



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102740834 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 17

(21) 申请号 201080060367. 2

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 12. 29

A61K 9/127(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 31/436(2006. 01)

10-2009-0134617 2009. 12. 30 KR

A61P 35/00(2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 07. 02

(86) PCT申请的申请数据

PCT/KR2010/009476 2010. 12. 29

(87) PCT申请的公布数据

W02011/081430 KO 2011. 07. 07

(71) 申请人 株式会社三养生物制药

地址 韩国首尔

(72) 发明人 姜惠媛 徐敏孝 李思元 金峰五

崔恩卿 郑盛允 禹汉娜

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司

11002

代理人 谢顺星 张晶

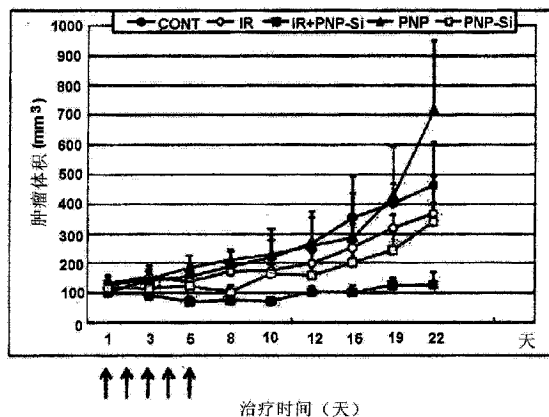
权利要求书 2 页 说明书 13 页 附图 4 页

(54) 发明名称

具有提升的水溶解度的含雷帕霉素的高分子纳米粒子注射剂型组合物及其制备方法, 以及用于与放射线疗法联用的抗癌组合物

(57) 摘要

本发明涉及具有提升的水溶解度的含雷帕霉素的高分子纳米粒子注射剂型组合物。更详细地, 涉及通过将水溶解度低的雷帕霉素增容成高分子纳米粒子而提升水溶解度的含雷帕霉素的注射剂型组合物及其制备方法, 以及用于与放射线疗法联用的抗癌组合物。



1. 一种含雷帕霉素的高分子纳米粒子注射剂型组合物,其特征在于,所述含雷帕霉素的高分子纳米粒子注射剂型组合物包含:

- i) 由亲水性嵌段(A)与疏水性嵌段(B)构成的A-B型双嵌段共聚物;
- ii) 末端至少含有一个羧基的聚乳酸或其衍生物的碱金属盐;以及
- iii) 作为活性成分的雷帕霉素;

在此,所述A-B型双嵌段共聚物与聚乳酸或其衍生物的碱金属盐所形成的胶束的内部包封有雷帕霉素。

2. 根据权利要求1所述的含雷帕霉素的高分子纳米粒子注射剂型组合物,其特征在于,所述双嵌段共聚物的亲水性嵌段(A)的数均分子量为500~20000道尔顿、所述疏水性嵌段(B)的数均分子量为500~10000道尔顿,以双嵌段共聚物整体100重量%为基准,双嵌段共聚物内的亲水性嵌段(A)的含量为40~70重量%。

3. 根据权利要求1所述的含雷帕霉素的高分子纳米粒子注射剂型组合物,其特征在于,所述亲水性嵌段(A)为聚乙二醇或甲氧基聚乙二醇,所述疏水性嵌段(B)选自聚乳酸、聚丙交酯、聚乙交酯、聚扁桃酸、聚己内酯、聚二氧六环-2-酮、聚氨基酸、聚原酸酯、聚酸酐及它们的共聚物中的一种以上。

4. 根据权利要求1所述的含雷帕霉素的高分子纳米粒子注射剂型组合物,其特征在于,末端至少含有一个羧基的聚乳酸或其衍生物选自聚乳酸、聚丙交酯、聚乙交酯、聚扁桃酸、聚己内酯、聚酸酐及它们的共聚物中的一种以上,其数均分子量为500~2500道尔顿。

5. 根据权利要求1所述的含雷帕霉素的高分子纳米粒子注射剂型组合物,其特征在于,所述碱金属选自钠、钾及锂中的一种以上的1价金属。

6. 根据权利要求1所述的雷帕霉素高分子纳米粒子注射剂型组合物,其特征在于,还包含2价或3价的金属离子。

7. 根据权利要求6所述的含雷帕霉素的高分子纳米粒子注射剂型组合物,其特征在于,所述2价或3价的金属离子选自钙、镁、钡、铬、铁、锰、镍、铜、锌及铝的金属的2价或3价阳离子。

8. 根据权利要求1所述的含雷帕霉素的高分子纳米粒子注射剂型组合物,其特征在于,A-B型双嵌段共聚物与末端至少含有一个羧基的聚乳酸或其衍生物的碱金属盐的重量比为9:1~3:7。

9. 根据权利要求1所述的含雷帕霉素的高分子纳米粒子注射剂型组合物,其特征在于,雷帕霉素的浓度重构为0.1~25mg/mL。

10. 一种含雷帕霉素的高分子纳米粒子注射剂型组合物的制备方法,所述含雷帕霉素的高分子纳米粒子注射剂型组合物的制备方法包括下列步骤:

a) 将i)由亲水性嵌段(A)与疏水性嵌段(B)构成的A-B型双嵌段共聚物、ii)末端至少含有一个羧基的聚乳酸或其衍生物的碱金属盐,以及iii)作为活性成分的雷帕霉素在有机溶剂中进行增容;

b) 从上述步骤a)的产物中去除有机溶剂;以及

c) 在上述步骤b)的产物中加入水性介质。

11. 根据权利要求10所述的含雷帕霉素的高分子纳米粒子注射剂型组合物的制备方法,其特征在于,在所述步骤c)之后,还包括在其产物中添加2价或3价金属离子的步骤

(c-1)。

12. 一种用于与放射性疗法联用的抗癌组合物,所述用于与放射性疗法联用的抗癌组合物包含:

- i) 由亲水性嵌段(A)与疏水性嵌段(B)构成的A-B型双嵌段共聚物;
- ii) 末端至少含有一个羧基的聚乳酸或其衍生物的碱金属盐;以及
- iii) 作为活性成分的雷帕霉素;

在此,所述A-B型双嵌段共聚物与聚乳酸或其衍生物的碱金属盐所形成的纳米粒子的内部包封有雷帕霉素。

13. 根据权利要求12所述的用于与放射性疗法联用的抗癌组合物,其特征在于,还包含2价或3价的金属离子。

14. 根据权利要求12所述的用于与放射性疗法联用的抗癌组合物,其特征在于,在放射性照射前1分钟~7天前给药。

15. 根据权利要求12所述的用于与放射性疗法联用的抗癌组合物,其特征在于,其用于经过4~12周的期间、每周并行实施1~5次化学疗法与放射线疗法的联用疗法。

16. 一种哺乳动物癌细胞的放射线治疗方法,其特征在于,对哺乳动物的癌细胞进行放射线照射时,在照射前或照射后,给药权利要求1至权利要求9中任意一项的含雷帕霉素的高分子纳米粒子注射剂型组合物,从而增进对哺乳动物癌细胞的放射线治疗的敏感性。

具有提升的水溶解度的含雷帕霉素的高分子纳米粒子注射剂型组合物及其制备方法,以及用于与放射线疗法联用的抗癌组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及具有提升的水溶解度的含雷帕霉素的高分子纳米粒子注射剂型组合物。更详细地,涉及通过将水溶解度低的雷帕霉素增容成高分子纳米粒子而提升水溶解度的含雷帕霉素的注射剂型组合物及其制备方法,以及用于与放射线疗法联用的抗癌组合物。

背景技术

[0002] 雷帕霉素(分子式: $C_{51}H_{79}NO_{13}$,分子量:914.2)也被称为西罗莫司(sirosimus),其作为大环内酯类化合物,由于具有免疫抑制活性,从而被商品化为器官移植患者的移植排斥抑制剂(雷帕霉素(Rapamune))。此外,雷帕霉素除了可以抑制器官移植的排斥,还可用于治疗肺炎(pulmonary inflammation)、全身性红斑狼疮(systemic lupus erythematosis)、牛皮癣等免疫炎症皮肤疾病(immunoinflammatory skin disorders)、免疫炎症肠道疾病(immunoinflammatory bowel disorders)、眼部炎症(ocular inflammation)、再狭窄(restenosis)、风湿性关节炎(rheumatoid arthritis)等。

[0003] 最近,有关于雷帕霉素不仅具有免疫抑制剂的功能,还具有作为哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR:mammalian target of rapamycin)的抑制剂,诱导细胞死亡(apoptosis),破坏癌细胞的抗癌剂功能的报道。但是,由于雷帕霉素对于水的溶解度非常低($1\sim 2\mu\text{g}/\text{mL}$),因此存在经口给药时,吸收率非常低,个体间的生物利用度的变化非常严重的缺点。

[0004] 已被介绍的含雷帕霉素的剂型有雷帕霉素片剂。上述片剂含有蔗糖、乳糖、聚乙二醇 8000、硫酸钙、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮(Povidone)、泊洛沙姆 188、单油酸甘油酯等赋形剂。此外,雷帕霉素经口溶液剂中含有 Phosal 50PG (卵磷脂、丙二醇、单甘油酯、双甘油酯、乙醇、大豆脂肪酸、抗坏血酸棕榈酸酯)与聚山梨醇酯 80,含有 1.5~2.5% 的乙醇。

[0005] 但是,上述雷帕霉素经口溶液剂对人进行经口给药时,生物利用度(absolute bioavailability)约为 14% 左右,将雷帕霉素片剂经口给药时与将雷帕霉素溶液剂经口给药时相比,显示出相对要高约 25% 的生物利用度。但是,两种制剂的生物利用度均在 20% 以下,其原因在于雷帕霉素对水的低溶解度。

[0006] 因此,利用多种增容技术,进行了各种制剂化雷帕霉素的尝试。美国第 5,559,121 号专利中公开了一种胶囊制剂组合物,该胶囊制剂包含一种溶液,该溶液为,在含表面活性剂聚山梨醇酯 80、N,N-二甲基乙酰胺,以及卵磷脂或磷脂中的一种的混合溶液中溶有雷帕霉素的溶液。美国第 5,616,588 号专利中公开了一种注射用水溶液组合物,该组合物为,雷帕霉素以 0.1~4mg/mL 的浓度溶解在丙二醇水溶液中,并且不含有非离子性表面活性剂。但是,现有的雷帕霉素注射用水溶液的情况下,因水溶液的稳定性降低,存在需要在很短的时间内进行给药的缺点。目前没有以商业化进行销售的注射剂型。

[0007] 另一方面,韩国第 0160957 号专利公开了一种用于抑制器官或组织移植排斥的组

合物,该组合物含有雷帕霉素,雷帕霉素的含量为对抑制哺乳类的器官或组织的移植排斥有效的量。但是,该专利中公开了将雷帕霉素与橄榄油等油,乙醇、丙二醇及聚乙二醇、聚氧乙烯蓖麻油、聚山梨醇酯 80 等表面活性剂一起使用的情况。

[0008] 另一方面,美国第 6,322,805 号与 6,616,941 号专利中公开了一种利用两亲性嵌段共聚物的高分子胶束,该两亲性嵌段共聚物是采用作为能够使难溶性药物增溶的技术,将作为亲水性嵌段的聚乙二醇(A)与作为疏水性嵌段的聚乳酸(B)结合为 A-B 型的双嵌段。但是,没有公开利用上述高分子胶束对雷帕霉素进行增溶的具体实例。

发明内容

[0009] 要解决的技术问题

[0010] 本发明用于解决如上所述的现有技术中存在的问题,以提供一种不含有有机溶剂、活体适合性优异,并且仅使用生物可降解的高分子而能够进行静脉注射、皮下/肌肉注射的含雷帕霉素的高分子纳米粒子注射剂型组合物,以及其制备方法和用于与放射性疗法联用的抗癌组合物作为技术问题。

[0011] 技术方案

[0012] 为了解决上述技术问题,本发明提供一种含雷帕霉素的高分子纳米粒子注射剂型组合物。其特征为,所述含雷帕霉素的高分子纳米粒子注射剂型组合物包含:i)由亲水性嵌段(A)与疏水性嵌段(B)构成的 A-B 型双嵌段共聚物;ii)末端至少含有一个羧基的聚乳酸或其衍生物的碱金属盐;以及 iii)作为活性成分的雷帕霉素;在此,所述 A-B 型双嵌段共聚物与聚乳酸或其衍生物的碱金属盐所形成的胶束的内部包封有雷帕霉素。

[0013] 另一方面,本发明提供一种含雷帕霉素的高分子纳米粒子注射剂型组合物的制备方法,所述含雷帕霉素的高分子纳米粒子注射剂型组合物的制备方法包括下列步骤:

[0014] (a)将(i)由亲水性嵌段(A)与疏水性嵌段(B)构成的 A-B 型双嵌段共聚物、(ii)末端至少含有一个羧基的聚乳酸或其衍生物的碱金属盐、以及(iii)作为活性成分的雷帕霉素在有机溶剂中进行增容;(b)从上述步骤(a)的产物中去除有机溶剂;以及(c)在上述步骤(b)的产物中加入水性介质。

[0015] 再一方面,本发明提供一种用于与放射性疗法联用的抗癌组合物,所述用于与放射性疗法联用的抗癌组合物包含:

[0016] (i)由亲水性嵌段(A)与疏水性嵌段(B)构成的 A-B 型双嵌段共聚物;(ii)末端至少含有一个羧基的聚乳酸或其衍生物的碱金属盐;以及(iii)作为活性成分的雷帕霉素。在此,所述 A-B 型双嵌段共聚物与聚乳酸或其衍生物的碱金属盐所形成的纳米粒子的内部包封有雷帕霉素。

[0017] 发明效果

[0018] 上述注射剂型组合物可提供干燥后在水溶液中重构时,雷帕霉素的溶解度为 0.1mg/mL 以上的注射液。根据本发明,雷帕霉素的溶解度可以为 0.1mg/mL 以上,不含有有机溶剂,活体适合性优异,并且仅使用生物可降解的高分子,从而能够获得能够进行静脉注射、皮下/肌肉注射的雷帕霉素注射剂组合物,并且将本发明的组合物与放射线疗法联用,可期待显著提高抗癌功效的效果。

[0019] 本发明的含雷帕霉素注射剂型组合物可以根据协同作用来使放射线照射效果最

大化,从而能够减少放射线治疗时引起的毒性。此外,雷帕霉素作为不仅对放射线有增敏作用,而且具有免疫抑制作用等有力的药理活性的药物,是具有严重副作用的药物之一,此外,由于不溶于水,需要使用增溶剂进行制剂化。目前,用于注射剂的增溶剂为表面活性剂,大部分具有过敏反应等毒性,但本发明的含雷帕霉素注射剂型组合物不仅不会引起增溶剂的毒性,而且使雷帕霉素的用量最小化,从而减少副作用,同时能够最大程度地发挥放射线的增敏作用。

附图说明

[0020] 图 1 为根据制备例 1 的 D, L-PLA-COONa 的 NMR 光谱。

[0021] 图 2 为根据制备例 2 的 mPEG-PLA 的 NMR 光谱。

[0022] 图 3 为表示实验例 1 获得的含雷帕霉素的高分子纳米粒子的体内动态评价的图表。

[0023] 图 4 为表示实验例 2 获得的含雷帕霉素的高分子纳米粒子组合物的放射线增敏作用实验结果的图表。

[0024] 图 5 为表示实验例 3 获得的含雷帕霉素的高分子纳米粒子在试管内的抗癌活性实验的结果的图表。

[0025] 图 6 为表示实验例 4 获得的含雷帕霉素的高分子纳米粒子的体内动态实验结果的图表。

[0026] 图 7 为表示实验例 5 获得的含雷帕霉素的高分子纳米粒子在动物模型中的抗癌功效实验结果的图表。

[0027] 图 8 为表示实验例 6 获得的含雷帕霉素的高分子纳米粒子在动物模型中的放射线增敏作用实验结果的图表。

具体实施方式

[0028] 下面,对本发明进行更详细的说明。

[0029] 本发明中的术语“雷帕霉素”包括雷帕霉素、其衍生物或类似物,以及它们在制药上允许的盐。雷帕霉素的衍生物或类似物具体包括苯甲酰雷帕霉素、依维莫司、替西罗莫司、吡美莫司、白欧利莫斯(bi olinus)等,但不限于这些。此外,术语“纳米粒子”为粒径在纳米级的粒子的总称的概念,包括胶束、混合胶束、纳米囊或纳米球等,其大小不局限于这些,例如可以具有 1~500nm 的粒径。

[0030] 本发明的所述两亲性双嵌段共聚物(i)为由亲水性嵌段(A)与疏水性嵌段(B)构成的 A-B 型双嵌段共聚物,所述亲水性嵌段(A)为聚乙二醇,所述疏水性嵌段(B)为聚乳酸或其衍生物。

[0031] 所述亲水性嵌段(A)的聚乙二醇可以是聚乙二醇、甲氧基聚乙二醇等,但不限于这些。具体为甲氧基聚乙二醇。所述亲水性嵌段(A)的数均分子量优选为 500~20000 道尔顿,更优选为 1000~10000 道尔顿,最优选为 1000~5000 道尔顿。亲水性嵌段(A)的数均分子量不足 500 道尔顿时,则亲水性部分与疏水性部分相比要小,从而有可能使本发明的组合物不溶于水,如果超过 20000 道尔顿时,则亲水性部分太大,从而难以形成胶束。此外,以双嵌段共聚物整体 100 重量%为基准,所述双嵌段共聚物内的亲水性嵌段(A)的含量优选

为 40~70 重量%，更优选为 50~65 重量%，这样有利于能够稳定维持两亲性双嵌段共聚物的胶束。

[0032] 上述疏水性嵌段(B)的聚乳酸或其衍生物例如可以为选自聚乳酸、聚丙交酯、聚乙交酯、聚扁桃酸、聚己内酯、聚二氧六环-2-酮、聚氨基酸、聚原酸酯、聚酸酐及它们的共聚物中的一种以上。更具体地，可以是聚乳酸、聚丙交酯、聚乙交酯、聚扁桃酸、聚己内酯或聚二氧六环-2-酮。根据本发明的一个具体例，所述疏水性嵌段(B)的聚乳酸或其衍生物可以为选自聚乳酸、聚丙交酯、聚己内酯、乳酸与扁桃酸的共聚物、乳酸与乙醇酸的共聚物、乳酸与己内酯的共聚物及乳酸与 1,4-二氧六环-2-酮的共聚物中的一种以上。所述疏水性嵌段(B)的数均分子量优选为 500~10000 道尔顿，更优选为 500~5000 道尔顿。疏水性嵌段(B)的数均分子量不足 500 道尔顿时，则亲水性部分大，有可能存在不形成胶束的问题，如果超过 10000 道尔顿时，则疏水性部分变大，有可能存在组合物不在水中增溶的问题。此外，以双嵌段共聚物整体 100 重量%为基准，所述两亲性双嵌段共聚物内的疏水性嵌段(B)的含量优选为 30~60 重量%，更优选为 35~50 重量%，这样有利于能够稳定维持两亲性双嵌段共聚物的胶束。

[0033] 本发明的末端至少含有一个羧基的聚乳酸或其衍生物的碱金属盐具有使含有药物的胶束内芯的内部变硬，从而提高药物的包封率的作用。

[0034] 所述末端至少含有一个羧基的聚乳酸或其衍生物可以使用选自聚乳酸、聚丙交酯、聚乙交酯、聚扁桃酸、聚己内酯、聚酸酐及它们的共聚物中的一种以上。更具体地，所述聚乳酸或其衍生物为聚丙交酯、聚乙交酯、聚己内酯或它们的共聚物。根据本发明的一个优选具体例，所述聚乳酸或其衍生物可以为选自聚乳酸、乳酸与扁桃酸的共聚物、乳酸与乙醇酸的共聚物，以及乳酸与己内酯的共聚物中的一种以上。

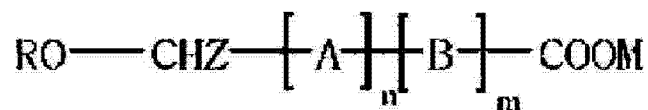
[0035] 本发明的聚乳酸或其衍生物的碱金属盐是指如上所述的聚乳酸或其衍生物的末端羧酸阴离子与碱金属离子通过离子结合而结合的形态。所述碱金属优选为选自钠、钾及锂中的一种以上的 1 价金属，更优选为钠。

[0036] 此外，对于所述聚乳酸或其衍生物的碱金属盐，与碱金属离子进行离子结合的羧基相反侧末端可以取代为选自羟基、乙酰氧基、苯甲酰氧基、癸酰氧基、棕榈酰氧基以及烷氧基中的一种以上。

[0037] 具体地，本发明的末端至少含有一个羧基的聚乳酸碱金属盐可由下述化学式 1 表示。

[0038] 【化学式 1】

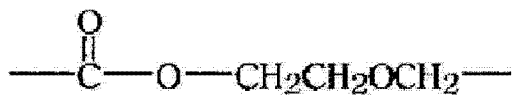
[0039]



[0040] (上述式中，A 为 $\text{---}\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{CHZ}\text{---}$ ，

[0041] B 为 $\text{---}\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{CHY}\text{---}$ 、 $\text{---}\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{---}$ 或

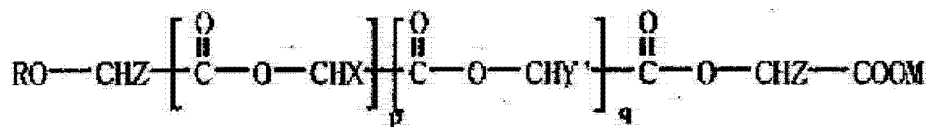
[0042]



- [0043] R 为氢、乙酰基、苯甲酰基、癸酰基、棕榈酰基、甲基或乙基，
 [0044] Z 及 Y 为氢、甲基或苯基，
 [0045] M 为钠、钾或锂，
 [0046] n 为 1-30 的整数，
 [0047] m 为 0-20 的整数。)
 [0048] 更具体地，所述聚乳酸或其衍生物的盐可用下述化学式 2 表示。

[0049] 【化学式 2】

[0050]



- [0051] (上述式中，
 [0052] R 为氢、乙酰基、苯甲酰基、癸酰基、棕榈酰基、甲基或乙基，
 [0053] X 为甲基，
 [0054] Y' 为氢或苯基，
 [0055] Z 为氢、甲基或苯基，
 [0056] M 为钠、钾或锂，
 [0057] p 为 0~25 的整数，
 [0058] q 为 0~25 的整数，
 [0059] 但，p+q 为 5~25 的整数。)

[0060] 所述聚乳酸或其衍生物的碱金属盐优选为显示出 20mg/mL 以上的水溶解度，如果溶解于水性介质，存在于其分子内的羧酸阴离子的亲水性部分及聚乳酸的疏水性部分形成均衡，从而参与到与胶束的形成。因此，如果其分子量过大，则疏水性部分变大，从而显示亲水性的末端的羧酸阴离子之间难以会合，胶束可能不容易形成，相反，如果其分子量过小，则完全溶于水中，从而形成胶束本身变得困难。根据本发明的一个优选具体例，所述聚乳酸或其衍生物的碱金属盐的数均分子量为 500~2500 道尔顿，具体为 1000~2000 道尔顿。如果该分子量不足 500 道尔顿，则完全溶于水中，从而使形成胶束本身存在困难，如果分子量超过 2500 道尔顿，则疏水性变大，在水溶液中难以溶解，也有可能不能形成胶束。

[0061] 根据本发明的一个优选具体例，本发明的含雷帕霉素的高分子纳米粒子注射剂型组合物包含 0.1~10 重量%的雷帕霉素，优选包含 0.2~5 重量%；包含 40~90 重量%的由亲水性嵌段(A)与疏水性嵌段(B)构成的 A-B 型双嵌段共聚物，优选包含 45~74 重量%；以及包含 10~50 重量%的末端至少含有一个羧基的聚乳酸或其衍生物的碱金属盐，优选包含 25~45 重量%。

[0062] 本发明的一个具体例中，A-B 型双嵌段共聚物与末端至少含有一个羧基的聚乳酸或其衍生物的碱金属盐的重量比为 9:1~3:7，更优选为 5:1~1:2。

[0063] 另一方面，将所述两亲性嵌段共聚物及聚乳酸或其衍生物的碱金属盐进行混合而形成的高分子纳米粒子组合物的情况下，为了进一步提高纳米粒子的稳定性，可以进一步

添加 2 价或 3 价的金属离子。所述 2 价或 3 价金属离子与高分子纳米粒子内的聚乳酸或其衍生物的碱金属盐的末端 1 价碱金属阳离子进行取代反应,从而与聚乳酸或其衍生物的末端的羧基形成更强的离子结合。

[0064] 此外,根据本发明的一个具体例,提供一种含雷帕霉素的高分子纳米粒子注射剂型组合物,其特征为,所述含雷帕霉素的高分子纳米粒子注射剂型组合物包含:(i)由亲水性嵌段(A)与疏水性嵌段(B)构成的A-B型双嵌段共聚物;(ii)末端至少含有一个羧基且该羧基末端被由 2 价或 3 价金属离子固定的聚乳酸或其衍生物,以及(iii)作为活性成分的雷帕霉素;在此,所述A-B型双嵌段共聚物与聚乳酸或其衍生物所形成的纳米粒子的内部包封有雷帕霉素。

[0065] 所述末端至少含有一个羧基的聚乳酸或其衍生物可以使用如上所述的物质。

[0066] 根据所述 2 价或 3 价金属离子的金属结合,因强结合力而起到更加提高高分子纳米粒子的稳定性的作用。所述 2 价或 3 价金属离子优选为选自钙、镁、钡、铬、铁、锰、镍、铜、锌及铝的金属的 2 价或 3 价阳离子,更优选为钙或镁的 2 价阳离子。

[0067] 所述 2 价或 3 价金属离子的当量可以根据包封在高分子纳米粒子内部的药物的释放速度来调节。具体地,在高分子纳米粒子组合物中,相对于聚乳酸碱金属盐的羧基的当量,包含的所述 2 价或 3 价金属离子不足 1 当量时,则与聚乳酸盐的羧基末端基结合的数量少,从而加快药物的释放速率,超过 1 当量时,则与聚乳酸盐的羧基末端基结合的数量多,从而延迟药物的释放速度。

[0068] 聚乳酸或其衍生物的羧基末端被 2 价或 3 价金属离子固定的情况下,本发明的组合物以组合物的整体重量为基准,包含 0.1~10 重量%雷帕霉素,更优选包含 0.2~5 重量%;包含 40~90 重量%的所述两亲性嵌段共聚物,更优选包含 45~74 重量%;以及包含 10~50 重量%的末端至少含有一个羧基的聚乳酸或其衍生物,更优选包含 25~45 重量%。进一步地,相对于所述聚乳酸或其衍生物的末端羧基当量,包含 0.01~10 当量的所述 2 价或 3 价金属离子,更优选包含 1~2 当量。两亲性嵌段共聚物的相对比例过大时,则相比于作为高分子纳米粒子的性质,具备胶束的性质,因此在稀释时发生稳定性的问题,聚乳酸或其衍生物的金属盐的相对比例过大时,则在添加 2 价或 3 价金属离子时,沉淀为聚乳酸或其衍生物的 2 价或 3 价金属盐,从而不能够获得分散均匀的纳米粒子溶液。

[0069] 如上所述,使用 2 价或 3 价金属离子时,最终能够获得包含两亲性嵌段共聚物及羧基末端被 2 价或 3 价的金属离子固定的聚乳酸或其衍生物的、纳米粒子内部包封有药物的组合物。

[0070] 本发明的一个具体例中,本发明的组合物可以是冷冻干燥或喷雾干燥了的干燥形态。即,在含有上述成分的水溶液中生成胶束后,通过冷冻干燥、喷雾干燥等方法进行干燥后,能够获得固体状的高分子纳米粒子组合物。冷冻干燥组合物的情况下,还可以进一步含有多糖类、甘露醇、山梨醇、乳糖等作为冷冻干燥助剂。作为冷冻干燥助剂优选使用选自甘露醇、山梨醇、乳糖、海藻糖及蔗糖中的一种以上,更优选使用甘露醇及乳糖。

[0071] 本发明的组合物的雷帕霉素与上述说明的高分子疏水性嵌段部分以物理方式会合,位于水溶液中所述高分子形成的纳米粒子的疏水性内芯上,此时,含雷帕霉素的高分子纳米粒子的粒子大小优选为 10~150nm 范围。

[0072] 将本发明的干燥形态的组合物重构于水性介质,则能够获得雷帕霉素浓度为

0.1mg/mL 以上的,例如 0.1~25mg/mL,更具体为 0.2~10mg/mL 的注射剂型组合物。雷帕霉素浓度小于 0.1mg/mL 时,则不能够获得希望水平的雷帕霉素的给药效果,高于 25mg/mL 时,则在低于常温的温度下,水溶液的粘性高,难以注射。在一个实施例中,提供雷帕霉素浓度为 0.1~25mg/mL 的注射剂型组合物。

[0073] 本发明的含雷帕霉素的高分子胶束注射剂型组合物除了上述成分之外,还可以进一步含有防腐剂、稳定剂、水和剂或促乳化剂、用于调节渗透压的盐及 / 或缓冲剂等药剂学助剂及对治疗有用的物质。本发明的注射剂型组合物可以通过直肠、局部、经皮、静脉内、肌肉内、腹腔内、皮下等进行给药。根据本发明的一个具体例,可以将冷冻干燥形态的组合物用注射用蒸馏水、5% 葡萄糖及生理盐水等水性介质进行重构,以血管注射的方式进行给药。

[0074] 根据本发明的另一方面,提供一种含雷帕霉素的高分子纳米粒子组合物的制备方法,所述含雷帕霉素的高分子纳米粒子组合物的制备方法包括下列步骤:

[0075] (a) 将 (i) 由亲水性嵌段 (A) 与疏水性嵌段 (B) 构成的 A-B 型双嵌段共聚物、(ii) 末端至少含有一个羧基的聚乳酸或其衍生物的碱金属盐、以及 (iii) 作为活性成分的雷帕霉素在有机溶剂中进行增容;(b) 从上述步骤 (a) 的产物中去除有机溶剂;以及 (c) 在上述步骤 (b) 的产物中加入水性介质。

[0076] 所述步骤 (a) 中的有机溶剂优选使用选自二氯甲烷、乙醇、甲醇、丙醇、丙酮、乙腈、1,2-丙二醇、N-甲基吡咯烷酮、N,N-二乙酰胺、聚乙二醇或其衍生物(分子量 300~600 道尔顿),以及甘油中的一种以上。

[0077] 所述步骤 (b) 中的有机溶剂的去除可以按照通常的方法实施,具体地,可以使用真空蒸发器进行蒸发。

[0078] 所述步骤 (c) 中的水性介质可以使用蒸馏水、注射用水、生理盐水或冷冻干燥助剂水溶液。

[0079] 本发明的含雷帕霉素的高分子纳米组合物的制备方法,在所述步骤 (c) 之后,还可以包括在其产物中添加 2 价或 3 价金属离子,从而进一步固定聚乳酸或其衍生物末端基的步骤 (c-1)。例如,可以在所述步骤 (c) 中获得的高分子胶束水溶液中加入含有 2 价或 3 价金属离子的水溶液,在室温下搅拌 30 分钟以上。所述 2 价或 3 价金属离子可以以硫酸盐、盐酸盐、碳酸盐、磷酸盐及水合物的形态添加,具体地,可以添加氯化钙、氯化镁、氯化锌、氯化铁、碳酸钙、碳酸镁、磷酸钙、磷酸镁、磷酸铝、硫酸镁、氢氧化钙、氢氧化镁、氢氧化铝或氢氧化锌。

[0080] 此外,本发明的含雷帕霉素的高分子纳米粒子组合物的制备方法还可以包含下列步骤:(d) 对所述步骤 (c) 或步骤 (c-1) 中获得的高分子纳米粒子组合物进行灭菌;(e) 将灭菌的胶束水溶液以一定量填充到容器中;以及 (f) 将所述步骤 (e) 中填充的容器进行冷冻干燥。所述步骤 (f) 中进行冷冻干燥时,可以使用选自甘露醇、山梨醇、乳酸、海藻糖及蔗糖中的一种作为冷冻干燥助剂。更具体地,可以使用甘露醇。在上述冷冻干燥后,还可以包含用蒸馏水、注射用水、生理盐水等水溶液进行重构,获得重构的含雷帕霉素的注射溶液组合物的步骤 (g)。

[0081] 本发明的再一方面,还提供应用本发明的含雷帕霉素高分子纳米粒子组合物的,用于与放射线疗法联用的抗癌组合物。

[0082] 将本发明的抗癌组合物与放射性疗法联用的情况下,雷帕霉素以 30mg/m²~300mg/

m² 的给药量进行 1 次体内给药,此时,放射线可以每天以 80Gy 实施 5 次。本发明的抗癌组合物的情况下,可以慢慢地进行点滴静脉注射或者皮下或肌肉注射。

[0083] 在移植了癌的动物实验中,将本发明的高分子纳米粒子组合物与放射线一同进行处理的情况下,对于癌的有效性显著提高。例如,可以以数分钟至数周的间隔,在放射线照射前或照射后给药本发明的抗癌组合物。在给药方法中,本发明的抗癌组合物与放射线治疗之间的时间间隔可优选为有意延长用于治疗的时间,并且,在 2 个疗法之间可以有数日至数周的间隔。可以与本发明的抗癌组合物联用的放射线包括例如 γ -线、X-线(外部束)等。本发明的一个具体例中,放射线的量可以按照约 1~约 100Gy 的范围照射,具体为约 5~约 80,更具体地,可以为 10~50Gy。对于放射线同位素的剂量范围是根据同位素的半衰期及释放的放射线强度与种类决定。

[0084] 根据本发明的一个具体例,利用本发明的含雷帕霉素的高分子纳米粒子组合物的、用于与放射线疗法联用的抗癌组合物可以在放射线照射前 1 分钟~7 天前给药。

[0085] 根据本发明的另一具体例,利用本发明的含雷帕霉素的高分子纳米粒子组合物的、用于与放射线疗法联用的抗癌组合物,其可以用于经过 4~12 周的期间、每周 1~5 次并行实施的将根据上述抗癌组合物的给药的化学疗法与放射线疗法的联用疗法。

[0086] 根据本发明的再一具体例,在哺乳动物的癌细胞的放射线治疗方法中,对哺乳动物的癌细胞进行放射线照射时,在照射前或照射后给药本发明的含雷帕霉素的高分子纳米粒子注射剂型组合物,从而能够提高哺乳动物的癌细胞对于放射线治疗的敏感性。

[0087] 下面,通过制备例、实施例及实验例等对本发明进行更详细的说明,这些仅是为了说明本发明,本发明的范围并不由这些限定。

[0088] 制备例 1. D, L-PLA-COONa (数均分子量 1200 道尔顿)

[0089] 本发明的聚乳酸碱金属盐是根据韩国第 2002-63955 号申请等公知的方法制备得到。即、将 1000g 的 D, L- 乳酸加入到 3 口圆底的烧瓶中,并安装搅拌器。然后,在加热至 80°C 的油浴中加热,以及使用减压抽吸器减压至 25mmHg,反应 1 小时,从而去除过量存在的水分。将反应温度上升至 160°C,压力减压至 5~10mmHg 的条件下,反应 7 小时,然后结束反应。其结果为,获得了未精制状态的 646g 聚乳酸,采用下述 NMR 分析法进行测定的结果为,制备得到的聚乳酸的数均分子量为 1200 道尔顿。在 500g 上述聚乳酸中加入 750mL 的乙腈进行溶解。在该溶液中缓缓加入 750mL 的碳酸氢钠水溶液(0.1g/mL)。在常温下搅拌 2 小时,使高分子中和。在中和了的高分子溶液中加入 75g 的氯化钠,进行分层。取分层的有机溶剂层,进行分馏,从而去除有机溶剂,制得聚乳酸钠盐。

[0090] 对于聚乳酸钠盐的 ¹H-NMR 测定结果如图 1 所示。

[0091] < 由 ¹H-NMR 扫描的峰面积计算数均分子量 >

[0092] 【计算式】

[0093] 数均分子量(道尔顿) = { (A+B) / (C/N) } × 72.1

[0094] 在上述计算式中,

[0095] A 为 D, L- 聚乳酸的亚甲基质子峰面积,

[0096] B 为高分子末端 D, L- 聚乳酸的亚甲基质子峰面积,

[0097] C 为二羧酸的亚甲基质子峰面积,

[0098] N 为二羧酸的亚甲基质子个数。

[0099] 制备例 2. mPEG-PLA (分子量 2000-1700 道尔顿)

[0100] 将 500g 的单甲氧基聚乙二醇(数均分子量 :2000)加入到 2 口圆底的烧瓶中,在减压下,以 100℃加热 2~3 小时进行脱水。在反应烧瓶中加入干燥的氮气,利用注射器加入作为反应催化剂的辛酸亚锡($\text{Sn}(\text{Oct})_2$),加入量约为 D, L- 丙交酯的 0.1 重量%(1g, 2.5mol), 搅拌 30 分钟后,在 130℃下减压(1mmHg)1 小时,去除溶解了催化剂的溶质(甲苯)。然后加入 1375g 的精制的丙交酯,在 130℃下加热 18 小时。将生成的高分子溶解于二氯甲烷中,然后加入到乙醚中,析出高分子。将获得的高分子在真空干燥箱中干燥 48 小时。通过上述过程获得的 mPEG-PLA 的数均分子量为 2000~1750 道尔顿,根据图 2 的 $^1\text{H-NMR}$,确定为 A-B 型。

[0101] 实施例 1. 含雷帕霉素的 D, L-PLA-COONa/mPEG-PLA 混合高分子纳米粒子组合物

[0102] 将 20mg 雷帕霉素、895g 的制备例 2 的 mPEG-PLA、329mg 的制备例 1 的 D, L-PLACOONa 在乙醇中增容后,用真空蒸发器蒸发有机溶剂。在上述干燥物中加入注射用灭菌水,使雷帕霉素浓度为 2mg/mL,从而形成胶束。进一步地,将约 26mg 的 2 价钙金属离子加入到精制水中进行溶解,使其摩尔量为 D, L-PLACOONa 摩尔量的 1/2,然后将该溶液点滴加入到在 200rpm 下进行搅拌的胶束水溶液中,从而将聚乳酸盐末端基以离子结合固定,形成包封有雷帕霉素的高分子纳米粒子,将该溶液用 0.2 μm 的膜过滤纸进行灭菌过滤后,加入到小瓶中冷冻干燥。制得的组合物的雷帕霉素含量及高分子纳米粒子大小的测定结果如下。

[0103] - 含量 :99.8%

[0104] - 粒子大小 :19.5nm

[0105] 实验例 1. 含雷帕霉素的高分子纳米粒子的体内动态评价

[0106] 对实施例 1 中的包封有雷帕霉素的纳米粒子组合物的体内动态进行评价。为进行动物实验,使用体重为 210-250g 的雄性 Sprague-Dawley 大鼠,以雷帕霉素为基准,将 5mg/Kg 的用量经过静脉及皮下注射后,每 5、15、30 分钟及每 1、2、4、8、24 小时从尾部动脉采集 0.3mL 全血。将采集的全血用蛋白沉淀法(蛋白沉淀法, PPT, 在药物与生物医学分析中的进展, 第 5 卷, 2003, 第 199-254 页(Prot ein Precipitation, PPT, Progress in Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Volume 5, 2003, Pages 199-254))进行处理后,进行离心分离,获得 0.15mL 的清澈的上清液,用 LC/MS/MS 法对血中的雷帕霉素浓度进行了分析。

[0107] ① HPLC 条件

[0108] i) 色谱柱 :Zorbax XDB-C18 (2.1×100mm、3.5 毫米、安捷伦)

[0109] ii) 流动相 :10mM 的醋酸铵 /MeOH (1/99、v/v)

[0110] iii) 流速 :0.3mL/min

[0111] ② 串联质谱条件

[0112] i) 电离 :电喷雾电离,负(ESI-)

[0113] ii) MS 方法 :多反映监测(MRM)

[0114] iii) 毛细管电压 :2.95kV

[0115] iv) 锥孔电压 :134V

[0116] v) 碰撞能量 :22eV

[0117] vi) 源温度(Source Temperature) :100℃

[0118] vii) 脱溶剂气温度 :200℃

[0119] viii) 质量转移(Mass Transition):西罗莫司 912.6 → 321.4amu

[0120] 将雷帕霉素的体内动态曲线显示在图 3 中,将体内动态参数显示在表 1 中。静脉给药与皮下给药的 C_{max} ,显示为静脉给药时的 C_{max} 比皮下给药时约高 7 倍,在消失相(소실상)的半衰期($t_{1/2}$)约为 3 小时,几乎相似,但 24 小时时皮下给药时的血中浓度比静脉给药时的约高 2 倍左右。将静脉给药以 100 计,皮下给药时的生物利用度(F%) 约显示为 74%。

[0121] 表 1

体内动态参数	实施例 1	
	静脉给药	皮下给药
AUC (last) (ng · hr/mL)	3132.6	2304.5
AUC (inf) (ng · hr/mL)	3145.1	2333.3
C_{max} (ng/mL)	2010.0	288.0
T_{max} (hr)	0.25	4.00
$t_{1/2}$ (hr)	3.32	3.45
F (%)	100.0	73.6

[0123] 实验例 2. 含雷帕霉素的高分子纳米粒子组合物的放射线增敏作用评价

[0124] 观察了实施例 1 的组合物与放射线疗法联用时的抗癌活性。

[0125] 采集储存于液氮中的细胞,建立试管内细胞培养。获得细胞后,用灭菌的磷酸盐缓冲液(PBS)清洗,测定了存活细胞数量。将细胞以 7×10^7 细胞 /mL 的浓度再次悬浮在灭菌的 PBS 中。

[0126] 在健康的裸鼠(nu/nu)无胸腺小鼠(20-25g,8 周龄)的右侧肋下皮下注射 0.1mL 的含人类肺癌细胞(A549)的细胞悬浮液。A549 的情况下,已知其是对放射能和包括一部分抗癌药的化学疗法具有耐性的癌。癌达到一定的大小后,进行 3 次异种移植,形成 3~4mm 的异种移植植物。将异种移植植物以 12 号套管针对健康的裸鼠(nu/nu)无胸腺小鼠(20-25g,8 周龄)的右侧肋下进行皮下注射。待癌体积达到 $100 \sim 300 \text{mm}^3$ 后,进行给药,将这一时间点记录为第 1 天。在第 1 天将小鼠分成 5 组,每天通过尾静脉按照 5mg/kg 的雷帕霉素用量给药实施例 1 的组合物,3 小时后照射 2Gy 的放射能,共实施 5 天。随着时间的推移,测定肿瘤的长轴及短轴,使用下列数学式 1 计算了肿瘤体积。此外,为了对治疗效果进行评价,用下述数学式 2 计算了相对肿瘤体积。

[0127] 【数学式 1】

[0128] 肿瘤体积(TV) = $0.5 \times L \times W^2$ (L :长轴, W :短轴)

[0129] 【数学式 2】

[0130] 相对肿瘤体积(RTV) = $(V_t/V_0) \times 100\%$ (V_t :第 t 天的 TV, V_0 :0 天的 TV)

[0131] 为了确定实验是有意义的,每次处理使用了 4 只以上的小鼠,每组为 4 个以上的肿瘤。在开始处理的时间点,最小的肿瘤直径为 4mm^3 或 30mm^3 大小。最终给药后,在 2 周内死亡的动物视为毒性死亡,排除在评价之外。每 3 只中多于一只以上发生毒性死亡或者是平

均体重超过 15% 而减小后没有完全恢复的处理组视为无抗肿瘤功效。实验结果如图 4 所示。

[0132] 如图 4 中所示, 单独给药实施例 1 的组合物的给药组 (PNP-Si) 与放射线单独治疗组 (IR) 的抗癌功效与无处理组 (CONT) 及高分子纳米粒子载体给药组 (PNP) 相比, 显示出了好的癌症生长抑制。但是, 将实施例 1 的组合物与放射线治疗联用的组 (IR+PNP-Si) 的情况下, 不仅比 CONT 及 PNP, 而且与 PNP-Si 组及 IR 组相比也发挥出了更大的抗癌功效, 显示为几乎停止了癌症生长。

[0133] 实施例 2. 含雷帕霉素的 D, L-PLA-COONa/mPEG-PLA 混合高分子纳米粒子组合物

[0134] 将 25mg 的雷帕霉素、1650mg 的制备例 2 的 mPEG-PLA、825mg 的制备例 1 的 D, L-PLACOONa 完全溶于二氯甲烷中, 然后利用旋转式减压蒸馏器使有机溶剂挥发。在上述干燥物中加入注射用水, 使雷帕霉素的浓度为 1.0mg/mL, 形成胶束。然后加入 100mg/mL 的氯化钙溶液, 使氯化钙的量为 67.5mg, 进行搅拌。然后将该溶液用 0.2 μm 的膜过滤纸进行灭菌过滤后, 放入小瓶中冷冻干燥。制得的组合物的雷帕霉素含量及高分子纳米粒子大小的测定结果如下。

[0135] - 含量 :101.9%

[0136] - 粒子大小 :19.7nm

[0137] 实验例 3. 对于含雷帕霉素的高分子纳米粒子组合物试管内抗癌活性评价

[0138] 为了对雷帕霉素包封到高分子纳米粒子后, 是否能够维持癌细胞的增殖抑制效果, 利用实施例 2 的含雷帕霉素的高分子纳米粒子组合物进行了以下实验。

[0139] 将作为肺癌细胞的 A549、NCI-H460 细胞株与作为乳腺癌细胞的 MDA-MB-231、MCF7 分别在 DMEM (A549, MCF7)、RPMI1640 (NCI-H460, MDA-MB-231) 细胞培养液中培养。在处理一天前, 分别将 50 个 (生理盐水实验组, 不含雷帕霉素的高分子纳米粒子组合物)、100 个 (含雷帕霉素的高分子纳米粒子组合物, 雷帕霉素) 的细胞置于 6 孔培养皿中。在培养箱中培养 24 小时, 将细胞附着于培养皿的底部。去除培养液, 在 2mL 新的培养液中分别以 10、100、500nM 稀释试样对细胞进行处理。在培养箱中培养 14 天, 获得细胞菌落。用 0.5% 的结晶紫溶液对细胞进行固定及染色, 然后对生成的菌落数计数。利用生理盐水实验组中获得的细胞菌落数计算平板效率 (plating efficiency) (数学式 3)。

[0140] 【数学式 3】

[0141] 平板效率 (plating efficiency)

[0142] = 生理盐水处理组的菌落数 / 生理盐水处理组的置于培养皿上的细胞数 × 100

[0143] 根据以下数学式 4 计算各实验组中的存活率 (surviving fraction)

[0144] 【数学式 4】

[0145] 存活率 (surviving fraction)

[0146] = 处理组的菌落数 / (处理组的置于培养皿上的细胞数 × 平板效率 / 100)

[0147] 实验结果如图 5 所示。

[0148] 参照图 5 的结果, 可确认不含雷帕霉素的高分子纳米粒子载体 (vehicle) 几乎对细胞的增殖能力没有影响, 含雷帕霉素的高分子纳米粒子组合物 (PNP-西罗莫司 (PNP-sirolimus)) 与雷帕霉素本身 (rapamycin) 一样, 显著降低癌细胞的增殖能力。从该结果可知, 雷帕霉素即使包封到高分子纳米粒子中的情况下, 也能够维持其药效。

[0149] 实验例 4. 含雷帕霉素的高分子纳米粒子体内动态评价

[0150] 使用与实验例 1 相同的方法,对实验例 2 中包封有雷帕霉素的组合物的体内动态进行了评价。但,以雷帕霉素为基准,将 10mg/kg 用量经口、静脉或皮下注射后,每 15、30 分钟及 1、2、4、8、24、48 小时从尾部动脉采集 0.3mL 的全血。

[0151] 血中的雷帕霉素浓度的分析结果如图 6 所示,体内动态参数如表 2 所示。

[0152] 表 2

[0153]

体内动态参数	游离的西罗莫司 (Free sirolimus)	实施例 2		
	静脉给药	静脉给药	皮下给药	经口给药
AUC(last) (ng · hr/mL)	5366.7	16901.7	5275.2	1559.8
AUC(Inf) (ng · hr/mL)	5597.5	16991.2	5576.4	1983.7
C _{max} (ng/mL)	2890	11303.3	350	129.7
T _{max} (hr)	0.25	0.25	8.00	1.17
t _{1/2} (hr)	10.48	5.68	10.14	21.27
F (%)	100	315	98	29

[0154] 静脉给药时,实施例 2 的组合物的 AUC 与雷帕霉素本身(Free sirolimus)的 AUC 相比,显示为高出 3 倍以上,可知本发明的高分子纳米粒子组合物具有血中滞留性。粒子性药物载体具有血中滞留性是指具有根据 EPR (增强透过和滞留(Enhanced Permeability and Retention)) 效果的癌组织蓄积性,表示以低剂量也能够显示出同样的效果。

[0155] 另一方面,将实施例 2 的组合物通过皮下给药的情况下,生物利用度(BA%)为 100%,AUC 相比于静脉给药时为 33%水平,但在 24 小时及 48 小时的血中浓度约为 2 倍以上,很长一段时间持续维持在有效浓度以上。经口给药时,生物利用度约显示为 30%,本发明的组合物与现有的经口剂型(不到 20%)相比显示出了更高的生物利用度。

[0156] 实验例 5:含雷帕霉素的高分子纳米粒子组合物在癌移植动物模型中的抗癌功效评价

[0157] 对于实施例 2 的含雷帕霉素的高分子纳米粒子组合物的动物模型中的抗癌功效通过以下方法进行了评价。

[0158] 将作为肺癌细胞株的 A549 细胞在 DMEM 培养基中培养。获得细胞后,用灭菌磷酸盐缓冲液(PBS)清洗后计数。在健康的裸鼠(nu/nu)无胸腺小鼠(20-25g,6 周龄)的右侧大腿皮下注射 0.1mL 的含 1×10^6 个 A549 细胞的悬浮液。3 周后,癌肿块的大小约达到 70mm³,然后将小鼠分成 5 组,将这一时间点记录为第 1 天。从这一时间点开始以 20mg/kg 的用量,将含雷帕霉素、不含雷帕霉素的高分子胶束组合物分别静脉注射到各实验组小鼠的尾部进行给药。从第 1 天开始,每周 2 次测定肿瘤的长轴及短轴的长度,通过数学式 5 计算出肿瘤的体积。在测定肿瘤体积的同时,还测量了小鼠的体重。

[0159] 【数学式 5】

[0160] 肿瘤体积 = $0.5 \times \text{长轴长度} \times \text{短轴长度}^2$

[0161] 如图 7 所示,含雷帕霉素的高分子纳米粒子组合物与对照组及载体(Vehicle)给药组相比,对 A549 癌肿块的生长显示出了显著的推迟效果,每周给药 3 次并给药 4 周的组(q3d×3 天×4 周)与每周给药 1 次并给药 4 周的组(qw×4 周)相比,抗癌功效略微优异,

但没有显著性差异。根据本发明的制剂,过量给药药物时,考虑到药物的毒性表达的情况下,能够判断为低使用量也能够发挥出功效。另一方面,根据药物给药,小鼠的体重变化不到 10%,在给药结束后显示出恢复的倾向,每周 3 次并给药 4 周的组与每周 1 次并给药 4 周的组相比恢复要慢。

[0162] 实验例 6. 含雷帕霉素的高分子纳米粒子组合物的放射线增敏效果评价

[0163] 在与放射线疗法联用时,采用与实验例 2 相同的方法,对实施例 2 的组合物的抗癌活性进行了评价。其结果如图 8 所示。本实验与实验例 2 不同,以每天给药 5mg/kg 的用量,仅给药 5 天后,对放射线照射组(2Gy 处理)和未处理组进行了比较。

[0164] 如图 8 所示,实施例 2 的组合物单独给药(实施例 2)与放射线单独治疗(IR)组比对照组显示出了优异的抗癌功效,而实施例 2 组与 IR 组之间没有显示出显著性差异。但是,给药实施例 2 的组合物后,过 3 小时,照射 2Gy 放射线的组(实施例 2+IR)比所有的对照组显示出了高的癌生长抑制。

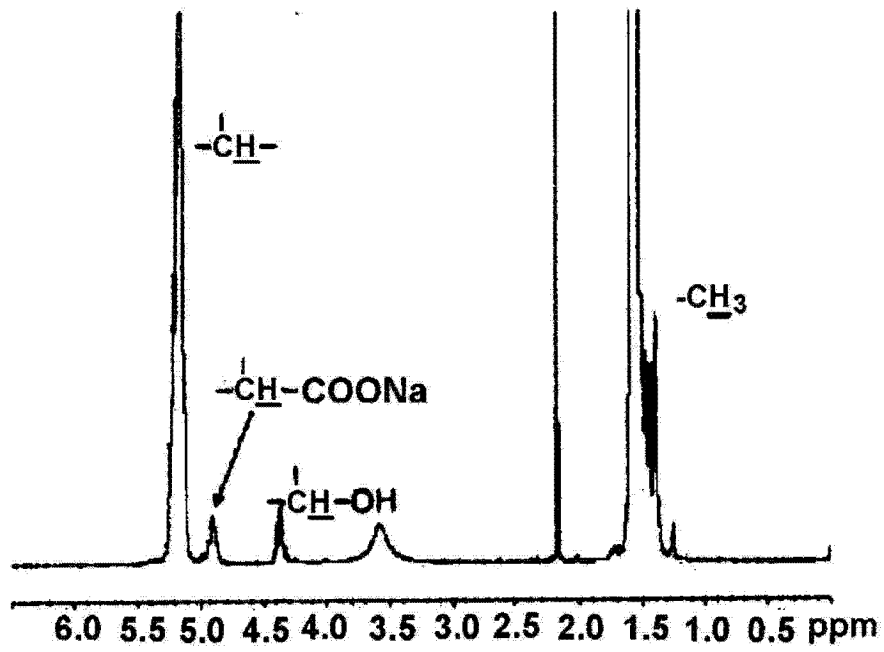
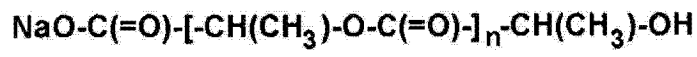


图 1

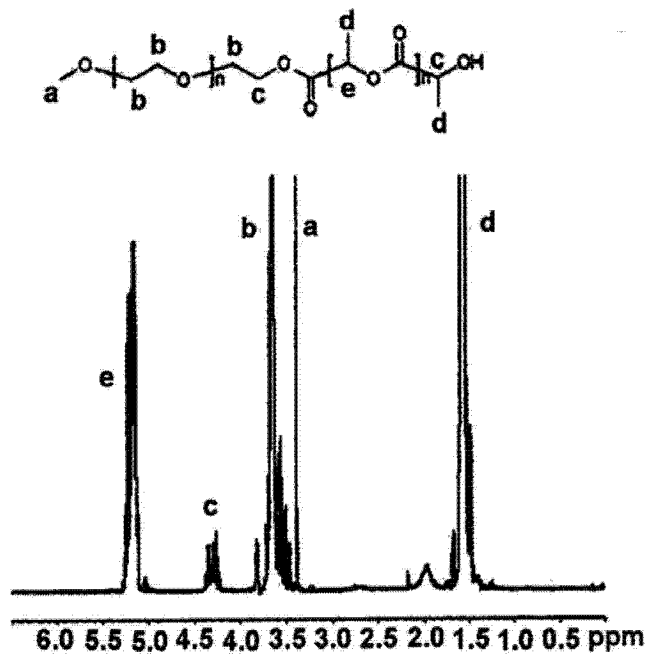


图 2

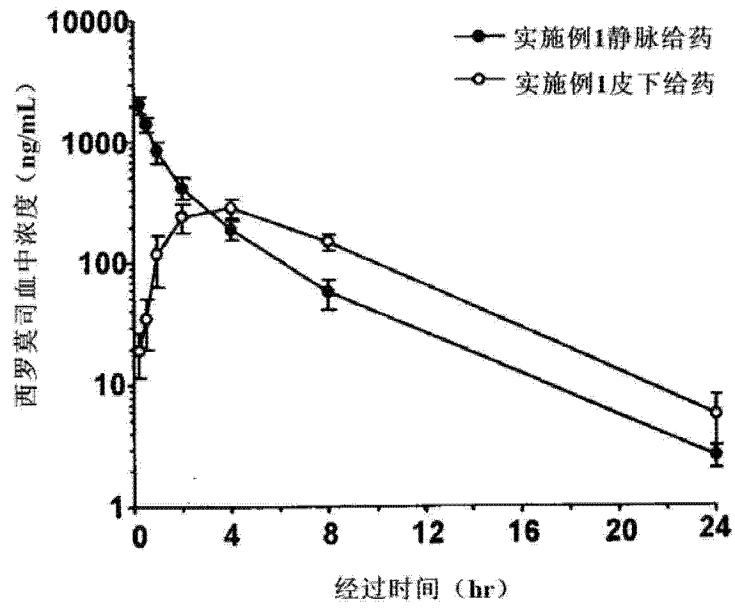


图 3

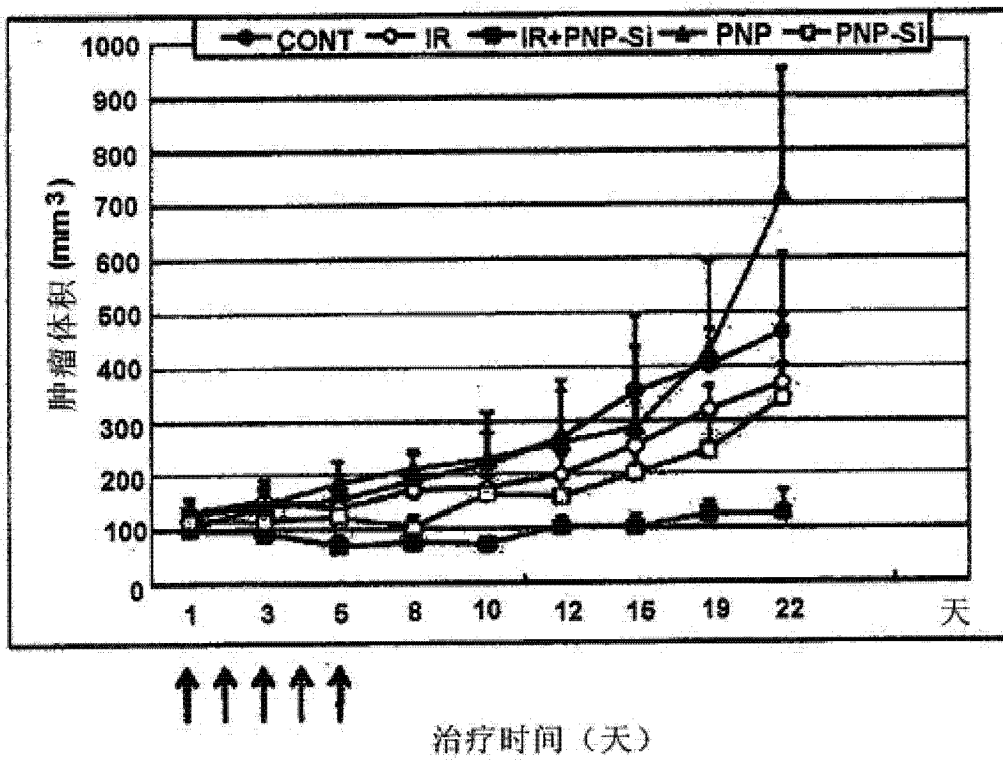


图 4

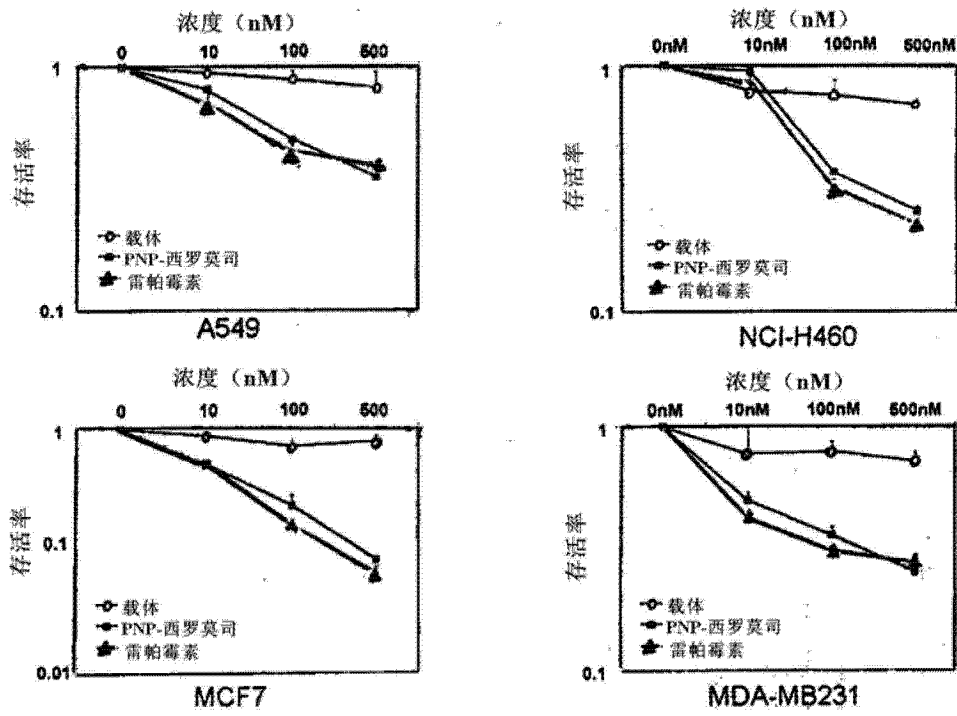


图 5

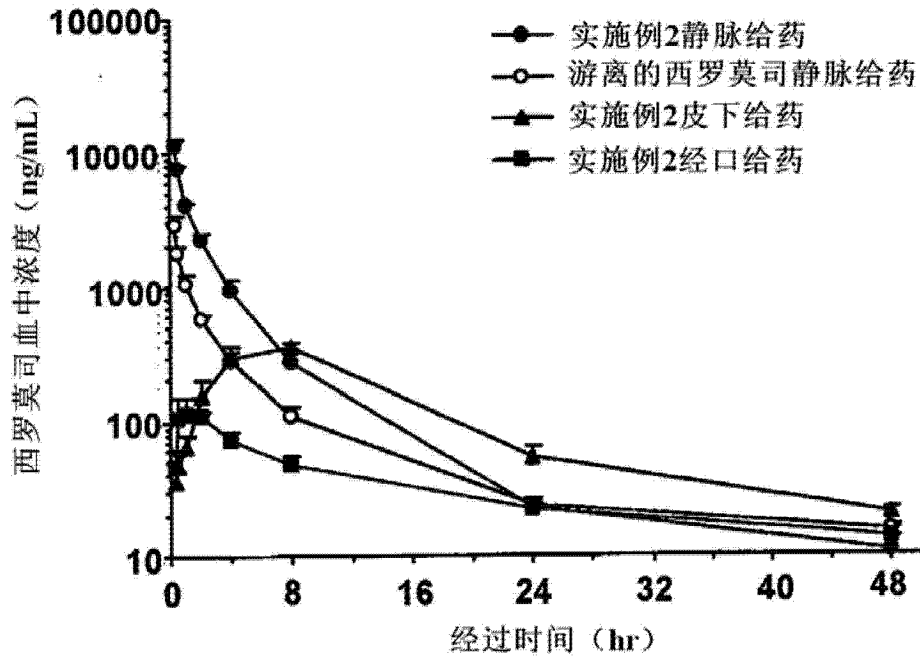


图 6

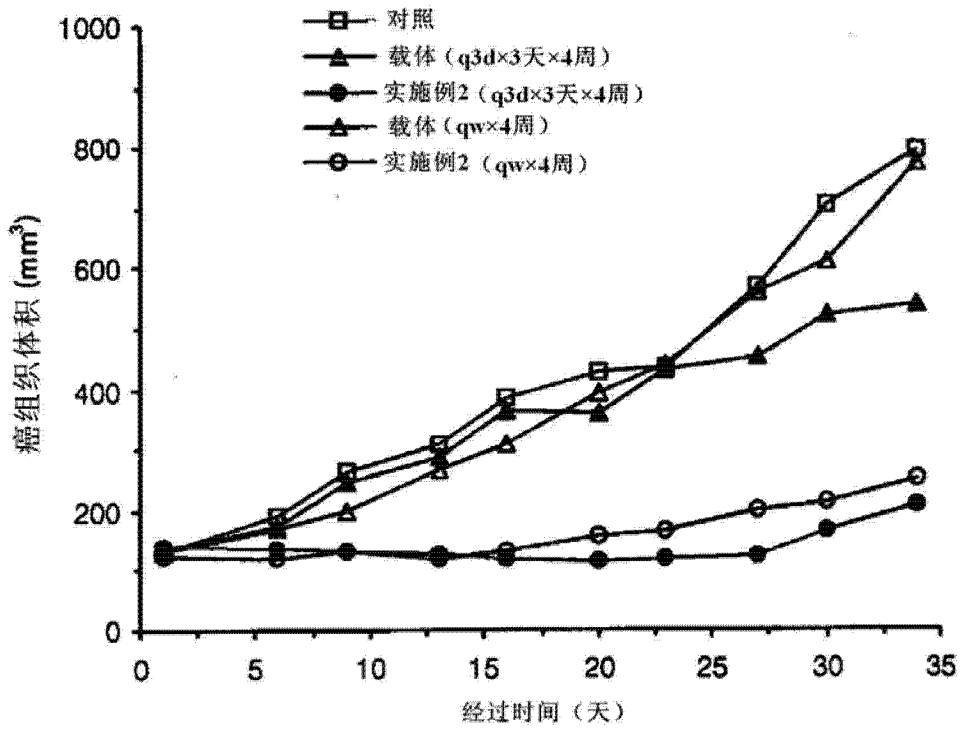


图 7

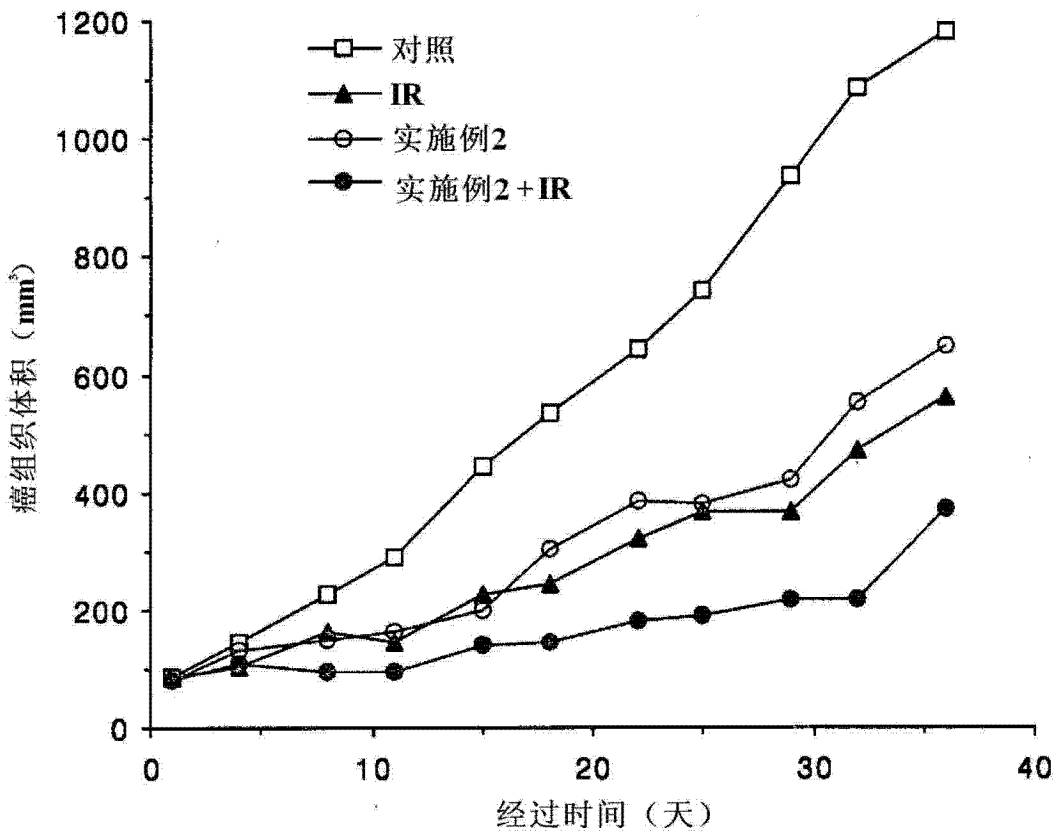


图 8