

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 9/127

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99809563. X

[43] 公开日 2001 年 9 月 12 日

[11] 公开号 CN 1312707A

[22] 申请日 1999. 6. 16 [21] 申请号 99809563. X
[30] 优先权
[32] 1998. 6. 18 [33] GB [31] 9813100. 6
[86] 国际申请 PCT/GB99/01911 1999. 6. 16
[87] 国际公布 WO99/65465 英 1999. 12. 23
[85] 进入国家阶段日期 2001. 2. 12
[71] 申请人 英国国防部
地址 英国汉普郡
[72] 发明人 G · 格雷戈里尔迪斯 B · 扎迪
P · N · 贾亚赛克拉

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 杨丽琴

权利要求书 2 页 说明书 20 页 附图页数 3 页

[54] 发明名称 形成脂质体的方法

[57] 摘要

制备一种试剂的组合物的方法,该方法包括以下步骤:(i)形成 空的脂质体;(ii)将来自步骤(i)的脂质体与糖溶液和试剂进行混合;和(iii)干燥来自步骤(ii)的混合物。此类组合物通常包含低于 10% (w/v) 的蔗糖。所述方法可以用于形成具有高包封率的小脂质体。它尤其 适用于药物的生产。

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 制备一种试剂组合物的方法, 所述方法包含以下步骤:
 - (i) 形成空的脂质体;
 - 5 (ii) 混合来自步骤(i)的脂质体和糖溶液以及一种试剂; 和
 - (iii) 干燥来自步骤(ii)的混合物。
2. 根据权利要求1的方法, 其进一步包含再水化步骤(iii)的混合物。
3. 根据权利要求1或权利要求2的方法, 其中在步骤(i)中形成的
- 10 脂质体为小的单层小囊。
4. 根据权利要求3的方法, 其中所述小囊的平均尺寸为 25-100nm。
5. 根据权利要求4的方法, 其中所述小囊的平均尺寸为 50-100nm。
- 15 6. 根据前述权利要求中任一项的方法, 其中所述组合物含有少于10%(w/v)的糖。
7. 根据前述权利要求中任一项的方法, 其中用于步骤(ii)的糖溶液浓度为 20-200mM。
8. 根据权利要求7的方法, 其中所述糖溶液的浓度为 30-
- 20 150mM。
9. 根据前述权利要求中任一项的方法, 其中用于步骤(ii)的糖与类脂的质量比为 1:1-6:1(w/w)。
10. 根据权利要求9的方法, 其中用于步骤(ii)的糖与类脂的质量比为 1:1-5:1(w/w)。
- 25 11. 根据前述权利要求中任一项的方法, 其中用于步骤(ii)的糖为二糖。
12. 根据权利要求11的方法, 其中所述糖为蔗糖。
13. 根据前述权利要求中任一项的方法, 其中用于步骤(ii)的糖为

单糖。

14. 根据权利要求 13 的方法，其中所述糖为葡萄糖。

15. 根据前述权利要求中任一项的方法，其中步骤(iii)通过冻干来完成。

5 16. 根据权利要求 1-14 中任一项的方法，其中步骤(iii)通过喷雾干燥来完成。

17. 根据权利要求 1-14 中任一项的方法，其中步骤(iii)通过快速结晶来完成。

10 18. 根据前述权利要求中任一项的方法，其中所述试剂为生物活性物质。

19. 根据权利要求 18 的方法，其中所述生物活性物质包括药物。

20. 含有一种通过前述权利要求任一项的方法包囊的试剂的组合物。

21. 根据权利要求 20 的组合物，它是一种药用组合物。

15 22. 根据权利要求 20 或 21 的组合物，它采用适于口服、局部、胃肠外或通过吸入给药的形式。

23. 将生物活性组分给予需要它的病人的方法，所述方法包括将根据权利要求 20 至 22 中任一项的组合物给予所述病人。

说明书

形成脂质体的方法

5 本发明涉及形成脂质体的方法、由此获得的脂质体以及它们的用途，具体为在药物应用中的用途。

众所周知，脂质体可以广泛用于包括药物和化妆品领域的各种领域，其中它们用作药物或适用于皮肤的其它制剂的载体。

10 制备脂质体的各种方法已为人熟知。例如，它们可以通过脱水/再水化技术来制备，其中将类脂溶于有机溶剂如氯仿、二氯甲烷或醇如甲醇或乙醇。随后如使用旋转蒸发器干燥所述溶液，从而在蒸发器壁上形成类脂膜。将水或水溶液如缓冲液加至干膜而形成多层脂质体。采用各种方法从而形成生产小囊的第一步骤。随后的处理可以导致小囊或 DRV 的脱水/再水化(Kirby and Gregoriadis, Biotechnology(1984) 2, 979-984)。或者，随后通过声波破碎类脂悬浮体从而形成如单层脂质体(A. D. Bangham 等, J. Mol. Biol. 13, 238 (1965))。

本领域广为报导的其它方法包括洗涤剂脱除(Y. Kagawa 等, J. Biol. Chem. (1971) 246, 5477), 反相蒸发(F. Szoka and D. Papahadjopoulos, Proc. Natl. Acad. Sci, USA(1978) 75, 4194)和醚注射(D. Deamer 等, Biochim. Biophys. Acta, (1976) 433, 629)以及冻干法(参见如 Ohsawa 等, Chem. Pharm. Bull, (1984) 32, 2442-5 and Kirby and Gregoriadis (1984) supra)和冻融法(D. D. Lasic “脂质体：从物理性质到应用”, Elsevier, 1993, p98)。

25 不同的制备方法导致脂质体不同的尺寸和其它特性。脂质体可以用于包囊各种物质如生物活性物质如包括疫苗的药物以及非药物制剂如施用于皮肤的各种物质如人造鞣制剂和其它的美容助剂。包囊技术根据待包囊制剂的性质和生成脂质体的大小和特性变化。

脂质体的大小对于它们的应用来说是重要的。在一些情况下, 例如当包括微生物(如细菌)的待包囊的颗粒用于如疫苗时(如 WO 95/09619 所述), 可能需要大的脂质体。

然而在许多应用中优选小的脂质体。这是因为与大脂质体(尺寸大于 200nm)相比, 小脂质体通过网状内皮组织系统(RES)的除去较慢, 并且脱除程度较小。RES 的摄取量随小囊的尺寸增加而增大。另外大脂质体的肌肉注射不能达到良好效果的局部淋巴结并且将疫苗和其它制剂传递至它们的位置(Gregoriadis G. 作为药物载体的脂质体: 最新趋势和进展, Wiley Chichester 1988)。

可以根据药物的用量、稳定性、生物分布模式和细胞摄取, 通过改变脂质体的物理化学参数如相转变温度、大小、尺寸分布、表面电荷、用具有疏水基团的化合物进行的表面水合以及尺寸分布来优化各种药物的脂质体制剂。

脂质体的大小是决定被 RES 清除部分的一个参数(Senior 等, Biochem., Biophys. Acta (1985) 839, 1-8; Nagayasu 等, Biol. Pharm. Bull. (1995) 18(7), 1020-1023)。小脂质体可以通过使用高压均化器来制备(Talsma 等, Drug Development and Industrial Pharmacy (1989) 15 (2) 197-207, Vemuri S 等, Drug Development and Industrial Pharmacy (1990) 16 (15) 2243-2256)。但人们已经采用大量的脂质体来获得可接受的包封药物与类脂质量比。另一种方法(Gregoriadis 等, Int. J. Pharm. 65 (1990) 235-242), 在未包囊药物的存在下, 通过多层脱水-再水化小囊(DRVs)的微流化来制备粒度小于 200nm 的小囊, 同时保持最初包封的溶质量。

在脂质体的制备后, 通过加入糖可以使小囊获得稳定化效果(Crowe L. M. 等, Alch. Biochem. Biophys. 242 (1985) 240-247, Hauser 等, Biochem. Biophys. Acta (1987) 897, 331-334), 例如将含药物的脂质体进行冻干用于贮存和以后使用时再水化。

申请人已经发现了一种改进的制备脂质体和特别小的脂质体的

方法，它可减少制备步骤，并以高包封率形成稳定的脂质体。

根据本发明，提出一种生产试剂的脂质体制剂的方法，这种方法包括以下步骤：

(i) 形成空的脂质体；

5 (ii) 将步骤(i)的脂质体与糖溶液和所述试剂进行混合；和

(iii) 干燥步骤(ii)的混合物。

对步骤(iii)的干物质进行再水化，形成包囊所述试剂的脂质体。与制备中不包含糖的脂质体相比，这样获得的脂质体的尺寸的增加(与由步骤(i)获得的脂质体相比)要小许多。因此可以避免如上所述需要的另外的挤出、微流化或均化步骤。

10 人们已经发现在合适浓度的糖的存在下，在干燥过程中由于形成非晶玻璃(Crowe 等 Arch. Biochem. Biophys. 242 (1985) 240-247)以及糖与磷脂首基的相互作用(Crowe 等 Cryobiology 31 (1994) 355-366)，在一定范围内可以防止脂质体的熔融和聚集。在早期研究中，小囊(DRV's)的脱水/再水化在没有使用糖作为稳定剂的情况下进行，

15 这种方法是基于在控制再水化的条件下，诱导所制小的单层小囊的熔融/聚集(Kirby Gregoriadis, 1984)。在这样的基础上，人们可以预测由于存在的适量的糖，小的单层小囊的总的稳定性作用将导致初始 SUV's 重组为具有极低的包封率。

20 出乎意料的是没有发现这种情况。尽管对于所有的脂质体而言，试剂的包封程度在一定程度上取决于系统中类脂与试剂之比，估计通过采用本发明方法所得的包囊在脂质体中的试剂量应是可观的。

另外，当它们用作药物传递系统时，要求脂质体物理性质和化学性质稳定。在水分散体中脂质体易水解，贮存时物理性质发生变化(包括包囊药物的泄漏)，以及由于聚集或熔融引起的小囊尺寸的变化。

25 估计通过本发明方法制得的脂质体具有良好的物理和化学稳定性。

如上面所述的那样，因此这种方法可以获得小的高载荷的脂质

体小囊，这种脂质体小囊尤其适用于形成药用组合物。因此这种方法可以用于制备许多类型的包囊物质。

然而它尤其适用于制备药用的小脂质体。在这种情况下，用于这种方法的脂质体包含生物活性物质如药物。由于这个目的，在步骤(i)中所得的脂质体为适当小的单层小囊，其平均尺寸范围为如 25-90nm，优选为 50-90nm，通常为 70-90nm。由本发明方法所得的最终脂质体仍然较小，其平均尺寸小于 500nm，通常为 100-200nm。

用于步骤(i)的脂质体为空的脂质体，它由任意常规方法(如采用上面所述的典型方法)获得。生成的、其平均尺寸太大而不能用于所需目的的脂质体，可以通过采用本领域所熟知的声波破碎、均化、挤出或微流化技术来变小。

用于生产脂质体的类脂在本领域中已为人熟知。它们包括如卵磷脂如磷脂酰胆碱(PC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)或带电的类脂，尤其任选在胆固醇的存在下的阴离子类脂如磷脂酸或阳离子类脂如硬脂胺。另一优选的类脂为 DSPC。类脂的选择在一定程度上取决于活性剂的性质和脂质体的潜在用途。

用于步骤(ii)的合适的糖溶液包括单糖如葡萄糖和果糖，二糖如乳糖或蔗糖以及多糖的水溶液。用于本发明方法的尤其优选的糖为二糖如蔗糖或乳糖或单糖如葡萄糖。尤其所述糖为蔗糖。

用于步骤(ii)的糖的合适用量应使得糖与类脂的质量比范围为 1:1-6:1(w/w)，合适的为 1:1-5:1(w/w)。人们已经发现：与由步骤(i)所得的那些脂质体相比，存在的糖的量越大，在再水化后所得脂质体的尺寸的增加越小。然而，试剂的包封率可能较低。因此所用比例的精确选择将取决于所需的最终用途，以及给定类脂量的包封率和脂质体尺寸之间的平衡。根据如下所述采用的具体试剂，这种不同可以在一定程度上变化脂质体的形成。糖的存在量宜小于所述组合物的 10%(w/v)。

人们进一步发现：通过减小糖溶液的浓度，增加用于本方法的糖溶液的体积，可以提高包封率。糖溶液的合适浓度为 20-200mM，优选为 30-150mM。

此外，人们已经发现：如果在高温如 30-80℃，尤其 40-65℃ 并且特别约 60℃ 下进行随后的再水化，可以提高包封值。人们发现它对含有 PC 和 CHOL 的脂质体是有效的，这种脂质体通常可在室温下形成。当采用高温时，与开始的脂质体相比，其尺寸可能出现一些增长，因此在具体情况下，人们应考虑对具体条件的选择来生产脂质体。

已知的影响包封率的其它因素包括试剂如包囊药物的具体性质，特别是它的溶解性和试剂的存在量。试剂的溶解性在一些情况下限制了步骤(ii)中可以溶解的量和由此被脂质体包封的量。影响被包封的试剂量的其它因素包括试剂与形成脂质体的类脂的相互作用以及试剂对脂质体的渗透性。

在用于所述反应步骤(ii)的溶液中，当存在较高浓度的试剂时，包封百分率将比较低。因此，出于经济原因的考虑，它在减少所用试剂量的方面是有优势的。

对于具体试剂而言，可以通过采用常规方法来确定决定脂质体所需尺寸和载荷的条件选择，所述条件包括糖与类脂的质量比、类脂的选择、所用的糖溶液的浓度、包括在所述溶液中的试剂量以及再水化温度。

上面的干燥步骤(iii)可以通过采用常规方法来实施，这些方法如冻干、喷雾干燥、快速结晶、空气流干燥(如在流化床中)、真空干燥、烘箱干燥或本领域已知的其它方法。尽管这两种方法所得产物的机械性能可能不同，喷雾干燥法所得产物是松散的并且容易流动的粉末，而冻干则得到坚固的饼，但是在脂质体再水化时的稳定性和包封的性质上则广泛相似。

对于包括制备药用组合物的许多应用而言，喷雾干燥可能是最

好的，因为它使产物获得合适的机械性能以作进一步的加工。

冻干产物包括一块具有较低机械性能的多孔饼，对该饼进行气流粉碎可以获得较好的性质，但在其它步骤中将出现损伤。

5 喷雾干燥可以获得具有良好机械性能的干的产物，所述产物可以通过吸入进行给药，或在水中重组并通过胃肠外给药。

在生产过程中可以实施后续的再水化步骤，或者可以在所需现场如给予病人包囊药物的医院或药房应用于干态和再水化的组合物。

所得脂质体具有良好的稳定性，从而导致产品较长的货架期。这对于如化妆品、盥洗用品和药物是重要的。

10 如上所述，本方法尤其适用于制备具有高试剂负载的较小脂质体。这对于药物施用(如一些物质如聚合药物或蛋白质药物、DNA 疫苗、基因治疗载体或化学品的给药)而言是尤其需要的。合适的化学
品包括抗生素如土霉素(oxytetracyclines)、 β -内酯抗生素如青霉素如青霉素 G、氨苄青霉素或阿莫西林或头孢霉素、抗癌药、荷尔蒙、免
15 疫治疗剂、抗病毒药、消炎化合物等。

采用上述方法所得的脂质体产物可以配制成药用组合物，例如通过采用药学上可接受的载体或赋形剂来组合它们。所述制剂可适用于口服、胃肠外尤其静脉、或局部施用于如皮肤或粘膜表面。本
20 发明尤其适用的组合物为适用通过气雾剂或吸入剂施用的组合物。对此，人们已经发现高相转变的中性类脂基的脂质体如由 DSPC 和胆固醇的混合物形成的脂质体是合适的。当根据本发明生产时，不必在干燥前进行挤出。

以下将参照附图通过实施例对本发明作具体描述，其中附图为：

25 图 1 图示二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)和胆固醇(CHOL)脂质体在 0.0357M 蔗糖的存在下从声波破碎到冻干，以及再水化时的尺寸演变；

图 2 图示在本发明方法中，蔗糖的体积摩尔浓度对 PC:CHOL 脂质体包封 FITC-白蛋白、经冻干和再水化后所获得的尺寸分布(%分

布: 强度)的影响;

图 3 图示在本发明方法中, 蔗糖的体积摩尔浓度对包封表皮生长因子(EGF)的 PC:CHOL 脂质体经再水化后的尺寸分布的影响;

图 4 对根据本发明挤出和再水化所得的、包封 FITC-白蛋白的 PC:CHOL 脂质体的尺寸分布进行了图示比较;

图 5 对根据本发明方法挤出和冻干所得的、包囊羧基荧光素(CF)的脂质体的尺寸分布进行了图示说明; 和

图 6 图示本发明的各种脂质体组合物的尺寸分布。

在下面的实施例中, 卵磷脂酰胆碱(PC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)和二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)购自 Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany), 胆固醇、羧基荧光素(CF)、荧光素异硫氰酸酯标记的白蛋白(FITC-白蛋白)、核黄素、柔红霉素、阿霉素、Triton X-100、蔗糖、葡萄糖以及十二烷基硫酸钠(SDS)购自 Sigma London. 表皮生长因子(EGF)是来自古巴哈瓦那生物科学中心的礼物。Na¹²⁵I、C¹⁴-标记的羟丙基-β-环糊精、C¹⁴-标记的青霉素购自 Amersham International (Amersham, UK)。根据氯胺 T 法, 用 ¹²⁵I 标记 EGF。所有其它试剂均为分析级。

实施例 1

冻干法

含溶质的 DRV 脂质体的制备如下: 将各种类脂混合物, 具体为 PC:CHOL 和 DPPC:CHOL 以 1:1 的摩尔比溶于氯仿。随后在 37℃ 的旋转蒸发器中蒸发溶剂, 在圆底球形烧瓶的壁上形成一层薄膜。通过在大于类脂转变温度(> T_c)(在某些情况下为室温)的条件下, 用二次蒸馏水分散类脂膜从而生成多层小囊(MLV)。随后对所述悬浮体进行充分的声波破碎从而生成小的单层小囊(SUV), 对它们进行离心以除去金属颗粒。

随后将 SUV 悬浮体转移至甌形瓶中, 将所需量的所选药物(FITC-

白蛋白(1mg)、CF(1mg)、羟丙基- β -环糊精(2mg)或 EGF(150 μ g))的溶液加入其中, 并且加入 0.0357M 蔗糖和水从而得到所需体积摩尔浓度的蔗糖。

随后将所述制剂进行冷冻, 然后冻干足够长的时间(根据最后的体积)。随后在温度大于 T_c (如 60 $^{\circ}$ C)下, 通过加入 100 μ l 蒸馏水可控再水化所述干饼 15 分钟。在 PBS 中稀释所述制剂从而使其比重达到能通过超速离心从脂质体中分离出游离药物。

再水化后, 采用装配 25mw 氦/氖激光仪的自动粒度仪 2C-Malvern(Malvern Instruments UK), 通过 photon correlation spectroscopy 测定再水化后脂质体的粒度。可以获得平均直径和尺寸分布。

对平均直径 z 、多分散性指数的积分和微分分布作为蔗糖体积摩尔浓度的函数进行记录, 或者根据它们的尺寸对 DRV 进行挤出。为制备较大尺寸(高达 6 微米), 使用 Mastersizer(Malvern)。

以 40000 $\times$ g 超速离心脂质体后, 测定药物的包封值。以所用的 CF、FITC-白蛋白、EGF 或羟丙基- β -环糊精的总百分率计算包囊物质的量。

羧基荧光素和 FITC-白蛋白的总量和包囊量通过荧光光度法(对于 CF, $\lambda_{\text{发射}} = 486\text{nm}$ 和 $\lambda_{\text{激发}} = 514\text{nm}$, 对于 FITC-白蛋白, $\lambda_{\text{发射}} = 495\text{nm}$ 和 $\lambda_{\text{激发}} = 520\text{nm}$, 用 Triton 或 SDS(5%最终浓度)溶解的粒料)来测量。采用 β 闪烁计数器, 通过放射度测定来测量来自标记的羟丙基- β -环糊精的碳 14 发射。

结果列于表 1:

表 1

包封的物质	蔗糖的体积摩尔浓度	再水化后的粒度 $\pm$ (SD) nm	% 包封率 $\pm$ (SD)
FITC-白蛋白 ★	40 mM	286.9 (29.2)	87.5 (0.5)
	65 mM	265.4 (6)	70.2 (8.5)
	135 mM	254.8 (6.5)	52.7 (2.3)

	无蔗糖	5250 (25)	84.2 (2.7)
羧基荧光素 #	35.7 mM	163.8 (25)	31.5 (0.1)
	71.4 mM	124.9 (2)	30.75 (0.05)
	135 mM	129.35 (1)	30.7 (0.05)
	无蔗糖	6200 (40)	55.45 (0.05)
EGF #	35.7 mM	144.8 (32)	33.5 (6.9)
EGF**	64.6 mM	167.4 (6.8)	42 (1.5)
EGF #	126 mM	146.4 (1.3)	29.6 (1)
EGF #	无蔗糖	1276.7 (100.7)	22.3 (2.10)
EGF ⊕	35.7 mM	127.6 (2.8)	25.5 (0.2)
EGF ⊕	无蔗糖	2495.7 (329)	31.9 (0.85)
羟丙基-β-环 糊精 #	40 mM	133	26
	无蔗糖	10,000	24.4

其中*是指由 32:32 μmoles 的 PC:CHOL 混合物形成的脂质体;

= 16:16 μmoles 的 PC:CHOL;

** + 64:64 μmoles 的 PC:CHOL; 和

5 ⊕ = 16:16 μmoles 的 DPPC:CHOL

结果显示: 通过蔗糖的中等程度的稳定化作用、允许一定程度
熔融的重组(图 1)可以获得非常高的包封百分率。

10 尽管在或没有 40mM 蔗糖的存在下, 可以获得相似的 FITC-白
蛋白包封百分率, 但(分别有 87%和 84%)的最终尺寸远小于使用蔗糖
的制剂。

通过变化蔗糖在含有 FITC-白蛋白的脂质体的不同制剂中的体积
摩尔浓度(表 1), 可以获得脂质体的不同的尺寸分布(图 2), 尽管包封
值随着体积摩尔浓度的增加而减小。

15 在不同体积摩尔浓度的蔗糖的存在下, 对 EGF 和 CF 进行包囊。
包封百分率等于采用相同数量的类脂但在无蔗糖存在下所得的其它

制剂的百分率(参见表 1)。在这种情况下, 蔗糖的体积摩尔浓度不会
影响包封百分率, 但对尺寸和尺寸分布有影响(图 3)。

在蔗糖或无蔗糖存在下制得的 DRV 脂质体的平均直径 z 列于表
1 中。结果显示: 当采用高体积摩尔浓度的蔗糖时, 得到较小的小囊
尺寸, 对应于较窄的尺寸分布, 并由此对应中等的包封百分数。包
封百分数正比于尺寸和尺寸分布。

在两种不同体积摩尔浓度的蔗糖中, 我们可以测出不同宽度的
两类小囊具有几乎相同的两种平均直径, (图 3)。

在 35.70 mM 和 126 mM 的蔗糖中制备的包封 EGF 的脂质体在
再水化后的两种平均直径分别为 $144.8 \pm 32\text{nm}$ 和 $146.4 \pm 1.3\text{nm}$ 。

由尺寸分布, 我们可以看出 126mM 蔗糖制剂的尺寸分布较窄。
通过采用高体积摩尔浓度的蔗糖(大于 36mM), 来降低脂质体的尺寸
和使尺寸分布变窄不会导致包封值变小。采用两种不同浓度的蔗糖
(35.7mM 和 135mM), 我们发现: 可获得与 135mM 蔗糖制备的脂质
体相比, 具有较窄尺寸分布(PDI=0.13)的包封相同量 CF(约 30%)的脂
质体。

实施例 2

本发明脂质体与挤出脂质体的比较

为比较本发明方法与挤出方法(也导致小囊尺寸变小), 我们采用
挤出机来处理未用蔗糖制备的 DRV 脂质体。对如实施例 1 所述制备
的脂质体与由挤出法获得的脂质体进行比较。

采用高压过滤罐, 对未用蔗糖制备的 DRV 脂质体进行挤出。在
消除未包封的溶质前, 使脂质体通过孔径为 $1.2\mu\text{m}$ 、 $0.4\mu\text{m}$ 、 $0.2\mu\text{m}$
和 $0.1\mu\text{m}$ 的聚碳酸酯膜。在各个挤出步骤中, 五次通过相同的膜。

随后通过超速离心, 将游离溶质与挤出小囊分离。将所述粒料
悬浮至 1ml 的 PBS(pH=7.4)。

随后按实施例 1 所述的方法测量脂质体的尺寸。将所述尺寸分

布与如实施例 1 所述所得的相似脂质体进行比较。结果列于下面的图 4 和图 5。可以看出：挤出脂质体展现出较窄的小囊尺寸分布。

在挤出前和挤出后，对比较脂质体中的包封物质进行测量。结果列于表 2。

5

表 2

膜孔径 (nm)	试剂材料	挤出前的尺寸 ± (SD)	挤出后的尺寸 ± (SD)	最终包封率 % ± (SD)
200	FITC-白蛋白	5250 (25)	210.75 (4)	29 (2)
200	CF	6300 (150)	213.9 (0.7)	6.3 (1)
100	CF	6220 (130)	158.7 (0.3)	6 (0.5)
400	EGF	2495 (329)	327.4 (12.68)	9.15 (0.35)
200	EGF	3128 (763)	220.7 (4.12)	6.35 (1.25)

平均直径和包封值列于表 2。它们表明：挤出的脂质体获得较低的包封值和窄的尺寸分布($PDI \leq 0.1$)。较低的包封值和制备小尺寸脂质体时需要的其它步骤(挤出)明显降低了这种方法的实际应用。

10

图 5 显示了包封 CF(6%包封率)的挤出脂质体和存在 135mM 蔗糖的存在下包囊 30%CF 的冻干脂质体包覆的尺寸分布。

用挤出法获得的小囊的较窄尺寸分布并不是最重要的，因为相应的包封百分率较低。

15

实施例 3

本发明脂质体的尺寸分布

采用具有高相转变温度的磷脂可以改进涉及尺寸分布宽度的技术。这通过按实施例 1 所述方法在 35.71mM 蔗糖的存在下对包封 EGF 的等摩尔 DPPC:CHOL 脂质体进行配制来实现。EGF 的包封值为 25%。然而，脂质体具有比相应 PC:CHOL 制剂较窄的尺寸分布(z 平均值 = 128 nm)。结果列于图 6。因此在这种情况下，最好选择具有

20

较高相转变温度的类脂从而获得具有较窄尺寸分布的脂质体。

实施例 4

高收率包封核黄素进入小脂质体

5 使用等摩尔磷脂酰胆碱(390 μ moles)和胆固醇，通过声波破碎来制备小的单层小囊(SUV)。随后将 SUV 与核黄素(12mg)进行混合并增加蔗糖的用量(每毫克总类脂 0-5 毫克)。对所述混合物进行喷雾干燥并随后进行再水化。在离心制备的悬浮的粒料中对包封的药物进行测量。最终小囊制剂中的 SUV 尺寸通过 photocalibration spectroscopy
10 或 Mastersizer 进行测量。结果列于表 3。

表 3

SUV z 平均尺寸 (nm $\pm$ SD)	蔗糖量/类脂量	包封率(所用药物的%)	小囊 z 平均尺寸 (nm $\pm$ SD)
78.1 $\pm$ 0.5	0	45.8%	4690
77.0 $\pm$ 0.4	1	47.5%	313.2 $\pm$ 1.5
67.0 $\pm$ 0.1	3	18.8%	155.4 $\pm$ 1.5
80.5 $\pm$ 0.9	5	11.0%	106.8 $\pm$ 1.5

15 可以看出在药物和蔗糖(1mg/1mg 类脂)的存在下，对小脂质体(SUV)的喷雾干燥可以获得包封几乎一半(47.5%)所用药物量的较小脂质体。通过增加蔗糖量，可以进一步减小小囊的尺寸，然而包封值相伴减小。

实施例 5

包含葡萄糖的脂质体

20 重复实施例 1 的方法，但采用核黄素作为活性剂，其在溶液中的量为 1mg(总共 1ml)并且在一些情况下，采用葡萄糖替代蔗糖。如实施例 1 所述方法对再水化的脂质体尺寸进行测量。由发射波长

=480nm、激发波长=520nm 的荧光光度法，通过测量总的核黄素和包裹的核黄素，来计算核黄素的包裹效率。结果列于表 4 和表 5。

表 4

蔗糖/类脂的质量比	尺寸 (nm)	葡萄糖/类脂的质量比	尺寸 (nm)
0/1	1243.4	0/1	5210
1/1	591.8	1/1	908
3/1	168.9	3/1	306.8
5/1	144.9	5/1	267

5

表 5

蔗糖/类脂的质量比	包封率 %	葡萄糖/类脂的质量比	包封率 %
0/1	59.3	0	45.87
1/1	78.0	1	52.97
3/1	47.83	3	45.21
5/1	34.81	5	39.4

根据质量，用葡萄糖代替蔗糖加入 SUV 脂质体来获得相同的稳定效果。类脂与糖(葡萄糖或蔗糖)之比为 3g/g 和 5g/g 的核黄素的包封值的数量级相同(表 5)。

10

与在蔗糖的存在下制备的样品相比，通过加入等量的葡萄糖来制备的脂质体在再水化时具有较大的小囊尺寸(表 4)。

实施例 6

再水化温度对形成脂质体的影响

15

采用等摩尔 PC:CHOL 脂质体、蔗糖溶液(68.7mM)和 5mg 作为活性物的 ^{14}C 青霉素(青霉素 G)，重复实施例 1 的方法。在这种情况下，在不同温度下进行再水化。具体而言，将一些制剂在室温下再

水化, 而另一些则在 60℃ 下加热 15 分钟。以 40000g 对制备的脂质体进行超速离心后, 测定包封效率, 随后以上层清液和粒料的总量百分率来表征 ^{14}C -青霉素的放射性。结果列于表 6。

表 6

EPC: CHOL	再水化 25℃			EPC: CHOL	再水化 60℃		
蔗糖 mol=68.7mM				葡萄糖 mol=68.7mM			
SUV 尺寸 = 68nm				SUV 尺寸 = 85.8nm			
青霉素 G	5mg			青霉素 G	5mg		
蔗糖/类 脂	尺寸 (nm)	%包封 率	PDI				
0/1	5605	38.5	-				
	4920	45.5	-	蔗糖/类 脂	尺寸(nm)	%包封 率	PDI
AV	5262	42	-				
SD	342.5	3.5	-				
1g/g	95.7		0.38				
	69.7		0.38	1g/g	973		0.12
	95.7		0.38		926.4		1.0
AV	96	12.9	0.38	AV	949.7	34.4	0.56
SD	0.47		0.0	SD	23.3		0.44
1g/g	104		0.33				
	102.9		0.4	1g/g	1135		0.33
	101.5		0.43		1063.4		0.40
AV	102.8	14.1	0.39	AV	1099	40	0.36
SD	1.02		0.04	SD	35.8		0.03
3g/g	89.5		0.24				
	92.8		0.22	3g/g	232		0.31
	90.4		0.21		229		0.29
AV	90.9	6.2	0.22	AV	230.5	24.1	0.3
SD	1.39		0.01	SD	1.45		0.01
3g/g	93.7		0.2				
	88.8		0.43	3g/g	247.7		0.29
	84.5		0.53		244.6		0.27
AV	89	6.1	0.39	AV	246.15	23.6	0.28
SD	3.76		0.14	SD	1.55		0.01
5g/g	88.8		0.19				
	92.1		0.14	5g/g	271.6		0.30
	90.9		0.16		276.2		0.21
AV	90.6	6.3	0.16	AV	273.9	17.2	0.25
SD	1.36		0.02	SD	2.3		0.04

5g/g	89		0.16				
	88.7		0.12	5g/g	268.3		0.37
	86.9		0.15		266.3		0.27
AV	88.2	6.9	0.14	AV	267.3	17.9	0.32
SD	0.93		0.02	SD	1		0.05

在上面的表和下面的表中,“AV”代表脂质体的平均尺寸,“SD”为标准偏差,并且“PDI”代表尺寸分布或多分散性指数。

在室温下再水化的脂质体只在 68nm(声波破碎的 SUV)至平均 90nm 的尺寸下有轻微的增加,但可以包囊平均 6.5%的初始加入的青霉素。即使在较高的蔗糖浓度下,仍可获得一定程度的包囊。100nm 的小囊的包囊率为 14%。

在再水化步骤中,加热相似的制剂,可以得到较大的小囊。平均直径 230nm 的脂质体可以包囊 24%初始加入的 ^{14}C 青霉素(比例为 3g 蔗糖/g 类脂)。通过将糖/类脂的质量比从 3 增加至 5 来增加蔗糖的量,从而得到具有较小包囊率的稍大的小囊。

实施例 7

在不同蔗糖浓度下对 ^{14}C 青霉素的包囊

采用等摩尔 PC:CHOL 脂质体和作为活性物的 ^{14}C 青霉素(5mg),重复实施例 6 的方法,但采用较高体积摩尔浓度的蔗糖溶液(68.78mM)或更稀的蔗糖溶液(35mM)。

结果列于表 7,一起的为前面表 6 所示的在 25℃下再水化的结果。

表 7

EPC:CHOL	再水化 25℃			EPC:CHOL	再水化 25℃		
蔗糖 摩尔=68.7mM, SUV 尺寸=68nm				蔗糖 摩尔=35mM, SUV 尺寸=83.5nm			
青霉素 G	5mg			青霉素 G	5mg		
蔗糖/类脂	尺寸 (nm)	%包封率	PDI				
0/1	5605	38.5	-				
	4920	45.5	-				
AV	5262.5	42	-				

SD	342.5	3.5	-	蔗糖/类脂	尺寸(nm)	%包封率	PDI
1g/g	95.7		0.38				
	69.7		0.38	1g/g	211.6		0.3
	95.7		0.38		213.5		0.34
AV	96	12.9	0.38	AV	212.55	29.1	0.32
SD	0.47		00	SD	0.95		0.02
1g/g	104		0.33				
	102.9		0.4	1g/g	212.2		0.25
	101.5		0.43		215.3		0.27
AV	102.8	14.1	0.39	AV	213.75	31.8	0.26
SD	1.02		0.04	SD	1.55		0.01
3g/g	89.5		0.24				
	92.8		0.22	3g/g	200.8		0.06
	90.4		0.21		198.8		0.09
AV	90.9	6.2	0.22	AV	199.8	19.9	0.075
SD	1.39		0.01	SD	1		0.015
3g/g	93.7		0.2				
	88.8		0.43	3g/g	190		0.2
	84.5		0.53		192.3		0.16
AV	89	6.1	0.39	AV	191.15	19.0	0.18
SD	3.76		0.14	SD	1.15		0.02
5g/g	88.8		0.19				
	92.1		0.14	5g/g	198.7		0.04
	90.9		0.16		200		0.1
AV	90.6	6.3	0.16	AV	199.35	16.2	0.07
SD	1.36		0.02	SD	0.65		0.03
5g/g	89		0.16				
	88.7		0.12	5g/g	195.2		0.08
	86.9		0.15		196		0.06
AV	88.2	6.9	0.14	AV	195.6	14.8	0.07
SD	0.93		0.02	SD	0.4		0.01

采用较低体积摩尔浓度的糖溶液生产的脂质体的平均尺寸约200nm，其大于采用较高体积摩尔浓度糖溶液生产的那些脂质体。然而，包封值较大，多分散性指数较小。

- 5 因此可以看出：在脂质体的制备过程中，减小蔗糖的体积摩尔浓度是在再水化时采用高温从而提高包封率的一种较好的替代方法(参见实施例6)。尽管可以获得相似的包囊百分率，但是当采用较低体积摩尔浓度的蔗糖时，脂质体保持较小的尺寸。

实施例 8

DSPC 脂质体的制备

采用 DSPC 和等摩尔胆固醇，重复实施例 6 的方法来制备脂质体。在这个实验中，采用较高蔗糖体积摩尔浓度(71mM)和青霉素(5mg)。

结果列于表 8。

表 8

DSPC:CHOL	在 60℃ 下加热 15 分钟		
蔗糖体积摩尔浓度	71.16 mM		
SUV 尺寸(nm)	77.2	PDI=0.27	
糖/类脂质量比	尺寸 (nm)	包囊率%	PDI
0/1	4645	50.35	-
	5005	51.43	-
AV	4825.0	50.9	-
SD	180.00	0.54	-
1	302		0.17
	282		0.34
	277.2		0.3
AV	287.1	41.9	0.3
SD	10.74		0.07
1	252.9		0.28
	241.3		0.25
	239.7		0.27
AV	244.6	37.7	0.27
SD	5.88		0.01
3	158		0.08
	152.3		0.18
	152.4		0.15
AV	154.2	18.8	0.14
SD	2.66		0.04
3	160.8		0.18
	158.8		0.14
	154.2		0.17
AV	157.9	19.3	0.16
SD	2.78		0.02
5	171.2		0.1
	166.9		0.14
	164.5		0.12
AV	167.5	13.9	0.12
SD	2.77		0.02
5	143.9		0.13

	142.4		0.11
	139.5		0.14
AV	141.9	15.3	0.13
SD	1.83		0.01

这些结果表明：增加蔗糖的量，可以降低 ^{14}C 青霉素的包封值和降低平均直径。与 PC:CHOL 脂质体相比，DSPC:CHOL 脂质体具有较高的包封值和较小的尺寸。这可能是由于 DSPC 较高的相转变温度(T_c)可以获得加热时较高的稳定性。

实施例 9

阿霉素的包囊

根据表 9 的条件，制备包含阿霉素的脂质体。

表 9

实验条件

阿霉素 (1.3 mg/ml)

在激发和发射波长分别为 480nm 和 560nm 下测定阿霉素。

脂质体组合物

EPC:CHOL (总共 38.2 mg); 小囊尺寸 68.2nm

阿霉素用量 0.5mg

蔗糖用量 (mg)	0	38	114	190
-----------	---	----	-----	-----

冻干前的体积 (ml)	1.51	1.51	4.5	7.5
-------------	------	------	-----	-----

DSPC:CHOL (总共 40 mg); 小囊尺寸 59.7nm

阿霉素用量: 0.5mg

蔗糖用量 (mg)	0	40	120	200
-----------	---	----	-----	-----

冻干前的体积 (ml)	1.58	1.58	4.73	7.9
-------------	------	------	------	-----

按前面实施例所述方法测量再水化脂质体的尺寸。在超速离心后，如前所述确定阿霉素的包封值。在发射波长 490nm 和激发波长

560nm 的条件下, 通过荧光光度法测量总的阿霉素和包囊的阿霉素。结果列于表 10。

表 10

	蔗糖/类脂的质 量比	包封	尺寸(nm)	PDI
	0/1	53	2276	0.99
EPC:CHOL	1/1	54.5	281.96	0.34
	3/1	47.1	133.5	0.15
	5/1	45.45	116.4	0.15
DSPC:CHOL	0/1	74	2373.8	1
	1/1	71.6	686.9	0.51
	3/1	67.95	179.53	0.28
	5/1	66.4	131.23	0.11

- 5 阿霉素成功地包囊于小尺寸的脂质体中。用 5g 蔗糖对 1g 类脂制备的等摩尔 PC:CHOL 脂质体的尺寸为 116nm 并且包囊率为 45%。增加蔗糖与类脂之比不会显著影响包囊百分率。用 DSPC 代替 PC 可以得到具有较高包囊百分率的脂质体。

10 实施例 10

增加蔗糖浓度的作用

采用不断增高的蔗糖浓度, 重复实施例 4 的方法。所用浓度和核黄素包囊值以及脂质体尺寸的结果列于表 11。

表 11

蔗糖浓度对包封核黄素的作用

15

SUV	尺寸(nm)	蔗糖 (mM)	蔗糖/类 脂的质量 比(%w/v 糖)	包封率 (%±SD)	尺寸 (nm±SD)	PDI±SD

PC, CHOL	57.0	0.0	0.0	43.7	5200	
		40.0	1.0	78.0	591.8	
			3.0	47.8	168.9	
		292.1	10.0 (10.0%)	6.1±0.8	113.4±3.4	0.12±0.0
			15.0 (10.0%)	4.1±0.3	116.3±0.4	0.14±0.0

这些结果表明：在较高的蔗糖/类脂质量比，特别是蔗糖过量 10%(w/v)的条件下，包封值较小，尽管稳定性作用对脂质体大小的影响具有良好的弥补效果。

5

实施例 11

脱氧果糖(Desoxyfructo)-血清素(DFS)的包囊

包含 DFS 的脂质体通过采用下面表 12 所述的条件来制备。包括包封值和再水化后的尺寸的结果也列于这个表中。

10

表 12

脱氧果糖-血清素(DFS) (输入 2mg)				
在室温下再水化				
蔗糖的体积摩尔浓度 = 52 mM				
类脂组合物	蔗糖/类脂的 质量比	%包封率 (±SD)	尺寸(nm) (±SD)	PDI (±SD)
EPC:CHOL	无	92.73 (0.23)	1152.9 (60.6)	1(0)
	1	36.9 (0.42)	121.1 (7)	0.29 (0.01)
	5	12 (2.7)	134.5 (24)	0.15(0.07)

在这个实施例中，获得良好的包封率以及可接受的尺寸稳定性。

说明书附图

图 1

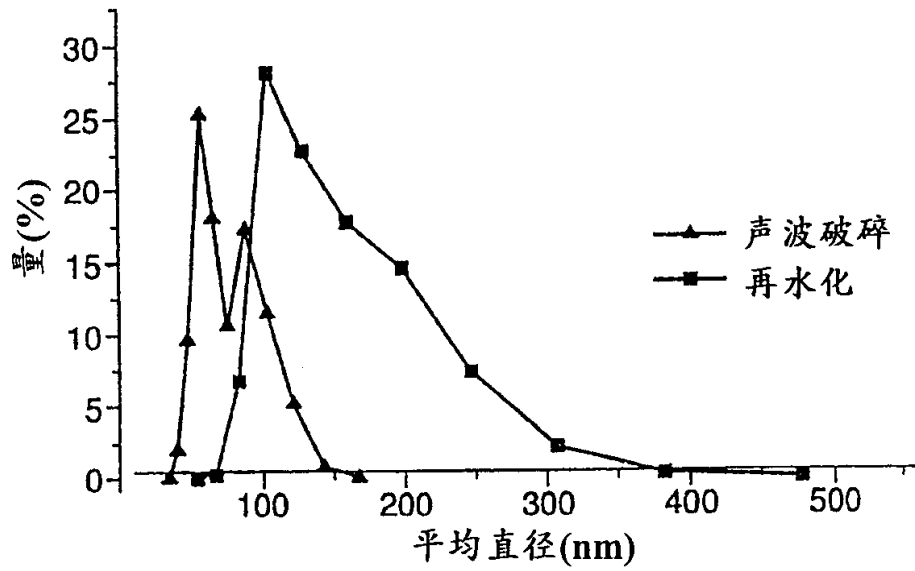


图 2

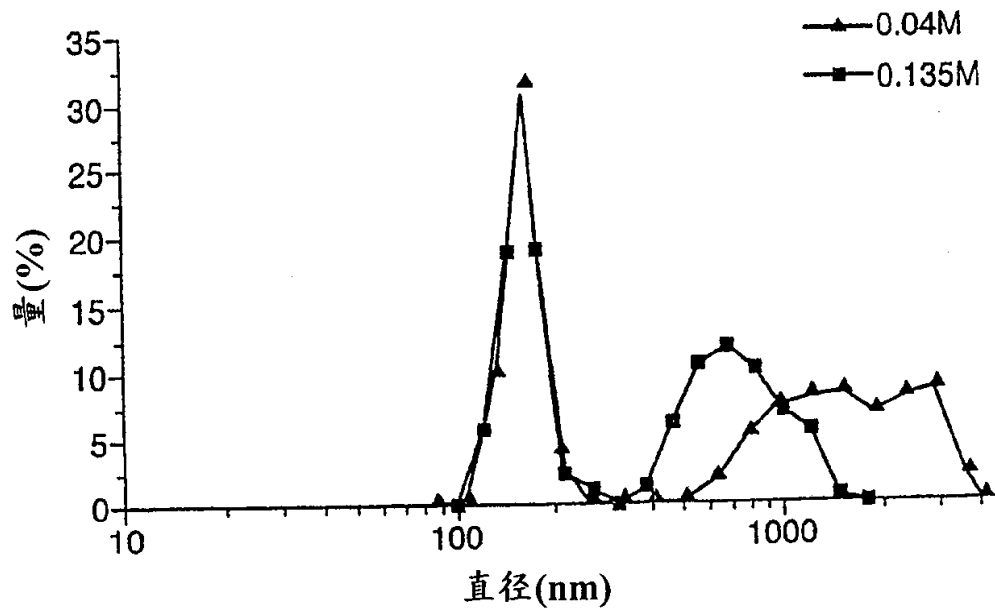


图 3

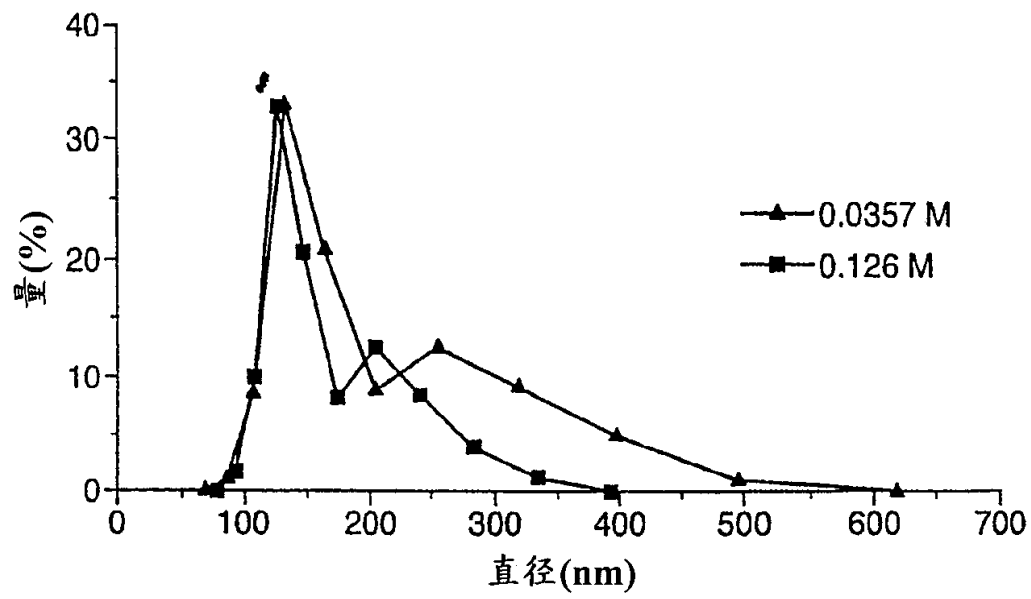


图 4

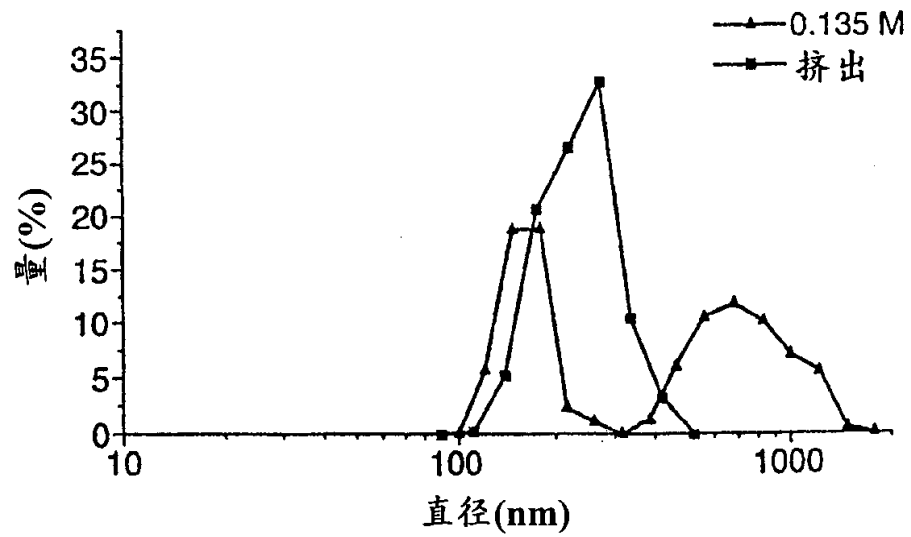


图 5

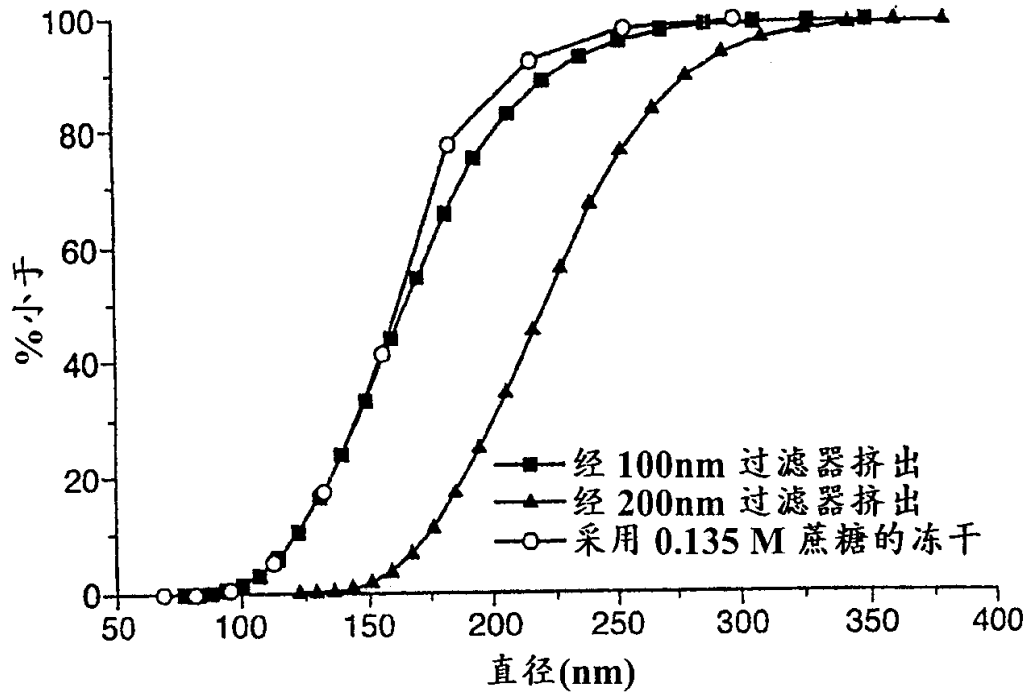


图 6

