



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107823649 B

(45) 授权公告日 2021.07.27

(21) 申请号 201711105675.2	CN 103405783 A, 2013.11.27
(22) 申请日 2017.11.10	CN 102188713 A, 2011.09.21
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 107823649 A	CN 106137967 A, 2016.11.23
(43) 申请公布日 2018.03.23	CN 103450087 A, 2013.12.18
(73) 专利权人 安徽中医药大学 地址 230012 安徽省合肥市合肥梅山路103号	CN 101416943 A, 2009.04.29
(72) 发明人 彭灿 蒋苗苗 余之宝 金玉 陈卫东 彭代银	CN 101439182 A, 2009.05.27
(74) 专利代理机构 广州致信伟盛知识产权代理有限公司 44253 代理人 彭玲	CN 105687136 A, 2016.06.22
(51) Int. Cl.	US 2005152963 A1, 2005.07.14
A61K 47/55 (2017.01)	KR 101732844 B1, 2017.05.08
A61K 47/69 (2017.01)	Xiao-Bing Xiong et al. Enhanced
A61K 47/68 (2017.01)	Intracellular Uptake of Sterically
A61K 31/12 (2006.01)	Stabilized Liposomal Doxorubicin in Vitro
A61K 31/4174 (2006.01)	Resulting in Improved Antitumor Activity
A61P 9/00 (2006.01)	in Vivo.《Pharmaceutical Research》.2005,第
A61P 9/10 (2006.01)	22卷(第6期),
(56) 对比文件	王海龙,等.丹皮酚脂质体的制备与质量评
CN 106943352 A, 2017.07.14	价.《中国药房》.2012,第23卷(第43期),
	蒋苗苗,等.丹皮酚-奥扎格雷偶联物长循环
	脂质体的制备及其体外释放.《中国新药杂志》
	.2019,第28卷(第2期),
	蒋苗苗.丹皮酚-奥扎格雷偶联物长循环脂
	质体的制备、表征及其药动学参数研究.《中国优
	秀硕士学位论文全文数据库 工程科技I辑》
	.2020,(第03期),
	审查员 许慧

权利要求书2页 说明书11页

(54) 发明名称
一种丹皮酚-奥扎格雷偶联物脑靶向脂质体及其制备方法

(57) 摘要
本发明公开了一种丹皮酚-奥扎格雷偶联物脑靶向脂质体及其制备方法,由丹皮酚-奥扎格雷偶联物、磷脂、胆固醇、聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺、聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺马来酰亚胺、OX26、有机溶剂和水制成。本发明制备得到的丹皮酚-奥扎格雷偶联物脑靶向脂质体,既可以避免药物体内肝脾网状内皮系统的吞噬,且具有缓释功能,有助于延长药物在体内的

循环时间,又可以透过血脑屏障,将丹皮酚-奥扎格雷偶联物靶向入脑,能更好的预防或治疗血小板聚集引起的心脑血管疾病的作用,特别是血栓性心、脑的缺血或梗死等疾病。

CN 107823649 B

1. 一种丹皮酚-奥扎格雷偶联物脑靶向脂质体,其特征在于,由丹皮酚-奥扎格雷偶联物、磷脂、胆固醇、聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺、聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺马来酰亚胺、OX26、有机溶剂和水制成,其中丹皮酚-奥扎格雷偶联物与磷脂的质量比为1:20,胆固醇与磷脂的质量比为1:10,聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺与磷脂的质量比为1:12,聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺马来酰亚胺与磷脂的质量比为1:24,聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺马来酰亚胺与OX26的摩尔比为1:2,有机相与水相的体积比为1:10;

所述的丹皮酚-奥扎格雷偶联物脑靶向脂质体的制备方法,包括以下步骤:

a、将水于40°C-50°C水浴预热;

b、将丹皮酚-奥扎格雷偶联物、胆固醇、磷脂、聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺、聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺马来酰亚胺溶于有机溶剂中,水浴加热至完全溶解,构成油相;

c、用注射器将步骤b的油相缓慢匀速注入到预热的水中,继续搅拌,所述搅拌的时间为2-3h,转速为400-600 r/min,待有机溶剂挥发完全后,得到丹皮酚-奥扎格雷偶联物长循环脂质体的混悬液;

d、将OX26巯基化,加入到丹皮酚-奥扎格雷偶联物长循环脂质体的混悬液中,室温下进行偶联反应,反应后除去未结合的 OX26,收集脂质体混悬液,即得到丹皮酚-奥扎格雷偶联物脑靶向脂质体。

2. 根据权利要求1所述的丹皮酚-奥扎格雷偶联物脑靶向脂质体,其特征在于,所述聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺和聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺马来酰亚胺中聚乙二醇的分子量为1000-2000。

3. 根据权利要求2所述的丹皮酚-奥扎格雷偶联物脑靶向脂质体,其特征在于,所述聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺和聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺马来酰亚胺中聚乙二醇的分子量为2000。

4. 根据权利要求1所述的丹皮酚-奥扎格雷偶联物脑靶向脂质体,其特征在于,所述磷脂为大豆卵磷脂、卵黄磷脂、二硬脂酰磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰胆碱或二棕榈酰磷脂酰乙醇胺中的一种或几种的混合。

5. 根据权利要求4所述的丹皮酚-奥扎格雷偶联物脑靶向脂质体,其特征在于,所述磷脂为大豆卵磷脂或卵黄磷脂。

6. 根据权利要求1或2所述的丹皮酚-奥扎格雷偶联物脑靶向脂质体,其特征在于,所述有机溶剂为二氯甲烷、甲醇、无水乙醇、四氢呋喃或异丙醇中的一种或几种的混合。

7. 根据权利要求6所述的丹皮酚-奥扎格雷偶联物脑靶向脂质体,其特征在于,所述有机溶剂为无水乙醇。

8. 权利要求1-7任一项所述的丹皮酚-奥扎格雷偶联物脑靶向脂质体的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

a、将水于40°C-50°C水浴预热;

b、将丹皮酚-奥扎格雷偶联物、胆固醇、磷脂、聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺、聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺马来酰亚胺溶于有机溶剂中,水浴加热至完全溶解,构成油相;

c、用注射器将步骤b的油相缓慢匀速注入到预热的水中,继续搅拌,待有机溶剂挥发完

全后,得到丹皮酚-奥扎格雷偶联物长循环脂质体的混悬液;

d、将OX26巯基化,加入到丹皮酚-奥扎格雷偶联物长循环脂质体的混悬液中,室温下进行偶联反应,反应后除去未结合的 OX26,收集脂质体混悬液,即得到丹皮酚-奥扎格雷偶联物脑靶向脂质体。

9. 权利要求8所述的丹皮酚-奥扎格雷偶联物脑靶向脂质体的制备方法,其特征在于,步骤c中,所述搅拌的时间为2-3h,转速为400-600 r/min。

10. 权利要求8所述的丹皮酚-奥扎格雷偶联物脑靶向脂质体的制备方法,其特征在于,步骤c中,所述搅拌的时间为2h,转速为 400 r/min。

一种丹皮酚-奥扎格雷偶联物脑靶向脂质体及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及药物制剂领域,具体涉及一种丹皮酚-奥扎格雷偶联物脑靶向脂质体及其制备方法。

背景技术

[0002] 心脑血管疾病是全球人口死亡的主要原因,具有较高的发病率、致残率和死亡率,严重危害了患者的生命安全和身体健康,随着社会人口的老龄化,发病率与日俱增,有效预防和治疗心脑血管疾病是当代医学研究的重点。血栓栓塞是导致心脑血管疾病的重要因素之一,血栓栓塞性疾病是各种内在和外在因素导致血管内血栓形成和栓塞并导致组织和器官功能受损的病理过程。以冠状动脉血栓和脑血栓为核心的血栓栓塞性疾病在我国有很高的发病率和死亡率,因此,防止血栓也就成了心血管疾病领域当今最为热门的研究课题之一。抗血小板聚集在血栓形成过程中具有非常重要的作用,当动脉粥样斑块破裂后,血小板被激活,聚集的血小板活化并释放多种物质,同时为凝血因子的活化提供平台,凝血因子的活化使纤维蛋白原转变为纤维蛋白,网罗红细胞等形成血栓。如果能及时有效的控制血小板聚集,即可阻止或者延缓血栓栓塞的形成。

[0003] 奥扎格雷的作用部位是血小板与血管内皮细胞,可以通过抑制血小板聚集,扩张血管,有效抑制脑血栓的形成,被批准用于治疗心脑血管疾病。丹皮酚对脑缺血有保护作用,属于脂溶性的成分,容易透过血脑屏障,能够活血化淤,从而改善脑部血液循环,防止血栓的形成。实验前期将丹皮酚与奥扎格雷拼合,得到丹皮酚奥扎格雷偶联物(POC),可以通过抑制血小板聚集,达到抑制脑血栓形成和治疗脑梗塞的作用,具有很好的稳定性、半衰期较长,生物利用度高、疗效更好等特点。在临床上可以预防或治疗血小板聚集引起的心脑血管疾病的作用,特别是能治疗血栓性心、脑的缺血或梗死等疾病。

[0004] 专利CN201710269432.6公开了一种乙醇注入法制备丹皮酚-奥扎格雷偶联物脑靶向脂质体的方法。其是由丹皮酚-奥扎格雷偶联物、磷脂、胆固醇、缓冲溶液、有机溶剂等组成,是一种普通的脂质体,包封的药物快速渗漏,容易被体内肝脾网状内皮系统吞噬,药物在体内的循环时间短。另外,脑部结构复杂,大部分的活性药物难以透过血脑屏障在脑内达到有效治疗浓度。

发明内容

[0005] 为了克服现有技术的缺点与不足,本发明的首要目的在于提供一种丹皮酚-奥扎格雷偶联物脑靶向脂质体。

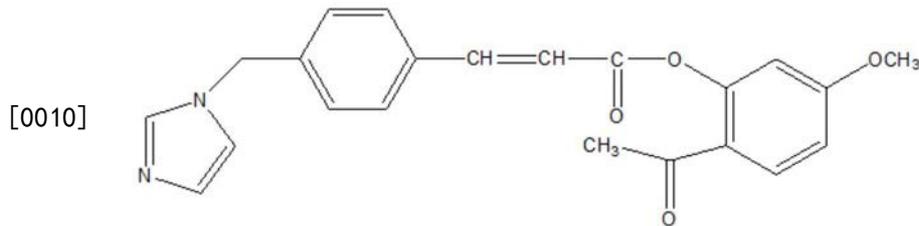
[0006] 本发明的另一目的在于提供上述丹皮酚-奥扎格雷偶联物脑靶向脂质体的制备方法。

[0007] 本发明是通过以下技术方案实现的:

[0008] 一种丹皮酚-奥扎格雷偶联物脑靶向脂质体,由丹皮酚-奥扎格雷偶联物、磷脂、胆固醇、聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺、聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺马来酰亚胺、

OX26、有机溶剂和水制成,其中,丹皮酚-奥扎格雷偶联物与磷脂的质量比为1:30~1:15,胆固醇与磷脂的质量比为1:10~1:5,聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺与磷脂的质量比为1:12~1:7.5,聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺马来酰亚胺与磷脂的质量比为1:30~1:20,聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺马来酰亚胺与OX26的摩尔比为1:1~1:3,有机溶剂与水的体积比为1:10~1:5。

[0009] 本发明所述的丹皮酚-奥扎格雷偶联物可参照CN201310422876.0制备得到,其化学名为(E)-3-(4-((1H-咪唑基-1-基)甲基)苯基)丙烯酰氯,分子式: $C_{22}H_{20}N_2O_4$,分子量:376.41,结构式如下:



[0011] 本发明先通过长循环辅料对药物表面进行表面修饰,制备得到长循环脂质体,有助于避免体内肝脾网状内皮系统的吞噬,且具有缓释功能,可以延长药物在体内的循环时间。

[0012] 本领域适用的长循环辅料有很多,常见的如PEG分子量为1000-10000的硬脂酸酯、PEG分子量为1000-10000维生素E琥珀酸酯,PEG硬脂酸酯与分子量为200-10000的PEG的混合物,Myr j类,Brij类,PEG-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺、PEG-二棕榈酰磷脂酰胆碱、PEG-二棕榈酰磷脂酰乙醇胺,神经节苷脂,聚丙烯酰胺,壳聚糖,聚乙二醇聚十六烷基胺基丙酸酯,分子量为200-10000的PEG、PVP或PVA及其任意组合。

[0013] 本发明对上述长循环辅料进行了筛选,结果如下:

[0014] 直接使用PEG或PEG-硬脂酸酯与脂质体之间的连接不牢固,不能有效的降低网状内皮系统(RES)对脂质体的摄取。而对于PEG-二棕榈酰磷脂酰甘油酯和PEG-胆固醇,可以延长脂质体长循环的能力,但其效果差于PEG-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺。DSPE-PEG(二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇)是两亲线型聚合物,PEG与DSPE通过氨基甲酸酯键相连,有两个饱和脂酰基链,亲脂端为DSPE,亲水端为PEG,与脂质体的连接牢固,保护脂质体不被破坏的能力最强。DSPE-PEG(聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺)在脂质体表面交错覆盖成致密的构象云,形成较厚的立体位阻层,这种立体位阻降低了血浆蛋白与细胞表面配体的相互作用,其立体位阻可同时屏蔽RES系统对脂质体的识别,明显延长在血液中驻留时间,有利于病变部位的有效吸收。PEG链的长度和分子质量与脂质体的稳定性关系密切,对于胶态脂质体,分子质量在1000~2000之间的PEG长循环效果较好,因此,本发明优选PEG分子量为1000-2000的PEG-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺作为长循环辅料。一般而言,PEG链越长,脂质体的循环时间越长,故本发明更优选DSPE-PEG₂₀₀₀。

[0015] 本发明在制备得到的长循环脂质体基础上,进一步通过脑靶向配体,将药物靶向入脑,所选用的脑靶向配体为转铁蛋白受体单克隆抗体OX26,其是一种高效的药物转运载体系统,具有较强的进入中枢神经系统的能力,偶联药物后可由转铁蛋白单克隆抗体受体介导内吞,跨血脑屏障进行转运,将丹皮酚-奥扎格雷偶联物靶向入脑,使其发挥治疗作用。

[0016] 为了使转铁蛋白受体单克隆抗体OX26能够连接至脂质体,本发明选用聚乙二醇-

二硬脂酰磷脂酰乙醇胺马来酰亚胺作为连接辅料,当转铁蛋白受体单克隆抗体OX26巯基化后,其巯基可以与聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺马来酰亚胺上的马来酰亚胺键共价结合,从而将转铁蛋白受体单克隆抗体OX26连接至脂质体。

[0017] 所述聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺马来酰亚胺中聚乙二醇的分子量为1000-2000,优选为2000,即DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal。

[0018] 所述磷脂为大豆卵磷脂、卵黄磷脂、二硬脂酰磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰胆碱或二棕榈酰磷脂酰乙醇胺中的一种或几种的混合,优选大豆卵磷脂或卵黄磷脂。

[0019] 所述有机溶剂为二氯甲烷、甲醇、无水乙醇、四氢呋喃或异丙醇中的一种或几种的混合,优选无水乙醇。

[0020] 本发明先通过长循环辅料对药物表面进行表面修饰,制备得到长循环脂质体,考虑到长循环脂质体的包封率和粒径,本发明对长循环脂质体的各成分之间的配比进行了优化,具体操作如下:

[0021] 一、药脂比例的考察

[0022] 按表1配方,将水于40℃水浴预热;称取丹皮酚-奥扎格雷偶联物、磷脂、胆固醇、脑靶向辅料于无水乙醇中,水浴加热至完全溶解,构成油相;用注射器将上述油相缓慢匀速注射到预热的水中,继续搅拌,得到丹皮酚-奥扎格雷偶联物长循环脂质体的混悬液。

[0023] 高效液相计算药物的包封率,使用粒径仪测定粒径,结果如表2。

[0024] 表1 丹皮酚-奥扎格雷偶联物脑靶向脂质体的药脂比例的考察

批号	1-1	1-2	1-3	1-4
大豆卵磷脂	60.00mg	60.00mg	60.00mg	60.00mg
胆固醇	6.00mg	6.00mg	6.00mg	6.00mg
DSPE-PEG ₂₀₀₀	5.00mg	5.00mg	5.00mg	5.00mg
DSPE-PEG ₂₀₀₀ -Mal	2.00mg	2.00mg	2.00mg	2.00mg
[0025] 丹皮酚-奥扎格雷偶联物	1.50mg	3.00mg	4.00mg	6.00mg
反应温度	40℃	40℃	40℃	40℃
搅拌时间	2h	2h	2h	2h
转速	400rpm	400rpm	400rpm	400rpm
水体积	20mL	20mL	20mL	20mL
有机溶剂体积	4mL	4mL	4mL	4mL

[0026] 表2 药脂比例的考察结果

转速	包封率	粒径
1-1	90.21%	81.75nm
[0027] 1-2	88.25%	73.38nm
1-3	86.93%	72.98nm
1-4	86.28%	75.12nm

[0028] 由表2可以看出,综合考虑包封率和粒径,丹皮酚-奥扎格雷偶联物与磷脂的质量

比控制在1:30~1:15为宜,优选为1:20。

[0029] 二、胆固醇与磷脂的质量比例的考察

[0030] 配方如表3,制备方法同上,高效液相计算药物的包封率,使用粒径仪测定粒径,结果如表4。

[0031] 表3 胆固醇与磷脂的质量比例的考察

批号	1-1	1-2	1-3	1-4
大豆卵磷脂	60.00mg	60.00mg	60.00mg	60.00mg
胆固醇	3.00mg	6.00mg	12.00mg	20.00mg
DSPE-PEG ₂₀₀₀	5.00mg	5.00mg	5.00mg	5.00mg
DSPE-PEG ₂₀₀₀ -Mal	2.00mg	2.00mg	2.00mg	2.00mg
丹皮酚-奥扎格雷偶联物	3.00mg	3.00mg	3.00mg	3.00mg
反应温度	40℃	40℃	40℃	40℃
搅拌时间	2h	2h	2h	2h
转速	400rpm	400rpm	400rpm	400rpm
水相体积	20mL	20mL	20mL	20mL
有机相体积	4mL	4mL	4mL	4mL

[0034] 表4 胆固醇与磷脂质量比例的考察结果

转速	包封率	粒径
1-1	84.42%	82.32nm
1-2	88.43%	78.31nm
1-3	85.78%	78.56nm
1-4	85.23%	79.17nm

[0036] 由表4可以看出,胆固醇与磷脂的质量比控制在1:10~1:5为宜,优选为1:10。

[0037] 三、DSPE-PEG₂₀₀₀与磷脂的质量比例的考察

[0038] 配方如表5,制备方法同上,高效液相计算药物的包封率,使用粒径仪测定粒径,结果如表6。

[0039] 表5 DSPE-PEG₂₀₀₀与磷脂的质量比例的考察

批号	1-1	1-2	1-3	1-4
大豆卵磷脂	60.00mg	60.00mg	60.00mg	60.00mg
胆固醇	6.00mg	6.00mg	6.00mg	6.00mg
DSPE-PEG ₂₀₀₀	4.00mg	5.00mg	8.00mg	12.00mg
DSPE-PEG ₂₀₀₀ -Mal	2.00mg	2.00mg	2.00mg	2.00mg
[0040] 丹皮酚-奥扎格雷偶联物	3.00mg	3.00mg	3.00mg	3.00mg
反应温度	40℃	40℃	40℃	40℃
搅拌时间	2h	2h	2h	2h
转速	400rpm	400rpm	400rpm	400rpm
水相体积	20mL	20mL	20mL	20mL
有机相体积	4mL	4mL	4mL	4mL

[0041] 表6 DSPE-PEG₂₀₀₀与磷脂的质量比例的考察结果

转速	包封率	粒径
1-1	84.55%	84.26nm
[0042] 1-2	86.43%	79.87nm
1-3	84.56%	80.22nm
1-4	84.34%	80.89nm

[0043] 由表6可以看出,DSPE-PEG₂₀₀₀与磷脂的质量比控制在1:12~1:7.5为宜,优选为1:12。

[0044] 四、DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal与磷脂的质量比例的考察

[0045] 配方如表7,制备方法同上,高效液相计算药物的包封率,使用粒径仪测定粒径,结果如表8。

[0046] 表7 DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal与磷脂的质量比例的考察

批号	1-1	1-2	1-3	1-4
大豆卵磷脂	60.00mg	60.00mg	60.00mg	60.00mg
胆固醇	6.00mg	6.00mg	6.00mg	6.00mg
DSPE-PEG ₂₀₀₀	4.00mg	5.00mg	8.00mg	12.00mg
DSPE-PEG ₂₀₀₀ -Mal	1.50mg	2.00mg	2.50mg	3.00mg
[0047] 丹皮酚-奥扎格雷偶联物	3.00mg	3.00mg	3.00mg	3.00mg
反应温度	40℃	40℃	40℃	40℃
搅拌时间	2h	2h	2h	2h
转速	400rpm	400rpm	400rpm	400rpm
水相体积	20mL	20mL	20mL	20mL
有机相体积	4mL	4mL	4mL	4mL

[0048] 表8 DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal与磷脂的质量比例的考察结果

转速	包封率	粒径
1-1	83.32%	80.57nm
1-2	85.21%	79.43nm
1-3	88.96%	77.09nm
1-4	87.76%	78.35nm

[0050] 由表8可以看出,DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal与磷脂的质量比控制在1:30~1:20为宜,优选为1:24。

[0051] 五、水与有机溶剂的体积比的考察

[0052] 配方如表9,制备方法同上,高效液相计算药物的包封率,使用粒径仪测定粒径,结果如表10。

[0053] 表9 水与有机溶剂的体积比的考察

批号	1-1	1-2	1-3	1-4
大豆卵磷脂	60.00mg	60.00mg	60.00mg	60.00mg
胆固醇	6.00mg	6.00mg	6.00mg	6.00mg
DSPE-PEG ₂₀₀₀	5.00mg	5.00mg	5.00mg	5.00mg
DSPE-PEG ₂₀₀₀ -Mal	2.00mg	2.00mg	2.00mg	2.00mg
丹皮酚-奥扎格雷偶联物	3.00mg	3.00mg	3.00mg	3.00mg
反应温度	40℃	40℃	40℃	40℃
搅拌时间	2h	2h	2h	2h
转速	400rpm	400rpm	400rpm	400rpm
水相体积	20mL	40mL	60mL	80mL
有机相体积	4mL	4mL	4mL	4mL

[0054] 表10 水与有机溶剂的体积比的考察结果

转速	包封率	粒径
1-1	83.78%	79.69nm
1-2	85.49%	80.32nm
1-3	89.01%	83.21nm
1-4	91.60%	83.78nm

[0055] 由表10可以看出,有机溶剂与水的体积比为1:10~1:5为宜,优选为1:10。

[0056] 综上考察,优选的,丹皮酚-奥扎格雷偶联物与磷脂的质量比为1:30,胆固醇与磷脂的质量比为1:10,DSPE-PEG₂₀₀₀与磷脂的质量比为1:12,DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal与磷脂的质量比为1:24,有机溶剂与水的体积比为1:10。

[0057] 本发明还提供了上述丹皮酚-奥扎格雷偶联物脑靶向脂质体的制备方法,包括以下步骤:

[0060] a、将水于40℃-50℃水浴预热；

[0061] b、将丹皮酚-奥扎格雷偶联物、胆固醇、磷脂和脑靶向辅料溶于有机溶剂中，水浴加热至完全溶解，构成油相；

[0062] c、用注射器将步骤b的油相缓慢匀速注入到预热的水中，继续搅拌，待有机溶剂挥发完全后，得到丹皮酚-奥扎格雷偶联物长循环脂质体的混悬液；

[0063] d、将OX26巯基化，加入到丹皮酚-奥扎格雷偶联物脂质体混悬液中，室温下进行偶联反应，反应后除去未结合的OX26，收集脂质体混悬液，即得到丹皮酚-奥扎格雷偶联物脑靶向脂质体。

[0064] 另外，本发明对a-c步骤制备长循环脂质体的工艺条件进行了优化，具体操作如下：

[0065] 六、温度的选择

[0066] 如表11所示，温度分别选择30℃、40℃和50℃，高效液相计算药物的包封率，使用粒径仪测定粒径，结果如表12。

[0067] 表11 丹皮酚-奥扎格雷偶联物长循环脂质体制备温度的选择

批号	1-1	1-2	1-3
大豆卵磷脂	60.00mg	60.00mg	60.00mg
胆固醇	6.00mg	6.00mg	6.00mg
DSPE-PEG ₂₀₀₀	5.00mg	5.00mg	5.00mg
DSPE-PEG ₂₀₀₀ -Mal	2.00mg	2.00mg	2.00mg
[0068] 丹皮酚-奥扎格雷偶联物	3.00mg	3.00mg	3.00mg
反应温度	30℃	40℃	50℃
搅拌时间	2h	2h	2h
转速	400rpm	400rpm	400rpm
水相体积	20mL	20mL	20mL
有机相体积	4mL	4mL	4mL

[0069] 表12 丹皮酚-奥扎格雷偶联物长循环脂质体制备温度的考察结果

温度	包封率	粒径
[0070] 1-1	86.36%	78.39nm
1-2	89.32%	77.02nm
1-3	87.92%	77.39nm

[0071] 由表10可以看出，温度选择40℃-50℃为宜，优选40℃。

[0072] 七、转速的考察

[0073] 如表13所示，转速分别选择200rpm、400rpm、600rpm和800rpm，高效液相计算药物的包封率，使用粒径仪测定粒径，结果如表14。

[0074] 表13 丹皮酚-奥扎格雷偶联物长循环脂质体制备转速的考察

批号	1-1	1-2	1-3	1-4
大豆卵磷脂	60.00mg	60.00mg	60.00mg	60.00mg
胆固醇	6.00mg	6.00mg	6.00mg	6.00mg
DSPE-PEG ₂₀₀₀	5.00mg	5.00mg	5.00mg	5.00mg
DSPE-PEG ₂₀₀₀ -Mal	2.00mg	2.00mg	2.00mg	2.00mg
[0075] 丹皮酚-奥扎格雷偶联物	3.00mg	3.00mg	3.00mg	3.00mg
反应温度	40℃	40℃	40℃	40℃
搅拌时间	2h	2h	2h	2h
转速	200rpm	400rpm	600rpm	800rpm
水相体积	20mL	20mL	20mL	20mL
有机相体积	4mL	4mL	4mL	4mL

[0076] 表14 丹皮酚-奥扎格雷偶联物长循环脂质体制备转速的考察结果

转速	包封率	粒径
1-1	88.20%	89.63nm
[0077] 1-2	90.36%	76.21 nm
1-3	88.82%	76.98nm
1-4	88.14%	98.53nm

[0078] 由表14可以看出,转速选择400-600rpm为宜,优选400rpm。

[0079] 八、搅拌时间的考察

[0080] 如表15所示,搅拌时间分别选择1h、2h和3h,高效液相计算药物的包封率,使用粒径仪测定粒径,结果如表16。

[0081] 表15 丹皮酚-奥扎格雷偶联物长循环脂质体制备搅拌时间的考察

批号	1-1	1-2	1-3
大豆卵磷脂	60.00mg	60.00mg	60.00mg
胆固醇	6.00mg	6.00mg	6.00mg
DSPE-PEG ₂₀₀₀	5.00mg	5.00mg	5.00mg
[0082] 丹皮酚-奥扎格雷偶联物	3.00mg	3.00mg	3.00mg
反应温度	40℃	40℃	40℃
搅拌时间	1h	2h	3h
转速	400rpm	400rpm	400rpm
水相体积	20mL	20mL	20mL
有机相体积	4mL	4mL	4mL

[0083] 表16 丹皮酚-奥扎格雷偶联物长循环脂质体制备搅拌时间的考察结果

	温度	包封率	粒径
[0084]	1-1	89.73%	84.29nm
	1-2	90.39%	79.20nm
	1-3	88.92%	77.94nm

[0085] 由表16可以看出,搅拌时间选择2-3h为宜,优选2h。

[0086] 综上考察结果,优选的,步骤c中,所述搅拌的时间为2-3h,优选为2h;转速为400-600r/min,优选为400r/min。

[0087] 本发明与现有技术相比,具有如下有益效果:

[0088] (1) 与现有的丹皮酚-奥扎格雷偶联物脂质体相比,本发明通过长循环辅料进行表面修饰先制备得到长循环脂质体,再以转铁蛋白受体单克隆抗体OX26作为脑靶向修饰的配体,将丹皮酚-奥扎格雷偶联物包裹于脂质体的类似生物膜结构的双分子小囊中,脂质体表面连接靶向配体OX26,制备得到的丹皮酚-奥扎格雷偶联物脑靶向脂质体,既可以避免药物体内肝脾网状内皮系统的吞噬,且具有缓释功能,有助于延长药物在体内的循环时间,又可以透过血脑屏障,将丹皮酚-奥扎格雷偶联物靶向入脑,能更好的预防或治疗血小板聚集引起的心脑血管疾病的作用,特别是血栓性心、脑的缺血或梗死等疾病;

[0089] (2) 本发明通过对组分的配比及工艺条件的优化,制备得到的丹皮酚-奥扎格雷偶联物脑靶向脂质体具有包封率高、粒径分布均匀、性能稳定,制剂可稳定贮存等优点。

具体实施方式

[0090] 下面通过具体实施方式来进一步说明本发明,以下实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受下述实施例的限制。

[0091] 丹皮酚-奥扎格雷偶联物(POC):安徽中医药大学参照CN201310422876.0制备得到。

[0092] 本发明中使用的其他原料全部为市售原料。

[0093] 实施例一

[0094] 量取20mL水于具塞锥形瓶中,放入磁子,于40℃水浴预热;精密称取丹皮酚-奥扎格雷偶联物3mg、大豆卵磷脂60mg、胆固醇6mg,DSPE-PEG₂₀₀₀ 5mg,DSPE-PEG₂₀₀₀-Ma1 1.5mg加入3mL无水乙醇,水浴加热至完全溶解,构成油相;用1mL注射器将上述药物缓慢匀速注入到预热的水中,继续搅拌2h,转速400r/min,待有机溶剂挥发完全后,即得丹皮酚-奥扎格雷偶联物长循环脂质体混悬液。将100μL靶向配体OX26(3mM)按照Traut's试剂盒的实验步骤巯基化,加入到丹皮酚-奥扎格雷偶联物脂质体混悬液中,室温下进行偶联反应,反应后的溶液过Sephacrose CL-4B柱(20cm×1.5cm)除去未结合的OX26,收集脂质体混悬液,即得到丹皮酚-奥扎格雷偶联物脑靶向脂质体。

[0095] 测定丹皮酚-奥扎格雷偶联物脑靶向脂质体的粒径为80.53nm,PDI 0.198。

[0096] 实施例二

[0097] 量取20mL水于具塞锥形瓶中,放入磁子,于40℃水浴预热;精密称取丹皮酚-奥扎格雷偶联物4mg、大豆卵磷脂60mg、胆固醇6mg,DSPE-PEG₂₀₀₀ 5mg,DSPE-PEG₂₀₀₀-Ma1 2.5mg加入3mL无水乙醇,水浴加热至完全溶解,构成油相;用1mL注射器将上述药物缓慢匀速注入到

预热的水中,继续搅拌2h,转速400r/min,待有机溶剂挥发完全后,即得丹皮酚-奥扎格雷偶联物长循环脂质体混悬液;将100 μ L靶向配体OX26 (3mM) 按照Traut's试剂盒的实验步骤巯基化,加入到丹皮酚-奥扎格雷偶联物脂质体混悬液中,室温下进行偶联反应,反应后的溶液过Sepharose CL-4B柱(20cm \times 1.5cm)除去未结合的OX26,收集脂质体混悬液,即得到丹皮酚-奥扎格雷偶联物脑靶向脂质体。

[0098] 测定丹皮酚-奥扎格雷偶联物脑靶向脂质体的粒径为79.61nm,PDI 0.210。

[0099] 实施例三

[0100] 量取20mL水于具塞锥形瓶中,放入磁子,于40 $^{\circ}$ C水浴预热;精密称取丹皮酚-奥扎格雷偶联物2mg、大豆卵磷脂60mg、胆固醇6mg,DSPE-PEG₂₀₀₀ 5mg,DSPE-PEG₂₀₀₀-Ma1 1.5mg加入3mL无水乙醇,水浴加热至完全溶解,构成油相;用1mL注射器将上述药物缓慢匀速注入到预热的水中,继续搅拌2h,转速400r/min,待有机溶剂挥发完全后,即得丹皮酚-奥扎格雷偶联物长循环脂质体混悬液;将100 μ L靶向配体OX26 (3mM) 按照Traut's试剂盒的实验步骤巯基化,加入到丹皮酚-奥扎格雷偶联物脂质体混悬液中,室温下进行偶联反应,反应后的溶液过Sepharose CL-4B柱(20cm \times 1.5cm)除去未结合的OX26,收集脂质体混悬液,即得到丹皮酚-奥扎格雷偶联物脑靶向脂质体。

[0101] 测定丹皮酚-奥扎格雷偶联物脑靶向脂质体的粒径为80.89nm,PDI 0.207。

[0102] 实施例四

[0103] 量取20mL水于具塞锥形瓶中,放入磁子,于40 $^{\circ}$ C水浴预热;精密称取丹皮酚-奥扎格雷偶联物3mg、卵黄磷脂60mg、胆固醇10mg,DSPE-PEG₂₀₀₀ 5mg,1.5mg加入3mL无水乙醇,水浴加热至完全溶解,构成油相;用1mL用注射器将上述药物缓慢匀速注入到预热的水中,继续搅拌2h,转速400r/min,待有机溶剂挥发完全后,即得丹皮酚-奥扎格雷偶联物长循环脂质体混悬液;将100 μ L靶向配体OX26 (3mM) 按照Traut's试剂盒的实验步骤巯基化,加入到丹皮酚-奥扎格雷偶联物脂质体混悬液中,室温下进行偶联反应,反应后的溶液过Sepharose CL-4B柱(20cm \times 1.5cm)除去未结合的OX26,收集脂质体混悬液,即得到丹皮酚-奥扎格雷偶联物脑靶向脂质体。

[0104] 测定丹皮酚-奥扎格雷偶联物脑靶向脂质体的粒径为79.52nm,PDI 0.209。

[0105] 实施例五

[0106] 量取20mL水于具塞锥形瓶中,放入磁子,于45 $^{\circ}$ C水浴预热;精密称取丹皮酚-奥扎格雷偶联物3mg、大豆卵磷脂60mg、胆固醇12mg,DSPE-PEG2000 5mg,DSPE-PEG₂₀₀₀-Ma11.5mg加入3mL无水乙醇,水浴加热至完全溶解,构成油相;用1mL注射器将上述药物缓慢匀速注入到预热的水中,继续搅拌2h,转速400r/min,待有机溶剂挥发完全后,即得丹皮酚-奥扎格雷偶联物长循环脂质体混悬液;将100 μ L靶向配体OX26 (3mM) 按照Traut's试剂盒的实验步骤巯基化,加入到丹皮酚-奥扎格雷偶联物脂质体混悬液中,室温下进行偶联反应,反应后的溶液过Sepharose CL-4B柱(20cm \times 1.5cm)除去未结合的OX26,收集脂质体混悬液,即得到丹皮酚-奥扎格雷偶联物脑靶向脂质体。

[0107] 测定丹皮酚-奥扎格雷偶联物脑靶向脂质体的粒径为77.93nm,PDI 0.219。

[0108] 实施例六

[0109] 量取20mL水于具塞锥形瓶中,放入磁子,于50 $^{\circ}$ C水浴预热;精密称取丹皮酚-奥扎格雷偶联物3mg、卵黄磷脂60mg、胆固醇6mg,DSPE-PEG₂₀₀₀ 6mg,DSPE-PEG₂₀₀₀-Ma1 2.5mg加入

3mL无水乙醇,水浴加热至完全溶解,构成油相;用1mL注射器将上述药物缓慢匀速注入到预热的热水中,继续搅拌2h,转速400r/min,待有机溶剂挥发完全后,即得丹皮酚-奥扎格雷偶联物长循环脂质体混悬液;将300 μ L靶向配体OX26 (3mM)按照Traut's试剂盒的实验步骤巯基化,加入到丹皮酚-奥扎格雷偶联物脂质体混悬液中,室温下进行偶联反应,反应后的溶液过Sepharose CL-4B柱(20cm \times 1.5cm)除去未结合的OX26,收集脂质体混悬液,即得到丹皮酚-奥扎格雷偶联物脑靶向脂质体。

[0110] 测定丹皮酚-奥扎格雷偶联物脑靶向脂质体的粒径为82.24nm,PDI 0.193。

[0111] 实施例七

[0112] 量取20mL水于具塞锥形瓶中,放入磁子,于40 $^{\circ}$ C水浴预热;精密称取丹皮酚-奥扎格雷偶联物3mg、大豆卵磷脂60mg、胆固醇6mg,DSPE-PEG₂₀₀₀ 8mg,DSPE-PEG₂₀₀₀-Ma1 1.5mg加入3mL无水乙醇,水浴加热至完全溶解,构成油相;用1mL注射器将上述药物缓慢匀速注入到预热的热水中,继续搅拌2h,转速400r/min,待有机溶剂挥发完全后,即得丹皮酚-奥扎格雷偶联物长循环脂质体混悬液;将300 μ L靶向配体OX26 (3mM)按照Traut's试剂盒的实验步骤巯基化,加入到丹皮酚-奥扎格雷偶联物脂质体混悬液中,室温下进行偶联反应,反应后的溶液过Sepharose CL-4B柱(20cm \times 1.5cm)除去未结合的OX26,收集脂质体混悬液,即得到丹皮酚-奥扎格雷偶联物脑靶向脂质体。

[0113] 测定丹皮酚-奥扎格雷偶联物脑靶向脂质体的粒径为82.82nm,PDI 0.216。

[0114] 实施例八

[0115] 量取20mL水于具塞锥形瓶中,放入磁子,于40 $^{\circ}$ C水浴预热;精密称取丹皮酚-奥扎格雷偶联物3mg、大豆卵磷脂60mg、胆固醇6mg,DSPE-PEG₂₀₀₀ 5mg,DSPE-PEG₂₀₀₀-Ma1 2.0mg加入3mL无水乙醇,水浴加热至完全溶解,构成油相;用1mL注射器将上述药物缓慢匀速注入到预热的热水中,继续搅拌2h,转速400r/min,待有机溶剂挥发完全后,即得丹皮酚-奥扎格雷偶联物长循环脂质体混悬液;将200 μ L靶向配体OX26 (3mM)按照Traut's试剂盒的实验步骤巯基化,加入到丹皮酚-奥扎格雷偶联物脂质体混悬液中,室温下进行偶联反应,反应后的溶液过Sepharose CL-4B柱(20cm \times 1.5cm)除去未结合的OX26,收集脂质体混悬液,即得到丹皮酚-奥扎格雷偶联物脑靶向脂质体。

[0116] 测定丹皮酚-奥扎格雷偶联物脑靶向脂质体的粒径为79.93nm,PDI 0.198。

[0117] 实施例九

[0118] 量取20mL水于具塞锥形瓶中,放入磁子,于40 $^{\circ}$ C水浴预热;精密称取丹皮酚-奥扎格雷偶联物3mg、大豆卵磷脂60mg、胆固醇6mg,DSPE-PEG₂₀₀₀ 5mg,DSPE-PEG₂₀₀₀-Ma1 2.5mg加入2mL无水乙醇,水浴加热至完全溶解,构成油相;用1mL注射器将上述药物缓慢匀速注入到预热的热水中,继续搅拌2h,转速400r/min,待有机溶剂挥发完全后,即得丹皮酚-奥扎格雷偶联物长循环脂质体混悬液;将200 μ L靶向配体OX26 (3mM)按照Traut's试剂盒的实验步骤巯基化,加入到丹皮酚-奥扎格雷偶联物脂质体混悬液中,室温下进行偶联反应,反应后的溶液过Sepharose CL-4B柱(20cm \times 1.5cm)除去未结合的OX26,收集脂质体混悬液,即得到丹皮酚-奥扎格雷偶联物脑靶向脂质体。

[0119] 测定丹皮酚-奥扎格雷偶联物脑靶向脂质体的粒径为78.12nm,PDI 0.185。