

[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 200710041027.5

[51] Int. Cl.

A61K 31/343 (2006.01)

A61K 9/19 (2006.01)

A61K 47/34 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 11 月 26 日

[11] 公开号 CN 101310717A

[22] 申请日 2007.5.22

[21] 申请号 200710041027.5

[71] 申请人 上海中医药大学附属普陀医院

地址 200062 上海市兰溪路 164 号

[72] 发明人 李琦 冯年平 范忠泽 孙珏

王炎 南艺蕾 李先茜 李绪林

殷佩浩 梅映昊 刘宁宁 刘昭林

[74] 专利代理机构 上海正旦专利代理有限公司

代理人 吴桂琴

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 5 页

[54] 发明名称

丹参酮 IIA 聚乳酸纳米粒及其制备方法

[57] 摘要

本发明属制药领域，涉及一种丹参酮 IIA 聚乳酸载药纳米粒制剂以及该制剂的制备方法。本发明的载药纳米粒的活性组分为丹参酮 IIA，所用载药纳米材料为聚乳酸，纳米粒粒径范围为 50nm ~ 300nm，纳米粒载药量为 1% ~ 30%，纳米粒包封率为 70% ~ 90%。所述的载药纳米粒制成冻干粉针剂。本发明能提高药物在载体材料中的分散程度，改善药物的溶出，提高生物利用度，而且可以改变药物的体内过程，增加肝靶向性，于丹参酮的注射给药具有重要意义。同时能较好地解决脂质体、微乳等制剂中药物易泄露的问题。

1、丹参酮IIA聚乳酸纳米粒，其特征在于所述的载药纳米粒的活性组分为丹参酮IIA，所用载药纳米材料为聚乳酸，所述纳米粒粒径范围为50nm~300nm。

2、按权利要求1所述的丹参酮IIA聚乳酸纳米粒，其特征在于所述的载药纳米粒载药量为1%~30%，所述的载药纳米粒包封率为70%~90%。

3、权利要求1所述的丹参酮IIA聚乳酸纳米粒的制备方法，其特征是：将聚乳酸和丹参酮IIA的二氯甲烷或丙酮溶液加入到含表面活性剂的水相溶液中，冰浴下探头超声，搅拌除掉有机溶剂后得到纳米粒混悬液，用微孔滤膜过滤后，加入支架剂，滤液进行冻干得到冻干粉针剂。

4、按权利要求3所述的制备方法，其特征是，所述的表面活性剂选自PVA或F68。

5、按权利要求3所述的制备方法，其特征是，所述的支架剂选自甘露醇、葡萄糖或乳糖。

6、按权利要求3所述的制备方法，其特征是，所述的搅拌为磁力搅拌。

7、按权利要求3所述的制备方法，其特征是，所述的微孔滤膜孔径为0.65 μm 。

丹参酮IIA聚乳酸纳米粒及其制备方法

技术领域

本发明属制药领域，涉及一种丹参酮IIA聚乳酸载药纳米粒制剂以及该制剂的制备方法。

背景技术

丹参酮IIA (Tashinones, TS) 是从中药丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) 中提取的脂溶性有效成分，为菲醌类化合物，临床多用于治疗心血管疾病，近年来研究表明，丹参酮IIA对多种肿瘤细胞具有细胞毒作用，能抑制肿瘤细胞侵袭和转移，应用于白血病、原发性肝癌、胃癌等恶性肿瘤的治疗，可使病情改善、肿块缩小、生存期延长。有文献报道，0.25~1.0 $\mu\text{g/ml}$ 丹参酮IIA对多种肿瘤细胞具有增殖抑制和细胞毒作用。对环磷酰胺、喜树碱等药物的抗肿瘤活性具有增效作用，对腹水癌细胞具有杀伤作用，并可抑制肉瘤S180细胞的DNA合成。

目前临床上用于治疗肝癌、肺癌的药物，绝大多数的毒副作用较强。其主要原因是因为这些药物在体内的分布没有选择性，除了对癌变的细胞有杀灭作用之外，对正常细胞的代谢也同样有影响，其结果是产生不必要副作用，使患者的治疗难以继续进行，导致癌症病人生存质量下降，死亡率增加。因此，进一步提高丹参酮IIA的生物利用度，尤其提高对特定部位靶向作用仍然是需要研究解决的问题。载药纳米粒一般是指粒径在1nm~1000nm之间的固态或胶态粒子。载药纳米粒由于尺寸效应，能够迅速使药物到达靶向部位，起到靶向作用，同时可以缓释药物，延长药物的作用时间。。

发明内容

本发明的目的是提供一种含丹参酮IIA的载药纳米粒。

本发明的另一目的是提供一种载药纳米粒的制备方法。

本发明所述的载药纳米粒的活性组分为丹参酮IIA，所用载药纳米材料为聚乳酸，所述纳米粒粒径范围为50nm~300nm。

本发明的含丹参酮IIA纳米粒，可以增加丹参酮的稳定性、提高其生物利用度。

所述的载药纳米粒制成丹参酮IIA聚乳酸纳米粒冻干粉针剂，其主要原料组成为：丹参酮IIA，乳化剂，丹参酮IIA纳米粒载体，冻干辅料。

上述丹参酮IIA聚乳酸纳米粒通过下述方法制备，包括以下步骤：

将聚乳酸和丹参酮IIA的二氯甲烷或丙酮溶液加入到含表面活性剂的水相溶液中，冰浴下探头超声，除掉有机溶剂后得到纳米粒混悬液，用微孔滤膜过滤后，加入支架剂，滤液进行冻干得到冻干粉针剂。

所述的表面活性剂选用PVA或F68；

所述的聚乳酸为丹参酮IIA纳米粒载体；

所述的丹参酮IIA纳米粒冻干辅料中的支架剂选用甘露醇、葡萄糖或乳糖；

所述的载药纳米粒包封率为70%~90%，载药量为1%~30%。

对制备得到的丹参酮IIA聚乳酸载药纳米粒的粒径、包封率和载药量等指标进行如下评价：

1. 丹参酮IIA聚乳酸载药纳米粒的透射电镜（TEM）照片

样品加适量蒸馏水稀释，滴加在覆盖碳膜的铜网上，用2.0%磷钨酸负染，于透射电镜下观察，拍摄透射电镜照片。

2. 测定丹参酮IIA聚乳酸载药纳米粒的粒径和Zeta电位

将纳米粒混悬液以蒸馏水稀释，用激光粒度分析仪（Nicomp 380/ZLS）测定纳米混悬液的粒径。

3. 测定丹参酮IIA聚乳酸载药纳米粒的包封率、载药量

采用超高速离心法（70000r/min）分离丹参酮IIA聚乳酸载药纳米粒和游离药物，HPLC法测定游离药物浓度，根据公式计算其包封率、载药量。

$$\text{包封率}\% = \frac{\text{纳米粒中药物重}}{\text{投药量}} \times 100\%$$

$$\text{载药量}\% = \frac{\text{纳米粒中药物重}}{\text{纳米粒重}} \times 100\%$$

与现有技术比较，本发明具有以下优点：

丹参酮在较强的酸、碱环境中易于分解，水中溶解度小，普通制剂如片剂、胶囊等吸收慢，生物利用度小。将丹参酮制成具有适宜粒径的聚乳酸载药纳米粒，不仅能提高药物在载体材料中的分散程度，改善药物的溶出，提高生物利用度，而且可以改变药物的体内过程，增加肝靶向性。本发明于丹

参酮的注射给药均具有重要意义。本发明固体脂质纳米粒对药物具有保护作用，能较好地解决脂质体、微乳等制剂中药物易泄露的问题。

附图说明

图 1 是丹参酮 II A 聚乳酸载药纳米粒的电镜扫描图。

图 2 是丹参酮 II A 聚乳酸载药纳米粒的粒径分布图。

图 3 是 X 射线衍射图，A 为丹参酮 II A 粉末，B 为载体聚乳酸粉末，C 为丹参酮 II A 聚乳酸载药纳米粒。

图 4 丹参酮 II A 聚乳酸纳米粒给药后各组小鼠肝癌瘤体体积的药效结果。

图 5 丹参酮 II A 聚乳酸纳米粒对小鼠肝癌细胞凋亡的影响：图 5-A 生理盐水组；图 5-B 丹参酮组；图 5-C 丹参酮 II A 聚乳酸纳米粒。

具体实施方式

下面结合附图和实施例对本发明作进一步描述。

实施例 1

称取 1.42mg 丹参酮 II A、36.9mgPLA、80mg 卵磷脂溶于 4.5ml 二氯甲烷和 0.5ml 丙酮的混合液中，构成有机相，加入到 30ml 浓度为 1.0% 的 F68 水相溶液，将有机相加入到水相中，冰浴下探头超声 5min，形成 O/W 乳剂，然后室温磁力搅拌挥发完有机溶剂，得到丹参酮 II A 聚乳酸载药纳米粒混悬液，用 0.65 μ m 微孔滤膜过滤除去聚集体及未包裹的药物，加入支架剂葡萄糖，冷冻干燥得到冻干纳米粒。

检测：丹参酮 II A 聚乳酸载药纳米粒的平均粒径为 210nm，包封率为 68%。

实施例 2

称取 2.58mg 丹参酮 II A、36.9mgPLA、80mg 卵磷脂溶于 4.5ml 二氯甲烷和 0.5ml 丙酮的混合液中，构成有机相，加入 30ml 浓度为 2.0% 的 PVA 水相溶液，将有机相加入到水相中，冰浴下探头超声 5min，形成 O/W 乳剂，然后室温磁力搅拌挥发完有机溶剂，得到丹参酮 II A 聚乳酸载药纳米粒混悬液，用 0.65 μ m 微孔滤膜过滤除去聚集体及未包裹的药物，加入支架剂乳糖，冷冻干燥得到冻干纳米粒。

检测：丹参酮 II A 聚乳酸载药纳米粒的平均粒径为 230nm，包封率为 78%。

实施例 3

称取 1.5mg 丹参酮 II A、100mgPLA、80mg 卵磷脂溶于 8ml 二氯甲烷和 1ml 丙酮的混合液中，构成有机相，加入 30ml 浓度为 1.5% 的 F68 水相溶液，将有机相加入到水相中，冰浴下探头超声 5min，形成 O/W 乳剂，然后室温磁力搅拌挥发完有机溶剂，得到丹参酮 II A 聚乳酸载药纳米粒混悬液，用 0.65 μm 微孔滤膜过滤除去聚集体及未包裹的药物，加入支架剂甘露醇，冷冻干燥得到冻干纳米粒。

检测：丹参酮 II A 聚乳酸载药纳米粒的平均粒径为 195nm，包封率为 82%。

实施例 4

称取 1.0mg 丹参酮 II A、75mgPLA、80mg 卵磷脂溶于 9ml 二氯甲烷和 1ml 丙酮的混合液中，构成有机相，加入 50ml 浓度为 2.5% 的 F68 水相溶液，将有机相加入到水相中，冰浴下探头超声 5min，形成 O/W 乳剂，然后室温磁力搅拌挥发完有机溶剂，得到丹参酮 II A 聚乳酸载药纳米粒混悬液，用 0.65 μm 微孔滤膜过滤除去聚集体及未包裹的药物，加入支架剂甘露醇，冷冻干燥得到冻干纳米粒。

检测：丹参酮 II A 聚乳酸载药纳米粒的平均粒径为 134nm，包封率为 81%。

实施例 5

称取 3.0mg 丹参酮 II A、60mgPLA、80mg 卵磷脂溶于 8ml 二氯甲烷和 1ml 丙酮的混合液中，构成有机相，加入浓度为 30ml 的 3.0% 的 PVA 水相溶液，将有机相加入到水相中，冰浴下探头超声 5min，形成 O/W 乳剂，然后室温磁力搅拌挥发完有机溶剂，得到丹参酮 II A 聚乳酸载药纳米粒混悬液，用 0.65 μm 微孔滤膜过滤除去聚集体及未包裹的药物，加入支架剂甘露醇，冷冻干燥得到冻干纳米粒。

检测：丹参酮 II A 聚乳酸载药纳米粒的平均粒径 190nm，包封率为 67.2%。

实施例 6

称取 2.0mg 丹参酮 II A、40mgPLA、80mg 卵磷脂溶于 13.5ml 二氯甲烷和 1.5ml 丙酮的混合液中，构成有机相，加入浓度为 60ml 的 2.0% 的 PVA 水相溶液，将有机相加入到水相中，冰浴下探头超声 5min，形成 O/W 乳剂，然后室温磁力搅拌挥发完有机溶剂，得到丹参酮 II A 聚乳酸载药纳米粒混悬液，用 0.65 μm 微孔滤膜过滤除去聚集体及未包裹的药物，加入支架剂甘露醇，冷冻干燥得到冻干纳米粒。

检测：丹参酮 II A 聚乳酸载药纳米粒平均粒径为 120nm，包封率为 88.4%。

实施例 7

常规方法建立小鼠原位肝癌模型 72 只，随机分为生理盐水组（NS）、空白纳米组（B-NP）、丹参酮 II A 组（TS II A）、丹参酮 II A 低剂量组（TS-NP L）、丹参酮 II A 中剂量组（TS-NP M）、丹参酮 II A 高剂量组（TS-NP H），分别尾静脉给药，连续给药 7 天，治疗后每组取 6 只观察生存时间，余下小鼠处死，比较各组肿瘤体积，肿瘤坏死程度。结果：丹参酮 II A 纳米高剂量组瘤体体积明显低于其他各组（ $P < 0.01$ ）且肿瘤坏死程度显著重于其他各组（ $P < 0.01$ ）。丹参酮 II A 纳米中、高剂量组生存期（ 18.67 ± 1.75 ， 19.5 ± 1.52 ）d 明显长于其他各组。证实丹参酮 II A 纳米微粒治疗肝癌的作用优于丹参酮 II A 单体，且随剂量增加效果越明显。

实施例 8

按实施例 7 方法分组给药，取肿瘤组织采用 TUNEL 标记法检测细胞凋亡指数，免疫组化 SP 法检测肝癌组织 TGF β 1，p38MAPK 的表达。结果显示：丹参酮 II A 纳米中、高剂量两组间凋亡指数无明显差异（ $P > 0.05$ ），但显著高于其他各组（ $P < 0.01$ ）。丹参酮 II A 纳米高剂量组 TGF β 1 阳性率明显低于其他各组（ $P < 0.01$ ），p38MAPK 阳性率明显高于其他各组（ $P < 0.01$ ）。表明：丹参酮 II A 纳米微粒治疗肝癌的机制与抑制 TGF β 1 的表达、上调 p38MAPK 表达，从而促进细胞凋亡有关。

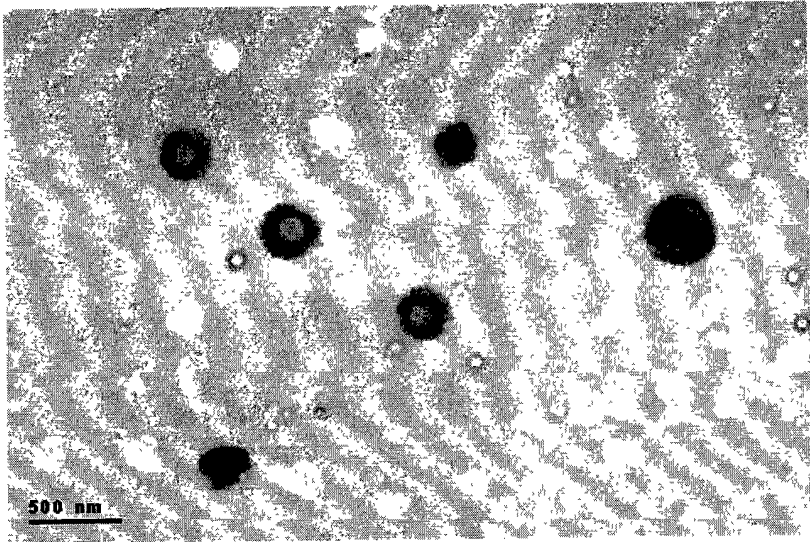


图 1

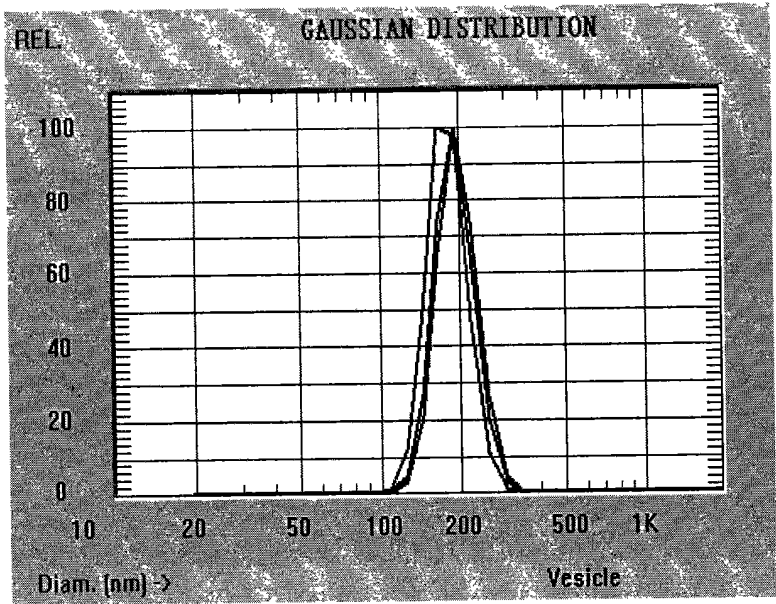


图 2

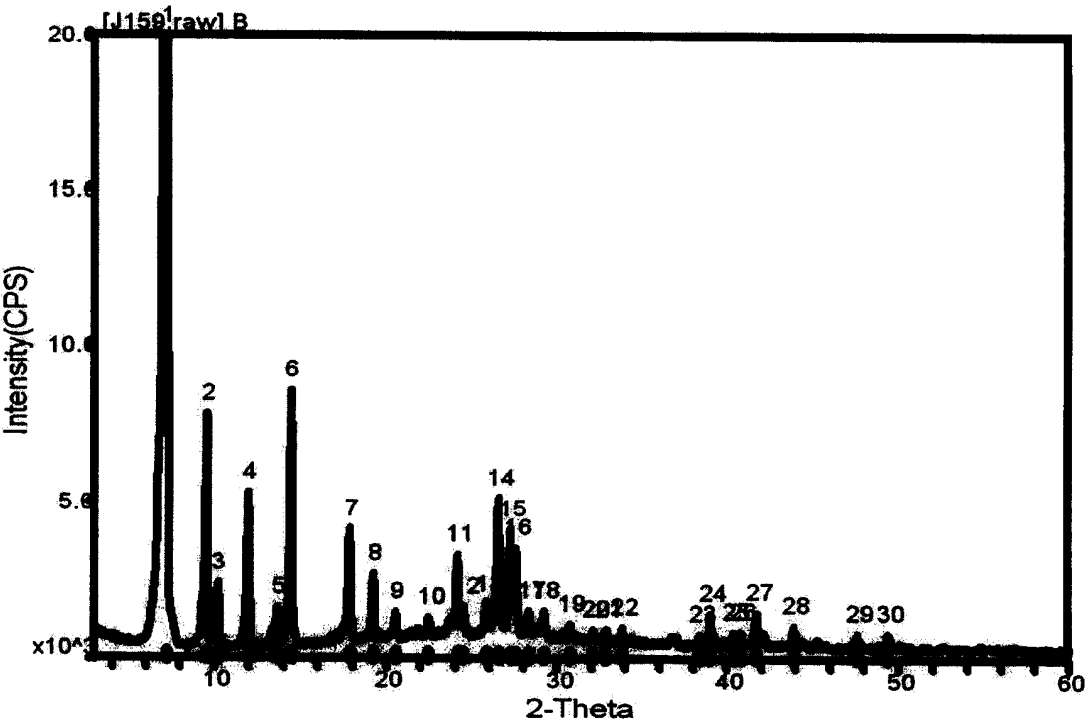


图 3-A

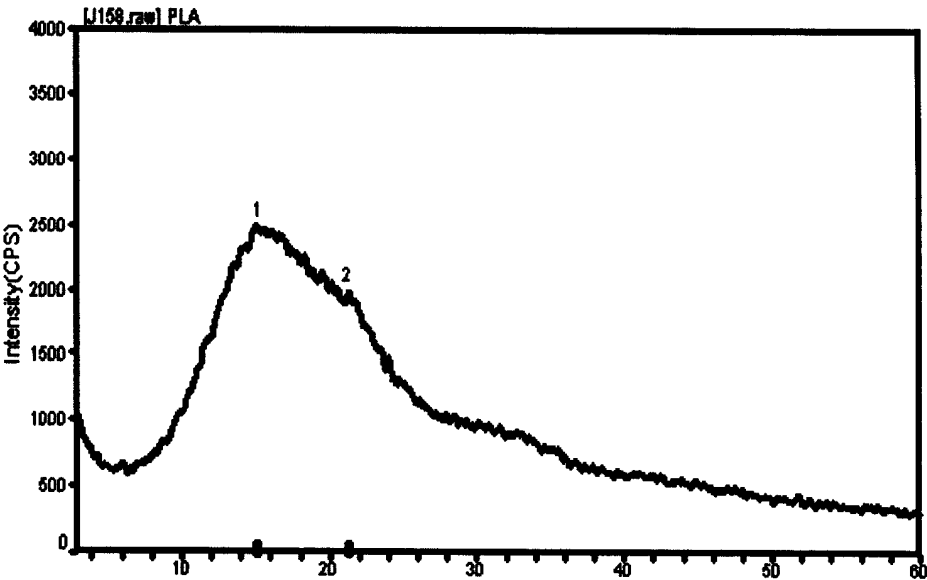


图 3-B

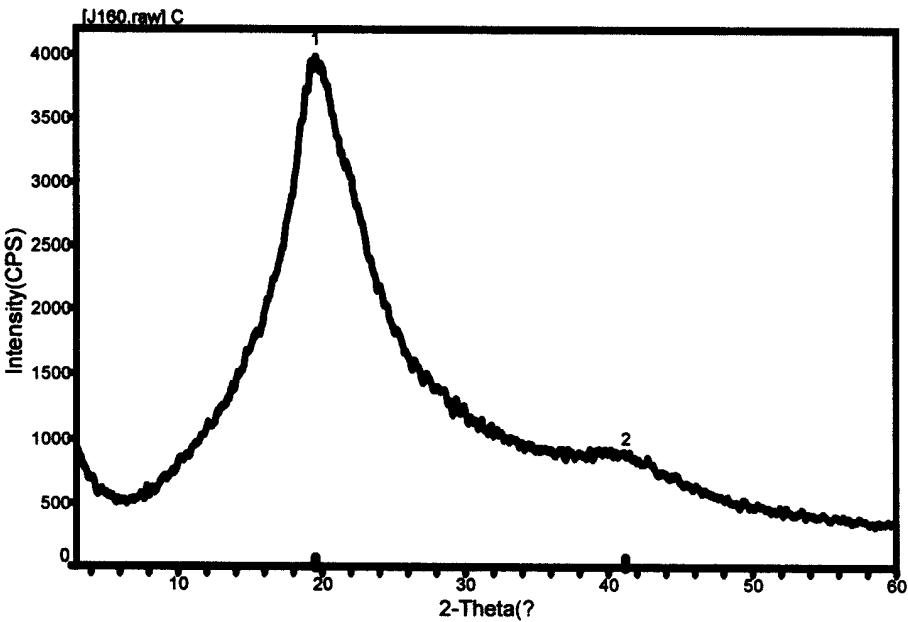


图 3-C

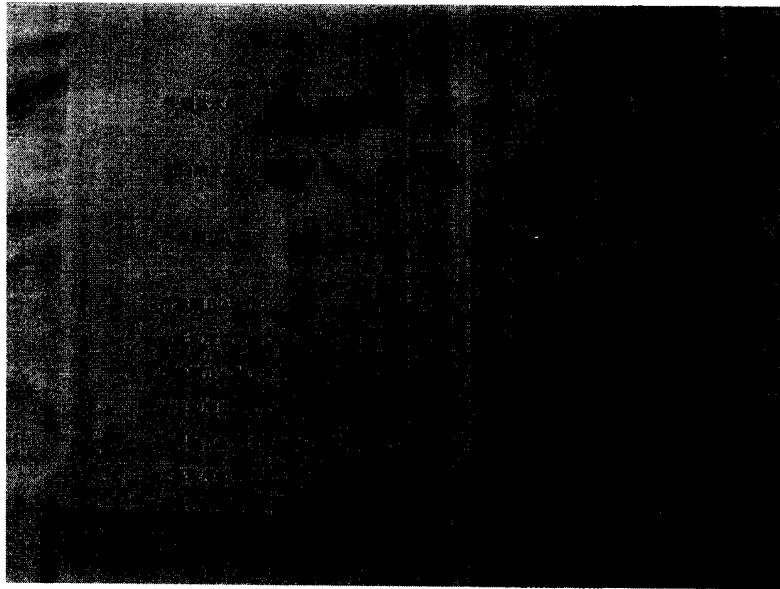


图 4

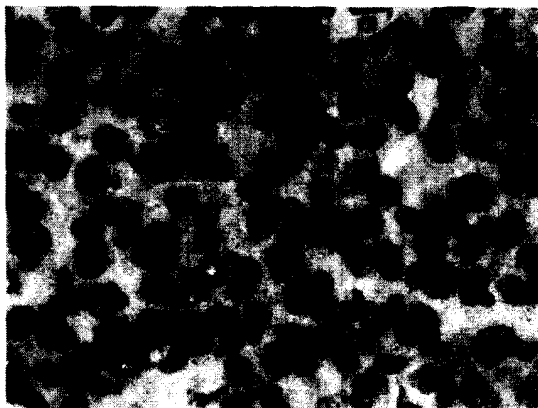


图 5-A

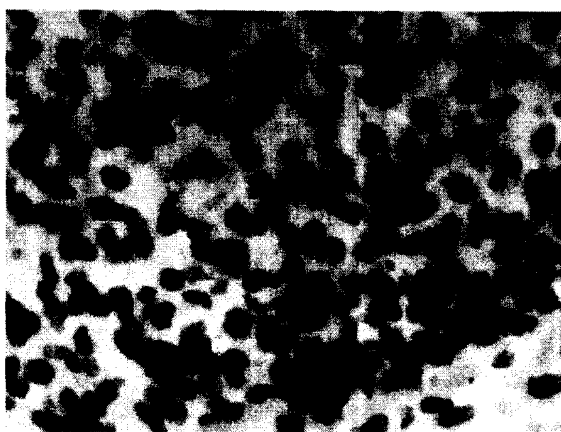


图 5-B

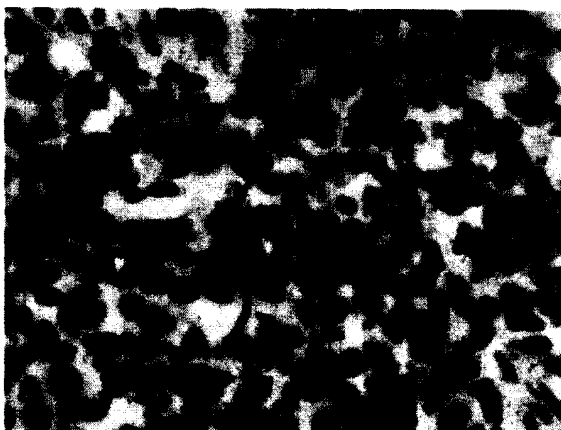


图 5-C