

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 9/22 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 98808225. X

[45] 授权公告日 2009 年 2 月 18 日

[11] 授权公告号 CN 100462066C

[22] 申请日 1998.6.26 [21] 申请号 98808225. X
[30] 优先权

[32] 1997. 6. 27 [33] US [31] 60/051,021

[32] 1997. 9. 9 [33] US [31] 08/926,155

[86] 国际申请 PCT/US1998/013272 1998.6.26

[87] 国际公布 WO1999/000113 英 1999.1.7

[85] 进入国家阶段日期 2000.2.17

[73] 专利权人 美国生物科学有限公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 内尔·P·代塞 帕奇克·苏-雄

什落莫·马格达西

大卫·C·沙哈地万

[56] 参考文献

US5565478A 1996.10.15

WO9602247A1 1996.2.1

CN1130868A 1996.9.11

CN1148957A 1997.5.7

审查员 曲 燕

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 赵蓉民

权利要求书 6 页 说明书 103 页 附图 4 页

[54] 发明名称

药剂的新制剂及其制备和应用方法

[57] 摘要

本发明提供了用于体内输送实质上水不溶性药理活性物质(如抗癌药紫杉醇)的组合物及其方法,其中药理活性物质以蛋白(用作稳定剂)包衣悬浮颗粒的形式进行输送。尤其是,蛋白质和药理活性物质在生物相容的分散介质中经过高切变,不含有常规表面活性剂,也不含有任何形式颗粒的聚合核心物质。该方法产生直径小于约 1 微米的颗粒。特定组分的使用和制备条件(例如,极性溶剂添加到有机相中),以及适合的有机相及相比比例的精心选择,使得可再生的极其微小的纳米颗粒直径小于 200nm,能够无菌过滤。依据本发明制备的颗粒体系能够转化成可再分散的干燥粉末,该粉末含有包被蛋白的水不溶性药物的纳米颗粒,游离蛋白质被结合到药理活性物质中。结果得到一种独特的输送体系,其中一部分的药理活性物质更易具有生物有

效性(以与蛋白质键合的分子形式),另一部分的活性物质存在于不含任何聚合基质的颗粒中。

1. 紫杉醇和其衍生物之一或多种与至少一种蛋白质在用于制备包括一部分与所述至少一种蛋白质结合而其它部分被所述至少一种蛋白质包被的无定形的紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种的药学上可接受的制剂中的用途，其中所述制剂适宜于全身给予接受用紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种治疗的受试者，具有降低的毒性，紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种以至少 135 mg/m^2 的剂量，在不超过 2 小时的给药时间内给药，其中所述制剂不含聚乙氧蓖麻油，并且所述制剂包括所述无定形的紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种的颗粒，平均直径不超过 1 微米，其中所述紫杉醇的衍生物是泰索帝。

2. 根据权利要求 1 所述的用途，其中所述紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种的血液学毒性或神经毒性被降低。

3. 紫杉醇和其衍生物之一或多种与至少一种蛋白质在用于制备包括一部分与所述蛋白质结合而其它部分被所述蛋白质包被的无定形的紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种的药学上可接受的制剂中的用途，其中所述制剂适宜于给予需要治疗的受试者，无需在给予紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种之前预先用药，紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种以至少 135 mg/m^2 的剂量，在不超过 2 小时的给药时间内给药，其中所述制剂不含聚乙氧蓖麻油，并且所述制剂包括所述无定形的紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种的颗粒，平均直径不超过 1 微米，其中所述紫杉醇的衍生物是泰索帝。

4. 紫杉醇和其衍生物之一或多种在用于制备药学上可接受的制剂中的用途，其中所述制剂包括一部分与至少一种蛋白质结合而其它部分被至少一种蛋白质包被的无定形的紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种，其中所述制剂适宜于给予需要治疗的受试者，紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种以至少 135 mg/m^2 的剂量，在不超过 2 小时的给药时间内给药，治疗周期少于 3 周，其中所述制剂不含聚乙氧蓖麻油，

并且所述制剂包括所述无定形的紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种的颗粒，平均直径不超过 1 微米，其中所述紫杉醇的衍生物是泰索帝。

5. 根据权利要求 4 所述的用途，其中所述的治疗周期少于 2 周。

6. 根据权利要求 4 所述的用途，其中所述的治疗周期少于 1 周。

7. 紫杉醇和其衍生物之一或多种在用于制备包括一部分与蛋白质缔合而其它部分被所述蛋白质包被的无定形的紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种的药学上可接受的制剂中的用途，其中所述制剂是适宜于全身给予需要治疗的受试者，所述紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种以至少 135 mg/m^2 的剂量给药，其中所述制剂不含聚乙氧蓖麻油，并且所述制剂包括所述无定形的紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种的颗粒，平均直径不超过 1 微米，其中所述紫杉醇的衍生物是泰索帝。

8. 紫杉醇和其衍生物之一或多种在用于制备包括一部分与蛋白质结合而其它部分被所述蛋白质包被的无定形的紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种的药学上可接受的制剂中的用途，其中所述制剂适宜于全身给予需要的受试者，以少于 250 ml 的容积给药，其中所述制剂不含聚乙氧蓖麻油，并且所述制剂包括所述无定形形式的紫杉醇和其衍生物的所述一种或多种的颗粒，平均直径不超过 1 微米，其中所述紫杉醇的衍生物是泰索帝。

9. 根据权利要求 8 所述的用途，其中所述的容积少于 150 ml。

10. 根据权利要求 8 所述的用途，其中所述的容积少于 60 ml。

11. 紫杉醇和其衍生物之一或多种在用于制备包括一部分与蛋白质结合而其它部分被所述蛋白质包被的无定形的紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种的药学上可接受的制剂中的用途，其中所述制剂适宜于全身给予需要治疗的受试者，以至少 $50 \text{ mg/m}^2/\text{小时}$ 的速度给药，

其中所述制剂不含聚乙氧蓖麻油，并且所述制剂包括所述无定形形式的紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种的颗粒，平均直径不超过 1 微米，其中所述紫杉醇的衍生物是泰索帝。

12. 根据权利要求 1-11 中任一项所述的用途，其中所述的给药不超过 1 小时。

13. 根据权利要求 1-11 中任一项所述的用途，其中所述的给药不超过 30 分钟。

14. 根据权利要求 1-11 中任一项所述的用途，其中所述的给药不超过 5 分钟。

15. 根据权利要求 8-11 中任一项所述的用途，其中所述的制剂以紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种至少 135 mg/m^2 的剂量给药。

16. 根据权利要求 1-11 中任一项所述的用途，其中所述的制剂以紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种至少 175 mg/m^2 的剂量给药。

17. 根据权利要求 1-11 中任一项所述的用途，其中所述的制剂以紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种至少 250 mg/m^2 的剂量给药。

18. 根据权利要求 1-11 中任一项所述的用途，其中所述制剂是通过口服、肌肉内、静脉内、腹腔内、或吸入给药。

19. 根据权利要求 1-11 中任一项所述的用途，其中所述制剂用于治疗前列腺癌、睾丸切除术、胰腺癌、或脑瘤。

20. 根据权利要求 1-11 中任一项所述的用途，其中所述的制剂以紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种至少 135 mg/m^2 的剂量给药，并且所述制剂是通过口服、肌肉内、静脉内、腹腔内、或吸入给药的。

21. 根据权利要求 1-11 中任一项所述的用途, 其中所述的制剂以紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种至少 175 mg/m^2 的剂量给药, 并且所述制剂是通过口服、肌肉内、静脉内、腹腔内、或吸入给药的。

22. 根据权利要求 1-11 中任一项所述的用途, 其中所述的制剂以紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种至少 250 mg/m^2 的剂量给药, 并且所述制剂是通过口服、肌肉内、静脉内、腹腔内、或吸入给药的。

23. 根据权利要求 1-11 中任一项所述的用途, 其中所述的制剂以紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种至少 135 mg/m^2 的剂量给药, 并且所述的制剂用于治疗前列腺癌、睾丸切除术、胰腺癌、或脑瘤。

24. 根据权利要求 1-11 中任一项所述的用途, 其中所述的制剂以紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种至少是 175 mg/m^2 的剂量给药, 并且所述的制剂用于治疗前列腺癌、睾丸切除术、胰腺癌、或脑瘤。

25. 根据权利要求 1-11 中任一项所述的用途, 其中所述的制剂以紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种至少 250 mg/m^2 的剂量给药, 并且所述的制剂用于治疗前列腺癌、睾丸切除术、胰腺癌、或脑瘤。

26. 根据权利要求 1-11 中任一项所述的用途, 其中所述的制剂以紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种至少 135 mg/m^2 的剂量给药, 并且所述的给药不超过 1 小时。

27. 根据权利要求 1-11 中任一项所述的用途, 其中所述的制剂以紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种至少 175 mg/m^2 的剂量给药, 并且所述的给药不超过 1 小时。

28. 根据权利要求 1-11 中任一项所述的用途, 其中所述的制剂以紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种至少 250 mg/m^2 的剂量给药, 并且所述的给药不超过 1 小时。

29. 一种包括紫杉醇和其衍生物之一或多种的制剂，对接受紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种的治疗的受试者具有降低的血液学毒性，所述制剂包括紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种的无定形形式与至少一种蛋白质于药学上可接受的制剂之中，所述制剂包括一部分与所述蛋白质缔合而其它部分被所述蛋白质包被的紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种，其中所述制剂适宜于以至少 135 mg/m^2 的剂量，在不超过 2 小时的给药时间内全身给药，其中所述制剂不含聚乙氧蓖麻油，并且所述制剂包括所述无定形形式的紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种的颗粒，平均直径不超过 1 微米，其中所述紫杉醇的衍生物是泰索帝。

30. 一种包括紫杉醇和其衍生物之一或多种的制剂，适于向需要紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种的受试者给药，所述制剂含有的无定形的紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种与至少一种蛋白质存在于药学上可接受的制剂中，所述紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种的一部分与所述蛋白质缔合而其它部分被所述蛋白质包被，其中所述制剂不含聚乙氧蓖麻油，并且其中所述制剂包括所述无定形形式的紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种的颗粒，平均直径为不超过 1 微米，其中所述紫杉醇的衍生物是泰索帝。

31. 一种冻干制剂，包括一部分与至少一种蛋白质结合而其它部分被所述蛋白质包被的无定形形式的紫杉醇和其衍生物之一或多种，其中所述制剂适于通过重构向需要紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种的受试者给予紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种，其中所述制剂不含聚乙氧蓖麻油，并且其中所述制剂包括所述无定形形式的紫杉醇和其衍生物的所述一种或多种的颗粒，平均直径为不超过 1 微米，其中所述紫杉醇的衍生物是泰索帝。

32. 一种重构制剂，包括一部分与至少一种蛋白质结合而其它部分被至少一种蛋白质包被的无定形形式的紫杉醇和其衍生物之一或多种，其中所述制剂适于向需要紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种

的受试者给予紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种，所述的制剂含有权利要求 31 的冻干制剂和水或水溶液，其中所述紫杉醇的衍生物是泰索帝。

33. 一种冷冻制剂，包括紫杉醇和其衍生物之一或多种的无定形式和至少一种蛋白质，其中所述制剂包括所述一部分与所述蛋白质结合而其它部分被所述蛋白质包被的紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种，其中所述制剂适于通过融化向需要紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种的受试者给予所述紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种，其中所述制剂不含聚乙氧蓖麻油，并且其中所述制剂包括所述无定形式的紫杉醇和其衍生物的所述一种或多种的颗粒，平均直径为不超过 1 微米，其中所述紫杉醇的衍生物是泰索帝。

34. 一种液体制剂，包括无定形的紫杉醇和其衍生物之一或多种与至少一种蛋白质，其中所述紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种一部分与所述蛋白质结合而其它部分被所述蛋白质包被，其中所述制剂含有水、蛋白质和浓度至少为 2.0 毫克 / 毫升的紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种，其中所述制剂不含聚乙氧蓖麻油，并且其中所述制剂包括所述无定形式的紫杉醇和其衍生物的所述一种或多种的颗粒，平均直径为不超过 1 微米，其中所述紫杉醇的衍生物是泰索帝。

35. 根据权利要求 34 所述的液体制剂，包括紫杉醇和其衍生物之一或多种，其中紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种的浓度至少是 5.0 mg/ml。

36. 根据权利要求 34 所述的液体制剂，包括紫杉醇和其衍生物之一或多种，其中紫杉醇和其衍生物之所述一种或多种的浓度至少是 10.0mg / ml。

药剂的新制剂及其制备和应用方法

发明的领域

本发明涉及用于静脉给药的药理活性物质的颗粒载体的制备方法，以及因此产生的新的组合物。从一个特殊的方面来说，本发明涉及在体内输送本质上水不溶性药理活性物质(如抗癌药紫杉醇)的方法。从另一方面，则提供了包含不溶性药理活性物质的可扩散胶体系统。悬浮的颗粒可由 100% 活性物质形成，或是包被在由一种生物相容性多聚体构成的聚合外壳中，一般直径小于 1 微米。本发明的胶体系统可以在不使用常规的表面活性剂或任何聚合核心基质的情况下制备。目前在优选方面，本发明提供了一种可以无菌过滤的极小颗粒的制备方法。聚合外壳包含有药理活性物质颗粒，并且根据需要可含有一种生物相容性扩散剂，药理活性物质可以溶解或悬浮在其中。因此，本发明提供了一种以液体或可再分散的粉末形式的药物输送系统。每种形式均提供了可迅速生物利用的药物分子(比如与蛋白质分子缔合的药物分子)和用一种蛋白质包被的纯药物颗粒。

本发明也涉及了药物如抗癌药紫杉醇组合物(制剂)的制备和应用方法。从一方面来说，紫杉醇的制剂，如所知的 Capxol™，明显比一种可从商业渠道得到的紫杉醇制剂 Taxol® 毒性低而且更有效。从另一方面说，新的制剂 Capxol™，胃肠外给药后可以定位于特定组织，因此可以增加与这些组织有关的肿瘤治疗的有效性。

发明的背景

静脉给药可将药迅速、直接与血流达到平衡，并输送至身体的其他部位。为避免血管内注射后在短时间内达到血清峰值水平，在静脉注射一团治疗性纳米颗粒后置入稳定载体内的药物可使其在血管内腔

隙中逐渐地释放。

可注射的可控释放的纳米颗粒能够提供一个预先设定的作用持续时间，其范围是一次注射后维持几天、几周以至数月。它们可比常规的用药方式有许多更大的优势，包括自动确保病人对剂量的适应性，以及药物对特异组织或器官的目标作用。(Tice 和 Gilley, *Journal of Controlled Release*,2:343-352(1985))。

血中存在的微小颗粒和外源性物质一般可以通过“血液过滤器官”从循环中清除，“血液过滤器官”主要指脾脏，肺和肝。在正常全血中含有的微粒物质包括红细胞(一般直径为 8 微米)，白血细胞(一般直径为 6-8 微米)，和血小板(一般直径为 1-3 微米)。在大多数器官和组织的微循环中可以允许上述血细胞自由通过。当直径大于 10-15 微米的微血栓(血凝块)存在循环中时，毛细血管有可能出现梗塞或阻塞的危险，可导致缺血或缺氧，组织可能发生坏死。因此必须避免向循环中注射直径大于 10-15 微米的颗粒。但小于 7-8 微米的颗粒的悬液相对是安全的，并已经用作输送药理活性物质，其形式可以是脂质体，乳剂，营养剂和影像用途的对比剂等。

颗粒的大小和其输送模式决定了它们的生物学行为。Strand 等在 *Microspheres-Biomedical Applications Ed.A.Rembaum*, PP193-227, *CRC Press*(1988)文中描述了颗粒的转归取决于其大小。范围在几纳米到 100 纳米的颗粒从间质注射后进入毛细淋巴管，可能在淋巴结中被吞噬。在静脉注射/动脉内注射后，小于约 2 微米的颗粒将被网状内皮系统(RES)从血流中迅速清除，网状内皮系统也周知是单核巨噬系统(MPS)。大于 7 微米的颗粒在静脉注射后将被嵌顿在肺毛细血管中。在动脉内注射后颗粒将嵌顿在所到达的第一级毛细血管中。吸入的颗粒被肺泡巨噬细胞扣留。

水不溶性或水溶性较差、对胃内酸性环境敏感的药物不能用常规的方式给药(如静脉注射或口服)。这种药物的胃肠外给药可以通过以下方式实现，即将油溶解的药物与一种水性液体(如普通生理盐水)在

表面活性剂或乳化稳定剂的存在下乳化以产生稳定的微乳剂。如果乳剂的成分在药学上是惰性的，则这些乳剂可以静脉注射。美国专利第 4,073,943 条描述了溶解在油中并与水在表面活性剂如卵磷脂，pluronic(聚丙烯丙二醇和聚乙烯丙二醇的共聚物)，聚合丙二醇油酸酯等存在下乳化的药学活性物质的使用。PCT 国际出版物第 WO85/00011 号描述了一种包被以一种磷脂如双肉豆蔻酰磷脂酰胆碱的麻醉药的微滴，该磷脂具有合适的大小以供皮内注射或静脉内注射。

一种水不溶性药物的实施例是紫杉醇，一种首先由 Wani 等从太平洋红豆杉树紫杉属短叶苏木酚中分离的天然产物 (*J.Am.Chem.Soc.*, 93:2325(1971))。在抗有丝分裂剂中，紫杉醇含有一个双萜碳骨架，对与有丝分裂纺锤丝的形成有关的微管蛋白可发挥独特方式的作用。与其他抗有丝分裂剂如可以阻止微管装配的长春碱或秋水仙碱相比，紫杉醇是仅有的已知的可抑制微管的解聚过程的植物产物，因此它可以阻止细胞的复制过程。

紫杉醇，一种天然存在的二萜类化合物，已显示出对药物难治性卵巢癌具有明显的抗肿瘤和抗癌效应。对于大量的肿瘤模型如 B16 黑色素瘤，L1210 白血病，MX-1 乳房肿瘤和 CS-1 结肠肿瘤异种移植植物等紫杉醇已经显示了出色的抗肿瘤活性。最近的几次新闻发布会上紫杉醇被称为是新的抗癌奇迹药物。实际上，紫杉醇最近才被联邦药物管理局批准用于卵巢癌的治疗。但由于紫杉醇水溶性较差使其在人体的用药产生了问题。实际上，如果口服无效，这种本来不溶或水溶性较差的药物通过水介质输送时将会受到严重的损害。相应的，目前所使用的紫杉醇制剂(即 Taxol®)需要一种聚乙二醇化合物 (cremaphor)来溶解该药物。人类临床的剂量范围是 200-500mg。这种剂量是以 1:1 的比例溶解在乙醇:聚乙二醇化合物溶液中的，并以生理盐水稀释到大约 300-1000ml 液体以供静脉内使用。目前所使用的聚乙二醇化合物是聚乙氧基蓖麻油。在这种制剂中聚乙二醇化合物的存在可以导致动物(Lorenz 等, *Agents Actions* 7:63-67 (1987))和人 (Weiss 等, *J.Clin.Oncol.* 8:1263-68(1990))的严重超敏反应，因此需要

预先给予病人糖皮质激素(地塞米松)和抗组胺药。大量的稀释导致大量的输注(一般剂量 $175\text{mg}/\text{m}^2$, 或最大到 1 升)和输注时间, 时间从 3 小时到 24 小时。因此, 有必要为紫杉醇找到一种毒性更小的制剂。

在 I 期临床实验中, 紫杉醇本身并没有显示出过多的毒性作用, 但溶解药物的乳化剂却引起了严重的过敏反应。目前用药的方案中包括了在病人注射药物前使用抗过敏药和激素以减少聚乙二醇化合物的过敏副作用。

为了增加紫杉醇的水溶性, 几位研究者已经通过可增强水溶性的官能基团来改变其化学结构。其中有磺化的衍生物(Kingston 等, 美国专利 5,059,699 号(1991))和显示明显生物活性的氨基酸酯类(Mathew 等, *J. Med. Chem.*, 35:145-151 (1992))。这些修饰可以产生一种水溶性的衍生物, 便于溶解在无毒载体如生理盐水中的紫杉醇在静脉内的输送。但这些修饰增加了药物制备的成本, 可能诱导不期望的副作用和/或过敏反应, 和/或可能减少药物的效能。

已有文献报道蛋白质微球体可作为药物或诊断试剂的载体。白蛋白的微球体可以通过热变性或化学交联进行制备。热变性的微球体是从乳化混合物(如可掺入的药剂白蛋白和一种合适的油)中在 100°C 到 150°C 的温度下产生的。然后微球体用一种合适的溶剂清洗并保存。Leucuta 等在(*International Journal of Pharmaceutics*, 41:213-217 (1998))一文中描述了热变性微球体的制备方法。

制备化学交联微球体的过程包括用戊二醛处理乳剂以交联蛋白质, 然后清洗和保存。Lee 等(*Science*, 213:233-235 (1981))和美国专利第 4,671,954 号讲述了这种制备方法。

上述制备蛋白质微球体作为药理活性物质载体的技术, 虽然可以适合水溶性药剂的输送, 但却不能搭载不溶性的药剂。这种限制是该制备技术本身所固有的, 即其依赖于在一种“油包水”乳剂水相蛋白成分的交联或热变性。任何水溶性的药剂溶解在含有水相的蛋白

中,都有可能陷入因此得到的交联或热变性蛋白基质中,而水溶性差或油溶性的药剂却不能被掺入进用这些技术形成的蛋白基质中。

制造含有药物纳米颗粒的一个常规方法包括将聚合乳酸(或其他生物相容性,水不溶性聚合物)溶解在水不易混合性溶剂中(如二氯甲烷或其他氯化,脂肪族的或芳香族的溶剂),将药理活性物质溶解在聚合物溶液中,使用合适的方法将表面活性剂加入到油相或水相中,形成一个水包油的乳剂,并将乳剂在真空下缓慢蒸发等步骤。如果油滴足够小并在蒸发过程中稳定,就可获得水中聚合物悬液。由于药物开始是存在于聚合物溶液中,因此可能用这种方法获得的一个组合物,其中药物分子陷入在由一个聚合基质组成的颗粒里。用这种溶剂蒸发制成微球体和纳米颗粒的方法已为许多研究者报道(见,如 Tice 和 Gilley, 在 *Journal of Controlled Release*, 2:343-352 (1985)上的文章; Bodmeier 和 McGinity, 在 *Int. J. Pharmaceutics*, 43:179 (1988)上的文章; Cavalier 等, 在 *J. Pharm. Pharmacol.*, 38:249 (1985)的文章; D'Souza 等, WO 94/10980)并同时应用了多种药物。

Bazile 等在 *Biomaterials*, 13:1093(1992)和 Spenlehauer 等在法国专利第 2 660 556 号均报道了使用两种生物相容性聚合物制备纳米颗粒,其中一种聚合物(如聚乳酸)与一种活性成分如一种药物溶解在有机相中,另一种聚合物如白蛋白用作表面活性剂。乳化后并去除溶剂,纳米颗粒就形成了,其中药物存在于聚乳酸颗粒的聚合基质中。

在第一期中可形成聚合基质的聚合物溶液的特性对于获得正确的乳剂是非常重要的。如聚乳酸(聚合物通常用在制备可注射的纳米颗粒中)具有一种表面活性,这种活性可以导致其在二氯甲烷-水界面中迅速吸收,降低表面张力(见如 Boury 等在 *Langmuir*, 11:1636 (1995)的文章),这样可以反过来促进乳化过程。另外,同一研究者发现牛血清白蛋白(BSA)可与聚乳酸互相作用,可穿透在油-水界面上的聚乳酸单层。因此可以预期的是,基于以上文献,在常规溶剂蒸发方法的过程中在非水有机相中加入表面活性聚合物(聚乳酸)可极大促进乳化作用。实际上,聚乳酸的存在不仅仅是一个充分的条件,而且对于适

宜大小的纳米颗粒的形成它事实上也是必须的。

另外一个基于溶剂蒸发方法的过程包括将药物溶解在疏水溶剂(如甲苯或环己胺)中,在有机溶剂中不溶解任何聚合物,将常规的表面活性剂加入到混合物中作为一种乳化剂,通过应用超声或高切变装置形成一个水包油的乳剂,然后蒸发溶剂获得干燥的药物颗粒(见如 Sjostrom 等在 *J.Dispersion Science and Technology*, 15:89-117 (1994)的文章)等步骤组成。去除非极性溶剂后,紧接着溶剂液滴中的药物发生凝结,获得亚微米颗粒。

已经发现微粒的大小主要受乳滴的初始大小控制。另外,有意思的是有报道注意到最终颗粒大小的减小伴随着有机相中药物浓度的减小。这种发现与在此报道的结果是相反的,其中没有将常规表面活性剂用来制备纳米颗粒(在本发明的一些实施方案中)。另外,在 Sjostrom 的文章中可以注意到,所用的药物胆固醇醋酸盐在甲苯中是有表面活性的,因此有可能浮在油-水的界面上;所以在界面上的药物浓度越高,就增加了沉淀的可能性。

亚微米颗粒的形成已可以通过沉淀过程达到,如 Calvo 等在 *J.Pharm.Sci.*, 85:530 (1996)上文章所述。这个过程是基于将药物(如消炎痛)和聚合物(聚己内酯)溶解在二氯甲烷和丙酮中,然后将溶液倒在含有表面活性剂(Ploxamer 188)的水相上,产生亚微米颗粒(216 纳米)。但是,此过程是在不形成乳剂的溶剂浓度中进行。

紫杉醇是一个天然存在的化合物,极有希望成为一个抗癌药物。比如,McGuire 等发现紫杉醇是对付药物难治性卵巢癌的一个活性剂。见 *Ann.Int.Med.*, 111:273-279 (1989) 上的“Taxol:一个少见的对晚期卵巢上皮肿瘤有明显作用的抗肿瘤药剂”。本说明书提到的所有的专利,科学文章和其它文件均作为参考文献引用,如同以下完全复制的一样。

可惜的是紫杉醇在水中有极低的溶解性,使其很难制成适宜的制

剂。事实上，在 I 期临床实验中，与紫杉醇结合以补偿其低水溶性的乳化剂导致了严重的过敏反应；至少有一个病人是由乳化剂诱导的过敏反应导致死亡。剂量依赖性的毒性包括中性粒细胞减少症，外周神经病变和超敏反应等。

Brown 等在 *J.Clin.Oncol.*,9(7):1261-67 (1991 年 7 月)上的“6 小时静脉输注 Taxol 的临床 I 期实验”中报道了一种临床 I 期实验，在该实验中在不预防用药的情况下 Taxol 每 21 天一次 6 小时静脉输注给药。31 个病人接受了 64 次可评价的疗程。一个病人发生了严重(或急性)的超敏反应，该反应需要中断输注并立即处理以挽救病人的生命。另一个也经历了超敏反应，但并未严重到需要中断输注。骨髓抑制是剂量依赖性的，两例死亡原因均为脓毒症。除了一个病人有 3 级粘膜炎，两个病人 3 级神经病变以外，其他非血液学的毒性均为 1 级和 2 级。神经病变包括可逆的痛觉感觉异常，两个病人需要中断 Taxol 的给药。发现四个其他反应(3 个出现非小细胞肺癌病人，一个出现未知原发灶的腺癌病人)。据报道最大耐受剂量是 $275\text{mg}/\text{m}^2$ ，在 II 期实验中开始的剂量推荐为 $225\text{mg}/\text{m}^2$ 。超敏反应的发生率据报道是时间依赖性，药物输注 6 到 24 小时有 0 到 8% 的超敏反应发生率。也有报道超敏反应持续与预防用药有关，而与输注的时间长短无关。因为这些 I 期实验研究是在多种癌症的终末期病人中进行的，因此 Taxol 治疗的有效性不能确定。

在 Kris 等的研究中，紫杉醇用聚乙二醇化合物 EL 在无水乙醇中制成的制剂每 21 天给予 3 小时的静脉输注，使用剂量从 15 到 $230\text{mg}/\text{m}^2$ 分成 9 个不断增加的步骤。Kris 等得出结论：“由于超敏反应的严重性和不可预见性，不能提倡进一步应用以这种用药时间和这种药物制剂的 Taxol。”见 1986 年 5 月 70 卷第 5 期的 *Cancer Treat.Rep.*。

由于早期实验使用药团式的注射或短时间(1-3 小时)的输注可以诱导过敏反应或其他超敏反应，进一步的研究发现 Taxol 仅在预先给予类固醇(如地塞米松)，抗组胺药(如苯海拉明)和 H_2 -受体阻断剂(如

西米替丁或雷尼替丁)后才能使用,且输注时间延长至 24 小时以便能消除大多数严重的过敏反应。许多 I 期和 II 期实验研究结果已经公开, Taxol 的应用方法是最大总剂量为 $250\text{mg}/\text{m}^2$, 输注 24 小时, 一般每 3 周重复一疗程。病人预先给予地塞米松, 苯海拉明和西米替丁以消除过敏反应。见 Einzig 等在 *Cancer Investigation*, 9(2):133-136 (1991)上的“Taxol 对转移性肾细胞癌病人的 II 期实验”, 和 A.B.Miller 等在 *Cancer*, 47:207-214 (1981)上的“癌症治疗的结果报道”。

Koeller 等在 *Proceeding of ASCO*, 第 8 卷(1989 年 3 月)的“无预防用药, 延长输注 Taxol 的 I 期药物动力学研究”中提到常规的预防用药是为了避免确信是由为紫杉醇输注使用的 cremophor 载体(聚乙氧蓖麻油)引起的过敏反应的明显数量。病人接受的剂量范围是 $175\text{mg}/\text{m}^2$ 到 $275\text{mg}/\text{m}^2$ 。

Wiernik 等在 *Cancer Research*, 47:2486-93 (1987 年 5 月)上的“Taxol 的 I 期临床和药物动力学研究”中也报道在 I 期研究中紫杉醇的给药是利用一个 cremophor 载体通过静脉输注, 输注时间为 6 小时。3-4 级超敏反应在 13 个疗程中的 4 个中发生。该研究开始的剂量是 $15\text{mg}/\text{m}^2$ (狗的 1/3 最低毒性剂量)。剂量逐级增加, 每个剂量水平给予 3 个病人以最小量直至鉴定出毒性, 然后 4-6 个病人再以随后的每个剂量水平进行处理。该研究得出结论神经毒性和白血球减少症是剂量依赖性的, 并且推荐 II 期实验的剂量为 $250\text{mg}/\text{m}^2$, 并预防用药。

其他关于紫杉醇的实验性研究包括: Legha 等 65:2478-81(1990 年六月)上的“Taxol 对转移性黑色素瘤的 II 期实验”; Rowinsky 等在 *Cancer Research*, 49:4640-47 (1989 年 8 月 15 日)上的“Taxol 在顽固性急性白血病中的 I 期和药物动力学研究”; Grem 等在 *Cancer Treatment Reports*, 1987 年 12 月 71 卷第 12 期的“Taxol 应用的临床 I 期研究, 每天短时间静脉输注使用 5 天”; Donehower 等在 *Cancer Treatment Reports* 1987 年 12 月 71 卷第 12 期上的“Taxol 在晚期癌症病人的临床 I 期研究”; Holmes 等在 *Proceedings of the American*

Society of Clinical Oncology, 10:60, (1991 年 3 月)上的“Taxol 在转移性乳癌(MBC)病人(PT)的临床 II 期研究”。同样 Suffness 在 *Gann Monograph of Cancer Research*, 31:21-44 (1989)(其中介绍 Taxol 仅能以 24 小时输注的方式给药)上的“国家癌症协会天然抗肿瘤药物的发展”。

Weiss 等在 *Journal of Clinical Oncology*, 8(7):1263-68 (1990 年 8 月)上的“Taxol 的超敏反应”报道很难确定可信的超敏反应(HSR)总体发生率, 因为紫杉醇剂量和使用时间变化很大, 而且改变输注时间和预防用药对 HSR 的发生影响的程度未知。比如, 5 个接受 Taxol 治疗的病人, 输注时间为 3 小时, 剂量大于 $190\text{mg}/\text{m}^2$, 没有预防用药, 其中 3 个发生反应; 同时输注时间为 6 小时, 无预防用药, 即使剂量更大在 30 个病人中仅有一个发生反应。因此, 这说明延长输注时间超过 6 小时足以减少 HSR 的发生率。然而, Weiss 等发现病人接受 $250\text{mg}/\text{m}^2$ 的 Taxol 输注 24 小时仍然发生致命的 HSR。因此, 虽然不管延长药物输注时间至 6 小时或 24 小时都可能减少急性反应的可能, 但这种结论并未证实, 因为 78%的 HSR 反应发生在 Taxol 输注的开始 10 分钟内, 这表明为整个输注设计的时间长度没有什么意义。进一步说, 输注的紫杉醇浓度可能也没有什么不同, 因为大量病人对许多小剂量的 Taxol 有反应。最后, 不仅 Taxol HSR 的机制未知, 而且是紫杉醇本身可以诱导 HSR 或是由于赋形剂(聚乙二醇化合物 EL; Badische Anilin und Soda Fabrik AG(BASF), Ludwigshafen, 德国联邦共和国)引起 HSR 也尚不清楚。尽管预防用药是否对减少 HSR 的严重性或数目有何影响不明确, 但预防疗法仍被推荐, 因为它的应用并未有任何已知的危险。

对以前的技术关于在延长输注时间时应预防用药以避免超敏反应的争论以及对输注 6 小时以上时间缺乏有效数据, 已使大剂量含有聚乙二醇化合物 EL 乳剂的 Taxol, 输注 24 小时作为癌症治疗的基本方案。

虽然通过使用长时间输注的方法减少应用乳化的紫杉醇的副作用

看上去是可能的，但长时间的输注对病人是不方便的并且因为需要对病人在整个 6 到 24 小时内进行监护费用十分昂贵。另外，长时间的输注需要病人在医院或诊所花费至少一晚的时间。

更高的紫杉醇剂量在文献中也已描述。为确定自体造血祖细胞支持(AHPCS)之前紫杉醇与大剂量环磷酰胺和顺铂联合使用的最大耐受剂量(MTD)，Stemmer 等(“大剂量紫杉醇，环磷酰胺和顺铂以及自体造血祖细胞支持：临床 I 期实验”，*J.Clin.Oncol.*, 14:1463-1472 (1996))对 49 个造血功能差的乳癌、非何杰金氏淋巴瘤(NHL)或卵巢癌病人进行临床 I 期实验，其中紫杉醇输注超过 24 小时，剂量逐级增加，然后给予环磷酰胺($5,625\text{mg}/\text{m}^2$)和顺铂($165\text{mg}/\text{m}^2$)以及 AHPCS。对于 $825\text{mg}/\text{m}^2$ 剂量的紫杉醇两个病人出现了剂量依赖的毒性；一个病人死于多器官衰竭，其他发展为 3 级呼吸器官，CNS 和肾毒性，均已处理。这种联合使用的 MTD 确定为紫杉醇剂量是($775\text{mg}/\text{m}^2$)，环磷酰胺($5,625\text{mg}/\text{m}^2$)和顺铂($165\text{mg}/\text{m}^2$)，接着使用 AHPCS。继发的多神经病变和粘膜炎是显著的毒性，但两者均是可逆的和可以耐受的。33 个乳癌病人中的 18 个(54%)发生了部分反应。在 NHL 病人(5 个病人中的 4 个)和卵巢癌病人(2 个病人中的 2 个)中也观察到了上述反应。

美国专利 5,641,803 号报道了 175 到 $135\text{mg}/\text{m}^2$ 剂量的紫杉醇的应用，输注时间为 3 小时。输注的基本方案需要使用预防用药，并报道有 35%的病人发生超敏反应。51%的病人报道有神经毒性发生，高剂量组的病人 66%出现神经毒性，而低剂量组中 37%出现。而且注意到 24 小时长时间输注的病人中 48%出现神经毒性，而短于 3 小时的病人中 54%出现神经毒性。

文献中的另一个证据是紫杉醇的剂量越高，反应的发生率越高。紫杉醇的最佳剂量和使用时间现仍在研究之中。紫杉醇剂量强度对诱导病态反应可能十分重要，为评价其可能性，NCI 的 Reed 等(Reed E, Bitton R, Sarosy G 和 Kohn E, “紫杉醇的剂量强度”，*Journal of Infusional Chemotherapy*, 6:59-63 (1996))分析了在治疗卵巢癌和乳癌

病人中获得的临床 II 期实验数据。他们的结果表明对于复发的卵巢癌紫杉醇的剂量强度与外在的病态反应间的关系具有高度的统计学显著性，双向 P 值为 0.022。对于乳癌关系更为显著，双向 P 值为 0.004。在 135mg/m²/21 天的情况下，外在反应发生率为 13.2%；在 250mg/m²/21 天时外在反应发生率为 35.9%；在 175mg/m² 中间剂量所见的反应发生率与 135mg/m² 和 250mg/m² 时的结果呈线性关系，而且线性回归分析显示这些数据的相关系数为 0.946(Reed 等，1996)。

在 Holmes 等的一项研究中(“治疗转移性乳癌的一个活性药物，Taxol 的临床 II 期实验”，*J.Natl.Cancer Inst.*, 83:1797-1805 (1991))和 MSKCC 中(“紫杉醇和重组人粒细胞集落刺激因子作为转移性乳癌的初始化学治疗”，*J.Clin.Oncol.*, 11:1943-1951 (1993))，发现更高剂量直到 250mg/m² 的紫杉醇(60%)可以产生比目前承认的剂量 175mg/m²(26%)引起更高的反应发生率。但这些结果并没有被重复以说明高剂量导致较高的毒性。但这些结果得出了紫杉醇增加剂量可能引起反应发生率增加的证据。

由于 Taxol 需要预防用药，这经常对在医院里过夜的病人是必须的，因此非常需要发明一种无预防用药必要性的紫杉醇制剂。

由于 Taxol 需要预防用药，因为 HSR 与药物的使用有关联，所以非常需要发明一种不引起超敏反应的紫杉醇制剂。同时也需要一种不引起神经毒性的紫杉醇制剂。

由于 Taxol 的输注一般是在预防用药之后进行，并且需要输注后监测和持续的记录，这经常对在医院过夜的病人是必须的，因此非常需要发明一种可允许病人在门诊进行治疗的紫杉醇制剂。

由于已经证实较高的 Taxol 剂量可以引起较高的临床反应，即使有较高的毒性，也非常需要发明一种可以达到较高剂量却没有这种毒性的紫杉醇制剂。

由于已经证实 Taxol 的剂量依赖性毒性是中枢和神经毒性的，因此非常需要发明一种减少此种毒性的紫杉醇制剂。

同时也需要去除预防用药，因为这增加了病人的不适和病人的费用和治疗时间。

同时也需要缩短紫杉醇输注的时间以减少病人在医院和诊所的滞留时间，目前给药的时间是 3-24 小时。

由于 Taxol 目前承认的给药剂量是浓度在 0.6-1.2mg/ml 之间，而人一般的剂量是大约 250-350mg，这就导致了一般输注的量远大于 300ml。非常需要发明可以在较高浓度下稳定以便减少给药时间的紫杉醇制剂，并因此能减少输注的量。

由于 Taxol 的输注必须使用特殊的静脉注射套管、袋子或瓶子以过滤 Taxol®制剂中聚乙二醇化合物的可塑剂，因此非常需要发明一种紫杉醇制剂，其中没有聚乙二醇化合物而且不用过滤从常规用作静脉输注的塑料套管或袋子中带进的潜在毒性物质。

发明的简单描述

因此本发明的一个目的是将药理活性物质(如紫杉醇，紫杉烷(taxane)，泰索帝，以及类似物)以非修饰的形式加入一个组合物中，该组合物不会产生因为添加的乳化剂和助溶剂存在所引起的过敏反应，如目前在药物输送中所采用的方法一样。

本发明一个进一步目的是将药理活性物质加入到一个微颗粒或纳米颗粒的组合物中，根据需要悬浮在一种适宜的生物相容性液体中。

然而本发明的另一个目的是提供通过一种溶剂蒸发技术从水包油乳剂中形成药理活性物质的亚微米颗粒(纳米颗粒)的方法。一些方

法是以蛋白质作为稳定剂进行的。一些方法则在不存在任何常规表面活性剂和任何聚合核心物质的条件下进行。

本发明的这些和其他目的将通过阅读说明书和权利要求而易见。

根据本发明，我们已经发现实质上为水不溶性药理活性物质能以微颗粒或纳米颗粒的形式进行输送，该形式适合以水悬液的形式胃肠外给药。这种输送形式消除了实质上水不溶性药理活性物质(如紫杉醇)在含有如稀释于生理盐水的乙醇和聚乙氧基蓖麻油等乳剂中给药的必要性(见，如 Norton 等在第 2 届国家癌症协会 Taxol 和 Taxus 研讨会摘要，1992 年 9 月 23-24)。这项已知的组合物的缺点是易于产生过敏性副作用。

因此根据本发明，应提供通过溶剂蒸发技术从不同条件下制备的水包油乳剂中形成药理活性物质的纳米颗粒的方法。比如，高切变力(如超声，高压匀浆作用或类似条件)可被用来在缺乏任何常规表面活性剂和任何聚合核心物质的条件下形成纳米颗粒的基质。取而代之，蛋白质(如人血清白蛋白)可作为稳定剂。另一种选择的方法是，纳米颗粒可不需任何高切变力，仅仅通过选择可自发形成微乳剂的物质即可形成。

本发明进一步提供了不常用的可重复使用的小纳米颗粒(直径小于 200 纳米)形式制备的方法，该微粒可通过 0.22 微米滤器无菌过滤。这可以通过向有机相中添加一种可溶于水的溶剂(如乙醇)并仔细选择有机相，相的比例和有机相中药物的浓度来达到。形成可以通过 0.22 微米滤器过滤的一定大小的纳米颗粒的能力很重要而且有意义，因为含有大量任何蛋白质(如白蛋白)的制剂均不能用常规的方法如高压灭菌进行消毒，因为热可使蛋白凝结。

根据本发明的其他实施方案，我们已经发明了可用作体内输送本质上水不溶性的药理活性物质的组合物。发明的组合物由包含在聚

合外壳中的本质上水不溶性的药理活性物质(如一种固体或液体)组成。聚合外壳是一种交联的生物相容性聚合物。在此提到的含有本质上水不溶性药理活性物质的聚合外壳可以悬浮在一种生物相容性水性液体中以便给药。

本发明进一步提供了一种药物输送系统,其中药理活性物质的部分分子与蛋白质(如人血清白蛋白)缔合,因此进入哺乳动物体内后可以被迅速生物利用。药理活性物质的其他部分包含在蛋白质包被的纳米颗粒中。含有药理活性物质的纳米颗粒作为一种纯的活性成分存在,未被任何聚合基质稀释。

在血流中循环的大量数目的常规药理活性物质与载体蛋白质缔合(通过疏水或离子相互作用),载体蛋白质一般情况下大部分使用血清白蛋白。发明的方法和由此产生组合物因此可以提供给一种药理活性物质,该活性物质在给药前预先与一种蛋白质(通过疏水或离子相互作用)缔合。

本公开证实了一种能够与人血清白蛋白缔合的抗癌药紫杉醇以上的两种生物利用模式(见,如 Kumer 等, *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, 80:337 (1993))。在发明的颗粒中高浓度的白蛋白,与 Taxol® (Bristol-Myers Squibb's 紫杉醇制剂)相比,可以提供更大量缔合白蛋白的分子形式的药物,其中白蛋白也是血流中药物的天然载体。

另外,人血清白蛋白的可取的优势是有能力缔合紫杉醇,和其他药物一样,这样可以增强紫杉醇吸附在颗粒表面的能力。由于白蛋白存在于胶状药物颗粒中(去除有机溶剂后即可形成),就容易形成长时间稳定的胶体分散液,其原因是电荷排斥和空间结构稳定。

根据本发明,同时也提供了粉末形式的亚微米颗粒,这种形式可以很容易的在水或盐水中进行重构。冻干去除水分后就可获得粉剂。人血清白蛋白可以作为一些纳米颗粒发明的结构成分,同时也可

作为冷冻保护剂和重构辅助剂。根据本发明的方法经 0.22 微米滤器过滤，然后干燥或冻干的颗粒制备过程可以产生一种无菌的可供静脉注射的固体制剂。

本发明从一个特定的方面提供了一种抗癌药物如紫杉醇的组合物，其形式是存在于一种液体分散液中的纳米颗粒或是作为一种可以很容易被重构以供给药的固体。由于某种药物如紫杉醇的特殊特性。这些组合物不能通过常规的依赖应用表面活性剂的溶剂蒸发方法获得。在各种表面活性剂的存在下，在制备过程结束后保存几分钟就可形成很大的药物晶体(如大约 5 微米大小到几百微米)。这些晶体的大小一般比静脉注射所允许的大小大得多。

同时我们认识到根据本发明所产生的颗粒可以是结晶的、也可以是无定形的，或是两者的混合物，一般来说最好是药物存在于一种无定形的制剂中。这样可以更好的分解和吸收，以便更好的被生物利用。

抗癌剂紫杉醇在许多人的癌症包括卵巢癌，乳癌，肺癌，食道癌，头部和颈部病变，膀胱癌和淋巴瘤等中显示了非常显著的临床活性。目前已经承认它与顺铂联合应用对卵巢癌的治疗作用以及对以前应用一种联合化学治疗方案治疗失败的转移性乳癌的治疗作用。Taxol®的主要限制是它较差的溶解性和因此制成的含有作为溶解载体的 50%聚乙二醇化合物 EL 和 50%乙醇的 BMS 制剂。每瓶这样的制剂中含有 30mg 紫杉醇，浓度为 6mg/ml。在静脉给药前，这种制剂必须以 1: 10 在盐水中稀释配成含有 0.6mg/ml 最终剂量的紫杉醇溶液。这种制剂已与动物(Lorena 等, *Agents Actions*,7:63-67 (1987))和人(Weiss 等, *J.Clin.Oncol.*, 8:1263-68 (1990))严重的超敏反应联系在一起，因此需要以皮质类固醇激素(如地塞米松)和抗组胺药预防用药。大量的稀释导致大量的输注(一般剂量为 175mg/m²或直至 1 升)，输注时间从 3 小时到 24 小时。因此，需要找到另外一种毒性更小的紫杉醇制剂。

Capxol®是抗癌药物紫杉醇的一种新型的，无 Cremophor 制剂。基于动物研究发明者相信一种无 cremophor 的制剂毒性将更小，而且将不需给病人预防用药。预防用药是为了减少超敏反应和过敏性反应，这些反应的发生是目前已经承认和投入市场的紫杉醇的 Taxol®制剂中 Cremophor 引起的结果。Capxol®是一种为重构和静脉给药的冻干粉末。当用适宜的水介质如 0.9%氯化钠注射液或 0.5%葡萄糖注射液重构时，Capxol®形成一种稳定的紫杉醇的胶状溶液。胶状悬液的大小范围从 20 纳米到 8 微米，优选范围是大约 20-400 纳米。Capxol®的两种主要成分是未修饰的紫杉醇和人血清白蛋白(HSA)。由于 HSA 在水中是自由可溶的，因此 Capxol®可以重构成任何需要浓度的紫杉醇，仅受 HSA 的溶解性限制。因此 Capxol®可以在从稀释(0.1mg/ml 紫杉醇)到浓缩(20mg/ml 紫杉醇)很宽的浓度范围内重构。这将使用药量变为相当小。

根据本发明，同时提供了用作体内生物学输送的方法和组合物，这种输送是以适合以水悬液胃肠外给药的纳米颗粒形式进行的。本发明的组合物是通过一种聚合物来稳定的。聚合物是一种生物相容性物质，如蛋白质白蛋白。用作生物学输送的组合物发明的应用消除了使用毒性稀释剂或载体中的生物物质的必要性，比如以普通盐水稀释的乙醇和聚乙氧基蓖麻油(见，如 Norton 等在第 2 届国家癌症协会 Taxol 和 Taxus 研讨会摘要，1992 年 9 月 23-24 上的文章)。这种已知组合物的缺点是易于引起严重的过敏反应和其他副作用。

已经知道以一种颗粒悬液形式生物物质的输送可允许以诸如肝，肺，脾，淋巴循环和类似的器官为靶目标，因为它可被这些器官的网状内皮系统(RES)细胞摄取。通过使用不同大小的颗粒和不同的给药途径可以控制对含有 RES 器官的靶向作用。但当给大鼠使用时，却令人感到意外和惊讶的发现 Capxol®可积累在那些含有 RES 组织以外的组织如前列腺，胰腺，睾丸，输精管，骨等，其水平明显超过相似剂量的 Taxol®。

因此，令人惊奇的是本发明的紫杉醇制剂 Capxol®，一种纳米微

粒制剂，可在如前列腺，胰腺，睾丸，输精管，骨等组织浓集，也就是说，在不含 RES 的器官中，其水平明显高于紫杉醇的非颗粒制剂如 Taxol[®]。因此 Capxol[®]可以用来治疗这些组织的癌症，其效果强于 Taxol[®]。但对于其他组织的分布，Capxol[®]和 Taxol[®]是相似的，因此 Capxol[®]在其他组织其抗癌活性可期望至少与 Taxol[®]是等同的。

在前列腺的定位其基础是制剂颗粒大小(20-400 纳米)，或是制剂中存在的蛋白质白蛋白，它可通过特殊的膜受体(gp60, gp18, gp13 等)定位在前列腺。同样除白蛋白之外其他生物相容性的，可生物降解的聚合物也可能显示对某种组织如前列腺的特异性，因此作为上述特性的结果紫杉醇可在这些组织中形成局部的高浓度。这种生物相容性物质也是在本发明的预期范围之内的。一种组合物可在前列腺中达到较高的局部紫杉醇浓度，其一种优选实施方案是一种制剂中含有紫杉醇和白蛋白，其微粒大小在 20-400 纳米之间，并且不含有 cremophor。这种实施方案已经被证实与同等剂量的 Taxol[®]相比可在前列腺，肾脏，肺，心，骨和脾中达到较高浓度水平的紫杉醇。这种特性为这种紫杉醇制剂提供了新的用途，包括降低睾酮水平的方法，为进行睾丸切除术和治疗冠状动脉再狭窄提供较高的局部浓度。

令人非常惊奇的是紫杉醇当以 Capxol[®]的形式用药时代谢为其代谢物的速度比使用 Taxol[®]慢得多。这表明对于同样剂量的紫杉醇，可获得长时间的较强的抗癌活性。

令人惊奇的是对大鼠使用同等剂量的 Capxol[®]和 Taxol[®]时，Taxol[®]组骨髓抑制的程度较 Capxol[®]高得多。因此感染和发热(如发热性中性粒细胞减少症)的发生率大大降低。同时也可减少两次治疗之间的周期，目前是 21 天。因此 Capxol[®]的应用可以较 Taxol[®]有更重要的优势。

令人惊奇的发现 Taxol[®]载体(cremophor/在盐水中稀释的乙醇)对几种剂量组的鼠可单独引起强烈的骨髓抑制和严重的超敏反应以至致死。在同样和更高剂量的 Capxol[®]组却未观察到任何这样的反应。

因此 Capxol™，作为一种没有 Taxol®载体的紫杉醇制剂，是具有很重要的优势的。

令人非常惊奇的是当 Capxol™ 和 Taxol®以同样剂量的紫杉醇给大鼠使用时，可发现与 Taxol®相比 Capxol™ 的毒性更低，其证据是 LD₅₀ 值明显升高。这可以允许给病人以紫杉醇更高，更大的治疗有效剂量。文献中有证据显示较高剂量的紫杉醇可增加大鼠的反应。Capxol™ 制剂可允许给予更高的剂量是因为其更低的毒性，因此可以开发出这种药物的所有潜力。

令人惊奇的是 Capxol™，一种本质上不溶于水的药物紫杉醇的制剂，当用水介质重构成几种不同浓度时是稳定的，该浓度范围是 0.1-20mg/ml，但并不仅限于此。这就赋予它在给药时较 Taxol®有重要的优势，即较小的输注量，克服了 Taxol®已知的不稳定性问题(如沉淀)和避免在输注线上在线过滤。因此 Capxol™ 极大简化和改善了病人使用紫杉醇。

令人惊讶的是当以同样剂量给予大鼠时，与 Taxol®相比 Capxol™ 没有显示神经毒性的任何征象，而 Taxol®即使在小剂量也显示有神经毒性作用。

本发明制剂进一步可允许紫杉醇及其他实际上水不溶性药理活性物质以非常小的液体量给药，大大减少了与给药量有关的给药时间以及现有输送系统技术所需的次数。

与一种生物聚合物基质一起，本发明制剂(Capxol™)允许输送的紫杉醇以较低的毒性和长时间的活性维持在局部。

上述对 Capxol™ 令人惊奇的发现提供了极大改善接受紫杉醇治疗病人生命质量的潜力。

Capxol™ 是一种仅含有紫杉醇和人血清白蛋白的冻干粉末。由于

冻干粉末重构后形成的胶体溶液性质决定，不需要毒性乳化剂如 cremophor(紫杉醇的 BMS 制剂中)或吐温 80(如 Rhone poulenc docetaxel 的制剂中)和溶剂如乙醇以溶解药物。去除毒性的乳化剂将减少严重超敏反应和过敏反应的发生率，这已经知道是出现在 TAXOL 产品中的。

另外，在药物使用前不需要事先给予类固醇和抗组织胺药物。

由于减少了毒性，如 LD_{10}/LD_{50} 研究结果的显示，可以使用更高剂量以达到更大的效果。

骨髓抑制的减轻(与 BMS 制剂比较)可以期望减少治疗的周期(目前为 3 周)和改善治疗结果。

与 BMS 制剂(0.6mg/ml)相比 Capxol™ 可以更高的浓度给药(直至 20mg/ml)，允许更低的输注量和以静脉团式给药。

Taxol®更为不利的是只能以硝化丙二醇聚烯烃输注装置进行输注，因为要将标准输注管中的可塑剂过滤至制剂中。Capxol™ 不需过滤且可以以任何标准的输注管使用。另外，仅仅玻璃或聚烯烃容器可用于保存任何含有 cremophor 的溶液，Capxol™ 制剂没有这种限制。

另外可认识到 Taxol®的问题是在体内导管中紫杉醇的沉淀。这导致了药剂不稳定和可控性很差。由于新制剂 Capxol™ 胶体溶液固有的稳定性，沉淀问题被消除了。因为这种沉淀问题，Taxol®的给药需要使用在线过滤器以去除沉淀和其他沉淀物质。Capxol™ 由于其固有的稳定性则无此需要。

文献认为在几百纳米大小范围的颗粒优先通过肿瘤部位可渗漏的血管留在肿瘤中。在 Capxol™ 制剂中紫杉醇的胶体颗粒因此可能显示较好的靶向作用，极大减小了 Taxol®制剂中紫杉醇使用的副作用。

因此本发明的一个基本目的是提供一种紫杉醇的新制剂以提供以上需要的各种特性。

本发明的另一个目的是提供一种紫杉醇制剂可定位在特定组织中，因此可在这些部位提供更高的抗癌活性。

本发明的另一个目的是使用大于约 2mg/ml 的紫杉醇浓度以减少输注量。

本发明也有一个目的是提供一种不含 Taxol®载体的紫杉醇制剂。

本发明还有另一个目的是提供一种紫杉醇的制剂以改善接受紫杉醇治疗癌症的病人的生命质量。

详尽而言之，本发明包括如下几个方面：

紫杉醇和其衍生物之一种或多种与至少一种蛋白质在用于制备包括一种或多种一部分与所述至少一种蛋白质结合而其他部分被所述至少一种蛋白质包被的无定形的紫杉醇和其衍生物的药学上可接受的制剂中的用途，其中所述制剂适宜于全身给予接受所述一种或多种紫杉醇和其衍生物的治疗的受试者，具有降低的毒性，所述一种或多种紫杉醇和其衍生物以至少 135 mg/m²的剂量，在不超过 2 小时的给药时间内给药，其中所述制剂不含聚乙氧蓖麻油，并且所述制剂包括所述一种或多种所述无定形的紫杉醇和其衍生物的颗粒，颗粒大小不超过 1 微米。

在上述技术方案中，紫杉醇和/或其衍生物的给药时间可以不超过 1 小时；尤其是，给药时间可以不超过 30 分钟，更优选地，给药时间不超过 5 分钟。可以通过口服、肌肉内、静脉内、腹腔内、或吸入给药。治疗能针对前列腺癌、睾丸切除术、胰腺癌、或脑瘤。紫杉醇或其衍生物的血液学毒性和神经毒性被降低，可以表现出这种药物

的所有潜力。

一种或多种紫杉醇和衍生物与至少一种蛋白质在用于制备包括一种或多种一部分与所述蛋白质结合而其他部分被所述蛋白质包被的无定形的紫杉醇和其衍生物的药学上可接受的制剂中的用途，其中所述制剂适宜于给予需要治疗的受试者，无需在给予所述一种或多种紫杉醇和其衍生物前预先用药，所述一种或多种紫杉醇和其衍生物以至少 135 mg/m^2 的剂量，在不超过 2 小时的给药时间内给药，其中所述制剂不含聚乙氧蓖麻油，并且所述制剂包括所述一种或多种无定形的紫杉醇和其衍生物的颗粒，颗粒大小不超过 1 微米。

同样地，紫杉醇和其衍生物的给药时间可以不超过 1 小时；尤其是，给药时间可以不超过 5 分钟。可以通过通过口服、肌肉内、静脉内、或腹腔内、动脉内、尿道内、鞘内给药。治疗能针对前列腺癌、睾丸切除术、胰腺癌、或脑瘤。

一种或多种紫杉醇和其衍生物在用于制备药学上可接受的制剂中的用途，其中所述制剂包括所述一种或多种一部分与至少一种蛋白质结合而其他部分被至少一种蛋白质包被的无定形的紫杉醇和其衍生物，其中所述制剂适宜于给予需要治疗的受试者，所述一种或多种紫杉醇和其衍生物以至少 135 mg/m^2 的剂量，在不超过 2 小时的给药时间内给药，治疗周期少于 3 周，其中所述制剂不含聚乙氧蓖麻油，并且所述制剂包括所述无定形的紫杉醇和其衍生物的所述一种或多种的颗粒，颗粒大小不超过 1 微米。

在该实施方案中，治疗周期少于 2 周；尤其是，治疗周期少于 1 周。通过口服、肌肉内、静脉内、或腹腔内给药紫杉醇和其衍生物。治疗针对前列腺癌、睾丸切除术、胰腺癌、或脑瘤。

紫杉醇和其衍生物之一或多种在用于制备包括所述一种或多种一部分与蛋白质结合而其他部分被蛋白质包被的无定形的紫杉醇

和其衍生物的药学上可接受的制剂中的用途，其中所述制剂是适宜于全身给予需要治疗的受试者，所述一种或多种紫杉醇和其衍生物以至少 135 mg/m² 的剂量施用，其中所述制剂不含聚乙氧蓖麻油，并且所述制剂包括所述一种或多种所述无定形形态的紫杉醇和其衍生物的颗粒，颗粒大小不超过 1 微米。

同样地，治疗周期少于 2 周；尤其是，治疗周期少于 1 周。通过口服、肌肉内、静脉内、或腹腔内给药紫杉醇或其衍生物。治疗针对前列腺癌、睾丸切除术、胰腺癌、或脑瘤。

一种或多种紫杉醇和其衍生物在用于制备包括所述一种或多种一部分与蛋白质结合而其他部分被所述蛋白质包被的无定形的紫杉醇和其衍生物的药学上可接受的制剂中的用途，其中所述制剂是适宜于全身给予需要治疗的受试者，该制剂可用含可提取成分的材料制造的医用硬件给药，其中所述制剂不含聚乙氧蓖麻油，并且所述制剂包括所述一种或多种所述无定形的紫杉醇和其衍生物的颗粒，颗粒大小不超过 1 微米。

在上述技术方案中，医用硬件可以选自管、导管、输液袋、瓶和注射器。

紫杉醇和其衍生物之一或多种在用于制备包括所述一种或多种一部分与蛋白质结合而其他部分被所述蛋白质包被的无定形的紫杉醇和其衍生物的药学上可接受的制剂中的用途，其中所述制剂适宜于全身给予需要的受试者，不需使用线中过滤器给药，其中所述制剂不含聚乙氧蓖麻油，并且所述制剂包括所述一种或多种所述无定形形式的紫杉醇和其衍生物的颗粒，颗粒大小不超过 1 微米。

一种或多种紫杉醇和其衍生物在用于制备包括所述一种或多种一部分与蛋白质结合而其他部分被所述蛋白质包被的无定形的紫杉醇和其衍生物的药学上可接受的制剂中的用途，其中所述制剂适宜于

全身给予需要的受试者，以少于 250 ml 的容积给药，其中所述制剂不含聚乙氧蓖麻油，并且所述制剂包括所述一种或多种所述无定形的紫杉醇和其衍生物的颗粒，颗粒大小不超过 1 微米。

在该技术方案中，给药容积可以少于 150ml；尤其是，容积可以少于 60ml。

紫杉醇和其衍生物之一或多种在用于制备包括所述一种或多种一部分与蛋白质结合的无定形的紫杉醇和其衍生物的药学上可接受的制剂中的用途，其中所述制剂适宜于全身给予需要治疗的受试者，以至少 $50 \text{ mg/m}^2/\text{h}$ 的速度给药，其中所述制剂不含聚乙氧蓖麻油，并且所述制剂包括所述一种或多种所述无定形的紫杉醇和其衍生物的颗粒，颗粒大小不超过 1 微米。

在前述的所有技术方案中，包括各种基本方案、优选方案或者修饰方案、衍生方案中，给药时间可以不超过 1 小时；更进一步，给药时间可以不超过 30 分钟；再进一步，给药时间可以不超过 5 分钟。给药剂量可以是至少 135 mg/m^2 的剂量，至少 175 mg/m^2 的剂量，至少 250 mg/m^2 的剂量。给药途径包括通过口服、肌肉内、静脉内、或腹腔内给药紫杉醇或其衍生物。治疗针对前列腺癌、睾丸切除术、胰腺癌、或脑瘤。所述紫杉醇衍生物是泰帝索。

一种对接受一种或多种紫杉醇和其衍生物的治疗的受试者具有低血液学毒性的包括一种或多种紫杉醇和其衍生物的制剂，该制剂含有无定形的所述一种或多种紫杉醇和其衍生物和至少一种蛋白质于药学上可接受的制剂之中，所述制剂包括所述一种或多种一部分与所述蛋白质结合而其他部分被所述蛋白质包被的所述紫杉醇和其衍生物，其中所述制剂适宜于以至少 135 mg/m^2 的剂量，在不超过 2 小时的给药时间内全身给药，其中所述制剂不含聚乙氧蓖麻油，并且所述制剂包括所述一种或多种所述无定形的紫杉醇，泰索帝或其衍生物的颗粒，颗粒大小不超过 1 微米。

一种适于给需要一种或多种紫杉醇和其衍生物的受试者给药的包括一种或多种紫杉醇和其衍生物的制剂，无需在给予所述一种或多种紫杉醇和其衍生物前预先用药，该制剂含有无定形的所述一种或多种紫杉醇和其衍生物和至少一种蛋白质于药学上可接受的制剂之中，所述制剂包括所述一种或多种一部分与所述蛋白质结合的所述紫杉醇和其衍生物，其中所述制剂适宜于以至少 135 mg/m^2 的剂量，在不超过 2 小时的给药时间内全身给药，其中所述制剂不含聚乙氧蓖麻油，并且所述制剂包括所述一种或多种所述无定形的紫杉醇和其衍生物的颗粒，颗粒大小为不超过 1 微米。

一种适于给需要一种或多种紫杉醇和其衍生物的受试者，在不足 3 周的治疗周期内给药的一种或多种紫杉醇和其衍生物制剂，该制剂含有所述一种或多种的无定形的紫杉醇和其衍生物和至少一种蛋白质于药学上可接受的制剂之中，该制剂包括所述一种或多种一部分与所述蛋白质结合的紫杉醇和其衍生物，其中所述制剂适宜于以至少 135 mg/m^2 的剂量，在不超过 2 小时的给药时间内全身给药，其中所述制剂不含聚乙氧蓖麻油，并且所述制剂包括所述一种或多种所述无定形的紫杉醇和其衍生物的颗粒，颗粒大小为不超过 1 微米。

一种适于给需要一种或多种紫杉醇和其衍生物的受试者给药的包括一种或多种紫杉醇和其衍生物制剂，该制剂含有的所述一种或多种的无定形的紫杉醇和其衍生物和至少一种蛋白质存在于药学上可接受的制剂中，其中所述制剂不含聚乙氧蓖麻油，并且所述制剂包括所述一种或多种无定形的紫杉醇和其衍生物的颗粒，颗粒大小为不超过 1 微米。

一种冻干制剂，包括一种或多种一部分与至少一种蛋白质结合而其他部分被蛋白质包被的无定形的紫杉醇和其衍生物，其中所述制剂适于通过重构给需要一种或多种紫杉醇和其衍生物的受试者给药所述一种或多种紫杉醇和其衍生物，其中所述制剂不含聚乙氧蓖麻油，

并且所述制剂包括所述一种或多种无定形的紫杉醇和其衍生物的颗粒，颗粒大小为不超过 1 微米。

一种重构制剂，包括一种或多种一部分与至少一种蛋白质结合而其他部分被所述蛋白质包被的无定形的紫杉醇和其衍生物，其中所述制剂适于给需要一种或多种紫杉醇和其衍生物的受试者给药所述一种或多种紫杉醇和其衍生物，所述的制剂含有一种冻干制剂与水或水溶液。其中该冻干制剂包括一种或多种一部分与至少一种蛋白质结合的而其他部分被所述蛋白质包被的无定形的紫杉醇和其衍生物，其中所述制剂适于通过重构给需要一种或多种紫杉醇和其衍生物的受试者给药所述一种或多种紫杉醇和其衍生物，其中所述制剂不含聚乙氧蓖麻油，并且所述制剂包括所述一种或多种无定形的紫杉醇和其衍生物的颗粒，颗粒大小为不超过 1 微米。

一种冷冻制剂，包括一种或多种无定形的紫杉醇和其衍生物和至少一种蛋白质，其中所述制剂包括所述一种或多种一部分与所述蛋白质结合而其他部分被所述蛋白质包被的紫杉醇和其衍生物，其中所述制剂适于通过融化给需要一种紫杉醇和其衍生物的受试者给药所述一种或多种紫杉醇和其衍生物，其中所述制剂不含聚乙氧蓖麻油，并且所述制剂包括所述一种或多种无定形的紫杉醇和其衍生物的颗粒，颗粒大小为不超过 1 微米。

一种液体制剂，包括一种或多种无定形的紫杉醇和其衍生物和至少一种蛋白质，其中所述紫杉醇和其衍生物的一部分与所述蛋白质缔合而其他部分被所述蛋白质包被，其中所述制剂含有水，蛋白质和浓度至少为 2.0mg / ml 的所述一种或多种紫杉醇和其衍生物，其中所述制剂不含聚乙氧蓖麻油，并且所述制剂包括所述一种或多种无定形的紫杉醇和其衍生物的颗粒，颗粒大小为不超过 1 微米。在该液体制剂中，所述一种或多种紫杉醇和其衍生物的浓度至少可以是 5.0mg / ml；更进一步，浓度至少可以是 10.0mg / ml。

优选地，紫杉醇的衍生物是泰帝索。

附图的简单描述

图 1 代表了对患肿瘤小鼠(每组 $n=5$) 静脉使用紫杉醇纳米颗粒的结果，显示与接受盐水的对照组(●)相比治疗组(■)中肿瘤完全消退。事实上在对照组中可见到肿瘤的生长无法控制。治疗组的剂量是 20mg/ml 紫杉醇，以静脉团式给药的方式连续 5 天给药。

图 2 代表对皮下注射胶原后脚爪发生关节炎的大鼠使用紫杉醇纳米颗粒腹腔给药的结果。测量脚爪的体积，从而判断疾病的严重性。脚爪体积正常为治疗开始时的 100%。0 天代表治疗的初始。共有 3 组一对照组注射盐水($n=2$ ，表示为一根细线，图上标记为“未治疗”)；第一治疗组接受剂量为 1mg/kg($n=4$ ，表示为一根粗线，图上标记为“紫杉醇纳米颗粒 1.0mg/kg”)的紫杉醇纳米颗粒，第二治疗组接受剂量为 0.5mg/kg 的紫杉醇纳米颗粒和剂量为 0.2mg/kg 的强的松($n=4$ ，表示为一根粗线，图上标记为“强的松 0.2mg/kg+紫杉醇纳米颗粒 0.5mg/kg”)。两个治疗组显示随时间变化脚爪体积明显减小，表明关节炎的消退，同时对照组在同期显示脚爪体积增加。

图 3 代表了大鼠骨髓抑制研究的结果。第一组的 3 只大鼠给予 Capxol™，第二组 3 只大鼠给予 Taxol®，两组均给予每公斤体重 7ml 制剂的剂量，即每种含有紫杉醇的制剂均为 5mg/kg。所有剂量经尾静脉以静脉团的形式给予。图 3 显示了作为骨髓抑制指标的白细胞 (WBC) 计数的百分比变化。

图 4 代表了 Capxol™ 的一个导向研究以确定靶向剂量的范围和效能。小鼠(n=10)经皮下接种 MX-1 乳房肿瘤，当肿瘤达到大约 150-300mg 大小时开始进行治疗。这些发生于第 12 天，治疗在初始接种后第 13 天开始。Capxol™ 以盐水重构以获得紫杉醇纳米颗粒的胶体溶液。患肿瘤的小鼠(n=5)以重构的 Capxol™ 治疗，剂量为 20mg/ml(以 VIV-1 表示)，每天经尾静脉以团药形式注射连续 5 天。对照组(n=5)以同样的时间表仅注射盐水。监测肿瘤的大小作为起作用的时间。对照组显示肿瘤重量大大增加至平均多于 4500mg，该组的所有动物均在 28 和 39 天处死。而另一方面，治疗组显示了明显的治疗作用，所有动物在 25 天均没有可以测量到的肿瘤。该组的动物在 39 天全部处死，此时均未显示复发和肿瘤的任何证据。

发明的详细描述

根据本发明，提供了减少紫杉醇治疗的受试者毒性的方法，所述的方法包括将所述的紫杉醇以一种药学上可接受的制剂全身性的给予所述的受试者，剂量至少为 175mg/m²，给药时间不超过 2 小时。

根据本发明，也提供了一种将紫杉醇给予一个需要的受试者的给药方法，不需要在给予所述的紫杉醇之前预防用药，所述的方法包括将所述的紫杉醇以一种药学上可接受的制剂全身性的给予所述的受试者，其剂量至少为 135mg/m²，给药时间不超过 2 小时。

根据本发明的一项更深入的实施方案，提供了一种将紫杉醇给予一位需要的受试者的给药方法，所述的方法包括所述的紫杉醇以一

种药学上可接受的制剂全身性的给予所述的受试者，剂量至少为 $135\text{mg}/\text{m}^2$ ，给药时间不超过 2 小时，治疗周期不满 3 周。

根据本发明的一项更深入的实施方案，提供了一种将紫杉醇给予一位需要的受试者的给药方法，所述的方法包括所述的紫杉醇以一种药学上可接受的制剂全身性的给予所述的受试者，剂量至少为 $250\text{mg}/\text{m}^2$ 。

根据本发明的一项更深入的实施方案，提供了一种将紫杉醇给予一位需要的受试者的给药方法，所述的方法包括所述的紫杉醇全身性的给予所述的受试者，其制剂可使用医学硬件进行安全的给药，其中的医学硬件由含有可提取的成分的物质制成。

根据本发明的一项更深入的实施方案，提供了一种将紫杉醇给予一位需要的受试者的给药方法，所述的方法包括所述的紫杉醇全身性的给予所述的受试者，该制剂不需使用一种在线滤器即可安全给药。

根据本发明的一项更深入的实施方案，提供了一种将紫杉醇给予一位需要的受试者的给药方法，所述的方法包括所述的紫杉醇以完全的剂量全身性的给予所述的受试者，输注量小于 250ml。

根据本发明的一项更深入的实施方案，提供了一种将紫杉醇给予一位需要的受试者的给药方法，所述的方法包括所述的紫杉醇全身性的给予所述的受试者，其速率为至少 $50\text{mg}/\text{m}^2/\text{hr}$ 。

根据此项发明的一项更深入的实施方案，提供了一种紫杉醇的制剂，对于正在接受紫杉醇治疗的受试者可以减少血液性毒性，所述的制剂包括适合全身性给药的药学上可接受制剂，剂量至少为 $175\text{mg}/\text{m}^2$ ，给药时间不超过 2 小时。

根据本发明的一项更深入的实施方案，提供了一种适合将紫杉

醇给予一位需要的受试者的紫杉醇的制剂，不需在给予所述的紫杉醇前预防给药，所述的制剂包括适合全身性给药的药学上可接受的制剂，剂量至少为 $135\text{mg}/\text{m}^2$ ，给药时间不超过 2 小时。

根据本发明的一项更深入的实施方案，提供了一种适合将紫杉醇给予一位需要的受试者的紫杉醇的制剂，治疗周期不满 3 周，所述的制剂包括适合全身性给药的药学上可接受制剂，剂量至少为 $135\text{mg}/\text{m}^2$ ，给药时间不超过 2 小时。

根据本发明的一项更深入的实施方案，提供了一种适合将紫杉醇给予一位需要的受试者的紫杉醇的制剂，所述的制剂以一种不含聚乙二醇化合物的药学上可接受的制剂形式含有紫杉醇。

根本发明的一项更深入的实施方案，提供了一种适合将紫杉醇以重构形式给予一位需要的受试者的紫杉醇的冻干制剂。

根据本发明的一项更深入的实施方案，提供了一种适合将紫杉醇在融化后给予一位需要的受试者的紫杉醇的冰冻制剂。

根据本发明的一项更深入的实施方案，提供了一种紫杉醇的液体制剂，其中含有水和浓度至少为 $2.0\text{mg}/\text{ml}$ 的紫杉醇。

根据本发明的一项更深入的实施方案，提供了一种药物输送系统，包括一种包被以蛋白质的实际上水不溶性的药剂活性剂的固体或液体的颗粒，

其中所述的蛋白质包衣中缔合有游离的蛋白质，

其中所述的药剂活性物质的部分包含在所述的包被蛋白质中，所述的药剂活性物质的部分与所述的蛋白质是相缔合的，

其中所述颗粒的平均直径不超过约 1 微米。

根据本发明的一项更深入的实施方案，提供了一种适合通过吸入方式给予需要的受试者的药物制剂，所述的制剂包括大小约为 1-10

纳米的蛋白质微颗粒，其中所述的蛋白质颗粒包括大小约 50-1,000 纳米的药物纳米颗粒和任意的赋形剂。

根据本发明，也提供了制备适合体内输送的本质上不溶于水的药剂活性物质的方法，所述的方法包括：

a) 混合：

- i) 一种有机溶剂，所述的活性物质溶解在其中；
- ii) 水或一种水性溶液；
- iii) 一种表面活性剂；和
- iv) 一种复合表面活性剂
自发形成一种微乳剂；而且紫杉醇

b) 去除所述的有机溶剂以获得所述的活性剂在所述水中的纳米颗粒悬液。

根据本发明的一项更深入的实施方案，提供了一种制备含有一种活性物质的纳米颗粒的方法，所述的方法包括混合一种非挥发性相，一种挥发性相和一种表面活性剂，可以自发形成一种微乳剂，其中所述的挥发性相含有所述的活性物质，去除所述的挥发性相就可以获得一种存在于所述非挥发性相中的固体纳米颗粒悬液，其中所述的纳米颗粒含有所述的活性物质，而且平均直径小于 100 纳米。

根据本发明的一项更深入的实施方案，提供了一种制备含有一种活性物质的纳米颗粒的方法，所述的方法包括混合一种非挥发性效果和一种挥发性相，可以自发形成一种微乳剂，其中所述的非挥发性相含有所述的活性物质，去除所述的非挥发性相就可获得存在于所述挥发性相中的固体纳米颗粒，其中所述的纳米颗粒含有所述的活性物质，平均直径小于 100 纳米。

通过上述描述方法制备的组合物有特别的优点，在于他们已经被观察到可提供多种药理活性物质的一种毒性非常低的形式。同时本说明书描述的也有其他制备药理活性物质如紫杉醇的低毒形式的方法。

在一项优选的实施方案中，上述描述的颗粒平均直径不超过大约 200 纳米。这些颗粒的特别优势在于他们可以经受无菌过滤，因此可消除用更剧烈的处理达到含有所需的药理活性物质无菌溶液的需要。

如果未特殊说明，本说明书所用的术语“紫杉醇”包含紫杉醇的所有形式，修饰物和衍生物如泰索帝等。

Capxol™ 是申请人的受让人推向市场的紫杉醇的制剂商标。此处所用的 Capxol™ 仅仅是一种代表通过实施例 1 方法制备的蛋白质包被紫杉醇纳米微粒的速记方式。Capxol™ 是一种获得专利的新型的，无聚乙二醇化合物的抗癌药紫杉醇的制剂。发明者基于动物研究，相信一种无聚乙二醇化合物的制剂将有明显低的毒性，而且不需预防用药。预防用药的目的是减少超敏反应和过敏性反应，这些反应是目前批准的市售紫杉醇 Taxol® 制剂中的聚乙二醇化合物所引起的。Capxol™ 是一种可以重构和静脉给药的冻干粉末。每瓶 Capxol™ 含有 30mg 的紫杉醇和大约 400mg 人血清白蛋白。当以合适的水介质如 0.9%氯化钠注射液或 5%葡萄糖注射液重构时，Capxol™ 可形成一种稳定的紫杉醇胶体溶液。胶体纳米颗粒的大小一般小于 400 纳米。纳米颗粒是将 USP 人血清白蛋白溶液和溶解在有机溶剂中的紫杉醇溶液通过高压匀浆作用制备而成。然后去除溶剂生成胶体悬液或含有紫杉醇的人白蛋白溶液。这种悬液经过无菌过滤，冻干成为 Capxol™。制剂中不含有任何其他赋形剂或稳定剂。产物的无菌性是通过一种无菌处理过程和/或无菌过滤所保证的。Capxol™ 中的两种主要成分是无修饰的紫杉醇和人血清白蛋白(HSA)。由于 HAS 在水中是自由可溶的，Capxol™ 可以被重构成任何所需的紫杉醇浓度，仅受 HAS 的溶解性限制。因此 Capxol™ 可被重构的浓度范围很宽，从稀释的(0.1mg/ml 紫杉醇)到浓缩的(20mg/ml 紫杉醇)。这可使给药的量变得非常小。

此处所用的术语“体内输送”是指通过诸如口服，静脉，皮下，

腹腔内，鞘内，肌肉，吸入，局部，经皮，栓剂(直肠)，子宫(阴道)，尿道，门静脉，肝内，动脉，体液等途径给予的一种药理活性物质的输送方式。

此处所用的术语“微米”是指毫米的千分之一计量单位。

此处所用的术语“生物相容性”描述了一种物质不能以任何不利的方式改变或影响它所进入的生物系统。

计划在本发明的实施中应用的实际上水不溶性的药理活性物质包括药理活性物质，诊断试剂，营养剂以及类似物。药理活性物质的实施例包括：

止痛剂/退热剂(如阿斯匹林，对乙酰氨基酚，布洛芬，萘普生钠，丁丙诺啡盐酸盐，盐酸丙氧芬，萘磺酸丙氧芬，哌替啶，盐酸二氢吗啡酮，硫酸吗啡，盐酸氧可酮，磷酸可待因，双氢可待因酒石酸盐，盐酸镇痛新，可待因酒石酸盐，左啡诺酒石酸盐，二氟苯水杨酸，水杨酸三乙醇胺，盐酸纳布啡，甲灭酸，布托啡诺酒石酸盐，胆碱酒石酸盐，异丁巴比妥，苯托沙明，苯海拉明柠檬酸盐，甲氧异丁嗪，盐酸异丁巴比妥，氨甲丙二酯以及类似物。

麻醉药(如环丙烷，安氟醚，氟烷，异氟醚，甲氧氟烷，一氧化氮，普鲁泊福以及类似物)；

平喘药(如氮卓斯汀，酮替芬，Traxanox，安氯地平，色甘酸，依布拉特，Montelukast，奈多罗米，澳沙米特，Pranlukast，Seratrodast，Suplatast tosylate 甲苯磺酸盐，噻拉米特，Zafirlukast，Zileuton，氯地米松，布地奈德，地塞米松，去氟肤轻松，丙酮去炎松以及类似物)；

抗生素(如新霉素，链霉素，氯霉素，头孢菌素，氨比西林，盘尼西林，四环素以及类似物)；

抗抑郁药(如奈福泮，奥昔哌汀，多塞平盐酸盐，阿莫沙平，曲唑酮盐酸盐，盐酸阿米替林，盐酸马普替林，苯乙肼硫酸盐，地昔帕明硫酸盐，去甲替林盐酸盐，硫酸反苯环丙胺，氟西汀盐酸盐，盐酸

多塞平，盐酸丙咪嗪，双氢奈酸丙咪嗪，去甲替林，盐酸阿米替林，异唑胍，地昔帕明盐酸盐，曲米帕明马来酸盐，普罗替林盐酸盐以及类似物)；

抗糖尿病药(如双胍，激素，磺酰脲衍生物以及类似物)；

抗真菌药(如灰黄霉素，酮康唑，两性霉素 B，制霉菌素，克念菌素以及类似物)；

抗高血压药(如奈心安，普罗帕酮，oxyprenolol，硝苯吡啶，蛇根碱，曲美芬樟脑磺酸盐，酚苄明盐酸盐，帕吉林盐酸盐，去甲氧利血平，二氮嗪，胍乙啶单硫酸酯，长压定，萝芙木碱，硝普钠，蛇根萝芙木碱，阿舍西隆，酚妥拉明甲磺酸盐，蛇根碱以及类似物)；

抗炎药(如(非甾体)吲哚美辛，甲氧奈普酸，布洛芬，雷米那酮，吡氧噻嗪，(甾体)可的松，地塞米松，氟恶米松，氢化可的松，氢化泼尼松，强的松以及类似物)；

抗肿瘤药(如阿霉素，环磷酰胺，放射菌素，争光霉素，正定霉素，阿霉素，表柔比星，丝裂霉素，氨甲酰呤，氟尿嘧啶，卡铂，卡氮芥(BCNU)，甲基-CCNU，顺铂，鬼臼乙叉甙，干扰素，喜树碱及其衍生物，苯芥胆甾醇，紫杉醇及其衍生物，泰索帝及其衍生物，长春碱，长春新碱，他莫西芬，鬼臼乙叉甙，哌泊舒凡，以及类似物)；

抗焦虑药(如安定，盐酸丁螺环酮，环丙安定，利眠宁盐酸盐，去甲羟安定，二钾氯氮卓，安定，羟嗪双羟萘酸盐，盐酸羟嗪，阿普唑仑，氟哌啶，三氟甲安定，氯美扎酮，硝苯氟海因，以及类似物)；

免疫抑制剂(如环孢菌素，硫唑嘌呤，咪唑立宾，FK506(免疫抑制剂)，以及类似物)；

抗偏头疼药(如麦角胺酒石酸盐，盐酸萘心安，异美丁粘酸盐，氯醛比林，以及类似物)；

镇静剂/催眠剂(如巴比妥类(如戊巴比妥，戊巴比妥钠，司可巴比妥钠)，benzodiazapine(如盐酸氟安定，三唑仑，tomazepam，咪达唑仑盐酸盐)，以及类似物)；

抗心绞痛药(如 β -肾上腺素受体阻滞剂，钙通道阻滞剂(如硝苯吡啶，地尔硫卓盐酸盐，以及类似物)，硝酸盐类(如硝酸丙二醇，异山梨醇酯，季戊四醇四硝酸盐，赤藓醇四硝酸盐)，以及类似物)；

抗精神病药(如氟哌啶醇，洛沙平琥珀酸盐，洛沙平盐酸盐，氨

砒噻吨，盐酸氟奋乃静，癸氟奋乃静，庚氟奋乃静，盐酸三氟拉嗪，盐酸氯丙嗪，奋乃静，枸橼酸锂，甲哌氯丙嗪，以及类似物)；

抗燥狂药(如碳酸锂)；

抗心律失常药(如溴苄胺甲苯磺酸盐，艾司洛尔盐酸盐，盐酸维拉帕米，乙胺碘呋酮，恩卡尼盐酸盐，地高辛，洋地黄毒甙，盐酸慢心利，磷酸双异丙吡胺，盐酸普鲁卡因胺，硫酸奎尼丁，葡萄糖酸奎尼丁，聚半乳糖醛酸奎尼丁，醋酸氟卡尼，盐酸妥卡尼，盐酸利多卡因，以及类似物)；

抗关节炎药(如保泰松，舒林酸，青霉胺，双水杨酯，吡罗昔康，硫唑嘌呤，吲哚美辛，甲氯灭酸钠，硫代苹果酸金钠，酮洛芬，金诺芬，金硫葡萄糖，甲苯酰吡酸钠，以及类似物)；

抗痛风药(如秋水仙碱，别嘌呤醇，以及类似物)；

抗凝剂(如肝素，肝素钠，华法林钠，以及类似物)；

血栓溶解剂(如尿激酶，链激酶，阿特普酶，以及类似物)；

抗纤维蛋白溶解药(如氨基己酸丙二醇酯)；

血液流变学试剂(如己酮可可碱)；

抗血小板药(如阿斯匹林，empirin，ascriptin，以及类似物)；

抗惊厥药(如丙戊酸，divalproate sodium，苯妥英，苯妥英钠，氯硝安定，扑痫酮，苯巴比妥，苯巴比妥钠，卡马西平，异戊巴比妥钠，甲琥胺，甲基巴比妥，甲苯巴比妥，美芬妥英，苯琥胺，对甲双酮，乙苯妥英，苯乙酰脲，司可巴比妥钠，二钾氯氮卓，三甲双酮，以及类似物)；

抗帕金森药(如乙琥胺，以及类似物)；

抗组胺药/止痒剂(如盐酸羟嗪，盐酸苯海拉明，马来酸扑尔敏，马来酸溴苯吡胺，盐酸赛庚啶，特非那定，富马酸氯马斯丁，盐酸曲普利啶，马来酸卡比沙明，盐酸二苯拉明，酒石酸苯茛胺，马来酸阿托他定，盐酸曲吡那敏，马来酸右氯苯那敏，盐酸甲地嗪，trimiprazine酒石酸盐，以及类似物)；

可用作钙调节剂(如降钙素，甲状旁腺激素，以及类似物)；

抗菌药(如硫酸阿米卡星，氨基糖苷类，氯霉素，棕榈酸氯霉素，氯霉素琥珀酸钠，环丙沙星盐酸盐，盐酸氯林可霉素，棕榈酸氯林可霉素，磷酸氯林可霉素，甲硝唑，盐酸甲硝唑，硫酸庆大霉素，盐酸林

可霉素, 硫酸妥布霉素, 盐酸万古霉素, 硫酸多粘菌素 B, 多粘菌素 E 甲磺酸钠, 硫酸多粘菌素 E, 以及类似物);

抗病毒药(如 γ -干扰素, 齐多夫定, 盐酸金刚烷胺, 三氮唑核苷, 无环鸟苷, 以及类似物);

抗微生物药(如头孢菌素类如(头孢唑啉钠, 头孢拉定, 头孢氯氨苄, 头孢吡硫钠, 头孢唑肟钠, 头孢哌酮钠, 头孢替坦钠, 头孢呋新酯, 头孢噻肟钠, 头孢羟氨苄霜剂, 头孢他啶, 头孢氨苄, 头孢菌素钠, 盐酸头孢氨苄一水化合物, 头孢孟多酯钠, 头孢西丁钠, 头孢尼西钠, 头孢雷特, 头孢曲松钠, 头孢他啶, 头孢羟氨苄, 头孢拉定钠, 头孢呋肟钠, 以及类似物), 青霉素类(如氨苄西林, 阿莫西林, 苄星青霉素 G, 环己西林, 阿莫西林钠, 青霉素 G 钾, 青霉素 V 钾, 哌拉西林钠, 苯唑西林钠, 巴氨西林盐酸盐, 氯唑西林钠, 替卡西林二钠, 阿洛西林钠, 卡茛西林钠, 青霉素 G 钾, 普鲁卡因青霉素 G, 甲氧西林钠, 萘夫西林钠, 以及类似物), 红霉素类(如乙基丁二酸红霉素, 乙琥红霉素, 红霉素, 无味红霉素, 乳糖酸红霉素, lactobionate, erythromycin siearate, 乙基丁二酸红霉素, 以及类似物), 四环素类(如盐酸四环素, 乙内酰脲多西环素, 盐酸米诺环素, 以及类似物), 以及类似物);

抗感染药(如 GM-CSF);

支气管扩张药(如拟交感神经药(如盐酸肾上腺素, 硫酸异丙肾上腺素, 硫酸间羟叔丁肾上腺素, 乙基异丙肾上腺素, 乙基异丙肾上腺素甲磺酸盐, 盐酸乙基异丙肾上腺素, 硫酸舒喘灵, 舒喘灵, 双甲苯苄醇, 甲磺酸异丙肾上腺素盐酸盐, 硫酸间羟叔丁肾上腺素, 酒石酸氢肾上腺素, 间羟异丙肾上腺素硫酸盐, 肾上腺素, 酒石酸氢肾上腺素), 反副交感神经药(如异丙托溴胺), 黄嘌呤类(如氨茶碱, 双羟丙茶碱, 硫酸间羟异丙肾上腺素, 氨茶碱), 肥大细胞稳定剂(如色甘酸钠), 吸入性皮质类固醇(如二丙酸氟尼缩松氯倍米松, 二丙酸培氯松气雾剂), 舒喘灵, 氯倍米松二丙酸盐(BDP), 异丙托溴胺, 布地奈德, 酮替芬, 沙美特罗, xinafoate, 硫酸间羟叔丁肾上腺素, 曲安西龙, 茶碱, 奈多罗米钠, 硫酸间羟异丙肾上腺素, 舒喘灵, 氟尼缩松, 以及类似物);

激素类(如雄激素(如炔睾酮, 苯乙酸睾酮, 氟甲睾酮, 乙基睾

酮, 庚酸睾酮, 甲基睾酮, 氟甲睾酮, 苯乙酸睾酮), 雌激素(如雌二醇, 硫酸雌酮哌嗪, 共轭雌激素), 黄体激素(如安宫黄体酮, 甲基黄体酮, 醋酸炔诺酮), 皮质类固醇类(如曲安奈德, 倍他米松, 地塞米松, 磷酸钠地塞米松, 醋酸地塞米松, 强的松, 醋酸甲基强的松龙悬液, 丙酮曲安奈德, 甲基强的松龙, 氢化泼尼松磷酸钠, 甲基强的松龙琥珀酸钠, 氢化可的松琥珀酸钠, 甲基强的松龙琥珀酸钠, triamcinolone hexacetonide, 氢化可的松, hydrocortisone cypionate, 氢化泼尼松, flurocortisone acetate, 醋酸对氟米松, prednisolone tebulate, 醋酸氢化泼尼松, 磷酸钠氢化泼尼松, 氢化可的松琥珀酸钠, 以及类似物), 甲状腺素(如左旋甲状腺素钠)以及类似物), 以及类似物;

降血糖药(如人胰岛素, 纯化牛胰岛素, 纯化猪胰岛素, 优降糖, 氯磺丙脲, 吡磺环己脲, 甲苯磺丁脲, 妥拉磺脲, 以及类似物);

降血脂药(如安妥明, 右旋甲状腺素钠, 丙丁酚, 洛伐他汀, 尼亚新, 以及类似物);

蛋白质(如 DNA 酶, 藻酸盐, 超氧化物歧化酶, 脂肪酶, 以及类似物);

核酸(如编码任何有药理作用的蛋白质的正义或反义核苷酸, 包括在此描述的任何蛋白质, 以及类似物);

刺激红细胞生成的药物(如促红细胞生成素);

抗溃疡药/抗反流药(如法莫替丁, 西咪替丁, 盐酸雷尼替丁, 以及类似物);

止恶心药/止吐药(如盐酸氯苯甲嗪, 大麻隆, 甲哌氯丙嗪, 承晕宁, 盐酸异丙嗪, 甲哌硫丙嗪, 东莨菪碱, 以及类似物);

油溶性维生素(如维生素 A, D, E, K, 以及类似物); 和

其他药物如氯苯二氯乙烷, visadine, 亚硝基脲盐, 蒽环类抗生素, 玫瑰树碱, 以及类似物)。

计划在本发明的实施中应用的诊断试剂包括超声对比试剂, 放射对比试剂(如碘-辛烷, 卤卡班, 泛影葡胺, 以及类似物), 磁性对比试剂(如氟碳化合物, 脂溶性常磁化合物, paramagnetic, 以及类似物), 以及其他诊断试剂, 这些试剂如没有一些物理和/或化学修饰以调节

实际上不溶于水的性质则不能被很容易的输送。

计划在本发明的实施中应用的营养剂包括氨基酸，糖类，蛋白质，碳水化合物，脂溶性维生素(如维生素 A，D，E，K，以及类似物)，脂肪，或任何两种或两种以上的混合物。

A. 用高切变匀浆作用制备纳米颗粒

包含在一种根据本发明制备的聚合外壳中的药理活性物质和现有技术制备的蛋白微球体之间关键区别在于形成的性质和颗粒形成后蛋白的最终状态，以及可以负载水溶性很差或实际上水不溶性药物的能力。根据本发明，聚合物(如一种蛋白质)在高压匀浆器中暴露在高切变条件中可被交联。高切变力可用来将含有溶解或悬浮药理活性剂的分散剂驱散至一种任意含有巯基或二巯基的生物相容性聚合物(如白蛋白)的水溶液中，在此交联的聚合物外壳形成在非水介质的小滴周围。高切变条件可在液体中产生气穴作用，可使局部产生大量的热量，因此导致超氧离子的形成，通过氧化巯基残基(和/或使存在的二硫键断裂)能使聚合物发生交联形成新交联的二硫键。

与本发明的方法相比，现有技术的戊二醛交联方法是非特异性的，重要的是可以与蛋白质结构(如胺和氢氧根)中存在的任何亲核基团反应。现有技术所使用的热变性可明显的，不可逆的改变蛋白质结构。可以对比的是，通过本发明计划形成的二硫键不会使蛋白质变性。另外，包裹在外壳中的实际上水不溶性的药理活性物质颗粒与现有技术的交联或热变性蛋白微球体是不同的，因为本发明方法产生的聚合外壳与包被颗粒的直径相比是相对小的。已经确定(通过透射电镜)对于一个直径为 1 微米(1000 纳米)的包被颗粒其聚合包衣的“外壳厚度”大约为 25 纳米。可以对比的是现有技术的微球体不含蛋白外壳，但却有蛋白质分散在微球体体积中。

因此，根据本发明，一种药理活性物质溶解在一种合适的溶剂(如氯仿，二氯甲烷，乙酸乙酯，乙醇，四氢呋喃，二氧杂环乙烷，丁醇，乙酸丁酯，乙腈，丙酮，二甲亚砜，二甲酰胺，甲基吡咯烷酮，或类

似物，也可以的任何两种或更多种的混合物)。其他本发明计划在实施例中使用的溶剂包括大豆油，椰子油，橄榄油，红花油，棉籽油，芝麻油，橘油，柠檬油，C1-C20 醇，C2-C20 酯，C3-C20 酮，聚乙烯丙二醇，脂肪族碳水化合物，芳香烃碳水化合物，卤代烃碳水化合物和它们的混合物。

不同于常规的纳米颗粒制备方法，聚合物(如聚乳酸)是不溶解在溶剂中。在本发明组合物制备中使用的油相一般仅包括溶解在溶剂中的药理活性物质。

下一步，加入(加到水相中)一种蛋白(如人血清白蛋白)作为稳定形成纳米滴制剂的稳定剂。加入蛋白的浓度在大约 0.05 到 25%(w/v) 范围内，更好的是在大约 0.5%到 5%(w/v)的范围。不同于常规的纳米颗粒制备方法，混合物中不加入任何表面活性剂(如十二烷基硫酸钠，卵磷脂，吐温 80，非离子型表面活性剂 F-68，或类似物)。

下一步，在高压和高切变力的条件下通过匀浆作用形成一种乳剂。这种匀浆作用通常是在一种高压匀浆机中进行，一般操作压力范围是大约 3,000 到 60,000 磅/英寸² (psi)。这些过程优选在 6,000 到 40,000 磅/英寸² 的范围中进行的。得到的乳剂由非水溶剂的非常小的纳米滴(含有溶解的药理活性物质)和蛋白质稳定剂的非常小的纳米滴组成。匀浆作用允许的方法包括给予高切变和气穴作用的过程如高压匀浆作用，高切变混频器，超声，高切变推进器，以及类似物。

最后，溶剂在减压中蒸发以产生一种由蛋白质包被的药理活性物质和蛋白的纳米颗粒组成的胶体系统。允许的蒸发方法包括应用旋转式蒸发器，降落式薄膜蒸发器，喷雾干燥机，冷冻干燥机，以及类似物。超滤被用来去除溶剂。

随着溶剂的蒸发，液体悬液可被干燥以获得一种含有药理活性物质和蛋白的粉末。获得的粉末可以在任何方便的时候，重新加入到合适的水介质如盐水，缓冲盐水，水，缓冲水性介质，氨基酸溶液，

维生素溶液，碳水化合物溶液或类似物，也可以是任何两者或更多者的混合物中，以获得一种悬浮液，它可以对哺乳动物使用。计划获得这种粉末的方法包括冷冻干燥，喷雾干燥，以及类似方法。

根据本发明的另一项实施方案，提供了一种制备罕用的小的亚微米颗粒制剂(纳米颗粒)即颗粒直径小于 200 纳米的另一选择方法。这些颗粒能够在使用前以液体悬液的形式进行无菌过滤。本发明制剂制备过程的最终产物(即药物颗粒)能够无菌过滤的能力是非常重要的因为含有高浓度蛋白质(如血清白蛋白)的分散液通过常规方法如高压灭菌是不可能的。

为获得能够无菌过滤的颗粒(即颗粒<200 纳米)，药理活性物质开始是溶解在一种高浓度实际上水不易混合的有机溶剂(如在水中溶解度小于 5%的溶剂，如氯仿)中，因此形成一种含有药理活性物质的油相。合适的溶剂见上面所述。不同于常规制备纳米颗粒制剂的方法，聚合物(如聚乳酸)在溶剂中是不溶解的。在本发明制备过程中的油相仅含有溶解在溶剂中的药理活性物质。

下一步，一种水易混合性有机溶剂(如一种水溶解度大于 10%的溶剂，如乙醇)加入到油相中，终浓度为总有机相的大约 1%-99%v/v 范围之内，优选为 5%-25%。水易混合性有机溶剂选自下列溶剂如乙酸乙酯，乙醇，四氢呋喃，二氧杂环乙烷，乙腈，丁醇，丙酮，丙烯丙二醇，丙二醇，二甲亚砜，甲基吡咯烷酮，以及类似物。另一可选方法是，首先制备水易混合性溶剂与水不易混合性溶剂的混合物，然后将药理活性物质溶解在混合物中。

下一步，人血清白蛋白或上面述及的其他任何合适的稳定剂溶解在水性介质中。这种成分作为形成稳定纳米滴的稳定剂。根据需要足量的第一个有机溶剂(如氯仿)溶解在水相中直至饱和浓度。向饱和的水相中加入一个单独的，已定量的有机相(其中已含有药理活性物质，第一个有机溶剂和第二个有机溶剂)，使有机相的相比例在大约 0.5-15% v/v 之间，优选在 1%-8% v/v 之间。

下一步，在低切变力的条件下通过匀浆作用形成由微米滴和纳米滴组成的混合物。这可通过许多方法达到，就象它可很容易被文献中的那些技术所鉴定一样，如应用一种常规的实验室匀浆机，运转范围是大约 2,000 到 15,000rpm。然后在高压(即是大约 3,000 到 60,000 磅/英寸² 的范围内)下进行匀浆作用。获得的混合物由一种蛋白(如人血清白蛋白)质的水溶液，水不溶性药理活性物质，第一个溶剂和第二个溶剂组成。最后，溶剂在真空中迅速蒸发以获得一种胶体分散系统(药理活性物质和蛋白质)，其形式是可无菌过滤的非常小的纳米颗粒(即颗粒直径在大约 10 纳米到 200 纳米的范围内)。优选的颗粒大小范围是在大约 50 纳米到 170 纳米的范围内，这取决于制剂和操作参数。

根据本发明制备的胶体系统去除水，如通过在合适的温度-时间组合下冻干或喷雾干燥就可进一步转化成粉末。蛋白质(如人血清白蛋白)本身可作为一种冷冻保护剂或冻干保护剂，粉末通过添加水，盐水或缓冲液即可很容易被重构，不需应用常规的冷冻保护剂如甘露醇，蔗糖，氨基乙酸，以及类似物。虽然不需要，但如果希望的话，当然可以理解常规的冷冻保护剂可以加入到本发明制剂中。

药理活性物质的胶体系统允许高剂量的药理活性物质以相对小的量进行输送。这减小了病人因为接受大量液体的不适和医院驻留时间。另外，聚合外壳和包衣的壁一般在体内可被蛋白溶解酶(如，当聚合物是一种蛋白质)完全降解，因此输送系统基本没有副作用，这与以前的制剂造成的明显副作用形成鲜明对比。

多数生物相容性聚合物可被用来形成本发明的实施中包绕实际上水不溶性药理活性物质的聚合外壳。本质上不论天然或合成的，结构中任意含有巯基或二硫键的任何聚合物可用来制备一种二硫键交联的包绕在实际上药理活性物质颗粒周围的外壳。巯基或二硫键应预先存在于聚合物结构中或它们可通过合适的化学修饰引入。例如，天然聚合物如蛋白质，肽，多核苷酸，多糖类(如淀粉，纤维素，葡聚糖，

藻酸盐, 聚氨基葡萄糖, 胶质, 透明质酸, 以及类似物), 蛋白多糖, 脂蛋白, 等等, 均是这些修饰的候选物。

根据本发明计划用作稳定剂的蛋白质包括白蛋白(含有 35 半胱氨酸残基), 免疫球蛋白, 酪蛋白, 胰岛素(含有 6 个半胱氨酸残基), 血红蛋白(每个 $\alpha_2\beta_2$ 单位中含有 6 个半胱氨酸残基), 溶解酵素(含有 8 个半胱氨酸残基), 免疫球蛋白, α -2-巨球蛋白, 纤维结合素, 玻璃结合素, 纤维蛋白原, 脂肪酶, 以及类似物。蛋白质, 肽, 酶, 抗体以及它们的混合物, 都是本发明中计划使用的稳定剂的一般类别。

目前所述的用作稳定剂的蛋白质是白蛋白。优选的蛋白如 α -2-巨球蛋白, 一种已知的调理素, 可以用来增强巨噬样细胞对包被实际上水不溶性药理活性物质的外壳的摄取, 或是增强肝和脾对包被颗粒外壳的摄取。特异抗体也可以用来将纳米颗粒靶向特异的部位。其他功能性蛋白如可以促进生物物质靶向所需部位的抗体或酶也可以用来作为稳定蛋白的成分。

简单来说, 人工合成的聚合物也是形成含有聚合物外壳的颗粒的很好的候选物质。另外, 聚烯基乙二醇(如直链或支链), 聚乙烯醇, 聚丙烯酸酯, 聚羟乙基甲基丙烯酸酯, 聚丙烯酸, 聚乙基恶唑啉, 聚丙烯酰胺, 聚异丙基丙烯酰胺, 聚乙烯吡咯烷酮, 聚交酯/乙交酯, 以及类似物, 和它们的混合物, 均是本项发明中生物相容性聚合物的很好的候选物质。

简单来说, 人工合成的多肽也是实际上水不溶性药理活性剂稳定物质的很好的候选物质。另外, 计划在本发明实施中使用的物质诸如合成的含有半胱氨酸残基和/或二硫键的聚氨基酸; 含有自由巯基和/或二硫键修饰的聚乙烯醇; 含有自由巯基和/或二硫键修饰的聚甲基丙烯酸羟乙酯; 含有自由巯基和/或二硫键的修饰的聚丙烯酸; 含有自由巯基和/或二硫键的修饰的聚乙基恶唑啉; 含有自由巯基和/或二硫键的修饰的聚丙烯酰胺; 含有自由巯基和/或二硫键的修饰的聚乙烯吡咯烷酮, 含有自由巯基和/或二硫键的修饰的聚烯基乙二醇;

含有自由巯基和/或二硫键的修饰的聚交酯，聚乙交酯，聚己内酯，或它们的共聚物；还有任何两种或多种的混合物。

在本发明化合物的制备中，多种有机介质可用来悬浮或溶解实际上水不溶性药理活性物质。计划在本发明的实施中使用的有机介质包括任何能够悬浮或溶解药理活性物质的非水性液体，它既不能与产生外壳的聚合物起化学反应，也不能与药理活性物质本身起反应。实施例包括植物油(如大豆油，橄榄油，以及类似物)，椰子油，红花油，棉籽油，芝麻油，橘油，柠檬油精，含有 4-30 碳原子的脂肪族，脂环族或芳香烃碳水化合物(如 n-十二烷，n-癸烷，n-己烷，环己烷，甲苯，苯以及类似物)，含有 2-30 碳原子的脂肪族或芳香族醇(如辛醇，以及类似物)，含有 2-30 碳原子的脂肪族或芳香族酯类(如辛酸乙酯(Octanoate)，以及类似物)，含有 2-30 碳原子的烷基，芳基，或环醚(如二乙醚，四氢呋喃，以及类似物)，含有 1-30 碳原子的烷基或芳基卤化物(任意含一个以上的卤化替代物，如 CH_3Cl ， CH_2Cl_2 ， $\text{CH}_2\text{Cl}-\text{CH}_2\text{Cl}$ ，以及类似物)，含有 3-30 碳原子的酮类(如丙酮，甲基乙酮，以及类似物)，聚烯基乙二醇(如聚乙二醇，以及类似物)，或任何两种或以上的混合物。

计划在本发明的实施中使用的有机介质特别优选混合物的沸点不超过 200°C ，而且包括挥发性液体如二氯甲烷，氯仿，乙酸乙酯，苯，乙醇，丁醇，乙酸丁酯，以及类似物(也就是说，溶剂对于药理活性物质有高的溶解度，而且在其他应用的有机介质中也是可溶的)，同时还有更高分子量(挥发性较低)的有机介质。当加入到其他有机介质中时，这些挥发性添加剂可促进药理活性物质在有机介质中的溶解性。这是非常需要的，因为这一步一般是要消耗时间的。溶解后，挥发性成分通过蒸发作用去除(优选在真空下)。

以上述方法制备的与一种聚合外壳缔合的药理活性物质颗粒以生物相容性水相液体的悬液形式被输送。这种液体选自水，盐水，一种含有合适缓冲液的溶液，一种含有营养剂如氨基酸，糖类，蛋白质，碳水化合物，维生素或脂肪以及类似物的溶液。

这些生物相容性物质可以几种物理形式应用，如胶(交联或未交联的)以提供基质，从中可通过基质扩散和/或降解释放药理活性物质成分，如紫杉醇。温度敏感的物质也可以用作本发明的扩散基质。因此例如 Capxol™ 可以一种温度敏感物质的液体制剂注射(如聚丙烯酰胺的共聚物或聚烯基乙二醇共聚物和聚交酯/乙交酯)，该液体可在肿瘤部位形成胶并可缓慢释放 Capxol™。Capxol™ 制剂可以分散在上述及的生物相容性聚合物的基质中以提供可控释放的紫杉醇制剂，通过 Capxol™ 制剂(白蛋白缔合紫杉醇)的特性可对脑组织产生较低的毒性，同时如下所述对全身也产生较低的毒性。这种 Capxol™ 组合物或其他类似 Capxol™ 的化学治疗药物，与生物相容性聚合物基质一起对局部可控输送化学治疗药物以治疗脑和腹膜(卵巢癌)实体肿瘤，以及局部应用于其他实体肿瘤是有用的。这些复合的制剂并不限于紫杉醇的应用，可以应用于许多药理活性物质成分包括抗感染药，免疫抑制剂，其他化学治疗药物，以及类似物。

以上述方法制备的胶体颗粒实际上完全包被在一个聚合物稳定层中或可以在此描述的制备方法与其缔合，它是以纯的方式或优选在一种生物相容性介质中的悬液方式被输送。这种介质可选自水，缓冲水性介质，盐水，缓冲盐水，任意的氨基酸缓冲溶液，糖类缓冲溶液，任意的碳水化合物缓冲溶液，任意的维生素缓冲溶液，人工合成聚合物的缓冲溶液，含有脂类的乳剂，以及类似物。

另外，胶体颗粒能够用一种合适的试剂任意修饰，其中这种试剂是通过一个任意共价键与聚合层缔合。计划提供这种连接的共价键包括酯类，醚，聚氨酯，二酯，酰胺，仲胺或叔胺，磷酸酯，硫酸酯，以及类似物。计划为聚合外壳提供这种任意修饰的合适的试剂包括合成的聚合物(如聚烯基乙二醇(如直链或支链聚乙二醇)，聚乙烯醇，聚羟乙基甲基丙烯酸酯，聚丙烯酸，聚乙基恶唑啉，聚丙烯酰胺，聚乙烯吡咯烷酮，以及类似物)，磷脂(如磷脂酰胆碱(PC)，磷脂酰乙醇胺(PE)，磷脂酰肌醇(PI)，鞘磷脂，以及类似物)，蛋白质(如酶，抗体，以及类似物)，多糖(如淀粉，纤维素，葡聚糖，藻酸盐，聚氨基葡萄糖

糖，胶质，透明质酸，以及类似物)，化学修饰剂(如 5'-磷酸吡多醛，吡多醛衍生物，二醛，琥珀水杨酸酯，以及类似物)，或任何两种或以上的混合物。

稳定胶体颗粒的一般是可以发生变化的。药理活性物质的小颗粒在一种生物相容性分散剂中的悬液可以用来(在含有溶解生物物质的生物相容性分散剂的部位)产生一种含有生物物质的分散剂悬浮颗粒的聚合外壳。换言之，聚合外壳可含有一种生物物质的分散剂饱和溶液。另外一种变化是含有一种生物物质的固体核心的聚合外壳，这种核心的产生是通过开始在一种挥发性有机溶剂(如苯)中溶解生物物质，形成聚合外壳并在真空下蒸发挥发性溶剂，例如在蒸发器，喷雾干燥机，或冰冻干燥整个悬液。这样可以形成由一种聚合包衣包绕的一种有生物物质的固体核心。后面这种方法对于以相对小的容积输送大剂量的生物物质是特别有益的。在某些实施例中，围绕核心形成外壳的生物相容性物质本身可以是一种治疗性或诊断性试剂，如对于胰岛素，可以用上述方法形成聚合外壳的一部分进行输送。在其他实施例中，形成外壳的聚合物可以加入到生物物质的输送中，如对于靶向的抗体或血红蛋白，可以用上述的超声照射方法形成的一种聚合外壳的一部分进行输送，因此可以提供一种与氧有高度结合活性的血液替代物。

本领域熟练的技术人员将会认识到许多变化在本发明该方面的精神和范围之内是可能的。在聚合外壳内的有机介质可以变化，也可使用大量的药理活性物质，在聚合外壳壁的形成中也可以使用较宽范围的蛋白质和其他天然和合成的聚合物。其应用的范围也是非常广的。除了诸如药物的输送，诊断试剂(影像学应用)，人造血液和胃肠外营养剂，等生物医学的应用外，本发明的聚合外壳结构也可掺入到化妆品的使用中如皮肤霜剂或头发护理产品，香水的应用中，压力敏感性墨水，以及类似物中。

本发明的这一方面内容将参照下面非限制性实施例进行详细的说明。

实施例 1

通过高压匀浆作用制备纳米微粒

30 毫克紫杉醇溶解在 3.0 毫升二氯甲烷。溶液加入到 27.0 毫升人血清白蛋白溶液中(1% w/v)。混合物在每分钟转速较低条件下匀浆 5 分钟(Vitris 匀浆机, 型号: Tempest I.Q.)以形成粗的乳剂, 然后转移到高压匀浆机(Avestin)中。乳化在 9000-40,000 磅/英寸²的条件下进行, 将乳剂重复循环至少 5 次。获得的系统再转移到旋转式蒸发器中, 减压下 (30mmHg) 二氯乙烷在 40℃ 20-30 分钟迅速被去除。得到的分散液是透明的, 得到的紫杉醇颗粒一般直径在 160-220 纳米 (Z-average, Malvern Zetasizer)。

分散液在不添加任何冷冻保护剂的情况下进一步冻干 48 小时。得到的块状物可以通过添加无菌水或盐水很容易重构成原始分散液。重构后颗粒的大小与冻干前是相同的。

实施例 2

使用常规表面活性剂和蛋白质引起大晶体的形成

下面的实施例证实了常规的溶剂蒸发方法中使用表面活性剂的效果。实施一系列实验, 其程序与实施例 1 中所述相似, 只是在有机溶剂中加入一种表面活性剂如吐温 80(1%到 10%)。发现去除二氯甲烷后, 获得了平均大小为 1-2 微米的大量紫杉醇晶体 (在光学显微镜和偏振光下观察)。在几小时内晶体长大, 形成非常大的针样晶体, 大小在大约 5-15 微米的范围内。相似的现象在其他普遍使用的表面活性剂中也可观察到, 这些表面活性剂如 Pluronic F-68, Pluronic F-127, Cremophor EL 和 Brij 58。

从这些结果可以得出结论, 常规表面活性剂的常规溶剂蒸发方法与蛋白如白蛋白一起使用, 不适合没有聚合核心的、同时使用一种极性溶剂(如二氯甲烷)的亚微米药物颗粒(如紫杉醇)的形成。

实施例 3

单独使用常规表面活性剂导致形成大晶体

这个实施例证实了在使用常规表面活性剂时，没有一个聚合核心物质，可溶解在极性的水不易混合性溶剂(如氯仿)的药理活性物质是不可能形成纳米颗粒。

30 毫克紫杉醇溶解在 0.55 毫升氯仿和 0.05 毫升乙醇中。溶液加入到 29.4 毫升预先以 1%氯仿饱和的吐温 80 溶液(1% w/v)中。混合物在每分钟转速较低的条件匀浆 5 分钟(Vitris 匀浆机, 型号: Tempest I.Q.)以形成粗的乳剂, 然后转移到高压匀浆机(Avestin)中。乳化在 9000-40,000 磅/英寸²的条件下进行, 将乳剂重复循环至少 6 次。获得的系统再转移到旋转式蒸发器中, 氯仿在 40℃, 减压(30 毫米汞柱)下 15-30 分钟即可迅速被去除。得到的分散液是不透明的, 并含有大量的针样药物晶体。晶体的初始大小(也通过偏振光观察)是 0.7-5 微米。分散液在室温下储存几小时后其晶体大小进一步增加, 最终析出为沉淀。

实施例 4

小于 200 纳米的可无菌过滤的纳米颗粒的制备

这个实施例描述了可获得可无菌过滤的药物颗粒的一个方法。因此 30 毫克紫杉醇溶解在 0.55 毫升氯仿和 0.05 毫升乙醇中, 溶液加入到 29.4 毫升预先以 1%氯仿饱和的人血清白蛋白溶液中(1% w/v)。混合物在每分钟转速较低的条件匀浆 5 分钟(Vitris 匀浆机, 型号: Tempest I.Q.)以形成粗的乳剂, 然后转移到高压匀浆机(Avestin)中。乳化在 9000-40,000 磅/英寸²的条件下进行, 将乳剂重复循环至少 6 次。获得的系统再转移到旋转式蒸发器中, 氯仿在 40℃, 减压(30 毫米汞柱)下 15-30 分钟即可迅速被去除。得到的分散液是透明的, 所得到的颗粒一般直径为 140-160 纳米(Z-平均, Malvern Zeta Sizer)。分散液通过一个 0.22 微米的微孔滤器(Millipore)进行过滤, 混浊性或

颗粒大小没有任何改变。紫杉醇含量的 HPLC 分析显示超过 97%的紫杉醇过滤后可回收，因此可提供一种无菌的紫杉醇分散液。

无菌的分散液在不添加任何冷冻保护剂的情况下进一步冻干 48 小时。得到的块状物可以通过添加无菌水或盐水很容易地重构成原始分散液。重构后颗粒的大小与冻干前相同。

实施例 5

小于 200 纳米的可无菌过滤的纳米微粒的制备

这个实施例描述了可获得可无菌过滤的药物颗粒的一个方法。因此 225 毫克紫杉醇溶解在 2.7 毫升氯仿和 0.3 毫升乙醇中，溶液加入到 97 毫升人血清白蛋白溶液中(3% w/v)。混合物在每分钟转速较低的条件匀浆 5 分钟(Vitris 匀浆机，型号：Tempest I.Q.)以形成粗的乳剂，然后转移到高压匀浆机(Avestin)中。乳化在 9000-40,000 磅/英寸²的条件下进行，将乳剂重复循环至少 6 次。获得的系统再转移到旋转式蒸发器中，氯仿在 40℃，减压 (30 毫米汞柱)下 15-30 分钟即可迅速被去除。得到的分散液是透明的，所得到的颗粒一般直径为 140-160 纳米(Z-平均, Malvern Zeta Sizer)。分散液通过一个 0.22 微米的微孔滤器(Millipore)进行过滤，混浊性或颗粒大小没有任何改变。紫杉醇含量的 HPLC 分析显示依靠所使用的条件一般 70-100%的紫杉醇过滤后可回收。因此可获得一种无菌的紫杉醇分散液。

无菌的分散液在无菌条件下装入无菌玻璃瓶中，并且不需添加任何冷冻保护剂进行冻干。得到的块状物可通过添加无菌水或盐水重构成原始的分散液。重构后颗粒的大小与冻干前是相同的。

实施例 6

有机溶剂的相比对颗粒大小的影响

下面的实施例证实了在系统中有机溶剂的异常低的相比的重要性。

因此进行的一系列实验除了改变有机溶剂的相比比例以外，其他与实施例 4 所述的程序相似，乙醇在有机相中的含量维持在 10%v/v。发现增加相比比例可以明显增加颗粒的大小：在 4%v/v 相比比例下(超过饱和浓度，或 5% v/v 总氯仿浓度)得到的颗粒直径为 250 纳米；在 3%v/v 相比比例下，颗粒大小为直径 200 纳米，在 2%v/v 相比比例，颗粒直径为 150 纳米。

很明显，只有在较低相比比例的情况下制备的颗粒可以无菌过滤。

实施例 7

药物浓度对颗粒大小的影响

以下的实施例将证实有机相中药物的浓度的作用。进行两个实验，其中紫杉醇在有机相中的浓度为 50 毫克/毫升或 75 毫克/毫升，而其他参数与实施例 2 中所述的相同。发现较低的药物浓度可生成直径大约为 150 纳米的颗粒，而较高浓度则生成更小的颗粒，即 130-138 纳米。当进行一个类似的实验，但有机相中的乙醇浓度大约为 50%，也可观察到类似的趋势，即，当药物浓度为 25 毫克/毫升和 50 毫克/毫升时，颗粒直径分别为 210 纳米和 156 纳米。

这些发现直接与前面引用的 Sjostrom 等的关于在表面活性剂存在下纳米颗粒形成的报道相左。

实施例 8

模型药物纳米颗粒的形成

30 毫克异利血平(一种模型药物)溶解在 3.0 毫升二氯甲烷中。溶液加入到 27.0 毫升人血清白蛋白溶液中(1% w/v)。混合物在每分钟转速较低的条件匀浆 5 分钟(Vitris 匀浆机，型号：Tempest I.Q.)以形成粗的乳剂，然后转移到高压匀浆机(Avestin)中。乳化在 9000-18,000 磅/英寸²的条件下进行，同时将乳剂重复循环至少 5 次。获得的系统

再转移到旋转式蒸发器中，二氯甲烷在 40℃，减压(30 毫米汞柱)下 20-30 分钟即可迅速被去除。得到的分散液是透明的，所得到的颗粒一般直径为 120-140 纳米(Z-平均, Malvern Zeta Sizer)。分散液通过一个 0.22 微米的微孔滤器(Millipore)进行过滤。

无菌的分散液在不添加任何冷冻保护剂的情况下进一步冻干 48 小时。得到的块状物可以通过添加无菌水或盐水很容易重构成原始分散液。重构后颗粒的大小与冻干前是相同的。

实施例 9

用模型药物形成非常小颗粒

证实添加乙醇对减小异利血平颗粒大小的影响。因此 30 毫克异利血平溶解在 2.7 毫升二氯甲烷和 0.3 毫升乙醇中。溶液加入到 27.0 毫升人血清白蛋白溶液中(1% w/v)。混合物在每分钟转速较低的条件 下匀浆 5 分钟(Vitris 匀浆机, 型号: Tempest I.Q.)以形成粗的乳剂, 然后转移到高压匀浆机(Avestin)中。乳化在 9000-40,000 磅/英寸² 的条件下进行, 将乳剂重复循环至少 5 次。获得的系统再转移到旋转式蒸发器中, 二氯甲烷在 40℃, 减压(30 毫米汞柱)下 20-30 分钟即可迅速被去除。得到的分散液是透明的, 所得到的颗粒一般直径为 90-110 纳米(Z-平均, Malvern Zeta Sizer)。分散液通过一个 0.22 微米的微孔滤器(Millipore)进行过滤。

无菌的分散液在不添加任何冷冻保护剂的情况下进一步冻干 48 小时。得到的块状物可以通过添加无菌水或盐水很容易重构成原始分散液。重构后颗粒的大小与冻干前是相同的。

实施例 10

单独使用药物过饱和的水易混合性溶剂-不适合本发明方法

30 毫克紫杉醇溶解在 0.6 毫升乙醇中。在这个浓度(50 毫克/毫升)紫杉醇是不完全溶解的, 并形成一种过饱和分散液。分散液加入到 29.4

毫升人血清白蛋白溶液中(1% w/v)。混合物在每分钟转速较低的条件
下匀浆 5 分钟(Vitris 匀浆机, 型号: Tempest I.Q.)以形成粗的乳剂,
然后转移到高压匀浆机(Avestin)中。乳化在 9000-40,000 磅/英寸²的
条件下进行, 将乳剂重复循环至少 6 次。获得的系统再转移到旋转式
蒸发器中, 乙醇在 40℃, 减压(30 毫米汞柱)下 15-30 分钟即可迅速
被去除。得到的分散液颗粒大小范围非常宽, 从 250 纳米到几微米。

在显微镜下的观察揭示了存在大颗粒和典型针状的紫杉醇晶
体。这些颗粒太大以至不能静脉注射。这个实验证实了使用乙醇等可
容易与水混合的溶剂在本发明方法中可以引起大型颗粒的形成, 其大
小分布范围非常宽, 因此在本发明方法中不能单独使用。因此本发明
方法在单独用作药物成分的溶解或分散时特别排除了水易混合性溶剂
的使用。本发明方法需要这样的溶剂, 即当使用时, 必须能与水不易
混合性溶剂相混合以允许产生本发明的纳米颗粒。

实施例 11

单独使用含有溶解药物的水易混合性溶剂-不适合于本发明方法

30 毫克紫杉醇溶解在 1.3 毫升乙醇中。在这个浓度(大约 24.5 毫
克/毫升)紫杉醇是完全溶解的。溶液加入到 28.7 毫升人血清白蛋白溶
液中(1% w/v)。混合物在每分钟转速较低的条件匀浆 5 分钟(Vitris
匀浆机, 型号: Tempest I.Q.)以形成粗的乳剂, 然后转移到高压匀浆
机(Avestin)中。乳化在 9000-18,000 磅/英寸² (psi) 的条件下进行,
将乳剂重复循环至少 6 次。获得的系统再转移到旋转式蒸发器中, 乙
醇在 40℃, 减压(30 毫米汞柱)下 15-30 分钟即可迅速被去除。得到
的分散液颗粒大小范围非常宽, 从 250 纳米到几微米。在显微镜下的
观察揭示了存在大颗粒和典型针状的紫杉醇晶体。这些颗粒太大以至
不能静脉注射。

这个实施例, 在上述实施例 10 之外, 证实了使用乙醇等可容易
与水混合的溶剂在本发明方法中可以引起大型颗粒的形成, 其大小分
布范围非常宽, 因此本发明方法中不能单独使用。因此本发明方法在

单独用作药物成分的溶解或分散时特别排除了水易混合性溶剂的使用。本发明方法需要这样的溶剂，即当使用时，必须能与水不易混合性溶剂相混合以允许产生本发明的纳米颗粒。

实施例 12

通过 X 线粉末衍射判断纳米颗粒形式中紫杉醇的物理状态

紫杉醇粗原料通常是以不同大小的针样晶体存在的，其大小典型的是在 5-500 微米。在静脉注射用的药物制剂中晶体的存在明显是有害的，如果存在的晶体大小超过几微米则有阻塞在毛细血管的潜在危险。另外，药物晶体的溶解性通常比无定形药物小得多，因此在静脉注射后会降低药物的生物利用度。众所周知当一种制剂中药物的分量增加，晶化也随之增加。因此含有本质上无定形的药物的制剂是有好处的。

X 线粉末衍射可以用来判定在冻干粉末制剂中紫杉醇的结晶或非结晶特性。对下面的样品进行分析：样品 1-紫杉醇粉末；样品 2-冻干血清白蛋白；样品 3-一种紫杉醇和白蛋白的物理混合物；和样品 4-紫杉醇制剂。每个样品利用 CuK α 放射线从 2° 到 70° 的 2- θ 角进行 X 线照射，加速电压为 40 千电子伏特/30 毫安 (40/Kev/30mA)，一步大小为 0.05° 2- θ ，一个数据采集时间为每步 2.0 秒。样品 1 显示了一个晶体样品典型的强峰。大多数强的紫杉醇峰定位于 5.1° 2- θ 。样品 2 显示了无定形物质典型的宽带隆起，但另外可见到在 5.1° 2- θ 的紫杉醇峰。样品 4 紫杉醇制剂没有显示出紫杉醇具有晶化特性的证据，而且如出现在样品 2 的一样，提示在制成的样品中有实际上无定形药理活性物质的存在。

根据本发明生成的纳米颗粒的无定形特性与以往文献中描述的其他制备纳米颗粒方法生成的产物形成了对比。例如，研磨技术的应用，如在美国专利 5,145,684(Liversidge 等)所述，和 Liversidge-Merisko 等在 *Pharmaceutical Research*, 13(2):272-278 (1996)中所述，生成一种实际上晶化的产物。

实施例 13

通过高压匀浆作用制备环孢菌素(静脉用环孢菌素)纳米颗粒

30 毫克环孢菌素溶解在 3.0 毫升二氯甲烷中。然后溶液加入到 27.0 毫升人血清白蛋白溶液中(1% w/v)。混合物在每分钟转速较低的条件匀浆 5 分钟(Vitris 匀浆机, 型号: Tempest I.Q.)以形成粗的乳剂, 然后转移到高压匀浆机(Avestin)中。乳化在 9000-40,000 磅/英寸²的条件下进行, 将乳剂重复循环至少 5 次。获得的系统再转移到旋转式蒸发器中, 二氯甲烷在 40℃, 减压(30 毫米汞柱)下 20-30 分钟即可迅速被去除。得到的分散液是透明的, 所得到的颗粒一般直径为 160-220 纳米(Z-平均, Malvern Zeta Sizer)。

分散液在不添加任何冷冻保护剂的情况下进一步冻干 48 小时。得到的块状物可以通过添加无菌水或盐水很容易重构成原始分散液。重构后颗粒的大小与冻干前是相同的。

实施例 14

通过高压匀浆作用制备环孢菌素(口服用环孢菌素)纳米颗粒

30 毫克环孢菌素溶解在 3.0 毫升合适的油(含有 10%橘油的芝麻油)中。然后溶液加入到 27.0 毫升人血清白蛋白溶液中(1% v/w)。混合物在每分钟转速较低的条件匀浆 5 分钟(Vitris 匀浆机, 型号: Tempest I.Q.)以形成粗的乳剂, 然后转移到高压匀浆机(Avestin)中。乳化在 9000-40,000 磅/英寸²的条件下进行, 将乳剂重复循环至少 5 次。所得到的分散液典型直径是 160-220 纳米(Z-平均, Malvern Zeta Sizer)。

分散液可以直接干燥或冻干 48 小时, 任意加入合适的冷冻保护剂。得到的块状物可以通过添加无菌水或盐水很容易重构成原始分散液。

实施例 15

抗哮喘药物的吸入制剂

抗哮喘药可用微颗粒技术制备以产生干粉吸入器(DPI)使用的有效制剂。开始以一类固醇药物(如倍氯米松, 二丙酸倍氯米松, 布地奈德, 地塞米松, 氟尼缩松, 丙酮曲安奈德, 以及类似物), 制备的干燥制剂具有合适颗粒大小和释放特性, 可以保证在呼吸系统有效的输送。

利用超声技术或匀浆作用使活性药物溶解在溶剂中的制备的制剂可分散到一种蛋白质水溶液中形成一种纳米颗粒的乳剂。这种乳剂然后被蒸发以去除溶剂, 留下包被蛋白质的活性药物在溶液中。含有胶体药物颗粒的这种液体样品可以用 Malvern Zetasizer 进行测定, 得出 Z-平均大小为 260 纳米。在优选的实施例中, 这些胶体颗粒的大小范围是大约 50-1,000 纳米, 更优的是在大约 70-400 纳米。

在这种液体形式, 其他赋形剂均可溶解。这些赋形剂包括(但不限于此)甘露醇 0.5-15%, 乳糖 0.1-5%, 和麦芽糊精。在这一阶段, 得到的活性药物, 蛋白质和赋形剂的溶液可以喷雾干燥或冻干和搅拌生成一种干粉。喷雾干燥后, 干燥颗粒的大小由 Malvern Mastersizer 确定为大约 1-10 微米的 D(v.0.5)。这些颗粒的优选大小为 0.5-15 微米, 更优的范围是 0.7-8 微米。

这种喷雾干燥的粉末然后与赋形剂载体粉末混合。此外, 可用几种载体, 包括乳糖, 海藻糖, Pharmatose 325M, 蔗糖, 甘露醇, 以及类似物。载体粉末的大小明显大于制成的药物颗粒(乳糖为大约 63-90 微米, Pharmatose 为 40-100 微米)。

干粉制剂的效能可通过一种 Andersen 八道尘埃粒度分布测定装置测定证实。测定装置的结果显示很小颗粒的比例(FPF)为约 60%。这表明颗粒有较高的有效释放, 其大小适合在呼吸系统沉积。这种 FPF 令人惊奇的高, 它是含有包含在更大制剂颗粒中的药物胶体纳米颗粒

的制剂组合物的结果。

这种制剂显示了微小颗粒在加工和组成用于经 DPI 气溶剂输送的干粉制剂时喷雾干燥技术的有用性。显示的高 FPF 结果表明了有效性和有希望成为 DPI 制剂。

实施例 16

目前优选的制造方法的总结：以 1 克紫杉醇作为 BDS 开始

制备 3%HAS 溶液。在 51.7 毫升 25%人血清白蛋白 (Albutein) 中加入 379.3 毫升水以供注射用。溶液完全混合并通过一种无菌 0.22 微米 Nalgene 一次性过滤器过滤。保持在 4°C 直到使用。

称量 1.0 克紫杉醇于一玻璃瓶中。在瓶中以合适的比例与 CHCl_3 和乙醇混合。充分混合。将 13.33 毫升氯仿/乙醇混合物加入到紫杉醇中。振荡以保证所有紫杉醇溶解在溶液中。将这些溶液通过 0.22 微米无菌 Teflon 滤器过滤并收集在一个无菌玻璃瓶中。

将 HAS 溶液加入到在玻璃瓶中溶解的紫杉醇溶液。使用 Sentry 微电脑混合器混合紫杉醇/HAS 溶液。当溶液混合后，将所有成分倒入匀浆机的室中。通过匀浆机在一定压力下使混合物旋转直至得到所需大小的颗粒。收集匀浆样品于一个无菌的 Kontes 圆底瓶。

将盛有最终样品的瓶子置入旋转式蒸发器中。在旋转式蒸发器中打开真空并旋转至最大，将有机溶剂蒸发。这可产生紫杉醇的人白蛋白胶体溶液。留出约 3 毫升旋转蒸发的样品以供分析颗粒大小。

在无菌帽下，使用无菌 0.45/0.2 微米滤器过滤胶体溶液并收集在无菌收集瓶中。留出约 3 毫升样品以供 HPLC 分析紫杉醇浓度。

确定每瓶获得 30 毫克(或其他导入量)紫杉醇所需的注入量。将

无菌过滤的样品注入经高压灭菌的 Wheaton 30 毫升瓶中，每瓶大约 17 毫升(基于实验)。用经高压灭菌的 Wheaton 血清瓶塞将瓶盖上。每瓶应含有大约 30 毫克紫杉醇。

将样品在 FTS 系统阻塞盘状冷冻干燥机上使用预定的冻干循环进行冻干。样品冻干后，盖上瓶盖，用 20 毫米 Wheaton 铝撕脱的无沿帽使其弯曲封住瓶口。适当标记样品。整个过程在干净的室内环境无菌条件下进行。

冻干的样品含有残余溶剂小于 1000ppm，优选小于 500ppm，或甚至小于 100ppm。

最后的产品无菌过滤：在通过蒸发去除溶剂后，瓶中的紫杉醇胶体溶液通过 0.45/0.2 微米无菌滤器一起进行过滤。过滤的溶液收集在一个无菌烧杯中并在无菌下注入 30 毫升瓶中。瓶子然后放置在冷冻干燥机中。完成干燥循环后瓶子置入干燥无菌氮气中并在其中封盖。

应注意的是高压匀浆过程可用来破裂和杀灭细菌和其他细胞以提取其成分。

实施例 17

使用超声形成纳米颗粒

含有油的蛋白外壳的制备

与使用高切变的匀浆作用相似，使用超声以形成蛋白质包被的水不溶性药理活性物质纳米颗粒被认为是通过形成分子间二硫键交联蛋白质作用的。前面已述及的高切变匀浆技术有许多优于现有技术的优点，它们与下面所述的超声方法是相同的。

关于可用在超声方法中的有机溶剂，蛋白质和非蛋白聚合物，对关于高切变匀浆方法的那些前面已述及的成分已成为参考。所有同

样的成分可期望在两种方法中同样可以很好的发挥作用。

本发明的这个方面现在将以下面非限制性实施例进行详细的描述。

3 毫升 USP(美国药典)的 5%人血清白蛋白溶液(Alpha Therapeutic Corporation)置入一个柱状容器中，可以贴附在一个超声探头上(Heat Systems, 型号 XL2020)。白蛋白溶液以 6.5 毫升 USP 级大豆油(黄豆油)覆盖。超声探头的尖端放在两种溶液的界面上，在 20℃冷浴中维持此装置。超声机打开 30 秒，系统进行平衡。充分混合并获得一种乳白色的悬浮液。悬液用生理盐水以 1: 5 的比例稀释。一种颗粒计数器用来确定尺寸的分布和含油蛋白质外壳浓度。得到的蛋白质外壳被确定其最大横切面尺寸为 1.35 ± 0.73 微米，原始悬液的总浓度为约 10^9 外壳/毫升。

作为对照，不含蛋白质的上述成分当经受超声照射时不会形成稳定的微乳剂。这个结果提示蛋白质对微球体的形成是不可缺少的。这也被下面所述的扫描电镜和透射电镜研究证实。

实施例 18

含有溶解紫杉醇的聚合外壳的制备

紫杉醇溶解在 USP 级大豆油中，浓度为 2 毫克/毫升。3 毫升的 USP5%人血清白蛋白溶液置入柱状容器中，此容器可贴附在一个超声探头上。白蛋白溶液以 6.5 毫升大豆油/紫杉醇溶液覆盖。超声探头的尖端放置在两种溶液的界面上，在平衡维持这样的装置，超声机打开 30 秒。充分混合并获得一种稳定的乳白色悬液，该悬液含有蛋白质壁的聚合外壳，里面封入有油/紫杉醇溶液。

为了在交联的蛋白质外壳中获得更高含量的药物，一种可与油和药物共溶的溶剂(药物在其中有相当高的溶解度)与油混合。假设此溶剂是相对无毒性的(如乙酸乙酯)，它可以与原始载体一起注射。在

其他例子中，在聚合外壳制备后它可以通过在真空下液体蒸发被去除。

已经认识到几种不同的方法可以用来获得本发明制剂的物理特性。与此制剂在特殊器官部位(前列腺，肺，胰腺，骨，肾，心)有较高局部浓度有关的生物学特性以及与低毒性(LD₅₀ 的人增加，降低骨髓抑制，降低脑毒性)相关的高效能与制备的方法是无关的。

实施例 19

使用超声制备纳米颗粒

20 毫克紫杉醇溶解在 1.0 毫升二氯甲烷。溶液加入到 4.0 毫升人血清白蛋白(5% w/v)。混合物在低每分钟转速的条件(Vitris 匀浆机，型号：Tempest I.Q.)下匀浆 5 分钟以获得一种粗的乳剂，然后转移到一个 40kHz 的超声机槽中。超声在 0 度 60-90%功率的条件下作用 1 分钟(550 Sonic Dismembrator)。混合物转移到旋转式蒸发器中，二氯甲烷在 40℃，减压(30 毫米汞柱)下 20-30 分钟可迅速被去除。得到的颗粒一般直径为 350-420 纳米(Z-平均, Malvern Zeta Sizer)。

分散液在不添加任何冷冻保护剂的情况下进一步冻干 48 小时。得到的块状物可以通过添加无菌水或盐水很容易重构成原始分散液。重构后颗粒的大小与冻干前是相同的。

实施例 20

含荧光团的交联蛋白外壳的体内生物分布

为确定包裹在蛋白聚合外壳内的液体在静脉注射后的摄取和生物分布，一种荧光染料（红荧烯，可从 Aldrich 得到）被裹入人血浆白蛋白（HSA）聚合外壳内并被作为标记物。于是，红荧烯被溶于甲苯内，含甲苯/红荧烯的白蛋白外壳如上所述用超声照射方法制备。得到的混浊悬液在生理盐水中稀释 5 倍。然后，将 2ml 稀释的悬液在 10 分钟内注入大鼠尾静脉。注射 1 小时后处死一只动物，24 小时

后处死另一只。

100 微米的肺、肝、肾、脾和骨髓冰冻切片，在荧光显微镜下检测存在的聚合外壳包裹的荧光染料或释放的染料。在 1 小时，大多数聚合外壳看起来是完整的（即，表现为约 1 微米直径的明亮荧光颗粒），并位于肺和肝内。在 24 小时，染料可在肝、肺、脾和骨髓内观察到。还观察了组织的总体染色，表明聚合外壳的外壳壁已被消化，染料从中释放出来。结果与预期一致，表明发明的成分在延迟或控制包裹的药剂如紫杉醇，释放方面有潜在用途。

实施例 21

含豆油（SBO）的聚合外壳的毒性

含豆油的聚合外壳如实施例 15 所述制备。得到的悬液在生理盐水中稀释以产生两种不同的溶液，一种含 20% SBO，另一种含 30% SBO。

脂肪乳剂（莫脱利匹特），一种全胃肠外营养药商品，含 20% SBO。小鼠脂肪乳剂的 LD₅₀ 是 120ml/kg，或对 30 克的小鼠以 1cc/min 注射约 4ml。

用含 SBO 的发明成分处理如下两组小鼠（每组三只，每个鼠重约 30 克）。每个小鼠被注射 4 ml 含 SBO 聚合外壳的制备悬液。一个组的每个成员接受含 20% SBO 的悬液，而另一组的成员接受含 30% SBO 的悬液。

接受含 20% SBO 悬液组内的所有三只小鼠均在处理后继续生存，且在 SBO 处理一周后观察时，任何组织或脏器未表现出显著的毒性。仅在接受含 30% SBO 悬液组的三只小鼠中有一只在注射后死亡。这些结果明显表明，同商用 SBO 制剂（脂肪乳剂）相比，按照本发明所得的聚合外壳内含的油，在其 LD₅₀ 剂量时是无毒的。此效果可归因于油从聚合外壳内的缓慢释放（即，适于生物利用的控制速

度)。与用商用乳剂获得的高油剂量相反，这种缓慢释放防止达到油的致死剂量。

实施例 22
从聚合外壳释放的豆油的体内生物利用度

为测定将聚合外壳悬液注入大鼠血流后，聚合外壳包裹物质的缓慢或持续释放，进行了一个试验。用上述的声处理方法制备含豆油（SBO）的交联蛋白（白蛋白）作壁的聚合外壳。得到的含油聚合外壳悬液在盐水中稀释至含 20%油的终悬液。5 ml 此悬液经插管用 10 分钟注入大鼠颈外静脉。在注射后的数个时间点采集这些大鼠的血液，并采用常规分析测定血液中的甘油三酯水平（豆油主要是甘油三酯）。

5 ml 商用脂肪乳剂（莫脱利匹特，一种水状的胃肠外营养药…含 20%豆油，1.2%卵黄磷脂和 2.25%甘油）被用作对照。对照物应用卵磷脂作为乳化剂以稳定乳剂。比较两种情况下甘油三酯血浆的水平，可以时间的函数方式直接比较油的生物利用度。除含 20%油的聚合外壳悬液外，还注射了终浓度为 30%油的含油聚合外壳盐水标本 5 ml。三组中，各组用两只大鼠。各例的血液甘油三酯水平列于表 1，给出单位为 mg/dl。

表 1

组	血浆甘油三酯（mg/dl）					
	前	1hr	4hr	24hr	48hr	72hr
脂肪乳剂对照 （20%SBO）	11.4	941.9	382.9	15.0	8.8	23.8
聚合外壳 （20%SBO）	24.8	46.7	43.8	29.3	24.2	43.4
聚合外壳 （30%SBO）	33.4	56.1	134.5	83.2	34.3	33.9

注射前血液水平显示于标‘前’的栏内。显然，对于脂肪乳剂对照组，注射后甘油三酯水平非常高。然后，甘油三酯水平经过 24 小时降到注射前水平。因此，看起来油在注射后可即刻为代谢所用。

含有与脂肪乳剂（20%）相同总油量的含油聚合外壳悬液，显示了血浆可检测甘油三酯的显著不同的可用性。其水平升高到约两倍正常值并保持此水平数小时，表明甘油三酯在相当接近正常的水平缓慢或持续地释放入血液。接受有 30%油的含油聚合外壳组显示了较高的甘油三酯水平（同较高的注射剂量一致）并在 48 小时内降至正常。再一次地，同接受脂肪乳剂的对照组相比，此组的甘油三酯血液水平没有极大地升高。这再一次表明，发明成分中油的缓慢和持续的可用性，这样就有利于避免含在聚合外壳内的物质达到危险的高血液水平，并在可接受的水平更长久地保持可用性。显然，装在本发明聚合外壳内的输送的药物也可获得这些同样的长处。

这种含豆油的聚合外壳系统可悬浮在氨基酸、必需电解质、维生素和糖的水溶液中以形成全胃肠外营养（TPN）药物。这种 TPN 用目前所用的脂肪乳剂（如，莫脱利匹特）是不能调配的，因为在存在电解质的情况下，乳剂是不稳定的。

实施例 23

含固态药理活性剂核心的蛋白壁聚合外壳的制备

输送聚合外壳内难溶于水的药物（如紫杉醇），的另一种方法是制备包被固体药物核心的聚物质外壳。这样一种‘蛋白包衣’的药物颗粒可按下述方法获得。用有机溶剂重复实施例 16 所描述的步骤，以较高的浓度溶解紫杉醇。通常所用的溶剂是有机物，如苯、甲苯、己烷、乙醚、氯仿、酒精等。聚合外壳按实施例 15 所述方法制造。5 ml 含溶解紫杉醇的聚合外壳混浊悬液在生理盐水中稀释至 10 ml。将此悬液置于旋转式汽化器中，由真空去除挥发性有机物。生成物悬液在显微镜下检查，表现为不透明的核心，表明基本上去除了全部有机溶剂，存在固态紫杉醇。悬液可被冷冻，并无限期保存和直

接使用或在晚些时冻干。

另一方面，含有机溶剂溶解的药物核心的聚合外壳被冷冻干燥以获得干燥疏松的粉剂，该粉剂可在使用时在盐水（或其他适合的液体）中重新悬浮。尽管目前用于组成聚合外壳的蛋白优选白蛋白，其他蛋白如 α -2-巨球蛋白，一种已知的调理素，可用于增加聚合外壳被巨噬细胞样细胞的摄取。可选择地，像 PEG 样的分子可掺入颗粒内制造聚合外壳，以延长体内循环时间。

实施例 24

用自发微乳状液形成超微颗粒

不用声处理、高剪切匀浆或其他高能技术也能形成超微颗粒。因此，如果需要，可以形成基本是纯药的悬液（或干粉）。

微乳状液是一热力学稳定的乳状液系统，它是在不用高剪切设备或其他大幅度搅拌的情况下，当其组分开始接触时即自动形成。微乳状液基本上是不混浊的，即它们是透明或半透明的。微乳状液包括一个分散液，其中典型的微滴尺寸小于 1000 埃（Å），因此构成其视觉的透明性。微乳状液中的微滴一般为球形，虽然其他结构如长圆柱形是可行的。（进一步讨论见，如，Rosof，表面和膜科学进展（*Progress in Surface and Membrane Science*），12: 405，Academic Press（1975），Friberg，分散科学和技术（*Dispersion Science and Technology*），6: 317（1985）。）

如下所示本发明应用微乳状液的独特特性在于去除油相后作为获得极小超微颗粒的第一步。

如前面所述，微颗粒和超微颗粒可通过不同方法形成，其中有溶剂蒸发方法。原则上，此方法基于在有表面活性剂存在的同时，用各种设备如旋转定子搅拌器、超声破碎器、高压匀浆器、胶体磨等产生高剪切力而形成简单的水包油乳剂。在形成了这种包含有溶解在分散

的油微滴内的聚合物和药物乳剂后，一般在低压和高温下，通过蒸发去除油相，就形成了溶解药物和聚合物的微颗粒和超微颗粒。明显地，颗粒大小依赖于乳剂微滴的大小；微滴愈小，得到的颗粒愈小。只有应用非常高的能量才能得到小的乳剂微滴，即使那样，用最先进的高压匀浆器如 Microfluidizer，要得到低于 75nm 的乳剂微滴也是无用的。因为乳剂本身是非稳定系统，并进行着诸如聚合和微滴聚结的过程，这种乳剂的溶剂蒸发过程可能会导致较大颗粒的产生。

所述新方法，克服了常规乳剂应用溶剂蒸发方法所伴随的问题，该方法由下述步骤组成：

a. 将不溶于水的药物溶解在有较低水溶性而比水有较高蒸汽压的溶剂内。原则上，药物在没有附加的聚合粘合剂的条件下溶解，尽管这种粘合剂能够使用。

b. 用适当的表面活性剂和水溶性辅助表面活性剂与溶剂混合。

c. 将适当量的水或水溶液加入到所述混合物中，于是，无需使用任何高剪切设备，就自动形成了水包油的微乳状液。水溶液可包含电解质、氨基酸、或其他任何在第一制备阶段可影响微乳状液形成的添加剂。

d. 把蛋白溶液选择性地添加到微乳状液中。

e. 在低压下，通过蒸发去除溶剂，于是形成了极其小的非晶形超微颗粒的药物沉淀，其一般颗粒尺寸小于 1000 埃。此阶段的颗粒在含有表面活性剂、辅助表面活性剂和适当的保护剂(如蛋白、糖等)的水介质中是分散的和稳定化的。可接受的蒸发方法包括使用旋转式汽化器、降膜蒸发器、喷雾干燥器、冷冻干燥器、和其他典型的工业用标准蒸发设备。

f. 可选择地，可以通过透析、超滤、吸附等方法去除表面活性剂和辅助表面活性剂，这样获得被蛋白（如果使用的话）稳定化的超微颗粒。

g. 溶剂蒸发后，超微颗粒的液体分散液可被干燥以得到含药剂和任选蛋白的干粉，它可以重新分散到适当的水介质(如盐水、缓冲液、水等)中，而获得可施与动物、颗粒大小低于 1000 埃的悬液。

得到这种干粉可采用的方法是通过冷冻干燥、喷雾干燥等。如果向固态的转化是用冻干法进行的，可添加各种冷冻防护剂,如甘露醇、乳糖、白蛋白、羧甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、麦芽糖糊精、和/或聚乙二醇。

这些超微颗粒可进一步与附加赋形剂或基质成形物质混合，以获得有较高的生物利用度、控制释放特点和在消化液中加以保护的药物传递系统。最终产品可以片剂、胶囊剂、再生液体等形式施与受体。

本发明制剂较先前所用的制备超微颗粒和微颗粒的方法，以及在微乳状液或“前微乳状液浓缩物(pre-microemulsion concentrates)”的使用上有显著的优点。

用本发明方法可实现许多优点。如果选择合适的组成成分，微乳状液是自动形成的而无需高价设备和能量投入。微滴大小较高剪切设备所得到的最小乳剂微滴小大约一个数量级，因此可获得极其小的超微颗粒。微乳状液是热力学稳定的，于是避免了乳剂不稳定性（所得到的颗粒大小的时间依赖性）所带来的通常问题。整体过程较常规的乳剂—溶剂蒸发法更简单，对各种参数敏感性更低。同用诸如高剪切匀浆器的乳化方法相比，由于在本过程中仅涉及简单的混合，因此扩大规模至大产量非常简单。因为用新方法获得的颗粒大小非常小，比消毒过滤膜的孔径小一个数量级，所以消毒过程非常有效，没有膜阻塞所带来的问题，如增加过滤压和在过滤过程中丢失较多的药物。因为在乳化过程中没有高剪切力和温度升高，所以即使温度敏感的药物也可用该新的发明方法加工。在本发明液体制剂中的药物有较高的化学稳定性，因为同常规的含分散超微滴的微乳状液相比，它含有分散的超微颗粒，即，液态（微滴）比固态（超微颗粒）发生更多的化学反应。常规的微乳状液是持续微乳状液相的液体，与之相比，本发明以干粉制剂增加了化学稳定性。同常规微乳状液或“前微乳状液浓缩物”（以液体形式表现）相比，固体制剂的药物能包括各种固体剂量形式，如片剂、颗粒剂和胶囊剂。由于非常窄的大小分布和非常低的平均颗粒大小，保证了药物以比常规方法制备的微颗粒和超微颗粒

更均匀的方式增加吸收，因此可望提高生物利用度。

尽管以下实施例涉及不溶于水的分子，期望用于制备超微颗粒的药剂包括，但并不限于溶或不溶于水的药物、诊断试剂、治疗用制剂、营养制剂等。非限制的药物种类和化合物名单包括但并不限于上面所列的用于本发明的高剪切匀浆方面的所有化合物。

下面实施例中描述的溶剂是甲苯和乙酸丁酯，但是，假如在去除溶剂之前能够形成合适的微乳状液，任何可溶解所需药物的溶剂或溶剂混合物均适用于本发明方法。这种溶剂可以是氯仿、二氯甲烷、乙酸乙酯、乙酸丁酯、乙酸异丁酯、乙酸丙酯、叔丁基甲基醚、丁醇、丙二醇、庚烷、茴香醚、枯烯、甲酸乙酯乙醇、丙醇、四氢呋喃、二噁烷、乙腈、丙酮、二甲基亚砷、二甲基甲酰胺、甲基吡咯烷酮、豆油、椰子油、蓖麻油、橄榄油、红花油、棉籽油、醇类 C1—C20、酯类 C2—C20、酮类 C3—C20、聚乙二醇类、脂族烃类、芳烃类、卤代烃类、d-苧烯、以及它们的组合等。

用于此方法的蛋白质（或数种蛋白的混合物）应当在起初的混合期间或蒸发阶段不沉淀。有许多这种蛋白质，包括白蛋白（如，BSA（牛血清白蛋白）、HSA（人血清白蛋白）、卵）、明胶、胶原、IgG、各种酶类、乳球蛋白、酪蛋白、大豆蛋白等。

用于本发明的表面活性剂应当在存在适宜的辅助表面活性剂和溶剂的条件下，能够自动地形成水包油微乳状液，而不引起药物或蛋白质（如果存在的话）的沉淀。表面活性剂可以是非离子表面活性剂（吐温（Tween）、Span、曲拉通(Triton)、Pluronic、聚甘油酯类等），阴离子表面活性剂（SDS、胆酸盐类和脱氧胆酸类、脂肪酸皂类等），阳离子表面活性剂（十六烷基三甲基铵氯化物等），或两性离子表面活性剂（卵磷脂、氨基酸等）。

辅助表面活性剂应当有与选择的表面活性剂一起自动形成微乳状液的能力，而不引起溶解的药物分子（或蛋白质，如果存在的话）沉

淀并不诱导和形成大的晶质材料。辅助表面活性剂可以是水溶性的或油溶性的，如丁醇、丙二醇、苯甲醇、丙醇等。

超微颗粒的液体分散体经冻干法的转化过程可能需要添加低温防护剂，如甘露醇、乳糖、氨基酸、蛋白类、多糖类等。

明显地，本发明所描述的原理可应用于本方法的几个变异中，如：

1. 可通过在适当溶剂中稀释微乳状液诱导药物颗粒的形成，其中溶剂是可互溶的。例如，如果溶剂在水中的溶解度低，那么就可能将微乳状液稀释至溶剂低于在水中的溶解度极限。

2. 溶剂以及任选的表面活性剂和辅助表面活性剂可用不溶解药物的选择性萃取剂去除。

3. 表面活性剂和辅助表面活性剂可采用截取低于蛋白质分子量的过滤器，经超滤去除。简单的透析也是一个选择。

4. 制剂可只包含满足最终处方用途的成分（不管是口服、静脉注射、局部用药等），因此无需进行去除。

5. 相似地，可以使用能保留在最终产物中的辅助表面活性剂，如甘油、苯甲醇等。

6. 有可能添加各种可影响微乳状液相图的水溶性分子（电解质、乙醇等），以此控制各种成分间的比例而得到最佳药物装载量。

7. 为影响相图（和导致微乳状液形成的成分比例），自发乳化步骤可在非室温温度下进行。特别地，能用温度效应（在乙氧基表面活性剂）将系统从水包油转变为油包水微乳状液。

8. 为影响药物的生物利用度，能在溶剂相内加入其他成分。特别地，优选添加油（如豆油）以增加口服吸收和防止药物被化学和酶降解。

9. 类似地，可以和药物一起，在溶剂中添加基质成形聚合物（如 PVP）。

10. 在微乳状液的外部水相中添加水溶性聚合物（羧甲基纤维素、树胶等）而非蛋白质可改变稳定性和固态性能。

11. 通过加入胶体颗粒（如硅石）作为填料，或加入再生/抗凝聚助剂，可改变所得固态粉剂的流动性。

12. 形成油包水的微乳状液的在成分范围内进行乳化步骤时, 本发明所描述的同样原理可用以形成水溶性颗粒。例如, 此方法可被用来形成极其小的蛋白质超微颗粒。

实施例 25

制备环孢菌素 A 超微颗粒

115mg 环孢菌素 A 溶于 1ml 乙酸丁酯内, 并与 2g 曲拉通 X-100 : n-丁醇为 4 : 1 的溶液相混合。得到一清亮的系统。逐滴加入 10g 水同时轻轻摇动。获得清亮的水包油微乳状液。加入 10 g 1% 的酪蛋白溶液, 同时轻轻摇动。系统变得轻度混浊。在一 Rotovap 里 40°C、80mmHg 条件下去除乙酸丁酯。系统变得完全清亮。

用光子相关性光谱法测量颗粒大小。发现 Z-平均大小为 25—33nm, 而以分子数或体分布表示的大小仅 9 nm。在光学显微镜和偏振光下未观察到颗粒。这一结果表明存在着结晶颗粒。

在加入乳糖 (2%w/w) 后, 这些超微颗粒的液体分散体被冻干。

得到了一白色固态物质, 在水中再生后产生一清亮的系统, 同冻干前相似。此再生标本中的颗粒大小与最初制剂非常相似, Z-平均值约 40nm, 以体积和分子数分布表示的直径在 10—12nm 之间。

实施例 26

制备环孢菌素 A 的超微颗粒

119mg 环孢菌素 A 溶于乙酸丁酯内, 并与 2 克曲拉通 X-100 : 丙二醇为 4 : 1 的溶液相混合。得到一清亮的系统。逐滴加入 7g 水同时轻轻摇动。获得清亮的水包油微乳状液。加入 7 g 1% 的酪蛋白溶液, 同时轻轻摇动。系统变得轻度混浊。在溶剂蒸发前, 用水 1 : 1 稀释样品。在一 Rotovap 里 40°C、80mmHg 条件下去除乙酸丁酯。系统变得完全清亮。此方法也产生极其小的超微颗粒: Z-平均值

45nm，以体积和分子数分布表示的直径为 11nm。

在加入乳糖（2%w/w）后，这些超微颗粒的液体分散液被冻干。

得到一白色固态物质，在水中再生后产生一清亮的系统，同冻干前相似。此再生样品中的颗粒大小接近于最初制剂，Z-平均值约 25nm，以体积和分子数分布表示的直径在 9—11nm 之间。

实施例 27

环孢菌素超微颗粒

用下述成分制备微乳状液：50mg 环孢菌素、0.5g 乙酸丁酯、3.04g 吐温 80：丙二醇（1：1）、和 6.8g 水。微乳状液被蒸发以得到含 5mg/ml 环孢菌素的清亮液体。在对照实验中，简单混合上述成分但没有乙酸丁酯，即使在 17 小时后，环孢菌素未被溶解。

表面活性剂有数种可能性，包括聚山梨酸酯类（Tween）、脱水山梨醇酯类（span）、蔗糖酯类、卵磷脂、单二脂酰甘油酯类、聚乙烯—聚丙烯嵌段共聚物(pluromics)、皂类（硬脂酸钠等）、甘醇酸酯钠胆汁盐类、乙氧基蓖麻油、硬酯酰乳酸钠、乙氧基脂肪酸类(myrij)、乙氧基脂族醇类(Brij)、十二烷基硫酸钠（SDS）等。此外，通常可以使用生物聚合物，如淀粉、明胶、纤维素衍生物等。另外，对于口服应用者，可使用所有令人满意的食品级表面活性剂，以及列于 McCutcheon 表面活性剂手册或 CTFA 索引内的表面活性剂。可用于微乳状液的共溶剂或辅助表面活性剂包括丙二醇、乙醇、甘油、丁醇、油酸等。

实施例 28

制备 BHT 超微颗粒

110mg 丁羟甲苯(BHT)溶于 1ml 甲苯内，并与 2ml 曲拉通 X-100：

n-丁醇为 4:1 的溶液相混合。加入 32g 1% 的酪蛋白溶液，微乳状液自动形成。微乳状液在低压，80mmHg，40℃ 条件下被蒸发直至其变清亮。所得到的颗粒大小是：Z-平均值 30nm，以体积和分子数分布表示的直径分别是 16 和 15nm。

实施例 29

制备 BHT 超微颗粒

按照类似实施例 27 所描述的方法进行，而用水代替酪蛋白溶液。在 40℃、80mmHg 蒸发后，系统变得清亮，其 Z-平均值大小约为 10 nm。

实施例 30

制备紫杉醇超微颗粒

30mg 紫杉醇溶于 2ml 乙酸丁酯内，并加入 4:1 的曲拉通 X-100: 丙二醇 4 克。加入 40ml 水，系统轻度混浊。蒸发后，系统变得完全清亮。Z-平均值是 6nm，以体积和分子数分布表示的大小是 7—9nm。在 4℃ 一天后，测得同样的大小。

实施例 31

微乳状液相图的识别

产生微乳状液，并可被用于通过溶剂蒸发方法获得超微颗粒的成分被识别。这些成分应含有能够溶解疏水性分子的水互溶性溶剂，作为连续介质的水溶液，表面活性剂，以及可能有辅助表面活性剂。

水包乙酸丁酯微乳状液可在相图中所述的各种成分下形成（乙酸丁酯被归类为在终产品中有可接受的高残余浓度的溶剂）。此外，表面活性剂和辅助表面活性剂均可在食品和药理学应用中被使用：吐温 80（乙氧基脱水山梨醇—油酸）和丙二醇。用 BHT 作为疏水分子模型进行了预实验，产生颗粒大小范围为 20—50nm 的分散体。在用 0.2

μm 滤器过滤后，大约 100% 的 BHT 通过了滤膜。

通过用表面活性剂/辅助表面活性剂混合物（在与溶剂混合前以各种比例制备）与溶剂旋涡混合，随后逐滴加入水得到表面活性剂/辅助表面活性剂不同成分的相图。沿“水线”观察各成分的浊度，并用光散射进一步分析产生半透明系统的成分。通过用各种比例的溶剂/表面活性剂/辅助表面活性剂，相图上产生微乳状液的区域被识别出来（仅有一小部分选择的组成产生微乳状液）。在进行相图实验前，同样的方法用于 BHT 溶于乙酸丁酯的系统内。

通过比较 $0.2\ \mu\text{m}$ 过滤前后的紫外吸收光谱评价微乳状液和含 BHT 的超微颗粒的滤过性。通过乙酸丁酯的真空蒸发（60mmHg，40℃）获得超微颗粒。应当强调，在整个过程中无需使用高剪切设备。

微乳状液系统的识别对经口服用是有用的。n-丁基乙酸盐被选作溶剂。下述表面活性剂和辅助表面活性剂在不同比例下被评价：

吐温 80：甘油	5：1
吐温 80：甘油	4：1
吐温 80：甘油	3：1
吐温 80：甘油	2：1
吐温 80：甘油	1：1

Span 80：甘油	4：1
Span 80：甘油	3：1

吐温 80：丙二醇	4：1
吐温 80：丙二醇	3：1
吐温 80：丙二醇	2.5：1
吐温 80：丙二醇	1.5：1
吐温 80：丙二醇	1：1
吐温 80：丙二醇	1：2

((吐温 80+ Span 80) 7 : 1) : 丙二醇 3.5 : 1

((吐温 80+ Span 80) 7 : 1) : 丙二醇 1 : 1

((吐温 80+ Span 80) 8 : 1) : 丙二醇 4 : 1

((吐温 80+ Span 80) 5 : 1) : 丙二醇 1 : 1

吐温 80 : ((丙二醇+甘油) 1 : 1.2) 2 : 1

发现适合的成分应当如下：吐温 80 作为表面活性剂，丙二醇作为辅助表面活性剂，比例为 1 : 1。评价了 n-丁基乙酸盐、吐温 80 : 丙二醇 1 : 1 和水系统的全部相图。另外两个溶剂被测试：仲丁基乙酸盐和叔丁基乙酸盐。这些系统的相图与 n-丁基乙酸盐的相图一样。n-丁基乙酸盐、吐温 80 : 丙二醇 1 : 1 和水的系统被进一步评价。

对 7%乙酸丁酯、30%表面活性剂/PG、63%水样品的颗粒大小进行了测量。发现 Z 平均值约 20nm。对不溶于水的染料，苏丹 III，在约每 1g 乙酸丁酯（5%乙酸丁酯、23%表面活性剂/PG、72%水）中 10mg 的浓度下，进行了超微颗粒形成处理。发现颗粒大小约 17nm。对 BHT，也在每 1g 乙酸丁酯中 100mg 的浓度下，进行了超微颗粒形成处理。此系统的相图被测定。颗粒大小约 20—50 nm，依其组成成分而定。

用苏丹 III 和 BHT 进行了对照实验。10mg 苏丹 III 加入 14.4g 水中，在混合物中加入 4.6g 表面活性剂/PG。此样品用磁性搅拌器搅拌 24h。观察到苏丹 III 的溶解。而当用 BHT 进行同样实验时（100mg BHT 加入 9g 水和 4.3g 表面活性剂/PG），则观察不到 BHT 的溶解。在此阶段进行蒸发（40℃温度，约 60mmHg 压力）。蒸发前后测量样品颗粒大小。蒸发前后，样品 Z 平均值分别是约 20—50 nm 和 30 nm。

蒸发后，样品经 0.2 μm 滤器过滤，过滤前后 BHT 的浓度用紫外线吸收测量。发现两个样品间无差异。此结果明显表明 BHT 超微颗粒非常小。

制备两种样品（这些样品的组成：样品 1：4％乙酸丁酯、14％表面活性剂/PG、80％水；样品 2：BHT123mg/g 乙酸丁酯、5％乙酸丁酯、18％表面活性剂/PG、77％水）。

实施例 32
选择处理设备时的代用品

用于生产通用批量的处理设备将扩大临床生产的规模。在选择 Capxol™ 产品的较大规模设备时有几种可用的代用品。将这些代用品中的几种列于下表：

设备种类	设备选择
预混器	桨叶式混合器，旋转式混合器
高压设备	高压匀浆器（Avestin, Microfluidics, Stansted）， 超声破碎器（热系统）
溶剂去除设	旋转式汽化器，持续流量蒸发器，涂薄膜 蒸发器、闪蒸器、循环浓缩器、超滤器
脱水设备	冷冻干燥器，喷雾干燥器

实施例 33
由不同材料设计的静脉内输送系统

用于制备静脉内输送系统的材料可以是聚合物（如聚乙烯、聚乙烯化合物、聚丙烯管等）或玻璃。标准的医用管已知在其内表面含有疏水部分。因此，这些部分可用于与注射溶液接触。确实，如导管一样，这种管是特制的，在与治疗溶液接触的部分为疏水性的以减少水物质吸收进管壁。然而，在治疗溶液中的任何疏水部分可能与导管和输送系统的其他部分结合。其结果，相当部分的疏水性药理活性物质可被导管和输送管的内表面吸附。因而，药理活性剂的剂量是不稳定的，因为活性药物的相当部分被管壁吸收。在用疏水性药理活性剂治

疗疾病的关键治疗处置中，活性药物有效剂量的显著下降可导致治疗失败。当所用的治疗部分需要活性药物达到某水平之上而治疗窗窄时，这种失败就特别突出。

现在，静脉内导入疏水性药理活性物质的新方法已经形成。通过保护活性药物的疏水部分结合生物相容涂料（如白蛋白）的疏水部分，使活性药物与管壁附着的倾向显著地下降。因此，本发明使得用标准医用聚合物和疏水性玻璃输送高度疏水性药物成为可能，其中的药物被保护并因此不吸附在表面上。本发明方法包括在疏水性药物周围安置生物相容聚合物（如白蛋白）的保护性涂料，和在疏水性聚合物的输送系统中放置所得到的组分。因而，本发明方法可以改善许多疏水性治疗的输送。

实施例 34

紫杉醇的 HPLC 分析

色谱系统：

HPLC: Shimadzu LC-10AS 溶剂输送系统
Shimadzu SIL-10A 自动注射器
Shimadzu SCL-10A 系统控制器
Shimadzu SPD-M10AV 二极管阵列探测器
Shimadzu CTO-10A 柱加热炉

柱: Curosil-PFP, 5 μ m, 4.6mm $\times$ 25cm, Phenomenex; 或 C-18

流动相: 水/乙腈 65 : 45

流量: 同溶剂的, 1.0ml/min

探测: 228nm

紫杉醇主体药物物质（BDS）的同一性

紫杉醇 BDS 和紫杉醇标准（99.9%, Hauser 化学研究公司 Lot 1782-105-5）被定量地溶于乙腈中，并分别注入 HPLC 内。注射 10 μ l 1.00mg/ml 的紫杉醇 BDS 和 10 μ l 2.07mg/ml 的标准紫杉醇。紫杉醇 BDS 的高峰保留时间与来自 Hauser 的紫杉醇标准的保留时间相

当。

紫杉醇 BDS 的效能

紫杉醇 BDS 和标准紫杉醇如上所述注入 HPLC。根据紫杉醇 BDS 与标准紫杉醇的峰面积比和已知的标准紫杉醇的效能得出紫杉醇的效能。

紫杉醇 BDS 的杂质分布

上述的色谱系统能够提供对紫杉碱的高分辨。1.0mg/ml 溶于乙腈的紫杉醇 BDS 10–20 μ l 注入 HPLC，此剂量位于我们的 HPLC 系统的线性反应范围内。用相对峰面积测定杂质分布。

测定 Capxol™ 中紫杉醇的效能

通过在 3% HSA 中定量溶解紫杉醇 BDS 制备标准溶液（60，100，120，140 和 160 μ g/ml）。Capxol™ 样品在盐水中稀释至紫杉醇浓度约为 100 μ g/ml。标准溶液和 Capxol™ 样品中插入 cephalomannine 作为内标准，随后固相提取和液相提取（见下面）。分别在 HPLC 内注入相同体积（20–30 μ l）的标准制备液和 Capxol™ 样品制备液，测量紫杉醇和内标准 cephalomannine 间的峰值响应比。对标准注入液所得结果进行普通最小平方方法回归产生了校准曲线。通过比较样品注入液和标准注入液的峰值响应比测定 Capxol™ 中紫杉醇的效能。

Capxol™ 中紫杉醇的杂质分布

Capxol™ 在注入 HPLC 前接受固相提取或液相提取（见下面）。注入 30 μ l 从 Capxol™ 中提取的约 1 mg/ml 紫杉醇，如上所述调查杂质分布。

固相提取

Capxol™ 样品在盐水中重组至大约 100 μ g/ml。用水调节固相提取柱 Bond-Elut（粘合一洗脱）（C-18）。该柱装以样品，用真空拉动样品经过柱子。然后用水冲洗柱子，再用乙腈洗脱紫杉醇。洗脱液含提取的溶于乙腈的紫杉醇，被注入到 HPLC 上。

液相提取

Capxol™样品在盐水中重组至大约 $100 \mu\text{g/ml}$ 。在大约 $200 \mu\text{l}$ 的此样品中加入 $800 \mu\text{l}$ 乙腈。该混合物旋涡振荡 30 秒，然后在 3,000g 离心 5 分钟。移出并收集上清。沉淀在 $200 \mu\text{l}$ 盐水中重悬浮并重复提取步骤。第二次上清与第一次合并。蒸发浓缩合并的提取物，随后注入到 HPLC 上。

实施例 35

用光子关联光谱学 (PCS) 测定颗粒尺寸分布

在 Malvern Zetasizer 上 (Malvern 仪器有限公司)，用光子关联光谱学 (PCS) 分析重组 Capxol™的颗粒尺寸分布。用 NIST 可追踪的 Nanosphere™大小标准 (Duke 科学股份有限公司)，校准 Zetasizer。在 Malvern Zetasizer 上测量 Capxol™颗粒尺寸的步骤包括设置如下参数：

温度：20.70℃，

散射角：90°

折射率分散剂：1.33

波长：633 nm

粘度 (Visc.) (自动)：0.99

实折射率：1.59

虚折射率：0

准备了 Zetasizer 后，接着确定为了良好的颗粒尺寸测定，从 kcts/sec 读数所需的样品稀释（开始， $200 \mu\text{l}$ 等分样品加入小池内，然后用大约 2ml 经 $0.22 \mu\text{m}$ 滤器过滤的蒸馏水稀释）。将小池放置进 Zetasizer 里的小池架内并开始测量。一旦测量开始，将出现相关控制显示。从菜单上选择显示计数率计。计数率应当在 100—250 kcts/sec 的中等范围内。如果计数率太高或太低，则分别准备较高或较低稀释的另外样品。在自动运行 3 次后，重组 Capxol™的大小被多模态分析系统分析、平均和记录。25 批 Capxol™的平均颗粒尺寸为 155nm

±23nm。

实施例 36

聚合外壳作为多核苷酸组成、酶和疫苗的载体

由于基因治疗作为可行的治疗选择被更广泛地接受（目前，已有超过 40 个人类基因转移提议已被 NIH 和/或 FDA 委员会批准），实现此治疗途径需克服的障碍之一是不愿用病毒媒介将遗传物质并入人细胞基因组。病毒有固有的毒性。因此，在基因治疗中应用病毒媒介需要承担的危险是不可接受的，尤其是为治疗非致死性、非遗传性疾病。不幸地，不用病毒媒介的质粒转移通常不并入靶细胞基因组。此外，同传统药物一样，这种质粒在体内有有限的半衰期。因此，实现基因治疗（也包括基因治疗的相反形式反义治疗，即导入核酸或寡核苷酸以抑制基因表达）的总体限制是不能有效地传递核酸或寡核苷酸，它们因太大而不能渗入细胞膜。

如这里所叙述的，将 DNA、RNA、质粒、寡核苷酸、酶等包裹入蛋白微胶囊内，可使它们容易向肝、肺、脾、淋巴和骨髓靶向传递。因此，按照本发明，这种生物制剂可被输送到细胞内部位而没有用病毒媒介所伴随的危险。此种制剂促进聚合外壳直接从血流非特异地吸收或内吞作用到 RES 细胞，通过肌肉注射进入肌肉细胞，或通过直接注射进入肿瘤。此外，抗核受体的单克隆抗体可被用来将包裹的产物定向到某型细胞的胞核。

可被这种组成定向的疾病包括糖尿病、肝炎、血友病、囊性纤维变性、多发性硬化、通常的癌症、流感、AIDS 等。例如，胰岛素样生长因子（IGF—1）基因可被密封进蛋白外壳内输送以治疗糖尿病性神经病和恶病质。编码因子 IX 和因子 VIII（用于治疗血友病）的基因可通过密封进本发明的蛋白微胶囊外壳内靶向到肝脏。相似地，将低密度脂蛋白（LDL）受体的基因密封进本发明的蛋白微胶囊外壳内可定向到肝脏以治疗粥样硬化。

其他可用于本发明实践的基因是重新刺激机体抗肿瘤细胞免疫反应的基因。例如，HLA-B7 抗原，被包含在质粒中的 DNA 编码，可并入本发明的蛋白外壳内以直接注射入肿瘤（如皮肤癌）。一旦进入肿瘤，抗原将募集到肿瘤特异性细胞并提高细胞因子（如 IL-12）水平，使肿瘤成为免疫系统进攻的靶子。

另一个例子是，含腺病毒组基因组蛋白的质粒可望包裹入本发明的蛋白微胶囊外壳内。此外，本发明的蛋白微胶囊外壳可用于输送治疗基因到 CD8+ T 细胞，作为抗多种肿瘤和感染性疾病的继承性免疫治疗。

本发明的蛋白外壳还可通过定向输送反义核苷酸而用作对抗感染性疾病的传递系统，如抗肝炎 B 病毒。这种反义寡核苷酸的一个例子是抗肝炎 B 病毒多腺苷信号的 21-mer 硫代磷酸盐。

本发明的蛋白外壳还可用来输送囊性纤维变性的跨膜调节（CFTR）基因。缺少此基因的人出现囊性纤维变性，可通过雾化含 CFTR 基因的本发明蛋白微胶囊外壳并直接吸入肺内而治疗。

酶也可用本发明的蛋白外壳输送。例如，DNA 酶包入胶囊并输送到肺。相似地，核酶（ribozymes）可包入胶囊内，并通过在聚合外壳的外部附加适当的抗体而定向到病毒包围蛋白或病毒感染细胞。疫苗也可包入本发明的聚合微胶囊内并用于皮下、肌肉内或静脉内给药。

实施例 37

脑瘤和腹膜内肿瘤的局部治疗

向肿瘤内局部地输送化疗药，对于长期接触药物而将剂量限制的副作用减到最小是有效的方法。上面讨论的生物相容物质也可以几种物理形态如凝胶（交联或非交联的）被应用以提供基质，药理活性成分如紫杉醇，可通过弥散和/或基质降解而从基质中释放。Capxol™

可在生物相容物质的基质内分散，以提供治疗脑瘤和腹腔内肿瘤（卵巢癌和转移性疾病）的持续释放剂型的紫杉醇。温度敏感材料也可被用作本发明剂型的分散基质。例如，Capxol™可以温度敏感材料（如，聚丙烯酰胺的共聚物或聚二醇的共聚物和聚交酯/乙交酯等）的液体剂型注射，它在肿瘤部位形成凝胶并提供缓慢释放的 Capxol™。Capxol™制剂可分散进入上述生物相容聚合物的基质内，以提供控制释放的紫杉醇剂型，通过 Capxol™制剂的特性（白蛋白与紫杉醇联合）产生对脑组织较低的毒性，以及下面所讨论的较低的全身毒性。这种 Capxol 或其他化疗药配方类似 Capxol™的化疗药与生物相容聚合物基质的组合可被用于化疗药控制性局部递送，以治疗脑和腹膜（卵巢癌）内的实体肿瘤，以及局部应用于其他实体肿瘤。这些组合配方并不限于紫杉醇的应用，可被用于多种类的药理活性成分，包括抗感染剂、免疫抑制剂和其他化疗药等。

实施例 38

重构后 Capxol™的稳定性

在玻璃小瓶内的冻干 Capxol™用消毒生理盐水恢复水分至浓度为 1、5、10 和 15mg/ml，并储存于室温和冷冻状态。发现在这些状态下，悬液至少在 3 天内是均质的。在数个时间点进行的颗粒大小测量表明颗粒大小分布没有改变。在这些状态下没有看见沉淀。此稳定性对于泰素（Taxol®）是不可想象的且克服了 Taxol®所伴有的问题，Taxol®在重制至推荐的 0.6—1.2mg/ml 浓度后，24 小时内沉淀。

此外，重制的 Capxol™在存在不同的聚合物管类材料时，如特氟隆、硅橡胶、聚乙烯、聚乙烯和其他标准的灌输管材料，是稳定的。这是超过 Taxol®的主要优点，后者限于聚乙烯灌输装置和玻璃灌输瓶。

实施例 39

Capxol™的单位剂量形式

Capxol™被制备为在适当大小的小瓶内的冻干粉剂。因此，可将所需剂量装入适当的容器内并冻干，以获得本质上含有所需量的白蛋白和紫杉醇的粉剂。然后该容器用消毒生理盐水或其他水溶液重制至使用时的适当体积，获得稀释的均质的紫杉醇悬液。此重制溶液可通过注射或用标准的静脉注射灌输装置输入给病人。

此外，Capxol™可制备为冷冻的、在瓶子或袋子里的备用溶液，在用时可被融化并简单地用于病人。这样避免了生产过程中的冻干步骤。

非常惊奇的是，给予大鼠紫杉醇剂量相当的 Capxol™和 Taxol®时，Taxol®组较 Capxol™组有更高程度的骨髓抑制。这可引起较低的感染和发热事件（如热性白细胞减少）发生率。还可以缩短治疗之间的循环时间，通常是 21 天。应用按照本发明制备的药理学组分，此循环时间可缩短到 2 周或更少，使得对肿瘤的治疗更有效。因此，应用按照本发明制备的药理学组分可比 Taxol®提供巨大的好处。

实施例 40

药物的经口输送

Taxol®经口途径吸收非常少。诸如 Capxol™的颗粒制剂可大大提高诸如紫杉醇药物的吸收。此外，用微乳状液/蒸发方法制备的紫杉醇的本发明配方可用于药物的口服吸收。这些配方合并应用表面活性剂惊人地增加这些药物的口服生物利用度。意外地发现，应用类脂类、表面活性剂类、酶抑制剂类、渗透增强剂类、离子配对剂类、代谢抑制剂类等增加本发明紫杉醇制剂的口服吸收。离子配对剂类的例子包括但不限于三氯乙缩醛盐、三氯乙缩醛水杨酸盐、蔡亚磺酸、甘氨酸、叠氮-二丁基氨基乙烯碳酸盐（bis-N, N-dibutlaminoethylene carbonate）、n-烷基磺酸盐和 n-烷基硫酸盐。膜渗透增强剂的例子包括但不限于癸酸钠、酰基甘油酯类、poloxyethylene alkyl ethersacyl carnitines，胆酸钠、牛磺胆酸钠、牛磺二氢梭链孢酸钠、EDTA、水杨酸钠和甲氧基水杨酸钠。可用于本发明配方的表面活性剂类和类脂

类的非限制性目录已在本说明书中叙述过。

实施例 41

给予 Capxol™的方式和其他药物的发明配方

本发明配方可通过静脉内输注、静脉内推注、腹膜内注射、动脉内注射、门内注射、肝栓塞、瘤内注射或植入、尿道内注射或离子电渗疗法、肌肉内注射、皮下注射、鞘内注射、干粉或雾化液吸入等方法给药。

实施例 42

用 Capxol™定向于血管性脉管系统

血管生成与诸如癌症、类风湿性关节炎和视网膜病的起因和/或疾病进展过程中的恶化因素有关。我们吃惊地发现，Capxol™可以逆转或减轻类风湿性关节炎的严重程度，以及治疗动物模型的肿瘤。因此，Capxol™可能有抗血管生成活性。为使 Capxol™更加有效，有可能通过在 Capxol™上附加适当的肽类而定向于血管性脉管系统。这种肽的一个例子是 RGD（精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸）。许多有相似活性的其他肽类可附加到 Capxol™或其他用本发明方法制备的药物上，用于靶向治疗。肽/ Capxol™可用常规的方法按其需要给予病人。

实施例 43

用 Capxol™治疗肝脏疾病

终末期肝细胞肿瘤和肝脏其他癌症可通过肝门内给予 Capxol™治疗。直接栓塞进肝脏极大地增加达到肝脏的剂量。此外，可应用比常规 Taxol®更高的剂量以更有效地治疗疾病。而且，使之局限于肝组织的适当靶向剂如蛋白类或肽类可与 Capxol™结合而有更高的疗效。

实施例 44

紫杉醇的毒性/骨髓抑制研究一大鼠单剂量

给予 Taxol®和 Capxol™的比较研究

一项临床前研究的总结列于下面：

计划：1X，单剂量静脉内输注（第一天）

动物：Sprague Dawley 大鼠，雄性 40 只，雌性 40 只，5 只/性别/组

体重：300±50g

研究时间：15 天

治疗分组：Taxol® (1 只媒介*+3 只治疗组)

Capxol™(1 只媒介+3 只治疗组)

剂量：Taxol® (0、3、6、和 9mg/kg)

Capxol™(0、6、9、和 12mg/kg)

剂量浓度：0.6mg/ml（所有大鼠）

剂量容积：Taxol® (15、5、10、15ml/kg)

Capxol™(20、10、15、和 20ml/kg)

输注速度：大约 0.75ml/hr（所有大鼠）

剂量入路：静脉内输注，尾静脉

临床观察：1 次/天

临床病理：第 0 天（治疗前）、1、3、7、11、15。做 NCI 毒性部的标准列表

体重：第-1、1、3、8、和 15 天

（* 媒介由制备部分所描述的相同的方法制备，除省略加入紫杉醇以外。）

实施例 45

骨髓抑制（血液学毒性）试点研究

在正式实验开始前，用 3 只 Capxol™组大鼠和 3 只 Taxol®组大鼠进行试点研究以测定结果。所用剂量为 5mg/kg，剂量容积为 7ml/kg。药剂经过尾静脉以静脉推注方式给予。此研究结果以图示总结（见图 3），显示每个处方的 WBC 计数改变百分率（骨髓抑制的一个指标）是时间的函数。

骨髓抑制试点研究结论：

数据显示，Taxol®组的 WBC 计数(平均值+SD)显著低于 Capxol™组，表明 Taxol®有更高程度的骨髓抑制（Taxol®的最大 WBC 抑制>70%；Capxol™的最大 WBC 抑制<30%）。数据分析显示，除 0、13 和 14 天外，两组所有数据点之间有统计学显著差异（ $p<0.05$ ）。此外，接受 Capxol™组在 6 天内恢复 WBC 正常水平，而 Taxol®组则需 14 天恢复正常 WBC 水平。这表明 Capxol™有显著降低的血液学毒性。如果在人的临床试验中得到相似的结果，那么此数据提示后续治疗周期之间的间隔时间（Taxol®通常为 3 周）可显著减少（当用 Capxol™时可能为 2 周，或甚至为 1 周或更少）。

实施例 46

抗肿瘤效能的试点研究

在上述研究开始前，用 Capxol™进行了试点研究以测定目标剂量范围和效能。小鼠（ $n=10$ ）皮下种植 MX-1 乳腺肿瘤，当肿瘤达到大约 150—300mg 大小时开始治疗。最初接种后 12 天出现上述情况，在 13 天开始治疗。Capxol™用盐水恢复水分以获得紫杉醇超微颗粒的胶体溶液。带瘤小鼠（ $n=5$ ）用 20mg/kg（以 VIV-1 表示）的 Capxol™治疗，每天经尾静脉推注给药，连续 5 天。对照带瘤小鼠以同样的程序仅接受盐水。以时间的函数监测肿瘤大小。对照组显示肿瘤重量极大地增加，至中位数超过 4500mg，而且此组中的所有动物在 28 和 39 天之间死亡。另一方面，治疗组显示了显著的效果，所有动物在 25 天时均没有可测量到的肿瘤。本组动物在 39 天全部处死，其时它们没有复发的表现，也没有肿瘤的证据。结果示于图 4 中。

结论：

此研究显示了 Capxol™非凡的抗肿瘤活性。因此，在 Capxol™配方中保持了紫杉醇的抗肿瘤活性。此研究表明静脉内给予紫杉醇超微颗粒同给予可溶解形式的药物一样有效。因此 Capxol™显示了有效和强大的抗癌活性，而没有在已批准和出售的含聚乙二醇化合物的 Taxol®配方中所见到的毒性作用。

注释：根据文献数据和 SRI（南方研究院（Southern Research Institute））科学家的实践，已经确定对此特种的无胸腺小鼠，溶解于稀释剂 12（聚乙二醇化合物/乙醇，是 Taxol®所用的同样稀释剂）中的紫杉醇的最大耐受剂量（MTD）是 22.5mg/kg。此结果是通过以比 Taxol®（6mg/ml 聚乙二醇化合物/乙醇）更高的浓度在稀释剂 12 中溶解紫杉醇而获得的。这样做是为了将给予小鼠的聚乙二醇/乙醇量最小化以避免媒介的毒性。在 22.5mg/kg 剂量时，溶解在稀释剂 12 中的紫杉醇同上述 Capxol™有相似的效能。

实施例 47

用紫杉醇超微颗粒在动物模型中治疗类风湿性关节炎

Louvain 大鼠的胶原所致的关节炎模型被用来测试紫杉醇超微颗粒对关节炎的治疗效果。监测实验动物脚爪大小以评价关节炎的严重程度。

在关节炎完全形成（通常在注射胶原后~9—10 天）后，实验动物分为不同的组接受紫杉醇超微颗粒 1mg/kg q.o.d.（隔天一次），或紫杉醇超微颗粒 0.5mg/kg+强的松 0.2mg/kg q.o.d.（联合治疗），腹腔内用药 6 次，然后每周一次，用三周。脚爪大小在开始治疗时（0 天）和每次注射药物时测量。仅接受生理盐水的组为对照。实验结束时，接受紫杉醇超微颗粒组脚爪大小减小 42%，联合治疗组脚爪大小减少 33%，而对照组脚爪大小则增加大约 20%。关节炎未被诱导前脚爪的最初大小为 50%。结果示于图 2。

结论，含紫杉醇的超微颗粒对关节炎显示了治疗效果。为避免长期应用紫杉醇和类固醇的副作用，可能最好选择联合治疗以仅用各药的半量而得到相似的效果。

实施例 48

Capxol™对动脉再狭窄的效果

异常的血管平滑肌增生 (VSMP) 伴随着心血管疾病, 如粥样硬化、高血压和许多的血管内过程。异常 VSMP 是经皮经腔冠状动脉成形术 (PTCA) 的常见并发症。据报道, PTCA 后由 VSMP 引起的慢性再狭窄的发生率在 3—6 月内高达 40—50%。

伴随 PTCA 的血管再狭窄的高发生率引起了体内再狭窄动物模型的形成以及预防它的药物研究。下面的研究描述了应用 Capxol™抑制动脉内膜创伤后的再狭窄。

体重 350—400g 的雄性 Sprague-Dawley 大鼠(Charles River)用氯胺酮和 Rompun 麻醉, 并暴露右颈总动脉 3.0cm。清除邻近的组织以使两个 DIETRICH 微型喇叭狗样夹钳间隔约 2cm 置于颈动脉周围, 而不引起迷走神经或伴行的颈上神经节和交感神经干的挤压损伤。沿血管的这一段没有分支。首先插入一个附着在三通开关上的 30 号针, 然后从隔离部分的下端拉出而在血管壁上形成孔洞, 然后插入到上端以进行注射。注射 2—3ml 磷酸缓冲盐水以冲出隔离段内的所用血液, 然后三通开关转向连接到稳定的压缩空气源的另一方向。适度的气流 (每分钟 25ml) 流经管腔 3 分钟以造成内膜的干燥损伤。然后在从血管上移走针之前重新充以盐水。在夹钳移开前, 血管壁上的孔洞被仔细灼烙以防止出血。还可用盐水弄湿的棉拭子压迫在针孔上以止血。皮肤用 7.5-mm 的金属夹关闭, 并用聚烯吡酮碘冲洗。

所有动物接受上述的外科手术, 并在术后第 14 天处死。取回每侧颈动脉进行病理检查。未手术一侧作为自身对照。实验组接受如下不同处理:

1 组: 高剂量 Capxol™治疗:

紫杉醇 5mg(w/100mg 人白蛋白)/kg/周, IV。

2 组: 低剂量 Capxol™治疗:

紫杉醇 1mg(w/20mg 人白蛋白)/kg/周, IV。

3 组：药物媒介对照。

人白蛋白 100mg/kg/周，IV。

颈动脉活检标本保存在福尔马林中，然后从石蜡块上切取截面（8 μm ）并用苏木精曙红染剂染色。血管层（内膜、中层和外膜）的横截面积被量化。

对照组损伤的颈动脉显示显著的内膜平滑肌细胞累积和基底膜 VSMC 浸润。颈动脉壁的总厚度加倍。同对照组相比，治疗组内膜壁厚度有统计学显著的下降。

实施例 49

超微颗粒的体内定向

将某种定向部分如蛋白类、抗体类、酶类、肽类、寡核苷酸类、糖类、多糖类等并入超微颗粒的蛋白包被中，可能定向到体内的特定部位。此定向能力可被用于治疗 and 诊断用途。

实施例 50

聚合物外壳的抗体定向

本发明的特定方面的聚合外壳的性质使单克隆或多克隆抗体附着到聚合外壳上，或将抗体并入聚合外壳中。抗体可在微胶囊聚合外壳形成时并入聚合外壳内，或在其制备后附着在聚合外壳上。为此，可应用标准的蛋白固定技术。例如，对于从蛋白（如白蛋白）制备的蛋白微胶囊，白蛋白赖氨酸残端的大量氨基可用于附着经适当修饰的抗体。作为一个例子，通过将抗肿瘤的抗体在聚合外壳形成时并入其中，或在聚合外壳制备后将抗肿瘤抗体附着在其上，可将抗肿瘤药物送到肿瘤。另一个例子是，通过将抗靶细胞受体的抗体在聚合外壳形成时并入其中，或在聚合外壳制备后将抗靶细胞受体的抗体附着在其上，可将基因产物送到特定细胞（如肝细胞或骨髓内某种干细胞）。此外，抗核受体的单克隆抗体可被用于将包在胶囊内的产物定向到某型细胞

的胞核。

实施例 51

用静脉内输送含免疫抑制剂的聚合外壳定向该药到移植器官

免疫抑制剂被广泛用于器官移植，以防止发生排斥事件。特别地，一种有力的免疫抑制剂环孢菌素，延长包括皮肤、心脏、肾脏、胰腺、骨髓、小肠和肺的异基因移植动物的生存期。环孢菌素在很多动物的许多器官表现出抑制某些体液免疫，而且在很大程度上抑制细胞介导的反应，如同种移植排斥、迟发过敏反应、实验性过敏性脑脊髓炎、弗式佐剂关节炎、和移植物抗宿主病。用环孢菌素已经成功地进行了人肾、肝和心的同种移植。

环孢菌素通常以口服形式给药，或者是含溶于醇和诸如玉米油、聚氧乙烯化甘油酯等油类的环孢菌素溶液的胶囊制剂，或者是橄榄油、聚氧乙烯化甘油酯等的溶液制剂。也通过静脉注射给药，在这种情况下，环孢菌素溶于乙醇（大约 30%）和聚乙二醇化合物（聚氧乙烯化的蓖麻油）中，后者在注射前必须在生理盐水或 5% 葡萄糖中稀释 1:20 到 1:100。同静脉内（i. v.）输注相比，口服溶液的绝对生物利用度大约 30%（Sandoz 药物公司，刊物 SDI-Z10（A4），1990）。通常，环孢菌素的静脉给药与目前惯用的 Taxol® 静脉用药存在着相似的问题，即认为由 i. v. 配方所用的传递媒介聚乙二醇化合物所致的过敏和变应性反应。此外，静脉输注按此描述包裹进胶囊的药物（如环孢菌素）避免了给药后即刻出现危险的血液水平峰。例如，用上述环孢菌素包被形式与目前所用的环孢菌素制剂比较，注射后立即，环孢菌素的血液水平峰显示 5 倍下降。

为避免聚乙二醇所伴随的问题，包含在上述聚合外壳内的环孢菌素可通过静脉注射给药。药物可溶解在生物相容油或其他几种溶剂中，溶解后，它可通过上述的声处理分散进聚合外壳内。此外，由于注射的物质被肝内 RES 系统吸收，在聚合外壳内输送环孢菌素（或其他免疫抑制剂）的重要优点是利于局部定向。这样，可在一定程度上

避免全身毒性和由于局部定向而减少有效剂量。

实施例 52

用 Capxol™定向抗体

抗各种肿瘤或组织的单克隆抗体可附着在 Capxol™上，使 Capxol™或其他用本发明方法制备的药物能够定位到疾病部位。例如，抗卵巢癌的抗体附着到 Capxol™上并腹腔内给药，对卵巢癌病人将有很大的好处。

实施例 53

治疗药的静脉内给药

治疗药的静脉给药，如药物、显色剂等，在至少一次经过肝脏中预处理了药物。由于治疗药被肝脏过滤，那些治疗药的有效部分被肝脏吸收和吸附，因此不能得到全身分布。而且，一旦被肝脏吸收，它很可能被代谢，而产生的代谢副产物通常有全身毒性。通过将药物或其他治疗剂包裹进根据本发明的包衣（如用诸如白蛋白的蛋白）内，对静脉内给药的肝脏吸附被消除。例如，已知白蛋白可流经肝脏而在病人全身分布。因此，肝脏对白蛋白的吸附与毒性化合物或药物的程度不同，它们有肝受体（或其他机制），启动引起它们从血流中移除的过程。通过用生物相容聚合物包衣（如人白蛋白包衣）保护治疗药，药物可避开肝脏而在全身所用器官系统中广泛分布。按照本发明的一个方面，提供了一个新的避开肝脏的方法，它包括将药物包进入肝白蛋白（本质上是生理成分）中。用这种方式，更多的药物可用于全身治疗。除了增加药物的生物利用度外，还减少肝细胞药物降解所产生的代谢副产物。增加肝脏旁路和减少药物代谢副产物均协同改善了总体药效。此改善的效能延伸到包被进入白蛋白的所用药物和物质。

实施例 54

减少药物的骨髓抑制（血液学毒性）作用和全身毒性

几种化疗药因其骨髓抑制作用而有剂量限制的毒性。Taxol[®]（紫杉醇）是这种药物的典型例子。当给予目前批准的聚乙二醇化合物/乙醇配方的 Taxol[®]时，它产生限制药物重复使用的骨髓抑制作用，为使病人血液计数恢复到正常至少在 3 周内妨碍病人重复治疗。推测，由于本发明的某些方面的药物载体，即人白蛋白，有生物相容性无毒性，其骨髓抑制的毒性副作用可能大大减少。

Sprague Dawley 大鼠给予市售制剂或用本发明方法制备的含白蛋白超微颗粒的紫杉醇（Taxol[®]）。两种制剂均通过尾静脉给药。Taxol[®]给予 5mg/kg 的单剂量水平，而本发明制剂给予 5mg/kg 和 12mg/kg 两个剂量水平。在给药后，监测大鼠血液白细胞计数作为骨髓抑制的标志。

发现 Taxol[®]（5mg/kg）在给药后第 1 和第 2 天，WBC 分别下降 47.6%和 63.5%，而 5mg/kg 的本发明制剂在第 1 和第 2 天 WBC 计数分别增加 14.7%和 2.4%。对于 12mg/kg 较高剂量的本发明制剂，在第 1 和第 2 天 WBC 计数分别增加 6.5%和 3.6%。

这些结果表明，给予本发明制剂的药物大大减少短期的骨髓抑制。

另一个全身毒性的指标是动物的体重。在给予紫杉醇后，也监测了大鼠的体重。在 5mg/kg 剂量，Taxol[®]在给药后 3 天导致体重下降 10.4%，而给予相同剂量本发明制剂的紫杉醇仅引起 3.9%的体重下降，表明本发明制剂的毒性大大减少。

非常惊人的是，当给予大鼠相同剂量的本发明制剂和 Taxol[®]时，Taxol[®]组同本发明制剂组相比引起更程度的骨髓抑制。这样可引起较低的感染和发热事件发生率（如热性中性粒细胞减少症）。还可以缩短治疗之间的周期时间，通常 Taxol[®]的此时间为 21 天。应用本发明制备的药理组合物，此周期时间可缩短到 2 周、1 周或更少，使得对肿瘤的治疗更有效。因此，应用本发明制备的药理组合物可比 Taxol[®]

提供巨大的好处。

实施例 55

超微颗粒制剂的剂量团给药

抗肿瘤药物紫杉醇，以其用聚乙二醇化合物/乙醇的实用 BMS 配方，不能用静脉内团块给药。这是因为其媒介的巨大毒性引起严重的过敏反应，接受药物的病人需要用类固醇类、抗组胺类等预先治疗。Taxol®配方用静脉内输注的方式给药，在任何地方要持续 1 小时到 24 小时。相反，按照本发明制备的制剂，由于应用无毒的载体，可以容易地以静脉内团块方式（即，在少于 1 小时内）给予病人，而没有现今临床应用的 Taxol®所见的毒性问题。

紫杉醇对病人的有效剂量处于 200—500mg 之间，依其体重和体表面积而定。Taxol®必须在终剂量浓度为 0.6mg/ml 时给药，需要大输注容量（典型地在大约 300—1000 ml 范围内）。相反，本发明的制剂没有此限制，可在所需的浓度给药。这使得临床医生可以用快速的静脉内团块治疗病人，可在短至几分钟的时间内给药。例如，假如本发明制剂重制到 20 mg/ml 的剂量浓度，200—500mg 总剂量的输注体积仅分别为 10—25 ml。这在临床实践中是个很大的优点。

实施例 56

同 Taxol®相比超微颗粒配方中紫杉醇毒性的减少

众所周知，实用配方的抗肿瘤药紫杉醇（即 Taxol®），有引起严重过敏反应的巨大毒性，接受药物的病人需要用类固醇类、抗组胺类等预先治疗。Taxol®的毒性与本发明的超微颗粒配方进行了比较。

因此，通过 C57BL 小鼠尾静脉注射不同剂量水平的本配方，在注射后，通过小鼠的大体观察监测毒性作用。

对于 Taxol®，30mg/kg 的剂量在静脉内给药后 5 分钟内一律致死。

在同样剂量下，按照本发明的配方没有显示明显的毒性作用。103 mg/kg 的超微颗粒配方显示小鼠体重有一些下降，但即使高的剂量也不致死。大约 1000 mg/kg、800 mg/kg 和 550 mg/kg 的剂量都有致死性，但致死时间不同，其范围在数小时到 24 小时之间。因此，发明配方的致死剂量大于 103 mg/kg 但小于 550 mg/kg。

因此，很明显，紫杉醇本发明配方的致死剂量在很大程度上高于 Taxol[®]。这在临床实践中有很大重要性，可给予较高剂量的化疗药物以得到更有效的溶瘤活性而大大减少毒性。

实施例 57

用本发明方法制备的 Capxol[™]和 Taxol[®] **单次静脉内给药后小鼠 LD₅₀ 的测定**

在单次静脉内给药后，比较了 Capxol[™]、Taxol[®]和其载体媒介的 LD₅₀。总共用 48 只 CD1 小鼠。测定的紫杉醇剂量对 Capxol[™]是 30、103、367、548 和 822mg/kg，对 Taxol[®]是 4、6、9、13.4 和 20.1mg/kg。Capxol[™]的媒介物人白蛋白仅测试了 4.94g/kg（相当于 Capxol[™]剂量 548mg/ml）水平，因为人白蛋白被认为是对人无毒的。测试的 Taxol[®]媒介物（Cremophor EL[®]）的剂量是 1.5、1.9、2.8 和 3.4ml/kg，分别相当于紫杉醇剂量是 9、11.3、16.6 和 20.1mg/kg。每个浓度给予 3—4 只小鼠。结果表明，紫杉醇以 Capxol[™]给予的毒性小于 Taxol[®]或单独给予 Taxol[®]的媒介物。LD₅₀ 和 LD₁₀，在 Capxol[™]是 447.4 和 371.5mg/kg 的紫杉醇，在 Taxol[®]是 7.53 和 5.13mg/kg 的紫杉醇，以及 1325 和 794mg/kg Taxol[®]媒介物（相当于紫杉醇剂量为 15.06 和 9.06mg/kg）。在此研究中，Capxol[™]的 LD₅₀ 比 Taxol[®]大 59 倍，比 Taxol[®]媒介物本身大 29 倍。Capxol[™]中紫杉醇的 LD₁₀ 比 Taxol[®]中的紫杉醇大 72 倍。回顾此研究中的所有数据表明，Taxol[®]媒介物是 Taxol[®]很多毒性的根源。接受 Taxol[®]和 Taxol[®]媒介物的小鼠可见到典型的严重感染迹象，表现为在给药后不久出现鲜艳的粉色皮肤颜色。在 Capxol[™]和 Capxol[™]媒介物组没有见到这种反应。结果列于表 2。

表 2

组	单次静脉内给药					
	剂量 (mg/kg)	动物数(n)	死亡数	%存活	LD ₅₀ (mg/kg)	MTD 或 LD ₁₀ (mg/kg)
Capxol™	822	3	3	0	447.4	371.5
	548	4	4	0		
	367	3	0	100		
	103	3	0	100		
	30	3	0	100		
Taxol®	20.1	4	4	0	7.53	5.13
	13.4	4	4	0		
	9	3	2	33		
	6	4	1	75		
	4	3	0	100		

这些高剂量的 Capxol™是以团块注射方式给予的，代表了人的相当于大约 80—2000mg/m² 的剂量。此研究中 Capxol™的 LD₁₀ 或最大耐受剂量相当于人的大约 1000mg/ m²。此值显著高于批准的人体 Taxol®剂量 175 mg/m²。

出乎我们的意外，发现媒介物聚乙二醇化合物(Cremophor)/乙醇本身在 小鼠数个剂量组引起严重的过敏反应和死亡。Taxol®媒介物本身的 LD₅₀ 数据显示，它比 Capxol™有相当多的毒性，并且在 Taxol®的毒性中起重要的作用。在文献中尚不清楚过敏的原因，但基于这些数据，我们相信 Taxol®媒介物是 HSR 的原因。

实施例 58

多次静脉内给药后小鼠 Capxol™ Taxol®LD₅₀ 的测定

在多次静脉内给药后，比较了 Capxol™和 Taxol®及其载体的 LD₅₀。总共用了 32 只 CD1 小鼠。每天给予紫杉醇剂量为 30、69 和 103mg/kg 的 Capxol™，连续 5 天。每天给予紫杉醇剂量为 4、6、9、13.4 和 20.1mg/kg 的 Taxol®，连续 5 天。每一浓度给予 4 只小鼠。结果列于表 3。

表 3

多次静脉内给药

组	剂量 (mg/kg)	动物数(n)	死亡数	%存活	LD ₅₀ (mg/kg)	MTD 或 LD ₁₀
Capxol™	103	4	4	0	76	64
	69	4	1	75		
	30	4	0	100		
Taxol®	20.1	4	4	0	8.0	4.3
	13.4	4	4	0		
	9	4	2	50		
	6	4	1	75		
	4	4	0	100		

结果表明 Capxol™比 Taxol®毒性小。Capxol™的 LD₅₀ 和 LD₁₀ 分别是 76.2 和 64.5mg/kg 紫杉醇，与之相比，Taxol®分别是 8.07 和 4.3mg/kg 紫杉醇。在此研究中，Capxol™的 LD₅₀ 比 Taxol®高 9.4 倍。Capxol™的 LD₁₀ 比 Taxol®高 15 倍。此研究结果表明当每日间隔给予多次剂量时，Capxol™的毒性比 Taxol®小。

实施例 59

Capxol™的两种配方和 Taxol®的毒性和效能

用 MX-1 人乳房瘤碎片植入雌性无胸腺 NCr-nu 小鼠，进行了 Capxol™、Taxol®和 Capxol™媒介物效能的测定研究。

给每组 5 只小鼠的各组以 13.4、20、30、45mg/kg/天的剂量静脉内注射 Capxol™制剂 VR-3 或 VR-4，5 天。每组 5 只小鼠的各组也以 13.4、20 和 30mg/kg/天的剂量静脉内注射 Taxol®5 天。10 只小鼠的对照组静脉内注射 Capxol™媒介物对照（人白蛋白，600 mg/kg/天）5 天。评价参数是肿瘤完全消退数、完全消退平均时间、无瘤存活数和肿瘤复发数。

用 Capxol™制剂 VR-3 治疗在所有剂量水平引起肿瘤完全消退。两个最高剂量在 103 天后得到 100%存活。Capxol™制剂 VR-4 在三个最高剂量组得到肿瘤完全消退，在 13.4 mg/kg/天剂量时引起 60

%消退。在 103 天后的生存率略少于用制剂 VR-4 组。用 30、20 和 13.4mg/kg/天剂量的 Taxol[®]治疗，引起在 103 天的生存率分别是 40%、20%和 20%。用对照媒介物治疗对肿瘤生长没有作用，动物在 33 到 47 天后死亡。结果列于表 4。

表 4

剂量 (mg/kg/天)	CR/总数			TSF/TR			DCR (天)			非特异 死亡/总数		
	VR-	VR-	TXA	VR-3	VR-4	TXA	VR-3	VR-4	TXA	VR-	VR-4	TXA
45	5/5	5/5	NA	5/0	3/2	NA	>88	>73	NA	0/5	0/5	NA
30	5/5	5/5	4/4	5/0	5/0	2/2	>88	>88	>56	0/5	0/5	1/5
20	5/5	5/5	4/4	1/4	2/3	1/3	>51	>47	>57	0/5	0/5	1/5
13	4/5	3/5	4/5	0/5	0/5	1/4	10	8	>29	0/5	0/5	1/5

CR＝肿瘤完全消退；
TFS＝无瘤存活；
TR＝肿瘤复发；
DCR＝完全消退天数。

这些意外和令人吃惊的结果显示，同 Taxol[®]相比，两个 Capxol[™]配方效能增加。此外，由于制剂的较低毒性，在 Capxol[™]组可达到较高剂量的紫杉醇。这些高剂量可以团块注射给药。

实施例 60

大鼠单次静脉内给药后 ³H－Taxol[®]和 Capxol[™]的
血液动力学和组织分布

为比较配制的 Capxol[™]和 Taxol[®]注射浓缩物中的 ³H－紫杉醇的药物动力学和组织分布，进行了两项研究。14 只雄性大鼠静脉内注射 10mg/kg³H－Taxol[®]，10 只大鼠用 4.9 mg/kg。在上述研究中，10 只雄性大鼠静脉内注射 5.1 mg/kg³H－Capxol[™]。

³H－Taxol[®]或 ³H－Capxol[™]在 5 mg/kgIV 团块给药后，大鼠血液

中总放射活性和紫杉醇水平都双相性下降。然而，给予 ³H—Capxol™ 后的总放射活性和紫杉醇水平显著地低于相似剂量的 ³H—Taxol®。此低剂量水平更迅速地分布出血液。

血液 HPLC 图像显示，³H—Capxol™ 和 ³H—Taxol® 都与高度极性的代谢物有相似的代谢方式。但是，³H—Capxol™ 的代谢率显示明显的低，因为给药后 24 小时血液放射活性的 44.2% 残余为紫杉醇，而 ³H—Taxol® 仅残留 27.7%。³H—Capxol™ 与 ³H—Taxol® 报道的排泄方式相似，其放射活性在尿中仅有最低限度的排泄，主要地发生在粪便中。³H—Capxol™ 或 ³H—Taxol® 在以 5 mg/kg IV 给药后，总放射活性和紫杉醇的血液动力学列于表 5。

表 5

治疗	AUC ₀₋₂₄ (mg eq.hr/ml)	推断的 C ₀ (mg eq/ml)	观察的 C _{max} (mg eq/ml)	观察的 T _{max} (hr)	t _{1/2} β (hr)
总放射活性 ³ H—Capxol™	6.1	7.6	4.2	0.03	19.0
³ H—Taxol®	10.2	19.7	13.5	0.03	19.7
紫杉醇 ³ H—Capxol™	3.7	7.0	4.0	0.03	11.4
³ H—Taxol®	5.4	17.1	11.8	0.03	7.2

14 种组织中的 12 种，给予 ³H—Capxol™ 后的放射活性水平高于 ³H—Taxol®。由于血液水平低，给予 ³H—Capxol™ 的动物的所有组织中，组织/血液 ppm 比值均较高。这一点支持血液动力学数据所提出的 ³H—Capxol™ 从血液到组织的快速分布。

配入 Capxol™ 中的 ³H—紫杉醇显示与配入 Taxol® 注射浓缩物中的 ³H—紫杉醇有相似的药物动力学表现，但组织/血液 ppm 比值和代谢率明显不同。Capxol™ 治疗的动物在给药后 2 分钟的血样内总放射活性显著低于 Taxol® 治疗的动物，表明 ³H—Capxol™ 更迅速地从血

液中分布出去。但 ^3H -Capxol™ 的代谢率显得显著的低，因为给药后 24 小时血液放射活性的 44% 残余为紫杉醇，而 ^3H -Taxol® 仅残留 28%。

Capxol™ 的此发现是令人惊奇的，同 Taxol® 相比，提供了一个得到紫杉醇持续活性的新配方。此提高的活性与局部高浓度一起，可导致有局部高浓度的器官内原发肿瘤或转移灶的治疗效能增加。组织分布列于下面的表 6 中。数据表示为每组 10 只大鼠的平均值和标准差（Capxol™ 和 Taxol®）。

表 6

5mg/kg ^3H -Capxol™ 和 ^3H -Taxol® 在单次静脉内给药后
雄性大鼠组织中的放射活性残留，表达为 ppm

样本	Capxol™		Taxol®	
	平均值	±SD	平均值	±SD
脑	0.106	0.008	0.145	0.020
心脏	0.368	0.063	0.262	0.037
肺	1.006	0.140	0.694	0.057
肝	1.192	0.128	1.37	0.204
肾	0.670	0.110	0.473	0.068
肌肉	0.422	0.120	0.386	0.035
消化道	0.802	0.274	0.898	0.243
精巢	0.265	0.023	0.326	0.047
胰腺	0.963	0.357	0.468	0.070
骨架	0.596	0.070	0.441	0.065
骨骼	0.531	0.108	0.297	0.051
脾	0.912	0.131	0.493	0.070
前列腺	1.728	0.356	1.10	0.161
精囊	1.142	0.253	1.20	0.237
血液	0.131	0.010	0.181	0.020
血浆	0.131	0.012	0.196	0.026

数据显示，同 Taxol® 相比，Capxol™ 的聚集在几个器官内有更高的水平。这些器官包括前列腺、胰腺、肾脏、肺脏、心脏、骨和脾。

因此，Capxol™在治疗这些器官的癌症时，可在紫杉醇的相等剂量水平下，比 Taxol®更有效。

在治疗前列腺癌时，前列腺组织中的水平是特别令人感兴趣的。此惊人和意外的结果对治疗前列腺癌有意义。下面的表 7 列出了每只大鼠（每组 10 只）的数据，显示 Capxol™同 Taxol®相比，前列腺中紫杉醇的聚集增加。在前列腺中定位的基础可能是制剂颗粒大小（20—400nm）的结果，或因为制剂中存在白蛋白，可通过特殊的膜受体（gp60、gp 18、gp 13 等）引起在前列腺组织中的集中。也有可能，其他生物相容性的、可生物降解的聚合物而非白蛋白也可对某种组织如前列腺显示特异性，而引起如上述特性的紫杉醇在这些组织中局部高浓度的结果。这种生物相容性物质期望在本发明范围内。获得前列腺局部紫杉醇高浓度的一个优选组合物实施例是含紫杉醇和白蛋白的配方，其颗粒大小在 20—400nm 范围内，且无聚乙二醇化合物。此实施例还表现同相等剂量 Taxol®相比，在胰腺、肾脏、肺脏、心脏、骨和脾中引起较高浓度的紫杉醇。

表 7

每组 10 只大鼠给予 5mg/kg 紫杉醇的数据

Capxol™		Taxol®	
	1.228		1.13
	2.463		1.04
	1.904		0.952
	1.850		1.42
	1.660		1.31
	1.246		1.08
	1.895		1.03
	1.563		0.95
	1.798		0.94
	1.676		1.18
平均值	1.728	平均值	1.103
SD	0.36	SD	0.16

数据显示同 Taxol[®]相比, Capxol[™]在前列腺的定位大约是 150%。

Capxol[™]制剂中的紫杉醇在前列腺的此意外分布, 可用于输送其他药理活性药物到前列腺以治疗侵袭该器官的其他疾病状态, 如, 在相似配方中的抗菌素以治疗前列腺炎(前列腺的炎症和感染), 用于治疗良性前列腺肥大的治疗性药物可以相似的方式配制以获得高的局部输送。相似地, Capxol[™]对心脏供给局部高浓度的惊人发现可被用于治疗冠状血管的再狭窄以及粥样硬化性疾病。紫杉醇已被证明有预防再狭窄和粥样硬化的作用, 因此, Capxol[™]是紫杉醇用于这些疾病的理想形式。而且, 已证明聚合白蛋白可能通过 gp60、gp18 和 gp13 受体优先与内皮有炎症的血管结合。

实施例 61

大鼠多次静脉内给予各水平 Capxol[™]后 紫杉醇的血液动力学和组织分布

通过处理另外四组大鼠补充了用 ³H-Capxol[™] 的研究, 用 Capxol[™] 剂量为 9.1mg/kg、26.4mg/kg、116.7mg/kg 和 148.1mg/kg 的紫杉醇单次团块给药。从尾静脉采集血液并计算 AUC₀₋₂₄。在 24 小时, 采集血液样本并提取, 将提取物注入 HPLC 以测定血液中母体化合物的水平。

IV 给予 ³H-Capxol[™] 后总放射活性和紫杉醇的血液动力学列于表 8 中。

表 8

组/剂量 (mg/kg)	AUC ₀₋₂₄ (μg eq.hr/ml)	推断的 C ₀ (μg eq/ml)	观察的 C _{max} (μg eq/ml)	观察的 T _{max} (hr)	t _{1/2 β} (hr)
A/9.1	11.5	10.2	7.19	0.03	22.3
B/26.4	43.5	44.8	29.5	0.03	16.0
C/116.7	248.9	644.6	283.3	0.03	8.48
D/148.1	355.3	1009.8	414.2	0.03	9.34

随着紫杉醇剂量的增加,曲线下面积成比例地增加。从 9 mg/kg 剂量到 148 mg/kg 剂量, 24 小时后母体化合物的水平升高 8.5 倍 (0.04ppm—0.34ppm)。

实施例 62

大鼠单次静脉内给药后 Capxol™和 Taxol®的毒性测定

研究目的是测定单次 IV 给药后, Capxol™在雄性和雌性大鼠中的毒性。Capxol™以 5、9、30、90 和 120 mg/kg 剂量给予 6 只雄性和 6 只雌性大鼠。各组动物中的一半在第 8 天处以安乐死并进行验尸。其余的动物在第 31 天验尸。Capxol™处理动物的结果与生理盐水和媒介物对照组, 以及用 5、9 和 30 mg/kg Taxol®处理的动物结果进行比较。

在给药后即刻、给药后 1 小时和 4 小时、以及其后每天一次检查动物。在安乐死之前, 从每个动物采集血液进行血液学和血浆测定。

在观察的 30 天期间, 发生 13 例死亡。以 30 mg/kg 紫杉醇剂量 Taxol®处理的所有 12 只动物均在 4 天时死亡。只有一只用 Capxol™处理的动物死亡。此 Capxol™处理的动物接受 90 mg/kg 紫杉醇, 被发现在第 15 天死亡。以 90 mg/kg 或 120 mg/kg 剂量 Capxol™处理的其他动物没有死亡, 因此认为死亡与处理因素无关。

在观察的最初 4 小时期间, 用 Taxol®处理的大多数动物中可观察到立毛和不可置信的步态, 可能是由于药物中的酒精成分。在少数 Capxol™处理的动物中可见到立毛。在用 30 mg/kg 紫杉醇剂量 Taxol®处理的动物中观察到立毛和昏睡, 并在 4 天时死亡。除了在 90mg/ml 和 120mg/ml 剂量水平中观察到数例立毛以外, 在 Capxol™处理的动物中没有观察到明显的毒性表现。

在 Capxol™处理的动物中没有异常报告。第 8 天和第 31 天的总体验尸结果是正常的。在 Capxol™处理的雄性动物的生殖器官内可

见到显著的剂量相关性改变。观察到附睾管上皮细胞的变性和空泡化，经常伴有多灶性间质淋巴细胞浸润。随着 Capxol™剂量增加，精巢精细管萎缩愈加严重。以病理学家的意见，在用 9、30、90 和 120 mg/kg 剂量 Capxol™处理的动物中，雄性生殖器官观察到显著的损害。这些改变包括精巢的弥漫性变性和坏死。这些改变在接受较高剂量 Capxol™的动物中最为普遍。在对照组动物、媒介物对照组动物或那些用 Taxol®处理的动物精巢中未见改变。

此发现是意外的，并对治疗激素依赖的肿瘤，如前列腺癌，有重要的治疗意义。去除精巢（睾丸切除术）是治疗前列腺癌的一种治疗手段。Capxol™通过在该部位获得紫杉醇的高局部浓度、通过活性成分的持续活性、通过减低睾丸功能以及没有聚乙二醇媒介物的毒性，而代表了治疗此疾病的一种新配方。因此，用 Capxol™治疗可使睾酮和其他雄激素的水平减低。

用中等剂量水平 Taxol®处理的动物中可见到大脑皮层的坏死。这可解释用更高剂量 Taxol®处理的动物的死亡。Capxol™处理的动物中没有见到大脑损害。

这种大脑和中枢毒性的缺乏是令人惊奇的，对于脑肿瘤治疗和获得从 5—120 mg/kg 范围的大鼠高全身剂量（相当于人 30—700mg/m² 的剂量）有重要意义。

总之，Capxol™比 Taxol®有相当小的毒性。在高于 9 mg/kg 剂量下，没有 Taxol®处理动物可生存。除了在 90 mg/kg Capxol™组中的一例偶然死亡外，接受 Capxol™达到和包括 120 mg/kg 剂量的所有动物均生存。Capxol™对雄性生殖器官有高剂量相关的作用，并抑制雄性的体重。给予 Capxol™剂量达到和包括 120 mg/kg 的雌性大鼠中没有显示任何毒性作用。这些高剂量通过团块注射方式给药，代表了相当于人 30—700mg/m² 的剂量。

实施例 63

静脉内给药后环孢菌素超微颗粒 (Capsorine I.V.) 的药物动力学 (PK) 数据

(同目前 Sandoz 销售的 Sandimmune I.V. 配方比较)

按前述方法(实施例 13 和 14)制备的环孢菌素超微颗粒(Capsorine I.V.)在盐水中重制, 并通过静脉内团块注射给予第 1 组 3 只 Sprague Dawley 大鼠。第二组 3 只大鼠给予在盐水中稀释的含聚乙二醇化合物/乙醇的 Sandimmune I.V.。每组接受 2.5mg/kg 相同剂量的环孢菌素。在 0、5、15、30 (分钟) 和 1、2、4、8、24、36 和 48 (小时) 时采取血液样本。血液中环孢菌素的水平用 HPLC 测试, 并测定典型的 PK 参数。PK 曲线显示如下典型的超时延迟:

	超时延迟	
	AUC, mg-hr/ml	Cmax, ng/ml
Capsorine I.V.	12, 228	2, 853
Sandimmune I.V.	7, 791	2, 606

此外, 由于 Sandimmune I.V. 配方的毒性, 该组 3 只大鼠中的 2 只在给药后 4 小时内死亡。因此, 按照本发明制备的超微颗粒配方 (Capsorine I.V.) 同市场得到的配方 (Sandimmune I.V.) 相比显示出较大的 AUC, 且无毒。

实施例 64

口服给药后环孢菌素超微颗粒 (Capsorine Oral) 的药物动力学 (PK) 数据

同 Neoral (目前 Sandoz 销售的配方) 比较

上面制备的环孢菌素超微颗粒以桔汁形式经口管饲给第 1 组 3 只 Sprague Dawley 大鼠。第二组 3 只大鼠也通过管饲法给予经桔汁稀释

的 Neoral，它是市场得到的含乳化剂的微乳状液配方。每组以相等体积的桔汁接受相同剂量的 12 mg/kg 环孢菌素。在 0、5、15、30（分钟）和 1、2、4、8、24、36 和 48（小时）时采取血液样本。血液中环孢菌素的水平用 HPLC 测试，并测定典型的 PK 参数。PK 曲线显示如下典型的超时延迟：

	超时延迟	
	AUC, mg-hr/ml	Cmax, ng/ml
Capsorine Oral	3,195	887
Neoral	3,213	690

因此，本发明的超微滴配方（Capsorine Oral）显示与市场得到的配方（Neoral）相似的 PK 性能。

实施例 65

Capxol™的临床调查：目的和利益

I/II 期试验最初剂量选择的根本理由，是根据 Capxol™制剂同 Taxol®相比显著低毒性的临床前资料。上面的临床前资料表明，I/II 期研究的 Capxol™最初剂量水平应当用确定的 Taxol®中紫杉醇的 MTD（最大耐受剂量）。基于目前的临床前资料，期望在此时市场许可的临床试验目的应当是，消除在给予紫杉醇以前预先用药的需要；确定 Capxol™对 Taxol®的相等剂量一即，确定得到同等抗肿瘤反应的剂量；消除紫杉醇持续 i.v.输注（3 到 24 小时）的需要，代之以更短时间内的给药（<1 小时或团块形式）。

对紫杉醇，Capxol™配方有许多潜在的优点。Capxol™为仅含紫杉醇和人血浆白蛋白的冻干粉剂。由于冻干粉剂重制时形成的胶体溶液性质，无需用毒性乳化剂如聚乙二醇化合物（在紫杉醇的 BMS 配方中）或多乙氧基醚 80（在 docetaxel 的 Rhone Poulenc 配方中），和诸如乙醇的溶剂以溶解药物。去除毒性乳化剂将减少已知在 Taxol®等产品中发生的严重过敏和过敏反应的发生率。

此外，在给药前不用给予类固醇、抗组胺药的预先处理。

由于毒性减低，如 LD_{10}/LD_{50} 研究所显示的，可使用较高的剂量而得到更高的效能。

骨髓抑制的减少（同 Taxol[®]相比），期望可缩短治疗周期的时间（通常为 3 周）和改善治疗结果。

Capxol[™]可以比 Taxol[®]（0.6mg/ml）更高的浓度（高达 20 mg/ml）给药，容许更低的注射容积并可能用静脉内团块注射方式给药。

用 Taxol[®]的一个已知问题是紫杉醇在留置导管内的沉淀。这引起不稳定和无法控制剂量。由于新配方 Capxol[™]的胶体溶液的内在稳定性，沉淀的问题减轻了。

文献提示，在近百纳米大小范围内的颗粒，在肿瘤部位主要地通过血管渗漏分散入肿瘤。因此，Capxol[™]配方中的紫杉醇胶体颗粒可望显示优先靶向的效果，大大减轻给予 BMS 配方中的紫杉醇的副作用。

实施例 66

Capxol[™]临床试验设计的要点

适应症：转移性乳癌

剂量方案：I/II 期试验最初剂量选择的根本理由，是根据 Capxol[™]同 Taxol[®]相比显著低毒性的临床前资料（小鼠单剂量 LD_{10} 的剂量）。经测定，小鼠单剂量 LD_{10} 是 398.1mg/kg。将此剂量转换为体表面积单位（3 乘 mg/kg 值）产生估计值为 1194.3 或大约 1200mg/m²。对人，保守的开始剂量即此值的 1/10，为 120 mg/m²。然而，已经充分证实紫杉醇在 175 剂量下是安全的，根据用 Capxol[™]进行的试点研究显示在大鼠中骨髓抑制很低，因此，175 mg/m² 剂量的 Capxol[™]配方应

当是安全的。如果可能，Capxol™溶液可在大约 15—30 分钟或更短时间内给药。

实施例 67

Capxol™临床发展规划：结合 I/II 期剂量调查研究/有限效能试验

病人/目的：有进展性乳腺转移疾病，对标准治疗无反应的病人。此试验的目的应是确定有转移性乳癌的病人用 Capxol™作为单一药剂的反应率。

剂量—I 期试验内容：用于 I 期试验内容的最初剂量应是已知的紫杉醇最大耐受剂量（MTD）（135 mg/m²）。随后的剂量将以 25% 的梯度逐步增加直到达到 MTD。升到下一剂量水平的能力应根据有害事件的方式而定。即，当 6 个病人中有 2 个或以上在某剂量水平出现 3 级非骨髓抑制毒性或 4 级骨髓抑制毒性（按 WHO 毒性标准）时，应当中止研究。Capxol™的剂量应指定为紧接试验中止剂量前的剂量。根据最初单剂量团块给药计划的结果，必要时也可使用其他的备选给药计划，如每天×5 或 24 小时输注。

药物动力学：对于所选的病人，应当在指定的适当时间点用取得的血清进行完整的药物动力学研究。将测定诸如 $t^{1/2}$ （ α 和 β 相）、AUC、 C_{max} 、廓清和分布容积等参数。

病人—II 期试验内容：已经确定 MTD 后，那些与用于最初紫杉醇试验相似的乳癌病人将选入 II 期试验。例数将根据在 95% 置信水平，以可接受的精确度确定肿瘤反应率的需要而定。正如所指的，此研究的唯一目的，是通过显示含 Capxol™期望反应率的可信区间，确定标准紫杉醇的等同量。所用的病人样本大小应是 30 例，这在 I/II 期研究的 II 期试验中是普遍的。

测量：首要的结果应是登记病人的肿瘤反应率（CR/PR）。此外，

应监测反应的时间、反应持续时间和存活时间。还应从有害事件的发生率和标准实验室参数的改变中评价治疗的安全性。

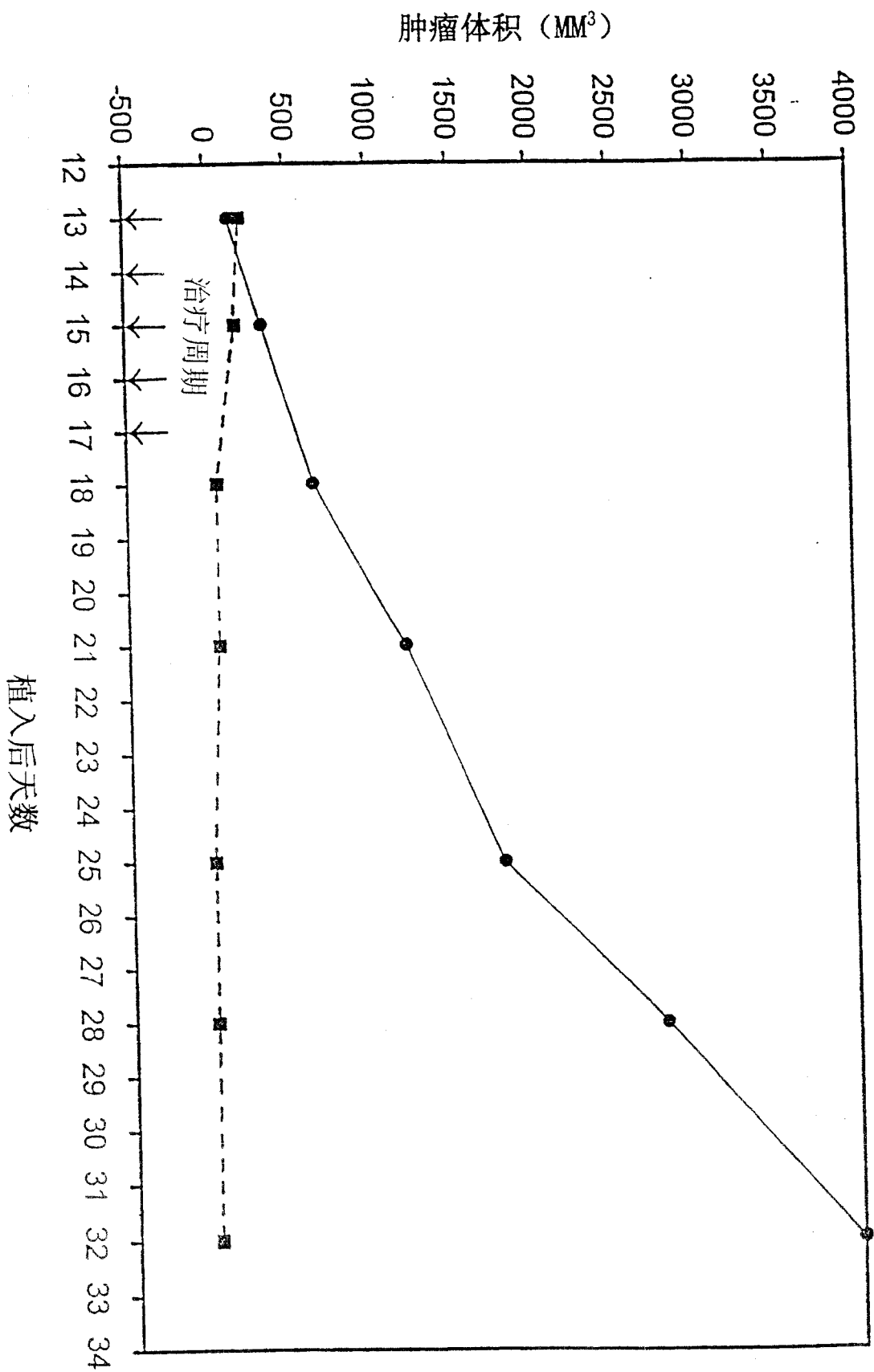


图 1

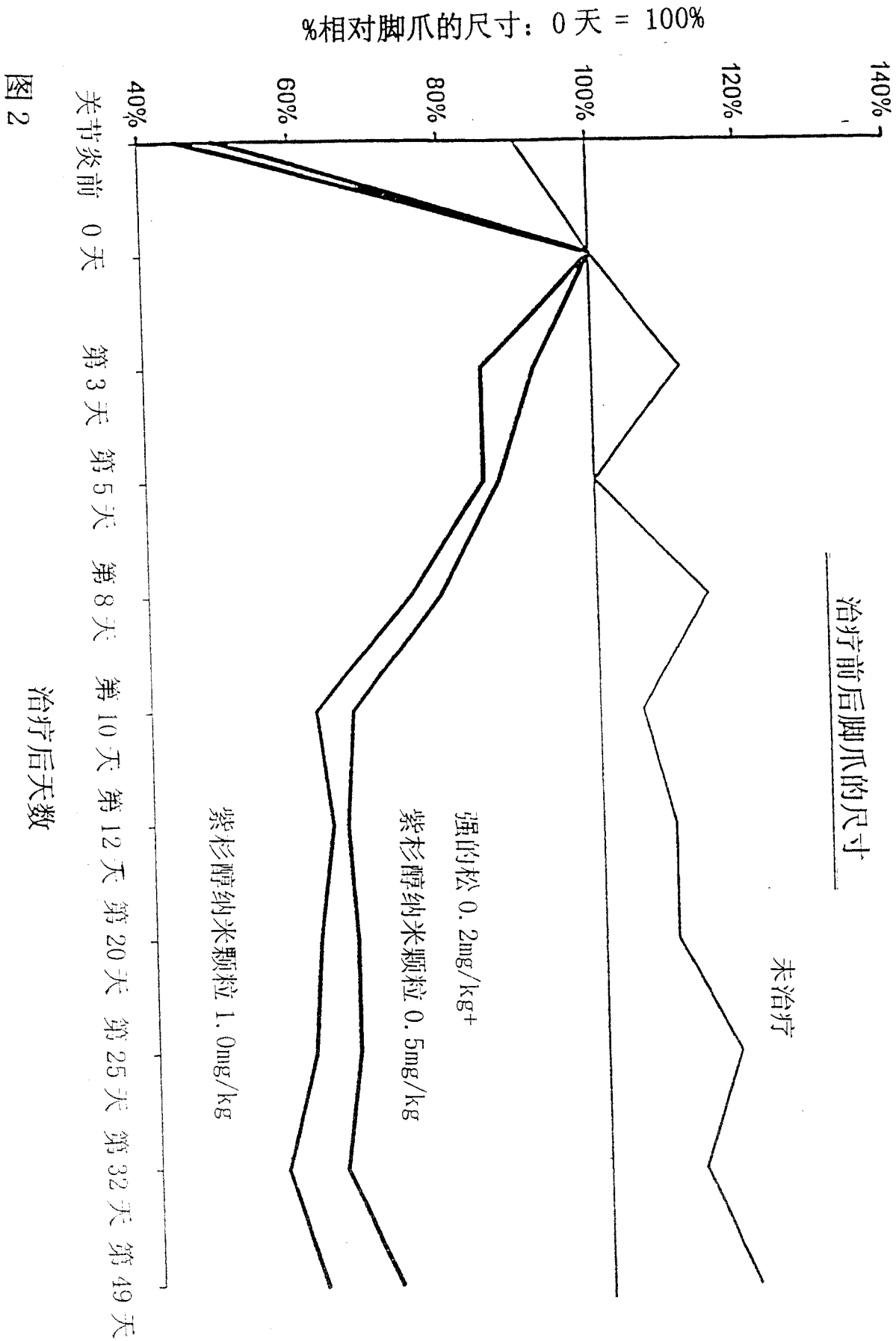


图 2

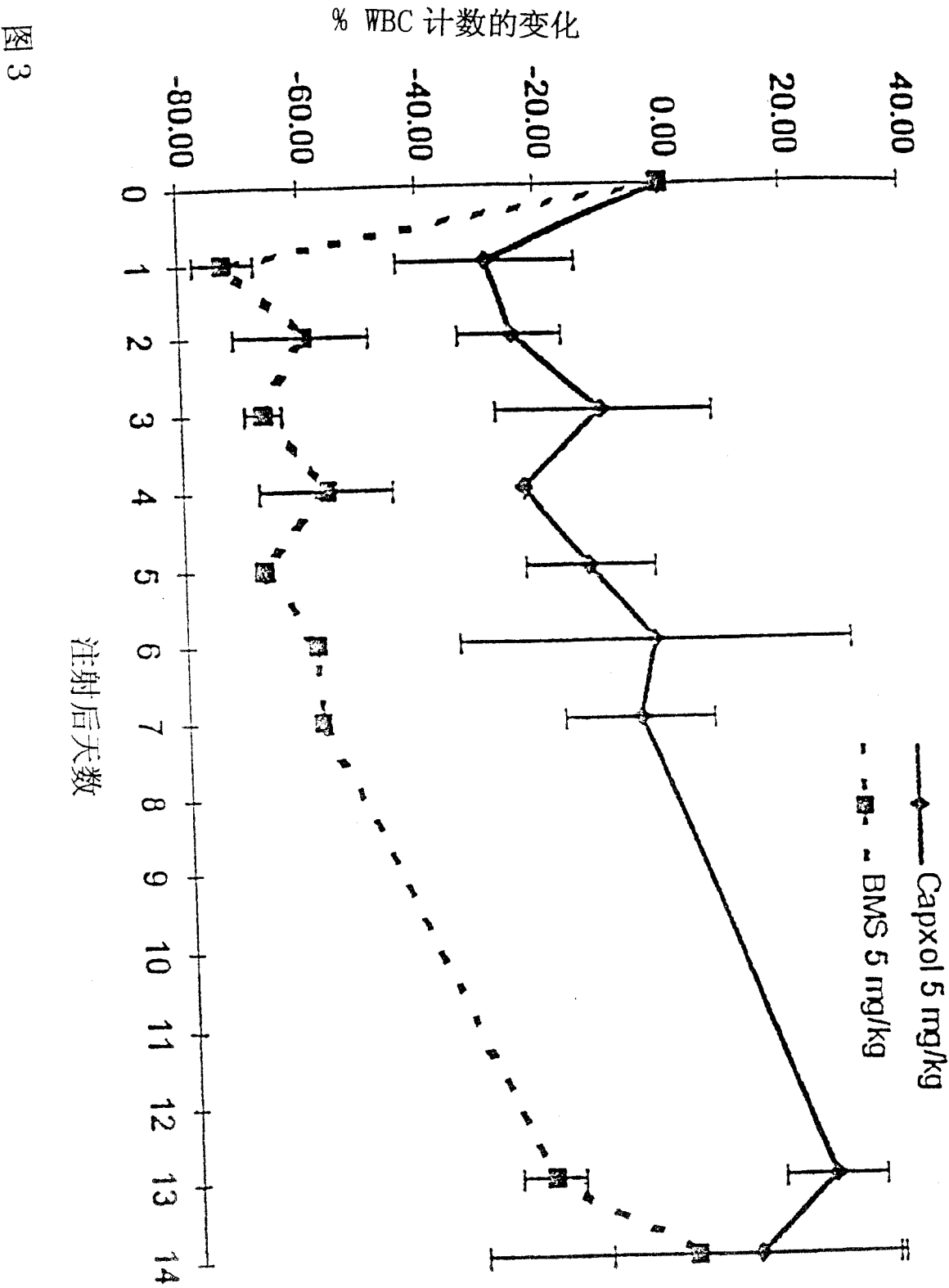


图 3

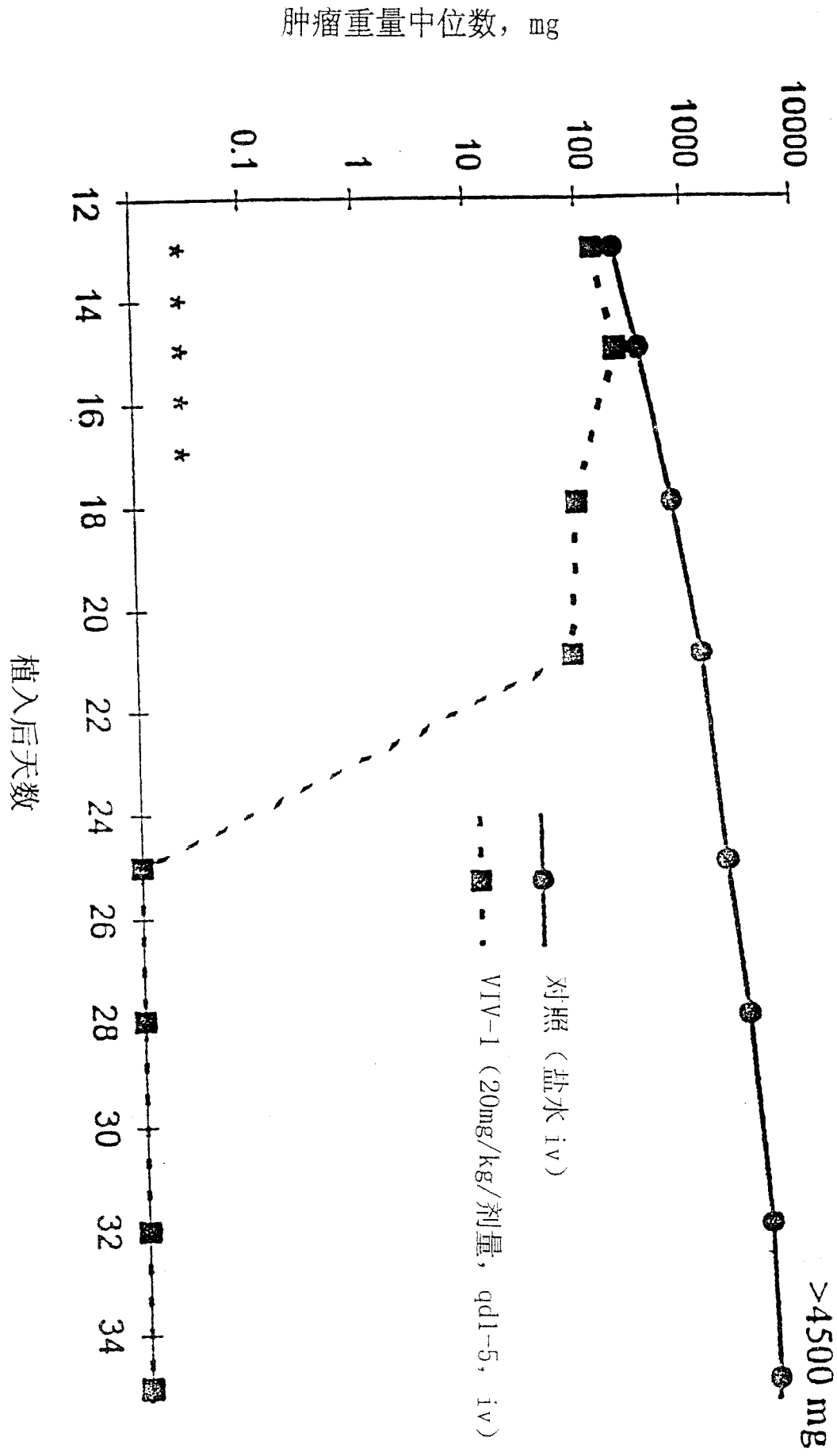


图 4