



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101909614 B

(45) 授权公告日 2015. 04. 15

(21) 申请号 200880122577. 2

(22) 申请日 2008. 12. 23

(30) 优先权数据
2527/MUM/2007 2007. 12. 24 IN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2010. 06. 24

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/IN2008/000857 2008. 12. 23

(87) PCT国际申请的公布数据
W02009/087678 EN 2009. 07. 16

(73) 专利权人 太阳医药高级研发有限公司
地址 印度孟买

(72) 发明人 埃杰伊·杰伊辛·库帕德
撒布哈斯·巴拉姆·博米克
N·阿鲁苏达尔

(74) 专利代理机构 广州华进联合专利商标代理
有限公司 44224
代理人 郑小粤

(51) Int. Cl.
A61K 31/337(2006. 01)
A61K 9/10(2006. 01)
A61K 9/51(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 0121174 A1, 2001. 03. 29, 权利要求
1-12.
WO 03077882 A2, 2003. 09. 25, 权利要求 1、
10-11 和 13-15.
WO 2004039351 A2, 2004. 05. 13, 权利要求
1、2、47-8、14 和 20-21.
US 20060188566 A1, 2006. 08. 24, 权利要求
6、实施例 8、说明书第 122 和 141 段。
WO 2007069272 A2, 2007. 06. 21, 权利要求
1、2、13-17、19、28 和 30、说明书第 23 页第 15-21
行。

审查员 王芳菲

权利要求书1页 说明书34页 附图4页

(54) 发明名称
纳米分散体

(57) 摘要

本发明提供了一种纳米分散体,所述纳米分散体包括具有平均大小小于 300nm 的分散于包括水溶性溶剂和水的载体中的纳米粒子,所述纳米粒子包括一种或多种紫杉烷衍生物,聚合物和表面活性剂,所述表面活性剂包括脂肪酸或它的盐和固醇或它的衍生物或它的盐的混合物。

1. 一种纳米分散体,所述纳米分散体包括具有平均大小小于 300nm 的分散于载体中的纳米粒子,所述载体包括水溶性溶剂和水,所述纳米粒子由一种或多种紫杉烷衍生物、水溶性聚合物和包含辛酸和胆固醇硫酸酯的混合物的表面活性剂组成,其中所述紫杉烷衍生物选自紫杉醇或多烯紫杉醇,所述纳米分散体在室温下至少稳定 4 小时,没有紫杉烷衍生物的聚集或结晶。

2. 根据权利要求 1 所述的纳米分散体,其中表面活性剂与紫杉烷衍生物的比例是 1 :5 至 1 :10。

3. 根据权利要求 1 所述的纳米分散体,其中表面活性剂与紫杉醇的比例是 1 :5 至 1 :10,并且其中所述纳米分散体在室温下稳定 24 小时。

4. 根据权利要求 1 所述的纳米分散体,其中表面活性剂与多烯紫杉醇的比例是 1 :10,并且其中所述纳米分散体在室温下稳定 8 小时。

5. 根据权利要求 1 所述的纳米分散体,其中所述纳米粒子的平均大小的范围在 10nm 至 200nm 之间。

6. 根据权利要求 1 所述的纳米分散体,其中所述水溶性溶剂选自乙醇,二醇类,聚亚烷基二醇类,丙三醇,四氢呋喃聚乙二醇醚,和它们的混合物。

7. 根据权利要求 6 所述的纳米分散体,其中所述水溶性溶剂选自由乙醇和聚乙二醇组成的组。

8. 根据权利要求 1 所述的纳米分散体,其中所述水溶性聚合物选自由聚乙烯吡咯酮和聚乙二醇组成的组。

9. 根据权利要求 8 所述的纳米分散体,其中使用的聚乙烯吡咯酮具有 1000 至 50,000 范围的分子量,并以 0.001% w/v 至 10% w/v 的用量范围使用。

10. 根据权利要求 1 所述的纳米分散体,其中所述表面活性剂的用量范围在 0.001% w/v 至 5.0% w/v 之间。

11. 一种由紫杉烷衍生物、水溶性聚合物和包含辛酸和胆固醇硫酸酯的混合物的表面活性剂组成的溶液,其中所述紫杉烷衍生物选自紫杉醇或多烯紫杉醇,在用水性液体载体稀释所述溶液时获得纳米分散体,其中所述纳米分散体在室温下至少稳定 4 小时,没有紫杉烷衍生物的聚集或结晶。

12. 粒子平均大小小于 300nm 的纳米粒子,所述纳米粒子由紫杉烷衍生物、水溶性聚合物和包含辛酸和胆固醇硫酸酯的混合物的表面活性剂组成,其中所述紫杉烷衍生物选自紫杉醇或多烯紫杉醇,其中所述纳米分散体在室温下至少稳定 4 小时,没有紫杉烷衍生物的聚集或结晶。

纳米分散体

技术领域

[0001] 本发明涉及一种紫杉烷衍生物的‘纳米分散体’和它的制备方法。

背景技术

[0002] 有许多药物在水溶液中难溶或不溶。这些药物面临的挑战是具有较差的口服药物生物利用度或将它们配制为特别是通过静脉途径的药物输送。如果药物通过静脉给药，颗粒必须足够小以安全地通过毛细管而不会引起栓塞。为了静脉给药，以溶液，乳剂，脂质体，纳米分散体等形式进行给药被认为是安全的。另一个应该满足的要求是，当配制特别是疏水性药物的药物输送系统时，配方应该是物理稳定的而且在室温储存需要的时间内基本没有药物的聚合或结晶或配方外观的变化。

[0003] 难溶药物的一个例子包括紫杉烷衍生物，对于它们的抗癌活性是已知的。紫杉烷衍生物或紫杉烷是主要来源于 Western Yew, *Taxus brevifolia* 的树皮的复杂的二萜类化合物的天然产物并基本上具有紫杉烷结构。已经使用紫杉烷类制备各种化疗药物。目前，两种紫杉烷衍生物紫杉醇和多烯紫杉醇作为有效的抗癌剂可商业获得。

[0004] 紫杉烷衍生物在水和大多数药物可接受的溶剂中显示了非常差的溶解性，从而限制了它们对病人的给药。由于这一不利的固有特性，紫杉酚注射剂—商业上的紫杉醇注射剂被配制为在 Cremophor™EL (聚氧乙烯蓖麻油) 和无水乙醇中的非水溶液。然而，大量使用的像 Cremophor™EL 的增溶剂导致例如严重的或致命的过敏和高血压反应，缓慢心律失常，贫血，嗜中性白血球减少症和 / 或外周神经病变的各种不良反应。因此，服用紫杉醇的所有病人术前服用类固醇，抗组胺类和 H2 受体拮抗剂，并且随后紫杉醇仅仅在至少 3 小时或更长的时间内被非常缓慢地注入。

[0005] 考虑到与紫杉酚配方有关的这些问题，研究人员已经尝试制备不使用 Cremophor EL 的紫杉酚配方。

[0006] 美国第 6537570 号专利描述了基本不溶于水的例如紫杉醇的生理活性剂的组合物，其中所述生理活性剂以涂覆有蛋白质（其作为稳定剂）的悬浮粒子的形式存在。特别地，蛋白质和生理活性剂在没有任何的传统表面活性剂且同样没有任何的将粒子聚合的核心材料的生物相容性分散介质中受到高剪切力。该方法得到的粒子的直径约小于 1 微米。根据这一方法产生的特定系统可以被转化为包括涂覆有蛋白质的水不溶性药物的纳米粒子的再分散性干燥粉末，并且游离蛋白质与药理剂分子键合。

[0007] 美国第 6017948 号专利涉及一种组合物，所述组合物包括以药物可接受的，水混溶性的，非水溶剂（像 N-甲基吡咯酮）的紫杉醇溶液形式的紫杉醇并且还包含药物可接受的增溶剂（例如甘油醋酸酯），并规定聚氧乙烯蓖麻油 (Cremophor) 被排除在所述组合物以外。在一个优选实施例中，使用大量溶剂，例如 4000mg 的 NMP (例 1) 或 2000mg 的 NMP 和 2000mg 的乙醇的混合物 (例 2) 在适度搅拌下溶解 10mg 的紫杉醇。如果治疗有效量的药物通过这类组合物进行输送，它将在人体内输入过多量的乙醇，非水溶剂或增溶剂。

[0008] 美国第 6046230 号专利涉及一种稳定的注射剂配方，所述配方含有紫杉醇和两种

增溶剂——氧乙烯山梨醇油酸酯 (oxyethylene sorbitol oleate) 和 (氧乙烯乙二醇)₁₅₋₂₀ 脂肪酸单酯以及例如聚乙烯吡咯酮和聚乙二醇的其它成分。用于配方中的主要增溶剂聚乙氧基山梨醇油酸聚酯 (polyethoxylated sorbitol oleic polyester) 是来源于棕榈油的油酸的环氧乙烷加成产物, 其具有在低于 10°C 的温度下凝固的固有特性, 这使得它单独使用时不适合于紫杉醇的溶解。然而, 当与辅助增溶剂聚乙二醇单脂肪酸酯混合时, 这两种增溶剂一起显示了在水中和在无水乙醇中的良好的溶解性, 并且它们甚至在低温时仍存在于液相中。因此, 这两种增溶剂必须一起使用。此外, 满足所期望的特性的这两种增溶剂的 HLB 值应当高达 15 且不低于 13, 这是一个基本标准。获得的配方是一种溶液。

[0009] PCT 第 WO 2006/133510 号申请公开了一种注射给药的液体药物配方, 所述配方包括多烯紫杉醇或其药物可接受的盐; 一种或多种乙二醇和药物可接受的非水溶剂系统, 其中所述配方具有 2.5 至 7.0 范围内的 pH 值读数。这一发明的实施例涉及非常高用量的表面活性剂 (大约 25% v/v 的聚山梨醇酯 80 或 30% v/v 的 Cremophor), 它反过来可能引起毒副作用。这一申请没有公开所述配方的功效和毒性曲线。此外, 由 '510 申请所公开的所述配方是非水溶剂系统中的药物溶液, 在与输液稀释剂 (0.9% 的 NaCl 或 5% 的葡萄糖溶液) 混合时配制输液溶液。新型的药物输送系统或纳米分散体在此方法不能形成。此外, 在用输液稀释剂进行稀释之后, 该配方溶液的稳定性非常短, 只有 4 至 6 小时, 这就限制了它的给药效率。

[0010] US2002/0058060 (下文称为专利申请 '060) 公开了含有疏水物质和两种具有不同的相变温度的磷脂的脂质体, 并且脂质体形成物质类似胆固醇和亲水性聚合物改性酯。改变所述药物与磷脂和脂质体形成物质的比例以获得不同的脂质体配方。此专利申请 '060 通过使用两种指定类的磷脂进行了配制具有升高的药物: 脂质比例的紫杉醇的脂质体的各种尝试, 使得使用的脂质的总量被减少, 因为在人体内过量脂质的注射导致一定程度的毒性。

[0011] 因此, 显然现有技术中与配制紫杉醇组合物有关的主要问题是紫杉醇的疏水性, 这

[0012] (a) 使得它难于配制含有稳定形式的药物并且在需要的时间内是稳定的基本没有任何的药物聚合或结晶或在配方外观上没有变化的组合物,

[0013] (b) 必须使用大量的增溶剂, 磷脂和表面活性剂。

[0014] 此外, 紫杉醇 (Cremophor 和乙醇中紫杉醇的商业可获得的溶液) 的毒性研究显示如美国第 6753006 号专利中公开的 7.5-12.0mg/kg 的低的 LD₅₀ 值, 这说明以溶液形式给药的药物具有非常低的治疗指数并且在甚至中等剂量就可能显示严重的副作用和毒性反应。

[0015] 因此, 需要存在一种紫杉醇衍生物的注射剂配方, 所述配方

[0016] (a) 避免使用大量的赋形剂,

[0017] (b) 避免使用 Cremophor,

[0018] (c) 通过新型输送系统输送药物, 显示了升高的 LD₅₀ 值, 从而减少了与溶液形式的药物进行给药有关的毒副作用, 和

[0019] (d) 克服了与药物的疏水本质有关的药物限制, 并且在给药和储存过程中需要的时间内所述配方稳定并基本没有药物聚合或结晶或配方外观上的变化。

[0020] 我们已经开发了一种纳米分散体, 所述纳米分散体包括具有平均大小小于 300nm

的分散于包括水混溶性溶剂和水的载体中的纳米粒子,所述纳米粒子包括紫杉烷衍生物,聚合物和低量的表面活性剂。本发明提供了一种避免使用 Cremophor 的配方,其包括使用量大大减少的添加剂(磷脂)并以纳米粒子的形式输送药物,从而减少了与药物给药有关的毒性反应和副作用。所观察到的本发明的配方的 LD₅₀值是 342.5mg/kg,其大大高于美国第 6753006 号专利中公开的市售 TAXOL[®]溶液的 7.5-12.0mg/kg 的 LD₅₀值。此外,本发明的配方在给药和储存所需要的时间内是稳定的而基本没有药物的聚合或结晶或配方外观的变化。

[0021] 发明目的

[0022] 本发明的一个目的是提供一种紫杉烷衍生物的纳米分散体,所述纳米分散体在注射途径给药之前和过程中所需要的时间内是稳定的。

[0023] 本发明的另一个目的是提供一种纳米分散体,所述纳米分散体在室温下储存超过 4 小时没有聚合迹象或外观没有变化。

[0024] 本发明的又一个目的是提供一种紫杉烷衍生物的预浓缩剂,所述预浓缩剂是化学稳定的并在室温下储存至少 3 个月没有聚合迹象或外观没有变化,并且当用水溶液液体载体稀释时提供了稳定的纳米分散体。

[0025] 本发明的再一个目的是提供一种具有两个容器的试剂盒,第一个容器包括水混溶性溶剂中的紫杉烷衍生物的预浓缩剂,并且第二个容器包括水溶液的液体载体,使得第二个容器的内含物添加至第一个容器的内含物中时,或与之相反,形成了稳定的纳米分散体,所述纳米分散体适合于仅仅使用适度搅拌或振荡就可以进行静脉给药。

[0026] 本发明的再一个目的是提供一种具有多于两个容器的试剂盒,例如,两个容器,第一容器包括冻干形式的纳米分散体,并且第二容器包括水溶液液体载体,使得第二容器的内含物添加至第一容器的内含物中时,或与之相反,形成了稳定的纳米分散体,所述纳米分散体适合于仅仅使用适度搅拌或振荡就可以进行静脉给药。

[0027] 本发明的又一个目的是提供一种治疗癌症的方法,所述方法包括将所述纳米分散体组合物给药给需要的病人。

发明内容

[0028] 本发明提供了一种纳米分散体,所述纳米分散体包括具有平均大小小于 300nm 的分散于包括水溶性溶剂和水的载体中的纳米粒子,所述纳米粒子包括一种或多种紫杉烷衍生物,聚合物和表面活性剂,所述表面活性剂包括由脂肪酸或它的盐和固醇或它的衍生物或它的盐组成的混合物。

[0029] 本发明还提供了一种溶液,所述溶液包括一种或多种紫杉烷衍生物,聚合物和表面活性剂,所述表面活性剂包括在水溶性溶剂中的脂肪酸或它的盐和固醇或它的衍生物或它的盐组成的混合物,当用水溶液液体载体稀释时产生纳米分散体。

[0030] 本发明还提供了一种颗粒平均大小小于 300nm 的纳米粒子,所述纳米粒子包括紫杉烷衍生物,表面活性剂,所述表面活性剂包括固醇或它的衍生物或它的盐和脂肪酸或它的盐的混合物以及聚合物。

附图说明

[0031] 图 1 表示根据例 27 中详细描述的研究对照样品,参考样品(**ABRAXANE[®]**)和试验样品(本发明的例 12a 的组合物)在 Balb/c 雌性裸鼠中植入人类乳腺肿瘤异种移植(MX-I)的随着时间(以天计)的肿瘤体积变化的对照说明。

[0032] 图 2 表示根据例 28 中详细描述的研究对照样品,参考样品(**ABRAXANE[®]**)和试验样品(本发明的例 9 的组合物)在 Athymic 雌性裸鼠中植入人类乳腺肿瘤异种移植(MX-I)的随着时间(以天计)的肿瘤体积变化的对照说明。

[0033] 图 3 表示根据例 29 中详细描述的研究对照样品,试验样品(本发明的例 9 的组合物)和两组参考样品(**ABRAXANE[®]**和 **ONCOT AXEL[®]**) 在 Athymic 雌性裸鼠中植入人类结肠肿瘤异种移植(HT-29)的随着时间(以天计)的肿瘤体积变化的对照说明。

[0034] 图 4(a) 的柱状图显示了在起始时间例 9 的纳米分散体的粒子大小分布,且图 4(b) 的柱状图显示了当室温储存 24 小时例 9 紫杉醇的纳米分散体的粒子大小分布。

[0035] 图 5(a) 的柱状图显示了在起始时间例 24D 的纳米分散体的粒子大小分布,且图 5(b) 的柱状图显示了当室温储存 8 小时例 24D 的多烯紫杉醇的纳米分散体的粒子大小分布。

具体实施方案

[0036] 本发明提供了一种纳米分散体,所述纳米分散体包括具有颗粒平均大小小于 300nm 的分散于包括水溶性溶剂和水的水溶液载体中的纳米粒子,所述纳米粒子包括紫杉烷衍生物,聚合物和表面活性剂,所述表面活性剂包括脂肪酸或它的盐和固醇或它的衍生物或它的盐的混合物。

[0037] 本发明还提供了一种溶液,所述溶液包括紫杉烷衍生物,聚合物和表面活性剂,所述表面活性剂包括在水溶性溶剂中的脂肪酸或它的盐和固醇或它的衍生物或它的盐的混合物,当用水溶液载体稀释时获得纳米分散体。

[0038] 本发明还提供了一种具有颗粒平均大小小于 300nm 的纳米粒子,所述纳米粒子包括紫杉烷衍生物,表面活性剂,所述表面活性剂包括固醇或它的衍生物或它的盐和脂肪酸或它的盐的混合物以及聚合物。本发明的纳米分散体没有像 Cremophor 的毒性赋形剂并涉及使用大量减少的添加剂,所述添加剂是配制稳定的紫杉烷衍生物的纳米分散体所必须的,从而减少了有关的毒性反应。

[0039] 纳米粒子或纳米级粒子本身在有效药物输送方面提供了许多优点。已经认识到,与以药物的自由形式进行给药相比,将药物添加至输送载体或将药物附着于载体可以提供许多优点。在载体中添加药物可以影响组织特异性分布,特别是在某目标组织或病灶中优先积累,使药物靶向对特定细胞类型,减少与血液成分的相互作用,加强保护药物避免过早降解并提高了循环时间。纳米粒子就是这样一种重要的药物输送载体。纳米粒子具有设计特异性,允许它们将较高浓度的药剂输送至需要的位置或作用的靶点(Kayser 等, Current Pharmaceutical Biotechnology, 2005, 6, 3-5 页)。靶向药物输送在许多应用中是重要的,特别是当如果进行全身输送药物的毒性针对的是组织时。在其它有益特点中,靶向药物输送可以帮助消除或至少减少毒副作用并降低所需要的剂量。有不同的方法使药物靶向作用位点。一种非常简单的但实用性有限的方法是在靶位点进行直接注射,例如注射进入肿瘤组织。另一种方法是对不同的给药途径(例如局部输送的转移器具)使用特定的载体系

统,对口服和注射给药使用微球体或纳米粒子。注射途径以外,静脉注射使用的最为频繁。一旦静脉注射给药,粒子被肝脏和脾巨噬细胞识别并优先由肝脏巨噬细胞优先获取。可以使用这一效果将负载了药物的载体靶向至肝脏和脾或通常至巨噬细胞以治疗 MPS(单核吞噬系统)或 RES(网状内皮系统)的感染,并且这一靶向现象通常被称为“被动靶向”。通过用聚乙二醇(PEG)基团或含有例如 Poloxamine908 的聚合物的 PEG 链修饰载体表面可以逃避 MPS/RES 的识别。这增加了当静脉注射时血流中的载体的循环周期。这些正常以及长循环载体可以配有通常被称为配体的靶向基团(外源凝集素或单克隆抗体或像甘露糖/半乳糖等的糖类)。这些配体将含有载体的药物引向需要的携带对所述配体有适当受体的靶细胞。通过使用靶向配体实现的这一位点特定输送包括一种主动过程;因此它同样被称为“主动靶向”。具有特定大小的纳米粒子可以通过使用肿瘤生物学特点的现象被动靶向实体肿瘤。肿瘤组织的血管渗血,渗透性增加和淋巴流向差。相反,与肿瘤组织相比,正常组织中的血管内皮细胞对纳米粒子具有较低的渗透性。这使得纳米载体积聚在肿瘤中。这一效应已知为高渗透性和滞留效应或 EPR 效应(Nanoparticle Technology for drug delivery, edited by Ram B. Gupta 和 Uday B. Kompella, published by Taylor and Francis, 2005, 539 页)。此外,小于 200nm 的纳米粒子更有效地躲避了网状内皮组织系统并保留长时间的循环(Nanoparticle Technology for drug delivery, edited by Ram B. Gupta 和 Uday B. Kompella, published by Taylor and Francis, 2005, 540 页)。

[0040] 在此使用的术语纳米粒子意思是具有受控大小的纳米级的粒子。本发明要求保护的纳米粒子可以是高分子纳米粒子(包埋药物的聚合物基体)和/或高分子纳米颗粒(封装药物的聚合物稳定的纳米大小的颗粒)和/或纳米胶囊(包围药芯中药物的聚合物膜)和/或由表面活性剂稳定的药物的纳米大小粒子,和具有平均大小小于 300nm 的类似物。纳米粒子的粒子大小使用传统的测量方法进行确定并且像 Malvern 粒子大小分析,筛选,光散射光学显微镜,图像分析,沉降和现有技术中本领域技术人员已知的其它方法进行粒子尺寸的分析。粒子大小分布信息可以通过 D_{10} , D_{50} 和 D_{90} 值获得,例如可以通过 Malvern 粒子大小测定产生而不希望受到任何理论的限制,本申请人认为通过包括具有平均大小小于 300nm 的纳米粒子的纳米分散体进行药物输送可以提高药物在靶向肿瘤组织和细胞中的内化(internalization)和积聚。这一增加的内化水平为与癌症有关的肿瘤治疗提供了有效的治疗方案。

[0041] 根据本发明的一个实施例,纳米粒子的粒子尺寸范围在 10nm 至 275nm 之间。在本发明的一个优选实施例中,粒子尺寸小于 200nm。在本发明的最优选实施例中,粒子大小在 10nm 至 200nm 之间。

[0042] 本发明提供了一种纳米分散体,所述纳米分散体包括具有平均大小小于 300nm 的分散于包括水溶性溶剂和水的载体中的纳米粒子,所述纳米粒子包括一种或多种紫杉烷衍生物,聚合物和表面活性剂,所述表面活性剂包括脂肪酸或它的盐和固醇或它的衍生物或它的盐的混合物。

[0043] 本发明还提供了一种溶液,所述溶液包括一种或多种紫杉烷衍生物,聚合物和表面活性剂,所述表面活性剂包括在水溶性溶剂中的脂肪酸或它的盐和固醇或它的衍生物或它的盐的混合物,当其用水溶液液体载体稀释时得到纳米分散体。

[0044] 本发明的纳米粒子平均大小小于 300nm,其中所述粒子包括一种或多种紫杉烷衍

生物,表面活性剂,所述表面活性剂包括固醇或它的衍生物或它的盐和脂肪酸或它的盐的混合物以及聚合物。

[0045] 如本发明的实施例中提到的紫杉烷衍生物是那些主要具有紫杉烷结构并主要来源于例如 Yew, *Taxus brevifolia* 的树皮或来自细胞培养或化学合成分子的复杂的二萜类化合物的天然产物的化合物。紫杉烷类药物的主要作用机理是阻断微管功能。这通过稳定微管中的 GDP- 结合微管蛋白实现。微管是细胞分裂所必需的,而紫杉烷阻止这一过程 - 其被称为“冻结有丝分裂”。

[0046] 用于本发明组合物中的这组最重要的代表包括紫杉醇和多烯紫杉醇和它们药物上可接受的盐,衍生物,类似物和异构体等和它们的混合物,例如 7- 表紫杉醇, t- 乙酰紫杉醇, 10- 去乙酰 - 紫杉醇, 10- 去乙酰 -7- 表紫杉醇, 7- 木糖紫杉醇, 10- 去乙酰 -7- 戊二酰紫杉醇, 7-N, N- 二甲基甘氨酸紫杉醇, 7-L- 丙氨酸紫杉醇。

[0047] 紫杉醇是具有抗癌活性的天然产物。通过短叶红豆杉和 / 或欧洲紫杉的半合成方法获得紫杉醇。紫杉醇的化学名称是 5 β , 20- 环氧 -1, 2 α , 4, 7 β , 10 β , 13 α - 六羟基紫杉烷 -11- 烯 -9- 酮 -4, 10- 二乙酸酯 -2- 苯甲酸酯 -13[(2' R, 3' S)-N- 苯甲酰 -3- 苯基异丝氨酸酯]。紫杉醇在美国作为 TAXOL 注射剂可以获得。紫杉醇被作为晚期卵巢癌治疗的一线 and 随后治疗。作为一线治疗,紫杉醇与顺铂结合使用。紫杉醇还用于淋巴结阳性乳腺癌的辅助治疗,在标准的含有阿霉素的结合化疗之后连续给药。紫杉醇还可在 6 个月的辅助化疗中转移性疾病或复发的联合化疗失败之后对乳腺癌进行治疗。紫杉醇与顺铂结合还被用于未进行手术治疗和 / 或放疗的非小细胞肺癌病人的一线治疗。紫杉醇还被用于与 AID 有关的波西氏肉瘤的二线治疗。

[0048] 多烯紫杉醇是属于紫杉家族的另一种抗肿瘤剂。它通过起始于来自紫杉植物的可再生的针状生物质 (renewable needle biomass) 提取的前体进行半合成制备。多烯紫杉醇的化学名成是三水合 5 β , 20- 环氧 -1, 2 α , 4, 7 β , 10 β , 13 α - 六羟基紫杉烷 -11- 烯 -9- 酮 -4 乙酸酯 -2- 苯甲酸酯 -13-[(2' R, 3' S)-N- 羧基 -3- 苯基异丝氨酸酯, N- 叔 - 丁酯。多烯紫杉醇在美国以 TAXOTERE[®] 注射浓缩剂的形式获得。多烯紫杉醇作为单一试剂用于以铂为基础的化疗失败之后局部晚期或转移性非小细胞肺癌病人的治疗中。多烯紫杉醇与顺铂结合用于先前未接受化疗的不能手术的,局部晚期或转移性非小细胞肺癌病人的治疗中。多烯紫杉醇与强的松结合用于治疗具有雄激素非依赖性 (激素难治) 转移性前列腺癌的病人。多烯紫杉醇与顺铂和氟尿嘧啶结合用于治疗晚期胃腺癌病人,包括胃食管交界处的腺癌,其中病人先前未接受过化疗治疗该晚期疾病。多烯紫杉醇与顺铂和氟尿嘧啶结合用于治疗具有头部和颈部的不能手术的局部晚期鳞状细胞癌的病人。本发明的实施例包括用量范围在 0.001mg/ml 至 15.0mg/ml 之间的紫杉醇,较优选范围在 0.1mg/ml 至 10.0mg/ml 之间且最优选范围在 1.5mg/ml 至 5.0mg/ml 之间。本发明的实施例中使用的多烯紫杉醇的用量范围在 0.001mg/ml 至 10.0mg/ml 之间,较优选范围在 0.1mg/ml 至 1.0mg/ml 之间且最优选范围在 0.3mg/ml 至 0.7mg/ml 之间。

[0049] 包括纳米粒子的纳米分散体可以进一步包括附加的治疗活性剂,其选自消炎剂,抗组胺剂,5-HT₃拮抗剂, H₂- 受体拮抗剂,维生素和它们的混合物组成的组中。用于本发明的组合物中的消炎剂可以选自类固醇消炎药物和非类固醇消炎药物。本发明的实施例优选包括例如糖皮质激素的类固醇消炎药物。可以用于本发明的组合物的糖皮质激素的

例子可以选自皮质醇或氢化可的松,强的松,氢化泼尼松,地塞米松,被他米松,布地缩松,氟羟氢化泼尼松等和它们的混合物。在本发明的优选实施例中,地塞米松用作消炎剂。可以用于本发明的组合物的抗组胺剂或组胺拮抗剂可以选自第一代抗组织胺剂,例如乙二胺类((美吡拉敏,安他唑啉),乙醇胺类(苯海拉明,卡比沙明,氯马斯汀,乘晕宁),烷基胺类(非利拉明,chlorpheniramine,右氯苯那敏,曲普利啶),哌嗪类(苯甲嗪,氯环嗪,羟嗪,美其敏),三环和四环类(异丙嗪,阿列马嗪,赛庚啶,阿扎他定,酮替芬)等;第二代抗组织胺剂,例如阿伐斯汀,阿司咪唑,西替利嗪,氯雷他定,咪唑斯汀,特非那丁,氮卓斯汀,卡巴斯汀,奥洛他定等;第三代抗组织胺剂,例如左西替利嗪,地氯雷他定,非索非那定等和它们的混合物。可以用于本发明的组合物中的 5-HT₃拮抗剂可以选自昂丹司琼,格拉司琼,多拉司琼,托烷司琼,帕洛诺司琼,阿洛司琼,西兰司琼等和它们的混合物。可以用于本发明的组合物中的 H₂-受体拮抗剂或 H₂-拮抗剂可以选自甲氰咪胍,雷尼替丁,尼扎替丁,法莫替丁,罗沙替丁,布立马胺,甲硫咪胺等和它们的混合物。可以用于本发明的组合物中的维生素可以选自例如维生素 A,维生素 D,维生素 E 和维生素 K 的脂溶性维生素和例如维生素 C 和维生素 B(包括维生素 B1:硫胺;B2:核黄素;B3:烟酸;B5:泛酸;B7:生物素;B9:叶酸;B12:氰钴维生素)的水溶性维生素和它们的混合物。在本发明的一个实施例中使用的维生素是维生素 D。

[0050] 在本发明的纳米分散体中存在的纳米粒子包括一种或多种聚合物,适用于本发明的纳米粒子的聚合物优选水溶性的。水溶性聚合物的例子包括但不限于聚乙烯吡咯烷酮,泊洛沙姆,聚乙二醇,聚乙烯醇,海藻酸钠,透明质酸钠,结冷胶,卡拉胶,黄原胶,硫酸葡聚糖,硫酸软骨素,果胶,肝磷脂,甲基丙烯酸共聚物,硫酸皮肤素,纤维素聚合物例如羧甲基纤维素钠,羟乙基纤维素,羟丙基甲基纤维素等和它们的混合物。

[0051] 聚乙烯吡咯烷酮是具有线性排列的 1-乙烯基-2-吡咯烷酮的单体单元的三级酰胺聚合物,下面将其称为 PVP 并同样已知为聚维酮。它在商业上可获得具有平均分子量范围在 10,000 至 700,000 之间的一系列的产品。各种产品根据平均分子量指定的 K-值进行销售;例如 GAF 公司提供具有下面 K-值的 PVP:

[0052]	K-值	平均分子量
[0053]	15	约 10,000
[0054]	30	约 40,000
[0055]	60	约 160,000
[0056]	90	约 360,000

[0057] 另一个供应商 BASF 提供了称为科利当的不同等级的水溶性聚乙烯吡咯烷酮,其具有例如分子量 2000 至 3000(科利当 12PF),7000-11,000(科利当 17PF),28,000-34,000(科利当 25),1,000,000-1,500,000(科利当 90F)的等级。在实施例中,聚乙烯吡咯烷酮作为水溶性聚合物。适用于本发明的聚乙烯吡咯烷酮的等级包括具有分子量范围在 1,000 至 45,000,优选 4,000 至 30,000 的聚乙烯吡咯烷酮。根据本发明的一个实施例,用于纳米分散体中的聚合物的用量范围从 0.001% v/v 至 20% v/v。优选聚合物的用量范围从 0.01% v/v 至 5.0% v/v。最优选聚合物的用量范围从 0.01% v/v 至 1.0% v/v。

[0058] 本发明的纳米分散体包括一种或多种表面活性剂。术语表面活性剂是“表面活性试剂”的另一种名称。表面活性剂是分子,包括水溶性(亲水)和脂溶性(亲脂)部分。用

于本发明的纳米分散体的表面活性剂包括脂肪酸或它的盐和固醇或它的衍生物或它的盐的混合物。

[0059] 术语脂肪酸包括来自或以酯化形式含在动物或植物脂肪,油或蜡中的脂肪族(饱和或不饱和)一元羧酸。可以用于本发明的组合物中的脂肪酸或它的盐的例子包括但不限于具有“n”个碳原子的脂肪酸或它的盐,其中“n”范围从4至28。脂肪酸可以是饱和脂肪酸或不饱和脂肪酸,和它们的盐和它们的混合物。饱和脂肪酸和它的盐可以选自丁酸,己酸,辛酸,癸酸,月桂酸,肉豆蔻酸,棕榈酸,硬脂酸,花生酸,二十二酸,辛酸钠,月桂酸钠,肉豆蔻酸钠,棕榈酸酯钠等和/或它们的混合物。不饱和脂肪酸和它的盐可以选自肉豆蔻酸,棕榈油酸,油酸,亚油酸, α 亚麻酸,花生四烯酸,二十碳五烯酸,芥酸,十二碳六烯酸,油酸钠,花生四烯酸钠等和/或它们的混合物。

[0060] 可以用于本发明的纳米分散体或纳米粒子的固醇或它的衍生物或它的盐的例子可以是固醇的酸酯。可以适用于本发明的固醇包括但不限于胆固醇,植物固醇,麦角脂醇,胆汁酸盐和它们的混合物。可以使用的胆固醇的酸盐包括但不限于胆固醇硫酸盐,胆固醇乙酸盐,胆固醇氯乙酸盐,胆固醇苯甲酸盐,胆固醇肉豆蔻酸盐,胆固醇半琥珀酸盐,胆固醇磷酸盐,磷酸盐,硼酸盐,硝酸盐,胆固醇桂皮酸盐,胆固醇 crotonate,胆固醇丁酸盐,胆固醇庚酸盐,胆固醇己酸盐,胆固醇辛酸盐,胆固醇壬酸盐,胆固醇癸酸盐,胆固醇油酸盐,胆固醇丙酸盐,胆固醇戊酸盐,双胆固醇碳酸盐等和它们的混合物。可以用于本发明的组合物的植物甾醇类包括谷甾醇,油菜甾醇,豆甾醇,菜籽甾醇和它的衍生物,盐和它们的混合物。美国, Sigma 公司销售的植物甾醇类*含有谷甾醇,油菜甾醇和二氢菜籽甾醇(dihydrobrassicasterol)。胆汁酸包括胆酸,鹅去氧胆酸,脱氧胆酸,甘氨酸胆酸,牛磺胆酸,熊去氧胆酸和它的衍生物,盐和它们的混合物。固醇还可以是包括胆固醇半琥珀酸的胆固醇的酯,包括胆固醇氢硫酸和胆固醇硫酸的胆固醇的盐,麦角固醇,包括麦角固醇半琥珀酸的麦角固醇的酯,包括硫酸氢麦角固醇和麦角固醇硫酸的麦角固醇的盐,羊毛甾醇,包括羊毛甾醇半琥珀酸的羊毛甾醇的酯,包括硫酸氢羊毛甾醇和羊毛甾醇硫酸的羊毛甾醇的盐。

[0061] 根据本发明的一个实施例,纳米粒子包括表面活性剂,其是固醇或它的衍生物或它的盐和脂肪酸和它的盐的混合物。在另一个优选实施例中,纳米粒子包括极性酸的胆固醇酯。在一个优选实施例中,用于纳米分散体中的表面活性剂是辛酸和胆固醇硫酸盐的混合物。辛酸(caprylic acid)同样已知为辛酸(octanoic acid),可以0.001% w/v至5.0% w/v,优选0.01% w/v至1.0% w/v且最优选0.01% w/v至0.5% w/v的用量范围用于实施例中。用于本发明的实施例中的胆固醇硫酸盐用量范围是0.001% w/v至5.0% w/v,较优选是0.01% w/v至1.0% w/v且最优选是0.01% w/v至0.5% w/v。

[0062] 已经惊讶地发现,表面活性剂的这一特定的混合提供了一种甚至在表面活性剂与紫杉烷衍生物的低比例下保持超过6小时稳定的紫杉烷衍生物的纳米分散体。在本发明的纳米分散体中,表面活性剂与紫杉烷衍生物的比例是1:5至1:10。本发明的纳米分散体稳定至少6小时,特别地,发现包括紫杉醇的纳米分散体保持24小时稳定,而发现包括多烯紫杉醇的纳米分散体发现保持8小时稳定。

[0063] 根据另一个优选实施例,使用的表面活性剂选自油酸和胆固醇硫酸和/或它们的混合物。

[0064] 根据本发明的另一个实施例,使用的表面活性剂选自饱和脂肪酸和胆汁酸或胆盐

和 / 或它们的混合物。根据优选实施例,使用的表面活性剂选自辛酸和甘氨酸钠或熊去氧胆酸和 / 或它们的组合物组成的组中。

[0065] 使用的胆盐的用量范围是 0.001% w/v 至 5.0% w/v,较优选的用量范围是 0.01% w/v 至 1.0% w/v 且最优选的用量范围是 0.01% w/v 至 0.75% w/v。

[0066] 本发明的组合物还可以包括低含量的卵磷脂 / 磷脂和 / 或它们的衍生物。在此使用的术语“低含量”意思是磷脂与紫杉烷衍生物的比例是 1 : 4 至 1 : 10,即如果使用了磷脂,磷脂的用量很低,即与紫杉烷衍生物的用量相比,磷脂的用量非常低。通常,现有技术的组合物是脂质体,与药物的用量相比需要大量的磷脂。

[0067] 当使用少量磷脂时在一些实施例中,这些磷脂的实例包括但不限于天然卵磷脂,部分氢化或氢化卵磷脂或鞘脂。天然卵磷脂是不同磷脂的混合物。用于本发明的组合物的磷脂选自磷脂酰胆碱,(二豆蔻酰磷脂酰胆碱, dipalmitoylphosphatidyl 胆碱, distearyloylphosphatidyl 胆碱,二油酰磷脂酰胆碱,二月桂酰磷脂酰胆碱,1 棕榈酰磷脂酰胆碱,1 豆蔻 -2-palmitoyl 磷脂胆碱,1- 棕榈酰 -2- 豆蔻酰磷脂酰胆碱,1- 硬脂酰 -2- 棕榈酰磷脂酰胆碱);磷脂酰乙醇胺(二肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺,二棕榈酰磷脂酰乙醇胺,二硬脂酰磷脂酰乙醇胺,溶血磷脂酰乙醇胺);鞘磷脂(脑磷脂,二棕榈酰神经鞘磷脂),溶血卵磷脂,脑苷脂等和它们的混合物。此外,例如聚乙二醇 - 二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(PEG-DSPE),甲氧基聚乙二醇 - 二硬脂酰磷脂酰胆碱 m-PEG-DSPE 等和它们的混合物的脂质的聚乙二醇衍生物还可以用于本发明的组合物中。优选的,可以用于本发明的组合物的 butylenesids 是 m-PEG-DSPE(甲氧基聚乙二醇 - 二硬脂酰磷脂酰乙醇胺)。

[0068] 在本发明的一个实施例中,使用的磷脂是 m-PEG-DSPE。它的用量范围是 0.001% w/v 至 10.0% w/v,较优选 0.01% w/v 至 5.0% w/v 且最优选 0.03% w/v 至 0.5% w/v。

[0069] 用于本发明的组合物中的非水溶剂是一种紫杉烷衍生物相对可溶的溶剂。该非水溶剂是与水或水溶剂易混合的。用于本发明的这类水溶性溶剂的粒子包括但不限于例如乙醇,n- 丙醇,异丙醇的醇类;例如乙二醇,丙二醇,丁二醇和它的衍生物的二醇类;像 PEG400 或 PEG3350 的聚乙二醇;例如 PPG-10 丁二醇,PPG-10 甲基葡萄糖醚,PPG-20 甲基葡萄糖醚,PPG-15 硬脂醚的聚丙二醇和它的衍生物;丙三醇;四氢呋喃聚乙二醇醚(glycofurol)等和它们的混合物。

[0070] 在本发明的一个实施例中,非水溶剂可以选自由乙醇,聚乙二醇和 / 或它们的混合物组成的组中。在本发明的优选实施例中,乙醇和 PEG(聚乙二醇)的混合物作为水溶性溶剂使用。用于本发明的纳米分散体组合物中的乙醇用量范围是 0.001% w/v 至 5% w/v,较优选是 0.05% w/v 至 0.5% w/v 且最优选是 0.1% w/v 至 0.25% w/v。优选使用的聚乙二醇包括 PEG-400 和 PEG-3350。用于本发明的实施例的 PEG-400 的用量范围是 0.01% w/v 至 20.0% w/v,较优选是 0.05% w/v 至 5.0% w/v 且最优选是 1.0% w/v 至 2.5% w/v。用于本发明的实施例的 PEG-3350 的用量范围是 0.001% w/v 至 10.0% w/v,较优选是 0.05% w/v 至 5.0% w/v 且最优选是 0.1% w/v 至 3% w/v。

[0071] 通常,需要紫杉烷的预浓缩剂,即用水溶液载体稀释溶液时可以提供保持至少 4 小时稳定的纳米分散体。这一时间是将纳米分散体以注射形式给药至病人的时间。从而,它始终是需要以实现本发明的纳米分散体的至少 4 小时的稳定性。载体还可以在注射用水中包括 5% 至 10.0% w/v 葡萄糖溶液或任何其它的药物可接受的静脉水液体载体和它的

混合物。其中紫杉烷衍生物是紫杉醇的本发明的一个实施例中,水性液体载体还包括5%的葡萄糖溶液以提高稳定性但其它的稳定剂也可以存在于所述水相中。这些稳定剂的例子是羟乙基淀粉,葡萄糖,透明质酸钠,谷胱甘肽,鸟氨酸-L-天冬氨酸盐等和它们的混合物。在另一个实施例中,发现在5%的葡萄糖溶液中使用0.01%的精氨酸获得了可以稳定8小时的多烯紫杉醇的纳米分散体,而在5%的葡萄糖溶液中使用1%的组氨酸产生了可以稳定5小时的多烯紫杉醇的纳米分散体。在使用多烯紫杉醇作为紫杉烷衍生物的实施例中,水溶液载体还可以包括羟乙基淀粉,葡聚糖,透明质酸钠,谷胱甘肽,鸟氨酸天冬氨酸盐,例如组氨酸,精氨酸等的氨基酸和它们的混合物。这些其它的稳定剂可以在水溶液载体中以0.05至5%的用量范围存在。在一个优选实施例中,发现在5%的葡萄糖溶液中使用0.5%的羟乙基淀粉产生的多烯紫杉醇的纳米分散体以粒子大小稳定超过5小时。

[0072] 本发明的紫杉烷衍生物的纳米分散体通常可以通过下面列出的任何一种方法进行制备:

[0073] 1) 治疗活性成分(紫杉烷衍生物和/或其它试剂),聚合物和选自脂肪酸或它的盐,固醇或它的衍生物或它的盐和它们的混合物的表面活性剂被溶解于例如乙醇和/或PEG的水溶性溶剂中,同时伴随搅拌和加热以获得药物的浓缩溶液。这样获得的所述溶液通过薄膜过滤器进行过滤。在这一溶液中缓慢地添加水溶液液体载体(5%的葡萄糖溶液)并将混合物振荡/搅拌,从而形成本发明的纳米分散体。这样形成的纳米分散体可选地进行均质和/或超声降解,过滤或冻干。在给药给病人之前,所述药剂的冻干粉末可以与液体介质重新溶解配制成原来浓度,再次形成本发明的纳米分散体。

[0074] 2) 紫杉烷衍生物,聚合物和选自脂肪酸或它的盐,固醇或它的衍生物或它的盐和它们的混合物的表面活性剂被溶解于例如乙醇和/或PEG的水溶性溶剂中,同时伴随搅拌和加热以获得药物的浓缩溶液。这样获得的所述溶液通过薄膜过滤器进行过滤,并被添加至水性介质中(5%的葡萄糖溶液)并将混合物振荡/搅拌,从而形成本发明的纳米分散体。这样形成的纳米分散体可选地进行均质和/或超声,过滤或冻干。在给药给病人之前,所述药剂的冻干粉末可以与水性液体介质重新溶解配制成原来浓度,再次形成本发明的纳米分散体。

[0075] 3) 紫杉烷衍生物和包括脂肪酸或它的盐和固醇或它的衍生物或它的盐的混合物的表面活性剂通过在圆底烧瓶中40°C的轻度加热被溶解于例如乙醇和/或PEG的水溶性溶剂中,并且将溶剂蒸发以形成药物的薄膜。聚合物被溶解于需要数量的水性液体介质中并且这一溶液伴随适度搅拌并振荡3-4小时被添加至所述薄膜,从而形成本发明的纳米分散体。这样形成的纳米分散体可选地进行均质和/或超声,过滤或冻干。在给药给病人之前,所述药剂的冻干粉末可以与水性液体介质重新溶解配制成原来浓度,再次形成本发明的纳米分散体。

[0076] 由于本发明的纳米分散体是包括具有平均大小小于300nm的纳米粒子的紫杉烷衍生物的胶体纳米分散体,分析它们是物理和化学稳定的。观察到在室温8小时至24小时储存后粒子没有发生聚集,并且纳米分散体的外观没有显示变化,从而推断在给药之前和过程中纳米分散体在所需要的时间内是稳定的。

[0077] 此外,当对紫杉烷衍生物和/或水溶性溶剂中的其它试剂的溶液进行试验时,观察到所述溶液在至少3个月的时间内保持物理和化学稳定,在药物试验中没有明显的变化

且在配方的外观上基本没有聚集或变化。观察结果将在下面的例子中显示。

[0078] 本发明的纳米分散体可以作为具有两个或多个容器的试剂盒提供，例如两个容器，其中第一容器包括紫杉烷衍生物，聚合物和表面活性剂，其中所述表面活性剂包括在水溶性溶剂中的脂肪酸或它的盐和固醇或它的衍生物或它的盐的混合物，且第二容器包括水性液体载体，使得第二容器的内含物添加至第一个容器的内含物中时，或与之相反，随着适度搅拌或振荡，形成了本发明的纳米分散体并且它是适合于进行静脉给药。其它的容器可以包括在形成紫杉烷纳米分散体之前或在所述紫杉烷的纳米分散体形成之后用于混合的第三容器组件。

[0079] 本发明还提供了具有两个容器的试剂盒，第一容器包括冻干形式的纳米分散体且第二容器包括水溶液液体载体，使得在给药给病人之前，随着适度搅拌或振荡，第二容器的内含物添加至第一容器的内含物中时，或与之相反，形成了本发明的纳米分散体。

[0080] 在病人需要的时候将本发明的纳米分散体进行给药将对现有技术中已知的各种类型的癌症的治疗提供有效的方法。

[0081] 本发明的纳米分散体的功效和毒性与商业可获得的例如Abraxane[®]，Oncotaxel[®]等的紫杉烷产品进行对照。根据下面的参数进行功效评估：

[0082] 1. 肿瘤评估：根据以天计算的时间在肿瘤体积 (mm³) 减少上进行评估肿瘤。对肿瘤进行 42 天的评估。

[0083] 2. T/C 百分数 = (药物治疗 x 天的组的平均肿瘤体积 / 药物治疗 x 天的组的平均肿瘤体积) × 100

[0084] 3. 肿瘤缩小：临床意义上的试验动物肿瘤模型的重要端点中的肿瘤缩小。如果肿瘤体积减少至在治疗开始时肿瘤体积的 50% 以下而没有减少至测量值以下被记录为部分 (PR)，或如果肿瘤大小已经变得感知不到被记录为完全 (CR)。

[0085] 4. 特定肿瘤生长延迟 (SGD) 被定义为药物治疗过的肿瘤和对照肿瘤达到给定体积 (V) 的时间差异的比例和对照肿瘤达到相同体积 (V) 的时间，其中 V 是在从治疗开始的最初肿瘤体积的两个体积加倍之后的肿瘤体积，且 T_v 是药物治疗或对照组达到给定体积的时间。如果 V 值在 45 天在试验组或参照组动物未达到，相同的值 × 45 天被认为是这一动物的 T_v。如果 SGD 参数大于 1，认为试验是有效的。

[0086] 5. 体重变化被计算为 (x 天动物的体重 - 0 天动物的体重 / 0 天动物的体重) × 100。

[0087] 6. 由 Kaplan Meier 方法完成的生存分析。P 值 < 0.05 被认为是显著的。虽然，本发明的纳米分散体的功效通过上述参数进行评估，可以使用任何其它的适合的或相似的试验方法以确定纳米分散体的功效。通过例 27, 28 和 29 的例证发现进行试验的本发明的纳米分散体是有效的。

[0088] 本发明的纳米分散体的毒性通过以静脉注射的方式给药给 CD-1 老鼠进行确定。在末次注射之后，在给药后 4-6 小时之间观察动物 1 小时。之后，对老鼠进行临床症状每天观察两次并观察 15 天死亡率。在给药后第 1, 7 和 14 天记录所有存活动物的体重。在第 15 天，进行存活动物的尸体解剖并记录肉眼病变。毒性研究的结果在紫杉醇纳米分散体和紫杉萜纳米分散体的例 25 和 26 中分别进行了详细描述。

[0089] 虽然上面总体的公开本发明，但其它的内容根据下面的例子进一步讨论和说明。然而，所公开的实施例仅仅是为了说明本发明而不能认为限制本发明。

[0090] 例 1-5 本发明的纳米分散体在下面的表 1 中进行描述。

[0091] 表 1

[0092]

序号	成分	数量 (%w/v)				
		例 1	例 2	例 3	例 4	例 5
1	紫杉醇	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
2	胆固醇硫酸酯	0.01	0.01	0.01	0.02	0.04
3	辛酸	0.0125	0.0125	0.0125	0.025	0.05
4	聚乙烯吡咯烷酮(PVP) K-30	0.125	0.0625	0.0325	0.125	0.125
5	乙醇	0.14825	0.14825	0.14825	0.14825	0.14825
6	PEG-400	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
7	葡萄糖 (5%)	适量 100.0	适量 100.0	适量 100.0	适量 100.0	适量 100.0

[0093] 方法：

[0094] • 药物,胆固醇硫酸酯,辛酸和 PVP K-30 在玻璃瓶中被精确称重。内含物被溶解于需要数量的无水乙醇和 PEG-400 中并伴随搅拌并在 45°C 加热以获得溶液。

[0095] • 溶液通过 0.2 μ PVDF 的薄膜过滤器进行过滤。

[0096] • 随后,缓慢地将葡萄糖溶液 (5%) 添加至含有所述药物溶液的玻璃瓶中并缓慢振荡以获得透明至半透明的纳米分散体。

[0097] • 通过 pH 值计 (Mettler Toledo-seven easy) 确定纳米分散体的 pH 值。

[0098] • 纳米分散体的粒子大小通过粒子大小分析器 (Nano-ZS, Malvern) 进行测定。

[0099] 观察到的组合物的可见外观, pH 值和粒子大小总结在下面的表 2 中。

[0100] 表 2

[0101]

观察					
	例 1	例 2	例 3	例 4	例 5
外观					
最初	基本透明至半透明的分散体	基本透明至半透明的分散体	基本透明至半透明的分散体	基本透明至半透明的分散体	基本透明至半透明的分散体
室温 24 小时	基本透明至半透明的分散体	基本透明至半透明的分散体	基本透明至半透明的分散体	基本透明至半透明的分散体	基本透明至半透明的分散体
pH 值	3.86	4.0	4.0	4.0	4.0
粒子尺寸 (nm)					
最初	127	146	179	136	122
3 小时	134	148	156	138	158
24 小时	128	154	158.2	169	169

[0102] 可以看出本发明的纳米分散体是物理稳定的,室温储存 24 小时配方基本没有聚集或外观的变化。

[0103] 这些例子的纳米分散体组合物含有 150mg/100ml 的紫杉醇。对于 70kg 的人来说,用于人体的紫杉醇的剂量大约是 300mg,200ml 的每种纳米组合物可以给药给病人。从而,例 1-5 的紫杉醇组合物的一次成人剂量包括 20-80mg 的胆固醇硫酸酯,25-100mg 的辛酸,65-250mg 的 PVP 和 300mg 的乙醇。从而,本发明的组合物提供了将具有非常低量的赋形剂与活性剂共同给药的纳米级粒子。

[0104] 下面例 6-7 中描述的药物组合物是浓缩溶液,其在给药给病人之前,已经用稀释剂(5% w/v 葡萄糖溶液)稀释多次以获得本发明的纳米分散体。

[0105] 虽然本发明已经根据它的特定实施例和应用进行了描述,但是本领域技术人员根据这一教导可以获得其它的实施例和改进而不会背离本发明的精神或超出要求保护的发明的范围。应该强调的是本发明的上述实施例,特别是“优选”实施例仅仅是实施本发明的可能的例子,仅仅是为了清楚的说明本发明的原理而给出的。

[0106] 因此,应该理解的是在此的附图和说明书优选通过举例的方式以便于理解本发明而不应该被认为是发明范围的限制。

[0107] 例 6-7

[0108] 本发明的药物组合物作为紫杉烷衍生物的浓缩溶液描述在下面的表 3 中。

[0109] 表 3

[0110]

序号	成分	用量 (%w/w)	
		例 6 (药物浓度: 60mg/gm)	例 7 (药物浓度: 100mg/gm)
1	紫杉醇	6.0	10.0
2	胆固醇硫酸酯	0.400	0.66
3	辛酸	0.500	0.830
4	聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) K-30	5.0	4.16
5	乙醇	6.0	10.0
6	PEG-400	适量-100.0	适量-100.0

[0111] 方法:

[0112] • 药物,胆固醇硫酸酯,辛酸和 PVP K-30 在玻璃瓶中被精确称重。

[0113] • 内含物被溶解于需要数量的无水乙醇和 PEG-400 中并伴随搅拌并在 45°C 加热以获得溶液。

[0114] • 溶液通过 0.2 μ PVDF 的薄膜过滤器进行过滤。

[0115] • 例 6 的溶液被装在玻璃瓶 (每瓶 1gm 含有 60mg 的药物) 中并对稳定性进行试验。

[0116] 稳定样品以纳米分散体的形式进行分析。随着适度振荡,葡萄糖溶液 (5% w/v) (40ml) 被缓慢地添加至含有药物浓缩剂 (60mg 药物) 的玻璃瓶中以获得具有 1.5mg/ml 的稀释液的半透明的药物纳米分散体。纳米分散体进行如下面的表 4 进行的试验分析:外观,药物试验,pH 值 (Mettler Toledo-seven easy, pH 计) 和粒子大小 (Nano-ZS, Malvern 粒子大小分析器)。

[0117] 表 4:例 6 的稳定性数据

[0118]

稳定性 条件	浓缩的药物溶液	纳米分散体				
	外观	药物 试验	pH 值	粒子大小 (nm)		
				最 初	24小 时后	
最初	透明的, 无色的, 粘性液体	基本透明至半透明 的纳米分散体	96.59	3.97	152	146
25/60%RH						
1M	-do-	-do-	93.55	4.00	133	149
3M	-do-	-do-	94.07	4.00	165	162
2-8°C冷藏						
1M	-do-	-do-	94.86	3.96	132	127
3M	-do-	-do-	94.47	3.99	159	165

[0119] 超过3个月试验紫杉醇没有变化,推断出所述配方是化学稳定的。此外,可以看出本发明的组合物是物理稳定的,在储存中配方基本没有发生聚集或外观发生变化。

[0120] 例8

[0121] 使用了PVP K-12的本发明的药物组合物在下面的表5中被描述。纳米分散体的制备过程与例1-7中描述的一样。表5

序号	成分	数量(%w/v)
1	紫杉醇	0.15
2	胆固醇硫酸酯	0.01
3	辛酸	0.0125
4	聚乙烯吡咯烷酮(PVP)K-12	0.125
5	乙醇	0.14825
6	PEG-400	2.0
7	葡萄糖(5%)	适量 100.0

[0122] 观察组合物的可见外观,pH值和粒子尺寸并在下面的表6中总结。

[0123] 表6

[0125]

观察	
外观	
最初	基本透明至半透明的分散体
室温 24 小时	基本透明至半透明的分散体
pH 值	4.0
粒子大小 (nm)	
最初	164
1 小时	169
3 小时	179
5 小时	177
24 小时	177

[0126] RT : 室温

[0127] 可以看出本发明的组合物是物理稳定的, 在室温储存 24 小时配方基本没有发生聚集或在外观上发生变化。

[0128] 例 9

[0129] 本发明的组合物作为紫杉醇衍生物的浓缩溶液描述在下面的表 7 中。

[0130] 表 7

[0131]

表 7 序号	成分	数量 (% w/w) (药物浓度 :100mg/gm)
1	紫杉烷	10.0
2	胆固醇硫酸酯	0.66
3	辛酸	0.83
4	聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)K-12	8.33
5	乙醇	10.0
6	PEG-400	适量至 100.0

[0132] 稳定性样品进行如下分析并且在表 8 中提供稳定性数据。药物试验以浓缩药物溶液进行。为了其它观察, 随着适度振荡, 葡萄糖溶液 (5% w/v) (40ml) 被缓慢地添加至含有药物浓缩剂 (60mg 药物) 的玻璃瓶中以获得具有 1.5mg/ml 的稀释液的透明至半透明的药物纳米分散体。随后, 纳米分散体进行如下的试验分析: 外观, pH 值 (Mettler Toledo-seven easy, pH 计) 和粒子大小 (Nano-ZS, Malvern 粒子大小分析器)。

[0133] 表 8:例 9 的稳定性数据

[0134]

稳定性条件	预浓缩剂		纳米分散体				
	外观	试验	外观	pH 值	粒子尺寸 (nm)		
					最初	8 小时后	24 小时后
最初	透明的, 无色, 粘性液体	97.02	基本透明至半透明的纳米分散体	3.87	149	156	160
25°C/60%RH							
1M	-do-	97.81	-do-	3.90	159	225	246
3M	-do-	99.08	-do-	3.74	146	153	160
12M	-do-	100.32	-do-	3.8	110	115	114
冷藏 2-8°C							
1M	-do-	98.02	-do-	3.92	140	150	150
3M	-do-	98.02	-do-	3.72	97.9	109	111
12M	-do-	99.10	-do-	3.75	113	119	113

[0135] RH:相对湿度

[0136] 超过 3 个月储存试验紫杉醇没有变化, 推断出所述配方是化学稳定的。此外, 可以看出本发明的组合物是物理稳定的, 在各种储存条件下储存时配方基本没有发生聚集或在外观上发生变化。图 4(a) 显示的柱状图显示了在起始时间例 9 的纳米分散体的粒子大小分布, 且图 4(b) 显示的柱状图显示了当室温储存 24 小时例 9 紫杉醇的纳米分散体的粒子大小分布。这些柱状图显示在室温储存 24 小时之后, 平均粒子大小基本不变, 从而显示了纳米分散体的稳定本质。

[0137] 例 10

[0138] 含有 PEG-3350 的本发明的药物组合物在表 9 中进行描述。

[0139] 表 9

[0140]

序号	成分	数量 (% w/w)
1	紫杉烷	0.15
2	胆固醇硫酸酯	0.01
3	辛酸	0.0125

4	聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)K-30	0.0625
5	乙醇 (% v/v)	2.5
6	PEG-3350	0.5
7	葡萄糖 (5%)	适量至 100.0

[0141] 制备：

[0142] • 药物,胆固醇硫酸酯,辛酸, PVP K-30 和 PEG3350 在玻璃瓶中被称重。

[0143] • 玻璃瓶中的内含物被溶解于需要数量的无水乙醇中并伴随搅拌并在 45℃ 加热以获得透明的溶液。

[0144] • 缓慢地将上述乙醇溶液添加至葡萄糖溶液 (5%) 中并搅拌以形成纳米分散体。

[0145] • 通过 pH 值计 (Mettler Toledo-seven easy) 检查纳米分散体的 pH 值。

[0146] • 纳米分散体的粒子大小通过粒子大小分析器 (Nano-ZS, Malvern 粒子大小分析器) 进行测定。

[0147] • 纳米分散体通过 0.2 μ 的薄膜过滤器进行过滤。

[0148] • 将 20ml 的上述纳米分散体装入玻璃瓶并冻干 (Virtis)。

[0149] 在冻干之前,制备之后立即观察纳米分散体的可见外观和粒子大小,并在室温储存 24 小时和 48 小时进行观察。这些总结在下面的表 10 中：

[0150] 表 10

[0151]

观察	外观	粒子大小 (nm)
最初	半透明的纳米分散体	128
室温 24 小时	半透明的纳米分散体	132
室温 28 小时	半透明的纳米分散体	137

[0152] RT :室温

[0153] 可以看到室温储存 24 至 48 小时本发明的组合物是物理稳定的,配方基本没有聚集或发生外观上的变化。

[0154] 冻干饼的解冻 :在冻干之后,玻璃瓶中获得的饼通过适度振荡分散于注射用水 (20ml) 中以获得具有 1.5mg/ml 浓度的紫杉醇纳米分散体。

[0155] 重新配制的纳米分散体的每个玻璃瓶的内含物和特点分别在下面的表 11 和 12 中给出：

[0156] 表 11

[0157]

序号	成分	数量 (% w/w)

1	紫杉醇	30.0
2	胆固醇硫酸酯	2.0
3	辛酸	2.5
4	聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)K-30	12.5
5	PEG-3350	100.0

[0158] 每个玻璃瓶的组合物中含有 30mg 的紫杉醇。对 70kg 的人来说,人体剂量大约是 300mg 的紫杉醇,可以取上述组合物的 10 小瓶并再次溶解在例如 WFI 的 60 至 600ml 的稀释液中以获得 0.5 至 5.0mg/ml 的紫杉醇注射剂。如果将这一稀释过的组合物给药给病人将含有 20mg 的胆固醇硫酸酯,25mg 的辛酸和 125mg 的 PVP。

[0159] 表 12

[0160]

再次溶解之后进行观察	外观	粒子大小 (nm)
最初	半透明的纳米分散体	217
室温 24 小时	半透明的纳米分散体	225

[0161] 可以看出本发明的组合物在室温储存 24 小时之后是物理稳定的并且基本没有聚集并且配方的外观没有发生变化。

[0162] 例 11 和对照例 I-III

[0163] 表 13

序号	成分	数量 (%w/v)			
		例 II	对照		
			I	II	III
1	紫杉醇	0.15			
2	胆固醇硫酸酯	0.01	-	0.01	0.01
3	辛酸	0.0125	0.0125	-	0.0125
4	聚乙烯吡咯烷酮 (K-30)	0.0625	0.0625	0.0625	-
5	乙醇	0.1875	0.1875	0.1875	0.1875
6	PEG-400	2.0	2.0	2.0	2.0
7	葡萄糖 (5%w/v)	100ml			

[0164] 表 14 :观察

[0166]

最初外观	透明的, 蓝色	蓝色的均匀分散体	半透明的, 蓝色	蓝色的均匀分散体
粒子大小 (nm)				
最初		234	175	237
1 小时		243	176	-
3 小时		253	178	258
5 小时		观察到聚集		

[0167] 例 12

[0168] 在表 15 中进一步描述本发明的药物组合物并且在表 16 中描述对各种参数的观察。

[0169] 表 15

[0170]

序号	成分	例子	
		例 12 浓缩的药物溶液	例 12a 纳米分散体
		数量 (%w/w)	数量 (%w/w)
1	紫杉醇	10.0	0.15
2	胆固醇硫酸酯	0.66	0.01
3	辛酸	0.830	0.0125
4	聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) K-30	4.16	0.0625
5	甲氧基聚乙二醇 - 二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 (mPEG-DSPE)	4.16	0.0625
6	乙醇	10.0	0.14825
7	PEG-400	适量至 100	2.0
8	葡萄糖 (5%w/v)	-	适量至 100ml

[0171] 表 16

	观察	例 12	例 12a
	pH 值	-	4.0
	Zeta 电势	-	-32.4
	外观		
	最初	透明无色的粘性液体	基本透明至半透明的纳米分散体
	室温 24 小时	透明无色的粘性液体	基本透明至半透明的纳米分散体
[0172]	粒子大小 (nm)	透明溶液	
	最初		146
	1h		146
	3h		146
	5h		147
	8h		147
	24h		130

[0173] 例 13-14

[0174] 使用油酸和硬脂酸制备的本发明的纳米分散体组合物描述在下面的表 17 中：

[0175] 表 17

[0176]

序号	成分	数量 (%w/v)	
		例 13 (药物浓度: 1.5mg/ml)	例 14 (药物浓度: 1.5mg/ml)
1	紫杉醇	0.15	0.15
2	胆固醇硫酸酯	0.01	0.01
3	油酸	0.0125	-
4	硬脂酸	-	0.0125
5	聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) K-30	0.0625	0.0625
6	乙醇	0.14825	0.14825
7	PEG-400	2.0	2.0
8	葡萄糖 (5%w/v)	适量至 100ml	适量至 100ml

[0177] 这些组合物的制备方法与例 1-5 中的相同。获得的纳米分散体基本是透明至半透明的并且分别具有 134nm 和 155nm 的平均粒子大小。

[0178] 例 15

[0179] 使用胆固醇制备的本发明的药物组合物描述在下面的表 18 中。

[0180] 表 18

[0181]

序号	成分	数量 (% w/v)
1	紫杉醇	0.15
2	胆固醇	0.01
3	辛酸	0.830
4	聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) K-30	0.0625
5	乙醇	0.14825
6	PEG-400	2.0
7	葡萄糖 (5% w/v)	适量至 100.0ml

[0182] 方法：

[0183] • 药物,胆固醇,辛酸和 PVP K-30 在玻璃瓶中被精确称重。

[0184] • 内含物被溶解于需要数量的无水乙醇和 PEG-400 中并伴随搅拌并在 45°C 加热以获得浓缩溶液。

[0185] • 浓缩溶液通过 0.2 μ 的 PVDF 薄膜过滤器进行过滤。

[0186] • 缓慢地将葡萄糖溶液 (5%) 添加至含有浓缩溶液 (100mg 药物) 的小瓶中并适度搅拌以获得 1.5mg/ml 稀释度的透明至半透明的纳米分散体。

[0187] • 通过 pH 值计 (Mettler Toledo-seven easy) 检查纳米分散体的 pH 值。

[0188] • 纳米分散体的粒子大小通过粒子大小分析器 (Nano-ZS, Malvern) 进行测定。

[0189] 这一例子的纳米分散体基本透明至半透明并具有 217nm 的平均粒子大小。

[0190] 例 16

[0191] 使用胆汁酸 / 盐 (甘氨酸胆酸钠和熊去氧胆酸) 制备的本发明的药物组合物描述在下面的表 19 中。

[0192] 表 19

[0193]

序号	成分	数量 (%w/v) (药物浓度: 1.5mg/ml)	
		例 16a	例 16b
1	紫杉醇	0.15	0.15
2	甘氨酸钠	0.75	-
3	熊去氧胆酸	-	0.01
4	辛酸	0.0125	0.0125
5	聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) K-30	0.0625	0.0625
6	乙醇	0.14825	0.14825
7	PEG-400	2.0	2.0
8	葡萄糖 (5%w/v)	适量至 100.0ml	适量至 100.0ml

[0194] 方法：

[0195] • 药物, 胆汁酸 / 盐, 辛酸, PVP K-30 在玻璃瓶中被精确称重。

[0196] • 内含物被溶解于需要数量的无水乙醇和 PEG-400 中并伴随搅拌并在 45°C 加热以获得浓缩溶液。

[0197] • 浓缩溶液通过 0.2 μ 的 PVDF 薄膜过滤器进行过滤。

[0198] • 缓慢地将葡萄糖溶液 (5% w/v) 添加至含有浓缩溶液 (100mg 药物) 的小瓶中并适度搅拌以获得 1.5mg/ml 稀释度的半透明的纳米分散体。

[0199] • 通过 pH 值计 (Mettler Toledo-seven easy) 检测纳米分散体的 pH 值。

[0200] • 纳米分散体的粒子大小通过粒子大小分析器 (Nano-ZS, Malvern) 进行测定。

[0201] 获得的纳米组合物外观基本是半透明并分别具有 197nm 和 180nm 的平均粒子尺寸。例 17 含有 PVP K-90 的本发明的药物组合物描述在表 20 中。

[0202] 表 20

[0203]

序号	成分	数量 (% w/v)
1	紫杉醇	0.15
2	胆固醇硫酸酯	0.01
3	辛酸	0.0125
4	聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) K-90	0.0625
5	乙醇	0.14825
6	PEG-400	2.0
7	葡萄糖 (5% w/v)	适量至 100.0ml

[0204] 制备方法与例 1-5 相同。获得的纳米分散体组合物外观基本透明至半透明并具有 207nm 的平均粒子大小。

[0205] 例 18 含有透明质酸盐的本发明的药物组合物描述在表 21 中。

[0206] 表 21

[0207]

序号	成分	数量 (% w/v)
1	紫杉醇	0.15
2	胆固醇硫酸酯	0.01
3	辛酸	0.0125
4	透明质酸钠	0.025
5	乙醇	0.148
6	PEG-400	2.0
7	葡萄糖 (5% w/v)	适量至 100.0ml

[0208] 方法：

[0209] • 药物,胆固醇硫酸酯和辛酸在玻璃瓶中被精确称重。

[0210] • 内含物被溶解于需要数量的无水乙醇和 PEG-400 中并伴随搅拌并在 45°C 加热以获得浓缩的药物溶液。

[0211] • 浓缩溶液通过 0.2 μ 的 PVDF 薄膜过滤器进行过滤。

[0212] • 透明质酸钠溶解于葡萄糖溶液 (5% w/v) 中并缓慢地被添加至含有浓缩药物溶液 (30mg 药物) 的小瓶中,随后适度振荡添加剩余的 5% w/v 葡萄糖溶液以获得 1.5mg/ml 稀释度的半透明的纳米分散体。

[0213] • 通过 pH 值计 (Mettler Toledo-seven easy) 检测纳米分散体的 pH 值。

[0214] • 纳米分散体的粒子大小通过粒子大小分析器 (Nano-ZS, Malvern) 进行测定。

[0215] 获得的纳米组合物外观基本半透明并具有 263nm 的平均粒子尺寸。

[0216] 例 19 含有聚谷氨酸盐的本发明的药物组合物描述在表 22 中。

[0217] 表 22

[0218]

序号	成分	数量 (% w/v)
1	紫杉醇	0.15
2	胆固醇硫酸酯	0.01
3	辛酸	0.0125
4	聚谷氨酸钠盐	0.0625

5	乙醇	0.148
6	PEG-400	2.0
7	葡萄糖 (5% w/v)	适量至 100.0ml

[0219] 纳米分散体的制备方法与例 18 中的相同。获得的纳米分散体组合物外观基本是半透明的并具有 295nm 的平均粒子大小。

[0220] 例 20 含有其它治疗剂 - 地塞米松的本发明的药物组合物描述在下面的表 23 中。

[0221] 表 23

[0222]

序号	成分	数量 (% w/v)
1	紫杉醇	0.15
2	地塞米松	0.01
3	辛酸	0.0125
4	聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)K-30	0.0625
5	乙醇	0.148
6	PEG-400	2.0
7	葡萄糖 (5% w/v)	适量至 100.0ml

[0223] 获得的纳米组合物外观基本半透明并具有 185nm 的平均粒子大小。

[0224] 例 21

[0225] 含有多烯紫杉醇的本发明的药物组合物描述在表 24 中。

[0226] 表 24

[0227]

序号	成分	数量 (% w/v)
1	多烯紫杉醇	0.15
2	胆固醇硫酸酯	0.01
3	辛酸	0.0125
4	聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)K-30	0.125
5	乙醇	0.14825
6	PEG-400	2.0

7	葡萄糖 (5% w/v)	适量至 100.0ml
---	--------------	-------------

[0228] 这一例的纳米分散体通过例 1-5 中给出的方法进行制备。纳米分散体是稍带蓝色的白色并具有 172nm 的平均粒子大小。

[0229] 所述组合物含有 1.50mg/ml 的多烯紫杉醇。对于 70kg 的人来说,多烯紫杉醇的大约人体剂量是 180mg,120ml 的纳米分散体组合物可以用于给药给病人,使得所述组合物中含有 180mg 的多烯紫杉醇。

[0230] 服用了这一例子的组合物的病人,服用了 12mg 的胆固醇硫酸酯,15mg 的辛酸,150mg 的 PVP 和 180mg 的乙醇。从而,本发明的组合物提供了具有活性剂与最低量的赋形剂共同服用的纳米级粒子。乙醇的量不会上瘾。

[0231] 例 22

[0232] 下面给出含有多烯紫杉醇的本发明的药物组合物。

[0233] 表 25

序号	成分		数量 (%w/w)		
			21 (a)	22 (b)	23 (c)
1	多烯紫杉醇		6.0	6.0	6.0
2	胆固醇硫酸钠		0.4	0.4	0.4
3	辛酸		0.40	0.40	0.40
4	聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)	K-12	5.0	-	-
		K-17	-	5.0	-
		K-30	-	-	5.0
5	乙醇		6.0	6.0	6.0
6	PEG-400		适量至 100		

[0234] 表 25 中给出的根据配方的多烯紫杉醇预浓缩剂使用不同分子量的聚乙烯吡咯烷酮进行制备。

[0236] 发现聚乙烯吡咯烷酮分子量提高在聚集方面改进了纳米分散体的稳定性并在一定时间内保持纳米分散体的稳定。

[0237] 例 23 和对照例 IV, V 和 VI

[0238] 表 26

[0239]

序号	成分	数量 (%w/v)			
		例 23	对照		
			IV	V	VI
1	多烯紫杉醇	6	6	6	6
2	胆固醇硫酸钠	0.4	0.8	0.4	5
3	辛酸	0.4	-	-	-
4	聚乙烯吡咯烷酮 (K17)	5	5	5	10.6
5	乙醇	6	6	6	6
6	PEG-400	适量	适量	适量	适量
7	葡萄糖 (5%w/v)	达到 0.5mg/ml			

[0240] • 特定量的药物,胆固醇硫酸和辛酸在玻璃瓶中被精确称重。

[0241] • 内含物被溶解于需要数量的无水乙醇和 PEG-400 中并伴随搅拌并在 45°C 加热以获得浓缩的药物溶液。

[0242] • 所述溶液通过 0.2 μ 的 PVDF 薄膜过滤器进行过滤。

[0243] • 制备葡萄糖溶液 (5% w/v) 并缓慢地将其添加至含有浓缩药物溶液 (30mg 药物) 的小瓶中,随后适度振荡添加剩余的 5% w/v 葡萄糖溶液以获得 1.5mg/ml 稀释度的半透明的纳米分散体。

[0244] • 通过 pH 值计 (Mettler Toledo-seven easy) 检测纳米分散体的 pH 值。

[0245] • 纳米分散体的粒子大小通过粒子大小分析器 (Nano-ZS, Malvern) 进行测定。

[0246] 表 27- 观察

[0247]

参数评估	例 23	对照		
		IV	V	VI
pH 值	4.00	4.0		
Zete 电位	-26.0mV	-30.4mV 至-34.2mV		
外观	透明, 蓝色			
粒子大小 (nm)				
最初	114	174	171	364
1 小时	114	164	白色	
2 小时	113	白色		
3 小时	129			
4 小时	外观变化			

[0248] 例 24

[0249] 表 28

[0250]

序号	成分	数量 (% w/v)
1	多烯紫杉醇	9
2	胆固醇硫酸钠	0.6
3	辛酸	0.6
4	聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) K-17	5
5	乙醇	9
6	聚乙二醇-400	适量

[0251] 特定量的多烯紫杉醇,胆固醇硫酸钠,辛酸和聚乙烯吡咯烷酮在玻璃瓶中被称重。无水乙醇和聚乙二醇被混合并在 40°C 适度加热下溶解于超声波仪中,直到获得透明的预浓缩剂。所述预浓缩剂用表 29 给出的含有不同添加剂的水溶液液体载体进行稀释。所形成的纳米分散体使用通过 Malvern 粒子大小分析器进行平均粒子大小测定。

[0252] 表 29 :水溶液液体载体中的添加剂对纳米分散体稳定性的影响

[0253]

例 24	A	B	C	D
稀释剂	5%的葡萄糖注射水 USP 中 0.01% 的赖氨酸	5%的葡萄糖注射水 USP 中 1%的赖氨酸	5%的葡萄糖注射水中 1%的赖氨酸 +0.001%的依地酸二钠	5%的葡萄糖注射水中 0.5%的赖氨酸 +0.001%的依地酸二钠
浓度	0.5mg/ml	0.5mg/ml	0.5mg/ml	0.5mg/ml
纳米分散体的描述	基本透明, 蓝色	基本透明, 蓝色	基本透明, 蓝色	基本透明, 蓝色
物理稳定性粒子大小:				
0h	143nm	130nm	128nm	118nm
1h	146nm	133nm	131nm	121nm
3h	147nm	136nm	131nm	123nm
5h	-	138nm	-	130nm
6h	-	-	135nm	-
8h	145nm	-	-	136nm
Zeta 电位	-52.2mV	-32.0mV	-29.0mV	-29.8mV
pH 值	8.11	7.06	7.2	6.74
备注	稳定 8h	稳定 5h	稳定 6h	稳定 8h
化学稳定性试验	-	-	-	
最初				103.57
25°C/60%RH				
1M				100.37
冷藏 2-8°C				
1M				99.02
40°C/75%RH				
1M				101.53

[0254] 0.5%的赖氨酸,5%的葡萄糖注射剂中的 0.001%的依地酸二钠的例子的粒子大小分布结果在图 5(a) 和图 5(b) 中表示。图 5(a) 显示的柱状图显示了在起始时间的纳米分散体的粒子大小分布 (平均粒子大小 = 98nm), 且图 5(b) 显示的柱状图显示了当室温储存 8 小时的纳米分散体的粒子大小分布 (平均粒子大小 = 96.4nm), 从而显示了纳米分散体的稳定本质。

[0255] 例 25 本发明的紫杉醇纳米分散体在 CD-I 老鼠中的急性毒性

[0256] 试验项目:

[0257] 1. 例 12a 的组合物与 5% w/v 的葡萄糖稀释至 10mg/ml 伴随使用安慰剂

[0258] 2. 例 9 的组合物与 5% w/v 的葡萄糖稀释至 8mg/ml 伴随使用安慰剂, 和

[0259] 3. **ABRAXANE®**用 0.9% 的氯化钠稀释至 10mg/ml。

[0260] CD-I 老鼠在独立通风笼系统 (IVC) 的条件下适应环境 5 天, 动物居住区数为 2。在兽医健康检查之后, 5 只雄性和 5 只雌性老鼠分配至每个剂量组。在试验期间, 老鼠可以随意接触水和饲料。试验项目和低于剂量的安慰剂通过老鼠尾骨脉使用带有刻度注射器的 26gauge 号针静脉给药, 它们都没有用任何载体进行过任何稀释。在注射之前, 尾部用温水擦洗以扩张血管。150, 200, 250, 300, 350 和 400mg/kg 的总剂量用于紫杉醇纳米分散体 (例 12) 的试验, 250, 300 和 400mg/kg 的剂量用于安慰剂 (例 12 的安慰剂) 的试验, 200 和 250mg/kg 的剂量用于紫杉醇纳米分散体 (例 9) 的试验, 250mg/kg 的剂量用于安慰剂 (例 9 的安慰剂) 的试验, 以及 300mg/kg 的剂量用于 **ABRAXANE®**的试验。所有这些配方分 3 次静脉给药至 CD-I 老鼠, 其中两次剂量 / 注射之间有 1 小时停留。在末次注射之后, 每天两次, 每次 1 小时并在给药后 4-6 小时观察动物。之后, 直到 45 天每天观察两次老鼠以记录中毒症状和死亡率。

[0261] 表 30

试验项目	紫杉醇的剂量 静脉 (mg/kg)	死亡率%	LD ₅₀ 值
紫杉醇纳米分散体 (例 12a)	150	0	~ 342.5mg/kg
	200	0	
	250	0	
	300	0	
	350	60	
	400	90	
例 12a 的安慰剂	250	0	
	300	0	
	400	0	
紫杉醇纳米分散体 (例 9)	200	20	>250 mg/kg
	250	20	
例 9 的安慰剂	250	0	
ABRAXANE®	300	90	

[0262] 结果显示例 12 的紫杉醇纳米分散体在 400mg/kg 显示了 90% 的死亡率, 在 300mg/kg 的剂量下显示了 0 死亡率。在最高试验剂量 (400mg/kg) 下例 12 的安慰剂没有观察到死亡率。借助于紫杉醇纳米分散体的线性外推法, 获得的 LD₅₀和 LD₁₀值分别是 342.5mg/kg 和 310mg/kg。类似地, 例 9 的紫杉醇纳米分散体在 250mg/kg 显示了 20% 的死亡率并且紫杉醇纳米分散体的 LD₅₀> 250mg/kg。在最高试验剂量 (250mg/kg) 下例 9 的安慰剂没有观

观察到死亡率。市售的纳米粒子配方 **ABRAXANE®** 在 300mg/kg 显示了 90% 的毒性。这些数据清楚地显示了本发明的纳米分散体组合物与市售的 **ABRAXANE®** 相比是低毒性的。此外,对照本发明的纳米分散体组合物 (342.5mg/kg) 的 LD₅₀ 值和市售的 TAXOL 配方 (7.5-12.0mg/Kg; United States Patent No. -6753006) 的 LD₅₀ 值,证实本发明的紫杉醇纳米分散体观察到的 LD₅₀ 值大大高于市售的 TAXOL 溶液的 LD₅₀ 值。

[0264] SD 小鼠中的本发明的紫杉醇纳米分散体的急性毒性

[0265] 试验项目:

[0266] 1. 例 9 的组合物与 5% w/v 的葡萄糖稀释至 10mg/ml 伴随使用安慰剂,和

[0267] 2. **ABRAXANE®** 用 0.9% 的氯化钠稀释至 5mg/ml。

[0268] 小鼠在独立通风笼系统 (IVC) 的条件下适应环境 5 天,动物居住区数为 3。在兽医健康检查之后,5 只雄性和 5 只雌性 SD 小鼠分配至每个剂量组。在试验期间,小鼠可以随意接触水和饲料。试验项目和低于剂量的安慰剂通过小鼠尾骨脉使用带有刻度注射器的 26gauge 号针静脉给药,它们都没有用任何载体进行过任何稀释。在注射之前,尾部用温水擦洗以扩张血管。在注射之后,每天两次,每次 1 小时并在给药后 4-6 小时观察动物。之后,直到 14 天每天观察两次老鼠以记录中毒症状和死亡率。

[0269] 表 31

SD 小鼠中的急性毒性研究		
试验项目	紫杉醇静脉注射的剂量 (mg/kg)	死亡率%
紫杉醇纳米分散体 (例 9)	60	30
	90	40
例 9 的安慰剂	90	0
SD 小鼠的 LD ₅₀ 值		
ABRAXANE®	70	100

[0270] 结果显示例 9 的本发明的紫杉醇纳米分散体在 90mg/kg 显示了 40% 的死亡率。在 90mg/kg 的最高试验剂量下没有观察到例 9 安慰剂的死亡率。本发明的紫杉醇纳米分散体的 LD₅₀ 值 > 90mg/kg。市售的纳米粒子配方 **ABRAXANE®** 在 70mg/kg 显示了 100% 的毒性。

[0272] 这些数据清楚地显示了本发明的纳米分散体组合物将与药物有关的毒性最小化并且扩大了药物的有效给药制剂范围并且毒性比现有市售的例如 **ABRAXANE®** 配方相比是低毒性的。

[0273] 例 26

[0274] 例 24B 的组合物使用 5% w/v 的葡萄糖进行稀释至 10mg/ml,伴有安慰剂,市售的 **Taxotere®** 配方被稀释至 10mg/ml 通过静脉给药途径在 CD-1 老鼠上进行多烯紫杉醇纳米分散体和安慰剂的记性毒性研究。老鼠在实验室适应 6 天,动物居住区数为 2。在兽医健康检查之后,5 只雄性和 5 只雌性老鼠分配至每个剂量组。在研究期间,老鼠可以随意接触水和饲料。试验项目和安慰剂通过老鼠尾骨脉使用带有刻度注射器的 26gauge 号针静脉给药,它们都没有用任何载体进行过任何稀释。在注射之前,尾部用温水擦洗以扩张血管。200,

250 和 300mg/kg 的总剂量用于多烯紫杉醇纳米分散体 (例 24B) 的试验,安慰剂 (例 24B 的安慰剂) 以最高剂量使用。这些配方分 3 次静脉给药至 CD-I 老鼠,其中两次剂量 / 注射之间有 1 小时停留。在末次注射之后,每天两次,每次 1 小时并在给药后 4-6 小时观察动物。之后,直到 15 天每天观察两次老鼠以记录中毒症状和死亡率。所有存活动物的体重在给药后 1,7 和 14 天进行记录。在第 15 天,进行存活动物的尸体解剖并且记录全部病状。

[0275] 表 32 :急性毒性研究的结果

[0276]

试验项目	静脉多烯紫杉醇的剂量 (mg/kg)	死亡率 %	LD ₁₀
多烯紫杉醇纳米分散体 (例 24B)	200	0	
	250	0	
	300	10	300mg/kg
例 24B 的安慰剂	300	0	
Taxotere®	80	0	
	120	10	LD ₁₀ : 120mg/kg
	160	70	LD ₅₀ : 150mg/kg

[0277] 结果显示例 24B 的本发明的多烯紫杉醇纳米分散体在 300mg/kg 显示了 10% 的死亡率,在 250mg/kg 的剂量下是 LD₀。在最高剂量试验 (300mg/kg) 的安慰剂没有观察到死亡率。市售配方 Taxotere® 在 120mg/kg 显示了 10% 的毒性。这些清楚地显示了本发明的多烯紫杉醇纳米分散体观察到的 LD₁₀ 值与市售的 Taxotere® 溶液配方相比具有更大的 LD₁₀ 值。Taxotere® 的报道 LD₁₀ 值是 95mg/kg (参考 :SBA-NDA-20449)。

[0278] 例 27 紫杉醇纳米分散体 (例 12a 的组合物) 对具有 MX-I 肿瘤异种移植的裸鼠的抗癌功效 (肿瘤减少)

[0279] 动物 :种类 :老鼠,品系 :Ba1b/c 裸鼠,性别 :雌性,年龄 :6-8 周 (18.9g ± 1.8gs)

[0280] 人类肿瘤异种移植 :MX-I (乳腺)

[0281] 试验样品 :例 12a 的组合物用 5% 的葡萄糖进行稀释至 2mg/ml。参照 :市售配方, ABRAXANE®, 用 0.9% 的氯化钠再次稀释至 2mg/ml。

[0282] 安慰剂 :没有紫杉烷衍生物的试验样品

[0283] 剂量 :20mg/kg, 每天一次连续 5 天, 静脉给药, 每 kg 体重 10ml。

[0284] 研究设计 :

[0285] 1. 肿瘤通过皮下将 30mg 至 40mg 切片植入到动物的右腹,。

[0286] 2. 在开始治疗之前允许肿瘤增加到 125mm³ 至 132mm³ 的平均大小。

[0287] 3. 肿瘤动物被划分为包括 10 个动物的若干组。

[0288] 4. 动物如上面描述的进行给药并且按以下的进行评估肿瘤。

[0289] 结果 :与对照组相比,从试验开始第 8 天起肿瘤体积明显减少。以天为计,以肿瘤体积 (mm^3) 进行评估。42 天的数据在图 1 中图示表示。

[0290] 对照组 20mg/kg (最佳 % T/C < 20) 看到中度抗肿瘤活性,而实验组 20mg/kg 体重 (最佳 % T/C < 10) 看到非常明显的抗肿瘤活性。试验组和对照组的最佳 % T/C 值分别是 0 和 13.34。通过 20mg/kg 的在裸鼠中 MX-I 人类乳腺癌移植瘤的试验证实了非常明显的抗肿瘤活性。

[0291] 例 28

[0292] 植入有 MX-I 肿瘤异种移植的裸鼠的紫杉醇纳米分散体 (例 9 的组合物) 的抗癌功效 (肿瘤减少)

[0293] 动物 :种类 :老鼠,品系 :Athymic 裸鼠,性别 :雌性,年龄 :6-8 周 (20-25g)

[0294] 人类肿瘤异种移植 :MX-I (乳腺)

[0295] 试验样品 :例 9 的组合物用 5% 的葡萄糖进行稀释至 2mg/ml。

[0296] 参照 :市售配方, **ABRAXANE[®]**,用 0.9% 的氯化钠再次稀释至 2mg/ml。

[0297] 剂量 :20mg/kg,每天一次连续 5 天,静脉给药,每 kg 体重 10ml。

[0298] 研究设计 :

[0299] 1. 肿瘤通过皮下将大约 2x2 的切片植入到动物的右腹。

[0300] 2. 在开始治疗之前允许肿瘤增加到 200 mm^3 至 220 mm^3 的平均大小。

[0301] 3. 肿瘤动物被划分为包括 10 个动物的若干组。

[0302] 4. 动物如上面描述的进行给药并且按以下的进行评估肿瘤。

[0303] 肿瘤评估 :以天为计,对肿瘤体积 (mm^3) 进行评估。42 天的数据在图 2 中图示表示。

[0304] 结果 :非常明显的抗肿瘤活性在试验组和 **Abraxane[®]** 组 (optimal % T/C < 10) 中看到。试验组和 **Abraxane[®]** 的最佳 % T/C 值分别是 0.025 和 0.00。与 0 天相比,在安慰剂 / 对照组没有观察到体重的明显减少。通过 20mg/kg 的在裸鼠中 MX-I 人类乳腺癌移植瘤的试验 (紫杉醇纳米分散体浓缩注射剂) 证实了非常明显的抗肿瘤活性。

[0305] 例 29

[0306] 植入有 HT-29 人结肠癌异种移植的裸鼠的紫杉醇纳米分散体 (例 9 的组合物) 的抗癌功效 (肿瘤减少)

[0307] 动物 :种类 :老鼠,品系 :裸鼠,性别 :雌性,年龄 :6-8 周 (20-25g)

[0308] 人类肿瘤异种移植 :HT-29 人结肠癌裸鼠移植瘤肿瘤

[0309] 试验样品 :例 9 的组合物用 5% 的葡萄糖进行稀释至 2mg/ml。

[0310] 剂量 :20mg/kg,每天一次连续 5 天,静脉给药,每 kg 体重 10ml。

[0311] 参考 :

[0312] (a) 市售配方, **ABRAXANE[®]** 被稀释至 2mg/ml,用 0.9% 的氯化钠再次稀释至 2mg/ml。剂量 :20mg/kg,每天一次连续 5 天,静脉给药,每 kg 体重 10ml。

[0313] (b) 市售配方, **ONCOTAXEL[®]**

[0314] 剂量 :13.4mg/kg,每天一次连续 5 天,静脉注射。

[0315] 研究设计 :

[0316] 1. 肿瘤通过皮下将 2x2x2 的切片植入到动物的右腹。

[0317] 2. 在开始治疗之前允许肿瘤增加到 130mm^3 至 160mm^3 的大小。

[0318] 3. 肿瘤动物被划分为包括 10 个动物的若干组。

[0319] 4. 动物如上面描述的进行给药并且按以下的进行评估肿瘤。

[0320] 肿瘤评估 : 以天为计, 对肿瘤体积 (mm^3) 的缩小进行评估。49 天的数据在图 3 中图示表示。

[0321] 结果 : 非常明显的抗癌活性在试验组和 **Oncotaxel**[®] 100 组 (最佳 % T/C < 10) 中看到。20mg/kg 的试验和 13.4mg/kg 的 **Oncotaxel**[®] 100 组的最佳 % T/C 分别是 5.92 和 8.79, 而具有 20.33 的最佳 % T/C 值的 **Abraxane**[®] 的显示了适度的抗癌活性。通过 20mg/kg 的在裸鼠中 HT-29 人结肠癌裸鼠移植瘤肿瘤的试验 (紫杉醇纳米分散体浓缩注射剂) 证实了非常明显的抗癌活性。

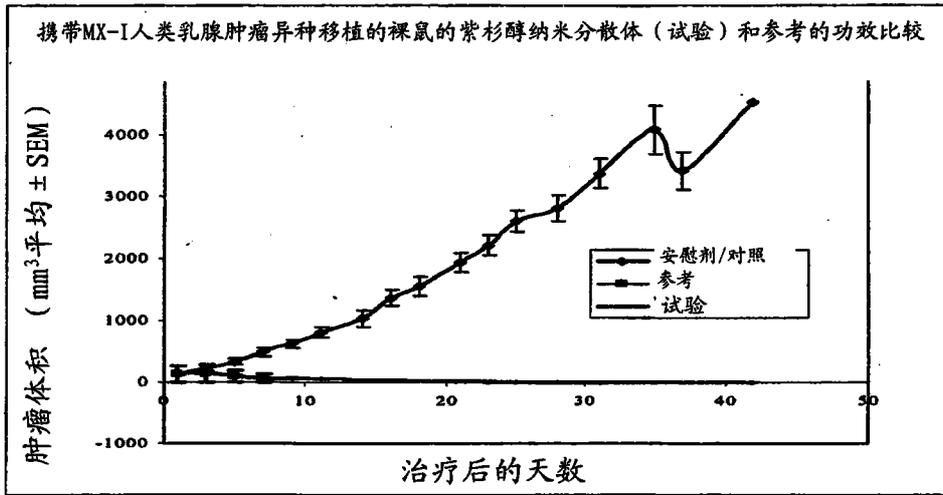


图 1

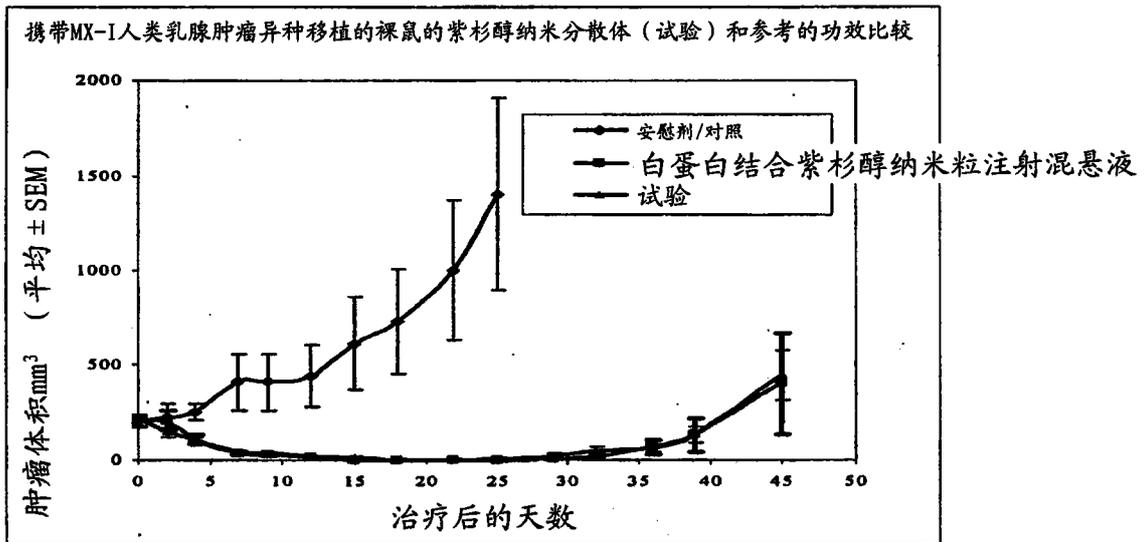


图 2

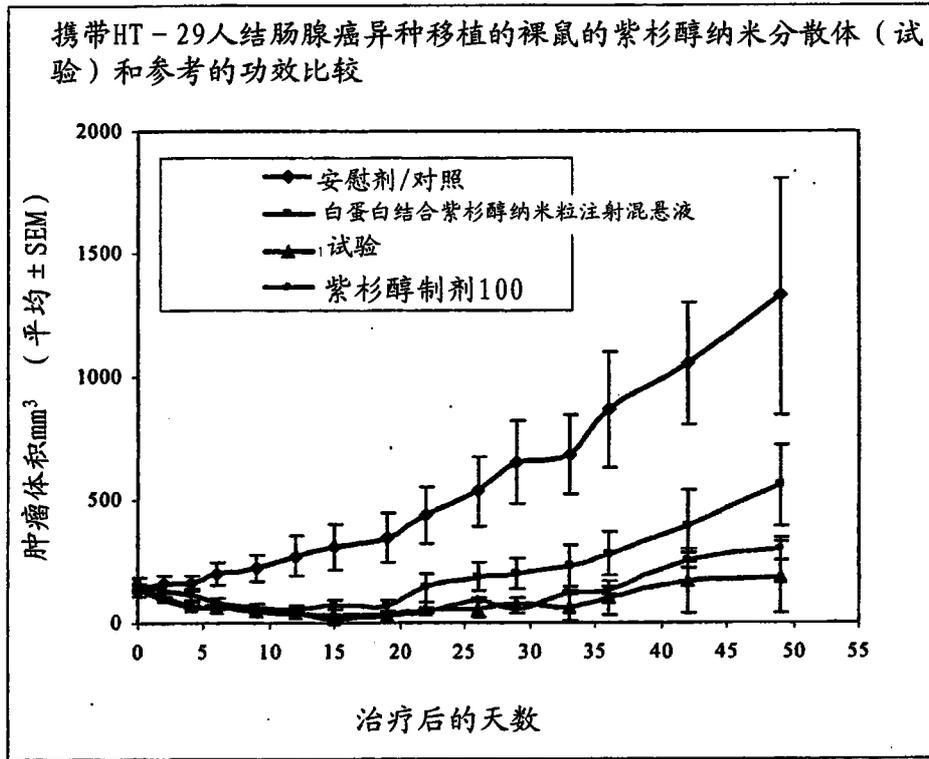


图 3

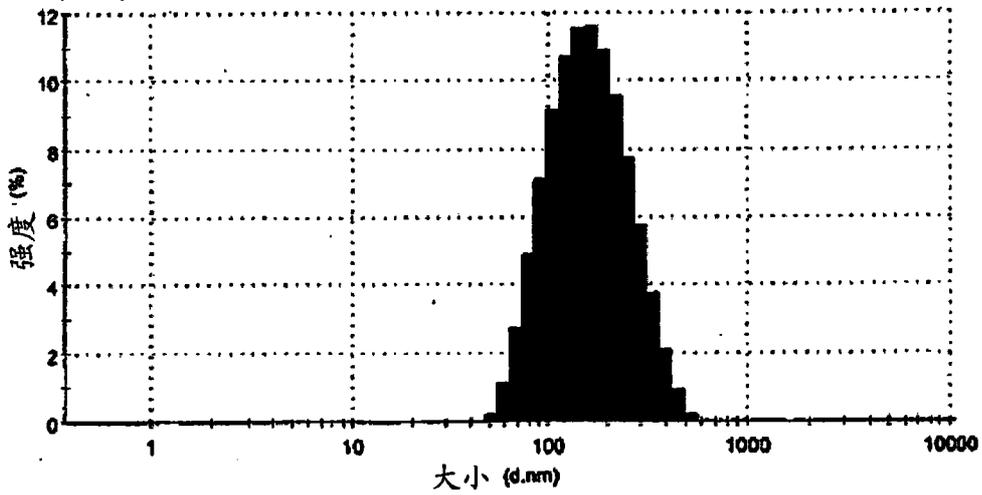


图 4(a) :柱状图显示了在起始时间例 9 的纳米分散体的粒子大小分布

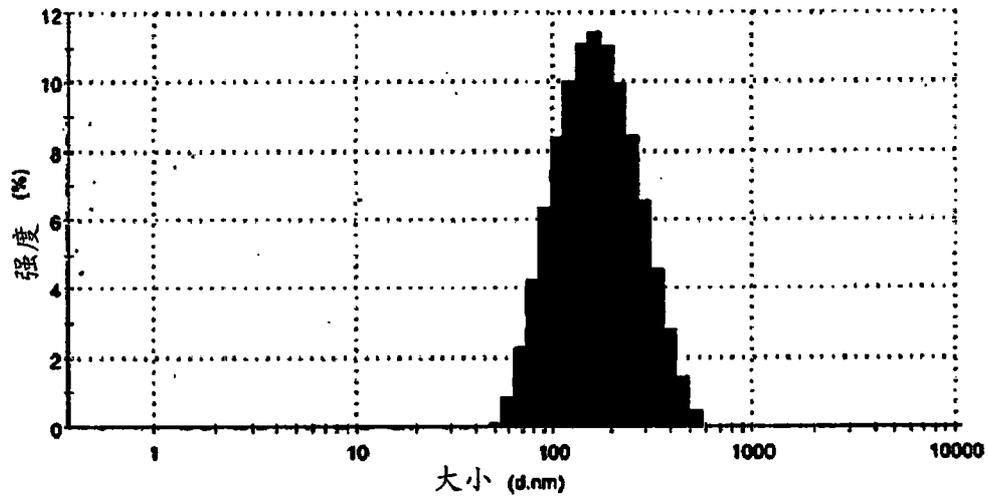


图 4(b) :柱状图显示了当室温储存 24 小时例 9 紫杉醇的纳米分散体的粒子大小分布

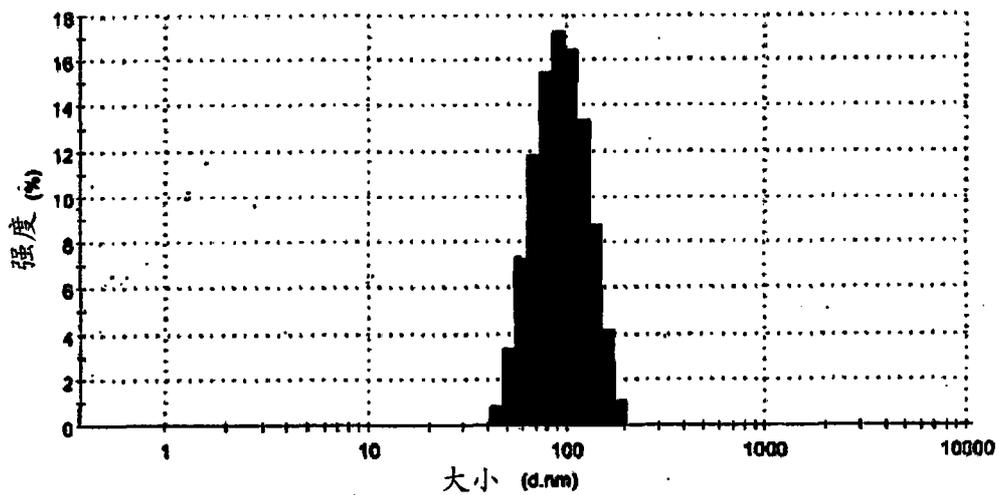


图 5(a) :所表示的柱状图显示了在起始时间例 24D 的多烯紫杉醇纳米分散体的粒子大小分布

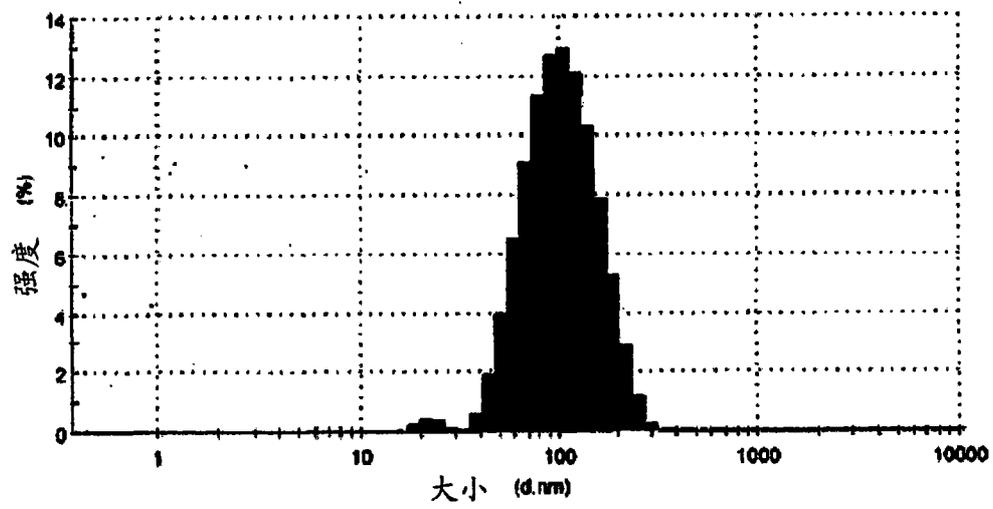


图 5(b) :柱状图显示了当室温储存 8 小时例 24D 的多烯紫杉醇的纳米分散体的粒子大小分布