

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2020 年 5 月 14 日 (14.05.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/093836 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 9/127 (2006.01) *A61K 47/28* (2006.01)
A61K 47/20 (2006.01) *A61K 31/4745* (2006.01)
A61K 47/24 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,
PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/110542

(22) 国际申请日: 2019 年 10 月 11 日 (11.10.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201811305299.6 2018 年 11 月 5 日 (05.11.2018) CN

(71) 申请人: 杭州高田生物医药有限公司 (HIGHFIELD BIOPHARMACEUTICAL CORPORATION) [CN/CN]; 中国杭州市滨江区六和路 368 号 1 幢 (北) 2 层 B2091 室, Zhejiang 310058 (CN)。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告 (条约第 21 条 (3))。

(72) 发明人: 魏晓慧 (WEI, Xiaohui); 中国上海市闵行区东川路 800 号, Shanghai 200240 (CN)。姜炳奇 (JIANG, Bingqi); 中国上海市闵行区东川路 800 号, Shanghai 200240 (CN)。

(74) 代理人: 上海光华专利事务所 (普通合伙) (J.Z.M.C. PATENT AND TRADEMARK LAW OFFICE (GENERAL PARTNERSHIP)); 中国上海市杨浦区国定路 335 号 5022 室余明伟, Shanghai 200433 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,

(54) Title: IRINOTECAN LIPOSOME PREPARATION, AND PREPARATION AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 伊立替康脂质体制剂及其制备与应用

(57) Abstract: An irinotecan liposome preparation, a preparation method, and use. The irinotecan liposome comprises irinotecan and liposome carriers, and internal aqueous phases located inside a liposome membrane and an external aqueous phase located outside the liposome membrane, the irinotecan is encapsulated in the internal aqueous phases, and a sulfonate gradient exists between the internal aqueous phases inside the liposome membrane and the external aqueous phase outside the liposome membrane. The liposome takes monovalent sulfonate and disulfonate as the internal water phases, encapsulates the irinotecan in the form of insoluble sulfonate and disulfonate in the aqueous phases of the liposome, and has a good sustained-release effect.

(57) 摘要: 一种伊立替康脂质体制剂、制备方法和用途, 所述伊立替康脂质体包括: 伊立替康和脂质体载体以及位于脂质体膜内的内水相和位于脂质体膜外的外水相, 所述伊立替康被包封于所述内水相中; 所述脂质体膜内的内水相和膜外的外水相之间存在磺酸盐梯度。该脂质体以单价磺酸盐和二磺酸盐为内水相, 将伊立替康以不溶性磺酸盐和二磺酸盐的形式, 包封在脂质体内水相中, 具有缓释效果。



WO 2020/093836 A1

伊立替康脂质体制剂及其制备与应用

技术领域

本发明属于纳米药物输送技术领域，具体涉及一种伊立替康脂质体制剂及其制备与应用。

背景技术

伊立替康（irinotecan, CPT-11），为喜树碱的半合成衍生物，它是一种治疗转移性结肠癌的有效药物。喜树碱可特异性地与拓扑异构酶 I 结合，后者诱导可逆性单链断裂，从而使 DNA 双链结构解旋；伊立替康及其活性代谢物 SN-38 可与拓扑异构酶 I—DNA 复合物结合，从而阻止断裂单链的再连接。现有研究提示，伊立替康的细胞毒作用归因于 DNA 合成过程中，复制酶与拓扑异构酶 I—DNA—伊立替康（或 SN-38）三联复合物相互作用，从而使 DNA 双链断裂。

目前已上市的伊立替康产品有盐酸伊立替康注射液、冻干粉针剂和脂质体注射剂。其中，盐酸伊立替康是伊立替康的盐酸盐，具有较好的水溶性。盐酸伊立替康注射液经静脉给药后，在偏碱性的生理环境下，游离伊立替康的内酯环易开环形成羧酸盐形式，从而失去活性，降低了药物的疗效。同时，盐酸伊立替康粉针剂的毒副作用较大，主要表现为中性粒细胞减少和迟发性腹泻。

2015 年 10 月，FDA 批准了伊立替康脂质体药物 Onivyde，用于晚期胰腺癌治疗。Onivyde 以蔗糖八硫酸酯（图 1a）的三乙胺盐作为内水相，利用脂质体内外水相之间的三乙胺梯度将伊立替康包裹在脂质体内水相中，形成伊立替康-蔗糖八硫酸酯盐，达到体内缓释的效果（Drummond, D. C.等，Development of a highly active nanoliposomal irinotecan using a novel intraliposomal stabilization strategy[J]. Cancer Research, 2006, 66 (6), 3271-3277.）。Onivyde 脂质体载药所必需的关键辅料，蔗糖八硫酸酯三乙胺不仅原料昂贵，而且制备复杂：首先需用通过离子交换树脂将蔗糖八硫酸酯钠盐转化为蔗糖八硫酸酯，再用三乙胺滴定，制备为蔗糖八硫酸酯三乙胺盐。此外，还有报道，蔗糖八硫酸酯可能具有类似生长因子的活性(邱永峰等，蔗糖八硫酸酯的应用综述，《医药卫生(引文版)》2017 年 第 5 卷，286 页)。

在目前国内已公开的盐酸伊立替康或伊立替康脂质体专利中，所采用的载药梯度集中在硫酸铵梯度（如 CN103120645B 专利“伊立替康或盐酸伊立替康脂质体及其制备方法”）及质子浓度梯度法（如 CN1960729B “伊立替康制剂”）。采用硫酸铵梯度和质子浓度梯度制备的伊立替康或盐酸伊立替康脂质体并不能有效实现缓释，如采用硫酸铵梯度法制备的伊立替康脂质体（CN105796495A）在大鼠体内的药物半衰期是 8.90 小时。

因此有必要发展基于更为易得的其他类型的铵盐或三乙胺盐的主动载药梯度，用于伊立

替康脂质体的制备，并达到较好的体内缓释效果。

发明内容

为了克服现有技术中所存在的问题，本发明的目的在于提供一种伊立替康脂质体制剂及其制备与应用，用于解决现有技术中的问题。

为实现上述目的及其他相关目的，本发明第一方面提供了一种伊立替康脂质体制剂，含有伊立替康脂质体，所述伊立替康脂质体包括：伊立替康和脂质体载体以及位于脂质体膜内的内水相和位于脂质体膜外的外水相，所述伊立替康被包封于所述内水相中；所述脂质体膜内的内水相和膜外的外水相之间存在磺酸盐梯度。

于本发明的一个实施例中，所述脂质体为单室脂质体。

于本发明的一个实施例中，所述脂质体的粒径范围是 30nm~200nm。

于本发明的一个实施例中，所述脂质体的粒径范围是 50 nm ~120nm。

于本发明的一个实施例中，所述脂质体的粒径范围是 90nm~110nm。

于本发明的一个实施例中，所述脂质体的 D95 为小于等于 200nm；其中，D95 为所述脂质体从小到大累积分布百分数达到 95%时对应的粒径值，即所述脂质体中，粒径小于 D95 的脂质体颗粒数占所述脂质体总颗粒数的 95%。

于本发明的一个实施例中，所述脂质体的 D95 小于等于 120nm；其中，D95 为所述脂质体从小到大累积分布百分数达到 95%时对应的粒径值，即所述脂质体中，粒径小于 D95 的脂质体颗粒数占所述脂质体总颗粒数的 95%。

于本发明的一个实施例中，所述脂质体的 D95 小于等于 110nm；其中，D95 为所述脂质体从小到大累积分布百分数达到 95%时对应的粒径值，即所述脂质体中，粒径小于 D95 的脂质体颗粒数占所述脂质体总颗粒数的 95%。

于本发明的一个实施例中，所述内水相包括磺酸盐水溶液；所述外水相为生理等渗溶液。

于本发明的一个实施例中，所述内水相中的伊立替康的阳离子与磺酸盐阴离子形成不溶性盐。

于本发明的一个实施例中，所述磺酸盐选自单价磺酸盐和/或二磺酸盐。

于本发明的一个实施例中，单价磺酸盐可选自甲基磺酸铵、4-羟基苯磺酸铵、甲基磺酸三乙胺、4-羟基苯磺酸三乙胺中的一种或多种。

于本发明的一个实施例中，二磺酸盐可选自乙二磺酸铵、丙二磺酸铵、乙二磺酸三乙胺、丙二磺酸三乙胺中的一种或多种。

于本发明的一个实施例中,所述脂质体内水相中单价磷酸根离子浓度为 100mM~800mM。

于本发明的一个实施例中,所述脂质体内水相中单价磷酸根离子浓度为 200mM~700mM。

于本发明的一个实施例中,所述脂质体内水相中二磷酸根离子浓度为 50mM~500mM。

于本发明的一个实施例中,所述脂质体内水相中二磷酸根离子浓度为 100mM~400mM。

于本发明的一个实施例中,所述生理等渗溶液选自 5% (w/v) 葡萄糖水溶液、10% (w/v) 蔗糖水溶液或 0.9% (w/v) 氯化钠水溶液。

于本发明的一个实施例中,所述脂质体内水相的 pH 值为 4.0~9.0。

于本发明的一个实施例中,所述脂质体内水相的 pH 值为 4.5~8.0。

于本发明的一个实施例中,在所述伊立替康脂质体制剂中,所述伊立替康的浓度大于等于 0.86mg/ml。

于本发明的一个实施例中,所述伊立替康和所述脂质体之间的药脂摩尔比大于等于 0.1。

于本发明的一个实施例中,所述脂质体的组分包括磷脂、胆固醇和聚乙二醇化磷脂。

于本发明的一个实施例中,所述聚乙二醇化磷脂中的聚乙二醇的分子量为 50~10000。

于本发明的一个实施例中,所述聚乙二醇化磷脂中的聚乙二醇的分子量为 2000。

于本发明的一个实施例中,所述磷脂、所述胆固醇和所述聚乙二醇化磷脂之间的摩尔比为 (30~80) : (0.1~40) : (0.1~30)。

于本发明的一个实施例中,所述磷脂、所述胆固醇和所述聚乙二醇化磷脂之间的摩尔比为 55:40:5。

于本发明的一个实施例中,所述脂质体外水相为质量浓度 10% 的蔗糖溶液。

本发明第二方面提供了一种伊立替康脂质体制剂的制备方法,所述方法为主动载药法,所述主动载药法包括以下步骤:

(1) 制备内水相和外水相均含磷酸盐水溶液的空白脂质体;

(2) 制备内水相含有磷酸盐水溶液、外水相含有生理等渗溶液的空白脂质体,以形成空白脂质体内外水相磷酸盐浓度梯度;

(3) 将步骤(2)所得空白脂质体与伊立替康可溶性盐水溶液混合,孵育,去除游离伊立替康可溶性盐,获得伊立替康脂质体。

于本发明的一个实施例中,所述磷酸盐选自单价磷酸盐和/或二磷酸盐。

于本发明的一个实施例中,单价磷酸盐可选自甲基磷酸铵、4-羟基苯磷酸铵、甲基磷酸三乙胺、4-羟基苯磷酸三乙胺中的一种或多种。

于本发明的一个实施例中,二磷酸盐可选自乙二磷酸铵、丙二磷酸铵、乙二磷酸三乙胺、

丙二磺酸三乙胺中的一种或多种。

于本发明的一个实施例中，步骤（1）和步骤（2）中，所述磺酸盐水溶液中的磺酸盐浓度为 50mM~800mM。

步骤（1）和步骤（2）中，所述磺酸盐水溶液中阳离子的浓度是 50~800mM。

于本发明的一个实施例中，步骤（1）和步骤（2）中，所述磺酸盐水溶液的 pH 值为 4.0~9.0。

于本发明的一个实施例中，步骤（1）和步骤（2）中，所述磺酸盐水溶液的 pH 值为 4.5~8.0。

于本发明的一个实施例中，步骤（1）和步骤（2）中，选用单价磺酸盐时，所述磺酸盐水溶液中磺酸根离子的浓度是 100mM~800mM。

进一步的，步骤（1）和步骤（2）中，选用单价磺酸盐时，所述磺酸盐水溶液中磺酸根离子的浓度是 200mM~700mM。

于本发明的一个实施例中，选用二磺酸盐时，步骤（1）和步骤（2）中，所述磺酸盐水溶液中阳离子的浓度是 50mM~500mM。

进一步的，选用二价磺酸盐时，步骤（1）和步骤（2）中，所述磺酸盐水溶液中阳离子的浓度是 100mM~400mM。

于本发明的一个实施例中，步骤（2）中，所述生理等渗溶液可选自：5%（w/v）葡萄糖水溶液、10%（w/v）蔗糖水溶液或 0.9%（w/v）氯化钠水溶液。

于本发明的一个实施例中，步骤（2）中，所述脂质体内水相的 pH 值为 4.0~9.0。

进一步的，步骤（2）中，所述脂质体内水相的 pH 值为 4.5~8.0。

于本发明的一个实施例中，步骤（3）中，药脂摩尔比大于等于 0.1。

于本发明的一个实施例中，步骤（3）中，所述伊立替康可溶性盐选自盐酸伊立替康。

本发明提供了上文所述的伊立替康脂质体在制备结直肠癌、肺癌、乳腺癌或胰腺癌的肿瘤治疗药物中的用途。

于本发明的一个实施例中，所述用途中，伊立替康脂质体制剂可使更多的伊立替康以活性内酯环形式存在于血液循环中，并到达肿瘤部位，转化为 SN-38，从而进一步改善抗肿瘤效果。

本发明的有益效果为：

本发明提出的伊立替康脂质体制剂，在改善原料的易得性、降低制剂成本的同时，更为简便地实现伊立替康的稳定装载，具有高包封率和储存稳定性好的优点；同时，该制剂具有明显的缓释性，有利于保证盐酸伊立替康的体内稳定性和有效性，提升药物疗效。本发明所述的伊立替康脂质体体内半衰期长，生物利用度高。

附图说明

图 1A: 单价磺酸（左：甲基磺酸；右：4-羟基苯磺酸）的化学结构。

图 1B: 二磺酸（左：乙二磺酸；右：丙二磺酸）的化学结构

图 2 盐酸伊立替康水溶液 UV 标准曲线图；

图 3 三组不同投药药脂比时（分别为 0.1, 0.3 和 0.5），采用不同梯度制备的伊立替康脂质体的包封率；

图 4 以不同磺酸盐溶液为内水相的伊立替康脂质体在模拟血浆中的累积释放速率图（TEA: 三乙胺；MS: 甲基磺酸；HBS: 4-羟基苯磺酸；EDS: 乙二磺酸；PDS: 丙二磺酸）；

图 5 采用不同磺酸盐梯度、三乙胺蔗糖脂梯度以及硫酸铵梯度制备的伊立替康脂质体的差示热扫描图。

具体实施方式

本发明发明人经过大量探索实验发现，脂质体内水相中的磺酸盐的阴离子可以与伊立替康阳离子形成不溶盐，进而将伊立替康稳定包封在脂质体的内水相中，在此基础上完成了本发明。

本发明的伊立替康脂质体制剂，含有伊立替康脂质体，所述伊立替康脂质体包括：伊立替康和脂质体载体。

所述脂质体具有呈双分子层结构的脂质体膜。所述脂质体膜类似于生物膜。

所述脂质体的载体材料含有磷脂和胆固醇。本发明对于脂质体的载体材料及含量并无特别的限制，只要能够形成稳定的、无泄漏的呈双分子层结构的脂质体膜即可。这些均在本领域技术人员所能知晓的知识范围内。

本发明实施例中列举了：所述磷脂选用氢化豆磷脂（HSPC）和二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇（DSPE-PEG）。但是，并不仅限于此。

所述 DSPE-PEG 中 PEG 的分子量范围可以是 50~10000。例如，所述 DSPE-PEG 中 PEG 的分子量是 2000。

HSPC、CHOL（胆固醇）、DSPE-PEG 之间的摩尔比例范围可以是 (30~80): (0.1~40): (0.1~30)。例如，HSPC、CHOL、DSPE-PEG 之间的摩尔比例范围可以是 55:40:5。

所述伊立替康脂质制剂还包括：位于脂质体膜内的内水相和位于脂质体膜外的外水相。所述伊立替康被包封于所述内水相中。

所述脂质体膜内的内水相和膜外的外水相之间存在磺酸盐梯度。

所述铵盐梯度是指存在铵盐浓度梯度与 pH 的差异。

所述三乙胺盐梯度是指存在三乙胺盐浓度梯度与 pH 的差异。

所述内水相为磷酸盐水溶液，所述伊立替康的阳离子与所述磷酸根形成不溶性盐，从而使伊立替康被包封于所述内水相中。所述外水相为生理等渗溶液。

所述生理等渗溶液选自：5% (w/v) 葡萄糖水溶液、10% (w/v) 蔗糖水溶液或 0.9% (w/v) 氯化钠水溶液。

% (w/w) 是指质量百分浓度，亦即每 100g 的溶液中含有的溶质的质量。

% (w/v) 是指质量体积百分浓度，亦即每 100ml 的溶液中含有的溶质的质量。

所述伊立替康脂质体制剂可以为注射给药制剂。

所述注射给药制剂可选自皮下注射剂型、静脉注射剂型、肌肉注射剂型或盆腔注射剂型。

所述磷酸盐的阳离子可选自铵根离子、三乙胺离子。

所述磷酸盐可选自单价磷酸盐和/或二磷酸盐。其中单价磷酸盐可选自甲基磷酸铵、4-羟基苯磷酸铵、甲基磷酸三乙胺、4-羟基苯磷酸三乙胺中的一种或多种。二磷酸盐可选自乙二磷酸铵、丙二磷酸铵、乙二磷酸三乙胺、丙二磷酸三乙胺中的一种或多种。

所述内水相的 pH 可以是 4.0~9.0。进一步可以是 4.5~8.0。

选用单价磷酸盐时，所述内水相中磷酸根离子的浓度可以是 100~800mM。进一步还可以是 200mM~700mM。

选用二磷酸盐时，所述内水相中磷酸根离子的浓度可以是 50mM~500mM。进一步还可以是 100mM~400mM。

所述内水相中伊立替康的浓度可以是 0.1mg/ml 以上。

本发明所述的伊立替康脂质体制剂的制备方法，包括如下步骤：

- (1) 制备内水相和外水相均含磷酸盐水溶液的空白脂质体；
- (2) 制备内水相含有磷酸盐水溶液、外水相含有生理等渗溶液的空白脂质体，以形成空白脂质体内外水相磷酸盐浓度梯度；
- (3) 将步骤 (2) 所得空白脂质体与伊立替康可溶性盐水溶液混合，孵育，去除游离伊立替康可溶性盐，获得伊立替康脂质体。

所述磷酸盐选自单价磷酸盐和/或二磷酸盐。

单价磷酸盐可选自甲基磷酸铵、4-羟基苯磷酸铵、甲基磷酸三乙胺、4-羟基苯磷酸三乙胺中的一种或多种。

二磷酸盐可选自乙二磷酸铵、丙二磷酸铵、乙二磷酸三乙胺、丙二磷酸三乙胺中的一种或多种。

步骤（1）和步骤（2）中，选用单价磺酸盐时，所述磺酸盐水溶液中磺酸根离子的浓度是 100mM~800mM。

进一步的，步骤（1）和步骤（2）中，选用单价磺酸盐时，所述磺酸盐水溶液中磺酸根离子的浓度是 200mM~700mM。

选用二磺酸盐时，步骤（1）和步骤（2）中，所述磺酸盐水溶液中阳离子的浓度是 50mM~500mM。

进一步的，选用二价磺酸盐时，步骤（1）和步骤（2）中，所述磺酸盐水溶液中阳离子的浓度是 100mM~400mM。

步骤（1）和步骤（2）中，所述磺酸盐水溶液的 pH 值可以为 4.0~9.0。还可以为 4.5~8.0。

步骤（2）中，所述生理等渗溶液可选自：5%（w/v）葡萄糖水溶液、10%（w/v）蔗糖水溶液或 0.9%（w/v）氯化钠水溶液。

于本发明的一个实施例中，步骤（2）中，所述外水相的 pH 是 4.0~9.0。还可以为 5.0~8.0。

于本发明的一个实施例中，步骤（3）中，药脂比（亦即伊立替康与脂质体之间的摩尔比）可以是 0.1 及以上。药脂比还可以是 0.15 及以上。药脂比还可以是 0.20 及以上。药脂比还可以是 0.25 及以上。药脂比还可以是 0.3 及以上。药脂比还可以是 0.5 及以上。可以是 0.1-0.15。可以是 0.1-0.2。可以是 0.1-0.25。可以是 0.1-0.3。可以是 0.15-0.3。可以是 0.3-0.5。可以是 0.2-0.5。

于本发明的一个实施例中，步骤（3）中，所述伊立替康可溶性盐选自盐酸伊立替康。

所述伊立替康可溶性盐水溶液中，伊立替康的浓度可以大于等于 10mg/ml。伊立替康的浓度可以大于等于 12mg/ml。伊立替康的浓度可以大于等于 15mg/ml。例如可以是 10mg/ml、12mg/ml、15mg/ml。可以是 10mg/ml-12mg/ml。可以是 12mg/ml-15mg/ml。可以是 10mg/ml-15mg/ml。

本发明利用主动载药原理：在脂质体内外水相之间存在磺酸盐离子梯度；外水相中的盐酸伊立替康发生部分电离，其中，非解离形式的伊立替康以被动扩散方式进入脂质体内水相中，与内水相中铵根离子或三乙胺离子电离所产生的氢离子结合，形成伊立替康离子，进而与磺酸根形成晶体或无定型不溶性盐，从而使伊立替康包封在脂质体内水相中。同时，脂质体内水相中的铵根离子电离所产生的氨气，或三乙胺离子电离所产生的三乙胺不断从脂质体内水相逸出，维持了脂质体内水相中的氢离子的浓度，使脂质体内水相中的伊立替康分子持续不断地与氢离子结合，形成伊立替康阳离子，并与磺酸根形成沉淀，直到外水相中几乎所有的伊立替康被包封到脂质体内水相中。该脂质体具有高载药量，高稳定性，并且具备优异

的缓释效果。

伊立替康脂质体制剂的用途

伊立替康是一种半合成水溶性喜树碱类衍生物，可用于包括结直肠癌、肺癌、乳腺癌及胰腺癌的肿瘤治疗。

本发明所述的伊立替康脂质体制剂可使更多的伊立替康以活性内酯环形式存在于血液循环中，并到达肿瘤部位，转化为 SN-38，从而进一步改善抗肿瘤效果。本发明所述的伊立替康脂质体体内半衰期长，生物利用度高。

在进一步描述本发明具体实施方式之前，应理解，本发明的保护范围不局限于下述特定的具体实施方案；还应当理解，本发明实施例中使用的术语是为了描述特定的具体实施方案，而不是为了限制本发明的保护范围；在本发明说明书和权利要求书中，除非文中另外明确指出，单数形式“一个”、“一”和“这个”包括复数形式。

当实施例给出数值范围时，应理解，除非本发明另有说明，每个数值范围的两个端点以及两个端点之间任何一个数值均可选用。除非另外定义，本发明中使用的所有技术和科学术语与本技术领域技术人员通常理解的意义相同。除实施例中使用的具体方法、设备、材料外，根据本技术领域的技术人员对现有技术的掌握及本发明的记载，还可以使用与本发明实施例中所述的方法、设备、材料相似或等同的现有技术的任何方法、设备和材料来实现本发明。

除非另外说明，本发明中所公开的实验方法、检测方法、制备方法均采用本技术领域常规的药剂学，药物分析学，药物化学，分析化学，分子生物学、生物化学及相关领域的常规技术。这些技术在现有文献中已有完善说明。

实施例 1、盐酸伊立替康的检测方法

本实施例中建立盐酸伊立替康标准曲线，具体如下。

采用紫外（ultraviolet, UV）检测分析方法：检测仪器为 TECAN Infinite® 200 PRO；检测波长为 369nm；检测温度为 24°C；检测孔板为 Corning® 96 well plates, UV-transparent；检测体积为 200μl。

精密称量 2.5001mg 盐酸伊立替康溶解于 25ml 容量瓶中得到浓度为 0.1000mg/ml 的盐酸伊立替康水溶液；将盐酸伊立替康水溶液与超纯水混合，梯度稀释，得到浓度为 5μg/ml、6.25μg/ml、7.5μg/ml、10μg/ml、12.5μg/ml、15μg/ml、20μg/ml 和 25μg/ml 的盐酸伊立替康标准溶液。采用 UV 法检测上述浓度的盐酸伊立替康标准溶液，检测结果如表 1 所示。

表 1 不同浓度的盐酸伊立替康水溶液 UV 检测值

浓度	UV 吸收值	SD
----	--------	----

($\mu\text{g/ml}$)	1	2	3	平均值	($\pm$)
5	0.1393	0.1382	0.1386	0.1387	0.001
6.25	0.1758	0.1689	0.1647	0.1698	0.006
7.5	0.2063	0.2050	0.2073	0.2062	0.001
10	0.2785	0.2761	0.2776	0.2774	0.001
12.5	0.3462	0.3412	0.3440	0.3438	0.002
15	0.4090	0.3967	0.4015	0.4024	0.006
20	0.5447	0.5401	0.5427	0.5425	0.002
25	0.6585	0.6570	0.6592	0.6582	0.001
$Y = 0.0262X + 0.0105$			$R^2 = 0.9991$		

根据表 1 所示的结果建立标准曲线并考察回收率。工作曲线如图 2 所示。盐酸伊立替康水溶液的 UV 标准曲线为 $Y = 0.0262X + 0.0105$ ($n=8$)， $R^2=0.9991$ ，回收率均在 95%~105%，标曲拟合良好。

实施例 2、以甲基磺酸铵为内水相的伊立替康脂质体的制备和表征

本实施例中使用的磷脂均购自德国 Lipoid 公司。具体为氢化豆磷脂（HSPC，分子量 783.8）；聚乙二醇化磷脂具体为二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000（DSPE-PEG2000）；胆固醇（CHOL，分子量 386.7）；使用的盐酸伊立替康购自 Aladdin 公司；使用的甲基磺酸铵购自西格玛奥德里奇（Sigma-Aldrich）公司；使用的氨水购自 Aladdin 公司。

需要说明的是，在后续的实施例中所使用的磷脂均为 Lipoid 公司的氢化豆磷脂；所使用的聚乙二醇化磷脂均为 Lipoid 公司的二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇；所使用的胆固醇均为 Lipoid 的胆固醇；所使用的盐酸伊立替康均购自 Aladdin 公司。

2.1 伊立替康脂质体的制备

具体制备过程如下：

步骤（1），精密称量 479.9mg 氢化豆磷脂，160.9mg 胆固醇和 160.8mg 二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000，加入适量乙醇充分溶解混合，得到脂质的乙醇混合溶液；

步骤（2），精密量取 2.131ml 甲磺酸溶液，用氨水滴定至 pH 4.0~6.0，双蒸水（ddH₂O）定容至 50ml，得到 pH 为 4.0~6.0 的 650mM 甲基磺酸铵缓冲液；

步骤（3），将步骤（1）所得脂质的乙醇混合溶液加入 10 ml pH 为 4.0~6.0 的 650mM 甲基磺酸铵缓冲液，并置于 70 摄氏度中搅拌水浴 30 分钟，使脂质体充分水合，得到较均匀的脂质体混悬液；

步骤（4），利用脂质体挤出仪，将步骤（3）所得脂质体混悬液依次挤压通过不同孔径

的聚碳酸酯膜各 10 次，最终得到粒径大小为 100nm，粒径分布均匀的空白脂质体；

步骤（5），将步骤（4）所制得的脂质体置于截留分子量为 10000 的透析袋中，以 10% 蔗糖水溶液作为透析介质，4 摄氏度透析过夜。样品与透析介质体积比为 1:1000，透析期间换三次透析液，完全除去脂质体外水相中的甲基磺酸铵，得到由 10% 的蔗糖组成的外水相、由甲基磺酸铵溶液为内水相，以及由磷脂双分子层构成空白脂质体，脂质体内外水相具有一定的 pH 和甲基磺酸铵浓度梯度。具体地，空白脂质体内水相为 650mM 甲基磺酸铵水溶液（pH4.0~6.0）、空白脂质体外水相为质量分数 10% 蔗糖水溶液。

步骤（6），将步骤（5）中所得的内水相为甲基磺酸铵溶液的空白脂质体混悬液，与浓度为 10mg/ml 的盐酸伊立替康水溶液，按照体积比为 1:1 混合，并于 50-60 摄氏度中孵育 10-30 分钟，得到内水相含伊立替康的脂质体。

2.2、伊立替康脂质体的表征

2.2.1、伊立替康脂质体的粒径测定

将本实施例制备的伊立替康脂质体，用 ddH₂O 稀释 50 倍，利用 Zetasizer ZS90（马尔文公司，英国）对粒径进行分析，具体结果如表 3 所示。表 3 表明，载药后的脂质体粒径均在 100nm 左右，粒度分布（PDI）均小于 0.1。此外，载药前空白脂质体的粒径也在 100nm 左右，粒度分布（PDI）均小于 0.1。

2.2.2、伊立替康脂质体包封率的测定

在制备得到的伊立替康脂质体中加入适量 Dowex 树脂（西格玛奥德里奇（Sigma-Aldrich）公司），充分振摇，吸附未包裹的伊立替康。静置后取上清 200ul，采用 UV 检测分析方法（实施例 1），测定加入树脂前后脂质体中的伊立替康的含量。

伊立替康脂质体的包封率（EE）按以下公式计算：

$$EE\% = \frac{M_{inter}}{M_{total}} * 100\%$$

其中，M_{inter} 是树脂吸附游离药物后的脂质体制剂中伊立替康的含量，即被脂质体包封的伊立替康的含量；M_{total} 是树脂吸附前的伊立替康脂质体制剂中伊立替康的含量，即伊立替康的投药量。结果如表 2 所示。表 2 表明，按照本方法制备的伊立替康脂质体的包封率良好，可实现高药脂比载药。

表 2 以甲基磺酸铵溶液为内水相的伊立替康脂质体粒径和包封率

脂质浓度	药物浓度	药脂比	载药后粒径（nm）	载药后 PDI	包封率
------	------	-----	-----------	---------	-----

(mg/ml)	(mg/ml)				(%)
	0.86	0.1	100.06	0.046	95.28
8.91	2.58	0.3	100.08	0.035	88.91
	4.30	0.5	101.00	0.037	70.01

实施例 3、以甲基磺酸三乙胺溶液为内水相的伊立替康脂质体的制备和表征

本实施例中使用的甲磺酸购自西格玛奥德里奇 (Sigma-Aldrich) 公司；使用的三乙胺购自国药集团。

精密量取 2.131ml 甲磺酸溶液,用三乙胺滴定至 pH 4.0~6.0,双蒸水(ddH₂O)定容至 50ml,得到 pH 为 4.0~6.0 的 650mM 甲基磺酸三乙胺缓冲液;

制备伊立替康脂质体,具体制备过程参照实施例 2。不同之处在于,在步骤(3)往步骤(1)所得到的脂质的乙醇溶液加入 10 ml、pH 为 4.0~6.0 的 650mM 甲基磺酸三乙胺缓冲液,而不加入甲基磺酸铵缓冲液。

伊立替康脂质体的表征方法参照实施例 2,结果如表 3 所示。表 3 表明,实施例 3 制备的伊立替康脂质体的包封率约在 70%左右。与实施例 2 结果相比,以甲基磺酸三乙胺作为脂质体内水相其包封率有所下降,说明铵盐离子浓度梯度在主动载药中的贡献要优于三乙胺离子浓度梯度。

表 3 以甲基磺酸三乙胺溶液为内水相的伊立替康脂质体粒径和包封率

脂质浓度 (mg/ml)	药物浓度 (mg/ml)	药脂比	载药后粒径 (nm)	载药后 PDI	包封率 (%)
	0.86	0.1	102.10	0.031	82.41
8.91	2.58	0.3	102.40	0.043	76.92
	4.30	0.5	102.70	0.029	60.10

实施例 4、以 4-羟基苯磺酸铵溶液为内水相的伊立替康脂质体的制备和表征

本实施例中使用的 4-羟基苯磺酸购自麦克林 (Macklin) 公司；使用的氨水购自 Aladdin 公司。

精密量取 6.513ml 4-羟基苯磺酸溶液,用氨水滴定至 pH 4.0~6.0,双蒸水 (ddH₂O) 定容至 50ml,得到 pH 为 4.0~6.0 的 650mM 4-羟基苯磺酸铵缓冲液;

制备伊立替康脂质体,具体制备过程参照实施例 2。不同之处在于,在步骤(3)往步骤(1)所得到的脂质乙醇溶液加入 10 ml 浓度为 650mM 4-羟基苯磺酸铵缓冲液(pH 为 4.0~6.0),而不加入甲基磺酸铵缓冲液。

伊立替康脂质体的表征方法参照实施例 2，结果如表 4 所示。表 4 表明，实施例 4 制备的伊立替康脂质体的包封率良好。

表 4 以 4-羟基苯磺酸铵溶液为内水相的伊立替康脂质体粒径和包封率

脂质浓度 (mg/ml)	药物浓度 (mg/ml)	药脂比	载药后粒径 (nm)	载药后 PDI	包封率 (%)
8.91	0.86	0.1	99.20	0.048	96.55
	2.58	0.3	99.18	0.037	77.70
	4.30	0.5	98.65	0.045	60.19

实施例 5、以 4-羟基苯磺酸三乙胺溶液为内水相的伊立替康脂质体的制备和表征

本实施例中使用的 4-羟基苯磺酸三乙胺购自麦克林 (Macklin) 公司；使用的三乙胺购自国药集团。

精密量取 6.513ml 4-羟基苯磺酸溶液，用三乙胺滴定至 pH 4.0~6.0，双蒸水 (ddH₂O) 定容至 50ml，得到 pH 为 4.0~6.0 的 650mM 4-羟基苯磺酸三乙胺缓冲液；

制备伊立替康脂质体，具体制备过程参照实施例 2。不同之处在于，在步骤 (2) 往步骤 (1) 所得到的脂质乙醇溶液加入 10 ml、pH 为 4.0~6.0 的 650mM 4-羟基苯磺酸三乙胺缓冲液，而不加入甲基磺酸铵缓冲液。

表征伊立替康脂质体的方法参照实施例 2，结果如表 5 所示。表 5 表明，实施例 5 制备得伊立替康脂质体的包封率良好。

表 5 以 4-羟基苯磺酸三乙胺溶液为内水相的伊立替康脂质体粒径和包封率

脂质浓度 (mg/ml)	药物浓度 (mg/ml)	药脂比	载药后粒径 (nm)	载药后 PDI	包封率 (%)
8.91	0.86	0.1	102.15	0.033	97.80
	2.58	0.3	102.80	0.058	89.69
	4.30	0.5	102.55	0.065	62.93

实施案例 2、3、4、5 的四种内水相成分对伊立替康脂质体载药能力的影响于图 3 所示。

实施例 6、以乙二磺酸铵溶液为内水相的伊立替康脂质体的制备和表征

本实施例中使用的乙二磺酸购自阿法埃莎 (Alfa Aesar) 公司；使用的氨水购自 Aladdin 公司。

精密称量 3.1538mg 乙二磺酸水合物溶于双蒸水 (ddH₂O)，用氨水滴定至 pH 4.0~6.0，双蒸水定容至 50ml，得到 pH 为 4.0~6.0 的 325mM 乙二磺酸铵缓冲液；

制备伊立替康脂质体，具体制备过程参照实施例 2。不同之处在于，在步骤（2）往步骤（1）所得到的脂质乙醇溶液加入 10 ml、pH 为 4.0~6.0 的 325mM 乙二磺酸铵缓冲液，而不加入甲基磺酸铵缓冲液。

表征伊立替康脂质体的方法参照实施例 2，结果如表 6 所示。表 6 表明，实施例 6 制备得伊立替康脂质体的包封率良好。

表 6 以乙二磺酸铵溶液为内水相的伊立替康脂质体粒径和包封率

脂质浓度 (mg/ml)	药物浓度 (mg/ml)	药脂比	载药后粒径 (nm)	载药后 PDI	包封率 (%)
	0.86	0.1	101.55	0.035	96.92
8.91	2.58	0.3	101.90	0.048	92.17
	4.30	0.5	101.85	0.059	74.90

实施例 7、以乙二磺酸三乙胺溶液为内水相的伊立替康脂质体的制备和表征

本实施例中使用的乙二磺酸购自阿法埃莎（Alfa Aesar）公司；使用的三乙胺购自国药集团。

精密称量 3.1535mg 乙二磺酸水合物溶于双蒸水（ddH₂O），用三乙胺滴定至 pH 4.0~6.0，双蒸水定容至 50ml，得到 pH 为 4.0~6.0 的 325mM 乙二磺酸三乙胺缓冲液；

制备伊立替康脂质体，具体制备过程参照实施例 2。不同之处在于，在步骤（2）往步骤（1）所得到的脂质乙醇溶液加入 10 ml、pH 为 4.0~6.0 的 325mM 乙二磺酸三乙胺缓冲液，而不加入甲基磺酸铵缓冲液。

表征伊立替康脂质体的方法参照实施例 2，结果如表 7 所示。表 7 表明，实施例 7 制备得伊立替康脂质体的包封率良好。

表 7 以乙二磺酸三乙胺溶液为内水相的伊立替康脂质体粒径和包封率

脂质浓度 (mg/ml)	药物浓度 (mg/ml)	药脂比	载药后粒径 (nm)	载药后 PDI	包封率 (%)
	0.86	0.1	102.45	0.043	98.25
8.91	2.58	0.3	101.98	0.060	90.43
	4.30	0.5	102.36	0.051	76.06

实施例 8、以丙二磺酸铵溶液为内水相的伊立替康脂质体的制备和表征

本实施例中使用的丙二磺酸购自阿法埃莎（Alfa Aesar）公司；使用的氨水购自 Aladdin 公司。

精密量取 4.741ml 丙二磺酸溶液,用氨水滴定至 pH 4.0~6.0,双蒸水(ddH₂O)定容至 50ml,得到 pH 为 4.0~6.0 的 325mM 丙二磺酸铵缓冲液;

制备伊立替康脂质体,具体制备过程参照实施例 2。不同之处在于,在步骤(2)往步骤(1)所得到的脂质乙醇溶液加入 10 ml、pH 为 4.0~6.0 的 325mM 丙二磺酸铵缓冲液,而不加入甲基磺酸铵缓冲液。

表征伊立替康脂质体的方法参照实施例 2,结果如表 8 所示。表 8 表明,实施例 8 制备得伊立替康脂质体的包封率良好。

表 8 以丙二磺酸铵溶液为内水相的伊立替康脂质体粒径和包封率

脂质浓度 (mg/ml)	药物浓度 (mg/ml)	药脂比	载药后粒径 (nm)	载药后 PDI	包封率 (%)
8.91	0.86	0.1	102.75	0.039	95.65
	2.58	0.3	101.80	0.054	92.89
	4.30	0.5	102.34	0.062	85.91

实施例 9、以丙二磺酸三乙胺溶液为内水相的伊立替康脂质体的制备和表征

本实施例中使用的丙二磺酸购自阿法埃莎(Alfa Aesar)公司;使用的三乙胺购自国药集团。

精密量取 4.735ml 4-羟基苯磺酸溶液,用三乙胺滴定至 pH 4.0~6.0,双蒸水(ddH₂O)定容至 50ml,得到 pH 为 4.0~6.0 的 325mM 丙二磺酸三乙胺缓冲液;

制备伊立替康脂质体,具体制备过程参照实施例 2。不同之处在于,在步骤(2)往步骤(1)所得到的脂质乙醇溶液加入 10 ml、pH 为 4.0~6.0 的 325mM 丙二磺酸三乙胺缓冲液,而不加入甲基磺酸铵缓冲液。

表征伊立替康脂质体的方法参照实施例 2,结果如表 9 所示。表 9 表明,实施例 9 制备得伊立替康脂质体的包封率良好。

表 9 以丙二磺酸三乙胺溶液为内水相的伊立替康脂质体粒径和包封率

脂质浓度 (mg/ml)	药物浓度 (mg/ml)	药脂比	载药后粒径 (nm)	载药后 PDI	包封率 (%)
8.91	0.86	0.1	101.87	0.047	98.39
	2.58	0.3	102.16	0.054	93.25
	4.30	0.5	102.41	0.056	84.47

实施例 2~9 的八种磺酸盐梯度对伊立替康脂质体的包封率的影响如图 3 所示。

实施例 10、以不同磷酸盐为内水相的伊立替康脂质体的体外释放研究

不同药脂比时，脂质体内水相中药物的浓度不同，因此药物与磷酸根离子所形成的不溶性盐很可能具有不同的结构，因而可能具有不同的药物释放速率。为了比较以不同的磷酸盐（包括铵盐和三乙胺盐）为内水相所制备的伊立替康脂质体的体外释放速率，本实施例中，进行体外释放研究的伊立替康脂质体均具有相同的药脂比（0.3），载药浓度均为 2.58mg/ml、脂质浓度均为 8.91mg/ml。

用于体外释放研究的牛血清白蛋白（BSA）购自于生工生物工程（上海）股份有限公司；Dowex 树脂购自西格玛奥德里奇（Sigma-Aldrich）公司。

伊立替康脂质体的体外释放实验具体过程如下：

步骤（1），精密称量 4.0152g 牛血清白蛋白（BSA）粉末，溶解于 100ml 生理盐水，配制 40mg/ml 白蛋白生理盐水溶液（蛋白浓度与 50% 血浆中蛋白浓度相当）；

步骤（2），取实施例 2-9 中以不同单价磷酸盐溶液或二磷酸盐（pH 为 4.0~6.0）溶液为内水相所制备的伊立替康脂质体；其中，脂质浓度为 8.91mg/ml、药脂比（药物和脂质的摩尔比）均为 0.3。

步骤（3），用 40mg/ml 白蛋白生理盐水溶液将脂质体稀释 80 倍，加入足量的 Dowex 树脂吸附游离药物，形成漏槽条件，于 37℃ 100rpm 摇床（THZ-C 恒温振荡器，中国）中震荡。在不同的时间点（0 小时、1 小时、3 小时、6 小时、9 小时和 24 小时）取样，静置后取上清，UV 法测定包裹在脂质体中的伊立替康的含量，计算不同时间点伊立替康的累积释放速率。

作为比较，本发明还按照市售 Onivyde 的说明书自制了以蔗糖八硫酸脂三乙胺为内水相的伊立替康脂质体。其中，脂质浓度为 8.91mg/ml、药脂比为 0.3；以及以 pH4.0-6.0 的 325 mM 的硫酸铵为内水相的伊立替康脂质体，其中，脂质浓度为 8.91mg/ml、药脂比为 0.3。按照上述方法，平行测定了以蔗糖八硫酸脂三乙胺和硫酸铵为内水相的伊立替康脂质体在白蛋白生理盐水中的体外释放速率，并与本发明提出的伊立替康脂质体制剂的释放速率进行了比较。

各组伊立替康脂质体的体外累积释放曲线如图 4 所示。图 4 表明，在白蛋白生理盐水溶液中，以甲基磷酸铵、4-羟基苯磷酸铵、4-羟基苯磷酸三乙胺、乙二磷酸铵、乙二磷酸三乙胺、丙二磷酸铵和丙二磷酸三乙胺溶液为内水相的脂质体伊立替康均具备较好的体外缓释效果。其中，从 24 小时累积释放百分率来看，甲基磷酸铵组达到 10.03%，4-羟基苯磷酸铵组达到 11.35%，4-羟基苯磷酸三乙胺组达到 10.32%，乙二磷酸铵组达到 1.03%，乙二磷酸三乙胺组达到 3.49%，丙二磷酸铵组达到 2.31%，丙二磷酸三乙胺组达到 1.96%。同时平行测定蔗糖八硫酸脂三乙胺组 24 小时累积释放百分率达到 8.91%，硫酸铵组达到了 15.34%。该体

外释放研究结果表明,以单价磺酸盐和二磺酸盐为内水相的伊立替康脂质体的释放速率明显慢于以硫酸铵为内水相的脂质体的释放速率。

实施例 11、伊立替康磺酸盐的熔点测定

本实施例使用的甲磺酸和羟基苯磺酸购自西格玛奥德里奇(Sigma-Aldrich)公司。

熔点可以反映化合物内部结构的规整性。盐的熔点越高,其分子排列很可能越规整。例如晶体的熔点往往高于无定型。为了考察脂质体内水相中,不同的磺酸盐与伊立替康所形成的盐的可能结构,本实施例中通过将盐酸伊立替康与磺酸盐溶液直接混合的方式,形成伊立替康磺酸盐,并测定了各个盐的熔点。

具体过程如下:

(1)精密量取 2.131ml 甲磺酸溶液,加入 2.431ml 氨水,双蒸水(ddH₂O)定容至 50ml,得到浓度为 650mM 的甲基磺酸铵水溶液;精密称量 50.6mg 盐酸伊立替康加入 1ml 650mM 的甲基磺酸铵水溶液中,摇匀;

(2)精密量取 2.131ml 甲磺酸溶液,加入 4.572ml 三乙胺,双蒸水(ddH₂O)定容至 50ml,得到浓度为 650mM 的甲基磺酸三乙胺水溶液;精密称量 50.6mg 盐酸伊立替康加入 1ml 650mM 的甲基磺酸三乙胺水溶液中,摇匀;

(3)精密量取 6.513ml 4-羟基苯磺酸溶液,加入 2.432ml 氨水,双蒸水(ddH₂O)定容至 50ml,得到浓度为 650mM 的羟基苯磺酸铵水溶液;精密称量 50.6mg 盐酸伊立替康加入 1ml 650mM 的羟基苯磺酸铵水溶液中,摇匀;

(4)精密量取 6.513ml 4-羟基苯磺酸溶液,加入 5.866ml 三乙胺,双蒸水(ddH₂O)定容至 50ml,得到浓度为 650mM 的羟基苯磺酸三乙胺水溶液;精密称量 50.6mg 盐酸伊立替康加入 1ml 650mM 的羟基苯磺酸三乙胺水溶液中,摇匀;

将上述盐酸伊立替康与磺酸盐溶液的混悬液,油浴加热,测定熔点,结果如表 10 所示。

表 10 不同伊立替康磺酸盐的熔点测定结果

盐溶液 温度(°C)	甲基磺酸铵	甲基磺酸三乙胺	4-羟基苯磺酸铵	4-羟基苯磺酸三乙胺
始熔温度	88	86	91	92
全熔温度	94	93	97	99
熔程	6	7	6	7

表 10 表明,各伊立替康磺酸盐的熔融温度在 86°C~99°C 之间。将熔融实验结果结合后续

DSC 实验结果分析, 可以得出以这些磺酸盐溶液作为脂质体内水相时, 与脂质体内水相中的伊立替康离子形成了晶型或无定型结构的不溶性盐, 从而达到对伊立替康的稳定包封, 并增加伊立替康脂质体的储存稳定性。

实施例 12 伊立替康脂质体的高分辨 DSC 表征

研究表明, 脂质体内水相中的纳米晶体的形成, 有利于提高脂质体制剂的储存稳定性, 并减缓药物释放速率 (Wei, X.等, Cardinal role of intraliposome doxorubicin-sulfate nanorod crystal in doxil properties and performance[J]. ACS Omega 2018, 3 (3), 2508-2517)。

为了考察单价磺酸盐和二磺酸盐在脂质体内水相中, 与伊立替康所形成的盐的微观结构, 在实施例 11 熔点测定的基础上, 我们采用高分辨 DSC 研究了实施例 2~9 中所制备的伊立替康脂质体的热力学行为, 并与自制的以蔗糖八硫酸酯三乙胺和硫酸铵为内水相的伊立替康脂质体进行了对比。所有进行 DSC 表征的伊立替康脂质体样品的投药药脂比均为 0.3, 脂质浓度为 8.9mg/ml, 平均粒径为 100nm 且 PDI 小于 0.1。

本实施例使用的差示扫描量热仪 (DSC) 为美国 GE 公司的毛细管 DSC (Capillary DSC)。扫描温度为 10-120 摄氏度, 扫描速度为 1 度/分钟。

具体过程如下:

取实施例 2-9 中以不同磺酸盐溶液为内水相制备的伊立替康脂质体, 0.22 μ m 滤膜过滤后, 手动加入毛细管 DSC 的样品池中 (约 200 μ l), 用 10%蔗糖溶液作为对照, 加热扫描并记录热力学图谱。按照文献方法 (Wei, X.等, Insights into composition/structure/function relationships of doxil® gained from "high-sensitivity" differential scanning calorimetry[J]. Eur J Pharm Biopharm 2016, 104, 260-270) 处理所得的热力学图谱并依据各脂质体中所包裹的伊立替康的摩尔浓度计算热力学参数。结果如图 5 所示。各组盐酸伊立替康脂质体的主要热力学参数如表 11 所示。

表 11 以不同磺酸盐溶液为内水相制备的伊立替康脂质体的主要药动学参数

磺酸盐	脂质双层膜的相变温度 (°C)	内水相中伊立替康磺酸盐的熔融温度 (°C)
三乙胺蔗糖脂	58.85	105.38
硫酸铵	60.76	97.38
甲磺酸铵	58.35	96.58
甲磺酸三乙胺	56.05	95.53

4-羟基苯磺酸铵	52.41	100.16, 116.71(重结晶后的熔融温度)
4-羟基苯磺酸三乙胺	52.49	103.50
乙二磺酸铵	53.13	107.57
乙二磺酸三乙胺	53.13	109.18
丙二磺酸铵	54.14	107.53
丙二磺酸三乙胺	53.20	109.16

DSC 实验结果表明, 伊立替康脂质体内水相中的磺酸盐与药物形成了较为规整的结构, 具有较高的熔点。这种形式有利于药物的稳定包载和制剂的缓释。结合实施例 10 的体外释放结果, 以甲基磺酸铵、4-羟基苯磺酸铵、4-羟基苯磺酸三乙胺溶液以及四组二磺酸盐溶液为内水相的伊立替康脂质体具备较好的体外缓释效果。

实施例 12

本发明还参照实施例 2 和实施例 6 制备了其他种类的伊立替康脂质体, 并进行表征。

类型 1、与实施例 2 中伊立替康脂质体制备方法的不同之处在于, 步骤 (2) 为, 取甲基磺酸铵溶液调 pH, 制得 pH 为 9.0 的 800mM 甲基磺酸铵缓冲液; 步骤 (4) 中, 得到粒径大小为 200nm 的空白脂质体, 步骤 (5) 中, 与浓度为 15mg/ml 的盐酸伊立替康水溶液混合, 其余皆相同。

类型 2、与实施例 2 中伊立替康脂质体制备方法的不同之处在于, 步骤 (2) 为, 取甲基磺酸铵溶液调 pH, 制得 pH 为 4.5 的 100mM 甲基磺酸铵缓冲液; 步骤 (4) 中, 得到粒径大小为 30nm 的空白脂质体, 步骤 (5) 中, 与浓度为 10mg/ml 的盐酸伊立替康水溶液混合, 其余皆相同。

类型 3、与实施例 2 中伊立替康脂质体制备方法的不同之处在于, 步骤 (2) 为, 取甲基磺酸铵溶液调 pH, 制得 pH 为 5.0 的 200mM 甲基磺酸铵缓冲液; 步骤 (4) 中, 得到粒径大小为 50nm 的空白脂质体, 步骤 (5) 中, 与浓度为 13mg/ml 的盐酸伊立替康水溶液混合, 其余皆相同。

类型 4、与实施例 2 中伊立替康脂质体制备方法的不同之处在于, 步骤 (2) 为, 取甲基磺酸铵溶液调 pH, 制得 pH 为 8.0 的 700mM 甲基磺酸铵缓冲液; 步骤 (4) 中, 得到粒径大小为 120nm 的空白脂质体, 步骤 (5) 中, 与浓度为 14mg/ml 的盐酸伊立替康水溶液混合,

其余皆相同。

类型 5、与实施例 6 中伊立替康脂质体制备方法的不同之处在于，步骤（2）为，取乙二磺酸水合物溶液调 pH，制得 pH 为 6.0 的 500mM 乙二磺酸铵缓冲液；步骤（4）中，得到粒径大小为 90nm 的空白脂质体，步骤（5）中，与浓度为 14mg/ml 的盐酸伊立替康水溶液混合，其余皆相同。

类型 6、与实施例 6 中伊立替康脂质体制备方法的不同之处在于，步骤（2）为，取乙二磺酸水合物溶液调 pH，制得 pH 为 4.0 的 50mM 乙二磺酸铵缓冲液；步骤（4）中，得到粒径大小为 110nm 的空白脂质体，步骤（5）中，与浓度为 12mg/ml 的盐酸伊立替康水溶液混合，其余皆相同。

类型 7、与实施例 6 中伊立替康脂质体制备方法的不同之处在于，步骤（2）为，取乙二磺酸水合物溶液调 pH，制得 pH 为 4.5 的 100mM 乙二磺酸铵缓冲液；步骤（4）中，得到粒径大小为 80nm 的空白脂质体，步骤（5）中，与浓度为 13mg/ml 的盐酸伊立替康水溶液混合，其余皆相同。

类型 8、与实施例 6 中伊立替康脂质体制备方法的不同之处在于，步骤（2）为，取乙二磺酸水合物溶液调 pH，制得 pH 为 7.5 的 400mM 乙二磺酸铵缓冲液；步骤（4）中，得到粒径大小为 150nm 的空白脂质体，步骤（5）中，与浓度为 13mg/ml 的盐酸伊立替康水溶液混合，其余皆相同。

类型 1、以甲基磺酸铵溶液为内水相的伊立替康脂质体粒径和包封率

脂质浓度 (mg/ml)	药物浓度 (mg/ml)	药脂比	载药后粒径 (nm)	载药后 PDI	包封率 (%)
	0.86	0.1	200.10	0.041	95.28
8.91	2.58	0.3	201.20	0.053	88.91
	4.30	0.5	199.70	0.025	70.01

类型 2、以甲基磺酸铵溶液为内水相的伊立替康脂质体粒径和包封率

脂质浓度 (mg/ml)	药物浓度 (mg/ml)	药脂比	载药后粒径 (nm)	载药后 PDI	包封率 (%)
	0.86	0.1	30.57	0.065	94.35
8.91	2.58	0.3	29.85	0.058	87.94
	4.30	0.5	30.22	0.061	71.14

类型 3、以甲基磺酸铵溶液为内水相的伊立替康脂质体粒径和包封率

脂质浓度 (mg/ml)	药物浓度 (mg/ml)	药脂比	载药后粒径 (nm)	载药后 PDI	包封率 (%)
8.91	0.86	0.1	50.16	0.046	94.76
	2.58	0.3	50.40	0.052	89.22
	4.30	0.5	49.60	0.038	70.52

类型 4、以甲基磺酸铵溶液为内水相的伊立替康脂质体粒径和包封率

脂质浓度 (mg/ml)	药物浓度 (mg/ml)	药脂比	载药后粒径 (nm)	载药后 PDI	包封率 (%)
8.91	0.86	0.1	121.10	0.051	95.86
	2.58	0.3	120.46	0.054	87.21
	4.30	0.5	119.78	0.042	69.51

类型 5、以乙二磺酸铵溶液为内水相的伊立替康脂质体粒径和包封率

脂质浓度 (mg/ml)	药物浓度 (mg/ml)	药脂比	载药后粒径 (nm)	载药后 PDI	包封率 (%)
8.91	0.86	0.1	90.15	0.041	85.21
	2.58	0.3	91.46	0.049	77.62
	4.30	0.5	89.74	0.034	58.19

类型 6、以乙二磺酸铵溶液为内水相的伊立替康脂质体粒径和包封率

脂质浓度 (mg/ml)	药物浓度 (mg/ml)	药脂比	载药后粒径 (nm)	载药后 PDI	包封率 (%)
8.91	0.86	0.1	110.10	0.065	82.31
	2.58	0.3	111.20	0.058	73.98
	4.30	0.5	109.65	0.061	58.95

类型 7、以乙二磺酸铵溶液为内水相的伊立替康脂质体粒径和包封率

脂质浓度 (mg/ml)	药物浓度 (mg/ml)	药脂比	载药后粒径 (nm)	载药后 PDI	包封率 (%)
8.91	0.86	0.1	80.10	0.046	80.25
	2.58	0.3	81.45	0.052	74.72
	4.30	0.5	80.35	0.038	61.18

类型 8、以乙二磺酸铵溶液为内水相的伊立替康脂质体粒径和包封率

脂质浓度 (mg/ml)	药物浓度 (mg/ml)	药脂比	载药后粒径 (nm)	载药后 PDI	包封率 (%)
8.91	0.86	0.1	150.10	0.051	83.21
	2.58	0.3	151.46	0.054	72.62
	4.30	0.5	148.98	0.042	60.96

上述实施例仅例示性说明本发明的原理及其功效，而非用于限制本发明。任何熟悉此技术的人士皆可在不违背本发明的精神及范畴下，对上述实施例进行修饰或改变。因此，举凡所属技术领域中具有通常知识者在未脱离本发明所揭示的精神与技术思想下所完成的一切等效修饰或改变，仍应由本发明的权利要求所涵盖。

权利要求书

- 1、一种伊立替康脂质体制剂，含有伊立替康脂质体，所述伊立替康脂质体包括：伊立替康和脂质体载体以及位于脂质体膜内的内水相和位于脂质体膜外的外水相，所述伊立替康被包封于所述内水相中；所述脂质体膜内的内水相和膜外的外水相之间存在磺酸盐梯度。
- 2、根据权利要求 1 所述的伊立替康脂质体制剂，其特征在于，所述内水相包括磺酸盐水溶液；所述外水相为生理等渗溶液。
- 3、根据权利要求 2 所述的伊立替康脂质体制剂，其特征在于，所述内水相中的伊立替康的阳离子与磺酸盐阴离子形成不溶性盐。
- 4、根据权利要求 2 所述的伊立替康脂质体制剂，其特征在于，所述磺酸盐包括单价磺酸盐和/或二磺酸盐。
- 5、根据权利要求 4 所述的伊立替康脂质体制剂，其特征在于，还包括以下特征中的一项或多项：a.所述单价磺酸盐选自甲基磺酸铵、4-羟基苯磺酸铵、甲基磺酸三乙胺和 4-羟基苯磺酸三乙胺中的一种或多种；b. 所述二磺酸盐选自乙基二磺酸铵、丙基二磺酸铵、乙基二磺酸三乙胺和丙基二磺酸三乙胺中的一种或多种。
- 6、根据权利要求 1 所述的伊立替康脂质体制剂，其特征在于，还包括以下特征中的一项或多项：a.所述脂质体内水相的 pH 值为 4.0~9.0；b.所述伊立替康脂质体制剂中，伊立替康的浓度大于等于 0.1mg/ml；c.所述伊立替康脂质体制剂中，伊立替康的包封率大于等于 85%。
- 7、一种如权利要求 1-6 任一项所述的伊立替康脂质体制剂的制备方法，其特征在于，所述方法为主动载药法，所述主动载药法包括以下步骤：
 - (1) 制备内水相和外水相均含磺酸盐水溶液的空白脂质体；
 - (2) 制备内水相含有磺酸盐水溶液、外水相含有生理等渗溶液的空白脂质体，以形成空白脂质体内外水相磺酸盐浓度梯度；
 - (3) 将步骤 (2) 所得空白脂质体与伊立替康可溶性盐水溶液混合，孵育，去除游离伊立替康可溶性盐，获得伊立替康脂质体。
- 8、如权利要求 7 所述的伊立替康脂质体制剂的制备方法，其特征在于，所述方法还包括以下特征中的一项或多项：
 - a. 步骤 (1) 和步骤 (2) 中，所述磺酸盐水溶液中的磺酸盐浓度为 100mM-800mM；
 - b. 步骤 (1) 和步骤 (2) 中，所述磺酸盐水溶液的 pH 值为 4.0~9.0；
 - c. 步骤 (1) 和步骤 (2) 中，所述磺酸盐水溶液中磺酸根离子的浓度是 50mM~800mM；
 - d. 步骤 (1) 和步骤 (2) 中，所述磺酸盐水溶液中阳离子的浓度是 50~800mM；

- e. 步骤（2）中，所述生理等渗溶液可选自：5%（w/v）葡萄糖水溶液、10%（w/v）蔗糖水溶液或 0.9%（w/v）氯化钠水溶液；
 - f. 步骤（2）中，所述外水相的 pH 是 4.0~9.0；
 - g. 步骤（3）中，药脂摩尔比大于等于 0.1；
 - h. 步骤（3）中，所述伊立替康可溶性盐选自盐酸伊立替康。
- 9、一种由如权利要求 7-8 任一项所述方法制备获得的伊立替康脂质体制剂。
- 10、如权利要求 1-6 任一项所述伊立替康脂质体制剂在制备结直肠癌、肺癌、乳腺癌或胰腺癌的肿瘤治疗药物中的用途。

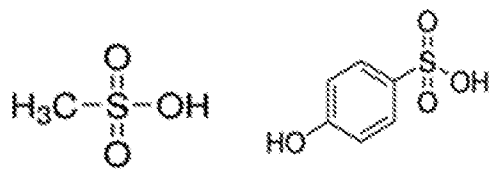


图 1A.

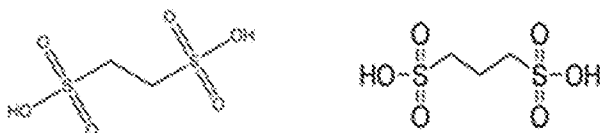


图 1B.

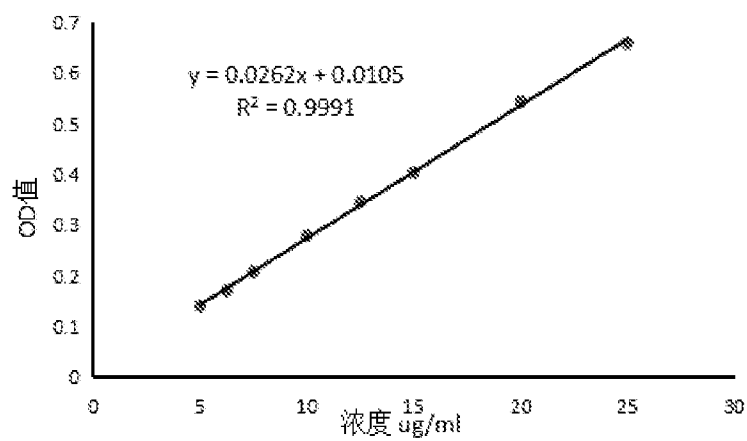


图 2

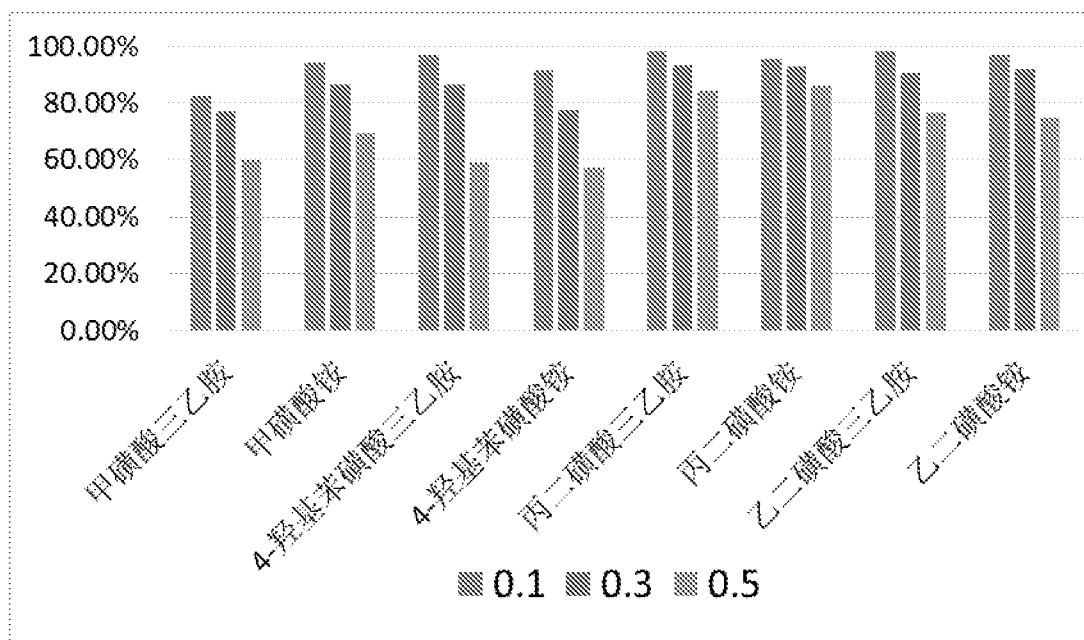


图 3

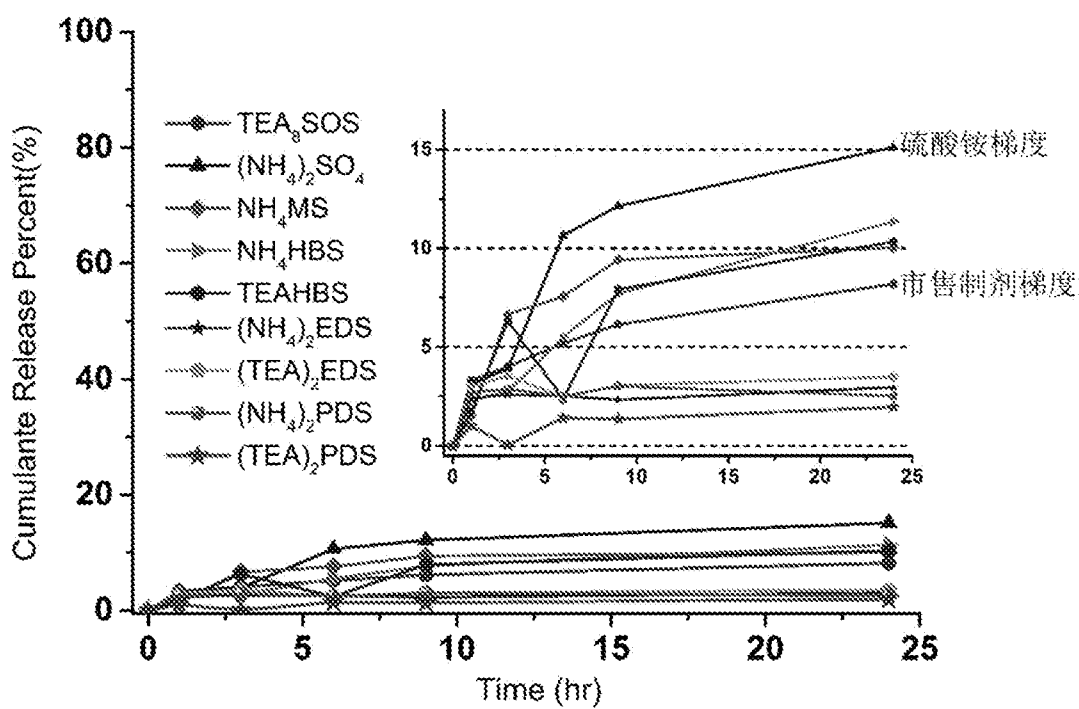


图 4

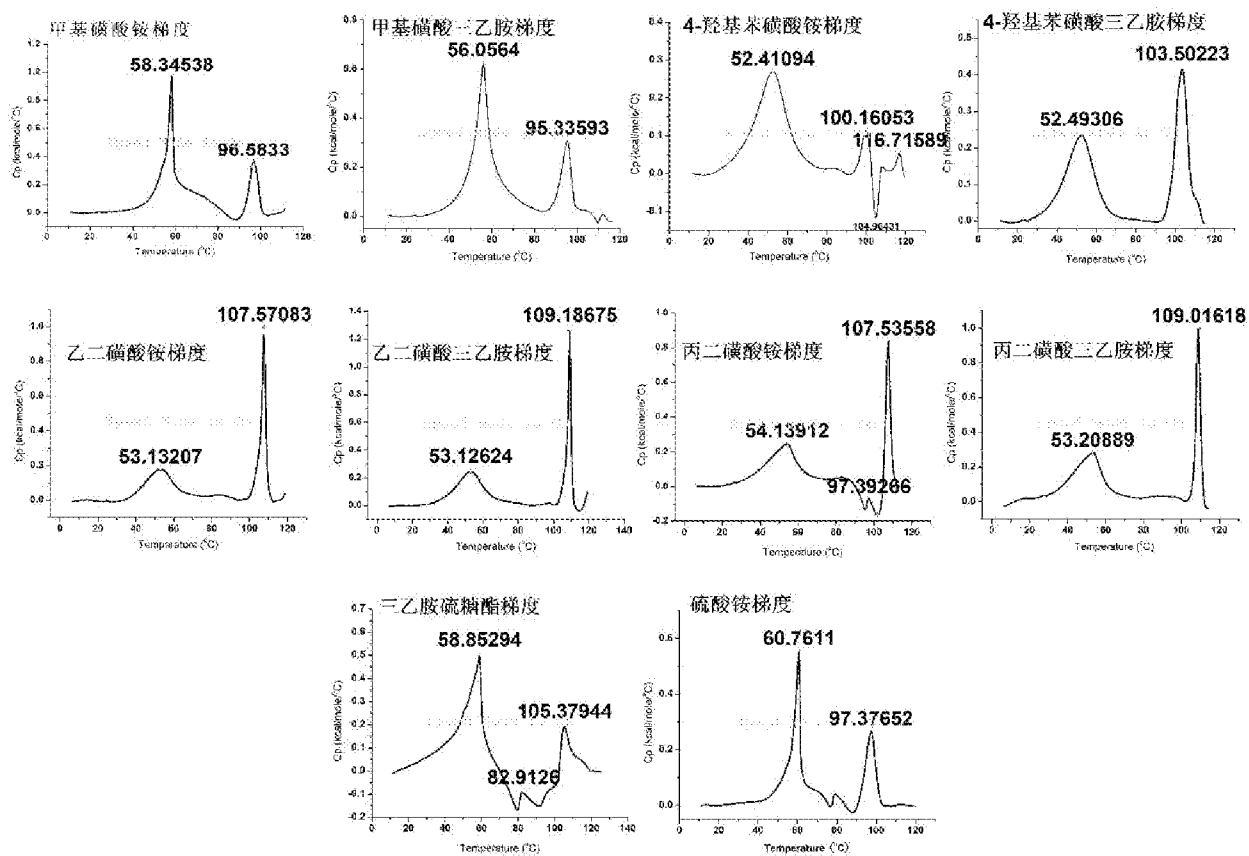


图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/110542

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 9/127(2006.01)i; A61K 47/20(2006.01)i; A61K 47/24(2006.01)i; A61K 47/28(2006.01)i; A61K 31/4745(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CPRSABS, CNMED, MOABS, HKABS, TWABS, TWMED, DWPI, SIPOABS, JPABS, CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, CNKI, ISI WEB OF KNOWLEDGE: 伊立替康, 依立替康, 伊力替康, 伊利替康, 伊诺替康, 依利替康, 依诺替康, Irinotecan, 脂质体, liposome, 磷酸, sulfonic, sulphonic, sulfonate

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 109260155 A (SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY) 25 January 2019 (2019-01-25) claims 1-10	1-10
X	CN 102048693 A (ZHONGQI PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY (SHIJIAZHUANG) CO., LTD.) 11 May 2011 (2011-05-11) claims 1-10, description, paragraphs 35-39, and embodiment 1	1-10
A	CN 107260680 A (SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY) 20 October 2017 (2017-10-20) entire document	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
 “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 “&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

09 December 2019

Date of mailing of the international search report

15 January 2020

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/110542

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	109260155	A	25 January 2019	None			
CN	102048693	A	11 May 2011	JP	2013508313	A	07 March 2013
				EP	2494960	B1	10 January 2018
				CN	102048693	B	21 August 2013
				AU	2010312078	A1	24 May 2012
				WO	2011050710	A1	05 May 2011
				US	8871253	B2	28 October 2014
				BR	112012009660	A2	17 May 2016
				ES	2665033	T3	24 April 2018
				EP	2494960	A4	16 October 2013
				AU	2010312078	B2	08 October 2015
				CN	102596178	B	03 December 2014
				CN	102596178	A	18 July 2012
				CA	2776925	C	24 July 2018
				KR	101772399	B1	29 August 2017
				RU	2012119799	A	10 December 2013
				KR	20120089735	A	13 August 2012
				US	2012201874	A1	09 August 2012
				EP	2494960	A1	05 September 2012
				JP	5785175	B2	24 September 2015
				CA	2776925	A1	05 May 2011
CN	107260680	A	20 October 2017	None			

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/110542

A. 主题的分类 A61K 9/127(2006.01)i; A61K 47/20(2006.01)i; A61K 47/24(2006.01)i; A61K 47/28(2006.01)i; A61K 31/4745(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类														
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) A61K, A61P 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS, CPRSABS, CNMED, MOABS, HKABS, TWABS, TWMED, DWPI, SIPOABS, JPABS, CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, CNKI, ISI WEB OF KNOWLEDGE: 伊立替康, 依立替康, 伊力替康, 伊利替康, 伊诺替康, 依利替康, 依诺替康, Irinotecan, 脂质体, liposome, 磺酸, sulfonic, sulphonic, sulfonate														
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>CN 109260155 A (上海交通大学) 2019年 1月 25日 (2019 - 01 - 25) 权利要求1-10</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 102048693 A (石药集团中奇制药技术石家庄有限公司) 2011年 5月 11日 (2011 - 05 - 11) 权利要求1-10, 说明书第35-39段, 实施例1</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 107260680 A (上海交通大学) 2017年 10月 20日 (2017 - 10 - 20) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	CN 109260155 A (上海交通大学) 2019年 1月 25日 (2019 - 01 - 25) 权利要求1-10	1-10	X	CN 102048693 A (石药集团中奇制药技术石家庄有限公司) 2011年 5月 11日 (2011 - 05 - 11) 权利要求1-10, 说明书第35-39段, 实施例1	1-10	A	CN 107260680 A (上海交通大学) 2017年 10月 20日 (2017 - 10 - 20) 全文	1-10
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求												
PX	CN 109260155 A (上海交通大学) 2019年 1月 25日 (2019 - 01 - 25) 权利要求1-10	1-10												
X	CN 102048693 A (石药集团中奇制药技术石家庄有限公司) 2011年 5月 11日 (2011 - 05 - 11) 权利要求1-10, 说明书第35-39段, 实施例1	1-10												
A	CN 107260680 A (上海交通大学) 2017年 10月 20日 (2017 - 10 - 20) 全文	1-10												
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。														
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件														
国际检索实际完成的日期 2019年 12月 9日		国际检索报告邮寄日期 2020年 1月 15日												
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		授权官员 盛倩 电话号码 62411142												

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/110542

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	109260155	A	2019年 1月 25日	无			
CN	102048693	A	2011年 5月 11日	JP	2013508313	A	2013年 3月 7日
				EP	2494960	B1	2018年 1月 10日
				CN	102048693	B	2013年 8月 21日
				AU	2010312078	A1	2012年 5月 24日
				WO	2011050710	A1	2011年 5月 5日
				US	8871253	B2	2014年 10月 28日
				BR	112012009660	A2	2016年 5月 17日
				ES	2665033	T3	2018年 4月 24日
				EP	2494960	A4	2013年 10月 16日
				AU	2010312078	B2	2015年 10月 8日
				CN	102596178	B	2014年 12月 3日
				CN	102596178	A	2012年 7月 18日
				CA	2776925	C	2018年 7月 24日
				KR	101772399	B1	2017年 8月 29日
				RU	2012119799	A	2013年 12月 10日
				KR	20120089735	A	2012年 8月 13日
				US	2012201874	A1	2012年 8月 9日
				EP	2494960	A1	2012年 9月 5日
				JP	5785175	B2	2015年 9月 24日
				CA	2776925	A1	2011年 5月 5日
CN	107260680	A	2017年 10月 20日	无			