[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 9/51 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780010641.3

[43] 公开日 2009 年 4 月 15 日

[11] 公开号 CN 101410099A

[22] 申请日 2007.3.13
[21] 申请号 200780010641.3
[30] 优先权
[32] 2006.3.24 [33] DE [31] 102006013531.8
[86] 国际申请 PCT/EP2007/002198 2007.3.13
[87] 国际公布 WO2007/110152 德 2007.10.4
[85] 进入国家阶段日期 2008.9.24
[71] 申请人 LTS 罗曼治疗方法有限公司
地址 德国安德奈斯市
[72] 发明人 约尔格·克罗伊特尔
斯韦特兰娜·赫尔皮里纳
奥尔佳·马克西缅科
亚历山大·哈拉斯基
[74] 专利代理机构 北京金信立方知识产权代理有限公司
代理人 朱 梅 黄丽娟
权利要求书 7 页 说明书 24 页 附图 2 页

[54] 发明名称

聚丙交酯纳米粒子

[57] 摘要

本发明属于一种用于定向递送活性物质的系统、制备所述用于定向递送活性物质的方法以及该系统用于定向递送活性物质以治疗中枢神经系统疾病或障碍的用途，所述系统用于通过血脑屏障向哺乳动物的中枢神经系统使用药理学活性物质，其中所述用于定向给药的系统包含聚(DL－丙交酯)和/或聚(DL－丙交酯－共－乙交酯)制成的纳米粒子以及吸收、吸附和/或并入至所述纳米粒子中的至少一种药理学活性物质，并且还包含 TPGS 或者含有沉积在载有活性物质的纳米粒子上的普卢兰尼克 188 表面活性剂涂层。

1、一种药物靶向系统，该系统用于穿过哺乳动物的血脑屏障向其中枢神经系统施用药理学活性物质，所述靶向系统包括由聚(DL-丙交酯)和/或聚(DL-丙交酯-共-乙交酯)制成的纳米粒子，以及吸收、吸附和/或并入至所述纳米粒子中的至少一种药理学活性物质，其中，所述系统包含 TPGS 或者含有沉积在载药纳米粒子上的普卢兰尼克 188 表面活性剂涂层。

2、根据权利要求 1 所述的药物靶向系统，其特征在于所述纳米粒子含有直径为 1,000 nm 以下、优选直径为 100~800 nm 并且最优选直径为 150~600 nm 的粒子。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的药物靶向系统，其特征在于所述药理学活性物质为治疗剂或诊断剂。

4、根据权利要求 3 所述的药物靶向系统，其特征在于所述治疗剂选自由作用于突触和神经效应器接合部位的药物；全身和局部镇痛药和麻醉剂；安眠药和镇静药；用于如抑郁症和精神分裂症的精神病性疾病的治疗的药物；抗癫痫剂和抗惊厥剂；治疗亨廷顿氏病、老化和阿尔茨海默氏病的药物；兴奋性氨基酸拮抗剂和亲神经因子及神经再生剂；营养因子；针对 CNS 外伤或中风治疗的药物；用于药物成瘾和药物滥用的治疗的药物；自身活性物质和消炎药物；用于寄生虫感染和微生物引起的疾病的化学治疗剂；免疫抑制剂和抗癌药物；激素和激素拮抗剂；重金属和重金属拮抗剂；非金属毒剂的拮抗剂；治疗癌症的细胞生长抑制剂；用于核医学用途的诊断物质；免疫活性和免疫反应剂；递质及其各自的受体激动剂和受体拮抗剂、其各自的前体或代谢产物；抗生素、解痉剂、抗组胺剂、止吐药、弛缓剂、兴奋剂、“有

义”和“反义”寡核苷酸、脑血管扩张剂、精神调节剂、抗躁狂药、血管扩张剂和收缩剂、抗高血压药、偏头痛治疗剂、安眠药、促血糖增高剂或降血糖剂、矿物或营养剂、抗肥胖药物、合成代谢药和平喘药及其混合物组成的组中。

5、根据权利要求 4 所述药物递送系统，其特征在于所述抗癌药物为选自由生物碱，如烷基磺酸酯、氮丙啶、氮杂环丙烷和甲基三聚氰胺的烷基化剂，氮芥，亚硝基脲，抗生素及类似物组成的组中的抗肿瘤药，优选的是蒽环霉素，如叶酸类似物、叶酸拮抗剂、嘌呤类似物和嘧啶类似物的抗代谢药，酶，免疫调节剂，免疫毒素，单克隆抗体类和铂配合物。

6、根据权利要求 3 所述的药物靶向系统，其特征在于所述诊断剂用于核医学和/或放射疗法中的诊断。

7、一种制备药物靶向系统的方法，该药物靶向系统用于穿过哺乳动物的血脑屏障向其中枢神经系统施用药理学活性物质，该方法包括以下步骤:

-在有机溶剂中溶解聚(DL-丙交酯)和/或聚(DL-丙交酯-共-乙交酯)、至少一种药理学活性物质以及非必需的脂质化合物以制得有机相;

-将所述有机相注入至包含 TPGS 的水溶液中;

-乳化该混合物以制得初乳剂;

-均化所述初乳剂;

-从所述初乳剂中除去有机溶剂; 和

-过滤生成的含有载药纳米粒子的纳米悬浮液。

8、一种制备药物靶向系统的方法，该药物靶向系统用于穿过哺乳动物的血脑屏障向其中枢神经系统施用药理学活性物质，该方法包括以下步骤:

-在有机溶剂中溶解聚(DL-丙交酯)和/或聚(DL-丙交酯-共-乙交酯)、至少一种药理学活性物质和非必需的脂质化合物以制得有机相;

-将所述有机相注入至非必须地含有稳定剂的水溶液中;

-乳化该混合物以制得初乳剂;

-均化所述初乳剂;

-从所述初乳剂中除去有机溶剂;

-过滤生成的含有载药纳米粒子的纳米悬浮液; 和

-用泊洛沙姆 188 包覆该纳米粒子。

9、根据权利要求 7 或 8 所述的方法，其特征在于所述脂质化合物选自由十六烷基磷酸酯、胆甾醇硫酸酯钾和维生素 E 琥珀酸酯组成的组中。

10、一种制备药物靶向系统的方法，该药物靶向系统用于穿过哺乳动物的血脑屏障向其中枢神经系统施用药理学活性物质，该方法包括以下步骤:

-在有机溶剂中溶解聚(DL-丙交酯)和/或聚(DL-丙交酯-共-乙交酯)以制得有机相;

-在水溶液中溶解至少一种药理学活性物质;

-将所述水溶液注入至有机相中;

-乳化该混合物以制得初乳剂;

-将所述初乳剂注入至 TPGS 水溶液中;

-均化所述初乳剂与 TPGS 水溶液的混合物;

-从所述初乳剂与稳定剂水溶液的混合物中除去有机溶剂;

-过滤生成的含有载药纳米粒子的纳米悬浮液。

11、一种制备药物靶向系统的方法，该药物靶向系统用于穿过哺乳动物的血脑屏障向其中枢神经系统施用药理学活性物质，该方法包括以下步骤:

-在有机溶剂中溶解聚(DL-丙交酯)和/或聚(DL-丙交酯-共-乙交酯)以制得有机相;

-在水溶液中溶解至少一种药理学活性物质;

-将所述水溶液注入至有机相中;

-乳化该混合物以制得初乳剂;

-将所述初乳剂注入至稳定剂水溶液中;

-均化所述初乳剂与稳定剂水溶液的混合物;

-从所述初乳剂与稳定剂水溶液的混合物中除去有机溶剂;

-过滤生成的含有载药纳米粒子的纳米悬浮液; 和

-用泊洛沙姆 188 包覆该纳米粒子。

12、根据权利要求 7~11 中任一项所述的方法，其特征在于所述稳定剂选自由聚乙烯醇、血清白蛋白、TPGS 和 γ-环糊精组成的组中。

13、根据权利要求 12 所述的方法，其特征在于所述聚乙烯醇的分子量为 30~70 kDa。

14、根据权利要求 12 所述的方法，其特征在于所述血清白蛋白为人血清白蛋白。

15、根据权利要求 7~14 中任一项所述的方法，其特征在于所述药理学活性物质为治疗剂或诊断剂。

16、根据权利要求 15 所述的方法，其特征在于所述治疗剂选自由作用于突触和神经效应器接合部位的药物；全身和局部镇痛药和麻醉剂；安眠药和镇静药；用于如抑郁症和精神分裂症的精神病性疾病的治疗的药物；抗癫痫剂和抗惊厥剂；治疗亨廷顿氏病、老化和阿尔茨海默氏病的药物；兴奋性氨基酸拮抗剂和亲神经因子及神经再生剂；营养因子；针对 CNS 外伤或中风治疗的药物；用于药物成瘾和药物滥用的治疗的药物；自身活性物质和消炎药物；用于寄生虫感染和微生物引起的疾病的化学治疗剂；免疫抑制剂和抗癌药物；激素和激素拮抗剂；重金属和重金属拮抗剂；非金属毒剂的拮抗剂；治疗癌症的细胞生长抑制剂；用于核医学用途的诊断物质；免疫活性和免疫反应剂；递质及其各自的受体激动剂和受体拮抗剂、其各自的前体或代谢产物；抗生素、解痉剂、抗组胺剂、止吐药、弛缓剂、兴奋剂、“有义”和“反义”寡核苷酸、脑血管扩张剂、精神调节剂、抗躁狂药、血管扩张剂和收缩剂、抗高血压药、偏头痛治疗剂、安眠药、促血糖增高剂或降血

糖剂、矿物或营养剂、抗肥胖药物、合成代谢药和平喘药及其混合物组成的组中。

17、根据权利要求 16 所述的方法，其特征在于所述抗癌药物为选自由生物碱，如烷基磺酸酯、氮丙啶、氮杂环丙烷和甲基三聚氰胺的烷基化剂，氮芥，亚硝基脲，抗生素及类似物组成的组中的抗肿瘤药，优选的是蒽环霉素，如叶酸类似物、叶酸拮抗剂、嘌呤类似物和嘧啶类似物的抗代谢药，酶，免疫调节剂，免疫毒素，单克隆抗体类和铂配合物。

18、根据权利要求 15 所述的方法，其特征在于所述诊断剂用于核医学和/或放射疗法中的诊断。

19、根据前述权利要求中的任一项中所述的方法，其特征在于所述有机溶剂选自由二氯甲烷、氯仿、乙酸乙酯和其混合物组成的组中。

20、根据权利要求 7~19 中任一项所述的方法，其特征在于在加入防冻剂之后将所述纳米悬浮液冷冻干燥。

21、根据权利要求 20 所述的方法，其特征在于所述防冻剂为甘露醇。

22、根据权利要求 20 或 21 所述的方法，其特征在于将所述防冻剂以 5% (w/v)的量加入到纳米悬浮液中。

23、一种治疗哺乳动物中枢神经系统疾病或障碍的方法，该方法包括以下步骤:

-制备由聚(DL-丙交酯)和/或聚(DL-丙交酯-共-乙交酯)制成的载药纳米粒子;

-用泊洛沙姆 188 包覆载药的 PLGA 纳米粒子;

-向哺乳动物的血流中施用包覆了泊洛沙姆 188 的载药纳米粒子;和

-使该药物实现其药理学作用。

24、根据权利要求 23 所述的方法，其特征在于所述施用步骤包括经口或静脉施用。

25、根据权利要求 1~6 中任一项所述的药物靶向系统用于治疗哺乳动物中枢神经系统疾病或障碍的用途。

26、根据权利要求 1~6 中任一项所述的药物靶向系统用于制备治疗哺乳动物中枢神经系统疾病或障碍的药剂中的用途。

聚丙交酯纳米粒子

技术领域

本发明涉及用于使药理学活性物质靶向定位于哺乳动物的中枢神经系统的系统。具体地，本发明涉及能够穿过哺乳动物的血脑屏障的纳米微粒药物靶向系统。更具体而言，本发明涉及基于聚丙交酯和/或聚丙交酯-共乙交酯的载药纳米粒子；制备基于聚丙交酯和/或聚丙交酯-共乙交酯的该载药纳米粒子的方法；以及基于聚丙交酯和/或聚丙交酯-共乙交酯的该载药纳米粒子用于中枢神经系统疾病或障碍的治疗尤其是神经细胞癌的治疗的用途。

背景技术

中枢神经系统(CNS)疾病和障碍可通过施用对神经系统功能起作用的药物得到治疗。这些药物通常通过常规的口服或注射而向需要其的患者提供。不幸的是，如腺苷、β-内啡肽、内源肽的合成类似物、兴奋性和抑制性氨基酸以及营养因子的许多药物根本不能通过血脑屏障或者仅以不足以达到有效治疗的量通过血脑屏障。这些药物仅在直接向脑部施用时为治疗有效的，例如通过直接 CNS 输注。

作为直接 CNS 输注的另一选择，第 6,117,454 号美国专利提出了一种用于穿过哺乳动物的血脑屏障传送药学活性物质的方法，其中，将该纳米粒子用于通过穿过血脑屏障将药物或诊断剂靶向定位于 CNS。依照 US 6,117,454，在聚合如氰基丙烯酸丁酯的适合单体的过程中或之后加入药物，聚合的单体将被并入或吸附在生成的聚氰基丙烯酸丁酯纳米粒子的表面。如果用适当的表面活性剂包覆该纳米粒子-药物复合物，据说这些纳米粒子-药物复合物能够穿过血脑屏障并且能够

使药物靶向定位于 CNS。其要求保护的使载药的聚氰基丙烯酸丁酯纳米粒子能够穿过血脑屏障的适当表面活性剂为聚氧乙烯 20 失水山梨糖醇单月桂酸酯(吐温® 20)、聚氧乙烯 20 失水山梨糖醇单棕榈酸酯(吐温® 40)、聚氧乙烯 20 失水山梨糖醇单硬脂酸酯(吐温® 60)、聚氧乙烯 20 失水山梨糖醇单油酸酯(吐温® 80)及其混合物。

该文献中提出，基本上任何药物能够与包覆表面活性剂的纳米粒子合并或结合并且被递送至脑部而无需改变药物的结构。因此，看来 US 6,117,454 提供了使药物穿过血脑屏障靶向定位于 CNS 的第一种通用方法。

对用于包覆生成的聚氰基丙烯酸丁酯纳米粒子的表面活性剂的可能毒副作用的关注以及对简化载药纳米粒子的制备方法的需要促使开发如 WO 98/56361 中所公开出简化的且潜在较小毒性的纳米粒子制造的方法。

WO 98/56361 公开了如果在氰基丙烯酸丁酯单体的聚合过程中，通过使用右旋糖酐 12.000 或聚山梨酯 85 (聚氧乙烯 20 失水山梨糖醇三油酸酯；吐温® 85)作为稳定剂来制备纳米粒子，则不再需要表面活性剂。其显示，吸附在稳定的聚氰基丙烯酸丁酯纳米粒子上的达拉根(dalargin)可通过血脑屏障，并且显示，吸附到聚山梨酯 85 稳定的纳米粒子的阿米替林同样地在脑中累积至比阿米替林更高的浓度。

然而，为了改善功效、特异性、毒性和制备简单性中的一种或多种，还需要可替代的用于使药物穿过血脑屏障靶向定位于哺乳动物 CNS 的载药纳米粒子的系统。

发明内容

因此，本发明的一个目的是提供一种改良的药物靶向系统，该系统用于穿过哺乳动物的血脑屏障向哺乳动物的中枢神经系统施用药理学活性物质。

该目的通过含有基于聚(DL-丙交酯)(PLA)和/或聚(DL-丙交酯-共-乙交酯)(PLGA)的纳米粒子的药物靶向系统而实现，其中，药理学活性物质被吸收、吸附和/或并入至所述纳米粒子，并且其中，该纳米粒子不是包含 TPGS 就是含有沉积在载药纳米粒子上的泊洛沙姆(poloxamer)188 表面活性剂涂层。

应当理解，本文中所用术语“载药纳米粒子”指含有药理学活性物质的纳米粒子。药理学活性物质可为治疗剂或诊断剂。因此，本发明的“载药纳米粒子”含有被吸收、吸附或并入至所述纳米粒子的至少一种治疗剂和/或至少一种诊断剂。

本文中所用术语“血脑屏障”同样指血脑屏障，即脑血管的内皮、基底膜和神经胶质细胞。血脑屏障用来控制向脑部传递物质。本文中所用术语“血脑屏障”指血脊屏障(blood-spinal barrier)并且还指血-视网膜屏障(blood-retina barrier)。

聚丙交酯(PLA)，也称聚乳酸，为基于乳酸的聚酯。聚丙交酯为多羟基酸。它们是生物相容的和生物可降解的。

如可适用，聚丙交酯的性质主要取决于其分子量、结晶性程度和共聚物部分。随着聚丙交酯的分子量增大，聚丙交酯的玻璃化转变温度、熔化温度、拉伸强度和 E-模量增大，而致断伸长减少。

聚丙交酯可通过丙交酯的开环聚合而制得。所述开环聚合在辛酸亚锡催化剂存在下在 140~180℃温度下进行。具有高分子量的聚丙交酯可容易地通过这种方法制备。

另外，高分子量和纯的聚丙交酯可通过所谓的缩聚作用直接由乳酸产生。

聚丙交酯-共乙交酯(PLGA)是生物可降解的聚合物，该聚合物由与羟基乙酸连接的乳酸组成，其各自的百分比在药物释放的速率方面起重要作用。丙交酯与乙交酯的比可为 90:10~10:90、优选为 20:80~80:20 并且更有选为 40:60~60:40 并且最优选为 50:50。丙交酯为旋光的，并且 D 与 L 异构体可以任何比例存在，从纯的 D-丙交酯到纯的 L-丙交酯范围内变化，具有含有 50%的 D-丙交酯和 50%的 L-丙交酯的外消旋物。

泊洛沙姆是通式为 $HO(C_2H_4O)_a(-C_3H_6O)_b(C_2H_4O)_aH$ 的非离子聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物。可用从液态到固态变化的不同聚合级的泊洛沙姆。可将泊洛沙姆用作乳化剂、增溶剂、表面活性剂以及作为用于抗生素的湿润剂。

泊洛沙姆 188 (普卢兰尼克® F68 (BASF 公司))是以伯羟基封端的双官能嵌段共聚物表面活性剂。它是一种相对无毒的非离子表面活性剂。泊洛沙姆 188 的平均分子量为 8,400，在 77℃的粘度为 1,000 cps，浊点(10%水溶液)为>100℃，以及 HLB 值为>24。

泊洛沙姆 185 (普卢兰尼克® P65 (BASF 公司))是以伯羟基封端的双官能嵌段共聚物表面活性剂。它是相对无毒的非离子表面活性剂。普卢兰尼克® P65 的平均分子量为 3,400，在 60℃的粘度为 180 cps，浊点(10%水溶液)为 80~84℃，以及 HLB 值为 12~18。

普卢兰尼克® P85 (BASF 公司)，也称泊洛沙姆 235，是以伯羟基封端的双官能嵌段共聚物表面活性剂。它是相对无毒的非离子表面活性剂。普卢兰尼克® P85 的平均分子量为 4,600，在 60℃的粘度为 310 cps，浊点(10%水溶液)为 83~89℃，以及 HLB 值为 12~18。

聚山梨酯 80 (聚氧乙烯-失水山梨糖醇-单油酸酯, 吐温® 80)是非离子表面活性剂。聚山梨酯 80 的平均分子量为 1,300，在 25℃的粘度为 375~480 mPa·s，以及 HLB 值为 14~16。

TPGS (D-α-维生素 E 聚乙二醇 1000 琥珀酸酯)是 d-α-维生素 E 琥珀酸酯的水溶性衍生物。将 TPGS 用作针对患脂肪吸收不良综合症(例如慢性儿童胆汁淤积)的人的维生素 E 的水溶性递送形式。还将其作为用于不溶于水的 HIV 蛋白酶抑制剂安泼那韦(amprenavir)和如维生素 D 的脂溶性维生素的吸收和生物利用度的增强剂。TPGS 是通过用聚乙二醇(PEG)1000(PEG 1000 的分子量约为 1,000 道尔顿)酯化 d-α维生素 E 琥珀酸酯而合成。其分子量约为 1,513 道尔顿。它是两亲的和亲水的浅黄蜡状固体物质。仍在对 TPGS 的药物代谢动力学进行研究。在摄食之后 TPGS 比维生素 E 的其他形式经小肠管腔更加有效地被吸收。其被吸收如肠上皮细胞的机理尚不清楚。由于其两亲性(既有亲水端又有亲脂端)，TPGS 自身形成胶束，因此不需要胆汁盐来做这些。如果与亲脂药物配制在一起，TPGS 可增强这些亲脂药物的吸收。此外，当与 TPGS 共同施用时，一些药物的口服生物利用度的增强可部分地归因于对肠内 P-糖蛋白的抑制。

本发明的载药 PLA 纳米粒子和 PLGA 纳米粒子可用于使药物穿过血脑屏障靶向定位于中枢神经系统，并且用于治疗中枢神经系统疾病或障碍，或者用于制造治疗中枢神经系统疾病或障碍的药剂。

附图说明

图 1 为显示患颅内 101/8 成胶质细胞瘤的大鼠在使用含有多柔比星(doxorubicin)的不同纳米粒子制品进行化学疗法之后的存活率的曲线图。

图2为显示患颅内101/8成胶质细胞瘤的大鼠在使用含有多柔比星和TPGS的不同纳米粒子制品进行化学疗法之后的存活率的曲线图。

具体实施方式

本发明的载药PLA纳米粒子和PLGA纳米粒子可通过a)高压均化-溶剂蒸发技术或者b)复乳剂技术(double emulsion technique)(水包油包水乳剂)而制得。

a)高压均化-溶剂蒸发技术

通常，在有机溶剂中溶解聚合物和药物。在搅拌下，将该有机相缓慢注入稳定剂水溶液中。然后，使用高速剪切均化器乳化该混合物。然后在高压下使制得的初乳剂通过高压均化器。通过在环境温度和常压下经搅拌缓慢蒸发或者通过在减压下快速蒸发而除去有机溶剂。在上述过程中，纳米液滴在水系统中固化。

通过烧结玻璃滤器过滤生成的纳米悬浮液。为贮藏，加入防冻剂，优选加入5% w/v的甘露醇。然后，将悬浮液装入管形瓶中，在-35°C下冷冻，接着冷冻干燥。

在药物靶向系统的制备中，如果将如十六烷基磷酸酯(cetyl phosphate)、胆甾醇硫酸酯钾(potassium cholesteryl sulfate)或维生素E琥珀酸酯(tocopheryl succinate)的另外的化合物用作乳化剂和/或抗衡离子，则使聚合物和脂质化合物溶解于有机溶剂中而将药物溶于水中。混合有机溶液和水溶液并且在环境温度下保温。然后，如上所述，将该混合物注入至搅拌过的包含稳定剂的水溶液中，然后进一步处理。

b)复乳剂技术

通常，将聚合物溶解于有机溶剂中而将药物溶于水中。向有机相中加入水溶液。乳化该混合物。将制得的w/o乳剂加入到稳定剂水溶液中，然后进一步乳化。使生成的粗制乳剂通过高压均化器。重复几

次均化步骤以制得稳定的 w/o/w 乳剂。然后通过在环境温度和常压下缓慢蒸发而除去有机溶剂。

在向该有机相加入所述溶液之前，可以在水中溶解药物和如 γ-环糊精的另外的乳化剂。

通过烧结玻璃滤器过滤生成的纳米悬浮液。为贮藏，加入防冻剂，并且将悬浮液装入管形瓶中，冷冻，接着冷冻干燥。

测试制得的纳米粒子制剂的再悬浮性、粒度、药物载荷(理论)和药物含量。

因为对本领域技术人员来说，从本说明书和附图及权利要求书中，在本发明的实质和范围内的各种变化和改变是明显的，所以仅以示例的方式给出的本发明的详细描述和具体实例，同时指出优选实施方式，是应被理解的。

本发明的药物靶向系统包括基于聚(DL-丙交酯)和/或聚(DL-丙交酯-共-乙交酯)的纳米粒子；至少一种药理学活性物质；以及包含 TPGS 或者含有沉积于载药纳米粒子上的表面活性剂涂层，其中，该表面活性剂为泊洛沙姆。

在优选实施方式中，所述药物靶向系统的纳米粒子的直径为 1，000 nm 以下，优选地，直径为 100~800 nm，并且最优选地，直径为 130~160 nm。

本发明的基于 PLA 和/或 PLGA 的纳米粒子可以载有事实上任何药理学活性物质以穿过哺乳动物的血脑屏障向哺乳动物的 CNS 施用所述药理学活性物质，即治疗剂或诊断剂。

所述治疗剂可选自由作用于突触和神经效应器接合部位的药物；全身和局部镇痛药和麻醉剂；安眠药和镇静药；治疗精神病性疾病(例如抑郁症和精神分裂症)的药物；抗癫痫剂和抗惊厥剂；治疗亨廷顿氏

病、老化和阿尔茨海默氏病的药物；兴奋性氨基酸拮抗剂和亲神经因子(neurotropic factor)及神经再生剂；营养因子；针对CNS外伤或中风治疗的药物；用于药物成瘾和药物滥用的治疗的药物；自身活性物质和消炎药物；治疗寄生虫感染和微生物引起的疾病的化学治疗剂；免疫抑制剂和抗癌药物；激素和激素拮抗剂；重金属和重金属拮抗剂；非金属毒剂的拮抗剂；治疗癌症的细胞生长抑制剂；用于核医学用途的诊断物质；免疫活性剂和免疫反应剂；递质及其各自的受体激动剂和受体拮抗剂、其各自的前体或代谢产物；抗生素、解痉剂、抗组胺剂、止吐药、弛缓剂、兴奋剂、“有义”和“反义”寡核苷酸、脑血管扩张剂(cerebral dilator)、精神调节剂、抗躁狂药、血管扩张剂和收缩剂、抗高血压药、偏头痛治疗剂、安眠药、促血糖增高剂或降血糖剂、矿物或营养剂、抗肥胖药物、合成代谢药和平喘药及其混合物组成的组中。

优选的治疗剂为抗癌药物，优选为抗肿瘤药。所述抗肿瘤药可选自由生物碱，烷基化剂(例如烷基磺酸酯、氮丙啶、氮杂环丙烷和甲基三聚氰胺(methylmelamine))，氮芥，硝基脲，抗生素及其类似物组成的组中，优选为蒽环霉素(anthracyclin)，抗代谢药(例如叶酸类似物、叶酸拮抗剂、嘌呤类似物和嘧啶类似物)，酶，免疫调节剂，免疫毒素，单克隆抗体类和铂配合物。

尤其优选的抗肿瘤药可选自由由 9-氨基喜树碱、多西他赛、海兔斯大丁(ecteinascidins)、依托泊苷、伊立替康、紫杉醇、卢比替康、替尼泊苷、托泊替康、长春碱、长春新碱、长春地辛、白消安、英丙舒凡、哌泊舒凡、卡波醌、乌瑞替派、六甲蜜胺、曲他胺、三亚乙基磷酰胺、三亚乙基硫化磷酰胺、苯丁酸氮芥、萘氮芥、环磷酰胺、雌莫司汀、异环磷酰胺、氮芥、氧氮芥盐酸盐、美法仑、新氮芥、培磷酰胺、苯芥胆甾醇、泼尼莫司汀、三氮芥、曲磷胺、乌拉莫司汀、卡莫

司汀、氯乙链脲菌素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀、雷莫司汀、达卡巴嗪、甘露莫司汀、二溴甘露醇、二溴卫矛醇、哌泊溴烷、替莫唑胺、阿柔比星、氨茴霉素、偶氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素 C、卡柔比星、色霉素、放线菌素 D、柔红霉素、6-重氮基-5-氧-L-正亮氨酸、多柔比星、表柔比星、伊达比星、美诺立尔、丝裂霉素、麦考酚酸、诺加霉素、橄榄霉素、培洛霉素、吡柔比星、普卡霉素、泊非霉素、嘌呤霉素、链黑菌素、链佐星、TNP-470、杀结核菌素、戊柔比星、净司他丁、佐柔比星、二甲叶酸、依达曲沙、甲氨蝶呤、诺拉曲塞、培美曲塞、吡曲克辛、蝶罗呤、雷替曲塞、三甲曲沙、克拉屈滨、氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫唑鸟嘌呤、硫鸟嘌呤、噻唑呋林、安西他滨、阿扎胞苷、6-氮尿苷、卡培他滨、卡莫氟、阿糖胞苷、地西他滨、去氧氟尿苷、乙嘧替氟、依诺他滨、氟尿苷、氟尿嘧啶、吉西他滨、替加氟、L-门冬酰胺酶、豹蛙酶、溴匹立明、α-干扰素、γ-干扰素、白细胞介素-2、磨菇多糖、丙帕锗、PSK®、罗喹美克、西佐喃、乌苯美司、地尼白介素(denileukin diftitox)、阿仑单抗、依决洛单抗、吉姆单抗奥佐米星（gemtuzumab ozogamicin）、替伊莫单抗(ibritumomab tiuxetan)、利妥昔单抗、托西莫单抗 ^{131}I、曲妥单抗、卡铂、顺铂、洛铂、米帕、奥沙利铂、安吖啶、三氧化二砷、比生群、磷胺氮芥(defosfamine)、秋水仙胺、地吖醌、依氟鸟氨酸、醋酸羟哔咔唑(elliptinium acetate)、依托格鲁、芬维 A 胺、葱臭木黄酮(flavopiridol)、硝酸镓、羟基脲、伊马替尼(imatinib)、利阿唑、氯尼达明、米替福新、米托胍腙、米托蒽醌、莫哌达醇、二胺硝吖啶、喷司他丁、蛋氨氮芥、足叶草肼、丙卡巴肼、雷佐生、索布佐生、锗螺胺、细交链孢菌酮酸、替拉扎明、三亚胺醌和乌拉坦组成的组中。

本发明的药物靶向系统可通过高压均化-溶剂蒸发技术或者通过复乳剂技术而制得。

用于制备包含TPGS的载药PLA和/或PLGA纳米粒子药物靶向系统的优选方法包括以下步骤:

-在有机溶剂中溶解聚(DL-丙交酯)和/或聚(DL-丙交酯-共-乙交酯)、至少一种药理学活性物质和非必需的脂质化合物以制得有机相;

-将该有机相注入至包含TPGS的水溶液中;

-乳化该混合物以制得初乳剂;

-均化所述初乳剂;

-从所述初乳剂中除去所述有机溶剂; 和

-过滤生成的含有载药纳米粒子的纳米悬浮液。

用于制备包含TPGS的载药PLA和/或PLGA纳米粒子药物靶向系统的另一优选方法包括以下步骤:

-在有机溶剂中溶解聚(DL-丙交酯)和/或聚(DL-丙交酯-共-乙交酯)以制得有机相;

-在水溶液中溶解至少一种药理学活性物质;

-将该水溶液注入至所述有机相中;

-乳化该混合物以制得初乳剂;

-将所述初乳剂注入至TPGS水溶液中;

-均化所述初乳剂与TPGS水溶液的混合物;

-从所述初乳剂与稳定剂水溶液的混合物中除去所述有机溶剂;

-过滤生成的含有载药纳米粒子的纳米悬浮液。

用于制备使用泊洛沙姆188包覆的载药PLA和/或PLGA纳米粒子药物靶向系统的优选方法包括以下步骤:

-在有机溶剂中溶解聚(DL-丙交酯)和/或聚(DL-丙交酯-共-乙交酯)、至少一种药理学活性物质和非必需的脂质化合物以制得有机相;

-将该有机相注入非必须地含有稳定剂的水溶液中;

-乳化该混合物以制得初乳剂;

-均化所述初乳剂;

-从所述初乳剂中除去有机溶剂;

-过滤生成的含有载药纳米粒子的纳米悬浮液; 和

-用泊洛沙姆 188 包覆该纳米粒子。

用于制备使用泊洛沙姆188包覆的载药PLA和/或PLGA纳米粒子药物靶向系统的另一优选方法包括以下步骤:

-在有机溶剂中溶解聚(DL-丙交酯)和/或聚(DL-丙交酯-共-乙交酯)以制得有机相;

-在水溶液中溶解至少一种药理学活性物质;

-将该水溶液注入至所述有机相中;

-乳化该混合物以制得初乳剂;

-将所述初乳剂注入至稳定剂水溶液中;

-均化所述初乳剂与稳定剂水溶液的混合物;

-从所述初乳剂与稳定剂水溶液的混合物中除去有机溶剂;

-过滤生成的含有载药纳米粒子的纳米悬浮液; 和

-用泊洛沙姆 188 包覆该纳米粒子。

在此之前已详细说明了优选的用于制备本发明的药物靶向系统的诊断剂和治疗剂，尤其是抗肿瘤剂。

用于制备本发明的药物靶向系统的优选的有机溶剂选自由二氯甲烷和氯仿组成的组中。若非必需的稳定剂可溶于乙酸乙酯中，还可以

将乙酸乙酯用作制备 PLA 和/或 PLGA 纳米粒子的溶剂。进一步地，可以使用二氯甲烷与乙酸乙酯的混合物。

优选的脂质化合物选自由十六烷基磷酸酯、胆甾醇硫酸酯钾和维生素 E 琥珀酸酯组成的组中。

优选的稳定剂为乳化剂、表面活性剂或抗衡离子。优选的稳定剂选自由聚乙烯醇、血清白蛋白、γ-环糊精和维生素 E 聚乙二醇 1000 琥珀酸酯(TPGS)组成的组中，其中，优选分子量为 30~70kDa 的聚乙烯醇，并且特别优选的血清白蛋白为人血清白蛋白。

为了贮藏，生成的载药纳米粒子的纳米悬浮液可在用泊洛沙姆 188 包覆之前冷冻干燥。优选地，在冷冻干燥前向纳米悬浮液加入防冻剂。适宜的防冻剂为甘露醇，优选向纳米悬浮液中加入 5% (w/v)的量的甘露醇。

优选地，在溶液中用泊洛沙姆 188 溶液进行载药纳米粒子的包覆并且经过足够的时间以使表面活性剂涂敷到载药纳米粒子上。

用于穿过哺乳动物的血脑屏障向其中枢神经系统施用药理学活性物质的药物靶向系统能够用于治疗哺乳动物中枢神经系统的疾病或障碍，其中，所述药物靶向系统包括由聚(DL-丙交酯)和/或聚(DL-丙交酯-共-乙交酯)制成的纳米粒子、治疗剂以及 TPGS 或沉积在载药纳米粒子上的泊洛沙姆 188 表面活性剂涂层。该药物靶向系统尤其适用于施用具有中枢神经系统活性但在未被修饰或与载体结合的情况下不能穿过哺乳动物的血脑屏障的药理学活性物质。

因本发明的药物靶向系统能够穿过血脑屏障递送抗肿瘤药从而使抗癌药物靶向定位于 CNS，所以本发明的药物靶向系统尤其有助于治疗神经系统的癌症(neuronal cancer)。

施用本发明的药物靶向系统以使其能够进入血流，从而使药物到达并穿过血脑屏障。优选地，本发明的药物靶向系统经口或通过注射施用，最优选通过静脉注射施用。

实施例

1.纳米微粒制剂的制备

不同聚合级的 Lactel®聚合物，即聚(DL-丙交酯)(PLA)和聚(DL-丙交酯-共-乙交酯)(PLGA)，购自美国 Absorbable Polymers; 多柔比星盐酸盐由意大利 Sicor, Rho 慷慨捐赠; 十六烷基磷酸酯、胆甾醇硫酸酯钾、聚乙烯醇(PVA)(MW 30~70 kDa)和人血清白蛋白(HSA)购自 Sigma; D-α-维生素 E 聚乙二醇 1000 琥珀酸酯(TPGS)购自美国 Eastman 化学公司。

利用高压均化-溶剂蒸发技术或者复乳剂技术制备载药 PLA 和 PLGA 纳米粒子。

就高压均化-溶剂蒸发而言，通常在二氯甲烷中溶解聚合物和药物。在搅拌下将该有机相缓慢注入至稳定剂(PVA 或 HSA)的水溶液中。使用高速剪切均化器(Ultra-Turrax T-25 (IKA))乳化该混合物。然后使制得的初乳剂在 400 bar 下通过高压均化器(APV Micron Lab 40; Gaulin GmbH, 德国)。通过在环境温度和常压下经搅拌(3 h)缓慢蒸发或者通过在减压下快速蒸发(旋转式蒸发器 BUCHI R-200)而除去有机溶剂。在处理过程中，在水系统中固化纳米微滴。制得的纳米悬浮液通过烧结玻璃滤器过滤，并且加入 5% w/v 的甘露醇作为防冻剂。然后，将纳米悬浮液装入管形瓶中，在-35°C 冷冻，并且冷冻干燥。

在一些制品中，将如十六烷基磷酸酯、胆甾醇硫酸酯钾或维生素 E 琥珀酸酯的脂质化合物用作乳化剂和/或抗衡离子。在这种情况下，聚合物和脂质组分溶于有机溶剂(二氯甲烷或氯仿)中而药物溶解于水中。

混合有机溶液和水溶液并在环境温度下保温 12 h。然后，将该混合物注入至搅拌过的包含稳定剂的水溶液(25 ml)中而后进一步进行如上所述的处理。

就复乳剂技术而言，通常在二氯甲烷(5 ml)中溶解聚合物(500 mg)(经磁力搅拌 1 h)。在水(2 ml)中溶解药物(50 mg)。向所述有机相中滴加该水溶液。使用 Ultra-Turrax T-25 乳化该混合物(19,500 rpm，2 min)。将制得的 w/o 乳剂加入至 25 ml 1%的稳定剂(PVA、HAS 或 TGPS)水溶液中而后使用 Ultra-Turrax T-25 进行乳化。然后使生成的粗制乳剂在 600 bar 的压力下通过高压均化器(APV Micron Lab 40)。重复几次该均化步骤以制得稳定的 w/o/w 乳剂。通过在环境温度和常压下缓慢蒸发(磁力搅拌器, 3 h)而从 w/o/w 乳剂中除去有机溶剂。制得的纳米悬浮液通过烧结玻璃滤器过滤并被加入 5% w/v 的甘露醇作为防冻剂。然后，将乳剂装入管形瓶中(1 ml/管形瓶)，冷冻(-35°C)，并且冷冻干燥。

二氯甲烷是一种在 PLA/PLGA 纳米粒子的制备中使用的经典溶剂。然而，还可以使用乙酸乙酯或者二氯甲烷与乙酸乙酯的混合物。但是，某些抗衡离子不溶于乙酸乙酯。在这些情况下，乙酸乙酯不适合作为制备 PLA/PLGA 纳米粒子的溶剂。

测试所制得的制剂的再悬浮性、粒度、药物载荷(理论)和药物含量。

如果在用水重建冷冻干燥的纳米粒子之后观察到均匀和稳定的胶体系统，则认为制得的纳米微粒制剂是适合的。在视觉上评价纳米粒子的再悬浮性。因此，用水重建包含冻干制剂的管形瓶中的内容物至初始体积(2 ml)，并且轻轻振荡该管形瓶 2~4 min。适宜的重建制剂变成乳白色液体而没有可见的附聚物或沉淀。丢弃包含可见附聚物或沉淀物的样品。

通过光子关联能谱法(PCS)测量纳米粒子的尺寸，其中将重建制剂的等分 (50 μl)移至包含 3 ml 双蒸水的 Nanosizer 试管中。振荡该管而后将其插入到 Coulter N4MD Nanosizer (Coulter Electronics, 英国)中。工作参数为:

散射角: 90°

温度: 25℃

粘度: 0.01 泊

折射率 1.333

在过滤步骤之后的反应混合物中或者在重建之后的冻干制剂中测量药物载荷。确定药物载荷的方法包括: 通过超滤分离纳米粒子和随后通过分光光度测定法定量分析滤出液中的游离药物。

为了确定纳米微粒制剂的药物载荷，在 1 ml 水中重建具有冻干制剂的管形瓶中的内容物; 将 400 μl 移至微量离心机过滤器(Microcon 30 kDa, Millipore)中，并且在 16,000 rpm 通过离心 50 min 分离纳米粒子。将 100 μl 澄清滤出液移至包含 3 ml 双蒸水的比色杯中，并且通过使用分光光度计(Spectronics Heλios, Thermospectronic, 英国)测量相对水的在 480 nm 的吸光度。使用适当的校准曲线确定样品中的药物浓度。

计算相对药物载荷(占总药量的%)如下:

药物载荷% = $\frac{Ci-Cf}{Ci}\times 100\%$，其中

Ci = 聚合介质中的初始药物浓度(mg/ml);

Cf = 滤出液中的药物浓度(mg/ml).

确定药物含量(mg/管形瓶)的方法为在完全溶解冻干制剂之后的定量分析。使用校准曲线通过分光光度测定法测量溶液中该药物的浓度。

为了确定药物含量，在 2 ml 二甲亚砜中溶解具有冻干制剂的管形瓶中的内容物(3 h, 环境温度)；将 100 μl 该溶液移至包含 3 ml 双蒸水的分光光度计的比色杯中，并且使用分光光度计(Spectronics Heλios; Thermospectronic, 英国)测量相对水在 480 nm 的吸光度。使用适当校准曲线确定样品中的药物浓度。

制备实施例 1

通过高压均化-溶剂蒸发技术制备纳米粒子。将 250 mg 聚合物(PLGA 75:25, MW 90,000~126,000 Da)和 25 mg 多柔比星溶于 5 ml 二氯甲烷中。将该有机相注入至搅拌过的包含作为稳定剂的 0.5%的 PVA 水溶液(25 ml)中，并且使用 Ultra-Turrax T-25 乳化该混合物(2 min; 15,100 rpm)。使用高压均化器(APV Micron Lab 40)在 400 bar 下进一步均质所生成的初乳剂。在减压下蒸发二氯甲烷(旋转式蒸发器 BUCHI R-200)。该生成的纳米悬浮液通过烧结玻璃滤器过滤并且在加入 5% w/v 作为防冻剂的甘露醇之后冷冻干燥。该冻干制剂是完全可再悬浮的。通过 PCS 测量的粒度为 140~220 nm，多柔比星载荷为 40%。

制备实施例 2

通过复乳剂技术制备纳米粒子。将 500 mg 聚合物(具有酸性端基的 PLGA, 固有粘度: η=0.20 dL/g)溶于 3 ml 二氯甲烷中。将 25 mg 多柔比星盐酸盐溶解于 2ml 0.001N HCl 中。将该水溶液注入至所述有机相中，并且使用 Ultra-Turrax T-25 乳化该混合物(2 min; 19,500 rpm)。将该生成的初乳剂注入至 25 ml 1%的 PVA 水溶液中，并且利用 Ultra-Turrax T-25 再次均化该混合物，而后在 600 bar 下三次通过高压均化器(APV Micron Lab 40)。通过在环境温度搅拌该乳剂 3 h 而蒸发二氯甲烷。该生成的纳米悬浮液通过烧结玻璃滤器过滤并且在加入 5% w/v 作为防冻

剂的甘露醇之后冷冻干燥。该冻干制剂是完全可再悬浮的。通过 PCS 测量的粒度为 110~160 nm，多柔比星载荷为 75%。

制备实施例 3

通过复乳剂技术制备纳米粒子。将 500 mg 聚合物(PLGA 75:25, MW 90,000~126,000 Da)溶于 3 ml 二氯甲烷中。将 25 mg 多柔比星盐酸盐溶解于 2ml 0.001N HCl 中。将该水溶液注入至所述有机相中，并且使用 Ultra-Turrax T-25 乳化该混合物(2 min; 19,500 rpm)。将该生成的初乳剂注入至 25 ml 1%的 PVA 水溶液中，并且利用 Ultra-Turrax T-25 再次均化该混合物，而后在 600 bar 下四次通过高压均化器(APV Micron Lab 40)。通过在环境温度下搅拌该乳剂 3 h 而蒸发二氯甲烷。该生成的纳米悬浮液通过烧结玻璃滤器过滤并且在加入 5% w/v 作为防冻剂的甘露醇之后冷冻干燥。该冻干制剂是完全可再悬浮的。通过 PCS 测量的粒度为 160~330 nm，多柔比星载荷为 47%。

制备实施例 4

通过复乳剂技术制备纳米粒子。将 500 mg 聚合物(PLA, η=0.36 dL/g)溶于 3 ml 二氯甲烷中。将 25 mg 多柔比星盐酸盐溶解于 2ml 0.001N HCl 中。将该水溶液注入至所述有机相中，并且使用 Ultra-Turrax T-25 乳化该混合物(2 min; 19,500 rpm)。将该生成的初乳剂注入至 25 ml 1%的 PVA 水溶液中，并且利用 Ultra-Turrax T-25 再次均化该混合物，而后在 600 bar 下四次通过高压均化器(APV Micron Lab 40)。通过在环境温度下搅拌该乳剂 3 h 而蒸发二氯甲烷。该生成的纳米悬浮液通过烧结玻璃滤器过滤并且在加入 5% w/v 作为防冻剂的甘露醇之后冷冻干燥。该冻干制剂是完全可再悬浮的。通过 PCS 测量的粒度为 126~210 nm，多柔比星载荷为 42%。

制备实施例 5

通过复乳剂技术制备纳米粒子。将 500 mg 聚合物(具有酸型端基的 PLGA, η=0.20 dL/g)溶于 3 ml 二氯甲烷中。将 25 mg 多柔比星盐酸盐溶解于 2ml 0.001N HCl 中。将该水溶液注入至所述有机相中，并且使用 Ultra-Turrax T-25 乳化该混合物(2 min; 19,500 rpm)。将该生成的初乳剂注入至 25 ml 1%的 PVA 水溶液中，并且利用 Ultra-Turrax T-25 再次均化该混合物，而后在 600 bar 下三次通过高压均化器(APV Micron Lab 40)。通过在环境温度下搅拌该乳剂 3 h 而蒸发二氯甲烷。该生成的纳米悬浮液通过烧结玻璃滤器过滤并且在加入 5% w/v 作为防冻剂的甘露醇之后冷冻干燥。该冻干制剂是完全可再悬浮的。通过 PCS 测量的粒度为 140~200 nm，多柔比星载荷为 73%。

制备实施例 6

通过复乳剂技术制备纳米粒子。将 500 mg 聚合物(具有酸性端基的 PLGA 50:50, η=0.20 dL/g)溶于 3 ml 二氯甲烷中。将 25 mg 多柔比星盐酸盐溶解于 2ml 0.001N HCl 中。将该水溶液注入至所述有机相中，并且使用 Ultra-Turrax T-25 乳化该混合物(2 min; 19,500 rpm)。将该生成的初乳剂注入至 25 ml 1%的 PVA 水溶液中，利用 Ultra-Turrax T-25 再次均化该混合物，而后在 600 bar 下三次通过高压均化器(APV Micron Lab 40)。通过在环境温度下搅拌该乳剂 3 h 而蒸发二氯甲烷。该生成的纳米悬浮液通过烧结玻璃滤器过滤并且在加入 5% w/v 作为防冻剂的甘露醇之后冷冻干燥。该冻干制剂是完全可再悬浮的。通过 PCS 测量的粒度为 130~190 nm，多柔比星载荷为 67%。

制备实施例 7

通过复乳剂技术制备纳米粒子。将 500 mg 聚合物(具有酸性端基的 PLGA 50:50, η=0.20 dL/g)溶于 3 ml 二氯甲烷中。将 50 mg 多柔比星盐酸盐溶解于 2ml 0.001N HCl 中。将该水溶液注入至所述有机相中，并

且使用 Ultra-Turrax T-25 乳化该混合物(2 min; 20,100 rpm)。将该生成的初乳剂注入至 25 ml 1%的 PVA 水溶液中，利用 Ultra-Turrax T-25 再次均化该混合物，而后在 600 bar 下四次通过高压均化器(APV Micron Lab 40)。通过在环境温度下搅拌该乳剂 3 h 而蒸发二氯甲烷。该生成的纳米悬浮液通过烧结玻璃滤器过滤并且在加入 5% w/v 作为防冻剂的甘露醇之后冷冻干燥。该冻干制剂是完全可再悬浮的。通过 PCS 测量的粒度为 125~185 nm，多柔比星载荷为 69%。

制备实施例 8

通过复乳剂技术制备纳米粒子。将 500 mg 聚合物(具有酸型端基的 PLGA 50:50, η=0.20 dL/g)溶于 3 ml 二氯甲烷中。将 25 mg 多柔比星盐酸盐溶解于 2ml 0.001N HCl 中。将该水溶液注入至所述有机相中，并且使用 Ultra-Turrax T-25 乳化该混合物(2 min; 22,600 rpm)。将该生成的初乳剂注入至 25 ml 1%的 HSA 水溶液中，并且利用 Ultra-Turrax T-25 再次均化该混合物，而后在 600 bar 下四次通过高压均化器(APV Micron Lab 40)。通过在环境温度下搅拌该乳剂 3 h 而蒸发二氯甲烷。该生成的纳米悬浮液通过烧结玻璃滤器过滤并且在加入 5% w/v 作为防冻剂的甘露醇之后冷冻干燥。该冻干制剂是完全可再悬浮的。通过 PCS 测量的粒度为 100~200 nm，多柔比星载荷为 40%。

制备实施例 9

通过高压均化-溶剂蒸发技术制备纳米粒子。将 250 mg 聚合物(PLA, MW 90,000~126,000 Da)和 15.1 mg 十六烷基磷酸酯溶于 4 ml 二氯甲烷中。将 21.8 mg 多柔比星盐酸盐溶解于 2 ml 水中。混合该有机溶液和水溶液并且在环境温度下保温 12 h。然后将该混合物注入至搅拌过的包含 1%的作为稳定剂的 HSA 水溶液(25 ml)中，并且使用 Ultra-Turrax T-25 乳化该混合物(2 min; 19,100 rpm)。该生成的初乳剂在 600 bar 下四

次通过高压均化器(APV Micron Lab 40)。在减压下蒸发二氯甲烷(旋转式蒸发器 BUCHI R-200)。该生成的纳米悬浮液通过烧结玻璃滤器过滤并且在加入 5% w/v 作为防冻剂的甘露醇之后冷冻干燥。该冻干制剂是完全可再悬浮的。通过 PCS 测量的粒度为 160~240 nm，多柔比星载荷为 60%。

制备实施例 10

通过复乳剂技术制备纳米粒子。将 500 mg 聚合物(具有酸型端基的 PLGA 50:50, η=0.20 dL/g)溶于 3 ml 二氯甲烷中。将 25 mg 多柔比星盐酸盐溶解于 2ml 0.001N HCl 中。将该水溶液注入至所述有机相中，并且使用 Ultra-Turrax T-25 乳化该混合物(2 min; 19,900 rpm)。将该生成的初乳剂注入至 25 ml 1%的 TGPS 水溶液中，并且利用 Ultra-Turrax T-25 再次均化该混合物，而后在 600 bar 下四次通过高压均化器(APV Micron Lab 40)。通过在环境温度下搅拌该乳剂 3 h 而蒸发二氯甲烷。该生成的纳米悬浮液通过烧结玻璃滤器过滤并且在加入 5% w/v 作为防冻剂的甘露醇之后冷冻干燥。该冻干制剂是完全可再悬浮的。通过 PCS 测量的粒度为 300~380 nm，多柔比星载荷为 45%。

制备实施例 11

通过高压均化-溶剂蒸发技术制备纳米粒子。将 250 mg 聚合物(PLA, 0.34 dL/g)和 21.2 mg 胆甾醇硫酸酯钾溶于 5 ml 氯仿中。将 21.8 mg 多柔比星盐酸盐溶解于 2 ml 水中。混合该有机溶液和水溶液并且在环境温度下保温 12 h。然后将该混合物注入至搅拌过的包含 1%的作为稳定剂的 PVA 水溶液(23 ml)中，并且使用 Ultra-Turrax T-25 乳化该混合物(2 min; 19,100 rpm)。该生成的初乳剂在 600 bar 下四次通过高压均化器(APV Micron Lab 40)。在减压下蒸发二氯甲烷(旋转式蒸发器 BUCHI R-200)。该生成的纳米悬浮液通过烧结玻璃滤器过滤并且在加入 5%

w/v 作为防冻剂的甘露醇之后冷冻干燥。该冻干制剂是完全可再悬浮的。通过 PCS 测量的粒度为 500~600 nm，多柔比星载荷为 89%。

制备实施例 12

通过高压均化-溶剂蒸发技术制备纳米粒子。将 250 mg 聚合物(PLA, 0.34 dL/g)和 22.9 mg D-α-维生素 E 琥珀酸酯溶于 5 ml 氯仿中。将 25.4 mg 多柔比星盐酸盐溶解于 2 ml 水中。混合该有机溶液和水溶液并且在环境温度下保温 12 h。然后将该混合物注入至搅拌过的包含 0.5%的作为稳定剂的 PVA 水溶液(23 ml)中，并且使用 Ultra-Turrax T-25 乳化该混合物(2 min; 23,600 rpm)。该生成的初乳剂在 600 bar 下四次通过高压均化器(APV Micron Lab 40)。在减压下蒸发氯仿(旋转式蒸发器 BUCHI R-200)。该生成的纳米悬浮液通过烧结玻璃滤器过滤并且在加入 5% w/v 作为防冻剂的甘露醇之后冷冻干燥。该冻干制剂是完全可再悬浮的。通过 PCS 测量的粒度为 224~368 nm，多柔比星载荷为 50%。

制备实施例 13

通过高压均化-溶剂蒸发技术制备纳米粒子。将 250 mg 聚合物(PLA, 0.34 dL/g)和 14.9 mg 十六烷基磷酸酯溶于 5 ml 氯仿中。将 24.5 mg 多柔比星盐酸盐溶解于 2 ml 水中。混合该有机溶液和水溶液并且在环境温度下保温 12 h。然后将该混合物注入至搅拌过的包含 0.5%的作为稳定剂的 PVA 水溶液(23 ml)中，并且使用 Ultra-Turrax T-25 乳化该混合物(2 min; 23,600 rpm)。该生成的初乳剂在 600 bar 下四次通过高压均化器(APV Micron Lab 40)。在减压下蒸发氯仿(旋转式蒸发器 BUCHI R-200)。该生成的纳米悬浮液通过烧结玻璃滤器过滤并且在加入 5% w/v 作为防冻剂的甘露醇之后冷冻干燥。该冻干制剂是完全可再悬浮的。通过 PCS 测量的粒度为 200~250 nm，多柔比星载荷为 53%。

制备实施例 14

通过复乳剂技术制备纳米粒子。将 500 mg 聚合物(具有酸型端基的 PLGA 50:50, η=0.67 dL/g)溶于 3 ml 二氯甲烷中。将 20 mg 多柔比星盐酸盐和 45 mg γ-环糊精溶解于 3 ml 水中。将该水溶液注入至所述有机相中，并且使用 Ultra-Turrax T-25 乳化该混合物(2 min; 23,600 rpm)。将该生成的初乳剂注入至 25 ml 0.5%的 PVA 水溶液中，并且利用 Ultra-Turrax T-25 再次均化该混合物，而后在 600 bar 下四次通过高压均化器(APV Micron Lab 40)。通过在环境温度下搅拌该乳剂 3 h 而蒸发二氯甲烷。该生成的纳米悬浮液通过烧结玻璃滤器过滤并且在加入 5% w/v 作为防冻剂的甘露醇之后冷冻干燥。该冻干制剂是完全可再悬浮的。通过 PCS 测量的粒度为 200~250 nm，多柔比星载荷为 44%。

2.动物研究

原位肿瘤模型系统。实验系统基于在大鼠颅内植入的 101/8 成胶质细胞瘤。该肿瘤最初由将α-二甲基苯蒽(DMBA)片剂局部注入 Wistar 大鼠小脑中而产生并且通过连续通道保持向大脑内植入。为了长期贮藏，–196℃下保存该肿瘤组织并且通过向大鼠脑部注入而增殖。

101/8 成胶质细胞瘤先前被用于使用载有多柔比星的表面经修饰的聚(氰基丙烯酸丁酯纳米粒子)的实验性的化学疗法。该肿瘤具有稳定的单形结构并且显示出特有的具有在脑部软组织中快速弥蔓性生长和相当低的坏死趋向的浸润性成胶质细胞瘤的组织学照片。该肿瘤的可移植率(transplantation)约为 100%，得出了在接种之后可预见的无症状的生存期。在本研究中使用新鲜肿瘤组织进行 101/8 成胶质细胞瘤的移植。选择该技术以保留母瘤的主要典型特征，尤其是其抗原结构和分化。

重量为 200~250 g 的成年雄性 Wistar 大鼠驯化 1 周并且 5 只为一组笼养。用标准实验室的食物和水无限制地喂养。为了肿瘤植入，通

过腹膜内注射戊巴比妥(50 mg/kg)使动物深度麻醉。通过中线矢状切口，使用牙钻在右冠状缝后面 2 mm 和矢状中线侧面 2 mm 的点形成直径为 1.5 mm 的钻孔。将冷冻保藏的肿瘤材料(约 10^6 个细胞)引入至与 21-计量注射针连接的结核菌素注射器中。尖端置于骨表面以下 4 mm 并且注射肿瘤组织至右侧脑室的底部。缝合或用胶封闭头皮切口。在形成明显的疾病临床症状(通常 14 天)之后，通过二氧化碳窒息处死动物，然后断头。立即取出脑部。切除肿瘤并用解剖刀剁碎；如上所述，将肿瘤植入物(5 mg)接种到新的实验动物的脑中。通过重复的预实验确定适合的条件并改进技术。

用于动物试验的纳米粒子基于具有酸性端基的低分子 PLGA 50:50(η = 0.20 dL/g)，并且采用多柔比星盐酸盐而载有多柔比星。采用 1:10 的药物与聚合物的比例用于制备载有多柔比星的 PLGA 纳米粒子。测量粒度为 144±12 nm，多柔比星载荷为 75.5%。

为了制得包覆表面活性剂的粒子，在 1%的任一表面活性剂(普卢兰尼克® F68, 普卢兰尼克® P85 和聚山梨酯 80)水溶液中再悬浮冻干制剂。然后在搅拌下使该生成的制品保温 30 min 并在 2 h 内使用。

将患肿瘤的大鼠随机分成六组(n = 10)并且接受以下制剂中的一种：1)未处理的对照；2)盐水中的多柔比星(DOX)；3) 1% 普卢兰尼克® F68 中的多柔比星(DOX /F68)；4)载有多柔比星的 PLGA 纳米粒子(DOX-PLGA)；5)载有多柔比星的用普卢兰尼克® F68 包覆的 PLGA 纳米粒子 (DOX-PLGA/F68)；6)载有多柔比星的用聚山梨酯 80 包覆的 PLGA 纳米粒子 (未显示)；7)载有多柔比星的用普卢兰尼克® P85 包覆的 PLGA 纳米粒子 (图 1 中未显示结果)。

使用以下给药方案将这些制品静脉注射至尾静脉：在肿瘤植入之后的第 2、5 和 8 天以 3 x 1.5 mg/kg 给药。

在处理后 100 天跟踪观察动物；然后将存活动物处死并解剖。结果显示于图 1 中。

在对照组中，所有动物在肿瘤植入之后 19 天内死亡。载有多柔比星的用泊洛沙姆 188 包覆的 PLGA 纳米粒子相当大地提高了患肿瘤大鼠的存活率：40%的动物(4/10)存活 100 天。在将多柔比星溶于 1%的泊洛沙姆 188 溶液中处理的组中，仅一只动物存活。通过形态学检查确定这些动物中没有肿瘤。

与用载有多柔比星的泊洛沙姆 188 包覆的 PLGA 纳米粒子得到的结果相比，用聚山梨糖醇酯 80 或普卢兰尼克® P85 的载有多柔比星的纳米粒子的涂层没有提高纳米粒子结合多柔比星的功效(数据未显示)。

在第二套实验中，研究了含有基于具有酸型端基的 PLGA(PLGA-COOH)的载有多柔比星的 PLGA 纳米粒子并且包含作为稳定剂的 TPGS(Dox/PLGA-COOH/TPGS;制备实施例 10)或用 TPGS 包覆(Dox/PLGA-COOH+TPGS)的制剂对患 101/8 成胶质细胞瘤大鼠的体内作用。在将纳米粒子注射至动物之前，通过在 0.5% TPGS 中再悬浮根据制备实施例 5 的纳米粒子制得后一制剂。

该套实验的结果显示于图 2 中。可以看出，根据制备实施例 10 的纳米粒子，即包含作为稳定剂的 TPGS，相当大地增加了患肿瘤大鼠的存活时间并且使 20%的用于本实验的患肿瘤大鼠长期存活。根据制备实施例 5(其使用前用 TPGS 包覆)的纳米粒子没有效果。

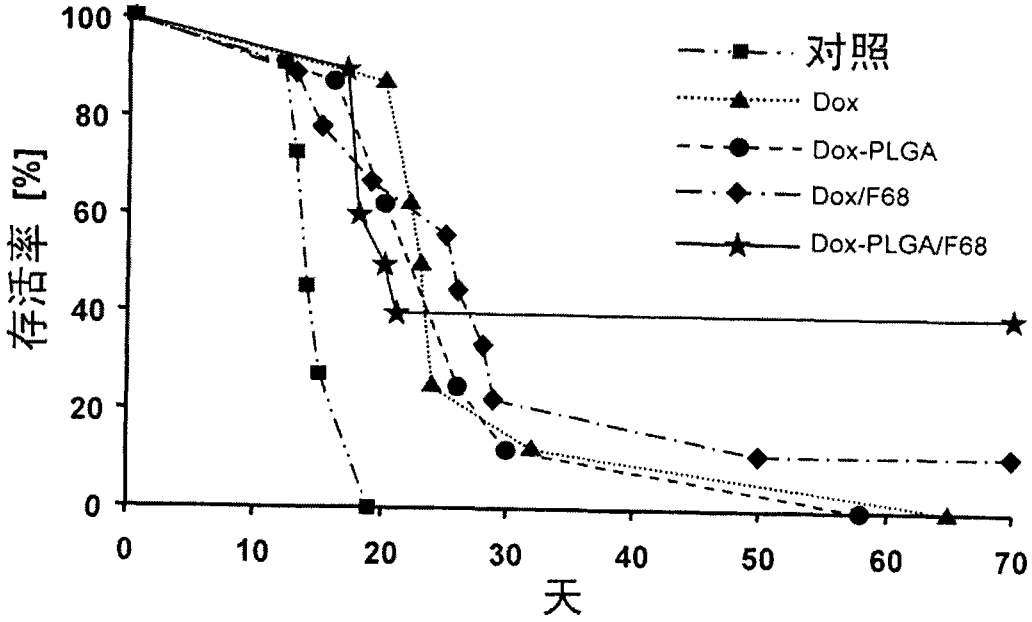
100
80
60
40
20
0
存活率 [%]
0
10
20
30
40
50
60
70
天
对照
Dox
Dox-PLGA
Dox/F68
Dox-PLGA/F68

图 1

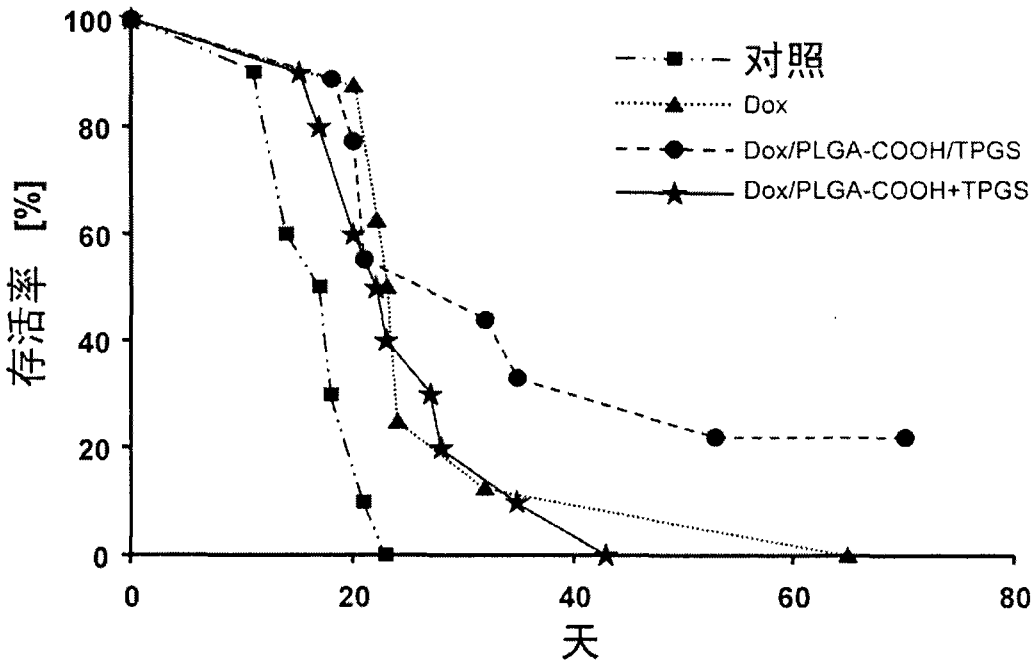
100
80
60
40
20
0
存活率 [%]
0
20
40
60
80
天
对照
Dox
Dox/PLGA-COOH/TPGS
Dox/PLGA-COOH+TPGS

图 2