



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103096901 A

(43) 申请公布日 2013. 05. 08

(21) 申请号 201180033234. 0

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011. 05. 04

A61K 31/74 (2006. 01)

(30) 优先权数据

12/774, 419 2010. 05. 05 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2013. 01. 04

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2011/035147 2011. 05. 04

(87) PCT申请的公布数据

W02011/140194 EN 2011. 11. 10

(71) 申请人 千寿美国有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 井上淳 T. 沙

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 温宏艳 李进

权利要求书1页 说明书33页 附图40页

(54) 发明名称

眼用组合物

(57) 摘要

本发明提供了一种包含超支化聚酯的眼用组合物。所述眼用组合物还可以包含碳酸酐酶抑制剂,其中所述超支化聚酯增加碳酸酐酶抑制剂的水溶解度,并增加活性剂的角膜渗透。所述眼用组合物还可以包含非离子表面活性剂(诸如 PEG、聚山梨酯、HPMC 或 HEC) 和 β -阻滞剂(诸如卡替洛尔、左布诺洛尔、倍他洛尔、美替洛尔、噻吗洛尔或普萘洛尔)。所述眼用制剂中的超支化聚酯的浓度应当小于或等于 4%(w/v) 以便避免对人角膜细胞的任何细胞毒性效应和由此产生的眼刺激。

1. 一种包含超支化聚合物的眼用组合物,其中所述超支化聚合物包含选自下述的末端官能团:胺基团、羟基、脂肪酸基团和 PEG。
2. 根据权利要求 1 所述的眼用组合物,所述眼用组合物另外包含碳酸酐酶抑制剂。
3. 根据权利要求 1 所述的眼用组合物,所述眼用组合物另外包含非离子表面活性剂。
4. 根据权利要求 2 所述的眼用组合物,所述眼用组合物另外包含非离子表面活性剂。
5. 根据权利要求 1 所述的眼用组合物,其中所述超支化聚合物的平均分子量是在 1,000 至 750,000 道尔顿(M_w) 范围内。
6. 根据权利要求 1 或 2 所述的眼用组合物,其中所述超支化聚合物包含选自下述的核心:聚乙烯亚胺、聚丙烯亚胺和聚酯。
7. 根据权利要求 1 所述的眼用组合物,其中 pH 是在 3.0 至 8.0 范围内。
8. 根据权利要求 1 所述的眼用组合物,其中所述超支化聚合物的浓度是在 0.01% 至 5% (w/v) 范围内。
9. 根据权利要求 2 所述的眼用组合物,所述眼用组合物另外包含 β -阻滞剂。
10. 根据权利要求 2 所述的眼用组合物,其中所述碳酸酐酶抑制剂选自:多佐胺、布林佐胺和乙酰唑胺。
11. 根据权利要求 3 所述的眼用组合物,其中所述非离子表面活性剂选自:PEG、聚山梨酯、羟丙基甲基纤维素和羟乙基纤维素。
12. 根据权利要求 4 所述的眼用组合物,其中所述非离子表面活性剂选自:PEG、聚山梨酯、羟丙基甲基纤维素和羟乙基纤维素。
13. 根据权利要求 9 所述的眼用组合物,其中所述 β -阻滞剂选自:卡替洛尔、左布诺洛尔、倍他洛尔、美替洛尔、噻吗洛尔和普萘洛尔。
14. 根据权利要求 6 所述的眼用组合物,其中所述超支化聚合物核心是聚酯,并且其中所述超支化聚合物包含作为末端官能团的羟基、脂肪酸基团和 PEG。
15. 根据权利要求 14 所述的眼用组合物,其中所述超支化聚合物的平均分子量是在 1,000 至 12,000 道尔顿(M_w) 范围内。
16. 根据权利要求 14 所述的眼用组合物,其中所述超支化聚合物的浓度是在 0.001 至 4% (w/v) 范围内。
17. 一种包含超支化聚酯、噻吗洛尔、多佐胺和聚山梨酯 80 的眼用组合物,其中所述超支化聚酯包含选自下述的末端官能团:聚酯羟基、脂肪酸基团和 PEG。
18. 一种包含超支化聚酯、噻吗洛尔、布林佐胺和聚山梨酯 80 的眼用组合物,其中所述超支化聚酯包含选自下述的末端官能团:聚酯羟基、脂肪酸基团和 PEG。

眼用组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及包含超支化聚合物的眼用组合物。本发明的超支化聚合物可以是药学上可接受的任意超支化聚合物,例如,具有聚乙烯亚胺、聚丙烯亚胺或聚酯的超支化聚合物。

背景技术

[0002] COSOPT® 和 TRUSOPT® 是由 Merck 开发的商业得到的局部眼用溶液,其用于治疗称作青光眼的眼病。在 TRUSOPT® 的情况下,活性成分仅是多佐胺。在 COSOPT® 的情况下,活性成分是多佐胺和噻吗洛尔(β 阻滞剂)。多佐胺是一种碳酸酐酶(carbonic anhydrase)抑制剂,在 pH 4.0-5.5 时具有 40 mg/mL 的水溶解度。它是白色至灰白色结晶性粉末,它可溶于水,且微溶于甲醇和乙醇中。

[0003] 但是,这些制剂含有 2% (w/v) 多佐胺,并在 pH 5.65 制备,这是由于多佐胺在生理 pH 的有限水溶解度。结果,由于低的 pH, COSOPT® 和 TRUSOPT® 制剂可以导致局部刺激。多佐胺具有 6.35 和 8.5 的 2 个 pKa 值,它们分别对应着质子化的仲胺基团和磺酰胺基团。多佐胺在 pH 6.4 以下主要是它的亲水阳离子形式,在 pH 8.5 以上主要是它的亲水阴离子形式。

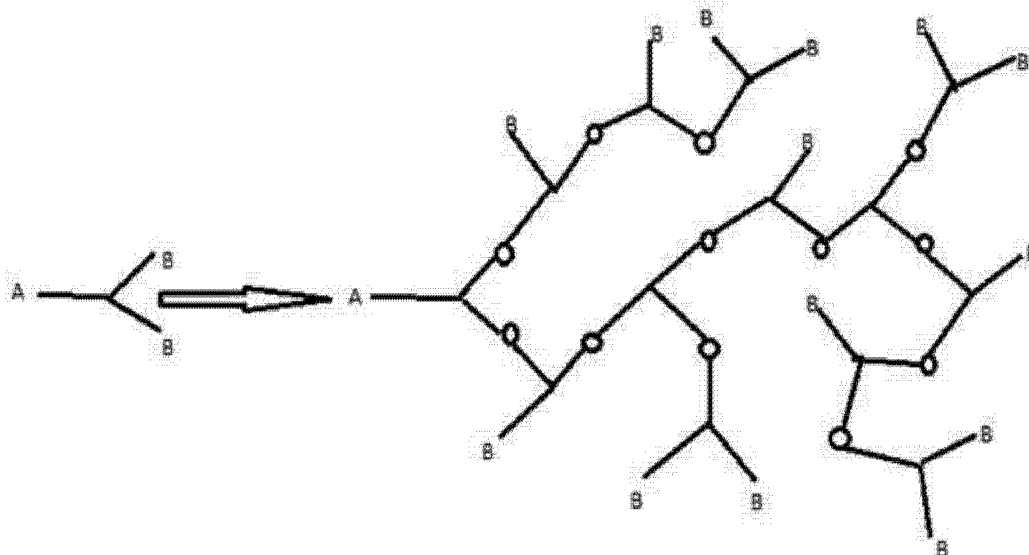
[0004] 因而,多佐胺在具有 6.4 至 8.5 之间的 pH 的溶液中具有相对较低的水溶解度,这主要是因为多佐胺在该生理 pH 范围内的非离子性能。

[0005] AZOPT® (布林佐胺眼用混悬液)1% 是一种布林佐胺无菌水性混悬液,其已经配制成在摇动以后可容易地悬浮和缓慢地沉降。AZOPT® 由 Alcon 开发,且含有布林佐胺作为活性成分。所述制剂具有大约 7.5 的 pH 和 300 mOsm/kg 的重量克分子渗透压浓度(osmolality)。滴注它来降低具有开角型青光眼或眼内高压的患者的眼内压升高。布林佐胺的 pKa 值是 5.9 (胺)和 8.4 (主要是磺酰胺),这允许它根据 pH 而起酸或碱的作用(两性电解质)。它在 pH 5.9 以下主要是它的亲水阳离子形式,在 pH 8.4 以上主要是它的亲水阴离子形式。显然,布林佐胺在生理 pH 会明显更少地质子化(<10%)。因而,布林佐胺在具有 5.9 至 8.4 之间的 pH 的溶液中具有相对较低的水溶解度,这主要是因为布林佐胺在该 pH 范围内的非离子(亲脂)性能。

[0006] 树枝状聚合物是这样的树样聚合物:基于它们的支化体系结构,其可以分为 2 大类,即“完美分支的”(树状物(dendrimers))和“不完美分支的”(超支化聚合物或 HP)。超支化聚合物是具有分支结构(通常围绕一个核心)的分子构造。不同于树状物,超支化聚合物的结构通常缺乏对称性,因为用于构建超支化聚合物的基础单元或单体可以具有不同的性质,且它们的分布是不均匀的。所述聚合物的分支可以具有不同的性质和长度。基础单元或单体的数目可以是不同的,这取决于不同的支化。尽管在不对称的同时,超支化聚合物可以具有:围绕一个核心的高度分支的结构;连续数代或数层的支化;一层末端链。超支化聚合物通常源自一种或多种单体 AB_x 的缩聚作用,其中 A 和 B 是能够一起反应的反应基团, x 是大于或等于 2 的整数。但是,其它制备方法也是可能的。超支化聚合物的特征在于它们的聚合度 $DP=100-b$, 其中 b 是在 B 中的尚未与基团 A 反应的非末端官能团的百分比。

因为所述缩合不是系统性的,聚合度小于 100%。末端基团 T 可以与超支化聚合物反应,以得到在链末端上的特定官能度。

[0007] 超支化聚合物主要通过它们的核心类型和它们的末端基团来鉴别。超支化聚合物的核心类型的实例是聚乙烯亚胺、聚丙烯亚胺、聚二醇、聚醚、聚酯等。具有聚酯核心的超支化聚合物可以称作超支化聚酯。超支化聚合物的末端或表面官能团的实例是胺、羟基、羧酸、脂肪酸、聚乙二醇(PEG)、聚酯等。参见美国专利 6,432,423、美国专利 7,097,856 和美国专利公开 2006/0204472,它们的内容通过引用并入本文。



[0008] 显示了从 AB_2 单体的聚合形成超支化聚合物的示意图。

[0009] 与通过多步合成制备的“结构完美的”树状物相比,可以在一步反应中合成完美度稍微更低的超支化聚合物。因而,不同于树状物,可以快速制备超支化聚合物,它们的制备不需要纯化步骤。结果,超支化聚合物明显不如树状物昂贵。因此,这使得超支化聚合物适用于大规模体内试验,并使得高度支化的聚合物成为药物递送(甚至诸如布洛芬等常见药物)的候选物(Kannan, R. M. 等人, *Biomedical Applications of Nanotechnology*, 2007, John Wiley & Sons Inc., 第 105 页)。

[0010] 发明目的

本发明的一个目的是提供一种改进的眼用组合物,其具有改善的活性剂的水溶解度和角膜渗透。

发明内容

[0011] 发明人已经研究了包含超支化聚合物的眼用组合物。发明人已经发现,超支化聚合物是具有高生物粘附力的粘膜粘着性聚合物,其提供带负电荷的角膜粘蛋白膜和阳离子超支化聚合物之间的强静电相互作用。

[0012] 发明人已经发现,超支化聚合物会增加用于青光眼治疗的碳酸酐酶抑制剂(诸如多佐胺或布林佐胺)的水溶解度。另外,发明人已经发现,多佐胺或布林佐胺的水溶解度随着超支化聚合物浓度的增加而线性增加。此外,基于体外人角膜上皮细胞培养研究,发明人已经发现超支化聚合物,诸如具有羟基官能团的 Bis-MPA 超支化聚酯(第 2 代),可以没有细胞毒性或眼刺激地安全地使用至高达 4% (w/v)。另外,发明人已经发现,超支化聚合物会增

加多佐胺和噻吗洛尔向完整角膜中的角膜渗透和分配,并增加多佐胺和噻吗洛尔向亲脂性角膜中的分配。

[0013] 因此,本发明提供了:

(1) 一种包含超支化聚合物的眼用组合物,其中所述超支化聚合物包含选自下述的末端官能团:胺基团、羟基、脂肪酸基团和聚乙二醇(PEG)。

[0014] (2) 根据上述(1)的眼用组合物,所述眼用组合物另外包含碳酸酐酶抑制剂。

[0015] (3) 根据上述(1)或(2)的眼用组合物,所述眼用组合物另外包含非离子表面活性剂。

[0016] (4) 根据上述(1)的眼用组合物,其中所述超支化聚合物的平均分子量是在 1,000 至 750,000 道尔顿(M_w) 范围内。

[0017] (5) 根据上述(1)或(2)的眼用组合物,其中所述超支化聚合物包含选自下述的核心:聚乙烯亚胺、聚丙烯亚胺和聚酯。

[0018] (6) 根据上述(1)的眼用组合物,其中 pH 是在 3.0 至 8.0 范围内。

[0019] (7) 根据上述(1)的眼用组合物,其中所述超支化聚酯的浓度是在 0.01% 至 5% (w/v) 范围内。

[0020] (8) 根据上述(2)的眼用组合物,所述眼用组合物另外包含 β -阻滞剂。

[0021] (9) 根据上述(2)的眼用组合物,其中所述碳酸酐酶抑制剂选自:多佐胺、布林佐胺和乙酰唑胺。

[0022] (10) 根据上述(3)的眼用组合物,其中所述非离子表面活性剂选自:PEG、聚山梨酯、羟丙基甲基纤维素(HPMC)和羟乙基纤维素(HEC)。

[0023] (11) 根据上述(8)的眼用组合物,其中所述 β -阻滞剂选自:卡替洛尔、左布诺洛尔、倍他洛尔、美替洛尔、噻吗洛尔和普萘洛尔。

[0024] (12) 根据上述(5)的眼用组合物,其中所述超支化聚合物核心是聚酯,并且其中所述超支化聚合物包含作为末端官能团的羟基、脂肪酸基团和 PEG。

[0025] (13) 根据上述(12)的眼用组合物,其中所述超支化聚合物的平均分子量是在 1,000 至 12,000 道尔顿(M_w) 范围内。

[0026] (14) 根据上述(12)的眼用组合物,其中所述超支化聚合物的浓度是在 0.001% 至 4% (w/v) 范围内。

[0027] (15) 一种包含超支化聚酯、噻吗洛尔、多佐胺和聚山梨酯 80 的眼用组合物,其中所述超支化聚酯包含选自下述的末端官能团:聚酯羟基、脂肪酸基团和 PEG。

[0028] (16) 一种包含超支化聚酯、噻吗洛尔、布林佐胺和聚山梨酯 80 的眼用组合物,其中所述超支化聚酯包含选自下述的末端官能团:聚酯羟基、脂肪酸基团和 PEG。

附图说明

[0029] 图 1 显示了多佐胺在 0.1% (w/v) 磷酸盐缓冲液中的 pH-溶解度特性。

[0030] 图 2 显示了超支化聚合物浓度对多佐胺在 pH 5.65 的 0.1% (w/v) 磷酸盐缓冲液中的水溶解度的依赖性。

[0031] 图 3 显示了超支化聚合物浓度对多佐胺在 pH 7 的 0.1% (w/v) 磷酸盐缓冲液中的水溶解度的依赖性。

[0032] 图 4 显示了 PEG 8000 和不同浓度的超支化聚合物(Lupasol®PS)的组合对多佐胺在 pH 7 的水溶解度的影响。

[0033] 图 5 显示了作为在 0.1% (w/v) 磷酸盐缓冲液中的不同溶液在 20℃时的剪切率的函数的粘度。

[0034] 图 6 显示了在 pH 7 和 80 s^{-1} 的剪切率时的生物粘附力。

[0035] 图 7 显示了多佐胺在 pH 5.65 和 pH 7 时的最大水溶解度,在所有情况下,在有 0.5% 噻吗洛尔存在下,向水溶液中加入添加剂。

[0036] 图 8 显示了在 pH 7 时的最大多佐胺溶解度,其中在有 0.5% 噻吗洛尔存在下,使用不同的添加剂组合。

[0037] 图 9 显示了标准的并排扩散池(side by side diffusion cell)的示意图。

[0038] 图 10 显示了就含有 Lupasol®PS 超支化聚合物的制剂而言,多佐胺穿过完整兔角膜的平均渗透特性(n=2)。

[0039] 图 11 显示了就含有 Lupasol®PS 超支化聚合物的制剂而言,噻吗洛尔穿过完整兔角膜的平均渗透特性(n=2)。

[0040] 图 12 显示了就含有 Lupasol®PS 超支化聚合物的制剂而言,在 3 小时以后,多佐胺和噻吗洛尔的总角膜渗透平均百分比。

[0041] 图 13 显示了就含有 Lupasol®PS 超支化聚合物的制剂而言,多佐胺和噻吗洛尔的平均角膜渗透系数。

[0042] 图 14 显示了就含有 Lupasol®PS 超支化聚合物的制剂而言,多佐胺和噻吗洛尔渗透穿过完整兔角膜的平均扩散系数。

[0043] 图 15 显示了就含有 Lupasol®PS 超支化聚合物的制剂而言,多佐胺和噻吗洛尔渗透穿过完整兔角膜的平均分配系数。

[0044] 图 16 显示了布林佐胺在具有不同 pH 值的 10 mM 磷酸盐缓冲液中的水溶解度。

[0045] 图 17 显示了布林佐胺在 pH 7 时的最大水溶解度,其中在有和没有 0.5% 噻吗洛尔存在下,向水溶液中加入添加剂。

[0046] 图 18 显示了就含有 Boltorn®H20 超支化聚合物的制剂而言,多佐胺(n=2) 穿过兔角膜的平均渗透特性。

[0047] 图 19 显示了就含有 Boltorn®H20 超支化聚合物的制剂而言,噻吗洛尔(n=2) 穿过兔角膜的平均渗透特性。

[0048] 图 20 显示了就含有 Boltorn®H20 超支化聚合物的制剂而言,在 2 小时以后,多佐胺和噻吗洛尔的总角膜渗透平均百分比。

[0049] 图 21 显示了就含有 Boltorn®H20 超支化聚合物的制剂而言,多佐胺和噻吗洛尔的平均角膜渗透系数。

[0050] 图 22 显示了就含有 Boltorn®H20 超支化聚合物的制剂而言,多佐胺和噻吗洛尔渗透穿过完整兔角膜的平均扩散系数。

[0051] 图 23 显示了就含有 Boltorn®H20 超支化聚合物的制剂而言,多佐胺和噻吗洛尔渗透穿过完整兔角膜的平均分配系数。

[0052] 图 24 显示了布林佐胺在 pH 7.4 时的最大水溶解度,其中在有 0.5% (w/v) 噻吗洛尔存在下,向乳剂溶液中加入 Boltorn®W3000 (两亲的 HP)。

[0053] 图 25 显示了就含有 Boltorn®W3000 超支化聚合物的制剂而言,多佐胺(n=2)穿过完整兔角膜的平均渗透特性。

[0054] 图 26 显示了就含有 Boltorn®W3000 超支化聚合物的制剂而言,噻吗洛尔穿过完整兔角膜的平均渗透特性(n=2)。

[0055] 图 27 显示了就含有 Boltorn®W3000 超支化聚合物的制剂而言,在 3 小时以后,多佐胺和噻吗洛尔的总角膜渗透平均百分比。

[0056] 图 28 显示了就含有 Boltorn®W3000 超支化聚合物的制剂而言,多佐胺和噻吗洛尔的平均角膜渗透系数。

[0057] 图 29 显示了就含有 Boltorn®W3000 超支化聚合物的制剂而言,多佐胺和噻吗洛尔渗透穿过完整兔角膜的平均扩散系数。

[0058] 图 30 显示了就含有 Boltorn®W3000 超支化聚合物的制剂而言,多佐胺和噻吗洛尔渗透穿过完整兔角膜的平均分配系数。

[0059] 图 31 显示了布林佐胺在 pH 7.4 时的最大水溶解度,其中在有 0.5% (w/v) 噻吗洛尔存在下,加入第 2 代 Bis-MPA 超支化聚酯或第 3 代 Bis-MPA 超支化聚酯。

[0060] 图 32 显示了不同浓度的超支化聚酯(羟基,第 2 和 3 代)和 AZOPT® 的体外人角膜上皮细胞生存力。

[0061] 图 33 显示了不同浓度的 Bis-MPA 超支化聚酯的细胞毒性。

[0062] 图 34 显示了多佐胺在 pH 7.4 时的溶解度和稳定性,其中在有 0.5% (w/v) 噻吗洛尔存在下,加入 Bis-MPA 超支化聚酯和非离子表面活性剂。

[0063] 图 35 显示了多佐胺在 pH 7.4 时的最大水溶解度,其中在有 0.5% (w/v) 噻吗洛尔存在下,加入不同的添加剂。

[0064] 图 36 显示了就含有 Bis MPA 超支化聚酯(第 2 代)的制剂而言,多佐胺的完整角膜渗透特性。

[0065] 图 37 显示了就含有 Bis MPA 超支化聚酯(第 2 代)的制剂而言,噻吗洛尔的完整角膜渗透特性。

[0066] 图 38 显示了就含有 Bis MPA 超支化聚酯(第 2 代)的制剂而言,在 3 小时以后,多佐胺和噻吗洛尔的总角膜渗透平均百分比。

[0067] 图 39 显示了就含有 Bis MPA 超支化聚酯(第 2 代)的制剂而言,多佐胺和噻吗洛尔的渗透系数。

[0068] 图 40 显示了就含有 Bis MPA 超支化聚酯(第 2 代)的制剂而言,多佐胺和噻吗洛尔的分配系数。

具体实施方式

[0069] 本发明的组合物是用于治疗眼病症的可局部给药的治疗组合物。这样的眼病症包括:青光眼,以及眼睛疾病,诸如白内障、结膜炎、感染、炎症或视网膜病变。

[0070] 下面提供了本发明的详细描述。

[0071] 本发明包括一种含有超支化聚合物的眼用组合物。

[0072] 根据本发明的超支化聚合物可以是药学上可接受的任意超支化聚合物,例如,具有聚乙烯亚胺、聚丙烯亚胺或聚酯核心的超支化聚合物。在本发明的眼用组合物中的超支

化聚合物的分子量是在 1,000 至 750,000 道尔顿范围内,优选地在 1,000 至 12,000 道尔顿范围内。所述分子量是通过动态光散射测得的重量平均分子量。在本发明的眼用组合物中的超支化聚合物的浓度是在 0.001% 至 10% (w/v) 范围内,优选地在 0.001% 至 5% (w/v) 范围内,更优选地在 0.001% 至 4% (w/v) 范围内,更优选地在 0.01% 至 4% (w/v) 范围内,更优选地在 0.01% 至 3% (w/v) 范围内。

[0073] 上面讨论的眼用组合物还可以包含碳酸酐酶抑制剂。碳酸酐酶抑制剂是一类抑制碳酸酐酶活性的药物,且已知可用作抗青光眼剂。可以存在于本发明的眼用组合物中的碳酸酐酶抑制剂的实例是:多佐胺、布林佐胺或乙酰唑胺。

[0074] 上面讨论的眼用组合物还可以包含非离子表面活性剂。所述非离子表面活性剂可以是,已知为药学上可接受的添加剂的任意非离子表面活性剂,例如,聚山梨酯 80、PEG 8000、HPMC 或 HEC。

[0075] 本发明的眼用组合物有利地在调节至被常规地采用以用于向眼局部施用的 pH 范围以后使用,且通常在调节至 pH 3-8、优选地 pH 5-8 以后使用。就 pH 调节而言,可以使用盐酸、醋酸、氢氧化钠等。

[0076] 本发明的眼用组合物还可以包含 β -阻滞剂。已知 β -阻滞剂会降低眼内部的压力(眼内压),并因而用于降低青光眼患者的视神经损伤和视力丧失的风险。在本发明的眼用组合物中的 β -阻滞剂可以是已知在眼用组合物中可接受的任意 β -阻滞剂,诸如卡替洛尔、左布诺洛尔、倍他洛尔、美替洛尔、噻吗洛尔和普萘洛尔。

[0077] 本发明的第一个具体实施方案是包含超支化聚合物、噻吗洛尔、多佐胺、PEG 8000 和聚山梨酯 80 的眼用组合物。

[0078] 这样的组合物优选地包含:约 0.001%-10% (w/v)、最优选约 1-5% (w/v) 的超支化聚合物,和 0.05-1% (w/v)、最优选约 0.5% (w/v) 的噻吗洛尔,和约 0.05-5% (w/v)、最优选约 0.5-2% (w/v) 的多佐胺,和约 0.05-5% (w/v)、最优选约 0.5-4% (w/v) 的 PEG 8000,和约 0.05-5% (w/v)、最优选约 0.5-4% (w/v) 的聚山梨酯 80,且向每只受影响的眼睛每天施用 1 次或 2 次。

[0079] 本发明的第二个具体实施方案是包含超支化聚合物、噻吗洛尔、布林佐胺、PEG 8000 和聚山梨酯 80 的眼用组合物。

[0080] 这样的组合物优选地包含:约 0.001%-10% (w/v)、最优选约 1-5% (w/v) 的超支化聚合物,和 0.05-1% (w/v)、最优选约 0.5% (w/v) 的噻吗洛尔,和约 0.05-5% (w/v)、最优选约 0.5-2% (w/v) 的布林佐胺,和约 0.05-5% (w/v)、最优选约 0.5-4% (w/v) 的 PEG 8000,和约 0.05-5% (w/v)、最优选约 0.5-4% (w/v) 的聚山梨酯 80,且向每只受影响的眼睛每天施用 1 次或 2 次。

[0081] 本发明的第三个具体实施方案是包含超支化聚酯、噻吗洛尔、多佐胺、PEG 8000 和聚山梨酯 80 的眼用组合物。

[0082] 这样的组合物优选地包含:约 0.1%-10% (w/v)、最优选约 1-5% (w/v) 的超支化聚酯,和 0.05-1% (w/v)、最优选约 0.5% (w/v) 的噻吗洛尔,和约 0.05-5% (w/v)、最优选约 0.5-2% (w/v) 的多佐胺,和约 0.05-5% (w/v)、最优选约 0.5-4% (w/v) 的 PEG 8000,和约 0.05-5% (w/v)、最优选约 0.5-4% (w/v) 的聚山梨酯 80,且向每只受影响的眼睛每天施用 1 次或 2 次。

[0083] 本发明的第四个具体实施方案是包含超支化聚酯、噻吗洛尔、布林佐胺、PEG 8000 和 PEG 8000 的眼用组合物。

[0084] 这样的组合物优选地包含：约 0.1%-10% (w/v)、最优选约 1-5% (w/v) 的超支化聚酯，和 0.05-1% (w/v)、最优选约 0.5% (w/v) 的噻吗洛尔，和约 0.05-5% (w/v)、最优选约 0.5-2% (w/v) 的布林佐胺，和约 0.05-5% (w/v)、最优选约 0.5-4% (w/v) 的 PEG 8000，和约 0.05-5% (w/v)、最优选约 0.5-4% (w/v) 的聚山梨酯 80，且向每只受影响的眼睛每天施用 1 次或 2 次。

[0085] 根据本发明的眼用组合物可以包含药理学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂，它们本身是已知的，且可以通过用于制备眼用组合物的本身已知的方法来配制。本发明的眼用组合物可以以常规地用作眼用制剂，例如，滴眼剂、乳剂和眼用软膏剂的任意药物剂型的形式提供。

[0086] 滴眼剂制剂可以是，例如，水性制剂，诸如作为澄清溶液的眼用溶液、眼用混悬剂、眼用乳剂，以及非水性制剂，诸如非水性的眼用溶液和非水性的眼用混悬剂。

[0087] 眼用溶液制剂可以含有通常掺入的各种添加剂，诸如：缓冲剂（例如，磷酸盐缓冲剂、硼酸盐缓冲剂、柠檬酸盐缓冲剂、酒石酸盐缓冲剂、乙酸盐缓冲剂、氨基酸、醋酸钠、柠檬酸钠等等）、等渗剂（例如，糖类诸如山梨醇、葡萄糖和甘露醇，多元醇类诸如甘油、浓缩甘油、PEG 和丙二醇，盐类诸如氯化钠）、防腐剂或消毒剂（例如，苯扎氯铵、苄索氯铵、对羟基苯甲酸酯类诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸乙酯、苯甲醇、苯乙醇、山梨酸或它的盐、硫柳汞、三氯叔丁醇等等）、增溶助剂或稳定剂（例如，环糊精类和它们的衍生物、水溶性聚合物诸如聚乙烯吡咯烷酮、表面活性剂诸如泰洛沙泊、pH 调节剂（例如，盐酸、醋酸、磷酸、氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵等等）、增稠剂（例如，HEC、羟丙基纤维素、甲基纤维素、HPMC、羧甲基纤维素和它们的盐）、螯合剂（例如，依地酸钠、柠檬酸钠、浓缩的磷酸钠）等等。

[0088] 除了上面列出的添加剂以外，水性混悬剂形式的滴眼剂制剂还可以含有助悬剂（例如，聚乙烯吡咯烷酮、单硬脂酸甘油酯）和分散剂（例如，表面活性剂诸如泰洛沙泊，离子聚合物诸如海藻酸钠），由此确保所述滴眼剂制剂是进一步均匀的微粒和令人满意地分散的水性混悬液。

[0089] 水性混悬剂形式的滴眼剂制剂优选地含有：作为缓冲剂的柠檬酸钠或醋酸钠、作为等渗剂的浓缩的甘油和 / 或丙二醇以及作为助悬剂的聚乙烯吡咯烷酮。一种优选的分散剂是表面活性剂和 / 或海藻酸钠。这样的表面活性剂优选地是泰洛沙泊。

[0090] 本发明的眼用组合物可以施用给哺乳动物（例如，人、兔、狗、猫、牛、马、猴），所述哺乳动物正在或可能遭受眼科疾病，诸如青光眼。

[0091] 尽管给药途径和剂量可以随受试者的症状、年龄和体重而变化，在本发明的眼用组合物中的活性剂的浓度是，当施用给成年人时，包含在水性滴眼剂制剂中的约 0.001-5 (w/v)%、优选约 0.01-3 (w/v)%，且优选地每天施用 1-8 次，单次剂量是 1 滴至数滴。

[0092] 除非不利地影响预期的使用目的，本发明的眼用组合物可以含有下述的其它适当的药理学上有效的物质，或可以与所述物质一起使用：例如，甾体抗炎剂（地塞米松、泼尼松龙、氯替泼诺氟米龙（Loteprednolm Fluorometholone）、氟轻松（Fluocinolone）等等）、非甾体抗炎剂（双氯芬酸钠、普拉洛芬、溴芬酸、酮咯酸氨丁三醇、奈帕芬胺、氟比洛芬钠等等）、抗过敏剂（曲尼司特、富马酸酮替芬、盐酸奥罗他定、色甘酸钠、吡嘧司特钾、奈多罗米

钠等等)、抗组胺剂(盐酸依匹斯汀、盐酸氮卓斯汀、Azalastine hydrochrlidem、盐酸苯海拉明等等)、青光眼治疗剂(盐酸毛果芸香碱、水杨酸毒扁豆碱、噻吗洛尔、乌诺前列酮异丙酯、拉坦前列素、盐酸倍他洛尔、阿可乐定、酒石酸溴莫尼定、卡米可林(Carbacol)、地匹福林、比马前列素、曲伏前列素、酒石酸溴莫尼定等等)、抗生素(阿奇霉素、硫酸庆大霉素、硫酸新霉素、妥布霉素、磺苄西林、头孢甲肟、红霉素、多粘菌素 E、土霉素、多粘菌素 B、氯霉素、小诺米星、地贝卡星、西索米星等等)、抗菌剂(磺胺甲二唑、磺胺甲噁唑、氧氟沙星、诺氟沙星、盐酸洛美沙星、盐酸莫西沙星、依诺沙星、盐酸环丙沙星、西诺沙星、司帕沙星、甲苯磺酸托氟沙星、萘啶酸、吡哌酸三水合物、吡哌酸、氟罗沙星、左氧氟沙星、加替沙星等等)和抗病毒剂(碘苷、阿昔洛韦等等)和抗真菌剂(匹马菌素、氟康唑、咪康唑、两性霉素 B、氟胞嘧啶、伊曲康唑等等)、抗 VEGF 抗体(哌加他尼(Pegaptanib)等等)。

[0093] 可以如下生产本发明的眼用组合物:将活性剂(多种活性剂)、超支化聚合物和任选的非离子表面活性剂溶解或分散在溶液中,所述溶液适当地含有药学上可接受的添加剂,诸如等渗剂、缓冲剂、防腐剂、助悬剂、增稠剂、稳定剂、pH 调节剂等等。

[0094] 发明人特此将先前提交的美国申请第 12/774, 419 号整体并入本文中作为参考。下述实验实施例进一步详细例证了本发明。这些实验实施例仅仅是示例性的,并且无意限制本发明的范围。

[0095] 实验实施例 1

多佐胺在含有不同浓度的超支化聚合物(HP) (Lupasol®G20、Lupasol®G 35、Lupasol®PS) 和 PEG 的水溶液中的 pH- 溶解度特性。

[0096] 方法

制备了盐酸多佐胺在 pH 5.5、pH 6、pH 6.5、pH 7、pH 7、pH 8 和 pH 8.5 的 0.1% (w/v) 磷酸盐缓冲溶液中的混悬液。还在含有不同浓度的不同 HP 和 PEG (分子量为 8000) 的水溶液中制备了类似的混悬液。还尝试了聚山梨酯 80 和 PEG 8000 的组合。使用微-pH 电极(Thermo Scientific)精确地测量 pH。使用 1 M NaOH 或 1 M HCl 调节期望的 pH。首先将所述混悬溶液在室温搅拌 10 min (加热至 60°C 持续 5 分钟)。在使所述混悬液在室温平衡另外的 30 分钟以后,再将所述混悬溶液声处理 10 分钟,最后通过 0.45μm 注射器式滤器进行过滤。使用 UPLC 分析滤液的多佐胺浓度。如下进行多佐胺检测:梯度 1% (v/v) 三乙胺(TEA)水溶液:乙腈方法,在室温进行,流速为 0.7 mL/min,在 254 nm 波长,注射体积 10 μL,在 BEH C18 1.7 μm、2.1x 50 mm 柱上。制备校正曲线,以发现多佐胺浓度。使用的聚合物的性质列出在表 1 中。

[0097] 表 1:实验实施例 1 中的 HP 的性质。

聚合物名称	粘度(cP)	分子量	pKa	固体含量(%w/v)
Lupasol®G20	200-500	1300	7-10	>98%
Lupasol®G35	250-650	2000	7-10	48-52%
Lupasol®PS	1000-2500	750,000	7-10	33%

[0098] 结果和讨论

图 1 表明多佐胺的水溶解度随着 pH 从 5.65 升高而降低,并在 pH 7 时达到底点。由于 COSOPT® 是在 pH 5.65 时配制,在有不同浓度的不同 HP 存在下,在 pH 5.65 定量多佐胺在 0.1% (w/v) 磷酸盐缓冲液中的溶解度。结果显示在图 2 中。随着 HP 浓度从 0.1%(w/v) 增加至 1% (w/v),多佐胺在 pH 5.65 时的溶解度增加。类似地,在 pH 7,如图 3 的条形图所

示,随着 HP 浓度从 0.1% (w/v) 增加至 4% (w/v),多佐胺溶解度线性地增加。

[0099] 如图 4 所示,在 pH 7 时应用了不同浓度的 PEG 8000 和 0.5% 和 1% (w/v) 的 HP (Lupasol®PS)的组合。从图 4 显而易见,通过使用约 20% 的 PEG 8000 和 0.5% 的 Lupasol®PS,或者 17% 的 PEG 8000 和 1% 的 Lupasol®PS,可以实现多佐胺在 pH 7 的磷酸盐缓冲液中的 2% (w/v) 溶解度(类似于 COSOPT®)。

[0100] 结论

发明人发现,多佐胺的水溶解度随着 HP 和 PEG 的浓度的增加而增加。在 PEG 的情况下,所述溶解度也随着 PEG 的分子量的增加而线性地增加。此外,聚山梨酯 80 有助于分散多佐胺分子,并抑制在有 PEG 存在下在水中的沉淀。

[0101] 从这些结果可以得出结论,HP 会显著地增加多佐胺的溶解度。另外,发现亲水的聚乙二醇是多佐胺溶解度增高剂。所述结果证实了在接近生理 pH 的 pH 值时使用超支化聚合物和 PEG 作为多佐胺溶解度增高添加剂的优点。

[0102] 实验实施例 2

用于在体外评估粘蛋白-超支化聚合物生物粘附键(bioadhesive bond)强度的简单流变学方法。

[0103] 采用简单的粘度测定方法来定量粘蛋白-聚合物生物粘附键强度。为了确定称作 Lupasol®PS 的可商业得到的 HP 的粘膜粘着性质,与市售产品 COSOPT® 相比,计算在 pH 7 时不同浓度的 HP 与猪胃粘蛋白的生物粘附力。使用猪胃粘蛋白作为模型粘蛋白。但是,由于所有粘蛋白似乎共有一般的物理性质、结构性质和流变学性质,据信猪胃粘蛋白是用于基本评价生物粘附材料的令人满意的模型。

[0104] 方法

使用 Brookfield Rotational L VDVE 粘度计进行所有测量。使用具有代号 18 的纺锤体进行所有粘度测量。按照手册,使用 1.32 的因数(factor)将 rpm 转换成剪切率(s^{-1})。在 pH 7 的 0.1% (w/v) 磷酸盐缓冲液中制备 15% (w/v) 的胃粘蛋白溶液。测量 0.5% (w/v) 和 1% (w/v) 的 Lupasol®PS 在磷酸盐缓冲溶液中的各个粘度。还测量了 15% 粘蛋白在磷酸盐缓冲液中的粘度。在 20°C 以从 2.6 至 80 s^{-1} 的不同剪切率 D 测量粘度(Hassan, E. 等人, *Pharm Res.* 5(1990)491)。使用不同浓度的 Lupasol®PS、PEG,使用和不使用 15% (w/v) 胃粘蛋白,在 pH 7 的 0.1% (w/v) 磷酸盐缓冲液中制备 5 个各自 10 mL 的样品。

[0105] 表 2:测试样品的含量(% w/v)。

含量(%w/v)	#1	#2	#3	#4	#5	#6
Lupasol®PS	-	0.5	0.5	1	1	1
胃粘蛋白	15	-	15	-	15	15
PEG8000	-	-	-	-	-	2
1MNaOH	调节 pH 至 7.0	调节 pH 至 7.0	调节 pH 至 7.0	调节 pH 至 7.0	调节 pH 至 7.0	调节 pH 至 7.0

[0106] 样品 #7 是原始的 COSOPT® 市售产品。在不同的剪切率测量在 20°C 的粘度。使用上面讨论的方程式(1)和(2)计算生物粘附力。

[0107] 按照下述方程式(1)计算生物粘附力(F):

$$F = \eta_b \sigma \quad (1)$$

其中 σ 是每秒的剪切率, η_b 是基于实验测量值,其按照下述方程式(2):

$$\eta_b = \eta_t - \eta_m - \eta_p \quad (2),$$

其中 η_t 是系统的粘度系数, 并且 η_m 和 η_p 分别是粘蛋白和生物粘附聚合物(例如, HP 和 PEG 8000)各自的粘度系数。

[0108] 为了使方程式(1)和(2)有效, η_t 、 η_m 和 η_p 应当在相同的浓度、温度、时间和剪切率进行测量。生物粘附现象在在角膜前区域中取代的水性泪液的接触时间中起主导作用。

[0109] 结果和讨论

如图 5 所示, 与 COSOPT® (样品 #7) 和粘蛋白(样品 #1) 相比, 在磷酸盐缓冲液中的低浓度的 HP 具有相对较低的粘度。在高剪切率, HP (0.5%, 样品 #2, 和 1%, 样品 #4) 的粘度相对接近于水。另外, 在高剪切率, 0.5% (w/v) 和 1% (w/v) 的 HP 之间的粘度差异是可忽略的。该结果清楚地暗示使用 HP 作为添加剂的优点, 所述添加剂具有非常适合局部眼用溶液的流变学性质, 因为向制剂中加入 HP 不会改变最终制剂的流变学性质。

[0110] 基于在 80 s^{-1} 的剪切率从图 5 可得到的数据定量生物粘附力。选择高剪切率, 因为所述聚合物通常在高剪切率(接近 100 s^{-1}) 表现出生物粘附性质。

[0111] 如图 6 所示, 低浓度(0.5% (w/v) 和 1% (w/v)) 的 HP-粘蛋白系统的生物粘附键强度几乎超过 COSOPT®-粘蛋白系统的 2 倍。2% (w/v) PEG 的加入没有改变 1% (w/v) HP-粘蛋白系统的生物粘附力, 这暗示 2% PEG 可能不会影响在 pH 7 时由 HP 造成的生物粘附力。总之, 在图 6 中所示的结果指示, 与在 COSOPT® 制剂中存在的聚合物相比, 低浓度的 HP 的生物粘附强度是相对显著的。所述生物粘附现象可能非常有助于增加药物的眼睛生物利用度。

[0112] 结论

综上所述, 通过生物粘附的粘度测定评估方法产生的数据暗示, 超支化聚合物是可以与眼睛粘蛋白强烈地相互作用的生物粘附添加剂材料。在粘蛋白和 HP 之间的这些生物粘附力最终会导致药物的眼睛生物利用度的增加。

[0113] 实验实施例 3

就含有 HP (Lupasol®PS) 和聚山梨酯 80 或 PEG 和聚山梨酯 80 的组合的新的制剂而言, 在 pH 5.65 和 pH 7 时, 多佐胺在有噻吗洛尔存在下的水溶解度。

[0114] 方法

制备盐酸多佐胺和 0.5% (w/v) 噻吗洛尔在 pH 5.65 的柠檬酸盐缓冲溶液中的混悬液(对照样品)。还在含有 2% (w/v) 的 HP (在 pH 3 的柠檬酸盐缓冲液中) 的水溶液中制备类似的混悬液。加入 HP 以后, 用 1 M NaOH 将最终的 pH 调至 5.65 (样品 1)。还尝试了根据表 3 的在 pH 5.65 时的不同分子量 PEG 和聚山梨酯 80 的组合。表 3 表明, 所有不同的测试样品混悬液在 10 mM 柠檬酸盐缓冲液中制备。

[0115] 表 3: 在 pH 5.65 在柠檬酸盐缓冲液中和在 pH 7 在磷酸盐缓冲液中制备的不同测试制剂。

含量(%v/w)	对照样品	样品 #1	样品 #2	样品 #3	样品 #4	样品 #5	样品 #6	样品 #7	样品 #8
盐酸多佐胺	>2.22	>2.22	>2.22	>2.22	>2.22	>2.22	>2.22	>2.22	>2.22
马来酸噻吗洛尔	0.683	0.683	0.683	0.683	0.683	0.683	0.683	0.683	0.683
Lupasol®PS(MW=750k)	-	2	-	-	-	-	-	-	-
PEG200	-	-	2	-	-	-	-	-	-
PEG400	-	-	-	2	-	-	-	-	-
PEG2000	-	-	-	-	2	-	-	-	-

PEG3350	-	-	-	-	-	2	-	-	-
PEG4000	-	-	-	-	-	-	2	-	-
PEG8000	-	-	-	-	-	-	-	2	-
PEG20000	-	-	-	-	-	-	-	-	2
聚山梨酯 80	-	-	1	1	1	1	1	1	1
在 10mM 柠檬酸盐或磷酸盐缓冲液中	调节 pH 至 5.65/7	调节 pH 至 5.65/7	调节 pH 至 5.65/7	调节 pH 至 5.65/7	调节 pH 至 5.65/7	调节 pH 至 5.65/7	调节 pH 至 5.65/7	调节 pH 至 5.65/7	调节 pH 至 5.65/7

[0116] 类似地,就要测试多佐胺在 pH 7 时在磷酸盐缓冲液(而不是柠檬酸盐缓冲液)中的溶解度的制剂而言,再在 10 mM 磷酸盐缓冲液中制备制剂(表 3)。首先将混悬溶液在室温搅拌 10 min (加热至 60℃持续 5 分钟)。在使所述混悬液在室温平衡另外 30 分钟以后,再将所述悬浮溶液声处理 10 分钟,最后通过 0.45μm 注射器式滤器进行过滤。使用与实验实施例 1 相同条件的 UPLC,分析滤液的多佐胺和噻吗洛尔浓度。

[0117] 结果和讨论

在该实验中,发明人使用 HP、PEG 和聚山梨酯 80 作为溶解度增高剂添加剂。在 pH 5.65 和 pH 7 尝试了不同的组合。如图 7 所示,证实了在 pH 5.65 和 pH 7 时,在有噻吗洛尔存在下,与没有添加剂的对照样品相比,多佐胺的溶解度随着添加剂的加入而增加。在 pH 5.65 时,在所有情况下,多佐胺的溶解度大于 2%,因此,在有噻吗洛尔存在下,HP 或 PEG 与聚山梨酯 80 组合的加入增加了多佐胺的溶解度。

[0118] 尽管市售的 COSOPT® 产品具有在 pH 5.65 时的 2% (w/v) 多佐胺,通过加入 HP 或 PEG 来增加在 pH 5.65 时的溶解度(超过 2% (w/v) 多佐胺溶解度)将不会通过增加剂量从而对药物的效力增强产生有用的促进。因而,在 pH 7 时的溶解度数据是更重要的,在此时,多佐胺在 10 mM 磷酸盐缓冲液中具有差的溶解度(小于 0.5% w/v 溶解度)。还注意到,在加入添加剂的情况下,噻吗洛尔在制剂样品(各自精确地含有 0.5% w/v 噻吗洛尔)中的溶解度在 pH 5.65 和 pH 7 时没有变化。因为 COSOPT® 是在 pH 5.65 配制的,通过在 pH 5.65 向制剂样品中加入不同浓度的不同 HP 定量了在有噻吗洛尔存在下的多佐胺溶解度。结果显示在图 7 中。如该条形图所示,在 pH 5.65 和 pH 7,随着 HP 浓度从 0.5% (w/v) 增加至 2% (w/v),多佐胺溶解度线性地增加。但是,与 pH 7 相比,在 pH 5.65 时 HP 对多佐胺的溶解度增加的影响更显著。如图 8 所示,向 HP 中加入聚山梨酯 80 会增加多佐胺溶解度。

[0119] 在 pH 5.65 时,在加入 HP 或 PEG 与聚山梨酯 80 的组合的情况下,多佐胺在有噻吗洛尔存在下的水溶解度的改善是显著的。在该情况下,聚山梨酯 80 有助于分散多佐胺分子,并抑制在有 PEG 存在下在水中的沉淀。在 pH 7 时,HP 和聚山梨酯 80 的组合是用于增加多佐胺在有噻吗洛尔存在下的溶解度的最佳组合。从所述结果可以得出结论,在 pH 7 时,HP 和聚山梨酯 80 会显著增加多佐胺在有噻吗洛尔存在下的溶解度。还证实亲水性 PEG 是多佐胺溶解度增高剂。此外,还证实低浓度的聚山梨酯 80 和 PEG 8000 的组合是用于增加多佐胺溶解度的非常有用的添加剂。总之,具有优化浓度的 HP 和聚山梨酯的在 pH 7 的制剂可以非常用地增加眼睛生物利用度。

[0120] 结论

所述结果清楚地指示在接近生理 pH 的 pH 值时使用 HP 和聚山梨酯 80 作为多佐胺溶解度增高添加剂的优点,所述优点更有助于约 1% (w/v) 多佐胺穿过角膜的渗透。还证实,聚山梨酯 80 是有效的乳化剂,其会抑制难溶的多佐胺在有 HP 存在下在 pH 7 时的沉淀。

[0121] 实验实施例 4

就含有 HP (Lupasol®PS) 和聚山梨酯 80 的新的局部制剂而言,多佐胺和噻吗洛尔的体外角膜渗透研究。

[0122] 进行关于多佐胺和噻吗洛尔(COSOPT® 的活性成分)的角膜渗透的体外实验,以研究在 pH 5.65 时与原始的市售局部制剂(仅有活性成分)相比,0.5% (w/v) HP 的加入或 0.5% (w/v) HP 和 1% (w/v) 聚山梨酯 80 的加入的影响。

[0123] 材料和方法

实验方法

1. 制剂制备:在 10 mM 柠檬酸盐缓冲液中配制下述 3 种溶液,用于检查多佐胺和噻吗洛尔的体外角膜渗透,以及确定角膜水解效应。

含量	组合物 (% w/v)		
	测试样品 1 (n=2)	测试样品 2 (n=2)	测试样品 3 (n=2)
多佐胺	2	2	2
噻吗洛尔	0.5	0.5	0.5
Lupasol®PS	-	0.5	0.5
聚山梨酯 80	-	-	1
1M NaOH	调节 pH 至 5.65	调节 pH 至 5.65	调节 pH 至 5.65

[0124] 通过 0.45µm 滤器式注射器过滤样品。通过 UPLC 分析确定两种样品的初始浓度。从实验数据得出下述推论:

a) 仅 HP (来自测试 1 和测试 2 数据对比)。

[0125] b) 聚山梨酯 80 (测试 2 和测试 3 对比) 对角膜渗透的重要性。

[0126] c) HP + 聚山梨酯 80 组合的重要性(来自测试 1、测试 2、测试 3 数据对比)。

[0127] 2. 体外兔角膜渗透实验

表 4:用于体外角膜渗透实验的受体溶液组合物。

组合物	化学式	[g/100mL]
氯化钙	CaCl ₂	0.0132
氯化钾	KCl	0.04
硫酸镁	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.02
磷酸二氢钠脱水物	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0.0187
氯化钠	NaCl	0.787
葡萄糖	葡萄糖	0.1
氢氧化钠	NaOH	适量
水	净化水	适量
pH	pH	7.2

[0128] 3 只雄性兔子(新西兰)重为 3-4 磅。兔龄为 11-12 周。在用过量的二氧化碳气体处死以后,立即摘出眼,用盐水洗涤,并分离角膜以用于渗透实验中。用新鲜制备的受体溶液(表 4)冲洗每个角膜,以去除过量的污渍。以使角膜上皮表面面向供体隔室的方式,将 6 个完整的且新鲜的角膜固定在所有玻璃并排扩散池的有卡箍的供体和受体隔室之间。图 9 显示了在该实验中使用的简单扩散池的示意图。

[0129] 可用于渗透的角膜面积是 0.211 cm²。给受体隔室装入新鲜制备的 pH 7.2 的受体溶液(按照表 4 所述的组合物)。将样品 #1 的等分试样(5 mL)置于 2 个完整角膜上,并用

玻璃盖玻片密封供体池的开口。在样品 #1 施用 10 分钟以后,将样品 #2 的等分试样(5 mL)施用在接下来的 2 个完整角膜上。再在 10 分钟以后,将样品 #3 等分试样(5 mL)施用在剩余的 2 个完整角膜上。在所有 6 种情况下,使用恒定搅拌,通过水套将受体流体(在每个受体池中,5 mL)保持在 34℃ 的恒定温度。在 10、20、40、60、80、100、120、140、160 和 180 分钟的预定时间间隔,从受体溶液中取出 200 μ L 样品。此后,将相同量的磷酸盐缓冲溶液加入到受体池中。通过 UPLC 测定药物浓度。

[0130] 3. 分析

多佐胺和马来酸噻吗洛尔的检测条件是:梯度 1% (v/v) 三乙胺(TEA)水溶液:乙腈方法,在室温进行,流速为 0.7 mL/min,在 254 nm 和 298 nm 波长,注射体积 1 μ L,在 BEH C 18 1.7 μ m、2.1 x 50 mm 柱上。

[0131] 4. 角膜渗透参数计算

在实验结束时,在去离子水中浸泡以后,称量每个角膜(没有粘着的巩膜)。将湿角膜在烘箱中干燥过夜,并重新称重。从重量差计算出角膜水化(corneal hydration)。将最终的药物渗透结果表示为累积渗透量(Q)。计算的参数如下:

$$\text{累积渗透量}(Q, \text{ ng/cm}^2)(t_i) = \frac{\text{浓度}(t_i) \times \text{池体积}(\text{mL}) + \text{浓度}(t_{i-1}) \times 0.2 \times \text{取样体积}(\text{mL})}{\text{有效面积}(\text{cm}^2)}$$

$i =$ 取样数目(1-10), 浓度

$(t_0) = 0$

dQ/dt [ng/cm²/min]

累积量曲线的斜率

t_d [min]

在时间轴上的截距

扩散系数(D) [cm²/秒]

$$\frac{h^2}{6 \times t_d \times 60}$$

分配系数(K) [-]

$$\frac{dQ}{dt} \times \frac{h}{D \times C_d} \times \frac{1}{60}$$

h [cm]

角膜厚度 :0.04 [cm]

C_d [ng/mL]

在供体溶液中的初始药物浓度。

[0132] 结果和讨论

通过 UPLC 确定的多佐胺和噻吗洛尔的初始浓度在表 5 中给出。

[0133] 表 5 :测试制剂的初始浓度。

样品	多佐胺(mg/mL)	噻吗洛尔(mg/mL)
测试 1	23.02	4.70
测试 2	21.48	4.51
测试 3	22.21	4.72

[0134] 基于角膜的净湿重和干重测量角膜水化。通常,正常哺乳动物的角膜的 % (w/w) 水化是在 75-80% 范围内。总之,所有测试样品的 % 水化没有显著变化,在所有情况下,它们是在期望的范围内。因而,HP 或聚山梨酯 80 对角膜水化没有影响。

[0135] 表 6 :角膜水化百分比计算。

样品	最终净湿重(g)	最终净干重(g)	% (w/w) 角膜水化
测试 1	0.0107	0.0017	84.11
测试 1	0.0112	0.0019	83.06

测试 2	0.0123	0.0023	80.16
测试 2	0.0133	0.0023	82.70
测试 3	0.0150	0.0024	84.00
测试 3	0.0053	0.0012	77.40

[0136] 图 10 和 11 分别揭示了多佐胺和噻吗洛尔的角膜渗透特性。在 34℃, 仔细地检查了多佐胺和噻吗洛尔的透过分离的兔角膜的时间依赖性的渗透。与没有添加剂的对照样品相比, 含有 0.5% (w/v) HP 的测试制剂具有相对更高的渗透穿过角膜的多佐胺累积总量和在 3 小时以后渗透的总量。此外, 聚山梨酯 80 连同 HP 一起加入会增加角膜渗透, 与仅含有 HP 的制剂相比, 渗透更多量的多佐胺。总之, 0.5% (w/v) HP 和 1% (w/v) 聚山梨酯 80 的加入会使多佐胺和噻吗洛尔的角膜渗透速率增加约 25-30%。也观察到噻吗洛尔的类似趋势(图 11)。因而, HP 和聚山梨酯 80 的组合会改善活性成分的角膜渗透。

[0137] 图 12 显示了多佐胺和噻吗洛尔的总渗透百分比。显然, HP 和聚山梨酯 80 的存在增加了渗透穿过角膜的活性成分(多佐胺和噻吗洛尔)的百分比。应当指出, 所有测试制剂具有类似的多佐胺和噻吗洛尔初始浓度(小于 10% 变化)。因而, 可容易地确定每种添加剂在类似的 pH 条件下的影响。在测试 2 和测试 1 的对比中, 清楚地证实了使用 HP 作为添加剂的重要性。

[0138] 图 13 显示了多佐胺和噻吗洛尔的角膜渗透系数。渗透系数与供体溶液中的药物初始浓度成反比。在多佐胺的情况下, 测试 2 和测试 3 的渗透系数更高, 这表明, 与不含有 HP 的 pH 5.65 对照制剂(测试 1)相比, 在有 0.5% HP 存在下, 多佐胺具有增加的角膜渗透速率。测试 3 具有比测试 2 相对更高的角膜渗透性, 由此指示聚山梨酯 80 的影响。聚山梨酯 80 可能起粘度增高剂的作用, 由此增加多佐胺和噻吗洛尔在角膜渗透方面的生物利用度。总之, 来自图 13 的数据清楚地指示, 与在 pH 5.65 的没有 HP 的对照测试 1(类似于 COSOPT® 活性成分制剂)相比, 分别含有 HP 和 HP 与聚山梨酯 80 的制剂测试 2 和 3 具有更高的噻吗洛尔和多佐胺渗透系数。

[0139] HP 和聚山梨酯 80 的加入没有显著改变多佐胺和噻吗洛尔的扩散系数(其与延迟时间成反比)(参见图 14)。因而, HP 和聚山梨酯 80 对角膜表面没有任何影响。如果扩散系数已经显著增加或降低了, 它将会指示角膜表面性质的变化。因为扩散系数是药物化合物的固有性质, 它不应当随着添加剂的加入而变化。

[0140] HP 会促进噻吗洛尔和多佐胺的包封, 并因而增加噻吗洛尔向角膜上皮中的分配。该理论也得到图 15 中的数据的支持。与测试 1 相比, 噻吗洛尔和多佐胺在角膜表面的分配系数在测试 3 中更高, 这指示在有 0.5% (w/v) 高度官能化的 HP 存在下, 噻吗洛尔和多佐胺向亲脂性角膜中的分配的改善。因而, 在有 HP 存在下改善的渗透主要是因为改善的向上皮的分配。通过增加制剂溶液中的 HP 的浓度, 可以进一步增加所述分配。HP 会增加角膜渗透, 主要是因为: a) 分子包封在高度官能化的聚乙烯亚胺的分支结构内, b) 药物分子和 HP 的离子官能胺基团之间的静电相互作用, 和 c) 带电荷的 HP 的粘膜粘着性能。

[0141] 0.5% (w/v) HP 和 1% (w/v) 聚山梨酯 80 的加入使多佐胺和噻吗洛尔的角膜渗透速率增加了约 25-30%。HP 的存在增加了在 pH 5.65 时多佐胺和噻吗洛尔向角膜中的分配。HP 和聚山梨酯 80 的加入没有显著改变角膜扩散速率和角膜水化速率, 这提示这些添加剂对角膜表面没有有害影响。在有 HP 存在下, 多佐胺和噻吗洛尔的角膜渗透系数相对更高, 这提示 HP 作为有效的药物载体添加剂的重要性。因而, 发明人发现了与当前的市售产品相

比具有增加的角膜渗透的新的制剂。通过增加 HP 的浓度可以进一步增加角膜渗透。

[0142] 结论

与没有添加剂的对照制剂(COSOPT® 活性成分制剂)相比,在有诸如 HP 等添加剂存在下,多佐胺和噻吗洛尔在 pH 5.65 时的累积渗透量相对更高。向制剂中加入 0.5% (w/v) HP 和 1% (w/v) 聚山梨酯 80 使多佐胺和噻吗洛尔的角膜渗透速率增加了约 25-30%。在有 HP 存在下,活性成分向角膜上皮中的分配增加了。因而,HP 和聚山梨酯 80 的组合可以非常有效地增加 COSOPT® 活性成分的眼睛生物利用度。

[0143] 实验实施例 5

在 pH 7 磷酸盐缓冲液中,布林佐胺在含有 HP (Lupasol®PS)或 HP 和聚山梨酯 80 组合或 PEG 和聚山梨酯 80 组合的水溶液中的溶解度的增加。

[0144] 在 pH 7 于 10 mM 磷酸盐缓冲液中研究了布林佐胺在有噻吗洛尔存在下的水溶解度。

[0145] 方法

表 7:在 pH 7 的磷酸盐缓冲液中制备的不同测试制剂

含量(%v/w)	对照样品	样品 #1	样品 #2	样品 #3	样品 #4	样品 #5	样品 #6	样品 #7	样品 #8
布林佐胺	1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
Lupasol®PS (MW=750k)	-	0.5	1	2	0.5	1	2	-	-
PEG400	-	-	-	-	-	-	-	2	-
PEG8000	-	-	-	-	-	-	-	-	2
聚山梨酯 80	-	-	-	-	1	1	1	1	1
在 10mM 柠檬酸盐或磷酸盐缓冲液中(加入 1MNaOH)	调节 pH 至 7	调节 pH 至 7	调节 pH 至 7	调节 pH 至 7	调节 pH 至 7	调节 pH 至 7	调节 pH 至 7	调节 pH 至 7	调节 pH 至 7

[0146] 制备了布林佐胺在磷酸盐缓冲液中的混悬液(含有 1% (w/v)),作为对照样品。还在含有 HP、PEG 和聚山梨酯 80 的不同组合(按照上面的表 7)的水溶液(10 mM 磷酸盐缓冲液)中制备了含有过量布林佐胺(> 1% (w/v))的类似混悬液。用 1 M NaOH 将最终的 pH 调至 7。首先将所述混悬溶液在室温搅拌 10 min (加热至 60℃持续 5 分钟)。在使混悬液在室温平衡另外 30 分钟以后,再将所述混悬溶液声处理 10 min,最后通过 0.45μm 注射器式滤器进行过滤。使用与实验实施例 1 相同条件的 UPLC 分析滤液的布林佐胺浓度。

[0147] 结果和讨论

图 16 显示了布林佐胺在不同 pH 值的 10 mM 磷酸盐缓冲液中的溶解度。显然,随着 pH 从 4 增加至 7,布林佐胺的水溶解度下降。布林佐胺的溶解度在 pH 7 时最小,这与在 pH 7 时完全非离子性能相一致。因为布林佐胺的离子化百分比随着 pH 从 8.4 增加至 10 而增加,溶解度陡然增加,这与布林佐胺在该 pH 范围中的阴离子性质相一致。所述溶解度性质与多佐胺非常类似。因此,重要的是,开发出在 pH 7.4 附近(泪液的 pH 是 7.44)具有增加的溶解度的亲脂性布林佐胺药物,以便增加布林佐胺的眼睛生物利用度和减少眼刺激现象。

[0148] 在该研究中,发明人使用 HP、PEG 和聚山梨酯 80 作为溶解度增高剂添加剂。在 pH 7 尝试了不同组合。在图 17 中,显示了布林佐胺溶解度随着添加剂的加入而增加。

[0149] 如图 17 所示,在两种情况下(有和没有噻吗洛尔),布林佐胺溶解度随着 HP 的浓度的增加而增加。在没有噻吗洛尔且有 0.5% (w/v) HP 和 1% (w/v) 聚山梨酯 80 存在下,布林佐胺溶解度是约 11 mg/mL。与 PEG 400 相比,PEG 8000 的加入似乎更能增加布林佐胺的溶解度。但是,对照溶液以及所有含有 0.5% (w/v) 噻吗洛尔的具有添加剂的制剂的溶解度

相对更低。因而,噻吗洛尔(其在 pH 7 时比布林佐胺相对更可溶于水)通过它在局部制剂样品中的存在对布林佐胺的水溶解度产生影响。这些结果与关于称作多佐胺的另一种碳酸酐酶的结果(实验实施例 1) 非常类似。由高度可溶性的离子型噻吗洛尔导致的在 pH 7 时的溶解度下降可能是由于噻吗洛尔的加入造成的溶液离子强度的变化或盐析效应。尽管市售的 AZARGA[®] 产品具有在 pH 7.4 的布林佐胺 10 mg/mL+ 噻吗洛尔 5 mg/mL 眼用混悬液,通过加入 HP 或 PEG 来增加在 pH 7 时的溶解度将会有助于药物的效力增强(通过使剂量增加至大于 1%)。

[0150] 向 HP 中加入聚山梨酯 80 会通过阻止沉淀而增加布林佐胺溶解度。聚山梨酯 80 可能起表面活性剂的作用,由此减少在有 HP 存在下相分离以后的布林佐胺聚集。在有 0.5% (w/v) 噻吗洛尔制剂存在下,在 pH 7 时,0.5% (w/v) HP 和 1% (w/v) 聚山梨酯的组合可以是非常有效的。

[0151] 在 pH 7 时,在加入 HP 或 PEG 与聚山梨酯 80 的组合的情况下,布林佐胺在有噻吗洛尔存在下的水溶解度的改善是显著的。聚山梨酯 80 有助于分散布林佐胺分子,并抑制在有 PEG 存在下在水中的沉淀。就在有噻吗洛尔存在下增加布林佐胺在 pH 7 的溶解度而言,HP 和聚山梨酯 80 的组合可以是良好的组合。从所述结果可以得出结论,HP 和聚山梨酯 80 会显著增加疏水性布林佐胺在有噻吗洛尔存在下在 pH 7 时的溶解度。还证实亲水性 PEG 是布林佐胺溶解度增高剂。此外,还证实低浓度的聚山梨酯 80 和 PEG 8000 的组合就增加疏水性布林佐胺的溶解度而言是非常有用的添加剂。总之,具有优化的浓度的 HP 和聚山梨酯 80 的在 pH 7 的制剂可以非常用地增加眼睛生物利用度。

[0152] 结论

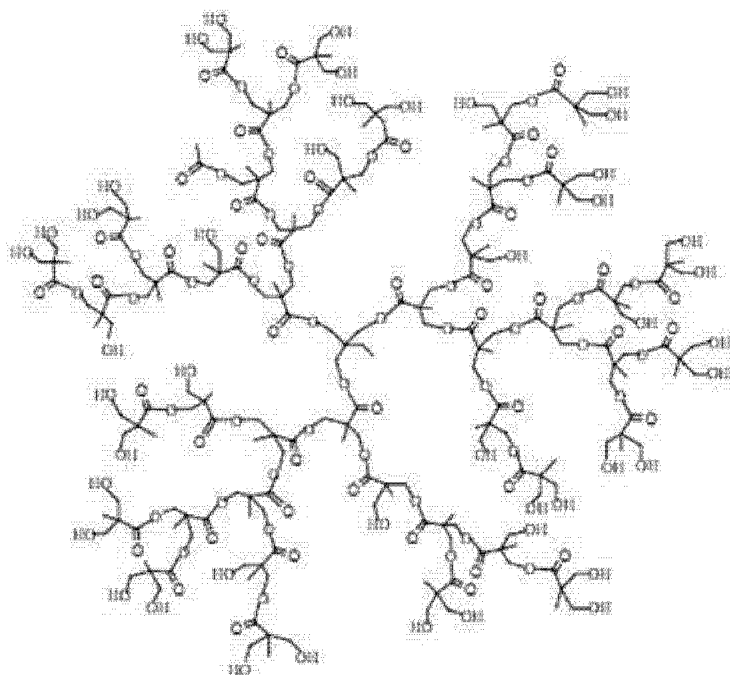
所述结果清楚地指示在接近生理 pH 的 pH 值时使用 HP 和聚山梨酯 80 作为疏水性布林佐胺溶解度增高添加剂的优点。还证实,聚山梨酯 80 是有效的乳化剂,其会抑制难溶性的布林佐胺在有 HP 存在下在 pH 7 时的沉淀。噻吗洛尔可能通过改变溶液的离子强度而影响布林佐胺溶解度。

[0153] 实验实施例 6

含有具有末端羟基的 HP 的多佐胺和噻吗洛尔的体外角膜渗透研究。

[0154] 进行关于多佐胺和噻吗洛尔(COSOPT[®] 的活性成分)的角膜渗透的体外实验,以研究与原始的市售局部制剂(仅活性成分)相比,具有羟基官能团的超支化聚酯的加入的影响。

[0155] 新的制剂含有称作 Boltorn[®]H20 的可商业得到的 HP。Boltorn[®]H20 的一般定义是具有聚酯核心和 16 个末端羟基官能团的 HP。它会增加在 pH 7 或 pH 7.4 配制的非离子型(亲脂性)多佐胺的溶解度。



[0156] 具有羟基末端基团的超支化聚酯的一般结构。

[0157] 在该实施例中所使用的 HP 的性质在表 8 中列出。它具有 16 个伯羟基 / 分子。固体含量是 100% (w/v)。

[0158] 表 8 :在该实施例中所使用的 HP 的性质。

聚合物名称	粘度(cP)	分子量(道尔顿)	多分散度	pH	分配系数
Boltorn®H20	7	2100	1.3	2.5-4	-0.2logPOW

[0159] 从含有最多 2% (w/v) HP 的新的制剂确定了多佐胺和噻吗洛尔的体外跨角膜渗透。还确定了 HP 的浓度对活性成分的影响。使用在 pH 7.4 的含有 COSOPT® 活性成分的标准溶液作为对照样品。

[0160] 材料和方法

制剂制备

配制了在 0.1% (w/v) 磷酸盐缓冲液中的下述 3 种溶液(表 9),用于检查多佐胺和噻吗洛尔的体外角膜渗透,以及用于确定角膜水解效应。

[0161] 表 9 :测试制剂的组成。

含量(%w/v)	对照样品 #1	测试样品 #2	测试样品 #3
盐酸多佐胺	1	1	1
马来酸噻吗洛尔	0.683	0.683	0.683
Boltorn®H20	---	0.5	2
1MNaOH/1MHCl	调节 pH 至 7.4	调节 pH 至 7.4	调节 pH 至 7.4
外观	混悬液	混悬液	混悬液

[0162] 首先,将 10 mM 磷酸盐缓冲液加入到固体活性成分的适当地称重的物料中,并彻底搅拌 15 分钟。其次,将有效体积的 5% (w/v) HP 混悬溶液加入到测试样品 2 和测试样品 3 中,以补足在表 9 中描述的精确浓度。

[0163] 然后将 3 种测试溶液在室温搅拌 10 分钟(加热至 60℃持续 5 分钟)。搅拌以后,将所述溶液声处理 5 分钟。除了对照溶液(对照样品 #1)以外,含有 HP 的溶液在调节 pH 以前是白色浆状混悬液。在完全稀释所有活性成分和非活性成分以后,使用 1 M NaOH 或 1 M

HCl 将 pH 调至 7.4, 并加入额外的缓冲液, 以补足如表 8 所示的精确组成。在调节 pH 的情况下, 在所有情况下形成混悬溶液, 通过在室温搅拌另外的 15 小时或更久将其平衡。再次测量所有样品溶液的 pH 以确认最终的期望的 pH。

[0164] 这些混悬溶液直接地用作样品供体溶液, 用于角膜渗透研究。为了确定溶解度, 通过 0.45 μ m 注射器式滤器过滤混悬液。在用超纯水稀释(稀释因子 = 1000)每个样品以后, 使用 UPLC 分析滤液的多佐胺和噻吗洛尔浓度。还将体外角膜渗透特性结果与来自实验实施例 4 的含有活性成分的对照样品在 pH 5.65 得到的数据进行对比。

[0165] 3 只雄性兔子(新西兰)重为 2-3 kg。在用过量的吸入异氟烷处死以后, 立即摘出眼, 并分离角膜以用于渗透实验。实验操作的细节描述在先前的实验实施例 4 中。

[0166] 计算的参数按照在实验实施例 4 中所述进行计算, 其中 C_d [ng/mL] 是供体溶液中的活性药物成分的初始药物浓度(表 10)。

[0167] 结果和讨论

通过 UPLC 确定的多佐胺和噻吗洛尔的初始浓度在表 10 中给出。角膜水化百分比计算结果在表 10 中给出。

[0168] 表 10 : 测试制剂的初始浓度。

样品	多佐胺(mg/mL)	噻吗洛尔(mg/mL)
测试 1	4.69	4.7
测试 2	6.6	4.5
测试 3	8.9	4.7

[0169] 表 11 : 角膜水化百分比计算结果。

样品	最终净湿重(g)	最终净干重(g)	% (w/w) 角膜水化
测试 1	0.0104	0.0020	80.7
测试 1	0.0124	0.0022	82.2
测试 2	0.0117	0.0025	78.6
测试 2	0.0126	0.0024	80.9
测试 3	0.0146	0.0029	80.1
测试 3	0.0113	0.0026	76.9

[0170] 基于角膜的净湿重和干重测量角膜水化。通常, 正常哺乳动物的角膜的 % 水化是在 75-80% 范围内。总之, 所有测试样品的 % 水化没有显著变化, 并且在所有情况下, 它们是在期望的范围内。因而, HP 对角膜水化没有影响。

[0171] 图 18 和 19 分别揭示了多佐胺和噻吗洛尔的角膜渗透特性。还与测试样品 1、2 和 3 得到的渗透特性一起, 绘制了来自实验实施例 4 的在 pH 5.65 时的对照样品渗透特性。在 34°C, 仔细地检查了多佐胺和噻吗洛尔的透过分离的兔角膜的时间依赖性的渗透。与没有添加剂的对照样品相比, 含有 0.5% (w/v) HP (测试 2) 和 2% (w/v) HP (测试 3) 的测试制剂具有相对更高的渗透穿过角膜的多佐胺累积总量和在 2 小时以后渗透的总量。此外, 从 0.5% HP 增加至 2% HP 的浓度, 表现出两种活性成分的角膜渗透的增加。在 pH 5.65 时, 在含有 2% (w/v) HP 的制剂(实验 3)中, 活性成分的角膜渗透高于市售产品 COSOPT® (在制剂中仅有活性成分)(参见图 19 和图 20)。另外, 含有 2% (w/v) HP 的制剂会在 2 小时以后提供显著增加的角膜渗透, 具有更高的渗透速率(斜率的变化)。

[0172] 总之, 具有羟基官能团的 HP 的加入会随着 HP 的浓度的增加而显著地增加多佐胺和噻吗洛尔的角膜渗透速率。因而, 与用于青光眼治疗的称作 COSOPT® 或 TRUSOPT® 或 AZOPT® 的市售产品相比, HP 改善了活性成分的角膜渗透。

[0173] 图 20 显示了在 2 小时以后的多佐胺和噻吗洛尔的总渗透百分比。显然, HP 的存在增加了渗透穿过角膜的活性成分(多佐胺和噻吗洛尔)的百分比。应当指出, 所有测试制剂具有不同的多佐胺初始浓度和类似的噻吗洛尔浓度(小于 10% 变化)。不同的多佐胺初始溶解度主要是因为 HP 导致的增加的溶解度。在测试 2 和测试 3 与测试 1 的对比中, 从图 20 清楚可见使用 HP 作为添加剂的重要性。使用来自图 19 和 20 的直至 2 小时的斜率以便确定角膜渗透性、分配系数和扩散系数。

[0174] 图 21 显示了多佐胺和噻吗洛尔的角膜渗透系数。渗透系数与供体溶液中的药物初始浓度成反比。在两种活性成分的情况下, 测试 2 和测试 3 的渗透系数更高, 这表明与不含有 HP 的对照制剂(测试 1)相比, 在有 HP 存在下, 多佐胺具有增加的角膜渗透速率。测试 3 具有比测试 2 相对更高的角膜渗透性, 由此指示增加 HP 浓度的影响。总之, 来自图 21 的数据清楚地指示, 与在 pH 7.4 的没有 HP 的对照测试 1 和在 pH 5.65 的 COSOPT® 对照制剂(类似于 COSOPT® 活性成分制剂)相比, 含有 HP 的制剂测试 2 和 3 具有更高的噻吗洛尔和多佐胺的渗透系数。

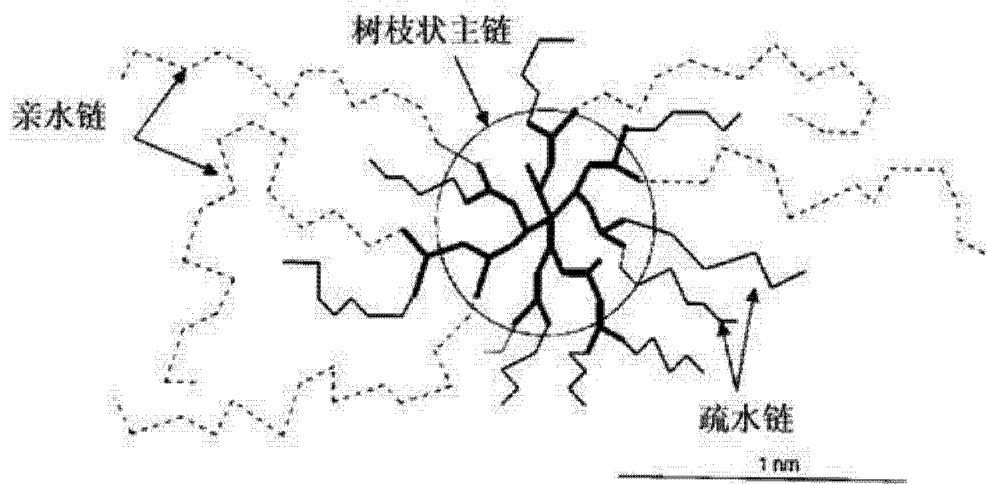
[0175] HP 的加入没有显著改变多佐胺和噻吗洛尔的扩散系数(其与延迟时间成反比)(参见图 22)。因而, HP 对角膜表面没有任何影响。如果扩散系数已经显著增加或降低了, 它会指示角膜表面性质的变化。因为扩散系数是药物化合物的固有性质, 它不应当随着添加剂的加入而变化。

[0176] HP 会促进噻吗洛尔和多佐胺的包封, 并因而增加噻吗洛尔和多佐胺向角膜上皮中的分配。该理论也得到图 23 中表明的数据的支持。与测试 1 相比, 噻吗洛尔和多佐胺在角膜表面的分配系数在测试 2 和 3 中更高, 这指示在有高度官能化的(羟基)HP 存在下噻吗洛尔和多佐胺向亲脂性角膜中的分配的改善。因而, 在有 HP 存在下改善的渗透主要是因为改善的向上皮的分配。通过使制剂溶液中的 HP 浓度从 0.5% (w/v) 增加至 2% (w/v), 可以进一步增加所述渗透。但是, 增加 HP 浓度不会显著改变分配系数和渗透系数, 因为这些参数将不会成物质的浓度的函数。

[0177] 与没有添加剂的对照制剂相比, 在有 HP 添加剂(诸如可商业得到的具有羟基官能团的 Boltorn®H20)存在下, 多佐胺和噻吗洛尔在 pH 7.4 的累积渗透量相对更高。制剂中的这样的 HP 的浓度的增加会显著增加多佐胺和噻吗洛尔的角膜渗透速率。在有 HP 存在下, 多佐胺和噻吗洛尔的角膜渗透系数相对更高。在有 HP 存在下, 活性成分向角膜上皮中的分配增加。因而, 具有羟基官能团的 HP 可以非常有效地增加 COSOPT® 活性成分的眼睛生物利用度。

[0178] 实验实施例 7

研究了碳酸酐酶抑制剂(诸如多佐胺和布林佐胺)在有 HP 和噻吗洛尔存在下在 pH 7.4 在 10 mM 磷酸盐缓冲液中的水溶解度。使用了称作 Boltorn®W3000 的 HP。该 HP 的末端官能团是 PEG (亲水的) 和不饱和的长链脂肪酸。在该实施例中使用的超支化聚酯的模型如下所示。



[0179] 具有两亲性端基的超支化聚酯。

[0180] 在该实验中使用的 HP 的性质如表 12 所述。所述 HP 具有 50 个伯羟基 / 分子,并且固体含量是 55% (w/w)。

[0181] 表 12 :在该研究中使用的 HP 的性质。

聚合物名称	粘度(mPa·s)	分子量(道尔顿)	多分散度	pH	酸值(mgKOH/g)
Boltorn®W3000	125	9000	1.3	3-5	10 (最大值)

[0182] 表 13 显示了在 pH 7.4 的 10 mM 磷酸盐缓冲液中制备的不同的测试样品制剂。

[0183] 表 13 :在 pH7 的磷酸盐缓冲液中制备的不同的测试制剂。

含量(%w/v)	对照样品	样品 #1	样品 #2	样品 #3	样品 #4	样品 #5	样品 #6
CAI	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
Boltorn®W3000	-	0.1	0.5	1	2	5	2
马来酸噻吗洛尔	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
HPMC	-	-	-	-	-	-	0.5
在 10mM 磷酸盐缓冲液中(加入 1MNaOH)	调节 pH 至 7.4	调节 pH 至 7.4	调节 pH 至 7.4	调节 pH 至 7.4	调节 pH 至 7.4	调节 pH 至 7.4	调节 pH 至 7.4

[0184] 如下制备乳剂 :将水缓慢地分散在称量的量的蜡状的 Boltorn®W3000 中以制备 5% (w/v) 乳剂,并继续搅拌和在 60-70℃ 加热至少 30 分钟,随后继续剧烈搅拌另外 15 小时,以在烧瓶中得到均匀的乳剂混合物。

[0185] 将 10 mM 磷酸盐缓冲液加入到固体活性成分的适当地称重的物料中,并彻底搅拌 15 分钟。其次,将有效体积的 5% (w/v) HP 乳剂溶液适当地稀释以补足在表 13 中描述的精确浓度。然后将样品测试乳剂溶液在室温搅拌 10 分钟(加热至 60℃ 持续 5 分钟)。搅拌以后,将所述乳剂溶液声处理 5 分钟。在完全乳化所有活性成分和非活性成分以后,使用 1 M NaOH 将 pH 调至 7.4,并加入额外的缓冲液以补足表 13 中的精确组成。在调节 pH 的情况下,在室温搅拌另外 15 小时或更久以将乳剂溶液进一步平衡。再次测量所有样品乳剂溶液的 pH,以确认最终的期望的 pH 7.4。使用与实验实施例 1 相同条件的 UPLC 分析滤液的 CAI 浓度。

[0186] 结果和讨论

在该实验中,使用两亲的自乳化的 HP 作为溶解度增高剂添加剂。在 pH 7.4,尝试了不同浓度的 HP。

[0187] 在图 24 中,显示了布林佐胺和多佐胺的溶解度随着 HP 的浓度的增加而增加。在有 0.5% (w/v) 噻吗洛尔和 5% (w/v) HP 存在下,多佐胺和布林佐胺的溶解度是约 2% (w/v)

的 CAI。向 2% (w/v) HP 中加入 HPMC 没有增加溶解度。尽管市售的 AZARGA[®] 混悬液产品具有在 pH 7.4 的 1% (w/v) 布林佐胺, 并且 COSOPT[®] 具有在 pH 5.65 的 2% (w/v) 多佐胺, 通过加入 HP 来增加在 pH 7.4 时的溶解度将有助于药物的效力增强(通过使剂量增加至大于 1% (w/v))。因此, 重要的是, 开发出在 pH 7.4 附近(泪液的 pH 是 7.4)具有增加的溶解度的布林佐胺或多佐胺以便增加 CAI 的眼睛生物利用度和减少眼刺激现象。

[0188] 实验实施例 8

含有具有两亲官能团的 HP (Boltorn[®]W3000) 的多佐胺和噻吗洛尔的体外角膜渗透研究。

[0189] 进行关于多佐胺和噻吗洛尔(COSOPT[®] 的活性成分) 的角膜渗透的体外实验, 以研究与原始的市售局部制剂(仅活性成分) 相比, 具有两亲官能团的 HP 的加入的影响。

[0190] 新的局部制剂含有 Boltorn[®]W3000(超支化聚酯), 所述 Boltorn[®]W3000 具有作为亲水官能团的非离子 PEG 和作为疏水官能团的不饱和脂肪酸(可商业得到的), 因而使它成为两亲的。通过在 pH 7.41 加入 2% (w/v) 的该 HP, 使多佐胺的溶解度从 4.3 mg/mL 增加至 15 mg/mL。在该实验中, 从含有最多 2% (w/v) HP (其与 COSOPT[®] 相当) 的新的制剂确定了多佐胺和噻吗洛尔的体外跨角膜渗透。还确定了 HP 的浓度对活性成分的影响。使用在 pH 7.4 的含有 COSOPT[®] 活性成分的标准溶液作为对样品。

[0191] 材料和方法

1. 制剂制备

配制了在 0.1% (w/v) 磷酸盐缓冲液中的下述 3 种溶液(表 14), 用于检查多佐胺和噻吗洛尔的体外角膜渗透, 以及用于确定角膜水解效应。

[0192] 表 14: 测试制剂的组成。

含量(%w/v)	测试 1	测试 2	测试 3
盐酸多佐胺	1.5	1.5	2.22
马来酸噻吗洛尔	0.638	0.683	0.683
Boltorn [®] W3000	-	2	-
1MNaOH/1MHCl	调节 pH 至 7.4	调节 pH 至 7.4	调节 pH 至 5.65
外观	混悬液	乳液	澄清溶液

[0193] 将 10 mM 磷酸盐缓冲液加入到固体活性成分的适当地称重的物料中, 并彻底搅拌 15 分钟。其次, 将有效体积的 5% (w/v) HP 混悬溶液加入到测试 2 中, 以补足在表 14 中描述的精确浓度。然后将 3 种测试溶液在室温搅拌 10 分钟(加热至 60°C 持续 5 分钟)。搅拌以后, 将所述溶液声处理 5 分钟。在完全稀释所有活性成分和非活性成分以后, 使用 1 M NaOH 或 1 M HCl 将 pH 调至 7.4 或 5.65, 并加入额外的缓冲液以补足表 15 中的精确组成。在调节 pH 的情况下, 注意到外观如表 14 所示, 并通过在室温搅拌另外 15 小时或更久将制剂进一步平衡。再次测量所有样品溶液的 pH, 以确认最终的期望的 pH。这些制剂直接地用作样品供体溶液, 用于角膜渗透研究。为了确定溶解度, 通过 0.45 μ m 注射器式过滤器过滤混悬液/乳液。在用超纯水稀释(稀释因子 = 1000) 每个样品以后, 使用 UPLC 分析滤液的多佐胺和噻吗洛尔浓度。

[0194] 2. 体外兔角膜渗透实验

在先前的实验实施例 4 中详细描述了要进行的实验操作和分析。计算的参数是在实验实施例 4 中所述的那些, 其中 C_d [ng/mL] 是供体溶液中的活性药物成分的初始药物浓度(来自表 15)。

[0195] 结果和讨论

通过 UPLC 确定的多佐胺和噻吗洛尔的初始浓度在表 15 中给出。角膜水化百分比计算结果在表 16 中给出。

[0196] 表 15 :测试制剂中的活性药物成分的溶解度。

样品	多佐胺 (mg/mL)	噻吗洛尔 (mg/mL)
测试 1	4.6	4.7
测试 2	15	4.7
测试 3	20	4.7

[0197] 表 16 :角膜水化百分比计算结果。

样品	最终净湿重 (g)	最终净干重 (g)	% (w/w) 角膜水化
测试 1	0.0143	0.0028	80.41
测试 1	0.0281	0.0044	84.34
测试 2	0.0201	0.0035	82.59
测试 2	0.151	0.0028	81.46
测试 3	0.0265	0.0042	84.15
测试 3	0.0257	0.0043	83.27

[0198] 基于角膜的净湿重和干重测量角膜水化。通常,正常哺乳动物的角膜的 % (w/w) 水化是在 75-80% 范围内。测试 1 和 3 都高于 80%。但是,分配和渗透系数的计算值没有差异,这提示更高的水化 % 不会产生任何角膜损伤。总之,所有测试样品的 % 水化没有显著变化,在所有情况下,它们是在期望的范围内。因而,HP 似乎对角膜水化没有影响。

[0199] 图 25 和 26 分别揭示了多佐胺和噻吗洛尔的角膜渗透特性。在 34°C 仔细地检查了多佐胺和噻吗洛尔的透过分离的兔角膜的时间依赖性的渗透。与没有添加剂的在 pH 7.4 的对照样品(测试 1)相比,含有 2% (w/v) HP 的测试制剂(测试 2)具有相对更高的渗透穿过角膜的多佐胺累积总量和在 2 小时以后渗透的总量。测试 2 (新的制剂)的多佐胺的总渗透与测试 3 的多佐胺渗透特性相当。但是,应当指出,与在 pH 5.65 制备的市售产品相比,测试 1 对于患者而言可能更为舒适,因为它是在 pH 7.4 制备的。通过增加 HP 的浓度可以进一步增加渗透。

[0200] 此外,不同于多佐胺,与具有类似水溶解度的测试 1 和 3 相比,测试 2 的噻吗洛尔渗透在有 HP 存在下显著增加(参见图 26)。在 pH 5.65 时,在含有 2% (w/v) HP 的制剂(测试 2)中,噻吗洛尔的角膜渗透几乎是市售产品 COSOPT® (在制剂中仅活性成分)的 2 倍(参见图 27)。该结果清楚地证实了使用 HP 作为多佐胺和噻吗洛尔的局部制剂的药物载体的重要性。

[0201] 总之,具有两亲官能团的 HP 的加入会随着 HP 的浓度的增加而显著地增加多佐胺和噻吗洛尔的角膜渗透速率。因而,与用于青光眼治疗的称作 COSOPT® 或 TRUSOPT® 或 AZOPT® 的市售产品相比,具有两亲官能团的树枝状聚酯 HP 会改善活性成分的角膜渗透。

[0202] 图 27 显示了在 3 小时以后的多佐胺和噻吗洛尔的总渗透百分比。显然,HP 的存在增加了渗透穿过角膜的活性成分(多佐胺和噻吗洛尔)的百分比(参见测试 2)。在 pH 7.4 制备的测试 2 具有稍微大于测试 3 (其在 pH 5.65 制备)的多佐胺总渗透 %。应当指出,所有测试制剂具有不同的多佐胺初始浓度和类似的噻吗洛尔浓度。不同的多佐胺初始溶解度主要是因为 HP 导致的增加的溶解度。在测试 2 与测试 3 (pH 5.65)和测试 1 (pH 7.4)的对比中,图 27 证实了使用 HP 作为添加剂的重要性。使用来自图 26 和 27 的斜率以确定角膜渗透性、分配系数和扩散系数。

[0203] 图 28 显示了多佐胺和噻吗洛尔的角膜渗透系数。渗透系数与供体溶液中的药物初始浓度成反比。在两种活性成分的情况下,与在 pH 7.4 和 pH 5.65 的对照样品相比,测试 2 的渗透系数更高,因而提示与不含有 HP 的对照制剂(测试 1 和 3)相比,在有 HP 存在下,活性药物成分具有增加的角膜渗透速率。测试 3 具有比测试 2 相对更高的角膜渗透性,由此指示 pH 的影响。在生理 pH 的活性药物成分更有助于类似溶解度下的渗透。总之,来自图 28 的数据清楚地指示,与在 pH 7.4 的没有 HP 的测试 1 和在 pH 5.65 的 COSOPT® 对照制剂(类似于 COSOPT® 活性成分制剂)相比,含有 HP 的测试 2 的制剂具有更高的噻吗洛尔和多佐胺的渗透系数。

[0204] HP 的加入没有显著改变多佐胺和噻吗洛尔的扩散系数(其与延迟时间成反比)(参见图 29)。因而,HP 对角膜表面没有任何影响。如果扩散系数已经显著增加或降低了,它会指示角膜表面性质的变化。因为扩散系数是药物化合物的固有性质,它不应当随着添加剂的加入而变化。

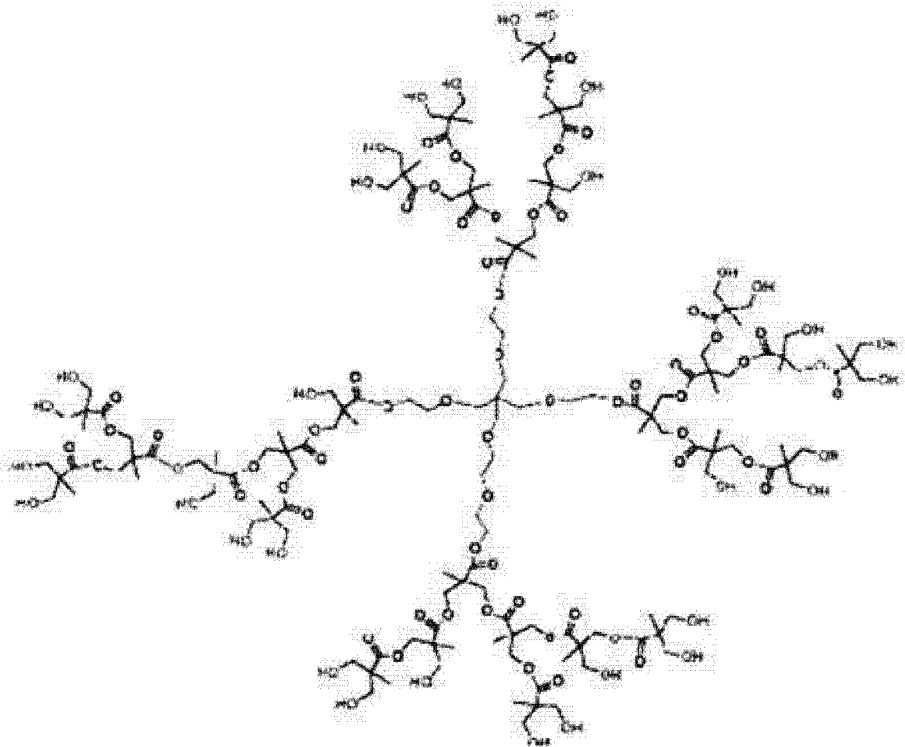
[0205] 与测试 1 和 3 相比,噻吗洛尔和多佐胺在角膜表面的分配系数在测试 2 中更高,因而指示在有高度官能化的(两亲的)HP 存在下,噻吗洛尔和多佐胺向亲脂性角膜中的分配的改善。因而,在有 HP 存在下改善的渗透主要是因为改善的向上皮的分配。通过使制剂溶液中的 HP 浓度从 2% (w/v) 增加至 5% (w/v),可以进一步增加所述渗透。

[0206] 在有 HP 添加剂(诸如可商业得到的具有两亲官能团的 Boltorn®W3000 (2% w/v))存在下,在 pH 7.4 时,多佐胺和噻吗洛尔的累积渗透量几乎是没有添加剂的在类似 pH 值的对照制剂的 2 倍。与在 pH 5.65 的市售产品相比,制剂中的这样的 HP 的浓度增加(大于 2% (w/v))可以进一步显著增加多佐胺和噻吗洛尔的角膜渗透速率。所述新的局部制剂是在 pH 7.4 制备的,因而使它对患者而言更有益和更舒适。在有 HP 存在下,活性成分向角膜上皮中的分配增加。因而,具有两亲官能团的 HP 可以非常有效地增加 COSOPT® 活性成分的眼睛生物利用度。

[0207] 实验实施例 9

Bis-MPA 聚酯超支化聚合物(BMPA-HP)或 PEG 和 BMPA-HP 的组合对碳酸酐酶抑制剂(CAI)的溶解度的增加。

[0208] 研究了在有噻吗洛尔存在下,在 pH 7.4 时,官能化的超支化聚合物对 CAI(诸如多佐胺和布林佐胺)在 10 mM 磷酸盐缓冲液中的水溶解度的影响。BMPA-HP 的一般定义是具有二羟甲基丙酸(Bis-MPA)聚酯核心和末端羟基(OH)官能团的超支化聚合物。末端羟基官能团的数目取决于超支化聚酯的代(generation)。所述代由从核心至末端官能团的支化层数或支化程度来定义。例如,第 2 代 BMPA 超支化聚酯含有 16 个羟基,而第 3 代含有 32 个羟基。BMPA-HP 的结构如下所示。



[0209] 第3代超支化的 Bis-MPA 聚酯(第3代 BMPA-HP)。

[0210] 在该调查研究中使用的不同代的聚酯 HP 的性质在表 17 中列出。

[0211] 表 17 :在该实验中使用的 HP 的性质。

聚合物名称	粘度(Pa·s)	分子量(道尔顿)	每个单体单元的羟基数	pH
第2代 BMPA-HP	0.007-0.25	1750	16	2.5-4
第3代 BMPA-HP	0.007-0.25	3600	32	2.5-4

[0212] 材料和方法

表 18 显示了要在 pH 7.4 的 10 mM 磷酸盐缓冲液中制备的不同的测试样品乳液,对照溶液除外。

[0213] 表 18: 在 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中制备的不同测试制剂

含量(%w/v)	对照样品	样品 #1	样品 #2	样品 #3	样品 #4	样品 #5	样品 #6	样品 #7
CAI	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
第2代 BMPA-HP	-	0.1	0.5	1	2	5	2	2
马来酸噻吗洛尔	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
PEG8000	-	-	-	-	-	-	2	4
在 10mM 磷酸盐缓冲液中 (加入 1MNaOH)	调节 pH 至 7.4	调节 pH 至 7.4	调节 pH 至 7.4	调节 pH 至 7.4	调节 pH 至 7.4	调节 pH 至 7.4	调节 pH 至 7.4	调节 pH 至 7.4

含量(%w/v)	样品 #8	样品 #9	样品 #10	样品 #11	样品 #12	样品 #13	样品 #14
CAI	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
第3代 BMPA-HP	0.1	0.5	1	2	5	2	2
马来酸噻吗洛尔	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
PEG8000	-	-	-	-	-	2	4
在 10mM 磷酸盐缓冲液中(加入 1MNaOH)	调节 pH 至 7.4	调节 pH 至 7.4	调节 pH 至 7.4	调节 pH 至 7.4	调节 pH 至 7.4	调节 pH 至 7.4	调节 pH 至 7.4

[0214] 将 10 mM 磷酸盐缓冲液加入到固体活性成分的适当地称重的物料中,并彻底搅拌 15 分钟。其次,将有效体积的 5% (w/v) BMPA-HP 溶液适当地稀释以补足在表 18 中描述的精确浓度。然后将样品测试溶液在室温搅拌 10 分钟(加热至 60℃持续 5 分钟)。搅拌以后,将所述溶液声处理 5 分钟。在完全混悬所有活性成分和非活性成分以后,使用 1 M NaOH 将 pH 调至 7.4,并加入额外的缓冲液以补足如表 18 所述的精确组成。在调节 pH 的情况下,通过在室温搅拌另外 15 小时或更久以进一步平衡混悬溶液。再次测量所有样品溶液的 pH 以确认为 7.4 的最终期望的 pH。使用与实验实施例 1 相同条件的 UPLC 分析滤液的 CAI。

[0215] 结果和讨论

在该实验中,使用第 2 代 BMPA-HP 或第 3 代 BMPA-HP 作为溶解度增高剂添加剂,并在 pH 7.4 测试了每种的不同浓度。重要的是,开发出在 pH 7.4 附近(泪液的 pH 是 7.4)具有增加的溶解度的亲脂性布林佐胺或多佐胺药物以便增加 CAI 的眼睛生物利用度和减少眼刺激现象。在有 0.5% 噻吗洛尔和 5% 第 3 代 BMPA-HP 存在下,多佐胺和布林佐胺的溶解度是大约 1% (w/v) 的 CAI。就类似浓度的用作所有样品的添加剂的第 2 代 BMPA-HP 而言,与第 3 代 BMPA-HP 相比,低级的第 2 代 BMPA-HP 使 CAI 的溶解度下降了小于 10%。

[0216] 当使用 2% (w/v) PEG 8000 和 HP 的组合时,CAI 的溶解度急剧增加(是对照的 4 倍)。将 2% (w/v) PEG 8000 加入到 2% (w/v) BMPA-HP 中会使 CAI 的溶解度几乎翻倍(参见图 31)。

[0217] 尽管市售的 Azarga® 混悬液产品具有在 pH 7.4 的 1% 布林佐胺,并且 COSOPT® 具有在 pH 5.65 的 2% (w/v) 多佐胺,通过加入 BMPA-HP 来增加在 pH 7.4 时的溶解度将会有助于药物的效力增强(通过使剂量增加至大于 1% (w/v))。

[0218] 所述结果清楚地指示在接近生理 pH 的 pH 值时使用 BMPA-HP 作为疏水的 CAI 溶解度增高剂的优点。向含有 BMPA-HP 的溶液中加入 PEG 会进一步改善 CAI 的溶解度。

[0219] 实验实施例 10

确定 Bis-MPA 超支化聚酯的眼刺激的人角膜上皮(HCE)组织培养研究,和基于细胞的细胞毒性的眼睛研究的优化的样品施用时间。

[0220] 方法和材料

在盐水磷酸盐缓冲液(AZOPT® 除外)中,根据下表 19 制备样品,并使用 0.2μm 无菌的注射器式滤器除菌。使用 0.02% BAK 作为阳性对照。重建的人角膜上皮购自皮肤伦理学实验室(Skin Ethics laboratory)(法国)。

[0221] 表 19 :样品集合。

含量(%w/v)	空白样品	+ 媒介物对照	- 媒介物对照	样品 #1	样品 #2	样品 #3	样品 #4	样品 #5
磷酸盐盐水 (pH7.4)	一式三份	-	-	-	-	-	-	-
0.02% 苯扎氯铵 ¹	-	一式三份	-	-	-	-	-	-
3%BisMPA 第 3 代	-	-	一式三份	-	-	-	-	-
4%BisMPA 第 3 代	-	-	-	一式三份	-	-	-	-
2%BisMPA 第 2 代	-	-	-	-	一式三份	-	-	-
3%BisMPA 第 2 代	-	-	-	-	-	一式三份	-	-
5%BisMPA 第 2 代	-	-	-	-	-	-	一式三份	-
Azopt®	-	-	-	-	-	-	-	一式三份

[0222] 细胞培养方法如下所述：

将上皮从琼脂糖转移至维持培养基 6-孔板中

↓

组织预处理(conditioning):在 37℃、5% CO₂、≥ 95% 湿度,至少 2 小时

↓

将组织转移至在 24-孔板中的新鲜维持培养基中

↓

3 个组织,每个具有 30 μL / 30 mg 测试物质

↓

在室温温育 20 min 或 40 min

↓

用 PBS 冲洗

↓

将组织转移至新鲜维持培养基中

↓

在 37℃、5% CO₂、≥ 95% 湿度温育 16±1 小时

↓

将组织转移至在培养基中的 MTT 溶液中(MTT 温育)

↓

将组织温育 3 小时(37℃、5% CO₂、≥ 95%)

↓

将插入物浸入异丙醇中(甲臞提取)

↓

提取甲臞最少 2 小时(在室温)

↓

将插入物穿孔(perforate),并均质化

↓

在 570 nm 在平板分光光度计(plate spectrophotometer)中读取 OD。

[0223] 从相对于相应的阴性对照(100% 生存力)的测试化学物处理过的培养物中的 MTT 转化百分比计算每种处理过的培养物的生存力百分比。

[0224] 使用下述方程式：

生存力百分比 = [单个 OD_{化学物} / 平均 OD_{阴性对照}] x 100。

[0225] HCE 生存力分类预测模型:NI (生存力 ≥ 60%), I (生存力 < 60%), 即,如果与阴性对照相比,测试产物得到的生存力百分比 < 60%,那么将该产物分类为刺激物(根据体内分类法)。

[0226] 结果和讨论

如图 32 所示,使用在上面在实验部分中描述的生存力百分比方程式计算不同样品(根据表 19)的生存力百分比。生存力小于 60% 的样品被视为刺激物。所有样品的基于一式三份的细胞生存力的标准差小于 7%。来自细胞毒性研究的结果揭示具有最多 4% (w/v) 的第

3 代 BMPA-HP 的眼用样品将会是非眼刺激物,具有大于 60% 的细胞生存力(参见图 32)。来自图 32 的结果也揭示 AZOPT® 对角膜上皮细胞可以是细胞毒性的,就 1 小时的施用时间而言,具有小于 50% 的细胞生存力。含有 5% (w/v) 的第 2 代 Bis-MPA 的样品也造成眼刺激,具有小于 60% 的细胞生存力。

[0227] 与来自先前研究的结果相组合,不同浓度的 Bis-MPA 商业的超支化聚酯的细胞毒性在图 33 中所揭示。从该图显而易见,就在眼用溶液中的相同浓度而言,由第 2 代 BMPA-HP 造成的上皮细胞损伤和由此造成的眼刺激小于由第 3 代 BMPA-HP 造成的眼刺激。已知的是,支化的程度或长度和因而产生的末端官能团的分子量和数目随着 HP 的代数的减小而减小。来自图 33 的结果指示细胞毒性随着代数的减小而下降可以主要是由于末端官能团与上皮细胞的延长的相互作用的减少。

[0228] 结论

上皮细胞死亡率随着浓度剂量和代(摩尔质量和支化程度)的增加而增加。在 AZOPT® 市售产品的情况下,它造成具有小于 50% 细胞生存力的眼刺激,这可能是由于 0.01% (w/v) 的 BAK 和 1 小时的暴露时间。

[0229] 实验实施例 11

含有 BMPA-HP 或非离子表面活性剂和 BMPA-HP 的组分的 CAI 的溶解度增加。

[0230] 在有噻吗洛尔存在下,在 pH 7.4,研究了多佐胺在 10 mM 磷酸盐缓冲液中的水溶解度和稳定性。

[0231] 方法和材料

首先,将 10 mM 磷酸盐缓冲液加入到固体活性成分的适当地称重的物料中,并彻底搅拌 15 分钟。在完全溶解活性药物成分以后,将超支化的第 2 代 BMPA-HP 加入到溶液中。在 HP 溶解以后,按照需要的制剂浓度加入 PEG 8000。然后将样品测试溶液在室温搅拌 10 分钟(加热至 60°C 持续 5 分钟)。搅拌以后,将所述溶液声处理 20 分钟。在完全溶解所有活性成分和非活性成分以后,使用 1 M NaOH 将 pH 调至 7.4,并加入额外的缓冲液以补足如表 20 和 21 所示的精确组成。在调节 pH 的情况下,通过在室温搅拌另外 15 小时或更久以进一步平衡制剂。通过 0.45 μ m 注射器式滤器过滤样品。将聚山梨酯 80 加入到最终制剂中。在样品 #3 的情况下,在 pH 调节以后在 60°C 平衡制剂(24 小时),然后加入聚山梨酯 80。再次测量所有样品溶液的 pH 以确认最终的期望的 7.4 的 pH。在 25 和 60°C 储存所有样品 14 天,并且在用超纯水稀释(稀释因子 = 1000)每个样品以后使用 UPLC 分析滤液的多佐胺和噻吗洛尔。

[0232] 结果和讨论

表 20 :样品在室温的多佐胺和噻吗洛尔含量、外观和 pH。

		对照样品	样品#1	样品#2	样品#3	样品#4
多佐胺 (mg/mL)	最初	4.3	9.6	9.9	9.9	9.5
	1 周	4.3	8.9	9.5	9.9	8.2
	2 周	4.3	8.4	9.3	9.8	6.2
噻吗洛尔 (mg/mL)	最初	4.7	5.3	4.9	5.2	4.8
	1 周	4.6	5.0	4.7	5.1	4.8
	2 周	4.3	4.9	4.7	5.1	4.8
外观	最初	澄清	澄清	澄清	澄清	澄清
	1 周	澄清	混悬液	混悬液	澄清	混悬液
	2 周	澄清	混悬液	混悬液	澄清	混悬液
pH	最初	7.4	7.4	7.39	7.4	7.4
	1 周	7.4	7.4	7.38	7.4	7.39
	2 周	7.37	7.38	7.38	7.38	7.36

[0233] 表 21 :样品在 60℃ 的多佐胺和噻吗洛尔含量、外观和 pH。

		对照样品	样品#1	样品#2	样品#3	样品#4
多佐胺 (mg/mL)	最初	4.3	9.6	9.9	9.9	9.5
	1 周	4.3	8.9	9.5	9.9	8.2
	2 周	4.2	9.6	9.8	9.8	9.3
噻吗洛尔 (mg/mL)	最初	4.7	5.3	4.9	5.2	4.8
	1 周	4.8	5.1	4.8	5.3	4.8
	2 周	4.8	5.4	4.8	5.6	4.6
外观	最初	澄清	澄清	澄清	澄清	澄清
	1 周	澄清	澄清	澄清	澄清	澄清
	2 周	澄清	澄清	澄清	澄清	澄清
pH	最初	7.40	7.40	7.39	7.40	7.40
	2 周	7.43	7.42	7.37	7.43	7.36

[0234] 在该研究中,将第 2 代 BMPA-HP 作为溶解度增高剂添加剂进行了研究。在 pH 7.4 尝试了与非离子表面活性剂(诸如 PEG 和聚山梨酯 80)的不同组合。在样品制备以后,所有制剂在室温都是澄清溶液。在图 34 中,显示了在加入 4% (w/v) HP 和 2%(w/v) PEG 的情况下,多佐胺的溶解度增加。如图 34 所示,从第 1 天直到 2 周,含有 4% (w/v) HP 和 2% (w/v) PEG 的制剂的多佐胺浓度稳步下降。在 2 周以后,含有 4% (w/v) HP 和 2% (w/v) PEG 的制剂变成混悬液。发明人发现,多佐胺浓度的下降速率随着 1% (w/v) 聚山梨酯 80 的加入而下降(样品 #1)。在 2 周的时间段内,多佐胺浓度从 9.6 mg/mL 下降至 8.4 mg/mL。

[0235] 因而,更高浓度的聚山梨酯 80 会防止沉淀,并有助于稳定新的制剂。在 2 周的时段内,观察到所有制剂的 pH 的可忽略的变化(参见表 20 和表 21)。在 2 周的时段内,噻吗洛尔浓度的变化是轻微的。尽管市售的 AZARGA® 混悬液产品具有在 pH 7.4 的 1% (w/v) 布林佐胺,并且 COSOPT® 具有在 pH 5.65 的 2% 多佐胺,通过加入 HP 和非离子表面活性剂来增加在 pH 7.4 时的溶解度将会有助于药物的效力增强(通过使剂量增加至大于等于 1% (w/v))。

[0236] 结论

所述结果清楚地证实了在接近生理 pH 的 pH 值时使用与 PEG 8000 和聚山梨酯 80 相组合的第 2 代 BMPA-HP 作为 CAI 溶解度增高剂的优点。

[0237] 实验实施例 12

进行了基于在有噻吗洛尔存在下碳酸酐酶抑制剂(多佐胺和布林佐胺)在含有在磷酸盐缓冲液中的第 2 代超支化的 Bis-MPA 聚酯-16- 羟基(第 2 代 BMPA-HP)、PEG 8000 和聚山梨酯 80 的不同组合的水溶液中的溶解度和稳定性来确定在 pH 7.4 的局部制剂的研究。

[0238] 方法和材料

表 22 显示了要在 pH 7.4 的 10 mM 磷酸盐缓冲液中制备的所有不同的测试样品。

[0239] 表 22: 在 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中制备的不同测试制剂。

含量(%w/v)	对照样品	样品 #1	样品 #2	样品 #3	样品 #4	样品 #5	样品 #6
CAI	1	1	1	1	1	1	1
噻吗洛尔	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
第 2 代 BMPA-HP	-	4	4	4	-	-	-
PEG8000	-	2	-	2	2	2	-
聚山梨酯 80	-	4	4	-	4	-	4
1MNaOH/1MHCl	调节 pH 至 7.4	调节 pH 至 7.4	调节 pH 至 7.4	调节 pH 至 7.4	调节 pH 至 7.4	调节 pH 至 7.4	调节 pH 至 7.4

[0240] 首先,将 10 mM 磷酸盐缓冲液加入到固体活性成分的适当地称重的物料中,并彻底搅拌,直到活性药剂溶解。其次,将固体 BMPA-HP 粉末加入到样品制剂 1、2 和 3 中。在 HP 溶解以后,外观为澄清溶液。将适当质量的非离子表面活性剂(诸如 PEG 8000)加入到所述制剂中,以补足按照上表 22 中所述的制剂内容物的精确浓度。然后将所有测试溶液在室温搅拌 10 分钟(加热至 60℃持续 5 分钟)。搅拌以后,将所述溶液声处理 5 分钟。在完全溶解所有活性成分和非活性成分以后,使用 1 M NaOH 或 1 M HCl 将 pH 调至 7.4 或 5.65,并加入额外的缓冲液以补足根据表 22 样品组成的精确组成。在调节 pH 的情况下,形成测试溶液,通过在室温搅拌另外 24 小时或更久以将其平衡。就含有聚山梨酯 80 和超支化聚酯的样品(表 2)而言,仅在 60℃平衡最终制剂 24 小时以后加入聚山梨酯 80。再次调节所有样品溶液的 pH 以确认最终的期望的 pH。

[0241] 在用超纯水稀释(稀释因子 = 1000)每个样品以后,使用 UPLC 分析滤液的碳酸酐酶抑制剂、噻吗洛尔和 HP 浓度。使用从实验实施例 1 得到的 CAI 和噻吗洛尔检测的最佳条件。记录每种制剂在室温和 60℃时 1 个月时段内的外观和 pH。

[0242] 结果和讨论

该研究使用具有羟基末端基团的 HP、PEG 和聚山梨酯 80 作为溶解度增高剂添加剂。在 pH 7.4 尝试了不同组合,以便基于以前的结果确定最佳制剂。图 35 表明,在有 4% (w/v) HP 和 2% (w/v) PEG 或 4% (w/v) 聚山梨酯 80 存在下(样品 1、2 和 3),多佐胺的溶解度显著增加。但是,在仅有 PEG 8000(样品 5)或仅聚山梨酯 80(样品 6)或它们的组合(样品 4)存在下,多佐胺溶解度没有显著增加。因而,向制剂中加入超支化聚酯清楚地指示了其作为溶解度增高剂的优点。但是,与含有 HP、聚山梨酯 80 和 PEG 8000 的制剂(样品 1)相比,含有与聚山梨酯 80 相组合的具有羟基的 HP 的制剂(样品 2)具有类似的溶解度。因而,可以避免 PEG 8000 的加入。总之,基于多佐胺和噻吗洛尔溶解度数据发现,样品 2 是最佳制剂。向 HP 中加入表面活性剂(诸如聚山梨酯 80)也会通过防止包封在 HP 内的多佐胺的沉淀而增加多佐胺溶解度。

[0243] 表 23:样品在室温的多佐胺和噻吗洛尔含量、外观和 pH。

		对照	样品#1	样品#2	样品#3	样品#4	样品#5	样品#6
多佐胺 (mg/mL)	最初	4.6	10.4	10.1	9.1	5.4	5.2	5.0
	1 周	4.6	10.1	10.0	8.2	5.2	4.9	4.9
	2 周	4.6	10.1	10.1	6.2	5.1	4.8	4.8
	4 周	4.5	10.1	10.1	5.9	5.0	4.8	4.6
噻吗洛尔 (mg/mL)	最初	5.2	5.1	5.1	4.9	5.1	5.2	5.0
	1 周	5.1	5.0	5.1	4.9	5.1	5.1	5.0
	2 周	5.0	4.9	5.1	4.9	5.1	5.1	5.0
	4 周	5	4.9	5.1	4.8	5.1	5.0	4.9
外观	最初	混悬液	澄清	澄清	澄清	混悬液	混悬液	混悬液
	1 周	混悬液	澄清	澄清	混悬液	混悬液	混悬液	混悬液
	2 周	混悬液	澄清	澄清	混悬液	混悬液	混悬液	混悬液
	4 周	混悬液	澄清	澄清	混悬液	混悬液	混悬液	混悬液
pH	最初	7.40	7.40	7.40	7.39	7.40	7.40	7.39
	1 周	7.40	7.40	7.40	7.39	7.40	7.80	7.39
	2 周	7.37	7.38	7.38	7.37	7.38	7.37	7.39
	4 周	7.35	7.36	7.37	7.37	7.37	7.36	7.38

[0244] 表 24 :样品在 60℃ 的多佐胺和噻吗洛尔含量、外观和 pH。

		对照样品	样品#1	样品#2	样品#3	样品#4	样品#5	样品#6
多佐胺 (mg/mL)	最初	4.6	10.4	10.1	9.1	5.4	5.2	5.0
	1 周	4.6	10.3	10.2	9.0	5.3	5.1	4.9
	2 周	4.5	10.3	10.2	8.9	5.3	4.9	4.8
	4 周	4.5	10.1	10.2	8.7	5.3	4.9	4.8
噻吗洛尔 (mg/mL)	最初	5.2	5.1	5.0	4.9	5.1	5.2	5.0
	1 周	5.1	5.1	5.1	4.9	5.1	5.1	5.0
	2 周	4.9	4.9	5.0	4.9	5.1	5.1	5.0
	4 周	4.9	5.0	5.0	4.8	5.1	5.0	4.9
外观	最初	混悬液	澄清	澄清	澄清	混悬液	混悬液	混悬液
	1 周	混悬液	澄清	澄清	澄清	混悬液	混悬液	混悬液
	2 周	混悬液	澄清	澄清	澄清	混悬液	混悬液	混悬液
	4 周	澄清	澄清	澄清	澄清	混悬液	混悬液	混悬液
pH	最初	7.40	7.39	7.40	7.39	7.40	7.40	7.39
	2 周	7.43	7.37	7.43	7.41	7.38	7.38	7.38
	4 周	7.40	7.35	7.38	7.40	7.38	7.38	7.38

[0245] 表 23 和 24 显示了所有制剂样品在 4 周时段内的多佐胺和噻吗洛尔的稳定性测试结果。从所述表可见,样品 #1 和样品 #2 在 1 个月以后是相对稳定的且澄清的溶液。可以避免 PEG 在样品 #1 中的存在,因为没有 PEG 的样品 #2 产生了类似的结果。

[0246] 结论

所述结果清楚地指示使用与表面活性剂(诸如聚山梨酯 80 和 PEG 8000)相组合的具有羟基末端官能团的 HP 的优点。聚山梨酯 80 的表面活性剂性能非常有助于通过防止沉淀而增加 CAI 的溶解度。基于溶解度和 1 个月稳定性结果的良好制剂是含有在 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中的活性成分与仅 4% (w/v) 第 2 代 BMA-HP 和 4% 聚山梨酯 80 的组合的制剂。

[0247] 实验实施例 13

含有 Bis MPA 超支化聚酯和聚山梨酯 80 的新的局部制剂的多佐胺和噻吗洛尔的体外

角膜渗透研究。

[0248] 方法和材料

配制了在 0.1% (w/v) 磷酸盐缓冲液中的下述 3 种溶液(表 27),用于检查多佐胺和噻吗洛尔的体外角膜渗透,以及用于确定角膜水解效应。

[0249] 表 25 :测试制剂的组成。

含量(%w/v)	测试 1	测试 2	测试 3
多佐胺	2	1	1
噻吗洛尔	0.5	0.5	0.5
第 2 代 BMPA-HP	-	4	4
聚山梨酯 80	-	4	4
1MNaOH/1MHCl	调节 pH 至 5.65	调节 pH 至 5.65	调节 pH 至 7.4
外观	澄清	澄清	澄清

[0250] 首先,将 10 mM 磷酸盐缓冲液加入到固体活性成分的适当地称重的物料中,并彻底搅拌 15 分钟。在样品编号 2 和 3 的情况下,按照表 25 中的组成,将第 2 代 BMPA-HP 粉末加入到溶液中。然后将 3 种测试溶液在室温搅拌 10 分钟(加热至 60℃持续 5 分钟)。搅拌以后,将所述溶液声处理 5 分钟。在完全溶解所有活性成分和非活性成分以后,使用 1 M NaOH 或 1 M HCl 将 pH 调至 7.4 或 5.65,并加入额外的缓冲液以补足如上表样品组成所示的精确组成。在调节 pH 的情况下,形成测试溶液,就样品 1 和 2 而言,通过在室温搅拌另外 24 小时或更久以将测试溶液平衡。在样品号 2 和 3 中,在 60℃进行平衡 24 小时。然后加入聚山梨酯 80(4% (w/v)),随后再次调节 pH。再次测量所有样品溶液的 pH,以确认最终的期望的 pH。

[0251] 这些澄清溶液直接地用作样品供体溶液,用于角膜渗透研究。为了确定溶解度,通过 0.45μm 注射器式过滤器过滤测试溶液。在用超纯水稀释(稀释因子 = 1000)每个样品以后,使用 UPLC 分析滤液的多佐胺和噻吗洛尔浓度。使用的材料和设备的细节以及兔角膜研究操作在实验实施例 4 中给出。

[0252] 结果和讨论

表 26 :测试样品中的活性成分的初始浓度

样品	多佐胺(mg/mL)	噻吗洛尔(mg/mL)
测试 1	20.2	5.2
测试 2	10.2	5.1
测试 3	10.0	5.0

[0253] 通过 UPLC 确定的多佐胺和噻吗洛尔的初始浓度在表 26 中给出。

[0254] 表 27 :角膜水化百分比计算结果。

样品	最终净湿重(g)	最终净干重(g)	% (w/v) 角膜水化
测试 1	0.0534	0.0534	80.42
测试 2	0.0471	0.0471	82.59
测试 3	0.0627	0.0550	84.15
测试 1	0.0684	0.0420	84.34
测试 2	0.0459	0.0365	81.46
测试 3	0.0421	0.0370	83.27

[0255] 基于角膜的净湿重和干重测量角膜水化。通常,正常哺乳动物的角膜的 % (w/w) 水化是在 75-85% 范围内。总之,所有测试样品的 % 水化没有显著变化,并且都是在期望的范围内,如表 27 所示。因而,HP 或聚山梨酯 80 对角膜水化没有影响。

[0256] 图 36 和图 37 分别揭示了多佐胺和噻吗洛尔的角膜渗透特性。在 34℃,仔细地检

查了多佐胺和噻吗洛尔的透过分离的兔角膜的时间依赖性的渗透。从图 36 可见,与在 pH 5.65 的相同制剂(测试 2)相比,含有 4% (w/v) HP 和聚山梨酯 80 的在 pH 7.4 的测试制剂(测试 3)具有相对更高的渗透穿过角膜的多佐胺累积总量和在 3 小时以后渗透的总量。显然,多佐胺渗透在 pH 7.4 增加,因为它的非离子性能非常有助于亲脂性的角膜上皮膜。测试 3 的多佐胺角膜渗透与在 pH 5.65 的没有添加剂的对照溶液(测试 1)相当。应当指出,测试 3 含有 1% (w/v) 多佐胺,而测试 1 含有 2% (w/v) 多佐胺。尽管测试 3 含有测试 1 的一半多佐胺浓度,角膜渗透特性是类似的。与可以造成眼刺激的在 pH 5.65 的市售产品相比,测试 3 对患者而言可能是更舒适的,因为它是在 pH 7.4 制备的。来自图 37 的噻吗洛尔渗透特性提示,测试 3 具有比测试 1 (对照溶液)显著更高的角膜渗透。显然,与具有类似水溶解度的测试 1 相比,在 pH 7.4 时超支化聚酯和聚山梨酯 80 在测试 3 中的存在会增加噻吗洛尔渗透。总之,与市售产品相比增加的噻吗洛尔渗透和相当的多佐胺渗透是含有 HP 和聚山梨酯 80 的新的制剂的关键优点。从图 38 可见,测试 3 (新的制剂)在 3 小时以后的多佐胺和噻吗洛尔的总渗透百分比是测试 1 (市售产品活性成分)的至少 2 倍。显然,HP 和聚山梨酯 80 的存在会增加渗透穿过角膜的活性成分(多佐胺和噻吗洛尔)的百分比。

[0257] 使用来自图 36 和 37 的斜率以确定角膜渗透系数和分配系数。渗透系数与供体溶液中的药物初始浓度成反比。测试 2 的渗透系数(参见图 39)和分配系数(参见图 40)相对高于测试 1。应当指出,测试 1 和测试 2 溶液都是在 pH 5.65。结果提示了 HP 和聚山梨酯 80 的增加活性成分的分配和渗透的影响。由于 pH 效应,测试 3 的渗透系数和分配系数高于测试 2。测试 3 制剂是在 pH 7.4 制备的,这更有助于非离子型多佐胺和噻吗洛尔的渗透。总之,结果清楚地证实了使用 HP 和聚山梨酯 80 作为多佐胺和噻吗洛尔的局部制剂的药物载体的重要性。

[0258] 总之,来自图 39 的数据清楚地指示,与在 pH 7.4 的不含 HP 的测试 1 和在 pH 5.65 的 COSOPT[®] 对照制剂(类似于 COSOPT[®] 活性成分制剂)相比,含有 HP 和聚山梨酯 80 的制剂测试 2 具有更高的噻吗洛尔和多佐胺渗透系数。

[0259] HP 和聚山梨酯 80 促进噻吗洛尔和多佐胺的包封,并从而增加噻吗洛尔向角膜上皮中的分配。该理论也得到图 40 中的数据的支持。与测试 1 和测试 2 相比,噻吗洛尔和多佐胺在角膜表面的分配系数在 pH 7.4 的测试 3 中更高,这指示,在有高度官能化的 HP 存在下,在 pH 7.4 而不是 pH 5.65,噻吗洛尔和多佐胺向亲脂性角膜中的分配的改善。因而,在有 HP 存在下改善的渗透主要是因为改善的向上皮的分配。

[0260] 结论

在 pH 7.4,在有 HP 添加剂(诸如可商业得到的树枝状 Bis-MPA HP)和聚山梨酯 80 存在下,在多佐胺的情况下活性药剂的累积渗透量几乎与市售产品相当,并且就噻吗洛尔渗透而言活性药剂的累积渗透量超过市售产品的 2 倍。该新的局部制剂是在 pH 7.4 制备的,因而使它更有助于亲脂性上皮角膜渗透,并且对患者而言更舒适。因而,具有羟基末端基团的 HP 和聚山梨酯 80 可以非常有效地增加 COSOPT[®] 活性成分的眼睛生物利用度。

[0261] 工业实用性

根据本发明,可以提供一种包含 HP 的眼用组合物,所述眼用组合物显示出增加的碳酸酐酶抑制剂(诸如多佐胺或布林佐胺)的水溶解度。所述眼用组合物还可以包含非离子表面活性剂和 / 或 β -阻滞剂。本发明的眼用组合物导致增加的活性剂向角膜中的渗透。因

此,与可得到的目前有关的眼用市售产品相比,可以增加含有碳酸酐酶抑制剂和 β 阻滞剂(活性成分)的局部眼用溶液的总眼睛生物利用度,并因此增加其治疗活性。呈现在本发明中的局部眼用组合物提供更有效的抗青光眼组合物,其可以通过增加眼睛生物利用度而提高患者的顺应性。

[0262] 尽管上面已经详细地描述了本发明的一些实施方案,本领域普通技术人员可以对所示的具体实施方案做出各种改进和变化,而不实质上脱离本发明的新的教导和优点。这样的改进和变化被包括在所附权利要求书所述的本发明的精神和范围内。

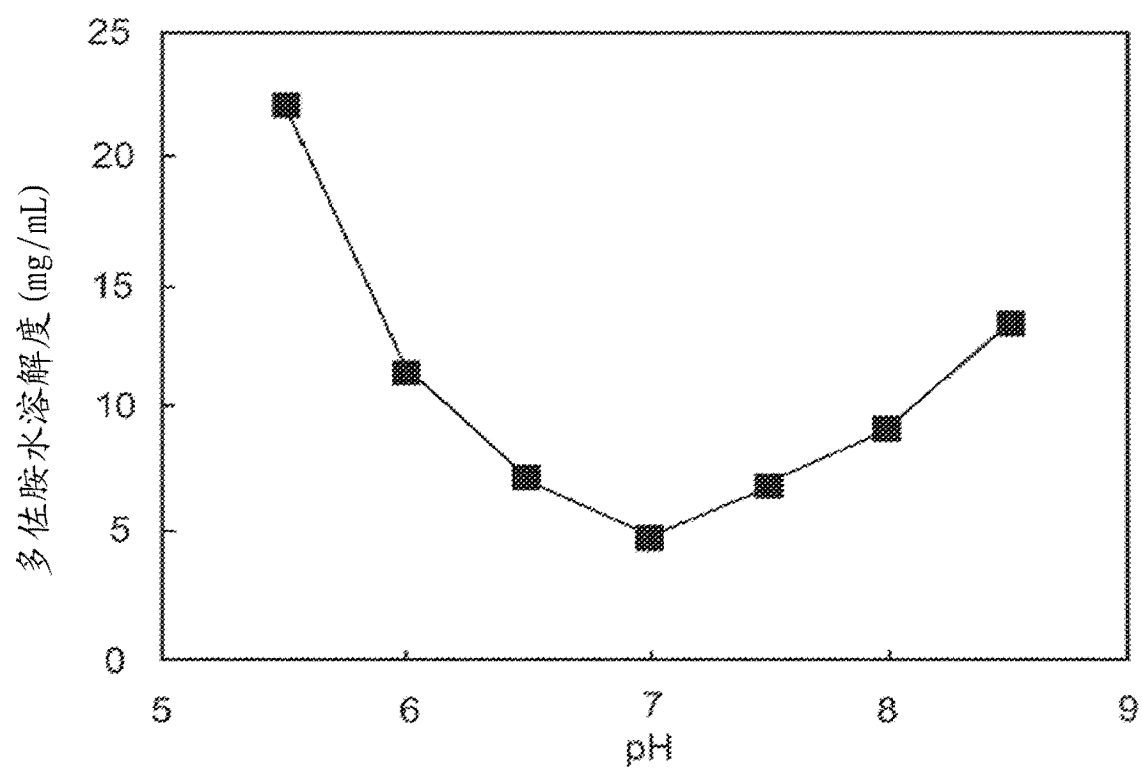


图 1

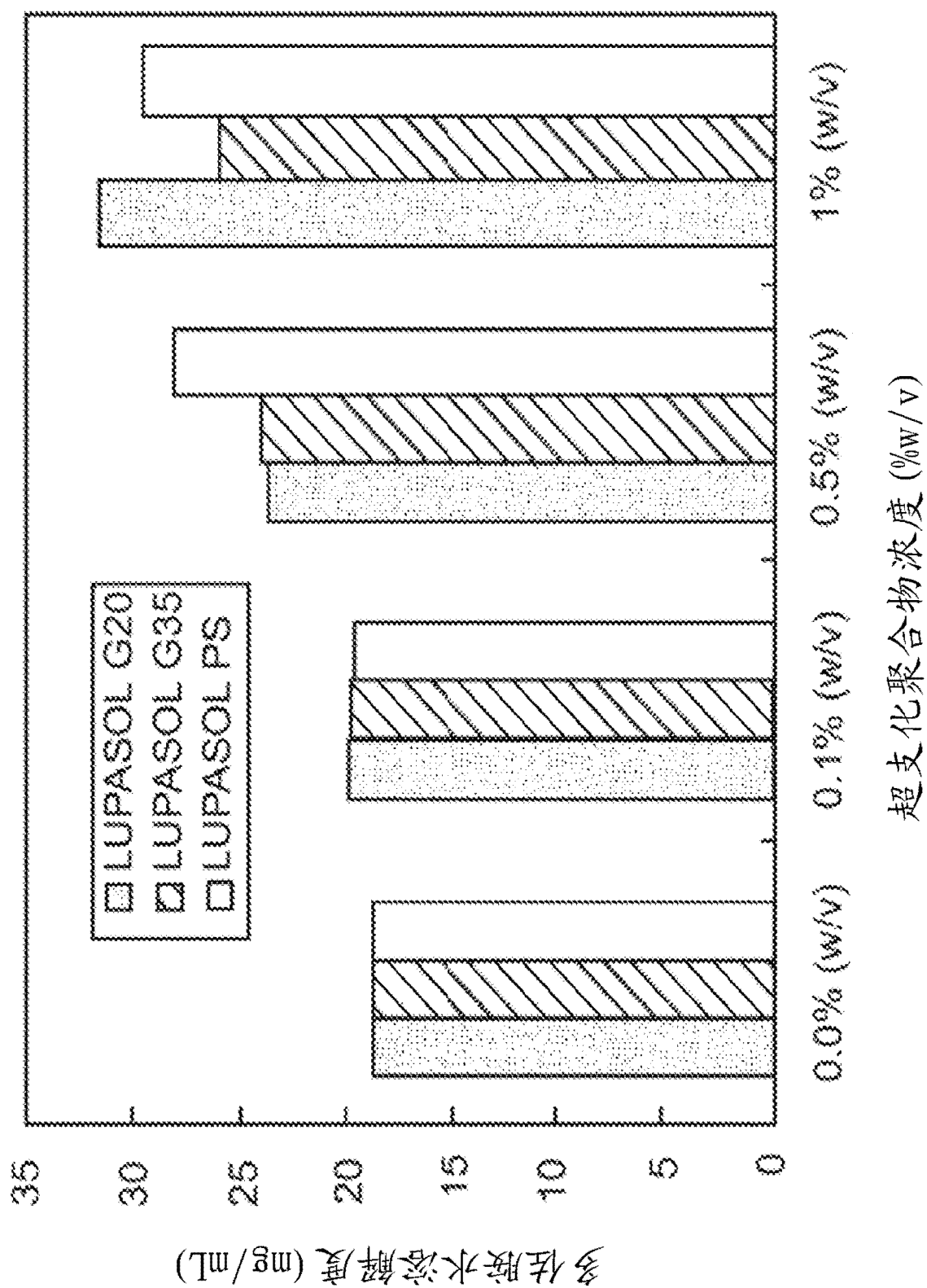


图 2

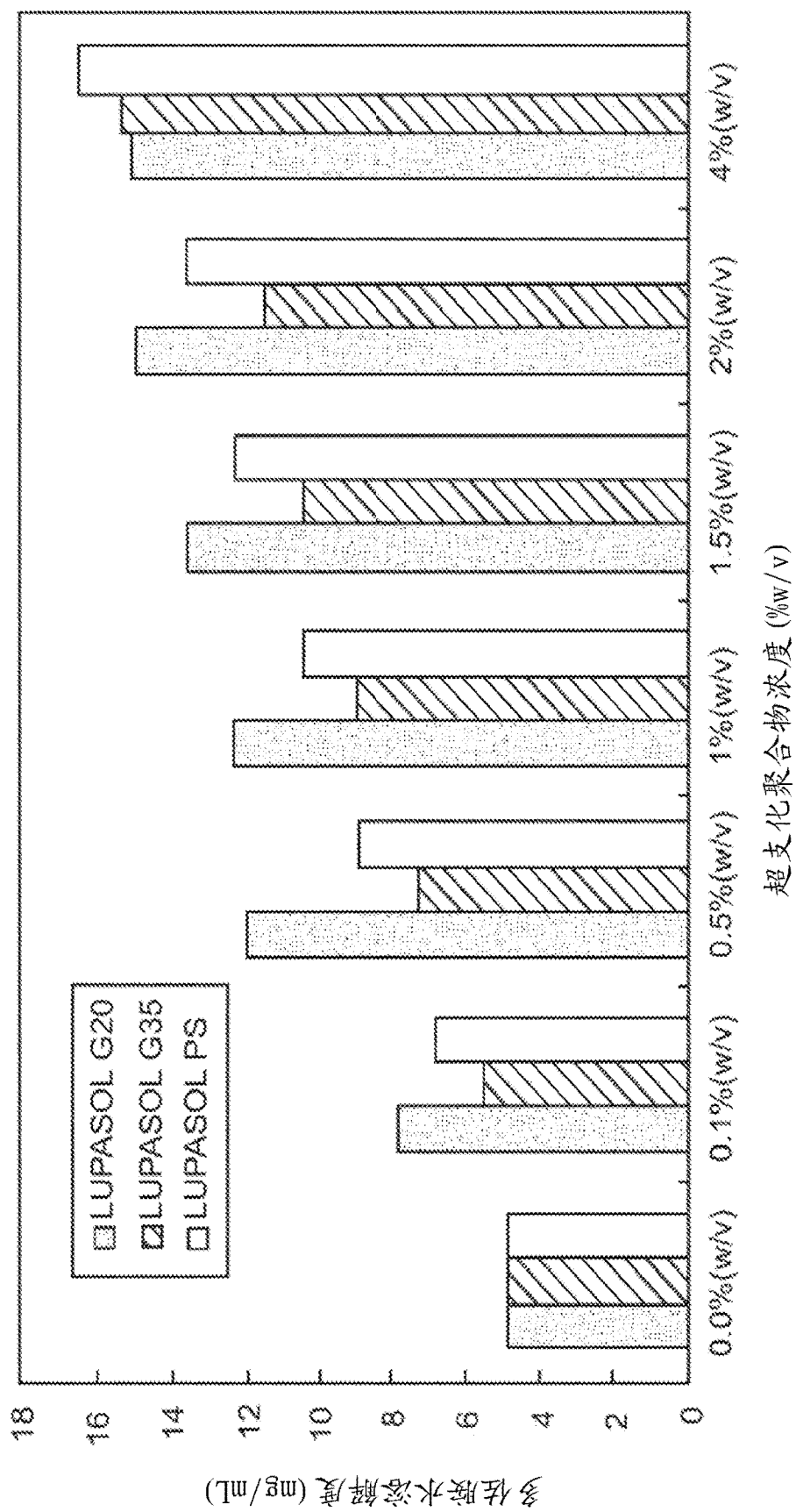


图 3

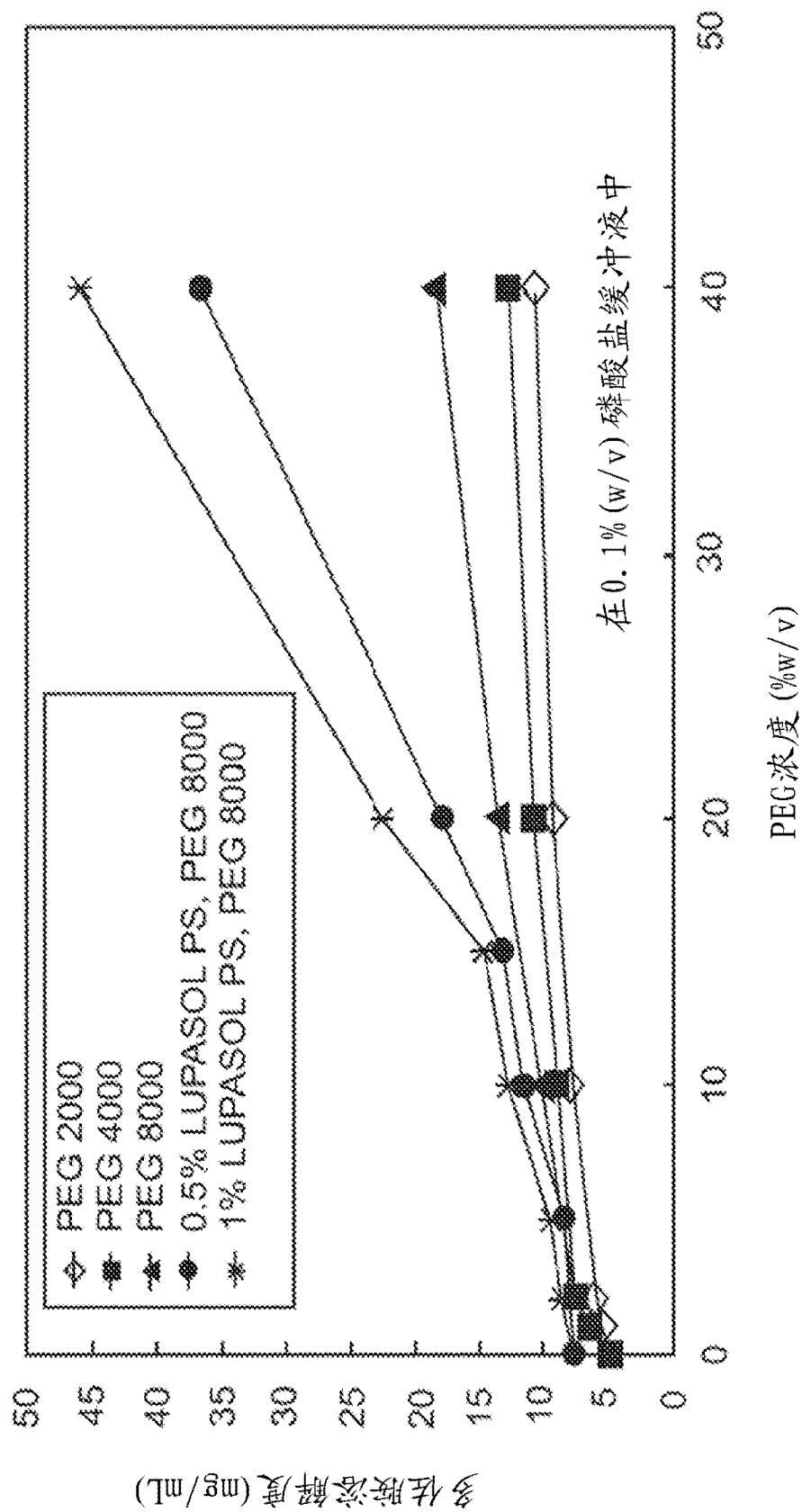


图 4

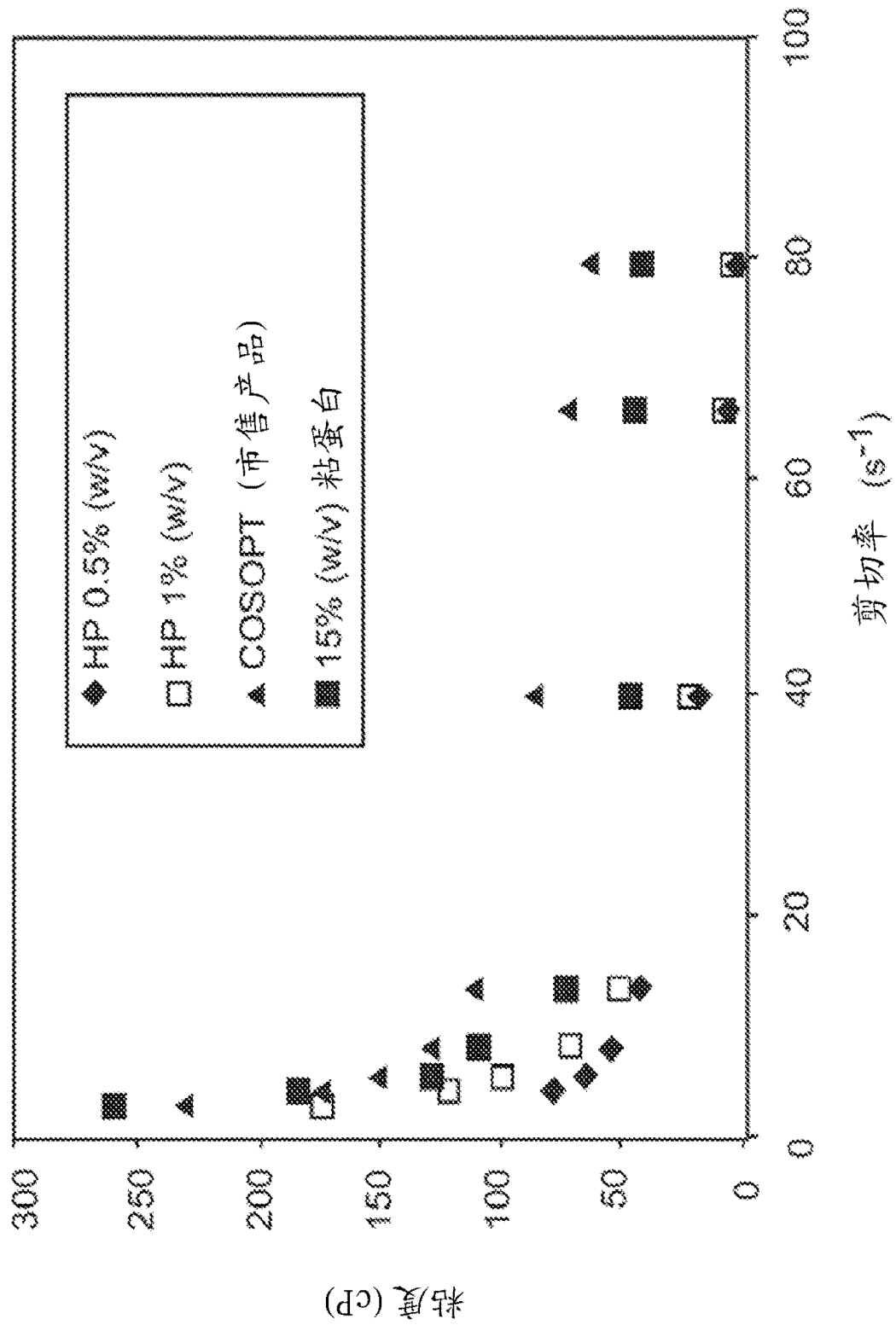


图 5

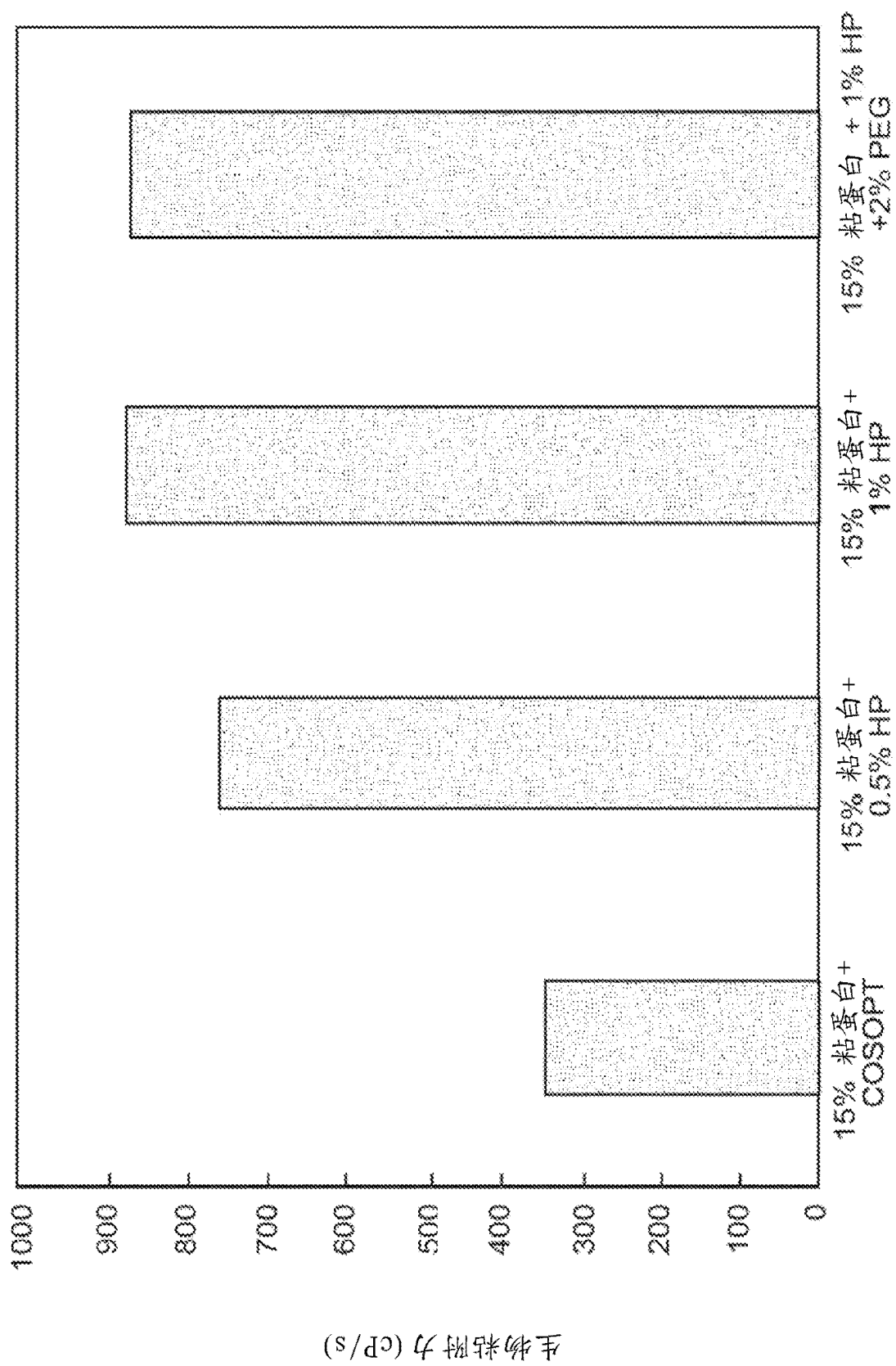


图 6

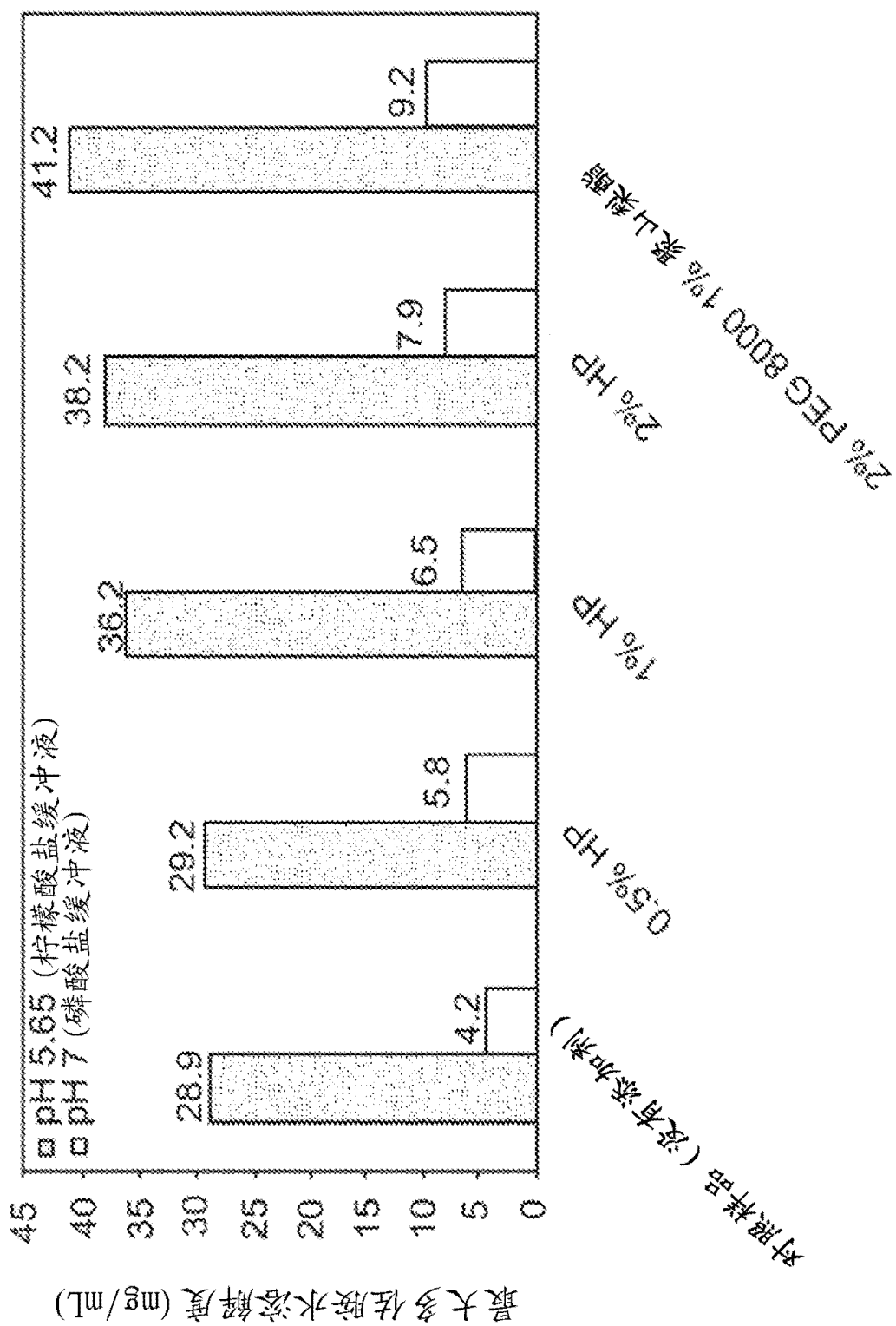


图 7

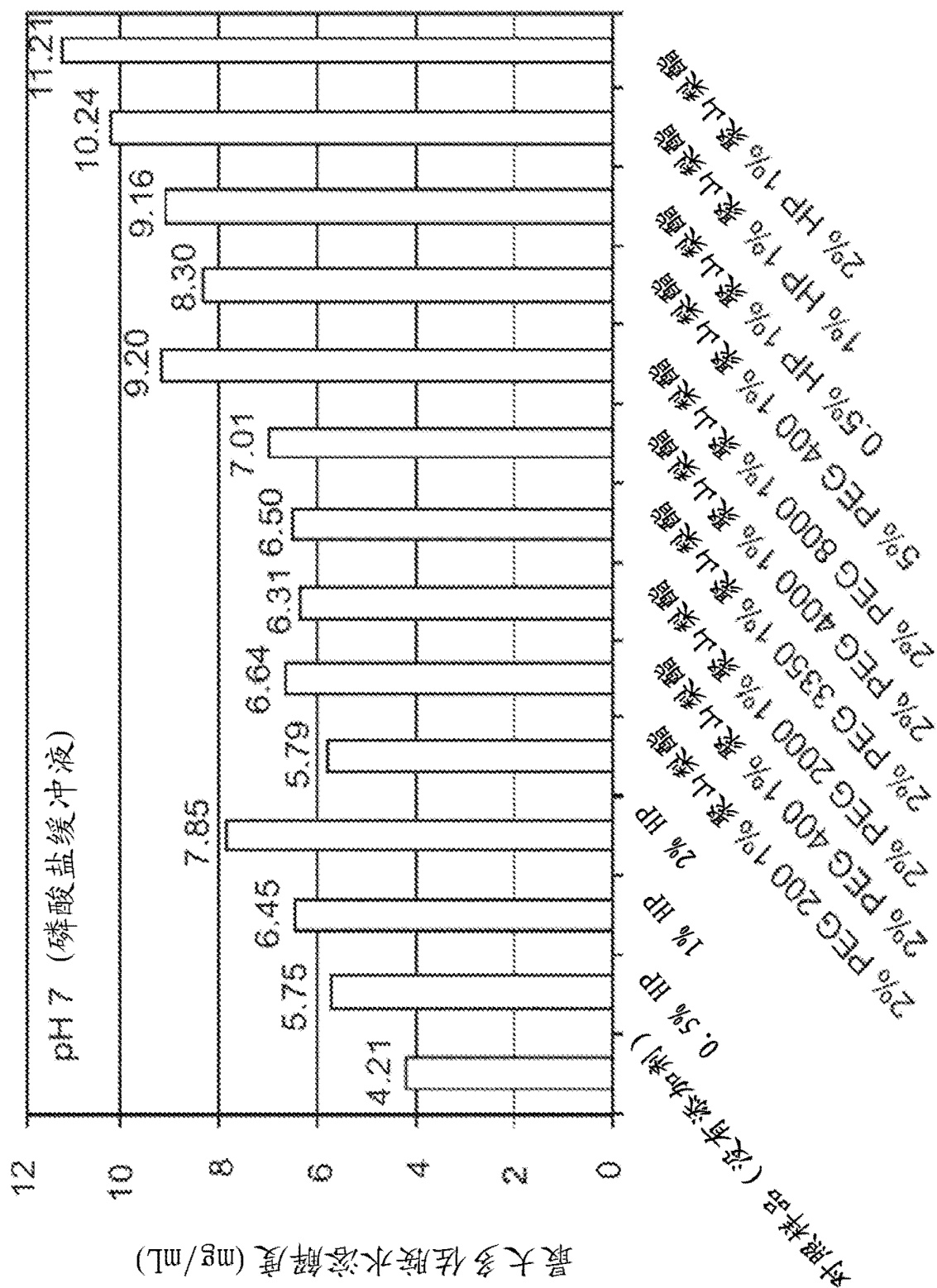


图 8

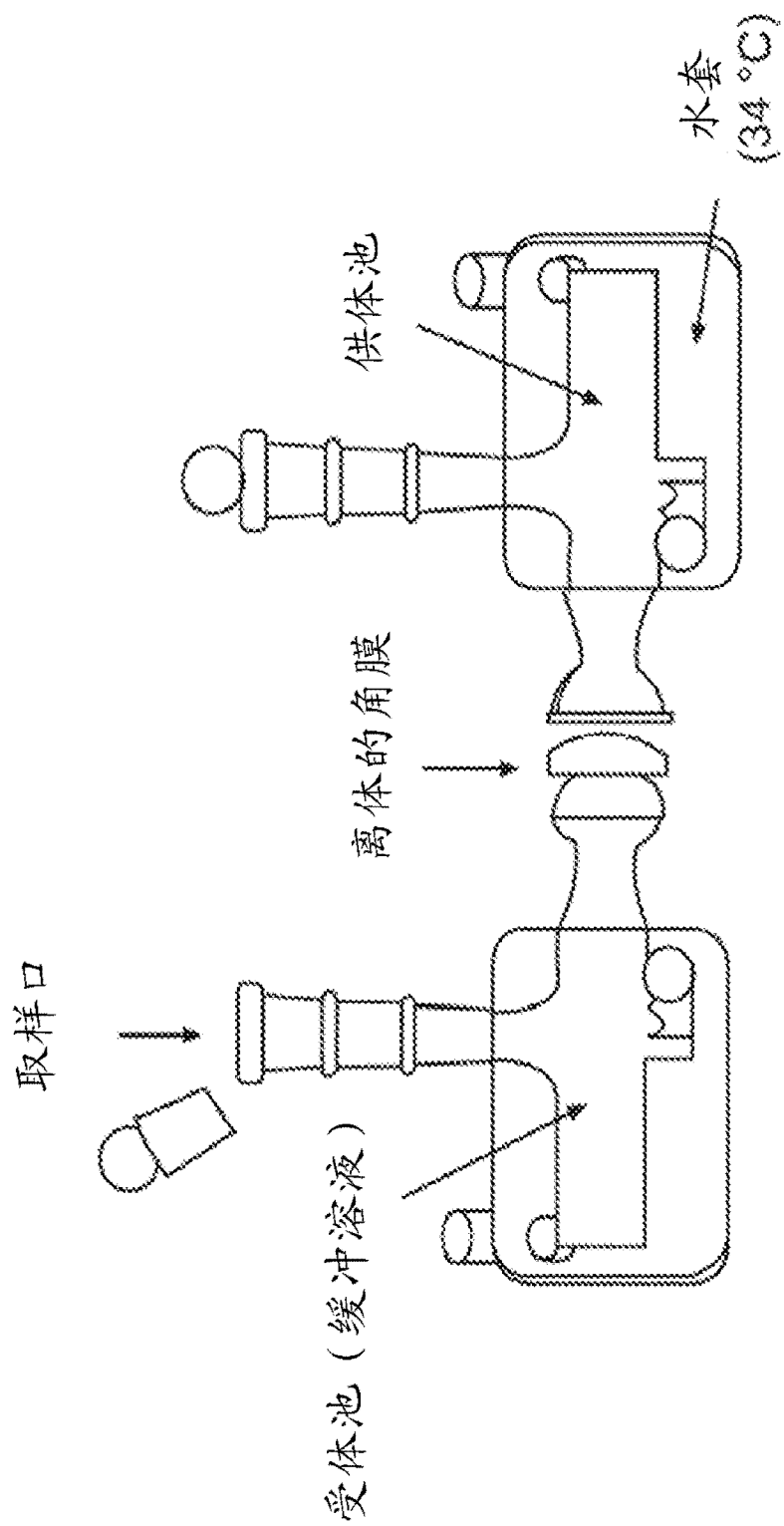


图 9

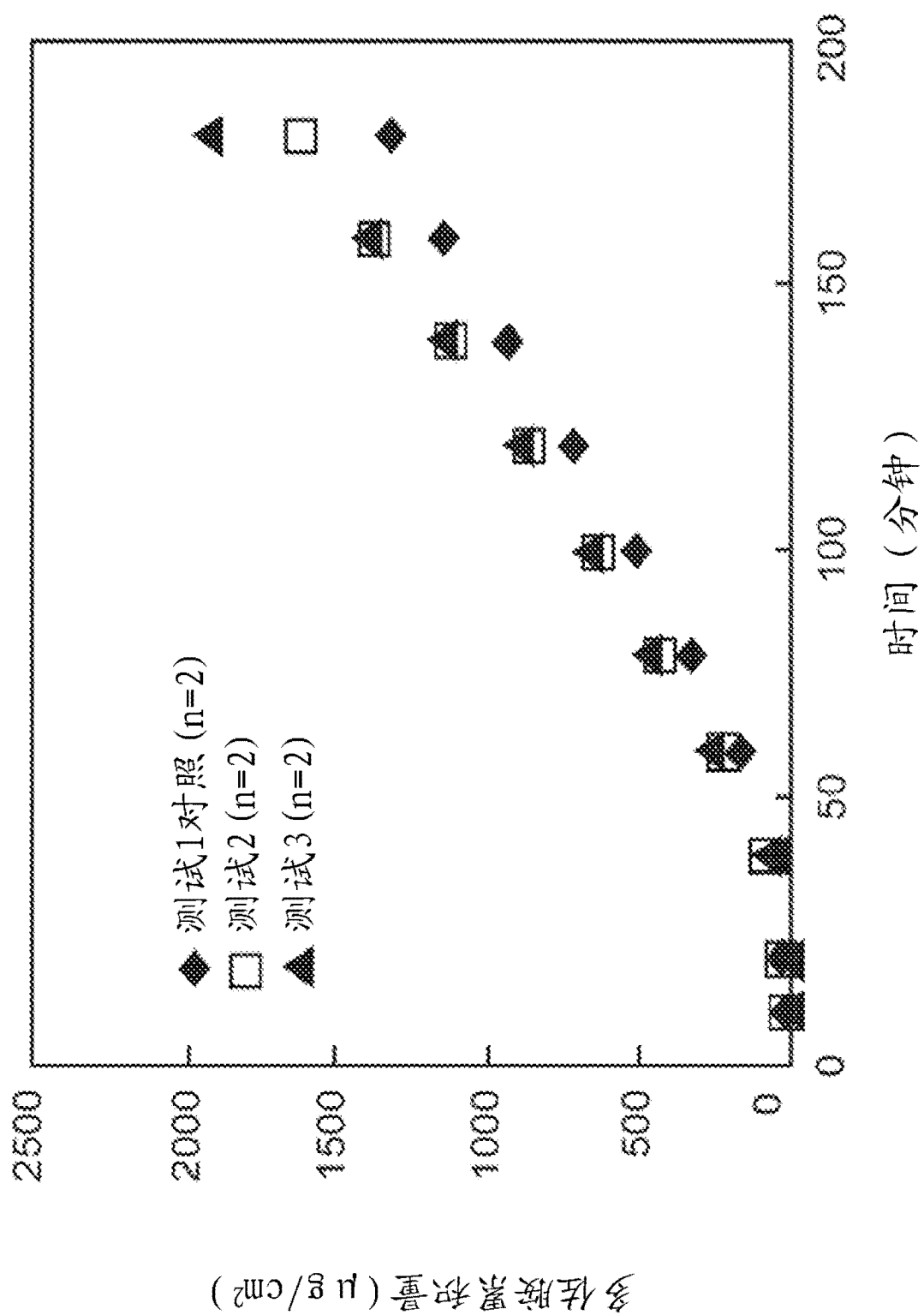


图 10

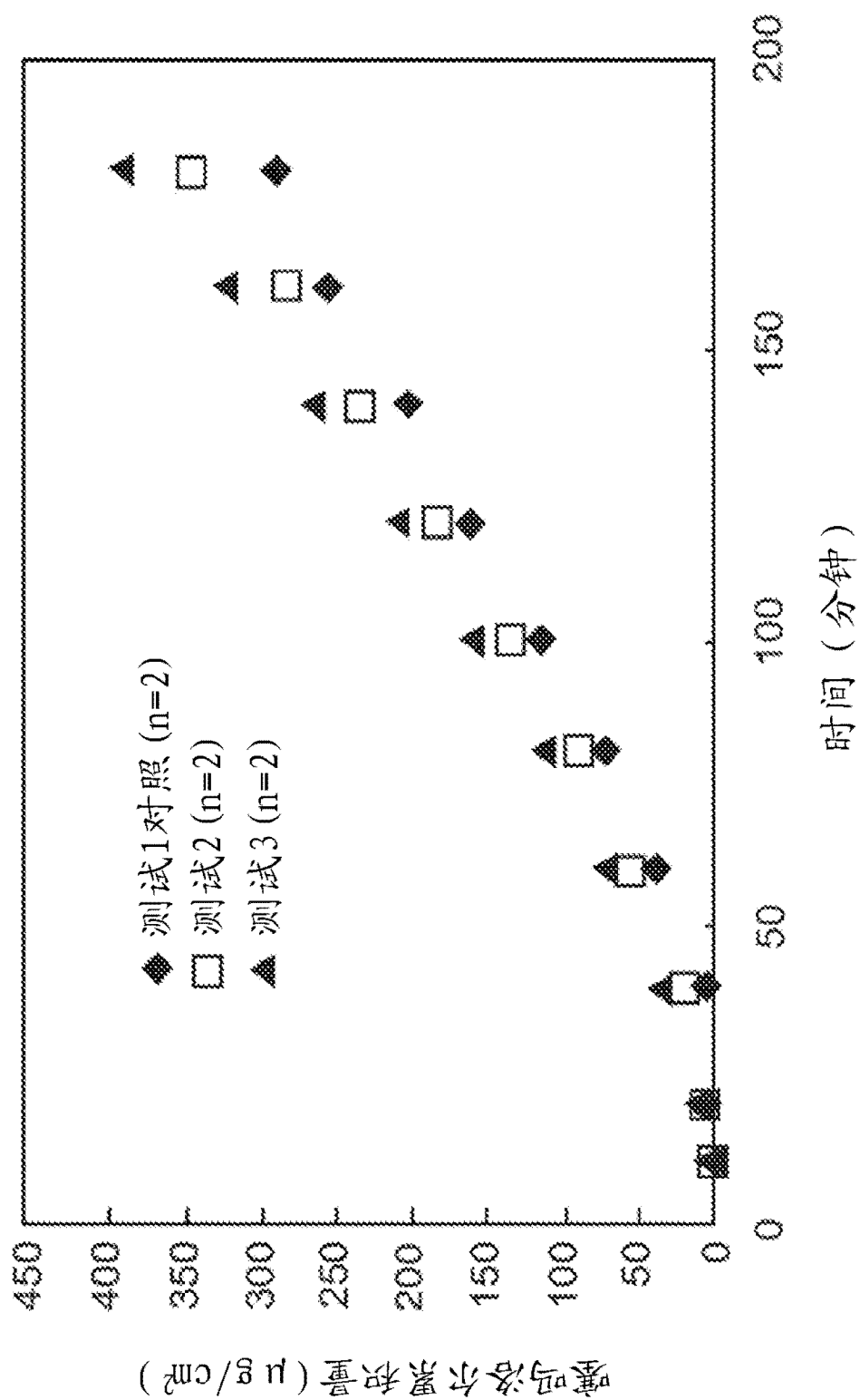


图 11

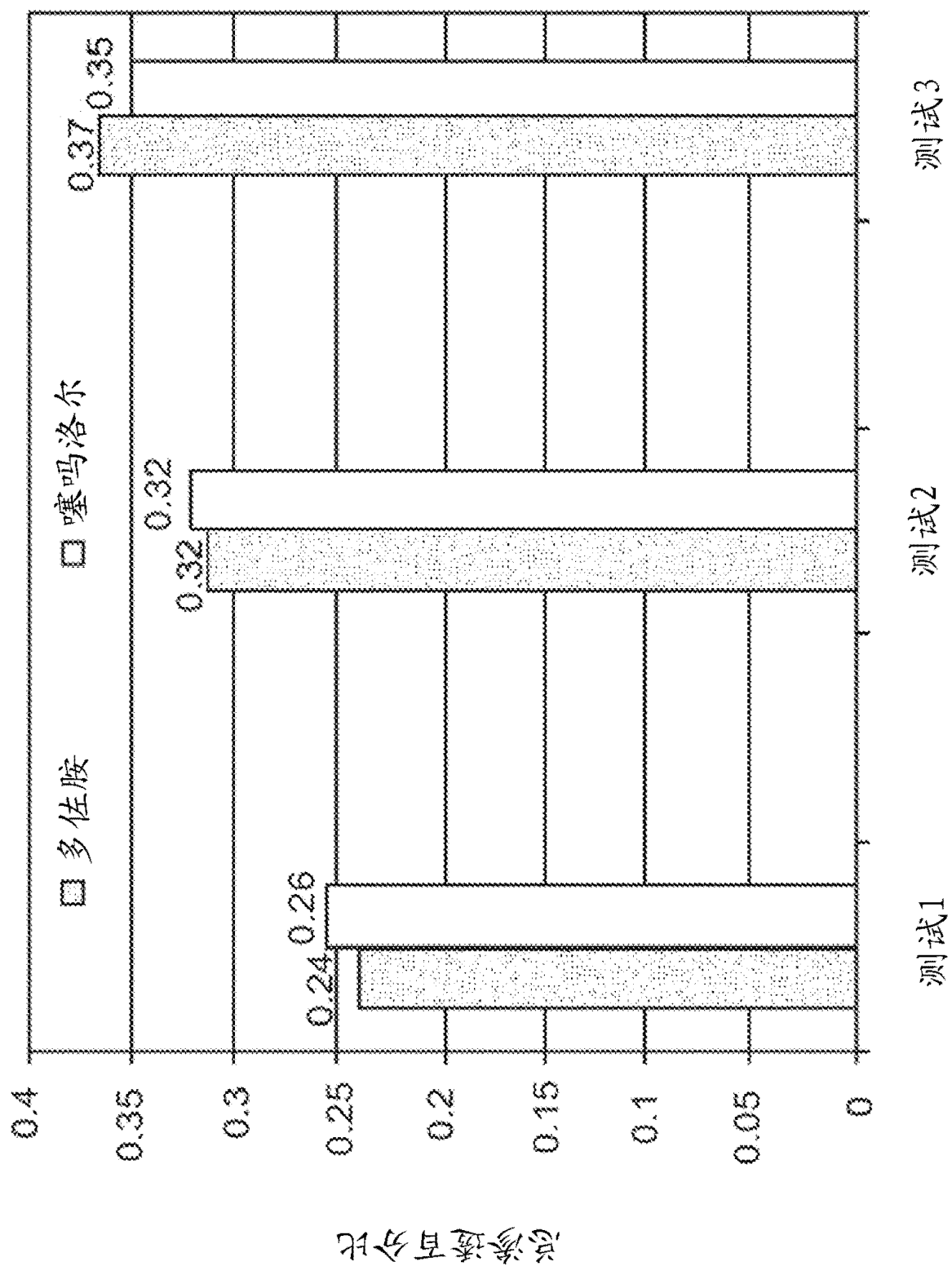


图 12

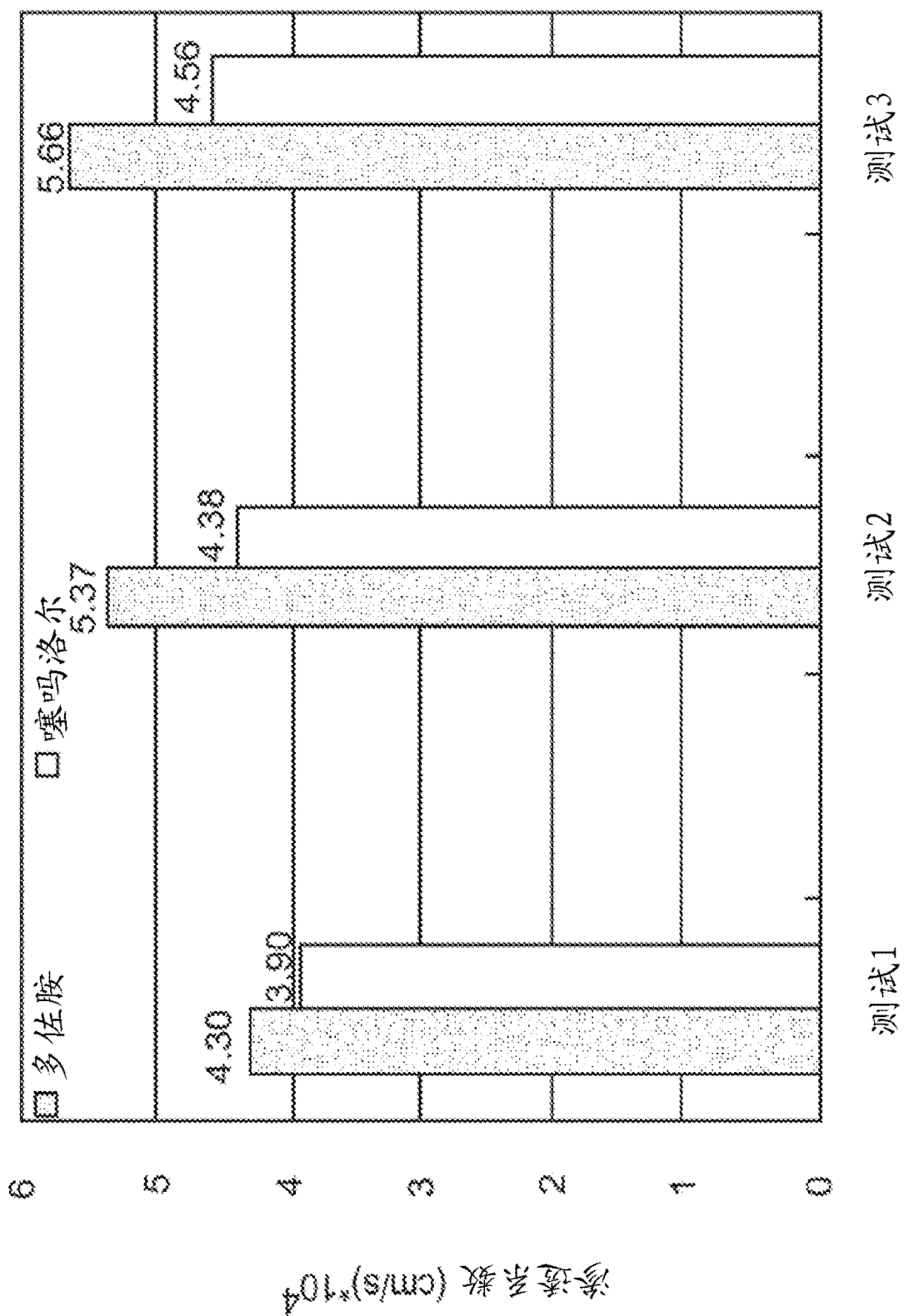


图 13

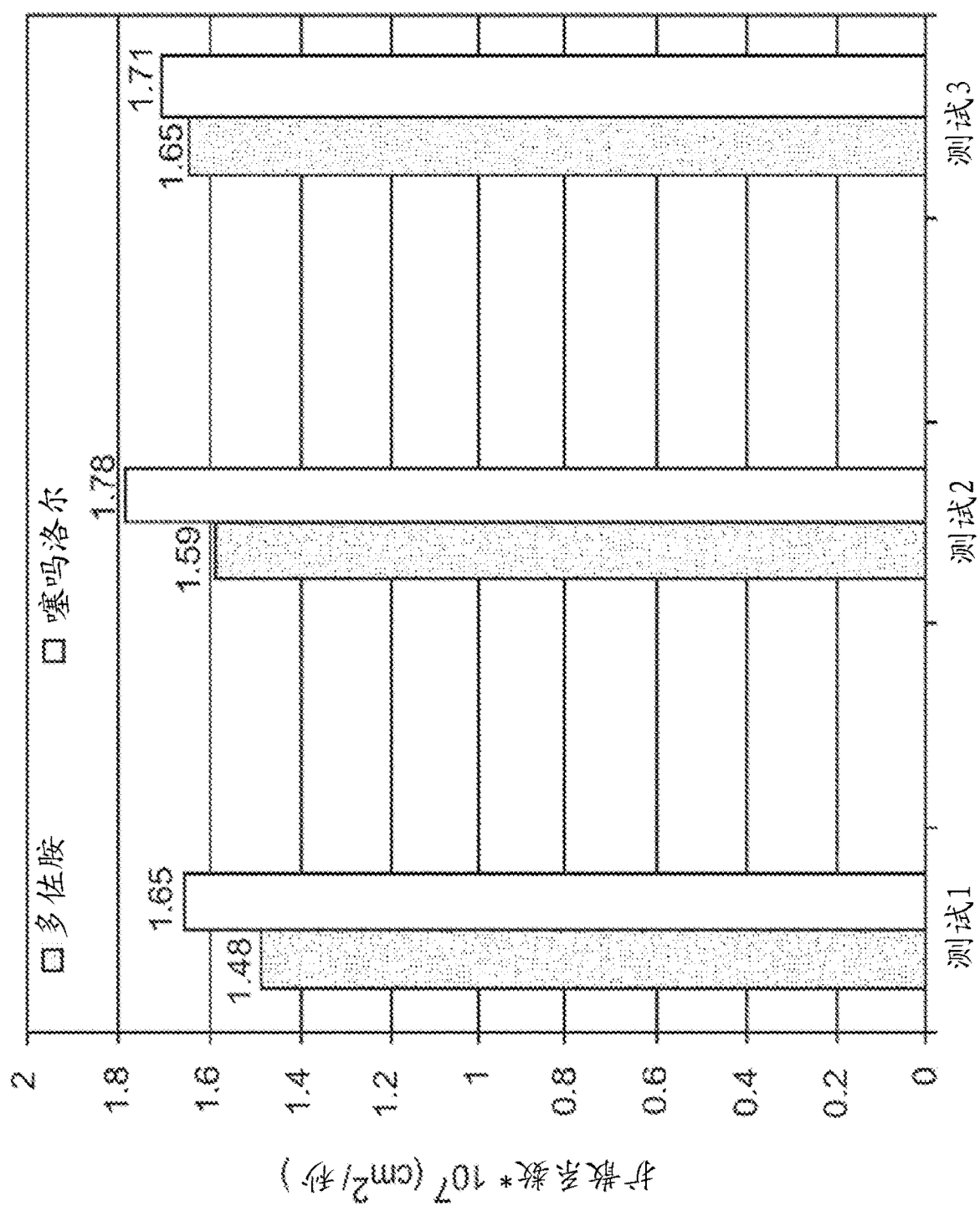


图 14

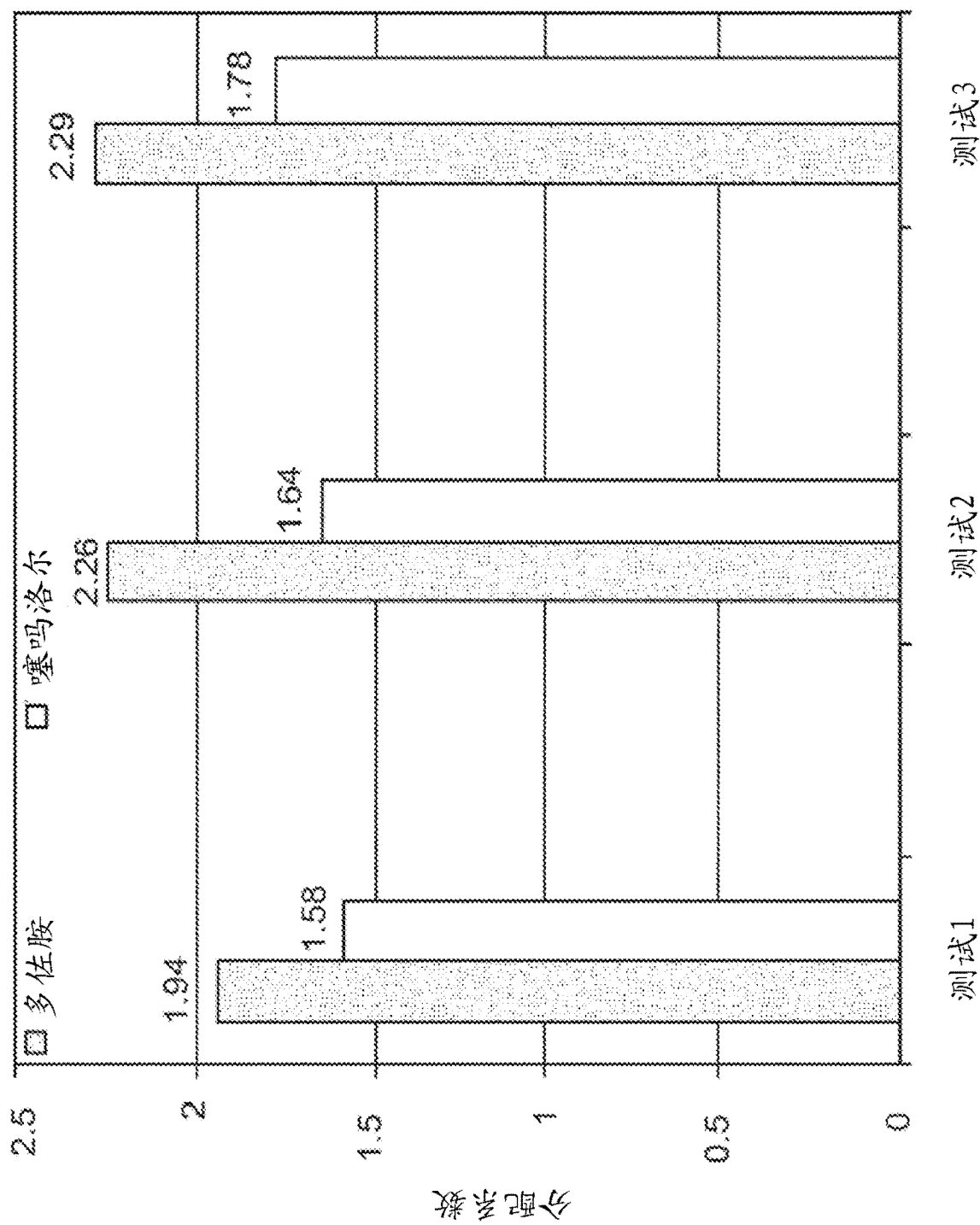


图 15

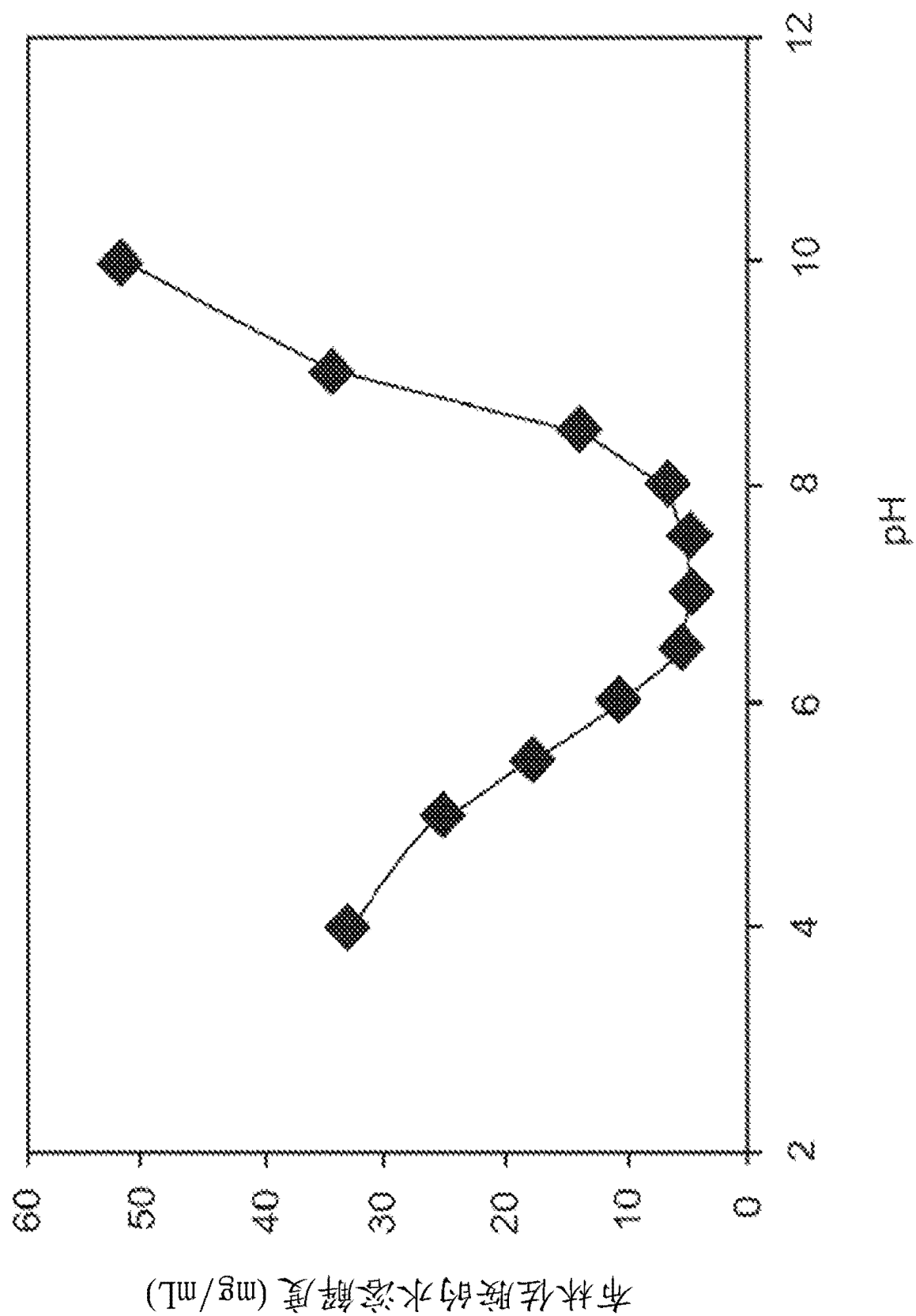


图 16

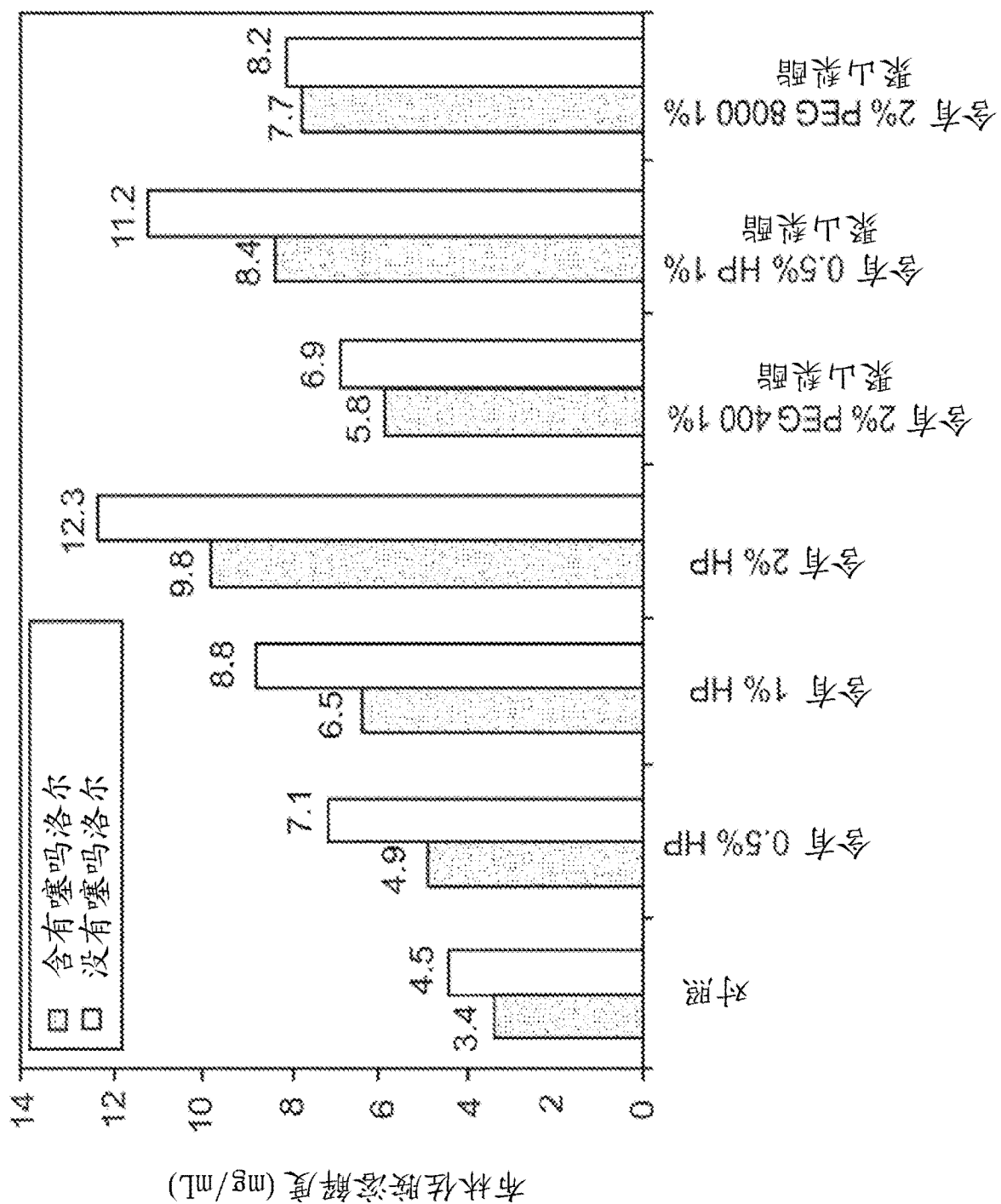


图 17

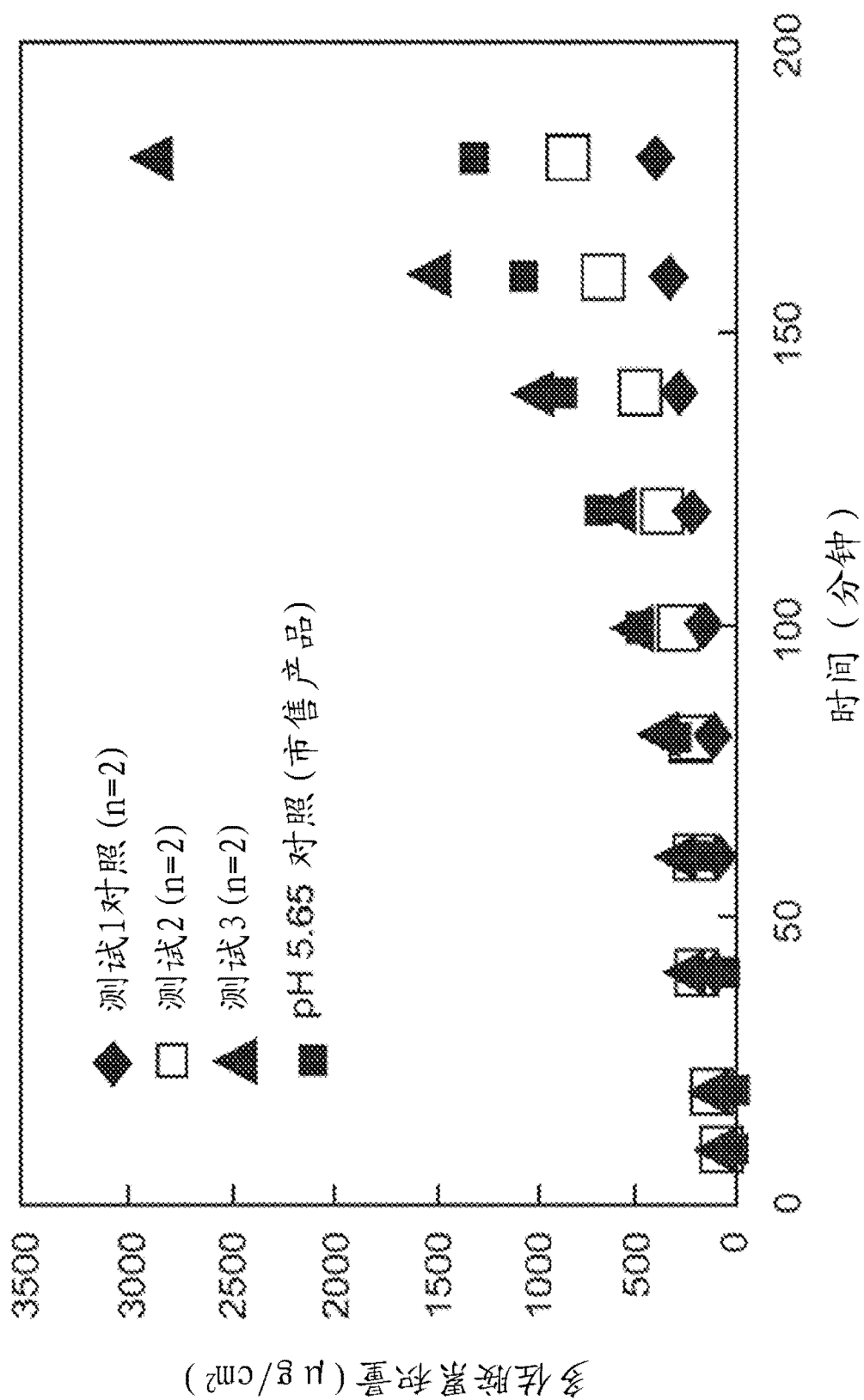


图 18

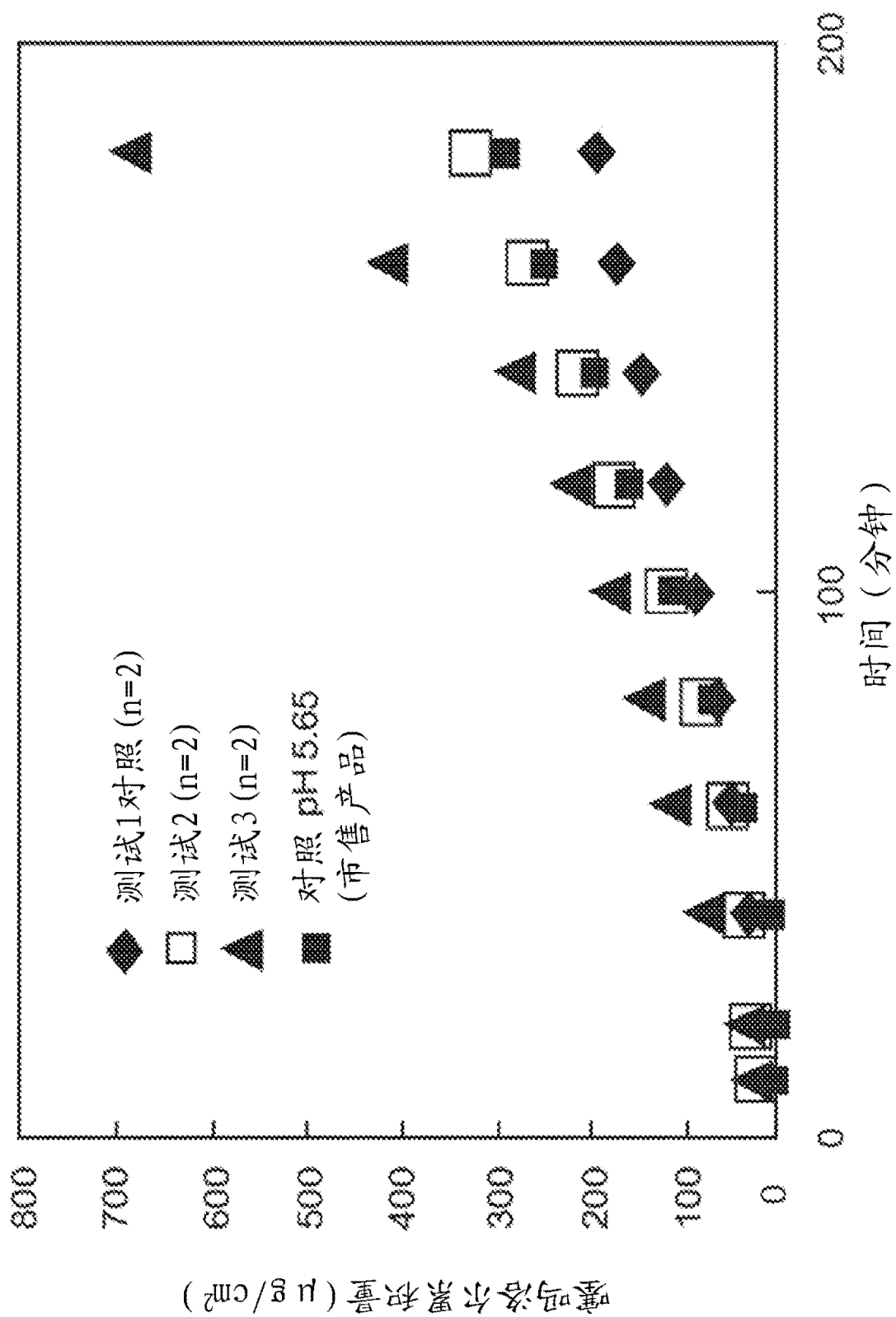


图 19

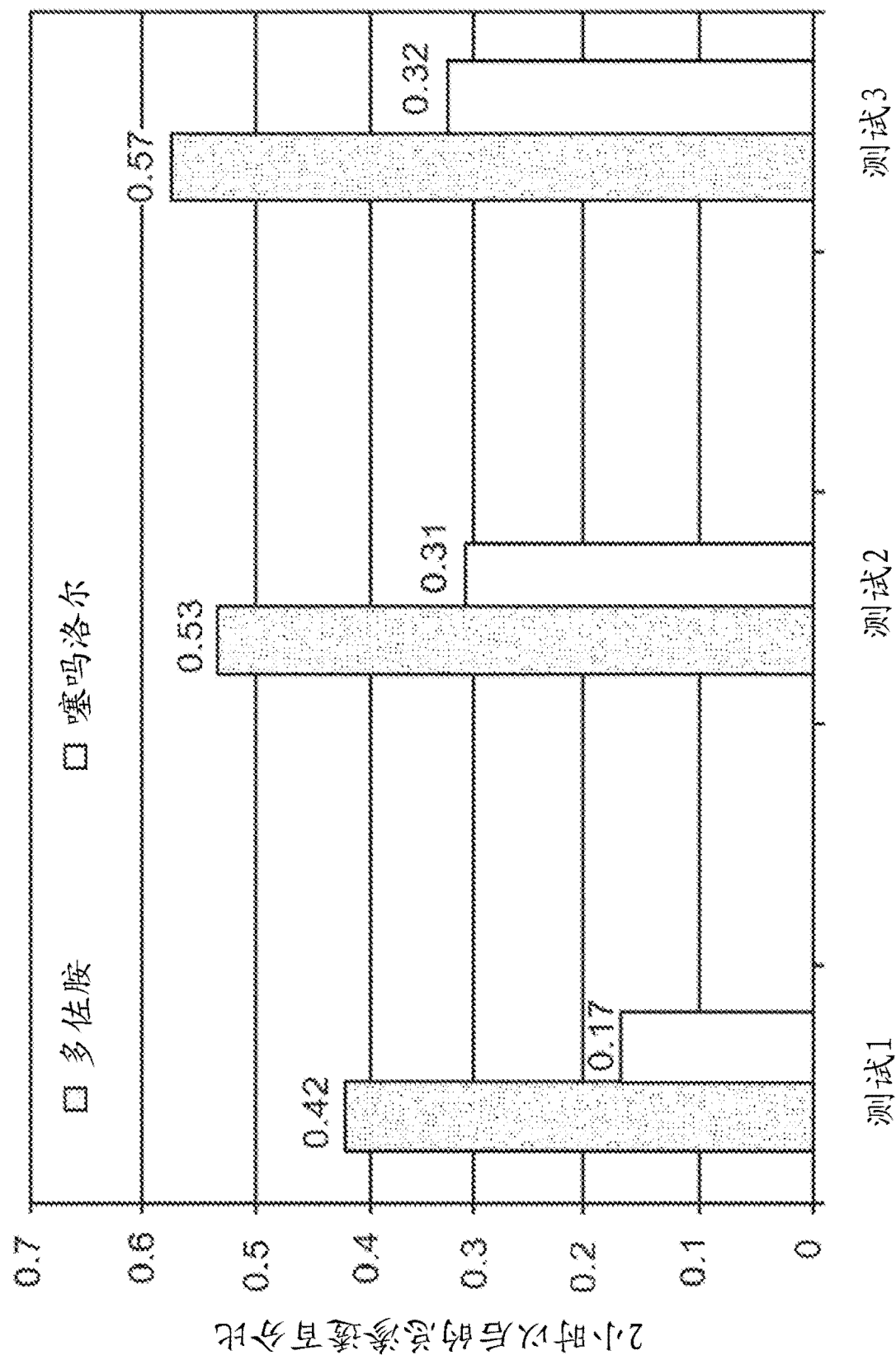


图 20

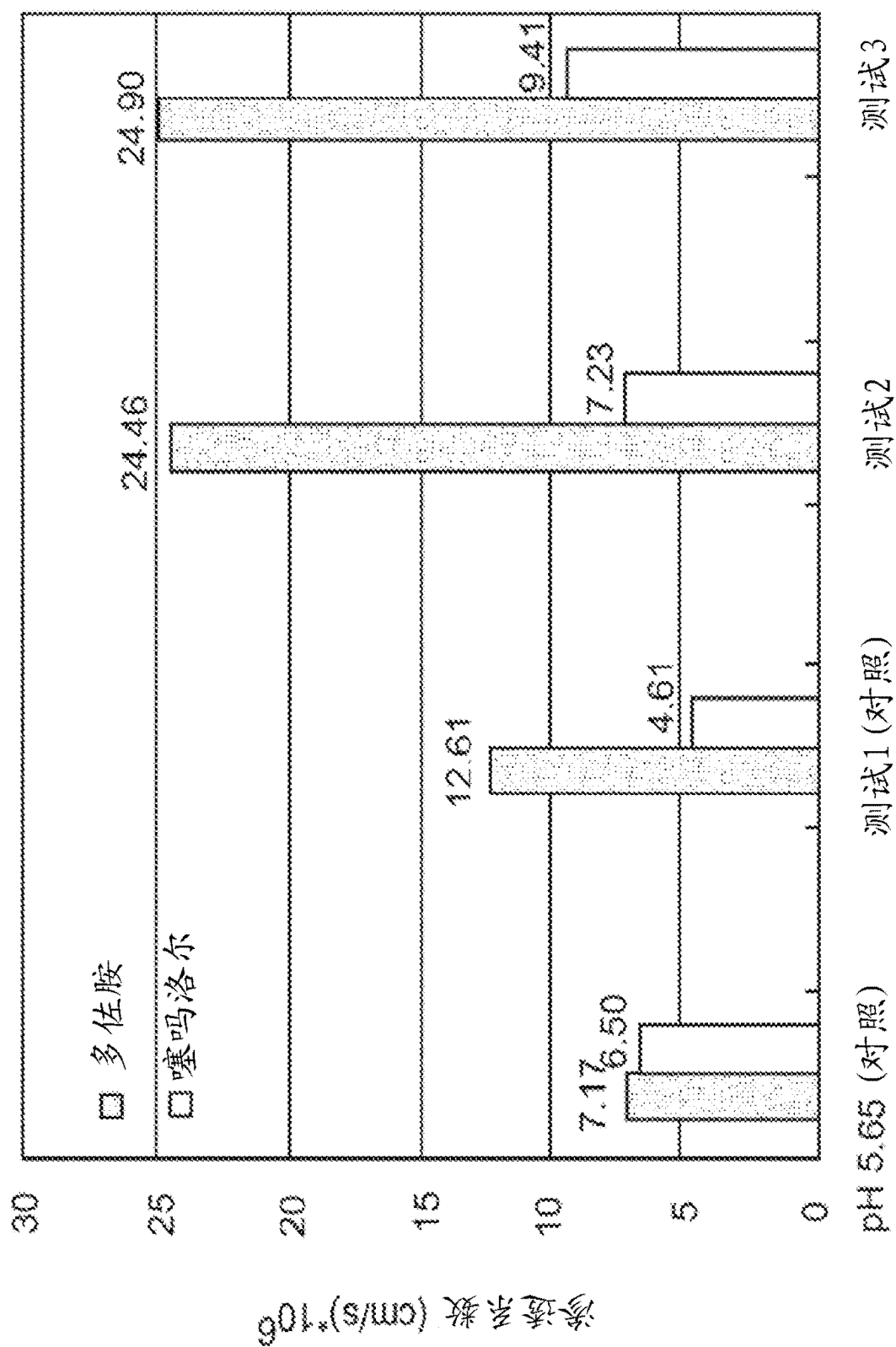


图 21

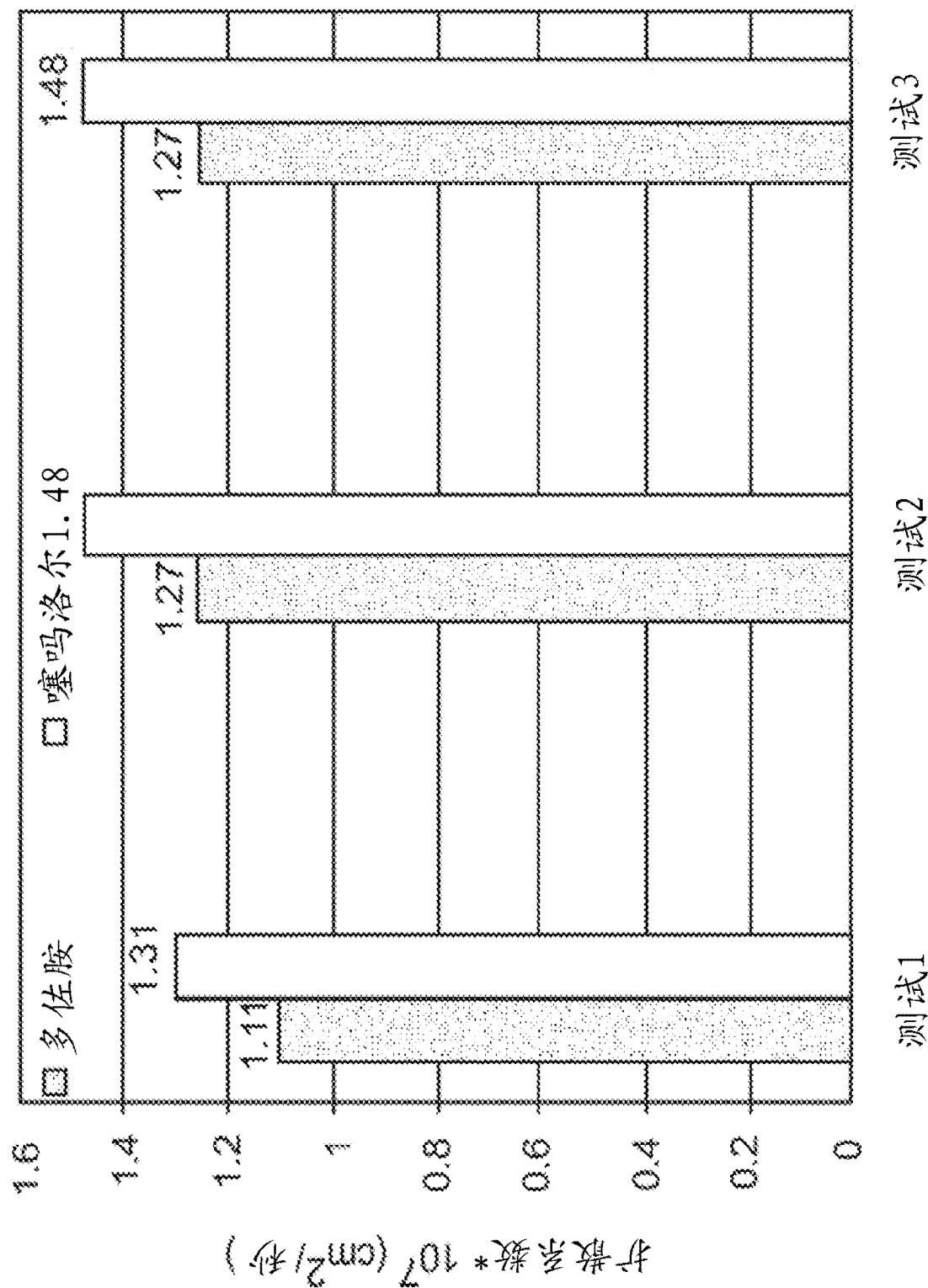


图 22

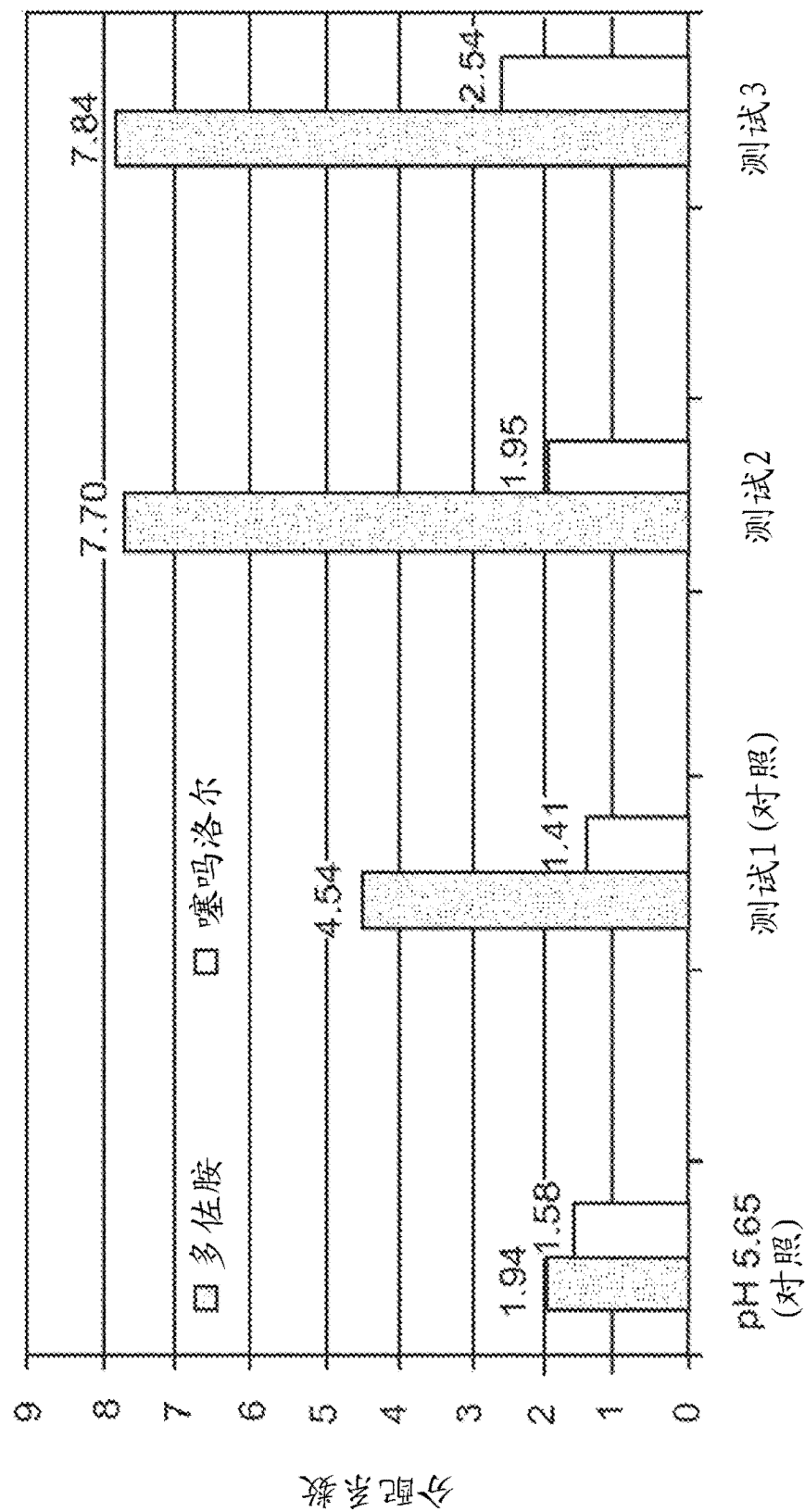


图 23

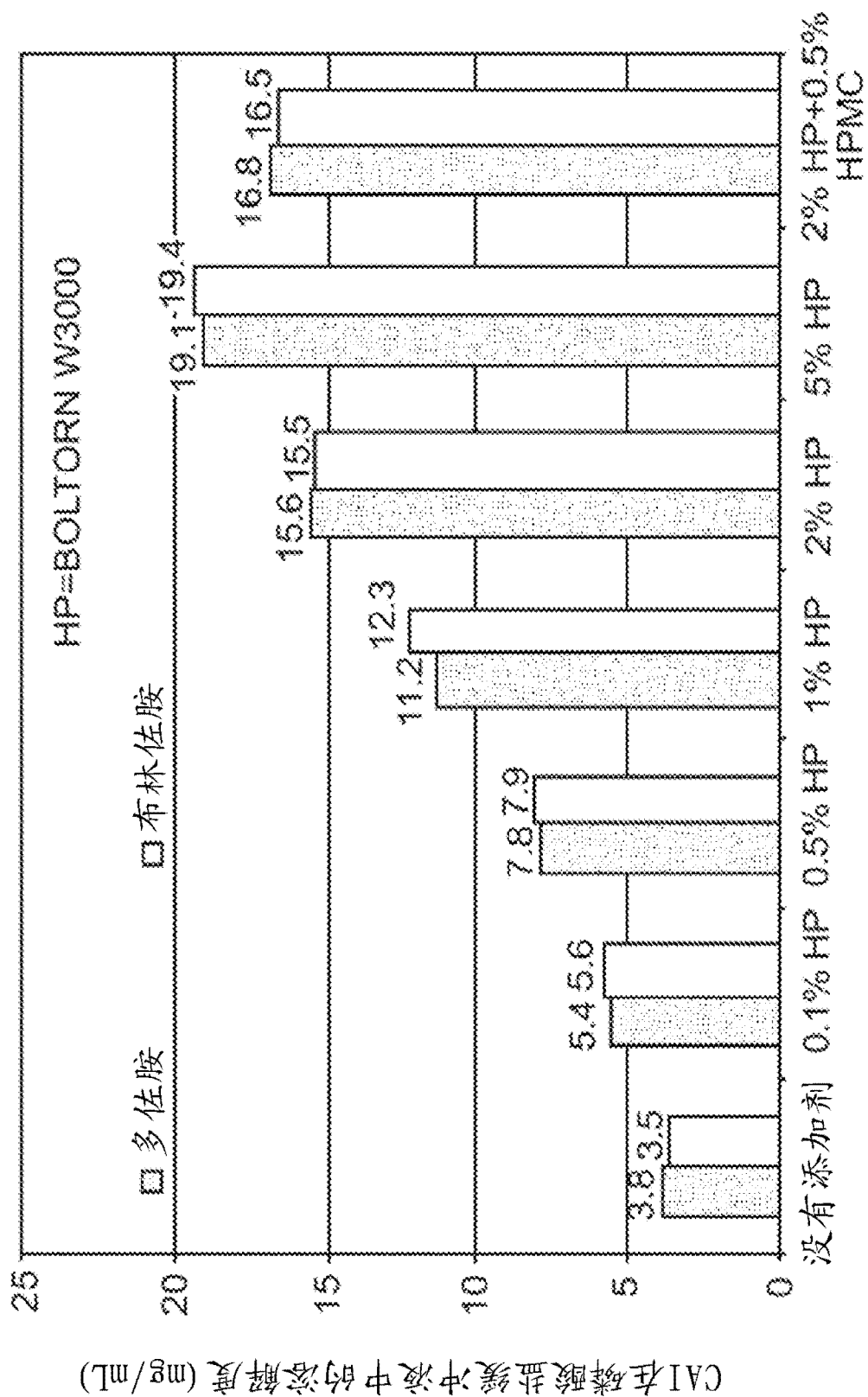


图 24

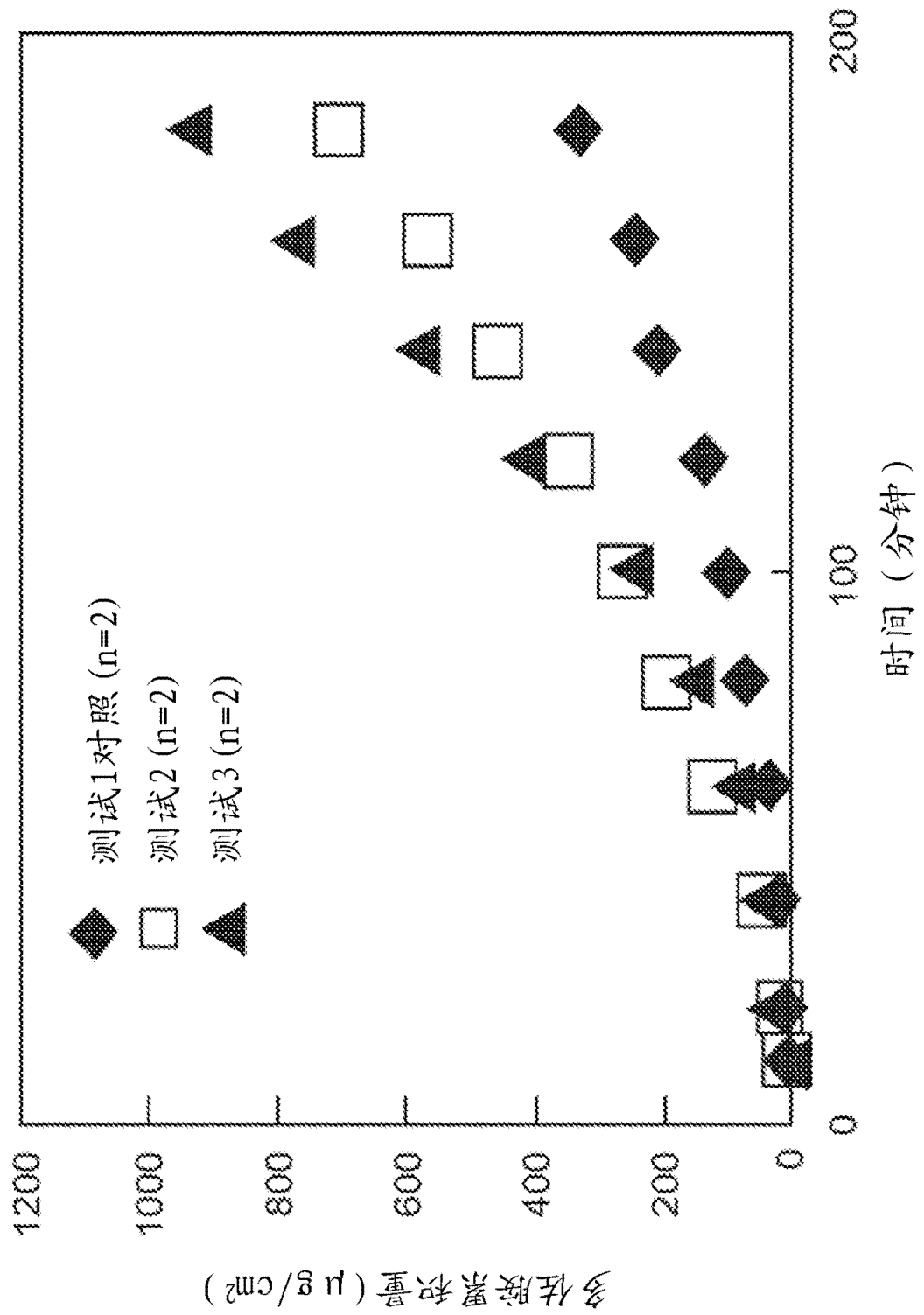


图 25

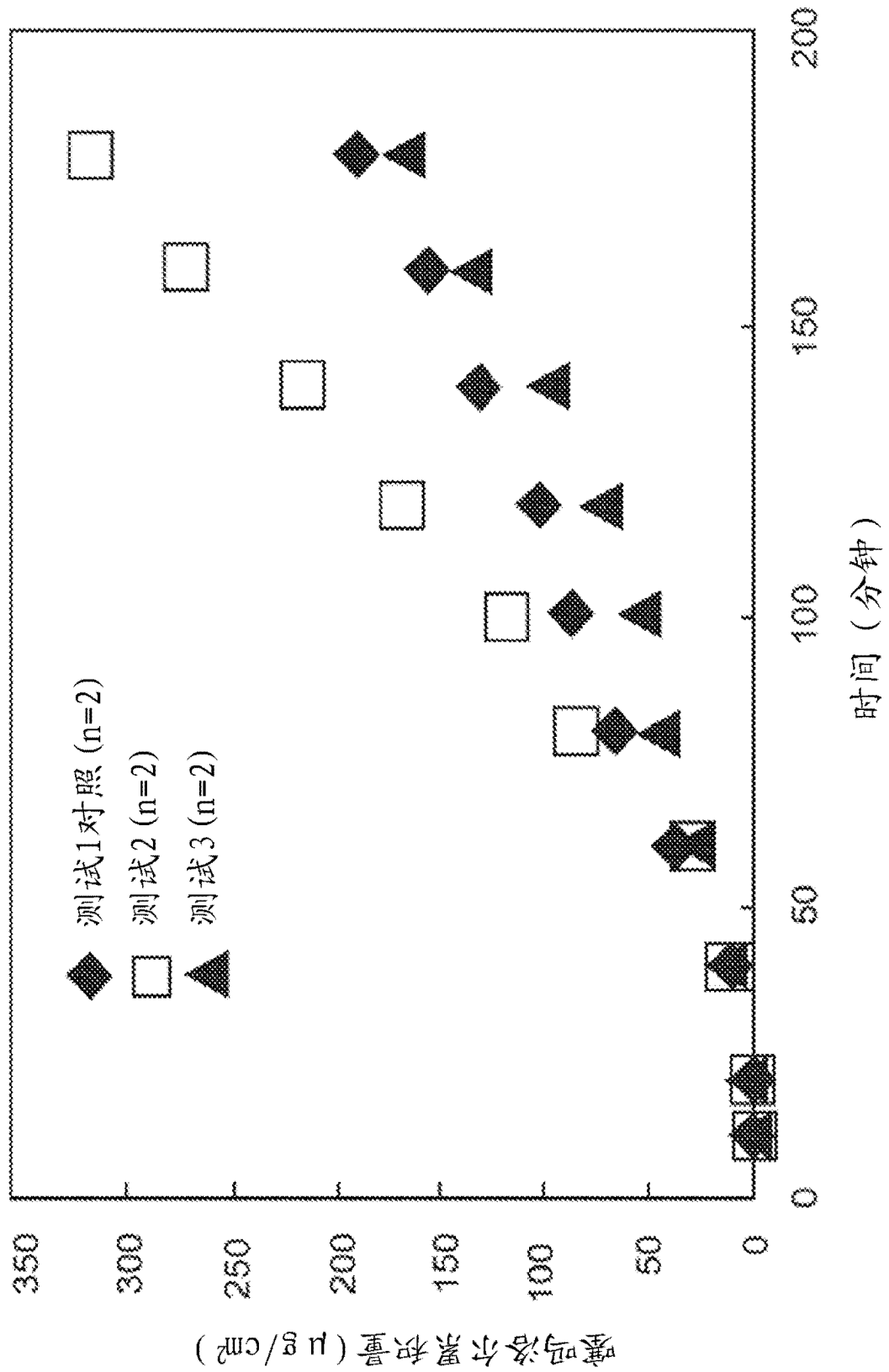


图 26

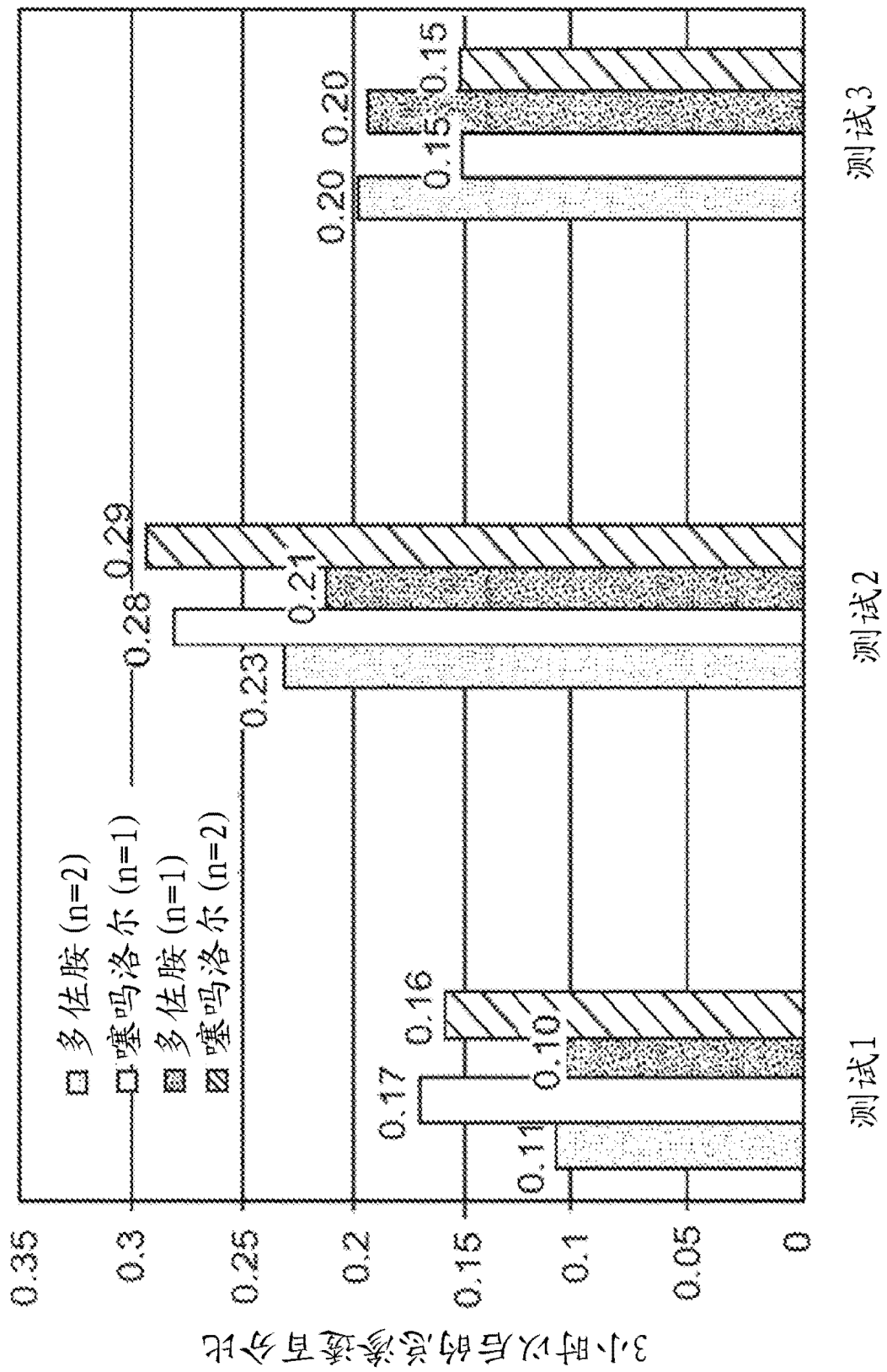


图 27

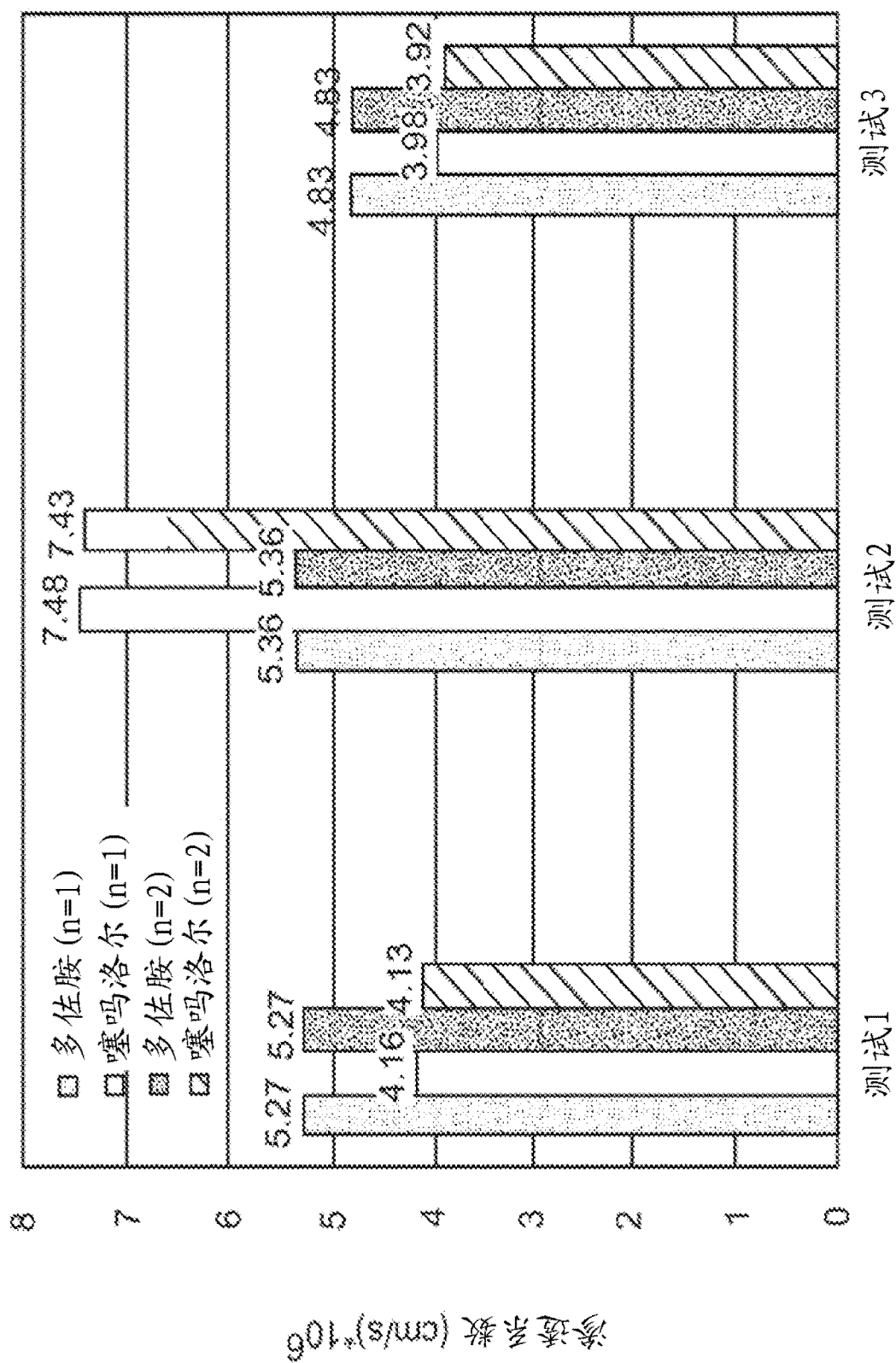


图 28

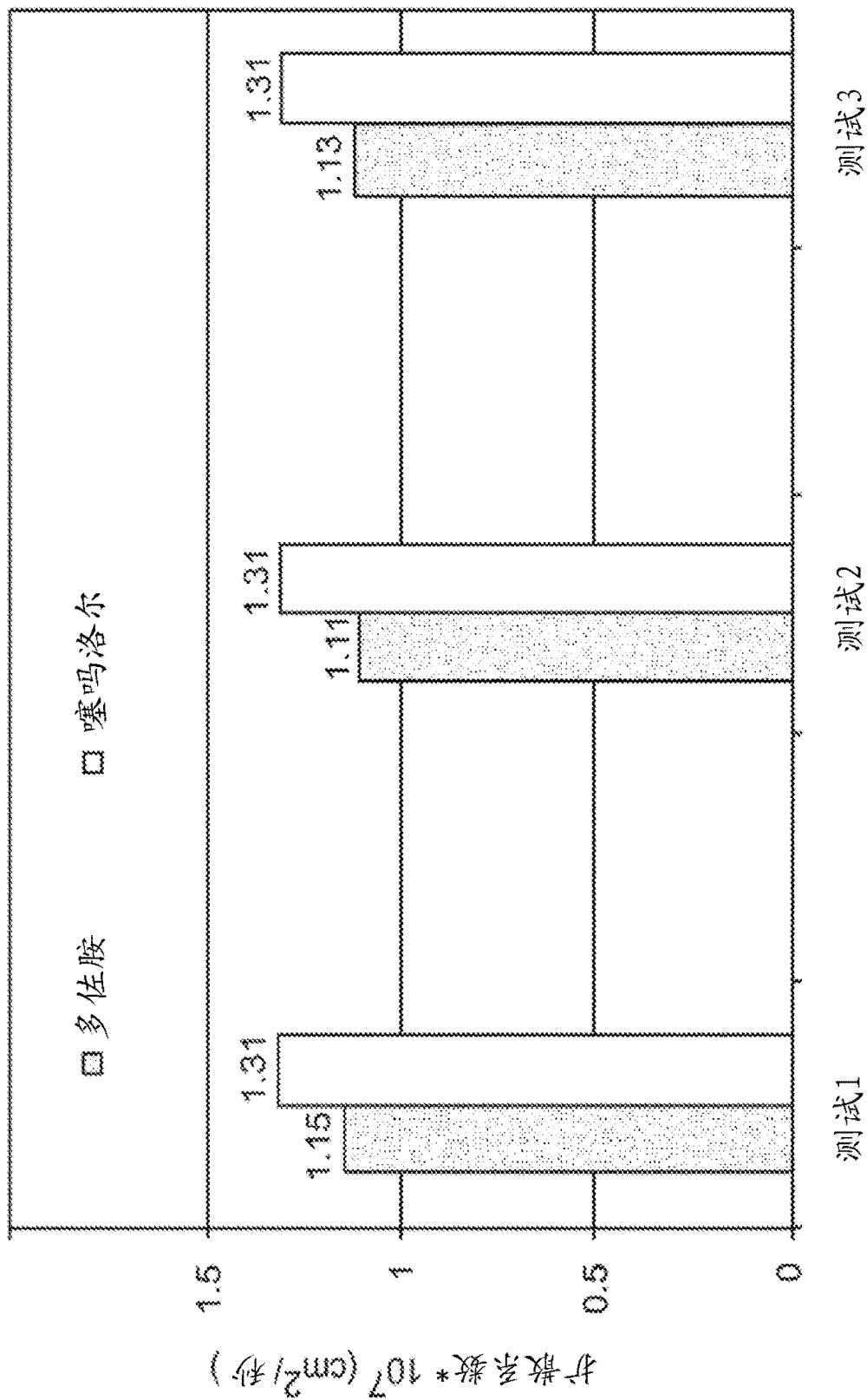


图 29

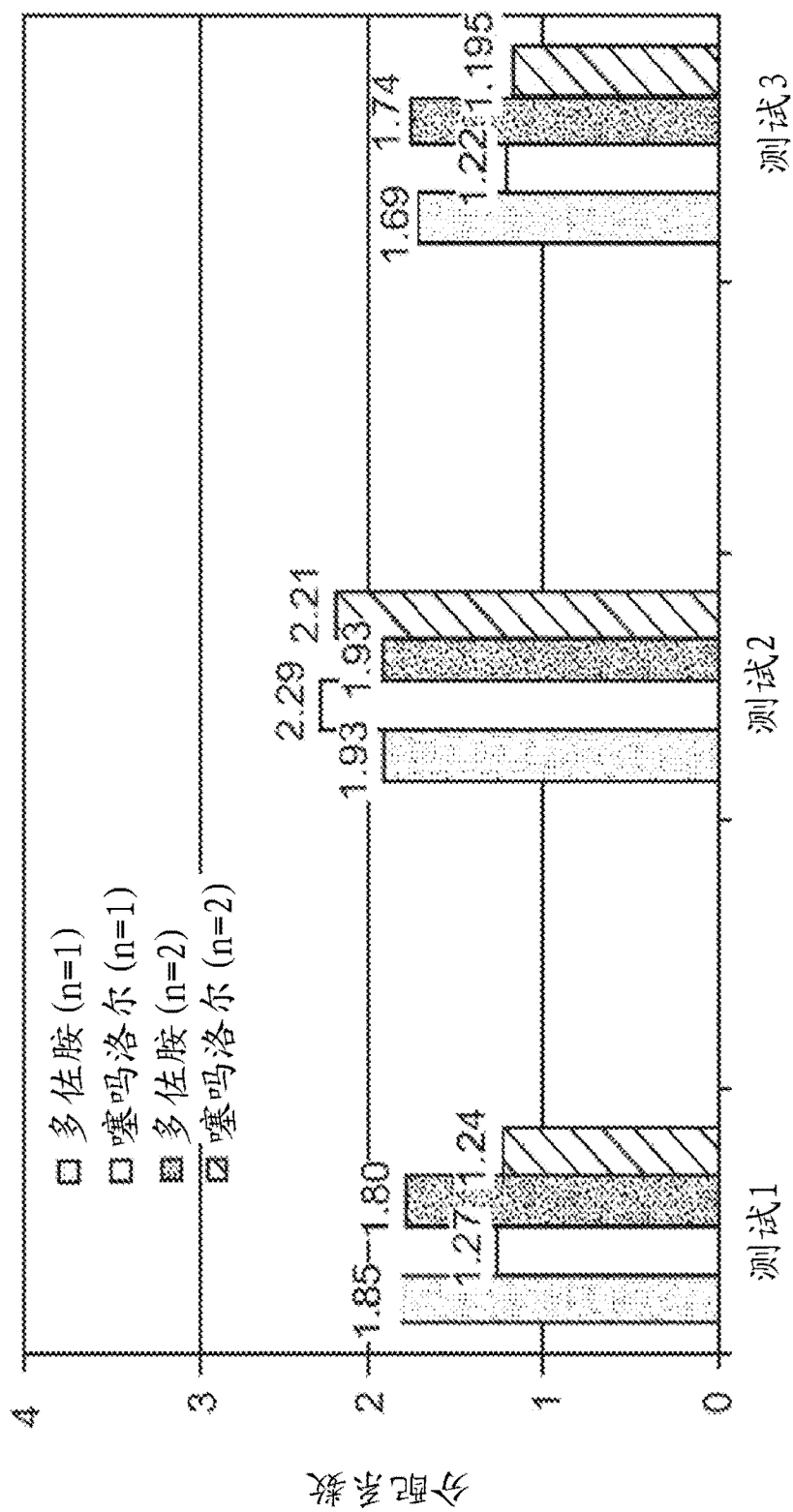


图 30

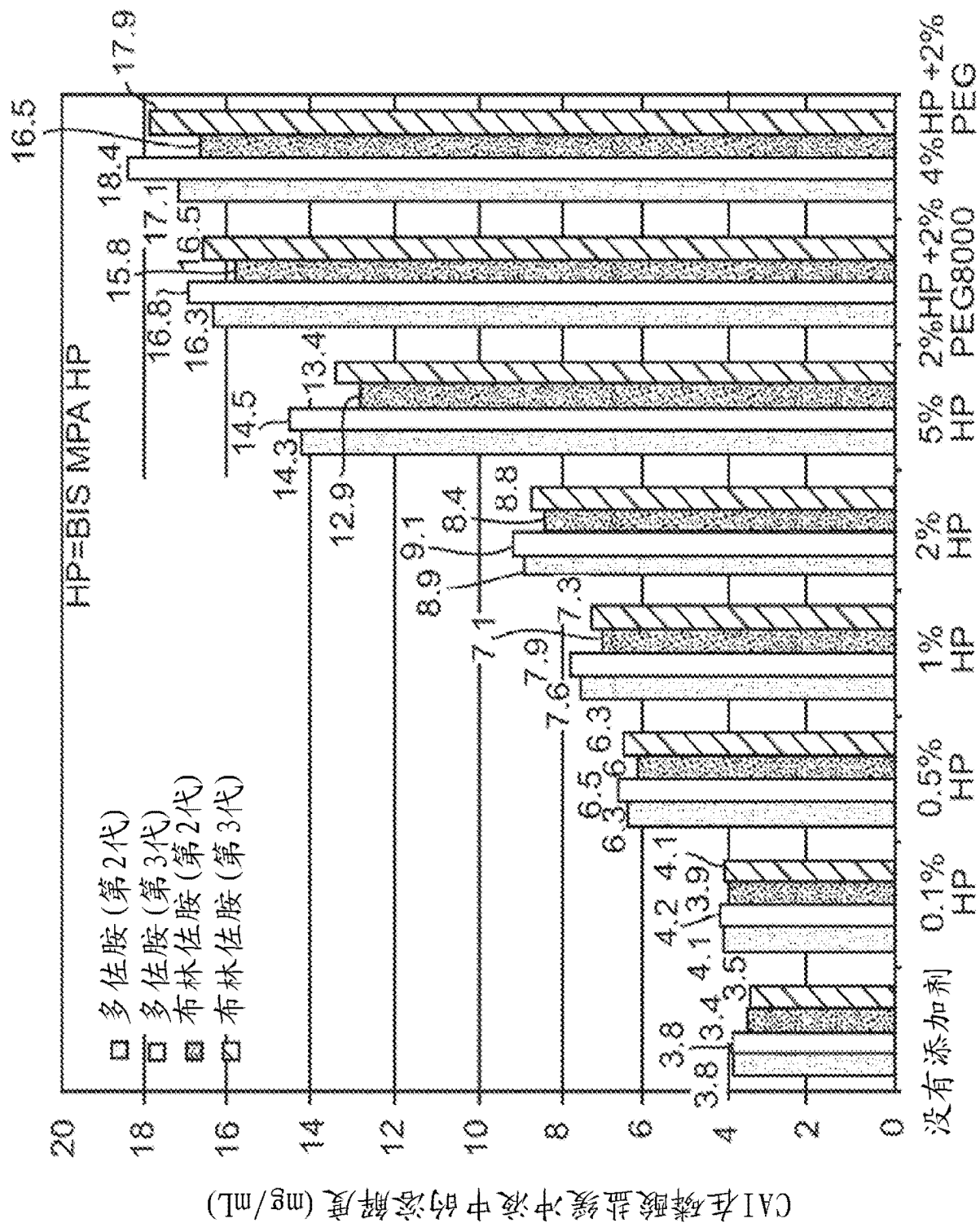


图 31

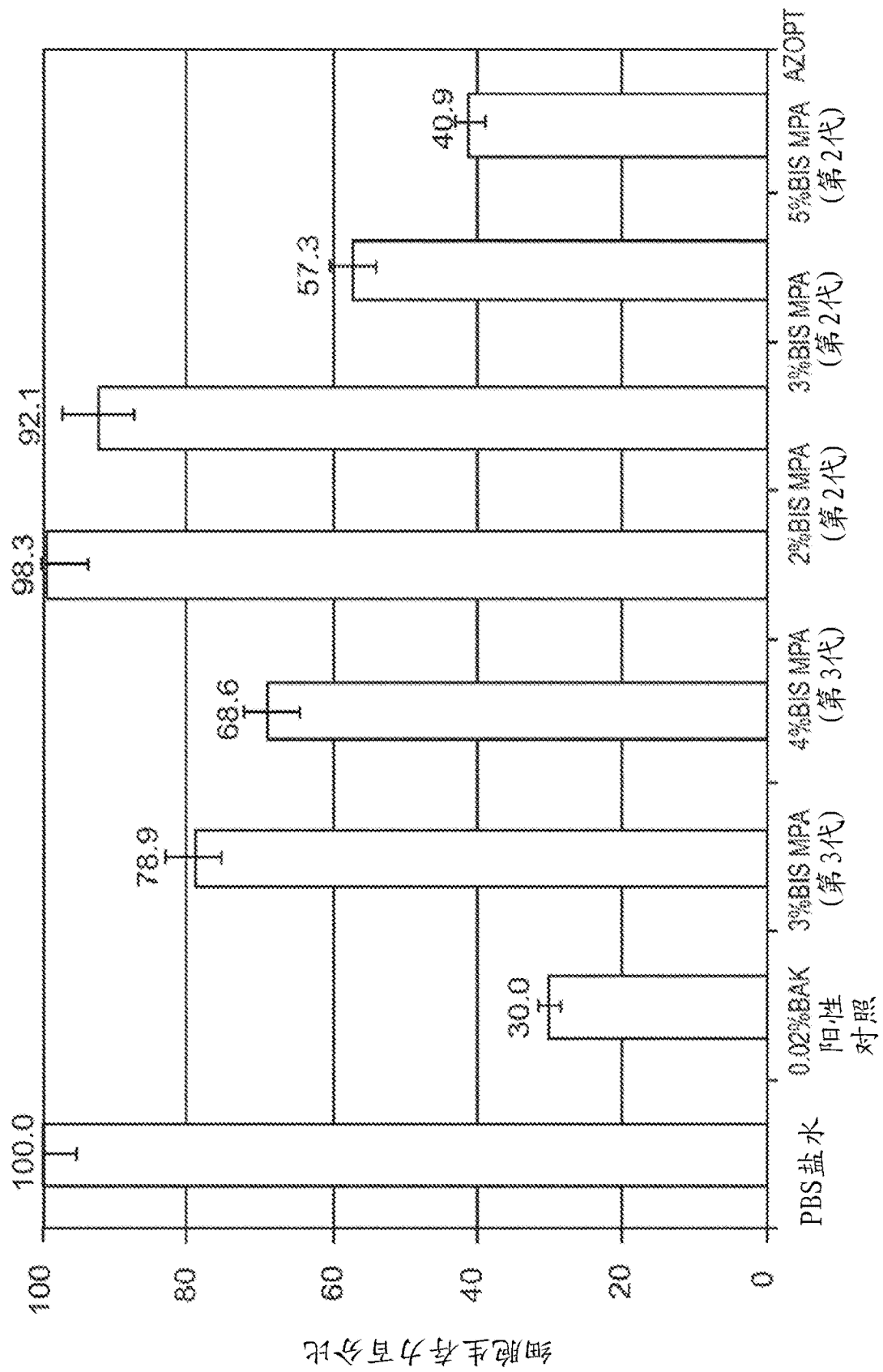


图 32

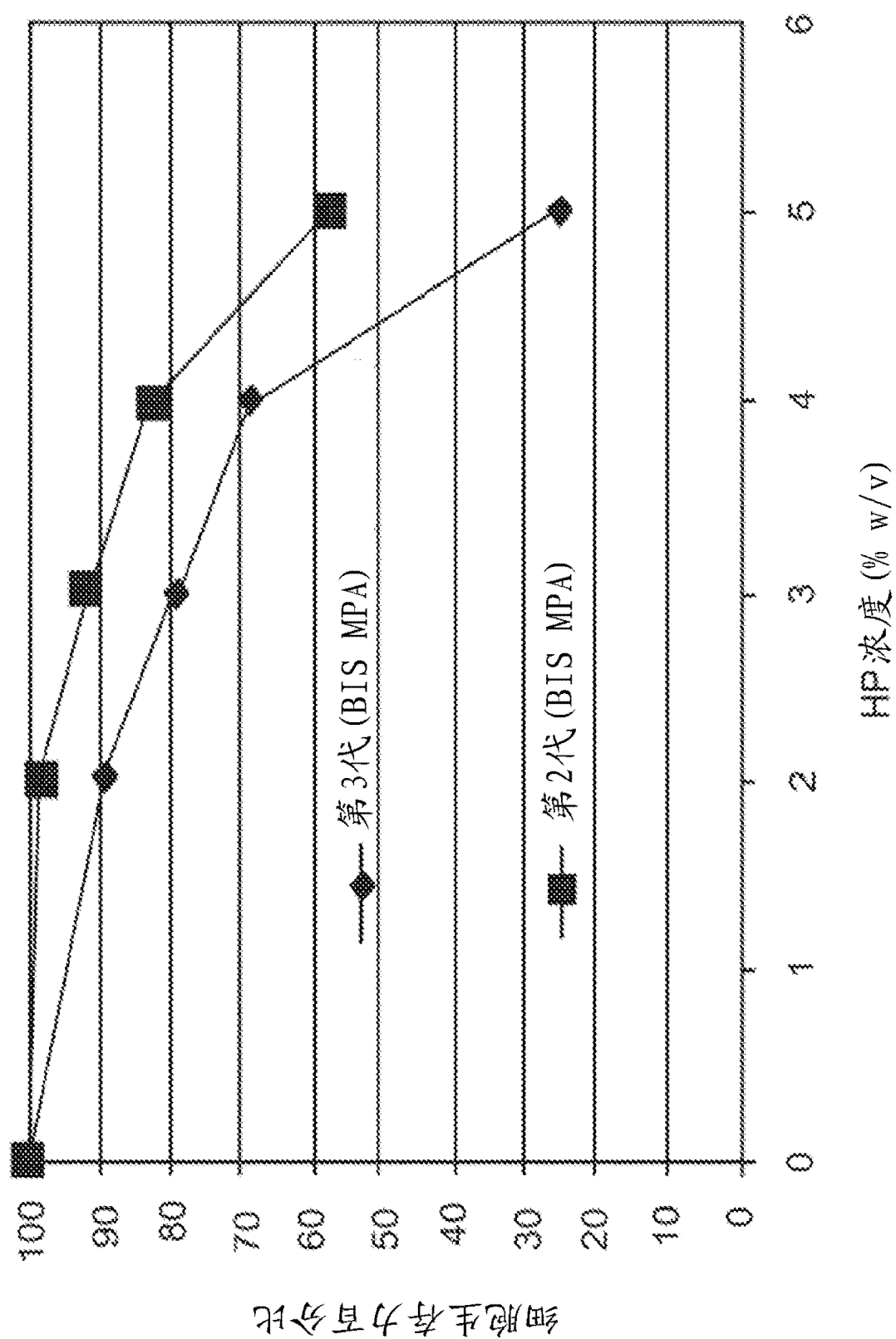


图 33

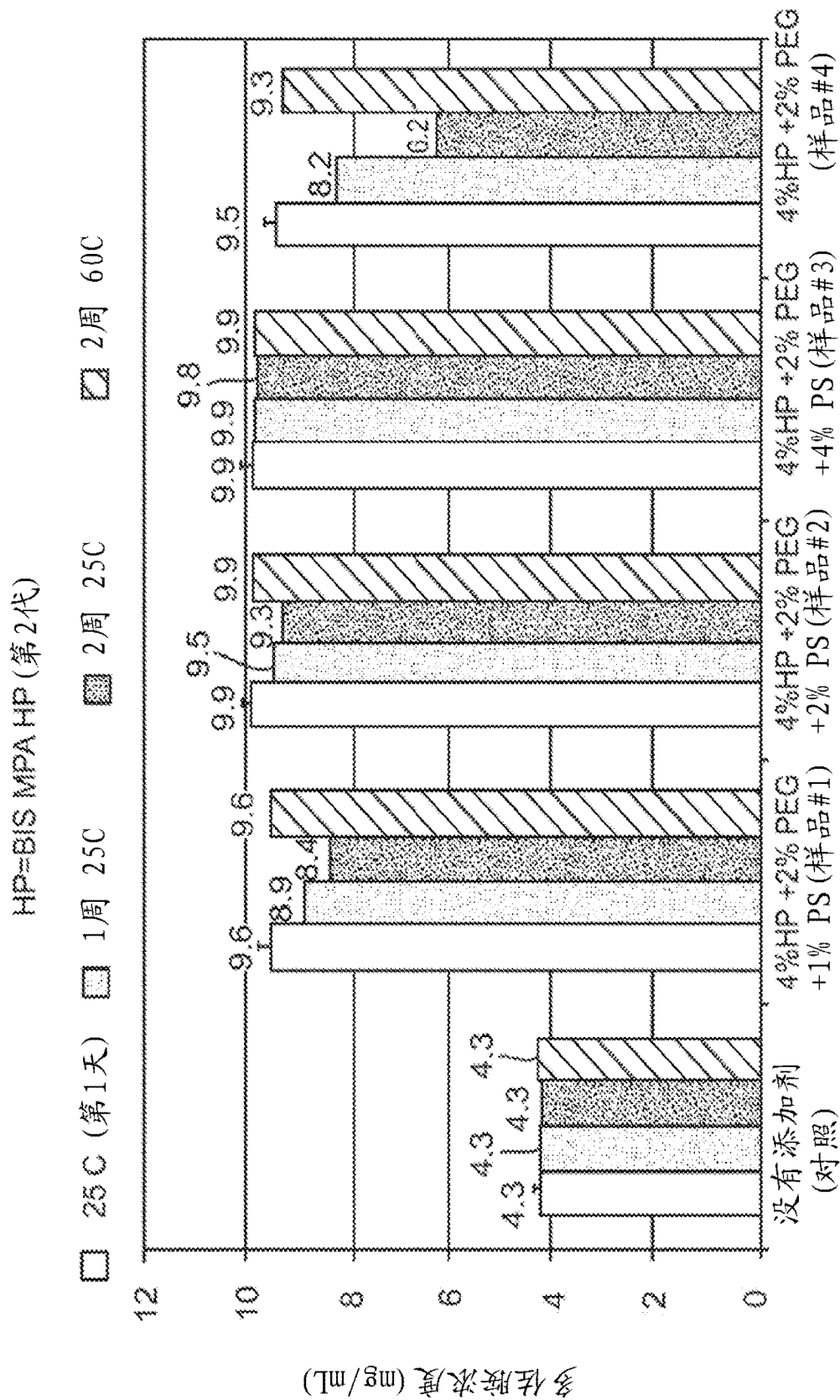


图 34

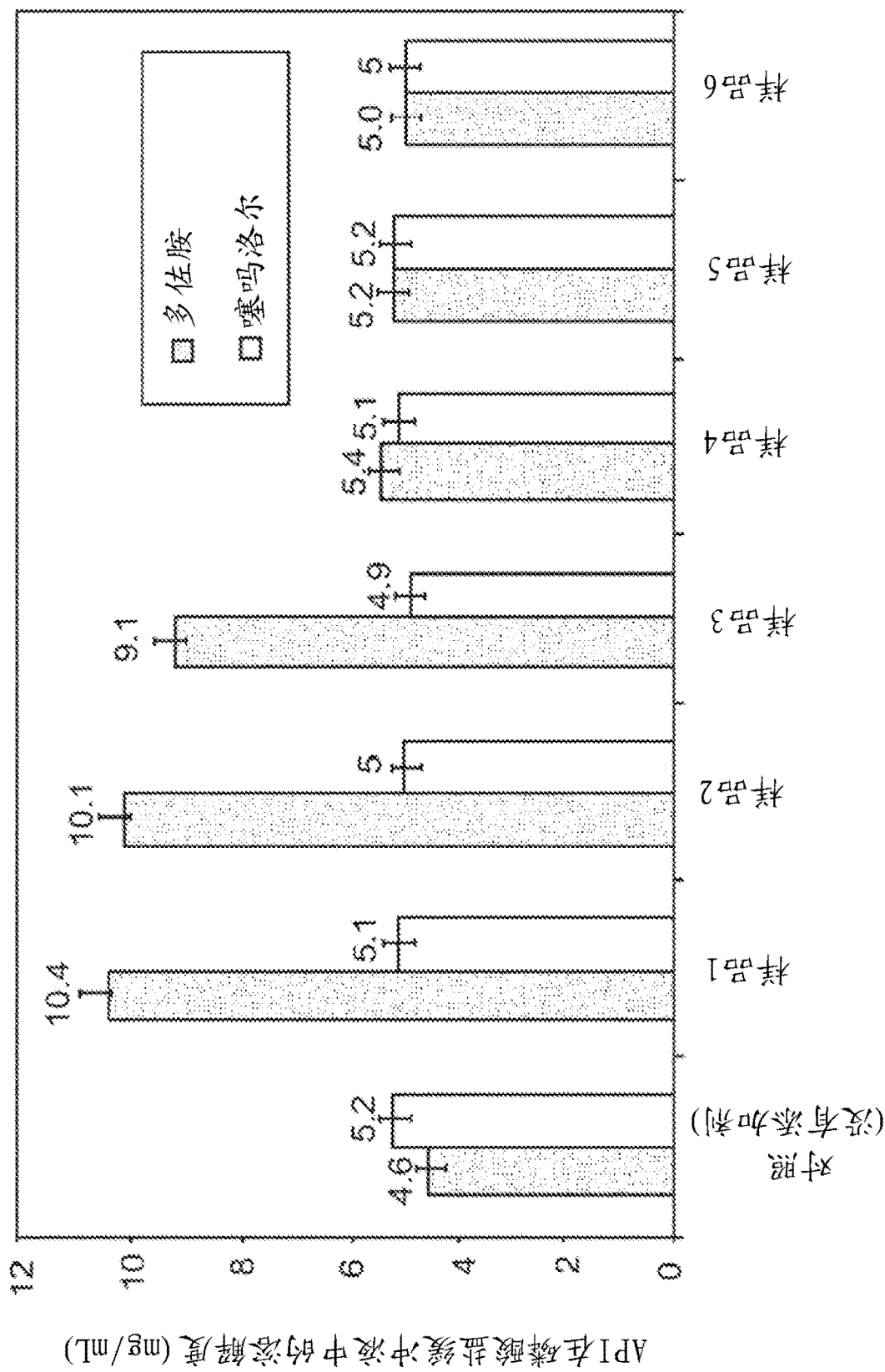


图 35

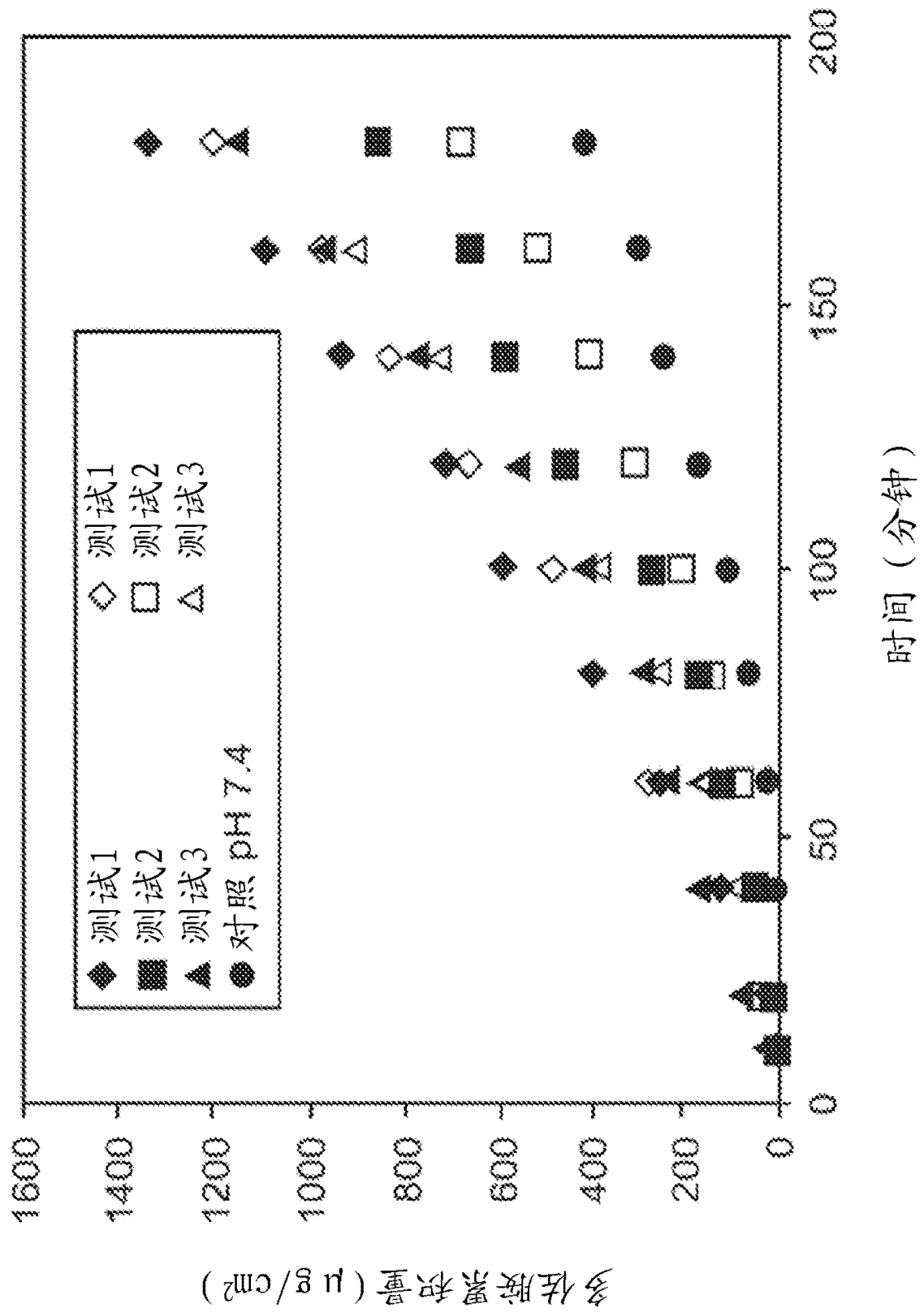


图 36

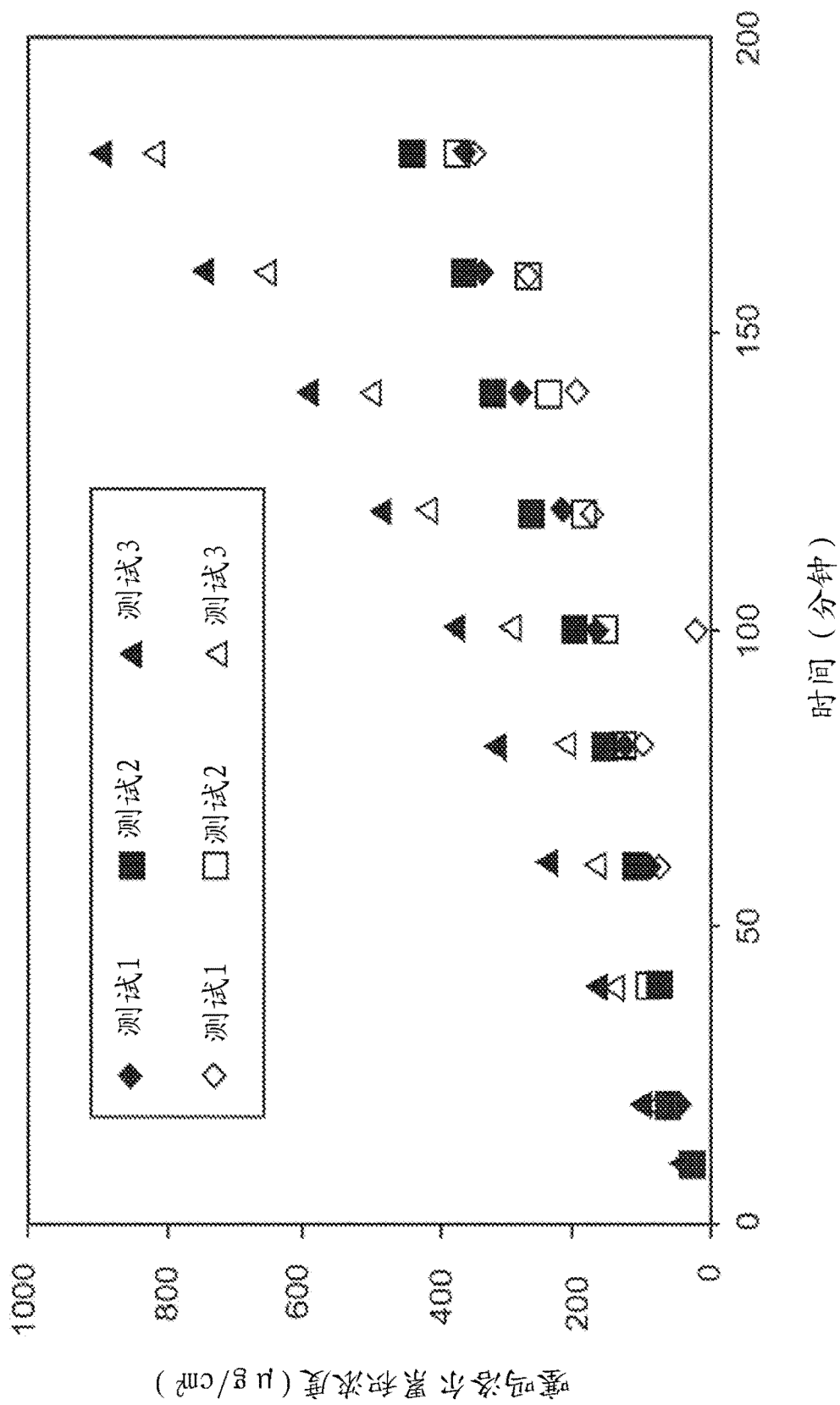


图 37

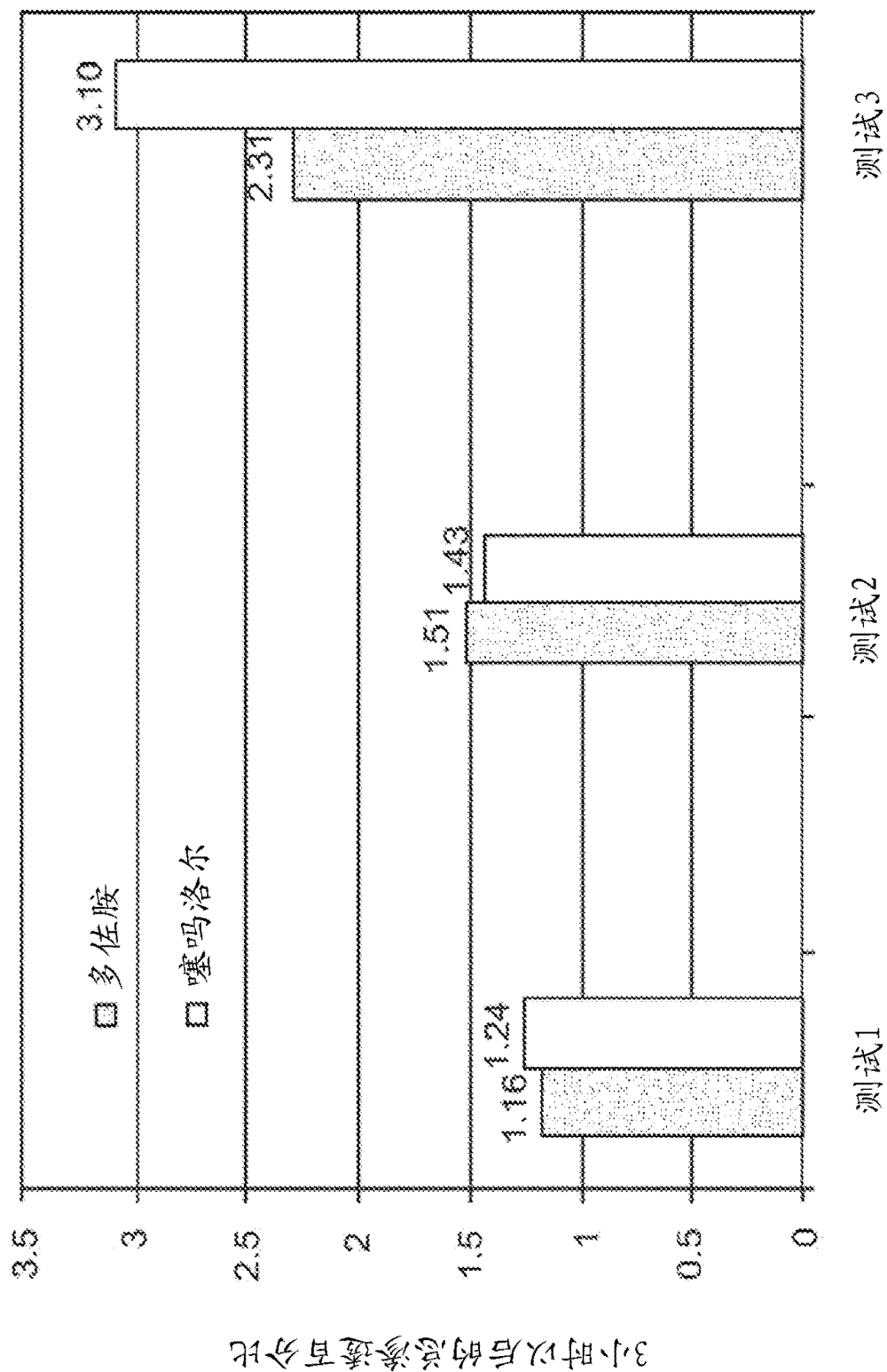


图 38

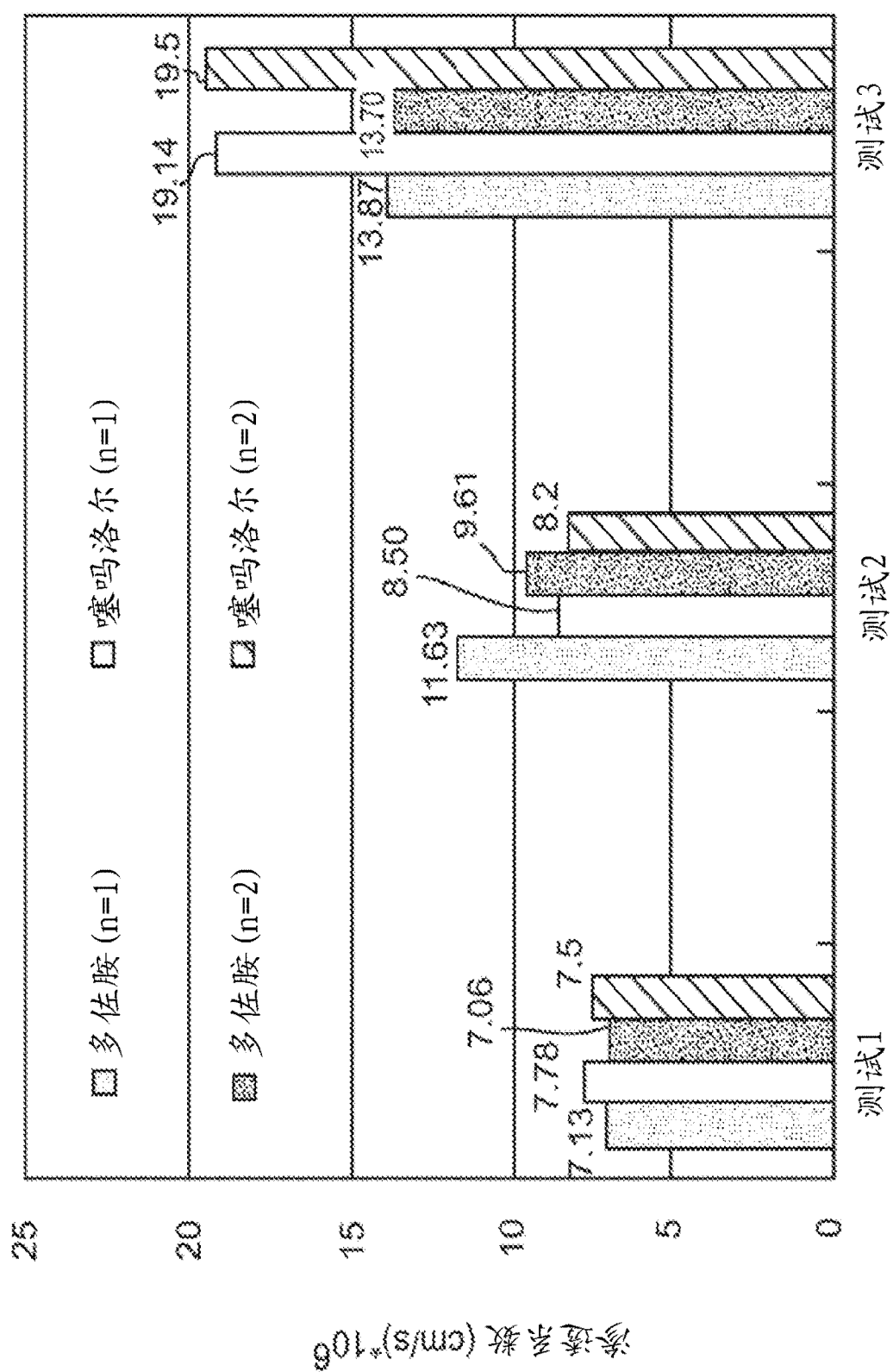


图 39

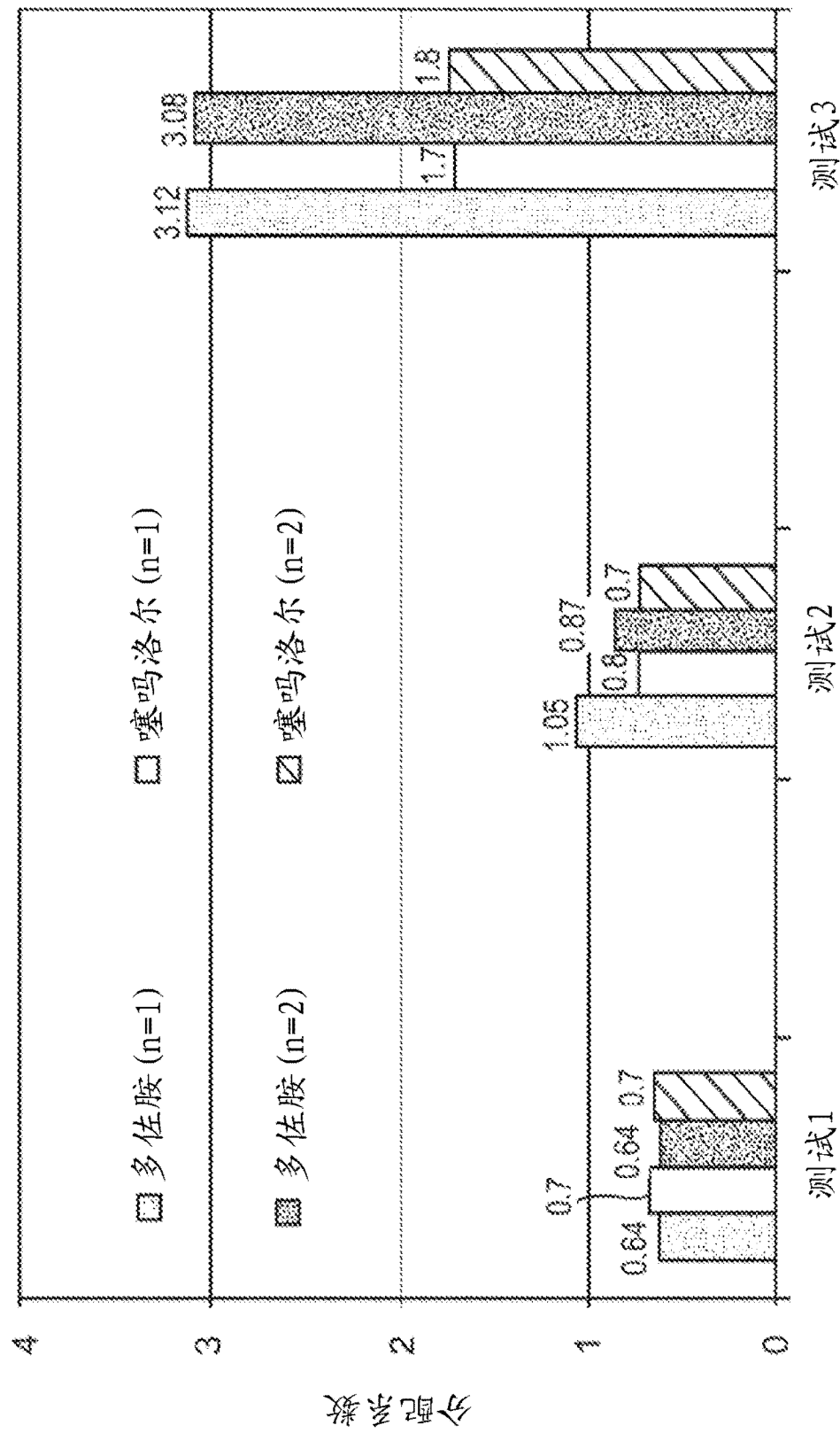


图 40