



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110623925 B

(45) 授权公告日 2021.06.25

(21) 申请号 201910918643.7

A61K 31/436 (2006.01)

(22) 申请日 2019.09.26

A61K 47/10 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61K 47/32 (2006.01)

申请公布号 CN 110623925 A

A61K 47/34 (2017.01)

(43) 申请公布日 2019.12.31

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

(73) 专利权人 严鹏科

审查员 凌宇静

地址 510140 广东省广州市荔湾区多宝路
63号

(72) 发明人 严鹏科

(74) 专利代理机构 广州市越秀区哲力专利商标
事务所(普通合伙) 44288

代理人 成婵娟

(51) Int. Cl.

A61K 9/107 (2006.01)

A61K 9/19 (2006.01)

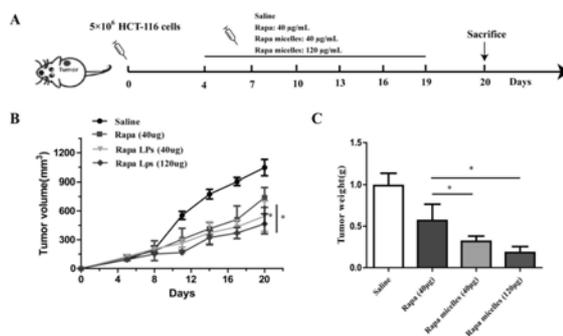
权利要求书1页 说明书9页 附图4页

(54) 发明名称

一种雷帕霉素纳米缓释剂及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种雷帕霉素纳米缓释剂,由按重量份计的以下原料制成:1份雷帕霉素、0.5-20份可溶性高分子聚合物载体、40-200份有机溶剂和400-20000份的水相液。本发明还提供了该雷帕霉素纳米缓释剂的制备方法,该雷帕霉素纳米缓释剂为纳米胶束结构,其粒径为10-200nm之间,对血管风险小;该雷帕霉素纳米缓释剂在血液内的半衰期可高达50个小时以上,能直达肿瘤患处,持续用药,肿瘤的消退率可达50%。



1. 一种雷帕霉素纳米缓释剂,其特征在于,由按重量份计的以下原料制成:1份雷帕霉素、0.5-20份可溶性高分子聚合物载体、40-200份有机溶剂和400-20000份的水相液;所述可溶性高分子聚合物载体为mPEG-PLA共聚物,其中,mPEG的分子量为2000,PLA的分子量为2000,总分子量为4000;所述有机溶剂为无水乙醇、二氯甲烷、丙酮和甲醇中的一种或两种以上;所述水相液为蒸馏水、生理盐水、细胞培养液、体液、组织液、缓冲液或葡萄糖注射液中一种或两种;

该雷帕霉素纳米缓释剂的制备包括以下步骤:

- 1) 把雷帕霉素原料药和可溶性高分子聚合物载体加入到有机溶剂中,形成有机相;
- 2) 将有机相吸入注射器中,按1-10滴每分钟的速度滴加入水相液中,室温搅拌30min-3h;搅拌速度为500-800rpm;
- 3) 减压回收有机溶剂;
- 4) 离心5-120min,离心速率为4000-8000rpm,取上清,0.22-0.45 μ m滤膜过滤后得到胶束溶液;
- 5) 将胶束溶液冷冻干燥,得到雷帕霉素纳米缓释剂。

2. 如权利要求1所述的雷帕霉素纳米缓释剂,其特征在于,原料还包括冻干保护剂。

3. 一种如权利要求1所述的雷帕霉素纳米缓释剂的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

- 1) 把雷帕霉素原料药和可溶性高分子聚合物载体加入到有机溶剂中,形成有机相;
- 2) 将有机相吸入注射器中,按1-10滴每分钟的速度滴加入水相液中,室温搅拌30min-3h;搅拌速度为500-800rpm;
- 3) 减压回收有机溶剂;
- 4) 离心5-120min,离心速率为4000-8000rpm,取上清,0.22-0.45 μ m滤膜过滤后得到胶束溶液;
- 5) 将胶束溶液冷冻干燥,得到雷帕霉素纳米缓释剂。

4. 如权利要求3所述的制备方法,其特征在于,步骤4)中,每100mL胶束溶液中加入5-10g的冻干保护剂。

一种雷帕霉素纳米缓释剂及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及雷帕霉素制剂技术领域,具体涉及一种雷帕霉素纳米缓释剂及其制备方法。

背景技术

[0002] 肿瘤癌症已经成为危害人类健康的头号杀手,虽然现在治疗肿瘤的方法层出不穷,但是大多数病人的生存状况并没有得到很大的改善。而在肿瘤的各种治疗方法中,化学疗法仍然是最常用的选择。虽然化疗药物应用广泛,但是其对实体肿瘤的治疗效果并不确切。其根本问题是传统化疗药物不能在肿瘤部位达到有效治疗浓度或不能维持足够的作用时间,而且,传统化疗药物对正常细胞的无差别杀伤,导致了多种毒副作用。化疗药物的效果不仅取决于药物的敏感性,还取决于药物在肿瘤部位的作用时间和药物在肿瘤部位的积蓄浓度。故化疗药物的局部应用,特别是局部缓释,已经成为当今肿瘤化疗研究的热点和难点。

[0003] 雷帕霉素在1975年于智利复活岛的土壤中发现,是一种由吸水性链霉菌产生的疏水性大环内酯类免疫抑制剂,具有抗真菌活性,为白色结晶,相对分子质量914.2,易溶于甲醛、乙醇、丙酮、氯仿等有机溶剂中,几乎不溶于水。

[0004] 雷帕霉素是具有低毒性的强有力免疫抑制剂,通过与相应免疫嗜素RMBP结合抑制细胞周期 G_0 期和 G_1 期,阻断 G_1 进入S期而发挥作用,广泛应用于移植手术中。雷帕霉素除了免疫抑制作用,还有抗肿瘤作用,能够浓度依赖性抑制肾癌、淋巴瘤、肺癌、肝癌、乳腺癌、神经内分泌癌和胃癌等肿瘤细胞的生长。2007年起,雷帕霉素的两种衍生物坦罗莫司和依维莫司开发用于治疗癌症,雷帕霉素在肿瘤治疗方面的研究及应用日益增多,单独应用或联合用药在体外、体内均表现显著的抗肿瘤效果。RAPA通过抑制哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)受体,影响其转导的多种信号通路,从而发挥抗血管生成、阻滞细胞周期和促进细胞凋亡等多种作用,对肿瘤的增殖、侵袭和转移等过程产生影响。

[0005] 纳米制剂具有高度的分散性,表面积巨大,有利于增加药物与吸收部位生物膜的接触时间和接触面积,增加药物的溶解性;纳米粒可通过内吞机理进入细胞,与一般药物的跨膜转运机理不一样,所以可能增加药物对生物膜的透过率。纳米载药系统作为一种优化药效的有效手段已经成为了药剂学和现代生物医学领域的研究热点。

[0006] 雷帕霉素属于疏水性药物,不能直接用于注射,需要一定的有机溶剂溶解才可注射,易对人体造成不良影响;雷帕霉素的体内生物利用度很低,易造成未到达病症部位就已经失效的问题。

[0007] 目前市面上有使用磷脂类或胆固醇类作为雷帕霉素的纳米缓释剂载体,这类载体与人体的亲和性非常高,但是由于磷脂类或胆固醇类血液中自然降解速率快,使得雷帕霉素达到作用部位浓度低,靶向性不足。

发明内容

[0008] 为了克服现有技术的不足,本发明的目的之一在于提供一种能有效控制雷帕霉素的缓释速度、提高其在肿瘤组织中的停留时间、延长其在血浆内的半衰期的雷帕霉素纳米缓释剂。

[0009] 本发明的目的之二在于提供该雷帕霉素纳米缓释剂的制备方法。

[0010] 本发明的目的之一采用如下技术方案实现:

[0011] 一种雷帕霉素纳米缓释剂,由按重量份计的以下原料制成:1份雷帕霉素、0.5-20份可溶性高分子聚合物载体、40-200份有机溶剂和400-20000份的水相液。

[0012] 该纳米缓释剂通过可溶性高分子聚合物对雷帕霉素的包覆作用,形成缓释型的包覆结构,同时通过有机溶剂与水相液的分散性,将包覆结构分散成纳米级的包覆粒子。

[0013] 进一步地,所述可溶性高分子聚合物载体为聚乙二醇-2000、聚乙二醇-4000、聚乙二醇-10000、聚乙二醇-15000、PLGA、PEO、PVP、聚丙烯、聚氨基酸、聚山梨酯和聚氧乙烯酯脂肪酸中的一种或两种以上。相对于小分子量的载体,高分子聚合物载体形成的缓释剂的亲水时间相对较长,可以提高雷帕霉素形成的注射液在体内的缓释时间,延长半衰期。

[0014] 进一步地,所述可溶性高分子聚合物载体为甲氧基聚乙二醇嵌段共聚物。该可溶性高分子聚合物在配制成缓释剂时,可有效形成缓释时间可控的纳米粒子。

[0015] 进一步地,所述可溶性高分子聚合物载体为mPEG-PLA,分子量为3000-20000。即为甲氧基聚乙二醇和聚乳酸的嵌段共聚物。

[0016] 进一步地,所述有机溶剂为无水乙醇、二氯甲烷、丙酮和甲醇中的一种或两种以上。有机溶剂需满足对雷帕霉素及可溶性高分子聚合物载体具有较佳的溶解性,同时在水中也具有较佳的分散性,与水可以互溶。即有机溶剂可溶于水。

[0017] 进一步地,所述水相液为蒸馏水、生理盐水、细胞培养液、体液、组织液、缓冲液或葡萄糖注射液中一种或两种。水相液为有机相提供较佳的分散介质,通过亲水性的可溶性高分子聚合物载体以及有机溶剂的分散作用,可以有效地提高雷帕霉素在水相液中的分散性,从而形成纳米级别的粒子。

[0018] 进一步地,原料还包括冻干保护剂。冻干保护剂为乳糖、葡萄糖、甘露醇或蔗糖中的一种或两种以上。

[0019] 本发明的目的之二采用如下技术方案实现:

[0020] 一种如上述的雷帕霉素纳米缓释剂的制备方法,包括以下步骤:

[0021] 1) 把雷帕霉素原料药和可溶性高分子聚合物载体加入到有机溶剂中,形成有机相;

[0022] 2) 将有机相吸入注射器中,按1-10滴每分钟的速度滴加入水相液中,室温搅拌30min-3h;

[0023] 3) 减压回收有机溶剂;

[0024] 4) 离心5-120min,取上清,0.22-0.45 μ m滤膜过滤后得到胶束溶液;

[0025] 5) 将胶束溶液冷冻干燥,得到雷帕霉素纳米缓释剂。

[0026] 即该方法中,通过有机溶剂分散雷帕霉素原料药和可溶性高分子聚合物载体,使形成均匀分散的有机相。再通过将有机相缓慢地释放至水相液中,而溶解速率的差异且随着水相溶液的搅拌,使雷帕霉素和可溶性高分子聚合物形成纳米级的胶束。

[0027] 进一步地,步骤2)中,搅拌速度为500-800rpm;步骤4)中,离心速率为4000-8000rpm。

[0028] 进一步地,步骤4)中,每100mL胶束溶液中加入5-10g的冻干保护剂。

[0029] 相比现有技术,本发明的有益效果在于:

[0030] 本发明提供一种雷帕霉素纳米缓释剂,通过可溶性高分子聚合物的包覆作用以及有机溶剂的助溶和分散作用,最后在水相液中形成胶束状的纳米粒子结构。该胶束型纳米粒子结构提高了雷帕霉素在血浆、组织液或进一步地消化道内的缓释性,其半衰期相对可控,可使雷帕霉素达到患处。

[0031] 本发明提供的雷帕霉素纳米缓释剂为纳米胶束结构,其粒径为10-200nm之间,载药量为0.1-20%,包封率可达80%以上,其具有均一且稳定的粒径分布,稳定的包封率和载药量,对血管风险小;该雷帕霉素纳米缓释剂具有稳定的包封率和载药量,具有较佳的肿瘤靶向作用;

[0032] 该雷帕霉素纳米缓释剂在血液内的半衰期可高达50个小时以上,能直达肿瘤患处,持续用药,肿瘤的消退率可达50%。

附图说明

[0033] 图1为实施例1-5的制剂外观;

[0034] 图2为实施例4的雷帕霉素纳米缓释剂的表征图;

[0035] 图3为实施例4的雷帕霉素纳米缓释剂的体外抗肿瘤试验结果图;

[0036] 图4为实施例4的雷帕霉素纳米缓释剂的体内靶向结果图;

[0037] 图5为实施例4的雷帕霉素纳米缓释剂的体内抗肿瘤效果图。

具体实施方式

[0038] 下面,结合附图和具体实施方式,对本发明做进一步描述,需要说明的是,在不相冲突的前提下,以下描述的各实施例之间或各技术特征之间可以任意组合形成新的实施例。

[0039] 一种雷帕霉素纳米缓释剂,由按重量份计的以下原料制成:1份雷帕霉素、0.5-20份可溶性高分子聚合物载体、40-200份有机溶剂和400-20000份的水相液。

[0040] 即本申请通过可溶性高分子聚合物载体的包覆作用和有机溶剂的分散作用,将雷帕霉素包覆于其中,形成胶束,通过缓慢释放至水相液中,以形成纳米级的微粒结构,再通过过滤和冻干,得到可用于注射液的雷帕霉素纳米缓释剂。

[0041] 该可溶性高分子聚合物载体优选为甲氧基聚乙二醇嵌段共聚物,即具有可以与雷帕霉素具有较佳相容性的甲氧基端基。优选地为mPEG-PLA嵌段共聚物,分子量优选为2000-20000,以形成胶束,进而形成包封率高,平均粒径大在nm级别的纳米缓释剂粒子。以下具体实施方式中,实施例1-10均采用mPEG-PLA共聚物,其中,mPEG的分子量为2000,PLA的分子量为2000,总分子量为4000。

[0042] 该雷帕霉素纳米缓释剂在肿瘤中的停留时间为24-48h;在血液中的半衰期为52h以上,该雷帕霉素纳米缓释剂以有效成分计雷帕霉素的注射量为10 μ g/mL以上,持续用药后肿瘤组织消退至少达50%。

[0043] 该雷帕霉素纳米缓释剂的制备方法,包括以下步骤:

[0044] 1) 把雷帕霉素原料药和可溶性高分子聚合物载体加入到有机溶剂中,形成有机相;

[0045] 2) 将有机相吸入注射器中,按1-10滴每分钟的速度滴加入水相液中,室温搅拌30min-3h;

[0046] 3) 减压回收有机溶剂;

[0047] 4) 离心5-120min,取上清,0.22-0.45 μ m滤膜过滤后得到胶束溶液;

[0048] 5) 将胶束溶液冷冻干燥,得到雷帕霉素纳米缓释剂。

[0049] 该雷帕霉素纳米缓释剂的制备过程中,通过有机相与水相液的互溶过程中,通过搅拌分散的方式,以物理作用力形成粒径小的胶束;最后通离心的方式,去除胶束溶液中的游离雷帕霉素,从而得到对血液健康风险低的雷帕霉素纳米缓释剂。

[0050] 该雷帕霉素纳米缓释剂的载体可在自然生理条件下降解,从而被通过代谢排出体外,不会对机体产生刺激或异物反应。

[0051] 以下是本发明具体的实施例,在下述实施例中所采用的原材料、设备等除特殊限定外均可以通过购买方式获得。

[0052] 实施例1:

[0053] 一种雷帕霉素纳米缓释剂,由以下组分制成:5mg雷帕霉素、10mg mPEG-PLA嵌段聚合物、1mL丙酮和50mL PBS缓冲液;

[0054] 其制备方法包括以下步骤:

[0055] 1) 把雷帕霉素原料药和mPEG-PLA嵌段聚合物加入到丙酮中,形成有机相;

[0056] 2) 将有机相吸入注射器中,按5滴每分钟的速度滴加至500rpm搅拌中的PBS缓冲液,600rpm室温搅拌60min;

[0057] 3) 40 $^{\circ}$ C减压回收有机溶剂;

[0058] 4) 4000r/min离心30min,取上清,0.22 μ m孔径的微孔滤膜过滤除菌后得到胶束溶液;

[0059] 5) 将胶束溶液冷冻干燥,得到雷帕霉素纳米缓释剂。

[0060] 实施例2:

[0061] 一种雷帕霉素纳米缓释剂,由以下组分制成:5mg雷帕霉素、20mg mPEG-PLA嵌段聚合物、1mL丙酮和50mL PBS缓冲液;

[0062] 其制备方法包括以下步骤:

[0063] 1) 把雷帕霉素原料药和mPEG-PLA嵌段聚合物加入到丙酮中,形成有机相;

[0064] 2) 将有机相吸入注射器中,按5滴每分钟的速度滴加至500rpm搅拌中的PBS缓冲液,600rpm室温搅拌60min;

[0065] 3) 40 $^{\circ}$ C减压回收有机溶剂;

[0066] 4) 5000r/min离心30min,取上清,0.22 μ m孔径的微孔滤膜过滤除菌后得到胶束溶液;

[0067] 5) 将胶束溶液冷冻干燥,得到雷帕霉素纳米缓释剂。

[0068] 实施例3:

[0069] 一种雷帕霉素纳米缓释剂,由以下组分制成:5mg雷帕霉素、40mg mPEG-PLA嵌段聚

合物、1mL丙酮和50mLPBS缓冲液；

[0070] 其制备方法包括以下步骤：

[0071] 1) 把雷帕霉素原料药和mPEG-PLA嵌段聚合物加入到丙酮中，形成有机相；

[0072] 2) 将有机相吸入注射器中，按5滴每分钟的速度滴加至500rpm搅拌中的PBS缓冲液，600rpm室温搅拌60min；

[0073] 3) 40℃减压回收有机溶剂；

[0074] 4) 5000r/min离心30min，取上清，0.22μm孔径的微孔滤膜过滤除菌后得到胶束溶液；

[0075] 5) 将胶束溶液冷冻干燥，得到雷帕霉素纳米缓释剂。

[0076] 实施例4：

[0077] 一种雷帕霉素纳米缓释剂，由以下组分制成：5mg雷帕霉素、50mg mPEG-PLA嵌段聚合物、1mL丙酮和50mL PBS缓冲液；

[0078] 其制备方法包括以下步骤：

[0079] 1) 把雷帕霉素原料药和mPEG-PLA嵌段聚合物加入到丙酮中，形成有机相；

[0080] 2) 将有机相吸入注射器中，按5滴每分钟的速度滴加至500rpm搅拌中的PBS缓冲液，600rpm室温搅拌60min；

[0081] 3) 40℃减压回收有机溶剂；

[0082] 4) 5000r/min离心30min，取上清，0.22μm孔径的微孔滤膜过滤除菌后得到胶束溶液；

[0083] 5) 将胶束溶液冷冻干燥，得到雷帕霉素纳米缓释剂。

[0084] 实施例5：

[0085] 一种雷帕霉素纳米缓释剂，由以下组分制成：5mg雷帕霉素、60mg mPEG-PLA嵌段聚合物、1mL丙酮和50mL PBS缓冲液；

[0086] 其制备方法包括以下步骤：

[0087] 1) 把雷帕霉素原料药和mPEG-PLA嵌段聚合物加入到丙酮中，形成有机相；

[0088] 2) 将有机相吸入注射器中，按5滴每分钟的速度滴加至500rpm搅拌中的PBS缓冲液，600rpm室温搅拌120min；

[0089] 3) 40℃减压回收有机溶剂；

[0090] 4) 5000r/min离心30min，取上清，0.22μm孔径的微孔滤膜过滤除菌后得到胶束溶液；

[0091] 5) 将胶束溶液冷冻干燥，得到雷帕霉素纳米缓释剂。

[0092] 实施例6：

[0093] 一种雷帕霉素纳米缓释剂，由以下组分制成：10mg雷帕霉素、90mg mPEG-PLA嵌段聚合物、1mL丙酮和100mL PBS缓冲液；

[0094] 其制备方法包括以下步骤：

[0095] 1) 把雷帕霉素原料药和mPEG-PLA嵌段聚合物加入到丙酮中，形成有机相；

[0096] 2) 将有机相吸入注射器中，按5滴每分钟的速度滴加至500rpm搅拌中的PBS缓冲液，800rpm室温搅拌120min；

[0097] 3) 40℃减压回收有机溶剂；

[0098] 4) 4000r/min离心30min,取上清,0.22 μ m孔径的微孔滤膜过滤除菌后得到胶束溶液;

[0099] 5) 将胶束溶液冷冻干燥,得到雷帕霉素纳米缓释剂。

[0100] 实施例7:

[0101] 一种雷帕霉素纳米缓释剂,由以下组分制成:100mg雷帕霉素、900mg mPEG-PLA嵌段聚合物、7mL丙酮、10mL PBS缓冲液和0.5g乳糖;

[0102] 其制备方法包括以下步骤:

[0103] 1) 把雷帕霉素原料药和mPEG-PLA嵌段聚合物加入到丙酮中,形成有机相;

[0104] 2) 将有机相吸入注射器中,按5滴每分钟的速度滴加至500rpm搅拌中的PBS缓冲液,800rpm室温搅拌120min;

[0105] 3) 40 $^{\circ}$ C减压回收有机溶剂;

[0106] 4) 4000r/min离心30min,取上清,0.22 μ m孔径的微孔滤膜过滤除菌后得到胶束溶液;

[0107] 5) 向胶束溶液加入乳糖,0.22 μ m孔径的微孔滤膜无菌过滤,冷冻干燥,得到雷帕霉素纳米缓释剂。

[0108] 实施例8:

[0109] 一种雷帕霉素纳米缓释剂,由以下组分制成:150mg雷帕霉素、100mg mPEG-PLA嵌段聚合物、7mL丙酮、100mL PBS缓冲液和5g乳糖;

[0110] 其制备方法包括以下步骤:

[0111] 1) 把雷帕霉素原料药和mPEG-PLA嵌段聚合物加入到丙酮中,形成有机相;

[0112] 2) 将有机相吸入注射器中,按5滴每分钟的速度滴加至500rpm搅拌中的PBS缓冲液,800rpm室温搅拌120min;

[0113] 3) 40 $^{\circ}$ C减压回收有机溶剂;

[0114] 4) 4000r/min离心30min,取上清,0.22 μ m孔径的微孔滤膜过滤除菌后得到胶束溶液;

[0115] 5) 向胶束溶液加入乳糖,0.22 μ m孔径的微孔滤膜无菌过滤,冷冻干燥,得到雷帕霉素纳米缓释剂。

[0116] 实施例9:

[0117] 一种雷帕霉素纳米缓释剂,由以下组分制成:100mg雷帕霉素、1000mg mPEG-PLA嵌段聚合物、7mL丙酮、100mL PBS缓冲液和5g乳糖;

[0118] 其制备方法包括以下步骤:

[0119] 1) 把雷帕霉素原料药和mPEG-PLA嵌段聚合物加入到丙酮中,形成有机相;

[0120] 2) 将有机相吸入注射器中,按5滴每分钟的速度滴加至500rpm搅拌中的PBS缓冲液,800rpm室温搅拌120min;

[0121] 3) 40 $^{\circ}$ C减压回收有机溶剂;

[0122] 4) 4000r/min离心30min,取上清,0.22 μ m孔径的微孔滤膜过滤除菌后得到胶束溶液;

[0123] 5) 向胶束溶液加入乳糖,0.22 μ m孔径的微孔滤膜无菌过滤,冷冻干燥,得到雷帕霉素纳米缓释剂。

[0124] 实施例10:

[0125] 一种雷帕霉素纳米缓释剂,由以下组分制成:50mg雷帕霉素、500mg mPEG-PLA嵌段聚合物、7mL丙酮、50mL PBS缓冲液和2.5g乳糖;

[0126] 其制备方法包括以下步骤:

[0127] 1) 把雷帕霉素原料药和mPEG-PLA嵌段聚合物加入到丙酮中,形成有机相;

[0128] 2) 将有机相吸入注射器中,按5滴每分钟的速度滴加至500rpm搅拌中的PBS缓冲液,800rpm室温搅拌120min;

[0129] 3) 40℃减压回收有机溶剂;

[0130] 4) 4000r/min离心30min,取上清,0.22μm孔径的微孔滤膜过滤除菌后得到胶束溶液;

[0131] 5) 向胶束溶液加入乳糖,0.22μm孔径的微孔滤膜无菌过滤,冷冻干燥,得到雷帕霉素纳米缓释剂。

[0132] 性能检测:

[0133] 1、制剂性能测试

[0134] 对实施例1-10得到的雷帕霉素纳米缓释剂进行外观评价、平均粒径、电位和包封率的测定;

[0135] 其中,外观评价标准:以维持原体积,不坍塌,不皱缩,色泽均匀,无花斑,质地细腻为佳;外观如图1所示,自左至右依次为实施例1-5的制剂。

[0136] 平均粒径:采用马尔文激光粒度仪测定纳米粒的粒径及粒径分布,其原理为利用粒子被光照射时发生光散射以及光发生衍射的特征,并光的散射强度和衍射强度与粒子大小以及光学特征有关的原理来测定粒子大小。

[0137] 如图2所示,图2A为实施例4的雷帕霉素纳米缓释剂的胶束模拟图,其中球状物为有效成分雷帕霉素,线状部分为mPEG-PLA嵌段聚合物;图2B为雷帕霉素纳米缓释剂的粒径分布图;图2C为雷帕霉素纳米缓释剂的TEM图。

[0138] 电位:采用马尔文激光粒度仪测定纳米粒电位;图2D为雷帕霉素纳米缓释剂的Zeta电位图。

[0139] 包封率:包封率在80%以上较佳。

[0140] 参照含量测定项方法,测定药物总含量。

[0141] 药物含量采用高效液相色谱法测定,以甲醇-乙腈-水(体积比为43:40:17)为流动相,流速为1mL/min,柱温为40℃,检测波长为278nm。

[0142] 包封率计算公式为:包封率=包封的药量/主药总含量×100%

[0143] 结果如下表所示:

[0144] 表1纳米粒的包封率,载药量和平均粒径的变化

[0145]

	外观	再分散性	包封率%	平均粒径 (nm)
实施例1	无皱缩,无塌陷	良好	91	12.37
实施例2	无皱缩,无塌陷	良好	85	17.6
实施例3	无皱缩,无塌陷	良好	87	18.5
实施例4	无皱缩,无塌陷	良好	88	18.9
实施例5	无皱缩,无塌陷	良好	86	18.6

实施例6	无皱缩,无塌陷	良好	87	28.1
实施例7	无皱缩,无塌陷	良好	85	25.3
实施例8	无皱缩,无塌陷	良好	84	29.4
实施例9	无皱缩,无塌陷	良好	87	31.3
实施例10	无皱缩,无塌陷	良好	88	27.5

[0146] 由表1可知,本申请得到的雷帕霉素纳米缓释制剂的包封率在80%以上。

[0147] 2、制剂性能测试

[0148] 使用MTT试剂盒法以及HCT116细胞进行细胞毒性实验,HCT116细胞以 1×10^4 个/孔的接种量接种于96孔板中/5%CO₂/37℃培养箱中培养24小时,分别给予浓度(以雷帕霉素有效成分计)为80μg/mL、40.00μg/mL、30.00μg/mL、20.00μg/mL、10.00μg/mL、5.00μg/mL、2.50μg/mL、1.25μg/mL、0.65μg/mL、0.3125μg/mL和0μg/mL的实施例4的雷帕霉素纳米缓释剂分别处理24h、48h、72h后,雷帕霉素纳米缓释剂明显抑制HCT116细胞的生长,见图3所示,给药24h的IC₅₀为10.29μg/mL,给药48h的IC₅₀为3.92μg/mL,给药72h的IC₅₀为0.63μg/mL。

[0149] 3、雷帕霉素纳米缓释剂的体内肿瘤靶向效果

[0150] HCT116实体瘤小鼠造模:取BALB/c裸鼠20只,雌性,体重20g,用已制备成的HCT116细胞混悬液进行小鼠皮下接种0.2mL,细胞数为 5×10^6 个。

[0151] 分组给药:接种后随机分成五个组,雷帕霉素纳米缓释剂给药量为13.3μg、40μg和120μg组,即低中高三个剂量组,另设雷帕霉素对照组40μg和生理盐水对照组。每组四只,接种后第五天0.2mL的给药容量尾静脉注射给药,隔两天一次(约56小时),连续给药21天。

[0152] 给药后每隔一天对肿瘤体积进行测量。在末次给药50小时后,将小鼠称重,取血,处死老鼠,取肝,取肿瘤,量取血,肝,肿瘤中雷帕霉素含量,结果见表2和图4。图4A为血液中雷帕霉素的含量;图4B为肝中雷帕霉素的含量;图4C为肿瘤中雷帕霉素的含量;

[0153] 表2血液、肝和肿瘤中雷帕霉素的含量

	对照组 40μg	试验组 13.3μg	试验组 40μg	试验组 120μg
[0154] 血 (ng/mL)	53.04±18.96	97.97±10.4	114.01±2.61	143.71±8.33
肝(ng/mg)	0.042±0.00	0.083±0.01	0.084±0.00	0.138±0.04
肿瘤(ng/mg)	//	0.11±0.05	0.37±0.06	0.38±0.05

[0155] 由表2可知,相对于雷帕霉素对照组,在给药后的50h后,同剂量的初稿例4的纳米缓释剂组的雷帕霉素的含量是对照组的2倍以上,且在肿瘤中仍有残留。

[0156] 将实施例4中的雷帕霉素替代为DiR脂质体,制作DiR脂质体的纳米缓释剂,作为对照组,尾静脉注射给裸鼠后,不同时间点进行活体成像观察荧光的位置。结果发现18h后,纳米粒在肿瘤部位聚集。结果见图4的4D和4E。图4D为不同时间点DiR脂质体的纳米缓释剂对肿瘤组织的靶向效果;图4E为DiR脂质体的纳米缓释剂作用24h取出内脏和肿瘤组织荧光结果。

[0157] 由图4D和4E可知,本申请的缓释剂可使有效成分直达肿瘤,作用时间持久,具有较佳的靶向作用。

[0158] 4、雷帕霉素纳米缓释剂的体内抗肿瘤效果

[0159] HCT116实体瘤小鼠造模:取BALB/c裸鼠20只,雌性,体重(20)g,用已制备成的HCT116细胞混悬液进行小鼠皮下接种0.2mL,细胞数为 5×10^6 个。

[0160] 分组给药:接种后随机分成五个组,实施例4的雷帕霉素纳米缓释剂为13.3 μ g,40 μ g,120 μ g组,即低中高三个剂量组,另设雷帕霉素对照组40 μ g和生理盐水对照组。每组四只,接种后第五天0.2mL的给药容量尾静脉注射给药,隔两天一次(约56小时)。连续给药21天。

[0161] 给药后每隔一天对肿瘤体积进行测量。在末次给药50小时后,将小鼠称重,处死老鼠,取肿瘤,称肿瘤,计算各组的抑瘤率。

[0162] 图5A为裸鼠的给药方案;图5B为雷帕霉素纳米缓释剂给药后肿瘤体积;图5C为雷帕霉素纳米缓释剂给药后肿瘤体重。由上图可知,相对于普通的雷帕霉素直接给药,本申请的纳米缓释剂能明显抑制肿瘤的生长。

[0163] 上述实施方式仅为本发明的优选实施方式,不能以此来限定本发明保护的范围,本领域的技术人员在本发明的基础上所做的任何非实质性的变化及替换均属于本发明所要求保护的范畴。



图1

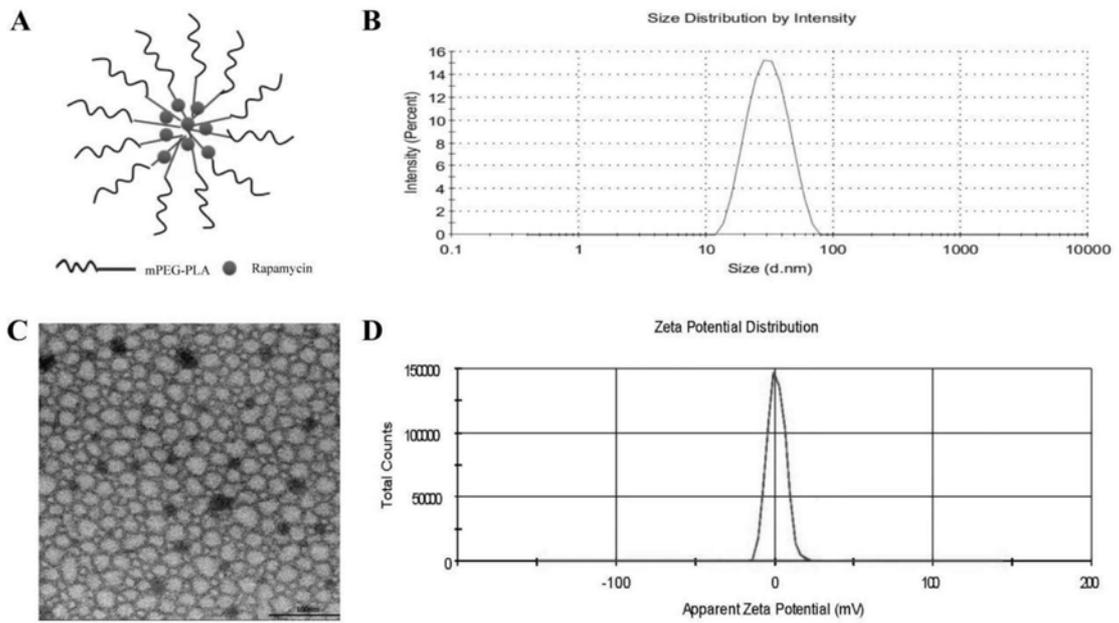


图2

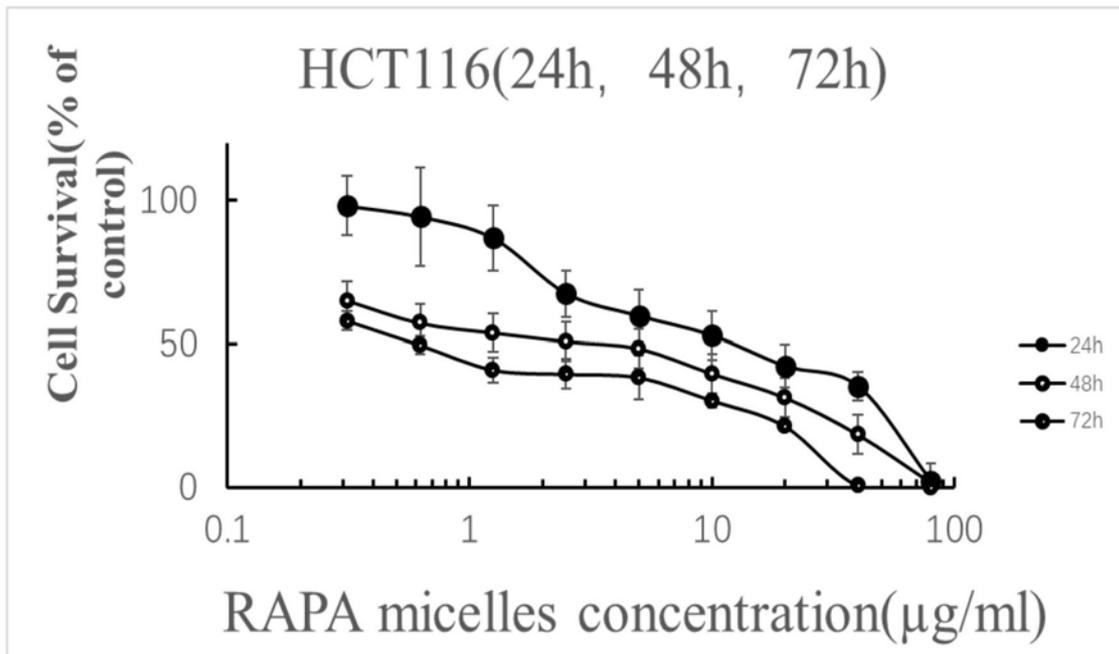


图3

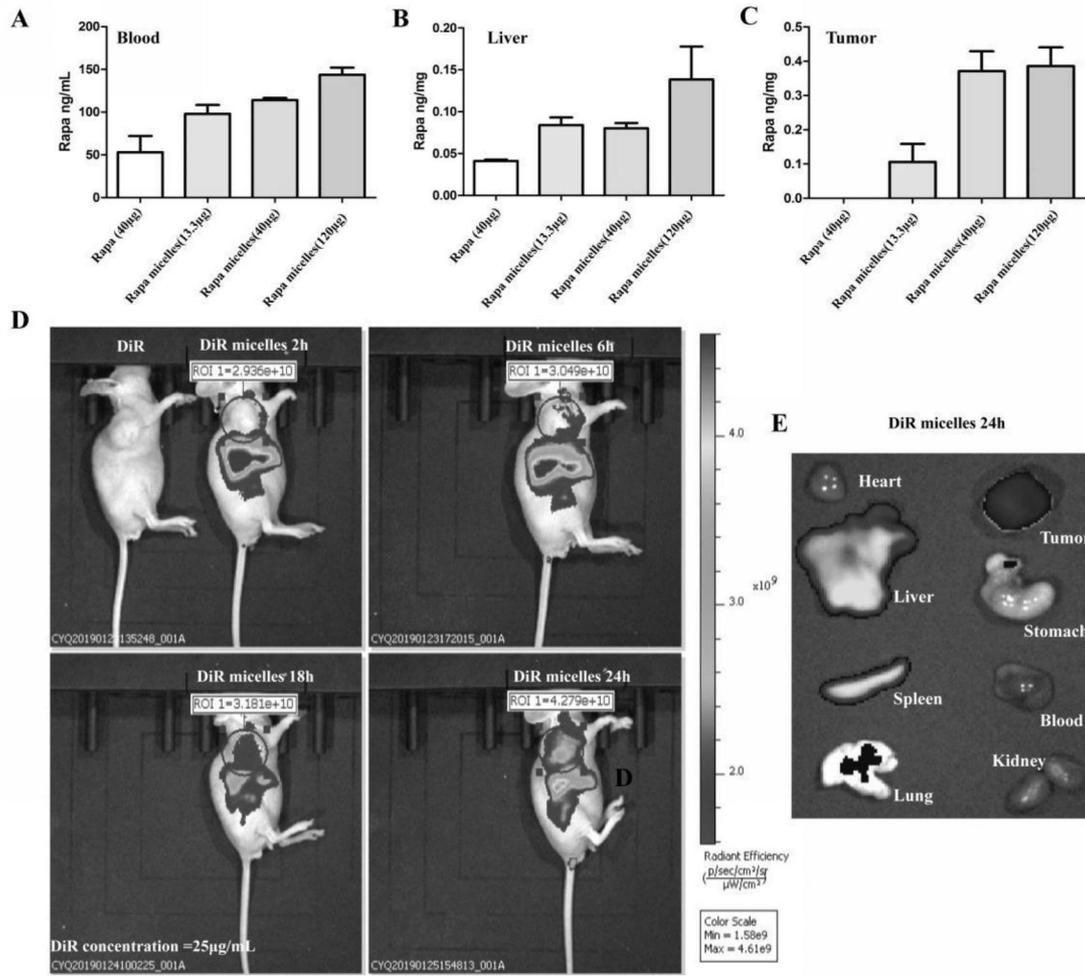


图4

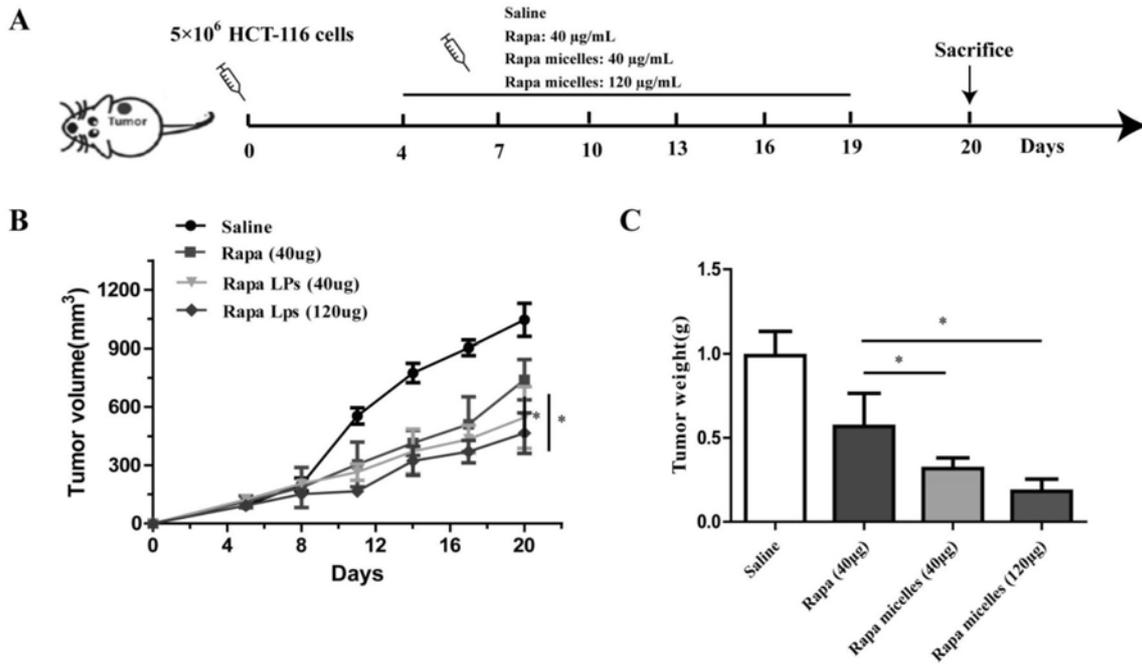


图5