

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810039089.7

[51] Int. Cl.

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 9/14 (2006.01)

A61K 31/662 (2006.01)

A61K 47/24 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 12 月 23 日

[11] 公开号 CN 101606907A

[22] 申请日 2008.6.17

[21] 申请号 200810039089.7

[71] 申请人 中国科学院上海药物研究所

地址 200031 上海市太原路 294 号

[72] 发明人 李亚平 陈伶俐 顾王文

[74] 专利代理机构 北京金信立方知识产权代理有限公司

代理人 朱梅 黄丽娟

权利要求书 3 页 说明书 18 页 附图 1 页

[54] 发明名称

福莫司汀固体脂质纳米粒及其制备方法

[57] 摘要

本发明提供一种可用于注射和口服的福莫司汀固体脂质纳米粒。它的特点是用脂质材料、乳化剂将福莫司汀包封制得粒径小、包封率高、稳定性好、毒性低的福莫司汀固体脂质纳米粒。本发明制备的福莫司汀固体脂质纳米粒提高了福莫司汀的溶解度和稳定性，并降低其血管刺激性，延长药物在血液中的循环时间，从而提高了药物的疗效，使本固体脂质纳米粒制成的制剂在临床应用上具有低毒性、低刺激性和高效性的特点。本发明还涉及福莫司汀固体脂质纳米粒的制备方法，该制备工艺简单、成本低廉，适合工业化生产。

1、一种福莫司汀固体脂质纳米粒，其特征在于，由包含以下重量份的原料制备而成：

福莫司汀： 1 份
脂质材料： 5-80 份
乳化剂： 0.1-50 份 。

2、根据权利要求1所述的福莫司汀固体脂质纳米粒，其特征在于，由包含以下重量份的原料制备而成：

福莫司汀： 1 份
脂质材料： 5-50 份
乳化剂： 0.4-30 份 。

3、根据权利要求1或2所述的福莫司汀固体脂质纳米粒，其特征在于，所述的脂质材料为甘油酯、脂肪酸、类固醇、蜡脂、十八醇或其混合物；其中甘油酯选自单硬脂酸甘油酯、双硬脂酸甘油酯、三硬脂酸甘油酯、三肉豆蔻酸甘油酯、单棕榈酸甘油酯、双棕榈酸甘油酯、三棕榈酸甘油酯、单山嵛酸甘油酯、双山嵛酸甘油酯、三山嵛酸甘油酯、三月桂酸甘油酯和三油酸甘油酯及其混合物；脂肪酸为硬脂酸、棕榈酸、山嵛酸、癸酸或其混合物；类固醇为胆固醇；蜡脂为鲸蜡醇棕榈酸酯、鲸蜡醇十六酸酯、微晶石蜡或其混合物。

4、根据权利要求1或2所述的福莫司汀固体脂质纳米粒，其特征在于，所述的乳化剂为磷脂、胆酸盐、脱氧胆酸盐、短链醇、泊洛沙姆、聚山梨醇酯、聚氧乙烯脂肪醇醚、聚氧乙烯脂肪酸酯或其混合物；其中，磷脂选自磷脂酰胆碱、磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰甘油、磷脂酸、二月桂酰磷脂酰胆碱、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰胆碱、二油酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂

酰甘油、二棕榈酰磷脂酰甘油、二棕榈酰磷脂酰丝氨酸、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺、二油酰磷脂酰乙醇胺、二肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺、大豆磷脂、卵磷脂、氢化卵磷脂及其混合物；胆酸盐选自胆酸钠、甘胆酸钠和牛磺胆酸钠及其混合物；脱氧胆酸盐选自脱氧胆酸钠和脱氧牛磺胆酸钠及其混合物；短链醇选自甘油和丙二醇及其混合物；泊洛沙姆选自Poloxamer-108和Poloxamer-188及其混合物；聚山梨醇酯选自吐温-80；聚氧乙烯脂肪醇醚选自Brij 78、Brij 35和Brij 30及其混合物；聚氧乙烯脂肪酸酯选自Myrj 53和Myrj 59及其混合物。

5、根据权利要求1或2所述的福莫司汀固体脂质纳米粒，其特征在于，其粒径小于1000nm。

6、根据权利要求5所述的福莫司汀固体脂质纳米粒，其特征在于，其粒径小于500nm。

7、权利要求1或2所述的福莫司汀固体脂质纳米粒的制备方法，其特征在于，采用以下不同方法中的任意一种：

1) 乳化-沉淀法：称取处方量的福莫司汀、脂质材料、脂溶性乳化剂溶于有机溶剂得有机相，称取水溶性乳化剂溶于水中得水相；有机相和水相分别加热至相同温度，搅拌下将有机相和水相混合，然后减压蒸发除去有机溶剂，再进行超声或高压均质处理，即可得到固体脂质纳米粒；或

2) 乳化挥发-低温固化法：将福莫司汀、脂质材料、脂溶性乳化剂按比例溶于有机溶剂得有机相；称取水溶性乳化剂溶于水中得水相；有机相和水相分别加热至相同温度，搅拌下将有机相和水相混合，减压蒸发除去有机溶剂，并使体系浓缩，将浓缩液迅速混于2-50倍体积的0-4℃低温水相中，搅拌降温，然后进行超声或高压均质处理得到福莫司汀固体脂质纳米粒；或

3) 薄膜-分散法: 称取处方量的福莫司汀、脂质材料、脂溶性乳化剂溶于有机溶剂中, 在 20-60℃下减压蒸干成膜, 加入含水溶性乳化剂的水溶液, 超声或高压均质处理即得福莫司汀固体脂质纳米粒;

所述有机溶剂为氯仿、乙醚、乙醇、甲醇、乙酸乙酯、二氯甲烷或丙酮或其混合溶剂; 所述有机相和水相的温度为 20-60℃; 高压均质时压力为 10000-25000psi, 高压均质的次数为 3 次-10 次; 超声功率为 100-1000W, 超声时间为 10-40min。

8、根据权利要求 7 所述的福莫司汀固体脂质纳米粒的制备方法, 其特征在于, 有机相和水相的温度为 20-40℃。

9、一种福莫司汀固体脂质纳米粒固体制剂, 其特征在于, 所述固体制剂是权利要求 1 或 2 中的福莫司汀固体脂质纳米粒加入支架剂并采用冷冻干燥或喷雾干燥的工艺制成的。

10、根据权利要求 9 所述的福莫司汀固体脂质纳米粒固体制剂, 其特征在于, 所述的支架剂选自氨基酸、麦芽糖、乳糖、甘露糖、葡萄糖、海藻糖、阿拉伯胶、木糖醇、山梨醇和果糖及其混合物; 并且其用量按脂质材料和乳化剂总重量计为 1 份总重量加入 0.05-4 份冻干支架剂。

11、一种福莫司汀注射剂或口服制剂, 其特征在于, 是由权利要求 1 或 2 中的福莫司汀固体脂质纳米粒制备而成的。

福莫司汀固体脂质纳米粒及其制备方法

技术领域

本发明属于药剂学领域，具体涉及含有抗肿瘤活性成分福莫司汀的固体脂质纳米粒及其制备方法。

背景技术

恶性胶质瘤为常见的脑部肿瘤，主要的治疗方法是手术和术后放疗。手术本身很难完全切除全部肿瘤，单纯手术治疗恶性脑胶质瘤的生存期约为4个月。放疗和化疗综合治疗方法可延长恶性脑胶质瘤病人的生存时间约9~12个月。化疗作为恶性胶质瘤手术和放疗的补充，特别是对于某些复发的或者已经接受放疗的病例，可能是最主要的治疗方法，已逐渐受到临床和研究工作者的重视。福莫司汀是由法国施维雅公司研制开发的亚硝基脲类抗肿瘤药，商品名为“武活龙”，属第三代亚硝基脲类药物，于1989年11月在法国上市，其抗肿瘤机制主要是通过体内和DNA酶作用抑制DNA和RNA合成，其特殊结构在于增加了丙酰胺磷酸脂，再加上低分子量、高脂溶性，使其更易透过血脑屏障，因而对脑瘤具有良好治疗效果。经动物实验和临床研究证实，本品具有广谱抗肿瘤活性，尤其是对恶性胶质瘤、黑色素瘤疗效显著，因而被列为脑肿瘤化疗首选的一种药物。据文献报道，该药虽然有良好的通过血脑屏障的作用，并能有效地抑制肿瘤生长，但其较明显的胃肠道反应和延迟性骨髓抑制限制了其进一步的持续应用。

由于福莫司汀不溶于水，因此在制备成制剂时存在一定困难。目前上市的福莫司汀均为法国施维雅药厂生产的冻干粉，由于该药水溶性差，需用有机溶剂来增加福莫司汀的溶解度，从而对冻干设备有特

殊要求,且该产品稳定性差,在2-8℃只能保存9个月。为解决上述问题,中国专利文献(专利号:ZL 200410024870.9)采用溶媒结晶法制备注射用无菌粉针,使药物的稳定性提高;另有专利文献(申请号:200710126506.7)报道了注射用福莫司汀冻干粉针的制备方法,以上制剂存在对仪器设备有特殊要求、工业化生产困难等问题,因此,需寻求一种有效的制剂,可以提高药物的稳定性、溶解度及抗肿瘤效果,减少毒副作用,增强福莫司汀的临床应用性。

固体脂质纳米粒(solid lipid nanoparticles, SLN)是在20世纪90年代初发展起来的一种可替代乳剂、脂质体和聚合物纳米粒的新型胶体给药系统,它是以天然的或人工合成的脂质材料为载体,将药物吸附或包裹于脂质材料中制成的纳米给药体系。它所含有的脂质成分机体可利用、可生物降解,与聚合物纳米粒相比,它的毒性更低。与脂质体相比,由于药物被包封在脂质骨架中,不存在药物在贮存过程中的泄漏问题。SLN还具有缓释、控释、靶向作用。SLN的水分散系统可以进行高压灭菌或辐射灭菌,具有长期的物理化学稳定性,也可通过冷冻干燥或喷雾干燥制成固体制剂,同时,可采用高压均质机进行制备,实现工业化生产。

发明内容

本发明的一个目的在于提供一种性质稳定且可采用现有技术工业化生产的福莫司汀固体脂质纳米粒,本发明将福莫司汀包裹于内脂核中,增加了福莫司汀的水溶性,具有长期物理化学稳定、可控制药物释放、靶向定位释放等优点,既能减少福莫司汀自身的毒性反应,又能提高福莫司汀的生物利用度及其治疗指数。

本发明的另一目的是提供上述福莫司汀固体脂质纳米粒的制备方法,而且制备方法灵活多样,均采用常规的工艺设备,可工业规模、

高效率生产，产品质量保持稳定，可直接或二次加工制备注射或口服制剂。

本发明的又一目的是提供一种福莫司汀固体脂质纳米粒固体制剂，该固体制剂是上述福莫司汀固体脂质纳米粒加入支架剂并采用冷冻干燥或喷雾干燥的工艺制成的。

本发明的再一目的是提供一种福莫司汀注射剂或口服制剂，其是由上述的福莫司汀固体脂质纳米粒制备而成的。

本发明的福莫司汀固体脂质纳米粒由包含以下重量份的原料制备而成：

福莫司汀：	1 份
脂质材料：	5-80 份
乳化剂：	0.1-50 份。

优选地，本发明的福莫司汀固体脂质纳米粒由包含以下重量份的原料制备而成：

福莫司汀：	1 份
脂质材料：	5-50 份
乳化剂：	0.4-30 份。

上述的脂质材料是指在 SLN 中作为载体材料、生物相容性好、且室温下呈固态或液态的类脂材料，选自甘油酯（单硬脂酸甘油酯、双硬脂酸甘油酯、三硬脂酸甘油酯、三肉豆蔻酸甘油酯、单棕榈酸甘油酯、双棕榈酸甘油酯、三棕榈酸甘油酯、单山嵛酸甘油酯、双山嵛酸甘油酯、三山嵛酸甘油酯、三月桂酸甘油酯、三油酸甘油酯及其混合物）、脂肪酸（硬脂酸、棕榈酸、山嵛酸、癸酸及其混合物）、类固醇（胆固醇）、蜡脂（鲸蜡醇棕榈酸酯、鲸蜡醇十六酸酯、微晶石蜡及其混合物）、十八醇及其混合物。

所述乳化剂是具有乳化、稳定、分散作用的药用辅料，可以为脂溶性乳化剂和水溶性乳化剂，选自磷脂、胆酸盐、脱氧胆酸盐、短链醇、泊洛沙姆、聚山梨醇酯、聚氧乙烯脂肪醇醚、聚氧乙烯脂肪酸酯及其混合物。其中磷脂选自磷脂酰胆碱、磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰甘油、磷脂酸、二月桂酰磷脂酰胆碱、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰胆碱、二油酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰甘油、二棕榈酰磷脂酰甘油、二棕榈酰磷脂酰丝氨酸、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺、二油酰磷脂酰乙醇胺、二肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺及大豆磷脂、卵磷脂和氢化卵磷脂及其混合物；胆酸盐选自胆酸钠、甘胆酸钠和牛磺胆酸钠及其混合物；脱氧胆酸盐选自脱氧胆酸钠和脱氧牛磺胆酸钠及其混合物；短链醇选自甘油和丙二醇及其混合物；泊洛沙姆优选Poloxamer-108和Poloxamer-188及其混合物；聚山梨醇酯优选吐温-80；聚氧乙烯脂肪醇醚优选Brij 78、Brij 35和Brij 30及其混合物；聚氧乙烯脂肪酸酯优选Myrj 53和Myrj 59及其混合物。

所述的福莫司汀固体脂质纳米粒的粒径小于1000nm，优选粒径小于500nm。

本发明提供福莫司汀固体脂质纳米粒的制备方法。

该制备方法可以使用以下几种方法中的任意一种：

方法一：乳化-沉淀法制备，称取处方量的福莫司汀、脂质材料、脂溶性乳化剂溶于有机溶剂得有机相，称取水溶性乳化剂溶于水中得水相；有机相和水相分别加热至相同温度，搅拌下将有机相和水相混合，减压蒸发除去有机溶剂，进行超声或高压均质处理，即可得到固体脂质纳米粒。或

方法二：乳化挥发-低温固化法制备，即将福莫司汀、脂质材料、脂溶性乳化剂按比例溶于有机溶剂得有机相；称取水溶性乳化剂溶于

水中得水相；有机相和水相分别加热至相同温度，搅拌下将有机相和水相混合，减压蒸发除去有机溶剂，并使体系浓缩，将浓缩液迅速混于 2-50 倍体积的 0-4℃低温水相中，搅拌降温，然后可进行超声或高压均质处理得到福莫司汀固体脂质纳米粒。或

方法三：薄膜-分散法制备，称取处方量的福莫司汀、脂质材料、脂溶性乳化剂溶于有机溶剂中，在 20-60℃水浴中减压蒸干成膜，加入一定量含水溶性乳化剂的水溶液，超声或高压均质即得到福莫司汀固体脂质纳米粒。

上述制备方法中所述的有机相和水相温度为 20-60℃，最佳温度为 20-40℃；所说的有机溶剂选自氯仿、乙醚、乙醇、甲醇、乙酸乙酯、二氯甲烷、丙酮中的一种及其混合溶剂；为减小固体脂质纳米粒的粒径，可采用超声或高压均质工艺。其中，超声功率为 100-1000W，超声时间为 10-40min；高压均质压力为 10000-25000psi，高压均质次数为 3 次-10 次。

为延长福莫司汀固体脂质纳米粒的存放时间，便于运输，可将本发明的福莫司汀固体脂质纳米粒通过喷雾干燥或冷冻干燥工艺制成固体制剂；为防止干燥工艺中固体脂质纳米粒的聚集需加入支架剂，可以选择的支架剂为氨基酸、麦芽糖、乳糖、甘露醇、葡萄糖、海藻糖、阿拉伯胶、木糖醇、山梨醇、果糖及其混合物，其用量按脂质材料和乳化剂总重量计为1份总重量加入0.05-4份冻干支架剂。

本发明的福莫司汀固体脂质纳米粒能够以注射或口服方式给药，其中注射方式可以为静脉输注、静脉注射，优选静脉输注方式给予患者。

本发明以脂质材料为载体材料将福莫司汀制成具有适宜粒径的固体脂质纳米粒，不仅增加药物的稳定性，提高药物在载体中的分散程

度和生物利用度，而且可以改变药物的体内过程，增加靶向性。选择口服给药，福莫司汀固体脂质纳米粒可以增强对肠道内皮细胞的亲和性并可通过细胞内吞、融合和派伊尔结转运等途径吸收，有效提高生物利用度；通过注射给药，福莫司汀固体脂质纳米粒可以提高血药浓度，延长药物在血液中的循环时间，且具有靶向性，能选择性到达病变部位、组织或细胞，从而提高药物的治疗指数，减少毒副作用。

采用本发明方法所制备的福莫司汀固体脂质纳米粒可以提高药物化学稳定性和疗效，因而具有一定创新性和实用性；其平均粒径在1000nm以下，包封率大于80%；所得制剂稳定性好；且该制剂制备工艺成熟，方法简便易行，材料来源广，成本低，便于工业化生产。

附图说明

图1为福莫司汀固体脂质纳米粒中药物释放图。

具体实施方式：

下面再以实施例对本发明作进一步说明，给出本发明的实施细节。在制备过程中，未说明温度的，均表示在室温下进行。

实施例1：

称取208mg福莫司汀、1200mg硬脂酸和1000mg卵磷脂溶于20ml的二氯甲烷中，在40℃下减压蒸干，形成脂质膜，加入4ml的吐温-80（2.5%），超声分散30min（超声功率600w），即得固体脂质纳米粒混悬液，于2℃保存备用。其平均粒径为210nm，全部粒子均在500nm以下，粒径分布狭窄，表明固体脂质纳米粒大小较为均一；该固体脂质纳米粒混悬液可在室温下稳定数天并在4℃下稳定12个月，贮存期间观察不到沉淀。

实施例2：

称取624mg福莫司汀、6240mg单硬脂酸甘油酯、3000mg大豆磷脂

加入50ml具塞锥形瓶中，加10ml乙醇:丙酮(1:1)混合溶剂，超声使其充分溶解并加热至60℃，构成有机相。另取500mg Poloxamer-188溶于30ml重蒸水中，构成水相。用注射器将有机相缓慢注入1000r/min搅拌的60℃水相中，继续搅拌至形成半透明体系。40℃下减压蒸发除去有机溶剂，并使体系浓缩至12ml，降至室温，得到固体脂质纳米粒混悬液。

实施例3:

取0.624g福莫司汀、12.48g三棕榈酸甘油酯、1.2g十八醇、6.24g二棕榈酰磷脂酰胆碱溶解于乙醇20 ml，超声溶解并加热至(50±2)℃构成有机相。另取1g myrj 53加入40ml双蒸水中，超声使其充分溶解，构成水相。将有机相缓慢注入1000 r/min搅拌的(50±2)℃的恒温水相中形成初乳，继续搅拌约2~3 h，使有机溶媒完全蒸发并使体系浓缩至约2ml。将所得的半透明乳剂快速混于另一0~2℃的1000r/min搅拌的10ml冰水相中，继续搅拌2小时，然后于高压均质机中乳匀5次(均质压力为15000psi)，即得固体脂质纳米粒混悬液。

实施例4

取0.624g福莫司汀、12.48g山嵛酸、1.0g胆固醇、3.12g二硬脂酰磷脂酰甘油置于50 ml梨形瓶中，加15ml氯仿溶解构成有机相；另取500mg胆酸钠溶于30ml水中，构成水相。将有机相注入水相中，在20000rpm下搅拌30min，形成O/W型初乳。所得初乳于高压均质机中乳匀5次(均质压力为15000psi)，然后减压蒸发除去有机溶剂，并使体系浓缩至12ml，降至室温，即得固体脂质纳米粒混悬液。

实施例5:

称416mg福莫司汀、4160mg三月桂酸甘油酯、4160mg二棕榈酰磷脂酰丝氨酸溶解于乙醚20ml，超声溶解后于30℃水浴中保温作为有机

相。将600mg脱氧胆酸钠、800mg甘油加注射用水40ml，搅拌溶解后于30℃水浴中保温作为水相。在搅拌下将有机相趁热滴加到同温度水相中，20000rpm下高速搅拌30min后改用超声分散，室温，功率600W，超声时间20min，然后减压蒸发除去有机溶剂，并使体系浓缩至8ml，即制得福莫司汀固体脂质纳米粒混悬液。

实施例6

称取208mg福莫司汀、4160mg三肉豆蔻酸甘油酯、1040mg二油酰磷脂酰胆碱溶解于甲醇10ml，作为有机相。将1000mg脱氧牛磺胆酸钠、1000mg丙二醇加注射用水40ml，搅拌溶解作为水相。在搅拌下将水相滴加到有机相中，继续搅拌1h后，转至高压均质机中，经20000psi压力乳匀10次，然后减压蒸发除去有机溶剂，并使体系浓缩至4ml，即可得到福莫司汀固体脂质纳米粒混悬液。

实施例7

精密称取福莫司汀416 mg、双山嵛酸甘油酯4160mg、氢化卵磷脂3000mg、600mg二月桂酰磷脂酰胆碱于1000ml圆底烧瓶中，加入50ml氯仿溶解，40℃下旋转蒸发除去氯仿，在烧瓶壁上形成一层薄膜。加入5%甘胆酸钠溶液10ml，600W功率下水浴超声20min，即得福莫司汀固体脂质纳米粒。

实施例8

称取福莫司汀416mg、三油酸甘油酯8320mg、鲸蜡醇十六酸酯1000mg、二硬脂酰磷脂酰胆碱3000mg，溶于乙酸乙酯20ml，作为有机相；然后在搅拌条件下加入含0.5%甘油和0.5%牛磺胆酸钠的水溶液40ml，制成粗乳；通氮气条件下在高压乳匀机上25000psi压力下乳匀5次，然后减压除去有机溶剂并使体系浓缩至8ml，迅速冷却形成固体脂质纳米粒混悬液。在4℃密封保存，供试验用。

实施例9

称取二油酰磷脂酰乙醇胺12.48g、棕榈酸12.48g和福莫司汀0.416g加入20ml乙醚超声使之溶解完全，然后在磁力搅拌下用6号针头注入40ml 0.5% brij78溶液中。20000rpm搅拌30min后，转移至高压乳匀机上20000psi压力下乳匀5次，然后减压除去有机溶剂并使体系浓缩至8ml，直至形成乳白色悬浊液，加入山梨醇4g、甘氨酸4g经超声处理（超声功率600w）20min，药液于喷雾干燥机中干燥，喷雾干燥条件为：进风温度120℃，进料速度50ml/min，旋风分离器压差50mm水，雾化盘转速2500 r/min，收集得到福莫司汀固体脂质纳米粒喷雾干燥制剂。

实施例10

精密称取Poloxamer-108 1.0g、甘油0.2g，在高速磁力搅拌条件下，加入到已加热至60℃的10ml蒸馏水中，待完全溶解作为水相；另称双硬脂酸甘油酯5g、二棕榈酰磷脂酰甘油4g、福莫司汀0.208g加入10ml氯仿超声溶解并加热至60℃作为有机相；将有机相缓慢滴加至水相中，高速剪切（Fluko, 16000rpm）5min，制成O/W型乳剂后，改用水浴式超声仪超声分散（室温，功率600w，超声时间20min），然后减压除去有机溶剂并使体系浓缩至4ml，即得乳光明显的固体脂质纳米粒混悬液。加入0.5g甘露醇和0.6g葡萄糖超声溶解，于-40℃预冻6h后，以-40℃，8h；-30℃，8h；-20℃，8h；-10℃，6h；20℃，8h的程序冷冻干燥，即得福莫司汀固体脂质纳米粒冻干制剂。

实施例11

精密称取单棕榈酸甘油酯4160mg、二肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺8320mg、福莫司汀416mg，加入乙酸乙酯10ml，超声使完全溶解。将所得的混合物溶液加入到含1.0% brij 35溶液30ml中，高速搅拌（20000rpm）5 min后，改用水浴式超声仪超声分散（室温，功率600w，

超声时间30min)，然后减压除去有机溶剂并使体系浓缩至8ml，即得乳光明显的固体脂质纳米粒混悬液。加入800mg乳糖、500mg葡萄糖、500mg海藻糖超声溶解后，于微型喷雾干燥器中喷雾干燥，（进口温度130-140℃，出口温度50-60℃，空气压力1.2Atm，加料速度60 ml/min），即得福莫司汀固体脂质纳米粒喷雾干燥制剂。

实施例12

取福莫司汀208mg、双棕榈酸甘油酯2080mg、癸酸1000mg和甲醇：丙酮（1:1）20 ml加入25 ml梨形瓶中，超声使其充分溶解，加入3000mg二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱，微热使溶成有机相。另取500mg mrij 59溶于水20ml中构成水相。将有机相在（1000 r/min）搅拌下注入（40±2）℃的水相中，继续搅拌4h，使有机溶媒完全蒸发并使体系浓缩至约4ml，即得福莫司汀固体脂质纳米粒混悬液。该混悬液加入400mg阿拉伯胶、500mg甘露醇超声溶解后，于-40℃预冻6小时，于冷冻干燥机中冻干，冻干程序为-40℃，8小时；-30℃，6小时；-20℃，6小时；-10℃，5小时；0℃，5小时；15℃，5小时。

实施例13

称取福莫司汀208mg、三山萼酸甘油酯4000mg、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺1000mg溶于10ml乙醇作有机相，然后在搅拌条件下加入含0.5%甘油和0.5%吐温-80的水溶液20ml，制成粗乳；通氮气条件下在高压乳匀机（Avestin，C5）上15000psi 压力下乳匀5次，然后减压除去有机溶剂并使体系浓缩至4ml，形成固体脂质纳米粒混悬液。该混悬液加入400mg木糖醇、400mg果糖于-40℃预冻10小时，于冷冻干燥机（labconco）中冻干（冻干程序为-40℃，10小时；-20℃，8小时；0℃，8小时；20℃，5小时），即得福莫司汀固体脂质纳米粒冻干制剂。

实施例14

取实施例3中所述的福莫司汀固体脂质纳米粒进行理化性质研究。

取福莫司汀固体脂质纳米粒混悬液适量，加水稀释，然后滴加在覆盖碳膜的铜网上，在透射电镜下观察纳米粒形态并拍摄照片。

另取福莫司汀固体脂质纳米粒样品，加水稀释到适量，用激光散射粒度测定仪在温度25℃，波长633.0nm条件下的粒径。

结果：电镜下观察固体脂质纳米粒呈类球形实体粒子，且粒径均匀，无聚集和粘连。

实验测得的福莫司汀固体脂质纳米粒的粒径分布较窄，平均粒径为240nm。

实施例15

实施例3中福莫司汀固体脂质纳米粒包封率测定

福莫司汀固体脂质纳米粒混悬液经超滤结合高速离心法（膜截留分子量10000D，4000rpm，10min）分离游离的福莫司汀，用RP-HPLC测定游离福莫司汀含量。色谱条件如下：色谱柱：Eclipse XDP-C₁₈柱（250mm×4.6 mm，5μm）；流动相：甲醇-水（85:15）；柱温：20℃；检测波长：230nm；流速：1.0ml/min；进样20μl，按下列公式计算包封率。

$$\text{包封率} = (1 - M_{\text{游离}} / M_{\text{总}}) \times 100\%。$$

结果：测得固体脂质纳米粒混悬液的包封率为83.24%。

实施例16

实施例4中福莫司汀固体脂质纳米粒包封率测定

包封率通过葡聚糖凝胶柱层析法结合HPLC测定。层析条件为：Sephadex-G50 柱（30cm×2cm），洗脱液为蒸馏水，流速1ml/min，室温下层析。移取固体脂质纳米粒混悬液0.5ml上柱，以柱层析条件洗脱，

每2ml收集1管，被包封药物量采用高效液相色谱测定。色谱条件如下：
色谱柱：Eclipse XDP-C₁₈柱（250 mm×4.6 mm，5μm）；流动相：甲醇-水（85:15）；柱温：20℃；检测波长：230nm；流速：1.0ml/min；进样20μl，按下列公式计算包封率。

$$\text{包封率} = (M_{\text{包}} / M_{\text{总}}) \times 100\%$$

式中， $M_{\text{包}}$ 表示被固体脂质纳米粒包封的药物量， $M_{\text{总}}$ 表示固体脂质纳米粒中的总含药量。

结果：测得固体脂质纳米粒混悬液的包封率为82.45%。

实施例17

实施例5中福莫司汀固体脂质纳米粒理化性质研究。

1、形态学研究

取少量固体脂质纳米粒混悬液滴加在覆盖碳膜的铜网上，用2.0%磷钨酸钠溶液染色，在透射电镜下观察粒径大小和形态并拍摄照片，可见其外观为圆整的球形。

2、粒径和Zeta电位测定

取固体脂质纳米粒混悬液适量加水稀释，用多功能Zeta电位粒度分析仪在632.8nm下测定粒径、粒度分布及Zeta电位。结果：测得样品的平均粒径为273nm；平均Zeta电位-26.7mV。

3、包封率考察

取固体脂质纳米粒混悬液1ml进行低温超速离心（4℃，20000rpm，30min），精密量取上清液0.5ml，甲醇稀释定容至10ml，用高效液相色谱法测定得福莫司汀的峰面积为 $A_{\text{游}}$ ，同法将固体脂质纳米粒混悬液稀释后测得福莫司汀的峰面积为 $A_{\text{总}}$ 。

$$\text{包封率}(\%) = (1 - A_{\text{游}} / A_{\text{总}}) \times 100\%$$

结果：测得福莫司汀固体脂质纳米粒的包封率为82.50%。

实施例18

取实施例6中的福莫司汀固体脂质纳米粒混悬液放置于室温和4℃冰箱内，观察1个月、3个月、5个月、6个月时其外观及4000r/min离心15min混悬液是否出现分层或沉淀。

结果表明，放置于4℃冰箱内的样品，6个月内无沉淀及药物结晶析出，且4000r/min离心15min未出现分层现象，表明该体系具有一定的稳定性。而室温下的部分样品5个月时出现少量沉淀，部分敞口于空气中的样品表面出现小片灰褐色霉斑。

实施例19

取实施例9中的福莫司汀固体脂质纳米粒喷雾干燥制剂加水10ml分散，转至透析袋（截留分子量10000）中，置于250ml pH7.4磷酸盐缓冲液中，（37±0.5）℃，100rpm磁力搅拌，定时吸取介质5ml，测定吸光度，并按标准曲线方程计算累积释放百分率。结果见图1。

结果表明，在释放条件下，前10小时释药速率较快，随后释放速度减慢，经过36小时药物释放82.6%，表明福莫司汀制成固体脂质纳米粒后具有缓释效果。

实施例20

取实施例10中的冻干品适量，密封，于冰箱4℃放置，于0、1、2、3、6、12月对粒径、包封率、含量等指标进行测定，评价福莫司汀固体脂质纳米粒冻干品的稳定性。结果见表1。

表1

编号	测定项目	0个月	1个月	2个月	3个月	6个月	12个月
1	外观色泽	符合规定	符合规定	符合规定	符合规定	符合规定	符合规定
	平均粒径（nm）	256±31	258±40	262±43	267±41	269±51	280±51

	多分散指数	0.099	0.106	0.108	0.098	0.117	0.111
	包封率 (%)	84.56	84.34	84.11	84.06	84.67	84.01
	含量 (%)	100.89	100.81	100.54	100.44	100.24	100.15
	外观色泽	符合规定	符合规定	符合规定	符合规定	符合规定	符合规定
	平均粒径 (nm)	252±23	254±39	256±32	261±38	267±54	270±50
2	多分散指数	0.092	0.111	0.108	0.117	0.119	0.125
	包封率 (%)	83.61	83.41	83.14	83.06	82.89	82.80
	含量 (%)	101.02	100.94	100.87	100.80	100.78	100.65
	外观色泽	符合规定	符合规定	符合规定	符合规定	符合规定	符合规定
	平均粒径 (nm)	260±32	266±42	269±33	278±42	279±58	288±58
3	多分散指数	0.089	0.111	0.123	0.120	0.132	0.129
	包封率 (%)	83.66	83.24	83.04	82.88	82.81	82.70
	含量 (%)	101.06	100.95	100.78	100.75	100.70	100.50

表1说明，福莫司汀固体脂质纳米粒冻干品在冰箱4℃放置12个月，其粒径、包封率、含量等质量指标基本不变，表明福莫司汀固体脂质纳米粒冻干制剂稳定性良好。

实施例21

取上述实施例中的福莫司汀固体脂质纳米粒制剂进行刺激性实验。

(1) 对家兔耳缘静脉血管刺激试验：

实验前用无菌生理盐水将福莫司汀固体脂质纳米粒和注射液配制成浓度为1mg/ml的溶液。选用体重2.5-3.0kg的健康新西兰白兔6只，雌雄兼有。注射部位用碘酊和乙醇消毒后，3只白兔于右耳耳缘静脉注射2ml福莫司汀注射液，左耳注射相同体积无菌生理盐水注射液作对照；

另3只白兔于右耳耳缘静脉注射2ml福莫司汀固体脂质纳米粒，左耳注射相同体积无菌生理盐水注射液作对照。每日一次，连续3天，末次给药24小时后，由耳缘静脉注入空气处死白兔，肉眼观察注射部位的反应情况，并解剖兔耳血管及周围组织作石蜡切片（注射部位下向心段1cm及5cm处），染色，光镜检查。肉眼观察注射部位反应情况。结果见表2。

表2

制 剂	序号	右耳	左耳
固体脂质纳米粒	1	正常	正常
	2	正常	正常
	3	正常	轻微充血
福莫司汀注射液	1	充血	轻微充血
	2	充血	正常
	3	充血	轻微充血

结果，如表2所示，福莫司汀固体脂质纳米粒血管刺激性明显弱于福莫司汀注射液。

（2）肌肉刺激性试验

福莫司汀注射液的剂量换算、药物配制、新西兰白兔的选择同上（共4只，每种剂型2只）。剪去白兔两侧股四头肌部位的兔毛，用碘酊和乙醇消毒后，分别在右侧股四头肌注射福莫司汀固体脂质纳米粒和福莫司汀注射液2ml，左侧股四头肌注射等量无菌生理盐水注射液作对照，注射48小时后，由耳缘静脉注入空气处死白兔，解剖股四头肌，纵向切开，观察注射部位肌肉组织的反应情况，确定反应级数。

0级：无变化

1级：轻度充血，其范围在0.5cm×1.0cm以下

2级：中度充血，其范围在0.5cm×1.0cm以上

3级：重度充血，伴有肌肉变性

4级：出现坏死，有褐色变性

5级：出现广泛性坏死

然后算出4块股四头肌反应级数总和，如果股四头肌反应级数的最高值与最低值之差大于2，则应另取2只白兔重新实验。得到结果后，若四块股四头肌反应级数总和小于10，则认为供试品的局部刺激性实验符合规定。

表3

剂 型	序号	右侧股四头肌	左侧股四头肌
固体脂质纳米粒	1	0	0
	2	0	0
福莫司汀注射液	1	2	0
	2	2	0

结果（见表3）表明，福莫司汀固体脂质纳米粒的肌肉刺激性明显弱于福莫司汀注射液

实施例22 过敏试验

给药方法 取适量福莫司汀注射液用生理盐水稀释成浓度为8mg/ml的样品A；取自制福莫司汀固体脂质纳米粒用生理盐水稀释成浓度为8mg/ml的样品B。取豚鼠12只，分成A、B两组，分别以供样品A 和B进行过敏性试验用。每组豚鼠6只，体重250～350 g。隔日肌肉注射供试品0.5ml，连续3次。然后将A、B组豚鼠再分别平均分成A1、A2及B1、B2组，其中A1、B1组于首次注射后的第14天由静脉注入2mg/ml的供试品2ml进行攻击，观察注射后动物有无用爪搔鼻、喷嚏、竖毛、抽搐、呼吸困难、大小便失禁、休克、死亡等反应，A2、B2组于首次

注射后的第21天同样由静脉注入2mg/ml的供试品2ml并进行观察。

结果：福莫司汀注射液和福莫司汀固体脂质纳米粒均无明显的过敏反应症状。

实施例23 溶血性实验

自新西兰白兔的颈总动脉取血20ml，置于烧瓶内，用玻璃棒轻轻搅动数分钟后，除去纤维蛋白，取出血液，加等量生理盐水注射液，离心（1500rpm，10min），除去上清液；沉淀的红细胞再加生理盐水注射液清洗。如此反复直到上清液透明，按红细胞的容量用生理盐水配成2%的混悬液。

取干净试管7支，分别编号，依次加入下表内各液，第6管不加供试品作空白对照管，第7管用蒸馏水代替生理盐水，摇匀，置于37℃水浴中，分别于0.5、1、2、3小时观察是否有溶血现象发生。结果见表4和表5。

表4

编号	水针注射液	生理盐水	2%细胞悬液	0.5h	1h	2h	3h
1	0.1	2.4	2.5	-	-	-	-
2	0.2	2.3	2.5	-	-	-	-
3	0.3	2.2	2.5	-	-	-	-
4	0.4	2.1	2.5	-	-	-	-
5	0.5	2.0	2.5	-	-	-	-
6	0	2.5	2.5	-	-	-	-
7	2.5（蒸馏水）	0	2.5	+	+	+	+

表5

编号	纳米粒悬液	生理盐水	2%细胞悬液	0.5h	1h	2h	3h
----	-------	------	--------	------	----	----	----

1	0.1	2.4	2.5	-	-	-	-
2	0.2	2.3	2.5	-	-	-	-
3	0.3	2.2	2.5	-	-	-	-
4	0.4	2.1	2.5	-	-	-	-
5	0.5	2.0	2.5	-	-	-	-
6	0	2.5	2.5	-	-	-	-
7	2.5 (蒸馏水)	0	2.5	+	+	+	+

结果表明，福莫司汀注射液和福莫司汀固体脂质纳米粒都未见溶血发生，两种剂型的溶血性实验均合格。

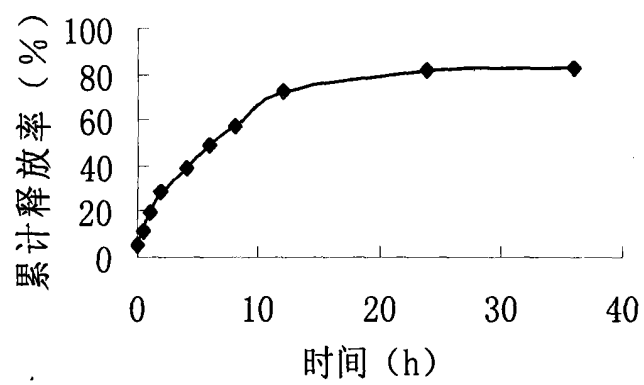


图 1