

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580003561.6

[51] Int. Cl.

A61K 9/10 (2006.01)

A61K 9/51 (2006.01)

[43] 公开日 2007年2月14日

[11] 公开号 CN 1913871A

[22] 申请日 2005.1.21

[21] 申请号 200580003561.6

[30] 优先权

[32] 2004.1.29 [33] US [31] 60/540,718

[86] 国际申请 PCT/US2005/001861 2005.1.21

[87] 国际公布 WO2005/072706 英 2005.8.11

[85] 进入国家阶段日期 2006.7.28

[71] 申请人 巴克斯特国际公司

地址 美国伊利诺伊州

共同申请人 巴克斯特医疗保健股份有限公司

[72] 发明人 珍·韦林 马赫什·V·乔巴尔

詹姆士·E·基普

巴雷特·E·拉比诺

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任  
公司

代理人 杨青 樊卫民

权利要求书6页 说明书30页 附图1页

[54] 发明名称

用于提高中枢神经系统投递的抗-逆转录病毒  
药剂的纳米悬浮液

[57] 摘要

本发明提供包括抗-逆转录病毒药剂分散体的  
组合物和制造方法。纳米悬浮液通过微量沉淀和能  
量添加的方法制备。优选，纳米悬浮液通过微量沉  
淀-匀浆的串联方法制备。

1. 一种用于投递至哺乳动物受试者脑的抗-逆转录病毒药剂的药物组合物，包括该药物组合物的分散体，其以具有约 100nm 至约 100  $\mu\text{m}$  平均粒径的颗粒提供并且适合通过能到达脑的细胞将有效量的该药物组合物投递至脑而给药至哺乳动物受试者。

2. 权利要求 1 的药物组合物，其中该药物组合物给药至哺乳动物受试者的中枢神经系统。

3. 权利要求 1 的药物组合物，其中该药物组合物给药至哺乳动物受试者的血管系统。

4. 权利要求 3 的药物组合物，其中该药物组合物给药至哺乳动物受试者的静脉系统。

5. 权利要求 3 的药物组合物，其中该药物组合物给药至哺乳动物受试者的颈动脉。

6. 权利要求 1 的药物组合物，其中细胞能进行吞噬作用。

7. 权利要求 1 的药物组合物，其中细胞选自 T-淋巴细胞、单核细胞、粒细胞、嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞和其混合物。

8. 权利要求 1 的药物组合物，其中该药物组合物作为颗粒由细胞吸收。

9. 权利要求 1 的药物组合物，其中该药物组合物作为颗粒吸附在细胞表面。

10. 权利要求 1 的药物组合物，其中该药物组合物作为颗粒与细胞接触。

11. 权利要求 10 的药物组合物，其中该药物组合物与分离的细胞接触。

12. 权利要求 11 的药物组合物，其中该药物组合物与通过细胞分离器分离的细胞接触。

13. 权利要求 1 的药物组合物，其中部分颗粒在投递至脑之前不溶解。

14. 权利要求 1 的药物组合物，其中该分散体具有高于颗粒的热力学溶解度或表观溶解度的颗粒浓度。

15. 权利要求 1 的药物组合物，其中该药物组合物进一步包括表面活性剂。

16. 权利要求 15 的药物组合物，其中该表面活性剂选自阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、非离子型表面活性剂和表面活性生物改性剂。

17. 权利要求 16 的药物组合物，其中阴离子表面活性剂选自：烷基磺酸酯、烷基磷酸酯、烷基膦酸酯、月桂酸钾、三乙醇胺硬脂酸酯、月桂基硫酸钠、十二烷基硫酸钠、烷基聚氧乙烯硫酸酯、藻酸钠，二辛基磺基丁二酸钠、磷脂酰胆碱、磷脂酰甘油、磷脂酰肌苷、磷脂酰丝氨酸、磷脂酸及其盐、羧甲基纤维素钠、胆汁酸和其盐、胆酸、脱氧胆酸、甘氨胆酸、牛磺胆酸和甘氨脱氧胆酸。

18. 权利要求 15 的药物组合物，其中阳离子表面活性剂选自：季铵化合物、苯扎氯铵、十六烷基三甲溴化胺、壳聚糖、氯化十二烷基二甲基苄基铵、盐酸酯酰肉碱和烷基吡啶卤化物。

19. 权利要求 15 的药物组合物，其中非离子型表面活性剂选自：聚氧乙烯脂肪醇醚、聚氧乙烯脱水山梨糖醇脂肪酸酯、聚氧乙烯脂肪酸酯、脱水山梨糖醇酯、单硬脂酸甘油酯、聚乙二醇、聚丙二醇、十六烷醇、十六醇十八醇混合物、十八烷醇、芳基烷基聚醚醇、聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物、保丽视明、甲基纤维素、羟甲基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、非结晶的纤维素、多糖、淀粉、淀粉衍生物、羟乙基淀粉、聚乙烯醇、甘油酯和聚乙烯吡咯烷酮。

20. 权利要求 19 的药物组合物，其中聚氧乙烯脂肪酸酯为聚乙烯-660-羟硬脂酸酯。

21. 权利要求 15 的药物组合物，其中表面活性生物改性剂选自：白蛋白、酪蛋白、水蛭素或其他蛋白质。

22. 权利要求 15 的药物组合物，其中表面活性生物改性剂为多糖。

23. 权利要求 22 的药物组合物，其中多糖选自淀粉、肝素、壳聚糖和其混合物。

24. 权利要求 15 的药物组合物，其中表面活性剂包括磷脂。

25. 权利要求 24 的药物组合物，其中磷脂选自天然的磷脂和合成的磷脂。

26. 权利要求 24 的药物组合物，其中磷脂选自：磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、二酰基-甘油基-磷酸乙醇胺、二肉豆蔻酰-甘油基-磷酸乙

醇胺 (DMPE)、二棕榈酰基-甘油基-磷酸乙醇胺 (DPPE)、二硬脂酰-甘油基-磷酸乙醇胺 (DSPE)、二油酰基-甘油基-磷酸乙醇胺 (DOPE)、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酰甘油、磷脂酸、溶血磷脂、聚乙二醇-磷脂偶联物、卵磷脂和大豆磷脂。

27. 权利要求 24 的药物组合物, 其中磷脂进一步包括共价连接至配体的官能团。

28. 权利要求 27 的药物组合物, 其中配体选自 PEG、蛋白质、肽、糖类、糖蛋白、抗体和药物活性剂。

29. 权利要求 15 的药物组合物, 其中表面活性剂包括胆汁酸或其盐。

30. 权利要求 29 的药物组合物, 其中表面活性剂选自脱氧胆酸、甘氨酸胆酸、甘氨酸脱氧胆酸、牛磺胆酸和这些酸的盐。

31. 权利要求 15 的药物组合物, 其中表面活性剂包括氧乙烯和氧丙烯的共聚物。

32. 权利要求 31 的药物组合物, 其中氧乙烯和氧丙烯的共聚物为嵌段共聚物。

33. 权利要求 1 的药物组合物, 其中分散体中的颗粒通过 XRD 测定为无定形的、半结晶的、结晶的或其组合。

34. 权利要求 1 的药物组合物, 其中抗-逆转录病毒药剂为蛋白酶抑药剂。

35. 权利要求 34 的药物组合物, 其中蛋白酶抑药剂选自印地那韦、

利托那韦、沙奎那韦和奈非那韦。

36. 权利要求 1 的药物组合物，其中抗-逆转录病毒药剂为印地那韦。

37. 权利要求 1 的药物组合物，其中治疗剂为核苷逆转录酶抑制剂。

38. 权利要求 37 的药物组合物，其中核苷逆转录酶抑制剂选自：叠氮胸苷、双脱氧肌苷、斯塔夫定、扎西他宾和拉米夫定。

39. 权利要求 1 的药物组合物，其中治疗剂为非核苷逆转录酶抑制剂。

40. 权利要求 30 的药物组合物，其中非核苷逆转录酶抑制剂选自奈韦拉平和地拉韦啉。

41. 权利要求 1 的药物组合物，其中治疗剂用于治疗中枢神经系统中的 HIV 感染。

42. 权利要求 1 的药物组合物，其中提供分散体的步骤包括通过匀浆方法匀浆药物组合物的步骤。

43. 权利要求 1 的药物组合物，其中提供分散体的步骤包括通过微量沉淀/匀浆方法匀浆药物组合物的步骤。

44. 权利要求 1 的药物组合物，其中药物组合物的分散体经鞘内或经硬膜外给药。

45. 权利要求 1 的药物组合物，其中药物组合物的分散体在给药

之前灭菌。

46. 权利要求 45 的药物组合物，其中灭菌通过加热灭菌或  $\gamma$  射线照射进行。

用于提高中枢神经系统投递  
的抗-逆转录病毒药剂的纳米悬浮液

联邦政府赞助的研究或开发：

不适用

### 发明背景

### 技术领域

本发明涉及包括抗-逆转录病毒药剂纳米悬浮液的组合物及其制备方法。该组合物通过微量沉淀和能量添加的方法制备。该组合物尤其可用于投递抗-逆转录病毒药剂至哺乳动物受试者的脑而用于HIV感染的治疗。

### 背景技术

用于治疗患者脑病症或疾病的药物或药剂通常口服给药。然而，所摄取药物的大部分并不靶向至脑而是通过肝脏代谢。药物的低效利用可能需要摄入对肝脏也是有害的更高药物浓度。此外，较低量的药物能到达脑，导致患者服用剂量的频率提高。药物更有效的利用可通过消除肝脏代谢以及直接靶向脑而实现。该问题的一种解决方法涉及通过利用能到达脑的细胞投递药物而传送药物。例如，一种具体的投递模式涉及利用患者脑脊液(CSF)中存在的巨噬细胞以投递药物至脑。该方法要求药物组合物为颗粒形式，其允许巨噬细胞通过吞噬作用很容易地摄取。

药物通过巨噬细胞而不是口服摄入投递至脑具有许多优点。由于巨噬细胞可吞噬的颗粒形式固有的高包装特点，提高了能投递的药物的装载量或数量。因为药物给药至CSF，由于该药物不暴露于体循环而随后传递至肝脏，就避免了肝脏代谢。一旦药物给药进入CSF，其



可作为延长释放的贮存库而持续数周或数月。

作为颗粒，药物被脑的巨噬细胞摄入，该细胞对病毒和细菌疾病如人类免疫缺陷性病毒（HIV）给予庇护。由于药物在脑巨噬细胞中浓缩，感染生物体暴露于非常大量的药物而因此杀死生物体。巨噬细胞可透过脑脊液-脑屏障而进入脑并且由于巨噬细胞内颗粒的溶解而释放药物浓缩物进入脑。因此，脑中存在的游离的病毒和细菌生物体暴露于比通常通过口服给药而能投递的更高浓度的药物。脑能更快速地清除微生物生物体而因此防止耐药生物体的出现。此外，可减轻体内致病生物体在体内的连续接种和永存。以该方式给予该药物可使用较低的药物水平而提高脑内药物的利用。通过本发明可避免药物过度的肝脏代谢并且降低治疗费用。

因此需要能投递至脑的抗-逆转录病毒药剂药剂的纳米悬浮液和其制造方法。

### 发明概述

本发明提供包括抗-逆转录病毒药剂药剂纳米悬浮液的组合物和制造方法。该纳米悬浮液通过微量沉淀和能量添加的方法制备。优选，该纳米悬浮液通过微量沉淀-均化作用的串联方法制备。

本发明的纳米悬浮液可通过细胞运输而投递抗-逆转录病毒药剂药剂至哺乳动物受试者的脑。该组合物可用于投递抗-逆转录病毒药剂至脑以治疗 HIV 感染。在一个优选的实施方案中，该方法包括步骤：

(i) 从哺乳动物受试者分离细胞，(ii) 将细胞与平均粒径为约 100nm 至约 100  $\mu$  m（优选 100nm 至约 8  $\mu$  m）的抗-逆转录病毒药剂颗粒的纳米悬浮液接触，(iii) 提供足够的时间用于颗粒的细胞摄取，和 (iv) 将装载的细胞给药至哺乳动物受试者以投递部分药物组合物至脑。哺乳动物受试者具有许多类型能进行此类颗粒的细胞摄取和运输的细胞。这些细胞包括，但不限于，T-淋巴细胞、巨噬细胞、单核细胞、粒

细胞、嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞。该方法可用于投递抗-逆转录病毒药剂至脑以治疗 HIV 感染。

### 附图简述

图 1 显示了利用设计以评估制剂长期稳定性的试验的印地那韦 (Indinavir) 纳米悬浮液胁迫试验结果。

图 2 显示了利用高压匀浆技术产生的印地那韦纳米悬浮液的长期稳定性数据。

### 发明详述

本发明容许许多不同方式的实施方案。本发明优选的实施方案按照这样的理解公开，即所公开的被认为是本发明原理的例证而不试图将本发明的广泛的方面限制于举例说明的实施方案。

本发明提供包括抗--逆转录病毒药剂分散体的组合物和制造方法。该分散体或纳米悬浮液通过微量沉淀和能量添加的方法制备。优选，该纳米悬浮液通过微量沉淀-均化作用的串联方法制备。

这些方法中的抗-逆转录病毒药剂可以为蛋白酶抑制剂、核苷逆转录酶抑制剂或非核苷逆转录酶抑制剂。蛋白酶抑制剂的实例包括但不限于印地那韦 (indinavir)、利托那韦 (ritonavir)、沙奎那韦 (saquinavir) 和奈非那韦 (nelfinavir)。核苷逆转录酶抑制剂的实例包括但不限于叠氮胸苷 (zidovudine)、双脱氧肌苷 (didanosine)、斯塔夫定 (stavudine)、扎西他宾 (zalcitabine) 和拉米夫定 (lamivudine)。非核苷逆转录酶抑制剂的实例包括但不限于奈韦拉平 (nevirapin) 和地拉韦啉 (delaviradine)。

本发明提供用于通过细胞运输投递药物组合物至哺乳动物受试者脑的方法。下列药物组合物的描述适用于本发明的所有实施方案。药物组合物可以为难溶于水的或溶于水的。药物组合物还可以为治疗剂

或诊断试剂。治疗剂可包括用于治疗中枢神经系统病症或脑疾病或病症的任何化合物。中枢神经系统病症可以是帕金森氏症、阿尔茨海默氏病、癌症、病毒感染、真菌感染、细菌感染和海绵状脑病。

药物组合物可进一步包括表面活性剂以稳定药物组合物。表面活性剂可选自各种已知的阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、非离子型表面活性剂和表面活性的生物学改性剂。

优选药物组合物为难溶于水的化合物。“难溶于水的”的意思为化合物在水中的溶解度小于约 10mg/mL，并且优选小于 1mg/mL。这些难溶于水的化合物非常适于含水的悬浮液制剂，因为少有替代在含水介质中配制这些化合物的其他方式。

下列颗粒的描述适用于本发明的所有实施方案。如通过 XRD 所测定的，分散体中的颗粒可以是无定形的、半结晶的、结晶的或其组合。给药前，药物组合物可通过匀浆方法搅匀。药物组合物还可通过微量沉淀/匀浆方法搅匀。

药物组合物的分散体可在给药前灭菌。灭菌可通过任何医疗灭菌方法包括加热灭菌或通过  $\gamma$  射线照射灭菌而进行。

本发明可利用溶于水的化合物实施。这些溶于水的活性物质被包裹在固体载体基质（例如，聚乳酸-聚羟乙酸酯共聚物、白蛋白、淀粉）中，或在药物化合物不能渗透的环绕泡囊中。包裹的泡囊可以是聚合的包衣如聚丙烯酸酯。此外，根据这些溶于水的化合物制备的小颗粒可经修饰以提高化学稳定性并且通过控制化合物从颗粒的释放而控制化合物的药物动力学性质。水溶性化合物的实例包括，但不限于简单的有机化合物、蛋白质、肽、核苷酸、寡核苷酸和糖类。

如通过动态光散射法，例如光相关光谱、激光衍射、小角度激光

散射 (LALLS)、中角度激光散射 (MALLS)、光模糊法 (例如库特方法)、流变学或显微术 (光或电子) 所测定的, 本发明中使用的颗粒具有通常约 100nm 至约 100  $\mu$  m, 优选从约 100nm 至约 8  $\mu$  m, 并且最优选从约 100nm 至约 400nm 的平均有效粒径。优选的平均有效粒径取决于如化合物所想要的给药途径、制剂、溶解度、毒性和生物利用率的 因素。

#### A. 作为颗粒的药物组合物的制备

用于本发明的制备颗粒的方法可通过本领域技术人员所知的许多技术实现。下面是用于制备药物组合物颗粒分散体的代表性的但非穷举的技术的讨论。

##### I. 用于形成小颗粒分散体的能量添加技术

通常, 利用能量添加技术制备小颗粒分散体的方法包括的步骤是: 以大批量的形式将有时应称为药物的药物活性化合物添加至合适的媒介物如含有一种或多种下文所述表面活性剂的水或基于水的溶液, 或其他液体中, 在这些媒介物中药物化合物没有可观察的溶解, 以形成第一悬浮液。能量加至第一悬浮液以形成颗粒分散体。能量通过机械研磨、珠碾磨、球碾磨、锤碾磨、液能碾磨或湿研磨而添加。所述技术在美国专利 No.5,145,684 中公开, 其在此作为参考引入而为本文的一部分。

能量添加技术进一步包括将第一悬浮液经受高剪切条件, 包括、利用微流器的空化作用、剪切力或冲击力。本发明进一步构思利用如美国专利 No.5,091,188 中所公开的带活塞口的 (piston gap) 均质器或逆流流动均质器添加能量至第一悬浮液, 上述专利在此作为参考引入而为本文的一部分。合适的带活塞口的均质器为市场上可买到的, Avestin 的产品名称 EMULSIFLEX 和 Spectronic Instruments 销售的 French Pressure Cells。合适的微流器可从 Microfluidics Corp 获得。

添加能量的步骤还可利用超声技术完成。超声的步骤可用任何合适的超声装置如 Branson Model S-450A 或 Cole-Parmer 500/750 Watt Model 进行。所述装置在本领域为大家所熟知。通常声处理装置具有超声处理角或探针，其插入第一悬浮液以散发声能进入溶液。在本发明优选的中超声装置形式以约 1kHz 至约 90kHz 且更优选约 20kHz 至约 40kHz 或其范围内的任何范围或组合的频率操作。所述探针的大小可变且优选不同大小，例如 1/2 英寸或 1/4 英寸等等。

与所用的能量添加技术无关，小颗粒的分散体在利用前必须灭菌。灭菌可利用如下所述的高压灭菌技术完成。

## II. 用于制备亚微米大小的颗粒分散体的沉淀法

微粒分散体还可通过熟知的沉淀技术制备。下列为沉淀技术实例的描述。

### 微量沉淀方法

微量沉淀方法的一个实例在美国专利 No.5,780,062 中公开，其在此作为参考引入而成本文的一部分。该 062 专利公开了有机化合物沉淀方法，包括：(i) 将有机化合物溶解于水-可混溶的第一溶剂中；(ii) 制备聚合物和两亲物在含水的第二溶剂中的溶液并且有机化合物基本上不溶解在第二溶剂中，从而形成聚合物/两亲物的复合物；和 (iii) 将步骤 (i) 和 (ii) 的溶液混合以沉淀有机化合物和聚合物/两亲物复合物的聚集体。

合适的沉淀方法的另一个实例在共同未决且共同转让的美国系列号 09/874,499；09/874,799；09/874,637 和 10/021,692 中公开，其在此作为参考引入而成为本文的一部分。公开的方法包括步骤：(1) 将有机化合物溶解于水溶性的第一有机溶剂中以制得第一溶液；(2) 将第一溶液与第二溶剂或水混合以沉淀有机化合物而制得第一悬浮液；和 (3) 以高剪切力混合或加热的形式添加能量至第一悬浮液以提供微粒

的分散体。下文所述的一种或多种任选的表面改性剂可加至第一有机溶剂或第二含水溶剂。

### 乳液沉淀方法

一种合适的乳液沉淀技术在共同未决且共同转让的美国系列号 09/964,273 中公开，其在此作为参考引入而成为本文的一部分。在该方法中，方法包括步骤：（1）提供具有有机相和含水相的多相系统，其中有机相含有药物活性物质；和（2）超声处理该系统以蒸发部分有机相而在水相中沉淀化合物以形成小颗粒的分散体。提供多相系统的步骤包括步骤：（1）将水溶性的溶剂与药物活性物质混合以确定有机溶液，（2）用一种或多种表面活性化合物制备含水溶液，和（3）将有机溶液与含水溶剂混合而形成多相系统。混合有机相和水相的步骤可包括带活塞口的均质器、胶体磨碎机、高速搅拌设备、挤出设备、人工搅拌或振荡设备、微流器或用于提供高剪切条件的其他设备或技术的利用。粗制的乳液将具有在水中大约小于  $1\ \mu\text{M}$  直径大小的油滴。粗制的乳液经超声处理以确定微乳剂并且最终提供微粒的分散体。

制备小颗粒分散体的另一种方法在共同未决且共同转让的美国系列号 10/183,035 中公开，其在此作为参考引入而成为本文的一部分。该方法包括步骤：（1）提供具有有机相和水相的多相系统的粗制分散体，其中该有机相含有药物化合物；（2）提供能量至粗制分散体以形成精细的分散体；（3）冷冻精细的分散体；和（4）冻干精细的分散体而获得药物化合物的小颗粒。微粒可通过下文所述的技术灭菌或者小颗粒可在含水介质中重建且灭菌。

提供多相系统的步骤包括步骤：（1）将水不可混溶的溶剂与药物有效的化合物混合以确定有机溶液；（2）用一种或多种表面表面活性化合物制备含水溶液；和（3）将有机溶液与含水溶剂混合而形成多相系统。混合有机相和水相的步骤包括带活塞口的均质器、胶体磨碎机、高速搅拌设备、挤出设备、人工搅拌或振荡设备、微流器或用于提供

高剪切条件的其他设备或技术的利用。

### 溶剂的抗-溶解沉淀

小颗粒分散体还可利用美国专利 No.5,118,528 和 5,100,591 中公开的溶剂反溶剂沉淀技术制备，其在此作为参考引入而成为本文的一部分。该方法包括步骤：（1）制备在一种溶剂或溶剂混合物中生物活性物质的液相，溶剂中可添加一种或多种表面活性剂；（2）制备一种反溶剂或几种反溶剂混合物的第二液相，该反溶剂与该物质的溶剂或溶剂混合物能够混溶；（3）将（1）和（2）中的溶液随着搅拌加到一起；和（4）除去不需要的溶剂以产生小颗粒的分散体。

### 相反转沉淀

小颗粒分散体可利用美国专利 No.6,235,224, 6,143,211 和美国专利申请号 2001/0042932 中公开的相反转沉淀形成，每篇在此作为参考引入而成为本文的一部分。相反转为用于描述物理现象的术语，溶于连续相溶剂系统的聚合物通过上述现象反转为固体大分子的网状结构，其中该聚合物为连续相。诱导相反转的一种方法为非溶剂添加至连续相。聚合物经历从单相至不稳定的双相混合物的转变：聚合物富集的和聚合物缺乏的级分。聚合物富集相中的非溶剂微胶粒充当成核部位并且由聚合物包被。该 224 专利公开了在一定条件下聚合物溶液的相反转可引起分散微粒，包括纳米颗粒的自发形成。该 224 专利公开了在溶剂中溶解或分散聚合物。药物试剂也溶解或分散在该溶剂中。为了使该方法中晶体接种的步骤有效，该试剂需要溶于溶剂中。聚合物、试剂和溶剂一起形成具有连续相的混合物，其中溶剂为连续相。混合物随后被引入至少十倍过量的可混溶的非溶剂中以促使具有 10nm 和 10 $\mu$ m 之间平均粒度的该试剂微胶囊化的微粒的自发形成。粒径受溶剂的影响：非溶剂体积比、聚合物浓度、聚合物-溶剂溶液的粘度、聚合物分子量和溶剂-非溶剂配对的特征。

### pH 转变沉淀

小颗粒分散体还可通过 pH 转变沉淀技术形成。所述技术通常包括将药物溶解于具有药物可溶的 pH 的溶液中的步骤，随后将 pH 改变至药物不再可溶的那一步骤。pH 可以是酸性或碱性的，取决于具体的药物化合物。溶液随后经中和而形成小颗粒分散体。一种合适的 pH 转变沉淀方法在美国专利 No.5,665,331 中公开，其在此作为参考引入而成为本文的一部分。该方法包括将药物制剂与晶体生长改性剂（CGM）一起溶解于碱性溶液中以及随后用酸在合适的表面-改性表面活性剂或试剂存在的条件下中和该溶液以形成药物制剂的小颗粒分散体的步骤。沉淀步骤之后可紧接着进行分散体的透滤净化步骤并且随后调节分散体的浓度至所想要的水平。

pH 转变沉淀方法的其他实例在美国专利 No.5,716,642; 5,662,883; 5,560,932 和 4,608,278 中公开，其在此作为参考引入而成为本文的一部分。

#### 注入沉淀方法

形成小颗粒分散体的合适的注入沉淀技术在美国专利 No.4,997,454 和 4,826,689 中公开，其在此作为参考引入而成为本文的一部分。首先，合适的固体化合物溶于合适的有机溶剂以形成溶剂混合物。随后，在约-10°C 和约 100°C 之间的温度以及以每 50ml 体积每分钟约 0.01ml 至每分钟约 1000ml 的注入速率将沉淀用的与有机溶剂可混溶的非溶剂注入溶剂混合物中而产生化合物沉淀的非聚集的固体颗粒悬浮液，所述颗粒具有基本上均匀的小于 10  $\mu$  m 平均直径。在沉淀用的非溶剂注入溶液时的搅动（例如，通过搅拌）是优选的。非溶剂可含有表面活性剂以稳定颗粒以防聚集。颗粒随后与溶剂分离。根据本发明，取决于固体化合物和所想要的粒径，温度、非溶剂与溶剂的比率、注入速率、搅拌速率和体积的参数可而改变。粒径与非溶剂：溶剂体积的比率和注入温度成正比并且与注入速率和搅拌速率成反比。沉淀用的非溶剂可以是含水的或无水的，取决于化合物的相对溶解度以及所想要的悬浮媒介物。



### 温度转变沉淀

温度转变沉淀技术也可用于形成小颗粒分散体。该技术在美国专利 No.5,188,837 中公开，其在此作为参考引入而成为本文的一部分。在本发明一个实施方案中，脂质球（lipospheres）通过下列步骤制备：

（1）将将要投递的物质如药物熔化或溶解于熔化的媒介物中以形成待投递的该物质的液体；（2）在高于该物质或媒介物熔化温度的温度下将磷脂与含水介质一起添加至所熔化的物质或媒介物；（3）在高于媒介物熔化温度的温度下混合悬浮液直至获得同质的精细制剂；和随后（4）快速冷却该制剂至室温或室温以下。

### 溶剂蒸发沉淀

溶剂蒸发沉淀技术在美国专利 No.4,973,465 中公开，其在此作为参考引入而成为本文的一部分。该 465 专利公开了用于制备微晶体的方法，包括步骤：（1）提供溶于常见的有机溶剂或溶剂组合中的药物组合物和磷脂的溶液，（2）蒸发该溶剂或多种溶剂和（3）通过强烈搅拌而悬浮薄膜以形成微粒分散体，该薄膜通过蒸发含水溶液中溶剂或多种溶剂而获得。可通过添加能量至该溶液而蒸发足够量的溶剂而除去溶剂以促使化合物的沉淀。还可以通过其他熟知的技术如施用真空至该溶液或吹入氮气至该溶液而除去溶剂。

### 反应沉淀

反应沉淀包括将药物化合物溶解入合适的溶剂中而形成溶液的步骤。应以化合物在该溶剂中的饱和点或饱和点以下的量添加化合物。通过与化学试剂反应或通过响应添加能量如热或紫外线等而修饰该化合物，以使修饰的化合物具有在该溶剂中较低的溶解度并且从溶液中沉淀而形成小颗粒分散体。

### 压缩流体沉淀

用于通过压缩流体而沉淀的合适的技术在 Johnson 的 WO

97/14407 中公开，其在此作为参考引入而成为本文的一部分。该方法包括将不溶于水的药物溶解在溶剂中而形成溶液的步骤。溶液随后喷入压缩的流体中，其可以是气体、液体或超临界流体。压缩的流体添加至溶剂中溶质的溶液引起溶质的获得或接近过饱和的状态并且以微颗粒沉淀析出。在这种情况下，压缩流体用作降低药物溶解于其中的溶剂的内聚能量密度的反溶剂。

或者，药物可溶于压缩流体，该流体随后喷入水相中。压缩流体快速的扩散降低了流体的溶剂能力，其随后引起溶质在水相中以小颗粒沉淀析出。在这种情况下，压缩流体用作溶剂。

为了稳定颗粒以防聚集作用，该技术中包括了表面改性剂，如表面活性剂。

### 蛋白质微球体沉淀

本发明中所用的微球体或微粒还可通过涉及将大分子如蛋白质与水溶性聚合物混合或溶解的方法产生。该方法在美国专利 No.5,849,884、5,981,719、6,090,925、6,268,053、6,458,387 和美国临时申请号 60/244,098 中公开，其在此作为参考引入而成为本文的一部分。在本发明的一个实施方案中，通过将溶液中的大分子与的聚合物或聚合物的混合物的接近该大分子等电点 pH 的溶液中混合而制备微球体。混合物在能源，如热、辐射或电离存在时温育预定的时间量。得到的微球体可通过物理分离方法从溶液中存在的任何未结合的组分中除去。

存在许多用于制备小颗粒分散体的其他方法。本发明提供了用于最后对所述分散体灭菌而不显著影响制剂效力的方法。

### III.用于制备药物组合物颗粒分散体的另外的方法

下列用于本发明的制备药物组合物（即有机化合物）颗粒的另外

的方法可分成总共四类。每一类方法共有的步骤有：（1）将有机化合物溶于水可混溶的第一溶剂以产生第一溶液，（2）将第一溶液与第二溶剂水混合以沉淀该有机化合物而产生预悬浮液，和（3）以高-切剪混合或热或两者结合的形式添加能量至第一悬浮液而提供具有以上限定的所需大小范围的稳定形式的该有机化合物。混合步骤和添加能量步骤可以通过连续的步骤或同时进行。

方法的类型基于通过在能量-添加步骤之前和能量-添加步骤之后进行的 X 射线衍射研究、差示扫描量热法（DSC）研究或其他合适的研究所测定的有机化合物的物理特性而区分。在第一类方法中，能量-添加步骤之前第一悬浮液中的有机化合物以无定形形式、半结晶形式或过冷液体形式存在并且具有平均有效粒径。能量-添加步骤之后有机化合物为具有基本上与第一悬浮液中的相同或小于其的平均有效粒径的结晶形式。

在第二类方法中，能量-添加步骤之前有机化合物为结晶形式并且具有平均有效粒径。能量-添加步骤之后有机化合物为具有与能量-添加步骤之前基本上相同的平均有效粒径的结晶形式但是能量-添加步骤之后的晶体较不容易聚集。

有机化合物不易聚集的趋势通过激光动态光散射和光学显微术观察到。

在第三类方法中，能量-添加步骤之前有机化合物为易碎的结晶形式并且具有平均有效粒径。术语"易碎的"是指颗粒为脆性的并且更容易分解为较小的颗粒。能量-添加步骤之后有机化合物为结晶形式，其平均有效粒径小于预悬浮液中的晶体。通过采用必要的步骤使有机化合物以易碎的结晶形式存在，与较不易碎的结晶形式的有机化合物相比，后续的能量-添加步骤可更快速和有效地进行。

在第四类方法中，第一溶液和第二溶剂同时进行能量-添加步骤。因此，没有测定能量添加步骤前后有机化合物的物理特性。

能量-添加步骤可以通过使第一悬浮液或第一溶液和第二溶剂受到空化、剪切力或冲击力中的任何方式而进行。在一种优选的方式中，能量-添加步骤为退火步骤。本发明中退火定义为通过单次或多次施加能量（直接加热或机械加压），接着热松弛而将热力学不稳定的物质转化为更稳定形式的过程。能量的降低可通过固体形式从不够有序的晶格结构转化为更有序的晶格结构而实现。或者，该稳定化可通过固液相交界面处表面活性剂分子的重排而实现。

这四类方法将在下文逐一显示。然而应当理解的是，方法的条件，如表面活性剂的或表面活性剂组合的选择、表面活性剂的用量、反应温度、溶液混合速率、沉淀速率等等，在选择时要考虑到允许任何一种药物在下文所述任一类方法中的处理。

第一类方法，以及第二类、第三类和第四类方法可进一步分为两个亚类，方法 A 和 B。

根据下列方法的第一溶剂为溶剂或溶剂的混合物，在其中目的有机化合物相对可溶并且其可与第二溶剂混溶。所述溶剂包括，但不限于水-可混溶的质子化合物，在其中分子中的氢原子结合带负电的原子如氧、氮或元素周期表中的其他族 VA、VIA 和 VIIA。所述溶剂的实例包括，但不限于醇、胺（伯胺或仲胺）、脲、异羟肟酸、羧酸、磺酸、膦酸、磷酸、酰胺和尿素。

第一溶剂的其他实例还包括质子惰性的有机溶剂。一些这种质子惰性溶剂的可与水形成氢键，但是由于其缺乏有效的质子提供基团，只能充当质子受体。如 International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC Compendium of Chemical Terminology, 2<sup>nd</sup> Ed., 1997) 所定

义的，质子惰性溶剂的一种类型为偶极质子惰性溶剂：

一种溶剂，具有相对高的相对电容率（或介电常数），大于 ca.15，以及相当大的永久偶极矩的，无法适当地提供不稳定的氢原子以形成强氢键，例如二甲亚砷。

偶极质子惰性溶剂可选自：酰胺（完全取代，具有无氢原子附着的氮）、尿素（完全取代，无氢原子附着于氮）、醚、环醚、腈、酮、砷、亚砷、完全取代的磷酸盐、磷酸酯、磷酰胺、硝基化合物等等。除此之外，该类的成员有二甲亚砷（DMSO）、N-甲基-2-吡咯烷酮（NMP）、2-吡咯烷酮、1,3-二甲基咪唑啉酮（DMI）、二甲基乙酰胺（DMA）、二甲基甲酰胺（DMF）、二恶烷、丙酮、四氢呋喃（THF）、四亚甲基砷（二氢噻吩烷）、乙腈和六甲基磷酰胺（HMPA）、硝基甲烷。

还可选择通常与水不溶混的，但是在小体积时（小于 10%）具有足够水溶性的溶剂以该小体积时充当水-可混溶的第一溶剂。实例包括芳香烃、烯烃、烷烃和卤化芳香族物质、卤化烯烃和卤化烷烃。芳族化合物包括，但不限于苯（取代或未取代的）和单环或多环的芳烃。取代苯的实例包括，但不限于二甲苯（邻、间或对）和甲苯。烷烃的实例包括但不限于己烷、新戊烷、庚烷、异辛烷和环己烷。卤化芳香族物质的实例包括，但不限于，氯苯、溴苯和氯甲苯。卤化烷烃和烯烃的实例包括，但不限于三氯乙烷、二氯甲烷、二氯乙烯（EDC）等等。

以上全部溶剂种类的实例包括但不限于：N-甲基-2-吡咯烷酮（又称作 N-甲基-2-吡咯烷酮）、2-吡咯烷酮（又称作 2-吡咯烷酮）、1,3-二甲基-2-咪唑啉酮（DMI）、二甲亚砷、二甲基乙酰胺、乙酸、乳酸、甲醇、乙醇、异丙醇、3-戊醇、正丙醇、苯甲醇、甘油、丁烯乙二醇（丁二醇）、乙二醇，丙二醇，单或二酰化甘油一酯（如辛酸甘油酯），二甲基异山梨醇，丙酮，二甲砷、二甲基甲酰胺，1,4-二恶烷、四亚

甲基砜(二氧噻吩烷)、乙腈、硝基甲烷、四甲脒、六甲基磷酰胺(HMPA)、四氢呋喃(THF)、二恶烷、二乙基醚、叔丁基甲基醚(TBME)、芳香烃、烯烃、烷烃、卤化芳香族物质、卤化烯烃、卤化烷烃、二甲苯、甲苯、苯、取代苯、乙酸乙酯、乙酸甲酯、乙酸丁酯、氯苯、溴苯、氯甲苯、三氯乙烷、二氯甲烷、二氯乙烯(EDC)、己烷、新戊烷、庚烷、异辛烷、环己烷、聚乙二醇(PEG, 例如 PEG-4、PEG-8、PEG-9、PEG-12、PEG-14、PEG-16、PEG-120、PEG-75、PEG-150)、聚乙二醇酯(实例如 PEG-4 二月桂酸酯、PEG-20 二月桂酸酯、PEG-6 异硬脂酸酯、PEG-8 棕榈酸硬脂酸酯、PEG-150 棕榈酸硬脂酸酯)、聚乙二醇脱水山梨糖醇(如 PEG-20 脱水山梨糖醇异硬脂酸酯)、聚乙二醇单烷基醚(实例如 PEG-3 二甲醚、PEG-4 二甲醚)、聚丙二醇(PPG)、聚海藻酸丙二醇酯、PPG-10 丁二醇、PPG-10 甲基葡萄糖醚、PPG-20 甲基葡萄糖醚、PPG-15 十八烷基醚、二辛酸/二癸酸丙二醇酯、月桂酸丙二醇酯和糖糠醛(四氢糠醇聚乙二醇醚)。优选的第一溶剂为 N-甲基-2-吡咯烷酮。另一种优选的第一溶剂为乳酸。

第二溶剂为含水溶剂。该含水溶剂可以是水本身。该溶剂也可含有缓冲液、盐、表面活性剂、水溶性聚合物和这些赋形剂的组合。

#### 方法 A

方法 A 中(参见图 1), 有机化合物("药物")首先溶于第一溶剂以产生第一溶液。依据有机化合物在第一溶剂中的溶解度, 加入的有机化合物可从约 0.1% (w/v) 到约 50% (w/v)。为确保其能够在第一溶剂中完全溶解, 可能需要对浓溶液从约 30°C 加热到约 100°C。

第二含水溶剂可加入一种或多种任意的表面改性剂, 如阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、非离子表面活性剂或生物表面活性分子。合适的阴离子表面活性剂包括但不限于, 烷基磺酸酯、烷基磷酸酯、烷基膦酸酯、月桂酸钾、三乙醇胺硬脂酸酯、十二烷基硫酸钠、十二烷基磺酸钠、烷基聚氧乙烯硫酸酯、藻酸钠, 二辛基磺基丁二酸

钠、磷脂酰胆碱、磷脂酰甘油、磷脂酰肌苷、磷脂酰丝氨酸、磷脂酸及其盐、甘油酯、羧甲基纤维素钠、胆酸及其他胆汁酸（例如，胆酸、脱氧胆酸、甘氨酸、牛磺胆酸、甘氨酸脱氧胆酸）和其盐（例如，脱氧胆酸钠等等）。合适的阳离子表面活性剂包括但不限于，季铵类化合物，如苯扎氯铵、十六烷基三甲溴化胺、壳聚糖、氯化十二烷基二甲基苄基铵、盐酸酰基肉碱或烷基吡啶卤化物。作为阴离子表面活性剂，可利用磷脂。合适的磷脂包括，例如磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、二酰基-甘油基-磷酸乙醇胺（如二肉豆蔻酰-甘油基-磷酸乙醇胺（DMPE）、二棕榈酰基-甘油基-磷酸乙醇胺（DPPE）、二硬脂酰-甘油基-磷酸乙醇胺（DSPE）和二油酰基-甘油基-磷酸乙醇胺（DOPE））、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酰甘油、磷脂酸、溶血磷脂、卵磷脂或大豆磷脂或其组合。磷脂可加盐或脱盐，氢化或部分氢化，或为天然的、半合成的或合成的。磷脂也可与水溶性的或亲水聚合物偶联。优选的聚合物为聚乙二醇（PEG），其亦称单甲氧基聚乙二醇（mPEG）。PEG 的分子量可变化，例如从 200 至 50,000。一些市场上可买到的常用 PEG 包括 PEG350、PEG550、PEG750、PEG1000、PEG2000、PEG3000 和 PEG5000。磷脂或 PEG-磷脂偶联物也可包含能共价附着于配体的官能团，包括但不限于蛋白质、肽、糖类、糖蛋白、抗体或药物活性剂。这些官能团可通过例如，形成酰胺键、二硫化物或硫醚，或生物素/链亲和素结合而与配体偶联。配体-结合的官能团的实例包括但不限于，己酰胺、十二烷酰胺、1, 12-十二烷双羧酸盐、硫乙醇、4-（*p*-马来酰亚胺基苯基）丁酰胺（MPB）、4-（*p*-马来酰亚胺基甲基）环己烷-羧酰胺（MCC）、3-（2-二硫吡啶基）丙酸酯（PDP）、琥珀酸盐、戊二酸、十二酸盐和生物素。

合适的非离子表面活性剂包括：聚氧化乙烯脂肪醇醚（Macrogol 和 Brij）、聚氧乙烯脱水山梨糖醇脂肪酸酯（Polysorbates）、聚氧乙烯脂肪酸酯（Myrj）、脱水山梨糖醇酯（Span）、单硬脂酸甘油酯、聚乙二醇、聚丙二醇、十六烷醇、十六醇十八醇混合物、十八烷醇、芳基烷基聚醚醇、聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物（poloxamers）、保丽视

明 (poloxamines)、甲基纤维素、羟甲基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、非结晶的纤维素、多糖包括淀粉和衍生物如羟乙基淀粉 (HES)、聚乙烯醇和聚乙烯吡咯烷酮。在优选的方式中, 非离子表面活性剂为聚氧化乙烯和聚氧化丙烯的共聚物并且优选为丙二醇和乙二醇的嵌段共聚物。所述聚合物以商品名 POLOXAMER 销售, 有时也可称为 PLURONIC®, 几家供应商都有销售, 包括 Spectrum Chemical 和 Ruger。聚氧乙烯脂肪酸酯中也包含那些短链的化合物。这种表面活性剂的一个例子是 SOLUTOL®HS 15, 聚乙烯-660-羟基硬脂酸酯, 由 BASF 股份有限公司生产。

生物表面活性分子包括白蛋白、酪蛋白、水蛭素或其它合适的蛋白质分子。还包括多糖生物制剂, 由淀粉、肝素、壳聚糖组成, 但不限于此。

第二溶液中还可如所需加入 pH 调节剂如氢氧化钠、盐酸、tris 缓冲液或柠檬酸盐、醋酸盐、乳酸盐或葡甲胺等。第二溶液的 pH 范围约为 3-11。

对于口服剂型, 可采用一种或多种以下赋形剂: 明胶、酪蛋白、卵磷脂 (磷脂)、阿拉伯树胶、胆固醇、黄芪胶、硬脂酸、苯扎氯铵、硬脂酸钙、硬脂酸单甘油酯、十六醇十八醇混合物、聚西托醇乳化蜡、脱水山梨糖醇酯、聚氧化乙烯烷基醚, 如聚乙二醇醚, 如聚西托醇 1000、聚氧化乙烯蓖麻油衍生物、聚氧化乙烯脱水山梨糖醇脂肪酸酯, 如市场上可买到的 Tween™、聚丙二醇、聚氧乙烯硬脂酸酯、胶体二氧化硅、磷酸盐、十二烷基硫酸钠、羧甲基纤维素钙、羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素苯二甲酸酯、非结晶的纤维素、硅酸镁铝、三乙醇胺、聚乙烯醇 (PVA)、聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)。这些赋形剂大多数在美国药物学会和大不列颠药物学会共同出版的药物赋形剂手册 (Handbook of Pharmaceutical Excipients) 中有详细介绍, 本书 1986 年由药物出版社出版。表面改性



剂为市场上可买到的和/或可通过本领域已知技术制备。两种或多种表面改性剂可联合使用。

在优选的方式中，用于制备有机化合物小颗粒的方法包括添加第一溶液至第二溶剂的步骤。加入速率取决于批次规模和有机化合物的沉淀动力学。通常，对于实验室小试规模的方法（制备 1 升），加入速率为每分钟约 0.05cc 至每分钟约 10cc。在添加过程中，溶液应恒速搅拌。用光学显微镜已观察到无定形颗粒、半结晶固体或过冷液体形成而得到预悬浮液。该方法还包括使预悬浮液经过能量-添加步骤的步骤，以便让无定形颗粒、过冷液体或半结晶固体转化为更加稳定的结晶固体固态。得到的颗粒将具有用动态光散射方法测定的平均有效粒径（例如，上述范围内的光相关光谱、激光衍射、小角度激光散射（LALLS）、中角度激光散射（MALLS）、光模糊法（如库特方法）、流变学或显微术（光学显微镜或电子显微镜））。在第四类工艺中，结合第一溶液和第二溶剂且同时进行能量-添加步骤。

能量-添加步骤包括通过超声处理、匀浆、逆流流动匀浆、微流化或其它提供冲击力、剪切力或空化力的方法加入能量。在此过程中样品可以冷却或加热。在一优选的方式中，能量-添加步骤通过带活塞口的均化器完成，如 Avestin Inc 出售的产品 EmulsiFlex-C160。在另一优选的方式中，能量-添加步骤可通过超声处理器进行超声处理来完成，如 Sonics and Materials, Inc 制造的 Vibra-Cell 超声波处理器（600W）。在又一优选的方式中，能量-添加步骤可用美国专利 No.5,720,551 中所述的乳化设备来完成，其在此作为参考引入而成为本文的一部分。

根据能量添加速率，最好将处理的样品的温度调节到大约-30℃至 30℃ 范围之内。或者，为了使处理的固体发生理想的相变，也可能有必要在能量-添加步骤的过程中将预悬浮液加热至约 30℃ 至约 100℃ 范围之间的温度。

## 方法 B

方法 B 与方法 A 在如下方面有所不同。第一个不同在于要向第一溶液中加入表面活性剂或多种表面活性剂的组合。表面活性剂可选自上述的阴离子、非离子、阳离子表面活性剂和表面活性生物改性剂。

## 方法 A 和方法 B 以及美国专利 5,780,062 的比较例

美国专利 No.5,780,062 公开了制备有机化合物小颗粒的方法，首先将有机物溶解到可与水混溶的第一溶剂中。第二溶液通过将聚合物和两亲物溶解到含水溶剂中制备。随后将第一溶液加入到第二溶液以形成由有机化合物和聚合物-两亲物复合物组成的沉淀。062 专利没有公开利用在方法 A 和方法 B 中的能量-添加步骤。快速聚集和颗粒生长是缺乏稳定性的典型表现。在有些情况下，无定形颗粒以重结晶为大晶体。按照上述公开的方式向预悬浮液中添加能量一般会使颗粒的聚集和生长速率降低，以及在产品储存时不会出现重结晶。

方法 A 和方法 B 与专利 062 方法的差别还在于在沉淀前没有形成聚合物-两亲物复合物的步骤。方法 A 中，由于没有向稀释（水）相中加入聚合物，故没有形成所述复合物。在方法 B 中，表面活性剂，其也可充当两亲物，或聚合物，与有机化合物共同溶解到第一溶剂中。这阻止沉淀前形成任何两亲物-聚合物的复合物。在 062 专利中，小颗粒的成功沉淀依赖于在沉淀前两亲物-聚合物复合物的形成。062 专利揭示两亲物-聚合物的复合物在含水的第二溶液中形成聚集体。062 专利解释了疏水性有机化合物与两亲物-聚合物复合物相互作用，从而降低这些聚集体的溶解度并促使其沉淀。在本方法中，已证明第一溶剂中含有表面活性剂或聚合物（方法 B），当其随后加入到第二溶剂时，形成比通过 062 专利方法产生的更均一和精细的颗粒。

因此，制备和分析了两种制剂。每一制剂有两种溶液，浓溶液和水稀释液，对其混合并经过超声处理。每种制剂的浓溶液都含有有机化合物（伊曲康唑），水可混溶的溶剂（N-甲基-2-吡咯烷酮或 NMP）

以及可能含有聚合物 (poloxamer 188)。水稀释液具有水、tris 缓冲液并且可能含有聚合物 (poloxamer 188) 和/或表面活性剂 (脱氧胆酸钠)。在超声处理前后测定有机颗粒的平均粒径。

第一制剂 A 有作为浓缩物的伊曲康唑和 NMP。水稀释液中包含水、poloxamer188、tris 缓冲液和脱氧胆酸钠。因此，所述水稀释液中包含聚合物 (poloxamer188) 和两亲物 (脱氧胆酸钠)，其可形成聚合物/两亲物复合物，并且因此与 062 专利所公开的信息一致 (但 062 专利还是没有公开能量添加的步骤)。

第二制剂 B 中有作为浓缩物的伊曲康唑、NMP 和 poloxamer188。水稀释液中包含水、tris 缓冲液和脱氧胆酸钠。该制剂按照本方法制备。由于水稀释液中不含有聚合物 (poloxamer) 和两亲物 (脱氧胆酸钠) 的组合，在混合前不会形成聚合物/两亲物的复合物。

表 1 显示了通过对三个重复的悬浮液制剂采用激光衍射测定的平均粒径。先进行初始的粒径测定，然后对样品进行 1 分钟的超声处理。随后重复测定粒径。方法 A 的超声处理后粒径大大减小预示着颗粒的聚集。

表 1:

方法	浓缩物	水稀释剂	平均粒径 ( $\mu\text{m}$ )	超声处理 后 (1min)
A	伊曲康唑 (18%)，N- 甲基-2-吡咯烷酮 (6mL)	poloxamer188 (2.3%)， 脱氧胆酸钠 (0.3%) tris 缓冲液 (5mM, pH8) 水 (定量至 94mL)	18.7	2.36
			10.7	2.46
			12.1	1.93
B	伊曲康唑 (18%)， poloxamer188 (37%) N-甲基-2-吡咯烷酮 (6mL)	脱氧胆酸钠 (0.3%) tris 缓冲液 (5mM, pH8) 水 (定量至 94mL)	0.194	0.198
			0.178	0.179
			0.181	0.177

应用本方法得到的药物悬浮液可以以注射液的形式直接给药，前提是制剂采用的是注射用水并且采用适当方法对溶液灭菌。灭菌可通过本领域熟知的方法如蒸汽或加热灭菌、 $\gamma$ 射线照射等等完成。其他的灭菌方法，尤其是用于其中大于99%的颗粒小于200nm的颗粒的方法，还包括首先预过滤，先通过3.0微米的滤器，再通过0.45微米的颗粒滤器，然后经过加热或蒸汽灭菌或通过重复的两个0.2微米的滤膜过滤除菌。另一种灭菌方法为从含有药物和任选表面活性剂或多种表面活性剂的第一溶剂制备的浓缩液的过滤除菌以及水稀释液的过滤除菌。其随后优选在隔离的灭菌的环境中于无菌的混合容器中混合。随后在无菌条件下进行悬浮液的混合、匀浆和进一步的处理。

然而用于灭菌的另一种方法将由匀浆步骤之前、期间或之后在均质器自身内的加热灭菌或高压灭菌组成。该加热处理后的加工将在无菌条件下进行。

任选地，通过沉淀后去除溶剂可以制备无溶剂的悬浮液。该过程可通过离心、透析、透滤、力场分级分离、高压过滤或本领域熟知的其它分离技术来完成。彻底去除N-甲基-2-吡咯烷酮通常需要一到三次连续离心操作；每次离心（18,000rpm，30分钟）后倾出弃去上清液。向剩余固体中加入新的不含有机溶剂的悬浮媒介物并且通过匀浆分散混合物。本领域技术人员还会发现其它高剪切力混合的技术也可用于此重建步骤中。或者，无溶剂的颗粒可制成用于各种给药途径所需的不同剂型，如口服的、经肺的、经鼻的、局部的、肌肉内的等等。

此外，任何不想要的赋形剂如表面活性剂可通过上述段落中描述的分选方法，以理想的赋形剂将其取代。溶剂和第一赋形剂在离心或过滤后可随上清液一同摒弃。随后加入新的不含溶剂和第一赋形剂的悬浮液媒介物。或者，可添加新的表面活性剂。例如，由药物、N-甲基-2-吡咯烷酮（溶剂）、poloxamer188（第一赋形剂）、脱氧胆酸钠、

甘油和水组成的悬浮液，在离心和去除上清液后，可由磷脂（新的表面活性剂）、甘油和水取代。

### I. 第一类方法

第一类加工的方法一般包括将有机化合物溶解到可与水混溶的第一溶剂中，然后将该溶液与水溶剂混合形成预悬浮液，其中，如通过 X 射线衍射研究、DSC、光学显微术和其它分析手段分析所测定的，所述有机化合物在预悬浮液中以无定形形式、半结晶形式或过冷液体形式存在，且平均有效粒径在上述有效粒径范围内。混合步骤之后是能量-添加的步骤。

### II. 第二类方法

第二类加工方法除了下述几方面有所差别外，包括与第一类工艺基本相同的步骤。X 射线衍射、DSC 或其他合适的分析技术对悬浮液的分析表明，有机化合物以结晶形式存在并且具有平均有效粒径。与预悬浮液的颗粒粒径相比，在能量-添加步骤后有机化合物具有与能量添加步骤前基本相同的平均有效粒径，但聚集成大颗粒的趋势降低。不受理论的约束，认为颗粒稳定性的差异可能是由固液界面表面活性分子的重排引起。

### III. 第三类方法

第三类加工方法对第一和第二类方法的前两个步骤进行了改进，确保预悬浮液中的有机化合物具有平均有效粒径，以易碎形式存在（如细针和薄片）。通过选择合适的溶剂、表面活性剂和表面活性剂的组合、每种溶液的温度、混合速率和沉淀速率等等而形成易碎颗粒。易碎性还可通过在第一溶液与含水溶剂混合的过程中加入晶格缺陷（例如，解理面）而提高。这通过例如沉淀步骤中提供快速结晶而产生。在能量-添加步骤中，这些易碎晶体转变成动力学稳定的晶体，且其平均有效粒径比预悬浮液中的更小。处于动力学稳定形式的颗粒与那些动力学不稳定的颗粒相比，聚集的趋势降低。在这种情况下，能量-添

加步骤导致易碎颗粒破碎。与没有采用使颗粒形成易碎形式的步骤的有机化合物处理工艺相比，使第一悬浮液中的颗粒处于易碎状态，有机化合物会更容易和更快速地制成具有期望粒径范围的颗粒。

#### IV.第四类方法

除了混合步骤与能量-添加步骤同时进行外，第四类加工方法包括第一类方法的步骤。

#### 多晶型的控制

本方法进一步提供控制有机化合物晶体结构的附加步骤，以最终形成在期望的粒度范围内并具有所期望的晶体结构的化合物的悬浮液。术语“晶格结构”是指在晶体的晶胞内原子的排列。可结晶形成不同晶体结构的化合物，称之为多晶型物。在药物制剂过程中鉴定多晶型物是很重要的步骤，因为同一种药物的不同多晶型物表现出不同的溶解度、治疗活性、生物利用度和悬浮液稳定性。因此，有必要控制化合物的多晶型形式，以确保产物的纯度和每批次产物的重复性。

控制化合物多晶型的步骤包括向第一溶液、第二溶剂或预悬浮液中加入晶种，以确保其形成所期望的多晶型物。加入晶种包括利用晶种化合物或添加能量。在优选的方式中，晶种化合物是具有期望的多晶型形式的药物活性化合物。或者，晶种化合物也可以是惰性杂质，与所需的多晶型结构无关但具有作为晶核模板特征的化合物，或与所需的多晶型具有相似结构的有机化合物。

晶种化合物可从第一溶液中沉淀得到。该方法包括向第一溶液中加入足够量的有机化合物，以使其超过有机化合物在第一溶剂中的溶解度，从而形成过饱和溶液。对过饱和溶液进行处理，沉淀得到有所期望多晶型形式的有机化合物。对过饱和溶液的处理包括对溶液进行一段时间老化，直至形成晶体或观察到晶体形成晶种混合物。也可以向过饱和溶液中加入能量，使有机化合物以所期望的多晶型形式从

溶液中沉淀析出。能量可通过多种方式，包括上述能量添加的步骤而加入。能量还可通过对预悬浮液加热或使之受电磁能、粒子束源或电子束源的作用而加入。电磁能包括如通过激光提供的光能（紫外线、可见光或红外线）或相干辐射、如通过微波激射器（受激辐射式微波放大器）提供的微波能、动态电磁能或其他辐射源。还可进一步构思利用超声、静电场或静磁场或其组合作为能量-添加源。

在优选的方式中，从老化的过饱和溶液中生产晶种的方法包括步骤：（i）向第一有机溶剂中加入一定量的有机化合物以形成过饱和溶液；（ii）老化过饱和溶液以形成可检测的晶体，产生晶种混合物；和（iii）将晶种混合物与第二溶剂混合以沉淀有机化合物，产生预悬浮液。第一悬浮液可随后按以上详述方法进一步处理以提供具有期望的多晶型和粒径范围的有机化合物的水悬浮液。

还可通过向第一溶液、第二溶剂或预悬浮液中添加能量实现晶种接种，其前提是暴露的一种或多种液体含有有机化合物或晶种物质。能量可用如上述用于过饱和溶液的相同方式添加。

因此，本方法利用有机化合物物质的组合物，其具有所期望的多晶型形式而基本不存在未指明的多晶型形式。在优选的方式中，有机化合物为药物活性物质。此处所述的方法还可考虑用于选择性地产生许多药物活性物质的所期望的多晶型。

## B. 靶向至脑

本发明的组合物尤其可用于将抗逆转录病毒药剂投递至脑。本发明组合物优选的用法包括步骤：（i）以颗粒形式提供药物有效的抗逆转录病毒药剂的分散体，（ii）将分散体与细胞接触用于细胞摄取以形成装载的细胞，和（iii）将装载的细胞给药用于投递颗粒的一部分至脑。用于给药至脑的方法可分为离体和体内类型，取决于分散体与细胞接触是在哺乳动物受试者外部还是内部。

离体的方法包括步骤：(i) 从哺乳动物受试者分离细胞，(ii) 将细胞与药物组合物的分散体接触，所述组合物为具有约 100nm 至约 100  $\mu$  m (优选约 100nm 至约 8  $\mu$  m) 平均粒径的颗粒，(iii) 提供足够的时间使细胞摄取一部分颗粒的而形成装载的细胞，和 (iv) 将装载的细胞给药至哺乳动物受试者以投递一部分药物组合物至脑。哺乳动物受试者中具有许多类型的细胞能进行此类颗粒的细胞摄取和运输。这些细胞包括，但不限于，巨噬细胞、单核细胞、粒细胞、嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞。此外，约 100nm 至约 8  $\mu$  m 大小的颗粒更容易由这些吞噬性的生物体吸收。

从哺乳动物受试者分离巨噬细胞可通过细胞分离器进行。例如，Fenwal 细胞分离器 (Baxter Healthcare Corp., Deefield, IL) 可用于分离各种细胞。一旦分离，颗粒药物组合物与分离的细胞样品接触并且短时间温育以允许细胞摄取颗粒。可给予上至一个小时以允许细胞充分摄取药物颗粒。药物组合物的分散体作为颗粒被细胞的摄取可包括吞噬作用或颗粒吸附至细胞表面上。此外，在本发明优选的方式中，在接触细胞期间，颗粒浓度高于热力学溶解度或表观溶解度，因此使得颗粒在通过细胞摄取和投递至脑期间维持微粒形式。

对于稍可溶的药物，例如印地那韦，可使用离体方法，条件是分离的细胞能以比竞争的溶解过程更快的速率吞噬药物组合物颗粒。颗粒应该足够大以使细胞在颗粒完全溶解之前吞噬该颗粒并且投递至脑。此外，药物组合物应当保持高于组合物的热力学或表观溶解度的浓度以使颗粒在吞噬作用期间能维持晶体状态。

装载的细胞可经鞘内、经硬膜外或通过可用于药品投递入中枢神经系统的任何方法给药。装载的细胞还可给药进入哺乳动物受试者血管系统，包括给药进入静脉系统或经过颈动脉。给药步骤可以通过单剂量注射或通过连续给药。



在另一个优选的实施方案中，药物组合物颗粒直接给药进入哺乳动物受试者的中枢神经系统，尤其是脑脊液（CSF）。颗粒具有足够的大小，使得由 CSF 中的吞噬细胞吞入并且运输通过脑脊液-脑屏障（CFBB）而进入脑。颗粒也可吸附在这些细胞的表面上。通常，CFBB 起作用以防止药物进入脑。本发明利用了这些吞噬细胞作为给药工具的用途，尤其是当脑中巨噬细胞通过 CFBB 的速率提高的时候。在本发明优选的方式中，当通过 CFBB 的巨噬细胞百分比超过 2%，更优选超过 3%，更优选超过 4%，且最优选超过 5%时药物药剂将被投递。

某些病毒和细菌可由吞噬细胞吸收并且持续保留在这些细胞内。然而，由于药物在吞噬细胞中浓缩，并且感染生物体暴露于非常大量的药物而因此杀死生物体，装载药物颗粒的细胞在治疗所述感染中是有效的。此外，进入脑后，酸-可溶的颗粒因吞噬细胞内较低的 pH 水平而溶解，由此释放药物浓缩物。形成了浓度梯度，吞噬细胞的体内药物组合物浓度较高而体外浓度较低。因此，为了改善的目的，巨噬细胞内的颗粒物释放进入脑。随着时间的过去，脑中存在的游离的病毒和细菌生物体暴露于具有比通常通过口服给药而能投递的更高浓度的药物。

在另一个优选的实施方案中，药物组合物颗粒直接给药进入哺乳动物受试者的血管系统。颗粒可由血管系统中存在的吞噬细胞吞入或吸附在细胞壁上。一旦颗粒被装载的细胞吸收，一定百分比的装载细胞将以与运输通过脑脊液-脑屏障类似的方式运输通过血脑屏障而进入脑。

在另一个优选的实施方案中，该方法包括通过利用上述方法投递抗-HIV 组合物至脑而治疗患有中枢神经系统 HIV 传染的患者。合适的抗-HIV 组合物包括蛋白酶抑制剂。蛋白酶抑制剂的实例包括印地那韦（indinavir）、利托那韦（ritonavir）、沙奎那韦（saquinavir）和奈非

那韦 (nelfinavir)。抗-HIV 组合物还可以是核苷逆转录酶抑制剂。核苷逆转录酶抑制剂的实例包括叠氮胸苷 (zidovudine)、双脱氧肌苷 (didanosine)、斯塔夫定 (stavudine)、扎西他宾 (zalcitabine) 和拉米夫定 (lamivudine)。抗-HIV 组合物还可以是非核苷逆转录酶抑制剂。非核苷逆转录酶抑制剂的实例包括奈韦拉平 (nevirapin) 和地拉韦啉 (delaviradine)。

### 通过用于提高的中枢神经系统 (CNS) 投递的抗-逆转录病毒制剂 纳米悬浮液治疗 HIV 感染

尽管出现高效的抗-逆转录病毒治疗 (HAART)，HIV-1 相关的痴呆仍然有一系列的医疗的问题。许多抗-逆转录病毒药物不良的 CNS 渗透只提供了亚-治疗的药物水平，导致抗性病毒株的出现。其持续感染脑并且从其庇护地逸出而感染体循环。很显然，需要用于提高脑投递的优良的药物传递系统 (参见参考文献 1, Limoges 等.)。

由于单核细胞-来源的巨噬细胞 (MDM) 为脑病毒感染的天然靶细胞, 并且由于其吞噬药物微粒悬浮液 (参见参考文献 3, Moghimi 等.), 其优选作为抗-逆转录病毒药物的给药载体 (参见, 参考文献 2, Nottet 等.)。因此, 可期望药物被摄取和随后的投递至脑。蛋白酶抑制剂印地那韦, 优选作为在中性 pH 时维持微粒形式而用于巨噬细胞摄取, 但在吞噬溶酶体的酸性条件下溶解而表现出所期望的治疗效力的药物。

### 实施例 1: 用于通过靶向巨噬细胞而提高 CNS 投递的印地那韦纳 米悬浮液

制备适于靶向巨噬细胞的印地那韦 (IND) 纳米悬浮液制剂 (组合物 1) 并且显示储存时良好的物理稳定性。IND 纳米悬浮液的单剂量装载有效抑制 HIV-1 的复制并且消除了病毒-相关的细胞病变性而不影响细胞存活性的限度。

IND 纳米悬浮液通过在碱性 pH 下在合适的稳定表面活性剂存在

时的高压匀浆含水悬浮液而制备（参见组合物 1）。Lipoid E80 为 Lipoid GmbH 制造的磷脂混合物。优化该方法的各个参数包括温度和匀浆循环数。利用光散射测定粒径并且利用特别设计的胁迫试验和短时间稳定性研究评估该悬浮液的稳定性。

#### 组合物 1

组分	浓度（% w/v）
印地那韦	0.6
Lipoid E80	1.2
磷酸缓冲液	0.14
氯化钠	0.9
pH8	

为了评估 IND 纳米悬浮液的活性，MDM 用 HIV-1 感染并且在暴露 12 小时后除去病毒。受感染细胞用 500  $\mu$  M 药物纳米悬浮液治疗过夜。另一同样的 MDM 未经治疗作为对照（CON）。每 2 天收集培养物上清并且评估逆转录酶（RT）活性。在感染后第 9 天通过噻唑蓝（MTT）转化分析法测定 MDM 的存活性。

颗粒加权平均大小为大约 1.6  $\mu$  m，99%的颗粒（按体积）小于 8.4  $\mu$  m。方法优化研究表明较长的匀浆时间和较低的温度产生较小的颗粒。悬浮液经多重胁迫试验而评估其长期稳定性。如可在图 1 中看到的，悬浮液通过了所有的胁迫试验。此外，如图 2 所示，如粒径分析所确定的，悬浮液在 5 $^{\circ}$ C 可稳定至少 6 个月。

整个 9 天的观察期，CON HIV-1-感染的 MDM 表现出显著的细胞病变性（胀气、多核巨细胞和细胞死亡），具有持续高水平的 RT 活性。IND 纳米悬浮液 MDM 相比无细胞病变性的对照呈现 RT 活性降低 99%。药物纳米悬浮液对 MDM 的存活性无统计学显著的作用。

---

虽然已经举例说明和描述了特定的实施方案，不背离本发明精神下可很容易想到许多改进，并且保护范围仅由附加的权利要求的范围来限定。

### 参考文献

(1) J.Limoges, I.Kadiu, D.Morin, M.Chaubal, J.Werling, B.Rabinow 和 H.E.Gendelman, "在初级单核细胞衍生的巨噬细胞中 Indinavir 纳米悬浮液的缓释抗逆转录病毒活性 (Sustained Antiretroviral Activity of Indinavir Nanosuspensions in Primary Monocyte-Derived Macrophages)", 简报, 11<sup>th</sup> Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, 2004 年 2.8-11, San Francisco。

(2) H.S.L.M.Nottet 和 S.Dhawan, "HIV-1 进入脑: HIV-1 感染的巨噬细胞穿过血脑屏障的渗透机制(HIV-1 entry into Brain: Mechanisms for the infiltration of HIV-1-infected macrophages across the blood-brain barrier)" in The Neurology of AIDS, eds H.E.Gendelman, S Lipton, L.Epstein, S.Swindells, 1998, Chapman & Hall, p.55。

(3) S. Moein Moghimi, A. Christy Hunter 和 J. Clifford Murray, "长期循环和靶特异性纳米颗粒: 理论到实践 (Long-Circulating and Target-Specific Nanoparticles: Theory to Practice)", *Pharmacological Reviews*, 53: 283-318, 2001。

图1. 利用设计以评估制剂长期稳定性的试验的Indinavir纳米悬浮液的胁迫试验结果

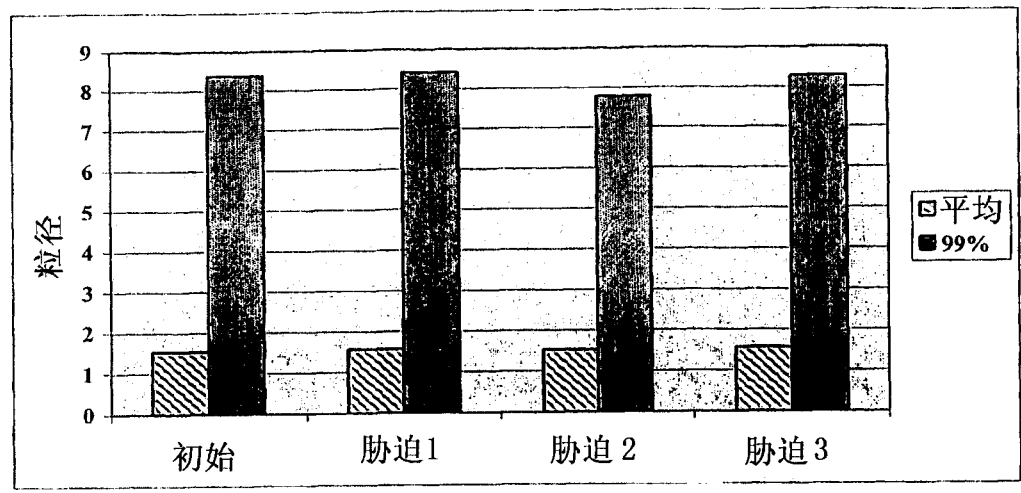


图1

图2. 利用高压匀浆技术产生的Indinavir纳米悬浮液的长期稳定性数据

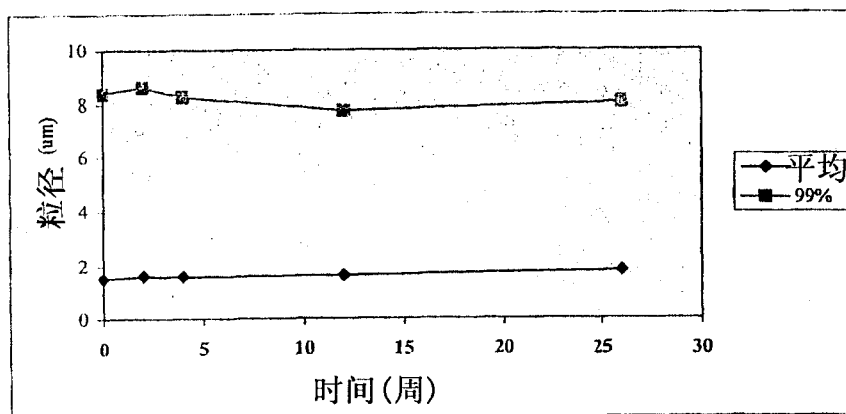


图2