

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁶

A61K 31/00

A61K 31/28 A61K 31/335

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 97194908.5

[43]公开日 1999年6月16日

[11]公开号 CN 1219872A

[22]申请日 97.5.26 [21]申请号 97194908.5

[30]优先权

[32]96.5.24 [33]US [31]08/653,207

[86]国际申请 PCT/CA97/00345 97.5.26

[87]国际公布 WO97/45105 英 97.12.4

[85]进入国家阶段日期 98.11.24

[71]申请人 血管技术药物公司

地址 加拿大不列颠哥伦比亚省

共同申请人 不列颠哥伦比亚大学

[72]发明人 W·L·杭特 L·S·马尚

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所

代理人 李华英

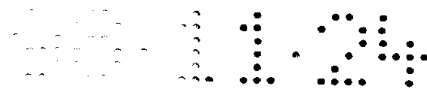
权利要求书 2 页 说明书 103 页 附图页数 90 页

[54]发明名称 治疗或预防身体通道疾病的组合物和方法

[57]摘要

本发明提供了治疗或预防与身体通道相关的疾病的方法,它包含将治疗剂释放到身体通道的外部的步骤。治疗剂的代表实例包括抗血管生成因子,抗增殖剂,抗炎剂和抗生素。

ISSN 1008-4274



权 利 要 求 书

1.一种治疗或预防与身体通道有关的疾病的方法，它包含将治疗剂输送到所述身体通道的外部。

2.一种治疗或预防与身体通道有关的疾病的方法，它包含将治疗剂经血管外膜输送到所述身体通道的平滑肌细胞。

3.根据权利要求1或2所述的方法，其中所述治疗剂是抗血管生成因子。

4.根据权利要求1或2所述的方法，其中所述治疗剂还包含聚合物。

5.根据权利要求3所述的方法，其中所述聚合物载体是聚(乙烯乙酸乙烯酯)(40%交联)。

6.根据权利要求3所述的方法，其中所述聚合物载体是乳酸和乙醇酸的共聚物。

7.根据权利要求3所述的方法，其中所述聚合物载体是聚(己内酯)。

8.根据权利要求3所述的方法，其中所述聚合物载体是聚(乳酸)。

9.根据权利要求3所述的方法，其中所述聚合物载体是聚(乳酸)与聚(己内酯)的共聚物。

10.根据权利要求1或2所述的方法，其中所述治疗剂是抗微管剂。

11.根据权利要求10所述的方法，其中所述抗微管剂能稳定微管。

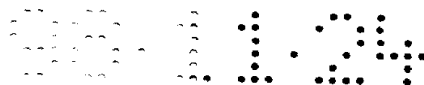
12.根据权利要求11所述的方法，其中所述抗微管剂是紫杉酚，或其类似物或衍生物。

13.根据权利要求1或2所述的方法，其中所述身体通道选自：动脉、食管、胃、十二指肠、小肠、大肠、胆道、输尿管、膀胱、尿道、泪管、气管、支气管、细支气管、鼻气道、咽鼓管、外耳道和输卵管。

14.根据权利要求13所述的方法，其中所述治疗剂经动脉外壁直接注射到血管外膜，从而输送到动脉。

15.根据权利要求1或2所述的方法，其中所述疾病选自：血管疾病、胃肠疾病、泌尿生殖系统疾病和肺部疾病。

16.根据权利要求15所述的方法，其中所述治疗剂是抗微管剂。



17.根据权利要求 16 所述的方法，其中所述抗微管剂能稳定微管。

18.根据权利要求 17 所述的方法，其中所述抗微管剂是紫杉酚，或其类似物或衍生物。

19.根据权利要求 16 所述的方法，其中所述抗微管剂是钒酸盐或氧钒化合物，或其类似物或衍生物。



说明书

治疗或预防身体通道疾病的组合物和方法

技术领域

概括地讲，本发明涉及治疗或预防身体通道疾病的组合物和方法，更具体地说，涉及包含可释放到身体通道外壁的治疗剂的组合物。

发明背景

在身体内有许多允许必需物质流动的通道。例如，这些通道包括动脉和静脉，食管，胃，小肠和大肠，胆道，输尿管，膀胱，尿道，鼻通道，气管和其他气道，以及男性和女性生殖道。损伤、各种外科手术或疾病都可能导致这样的身体通道的狭窄、衰弱和/或阻塞，导致严重的并发症和/或甚至死亡。

例如，有多种类型的肿瘤（良性的和恶性的）可导致对身体通道壁的伤害或腔的阻塞，由此减慢或阻止了物质在通道中的流动。仅 1996 年一年，估计在美国因食道癌死亡的人数在 11,200 人以上，因大肠和小肠癌死亡的人数在 51,000 人以上，而因直肠癌死亡的人数近 17,000 人。因癌症而导致的身体通道的阻塞不仅本身自然而然地会威胁生命，而且他们会限制患者的生活质量。

对于引起肿瘤性阻塞的大多数肿瘤的最初治疗是手术切除和/或化学治疗，放射治疗或激光治疗。不幸的是，当肿瘤已导致身体通道阻塞的时候，常常已不宜手术且一般将不适合传统治疗。解决该问题的一种方法是插入腔内固定模。简言之，固定模是置于已被肿瘤或其他组织/物质阻断的身体通道腔中用于机械式撑开通道的设备。常用的固定模的代表实例包括 Wall 固定模，Stecker 固定模，Gianturco 固定模和 Palmaz 固定模（参见，例如：美国专利 5,102,417, 5,195,984, 5,176,626, 5,147,370, 5,141,516, 4,776,337）。不过，在肿瘤性阻塞中使用固定模的一个显著缺点是肿瘤经常能通过该固定模的小间隙生长到腔中。另外，存在于腔中的固定模可能导致反应性或炎性组织（例如血管，成纤



维细胞和白细胞)向内生长到该固定模的表面上。如果这种向内生长(由肿瘤细胞和/或炎性细胞构成)到达了固定模的内表面并危及到腔,结果将使已恰当插入了固定模的身体通道重新阻塞。

尽管不是肿瘤但也涉及增殖的其他疾病同样可阻塞身体通道。例如,因良性前列腺增生而导致的前列腺尿道狭窄是影响60%的60岁以上男性和100%80岁以上男性的一个严重问题。目前的药物治疗,诸如5 α -还原酶抑制剂(例如非那司提),或 α -肾上腺素能阻滞剂(例如Terazosin)一般仅对有限的患者人群是有效的。

另外,也可以进行手术治疗(例如经尿道前列腺切除术(TURP);开放式前列腺切除术,或内分泌科手术如激光前列腺切除术,使用微波、低温、冷冻破坏法或插入固定模),但这些治疗一般会导致多种并发症如出血,感染,失禁,阳痿和再发性疾病。

除了肿瘤或增生性疾病以外,其他疾病如血管疾病也可导致身体通道的狭窄、衰弱和/或阻塞。按照1993年的估计(来源-美国心脏及中风基本主页(Foundation homepage)),有六千万以上美国人患有一种或多种形式的心血管疾病。在这一年内这些疾病夺去了954,138人的生命(占美国死亡总人数的41%)。

气囊血管成形术(有或没有插入固定模)是血管疾病的治疗中最广泛使用的一种方法;也可使用其他方法如激光血管成形术。尽管这是在许多血管系统严重狭窄的情况下选用的疗法,但仍有约三分之一进行了气囊血管成形术的患者(来源于心脏和中风基本主页)在最初手术后的6个月内治疗过的动脉恢复狭窄状态(再狭窄),经常严重到足以需要再次手术。

产生这样的血管疾病(包括例如再狭窄)至少有部分原因是在血管平滑肌细胞(VSMC)迁移,VSMC增生,和胞外基质沉积后继发内膜增厚。简单地说,血管内皮作为血液可在其上平滑流动的非形成血栓的表面和将血液成分与构成血管壁的组织分离开的屏障。内皮细胞还释放硫酸肝素,前列环素,EDRF和其他抑制血小板及白细胞粘附、VSMC收缩、VSMC迁移和VSMC增生的因子。内皮细胞的任何损失



或破坏，诸如在气囊血管成形术、动脉粥样硬化斑切除术或固定模插入过程中发生的那些，都可能导致血小板粘着，血小板聚集和血栓形成。活化血小板能释放可产生血管收缩的物质（5-羟色胺和血栓烷）和/或促进 VSMC 迁移及增生的物质（PDGF，表皮生长因子，TGF- β ，和肝素酶）。动脉释放的组织因子刺激血块形成，从而导致平滑肌细胞可迁移和增生到其中的血纤蛋白基质中。

这一连串的事件使得血管平滑肌细胞由收缩性的转变为分泌表现型。血管成形术诱导的细胞溶解和基质破坏导致碱性成纤维细胞生长因子（bFGF）局部释放，这反过来通过诱导 PDGF 的产生而直接和间接地刺激 VSMC 增生。除了 PDGF 和 bFGF 以外，血小板释放的 EGF 和胰岛素生长因子-1 也会刺激 VSMC 增殖。

血管平滑肌细胞还被诱导迁移到血管的中层和内膜中。这可由基质金属蛋白酶的释放和活化造成，基质金属蛋白酶的释放和活化使得 VSMC 通过胞外基质和血管壁的内弹性层的路径降解。当血管平滑肌细胞迁移和增生后便沉淀含有葡萄糖胺聚糖，弹性蛋白和胶原的胞外基质，这构成了增厚内膜的最大部分。大部分的再狭窄过程可以是因血管壁的重建使得动脉的大小全面改变而造成的；至少有一些是在外膜内（除了中层以外）继发增生的。这些过程的最终结果是复发血管壁狭窄，这经常严重到足以需要重新进行手术。

总而言之，实际上在血管腔中进行的任何强有力的操作都将破坏或剥露出其内皮衬层(lining)。因此，血管疾病自身的治疗方法和治疗性手术后的再狭窄的治疗仍然是这种疾病的长期治疗效果中要考虑的主要问题。

除了肿瘤性阻塞和血管疾病外，还有许多导致身体通道阻塞的急性和慢性炎性疾病。例如，这些包括脉管炎，胃肠道疾病（例如克罗恩氏症，溃疡性结肠炎）和呼吸道疾病（例如哮喘，慢性阻塞性肺部疾病）。

上述每种疾病都可用药剂如抗炎药或免疫抑制剂治愈到不同程度。然而目前的治疗方案在减缓疾病的发展中经常是无效的，并可导致系统毒性和不期望的副作用。也可用外科手术代替或辅助药物治疗。但



是这种外科手术因形成疤痕而具有较高的局部复发率，并且在某些疾病条件下（例如通过使用气囊导管时）可导致良性反应性增生。

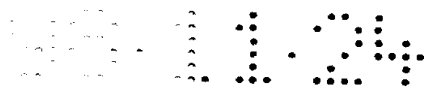
可阻塞身体通道的其他疾病包括传染病。简单地说，有许多急性和慢性传染病可导致身体通道阻塞，包括例如尿道炎，前列腺炎和其他男性生殖道疾病，各种女性生殖道疾病，膀胱炎和尿道炎（尿道疾病），慢性支气管炎，结核病和其他分支杆菌感染以及其他呼吸疾病和某些心血管疾病。

这些疾病目前是利用各种各样不同的治疗方案和/或外科手术进行治疗。不过，如上所述，这些治疗方案有与系统毒性相关的难题，这可导致不希望的副作用。另外，正如上文中所讨论的，外科手术因会形成疤痕而可导致局部复发，并且在某些手术中（例如插入商业上可得到的固定模）可导致良性反应性增生。

现有的对于上述疾病和病情的治疗方法在极大程度上有着相同的局限。使用治疗剂并没有使患者的病情得到逆转，且每当利用手术治疗这些病情时，患者总是因身体对手术的反应而存在危险。本发明提供了适于治疗上文中大致讨论过的病情和疾病的组合物及方法。这些组合物和方法致力于解决现行治疗中存在的有关问题，当与现行疗法比较时可提供显著的优点，另外还提供了其他相关长处。

发明概述

简单地讲，本发明提供了用于治疗或预防与身体通道相关的疾病的方法，它包含将治疗剂释放到该身体通道的外部的步骤。在相关的方面，提供了用于治疗或预防与身体通道相关的疾病的方法，它包含将治疗剂经外膜释放到所述身体通道的平滑肌细胞的步骤。通过将治疗化合物局部释放到疾病部位可避免系统性和不希望的副作用，并可能减少总剂量。治疗剂扇形或环状释放到患病通道周围也可避免许多腔内操作的缺点，包括组织的上皮衬层的损害。例如内皮损害可导致血栓形成，改变为层状流动模式，和/或对腔内装置的异物反应，任何一点都可引发再狭窄锁链。对于前列腺疾病，避免尿道的器械操作可减少狭窄的可能性并保持节制力和效力。



在本发明范围内可以使用各种治疗剂，包括例如抗血管生成剂，抗增生剂，抗炎剂和抗生素。在本发明的优选实施方案中，治疗剂是抗微管剂如本文中描述的“轻质 d 族”试剂（例如钒酸盐或氧钒化合物），或微管稳定剂如 D₂O discodermolide，epithilones 和紫杉酚，或其类似物或衍生物。

在本发明的某些实施方案中，治疗剂还可包含聚合物，诸如象聚(乙烯乙酸乙烯酯)（40 % 交联），乳酸和乙醇酸的共聚物，聚(己内酯)，聚(乳酸)，聚(乳酸)和聚(己内酯)的共聚物，明胶，透明质酸，胶原基质和白蛋白。也可利用其他载体（例如脂质体）来包含和/或传送一种或多种治疗剂。

治疗剂可用来治疗或预防各种疾病，包括例如血管疾病，肿瘤性阻塞，炎性疾病和传染病。可用其治疗的代表性身体通道包括，例如动脉，食管，胃，十二指肠，小肠，大肠，胆道，输尿管，膀胱，尿道，前列腺，泪管，气管，支气管，细支气管，鼻气道，咽鼓管，外耳道，子宫和输卵管。

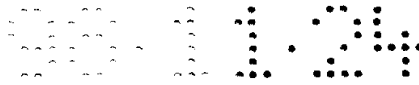
在本发明的一个特别优选的实施方案中，通过经动脉的外壁直接注射到外膜内而将治疗剂释放到动脉。

仅仅是为了举例说明的目的，本发明的某些实施方案提供了治疗血管疾病（例如狭窄），胃肠疾病，生殖泌尿器疾病（例如良性前列腺肥大或前列腺癌），和肺部疾病的方法（上述每种疾病的具体实施例在下文中更详细地进行了论述），是通过给予受到疾病影响的身体通道抗微管剂如本文中描述的“轻质 d 族”试剂（例如钒酸盐或氧钒化合物），或微管稳定剂如 D₂O discodermolide，epithilones 或紫杉酚，或上述任何一种的类似物或衍生物而实现的。

参照下面的具体描述和附图将会更加明确本发明的这些方面和其它方面。另外，下面列出了更细致地描述某些方法、装置或组合物的参考文献，在此将其全部引入本发明作为参考。

附图简述

图 1 显示了聚合微球的血浆调理作用对于中性粒细胞（20mg/ml



微球在 0.5ml 细胞中(浓度 5×10^6 细胞/ml) 对 PCL 微球的化学发光反应的影响。

图 2 显示了预涂渍血浆 + /-2% 多聚醇(pluroic,或 pluronic) F127 对于中性粒细胞(5×10^6 细胞/ml)对 PCL 微球的化学发光反应的影响。

图 3 显示了预涂渍血浆 + /-2% 多聚醇 F127 对于中性粒细胞 (5×10^6 细胞/ml) 对 PMMA 微球的化学发光反应的影响。

图 4 显示了预涂渍血浆 + /-2% 多聚醇 F127 对于中性粒细胞 (5×10^6 细胞/ml) 对 PLA 微球的化学发光反应的影响。

图 5 显示了预涂渍血浆 + /-2% 多聚醇 F127 对于中性粒细胞 (5×10^6 细胞/ml) 对 EVA:PLA 微球的化学发光反应的影响。

图 6 显示了预涂渍 IgG(2mg/ml), 或 2% 多聚醇 F127 后再涂渍 IgG(2mg/ml)对于中性粒细胞对 PCL 微球的化学发光反应的影响。

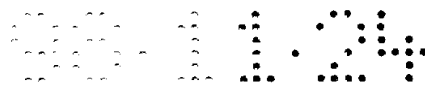
图 7 显示了预涂渍 IgG(2mg/ml), 或 2% 多聚醇 F127 后再涂渍 IgG(2mg/ml)对于中性粒细胞对 PMMA 微球的化学发光反应的影响。

图 8 显示了预涂渍 IgG(2mg/ml), 或 2% 多聚醇 F127 后再涂渍 IgG(2mg/ml)对于中性粒细胞对 PVA 微球的化学发光反应的影响。

图 9 显示了预涂渍 IgG(2mg/ml), 或 2% 多聚醇 F127 后再涂渍 IgG(2mg/ml)对于中性粒细胞对 EVA:PLA 微球的化学发光反应的影响。

图 10A 显示了 EVA:PLA 聚合物的混合比例对微球聚集的影响。图 10B 是一张扫描电子显微照片, 它显示了“小”微球的尺寸。图 10C (包括一张放大的插图 - 标记为“10C-插图”) 是一张扫描电子显微照片, 它显示了“大”微球的尺寸。图 10D 描绘的是在 37 °C, 紫杉酚从 0.6%w/v 加载了紫杉酚的 50:50 EVA:PLA 聚合物混合微球中体外释放到磷酸盐缓冲盐水 (pH7.4) 中的时间过程。开口的圆圈是“小”号微球, 闭合圆圈是“大”号微球。图 10E 是 CAM 的照片, 显示了微球 (“ MS ”) 释放紫杉酚的结果。图 10F 是增加了放大倍数的类似于 10E 的照片。

图 11A 显示了在 37 °C 下, 从含有 1 %、 2 %、 5 % 或 10 % 紫杉酚



的聚己内酯微球释放到磷酸盐缓冲盐水中的释放速率分布图。图 11B 是照片，显示了用对照微球处理过的 CAM。图 11C 是照片，显示了用加载了 5 % 紫杉酚的微球处理过的 CAM。

图 12A 和 12B 两张图分别显示了紫杉酚从 EVA 膜的释放，以及在那些相同的膜中随时间剩余的紫杉酚的百分数。图 12C 显示了没有紫杉酚的 EVA/F127 膜随时间的溶胀情况。图 12D 显示了没有紫杉酚的 EVA/司盘 80 膜随时间的溶胀情况。图 12E 描绘了各种 EVA/F127 掺合物的张力对压力的曲线。

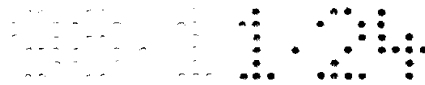
图 13A 和 13B 两张图显示了 PCL/MePEG 共混聚合物的熔点作为制剂中 %MePEG 的函数 (13A)，和 PCL 糊在 60 °C 固化所需的时间的增长百分数作为制剂中 MePEG 的量的函数 (13B)。图 13C 描绘的是不同 PCL/MePEG 共混聚合物的柔软度。图 13D 显示了各种 MePEG 浓度的共混聚合物随时间的重量变化百分数。图 13E 描述了紫杉酚从加载有 1 % 紫杉酚的各种共混聚合物中随时间的释放速率。图 13F 和 13G 描绘了不同数量的紫杉酚对从 20 % MePEG/PCL 混合物释放的紫杉酚的总量的影响。图 13H 描绘了 MePEG 对 MePEG/PCL 聚合物的抗张强度的影响。

图 14 显示了紫杉酚从各种聚合物制剂中的释放。

图 15 描绘了在 37 °C 下，紫杉酚从 PCL 糊释放到 PBS 中的时间过程。该 PCL 糊含有利用 140 号筛制备的紫杉酚和各种添加剂的微球。误差条代表 3 份样品的标准偏差。

图 16 描绘了在 37 °C 下，紫杉酚从紫杉酚-明胶-PCL 糊释放到 PBS 中的时间过程。该图显示了明胶浓度 (140 目) 和利用 140 号筛或 60 号筛制备的紫杉酚-明胶(1:1)微球的大小的影响。误差条代表 3 份样品的标准偏差。

图 17A 和 17B 描绘了添加剂 (17A ; 140 号筛) 和微粒大小 (17B ; 140 号筛或 60 号筛) 以及添加剂 (140 号筛) 的比例对含有 20 % 紫杉酚的 PCL 糊在 37 °C 下悬浮于蒸馏水中后的溶胀性能的影响。测量是针对用在紫杉酚-明胶中的 270 μ m 微粒制成的糊和含有 30



% 明胶的糊进行的，4 小时后因基质分解而停止测量。误差条代表 3 份样品的标准偏差。

图 18A，18B，18C 和 18D 是紫杉酚-明胶-PCL(20:20:60)糊在 37 °C 下悬浮于蒸馏水中之前 (18A) 和之后 6 小时 (18B) 的代表性扫描电子显微照片。显微照片 18C 和 18D 是放大更多倍的 18B，显示了紫杉酚 (棒状) 与明胶基质的紧密联系。

图 19A 和 19B 是用明胶-PCL (19A) 和紫杉酚-明胶-PCL(20:20:60, 19B)糊处理的 CAM 的显微照片，显示了紫杉酚处理的 CAM 中的无血管分布区。

图 20 是一张表，显示了紫杉酚-明胶-PCL 糊剂肿瘤周围注射到有确定肿瘤的小鼠体内的作用。

图 21 是一张表，显示了 PDLLA-PEG-PDLLA 组合物的溶解温度，热函，分子量，多分散性和特性粘度。

图 22 描绘了 PDLLA-PEG-PDLLA 和 PEG 的 DSC 差示热分析图。加热速率为 10 °C/分钟。参见图 21 的溶解温度和热函。

图 23 描绘了在 37 °C 下，紫杉酚从加载了 20 % 紫杉酚的 PDLLA-PEG-PDLLA 圆柱体 (cylinder) 向 PBS 白蛋白缓冲剂中的累积释放。误差条代表 4 份样品的标准偏差。40 % PEG 的圆柱体在第 4 天时因分解而停止。

图 24A，24B 和 24C 描绘了加载 20 % 紫杉酚的 PDLLA-PEG-PDLLA 圆柱体在 37 °C 下紫杉酚的体外释放过程中的尺寸，长度 (A)，直径 (B) 和湿重 (C) 的变化。

图 25 显示了加载 20 % 紫杉酚的 PDLLA-PEG-PDLLA 圆柱体 (20 % PEG, 1mm 直径) 在 37 °C 下在 PBS 白蛋白缓冲剂中释放过程中的凝胶渗透色谱。

图 26 是一张表，显示了 PDLLA-PEG-PDLLA 圆柱体 (加载 20 % 紫杉酚) 在 37 °C 下向 PBS 白蛋白缓冲剂中释放过程中的质量损耗和聚合物组分变化。

图 27A，27B，27C 和 27D 是干燥 PDLLA-PEG-PDLLA 圆柱体



(加载 20 % 紫杉酚, 直径 1mm) 在紫杉酚释放前和释放过程中的 SEM. A: 20 % PEG, 0 天; B: 30 % PEG, 0 天; C: 20 % PEG, 69 天; D: 30 % PEG, 69 天.

图 28 描绘了在 37 °C 下, 紫杉酚从加载了 20 % 紫杉酚的 PDLLA:PCL 掺合物和 PCL 向 PBS 白蛋白缓冲剂中的累积释放. 误差条代表 4 份样品的标准偏差.

图 29 是一张表, 显示了加载了紫杉酚的外科用糊剂局部用于小鼠的皮下肿瘤后的效能.

图 30 显示了辐射对紫杉酚释放的影响.

图 31 描绘了对照微球 (PLLA:GA-85:15) 的颗粒大小的范围.

图 32 描绘了加载 20 % 紫杉酚的微球 (PLLA:GA-85:15) 的颗粒大小的范围.

图 33 描绘了对照微球 (PLLA:GA-85:15) 的颗粒大小的范围.

图 34 描绘了加载 20 % 紫杉酚的微球 (PLLA:GA-85:15) 的颗粒大小的范围.

图 35A, 35B 和 35C 描绘了不同比例的 PLLA 和 GA 的颗粒大小的范围.

图 36A 和 36B 描绘了不同比例的 PLLA 和 GA 的颗粒大小的范围.

图 37A, 37B 和 37C 描绘了不同比例的 PLLA 和 GA 的颗粒大小的范围.

图 38A 和 38B 描绘了不同比例的 PLLA 和 GA 的颗粒大小的范围.

图 39 是一张表, 显示了选定的二嵌段共聚物的分子量, CMC 和紫杉酚最大加载量.

图 40A 和 40B 描绘了共聚物和克列莫佛乳化剂(Cremophor) EL 对紫杉酚结晶在水中 (37 %) 的增溶溶解作用. 40A: 共聚物浓度对克列莫佛乳化剂的影响 (温育 20 小时); 40B: 时间的影响 (共聚物或克列莫佛乳化剂浓度 0.5 %).

图 41A 和 41B 描绘了紫杉酚微粒溶液在室温 (22 °C) 下的混浊度 (在 450nm 处的紫外可见光吸收). 紫杉酚在水中的浓度为 2mg/ml.



除了 MePEG 5000-30/70 加载 5 % 紫杉酚外，其余加载 10 % 紫杉酚。

图 42 描绘了紫杉酚从紫杉酚-尼龙微胶囊中的释放。

图 43A 显示了紫杉酚/PCL 对肿瘤生长的影响。图 43B 和 43C 是两张照片，显示了对照、加载 10 % 紫杉酚和加载 20 % 紫杉酚的热糊剂 (thermopaste) 对肿瘤生长的影响。

图 44 是条形图，描绘了微球数量大小分布 (含有 10mg 苏拉明钠的 5 % 聚(乙烯乙酸乙烯酯)向 5 % PVA 中)。

图 45 是条形图，描绘了微球重量大小分布 (含有 10mg 苏拉明钠的 5 % 聚(乙烯乙酸乙烯酯)向 5 % PVA 中)。

图 46 描绘了苏拉明钠封装于 50mg 聚(乙烯乙酸乙烯酯)中的胶囊的重量。

图 47 描绘了苏拉明钠封装于 50mg 聚(乙烯乙酸乙烯酯)中的胶囊的百分数。

图 48 是条形图，描绘了用含有 10 % NaCl 的 5 % PVA 制成的含有 10mg 苏拉明钠的 5 % ELVAX 微球的重量大小分布。

图 49 是条形图，描绘了用含有 10 % NaCl 的 5 % PVA 制成的含有 10mg 苏拉明钠的 5 % 微球的重量大小分布。

图 50 是条形图，描绘了用含有 10 % NaCl 的 5 % PVA 制成的含有 10mg 苏拉明钠的 5 % 微球的数量大小分布。

图 51A 是 CAM 中苏拉明和醋酸可的松的照片 (放大倍数 = 8 ×)。简言之，该图像显示了用在 0.5 % 甲基纤维素中的 20μg 苏拉明和 70μg 醋酸可的松处理的无血管区域。注意位于无血管区周围的血管是改变方向而远离药物源的。图 51B 是照片，它以更高的放大倍数 (20 ×) 显示了受影响区域的血管的详细情形。注意无血管区和无血管区周围的血管的典型“肘推”(elbowing)作用。

图 52A, B, C, D 和 E 显示了 MTX 随时间从 PCL 释放的作用。

图 53 是用 PLA:GA(50:50)制成的加载了 10 % 甲氨蝶呤的微球的照片；特性粘度“IV” = 0.78。

图 54 描绘了加载的 10 % 硫酸氧钒从 PCL 的释放。



图 55 是含有硫酸钡的透明质酸微球的照片。

图 56A 描绘了有机钒酸盐从 PCL 的释放。图 56B 描绘了随时间过程而剩余的有机钒酸盐的百分数。

图 57 是一张照片，显示了含有有机钒酸盐的聚 D,L, 乳酸微球。

图 58A 和 58B 显示了 BMOV 从 PCL (150mg 的药柱) 释放的时间过程。(A) 释放的 μg 药物或 (B) 药柱中剩余的药物的 %。BMOV 在 PCL 中的最初加载量是 (O), 5%; (\bullet), 10%; (Δ), 15%; (\blacktriangle), 20%; (\square), 30% 和 (∇), 35%。

图 59A 和 59B 显示了 BMOV 从 150mg PCL:MEPEG(80:20, w:w) 的药柱中释放的时间过程，表示为 (A) 释放的 μg 药物或 (B) 药柱中剩余的药物的 %。BMOV 在 PCL:MEPEG 中的最初加载量是 (O), 5%; (\bullet), 10%; (Δ), 15%; (\blacktriangle), 20%。

图 60A, 60B 和 60C 是在药物释放实验开始时含有 20% BMOV 的 PCL 药柱的 (60A: 上部), BMOV 结晶; (60B: 中部) 表面形态学的扫描电子显微照片, 和在药物释放实验结束时 (72 天在 PBS 中) 含有 20% BMOV 的 PCL 药柱的 (60C: 底部) 表面形态学的扫描电子显微照片。

图 61A 和 61B 两张图显示了升高 BMOV 的浓度对细胞存活的影响, 是利用细胞与 BMOV 接触 1 小时 (61A), 或继续接触 BMOV (61B) 进行观测的。所用细胞为 (O), HT-29 结肠细胞; (\bullet), MCF-7 乳腺细胞; (Δ), Skmes-1 非肺小细胞和 (\blacktriangle), 正常骨髓细胞。

图 62 是一张表, 显示了加载了 BMOV 的糊剂对小鼠的 MDAY-D2 肿瘤生长的重量的影响。简言之, 含有 25%、30% 或 35% BMOV 的 PCL 糊剂 (150mg) 皮下注射到有 MDAY-2 肿瘤的小鼠体内。处理过 10 天后测定肿瘤的重量。该表显示了利用 25% BMOV (上表) 和 30% 或 35% BMOV (下表) 进行的 2 个独立实验的结果。对照数据描述的是用不含 BMOV 的 PCL 处理的小鼠。

图 63 的表阐明了加载了 BMOV 的 PCL:MePEG 糊对小鼠的 RIF-



1 肿瘤生长的重量的影响。简言之，让 RIF-1 肿瘤在小鼠体内生长 5 天，此时手术切除 90 % 肿瘤并用不含 BMOV（对照）或含有 5 % BMOV 的 150mg PCL:MePEG(80:20, w:w)糊处理切除部位。进行完该操作后第 4、5 和 6 天时测定肿瘤的再生长。

图 64A 和 64B 是两张图。图 64A 显示了增加 BEMOV 在 PCL 热糊（150mg 小丸）中的加载量对 BEMOV 释放到 15mL PBS/ALB 中的时间过程的影响。图 64B 也显示了增加 BEMOV 在 PCL 热糊（150mg 小丸）中的加载量对 BEMOV 释放到 15mL PBS/ALB 中的时间过程的影响。药物的释放表示为 BEMOV 在小丸中的剩余百分数。

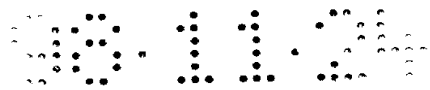
图 65A 和 65B 是两张图。图 65A 显示了增加 V5 在 PCL 热糊（150mg 小丸）中的加载量对 V5 释放到 15mL PBS/ALB 中的时间过程的影响。图 65B 也显示了增加 V5 在 PCL 热糊（150mg 小丸）中的加载量对 V5 释放到 15mL PBS/ALB 中的时间过程的影响。药物的释放表示为 V5 在小丸中的剩余百分数。

图 66A 和 66B 是两张图。图 66A 显示了增加 PRC-V 在 PCL 热糊（150mg 小丸）中的加载量对 PRC-V 释放到 15mL PBS/ALB 中的时间过程的影响。图 66B 也显示了增加 PRC-V 在 PCL 热糊（150mg 小丸）中的加载量对 PRC-V 释放到 15mL PBS/ALB 中的时间过程的影响。药物的释放表示为 PRC-V 在小丸中的剩余百分数。

图 67A，67B，67C 和 67D 这一连串图显示了在含有 5 % BMOV（67A），10 % BMOV（67B），15 % BMOV（67C）和 20 % BMOV（67D）的 PCL 热糊（150mg 小丸）中加载不同浓度的 MePEG 对 BMOV 释放到 15mL PBS/ALB 中的时间过程的影响。

图 68A，68B，68C 和 68D 这一连串图显示了在含有 0 % MePEG（68A），5 % MePEG（68B），10 % MePEG（68C）和 15 % MePEG（68D）的 PCL 热糊（150mg 小丸）中加载不同浓度的 MePEG 对 BMOV 释放到 15mL PBS/ALB 中的时间过程的影响，。药物的释放表示为 BMOV 在小丸中的剩余百分数。

图 69A 和 69B 是膀胱组织上涂敷有纤连蛋白的 PLLA 微球的照片



(69A)，和膀胱组织上聚(L-赖氨酸)微球的照片。

图 70A 和 70B 是两张带有有用对照 (未加载的) 微球处理过的肿瘤的 CAM 的照片。简言之，图 70A 中的中心白色团是肿瘤组织。注意有大量血管由各个方向从 CAM 进入肿瘤。肿瘤通过产生“血管生成因子”而诱导宿主脉管系统的向内生长。该肿瘤组织沿着包容它的血管向末端扩展。图 70B 是 70A 中显示的 CAM 的内面图。简言之，该图表明了进入肿瘤的血管象轮子的辐条一样放射状出现。注意肿瘤附近的血管密度大于正常 CAM 组织周围的血管密度。图 70C 和 70D 是两张具有有用加载了 20 % 紫杉酚的热糊处理过的肿瘤的 CAM 的照片。简言之，图 70C 中的中心白色团块是肿瘤组织。注意在肿瘤组织附近只有极少量血管。血管生成抑制剂的持续释放能对抗肿瘤产生的血管生成刺激物。肿瘤自身形成血管很少且大小日益减小。图 70D 是 70C 中所示的 CAM 的内面图，它表明了当与对照肿瘤组织比较时，流到肿瘤中的血液中断了。注意肿瘤附近的血管密度降低了，并且比正常 CAM 组织周围的血管少。

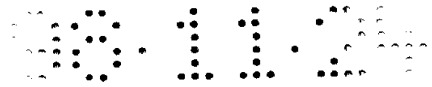
发明详述

在陈述本发明之前，列出下文中将要使用的某些术语的定义对于理解本发明是有帮助的。

本文中所用的“身体通道”是指身体内具有内腔并允许物质流动的许多通道、导管、输送管、道、沟管、窦道或管道。身体通道的代表性实例包括动脉和静脉，泪管，气管，支气管，细支气管，鼻通道（包括窦）和其他气道，咽鼓管，外耳道，口腔，食管，胃，十二指肠，小肠，大肠，胆道，输尿管，膀胱，尿道，输卵管，子宫，阴道和其他女性生殖道的通道，输精管和其他男性生殖道的通道，脑和脊髓的室系统（脑脊髓液）。

本文中所用的“治疗剂”是指能减轻、治疗、治愈或预防所给疾病或病情的那些试剂。下文中更详细地论述了治疗剂的代表性实例，它们包括，例如抗血管生成剂，抗增生剂，抗炎剂和抗生素。

如上所述，本发明提供了治疗或预防与身体通道相关的疾病的方



法，它包含将含有治疗剂的组合物释放到身体通道的外部（即非腔表面）的步骤，在优选的实施方案中，组合物包含治疗剂和聚合载体。简单地说，将治疗剂释放到身体通道的外部（例如扇形或环状释放）避免了涉及腔内操作的传统方法的许多缺点。另外，如本文中所述的治疗剂的释放允许更大量的治疗剂给药，而对于传送的体积的约束较小。

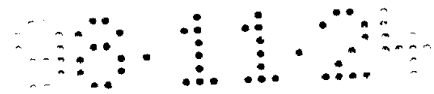
下面的详细描述进行了讨论，许多治疗剂可被传送到身体通道的外部，可以有或没有载体（如聚合物），从而治疗或预防与身体通道相关的疾病。下面对这些方面进行更详细的阐述。

治疗剂

如上所述，本发明提供了应用各种各样治疗剂的方法和组合物。在本发明的一个方面，治疗剂是抗血管生成因子。简言之，在本发明的上下文中，抗血管生成因子应理解为包括任何蛋白质，肽，化学药品或其他用来抑制血管生长的分子。可容易地使用许多方法来测定所给因子的抗血管生成活性，包括例如鸡尿囊绒毛膜（“CAM”）试验。简言之，将刚受精的鸡蛋的一部分壳除去，将要进行测试的含有抗血管生成因子样品的甲基纤维素皿置于膜上。几天后（例如48小时后），通过测定甲基纤维素皿周围区域中的看得见的鸡尿囊绒毛膜可容易地测定样品对血管生长的抑制。也可定量测定血管生长的抑制，例如，通过测定甲基纤维素皿周围的血管的数目和大小，与对照甲基纤维素皿进行对比。尽管如果与对照相比本文中所述的抗血管生成因子仅仅以统计学上显著的方式起作用时被认为是抑制新血管的形成，但在本发明的优选方面，这样的抗血管生成因子不仅完全抑制新血管的形成，而且减少了以前存在的血管的大小和数量。

除了上述CAM试验以外，还有许多其他试验也可用来测定体内抗血管生成因子的效能，包括例如，为此目的而研制的小鼠模型（参见Roberston等人，*癌症研究* 51: 1339 - 1344, 1991）。

在本发明的上下文中可以容易地使用各种各样的抗血管生成因子。代表性实例包括抗侵袭因子，视黄酸及其衍生物，苏拉明，金属蛋白酶-1的组织抑制剂，金属蛋白酶-2的组织抑制剂，纤溶酶原激活物



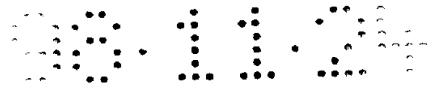
抑制剂-1，纤溶酶原激活物抑制剂-2，破坏微管功能的化合物，以及各种形式的轻质“d族”过渡金属。下文中将更详细地讨论这些以及其他抗血管生成因子。

简单地说，抗侵袭因子或“AIF”是用软骨的提取物制备的，它含有能抑制新血管生长的成分。这些成分包含一类7种低分子量蛋白质（<50,000道尔顿）（Kuettner和Pauli，“软骨因子对新血管形成的抑制”，*血管系统的研究进展*，Pitman Books（CIBA基金会专题论文集100），163 - 173页，1983），包括许多对大量蛋白酶有抑制作用的蛋白质（Eisentein等人，*美国病理学杂志* 81：337 - 346，1975；Langer等人，*科学* 193：70 - 72，1976；和Horton等人，*科学* 199：1342 - 1345，1978）。适合在本发明中使用的AIF可容易地利用本领域中的已知技术进行制备（例如Eisentein等人，出处同上；Kuettner和Pauli，出处同上；和Langer等人，出处同上）。AIF的纯成分如软骨衍生抑制剂（“CDI”）（参见Moses等人，*科学* 248：1408 - 1410，1990）也可容易地制得并用于本发明的上下文中。

视黄酸改变胞外基质成分的代谢，从而抑制血管生成。为了协同增加反式视黄酸的抗血管生成作用可加入脯氨酸类似物，血管抑制类固醇，或肝素。视黄酸，及其也可用于本发明上下文中的衍生物可以容易地从商业来源得到，包括例如Sigma化学公司，（#R2625）。

苏拉明是一种多磺化萘脲化合物，一般用作杀锥虫剂。简言之，苏拉明阻断了各种生长因子的特异性细胞表面结合，诸如血小板衍生生长因子（“PDGF”），表皮生长因子（“EGF”），转化生长因子（“TGF- β ”），胰岛素样生长因子（“IGF-1”），和成纤维细胞生长因子（“ β FGF”）。苏拉明可以按照已知技术制备，或容易地从许多商业来源得到，包括例如Mobay化学公司，纽约，（参见Gagliardi等人，*癌症研究* 52：5073 - 5075，1992；和Coffey.Jr.等人，*细胞生理学杂志* 132：143 - 148，1987）。

金属蛋白酶-1的组织抑制剂（“TIMP”）是由内皮细胞分泌的，



它也分泌 MMP 酶。TIMP 是糖基化的，分子量为 28.5kDa。TIMP-1 通过结合到活性金属蛋白酶上来调节血管生成，由此抑制血管向胞外基质中的侵袭。也可用金属蛋白酶-2 的组织抑制剂（“TIMP-2”）来抑制血管生成。简言之，TIMP-2 是一种 21 kDa 的非糖基化蛋白，它以活性酶和潜在酶、酶原形式结合金属蛋白酶。TIMP-1 和 TIMP-2 都可从商业来源得到，诸如 Synergen, Boulder, Colorado。

纤溶酶原激活物抑制剂-1（PAI-1）是存在于血小板中的一种 50kDa 的糖蛋白，也可由内皮细胞和肌细胞合成。PAI-1 抑制内皮基底外侧部位的 t-PA 和尿激酶纤溶酶原激活物，并调控纤维细胞溶解过程。纤溶酶原激活物抑制剂-2（PAI-2）一般仅在某些情况诸如在妊娠期，和在肿瘤存在下的血液中发现。简单地说，PAI-2 是单核细胞和巨噬细胞分泌的一种 56kDa 的蛋白。相信其能调节纤维蛋白溶解活性，特别是抑制尿激酶纤溶酶原激活物和组织纤溶酶原激活物，由此防止纤维蛋白溶解。

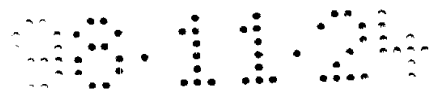
本发明的治疗剂还包括破坏微管功能的化合物。这样的化合物的代表性实例包括雌氮芥（可从 Sigma, Wang 和 Stearns 得到，癌症研究 48：6262 - 6271，1988），epothilone, curacin-A，秋水仙碱，甲氧蝶呤，和紫杉酚，长春碱，长春新碱，D₂O 和 4-叔丁基-[3-(2-氯乙基)脲基]苯（“tBCEU”）。简言之，这样的化合物可以数种不同方式起作用。例如，诸如秋水仙碱和长春碱的化合物通过解聚微管而起作用。

在本发明的一个优选的实施方案中，治疗剂是紫杉酚，一种通过结合到微管蛋白上形成异常有丝分裂纺锤体而破坏微管形成的化合物。简单地讲，紫杉酚是一种高度衍生的二萜化合物（Wani 等人，美国化学会会志 93：2325，1971），它已从短叶紫杉（Pacific Yew.）和 Taxomyces Andreanae 的收获物及干皮和短叶紫杉的植物内真菌中得到（Stierle 等人，科学 60：214 - 216，1993）。“紫杉酚”（本文中应将其理解为包括药物前体，类似物和衍生物，诸如象 TAXOL[®]，TAXOTERE[®]，紫杉酚的 10-去乙酰类似物和紫杉酚的 3'-N-去苯甲酰基



-3'-N-叔丁氧基羰基类似物) 可以用本领域技术人员已知的技术容易地制备 (参见 WO94/07882, WO94/07881, WO94/07880, WO94/07876, WO93/23555, WO93/10076, WO94/00156, WO93/24476, EP 590267, WO94/20089; 美国专利 No.5,294,637, 5,283,253, 5,279,949, 5,274,137, 5,202,448, 5,200,534, 5,229,529, 5,254,580, 5,412,092, 5,395,850, 5,380,751, 5,350,866, 4,857,653, 5,272,171, 5,411,984, 5,248,796, 5,422,364, 5,300,638, 5,294,637, 5,362,831, 5,440,056, 4,814,470, 5,278,324, 5,352,805, 5,411,984, 5,059,699, 4,942,184 ; 四面体快报 35(52): 9709 - 9712, 1994; 医药化学杂志 35: 4230 - 4237, 1992; 医药化学杂志 34: 992 - 998, 1991; 天然产物杂志 57(10): 1404 - 1410, 1994; 天然产物杂志 57(11): 1580 - 1583, 1994; 美国化学会会志 110: 6558 - 6560, 1988), 或者从许多商业来源得到, 包括例如 Sigma 化学公司, St. Louis, Missouri(T7402-来自短叶紫杉).

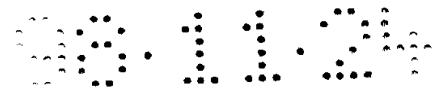
这样的紫杉酚衍生物或类似物的代表性实例包括 7-脱氧-docetaxol, 7,8-环丙紫杉烷 (7,8-Cyclopropataxanes), N-取代 2-氯杂环丁二酮, 6,7-环氧紫杉酚, 6,7-改性紫杉酚, 10-去乙酸紫杉醇, 10-去乙酰紫杉醇 (来自 10-去乙酰浆果赤霉素 III), 紫杉醇的膦酰氧基和碳酸酯衍生物, 2',7-二(1,2-苯二羧酸钠)紫杉醇, 10-去乙酰基-11,12-二氢紫杉醇-10,12(18)-二烯衍生物, 10-去乙酰基紫杉醇, 紫杉醇前体(Protaxol)(2'-和/或 7-O-酯衍生物), (2'-和/或 7-O-碳酸酯衍生物), 紫杉醇侧链的不对称合成, 氟代紫杉醇, 9-脱氧紫杉烷, (13-乙酰基-9-脱氧浆果赤霉素 III, 9-脱氧紫杉醇, 7-脱氧-9-脱氧紫杉醇, 10-去乙酰基-7-脱氧-9-脱氧紫杉醇, 含有氢或乙酰基和羟基与叔丁氧羰基氨基的衍生物, 磺化 2'-丙烯酰紫杉醇和磺化 2'-O-酰基酸性紫杉醇衍生物, 琥珀酰紫杉醇, 2'- γ -氨基丁酰紫杉醇甲酸酯, 2'-乙酰紫杉醇, 7-乙酰紫杉醇, 7-甘氨酸氨基甲酸紫杉醇酯, 2'-OH-7-PEG(5000)氨基甲酸紫杉醇酯, 2'-苯甲酰基和 2',7-二苯甲酰基紫杉醇衍生物, 药物前体 (2'-乙酰紫杉醇; 2',7-二乙酰紫杉醇; 2'-琥珀酰紫杉醇; 2'-(β -



丙氨酰)-紫杉醇); 2'- γ -氨基丁酰紫杉醇甲酸酯; 2'-琥珀酰紫杉醇的乙二醇衍生物; 2'-戊二酰基紫杉醇; 2'-(N,N-二甲基甘氨酸)紫杉醇; 2'-[2-(N,N-二甲氨基)丙酰]紫杉醇; 2'邻羧基苯甲酰紫杉醇; 紫杉醇的2'脂族羧酸衍生物; 药物前体{2'(N,N-二乙氨基丙酰)紫杉醇, 2'(N,N-二甲基甘氨酸)紫杉醇, 7(N,N-二甲基甘氨酸)紫杉醇, 2',7-二(N,N-二甲基甘氨酸)紫杉醇, 7(N,N-二乙氨基丙酰)紫杉醇, 2',7-二(N,N-二乙氨基丙酰)紫杉醇, 2'-(L-甘氨酸)紫杉醇, 7-(L-甘氨酸)紫杉醇, 2',7-二(L-甘氨酸)紫杉醇, 2'-(L-丙氨酸)紫杉醇, 7-(L-丙氨酸)紫杉醇, 2',7-二(L-丙氨酸)紫杉醇, 2'-(L-亮氨酸)紫杉醇, 7-(L-亮氨酸)紫杉醇, 2',7-二(L-亮氨酸)紫杉醇, 2'-(L-异亮氨酸)紫杉醇, 7-(L-异亮氨酸)紫杉醇, 2',7-二(L-异亮氨酸)紫杉醇, 2'-(L-缬氨酸)紫杉醇, 7-(L-缬氨酸)紫杉醇, 2',7-二(L-缬氨酸)紫杉醇, 2'-(L-苯基丙氨酸)紫杉醇, 7-(L-苯基丙氨酸)紫杉醇, 2',7-二(L-苯基丙氨酸)紫杉醇, 2'-(L-脯氨酸)紫杉醇, 7-(L-脯氨酸)紫杉醇, 2',7-二(L-脯氨酸)紫杉醇, 2'-(L-赖氨酸)紫杉醇, 7-(L-赖氨酸)紫杉醇, 2',7-二(L-赖氨酸)紫杉醇, 2'-(L-谷氨酸)紫杉醇, 7-(L-谷氨酸)紫杉醇, 2',7-二(L-谷氨酸)紫杉醇, 2'-(L-精氨酸)紫杉醇, 7-(L-精氨酸)紫杉醇, 2',7-二(L-精氨酸)紫杉醇}, 带有改性苯基异丝氨酸侧链的紫杉醇类似物, taxotere, (N-去苯甲酰基-N-叔-(丁氧羰基)-10-去乙酰紫杉醇, 和紫杉烷(例如浆果赤霉素 III, 头孢曼宁(cephalomannine), 10-去乙酰浆果赤霉素 III, 短叶苏木醇, 云南紫杉素(yunantaxusin)和紫杉素)。

可在本发明中使用的其他治疗剂包括轻质“d族”过渡金属, 诸如象钒, 钼, 钨, 钛, 铌和钽。这样的过渡金属可形成过渡金属配合物。上述过渡金属的合适的配合物包括氧过渡金属配合物。

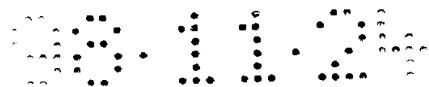
钒配合物的代表性实例包括氧钒配合物, 诸如钒酸盐和氧钒配合物, 合适的钒酸盐配合物包括偏钒酸盐(即 VO_3^-)和原钒酸盐(即 VO_4^{3-})配合物, 诸如象偏钒酸铵(即 NH_4VO_3), 偏钒酸钠(即 NaVO_3), 和原钒酸钠(即 Na_3VO_4)。合适的氧钒(即 VO^{2+})配合物包括, 例如乙酰丙酮酸氧钒和硫酸氧钒包括硫酸氧钒水合物诸如硫酸氧钒一水



和三水合物，双[麦芽酚酸(氧钒)](IV) (Bis[麦芽酚酸(maltolato)(氧钒)](IV)] (“BMOV”)，双[(乙基麦芽酚酸)氧钒](IV) (“BEOV”)，和双(半胱氨酸，酰胺 N-辛基)氧钒(IV) (“naglivan”)。

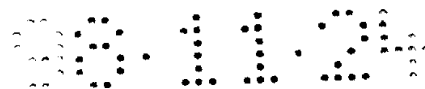
钨和钼配合物的代表性实例也包括氧配合物。合适的氧钨配合物包括钨酸盐和氧化钨配合物。合适的钨酸盐(即 WO_4^{2-})配合物包括钨酸铵(即 $(\text{NH}_4)_2\text{WO}_4$)，钨酸钙(即 CaWO_4)，二水合钨酸钠(即 $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)，和钨酸(即 H_2WO_4)。合适的氧化钨包括二氧化钨(IV)(即 WO_2)和三氧化钨(VI)(即 WO_3)。合适的氧钼配合物包括钼酸盐，氧化钼，和氧钼配合物。合适的钼酸盐(即 MoO_4^{2-})配合物包括钼酸铵(即 $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$)及其水合物，钼酸钠(即 Na_2MoO_4)及其水合物，和钼酸钾(即 K_2MoO_4)及其水合物。合适的氧化钼包括二氧化钼(VI)(即 MoO_2)，三氧化钼(VI)(即 MoO_3)和钼酸。合适的氧钼(即 MoO_2^{2-})配合物包括，例如乙酰丙酮酸氧钼。其他合适的钨和钼配合物包括从例如甘油、酒石酸和糖衍生的羟基衍生物。

在本发明的上下文中还可使用各种其他抗血管生成因子。代表性的实例包括血小板因子 4 (Sigma 化学公司，#F1385)；鱼精蛋白硫酸盐(鲱精蛋白) (Sigma 化学公司，#P4505)；硫酸化壳多糖衍生物(用母蟹壳制备)，(Sigma 化学公司，#C3641；Murate 等人，癌症研究 51: 22 - 26, 1991)；硫酸化多糖肽聚糖复合物 (SP-PG) (类固醇如雌激素，和枸橼酸他莫昔芬的存在可增强该化合物的功能)；星形孢菌素 (Sigma 化学公司，#S4400)；基质代谢的调节剂，包括例如：脯氨酸类似物{[(L-氮杂环丁烷-2-羧酸(LACA) (Sigma 化学公司，#A0760)；顺式羟基脯氨酸，d,L-3,4-去氢脯氨酸 (Sigma 化学公司，#D0625)，硫代脯氨酸 (Sigma 化学公司，#T0631)]， α,α -联吡啶 (Sigma 化学公司，#D7505)， β -氨基丙腈富马酸盐 (Sigma 化学公司，#A3134)}；MDL 27032 (4-丙基-5-(4-吡啶基)-2(3H)-咪唑酮；Merion Merrel Dow 研究所)；甲氧蝶呤 (Sigma 化学公司，#A6770；Hirata 等人，关节炎与风湿病 32: 1065 - 1073, 1989)；米托蒽醌 (Polverini 和 Novak, 生物化学与生物物理学研究通讯 140:



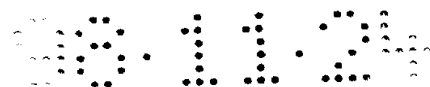
901 - 907); 肝素 (Folkman, *生化药* 34: 905 - 909, 1985; Sigma 化学公司, #P8754); 干扰素(例如, Sigma 化学公司, #13265); 2 巨球蛋白-血清 (Sigma 化学公司, #M7151); ChIMP-3 (Pavloff 等人, *生物化学杂志* 267: 17321 - 17326, 1992); 抑糜蛋白酶素 (Sigma 化学公司, #C7268; Tomkinson 等人, *生物化学杂志* 286: 475 - 480, 1992); β -环糊精十四烷硫酸盐 (Sigma 化学公司, #C4767); Eponemycin; 喜树碱; 烟曲霉素和衍生物 (Sigma 化学公司, #F6771; 加拿大专利 No.2,024,306; Ingber 等人, *自然* 348: 555 - 557, 1990); 金硫丁二钠 (“GST”; Sigma: G4022; Matsubara 和 Ziff, *临床检查杂志* 79: 1440 - 1446, 1987); (D-青霉胺 (“CDPT”; Sigma 化学公司, #P4875 或 P5000(HCl)); β -1-抗胶原酶-血清; α 2-抗纤溶酶 (Sigma 化学公司: A0914; Holmes 等人, *生物化学杂志* 262(4): 1659 - 1664, 1987); 比生群 (国际癌症协会); 氯苯扎利二钠 (N-(2)-羧基苯基-4-氯 anthronilic acid 二钠或 “CCA”; Takeuchi 等人, *试剂作用(Agents Actions)*36: 312 - 316, 1992); 沙利度胺; Angostatic 类固醇; AGM-1470; carboxynaminolimidazole; 以及金属蛋白酶抑制剂如 BB94, 雌激素和雌激素类似物, 抗雌激素药, 抗氧化剂, 生物类黄酮 (Pycnogenol); 醚类脂 (s-磷酸酯, ET-18-OCH₃), 酪氨酸激酶抑制剂 (金雀异黄素, 制表菌素, 草霉素 A, 灰薰草菌素-c, 羟基桂皮酸酯), α 趋化因子 [人干扰素诱导蛋白 10(IP-10)], -C-X-C-趋化因子 (Gro-beta), 氧化氮, 抗真菌剂 (根赤壳菌素), 15-脱氧精脒菌素, 金属配合物 (二氯环戊二烯钛 - 环戊二烯基二氯化钛), 三苯基甲烷衍生物 (金精三羧酸), Linomide, 沙利度胺, IL-12, 肝素酶, 制管张素, 抗微生物剂 (米诺环素), 血浆蛋白 (载脂蛋白 E), anthracyclines(TAN-1120), 增殖蛋白相关蛋白, FR-111142, 人参皂甙 (人参皂甙 Rb2), 多硫酸五聚糖。

本发明的组合物还可含有多种其他治疗剂, 包括例如: α -肾上腺素能阻滞剂, 血管紧张素 II 受体拮抗剂和组胺、5-羟色胺、内皮素的受



体拮抗剂，钠/氢反向转运蛋白的抑制剂（例如阿米洛利及其衍生物）；调节胞内钙离子转运的试剂如 L 型（例如地尔硫草，硝苯地平，维拉帕米）或 T 型钙离子通道阻滞剂（例如阿米洛利），钙调蛋白拮抗剂（例如 H₇）和钠/钙转运蛋白的抑制剂（例如阿米洛利），ap-1 抑制剂（针对酪氨酸激酶，蛋白激酶 C，肌球蛋白轻链激酶，Ca²⁺/钙调蛋白激酶 II，酪蛋白激酶 II）；抗抑郁剂（例如 amytryptiline，氟西汀，LUVOX® 和 PAXIL®）；细胞因子和/或生长因子，以及它们各自的受体，（例如白细胞介素，α，β，或 γ-IFN，GM-CSF，G-CSF，表皮生长因子，转化生长因子 α 和 β，TNF，和血管上皮生长因子的拮抗剂，内皮生长因子，酸性或碱性成纤维细胞生长因子，和血小板衍生生长因子）；IP₃ 受体的抑制剂（例如肝素）；蛋白酶和胶原酶抑制剂（例如上文中讨论过的 TIMPs）；硝基血管舒张剂（例如硝酸异山梨醇酯）；抗有丝分裂剂（例如秋水仙碱，anthracyclines 和其他抗生素，叶酸拮抗剂和其他抗代谢物剂，长春花生物碱，亚硝基脲，DNA 烷基化剂，拓扑异构酶抑制剂，嘌呤拮抗剂和类似物，嘧啶拮抗剂和类似物，磺酸烷基酯）；免疫抑制剂（例如肾上腺皮质类固醇，环孢菌素）；有义或反义寡核苷酸（例如 DNA，RNA，核酸类似物（例如肽核酸）或它们的任意结合物）；以及转录因子活性的抑制剂（例如轻质 d 族过渡金属）。

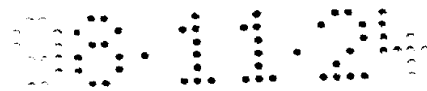
可在本发明中使用的其他治疗剂包括各种抗生素，包括抗细菌剂，抗微生物剂，抗病毒剂，抗原虫剂和抗真菌剂。这些药剂的代表性实例包括系统性抗菌素如氨基糖苷类（例如链霉素，阿米卡星，庆大霉素，奈替米星，妥布霉素）；第一、第二和第三代头孢菌素类（例如头孢噻吩，头孢唑林，头孢匹林，头孢拉定，头孢氨苄，头孢羟氨苄，头孢克洛，头孢孟多，头孢呋辛，头孢呋辛酯，头孢尼西，头孢雷特，头孢西丁，头孢噻肟，头孢替坦，头孢唑肟，头孢哌酮，头孢他啶，头孢曲松，拉氧头孢，其他半合成头孢菌素如头孢克肟和头孢泊肟酯）；青霉素类（例如青霉素 G（苄星青霉素和普鲁卡因盐），邻氯青霉素，双氯青霉素，甲氧西林，萘夫西林，苯唑西林，青霉素类，氨苄西林，阿莫西林，巴氨西林，环青霉素，羟苄西林，替卡西林，美洛西林，哌拉西林，阿洛



西林，氨基糖苷青霉素，和与棒酸结合的青霉素类）；喹诺酮类（例如西诺沙星，环丙氟哌酸，萘啶酸，诺氟沙星，吡哌酸，perloxacin，氟罗沙星，依诺沙星，氧氟沙星，托磺沙星，洛美沙星，喹诺酮的立体异构体）；磺胺类（例如磺胺西汀，磺胺甲二唑，磺胺甲基噁唑，磺胺异噁唑，柳氮磺胺吡啶，和甲氧苄啶加磺胺甲基噁唑结合物）；四环素类（例如强力霉素，地美环素，美他环素，米诺环素，土霉素，四环素）；大环内酯类（例如红霉素，其他半合成大环内酯如阿齐红霉素和克红霉素）；单菌霉素类（新合成类）（例如氨曲南，洛拉卡比）；和混杂药剂如放线菌素 D，阿霉素，丝裂霉素 C，新生霉素，光辉霉素，利福平，博来霉素，氯霉素，克林霉素，竹桃霉素，卡那霉素，林可霉素，新霉素，巴龙霉素，大观霉素，醋竹桃霉素，两性霉素 B，多粘菌素 E，制霉素，多粘菌素 B，灰黄霉素，氨曲南，环丝氨酸，克林霉素，多粘菌素 E 甲磺酸盐，亚胺培南-西司他丁，乌洛托品，甲硝唑，呋喃妥因，利福布坦，大观霉素，甲氧苄啶，杆菌肽，万古霉素，其他 β -内酰胺抗菌素。

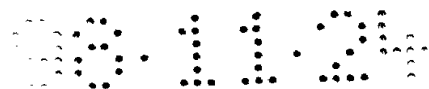
可在本发明中使用的其他治疗剂包括局部用抗菌素如杆菌肽，锌，新霉素，莫匹罗星，克林霉素；抗病原物质的多肽如 cecropionins，mangainins；和抗结核剂如磺胺地索辛，磺胺异噁唑，磺胺素嘧啶，盐酸乙胺丁醇，异烟肼，对氨基水杨酸钙。

可在本发明中使用的其他治疗剂包括抗菌素如碘，聚维酮碘，硼酸，硼酸钠，oxydale，高锰酸钾，乙醇，异丙醇，福尔马林，甲酚，地马唑，西卡宁，碘代十一碳炔酸苯基酯，六氯酚，间苯二酚，苄索氯铵，十二烷基硫酸钠，氯化汞，汞溴红，磺胺嘧啶银和其他无机和有机银和锌盐，一价和二价阳离子的盐，葡萄糖酸洗必太，盐酸烷基聚氨基乙基甘氨酸，苯扎氯铵，呋喃西林，制霉素，乙酰氨基磺胺，克霉唑，磺胺甲二唑，磺胺醋酰，二乙醇胺，托萘酯，吡咯尼群，十一碳烯酸，microazole，宛氏菌素，卤普罗近，和地马唑，（甲氯环素，曲古霉素和喷他霉素），青霉素类。抗真菌剂包括氟胞嘧啶，氟康唑，灰黄霉素，酮康唑，和咪康唑。抗病毒和 AIDS 剂包括阿昔洛韦，金刚烷胺，二脱



氧肌苷（以前为 ddI），灰黄霉素，氟胞嘧啶，膦甲酸，更昔洛韦，碘苷，咪康唑，克霉唑，乙胺嘧啶，利巴韦林，金刚乙胺，双脱氧胸苷（以前为 d4T），曲氟尿苷，三磺嘧啶，valacyclovir，阿糖腺苷，扎西他宾（以前为 ddC）和齐多夫定（以前为 AZT）。AIDS 的辅助治疗剂（例如促红细胞生成素；氟康唑（抗真菌）；干扰素 α -2a 和-2b（卡波西肉瘤）；阿托喹酮，喷他脒和三甲曲沙（抗原虫）；醋酸甲地孕酮（食欲增强剂）；利福布丁（抗分支杆菌的）。抗原虫剂的代表性实例包括：羟乙磺酸喷他脒，喹尼丁，氟喹和甲氟喹。

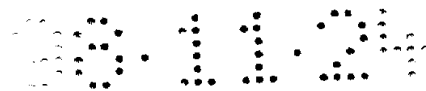
可在本发明中使用的其他治疗剂包括抗增殖剂，抗肿瘤剂或化学治疗剂。这种药剂的代表性实例包括雄激素抑制剂，抗雌激素剂和激素，如氟他胺，亮丙瑞林，他莫昔芬，雌二醇，雌莫司汀，甲地孕酮，己烯雌酚，睾内酯，戈舍瑞林，甲羟孕酮；细胞毒性试剂如六甲蜜胺，博来霉素，白消安，卡铂，卡莫司汀（BiCNU），顺铂，克拉立平，达卡巴嗪，放线菌素 D，柔红霉素，阿霉素，雌莫司汀，依托泊甙，洛莫司汀，环磷酰胺，阿糖胞苷，羟基脲，伊达比星，干扰素 α -2a 和-2b，异环磷酰胺，米托蒽醌，丝裂霉素，paclitaxel，链佐昌，替尼泊甙，塞替派，长春碱，长春新碱，长春瑞宾，抗代谢剂和抗有丝分裂剂，如氟尿苷，5-氟尿嘧啶，fluarabine，干扰素 α -2a 和-2b，亚叶酸，巯嘌呤，甲氧蝶呤，米托坦，光辉霉素，硫鸟嘌呤，秋水仙碱，anthracyclines 和其他抗菌素，叶酸拮抗剂和其他抗代谢物剂，长春花生物碱，亚硝基脲，DNA 烷化剂，嘌呤拮抗剂和类似物，嘧啶拮抗剂和类似物，磺酸烷基酯；酶如天冬酰胺酶，培加帕酶；放射性试剂（例如：Cu-64, Ga-67, Ga-68, Zr-89, Ru-97, Tc-99m, Rh-105, Pd-109, In-111, I-123, I-125, I-131, Re-186, Re-188, Au-198, Au-199, Pd-203, At-211, Pd-212 和 Bi-212），毒素（例如蓖麻毒蛋白，相思豆毒蛋白，白喉毒素，霍乱毒素，gelonin，商陆抗病毒蛋白，tritin，志贺毒素，和假单胞杆菌外毒素 A），辅助治疗剂如格兰西龙和奥丹亚龙（止恶心药，止吐药），地拉佐生（心肌病），硝酸镓（高钙血），GCSF 和 GMSCF（化学治疗和 BMT），IL-1 α ，IL-2，IL-3，IL-4，左旋米唑，毛果芸香碱（产



生于放射治疗时的唾液中)，锶 89（骨瘤）。

可在本发明中使用的其他治疗剂包括心血管试剂；抗高血压剂；肾上腺素能阻滞剂和刺激素（例如多沙唑嗪，胍那决尔，胍乙啶，酚苄明，哌唑嗪加泊利塞嗪，特拉唑嗪，甲基多巴，可乐定，胍那苄，胍法辛）； α -/ β -肾上腺素能阻滞剂（例如拉贝洛尔）；血管紧张肽转化酶（ACE）抑制剂（例如贝那普利，catopril，依那普利，依那普利拉，福辛普利，赖诺普利，莫西普利，喹那普利，雷米普利，和与钙通道阻滞剂及利尿剂的结合物；ACE-受体拮抗剂（例如 losartan）； β 阻滞剂（例如醋丁洛尔，阿替洛尔，倍他洛尔，比索洛尔，卡替洛尔，艾司洛尔，fimolol，吲哚洛尔，普萘洛尔，喷巴洛尔，美托洛尔，纳多洛尔，索他洛尔）；钙通道阻滞剂（例如阿米洛利，氟氯地平，苜普地尔，地尔硫草，伊拉地平，硝苯地平，维拉帕米，非洛地平，尼卡地平，尼莫地平）；抗心律失常药，I-IV 族（例如溴苄胺，丙吡胺，恩卡尼，氟卡尼，利多卡因，美西律，莫立昔嗪，普罗帕酮，普鲁卡因酰胺，喹尼丁，妥卡尼，艾司洛尔，普萘洛尔，醋丁洛尔，胺碘酮，索他洛尔，维拉帕米，地尔硫草，吲哚洛尔，盐酸布拉洛尔，三氯噻嗪，吠塞米，盐酸哌唑嗪，美托洛尔酒石酸盐，盐酸卡替洛尔，盐酸氧烯洛尔，和盐酸普萘洛尔）；和混杂抗心律失常药及强心剂（例如腺苷，地高辛，甲地高辛，咖啡因，盐酸多巴胺，盐酸多巴酚丁胺，盐酸酚乙醇胺，二羟丙茶碱，泛癸利酮，洋地黄）。

可在本发明中使用的其他治疗剂包括利尿剂（例如乙酰唑胺，阿米洛利，氨苯蝶啶加氢氯噻嗪结合物，螺内酯加氢氯噻嗪结合物，托塞米，吠塞米，利尿酸，布美他尼，氨苯蝶啶，甲氯噻嗪，氢氯噻嗪，metdazone，氯噻酮，氢氯噻嗪，美扎拉宗，甲氯噻嗪，泊利塞嗪，quinithazone，三氯噻嗪，benroflumethizaide，苯噻嗪）；低血压利尿药（例如美夫西特，戊氟噻嗪，bumetamide，双氢噻嗪，bentroflumethiazide，利血平）；肌收缩剂（例如地高辛，洋地黄毒甙，多巴酚丁胺，氨力农，米力农）；血管舒张药（例如罂粟碱，单硝酸异山梨酯和硝酸异山梨酯，硝酸甘油，dizoxide，胍屈嗪，米诺地尔，



nitroprusside, 哌唑嗪, 特拉唑嗪, 1,2,3-丙三醇一硝酸, 1,2,3-丙三醇硝酸和它们的酯衍生物, 戊四硝酯, 癸烟酯, 吗多明, 尼可莫尔, 双贝特, 盐酸地尔硫草, 桂利嗪, 双嘧达莫, 曲匹地尔, 盐酸曲美他嗪, 卡波罗孟, 乳酸普尼拉明, 二盐酸地拉草); 血管加压药 (例如间羟胺, 异丙肾上腺素, 苯福林, methaxamine); 抗凝剂和溶栓剂 (例如组织纤溶酶原激活物(TPA), 尿激酶, 链激酶, 尿激酶原, 肝素, 华法林); 钙调蛋白拮抗剂 (例如 H₇); 钠/钙反向转运物的抑制剂 (例如阿米洛利); 和 ryanodine 受体的抑制剂 (例如 Ryanodine); IP₃ 受体拮抗剂 (例如肝素)。

可在本发明中使用的其他治疗剂包括抗炎剂。这种药剂的代表性实例包括非甾类试剂 (“NSAIDS”) 如水杨酸盐类 (例如双水杨酯, 美沙拉胺, 二氟尼柳, 胆碱三水杨酸镁), 双氯芬酸, 二氟尼柳, 依托度酸, 非诺洛芬, 氯比洛芬, 布洛芬, 吲哚美辛, 甲芬那酸, 萘丁美酮, 萘普生, 吡罗昔康, 保泰松, 酮洛芬, S-酮洛芬, 酮咯酸, 氨丁三醇, 舒林酸, 托美丁)。其他抗炎药包括甾类试剂如倍氯米松, 倍他米松, 可的松, 地塞米松, 肤轻松, 氟尼缩松, 丙酸氟替卡松, 氟化类皮质激素, 二醋酸曲安西龙, 氢化可的松, 氢化泼尼松, 甲基氢化泼尼松和泼尼松。免疫抑制剂 (例如 adencorticosteroids, 环孢菌素); 和抗组胺药和减充血剂 (例如阿司咪唑(组胺 H₁-受体拮抗剂), azatidine, 溴苯那敏, 氯马斯汀, 氯苯那敏, 色甘酸, 塞庚啶, 双苯咪唑, 苯海拉明, 氢氯化物, 羟嗪, 甘草次酸, 高氯环嗪, 氢氯化物, 酮替芬, 氯雷他定, 萘甲唑林, 苯茚胺, 非尼拉敏, 异丙嗪, 特非那丁, 阿利马嗪, 曲吡那敏, 曲尼司特, 和减充血剂苯丙醇胺和伪麻黄碱。

可在本发明中使用的其他治疗剂包括中枢神经系统药剂。这种药剂的代表性实例包括抗抑郁药 (例如氟西汀, 帕罗西汀, Luvox, Mannorex 和 Effexor); CNS 刺激剂 (例如匹莫林, 去氧麻黄碱, 右旋苯丙胺); 催眠剂 (例如戊巴比妥, 艾司唑仑, 乙氯维诺, 氟西洋, 普鲁泊福, 司可巴比妥, 替马西洋, 三唑仑, 夸西洋, 酒石酸唑吡坦); 抗躁狂药 (例如锂); 镇静药和抗惊厥药巴比妥类 (例如戊巴比妥, 苯巴比妥, 司可

巴比妥，甲巴比妥，仲丁巴比妥扑米酮，异戊巴比妥)；非巴比妥类镇静药(例如苯海拉明，多西拉敏，咪达唑仑，地西洋，异丙嗪，劳拉西泮，替马西泮)；和其他混杂催眠药和镇静药(例如甲喹唑酮，格鲁米特，氟西洋，溴异戊酰脲，氟西洋，氯化物，卤咪唑仑，三唑仑，苯巴比妥，水合氯醛，硝甲西洋，艾司唑仑)。

可在本发明中使用的其他治疗剂包括阿尔茨海默试剂如他克林(可逆胆碱酯酶抑制剂)；帕金森氏症用药剂如金刚烷胺，甲磺酸溴麦角环肽，比哌立登，甲磺酸苯扎托品，卡比多巴-左旋多巴，苯海拉明，莨菪碱，左旋多巴，培高利特甲磺酸酯，丙环定，司来吉兰 HCl，苯海索 HCl；和其他混杂 CNS 药剂如氟奋乃静，氟他唑仑，苯巴比妥，甲基苯巴比妥，疏利达嗪，地西洋，苯溴马隆，盐酸氟卡帕明，氟塞西洋，氟丙嗪，氟哌啶醇，碳酸锂。

可在本发明中使用的其他治疗剂包括抗偏头痛剂(例如麦角胺，methylsergide，普萘洛尔，双氢麦角胺，舍曲林和 Immitrex)；脑后栓塞药剂(例如盐酸尼卡地平，马来桂哌齐特，己酮可可碱，酒石酸艾芬地尔)；局麻药(例如利多卡因，苯佐卡因，氨基苯甲酸乙酯，盐酸普鲁卡因，辛可卡因，普鲁卡因)；抗溃疡/抗反流剂(例如洛塞克(奥美拉唑)，醋谷胺铝，盐酸西曲酸酯，盐酸哌仑西平，西咪替丁，法莫替丁，甲氧氯普胺，雷尼替丁，左旋谷酰胺，吉法酯，和这些化合物的任何立体异构体，以及这些化合物的药学上可接受的盐，这样的化合物可单独使用或一种以上化合物结合使用，根据情况合适选择)；蛋白酶抑制剂(例如丝氨酸蛋白酶，金属内切蛋白酶和天冬氨酸蛋白酶(诸如 HIV 蛋白酶，肾素和组织蛋白酶)和巯基蛋白酶抑制剂(例如：苄氧基羰基-亮氨酸-正亮氨酸(calpeptin)和乙酰-亮氨酸-亮氨酸-正亮氨酸)；磷酸二酯酶抑制剂(例如异丁基甲基黄嘌呤)；酚噻嗪类；生长因子受体拮抗剂(例如血小板衍生生长因子(PDGF)，表皮生长因子，白细胞介素，转化生长因子 α 和 β ，以及酸性或碱性成纤维细胞生长因子)；反义寡核苷酸(例如与对 DPGF 或其他生长因子编码的 mRNA 部分互补的序列)；和蛋白激酶抑制剂(例如抑制酪氨酸激酶，蛋白激酶 C，

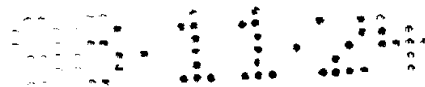


肌球蛋白轻链激酶， Ca^{2+} /钙调蛋白激酶 II，酪蛋白激酶 II）。

可在本发明中使用的其他治疗剂包括抗组织损伤剂。这种试剂的代表性实例包括超氧化物歧化酶；免疫调制剂（例如淋巴因子，单核因子，干扰素 α ， β ， τ -1b， α -n3， α -2b， α -2b；生长调节剂（例如 IL-2，肿瘤坏死因子，表皮生长因子，人蛋氨酸生长素，纤维结合素，GM-CSF，CSF，血小板衍生生长因子，生长激素，rG-CSF，表皮生长因子，IGF-1）。

可在本发明中使用的其他治疗剂包括单克隆和多克隆抗体（例如针对毒液、毒素、肿瘤坏死因子、细菌的那些）；激素（例如雌激素，孕酮，睾酮，人生长激素，肾上腺素，去甲肾上腺素，甲状腺素，甲状腺球蛋白，催产素，加压素，ACTH，生长激素，促甲状腺素，胰岛素，甲状旁腺素，降钙素）；维生素类（例如维生素 A，B 及其次维生素，C，D，E，F，G，J，K，N，P，PP，T，U 及它们的亚种）；氨基酸如精氨酸，组氨酸，脯氨酸，赖氨酸，甲硫氨酸，丙氨酸，苯丙氨酸，天冬氨酸，谷氨酸，谷氨酰胺，苏氨酸，色氨酸，甘氨酸，异亮氨酸，亮氨酸，缬氨酸；前列腺素（例如 E_1 ， E_2 ， F_{2a} ， I_2 ）；酶如胃蛋白酶，胰酶制剂，凝乳酶，木瓜蛋白酶，胰蛋白酶，胰脂肪酶，木瓜凝乳蛋白酶，菠萝蛋白酶，糜蛋白酶，链激酶，尿激酶，组织纤溶酶原激活物，纤维蛋白溶酶，脱氧核糖核酸酶，蛋白水解酶，胶原酶，天冬酰胺酶，肝素酶；缓冲剂和盐（例如 NaCl，阳离子包括： Na^+ ， K^+ ， Ca^{++} ， Mg^{++} ， Zn^{++} ， NH_4^+ ，三乙醇胺，阴离子包括：磷酸根，硫酸根， Cl^- ，枸橼酸根，抗坏血酸根，乙酸根，硼酸根，碳酸根离子）；防腐剂（例如苯扎氯铵，亚硫酸氢钠或钾，硫代硫酸钠或钾，尼泊金酯类）；抗痛风剂（例如别嘌醇，cochicine，丙磺舒，磺吡酮）；抗抑郁剂如阿米替林，阿莫沙平，地昔帕明，多塞平，米帕明，去甲替林，普罗替林，曲米帕明；避孕药（例如炔诺酮结合物，例如与炔雌醇或与美雌醇结合）；和止恶心药/止吐药（例如茶苯海明，羟嗪，美克洛嗪，甲氧氯普胺，丙氯拉嗪，异丙嗪，东莨菪碱，硫乙拉嗪，triethobenzamide）。

其他可在本发明中使用的治疗剂包括镇喘药，精神抑制药，支气管



扩张药，金化合物，降血糖药，降血脂药，麻醉剂，疫苗，影响骨代谢的药剂，抗腹泻药，致育药，肌肉松弛药，食欲抑制剂，激素如甲状腺激素，雌激素，孕酮，可的松和/或生长激素，其他生物活性分子如胰岛素，以及 T_H1 （例如白介素-2, -12 和 -15, γ 干扰素）或 T_H2 （例如白介素-4 和 -10）细胞因子。

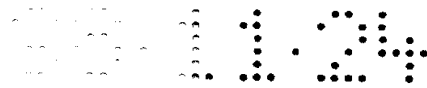
尽管为了阐述本发明而列出了上述治疗剂，但应理解本发明并不局限于此。例如，尽管具体提到了上述药剂，但本发明应理解为还包括这些药剂的类似物，衍生物和衍合物。比如，紫杉酚应理解为不仅指通常化学上可得到的紫杉酚形式，而且还包括类似物（例如上文中所述的 taxotere）和紫杉酚衍合物（例如紫杉酚-PEG，紫杉酚-聚糖，或紫杉酚-木糖）。另外，对于本领域技术人员来说很显然，尽管上文中提到的药剂被归于某一类中，但事实上所列出的许多药剂具有多种生物学活性。而且，每次可使用一种以上的治疗剂（即结合使用），或顺序释放。

聚合物

如上所述，本发明的治疗组合物还可包含聚合物。有各种各样的聚合物可用来包含和/或释放一种或多种上文中所述的治疗剂，包括例如可生物降解的和不可生物降解的组合物。可生物降解的组合物代表性实例包括白蛋白，胶原，明胶，淀粉，纤维素（甲基纤维素，羟丙基纤维素，羟丙甲基纤维素，羧甲基纤维素，乙酸邻苯二甲酸纤维素，乙酸琥珀酸纤维素，邻苯二甲酸羟丙甲基纤维素），酪蛋白，葡聚糖，多糖，纤维蛋白原，聚(D,L-丙交酯)，聚(D,L-丙交酯-共聚-乙交酯(英: glycolide))，聚(乙交酯)，聚(羟基丁酸酯)，聚(碳酸烷基酯)和聚(原酸酯)，聚酯，聚(羟基戊酸)，聚二噁酮，聚(对苯二甲酸乙烯酯)，聚(苹果酸)，聚(酒石酸)，聚酞，聚磷腈，聚(氨基酸)和它们的共聚物(一般参见 Illum, L., Davida, S.S.(eds.)“受控药物释放中的聚合物”，Wright, Bristol, 1987; Arshady, 可控释放杂志 17: 1 - 22, 1991; Pitt, 国际药理学杂志 59: 173 - 196, 1990; Holland 等人, 可控释放杂志 4: 155 - 180, 1986)。不可生物降解的聚合物的代表性实例包括 EVA 共聚物，硅酮橡胶，丙烯酸聚合物（聚丙烯酸，聚甲基丙烯酸，聚甲基丙烯酸甲

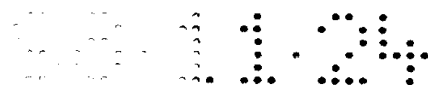
酯, 聚氰基丙烯酸烷基酯, 聚乙烯, 聚丙烯, 聚酰胺(尼龙 6,6), 聚氨酯, 聚(酯氨酯), 聚(醚氨酯), 聚(酯-脲), 聚醚(聚(氧化乙烯), 聚(氧化丙烯)), pluronic 非离子型表面活性剂, 聚(四甲二醇)), 硅酮橡胶和乙烯聚合物[聚乙烯吡咯烷酮, 聚(乙烯醇, 聚(乙酸邻苯二甲酸乙烯酯。还可利用或者是阴离子的聚合物(例如海藻酸盐, 角叉菜胶, 羧甲基纤维素和聚(丙烯酸), 或者是阳离子的(例如脱乙酰壳多糖, 聚-L-赖氨酸, 聚氮丙啶, 和聚(烯丙胺))(一般参见, Dunn 等人, *应用聚合物科学杂志* 50: 353 - 365, 1993; Cascone 等人, *材料科学杂志: 医用材料* 5: 770 - 774, 1994; Shiraishi 等人, *生物药学通报* 16(11): 1164 - 1168, 1993; Thacharodi 和 Rao, *国际药学杂志* 120: 115 - 118, 1995; Miyazaki 等人, *国际药学杂志* 118: 257 - 263, 1995)。特别优选的聚合载体包括聚(乙烯-乙酸乙烯酯)(40% 交联), 聚(D,L-乳酸)低聚物和聚合物, 聚(L-乳酸)低聚物和聚合物, 聚(乙醇酸), 乳酸和乙醇酸的共聚物, 聚(己内酯), 聚(戊内酯), 聚酞, 聚(己内酯)或聚(乳酸)与聚乙二醇的共聚物及其掺合物。

可以各种形式制成具有所需释放性能和/或具有特定所需性能的聚合物载体。例如, 聚合物载体可以制成随接触特定引发因素如 pH 而释放治疗剂(参见, 例如: Heller 等人, “化学自调节药物释放系统”, *医用聚合物 III*, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1988, 175-188 页; Kang 等人, *应用聚合物科学杂志* 48: 343 - 354, 1993; Dong 等人, *可控释放杂志* 19: 171 - 178, 1992; Dong 和 Hoffman, *可控释放杂志* 15: 141 - 152, 1991; Kim 等人, *可控释放杂志* 28: 143 - 152, 1994; Cornejo-Bravo 等人, *可控释放杂志* 33: 223 - 229, 1995; Wu 和 Lee, *药学研究* 10(10): 1544 - 1547, 1993; Serres 等人, *药学研究* 13(2): 196 - 201, 1996; Peppas, “pH-和温度敏感释放系统的基础”, Gurny 等人(编), *脉冲式药物释放*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1993, 41-55 页; Doelker, “纤维素衍生物”, 1993, Peppas 和 Langer(编), *生物聚合物 I*, Springer-Verlag, Berlin)。pH-敏感



聚合物的代表性实例包括聚(丙烯酸)及其衍生物(包括例如,均聚物如聚(氨基羧酸);聚(丙烯酸);聚(甲基丙烯酸)),这种均聚物的共聚物,以及聚(丙烯酸)和丙烯酰基单体的共聚物如上文中讨论的那些。其他 pH 敏感聚合物包括多糖如乙酸邻苯二甲酸纤维素;邻苯二甲酸羟丙甲基纤维素;乙酸琥珀酸羟丙甲基纤维素;乙酸偏苯三酸纤维素;和脱乙酰壳多糖。其他 pH 敏感聚合物还包括任何 pH 敏感聚合物与水溶性聚合物的混合物。

同样,聚合物载体可制成温度敏感型(参见,例如:Chen 等人,“新的用于阴道药物释放的移植到生物粘着聚丙烯酸骨架上的温度敏感型多聚醇的水凝胶”,*控释生物活性物质的研究进展国际专题集 22*: 167 - 168, 控释协会公司(Controlled Release Society, Inc.), 1995; Okano, “用于暂时性可控药物释放的刺激应答性水凝胶的分子设计”, *控释生物活性物质的研究进展国际专题集 22*: 111 - 112, Controlled Release Society, Inc., 1995; Johnston 等人, *药学研究 9(3)*: 425 - 433, 1992; Tung, *国际药理学杂志 107*: 85 - 90, 1994; Harsh 和 Gehrke, *可控释放杂志 17*: 175 - 186, 1991; Bae 等人, *药学研究 8(4)*: 531 - 537, 1991; Dinarvand 和 D'Emanuele, *可控释放杂志 36*: 221 - 227, 1995; Yu 和 Grainger, “新的热敏两亲凝胶:聚 N-异丙基丙烯酰胺-共聚-丙烯酸钠-共聚-正-N-烷基丙烯酰胺网络合成及生化特性”, 化学与生物学部, Oregon 科学与技术研究生院, Beaverton, OR, 820 - 821 页; Zhou 和 Smid, “相关星形高聚物的物理水凝胶”, 聚合物研究协会, 化学部, 环境科学与林学院, 纽约州立大学, Syracuse, NY, 822 - 823 页; Hoffman 等人, “刺激应答性水凝胶的特征孔径和水‘结构’”, 生物工程中心, 华盛顿大学, Seattle, WA, 828 页; Yu 和 Grainger, “交联 N-异丙基丙烯酰胺网络中的热敏溶胀性能:阳离子、阴离子和两性水凝胶”, 化学与生物学部, Oregon 科学与技术研究生院, Beaverton, OR, 829 - 830 页; Kim 等人, *药学研究 9(30)*: 283 - 290, 1992; Bae 等人, *药学研究 8(5)*: 624 - 628, 1991; Kono 等人, *可控释*

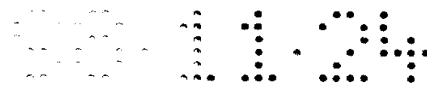


放杂志 30: 69 - 75, 1994; Yoshida 等人, 可控释放杂志 32: 97 - 102, 1994; Okano 等人, 可控释放杂志 36: 125 - 133, 1995; Chun 和 Kim, 可控释放杂志 38: 39 - 47, 1996; D'Emanuele 和 Dinarvand, 国际药理学杂志 118: 237 - 242, 1995; Katono 等人, 可控释放杂志 16: 215 - 228, 1991; Hoffman, “含有生物活性组分的热逆变水凝胶”, Migliaresi 等人(编), 医用聚合物 III, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1988, 161-167 页; Hoffman, “热逆变聚合物和水凝胶在治疗和诊断中的应用”, 关于药物释放系统的最新进展的第三次国际研讨会, 盐湖城, UT, 1987 年 2 月 24 - 27 日, 297 - 305 页; Gutowska 等人, 可控释放杂志 22: 95 - 104, 1992; Palasis 和 Gehrke, 可控释放杂志 18: 1 - 12, 1992; Paavola 等人, 药学研究 12(12): 1997 - 2002, 1995)。

热胶凝聚合物的代表性实例以及它们的凝胶温度 (LCST(°C)) 包括均聚物如聚(N-甲基-N-正丙基丙烯酰胺), 19.8; 聚(N-正丙基丙烯酰胺), 21.5; 聚(N-甲基-N-异丙基丙烯酰胺), 22.3; 聚(N-正丙基甲基丙烯酰胺), 28.0; 聚(N-异丙基丙烯酰胺), 30.9; 聚(N,N-二乙基丙烯酰胺), 32.0; 聚(N-异丙基甲基丙烯酰胺), 44.0; 聚(N-环丙基丙烯酰胺), 45.5; 聚(N-乙基甲基丙烯酰胺), 50.0; 聚(N-甲基-N-乙基丙烯酰胺), 56.0; 聚(N-环丙基甲基丙烯酰胺), 59.0; 聚(N-乙基丙烯酰胺), 72.0。另外也可通过制备上述物质的单体间的共聚物, 或通过这样的均聚物与其他水溶性聚合物如丙烯酰基单体结合而制成热胶凝聚合物(例如丙烯酸及其衍生物如甲基丙烯酸, 丙烯酸酯及其衍生物如甲基丙烯酸丁酯, 丙烯酰胺, 和 N-正丁基丙烯酰胺)。

热胶凝聚合物的其他代表性实例包括纤维素醚衍生物如羟丙基纤维素, 41 °C; 甲基纤维素, 55 °C; 羟丙甲基纤维素, 66 °C; 和乙基羟乙基纤维素, 和多聚醇如 F-127, 10-15 °C; L-122, 19 °C; L-92, 26 °C; L-81, 20 °C; 和 L-61, 24 °C。

利用本发明的聚合物载体可以制成各种剂型, 包括例如棒形设备, 小丸, 片块, 或胶囊(参见, 例如: Goodell 等人, 美国医院药理学杂志



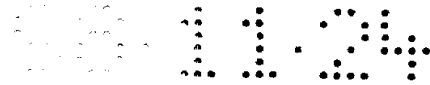
43: 1454 - 1461, 1986; Langer 等人, “大分子从聚合物中的控制释放”, *生物医学中使用的生物医学聚合物, 聚合材料和药物*, Goldberg, E.P., Nakagim, A. (编) Academic Press, 113-137 页, 1980; Rhine 等人, *药物科学杂志* 69: 265 - 270, 1980; Brown 等人, *药物科学杂志* 72: 1181 - 1185, 1983; 和 Bawa 等人, *可控释放杂志* 1: 259 - 267, 1985)。各种治疗剂可以封闭连接于聚合物基质中, 通过共价键结合, 或封装于微囊中。在本发明的某些优选实施方案中, 提供了非胶囊制剂形式的治疗组合物如微球(大小范围从纳米到微米), 糊剂, 各种尺寸的线剂, 膜剂和喷雾剂。

本发明的治疗组合物优选以合适的方式配制成适合预期用途的。在本发明的某些方面, 治疗剂应是生物相容的, 并在数天到数月内释放一种或多种治疗剂。例如, “快速释放”或“爆发释放”治疗组合物在 7 - 10 天内释放 10%、20% 或 25% (w/v) 以上治疗剂(例如紫杉酚)。在某些实施方案中, 这些“快速释放”的组合物应当能够释放化学治疗浓度的预期药剂(当可应用时)。在另一些实施方案中, “慢速释放”的治疗组合物在 7 - 10 天内释放小于 1% (w/v) 的治疗剂。另外, 本发明的治疗组合物应优选在数月内是稳定的并能在无菌条件下制备和储存。

在本发明的某些方面中, 治疗组合物可以根据特定用途配制成 50nm 到 500 μ m 范围内的任何大小。另一方面, 这样的组合物也可容易地作为“喷雾剂”应用, 其固化为膜或涂层。这种喷雾剂可用各种大小的微球制备, 包括例如从 0.1 μ m 到 3 μ m, 从 10 μ m 到 30 μ m, 和从 30 μ m 到 100 μ m 的微球。

本发明的治疗组合物也可制成各种“糊剂”或凝胶形式。例如, 在本发明的一个实施方案中, 治疗组合物在某一温度下(例如在大于 37 $^{\circ}$ C 的温度下, 如 40 $^{\circ}$ C, 45 $^{\circ}$ C, 50 $^{\circ}$ C, 55 $^{\circ}$ C 或 60 $^{\circ}$ C) 是液体, 而在另一温度下(例如正常室温, 或任何低于 37 $^{\circ}$ C 的温度下) 是固体或半固体。这样的“热糊剂”可容易地用本文中公开的方法制备。

在本发明的另一方面, 可将本发明的治疗组合物制成膜剂。这种膜



剂一般优选厚度小于 5、4、3、2 或 1mm，更优选小于 0.75mm 或 0.5mm 厚，最优选厚度小于 500 μ m 到 100 μ m。这样的膜剂优选是可伸缩的，具有良好的抗张强度（例如大于 50，优选大于 100，更优选大于 150 或 200M/cm²），良好的粘附性能（即容易粘附到潮湿或湿润表面），并具有可控的渗透性。

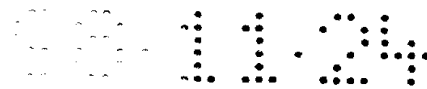
在本发明的某些实施方案中，该治疗组合物还可包含其他成分如表面活性剂（例如 pluronics 诸如 F-127, L-122, L-92, L-81, 和 L-61）。

在本发明的另一方面，所提供的聚合载体适于包含和释放疏水性化合物，含有与碳水化合物、蛋白质或多肽结合的疏水性化合物的载体。在某些实施方案中，该聚合物载体含有或包含一个或多个疏水性化合物的片段、包装或颗粒。例如，在本发明的一个实施方案中，疏水性化合物可以掺入含有疏水性化合物的基质中，然后该基质掺入聚合物载体中。此时可使用各种基质，包括例如碳水化合物和多糖如淀粉，纤维素，葡聚糖，甲基纤维素，和透明质酸，蛋白质或多肽如白蛋白，胶原和明胶。在另一些实施方案中，可将疏水性化合物包含在疏水芯中，而该芯包含在亲水性外壳中。例如，如实施例所述，紫杉酚可掺入具有亲水性外壳的疏水芯中（例如聚 D,L 乳糖-PEG 或 MePEG 填充剂）。

各种疏水性化合物均可从上述聚合物载体中释放，包括例如：能破坏微管功能的某些疏水性化合物如紫杉酚和雌氮芥；疏水性蛋白质如髓鞘碱性蛋白，CNS 髓鞘的蛋白脂质蛋白，疏水性细胞壁蛋白，外膜蛋白，膜蛋白（*欧洲分子生物学组织杂志* 12(9): 3409 - 3415, 1993），髓鞘少突胶质细胞糖蛋白（“MOG”）（*国际生物化学及分子生物学* 30(5): 945 - 958, 1993, 27 页, *癌症研究* 53(17): 4096 - 4101, 1913, 细菌视蛋白, 人表面活性蛋白（“HBS”, *生物化学杂志* 268(15): 11160 - 11166, 1993），和 SP-B 或 SP-C（*生物化学与生物物理学学报* 1105(1): 161 - 169, 1992）。

在下文中用实施例更详细地描述了将如上所述的那些治疗剂掺入聚合物载体中以形成治疗组合物的代表性实例。

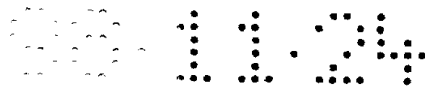
其他载体



同样可用于包含和/或传送本文中所述的治疗剂的其他载体包括:羟丙基 β 环糊精 (Cserhati 和 Hollo , *国际药理学杂志* 108 : 69 - 75 , 1994) , 脂质体 (参见, 例如: Sharma 等人, *癌症研究* 53 : 5877 - 5881 , 1993 ; Sharma 和 Straubinger , *药理学研究* 11(60) : 889 - 896 , 1994 ; WO 93/18751 ; 美国专利 No. 5,242,073) , 脂质体/凝胶 (WO 94/26254) , 毫微型胶囊 (Bartoli 等人, *微型胶囊杂志* 7(2) : 191 - 197 , 1990) , 微胞 (Alkan-Onyuksel 等人, *药理学研究* 11(2) : 206 - 212 , 1994) , 植入体 (Jampel 等人, *眼科学研究与视觉科学* 34(11) : 3076 - 3083 , 1993 ; Walter 等人, *癌症研究* 54 : 22017 - 2212 , 1994) , 毫微型颗粒 (Violante 和 Lanzafame PAACR) , 毫微型颗粒-改进型 (美国专利 No.5,145,684) , 毫微型颗粒 (表面改进型) (美国专利 No.5,399,363) , taxol 乳剂/溶液 (美国专利 No.5,407,683) , 微胞 (表面活性剂) (美国专利 No.5,403,858) , 合成磷脂化合物 (美国专利 No.4,534,899) , 气携式分散剂 (美国专利 No.5,301,644) , 液体乳剂, 泡沫喷雾剂, 凝胶洗液霜剂, 油膏, 分散气泡, 颗粒或液滴固体-或液体-气溶胶, 微乳状液 (美国专利 No.5,330,756) , 聚合物外壳 (毫微型-和微-胶囊) (美国专利 No.5,439,686) , 在表面活性剂中的 taxoid 基组合物 (美国专利 No.5,438,072) , 乳剂 (Tarr 等人, *药理学研究* 4 : 62 - 165 , 1987) , 毫微型球 (Hagan 等人, *控释生物活性物质的研究进展国际专题集* 22 , 1995 ; Kwon 等人, *药理学研究* 12(2) : 192 - 195 ; Kwon 等人, *药理学研究* 10(7) : 970 - 974 ; Yokoyama 等人, *可控释放杂志* 32 : 269 - 277 , 1994 ; Gref 等人, *科学* 263 : 1600 - 1603 , 1994 ; Bazile 等人, *药物科学杂志* 84 : 493 - 498 , 1994) 和植入体 (美国专利 No.4,882,168) 。

如下文中更详细的论述, 本发明的治疗剂, 可任意地掺入一种本文中所描述的载体中形成治疗组合物, 它可制备并用于治疗或预防各种疾病。

疾病的治疗或预防



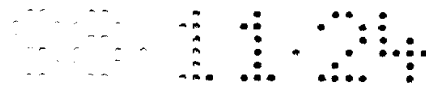
如上所述，本发明提供了治疗或预防与身体通道的阻塞有关的各种疾病的方法，包括例如血管疾病，肿瘤性阻塞，炎性疾病，和传染病。

例如，在本发明的一个方面，本文中所述的各种治疗组合物可用于治疗引起血管系统阻塞的血管病。这种疾病的代表性实例包括所有血管（任何动脉、静脉或移植物周围）的粥样硬化，这些血管包括但不限于：冠状动脉，主动脉，髂动脉，颈动脉，股总动脉，股表动脉，腘动脉，和在移植吻合术部位；血管痉挛（例如冠状血管痉挛和雷诺病）；再狭窄（在以前的手术如气囊血管成形术、分流术、固定模插入术和移植物插入手术部位的血管的狭窄）；炎性及自身免疫疾病（例如颞动脉炎，脉管炎）。

简单地说，在血管病如动脉粥样硬化中，白细胞，特别是单核细胞和T淋巴细胞粘附到内皮细胞上，特别是在动脉分支部位。当粘附到内皮上后，白细胞相应化学恒定刺激而通过内皮细胞里层迁移，并累积在动脉壁的内膜和平滑肌细胞上。这种动脉粥样硬化产生的内膜损伤称作“脂肪条”，该脂肪条中的单核细胞分化为巨噬细胞；该巨噬细胞和平滑肌细胞越来越多地吸收脂质和脂蛋白而成为泡沫细胞。

随着巨噬细胞的累积，覆在上面的内皮逐渐被机械损坏并被巨噬细胞释放的氧化脂质、氧衍生游离基和蛋白酶化学改变。泡沫细胞侵蚀内皮表面导致血管壁微溃疡。可能形成血栓的内皮下组织（例如胶原和其他蛋白质）与血流成分接触导致血小板附着到被损伤的内皮区域。血小板附着以及其他因素引发了生长因子的合成并释放到该环境中，包括血小板衍生生长因子（PDGF），血小板活化因子（PAF），和白细胞介素1和6（IL-1, IL-6）。这些旁分泌因子被认为刺激血管平滑肌细胞（VSMC）迁移和增殖。

在正常（未染病的）血管壁中，血管平滑肌细胞具有收缩表现型和较低的有丝分裂活性指数。然而，在血小板、巨噬细胞和内皮细胞释放的细胞因子和生长因子的影响下，VSMC的表现型发生变化，从成熟的收缩细胞变为未成熟的分泌细胞。转化后的VSMC在血管壁的中层增殖，迁移到内膜中，继续在内膜中增殖并产生大量胞内基质。这使进



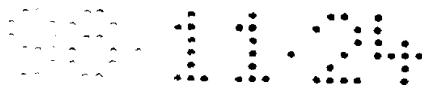
行中的血管损伤转化为纤维斑。由分泌型 VSMC 合成的胞内基质包括胶原，弹性蛋白，糖蛋白和糖胺聚糖，胶原包含动脉粥样硬化斑的主要胞内基质成分。弹性蛋白和糖胺聚糖结合脂蛋白并也促使损伤生长。纤维斑由含有平滑肌细胞和覆在上面的巨噬细胞、T 细胞和胞内基质的不同厚度的紧密连接的组织的纤维顶部组成。

除了 PDGF，IL-1 和 IL-6 以外，渗透到血管壁中的由细胞产生的其他促分裂因子包括：转化生长因子 β （TGF- β ），成纤维细胞生长因子（FGF），血小板反应蛋白，5-羟色胺，血栓烷 A₂，去甲肾上腺素，和血管紧张肽 II。这使得补充更多的细胞，更多的胞内基质合成和更多的脂质累积。这逐渐加大了动脉粥样硬化的损伤直到其显著侵占了血管腔。开始，当需要加快流动时，流过血管的血液阻塞仅使得远离动脉粥样硬化斑的组织局部缺血，而后来当损伤进一步阻塞了动脉后，在其余部位也发生局部缺血。

在增大的动脉粥样硬化斑中的巨噬细胞释放氧化脂质，游离基，弹性蛋白酶和胶原酶，这导致细胞损伤和邻近组织的坏死。损伤产生了坏死核心并转化为复合斑。复合斑是不稳定的损伤，它能：脱落导致栓塞形成；局部出血（继发于支持斑的滋养血管的破裂，因损伤迅速扩大而导致腔阻塞）；或溃疡和裂纹形成（这使血栓生成坏死核心与血流接触产生局部血栓形成或末梢栓塞形成）。即使上述后遗症无一发生，粘着性血栓也可有机化并加入斑中，由此加速其生长。另外，随着纤维蛋白原和凝血酶的局部浓度升高，血管平滑肌细胞在中层内增殖并刺激内膜；该过程最终也导致另外的血管狭窄。

正常动脉的中层和内膜从动脉腔中或从外膜中的滋养血管中得到氧气和提供的营养。随着动脉粥样硬化斑的形成，由外膜滋养血管产生的微脉管延伸到增厚的内膜和中层中。当斑更糟且斑的退化减少时这种血管网络变得更加广泛。

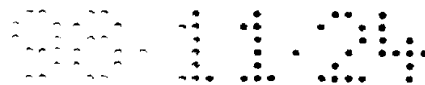
这些微脉管的出血可突然沉淀溶胀并使与动脉解剖、溃疡或血栓形成相关的斑破裂。也可假设为从这些微脉管中渗漏的血浆蛋白可吸引炎性细胞渗透到该区域，而这些炎性细胞可促进动脉粥样硬化斑的迅速生



长和相关的并发症（通过局部水肿和炎症）。

为了治疗诸如上文中讨论的那些血管病，可将各种治疗剂（有或没有载体）释放到身体通道的外部，或经身体通道的外膜释放到平滑肌细胞。在该情况下特别优选的治疗剂包括抗血管生成因子，血小板粘附/聚集的抑制剂（例如阿斯匹林，潘生丁，血栓烷合成抑制剂，导致血栓烷 AE 产生而不是更有效力的血栓烷 A₂ 产生的鱼油，结合纤维蛋白原和前列腺素的血小板 IIb/IIIa 受体的抗体），血管扩张剂（例如钙进入阻滞剂，和氧化氮供体硝化甘油，硝普盐和吗多明）和抗血栓形成药与凝血酶拮抗剂（例如肝素（低分子量肝素，华法林 andudin））。可使用的其他治疗剂包括抗炎剂（例如糖皮质激素，地塞米松和甲泼尼龙），生长因子抑制剂（例如 PDGF 拮抗剂如曲匹地尔）；受体抑制剂（例如 FGF、VEGF、PDGF 和 TNF 的受体的抑制剂），包括酪氨酸激酶和酪氨酸磷酸酶的启动子的抑制剂；抑生长素类似物，包括 angiopentin；血管紧张肽转化酶抑制剂；和 5HT₂ 血清能受体拮抗剂如酮色林）。其他治疗剂包括抗增殖剂（例如秋水仙碱，肝素，β（例如 P-32）或 γ 发射体（例如 Ir-192），钙进入阻滞剂例如维拉帕米，地尔硫革和硝苯地平，降低胆甾醇的 HMB Co-A 还原酶抑制剂如洛伐他汀，破坏微管功能的化合物如紫杉酚和上述氧化氮供体），和内皮重新愈合的启动子（例如 bFGF 和血管内皮细胞生长因子）。

在本发明的另一方面，本文中所述的治疗剂或组合物可用于治疗肿瘤性阻塞。简单地说，如本文中所用的，“肿瘤性阻塞”应理解为包括身体管道的任何肿瘤（良性或恶性的）阻塞，而不管肿瘤所存在的部位或组织学类型。代表性的实例包括胃肠道疾病（例如口咽癌（腺癌），食管癌（鳞状细胞，腺癌，淋巴瘤，黑素瘤），胃癌（腺癌，硬化性胃炎，淋巴瘤，平滑肌肉瘤），小肠肿瘤（腺瘤，平滑肌瘤，脂瘤，腺癌，淋巴瘤，类癌肿瘤），结肠癌（腺癌）和肛门直肠癌）；胆道疾病（例如导致胆囊阻塞的肿瘤如胰管癌（管腺癌，岛细胞肿瘤，囊腺癌），胆管癌和肝细胞癌）；肺部疾病（例如肺和/或气管/支气管通道的癌（小细胞肺癌，非小细胞肺癌）；女性生殖道疾病（例如输卵管的恶性肿瘤，子宫癌，宫颈癌，阴



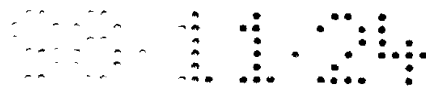
道癌)；男性生殖道疾病(例如睾丸癌，附睾癌，输精管肿瘤，前列腺癌，良性前列腺肥大)；和尿道疾病(例如肾细胞癌，肾盂的肿瘤，尿收集系统的肿瘤如过渡细胞癌，膀胱癌，和因良性狭窄或恶性肿瘤导致的尿道阻塞)。

例如，良性前列腺增生(BPH)是前列腺增大，特别是尿道周围的腺体的中部，它是在雄激素刺激延长时发生的。50岁以上的男人有80%以上受其影响。这种增大可导致通过前列腺的尿道部分受到压迫，从而使膀胱流出通道阻塞，即产生尿流需要异常的高膀胱压力。在1980年，在美国有367,000例为治疗BPH而进行了前列腺经尿道切除术。其他治疗包括药物，经尿道括约肌切开术，经尿道激光或微波治疗，经尿道高热治疗，经尿道超声波治疗，经直肠微波治疗，经直肠高热治疗，经直肠超声波治疗和手术切除。所有疗法都有缺点，包括阻断了括约肌机制而导致失禁和狭窄形成。

为了治疗如上文讨论的那些肿瘤疾病，可将各种治疗剂(有或没有聚合物载体)释放到身体通过的外部，或经身体通道的外膜释放到平滑肌细胞。在这方面特别优选的治疗剂包括上文所述的抗血管生成剂，抗增殖剂或抗肿瘤剂，包括例如可破坏微管功能的化合物，诸如紫杉酚及其衍生物或类似物。

例如，在一个优选的实施方案中，针或导管在超声波导引下通过经直肠途径(或经会阴)导引到邻近尿道的前列腺中并通过其释放治疗剂，优选在数腺体中，特别是在尿道周围。该针或导管也可在直接接触或在内窥镜、荧光镜、CT或MRI导引下放入，并间隔给药。另一方面，也可经导管或套针完成小丸的放入。上述过程可单独进行或与将固定模置于前列腺尿道中联合进行。因为避免了尿道器械操作法或损伤尿道，括约肌机制得以保持完整，避免了失禁，狭窄的可能性也减小了。

在本发明的另一方面，提供了预防或治疗会影响或导致身体通道阻塞的炎性疾病的方法。炎性疾病包括使得各种身体管道阻塞的急性和慢性炎症。代表性的实例包括脉管炎(例如颞动脉炎(颞动脉炎，Takayasu's 动脉炎)，结节性多动脉炎，变应性血管炎和肉芽肿病



(Churg-Strauss 疾病), 多血管炎交错综合征, 过敏性脉管炎(Henoch-Schonlein 紫癜), 血清病, 药物所致脉管炎, 传染性脉管炎, 肿瘤性脉管炎, 与相邻组织疾病有关的脉管炎, 与补体系统先天性缺陷有关的脉管炎), 韦格纳肉芽肿病, 川崎病, 中枢神经系统的脉管炎, 血栓闭塞性脉管炎和系统性硬化症); 胃肠道疾病(例如胰炎, 局限性回肠炎, 溃疡性结肠炎, 溃疡性直肠炎, 原发性硬化性胆管炎, 任何原因的良性狭窄包括意想性的(例如胆管、食管、十二指肠、小肠或结肠的狭窄)); 呼吸道疾病(例如哮喘, 过敏性肺炎, 石棉肺, 硅肺和其他形式的尘肺, 慢性支气管炎和慢性阻塞性气道疾病); 鼻泪管疾病(例如所有原因的狭窄包括意想性的); 和咽鼓管病(例如所有原因的狭窄包括意想性的)。

为了治疗如上文讨论的那些炎性疾病, 可将各种治疗剂(有或没有载体)释放到身体通过的外部, 或经身体通道的外膜释放到平滑肌细胞。在这方面特别优选的治疗剂包括非甾类制剂(“NSAIDS”)和甾类制剂, 以及上述抗血管生成因子。可使用的其他制剂包括各种抗血管生成因子, 包括例如破坏微管功能的化合物, 诸如紫杉酚和轻质“d”族过渡金属。

在本发明的另一方面, 提供了治疗或预防与身体通道的阻塞有关或是其成因的传染病的方法。简单地说, 传染病包括几种可导致身体通道阻塞的急性和慢性传染病, 包括例如男性生殖道的阻塞(例如因尿道炎、附睾炎、前列腺炎导致的狭窄); 女性生殖道的阻塞(例如阴道炎, 宫颈炎, 盆腔炎性疾病(例如结核病, 淋球菌感染, 衣原体感染, 肠球菌感染和梅毒)); 尿道阻塞(例如膀胱炎, 尿道炎); 呼吸道疾病(例如慢性支气管炎, 结核病, 其他分支杆菌感染(MAI等), 厌氧菌感染, 真菌感染和寄生虫感染)和心血管阻塞(例如细菌性动脉瘤和传染性心内膜炎)。

为了治疗如上文讨论的那些传染病, 可将各种治疗剂(有或没有载体)释放到身体通道的外部, 或经身体通道的外膜释放到平滑肌细胞。在这方面特别优选的治疗剂包括上文中所述的各种抗生素。



制剂和给药

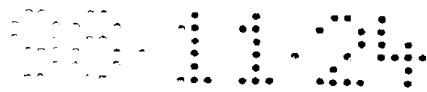
如上所述，本发明的治疗组合物可配制成各种形式（例如微球，糊剂，膜剂或喷雾剂）。另外本发明的组合物可配制成含有一种以上治疗剂，含有多种其他化合物，具有一定物理性能（如弹性，特定熔点，或规定释放速率）。在本发明的某些实施方案中，为了达到预期效果可将多种组合物结合（例如为了实现一种或多种抗血管生成因子的快速和缓慢释放或延迟释放可将数种微球制剂结合）。

本发明的治疗剂和组合物可单独给药，或与药学上或生理学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂结合给药。一般说来，这样的载体在所用的剂量和浓度下对于接受者应是无毒的。通常，这样的组合物的制备必需要让治疗剂与缓冲剂，抗氧剂如抗坏血酸，低分子量（少于约 10 个残基）多糖，蛋白质，氨基酸，碳水化合物包括葡萄糖、蔗糖或糊精，螯合剂如 EDTA，谷胱甘肽和其他稳定剂和赋形剂相结合。中性缓冲盐水或与非特异性血清白蛋白混合的盐水是合适的稀释剂。

如上所述，本文中提供的治疗剂，治疗组合物，或药物组合物可制备成用于多种不同途径给药的，包括例如在直接视线（例如在手术时或经内窥镜治疗时）直接释放到身体通道，或通过经皮药物释放途径而传送到身体通道的外部（外膜）表面（例如血管周释放）。其他代表性的给药途径包括胃镜检查， ECRP 和结肠镜检查，它们不需要全部手术过程和住院治疗，但可能需要医务人员在场操作。

简言之，血管周药物释放涉及局部化治疗剂的经皮给药（经常是缓释的），是利用针或导管经超声波、CT、荧光镜、MRI 或内窥镜引导直接给药到疾病部位。另外该过程也可在直接可视条件下或在其他显像引导下在手术中进行。这样的操作也可与血管内操作如血管成形术、粥样硬化斑切除术或插入固定模结合进行，或与动脉手术过程如动脉内膜剥除术、血管或移植物修复或移植物插入联合进行。

例如，在一个实施方案中，可将聚合紫杉酚制剂注射到血管壁中或应用于外膜表面使药物浓度在最需要生物活性的区域保持最高。这有可能减少在血管内药物释放设备（如加载药物的固定模）的表面上可被连



续血流增强的药物的局部“清洗”。将有效的治疗剂给药到血管的外表面可减少该血管的阻塞和降低与血管内操作有关的并发症的危险(诸如再狭窄, 栓塞形成, 血栓形成, 斑破裂, 和系统性药物毒性)。

例如, 对于股浅表动脉狭窄的患者, 将用常规方式进行气囊血管成形术(即, 气囊血管成形术导管沿动脉经导引线传下来并使穿过损伤部位的气囊充气)。在进行血管成形术之前, 之中, 或之后, 将针在超声波、荧光镜或 CT 导引下通过皮肤插入, 而治疗剂(例如灌入缓释聚合物中的紫杉酚)通过针或导管以圆周的方式直接渗透在动脉中的狭窄处周围。这可在任何动脉、静脉或移植物周围进行, 但该手术的理想状况包括颈动脉、冠状动脉、髂动脉、股总动脉、股浅表动脉和腘动脉疾病和在移植吻合术部位。逻辑上的静脉部位包括在静脉周围渗透, 其中插入了内置导管。

本文中提供的治疗剂, 治疗组合物和药物组合物可置于容器中, 同时包装材料提供了有关的使用说明书。一般说来, 这样的说明书包括描述试剂浓度的确实表述, 以及在某些实施方案中, 提供了重新构成抗血管生成因子、抗血管生成组合物或药物组合物需要的赋形剂成分或稀释剂(例如水, 盐水或 PBS)的相对用量。

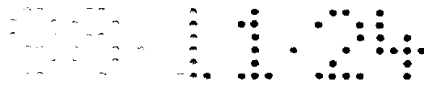
以下实施例是为了阐述本发明, 而不起限制作用。

实施例

实施例 1

“糊剂”的制备

如上所述, 本发明提供了多种可在各种临床情况中使用的含有聚合物的药物组合物。例如, 组合物可以制成: (1) 作为流体应用到预期部位的“热糊剂”, 其在特定温度(例如体温)下凝固为预期形状的固体; (2) 可直接或通过特型设备(例如内窥镜)而释放到预期部位的喷雾剂(即“毫微型雾滴”(nanospray)), 其随后硬化为固体粘附到其应用的组织上; (3) 可直接或通过特型设备应用到预期部位的粘着的、柔韧的、有弹性的、载药聚合物膜, 它优选粘附到其应用的部位上; 和(4) 由微球在合适的载体基质中的悬液组成的液体, 将其直接或经



特型设备应用到预期部位，并在应用部位形成一层微球。下面更详细地列出上述各实施方案的代表性实例。

A. 制备热糊剂的方法

在以下实验中使用的试剂和设备包括无菌玻璃注射器（1ml），Corning 加热板/搅拌器，20ml 玻璃闪烁管，模子（例如 50 μ l DSC 盘或 50ml 盖住内部的离心管），解剖刀和镊子，聚己内酯（“PCL” - 摩尔重量 10,000-20,000；Polysciences, Warrington, Pennsylvania USA），和紫杉酚（Sigma 级别 95 % 最小纯度）。

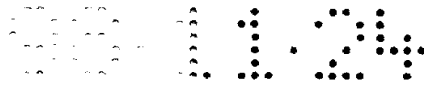
将重 5.00g 的聚己内酯直接加入 20ml 玻璃闪烁管中。将管置于含有 50ml 水的 600ml 烧杯中。将该烧杯温和加热到 65 $^{\circ}$ C 并在该温度下保持 20 分钟。这将使聚合物溶解。在 65 $^{\circ}$ C 下将已知重量的紫杉酚，或其他血管形成抑制剂充分混合到溶解的聚合物中。将该熔化的聚合物倒入预热（60 $^{\circ}$ C 烘箱）的模子中。利用刮勺帮助该倾倒过程。使模子冷却，则聚合物固化。将聚合物切割或打碎成小块（约 2mm \times 2mm 大小）。这些小块必须能装入 1ml 玻璃注射器中。将 1ml 玻璃注射器的栓塞拿掉（不拿走顶部的盖子）并将其置于天平上。将天平调零。

将重 0.5g 的小块直接加入该注射器的开口端。将该玻璃注射器竖直（加盖端向下）放入 65 $^{\circ}$ C（Corning 加热板）下的含有蒸馏水的 500ml 玻璃烧杯中以使水不能进入注射器的外管中。聚合物在该设备中在 10 分钟内完全溶解。当聚合物小块已溶解后，从水浴中取出注射器外管，将其保持水平并除去盖子。将栓塞插入外管中并将溶解的聚合物在外管的顶端压成粘着的团。将该注射器盖上并使其冷却至室温。

应用时，可以将该注射器重新加热到 60 $^{\circ}$ C 并作为液体给药，当其冷却至体温时固化。

B. 制备毫微型雾滴的方法

毫微型雾滴是小微球在盐水中的悬液。如果微球非常小（即直径在 1 μ m 以下），它们将形成胶体，则该悬液将无法在重力作用下沉降。按照下文中的详细描述，可制成适于通过指泵式 (finger pumped) 气溶胶而沉积到组织上的 0.1 μ m 到 1 μ m 微粒的悬液。用来制备毫微型雾滴



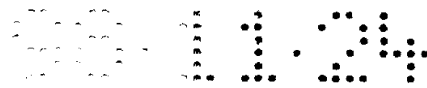
的设备和材料包括 200ml 水套层烧杯 (Kimax 或 Pyrex), Haake 循环水浴, 直径 2 英寸的顶部搅拌器和调节器 (4 叶片, 螺旋桨式不锈钢搅拌器; Fisher 牌), 500ml 玻璃烧杯, 加热板/搅拌器 (Corning 牌), 4 × 50ml 聚丙烯离心管 (Nalgene), 有塑料插入盖的玻璃闪烁管, 台式离心机 (Beckman), 高速离心机 - 落地型 (JS 21 Beckman), Mettler 分析天平 (AJ 100, 0.1mg), Mettler 数字上皿式天平 (AE 163, 0.01mg), 自动移液管操纵器 (Gilson), 无菌移液管尖, 泵推式气溶胶 (Pfeiffer pharmaceuticals) 20ml, 层流通风橱, 聚己内酯 (“ PCL ” - 摩尔重量 10,000-20,000; Polysciences, Warrington, Pennsylvania USA), “洗过的” (参见上文) 乙烯乙酸乙烯酯 (“ EVA ”), 聚(DL)乳酸 (“ PLA ” - 摩尔重量 15,000-25,000; Polysciences), 聚乙烯醇 (“ PVA ” - 摩尔重量 124,000-186,000; 99 % 水解; Aldrich Chemical Co., Milwaukee WI USA), 二氯甲烷 (“ DCM ” 或 “ methylene chloride ”; HPLC 级, Fisher scientific), 蒸馏水, 无菌盐水 (Becton 和 Dickenson or 等同物) 。

1. 制备 5%(w/v) 聚合物溶液

根据所制备的聚合物溶液, 将重 1.00g 的 PCL 或 PLA 或各 0.50g 的 PLA 和洗过的 EVA 直接加入 20ml 玻璃闪烁管中。用量筒加入 20ml 二氯甲烷并将该闪烁管紧紧盖上。将该管在室温 (25 °C) 中放置 1 小时或直到所有的聚合物均已溶解 (可偶尔用手振摇) 。聚合物的溶解可以通过视力检查来测定, 该溶液应是澄清的。给该闪烁管贴上标签标出溶液的名字和其产生的日期。将该溶液储存于室温下并在两周内使用。

2. 制备 3.5%(w/v) PVA 储液

该溶液可按照下文中给出的方法制备, 或者用为了生产微球而制备的 5%(w/v) PVA 储液 (参见实施例 2) 稀释而成。简单地说, 称取 17.5g PVA 直接加入 600ml 玻璃烧杯中, 并加入 500ml 蒸馏水。在该烧杯中放置 3 英寸涂覆特氟隆的搅拌棒。用玻璃盖将该烧杯盖上以减少蒸发损失。将该烧杯置于含有 300ml 水的 2000ml 玻璃烧杯中。这将用作水浴。在 85 °C 下以 300rpm 搅拌该 PVA (Corning 加热板/搅拌器) 2 小时



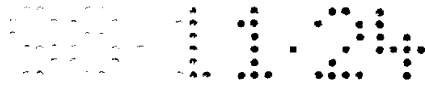
或直到完全溶解。PVA 的溶解可以通过视力检查来测定，该溶液应是澄清的。用移液管将该溶液转移到玻璃螺旋盖储存容器中并在 4 ℃ 下储存最多两个月。使用或稀释前应将该溶液加热到室温。

3. 制备毫微型雾滴的方法

将搅拌装置置于通风橱中。将 100ml 3.5% PVA 溶液置于 200ml 水套层烧杯中。将 Haake 水浴与该烧杯连结并使内容物在 27 ℃ (+/-1 ℃) 平衡 10 分钟。设定顶部搅拌器的开始速率为 3000rpm(+/-200rpm)。将顶部搅拌器的叶片浸入 PVA 溶液一半并开始搅拌。用 5ml 自动移液管操纵器将 10ml 聚合物溶液（所用的聚合物溶液根据所制备的毫微型雾滴类型而定）在 2 分钟内滴入搅拌的 PVA 中。3 分钟后将搅拌速率调节到 2500rpm(+/-200rpm) 并保持 2.5 小时。2.5 小时后，从毫微型雾滴制剂中除去搅拌叶片并用 10ml 蒸馏水冲洗。将冲洗溶液并入毫微型雾滴制剂中。

将微球制剂倒入 500ml 烧杯中。用 70ml 蒸馏水洗涤该套层水浴。将 70ml 冲洗溶液并入微球制剂中。用玻璃棒搅拌 180ml 微球制剂并将其等量地倒入 4 个聚丙烯 50ml 离心管中。将各管盖上盖子。盖好的离心管在 10000g(+/-1000g) 离心 10 分钟。利用 5ml 自动移液管操纵器或通过真空吸取，从各丸状微球的 PVA 溶液中吸出 45ml 并丢弃。向各离心管中加入 5ml 蒸馏水并利用涡流使各管中的微球再次悬浮。用 20ml 蒸馏水将 4 份微球悬液汇集到 1 个离心管中。为了洗涤微球，将该毫微型雾滴制剂在 10000g(+/-1000g) 离心 10 分钟。吸出丸状微球的上清液。加入 40ml 蒸馏水并利用涡流使微球再次悬浮。再重复该过程两次，共洗涤三次。第四次洗涤中当再次悬浮微球时仅使用 10ml（不是 40ml）蒸馏水。洗涤完四次后，将该微球制剂转移到预称重的玻璃闪烁管中。

将该闪烁管盖上并让其在室温（25 ℃）下放置 1 小时以使直径 2 μ m 和 3 μ m 的微球在重力下沉降出来。1 小时后，用 5ml 自动移液管操纵器吸出上部 9ml 悬液。将该 9ml 悬液加入无菌加盖的 50ml 离心管中。在 10000g(+/-1000g) 下离心该悬液 10 分钟。除去上清液并将该小丸再



次悬浮于 20ml 无菌盐水中。该悬液在 10000g(+/-1000g)下离心 10 分钟。除去上清液并将该小丸再次悬浮于无菌盐水中。所用的盐水的量根据所需的悬液终浓度而定(通常为 10%w/v)。用无菌盐水彻底冲洗气溶胶设备并将该毫微型雾滴悬液加入气溶胶中。

C. 制备加载紫杉酚的毫微型雾滴

为了制备含有紫杉酚的毫微型雾滴,使用紫杉酚(Sigma 级 95% 纯度)。为了制备聚合物药物储液,称取合适量的紫杉酚直接加入 20ml 玻璃闪烁管中。合适的量根据紫杉酚在毫微型雾滴中将占的百分数而定。例如,如果需要含有 5% 紫杉酚的毫微型雾滴,则应称取 25mg 紫杉酚,因为所加入的聚合物的量是 10ml 5% 聚合物的二氯甲烷溶液(参见下一步骤)。

将 10ml 合适的 5% 聚合物溶液加入含有紫杉酚的闪烁管中。将该管盖上盖并用涡流或手动搅动使紫杉酚溶解(视力检测以确保紫杉酚溶解)。给该管贴上标签标出其产生的日期。这将在其生成当天使用。

继续进行上文中描述的过程,只是用聚合物/药物(例如紫杉酚)储液代替聚合物溶液。

D. 制备膜的方法

术语膜是指形成多种几何形状之一的聚合物。该膜可以是薄的弹性聚合物片或 2mm 厚的聚合物圆片。该膜设计为将置于暴露的组织上以使任何被封装的药物在组织部位在较长的时间内从聚合物中释放。膜可以用多种方法制备,包括例如通过浇铸或通过喷雾。

在浇铸技术中,将聚合物溶解并倒入定型模中或将其溶于二氯甲烷并倒入定型模中。然后该聚合物或当其冷却时固化或当溶剂蒸发时固化。在喷雾技术中,将聚合物溶于溶剂中并喷洒到玻璃上,当溶剂蒸发时聚合物在玻璃上固化。反复喷洒可使聚合物形成可从玻璃上剥落下来的膜。

在这些实验中使用的试剂和设备包括小烧杯, Corning 加热板搅拌器, 浇铸模(例如 50ml 加盖离心管)和模支撑设备, 带盖的 20ml 玻璃闪烁管(塑料插入型), TLC 雾化器, 氮气罐, 聚己内酯(“PLC”



- 摩尔重量 10,000-20,000; Polysciences), 紫杉酚 (Sigma95 % 纯度), 乙醇, “洗过的” (参见上文) 乙烯乙酸乙烯酯 (“EVA”), 聚(DL)乳酸 (“PLA” - 摩尔重量 15,000-25,000; Polysciences), 二氯甲烷 (HPLC 级 Fisher Scientific)。

1. 制备膜的方法 - 溶解浇铸

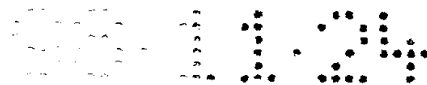
称取已知重量的 PCL 直接加入小玻璃烧杯中。将该烧杯置于含有水的大烧杯 (用作水浴) 中并将其放在 70 °C 加热板上 15 分钟或直到聚合物已完全溶解。将已知重量的药物加入溶解后的聚合物中并充分搅拌该混合物。为了帮助药物在溶解的 PCL 中分散, 可将药物悬浮/溶解于少量 (<10 % 体积的溶解 PCL) 100 % 乙醇中。然后将该乙醇悬液混合到溶解聚合物中。将该已溶解聚合物倒入模子里并使其冷却。冷却后, 将该膜储存于容器中。

2. 制备膜的方法 - 溶剂浇铸

称取已知重量的 PCL 直接加入 20ml 玻璃闪烁管中并加入足量二氯甲烷以形成 10 % w/v 溶液。将该管盖上盖并将溶液混合。向该溶液中加入足量紫杉酚以达到紫杉酚的预期终浓度。用手振摇或利用涡流使紫杉酚溶于溶液中。让该溶液放置 1 小时 (以清除存在的气泡) 然后将其缓慢倒入模子里。所用的模子根据需要的形状而定。将该模子置于通风橱中过夜。这将使二氯甲烷蒸发。或让膜留在模子里储藏或将其剥离出来并在密闭容器中储藏。

3. 制备膜的方法 - 喷雾法

称取足量的聚合物直接加入 20ml 玻璃闪烁管中并加入足量二氯甲烷使达到 2%w/v 溶液。将该闪烁管盖上盖并混合该溶液使聚合物溶解 (手振摇)。用合适的模子支撑设备将模子以垂直方向装配在通风橱中。将该模子支撑设备放在合适的支持物 (例如倒置的 2000ml 玻璃烧杯) 上使其距离通风橱底板 6 - 12 英寸以使水平喷雾。用自动移液管将合适体积 (最小 5ml) 的 2 % 聚合物溶液转移到分离的 20ml 玻璃闪烁管中。向该溶液中加入足量紫杉酚并通过用手振摇加盖的闪烁管使其溶解。为了准备喷雾, 将该闪烁管的盖子拿开并 (仅) 将 TLC 雾化器



的外管浸入聚合物溶液中。注意：在该过程中并不使用雾化器的储存器 - 20ml 玻璃管用作储存器。

将氮气罐与雾化器的气体入口连接。逐渐升高压力直到雾化和喷雾开始。注意压力并在整个过程中使用该压力。用 5 秒振荡喷雾喷洒模子，在喷雾之间有 15 秒干燥时间。在干燥期间，用手指将气体管道卷起来以避免破坏喷雾。继续喷洒直到合适厚度的聚合物沉积在模子上。厚度根据需要而定。让喷好的膜附着在模子上并储藏于密闭容器中。

E. 制备毫微型糊剂 (nanopaste) 的方法

毫微型糊剂是微球悬浮于亲水性凝胶中的悬液。在本发明的一个方面中，凝胶或糊剂可按照使加载了药物的微球位于靶组织附近的方法而涂抹在组织上。因为是水基的，糊剂将很快被体液稀释使糊剂的粘着性下降且微球倾向沉积在组织附近。由此封装了药物的微球集中定位在靶组织周围。

在这些实验中使用的试剂和设备包括玻璃烧杯，卡波泊尔 (Carbopol) 925(药用级，Goodyear Chemical Co.)，蒸馏水，氢氧化钠水溶液 (1M)，氢氧化钠水溶液 (5M)，以 20%w/v 悬浮于水中的 0.1 μm -3 μm 大小的微球 (参见上文)。

1. 制备 5 % w/v Carbopol 凝胶

向 1M 氢氧化钠中加入足量 carbopol 得到 5%w/v 溶液。为了将 carbopol 溶于 1M 氢氧化钠中，使该混合物放置约 1 小时。在这段时间里，用玻璃棒搅拌该混合物。1 小时后，测定混合物的 pH。pH 低表明 carbopol 未完全溶解。希望 pH 达到 7.4。用 5M 氢氧化钠调节 pH。这是通过将 5M 氢氧化钠缓慢滴加到该混合物中进行的，搅拌该混合物并测定其 pH。通常花费约 1 小时将 pH 调节到 7.4。一旦 pH 达到 7.4，将该凝胶盖住并放置 2 到 3 小时。之后，检查 pH 确保其仍为 7.4。如果有变化，则利用 5M 氢氧化钠将其调回到 pH7.4。使该凝胶放置数小时以确保 pH 稳定在 7.4。重复该过程直到达到预期的 pH 值并且是稳定的。给该容器贴上标签标出凝胶的名称及日期。在下周内用该凝胶制备毫微型糊剂。



2. 制备毫微型糊剂的方法

将足量 $0.1\mu\text{m}$ 到 $3\mu\text{m}$ 微球加入水中制得微球的 20 % 悬液。将 8ml 5%w/v carbopol 凝胶加入玻璃烧杯中，向该烧杯中加入 2ml 20 % 微球悬液。用玻璃棒或混合刮勺搅拌该混合物以使微球充分分散到整个凝胶中。这通常需要 30 分钟。一旦微球已分散到凝胶中，就将该混合物置于储存瓶中。该瓶储存于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下。它必须在 1 个月内使用。

实施例 2

微球的制备

下面描述优选用于制备微球的设备，包括：200ml 水套层烧杯（Kimax 或 Pyrex），Haake 循环水浴，直径 2 英寸的顶部搅拌器和调节器（4 叶片，螺旋桨式不锈钢搅拌器；Fisher 牌），500ml 玻璃烧杯，加热板/搅拌器（Corning 牌）， $4 \times 50\text{ml}$ 聚丙烯离心管（Nalgene），有塑料插入盖的玻璃闪烁管，台式离心机（GPR Beckman），高速离心机-落地型（JS 21 Beckman），Mettler 分析天平（AJ 100， 0.1mg ），Mettler 数字上皿天平（AE 163， 0.01mg ），自动移液管操纵器（Gilson），试剂包括：聚己内酯（“PCL” - 摩尔重量 10,000-20,000；Polysciences, Warrington, Pennsylvania USA），“洗过的”（参见后面的“洗涤”方法）乙烯乙酸乙烯酯（“EVA”），聚(DL)乳酸（“PLA” - 摩尔重量 15,000-25,000；Polysciences），聚乙烯醇（“PVA” - 摩尔重量 124,000-186,000；99 % 水解；Aldrich Chemical Co., Milwaukee WI USA），二氯甲烷（“DCM”或“methylene chloride”；HPLC 级 Fisher scientific），和蒸馏水。

A. 制备 5%(w/v) 聚合物溶液

根据所制备的聚合物溶液，将 1.00g PCL 或 PLA，或各 0.50g 的 PLA 和洗过的 EVA 直接称取到 20ml 玻璃闪烁管中。然后加入 20ml 二氯甲烷，并将该管盖紧。将该管在室温（ $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ）下储存 1 小时（偶尔用手振摇），或直到所有的聚合物均已溶解（溶液应是澄清的）。该溶液可在室温下储存至少两周。



B. 制备 5%(w/v)PVA 储液

将 25g PVA 直接称取到 600ml 玻璃烧杯中，加入 500ml 蒸馏水，同时加入 3 英寸涂覆特氟隆的搅拌棒。用玻璃盖将该烧杯盖上以减少蒸发损失并将其置于含有 300ml 水的 2000ml 玻璃烧杯中（用作水浴）。在 85 °C 下以 300rpm 搅拌该 PVA（Corning 加热板/搅拌器）2 小时或直到完全溶解。PVA 的溶解可以通过视力检查来测定，该溶液应是澄清的。然后将该溶液转移到玻璃螺旋盖储存容器中并在 4 °C 下储存最多两个月。不过该溶液在使用或稀释前应加热到室温。

C. 制备微球的方法

根据所制备的微球的大小（参见表 1），将 100ml PVA 溶液（表 1 中给出的浓度）置于 200ml 水套层烧杯中。将 Haake 循环水浴与该烧杯连结并使内容物在 27 °C（+/-1 °C）平衡 10 分钟。根据所制备的微球的大小（参见表 1），设定顶部搅拌器的开始速率，将顶部搅拌器的叶片浸入 PVA 溶液一半。然后开始搅拌，然后用 5ml 自动移液管操纵器将 10ml 聚合物溶液（所用的聚合物溶液根据所制备的微球的类型而定）在 2 分钟内滴入搅拌的 PVA 中。3 分钟后调节搅拌速率（参见表 1）并将该溶液再搅拌 2.5 小时。然后从微球制剂中取出搅拌叶片并用 10ml 蒸馏水冲洗使冲洗溶液流入微球制剂中。然后将该微球制剂倒入 500ml 烧杯中，用 70ml 蒸馏水洗涤该套层水浴，该冲洗溶液也流入微球制剂中。用玻璃棒搅拌该 180ml 微球制剂并将其等量地倒入 4 个聚丙烯 50ml 离心管中。将各管盖上盖子并离心 10 分钟（表 1 中给出了离心力）。利用 5ml 自动移液管操纵器或通过真空吸取从各丸状微球的 PVA 溶液中吸出 45ml。

表 1

各直径范围的微球所需的 PVA 浓度，搅拌速率，和离心力

制备阶段	微球直径范围		
	30 μ m-100 μ m	10 μ m-30 μ m	0.1 μ m-3 μ m
PVA 浓度	2.5%(w/v)(即用蒸馏水稀释 5%)	5%(w/v)(即未稀释储液)	3.5%(w/v)(即用蒸馏水稀释 5%)



	储液)		储液)
起始搅拌速率	500rpm +/-5-rpm	500rpm +/-50rpm	3000rpm +/-200rpm
调节后的搅拌速率	500rpm +/-5-rpm	500rpm +/-50rpm	2500rpm +/-200rpm
离心力	1000g +/-100g (台式)	1000g +/-100g (台式)	10000g +/-1000g (高速型)

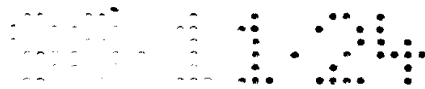
向各离心管中加入 5ml 蒸馏水并利用涡流使微球再次悬浮。用 20ml 蒸馏水将 4 份微球悬液汇集到 1 个离心管中并再离心 10 分钟（表 1 中给出的离心力）。该过程再重复两次，共洗涤三次。然后该微球离心最后一次，并再次悬浮于 10ml 蒸馏水中。洗涤完最后一次后，将该微球制剂转移到预称重的玻璃闪烁管中。将该闪烁管盖上盖并让其在室温（25℃）下放置过夜以使微球在重力下沉降出来。大小在 0.1 μm 到 3 μm 范围内的微球没有在重力作用下沉降出来，因此它们留在 10ml 悬液中。

D. 将 10 μm 到 30 μm 或 30 μm 到 100 μm 直径的微球干燥

当微球在室温下放置过夜后，用 5ml 自动移液管操纵器或通过真空吸取将沉降后的微球的上清液吸出。让微球在橱柜中在未盖盖的闪烁管中干燥 1 周或直到它们完全干燥（闪烁管达到恒重）。可将未盖盖的闪烁管置于通风橱中在缓慢的氮气流下（流速约 10ml/分钟）快速干燥。当已完全干燥（闪烁管达到恒重）时将该管称重并盖上盖。将贴上标签的盖上盖的闪烁管在室温下储存于橱柜中。一般微球储存不超过 3 个月。

E. 0.1 μm 到 3 μm 直径微球的干燥

该大小范围的微球未沉降出来，因此它们留在 4℃ 下的悬液中最多 4 周。为了测定微球在 10ml 悬液中的浓度，将 200 μl 悬液样品吸取到 1.5ml 预称重的微量离心管中。然后该管在 10000g 下离心（Eppendorf 台式微量离心机）。除去上清液，然后该管在 50℃ 下干燥过夜。再次



将该管称重以测定管中干燥后的微球的重量。

F. 制备加载紫杉酚的微球

为了制备含有紫杉酚的微球，称取合适量的（根据要封装的紫杉酚的百分数而定）紫杉酚直接加入 20ml 玻璃闪烁管中。然后将 10ml 合适的聚合物溶液加入含有紫杉酚的闪烁管中，用涡流直到紫杉酚溶解。

然后可基本按照上述步骤（C）到（E）制备含有紫杉酚的微球。

实施例 3

涂敷表面活性剂的微球

A. 材料与amp;方法

基本如实施例 2 中所述用聚(DL)乳酸（PLA），聚甲基丙烯酸甲酯（PMMA），聚己内酯（PCL）和 50:50 乙烯乙酸乙烯酯（EVA）:PLA 制备微球。大小范围从 10 到 100um，平均直径 45um。

从健康志愿者身上采得人血。利用葡聚糖沉降和 Ficoll Hypaque 离心技术从该血液中分离出中性粒细胞（白细胞）。将中性粒细胞以 5 百万细胞/ml 的密度悬浮于 Hanks 缓冲盐溶液（“HBSS”）中。

利用化学发光测定活性氧组分的产生，从而测定中性粒细胞活化水平。具体地说，利用带有 1uM 鲁米诺增强子的 LKB 发光计测定化学发光。通过将 10mg 微球悬浮于 0.5ml 血浆中并在 37℃ 转动 30 分钟而完成微球的血浆预涂渍（或调理）。

然后微球用 1ml HBSS 洗涤并在 37℃ 下在时间 $t=0$ 时将离心后的丸状微球加到中性粒细胞的悬液中。利用叫做多聚醇 F127(BASF) 的表面活性剂，通过在 37℃ 将 10mg 微球悬浮于 0.5ml 2%w/wF127 的 HBSS 溶液中 30 分钟来修饰微球表面。然后微球用 1ml HBSS 洗涤两次，再加入中性粒细胞或血浆中进一步预涂渍。

B. 结果

图 1 显示：未处理过的微球给出的化学发光值小于 50mV。这些值代表中性粒细胞的活化水平低。通过对比，炎性微晶给出的值接近 1000mV，可溶性化学激活物给出的值接近 5000mV。但是，当微球用血浆预涂渍后，所有化学发光值都增大到 100 到 300mV 的范围（参见

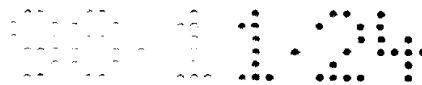


图 1)。这些中性粒细胞反应或活化水平可被认为是中度炎症。PMMA 给出了最大反应并可看作是重度炎症。PLA 和 PCL 在用血浆预处理（或调理）后活化中性粒细胞的效力均增大了 3 到 4 倍，但这两种聚合物在这方面几乎没有不同。由于微球难以干燥并再悬浮于含水缓冲液中，因此 EVA:PLA 不太可能用于血管形成制剂中。这种血浆作用称作调理作用并由抗体或补体分子吸附到表面上而产生。这些吸附的组分与白细胞上的受体相互作用并使细胞活化增强。

图 2 - 5 分别描述了 PCL, PMMA, PLA 和 EVA:PLA 的血浆预涂渍的影响，并显示了在微球的血浆预涂渍之前预涂渍多聚醇 F127 的作用。这些图均显示了相同的作用结果：（1）血浆预涂渍使反应增强了；（2）预涂渍多聚醇 F127 对其自身特性没有影响；（3）通过用 2% 多聚醇 F127 预处理微球的表面可强烈抑制由血浆预涂渍而导致的增强的中性粒细胞反应。

还通过电泳研究了从血浆吸附的蛋白质组分的性质。利用此方法，结果显示：用多聚醇 F127 预处理聚合物表面抑制了抗体吸附到聚合物表面。

图 6 - 9 同样显示了用 IgG(2mg/ml)或先用 2% 多聚醇 F127 后再用 IgG(2mg/ml)（分别）预涂渍 PCL, PMMA, PLA 或 EVA:PLA 微球的作用。从这些图中可看出，通过用多聚醇 F127 处理可抑制由用 IgG 预涂渍微球而导致的增强的反应。

这些结果表明：所有四种类型的微球的聚合物表面通过用多聚醇 F127 预处理可抑制中性粒细胞对微球的“炎症”反应。

实施例 4

紫杉酚包胶囊

将 500mg 紫杉酚或紫杉酚类似物（紫杉酚类似物，可从 Inflazyme Pharmaceuticals Inc., Vancouver, British Columbia, 加拿大 得到）溶于 1ml 在二氯甲烷中的 50:50 ELVAX:聚-L-乳酸混合物中。然后用溶解机（六锭溶解测定器，VanderKamp, Van Kell Industries Inc., 美国）以 42℃, 200rpm, 3 小时的条件制备微球一式三份。如此制得的微



球用水洗涤两次并用显微镜测定大小。

紫杉酚包胶囊的测定是用紫外/可见光试验进行的（紫外/可见光 λ_{\max} 237nm，荧光测试在 237 激发，在 325nm 发射；荧光结果在方括号[]中表示）。用上述方法，可以从总重 500 μ g 的起始物包胶 58 μ g（ \pm 12 μ g）[75 μ g（ \pm 25 μ g）]紫杉酚。这代表初始重量的 12%（ \pm 2.4%）[15%（ \pm 5%）]，或聚合物重量的 1.2%（ \pm 0.25%）[1.5%（ \pm 0.5%）]。在 37 $^{\circ}$ C 下烘箱中转动 18 小时后，从该微球中释放了紫杉酚总量的 10.3%（ \pm 10%）[6%（ \pm 5.6%）]。

至于浆果赤霉素，从 500 μ g 起始物可包胶 100 \pm 15 μ g[83 \pm 23 μ g]浆果赤霉素。这代表浆果赤霉素初始重量的 20%（ \pm 3%）[17%（ \pm 5%）]，和聚合物重量的 2%（ \pm 0.3%）[1.7%（ \pm 0.5%）]。在 37 $^{\circ}$ C 下烘箱中转动 18 小时后，从该微球中释放了浆果赤霉素的 55%（ \pm 13%）[60%（ \pm 23%）]。

实施例 5

紫杉酚从含有乙烯乙酸乙烯酯共聚物和聚（D,L-乳酸）的混合物的微球中的控制释放 微球的 CAM 体内试验

该实施例记载了含有可生物降解的聚（d,l-乳酸）（PLA）聚合物和不可降解的乙烯乙酸乙烯酯（EVA）共聚物的混合物的负载紫杉酚微球的制备。另外，证明了体外条件下紫杉酚从置于 CAM 上的微球中释放的释放速率和抗血管形成活性。

在此实验中使用的试剂包括紫杉酚，购自 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO);PLA(分子量 15,000-25,000)和 EVA（60% 乙烯乙酸酯）（购自 Polyscience）（Warrington,PA）；聚乙烯醇(PVA)（分子量 124,000-186,000，99% 水解，购自 Aldrich Chemical Co.（Milwaukee,WI）），二氯甲烷〔DCM〕（HPLC 纯度级，购自 Fisher Scientific Co.），从始至终使用蒸馏水。

A. 制备微球

基本按照实施例 2 使用溶剂蒸发法制备微球。概括地说，用



EVA:PLA 35:65-90:10 的混合物制备 5 % w/v 溶于 20ml DCM 的聚合物溶液。将 1ml 聚合物溶液搅拌滴加到盛有 5ml 2.5%w/v PVA 水溶液的 20ml 的玻璃瓶中。在上部搅拌溶解测试装置 (Vanderkamp) 的 6 个位置安装 6 个相似的小瓶, 并在 200rpm 搅拌。将小瓶的温度在 15 分钟内从室温增加到 40 ℃, 在 40 ℃ 保温 2 小时。在 500xg 将小瓶离心, 将微球在水中清洗 3 次。某些 EVA:PLA 聚合物混合物, 微球样品在清洗过程中由于除去分散剂或乳化剂 PVA 而聚集。可以半定量地分析此聚集效应, 因为聚集的微球溶化, 溶化的聚合物团块浮在清洗用水的表面。在清洗处理过程中弃去表面的聚合物层, 将剩余的丸状微球称重。

用下式计算聚集百分率

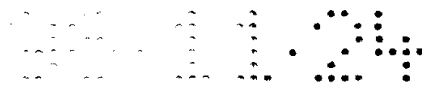
$$\% \text{ 聚集} = \frac{1 - (\text{丸状微球重量}) \times 100}{\text{聚合物最初重量}}$$

将紫杉酚溶解在 5 % w/v 聚合物 DCM 溶液中, 制备含有紫杉酚的微球 (0.6%w/w 紫杉酚)。所用的混合聚合物为 50:50 EVA:PLA。将紫杉酚/聚合物溶液分别滴加到 2.5% w/v PVA 和 5 % W/V PVA 中制备“大”号和“小”号微球。在 40 ℃, 以 200rpm 转速将分散相搅拌 2 小时, 离心, 如上所述在水中清洗 3 次。将微球空气干燥, 用安有目镜测微器的光学显微镜测定样品体积。每个样品测定 300 个微球。如上所述制备对照微球 (无紫杉酚) 并测定其体积。

B. 包封效率

将已知重量的加载紫杉酚的微球溶解在 1ml DCM 中, 加入 20ml 50 ℃ 的 40 % 乙腈水溶液, 旋转至将 DCM 蒸发。通过 HPLC 法测定紫杉酚在 40 % 乙腈中的浓度, 流动相为水:甲醇:乙腈 (37;5:58), 流速 1ml/分钟 (Beckman isocratic 系), C18 反相柱 (Beckman), UV 检测器在 232nm 测定。为测定此提取过程的回收率, 将 100-1000μg 已知重量的紫杉酚溶解在 1ml DCM 中, 如上所述制备同样的三份提取物。回收率均大于 85 %, 适当地校正包封效率。

C. 药物释放研究



在 15ml 玻璃器中，在有螺旋帽的试管中加入 10ml 10mM 磷酸盐缓冲盐水（PBS）pH7.4，和 35mg 加载紫杉酚的微球，将试管在 37℃ 于给定时间间隔振摇，于 1500xg 离心 5 分钟，保留上清液用于分析。将微球沉淀再次悬浮于新鲜 PBS（10ml）中，37℃ 再保温。以 1ml DCM 提取紫杉酚，在氮气流下蒸发至干，以 1ml 40% 乙腈水溶液重新溶解，如上所述用高效液相法测定紫杉酚浓度。

D. 扫描电子显微镜（SEM）

将微球置于样品架上，在其表面喷金，在 15kV 条件下，用 Philips 501B SEM 观察所得显微图像。

E. CAM 研究

将受精的家鸡的胚胎在脱壳培养前孵育 4 天。卵的内含物在 90% 相对湿度和 3% CO₂ 条件下保温 2 天。在保温的第 6 天，将每份 1mg 含有 0.6% 紫杉酚的微球或对照微球（无紫杉酚）的样品直接置于 CAM 表面。接触 2 天后，用接有摄像机的立体显微镜观察其血管系统，图像信号显示在计算机上，并打印出来。

F. 结果

用 100% EVA 制备的微球在 PVA 溶液中自然悬浮，随后以水清洗，使之彻底聚集或融熔以除去 PVA。使 EVA 与 PLA 混合时，PLA 的比例增加，制得的微球在用水清洗时，其聚集或凝结的趋势降低，如图 10A 所示。以 EVA:PLA 的比例为 50:50 混合生成的微球有好的物理稳定性，即这些微球保持分离并较好地悬浮，其聚集或凝结可以忽略不计。

“小”体积微球的体积范围定义为 >95% 的微球样品体积（以重量计）在 10-30mm，而对于“大”体积微球，应为 >95% 样品（以重量计）在 30-100mm。含有紫杉酚的 50:50 EVA:PLA 微球的“大”体积和“小”体积微球的典型的扫描电子显微照片分别示于图 10B 和 10C。微球为具有光滑表面的球形，没有迹象显示固体药物在微球的表面。在紫杉酚的初始浓度介于 100-1000mg 紫杉酚每 50mg 聚合物的范围内，50:50 EVA:PLA 微球对于紫杉酚的载药效率为 95-100%。“大”、“小”



微球的包封效率之间没有显著差异 (学生 t-试验 $p < 0.05$).

载药量为 0.6%w/v 的 50:50 EVA:PLA 的“小”体积(开环)和“大”体积(闭环)微球中紫杉酚的释放过程示于图 10D。每个样品一式三份分别进行实验以研究释放速率。释放曲线为两阶段,紫杉酚的初始快速释放或“爆发”阶段发生在从两种体积的微球释放出来的前 4 天。后随一非常缓慢释放的阶段,“大”、“小”微球的释放速率之间没有显著性差异。微球中总紫杉酚含量的 10 - 13 % 在 50 天内释放。

用 CAM 测定法对载有紫杉酚的微球(载药量 0.6 %) 进行实验,结果示于图 10E。紫杉酚微球释放足够的药物在周围组织产生一无血管区(图 10F)。注意非常邻近微球的区域(图 10E、10F 中的“MS”)为一完全无血管区(区域 1),稍远为一断裂、无功能的毛细血管区(区域 2),只在距微球约 6mm 处毛细血管恢复正常。在用对照微球(无紫杉酚)处理的 CAMs,有正常的毛细血管网结构(未示出)。

讨论

小管周围用药是一种损害轻微的外科技术。因此,理想地,抗增生药物如紫杉酚的血管周围剂型将在肿瘤或病变部位释放足够浓度的药物以使药效具有延长的时间周期,一般长达几个月。EVA 为一组织相容的不可降解的聚合物,它被广泛地用于在较长时间周期内(>100 天)控制释放大分子。

初始选择 EVA 作为聚合的生物材料,将紫杉酚分散在此聚合物基质中制备微球。然而用 100 % EVA 制备的微球在清洗过程中几乎完全聚集和凝结。

基于乳酸和乙醇酸的聚合物和共聚物具有生理学惰性和生物相容性,并能水解降解成毒理学能接受的产物。乳酸和乙醇酸共聚物的降解速率快于 PLA,用这些共聚物制备的含药微球不适于长达几个月的延长的控制释放。

图 10A 显示在 EVA:PLA 混合物中增加 PLA 的比例,会降低微球悬浮液的聚集程度。在 EVA:PLA 基质中混入 50 % 或更少的 EVA 产生在水或 PBS 中具有物理稳定性的微球悬浮液。此后的研究选择 50:50



EVA:PLA 混合物。

可以改变水相中乳化剂 PVA 的浓度制备不同体积范围的微球。在 5 % w/v 的高 PVA 浓度制备“小”微球，而在 2.5 % w/v 的 PVA 浓度制备“大”微球。对于两种体积的微球，其它制备条件相同。乳化剂浓度越高，水分散介质的粘性越大，在水相中产生的聚合物/紫杉酚/DCM 的乳化液滴越小，从而产生较“小”微球。负载紫杉酚的微球含有紫杉酚的初始浓度为 95-100 %，将紫杉酚加入有机相，使其被包封在固体微球中的。紫杉酚的低水溶性使其易于被分隔进入含有聚合物的有机相。

紫杉酚从 50:50 EVA;PLA 的微球中的释放速率很慢，在 50 天内所含紫杉酚的释放量少于 15 %。可以由于药物从微球表面区域（接近微球表面）的扩散导致药物释放的初始爆发相。

药物从不可降解的聚合基质，如 EVA 中的释放机制被认为包括水经聚合物中的药物分散相扩散，药物溶解和溶质经一系列互联的、充满流动相的孔扩散。当 PLA 中 EVA 的范围为 30 - 70 % 时，EVA 与 PLA 的混合物是不混溶或双连续的。在 37 °C PBS 中进行的降解研究中，在一诱导期或滞后期之后，PLA 从 EVA:PLA 聚合物混合基质中被水解降解和被浸蚀，剩下非活性的海绵状骨架。虽然诱导期、PLA 降解速率和混合基质的浸蚀速率取决于 PLA 在基质中的比例和此过程的时间关系函数，在 40 - 50 天后，PLA 均不再或很少降低。

虽然 PLA 从 50:50 EVA:PLA 微球中的某些浸蚀发生在体外释放研究的 50 天内（图 10C），药物在聚合物混合物中的主要释放机制为溶质经聚合物基质中小孔网状结构的扩散。

释放速率研究结论为，从微球中剩余药物数量分析微球的释放速率。在保温 50 天的微球样品中，“大”体积和“小”体积微球中剩余紫杉酚的百分率分别为 94 % +/- 9 % 和 89 % +/- 12 %。

每 mg 聚合物含有 6mg 紫杉酚的微球（0.6%），将其置于鸡胚的 CAM 上时产生广泛的血管生成抑制作用（图 10E 和 10F）。

实施例 6

用聚(ε-己内酯)微球包封的治疗剂

含有紫杉酚的微球在 CAM 测定中的血管生成抑制作用

该实施例测定了紫杉酚从聚(ε-己内酯)生物降解微球中的体外释放曲线,并证实了当置于 CAM 上时,从这些微球中释放的紫杉酚的体内抗血管生成活性。

在这些实验中使用的试剂包括:聚(ε-己内酯) (“PCL”) (分子量 35,000-45,000);购自 Polysciences(Warrington, PA);二氯甲烷 (“DCM”), Fisher Scientific Co. 加拿大;聚乙烯醇 (PVP) (分子量 12,000-18,000, 99% 水解), Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, Wis.), 和紫杉酚, 得自 Sigma 化学公司 (St. Louis, MO)。除非另有说明, 所有化学药品和试剂均如上所述。始终使用蒸馏水。

A. 制备微球

基本按照实施例 2 使用溶剂蒸发法制备微球。概括地说, 将 10mg 紫杉酚和 190mg PCL 溶于 2ml DCM 中, 加入 100ml 1% PVP 水溶液中, 并在 25 °C 1000rpm 转速的条件下搅拌 2 小时, 制备含有 5% w/w 紫杉酚的微球。将微球悬浮液离心, 1000xg, 10 分钟 (Beckman GPR), 弃去上清液, 将微球以水清洗 3 次。清洗后的微球空气干燥过夜, 保存在室温。如上制备对照微球 (无紫杉酚)。也制备含有 1% 和 2% 紫杉酚的微球。用安有目镜测微器的光学显微镜测定样微球体积。

B. 包封效率

将已知重量的含药微球 (约 5mg) 溶解在 8ml 乙腈中, 加入 2ml 蒸馏水, 促使聚合物沉淀。在 1000g 将混合物离心 10 分钟, 用 UV 分光光度计 (Hewlett-Packard 8452A Diode Array 分光光度计) 在 232nm 测定上清液的吸收, 计算紫杉酚的包封量。

C. 药物释放研究

在具螺旋帽的试管中, 将约 10mg 含有紫杉酚的微球悬浮在 20ml pH7.4 的 10mM 磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中。将试管在 37 °C 颠倒翻转, 在给定的时间间隔, 取上清液 19.5ml (使微球降落到管底后), 经过 0.45μm 滤膜过滤, 留作分析紫杉酚。在每管中代替以等体积的 PBS 以

在实验过程中保持渗透条件。以 $3 \times 1\text{ml}$ DCM 提取滤液，DCM 提取物在氮气流下蒸发至干，再溶于 1ml 乙腈中，以 HPLC 法测定。流动相：水：甲醇：乙腈（37：5：58），流速： 1ml/分钟 ，(Beckman Isocratic 系)，C8 反相柱(Beckman), 紫外检测器(Shimadzu SPD A), 232nm 。

D. CAM 研究

将受精的家鸡的胚胎在脱壳培养前孵育 4 天。在保温的第 6 天，将每份 1mg 含有 0.5% 紫杉酚的微球或对照微球（无紫杉酚）直接置于 CAM 表面。在接触 2 天后，用接有摄像机的立体显微镜观察其血管系统，图像信号显示在计算机上，并打印图像。

E. 扫描电子显微镜 (SEM)

将微球置于样品架上，在其表面喷金，在 15kV 条件下，用 Philips 501B SEM 观察所得的微球。

F. 结果

微球样品的体积范围在 $30\text{-}100\mu\text{m}$ ，虽然在含紫杉酚的微球和对照微球所有批次的产物中，一些微球的体积落在此范围之外。对于所有载药实验，有紫杉酚的 PCL 微球的荷载能力总大于 95%。扫描电镜证明微球均为球形，许多显示粗糙或凹陷的表面，没有迹象显示固体药物在微球的表面。

紫杉酚从载药量为 1%、2%、5% 的 PCL 微球中释放的时间过程曲线示于图 11F。释放曲线为两阶段的。所有药物负载量均有紫杉酚的初始快速释放或“爆发”阶段。在紫杉酚含量为 1% 和 2% 时，“爆发”阶段发生在 1 - 2 天，对于含药量为 5% 的微球，“爆发”阶段发生在第 3 - 4 天。快速释放的初始阶段后随一显著变慢的药物释放阶段，对于含有 1% 或 2% 紫杉酚的微球，在 21 天后便不再进一步释放药物。在紫杉酚含量为 5% 时，在 21 天后，微球释放了约 20% 总药量。

图 11B 显示用对照 PCL 微球处理的 CAMs，图 11C 显示用含有 5% 紫杉酚的微球处理的 CAMs。每个样品一式三份分别进行实验以研究释放速率。用对照 PCL 微球处理的 CAM 显示正常的毛细管网状结



构。用紫杉酚 - PCL 微球处理的 CAM 显示显著的血管退化和毛细血管网缺损区。

G. 讨论

制备含紫杉酚微球的溶剂蒸发法产生很高的紫杉酚包封效率，介于 95 - 100 % 之间。这是由于紫杉酚的低水溶性和其疏水性适于在含有聚合物的有机溶剂相中被分隔。

紫杉酚的两阶段释放曲线为许多药物从能生物降解的聚合物基质中释放的典型释放方式。聚 (ϵ -己内酯) 为脂族聚酯，可以在生理条件下被水解降解，并且是无毒和组织相容性的。PCL 的降解显著慢于已被广泛研究的乳酸和乙醇酸的聚合物和共聚物，因此适于设计长效小管周围药物释放系统。紫杉酚释放的初始快速或爆发段被认为是由于药物从微球表层区域 (接近微球表面) 的扩散释放。紫杉酚在释放曲线第二阶段 (慢) 的释放不象是由于 PCL 的降解或浸蚀，因为研究显示在体外条件下，在 7.5 周的期间内，在水中 PCL 没有显著的重量降低和表面浸蚀。紫杉酚释放的慢段可能是由于药物在聚合物基质中充满流动相的孔中的溶解作用以及在孔中的扩散。高紫杉酚负载量具有更大的释放速率，可能由于在聚合物基质中具有更广泛的网孔结构。

具有 5 % 负载量的紫杉酚微球，在将其置于 CAM 上时，已显示释放足够的药物产生广泛的血管生成抑制作用。血管生长的抑制作用导致一无血管区，如图 11C 所示。

实施例 7

由 EVA 和表面活性剂组成的加载治疗剂的小管周围聚合物膜

在该实施例中研究了两类膜：含有紫杉酚的纯 EVA 膜和含有紫杉酚的 EVA/表面活性剂混合膜。

试验所用的表面活性剂为两种疏水性表面活性剂 (Span80 和多聚醇 L 101) 和一种亲水性表面活性剂 (多聚醇 F127)。多聚醇表面活性剂自身为聚合物，由于它们能与 EVA 混合以使药物释放性能达到最优化，因此这是一个具有吸引力的性能。Span 80 是一小分子，以某些方式分散在聚合物基质中，而不形成混合物。



表面活性剂用于调整紫杉酚从膜中的释放速率，并使膜的物理参数达到最优化。混合有表面活性剂的膜表明可以控制药物释放速率，这能够改变化合物在水中溶胀的速率和程度。水扩散进入聚合物-药物基质是药物从载体释放的限速步骤。图 12C 和 12D 显示了当改变混合物中表面活性剂的用量时膜的溶胀程度。纯 EVA 膜在两个月内不发生任何程度的显著溶胀。然而通过提高加入 EVA 中的表面活性剂的水平，可能会增加化合物的溶胀程度，并通过增加亲水性，也能增加溶胀。

这些膜的实验结果示于图 12A - E。简要地说，图 12A 显示了紫杉酚在一段时间内从纯 EVA 膜中的释放（以 mg 计）。图 12B 显示了同一膜中药物的剩余百分率。从此二图可以看出，当紫杉酚负载量增加时（如紫杉酚的重量百分数增加），药物释放速率增加，显示预期的浓度依赖性。当增加紫杉酚负载量时，剩余在膜中的紫杉酚百分率也增加，显示高载药量对于长期释放配方可能是有吸引力的。

在图 12E 中评价了膜的物理强度和弹性。概括地说，图 12E 显示了纯 EVA 和 EVA-表面活性剂混合膜的应力/应变曲线。此应力测量曲线证明膜的弹性随多聚醇 F127 的加入而增加，抗拉强度（断裂时的应力）随多聚醇 F127 的加入以浓度相关方式增加。在设计膜时，可以根据特定的周围小管临床应用调节，而不导致化合物的永久变形，弹性和强度是重要的考虑因素。

以上资料论证了某些表面活性添加剂控制药物释放速率和改变载体的物理特性的能力。

实施例 8

在聚（E-己内酯）中加入甲氧基聚乙二醇 350（MePEG）制成
从糊剂中控制释放治疗剂的剂型

用于此实验中的试剂和仪器包括甲氧基聚乙二醇 350（“MePEG” - Union Carbide, Danbury, CT）。MePEG 在室温为液体，冰点为 10 °C 至 - 5 °C。

A. 制备含有紫杉酚的 MePEG/PCL 糊剂

先将一定量紫杉酚溶解在 MePEG 中，将其加入熔融的 PLC 中，



制备 MePEG/PCL 糊剂。此方法的优点是不需要 DCM。

B. 熔点分析

可以用差示扫描热量测定法测定 PCL/ MePEG 聚合物混合物的熔点，从 30 °C 至 70 °C，升温速率为 2.5 °C/分钟。实验结果示于图 13A 和 13B。概括地说，如图 13A 所示，聚合物的混合物熔点（热分析法测得的）随 MePEG 以浓度相关方式降低。聚合物的混合物的熔点作为 MePEG 浓度的函数示于图 13A。此低熔点意味着聚合物的混合物从熔融至固化所需的时间增加，如图 13B 所示。— 30 : 70 MePEG : PCL 混合物从熔融的液态至固化，所需时间为单独的 PCL 固化时间的两倍还多。

C. 脆性测定

MePEG 加入 PCL 中，与单独的 PCL 相比产生一低脆性固体。一“粗放”的定量测定脆性的方法是，使一称定重量的针从等高处坠入聚合物的混合物中，MePEG 在 PCL 中的含量为 0 % 至 30 %，测定针扎入固体中的距离。结果曲线示于图 13C。每个数据点为 4 次测定结果的平均值 \pm 1 S.D。

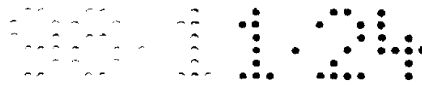
为进行比较，也测定了一石蜡样品，针扎入其中的距离为 7.25mm \pm 0.3mm。

D. 紫杉酚释放的测定

将聚合物丸剂（PCL 中含有 0 %、5 %、10 %、20 % MePEG）在 37 °C 磷酸盐缓冲盐水（PBS pH7.4）中保温，并在此过程中测定聚合物的重量变化百分率。如从图 13D 可见的，重量的损失随 MePEG 在混合物中的初始含量而增加。重量损失可能是由于 MePEG 从聚合物基质中释放进入保温液。这显示紫杉酚易于从 MePEG/PCL 混合物中释放，因为紫杉酚先溶于 MePEG，然后混入 PCL 中。

E. 改变 MePEG 重量对紫杉酚释放的影响

在 PCL 中含有 0.8% 至 20 % MePEG 制备热糊剂。其中紫杉酚的负载量为 1 %。用 HPLC 法测定在 37 °C PBS 缓冲液中紫杉酚从 10mg 丸剂中的释放。如图 13E 所示，配方中 MePEG 的含量不影响紫杉酚释



放的量。

F.改变紫杉酚重量对紫杉酚从 20 % MePEG/PCL 混合物中释放总量的影响

用含有 20 % MePEG 的 PCL 制备热糊剂，其中紫杉酚加载量为 0.2%-10%。如上测定紫杉酚随时间的释放。如图 13F 所示，紫杉酚的释放量随紫杉酚加载量的增加而增加。然而当按紫杉酚总释放百分量绘制曲线时，图的顺序是反的（图 13G）。此图给出了存在于糊剂中的紫杉酚的剩余量的信息，并便于推测紫杉酚可以从 20 % MePEG 热糊剂中释放的时间周期。

G.不同比例的 MePEG/PCL 混合物的强度分析

用 CT-40 机械强度测定仪测定直径为 0.88cm，平均厚度为 0.560cm 的固体聚合物片剂的强度。聚合物片剂为在 PCL 中含有 0 %、5 %、10 %、20 % MePEG 的混合物。

此实验的结果示于图 13H，其中将抗拉强度和破裂时间作为混合物中 MePEG 百分含量的函数作出曲线。可单独变化的 ANOVA 显示每组中的片厚相同。如图 13H 所示，在 PCL 中加入 MePEG 会降低所得固体的硬度。

H.γ-辐射对紫杉酚释放的影响

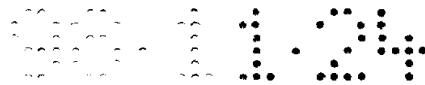
以γ射线照射基质为 PCL:MePEG（80:20），加载 20 % 紫杉酚的糊剂，并分析紫杉酚随时间的释放。结果示于图 30。

概括地，基于以上实验，可以得出结论，加入 MePEG 使聚合物脆性降低而更象蜡，降低其熔点并增加聚合物的固化时间。所有这些因素均会促进糊剂的适用性。低浓度 MePEG（20 %）对于紫杉酚从 PCL 中的释放没有影响。γ - 辐射显示对紫杉酚释放几乎没有影响。

实施例 9

使用低分子量聚（D,L-乳酸）改变治疗剂从热糊剂中的释放

如上所讨论的，根据所需的疗效，可以确定快速释放或慢速释放聚合物载体。例如，PCL 和 PCL 与 PEG 的混合物产生在几个月内释放紫杉酚的组合物。尤其，由于紫杉酚具有大的分子体积和极大的疏水



性，其在聚合物中的扩散很慢。

另一方面，低分子量聚（D，L-乳酸）（PDLLA）会快速降解，根据其初始分子量降解时间从1天至几个月。在这种情况下，聚合物的降解决定紫杉酚的释放。低分子量PDLLA的另一特点是其低熔融温度（如40℃ - 60℃），使其成为适于制备热糊剂的材料。如下进一步详细记载的，可以使用一些不同的方法控制聚合物降解速率，例如包括改变PDLLA的分子量，和/或将其与高分子量PCL、PDLLA，或聚（丙交酯 - 共聚 - 乙交酯）（PLGA）混合。

A. 实验材料

D,L-乳酸购自 Sigma 化学公司， St.Louis,MO.PCL(分子量 10-20,000)来自 Polysciences,Warrington,PA., 高分子量PDLLA（自身粘度为 0.60dl/g）和 PLGA（组成为 50:50，粘度为 0.58dl/g）来自 Birmingham 聚合物。

B. 低分子量 PDLLA 的合成

从 D,L-乳酸经缩聚合成低分子量 PDLLA。概括地说，在 200℃ 将 D,L-乳酸在玻璃烧杯中加热预定时间，伴以氮气驱气和磁力搅拌。在聚合过程中，由于分子量的增加导致粘度增加。得到具有不同聚合时间，即 40 分钟（分子量 800）、120 分钟、160 分钟的 3 批产物。

C. 紫杉酚热糊剂的配方

在约 60℃ 用手动将 20% 紫杉酚混入以下材料中。

1. 低分子量 PDLLA，聚合时间 40 分钟。
2. 低分子量 PDLLA，聚合时间 120 分钟。
3. 低分子量 PDLLA，聚合时间 160 分钟。
4. 50:50 高分子量 PDLLA 与低分子量 PDLLA 的混合物，聚合时间 40 分钟。
5. 50: 50 高分子量 PLGA 与低分子量 PDLLA 的混合物，聚合时间 40 分钟。
6. 高分子量 PCL 与低分子量 PDLLA 的混合物，聚合时间 40 分钟，PCL:PDLLA 为 10:90，20:80，40:60，60:40，80:20。



将这些材料溶于丙酮后干燥,得到高分子量 PDLLA 或 PLGA 与低分子量 PDLLA 的混合物。

D.释放研究

如上所述,用 HPLC 法测定不同时间于 37 ℃ 紫杉酚释放进入 PBS 白蛋白缓冲液的程度。

E.结果

低分子量 PDLLA 40 分钟为淡黄色的柔软材料。其颜色可能由于缩聚过程中的氧化引起。低分子量 PDLLA 120 分钟(黄色)和 160 分钟(棕色)在室温为脆性固体。它们在 60 ℃ 开始熔化。50:50 高分子量 PDLLA 或 PLGA 与低分子量 PDLLA 40 分钟的混合物也在约 60 ℃ 熔化。

在释放过程中,低分子量 PDLLA 40 分钟和 120 分钟在一天内断裂成碎片,其它材料在此记录期间内(3 天)无损坏。

紫杉酚从配方 2 - 5 中的释放示于图 14。低分子量 PDLLA 40 分钟和 120 分钟由于糊剂的断裂而产生最快的释放。此释放可能受限于溶解度。低分子量 PDLLA 160 分钟也产生快速释放,但保持一无损的小丸。如,所含的紫杉酚 1 天释放 10 %。高分子量 PDLLA 或 PLGA 与低分子量 PDLLA 40 分钟的 50:50 的混合物,释放速率较慢,如在 1 天内释放 3.4% 和 2.2%。

虽然上文未特别列出,可以制备多种其它聚合载体,包括,例如 (1) 低分子量(500-10,000)聚(D,L-乳酸),聚(L-乳酸),聚(乙醇酸),聚(6-羟基己酸),聚(5-羟基戊酸),聚(4-羟基丁酸)和其共聚物; (2) 上述(#1)的混合物; (3) 上述(#1)与高分子量聚(D,L-乳酸),聚(L-乳酸),聚(乙醇酸),聚(6-羟基己酸),聚(5-羟基戊酸),聚(4-羟基丁酸)及其共聚物的混合物; 和(4)聚乙二醇和聚多醇与聚(D,L-乳酸),聚(L-乳酸),聚(乙醇酸),聚(6-羟基己酸),聚(5-羟基戊酸),聚(4-羟基丁酸)的共聚物,及其共聚物。

实施例 10

制备含有水溶性添加剂和紫杉酚的聚合组合物

A. 制备聚合组合物

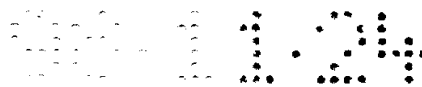
制备紫杉酚/添加剂的共沉淀微粒，随后加入 PCL 中以形成糊剂。概括地说，将紫杉酚（100mg）溶于 0.5ml 乙醇（95%），并与预先溶解或分散于 1.0ml 蒸馏水中的添加剂（100mg）混合。研磨此混合物直至形成均匀的糊剂。将糊剂铺在培养皿中，并在 37℃ 空气干燥过夜。用乳钵和研杵将干燥的块状物粉碎，过 # 140 筛（106μm）（Endecotts Test Sieves Ltd, 英国，伦敦）。在 65℃ 将微粒（40%）混入熔融的 PCL 中（60%），对应于 20% 的紫杉酚加载量。本研究中的添加剂为明胶（Type B, 100 bloom, Fisher Scientific），甲基纤维素（British Drug House），葡聚糖, T500（Pharmacia, Sweden），白蛋白（Fisher Scientific），氯化钠（Fisher Scientific）。如上制备含紫杉酚和明胶或白蛋白的微球，但过 # 60 筛（270μm）（Endecotts Test Sieves Ltd, 英国，伦敦）以测定微球体积对紫杉酚从糊剂中释放的影响。还制备了在 PCL 中含 10、20 或 30% 明胶和 20% 紫杉酚的糊剂以研究添加剂的比例对药物释放的影响。除非另有说明，制备在 PCL 中含有 20% 紫杉酚的糊剂作为研究药物释放速率的对照物。

B. 药物释放研究

将大约 2.5mg 由加载紫杉酚的糊剂制备的丸悬浮在 50ml pH7.4 的 10mM 磷酸盐缓冲盐水（PBS）中，置于具螺旋帽的试管中。将试管在 37℃ 上下翻转，在给定的时间，从中移取 49.5ml 上层液，过滤通过 0.45μm 膜的滤器，留作紫杉酚的分析。在每个试管中代替以等体积的 PBS 液，以在实验过程中保持沉浸状态。为进行分析，用 3 × 1ml 二氯甲烷（DCM）提取滤液，将 DCM 提取物在氮气流下蒸发至干，重新溶解在 1ml 乙腈中。以 HPLC 法分析，流动相为水:甲醇:乙腈（37:5:58），流速 1ml/min（Beckman isocratic 泵），C18 反相柱（Beckman），UV 检测器（Shimadzu SPDA）在 232nm 测定。

C. 溶胀研究

用具有 # 140（或明胶用 # 60）筛孔大小的紫杉酚-添加剂微粒制



备紫杉酚/添加剂/PCL糊剂，将其挤出形成圆柱，切割成片，称重，用千分尺（Mitutoyo Digimatic）测量每片的长度和直径。将此片悬浮在37℃蒸馏水中（10ml），在预定时间除去水，测定圆柱片的直径和长度，及样品重量。用扫描电子显微镜（SEM）（Hitachi F-2300）观察样品形态（悬浮在水中前、后）。用Hummer装置（Technics, USA）将样品表面镀以60%金和40%钯（厚度10-15nm）。

D. 鸡胚绒毛尿膜（CAM）实验

将受精的家鸡的胚胎在脱壳培养前孵育4天。卵的内含物在90%相对湿度和3% CO₂的条件下保温，在保温的第6天，将每份1mg含有6%紫杉酚、24%明胶和70% PCL的糊剂或对照糊剂（PCL中含30%明胶）的样品直接置于CAM表面。接触2天后，用接有摄像机的立体显微镜观察其血管系统，图像信号显示在计算机上，并打印出来。

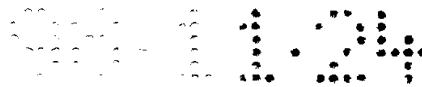
E. 体内抗肿瘤活性

如上制备含有20%紫杉酚、20%明胶和60% PCL的糊剂（用体积为140筛孔大小的紫杉酚-明胶微粒），将其注入8 × 1ml注射器（BD胰岛素注射器，1/2cc），每个注射器含有150mg糊剂（相当于30mg紫杉酚）。10周大的DBA/2j雌性小鼠（16），体重18 - 20克，使之到达后适应环境4天，于第1天在每只鼠的后侧肋腹部注射MDAY-D2肿瘤细胞，剂量为在100μl磷酸盐缓冲盐水中含有（10 × 10⁶ ml⁻¹）个细胞。在第6天，将鼠分为两组，每组8只，在麻醉下打开肿瘤部位，将预先加热到60℃的150mg糊剂挤压在肿瘤部位，关闭伤口。一组植入含有紫杉酚的糊剂，另一组植入只含有明胶和PCL的对照糊剂。在第16天，将鼠处死，测量鼠的重量和切除的肿瘤的重量。

F. 结果和讨论

紫杉酚和明胶或白蛋白共沉淀的微球硬而脆，较易被混入PCL，而其它添加剂产生柔软微粒，在制备糊剂的过程中有碎裂趋势。

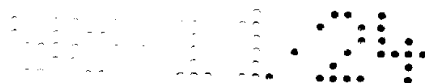
图15显示紫杉酚从含有20%紫杉酚的PCL糊剂或20%紫杉酚、20%添加剂和60% PCL的糊剂中释放的时间过程。紫杉酚从含有或不含添加剂的PCL糊剂中释放的方式为两阶段释放；开始，为较快的



药物释放速率，随之以一较慢的药物释放。紫杉酚从糊剂中快速释放的初始阶段被认为是由于位于表面的紫杉酚的溶解或紫杉酚从糊剂表层区域中扩散所致。随后的紫杉酚释放曲线的慢速释放阶段可归因于药物颗粒与溶剂接触的有效面积的降低，溶剂缓慢浸入聚合物基质中，或药物通过聚合物基质的中等扩散通道的增加。

在有亲水性添加剂和明胶、白蛋白、甲基纤维素等能导致药物释放速率最大地增加的物质存在时，紫杉酚从 PCL 中释放的曲线的两阶段增加（图 15）。在应用较大的紫杉酚-添加剂颗粒(270 μm)制备糊剂时，与使用较小的紫杉酚-添加剂颗粒（106 μm ）相比，导致紫杉酚从聚合物基质中释放的速率进一步增加（图 16）。增加添加剂（如明胶）的量相应增加药物释放（图 16）。图 17A 显示了含有 20% 紫杉酚、20% 添加剂和 60% PCL 的糊剂的溶胀性能。溶胀速率有如下顺序：明胶 > 白蛋白 > 甲基纤维素 > 葡聚糖 > 氯化钠。另外，当在糊剂中加入更高比例的水溶性聚合物时，溶胀速率增加（图 17B）。含有明胶或白蛋白的糊剂在开始的 8-10 小时内快速溶胀。当样品体积变化超过 40% 时，随之溶胀速率降低。用更大的紫杉酚-明胶颗粒（270 μm ）制备的糊剂比用较小的（106 μm ）紫杉酚-明胶颗粒制备的糊剂具有更快的溶胀速率。当体积的增加超过 50% 时，所有糊剂崩解。SEM 研究显示糊剂的溶胀伴随基质的裂解（图 18）。随着溶胀，在高放大倍数下（图 18C 和图 18D），可见在糊剂表面有针状或棒状紫杉酚结晶，并与糊剂中的明胶密切相关（图 18C 和 18D）。

能渗透或溶胀的亲水性药物作为分散的颗粒包埋在疏水性聚合物中，通过基质浸蚀、药物在聚合物基质中扩散，和/或通过基质中水溶性添加剂的溶解导致基质中通过孔的扩散和/或对流增加等综合效应，导致药物释放。分散在疏水性聚合物中的能渗透的药物和能溶胀的聚合物将吸水（相当于芯吸剂），溶解或溶胀，并产生充盈压力，致使相邻颗粒之间的隔膜（聚合物层）破裂，产生微管，因而利于药物分子借助扩散或对流逃逸进入周围介质。糊剂基质的溶胀和裂解（图 18）很可能导致形成贯穿基质内部的微管。聚合物溶胀的不同速率和程度可以导



致所观察的紫杉酚释放的不同速率(图 15、16)。

图 19 显示了用对照明胶-PCL 糊剂(图 19A)和 20% 紫杉酚-明胶-PCL 糊剂(图 19B)处理的 CAM。在图中用箭头表示糊剂在 CAMs 表面的位置。用对照糊剂处理的 CAM 显示正常的毛细血管网状结构。用紫杉酚-PCL 糊剂处理的 CAMs 均显示血管退化和无毛细血管网的区域。在糊剂中加入添加剂显著地增加无血管区域的直径(图 19)。

体内研究结果示于图 20。概括地说,对于建立了可触知的肿瘤的小鼠,在肿瘤周围注入紫杉酚-明胶-PCL 糊剂,此制剂导致肿瘤块比对照组平均缩小 63%。另外,对于处理后小鼠的体重没有显著的影响。紫杉酚-PCL 糊剂(无添加剂)不导致肿瘤块的显著缩小。

此项研究显示,可以通过在 PCL 基质中加入紫杉酚/亲水性聚合物颗粒,增加紫杉酚从 PCL 中的体外释放。评价制剂在治疗小鼠皮下肿瘤的效应的体内研究也显示紫杉酚/明胶/PCL 糊剂显著缩小肿瘤块。水溶性药物的类型、微粒体积和添加剂比例等因素影响药物的释放特性。

在小管周围注射化疗糊剂,使之进入被恶性增生阻塞的管的外膜,可以降低局部肿瘤生长,并能减轻阻塞的症状,而不需要侵入性的手术过程。

实施例 11

改进紫杉酚从 PDLLA-PEG-PDLLA 和 低分子量聚(D,L,乳酸)制备的热糊剂中的释放

A. 制备 PDLLA-PEG-PDLLA 和低分子量 PDLLA

DL-丙交酯购自 Aldrich。分子量为 8,000 的聚乙二醇(PEG)、锡辛酸盐和 DL-乳酸为从 Sigma 得到的。分子量为 20,000 的聚-ε-己内酯(PCL)得自 Birmingham Polymers(Birmingham,AL)。紫杉酚购自 Hauser Chemicals (Boulder,Co)。具有窄分子量分布的聚苯乙烯标准品购自 Polysciences(Warrington, PA)。乙腈和二氯甲烷为高效液相纯度级别(Fisher Scientific)。

通过开环聚合合成三嵌段共聚物 PDLLA-PEA-PDLLA。DL-丙交酯和 PEG 单体以不同比例混合,加入 0.5wt% 锡辛酸盐。聚合反应在 150



℃进行 3.5 小时。通过 DL-乳酸的缩聚合成低分子量 PDLA。反应在玻璃烧瓶中进行,伴以柔和的氮气驱气,机械搅拌,并在 180 ℃加热 1.5 小时。通过滴定末端羧基测定 PDLA 分子量约为 800。

B. 制备糊剂

将 20%或 30%紫杉酚充分混入 PDLA-PEG-PDLA 共聚物或在 60 ℃融熔的 PDLA:PCL 90:10, 80:20, 70:30 混合物中。将含有紫杉酚的糊剂称重加入注射器中,保存在 4 ℃。

C. PDLA-PEG-PDLA 和糊剂混合物的特性

在室温下,用 GPC 测定 PDLA-PEA-PDLA 共聚物的分子量及分布,此 GPC 使用 Shimadzu LC-10AD HPLC 系和与-104 A Hewlett Packard Plgel 柱连接的 Shimadzu RID-6A 折射率测定仪。流动相为氯仿,流速 1ml/min。样品注入体积为 20 μ l,聚合物浓度为 0.2%(w/v)。以聚苯乙烯标准品为基准测定聚合物分子量。用 Cannon-Fenske 粘度计测量 25 ℃时 PDLA-PEG-PDLA 在氯仿中的固有粘度。

使用 TA Instruments 2000 控制器和 DuPont 910S DSC(Newcastle,Delaware),通过差示扫描量热法(DSC)进行共聚物的热分析。升温速率为 10 ℃/min,将共聚物和紫杉酚/共聚物基质样品(3-5mg)称重加入具有弯曲开口(crimped open)的铝制样品槽中。

用 ^1H 核磁共振(NMR)测定聚合物的化学组成。用 NMR 仪(Bruker,AC-200E)在 200MHz 测得含有紫杉酚的 PDLA-PEG-PDLA 在 CDCl_3 中的 ^1H NMR 谱。聚合物浓度为 1-2%。

用扫描电子显微镜(SEM)(Hitachi F-2300)观测紫杉酚/PDLA-PEG-PDLA 糊剂的形态特征。样品用 Hummer 仪(Technics USA)将表面镀以 60%金和 40%钨的膜(厚度 10-15nm)。

D. 紫杉酚体外释放

将加载 20%紫杉酚的 PDLA:PCL 糊剂的小丸(约 2mg)或加载 20%紫杉酚的 PDLA-PEG-PDLA 糊剂的圆柱(将融熔的糊剂挤压通过一无针头的注射器制得)置于具塞的盛有 10ml 磷酸盐缓冲盐水(PBS, PH7.4)与 0.4g/L 白蛋白的 14ml 的玻璃试管内。试管在 37 ℃保温,并旋



转混合。定期取上清液进行紫杉酚分析,并补充以新鲜的 PBS/白蛋白缓冲液。用 1ml 二氯甲烷提取上清液(10ml)。倾去水相,在 60 ℃ 的氮气流下将二氯甲烷吹干。干燥的残余物中加入 40:60 水:乙腈混合物,在 10,000g 离心 1 分钟。用 HPLC 法分析上清液中紫杉酚的量。用 110A 泵和 C-8 特种球柱(Beckman),及 232nm 的 SPD-6A 紫外检测器,SIL-9A 自动进样器和 C-R3A 积分仪(Shimadzu)进行 HPLC 分析。进样体积为 20 μ l,流速为 1ml/min。流动相为 58%乙腈: 5%甲醇: 37%蒸馏水。

E. 体内动物实验

10 周大的 DBA/2j 雌性小鼠在到达后使之适应环境 3-4 天。第 1 天在每只鼠的胁腹部后外侧皮下注射 100 μ l PBS,内有 10×10^5 MDAY-D2 肿瘤细胞。在第 6 天,将鼠随机分成 2 组。组 1 植入空白糊剂(对照),组 2 植入含有紫杉酚的糊剂。在麻醉状态下通过手术在靠近肿瘤处形成皮下囊,在此囊中置入约 100mg 熔融糊剂(加热到 50 ℃-60 ℃),将伤口闭合。在第 16 天,将小鼠处死,切取肿瘤并称重。选择 16 天使肿瘤生长到在规格限度内易于测量的体积。

F. 结果和讨论

用 GPC 法测定 PDLLA-PEG-PDLLA 相对于聚苯乙烯标准品的分子量及其分子量分布(图 21)。用 Canon-Fensre 粘度计测定共聚物在 25 ℃ 氯仿中的固有粘度。随着 PEG 含量的增加,分子量和固有粘度降低。含有 10%-40%PEG 的 PDLLA-PEG-PDLLA 的多分散性为 2.4-3.5。然而,有 70%PEG 的共聚物具有多分散性值为 1.21 的窄分子量分布。这可能由于高 PEG 含量降低了副反应,如可导致聚合物宽分子量分布的转酯(基)作用发生的机率。另外,具有疏水-亲水单元的共聚物的卷曲结构可以导致人为的低多分散性值。

纯 PEG 和 PDLLA-PEG-PDLLA 共聚物的 DSC 扫描为图 21 和 22。PEG 和 PEG 含量为 70%和 40%的 PDLLA-PEG-PDLLA,当共聚物中 PEG 含量降低时,显示具有降低的焓和温度的吸热峰。含有 40%和 70% PEG 的共聚物的吸热峰,可能由于 PEG 区域的融熔,导致发生相分离而产生。纯 PEG 具有一尖的融熔峰,而含有 70%和 40%PEG



的共聚物显示宽的熔融峰,并在 PEG 含量为 70% 时具有一明显的肩峰。宽的熔融峰可能由于 PDLLA 干扰 PEG 结晶化而致。70%PEG 的肩峰可能反映 PDLLA 部位的玻璃化。具有 PEG 含量为 10%、20%、30% 的共聚物在 10-250 °C 温度范围内不发生热变化,提示不发生显著的结晶(可能是相分离)。

无紫杉酚或含 20% 紫杉酚的 PDLLA:PCL (70:30, 80:20, 90:10) 混合物的 DSC 温度自记曲线在约 60 °C 显示一吸热峰,由 PCL 熔化引起。因为 PDLLA 的无定形性及其低分子量(800),未观察到 PDLLA 的熔化和玻璃化,未观察到由于紫杉酚的重结晶或熔化产生的热变化。

由于以下原因选择含有 20% 和 30% PEG 的 PDLLA-PEG-PDLLA 共聚物作为组成糊剂的最佳材料。在约 60 °C 含有 10% PEG 的 PDLLA-PEG-PDLLA 不能熔化。含有 40% 和 70% PEG 的共聚物在 60 °C 已熔化,含有 20% 和 30% PEG 的共聚物在 50 °C-60 °C 变成粘性液体。含有 40% 和 70% PEG 的共聚物在水中溶胀很高导致糊剂在水中的快速分散。

紫杉酚从 PDLLA-PEG-PDLLA 圆柱体中的体外释放曲线示于图 23。测定从 40% PEG 圆柱体中释放的实验,由于圆柱体具有很高的溶胀度因而是吸水的(一天内约吸水 200%),并在几天内崩裂。从 30% PEG 圆柱体中释放的紫杉酚在 70 天内逐渐增加。从 20% PEG 圆柱体中释放的紫杉酚缓慢增加到第 30 天后,突然增加,继之另一逐渐增加的阶段。每个单独的圆柱体(20% PEG 含量)之间存在的显著的不同显示了紫杉酚释放中的突然的变化。在突然的增加之前,对于具有同样圆柱体直径的(1mm),具有较低 PEG 含量的共聚物,紫杉酚释放的部分是较低的。40% 和 30% PEG 圆柱体比 20% 圆柱体显示非常高的紫杉酚释放速率。如,30% PEG 的圆柱体在 30 天内释放 17% 紫杉酚,而从 20% PEG 圆柱体中仅释放 2%。具有较小直径的圆柱体导致更快的释放速率,如在 30 天内,0.65mm 和 1mm 直径的 30% PEG 圆柱体分别释放 26% 和 17% 紫杉酚(图 23)。

可以用紫杉酚从圆柱体中的释放机制解释以上观察结果。光学显微



镜观察到紫杉酚作为结晶分散于聚合物中。热镜台显微镜观察到结晶在 170 °C 开始溶解在共聚物基质中,在 180 °C 完全溶解。加载 20%紫杉酚的 PDLA-PEG-PDLA(30%PEG)糊剂的 DSC 温度自记曲线显示紫杉酚的一小的重结晶放热(16J/g,190 °C)和一熔融吸热(16J/g,212 °C)(图 21),显示紫杉酚在 180 °C 后熔融的共聚物中重结晶。在此类型的药物/聚合物基质中,紫杉酚能通过扩散和/或聚合物浸蚀而释放。

在这种控制扩散的情况下,药物能通过分子在聚合物内部扩散和/或通过联接药物粒子形成的开放的通道扩散,而被释放。因此在负载量为 20%时,脱离出一些紫杉酚颗粒,紫杉酚可以通过在共聚物中溶解而后扩散得到释放。其它紫杉酚颗粒可以与表面相联形成簇状排列,通过通道扩散而被释放。在这两种情况下,较小的圆柱体由于较短的扩散路径而产生较快的药物释放(图 23)。

在释放过程中记录圆柱体大小变化和吸水(图 24)。30%PEG 圆柱体的长度、直径、湿重在 2 天内快速增加到最大值,随后 15 天保持不变,然后逐渐降低。圆柱体的初始直径不影响其溶胀行为。对于 20%PEG 圆柱体,在 1 天内长度降低 10%,并达到平衡,而在此期间内直径和吸水性逐步增加。因为在共聚物中有更多的 PEG 吸收更多的水促使紫杉酚的扩散,可以观察到更快的释放(图 23)。

通过 GPC 检测 PDLA-PEG-PDLA 糊剂共聚物分子量降解。对于 20%PEG 圆柱体,在峰的位置的洗脱体积随时间增加,显示在释放实验的过程中分子量降低(图 25)。在第 69 天观察到一两阶段分子量分布。对于 30%PEG 圆柱体 (1mm 和 0.65mm),聚合物分子量也降低。然而没有观察到两阶段分布。

NMR 谱显示在 3.6ppm 有一 PEG 峰,在 1.65ppm 和 5.1ppm 有 PDLA 峰。在共聚物中 PEG 相对于 PDLA 的峰面积在 69 天后显著降低(图 26),表明 PEG 在其与 PDLA 分离后溶解。还记录了圆柱体的干燥失重(图 26),并显示降解速率按以下顺序降低:30%PEG-0.65mm > 30%PEG-1mm > 20%PEG-1mm。

用 SEM 观察了紫杉酚释放前后干燥圆柱体的形态学变化(图 27)。



概括地说,在释放之前能观察到固体紫杉酚结晶和非多孔性聚合物基质(图 27A 和 27B)。在释放 69 天以后,已观察不到紫杉酚结晶,并且基质含有许多由于聚合物降解和吸水产生的孔(图 27C 和 27D)。

在置于水中仅仅 2 天后,30%PEG 圆柱体显示强烈的溶胀(图 24),因此对于脱离的水溶性 PEG 嵌段物和降解的 PDLLA(即 DL-乳酸低聚物)的扩散的阻碍作用降低。因为失重和 30%PEG 圆柱体的继续降解,浸蚀释放的作用逐渐增加,导致紫杉酚的持续释放而不引起任何突然的变化(图 23)。对于 20 % PEG 圆柱体,溶胀程度初始较低(图 24),导致降解产物的缓慢扩散。因为扩散通道短,因此内部的降解产物主要停留在内部而有较少的降解产物在外部区域。因为低聚物的末端羧基团催化水解,降解产物加速了降解速率。这导致了两阶段共聚物分子量分布所显示的一高分子量的壳和一低分子量的内部(图 25,69 天)。因为壳的破裂依赖于这些因素,如壳的强度、厚度和其上的疵点,及内部的降解产物,因此内部降解产物开始减少的时间和程度有很大差异。因为壳的破裂是间断的,聚合物中的药物在显微水平上是不均匀的,4 个试验样品释放爆发的时间点和爆发的程度不同(图 23)。

图 28 显示了紫杉酚从 PDLLA 和 PCL 混和物中,及从纯 PCL 中的释放。概括地说,释放部分随混和物中 PDLLA 含量的增加而增加。如,在 10 天内,从 80:20,70:30 和 0:100 PDLLA:PCL 中释放的紫杉酚分别为 17%、11%和 6%。在第 1 天的初始爆发后,从 80:20 PDLLA:PCL 糊剂中的释放大体上变得稳定。在释放中不会观察到显著的溶胀。对于 PDLLA:PCL 混合物,因为 PDLLA 有很低的约为 800 的分子量,它快速水解成水溶性产物,而不在失重阶段延迟很长时间。PCL 作为骨架材料使糊剂不致快速崩解。因此随着混合物中 PDLLA 含量的增加,降解增强,导致释放速率增加。PDLLA 持续的浸蚀控制紫杉酚的释放并导致一持续释放。因为 PCL 的缓慢的降解速率(在 1-2 年内),紫杉酚从纯 PCL 中的释放可能是受扩散控制的。

加载 20%紫杉酚的 90:10 PDLLA:PCL 糊剂,因为在 24 小时内保温过程中糊剂丸产生崩解,使其释放研究遇到了困难。概括地说,在保



温的前 12 小时内, 每个小时都要取样以用以保证紫杉酚释放所需的渗透条件。在 10 小时内, 从 90:10 糊剂中释放的紫杉酚为 25-30%。

测定了糊剂抑制小鼠肿瘤生长的效果(图 29)。概括地说, 测定的糊剂为 PCL \pm 20% 紫杉酚, 80:20 PDLLA:PCL \pm 20% 紫杉酚, 90:10 PDLLA:PCL \pm 20% 紫杉酚, PDLLA-PEG-PDLLA(30%PEG) \pm 20% 紫杉酚。组成为 90:10 PDLLA:PCL 和 PDLLA-PEG-PDLLA 的含有紫杉酚的糊剂, 在体内对肿瘤生长的抑制率分别为 54% 和 40%。而组成为 PCL 和 80:20PDLLA:PCL 的含有紫杉酚的糊剂, 对于肿瘤生长没有或只有很小的作用。所有对照糊剂(无药物)对于肿瘤生长没有显著作用。具有紫杉酚快速释放速率的糊剂(90:10 PDLLA:PCL 和 PDLLA-PEG-PDLLA)对于降低肿瘤生长也很有效, 这提示需要在肿瘤部位具有足够的紫杉酚局部浓度以抑制肿瘤生长。释放紫杉酚缓慢的糊剂, 如 PCL 和 80:20 PDLLA:PCL 无效。所有测定的糊剂对于小鼠体重没有显著影响, 提示含有紫杉酚的糊剂在体内是可以被接受的。

这些数据提示, 紫杉酚在肿瘤部位的局部用药, 对于抑制局部肿瘤生长是有效而不增加全身毒性的治疗方法。含有紫杉酚的制剂不能完全抑制肿瘤生长, 可能是由于紫杉酚从聚合物中的释放没有达到充足的量, 和 MDAY-D2 肿瘤的快速生长。含有 30% 紫杉酚的 90:10 PDLLA:PCL 糊剂, 比含有 20% 紫杉酚的 90:10 PDLLA:PCL 糊剂, 能释放更多的紫杉酚, 因而能更有效地抑制肿瘤生长, 这一现象符合以上认识。因此, 调整由聚合物和化疗剂的性质及用药部位控制的紫杉酚的释放速率, 在抑制肿瘤生长的局部治疗方法的发展中是一重要步骤。

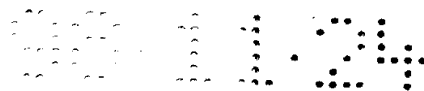
实施例 12

制备 PCL 微球: 扩大规模研究

用 PCL(标示分子量 80,000)按如下所述的溶剂蒸发法制备微球(50g)。

A. 方法

将 500ml 10% PCL 的二氯甲烷液和 4000ml 1% PVA(分子量 13,000-23,000, 99% 水解)溶液, 用 Homo 混合器乳化 10 小时, 控制混合



器的变阻器参数设定在 40。混合物用#140 筛过滤直到微球沉降在底部,然后将上清液轻轻倒出。用蒸馏水洗涤产品三次(使用沉淀后倾倒的方法),再悬浮于 250ml 蒸馏水中,并过滤。微球在 37 ℃ 过夜,空气干燥。

B.结果

微球产率如下:

PCL 的初始重量	50.1g
所得微球重量	41.2g
%产率	$(43.2/50.0) \times 100=86.4$

产率(10-50 μm)约为 72%,

平均体积 21.4 μm ,中间值 22.0 μm ,众数值 24.7 μm 。

可以通过过筛或用沉降法分离得到狭窄的体积分布范围(20-40 μm)。

实施例 13

制备 PLGA 微球

从 (PLLA) 乳酸-乙醇酸(GA)共聚物制备微球。

A.方法

用标准方法(将聚合物溶解在二氯甲烷中,并按制备 PCL 或 PDLLA 微球的方法,将其在 PVA 溶液中搅拌乳化),制备体积范围为 0.5-10 μm ,10-20 μm 和 30-100 μm 的微球。当使用不同分子量的聚合物时,采用 PLLA 对 GA 的不同比例[如 Intrinsic Viscosity(I.V.)所述]。

B.结果

从以下起始聚合物成功地制得微球:

PLLA	:	GA	I.V.
50	:	50	0.74
50	:	50	0.78
50	:	50	1.06
65	:	35	0.55
75	:	25	0.55
85	:	15	0.56



成功地将 10% 或 20% 的紫杉酚加入这些微球。图 31-34 显示了用一种起始聚合物(85:15 IV=0.56)制得的微球的体积分布的例子。用具有各种体积和各种组成的微球进行紫杉酚释放试验。释放速率示于图 35-38。

实施例 14

二嵌段共聚物

用总体熔融聚合技术合成聚合(DL-丙交酯)-嵌段-甲氧基聚乙二醇(PDLLA-MePEG), 聚合己内酯-嵌段-甲氧基聚乙二醇(PCL-MePEG), 和聚(DL-丙交酯-共-己内酯)-嵌段-甲氧基聚乙二醇(PDLLACL-MePEG)。简要地说, 将给定数量的有不同的分子量的 DL-丙交酯、己内酯和甲氧基聚乙二醇单体, 加热(130 °C)到熔融, 伴以氮气吹气和搅拌。将锡辛酸盐催化剂(0.2%W/W), 加入到熔融的单体中。聚合反应进行四小时。分别用 GPC、荧光法和溶出试验法测定分子重量、临界胶束浓度, 和最大紫杉酚负载量(图 39)。得到紫杉酚的高负载力。紫杉酚的溶出依赖于共聚物的组成和浓度(图 39 和 40), PDLLA-MePEG 可以使紫杉酚最稳定地溶出(图 40-41)。

实施例 15

尼龙微囊对紫杉酚的包封能力

A. 制备加载紫杉酚的微囊

用界面聚合技术将紫杉酚包进尼龙微囊。简要地说, 将 100mg 紫杉酚和 100mg 多聚醇(Pluronic) F-127 溶解在 1ml 二氯甲烷(DCM)中, 加入 0.4ml(约 500mg)己二酰氯(ADC)。用 Polytron 均化器(设定在 1)将此溶液均化 15 秒, 使之成为 2% PVA 溶液。均化时滴加溶解在 5ml 蒸馏水中的 1,6-己二胺(HMD)溶液。加入 HMD 溶液后, 将此混合物进一步均化 10 秒。将混合物移入烧杯中, 并用磁力搅拌器搅拌三小时。将混合物离心, 收集, 并再次悬浮在 1ml 蒸馏水中。

B. 包封效率/紫杉酚负载量

将约 0.5ml 悬浮液过滤, 并将微球干燥。将约 2.5mg 微球称重, 悬浮在 10ml 乙腈中 24 小时。测定上层液中的紫杉酚, 结果作为紫杉酚的百



分含量。初步研究显示,紫杉酚能以高负载量(60%)被包封在尼龙微囊中,并具有高的包封效率(高于 80%)。

C.紫杉酚释放研究

将约 2.5mg 紫杉酚-尼龙微球悬浮在含有 1M 氯化钠和 1M 脲的 50ml 水中,并周期地进行分析。紫杉酚从微囊中的释放是快的,在 72 小时后释放药物的 95%以上。(图 42)

实施例 16

紫杉酚聚合胶束

PDLLA-MePEG 是一有疏水(PDLLA)和亲水(MePEG)区域的嵌段共聚物。在适当的分子重量和化学组成时,它们形成具有疏水性 PDLLA 核和亲水性 MePEG 壳的胶束。紫杉酚可以被包入疏水性核,由此使紫杉酚增溶。

A.PDLLA-MePEG 双嵌段共聚物的合成

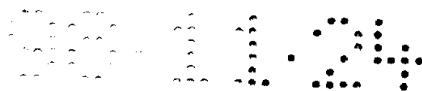
将甲氧基聚乙二醇(M.W.2000,150g)和 DL 丙交酯(100g)单体加入圆底烧瓶中,将温度升高到 130-150 °C。单体熔化后,加入 0.6g 锡辛酸盐催化剂。在氮气保护和搅拌条件下进行反应,聚合反应在 0 小时内完成。

B.制备紫杉酚胶束

将 PDLLA-MePEG 共聚物溶解在乙腈或 50:50 乙醇:丙酮(聚合浓度<40%)中。将聚合物溶液离心(14000rpm)5 分钟,将上清液(废弃不溶的聚合物)移到玻璃试管中。将紫杉酚溶解在乙腈或 50:50 乙醇:丙酮中,并被加到纯化的聚合物溶液中。旋转混合后,溶液在氮气流(一般每批量需要 40mg 紫杉酚 2 小时)保护下在 60 °C 蒸发。通过抽真空和加热,除去残余的溶剂。将基质加热到约 60 °C,直至变成透明的胶体。将一定体积的水(大于基质重量的四倍)加入到基质中。马上进行旋转混合,直至紫杉酚/聚合基质溶液化。配方示于表 II。

表 II 紫杉酚/PDLLA-MePEG*配方

PDLLA-MePEG	溶解介质	紫杉酚加载量(紫杉酚终浓度)
2000/50/50	水	10%(20mg/ml)



2000/40/60	水	10 % (20mg/ml)
2000/50/50	0.9% 盐水	5 % (10mg/ml)
2000/50/50	0.9% 盐水	10 % (20mg/ml)
2000/50/50	5 % 葡萄糖	10 % (10mg/ml)
2000/50/50	5 % 葡萄糖	10 % (20mg/ml)

C. 制备紫杉酚胶束/热凝胶聚合物的释放系统

将热凝胶聚合物如聚(N-异丙基丙烯酰胺)溶解于蒸馏水中。分别将水加到紫杉酚胶束/聚合物基质中,如含有10%紫杉酚的PDLLA/MePEG 2000-40/60,形成紫杉酚胶束溶液。将二溶液冷却(如4℃)并混合形成热凝胶释放系统。

实施例 17

药物释放分析

将已知重量的聚合物(一般2.5mg丸)加入盛有含10mm Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 , 0.145m NaCl 和 0.4g/l 牛血清白蛋白的14ml缓冲液的15ml的试管中。盖上试管并在37℃使其转动。在一定时间取出全部14ml缓冲溶液,并用新鲜缓冲液代替。

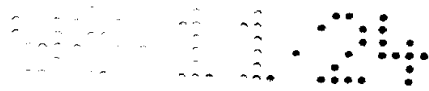
将缓冲液加到1ml二氯甲烷中,摇动1分钟,将紫杉酚提取到二氯甲烷中。移去水相在氮气流下将二氯甲烷干燥。残余物溶解在60%乙腈:40%水中,将溶液注入HPLC系统,实验条件为C8柱(Beckman Instruments USA),流动相58%:5%:37%乙腈:甲醇:水,流速为1ml/min。

在232nm分析收集的缓冲液中的紫杉酚。对于MTX,收集到的缓冲液直接加到HPLC柱上,不需要经过在二氯甲烷中的提取。在302nm分析MTX。对于含有钒的化合物,在200-300nm直接用UV/VIS光度计分析缓冲液。

实施例 18

加载紫杉酚的热糊剂在肿瘤生长和肿瘤血管生成中的体内作用

受精的家鸡胚胎孵化三天后去掉壳。将气室处的壳去掉,割开内壳



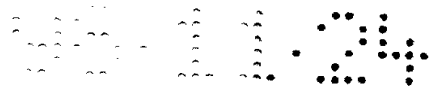
膜,在相对的一端打孔,使卵的内含物从钝圆的一端缓慢流出,将内含物倒空。将内含物倒入圆底灭菌的玻璃杯中,用培养皿覆盖,在相对湿度90%和3%二氧化碳条件下孵化。

将 MDAY-D2 细胞(鼠淋巴肿瘤)注入小鼠中,并使肿瘤生长到重量为 0.5-1.0g。将小鼠处死,用乙醇擦拭肿瘤部位,切除,置于无菌组织培养介质中,在层流通风柜下切成 1mm 薄片。在将切片的肿块置于 9 天大的家鸡胚胎上之前,用 30 号针轻轻刮 CAM 表面以保证肿瘤的植入。孵育 8 天后(去壳后孵育 4 天)将肿瘤块置于 CAM 上,使其在 CAM 上生长 4 天,建立血管供应。用这种方法制备 4 个胚胎,每个胚胎接受 3 个肿块。对于这些胚胎,一个肿块接受含有 20%紫杉酚的热糊剂,第二个肿块用不含药的热糊剂,第三个肿块不进行治疗。治疗两天,记录结果。

植入的 MDAY-D2 肿瘤分泌的血管生成因子,诱发毛细管(从 CAM 上衍生)向内生长进入肿瘤块,使其体积持续增长。因为肿块的所有血管从 CAM 上衍生,而所有肿瘤细胞从移植物衍生,可以设想,对于这两个过程的治疗干扰效应是独立的。这一测定法已用于测定含有紫杉酚的热糊剂的效应:(a)抑制肿瘤的血管系统,(b)抑制肿瘤细胞自身的生长。

直接体内立体显微镜观察和固定组织的组织学研究证明了以下结论。与对照肿瘤比较(图 70A 和 70B),用含有 20%紫杉酚的热糊剂处理的肿瘤,供应肿瘤的血管数量减少(图 70C 和 70D),肿瘤内血管数量降低,肿瘤周围血管数量降低(在固体肿瘤中,此处一般为高血管区域)。在进行研究的两天内,肿瘤体积和质量开始降低。另外,在细胞分裂中大批内皮细胞被抑制,显示破坏了内皮细胞的增生。在有丝分裂中,经常看到肿瘤细胞被抑制。所有 4 个胚胎显示一致方式,含有 20%紫杉酚的热糊剂抑制肿瘤血管系统,而不含药的热糊剂没有效应。

比较起来,用不含药的热糊剂处理的 CAM,肿瘤血管生长良好,与周围正常组织比较血管数量和密度增加,观察到的血管明显多于用含紫杉酚的热糊剂处理的肿瘤。新生成的血管从各个角度进入肿瘤,象轮辐伸向轮的中心(图 70A 和 70B)。在研究期间对照肿瘤在体积和质量上持续生长。组织学上,可以看到在肿瘤组织边缘有许多扩张的薄壁的毛细



管,在细胞分裂中,几乎没有内皮细胞。肿瘤组织始终具有良好的血管生长,并具有活力。

作为一个例子,将两个相似体积的肿瘤(初始,在移植时)置于同样的CAM上,获得随后的数据。用含有20%紫杉酚的热糊剂处理的肿瘤,经测定为330mm × 597mm,紧邻肿瘤周围有14条血管,而肿瘤块只有3-4条小毛细血管。对于使用不含药的热糊剂治疗的肿瘤,经测量为623mm × 678mm,紧邻肿瘤边缘有54条血管,肿瘤块有12-14条血管。另外,周围的CAM与紫杉酚处理的肿瘤周围区域比较含有更多的血管。

此研究证实热糊剂释放足够量的抗增殖剂(在该实施例中为紫杉酚)以抑制伴有肿瘤生长和发育的病理性血管生长。在这些条件下,肿瘤细胞最大程度地刺激血管生长,这些肿瘤细胞产生血管生长因子,能够引起毛细血管从周围组织向内生长进入肿瘤块。含有20%紫杉酚的热糊剂,能够阻断这一过程,并限制肿瘤组织保持足够量的血液供应的能力。通过药物对肿瘤细胞自身的细胞毒效应,和剥夺组织生长和扩张必需的营养供应,导致肿瘤大小的降低。

实施例 19

含有治疗剂的热糊剂在鼠肿瘤模型中对于肿瘤生长的体内效应

可以使用鼠MDAY-D2肿瘤模型,测定抗增殖化合物,如紫杉酚局部慢速释放,对于肿瘤生长、肿瘤转移和动物存活率的效应。概括地说,使MDAY-D2肿瘤细胞系于在 α mem培养基中的含有5%胎牛血清的细胞悬浮液中生长。在37℃,在用含5%二氧化碳供给的人工大气条件下孵育细胞,并每三天稀释到十五分之一,直到得到足够量的细胞。孵育后用光学显微镜检查细胞的成活力,并在1500rpm离心5分钟。将PBS加到细胞中,以达到稀释度为1,000,000细胞/ml。

使10周大的DBA/2j雌性小鼠在到达后适应三至四天。每只小鼠在肋腹的后侧面,皮下注射100ml PBS,内含100,000MDAY-D2细胞。前面的研究显示,此过程在3-4天内注射部位产生可见的肿瘤,在14天体积达到1.0-1.7g,注射19-25天后在肝内产生可见的转移。根据此



研究的目的是,可以在疾病发展的任何一点建立治疗性的介入。

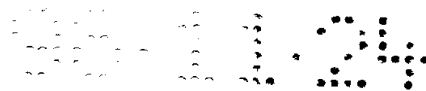
用以上动物模型,将 140,000 MDAY-D2 细胞皮下注入 20 只小鼠,使肿瘤组织生长。在第 5 天,将小鼠分为 5 组。在麻醉下,使用手术将肿瘤部位切开,用含药的热糊剂或对照热糊剂处理局部区域而不干扰存在的肿瘤细胞,关闭伤口。五组分别接受非治疗(仅仅关闭伤口),仅用聚合物(PCL),含有 10%紫杉酚的热糊剂或含有 20%紫杉酚的热糊剂(仅 4 只动物注射)植入紧邻肿瘤部位。在第 16 天,将小鼠处死,切取肿瘤并检查(整体检查和组织学检查)肿瘤生长、肿瘤转移、治疗产生的局部和系统毒性、对于伤口恢复的作用、对于肿瘤血管的作用,及保留在切口部位糊剂的情况。每只动物的肿瘤重量示于如下表 IV:

表 IV 肿瘤重量(gm)

动物(空白)	对照 (PCL)	对照 热糊剂	10%紫杉酚 热糊剂	20%紫杉酚
1	1.387	1.137	0.487	0.114
2	0.589	0.763	0.589	0.192
3	0.461	0.525	0.447	0.071
4	0.606	0.282	0.274	0.042
5	0.353	0.277	0.362	
平均	0.6808	0.6040	0.4318	0.1048
标准偏差	0.4078	0.3761	0.1202	0.0653
P 值	0.7647	0.358	0.036	

含有 20%紫杉酚的热糊剂与对照组动物比较(平均重量 0.681) 肿瘤生长抑制率高于 85%(平均重量 0.105)。用空白热糊剂或用含有 10%紫杉酚的热糊剂处理的动物,对于肿瘤生长只有一般的效应;肿瘤重量分别降低 10%和 35%(图 43A)。因此,含有 20%的紫杉酚的热糊剂在降低肿瘤生长方面比含有 10%紫杉酚的热糊剂有更大的作用(图 43C 和图 43B)。

在一些动物的用药部位检测糊剂。在 8/15 小鼠中检测到重量在



0.026g/0.078g 的聚合物。在含有 20%紫杉酚的热糊剂的组中，每只动物含有一些残余的聚合物，提示它对溶解是不敏感的。组织学上，用含有紫杉酚的热糊剂处理的肿瘤与对照肿瘤相比含有较低的细胞结构和更多的组织坏死。血管减少，在细胞分裂中经常见到内皮细胞被抑制。含有紫杉酚的热糊剂不显示损害皮肤或肿瘤周围组织的完整性或细胞结构。大体上，伤口恢复不受影响。

实施例 20

含有紫杉酚的手术用糊剂延缓小鼠体内部分切除的 RIF-1 肿瘤再生的用途

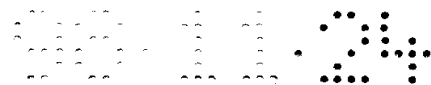
考察了紫杉酚可生物降解的聚合物持续释放手术用糊剂延缓 C3H/Hej 小鼠体内部分切除的 RIF-1 肿瘤再生的效应。

A.方法

将 20%紫杉酚混入聚(ϵ -己内酯)和甲氧基聚乙二醇 4:1 的混合物中。通过用 HPLC 测定法检测紫杉酚，考察了此剂型在含有白蛋白(0.4mg/ml)的 37℃的磷酸盐缓冲盐水中的体外释放曲线。概括地说，将悬浮有 RIF-1 细胞(1.0×10^6 细胞)的 Hanks 缓冲液 100ul，注入 17 只小鼠的右腹。使肿瘤生长 5 天，将每个肿瘤手术切除 70%以上，剩余肿块不进行处理，或以 20-30 ul 20%紫杉酚手术用糊剂或不含药物的手术用糊剂覆盖。此时为第 0 天。在第 4 天至第 7 天，和第 9 天，测定皮肤下可以见到的肿瘤块的尺寸。可见的圆柱形肿瘤的面积与肿瘤体积相关联($r = 0.812$)。

B.结果

紫杉酚的体外释放曲线，以初始第 1 天的爆发阶段和随之长期的慢速持续释放为特征。从第 4 天至第 9 天每只鼠可见的圆柱形肿瘤表面积示于表 V。在不接受紫杉酚的 2 组中，除 1 只鼠外，所有小鼠在第 4 天显示普遍的肿瘤再生。1 只只接受聚合物的小鼠显示延迟肿瘤生长，而 1 只不接受治疗的小鼠不显示肿瘤再生。对照地，用紫杉酚手术用糊剂处理的除 1 只外的所有小鼠，至少直至第 5 天，不显示肿瘤再生，两只鼠直至第 6 天仍不显示肿瘤再生。



C. 结论

含有紫杉酚的糊剂，在第 1-5 天显著抑制肿瘤再生。因为细胞系的进攻性，再生发生在第 6 天以后。

表 V

肿瘤切除术后测量的 RIF-1 细胞肿瘤大小
(表示为皮下可见肿瘤块的面积 mm^2)

治疗方法	肿瘤大小 (mm^2)				
	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天	第 9 天
聚合物中 20% 紫杉酚	0.0	0.0	41.3	58.8	*
聚合物中 20% 紫杉酚	30.7	35.3	49.0	67.9	*
聚合物中 20% 紫杉酚	0.0	0.0	0.0	*	42.4
聚合物中 20% 紫杉酚	0.0	47.2	55.4	47.8	*
聚合物中 20% 紫杉酚	0.0	25.5	41.9	57.1	*
聚合物中 20% 紫杉酚	0.0	0.0	0.0	*	46.6
单纯聚合物	44.2	52.8	*	*	*
单纯聚合物	36.3	39.0	32.7	*	38.5
单纯聚合物	36.9	44.2	51.5	42.7	*
单纯聚合物	0.0	12.9	14.9	*	29.2
单纯聚合物	37.4	39.6	40.7	54.1	*
单纯聚合物	40.7	24.2	40.7	*	36.9
不治疗	0.0	0.0	0.0	*	*



不治疗	52.2	77.8	*	*	*
不治疗	39.0	45.4	43.6	*	*
不治疗	22.1	21.2	31.2	*	26.9
不治疗	21.2	30.7	36.3	*	*

*未测量肿瘤或动物已被处死

实施例 21

包胶苏拉明

将 1ml 5%ELVAX (与 5%乙酸乙烯酯交联的聚合(乙烯-乙酸乙烯酯))的二氯甲烷(DCM)溶液,与固定重量的苏拉明钠亚微粒粉末混合。将此混合物注入盛于 30ml 平底试管中的 5ml 5% 聚乙烯醇(PVA)水溶液中。将含有不同重量药物的试管悬浮在 40℃ 放多个样品的水浴中 90 分钟,伴以自动搅拌。将混合物移出,分析微球样品的体积。将试管在 1000g 离心 5 分钟。移取并收集 PVA 上清液用以分析(非包胶药物)。在 5ml 水中洗涤微球并再次离心。保留此 5ml 洗涤液用于分析(表面结合着的药物)。将微球在 50ul 甲醇中湿润,并在 1ml DCM 中涡旋混合以溶解 ELVAX。将微球加热到 40℃,在搅拌条件下缓慢加入 5ml 50℃ 水。此过程导致 DCM 立即蒸发,因此苏拉明钠释放进入 5ml 水中。

所有样品用荧光定量法测定药物含量。概括地说,苏拉明钠的紫外/可见(uv/vis)吸收有最大吸收峰 λ 312nm。在水和 5% PVA 中,此吸收在 0-100ug/ml 范围内呈直线。苏拉明钠也能强烈地发出荧光,最大激发波长在 312nm,最大发射波长在 400nm。此荧光测定法在 0-25ug/ml 范围内是可以定量的。

这些实验结果示于图 44-50。概括地说,在 DCM 中加入药物,不影响微球体积的数量(图 44)或重量(图 45)分布。可以得到在 20-60um 范围内的微球的高产率。

苏拉明的包胶率很低(< 1%)(图 47)。然而随着 DCM 中药物重量增加,虽然包胶百分率降低,但被包胶的药物总量增加。如示于图 46,可以将 50ug 药物包在 50mg ELVAX 中。苏拉明钠在含有 10%NaCl 的



2.5%PVA 中的包胶作用示于图 48(以重量为基准的体积分布)。苏拉明钠在含有 10%氯化钠的 5%PVA 中的包胶作用示于图 49 和 50(分别为以重量、数量为基准的体积分布)。

为评价苏拉明钠和可的松乙酸酯作为潜在的抗血管生成剂的作用,每个药物与 0.5%甲基纤维素混合,并使用干燥的圆盘,在其中将药物置于 6 天大的 CAM 的生长的血管上。苏拉明 (70 μ g) 与可的松乙酸酯 (20 μ g) 联合治疗,当在 CAM 上试验 48 小时时,能成功地抑制血管生长。产生的无血管区域直径为 6mm,显示一个无血流和血管组织稀疏的区域(图 51A 和 51B)。

实施例 22

含有甲氨喋呤的糊剂

A. 制备含有甲氨喋呤的糊剂

用研杵和研钵将甲氨喋呤 (“MTX”; Sigma Chemical Co.) 研磨使颗粒体积降低到 5 微米以下。将其干粉末与聚己内酯(分子量 18000, Birmingham Polymers, AL USA) 混合。将混合物加热到 65 $^{\circ}$ C 5 分钟,将熔融的聚合物/甲氨喋呤混合物搅拌 5 分钟成为均匀的糊剂。将熔融糊剂置于 1ml 注射器中,按需要挤出。

B. 结果

结果示于图 52A - E。概括地说,图 52A 显示 MTX 从含有 20% MePEG 和各种浓度的 MTX 的 PCL 片中释放的情况。图 52B 显示了一相似的试验,所用的糊剂不含 MePEG。图 52C, D 和 E 显示了存在于片中的 MTX 的量。

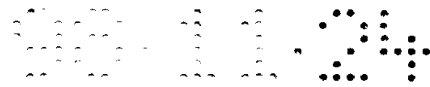
从以上结果可以看出,当使用高含量的 MePEG 时,可以从聚合物中释放出相当大量的 MTX。

实施例 23

制备含有甲氨喋呤的微球

A. 仅含有 MTX 的微球

用研杵和研钵将甲氨喋呤 (Sigma) 研磨使颗粒体积降低到 5 微米以下。将 100ml 2.5% PVA (w/v) (Aldrich 或 Sigma) 水溶液与



500mg 未研碎的 MTX 在 25 ℃ 搅拌 15 分钟，使溶液被 MTX 饱和。在 2000rpm 将此溶液离心除去未溶解的 MTX，上清液用于制备微球。

概括地说，将 10ml 5%w/v 聚合 (DL) 乳酸 (分子量 500,000; Polysciences)、聚合乳酸:乙醇酸 (50:50 IV 0.78 Polysciences) 或含有 10:90w/w MTX(粉末):聚合物的聚己内酯 PCL(分子量 18,000, BPI) 溶液缓慢滴入 100ml MTX 饱和的 2.5 % w/v PVA(Aldrich 或 Sigma) 溶液中，同时，伴以 600rpm 的搅拌。将混合物在 25 ℃ 搅拌 2 小时，将产生的微球洗涤并干燥。

用这种方法能够重复制备在 30 - 160 微米范围内的含有 MTX 的微球 (图 53)。

B.含有 MTX 和透明质酸的微球

按如下所述，可以用透明质酸 (HA) 作为载体，用油包水乳化方法制备含有 MTX 的微球。概括地说，将 50ml 石蜡油(Parafin oil) (轻油; Fisher Scientific) 在 200rpm 搅拌的条件下加热到 60 ℃。将 5ml 含有不同量的 MTX 的透明质酸钠(来源 = 公鸡鸡冠;Sigma) 水溶液 (20/ml) 滴加到石蜡油中。将混合物在 200rpm 搅拌 5 小时，在 500xg 离心 5 分钟。将产生的微球在正己烷中洗涤 4 次，然后干燥。

实施例 24

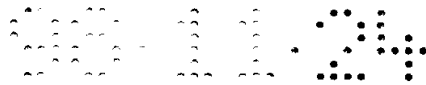
制备含有钒化合物的聚合组合物

A.含有硫酸氧钒的聚合糊剂

首先用研钵和研杵将硫酸氧钒 (Fisher Scientific) 研磨以降低其颗粒体积，然后按如上所述用于 MTX 的方法将其分散于熔融的 PCL 中。将其置于注射器中固化待用。

如在例 31 中所述测定药物的释放，不同点只在于将 65mg 含有 10 % w/wVOSO₄:PCL 的丸剂悬浮于 10ml 水中，用 UV/Vis 分光法测定在 200-300nm 范围内的吸收峰，以分析上清液中释放的硫酸氧钒。

结果示于图 54。概括地说，从含有 10 % VOSO₄ 的聚合组合物中，6 小时内释放 1mg VOSO₄，两天后释放 3mg VOSO₄，6 天释放 5mg VOSO₄。



B.含有硫酸氧钒的聚合微球

如例 23 所述，将硫酸氧钒加入聚合-乳酸或透明质酸的微球。结果示于图 55。

C.含有有机钒酸盐的聚合糊剂

如例 22 所述，将有机钒酸盐加入 PCL 糊剂。如上测定钒从微球中的释放。结果示于图 56A 和 56B。

D.含有有机钒酸盐的微球

如例 23 所述，也可将有机钒酸盐加入微球。如示于图 57 的聚合 D,L-乳酸的微球（分子量 500,000, Polysciences）。

实施例 25

含有双（麦芽酚酸）氧合钒（BMOV）的聚合组合物

A.制备加载双（麦芽酚酸）氧合钒（BMOV）的糊剂

将聚(ϵ -己内酯)(分子量 20000)(BPI Birmingham AL)和 BMOV 称重，直接以适当比例置于玻璃烧杯中。在某些制剂中，也在 PCL 和 BMOV 中加入甲氧基聚乙二醇（MEPEG）（分子量 350）（Union Carbide, Danbury CT.）。将烧杯和内容物加热到 55℃，同时轻轻搅拌 5 分钟直至 BMOV 彻底分散于熔融的聚合物中。将熔融的混合物吸入预热的注射器中，保存在 4℃ 待用。

B.药物释放研究

向含有 15ml 10mM 磷酸盐缓冲盐水（PBS pH7.4）和 100 μ g/ml 牛血清白蛋白（部分 5 Boehringer Mannheim, 德国）的试管中加入 150mg PCL - BMOV 糊剂的圆盘形的片。将试管密封，并在 37℃ 以 30rpm 的速率上下翻转。在适当的时间，使 PCL - BMOV 片在重力作用下沉降 5 分钟，吸取所有上清液。通过测定在 256nm（A256）和 276nm（A276）的吸收，测定上清液中的 BMOV 的含量。用 15ml 新鲜 PBS 补充试管中的上清液，再次使试管翻转。用 0 - 25 μ g/ml 范围内 BMOV 的标准品得到 BMOV 浓度与 A256 和 A276 的线性曲线。在 37℃ 密封试管中保存 2 - 3 天，这些标准品在 256nm 和 276nm 的吸收值不受影响（药物释放研究使用同样条件）。



在药物释放实验的最后，通过将已知干燥重量的基质溶解在 0.5ml DCM (Fisher) 中，测定 PCL - BMOV 基质样品中残余药物含量。向此溶液中加入 50ml 热水 (50 ℃)，搅拌，使 DCM 蒸发，将 BMOV 留在水中，用分光光度计进行分析 (A256)。

C. 扫描电镜 (SEM)

用扫描电镜观察在 2 个月的药物释放实验中使用的 PCL-BMOV 基质样品。这些样品与新鲜制备的对照样品比较。将聚合物样品镀膜 (金: 钯 = 60 : 40) (Hummer instruments, Technics, USA)，用有 IBM 数据采集系统的 Hitachi(model F-2300)扫描电镜观测。

D. 结果

BMOV 从 PCL 基质中的释放示于图 58A 和图 58B。将 BMOV 在 PCL 基质中的加载量从 5 % 增加到 35 %，将增加药物在 2 个月的周期内释放的速率 (图 58A)。在 35 % BMOV 加载量，释放速率显著增加。BMOV 加载量从 20 % 至 30 % 的释放曲线显示在前 2 天有一很快的药物初始释放阶段，在以后的 2 个月中，随之一受控制的几乎为 0 级的释放。

药物释放曲线也以存留于丸中的药物的百分比表示 (图 58B)。概括地说，存留于 PCL 基质中的 BMOV 的百分数，在所有时间点对于所有低于 (包括) 30 % 的 BMOV 含量，几乎是相同的。因此，占初始含量 65 % - 80 % 的 BMOV 在 2 个月后又存在于基质中。(为清楚计，只有 BMOV 含量为 25 % 和 30 % 的数据示于图 58B)。存留于基质中的药物的百分数在 BMOV 含量为 35 % 时降低最快，因此，占初始浓度的 50 % 稍高的 BMOV 在一个月后又存在于基质中。为确定药物累计释放数据，在每次药物释放实验结束时测定 PCL - BMOV 基质样品的存留药物含量。在 70 天按此存留量测定法测得的药物存留百分数如下：
67 % +/-10 % (5 % BMOV)， 56 % +/-10 % (10 % BMOV)， 80 % +/-20 % (15 % BMOV)， 84 % +/-20 % (20 % BMOV)， 85 % +/-12 % (25 % BMOV)， 77 % +/-14 % (30 % BMOV)， 57 % +/-15 % (35 % BMOV)。



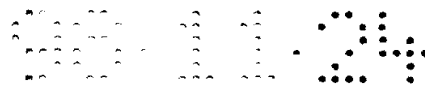
图 59A 和 59B 显示在 PCL 基质中加入 20 % MEPEG 对于不同 BMOV 加载量的药物释放曲线的影响。在基质中加入 MEPEG，与 BMOV 从只含 PCL 的基质中释放比较，显著增加 BMOV 的释放速率（图 58）。对于所有 BMOV 含量，高于 50 % 的 BMOV 在 1 周内从聚合基质中释放。PCL - BMOV - MEPEG 丸剂的存留分析给出 7 天时丸剂中 BMOV 的存留量：24 % (+/-9 %)，5 % BMOV；25 % (+/-8 %)，10 % BMOV；22 % (+/-4 %)，15 % BMOV；27 % (+/-7 %)，20 % BMOV。

图 60A 显示了在高放大倍数下 BMOV 结晶的形态。图 60B 和 60C 显示了在水溶性缓冲液中进行的周期为两个月的药物释放研究前后聚合物-药物基质的形态。含有 15 %、20 %、30 % BMOV 的 PCL-BMOV 基质在释放研究之前其外表面一般是光滑的，图 60B 显示了一张代表性的 SEM 照片。随着在水溶性缓冲液中保温 2 个月，外表面变得粗糙并有凹痕。

E. 讨论

此化合物从 PCL 基质中缓慢释放，具有维持持续的钒浓度的理想的特征。这些特征包括仅仅在开始几天药物释放的小的爆发效应，继之对于大部分药物加载量几乎为动力学 0 级释放（图 58）。BMOV 的水溶性比硫酸氧钒或原钒酸钠低，分子的疏水性很可能增加 BMOV 分子与疏水性 PCL 基质的亲和，并降低药物释放进入水性保温介质中的速率。

向 PCL 中加入 20 % MEPEG 显示能通过降低基质的粘性和聚合物的固化温度而增加糊剂的热流动性。这些性质对于将糊剂用于周围小管肿瘤部位，以在此条件下使此部位更好地恢复是重要的。在 BMOV - PCL 糊剂基质中加入 MEPEG 已显示能在各种 BMOV 含量（5 % - 20 %）下，与从 BMOV - PCL（无 MEPEG）中释放的速率（图 58）相比，增加 BMOV 的体外释放速率（图 59）。含有 5 % BMOV 的 PCL - MEPEG 糊剂显示每天释放 500 - 1000 μ g BMOV（与从含有 35 % BMOV 的 PCL 中的释放速率相似）。



实施例 26

含有双(麦芽酚酸)氧合钒(BMOV)的热糊剂的体外和体内功效

如上制备含有BMOV的聚合PCL热糊剂,并试验其在体外和体内抗肿瘤细胞系的功效。

A. 人肿瘤细胞系

从美国典型培养物保藏中心得到HT-29结肠、MCF-7乳腺和SKMES1非小细胞肺人肿瘤细胞系。用含有10%加热灭活的胎牛血清(HIFBS)的RPMI 1640培养HT-29结肠细胞系,用含有5% HIFBS加10-9M胰岛素的Iscov's改良Eagles培养基培养MCF-7乳腺细胞系,用含有10%非热灭活FBS的Eagle's最低必需培养基培养SKMES1肺细胞系。

B. 正常人骨髓细胞

从由于固体肿瘤将要进行骨髓移植,但在使用骨髓前死亡的病人身上得到正常人骨髓细胞(组织学上与肿瘤细胞不相容)。离心后,移去血沉棕黄层,用溶细胞缓冲液处理细胞,并用其洗涤细胞两次,然后再次悬浮于含有20% HIFBS的RPMI 1640中。将细胞拉过一25号的针并计数。

C. 辐射测量(Bactec)系统

Bactec系统(Johnston Laboratories, Towson, MD)以一测定血液培养物中的细菌的临床设备为基础,并用于筛选新的抗肿瘤剂。此辐射测量系统为高速半自动系统,采用 ^{14}C 葡萄糖向 $^{14}\text{CO}_2$ 转化的抑制效应作为细胞毒性的指数。Bactec仪器自动将 $^{14}\text{CO}_2$ 冲入离子室,在其中将放射标记的 CO_2 信号转化为成比例的电信号,或按1:1000比例的增长指数值。对于连续照射,将肿瘤细胞或正常骨髓细胞加入2ml含有2 μC ^{14}C 葡萄糖并加入BMOV使其终浓度为0.01,0.1,1,10,25,50 μM 的正常生长培养基中,并注入含有5% CO_2 和空气的20ml具有橡胶塞的玻璃瓶中,将玻璃瓶在37℃保温24天。对于再照射的1小时,将细胞和具有同样最终浓度的BMOV置于15ml聚丙烯锥形瓶中,在37℃水浴中保温1小时。然后将细胞离心,并在培养基中清洗,再次悬浮于2ml



含有 $2 \mu\text{Ci } ^{14}\text{C}$ 葡萄糖的正常生长培养基中, 并注入 20ml 含有 5% CO_2 和空气的具有橡胶塞的血清瓶中, 将血清瓶在 37°C 保温 24 天, 对于肿瘤细胞系, 在第 6、9、12 天, 对于骨髓细胞在第 6、15、24 天, 除去血清瓶, 将细胞注入 Bactec 装置, 测定细胞对于 ^{14}C 葡萄糖进行新陈代谢产生的 $^{14}\text{CO}_2$ 的量。将 BMOV 处理的细胞的生长指数与未非处理细胞的生长指数比较, 计算与未治疗的对照物比较的存活率%。

D. 切除肿瘤的研究

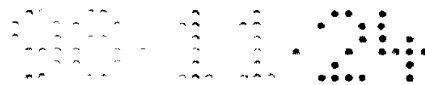
在此研究中使用 7 周大的雄性 C3H/HeJ 小鼠。在含有 10% FBS (Gibco Canada) 的 α -MEM 介质中培养 RIF-1 (鼠照射产生的纤维肉瘤) 细胞。将细胞悬浮在 1% Hanks 缓冲盐水溶液中 (HBSS pH7.4) (Gibco Canada), 浓度为 1×10^7 细胞/ml。将 100 微升这些细胞 (1×10^6 细胞) 注入每只鼠的右腹。使肿瘤生长 5 天 (此时肿瘤直径为 6-8mm)。在第 5 天将鼠用 Ketamine: Rompom (70mg/kg: 10mg/kg) 组合物 (0.02ml/g) 麻醉。从肿瘤边缘制造一 5mm 切口, 切除每个肿瘤的约 90%, 从一 500ul 注射器中挤出 150mg 熔融的 (50°C) PCL - BMOV 或 PCL (对照), 使其覆盖被切除肿瘤部位的整个表面。PCL 在 30 秒内固化, 以 5-0 聚丙烯纤维缝合线关闭此部位。在第 4、5、6、7 天检查小鼠。每天测量肿瘤 (长径和短径) 并照相。当肿瘤达到最大直径为 9mm 时, 将鼠处死, 切开肿瘤部位, 进一步进行组织学研究。

结果示于图 63。

E. 肿瘤抑制研究

使 MDAY-D2 造血细胞系 (从 Dr. J Dennis, Mount Sinai Hospital, Toronto 得到) 覆盖在含有 5% FBS (Cibco Canada) 的 DMEM 中的悬浮液中, 并使其在其中生长。在每只鼠的后侧部皮下注入存在于 100 ul PBS 中的 4×10^5 细胞。肿瘤生长 5 天, 在每只鼠靠近肿瘤的部位植入 150mg PCL 或 PCL - BMOV 熔融糊剂。15 天后将鼠处死, 称重, 并切取肿瘤称重。结果示于图 62。

F. 结果和讨论



对于正常人骨髓细胞，1小时照射的 BMOV 即使在浓度 50 μM ，只有很少的作用。使用连续照射，BMOV 对于骨髓细胞的作用也不明显，只在 50 μM 浓度观察到敏感性（49% 存活率）。因此 BMOV 化合物在此浓度和照射试验中不显示非常抑制骨髓生长。

在此研究中，BMOV 的抗肿瘤作用已显示在体外在连续暴露于这些药物之下时，能对抗 3 种人肿瘤细胞系。然而，其在体内的功效依赖于肿瘤细胞在 BMOV 之下的连续暴露。此研究的主要目的是设计和试验（体内）一种生物降解的聚合物传递系统，可以提供低浓度钒（BMOV 型）的持续供应。

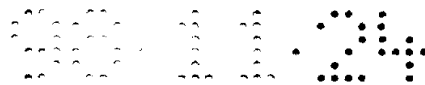
体内试验显示 PCL - BMOV 糊剂的皮下单一给药抑制 MDAY D2 肿瘤生长。图 62 显示对照鼠（PCL - 无 BMOV）的肿瘤重量和用含有 25%、30%、35% BMOV 的 PCL 治疗的鼠的肿瘤重量。对于含有 25% BMOV 的 PCL，肿瘤抑制率为 54%（显著性 $p < 0.05$ ）。含有 30% 和 35% BMOV 者分别产生 76% 和 80% 的肿瘤生长抑制率，在 BMOV 含量为 35% 的试验组中，6 只鼠中的 1 只能完全根除肿瘤。

令人感兴趣的是，体内药物释放曲线显示含有 25%、30% BMOV 的糊剂每天释放约 500 μg BMOV，此剂量以前已显示出功效。然而，在降低肿瘤生长方面最有效的含有 35% BMOV 的 PCL 糊剂，在体外的释放量约为此量的 2 倍。这些数据证明低剂量钒化合物的持续释放与钒酸盐每天给药的方式比较，是一等效或更有效的抗肿瘤方式。

虽然，PCL - BMOV 糊剂在抗肿瘤生长方面是等效的，小鼠不显示应激反应和体重降低。每日注射高剂量钒酸盐会观察到应激反应增加和体重降低，或许与用药后血浆中立即出现的钒酸盐的高水平导致的毒性相关。使用 PCL - BMOV 糊剂提供钒酸盐的长时期持续的释放可以降低血浆钒酸盐浓度的大的波动，防止钒产生毒性。这些数据与我们的假说一致，即 BMOV 的缓慢持续释放在降低肿瘤生长和防止钒产生毒性方面是等效或更有效的。

实施例 27

BMOV 微球对于小鼠肿瘤生长的影响



此研究的目的是测试加载 BMOV 的 PLLA 微球 (20 %) 对抑制小鼠肿瘤生长的作用。

24 只小鼠中的 20 只皮下注射 100ml 浓度为 $10 \times 10^6/ml$ 的 MDAY-D2 细胞。在第 6 天, 将小鼠分为 6 组。组 1, 空白对照; 组 2, 肿瘤对照; 组 3, 皮下注射 0.25mg/100ulBMOV, 每日 2 次; 组 4 腹膜内注射 20mg 含有 5mgBMOV 的 PLLA 微球; 组 5 分别在第 6 和第 9 天腹膜内注射 10mg BMOV 微球; 组 6 分别在第 6 和第 9 天肌肉内注射 10mg BMOV 微球。在第 16 天, 处死小鼠并解剖肿瘤。

结果示于如下的表 VI 和 VII。

表 VI

对照组和治疗组小鼠的重量

	对照组	肿瘤对 照组	BMOV 溶 液 0.25mgx1	BMOV 微 球, 腹 膜内注 射 5mg/ 每次	BMOV 微 球, 腹膜 内注射 2mgx2	BMOV 微 球, 肌肉内 注射 2mgx2
1	19	23.9	18	18.8	19.2	18.2
2	20.2	21	17.8	19.3	18.9	22.6
3	18.4	20	18.4	21.6	17.2	20.1
4	22.2	24.1	17.3		19.1	22.2
平均	19.95	22.25	17.87	19.9	18.6	20.78

表 VII

对照组和治疗组肿瘤的重量

	肿瘤对 照组	BMOV 溶 液 0.25mgx1	BMOV 微 球, 腹膜内注 射 5mg/每次	BMOV 微 球, 腹膜 内注射 2mgx2	BMOV 微 球, 肌肉内注 射 2mgx2
1	3.8	0.4	0.2	0.12	2.0



2	1.2	0.12	0.9	0.4	3.3
3	1.3	0.07	0.26	0.3	1.1
4	1.5	0.04	死亡	1.2	1.6
平均	1.95	0.15	0.45	0.50	1.6

实施例 28

控制释放的聚合物药物释放系统：有机钒配合物从聚（ ϵ -己内酯）（PCL）热糊剂与甲氧基聚乙二醇（PCL-MePEG）热糊剂中释放的体外药物释放曲线的比较研究

本研究旨在探索在聚（ ϵ -己内酯）（PCL）热糊剂和/或 PCL-MePEG 热糊剂中钒的 4 种有机配合物形式（BMOV，BEMOV，V5，PRC-V）的包封和体外释放动力学。

A. 方法

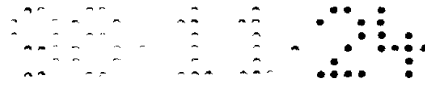
用不同浓度的钒溶液进行定量分析（UV/VIS 分光光度分析法）得到吸收峰的波长和计算方程。在含白蛋白的 10mM 磷酸盐缓冲盐水（PBS/ALB）（pH7.4）中研究钒的溶解度。将 1%、5%、10% 和 20%（在 PCL 中钒配合物的百分比）的各种有机配合物形式的钒包封在可生物降解的聚合物 PCL 和/或 PCL 与 MePEG（MW350）混合物中得到称为“热糊剂”的聚合药物输送产物。在 37 °C PBS/ALB 中进行各种形式的钒从热糊剂中释放的体外释放研究，用 UV/VIS 吸收分光光度法测定钒的释放。

B. 结果

结果示于图 64-68。简要地说，BMOV、BEMOV 和 V5 的吸收峰在 276nm，PRC-V 的吸收峰在 266nm。钒的各种形式的溶解速率和程度的顺序为 V5>BMOV&BEMOV >PRC-V。体外释放研究显示，药物从热糊剂中释放的速率随以下因素增加：(1)增加药物溶解度，(2)增加药物浓度，(3)增加热糊剂中 MePEG 的数量。

C. 结论

可以通过使用不同形式的钒(作为药物)，通过改变 PCL 中特定形



式的钒的加载百分含量,或通过 在 PCL 中加入 MePEG,使从 PCL 热糊剂中释放控制剂量的钒。然而改变 PCL 中特定形式的钒的百分含量,可以在短期内控制释放速率,但药物控制剂量的输送可以导致药物(PCL 中)在动物体内产生一巨大的储存(有潜在的毒性)。因此,交替使用各种形态的钒,或 PCL 在中加入 MePEG,可以为输送控制剂量的钒提供另一种方法。

实施例 29

在 PCL 热糊剂中包封喜树碱及其抗血管生成效应的分析

A.在 PCL 中加入喜树碱

用研杵和乳钵将喜树碱研磨使其体积降低到 5 微米以下.然后将此干燥粉末与聚己内酯(分子量 18,000 Birmingham 聚合物,AL USA)混合.将混合物加热到 65 ℃,保持 5 分钟,将熔融聚合物/药剂混合物搅拌 5 分钟,成为均匀的糊剂.将此糊剂加入 1ml 注射器中,并挤出形成 3mg 的丸.将这些丸置于 CAM 上,测定其抗血管生成效应。

B.结果

含有喜树碱的热糊剂与对照 PCL 丸剂相比能有效地抑制血管生成。含药量为 5%时,4/5 实验所用的 CAM 显示有效的血管生成抑制效应.另外,含药量为 1%和 0.25%时,分别有 2/3 和 3/4 CAM 显示血管生成抑制效应.因此,这些结果明确显示喜树碱从 PCL 糊剂中的释放是足够的,喜树碱具有治疗性的抗血管生成作用。

实施例 30

制备含有 S-磷酸酯的热糊剂

在此研究中,我们证明 S-磷酸酯,一种具有抗肿瘤活性的醚脂,能成功地加入 PCL 热糊剂中,并在 CAM 测定中显示出效力。

A.制备含有 S-磷酸酯的糊剂

将聚己内酯 (BirminghamPolymers, Birmingham AL)和 S-磷酸酯以适当比例在 55 ℃研磨 2 分钟.将熔融混合物用吸管滴制成 3mg 的半球形丸,在 4 ℃固化成型。

B.CAM 生物测定



将受精家鸡胚胎(Fizsimmons Consulting&Research Services Ltd. ,B.C.)孵育4天,然后在其壳上开一小窗.简要地说,从卵的钝圆的一端(气室部位)除去壳和内层壳膜,形成一小洞(直径约为2cm),将暴露区域以无菌石蜡膜封闭.将卵置于孵育器上,窗口向上,在37℃另外孵育2天.在孵育的第6天,将3mg的含有S-磷酸酯的聚合物丸或对照(无药物)聚合物丸置于生长的CAM血管表面.接触2天后(孵育的第8天)用装有Contax照相系统的立体显微镜观测CAM的血管系统.为增加血管的对比度,掩盖背景信息,在成象前将1ml脂肪乳剂溶液(Abbott Laboratories)注入CAM中.

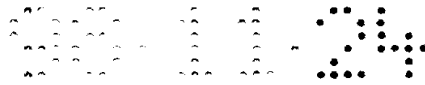
C.结果

S-磷酸酯浓度分别为0%、1%、2%、4%、8%的PCL丸剂,在CAM实验中引起剂量依赖性抗血管生成反应.抗血管生成反应以含有S-磷酸酯的丸剂直接接触的下部区域的血管缺损为特征.在CAM对照区域的致密的毛细血管网的正常生长,在经S-磷酸酯处理的CAM区域已明显地被抑制.在高浓度(4%和8%),被处理的CAM,在药物/聚合物丸剂的邻近区域已经发生结构改变.此改变包括CAM紧接S-磷酸酯/聚合物丸剂处明显增厚,丸剂下面的膜变薄.在所有经S-磷酸酯处理的CAM中,暴露2天后有一明显的无血管区域,这称为毛细血管网缺损区,面积约为 3mm^2 .

实施例 31

在PCL热糊剂中包胶酪氨酸激酶抑制剂并用CAM测定法分析

用研杵和乳钵将酪氨酸激酶抑制剂研磨使其体积降低到5微米以下.然后将此干燥粉末与PCL混合(分子量18,000 Birmingham Polymers, AL USA).将混合物加热到65℃,保持5分钟,将熔融聚合物/药剂混合物搅拌5分钟,成为均匀的糊剂.将此糊剂加入1ml注射器中,并挤出形成3mg的丸.然后用CAM法测定这些丸剂.CAM测定法所测定的酪氨酸激酶抑制剂包括灰黄霉素-C、制表霉素、除莠霉素、和金雀异黄素.当比较这些药剂的抗血管生成抑制效应时,在导致4/4实验的CAM产生无血管区方面,除莠霉素(在PCL中有2%)是最



有效的。

实施例 32

在 PCL 热糊剂中包胶长春花属生物碱并用 CAM 法进行分析

A. 在 PCL 热糊剂中加入抑制剂

用研杵和乳钵将长春花属生物碱(长春花碱和长春新碱)研磨使其体积降低到 5 微米以下.然后将此干燥粉末与 PCL 混合(分子量 18,000 BirminghamPolymers,AL USA).将混合物加热到 65 ℃,保持 5 分钟,将熔融聚合物/药剂混合物搅拌 5 分钟,成为均匀的糊剂.将此糊剂加入 1ml 注射器中,并挤出形成 3mg 的丸.然后用 CAM 法测定这些丸剂。

B. 结果

当以 CAM 法测定制剂时,明显地,这些药物从 PCL 丸中释放出足够的量产生生物效应。长春花碱和长春新碱与对照 PCL 热糊剂丸比较,在 CAM 测定中产生抗血管生成效应。

药物加载含量为 0.5%和 0.1%时,长春新碱在所有被实验的 CAM 中产生血管生成抑制效应。当浓度超过 2%时,达到有毒的药物水平,并发生意外的胚胎死亡。

在长春花碱浓度为 0.25%、 0.5%、 1%时,CAM 实验也有抑制血管生成的效果.然而,浓度超过 2%时,长春花碱也对胚胎产生毒性。

实施例 33

生物粘附微球

A. 制备生物粘附微球

用 100kg /mol PLLA 制备直径为 10-60um 的微球。将微球在氢氧化钠溶液中保温,通过聚酯水解在表面产生碳酸基团。此反应通过测定表面电荷,以氢氧化钠浓度和保温时间为特征。在 0.1M 氢氧化钠中保温 45 分钟后反应完成。用碱处理后,将微球悬浮在二甲基氨基丙基碳二亚胺 (DEC) 的乙醇溶液中,使微球表面包以交联剂 DEC,使混合物干燥成分散的粉末。微球与 DEC 的重量比为 9:1。微球干燥后,将其搅拌分散于 2%w/v 聚合丙烯酸溶液中,使 DEC 与 PAA 反应,在微球表面产生交联 PAA 水溶性网,用扫描电镜证实微球表面 PAA 的存在。



用碱处理微球前后,用差示扫描量热法观察微球显示,用扫描电镜观测到的体积热性质(比热、熔融、结晶度)不发生变化。

B.紫杉酚的体外释放速率

制备具有同样颗粒体积的加载紫杉酚的微球(含量 10%和 30% w/w),及其在磷酸盐缓冲盐水中释放 10 天的体外释放曲线。释放与药物含量呈比例,在 10 天内,从 5mg 含量为 30%的微球中释放的紫杉酚为 400 μ g,从含量为 10%的微球中释放的紫杉酚为 150 μ g。包封效率约为 80%。将含有紫杉酚的微球在 0.1M 的氢氧化钠溶液中保温 45 分钟,在氢氧化钠中保温前后分别测定 δ 电位。在碱处理前后,含有紫杉酚的微球的表面电荷,均低于不含紫杉酚的微球。

C.制备表面包以聚合-L-赖氨酸或纤维结合素的 PLLA, 并进行体外测定

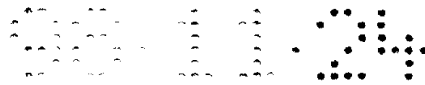
制备含有 1%苏丹黑的 PLLA 微球(使微球染色)。将这些球悬浮在 2%(w/v) 聚合赖氨酸(Sigma chemicals-Hydrobromell form)或纤维结合素(Sigma)溶液中 10 分钟。将这些微球在缓冲液中洗涤一次,置于新鲜制备的大鼠膀胱的内表面。这些膀胱放置 10 分钟,然后在缓冲液中洗涤 3 次。此过程后残余(粘附)微球出现在膀胱壁,显示纤维结合素或聚合赖氨酸包裹的微球具有生物附着性(图 69A 和 69B)。

实施例 34

合成聚合(N-异丙基丙烯酰胺)

可以通过自由基聚合和照射聚合容易地制备聚丙烯酰胺及其衍生物。以下是合成聚合(N-异丙基丙烯酰胺)的例子,通过从有机溶剂如己烷和甲苯中重结晶,使其中的单体(N-异丙基丙烯酰胺)纯化。

简要地说,在一定温度下,如 60 $^{\circ}$ C,将(N-异丙基丙烯酰胺)溶于甲苯。将此溶液冷却到较低温度(如 4 $^{\circ}$ C)以使单体重结晶。过滤收集单体,并使其真空干燥。为进行合成,在圆形玻璃烧瓶中,将此纯化过的单体(20g)溶于蒸馏水(180ml)。溶液用氮气吹洗 30 分钟,以置换其中溶解的氧气。将温度升高到 65 $^{\circ}$ C,在其中加入少量(0.1g)启动剂,如过硫酸铵和 2,2-偶氮二异丁基腈,以开始聚合反应。聚合反应在 10 小时内完成,



在此过程中有氮气保护并加以搅拌。最后通过加入乙醇使聚合(N-异丙基丙烯酰胺)沉淀。将聚合物干燥并收集。

实施例 35

聚合丙烯酸衍生物的合成

可以通过自由基聚合和照射聚合,产生聚合丙烯酸及其衍生物。以下是一个合成聚合丙烯酸的例子,其中通过减压蒸馏(如 40 °C,10mmHg)使单体丙烯酸纯化。

简要地说,在一圆底玻璃烧瓶中,使纯化的单体(20g)溶于二噁烷(180ml),。溶液以氮气吹洗 30 分钟,以置换溶解在其中的氧。将温度升高到 65 °C,并加入少量(0.1g)启动剂 2,2-偶氮-二异丁基腈以启动聚合反应。聚合反应在 24 小时内完成,在此过程中有氮气保护,并加以搅拌。最后通过加入正己烷,使聚合丙烯酸沉淀,将聚合物干燥并收集。

实施例 36

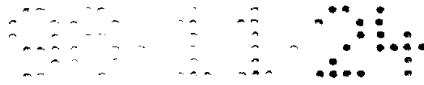
紫杉酚的血管周围用药

重量在 250-300g 的 WISTAR 大鼠,通过肌肉内注射达喉啉醇(0.33ml/kg)使其麻醉。当其镇静后,使其接受 Halothane 麻醉。常规麻醉后,剃掉颈部的毛,将皮肤夹紧,并用聚维酮碘擦拭。在左颈动脉处制备一垂直的切口,暴露表层的颈动脉,在表层的颈动脉处,进行两处结扎,并进行一横向的动脉切开术。将有 2 个 FRENCH FOGART 球的导管插入颈动脉,并进入左侧颈总动脉,用盐水使球加压溶胀。导管在颈动脉中上下移动三次。然后除去导管,解开表层颈动脉处的绳子。

将存在于乙烯-乙酸乙烯共聚物(EVA)中的紫杉酚(33%)以环状方式注入 10 只大鼠总动脉周围。将单独的 EVA 注入另外 10 只大鼠的颈总动脉周围。在第 14 天,将每组的 5 只大鼠处死,在第 28 天,处死剩余的 5 只大鼠,观察大鼠的失重和其它全身性疾病的症状。在 14 或 28 天后,将动物麻醉,以开始的实验方式,暴露大鼠的左颈动脉。分离左颈动脉,在 10%缓冲甲醛中固定,并进行组织学检测。

实施例 37

粥样硬化的治疗



A. 粥样硬化

通过膳食使在新西兰白兔中产生粥样硬化病变。简要地说,重量约为 1.6kg 的 New Zealand 白兔, 供给粉末状杂食,其中含有重量 0.25% 的胆固醇。每周通过在耳缘静脉处注射达哌啶醇(0.1ml/kg)使血管溶胀,从此处取样,测定血浆胆固醇。将样品与 EDTA 混合使 EDTA 在样品中的浓度达到 0.15%,置于冰中,通过低速离心分离血浆。

开始服用全胆固醇饮食一周后,将动物随机分成 3 组,每组 10 只。施以麻醉剂氯胺酮 35mg/kg 和赛拉嗪 7mg/kg 后,通过插管法麻醉,剃去下腹部的毛,皮肤消毒。施行剖腹术,分离腹主动脉。用 22 号的针乙烯-乙酸乙烯糊剂、含有 5 % 紫杉酚的乙烯-乙酸乙烯糊剂或含有 33 % 紫杉酚的乙烯-乙酸乙烯糊剂,以环状方式置于肾外腹主动脉近端周围。不治疗延伸至主动脉分支处的主动脉远端部分。在 10 只对照兔中,分离肾外腹主动脉,但不在其周围注入任何药物。

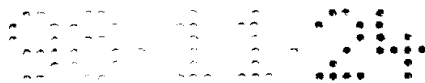
引起粥样硬化的杂食持续 24 周。此时通过肌内注射施以氯胺酮 35mg/kg 和赛拉嗪 7mg/kg 进行麻醉,然后静脉内超剂量注射 Euthanol(240mg/ml; 2ml/4.5kg)将动物处死。动物在 100mm 汞柱压力下通过左室灌注 Hanks' 平衡盐溶液与含有肝素 (1 IU/ml) 的 0.15 mmol/l N-2-羟乙基哌嗪-N'-乙磺酸 (pH7.4) 10 分钟,然后灌注稀释的 Karnovsky's 固定剂 15 分钟,从而灌注固定。整体地分离胸、腹主动脉和髂动脉,置于相似的溶液中再固定 30 分钟。

通过胸主动脉,并尤其通过肾外腹主动脉进行连续切片。进行 Movat,H&E,和 Masson 染色和组织学分析,检查动脉腔代偿度、动脉粥样硬化损害发展的程度,和动脉腔周围对动脉环周给药法的任何反应。

实施例 38

治疗再狭窄

重量在 250-300g 的 WISTAR 大鼠,通过肌肉注射达哌啶醇 (0.33ml/kg)而被麻醉。当服用镇静剂后,对其施以 Halothane 麻醉法,常规麻醉后,剃去颈部的毛,皮肤用聚烯吡酮碘消毒。在左颈动脉处制备一



垂直切口,暴露表层的颈动脉。在表层的颈动脉处,进行两处结扎,在其之间将动脉横向切开。将有两个 FRENCH FOGART 球的 导管插入表层颈动脉,并通入左侧的主动脉,导管的球用盐水溶胀加压。导管在颈动脉内上下移动三次。然后除去导管,解开表层颈动脉处的绳子。

将动物随机分为五组,五组分别是对照组,单独的聚合物载体,聚合物载体加 1,5,10,20 和 33 % 紫杉酚。观察两种聚合物载体,EVA 和 EVA/PLA 混合物。将聚合物混合物以环周方式置于颈动脉处,关闭伤口。将每组动物在 14 天和 28 天处死。在此期间,观察动物的体重降低和全身的其他症状。14 天和 28 天后,通过初始的静镇方式和肌肉内注射达哌啶醇(0.33ml/kg),将动物处死。动脉进行组织学检查。

实施例 39

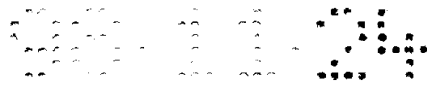
引起移植狭窄的内膜增生

A. 动物研究

对家猪进行常规的麻醉。剃去颈部的毛,皮肤用清洁溶剂消毒。在颈部两侧制备垂直的切口,暴露颈动脉,通过两端吻合术,插入 8mm PTFE 移植物,吻合处的近端在颈总动脉处,远端的吻合处在两侧的颈动脉处。将插入的旁路动脉结扎。动物随机分组,每组 10 只猪,在左侧的外科手术吻合处分别接受单独的聚合载体,聚合载体加 5% 紫杉酚,聚合载体加 33% 紫杉酚。右侧移植物作为对照,关闭伤口,使每只猪恢复。

研究第二组猪。以同样方式制备移植物。在手术时,不在吻合处加任何血管活性剂。使动物恢复。进行移植两周后,进行常规的第二次麻醉,再次暴露左动脉。靠近吻合处近端和远端,以靠近近端和远端吻合处环周方式,使 10 只猪分别接受单独的载体,聚合载体加 5% 紫杉酚和聚合载体加 33% 紫杉酚。闭合伤口,使猪恢复。对面的右侧作为对照。

3 个月后,将所有的猪进行常规麻醉,在股动脉处施以造口术,荧光镜引导下在上行的胸主动脉中插入猪尾导管。进行颈动脉系统的弓形注射并成像。分别测量近端和远端移植物狭窄等级,测量移植物远端吻合处远端紧邻动脉的狭窄等级,计算狭窄百分率。如果需要,进行颈总动脉的选择注射。



将每组 5 只猪处死。动物在 100mm 汞柱压力下通过左室灌注 Hanks' 平衡盐溶液与含有肝素 (1 IU/ml) 的 0.15 mmol/l N-2-羟乙基哌嗪-N'-乙磺酸 (pH7.4) 10 分钟, 然后灌注稀释的 Karnovsky's 固定剂 15 分钟, 从而灌注固定。整体地分离胸、腹主动脉和髂动脉, 置于相似的溶液中再固定 30 分钟。

通过紧邻近端吻合处颈动脉、近端吻合处、远端吻合处和紧邻远端吻合处远侧颈动脉制备组织学切片。切片用 Movat 和 H&E 和 Masson 染料染色。进行组织学分析, 观察血管内膜和外膜反应及血管周围反应。计算形态测量得到的腔内狭窄程度。

在 6 个月时研究其它的猪, 进行相似的制备血管造影标本过程。

从以上可以认识到, 虽然为阐述本发明而记载了具体的实施例, 但可以进行各种改进而不违背本发明的实质和不超出本发明的范围。相应地, 本发明只受限于所附的权利要求。

说明书附图

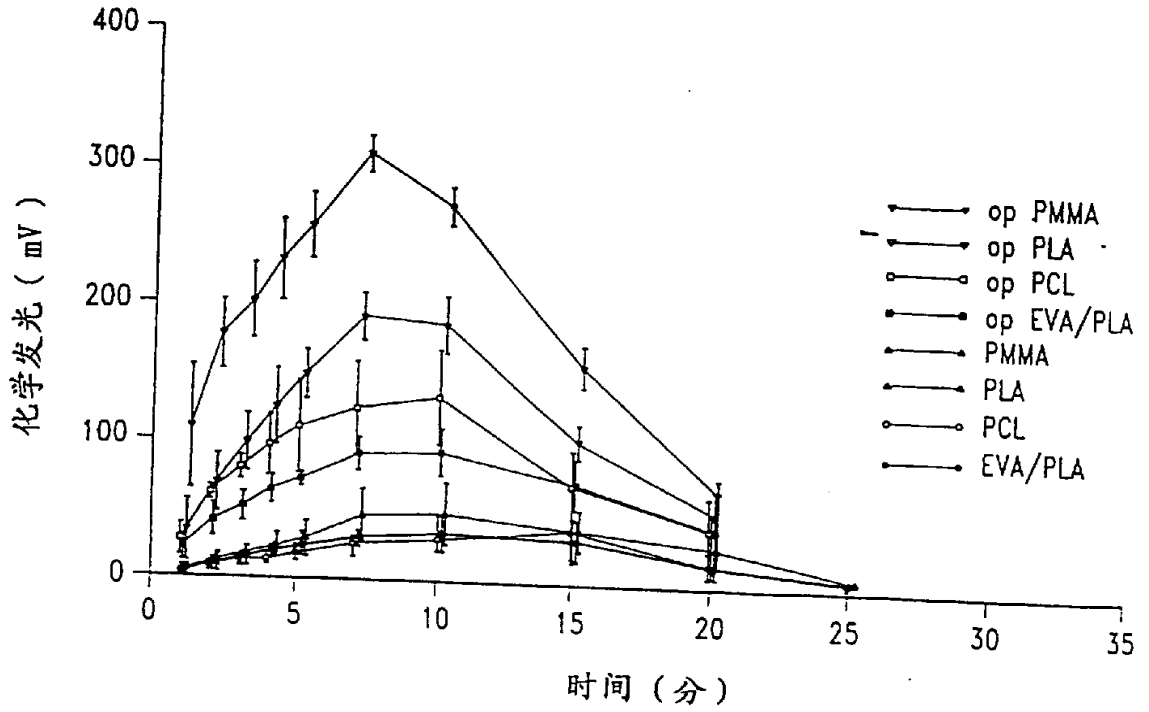


图 1

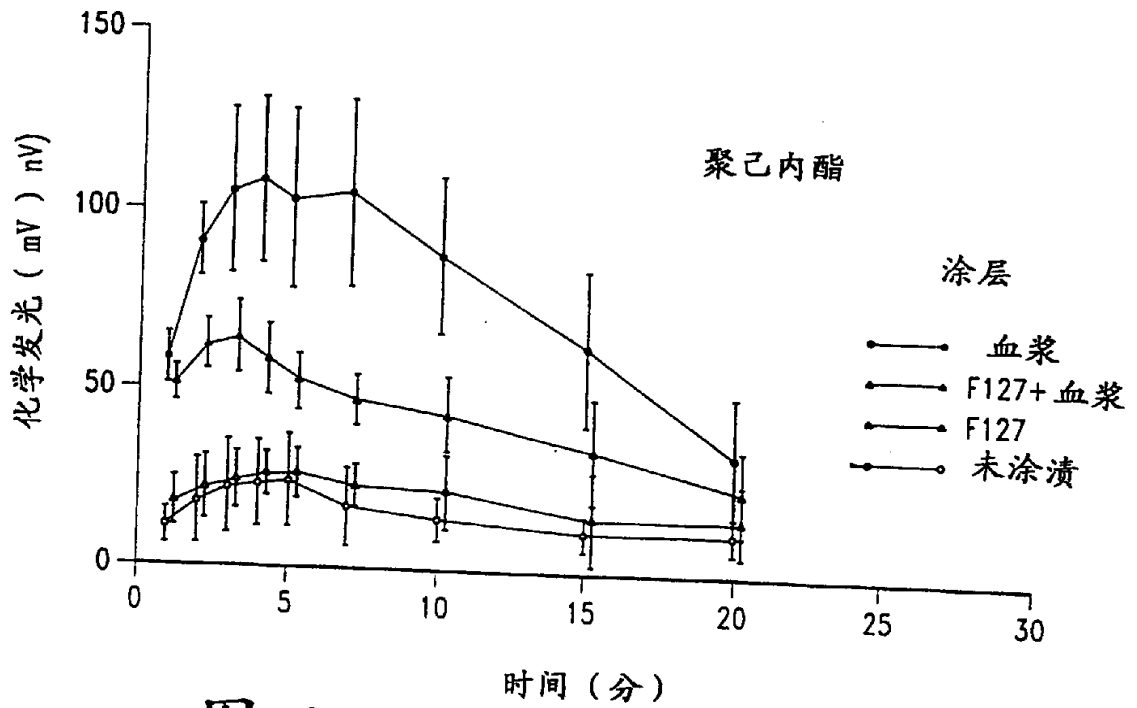
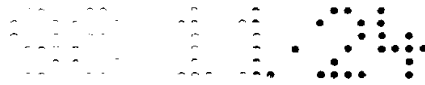


图 2

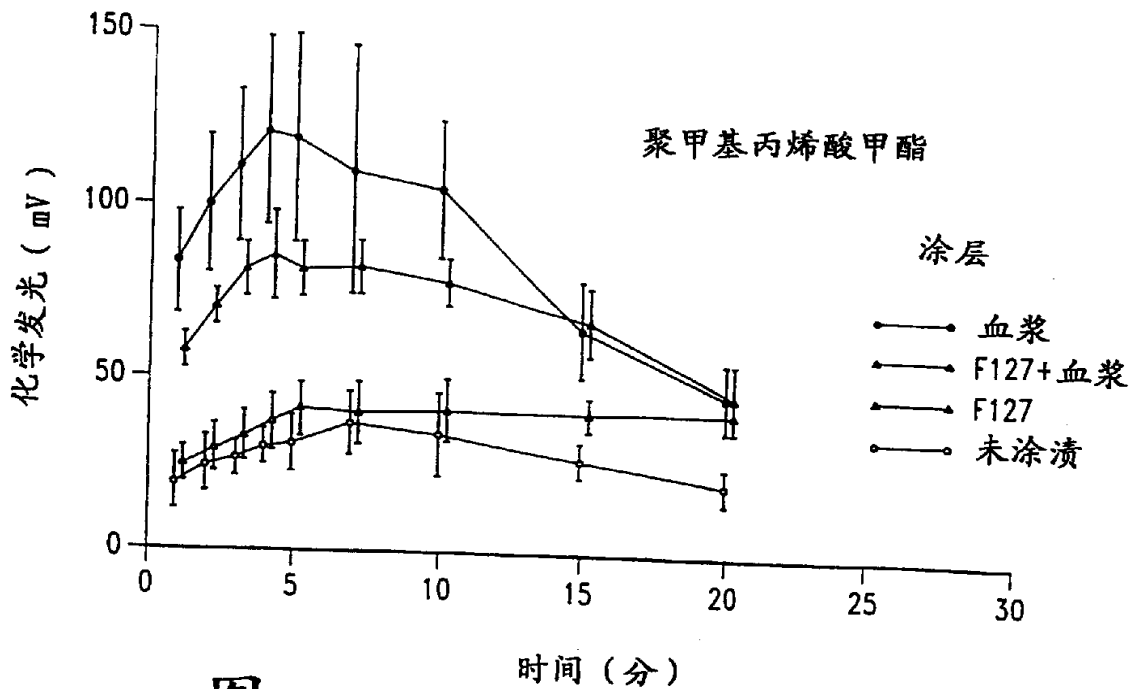


图 3

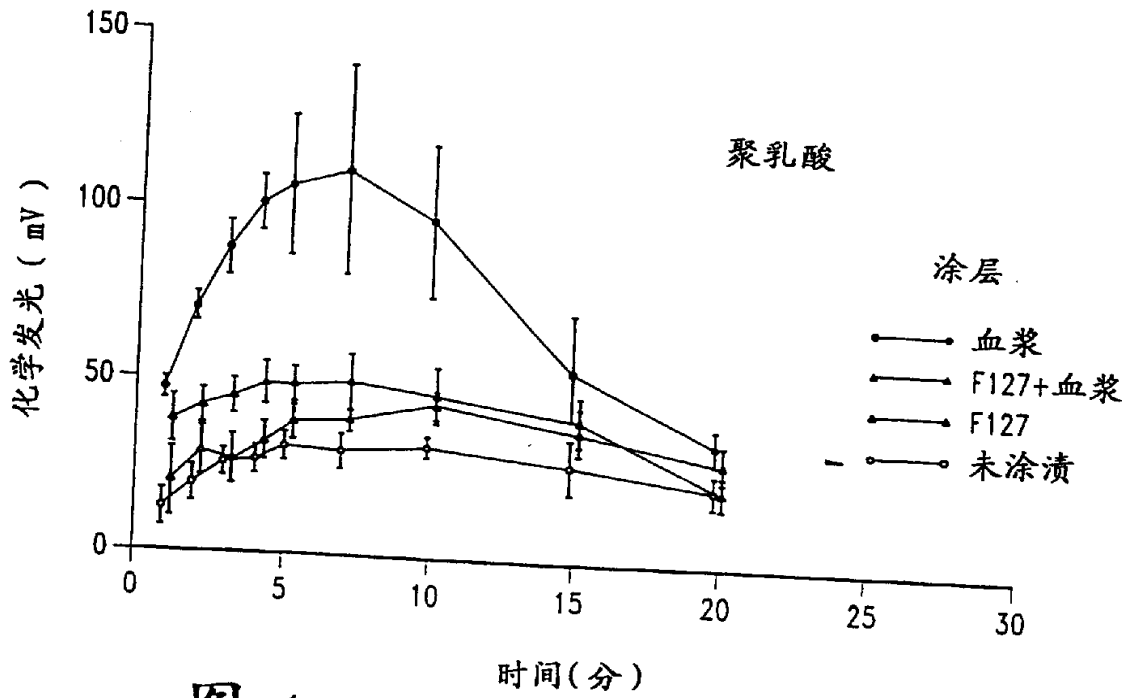


图 4

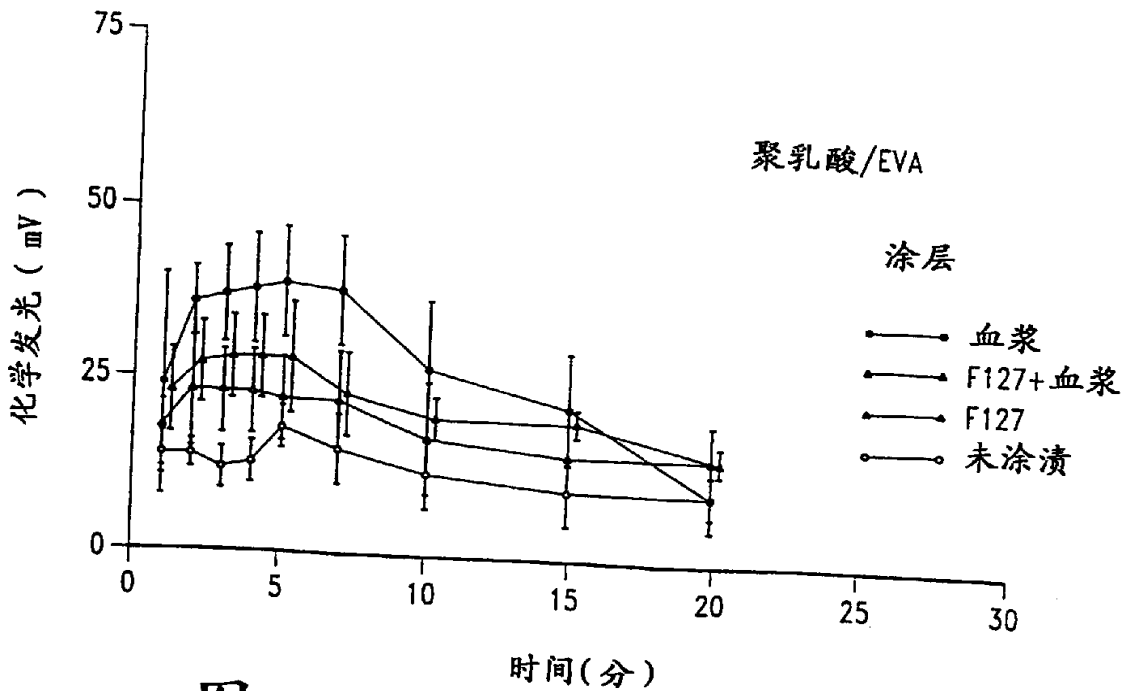


图 5

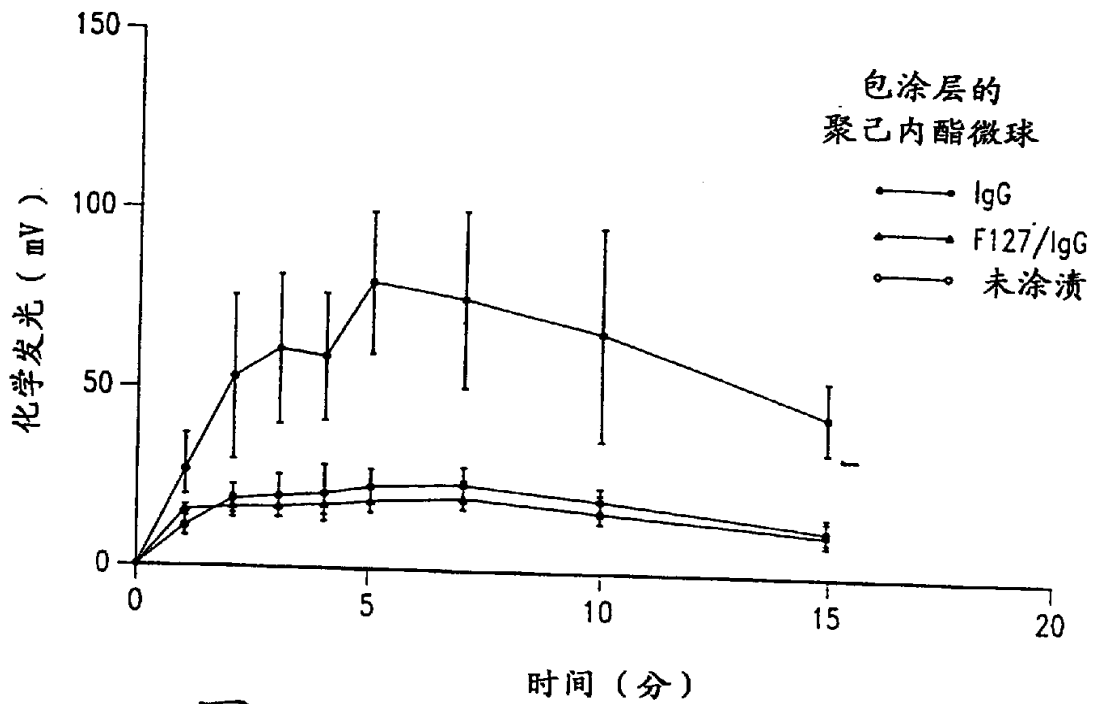


图 6

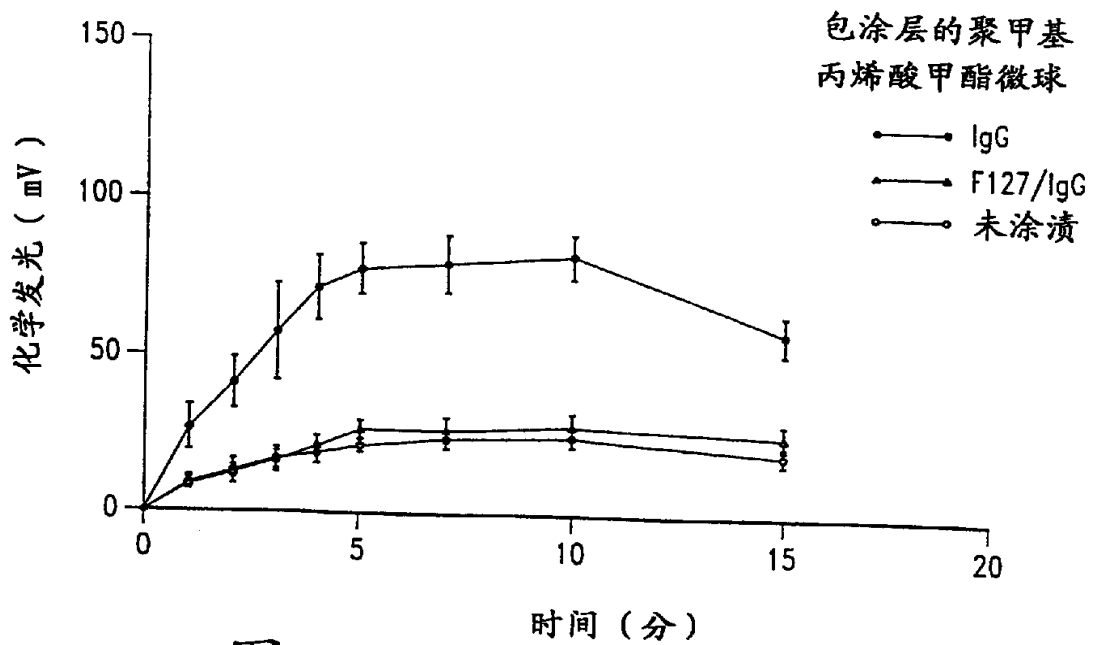


图 7

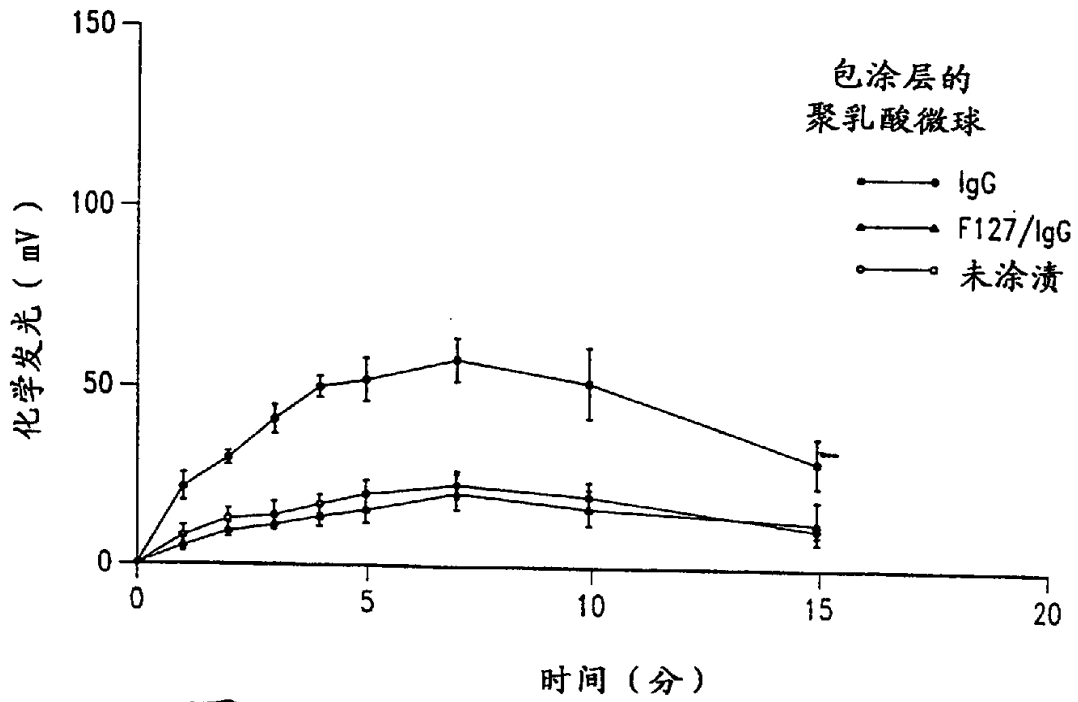


图 8

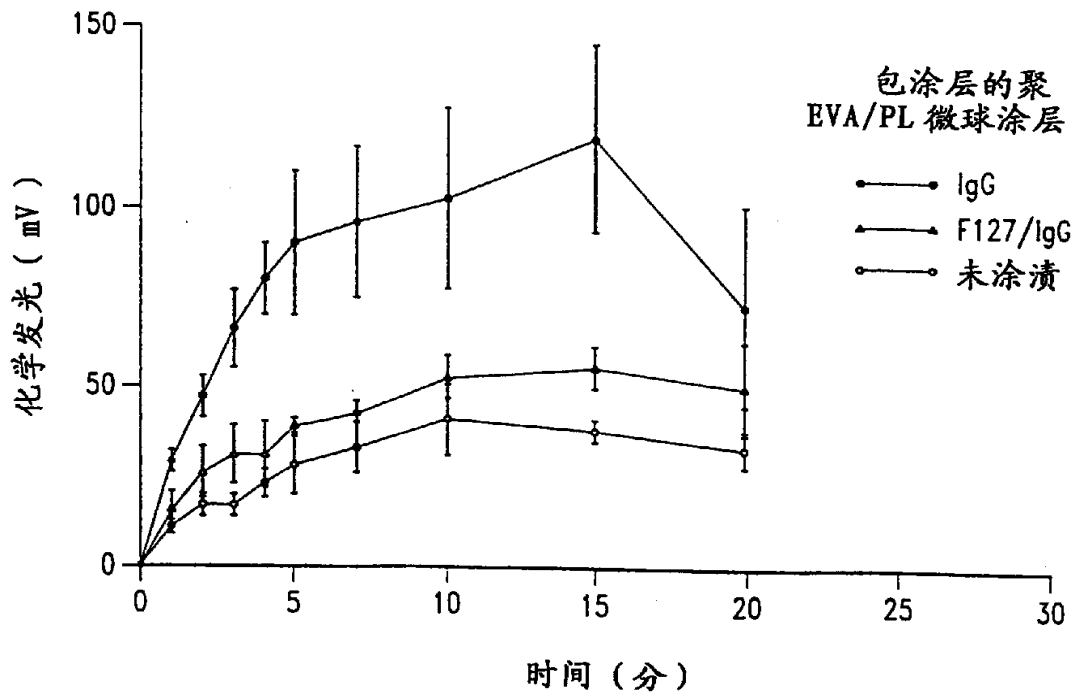


图 9

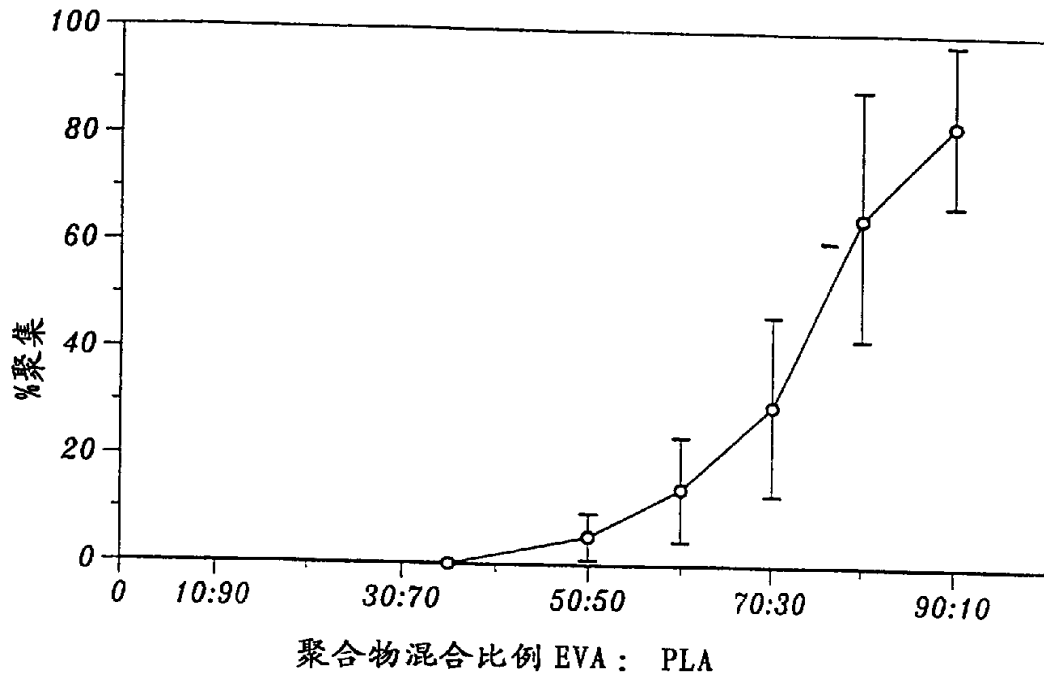
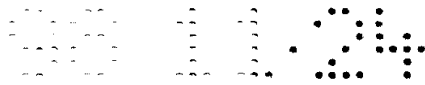


图 10A

014

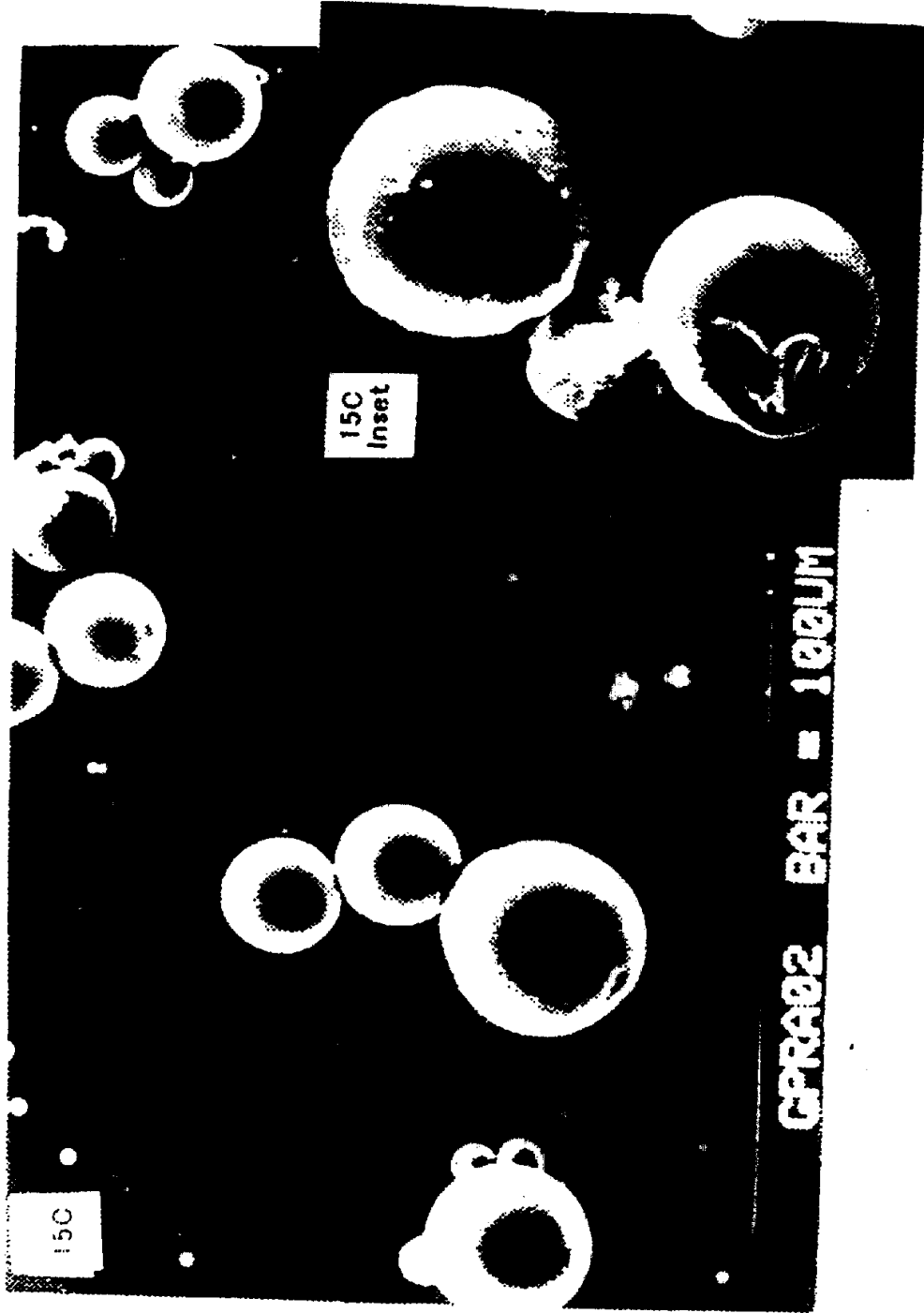


图 10C

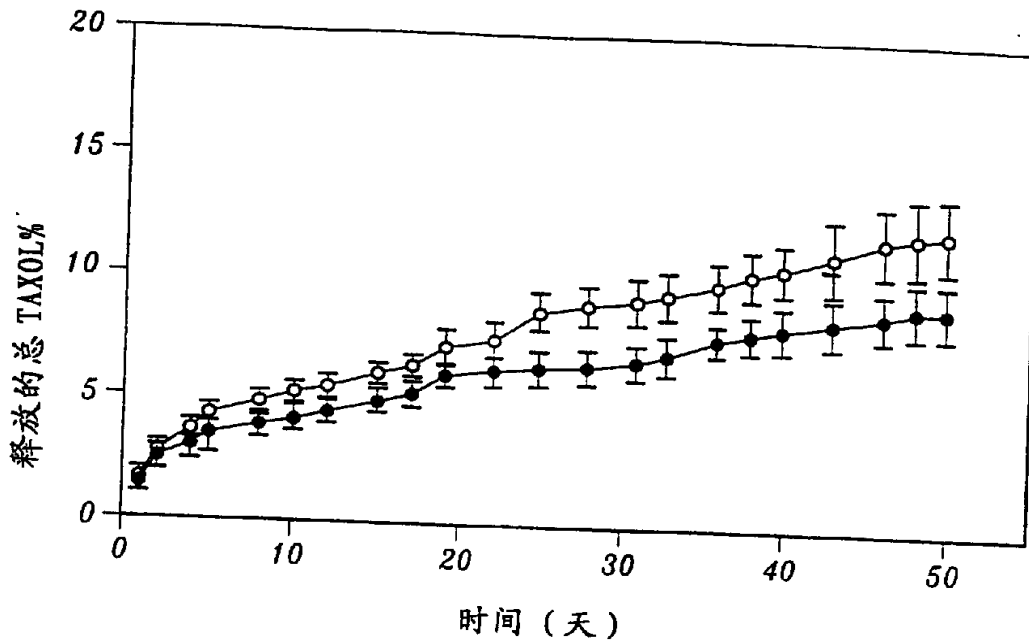


图 10D

014

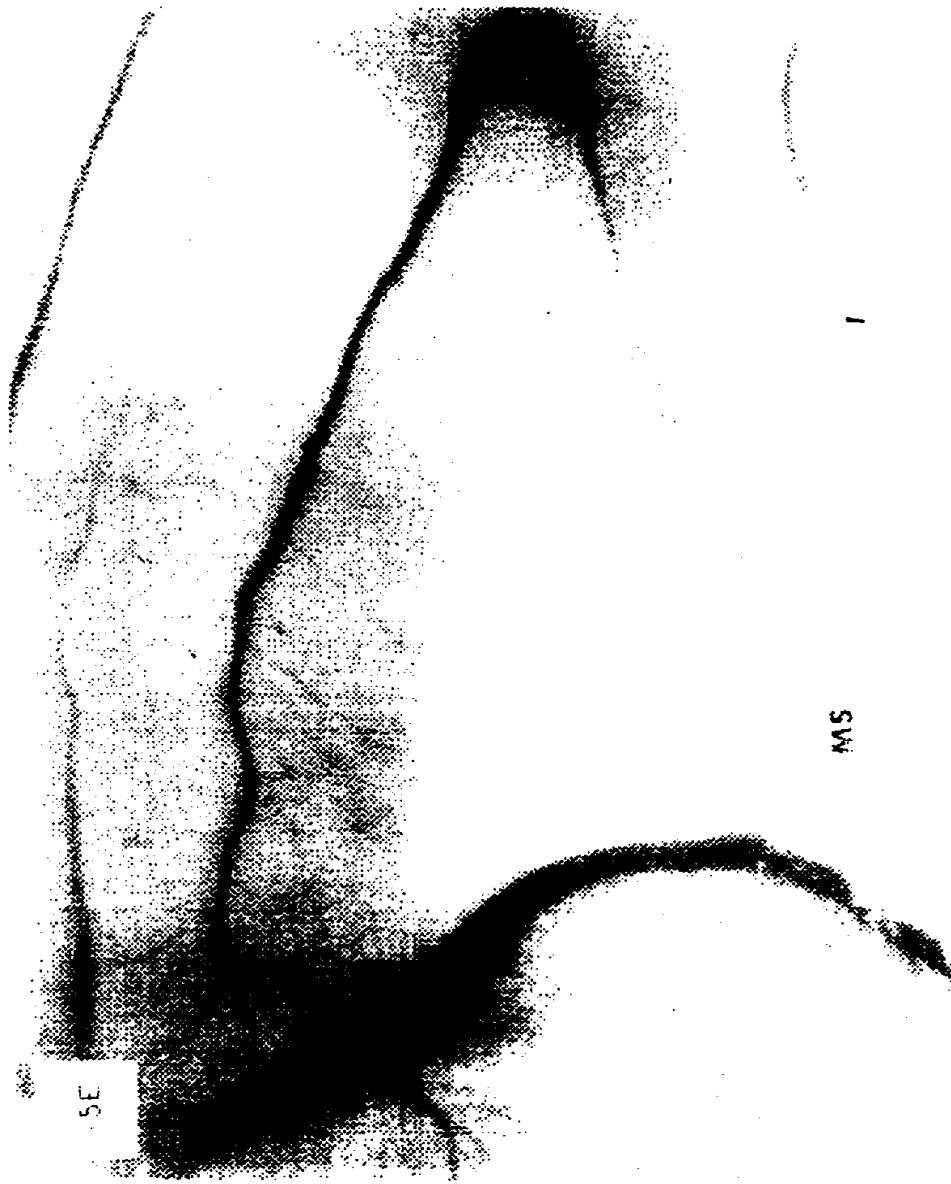


图 10E

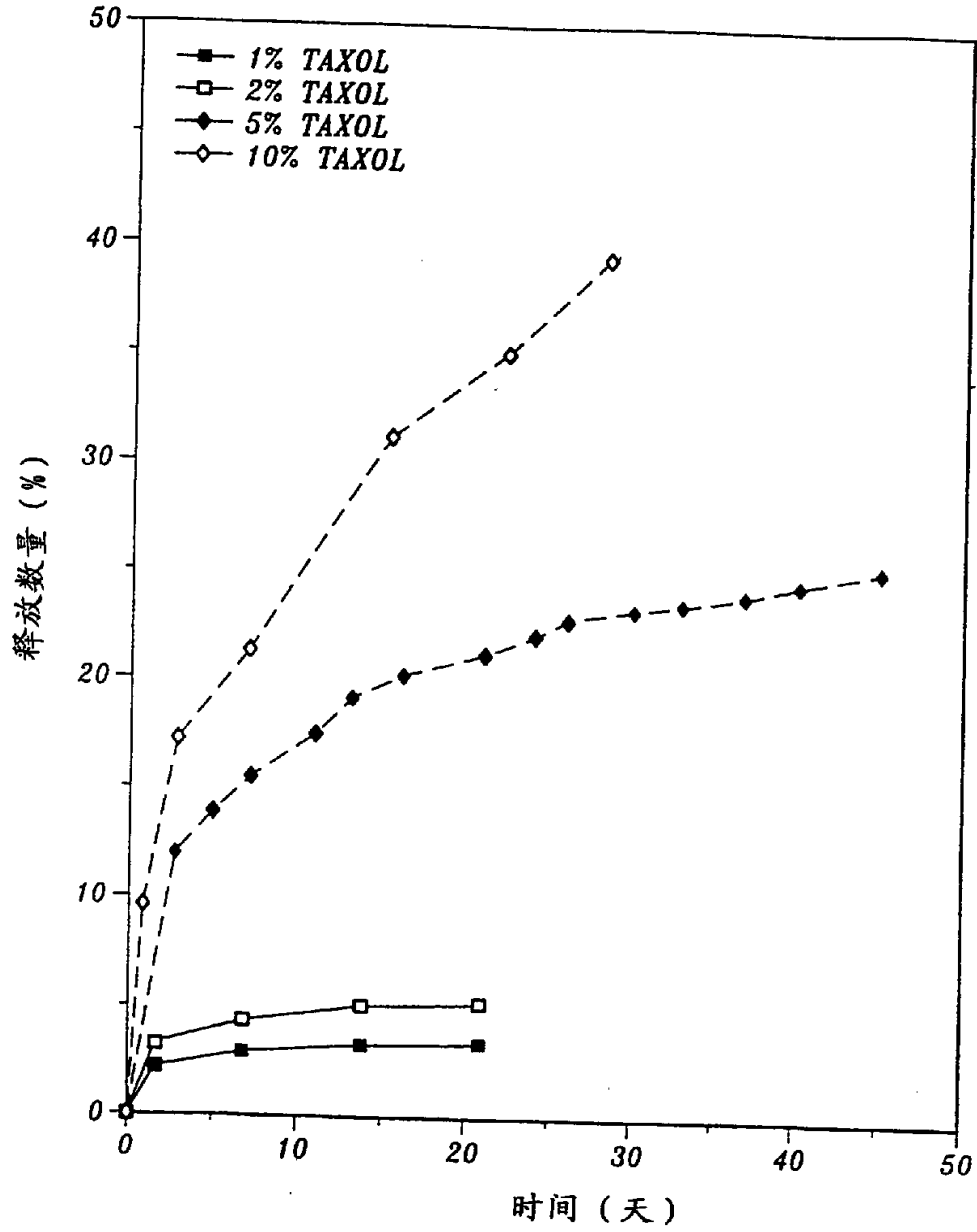


图 11A

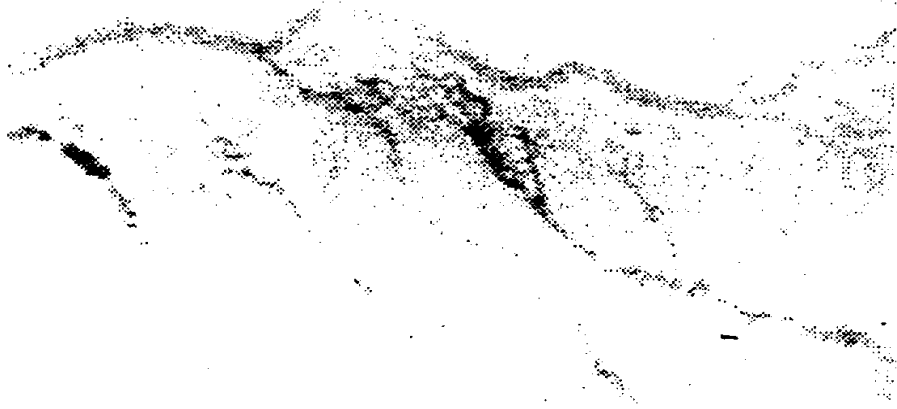


图 11B

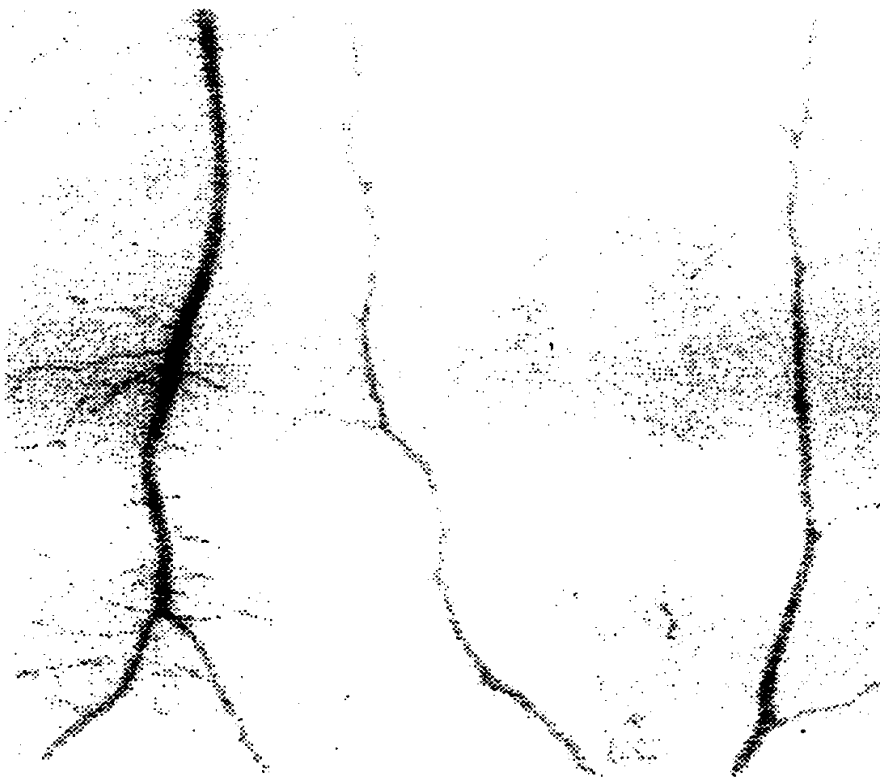


图 11C

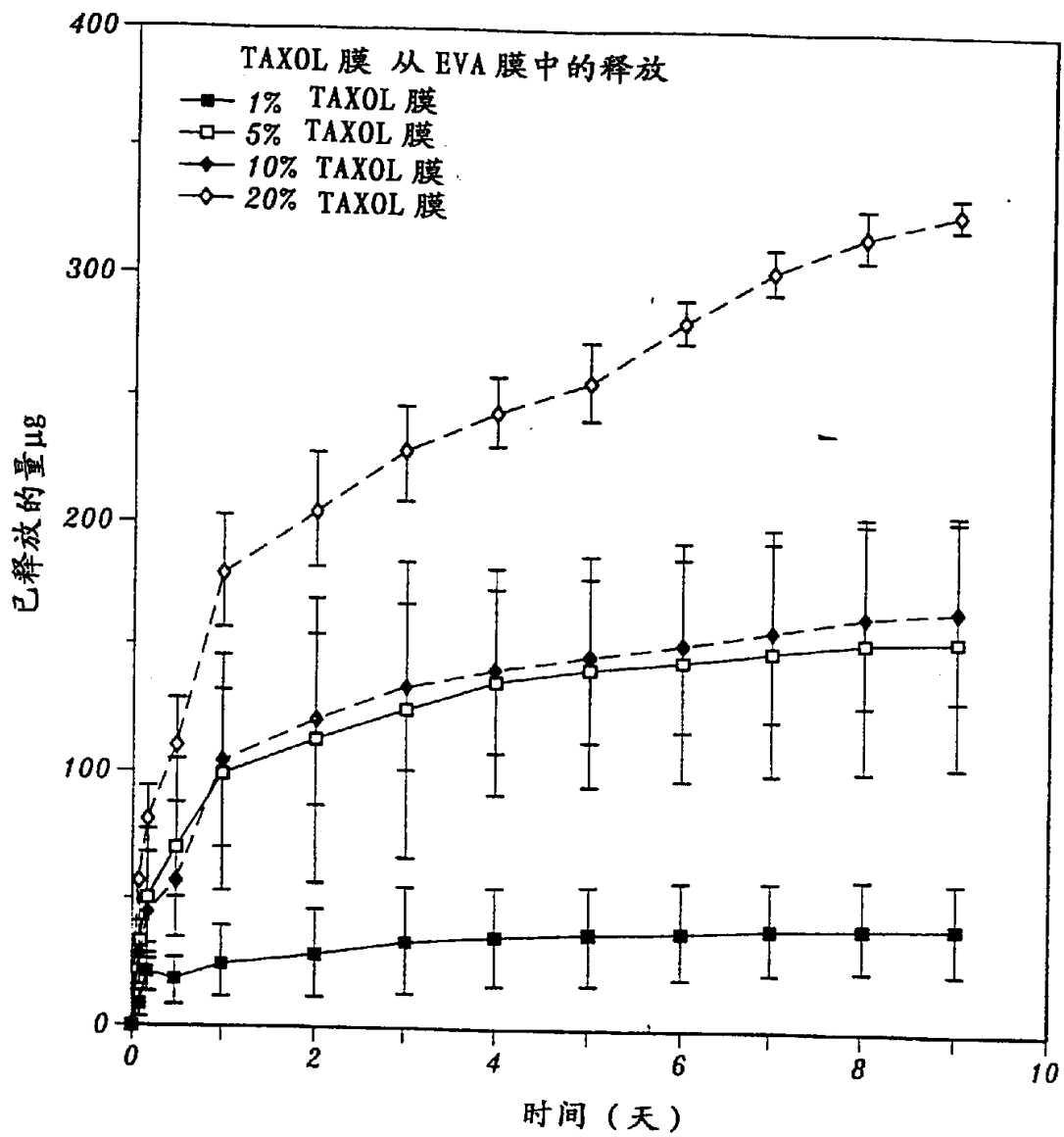


图 12A

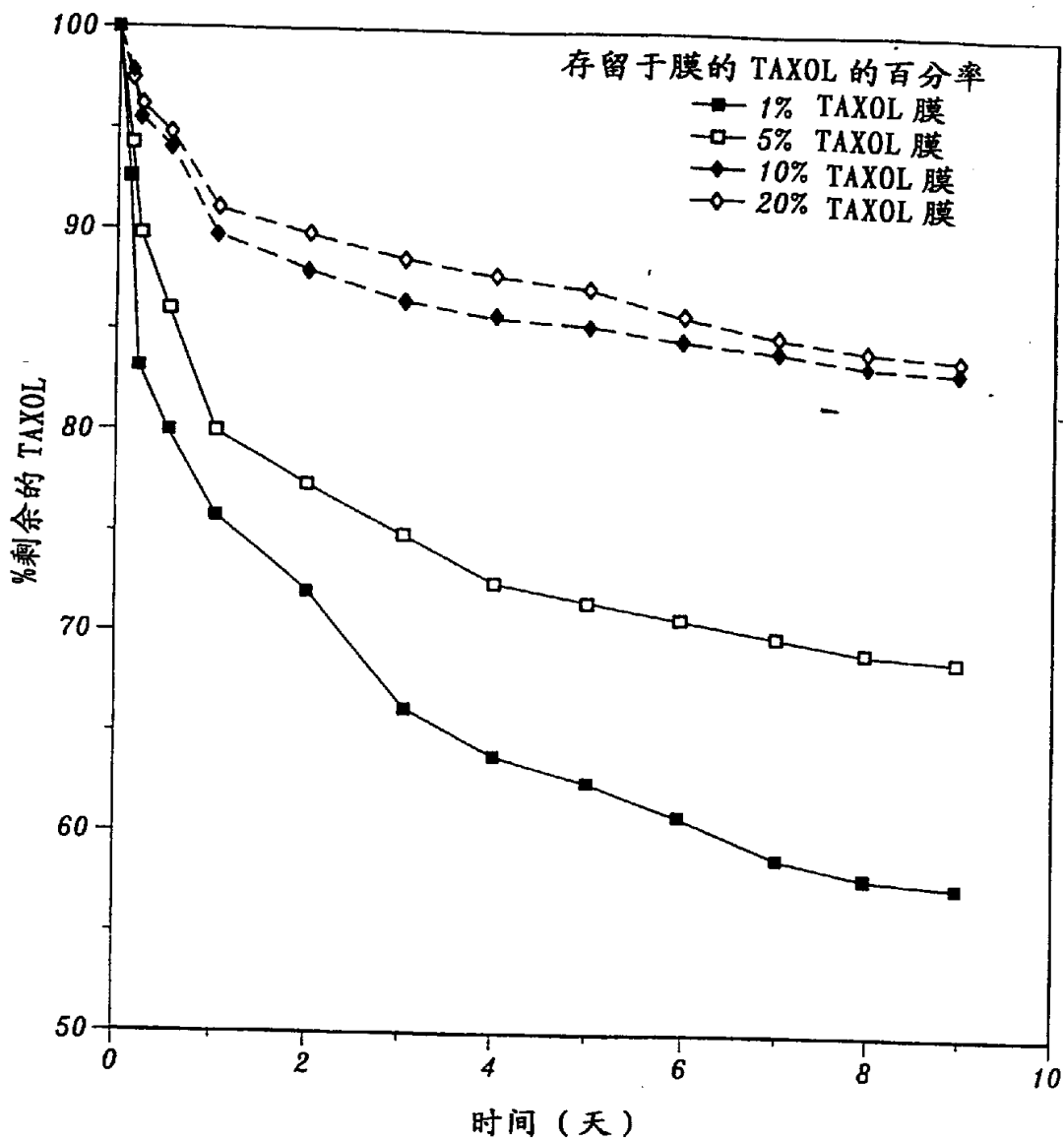


图 12B

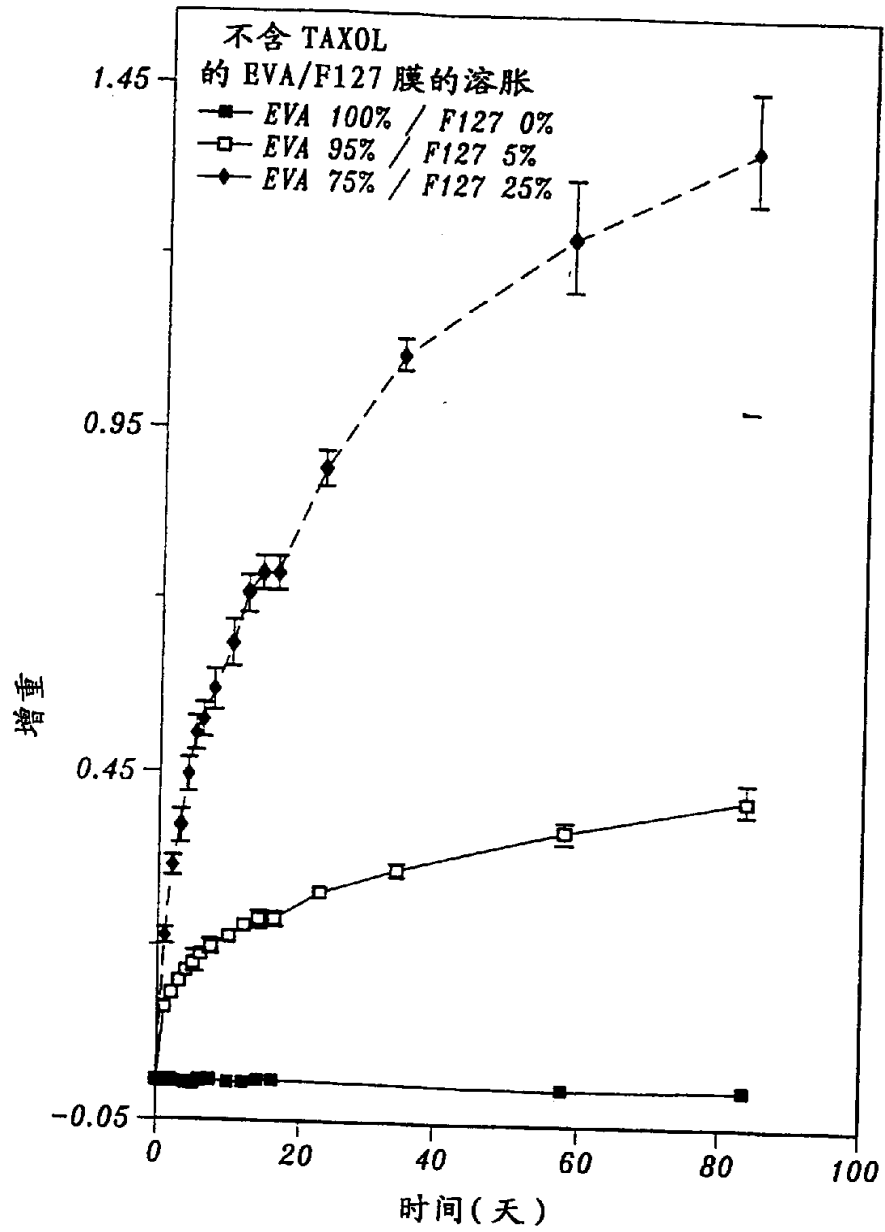
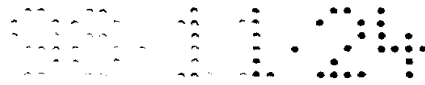


图 12C

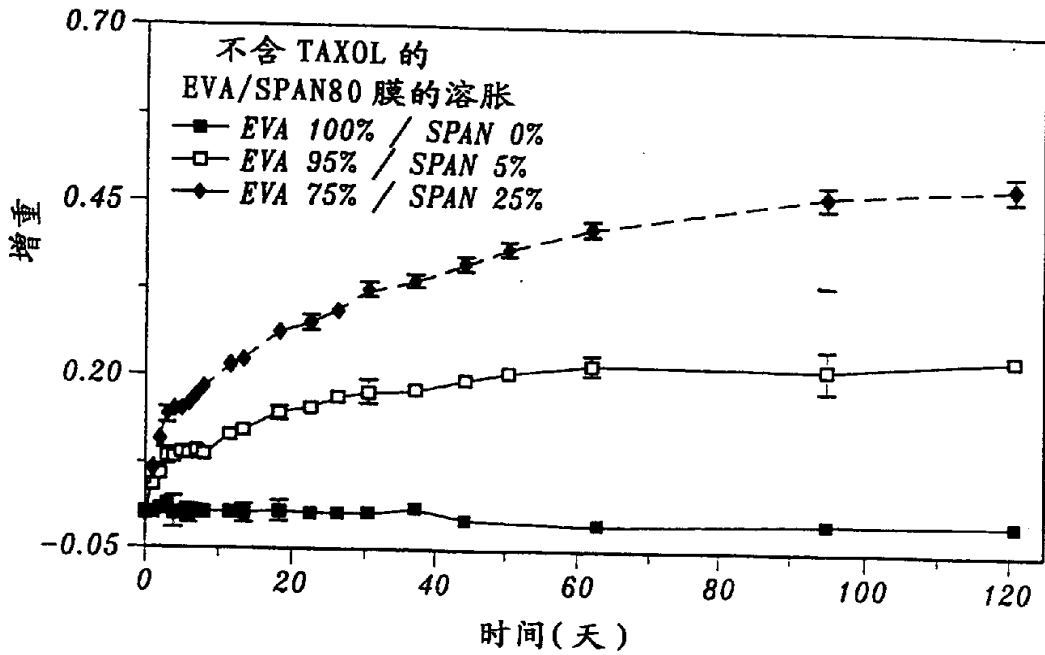


图 12D

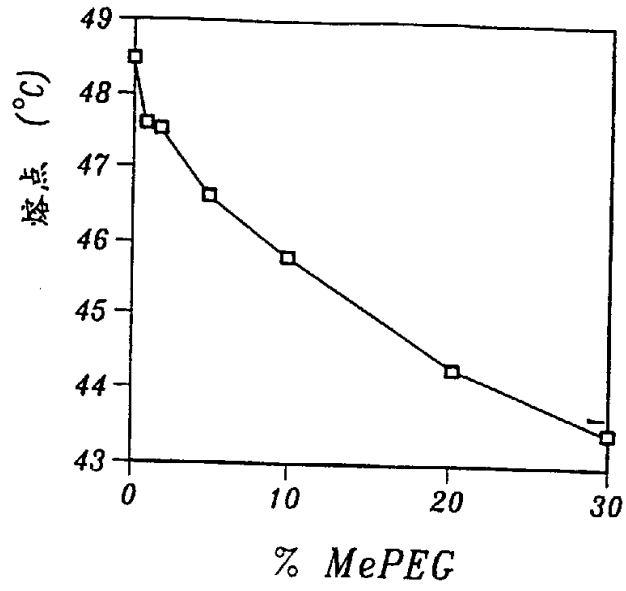


图 13A

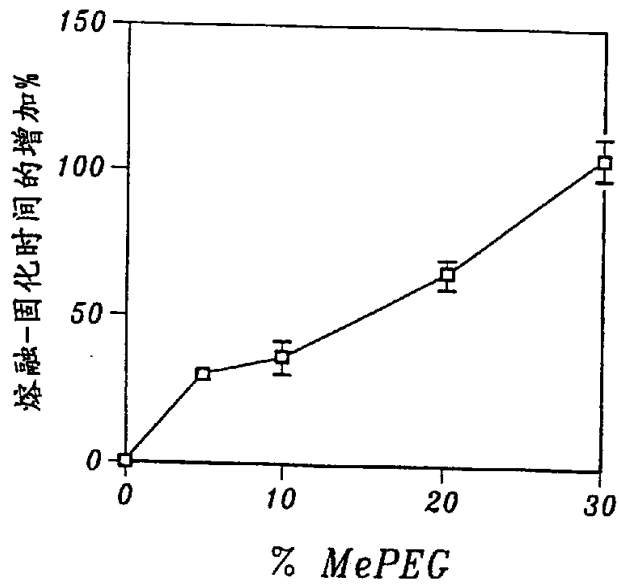


图 13B

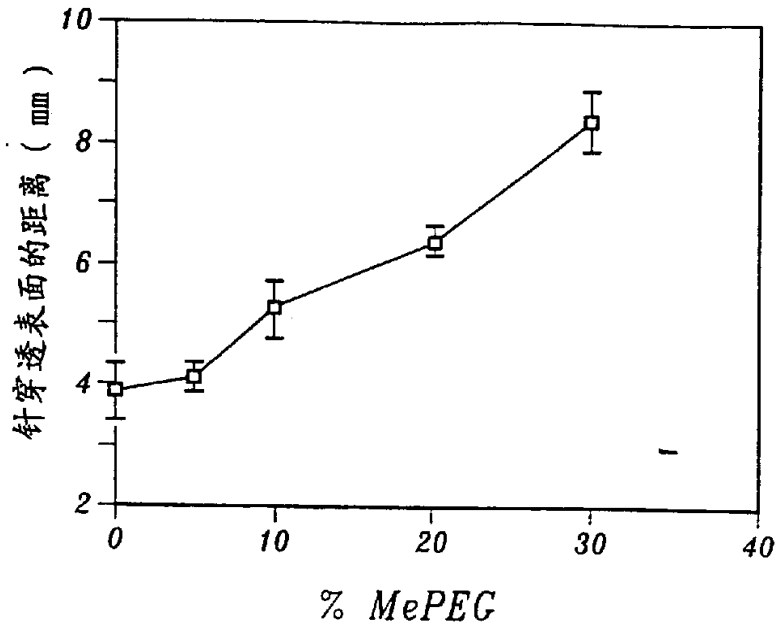


图 13C

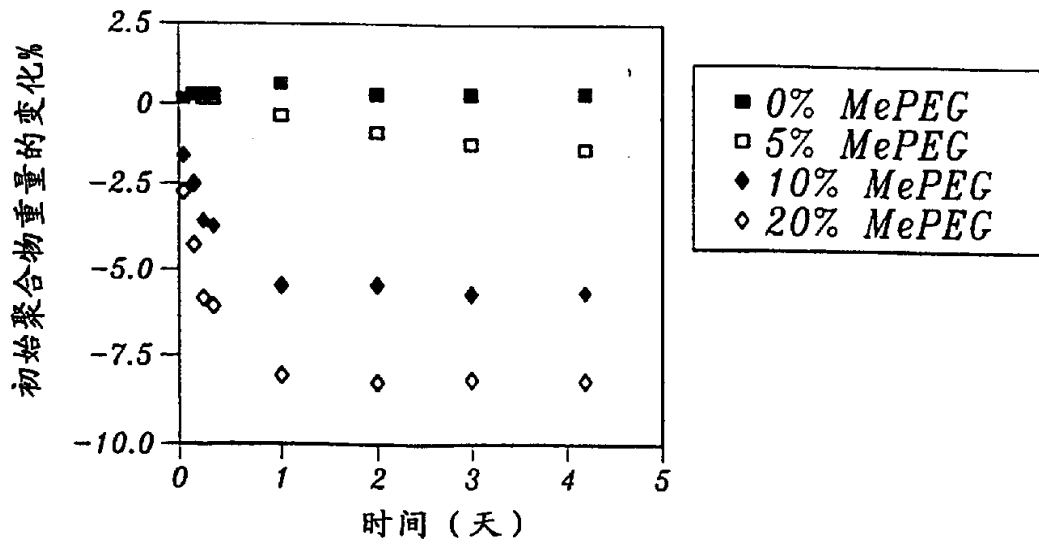


图 13D

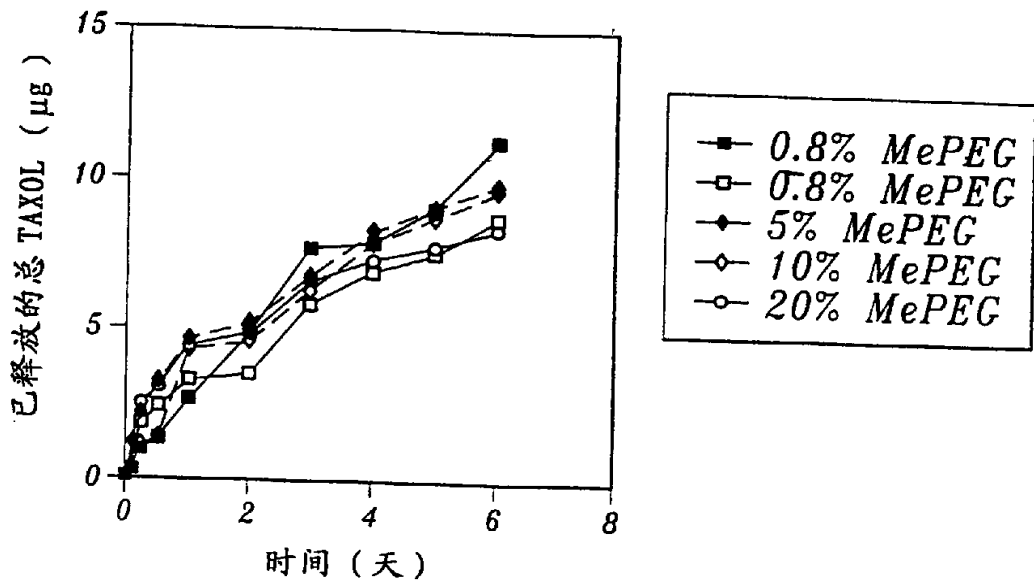


图 13E

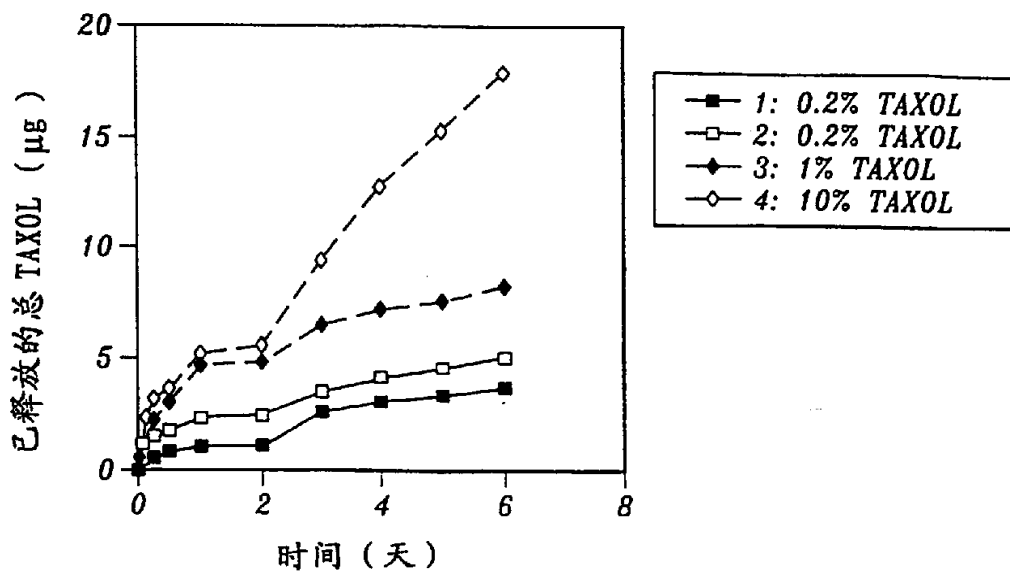


图 13F

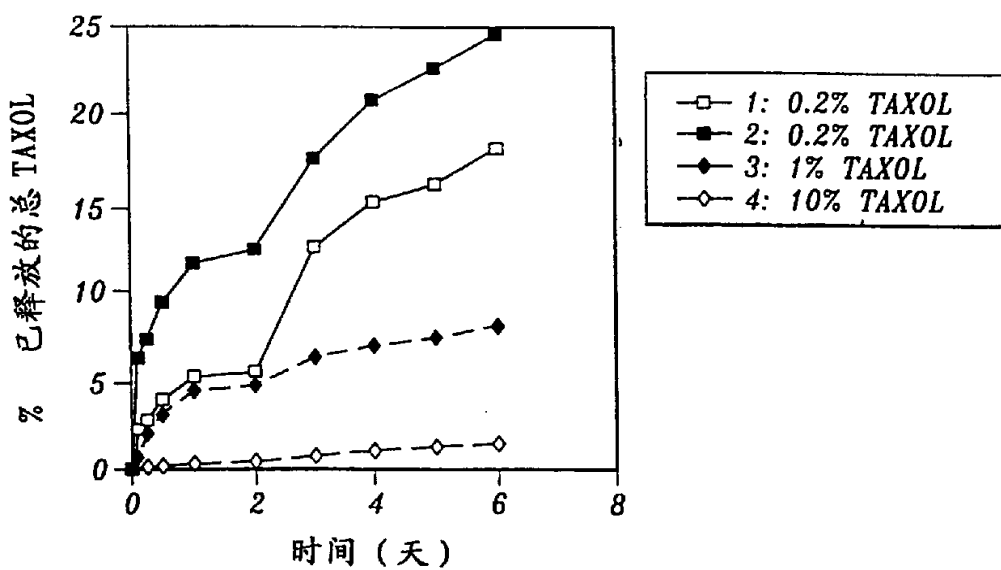


图 13G

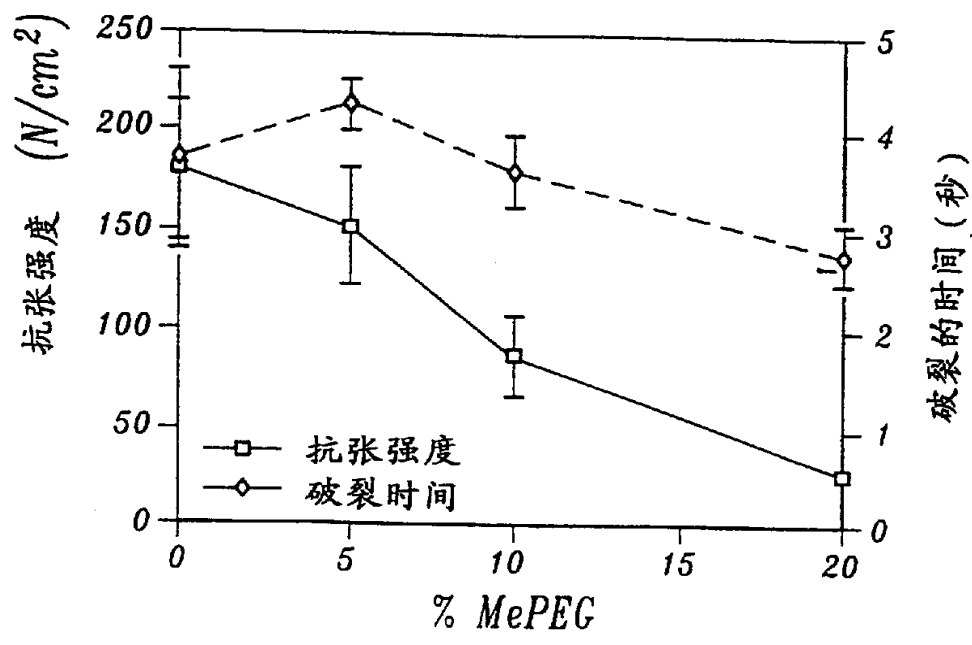


图 13H

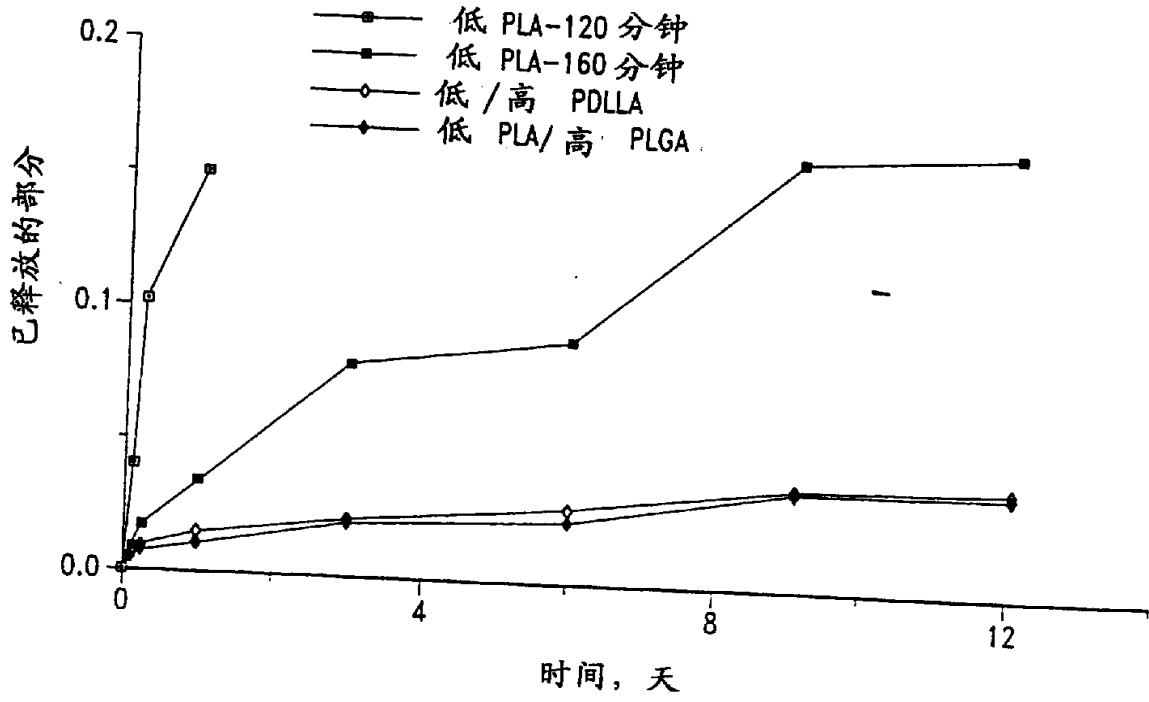
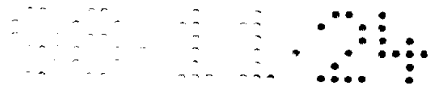


图 14

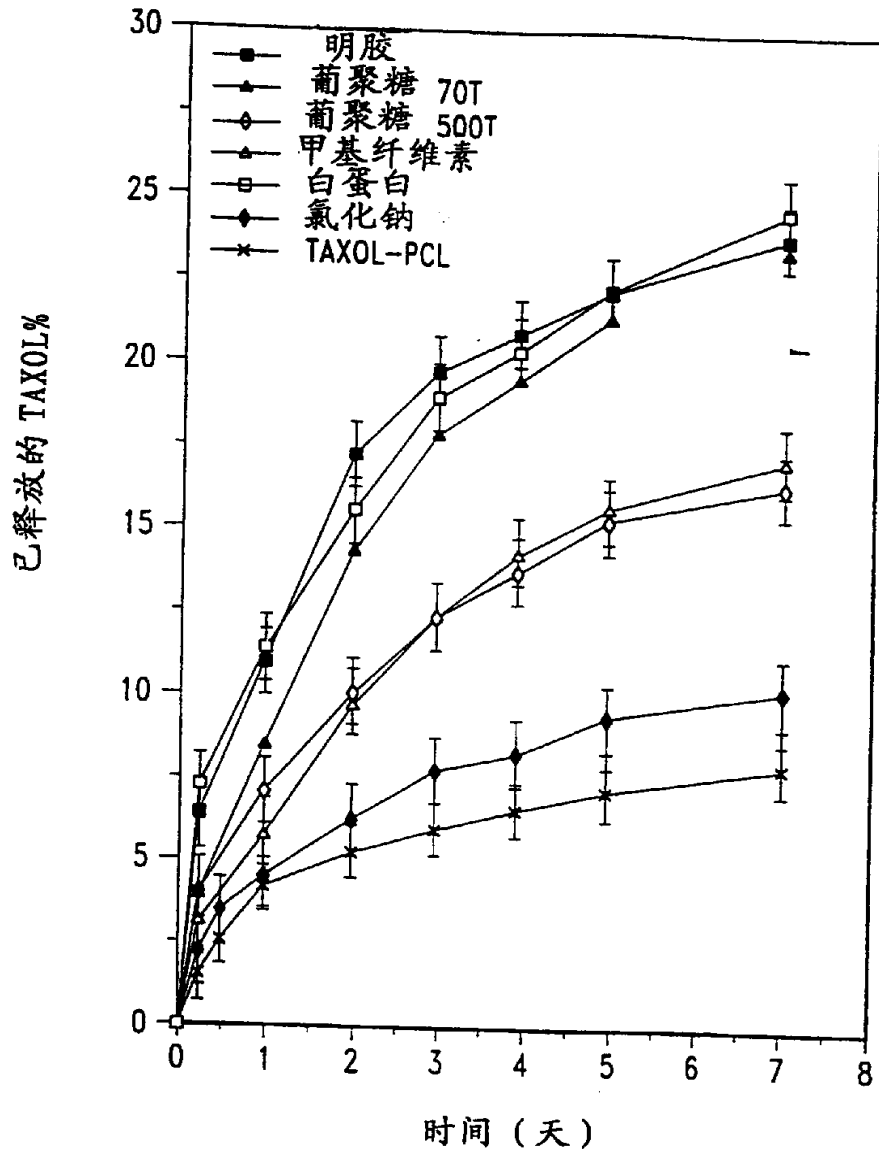


图 15

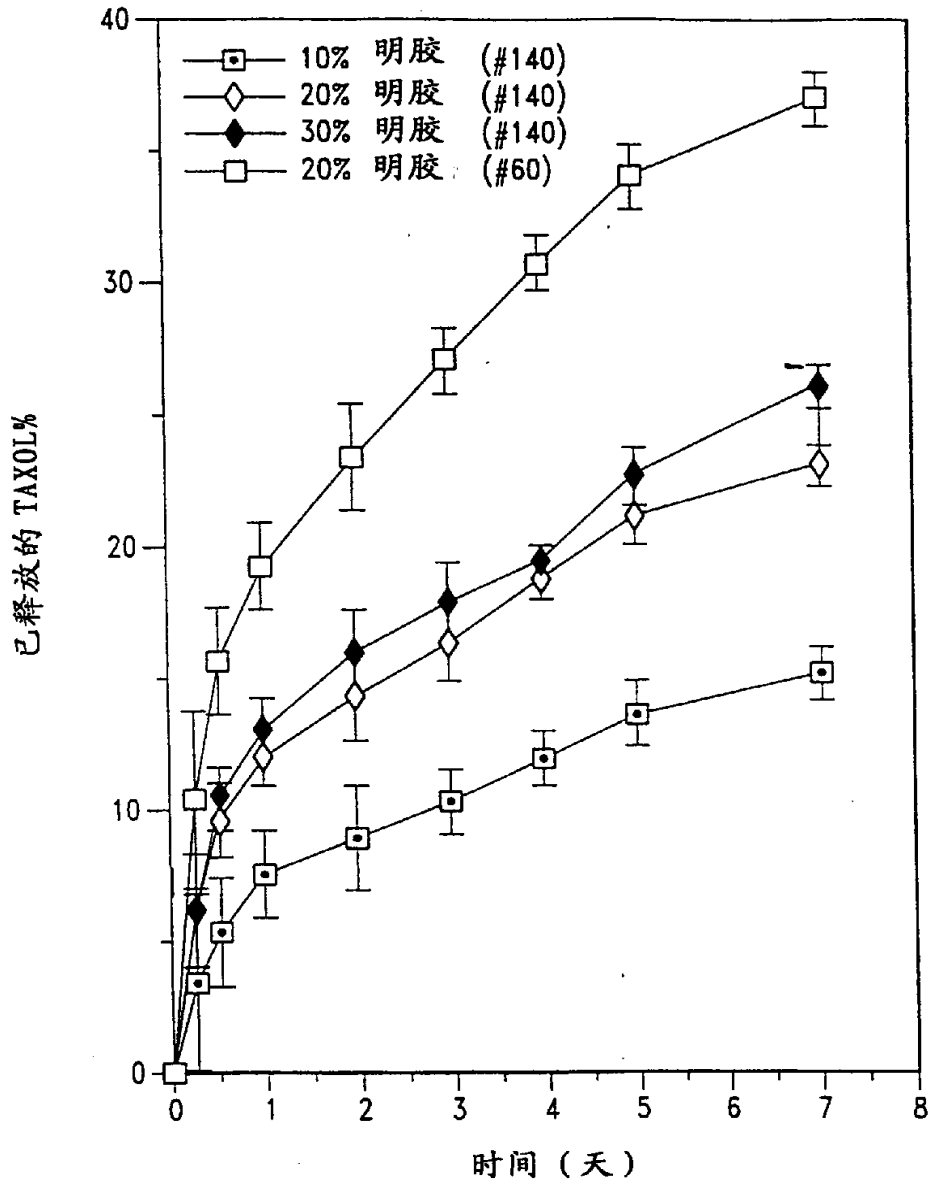


图 16

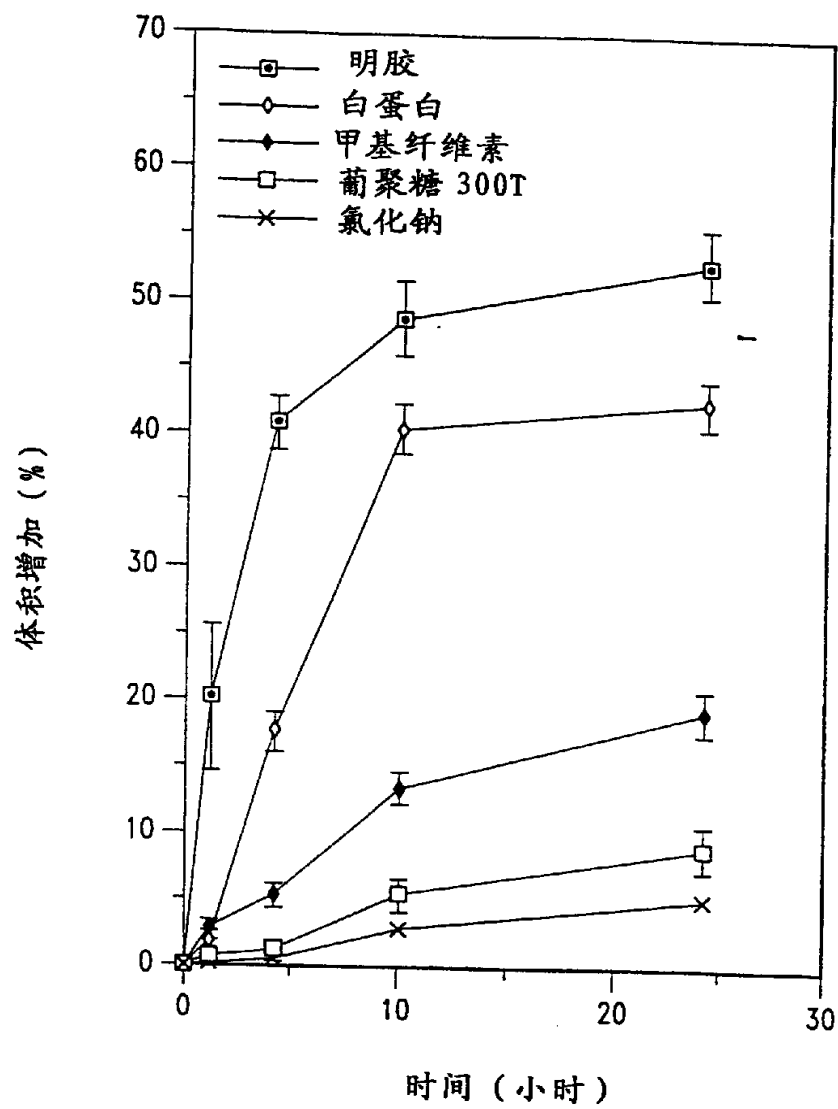
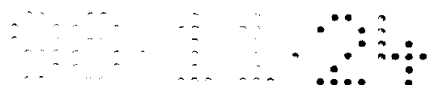


图 17A

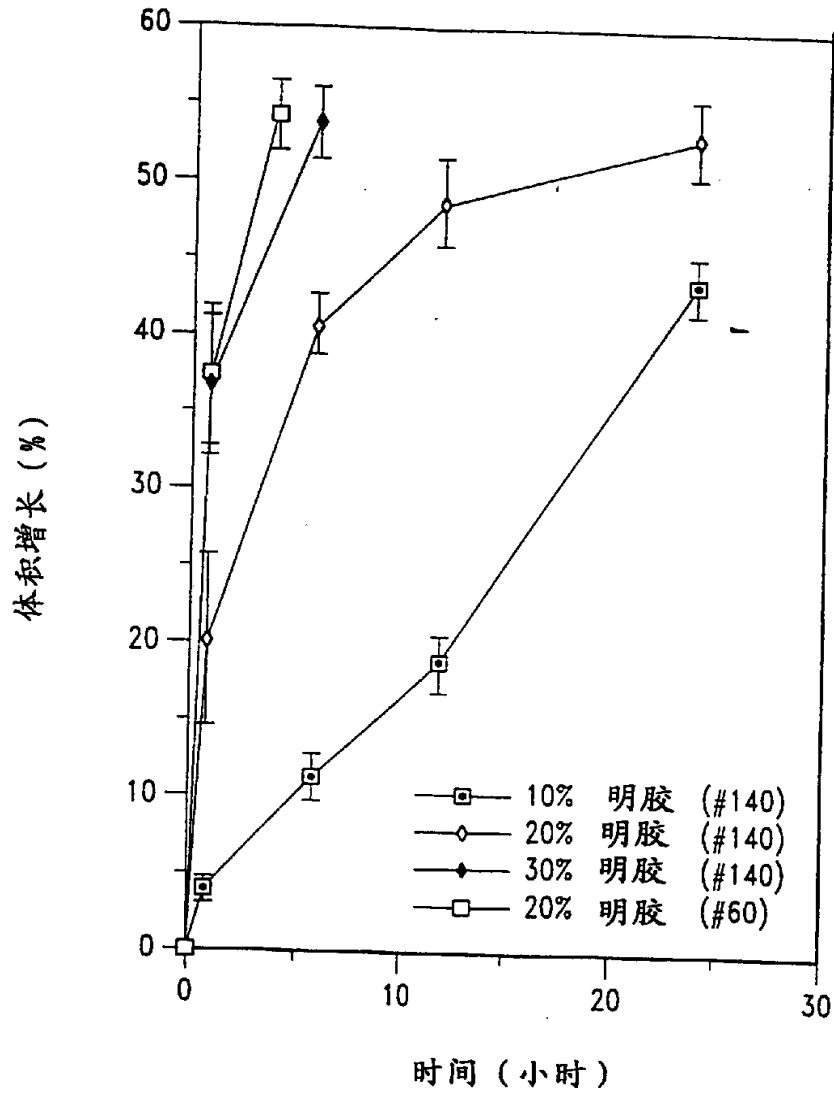


图 17B

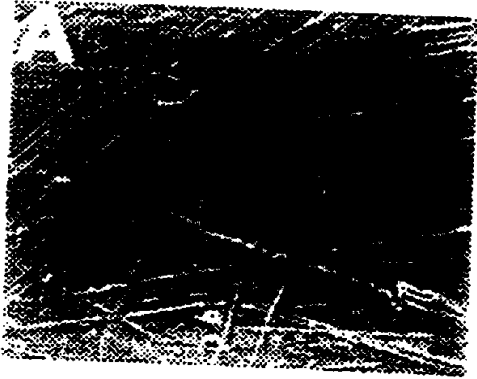


图 18A



图 18B



图 18C



图 18D

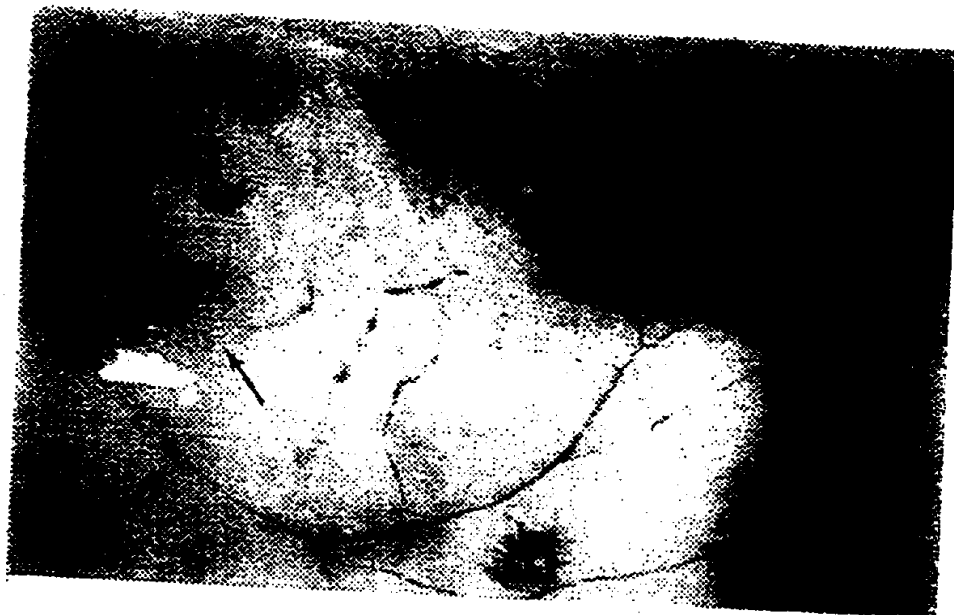


图 19B



图 19A

治疗对肿瘤重量和小鼠体重的影响

小鼠号	小鼠重量 (g)		肿瘤重量 (g)	
	对照组	治疗组	对照组	治疗组
1	19.4	19.0	1.76	1.14
2	20.4	18.6	1.85	1.98
3	20.6	19.5	2.4	0.65
4	19.8	18.5	2.31	0.20
5	20.0	18.9	3.2	0.35
6	-	19.1	-	1.51
7	-	19.9	-	0.61
8	-	19.3	-	0.40
平均	20.4	19.1	2.3	0.85
标准偏差	0.47	0.46	0.57	0.62

图 20

PDLLA-PEG-PDLLA 的溶解温度, 热函, 分子量 (M_n), 多分散性 (M_w/M_n), 和特性粘度 ($[\eta]$)

PDLLA-PEG-PDLLA PEG 含量	溶解 温度 ^a , °C	ΔH^a , J/g	$M_n^b \times 10^{-4}$	M_w/M_n^b	$[\eta]^c$, dl/g
100%	61.8	184.8	0.8 ^d	--	--
70%	50.2	72.2	2.1	1.21	0.27
40%	46.3	42.8	4.5	3.5	0.29
30%	无	无	5.9	2.95	1.0
20%	无	无	5.1	2.96	1.45
10%	无	无	11	2.38	1.5
TAXOL	212	59.3	--	--	--
20%负载 TAXOL	212.1	5.6	--	--	--
共聚物 (30%PEG)					

- a: 用 DSC 测量
 b: 用 GPC 测量, 相对于聚苯乙烯标准物
 c: 于 25 °C 在 $CHCl_3$ 中
 d: 制造商提供的数据

图 21

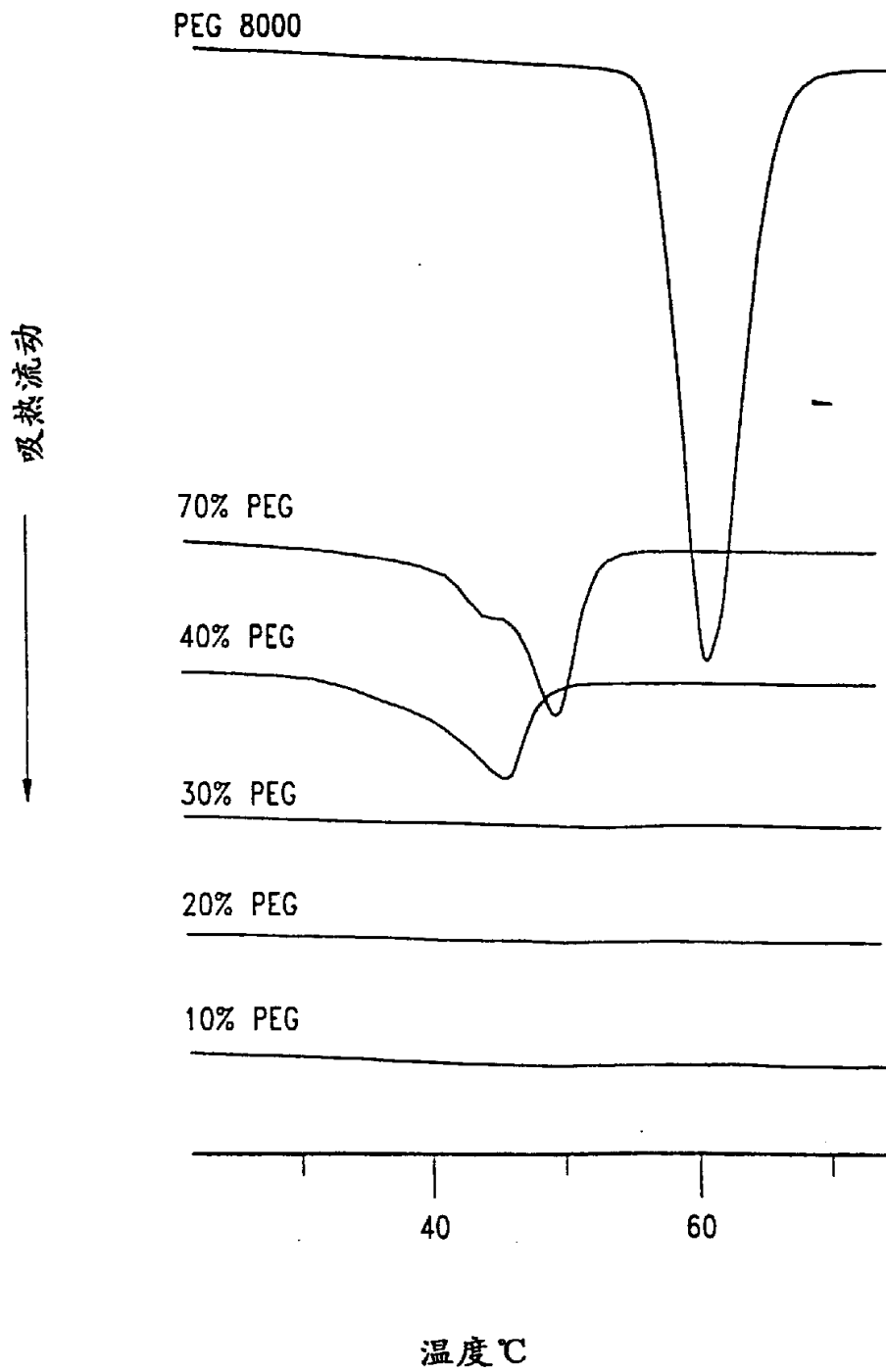


图 22

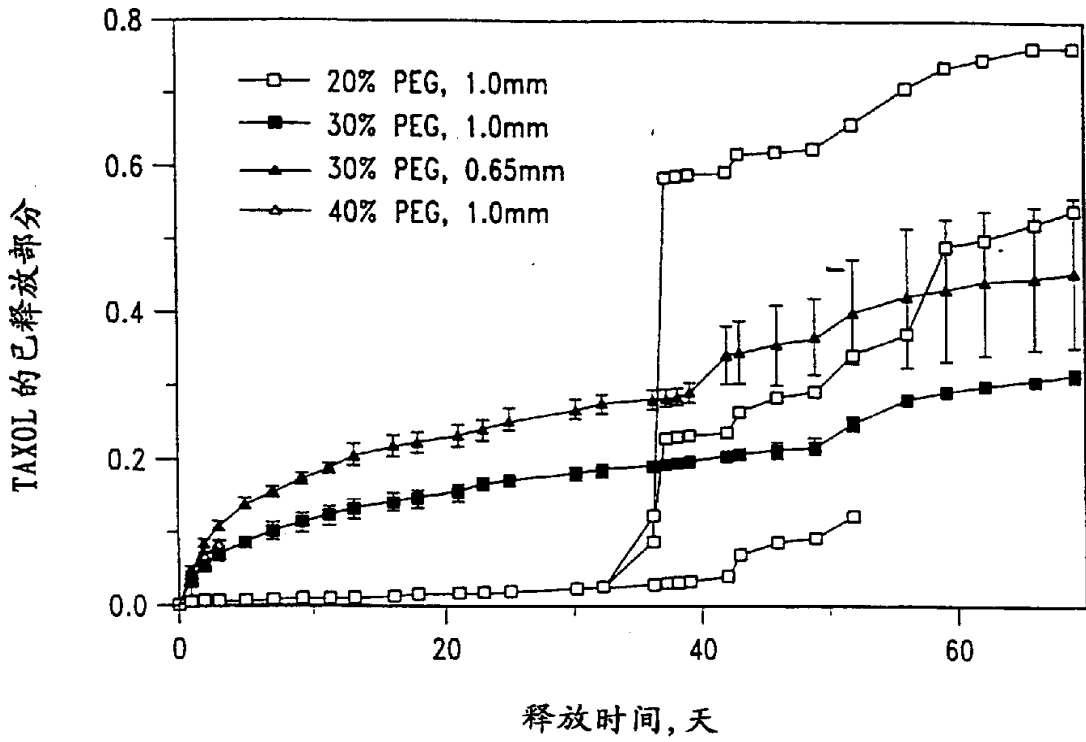


图 23

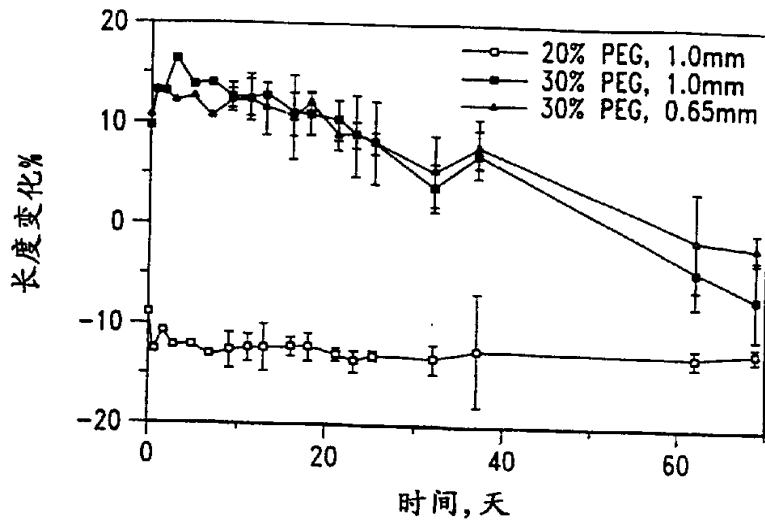


图 24A

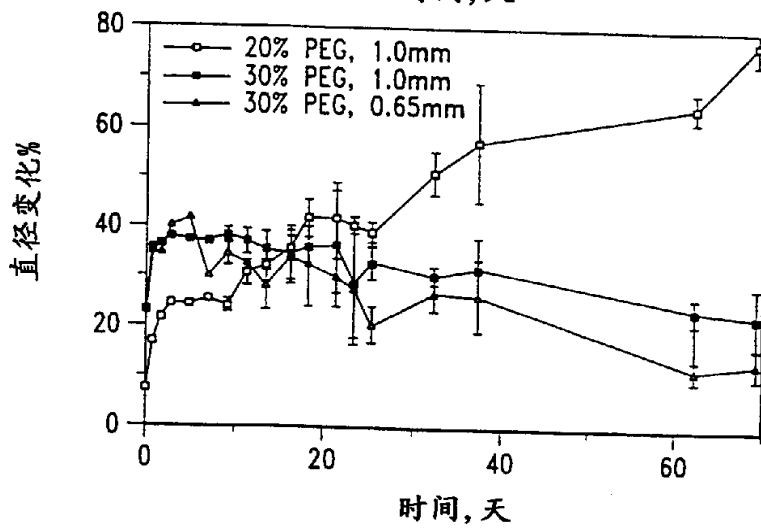


图 24B

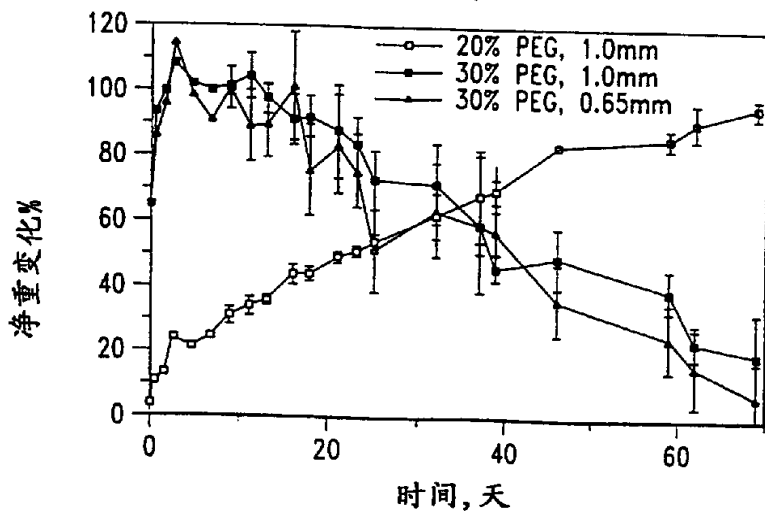


图 24C

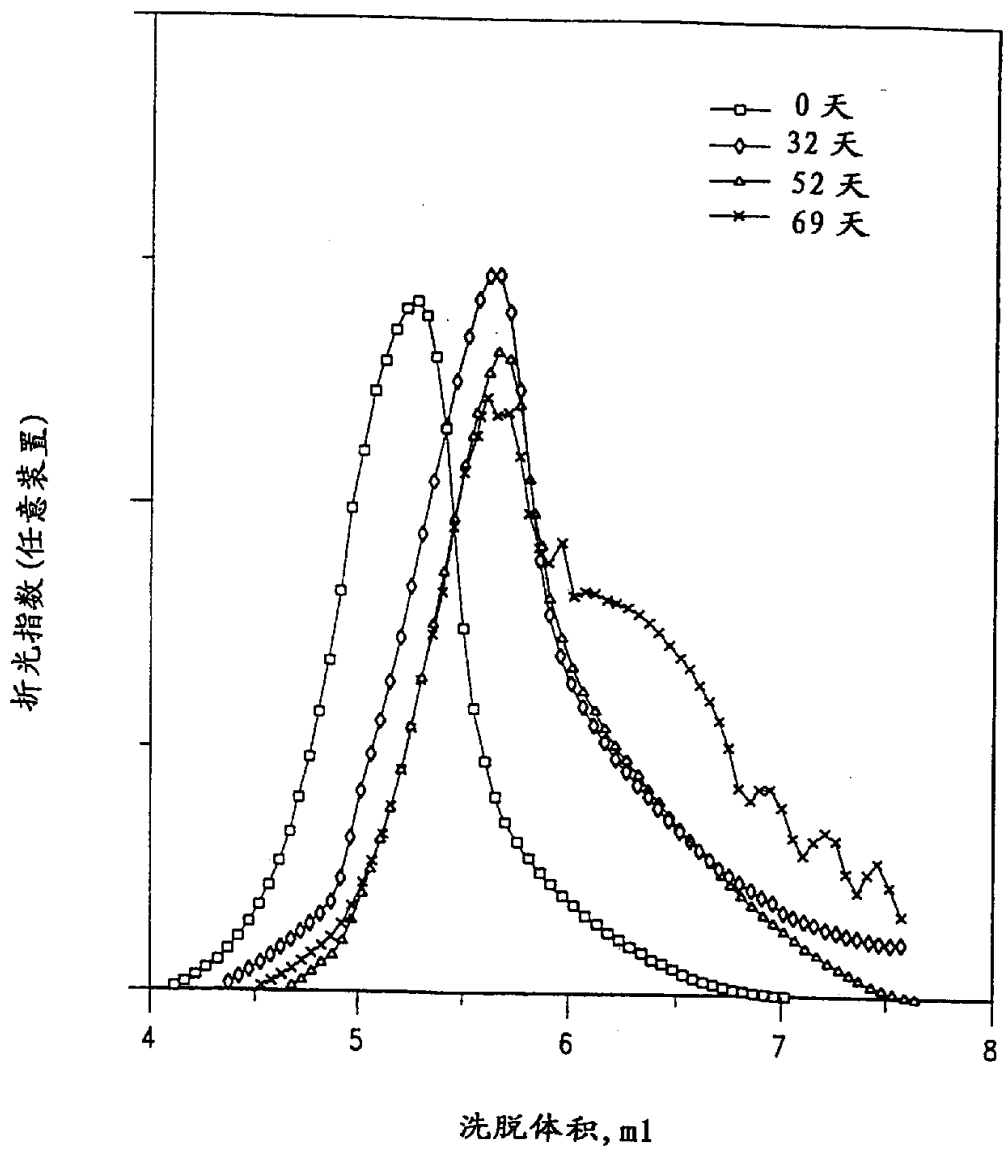


图 25



在 37 °C 释放到 PBS 白蛋白缓冲剂过程中 PDLLA-PEG-PDLLA 柱体 (加载 20% TAXOL) 的质量损失和聚合物组分变化

样品 ^a	时间, 天	干重损失%	°C	
			1.65/5.1 ^b	3.6/5.1 ^b
20% PEG-1mm	0	0	3.51	1.65
20% PEG-1mm	32	7.9	-	-
20% PEG-1mm	69	19.2	3.63	0.68
30% PEG-1mm	0	0	3.39	3.91
30% PEG-1mm	32	28.9	-	-
30% PEG-1mm	69	45.5	4.3	0.56
30% PEG-0.65mm	0	0	3.39	3.91
30% PEG-0.65mm	32	26.7	-	-
30% PEG-0.65mm	69	57.5	5.8	0.21

a: PDLLA-PEG-PDLLA 共聚物柱体中 PEG 含量和柱体直径

b: 在 CDCl_3 中用 $^1\text{H-NMR}$ 测量, 1.65/5.1 代表在 1.65ppm 处 (由于在 PDLLA 中的 $-\text{CHCH}_3-$) 和 5.1ppm 处 (由于在 PDLLA 中的 $-\text{CH}^*\text{CH}_3-$) 的峰面积之比。 3.6/5.1 代表在 3.6ppm 处 (由于在 PEG 中的 $-\text{CH}_2^*\text{CH}_2-$) 和 5.1ppm 处的峰面积之比。

图 26



图 27A



图 27B

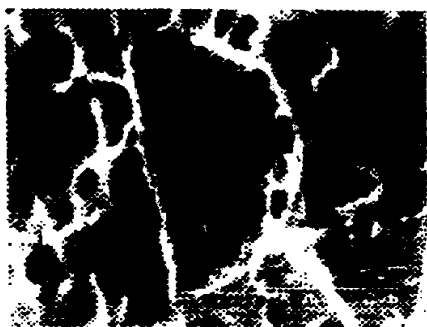


图 27C



图 27D

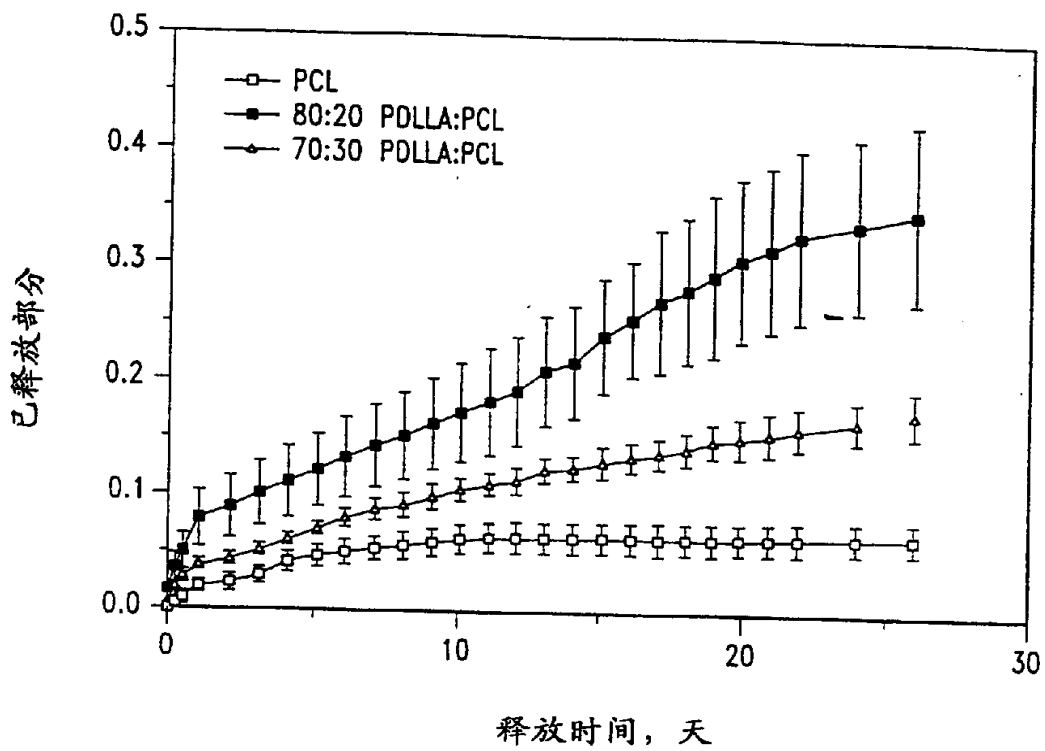


图 28

加载了 TAXOL 的外用糊剂局部应用于小鼠的皮下肿瘤的效能

未处理	PCL		80:20 PDLLA:PCL 混合		90:10 PDLLA:PCL 混合		PDLLA-PEG-PDLLA ^g	
	对照	20% taxol	对照	20% taxol	对照	20% taxol	对照	20% taxol
nb	5	5	4	5	5	15	10	13
死亡 ^c	0	0	1	0	0	0	0	0
重量 ^{d, g}	1.71	1.64	1.55	1.63	1.22	0.87	1.46	0.88
std ^e	0.61	0.68	0.49	0.75	0.49	0.57	0.71	0.42
衰减 ^f	--	--	5.7%	--	25.2%	--	--	39.9%
p ^g	--	--	0.818	--	0.331	0.0269	--	0.0231

a: with 30% PEG

b: 小鼠数

c: 实验期间小鼠的死亡数

d: 肿瘤的平均重量

e: 肿瘤重量的标准偏差

f: 肿瘤重量的下降百分数

g: 利用两尾 t-试验得到的显著水平

图 29

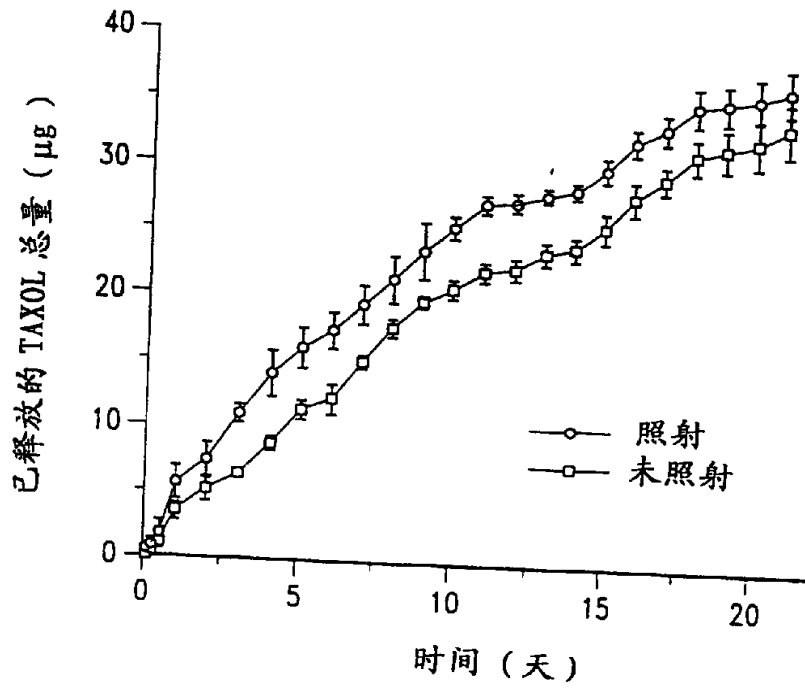


图 30

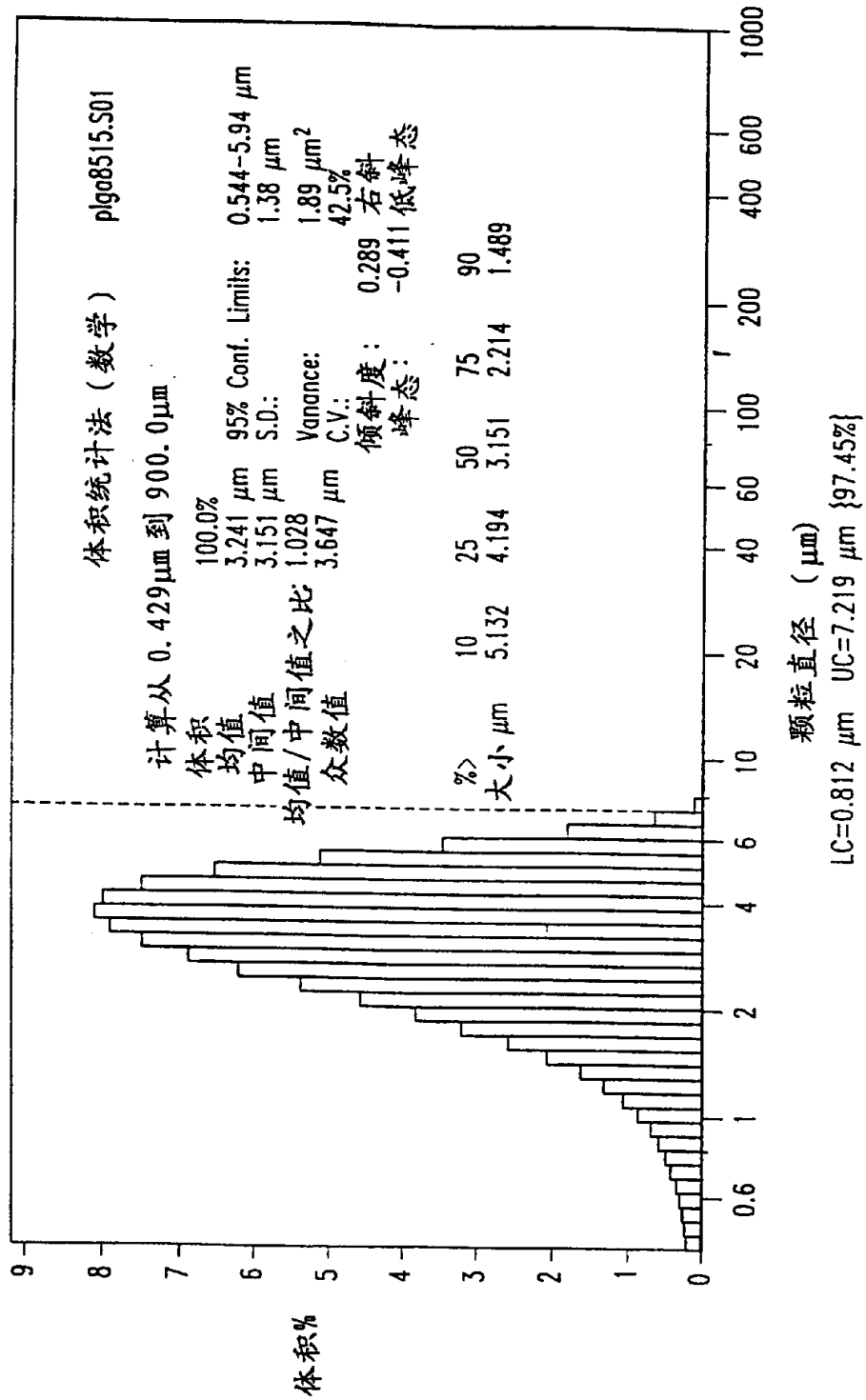


图 31

1000
800
600
400
200
0

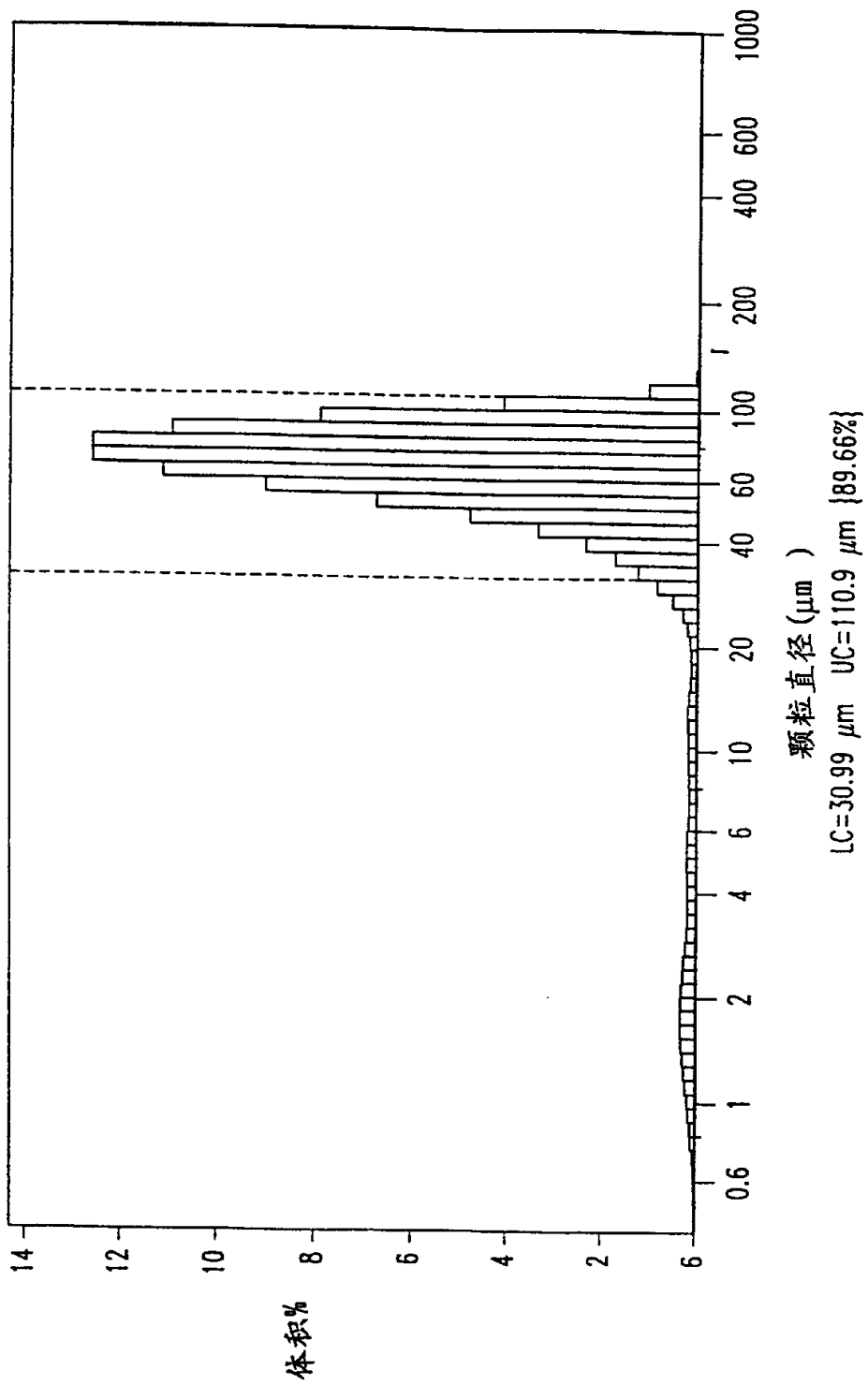


图 33

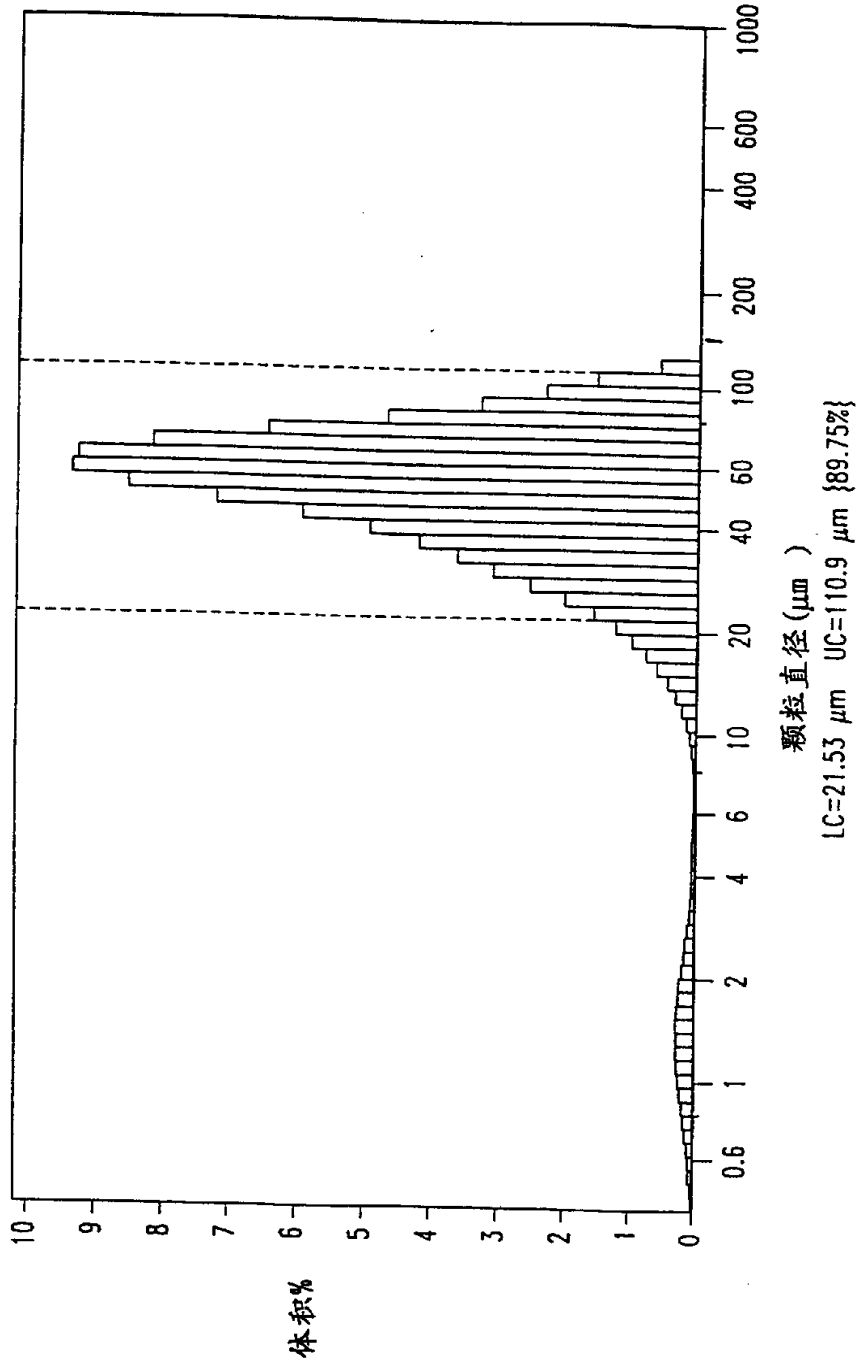


图 34

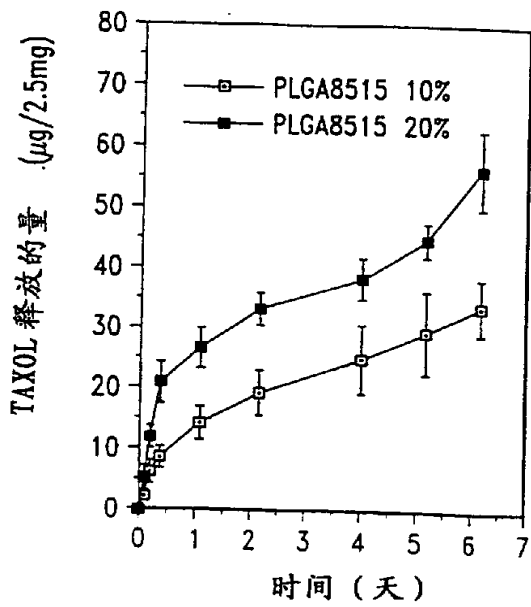


图 35A

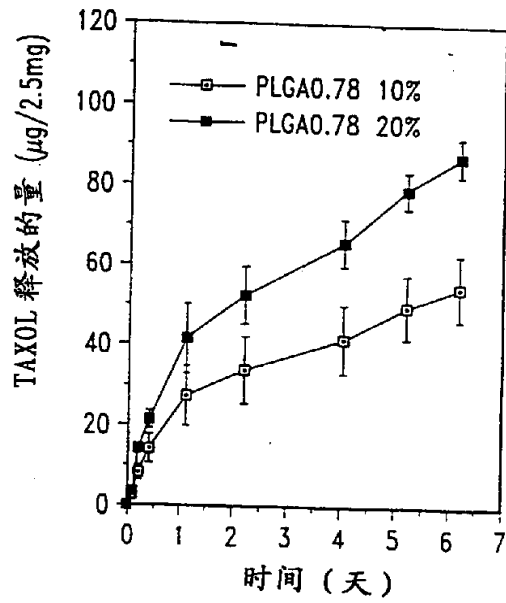


图 35B

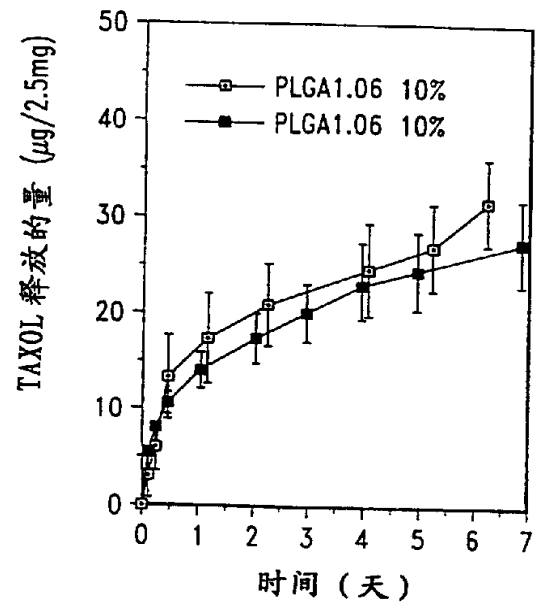


图 35C

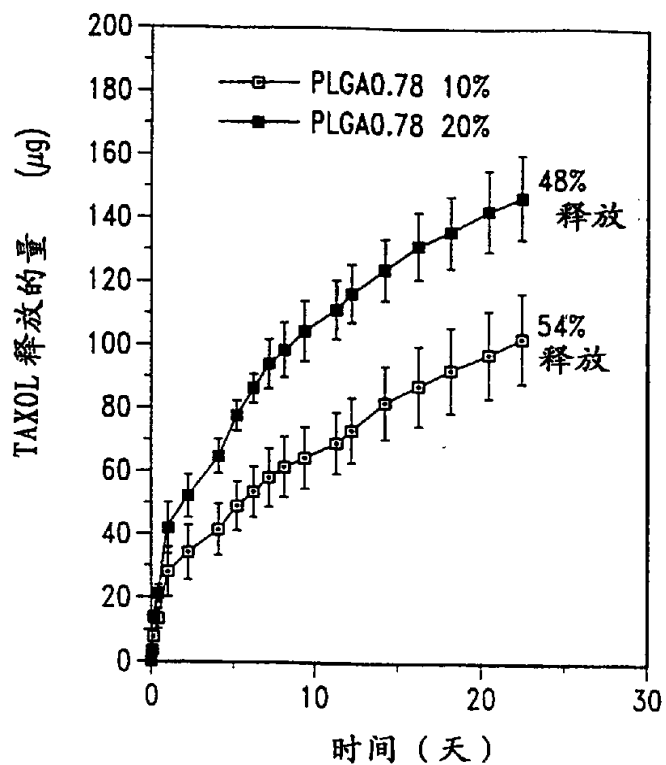
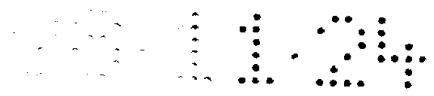


图 36A

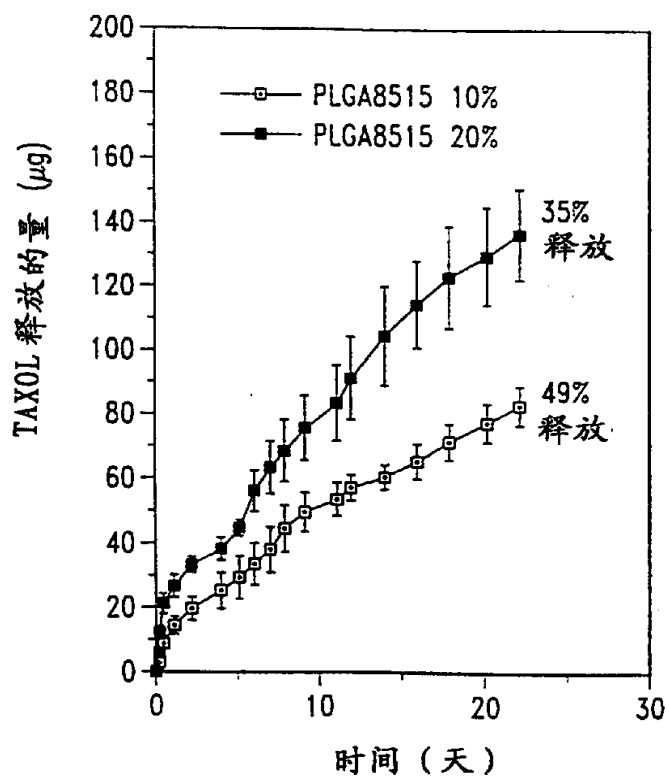


图 36B

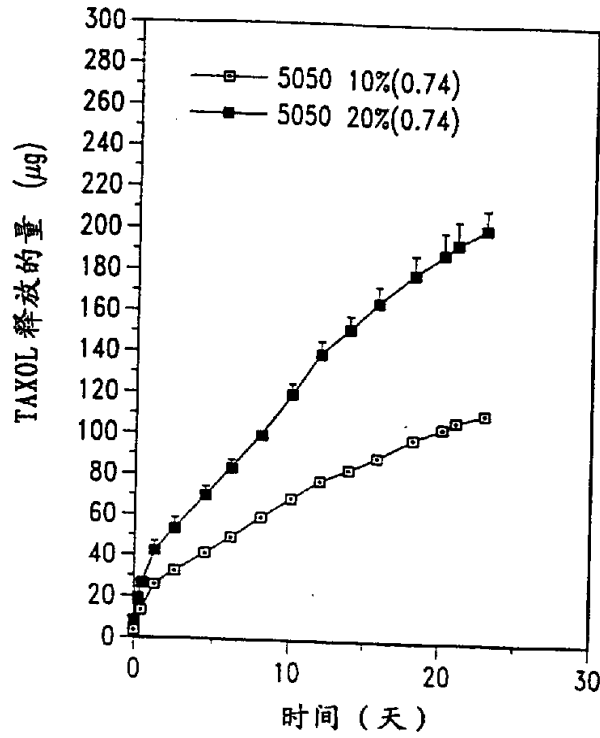


图 37A

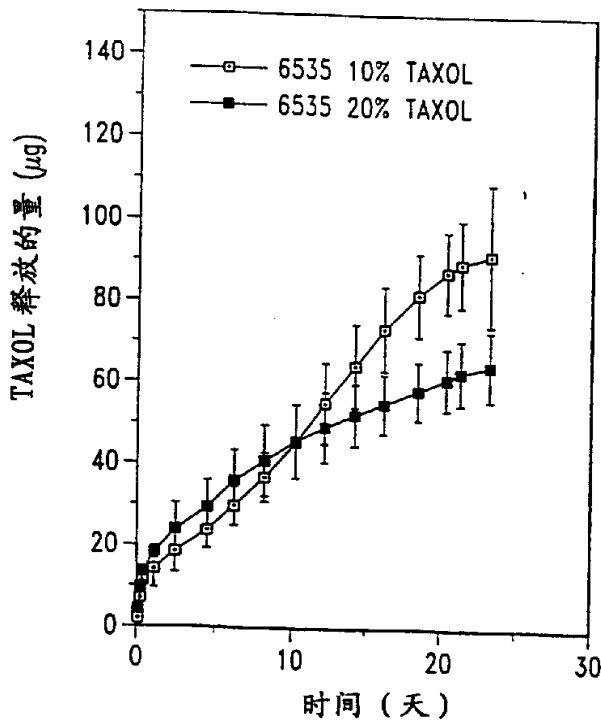


图 37B

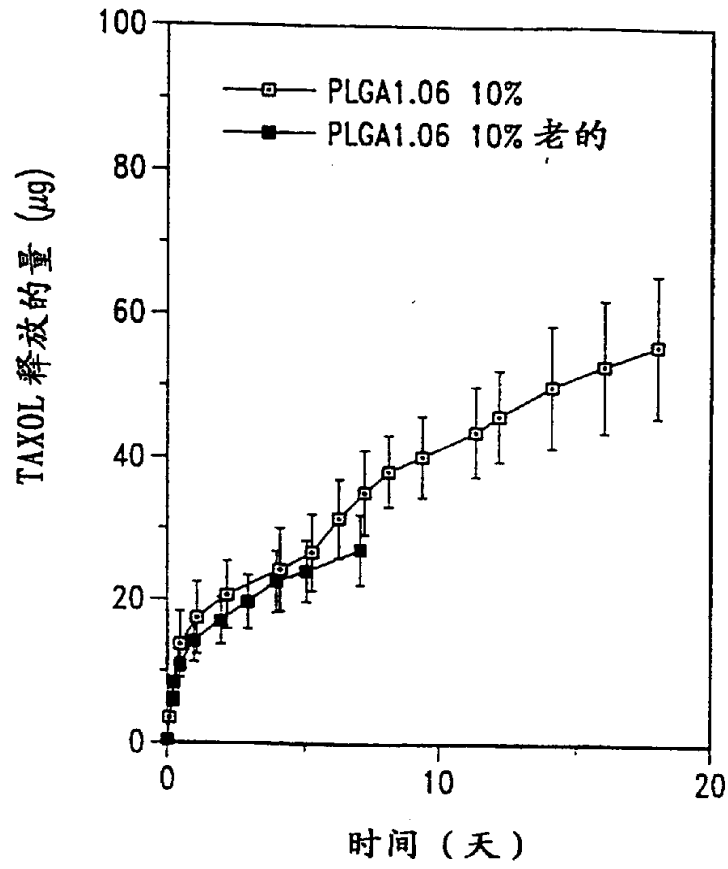


图 37C

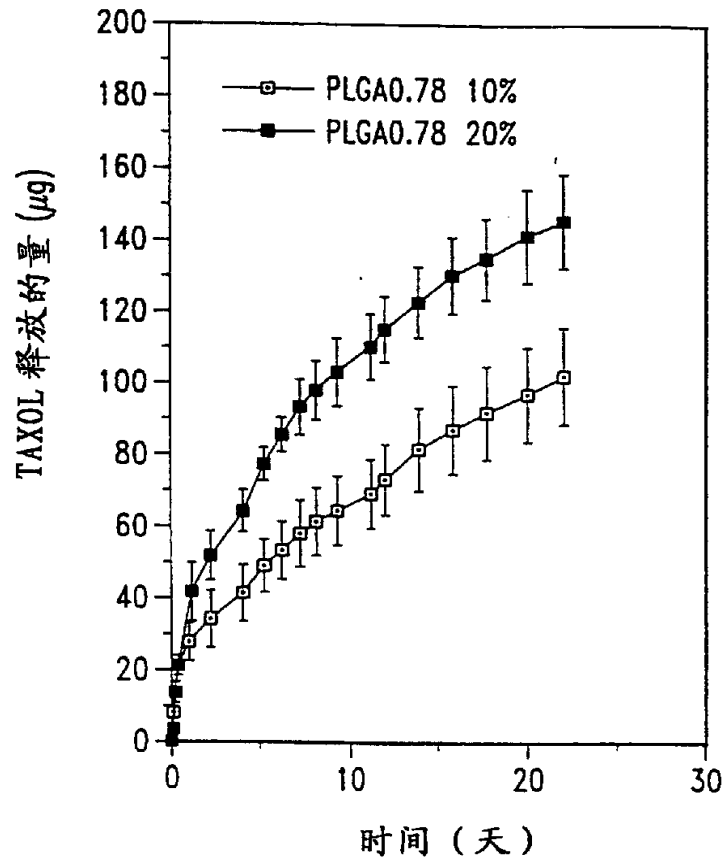


图 38A

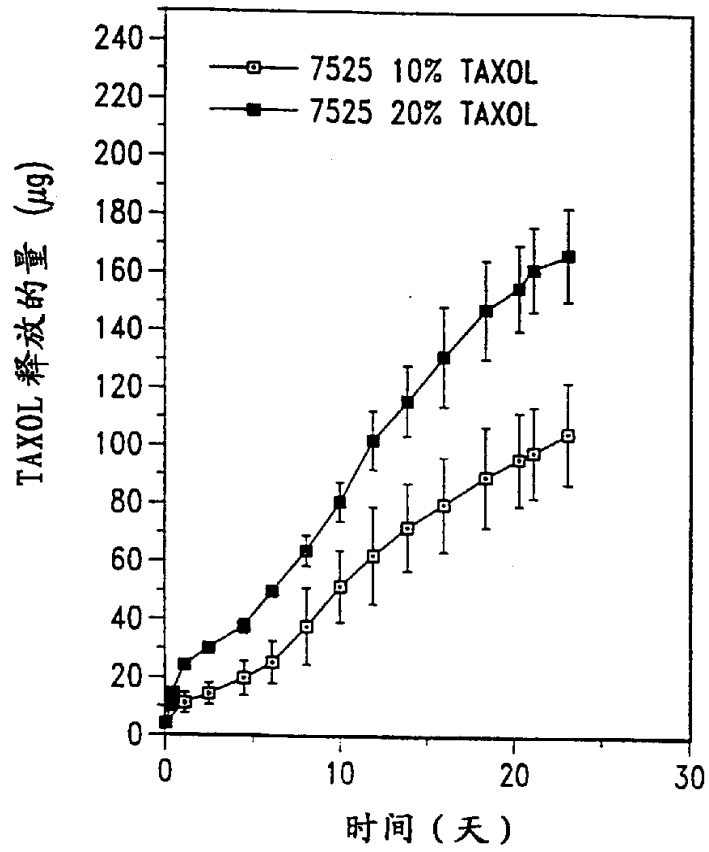
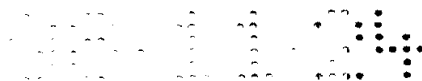


图 38B



二嵌段共聚物的分子量, CMC 和 TAXOL 最大加载量

聚合物	分子量		CMC 于 25°C. %		TAXOL 最大 加载量%
	计算值	GPC	强度	各向异性	
PDLLA-MePEG					
2000-50/50	4000	5632	0.016	0.012	15
2000-40/60	3333	5339	0.03	0.016	10
5000-30/70	7142	14948	0.03	0.018	5
5000-20/80	6250	13745	--	--	3
PCL-MePEG					
2000-40/60	4000	6125	--	--	30
5000-30/70	7142	17703	--	--	10
PDLLACL-MePEG					
2000-20/20/60	4000	5575	0.05	0.07	30
5000-15/15/70	7142	15498	0.05	0.07	10

图 39

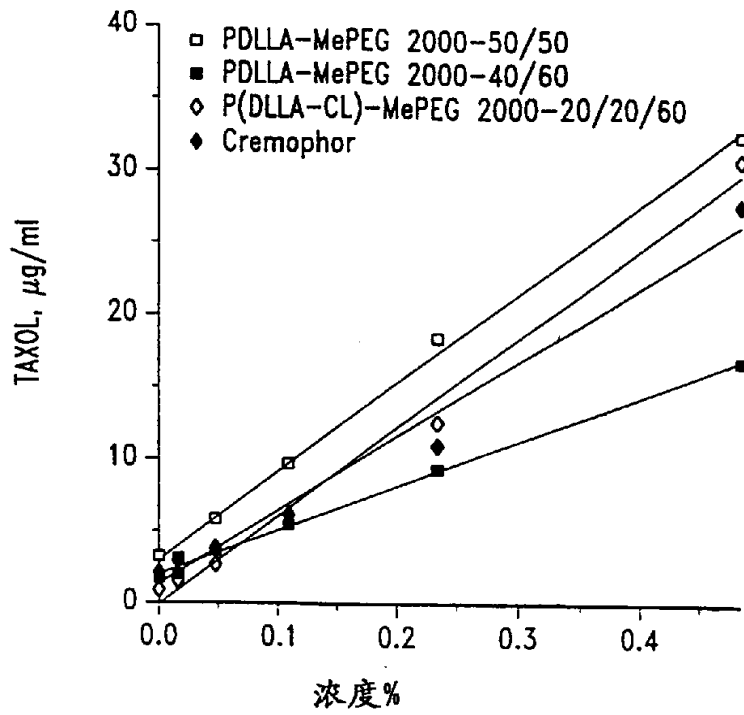


图 40A

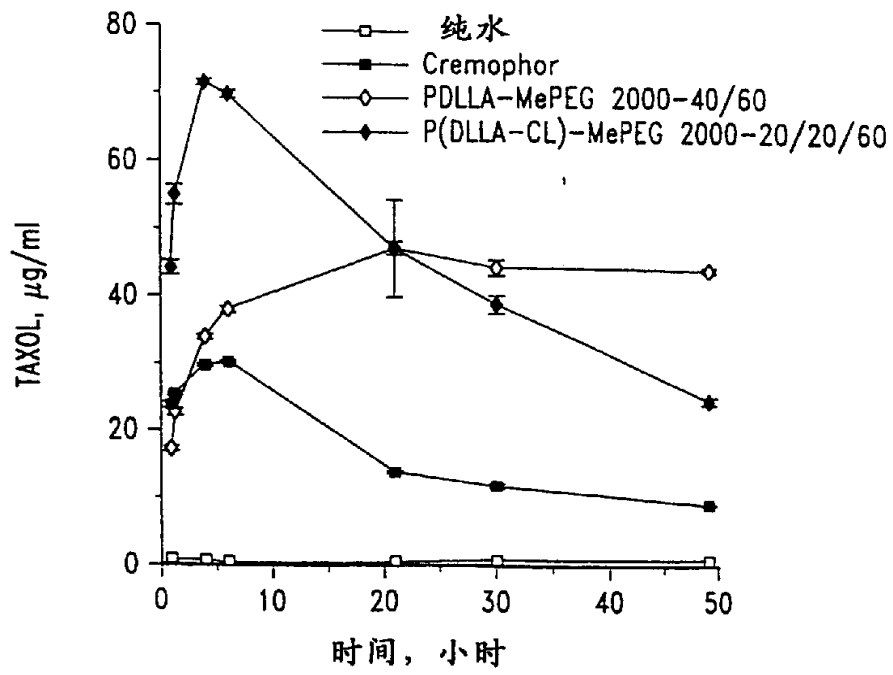


图 40B

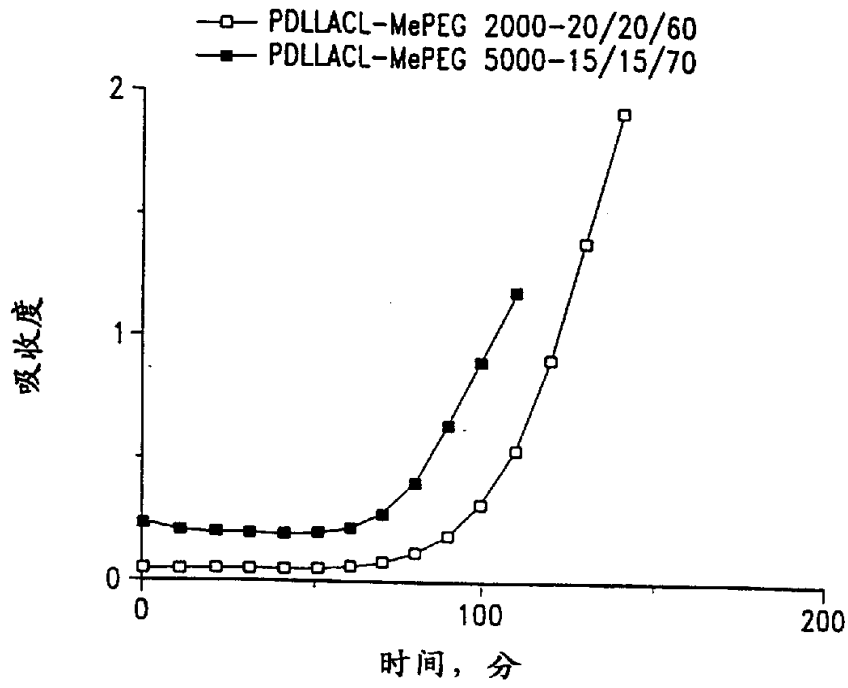


图 41A

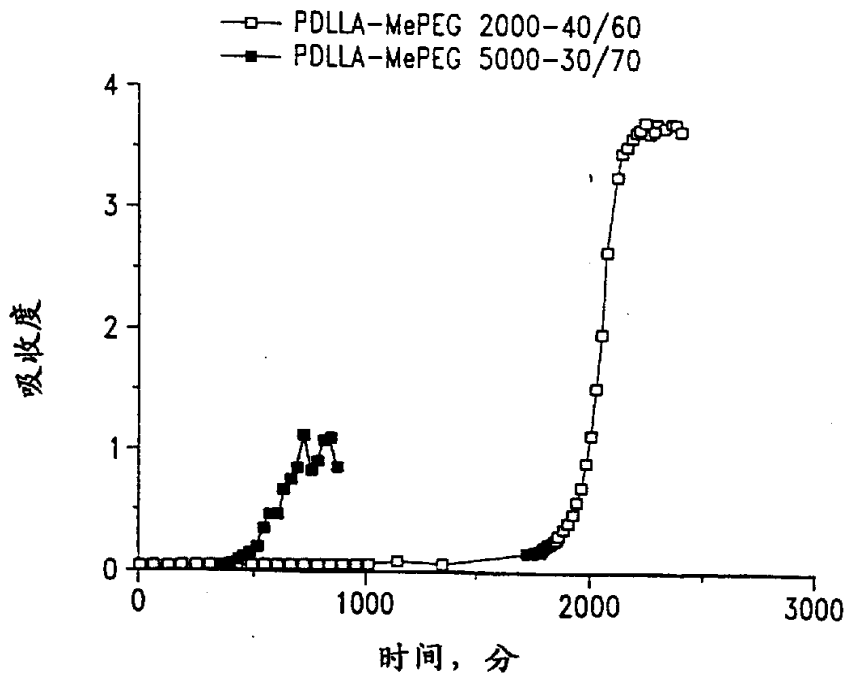


图 41B

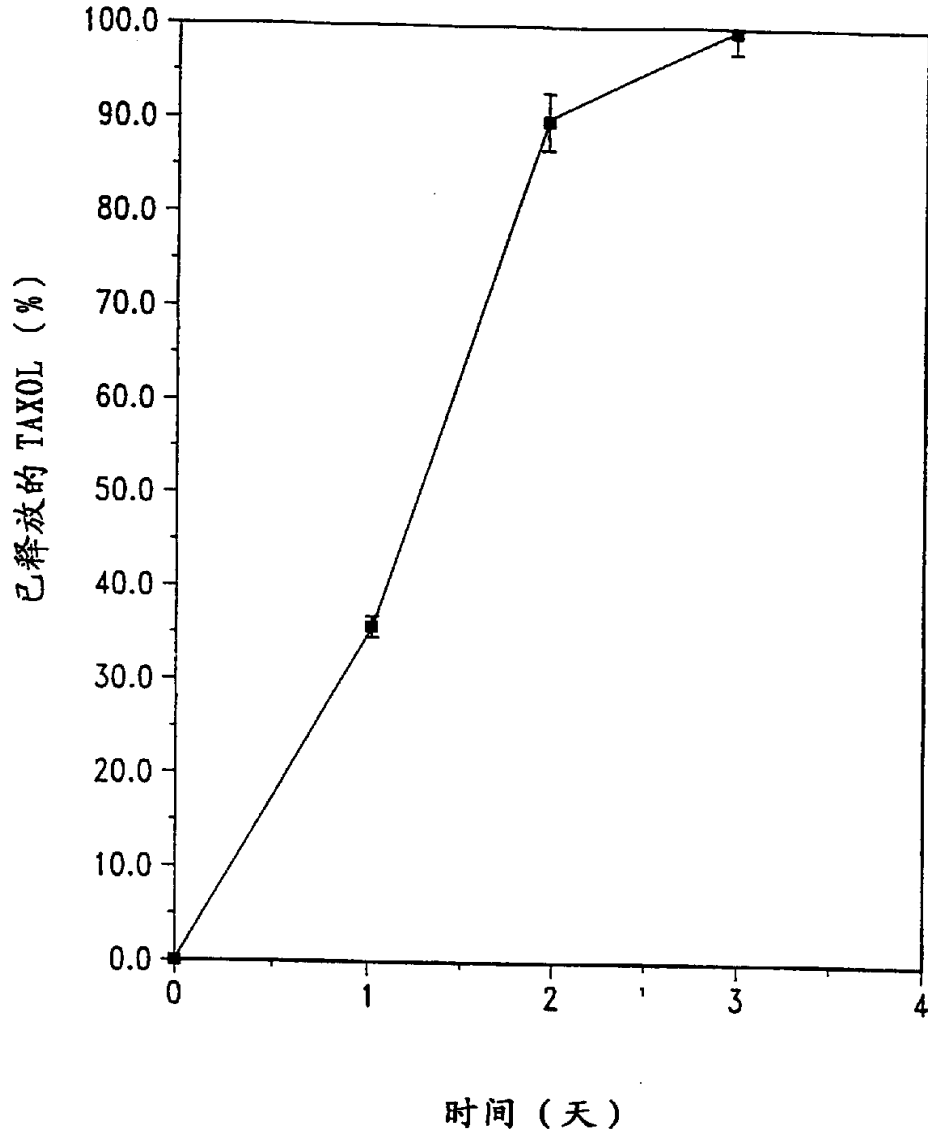


图 42

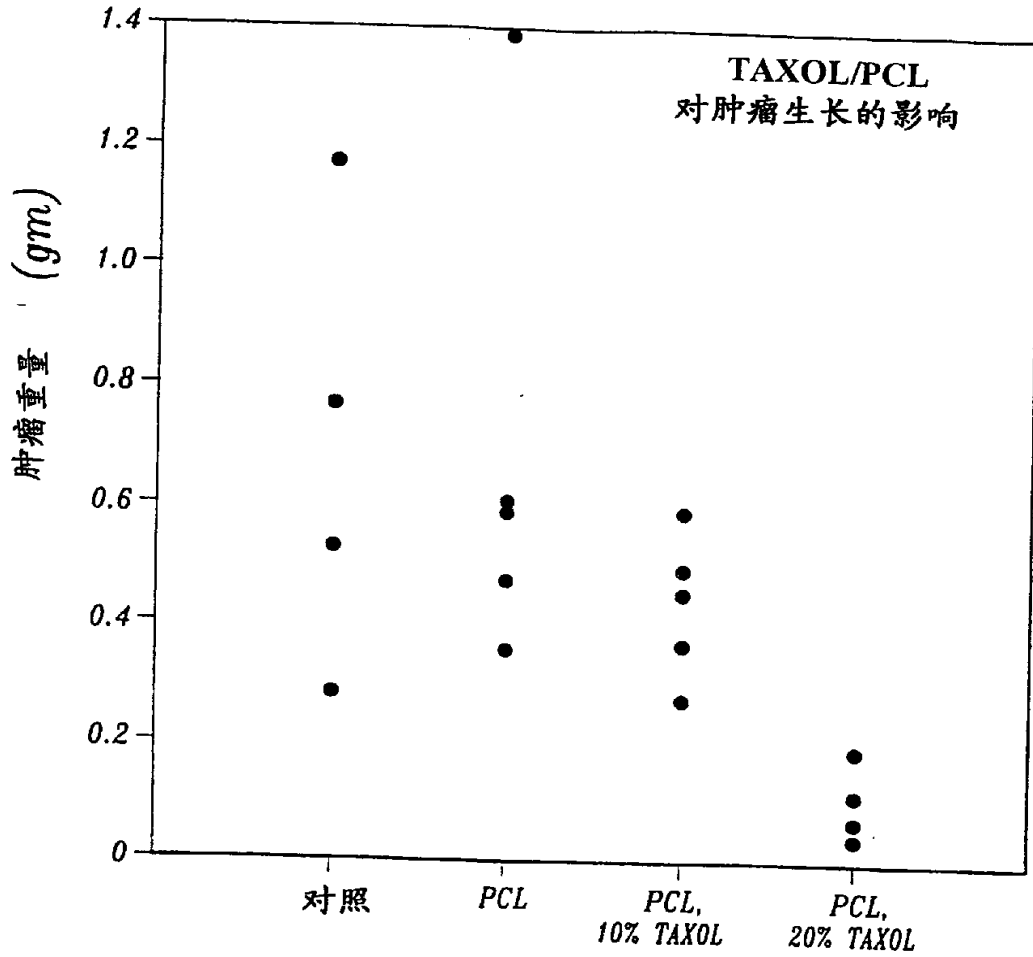


图 43A



对照



20%TAXOL 糊

肿瘤横切片

图43B



20%TAXOL 糊



10% TAXOL 糊

肿瘤横切片

图43C

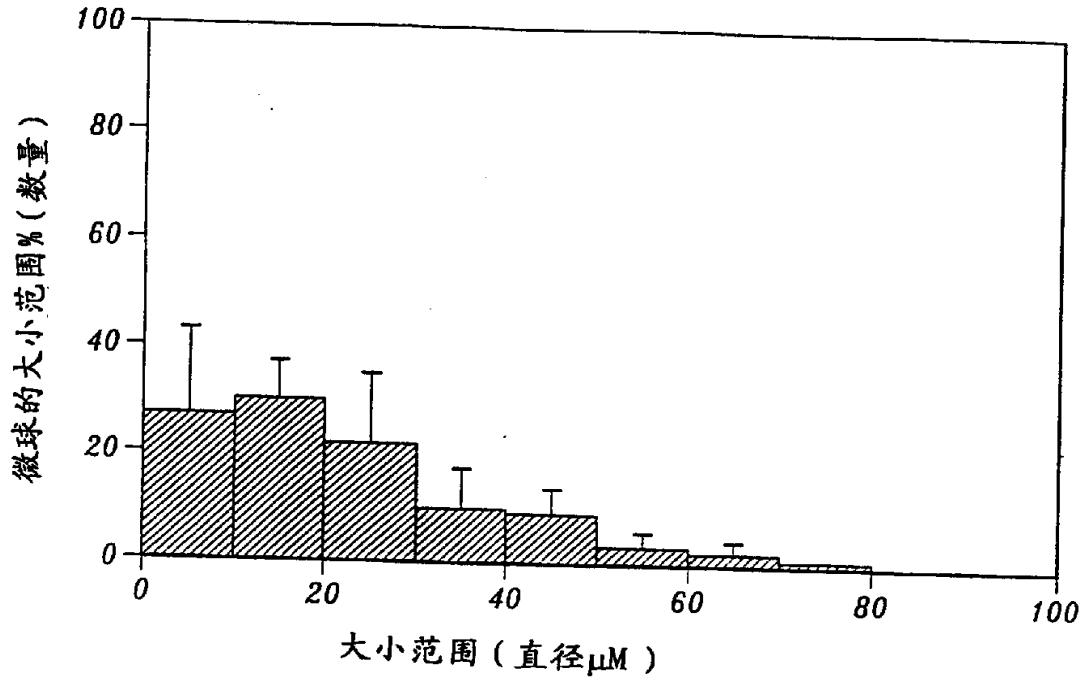


Fig. 44

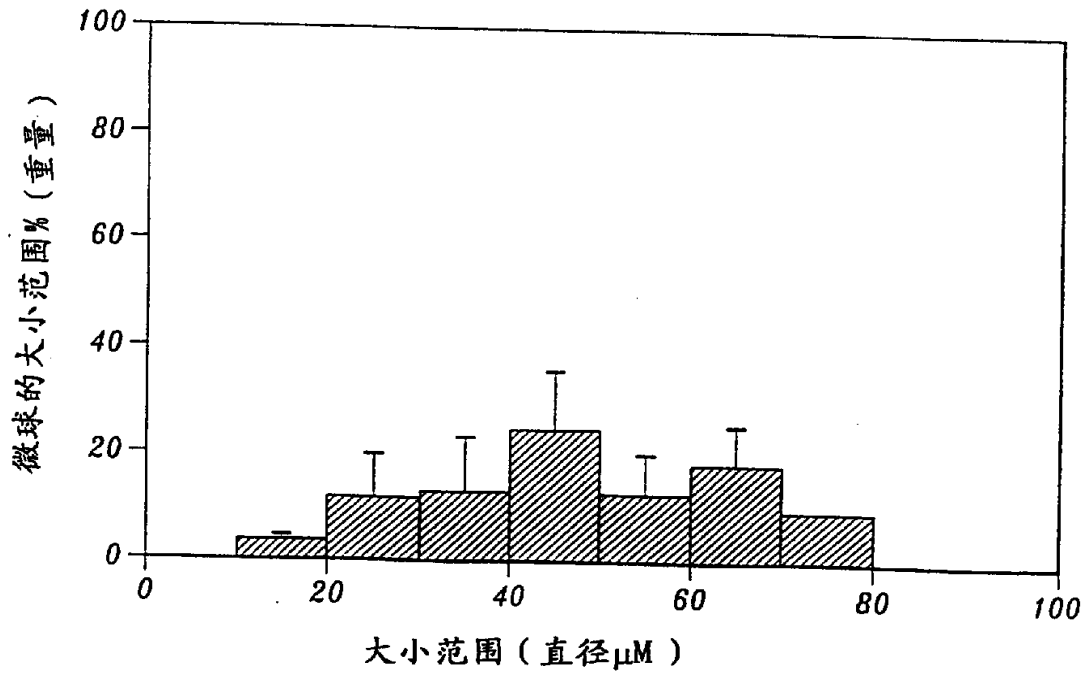


图 45

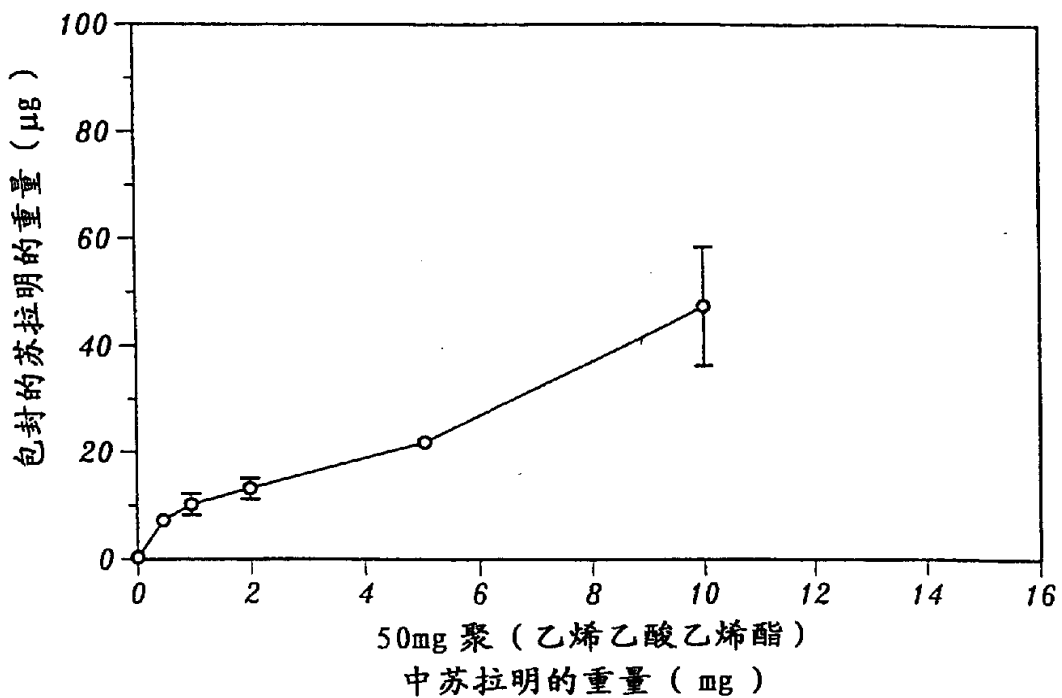


图 46

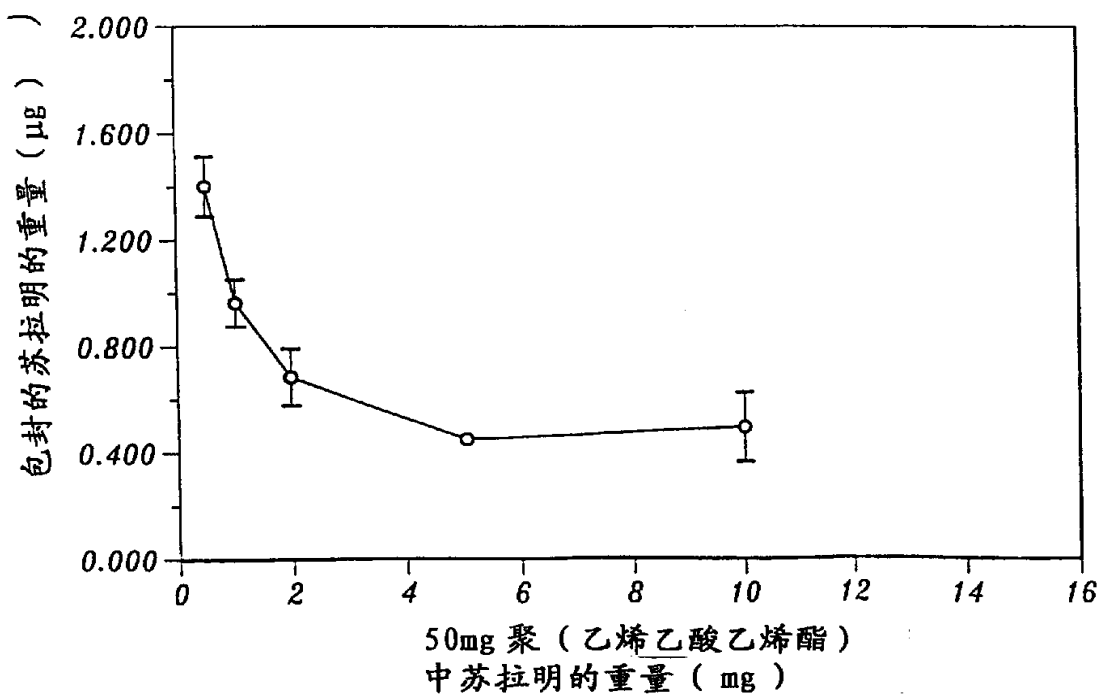


图 47

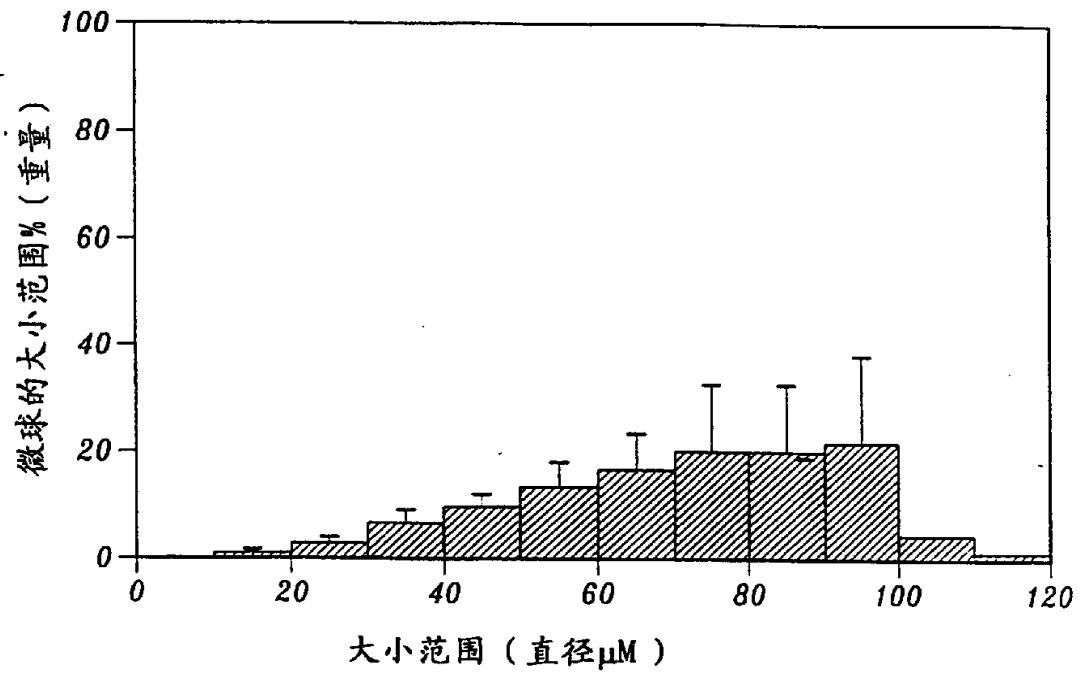


图 48

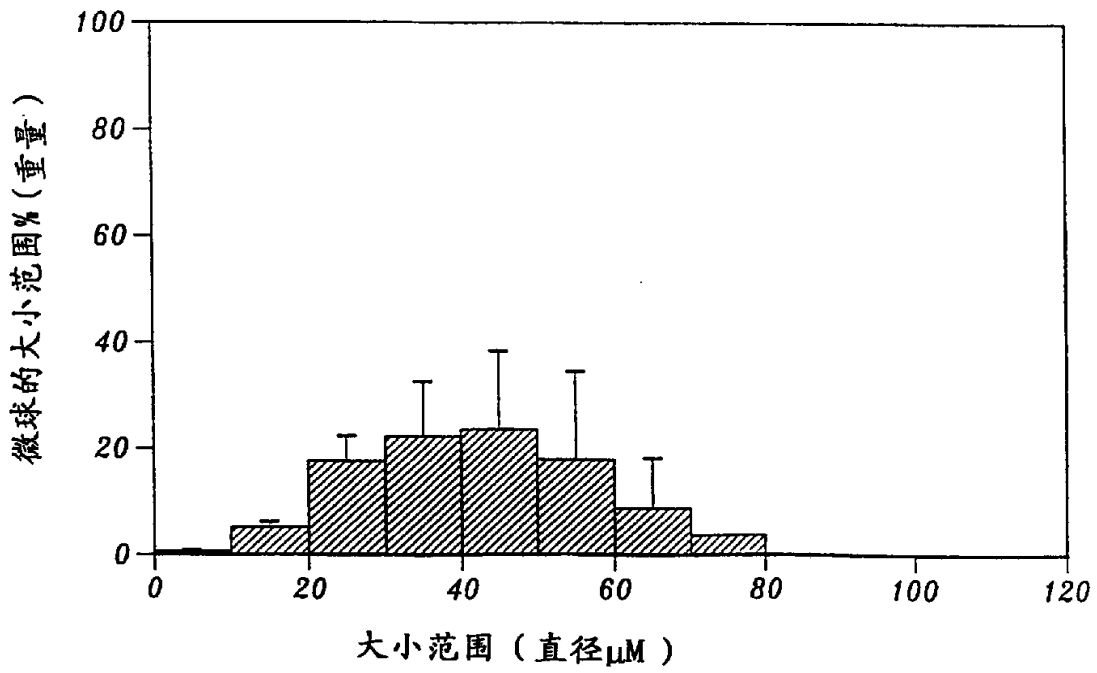


图 49

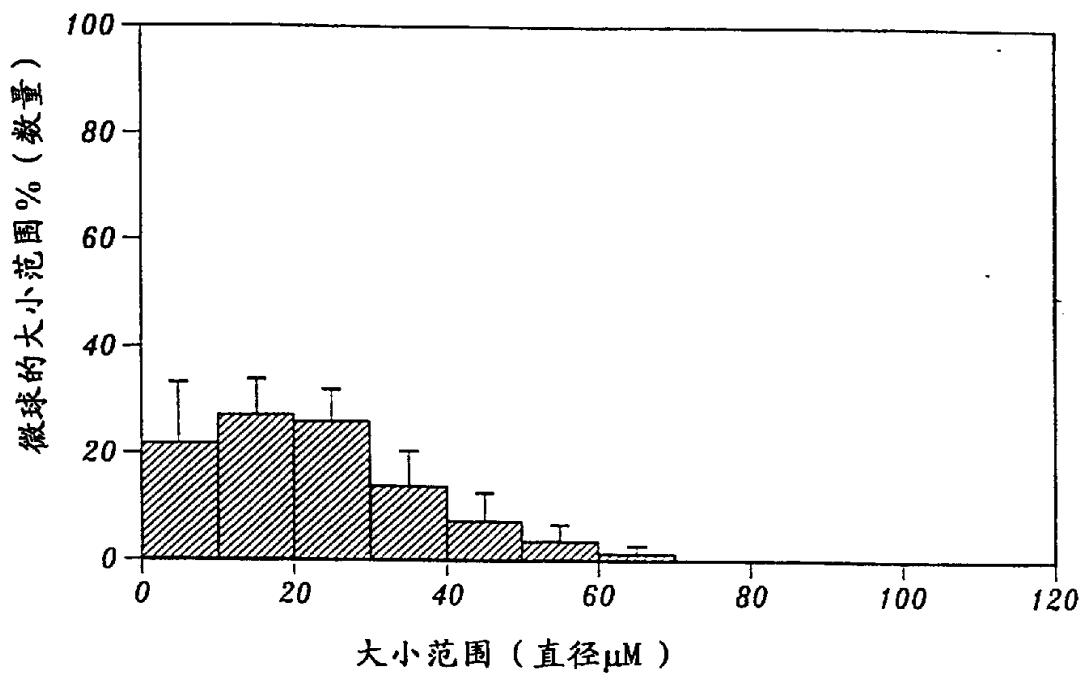


图 50

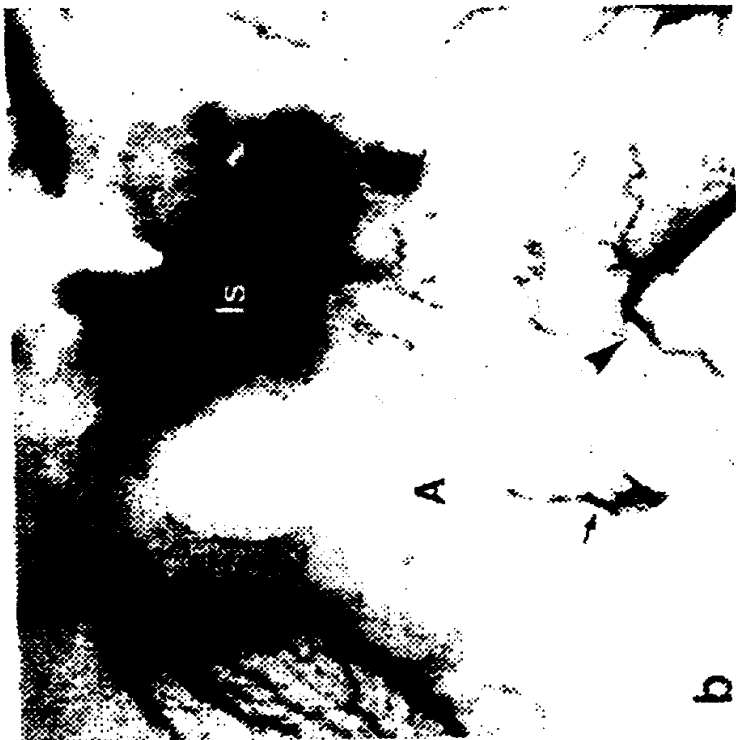


图 51B



图 51A

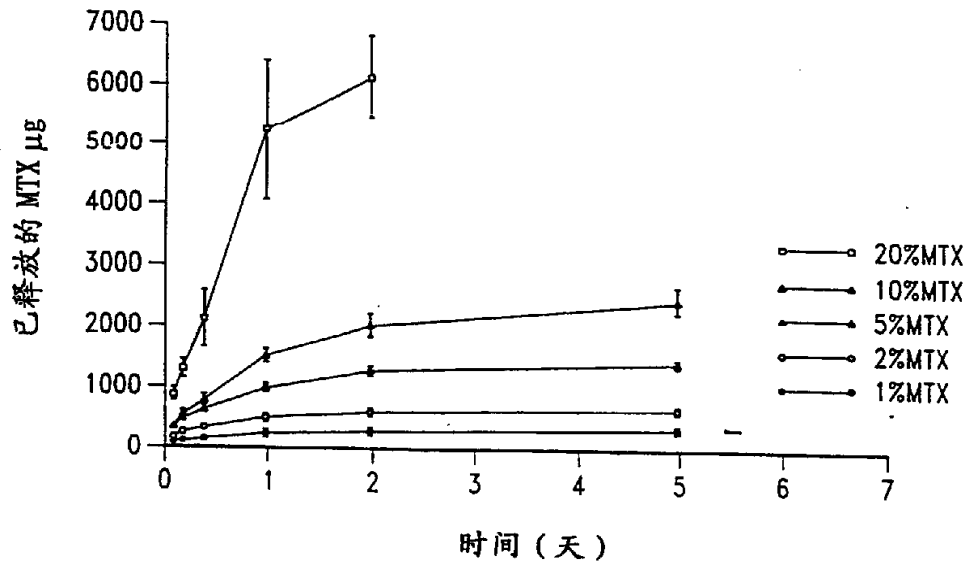


图 52A

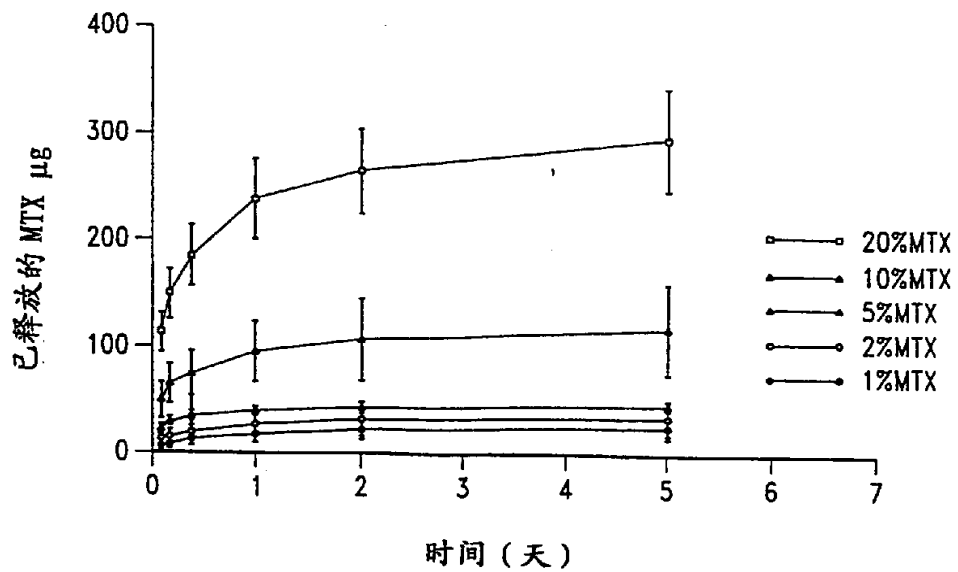


图 52B

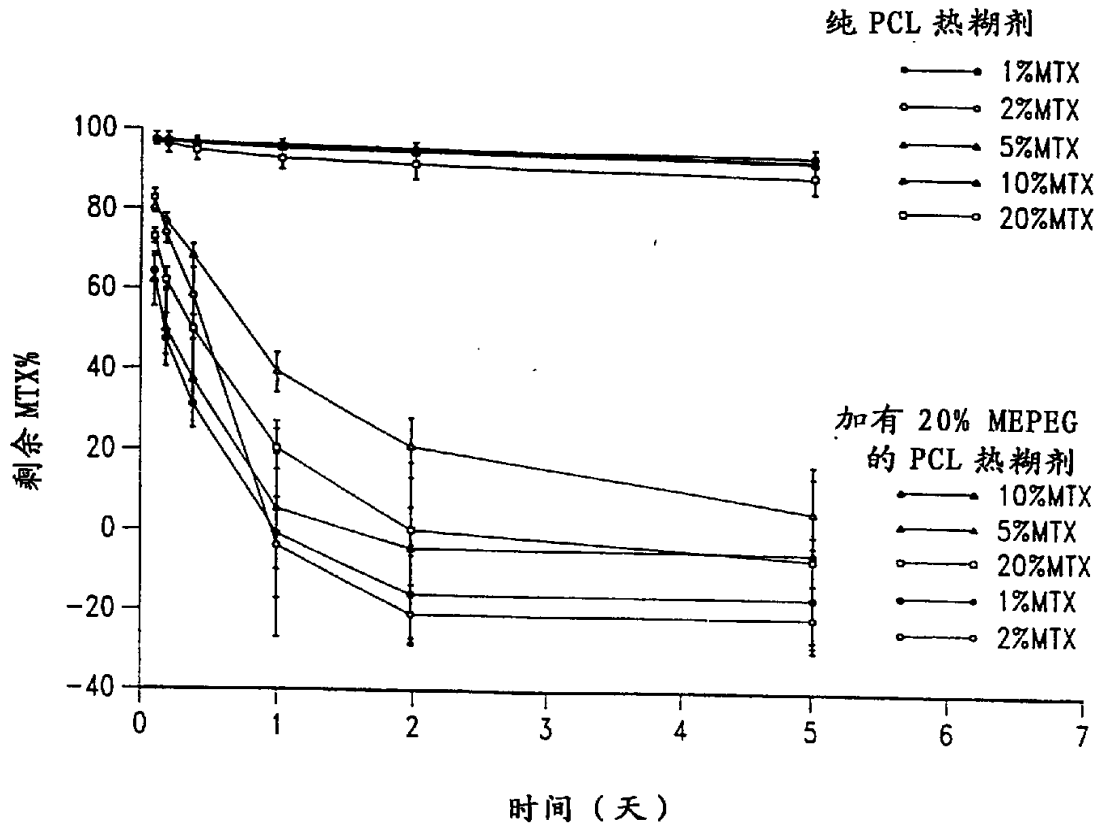
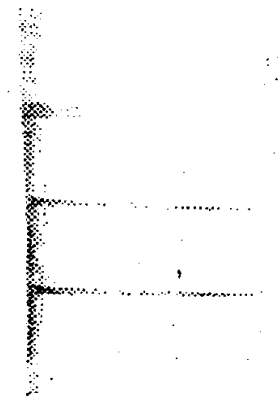


图 52C

PCL 皿中的 MTX

1% 2% 5% 10% 20%



PCL 皿中的 MTX
(加 20% MEPEG)

1% 2% 5% 10% 20%

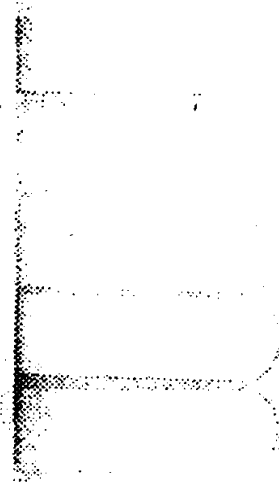


图 52D

图 52E

114

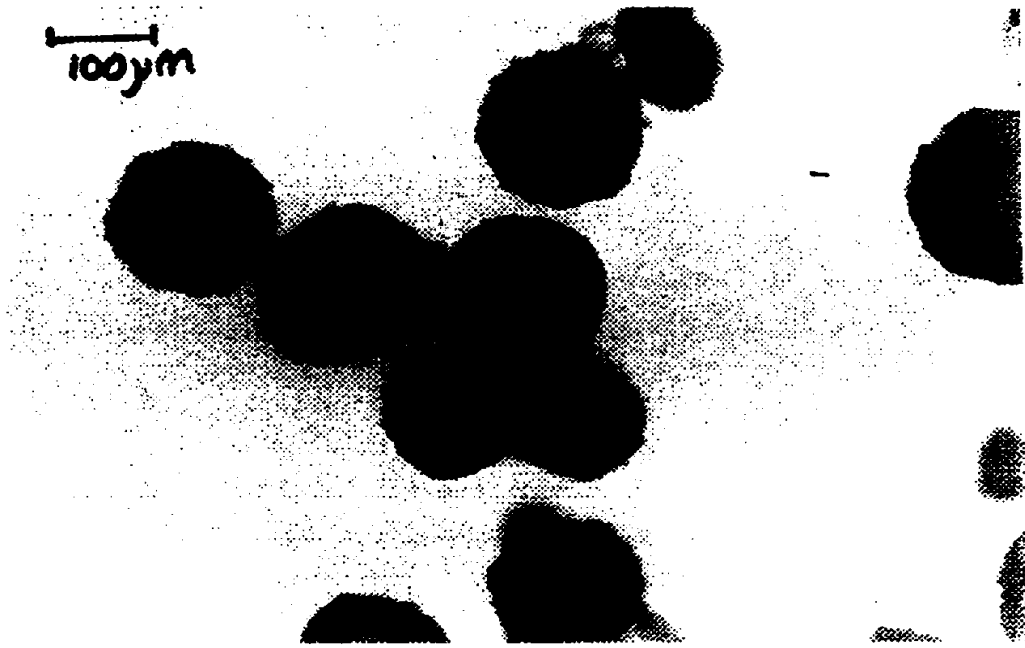


图 53

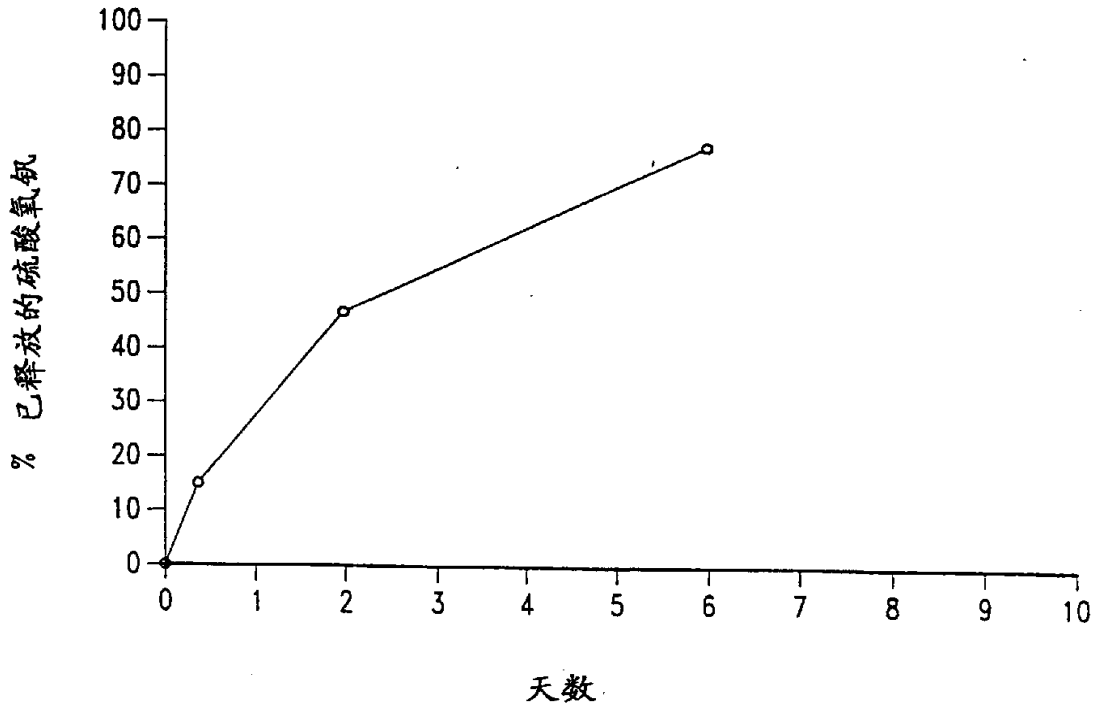


图 54



图 55

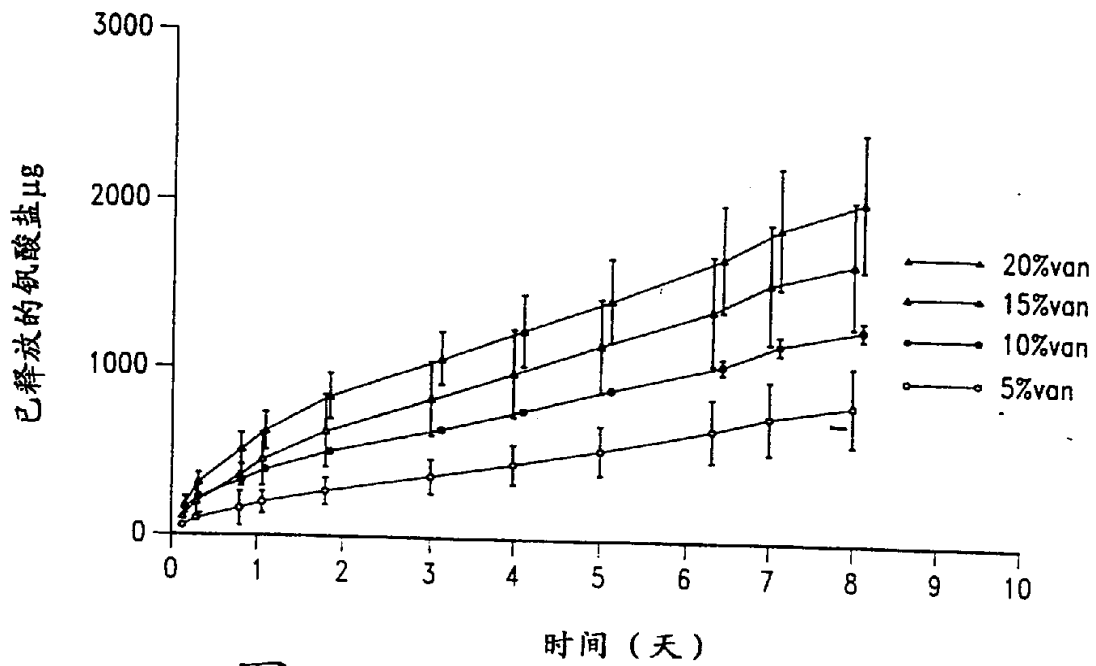


图 56A

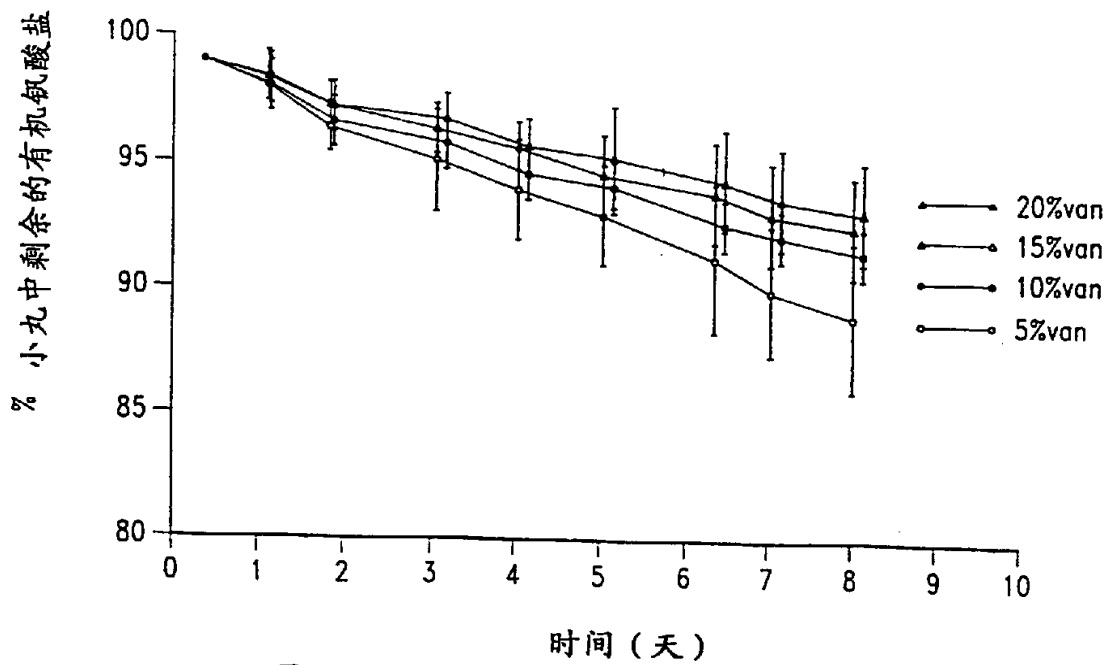


图 56B

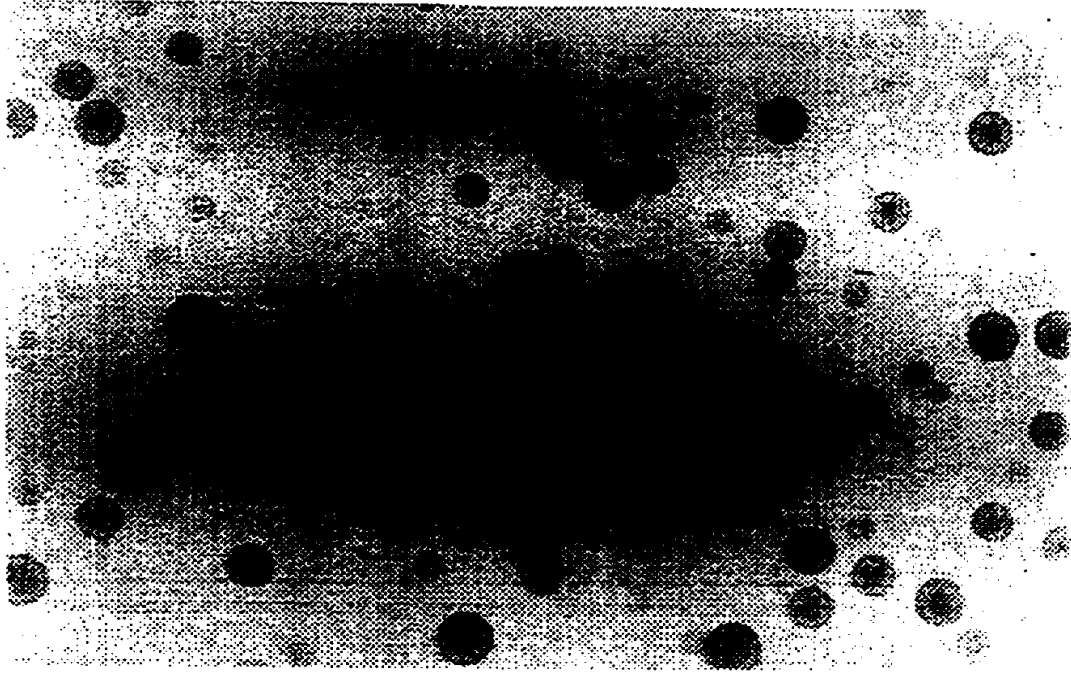


图 57

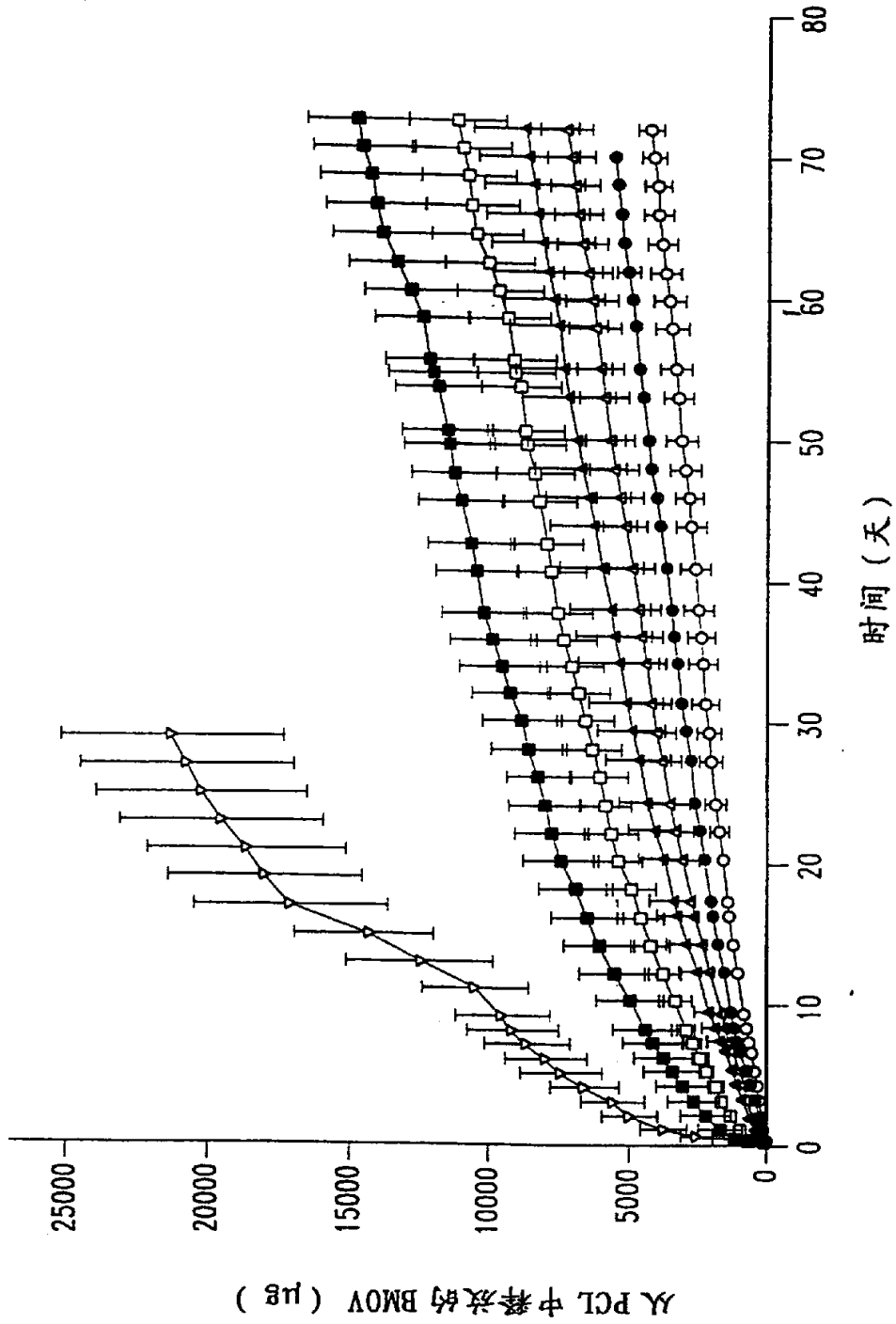


图 58A

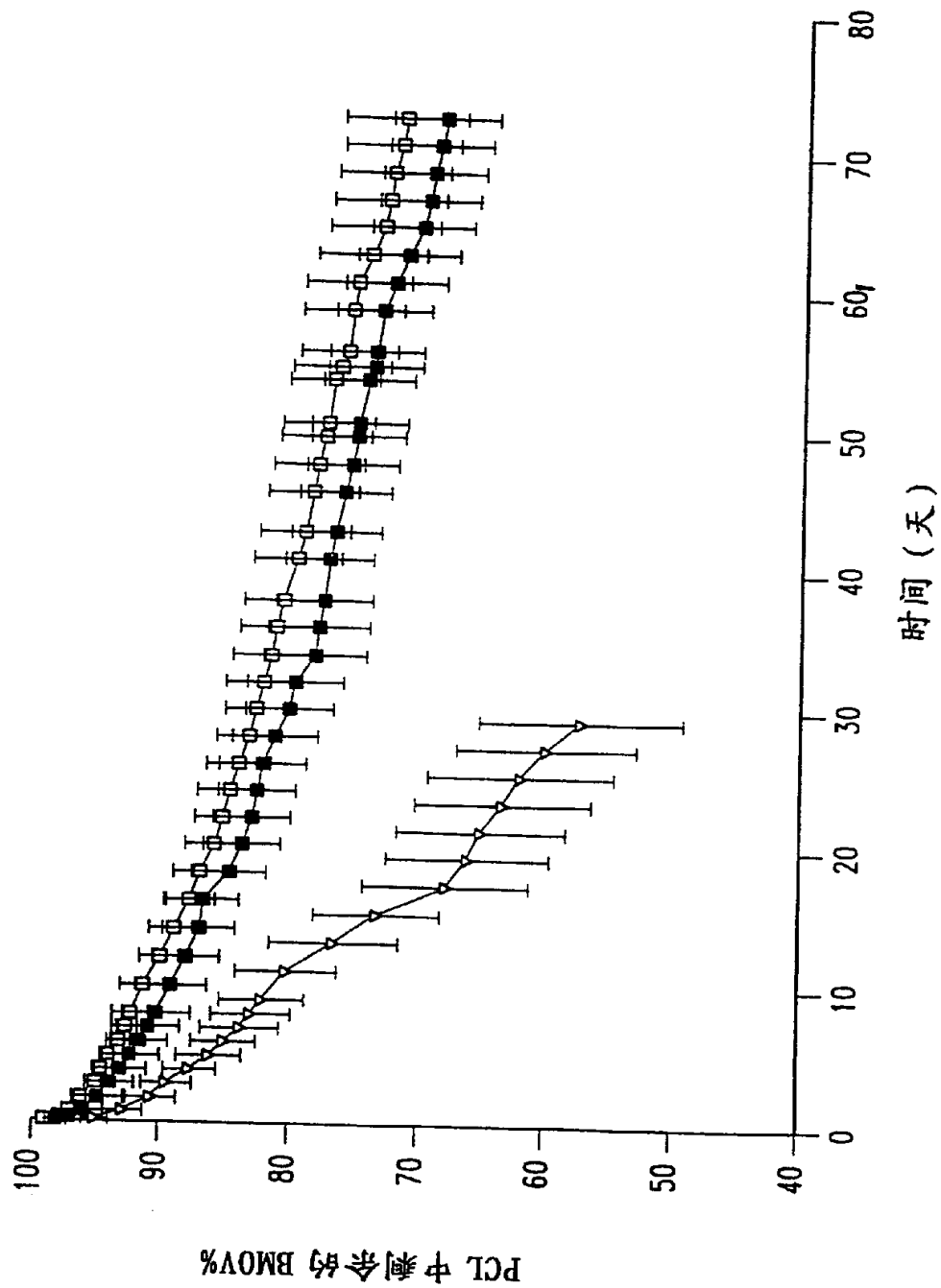


图 58B

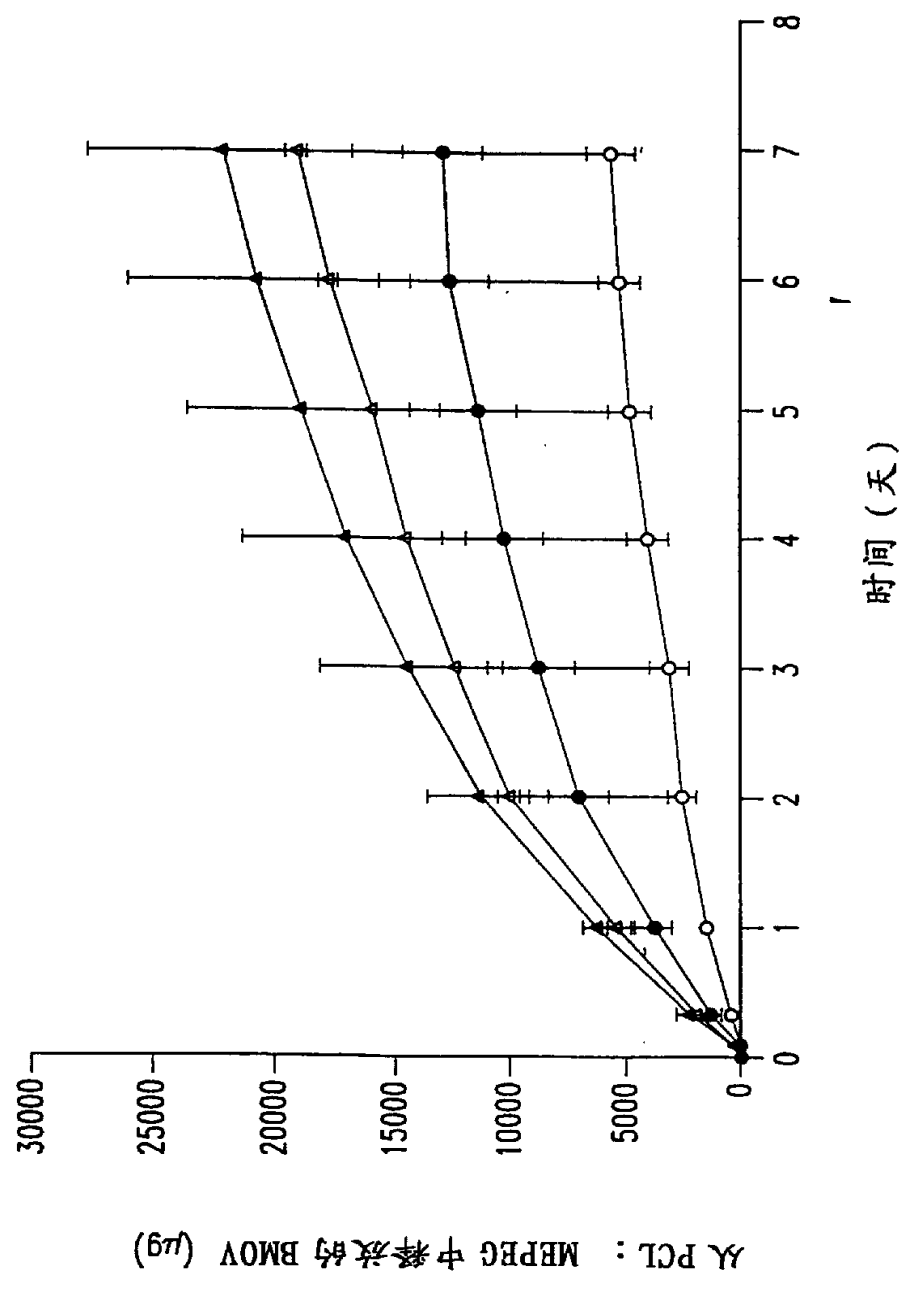


图 59A

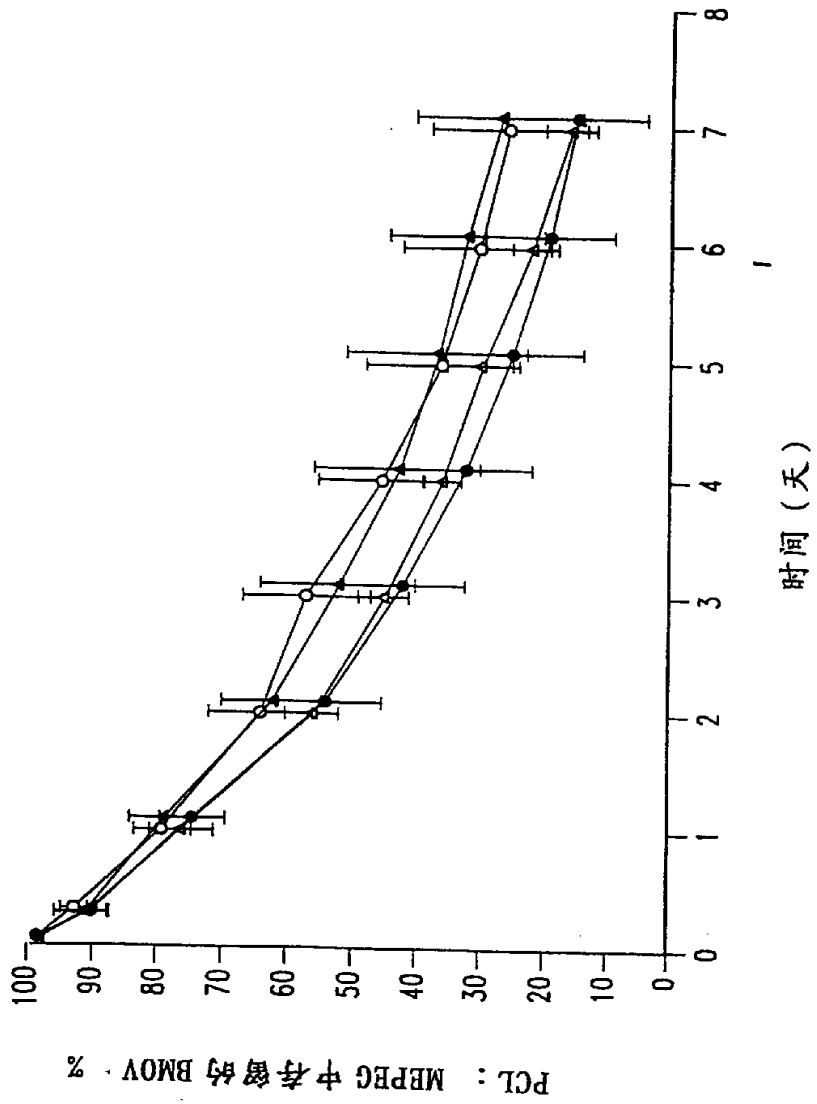


图 59B



图 60A

114



图 60B



图 60C

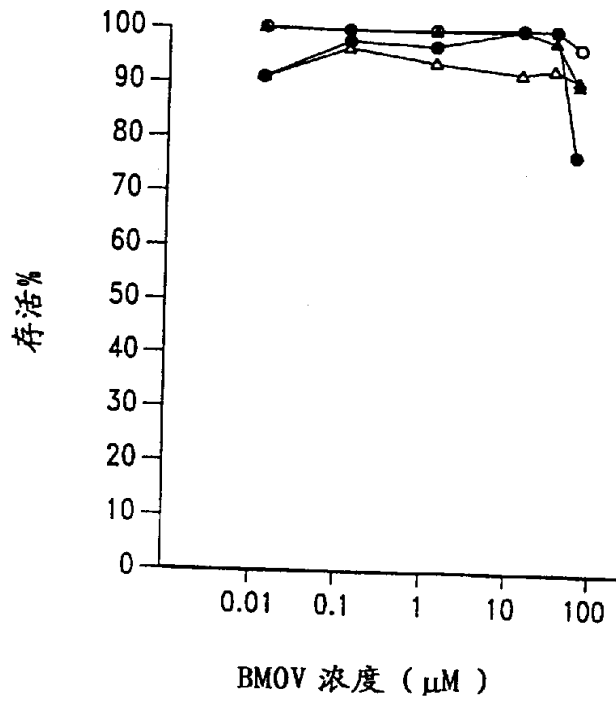


图 61A

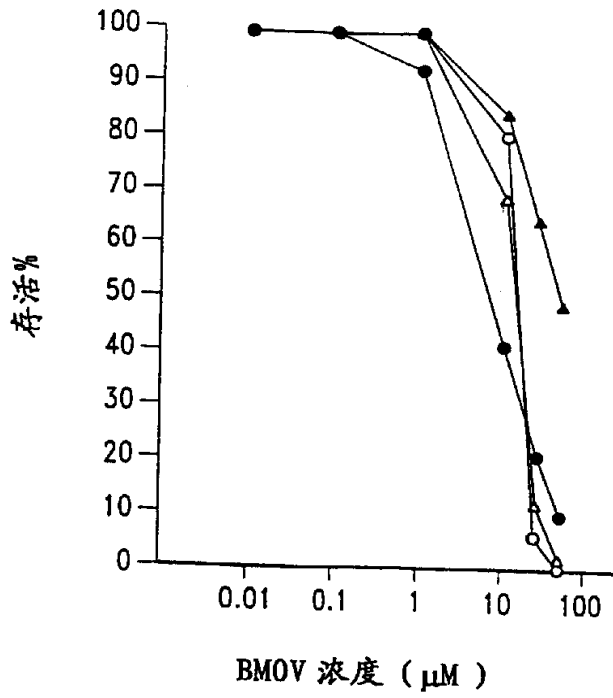


图 61B

1. 加载 BMOV 的糊对小鼠体内生长的 MDAY-D2 肿瘤的重量的影响

		肿瘤重量 (g)			
		对照	25% BMOV	30% BMOV	35% BMOV
		1.68	1.05	--	--
		1.01	0.48	--	--
		0.96	0.20	--	--
		0.91	0.14	--	--
		1.23	0.80	--	--
平均值		1.16	0.53	--	--
标准偏差		0.32	0.39	--	--
		1.15	--	0.02	0.36
		1.12	--	0.17	0.50
		1.04	--	0.13	0.15
		2.05	--	1.40	0.69
		1.02	--	0.37	0.16
		2.25	--	0.20	0.00
平均值		1.57	--	0.38	0.31
标准偏差		0.53	--	0.51	0.25

图 62



2. 加载 BMOV 的 PCL : MePEG 糊剂对小鼠体内 RIF-1 肿瘤生长的重量的影响

动物	治疗	肿瘤重量 (g)		
		第 4 天	第 5 天	第 6 天
1	对照	0.162	0.226	--
2	对照	0.131	0.146	0.114.
3	对照	0.133	0.173 -	0.233
4	对照	0.000	0.024	0.027
5	对照	0.122	0.148	0.161
6	对照	0.173	0.078	0.164
7-12	5% BMOV	0.000	0.000	0.000

图 63

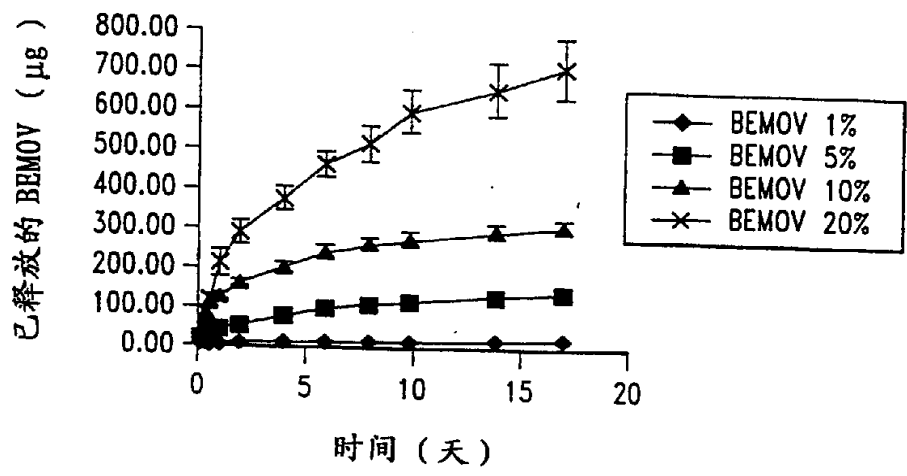


图 64A

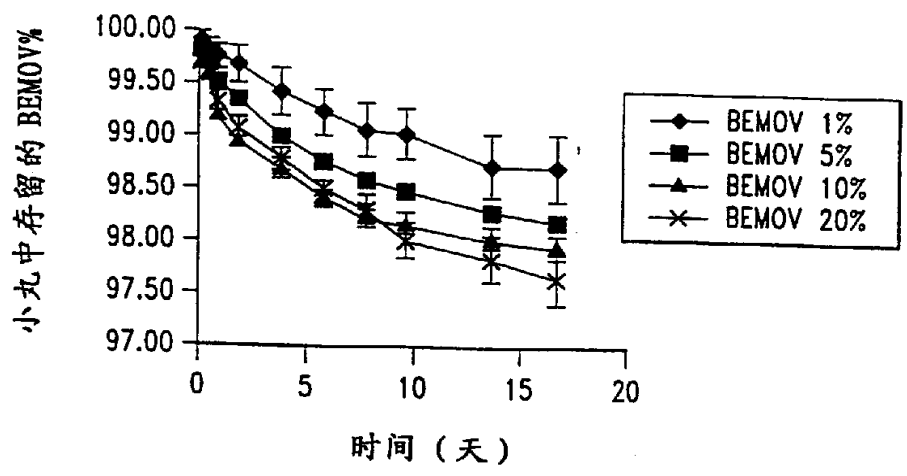


图 64B

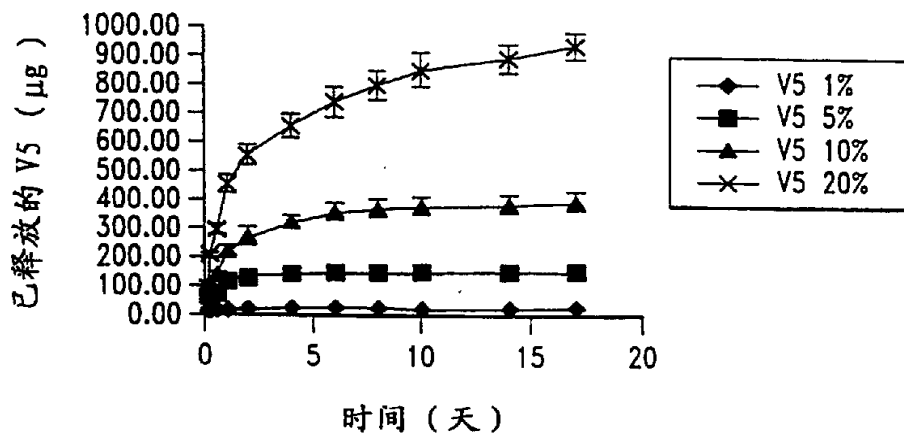


图 65A

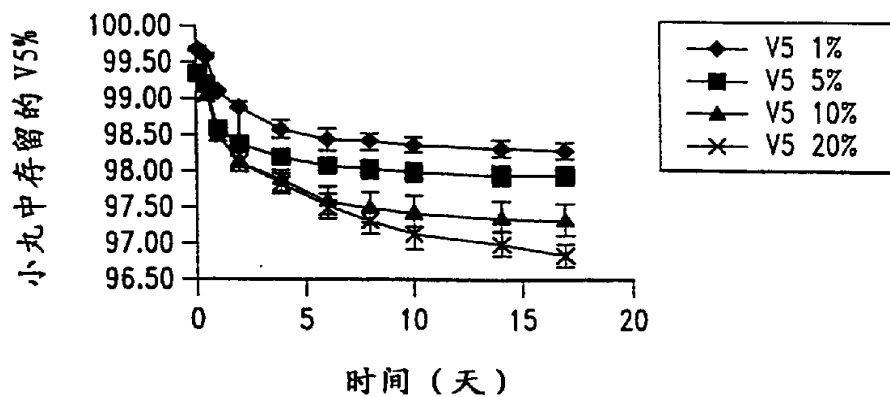


图 65B

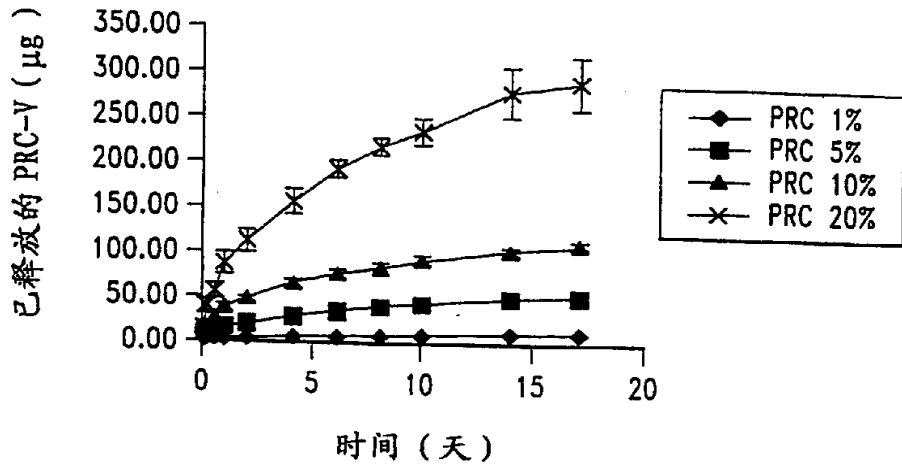


图 66A

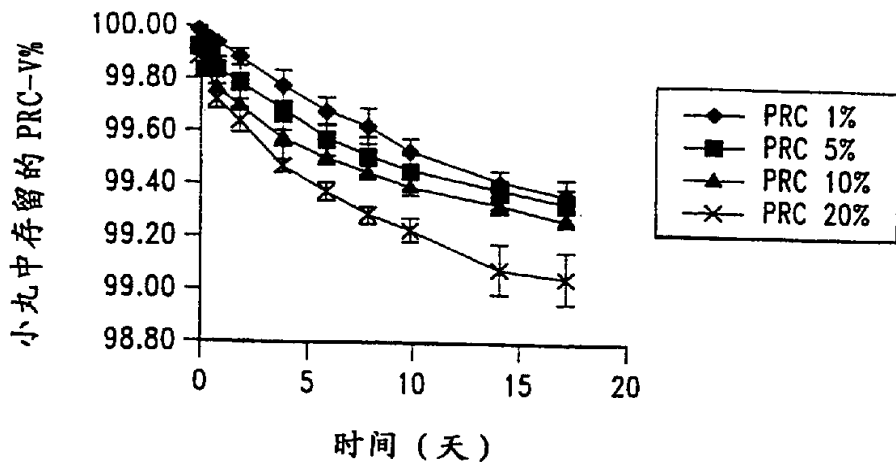


图 66B

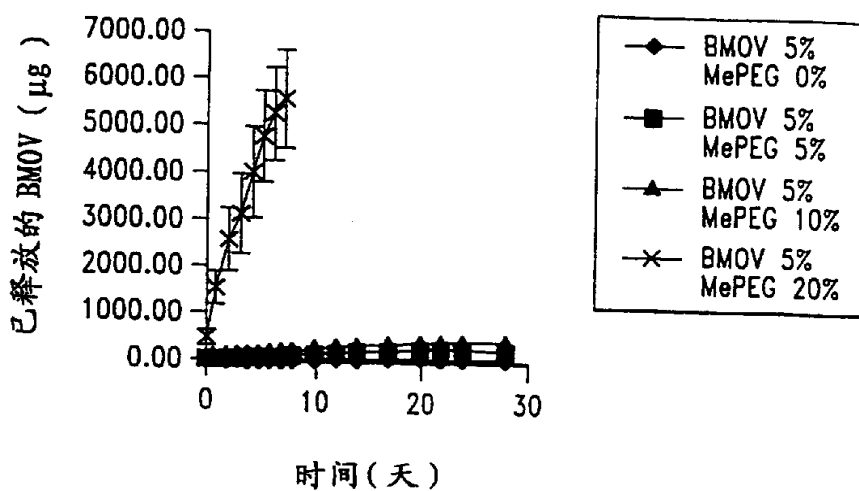
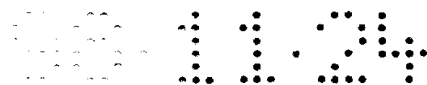


图 67A

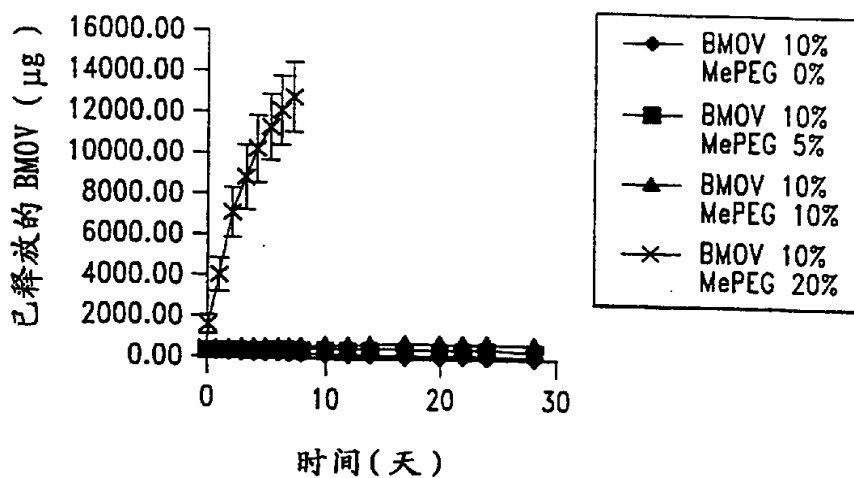


图 67B

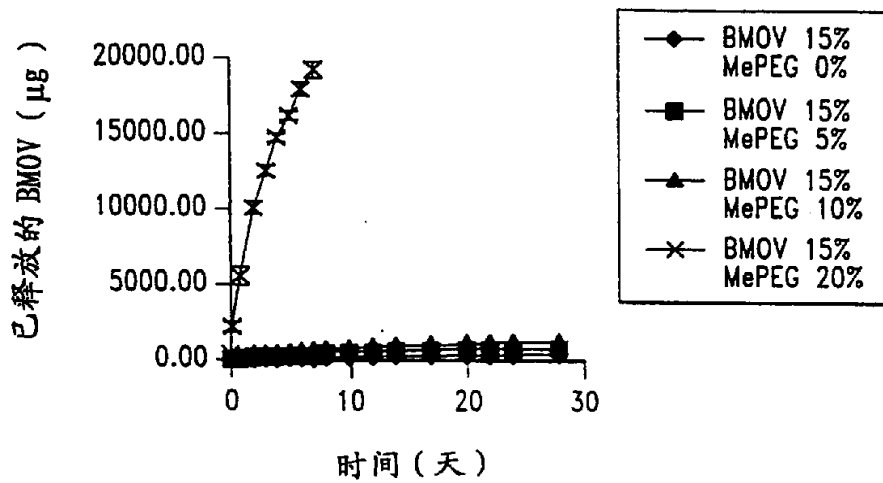


图 67C

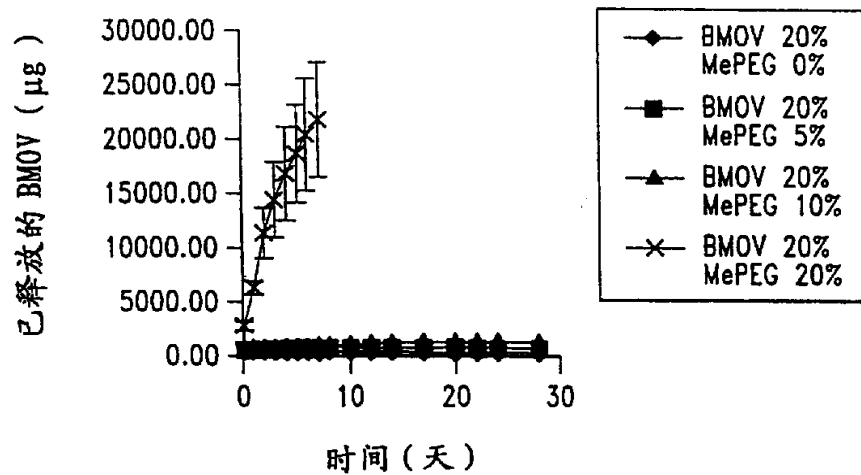


图 67D

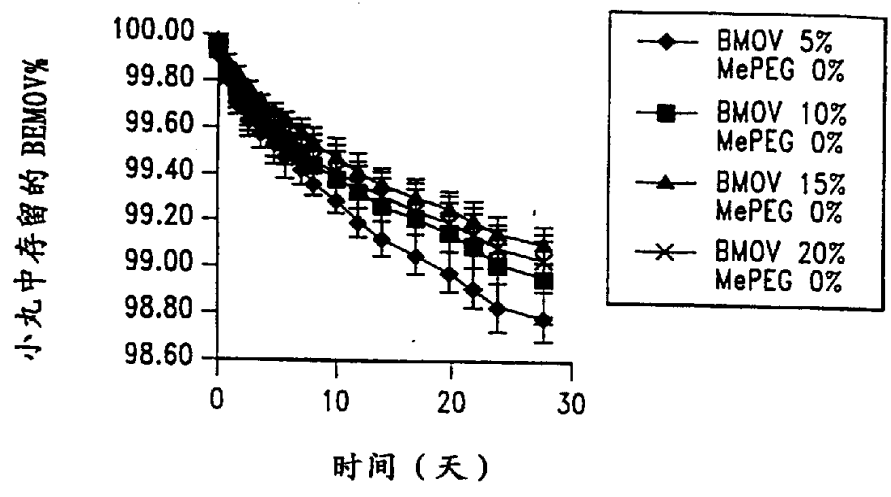


图 68A

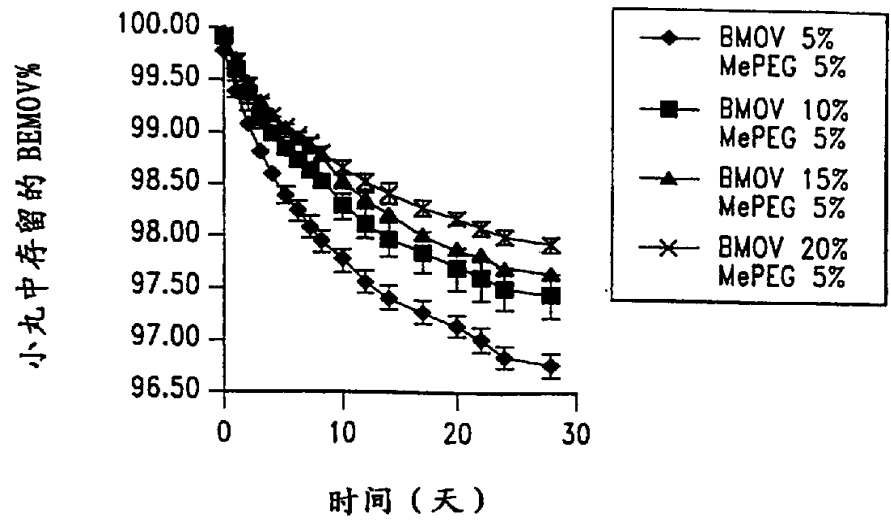


图 68B

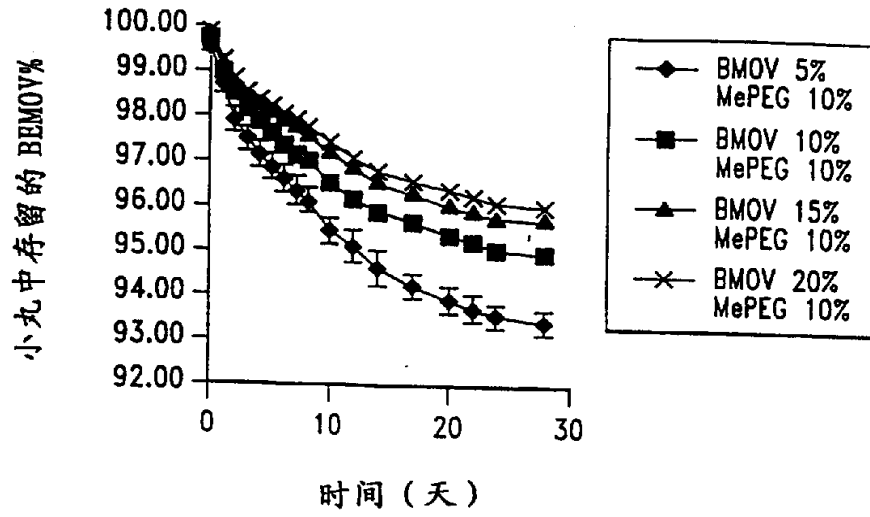


图 68C

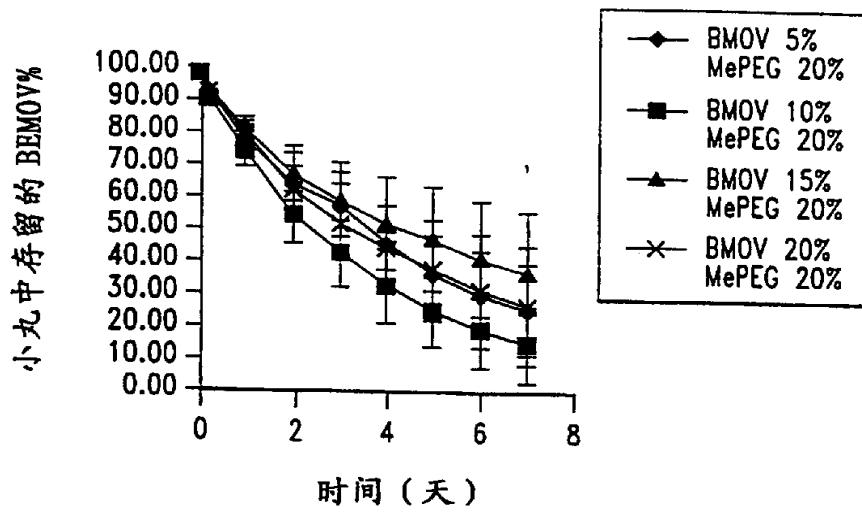


图 68D



图 69B



图 69A

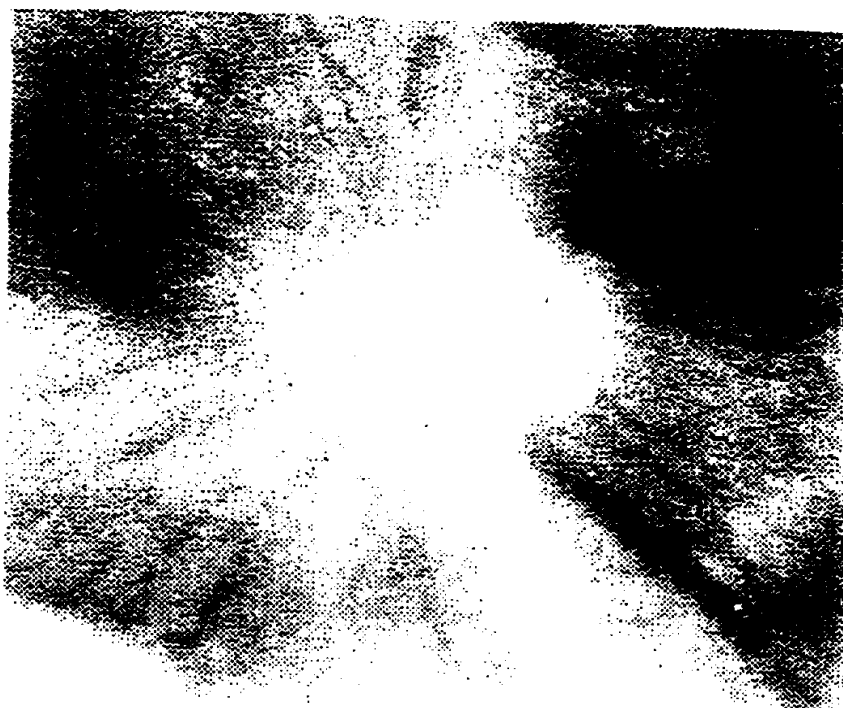


图 70A

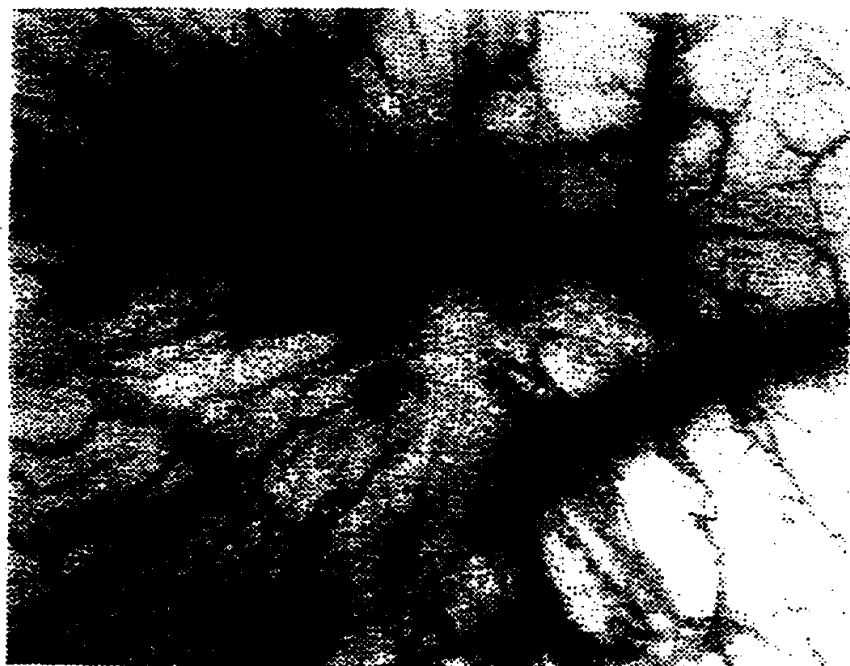


图 70B

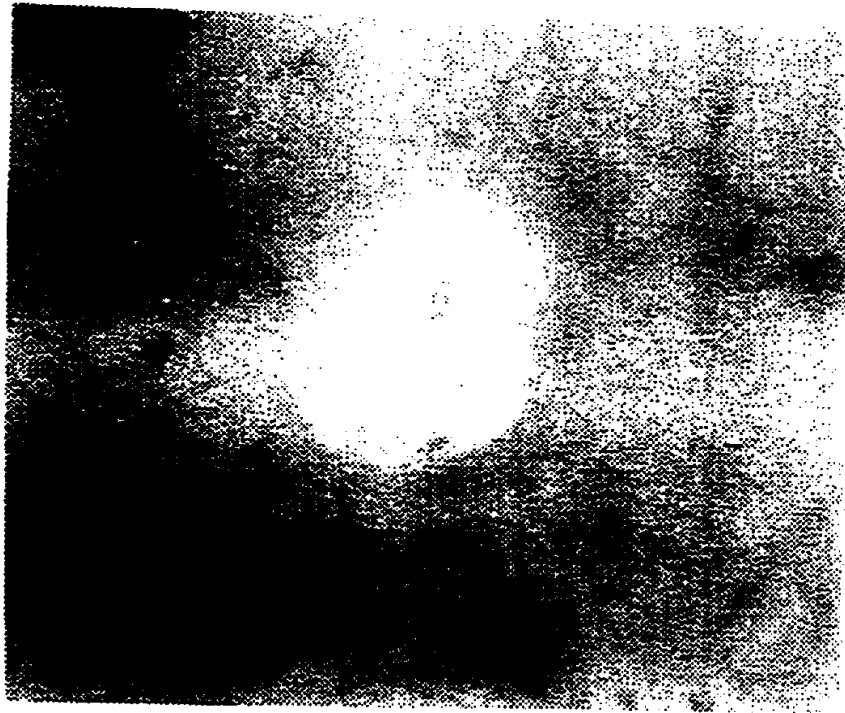


图 70C

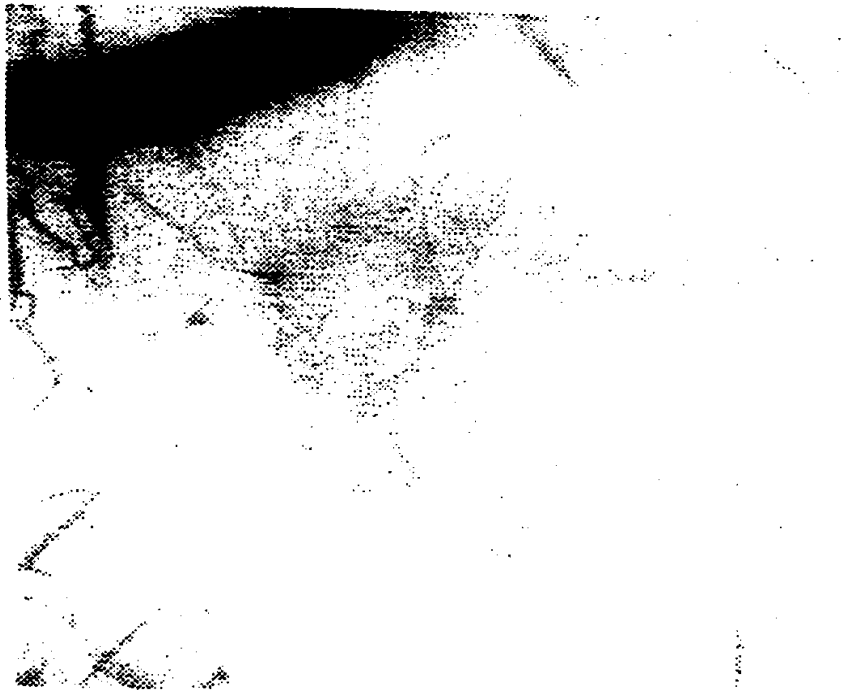


图 70D