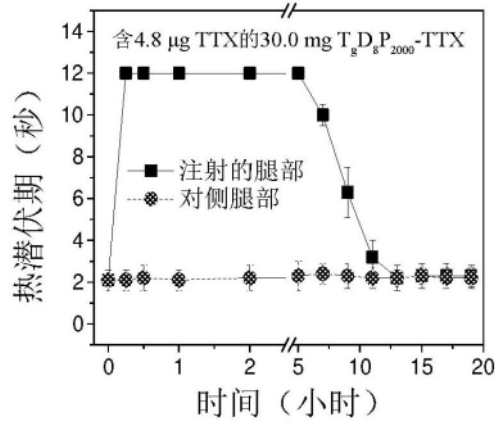


图10D

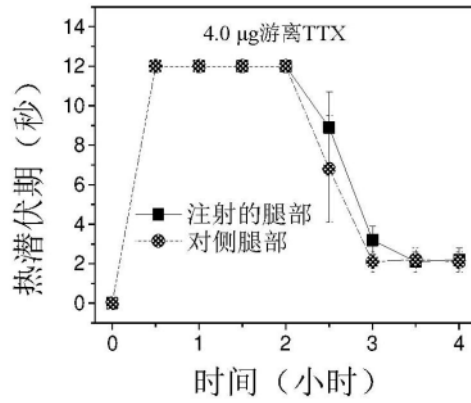


图10E

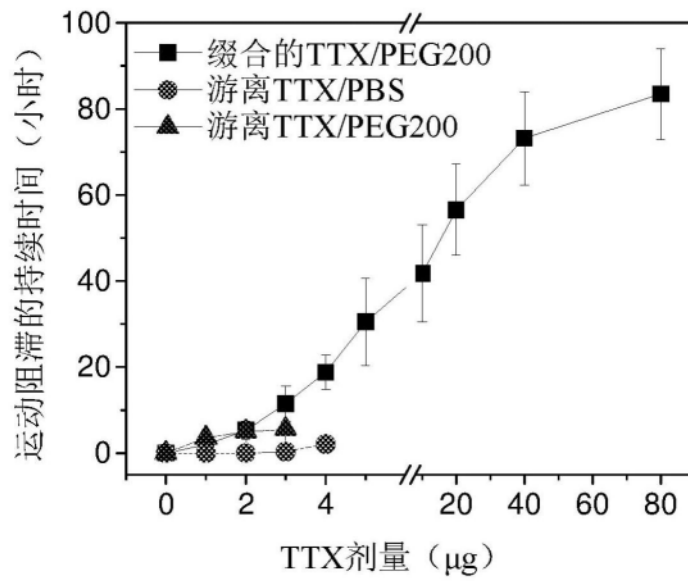


图11

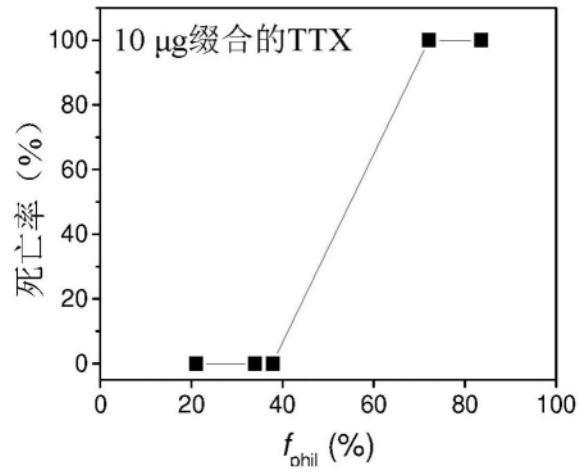


图12A

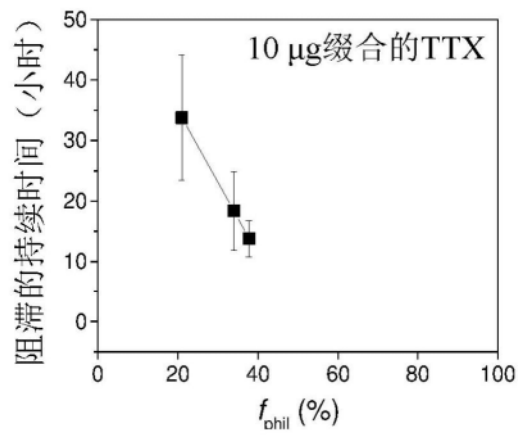


图12B

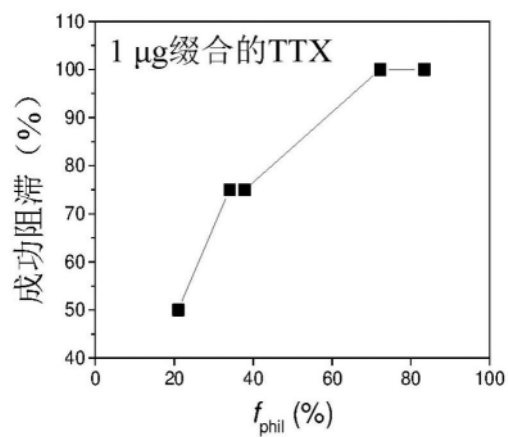


图12C

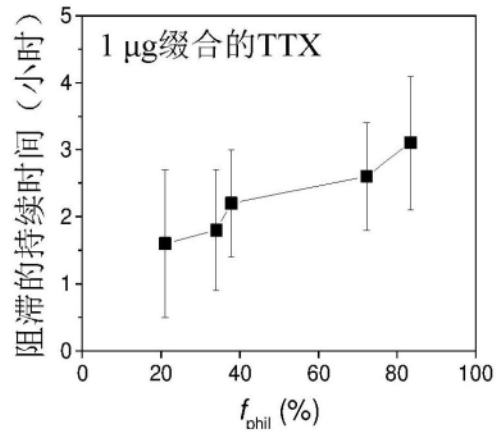


图12D

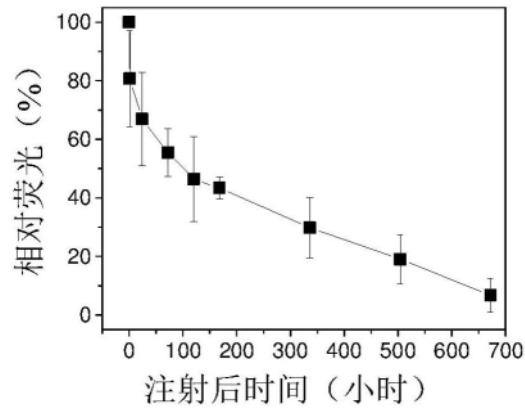


图13

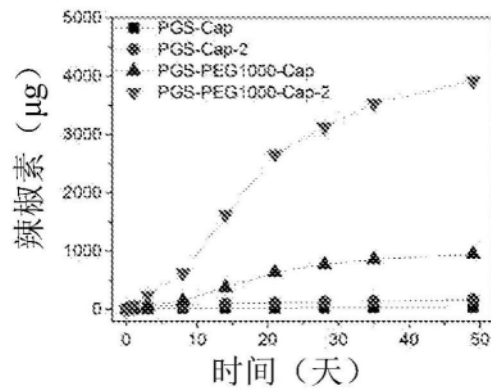


图14