(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102781428 B
(45)授权公告日 2017.09.19

(21)申请号 201180011038.3

(22)申请日 2011.02.24

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 102781428 A

(43)申请公布日 2012.11.14

(30)优先权数据
10-2010-0016555 2010.02.24 KR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2012.08.24

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2011/001303 2011.02.24

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2011/105835 EN 2011.09.01

(73)专利权人 有限公司公元前世界医药
地址 韩国京畿道

(72)发明人 黄成柱 朴熹俊 赵原庆 车光浩 朴峻成 朴灿赫 具东键

(74)专利代理机构 北京派特恩知识产权代理有限公司 11270
代理人 孟桂超 张颖玲

(51)Int.Cl.
A61K 9/127(2006.01)
A61K 47/36(2006.01)
C12M 1/02(2006.01)

(56)对比文件
WO 9427581 A1,1994.12.08,
Bo-Young Hwang,et al.In vitro skin permeation of nicotine from proliposomes.《Journal of controlled release》.1997,177-184.
李晓君.中药脂质体靶向给药的研究进展.《辽宁医学院学报》.2009,第30卷(第1期),78-81.
谢芳.超临界技术制备低水溶性药物脂质体实验研究.《中国优秀硕士学位论文全文数据库医药卫生科技辑》.2009,(第10期),E079-44.

审查员 齐丹丹

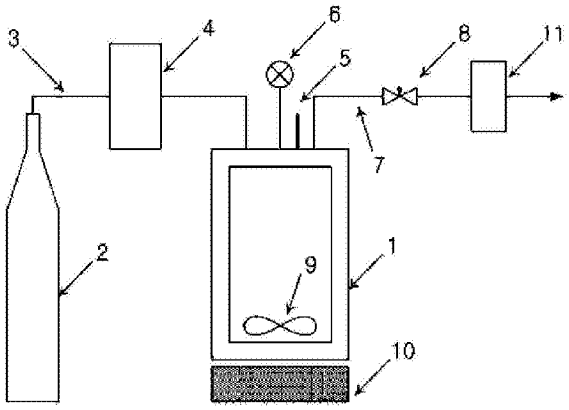
权利要求书1页 说明书8页 附图1页

(54)发明名称

用于制备新脂质体的方法及装置

(57)摘要

本发明公开了一种用于制备脂质体制剂的方法。在公开的方法中，将脂质组分溶解于有机溶剂中。将包括生物活性组分与脂质组分的溶液，还有载体一起放入反应容器中，并且将超临界流体引入到其中，以便制备包衣有生物活性组分-脂质的颗粒。通过加压将超临界流体排出以得到前体脂质体颗粒，并且然后用包括水的水性溶液使前体脂质体颗粒水化以便形成脂质体溶液。优选地，所述制剂可以包括一种或多种生物活性组分。如果需要，通过例如粒径减小、除去有机溶剂以及冷冻干燥等方法可以对脂质体制剂进一步处理。上述制备方法能够容易地以实验室规模进行。而且，同样的方法能够应用于大量生产或商业规模的脂质体制剂制备。



CN 102781428 B

1.一种用于制备脂质体制剂的方法，所述方法包括步骤：

(a)将包括选自磷脂和甾醇中的至少一种脂质组分，以及生物活性物质溶解于有机溶剂中；

(b)将步骤(a)中的有机溶剂溶液与糖类载体一起放入反应容器中，并且将超临界流体引入到所述反应容器中以便制备包衣有脂质-生物活性物质混合物的前体脂质体颗粒；

(c)通过加压使步骤(b)中的所述超临界流体排出以便得到所述前体脂质体颗粒；以及

(d)用包括水的水性溶液使步骤(c)中的所述前体脂质体颗粒水化以便形成脂质体溶液，

其中，所述生物活性物质为两性霉素B，

所述糖类载体为乳糖，

所述超临界流体为超临界二氧化碳，

其中，所述有机溶剂分为生物活性组分可溶的溶剂和脂质组分可溶的溶剂，并且所述生物活性组分可溶的溶剂是二甲基乙酰胺，所述脂质组分可溶的溶剂是氯仿和甲醇的混合物，

其中，所述步骤(b)中的反应在120巴～300巴范围内的压力下，在35℃～70℃范围内的温度下进行，

其中，步骤(d)中的水化温度在65℃～95℃的范围内。

2.根据权利要求1所述的方法，还包括通过使步骤(d)中的所述脂质体溶液经过微射流机使脂质体粒径减小的步骤。

3.根据权利要求1或2所述的方法，其中，所述磷脂为选自包括下列物质的组中的至少一种：磷脂酰甘油、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、蛋黄卵磷脂、大豆卵磷脂、N-[1-(2,3-二油酰氧)丙基]-N,N,N-三甲基甲硫酸铵、N-[1-(2,3-二油酰氧)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵、双十八烷基二甲基溴化铵、2,3-二油酰氧-N-[2(精胺羧基酰胺)乙基]-N,N-二甲基-1-丙基-三氟乙酸铵、二油酰磷脂酰乙醇胺、1,2-双十四烷氧基丙基-3-二甲基-羟乙基溴化铵、双十二烷基二甲基溴化铵、3β-[N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)-氨甲酰基]胆固醇、双十八烷酰氨基甘氨酰精胺、N,N-[二(2-羟乙基)]-N-甲基-N-[2,3-二(十四酰氧基)丙基]碘化铵、N,N,N',N'-四甲基-N,N'-二(2-羟乙基)-2,3-二(油酰氧)-1,4-碘化丁二铵、二乙氨基乙基纤维素、N,N,N,N-四甲基-N,N,N,N-四棕榈基精胺、二油酰磷脂酰乙醇胺、N-叔丁基-N'-十四烷基-3-十四烷基氨基丙脒以及二乙氨基乙基葡聚糖。

4.根据权利要求1或2所述的方法，其中，所述甾醇为选自包括胆固醇、胆固醇六琥珀酸酯、麦角甾醇以及羊毛甾醇的组中的至少一种。

5.根据权利要求1或2所述的方法，还包括将制备的脂质体无菌过滤的步骤。

6.根据权利要求1或2所述的方法，还包括将制备的脂质体冷冻干燥的步骤。

用于制备新脂质体的方法及装置

技术领域

[0001] 本发明涉及用于制备脂质体的新方法以及用于制备脂质体的装置，并且优选脂质体制剂可以包括一种或多种生物活性组分。更具体地，本发明涉及用于制备脂质体制剂的方法及装置，其中脂质体制剂具有抗生物活性组分的稳定性以及制剂稳定性，并且能够以高产率大量生产。

背景技术

[0002] 脂质体是包括磷脂及其衍生物的囊泡。当磷脂及其衍生物分散在水中时，它自发地形成囊泡，并且具有其内部包括水性内核的脂质双层的特性。各种脂质体已经在医疗、药物以及生物化学领域中用作药物、酶以及诸如基因序列等治疗剂的载体。

[0003] 脂质体组合物的实例公布在美国专利登记第4983397、6476068、5834012、5756069、6387397、5534241、4789633、4925661、6153596、6057299、5648478、6723338、6627218号；美国专利公开第2003/0224037、2004/0022842、2001/0033860、2003/0072794、2003/0082228、2003/0212031、2003/0203865、2004/0142025、2004/0071768号；国际专利公开第WO00/74646、WO96/13250、WO98/33481号；Papahadjopolulos D,Allen TM,Gbizon A等，“Sterically stabilized liposomes:Improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy”,Proc Natl Acad Sci U.S.A.(1991)88:11460-11464;Allen TM,Martin FJ,“Advantages of liposomal delivery systems for anthracyclines”Semin Oncol(2004)31:5-15(suppl 13);Weissig等,Pharm.Res.(1998)15:1552-1556中。

[0004] 各种用于制备脂质体的方法已经在本发明的技术领域中周知，这些方法中的一些在Liposome Technology 2nd Edition in G.Gregoriadis,CRC Press Inc.,Boca Raton(1993)中详细描述。

[0005] 在这些传统的脂质体制备技术的情况下，能以小的实验室规模的生产规模有效地制备脂质体。但是，这些技术具有大的问题，因为，由于诸如除去用于溶解磷脂的有机溶剂以及用于形成脂质膜的反应器的大小等一些问题不可能以大的商业生产规模有效地大量生产脂质体。

[0006] 作为用于商业规模大量生产的脂质体制备方法之一，美国专利公开第2004/0175417号公开了用于制备脂质体的方法，其中在氧化的氯仿与甲醇的混合溶液中形成两性霉素B与磷脂的复合物，并且然后经喷雾干燥以提供脂质粉末。然而，这种技术有大的问题，因为在工艺中不能够应用诸如二甲基乙酰胺(DMA)、二甲基甲酰胺(DMF)、二甲基亚砜(DMSO)等高沸点溶剂，因为在喷雾干燥过程中使用加热的空气除去有机溶剂。通常周知上述诸如DMA、DMF以及DMSO等溶剂充分地溶解两性霉素B并且保持溶解的两性霉素B的稳定性。

发明内容

[0007] 技术问题

[0008] 因此，本发明人连续地展开了对开发一种用于大量生产脂质体制剂的新方法的研究。结果，鉴于事实：通过经超临界流体制备前体脂质体以及使前体脂质体水化得到的脂质体溶液具有高含量、高承载效率以及高生物活性组分稳定性，并且能够由简单的装置大量生产，他们已经完成了本发明。

[0009] 因此，本发明的目的是提供一种用于大量生产脂质体制剂的制备方法，其中，所述脂质体制剂具有高含量、高承载效率以及高生物活性组分稳定性、以及高制剂稳定性。

[0010] 本发明的另一目的是提供一种用于大量生产脂质体制剂的脂质体制备装置，其中，所述脂质体制剂具有高含量、高承载效率以及高生物活性组分稳定性、以及高制剂稳定性。

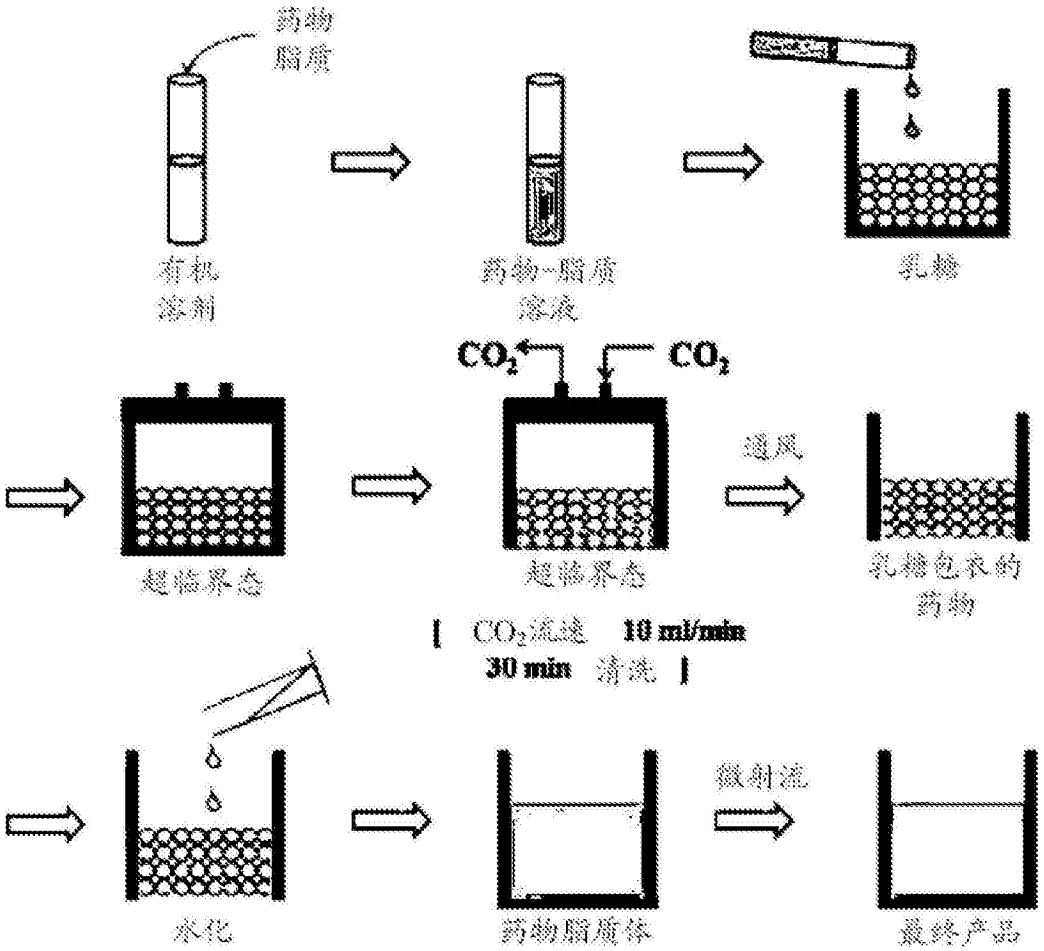
[0011] 技术方案

[0012] 根据本发明的一方面，提供一种用于制备脂质体制剂的方法，所述方法包括步骤：(a)将包括选自磷脂或甾醇中的至少一种脂质组分，以及生物活性物质(药物)溶解于有机溶剂中；(b)将包括所述脂质组分的有机溶剂溶液与糖类载体一起放入反应容器中，并且将超临界流体引入到所述反应容器中以便制备药物-脂质包衣的颗粒(将形成为脂质体，在下文中，称为“前体脂质体颗粒”)；(c)通过加压(compression)使所述超临界流体排出以便得到前体脂质体颗粒；并且用包括水的水性溶液使所述前体脂质体颗粒水化以便形成脂质体。

[0013] 另一方面，所述方法可进一步包括无菌过滤所述脂质体制剂；和/或冷冻干燥所述脂质体制剂的步骤。

[0014] <本发明的脂质体的制备顺序>

[0015]



[0016] 根据本发明的又一方面，提供一种用于实施脂质体制剂制备方法的装置，所述装置包括：在其中进行制备前体脂质体颗粒的步骤以及形成脂质体溶液的步骤的反应容器；超临界流体贮存容器，用于容纳超临界流体；连接所述超临界流体贮存容器和所述反应容器的超临界流体供应管，用于将所述超临界流体从所述超临界流体贮存容器输送到所述反应容器中；设置在所述超临界流体供应管中的超临界流体供应量调节泵，用于控制输送的所述超临界流体的量；连接到所述反应容器内部的反应材料引入部分，用于将反应材料提供给所述反应容器；连接到所述反应容器内部的压力计，用于测量所述反应容器中的压力；连接到所述反应容器的超临界流体排出管，用于将所述超临界流体排出；设置在所述超临界流体排出管中的降压阀，用于将所述超临界流体排出；以及设置在所述超临界流体排出管中的背压阀，用于将所述超临界流体排出，同时保持预先设定的压力或保持更高的压力。

[0017] 在下文中，将更详细地描述本发明。根据本发明，在用于制备脂质体制剂的方法中，将脂质组分溶解于有机溶剂中，并且将混合溶液与载体一起放入反应容器中。然后，将超临界流体引入到反应容器中以便形成前体脂质体颗粒。通过加压将超临界流体排出以得到前体脂质体颗粒，并且然后用包括水的水性溶液使前体脂质体颗粒水化以便形成脂质体溶液。

[0018] 在构成脂质体的脂质组分中，磷脂可以选自包括下列物质的组中，但不限于此：磷脂酰甘油、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、蛋黄卵磷脂、大豆卵磷脂、N-[1-(2,3-二油酰氧)丙基]-N,N,N-三甲基甲硫酸铵(DOTAP)、N-[1-(2,3-二油酰氧)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)、双十八烷基二甲基溴化铵(DODAB)、2,3-二油酰氧-N-[2(精胺羧基酰胺)乙基]-N,N-二甲基-1-丙基-三氟乙酸铵(DOSPA)、二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)、1,2-双十四烷氧基丙基-3-二甲基-羟乙基溴化铵(DMRIE)、双十二烷基二甲基溴化铵(DDAB)、3β-[N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)-氨甲酰基]胆固醇(DC-Chol)、双十八烷酰氨基甘氨酰精胺(DOGS)、N,N-[二(2-羟乙基)]-N-甲基-N-[2,3-二(十四酰氧基)丙基]碘化铵、N,N,N',N'-四甲基-N,N'-二(2-羟乙基)-2,3-二(油酰氧)-1,4-碘化丁二铵、二乙氨基乙基纤维素(DEAE-C)、N,N,N,N-四甲基-N,N,N,N-四棕榈基精胺、二油酰磷脂酰乙醇胺、N-叔丁基-N'-十四烷基-3-十四烷基氨基丙脒以及二乙氨基乙基葡聚糖(DEAE-D)。并且，上述磷脂可以组合使用。此外，这种磷脂包括各种来源的可商购的试剂，并且包括但不限于，例如Lipofect ACE(Life Technologies)、Lipofection(Life Technologies)、LipofectAmine(Life Technologies)、CeliFectin(Life Technologies)、DMRIE-C(Life Technologies)、DDAB(Sigma)、DC-Chol(Sigma)、DOTAP(Boehringer Mannheim,Avanti Polar Lipids,Biontex)、MRX-230(Avanti Polar Lipids)、MRX-220(Avanti Polar Lipids)、Transfectam(Promega)、Transfast(Promega)、Tfx 10(Promega)、Tfx 20(Promega)、Tfx 50(Promega)、Prefection-$CaPO_4$(Promega)、Prefection-DEAE-Dextran(Promega)、GeneSHUTTLE-40(Quantum Biotechnologies)、CLONfectin(Clontech)、METAFECTENE(Biontex)、INSECTOGENE(Biontex)、Effectene(Qiagen)、FuGENE6(Roche Molecular Biochemicals)、GENESEAL(MTTI)。磷脂酰甘油可以包括二硬脂酰磷脂酰甘油、二棕榈酰磷脂酰甘油以及其他可能的磷脂酰甘油衍生物。

[0019] 在构成脂质体的脂质组分中，甾醇可以选自包括胆固醇、胆固醇六琥珀酸酯、麦角甾醇、羊毛甾醇及其组合的组，但不限于此。优选地，可以使用胆固醇。

[0020] 用于制备包括脂质组分的有机溶剂的溶剂分为生物活性组分可溶的溶剂和脂质组分可溶的溶剂。生物活性组分可溶的溶剂可以选自包括二甲基乙酰胺、二甲基甲酰胺、二甲基亚砜、甲醇、乙醇及其组合的组，但不限于此。优选地，可以使用二甲基乙酰胺。脂质组分可溶的溶剂可以选自包括氯仿、甲醇、乙醇、乙醚及其组合的组，但不限于此。优选地，可以使用甲醇和氯仿的混合物。另外，优选地，当生物活性组分溶液与脂质组分溶液混合时，不产生沉淀。溶剂是之后通过超临界流体除去的组分，优选最少量使用以便减少有机溶剂除去步骤的工艺时间。

[0021] 生物活性组分为生理活性物质，可以是选自包括下列物质的组中的一种或多种：自主神经调节剂、皮质类固醇、利尿剂、止痛剂、性激素、麻醉药、驱肠虫药(anthelminitic)、抗组胺药、抗原虫剂、补血药、心脏血管疾病药、抗焦虑药、平喘药、抗惊厥药、抗抑郁药、抗糖尿病药、抗利尿剂、解毒剂、抗癫痫药、抗真菌剂、抗高血脂药、抗高脂蛋白血药、抗高血压药、抗低血压药、抗生素、止痛剂、抗偏头痛药、抗霉菌剂、止吐剂、抗癌药、抗抑郁药、抗帕金森药、抗牛皮癣药、神经精神药物、抗血小板药、止咳化痰剂、抗溃疡药、支气管扩张剂、强心剂、利尿剂、催吐药、抗溃疡药、激素、免疫调节剂、肌肉驰缓药、安定药、血管扩张剂、抗病毒药、杀虫剂、蛋白质药物、基因药物以及抗体。

[0022] 在制备生物活性组分溶液的步骤中，根据本领域已知的传统方法，考虑到生物活性组分的化学物理性能可以加入少量酸性或碱性组分以便增加溶解性。在酸性条件下，如果增加溶解性，可以加入少量的诸如抗坏血酸、盐酸或乙酸等酸。然后，加入酸后，为了中和可以加入诸如氢氧化钠等碱。以同样的方式，在碱性条件下，如果增加溶解性，可以加入诸如碱金属等碱性材料并使之溶解。然后为了中和可以加入酸。

[0023] 作为糖类载体，可以使用乳糖、蔗糖、麦芽糖、海藻糖、葡萄糖、山梨醇、甘露醇、木糖醇或其组合，但本发明不限于此。优选地，可使用乳糖。这种糖类可以不仅起到载体的作用，而且在通过水化制备脂质体后，这种糖类在为了便于贮存的脂质体冷冻干燥过程中还起到稳定脂质体物理结构的作用。

[0024] 作为超临界流体，可以使用超临界二氧化碳、超临界一氧化氮、超临界乙炔、超临界三氟甲烷、超临界丙烷、超临界乙烯、超临界氟氯化碳或超临界氙，但本发明不限于此。

[0025] 在制备前体脂质体颗粒的步骤中，需要预先设定的时间直至超临界流体与有机溶剂混合并且达到平衡态。根据样品的量，需要的时间可以在约1～30分钟范围内。本步骤中的反应可以在高于保持超临界流体态的温度和压力的温度和压力下进行。当使用超临界二氧化碳为超临界流体时，压力在120～300巴范围内，并且优选150巴，温度在35～70℃范围内，并且优选45℃。另外，为了在反应期间使混合更容易，可以使用搅拌器件并且连续地进行搅拌。搅拌器的旋转速度优选在200～500rpm范围内。基于超临界流体与有机溶剂的混合物达到均相态的时间点能判定反应是否达到平衡状态。

[0026] 为了除去达到平衡后残留的有机溶剂，进行供应额外的超临界流体的步骤。超临界流体的供应速度合适地在5～20ml/min范围内。在该步骤中，预先设定的压力和预先设定的温度以能够保持反应容器内处于超临界态的方式保持。该步骤需要的时间根据有机溶剂的量可以在约10分钟～1小时范围内。另外，超临界流体具有以下优点，它不仅能够容易地除去挥发性有机溶剂而且能够容易地除去用传统方法难以除去的非挥发性溶剂(例如：二甲基乙酰胺、二甲基甲酰胺、二甲基亚砜)。

[0027] 完全除去有机溶剂后，进行通过减压排出超临界流体的步骤以得到前体脂质体颗粒。减压速度合适地在10～200巴/分钟范围内。应该注意到在减压过程中前体脂质体颗粒没有损失。另外，在保持高压并且进行减压的同时进行无菌处理方面具有优点。

[0028] 为了使得到的前体脂质体颗粒形成脂质体溶液，可以可选地执行在相转化温度或高于相转化温度下通过包括水使颗粒水化成水性溶液的过程。水性溶液的体积合适地在5～20ml范围内，并且水性溶液的温度合适地在45～95℃范围内，优选在65～80℃范围内。在该过程中，作为薄膜形成在载体表面上的药物-脂质膜，在相转化温度或高于相转化温度的水性溶液中，以与液体薄膜法的原理相同的原理形成脂质体。通常，药物-脂质膜比液体薄膜法具有更宽的表面积，由此在水化后形成更小和更一致的脂质体颗粒。

[0029] 制备的脂质体可以可选地经过微射流机以便减小粒径。该过程需要的时间合适地在1～10分钟范围内，温度合适地在45～95℃范围内，优选在65～85℃范围内。

[0030] 为方便贮存可以可选地将制备的脂质体制剂冷冻干燥。在前体脂质体的制备中用作载体的糖类通过在水化过程中溶解于包括水的水性溶液中可以在冷冻干燥过程中稳定脂质体的物理结构。作为糖类载体，可以使用麦芽糖、乳糖、蔗糖、海藻糖、葡萄糖、山梨醇、甘露醇、木糖醇或其组合，但本发明不限于此。优选地，可以使用乳糖。通过将脂质体溶液冷冻干燥形成的饼状物、片(plaque)或粉末在使用时可以通过无菌水经复原后服用。

[0031] 根据本发明制备的脂质体制剂可以用于亲本注射以及经皮药物递送、鼻腔药物递送以及吸入药物递送。这种制剂需要的技术以及药学上可接受的载体以及添加剂为医药领域内技术人员广泛周知，并且可以参照Remington's Pharmaceutical Sciences(第19版，1995)。

[0032] 根据本发明另一方面，根据本发明的用于制备脂质体的装置包括：在其中进行制备前体脂质体颗粒的步骤以及形成脂质体溶液的步骤的反应容器；超临界流体贮存容器，用于容纳超临界流体；连接超临界流体贮存容器和反应容器的超临界流体供应管，用于将超临界流体从超临界流体贮存容器输送到反应容器中；设置在超临界流体供应管中的超临界流体供应量调节泵，用于控制输送的超临界流体的量；连接到反应容器内部的反应材料引入部分，用于将反应材料提供给反应容器；连接到反应容器内部的压力计，用于测量反应容器中的压力；连接到反应容器的超临界流体排出管，用于将超临界流体排出；设置在超临界流体排出管中的降压阀，用于将超临界流体排出；以及设置在超临界流体排出管中的背压阀，用于将超临界流体排出，同时保持预先设定的压力或保持更高的压力。

[0033] 在该装置中，优选地，将搅拌器件设置在反应容器内，并且该反应容器包括在反应容器自身内或外部的搅拌器从而在反应容器内的搅拌器件能够经旋转混合反应材料。

[0034] 根据本发明的一种实施方式的脂质体制备装置的模拟图示于图1中。通过使用根据本发明的一种实施方式的装置(示于图1中)的用于制备包含两性霉素B的脂质体的方法将在下面的实施例中描述。

[0035] 如图1中所示，用于实施本发明的脂质体制备方法的装置比传统的使用超临界流体的脂质体制备装置(US5776486)具有更简单的结构，由此能够更方便以及更经济地实施脂质体制备方法。

[0036] 本发明的有益效果

[0037] 如上所述，根据本发明的方法，能制备具有高含量、高承载效率以及高生物活性组

分稳定性、以及高脂质体制剂稳定性的脂质体。另外，由于高度简化的工艺，根据本发明的用于制备脂质体制剂的方法能够通过简单的装置进行，并且能够容易地以实验室规模进行。而且，同样的方法能够应用于大量生产，产生高经济效率。

附图说明

[0038] 本发明前述和其他的目的、特征以及优点从下列与附图结合的详细描述中将变得更加明显，其中：

[0039] 图1是说明根据本发明的一种实施方式的用于制备包含两性霉素B的脂质体的装置的模拟图。

[0040] <附图标记说明>

[0041] 1：反应容器

[0042] 2：流体贮存容器

[0043] 3：超临界流体供应管

[0044] 4：超临界流体供应量调节泵

[0045] 5：反应材料引入部分

[0046] 6：压力计

[0047] 7：超临界流体排出管

[0048] 8：降压阀

[0049] 9：磁棒

[0050] 10：磁力搅拌器

[0051] 11：背压调节器

具体实施方式

[0052] 下面，将参照下面的实施例对本发明进行更详细地描述。但是，这些实施例不以任何方式限制本发明的范围，而仅仅是帮助理解本发明。

[0053] 实施例1a～1f以及2a～2d：两性霉素B脂质体的制备

[0054] 在65℃下将84mg二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)溶解于1ml氯仿与甲醇1：1的混合溶剂中。通过超声10分钟将200mg抗坏血酸(Vit-C)完全溶解于2ml的N,N-二甲基乙酰胺(DMA)中。在65℃下将50mg两性霉素B溶解于DMA-Vit C溶液中，并且向产生的溶液中加入DSPC溶液。在65℃下将213mg氢化大豆磷脂酰胆碱和52mg胆固醇溶解于1ml氯仿与甲醇1：1的混合溶剂中。将氢化大豆磷脂酰胆碱和胆固醇的溶液与两性霉素B-DSPG溶液混合。

[0055] 将两性霉素B-脂质溶液和900mg乳糖容纳在反应容器1中，接着密封。反应容器的温度保持在45℃、55℃和65℃。通过操作泵4，将超临界二氧化碳经由超临界流体供应管3从气体贮存容器2注入到反应容器1中，然后使用压力计6将压力保持在150巴、200巴、250巴以及300巴。通过操作搅拌器10，使反应容器在500rpm转数下旋转40分钟，同时上述材料被混合至平衡态。将额外的超临界二氧化碳注入到反应容器中以便除去残留的有机溶剂。然后，打开降压阀8通过超临界流体排出管7排出超临界二氧化碳，同时反应容器逐渐减压至大气压。减压之后，从反应容器中得到包衣有药物和脂质的乳糖颗粒。在55℃、65℃、75℃以及85℃下，向该颗粒加入水性溶液(包括10ml水)，并且搅拌30分钟，以提供脂质体溶液。

[0056] 如上所述得到的脂质体的粒径通过电泳光散射分光光度计(ELS-8000)测量，并且测量了药物含量。该实施例的结果示于下面。

[0057] 实施例1涉及在超临界过程中脂质体溶液根据反应容器的温度和压力的特性。在实施例1a～1f中根据反应容器的温度和压力的粒径以及药物含量记录在表1中。实施例2涉及：当在对应于实施例1a的超临界过程中通过加入水性溶液(包括水)使在反应温度45℃和压力200巴下制备的前体脂质体颗粒水化时，脂质体溶液根据水化温度的特性。在实施例2a～2d中脂质体根据水化温度的粒径、药物含量以及形成/未形成记录在表2中。

[0058] 表1

[0059] [表1]

[0060] [表]

[0061] 在实施例1a～1f中，根据反应容器的温度和压力的粒径以及药物含量

[0062]

实施例 1	在超临界过程中的反应容器		粒径（nm）	药物含量（%）
	温度（℃）	压力（巴）		
a	45	200	949.3	90.5
b	55	200	801.6	86.3
c	65	200	839.1	77.1
d	45	150	761.0	91.1
e	45	250	855.7	84.2
f	45	300	821.3	79.7

[0063] 表2

[0064] [表2]

[0065] [表]

[0066] 在实施例2a～2d中，脂质体根据水化温度的粒径、药物含量以及形成/未形成

[0067]

实施例2	水化温度(℃)	粒径(nm)	药物含量(%)	其他
a	55	N/A	N/A	未形成脂质体
b	65	949.3	90.5	形成脂质体
c	75	866.2	88.1	形成脂质体
d	85	752.1	84.3	形成脂质体

[0068] 试验例1：包含两性霉素B的脂质体抗冷冻干燥的稳定性

[0069] 为了改进根据本发明的包含两性霉素B的脂质体贮存的容易性，进行了冷冻干燥，并且测试了稳定性。

[0070] 在实施例条件之中，使由在45℃和200巴下制备前体脂质体并且在65℃下进行水化而制备的脂质体经过微射流机，以便减小脂质体的粒径。然后将脂质体冷冻干燥，并且通过用蒸馏水使脂质体复原为分散溶液。在冷冻干燥前和冷冻干燥后，测试了每种脂质体的尺寸、ζ电位、药物含量以及承载效率。结果简要地记录在表3中。

[0071] 表3

[0072] [表3]

[0073] [表]

[0074] 在冷冻干燥前和冷冻干燥后，每种脂质体的尺寸、ζ电位、药物含量以及承载容量

[0075]

状态	粒径(nm)	ζ电位	药物含量(%)	承载容量(%)
冷冻干燥前	137.35	-42.49	91.6	89.2
冷冻干燥后	146.85	-43.64	90.2	83.5

[0076] 根据这些结果，通过超临界法制备的脂质体即使在冷冻干燥后也能够保持平均尺寸、ζ电势、药物含量以及承载效率，由此，通过利用冷冻干燥，脂质体制剂能够长时间地保存。

[0077] 工业应用性

[0078] 虽然为了示例的目的已经描述了本发明的几种示范性实施方式，但本领域内技术人员将领悟到不背离如公布在所附权利要求中的本发明的范围和精神的各种修改、添加以及取代是可能的。

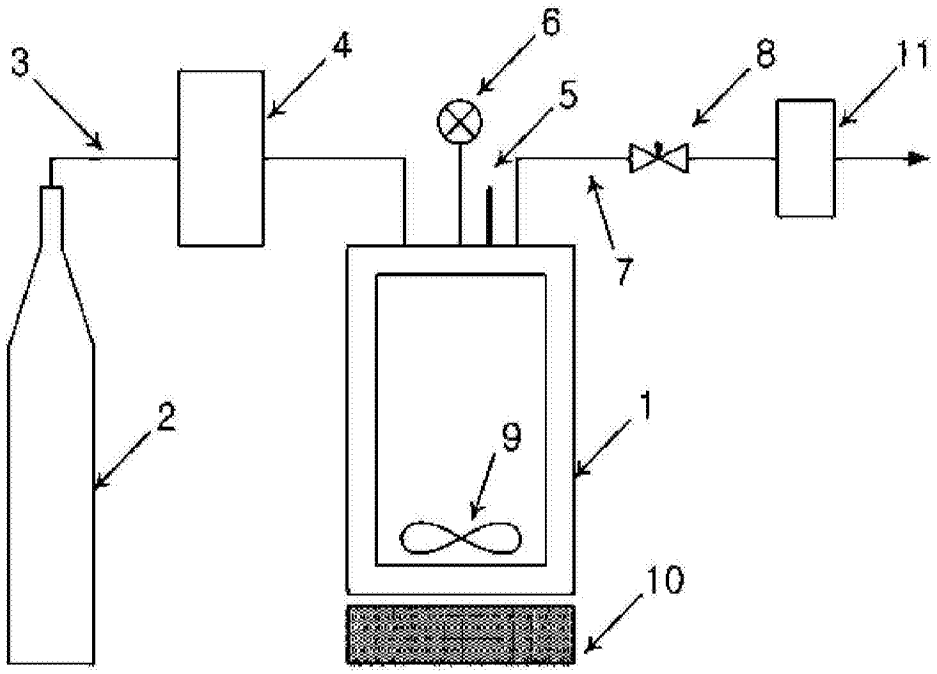


图1