



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102871966 A

(43) 申请公布日 2013. 01. 16

(21) 申请号 201210401434. 3

(22) 申请日 2012. 10. 19

(71) 申请人 东南大学

地址 210096 江苏省南京市四牌楼 2 号

(72) 发明人 黄宁平 张菲菲

(74) 专利代理机构 南京苏高专利商标事务所

(普通合伙) 32204

代理人 柏尚春

(51) Int. Cl.

A61K 9/14 (2006. 01)

A61K 31/436 (2006. 01)

A61K 47/34 (2006. 01)

A61P 37/06 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 3 页

### (54) 发明名称

用于改善雷帕霉素生物利用度的纳米载药颗粒及其制备方法

### (57) 摘要

本发明公开了一种用于改善雷帕霉素生物利用度的纳米载药颗粒及其制备方法,以进行药效优化的方法。纳米载药颗粒由以下步骤所得:根据乳化溶剂挥发法的原理,将确定量的 PEG-PLGA 和雷帕霉素分别溶解于丙酮中,混合均匀后缓慢加入水中进行磁力搅拌,一定时间后将所得液体超声匀浆,于真空干燥器中除去有机相,得到的水相在离心管中除去游离药物,之后使用超滤管浓缩,冷冻干燥得到纳米颗粒。本发明的方法具有操作方便、简单易行、可重复性好等优点。制备的纳米载药颗粒能够通过提高药物吸收率、延长体内循环时间从而提高药物利用率。同时,该方法制备的纳米颗粒生物相容性好,表面活性基团可以进一步修饰配基或靶向基团。

1. 一种用于改善雷帕霉素生物利用度的纳米载药颗粒,其特征为:使用聚乙二醇-聚乳酸羟基乙醇酸共聚物 PEG-PLGA 作为载体,其中 PEG 末端为甲氧基、氨基或羧基活性基团,通过乳化溶剂挥发法形成具有核壳结构的内部包裹雷帕霉素,外部亲水的粒径为 100~120nm 的纳米载药颗粒。

2. 一种如权利要求 1 所述的用于改善雷帕霉素生物利用度的纳米载药颗粒的制备方法,其特征在于该方法包括以下步骤:

1) 称取所述共聚物 PEG-PLGA 以及雷帕霉素,分别充分溶解于丙酮中;

2) 磁力搅拌将所述共聚物 PEG-PLGA 的丙酮溶液与雷帕霉素的丙酮溶液混合均匀后,得到有机混合液,将该有机混合液滴入磁力搅拌下的水中,保持持续搅拌 30~60min,得到有机相和水相的混合液体;

3) 将步骤 2) 所得混合液体用超声乳化仪超声处理 1~2min;

4) 真空干燥 3~6h 除去丙酮;

5) 将步骤 4) 除去丙酮后剩余液体转移至离心管中离心除去游离药物;

6) 转移上清液至超滤管中超滤浓缩纳米颗粒,超纯水洗涤除去残留丙酮;

7) 所得浓缩液使用冷冻干燥机冻干。

3. 根据权利要求 2 所述的用于改善雷帕霉素生物利用度的纳米载药颗粒的制备方法,其特征在于:步骤 1) 中共聚物 PEG-PLGA 与雷帕霉素投料浓度比例为 9-11:1,使用丙酮作为溶剂,溶解 PEG-PLGA 与雷帕霉素所用丙酮的体积比是 2:1。

4. 根据权利要求 2 所述的用于改善雷帕霉素生物利用度的纳米载药颗粒的制备方法,其特征在于,步骤 2) 中水的体积与有机混合液体积的比为 2:1,有机相滴入水相的速度为 0.5mL/min。

## 用于改善雷帕霉素生物利用度的纳米载药颗粒及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物材料与纳米技术领域,具体涉及一种具有适宜包封率和载药量,高生物安全性,并且能够缓慢释放药物雷帕霉素的纳米级药物载体及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 雷帕霉素 (Rapamycin) 是具有低肾毒性的强有力免疫抑制药物,广泛应用于移植手术中。同时它又能有效抑制血管损伤后血管平滑肌细胞的增殖和迁移能力,从而减少血管再狭窄的发生,并且它还能够促进心肌缺损处心肌细胞增殖,因而在心血管疾病治疗方面有很大应用前景。但由于其自身的低溶解性及现阶段的给药方式,极大地限制了其药效的发挥和应用范围。

[0003] 纳米载药系统作为一种优化药效的有效手段已经成为药剂学以及现代生物医学领域的研究热点。研究较多的纳米载药系统包括纳米脂质体、纳米球、纳米囊、固体脂质纳米粒以及聚合物胶囊等。目前,纳米载药系统的研究热点主要集中于针对癌症的诊断和靶向治疗制剂的开发,已经有部分制剂通过实验阶段进入临床试验或进入市场。心血管疾病与癌症一样,严重威胁着人类健康,但是由于部分疾病病理机制解释不完善、缺乏有效靶向作用基团等原因,针对心血管疾病诊断治疗药物的载药系统研究远远落后于癌症,而许多药物因为水溶性差、吸收率低、生物利用度低、口服给药困难等因素尚未得到很好的应用,目前,国内外对雷帕霉素纳米载体的研究仍然处于初始阶段,国内并没有有效的雷帕霉素缓释口服制剂上市,鉴于该药在多疾病领域的良好治疗效果,针对该药开发一种合适的纳米载体符合市场需求以及临床需要。

[0004] 本专利使用乳化溶剂挥发法制备 PEG-PLGA 纳米微球搭载雷帕霉素,类似的研究未见报道。PLGA 及 PEG 均为 FDA 批准的具备生物安全性的高分子聚合物,二者合成的嵌段聚合物体内降解产物对机体无毒副作用。用乳化溶剂挥发法制备的纳米载药颗粒,内层为由疏水性 PLGA 嵌段与药物通过物理作用形成的核心,外层为亲水的 PEG 水化层,该水化层不仅可以解决难溶性药物雷帕霉素的水溶性问题,还可以帮助纳米颗粒躲避网状内皮系统的吞噬,降低血清蛋白的粘附作用,从而延长药物在循环系统中的停留时间,有利于口服缓释制剂的开发,避免了静脉注射药物制剂对表面活性剂以及溶剂残留的高要求、潜在的生物安全性风险以及给药方式上的不便。由于 PEG 末端可以是活性基团,通过简单的化学反应可以在纳米颗粒表面进一步修饰配基或其它靶向基团,达到靶向病变组织、器官的目的,从而提高病灶部位的药物浓度,减小药物对其它组织器官的毒副作用。另外,PLGA 作为一种生物可降解聚合物,能够在循环过程中缓慢降解为无生物毒性的小分子物质,同时在降解过程中释放出包裹的药物,实现药物的缓慢释放,通过改变 PLGA 中乳酸和羟基乙酸的比例还可以控制药物的释放速率,以求满足不同药物的给药需求,提高药物的吸收率和生物利用度,达到药效的最大化。

## 发明内容

[0005] 技术问题：本发明的目的是通过纳米合成技术，构建针对药物雷帕霉素的纳米载药系统，优化现有药物给药方式，解决雷帕霉素水溶性、吸收性、靶向性、生物利用度存在的问题。本发明的另一目的是提供一种制备上述雷帕霉素纳米载药系统的方法，使其具有重复性好，操作方便，简单易行，成本低廉等优点。

[0006] 技术方案：为了实现上述发明目的，本发明的用于改善雷帕霉素生物利用度的纳米载药颗粒为：

[0007] 使用聚乙二醇-聚乳酸羟基乙醇酸共聚物 PEG-PLGA 作为载体，其中 PEG 末端为甲氧基、氨基或羧基活性基团，通过乳化溶剂挥发法形成具有核壳结构的内部包裹雷帕霉素，外部亲水的粒径为 100 ~ 120nm 的纳米载药颗粒。

[0008] 本发明的用于改善雷帕霉素生物利用度的纳米载药颗粒的制备方法，包括以下步骤：

[0009] 1) 称取所述共聚物 PEG-PLGA 以及雷帕霉素，分别充分溶解于丙酮中；

[0010] 2) 磁力搅拌将所述共聚物 PEG-PLGA 的丙酮溶液与雷帕霉素的丙酮溶液混合均匀后，得到有机混合液，将该有机混合液滴入磁力搅拌下的水中，保持持续搅拌 30 ~ 60min，得到有机相和水相的混合液体；

[0011] 3) 将步骤 2) 所得混合液体用超声乳化仪超声处理 1 ~ 2min；

[0012] 4) 真空干燥 3 ~ 6h 除去丙酮；

[0013] 5) 将步骤 4) 除去丙酮后剩余液体转移至离心管中离心除去游离药物；

[0014] 6) 转移上清液至超滤管中超滤浓缩纳米颗粒，超纯水洗涤除去残留丙酮；

[0015] 7) 所得浓缩液使用冷冻干燥机冻干。

[0016] 其中：

[0017] 步骤 1) 中共聚物 PEG-PLGA 与雷帕霉素投料浓度比例为 9-11 : 1，使用丙酮作为溶剂，溶解 PEG-PLGA 与雷帕霉素所用丙酮的体积比是 2 : 1。

[0018] 步骤 2) 中水的体积与有机混合液体积的比为 2 : 1，有机相滴入水相的速度为 0.5mL/min。

[0019] 有益效果：本发明的优点在于：采用简单易行的乳化溶剂挥发法制备纳米载药颗粒，该方法成本低廉，不需要超洁净实验环境，可重复性好，并可以大批量制备，具有操作方便、简单易行、成本低廉以及可重复性好等优势，这些优势可被广泛应用于多种疏水性药物的纳米载药颗粒制备。制备的纳米载药颗粒水溶性好，具有良好的生物相容性和生物安全性，能有效延长药物释放时间，并且 PEG 末端可以是活性基团，有利于未来实现靶向给药以及制备诊疗一体制剂。

## 具体实施方式

[0020] 下面结合具体实施例对本发明做进一步的说明。

[0021] 雷帕霉素载药纳米颗粒 (RAPA-NPs) 的制备：精密称取 100mg PEG-PLGA 以及 5mg 雷帕霉素，分别充分溶解于 4mL 和 2mL 丙酮中。磁力搅拌将有机相混合均匀后，以 0.5mL/min 的速度，将有机相混合液滴入磁力搅拌下的 12mL 水相中，保持中速持续搅拌 30min。将所得液体用超声乳化仪超声 1min (仪器设置参数：Φ3 变速杆，功率 20%，20℃，3s 开，

1s 关) 后真空干燥 3h 除去有机相。将液体转移至离心管中离心除去游离药物 (参数: 3000rpm, 25℃, 15min, ×2), 转移上清液至超滤管中超滤浓缩纳米颗粒 (参数: 4000rpm, 35℃, 15min, ×2), 超纯水洗涤除去残留有机溶剂。浓缩液保留于 4℃ 备用, 取部分添加 5% (w/v) 蔗糖作为冻干保护剂混合均匀, 于冷冻干燥机中冻干, 称量质量。

[0022] 纳米颗粒尺寸表征: 使用粒度分析仪和动态光散射仪测量颗粒尺寸和分散性, 所得结果吻合, 测得的平均粒径为  $112.25 \pm 5.56$  nm, 分散系数为 0.248。

[0023] 体外药物释放: 配置一定浓度的 RAPA-NPs 溶液 2mL, 溶剂为 PBS : 乙醇 = 9 : 1, 放入 37℃ 恒温箱中孵育, 分别于 4h, 7h, 20h, 30h, 42h, 52h, 70h 取出离心 (10000rpm, 25℃, 30min), 吸取上清 1.5mL 保存于 4℃ 待测浓度, 在纳米颗粒沉淀中添加 1.5mL 溶剂继续孵育。使用紫外分光光度计测定孵育不同时间获得的上清液中雷帕霉素在 277nm 处的吸光值, 通过线性拟合方程计算出浓度, 绘制药物流放曲线, 并且进行拟合, 确定药物释放模型及其方程。实验结果显示 20h 之内药物释放量到达 40%, 之后缓慢释放持续时间 > 90h, 表明能够起到良好的药物缓释作用, 并且药物释放时间 - 浓度关系符合 Higuchi 释放模型, 符合实验预期结果。

[0024] 细胞毒性测试: 使用 CCK-8 试剂盒以及雪旺细胞进行细胞毒性测试, 给药浓度分别为 0.002, 0.02, 0.2, 2, 20  $\mu$ g/mL, 连续培养观察细胞活性。测试结果显示, 雷帕霉素纳米载药颗粒能够在一定程度上抑制细胞增殖活性, 并且在一定的浓度范围内抑制效果随浓度增加而增强, 但并未观察到细胞数量的降低, 表明该纳米颗粒并没有细胞杀伤毒性, 具有良好的生物安全性。