

一种环孢素乳剂及其制备方法

技术领域

本发明涉及制剂领域，尤其是涉及一种环孢素乳剂及其制备方法。

背景技术

环孢素是一种钙调神经磷酸酶抑制剂和有效的免疫抑制剂，相较其他免疫抑制剂毒性作用更小，可通过可逆的选择性地改变 T 淋巴细胞的功能，阻止淋巴激活素基因的转录，干扰原信息的传递，抑制白细胞介素-2(IL-2)、干扰素和其他免疫因子的释放，发挥抗炎作用。环孢素眼部给药后，可通过诱导钙神经蛋白磷酸酶失活，阻止 IL-2 等原炎细胞因子的释放，从而缓解干眼(角结膜干燥症)的症状。

环孢素在水中几乎不溶，其脂溶性良好，市售滴眼剂一般将其溶解于植物油中制成溶液剂或采用乳化技术制备成水包油乳剂。油溶液剂用于眼局部给药刺激性强，患者顺应性差。水包油眼用乳剂领域，已上市的 Restasis®和 Ikervis®均为平均粒径 100nm 以上的亚微乳，性状呈不透明的乳白色，滴眼后会模糊患者视力。此外，Restasis®因粒径较大且未添加促进药物在眼内停留或促渗透的组分，生物利用度较低；Ikervis®使用了阳离子表面活性剂西他氯铵加强药物在眼表的保留时间，但阳离子表面活性剂的使用增加了眼痛、眼刺激、眼充血等不良反应的发生。

纳米乳剂是由油、水、界面稳定剂等自组装形成的粒径 100nm 以下的半透明至几乎透明的分散体系。纳米乳剂应用于眼部给药，其纳米尺寸的粒径可增加药物在眼组织的渗透性而提高药效，更高的澄明度可提高患者顺应性，具有很高的开发价值。

目前水包油眼用乳剂需要解决两大技术难题：1)乳粒稳定性和包封稳定性问题，例如生理泪液或人工替代泪液的离子强度会影响乳剂的界面膜稳定性，进而导致乳粒聚集和药物渗漏，影响制剂的安全性和有效性；2)长期稳定性时，制剂 pH 值逐渐下降，影响制剂的质量。水包油乳剂通常使用氢氧化钠或盐酸调节 pH 值，但在储存过程中，随着油脂水解成游离脂肪酸，pH 值会逐渐下降。使用缓冲盐组成缓冲体系可以提高 pH 值的稳定性，但离子强度增大会影响界面膜稳定性，进而导致乳粒聚集和药物渗漏。鉴于此，水包油眼用乳剂领域，亟需提供一

种能够产生协同稳定作用的稳定剂组合,共同构成界面复合膜,复合膜可在较高的离子强度环境下(如缓冲盐溶液中)保持稳定,进而实现制剂 pH 值、粒径和包封率等均长期稳定。

发明内容

本发明的目的是提供一种粒径可控(例如,平均粒径在 50nm 以下)和包封率高(90%以上)的环孢素乳剂。

本发明的另一个目的是提供一种 pH 值、粒径和包封率长期稳定的环孢素乳剂。

本发明提供了一种水包油环孢素乳剂,包含界面稳定剂,所述界面稳定剂包含 15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯和磷脂的组合。

本发明还提供了一种制备水包油环孢素乳剂的方法,所述乳剂包含界面稳定剂、渗透压调节剂和缓冲盐,所述界面稳定剂包含 15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯和磷脂的组合,所述方法包括

- 1)将油和界面稳定剂混合均匀,向其中加入环孢素并溶解,形成油相;
- 2)将渗透压调节剂的一部分溶于水,将油相和含有渗透压调节剂的水搅拌混合,形成初乳;以及
- 3)将缓冲盐和余量的渗透压调节剂溶于水形成溶液,将初乳加入至所述溶液并混匀。

所述环孢素乳剂具有提高的界面膜稳定性,可有效抑制环孢素向水介质中迁移,并抑制乳粒的聚集,从而使得 pH 值、粒径和包封率方面的长期稳定性得到显著改善。因纳米尺寸粒径的促渗透性和更高的澄明度,使得该乳剂具有更高的药效和更好的患者顺应性。

具体实施方式

除非另外定义,本文所用的所有技术和科学术语具有本领域技术人员通常理解的相同含义。在冲突的情况下,以包括定义在内的本文件为准。下面描述优选的方法和材料,但是与本文所述那些类似或等同的方法和材料可用于实施或测试本发明。本文公开的材料、方法和实例仅是说明性的,而非旨在限制。

对于本公开内容涉及的所有数值范围,应理解为公开了该范围内所有具体数值,以及该范围内任意两个数值限定的子范围。例如,对于 1-20,应理解为公

开了 1、2、3、3.5、4.5、10、12、15、20 等具体数值，以及 1-5，2-6，3.5-7.5，15-20 等子范围。

本发明涉及一种水包油环孢素乳剂，优选纳米乳剂，包含界面稳定剂，所述界面稳定剂包含 15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯和磷脂的组合。

在一个实施方案中，所述水包油环孢素乳剂还包含缓冲盐。

在一个实施方案中，所述磷脂选自大豆磷脂、蛋黄磷脂或其任何组合，优选地，选自大豆磷脂 S100、蛋黄磷脂 E80 或其任何组合。

在一个实施方案中，环孢素与 15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯的质量比为 1:30~1:45。

在一个实施方案中，磷脂与 15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯的质量比为 1:14~1:31。

在一个实施方案中，15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯的含量为 2.25~13.5g/100ml。

在一个实施方案中，所述缓冲盐为磷酸缓冲盐，优选地，以磷酸根计，缓冲盐浓度为 0.01mol/L~0.05mol/L。

在一个实施方案中，所述水包油环孢素乳剂还包含渗透压调节剂；优选地，渗透压调节剂选自氯化钠、山梨醇或其任何组合；优选地，渗透压调节剂的含量为 0.2~1g/100ml。

在一个实施方案中，所述乳剂的粒子的平均粒径不超过 50nm，优选 10~40nm，更优选 20~30nm；优选地，所述乳剂的 90%的粒子的粒径不超过 90nm；优选地，乳剂的 pH 值为 6.5~8.0，优选 6.8~7.6，更优选 7.0~7.4；优选地，乳剂的包封率为不低于 90%，优选不低于 95%；优选地，所述乳剂为透明的乳状液体；优选地，所述乳剂为滴眼剂；优选地，所述油选自中链甘油三酸酯、大豆油、蓖麻油、橄榄油或鱼油。

本发明还提供了一种制备水包油环孢素乳剂的方法，所述乳剂包含界面稳定剂、渗透压调节剂和缓冲盐，所述界面稳定剂包含 15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯和磷脂的组合，所述方法包括

- 1)将油和界面稳定剂混合均匀，向其中加入环孢素并溶解，形成油相；
- 2)将渗透压调节剂的一部分溶于水，将油相和含有渗透压调节剂的水搅拌混合，形成初乳；以及
- 3)将缓冲盐和余量的渗透压调节剂溶于水形成溶液，将初乳加入至所述溶液

并混匀。

所述缓冲盐优选磷酸缓冲盐。

以上提及的各个实施方案中的技术特征在不产生矛盾的前提下可以相互组合成另外的技术方案。

实施例

实施例 1

以15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯和大豆磷脂S100为稳定剂，磷酸氢二钠和磷酸二氢钠为pH调节剂，氯化钠为渗透压调节剂制备环孢素纳米乳剂，处方组成如下：

组成成分	功能	处方量
环孢素	活性物质	0.1 g
油(中链甘油三酸酯)	分散相	1.5 g
15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯	稳定剂	4.5 g
大豆磷脂 S100	稳定剂	0.273 g
氯化钠	渗透压调节剂	0.356 g
磷酸氢二钠(以无水物计)	pH 调节剂	0.511 g
磷酸二氢钠(以无水物计)	pH 调节剂	0.168 g
注射用水	分散剂	至 100 ml
质量比/浓度		
环孢素与 15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯的质量比		1：45
磷脂与 15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯的质量比		1：16
磷酸盐浓度		0.05 mol/L

制备方法：

- 1) 将15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯、大豆磷脂S100和油加入容器1中，加热至60℃~80℃，搅拌混合均匀；加入环孢素搅拌溶解，成油相；
- 2) 向容器2中加入约配制总量9%的注射用水，搅拌下加入适量渗透压调节剂，继续搅拌至溶解，成初乳水相；
- 3) 搅拌下，将初乳水相加入到油相中，在搅拌下逐渐升温至60℃~80℃，继续搅拌5~15min，成初乳；
- 4) 向容器3中加入约配制总量50%的注射用水，搅拌下加入pH调节剂和剩余的渗透压调节剂，继续搅拌至溶解，得稀释水相；

- 5) 搅拌下，将初乳加入到稀释水相中，用适量注射用水分次冲洗容器2并将冲洗水转移至容器3中，继续搅拌5~10min；
- 6) 加注射用水至配制总量，搅拌均匀。

实施例2

以15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯和蛋黄磷脂E80为稳定剂，磷酸氢二钠和磷酸二氢钠为pH调节剂，氯化钠为渗透压调节剂制备环孢素纳米乳剂，处方组成如下：

组成成分	功能	处方量
环孢素	活性物质	0.1 g
油(中链甘油三酸酯)	分散相	1.5 g
15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯	稳定剂	4.5 g
蛋黄磷脂 E80	稳定剂	0.273 g
氯化钠	渗透压调节剂	0.356 g
磷酸氢二钠(以无水物计)	pH 调节剂	0.511 g
磷酸二氢钠(以无水物计)	pH 调节剂	0.168 g
注射用水	分散剂	至 100ml
质量比/浓度		
环孢素与 15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯的质量比		1: 45
磷脂与 15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯的质量比		1: 16
磷酸盐浓度		0.05 mol/L

制备方法：

- 1) 将15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯、蛋黄磷脂E80和油加入容器1中，加热至60℃~80℃，搅拌混合均匀；加入环孢素搅拌溶解，成油相；
- 2) 向容器2中加入约配制总量9%的注射用水，搅拌下加入适量渗透压调节剂，继续搅拌至溶解，成初乳水相；
- 3) 搅拌下，将初乳水相加入到油相中，在搅拌下逐渐升温至60℃~80℃，继续搅拌5~15min，成初乳；
- 4) 向容器3中加入约配制总量50%的注射用水，搅拌下加入pH调节剂和剩余的渗透压调节剂，继续搅拌至溶解，得稀释水相；
- 5) 搅拌下，将初乳加入到稀释水相中，用适量注射用水分次冲洗容器2并将冲洗水转移至容器3中，继续搅拌5~10min；
- 6) 加注射用水至配制总量，搅拌均匀。

实施例3

以15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯和大豆磷脂S100为稳定剂，磷酸氢二钠和磷酸二氢钠为pH调节剂，氯化钠和山梨醇为渗透压调节剂制备环孢素纳米乳剂，处方组成如下：

组成成分	功能	处方量
环孢素	活性物质	0.1 g
油(中链甘油三酸酯)	分散相	1.5 g
15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯	稳定剂	4.5 g
大豆磷脂 S100	稳定剂	0.273 g
氯化钠	渗透压调节剂	0.306 g
山梨醇	渗透压调节剂	0.675 g
磷酸氢二钠(以无水物计)	pH 调节剂	0.547 g
磷酸二氢钠(以无水物计)	pH 调节剂	0.137 g
注射用水	分散剂	至 100ml
质量比/浓度		
环孢素与 15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯的质量比		1： 45
磷脂与 15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯的质量比		1： 16
磷酸盐浓度		0.05 mol/L

制备方法：

- 1) 将15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯、大豆磷脂S100和油加入容器1中，加热至60℃~80℃，搅拌混合均匀；加入环孢素搅拌溶解，成油相；
- 2) 向容器2中加入约配制总量9%的注射用水，搅拌下加入适量渗透压调节剂，继续搅拌至溶解，成初乳水相；
- 3) 搅拌下，将初乳水相加入到油相中，在搅拌下逐渐升温至60℃~80℃，继续搅拌5~15min，成初乳；
- 4) 向容器3中加入约配制总量50%的注射用水，搅拌下pH调节剂和剩余的渗透压调节剂，继续搅拌至溶解，得稀释水相；
- 5) 搅拌下，将初乳加入到稀释水相中，用适量注射用水分次冲洗容器2并将冲洗水转移至容器3中，继续搅拌5~10min；
- 6) 加注射用水至配制总量，搅拌均匀。

实施例4

以15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯和大豆磷脂S100为稳定剂，磷酸氢二钠和磷酸二氢钠为pH调节剂，氯化钠为渗透压调节剂制备环孢素纳米乳剂，处方组成如下：

组成成分	功能	处方量
环孢素	活性物质	0.3 g
油(中链甘油三酸酯)	分散相	4.5 g
15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯	稳定剂	13.5 g
大豆磷脂 S100	稳定剂	0.819 g
氯化钠	渗透压调节剂	0.23 g
磷酸氢二钠(以无水物计)	pH 调节剂	0.102 g
磷酸二氢钠(以无水物计)	pH 调节剂	0.034 g
注射用水	分散剂	至 100ml
质量比/浓度		
环孢素与 15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯的质量比		1：45
磷脂与 15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯的质量比		1：16
磷酸盐浓度		0.01 mol/L

制备方法：

- 1)将15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯、大豆磷脂S100和油加入容器1中，加热至60℃~80℃，搅拌混合均匀；加入环孢素搅拌溶解，成油相；
- 2)向容器2中加入约配制总量27%的注射用水，搅拌下加入适量渗透压调节剂，继续搅拌至溶解，成初乳水相；
- 3)搅拌下，将初乳水相加入到油相中，在搅拌下逐渐升温至60℃~80℃，继续搅拌5~15min，成初乳；
- 4)向容器3中加入约配制总量30%的注射用水，搅拌下加入pH调节剂和剩余的渗透压调节剂，继续搅拌至溶解，得稀释水相；
- 5)搅拌下，将初乳加入到稀释水相中，用适量注射用水分次冲洗容器2并将冲洗水转移至容器3中，继续搅拌5~10min；
- 6)加注射用水至配制总量，搅拌均匀。

实施例5

以15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯和大豆磷脂S100为稳定剂，磷酸氢二钠和磷酸二氢钠为pH调节剂，氯化钠为渗透压调节剂制备环孢素纳米乳剂，处方组成如下：

组成成分	功能	处方量
环孢素	活性物质	0.05 g
油(中链甘油三酸酯)	分散相	0.75 g
15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯	稳定剂	2.25 g
大豆磷脂 S100	稳定剂	0.137 g
氯化钠	渗透压调节剂	0.628 g
磷酸氢二钠(以无水物计)	pH 调节剂	0.256 g
磷酸二氢钠(以无水物计)	pH 调节剂	0.084 g
注射用水	分散剂	至 100ml
质量比/浓度		
环孢素与 15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯的质量比		1: 45
磷脂与 15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯的质量比		1: 16
磷酸盐浓度		0.025 mol/L

制备方法:

- 1) 将15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯、大豆磷脂S100和油加入容器1中，加热至60℃~80℃，搅拌混合均匀；加入环孢素搅拌溶解，成油相；
- 2) 向容器2中加入约配制总量4.5%的注射用水，搅拌下加入适量渗透压调节剂，继续搅拌至溶解，成初乳水相；
- 3) 搅拌下，将初乳水相加入到油相中，在搅拌下逐渐升温至60℃~80℃，继续搅拌5~15min，成初乳；
- 4) 向容器3中加入约配制总量25%的注射用水，搅拌下加入pH调节剂和剩余的渗透压调节剂，继续搅拌至溶解，得稀释水相；
- 5) 搅拌下，将初乳加入到稀释水相中，用适量注射用水分次冲洗容器2并将冲洗水转移至容器3中，继续搅拌5~10min；
- 6) 加注射用水至配制总量，搅拌均匀。

实施例6

以15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯和大豆磷脂S100为稳定剂，磷酸氢二钠和磷酸二氢钠为pH调节剂，氯化钠为渗透压调节剂制备环孢素纳米乳剂，处方组成如下：

组成成分	功能	处方量
环孢素	活性物质	0.1 g
油(中链甘油三酸酯)	分散相	1.5 g

15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯	稳定剂	3.0 g
大豆磷脂 S100	稳定剂	0.218 g
氯化钠	渗透压调节剂	0.406 g
磷酸氢二钠(以无水物计)	pH 调节剂	0.511 g
磷酸二氢钠(以无水物计)	pH 调节剂	0.168 g
注射用水	分散剂	至 100ml
质量比/浓度		
环孢素与 15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯的质量比		1: 30
磷脂与 15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯的质量比		1: 14
磷酸盐浓度		0.05 mol/L

制备方法:

- 1) 将15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯、大豆磷脂S100和油加入容器1中，加热至60℃~80℃，搅拌混合均匀；加入环孢素搅拌溶解，成油相；
- 2) 向容器2中加入约配制总量9%的注射用水，搅拌下加入适量渗透压调节剂，继续搅拌至溶解，成初乳水相；
- 3) 搅拌下，将初乳水相加入到油相中，在搅拌下逐渐升温至60℃~80℃，继续搅拌5~15min，成初乳；
- 4) 向容器3中加入约配制总量50%的注射用水，搅拌下加入pH调节剂和剩余的渗透压调节剂，继续搅拌至溶解，得稀释水相；
- 5) 搅拌下，将初乳加入到稀释水相中，用适量注射用水分次冲洗容器2并将冲洗水转移至容器3中，继续搅拌5~10min；
- 6) 加注射用水至配制总量，搅拌均匀。

实施例7

以15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯和大豆磷脂S100为稳定剂，磷酸氢二钠和磷酸二氢钠为pH调节剂，氯化钠为渗透压调节剂制备环孢素纳米乳剂，处方组成如下：

组成成分	功能	处方量
环孢素	活性物质	0.1 g
油(中链甘油三酸酯)	分散相	1.5 g
15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯	稳定剂	4.5 g
大豆磷脂 S100	稳定剂	0.146 g
氯化钠	渗透压调节剂	0.406 g

磷酸氢二钠(以无水物计)	pH 调节剂	0.511 g
磷酸二氢钠(以无水物计)	pH 调节剂	0.168 g
注射用水	分散剂	至 100ml
质量比/浓度		
环孢素与 15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯的质量比		1: 45
磷脂与 15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯的质量比		1: 31
磷酸盐浓度		0.05 mol/L

制备方法:

- 1) 将15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯、大豆磷脂S100和油加入容器1中，加热至60℃~80℃，搅拌混合均匀；加入环孢素搅拌溶解，成油相；
- 2) 向容器2中加入约配制总量9%的注射用水，搅拌下加入适量渗透压调节剂，继续搅拌至溶解，成初乳水相；
- 3) 搅拌下，将初乳水相加入到油相中，在搅拌下逐渐升温至60℃~80℃，继续搅拌5~15min，成初乳；
- 4) 向容器3中加入约配制总量50%的注射用水，搅拌下加入pH调节剂和剩余的渗透压调节剂，继续搅拌至溶解，得稀释水相；
- 5) 搅拌下，将初乳加入到稀释水相中，用适量注射用水分次冲洗容器2并将冲洗水转移至容器3中，继续搅拌5~10min；
- 6) 加注射用水至配制总量，搅拌均匀。

实验例8: 环孢素纳米乳剂质量特性考察

本申请中，粒径按照《中国药典》2020年版四部通则0982第三法测定；包封率的检测方法如下：

取本品200μl加入到葡聚糖凝胶G-25微型柱的顶端，2000rpm/min离心1min，以水为洗脱液进行洗脱，向微型柱顶端加水200μl，2000rpm/min离心2min，重复洗脱4次，收集洗脱液于5ml量瓶中，加甲醇破乳并稀释至刻度，摇匀，即得。取环孢素对照品适量，加500μl的甲醇溶解后，再用50%的甲醇溶液定量稀释制成每1ml中约含环孢素对照品0.1mg溶液。用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；以乙腈-水（70:30）为流动相；流速为每分钟1.0ml；不锈钢管和柱温为80℃；检测波长为210nm。分别取上述溶液，注入液相色谱仪，记录色谱图，按外标法以峰面积计算，即得。

按实施例1处方工艺制备样品，考察环孢素纳米乳剂的性状、pH值、粒径和包封率，结果见表1。按实施例2、实施例3、实施例4、实施例5、实施例6和实施例7处方工艺制备样品，考察环孢素纳米乳剂的性状、pH值和粒径，结果见表2。

表 1 实施例 1 环孢素纳米乳剂质量特性

项目	性状	pH 值	粒径		包封率
			平均粒径	D ₉₀	
限度要求	应为几乎透明的乳状液体	6.5~8.0	≤50 nm	≤90 nm	≥90%
实施例 1	几乎透明的乳状液体	7.2	23 nm	< 27 nm	98.7%

表 2 实施例 2~6 环孢素纳米乳剂质量特性

项目	性状	pH 值	粒径	
			平均粒径	D ₉₀
限度要求	应为几乎透明的乳状液体	6.5~8.0	≤50 nm	≤90 nm
实施例 2	几乎透明的乳状液体	7.2	22 nm	< 23 nm
实施例 3	几乎透明的乳状液体	7.3	22 nm	< 25 nm
实施例 4	几乎透明的乳状液体	7.2	26 nm	< 43 nm
实施例 5	几乎透明的乳状液体	7.2	24 nm	< 30 nm
实施例 6	几乎透明的乳状液体	7.3	26 nm	< 31 nm
实施例 7	几乎透明的乳状液体	7.2	22 nm	< 26 nm

结论：环孢素纳米乳剂的性状、pH值、粒径和包封率符合限度要求。

实验例9：环孢素纳米乳剂稳定性试验

按实施例1、实施例2、实施例3处方工艺制备样品，进行40℃高温和5000 ± 500lx光照稳定性的考察，结果见表3-表4。按实施例1处方工艺制备样品，进行30℃中间条件试验及15~20℃长期试验的考察，结果见表5-表6。

表 3 实施例 1~3 环孢素纳米乳剂高温稳定性试验结果

项目		性状	pH 值	粒径	
				平均粒径	D ₉₀
限度要求 样品(天)		应为几乎透明的乳状液体	6.5~8.0	≤50 nm	≤90 nm
实施例 1	0	几乎透明的乳状液体	7.2	23 nm	< 27 nm
	30	几乎透明的乳状液体	7.1	23 nm	< 31 nm
实施例 2	0	几乎透明的乳状液体	7.2	22 nm	< 23 nm
	30	几乎透明的乳状液体	7.1	20 nm	< 21 nm
实施例 3	0	几乎透明的乳状液体	7.3	22 nm	< 25 nm
	30	几乎透明的乳状液体	7.2	24 nm	< 32 nm

表 4 实施例 1、实施例 3 环孢素纳米乳剂光照稳定性试验结果

项目		性状	pH 值	粒径	
				平均粒径	D ₉₀
限度要求 样品(天)		应为几乎透明的乳状液体	6.5~8.0	≤50 nm	≤90 nm
实施例 1	0	几乎透明的乳状液体	7.2	23 nm	< 27 nm
	30	几乎透明的乳状液体	7.1	24 nm	< 33 nm
实施例 3	0	几乎透明的乳状液体	7.3	22 nm	< 25 nm
	30	几乎透明的乳状液体	7.2	22 nm	< 27 nm

表 5 实施例 1 环孢素纳米乳剂中间条件稳定性试验结果

项目		性状	pH 值	粒径		包封率
				平均粒径	D ₉₀	
限度要求 样品(月)		应为几乎透明的乳状液体	6.5~8.0	≤50 nm	≤90 nm	≥90%
实施例 1	0	几乎透明的乳状液体	7.2	23 nm	< 27 nm	98.7%
	3	几乎透明的乳状液体	7.2	25 nm	< 35 nm	101.0%
	6	几乎透明的乳状液体	7.1	25 nm	< 37 nm	-

表 6 实施例 1 环孢素纳米乳剂长期稳定性试验结果

项目		性状	pH 值	粒径		包封率
				平均粒径	D ₉₀	
限度要求 样品(月)		应为几乎透明的乳状液体	6.5~8.0	≤50 nm	≤90 nm	≥90%
实施例 1	0	几乎透明的乳状液体	7.2	23 nm	< 27 nm	98.7%
	3	几乎透明的乳状液体	7.2	23 nm	< 30 nm	97.7%
	6	几乎透明的乳状液体	7.2	24 nm	< 34 nm	-

结论：环孢素纳米乳剂的pH值、粒径和包封率的稳定性良好，说明缓冲盐的使用可以提高乳剂的pH值稳定性，15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯和磷脂组成的界面复合膜可以耐受较高的离子强度，保证纳米乳剂储存过程中的乳粒和包封的稳定性。

实验例10：环孢素纳米乳剂对干燥应激所致小鼠干眼的药效学试验

1、受试药物：

低剂量的供试品：0.05%环孢素纳米乳剂，按实施例5处方工艺制备。

中剂量的供试品：0.1%环孢素纳米乳剂，按实施例1处方工艺制备。

高剂量的供试品：0.3%环孢素纳米乳剂，按实施例4处方工艺制备。

市售对照品：Ikervis[®]，规格0.1%。

空白辅料：按实施例1处方工艺制备，除了不含环孢素。

2、受试动物：C57BL/6JShjh小鼠，体重15.4-20.4 g，雌性。

3、试验方法：150 只健康雌性C57BL/6JShjh小鼠，于D-1选择双眼眼部无异常的21只小鼠不进行造模和125只小鼠连续5天接受低湿环境联合皮下注射东莨菪碱(2次/天，0.75 mg/mL，0.3 mL/只/次)诱导造模，首次造模当天记为D1。D5选择角膜荧光素钠染色评分、泪液分泌量相近的15只未造模动物分入未造模组，选择角膜荧光素钠染色评分、泪液分泌量相近的90只造模动物，同时兼顾造模前的基础分值，依双眼角膜荧光素钠染色评分均值随机分入2~7组(15只/组)，依次为模型对照组、空白辅料组、市售对照组、供试品低、中、高剂量组。D6~D15，2~7组动物继续接受造模(方法同前)，第1~2组不给药，第3~7组分别给予空白辅料、Ikervis、0.05%、0.1%和0.3%环孢素纳米乳剂，双眼滴眼给药(3次/天，间隔约3小时，3 μ L/眼)。D-1、D5、D10、D15对各组动物进行泪液分泌量检查及角膜荧光素钠染色试验。

4、评价方法：

泪液分泌量：保定小鼠，用洁净的无齿镊夹持截短后的市售酚红棉线，将棉线固定于小鼠下眼睑结膜囊中部30s，测量棉线染湿长度。泪液分泌量总结表见表7。

角膜荧光素钠染色试验：将荧光素钠溶液(1.5 μ L，0.5%)滴入动物上结膜囊后，自染色约1.5 min 开始，每隔约10 s 使用1.25 mL的无菌生理盐水冲洗动物结膜囊，连续 3次，每次冲洗完毕用面纸吸干动物眼周生理盐水。染色约5 min 时使用裂隙灯(+钴蓝滤光片)观察眼表，拍照，评分。评分标准：每眼角膜分为5个区域(1-中央区、2-上方、3-颞侧、4-鼻侧、5-下方)，每个区域染色评分最高8分，其中0分表示对应区域未见着色，1分表示点状着色面积为对应区域面积的1%~25%，2分表示点状着色面积为对应区域面积的26%~50%，3分表示点状着色面积为对应区域面积的51%~75%，4分表示点状着色面积为对应区域面积的76%~100%，若着色区致密和/或可见明显融合，依着色区占对应区域的面积大小，即1%~25%、26%~50%、51%~75%、76%~100%，分别给予1、2、3、4 分的加分。每眼总分最高40分。计算每眼角膜荧光素钠染色总分。角膜荧光素钠染色评分总结表见表8。

表 7 泪液分泌量总结表(mm)

组别		D-1	D5	D10	D15
1-未造模组	Mean±SD N	5.48±1.89 30	5.77±2.12 30	6.22±2.07 30	6.65±2.21 30
2-模型对照组	Mean±SD N	5.93±2.20 30	1.50±0.57 ^a 30	1.90±0.62 ^a 30	1.82±0.51 ^a 28
3-空白辅料组	Mean±SD N	5.97±1.96 30	1.43±0.61 ^a 30	1.82±0.50 ^a 30	1.82±0.70 ^a 30
4-市售对照组	Mean±SD N	6.02±2.13 30	1.55±0.63 ^a 30	3.00±0.71 ^{abc} 30	3.08±1.02 ^{abc} 30
5-供试品低剂量组	Mean±SD N	5.28±1.88 30	1.48±0.59 ^a 30	2.78±0.99 ^{abc} 30	3.22±0.72 ^{abc} 30
6-供试品中剂量组	Mean±SD N	5.30±2.00 30	1.48±0.79 ^a 30	2.82±0.92 ^{abc} 30	3.37±0.54 ^{abc} 30
7-供试品高剂量组	Mean±SD N	5.37±1.91 30	1.62±0.54 ^a 30	2.72±0.67 ^{abc} 30	3.45±0.79 ^{abc} 30

注：N 表示动物眼数。和未造模组比较，^a表示 $p \leq 0.05$ ；和模型对照组比较，^b表示 $p \leq 0.05$ ；和空白辅料组比较，^c表示 $p \leq 0.05$ ；和市售对照组比较，^d表示 $p \leq 0.05$ ；和供试品低剂量组比较，^e表示 $p \leq 0.05$ ；和供试品中剂量组比较，^f表示 $p \leq 0.05$ 。

表 8 角膜荧光素钠染色评分总结表

组别		D-1	D5	D10	D15
1-未造模组	Mean±SD N	14.3±2.8 30	16.0±4.0 30	17.2±4.4 30	16.6±3.5 30
2-模型对照组	Mean±SD N	15.7±4.6 30	35.1±2.5 ^a 30	35.0±2.2 ^a 30	35.2±2.5 ^a 28
3-空白辅料组	Mean±SD N	15.6±3.2 30	35.4±2.0 ^a 30	32.1±3.8 ^{ab} 30	29.6±4.2 ^{ab} 30
4-市售对照组	Mean±SD N	15.3±4.3 30	35.2±2.0 ^a 30	27.7±4.5 ^{abc} 30	22.5±4.0 ^{abc} 30
5-供试品低剂量组	Mean±SD N	15.2±3.7 30	35.8±1.8 ^a 30	24.7±4.0 ^{abcd} 30	21.8±4.5 ^{abc} 30
6-供试品中剂量组	Mean±SD N	14.3±3.8 30	34.9±2.2 ^a 30	21.7±3.7 ^{abcde} 30	19.5±3.3 ^{abcd} 30
7-供试品高剂量组	Mean±SD N	16.2±4.5 30	35.5±2.4 ^a 30	20.1±2.6 ^{abcde} 30	17.5±3.2 ^{bcdef} 30

注：N 表示动物眼数。和未造模组比较，^a表示 $p \leq 0.05$ ；和模型对照组比较，^b表示 $p \leq 0.05$ ；和空白辅料组比较，^c表示 $p \leq 0.05$ ；和市售对照组比较，^d表示 $p \leq 0.05$ ；和供试品低剂量组比较，^e表示 $p \leq 0.05$ ；和供试品中剂量组比较，^f表示 $p \leq 0.05$ 。

5、实验结果

低湿环境联合东莨菪碱皮下注射能成功诱导小鼠泪液分泌量的减少，低、中、高剂量的供试品和市售对照品连续给药 5 天对模型小鼠的泪液分泌量的降低均有显著的改善作用，给药延长至 10 天时低、中、高剂量的供试品和市售对照品仍可见一定的改善作用且从均值上看供试品的效果更明显。

低湿环境联合东莨菪碱皮下注射能成功诱导小鼠角膜荧光素钠染色评分的升高，低、中、高剂量的供试品和市售对照品连续给药 5 天均可显著降低小鼠角膜荧光素钠染色评分，给药延长至 10 天时仍可降低小鼠角膜荧光素钠染色评分，

其中中、高剂量的供试品效果更优于市售对照品，且高剂量的供试品可使模型小鼠的角膜荧光素钠染色评分恢复接近至正常水平。

结论：本发明的环孢素眼用乳剂可以提高药效。

虽然本发明某些特征已经在本文中阐释和描述，但本领域技术人员将想到许多修改、替代、变更和等同。因此，应理解的是，所附权利要求书意在涵盖落入本发明真实精神范围之内所有此类修改和变更。

权 利 要 求 书

1. 一种水包油环孢素乳剂，优选纳米乳剂，包含界面稳定剂，所述界面稳定剂包含 15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯和磷脂的组合。
2. 根据权利要求 1 所述的水包油环孢素乳剂，还包含缓冲盐。
3. 根据权利要求 1 所述的水包油环孢素乳剂，其中所述磷脂选自大豆磷脂、蛋黄磷脂或其任何组合，优选地，选自大豆磷脂 S100、蛋黄磷脂 E80 或其任何组合。
4. 根据权利要求 1 所述的水包油环孢素乳剂，其中环孢素与 15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯的质量比为 1: 30~1: 45。
5. 根据权利要求 1 所述的水包油环孢素乳剂，其中磷脂与 15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯的质量比为 1: 14~1: 31。
6. 根据权利要求 1 所述的水包油环孢素乳剂，其中 15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯的含量为 2.25~13.5g/100ml。
7. 根据权利要求 2 所述的水包油环孢素乳剂，其中缓冲盐为磷酸缓冲盐，优选地，以磷酸根计，缓冲盐浓度为 0.01mol/L~0.05mol/L。
8. 根据权利要求 1 所述的水包油环孢素乳剂，还包含渗透压调节剂；优选地，渗透压调节剂选自氯化钠、山梨醇或其任何组合；优选地，渗透压调节剂的含量为 0.2~1g/100ml。
9. 根据权利要求 1 所述的水包油环孢素乳剂，所述乳剂的粒子的平均粒径不超过 50nm，优选 10~40nm，更优选 20~30nm；优选地，所述乳剂的 90% 的粒子的粒径不超过 90nm；优选地，乳剂的 pH 值为 6.5~8.0，优选 6.8~7.6，更优选 7.0~7.4；优选地，乳剂的包封率为不低于 90%，优选不低于 95%；优选地，所述乳剂为透明的乳状液体；优选地，所述乳剂为滴眼剂；优选地，所述油选自中链甘油三酸酯、大豆油、蓖麻油、橄榄油或鱼油。
10. 一种制备水包油环孢素乳剂的方法，所述乳剂包含界面稳定剂、渗透压调节剂和缓冲盐，所述界面稳定剂包含 15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯和磷脂的组合，所述方法包括
 - 1)将油和界面稳定剂混合均匀，向其中加入环孢素并溶解，形成油相；
 - 2)将渗透压调节剂的一部分溶于水，将油相和含有渗透压调节剂的水搅拌混合，形成初乳；以及
 - 3)将缓冲盐和余量的渗透压调节剂溶于水形成溶液，将初乳加入至所述溶液并混匀。