



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114177278 A

(43) 申请公布日 2022.03.15

(21) 申请号 202111212295.5 *A61K 47/28* (2006.01)

(22) 申请日 2021.10.18 *A61K 47/38* (2006.01)

(71) 申请人 山东多美康生物医药有限公司 *A61K 47/36* (2006.01)

地址 274100 山东省菏泽市定陶区天中街 *A61P 39/00* (2006.01)

道青年路和定碭路交叉口往东218米
路北

(72) 发明人 郭志栋 黄桂华 单如梦

(74) 专利代理机构 北京华夏泰和知识产权代理
有限公司 11662

代理人 阴亮

(51) Int. Cl.

A61K 38/39 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 9/06 (2006.01)

A61K 47/24 (2006.01)

权利要求书1页 说明书16页 附图3页

(54) 发明名称

脂质体制备

(57) 摘要

公开了脂质体,其包含磷脂、胆固醇和重组III型人源化胶原蛋白,其中所述磷脂的重量与所述胆固醇的重量之比为3-7.5:1,所述重组III型人源化胶原蛋白的重量与所述磷脂和所述胆固醇的重量之比为1:5-15。

1. 脂质体,其包含磷脂、胆固醇和重组III型人源化胶原蛋白,其中所述磷脂的重量与所述胆固醇的重量之比为3-7.5:1,所述重组III型人源化胶原蛋白的重量与所述磷脂和所述胆固醇的重量之比为1:5-15。

2. 如权利要求1所述的脂质体,其中所述磷脂选自磷酸甘油酯和鞘磷脂。

3. 如权利要求2所述的脂质体,其中所述磷酸甘油酯选自磷脂酰胆碱(Phosphatidyl cholines,PC)、磷脂酰乙醇胺(Phosphatidyl ethanolamines,PE)、磷脂酰丝氨酸(Phosphatidyl serines,PS)、磷脂酰肌醇(Phosphatidyl inositols,PI)、磷脂酰甘油(Glycerophospholipid,PG)、甘油磷脂酸(phosphatidic acid,PA)、大豆磷脂、蛋黄卵磷脂或其任意混合物。

4. 凝胶剂,其包含权利要求1至4中任一权利要求所述的脂质体以及凝胶剂基质。

5. 如权利要求4所述的凝胶剂,其中所述凝胶剂基质选自卡波姆、羧甲基纤维素钠(CMC-Na)、羟丙基甲基纤维素(HPMC)、甲基纤维素、壳聚糖、海藻酸钠或其任意混合物。

6. 如权利要求4或5所述的凝胶剂,其中所述凝胶剂还包含吐温,优选基于所述凝胶剂的重量,所述吐温的含量为1%至4%重量比。

7. 如权利要求4至6中任一权利要求所述的凝胶剂,其中基于所述凝胶剂的重量,所述磷脂和所述胆固醇的含量为0.6%至1.5%重量比。

8. 制备脂质体的方法,其包括:

将磷脂和胆固醇溶于醇中,蒸发除去所述醇,得到脂质薄膜;

将重组III型人源化胶原蛋白、吐温和蒸馏水混合,得到混合溶液;以及

将所述脂质薄膜与所述混合溶液混合并水化,过滤从而得到所述脂质体,

其中所述磷脂的重量与所述胆固醇的重量之比为3-7.5:1,所述重组III型人源化胶原蛋白的重量与所述磷脂和所述胆固醇的重量之比为1:5-15。

9. 如权利要求8所述的方法,其中所述吐温的浓度为10%体积比。

10. 如权利要求8或9所述的方法,其中所述水化时间为15分钟至30分钟。

脂质体制备

[0001] 领域

[0002] 本公开大体上涉及制剂领域,更具体地,本公开涉及脂质体。

[0003] 背景

[0004] 胶原蛋白是一组由多种糖蛋白分子组成的大家族,结缔组织的主要蛋白质成分,约占人体总蛋白的25%。到目前为止,发现了至少30余种胶原蛋白链的编码基因,这些不同的胶原蛋白链,以不同的方式组合,可以至少形成16种以上的胶原蛋白分子。16种不同类型的胶原蛋白分子大多是由3条 α 链绞合而成,形似棒状。其中有的由3条相同的 α 链如 $[\alpha_1]_3$ 组成均相三聚体,也有的由3条不同的 α 链如 $[\alpha_1]_2\alpha_2$ 或 $\alpha_1\alpha_2\alpha_3$ 组成异相三聚体。 α 链的大小一般在600至1000个氨基酸间变化。新的胶原蛋白链以及胶原蛋白类型正在不断地被发现。在分子结构上,每条胶原肽链主要由Gly-X-Y(X、Y是Gly之外的任何氨基酸残基)三联体重复构成,这种独特的结构是形成胶原纤维高级结构所必需的,它决定了胶原蛋白优良的生物相容性和低免疫原性,已广泛应用于医药、保健品及化妆品行业中。

[0005] 概述

[0006] 一方面,本公开涉及脂质体,其包含磷脂、胆固醇和重组III型人源化胶原蛋白,其中所述磷脂的重量与所述胆固醇的重量之比为3-7.5:1,所述重组III型人源化胶原蛋白的重量与所述磷脂和所述胆固醇的重量之比为1:5-15。

[0007] 另一方面,本公开涉及凝胶剂,其包含本公开所述的脂质体以及凝胶剂基质。

[0008] 再一方面,本公开涉及制备脂质体的方法,其包括:

[0009] 将磷脂和胆固醇溶于醇中,蒸发除去所述醇,得到脂质薄膜;

[0010] 将重组III型人源化胶原蛋白、吐温和蒸馏水混合,得到混合溶液;以及

[0011] 将所述脂质薄膜与所述混合溶液混合并水化,过滤从而得到所述脂质体,

[0012] 其中所述磷脂的重量与所述胆固醇的重量之比为3-7.5:1,所述重组III型人源化胶原蛋白的重量与所述磷脂和所述胆固醇的重量之比为1:5-15。

[0013] 附图简要说明

[0014] 图1示出了药脂比对重组III型人源化胶原蛋白脂质体粒径、包封率(EE)和载药量(DL)的影响;

[0015] 图2示出了磷脂与胆固醇之比对重组III型人源化胶原蛋白脂质体粒径、包封率(EE)和载药量(DL)的影响;

[0016] 图3示出了吐温80浓度对重组III型人源化胶原蛋白脂质体粒径、包封率(EE)和载药量(DL)的影响;

[0017] 图4示出了水化时间对重组III型人源化胶原蛋白脂质体粒径、包封率(EE)和载药量(DL)的影响;

[0018] 图5示出了凝胶剂在硅胶干燥器中的失水率-时间曲线;以及

[0019] 图6示出了凝胶剂在相对湿度为43%干燥器中的失水率-时间曲线。

[0020] 详述

[0021] 在以下的说明中,包括某些具体的细节以对各个公开的实施方案提供全面的理

解。然而,相关领域的技术人员会认识到,不采用一个或多个这些具体的细节,而采用其它方法、部件、材料等的情况下仍实现实施方案。

[0022] 除非本申请中另有要求,在整个说明书和所附的权利要求书中,词语“包括”、“包含”、“含有”和“具有”应解释为开放式的、含括式的意义,即“包括但不限于”。

[0023] 在本公开和所附权利要求书中使用时,除非上下文另有明确规定,否则不带数量指示的单数指称物包括复数指称物。

[0024] 在整个说明书中提到的“一实施方案”、“实施方案”、“在另一实施方案中”或“在某些实施方案中”意指在至少一实施方案中包括与该实施方案所述的相关的具体参考要素、结构或特征。因此,在整个说明书中不同位置出现的短语“在一实施方案中”或“在实施方案中”或“在另一实施方案中”或“在某些实施方案中”不必全部指同一实施方案。此外,具体要素、结构或特征可以任何适当的方式在一个或多个实施方案中结合。

[0025] 应当理解,在本公开的说明书和所附的权利要求书中用到的单数形式的冠词“一”(对应于英文“a”、“an”和“the”)包括复数的对象,除非文中另外明确地规定。因此,例如提到的包含“重组人源化胶原蛋白”的冻干粉包括一种重组人源化胶原蛋白,或两种或多种重组人源化胶原蛋白。

[0026] 定义

[0027] 在本公开中,术语“脂质体”系指将活性成分包封于类脂质双分子层内而形成的微型囊泡。

[0028] 在本公开中,术语“重组人源化胶原蛋白”系指由DNA重组技术制备的人胶原蛋白特定型别基因编码的全长或部分氨基酸序列片段,或是含人胶原蛋白功能片段的组合。

[0029] 在本公开中,术语“III型”系指基于胶原蛋白COL3A1基因或部分基因编码的重组胶原蛋白。

[0030] 在本公开中,术语“磷脂”系指含有磷酸的脂类。

[0031] 在本公开中,术语“磷酸甘油酯”系指主链为甘油-3-磷酸,甘油分子中的另外两个羟基都被脂肪酸所酯化,磷酸基团又可被各种结构不同的小分子化合物酯化后形成各种磷酸甘油酯。

[0032] 在本公开中,术语“鞘磷脂”系指含鞘氨醇或二氢鞘氨醇的磷脂。

[0033] 在本公开中,术语“水化”系指物质在水中溶解。

具体实施方式

[0034] 一方面,本公开涉及脂质体,其包含磷脂、胆固醇和重组III型人源化胶原蛋白,其中所述磷脂的重量与所述胆固醇的重量之比约为3-7.5:1,所述重组III型人源化胶原蛋白的重量与所述磷脂和所述胆固醇的重量之比约为1:5-15。

[0035] 在某些实施方案中,磷脂的重量与胆固醇的重量之比约为7.5:1。

[0036] 在某些实施方案中,磷脂的重量与胆固醇的重量之比为7.5:1。

[0037] 在某些实施方案中,重组III型人源化胶原蛋白的重量与磷脂和胆固醇的重量之比约为1:10。

[0038] 在某些实施方案中,重组III型人源化胶原蛋白的重量与磷脂和胆固醇的重量之比约为1:10。

[0039] 在某些实施方案中,能够用于本公开的磷脂的示例性实例包括但不限于磷酸甘油酯和鞘磷脂。

[0040] 在某些实施方案中,能够用于本公开的磷酸甘油酯的示例性实例包括但不限于磷脂酰胆碱(Phosphatidyl cholines,PC)、磷脂酰乙醇胺(Phosphatidyl ethanolamines,PE)、磷脂酰丝氨酸(Phosphatidyl serines,PS)、磷脂酰肌醇(Phosphatidyl inositols,PI)、磷脂酰甘油(Glycerophospholipid,PG)、甘油磷脂酸(phosphatidic acid,PA)、大豆磷脂和蛋黄卵磷脂。

[0041] 在本公开中,蛋黄卵磷脂是从蛋黄中提取得到,具有价格低、中性电荷、化学惰性的性质,而且是细胞膜的主要的磷脂成分,生物相容性好,无免疫原性,蛋黄卵磷脂分散在水相时,分子的疏水尾部倾向于聚集在一起,避开水相,而亲水头部暴露于水相,形成具有双分子结构的封闭囊泡,将水溶性的重组III型人源化胶原蛋白包裹在囊泡内水相中,从而制备得到重组III型人源化胶原蛋白脂质体。

[0042] 在本公开中,胆固醇是生物膜中重要成分之一,它本身不会形成脂质双分子层结构,但它能以高浓度方式掺入磷脂膜中,起着调节膜结构流动性的作用。

[0043] 另一方面,本公开涉及凝胶剂,其包含本公开所述的脂质体以及凝胶剂基质。

[0044] 在某些实施方案中,能够用于本公开的凝胶剂基质的示例性实例包括但不限于卡波姆、羧甲基纤维素钠(CMC-Na)、羟丙基甲基纤维素(HPMC)、甲基纤维素、壳聚糖和海藻酸钠。

[0045] 在某些实施方案中,凝胶剂还包含吐温。

[0046] 在某些是实施方案中,基于凝胶剂的重量,吐温的含量约为0%至4%重量比。

[0047] 在某些是实施方案中,基于凝胶剂的重量,吐温的含量为0%至4%重量比。

[0048] 在某些是实施方案中,基于凝胶剂的重量,吐温的含量约为0.5%至2%重量比。

[0049] 在某些是实施方案中,基于凝胶剂的重量,吐温的含量为0.5%至2%重量比。

[0050] 在本公开中,脂质体膜是动态膜,磷脂分子间不断交换位置,脂质体颗粒自发聚集,沉淀,造成脂质体形态结构的不稳定。吐温80作为非离子表面活性剂,能够在一定程度上抑制纳米粒子的聚集,因此,选择吐温80为稳定剂。

[0051] 在某些是实施方案中,基于凝胶剂的重量,磷脂和胆固醇的含量约为0.6%至1.5%重量比。

[0052] 在某些是实施方案中,基于凝胶剂的重量,磷脂和胆固醇的含量为0.6%至1.5%重量比。

[0053] 在某些实施方案中,凝胶剂包含本公开所述的脂质体、卡波姆940、三乙醇胺、甘油、羟苯甲酯、苯氧乙醇和纯化水。

[0054] 在某些实施方案中,基于凝胶剂的总重量,凝胶剂包含50%重量比的本公开所述的脂质体、0.5%重量比的卡波姆940、0.4%重量比的三乙醇胺、15%重量比的甘油、0.1%重量比的羟苯甲酯、0.5%重量比的苯氧乙醇和33.5%重量比的纯化水。

[0055] 再一方面,本公开涉及制备脂质体的方法,其包括:

[0056] 将磷脂和胆固醇溶于醇中,蒸发除去所述醇,得到脂质薄膜;

[0057] 将重组III型人源化胶原蛋白、吐温和蒸馏水混合,得到混合溶液;以及

[0058] 将所述脂质薄膜与所述混合溶液混合并水化,过滤从而得到所述脂质体,

[0059] 其中所述磷脂的重量与所述胆固醇的重量之比约为3-7.5:1,所述重组III型人源化胶原蛋白的重量与所述磷脂和所述胆固醇的重量之比约为1:5-15。

[0060] 在某些实施方案中,能够用于本公开的醇的示例性实例包括但不限于乙醇。

[0061] 在某些实施方案中,可以使用滤膜过滤从而得到脂质体。

[0062] 在某些实施方案中,吐温的浓度约为10%。

[0063] 在某些实施方案中,吐温的浓度约为3%。

[0064] 在某些实施方案中,水化时间约为15分钟至30分钟。

[0065] 在某些实施方案中,水化时间为15分钟至30分钟。

[0066] 在某些实施方案中,水化时间约为30分钟。

[0067] 在某些实施方案中,水化时间为30分钟。

[0068] 下文中,本公开将通过如下实施例进行详细解释以便更好地理解本申请的各个方面及其优点。然而,应当理解,以下的实施例是非限制性的而且仅用于说明本公开的某些实施方案。

[0069] 实施例

[0070] 本公开的实施例中使用的试剂和设备均为常规的并且可商购的。例如:

[0071] 表1. 重组III型人源化胶原蛋白脂质体凝胶剂制备常用仪器设备

	仪器名称	型号	厂家
	精密分析天平	AL104-IC	瑞士 Mettler Toledo
	pH 计	FiveEasyPlusFE28	瑞士 Mettler Toledo
[0072]	冰箱(灵敏度 $\pm 2^{\circ}\text{C}$)	HCD-207H	海信集团有限公司
	旋转粘度计	NDJ-8S	上海越屏精密仪器有限公司
	酶标仪	Cytation	BIO-TEK
	电磁搅拌器	ETS-D4	德国 IKA 公司
	涡旋机	VORTEX-5	Kylin-Bell
	96 孔板	655180	Greiner bio-one
	移液枪	GJ01937/HH19844/ZY8 7027	Thermo
[0073]	恒温震荡仪	HZ-8812S	华利达实验设备公司
	旋转蒸发仪	RE-52AA	上海亚荣生化仪器厂
	立式自动压力蒸汽灭菌器	GF-36DA	致微(厦门)仪器有限公司
	电动搅拌器	HW30-F	上海恒川机械设备有限公司

[0074] 注明:其他实验室用具包括烧杯、玻璃棒、滴管、温度计等。

[0075] 表2重组人胶原蛋白脂质体凝胶剂所用药品与试剂

药品或试剂名称	厂家	批号	CAS	级别
重组 III 型人源化 胶原蛋白原液 (10mg/mL)	华北生物制药	20200302	--	--
标准胶原蛋白对 照品	成都瑞远生物 技术有限公司	C20170701-1	--	--
重组人胶原蛋白 脂质体	自制	20200914-1	--	实验室
重组人胶原蛋白 脂质体	自制	20200914-2	--	实验室
重组人胶原蛋白 脂质体	自制	20200914-3	--	实验室
重组人胶原蛋白 脂质体凝胶剂	自制	20200916-1	--	实验室
重组人胶原蛋白 脂质体凝胶剂	自制	20200916-2	--	实验室

[0076]

	重组人胶原蛋白 脂质体凝胶剂	自制	20200916-3	--	实验室
	蛋黄卵磷脂	上海太伟药业 股份有限公司	--	93685-90-6	药用级
	胆固醇	国药集团化学 试剂有限公司	20130618	57-88-5	药用级
	无水乙醇	天津市富宇精 细化工有限公司	2019年12月15 日	64-17-5	分析纯
	吐温 80	天津市科密欧 化学试剂有限 公司	20170528	9005-65-6	药用级
	卡波姆 940	上海源叶生物 科技有限公司	YOLJ9S62800	9007-17-4	药用级
[0077]	甘油	国药集团化学 试剂有限公司	20190815	56-81-5	药用级
	三乙醇胺	广州森羽创妍 生物科技有限 公司	--	102-71-6	药用级
	苯氧乙醇	东邦化学	--	122-99-6	药用级
	羟苯甲酯	英国托尔	--	99-76-3	药用级
	无水碳酸钠	国药集团化学 试剂有限公司	20200421	497-19-8	分析纯
	酒石酸钠	上海麦克林生 化科技有限公 司	C11423496	868-18-8	分析纯
	BCA	上海源叶生物 科技有限公司	Y28J11S116907	979-88-4	--
	碳酸氢钠	国药集团化学 试剂有限公司	20180223	144-55-8	分析纯
[0078]	五水合硫酸铜	国药集团化学 试剂有限公司	20181120	7758-99-8	分析纯

[0079] 实施例1:处方组成的筛选

[0080] 蛋黄卵磷脂150mg,胆固醇20mg,无水乙醇5mL,胶原蛋白水化液5mL(其由1mL胶原蛋白、1.5mL 10%体积比的吐温80、2.5mL蒸馏水组成)。薄膜蒸发法的基本制备工艺:精密称量蛋黄卵磷脂150mg、胆固醇20mg,溶于5mL无水乙醇中。减压旋转蒸发(50℃,转速为2)去除乙醇,待乙醇挥发完全形成均匀薄膜。常温下加入溶有胶原蛋白水化液5mL,旋转水合至薄膜完全脱离形成乳白色混悬液液体,旋蒸温度40℃,时间30min。

[0081] 实施例2:药脂比的筛选

[0082] 固定实施例1中的基本处方中其他成分用量不变,采用基本制备工艺制备重组III型人源化胶原蛋白脂质体(rhc-III-Lips),改变药脂比(药脂比即重组III型人源化胶原蛋白与磷脂和胆固醇之比)(药脂比分别为1:5、1:10、1:15),以粒径、包封率(EE)和载药量(DL)为评价指标,考察药脂比对评价指标的影响,结果见表3和图1。

[0083] 表3.药脂比筛选结果

	药脂比	粒径(nm)	EE(%)	DL(%)
[0084]	1:5	348.27±8.52	27.36	3.79
	1:10	316.80±13.36	37.65	2.95
	1:15	250.27±9.26	35.85	1.96

[0085] 从图1可知,随着脂质用量的增加,包封率呈现先增加后降低的趋势,载药量则随着载体材料的增加而降低,粒径呈下降趋势。因此选择药脂比为1:5-15。

[0086] 实施例3:磷脂与胆固醇之比的筛选

[0087] 固定实施例1中的基本处方中其他成分用量不变,采用基本制备工艺制备重组III型人源化胶原蛋白脂质体(rhc-III-Lips),改变磷脂与胆固醇之比(分别为3:1、5:1、7.5:1),以粒径、包封率(EE)和载药量(DL)为评价指标,考察磷脂与胆固醇之比对评价指标的影响,结果见表4和图2。

[0088] 表4.磷脂与胆固醇之比筛选结果

	磷脂与胆固醇之比	粒径(nm)	EE(%)	DL(%)
[0089]	3:1	390.13±42.88	30.05	1.66
	5:1	299.73±25.10	23.45	1.45
	7.5:1	305.53±6.47	36.65	2.33

[0090] 从图2可知,随着磷脂与胆固醇之比的增加,包封率和粒径呈现先降低后增高的趋势。胆固醇可以调整脂质双分子层的流动性,增强其抗凝聚能力,但胆固醇用量过多时,会造成脂质体流动性增大,药物易泄露,因此选择磷脂、胆固醇比为3-7.5:1。

[0091] 实施例4:吐温80用量的筛选

[0092] 固定实施例1的基本处方中其他成分用量不变,采用基本制备工艺制备重组III型人源化胶原蛋白脂质体(rhc-III-Lips),改变吐温80的用量(分别为0、1、2、3、4),以粒径、包封率(EE)和载药量(DL)为评价指标,考察吐温80的用量对评价指标的影响,结果见表5和图3。

[0093] 表5.吐温80的用量筛选结果

	吐温 80 浓度(%)	粒径(nm)	EE(%)	DL(%)
	0	309.67±8.71	-	-
[0094]	1	314.05±12.35	51.35	4.08
	2	320.11±15.71	62.73	4.92
	3	330.12±22.33	81.50	6.24
[0095]	4	352.53±10.47	67.35	5.25

[0096] 从图3中的结果可知,当吐温80用量为0%时,脂质体放置2h就出现分层,非常的不稳定,随着吐温80用量的增加,包封率呈现先增加后降低的趋势,因此,吐温80用量为1%至4%。

[0097] 实施例5:重组III型人源化胶原蛋白脂质体(rhc-III-Lips)制备工艺中水化温度的筛选

[0098] 采用薄膜分散法制备脂质体时,水化温度需要高于磷脂的相变温度,脂质膜的流动性增加,药物才能更好的进入到内水相中从而增加包封率。蛋黄卵磷脂的相变温度为28℃。在一定的温度范围内,随着水化温度的升高,脂质体的包封率也在增加。因此,宜在一定范围内,选择较高水化温度。由于重组III型人源化胶原蛋白(rhc-III)不耐热,理论显示最高耐热温度为40℃,预实验时,将重组III型人源化胶原蛋白(rhc-III)溶液置于40℃水浴条件下60min,其含量无明显变化。因此,在本公开中,将水化温度固定为40℃,不再进行筛选。

[0099] 实施例6:重组III型人源化胶原蛋白脂质体(rhc-III-Lips)制备工艺中水化时间的筛选

[0100] 固定实施例1中的处方组成成分和用量不变,采用基本制备工艺制备重组III型人源化胶原蛋白脂质体(rhc-III-Lips),改变基本制备工艺中的水化时间(分别为15、30、45min),以粒径、包封率(EE)和载药量(DL)为评价指标,考察水化时间对评价指标的影响,结果见表6和图4。

[0101] 表6.水化时间筛选结果

	水化时间(min)	粒径(nm)	EE(%)	DL(%)
[0102]	15	329.93±5.25	85.44	6.78
	30	269.93±3.3	84.73	6.61
	45	256.37±6.64	75.72	6.56

[0103] 从图4中的结果可知,随着水化时间的增加,包封率和载药量及粒径呈下降的趋势,30min以后下降变化明显,考虑到时间成本,选择水化时间为15min至30min。

[0104] 实施例7:重组III型人源化胶原蛋白脂质体(rhc-III-Lips)三批样品的重现性试验

[0105] 按照筛选的处方和制备工艺,重复制备三批样品,按质量标准项下的方法进行检查,评价处方组成的可行性和制备工艺的稳定性,结果见表7。

[0106] 表7. 三批重组III型人源化胶原蛋白脂质体 (rhc-III-Lips) 处方工艺重现性试验结果

质量检查指标	批号20200914-1	批号20200914-2	批号20200914-3
外观性状	乳白色混悬液	乳白色混悬液	乳白色混悬液
粒径 (nm)	273.53±2.10	261.20±9.54	248.80±2.71
PDI	0.156±0.001	0.142±0.004	0.139±0.007
电位 (mV)	-8.03±0.44	-8.52±0.48	-8.28±0.25
pH	6.22±0.02	6.28±0.01	6.32±0.04
包封率 (%)	81.43±2.45	85.22±1.72	82.93±1.93
载药量 (%)	6.13±0.17	6.34±0.12	6.24±0.14

[0108] 实验结果表明, 重组III型人源化胶原蛋白脂质体 (rhc-III-Lips) 处方组成合理, 制备工艺稳定。

[0109] 实施例8: 凝胶基质的筛选

[0110] 常用的水性凝胶基质包括卡波姆、羟丙基甲基纤维素 (HPMC)、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠 (CMC-Na)、壳聚糖和海藻酸钠等。根据各类凝胶基质常用的浓度, 分别配制0.3%、0.5%、1%的卡波姆 (需用三乙醇胺调节pH), 1%、3%和5%的羧甲基纤维素钠 (CMC-Na), 0.5%、1%、1.5%的壳聚糖 (使用1%醋酸溶解), 0.5%、1%、1.5%的羟丙基甲基纤维素 (HPMC)。

[0111] 以凝胶基质的外观、pH、均匀性、黏度和涂展性为评价指标, 对凝胶基质的种类进行筛选。实验结果见表8。

[0112] 表8. 凝胶基质种类和浓度的筛选结果

基质	外观	均匀性	流动性	涂展性	黏度 (Pa·s)	pH
1%CMC-Na	白色透明的液体	均匀	有	易于涂展	0.27	6.94
3%CMC-Na	略带黄色的粘稠半固体	均匀	有	不易涂展	13.75	7.2
5%CMC-Na	淡黄色的粘稠半固体	不均匀	否	不易涂展	1117.50	6.88
0.5%壳聚糖	白色透明液体	均匀	有	易于涂展	0.06	3.52
1%壳聚糖	略带黄色的液体	均匀	有	易于涂展	0.23	3.79
1.5%壳聚糖	淡黄色液体	均匀	有	易于涂展	0.62	4.20
0.5%HPMC	白色透明液体	均匀	有	易于涂展	0.03	6.38
1%HPMC	白色透明粘稠液体	均匀	有	易于涂展	0.42	6.40
1.5%HPMC	白色透明粘稠液体	不均匀	有	不易涂展	1.33	6.47
0.3%卡波姆	无色透明半固体	均匀	无	易于涂展	140.67	6.89
0.5%卡波姆	无色透明半固体	均匀	无	易于涂展	269.14	7.10
1%卡波姆	无色透明半	均匀	无	易于涂展	1446.54	6.20
[0113]	固体					

[0115] 从表8结果可以看出,高浓度的CMC-Na成形性好,但是涂展性差,并且5%的CMC-Na放置一天后,表面会渗水;壳聚糖不溶于水,需用1%的醋酸溶解,导致凝胶基质pH低,过酸的凝胶基质会刺激皮肤;低浓度的HPMC成形性不好,流动性大,高浓度的HPMC难以溶胀,即使溶胀24h,仍然有凝胶团块,不易搅拌分散均匀;卡波姆凝胶基质成形性好,易涂展且无油腻感,经三乙醇胺调节pH后,pH接近正常人体皮肤的pH,适用于皮肤给药。0.5%的卡波姆基质黏度较适宜,因此,可以选择0.5%卡波姆作为凝胶基质。

[0116] 实施例9:pH调节剂的种类和用量的筛选

[0117] 卡波姆水溶液显酸性,pH约为3.0。当用碱中和时,原本蜷缩的分子链伸展开,使得体积增大,黏度也逐渐上升,在浓度较大时形成无色透明的半固体凝胶,根据临床用途及实

际需要选择适宜稠度的卡波姆凝胶剂。最常使用的pH调节剂为三乙醇胺和氢氧化钠。氢氧化钠为强碱,对皮肤刺激性较大;三乙醇胺为弱碱,性质比较温和,对皮肤刺激性小,故选择三乙醇胺作为凝胶剂的pH调节剂。以外观性状、pH、黏度和涂展性为评价指标,按表9的分组对三乙醇胺的用量进行筛选,实验结果见表10。

[0118] 表9.三乙醇胺用量筛选的处方组成(总量为100g)

成分	分组与用量/g				
	1组	2组	3组	4组	5组
卡波姆 940	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
甘油	5	5	5	5	5
苯氧乙醇	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
三乙醇胺	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6
纯化水	93.8	93.7	93.6	93.5	93.4

[0120] 表10.三乙醇胺用量筛选的结果

样品	外观	黏度(Pa·s)	pH
0.2%组	无色透明半固体	63.69	5.59
0.3%组	无色透明半固体	85.08	5.86
0.4%组	无色透明半固体	266.90	6.48
0.5%组	无色透明半固体	283.65	7.02
0.6%组	无色透明半固体	295.70	7.12

[0122] 从表10结果来看,各组凝胶的黏度都很大,成形性好呈半固体状态,能够很好的粘附在皮肤上;从pH结果来看,0.2%和0.3%组的凝胶pH低于6,呈酸性;0.4%组凝胶为弱酸性,相关研究表明,弱酸性环境有利于创伤的愈合;0.5%组的凝胶pH为7.02,接近中性;0.6%组的凝胶pH略高于7,考虑到三乙醇胺中的胺类物质会对皮肤有刺激,不可使用过高浓度的三乙醇胺,因此综合考虑凝胶基质对皮肤的刺激及对创伤愈合情况的影响,选择三乙醇胺的使用量为0.4%。

[0123] 实施例10:保湿剂种类和用量的筛选

[0124] 凝胶中常用的保湿剂主要有甘油、丙二醇、聚乙二醇400(Polyethylene glycol 400,PEG400)和透明质酸等,这些物质通过增强皮肤角质层的吸水性和结合水的能力而实现保湿。甘油又称丙三醇,其分子中含有羟基基团,能够与水分子形成氢键,牢牢锁住水分,保持伤口附近的湿润,可促进伤口的愈合,而高浓度的甘油会吸收皮肤中的水分而产生灼热感,因此,常用浓度为5%至15%,因其价格低廉且易于获得而被广泛应用;丙二醇也具有好的保湿性,但有研究发现它具有一定的皮肤致癌性,因此,避免使用丙二醇;PEG400具有保湿润滑的作用,可作为皮膜形成剂,使用后在皮肤表面形成一层膜状物从而锁住皮肤

水分;透明质酸作为水溶性高分子,其保湿性优异并且被广泛用于化妆品中,但是众多研究结果显示透明质酸具有促进创伤愈合的作用,为了避免其影响后续的大鼠体内药效学研究,所以在本制剂中不选择透明质酸作为保湿剂。因为单一的保湿剂不能达到锁水、保湿和吸湿等多种目的,所以在实际应用中常将多种保湿剂进行复配使用,因此本实施例将对不同浓度的甘油(5%、10%和15%)、PEG400(5%、10%和15%)和甘油复配PEG400(固定总浓度为10%,复配比例为2:8、5:5和8:2)的保湿性进行研究。

[0125] 参考化妆品保湿性的研究方法(失水率测定法),以水分损失率为评价指标。采用体外称重法,将干燥至恒重的培养皿称重记为 M_1 ,称取适量含有不同保湿剂的凝胶基质分别放入培养皿中,称重记为 M_2 ,将装有凝胶基质的培养皿分别置于相对湿度43%的干燥器和硅胶干燥器中,在放置2h、4h、6h、8h、10h、12h、24h、36h和48h时取出称重,记为 M_t ,按下式计算其失水率,具体处方用量见表11。

[0126] 水分损失率 = $[(M_2 - M_t) / (M_2 - M_1)] \times 100\%$

[0127] 表11. 筛选保湿剂种类和用量的处方用量

成分	用量/g								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
卡波姆 940	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
甘油	5	10	15	-	-	-	2	5	8
PEG400	-	-	-	5	10	15	8	5	2
苯氧乙醇	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
三乙醇胺	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
纯化水	93.5	88.5	83.5	93.5	88.5	83.5	88.5	88.5	88.5

[0128] 含有不同种类和浓度保湿剂的凝胶剂在硅胶干燥器、相对湿度为43%干燥器中的水分损失率结果见图5和图6。

[0129] 由图5和图6可知,甘油浓度越高,保湿效果越好;同浓度的甘油和PEG400相比,甘油的保湿效果更好;当甘油和PEG400复配时,失水率仍高于同浓度的甘油,综合所有处方的结果,选择使用甘油为保湿剂,用量为15%重量比。

[0130] 实施例11:防腐剂种类和用量的确定

[0131] 在凝胶剂中常常加入防腐剂来防止含水量较高的凝胶剂产生微生物而腐败,用于伤口的制剂中所含的防腐剂应满足无刺激性且能达到防腐的两个基本要求。

[0132] 在制剂研发阶段中,使用抑菌效力检查法测定制剂的抑菌活性,以此来指导制剂中防腐剂的种类和用量的确定,为了保证用药安全,防腐剂的使用量应为最低有效量。单一的防腐剂需要较高的浓度,才能达到防腐的作用,而防腐剂复配可以扩展抗菌广谱性。苯氧乙醇有良好的抗细菌能力,但是对革兰氏阳性菌和真菌的抗菌效果一般。羟苯甲酯对于真菌类的抑制作用较强,对革兰氏阳性菌有一定的效果,对革兰氏阴性菌的作用较弱,因此将苯氧乙醇和羟苯甲酯配合使用,可以达到增加抗菌谱,低剂量,高抑菌的目的。通过查阅现有技术确定二者的最低有效量,最终选择0.5%苯氧乙醇和0.1%羟苯甲酯复配作为防腐剂。

[0134] 实施例12:空白凝胶基质制备工艺中的防腐剂溶解条件的筛选

[0135] 羟苯甲酯水溶性差,在甘油中溶解度较大,苯氧乙醇微溶于水但能与甘油任意混溶,为了保证羟苯甲酯完全溶解和苯氧乙醇均匀分散在凝胶基质中达到更好的防腐效果,因此,将处方量的羟苯甲酯、苯氧乙醇和甘油共同混合,于磁力搅拌器上,以羟苯甲酯完全溶解所需的最短时间为评价指标,固定转速为300rpm,筛选最佳溶解温度;固定温度,筛选最佳转速。实验结果见表12和表13。

[0136] 表12. 在不同温度下羟苯甲酯溶解时间筛选结果

温度(°C)	时间(min)			Mean±SD
	1	2	3	
60	18	18	20	18.67±1.15
70	15	14	15	14.67±0.58
80	8	7	5	6.67±1.53

[0138] 表13. 在不同转速下羟苯甲酯的溶解时间筛选结果

转速(rpm)	时间(min)			Mean±SD
	1	2	3	
200	17	16	18	17.00±1.00
300	15	14	15	14.67±0.58
400	11	13	12	12.00±1.00

[0140] 从表12实验结果来看,随着温度的升高,羟苯甲酯的溶解速度也随之增快,当加热温度为80℃时,羟苯甲酯的溶解时间大大缩短,仅需6.67min就可溶解完全。从表13实验结果来看,随着转速的增加,羟苯甲酯的溶解速度有所增快。综合考虑时间和经济成本,最终确定羟苯甲酯的溶解条件:温度为80℃,转速为300rpm。

[0141] 实施例13:空白凝胶基质制备工艺中的灭菌方法和灭菌条件的筛选

[0142] 由于重组III型人源化胶原蛋白(Rhc-III)是生物大分子类药物,对热敏感,因此,采取过滤灭菌法,即使用0.22μm的滤膜过滤后再加入到凝胶基质中。所以灭菌方法筛选主要是针对凝胶基质的灭菌。使用流通蒸汽灭菌(100℃,30min)和热压灭菌法(121℃,20min)、(115℃,30min)对凝胶基质进行灭菌,并对灭菌前后凝胶基质的外观、黏度、pH和涂展性进行比较,筛选出最合适的灭菌方法和灭菌条件。实验结果见表12。

[0143] 表14. 凝胶基质灭菌前后性质的变化

灭菌方式		检测指标			
		外观	pH	黏度(Pa·s)	
[0144]	流通蒸汽 (100°C, 30 min)	灭菌前	无色、透明黏稠 的半固体	6.26±0.04	262.60±4.76
	灭菌后	无色、透明黏稠 的半固体	6.26±0.06	257.43±10.25	
	热压灭菌	灭菌前	无色、透明黏稠	6.32±0.13	265.13±15.35
[0145]	(115°C, 30 min)		的半固体		
		灭菌后	无色、透明黏稠 的半固体	6.23±0.07	243.49±17.67
	热压灭菌 (121°C, 20 min)	灭菌前	无色、透明黏稠 的半固体	6.24±0.04	271.83±16.20
		灭菌后	无色、透明黏稠 的半固体	6.17±0.09	249.58±21.96

[0146] 由表14可知,凝胶基质经流通蒸汽灭菌后,黏度下降了约5.17Pa·s,pH没有明显的变化;经热压灭菌(115°C,30min)后,黏度下降了约21.64Pa·s,pH下降了0.09;经热压灭菌(121°C,20min)后,黏度下降了约22.25Pa·s,pH下降了0.07。可以看出,流通蒸汽灭菌对凝胶基质的黏度影响最小,虽然热压灭菌会使凝胶的黏度下降,但对凝胶的皮肤附着性没有太大的影响,因此选择使用热压灭菌法(115°C,30min)对凝胶基质灭菌。

[0147] 实施例14:空白凝胶基质的重现性试验

[0148] 通过对空白凝胶剂处方和工艺的筛选,得到处方和制备工艺如下:

[0149] 1. 处方组成:0.5%卡波姆作为凝胶基质,0.4%三乙醇胺为pH调节剂,15%甘油为保湿剂,0.1%羟苯甲酯和0.5%苯氧乙醇联合应用作为防腐剂。

[0150] 2. 制备工艺:(1) 首先将处方量的卡波姆940溶解备用;(2) 称取处方量的羟苯甲酯、苯氧乙醇和甘油于磁力搅拌上(80°C,300rpm)加热,得到无色透明的均匀溶液。将该混合溶液加入到卡波姆溶液中,混合均匀;(3) 边搅拌边向上述溶液中滴加处方量的三乙醇胺进行pH的调节,形成半固体凝胶;以及(4) 采用热压灭菌法(115°C,30min)进行灭菌,放冷即得空白凝胶剂。

[0151] 按上述处方和工艺,制备三批空白凝胶剂,并对其外观性状、黏度、pH和涂展性等进行考察,确定处方、工艺的稳定性。实验结果见表15。

[0152] 表15. 三批空白凝胶剂重现性试验结果

检查项目	1	2	3	mean±SD
[0153] 外观性状	无色、透明、黏稠的半固体, 无异物	无色、透明、黏稠的半固体, 无异物	无色、透明、黏稠的半固体, 无异物	--
涂展性	易涂展	易涂展	易涂展	--
pH	6.18	6.12	6.31	6.20±0.10
黏度(Pa·s)	136.02	138.67	131.44	135.38±3.66

[0154] 表15实验结果表明, 三批空白凝胶基质处方及工艺稳定。

[0155] 实施例15: 重组III型人源化胶原蛋白脂质体 (rhC-III-Lips) 凝胶剂的制备

[0156] 根据重组III型人源化胶原蛋白脂质体 (rhC-III-Lips) 中胶原蛋白的含量, 确定重组III型人源化胶原蛋白脂质体 (rhC-III-Lips) 凝胶剂中重组III型人源化胶原蛋白脂质体 (rhC-III-Lips) 的用量。按照空白凝胶基质的组方, 确定重组III型人源化胶原蛋白脂质体 (rhC-III-Lips) 凝胶剂的处方和制备工艺制备, 结果如下。

[0157] 1. 处方

[0158] 重组III型人源化胶原蛋白脂质体 (rhC-III-Lips) 凝胶剂的处方见表16。

[0159] 表16. 重组III型人源化胶原蛋白脂质体 (rhC-III-Lips) 凝胶剂的处方

成分	用量(g)	在处方中的作用
[0160] 卡波姆 940	0.5	凝胶基质
三乙醇胺	0.4	pH 调节剂
甘油	15	保湿剂
羟苯甲酯	0.1	防腐剂
苯氧乙醇	0.5	防腐剂
纯化水	33.5	溶剂
[0161] 重组 III 型人源化胶原蛋白脂质体混悬液	50	主成分

[0162] 2. 制备工艺

[0163] (1) 首先使用处方量的纯化水溶解卡波姆940, 待其溶解形成黏稠、均匀的溶液后, 备用。

[0164] (2) 称取处方量的羟苯甲酯、苯氧乙醇和甘油于25mL小烧杯中, 于磁力搅拌上 (80℃, 300rpm) 加热7min, 得到透明无色的均匀溶液, 冷却至室温待用。

[0165] (3) 将(2)项下的溶液加到(1)项下的卡波姆溶液中, 搅拌均匀, 再边搅拌边滴加三乙醇胺调节pH, 直至形成稠厚的凝胶基质。

[0166] (4) 采用热压灭菌法对凝胶基质进行灭菌。灭菌条件是: 温度为115℃, 时间为

30min。

[0167] (5) 待灭菌基质降温至40℃以下,向其中加入采用微孔滤膜过滤除菌的重组III型人源化胶原蛋白脂质体(rhc-III-Lips)混悬液,搅拌均匀,即得重组III型人源化胶原蛋白脂质体(rhc-III-Lips)凝胶剂。

[0168] 实施例16:重组III型人源化胶原蛋白脂质体(rhc-III-Lips)凝胶剂重现性试验

[0169] 按照实施例15的处方和制备工艺制备三批样品,按质量标准项下的方法进行检査,评价处方组成的可行性和制备工艺的稳定性。结果见表17。

[0170] 表17.三批重组III型人源化胶原蛋白脂质体(rhc-III-Lips)凝胶剂处方工艺重现性试验结果

[0171]	质量检查指标	批号 20200916-1	批号 20200916-2	批号 20200916-3
	外观性状	乳白色、粘稠的	乳白色、粘稠的	乳白色、粘稠的
[0172]		半固体,无异味, 无肉眼可见异物	半固体,无异味, 无肉眼可见异物	半固体,无异味, 无肉眼可见异物
	净重量(g)	符合要求	符合要求	符合要求
	涂展性	易涂展	易涂展	易涂展
	pH	6.29±0.05	6.26±0.05	6.25±0.01
	粘度(Pa·s)	122.00±1.56	124.89±2.82	127.21±2.58

[0173] 实验结果表明,重组III型人源化胶原蛋白脂质体(rhc-III-Lips)凝胶剂处方组成合理,制备工艺稳定。

[0174] 在本公开中,诸如第一和第二等之类的关系术语仅仅用来将一个实体或者操作与另一个实体或操作区分开来,而不一定要求或者暗示这些实体或操作之间存在任何这种实际的关系或者顺序。

[0175] 从前述中可以理解,尽管为了示例性说明的目的描述了本公开的具体实施方案,但是在不偏离本公开的精神和范围的条件下,本领域所述技术人员可以作出各种变形或改进。这些变形或修改都应落入本公开所附权利要求的范围。

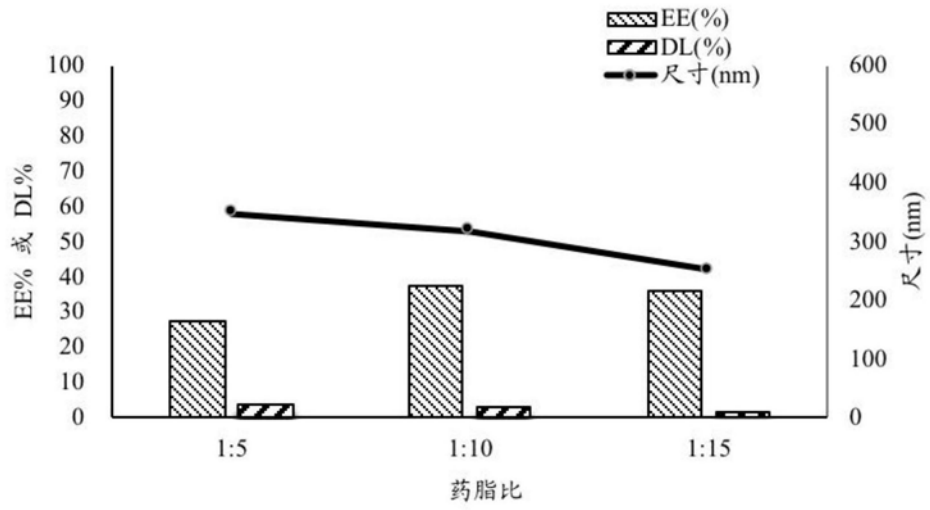


图1

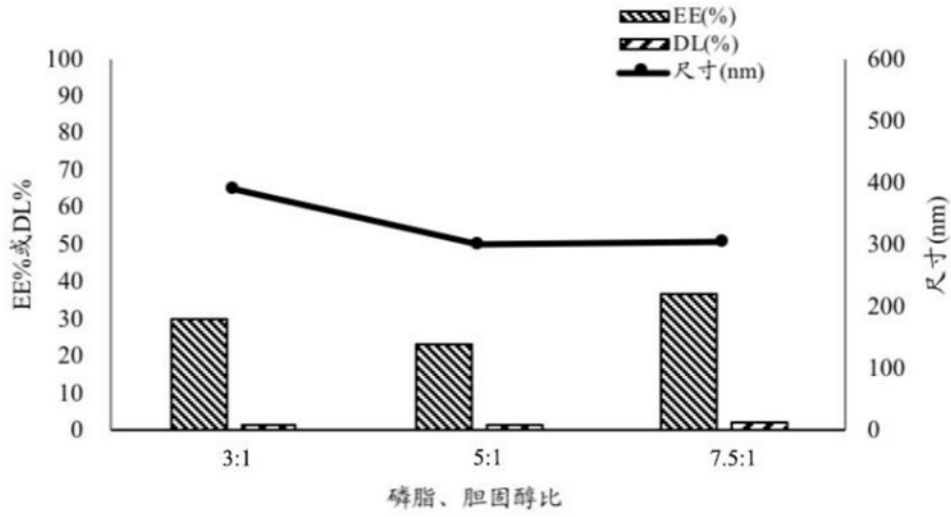


图2

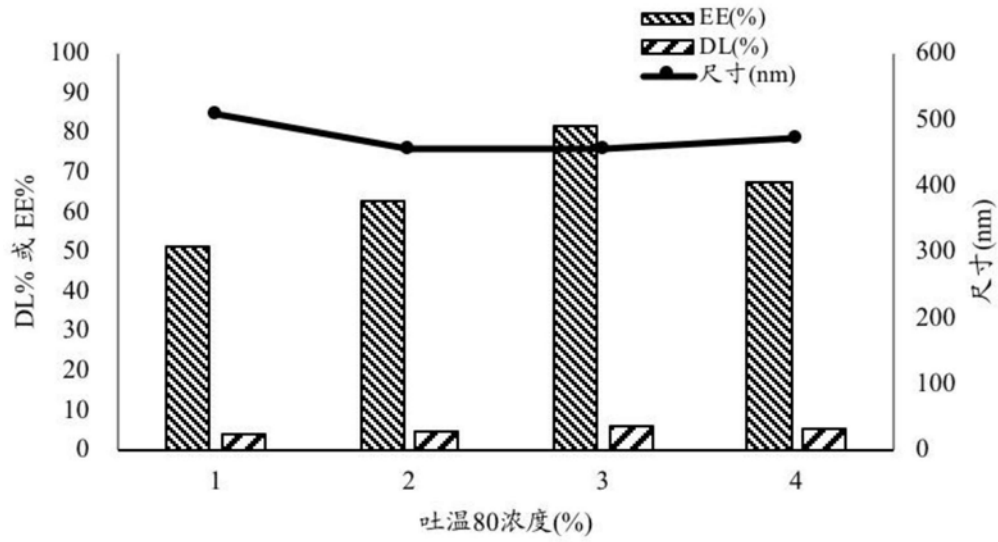


图3

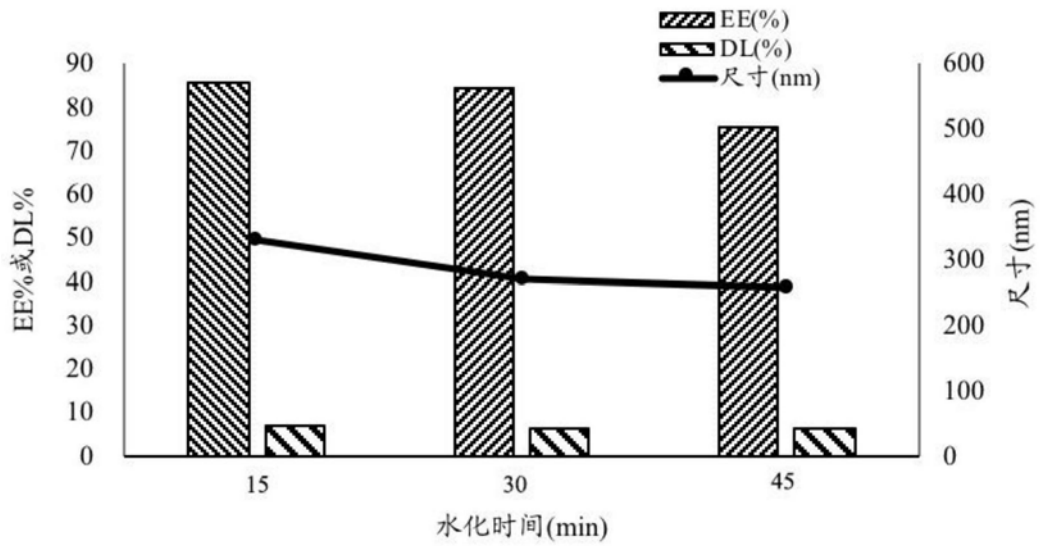


图4

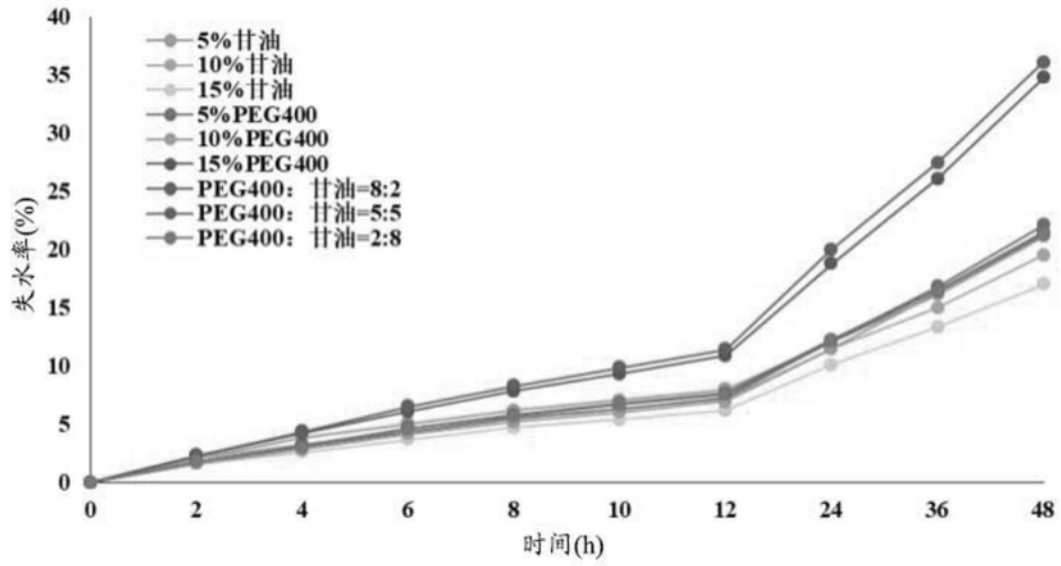


图5

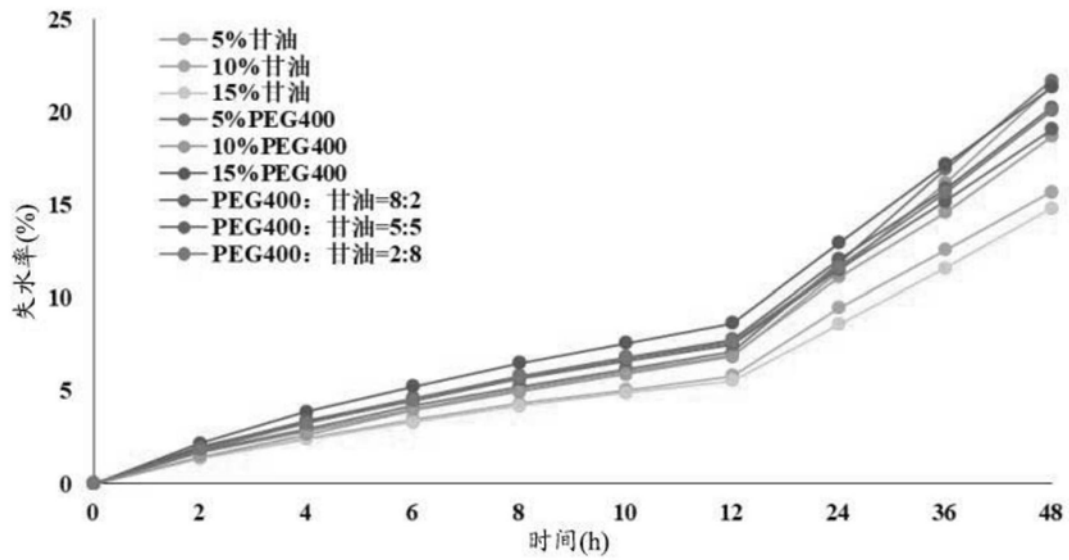


图6