



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106946975 A

(43)申请公布日 2017. 07. 14

(21)申请号 201710157831.3

A61P 35/00(2006.01)

(22)申请日 2017.03.16

(71)申请人 上海天氏利医药科技有限公司

地址 201802 上海市嘉定区南翔镇惠裕路
555号4幢294室

(72)发明人 傅志勤 周琴琴 单彬

(74)专利代理机构 上海顺华专利代理有限责任
公司 31203

代理人 陆林辉

(51)Int.Cl.

C07J 73/00(2006.01)

A61K 31/585(2006.01)

A61K 9/127(2006.01)

A61K 47/26(2006.01)

A61P 29/00(2006.01)

权利要求书3页 说明书20页

(54)发明名称

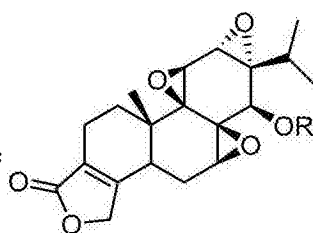
一种雷公藤甲素衍生物及其制备方法与制
剂

载效果,制成的纳米制剂具有载药量大、包封率
高、性质稳定等特点,同时还具有显著降低毒性,
延长半衰期等优势。

(57)摘要

本发明公开了一种雷公藤甲素衍生物及其
制备方法与制剂,所述的雷公藤甲素衍生物的化

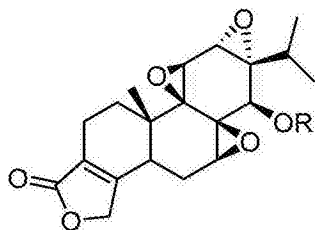
学结构如式(I)所示:



(I)

式(I)中,R表示碳原子数为2n的直链烷基酰基,n
为2~9。本发明公开了所述化合物的制备方法,
是由雷公藤甲素与饱和脂肪酸通过酯化反应得
到。在TP的C14位OH键合饱和脂肪酸,将羟基成酯
减小极性的同时引入脂肪酸可有效地增强脂溶
性,而且性质稳定,不易氧化,可显著改善TP纳米
制剂成药性。由本发明化合物制备的脂质体、胶
束、纳米粒、脂肪乳等纳米制剂均具有良好的包

1. 一种雷公藤甲素脂肪酸酯,其化学结构如式(I)所示:



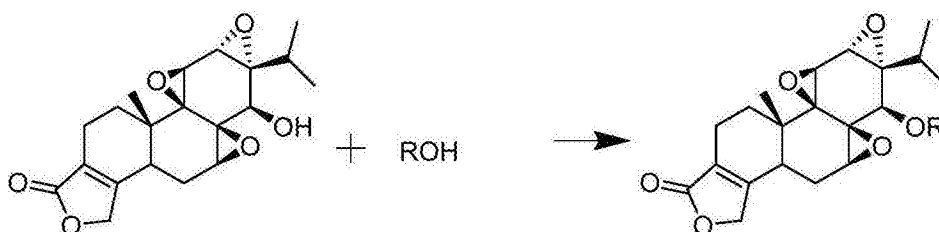
(I)

式(I)中,R表示碳原子数为2n的直链烷基酰基,n为2~9。

2. 如权利要求1所述的雷公藤甲素脂肪酸酯,其特征在于,n为4~9。

3. 如权利要求1所述的雷公藤甲素脂肪酸酯,其特征在于,n为7~9。

4. 一种制备权利要求1~3任一项所述的雷公藤甲素脂肪酸酯的方法,其特征在于,所述的雷公藤甲素脂肪酸酯由雷公藤甲素与饱和脂肪酸通过酯化反应得到,合成路线为:



其中,ROH为饱和脂肪酸,R定义如权利要求1~3任一项所述;

具体步骤包括:

(a) 将饱和脂肪酸、缩合剂及催化剂溶于有机溶剂中,搅拌下冷却至0~10℃得混合液;

(b) 将雷公藤甲素溶解在有机溶剂中滴入上述混合液中,0~10℃条件下反应15~45分钟,然后室温下继续反应,酯化反应结束后分离得到雷公藤甲素脂肪酸酯。

5. 如权利要求4所述的方法,其特征在于,

所述的缩合剂为对硝基苯甲酰氯、N,N'-二环己基碳二亚胺、N,N'-二异丙基碳二亚胺、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐、2-氯-1-甲基吡啶鎓碘化物、六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯、0-(5-氯苯并三氮唑-1-基)-二(二甲胺基)碳鎓六氟磷酸盐、0-(苯并三氮唑-1-基氧基)-二哌啶碳鎓六氟磷酸盐、N-羟基琥珀酰亚胺和N-羟基硫代琥珀酰亚胺中的一种或两种以上;

所述的催化剂为1-羟基苯并三唑、4-二甲氨基吡啶、三乙胺和N,N-二异丙基乙胺中的一种或两种以上;

所述的有机溶剂为二氯甲烷、三氯甲烷、N,N-二甲基甲酰胺和N,N-二甲基乙酰胺中的一种或两种以上。

6. 如权利要求4所述的方法,其特征在于,所述的饱和脂肪酸与雷公藤甲素摩尔比为1.2~4:1,所述的缩合剂与雷公藤甲素的摩尔比为1.2~4:1。

7. 权利要求1~3任一项所述的雷公藤甲素脂肪酸酯在制备抗肿瘤或抗炎药物中的应用。

8. 一种权利要求1~3任一项所述的雷公藤甲素脂肪酸酯的纳米制剂,所述纳米制剂为

脂质体、聚合物胶束、白蛋白纳米粒或脂肪乳。

9. 如权利要求8所述的纳米制剂,其特征在于,所述的脂质体由下列成分按照重量体积比配制而成:

雷公藤甲素脂肪酸酯	0.05~1% 克/毫升
磷脂	0.5~10% 克/毫升
PEG 化磷脂	0~1% 克/毫升
胆固醇	0~1% 克/毫升
冻干保护剂	4~40% 克/毫升
pH 调节剂	调节 pH 至 4.0~9.0
注射用水	余量。

10. 如权利要求9所述的纳米制剂,其特征在于,所述的脂质体由下列成分按照重量体积比配制而成:

雷公藤甲素脂肪酸酯	0.05~0.5% 克/毫升
磷脂	1~5% 克/毫升
PEG 化磷脂	0~0.5% 克/毫升
胆固醇	0~0.5% 克/毫升
冻干保护剂	15~30% 克/毫升
pH 调节剂	调节 pH 至 5.0~8.0
注射用水	余量。

11. 如权利要求9或10所述的纳米制剂,其特征在于,

所述的磷脂为蛋黄磷脂、大豆磷脂、磷脂、氢化蛋黄磷脂、氢化大豆磷脂、二棕榈酰磷脂酰胆碱、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、二硬脂酰磷脂酰甘油、二棕榈酰磷脂酰甘油、二油酰磷脂酰胆碱、心磷脂和鞘磷脂中的一种或两种以上;

所述的PEG化磷脂为PEG化二硬脂酰磷脂酰乙醇胺、PEG化二棕榈酰磷脂酰乙醇胺、PEG化二肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺中的一种或两种以上,所述PEG化磷脂的PEG平均分子量为1000~8000;

所述的冻干保护剂为海藻糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、甘露醇、葡萄糖中的一种或两种以上;

所述的pH调节剂为氢氧化钠、醋酸钠、醋酸、磷酸盐、碳酸盐、盐酸、柠檬酸等中的一种或两种以上。

12. 如权利要求9或10所述的纳米制剂,其特征在于,

所述的磷脂为蛋黄磷脂或大豆磷脂;

所述的PEG化磷脂为平均分子量为2000的PEG化二硬脂酰磷脂酰乙醇胺;

所述的冻干保护剂为海藻糖或蔗糖;

所述的pH调节剂为氢氧化钠、盐酸或柠檬酸。

13. 一种脂质体的制备方法, 所述脂质体的配方如权利要求9~12任一项所述, 所述制备方法包括步骤:

(A) 脂质体粗品的配制, 称取配方量雷公藤甲素脂肪酸酯、磷脂、PEG化磷脂及胆固醇, 加入适量有机溶媒I于25~75℃下加热溶解得有机相, 再将有机相缓慢注入25~75℃的适量注射用水中, 边注入边搅拌混匀, 即得脂质体粗品;

(B) 脂质体溶液的制备, 将所述脂质体粗品置于高压均质机中均质乳化、或置于挤出器中依次通过不同孔径的挤出膜挤出、或置于高压均质机中均质后再行挤出, 得脂质体溶液;

(C) 称取配方量冻干保护剂, 溶于所述脂质体溶液; 加注射用水定容, 调节pH至规定值; 0.22μm滤膜过滤, 分装, 冷冻干燥, 封口压盖, 即得;

或者,

步骤(A) 替换为: (A') 称取配方量雷公藤甲素脂肪酸酯、磷脂、PEG化磷脂、胆固醇溶于有机溶媒II中, 40~60℃条件下真空旋蒸除去溶剂得脂质薄膜, 用适量注射用水进行水化得脂质体粗品。

14. 如权利要求13所述的脂质体的制备方法, 其特征在于, 所述的有机溶媒I选自无水乙醇、丙二醇、叔丁醇中的一种或两种以上; 所述的有机溶媒I保留在脂质体中, 或者在脂质体粗品乳化后再通过超滤或刮板薄膜蒸发器去除。

15. 如权利要求13所述的脂质体的制备方法, 其特征在于, 所述的有机溶媒II为二氯甲烷、三氯甲烷、无水乙醇中的一种或两种以上。

16. 如权利要求13所述的脂质体的制备方法, 其特征在于, 所述的冻干保护剂于脂质体溶液中外加或溶于水相中内加。

17. 如权利要求13所述的脂质体的制备方法, 其特征在于, 步骤(B) 中的所述挤出膜孔径选自2.0μm、1.0μm、0.8μm、0.6μm、0.4μm、0.2μm、0.1μm和0.05μm中的一种或两种以上, 挤出时依次通过大孔径到小孔径。

一种雷公藤甲素衍生物及其制备方法与制剂

技术领域

[0001] 本发明涉及医药技术领域,具体涉及一种雷公藤甲素衍生物及其制备方法与制剂。

背景技术

[0002] 雷公藤甲素(Triptolide,TP)又称雷公藤内酯、雷公藤内酯醇,是从中药雷公藤(*Tripterygium wilfordii* Hook F)植物中分离的一种环氧二萜类内酯化合物,具有很强的生物活性,包括抗炎、免疫抑制、抗肿瘤、抗生育等(Liu Q.Triptolide and its expanding multiple pharmacological functions[J].International Immunopharmacology,2011,11(3):377-383)。作为雷公藤主要活性成分,其抗肿瘤价值被广泛研究,截至目前至少有60种肿瘤细胞株经研究可以被TP抑制(骆永伟,施畅,廖明阳.雷公藤甲素抗肿瘤作用机制研究进展[J].中国中药杂志,2009,34(16):2024-2026)。TP作为抗肿瘤药物有以下四个特点:①在鼠移植瘤动物模型中表现出广谱的抗肿瘤活性,对乳腺癌、膀胱癌、胃癌和黑色素瘤原发性肿瘤的抑制率可达50%~90%,不仅对原发性肿瘤有效,对继发性肿瘤也有效;②能够抑制多种实体瘤的生长和转移与抑瘤基因(P53)的状态无关,对P53缺陷的肿瘤细胞仍能发挥作用;③对高表达多药耐药蛋白(MDR1)的肿瘤细胞有效,而这些细胞对常用化疗药物如紫杉醇等耐药,因此TP可与化疗药物合用以增加疗效;④具有较传统抗肿瘤药物更强的抗肿瘤活性,低浓度时即产生很强的抗肿瘤活性(Yang S,Chen J,Guo Z,et al.Triptolide Inhibits the Growth and Metastasis of Solid Tumors[J].Molecular Cancer Therapeutics,2003,2(1):65-72)。TP抗肿瘤作用的具体机制不明,通过多种信号通路诱导肿瘤细胞凋亡可能是其抗肿瘤作用的最主要机制。此外,TP还可通过抑制血管生成、阻断细胞周期进程、抑制细胞外基质降解等作用达到抑制肿瘤生长和转移的目的(Meng C,Zhu H,Song H,et al.Targets and molecular mechanisms of triptolide in cancer therapy[J].Chinese Journal of Cancer Research,2014,26(5):622-626)。其在抗肿瘤方面表现出的广谱、高效等优势使得TP具有广阔的临床应用前景。

[0003] 虽然早在1972年TP就被证实对白血病有治疗作用(Kupchan S M,Court W A, Dailey R G,et al.Tumor inhibitors.LXXIV.Triptolide and triptolide,novel antileukemic diterpenoid triepoxides from *Tripterygium wilfordii* [J].Journal of the American Chemical Society,1972,94(20):7194-7195),并且近十余年来,大量体内外研究充分表明TP对多种实体瘤细胞和实体瘤的生长具有抑制作用。然而迄今为止却仍未开发出一种针对TP应用于抗肿瘤治疗的高效药物上市。其中困难主要体现在以下几个方面:

[0004] TP毒性大:在发挥药效的同时伴随着严重的毒副作用,并表现出窄的治疗窗,导致其临床应用受到了极大的限制。其毒性作用主要反映在一般毒性、靶器官毒性、遗传毒性、生殖系统毒性、局部刺激毒性等几个方面。而靶器官毒性涉及机体几乎所有的有生理功能的器官,即使治疗剂量的TP仍然显示对免疫功能有抑制,超量、中毒则会引起淋巴器官的萎

缩和淋巴细胞的坏死(Li X,Jiang Z,Zhang L.Triptolide:progress on research in pharmacodynamics and toxicology[J].Journal of Ethnopharmacology,2014,155(1):67-79)。

[0005] TP半衰期短:其体内消除速率快,半衰期短,导致在很大程度上削弱了其应有的抗肿瘤效果,并且其入血体积分布广,靶向性差,反而加重了不良反应的发生。Shao等采用液相色谱/质谱联用方法(LC/MS)研究了TP在大鼠体内的药代动力学特征,结果表明SD大鼠单次口服TP剂量分别为0.6、1.2和2.4mg/kg,血药浓度达峰时间在10min左右,消除半衰期为16.81~21.70min,比较三者的药动学参数显示AUC和C_{max}值并不会随剂量的增加而提高,提示临床应用高剂量时可能呈现非线性动力学特征;SD大鼠单次静脉注射TP剂量0.6mg/kg其半衰期约为15min。TP可迅速分布到被检测组织(血浆、心、肝、脾、肺、肾),且组织中的变化同血浆中浓度的变化相平行(Shao F,Wang G,Xie H,et al.Pharmacokinetic study of triptolide,a constituent of immunosuppressive chinese herb medicine,in rats [J].Biological&Pharmaceutical Bulletin,2007,30(4):702-707)。

[0006] TP制剂成药性差:不管是在蒸馏水、0.1mol/L HCl还是pH6.8的PBS中,TP溶解度均小于0.3mg/mL,按照中国药典2015版描述溶解度术语的规定,TP属于极微溶于水的物质(张聪.雷公藤甲素脂质纳米粒研究[D].华中科技大学,2014)。此外,TP在其他一些药剂学上可接受的溶剂和油中的溶解度也不超过0.5%(w/w),这使得其难以制备成常规的静脉注射用溶液。即使开发成一些脂质体或者纳米粒等新型制剂,仍然存在载药量低、包封率差、制剂不稳定等诸多弊端。林绥等人尝试制备TP纳米脂质体,最大载药量仍只达0.016%(中国专利CN105816428A);张聪制备TP脂质纳米粒,在最佳处方工艺脂质/药物=50:1~100:1条件下,包封率仍不超过60%,远低于中国药典的规定要求(张聪.雷公藤甲素脂质纳米粒研究[D].华中科技大学,2014);王淑娟对制备所得脂质体进行稳定性考察显示,新制备的TP脂质体室温放置10天即有聚集,一个月后基本沉淀,即使进行冻干处理,经冷冻干燥后复水重建的脂质体与冻干前相比包封率仍有不同程度的降低,包封率不足40%(王淑娟.雷公藤甲素脂质体的制备及质量的初步研究[D].扬州大学,2010)。以上性质使得TP难以开发为利于肿瘤治疗的高效体内注射制剂。

[0007] 如何在保持TP生物活性的前提下,延长体内作用时间,降低毒副作用,是使TP能够安全有效地应用于临床所亟需解决的关键问题。前体药物(prodrug,前药)本身没有生物活性或活性很低,经过体内代谢后变为有活性的物质,这一过程可以改变母体药物的体内药动学特性。因此,在对TP的探索中,很多研究者们钟情于对TP进行结构修饰,以获得具有良好药动学特性的TP前药。受限于其难溶于水的特性,多数研究者倾向于设计与合成具有良好药动学特性的新型水溶性TP衍生物,以期降低药物的毒副作用。比如:PG490-88Na、WilGraf、Minnelide等皆是TP的水溶性前药(Fidler J M,Li K,Chung C,et al.PG490-88,a derivative of triptolide,causes tumor regression and sensitizes tumors to chemotherapy[J].Molecular Cancer Therapeutics,2003,2(9):855-862;Zhou Z,Yang Y,Ding J,et al.Triptolide:structural modifications,structure-activity relationships,bioactivities,clinical development and mechanisms[J].Natural Product Reports,2012,29(4):457-475)。虽然以上前药将TP成盐很好的改善了其制剂性质,但并非真如预期设想能够达到降低毒性改善药动学性质的目的,仍然存在降解释放过

快或转化不完全等可能弊端。更有甚者如PG490-88Na的I期临床试验的剂量递增研究中,受试对象为晚期实体瘤患者,给药方式为每周静脉注射一次,每两周休息一周。试验中较常出现的不良反应有贫血、乏力、恶心、呕吐、腹泻和便秘等,评级都为1~2级。然而,药代动力学研究表明,PG490-88Na的药动学特性存在较高的个体间差异(2~3倍),其转化为TP的程度难以预测,转化过程缓慢且不完全。因此,PG490-88Na并不是一个理想的TP衍生物,该临床试验已被迫暂停(Kitzen J J,de Jonge M J,Lamers C H,et al.Phase I dose-escalation study of F60008,a novel apoptosis inducer,in patients with advanced solid tumours[J].European Journal of Cancer,2009,45(10):1764-1772)。此后,并无PG490-88Na临床试验的相关报道更新。可见将TP成盐改善水溶性是否是理想的修饰方式使得能够满足临床的需求还有待商榷。

[0008] 而另一方面,纳米制剂作为当前研究开发的热点,已表现出广泛的应用前景,其优势在于:纳米药物可通过靶向作用降低毒性的同时,在保证有效性的基础上进一步提高疗效;将药物包裹在纳米粒中,特别是长循环纳米粒,具有明显的缓控释作用,大大减缓了药物在体内的消除速率,延长半衰期,使其有足够的时间将药物靶向在肿瘤部位,减少在正常组织中的分布,从而提高了临床用药的安全性。以上特点正是TP迫切需要达到的理想效果。并且随着制剂技术的发展,目前已有不少纳米制剂相继应用于临床,比如阿霉素脂质体(Doxil®)、注射用紫杉醇(白蛋白结合型),商品名“Abraxane®”、紫杉醇聚合物胶束(Genexol®-PM)等(Barenholz Y. Doxil®;—The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned[J].Journal of Controlled Release,2012,160(160):117-134;龚继芳,陆明,李洁,等.注射用紫杉醇(白蛋白结合型)治疗进展期胃癌[J].北京大学学报医学版,2014,46(1):144-148;Lee K S,Chung H C,Im S A,et al.Multicenter phase II trial of Genexol-PM,a Cremophor-free,polymeric micelle formulation of paclitaxel,in patients with metastatic breast cancer[J].Breast Cancer Research and Treatment,2008,108(2):241-250)。上述制剂充分说明了纳米制剂用于抗肿瘤药物上市的可行性,可为TP的开发提供重要参考,或将其开发成纳米制剂将是更加正确的研究方向。

[0009] 但正如TP制剂成药性缺陷所决定的,尝试直接将TP制备成脂质体、胶束、纳米粒等包裹纳米制剂的可实施性很差,主要原因在于TP脂溶性过低,与包裹材料的相容性不匹配所致。如何改善TP的脂溶性将是纳米制剂开发的重点。鉴于前药可显著改善母体药物的化学性质,是否可利用该手段以满足制剂成药性显得具有重要意义。中国专利CN105263475A中公开了一种TP前药“MRx102”,但是MRx102不具有成药性,或成药性差,主要体现在:①实施例中MRx102乳剂配方中所用的油相量大,绝大部分乳剂油相用量为40%,正像该专利所述,“经典的乳剂配方含有10~30%的甘油三酯”,而40%油相将直接导致配制的乳剂是稠厚的乳膏状(Fidler J M,An J,Carter B Z,et al.Preclinical antileukemic activity,toxicology,toxicokinetics and formulation development of triptolide derivative MRx102[J].Cancer Chemotherapy and Pharmacology,2014,73(5):961-974),这必然影响制剂的除菌处理,无法过0.22μm滤膜或进行高压灭菌,此外潜在的通针性不足,更可能造成无法顺利注射,导致患者顺应性差;②油中溶解度太差,暂且不论三辛酸甘油酯的安全性,该专利表4中即便采用29.4%的三辛酸甘油酯作为油相制备的乳剂,

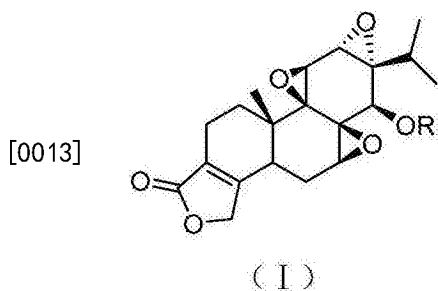
MRx102溶解度才0.681 $\mu\text{g/mL}$,直接导致载药量太低;③稳定性太差,该专利表5中,即便采用40%三辛酸甘油酯作为油相制得的乳剂(以E-3为例),配制2mg/mL载药量的乳剂,其药物含量(溶解度)从0小时、1小时、24小时、8天分别为1529、1514、1353、1176 $\mu\text{g/mL}$,也就是制备的乳剂放置8天后载药量降低了41.2%,不具有成药性;④MRx102乳剂配方中均含有高含量的三辛酸甘油酯,该专利中明确,用大豆油部分或全部取代三辛酸甘油酯将降低MRx102在乳剂中的溶解度,说明三辛酸甘油酯不可缺少性,而该成分目前主要用于护肤品和化妆品中,用于静脉给药制剂中其安全性存在隐患;⑤为了增加MRx102在乳剂中溶解,配方中均加入了离子型表面活性剂胆酸钠进行增溶,这也说明了该前药并不具有显著提高脂溶性的特点。而离子型表面活性剂不仅毒性较大,同时还有较强的溶血作用(崔福德.药剂学[M].北京:人民卫生出版社,2011:42)。此外专利中也并未涉及其他诸如脂质体、胶束等纳米制剂的制备,或将其进行脂肪乳的开发也属无奈之选。

[0010] 综上,尽管已有大量针对雷公藤甲素的研究,但是雷公藤甲素制剂成药性的问题仍然突出,急需进一步的研发来改善上述问题,开发针对TP应用于抗肿瘤治疗的高效药物。

发明内容

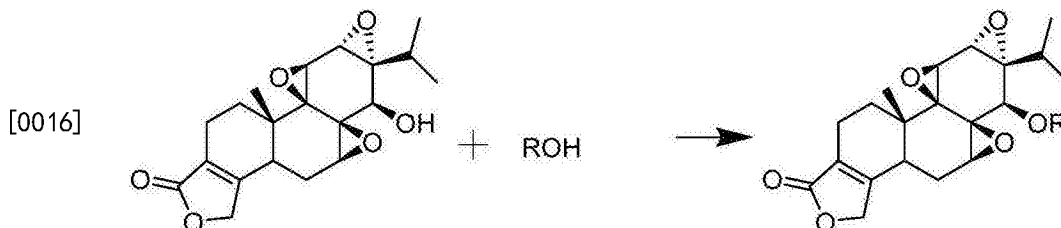
[0011] 本发明为解决TP成药性的缺陷,针对TP开展了大量的结构修饰工作,有针对性的从脂溶性前药角度入手,研究中发现当TP键合饱和脂肪酸后脂溶性明显提高,通过进一步筛选合成了碳原子数为 $2n$ (n 为2~9)范围内不同链长饱和脂肪酸修饰而得的雷公藤甲素脂肪酸酯,结果显示,以上雷公藤甲素脂肪酸酯制剂成药性均优于TP。而尝试制备成脂质体、胶束、纳米粒、脂肪乳均具有良好的包载效果。进一步的体内外研究表明,制备所得纳米制剂同时还具有显著降低毒性,延长半衰期等优势。

[0012] 本发明的第一目的在于提供一种雷公藤甲素衍生物,具体是一种雷公藤甲素脂肪酸酯,其化学结构如式(I)所示:



[0014] 式(I)中,R表示碳原子数为 $2n$ 的直链烷基酰基, n 为2~9,优选4~9,更优选7~9。

[0015] 本发明的第二目的在于提供所述的雷公藤甲素脂肪酸酯的制备方法,所述的雷公藤甲素脂肪酸酯可由雷公藤甲素与饱和脂肪酸通过酯化反应得到,合成路线为:



[0017] 其中,ROH为饱和脂肪酸,R定义如权利要求1~3任一项所述;

[0018] 具体步骤包括:

[0019] (a) 将饱和脂肪酸、缩合剂及催化剂溶于有机溶剂中, 搅拌下冷却至0~10℃得混合液;

[0020] (b) 将雷公藤甲素溶解在有机溶剂中滴入上述混合液中, 0~10℃条件下反应15~45分钟, 然后室温下继续反应, 酯化反应结束后分离得到雷公藤甲素脂肪酸酯。

[0021] 雷公藤甲素脂肪酸酯的制备方法中,

[0022] 所述的缩合剂为对硝基苯甲酰氯、N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)、N,N'-二异丙基碳二亚胺(DIC)、1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)、2-氯-1-甲基吡啶鎓碘化物(CMPI)、六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷(PyBOP)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯(HATU)、0-(5-氯苯并三氮唑-1-基)-二(二甲胺基)碳鎓六氟磷酸盐(HCTU)、0-(苯并三氮唑-1-基氧基)-二吡啶碳鎓六氟磷酸盐(HBPipU)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和N-羟基硫代琥珀酰亚胺(sulfo-NHS)中的一种或两种以上, 优选DCC或EDC·HCl;

[0023] 所述的催化剂为1-羟基苯并三唑(HOBT)、4-二甲氨基吡啶(DMAP)、三乙胺和N,N-二异丙基乙胺(DIPEA)中的一种或两种以上, 优选DMAP或DIPEA;

[0024] 所述的有机溶剂为二氯甲烷、三氯甲烷、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)和N,N-二甲基乙酰胺(DMA)中的一种或两种以上, 有机溶剂优选无水的。

[0025] 所述的饱和脂肪酸与雷公藤甲素摩尔比为1.2~4:1, 优选2~3:1; 所述的缩合剂与雷公藤甲素的摩尔比为1.2~4:1, 优选2~3:1。

[0026] 本发明的所述的雷公藤甲素脂肪酸酯可用于制备抗肿瘤或抗炎药物。

[0027] 本发明的第三目的在于提供所述的雷公藤甲素脂肪酸酯的纳米制剂, 所述纳米制剂为脂质体、聚合物胶束、白蛋白纳米粒或脂肪乳, 优选脂质体。

[0028] 本发明的一些较佳实施例中, 所述的脂质体由下列成分按照重量体积比配制而成:

雷公藤甲素脂肪酸酯	0.05~1% 克/毫升, 优选
磷脂	0.5~10% 克/毫升
PEG 化磷脂	0~1% 克/毫升
[0029] 胆固醇	0~1% 克/毫升
冻干保护剂	4~40% 克/毫升
pH 调节剂	调节 pH 至 4.0~9.0
注射用水	余量。

[0030] 上述配方优选为:

	雷公藤甲素脂肪酸酯	0.05~0.5% 克/毫升
	磷脂	1~5% 克/毫升
	PEG 化磷脂	0~0.5% 克/毫升
[0031]	胆固醇	0~0.5% 克/毫升
	冻干保护剂	15~30% 克/毫升
	pH 调节剂	调节 pH 至 5.0~8.0
	注射用水	余量。

[0032] 其中,

[0033] 所述的磷脂为蛋黄磷脂、大豆磷脂、以及各种动物来源的磷脂、氢化蛋黄磷脂、氢化大豆磷脂、二棕榈酰磷脂酰胆碱、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、二硬脂酰磷脂酰甘油、二棕榈酰磷脂酰甘油、二油酰磷脂酰胆碱、心磷脂和鞘磷脂中的一种或两种以上;优选蛋黄磷脂或大豆磷脂。

[0034] 所述的PEG化磷脂为PEG化二硬脂酰磷脂酰乙醇胺、PEG化二棕榈酰磷脂酰乙醇胺、PEG化二肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺中的一种或两种以上,优选PEG化二硬脂酰磷脂酰乙醇胺;所述PEG化磷脂的PEG平均分子量为1000~8000,优选1500~3500,更优选2000。

[0035] 所述的冻干保护剂为海藻糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、甘露醇、葡萄糖中的一种或两种以上;优选海藻糖或蔗糖。

[0036] 所述的pH调节剂为氢氧化钠、醋酸钠、醋酸、磷酸盐、碳酸盐、盐酸、柠檬酸等中的一种或两种以上;优选氢氧化钠、盐酸或柠檬酸。

[0037] 所述的脂质体可通过以下步骤制备:

[0038] (A) 脂质体粗品的配置,称取配方量雷公藤甲素脂肪酸酯、磷脂、PEG化磷脂及胆固醇,加入适量有机溶媒I于25~75℃下加热溶解得有机相,再将有机相缓慢注入25~75℃的适量注射用水中,边注入边搅拌混匀,即得脂质体粗品;

[0039] (B) 脂质体溶液的制备,将所述脂质体粗品置于高压均质机中均质乳化、或置于挤出器中依次通过不同孔径的挤出膜挤出、或置于高压均质机中均质后再行挤出,得脂质体溶液;

[0040] (C) 称取配方量冻干保护剂,溶于所述脂质体溶液;加注射用水定容,调节pH至规定值;0.22μm滤膜过滤,分装,冷冻干燥,封口压盖,即得;

[0041] 或者,

[0042] 步骤(A) 替换为:(A') 称取配方量雷公藤甲素脂肪酸酯、磷脂、PEG化磷脂、胆固醇溶于有机溶媒II中,40~60℃条件下真空旋蒸除去溶剂得脂质薄膜,用适量注射用水进行水化得脂质体粗品。

[0043] 所述的有机溶媒I选自无水乙醇、丙二醇、叔丁醇中的一种或两种以上;用量为1~10%克/毫升,所述的有机溶媒I保留在脂质体中,或者在脂质体粗品乳化后再通过超滤或刮板薄膜蒸发器去除。

[0044] 所述的有机溶媒II为二氯甲烷、三氯甲烷、无水乙醇中的一种或两种以上,用量为1~10%克/毫升。

[0045] 所述的冻干保护剂可以直接加入步骤(B)制得的脂质体溶液中,也可以先溶于注射用水中再与脂质体溶液混合(即溶于水相内加)。

[0046] 步骤(B)中的所述挤出膜孔径选自 $2.0\mu\text{m}$ 、 $1.0\mu\text{m}$ 、 $0.8\mu\text{m}$ 、 $0.6\mu\text{m}$ 、 $0.4\mu\text{m}$ 、 $0.2\mu\text{m}$ 、 $0.1\mu\text{m}$ 和 $0.05\mu\text{m}$ 中的一种或两种以上,挤出时依次通过大孔径到小孔径。

[0047] 本发明的有益效果在于:

[0048] 本发明针对TP开展了大量的结构修饰工作,从提高脂溶性的角度入手,在TP的C14位OH键合饱和脂肪酸,将羟基成酯减小极性的同时引入脂肪酸可有效地增强脂溶性,而且性质稳定,不易氧化,可显著改善TP纳米制剂成药性。通过进一步筛选合成了碳原子数为 $2n$ (n 为 $2\sim 9$)范围内不同链长饱和脂肪酸修饰而得的雷公藤甲素脂肪酸酯制剂成药性均优于TP,由所述雷公藤甲素脂肪酸酯制备的脂质体、胶束、纳米粒、脂肪乳等纳米制剂均具有良好的包载效果,制成的纳米制剂具有载药量大、包封率高、性质稳定等特点。进一步的体内外研究表明,制备所得纳米制剂同时还具有显著降低毒性,延长半衰期等优势。本发明为成功开发雷公藤甲素纳米制剂提供了可能,可为雷公藤甲素的研究与应用奠定坚实的基础。

具体实施方式

[0049] 以下结合具体实施例,对本发明作进一步说明。应理解,以下实施例仅用于说明本发明而非用于限定本发明的范围。

[0050] 本发明TP购自江苏倍达医药科技有限公司;饱和脂肪酸购自国药集团化学试剂有限公司。

[0051] 下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,或按照制造厂商所建议的条件。

[0052] 实施例1不同雷公藤甲素脂肪酸酯的制备

[0053] 1.1.1雷公藤甲素硬脂酸酯(TP-SA)的制备

[0054] 在反应容器中投量 3mmol 硬脂酸、 3mmol 的DCC、 3mmol 的DMAP,加入 20mL 无水二氯甲烷溶解,冰浴条件下搅拌30分钟;将 1mmol 的TP溶解于适量无水二氯甲烷中并缓慢滴加入反应体系,冰浴条件下反应30分钟,室温下继续反应过夜,将反应物经硅胶柱分离纯化得雷公藤甲素硬脂酸酯 532.2mg 。产率 84.9% 。

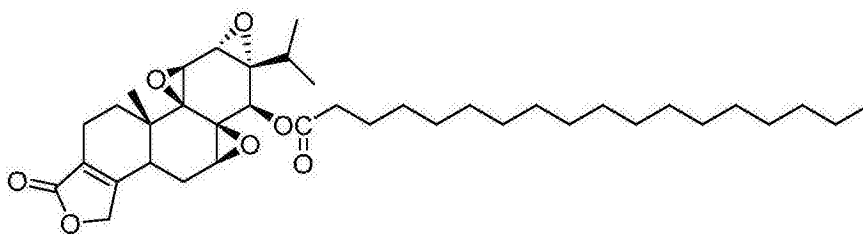
[0055] ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 600MHz) δ 4.98 (1H, s, 14-CH), 4.86 (1H, d, $J=18.88\text{Hz}$, 19-CH), 4.77 (1H, d, $J=18.88\text{Hz}$, 19-CH), 3.95 (1H, d, 11-CH), 3.69 (1H, d, 12-CH), 3.56 (1H, d, 7-CH), 2.28-2.39 (2H, m, 2'-CH₂), 1.73-2.00 (1H, m, 15-CH), 1.80-1.85 (2H, m, 3'-CH₂), 1.57-1.59 (2H, m, 2-CH₂), 1.24-1.34 (28H, m, $14\times\text{CH}_2$), 0.92 (3H, s, 20-CH₃), 0.85-0.87 (6H, m, 16、17-CH₂), 0.76 (3H, t, 18'-CH₂)。

[0056] ^{13}C NMR (DMSO , 150MHz) δ 175.52, 170.59, 71.08, 70.66, 63.74, 63.08, 61.30, 59.84, 55.29, 54.93, 35.51, 34.19, 31.78, 29.57, 29.51, 29.37, 29.23, 29.19, 28.71, 28.11, 25.06, 22.85, 22.57, 17.90, 17.05, 17.00, 14.39, 14.13。

[0057] ESI-MS (m/z): $627.8 [\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[0058] 化学结构式如下:

[0059]



TP-SA

[0060] 1.1.2雷公藤甲素硬脂酸酯 (TP-SA) 的制备

[0061] 在反应容器中投量2.5mmol硬脂酸、2.5mmol的EDC·HCl、2.5mmol的DIPEA,加入20mL无水二氯甲烷溶解,冰浴条件下搅拌30分钟;将1mmol的TP溶解于适量无水二氯甲烷中并缓慢滴加入反应体系,冰浴条件下反应30分钟,室温下继续反应过夜,将反应物经硅胶柱分离纯化得雷公藤甲素硬脂酸酯524.0mg。产率83.6%。

[0062] 1.2.1雷公藤甲素棕榈酸酯 (TP-PA) 的制备

[0063] 在反应容器中投量3mmol棕榈酸、3mmol的DCC、3mmol的DMAP,加入20mL无水二氯甲烷溶解,冰浴条件下搅拌30分钟;将1mmol的TP溶解于适量无水二氯甲烷中并缓慢滴加入反应体系,冰浴条件下反应45分钟,室温下继续反应过夜,将反应物经硅胶柱分离纯化得纯化雷公藤甲素棕榈酸酯504.7mg。产率84.3%。

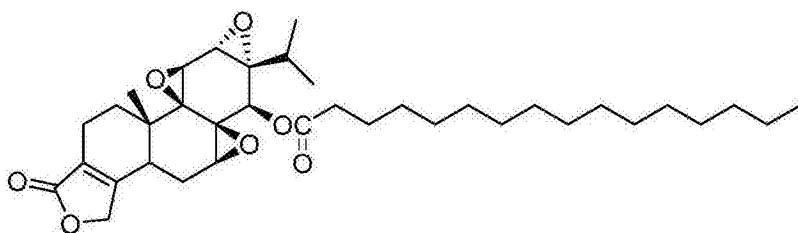
[0064] ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600MHz) δ 4.96 (1H, s, 14-CH), 4.86 (1H, d, $J=18.88\text{Hz}$, 19-CH), 4.73 (1H, d, $J=18.86\text{Hz}$, 19-CH), 3.98 (1H, d, 11-CH), 3.69 (1H, d, 12-CH), 3.57 (1H, d, 7-CH), 2.28-2.42 (2H, m, 2'-CH₂), 1.73-2.00 (1H, m, 15-CH), 1.80-1.85 (2H, m, 3'-CH₂), 1.57-1.61 (2H, m, 2-CH₂), 1.24-1.35 (24H, m, 12 $\times$ CH₂), 0.93 (3H, s, 20-CH₃), 0.85-0.88 (6H, m, 16、17-CH₂), 0.78 (3H, t, 18'-CH₂).

[0065] ^{13}C NMR (DMSO, 150MHz) δ 178.52, 173.59, 70.88, 70.26, 63.64, 63.18, 61.30, 59.34, 55.29, 55.03, 35.91, 34.21, 31.78, 29.77, 29.23, 29.17, 28.71, 28.05, 25.13, 22.80, 22.57, 17.90, 17.35, 17.09, 14.42, 14.11.

[0066] ESI-MS (m/z): 599.8 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0067] 化学结构式如下:

[0068]



TP-PA

[0069] 1.2.2雷公藤甲素棕榈酸酯 (TP-PA) 的制备

[0070] 在反应容器中投量2mmol棕榈酸、2mmol的EDC·HCl、2mmol的DIPEA,加入20mL无水二氯甲烷溶解,冰浴条件下搅拌30分钟;将1mmol的TP溶解于适量无水二氯甲烷中并缓慢滴加入反应体系,冰浴条件下反应30分钟,室温下继续反应过夜,将反应物经硅胶柱分离纯化得纯化雷公藤甲素棕榈酸酯495.2mg。产率82.7%。

[0071] 1.3.1雷公藤甲素肉豆蔻酸酯 (TP-MA) 的制备

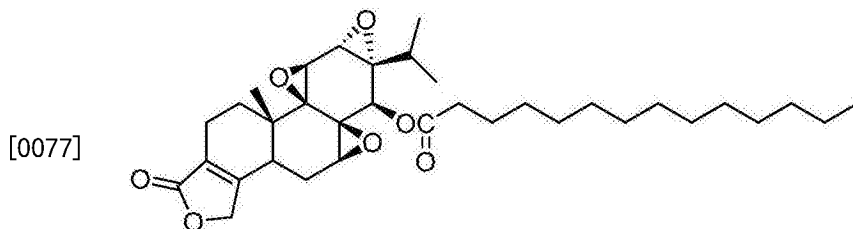
[0072] 在反应容器中投量3mmol肉豆蔻酸、3mmol的DCC、3mmol的DMAP,加入20mL无水三氯甲烷溶解,冰浴条件下搅拌15分钟;将1mmol的TP溶解于适量无水三氯甲烷中并缓慢滴加入反应体系,冰浴条件下反应30分钟,室温下继续反应过夜,将反应物经硅胶柱分离纯化得雷公藤甲素肉豆蔻酸酯464.5mg。产率81.4%。

[0073] ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 600MHz) δ : 4.97 (1H, s, 14-CH), 4.84 (1H, d, $J=18.88\text{Hz}$, 19-CH), 4.73 (1H, d, $J=18.83\text{Hz}$, 19-CH), 3.97 (1H, d, 11-CH), 3.66 (1H, d, 12-CH), 3.61 (1H, d, 7-CH), 2.27-2.41 (2H, m, 2'-CH₂), 1.73-2.00 (1H, m, 15-CH), 1.80-1.85 (2H, m, 3'-CH₂), 1.57-1.61 (2H, m, 2-CH₂), 1.22-1.35 (20H, m, 10 $\times$ CH₂), 0.90 (3H, s, 20-CH₃), 0.83-0.87 (6H, m, 16, 17-CH₂), 0.74 (3H, t, 18'-CH₂) .

[0074] ^{13}C NMR (DMSO , 150MHz) δ : 178.92, 173.10, 70.90, 62.73, 61.64, 59.34, 58.43, 55.29, 55.03, 49.97, 46.13, 46.05, 35.91, 34.21, 34.19, 32.22, 31.88, 31.52, 29.57, 29.23, 29.17, 28.71, 28.05, 25.13, 22.80, 22.57, 17.90, 17.35, 17.09, 14.42, 14.08.

[0075] ESI-MS (m/z): 571.7 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0076] 化学结构式如下:



TP-MA

[0078] 1.3.2雷公藤甲素肉豆蔻酸酯 (TP-MA) 的制备

[0079] 在反应容器中投量2mmol肉豆蔻酸、2mmol的EDC·HCl、2mmol的DIPEA,加入20mL无水二氯甲烷溶解,冰浴条件下搅拌15分钟;将1mmol的TP溶解于适量无水三氯甲烷中并缓慢滴加入反应体系,冰浴条件下反应30分钟,室温下继续反应过夜,将反应物经硅胶柱分离纯化得雷公藤甲素肉豆蔻酸酯476.5mg。产率83.5%。

[0080] 1.4.1雷公藤甲素月桂酸酯 (TP-LA) 的制备

[0081] 在反应容器中投量1.2mmol月桂酸、1.2mmol的DIC、1.2mmol的HOBT,加入20mL无水DMF溶解,冰浴条件下搅拌20分钟;将1mmol的TP溶解于适量无水二氯甲烷中并缓慢滴加入反应体系,冰浴条件下反应30分钟,室温下继续反应过夜,将反应物经硅胶柱分离纯化得雷公藤甲素月桂酸酯397.3mg。产率73.2%。

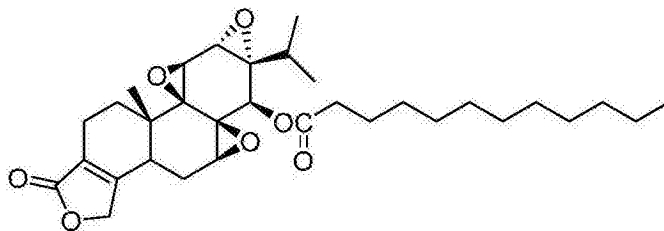
[0082] ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 600MHz) δ : 4.78 (1H, s, 14-CH), 4.50 (1H, d, $J=18.77\text{Hz}$, 19-CH), 4.43 (1H, d, $J=18.77\text{Hz}$, 19-CH), 3.35 (2H, s, 11、12-CH), 3.21 (1H, t, 7-CH), 2.56-2.60 (1H, m, 4-CH), 2.32-2.37 (2H, m, 2'-CH₂), 2.16-2.21 (1H, m, 3-CH), 1.80-1.85 (2H, m, 3'-CH₂), 1.73-1.77 (1H, m, 15-CH), 1.57-1.61 (4H, m, 1、2-CH₂), 1.44-1.50 (2H, m, 6-CH₂), 1.25-1.30 (16H, m, 8 $\times$ CH₂), 1.04-1.10 (1H, m, 5-CH), 0.93 (3H, s, 20-CH₃), 0.85-0.88 (6H, m, 16、17-CH₂), 0.78 (3H, t, 12'-CH₂) .

[0083] ^{13}C NMR (150MHz, DMSO) δ : 178.9, 173.3, 71.0, 62.6, 61.5, 59.3, 58.7, 52.4, 49.7, 46.0, 34.9, 34.2, 31.6, 29.6, 29.3, 22.7, 21.6, 19.3, 18.5, 14.3.

[0084] ESI-MS (m/z): 543.7 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0085] 化学结构式如下:

[0086]



TP-LA

[0087] 1.5.1雷公藤甲素癸酸酯 (TP-DA) 的制备

[0088] 在反应容器中投量1.5mmol癸酸、1.5mmol的对硝基苯甲酰氯、1.5mmol的三乙胺,加入20mL无水二氯甲烷溶解,冰浴条件下搅拌5分钟;将1mmol的TP溶解于适量无水二氯甲烷中并缓慢滴加入反应体系,冰浴条件下反应30分钟,室温下继续反应过夜,将反应物经硅胶柱分离纯化得雷公藤甲素癸酸酯390.6mg。产率75.9%。

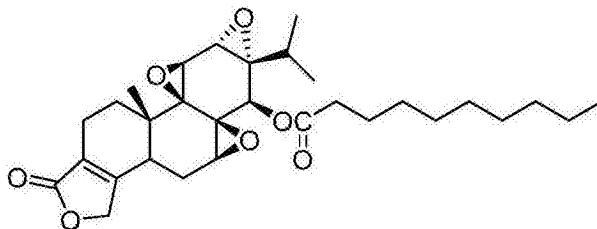
[0089] ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 600MHz) δ : 4.88 (1H, s, 14-CH), 4.54 (1H, d, $J=18.71\text{Hz}$, 19-CH), 4.33 (1H, d, $J=18.71\text{Hz}$, 19-CH), 3.35 (2H, s, 11、12-CH), 3.21 (1H, t, 7-CH), 2.56–2.60 (1H, m, 4-CH), 2.32–2.37 (2H, m, 2'-CH₂), 2.16–2.25 (1H, m, 3-CH), 1.82–1.85 (2H, m, 3'-CH₂), 1.73–1.77 (1H, m, 15-CH), 1.57–1.61 (4H, m, 1、2-CH₂), 1.44–1.50 (2H, m, 6-CH₂), 1.25–1.30 (12H, m, 6×CH₂), 1.04–1.10 (1H, m, 5-CH), 0.93 (3H, s, 20-CH₃), 0.85–0.88 (6H, m, 16、17-CH₂), 0.78 (3H, t, 10'-CH₂).

[0090] ^{13}C NMR (150MHz, DMSO) δ : 178.9, 173.5, 71.7, 62.6, 61.6, 59.3, 58.4, 52.3, 49.9, 46.0, 34.8, 34.2, 31.5, 29.5, 26.3, 25.0, 22.7, 21.6, 19.1, 14.0.

[0091] ESI-MS (m/z): 515.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0092] 化学结构式如下:

[0093]



TP-DA

[0094] 1.6.1雷公藤甲素辛酸酯 (TP-CA) 的制备

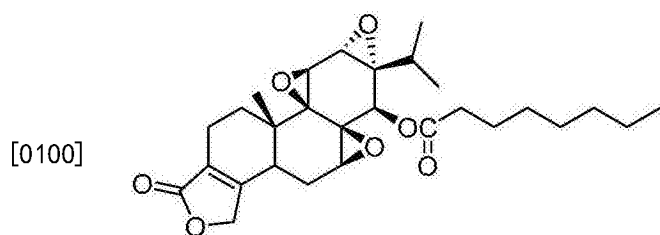
[0095] 在反应容器中投量4mmol辛酸、4mmol的DCC、4mmol的DMAP,加入20mL无水DMA溶解,冰浴条件下搅拌30分钟;将1mmol的TP溶解于适量无水二氯甲烷中并缓慢滴加入反应体系,冰浴条件下反应45分钟,室温下继续反应过夜,将反应物经硅胶柱分离纯化得雷公藤甲素辛酸酯411.2mg。产率84.5%。

[0096] ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 600MHz) δ : 4.81 (1H, s, 14-CH), 4.47 (1H, d, $J=18.68\text{Hz}$, 19-CH), 4.22 (1H, d, $J=18.68\text{Hz}$, 19-CH), 3.37 (2H, s, 11、12-CH), 3.17 (1H, t, 7-CH), 2.56–2.60 (1H, m, 4-CH), 2.33–2.37 (2H, m, 2'-CH₂), 2.16–2.21 (1H, m, 3-CH), 1.80–1.86 (2H, m, 3'-CH₂), 1.73–1.78 (1H, m, 15-CH), 1.57–1.61 (4H, m, 1、2-CH₂), 1.39–1.50 (2H, m, 6-CH₂), 1.25–1.30 (8H, m, 4'、5'、6'、7'-CH₂), 1.04–1.10 (1H, m, 5-CH), 0.93 (3H, s, 20-CH₃), 0.85–0.88 (6H, m, 16、17-CH₂), 0.78 (3H, t, 18'-CH₂).

[0097] ^{13}C NMR (150MHz, DMSO) δ : 178.8, 173.2, 71.1, 62.6, 61.3, 59.6, 58.2, 52.3, 49.9, 46.0, 34.9, 34.2, 31.5, 29.0, 26.3, 25.0, 22.7, 21.6, 19.0, 13.9.

[0098] ESI-MS (m/z): 487.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0099] 化学结构式如下:



TP-CA

[0101] 1.7.1 雷公藤甲素己酸酯 (TP-HA) 的制备

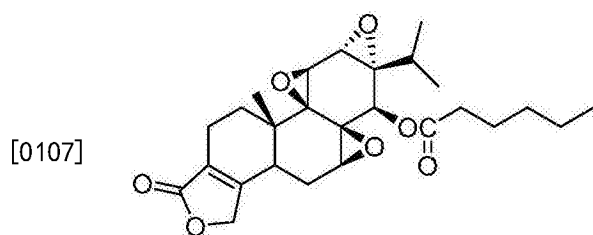
[0102] 在反应容器中投量 2.5mmol 己酸、2.5mmol 的 HATU、2.5mmol 的 DMAP, 加入 20mL 无水 DMF 溶解, 冰浴条件下搅拌 15 分钟; 将 1mmol 的 TP 溶解于适量无水三氯甲烷中并缓慢滴加入反应体系, 冰浴条件下反应 30 分钟, 室温下继续反应过夜, 将反应物经硅胶柱分离纯化得雷公藤甲素己酸酯 352.6mg, 产率 76.9%。

[0103] ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600MHz) δ : 4.88 (1H, s, 14-CH), 4.45 (1H, d, $J=18.78\text{Hz}$, 19-CH), 4.15 (1H, d, $J=18.78\text{Hz}$, 19-CH), 3.43 (2H, s, 11、12-CH), 3.20 (1H, t, 7-CH), 2.66–2.76 (1H, m, 4-CH), 2.28–2.35 (2H, m, 2'-CH₂), 2.17–2.20 (1H, m, 3-CH), 1.80–1.85 (2H, m, 3'-CH₂), 1.73–1.79 (1H, m, 15-CH), 1.57–1.61 (4H, m, 1、2-CH₂), 1.39–1.50 (2H, m, 6-CH₂), 1.25–1.30 (4H, m, 4'-5'-CH₂), 1.04–1.10 (1H, m, 5-CH), 0.93 (3H, s, 20-CH₃), 0.85–0.88 (9H, m, 16、17、6'-CH₂).

[0104] ^{13}C NMR (150MHz, DMSO) δ : 178.5, 172.0, 71.3, 63.1, 61.8, 59.8, 58.6, 53.0, 49.6, 46.3, 34.9, 34.2, 32.2, 31.8, 26.5, 22.4, 21.7, 19.3, 14.1.

[0105] ESI-MS (m/z): 459.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0106] 化学结构式如下:



TP-HA

[0108] 1.8.1 雷公藤甲素丁酸酯 (TP-BA) 的制备

[0109] 在反应容器中投量 3mmol 丁酸、3mmol 的 EDC · HCl、3mmol 的 DIPEA, 加入 20mL 无水三氯甲烷溶解, 冰浴条件下搅拌 30 分钟; 将 1mmol 的 TP 溶解于适量无水三氯甲烷中并缓慢滴加入反应体系, 冰浴条件下反应 45 分钟, 室温下继续反应过夜, 将反应物经硅胶柱分离纯化得雷公藤甲素丁酸酯 341.8mg, 产率 79.4%。

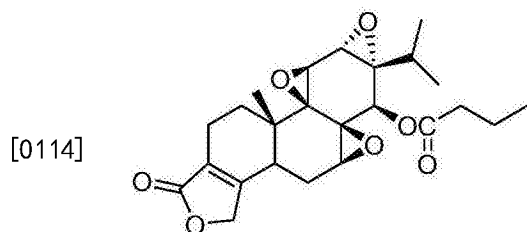
[0110] ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600MHz) δ : 4.96 (1H, s, 14-CH), 4.86 (1H, d, $J=18.88\text{Hz}$, 19-CH), 4.73 (1H, d, $J=18.86\text{Hz}$, 19-CH), 3.98 (1H, d, 11-CH), 3.93 (1H, d, 12-CH), 3.70 (1H, d, 7-

CH), 2.66–2.76 (1H, m, 4-CH), 2.28–2.42 (2H, m, 2'-CH₂), 2.17–2.20 (1H, m, 3-CH), 1.80–1.85 (2H, m, 3'-CH₂), 1.73–1.78 (1H, m, 15-CH), 1.57–1.61 (4H, m, 1,2-CH₂), 1.39–1.50 (2H, m, 6-CH₂), 1.04–1.10 (1H, m, 5-CH), 0.99 (3H, t, 4'-CH₃), 0.93 (3H, s, 20-CH₂), 0.85–0.88 (6H, m, 16,17-CH₂).

[0111] ¹³C NMR (150MHz, DMSO) δ: 178.9, 173.1, 70.9, 62.7, 61.7, 59.3, 58.4, 52.4, 49.9, 46.1, 36.4, 34.1, 32.2, 31.9, 26.3, 21.6, 19.2, 18.9, 13.5.

[0112] ESI-MS (m/z): 431.5 [M+H]⁺.

[0113] 化学结构式如下:



TP-BA

[0115] 实施例2:雷公藤甲素脂肪酸酯不同纳米制剂的制备

[0116] 以实施例1制备所得不同雷公藤甲素脂肪酸酯进行制剂成药性考察,考察制剂包括脂质体、聚合物胶束、白蛋白纳米粒、脂肪乳。

[0117] 2.1不同雷公藤甲素脂肪酸酯脂质体的制备

[0118] 2.1.1a雷公藤甲素硬脂酸酯(TP-SA)脂质体的制备

[0119] 称取雷公藤甲素硬脂酸酯0.2g、蛋黄磷脂(PC-98T) 2g及胆固醇0.2g加入5g无水乙醇中,于60℃下加热溶解,得有机相;将有机相缓慢注入80mL的60℃注射用水中,边注入边搅拌混匀,即得脂质体粗品;将脂质体粗品置于挤出器中,依次通过孔径0.2μm、0.1μm、0.05μm的挤出膜挤出,得脂质体溶液;超滤除去脂质体中乙醇;称取25g蔗糖,溶于上述脂质体溶液;加注射用水定容至100mL,用氢氧化钠、盐酸调节pH至4.0;0.22μm滤膜过滤,分装,冷冻干燥,封口压盖,即得。

[0120] 2.1.1b雷公藤甲素硬脂酸酯(TP-SA)脂质体的制备

[0121] 称取雷公藤甲素硬脂酸酯0.2g、蛋黄磷脂(EPCS) 2g、PEG化二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE-PEG2000) 0.2g及胆固醇0.2g溶于适量二氯甲烷中,45℃条件下真空旋蒸除去溶剂得脂质薄膜,用80mL注射用水进行水化得脂质体粗品;将脂质体粗品置于高压均质机中均质乳化,得脂质体溶液;称取25g海藻糖,溶于上述脂质体溶液;加注射用水定容至100mL,用氢氧化钠、盐酸调节pH至6.0;0.22μm滤膜过滤,分装,冷冻干燥,封口压盖,即得。

[0122] 2.1.1c雷公藤甲素硬脂酸酯(TP-SA)脂质体的制备

[0123] 称取雷公藤甲素硬脂酸酯0.3g、氢化磷脂(HSPC) 3g、PEG化二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE-PEG2000) 0.3g及胆固醇0.3g溶于适量三氯甲烷中,45℃条件下真空旋蒸除去溶剂得脂质薄膜,用75mL注射用水进行水化得脂质体粗品;将脂质体粗品置于高压均质机中均质乳化,得脂质体溶液;称取30g蔗糖,溶于上述脂质体溶液;加注射用水定容至100mL,用氢氧化钠、柠檬酸调节pH至8.0;0.22μm滤膜过滤,分装,冷冻干燥,封口压盖,即得。

[0124] 2.1.1d雷公藤甲素硬脂酸酯(TP-SA)脂质体的制备

[0125] 称取雷公藤甲素硬脂酸酯0.2g、蛋黄磷脂(PC-98T) 2g、PEG化二硬脂酰乙醇胺

(DSPE-PEG2000) 0.2g及胆固醇0.2g溶于适量二氯甲烷中,45℃条件下真空旋蒸除去溶剂得脂质薄膜,称取25g蔗糖溶于80mL注射用水水化薄膜得脂质体粗品;将脂质体粗品置于高压均质机中均质乳化,得脂质体溶液;称取25g蔗糖,溶于上述脂质体溶液;加注射用水定容至100mL,用氢氧化钠、盐酸调节pH至6.5;0.22μm滤膜过滤,分装,冷冻干燥,封口压盖,即得。

[0126] 2.1.2a雷公藤甲素棕榈酸酯(TP-PA)脂质体的制备

[0127] 称取雷公藤甲素棕榈酸酯0.2g、蛋黄磷脂(PC-98T) 2g及胆固醇0.2g加入5g无水乙醇于60℃下加热溶解,得有机相;将有机相缓慢注入80mL的60℃注射用水中,边注入边搅拌均匀,即得脂质体粗品;将脂质体粗品置于挤出器中,依次通过孔径0.2μm、0.1μm、0.05μm的挤出膜挤出,得脂质体溶液;超滤除去脂质体中乙醇;称取25g蔗糖,溶于上述脂质体溶液;加注射用水定容至100mL,用氢氧化钠、盐酸调节pH至4.0;0.22μm滤膜过滤,分装,冷冻干燥,封口压盖,即得。

[0128] 2.1.2b雷公藤甲素棕榈酸酯(TP-PA)脂质体的制备

[0129] 称取雷公藤甲素棕榈酸酯0.2g、蛋黄磷脂(EPCS) 2g、PEG化二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE-PEG2000) 0.2g及胆固醇0.2g溶于适量二氯甲烷中,45℃条件下真空旋蒸除去溶剂得脂质薄膜,用80mL注射用水进行水化得脂质体粗品;将脂质体粗品置于高压均质机中均质乳化,得脂质体溶液;称取25g海藻糖,溶于上述脂质体溶液;加注射用水定容至100mL,用氢氧化钠、盐酸调节pH至6.0;0.22μm滤膜过滤,分装,冷冻干燥,封口压盖,即得。

[0130] 2.1.2c雷公藤甲素棕榈酸酯(TP-PA)脂质体的制备

[0131] 称取雷公藤甲素棕榈酸酯0.3g、氢化磷脂(HSPC) 3g、PEG化二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE-PEG2000) 0.3g及胆固醇0.3g溶于适量三氯甲烷中,45℃条件下真空旋蒸除去溶剂得脂质薄膜,用75mL注射用水进行水化得脂质体粗品;将脂质体粗品置于高压均质机中均质乳化,得脂质体溶液;称取30g蔗糖,溶于上述脂质体溶液;加注射用水定容至100mL,用氢氧化钠、柠檬酸调节pH至8.0;0.22μm滤膜过滤,分装,冷冻干燥,封口压盖,即得。

[0132] 2.1.2d雷公藤甲素棕榈酸酯(TP-PA)脂质体的制备

[0133] 称取雷公藤甲素棕榈酸酯0.2g、蛋黄磷脂(PC-98T) 2g、PEG化二硬脂酰乙醇胺(DSPE-PEG2000) 0.2g及胆固醇0.2g溶于适量二氯甲烷中,45℃条件下真空旋蒸除去溶剂得脂质薄膜,称取25g蔗糖溶于80mL注射用水水化薄膜得脂质体粗品;将脂质体粗品置于高压均质机中均质乳化,得脂质体溶液;称取25g蔗糖,溶于上述脂质体溶液;加注射用水定容至100mL,用氢氧化钠、盐酸调节pH至6.5;0.22μm滤膜过滤,分装,冷冻干燥,封口压盖,即得。

[0134] 2.1.3a雷公藤甲素肉豆蔻酸酯(TP-MA)脂质体的制备

[0135] 称取雷公藤甲素肉豆蔻酸酯0.2g、蛋黄磷脂(EPCS) 2g、PEG化二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE-PEG2000) 0.2g及胆固醇0.2g溶于适量二氯甲烷中,45℃条件下真空旋蒸除去溶剂得脂质薄膜,用80mL注射用水进行水化得脂质体粗品;将脂质体粗品置于高压均质机中均质乳化,得脂质体溶液;称取25g海藻糖,溶于上述脂质体溶液;加注射用水定容至100mL,用氢氧化钠、盐酸调节pH至6.0;0.22μm滤膜过滤,分装,冷冻干燥,封口压盖,即得。

[0136] 2.1.3b雷公藤甲素肉豆蔻酸酯(TP-MA)脂质体的制备

[0137] 称取雷公藤甲素肉豆蔻酸酯0.3g、氢化磷脂(HSPC) 3g、PEG化二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE-PEG2000) 0.3g及胆固醇0.3g溶于适量三氯甲烷中,45℃条件下真空旋蒸除去溶剂得脂质薄膜,用75mL注射用水进行水化得脂质体粗品;将脂质体粗品置于高压均质机中均

质乳化,得脂质体溶液;称取30g蔗糖,溶于上述脂质体溶液;加注射用水定容至100mL,用氢氧化钠、柠檬酸调节pH至8.0;0.22 μ m滤膜过滤,分装,冷冻干燥,封口压盖,即得。

[0138] 2.1.4a雷公藤甲素月桂酸酯(TP-LA)脂质体的制备

[0139] 称取雷公藤甲素月桂酸酯0.5g、蛋黄磷脂(E80)5g、PEG化二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE-PEG5000)0.7g及胆固醇0.5g加入4g丙二醇于75℃下加热溶解,得有机相;将有机相缓慢注入80mL的75℃注射用水中,边注入边搅拌混匀,即得脂质体粗品;将脂质体粗品置于挤出器中,依次通过孔径1.0 μ m、0.6 μ m、0.4 μ m、0.2 μ m、0.1 μ m、0.05 μ m的挤出膜挤出,得脂质体溶液;超滤除去脂质体中丙二醇;称取25g乳糖,溶于上述脂质体溶液;加注射用水定容至100mL,用盐酸、磷酸盐调节pH至7.0;0.22 μ m滤膜过滤,分装,冷冻干燥,封口压盖,即得。

[0140] 2.1.4b雷公藤甲素月桂酸酯(TP-LA)脂质体的制备

[0141] 称取雷公藤甲素月桂酸酯0.2g、大豆磷脂(PL-100M)4g、PEG化二肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺(DMPE-PEG3500)0.4g及胆固醇0.4g溶于适量三氯甲烷中,45℃条件下真空旋蒸除去溶剂得脂质薄膜,用80mL注射用水进行水化得脂质体粗品;将脂质体粗品置于挤出器中,依次通过孔径0.2 μ m、0.1 μ m、0.05 μ m的挤出膜挤出,得脂质体溶液;称取25g蔗糖,溶于上述脂质体溶液;加注射用水定容至100mL,用磷酸盐调节pH至7.0;0.22 μ m滤膜过滤,分装,冷冻干燥,封口压盖,即得。

[0142] 2.1.5a雷公藤甲素癸酸酯(TP-DA)脂质体的制备

[0143] 称取雷公藤甲素癸酸酯0.7g、大豆磷脂(S100)7g、PEG化二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE-PEG2000)1g及胆固醇1g加入10g无水乙醇于30℃下加热溶解,得有机相;将有机相缓慢注入75mL的30℃注射用水中,边注入边搅拌混匀,即得脂质体粗品;将脂质体粗品置于挤出器中,依次通过孔径0.2 μ m、0.1 μ m、0.05 μ m的挤出膜挤出,得脂质体溶液;刮板式薄膜蒸发除去脂质体中乙醇;称取30g甘露醇,溶于上述脂质体溶液;加注射用水定容至100mL,用醋酸、磷酸盐调节pH至6.0;0.22 μ m滤膜过滤,分装,冷冻干燥,封口压盖,即得。

[0144] 2.1.5b雷公藤甲素癸酸酯(TP-DA)脂质体的制备

[0145] 称取雷公藤甲素癸酸酯0.2g、蛋黄磷脂(EPCS)2g、PEG化二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE-PEG8000)0.2g及胆固醇0.2g加入8g叔丁醇于50℃下加热溶解,得有机相;将有机相缓慢注入80mL的50℃注射用水中,边注入边搅拌混匀,即得脂质体粗品;将脂质体粗品置于高压均质机中均质乳化,得脂质体溶液;刮板式薄膜蒸发除去脂质体中叔丁醇;称取20g海藻糖,溶于上述脂质体溶液;加注射用水定容至100mL,用氢氧化钠、盐酸调节pH至6.0;0.22 μ m滤膜过滤,分装,冷冻干燥,封口压盖,即得。

[0146] 2.1.6a雷公藤甲素辛酸酯(TP-CA)脂质体的制备

[0147] 称取雷公藤甲素辛酸酯0.05g、蛋黄磷脂(EPCS)0.5g、PEG化二棕榈酰磷脂酰乙醇胺(DPPE-PEG2000)0.4g溶于适量二氯甲烷中,50℃条件下真空旋蒸除去溶剂得脂质薄膜,用90mL注射用水进行水化得脂质体粗品;将脂质体粗品置于挤出器中,依次通过孔径0.4 μ m、0.2 μ m、0.1 μ m、0.05 μ m的挤出膜挤出,得脂质体溶液;称取4g麦芽糖,溶于上述脂质体溶液;加注射用水定容至100mL,用氢氧化钠、盐酸调节pH至6.0;0.22 μ m滤膜过滤,分装,冷冻干燥,封口压盖,即得。

[0148] 2.1.6b雷公藤甲素辛酸酯(TP-CA)脂质体的制备

[0149] 称取雷公藤甲素辛酸酯0.1g、大豆磷脂(DOPC)1g、PEG化二硬脂酰磷脂酰乙醇胺

(DSPE-PEG1500) 1g及胆固醇0.1g加入3g叔丁醇于25℃下加热溶解,得有机相;将有机相缓慢注入95mL的25℃注射用水中,边注入边搅拌混匀,即得脂质体粗品;将脂质体粗品置于挤出器中,依次通过孔径0.2μm、0.1μm、0.05μm的挤出膜挤出,得脂质体溶液;超滤除去脂质体中叔丁醇;称取10g乳糖,溶于上述脂质体溶液;加注射用水定容至100mL,用氢氧化钠、盐酸调节pH至4.0;0.22μm滤膜过滤,分装,冷冻干燥,封口压盖,即得。

[0150] 2.1.6c雷公藤甲素辛酸酯(TP-CA)脂质体的制备

[0151] 称取雷公藤甲素辛酸酯0.4g、蛋黄磷脂(EPCS) 4g、PEG化二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE-PEG2000) 0.4g及胆固醇0.4g溶于适量无水乙醇中,45℃条件下真空旋蒸除去溶剂得脂质薄膜,用85mL注射用水进行水化得脂质体粗品;将脂质体粗品置于高压均质机中均质乳化,得脂质体溶液;称取15g海藻糖,溶于上述脂质体溶液;加注射用水定容至100mL,用氢氧化钠、盐酸调节pH至7.0;0.22μm滤膜过滤,分装,冷冻干燥,封口压盖,即得。

[0152] 2.1.7a雷公藤甲素己酸酯(TP-HA)脂质体的制备

[0153] 称取雷公藤甲素己酸酯1g、蛋黄磷脂(PC-98T) 10g、PEG化二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE-PEG2000) 0.5g及胆固醇0.5g溶于适量二氯甲烷中,45℃条件下真空旋蒸除去溶剂得脂质薄膜,称取30g蔗糖溶于80mL注射用水水化薄膜得脂质体粗品;将脂质体粗品置于高压均质机中均质乳化,得脂质体溶液;称取30g海藻糖,溶于上述脂质体溶液;加注射用水定容至100mL,用氢氧化钠、盐酸调节pH至8.0;0.22μm滤膜过滤,分装,冷冻干燥,封口压盖,即得。

[0154] 2.1.7b雷公藤甲素己酸酯(TP-HA)脂质体的制备

[0155] 称取雷公藤甲素己酸酯0.2g、大豆磷脂(SPC-3) 2g、PEG化二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DPPE-PEG2000) 0.2g溶于适量无水乙醇中,50℃条件下真空旋蒸除去溶剂得脂质薄膜,用75mL注射用水进行水化得脂质体粗品;将脂质体粗品置于挤出器中,依次通过孔径2.0μm、1.0μm、0.4μm、0.1μm、0.05μm的挤出膜挤出,得脂质体溶液;称取40g蔗糖,溶于上述脂质体溶液;加注射用水定容至100mL,用醋酸、磷酸盐调节pH至5.0;0.22μm滤膜过滤,分装,冷冻干燥,封口压盖,即得。

[0156] 2.1.8a雷公藤甲素丁酸酯(TP-BA)脂质体的制备

[0157] 称取雷公藤甲素丁酸酯0.2g、氢化磷脂(HSPC) 3g、PEG化二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE-PEG6000) 0.3g及胆固醇0.3g加入6g丙二醇于55℃下加热溶解,得有机相;将有机相缓慢注入85mL的55℃注射用水中,边注入边搅拌混匀,即得脂质体粗品;将脂质体粗品置于高压均质机中均质乳化,再置于挤出器中,过孔径0.05μm的挤出膜挤出,得脂质体溶液;超滤除去脂质体中丙二醇;称取9g葡萄糖、6g甘露醇,溶于上述脂质体溶液;加注射用水定容至100mL,用氢氧化钠调节pH至10.0;0.22μm滤膜过滤,分装,冷冻干燥,封口压盖,即得。

[0158] 2.1.8b雷公藤甲素丁酸酯(TP-BA)脂质体的制备

[0159] 称取雷公藤甲素丁酸酯0.2g、磷脂(DSPC) 2g、PEG化二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE-PEG2000) 0.2g及胆固醇0.8g加入1g无水乙醇于50℃下加热溶解,得有机相;将有机相缓慢注入80mL的50℃注射用水中,边注入边搅拌混匀,即得脂质体粗品;将脂质体粗品置于挤出器中,依次通过孔径2.0μm、1.0μm、0.4μm、0.05μm的挤出膜挤出,得脂质体溶液;超滤除去脂质体中乙醇;称取25g海藻糖,溶于上述脂质体溶液;加注射用水定容至100mL,用氢氧化钠、盐酸调节pH至6.0;0.22μm滤膜过滤,分装,冷冻干燥,封口压盖,即得。

[0160] 2.2不同雷公藤甲素脂肪酸酯聚合物胶束的制备

[0161] 2.2.1a雷公藤甲素硬脂酸酯(TP-SA) 聚合物胶束的制备

[0162] 称取雷公藤甲素硬脂酸酯0.2g、聚乙二醇单甲醚-聚乳酸(mPEG-PDLLA) 1.2g溶于适量乙腈中;60℃条件下真空旋蒸除去溶剂成膜;用90mL预热至60℃注射用水振摇水化;加入20g海藻糖溶解,定容至100mL,0.22μm滤膜过滤,分装,冷冻干燥,封口压盖,即得。

[0163] 2.2.1b雷公藤甲素棕榈酸酯(TP-PA) 聚合物胶束的制备

[0164] 称取雷公藤甲素棕榈酸酯0.3g、聚乙二醇单甲醚-聚乳酸(mPEG-PDLLA) 1.5g溶于适量乙腈中;60℃条件下真空旋蒸除去溶剂成膜;用90mL预热至60℃注射用水振摇水化;加入20g蔗糖溶解,定容至100mL,0.22μm滤膜过滤,分装,冷冻干燥,封口压盖,即得。

[0165] 2.2.2雷公藤甲素肉豆蔻酸酯(TP-MA) 聚合物胶束的制备

[0166] 称取雷公藤甲素肉豆蔻酸酯0.2g、聚乙二醇单甲醚-聚乳酸(mPEG-PDLLA) 1.4g溶于适量乙腈中;60℃条件下真空旋蒸除去溶剂成膜;用85mL预热至60℃注射用水振摇水化;加入12g葡萄糖、8g甘露醇溶解,定容至100mL,0.22μm滤膜过滤,分装,冷冻干燥,封口压盖,即得。

[0167] 2.2.3雷公藤甲素辛酸酯(TP-CA) 聚合物胶束的制备

[0168] 称取雷公藤甲素辛酸酯0.4g、聚乙二醇单甲醚-聚乳酸(mPEG-PDLLA) 5g溶于适量乙腈中;55℃条件下真空旋蒸除去溶剂成膜;用85mL预热至55℃注射用水振摇水化;定容至100mL,0.22μm滤膜过滤,分装,冷冻干燥,封口压盖,即得。

[0169] 2.2.4雷公藤甲素丁酸酯(TP-BA) 聚合物胶束的制备

[0170] 称取雷公藤甲素丁酸酯0.5g、聚乙二醇单甲醚-聚乳酸(mPEG-PDLLA) 2.5g溶于适量乙腈中;50℃条件下真空旋蒸除去溶剂成膜;用85mL预热至60℃注射用水振摇水化;加入20g麦芽糖溶解,定容至100mL,0.22μm滤膜过滤,分装,冷冻干燥,封口压盖,即得。

[0171] 2.3雷公藤甲素脂肪酸酯白蛋白纳米粒的制备

[0172] 2.3.1雷公藤甲素硬脂酸酯(TP-SA) 白蛋白纳米粒的制备

[0173] 称取人血清白蛋白4.5g加入100mL注射用水低温搅拌使混合,待温度降至2℃,滴加入1mL氯仿,于0℃条件下10000rpm剪切5min是为水相;称取雷公藤甲素硬脂酸酯0.5g溶于无水乙醇-氯仿混合溶剂3mL(1:2)是为有机相;于高速剪切分散水相条件下缓慢滴加入有机相,10000rpm剪切5min得初乳;将初乳转移至高压均质机中,以均质压力5000psi、10000psi、15000psi、20000psi各循环2次;均质结束后以5倍量2℃注射用水稀释,采用刮板式薄膜蒸发除去溶剂,浓缩定容至100mL;0.22μm滤膜过滤除菌,分装,冷冻干燥,封口压盖,即得。

[0174] 2.3.2雷公藤甲素棕榈酸酯(TP-PA) 白蛋白纳米粒的制备

[0175] 称取人血清白蛋白4.5g加入100mL注射用水低温搅拌使混合,待温度降至2℃,滴加入1mL氯仿,于0℃条件下10000rpm剪切3min是为水相;称取雷公藤甲素棕榈酸酯0.4g溶于无水乙醇-氯仿混合溶剂3mL(1:4)是为有机相;于高速剪切分散水相条件下缓慢滴加入有机相,10000rpm剪切5min得初乳;将初乳转移至高压均质机中,以均质压力5000psi、10000psi、15000psi、20000psi各循环2次;均质结束后以5倍量2℃注射用水稀释,采用刮板式薄膜蒸发除去溶剂,浓缩定容至100mL;0.22μm滤膜过滤除菌,分装,冷冻干燥,封口压盖,即得。

[0176] 2.3.3雷公藤甲素肉豆蔻酸酯 (TP-MA) 白蛋白纳米粒的制备

[0177] 称取人血清白蛋白4.5g加入100mL注射用水低温搅拌使混合,待温度降至2℃,滴加入1mL氯仿,于0℃条件下10000rpm剪切3min是为水相;称取雷公藤甲素肉豆蔻酸酯0.45g溶于无水乙醇-氯仿混合溶剂2.5mL (1:4) 是为有机相;于高速剪切分散水相条件下缓慢滴加入有机相,12000rpm剪切8min得初乳;将初乳转移至高压均质机中,以均质压力10000psi、15000psi、20000psi各循环2次;均质结束后以5倍量2℃注射用水稀释,采用刮板式薄膜蒸发除去溶剂,浓缩定容至100mL;0.22μm滤膜过滤除菌,分装,冷冻干燥,封口压盖,即得。

[0178] 2.3.4雷公藤甲素辛酸酯 (TP-CA) 白蛋白纳米粒的制备

[0179] 称取人血清白蛋白4.5g加入100mL注射用水低温搅拌使混合,待温度降至2℃,滴加入1mL氯仿,于0℃条件下10000rpm剪切5min是为水相;称取雷公藤甲素辛酸酯0.5g溶于无水乙醇-氯仿混合溶剂4mL (1:3) 是为有机相;于高速剪切分散水相条件下缓慢滴加入有机相,10000rpm剪切5min得初乳;将初乳转移至高压均质机中,以均质压力15000psi循环2次,20000psi循环4次;均质结束后以5倍量2℃注射用水稀释,采用刮板式薄膜蒸发除去溶剂,浓缩定容至100mL;0.22μm滤膜过滤除菌,分装,冷冻干燥,封口压盖,即得。

[0180] 2.3.5雷公藤甲素丁酸酯 (TP-BA) 白蛋白纳米粒的制备

[0181] 称取人血清白蛋白4.5g加入100mL注射用水低温搅拌使混合,待温度降至2℃,滴加入1mL氯仿,于0℃条件下10000rpm剪切3min是为水相;称取雷公藤甲素丁酸酯0.4g溶于无水乙醇-氯仿混合溶剂2mL (1:5) 是为有机相;于高速剪切分散水相条件下缓慢滴加入有机相,10000rpm剪切3min得初乳;将初乳转移至高压均质机中,以均质压力5000psi、10000psi、15000psi、20000psi各循环2次;均质结束后以5倍量2℃注射用水稀释,采用刮板式薄膜蒸发除去溶剂,浓缩定容至100mL;0.22μm滤膜过滤除菌,分装,冷冻干燥,封口压盖,即得。

[0182] 2.4雷公藤甲素脂肪酸酯脂肪乳的制备

[0183] 2.4.1雷公藤甲素硬脂酸酯 (TP-SA) 脂肪乳的制备

[0184] 称取注射用中链甘油三酯5g、雷公藤甲素硬脂酸酯0.2g,水浴加热至70℃条件下搅拌使溶解,得油相;称取磷脂 (PL-100M) 3g加至90mL注射用水中,剪切使分散,得水相;将油相和水相在70℃下混合,同时用剪切乳化机乳化5min,得初乳,用注射用水定容至100mL;将初乳置于高压均质机中进一步均质乳化,用盐酸调节pH至5.0,过0.22μm滤膜过滤,分装,封口,121℃下灭菌15min,即得。

[0185] 2.4.2雷公藤甲素棕榈酸酯 (TP-PA) 脂肪乳的制备

[0186] 称取注射用中链甘油三酯2.5g、大豆油2.5g、雷公藤甲素棕榈酸酯0.2g,水浴加热至60℃条件下搅拌使溶解,得油相;称取磷脂 (PL-100M) 3g加至90mL注射用水中,剪切使分散,得水相;将油相和水相在60℃下混合,同时用剪切乳化机乳化5min,得初乳,用注射用水定容至100mL;将初乳置于高压均质机中进一步均质乳化,用磷酸盐调节pH至7.0,过0.22μm滤膜过滤,分装,封口,100℃下灭菌30min,即得。

[0187] 2.4.3雷公藤甲素肉豆蔻酸酯 (TP-MA) 脂肪乳的制备

[0188] 称取注射用大豆油6g、雷公藤甲素肉豆蔻酸酯0.3g,水浴加热至70℃条件下搅拌使溶解,得油相;称取磷脂 (PL-100M) 3g加至90mL注射用水中,剪切使分散,得水相;将油相

和水相在70℃下混合,同时用剪切乳化机乳化8min,得初乳,用注射用水定容至100mL;将初乳置于高压均质机中进一步均质乳化,用磷酸盐调节pH至6.5,分别经0.45μm、0.22μm滤膜过滤除菌,分装,封口,即得。

[0189] 2.4.4雷公藤甲素辛酸酯(TP-CA)脂肪乳的制备

[0190] 称取注射用中链甘油三酯4g、大豆油4g、雷公藤甲素辛酸酯0.4g,水浴加热至80℃条件下搅拌使溶解,得油相;称取磷脂(PC-98T)4g、甘油1g加至85mL注射用水中,剪切使分散,得水相;将油相和水相在80℃下混合,同时用剪切乳化机乳化5min,得初乳,用注射用水定容至100mL;将初乳置于高压均质机中进一步均质乳化,用盐酸调节pH至6.0,0.45μm滤膜过滤,分装,封口,121℃下灭菌15min,即得。

[0191] 2.4.5雷公藤甲素丁酸酯(TP-BA)脂肪乳的制备

[0192] 称取注射用中链甘油三酯4g、油酸0.01g、雷公藤甲素丁酸酯0.2g,水浴加热至80℃条件下搅拌使溶解,得油相;称取磷脂(SPC-3)3g加至90mL注射用水中,剪切使分散,得水相;将油相和水相在65℃下混合,同时用剪切乳化机乳化6min,得初乳,用注射用水定容至100mL;将初乳置于高压均质机中进一步均质乳化,用乳酸调节pH至5.0,过0.22μm滤膜过滤,分装,封口,121℃下灭菌15min,即得。

[0193] 结果表明:雷公藤甲素脂肪酸酯可有效制备得到脂质体、聚合物胶束、白蛋白纳米粒、脂肪乳等纳米制剂,成药性良好。

[0194] 实施例3:脂质体粒径及包封率的测定

[0195] 以实施例2.1.1b项下药脂比为统一处方分别制备不同雷公藤甲素脂肪酸酯及雷公藤甲素脂质体,测定脂质体粒径及包封率。结果见表1,

[0196] 表1脂质体粒径及包封率测定结果

[0197]

脂质体	粒径 (nm)	PDI	包封率 (%)
TP-SA	112.8	0.189	96.9
TP-PA	109.7	0.174	97.3
TP-MA	115.6	0.182	97.2
TP-LA	116.3	0.197	95.7
TP-DA	108.7	0.181	94.8
TP-CA	117.5	0.176	95.2
TP-HA	129.9	0.278	94.6
TP-BA	126.3	0.285	93.9
TP	—	—	<50

[0198] 实验结果表明,相同处方条件下雷公藤甲素脂肪酸酯可制备成脂质体,粒径分布100~130nm,包封率大于90%;而雷公藤甲素制备过程中由于药物析出,脂质体无法有效制备,包封率不足50%。同时综合比较发现,碳原子数≥8的饱和脂肪酸修饰而得雷公藤甲素

脂肪酸脂具有更小的粒径,并且分布更均匀,故优选碳原子数为 $2n$ (n 为4~9)的饱和脂肪酸。

[0199] 实施例4:细胞毒性实验

[0200] 基于实施例3优选基础上,以实施例2.1.1b项下药脂比为统一处方分别制备碳原子数为 $2n$ (n 为4~9)的不同链长饱和脂肪酸修饰的雷公藤甲素脂肪酸酯脂质体,以TP (DMSO) 溶液作为对照进行MCF-7及A549细胞的抗肿瘤毒性研究,具体操作步骤如下:

[0201] 1) 将生长状态良好的细胞用一定培养基稀释成适宜浓度,然后按每孔5000个细胞的密度接种于96孔培养板中,每孔100 μ L。将培养板在培养箱预培养24h (37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂)。

[0202] 2) 向培养板中分别加入10 μ L不同浓度药物(等摩尔给药,每个浓度3个复孔)。将培养板在培养箱孵育48h。

[0203] 3) 向每孔中加入CCK-8的培养基10 μ L。将培养板在培养箱内孵育4h。

[0204] 4) 用酶标仪测定在450nm处的吸光度。取平均值,计算抑制率。

[0205] 计算公式:抑制率 = $[(Ac-As)/(Ac-Ab)] \times 100\%$

[0206] As:实验孔(含有细胞的培养基、CCK-8、药物)

[0207] Ac:对照孔(含有细胞的培养基和CCK-8、不含药物)

[0208] Ab:空白孔(不含细胞和药物的培养基、CCK-8)

[0209] 结果:分别计算各药物浓度下细胞抑制IC₅₀值见表2。

[0210] 表2细胞毒性作用IC₅₀值结果

	药物	IC ₅₀	
		MCF-7	A549
	TP-SA 脂质体	13.2 μ M	14.9 μ M
	TP-PA 脂质体	7.5 μ M	6.4 μ M
[0211]	TP-MA 脂质体	5.3 μ M	3.6 μ M
	TP-LA 脂质体	903 nM	897 nM
	TP-DA 脂质体	842 nM	793 nM
	TP-CA 脂质体	604 nM	654 nM
	TP 溶液	28.3 nM	20.8 nM

[0212] 实验结果表明,雷公藤甲素脂肪酸酯制备所得脂质体相较TP而言,细胞毒性作用更低。体现在针对细胞生长的抑制作用方面,雷公藤甲素脂肪酸酯脂质体达到半数抑制所需的药物浓度IC₅₀值更高,并且碳原子数 ≥ 14 的饱和脂肪酸修饰所得雷公藤甲素脂肪酸酯脂质体又比其它具有更高的IC₅₀浓度,故进一步优选碳原子数 $2n$ (n 为7~9)的饱和脂肪酸。

[0213] 实施例5:大鼠体内药动学研究

[0214] 基于实施例4优选基础上,以实施例2.1.1b项下药脂比为统一处方分别制备C_{2n} (n 为7~9)范围内不同链长饱和脂肪酸修饰的雷公藤甲素脂肪酸酯(TP-MA、TP-PA、TP-SA) 脂质体,以TP (DMSO) 溶液作为参照进行大鼠体内药动学研究。大鼠尾静脉给药,剂量为等效TP 3mg/kg,取血时间点设置2、5、10、15、30、45、60、90、120、180min,每组药物各5只SD大鼠(♂)。

[0215] 样品处理及分析方法:取血浆加4倍量甲醇沉淀蛋白,12000r/min离心10min,取上清挥去甲醇,剩余残液加400 μ L甲基叔丁基醚萃取两次,12000r/min离心10min。汇集有机萃取相,浓缩挥干,加甲醇100 μ L复溶,离心取上清进液相测定含量计算血药浓度,采用DAS 2.0软件进行药代动力学拟合,半衰期结果见表3。

[0216] 表3药物体内半衰期结果

[0217]

药物	TP 溶液	TP-MA 脂质体		TP-PA 脂质体		TP-SA 脂质体	
(t _{1/2})	TP	TP-MA	代谢 TP	TP-PA	代谢 TP	TP-SA	代谢 TP
min	15.0 $\pm$ 1.4	45.8 $\pm$ 2.5	80.4 $\pm$ 4.9	50.4 $\pm$ 3.1	100.9 $\pm$ 2.6	63.6 $\pm$ 4.3	124.2 $\pm$ 5.2

[0218] 实验结果表明,雷公藤甲素脂肪酸酯制备所得脂质体相比TP可有效延长药物作用半衰期,显著改善药代动力学性质。

[0219] 以上已对本发明创造的较佳实施例进行了具体说明,但本发明创造并不限于所述实施例,熟悉本领域的技术人员在不违背本发明创造精神的前提下还可作出种种的等同的变型或替换,这些等同的变型或替换均包含在本申请权利要求所限定的范围内。