

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200410022041.7

[51] Int. Cl.

A61K 31/475 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 47/24 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 12 月 13 日

[11] 授权公告号 CN 1289088C

[22] 申请日 2004.3.15

[21] 申请号 200410022041.7

[73] 专利权人 重庆科美纳米生物技术有限公司

地址 400030 重庆市沙坪坝区华宇广场时代
代星空 23-1

[72] 发明人 孙平 陈艾迪 胡武生

审查员 李晓林

[74] 专利代理机构 重庆创新专利商标代理有限公司

代理人 宫兆斌

权利要求书 3 页 说明书 6 页

[54] 发明名称

提高喜树碱或其衍生物的脂质体包封率的方法

[57] 摘要

本发明公开了一种提高喜树碱或其衍生物的脂质体包封率的方法，该方法包括以下步骤：制备喜树碱或其衍生物与磷脂以及胆固醇膜材成份的混合干膜或粉末、制备喜树碱或其衍生物的脂质体悬浮液体、通过调节脂质体悬浮液体外相的 pH 值制备具有高包封率的喜树碱或其衍生物的脂质体；采用本发明的方法制备的喜树碱或其衍生物的脂质体，其药物包封率达 75% - 100%，大大提高了生物利用度，且抗癌活性成份结构稳定。

1、提高喜树碱或其衍生物的脂质体包封率的方法，其特征在于包括以下步骤：

(a) 按下列组分（重量比）配料：

喜树碱或其衍生物 0.01%~20%、磷脂 0.1%~50%、胆固醇 0.05%~30%、水溶性填充剂 0~50%、酸性 PH 调节剂、碱性 pH 调节剂适量，活性成分为喜树碱或其衍生物；

(b) 制备喜树碱或其衍生物的脂质体膜材成分的混合物干膜或粉末

将喜树碱或其衍生物、磷脂、胆固醇溶解于有机溶剂中，用干燥的方法获得喜树碱或其衍生物的脂质体膜材成分的混合物干膜或粉末；

(c) 制备喜树碱或其衍生物的脂质体悬浮液体

在所获得的喜树碱或其衍生物的混合物干膜或粉末中加入适量含有或不含水溶性填充剂、PH 值为 7.5~13.0 的碱性 PH 调节剂，待喜树碱或其衍生物与脂质体膜材成分的混合物干膜或粉末充分水化后，再通过粒径处理获得粒径为 10~3000 纳米的脂质体悬浮液体；

(d) 制备具有高包封率的喜树碱或其衍生物的脂质体

用干燥方法将所获得的喜树碱或其衍生物的脂质体悬浮液浓缩，然后加入酸性 PH 调节剂调节脂质体悬浮液外相的 PH 值至 2.5~6.5，制得具有高包封率的喜树碱或其衍生物的脂质体。

步骤 (a) 中所述喜树碱衍生物选自 10-羟基喜树碱、7-乙基-10-羟基喜树碱、9-氨基喜树碱和 9-硝基喜树碱中的一种或多种。

2、根据权利要求 1 所述的提高喜树碱或其衍生物的脂质体包封率的方法，其特征在于：步骤 (a) 中所述磷脂选自磷脂酰胆碱、磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨

酸、蛋黄卵磷脂、氢化大豆磷脂和非氢化大豆磷脂中的一种或多种。

3、根据权利要求1所述的提高喜树碱或其衍生物的脂质体包封率的方法，其特征在于：步骤（a）中所述水溶性填充剂选自淀粉、右旋糖酐、乳糖、麦芽糖、蔗糖、甘露醇、明胶、山梨醇、氯化钠、聚乙烯吡咯酮和聚乙烯醇中的一种或多种。

4、根据权利要求1所述的提高喜树碱或其衍生物的脂质体包封率的方法，其特征在于：步骤（a）中所述碱性 pH 调节剂选自有机碱、无机碱、盐类中的一种或多种，酸性 pH 调节剂选自有机酸、无机酸中的一种或多种。

5、根据权利要求5所述的提高喜树碱或其衍生物的脂质体包封率的方法，其特征在于：所述有机碱选自四乙胺、甘油磷酸胆碱和丁胺中的一种或多种。

6、根据权利要求5所述的提高喜树碱或其衍生物的脂质体包封率的方法，其特征在于：所述无机碱选自氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化钙和氢氧化镁中的一种或多种。

7、根据权利要求5所述的提高喜树碱或其衍生物的脂质体包封率的方法，其特征在于：所述有机酸选自柠檬酸、乳酸、精氨酸、甘氨酸、丝氨酸、枸橼酸、甲酸和乙酸中的一种或多种。

8、根据权利要求5所述的提高喜树碱或其衍生物的脂质体包封率的方法，其特征在于：所述无机酸选自盐酸、磷酸和硼酸中的一种或多种。

9、根据权利要求5所述的提高喜树碱或其衍生物的脂质体包封率的方法，其特征在于：所述盐类选自乙酸钠、乙酸胺、乙酸钾、柠檬酸钠、柠檬酸钾和乳酸钠中的一种或多种。

10、根据权利要求1所述的提高喜树碱或其衍生物的脂质体包封率的方法，其特征在于：步骤（b）中所述有机溶剂选自直链醇类、支链醇类、三氯甲烷、

二氯甲烷和正己烷中的一种或几种。

11、根据权利要求1所述的提高喜树碱或其衍生物的脂质体包封率的方法，其特征在于：步骤（b）和（d）中所述的干燥方法可选用减压干燥、真空冷冻干燥、喷雾干燥、离心干燥和流床干燥中的一种或几种。

12、根据权利要求1所述的提高喜树碱或其衍生物的脂质体包封率的方法，其特征在于：步骤（c）中所述的粒径处理方法可选用超声、高速搅拌、膜挤压、高剪切力匀浆和高压微流的一种或几种。

提高喜树碱或其衍生物的脂质体包封率的方法

技术领域

本发明涉及喜树碱或其衍生物的脂质体，特别涉及提高喜树碱或其衍生物的脂质体包封率的方法。

背景技术

喜树碱或其衍生物是 DNA 合成抑制剂，用于多种癌症疾病的治疗。喜树碱或其衍生物以拓扑异构酶为作用部位，靶抑制 DNA 的合成而发挥抗癌作用的药物，适用于不同生长速度的肿瘤，细胞毒性强，对于胃癌、肝癌、骨癌、白血病、膀胱癌等多种恶性肿瘤的治疗效果明显。目前市场上喜树碱类药物的品种有喜树碱、羟基喜树碱、7-乙基-10-羟基喜树碱、9-氨基喜树碱等，通过静脉、口服、外用、肺部黏膜吸如等方式给药。

现有技术制备的喜树碱或其衍生物制剂，在临床使用中存在半衰期短、生物利用度低并且毒副作用明显等缺点，而且由于喜树碱或其衍生物的难溶性，在制备过程中多选用高 pH 值的碱性溶剂体系，使活性成份大大降低，活性结构不稳定，而且靶向性也差，从而导致抗癌活性受到限制，降低了治疗指数及安全指数。为解决上述技术缺陷，人们采用了用脂质体包封喜树碱及其衍生物，提高药物的溶解度，增强药物靶向性，提高生物利用度以及降低毒副作用。常规脂质体的制备方法包括用易挥发的一种或多种有机溶剂混合物溶解多层或双层组成成分，然后在不分相的条件下蒸发有机溶剂，干脂混合物通常以薄层方式沉淀在反应器的壁上，再用水相介质水化包封活性物，这种水化和包封在干脂层很薄时非常有效，该方法有效地提高了活性成分的稳定性和靶向性，但只

能在实验室中实现，不适于规模化生产。ZL95190971.1 公开了一种脂质体前体、高效包载力脂质体的制备方法、装置及应用。该方法通过一层或多层形成脂类化合物的薄层溶解在至少一种有机溶剂中形成具有高效包载力的脂质体。该技术解决了规模化生产的问题，但要求被包封药物具有良好的亲水性或亲脂性，对既不亲水亦不亲脂的喜树碱或其衍生物不适用。针对上述缺陷，ZL95192734.5 公开了一种增大包封量的脂质体，该技术采用含有基本饱和脂肪酸基的中性磷脂和含有基本饱和脂肪酸的带电磷脂来制备脂质体膜，有效地解决了水溶性非电解质药物包封在脂质体中，提高了活性药物的包封量，但喜树碱或其衍生物具有难溶性的化学特点，不适用该法。ZL95115156.8 公开了另一种注射用脂质体药物制剂，该制剂是用短链脂肪酸作为稳定剂的脂质体形式的亲脂性、难溶性活性化合物的脂质体，提高了活性化合物的稳定性，但脂质体的包封率仍较低，仅能达到 10%-30%。因此上述现有技术都未能解决喜树碱或其衍生物脂质体的包封率问题，且制备工艺复杂，所获得的制剂不稳定，质量控制难度高，工业化生产难度大。

发明内容

针对上述现有技术存在的问题，本发明目的在于提供一种提高喜树碱及其衍生物的脂质体的包封率，使用本发明方法制备的喜树碱及其衍生物的脂质体药物活性成分结构稳定，用药靶向性强，药物包封率高于 75%，并适于工业化生产。

本发明提供的提高喜树碱或其衍生物的脂质体包封率的方法，其特征在于包括以下步骤：

提高喜树碱或其衍生物的脂质体包封率的方法，其特征在于包括以下步骤：

a) 按下列组分（重量比）配料：

喜树碱或其衍生物 0.01%~20%、磷脂 0.1%~50%、胆固醇 0.05%~30%、水溶性填充剂 0~50%、酸性 PH 调节剂及碱性 pH 调节剂适量，活性成分为喜树碱或其衍生物；

(b) 制备喜树碱或其衍生物的脂质体膜材成分的混合物干膜或粉末

将喜树碱或其衍生物、磷脂、胆固醇溶解于有机溶剂中，用干燥的方法获得喜树碱或其衍生物的脂质体膜材成分的混合物干膜或粉末；

(c) 制备喜树碱或其衍生物的脂质体悬浮液体

在所获得的喜树碱或其衍生物的混合物干膜或粉末中加入适量含有或不含水溶性填充剂、PH 值为 7.5~13.0 的碱性 PH 调节剂，待喜树碱或其衍生物与脂质体膜材成分的混合物干膜或粉末充分水化后，再通过粒径处理获得粒径为 10~3000 纳米的脂质体悬浮液体；

(d) 制备具有高包封率的喜树碱或其衍生物的脂质体

用干燥方法将所获得的喜树碱或其衍生物的脂质体悬浮液浓缩，然后加入酸性 PH 调节剂调节脂质体悬浮液外相的 PH 值至 2.5~6.5，制得具有高包封率的喜树碱或其衍生物的脂质体。

进一步，步骤 (a) 中所述喜树碱衍生物选自 10-羟基喜树碱、7-乙基-10-羟基喜树碱、9-氨基喜树碱和 9-硝基喜树碱中的一种或多种；步骤 (a) 中所述磷脂选自磷脂酰胆碱、磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸、蛋黄卵磷脂、氢化大豆磷脂和非氢化大豆磷脂中的一种或多种；步骤 (a) 中所述水溶性填充剂选自淀粉、右旋糖酐、乳糖、麦芽糖、蔗糖、甘露醇、明胶、山梨醇、氯化钠、聚乙烯吡咯酮和聚乙烯醇中的一种或多种；步骤 (a) 中所述碱性 pH 调节剂选自有机碱、无机碱、盐类中的一种或多种，酸性 pH 调节剂选自有机酸、无机酸中的一种或多种；所述有机碱选自四乙胺、甘油磷酸胆碱和丁胺中的一种或多种；所述无

机碱选自氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化钙和氢氧化镁中的一种或多种；所述有机酸选自柠檬酸、乳酸、精氨酸、甘氨酸、丝氨酸、枸橼酸、甲酸和乙酸中的一种或多种；所述无机酸选自盐酸、磷酸和硼酸中的一种或多种；所述盐类选自乙酸钠、乙酸胺、乙酸钾、柠檬酸钠、柠檬酸钾和乳酸钠中的一种或多种；步骤（b）中所述有机溶剂选自直链醇类、支链醇类、三氯甲烷、二氯甲烷和正己烷中的一种或几种；步骤（b）和（d）中所述的干燥方法可选用减压干燥、真空冷冻干燥、喷雾干燥、离心干燥和流床干燥中的一种或几种；步骤（c）中所述的粒径处理方法可选用超声、高速搅拌、膜挤压、高剪切力匀浆和高压微流的一种或几种。

本发明提供的提高喜树碱或其衍生物的脂质体包封率的方法，通过采用独创的调节喜树碱或其衍生物的脂质体悬浮液体及脂质体悬浮液体外相的 PH 值的方法，使所制备的喜树碱或其衍生物的脂质体活性药物包封率由现有技术的 10%-30%到高于 75%，解决了现有技术中制备具有难溶性特点的喜树碱或其衍生物的脂质体低包封率技术难题，并可实现工业化放大生产。

具体实施方式

下面的实施例仅对本发明作进一步说明，而不是限制本发明。

实施例 1

按配方称取喜树碱 62.5g、磷脂酰胆碱 300g、胆固醇为 200g，将其混合并溶于体积比为 1：1 的三氯甲烷、甲醇混合溶液 2 升中，充分搅拌使其溶解，然后采用真空减压方式除去混合溶液中的有机溶剂，获得喜树碱混合物干膜；将 437.5g 淀粉作为水溶性添加剂加入到 10 升、pH 值为 12 的氢氧化钾/硼酸溶液中，制得碱性缓冲溶液，在所获得的混合物干膜中加入该缓冲溶液洗膜，使其充分水化，形成多层大脂质体，然后根据静脉以及肺粘膜吸入给药的粒径要求，采

用膜挤压粒径处理方式获得粒径为 10-1000 纳米的单层脂质体悬浮液体,然后用真空减压的方法除去缓冲溶液中的水分,使除水分后的体积为除水分前的 50%,再用 1N 盐酸调节除水分后的脂质体外相至 pH 值为 5.5,得高包封喜树碱的脂质体悬浮液体。

测定喜树碱的脂质体包封率

取所获得的脂质体悬液 0.5ml,用磷酸缓冲液将脂质体悬浮液稀释 10 倍,用高压液相仪 (HPLC) 测定药物总量,记为 $W_{总}$,然后超高速离心,取离心沉淀,用高压液相仪 (HPLC) 测定喜树碱浓度,从而获得药物的被包封量,记为 $W_{包}$,利用公式包封率= $(W_{包}/W_{总})$, 高压液相仪 (HPLC) 根据采集的数据计算出包被的喜树碱的脂质体包封率为 95.5%。

实施例 2

按配方称取 10-羟基喜树碱 200g、磷脂酰胆碱 300g、胆固醇为 500g,将其混合并溶于体积比为 1:1 的三氯甲烷、甲醇混合溶液 2 升中,充分搅拌使其溶解,采用真空减压方法除去混合溶液中的有机溶剂,获得喜树碱混合物干膜;用 8 升 pH 值为 10 的氢氧化钾/硼酸碱性缓冲液作为 pH 调节剂,在所获得的混合物干膜中加入该 pH 调节剂洗膜,使其充分水化,形成多层大脂质体,然后根据皮肤和口服给药的粒径要求,采用膜挤压粒径处理方式获得粒径为 1000-3000 纳米的单层脂质体悬浮液体,用真空减压的方法除去缓冲液中的水分,使总体积为除水分前的 50%。用 1N 盐酸调节除水分后的脂质体外相至 pH 值为 4.5,得高包封喜树碱的脂质体悬液。

测定羟基喜树碱的脂质体包封率

取获得的脂质体悬液 0.5ml,用磷酸缓冲液将脂质体悬浮液稀释 10 倍,用高压液相仪 (HPLC) 测定药物总量,记为 $W_{总}$,然后超高速离心,取离心沉淀,

测定喜树碱浓度，从而获得药物的被包封量，记为 $W_{包}$ ，利用公式包封率= ($W_{包}/W_{总}$)，高压液相仪 (HPLC) 根据采集的数据计算出包被的喜树碱的脂质体包封率为 90.5%。

实施例 3

按配方称取 7-乙基-10-羟基喜树碱 100g、磷脂酰胆碱 400g、胆固醇 200g，将其混合并溶于体积比为 1: 1 的三氯甲烷、甲醇的混合溶液 2 升中，充分搅拌使其溶解，然后采用真空减压方法除去混合溶液中的有机溶剂，获得喜树碱混合物干膜;将 300g 甘露醇作为水溶性添加剂加入到 8 升 pH 值为 13 的氢氧化钾/硼酸碱性 pH 调节剂中，制得碱性缓冲溶液，在所获得的混合物干膜中加入该缓冲溶液洗膜，使其充分水化，形成多层大脂质体，然后根据皮肤和口服给药的粒径要求，采用膜挤压粒径处理方式获得粒径为 1000-3000 纳米的单层脂质体悬浮液体，然后用真空减压的方法除去缓冲液中的水分，使除水分后的总体积为除水分前的 20%,用 1N 盐酸调节除水分后的脂质体外相至 pH 值为 2.5，得高包封喜树碱的脂质体悬液。

测定 7-乙基-10-羟基喜树碱的脂质体包封率

取获得的脂质体悬浮液 0.5ml，用磷酸缓冲液将脂质体悬浮液稀释 10 倍，用高压液相仪 (HPLC) 测定药物总量，记为 $W_{总}$ ，然后超高速离心，取离心沉淀，测定喜树碱浓度，从而获得药物的被包封量，记为 $W_{包}$ ，利用公式包封率= ($W_{包}/W_{总}$)，高压液相仪 (HPLC) 根据采集的数据计算出包被的 7-乙基-10-羟基喜树碱的脂质体包封率为 78%。