

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 47/30

A61K 48/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200310110762.9

[43] 公开日 2005 年 4 月 27 日

[11] 公开号 CN 1608675A

[22] 申请日 2003.10.22

[21] 申请号 200310110762.9

[71] 申请人 四川大学

地址 610041 四川省成都市人民南路三段十七号四川大学华西药学院

共同申请人 成都康弘科技实业(集团)有限公司

[72] 发明人 张志荣 孙 逊 段友容

[74] 专利代理机构 成都信博专利代理有限责任公司

代理人 冯义高

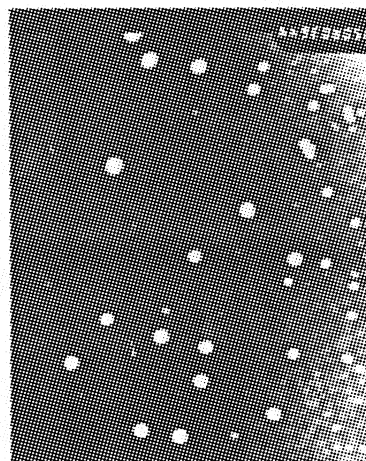
权利要求书 2 页 说明书 8 页 附图 4 页

[54] 发明名称 一种新型高分子材料载药纳米粒及制法和用途

药物的纳米粒制剂的血管内注射、肌肉注射或口服给药剂型。

[57] 摘要

本发明公开了一种药用高分子材料 (PELGE/PELGA) 载基因或化学药物或多肽、蛋白类药物纳米粒及其制备方法和用途。载体材料用不同分子量和不同 LA : GA 比例以及不同 PEG 含量的 PELGE 材料, 载基因或化学药物或蛋白类药物的纳米粒的制法为乳化—蒸发法, 在机械搅拌或高压乳匀机作用下制备出 PELGE 或 PELGA 纳米粒。这类共聚物在水中自组装成纳米粒或胶束, 其中相对疏水性的 PLGA 段聚集成核, 亲水性的聚乙二醇形成亲水性的壳。本发明制法简单, 工艺成熟, 性能稳定, 纳米粒表面光滑, 均匀, 无粘连, 载药量和包封率高, 适于大规模连续生产。其应用包括作为基因治疗的质粒、核酸疫苗、反义寡聚脱氧核苷酸或核酶的纳米粒制剂或作为化学药物如水不溶性、水难溶性、水溶性化学药物的纳米粒制剂或多肽、蛋白类



1、一种新型高分子材料载药纳米粒，其特征在于它用高分子材料 PELGE 或 PELGA 与所载药物为基因治疗所用的质粒、核酸疫苗、反义寡聚脱氧核苷酸、核酶或水不溶性、水难溶性、水溶性化学药物或多肽、蛋白类药物，在溶剂（水或有机溶剂）存在下，经机械搅拌或高压乳匀后，加入或不加入支架剂，冻干制成。

2、根据权利要求 1 所述的载药纳米粒，其特征在于载体材料用不同分子量和不同 LA: GA 比例以及不同 PEG 含量的 PELGE 或 PELGA 材料，其分子量为 $1.0 \times 10^3 - 6.0 \times 10^4$ ；LA/GA 为 100/0-50/50；PEG 含量为 5-50%，粒径在 5-600nm 可控，其有机溶剂残余量低于限量的 1/10。

3、一种新型高分子材料的载药纳米粒的制备方法，其特征在于包括以下步骤：

a) 将 PELGE 或 PELGA 材料溶于有机溶剂中制成有机相；

b) 取适量治疗基因如 pORF IL-12 质粒或化学药物如盐酸米托蒽醌 (DHAQ) 或阿霉素 (ADR) 或多肽、蛋白类药物如胸腺五肽加入上述有机相中，将其匀化后形成初乳；

c) 将此初乳滴加入外水相的溶液中，充分匀化，室温下磁力搅拌 2-8 小时，或高压乳匀，即得纳米粒胶体溶液；

d) 纳米粒胶体溶液中加入适量的支架剂（或不加支架剂），常规冻干保存。

4、根据权利要求 3 所述的载药纳米粒的制备方法，其特征在于有机溶剂为二氯甲烷 (DCM) 或二氯甲烷和丙酮 (AC) 的混合液，DCM 和 AC 的体积比为 50-100/0-50。

5、根据权利要求 3 所述的载药纳米粒的制备方法，其特征在于外水相为聚乙烯醇（PVA）或普朗尼克 F68 或右旋糖苷，其浓度为 0-5%。

6、根据权利要求 3 所述的载药纳米粒的制备方法，其特征在于乳化方式有超声乳化，高压乳匀方式。超声乳化 1-6 次，每次 5-10 秒，强度为 10-600W；高压乳匀 1-8 次，强度 5000-25000Kpa。

7、根据权利要求 3 所述的载药纳米粒的制备方法，其特征在于加入的支架剂有葡萄糖、乳糖或甘露糖等，其含量为 1-10%。

8、根据权利要求 1、2、3 所述的载药纳米粒，其特征在于表面光滑圆整，无粘连，粒径在 5-600nm 可控，包封率 50-99.5%。缓释期 8 小时起至 4 周。

9、根据权利要求 1、2、3 所述的载药纳米粒的制备方法，其特征在于抗核酸酶的能力为用 DNA 酶 I（0.32U/ μ gDNA）消化 10 小时后，质粒 DNA 无降解；载有 pORF LacZ 质粒的纳米粒对肝癌细胞 SMMC-7721 的转染率在 10-95%。

10、一种新型药用高分子材料载药纳米粒的用途，其特征在于可用于基因治疗的质粒、核酸疫苗、反义寡聚脱氧核苷酸、核酶的纳米粒制剂或作为化学药物如水不溶性、水难溶性、水溶性化学药物的纳米粒制剂或多肽、蛋白类药物的纳米粒制剂的血管内注射、肌肉注射或口服给药剂型。

一种新型高分子材料载药纳米粒及制法和用途

技术领域

本发明涉及一种新型药用高分子材料载药纳米粒及制备方法和应用。其载药纳米粒的制备方法为乳化-蒸发法。特别用高分子材料 PELGE/PELGA 为载体材料包裹治疗基因如 pORF IL-12 质粒或化学药物如盐酸米托蒽醌 (DHAQ) 或阿霉素 (ADR) 或多肽、蛋白类药物如胸腺五肽, 在机械搅拌或高压乳匀机作用下制备出该 PELGE/PELGA 纳米粒。

背景技术

一般可生物降解的聚合物纳米粒载体材料包括天然和合成两类, 较早应用的血清蛋白、血红蛋白、骨胶原、明胶、葡聚糖、白蛋白、甲壳素及其衍生物、卵磷脂、胆固醇等天然可生物降解的高分子材料生物相容性好, 但制备困难, 成本高, 质量无法控制, 不能大规模生产, 因而人们已将目光转向了较易获得的合成可生物降解聚合物。用于化学药物、多肽和蛋白类药物以及治疗基因载体的合成可生物降解聚合物主要有聚乳酸 (PLA)、乳酸-乙醇酸共聚物 (PLGA)、聚丙烯酸酯类等。PLA 和 PLGA 作为可降解的合成高分子材料, 具有良好的生物相容性。但由于该纳米粒表面具有一定的疏水性, 其纳米粒静注后迅速与血浆蛋白等血液成分结合, 易被巨噬细胞识别、包围、吞噬, 使该纳米粒在血液循环系统中的循环时间减少, 降低疗效。目前还没有一种合成聚合物纳米粒载体材料可用于血管内注射的临床报道。其最根本原因之一是载体材料与血细胞长期接触的血液不相容性。

日本科学家今井庸二提出, 具有血液相容性材料应在 $0.1\sim 0.2\mu\text{m}$ 范围内具有物理或化学上的不均匀微观结构, 从这个观点出发, 很多研究者采用多种方法研制开发具有微观相分离结构的聚合物。不少实验结果显示, 当聚合物呈现某种特定的相分离结构时, 表现出良好的血液相容性。因此, 在一个大分子

链上同时含有亲水和疏水链段的两亲（或两性）嵌段及接枝共聚物是人们颇感兴趣的研究对象。PLGA 上接枝 PEG 更引起了人们的注意。由于 PLGA 和 PEG 没有毒性，已被美国 FDA 批准应用于人体内（肌肉注射）。PLGA 分子上无肽链，无免疫原性，并且可生物降解，其降解产物是动物体内的自然代谢产物，易于从体内排出而不积蓄。将 PEG 接枝在 PLGA 材料上，这类含有不相容链段的共聚物具有微观相分离的形态。动物实验结果表明：与静注 PLGA 纳米粒相比，静注 PEG-PLGA-PEG (PELGE) 纳米粒后，纳米粒中的药物在血液循环系统中的滞留时间明显延长。

基因治疗就是将具有一定功能的外源基因导入人体细胞，以补充机体所缺失的基因或纠正机体异常表达的基因。基因治疗不仅是一个新的治疗手段，同时，它也是一门新的药物学。与传统药物学的不同之处在于，它是将一种特殊的活性物质转移入体内，使其在特定空间、特定时间进行表达，从而达到治疗疾病的目的。

基因治疗中一个重大问题是如何选择合适的基因载体，将目的基因输送到靶组织，并进入特定靶细胞，从而能在该细胞中得到高效表达。目前，应用于基因治疗的载体主要有病毒载体和非病毒载体两种。其中病毒载体已被广泛而有效地得到应用，但病毒载体存在免疫原性高、毒性大、目的基因容量小、靶向特异性差、制备较复杂及费用较高等不足。故人们越来越重视人工合成的非病毒载体的研究。现阶段研究得最多的非病毒载体是阳离子脂质体，其介导的基因转移有简便，安全，无免疫原性，可携带较大的 DNA 分子等优点，但其在体外培养的细胞中转染率高，而体内转染率却极低。这主要是因为阳离子脂质体在体内环境中不够稳定，且很容易与正常细胞膜如血细胞膜（均带负电荷）发生非特异性结合。Mohato 等系统地研究了大分子药物的药动学特性及其分子量和电荷等理化性质。研究表明，电荷对于分子量大于 70000 道尔顿的大分子处置是很重要的。阳离子型大分子由于静电相互作用很快被肝脏摄取，而那些带有较弱负电荷的大分子如牛血清白蛋白和羧甲基环糊精在血浆中的滞留时间较长。药动学解析结果表明，所有 DNA-阳离子脂质体复合物样品均具有较低的药时曲线下面积（AUC）和全身清除率，这些制剂的组织摄取指数都比较接近，脾脏的摄取指数最大，肝和肺居第二和第三。

以可生物降解的聚合物为骨架材料的纳米粒，作为一种新型的药物载体，其在基因治疗方面的运用已得到了普遍关注。由于常用的 DNA 为超螺旋结构或开环结构，空间体积太大，并且不能有效主动进入细胞，因此必须进行缩合及依赖其他技术的辅助。纳米载体具有结合、浓缩 DNA 及将 DNA 高效导入各种细胞的能力，体外显示无明显细胞毒性。同时动物实验提示，使用无免疫原性的纳米载体可获取有效基因转移率。mPEG-PLGA-mPEG (PELGE) 纳米粒用作传递系统，除了具有脂质体载体的一般优点外，还可以克服脂质体载体稳定性差，静注后迅速被肝脾摄取，不能有效到达靶组织的问题。

发明内容

本发明的目的在于提供一种载基因或化学药物或多肽、蛋白类药物的用聚乙二醇 (PEG) 修饰的聚乳酸-乙醇酸 (PLGA) 嵌段接核共聚物 (mPEG-PLGA-mPEG 简称 PELGE 或 mPEG-PLGA 简称 PELGA) 两亲性、可生物降解的三嵌段共聚物制备的用于纳米粒。这种嵌段共聚物能够在水介质中自组装成胶束或纳米粒，其中，相对疏水性的 PLGA 聚集成疏水性、可生物降解的核，聚乙二醇嵌段组装成亲水性的壳，具有稳定胶束、有效躲避生物体内皮网状系统对药物的捕捉和血浆蛋白质对药物的吸附作用，因此这类纳米粒是一类优良的药物载体。这种纳米粒粒径在 5-600nm 可控，表面光滑，均匀度好，颗粒规则无粘连，再分散性好，且制备方法简单、工艺成熟、适宜大规模连续生产。同时，载基因或化学药物或多肽、蛋白类药物的量和包封率高，可用于血管内或肌肉注射或口服给药。

本发明的技术方案为：

将一定量的 PELGA 或 PELGE 加到一定体积的二氯甲烷 (DCM) 或二氯甲烷 (DCM) /丙酮的混合有机溶剂中构成有机相，取适量治疗基因或化学药物或多肽、蛋白类药物加入有机相中，将其匀化后形成初乳，将初乳加到一定量的乳化剂和一定体积的去离子水所构成的水相中，再次乳化，继而搅拌蒸发有机溶剂 2-8 小时或高压乳匀，使二氯甲烷和丙酮挥发完全，即得 PELGA 或 PELGE 纳米粒的胶体溶液，加入 1-10%的支架剂 (亦可不加支架剂)，常规冻干保存。

本发明纳米粒载体材料用下列不同分子量和不同 LA: GA 比例以及不同 PEG 含量的 PELGE 或 PELGA 材料, 其分子量为 1.0×10^3 - 6.0×10^4 ; LA: GA 为 100: 0-50: 50; PEG 含量为 5-50%; 粒径为 5-600nm 可控; 其有机溶剂为二氯甲烷 (DCM) 或二氯甲烷和丙酮 (AC) 的混合液, DCM 和 AC 的体积比为 50-100/0-50。冻干的纳米粒中有机溶剂残余量低于限量 1/10。

本发明外水相为聚乙烯醇 (PVA) 或普朗尼克 F68 或右旋糖苷, 其浓度为 0-10%。其匀化方式包括超声乳化, 高压乳匀方式。超声乳化 1-6 次, 每次 5-10 秒, 强度为 10-600W; 高压乳匀 1-8 次, 强度 5000-25000Kpa。支架剂包括葡萄糖、乳糖或甘露糖等, 其含量为 1-10%。

本发明制备的纳米粒, 表面光滑圆整, 无粘连, 粒径在 5-600nm 可控 (图 1、图 2 和图 3)。包封率在 50-99.5%, 缓释时间 8 小时起至 4 周。可用于血管内注射、肌肉注射或口服药物基因治疗的质粒、核酸疫苗、反义寡聚脱氧核苷酸、核酶或作为化学药物如水不溶性、水难溶性、水溶性化学药物或多肽、蛋白类药物。载基因或化学药物或多肽、蛋白类药物纳米粒的粒度用激光粒度仪和透射电镜测量所得。载治疗基因的纳米粒的抗核酸酶的能力为用 DNA 酶 I ($0.32\text{U}/\mu\text{gDNA}$) 消化 10 小时后, 质粒 DNA 无降解; 载有 pORF LacZ 质粒的纳米粒对肝癌细胞 SMMC-7721 的转染率在 10-95%。

本发明也可通过改变 LA/GA 的比例或 PEG 的含量或 PEG 的分子量或嵌段聚合物的分子量或几种材料的组合来调节纳米粒的降解速率, 从而调控所载基因或化学药物的释放速率。动物实验结果表明: 与 PLGA 纳米粒相比, PEG-PLGA-PEG (PELGE) 纳米粒静脉注射后, 纳米粒在血液循环系统中的滞留时间明显延长。

纳米粒中 DNA 的包封率的测定:

取 DNA- PELGE-NP 或 DNA- PELGA-NP 胶体溶液, 在 40000r/min(4 \square)条件下离心 1.5h, 精取上清液 250 μ l, 用 Hoechst 33258 染液 ($0.15\mu\text{g}/\text{ml}$) 定容到 5ml, 于荧光光度计上测定荧光强度, 用标准曲线计算上清液中 DNA 的浓度, 按下式计算包封率:

$$\text{包封率 (\%)} = [(X_1 - X_2) / X_1] \times 100\%.$$

式中 X_1 为未经包封前 DNA 的总浓度, X_2 为上清液中 DNA 的浓度。

纳米微粒体外降解实验:

采用动态渗析法,称取定量空白纳米微粒,置于透析袋内,加释放介质 pH7.4 磷酸盐缓冲液 2.5ml 封口,置于装有 42.5ml 释放介质的带塞锥形瓶中,于 (37 ± 0.5) °C 条件下恒温搅拌,转速约为 70r/min,定时取样品液 2ml 并补充相同体积释放介质。样品液按乳酸含量测定方法测定吸收度,代入乳酸标准曲线公式求出样品液中乳酸浓度,并计算累计降解百分率。

细胞转染:

肝癌细胞 SMMC-7721,用含有 10%的小牛血清和 $100 \mu\text{g/ml}$ 链霉素的 RPMI-1640 培养基培养。转染前的 24 小时,在 6 孔板的每个孔中接种 2×10^5 的细胞。在转染时细胞约有 70%的融合。将细胞用无抗生素的有血清培养基洗涤一遍后,在各孔中加入 1ml 该培养基和含有 $5-10 \mu\text{g DNA}$ 的纳米粒胶体溶液,并轻微混合。在 37°C, 5%CO₂ 孵箱中放置 5 小时后,吸出转染介质,用含有血清和抗生素的培养基洗涤两遍,并在各孔中加入 2ml 该培养基,继续培养 48 小时。转染后的细胞用 PBS 洗涤两遍后,用 2%甲醛和 0.2%的戊二醛室温固定 10 分钟,20mg/ml X-gal 37°C 染色 10 小时。染色后的细胞在倒置显微镜下观察,任取 5 个视野,计算蓝色细胞占总细胞的百分比。

载基因纳米粒的抗核酸酶能力实验:

取纳米粒胶体溶液四份,分别加入 DNA 酶 I ($0.32\text{U}/\mu\text{gDNA}$),充分混合后于 37°C 分别孵育 5 分钟,1、4、10 小时,并用 0.5M EDTA 终止酶反应。将得到的各胶体溶液超速冷冻离心 (40000r/min , 1.5h),沉淀用 0.5ml 氯仿溶解后,加入等量的 TE 缓冲液 (pH8.0)。旋涡混合 15 分钟,离心 (15000r/min) 15 分钟,上清液用二倍体积的冰冷的乙醇沉淀,并用 70%的乙醇洗涤沉淀,最后用少量的 TE 缓冲液 (pH8.0) 溶解沉淀。将该液作凝胶电泳,并与裸 DNA 进行比较。如图 10。

附图说明

图 1. 载基因 PELGA 纳米粒粒径分布图。

图 2. 载基因 PELGA 纳米粒透射电镜图。

图 3. 载基因 PELGE 纳米粒透射电镜图。

图 4. 载 pORF LacZ 质粒的 PELGA 纳米粒对肝癌细胞 SMMC-7721 的转染结果

图 5. 载 pORF LacZ 质粒的 PELGE 纳米粒对肝癌细胞 SMMC-7721 的转染结果

图 6 LA/GA 为 80/20 不同 PEG 含量的纳米粒在小鼠血管中不同时间点 DHAQ 的含量图。(PEG 的含量为: P: 0%, PE5: 5%, PE10: 10%, PE20: 20%)

图 7 PEG 含量相同 (5%) 而 LA/GA 比例不同的纳米粒在体外磷酸缓冲液中 DHAQ 累计释放百分比曲线。(LA/GA 比例为: a1 70/30, b1 80/20, d1 50/50)

图 8 LA/GA 比例相同 (70/30) 而 PEG 含量不相同的纳米粒在体外磷酸缓冲液中 DHAQ 累计释放百分比曲线。(PEG 的含量为: a1:5%, a2:10%, a3:15%)

图 9 PEG 含量相同 (10%) LA: GA 比例也相同 (50/50) 而 PEG 分子量不同的纳米粒在体外磷酸缓冲液中 DHAQ 累计释放量。(PEG 的分子量 d2: 2KD, D2: 5KD)

图 10 DNA-PELGE-NP 中的 DNA 电泳图

图中:

1. 未经处理的 pORF-mIL12 裸质粒
- 2、3. 从 pORF-mIL12-PELGE-NP 中提取出的质粒
4. DNA 酶消化 5 分钟后的 pORF-mIL12 裸质粒
5. DNA 酶消化 5 分钟后从 pORF-mIL12-PELGE-NP 提取出的质粒
6. DNA 酶消化 1 小时后从 pORF-mIL12-PELGE-NP 提取出的质粒
7. DNA 酶消化 4 小时后从 pORF-mIL12-PELGE-NP 提取出的质粒
8. DNA 酶消化 10 小时后从 pORF-mIL12-PELGE-NP 提取出的质粒

具体实施方案

下面再以实施例对本发明加以进一步的说明。

实施例 1:

精确称取 PELGE10mg, 加到丙酮中构成有机相。将治疗基因如 pORF IL-12 质粒 100 μ g 溶于双蒸水中形成水相。将质粒溶液加入有机相中其匀化后形成初乳。称取普朗尼克 F68 加入双蒸水中使其充分溶解, 调节使其浓度为 3%, 构成外水相。内水相与外水相的体积比为 1: 6-1: 10。将初乳加到外水相中, 高压乳匀机乳化, 将所得乳液用磁力搅拌蒸发有机溶剂 4-5 小时, 使丙酮挥发完全, 即得 PELGE 纳米粒的胶体溶液。加入 3%的甘露糖作为支架剂, 常规冻干保存。

实施例 2:

精确称取 PELGE10mg, 加到二氯甲烷 (DCM) 和丙酮的混合有机溶剂中 (DCM 和 AC 的体积比为 60-100/0-40) 构成有机相。将治疗基因如 pORF IL-12 质粒 100 μ g 溶于双蒸水中形成内水相。将质粒溶液加入有机相中其匀化后形成初乳。称取聚乙烯醇 (PVA) 加入双蒸水中使其充分溶解, 调节使其浓度为 2%, 构成外水相。将初乳加到外水相中, 超声乳化 30 秒, 将所得乳液放入烧杯中, 磁力搅拌蒸发有机溶剂 3 小时, 使二氯甲烷和丙酮挥发完全, 即得 PELGE 纳米粒的胶体溶液。加入 3%的葡萄糖作为支架剂, 常规冻干保存。

实施例 3:

精确称取 PELGA20mg, 加到二氯甲烷 (DCM) 中构成有机相。将治疗基因如 pORF IL-12 质粒 300 μ g 溶于双蒸水中形成内水相。将质粒溶液加入有机相中其匀化后形成初乳。称取聚乙烯醇 (PVA) 加入双蒸水中使其充分溶解, 调节使其浓度为 1%, 构成外水相。将初乳加到外水相中, 高压乳匀机乳化 1min, 将所得乳液磁力搅拌蒸发有机溶剂 4-5 小时, 使二氯甲烷挥发完全, 即得 PELGA 纳米粒的胶体溶液。加入 3%的乳糖作为支架剂, 常规冻干保存。

实施例 4:

精确称取 PELGE500mg, 加到丙酮中构成有机相。将抗癌药物如米托蒽醌 (DHAQ) 25mg 溶于双蒸水中形成水相。将 DHAQ 溶液加入有机相中其匀化后形成初乳。称取普朗尼克 F68 加入双蒸水中使其充分溶解, 调节使其浓度为 3%, 构成外水相。内水相与外水相的体积比为 1: 4-1: 8。将初乳加到外水相中, 高压乳匀机乳化, 将所得乳液用磁力搅拌蒸发有机溶剂 4-5 小时, 使丙酮

挥发完全，即得 PELGE 纳米粒的胶体溶液。加入 3%的甘露糖作为支架剂，常规冻干保存。

实施例 5:

精确称取 PELGE50mg，加到二氯甲烷（DCM）和丙酮的混合有机溶剂中（DCM 和 AC 的体积比为 60-100/0-40）构成有机相。将抗癌药如米托蒽醌（DHAQ）2mg 溶于双蒸水中形成内水相。

将 DHAQ 溶液加入有机相中其匀化后形成初乳。称取右旋糖苷 70 加入双蒸水中使其充分溶解，调节使其浓度为 1%，构成外水相。将初乳加到外水相中，超声乳化 30s，将所得乳液放入烧杯中，磁力搅拌蒸发有机溶剂 3 小时，使二氯甲烷和丙酮挥发完全，即得 PELGE 纳米粒的胶体溶液。加入 3%的甘露糖作为支架剂，常规冻干保存。

实施例 6:

精确称取 PELGA100mg，加到丙酮中构成有机相。将抗癌药物如米托蒽醌（DHAQ）5mg 溶于双蒸水中形成内水相。将 DHAQ 溶液加入有机相中其匀化后形成初乳。称取右旋糖苷 40 加入双蒸水中使其充分溶解，调节使其浓度为 1%，构成外水相。将初乳加到外水相中，高压乳匀机乳化，将所得乳液磁力搅拌蒸发有机溶剂 4-5 小时，使丙酮挥发完全，即得 PELGA 纳米粒的胶体溶液。加入 3%的乳糖作为支架剂，常规冻干保存。

实施例 7:

精确称取 PELGA/PELGE、PVA 以及胸腺五肽，将 PVA、胸腺五肽分别溶于水，配制成一定浓度备用。将 PELGA/PELGE 溶于二氯甲烷，量取胸腺五肽溶液，加入其中，在冰浴下，200-500W 超声 3-30 秒，间歇 5-30 秒，如此反复 5-1 次制成初乳。加入 PVA 溶液，再重复上述超声操作。待形成了均匀的复乳后，恒温搅拌挥去二氯甲烷。再在所得乳白色胶体溶液中加入 3%的乳糖或 3%的甘露糖作为支架剂，常规冷冻干燥即得。

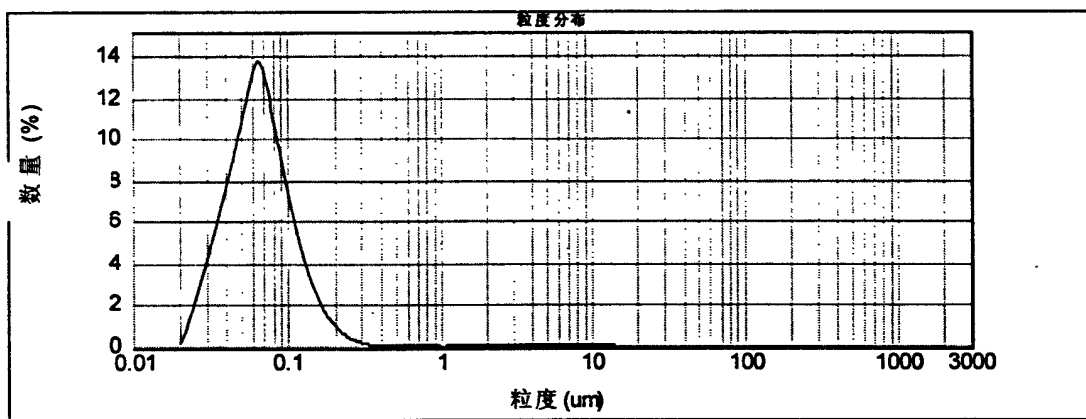


图 1

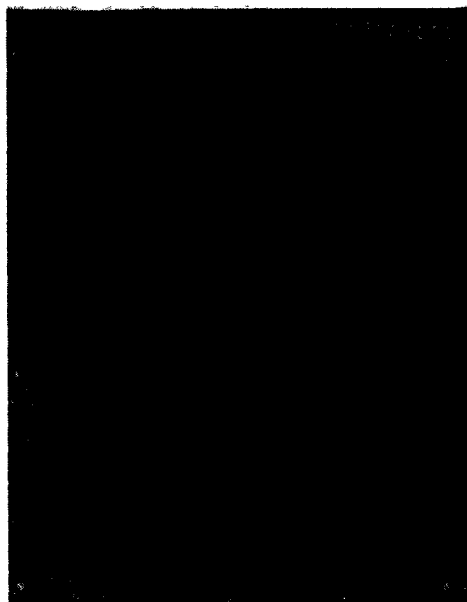


图 2



图 3



图 4

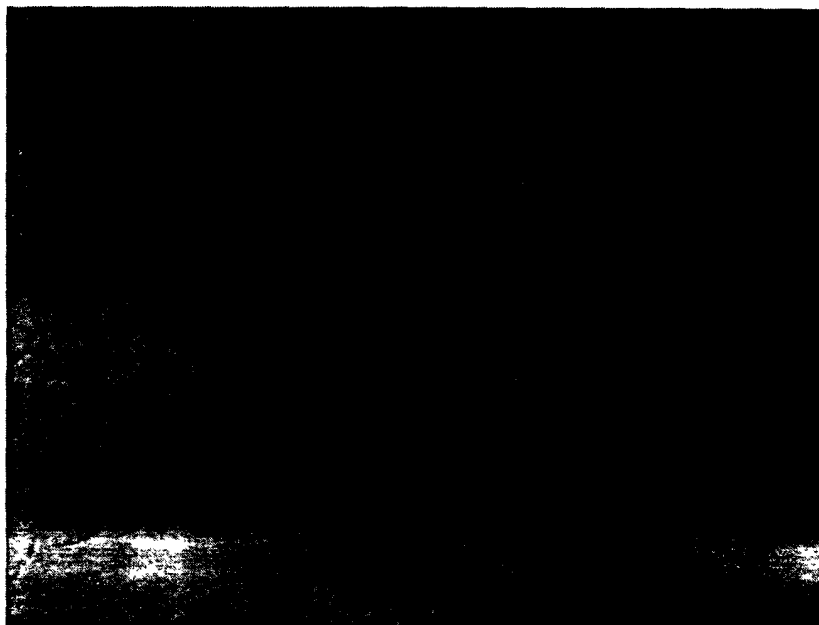


图 5

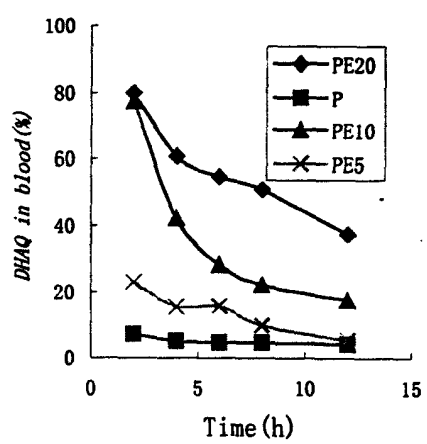


图 6

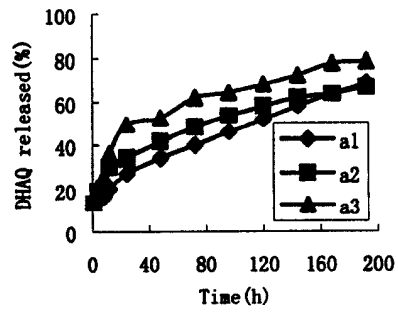


图 7.

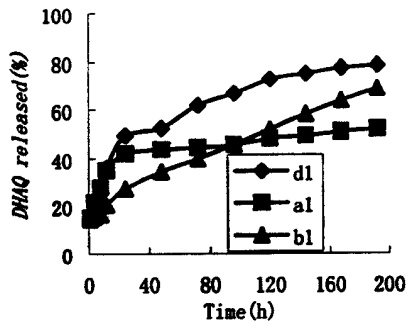


图 8

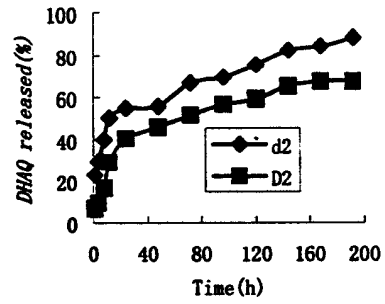


图 9

8 7 6 5 4 3 2 1



图 10