



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115487148 B

(45) 授权公告日 2024.07.26

(21) 申请号 202110678285.4

A61P 35/00 (2006.01)

(22) 申请日 2021.06.18

A61K 31/136 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 115487148 A

(56) 对比文件

CN 111228219 A, 2020.06.05

(43) 申请公布日 2022.12.20

Zhu等.Multifunctional ginsenoside

(73) 专利权人 厦门本素药业有限公司

地址 361027 福建省厦门市海沧区翁角西路2062号厦门生物医药产业园B7号楼

Rg3-based liposomes for glioma targeting therapy.《Journal of Controlled

Release.2020,第330卷第641页摘要,第642页第2.2节第1段,第652和655页第4节Conclusion部分.

(72) 发明人 李翀 王建新 王丹 陈颖江

詹华杏

Zhu等.Multifunctional ginsenoside

Rg3-based liposomes for glioma targeting therapy.《Journal of Controlled

Release.2020,第330卷第641页摘要,第642页第2.2节第1段,第652和655页第4节Conclusion部分.

(74) 专利代理机构 上海弼兴律师事务所 31283

专利代理师 王卫彬 陈卓

审查员 耿胜燕

(51) Int.Cl.

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 31/704 (2006.01)

A61K 47/24 (2006.01)

权利要求书4页 说明书29页

(54) 发明名称

一种人参皂苷米托蒽醌脂质体、其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种人参皂苷米托蒽醌脂质体、其制备方法和应用。本发明提供了一种人参皂苷米托蒽醌脂质体,其包括如下质量份数的组分:5-15份磷脂、0.1-4份人参皂苷、1份米托蒽醌盐;所述的人参皂苷米托蒽醌脂质体中不包括胆固醇。本发明的人参皂苷米托蒽醌脂质体对肿瘤细胞的具有靶向作用和增效减毒。

1. 一种人参皂苷米托蒽醌脂质体的制备方法,其特征在于,其包括如下步骤;

步骤1、将磷脂溶解于有机溶剂中得混合物A1,然后将混合物A1与盐溶液水化,得到脂质体溶液A1;

步骤2、其为方案1或方案2;

方案1:高压均质法,包括如下步骤:

将步骤1得到的脂质体溶液A1进行高压均质,控制粒径D90在100nm以下,得到脂质体溶液A2a;

方案2:挤出法,包括如下步骤:

将步骤1得到的所述的脂质体溶液A1,分别依次通过各孔径挤出板挤出,控制粒径D90在100nm以下,得到脂质体溶液A2b;

步骤3、将步骤2中得到的脂质体溶液A2a或A2b,置于透析袋中,以等渗溶液作为透析介质进行透析;得到脂质体溶液A3;

步骤4、将步骤3中得到的脂质体溶液A3与盐酸米托蒽醌水溶液混合,得脂质体溶液A4;

步骤5、将步骤4得到的脂质体溶液A4与人参皂苷溶液中混合,置于透析袋中,以上述步骤3相同的等渗溶液作为透析介质进行透析;得人参皂苷米托蒽醌脂质体溶液A5;

所述的盐酸米托蒽醌与所述的磷脂的质量比为1:10;

所述的盐酸米托蒽醌与所述的人参皂苷的质量比为1:(0.1~4);

所述的人参皂苷选自20(S)-人参皂苷Rg3、人参皂苷伪Rg3、20(S)-人参皂苷Rh2、人参皂苷Rg5、人参皂苷Rk1和人参皂苷Rp1中的一种或多种;

所述的磷脂选自氢化磷脂、蛋黄卵磷脂、大豆磷脂和脑磷脂中的一种或多种;

所述的盐溶液为硫酸铵、蔗糖八硫酸酯三乙胺、甲基磺酸铵、甲基磺酸三乙胺、乙二磺酸铵、丙二磺酸铵、乙二磺酸三乙胺或二磺酸三乙胺水溶液;

所述的硫酸铵水溶液的浓度为0.325M-0.65M;

所述的蔗糖八硫酸酯三乙胺水溶液的浓度为0.1M-0.3M;

所述的甲基磺酸铵水溶液的浓度为0.65M-0.975M;

所述的甲基磺酸三乙胺水溶液的浓度为0.65M-0.975M;

所述的乙二磺酸铵水溶液的浓度为0.325M-0.65M;

所述的丙二磺酸铵水溶液的浓度为0.325M-0.65M;

所述的乙二磺酸三乙胺水溶液的浓度为0.325M-0.65M;

所述的丙二磺酸三乙胺水溶液的浓度为0.325M-0.65M;

所述的步骤3中,所述的等渗溶液为5%葡萄糖或10%蔗糖水溶液;所述的步骤4中,所述的盐酸米托蒽醌水溶液的浓度为5~15mg/mL。

2. 如权利要求1所述的人参皂苷米托蒽醌脂质体的制备方法,其特征在于,所述的硫酸铵水溶液的浓度为0.325M或0.65M;

所述的蔗糖八硫酸酯三乙胺水溶液的浓度为0.1M、0.2M或0.3M;

所述的甲基磺酸铵水溶液的浓度为0.65M或0.975M;

所述的甲基磺酸三乙胺水溶液的浓度为0.65M或0.975M;

所述的乙二磺酸铵水溶液的浓度为0.325M或0.65M;

所述的丙二磺酸铵水溶液的浓度为0.325M或0.65M;

所述的乙二磺酸三乙胺水溶液的浓度为0.325M或0.65M;

所述的丙二磺酸三乙胺水溶液的浓度为0.325M或0.65M。

3. 如权利要求1所述的人参皂苷米托蒽醌脂质体的制备方法,其特征在于,所述的人参皂苷米托蒽醌脂质体的制备方法满足如下一个或多个条件:

(1) 所述的磷脂为氢化磷脂或蛋黄卵磷脂;

(2) 所述的人参皂苷为20(S)-人参皂苷Rg3和/或20(S)-人参皂苷Rh2;

(3) 所述的盐酸米托蒽醌与所述的人参皂苷的质量比为1:1或1:1.5;

(4) 所述人参皂苷的HPLC纯度 $\geq 99\%$ ;

(5) 所述的盐溶液为硫酸铵水溶液;

(6) 所述人参皂苷米托蒽醌脂质体的制备方法还包括以下步骤中的一步或多步:

步骤6、将步骤5得到的所述的脂质体溶液A5和PEG-DSPE生理等渗溶液混合,得到脂质体溶液A6;

步骤7、将步骤5得到的脂质体溶液A5或步骤6得到的脂质体溶液A6除菌过滤、灌装。

4. 如权利要求3所述的人参皂苷米托蒽醌脂质体的制备方法,其特征在于,所述的人参皂苷米托蒽醌脂质体的制备方法满足如下一个或多个条件:

(1) 所述的步骤1中,所述的有机溶剂为乙醇;

(2) 所述的步骤1中,所述的磷脂与所述的有机溶剂的质量体积比为1g/1~10mL;

(3) 所述的步骤1中,为将所述的磷脂加热溶解于有机溶剂中得到所述的混合物A1;

(4) 所述的步骤1中,所述的水化的温度为55-65°C;

(5) 所述的步骤1中,所述的水化为在旋蒸瓶中进行,转速为40~60rp/min;

(6) 所述的步骤1中,所述的水化的时间与反应规模相关,以使溶液均一即可;

(7) 所述的步骤2的方案1中,所述的高压均质为在均质机中使用0~10°C冷冻水冷切循环;

(8) 所述的步骤2的方案1中,所述的高压均质的压力在800-1400bar之间;

(9) 所述的步骤2的方案1中,所述的高压均质的次数为3-4次;

(10) 所述的步骤2的方案2中,所述挤出的温度为35-45°C;

(11) 所述的步骤2的方案2中,所述挤出板的孔径为800nm,400nm,200nm或100nm;

(12) 所述的步骤2的方案2中,所述挤出的压力为600~800 psi;

(13) 所述的步骤2的方案2中,所述挤出的次数为4-10次;

(14) 所述的步骤2的方案2中,所述的溶液A1,分别依次通过孔径分别为800nm、400nm、200nm或100nm的聚碳酸酯膜过滤板;

(15) 所述的步骤3中,所述的透析袋的截留分子量为8000~15000;

(16) 所述的步骤3中,所述的溶液A2a或A2b与所述的等渗溶液的体积比为1:1000;

(17) 所述的步骤3中,所述的透析的温度为0-10°C;

(18) 所述的步骤3中,所述的透析的时间以完全去除所述的溶液A2a或A2b脂质体外水相中的所述的盐溶液;

(19) 所述的步骤3中,为将所述将步骤2中得到的脂质体溶液A2a或A2b,置于透析袋中,以等渗溶液作为透析介质,4°C透析12小时,样品与透析介质体积比为1:1000,透析期间每4小时更换1次透析液,完全去除空白脂质体外水相中的酸根离子,得到由等渗溶液组成的外

水相,由酸根盐溶液为内水相的空白脂质体;

(20)所述的步骤4中,所述的盐酸米托蒽醌水溶液的浓度为5mg/mL、10mg/mL或15mg/mL;

(21)所述的步骤4中,为将所述的步骤3中得到的溶液A3与所述的盐酸米托蒽醌水溶液,按照体积比为1:1混合,并于50-60°C水浴中孵育40分钟,即得人参皂苷米托蒽醌脂质体;具体地,该脂质体内水相为酸根米托蒽醌不溶盐,该脂质体外水相为等渗溶液;

(22)所述的步骤5中,所述的人参皂苷溶液的浓度为5~20mg/mL;

(23)所述的步骤5中,所述的人参皂苷溶液的溶剂同步骤1中的溶剂;

(24)所述的步骤5中,所述的混合为搅拌;

(25)所述的步骤5中,所述的透析袋的截留分子量为8000~15000;

(26)所述的步骤5中,为将所述人参皂苷溶液缓慢加入到所述步骤4中得到的脂质体溶液A4,搅拌,挥发除去大部分乙醇,然后再置于透析袋中,以上述步骤3相同的等渗溶液作为透析介质,4°C透析12小时,样品与透析介质体积比为1:1000,透析期间每4小时更换1次透析液,完全去除乙醇溶剂、无机盐、未包裹的盐酸米托蒽醌和人参皂苷,即得脂质体溶液A5;

(27)所述的步骤6中,所述的PEG-DSPE与所述磷脂的质量比为(0.025~0.15):1;

(28)所述的步骤6中,所述的PEG-DSPE浓度为1-20mg/mL;

(29)所述步骤6中,为准确称取一定量的PEG-DSPE,溶于步骤3相同的等渗溶液中,然后加入到所述步骤5所得到的脂质体溶液A5;

(30)所述的步骤7中,所述的除菌过滤步骤中,采用0.22 $\mu$ m滤膜过滤所述的脂质体;所述的灌装步骤中,灌装于10mL或20mL西林瓶中、压盖和包装;

(31)所述的人参皂苷米托蒽醌脂质体的粒径D90 $\leq$ 150nm,包封率 $\geq$ 80%。

5.如权利要求3所述的人参皂苷米托蒽醌脂质体的制备方法,其特征在于,所述的人参皂苷米托蒽醌脂质体的制备方法满足如下一个或多个条件:

(1)所述的步骤1中,所述的有机溶剂为无水乙醇;

(2)所述的步骤1中,所述的磷脂与所述的有机溶剂的质量体积比为1g/2mL;

(3)所述的步骤1中,为将所述的磷脂加热溶解于有机溶剂中得到所述的混合物A1;所述的加热为水浴加热至55-65°C;

(4)所述的步骤1中,所述的水化的温度为60°C;

(5)所述的步骤1中,所述的水化为在旋蒸瓶中进行,转速为50 rp/min;

(6)所述的步骤1中,所述的水化的时间为2-4小时;

(7)所述的步骤2的方案1中,所述的高压均质为在均质机中使用0~10°C冷冻水冷切循环,确保脂质体溶液的温度在5-10°C;

(8)所述的步骤2的方案1中,所述的高压均质的压力为1200bar;

(9)所述的步骤2的方案1中,所述的高压均质的次数为4次;

(10)所述的步骤2的方案2中,所述挤出的温度为40°C;

(11)所述的步骤2的方案2中,所述挤出的压力为800 psi;

(12)所述的步骤2的方案2中,所述挤出的次数为4次;

(13)所述的步骤3中,所述的透析袋的截留分子量为10000;

(14)所述的步骤3中,所述的透析的温度为4°C;

(15)所述的步骤3中,所述的透析的时间为10-18小时;  
(16)所述的步骤4中,所述的盐酸米托蒽醌水溶液的浓度为10~15mg/mL;  
(17)所述的步骤5中,所述的人参皂苷溶液的浓度为10mg/mL;  
(18)所述的步骤5中,所述的混合为搅拌,所述搅拌时间为30-60分钟;  
(19)所述的步骤5中,所述的透析袋的截留分子量为10000;  
(20)所述的步骤6中,所述的PEG-DSPE与所述磷脂的质量比为0.05:1;  
(21)所述的步骤6中,所述的PEG-DSPE浓度为10mg/mL;(22)当所述的盐溶液为硫酸铵水溶液时,所述的盐溶液的浓度为0.325 M。

6.如权利要求5所述的人参皂苷米托蒽醌脂质体的制备方法,其特征在于,所述的步骤1中,为将所述的磷脂加热溶解于有机溶剂中得到所述的混合物A1;所述的加热为水浴加热至60°C;

和/或,所述的步骤3中,所述的透析的时间为12小时;

和/或,所述的步骤5中,所述的混合为搅拌,所述搅拌时间为45分钟。

7.一种人参皂苷米托蒽醌脂质体,其特征在于,其由权利要求1-6任一项所述的制备方法制得。

8.一种人参皂苷米托蒽醌脂质体组合物,其特征在于,其包含葡萄糖水溶液和如权利要求7所述人参皂苷米托蒽醌脂质体。

9.如权利要求8所述的人参皂苷米托蒽醌脂质体组合物,其特征在于,所述的人参皂苷米托蒽醌脂质体组合物满足如下一个或两个条件:

(1)所述的葡萄糖水溶液为5%葡萄糖水溶液;

(2)所述的人参皂苷米托蒽醌脂质体的包封率 $\geq 80\%$ 。

10.一种物质X在制备治疗和/或预防癌症药物中的应用,其特征在于,所述物质X为如权利要求7所述的人参皂苷米托蒽醌脂质体或如权利要求8所述的人参皂苷米托蒽醌脂质体组合物,

所述的癌症为乳腺癌、结直肠癌、原发性肝癌、胃癌、膀胱癌或脑瘤。

11.如权利要求10所述的物质X在制备治疗和/或预防癌症药物中的应用,其特征在于,所述的应用满足如下一个或多个条件:

(1)所述的人参皂苷米托蒽醌脂质体或所述的人参皂苷米托蒽醌脂质体组合物中的人参皂苷米托蒽醌脂质体的粒径 $D_{90} \leq 150\text{nm}$ ;

(2)所述的人参皂苷米托蒽醌脂质体或所述的人参皂苷米托蒽醌脂质体组合物中的人参皂苷米托蒽醌脂质体的包封率 $\geq 80\%$ ;

(3)所述的人参皂苷米托蒽醌脂质体或所述的人参皂苷米托蒽醌脂质体组合物中的人参皂苷米托蒽醌脂质体中的人参皂苷的纯度 $\geq 99\%$ 。

## 一种人参皂苷米托蒽醌脂质体、其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种人参皂苷米托蒽醌脂质体、其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 脂质体是一种定向载药系统,属于靶向给药系统的一种特殊剂型,它可以将药物包埋在直径为纳米级的微粒中,这种微粒类似于生物膜结构中双分子层微小囊泡,进入人体内主要被网状内皮系统吞噬,并改变被包封药物的体内分布,使药物主要在靶向组织中积蓄,从而提高药物的治疗指数,减少药物的治疗剂量和降低药物的毒性。

[0003] CN201610693884.2、CN201811447245.3和CN201811447243.4等三篇申请专利都公开了以“被动载药“即”薄膜蒸发法”为主制备的一种以人参皂苷为膜材的脂质体在包载紫杉醇等化疗药物之后,其相关脂质体质量稳定、药效显著等技术优势。

[0004] CN200380104235.5和CN200380104175.7等专利公开了一种以磷脂和胆固醇为膜材,以硫酸铵等为梯度的脂质体主动载药制备方法。

[0005] CN201811532448.2,CN201811552395.0等专利公开了一种以磷脂和胆固醇为膜材,以蔗糖八硫酸酯三乙胺为梯度的脂质体主动载药方法。

[0006] CN201811305299.6公开了一种以磷脂和胆固醇为膜材,以甲基磺酸铵、4-羟基苯磺酸铵、甲基磺酸三乙胺、4-羟基苯磺酸三乙胺;乙二磺酸铵、丙二磺酸铵、乙二磺酸三乙胺、丙二磺酸三乙胺等为梯度的脂质体主动载药方法。

[0007] 上述现有技术中,人参皂苷脂质体可采用薄膜蒸发法制备难溶性药物的共载脂质体,但水溶性药物一般采用主动载药法制备,其中,双分子膜由磷脂和胆固醇构成,以硫酸铵、蔗糖八硫酸酯三乙胺等离子型盐溶液作为内水相,以pH梯度等原理载入水溶性药物,将药物包载在脂质体内腔。

[0008] 因此,如何选择一个最佳的复方药物配伍,如何制定最佳的制备工艺,以便生产出一种药效更好、毒性更低,质量和其他指标都能符合药品要求的人参皂苷米托蒽醌脂质体,以便符合药品申报要求,需要大量的研究工作和技术攻关。

### 发明内容

[0009] 本发明所要解决的技术问题是针对现有米托蒽醌脂质体存在的不足,本发明提供一种人参皂苷米托蒽醌脂质体、其制备方法和应用。本发明的米托蒽醌脂质体性质稳定、粒径小、药物包封率高、体内相容性良好、体内释药良好、药效更好、毒性更低;且其具有较好制备工艺,制备条件易于实现,利于产业化;实现了制备工艺与产品性能结合的优化。

[0010] 本发明提供了一种人参皂苷米托蒽醌脂质体(简称“Ginposome-MIT”),其包括如下质量分数的组分:5-15份磷脂、0.1-4份人参皂苷、1份米托蒽醌盐;所述的人参皂苷米托蒽醌脂质体不包含胆固醇。

[0011] 在本发明的某一方案中,所述人参皂苷米托蒽醌脂质体还包括0.1-2份PEG-DSPE(全称为聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺),较佳地,所述PEG-DSPE为PEG2000-DSPE。

[0012] 在本发明的某一方案中,所述的米托蒽醌盐为盐酸米托蒽醌通过pH梯度法与盐溶液进行离子交换得到的米托蒽醌盐(其中米托蒽醌盐中的米托蒽醌与所述的盐溶液中的阴离子形成所述的米托蒽醌盐);所述的盐溶液为硫酸盐水溶液、磷酸盐水溶液或蔗糖八硫酸酯盐水溶液;较佳地,所述的盐溶液为硫酸铵水溶液、蔗糖八硫酸酯三乙胺水溶液、甲基磺酸铵水溶液、甲基磺酸三乙胺水溶液、乙二磺酸铵水溶液、丙二磺酸铵水溶液、乙二磺酸三乙胺水溶液或丙二磺酸三乙胺水溶液;更佳地,所述的盐溶液为硫酸铵水溶液、蔗糖八硫酸酯三乙胺水溶液、甲基磺酸铵水溶液或乙二磺酸三乙胺水溶液;例如硫酸铵水溶液。

[0013] 在本发明的某一方案中,所述的米托蒽醌盐为硫酸米托蒽醌、蔗糖八硫酸米托蒽醌、甲基磺酸米托蒽醌、米托蒽醌甲基磺酸、米托蒽醌乙二磺酸、米托蒽醌丙二磺酸、米托蒽醌乙二磺酸或米托蒽醌丙二磺酸;较佳地,所述的米托蒽醌盐为硫酸米托蒽醌、蔗糖八硫酸酯米托蒽醌或米托蒽醌甲基磺酸盐;例如硫酸米托蒽醌。

[0014] 在本发明的某一方案中,所述的盐酸米托蒽醌为盐酸米托蒽醌水溶液,较佳地,所述的盐酸米托蒽醌水溶液的浓度为10mg/mL。

[0015] 在本发明的某一方案中,所述的人参皂苷米托蒽醌脂质体中,所述的人参皂苷与所述的磷脂形成磷脂膜,较佳地,所述的磷脂膜还包括PEG-DSPE。

[0016] 在本发明的某一方案中,所述的磷脂膜的内侧为内水相,所述的磷脂膜的外侧为外水相,所述的米托蒽醌盐被包封于所述的内水相中;所述的米托蒽醌盐为米托蒽醌盐不溶盐。

[0017] 在本发明的某一方案中,所述的内水相为所述盐溶液,所述的外水相为生理等渗溶液;例如生理等渗溶液为5%葡萄糖水溶液或10%蔗糖水溶液。

[0018] 在本发明的某一方案中,所述的盐溶液的浓度为0.05M-0.975M;例如0.05M、0.1M、0.2M、0.3M、0.325M、0.65M、0.975M或0.16M。

[0019] 在本发明的某一方案中,当所述的盐溶液为蔗糖八硫酸酯三乙胺水溶液时,所述的盐溶液的浓度为0.05M-0.3M,例如0.1M、0.2M或0.3M。

[0020] 在本发明的某一方案中,当所述的盐溶液为乙二磺酸三乙胺水溶液时,所述的盐溶液的浓度为0.16M-0.325M。

[0021] 在本发明的某一方案中,当所述的盐溶液为甲基磺酸铵水溶液时,所述的盐溶液的浓度为0.325M-0.975M。

[0022] 在本发明的某一方案中,当所述的盐溶液为硫酸铵水溶液时,所述的盐溶液的浓度为0.16M-0.325M,例如0.325。

[0023] 在本发明的某一方案中,所述的磷脂选自氢化磷脂、蛋黄卵磷脂、大豆磷脂和脑磷脂中的一种或多种;较佳地,所述的磷脂为氢化磷脂或蛋黄卵磷脂。

[0024] 在本发明的某一方案中,所述的盐酸米托蒽醌与所述的磷脂的质量比为1:(5~15);例如,所述的盐酸米托蒽醌与氢化磷脂的质量比为1:10。

[0025] 在本发明的某一方案中,所述的人参皂苷选自20(S)-人参皂苷Rg3、人参皂苷伪Rg3、20(S)-人参皂苷Rh2、人参皂苷Rg5、人参皂苷Rk1和人参皂苷Rp1中的一种或多种,较佳地,所述的人参皂苷为20(S)-人参皂苷Rg3和/或20(S)-人参皂苷Rh2。

[0026] 在本发明的某一方案中,所述的米托蒽醌盐与所述的人参皂苷的质量比为1:(0.1~4);例如所述的米托蒽醌盐与所述的人参皂苷的质量比为1:1或1:1.5。

- [0027] 在本发明的某一方案中,所述人参皂苷的HPLC纯度 $\geq 99\%$ 。
- [0028] 在本发明的某一方案中,所述的磷脂的质量分数为10份。
- [0029] 在本发明的某一方案中,所述的PEG-DSPE的质量分数为0.5份。
- [0030] 在本发明的某一方案中,所述的人参皂苷的质量分数为1份。
- [0031] 在本发明的某一方案中,所述的米托蒽醌盐的质量分数为1份。
- [0032] 在本发明的某一方案中,所述的人参皂苷米托蒽醌脂质体粒径 $D_{90} \leq 150\text{nm}$ 。
- [0033] 在本发明的某一方案中,所述的人参皂苷米托蒽醌脂质体为如下质量分数的组分:10份磷脂、0.5份PEG-DSPE、1份人参皂苷、1份硫酸米托蒽醌。
- [0034] 本发明还提供了一种人参皂苷米托蒽醌脂质体的制备方法,其包括如下步骤;
- [0035] 步骤1、将磷脂溶解于有机溶剂中得混合物A1,然后将混合物A1与盐溶液水化,得到脂质体溶液A1;
- [0036] 步骤2、其为方案1或方案2;
- [0037] 方案1(高压均质法)包括如下步骤:
- [0038] 将步骤1得到的脂质体溶液A1进行高压均质,控制粒径 $D_{90}$ 在100nm以下,得到脂质体溶液A2a。
- [0039] 方案2(挤出法)包括如下步骤:
- [0040] 将步骤1得到的所述的脂质体溶液A1,分别依次通过各孔径挤出板挤出,控制粒径 $D_{90}$ 在100nm以下,得到脂质体溶液A2b;
- [0041] 步骤3、将步骤2中得到的脂质体溶液A2a或A2b,置于透析袋中,以等渗溶液作为透析介质进行透析;得到脂质体溶液A3;
- [0042] 步骤4、将步骤3中得到的溶液A3与米托蒽醌盐溶液混合,得脂质体溶液A4;
- [0043] 步骤5、将步骤4得到的脂质体溶液A4与人参皂苷溶液中混合,置于透析袋中,以上述步骤3相同的等渗溶液作为透析介质进行透析;得人参皂苷米托蒽醌脂质体溶液A5。
- [0044] 在本发明的某一方案中,所述人参皂苷米托蒽醌脂质体的制备方法还包括以下步骤中的一步或多步:
- [0045] 步骤6、将步骤5得到的所述的脂质体溶液A5和PEG-DSPE生理等渗溶液混合,得到脂质体溶液A6。
- [0046] 步骤7、将步骤5得到的脂质体溶液A5或步骤6得到的脂质体溶液A6除菌过滤、灌装。
- [0047] 在本发明的某一方案中,所述人参皂苷米托蒽醌脂质体的制备方法中,所述的磷脂选自氢化磷脂、蛋黄卵磷脂、大豆磷脂和脑磷脂中的一种或多种;较佳地,所述的磷脂为氢化磷脂或蛋黄卵磷脂。
- [0048] 在本发明的某一方案中,所述人参皂苷米托蒽醌脂质体的制备方法中,所述的盐酸米托蒽醌与所述的磷脂的质量比为1:(5~15);例如,所述的盐酸米托蒽醌与氢化磷脂的质量比为1:10。
- [0049] 在本发明的某一方案中,所述人参皂苷米托蒽醌脂质体的制备方法中,所述的人参皂苷选自20(S)-人参皂苷Rg3、人参皂苷伪Rg3、20(S)-人参皂苷Rh2、人参皂苷Rg5、人参皂苷Rk1和人参皂苷Rp1中的一种或多种,较佳地,所述的人参皂苷为20(S)-人参皂苷Rg3和/或20(S)-人参皂苷Rh2。



[0050] 在本发明的某一方案中,所述人参皂苷米托蒽醌脂质体的制备方法中,所述的盐酸米托蒽醌与所述的人参皂苷的质量比为1:(0.1~4);例如所述的盐酸米托蒽醌与所述的人参皂苷的质量比为1:1或1:1.5。

[0051] 在本发明的某一方案中,所述人参皂苷米托蒽醌脂质体的制备方法中,所述人参皂苷的HPLC纯度 $\geq 99\%$ 。

[0052] 在本发明的某一方案中,所述人参皂苷米托蒽醌脂质体的制备方法中,所述的盐溶液为硫酸铵、蔗糖八硫酸酯三乙胺、甲基磺酸铵、甲基磺酸三乙胺;乙二磺酸铵、丙二磺酸铵、乙二磺酸三乙胺、丙二磺酸三乙胺等水溶液。例如,硫酸铵水溶液。

[0053] 在本发明的某一方案中,所述人参皂苷米托蒽醌脂质体的制备方法中,所述的盐溶液的浓度为0.05M-0.975M;例如0.05M、0.1M、0.2M、0.3M、0.325M、0.65M、0.975M或0.16M。

[0054] 在本发明的某一方案中,所述人参皂苷米托蒽醌脂质体的制备方法中,当所述的盐溶液为蔗糖八硫酸酯三乙胺水溶液时,所述的盐溶液的浓度为0.05M-0.3M,例如0.1M、0.2M或0.3M。

[0055] 在本发明的某一方案中,所述人参皂苷米托蒽醌脂质体的制备方法中,当所述的盐溶液为乙二磺酸三乙胺水溶液时,所述的盐溶液的浓度为0.16M-0.325M。

[0056] 在本发明的某一方案中,所述人参皂苷米托蒽醌脂质体的制备方法中,当所述的盐溶液为甲基磺酸铵水溶液时,所述的盐溶液的浓度为0.325M-0.975M。

[0057] 在本发明的某一方案中,所述人参皂苷米托蒽醌脂质体的制备方法中,当所述的盐溶液为硫酸铵水溶液时,所述的盐溶液的浓度为0.16M-0.325M,例如0.325。

[0058] 在本发明的某一方案中,所述的步骤1中,所述的溶剂为本领域此类反应的常规溶剂;较佳地,所述的溶剂为乙醇;例如无水乙醇。

[0059] 在本发明的某一方案中,所述的步骤1中,所述的磷脂与所述的有机溶剂的质量体积比为1g/1~10mL,例如1g/2mL。

[0060] 在本发明的某一方案中,所述的步骤1中,为将所述的磷脂加热溶解于有机溶剂中得到所述的混合物A1;例如,所述的加热可为水浴加热至55-65 $^{\circ}\text{C}$ ,例如60 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0061] 在本发明的某一方案中,所述的步骤1中,所述的水化的温度可为55-65 $^{\circ}\text{C}$ ,例如,60 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0062] 在本发明的某一方案中,所述的步骤1中,所述的水化为在旋蒸瓶中进行,转速为40~60rp/min,例如50rp/min。

[0063] 在本发明的某一方案中,所述的步骤1中,所述的水化的时间与反应规模相关,以使溶液均一即可,例如2-4小时。

[0064] 在本发明的某一方案中,所述的步骤2的方案1中,所述的高压均质为在均质机中使用0~10 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻水冷切循环;较佳地,确保脂质体溶液的温度在5-10 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0065] 在本发明的某一方案中,所述的步骤2的方案1中,所述的高压均质的压力在800-1400bar之间,例如1200bar。

[0066] 在本发明的某一方案中,所述的步骤2的方案1中,所述的高压均质的次数为3-4次,例如4次。

[0067] 在本发明的某一方案中,所述的步骤2的方案2中,所述挤出的温度为35-45 $^{\circ}\text{C}$ ,例如40 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0068] 在本发明的某一方案中,所述的步骤2的方案2中,所述挤出板的孔径为800nm,400nm,200nm,100nm。

[0069] 在本发明的某一方案中,所述的步骤2的方案2中,所述挤出的压力为600~800psi;例如800psi。

[0070] 在本发明的某一方案中,所述的步骤2的方案2中,所述挤出的次数可为4-10次,例如4次。

[0071] 在本发明的某一方案中,所述的步骤2的方案2中,所述的溶液A1,分别依次通过孔径分别为800nm、400nm、200nm或100nm的聚碳酸酯膜过滤板。

[0072] 在本发明的某一方案中,所述的步骤3中,所述的透析袋的截留分子量为8000~15000,例如,截留分子量为10000。

[0073] 在本发明的某一方案中,所述的步骤3中,所述的等渗溶液为5%葡萄糖或10%蔗糖水溶液。

[0074] 在本发明的某一方案中,所述的步骤3中,所述的溶液A2a或A2b与所述的等渗溶液的体积比为1:1000。

[0075] 在本发明的某一方案中,所述的步骤3中,所述的透析的温度为0-10°C,例如4°C。

[0076] 在本发明的某一方案中,所述的步骤3中,所述的透析的时间以完全去除所述的溶液A2a或A2b脂质体外水相中的所述的盐溶液,较佳地,所述的透析的时间为10-18小时,例如12小时。

[0077] 在本发明的某一方案中,所述的步骤3中,为将所述将步骤2中得到的脂质体溶液A2a或A2b,置于透析袋中,以等渗溶液作为透析介质,4°C透析12小时,样品与透析介质体积比为1:1000,透析期间每4小时更换1次透析液,完全去除空白脂质体外水相中的酸根离子,得到由等渗溶液组成的外水相,由酸根盐溶液为内水相的空白脂质体。

[0078] 在本发明的某一方案中,所述的步骤4中,所述的盐酸米托蒽醌水溶液的浓度为5~20mg/mL,例如1mg/mL、5mg/mL、10mg/mL、15mg/mL或20mg/mL;优选地为10~15mg/mL。

[0079] 在本发明的某一方案中,所述的步骤4中,为将所述的步骤3中得到的溶液A3与所述的盐酸米托蒽醌水溶液,按照体积比为1:1混合,并于50-60°C水浴中孵育40分钟,即得人参皂苷米托蒽醌脂质体。具体地,该脂质体内水相为酸根米托蒽醌不溶盐,该脂质体外水相为等渗溶液。

[0080] 在本发明的某一方案中,所述的步骤5中,所述的人参皂苷溶液的浓度为5~20mg/mL,例如10mg/mL。

[0081] 在本发明的某一方案中,所述的步骤5中,所述的人参皂苷溶液的溶剂同步骤1中的溶剂。

[0082] 在本发明的某一方案中,所述的步骤5中,所述的混合为搅拌,较佳地,所述搅拌的时间为30-60分钟,例如45分钟。

[0083] 在本发明的某一方案中,所述的步骤5中,所述的透析袋的截留分子量为8000~15000,例如,截留分子量为10000。

[0084] 在本发明的某一方案中,所述的步骤5中,为将所述人参皂苷溶液缓慢加入到所述步骤4中得到的脂质体溶液A4,搅拌,挥发除去大部分乙醇,然后再置于透析袋中,以上述步骤3相同的等渗溶液作为透析介质,4°C透析12小时,样品与透析介质体积比为1:1000,透析

期间每4小时更换1次透析液,完全去除乙醇溶剂、无机盐、未包裹的盐酸米托蒽醌和人参皂苷,即得脂质体溶液A5。

[0085] 在本发明的某一方案中,所述的步骤6中,所述的PEG-DSPE与所述磷脂的质量比为(0.025~0.15):1,例如,0.05:1。

[0086] 在本发明的某一方案中,所述的步骤6中,所述的PEG-DSPE浓度为1-20mg/mL,例如10mg/mL。

[0087] 在本发明的某一方案中,所述步骤6中,为准确称取一定量的PEG-DSPE,溶于步骤3相同的等渗溶液中,然后加入到所述步骤5所得到的脂质体溶液A5。

[0088] 在本发明的某一方案中,所述的步骤7中,所述的除菌过滤和所述的灌装的条件和操作均可为本领域该类工艺中常规的条件和操作,例如,除菌过滤步骤中,采用0.22 $\mu$ m滤膜过滤所述的脂质体;灌装步骤中,灌装于10mL或20mL西林瓶中、压盖和包装。

[0089] 在本发明的某一方案中,所述的人参皂苷米托蒽醌脂质体的制备方法中,所述的人参皂苷米托蒽醌脂质体的粒径D90 $\leq$ 150nm,包封率 $\geq$ 80%。

[0090] 本发明还提供了一种人参皂苷米托蒽醌脂质体,其由如上所述的人参皂苷米托蒽醌脂质体的制备方法制备得到。

[0091] 本发明还提供了一种人参皂苷米托蒽醌脂质体,所述人参皂苷米托蒽醌脂质体的原料包括以下质量分数的组成:5-15份磷脂、0.1-4份人参皂苷、1份米托蒽醌盐;但不包含胆固醇。

[0092] 在本发明的某一方案中,所述人参皂苷米托蒽醌脂质体的原料还包括0.1-2份PEG-DSPE(全称为聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺),较佳地,所述PEG-DSPE为PEG2000-DSPE。

[0093] 在本发明的某一方案中,所述人参皂苷米托蒽醌脂质体的原料中,所述的米托蒽醌盐为盐酸米托蒽醌通过pH梯度法与盐溶液进行离子交换得到的米托蒽醌盐(其中米托蒽醌盐中的米托蒽醌与所述的盐溶液中的阴离子形成所述的米托蒽醌盐);所述的盐溶液为硫酸盐水溶液、磷酸盐水溶液或蔗糖八硫酸酯盐水溶液;较佳地,所述的盐溶液为硫酸铵水溶液、蔗糖八硫酸酯三乙胺水溶液、甲基磺酸铵水溶液、甲基磺酸三乙胺水溶液、乙二磺酸铵水溶液、丙二磺酸铵水溶液、乙二磺酸三乙胺水溶液或丙二磺酸三乙胺水溶液;更佳地,所述的盐溶液为硫酸铵水溶液、蔗糖八硫酸酯三乙胺水溶液、甲基磺酸铵水溶液或乙二磺酸三乙胺水溶液;例如硫酸铵水溶液。

[0094] 在本发明的某一方案中,所述人参皂苷米托蒽醌脂质体的原料中,所述的米托蒽醌盐为硫酸米托蒽醌、蔗糖八硫酸米托蒽醌、甲基磺酸米托蒽醌、米托蒽醌甲基磺酸、米托蒽醌乙二磺酸、米托蒽醌丙二磺酸、米托蒽醌乙二磺酸或米托蒽醌丙二磺酸;较佳地,所述的米托蒽醌盐为硫酸米托蒽醌、蔗糖八硫酸酯米托蒽醌或米托蒽醌甲基磺酸盐;例如硫酸米托蒽醌。

[0095] 在本发明的某一方案中,所述人参皂苷米托蒽醌脂质体的原料中,所述的盐酸米托蒽醌为盐酸米托蒽醌水溶液,较佳地,所述的盐酸米托蒽醌水溶液的浓度为10mg/mL。

[0096] 在本发明的某一方案中,所述人参皂苷米托蒽醌脂质体的原料中,所述的盐溶液的浓度为0.05M-0.975M;例如0.05M、0.1M、0.2M、0.3M、0.325M、0.65M、0.975M或0.16M。

[0097] 在本发明的某一方案中,所述人参皂苷米托蒽醌脂质体的原料中,当所述的盐溶

液为蔗糖八硫酸酯三乙胺水溶液时,所述的盐溶液的浓度为0.05M-0.3M,例如0.1M、0.2M或0.3M。

[0098] 在本发明的某一方案中,所述人参皂苷米托蒽醌脂质体的原料中,当所述的盐溶液为乙二磺酸三乙胺水溶液时,所述的盐溶液的浓度为0.16M-0.325M。

[0099] 在本发明的某一方案中,所述人参皂苷米托蒽醌脂质体的原料中,当所述的盐溶液为甲基磺酸铵水溶液时,所述的盐溶液的浓度为0.325M-0.975M。

[0100] 在本发明的某一方案中,所述人参皂苷米托蒽醌脂质体的原料中,当所述的盐溶液为硫酸铵水溶液时,所述的盐溶液的浓度为0.16M-0.325M,例如0.325。

[0101] 在本发明的某一方案中,所述人参皂苷米托蒽醌脂质体的原料中,所述的磷脂选自氢化磷脂、蛋黄卵磷脂、大豆磷脂和脑磷脂中的一种或多种;较佳地,所述的磷脂为氢化磷脂或蛋黄卵磷脂。

[0102] 在本发明的某一方案中,所述人参皂苷米托蒽醌脂质体的原料中,所述的盐酸米托蒽醌与所述的磷脂的质量比为1:(5~15);例如,所述的盐酸米托蒽醌与氢化磷脂的质量比为1:10。

[0103] 在本发明的某一方案中,所述人参皂苷米托蒽醌脂质体的原料中,所述的人参皂苷选自20(S)-人参皂苷Rg3、人参皂苷伪Rg3、20(S)-人参皂苷Rh2、人参皂苷Rg5、人参皂苷Rk1和人参皂苷Rp1中的一种或多种,较佳地,所述的人参皂苷为20(S)-人参皂苷Rg3和/或20(S)-人参皂苷Rh2。

[0104] 在本发明的某一方案中,所述人参皂苷米托蒽醌脂质体的原料中,所述的米托蒽醌盐与所述的人参皂苷的质量比为1:(0.1~4);例如所述的米托蒽醌盐与所述的人参皂苷的质量比为1:1或1:1.5。

[0105] 在本发明的某一方案中,所述人参皂苷米托蒽醌脂质体的原料中,所述人参皂苷的HPLC纯度 $\geq 99\%$ 。

[0106] 在本发明的某一方案中,所述人参皂苷米托蒽醌脂质体的原料中,所述的磷脂的质量分数为10份。

[0107] 在本发明的某一方案中,所述人参皂苷米托蒽醌脂质体的原料中,所述的PEG-DSPE的质量分数为0.5份。

[0108] 在本发明的某一方案中,所述人参皂苷米托蒽醌脂质体的原料中,所述的人参皂苷的质量分数为1份。

[0109] 在本发明的某一方案中,所述人参皂苷米托蒽醌脂质体的原料中,所述的米托蒽醌盐的质量分数为1份。

[0110] 在本发明的某一方案中,所述人参皂苷米托蒽醌脂质体的原料为如下质量分数的组分:10份磷脂、0.5份PEG-DSPE、1份人参皂苷、1份盐酸米托蒽醌。

[0111] 本发明还提供了一种人参皂苷米托蒽醌脂质体组合物,其包含葡萄糖水溶液和前述的人参皂苷米托蒽醌脂质体。

[0112] 在本发明的某一方案中,所述的人参皂苷米托蒽醌脂质体组合物中,所述的葡萄糖水溶液为5%葡萄糖水溶液。

[0113] 在本发明的某一方案中,所述的人参皂苷米托蒽醌脂质体组合物中,所述的人参皂苷米托蒽醌脂质体的包封率 $\geq 80\%$ 。

[0114] 在本发明的某一方案中,所述的人参皂苷米托蒽醌脂质体组合中,所述的磷脂、所述的PEG-DSPE、所述的人参皂苷和所述的米托蒽醌的质量分数由于制备过程的损失和工艺的差别存在约10%的误差。

[0115] 本发明还提供了一种物质X在制备治疗和/或预防癌症药物中的应用;所述物质X为如前所述的人参皂苷米托蒽醌脂质体或如前所述的人参皂苷米托蒽醌脂质体组合物。

[0116] 在本发明的某一方案中,所述应用中,所述的人参皂苷米托蒽醌脂质体或所述的人参皂苷米托蒽醌脂质体组合物中的人参皂苷米托蒽醌脂质体的粒径 $D_{90} \leq 150\text{nm}$ 。

[0117] 在本发明的某一方案中,所述应用中,所人参皂苷米托蒽醌脂质体或所述的人参皂苷米托蒽醌脂质体组合物中的人参皂苷米托蒽醌脂质体的包封率 $\geq 80\%$ 。

[0118] 在本发明的某一方案中,所述应用中,人参皂苷米托蒽醌脂质体或所述的人参皂苷米托蒽醌脂质体组合物中的人参皂苷米托蒽醌脂质体中的所述人参皂苷的纯度 $\geq 99\%$ 。

[0119] 在本发明的某一方案中,所述应用中,所述的癌症可为乳腺癌、结直肠癌、乳腺癌、原发性肝癌、胃癌、膀胱癌或脑瘤。

[0120] 在本发明的上述任一方案中,所述包封率的测定方法为离心法。

[0121] 术语“粒径 $D_{90}$ ”是指一个样品的累计粒度分布百分数达到90%时所对应的粒径。它的物理意义是粒径小于它的颗粒占90%。

[0122] 在不违背本领域常识的基础上,上述各优选条件,可任意组合,即得本发明各较佳实例。

[0123] 本发明所用试剂和原料均市售可得。

[0124] 在符合本领域常识的基础上,上述各优选条件,可任意组合,即得本发明各较佳实例。

[0125] 本发明所用试剂和原料均市售可得。

[0126] 本发明的积极进步效果在于:本发明的积极进步效果在于:本发明提供的人参皂苷米托蒽醌脂质体具有对肿瘤细胞的靶向作用、增效减毒和药物协同作用。以实施例中人参皂苷Rg3米托蒽醌脂质体为例,药效显著优于胆固醇米托蒽醌脂质体;说明了Rg3在人参皂苷Rg3米托蒽醌脂质体中起到了更好的“药物、辅料、膜材、靶头”等多种作用,起到了良好的药物协同作用。具体地:

[0127] (1) 药效显著提高。尤其是Rg3(1.0)-MIT-PEG/Lp组、Rg3(1.5)-MIT-PEG/Lp组、Rg3(2.0)-MIT-PEG/Lp和Rh2(1.0)-CPT-PEG/Lp组药效最优,其中,Rg3(1.0)-MIT-PEG/Lp、Rg3(1.5)-MIT-PEG/Lp和Rg3(2.0)-MIT-PEG/Lp的高剂量组(2mg/kg)在第28天,肿瘤已完全消失,比普通胆固醇米托蒽醌脂质体组(C-MIT-PEG/LP组)和胆固醇Rg3米托蒽醌脂质体组(C-Rg3(1.0)-MIT-PEG/Lp)具有显著性优效。同时,该三组实验组的中剂量组(1mg/kg)第28天的抑瘤率为9-11%,比普通胆固醇脂质体组(C-MIT-PEG/LP组)和胆固醇Rg3米托蒽醌脂质体组(C-Rg3(1.0)-MIT-PEG/Lp)的高剂量组(2mg/kg)第28天抑瘤率(11-20%)更优,显示出本发明Rg3米托蒽醌脂质体对传统米托蒽醌脂质体在药效学上显著优势。

[0128] (2) Glut1靶向性显著提高。在荷瘤鼠的Glut1靶向性实验中,所述的人参皂苷脂质体的Glut1靶向性都是比普通胆固醇脂质体的靶向性提高了4倍以上。

[0129] (3) 毒副作用显著降低。按本发明的处方制备的脂质体,Rg3米托蒽醌脂质体(Rg3

(1.0) -MIT-PEG/Lp组和Rg3 (2.0) -MIT-PEG/Lp组) 和Rh2米托蒽醌脂质体 (Rh2 (1.0) -MIT-PEG/Lp组和Rh2 (2.0) -MIT-PEG/Lp组) 在6mg/kg和9mg/kg未见死亡、12mg/kg死亡0/6或1/6, 18mg/kg时死亡3/6或4/6; 而胆固醇脂质体组 (C-MIT-PEG/LP组) 在6mg/kg死亡1/6, 9mg/kg死亡4/6。说明Rg3米托蒽醌脂质体和Rh2米托蒽醌脂质体的LD50在12-18mg/kg之间, 胆固醇米托蒽醌脂质体的LD50在6-9mg/kg之间, 显示人参皂苷脂质体比胆固醇脂质体的急性毒性显著性降低。

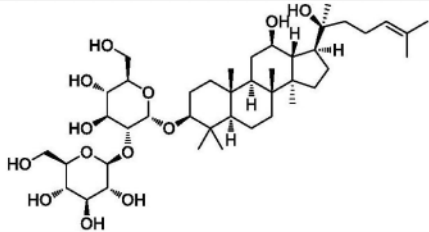
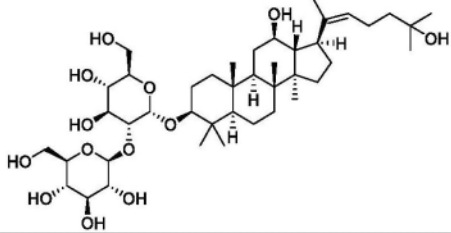
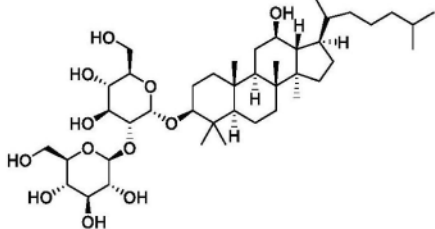
### 具体实施方式

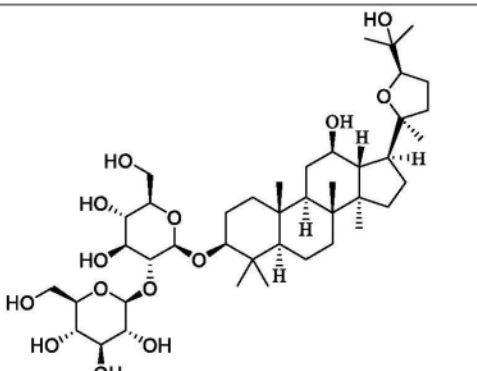
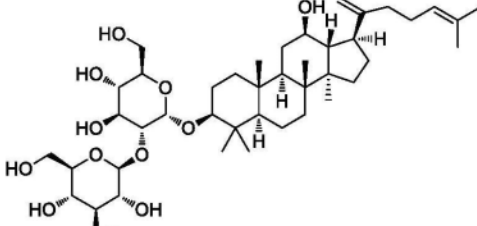
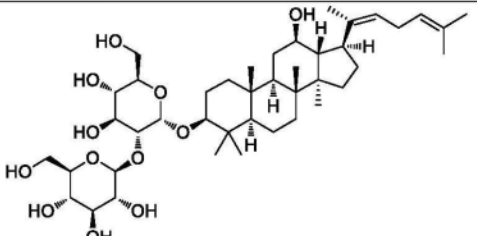
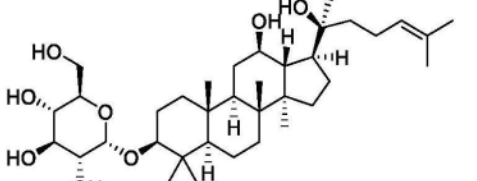
[0130] 下面通过实施例的方式进一步说明本发明, 但并不因此将本发明限制在所述的实施例范围之中。下列实施例中未注明具体条件的实验方法, 按照常规方法和条件, 或按照商品说明书选择。

[0131] 实验药物和器材

[0132] 实验药物: 20(S)-人参皂苷Rg3 (简称: Rg3)、人参皂苷伪Rg3 (简称: 伪Rg3)、人参皂苷Rp1 (简称: Rp1)、人参皂苷伪GQ (简称: 伪GQ)、人参皂苷Rk1 (简称: Rk1)、人参皂苷Rg5 (简称: Rg5)、20(S)-人参皂苷Rh2 (简称: Rh2)、人参皂苷Rk2 (简称: Rk2)、20(S)-人参皂苷Rg2 (简称: Rg2)、20(S)-人参皂苷Rh1 (简称: Rh1)、20(S)-原人参二醇 (简称: PPD)、20(S)-原人参三醇 (简称: PPT)、盐酸米托蒽醌等为本领域常规市售可得, 例如上海本素医药科技有限公司、上海金和生物制药有限公司、上海源叶生物科技有限公司等。

[0133] 本发明所述的人参皂苷分子结构式如下:

序号	名称	分子结构式
1	20(S)-人参皂苷 Rg3 CAS: 11019-45-7 简称: Rg3	
[0134] 2	人参皂苷伪 Rg3 简称: 伪 Rg3	
3	人参皂苷 Rp1 简称: Rp1	

4	人参皂昔伪 GQ 20 和 24 位的构型分别为: (S,S), (S,R), (R,S) 简称: 伪 GQ	
[0135] 5	人参皂昔 Rk1 CAS: 494753-69-4 简称: Rk1	
6	人参皂昔 Rg5 CAS: 186763-78-0 简称: Rg5	
7	20(S)-人参皂昔 Rh2 CAS: 67400-17-3 简称: Rh2	

[0136] 试验仪器: 下述实施例中所使用的仪器为上海本素医药科技有限公司、复旦大学药学院自有仪器设备, 其设备型号和来源信息如下:

[0137] 安捷伦液相色谱: 安捷伦1100一套, 奥泰3300ELSD, 安捷伦科技(中国)有限公司;

[0138] 旋蒸蒸发仪: ZX98-1 5L, 上海鲁伊工贸有限公司;

[0139] 超声波清洗机(SB3200DT, 宁波新芝生物科技股份有限公司);

[0140] 氮吹仪(HGC-12A, 天津市恒奥科技发展有限公司);

[0141] 探头超声仪(JYD-650, 上海智信仪器有限公司, 中国);

[0142] 高压均质机(B15, 加拿大AVESTIN);

[0143] 微型挤出器(Mini-extruder, Avanti Polar Lipids Inc);

[0144] 激光粒度分析仪(Nano ZS, 英国马尔文公司);

[0145] 马尔文粒度仪Malvern Nanosizer ZS90(英国马尔文公司);

[0146] 酶标仪(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA);

[0147] 酶标仪(Infinitie 200, 瑞士Tecan Trading Co., Ltd);

[0148] 流式细胞仪(BD Biosciences, USA);

[0149] 流式细胞仪(CytoFlex S, Beckman Coulter, Inc., USA);

- [0150] 倒置荧光显微镜(Leica,DMI 4000D,Germany);
- [0151] 荧光显微镜观察(Zeiss LSM 710,Oberkochen,Germany);
- [0152] 激光共聚焦显微镜(Leica,DMI 4000D,Germany);
- [0153] 共聚焦活体显微镜(Confocal intravital microscopy,IVM);
- [0154] 正置双光子显微镜(DM5500 Q;Nikon);
- [0155] 小动物活体光学成像系统(in vivo imaging system,IVIS)(PerkinElmer,USA);
- [0156] 生物大分子相互作用仪BiaCore T 200仪器(GE,USA);
- [0157] 洁净工作台(SW-CJ-1FD,苏州安泰空气技术有限公司);
- [0158] 20L旋转蒸发仪:R5002K,上海夏丰实业有限公司;
- [0159] 冷冻干燥机:FD-1D-80,上海比朗仪器制造有限公司;
- [0160] 冷冻干燥机:PDFD GLZ-1B,上海浦东冷冻干燥设备有限公司;
- [0161] 电子天平:CPA2250(精度0.00001g),赛多利斯(上海)贸易有限公司;
- [0162] 电子天平:JY3003(精度0.001g),上海舜宇恒平科学仪器有限公司;
- [0163] 光电显微镜(XDS-1B,重庆光电仪器有限公司);
- [0164] 细胞培养箱(CCL-170B-8,新加坡ESCO)。
- [0165] 动物和细胞株
- [0166] 动物:BALB/c裸小鼠,鼠龄3-4周,中科院上海药物研究所生产。
- [0167] 肿瘤细胞株:
- [0168] 乳腺癌原位瘤4T1细胞株,复旦大学药学院提供
- [0169] 人结肠癌C-26细胞株,购自江苏凯基生物技术股份有限公司
- [0170] 人胰腺癌Capan-1细胞株,购自江苏凯基生物技术股份有限公司
- [0171] 乳腺癌MCF-7细胞株,购自江苏凯基生物技术股份有限公司
- [0172] 盐酸米托蒽醌含量检测方法:依《中国药典》2020版二部“盐酸米托蒽醌”检测法。
- [0173] 1) 色谱条件:C18色谱柱(Kromasil C18,250×4.6mm,5μm)
- [0174] 2) 流动相:以庚烷磺酸钠溶液(取庚烷磺酸钠4.4g,加水适量使溶解,加冰醋酸6.4mL,用水稀释至730mL):乙腈=70:30(体积比)为流动相。
- [0175] 3) 检测波长:244nm,流速1.0mL/min,柱温30°C,进样量20μL。
- [0176] 4) 计算:记录色谱图,以外标法计算供试品溶液中盐酸米托蒽醌的含量。
- [0177] 人参皂苷含量检测方法:
- [0178] 1) 色谱条件:Kromasil 100-3.5C4 150mm×4.6mm色谱柱。
- [0179] 2) 流动相:乙腈:水=55:45。
- [0180] 3) 检测波长:203nm,流速1mL/min,柱温35°C,进样量10μL。
- [0181] 4) 计算:记录色谱图,以外标法计算供试品溶液中Rg3的含量。
- [0182] 米托蒽醌(或人参皂苷)包封率检测方法:
- [0183] 取2份待检测脂质体样品各1mL,离心(18000r/min,30min,3次,每次间隔30分钟),分别取上清液和脂质体沉淀,沉淀脂质体用蒸馏水洗涤3次,每次1ml蒸馏水,合并上清液,于25mL容量瓶中,去离子水定容,HPLC检测得到药物浓度(人参皂苷米托蒽醌脂质体中的游离的米托蒽醌或人参皂苷的浓度)为V1;另一份于25mL容量瓶中,去离子水定容,HPLC法检测药物浓度为V0。包封率=(V0-V1)/V0×100%。



[0184] 简称:盐酸米托蒽醌(MIT),氢化磷脂(HSPC),胆固醇(Cho),20(S)-人参皂苷Rg3(Rg3),20(S)-人参皂苷Rh2(Rh2)。

[0185] 实施例1:人参皂苷空白脂质体在各种离子型水溶液中的稳定性研究

[0186] 称取处方量的HSPC、人参皂苷,超声溶解于1mL氯仿中,减压浓缩至干,加入10mL水化溶液,水化10分钟,然后超声25次(600W,开5秒,停5秒),得到各实验组的空白脂质体,检测外观和包封率。

[0187] 3) 实验结果:

处方	水化溶液	外观	皂苷包封率
HSPC:Rg3=10mg:1mg	纯化水	清澈透亮	99.67%
HSPC:Rh2=10mg:1mg			99.15%
HSPC:Rg3=10mg:1mg	5%葡萄糖	清澈透亮	99.92%
HSPC:Rh2=10mg:1mg			99.03%
HSPC:Rg3=10mg:1mg	10%蔗糖水溶液	清澈透亮	99.05%
HSPC:Rh2=10mg:1mg			98.82%
HSPC:Rg3=10mg:1mg	生理盐水	浑浊	43.65%
HSPC:Rh2=10mg:1mg			40.72%
HSPC:Rg3=10mg:1mg	0.65M 甲基磺酸铵溶液	浑浊	57.17%
HSPC:Rh2=10mg:1mg			53.42%
HSPC:Rg3=10mg:1mg	0.325M 硫酸铵溶液	浑浊	26.82%
HSPC:Rh2=10mg:1mg			32.94%
HSPC:Rg3=10mg:1mg	0.1M 蔗糖八硫酸酯三乙胺溶液	浑浊	62.83%
HSPC:Rh2=10mg:1mg			65.71%

[0188] 实施例2传统主动载药法中磷脂用量对米托蒽醌包封率的影响实验

处方	制备方法(乙醇注入法)	包封率
HSPC:MIT=1mg:1mg	称取处方量的 HSPC, 溶于 2mL 无水乙醇中, 加入 1mL 0.325M 的硫酸铵溶液水化 10 分钟, 挥发除去乙醇, 超声 25 次(600W, 开 5 秒, 停 5 秒)至澄清透亮, 用 1000mL 5%葡萄糖水溶液透析 3 小时, 除去外水相的硫酸铵, 在 60°C搅拌滴加 100 $\mu$ l 盐酸米托蒽醌水溶液(10mg/ml), 保温孵育 40min 后, 降至室温, 即得米托蒽醌脂质体, 按本发明所述方法检测包封率。	58.52%
HSPC:MIT=2mg:1mg		69.77%
HSPC:MIT=3mg:1mg		83.89%
HSPC:MIT=5mg:1mg		90.74%
HSPC:MIT=8mg:1mg		93.54%
HSPC:MIT=10mg:1mg		<b>97.67%</b>
HSPC:MIT=12mg:1mg		99.35%
HSPC:MIT=15mg:1mg		99.65%
HSPC:MIT=20mg:1mg		99.78%

[0191] 结果分析:采用传统主动载药法中的乙醇注入法,药脂比(HSPC/药物)对包封率具有较大影响,当药脂比 $\geq 10$ 时,包封率没有显著差异。因此,本发明优选药脂比5-15的磷脂比例。

[0192] 实施例3传统主动载药法中胆固醇用量对米托蒽醌包封率的影响实验

处方	制备方法(乙醇注入法)	包封率
[0194] HSPC:Cho:MIT=10mg:0.1mg:1mg	称取处方量的 HSPC 和胆固醇,溶于 2mL 无水乙醇中,加入 1mL 0.325M 的硫酸铵溶液水化 10 分钟,挥发除去乙醇,超声 25 次(600w,开 5 秒,停 5 秒)至澄清透亮,用 1000mL 5%葡萄糖水溶液透析 3 小时,除去外水相的硫酸铵,在 60°C 搅拌滴加 100 $\mu$ l 盐酸米托蒽醌水溶液 (10mg/ml),保温孵育 40min 后,降至室温,即得米托蒽醌脂质体,按本发明所述方法检测包封率。	98.05%
HSPC:Cho:MIT=10mg:0.5mg:1mg		98.37%
HSPC:Cho:MIT=10mg:0.8mg:1mg		98.43%
HSPC:Cho:MIT=10mg:1mg:1mg		98.89%
HSPC:Cho:MIT=10mg:1.5mg:1mg		99.13%
HSPC:Cho:MIT=10mg:2mg:1mg		99.37%
HSPC:Cho:MIT=10mg:3mg:1mg		99.45%
HSPC:Cho:MIT=10mg:4mg:1mg		99.36%
HSPC:Cho:MIT=10mg:5mg:1mg		99.41%

[0195] 结果分析:采用传统主动载药法中的乙醇注入法,胆固醇可提高脂质体稳定性并提高米托蒽醌的包封率。当胆固醇/药物 $\geq 0.5$ 时,改善显著;当胆固醇/药物 $\geq 1$ 时,胆固醇的数量对包封率无显著差异。

[0196] 实施例4传统主动载药法中Rg3用量对米托蒽醌包封率的影响实验

处方	制备方法(乙醇注入法)	包封率 (MIT 计)
[0197] HSPC:Rg3:MIT=10mg:0.1mg:1mg	称取处方量的 HSPC 和 Rg3,溶于 2mL 无水乙醇中,加入 1mL 0.325M 的硫酸铵溶液水化 10 分钟,挥发除去乙醇,超声 25 次(600W,开 5 秒,停 5 秒)至澄清透亮,用 1000mL 5%葡萄糖水溶液透析 3 小时,除去外水相的硫酸铵,在 60°C 搅拌滴加 100 $\mu$ l 盐酸米托蒽醌水溶液 (10mg/ml),保温孵育 40min 后,降至室温,即	34.46%
HSPC:Rg3:MIT=10mg:0.5mg:1mg		32.79%
HSPC:Rg3:MIT=10mg:0.8mg:1mg		33.71%
HSPC:Rg3:MIT=10mg:1mg:1mg		35.54%
HSPC:Rg3:MIT=10mg:1.5mg:1mg		34.82%
HSPC:Rg3:MIT=10mg:2mg:1mg		36.58%
HSPC:Rg3:MIT=10mg:3mg:1mg		34.07%
[0198] HSPC:Rg3:MIT=10mg:4mg:1mg	得米托蒽醌脂质体,按本发明所述方法检测包封率。	39.92%
HSPC:Rg3:MIT=10mg:5mg:1mg		38.78%

[0199] 结果分析:采用传统主动载药法中的乙醇注入法,HSPC和Rg3同步成膜,然后离子型水溶液水化、5%葡萄糖水透析和载药,无法制备合格的Rg3米托蒽醌共载脂质体。

[0200] 实施例5传统主动载药法中胆固醇用量对Rg3脂质体包封率的影响实验

处方	制备方法(乙醇注入法)	包封率
[0201] HSPC:Cho:Rg3=10mg:0.1mg:1mg	称取处方量的 HSPC、胆固醇和 Rg3, 溶于 2mL 无水乙醇中, 加入 1mL 0.325M 的硫酸铵溶液水化 10 分钟, 挥发除去乙醇, 超声 25 次(600W, 开 5 秒, 停 5 秒)至澄清透亮, 用 1000mL 5%葡萄糖水溶液透析 3 小时, 除去外水相的硫酸铵, 即得 Rg3 脂质体, 按本发明所述方法检测 Rg3 的包封率。	42.69%
HSPC:Cho:Rg3=10mg:0.5mg:1mg		43.66%
HSPC:Cho:Rg3=10mg:0.8mg:1mg		41.28%
HSPC:Cho:Rg3=10mg:1mg:1mg		49.17%
HSPC:Cho:Rg3=10mg:1.5mg:1mg		50.92%
HSPC:Cho:Rg3=10mg:2mg:1mg		49.85%
HSPC:Cho:Rg3=10mg:3mg:1mg		42.05%
HSPC:Cho:Rg3=10mg:4mg:1mg		36.88%
HSPC:Cho:Rg3=10mg:5mg:1mg		40.75%

[0202] 结果分析:采用传统主动载药法中的乙醇注入法,HSPC、Rg3和胆固醇先同步成膜,然后离子型水溶液水化、5%葡萄糖透析,得到Rg3脂质体,该工艺制备的脂质体的Rg3包封率低,离子型水溶液造成了Rg3泄漏。

[0203] 实施例6传统主动载药法中胆固醇用量对Rg3脂质体包封率的影响实验

处方	制备方法(乙醇注入法)	包封率
[0204] HSPC:Cho:Rg3=10mg:0.1mg:1mg	称取处方量的 HSPC 和胆固醇, 溶于 2mL 无水乙醇中, 加入 1mL 0.325M 的硫酸铵溶液水化 10 分钟, 挥发除去乙醇, 超声 25 次(600W, 开 5 秒, 停 5 秒)至澄清透亮, 用 1000mL 5%葡萄糖水溶液透析 3 小时, 除去外水相的硫酸铵, 在 60°C 搅拌滴加 100 $\mu$ l Rg3 的乙醇溶液(10mg/ml), 保温孵育 40min 后, 降至室温, 即得 Rg3 脂质体, 按本发明所述方法检测包封率。	77.72%
HSPC:Cho:Rg3=10mg:0.5mg:1mg		81.55%
HSPC:Cho:Rg3=10mg:0.8mg:1mg		84.87%
HSPC:Cho:Rg3=10mg:1mg:1mg		87.75%
HSPC:Cho:Rg3=10mg:1.5mg:1mg		86.54%
HSPC:Cho:Rg3=10mg:2mg:1mg		82.15%
HSPC:Cho:Rg3=10mg:3mg:1mg		83.75%
HSPC:Cho:Rg3=10mg:4mg:1mg		84.67%
HSPC:Cho:Rg3=10mg:5mg:1mg		84.42%

[0205] 结果分析:采用传统主动载药法中的乙醇注入法,在透析之后外水相为5%葡萄糖时,Rg3作为药物载入脂质体,Rg3的包封率合格,其中胆固醇的用量对Rg3包封率的影响不大。通过效果实施例1:Glut1的细胞摄取实验中的C6-C-Rg3(后)/Lp组的靶向性实验结果显示:该组的Glut1介导的靶向性差,显示Rg3的葡萄糖基未暴露在脂质体表面,因此Rg3应被包裹于脂质体的内腔中。

[0206] 实施例7传统主动载药法中Rg3和米托蒽醌同步载入实验

处方	制备方法(乙醇注入法)	包封率
HSPC:Cho:Rg3:MIT= 10mg:0.1mg:0.1mg:1mg	称取处方量的 HSPC 和胆固醇,溶于 2mL 无水乙醇中,加入 1mL 0.325M 的硫酸铵溶液水化 10 分钟,挥发除去乙醇,超声 25 次(600W,开 5 秒,停 5 秒)至澄清透亮,用 1000mL 5%葡萄糖水溶液透析 3 小时,除去外水相的硫酸铵,在 60°C 搅拌滴加 100 $\mu$ l Rg3 和盐酸米托蒽醌的 50%乙醇水溶液(Rg3 和米托蒽醌浓度都是 10mg/ml),保温孵育 40min 后,降至室温,即得 Rg3 米托蒽醌共载脂质体,按本发明所述方法检测包封率。	MIT=57.26% Rg3=78.39%
HSPC:Cho:Rg3:MIT= 10mg:0.5mg:0.5mg:1mg		MIT=55.70% Rg3=78.92%
HSPC:Cho:Rg3:MIT= 10mg:0.8mg:0.8mg:1mg		MIT=50.83% Rg3=79.69%
HSPC:Cho:Rg3:MIT= 10mg:1mg:1mg:1mg		MIT=59.17% Rg3=75.19%
HSPC:Cho:Rg3:MIT= 10mg:1.5mg:1.5mg:1mg		MIT=62.34% Rg3=74.58%
HSPC:Cho:Rg3:MIT= 10mg:2mg:2mg:1mg		MIT=52.64% Rg3=74.68%
HSPC:Cho:Rg3:MIT= 10mg:3mg:3mg:1mg		MIT=58.95% Rg3=76.34%
HSPC:Cho:Rg3:MIT= 10mg:4mg:4mg:1mg		MIT=57.25% Rg3=73.47%
HSPC:Cho:Rg3:MIT= 10mg:5mg:5mg:1mg		MIT=53.33% Rg3=73.84%

[0208] 结果分析:采用传统主动载药法中的乙醇注入法,在不同比例的Rg3和胆固醇用量下,所述的空白脂质体的内水相为硫酸铵溶液,外水相为5%葡萄糖溶液,Rg3和米托蒽醌为药物,同步载入,米托蒽醌和Rg3的包封率都不合格。离子型水溶液同时影响了Rg3和盐酸米托蒽醌的包封率。

[0209] 实施例8传统主动载药法中先载Rg3再载米托蒽醌对包封率的影响实验

处方	制备方法(乙醇注入法)	包封率
HSPC:Cho:Rg3:MIT= 10mg:0.1mg:0.1mg:1mg	称取处方量的 HSPC 和胆固醇,溶于 2mL 无水乙醇中,加入 1mL 0.325M 的硫酸铵溶液水化 10 分钟,挥发除去乙醇,超声 25 次(600W,开 5 秒,停 5 秒)至澄清透亮,用 1000mL 5%葡萄糖水溶液透析 3 小时,除去外水相的硫酸铵,在 60°C 搅拌下,先滴加 100 $\mu$ l 的 Rg3 乙醇溶液(浓度根据处方计算),孵育 30 分钟后,再滴加 100 $\mu$ l 米托蒽醌的水溶液(10mg/ml),保温孵育 40min 后,降至室温,即得 Rg3 米托蒽醌共载脂质体,按本发	MIT=84.37% Rg3=72.46%
HSPC:Cho:Rg3:MIT= 10mg:0.5mg:0.5mg:1mg		MIT=83.57% Rg3=72.86%
HSPC:Cho:Rg3:MIT= 10mg:0.8mg:0.8mg:1mg		MIT=84.49% Rg3=71.53%
HSPC:Cho:Rg3:MIT= 10mg:1mg:1mg:1mg		MIT=81.62% Rg3=70.70%
HSPC:Cho:Rg3:MIT= 10mg:1.5mg:1.5mg:1mg		MIT=85.53% Rg3=73.59%

[0211]	HSPC:Cho:Rg3:MIT= 10mg:2mg:2mg:1mg	明所述方法检测包封率。	MIT=85.39%
	HSPC:Cho:Rg3:MIT= 10mg:3mg:3mg:1mg		Rg3=75.48%
	HSPC:Cho:Rg3:MIT= 10mg:4mg:4mg:1mg		MIT=85.54%
	HSPC:Cho:Rg3:MIT= 10mg:5mg:5mg:1mg		Rg3=74.19%
			MIT=84.26%
			Rg3=73.71%
			MIT=86.01%
			Rg3=72.14%

[0212] 结果分析:采用传统主动载药法中的乙醇注入法,采用了不同比例的Rg3和胆固醇比例,在透析之后,所述的空白脂质体的内水相为硫酸铵溶液,外水相为5%葡萄糖溶液,先载入Rg3,再载入盐酸米托蒽醌,所制备的Rg3米托蒽醌共载脂质体的包封率都不合格。

[0213] 实施例9不同制备方法对Rg3米托蒽醌共载脂质体包封率的影响实验

处方	制备方法	包封率
[0214] HSPC: Rg3:MIT =10mg:1 mg:1mg	薄膜法(被动载药):将处方量的 HSPC、Rg3 和米托蒽醌,溶于 1mL 乙醇和氯仿(体积比 1:1)的混合溶剂中,降压浓缩至干,加入 1mL 纯化水,水化 45 分钟,超声 25 次(600W,开 5 秒,停 5 秒,下同)至澄清透亮,即得。	Rg3=62.37% MIT=12.79%
	逆向蒸发法:将处方量的 HSPC 和 Rg3 溶于 1ml 乙醇和氯仿(体积比 1:1)的混合溶剂中,制成油相;然后与 1mL 米托蒽醌磷酸盐缓冲溶液(1mg/mL)混合,超声 25 次至澄清透亮,形成稳定的混合溶剂,减压浓缩除去有机溶剂,再加入 1mL 磷酸盐缓冲溶液,孵育 45 分钟,即得。	Rg3=65.52% MIT=13.61%
	乙醇注入法 1:将处方量的 HSPC 和 Rg3,溶于 1mL 无水乙醇中,加入 1mL 0.325M 的硫酸铵溶液水化 10 分钟,挥发除去乙醇,超声 25 次至澄清透亮,用 1000mL 5%葡萄糖水溶液透析 3 小时,除去外水相的硫酸铵,在 60°C 搅拌滴加 100 $\mu$ l 米托蒽醌的水溶液(10mg/ml),保温孵育 40min 后,降至室温,即得。	Rg3=76.35% MIT=68.45%
	乙醇注入法 2:将处方量的 HSPC,溶于 1mL 无水乙醇中,加入 1mL 0.325M 的硫酸铵溶液水化 10 分钟,挥发除去乙醇,超声 25 次至澄清透亮,用 1000mL 5%葡萄糖水溶液透析 3 小时,除去外水相的硫酸铵,在 60°C 搅拌滴加 100 $\mu$ l Rg3 和米托蒽醌的 50%乙醇水溶液(Rg3 和米托蒽醌浓度都是 10mg/ml),保温孵育 40min 后,降至室温,即得。	Rg3=89.26% MIT=75.69%
	乙醇注入法 3:将处方量的 HSPC,溶于 1mL 无水乙醇中,加入 1mL 0.325M 的硫酸铵溶液水化 10 分钟,挥发除去乙醇,超声 25 次至澄清透亮,用 1000mL 5%葡萄糖水溶液透析 3 小时,除去外水相的硫酸铵,	Rg3=82.05% MIT=77.81%

[0215]	在 60°C 搅拌滴加 100 $\mu$ l Rg3 的乙醇溶液(10mg/ml), 保温孵育 40min 后; 然后再滴加 100 $\mu$ l 米托蒎醌的水溶液(10mg/ml), 保温孵育 40min 后, 降至室温, 即得。	
	乙醇注入法 4: 将处方量的 HSPC, 溶于 1mL 无水乙醇中, 加入 1mL 0.325M 的硫酸铵溶液水化 10 分钟, 挥发除去乙醇, 超声 25 次至澄清透亮, 用 1000mL 5%葡萄糖水溶液透析 3 小时, 除去外水相的硫酸铵, 在 60°C 搅拌滴加 100 $\mu$ l 米托蒎醌的水溶液(10mg/ml), 保温孵育 40min 后; 然后再滴加 100 $\mu$ l Rg3 的乙醇溶液(10mg/ml), 保温孵育 40min 后, 降至室温, 即得。	Rg3=94.45% MIT=92.28%

[0216] 结果分析:

[0217] 1) 被动载药(薄膜法)无法制备合格的Rg3米托蒎醌共载脂质体;

[0218] 2) 普通主动载药法无法制备合格的Rg3米托蒎醌共载脂质体;

[0219] 3) 普通主动载药法, 先载Rg3再载米托蒎醌, 或Rg3与米托蒎醌同步载入, 无法制备合格的Rg3米托蒎醌共载脂质体;

[0220] 4) 普通主动载药法, 先载米托蒎醌再Rg3, 可制备得到合格的Rg3米托蒎醌共载脂质体。利用该方法制备的脂质体, 经本发明应用实施1:Glut1的细胞摄取实验, C6-Rg3(后)-MIT/Lp组实验结果表明: 利用该方法制备的Rg3脂质体具有显著的Glut1介导的主动靶向作用, 证明Rg3是嵌入在磷脂双分子膜中, 其中Rg3分子中的葡萄糖基(G1c)裸露在脂质体外表面。

[0221] 实施例10Rg3用量对Rg3米托蒎醌共载脂质体包封率的影响实验

处方	制备方法(依实施例 9 的乙醇注入法 4)	包封率
HSPC:Rg3:MIT= 10mg:0.1mg:1mg	步骤 1(成膜和水化): 将处方量的 HSPC, 溶于 1mL 无水乙醇中, 加入 1mL 0.325M 的硫酸铵溶液水化 10 分钟, 挥发除去乙醇, 制备得到内外水相均是硫酸铵溶液的空白脂质体粗品;	Rg3=97.06% MIT=88.16%
HSPC:Rg3:MIT= 10mg:0.5mg:1mg	步骤 2(粒径控制): 超声 25 次(600W, 开 5 秒, 停 5 秒)至澄清透亮, 得到粒径合格的空白脂质体;	Rg3=97.35% MIT=89.52%
HSPC:Rg3:MIT= 10mg:0.8mg:1mg	步骤 3(透析): 在截留分子量为 10000 的透析袋中, 用 1000mL 5%葡萄糖水溶液透析 3 小时, 除去外水相的硫酸铵, 得到内水相为硫酸铵溶液, 外水相为 5%葡萄糖的空白脂质体;	Rg3=96.22% MIT=92.52%
HSPC:Rg3:MIT= 10mg:1mg:1mg	步骤 4(载入 MIT): 在 60°C 搅拌滴加 100 $\mu$ l 米托蒎醌的水溶液(10mg/ml), 保温孵育 40min 后, 得到内水相为硫酸米托蒎醌, 外水相为 5%葡萄糖的米托蒎醌脂质体;	Rg3=96.63% MIT=95.87%
HSPC:Rg3:MIT= 10mg:1.5mg:1mg		Rg3=96.49% MIT=96.18%
HSPC:Rg3:MIT= 10mg:2mg:1mg		Rg3=95.38% MIT=96.94%
HSPC:Rg3:MIT=		Rg3=95.95%

[0223]	10mg:3mg:1mg	步骤 5 (嵌入 Rg3): 再加入 100 $\mu$ l Rg3 的乙醇溶液(浓度根据处方要求), 保温孵育 40min 后, 降至室温, 即得所述的 Rg3 米托蒽醌共载脂质体: 内水相为硫酸米托蒽醌盐, 外水相为 5%葡萄糖等渗溶液, Rg3 镶嵌在磷脂膜上。	MIT=97.77%
	HSPC:Rg3:MIT=		Rg3=90.73%
	10mg:4mg:1mg		MIT=92.57%
	HSPC:Rg3:MIT=		Rg3=77.46%
	10mg:5mg:1mg		MIT=83.84%

[0224] 结果分析:

[0225] 1) 采用上述的乙醇注入法, 可制备合格的 Rg3 米托蒽醌共载脂质体, 具体地, 该脂质体的内水相为硫酸米托蒽醌盐, 该脂质体的外水相为 5% 葡萄糖等渗溶液, 该脂质体的双分子膜为氢化磷脂和 Rg3, 其中 Rg3 分子中的葡萄糖基 (G1c) 裸露在脂质体外表面, 该脂质体膜材中不含胆固醇。

[0226] 2) 所述的 Rg3 米托蒽醌脂质体, 当 HSPC:Rg3:MIT=10:0.1~4:1 时, Rg3 和米托蒽醌的包封率良好。随着 Rg3 用量上升, Rg3 和米托蒽醌的包封率急剧下降。

[0227] 3) 本发明 Rg3 的使用范围为 HSPC:Rg3:MIT=10:0.1~4:1。

[0228] 实施例 11 不同盐对 Rg3 米托蒽醌共载脂质体包封率的影响实验

处方	梯度盐名称和浓度	制备方法	包封率
[0229] HSPC: Rg3:MIT =10mg:1 mg:1mg	0.1M 蔗糖八硫酸酯三乙胺	依实施例 10 的相同制备方法, 并把步骤 1(成膜和水化)中的 0.325M 的硫酸铵溶液更换为本实施例对应的处方和浓度。	Rg3=98.37%, MIT=92.40%
	0.325M 硫酸铵		Rg3=95.28%, MIT=90.29%
	0.65M 甲基磺酸铵		Rg3=92.41%, MIT=86.33%
	0.65M 甲基磺酸三乙胺		Rg3=93.39%, MIT=87.51%
	0.325M 乙二磺酸铵		Rg3=94.56%, MIT=92.09%
	0.325M 丙二磺酸铵		Rg3=91.12%, MIT=92.59%
	0.325M 乙二磺酸三乙胺		Rg3=97.37%, MIT=91.65%
	0.325M 丙二磺酸三乙胺		Rg3=96.36%, MIT=93.69%

[0230] 结果分析: 采用本发明的乙醇注入法, 蔗糖八硫酸酯三乙胺、硫酸铵、甲基磺酸铵、甲基磺酸三乙胺、乙二磺酸铵、丙二磺酸铵、乙二磺酸三乙胺和丙二磺酸三乙胺均能满足 Rg3 米托蒽醌脂质体的制备, 包封率都合格。

[0231] 实施例 12 不同盐浓度对 Rg3 米托蒽醌共载脂质体包封率的影响实验

处方	梯度盐名称和浓度	制备方法	包封率
[0232] HSPC: Rg3:MIT =10mg:1 mg:mg	0.05M 蔗糖八硫酸酯三乙胺	依实施例 10 的相同制备方法, 并把步骤 1(成膜和水化)中的 0.325M 的硫酸铵溶液更换为本实施例对应的处方	Rg3=98.16%, MIT=70.15%
	0.1M 蔗糖八硫酸酯三乙胺		Rg3=95.94%, MIT=92.78%
	0.2M 蔗糖八硫酸酯三乙胺		Rg3=90.63%, MIT=95.62%
	0.3M 蔗糖八硫酸酯三乙胺		Rg3=88.55%, MIT=95.87%
	0.16M 硫酸铵		Rg3=97.17%, MIT=75.56%
	0.325M 硫酸铵		Rg3=96.35%, MIT=98.83%
	0.65M 硫酸铵		Rg3=91.26%, MIT=94.86%

[0233]	0.325M 甲基磺酸铵	和浓度。	Rg3=93.55%, MIT=66.37%
	0.65M 甲基磺酸铵		Rg3=90.15%, MIT=88.57%
	0.975M 甲基磺酸铵		Rg3=82.99%, MIT=85.47%
	0.16M 乙二磺酸三乙胺		Rg3=95.41%, MIT=72.86%
	0.325M 乙二磺酸三乙胺		Rg3=96.57%, MIT=98.28%
	0.65M 乙二磺酸铵		Rg3=85.65%, MIT=91.24%

[0234] 结果分析:采用本发明的乙醇注入法,1)蔗糖八硫酸酯三乙胺浓度低于0.05M时,将包封率不能满足的工艺要求;当浓度 $\geq 0.1$ M时,包封率无显著差别。2)硫酸铵和乙二磺酸三乙胺浓度低于0.16M时,包封率无法满足工艺要求;浓度在0.32M和0.65M时,包封率无显著差别。3)甲基磺酸铵浓度低于0.325M时,包封率无法满足工艺要求;浓度在0.65M和0.975M时,包封率无显著差别。

[0235] 实施例13不同人参皂苷对皂苷米托蒽醌共载脂质体包封率的影响实验

处方	皂苷名称	制备方法	包封率
[0236] HSPC: 皂 苷 : MIT=10mg:1 mg:1mg	20(S)-Rg3	按实施例 10 相同制备方法,并把步骤 1(成膜和水化)中的 Rg3 更换为本实施例对应的处方。	S-Rg3=98.19%, MIT=97.26%
	20(R)-Rg3		R-Rg3=8.85%, MIT=45.43%
	20(S)-Rh2		S-Rh2=96.80%, MIT=95.32%
	Rg5		Rg5=99.01%, MIT=98.22%
	Rk1		Rk1=97.16%, MIT=93.44%
	Rp1		Rp1=97.35%, MIT=92.93%
	伪 Rg3		伪 Rg3=90.06%, MIT=90.47%
	伪 GQ		伪 GQ=88.69%, MIT=86.25%
	PPD		PPD=86.74%, MIT=84.07%
PPT	PPT=29.77%, MIT=73.45%		

[0237] 结果分析:采用本发明的乙醇注入法,20(S)-Rg3、20(S)-Rh2、Rg5、Rk1、Rp1、伪Rg3、伪GQ和PPD等皂苷制备的共载脂质体,其包封率符合质量要求;而20(R)-Rg3和PPT等皂苷制备的共载脂质体,其包封率不符合质量要求。

[0238] 实施例14不同均质方法对Rg3米托蒽醌共载脂质体包封率的影响实验

处方	均质方法	制备方法	包封率
[0239] HSPC:Rg3: MIT=10mg:1 mg:1mg	超声法	按实施例 10 相同制备方法,其中步骤 2(粒径控制)为:超声 25 次至澄清透亮。	Rg3=93.39% MIT=92.08%
	高压均质法	按实施例 10 相同制备方法,其中步骤 2(粒径控制)改为:将步骤 1 的溶液在压力 800-1500bar,在冷切温度为-5°C~10°C,高压均质 4 次,最终得到粒径约 100nm 的空白脂质体。	Rg3=98.16% MIT=96.67%



[0240]	推挤过膜法	按实施例 10 相同制备方法, 其中步骤 2(粒径控制)改为: 将步骤 1 的溶液在压力 600~800psi, 依次通过孔径分别为 800nm、400nm、200nm、100nm 的聚碳酸酯膜各 4 次, 最终得到粒径小于 100nm 的空白脂质体。	Rg3=98.19% MIT=96.81%
--------	-------	--	--------------------------

[0241] 结果分析:采用本发明的乙醇注入法,在粒径控制的三个常用方法(超声法、高压均质法、推挤过膜法),均能符合工艺要求。

[0242] 实施例15不同磷脂对Rg3米托蒽醌共载脂质体包封率的影响实验

处方	磷脂名称	制备方法	包封率
[0243] 磷 脂 :Rg3:MIT =10mg:1mg:1mg	HSPC	按实施例 10 相同制备方法, 其中步骤 1 的磷脂为 HSPC。	Rg3=96.36% MIT=94.55%
	蛋黄卵磷脂	按实施例 10 相同制备方法, 其中将步骤 1 中的 HSPC 改为蛋黄卵磷脂。	Rg3=98.97% MIT=98.26%
	大豆磷脂	按实施例 10 相同制备方法, 其中将步骤 1 中的 HSPC 改为大豆磷脂。	Rg3=97.46% MIT=95.87%
	脑磷脂	按实施例 10 相同制备方法, 其中将步骤 1 中的 HSPC 改为脑磷脂。	Rg3=95.08% MIT=93.23%
	PEG-DSPE	按实施例 10 相同制备方法, 其中将步骤 1 中的 HSPC 改为 PEG-DSPE。	Rg3=12.25% MIT=5.73%

[0244] 结果分析:采用本发明的乙醇注入法,氢化磷脂、蛋黄卵磷脂、大豆磷脂和脑磷脂所制备的Rg3米托蒽醌共载脂质体的包封率符合药品申报要求,PEG-DSPE不符合要求。

[0245] 实施例16不同米托蒽醌浓度对Rg3米托蒽醌共载脂质体包封率的影响实验

处方	MIT 浓度	制备方法	包封率
[0246] HSPC:Rg3: MIT=10mg :1mg:1mg	1mg/mL	按实施例 10 相同制备方法, 其中将步骤 4(载入 MIT)中米托蒽醌的药物浓度改为本实施例浓度。	Rg3=96.35%, MIT=66.28%
	5mg/mL		Rg3=94.43%, MIT=85.74%
	10mg/mL		Rg3=96.42%, MIT=94.55%
	15mg/mL		Rg3=88.39%, MIT=95.45%
	20mg/mL		Rg3=68.70%, MIT=94.36%

[0247] 结果分析:采用本发明的乙醇注入法,在药物浓度为5~15mg/mL时,包封率最佳,特别是药物浓度为10mg/mL时最佳。当药物浓度低于5mg/mL或高于20mg/mL时,包封率不符合药品质量要求。

[0248] 实施例17不同生理等渗溶液对Rg3米托蒽醌共载脂质体包封率的影响实验

处方	等渗溶液名称	制备方法	包封率
----	--------	------	-----

[0250]	HSPC:Rg3: MIT=10mg :1mg:1mg	5%葡萄糖	按实施例 10 相同制备方法,其中将步骤 3 中的 5%葡萄糖(透析液)改为本实施例对应的等渗溶液。	Rg3=95.79%, MIT=94.89%
		10%蔗糖水溶液		Rg3=96.53%, MIT=92.78%
		0.9%生理盐水		Rg3=8.64%, MIT=78.42%

[0251] 结果分析:采用本发明的乙醇注入法,5%葡萄糖和10%蔗糖水溶液对Rg3和米托蒽醌包封率无显著差别,0.9%生理盐水不适用。

[0252] 实施例18 Rg3米托蒽醌脂质体的制备

[0253] 1. 处方:HSPC 10g,Rg3 1g,盐酸米托蒽醌1g,无水乙醇适量,5%葡萄糖注射液适量,注射用水适量,0.325M硫酸铵溶液适量。

[0254] 2. 操作方法:

[0255] 步骤(1):成膜和水化

[0256] 称取处方量的HSPC,溶于20mL无水乙醇中,加入100mL 0.325M的硫酸铵,55~60℃水化10分钟,挥发除去大部分乙醇,制备得到内外水相均是硫酸铵溶液的空白脂质体粗品;

[0257] 步骤(2):推挤过膜

[0258] 将步骤(1)的空白脂质体溶液在压力600-800psi,依次通过孔径分别为800nm、400nm、200nm、100nm的聚碳酸酯膜过滤板各4次,最终得到粒径小于100nm内外水相均是硫酸铵溶液的空白脂质体。

[0259] 步骤(3):透析

[0260] 将步骤(2)的空白脂质体置于截留分子量为10000的透析袋中,以5%葡萄糖水溶液作为透析介质,4℃透析12小时,样品与透析介质体积比为1:1000,透析期间每4小时更换1次透析液,完全去除空白脂质体外水相中的硫酸铵,得到由5%葡萄糖组成的外水相由硫酸铵为内水相的空白脂质体。

[0261] 步骤(4):载入米托蒽醌

[0262] 将步骤(3)中的空白脂质体与浓度为10mg/ml的盐酸米托蒽醌水溶液,按照体积比为1:1混合,并于50-60℃水浴中孵育40分钟,即得米托蒽醌脂质体。具体地,该脂质体内水相为硫酸米托蒽醌不溶盐,该脂质体外水相为5%葡萄糖水溶液。

[0263] 步骤(5):嵌入Rg3

[0264] 将100mL 10mg/mL的Rg3乙醇溶液于20-30℃下,缓慢加入到步骤(4)的米托蒽醌脂质体溶液,搅拌45分钟,挥发除去大部分乙醇,然后再置于截留分子量为10000的透析袋中,以5%葡萄糖水溶液作为透析介质,4℃透析12小时,样品与透析介质体积比为1:1000,透析期间每4小时更换1次透析液,完全去除乙醇溶剂、无机盐、未包裹的盐酸米托蒽醌和Rg3,即得Rg3米托蒽醌脂质体。

[0265] 步骤(6):添加PEG-DSPE

[0266] 准确称取0.2g PEG-DSPE,溶于300mL5%葡萄糖中,然后加入到步骤(5)的Rg3米托蒽醌脂质体溶液,得到米托蒽醌和Rg3浓度都是约2mg/mL的Rg3米托蒽醌脂质体溶液。

[0267] 步骤(7):除菌过滤

[0268] 将步骤(6)的Rg3米托蒽醌脂质体过0.22μm滤膜。

[0269] 步骤(8):灌装

[0270] 将步骤(7)溶液灌装于10mL或20mL西林瓶中,压盖,包装,即得。

[0271] 经检测,上述脂质体,米托蒽醌浓度=4.88mg/mL,Rg3浓度=4.91mg/mL,粒径D90=101nm,Rg3包封率=98.65%,米托蒽醌包封率=96.79%。

[0272] 实施例19 PEG-DSPE用量对Rg3米托蒽醌共载脂质体稳定性的影响

[0273] 制备方法:取上述实施例18步骤(5)的Rg3米托蒽醌脂质体溶液,然后按本实施例处方加入不同浓度的PEG-DSPE水溶液,其他后续步骤同实施例18,然后将各处方制剂置于2-8°C冰箱,考察脂质体溶液的稳定性。

处方	PEG-D SPE 用量	粒径、包封率 (0 天)	粒径、包封率 (15 天)	粒径、包封率 (45 天)	粒径、包封率 (90 天)
[0274] HSPC:R g3:MIT=10 mg:1mg:1 mg	0	D90=105nm Rg3=98.78% MIT=96.90%	D90=125nm Rg3=96.35% MIT=93.39%	D90=159nm Rg3=89.48% MIT=88.46%	D90=215nm Rg3=84.65% MIT=85.47%
	0.05mg	D90=108nm Rg3=98.36% MIT=95.27%	D90=123nm Rg3=96.19% MIT=92.48%	D90=132nm Rg3=93.51% MIT=90.28%	D90=145nm Rg3=91.14% MIT=86.85%
	0.1mg	D90=105nm Rg3=98.45% MIT=96.54%	D90=111nm Rg3=96.46% MIT=95.65%	D90=116nm Rg3=95.58% MIT=92.45%	D90=128nm Rg3=94.58% MIT=90.37%
	0.25mg	D90=101nm Rg3=98.57% MIT=96.73%	D90=102nm Rg3=98.75% MIT=95.43%	D90=104nm Rg3=97.73% MIT=94.54%	D90=108nm Rg3=95.40% MIT=92.19%
	0.50mg	D90=101nm Rg3=98.65% MIT=96.79%	D90=101nm Rg3=98.64% MIT=96.76%	D90=102nm Rg3=97.89% MIT=95.84%	D90=103nm Rg3=97.61% MIT=95.25%
	1.0mg	D90=102nm Rg3=98.63% MIT=96.78%	D90=103nm Rg3=97.33% MIT=95.43%	D90=103nm Rg3=96.76% MIT=93.68%	D90=105nm Rg3=96.62% MIT=92.52%
	2.0mg	D90=102nm Rg3=98.05% MIT=96.14%	D90=105nm Rg3=96.23% MIT=95.25%	D90=110nm Rg3=94.45% MIT=93.69%	D90=116nm Rg3=90.15% MIT=87.19%

[0275] 结果分析:

[0276] 1) 未添加PEG-DSPE,Rg3米托蒽醌脂质体在2-8°C保存3个月后,粒径快速上升,Rg3和米托蒽醌的泄漏率明显上升;

[0277] 2) 当PEG-DSPE/HSPC $\leq$ 0.025时,在2-8°C保存3个月后,Rg3米托蒽醌脂质体的粒径显著上升,包封率显著下降,不合格稳定性质量要求。其中,PEG-DSPE/HSPC=0.025,3个月的稳定性数据可接受。

[0278] 3) 当PEG-DSPE/HSPC $\geq$ 0.025时,在2-8°C保存3个月后,Rg3米托蒽醌脂质体的粒径

稳定、Rg3和米托蒽醌的包封率较稳定,符合药品申报要求。

[0279] 4) 当PEG-DSPE/HSPC $\geq$ 0.05时,粒径和包封率没有显著差别。

[0280] 应用实施例1:Glut1的细胞摄取实验

[0281] 1) 实验目的:通过对比载荧光素的Rg3脂质体和胆固醇脂质体在4T1细胞上的摄取来观察Rg3脂质体是否在肿瘤细胞上有更多的摄取;通过添加葡萄糖抑制剂等证明Glut1靶向机制;通过Glut1靶向验证本发明的人参皂苷位于磷脂双分子膜中,并且葡萄糖基裸露在脂质体外表面。

[0282] 2) 实验方法:为了比较4T1对各实验组的摄取,探讨脂质体的摄取机制,将4T1细胞按 $2 \times 10^5$ 的细胞密度接种于12孔板中,对于实验组+葡萄糖、实验组+根皮苷和实验组+槲皮素组,12小时后分别用20mM的葡萄糖溶液、根皮苷溶液和槲皮素溶液代替培养基。这三种溶质应在无葡萄糖培养基中溶解,孵育1小时后,加入各实验组药物(紫外荧光显色剂的浓度为100ng/ml),孵育4小时后,消化,用新鲜PBS溶液洗涤,采用流式细胞仪进行分析。

[0283] 为了研究Rg3脂质体的摄取机制,将底物(葡萄糖),Glut1竞争性抑制剂根皮苷和槲皮素预先孵育1小时将Glut1先饱和后,再加入制剂,Rg3-Lp/C6的荧光强度分别降低了31%,43%和74%。由此可见Glut1底物和抑制剂的加入,阻止了Rg3-Lp/C6的细胞摄取,证明人参皂苷Rg3脂质体可通过与Glut1相互作用增强其摄取效率。

[0284] 3) 实验组制备方法:所述操作条件同本发明实施例的操作条件。

[0285] 方法1(被动载药):将处方量的HSPC、人参皂苷和/或胆固醇、荧光探针(香豆素)和/或药物,溶于适量乙醇和氯仿的混合溶剂中(体积比1:1),减压浓缩至干,纯化水水化,超声,然后按本应用实施例的实验方法检测荧光强度。

[0286] 方法2(主动载药):将处方量的HSPC、Rg3和荧光探针,超声溶解于适量乙醇中,加入0.325M硫酸铵溶液水化10分钟,然后超声25次(开5秒停5秒),用5%葡萄糖溶液透析,再依次载入(和/或)药物,再次透析除去游离药物,(和/或)适量PEG-DSPE,得到各实验组的脂质体溶液,然后按本应用实施例的实验方法检测荧光强度。

[0287] 方法3(主动载药):将处方量的HSPC和荧光探针,超声溶解于适量乙醇中,加入0.325M硫酸铵溶液水化10分钟,然后超声25次(开5秒停5秒),用5%葡萄糖溶液透析,再依次载入药物或Rg3,再次透析除去游离药物,(和/或)加入适量PEG-DSPE,得到各实验组的脂质体溶液,然后按本应用实施例的实验方法检测荧光强度。

	样品名称和制备方法	处方内容	核心工艺描述
[0288]	C6-C/Lp(对照1) 制备方法:方法1	HSPC:Cho:荧光探针=10:1:1	常规薄膜蒸发法制备 (纯化水水化)

[0289]

C6-Rg3/Lp(对照 2) 制备方法: 方法 1	HSPC:Rg3:荧光探针=10:1:1	常规薄膜蒸发法制备 (纯化水水化)
C6-Rg3-MIT/Lp(对照 3) 制备方法: 方法 1	HSPC:Rg3: 荧 光 探 针 :MIT= 10:1:1:1	常规薄膜蒸发法制备 (纯化水水化)
C6-Rg3(前加入)/Lp 制备方法: 方法 2	HSPC:Rg3:荧光探针=10:1:1	Rg3 在水化和透析之前加入 (硫酸铵溶液水化)
C6-Rg3(后加入)/Lp 制备方法: 方法 3	HSPC:Rg3:荧光探针=10:1:1	Rg3 在水化和透析之后加入 (硫酸铵溶液水化)
C6-Rg3(前)-MIT/Lp 制备方法: 方法 3	HSPC:Rg3: 荧 光 探 针 :MIT= 10:1:1:1	Rg3 在透析之后 MIT 之前加入 (硫酸铵溶液水化)
C6-Rg3(后)-MIT/Lp 制备方法: 方法 3	HSPC:Rg3: 荧 光 探 针 :MIT= 10:1:1:1	Rg3 在 MIT 之后加入 (硫酸铵溶液水化)
C6-Rg3-PEG/Lp 制备方法: 方法 3	HSPC:Rg3: 荧 光 探 针 : PEG-DSPE=10:1:1:0.5	Rg3 在透析之后加入, 再加入 PEG-DSPE (硫酸铵溶液水化)
C6-Rg3-MIT-PEG/Lp 制备方法: 方法 3	HSPC:Rg3: 荧 光 探 针 :MIT: PEG-DSPE=10:1:1:1:0.5	Rg3 在 MIT 之后加入, 再加入 PEG-DSPE (硫酸铵溶液水化)
C6-C-Rg3(前)/Lp 制备方法: 方法 2	HSPC:Cho:Rg3: 荧 光 探 针 =10:1:1:1	Rg3 和胆固醇在水化之前加入 (硫酸铵溶液水化)
C6-C-Rg3(后)/Lp 制备方法: 方法 3	HSPC:Cho:Rg3: 荧 光 探 针 =10:1:1:1	含胆固醇, Rg3 在透析之后加入 (硫酸铵溶液水化)
C6-C-Rg3-MIT/Lp 制备方法: 方法 3	HSPC:Cho:Rg3: 荧 光 探 针 : MIT=10:1:1:1:1	含胆固醇, Rg3 在 MIT 之后加入 (硫酸铵溶液水化)

[0290] 实验结果1如下:

[0291]

实验组名称	平均荧光强度	结果评价
C6-C/Lp(对照 1)	$2.26 \times 10^4 \pm 1849$	普通胆固醇脂质体, 无 Glut1 靶向机制, 阳性对照组。
C6-Rg3/Lp(对照 2)	$1.33 \times 10^5 \pm 1826$	经典被动载药法制备的 Rg3 脂质体处方 提高了 5.88 倍
C6-Rg3-MIT/Lp(对照 3)	$2.78 \times 10^4 \pm 1823$	靶向性提高了 1.23 倍; 原因分析: 按传统被动载药法制备过程中, 米托蒽醌 盐酸盐中的盐酸破坏了 Rg3 脂质体, 造成 Rg3 大量泄漏, 导致靶向性大幅度降低。
C6-Rg3(前加入)/Lp	$2.30 \times 10^4 \pm 1885$	靶向性为 1.02 倍;

[0292]

		原因分析: 传统主动载药法中, 水化过程所用的离子型水溶液破坏了 Rg3 脂质体稳定性, 造成 Rg3 泄漏, 从而失去了 Glut1 介导的靶向性。
C6-Rg3(后加入)/Lp	$1.21 \times 10^5 \pm 2047$	靶向性提高了 5.35 倍; 原因分析: 在使用传统主动载药法中, 将 Rg3 置于透析之后(外水相为 5%葡萄糖水溶液)加入, 成功地把 Rg3 嵌入了磷脂膜中, 从而起到了良好的 Glut1 介导的靶向性。
C6-Rg3(前)-MIT/Lp	$2.99 \times 10^4 \pm 1889$	靶向性提高了 1.32 倍; 原因分析: Rg3 在外水相为 5%葡萄糖时加入, 但之后加入的盐酸米托蒽醌溶液破坏了 Rg3 脂质体的稳定性, 从而导致了脂质体失去了 Glut1 介导的靶向性。
C6-Rg3(后)-MIT/Lp	$1.01 \times 10^5 \pm 1965$	靶向性提高了 4.47 倍; 原因分析: 在米托蒽醌完成载药后加入 Rg3, 成功地把 Rg3 嵌入了磷脂膜中, 从而起到了良好的 Glut1 介导的靶向性。但该制备方法也是离子型溶液, 与上述 C6-Rg3(前)-MIT/Lp 的制备相比, 理论上无差别, 该机制尚不明确。
C6-Rg3-PEG/Lp	$9.25 \times 10^4 \pm 1908$	靶向性提高了 4.09 倍; 原因分析: 加入 PEG-DSPE 后, 靶向性轻微降低。
C6-Rg3-MIT-PEG/Lp	$8.46 \times 10^4 \pm 1952$	靶向性提高了 3.74 倍; 原因分析: 载药脂质体在加入 PEG-DSPE 后, 靶向性有所降低, 提示 PEG-DSPE 用量对靶向性有影响。
C6-C-Rg3(前)/Lp	$2.56 \times 10^4 \pm 1844$	靶向性为 1.13 倍; 原因分析: 加入胆固醇后, 采用被动载药法, Rg3 无法起到提高靶向性作用。
C6-C-Rg3(后)/Lp	$2.71 \times 10^4 \pm 1816$	靶向性提高了 1.20 倍; 原因分析: 因磷脂与胆固醇已形成稳定的双分子膜, 新加入的 Rg3 只能被包裹在了脂质体内腔, 而非嵌在磷脂膜上, 从而失去了 Glut1 介导的靶向性。
C6-C-Rg3-MIT/Lp	$2.57 \times 10^4 \pm 1825$	靶向性为 1.14 倍; 原因分析: 因磷脂与胆固醇已形成稳定的双分子膜, 新加入的 Rg3 只能被包裹在了脂质体内腔, 而非嵌在磷脂膜上, 从而失去了 Glut1 介导的靶向性。

[0293] 以上比较为

[0294] 实验结论:

[0295] 1) 采用传统被动载药法(薄膜蒸发法), 靶向性实验数据证明: 无法制备合格的 Rg3 米托蒽醌共载脂质体。

[0296] 2) 采用传统的主动载药法, 具体地:

[0297] i. 在透析之前加入 Rg3, 酸根溶液造成 Rg3 在脂质体中发生泄漏, 从而造成脂质体

制备失败。

[0298] ii. 在透析之后加入Rg3, 可分两种情况:

[0299] a) Rg3在盐酸米托蒽醌之前加入, 因药物产生的离子型溶液导致脂质体中的Rg3<sup>2+</sup>严重泄漏, 从而脂质体制备失败;

[0300] b) Rg3在盐酸米托蒽醌之后加入, 脂质体制备成功。

[0301] 上述两个条件基本相同, 两者先后顺序虽然不同, 但都存在离子型溶液, 却产生了不同的结果, 机制尚不明确。

[0302] 3) 适量加入PEG-DSPE影响了Glut1介导的靶向性, 提示PEG-DSPE的用量有限制。

[0303] 4) 本实验提示, 本发明所述的Rg3米托蒽醌共载脂质体, 须按实施例18相同或相似的方法制备。

[0304] 实验结果2如下:

平均荧光强度	C6-C/Lp	C6-Rg3/Lp	C6-Rg3(后)/Lp
空白组	2.26×10 <sup>4</sup> ±1849	1.32×10 <sup>5</sup> ±3543	1.21×10 <sup>5</sup> ±2421
加入葡萄糖组	2.19×10 <sup>4</sup> ±1834	9.24×10 <sup>4</sup> ±1904	8.11×10 <sup>4</sup> ±1747
[0305] 加入根皮苷	2.16×10 <sup>4</sup> ±1890	8.71×10 <sup>4</sup> ±1929	6.90×10 <sup>4</sup> ±1818
加入槲皮素组	2.10×10 <sup>4</sup> ±1875	3.30×10 <sup>4</sup> ±1896	3.39×10 <sup>4</sup> ±1929
结果分析	分别降低了 3%, 4%, 7%	分别降低了 30%, 34%, 75%	分别降低了 33%, 43%, 72%

[0306] 由上述结果此可见, 随着Glut1底物和抑制剂的加入, C6-C/Lp的荧光强度无显著改变, 但阻止了C6-Rg3/Lp的细胞摄取, 证明人参皂苷Rg3脂质体通过与Glut1相互作用增强其摄取效率, 从而证明Rg3位于脂质体的膜上, Rg3的葡萄糖基 (Glc) 裸露在脂质体表面。

[0307] 应用实施例2: 人乳腺癌 (MCF-7) 体内药效学研究

[0308] 1) 试验方法: 将肿瘤细胞株 (MCF-7) 注入小鼠皮下, 建立皮下肿瘤模型。当肿瘤体积达到100mm<sup>3</sup> (接种后7d) 时, 将小鼠随机分组 (n=8每组) 治疗, 每组尾静脉注射空白溶剂 (5% 葡萄糖, Blank)、米托蒽醌脂质体注射剂 (C-MIT-PEG/LP组) 和各实验组, 剂量按米托蒽醌计高中低三组 (2mg、1mg、0.5mg), 每7天给一次药, 持续到第28天, 给药的同时测量肿瘤的长度、宽度和记录体重。计算肿瘤体积 (V) 的公式为:  $V = (W^2 \times L) / 2$ 。长度 (L) 为实体瘤的最长直径, 宽度 (W) 是垂直于长度的最短直径。在第28天实验结束, 所有动物均处死, 取出肿瘤进行影像学和组织学检测。

[0309] 抑瘤率  $T = (\text{未给药组肿瘤} - \text{测试组肿瘤重量}) / \text{未给药组肿瘤重量}$

[0310] 备注: 米托蒽醌+Rg3=2mg/kg+2mg/kg, 表示药物浓度, 下同。

[0311] 2) 实验组如下:

实验组名称	来源或制备方法
[0312] Rg3(1.0)-MIT-PEG/Lp	HSPC:Rg3:MIT:PEG-DSPE=10:1:1:0.5, 按实施例 18 方法制备
C-Rg3(1.0)-MIT-PEG/Lp	HSPC:Cho:Rg3:MIT:PEG-DSPE=10:1:1:1:0.5, 按实施例 18 方法制备 (增加胆固醇)
Rg3(1.5)-MIT-PEG/Lp	HSPC:Rg3:MIT:PEG-DSPE=10:1.5:1:0.5, 按实施例 18 方法制备
Rg3(2.0)-MIT-PEG/Lp	HSPC:Rg3:MIT:PEG-DSPE=10:2:1:0.5, 按实施例 18 方法制备

[0313] 3) 试验结果如下:

项目	给药剂量	7 天肿瘤抑制率	14 天肿瘤抑制率	21 天肿瘤抑制率	28 天肿瘤抑制率	备注
Blank	/	-26%	-45%	-87%	-108%	/
C-MIT-PEG/LP 组	0.5	94%	88%	80%	74%	/
	1	75%	60%	55%	35%	
	2	36%	29%	26%	20%	
Rg3(1.0)-MIT-PEG/Lp	0.5+0.5	84%	75%	65%	56%	药效显著
	1+1	63%	37%	23%	9%	
	2+2	35%	18%	7%	肿瘤消失	
C-Rg3(1.0)-MIT-PEG/Lp	0.5+0.5	90%	84%	79%	75%	比胆固醇组略有优效
	1+1	78%	62%	45%	33%	
	2+2	39%	24%	19%	12%	
Rg3(1.5)-MIT-PEG/Lp	0.5+0.75	82%	71%	61%	55%	药效显著
	1+1.5	60%	38%	21%	11%	
	2+3	33%	15%	6%	肿瘤消失	
Rg3(2.0)-MIT-PEG/Lp	0.5+1	85%	72%	59%	53%	药效显著
	1+2	66%	45%	25%	11%	
	2+4	35%	16%	5%	肿瘤消失	

[0315] 结论:

[0316] 1) Rg3/MIT=1.0、1.5和2.0,在药效学上,无显著差别。

[0317] 2) Rg3米托蒽醌脂质体的体内药效学比普通胆固醇米托蒽醌脂质体组 (C-MIT-PEG/LP组) 和胆固醇Rg3米托蒽醌脂质体组 (C-Rg3(1.0)-MIT-PEG/Lp) 具有显著优效,其中, Rg3(1.0)-MIT-PEG/Lp、Rg3(1.5)-MIT-PEG/Lp和Rg3(2.0)-MIT-PEG/Lp的高剂量组 (12mg/kg) 在第28天,肿瘤已完全消失,比普通胆固醇米托蒽醌脂质体组 (C-MIT-PEG/LP组) 和胆固醇Rg3米托蒽醌脂质体组 (C-Rg3(1.0)-MIT-PEG/Lp) 具有显著性优效。同时,该三组实验组的中剂量组 (8mg/kg) 第28天的抑瘤率为9-11%,比普通胆固醇脂质体组 (C-MIT-PEG/LP组) 和胆固醇Rg3米托蒽醌脂质体组 (C-Rg3(1.0)-MIT-PEG/Lp) 的高剂量组 (12mg/kg) 第28天抑瘤率 (11-20%) 更优,显示出本发明Rg3米托蒽醌脂质体对传统米托蒽醌脂质体在药效学上显著优势。

[0318] 人结肠癌C-26细胞株:根据体内药效学实验方法,针对人结肠癌 (C-26) 细胞体内药效学的研究数据如下。

项目	Blank	C-MIT-PEG/LP组	Rg3(1.0)-MIT-PEG/Lp	Rh2(1.0)-MIT-PEG/Lp
给药剂量	/	2mg/kg	2mg/kg+2mg/kg	2mg/kg+2mg/kg
7天肿瘤抑制率	-27%	46%	38%	35%
14天肿瘤抑制率	-53%	48%	25%	24%
21天肿瘤抑制率	-72%	37%	11%	9%
28天肿瘤抑制率	-91%	22%	肿瘤消失	肿瘤消失



[0320] 结果显示:

[0321] 1) Rg3米托蒽醌脂质体和Rh2米托蒽醌脂质体的药效学无显著差别;

[0322] 2) Rg3米托蒽醌脂质体和Rh2米托蒽醌脂质体的药效学比胆固醇脂质体组(C-MIT-PEG/LP组)具有显著优效。

[0323] 人胰腺癌Capan-1:根据体内药效学实验方法,针对人胰腺癌(Capan-1)细胞体内药效学的研究数据如下。

项目	Blank	C-MIT-PEG/LP组	Rg3(1.0)-MIT-PEG/Lp	Rh2(1.0)-MIT-PEG/Lp
给药剂量	/	2mg/kg	2mg/kg+2mg/kg	2mg/kg+2mg/kg
[0324] 7天肿瘤抑制率	-34%	87%	76%	66%
14天肿瘤抑制率	-65%	78%	70%	65%
21天肿瘤抑制率	-96%	75%	56%	53%
28天肿瘤抑制率	-124%	63%	35%	28%

[0325] 结果显示:

[0326] 1) Rg3米托蒽醌脂质体和Rh2米托蒽醌脂质体的药效学无显著差别;

[0327] 2) Rg3米托蒽醌脂质体和Rh2米托蒽醌脂质体的药效学比胆固醇脂质体组(C-MIT-PEG/LP组)具有显著优效。

[0328] 应用实施例3:急性毒性(LD50)研究(SD大鼠)

[0329] 1) 实验方法:大鼠160~260g,6~9周龄,每组6只,给药方式:缓慢静推(约1mL/min),给药频率:3次/天。

[0330] 本试验供试品米托蒽醌剂量设置为6,9,12和18mg/kg/天,供试品中含Rg3根据处方剂量计算。同时设置溶媒对照组(5%葡萄糖注射液)、市售阳性对照组(C-MIT-PEG/LP组)、Rg3(1.0)-MIT-PEG/Lp、Rg3(2.0)-MIT-PEG/Lp、Rh2(1.0)-MIT-PEG/Lp、Rh2(2.0)-MIT-PEG/Lp,缓慢静推(约1mL/min),3次/天,每次给药间隔至少4h。

[0331] 2) 实验组制备方法:根据处方要求,依实施例18方法制备。

组别	低(mg/kg) (MIT+皂 苷)	中(mg/kg) (MIT+皂苷)	高(mg/kg) (MIT+皂苷)	极高(mg/kg) (MIT+皂苷)
[0332] 溶媒对照组	0	0	0	0
C-MIT-PEG/LP组	6	9	12	18
Rg3(1.0)-MIT-PEG/Lp	6+6	9+9	12+12	18+18
Rg3(2.0)-MIT-PEG/Lp	6+12	9+18	12+24	18+36
Rh2(1.0)-MIT-PEG/Lp	6+6	9+9	12+12	18+18
Rh2(2.0)-MIT-PEG/Lp	6+12	9+18	12+24	18+36

[0333] 3) 实验结果如下表:

项目名称	大鼠(LD50)的死亡情况			
	6mg/kg	9mg/kg	12mg/kg	18mg/kg
给药剂量(按米托蒽醌计)	6mg/kg	9mg/kg	12mg/kg	18mg/kg
溶媒对照组	0/6	0/6	0/6	0/6
[0334] C-MIT-PEG/LP 组	1/6	4/6	6/6	/
Rg3(1.0)-MIT-PEG/Lp	0/6	0/6	0/6	3/6
Rg3(2.0)-MIT-PEG/Lp	0/6	0/6	1/6	4/6
Rh2(1.0)-MIT-PEG/Lp	0/6	0/6	0/6	3/6
Rh2(2.0)-MIT-PEG/Lp	0/6	0/6	0/6	2/6

[0335] 通过以上实验显示,

[0336] 1) Rg3米托蒽醌脂质体和Rh2米托蒽醌脂质体的急性毒性无显著差别;

[0337] 2) Rg3米托蒽醌脂质体 (Rg3 (1.0) -MIT-PEG/Lp组和Rg3 (2.0) -MIT-PEG/Lp组) 和Rh2米托蒽醌脂质体 (Rh2 (1.0) -MIT-PEG/Lp组和Rh2 (2.0) -MIT-PEG/Lp组) 在6mg/kg和9mg/kg未见死亡、12mg/kg死亡0/6或1/6, 18mg/kg时死亡3/6或4/6; 而胆固醇脂质体组 (C-MIT-PEG/LP组) 在6mg/kg死亡1/6, 9mg/kg死亡4/6。说明Rg3米托蒽醌脂质体和Rh2米托蒽醌脂质体的LD50在12-18mg/kg之间, 胆固醇米托蒽醌脂质体的LD50在6-9mg/kg之间, 显示人参皂苷脂质体比胆固醇脂质体的急性毒性显著性降低 (4/6, 在/后面的数字6表示测试老鼠总只数为6, /前面的数字表示老鼠的死亡只数为4)。