



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110054660 A

(43)申请公布日 2019.07.26

(21)申请号 201811590066.5

(22)申请日 2018.12.25

(71)申请人 四川大学

地址 610065 四川省成都市武侯区一环路  
南一段24号

(72)发明人 吴勇 海俐 管玫 彭瑶

(51)Int. Cl.

C07J 9/00(2006.01)

A61K 9/127(2006.01)

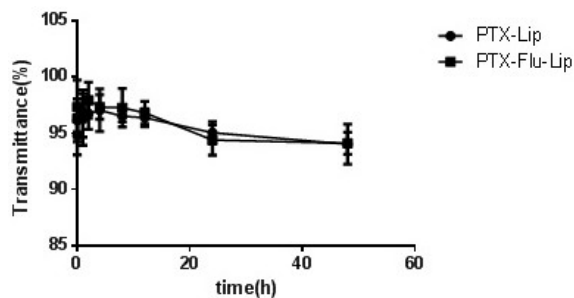
权利要求书1页 说明书10页 附图3页

## (54)发明名称

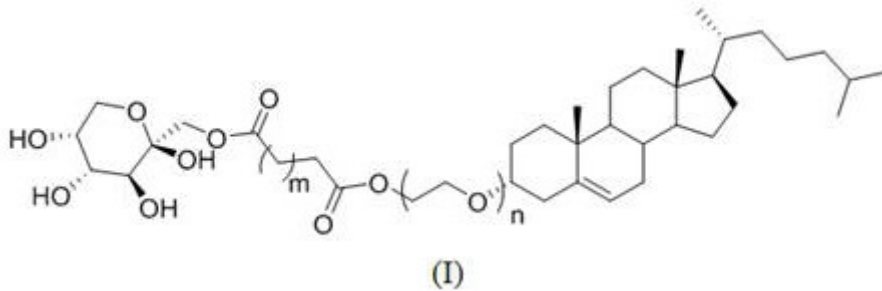
一种果糖修饰的乳腺癌靶向脂质材料的制备和应用

## (57)摘要

本发明公开了一种新型脂质材料,用于实现乳腺癌靶向药物的传递以及延长药物作用时间。所述的新型脂质材料通过对内源性胆固醇进行修饰,添加连接链,与具有乳腺癌靶向功能的果糖相连接,制成具有乳腺癌靶向的配体分子。使用该配体分子对脂质材料进行修饰,可以提高新型脂质材料与受体之间的亲和力,实现更强的肿瘤靶向性,发挥更加有效的乳腺癌治疗作用。该新型脂质材料可用于脂质体、纳米粒、胶束等在内的不同剂型,所制成的载紫杉醇脂质体具有明显的乳腺癌靶向性,拥有广阔的应用前景。



1. 一种果糖修饰的乳腺癌靶向脂质材料,为通式(I)所示结构或其药学上可接受的盐或水合物,脂质材料(I)特征在于:以三甘醇和丁二酸酐为连接链,一端连接内源性胆固醇,另外一端连接具有乳腺癌靶向功能的果糖:



其中,所使用的连接链中的酸酐为丁二酸酐、丙二酸酐和戊二酸酐中的一种,聚乙二醇为三甘醇或PEG200、400、600、800、1000、1500、2000、4000中的一种。

2. 根据权利要求1所述的新型乳腺癌靶向脂质材料作为药物载体在制备乳腺癌靶向药物中的应用。

3. 根据权利要求1所述的新型乳腺癌靶向脂质材料所制成的乳腺癌靶向脂质体,其特征在于,包括膜材与活性剂,所述的膜材为磷脂双分子层,由卵磷脂,胆固醇以及脂质体配体组成,其中,各组分配比关系如下:胆固醇和磷脂的摩尔比为1~2:1~10,脂质体配体的摩尔含量为胆固醇和磷脂的总摩尔数的1~25%;本发明所述的活性剂采用治疗剂或显影剂,活性剂的剂量可以依据包含在脂质体中的活性剂来调整,其中按重量百分数计算,活性剂占总脂质的0.1%~50%;水化液为pH 7.4的0.01M磷酸盐缓冲液(PBS)。

4. 根据权利要求1所述的新型乳腺癌靶向脂质材料所制成的乳腺癌靶向脂质体,其特征在于,根据上述组分配比关系,采用薄膜法制备乳腺癌靶向脂质体,可制备得到粒径及Zeta电位稳定的乳腺癌靶向脂质体,其脂质体粒度为110nm左右,包封率大于86%。

5. 根据权利要求1所述的新型乳腺癌靶向脂质材料所制成的乳腺癌靶向脂质体,其特征在于,所述磷脂本发明中采用卵磷脂。

6. 根据权利要求1所述的新型乳腺癌靶向脂质材料所制成的乳腺癌靶向脂质体,其特征在于,所述的活性剂本发明中的治疗剂采用紫杉醇,显影剂采用CFPE或DiD。

## 一种果糖修饰的乳腺癌靶向脂质材料的制备和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一类新型脂质材料及其在药物传递系统中的应用,具有乳腺癌靶向药物传递和延长体内循环时间的功能,包括该材料的制备,及其作为药物载体在药物传递中的应用,属于医药技术领域。

### 背景技术

[0002] 乳腺癌是一种高度异质性疾病,是女性常见癌症,是通常发生于乳房腺上皮组织的恶性肿瘤。遗传、环境、年龄、生活方式与饮食习惯等因素使患者的HER2, BRCA1, BRCA2, RB等基因发生突变,进而导致乳腺癌的发生。临床主要表现为乳腺肿痛、有肿块、腋窝下淋巴结出现肿大等。据统计, 99%的乳腺癌是女性,乳腺癌是女性三大恶性肿瘤之一,我国虽然是乳腺癌低发地区,但发病率快速上升,年发病率约为12/10万,女性一生之中罹患乳腺癌的几率约为12.3%,且患者趋于年轻化。中国的乳腺癌新发病例在2000 年约为12.1 万例,2005 年为16.8 万例,中国肿瘤登记中心2015年年报中指出,乳腺癌仍居女性癌症发病率首位,严重影响我国妇女的健康和生命。预计到2021年,中国乳腺癌患者将高达250万。患病早期,多给予手术治疗,中晚期,多选择放疗或化疗。然而手术治疗不仅给病人身体上带来极大痛苦,而且预后差、易感染,同时在患者心理上也会有一定的伤害。放疗虽有一定疗效,但同样无法根除,而且副作用大。虽然化疗在乳腺癌的综合治疗中占有非常重要的地位,能够控制乳腺癌早期发生的全身播散,预防缓解乳腺癌术后的复发转移,有效地延长患者生存期,但是因其无组织及器官特异性,药物呈全身分布,对正常组织也有毒副作用,治疗效果不是很理想。靶向治疗作为继手术、放疗、化疗三大传统治疗手段之外的一种全新的治疗方法,作用机制和毒性不同于传统的细胞毒性化疗,通常比传统化疗具有更好的耐受性,可更为有效地为临床治疗方案的选择提供进一步参考。伴随着药理学和分子生物学研究的深入,靶向药物的研究和应用也取得了突破性进展,新治疗靶点药物的研发也已成为人们关注的热点。

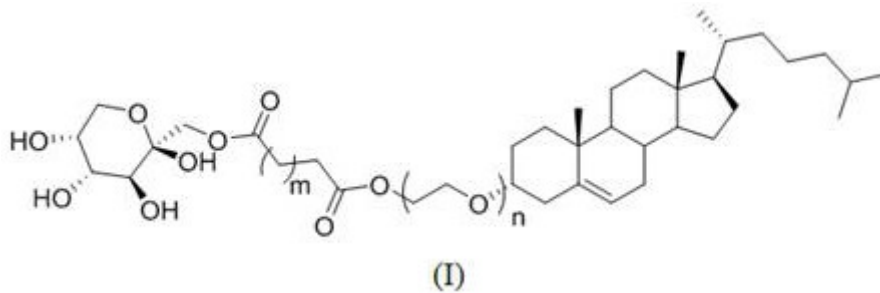
[0003] 近年来,研究人员利用环状RGD (cRGD)、叶酸(FA)、生物素(biotin)、人表皮生长因子受体-2 (Her2)、半乳糖、甘草酸(glycyrrhizin)、果糖等不同类型的靶向配体进行了肿瘤靶向药物递药系统的研究。与正常细胞相比,为了满足快速增殖和扩散所必须的能量需求,肿瘤细胞一般都会过度表达一种或多种的葡萄糖转运蛋白(GLUT)来转运一些高能的糖类物质,比如,葡萄糖、果糖、半乳糖等。果糖是除葡萄糖之外肿瘤能量代谢的另一重要底物。在葡萄糖转运蛋白的十二种亚型(GLUT1-12)中, GLUT5为果糖特异性专属转运蛋白。GLUT5也是肿瘤主要表达的三种葡萄糖转运蛋白(GLUT1、GLUT2 和GLUT5) 之一,尤其在乳腺肿瘤细胞中高度表达,而正常乳腺组织中未发现GLUT5。因此,利用GLUT5对果糖的转运特性及在乳腺癌细胞中的高表达性,有可能开发选择性的乳腺癌靶向治疗药物。此外已有文献报道表明,由于表面GLUT5受体的过度表达,乳腺癌细胞对果糖修饰聚合物的摄取有一定程度的提高。而且,通过对果糖的不同位置进行修饰,研究发现在果糖的C1位进行偶联与GLUT5受体具有很好地亲和力。因此,通过介导的具有果糖(Fru)识别作用的乳腺癌靶向治

疗方法将会是一种很有前景的研究方向。

### 发明内容

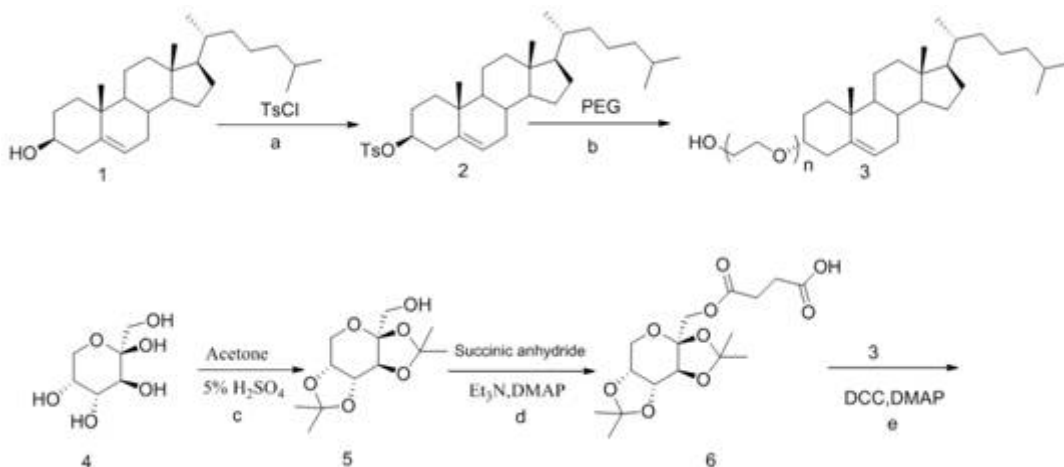
[0004] 基于上述研究及假设,本研究的目的是合成一种果糖修饰的脂质材料,并将其用于脂质体的制备。利用乳腺癌细胞GLUT5的高表达性和对果糖较强的亲和力,使经过果糖修饰的脂质材料具有乳腺癌靶向性。将此材料应用于具体的制剂,可以使其包封的药物定向作用于乳腺癌肿瘤组织,提高药物浓度,发挥更加有效的乳腺癌治疗作用。同时通过其靶向功能,降低药物在外周器官的分布,减少药物的毒副作用。因此,我们设计了如通式(I)所示的一类脂质材料,该脂质材料的胆固醇部分嵌入到脂质体磷脂双分子层中,具有乳腺癌靶向的果糖部分则暴露在脂质体的表面,从而使脂质体具有乳腺癌靶向功能。这种脂质材料可用于脂质体、纳米粒、胶束等在内的不同剂型,同时具有长循环、乳腺癌靶向、以及降低毒性的功能,将这种脂质材料应用于药物传递系统,将具有很大的应用前景,以这种脂质材料所制成的载紫杉醇脂质体具有明显的乳腺癌靶向功能。

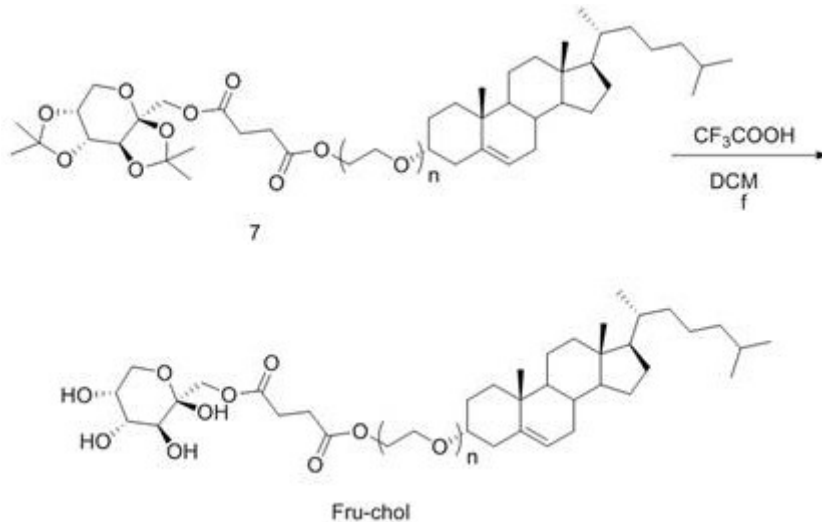
[0005] 本发明提供通式(I)所示结构的化合物或其药学上可接受的盐或水合物:



其中,所使用的连接链中的酸酐为丁二酸酐、丙二酸酐和戊二酸酐中的一种,聚乙二醇为三甘醇或PEG200、400、600、800、1000、1500、2000、4000中的一种。

[0006] 通式(I)所示结构的具体制备方法如下所示:





本发明所述的新型脂质材料可以作为配体用于制备乳腺癌靶向的脂质体。

[0007] 所述脂质体其特征在于包含磷脂、胆固醇、Fru-Chol及活性剂。

[0008] 所述脂质体主要由膜材与活性剂组成，其膜材为磷脂双分子层，由卵磷脂，胆固醇以及脂质体配体组成，其中，各组分配比关系如下：胆固醇和磷脂的摩尔比为1~2:1~10，脂质体配体的摩尔含量为胆固醇和磷脂的总摩尔数的1~25%。本发明所述的活性剂优选治疗剂或显影剂，如本领域所知的，活性剂的剂量可以依据包含在当体中的活性剂来调整，其中按重量百分数计算，活性剂占总脂质的0.1%~50%。

[0009] 所述的脂质体中的磷脂包括所有类型的磷脂，包括但不限于大豆磷脂、卵磷脂、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酰甘油、二磷脂酰甘油；优选卵磷脂。

[0010] 所述的脂质体中的活性剂可以是抗肿瘤药物，包括但不限于烷化剂、抗代谢物、抗肿瘤抗生素、蒽环类抗生素、植物生物碱、紫杉醇衍生物、拓朴异构酶抑制剂、单克隆抗体、光敏剂、激酶抑制剂和含铂化合物。抗癫痫药物，包括但不限于巴比妥类、乙丙酰脲类、双链脂肪酸类、琥珀酰亚胺类、苯甲二氮卓类、亚氨基胍类、磺胺类、恶唑烷双酮类、胡椒碱类、皮质激素类、免疫球蛋白等。抗抑郁药物，包括但不限于去甲肾上腺素再摄取抑制剂、单胺氧化酶抑制剂、5-羟色胺再摄取抑制剂。

[0011] 本发明所述的乳腺癌靶向脂质体的制备方法，包括以下步骤：

(一)称取磷脂、胆固醇、紫杉醇于茄型烧瓶中，用适量溶剂溶解，加入相应比例的脂质体配体(空白脂质体不加)，于20-40 °C恒温水浴旋转蒸发除去有机溶剂；

(二)再将茄型瓶置于真空干燥器中真空干燥过夜除去残余溶剂；

(三)向茄型瓶中加入磷酸盐缓冲液或硫酸铵溶液等水化液，用20 °C恒温空气浴摇床水化约0.5-2小时后，冰水浴探头超声，用挤压过膜或超声等方法将脂质体粒径控制在110nm左右。

[0012] 优选的步骤(一)中的紫杉醇:脂质材料比为1:30。

[0013] 优选的步骤(二)中的溶剂为氯仿，脂质摩尔比1:2(胆固醇:大豆磷脂)。

[0014] 优选的步骤(三)中的水化液为pH 7.4的0.01M磷酸盐缓冲液(PBS)。

[0015] 本发明通过以下技术方案实现上述目的：

具体实施方式

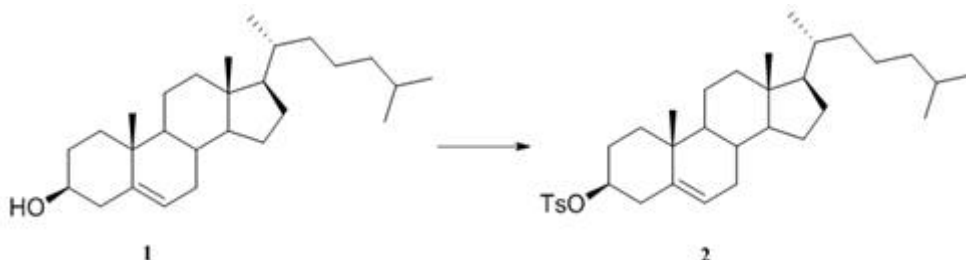
以下实施例旨在说明本发明而不是对本发明的进一步限定。下面参照实施例进一步详

细阐述本发明,但本发明并不限于这些实施例以及使用的制备方法。而且,本领域技术人员根据本发明的描述可以对本发明进行等同替换、组合、改良或修饰,但这些都包括在本发明的范围内。

[0016] 所述的新型脂质材料具体由以下步骤制备:

#### 实施例1

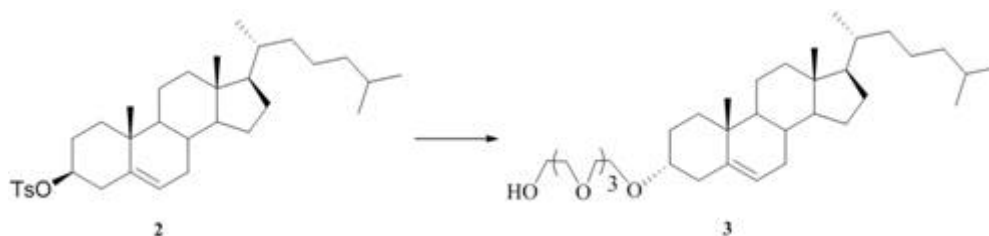
##### 化合物2的制备



将胆固醇1 (32.00 g, 82.76 mmol)溶于100 mL无水吡啶中,于0℃下滴加对甲苯磺酰氯(TsCl, 23.67 g, 124.14 mmol)的吡啶溶液(50 mL)。滴加完毕后,将反应液移至50℃,继续搅拌5小时,减压除去溶剂吡啶,向残留物中加入乙酸乙酯(300 mL),并依次用稀盐酸(1 mol/L, 100 mL × 2)、饱和氯化钠水溶液(100 mL × 2)洗涤,无水硫酸钠干燥,减压除去溶剂得白色固体42.35 g,收率94.62%,产品无需纯化即可直接进行下一步反应。Mp: 129-132 °C. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm) δ: 0.66 (s, 3H), 0.85 (d, 6H, *J* = 6.4 Hz), 0.91 (d, 3H, *J* = 6.4 Hz), 0.99 (s, 3H), 0.66-2.38 (remaining cholesterol protons), 3.16-3.21 (m, 1H), 3.59-3.75 (m, 12H), 5.34 (s, 1H)。

[0017] 实施例2

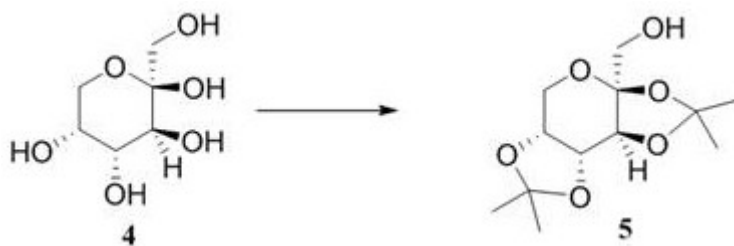
##### 化合物3的制备



将化合物2 (22.48 g, 41.56 mmol)溶于130 mL二氧六环中,加入二缩三乙二醇(27.86 mL, 207.82 mmol),升温至回流反应6小时,减压除去溶剂,残留物用二氯甲烷(200 mL)溶解后,用饱和氯化钠水溶液(100 mL × 2)洗涤,有机层用无水硫酸钠干燥,减压除去溶剂,残留物经硅胶柱层析(石油醚/丙酮=8/1)纯化得到无色油状物12.27 g,收率56.92%。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm) δ: 0.66 (s, 3H), 0.85 (d, 6H, *J* = 6.4 Hz), 0.91 (d, 3H, *J* = 6.4 Hz), 0.99 (s, 3H), 0.67-2.38 (remaining cholesterol protons), 3.16-3.21 (m, 1H), 3.59-3.75 (m, 12H), 5.32 (m, 1H)。

[0018] 实施例3

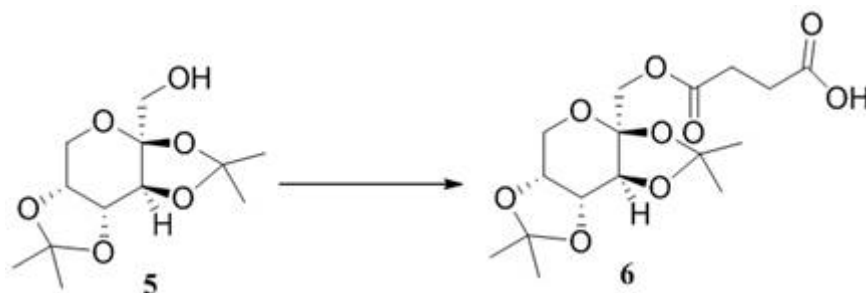
##### 化合物5的制备



氩气保护下,将无水果糖10(2g, 11.11mmol)溶解于0℃的39ml无水丙酮和1.95ml硫酸混合溶液中,加毕,将反应液移至室温反应2h.TLC监测反应完全,于冰浴下向反应液中缓慢加入55ml的0℃氢氧化钠(6.1g, 152.5mmol)水溶液。抽滤,减压蒸除滤液中溶剂,将残留物溶于50ml二氯甲烷,依次用水(100ml×2)、饱和食盐水(100ml×2)洗涤反应液,无水硫酸钠干燥,浓缩,石油醚重结晶得白色固体2.1g,收率72.7%。熔点:94-96℃。

#### [0019] 实施例4

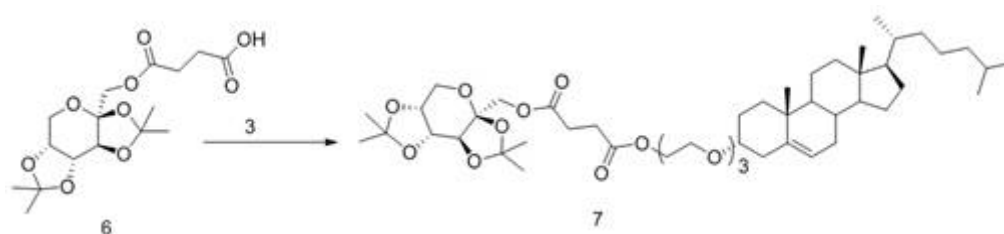
##### 化合物6的制备



将化合物4(3.00 g, 4.74 mmol)溶于20 mL甲苯中,加入对甲苯磺酸(0.13 g, 0.95 mmol),升温至110℃回流搅拌反应8小时。冷却至室温,反应液用饱和氯化钠水溶液洗涤(30 mL × 2),甲苯层用无水硫酸钠干燥后,浓缩,残留物经硅胶柱层析(二氯甲烷/甲醇=10/1)纯化得到浅黄色油状物2.45 g,收率89.65%。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm) δ: 0.67 (s, 3H), 0.86 (d, 6H, *J* = 6.4 Hz), 0.92 (d, 3H, *J* = 6.6 Hz), 0.99 (s, 3H), 0.66-2.39 (remaining cholesterol protons), 3.19-3.23 (m, 1H), 3.62-3.80 (m, 12H), 4.17 (s, 2H), 5.34 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz)。

#### [0020] 实施例5

##### 化合物7的制备

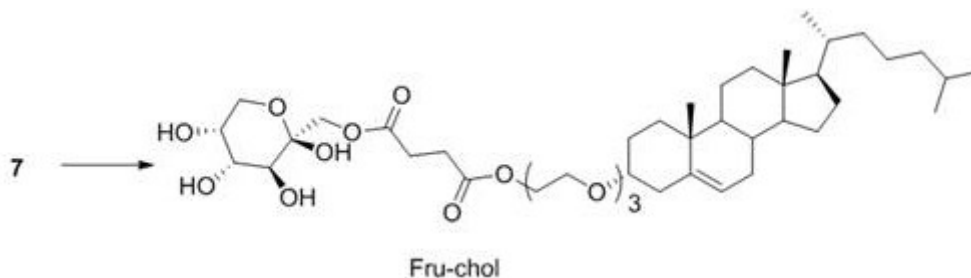


将化合物6(1.042g, 2.892mmol)溶解于30ml二氯甲烷中,于-5℃下加入DCC(795mg, 3.856mmol)、DMAP(47mg, 0.3856mmol),活化30分钟。将化合物3(1.0g, 1.928mmol)用20ml二氯甲烷溶解,滴加入上述活化液中。滴毕移至室温搅拌反应3h.TLC监测反应完全,将反应液旋干,用乙酸乙酯溶解,过滤,滤液经硅胶柱层析得淡黄色粘稠油状物1.284g,收率77%。<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm) δ: 0.68 (s, 3H), 0.87 (d, 6H, *J*=6.4Hz), 0.92 (d, 3H,

$J=6.0\text{Hz}$ ), 1.00 (s, 3H), 1.35 (s, 4H), 1.42 (s, 3H), 1.49 (s, 3H), 1.55 (s, 3H), 0.87–2.38 (remaining cholesterol protons), 2.70 (s, 4H), 3.17–3.21 (m, 1H), 3.65 (d, 8H,  $J=10\text{Hz}$ ), 3.71 (t, 2H,  $J=3.2\text{Hz}$ ), 3.76–3.78 (m, 1H), 3.90–3.92 (m, 1H), 4.06–4.08 (m, 1H), 4.24–4.27 (m, 3H), 4.32 (s, 1H), 4.43–4.45 (m, 1H), 4.61–4.62 (m, 1H), 5.35 (s, 1H). ESI-MS calculated for  $\text{C}_{49}\text{H}_{80}\text{O}_{12}\text{Na}^+$  [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$  883.5542, found 883.5550.

#### [0021] 实施例6

##### 配体Fru-Chol的制备



将化合物7 (3.49g, 4mmol) 加入到40ml  $\text{CF}_3\text{COOH}$ 和 $\text{H}_2\text{O}$  ( $V/V=1:1$ )的混合溶液中, 室温搅拌反应24h, TLC监测反应完全。减压除去溶剂 $\text{CF}_3\text{COOH}$ , 加入饱和 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 中和, EA萃取, 浓缩有机层, 经硅胶柱层析得淡黄色粘稠油状物1.197g, 收率44%。 $^1\text{H-NMR}$  (600MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm)  $\delta$ : 0.67 (s, 3H), 0.86 (d, 6H,  $J=8.0\text{Hz}$ ), 0.91 (d, 3H,  $J=8.0\text{Hz}$ ), 0.99 (s, 3H), 0.85–2.48 (remaining cholesterol protons), 2.69 (s, 4H), 3.15–3.21 (m, 1H), 3.41 (br, 8H), 3.65 (d, 8H,  $J=9.2\text{Hz}$ ), 3.70 (t, 2H,  $J=4\text{Hz}$ ), 4.23–4.25 (m, 3H), 4.36 (br, 2H), 5.34 (d, 1H,  $J=8.0\text{Hz}$ ). ESI-MS calculated for  $\text{C}_{43}\text{H}_{76}\text{NO}_{12}^+$  [ $\text{M}+\text{NH}_4$ ] $^+$  798.5362, found 798.1278.

[0022] 所述的乳腺癌靶向脂质体的具体制备方法:

##### 实施例7

薄膜水化法作为经典的脂质体制备方法, 应用最为广泛, 操作简单, 制备出的脂质体结构典型。因此, 本发明选择采用薄膜水化法来制备紫杉醇脂质体。

[0023] 根据对载紫杉醇脂质体的制备摸索, 最终我们选取最优化处方: 脂质摩尔比1:2 (胆固醇:大豆磷脂), 水化液为pH7.4的磷酸盐缓冲液(PBS) (0.01M), 紫杉醇:脂质材料质量比为1:30。我们用上述处方分别制备了空白载紫杉醇脂质体PTX-Lip以及Fru-Chol修饰的载紫杉醇脂质体PTX-Fru-Lip。

[0024] 准确称取处方脂质材料(按大豆磷脂:胆固醇=2:1的摩尔比)、紫杉醇(脂质材料比为1:30)于茄型烧瓶中, 用适量氯仿溶解, 加入相应比例的脂质体配体(空白脂质体不加),  $37\pm 1^\circ\text{C}$ 恒温水浴旋转蒸发除去氯仿后得均匀薄膜, 真空干燥过夜除去残余溶剂。加入pH 7.4 (0.01M)的PBS缓冲液,  $20^\circ\text{C}$ 恒温空气浴摇床, 180r/min条件下水化0.5h后, 冰水浴探头超声(80W, 5S, 5S)3分钟, 即得略带乳光的脂质体溶液。随后对制得的载紫杉醇脂质体进行了体外表征。

#### [0025] 实施例8

##### 脂质体的包封率及粒径与电位的测定

采用冷冻离心的方法分离游离紫杉醇与载紫杉醇脂质体。按实施例8制备空白载紫杉



醇脂质体PTX-Lip以及Fru-Chol修饰的载紫杉醇脂质体PTX-Fru-Lip,各取两份(0.5 ml/份),一份脂质体溶液在4℃条件下,10000 rpm离心20分钟,上清液即为不含游离紫杉醇的脂质体。分别取40μl离心后的载PTX脂质体和离心前的脂质体样品,加入960μl甲醇,涡旋10分钟后,再次10000 rpm离心10分钟,分别取20μl上清液注入高效液相色谱仪进行分析,HPLC色谱条件为:

色谱柱:SinoChrom ODS-C18柱(200×4.6 mm, 5μm);

流动相:甲醇-水(67:33);

柱温:35℃;

流速:1.0 ml/min;

进样量:20μl;

检测波长:227 nm。

[0026] 并计算载紫杉醇脂质体的包封率(encapsulation efficiency, EE%): $EE\% = A_{\text{离心后}}/A_{\text{离心前}} \times 100\%$ ,其中, $A_{\text{离心后}}$ 是指离心后脂质体样品的峰面积, $A_{\text{离心前}}$ 是指离心前脂质体样品的峰面积。各组脂质体的包封率见表1。此外,还对此两种载紫杉醇脂质体进行了粒径和Zeta电位的测定(表1)。结果表明在紫杉醇脂质体的包封率均达到86%以上,包封率良好;两组载紫杉醇脂质体的粒径均在110 nm以下,分散性指数(polymer dispersity index, PDI)均小于0.2,脂质体呈现均匀分布;Zeta电位呈负电性。

[0027] 表1 两种载紫杉醇脂质体的包封率、粒径以及Zeta电位(n=3)

Liposomes	Size(nm)	PDI	EE (%)	Zeta potential (mV)
PTX-Lip	108.5±4.7	0.143±0.024	86.65±1.53	-5.07±0.14
PTX-Fru-Lip	108.8±2.2	0.149±0.017	91.47±1.11	-4.54±0.17

#### 实施例10

##### 血清稳定性评价

通过浊度法测定不同配体修饰的紫杉醇脂质体在50%胎牛血清中的透光率。

[0028] 取各组载紫杉醇脂质体分别与等体积的胎牛血清混合均匀,于恒温摇床中缓慢振摇(37℃, 50 rpm),于预定的时间点(0 h、1 h、2 h、4 h、8 h、12 h、24 h、48 h),通过酶标仪测定所有样品在750 nm下的吸光度值,并换算成透光率。将脂质体与胎牛血清混合后立即测定的透光率为0 h时的结果,与缓冲液PBS混合后立即测定的透光率作为阴性对照,结果见图1。结果表明,所有脂质体在和胎牛血清共孵育48小时后,其透光率仍大于90%,无明显的聚集现象,表明所制备的脂质体具有较好的血清稳定性,为后期体外、体内等实验奠定了基础。

[0029] 实施例11

##### 体外释药评价

通过透析法对不同配体修饰的脂质体的体外药物释放进行考察。取各组载紫杉醇脂质体以及等量的游离药物紫杉醇分别置于8000-12000 Da的透析袋中,密封后置于40 ml透析介质(1%Tween 80的PBS溶液,v/v)中,于恒温摇床中缓慢振摇(37℃, 50 rpm),于预定的时间点(0 h、0.5 h、1 h、2 h、4 h、8 h、12 h、24 h、48 h)取样0.1 ml,并加入等体积的释放介质,取出的样品按上述HPLC色谱条件进行分析。并计算各个时间点每个样品的释放度,绘制

其释放行为曲线,结果见图2。结果表明,游离紫杉醇的释放较为迅速,在孵育12小时内释放了90%,而其他各组载PTX的脂质体释放较为缓慢,48小时内释放60%左右,均无明显突释的现象,而且各组脂质体之间的释放特征无明显差异,表明脂质体可以明显改善药物的释放行为,起到缓释作用。

#### [0030] 实施例12

##### 溶血性评价

取昆明小鼠(四川大学实验动物中心),经眼眶取血,收集血液置于涂有肝素钠的离心管中,在4℃下,10000 rpm离心10分钟,除去上清液,并用生理盐水清洗红细胞三遍,最后将红细胞重悬为2%(w/v)的溶液。按将制备的两种载紫杉醇脂质体,用生理盐水将其逐步稀释成脂质浓度600 nmol/ml、400 nmol/ml、200 nmol/ml、100 nmol/ml、50 nmol/ml、25 nmol/ml和5 nmol/ml。将上述不同浓度的脂质体分别与等体积的红细胞悬液混合后,于37℃在恒温摇床中孵育1小时,10000 rpm离心10分钟,取上清液在 $\lambda = 540 \text{ nm}$ 处检测血红蛋白的释放。将1%曲拉通(Triton X-100)与红细胞共孵育的结果作为阳性对照,将其溶血率设置为100%,以PBS与红细胞共同孵育的结果作为阴性对照,将其溶血率设置为0%。各组脂质体的溶血率计算公式为:溶血率(hemolysis rate)% =  $(A_{\text{Sample}} - A_{\text{Negative}}) / (A_{\text{Positive}} - A_{\text{Negative}}) \times 100\%$ 。结果见图3。结果表明,在设定的脂质浓度范围内,不同配体修饰的脂质体的溶血率均<10%,并没有引起明显的血红蛋白的释放,有较好的生物安全性。

#### [0031] 实施例13

##### CFPE标记的脂质体的制备

按上述实施例7中脂质体的制备方法,制备CFPE标记的脂质体。称取处方量的大豆磷脂、胆固醇和配体Fru-cho1(未修饰的脂质体不加配体)分别溶于氯仿-甲醇(v/v=2/1)的混合溶剂中,再向其中加入一定量的荧光素标记的磷脂CFPE,使最终CFPE的浓度约为20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,减压除去溶剂以形成均匀的脂质膜,继续在真空下放置4小时。加入pH 7.4的磷酸盐缓冲液(PBS),于20℃恒温摇床中180 rpm水化30分钟,再用超声波细胞粉碎机超声(80W, 5S, 5S)3分钟,即得CFPE标记的脂质体CFPE-Lip、CFPE-Fru-Lip。

#### [0032] 实施例14

##### 细胞摄取实验1

为了从细胞水平验证果糖修饰的脂质体的进入细胞的能力,分别将人源的三阴性乳腺癌细胞MDA-ME-231和鼠源的三阴性乳腺癌细胞4T1以 $1 \times 10^5$ 个细胞/孔的浓度接种于12孔板内,在37℃,5% CO<sub>2</sub>的细胞培养箱内孵育24小时,弃去培养基,将CFPE标记的不同配体修饰的脂质体用培养基稀释后分别加入到孔板内,使最终CFPE的浓度为2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,脂质浓度为0.3  $\mu\text{mol}/\text{ml}$ ,在37℃的培养箱中继续孵育2小时,弃去培养液并用PBS清洗两次,消化收集细胞并再次用PBS清洗三次,重悬后通过流式细胞仪测定细胞的荧光强度。摄取结果如图4所示。由摄取结果可见,果糖修饰的脂质体配体能一定程度上增加三阴性乳腺癌细胞MDA-ME-231和4T1对脂质体的摄取,与无配体修饰的脂质体Lip相比,分别达到了1.422倍和1.281倍。

#### [0033] 细胞摄取实验2

为了更直观地观察到MDA-ME-231和4T1细胞对CFPE标记的脂质体的摄取情况,我们用激光共聚焦显微镜对细胞进行了定性研究,具体操作如下:将MDA-ME-231和4T1细胞分别

以 $1 \times 10^6$ 的浓度接种于置有盖玻片的6孔板内,在 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 的细胞培养箱内孵育24小时,弃去培养基,将CFPE标记的不同配体修饰的脂质体用培养基稀释后分别加入到孔板内,使最终CFPE的浓度为 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,脂质浓度为 $0.3 \mu\text{mol}/\text{ml}$ ,在 $37^\circ\text{C}$ 的培养箱中继续孵育2小时,弃去培养液并用PBS清洗两次,4%多聚甲醛固定30分钟,弃去固定液,PBS清洗3次,用 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  DAPI染核5分钟,弃去染料,PBS清洗三次后,用甘油封片。将切片置于激光共聚焦显微镜下拍摄,结果如图5。结果表明,果糖修饰的脂质体配体能一定程度上增加三阴性乳腺癌细胞MDA-MB-231和4T1对脂质体的摄取。

#### [0034] 体内靶向性评价

体外靶向性评价之后,我们进一步在荷4T1乳腺癌小鼠模型考察了Fru-Lip的肿瘤靶向能力。

#### [0035] 实施例16

##### 载近红外染料DiD脂质体的制备

按实施例6中脂质体的制备方法,制备载近红外染料DiD脂质体。称取处方量的大豆磷脂、胆固醇和配体Fru-Chol(空白脂质体不加)分别溶于氯仿-甲醇( $v/v=2/1$ )的混合溶剂中,再以脂质:DiD=30:1的比例,向其中加入一定量的近红外染料DiD,使最终DiD的浓度约为 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,减压除去溶剂以形成均匀的脂质膜。加入 $\text{pH}7.4$ 的磷酸盐缓冲液(PBS),于 $20^\circ\text{C}$ 恒温摇床中180 rpm水化30分钟,再用超声波细胞粉碎机超声(80W, 5S, 5S)3分钟,即得载DiD的脂质体溶液DiD-Lip和DiD-Fru-Lip。

#### [0036] 实施例17

##### 活体成像

荷4T1乳腺癌小鼠模型建立14天后,按DiD  $500 \mu\text{g}/\text{kg}$ 的剂量经尾静脉注射,向模型小鼠给予载DiD的脂质体DiD-Lip、DiD-Fru-Lip在给药后2 h、6 h、12 h、16h和24 h将各组小鼠置于小动物活体成像仪中观察,随后立即将各时间点的小鼠心脏灌流处死后,将心、肝、脾、肺、肾及肿瘤取出,同样置于活体成像仪中观察,并对离体肿瘤图片用软件进行定量处理。结果如图6。

[0037] 结果表明(图6),在各个时间点,Fru-chol修饰的脂质体均表现出了较强的肿瘤靶向能力,肿瘤部位在12h达到了最高药物浓度。给药后2 h、6 h、12 h、16h和24 h, Fru-chol修饰的脂质体在肿瘤内的药物浓度分别是未修饰的脂质体的2.04、1.22、1.68、1.78、1.49倍。在内脏中主要富集于代谢器官肝脏,并在6h达到峰浓度,24h则大部分已被消除,其他脏器富集较少,尤其心和肾几乎没有富集。这些结果表明Fru-Chol修饰的脂质体相比于未修饰的脂质体能显著提高脂质体靶向乳腺癌能力。

#### [0038]

### 附图说明

[0039] 图1:不同配体修饰的载紫杉醇脂质体在50%血清中孵育后透光率的变化( $n=3$ )

图2:不同配体修饰的载紫杉醇脂质体的体外释药行为( $n=3$ )

图3:不同配体修饰的载紫杉醇脂质体的溶血率( $n=3$ )

图4:CFPE标记的脂质体在MDA-MB-231细胞(左)和在4T1细胞的摄取情况( $n=3$ )

图5: CFPE标记的脂质体在MDA-MB-231细胞(左)和在4T1细胞(右)的摄取情况

图6: (A) 荷4T1乳腺癌小鼠注射载DiD的脂质体后各时间点的活体成像图; (B) 离体脏器的活体成像图, 从左至右分别为心、肝、脾、肺和肾; (C) 离体肿瘤的活体成像图; (D) 离体肿瘤的荧光强度定量图。a=DiD-Lip, b=DiD-Fru-Lip, n=3。

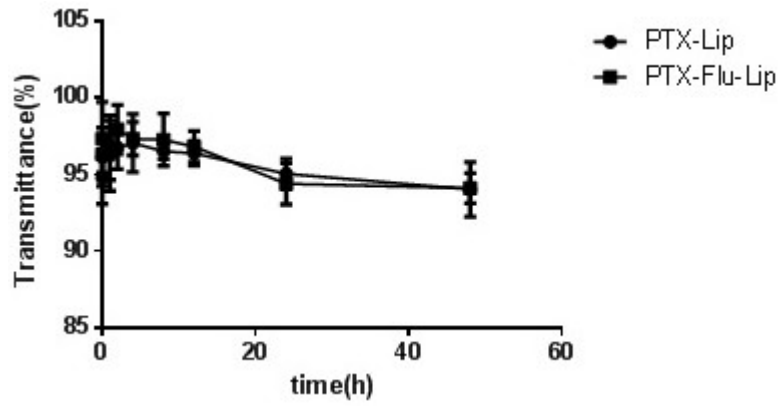


图1

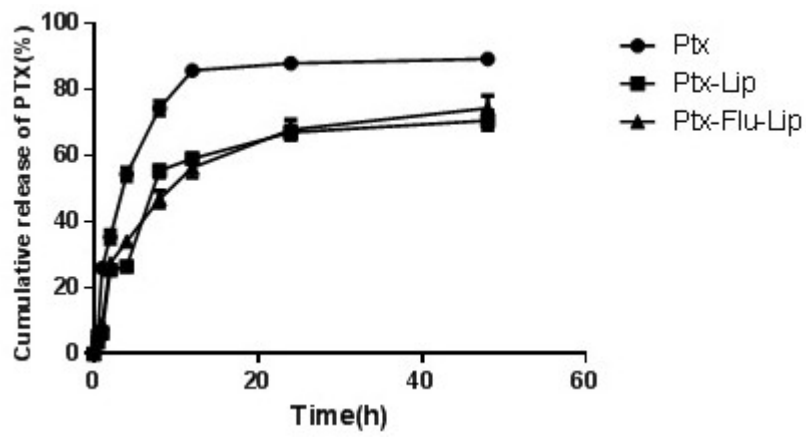


图2

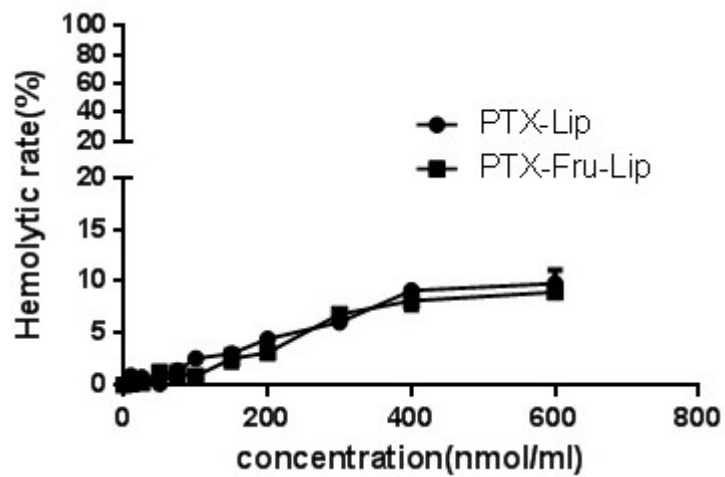


图3

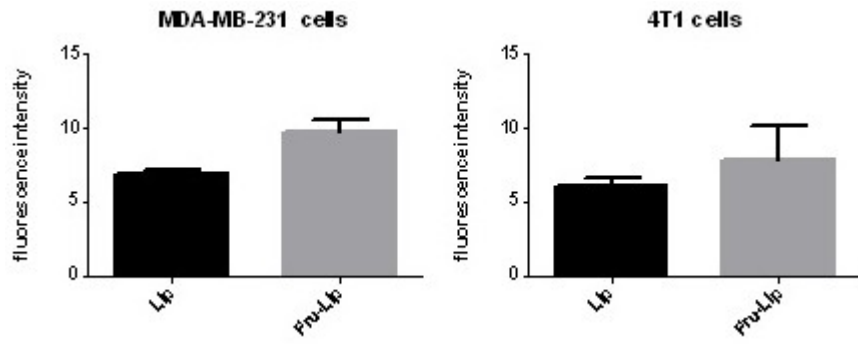


图4

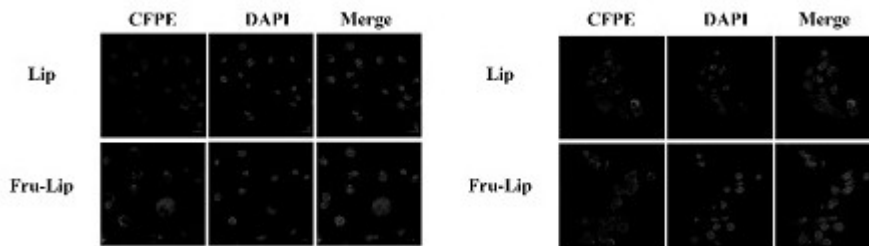


图5

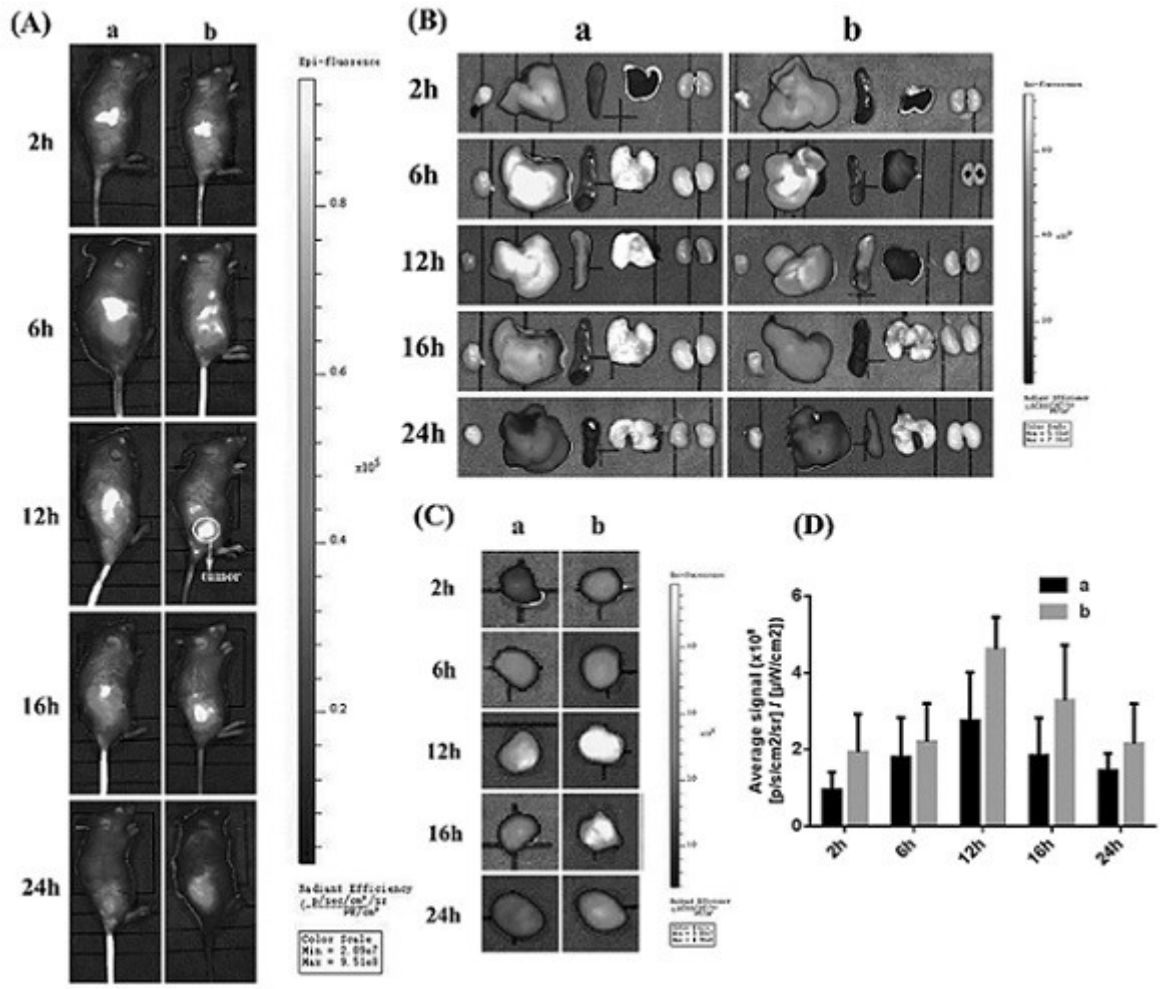


图6