



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113304276 A

(43) 申请公布日 2021.08.27

(21) 申请号 202110626039.4

A61K 31/473 (2006.01)

(22) 申请日 2021.06.04

A61K 31/4745 (2006.01)

(71) 申请人 沈阳药科大学

A61K 31/704 (2006.01)

地址 117004 辽宁省本溪市高新技术产业
开发区华佗大街26号

A61K 45/00 (2006.01)

A61K 47/24 (2006.01)

A61K 47/26 (2006.01)

(72) 发明人 邓意辉 赵丹 宋艳志 孙文靓
刘欣荣

A61K 47/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(74) 专利代理机构 沈阳东大知识产权代理有限
公司 21109

代理人 马海芳

(51) Int. Cl.

A61K 47/54 (2017.01)

A61K 47/69 (2017.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 31/136 (2006.01)

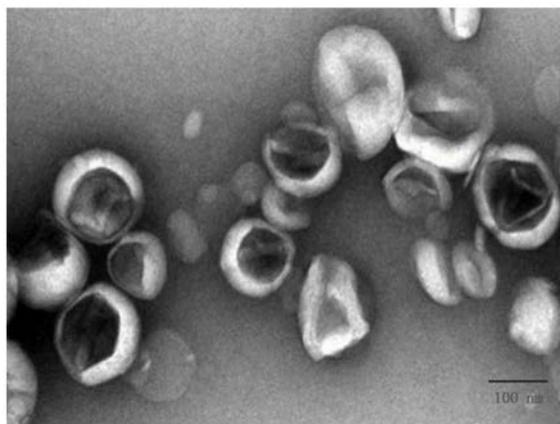
权利要求书2页 说明书18页 附图9页

(54) 发明名称

用单唾液酸四己糖神经节苷脂修饰的脂质体及其制法和冻干应用

(57) 摘要

一种用单唾液酸四己糖神经节苷脂修饰的脂质体及其制法和冻干应用,属于医药技术领域。该一种用单唾液酸四己糖神经节苷脂修饰的脂质体,其采用单唾液酸四己糖神经节苷脂修饰脂质体。单唾液酸四己糖神经节苷脂占脂质体膜材的摩尔百分比优选为0.5~20mol%。用单唾液酸四己糖神经节苷脂修饰的脂质体,还采用唾液酸衍生物进行修饰。采用单唾液酸四己糖神经节苷脂修饰的脂质体,或采用唾液酸衍生物和单唾液酸四己糖神经节苷脂共同修饰的脂质体,在后续装载药物,冷冻干燥前后的粒径差值在10nm以内,且粒径均匀,包封率超过90%,脂质体冻干后长期放置稳定性良好。



1. 一种用单唾液酸四己糖神经节苷脂修饰的脂质体,其特征在于,采用单唾液酸四己糖神经节苷脂修饰脂质体。

2. 根据权利要求1所述的用单唾液酸四己糖神经节苷脂修饰的脂质体,其特征在于,脂质体膜材包括单唾液酸四己糖神经节苷脂,所述的单唾液酸四己糖神经节苷脂占脂质体膜材的摩尔百分比为0.5~20mol%,优选为1~10mol%。

3. 根据权利要求1所述的用单唾液酸四己糖神经节苷脂修饰的脂质体,其特征在于,所述的用单唾液酸四己糖神经节苷脂修饰的脂质体,还采用唾液酸衍生物进行修饰;

所述的唾液酸衍生物为唾液酸-十八胺、唾液酸-胆固醇、唾液酸-脂肪酸衍生物中的一种;唾液酸衍生物占脂质体膜材的摩尔百分比为:5~10mol%。

4. 根据权利要求1所述的用单唾液酸四己糖神经节苷脂修饰的脂质体,其特征在于,所述的用单唾液酸四己糖神经节苷脂修饰的脂质体,其脂质体膜材包括:磷脂、二硬脂酰磷脂酰甘油、胆固醇和单唾液酸四己糖神经节苷脂。

5. 根据权利要求3所述的用单唾液酸四己糖神经节苷脂修饰的脂质体,其特征在于,所述的用单唾液酸四己糖神经节苷脂修饰的脂质体,其脂质体膜材包括:磷脂、二硬脂酰磷脂酰甘油、胆固醇、唾液酸衍生物和单唾液酸四己糖神经节苷脂。

6. 根据权利要求4或5所述的用单唾液酸四己糖神经节苷脂修饰的脂质体,其特征在于,按摩尔比,磷脂:二硬脂酰磷脂酰甘油:胆固醇=(35~70):20:10。

7. 根据权利要求4或5所述的用单唾液酸四己糖神经节苷脂修饰的脂质体,其特征在于,所述的磷脂为天然磷脂、半合成磷脂、合成磷脂中的一种或几种;

所述的天然磷脂选用天然甘油磷脂和/或天然鞘磷脂,甘油磷脂选用大豆卵磷脂、蛋黄卵磷脂、磷脂酰甘油、磷脂酰乙醇胺、心肌磷脂、磷脂酰肌醇中的一种或几种;

所述的半合成磷脂选用氢化大豆卵磷脂和/或氢化蛋黄卵磷脂;

所述的合成磷脂选用合成甘油磷脂和/或合成鞘磷脂,其中,甘油磷脂包括二硬脂酰磷脂酰胆碱,二棕榈酰磷脂酰胆碱、二油酰磷脂酰胆碱、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱、二月桂酰磷脂酰胆碱、二癸酰磷脂酰胆碱、二辛酰磷脂酰胆碱、二己酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰甘油及其盐,二棕榈酰磷脂酰甘油及其盐,L- α -二肉豆蔻酰磷脂酰甘油及其盐,二月桂酰磷脂酰甘油、二癸酰磷脂酰甘油、二辛酰磷脂酰甘油、二己酰磷脂酰甘油、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺,二棕榈酰磷脂酰乙醇胺、二油酰磷脂酰乙醇胺,二肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺、二月桂酰磷脂酰乙醇胺、双二硬脂酰磷脂酰甘油及其盐、双二棕榈酰磷脂酰甘油及其盐、双二肉豆蔻酰磷脂酰甘油及其盐、双二月桂酰磷脂酰甘油、二硬脂酰磷脂酰肌醇、二棕榈酰磷脂酰肌醇、二油酰磷脂酰肌醇、二肉豆蔻酰磷脂酰肌醇、二月桂酰磷脂酰肌醇、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱、棕榈酰亚油酰磷脂酰胆碱、硬脂酰亚油酰磷脂酰胆碱、硬脂酰油酰磷脂酰胆碱、硬脂酰花生四烯酰磷脂酰胆碱中的一种或几种。

8. 权利要求1或3所述的用单唾液酸四己糖神经节苷脂修饰的脂质体的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 按配比,称量脂质体膜材,加入无水乙醇混合,并溶解,得到膜材乙醇溶液;其中,无水乙醇体积占用单唾液酸四己糖神经节苷脂修饰的脂质体混悬液体积百分比为5~10%;

将膜材乙醇溶液以1~5mL·min⁻¹的速度加入至柠檬酸-柠檬酸钠溶液中,在55~70℃搅拌孵育10~30min,得到空白脂质体初品;按体积比,膜材乙醇溶液:柠檬酸-柠檬酸钠溶

液=1:(10~20);

(2) 在55~70℃,将空白脂质体初品经过不同规格过滤膜挤出,得到用单唾液酸四己糖神经节苷脂修饰的脂质体混悬液。

9. 权利要求1或3所述的用单唾液酸四己糖神经节苷脂修饰的脂质体的冻干应用,其特征在于,将用单唾液酸四己糖神经节苷脂修饰的脂质体用于作为药物载体,装载抗肿瘤药物、抗菌素、麻醉药物、激素类药物中的一种,并采用冷冻干燥法提高脂质体的贮存稳定性;

所述的抗肿瘤药物为多柔比星、表柔比星、米托蒽醌、伊立替康、匹杉琼、米铂中的一种或几种。

10. 根据权利要求9所述的用单唾液酸四己糖神经节苷脂修饰的脂质体的冻干应用,其特征在于,包括以下过程:

步骤1:梯度空白脂质体的制备与药物的装载

采用pH调节剂调节用单唾液酸四己糖神经节苷脂修饰的脂质体混悬液中外水相pH为7.0,按质量比,药物:脂质体=1:(20~5),加入药物,在55~65℃孵育15~30min进行装载,置于0℃中2min终止载药,得到载药后的脂质体混悬液;

步骤2:冷冻干燥

将载药后的脂质体混悬液和冻干保护剂溶液混合,置于西林瓶中,按质量体积比,冻干保护剂:载药后的脂质体混悬液+冻干保护剂溶液总体积=1g:(6~10)mL;

将西林瓶置于冻干机板层上,采用慢冻,在真空度为0Pa进行预冻,预冻温度为-50℃,预冻时间为6~8h,在真空度为4~15Pa,以间隔5~20℃梯度升温,并每个温度维持2~16h,并且分段进行一次干燥,并且,在升温至25~30℃进行二次干燥,二次干燥时间为5~10h;得到冻干脂质体;

步骤3:重构

室温下,用灭菌注射用水重构冻干脂质体,得到载药的冻干脂质体;

所述的载药的冻干脂质体,其粒径PDI<0.1,冷冻干燥前后的粒径变化<10nm,包封率≥90%,重构后的脂质体为圆形或类圆形囊泡,双分子层明显;冻干前后脂质体的体外释放行为无明显差异。

用单唾液酸四己糖神经节苷脂修饰的脂质体及其制法和冻干应用

技术领域

[0001] 本发明属于医药技术领域,具体涉及一种用单唾液酸四己糖神经节苷脂修饰的脂质体及其制法和冻干应用。

背景技术

[0002] 随着医药行业的发展,越来越多的药物被开发,但是在临床应用上,药物除了能够治疗疾病,但是也会表现出不少毒副作用,解决这种毒副作用采用比较多的方法是应用药物载体,改变药物的生物分布,实现靶向性。其中,研究比较广泛的药物载体是脂质体。脂质体(Liposomes)最早由Bangham于1964年发现,是由类似生物膜结构的磷脂等类脂分散于水相中所形成的的封闭囊泡,膜壁厚度约为5~7nm,囊的直径一般在25~500nm内。药物可根据其亲油、亲水性质,或插入类脂双分子层,或包封于脂质体内水相,也可直接连在脂质体表面。用于制备脂质体的类脂主要有天然磷脂与人工合成类脂,均属于两亲性分子,包含一个亲水头部(Hydrophilic head)和两个疏水尾链(Hydrophobic tail)。作为一种载体,脂质体因其具有类似生物细胞膜结构、体内可降解、低免疫原性、保护药物活性基团、延长药物半衰期、增效减毒等一系列优势而备受青睐。同时,由于组成结构可变、易通过适当表面修饰获得靶向及触发释放等特性,使脂质体在许多领域得到广泛应用。作为胶体药物载体系统(Colloidal drug carrier systems,CDCs)中的一个典型代表,脂质体发展至此经历了一系列突破式的“变革”,主动载药的实现、长循环概念的提出、挤出技术的建立、靶向策略在肿瘤治疗中的应用及阳离子脂质体对基因治疗的贡献,这些具有历史意义的创新充分展现了脂质体在药物载体领域的应用前景。随着脂质体研究的逐渐深入,许多不同治疗领域的脂质体制剂获准上市,如两性霉素B脂质体(AmBisome[®])、阿霉素脂质体(Doxil[®]/Caelyx[®], Myocet[®])、柔红霉素脂质体(DaunoXome[®])、吗啡硫酸盐脂质体(DepoDur[®])、维替泊芬脂质体(Visudyne[®])、阿糖胞苷脂质体(Depocyt[®])及硫酸长春新碱脂质体(Marqibo[®])等。

[0003] 虽然脂质体作为药物递送载体具有诸多优势,但其在水分散体中由于磷脂的氧化和降解以及包封药物的泄漏导致的化学不稳定性,储存过程中脂质体粒径的改变以及外界环境如温度、pH的变化,这些因素都限制了脂质体的临床应用。因此,研究人员提出了各种提高脂质体稳定性的方法,其中,冷冻干燥技术是目前应用最为广泛的提高脂质体制剂稳定性的方法。1978年Vanleberghe等首次报道采用冷冻干燥法提高脂质体的贮存稳定性。制成冻干脂质体可显著降低磷脂和药物的水解和氧化速度,同时冻干保护剂有助于保持脂质体膜结构的完整性,克服脂质体聚集、药物渗漏等不稳定因素,显著提高贮存稳定性。遗憾的是,脂质体冻干后,其由于冷冻干燥过程中冰晶对磷脂双分子层的破坏导致膜融合以及包封药物泄漏等问题还是依旧存在,限制了脂质体相关产品开发,或者增加脂质体产品临

床使用难度,例如Myocet[®],只能选择三瓶装的组合件。

[0004] 在现有的脂质体产品中,抗肿瘤药物脂质体所占比例很高。改善肿瘤治疗效果的方法之一是针对肿瘤微环境(Tumor microenvironment, TME)进行靶向设计。TME学说认为,肿瘤的发展并不单单由于肿瘤细胞的性质改变引起,TME中的非癌性基质细胞也是积极的参与者(BISSELL M J, HINES W C. Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression[J]. Nature Medicine, 2011, 17(3): 320-9.)。这些细胞支持癌细胞复制增殖,并逃避机体细胞程序性死亡的自然机制(WEINBERG H. Hallmarks of Cancer: The Next Generation[J]. Cell, 2011.)。其中,肿瘤相关巨噬细胞(Tumor-associated macrophage, TAM)是浸润到肿瘤中数量最多的炎性细胞,含量可达实体瘤质量的50%以上(QIAN B Z, POLLARD J W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis[J]. Cell, 2010, 141(1): 39-51.) (SOLINAS G, GERMANO G, MANTOVANI A. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation[J]. Journal of leukocyte biology, 2009, 86(5): 1065-73.)。TAM浸润也是癌症患者愈后不良的重要因素(CHANMEE T, ONTONG P, KONNO K, et al. Tumor-Associated Macrophages as Major Players in the Tumor Microenvironment[J]. Cancers, 2014, 6(3): 1670-90.) (MOVAHEDI K, LAOUI D, GYSEMANS C, et al. Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C (high) monocytes[J]. Cancer Research, 2010, 70(14): 5728-39.) (SICA A, LARGHI P, MANCINO A, et al. Macrophage polarization in tumour progression[J]. Seminars in Cancer Biology, 2008, 18(5): 349-55.)。因此,针对TAM的靶向治疗策略有望从源头解决肿瘤治疗难题。唾液酸(Sialic acid, SA)是一类含有9个碳原子的酸性糖的子集,含有大约50种神经氨酸衍生物。SA在肿瘤细胞表面异常表达,在肿瘤转化和恶性进展过程中发挥重要作用。SA识别受体是将抑制信号传递到免疫系统的主要分子,肿瘤细胞表面高表达的唾液酸聚糖与唾液酸受体结合来逃避免疫监视。其中,唾液酸结合免疫球蛋白样凝集素家族(Siglec)作为一类SA识别受体,在免疫细胞表面广泛表达,并且在维持免疫稳态和调节炎症反应过程中发挥重要作用。但是,在将唾液酸衍生物,例如唾液酸-十八胺(SA-ODA),修饰于脂质体表面上时,脂质体放置稳定性差,出现粒径变大和包封率下降的问题。

发明内容

[0005] 针对现有技术中在脂质体本身,以及脂质体中引入唾液酸衍生物同样会降低脂质体的冻干稳定性,包括粒径变大和包封率下降的问题,本发明提供了一种用单唾液酸四己糖神经节苷脂修饰的脂质体及其制法和冻干应用,采用单唾液酸四己糖神经节苷脂修饰的脂质体,或采用唾液酸衍生物和单唾液酸四己糖神经节苷脂共同修饰的脂质体,在后续装载药物,进行冷冻干燥后,其冷冻干燥前后的粒径差值在10nm以内,并且粒径均匀,包封率能够达到90%~100%,脂质体冻干后长期放置稳定性良好,通过对制备方法中冷冻干燥的工艺参数进行调整,可以进一步提高脂质体的稳定性。

[0006] 本发明的一种用单唾液酸四己糖神经节苷脂修饰的脂质体,其采用单唾液酸四己糖神经节苷脂修饰脂质体。

[0007] 所述的单唾液酸四己糖神经节苷脂作为脂质体膜材的组分之一。

[0008] 进一步的,所述的单唾液酸四己糖神经节苷脂占脂质体膜材的摩尔百分比优选为0.5~20mol%,更优选为1~10mol%。

[0009] 进一步的,所述的一种用单唾液酸四己糖神经节苷脂修饰的脂质体,还采用唾液酸衍生物进行修饰。

[0010] 进一步的,所述的唾液酸衍生物优选为唾液酸-十八胺(SA-ODA)、唾液酸-胆固醇(SA-CH)、唾液酸-脂肪酸衍生物中的一种,其中,唾液酸-脂肪酸衍生物为MT-18或WE-18;唾液酸衍生物更优选为唾液酸-十八胺(SA-ODA),唾液酸衍生物占脂质体膜材的摩尔百分比为:5~10mol%。

[0011] 所述的用单唾液酸四己糖神经节苷脂修饰的脂质体,其脂质体膜材包括:磷脂、二硬脂酰磷脂酰甘油(DSPG)、胆固醇(CH)和单唾液酸四己糖神经节苷脂(GM1)。

[0012] 进一步的,所述的用单唾液酸四己糖神经节苷脂修饰的脂质体,其脂质体膜材包括:磷脂、二硬脂酰磷脂酰甘油(DSPG)、胆固醇(CH)、唾液酸衍生物和单唾液酸四己糖神经节苷脂(GM1)。

[0013] 按摩尔比,磷脂:二硬脂酰磷脂酰甘油:胆固醇=(35~70):20:10。

[0014] 进一步的,所述的磷脂为天然磷脂、半合成磷脂、合成磷脂中的一种或几种。

[0015] 所述的天然磷脂选用天然甘油磷脂和/或天然鞘磷脂,甘油磷脂选用大豆卵磷脂、蛋黄卵磷脂、磷脂酰甘油、磷脂酰乙醇胺、心肌磷脂、磷脂酰肌醇中的一种或几种;

[0016] 所述的半合成磷脂选用氢化大豆卵磷脂和/或氢化蛋黄卵磷脂;更优选为氢化大豆卵磷脂。

[0017] 所述的合成磷脂选用合成甘油磷脂和/或合成鞘磷脂,其中,甘油磷脂包括二硬脂酰磷脂酰胆碱,二棕榈酰磷脂酰胆碱、二油酰磷脂酰胆碱、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱、二月桂酰磷脂酰胆碱、二癸酰磷脂酰胆碱、二辛酰磷脂酰胆碱、二己酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰甘油及其盐,二棕榈酰磷脂酰甘油及其盐,L- α -二肉豆蔻酰磷脂酰甘油及其盐,二月桂酰磷脂酰甘油、二癸酰磷脂酰甘油、二辛酰磷脂酰甘油、二己酰磷脂酰甘油、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺,二棕榈酰磷脂酰乙醇胺、二油酰磷脂酰乙醇胺,二肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺、二月桂酰磷脂酰乙醇胺、双二硬脂酰磷脂酰甘油及其盐、双二棕榈酰磷脂酰甘油及其盐、双二肉豆蔻酰磷脂酰甘油及其盐、双二月桂酰磷脂酰甘油、二硬脂酰磷脂酰肌醇、二棕榈酰磷脂酰肌醇、二油酰磷脂酰肌醇、二肉豆蔻酰磷脂酰肌醇、二月桂酰磷脂酰肌醇、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱、棕榈酰亚油酰磷脂酰胆碱、硬脂酰亚油酰磷脂酰胆碱、硬脂酰油酰磷脂酰胆碱、硬脂酰花生四烯酰磷脂酰胆碱中的一种或几种。

[0018] 本发明的用单唾液酸四己糖神经节苷脂修饰的脂质体的制备方法,包括以下步骤:

[0019] (1) 按配比,称量脂质体膜材,加入无水乙醇混合,并溶解,得到膜材乙醇溶液;其中,无水乙醇体积占用单唾液酸四己糖神经节苷脂修饰的脂质体混悬液体积百分比为5~10%;

[0020] 将膜材乙醇溶液以1~5mL·min⁻¹的速度加入至柠檬酸-柠檬酸钠溶液中,在55~70℃搅拌孵育10~30min,得到空白脂质体初品;按体积比,膜材乙醇溶液:柠檬酸-柠檬酸钠溶液=1:(10~20);

[0021] (2) 在55~70℃,将空白脂质体初品经过不同规格过滤膜挤出,得到用单唾液酸四己糖神经节苷脂修饰的脂质体混悬液。

[0022] 所述的步骤(1)中,溶解采用加热至55~70℃搅拌溶解,或超声溶解。

[0023] 所述的步骤(1)中,柠檬酸-柠檬酸钠溶液的摩尔浓度为150~300mmol/L,pH为3.5~4.5,其中,作为优选,柠檬酸-柠檬酸钠溶液的摩尔浓度为150~200mmol/L。

[0024] 所述的步骤(2)中,过滤膜的规格为0.2μm膜、0.1μm膜和0.08μm膜,具体挤出工艺为:0.2μm膜挤出1~10次,0.1μm膜挤出10~15次,0.08μm膜挤出10~15次。

[0025] 所述的步骤(2)中,空白脂质体混悬液中磷脂质量浓度为20~50mg·mL⁻¹。

[0026] 本发明的用单唾液酸四己糖神经节苷脂修饰的脂质体的冻干应用,为用于作为药物载体,装载抗肿瘤药物、抗菌素、麻醉药物、激素类药物中的一种,并采用冷冻干燥法提高脂质体的贮存稳定性。

[0027] 所述的抗肿瘤药物为多柔比星、表柔比星、米托蒽醌、伊立替康、匹杉琼、米铂中的一种或几种。

[0028] 本发明的用单唾液酸四己糖神经节苷脂修饰的脂质体的冻干应用,包括以下过程:

[0029] 步骤1:梯度空白脂质体的制备与药物的装载

[0030] 采用pH调节剂调节用单唾液酸四己糖神经节苷脂修饰的脂质体混悬液中外水相pH为7.0,按质量比,药物:脂质体=1:(20~5),加入药物,在55~65℃孵育15~30min进行装载,置于0℃中2min终止载药,得到载药后的脂质体混悬液;

[0031] 步骤2:冷冻干燥

[0032] 将载药后的脂质体混悬液和冻干保护剂溶液混合,置于西林瓶中,按质量体积比,冻干保护剂:载药后的脂质体混悬液+冻干保护剂溶液总体积=1g:(6~10)mL;

[0033] 将西林瓶置于冻干机板层上,采用慢冻,在真空度为0Pa进行预冻,预冻温度为-50℃,预冻时间为6~8h,在真空度为4~15Pa,以间隔5~20℃梯度升温,并每个温度维持2~16h,并且分段进行一次干燥,并且,在升温至25~30℃进行二次干燥,二次干燥时间为5~10h;得到冻干脂质体;

[0034] 步骤3:重构

[0035] 室温下,用灭菌注射用水重构冻干脂质体,得到载药的冻干脂质体。

[0036] 所述的步骤1中,pH调节剂选用磷酸钠溶液、碳酸钠溶液中的一种,优选为磷酸钠溶液,pH调节剂溶液的摩尔浓度为400~500mmol/L。

[0037] 所述的步骤2中,冻干保护剂选用双糖,优选为蔗糖或乳糖,更优选为蔗糖。

[0038] 所述的载药的冻干脂质体,其粒径PDI<0.1,冷冻干燥前后的粒径变化<10nm,包封率≥90%,重构后的脂质体为圆形或类圆形囊泡,双分子层明显;冻干前后脂质体的体外释放行为无明显差异,且重构后的脂质体稀释稳定性和放置稳定性良好,载药的冻干脂质体长期放置稳定性良好。

[0039] 本发明用单唾液酸四己糖神经节苷脂修饰的脂质体及其制法和冻干应用,其有益效果为:

[0040] 本发明采用单唾液酸四己糖神经节苷脂解决了脂质体冻干不稳定问题。这些冻干脂质体在进行重构之后,包封率和粒度没有显著性变化,提升了脂质体产品品质。

[0041] 并且特别是针对因为唾液酸衍生物修饰引起的冻干不稳定问题,本发明采用单唾液酸四己糖神经节苷脂也能够起到提高脂质体稳定性的作用。

附图说明

[0042] 图1是5-5-SAGL-EPI冻干后和重构后的外观;其中,A为冻干后外观,B为重构后外观。

[0043] 图2是5-5-SAGL-EPI冻干重构后的粒子形态。

[0044] 图3是5-5-SAGL-EPI冻干前后体外释放行为对比。

[0045] 图4是5-5-SAGL-EPI冻干重构后稀释稳定性;其中,A为5-5-SAGL-EPI的粒径在冻干重构后稀释稳定性,B为5-5-SAGL-EPI的包封率在冻干重构后稀释稳定性。

[0046] 图5是5-5-SAGL-EPI冻干重构后放置稳定性;其中,A为5-5-SAGL-EPI的粒径在冻干重构后放置稳定性,B为5-5-SAGL-EPI的包封率在冻干重构后放置稳定性。

[0047] 图6是SA-ODA和不同比例GM1共同修饰EPI脂质体的透射电镜图;其中,(A)为CL-EPI(对比例1);(B)为5-SAL-EPI(对比例2);(C)为0.3-5-SAGL-EPI(对比例3);(D)为5-5-SAGL-EPI(实施例14)。

[0048] 图7是SA-ODA和不同比例GM1共同修饰EPI脂质体抗S180肿瘤的肿瘤生长曲线。

[0049] 图8是SA-ODA和不同比例GM1共同修饰EPI脂质体抗S180肿瘤的小鼠体质量变化曲线。

[0050] 图9是SA-ODA和不同比例GM1共同修饰EPI脂质体抗S180肿瘤的小鼠净体质量变化曲线。

[0051] 图10是SA-ODA和不同比例GM1共同修饰EPI脂质体抗S180肿瘤的抑瘤指数。

[0052] 图11是SA-ODA和不同比例GM1共同修饰EPI脂质体抗S180肿瘤的HE病理切片。

具体实施方式

[0053] 以下实施方式是对本发明的具体说明,不应对本发明的范围构成限制。

[0054] 以下实施例中,基于普通脂质体冻干稳定性差,以及唾液酸-十八胺(SA-ODA)单独修饰的脂质体冻干稳定性更差,本发明用单唾液酸四己糖神经节苷脂(GM1)对脂质体进行修饰。

[0055] 以下实施例中,选用磷脂、二硬脂酰磷脂酰甘油(DSPG)和胆固醇(CH)、唾液酸衍生物和单唾液酸四己糖神经节苷脂(GM1)作为脂质体膜材组成,其中,摩尔比为磷脂/DSPG/CH((3.5~7):2:1)。其中,唾液酸衍生物修饰比例为5~10mol%,GM1选用比例为0~30mol%(包括对比例)。具体处方为:

[0056] 以下处方中,HSPC为氢化大豆卵磷脂,DSPG为二硬脂酰磷脂酰甘油,CH为胆固醇,SA-ODA为唾液酸-十八胺。

| | 对应实施例 | Formulation | Liposome composition (n/n) |
|--------|--------|----------------|---|
| | 对比例 1 | CL-EPI | HSPC/DSPG/CH(70:20:10) |
| | 对比例 2 | 5-SAL-EPI | HSPC/DSPG/CH/SA-ODA(65:20:10:5) |
| | 对比例 3 | 0.3-5-SAGL-EPI | HSPC/DSPG/CH/SA-ODA/GM1(64.7:20:10:5:0.3) |
| | 实施例 9 | 5-GL-EPI | HSPC/DSPG/CH/GM1(65:20:10:5) |
| [0057] | 实施例 10 | 10-GL-EPI | HSPC/DSPG/CH/GM1(60:20:10:10) |
| | 实施例 11 | 0.5-5-SAGL-EPI | HSPC/DSPG/CH/SA-ODA/GM1(64.5:20:10:5:0.5) |
| | 实施例 12 | 1-5-SAGL-EPI | HSPC/DSPG/CH/SA-ODA/GM1(64:20:10:5:1) |
| | 实施例 13 | 3-5-SAGL-EPI | HSPC/DSPG/CH/SA-ODA/GM1(62:20:10:5:3) |
| | 实施例 14 | 5-5-SAGL-EPI | HSPC/DSPG/CH/SA-ODA/GM1(60:20:10:5:5) |
| | 实施例 15 | 7-5-SAGL-EPI | HSPC/DSPG/CH/SA-ODA/GM1(58:20:10:5:7) |
| | 实施例 16 | 10-5-SAGL-EPI | HSPC/DSPG/CH/SA-ODA/GM1(55:20:10:5:10) |
| [0058] | 实施例 17 | 20-5-SAGL-EPI | HSPC/DSPG/CH/SA-ODA/GM1(45:20:10:5:20) |
| | 对比例 5 | 30-5-SAGL-EPI | HSPC/DSPG/CH/SA-ODA/GM1(35:20:10:5:30) |

[0059] 以下实施例中,采用的冻干程序为:0.5mL载药后的脂质体混悬液与0.5mL 200mg·mL⁻¹冻干保护剂溶液混合于10mL西林瓶中;其中,除非特殊说明,实施例采用蔗糖作为冻干保护剂。将西林瓶置于冻干机板层上,真空度设定为0Pa,在-50℃维持6h。然后真空度设定为10Pa,升温至-35℃维持4h,-25℃维持2h,-20℃维持7h,-15℃维持4h,-10℃维持16h,-5℃维持2h,0℃维持2h,5℃维持5h,10℃维持5h,15℃维持3h,20℃维持3h,25℃维持10h。

[0060] 以下实施例中,包封率测定方法:将常规酸碱处理后的ZB-1强酸钠型阳离子交换纤维剪至长0.5cm,装于含有聚丙烯筛板的2.5mL注射器内,以重蒸水平衡,2000rpm离心2min,弃去滤液,制成柱高为1cm的阳离子交换纤维微柱。精密移取两份已重构好的EPI冻干脂质体,每份100μL,将一份转移至10mL量瓶中,加入1.2mL重蒸水,以甲醇为破乳剂稀释至刻度,混匀,于480nm波长下测定吸光度A₀(药物总吸光度)。另一份EPI冻干脂质体自阳离子交换纤维微柱顶端中央缓慢上样,2000rpm离心2min,再于柱顶端加入400μL重蒸水,2000rpm离心2min,重复3次,合并洗脱液,转移至10mL量瓶中,以甲醇为破乳剂稀释至刻度,摇匀,测定吸光度A₁(包封药物吸光度),并按公式EE% = A₁/A₀ × 100%计算EPI冻干脂质体的包封率。

[0061] 以下是具体实施例部分,其中,实施例1~8列举了以本发明EPI脂质体5-5-SAGL-EPI为例的冻干工艺优化,对比例1~5,以及实施例9~22列举了本发明EPI脂质体的处方、制备及冻干结果,检测例1~4列举了本发明EPI脂质体5-5-SAGL-EPI冻干后的质量评价,检测例5是本发明SA-ODA和不同比例GM1共同修饰EPI脂质体的抗S180肿瘤疗效,实施例23是Myocet[®]冻干产品,实施例24是米托蒽醌冻干产品。

[0062] 实施例1

[0063] 选择-40℃和-50℃作为预冻温度进行考察,冻干后加入适量灭菌注射用水室温下

重构,结果见表1。

[0064] 表1不同预冻温度下EPI脂质体冻干后的结果

| | 预冻温度 (°C) | 外观 | 重构时间(s) | 粒径增长 (nm) | 冻干后包封率(%) |
|--------|--------------|----------|---------|--------------|------------|
| [0065] | -40 | 略萎缩, 无裂纹 | 90 ± 8 | 21.1 ± 3.1 | 92.4 ± 2.9 |
| [0066] | -50 | 略萎缩, 无裂纹 | 35 ± 2 | 8.2 ± 1.8 | 98.6 ± 1.0 |

[0067] 结果:预冻温度为-40℃和-50℃时,冻干品的外观无明显区别,但是预冻温度为-40℃时,脂质体冻干后粒径增加明显,药物包封率较低,可能是由于预冻温度不同,脂质体双分子层内外发生的冷冻行为不同。比较冻干后重构时间、粒径变化及包封率结果,选择-50℃作为预冻温度。

[0068] 实施例2

[0069] 选择预冻时间分别为4h、6h和8h(冻干机从室温开始降温算起)进行考察,冻干后加入适量灭菌注射用水室温下重构,结果见表2。

[0070] 表2不同预冻时间下EPI脂质体冻干后的结果

| | 预冻时间(h) | 外观 | 重构时间(s) | 粒径增长 (nm) | 冻干后包封率(%) |
|--------|---------|----------|---------|--------------|------------|
| [0071] | 4 | 喷瓶 | 125 ± 6 | 31.1 ± 5.3 | 82.3 ± 2.6 |
| | 6 | 略萎缩, 无裂纹 | 35 ± 2 | 8.2 ± 1.8 | 98.6 ± 1.0 |
| | 8 | 略萎缩, 无裂纹 | 37 ± 3 | 9.6 ± 2.0 | 96.8 ± 0.9 |

[0072] 结果:预冻时间为4h时,产品发生喷瓶,可能是由于预冻时间过短,冻干机搁板和样品降低到设定的最低温度都需要一定时间。且预冻时间为4h时,产品重构时间较长,粒径和包封率较冻干前变化明显。当预冻时间为6h和8h时,产品的关键属性无明显差异,考虑到生产的时间成本和经济成本,选择预冻时间为6h。

[0073] 实施例3

[0074] 预冻速度影响冰成核温度和冰晶大小,进而影响干燥速率和干燥后产品的溶解速度,所以应根据产品的特点和冻干机的性能而筛选出一个最佳冷冻速率。预冻速度分为慢冻和快冻,慢冻形成大冰晶,呈六角对称形,升华速度较快,但干燥后溶解慢;快冻形成小冰晶,呈树枝不规则形或球形,产品外观形态好,干燥后溶解快,但升华速度较慢。实验中慢冻是将样品先放入冻干机,随冻干机板层从室温降低到设置的预冻温度;快冻是指先将冻干机板层降低至设定的预冻温度后,再将样品放入冻干机进行预冻。冻干后加入适量灭菌注射用水室温下重构,结果见表3。

[0075] 表3不同预冻速度下EPI脂质体冻干后的结果

| | 预冻速度 | 外观 | 重构时间(s) | 粒径增长(nm) | 冻干后包封率(%) |
|--------|------|----------|---------|------------|------------|
| [0076] | 慢冻 | 略萎缩, 无裂纹 | 35 ± 2 | 8.2 ± 1.8 | 98.6 ± 1.0 |
| | 快冻 | 略萎缩, 无裂纹 | 74 ± 7 | 21.9 ± 1.0 | 92.4 ± 0.9 |

[0077] 结果:慢冻条件下脂质体冻干后粒径增长较小,包封率较高且重构时间较短,因此,选择慢冻对脂质体进行冷冻。

[0078] 实施例4

[0079] 产品温度是一次干燥中的关键温度,通常所说的产品温度是指冰升华界面的温度,其与塌陷温度(Collapse temperature, T_c)之间的温度差称为温度的安全区间。干燥时间随产品温度升高而缩短,但是当产品温度超过 T_c 时,将会发生塌陷,影响产品质量;如果产品温度过低,热量供应不足,升华速率会大幅度减慢而延长一次干燥时间。本实验选择-40℃23h和-20℃7h、-10℃16h对一次干燥过程进行优化,冻干后加入适量灭菌注射用水室温下重构,结果见表4。

[0080] 表4不同一次干燥过程下EPI脂质体冻干后的结果

| | 一次干燥温度(℃) | 外观 | 重构时间 (s) | 粒径增长 (nm) | 冻干后包封率 (%) |
|--------|-------------------|----------|-------------|--------------|---------------|
| [0081] | -40℃ 23 h | 回融 | 拒绝 | 拒绝 | 拒绝 |
| | -20℃ 7h、-10℃ 16 h | 略萎缩, 无裂纹 | 35 ± 2 | 8.2 ± 1.8 | 98.6 ± 1.0 |

[0082] 结果:虽然-20℃和-10℃高于样品的 T_g' ,但是当板层温度为-20℃和-10℃时,样品的升华界面温度可能由于冰不断的升华带走热量而低于产品塌陷温度,因此并未发生塌陷或回融。而-40℃作为一次干燥温度,可能升华界面温度过低,一次干燥速度过慢,导致在设置的一次干燥时间内可冻结水分并未完全除去样品温度便升高超过 T_c ,最终导致回融。因此,选择-20℃7h、-10℃16h分段进行一次干燥。

[0083] 实施例5

[0084] 二次干燥是将预冻过程中未冻结的水通过升高温度的方式解吸除去。二次干燥所达到的最高温度根据样品性质确定。本实验选择25℃干燥10h和25℃干燥5h,30℃干燥5h对二次干燥过程进行优化,冻干后加入适量灭菌注射用水室温下重构,结果见表5。

[0085] 表5不同二次干燥过程下EPI脂质体冻干后的结果

| | 二次干燥 | 外观 | 重构时间 (s) | 粒径增长 (nm) | 冻干后包封率 (%) |
|--------|-----------------|----------|-------------|--------------|---------------|
| [0086] | 25℃ 10 h | 略萎缩, 无裂纹 | 35 ± 2 | 8.2 ± 1.8 | 98.6 ± 1.0 |
| | 25℃ 5 h 30℃ 5 h | 略萎缩, 无裂纹 | 87 ± 5 | 33.6 ± 2.7 | 90.5 ± 0.8 |

[0087] 结果:25℃干燥10h得到的产品粒径增长较小,包封率较高,而25℃干燥5h,30℃干燥5h条件下,虽然产品外观并未发生明显变化,但产品重构时间延长,粒径大大增加,包封率降低,可能是由于二次干燥温度升高,产品中水分含量依然较高,产品的 T_g 较低,导致药

物发生泄漏。因此,选择二次干燥为25℃干燥10h。

[0088] 实施例6

[0089] 选择常用作脂质体冻干保护剂的双糖(蔗糖、海藻糖、乳糖和麦芽糖)作为冻干保护剂,浓度为10% (w/v)。结果见表6。

[0090] 表6不同冻干保护剂下EPI脂质体冻干后的结果

| | 冻干保护剂 | 外观 | 重构时间(s) | 粒径增长(nm) | 冻干后包封率(%) |
|--------|-------|----------|---------|------------|------------|
| [0091] | 蔗糖 | 略萎缩, 无裂纹 | 35 ± 2 | 8.2 ± 1.8 | 98.6 ± 1.0 |
| | 海藻糖 | 略萎缩, 无裂纹 | 46 ± 4 | 11.2 ± 4.8 | 95.7 ± 4.0 |
| | 乳糖 | 略萎缩, 无裂纹 | 48 ± 9 | 9.8 ± 1.1 | 95.5 ± 1.4 |
| | 麦芽糖 | 萎缩, 饼块升高 | 42 ± 3 | 7.6 ± 0.7 | 92.2 ± 1.4 |

[0092] 结果:四种不同双糖保护下,冻干后脂质体重构时间无明显差异,粒径增长在10nm左右,药物包封率在90%以上。综合考虑粒径增长以及包封率等因素,可以选择乳糖或蔗糖,最优选择蔗糖作为脂质体冻干保护剂。

[0093] 实施例7

[0094] 由于高浓度的糖溶液会导致整个给药体系粘度增大,冻干过程中冰升华阻力过大,因此选择按质量体积百分比,蔗糖:载药后的脂质体混悬液+蔗糖溶液总体积为10%和5% (w/v),来考察冷冻干燥过程中冻干保护剂加入在冻干总体积的浓度对脂质体的保护效果,结果见表7。

[0095] 表7冻干保护剂浓度对EPI脂质体冻干结果的影响

| | 冻干保护剂 (w/v) | 外观 | 重构时间(s) | 粒径增长(nm) | 冻干后包封率(%) |
|--------|----------------|----------|---------|------------|------------|
| [0096] | 10% 蔗糖 | 略萎缩, 无裂纹 | 35 ± 2 | 8.2 ± 1.8 | 98.6 ± 1.0 |
| | 5% 蔗糖 | 略萎缩, 无裂纹 | 17 ± 2 | 57.9 ± 2.0 | 78.3 ± 0.7 |

[0097] 结果:相比于10%蔗糖溶液,5%蔗糖的冻干保护效果远远不够,重构后脂质体粒径大大增加,药物包封率明显下降,可能是由于冻干保护剂浓度过低,一方面在于预冻时当水分子从制剂中被除去时,糖分子数较少,未能起到足够的替代水分子的作用;另一方面可能由于糖分子数较少,预冻时形成的玻璃态无法抵抗冰晶形成造成的机械破坏力,导致脂质体双层膜受到冰晶的破坏,药物发生泄漏。因此,最终选择冻干保护剂浓度为10% (w/v)。

[0098] 实施例8

[0099] 冻干保护剂有两种加入方式,分别为内加和外加。内加是指在制备脂质体过程中将冻干保护剂加入水化介质中;外加是指将冻干保护剂溶液与制备好的脂质体混悬液混合。选择内加10%蔗糖和外加10%蔗糖两种方式进行筛选,结果见表8。

[0100] 表8冻干保护剂加入方式对EPI脂质体冻干结果的影响

| | 冻干保护剂 | 外观 | 重构时间 | 粒径增长 | 冻干后包封率 |
|--------|-----------|----------|--------|-----------|------------|
| | | | (s) | (nm) | (%) |
| [0101] | 外加 10% 蔗糖 | 略萎缩, 无裂纹 | 35 ± 2 | 8.2 ± 1.8 | 98.6 ± 1.0 |
| | 内加 10% 蔗糖 | 略萎缩, 无裂纹 | 66 ± 4 | 6.3 ± 2.0 | 93.6 ± 3.1 |

[0102] 结果:内加和外加10%蔗糖溶液作为冻干保护剂时,脂质体的外观和粒径变化无明显区别,但内加冻干保护剂的脂质体重构时间明显延长,药物包封率较低。因此,选择外加10%蔗糖溶液作为脂质体冻干保护剂。

[0103] 对比例1 (CL-EPI)

[0104] 将154.7mg HSPC、45.2mg DSPG和10.9mg CH加入0.5mL无水乙醇并于65℃水浴中搅拌溶解。待膜材完全溶解后,以5mL·min⁻¹的速度将膜材注入预热至相同温度的5mL柠檬酸-柠檬酸钠溶液(200mmol/L,pH 4.0)中,65℃水浴搅拌20min,得到空白脂质体初品。

[0105] 在65℃水浴条件下,空白脂质体初品经聚碳酸酯膜挤出(0.2μm膜挤出2次,0.1μm膜挤出10次,0.08μm膜挤出10次),即得空白脂质体混悬液(磷脂浓度为40mg·mL⁻¹)。

[0106] 以500mmol/L的磷酸钠溶液为pH调节剂,调节脂质体外水相pH为7.0,药脂比1:10(w/w),60℃孵育20min装载EPI,冰水浴2min终止载药。

[0107] 粒径检测采用Nicomp-380激光粒度测定仪,测定值为129.8nm,PDI为0.049。包封率结果测定为97.0%。按照设定的冻干程序进行冷冻干燥,室温下重构后的粒径为145.0nm,PDI为0.272,冻干后包封率为92.9%。

[0108] 本对比例制备的EPI脂质体的透射电镜图见图6中的(A)。

[0109] 对比例2 (5-SAL-EPI)

[0110] 将153.6mg HSPC、44.9mg DSPG、10.8mg CH和7.8mg SA-ODA加入0.5mL无水乙醇并于65℃水浴中搅拌溶解。待膜材完全溶解后,以5mL·min⁻¹的速度将膜材注入预热至相同温度的5mL柠檬酸-柠檬酸钠溶液(200mmol/L,pH 4.0)中,65℃水浴搅拌20min,得到空白脂质体初品。

[0111] 在65℃水浴条件下,空白脂质体初品经聚碳酸酯膜挤出(0.2μm膜挤出2次,0.1μm膜挤出10次,0.08μm膜挤出10次),即得空白脂质体混悬液(磷脂浓度为40mg·mL⁻¹)。

[0112] 以500mmol/L的磷酸钠溶液为pH调节剂,调节脂质体外水相pH为7.0,药脂比1:10(w/w),60℃孵育20min装载EPI,冰水浴2min终止载药。

[0113] 粒径检测采用Nicomp-380激光粒度测定仪,测定值为125.8nm,PDI为0.078。包封率结果测定为96.5%。按照设定的冻干程序进行冷冻干燥,室温下重构后的粒径为133.0nm,PDI为0.057,冻干后包封率为88.8%。

[0114] 本对比例制备的EPI脂质体的透射电镜图见图6中的(B)。

[0115] 对比例3 (0.3-5-SAGL-EPI)

[0116] 将152.2mg HSPC、48.0mg DSPG、11.6mg CH、8.4mg SA-ODA和1.4mg GM1加入0.5mL无水乙醇并于65℃水浴中搅拌溶解。待膜材完全溶解后,以5mL·min⁻¹的速度将膜材注入预热至相同温度的5mL柠檬酸-柠檬酸钠溶液(200mmol/L,pH 4.0)中,65℃水浴搅拌20min,得到空白脂质体初品。

[0117] 在65℃水浴条件下,空白脂质体初品经聚碳酸酯膜挤出(0.2μm膜挤出2次,0.1μm

膜挤出10次,0.08 μm 膜挤出10次),即得空白脂质体混悬液(磷脂浓度为40 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

[0118] 以500 mmol/L 的磷酸钠溶液为pH调节剂,调节脂质体外水相pH为7.0,药脂比1:10(w/w),60 $^{\circ}\text{C}$ 孵育20min装载EPI,冰水浴2min终止载药。

[0119] 粒径检测采用Nicomp-380激光粒度测定仪,测定值为127.5nm,PDI为0.071。包封率结果测定为97.5%。按照设定的冻干程序进行冷冻干燥,室温下重构后的粒径为151.4nm,PDI为0.156,冻干后包封率为91.3%。

[0120] 本对比例制备的EPI脂质体的透射电镜图见图6中的(C)。

[0121] 实施例9(GM1单独修饰EPI脂质体(5-GL-EPI))

[0122] 将152.8mg HSPC、48.1mg DSPG、11.6mg CH和23.5mg GM1加入0.5mL无水乙醇并于65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中搅拌溶解。待膜材完全溶解后,以5 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度将膜材注入预热至相同温度的5mL柠檬酸-柠檬酸钠溶液(200 mmol/L ,pH 4.0)中,65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴搅拌20min,得到空白脂质体初品。

[0123] 在65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下,空白脂质体初品经聚碳酸酯膜挤出(0.2 μm 膜挤出2次,0.1 μm 膜挤出10次,0.08 μm 膜挤出10次),即得空白脂质体混悬液(磷脂浓度为40 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

[0124] 以500 mmol/L 的磷酸钠溶液为pH调节剂,调节脂质体外水相pH为7.0,药脂比1:10(w/w),60 $^{\circ}\text{C}$ 孵育20min装载EPI,冰水浴2min终止载药。

[0125] 粒径检测采用Nicomp-380激光粒度测定仪,测定值为123.7nm,PDI为0.078。包封率结果测定为98.2%。按照设定的冻干程序进行冷冻干燥,室温下重构后的粒径为131.2nm,PDI为0.092,冻干后包封率为97.1%

[0126] 实施例10(10-GL-EPI)

[0127] 将150.5mg HSPC、51.3mg DSPG、12.4mg CH和50.2mg GM1加入0.5mL无水乙醇并于65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中搅拌溶解。待膜材完全溶解后,以5 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度将膜材注入预热至相同温度的5mL柠檬酸-柠檬酸钠溶液(200 mmol/L ,pH 4.0)中,65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴搅拌20min,得到空白脂质体初品。

[0128] 在65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下,空白脂质体初品经聚碳酸酯膜挤出(0.2 μm 膜挤出2次,0.1 μm 膜挤出10次,0.08 μm 膜挤出10次),即得空白脂质体混悬液(磷脂浓度为40 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

[0129] 以500 mmol/L 的磷酸钠溶液为pH调节剂,调节脂质体外水相pH为7.0,药脂比1:10(w/w),60 $^{\circ}\text{C}$ 孵育20min装载EPI,冰水浴2min终止载药。

[0130] 粒径检测采用Nicomp-380激光粒度测定仪,测定值为124.2nm,PDI为0.073。包封率结果测定为98.6%。按照设定的冻干程序进行冷冻干燥,室温下重构后的粒径为132.5nm,PDI为0.084,冻干后包封率为97.3%。

[0131] 实施例11(0.5-5-SAGL-EPI)

[0132] 将166.8mg HSPC、52.9mg DSPG、12.8mg CH、9.2mg SA-ODA和2.6mg GM1加入0.5mL无水乙醇并于65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中搅拌溶解。待膜材完全溶解后,以5 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度将膜材注入预热至相同温度的5mL柠檬酸-柠檬酸钠溶液(200 mmol/L ,pH 4.0)中,65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴搅拌20min,得到空白脂质体初品。

[0133] 在65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下,空白脂质体初品经聚碳酸酯膜挤出(0.2 μm 膜挤出2次,0.1 μm 膜挤出10次,0.08 μm 膜挤出10次),即得空白脂质体混悬液(磷脂浓度为40 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

[0134] 以500 mmol/L 的磷酸钠溶液为pH调节剂,调节脂质体外水相pH为7.0,药脂比1:10

(w/w), 60℃孵育20min装载EPI,冰水浴2min终止载药。

[0135] 粒径检测采用Nicomp-380激光粒度测定仪,测定值为124.7nm,PDI为0.140。包封率结果测定为89.3%。按照设定的冻干程序进行冷冻干燥,室温下重构后的粒径为133.7nm,PDI为0.186,冻干后包封率为93.8%。

[0136] 实施例12(1-5-SAGL-EPI)

[0137] 将150.5mg HSPC、48.1mg DSPG、11.6mg CH、8.4mg SA-ODA和4.7mgGM1加入0.5mL无水乙醇并于65℃水浴中搅拌溶解。待膜材完全溶解后,以5mL·min⁻¹的速度将膜材注入预热至相同温度的5mL柠檬酸-柠檬酸钠溶液(200mmol/L,pH 4.0)中,65℃水浴搅拌20min,得到空白脂质体初品。

[0138] 在65℃水浴条件下,空白脂质体初品经聚碳酸酯膜挤出(0.2μm膜挤出2次,0.1μm膜挤出10次,0.08μm膜挤出10次),即得空白脂质体混悬液(磷脂浓度为40mg·mL⁻¹)。

[0139] 以500mmol/L的磷酸钠溶液为pH调节剂,调节脂质体外水相pH为7.0,药脂比1:10(w/w),60℃孵育20min装载EPI,冰水浴2min终止载药。

[0140] 粒径检测采用Nicomp-380激光粒度测定仪,测定值为125.6nm,PDI为0.126。包封率结果测定为100.0%。按照设定的冻干程序进行冷冻干燥,室温下重构后的粒径为135.4nm,PDI为0.134,冻干后包封率为96.9%。

[0141] 实施例13(3-5-SAGL-EPI)

[0142] 将150.6mg HSPC、49.7mg DSPG、12.0mg CH、8.7mgSA-ODA和14.6mgGM1加入0.5mL无水乙醇并于65℃水浴中搅拌溶解。待膜材完全溶解后,以5mL·min⁻¹的速度将膜材注入预热至相同温度的5mL柠檬酸-柠檬酸钠溶液(200mmol/L,pH 4.0)中,65℃水浴搅拌20min,得到空白脂质体初品。

[0143] 在65℃水浴条件下,空白脂质体初品经聚碳酸酯膜挤出(0.2μm膜挤出2次,0.1μm膜挤出10次,0.08μm膜挤出10次),即得空白脂质体混悬液(磷脂浓度为40mg·mL⁻¹)。

[0144] 以500mmol/L的磷酸钠溶液为pH调节剂,调节脂质体外水相pH为7.0,药脂比1:10(w/w),60℃孵育20min装载EPI,冰水浴2min终止载药。

[0145] 粒径检测采用Nicomp-380激光粒度测定仪,测定值为127.1nm,PDI为0.086。包封率结果测定为98.0%。按照设定的冻干程序进行冷冻干燥,室温下重构后的粒径为133.9nm,PDI为0.100,冻干后包封率为95.7%。

[0146] 实施例14(5-5-SAGL-EPI)

[0147] 将149mg HSPC、50.7mg DSPG、12.3mg CH、8.9mgSA-ODA和24.8mgGM1加入0.5mL无水乙醇并于65℃水浴中搅拌溶解。待膜材完全溶解后,以5mL·min⁻¹的速度将膜材注入预热至相同温度的5mL柠檬酸-柠檬酸钠溶液(200mmol/L,pH 4.0)中,65℃水浴搅拌20min,得到空白脂质体初品。

[0148] 在65℃水浴条件下,空白脂质体初品经聚碳酸酯膜挤出(0.2μm膜挤出2次,0.1μm膜挤出10次,0.08μm膜挤出10次),即得空白脂质体混悬液(磷脂浓度为40mg·mL⁻¹)。

[0149] 以500mmol/L的磷酸钠溶液为pH调节剂,调节脂质体外水相pH为7.0,药脂比1:10(w/w),60℃孵育20min装载EPI,冰水浴2min终止载药。

[0150] 粒径检测采用Nicomp-380激光粒度测定仪,测定EPI脂质体的粒径值为121.7nm,PDI为0.065。包封率结果测定为98.9%。按照设定的冻干程序进行冷冻干燥,得到5-5-

SAGL-EPI冻干后的外观图见图1中的A,室温下重构后的粒径为127.9nm,PDI为0.095,冻干后包封率为98.6%,重构后的5-5-SAGL-EPI的外观图见图1中的B,其冻干重构后的粒子形态见图2。

[0151] 本实施例制备的EPI脂质体的透射电镜图见图6中的(D),通过图6,可以看出对比例1~3以及本实施例制备出的脂质体都是合格的,在透射电镜下均可见明显的双分子层。

[0152] 对比例4

[0153] 将膜材乙醇溶液以 $10\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度加入至柠檬酸-柠檬酸钠溶液中,其他同实施例14,发现后续,高压挤出时过膜困难,挤出次数增加。

[0154] 实施例15(7-5-SAGL-EPI)

[0155] 将150.0mg HSPC、52.9mg DSPG、12.8mg CH、9.2mg SA-ODA和36.2mg GM1加入0.5mL无水乙醇并于 65°C 水浴中搅拌溶解。待膜材完全溶解后,以 $5\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度将膜材注入预热至相同温度的5mL柠檬酸-柠檬酸钠溶液(200mmol/L ,pH 4.0)中, 65°C 水浴搅拌20min,得到空白脂质体初品。

[0156] 在 65°C 水浴条件下,空白脂质体初品经聚碳酸酯膜挤出($0.2\mu\text{m}$ 膜挤出2次, $0.1\mu\text{m}$ 膜挤出10次, $0.08\mu\text{m}$ 膜挤出10次),即得空白脂质体混悬液(磷脂浓度为 $40\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

[0157] 以 500mmol/L 的磷酸钠溶液为pH调节剂,调节脂质体外水相pH为7.0,药脂比1:10(w/w), 60°C 孵育20min装载EPI,冰水浴2min终止载药。

[0158] 粒径检测采用Nicomp-380激光粒度测定仪,测定值为124.6nm,PDI为0.115。包封率结果测定为98.2%。按照设定的冻干程序进行冷冻干燥,室温下重构后的粒径为130.7nm,PDI为0.197,冻干后包封率为95.5%。

[0159] 实施例16(10-5-SAGL-EPI)

[0160] 将146.6mg HSPC、54.5mg DSPG、13.1mg CH、9.5mg SA-ODA和53.3mg GM1加入0.5mL无水乙醇并于 65°C 水浴中搅拌溶解。待膜材完全溶解后,以 $5\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度将膜材注入预热至相同温度的5mL柠檬酸-柠檬酸钠溶液(200mmol/L ,pH 4.0)中, 65°C 水浴搅拌20min,得到空白脂质体初品。

[0161] 在 65°C 水浴条件下,空白脂质体初品经聚碳酸酯膜挤出($0.2\mu\text{m}$ 膜挤出2次, $0.1\mu\text{m}$ 膜挤出10次, $0.08\mu\text{m}$ 膜挤出10次),即得空白脂质体混悬液(磷脂浓度为 $40\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

[0162] 以 500mmol/L 的磷酸钠溶液为pH调节剂,调节脂质体外水相pH为7.0,药脂比1:10(w/w), 60°C 孵育20min装载EPI,冰水浴2min终止载药。

[0163] 粒径检测采用Nicomp-380激光粒度测定仪,测定值为122.9nm,PDI为0.103。包封率结果测定为97.0%。按照设定的冻干程序进行冷冻干燥,室温下重构后的粒径为131.0nm,PDI为0.104,冻干后包封率为98.5%。

[0164] 实施例17(20-5-SAGL-EPI)

[0165] 将137.5mg HSPC、62.5mg DSPG、15.0mg CH、10.9mg SA-ODA和122.3mg GM1加入0.5mL无水乙醇并于 65°C 水浴中搅拌溶解。待膜材完全溶解后,以 $5\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度将膜材注入预热至相同温度的5mL柠檬酸-柠檬酸钠溶液(200mmol/L ,pH 4.0)中, 65°C 水浴搅拌20min,得到空白脂质体初品。

[0166] 在 65°C 水浴条件下,空白脂质体初品经聚碳酸酯膜挤出($0.2\mu\text{m}$ 膜挤出2次, $0.1\mu\text{m}$ 膜挤出10次, $0.08\mu\text{m}$ 膜挤出10次),即得空白脂质体混悬液(磷脂浓度为 $40\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

[0167] 以500mmol/L的磷酸钠溶液为pH调节剂,调节脂质体外水相pH为7.0,药脂比1:10(w/w),60℃孵育20min装载EPI,冰水浴2min终止载药。

[0168] 粒径检测采用Nicomp-380激光粒度测定仪,测定值为123.8nm,PDI为0.100。包封率结果测定为97.0%。按照设定的冻干程序进行冷冻干燥,室温下重构后的粒径为133.2nm,PDI为0.112,冻干后包封率为93.2%。

[0169] 对比例5(30-5-SAGL-EPI)

[0170] 将126.2mg HSPC、96.1mg DSPG、17.7mg CH、12.9mg SA-ODA和216.5mg GM1加入0.5mL无水乙醇并于65℃水浴中搅拌溶解。待膜材完全溶解后,以5mL·min⁻¹的速度将膜材注入预热至相同温度的5mL柠檬酸-柠檬酸钠溶液(200mmol/L,pH 4.0)中,65℃水浴搅拌20min,得到空白脂质体初品。

[0171] 在65℃水浴条件下,空白脂质体初品经聚碳酸酯膜挤出(0.2μm膜挤出2次,0.1μm膜挤出10次,0.08μm膜挤出10次),即得空白脂质体混悬液(磷脂浓度为40mg·mL⁻¹)。

[0172] 以500mmol/L的磷酸钠溶液为pH调节剂,调节脂质体外水相pH为7.0,药脂比1:10(w/w),60℃孵育20min装载EPI,冰水浴2min终止载药。

[0173] 粒径检测采用Nicomp-380激光粒度测定仪,测定值为121.6nm,PDI为0.069。包封率结果测定为92.0%。按照设定的冻干程序进行冷冻干燥,室温下重构后的粒径为132.1nm,PDI为0.146,冻干后包封率为89.5%。

[0174] 实施例18(SA-CH与GM1共修饰EPI脂质体)

[0175] 将150.5mg HSPC、51.3mg DSPG、12.4mg CH、12.9mg SA-CH和25.1mg GM1加入0.5mL无水乙醇并于65℃水浴中搅拌溶解。待膜材完全溶解后,以5mL·min⁻¹的速度将膜材注入预热至相同温度的5mL柠檬酸-柠檬酸钠溶液(200mmol/L,pH 4.0)中,65℃水浴搅拌20min,得到空白脂质体初品。

[0176] 在65℃水浴条件下,空白脂质体初品经聚碳酸酯膜挤出(0.2μm膜挤出2次,0.1μm膜挤出10次,0.08μm膜挤出10次),即得空白脂质体混悬液(磷脂浓度为40mg·mL⁻¹)。

[0177] 以500mmol/L的磷酸钠溶液为pH调节剂,调节脂质体外水相pH为7.0,药脂比1:10(w/w),60℃孵育20min装载EPI,冰水浴2min终止载药。

[0178] 粒径检测采用Nicomp-380激光粒度测定仪,测定值为124.9nm,PDI为0.078。包封率结果测定为97.6%。按照设定的冻干程序进行冷冻干燥,室温下重构后的粒径为132.1nm,PDI为0.070,冻干后包封率为96.9%。

[0179] 实施例19(WE-18与GM1共修饰EPI脂质体)

[0180] 将150.5mg HSPC、51.3mg DSPG、12.4mg CH、11.0mg WE-18和25.1mg GM1加入0.5mL无水乙醇并于65℃水浴中搅拌溶解。待膜材完全溶解后,以5mL·min⁻¹的速度将膜材注入预热至相同温度的5mL柠檬酸-柠檬酸钠溶液(200mmol/L,pH 4.0)中,65℃水浴搅拌20min,得到空白脂质体初品。

[0181] 在65℃水浴条件下,空白脂质体初品经聚碳酸酯膜挤出(0.2μm膜挤出2次,0.1μm膜挤出10次,0.08μm膜挤出10次),即得空白脂质体混悬液(磷脂浓度为40mg·mL⁻¹)。

[0182] 以500mmol/L的磷酸钠溶液为pH调节剂,调节脂质体外水相pH为7.0,药脂比1:10(w/w),60℃孵育20min装载EPI,冰水浴2min终止载药。粒径检测采用Nicomp-380激光粒度测定仪,测定值为123.3nm,PDI为0.086。包封率结果测定为96.4%。按照设定的冻干程序进

行冷冻干燥,室温下重构后的粒径为132.5nm,PDI为0.094,冻干后包封率为95.2%。

[0183] 实施例20(以二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)为膜材)

[0184] 将151.7mg DSPC、51.3mg DSPG、12.4mg CH、9.0mg SA-ODA和25.4mg GM1加入0.5mL无水乙醇并于65℃水浴中搅拌溶解。待膜材完全溶解后,以 $5\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度将膜材注入预热至相同温度的5mL柠檬酸-柠檬酸钠溶液(200mmol/L,pH 4.0)中,65℃水浴搅拌20min,得到空白脂质体初品。

[0185] 在65℃水浴条件下,空白脂质体初品经聚碳酸酯膜挤出(0.2 μm 膜挤出2次,0.1 μm 膜挤出10次,0.08 μm 膜挤出10次),即得空白脂质体混悬液(磷脂浓度为 $40\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

[0186] 以500mmol/L的磷酸钠溶液为pH调节剂,调节脂质体外水相pH为7.0,药脂比1:10(w/w),60℃孵育20min装载EPI,冰水浴2min终止载药。

[0187] 粒径检测采用Nicomp-380激光粒度测定仪,测定值为126.2nm,PDI为0.020。包封率结果测定为98.3%。按照设定的冻干程序进行冷冻干燥,室温下重构后的粒径为135.9nm,PDI为0.088,冻干后包封率为96.2%。

[0188] 实施例21

[0189] 本实施例中,以单唾液酸四己糖神经节苷脂的含量为5%mol,具体组成为149mg HSPC、50.7mg DSPG、12.3mg CH、17.8mg SA-ODA和24.8mg GM1加入0.5mL无水乙醇并于60℃水浴中搅拌溶解。待膜材完全溶解后,以 $1\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度将膜材注入预热至相同温度的5mL柠檬酸-柠檬酸钠溶液(200mmol/L,pH 4.0)中,60℃水浴搅拌25min,得到空白脂质体初品。

[0190] 在60℃水浴条件下,空白脂质体初品经聚碳酸酯膜挤出(0.2 μm 膜挤出1次,0.1 μm 膜挤出10次,0.08 μm 膜挤出10次),即得空白脂质体混悬液(磷脂浓度为 $40\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

[0191] 以400mmol/L的碳酸钠溶液为pH调节剂,调节脂质体外水相pH为7.0,药脂比1:20(w/w),55℃孵育30min装载匹杉琼,冰水浴2min终止载药。

[0192] 粒径检测采用Nicomp-380激光粒度测定仪,测定值为125.7nm,PDI为0.069。包封率结果测定为98.3%。按照设定的冻干程序进行冷冻干燥,室温下重构后的粒径为133.1nm,PDI为0.082,冻干后包封率为96.3%。

[0193] 实施例22

[0194] 将149mg HSPC、50.7mg DSPG、12.3mg CH、8.9mg SA-ODA和24.8mg GM1加入制剂终体积10%(v/v)的无水乙醇并于70℃水浴中搅拌溶解。待脂质体膜材完全溶解后,以 $3\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度将膜材注入预热至相同温度的柠檬酸-柠檬酸钠溶液(150mmol/L,pH 4.5)中,70℃水浴搅拌10min,得到空白脂质体初品。

[0195] 在70℃水浴条件下,空白脂质体初品经聚碳酸酯膜挤出(0.2 μm 膜挤出3次,0.1 μm 膜挤出12次,0.08 μm 膜挤出11次),即得空白脂质体混悬液(磷脂浓度为 $40\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

[0196] 以500mmol/L的磷酸钠溶液为pH调节剂,调节脂质体外水相pH为7.0,药脂比1:5(w/w),70℃孵育10min装载伊立替康,冰水浴2min终止载药。

[0197] 粒径检测采用Nicomp-380激光粒度测定仪,测定值为124.2nm,PDI为0.089。包封率结果测定为97.3%。按照设定的冻干程序进行冷冻干燥,室温下重构后的粒径为133.6nm,PDI为0.095,冻干后包封率为96.2%。

[0198] 检测例1

[0199] 取实施例14制备的冻干脂质体5-5-SAGL-EPI,加入适量灭菌注射用水室温下振摇重新分散,静置15min。精密移取S-EPI、冻干前5-5-SAGL-EPI和重构后5-5-SAGL-EPI溶液各1.0mL于透析袋中,两端夹紧后置于150mL释放介质内,于 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 条件下以100rpm恒速搅拌,分别于0.5、1、2、4、6、8、12、24、36和48h时吸取1.0mL透析液,同时补入同温度的等量释放介质。测定透析液的 ΔF ,并按如下公式计算累计释放率 R_n ,结果见图3。

$$[0200] \quad R_n = (C_n V_o + \sum_{n-1}^n C_{n-1} V) / M_t \times 100\%$$

[0201] 其中,释放介质体积为 V_o ,第n次取样时质量浓度为 C_n ,第n-1次取样时质量浓度为 C_{n-1} ,取样体积为V,总药物量为 M_t 。

[0202] 结果:冻干前后脂质体的体外释放行为无明显差异。

[0203] 检测例2

[0204] 取实施例14制备的冻干脂质体5-5-SAGL-EPI,加入适量灭菌注射用水室温下振摇重新分散,静置15min。分别精密移取0.5mL重构后的EPI脂质体于10mL容量瓶内,以5%Glu稀释至刻度,避光放置。于稀释后0、3、6、12和24h测定其粒径和包封率,结果见图4。

[0205] 结果:经5%Glu稀释20倍后24h内,各EPI脂质体的粒径与包封率均无显著变化,稀释稳定性良好。

[0206] 检测例3

[0207] 取实施例14制备的冻干脂质体5-5-SAGL-EPI,加入适量灭菌注射用水室温下振摇重新分散,静置15min。将重构后的脂质体混悬液分别置于 $4 \pm 2^\circ\text{C}$ 和室温下条件下避光保存,分别于0、2、4、8和12h测定其粒径和包封率,结果见图5。

[0208] 结果:12h的实验期内,重构后的脂质体无论在 $4 \pm 2^\circ\text{C}$ 还是室温下,粒径和包封率均未发生明显变化,表明重构后的脂质体放置稳定性良好。

[0209] 检测例4

[0210] 在 $4 \pm 2^\circ\text{C}$ 下进行长期稳定性实验。分别制备三批冻干EPI脂质体5-5-SAGL-EPI,充氮密封,在 $4 \pm 2^\circ\text{C}$ 条件下避光保存,分别于0、1、2、3和6个月取冻干品加入适量灭菌注射用水室温下振摇重新分散,静置15min后测定其重构时间、粒径及包封率,结果见表9。

[0211] 表9EPI脂质体冻干后的长期放置稳定性

| | 储存时间(月) | 外观 | 重构时间(s) | 粒径(nm) | 冻干后包封率(%) |
|--------|---------|---------|------------|-----------------|----------------|
| | 0 | 略萎缩,无裂纹 | 35 ± 2 | 127.9 ± 2.0 | 98.6 ± 1.0 |
| [0212] | 1 | 略萎缩,无裂纹 | 37 ± 4 | 127.9 ± 1.8 | 98.4 ± 3.1 |
| | 2 | 略萎缩,无裂纹 | 35 ± 2 | 128.5 ± 3.2 | 98.0 ± 2.5 |
| | 3 | 略萎缩,无裂纹 | 38 ± 2 | 128.2 ± 2.4 | 98.2 ± 2.0 |
| | 6 | 略萎缩,无裂纹 | 38 ± 3 | 128.5 ± 3.0 | 97.9 ± 2.3 |

[0213] 结果:冻干脂质体在 $4 \pm 2^\circ\text{C}$ 条件下放置6个月期间,外观未发生明显变化。重构后,其重构时间、粒径和药物包封率也未明显发生变化,说明脂质体冻干后放置稳定性良好。

[0214] 检测例5

[0215] 以肿瘤体积、生存时间、体质量变化、抑瘤指数和HE病理切片等参数为指标综合评价SA-ODA与不同比例GM1共同修饰EPI脂质体的疗效和毒性。

[0216] 实验细胞及动物:小鼠S180腹水瘤细胞(中国科学院上海细胞库);昆明小鼠(18~22g,♂,沈阳药科大学实验动物中心)。

[0217] 给药方案:将36只接种S180瘤株的小鼠随机分为6组,即对照组(5%Glu)、EPI溶液(S-EPI)、CL-EPI、5-SAL-EPI、0.3-5-SAGL-EPI和5-5-SAGL-EPI,每组6只。各组小鼠均于肿瘤体积到达100mm³后(接种后第4天)开始尾静脉注射给药,每3天1次,共给药5次(接种后第4、7、10、13和16天),各组的单次给药剂量均为5mg EPI • kg⁻¹,对照组5%Glu的给予量为10mL • kg⁻¹。在整个药效学实验期间,记录肿瘤体积、体质量、死亡事件等数据。30天实验期内,小鼠肿瘤生长曲线见图7,小鼠体质量变化见图8,净体质量变化见图9,抑瘤指数见图10,生存时间见下表,各主要器官的病理变化见图11。

| | 组别 | 存活率 |
|--------|----------------|-------|
| | 5%Glu | 50% |
| | S-EPI | 50% |
| [0218] | CL-EPI | 66.7% |
| | 5-SAL-EPI | 83.3% |
| | 0.3-5-SAGL-EPI | 83.3% |
| | 5-5-SAGL-EPI | 100% |

[0219] 结果:从抑制肿瘤生长速度来看,5-5-SAGL-EPI组与0.3-5-SAGL-EPI组无显著性差异,但从抑瘤指数及小鼠生存状态上看,5-5-SAGL-EPI抗S180肿瘤效果最优。

[0220] 目前进行的冻干实验:

| | 制剂 | 处方组成 (n/n) |
|--------|-----------|----------------------------------|
| | 0.3GL-EPI | HSPC/DSPG/CH/GM1(69.7:20:10:0.3) |
| | 0.5GL-EPI | HSPC/DSPG/CH/GM1(69.5:20:10:0.5) |
| [0221] | 1GL-EPI | HSPC/DSPG/CH/GM1(69:20:10:1) |
| | 3GL-EPI | HSPC/DSPG/CH/GM1(67:20:10:3) |
| | 7GL-EPI | HSPC/DSPG/CH/GM1(63:20:10:7) |

[0222] 实施例23

[0223] 制备Myocet[®]冻干产品

[0224] Myocet[®]的处方组成很简单:EPC与CHOL的摩尔比为55:45,药脂比在0.27左右,仍旧是采用梯度法进行主动载药。空白脂质体的制备中使用柠檬酸缓冲液故内水相pH为4.0,外水相pH使用碳酸钠调节至7.3左右后将其与阿霉素进行孵育,最终药物包封率可达99%以上。该脂质体粒径较大,在150~250nm间。

| | 制剂 | 处方组成 (n/n) | 冻干之前的包封率(%) | 冻干之后的包封率(%) |
|--------|---------------------|-------------------------|-------------|-------------|
| | Myocet [®] | EPC/ CH (55:45) | 98.6 | 53.2 |
| [0225] | 1.0GL-DOX | EPC/ CH /GM1(55:44: 1) | 99.1 | 71.5 |
| | 3.0GL-DOX | EPC/ CH /GM1(55:42: 3) | 99.3 | 91.2 |
| | 5.0GL-DOX | EPC/ CH /GM1(55:40: 5) | 98.2 | 96.8 |
| | 10GL-DOX | EPC/ CH /GM1(55:35: 15) | 96.5 | 97.3 |

[0226] 实施例24

[0227] 制备米托蒽醌脂质体冻干产品

[0228] 按处方称取膜材加入制剂终体积10%的无水乙醇并于65℃水浴中搅拌溶解。待膜材完全溶解后,以5mL·min⁻¹的速度将膜材注入预热至相同温度的柠檬酸-柠檬酸钠溶液(200mmol/L,pH 4.0)中,65℃水浴搅拌20min,得到空白脂质体初品。65℃水浴条件下,空白脂质体初品经聚碳酸酯膜挤出(0.2μm膜挤出2次,0.1μm膜挤出10次,0.08μm膜挤出10次),即得空白脂质体混悬液(磷脂浓度为40mg·mL⁻¹)。以500mmol/L的磷酸钠溶液为pH调节剂,调节脂质体外水相pH为7.0,药脂比1:10(w/w),60℃孵育20min装载MIT,冰水浴2min终止载药。按照设定的冻干程序进行冷冻干燥,室温下重构。冻干前后包封率如下表所示。

| | 制剂 | 处方组成 (n/n) | 冻干之前的包封率(%) | 冻干之后的包封率(%) |
|--------|-----------|----------------------------------|-------------|-------------|
| | CL-MIT | HSPC/DSPG/CH(70:20:10) | 98.4 | 90.3 |
| | 0.3GL-MIT | HSPC/DSPG/CH/GM1(69.7:20:10:0.3) | 97.2 | 91.2 |
| [0229] | 0.5GL-MIT | HSPC/DSPG/CH/GM1(69.5:20:10:0.5) | 98.1 | 93.2 |
| | 1.0GL-MIT | HSPC/DSPG/CH/GM1(69:20:10:1) | 97.1 | 95.7 |
| | 3.0GL-MIT | HSPC/DSPG/CH/GM1(67:20:10:3) | 99.4 | 95.8 |
| | 5.0GL-MIT | HSPC/DSPG/CH/GM1(65:20:10:5) | 98.6 | 98.1 |
| | 10GL-MIT | HSPC/DSPG/CH/GM1(60:20:10:10) | 97.2 | 98.3 |

。

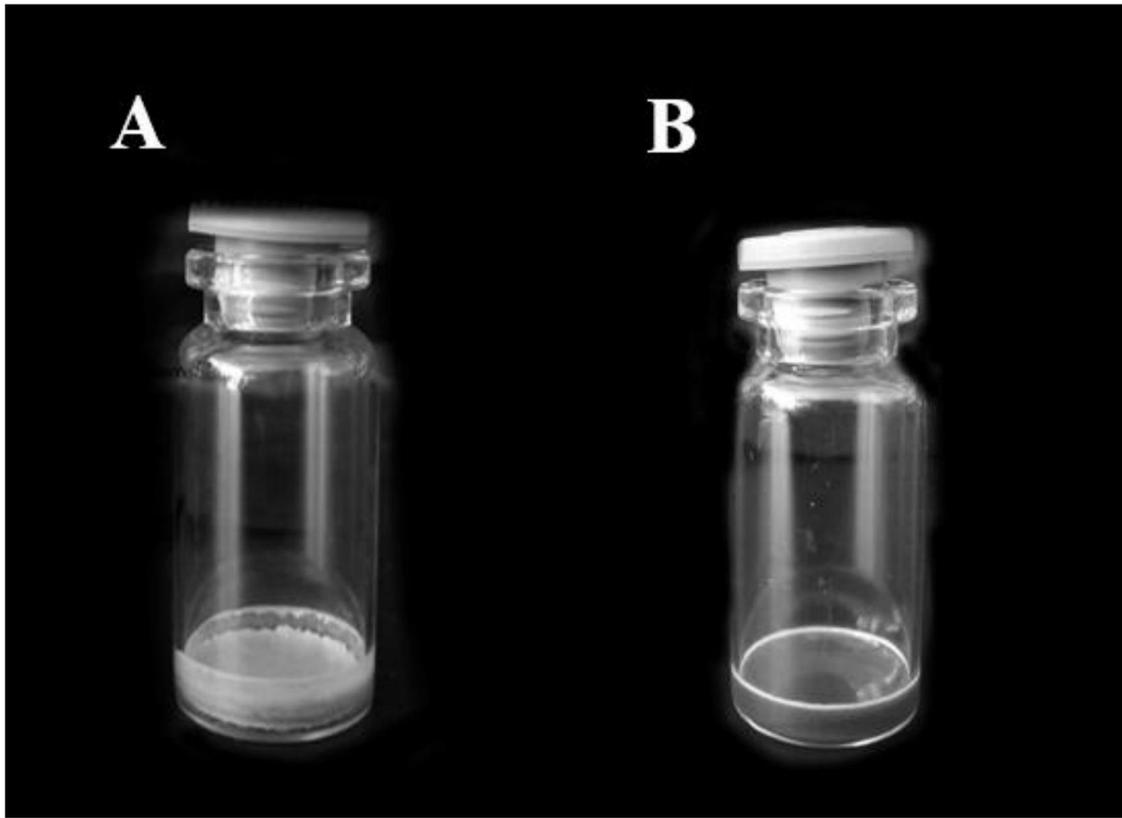


图1

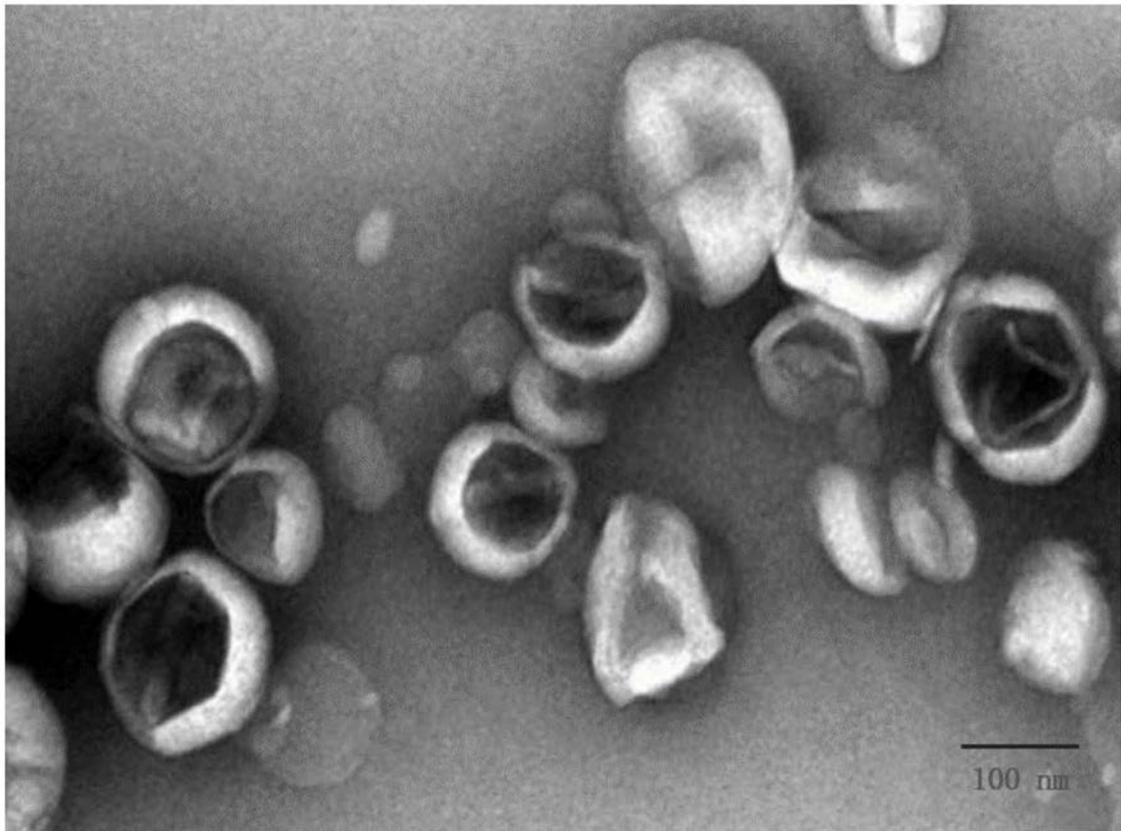


图2

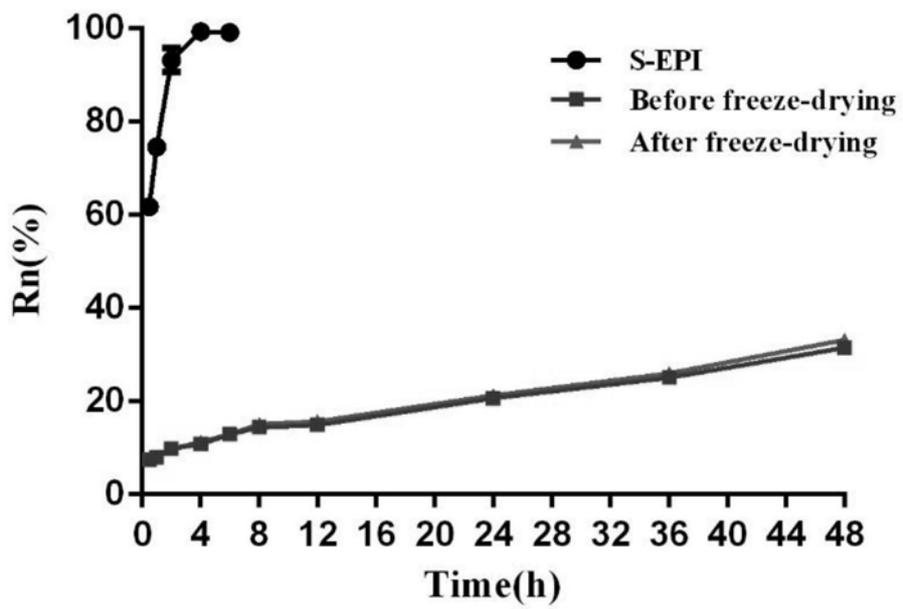


图3

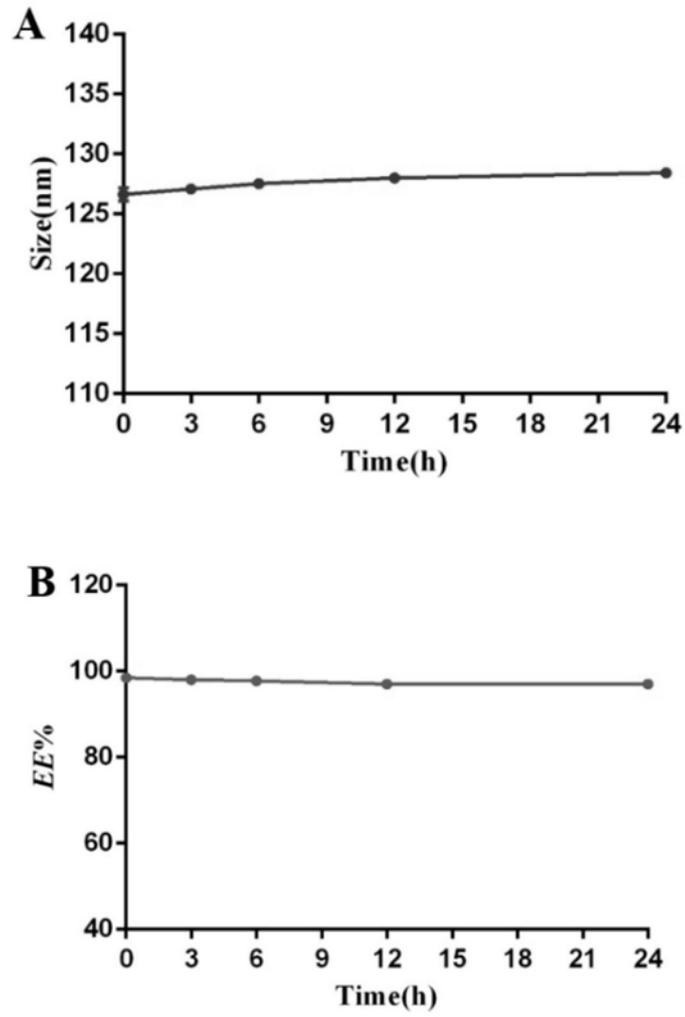


图4

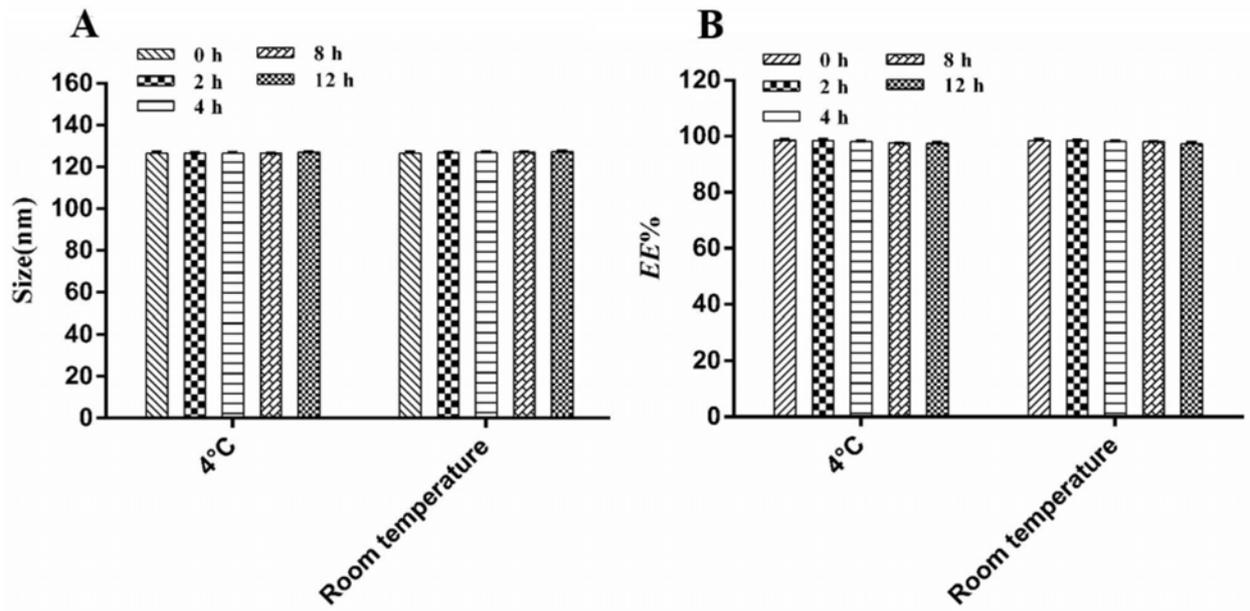


图5

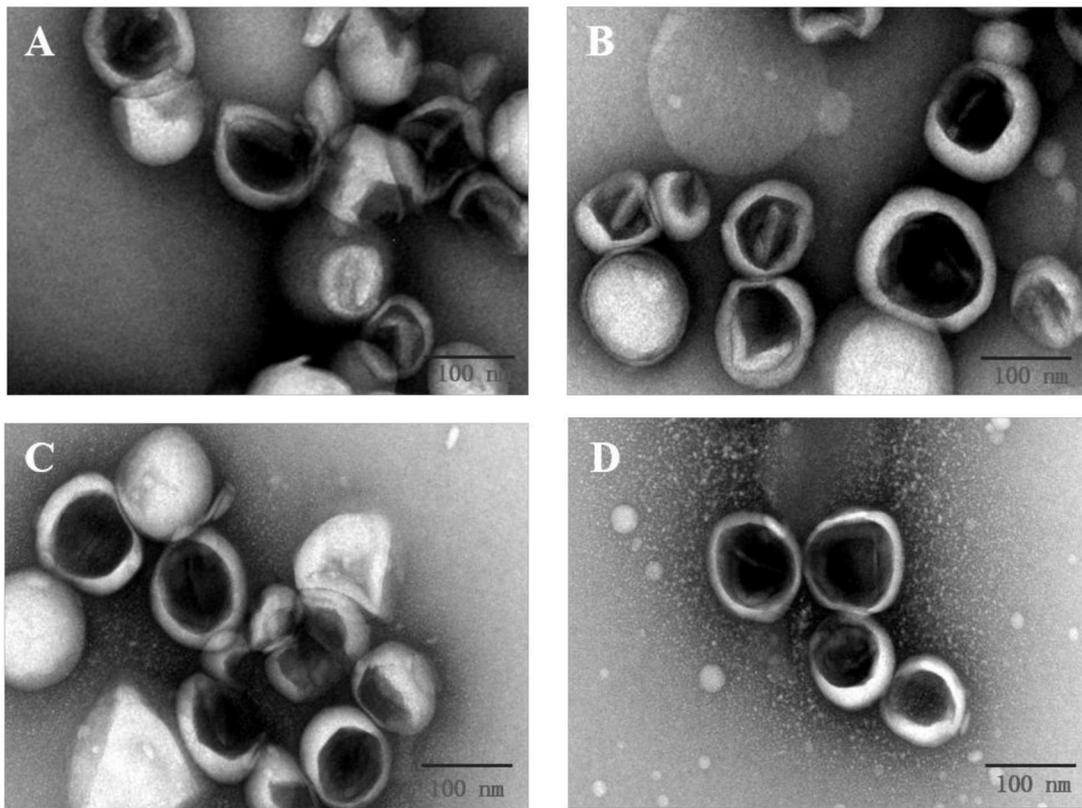


图6

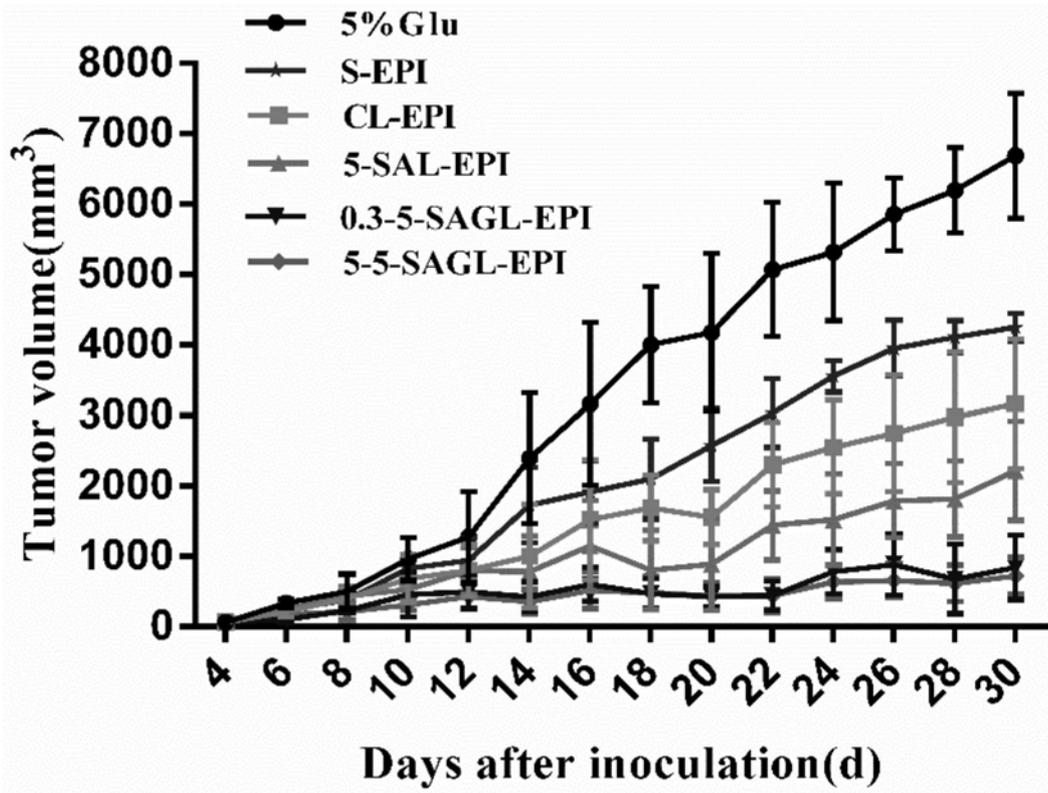


图7

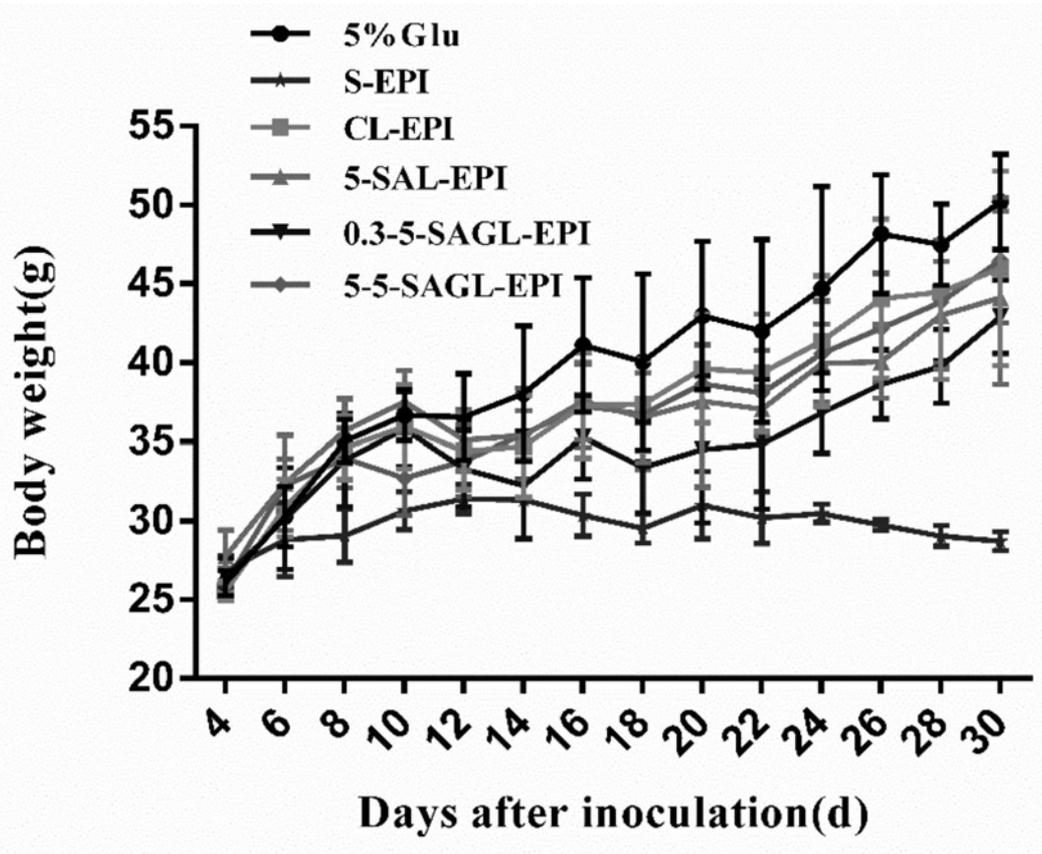


图8

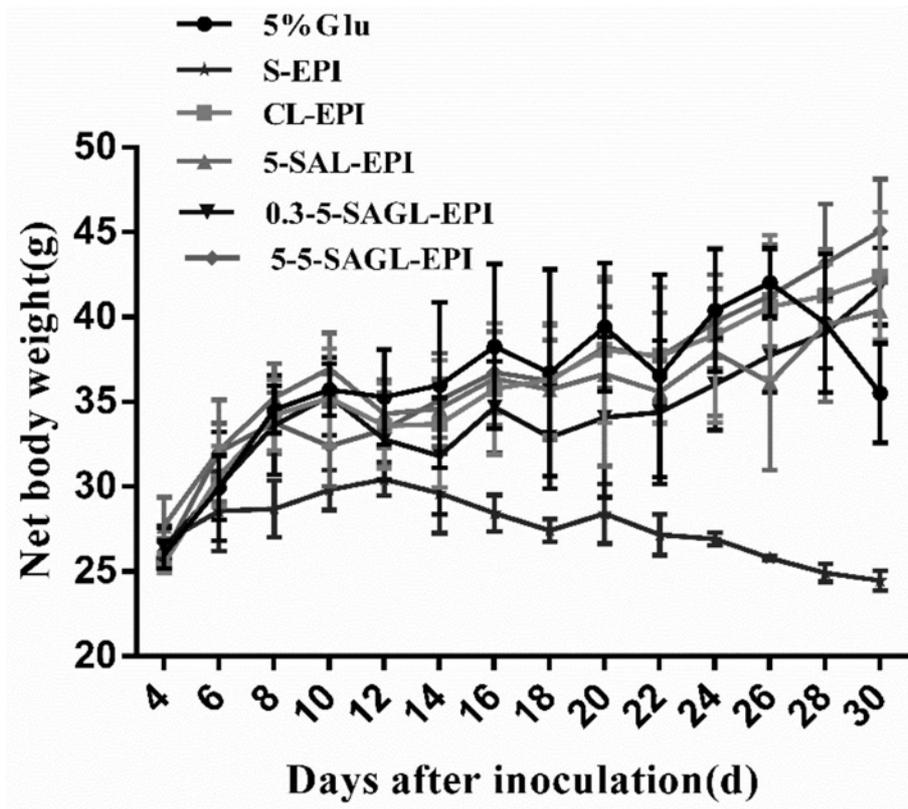


图9

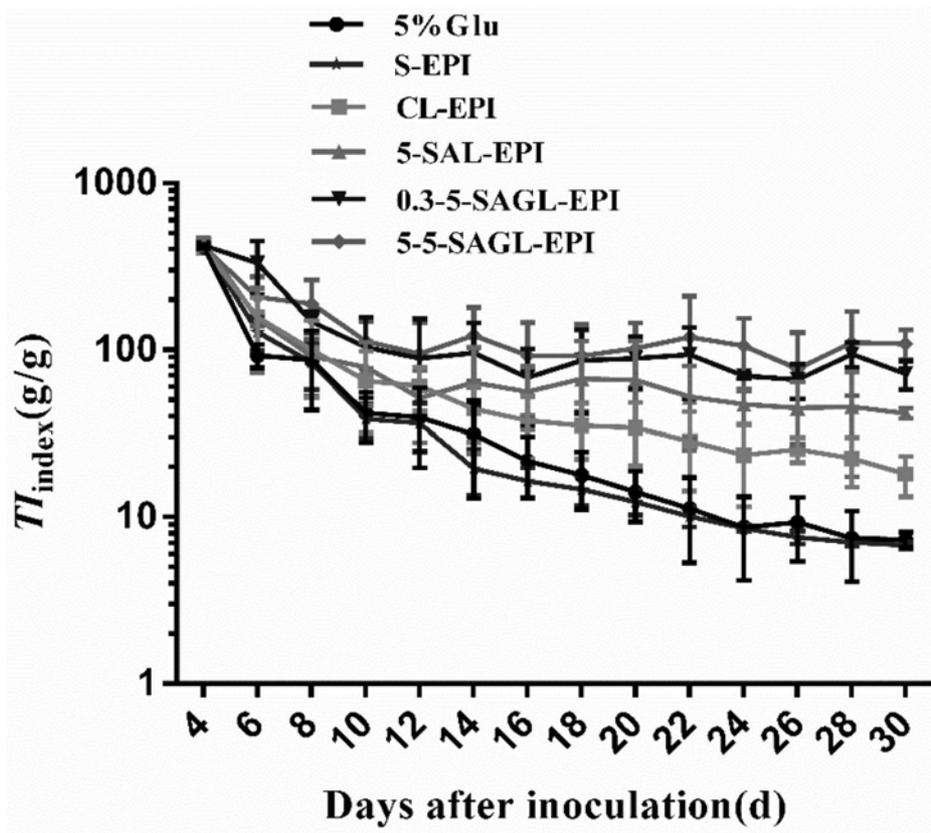


图10

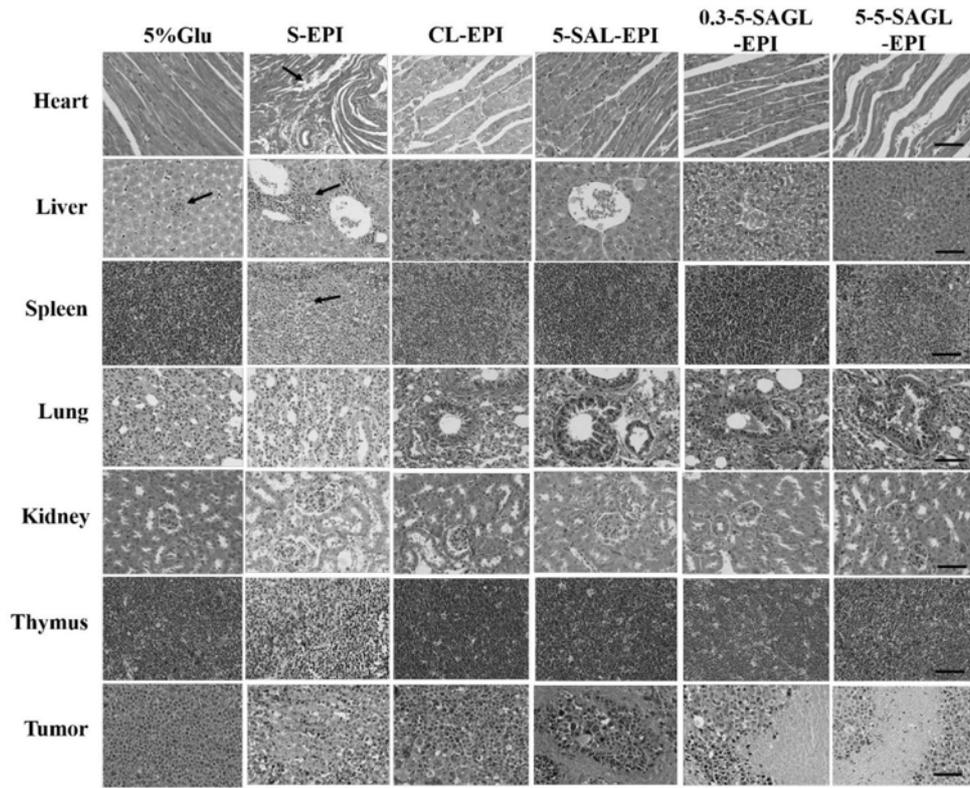


图11