



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102512404 B

(45) 授权公告日 2014. 05. 07

(21) 申请号 201110366800. 1

(22) 申请日 2011. 11. 18

(73) 专利权人 上海交通大学

地址 200240 上海市闵行区东川路 800 号

(72) 发明人 魏晓慧 孙加源 徐宇虹 韩宝惠

(74) 专利代理机构 上海光华专利事务所 31219

代理人 许亦琳 余明伟

(51) Int. Cl.

A61K 31/12(2006. 01)

A61K 47/44(2006. 01)

A61K 47/42(2006. 01)

A61K 47/34(2006. 01)

A61K 47/24(2006. 01)

A61P 11/00(2006. 01)

(56) 对比文件

于克炜, 等. 多西他赛 Pluronic F68 聚合物胶束的制备与体外评价. 《山东大学学报(医学版)》. 2011, 第 49 卷(第 11 期), 第 157 页左栏第 1. 2. 1 节, 第 158 页右栏第 2. 2 节.

岳秀, 等. 姜黄素通过 Wnt 信号转导通路抑制肺癌细胞 A549 增殖的研究. 《重庆医科大学学报》. 2008, 第 33 卷(第 12 期), 第 1457 页左栏第 2 段.

审查员 吴斌

权利要求书1页 说明书11页 附图2页

(54) 发明名称

一种姜黄素类化合物肺靶向制剂及其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明涉及姜黄素和 / 或其类似物肺靶向制剂及其制备方法与应用。该药物制剂包含表面活性物质、姜黄素和 / 或其类似物;姜黄素和 / 或其类似物装载于所述表面活性物质形成的胶束样自组装结构中, 具有载药量高, 安全性和稳定性良好的优点, 可用于静脉注射。经静脉注射后, 可以使姜黄素浓集于肺部组织, 从而增加肺部血药浓度, 提高药物疗效, 明显降低药物用量。

1. 一种姜黄素和 / 或其类似物肺靶向制剂, 包含表面活性物质、姜黄素和 / 或其类似物; 所述姜黄素和 / 或其类似物装载于所述表面活性物质形成的胶束样自组装结构中, 所述姜黄素的类似物选自去甲氧基姜黄素和双去甲氧基姜黄素中的一种或两种; 所述胶束样自组装结构的平均粒径为 150nm; 所述的姜黄素和 / 或其类似物肺靶向制剂为注射剂, 所述姜黄素和 / 或其类似物肺靶向制剂采用如下方法制备获得:

a) 将姜黄素和 / 或其类似物以及表面活性物质溶解于允许其溶解的溶剂中, 得到溶液, 所述允许其溶解的溶剂为叔丁醇; 所述表面活性物质为普朗尼克; 所述姜黄素和 / 或其类似物与表面活性物质的重量比为 1:20; 所加入的姜黄素在允许其溶解的溶剂中的浓度为 5mg/ml;

b) 将溶液干燥, 得到注射剂粉末;

c) 加入注射用溶剂, 将姜黄素和 / 或其类似物与表面活性物质自组装形成胶束样结构, 制成注射剂, 所述注射剂中姜黄素和 / 或其类似物的终浓度为 5mg/ml。

2. 一种制备如权利要求 1 所述的姜黄素和 / 或其类似物肺靶向制剂的方法, 包括步骤: 将姜黄素和 / 或其类似物与两亲性表面活性物质复合自组装形成胶束样自组装结构。

3. 如权利要求 2 所述的方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

a) 将姜黄素和 / 或其类似物以及表面活性物质溶解于允许其溶解的溶剂中, 得到溶液;

b) 将溶液干燥, 得到注射剂粉末;

c) 加入注射用溶剂, 使姜黄素和 / 或其类似物与表面活性物质自组装形成胶束样自组装结构, 制成注射剂。

4. 如权利要求 3 所述的方法, 其特征在于, 于步骤 a) 所述溶液中加入多羟基化合物, 所述多羟基化合物选自以下的一种或多种: 甘露醇、蔗糖、聚乙二醇、海藻糖。

5. 如权利要求 1 所述的姜黄素和 / 或其类似物肺靶向制剂的用途, 其特征在于, 用于制备肺靶向药物。

6. 如权利要求 5 所述的用途, 其特征在于, 所述肺靶向药物为用于防治急性肺损伤的药物。

一种姜黄素类化合物肺靶向制剂及其制备方法与应用

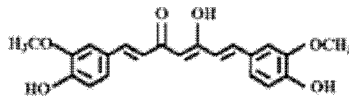
技术领域

[0001] 本发明涉及一种姜黄素及其类似物肺靶向制剂及其制备方法与应用,尤其涉及一种用于防治急性肺损伤的姜黄素及其类似物肺靶向制剂的制备方法与应用,属于药物制剂及其应用领域。

背景技术

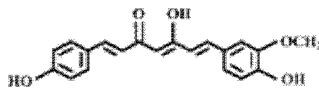
[0002] 姜黄素及其类似物是从姜科姜黄属植物如姜黄,郁金及莪术等的块根中分离出的有效成分,包括姜黄素 (curcumin), 去甲氧基姜黄素 (demethoxycurcumin) 和双去甲氧基姜黄素 (bisdemethoxycurcumin), 具有抗肿瘤、抗炎、抗 HIV、抗菌、抗氧化等多种药理作用,且毒性低,具有良好的临床应用潜力,受到国内外广泛的关注 (崔晶等,姜黄素的研究进展,中南药学,3(2):108-111,2005)。它们的结构式如下:

[0003]



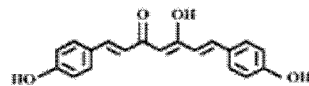
[0004] 姜黄素 (curcumin)

[0005]



[0006] 去甲氧基姜黄素 (demethoxycurcumin)

[0007]



[0008] 双去甲氧基姜 (bisdemethoxycurcumin)

[0009] 现有研究表明,姜黄素对大鼠单肺移植缺血再灌注损伤具有保护作用 (孙加源等,中华实验外科杂志 2007 年 8 月第 24 卷第 8 期)。但是,由于姜黄素不溶于水,只能通过口服或腹腔注入给药,生物利用度低,限制了其在临床治疗中的应用。

[0010] 目前,已有多种方法来增溶姜黄素,提高其生物利用度。如姜黄素脂质体或者冻干脂质体 (一种姜黄素脂质体及其冻干粉针的制备方法,中国专利申请 200610097245.6; 一种姜黄素冻干脂质体的制备方法,中国专利申请 200610026576.0),姜黄素乳剂 (姜黄素乳剂及其制备方法和用途,中国专利申请 200510091225.3) 或者自乳化微乳体系 (姜黄素纳米脂质注射液,其制备方法及其用途,中国专利申请 200910009097.1; 一种新型的姜黄素给药系统及其制备,中国专利申请 200910101327.7),姜黄素纳米晶体混悬液 (姜黄素纳米结晶制剂及其制备方法,中国专利申请 200810139941.8) 以及姜黄素-磷脂复合物 (姜黄素磷脂复合物及其制备方法,中国专利 200410036402.3) 或姜黄素-聚乙二醇-吐温复合物 (用于改善姜黄素溶出度和生物利用度的药物组合物及其制备方法,中国专利 200310118422.0)。这些制剂有效地提高了姜黄素的水溶性,改善了其在水溶液中的不稳定

性。但是,这些制剂用药后药物在血液及组织中分布均匀,没有靶向性,如果要提高靶区的药物浓度,就必须增加剂量,不仅造成药物的浪费,而且增大了药物的毒副作用和药物在体内的残留。已有研究报道姜黄素对急慢性肺部炎症疾病具有很好的防治作用 (Venkatesan N, et al. Protection from acute and chronic lung diseases by curcumin Adv Exp Med Biol. 2007 ;595 :379-405.)。因此,作为一种有潜力的治疗肺部疾病的药物,非常有必要制备一种可以使姜黄素药物浓集于肺组织,增加肺部血药浓度的姜黄素制剂,以拓展姜黄素在防治急性肺损伤等肺部疾病方面的临床应用。

发明内容

[0011] 本发明的目的在于克服上述现有技术的不足,提供一种可以使姜黄素药物浓集于肺组织,增加肺部血药浓度的姜黄素及其类似物肺靶向制剂与制备方法。

[0012] 为实现上述目的,本发明采用以下技术方案:

[0013] 一种姜黄素和 / 或其类似物肺靶向制剂,其中包含表面活性物质、姜黄素和 / 或其类似物;所述姜黄素和 / 或其类似物装载于所述表面活性物质形成的胶束样自组装结构中。

[0014] 所述姜黄素和 / 或其类似物是指姜黄素或姜黄素的类似物,或者为姜黄素和姜黄素的类似物的混合物。所述包含表面活性物质、姜黄素和 / 或其类似物是指:包含表面活性物质和姜黄素,或者包含表面活性物质和姜黄素的类似物,或者包含表面活性物质、姜黄素以及姜黄素的类似物。所述其类似物即姜黄素的类似物,选自去甲氧基姜黄素和双去甲氧基姜黄素中的一种或两种。

[0015] 本发明所用术语“胶束样自组装结构”或“胶束样粒子”是指,由表面活性物质,并任选地结合药物分子,在介质中的界面上自发定向排列形成的分散体系。表面活性物质的表面活性源于其分子的两亲结构,亲水基团使分子有进入水相的趋向,而憎水基团则竭力阻止其在水中溶解而从水的内部向外迁移,有逃逸水相的倾向,而这两种倾向平衡的结果是使表面活性剂在界面富集。当表面吸附达到饱和后,在憎水基团的作用下,表面活性物质分子在溶液内部自聚,即疏水基在一起形成内核,亲水基朝外与水接触,形成最简单的胶束样自组装结构。

[0016] 关于胶束形成和胶束表面活性物质的类型,在本领域中有众多的介绍。简单的说,当两亲性分子(包括表面活性物质)遇到选择性溶剂(即仅能溶解亲水段或疏水段中的一种,而不能溶解另一种)时,便可能形成胶束。通常可使用的选择性溶剂有很多种,包括例如水。在本发明中,术语“装载于胶束样自组装结构中”和“与表面活性物质自组装形成胶束样自组装结构”可互换使用,是指姜黄素和 / 或其类似物与表面活性物质相互作用形成胶束颗粒,其中药物分子被包裹在二者所形成的颗粒内,形成稳定的载药胶束样自组装结构。虽然不希望本发明局限于一种特定的理论,但本发明中的姜黄素胶束样自组装结构不是常规意义上的胶束,即并非姜黄素包封在表面活性物质形成的颗粒结构内部,而是姜黄素与表面活性物质分子相互作用,再共同自组装形成较大的颗粒。因此,与单纯表面活性物质形成的胶束颗粒较小的内径相比,本发明的姜黄素和 / 或其类似物与表面活性物质组合后自组装形成的胶束样自组装结构的平均粒径一般较大,一般在 50nm 以上,例如 50-500nm,优选 50-300nm,更优选 100-200nm。

[0017] 本发明所用术语“肺靶向”是指经局部给药或全身血液循环而选择性地浓集于肺部。

[0018] 所述表面活性物质可以是合适的、能稳定胶束样结构的表面活性物质，主要分为天然高分子和合成高分子两大类。前者主要是脂类和蛋白，包括例如卵磷脂、胆盐、白蛋白、脂蛋白等；后者主要有聚酯类，例如聚山梨醇酯、聚氧乙烯蓖麻油衍生物、聚氧乙烯硬脂酸酯、脱水山梨糖醇三油酸酯、胆酸盐等。

[0019] 可以根据其亲水亲油性来选择适用于本发明的胶束样自组装结构药物制剂中的表面活性物质。优选地，所述表面活性物质的亲水亲油平衡值 (hydrophile and lipophile balance, HLB) 在 6-40 之间，优选为 10-35，进一步优选为 15-30，尤其优选为 15-25。

[0020] 优选的，所述表面活性物质选自离子型表面活性物质、非离子型表面活性物质、蛋白质或它们的混合物。更优选的，所述表面活性物质选自以下一种或多种：白蛋白、酪蛋白、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白、山梨醇脂肪酸酯（吐温）、脱水山梨醇脂肪酸酯（司盘）、聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段聚合物（普朗尼克）、聚氧乙烯脂肪醇醚、聚氧乙烯氢化蓖麻油和磷脂。

[0021] 在本发明所提供的上述姜黄素和 / 或其类似物肺靶向制剂中，所述姜黄素和 / 或其类似物与表面活性物质可以是任何合适的用量和配比，条件是允许两者在水溶液中组装形成胶束样自组装结构的形式，或者是可以在溶于适当的水性溶剂后自组装形成胶束样自组装结构的形式。优选的，所述姜黄素和 / 或其类似物与表面活性物质的重量比为 1 : 1-1 : 100w/w，优选 1 : 5-1 : 80w/w，更优选 1 : 5-1 : 50w/w。

[0022] 优选的，所述的姜黄素和 / 或其类似物肺靶向制剂为注射剂。其中包含表面活性物质、姜黄素和 / 或其类似物，其中所述的姜黄素和 / 或其类似物以分子或微晶状态存在于所述胶束样自组装结构纳米粒子中。

[0023] 本发明所用术语“注射剂”是指用于注射给人体或其它哺乳动物的药剂或其使用前用于储存的形式，其在加入注射用溶剂后，药物以分子或微晶状态装载于表面活性物质形成的胶束样自组装结构中。所述注射剂形式可以是液体形式也可以是固体形式，包括但不限于：溶液、混悬液、乳剂、粉末、冻干粉针、溶媒结晶和浓有机溶液等形式。粉末或冻干粉针等固体形式的注射剂，其可以在临用前通过加入水或其它水性溶剂而制备成胶束样自组装粒子制剂的形式以供使用。

[0024] 本发明的姜黄素和 / 或其类似物肺靶向注射剂配成注射液使用时，其中：所述姜黄素的浓度为 0.01-50mg/ml，优选 0.1-5mg/ml，更优选 0.5-5mg/ml；所述表面活性物质浓度为 0.05-500mg/ml，优选 0.1-200mg/ml，更优选 5-150mg/ml。

[0025] 在本发明的姜黄素和 / 或其类似物肺靶向药物制剂中，除了姜黄素和 / 或其类似物以及表面活性物质之外，还可以可选地包含一种或多种其它的药物活性剂和 / 或一种或多种其它的药学可接受载体和 / 或赋型剂，包括例如一种或多种缓冲剂、稳定剂和 / 或张度剂。如果制剂为溶液形式，则可还存在溶剂。溶剂通常选自能对哺乳动物安全地胃肠外给药的溶剂类型，包括例如水、甘油、丙二醇、乙醇等及其各种可能的组合。一般地，安全溶剂是无毒的含水溶剂。优选的，本发明的姜黄素和 / 或其类似物肺靶向注射剂中不含有有机溶剂，或者仅含较低浓度的有机溶剂。

[0026] 本发明所用术语“稳定剂”是指能增强药物制剂中活性成分（如药物活性成分与

表面活性物质形成的胶束样粒子)的化学和物理稳定性的药学上可接受的赋型剂。合适的稳定剂包括例如多元醇(例如甘露糖醇、聚乙二醇、聚丙二醇以及糖类如蔗糖、果糖、乳糖等)、氨基酸等或者其各种组合。优选地,所述稳定剂在本发明的肺靶向药物制剂中的含量为0.5-50wt%,更优选为2-40wt%,例如5-35wt%、8-30wt%、10-25wt%、10-20wt%等。

[0027] 本发明所用术语“缓冲剂”是指任何能将溶液的pH值保持在所需pH范围内的药学上可接受的赋型剂,包括例如乙酸盐、柠檬酸盐、酒石酸盐、乳酸盐、磷酸盐、氨基酸等或者其任意组合。普通技术人员可以常规地确定本发明的肺靶向药物制剂中缓冲剂的合适含量,例如可以是制剂的约0.01-5.0wt%,优选约0.05-3.0wt%,更优选约0.1-2.0wt%。

[0028] 本发明还进一步提供了一种制备上述姜黄素和/或其类似物肺靶向制剂的方法,其中包括将姜黄素和/或其类似物与两亲性表面活性物质复合自组装形成胶束样自组装结构的步骤。

[0029] 优选的,所述制备姜黄素和/或其类似物肺靶向制剂的方法,包括以下步骤:

[0030] 1) 将姜黄素和/或其类似物以及表面活性物质溶解于允许其溶解的溶剂中,得到溶液;

[0031] 2) 加入注射用溶剂,将姜黄素和/或其类似物与表面活性物质自组装形成胶束样结构,制成注射剂。

[0032] 特别的,在上述方法中,其中姜黄素和/或其类似物与表面活性物质的重量比为1:1-1:100w/w,优选1:5-1:80w/w,更优选1:5-1:50w/w;其中所加入的姜黄素和/或其类似物在允许其溶解的溶剂中的浓度为0.5-500mg/ml,优选1-200mg/ml,更优选1-50mg/ml;所加入的表面活性物质在允许其溶解的溶剂中浓度为0.01-20g/ml,优选0.1-10g/ml,更优选0.5-2g/ml。

[0033] 特别的,在上述方法中,所述表面活性物质选自离子型表面活性物质、非离子型表面活性物质、蛋白质或它们的混合物。更优选的,所述表面活性物质选自以下一种或多种:白蛋白、酪蛋白、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白、山梨醇脂肪酸酯(吐温)、脱水山梨醇脂肪酸酯(司盘)、聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段聚合物(普朗尼克)、聚氧乙烯脂肪醇醚、聚氧乙烯氢化蓖麻油和磷脂。

[0034] 特别的,在上述方法中,所述允许其溶解的溶剂选自以下一种或多种:乙醇、丙二醇、叔丁醇、丙酮、二甲亚砜、水及其混合物;优选的,选自乙醇、丙二醇和其混合物。

[0035] 特别的,所述制备姜黄素和/或其类似物肺靶向制剂的方法,包括以下步骤:将所述表面活性物质溶解在允许注射的有机溶剂中,加入姜黄素和/或其类似物,超声溶解,得到药物-表面活性物质浓溶液,其中姜黄素和/或其类似物的浓度为5-50mg/ml,姜黄素和/或其类似物与表面活性物质的重量比为1:5-1:100w/w。临用前,用水、生理盐水或5%葡萄糖注射液等注射用溶剂稀释到所需浓度,得到姜黄素注射剂。其中,载药胶束样自组装结构的平均粒径为100-200nm,可以经0.22um滤膜无菌过滤。姜黄素的浓有机溶液中不含水,因此可以避免药物在储存过程中析出,具有更好的稳定性。临用前加入水或生理盐水稀释后,可将有机溶剂的浓度降低到注射许可的范围内,提高使用的安全性。

[0036] 特别的,所述有机溶剂包括例如乙醇、丙二醇、氯仿、丙酮、戊烷等,或者其任意混合物。

[0037] 优选的,所述制备姜黄素和/或其类似物肺靶向药物注射剂的方法,包括以下步

骤：

[0038] 1) 将姜黄素和 / 或其类似物以及表面活性物质溶解于允许其溶解的溶剂中, 得到溶液；

[0039] 2) 将溶液干燥, 得到注射剂粉末；

[0040] 3) 加入注射用溶剂, 使姜黄素和 / 或其类似物与表面活性物质自组装形成胶束样自组装结构, 制成注射剂。

[0041] 特别的, 在上述方法中, 姜黄素与表面活性物质的比例为 1 : 1-1 : 100w/w, 优选 1 : 1-1 : 80w/w, 更优选 1 : 5-1 : 50w/w ; 其中所加入的姜黄素在允许其溶解的溶剂中浓度为 0.5-500mg/ml, 优选 1-200mg/ml, 更优选 1-50mg/ml ; 所加入的表面活性物质在允许其溶解的溶剂中浓度为 0.01-20g/ml, 优选 0.1-10g/ml, 更优选 0.5-2g/ml。

[0042] 特别的, 在上述方法中, 所述表面活性物质选自离子型表面活性物质、非离子型表面活性物质、蛋白质或它们的混合物。更优选的, 所述表面活性物质选自以下一种或多种 : 白蛋白、酪蛋白、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白、山梨醇脂肪酸酯 (吐温)、脱水山梨醇脂肪酸酯 (司盘)、聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段聚合物 (普朗尼克)、聚氧乙烯脂肪醇醚、聚氧乙烯氢化蓖麻油和磷脂。

[0043] 特别的, 在上述方法中, 所述允许其溶解的溶剂选自以下一种或多种 : 乙醇、丙二醇、叔丁醇、丙酮、二甲亚砜、水和其混合物 ; 优选的, 选自叔丁醇、水和其混合物。

[0044] 特别的, 在上述方法中, 所述注射用溶剂选自以下一种或多种 : 水、生理盐水或 5% 葡萄糖注射液。

[0045] 在干燥溶液制备注射剂粉末的情况下, 优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥, 最优选冷冻干燥, 当然也可采用本领域普通技术人员熟知的任何其它合适方法。

[0046] 优选的, 在上述制备方法中, 另外在溶液中加入多羟基化合物, 所述多羟基化合物选自以下一种或多种 : 甘露醇、蔗糖、聚乙二醇和海藻糖。

[0047] 特别的, 所述制备姜黄素和 / 或其类似物肺靶向制剂的方法, 包括以下步骤 : 在无菌条件下, 将姜黄素和 / 或其类似物以及表面活性物质溶解在叔丁醇或者叔丁醇和水的混合溶剂中 (姜黄素和 / 或其类似物与表面活性物质的重量比为 1 : 5-1 : 100w/w), 得到澄清溶液 ; 将溶液冷冻干燥, 得到姜黄素冻干粉针。为了得到良好的冻干粉针形态, 也可在溶液中加入多羟基化合物, 如甘露醇, 蔗糖, 海藻糖。临用前, 加入水或生理盐水等注射用溶剂充分水合, 将姜黄素装载到胶束样结构中, 成为澄清黄色或浅棕色的姜黄素注射剂。其中, 载药胶束样自组装结构的平均粒径为 100-200nm。

[0048] 本发明所提供的上述方法的优点在于简便, 适合工业化大生产。在使用叔丁醇或叔丁醇-水体系作为溶剂时, 由于叔丁醇在冷冻过程中形成针状结晶, 产生很多孔道, 有利于溶剂的升华, 因此, 和单纯用水作溶剂相比, 可大大缩短冻干时间。同时, 得到的冻干粉针疏松, 水合过程中具有更大的表面积, 有利于得到均匀的载药胶束样自组装结构溶液。另外, 所制得的固体冻干粉针是固体制剂形式, 临用前才稀释, 稳定性好, 便于长期保存。也便于通过改变加入的水合溶剂的体积, 调整注射剂最终的药物含量, 灵活给药。

[0049] 本发明还进一步公开了上述姜黄素和 / 或其类似物肺靶向制剂的用途, 即用于制备肺靶向药物。

[0050] 优选的, 所述肺靶向药物为用于治疗或预防急性肺损伤的药物。进一步优选的, 所

述肺靶向药物为用于治疗或预防肺移植缺血再灌注损伤的药物。

[0051] 本发明所提供的上述姜黄素和 / 或其类似物肺靶向制剂的优点在于 : 通过是姜黄素和 / 或其类似物与表面活性物质自组装形成胶束样结构粒子, 使得药物的装载过程始终在具有纳米尺度的胶束样结构中进行, 因此, 只需要少量的表面活性物质就可大大增加胶束样结构中姜黄素的装载量。同时, 采用这一制备方法进行姜黄素装载时, 由于有机溶剂被迅速除去或者被大量稀释, 而分散在水中的胶束样结构对颗粒生长也具有限制作用, 使得溶解在有机溶剂中的姜黄素和 / 或其类似物尚来不及聚集形成大颗粒即以分子或微晶的状态有效地装载到胶束样结构中。微晶状态的药物不仅有利于大大提高载药量, 也进一步提高了注射剂的储存稳定性, 并具有一定的缓释作用。这主要是由于以微晶状态分散的药物在释放的过程中, 必须先溶解, 而后再逐步扩散。

[0052] 此外, 本发明所提供的上述姜黄素和 / 或其类似物肺靶向制剂避免了使用大量的油脂和脂质成分, 具有良好的稳定性和安全性。并且具有工艺简单, 易于放大的优点, 有利于提高不同批次样品间的一致性。本发明的药物制剂不含有机溶剂 (或其含量较低, 达到注射许可的范围)、载药量高, 可用于姜黄素的静脉注射。

[0053] 更重要的是, 本发明所提供的上述制剂经静脉注射后, 可以使姜黄素较为缓慢地从胶束中释放出来, 因而延长其在血浆中的半衰期, 并使姜黄素相对浓集于肺部组织, 从而增加肺部血药浓度, 提高药物对肺部疾病的疗效, 降低药物用量, 且全身其他组织部位药物浓度相对降低, 使其毒副作用减少。

附图说明

[0054] 图 1 姜黄素在小鼠体内的组织分布

[0055] 图 2 左肺静脉血氧合指数, 移植肺湿干比和肺毛细血管通透性。A 左肺静脉血氧合指数, B 移植肺湿干重比, C 移植肺伊文思蓝染料含量。结果以均数 \pm 标准差表示 ($n = 6$ / 组)。统计学差异如下所示 : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. 相应假手术组 ; † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$ vs. 相应载体组。

具体实施方式

[0056] 通过下述实施例对本发明作进一步的举例说明。这些实施例仅是示例性的, 它们不以任何方式限定本发明的范围。

[0057] 实施例 1 姜黄素注射剂

[0058] 姜黄素浓度为 50mg/ml, 选用普朗尼克 F68 和聚氧乙烯氢化蓖麻油做表面活性物质, 总浓度为 1000mg/ml, 药用无水乙醇作为溶剂, 制备为姜黄素浓溶液。具体制备方法为 : 将 4g 普朗尼克 F68 和 1g 聚氧乙烯氢化蓖麻油溶解于药用无水乙醇中, 加热充分溶解, 冷却后定容到 5ml。加入 250mg 姜黄素, 水浴超声溶解, 得到橙色透明的药物浓溶液。避光低温保存。临用前, 按照 1 : 10 的比例, 将水加入到浓溶液中, 边加边混合均匀, 最终得到浓度为 5mg/ml, 平均粒径为 168nm 的姜黄素注射液。

[0059] 取制备的 5mg/ml 姜黄素注射液 20ml, 冷冻干燥, 进行 DSC 研究。发现存在结晶峰。

[0060] 实施例 2 姜黄素注射剂

[0061] 将 20mg 姜黄素和 500mg 普朗尼克 F68 加入到 1ml 药用无水乙醇中, 于密闭试管内

加热溶解,得到橙色透明的药物浓溶液。避光低温保存。临用前,按照 1 : 10 的比例,逐滴加入到 5% 葡萄糖注射液中,边加边混合均匀,得到终浓度为 2mg/ml,平均粒径为 190nm 的姜黄素注射液。

[0062] 实施例 3 姜黄素注射剂

[0063] 具体制备方法为:将 5mg 姜黄素和 100mg 磷脂和 100mg 普朗尼克 F68 溶解于 1ml DMSO-水 (1 : 1, v/v) 混合液中,得到澄明溶液。避光低温保存。临用前,按照 1 : 10 的比例,逐滴加入到无菌注射用水中,边加边混合均匀。得到浓度为 0.5mg/ml 的姜黄素注射剂。平均粒径为 180nm。

[0064] 实施例 4 姜黄素注射用冻干粉针

[0065] 具体制备方法为:将 50mg 姜黄素和 1g 普朗尼克 F68 溶解于 10ml 叔丁醇中,加热到 35℃ 左右,避免叔丁醇凝固,无菌条件下用 0.22um 滤膜过滤后,趁热灌装到西林瓶中,每瓶分装 2ml,在 -70℃ 预冻 2 小时后,-20℃ 干燥 10 小时,10℃ 干燥 2 小时,压胶塞,从冻干机中取出,压铝盖。得到黄色疏松糕状冻干粉,其中每瓶中姜黄素的质量为 10mg,临用前加入 2ml 5% 葡萄糖注射液,充分水合,得到澄明的橙红色注射剂,平均粒径为 150nm,终浓度为 5mg/ml。

[0066] 实施例 5 姜黄素注射用冻干粉针

[0067] 具体制备方法为:将 10mg 姜黄素和 100mg 普朗尼克 F68 溶解于 5ml 叔丁醇中,将 100mg 海藻糖溶解于 4ml 水中。将两份溶液混匀,用叔丁醇定容到 10ml。加热到 50℃ 左右,无菌过滤,趁热灌装到西林瓶中,每瓶分装 2ml。-70℃ 预冻 2 小时后,-20℃ 干燥 15 小时,10℃ 干燥 2 小时,压胶塞,从冻干机中取出,压铝盖。得到黄色疏松糕状冻干粉,其中每瓶中姜黄素的质量为 2mg,临用前加入 2ml 5% 葡萄糖注射液,充分水合,得到澄明的橙红色注射剂,平均粒径为 120nm,终浓度为 1mg/ml。

[0068] 实施例 6 姜黄素注射用冻干粉针

[0069] 具体制备方法为:将 20mg 姜黄素溶解于 10ml 叔丁醇中,将 500mg 白蛋白和 2g 海藻糖溶解于 10ml 水中,将药物叔丁醇溶液与水溶液混合,并加热到 35℃ 左右,无菌过滤后趁热灌装到西林瓶中,每瓶分装 4ml,在 -70℃ 预冻 2 小时后,-30℃ 干燥 15 小时,5℃ 干燥 2 小时,压胶塞,从冻干机中取出,压铝盖。得到黄色疏松糕状冻干粉,其中每瓶中姜黄素的质量为 4mg,临用前加入 4ml 无菌注射用水,充分水合,得到澄明的黄色姜黄素注射剂,平均粒径为 220nm,终浓度为 1mg/ml。

[0070] 实施例 7 姜黄素注射用冻干粉针

[0071] 具体制备方法为:将 10mg 姜黄素,300mg 聚氧乙烯氢化蓖麻油 (Cremophor RH40) 和 1.5g 海藻糖溶解于 10ml 叔丁醇-水 (6 : 4, v/v) 中,加热到 35℃ 左右,避免叔丁醇凝固,无菌过滤后趁热灌装到西林瓶中,每瓶分装 2ml,在 -70℃ 预冻 2 小时后,-20℃ 干燥 10 小时,10℃ 干燥 2 小时,压胶塞,从冻干机中取出,压铝盖。得到浅棕色疏松糕状冻干粉,其中每瓶中姜黄素的质量为 4mg,临用前加入 2ml 无菌注射用水,充分水合,得到澄明黄色注射剂,平均粒径为 200nm,终浓度为 2mg/ml。

[0072] 实施例 8 姜黄素载药粒子载药量和包封率的测定

[0073] 将溶液干燥后,称取载药粒子干粉质量 (注射用冻干粉针直接称重)。

[0074] 载药粒子中的药物质量 = 载药粒子溶液中药物浓度 × 溶液体积

[0075] 载药量=载药粒子中的药物质量 / 干粉质量 ×100%

[0076] 取按照实施例 4 制备的姜黄素冻干粉针样品批号 070725, 水合后 HPLC 法测得其浓度为 4.97mg/ml, 体积为 2ml, 载药粒子干粉质量为 210mg, 载药量为 4.76%。按照下式计算包封率:

[0077] 包封率=载药粒子中姜黄素的量 / 制备载药粒子时加入的重量 ×100%

[0078] 计算得到 070725 样品的包封率为:

[0079] $4.97\text{mg/ml} \times 2\text{ml} / 10\text{mg} \times 100\% = 99.4\%$

[0080] 实施例 9 姜黄素注射剂在大鼠体内的药代动力学

[0081] 按照实施例 4 制备姜黄素注射用冻干粉针。用 5% 葡萄糖注射液水合为浓度为 5mg/ml 的澄明溶液, 用于药代动力学研究。对照品为浓度为 5mg/ml 的姜黄素溶液 (溶剂为 DMA-PEG400-5% 葡萄糖, 15 : 45 : 40, v/v)。

[0082] 取 5 只体重约为 300g 的雄性大鼠, 用 4% 的水合氯醛进行麻醉后, 从大鼠尾静脉注射进入大鼠血循环中。姜黄素冻干粉针和对照品的给药剂量均为 30mg/kg。给药后, 分别在 0min, 30min, 1h, 1.5h, 2h, 3h, 4h, 6h, 9h 从眼眶取血, 每次取样 0.1-0.2ml。将血样立即离心, 分离出血浆。加入 4-羟基二苯甲酮作为内标, 用 HPLC 法测定血浆中姜黄素浓度 (如不能立即测定, 血浆应于 -20 度的冰箱中保存, 但时间越短愈好)。采用非线性药代动力学模型进行拟合, 计算姜黄素冻干粉针和对照品的 AUC 及体内半衰期。

[0083] 根据血药浓度曲线, 计算得到姜黄素冻干粉针的 AUC 为 230735 ± 59431 (ng*min/ml), 半衰期为 105.79 ± 11.7 min。对照组姜黄素溶液剂在 30min 时血药浓度即低于检测限, 无法测到。

[0084] 实验结果表明, 姜黄素冻干粉针注射剂大大减缓了姜黄素在血浆中的清除和降解, 有利于提高其生物利用度和药效。

[0085] 实施例 10 姜黄素注射剂在小鼠体内的组织分布

[0086] 按照实施例 4 制备姜黄素注射用冻干粉针。用 5% 葡萄糖注射液水合为浓度为 5mg/ml 的澄明溶液, 用于药代动力学研究。对照品为浓度为 5mg/ml 的姜黄素溶液 (溶剂为 DMA-PEG400-5% 葡萄糖, 15 : 45 : 40, v/v)。

[0087] 取 10 周左右, 体重约为 30g 的雄性昆明鼠进行姜黄素干粉制剂的体内组织分布的研究。用 4% 的水和氯醛对小鼠进行麻醉后将药物从小鼠尾静脉注射进入小鼠血循环中。冻干粉针和对照品的剂量均为 30mg/kg。本次实验共 11 只小鼠。其中 1 只为空白对照, 其余 10 只分为两组, 分别给予姜黄素冻干粉针和对照品。于给药后 5min, 1h, 3h, 12h, 24h 各处死一只小鼠, 取心, 肝, 脾, 肺, 肾组织, 用 0.9% 氯化钠溶液对组织进行冲洗, 去除组织中的残留血液后, 加入各组织重量三倍的裂解液 (1% triton), 用研磨型匀浆机匀浆 90s。取 0.1ml 各组织匀浆液加入离心管中, 加入内标及 250 μ l 乙腈, 涡旋后立即进行离心 (12000r/min, 3 分钟)。用 HPLC 法测定各组织中姜黄素的浓度。结果如图 1 所示。可见, 姜黄素注射剂大大提高了姜黄素在肺中的分布, 并且直到给药后 12h, 肺中的浓度仍达到约 100ng/ml。远远高于对照组的姜黄素溶液。

[0088] 实施例 11 姜黄素干粉制剂对肺移植肺损伤药理作用研究

[0089] 一、材料和方法

[0090] 1. 实验分组

[0091] 在显微技术和机械通气下使用套管技术完成 48 例大鼠左单肺移植（供、受体各 48 只）。另完成假手术组 24 只，共计 120 只。根据再灌注时间不同分为两组。两组移植肺都经冷缺血 4h 保存，分别于再灌注 4h 和 24h 进行观察。每个组又分为三个亚组：假手术组，载体组，姜黄素组 $n = 12$ 只 / 组。再灌注 24h 组动物分别于肺移植手术后 12h 后加用相同剂量药物以确保再灌注 24h 阶段能达到有效血药浓度（表 1）

[0092] 表 1 分组情况

[0093]	分组 (I/R)	4 h/4h			4 h/24h		
	亚组	假手术	载体	姜黄素	假手术	载体	姜黄素
	n	12	12	12	12	12	12

[0094] 注：I：缺血，R：再灌注。

[0095] 时间配套的假手术组：开胸，机械通气同手术组但不进行移植，分别在假灌注 4h 和 24h 后处死动物；

[0096] 未治疗动物载体组：供体、受体分别于手术前静脉注入溶解姜黄素的药物载体 5% 葡萄糖溶液，供体、受体分别于手术前注入载体 6ml/kg，缓慢静脉注射；

[0097] 姜黄素组：取实施例 4 制备的姜黄素注射液（终浓度为 5mg/ml），按 30mg/kg 给药剂量，分别在手术前缓慢静脉注射给供体和受体。

[0098] 2. 标本留取

[0099] 取时间点 4h 和 24h 的移植鼠待恢复自主呼吸，拔除气管插管。并予以供氧 12h。在再灌注末期，受体大鼠被再次麻醉，与供体同样方法气管插管和机械通气，右颈动脉用 22 号深静脉穿刺针置管，通气 10min 后，血气从左肺静脉抽血测量，计算动脉血氧合指数。各组动物颈动脉采血 3ml，低温离心，取上清， -80°C 冰箱分装保存，待测。颈动脉驱血处死动物，取出心肺块按下述步骤分析。盲法操作外科手术和分析组织病理学表现。

[0100] 3. 肺湿干重比、肺形态学

[0101] 移除的心肺块左肺被即刻分成 3 个部分。左侧肺上 1/3 用电子天平称重为湿重，烤箱内 56°C 下放置 72h 至重量不再变化后称重为干重，计算湿干重比以反应供肺水肿情况。左肺中部 2mm 厚组织块浸在福尔马林液固定，石蜡包埋，HE 染色。其它肺组织被分成小块放入冻存管置液氮罐保存，然后存入 -80°C 冰箱待用。

[0102] 光镜下病理评分基于以下变量：肺泡和间质水肿，炎症细胞浸润，出血。严重程度评分如下：无损伤 = 1，损伤 25% = 2，损伤 50% = 3，损伤 75% = 4，弥漫性损伤 = 5（每个样品有三个切片，被病理学家随机分析，平均值作为样品评分）。

[0103] 4. 肺泡毛细血管膜通透性测量

[0104] 肺泡毛细血管通透性用伊文思蓝染料 (EBD) 方法测定。EBD 仅在每个亚组中 12 只动物中 6 只使用，EBD 按 15mg/ml PBS 溶解，在再灌注末期，按 30mg/kg 下腔静脉注入。循环 10min 后，正中开胸，下腔静脉注入 500u 肝素后，分离胸腺和主动脉，18 号静脉穿刺针插入肺动脉，以 3-0 丝线固定，剪开左心耳和左室放血，撤出穿刺针芯，用 50ml 生理盐水以 20cm 水柱高度进行肺血管床盥洗，盥洗结束后结扎气管。心肺块被移出胸腔，左下肺称重后放入 -80°C 冰箱集中待测。临测前烤箱内 56°C 下放置 72h 至重量不再变化后称干重，烤干的肺组织放入 3ml 甲酰胺中匀浆， 37°C 孵育 24h，5000 转离心 30min，取上清液于紫外可见光分

光光度计 620nm 波长下比色得到吸光度, 根据 EBD- 甲酰胺标准曲线计算肺组织伊文思蓝染料含量 ($\mu\text{g/g}$ 干重)。

[0105] 5. 统计分析

[0106] 结果以均数 \pm 标准差表示, 统计软件用 spss11.5 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), 多组差别比较用单因素方差分析 (One-way ANOVA procedures), 两组间差别比较用 Bonferroni 检验 (显著性标准设为 $P < 0.05$)。等级资料, 例如组织学半定量评分统计采用非参数检验 (Mann-Whitney test), $p < 0.05$ 考虑有统计学差异。

[0107] 二、结果

[0108] 1. 组织病理学和肺损伤评分

[0109] 与假手术组比较, 移植肺再灌注后损伤明显增加; 但在移植后 4h, 与假手术组比较, 移植肺炎细胞浸润并不明显。在移植后 4h 和 24h, 与载体组比较, 姜黄素治疗组肺损伤总分明显降低, 水肿程度明显减轻, 但炎症细胞浸润程度仅在移植后 24h 明显减轻。与载体组比较, 姜黄素组移植后 4h 和 24h 出血程度减轻, 但无统计学差异。半定量肺损伤病理评分结果见表 2。

[0110] 表 2 肺损伤形态学评分

[0111]

			水肿	浸润	出血	总分
分组	4h/	假手术	1.17 \pm 0.41	1.33 \pm 0.52	1.33 \pm 0.52	3.83 \pm 0.41
		载体	1.17 \pm 0.41	1.17 \pm 0.41	1.17 \pm 0.41	3.50 \pm 0.84
	4h/	姜黄素	2.33 \pm 0.52	2.00 \pm 0.00	2.33 \pm 0.52	6.67 \pm 0.82
		假手术	3.33 \pm 0.52	3.00 \pm 0.63	2.00 \pm 0.00	8.33 \pm 0.52
	24h/	载体	1.33 \pm 0.52	1.50 \pm 0.55	1.83 \pm 0.75	4.67 \pm 1.03
		姜黄素	2.33 \pm 0.52	2.00 \pm 0.00	1.67 \pm 0.52	6.00 \pm 0.63
Mann-Whitney P 值	4h/	假手术 vs 载体	0.009	0.065	0.026	0.002
		假手术 vs 姜黄素	0.699	0.699	0.310	0.132
	4h/	载体 vs 姜黄素	0.014	0.180	0.206	0.007
		假手术 vs 载体	0.002	0.002	0.015	0.002
	4h/	假手术 vs 姜黄素	0.009	0.015	0.180	0.002
		载体 vs 姜黄素	0.026	0.015	0.394	0.002

[0112] 2. 血气、湿干重比和毛细血管通透性

[0113] 2.1 移植肺左肺静脉血氧合指数

[0114] 在吸入氧浓度为 1 条件下测量受体左肺静脉血氧合指数 (图 2A), 与相应假手术组比较, 肺移植导致明显降低的氧合指数。在移植后 4h 和 24h, 姜黄素组左肺静脉血氧合指数明显高于相应载体组。

[0115] 2.2 移植肺湿干重比率

[0116] 肺水含量通过湿干重比测定 (图 2B), 与相应假手术组比较, 移植肺水含量明显增加。与相应载体组比较, 姜黄素组移植后 4h 和 24h 肺水含量减少, 但仅移植后 24h 肺水含量减少有统计学差异。

[0117] 2.3 移植肺泡毛细血管膜通透性测量

[0118] 肺泡毛细血管通透性用伊文思蓝染料法测量 (图 2C)。与相应假手术组比较, 移植肺在再灌注后 4h 和 24h 伊文思蓝染料含量分别明显增加 6.2 倍和 3.4 倍。与相应载体组

比较,姜黄素组移植后 4h 和 24h 移植肺伊文思蓝染料含量明显减少。

[0119] 以上通过举例说明的方式描述了本发明。但是,应当理解,本发明绝不仅仅限于这些具体实施方式。普通技术人员可以对本发明进行各种修改和改动,而不背离本发明的精神和范围。

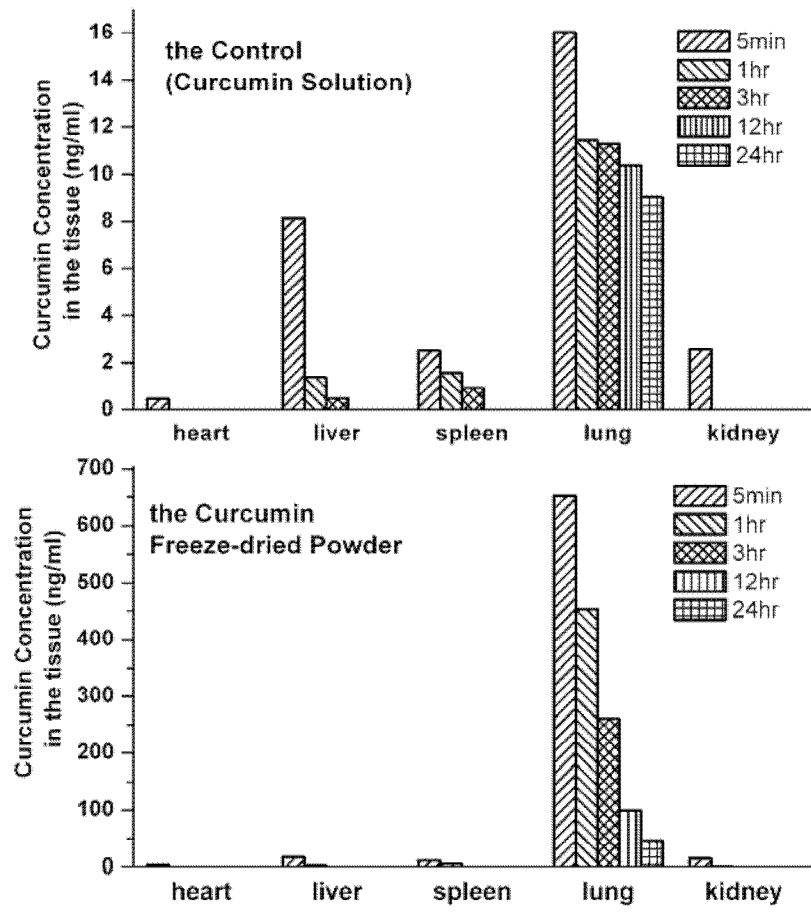


图 1

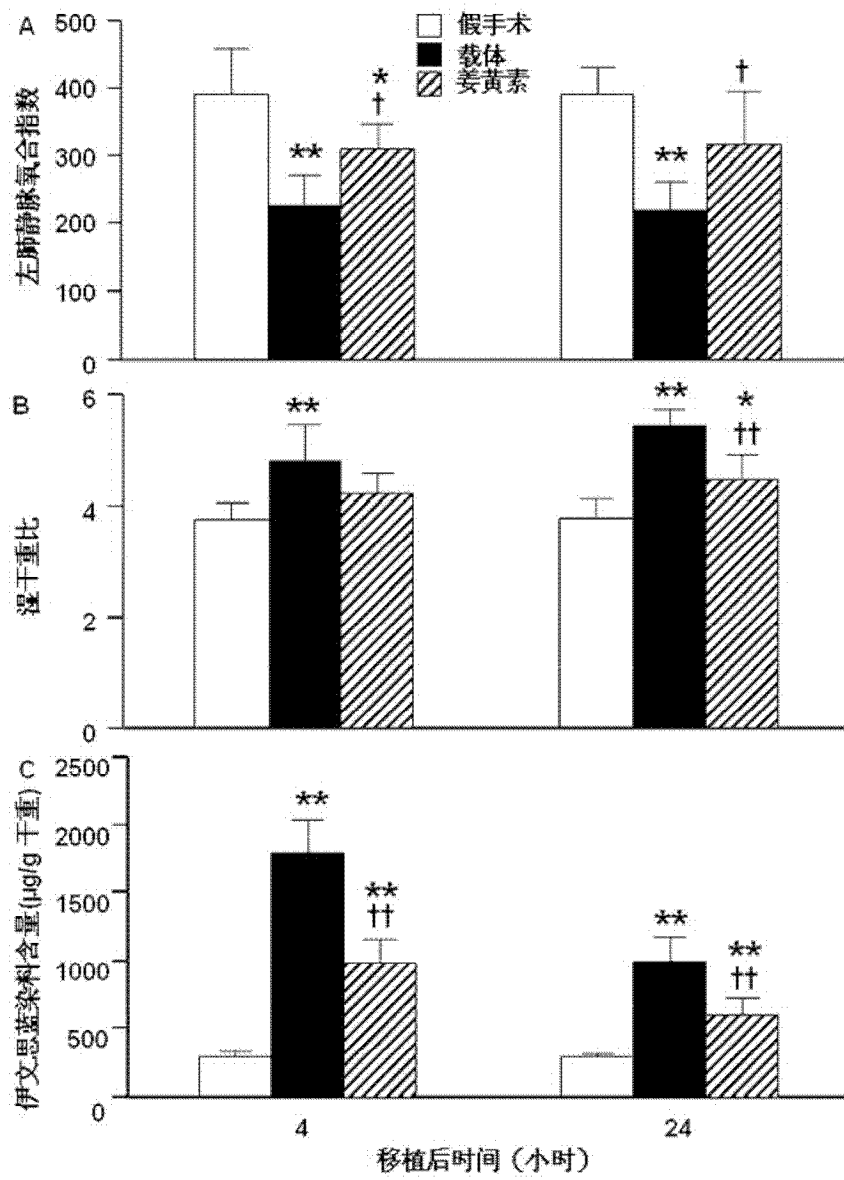


图 2