



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113116822 A

(43) 申请公布日 2021.07.16

(21) 申请号 202010592798.9 *A61K 31/56* (2006.01)

(22) 申请日 2020.06.25 *A61P 35/00* (2006.01)

(66) 本国优先权数据 *A61P 29/00* (2006.01)

201911404668.1 2019.12.30 CN

(71) 申请人 复旦大学

地址 200433 上海市杨浦区邯郸路220号

(72) 发明人 姜嫣嫣 吴俊龙 刘晓 杨月滢

(74) 专利代理机构 上海元一成知识产权代理事务
所(普通合伙) 31268

代理人 吴桂琴

(51) Int. Cl.

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 47/24 (2006.01)

A61K 47/28 (2006.01)

A61K 31/337 (2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图4页

(54) 发明名称

一种装载紫杉醇的抗肿瘤穿膜脂质体组合及其制备方法

(57) 摘要

本发明属医药技术和纳米医学技术领域,涉及一种装载紫杉醇的抗肿瘤穿膜脂质体组合及其制备方法和应用。本发明的装载紫杉醇的脂质体载体为无胆固醇脂质体,由磷脂和科罗索酸制成,具有高细胞融合功能,并兼具抗炎和抗肿瘤的功能。该功能性脂质体包载紫杉醇后,与传统胆固醇脂质体相比,具有更强的肿瘤细胞穿膜摄取能力,抗多药耐药、增效减毒和协同抗肿瘤作用,显著提升肿瘤治疗效果。

1. 一种装载紫杉醇的抗肿瘤穿膜脂质体组合,其特征在于,所述脂质体的膜材由磷脂和科罗素酸组成,该脂质体装载抗肿瘤药物紫杉醇,其组成通式为:

PTX/CALP

其中,PTX为紫杉醇(Paclitaxel);CA为科罗素酸(Corosolic Acid),LP为脂质体。

2. 按权利要求1所述的装载紫杉醇的抗肿瘤穿膜脂质体组合,其特征在于,所述的磷脂包括天然磷脂、半合成磷脂和合成磷脂,选自大豆卵磷脂、蛋黄卵磷脂、氢化大豆卵磷脂(HSPC)、磷脂酰胆碱(PC)类、磷脂酰甘油(PG)类、磷脂酰乙醇胺(PE)类或PEG化磷脂类中的一种或多种。

3. 按权利要求1所述的装载紫杉醇的抗肿瘤穿膜脂质体组合,其特征在于,所述的PTX/CALP通过薄膜分散法或注入法或冷冻干燥法制备;其中,

所述的薄膜分散法包括:将磷脂、科罗素酸与紫杉醇溶于有机溶剂中,获得的含药脂质溶液在40℃~80℃下减压旋转蒸发,除去有机溶剂后成膜,加入水性介质,于20℃~80℃水浴中旋转或震荡水化,得粗制的脂质体悬液,经高压均质、超声或挤压法制得小单室脂质体,再采用超滤法、离心法、透析法或体积排阻色谱法,去除游离药物,得粒径均匀的纳米脂质体悬液;

所述的注入法包括:将磷脂、科罗素酸与紫杉醇溶于有机溶剂中,获得的含药脂质溶液缓慢注入到30℃~80℃的水性介质中,搅拌,挥去有机溶剂,得粗制的脂质体悬液,经高压均质、超声或挤压法制得小单室脂质体,再采用超滤法、离心法、透析法或体积排阻色谱法,去除游离药物,得粒径均匀的纳米脂质体悬液;

所述的冷冻干燥法包括:将磷脂、科罗素酸、紫杉醇溶于有机溶剂中,获得的含药脂质溶液缓慢注入到30℃~80℃的含二糖和/或氨基酸的水性介质中,搅拌,挥去有机溶剂,得粗制的脂质体悬液,经高压均质、超声或挤压法制得小单室脂质体,再采用超滤法、离心法、透析法或体积排阻色谱法,去除游离药物,经冷冻干燥,制得脂质体冻干粉末;使用前用水性介质重悬脂质体冻干粉末,得粒径均匀的纳米脂质体悬液。

4. 按权利要求3所述的装载紫杉醇的抗肿瘤穿膜脂质体组合,其特征在于,所述的磷脂与科罗素酸的质量比为1:0.1~1:1。

5. 按权利要求3所述的装载紫杉醇的抗肿瘤穿膜脂质体组合,其特征在于,所述的磷脂与科罗素酸的质量比为1:0.2~1:0.5。

6. 按权利要求3所述的装载紫杉醇的抗肿瘤穿膜脂质体组合,其特征在于,所述的磷脂与紫杉醇的质量比为1:0.02~1:0.5。

7. 按权利要求3所述的装载紫杉醇的抗肿瘤穿膜脂质体组合,其特征在于,所述的磷脂与紫杉醇的质量比为1:0.05~1:0.1。

8. 按权利要求3所述的装载紫杉醇的抗肿瘤穿膜脂质体组合,其特征在于,所述的有机溶剂为醇类、烷烃、酮类、醚类、卤代烃中的一种或多种;所述的水性介质为纯水、磷酸盐缓冲液、枸橼酸缓冲液、酒石酸缓冲液、硫酸铵溶液、生理盐水、葡萄糖溶液中的一种;所述的二糖为蔗糖、乳糖、海藻糖中的一种或多种;所述的氨基酸为色氨酸、甘氨酸、赖氨酸的一种或多种;所述的超声操作为水浴超声或探头超声,超声功率为80W~200W,超声时间为5~20分钟。

一种装载紫杉醇的抗肿瘤穿膜脂质体组合及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于医药技术和纳米医学技术领域,涉及一种装载紫杉醇的抗肿瘤穿膜脂质体组合及其制备方法。

背景技术

[0002] 现有技术公开了紫杉醇 (Paclitaxel, PTX) 是从红豆杉属植物中提取的一种四环二萜类化合物,具有广谱抗肿瘤作用。研究显示,紫杉醇主要作用于细胞微管/微管蛋白系统,通过诱导和促进微管蛋白的聚合,稳定微管并阻碍微管的解聚,破坏微管与微管蛋白之间的动态平衡,使细胞的有丝分裂受到阻断从而抑细胞的分裂和增殖,引起细胞死亡。紫杉醇作为抗癌的一线药物,被广泛用于临床治疗多种恶性肿瘤,包括乳腺癌、卵巢癌、非小细胞癌和头颈癌等,然而,紫杉醇几乎不溶于水,因此临床使用时紫杉醇采用聚氧乙烯蓖麻油和无水乙醇 (50/50, v/v) 的混合液作为载体,静脉注射给药 (Taxol[®]);虽然 Taxol[®] 显著增加了紫杉醇的溶解度,但是其体内半衰期短,清除速率快,并且会引起过敏反应、神经毒性、肾毒性等毒副作用。另外,紫杉醇作为一种广谱抗肿瘤药物,由于缺乏靶向性,在杀伤肿瘤细胞的同时,会对正常细胞造成损伤。Taxol[®] 的诸多缺点大大限制了其在临床上的应用,因此为了克服上述缺陷,研制紫杉醇的新型制剂,如注射用微乳、聚合物微粒 (微囊、微球等)、纳米胶束、白蛋白结合物、环糊精包合、脂质体等已成为现代医学的研究热点。

[0003] 脂质体是由磷脂和胆固醇为膜材制备的具有脂质双分子层结构的纳米尺度或微米尺度的封闭囊泡。脂质体可同时包载亲水性药物和亲脂性药物,提高药物体内稳定性;降低药物体内清除速度,延长药物作用时间;改善药物生物利用度;使药物具有定向分布的靶向性,进而增强药理作用,降低药物毒性等诸多优点,被广泛运用于药物递送系统中,可作为紫杉醇的较理想载体。目前,国产的力扑素[®]是唯一获批上市的紫杉醇脂质体,此外还有处于临床试验阶段的紫杉醇脂质体 LEP-ETU[®]和 EndoTAG[®],其中力扑素[®]是由蛋黄卵磷脂和胆固醇处方制备而成的脂质体制剂;LEP-ETU[®]由二油酰基卵磷脂 (DOPC)、心磷脂和胆固醇脂质体处方制备而成;EndoTAG[®]则是由阳离子磷脂 (2,3-二油酰基-丙基)-三甲胺 (DOTAP)、DOPC和胆固醇脂质体处方制备而成。相比于 Taxol[®],脂质体载体能显著提高紫杉醇的体内滞留时间,并降低紫杉醇的毒副作用,然而,临床实践年显示,由于紫杉醇脂质体注射剂存在一定过敏反应的副作用,患者用药前需进行脱敏处理,明显限制了紫杉醇脂质体的用药剂量。

[0004] 科罗索酸 (corosolic acid, CA),即 2 α -羟基熊果酸,是存在于大叶紫薇、枇杷、金莲花等植物中的三萜类化合物,大量研究发现,CA具有降血糖、抗炎、抗肿瘤、抗病毒和抗心血管疾病等作用。在抗炎方面,CA通过抑制剂 STAT3 细胞通路对多种炎症具有显著的抑制作用;在抗肿瘤方面,CA具有诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤组织的炎症反应、抑制肿瘤相关巨噬细胞的募集、改善肿瘤微环境等作用;特别是,当 CA 与化疗药物如阿霉素、5-氟尿嘧啶、顺铂、紫杉醇、喜树碱等联用时,能够显著提高抗肿瘤疗效,表现出增效减毒和抗多药耐药的

协同治疗作用。

[0005] 基于现有技术的现状,本申请的发明人拟提供一种装载紫杉醇的抗肿瘤穿膜脂质体组合及其制备方法。本发明以磷脂和科罗索酸为膜材,包载紫杉醇的抗肿瘤脂质体,该脂质体具有肿瘤高渗透性,在肿瘤部位可充分发挥CA和紫杉醇的协同抗肿瘤作用,疗效显著优于传统的紫杉醇脂质体,并能显著降低药物的副作用。

发明内容

[0006] 本发明的目的是基于现有技术的现状,提供一种装载紫杉醇的抗肿瘤穿膜脂质体组合及其制备方法。本发明的装载紫杉醇的抗肿瘤穿膜脂质体组合 (PTX/CALP) 能够实现增效减毒的高效抗肿瘤疗效。

[0007] 基于研究发现,CA具有胆固醇样的结构,具有稳定和调节脂质体膜流动性的作用,可取代脂质体中的胆固醇;本发明提供了一种新型紫杉醇脂质体PTX/CALP及其制备方法,所述CA与不同类型的磷脂组合均可制得稳定脂质体 (CALP),CALP不仅仍保持CA的生物学活性,而且具有高效穿生物膜作用,该PTX/CALP具有稳定、缓释、肿瘤高渗透和安全的特性。

[0008] 具体地,本发明提供了一种装载紫杉醇的抗肿瘤穿膜脂质体组合,所述脂质体的膜材由磷脂和科罗索酸组成,该脂质体装载抗肿瘤药物紫杉醇,其组成通式为:

[0009] PTX/CALP

[0010] 其中,PTX为紫杉醇 (Paclitaxel);CA为科罗索酸 (Corosolic Acid),LP为脂质体。该脂质体一方面具有肿瘤高渗透性,另一方面在肿瘤部位能充分发挥CA和紫杉醇的协同抗肿瘤作用,疗效显著优于传统的紫杉醇脂质体,并显著降低药物的副作用,具有极为广阔的应用前景。

[0011] 本发明所涉及的PTX/CALP,其结构为:脂质体的膜材由磷脂和CA组成,脂溶性抗肿瘤活性药物紫杉醇被包封于脂质双分子层中(如图1所示)。本发明中,所述的PTX/CALP,其特征在于,构成脂质体膜的磷脂为天然磷脂、半合成磷脂和全合成磷脂中的一种或多种;其中,所述的天然磷脂为大豆磷脂和蛋黄卵磷脂中的一种或多种;所述的半合成或全合成磷脂包括磷脂酰胆碱类(PC)、磷脂酰甘油类(PG)、磷脂酰乙醇胺类(PE)或PEG化磷脂类中的一种或多种。其中,较佳的有大豆卵磷脂(SPC/EPC)、氢化大豆卵磷脂(HSPC)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、二油酰基卵磷脂(DOPC)、二硬脂酰磷脂酰甘油(DSPG)、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE)、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇(DSPE-MPEG)中的一种或多种。

[0012] 本发明中,所述PTX/CALP中磷脂与科罗索酸的质量比为1:0.05~1:1,较佳地为1:0.2~1:0.5。

[0013] 本发明中,所述PTX/CALP中磷脂与紫杉醇的质量比为1:0.02~1:0.5,较佳的为1:0.05~1:0.1

[0014] 本发明中,所述PTX/CALP的制备方法可为薄膜分散法、注入法、冷冻干燥法中的任意一种。

[0015] 本发明中,按上市制剂力扑素®处方同法制备PTX/LP;体外稳定性与释放实验测定结果表明,PTX/CALP与PTX/LP的粒径和包封率无显著区别,并且两者具有相似的缓慢释药特性,在血清中均能保持稳定;体外细胞实验结果表明,与PTX/LP相比,PTX/CALP更易被细胞摄取,抗肿瘤细胞的活性更大;体内实验表明,PTX/CALP具有与PTX/LP相一致的药动学性

质,呈现显著的长循环特征;抗肿瘤药效研究证明,与PTX/LP相比,PTX/CALP抑制肿瘤生长的作用更强,荷瘤小鼠的生存期显著延长,说明其疗效较PTX/LP有显著提升。

[0016] 本发明所提供的一种装载紫杉醇的抗肿瘤穿膜脂质体组合具有以下显著优点:

[0017] (1) 以具有明确药理活性的科罗索酸替代胆固醇作为脂质体膜材,可制成稳定性良好的CA脂质体载体,其中CA同时兼具了脂质体膜材和治疗药物的双重作用。作为药物载体,CALP具有高效穿膜、肿瘤渗透、抗炎和抗肿瘤等多种功能(如图1所示),而由胆固醇制备的常规脂质体载体无上述功能。

[0018] (2) 由于CA与PTX联用时能显著提高抗肿瘤疗效,将PTX装载于CALP内,所制备的PTX/CALP具有增效减毒、避免多药耐药及协同抗肿瘤的优势,其抗癌效果和安全性显著优于市售的紫杉醇脂质体。

附图说明

[0019] 图1为CALP和装载紫杉醇的PTX/CALP的结构示意图。

[0020] 图2为PTX/CALP、PTX/LP的血清稳定性考察,72小时内,PTX/CALP、PTX/LP在血清中的粒径无明显变化,表明其血清稳定性良好。

[0021] 图3为PTX/CALP、PTX/LP的体外释放曲线,表明PTX/CALP与PTX/LP具有相似的释放行为,呈现缓慢释放特征,药物泄露率较低。

[0022] 图4为PTX、PTX/CALP与PTX/LP的细胞摄取程度,分别考察MCF-7和SK-OV-2细胞摄取,表明两种细胞对PTX/CALP的摄取最高。

[0023] 图5.1和5.2为PTX/CALP和PTX/LP分别对MCF-7细胞和SK-OV-3细胞的体外毒性考察,横坐标轴所示药物浓度为PTX的浓度,结果表明,PTX/CALP相比PTX/LP具有更强的抗肿瘤作用。

[0024] 图6为PTX、PTX/LP和PTX/CALP的体内药动学曲线,结果表明本发明的PTX/CALP与PTX/LP相似的药动学行为,具有体内长循环的特性。

[0025] 图7为PTX、PTX/LP和PTX/CALP的体内抗肿瘤考察,结果表明PTX/CALP具有最强的肿瘤抑制作用,能够显著抑制肿瘤的生长。

[0026] 图8为PTX、PTX/LP和PTX/CALP的体内生存期考察,结果表明经PTX/CALP治疗的荷瘤小鼠具有最长的生存期。

具体实施方式

[0027] 下面结合具体实例对本发明加以进一步的说明,但是不限制本发明的内容。下列实施实例中未注明具体条件的实验方法,按常规方法和条件操作。

[0028] 实施例1薄膜分散法制备PTX/CALP

[0029] 称取96mgDPPC,48mg科罗索酸,8mg紫杉醇,溶于氯仿/甲醇(4/1,v/v)中,得一澄清溶液;40℃水浴中旋转蒸发,去除有机溶剂,成膜,加入生理盐水,50℃旋转水化2小时,冰水浴中120W超声20分钟,得到PTX/CALP的脂质体悬液。脂质体粒径为130~145nm,电位为-4mV~-8mV,紫杉醇含药量为4.36%,CA含量为23.2%,(wt/wt)。

[0030] 实施例2注入法制备PTX/CALP

[0031] 称取12mgDSPG,6mg科罗索酸,1mg紫杉醇,溶于乙醇中,得一澄清溶液;将乙醇匀速

缓慢注入60℃的生理盐水中,1000rpm转速下不断搅拌除去乙醇,随后冰水浴中120W超声20分钟,10000rpm离心,得到PTX/CALP的脂质体悬液。粒径、电位、紫杉醇含药量及CA含量同实施例1。

[0032] 实施例4冷冻干燥法制备PTX/CALP

[0033] 称取48mgEPC,24mg科罗索酸,4mg紫杉醇,溶于乙醇中,得一澄清溶液,然后加入到100mL含甘氨酸的5%海藻糖水溶液中,通过减压蒸发除去乙醇,得到粗脂质体悬液。脂质体悬液置于高压均质机内高压(1.5kPa)5次,随后置于-80℃冰箱冷冻10小时,冷冻干燥机干燥48小时,得到白色脂质体粉末。将脂质体粉末用生理盐水重悬后,得到PTX/CALP的脂质体悬液。粒径、电位、紫杉醇含药量及CA含量同实施例1。

[0034] 实施例5冷冻干燥法制备常规紫杉醇脂质体 (PTX/LP)

[0035] 称取48mgSPC,24mg胆固醇,4mg紫杉醇,溶于异丙醇中,得一澄清溶液,然后加入到100mL含赖氨酸的5%蔗糖水溶液中。通过减压蒸发除去叔丁醇,得到粗脂质体悬液。脂质体悬液置于高压均质机内高压(1.5kPa)5次,随后置于-80℃冰箱冷冻10小时,冷冻干燥机干燥48小时,得到白色脂质体粉末。将脂质体粉末用5%葡萄糖溶液重悬后,得到PTX/LP的脂质体悬液。脂质体粒径为120~140nm,电位为-1mV~-3mV,紫杉醇的载药量为4.23%(wt/wt)。

[0036] 实施例6PTX/CALP的血清稳定性考察

[0037] 取PTX/LP与PTX/CALP,置于含10%胎牛血清与10%青霉素-链霉素的PBS溶液中(pH7.4),37℃恒温震荡孵育。于固定时间点测量粒径,考察其血清稳定性。结果如附图2所示,96小时内,PTX/LP和PTX/CALP在血清中的粒径均无明显变化,表明其血清稳定性良好。

[0038] 实施例7脂质体的体外释放测定

[0039] 取PTX/LP、PTX/CALP于透析袋中,以pH7.4的PBS缓冲溶液作为透析袋外液,37℃恒温振荡。于固定时间点,取透析袋外液,HPLC测定阿霉素的含量,计算累计释放百分率。结果如附图3所示,表明PTX/CALP具有与PTX/LP相似的缓释性质,药物泄露率低于30%。

[0040] 实施例8PTX/CALP的体外摄取考察

[0041] 取处于对数生长期的MCF-7与SK-OV-3细胞,以40000个/孔接种于24孔板,待细胞生长至约80%汇合度时,分别加入50μg/mL的PTX以及含有50μg/mLPTX的PTX/CALP与PTX/LP,继续孵育4小时后用4℃的PBS(pH7.4)清洗并消化,超声粉碎细胞,用有机溶剂萃取被细胞摄取的PTX,在乙腈:水(60:40,v/v);紫外检测波长227nm条件下HPLC检测PTX含量。考察结果如附图4所示,PTX/CALP组中摄取细胞的百分率比PTX/LP组高出约2-3倍,比游离PTX高出约17-20%,表明PTX/CALP更易被细胞摄取。

[0042] 实施例9PTX/CALP的体外毒性考察

[0043] 取处于对数生长期的MCF-7细胞和SK-OV-3细胞,1000个/孔接种于96孔板,37℃培养24小时后,分别加入不同浓度的游离PTX、PTX/LP以及PTX/CALP。继续培养48小时后每孔加入0.2mL含0.5mg/mLMTT的无血清培养液,继续孵育4小时后吸去培养液,加入0.2mLDMSO,待溶解均匀后用酶标仪测定吸光度值($\lambda=570\text{nm}$),计算细胞活力的抑制情况。考察结果如附图5.1和5.2所示,表明了PTX/CALP较游离PTX和PTX/LP对肿瘤细胞具有更高的毒性及协同作用。

[0044] 实施例10PTX/CALP的药动力学考察

[0045] 取SD大鼠随机分组,每组6只,分别经尾静脉注射PTX、PTX/LP与PTX/CALP,药物剂量相当于5mgPTX/kg体重,分别于以下时间点眼部取血:PTX组的取样时间点为5min、0.25h、0.5h、1h、2h、3h、6h、12h和24h;脂质体组的取样时间为0.5h、3h、6h、12h、24h、48h和72h。处理血浆样品后,测定PTX的浓度。结果如附图6所示。实验表明PTX/CALP具有与PTX/LP相似的药动学性质。相比游离药物,表现出肿瘤组织的靶向性以及体内长循环的特性。

[0046] 实施例11PTX/CALP的体内药效学考察

[0047] 取BALB/c雌性小鼠随机分组,每组8只,建立4T1原位乳腺癌模型,当肿瘤长至100mm³时开始给药。分别经尾静脉注射PTX、PTX/LP和PTX/CALP,药物剂量相当于2mgPTX/kg体重,每隔三天注射一次,记录肿瘤体积的变化,绘制生存曲线;结果如附图7和附图8所示,显示PTX/CALP具有最强的肿瘤抑制效果,并显著延长荷瘤小鼠的生存期。

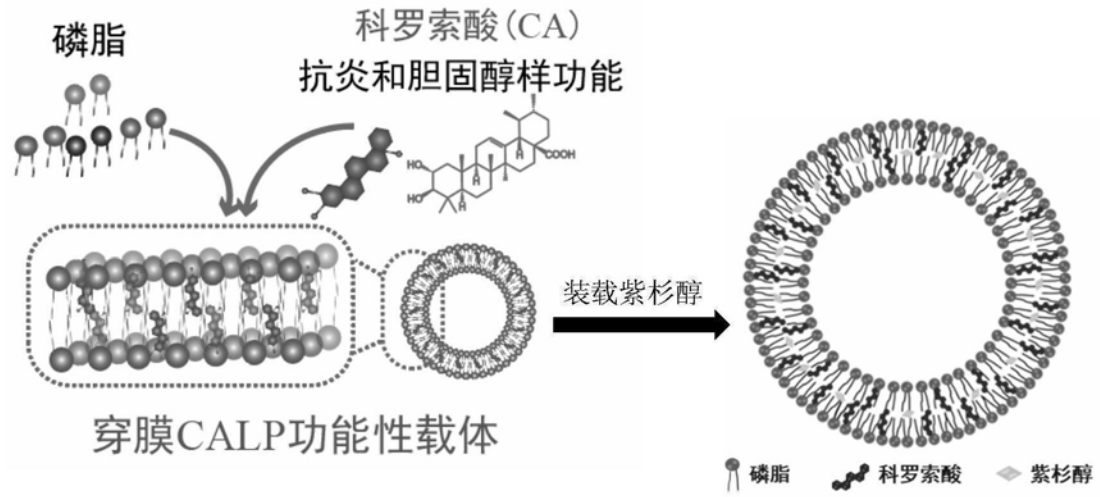


图1

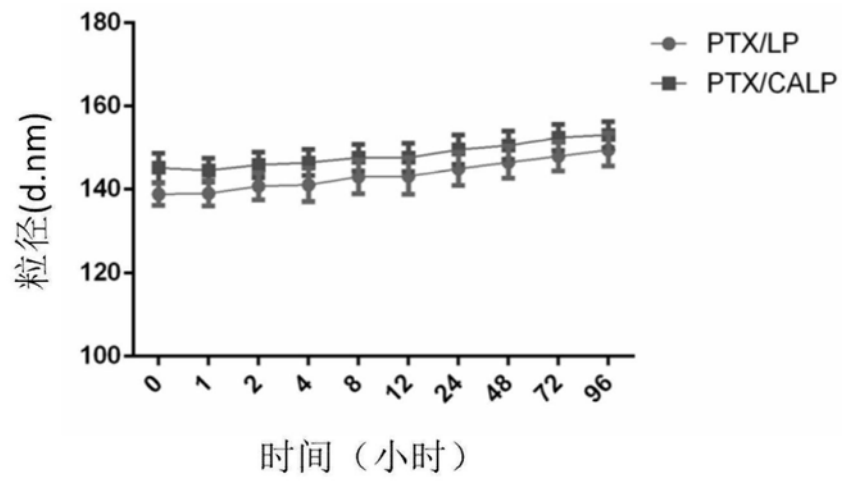


图2

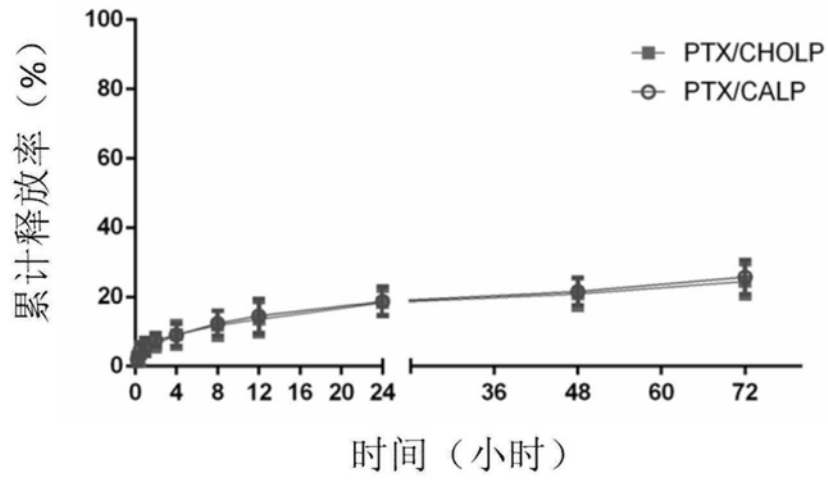


图3

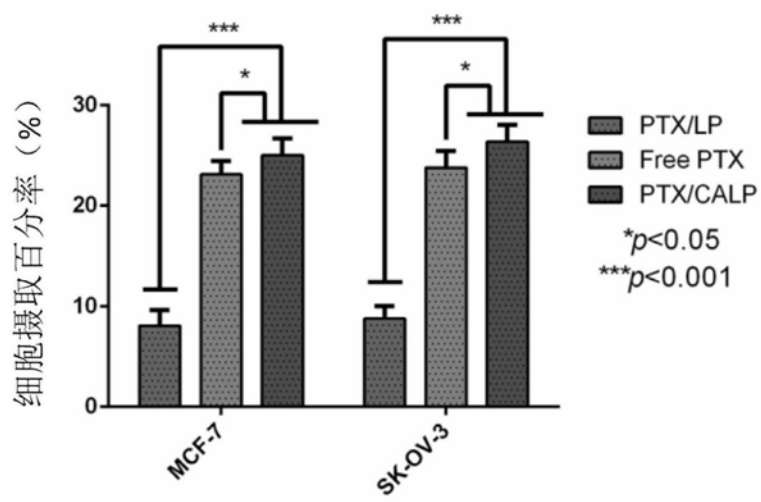
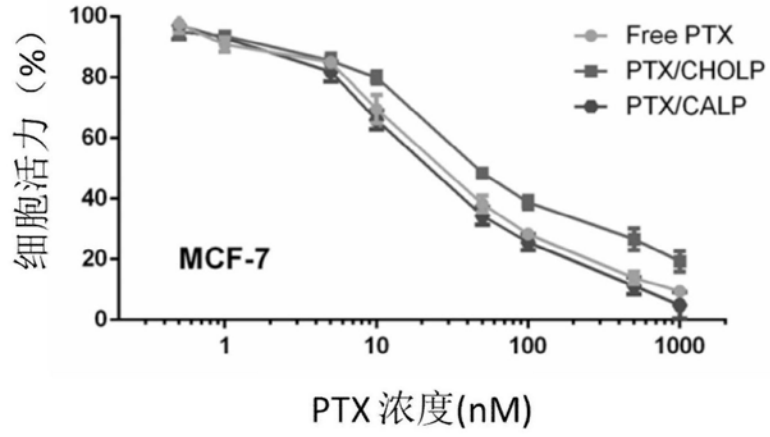


图4

1



2

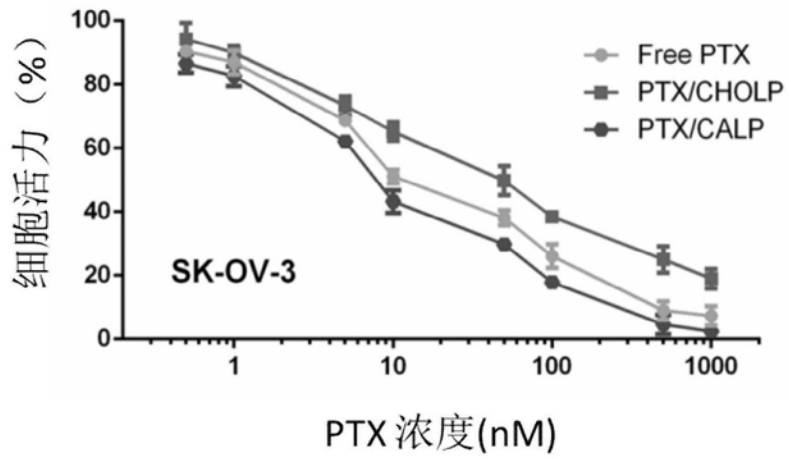


图5

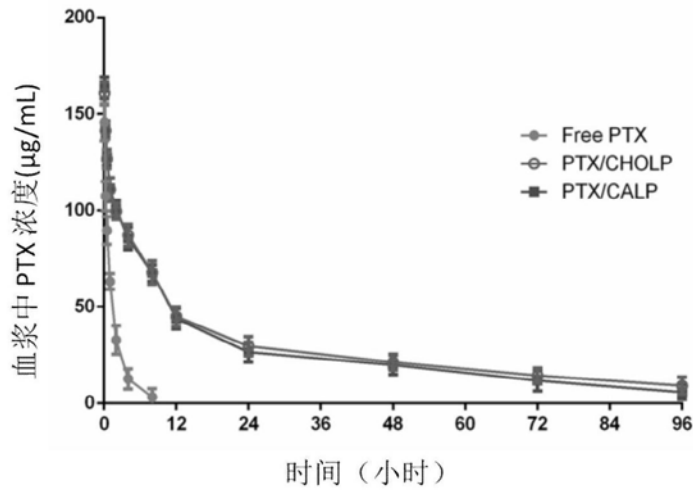


图6

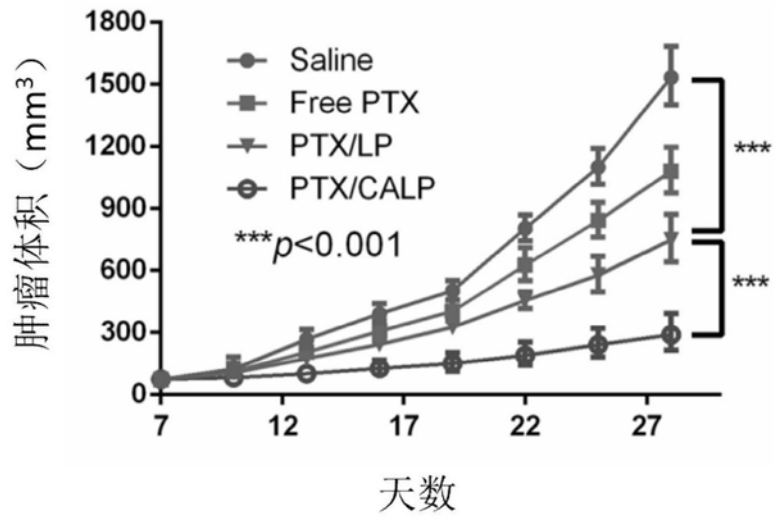


图7

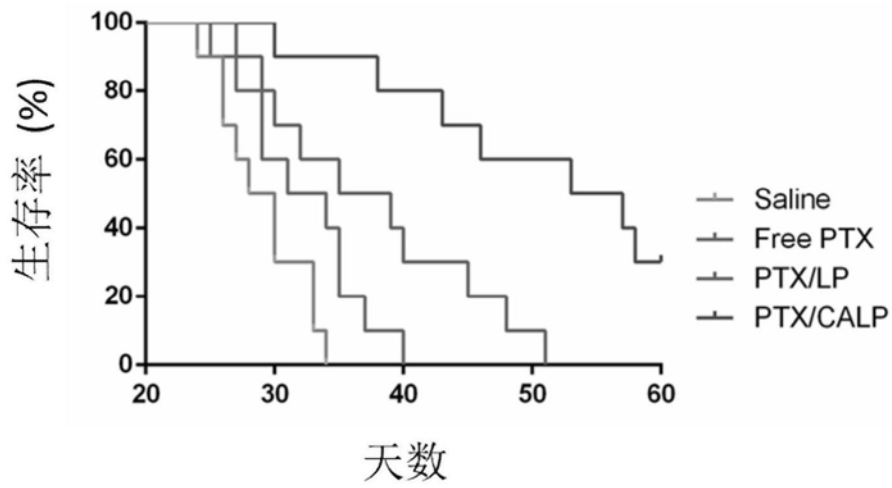


图8