靶向动脉粥样硬化脂质体纳米载体递送系统及其制备方法

技术领域

本发明属于医药技术领域，具体涉及一种主动包封脂质体纳米载体递送系统及其制备方法和应用。

背景技术

心脑血管疾病是高致残率、高病死率、高医疗风险及高医疗费用的第一大慢性疾病，是全球第一位的死亡原因。心脑血管病占居民全部死因的40%以上，而动脉粥样硬化相关疾病是心脑血管疾病的重中之重。根据统计，全球动脉粥样硬化患者4.66亿，其中冠心病患者1.54亿，每年新发2.73千万。全球每年新发急性心肌梗死1900万，患者死亡率为34%至42%，即使患者侥幸存活，心梗后1-5年全因死亡和心血管事件的相对危险度至少比一般人群高30%。

2018年《中国心血管病报告》显示：根据2010年我国第六次人口普查数据，目前我国冠心病患者达到1100万人，每年新增患者人数超过100万，每年死于心血管疾病的患者多达390万，占居民疾病死亡构成的40%以上。大量研究证实，动脉粥样硬化是导致患者发生心肌梗死、缺血性脑卒中的主要原因，该类患者也最易发生猝死或心功能不全、脑梗塞后遗症等严重不良事件，给家庭和社会带来沉重的医疗负担。

然而，面对如此重大的疾病，全球范围内尚无较好的防治手段。对于动脉粥样硬化目前的治疗仍是全身用药。口服药物仅能延缓斑块进展，而无法明显逆转斑块，更无法将疾病彻底治愈。而国人对他汀等药物的耐受性差，易诱发肝功能异常、新发糖尿病、横纹肌溶解、认知障碍等并发症。目前，患者的治疗策略仍然是终身药物治疗，无法将疾病治愈，还面临很多药物副反应。例如口服他汀类药物治疗动脉粥样硬化需要采用强化大剂量才能具有稳定斑块的作用，而全身大剂量使用他汀类药物治疗也存在严重副作用(例如肝功能异常、横纹肌溶解、II型糖尿病等)发生率升高的风险。

对于现有的全身性给药而言，药物在进入体内后通常仅有极少一部分有

效成分能够真正作用于病变部位。尤其是动脉粥样硬化，位于血管壁中，血流速度快，药物无法进入斑块，更无法在斑块中聚集。这是制约药物疗效，并导致药物毒副作用的根本原因。靶向给药系统是指具有靶向给药能力的给药系统。在经某种途径给药以后，靶向给药系统所包含的药物会由于粒度或电性等特异性富集于靶部位，或通过带有靶向探针的载体特异性地富集于靶部位。靶向给药系统能够使药物瞄准特定的病变部位，并在目标病变部位释放有效成分。因此，靶向给药系统可以使药物在目标病变部位形成相对较高的浓度，并减少血液循环中的药量，从而在提高药效的同时抑制毒副作用，减少对正常组织和细胞的伤害。

脂质体为常用的靶向给药系统。脂质体具有提高药效、降低药物毒副作用、提升药物的生物利用度、生物安全性强等明显优势。ZL201980001843.4 公开了一项通过被动包封法制备靶向 CD44 的脂质体纳米药物，可利用易损斑块内主要存在的巨噬细胞、单核细胞、内皮细胞、淋巴细胞和平滑肌细胞的表面上的 CD44 的表达状态及其与透明质酸（HA）的亲和能力，构建靶向斑块或与易损斑块相关的疾病的能够实现药物的脂质体药物递送体系用于诊断或治疗易损斑块并持续释放的靶向给药系统，但是目前手段仅限于被动载药方法。ZL201980001833.0 公开了通过薄膜水化、探头超声两步法，将一系列具有亲水或疏水的治疗药物和造影剂包被在亲水内腔或者疏水脂质层中，进一步与靶向配体偶联。这种策略属于被动包封，虽然普适性强，但包封率往往不够高，治疗效果也有进一步提升空间。

另外，对脂溶性强的他汀类药物制备成脂质体的研究表明，可以通过对脂溶性强他汀药物采用薄膜水化或逆向蒸发法，将药物包在脂质体双层膜内，达到提高代谢时间、提高生物利用度等目的。 但是这些方法对于具有一定水溶性的他汀药物并不适用。为了解决这些问题，本专利申请的发明人发现并公开了通过主动载药方法将具有一定水溶性的他汀药物进行主动包封，达到靶向给药的方法。

在靶向纳米制剂领域，制剂粒径和靶向配体偶联密度对治疗效果的影响密切相关，但是结论并不统一，即针对不同适应症的纳米制剂的尺寸和表面配体偶联浓度没有统一标准且针对不同适应症差异较大。对于动脉粥样硬化这一疾病来说，探索适宜尺寸的粒径和配体浓度对药效发挥至关重要的作用。本专利申请公开了一种新的载药工艺，以及使用特定纳米结构和特定配体密度进行针对动脉粥样硬化疾病的治疗的配方。

发明内容

本发明的目的在于克服现有技术中的缺陷，提供一种主动包封脂质体纳米载体递送系统，及其制备方法和应用。同时本发明披露了在靶向纳米药物中，特定粒径和表面配体密度对药效的影响。

在阐述本发明内容之前，定义本申请中所使用的术语如下：

术语“靶向给药系统”是指：具有靶向给药能力的给药系统。在经某种途径给药以后，靶向给药系统所包含的药物会通过特殊载体或靶向弹头(例如，靶向配体)的作用特异性地富集于靶部位。目前已知的用于实现靶向给药的手段包括利用各种微粒给药系统的被动靶向性能、在微粒给药系统的表面进行化学修饰、利用一些特殊的理化性能、利用抗体介导靶向给药、利用配体介导靶向给药、利用前体药物靶向给药等。

术语“动脉粥样硬化”是指：一组称为动脉硬化的血管病中常见而最重要的一种，特点为受累动脉病变从内膜开始，先后有脂质和复合糖类积聚、出血和血栓形成、纤维组织增生和钙质沉着，并有动脉中层的逐渐退变和钙化。由于在动脉内膜积聚的脂质外观呈黄色粥样，因此称为动脉粥样硬化。

术语“主动包封脂质体”是指：使用跨膜 pH 梯度或离子梯度将某些亲水性或两亲性化合物装载到预制的脂质体中。该技术被称为主动或远程包封。

为实现上述目的，本发明的第一方面提供了一种主动包封脂质体纳米载体递送系统。所述脂质体纳米载体递送系统包括脂质体载体及其主动包封的用于预防和/或治疗动脉粥样硬化或与动脉粥样硬化相关的疾病的物质。

根据本发明第一方面的脂质体纳米载体递送系统，其中，所述脂质体载体的材料包含磷脂和胆固醇；

优选地，所述磷脂选自以下一种或多种：氢化大豆磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺、聚乙二醇-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺、二硬脂酰磷脂酰甘油、二硬脂酰磷脂酰丝氨酸、二油酰磷脂酰胆碱、二油酰磷脂酰乙醇胺、二油酰磷脂酰丝氨酸、二油酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇、二肉桂酰磷脂酰胆碱、二肉桂酰磷脂酰乙醇胺、二肉桂酰磷脂酰丝氨酸、二肉桂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇、二棕榈酰磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺、二棕榈酰磷脂酰丝氨酸、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇、二芥酰

磷脂酰胆碱、二芥酰磷脂酰乙醇胺、二芥酰磷脂酰丝氨酸、二芥酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇、鞘磷脂、卵磷脂酰胆碱、卵磷脂酰乙醇胺和卵磷脂酰甘油。

根据本发明第一方面的脂质体纳米载体递送系统，其中，所述用于预防和/或治疗动脉粥样硬化或与动脉粥样硬化相关的疾病的物质和所述脂质体载体的质量比为1:0.1~50，优选为1：0.2~30，更优选为1：0.5~20。可选择的是，所述纳米载体递送系统的制备进一步包括使用盐溶液水化后的所述脂质体载体主动包封所述用于预防和/或治疗动脉粥样硬化或与动脉粥样硬化相关的疾病的物质的步骤。

根据本发明第一方面的脂质体纳米载体递送系统，其中，所述用于预防和/或治疗动脉粥样硬化或与动脉粥样硬化相关的疾病的物质为弱酸性物质；

优选地，所述用于预防和/或治疗动脉粥样硬化或与动脉粥样硬化相关的疾病的物质选自以下一种或多种：他汀类药物、贝特类药物、抗血小板药物、PCSK9抑制剂、抗凝药物、血管紧张素转换酶抑制剂、钙离子拮抗剂、MMPs抑制剂、β受体阻滞剂和糖皮质激素，及其药学上可接受的盐，以及所述药物或物质的活性制剂；

更优选地，所述用于预防和/或治疗动脉粥样硬化或与动脉粥样硬化相关的疾病的物质选自以下一种或多种：洛伐他汀、阿托伐他汀、瑞舒伐他汀、辛伐他汀、匹伐他汀、普伐他汀、苯扎贝特、环丙贝特、吉非贝齐、阿司匹林、阿西美辛、奥扎格雷钠、替罗非班以及它们的药效片段或药学上可接受的盐。

根据本发明第一方面的脂质体纳米载体递送系统，其中，所述脂质体纳米载体递送系统可以通过靶向配体修饰，如GAG、胶原、层黏连蛋白、纤黏连蛋白、选择蛋白、骨桥蛋白(OPN)以及单克隆抗体HI44a、HI313、A3D8、H90、IM7和透明质酸或透明质酸的衍生物；

优选地，所述靶向配体选自透明质酸、丝甘蛋白聚糖(serglycin)、胶原、纤黏连蛋白、选择蛋白、骨桥蛋白(OPN)、单克隆抗体HI44a和IM7。

根据本发明第一方面的脂质体纳米载体递送系统，其中，所述脂质体载体选自小单室脂质体、大单室脂质体和多室脂质体。

本发明的第二方面提供了第一方面所述的脂质体纳米载体递送系统的制备方法，包括通过加入盐溶液水化所述脂质体载体并分离造成脂质体内外溶液酸度梯度的步骤。

根据本发明第二方面的脂质体纳米载体递送系统，其中，所述盐为弱酸强碱盐；

优选地，所述盐的阴离子部分选自以下一种或多种：醋酸根、依地酸根、碳酸氢根、枸橼酸根、苯甲酸根和葡萄糖酸根；和/或

所述盐的阳离子部分选自以下一种或多种：钙离子、铜离子、镍离子、钡离子、镁离子和锌离子；

更优选地，所述盐选自以下一种或多种：醋酸钙、碳酸氢钙、枸橼酸镁和葡萄糖酸铜。

根据本发明第二方面的制备方法，其中该制备方法可以包括以下步骤：

（1）将脂质体载体材料溶于良溶剂；

（2）向步骤（1）所得产物中加入造成脂质体内外溶液酸度梯度的盐溶液对其进行水化，分散成粗脂液；

（3）降低步骤（2）所得粗脂液的粒径，得到精制脂质体；

（4）对步骤（3）所得到的精制脂质体溶液通过纯化去除外部离子，脂质体内外形成酸度梯度；

（5）在步骤（4）所得到的脂质体溶液加入待包被物质溶液，孵育使药物进入脂质体内部，得到所述脂质体纳米载体递送系统。

根据本发明第二方面的制备方法，其中，所述步骤（1）中还包括蒸发去除溶剂的使所述脂质体形成脂膜的步骤；

优选地，所述蒸发温度为40~80℃，优选为50~70℃，更优选为50~60℃；

更优选地，所述蒸发方式为旋转蒸发；

进一步优选地，所述旋转蒸发速度为50~200 r/min，优选为70~120 r/min，更优选为80~100 r/min。

根据本发明第二方面的制备方法，其中，步骤（1）中，所述良溶剂选自以下一种或多种：氯仿、乙醇、甲醇、二氯甲烷、丙酮、甲苯、乙醚、乙酸乙酯、乙酸甲酯、乙腈以及二氯乙烷。

根据本发明第二方面的制备方法，其中，步骤（1）中，所述脂质体载体材料包含磷脂和胆固醇；

优选地，所述磷脂浓度为0.1~500 mg/mL，优选为0.1~200 mg/mL，更优选为0.2-100 mg/mL；和/或

所述胆固醇浓度为0.05~200 mg/mL，优选为0.1~100 mg/mL，更优选为0.1-50 mg/mL。

根据本发明第二方面的制备方法，其中，步骤（2）中， 所述盐溶液的浓度为 100~500 mM，优选为 200~300 mM，更优选为 200~250 mM；和/或

所述水化温度为 30~90℃，优选为 40~80℃，更优选为 45~65℃。

根据本发明第二方面的制备方法，其中，步骤（3）中，所述降低粒径的方法为通过将所述粗脂液通过滤膜挤出；

优选地，所述滤膜选为聚碳酸酯膜；

更优选地，所述滤膜孔径为 30~800 nm，例如 50~400 nm，例如 100 ~200 nm，例如 30 nm、50 nm、100 nm、200 nm、400 nm、600nm 或 800 nm，优选 100-150 nm。

根据本发明第二方面的制备方法，其中，步骤（4）中，所述去除外部离子的方法选自以下一种或多种：超滤膜包分离、透析分离和离子交换。

根据本发明第二方面的制备方法，其中，步骤（5）中，所述包被物质溶液浓度为 0.01~100 mg/mL，优选为 0.05~50 mg/mL，更优选为 0.1~20 mg/mL，进一步优选为 0.1-10 mg/mL。

根据本发明第二方面的制备方法，其中，步骤（5）中，所述孵育温度为 20~80℃，优选为 25~70℃

根据本发明第二方面的制备方法，其中，当所述脂质体纳米载体递送系统通过靶向配体修饰时，所述方法还包括以下步骤：

（6）将所述靶向配体与步骤（5）所得的脂质体纳米载体递送系统共同孵育，得到所述修饰后的脂质体纳米载体递送系统。

本发明的第三方面提供了一种药物，所述药物包含第一方面所述的纳米载体递送系统或按照第二方面所述的制备方法而制得的纳米载体递送系统，以及至少一种药学上可接受的载体。

本发明的第四方面提供了第一方面所述的纳米载体递送系统、按照第二方面所述的制备方法而制得的纳米载体递送系统、第三方面所述的药物在制备用于预防和/或治疗动脉粥样硬化或与动脉粥样硬化相关的疾病的药物中的应用。

优选地，所述动脉粥样硬化相关的疾病选自以下一种或多种：动脉粥样硬化症、冠状动脉粥样硬化性心脏病（包括急性冠脉综合征、无症状心肌缺血-隐匿性冠心病、心绞痛、心肌梗死、缺血性心脏病、猝死、支架内再狭窄）、脑动脉粥样硬化症（包括缺血性脑卒中、出血性脑卒中）、外周血管动脉粥样硬化症（包括颈动脉粥样硬化症、椎动脉粥样硬化症、锁骨下动脉

粥样硬化症、闭塞性周围动脉粥样硬化、视网膜动脉粥样硬化症、肾动脉粥样硬化症、下肢动脉粥样硬化症、上肢动脉粥样硬化症、肠系膜动脉粥样硬化症、动脉粥样硬化性阳痿)、主动脉夹层、血管瘤、血栓栓塞、心力衰竭和心源性休克。

本发明的第五方面提供了第一方面所述的纳米载体递送系统、按照第二方面所述的制备方法而制得的纳米载体递送系统、第三方面所述的药物在制备用于治疗血管斑块的药物中的应用;

优选地，所述血管斑块为动脉斑块;

更优选地，所述药物用于遏制动脉斑块进展、逆转动脉斑块和/或减小动脉斑块体积。

本发明属于靶向制剂领域，涉及一种主动靶向脂质体纳米载体递送系统及其制备方法和应用，尤其是靶向动脉粥样硬化的主动包封脂质体纳米药物的创新性制备方法和用途，例如在动脉粥样硬化或与动脉粥样硬化相关的疾病的诊断、预防和治疗中的用途。

为了进一步提升纳米药物递送系统的治疗效果，提高纳米载体的载药量和包封率，增强靶向纳米药物临床转化能力，本专利申请公开了通过主动载药制备靶向脂质体纳米药物的工艺路线，而且本专利发明人意外地发现适宜尺寸的粒径和配体浓度对药效发挥至关重要的作用。本专利申请公开了载药工艺、特定载体纳米结构和特定配体密度，以及针对动脉粥样硬化疾病治疗的新方法，实现了多种动脉粥样硬化、抗炎、抗血小板等药物在动脉粥样硬化处的高效富集。

本专利申请公开了一系列靶向脂质体药物主动载药新系统、方法和工艺，使其对药物包封率可以达到 90%以上，体现了其作为药物载体的明显优势，并进一步在模型动物体内验证了其卓越的治疗效果，拓展了靶向动脉粥样硬化脂质体药物载体的应用。

优选地，所述脂质体的配方包括：磷脂 0.2-100 mg/mL、胆固醇 0.1-50 mg/mL、药物 0.1-10 mg/mL，其中药物与脂质材料的质量比在 1：0.5 到 1：20 之间。

根据本发明的一种实施方式，本专利申请提供了一种通过主动包封装载药物用于动脉粥样硬化治疗的脂质体制剂，粒径为 50~300 nm，磷脂 0.2-100 mg/mL、胆固醇 0.1-50 mg/mL、药物 0.1-10 mg/mL，其中药物与脂质材料的质量比在 1：0.5 到 1：20 之间。优选地，所述用于预防和/或治疗动脉

粥样硬化或与动脉粥样硬化相关的疾病的物质选自他汀类药物、贝特类药物、抗血小板药物、PCSK9 抑制剂、抗凝药物、血管紧张素转换酶抑制剂、钙离子拮抗剂、MMPs 抑制剂、β 受体阻滞剂和糖皮质激素，以及它们的药学上可接受的盐中的一种或多种，包括这些种类药物或物质的活性制剂。

更优选地，所述用于预防和/或治疗动脉粥样硬化或与动脉粥样硬化相关的疾病的物质选自洛伐他汀、阿托伐他汀、瑞舒伐他汀、辛伐他汀、匹伐他汀、普伐他汀、苯扎贝特、环丙贝特、吉非贝齐、阿司匹林、阿西美辛、奥扎格雷钠和替罗非班以及它们的药效片段或药学上可接受的盐中的一种或多种，以及它们的药学上可接受的盐中的一种或多种。

本发明的一种实施方式提供了纳米载体递送系统的制备方法，所述方法包括以下步骤：

（1）将磷脂类膜材溶于良溶剂，可以蒸发除去溶剂或不除去；

（2）向步骤（1）所得溶液或蒸干物中加入造成脂质体内外溶液酸度梯度的盐溶液水化，初步分散成粗脂液；

（3）通过对粗脂液降低粒径，得到精制脂质体；

（4）对步骤（3）所得到的脂质体溶液通过纯化去除外部离子，脂质体内外形成酸度梯度；

（5）在步骤（4）所得到的脂质体溶液加入待包被药液，使药物进入脂质体内部；

（6）基于插入法将靶向配体组装在脂质体表面。

本发明提供了一种主动包封的脂质体在制备用于动脉粥样硬化或与动脉粥样硬化相关的疾病的诊断、预防和治疗的产品中的应用。

本发明的纳米载体递送系统可以具有但不限于以下有益效果：

本发明提供了一种制备主动包封脂质体纳米载体递送系统的工艺路线及其优化过程，同时验证了所得靶向递送体系的逆转斑块能力。该体系具有高包封率和载药量，对包封药物保护性强，长期放置药物不会释放，药物在体内的缓慢释放，能够提高药物在病灶局部的富集浓度，具有低毒高效的优势。本发明方法简便，绿色、可控，载药量高，对各种药物的兼容性好，生物相容性好、安全性高，易于进行靶向配体修饰，所得靶向药物对动脉粥样硬化的治疗具有很好的效果。

附图说明

当与附图一起阅读时，将更好地理解前面的发明内容以及下面的发明详述。为了说明本公开，该附图说明了一些但不是全部的替代性实施方案。但是，应该理解，该公开不限于所示的精确的设置和手段。这些图，其已并入本说明书并且是本说明书的构成部分，有助于解释本公开的原则。

图 1 例示透明质酸钠（HA）和靶向斑块透明质酸靶材（HPD）的红外光谱图。

图 2 例示乙醇注入法主动包封瑞舒伐他汀的纳米脂质体 LP/R_{A90}、LP/R_{A120} 和 LP/R_{A150} 的冷冻电镜（A，B，C）和水合粒径结果（D，E，F）。

图 3 例示混合水化主动包封瑞舒伐他汀的纳米脂质体 LP/R_{B90}、LP/R_{B120} 和 LP/R_{B150} 的冷冻电镜（A，B，C）和水合粒径结果（D，E，F）。

图 4 例示主动包封瑞舒伐他汀纳米脂质体 HA_H-LP/R_{A150}、HA_M-LP/R_{A150} 和 HA_L-LP/R_{A150} 的冷冻电镜（A，B，C）和水合粒径结果（D，E，F）。

图 5 例示靶向瑞舒伐他汀主动包封脂质体纳米载体递送系统 HA-LP/R_C 的冷冻电镜（A）和水合粒径结果（B）。

图 6 例示靶向阿托伐他汀主动包封脂质体 HA-LP/A_C 冷冻电镜和水合粒径(Dynamic Light Scattering, DLS)。

图 7 例示靶向阿司匹林主动包封药物脂质体 HA-LP/A_C 冷冻电镜和 DLS。

图 8 例示靶向匹伐他汀主动包封脂质体 HA-LP/P_C 冷冻电镜和 DLS。

图 9 例示靶向洛伐他汀主动包封脂质体 HA-LP/L_C 冷冻电镜和 DLS。

图 10 例示靶向辛伐他汀主动包封脂质体 HA-LP/S_C 冷冻电镜和 DLS。

图 11 例示靶向普伐他汀主动包封脂质体 HA-LP/P_C 冷冻电镜和 DLS。

图 12 例示靶向苯扎贝特主动包封脂质体 HA-LP/B_C 冷冻电镜和 DLS。

图 13 例示靶向环丙贝特主动包封脂质体 HA-LP/C_C 冷冻电镜和 DLS。

图 14 例示靶向阿西美辛主动包封脂质体 HA-LP/Am_C 冷冻电镜和 DLS。

图 15 例示靶向奥扎格雷主动包封脂质体 HA-LP/O_C 冷冻电镜和 DLS。

图 16 例示靶向替罗非班主动包封脂质体 HA-LP/T_C 冷冻电镜和 DLS。

图 17 例示靶向瑞舒伐他汀主动包封脂质体 HA@LP/R_d 冷冻电镜和 DLS。

图 18 例示靶向阿托伐他汀主动包封脂质体 HA@LP/A_d 冷冻电镜和 DLS。

图 19 例示靶向环丙贝特主动包封脂质体 HA@LP/C_d 冷冻电镜和 DLS。

图 20 例示靶向苯扎贝特主动包封脂质体 HA-LP/B_d 冷冻电镜和 DLS。

图 21 例示本发明的纳米递送系统的长期稳定性考察结果。

图 22 例示本发明的 HA-LP/R 纳米药物递送系统与各对照组的斑块体积进展百分比。

图 23 例示主动脉对不同治疗药物的富集程度比较

图 24a 和图 24b 例示不同 HA/脂质材料质量比药效对比。

图 25 例示细胞内吞实验细胞裂解液荧光值对比。

图 26a 例示 LP/R_C 脂质体细胞内吞实验活细胞检测荧光显微镜照片；图 26b 例示 HA@LP/R_C 纳米载体递送系统细胞内吞实验活细胞检测荧光显微镜照片；蓝色为 Hoechst33342 染的细胞核，红色为细胞内的 Cy5.5 标记的脂质体。

图 27 例示不同时间条件下荧光标记的 HA@LP/R_C 和 LP/R_C 体内分布和代谢结果。

图 28 例示给药 HA@LP/R_C 后动物的体重变化。

图 29 例示 HPD 测定参考标准曲线。

具体实施方式

下面通过具体的实施例进一步说明本发明，但是，应当理解为，这些实施例仅仅是用于更详细具体地说明之用，而不应理解为用于以任何形式限制本发明。

本部分对本发明试验中所使用到的材料以及试验方法进行描述。本领域技术人员清楚，在上下文中，如果未特别说明，本发明所用材料和操作方法是本领域公知的。

以下实施例中使用的试剂和仪器如下：

试剂：

DSPC，DSPE，胆固醇，DSPE-PEG，购自 AVT 公司；

氯仿，无水乙醇，碳酸氢钠，EDC，NHS，醋酸钙，瑞舒伐他汀钙，购自百灵威科技；

HA，购自华熙生物； DSPE-PEG-NH_2，购自 Sigma；

超滤膜包，购自 Merck；聚碳酸酯膜，购自 Whatman；

阿托伐他汀，购自莱瑞森；

阿司匹林，匹伐他汀，洛伐他汀、辛伐他汀、普伐他汀、苯扎贝特，环丙贝特，阿西美辛，奥扎格雷，替罗非班购于百灵威。2-羟基丙基-β-环糊

精购于 Sigma-Aldrich。

仪器：

挤出仪，ATS、AE001；

激光粒度仪，购自马尔文公司，型号 Nano-ZS。

HPLC，购自 Waters 公司，型号 e2695。

实施例 1 构建靶向斑块透明质酸靶材（HPD）合成

在本实施例中，以平均分子量为 1.2-1.6 万的透明质酸钠（HA）和 DSPE-PEG2000-NH2（DPN）为原料，在 EDC 和 NHSS 作用下，两者通过酰胺键缩合，经析晶、乙醇洗涤得到靶向 CD44 的 HPD 靶向材料成品。

具体方法为称取 HA 75 g 用纯化水或注射用水搅拌溶解。加入 DPN 或 DPN 的 DMF 溶液，控制 DPN 和 HA 的投料质量比在 1:1 或大于 1:1，加入 EDC 或 EDC 和 NHSS，混合均匀，25-40℃搅拌反应≥10 小时。反应结束后向反应液中加入等体积或大于一倍体积的无水乙醇搅拌均匀后静置 20 分钟以上。静置后的溶液离心收集沉淀或经膜包浓缩后离心收集沉淀，用乙醇重悬洗涤沉淀并离心，重复洗涤 2 次以上，洗涤后得到的离心沉淀采用真空干燥或冻干，控制终产品中含水量小于 10%。

从图 1 中，可以看到 HA 和 HPD 的红外光谱。

实施例 2 乙醇注入法主动包封瑞舒伐他汀的纳米脂质体制备

在本实施例中，采用乙醇注入&主动包封法制备载瑞舒伐他汀的纳米脂质体。

称取 DSPC、胆固醇、DSPE-PEG2000 (质量比为 3：1：1 或 3：1：0.5)，上述脂材用乙醇溶解。加醋酸钙水溶液（大于等于 150 mM）在 40-60℃的保温搅拌条件下将乙醇相注入水相醋酸钙溶液中使脂材溶液充分水化，形成粗脂质体悬浮液（醋酸钙水相和乙醇相溶液的体积比大于 2）。使用挤出仪分别经 600 nm、400 nm、200 nm 和 100 nm 的聚碳酸酯膜或其多层组合膜挤出 3 次以上。挤出后的纳米脂质体溶液采用纯化水稀释 20 倍及以上，通过控制膜孔径获得粒径约为 90 nm、120 nm 和 150 nm 的三种不同大小的纳米粒（LP/R_{A90}, LP/R_{A120}, LP/R_{A150}），PDI 均小于 0.2。使用透析袋或超滤膜包透析分离未包封的醋酸钙，收集内液，与瑞舒伐他汀钙溶液或瑞舒伐他汀钙和蔗糖的混合溶液混匀后（瑞舒伐他汀钙和总脂材的质量比小于

0.25），于 4-66℃条件下孵育 15 分钟或以上，得到主动包封瑞舒伐他汀钙的纳米脂质体。所制备的纳米脂质体对 API 的包封率大于 80%,最终制剂中 API 的浓度小于等于 20 mg/mL。

从图 2 中，可以看到本实施例中乙醇注入法主动包封瑞舒伐他汀的纳米脂质体 LP/R_{A90}、 LP/R_{A120} 和 LP/R_{A150} 的冷冻电镜（A，B，C）和水合粒径结果（D，E，F）。

实施例 3 混合水化主动包封瑞舒伐他汀的纳米脂质体制备

在本实施例中，采用混合水化&主动包封法制备瑞舒伐他汀的纳米脂质体。称取 DSPC、胆固醇、DSPE-PEG2000 (质量比为 3：1：1-0.5)，上述脂材用乙醇溶解。加醋酸钙水溶液（150 mM 或大于 150 mM）在 40-60℃保温条件下采用三通管、微流控等其他混合器按恒比例混合乙醇相和水相，使脂材充分水化，形成粗脂质体悬浮液（醋酸钙水相和乙醇相溶液的体积比大于 2）。采用挤出仪分别经 600 nm、400 nm、200 nm 和 100 nm 的聚碳酸酯膜或其多层组合膜挤出 3 次以上。挤出后的脂质体溶液采用纯化水稀释 20 倍及以上，通过控制膜孔径和挤出次数，最终获得粒径约为 90 nm、120 nm 和 150 nm 的三种不同大小的纳米粒（LP/R_{B90}, LP/R_{B120}, LP/R_{B150}），PDI 均小于 0.2。使用透析袋或超滤膜包透析分离未包封的醋酸钙，收集内液，与瑞舒伐他汀钙溶液或瑞舒伐他汀钙和蔗糖的混合溶液混匀后（瑞舒伐他汀钙和总脂材的质量比小于 0.25），于 4-66℃条件下孵育 15 分钟或以上，得到主动包封瑞舒伐他汀钙的纳米脂质体。所制备的纳米脂质体对 API 的包封率大于 80%，最终制剂中 API 的浓度小于等于 20 mg/mL。

从图 3 中可以看出，本实施例中混合水化主动包封瑞舒伐他汀的纳米脂质体 LP/R_{B90}、LP/R_{B120} 和 LP/R_{B150} 的冷冻电镜（A，B，C）和水合粒径结果（D，E，F）。

实施例 4 主动包封瑞舒伐他汀纳米脂质体靶向制剂的制备

如上述实施例 1 所制备的靶向材料 HPD 插入实施例 2 所制备的 130 nm 载药纳米脂质体 LP/R_{A150} 中得到靶向载药纳米脂质体。具体插入方式为：由实施例 3 所制备的载瑞舒伐他汀钙的纳米脂质体溶液和预先溶解好的 HPD 水溶液混合，在 25℃或大于 25℃保温条件下孵育 5 分钟以上，孵育结束后使用透析袋或超滤膜包透析分离未插入的 HPD，得到最终产品中 HPD

浓度为 200±31 μg/mL 的高浓度靶向配体脂质体（HA_H-LP/R_{A150}）、中浓度靶向配体脂质体 100±24 μg/mL（HA_M-LP/R_{A150}）、10±5 μg/mL 低浓度靶向载药脂质体（HA_L-LP/R_{A150}）。

从图 4 中，可以看到本实施例中主动包封瑞舒伐他汀纳米脂质体 HA_H-LP/R_{A150}、HA_M-LP/R_{A150} 和 HA_L-LP/R_{A150} 的冷冻电镜（A，B，C）和水合粒径结果（D，E，F）。

试剂盒采用竞争法酶联免疫吸附试验（ELISA）。往预先包被透明质酸衍生物(HA)的包被微孔中，依次加入标本、标准品、HA 结合蛋白(HABP)和抗 HABP 抗体，经过温育与充分洗涤，去除未结合的组分，再加入 HRP 标记的抗小鼠免疫球蛋白 G（酶标二抗），经过温育与充分洗涤，去除未结合的组分，在微孔板固相表面形成固相抗原-HA 结合蛋白-HABP 抗体-酶标抗体的免疫复合物。加底物 A 和 B，底物在 HRP 催化下，产生蓝色产物，在终止液（2 M 硫酸）作用下，最终转化为黄色，颜色的深浅和样品中的透明质酸（HA）呈负相关。用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度（OD 值），拟合标准品曲线，可以计算出样本中透明质酸（HA）的浓度。

实施例 5 靶向的瑞舒伐他汀主动包封脂质体纳米载体递送系统（HA@LP/R_C）的制备

在本实施例中，采用薄膜分散法、主动载药、化学偶联工艺制备负载治疗剂的脂质体 HA@LP/R_C。

称取二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、DPN、胆固醇、聚乙二醇-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺 (DSPE-PEG) (质量比为 3：0.5：1：1)，上述脂材用氯仿溶解。通过缓慢旋转蒸发(55℃水浴，90 r/min，30 min) 除去有机溶剂，从而在容器壁上形成脂膜。加醋酸钙水溶液（200 mM）在 45℃的恒温水浴锅中使脂膜充分水化，形成粗制脂质体悬浮液。使用挤出仪分别经过 200 nm、100 nm 的聚碳酸酯膜挤出。使用超滤膜包分离未包封的醋酸钙，收集内液，随后与 25 mL 瑞舒伐他汀钙（133 mg）混匀后，于 65℃条件下孵育半小时，得到粒径为 160 nm 的主动包封药物脂质体 LP/R_C。图 5 示出了本发明实施例 1 中 LP/R_C 的粒度分布图。

制备的瑞舒伐他汀钙纳米脂质体溶液和预先溶解好的 HA 水溶液混合加入偶联剂 EDC 和 NHSS，在 25℃或大于 25℃保温条件下反应 2 小时以上，孵育结束后使用透析袋或超滤膜包透析分离未偶联和 HA，得到最终产

品中 HA 浓度为 10-200 μg/mL 的靶向载药脂质体 HA@LP/R_C。

实施例 6 靶向的阿托伐他汀主动包封脂质体纳米载体的制备

在本实施例中，采用乙醇注入-主动包封法、插入法制备负载治疗剂的脂质体 HA-LP/A_C 制备。

称取 DSPC、胆固醇、DSPE-PEG (质量比为 3：1：1)，乙醇溶解。加醋酸钙水溶液（250 mM）在 65℃的恒温水浴锅中使脂材溶液充分水化，形成粗制脂质体悬浮液。使用挤出仪分别经过 200 nm、100 nm 的聚碳酸酯膜挤出控制粒径最终为 130 nm。使用超滤膜包分离未包封的醋酸钙，收集内液，取 1 mL 与 2 mL 阿托伐他汀钙（2.5 mg）混匀后，于 60℃条件下孵育 10 min，得到主动包封药物脂质体 LP/A_C。

制备的载瑞阿托伐他汀钙的纳米脂质体溶液和预先溶解好的HPD水溶液混合，在 25℃或大于 25℃保温条件下孵育 5 分钟以上，孵育结束后使用透析袋或超滤膜包透析分离未插入的 HPD，得到最终产品中 HPD 浓度为 10-200 μg/mL 的靶向载药脂质体。

从图 6 中，可以看到本实施例中靶向阿托伐他汀主动包封脂质体 HA-LP/A_C 冷冻电镜和 DLS。

实施例 7 靶向的阿司匹林主动包封脂质体纳米载体的制备

在本实施例中，采用乙醇注入-主动包封法、后插入法制备 HA-LP/Asp_C。阿司匹林水溶液（2 mg/mL）用 NaOH 调节 pH 使其溶解。称取 DSPC、胆固醇、DSPE-PEG (质量比为 3:1:1)，乙醇溶解。加醋酸钙水溶液（250 mM）在 65℃的恒温水浴锅中使脂材溶液充分水化，形成粗制脂质体悬浮液。使用挤出仪分别经过 200 nm、100 nm 的聚碳酸酯膜挤出。使用超滤膜包分离未包封的醋酸钙，收集内液，取 2 mL 与 1 mL 阿司匹林水溶液混匀后，于 40℃条件下孵育 10 min，得到主动包封药物脂质体 LP/Asp_C。

制备的载阿司匹林纳米脂质体溶液和预先溶解好的 HPD 水溶液混合，在 25℃或大于 25℃保温条件下孵育 5 分钟以上，孵育结束后使用透析袋或超滤膜包透析分离未插入的 HPD，得到最终产品中 HPD 浓度 10-200 μg/mL 的靶向载药脂质体。

图 7 显示了本实施例中靶向阿司匹林主动包封药物脂质体 HA-LP/A_C 冷冻电镜和 DLS。

实施例 8 靶向的匹伐他汀主动包封脂质体纳米载体的制备

在本实施例中，采用乙醇注入-主动包封法、后插入法制备 HA-LP/P_C。

匹伐他汀水溶液（1 mg/mL）。称取 DSPC、胆固醇、DSPE-PEG(质量比为 3：1：1)，乙醇溶解。加醋酸钙水溶液（250 mM）在 65℃的恒温水浴锅中使脂材溶液充分水化，形成粗制脂质体悬浮液。使用挤出仪分别经过 200 nm、100 nm 的聚碳酸酯膜挤出。使用超滤膜包分离未包封的醋酸钙，收集内液，取 2 mL 与 1 mL 匹伐他汀水溶液混匀后，于室温条件下孵育 10min，得到主动包封药物脂质体 LP/P_C。

制备的载匹伐他汀纳米脂质体溶液和预先溶解好的 HPD 水溶液混合，在 25℃或大于 25℃保温条件下孵育 5 分钟以上，孵育结束后使用透析袋或超滤膜包透析分离未插入的 HPD，得到最终产品中 HPD 浓度为 10-200 μg/mL 的靶向载药脂质体（HA-LP/P_C）。

图 8 显示了本实施例中靶向匹伐他汀主动包封脂质体 HA-LP/P_C 冷冻电镜和 DLS。

实施例 9 靶向的洛伐他汀主动包封脂质体纳米载体的制备

在本实施例中，采用乙醇注入-主动包封、后插入法制备 HA-LP/L_C。洛伐他汀水溶液（Lova，1 mg/mL）用 NaOH 调节 pH 使其溶解。称取 DSPC、胆固醇、DSPE-PEG (质量比为 3：1：1)，乙醇溶解。加醋酸钙水溶液（250 mM）在 65℃的恒温水浴锅中使脂材溶液充分水化，形成粗制脂质体悬浮液。使用挤出仪分别经过 200 nm、100 nm 的聚碳酸酯膜挤出 10 次。使用超滤膜包分离未包封的醋酸钙，收集内液，取 2 mL 与 1 mL 洛伐他汀水溶液混匀后，于 65℃条件下孵育 10 min，得到主动包封药物脂质体 LP/L_C。

制备的载洛伐他汀纳米脂质体溶液和预先溶解好的 HPD 水溶液混合，在 25℃或大于 25℃保温条件下孵育 5 分钟以上，孵育结束后使用透析袋或超滤膜包透析分离未插入的 HPD，得到最终产品中 HPD 浓度为 10-200 μg/mL 的靶向载药脂质体（HA-LP/L_C）。

图 9 显示了本实施例中靶向洛伐他汀主动包封脂质体 HA-LP/L_C 冷冻电镜和 DLS。

实施例 10 靶向的辛伐他汀主动包封脂质体纳米载体的制备

在本实施例中，采用乙醇注入、主动包封法、后插入法制备 HA-LP/S_C。辛伐他汀水溶液（Simv, 1 mg/mL）用 NaOH 调节 pH 并加入 10%的 2-羟基丙基-β-环糊精使其溶解称取 DSPC、胆固醇、聚乙二醇-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(DSPE-PEG)(质量比为 3：1：1)，乙醇溶解。加醋酸钙水溶液（250 mM）在 65℃的恒温水浴锅中使脂材溶液充分水化，形成粗制脂质体悬浮液。使用挤出仪分别经过 200 nm、100 nm 的聚碳酸酯膜挤出 10 次。使用超滤膜包分离未包封的醋酸钙，收集内液，取 2 mL 与 1 mL 辛伐他汀水溶液混匀后，于室温条件下孵育 30 min，得到主动包封药物脂质体 LP/S_C。

制备的载辛伐他汀纳米脂质体溶液和预先溶解好的 HPD 水溶液混合，在 25℃或大于 25℃保温条件下孵育 5 分钟以上，孵育结束后使用透析袋或超滤膜包透析分离未插入的 HPD，得到最终产品中 HPD 浓度为 10-200 μg/mL 的靶向载药脂质体（HA-LP/S_C）。

图 10 显示了本实施例中靶向辛伐他汀主动包封脂质体 HA-LP/S_C 冷冻电镜和 DLS。

实施例 11 靶向的普伐他汀主动包封脂质体纳米载体的制备

在本实施例中，采用乙醇注入-主动包封法制备 HA-LP/P_C。普伐他汀水溶液（Pravas, 1 mg/mL）。称取 DSPC、胆固醇、聚乙二醇-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺 (DSPE-PEG) (质量比为 3：1：1)，乙醇溶解。加醋酸钙水溶液（250 mM）在 65℃的恒温水浴锅中使脂材溶液充分水化，形成粗制脂质体悬浮液。使用挤出仪分别经过 200 nm、100 nm 的聚碳酸酯膜挤出 10 次。使用超滤膜包分离未包封的醋酸钙，收集内液，取 2 mL 与 1 mL 普伐他汀水溶液混匀后，于 40℃条件下孵育 30 min，得到主动包封药物脂质体 LP/P_C。

制备的载普伐他汀纳米脂质体溶液和预先溶解好的 HPD 水溶液混合，在 25℃或大于 25℃保温条件下孵育 5 分钟以上，孵育结束后使用透析袋或超滤膜包透析分离未插入的 HPD，得到最终产品中 HPD 浓度为 10-200 μg/mL 的靶向载药脂质体（HA-LP/P_C）。

图 11 显示了本实施例中靶向普伐他汀主动包封脂质体 HA-LP/P_C 冷冻电镜和 DLS。

实施例 12 靶向的苯扎贝特主动包封脂质体纳米载体的制备

在本实施例中，采用乙醇注入-主动包封、后插入法制备 HA-LP/B_C。苯

扎贝特水溶液（Beza, 1 mg/mL）用 NaOH 调节 pH 并加入 10%的 2-羟基丙基-β-环糊精使其溶解。称取 DSPC、胆固醇、聚乙二醇-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺 (DSPE-PEG) (质量比为 3：1：1)，脂材用乙醇溶解。加醋酸钙水溶液（250 mM）在 65℃的恒温水浴锅中使脂材溶液充分水化，形成粗制脂质体悬浮液。使用挤出仪分别经过 200 nm、100 nm 的聚碳酸酯膜挤出 10 次。使用超滤膜包分离未包封的醋酸钙，收集内液，取 2 mL 与 1 mL 苯扎贝特水溶液混匀后，于 40℃条件下孵育 30 min，得到主动包封药物脂质体 LP/B_{C130}。

制备的苯扎贝特纳米脂质体溶液和预先溶解好的 HPD 水溶液混合，在 25℃或大于 25℃保温条件下孵育 5 分钟以上，孵育结束后使用透析袋或超滤膜包透析分离未插入的 HPD，得到最终产品中 HPD 浓度为 10-200 μg/mL 的靶向载药脂质体（HA-LP/B_C）。

图 12 显示了本实施例中靶向苯扎贝特主动包封脂质体 HA-LP/B_C 冷冻电镜和 DLS。

实施例 13 靶向的环丙贝特主动包封脂质体纳米载体的制备

在本实施例中，采用乙醇注入、主动包封、后插入法制备 HA-LP/C_C。环丙贝特水溶液（Cipro, 1.5 mg/mL）用 NaOH 调节 pH 为 6.0 使其溶解。称取二硬脂酰磷脂酰胆碱 (DSPC)、胆固醇、聚乙二醇-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺 (DSPE-PEG) (质量比为 3：1：1)脂材用乙醇溶解。加醋酸钙水溶液（250 mM）在 65℃的恒温水浴锅中使脂材溶液充分水化，形成粗制脂质体悬浮液。使用挤出仪分别经过 200 nm、100 nm 的聚碳酸酯膜挤出 10 次。使用超滤膜包分离未包封的醋酸钙，收集内液，取 2 mL 与 1 mL 环丙贝特水溶液混匀后，于室温条件下孵育 30 min，得到主动包封药物脂质体 LP/C_C。

制备的环丙贝特纳米脂质体溶液和预先溶解好的 HPD 水溶液混合，在 25℃或大于 25℃保温条件下孵育 5 分钟以上，孵育结束后使用透析袋或超滤膜包透析分离未插入的 HPD，得到最终产品中 HPD 浓度为 10-200 μg/mL 的靶向载药脂质体（HA-LP/C_C）。

图 13 显示了本实施例中靶向环丙贝特主动包封脂质体 HA-LP/C_C 冷冻电镜和 DLS。

实施例 14 靶向的阿西美辛主动包封脂质体纳米载体的制备

在本实施例中，采用乙醇注入、主动包封、后插入法制备 HA-LP/Am_C。阿西美辛水溶液（Acemet, 1 mg/mL）加入 10%的 2-羟基丙基-β-环糊精使其溶解。称取二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、胆固醇、聚乙二醇-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(DSPE-PEG)(质量比为 3：1：1)，脂材用乙醇溶解。加醋酸钙水溶液（250 mM）在 65℃的恒温水浴锅中使脂材溶液充分水化，形成粗制脂质体悬浮液。使用挤出仪分别经过 200 nm、100 nm 的聚碳酸酯膜挤出 10 次。使用超滤膜包分离未包封的醋酸钙，收集内液，取 2 mL 与 1 mL 阿西美辛水溶液混匀后，于室温条件下孵育 30 min，得到主动包封药物脂质体 LP/Am_C。

制备的阿西美辛纳米脂质体溶液和预先溶解好的 HPD 水溶液混合，在 25℃或大于 25℃保温条件下孵育 5 分钟以上，孵育结束后使用透析袋或超滤膜包透析分离未插入的 HPD，得到最终产品中 HPD 浓度为 10-200 μg/mL 的靶向载药脂质体（HA-LP/Am_C）。

图 14 显示了本实施例中靶向阿西美辛主动包封脂质体 HA-LP/Am_C 冷冻电镜和 DLS。

实施例 15 靶向的奥扎格雷主动包封脂质体纳米载体的制备

在本实施例中，采用乙醇注入、主动包封、后插入法制备 LP/O_C。奥扎格雷水溶液（Ozagrel, 2 mg/mL）加入 10%的 2-羟基丙基-β-环糊精使其溶解。称取二硬脂酰磷脂酰胆碱 (DSPC)、胆固醇、聚乙二醇-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺 (DSPE-PEG) (质量比为 3：1：1)，脂材用乙醇溶解。加醋酸钙水溶液（250 mM）在 65℃的恒温水浴锅中使脂材溶液充分水化，形成粗制脂质体悬浮液。使用挤出仪分别经过 200 nm、100 nm 的聚碳酸酯膜挤出 10 次。使用超滤膜包分离未包封的醋酸钙，收集内液，取 2 与 1 mL Ozagrel 水溶液混匀后，于室温条件下孵育 30 min，得到主动包封药物脂质体 LP/O_C。

制备的奥扎格雷纳米脂质体溶液和预先溶解好的 HPD 水溶液混合，在 25℃或大于 25℃保温条件下孵育 5 分钟以上，孵育结束后使用透析袋或超滤膜包透析分离未插入的 HPD，得到最终产品中 HPD 浓度为 10-200 μg/mL 的靶向载药脂质体（HA-LP/O_C）。

图 15 显示了本实施例中靶向奥扎格雷主动包封脂质体 HA-LP/O_C 冷冻电镜和 DLS。

实施例 16 靶向的替罗非班主动包封脂质体纳米载体的制备

在本实施例中，采用乙醇注入、主动包封、后插入法制 LP/T_C。替罗非班水溶液（Tirofiban, 2 mg/mL）加入 10%的 2-羟基丙基-β-环糊精使其溶解。称取二硬脂酰磷脂酰胆碱 (DSPC)、胆固醇、聚乙二醇-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺 (DSPE-PEG) (质量比为 3：1：1)，脂材用乙醇溶解。加醋酸钙水溶液（250 mM）在 65℃的恒温水浴锅中使脂材溶液充分水化，形成粗制脂质体悬浮液。使用挤出仪分别经过 200 nm、100 nm 的聚碳酸酯膜挤出 10 次。使用超滤膜包分离未包封的醋酸钙，收集内液，取 2 mL 与 1 mL Tirofiban 水溶液混匀后，于 65℃条件下孵育 30 min，得到主动包封药物脂质体 LP/T_{C130}。

制备的替罗非班纳米脂质体溶液和预先溶解好的 HPD 水溶液混合，在 25℃或大于 25℃保温条件下孵育 5 分钟以上，孵育结束后使用透析袋或超滤膜包透析分离未插入的 HPD, 得到最终产品中 HPD 浓度为 10-200 μg/mL 的靶向载药脂质体（HA-LP/T_C）。

图 16 显示了本实施例中靶向替罗非班主动包封脂质体 HA-LP/T_C 冷冻电镜和 DLS。

实施例 17 靶向的瑞舒伐他汀主动包封脂质体纳米载体递送系统（HA@LP/R_d）的制备

称取氢化大豆磷脂酰胆碱、DPN、胆固醇、聚乙二醇-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺 (DSPE-PEG) (质量比为 3：0.5：1：1)，上述脂材用氯仿溶解。通过缓慢旋转蒸发 (55℃水浴，90 r/min，30 min) 除去有机溶剂，从而在容器壁上形成脂膜。加葡萄糖酸铜水溶液（200 mM）在 45℃的恒温水浴锅中使脂膜充分水化，形成粗制脂质体悬浮液。使用挤出仪分别经过 200 nm、100 nm 的聚碳酸酯膜挤出。使用超滤膜包分离未包封的醋酸钙，收集内液，随后与 25 mL 瑞舒伐他汀钙（133 mg）混匀后，于 65℃条件下孵育半小时，得到主动包封药物脂质体 LP/R_d。

HA 水溶液混合加入偶联剂 EDC 和 NHSS，将其和 LP/R_d 脂液混合实现偶联，在 25℃或大于 25℃保温条件下反应 2 小时以上，结束后使用透析袋或超滤膜包透析分离未偶联的 HA，得到最终产品中 HA 浓度为 10-200 μg/mL 的靶向载药脂质体 HA@LP/R_d。

图 17 显示了本实施例中靶向瑞舒伐他汀主动包封脂质体 HA@LP/R_d

冷冻电镜和 DLS。

实施例 18 靶向的阿托伐他汀主动包封脂质体纳米载体递送系统（HA@LP/A_d）的制备

称取二棕榈酰磷脂酰胆碱、DPN、胆固醇、聚乙二醇-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺 (DSPE-PEG) (质量比为 3：0.5：1：1)，上述脂材用氯仿溶解。通过缓慢旋转蒸发 (55℃水浴，90 r/min，30 min) 除去有机溶剂，从而在容器壁上形成脂膜。加醋酸钙水溶液（300 mM）在 45℃的恒温水浴锅中使脂膜充分水化，形成粗制脂质体悬浮液。使用挤出仪分别经过 200 nm、100 nm 的聚碳酸酯膜挤出。使用超滤膜包分离未包封的醋酸钙，收集内液，随后与 25 mL 阿托伐他汀钙混匀后，于 65℃条件下孵育半小时，得到粒径为 130 nm 的主动包封药物脂质体 LP/A_d。

HA 水溶液混合加入偶联剂 EDC 和 NHSS，将其和 LP/A_d 脂液混合实现偶联，在 25℃或大于 25℃保温条件下反应 2 小时以上，结束后使用透析袋或超滤膜包透析分离未偶联的 HA，得到最终产品中 HA 浓度为 10-200 μg/mL 的靶向载药脂质体 HA@LP/A_d。

图 18 显示了本实施例中靶向阿托伐他汀主动包封脂质体 HA@LP/A_d 冷冻电镜和 DLS。

实施例19 靶向环丙贝特主动包封脂质体纳米载体递送系统(HA@LP/C_d)的制备

称取鞘磷脂、胆固醇、聚乙二醇-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺 (DSPE-PEG) (质量比为 3：1：1)，上述脂材用氯仿溶解。通过缓慢旋转蒸发 (55℃水浴，90 r/min，30 min) 除去有机溶剂，从而在容器壁上形成脂膜。加碳酸氢钙水溶液（250 mM）在 45℃的恒温水浴锅中使脂膜充分水化，形成粗制脂质体悬浮液。使用挤出仪分别经过 200 nm、100 nm 的聚碳酸酯膜挤出。使用超滤膜包分离未包封的碳酸氢钙，收集内液，随后与 25 mL 环丙贝特混匀后，于 65℃条件下孵育半小时，得到粒径为 130 nm 的主动包封药物脂质体 LP/C_d。

由实施例 1 所制备 HPD 水溶液混合，在 25℃或大于 25℃保温条件下孵育 30 分钟以上，孵育结束后使用透析袋或超滤膜包透析分离未插入的 HPD，得到最终产品中 HPD 浓度为 200 μg/mL 的高浓度靶向配体脂质体得

到最终产品中 HA 浓度为 10-200 μg/mL 的靶向载药脂质体 HA@LP/C_d。

图 19 显示了本实施例中靶向环丙贝特主动包封脂质体 HA@LP/C_d 冷冻电镜和 DLS。

实施例 20 靶向苯扎贝特主动包封脂质体纳米载体递送系统（HA-LP/B_d）的制备

在本实施例中，采用乙醇注入&主动包封法制备载苯扎贝特的纳米脂质体。

称取二硬脂酰磷脂酰丝氨酸（DOPS）、胆固醇、DSPE-PEG2000 (质量比为 3：1：1)，上述脂材用乙醇溶解。加柠檬酸镁水溶液（200 mM）在 40-60℃的保温搅拌条件下将乙醇相注入柠檬酸镁水溶液中使脂材溶液充分水化，形成粗脂质体悬浮液（醋酸钙水相和乙醇相溶液的体积比大于 2）。使用透析袋或超滤膜包透析分离未包封的醋酸钙，收集内液，与瑞舒伐他汀钙溶液或瑞舒伐他汀钙和蔗糖的混合溶液混匀后（瑞舒伐他汀钙和总脂材的质量比小于 0.25），于 4-66℃条件下孵育 15 分钟或以上，得到主动包封瑞舒伐他汀钙的纳米脂质体。所制备的纳米脂质体对 API 的包封率大于 20%，最终制剂中 API 的浓度小于等于 20 mg/mL。

由实施例 1 所制备 HPD 水溶液混合，在 25℃或大于 25℃保温条件下孵育 30 分钟以上，孵育结束后使用透析袋或超滤膜包透析分离未插入的 HPD，得到最终产品中 HPD 浓度为 200 μg/mL 的高浓度靶向配体脂质体得到最终产品中 HA 浓度为 10-200 μg/mL 的靶向载药脂质体 HA-LP/B_d。

图 20 显示了本实施例中靶向苯扎贝特主动包封脂质体 HA-LP/B_d 冷冻电镜和 DLS。

试验例 1 本发明纳米载体递送系统载体的稳定可控性

以本发明公开的制备的负载治疗剂的纳米递送系统为例，本发明的递送系统具有稳定可控的性质，从而适合于动脉粥样硬化或与动脉粥样硬化相关的疾病的治疗。

1. 药物浓度测定法：

载体药物瑞舒伐他汀、替罗非班、奥扎格雷、阿西美辛、环丙贝特、苯扎贝特、普伐他汀、阿司匹林、匹伐他汀钙、洛伐他汀和辛伐他汀，具有很强的紫外吸收特性，因此可以通过采用 HPLC-UV 法，药物溶液的浓度(X)

对 HPLC 色谱峰的峰面积(Y)建立标准定量方程。

HPLC 分析方法为：流动相：A：1.0%三氟乙酸：乙腈：水（1:29:70）；B：1.0%三氟乙酸：水：乙腈（1:24:75）。柱温：40℃，型号：Inertsil ODS-3（150*3.0）mm。平衡系统，等基线稳定后进样。

2. 水合粒径的测定：

本发明的递送系统的粒度测定由马尔文智能激光粒度仪测定。结果如表 2 所示。

3. 制剂中 HPD 测定：

试剂盒采用竞争法酶联免疫吸附试验（ELISA）。往预先包被透明质酸衍生物(HA)的包被微孔中，依次加入标本、标准品、HA 结合蛋白(HABP)和抗 HABP 抗体，经过温育与充分洗涤，去除未结合的组分，再加入 HRP 标记的抗小鼠免疫球蛋白 G（酶标二抗），经过温育与充分洗涤，去除未结合的组分，在微孔板固相表面形成固相抗原-HA 结合蛋白-HABP 抗体-酶标抗体的免疫复合物。加底物 A 和 B，底物在 HRP 催化下，产生蓝色产物，在终止液（2M 硫酸）作用下，最终转化为黄色，颜色的深浅和样品中的透明质酸（HA）呈负相关。用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度（OD 值），拟合标准品曲线，可以计算出样本中透明质酸（HA）的浓度。

采用透明质酸（HA）定量检测 ELISA 试剂盒进行检测，准确称取 HPD 适量，加水配制成约 2.5 mg/mL 的对照储备液，采用等比例水稀释的方式，配制线性工作溶液（0~1.25 mg/mL），取无 HPD 的制剂溶液适量，分别与各线性工作溶液混合作为标准线性溶液；取制剂溶液适量，根据需要加无 HPD 的制剂溶液进行稀释，并加入适量水使制剂测定溶液与标准线性溶液中的脂质体比例相同，作为供试品溶液；在 ELISA 试剂盒测定前，标准线性溶液和供试品溶液分别加入 10%Triton 溶液进行溶解，混合均匀，依照 ELISA 试剂盒操作程序进行，用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度（OD 值），四参数拟合标准曲线，计算出供试品中 HPD 的浓度。

参考标准曲线图如图 29 所示，拟合方程: y = (A - D) / [1 + (x/C)^B] + D

其中：A= 2.763；B= 1.777；C= 3.681；D=0.146；r2 =0.999.

4. 包封率的测定：

取一定量纳米载体，HPLC 法测游离药物和总药物量，并通过以下公式 1 计算包封率。结果如表 2 所示。

包封率（%）=（1-M 游离药物量/M 总药物量）*100%... .....公式 1

表 1 本发明的纳米载体递送系统工艺简述、平均粒径和包封率结果

名称	工艺描述	水合粒径 (Z-average)	药物包封率 (%)
LP/R_{A90}	乙醇注入法 主动包封	88	91.7±1.8
LP/R_{A120}		120	93.2±1.7
LP/R_{A150}		152	95.6±1.7
LP/R_{B90}	混合水化 主动包封法	89	93.5±1.2
LP/R_{B120}		128	94.4±1.4
LP/R_{B150}		142	95.4±0.85
HA_H-LP/R_{A150}	乙醇注入法 主动包封、HPD 后插入	165	95.5±1.24
HA_M-LP/R_{A150}		142	
HA_L-LP/R_{A150}		141	
HA@LP/R_C	薄膜分散法、主动载药、化学偶联	164	93.5±1.5
HA-LP/A_C	乙醇注入-主动包封法、插入法	170	91.5±1.9
HA-LP/Asp_C	乙醇注入-主动包封法、后插入法	145	92.5±1.7
HA-LP/P_C	乙醇注入-主动包封法、后插入法	126	90.5±1.6
HA-LP/L_C	乙醇注入-主动包封法、后插入法	155	91.5±2.2
HA-LP/S_C	乙醇注入-主动包封法、后插入法	144	94.4±1.5
HA-LP/P_C	乙醇注入-主动包封法、后插入法	150	95.1±0.9
HA-LP/B_C	乙醇注入-主动包封法、后插入法	155	95.7±0.8

HA-LP/C_C	乙醇注入-主动包封法、后插入法	148	93.4±1.4
HA-LP/Am_C	乙醇注入-主动包封法、后插入法	146	94.7±1.1
HA-LP/O_C	乙醇注入-主动包封法、后插入法	147	91.9±1.5
HA-LP/T_C	采用乙醇注入、主动包封、后插入法	132	92.7±1.3
HA@LP/R_d	薄膜水化、主动包封、化学偶联葡萄糖酸铜	169	91.3±0.9
HA@LP/A_d	薄膜水化、主动包封、化学偶联醋酸钙	165	94.3±1.6
HA-LP/C_d	薄膜水化、主动包封、后插入法碳酸氢钙	139	91.3±2.2
HA-LP/B_d	乙醇注入、主动包封法、后插入法檬酸镁	142	91.7±1.7

注：以上数据均以平行测定 3 次的结果的“平均值+标准差”的形式表示。

5. 长期稳定性考察

将本发明的纳米递送系统在 4℃储存，于不同的时间点取样，并通过激光粒度仪检测其水合粒径的变化。HPLC 方法考察其含量和包封率的变化。结果如图 21 所示。

试验例 2 本发明的靶向脂质体纳米载体递送系统靶向能力验证

本试验例的目的是验证本发明所述的靶向脂质体纳米药物载体递送系统，例如 HA@LP/R_C 载体递送系统，对于动脉粥样硬化斑块的靶向能力。具体的，由于动脉粥样硬化斑块富含巨噬细胞，高表达 CD44 受体，因此研究选用了 THP1 巨噬细胞，并使用脂多糖对其进行活化，通过与经荧光标记的靶向 HA@LP/R_C 或非靶向 LP/R_C 一起孵育，然后进行活细胞显微观察和荧光

值检测。通过对比具有 HA 靶头和非靶向脂质体组结果，评估对 HA 靶向脂质体对于高表达 CD44 受体的激活的巨噬细胞的靶向性。

1. 实验试剂和仪器：

表 2 实验使用试剂列表

名称	厂家	型号
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Sigma	P1585
THP1 人巨噬细胞	武汉普诺赛生命科技有限公司	CL-0233
Lipopolysaccharide (LPS)	Fisher Scientific	00-4976-93
Hoechst33342	BD Biosciences	561908
RPMI1640	Fisher Scientific	11998075
Gibco Fetal Bovine Serum	Fisher Scientific	11573397
RIPA 细胞裂解液	Solarbio Life Sciences	R0010-20ml
Cy5.5 荧光染料	西安瑞禧	210892-23-2
超滤管 (MWCD 50KD)	Merck millipore	UFC910096

表 3 实验使用仪器列表

名称	厂家	型号
荧光读板仪	Perkin Elmer	EnVision2105
智能活细胞检测系统	BioTek	Lionheart FX
医药低速水平转子离心机	北京白洋	52A

2. 实验步骤

2.1 供试品的荧光标记

精确称量 1.0 mg Cy5.5 染料溶解于 1ml 无水乙醇，配制成 1 mg/ml Cy5.5 溶液。分别取 5 ml 靶向 HA@LP/R_C 或者非靶向 LP/R_C 脂质体，加入 0.1 mL 1mg/ml 的 Cy5.5 溶液，150 rpm 搅拌 12h，进行荧光标记。然后用超滤管过滤，去除未反应的荧光分子。使用荧光酶标仪对于过滤后得到的荧光标记的脂质体进行荧光检测。检测后的荧光标记的脂质体用于后续的细胞内吞

实验。

2.2 细胞内吞实验

操作步骤参照本平台细胞复苏操作流程，培养基用本平台常规 THP1 细胞培养基（RPMI1640+10% FBS）。细胞复苏后重悬密度为 5×105/ml，接种于 T75 培养瓶。将悬浮生长的 10 ml THP1 细胞移至 15ml 离心管中，1000 rpm 离心 5 分钟，并重悬于 1 ml 培养基中并细胞计数，配制成 1×105/200 μl 的浓度的细胞悬液。往 1×105/200 μl 的细胞悬液中加入 PMA 至终浓度为 100 ng/ml。混合均匀后，把细胞悬液接种于 96 孔板中，200 μl/孔，持续刺激 72 h。刺激 72 小时后，弃去原先的培养基，加入含有脂多糖（LPS）的新鲜培养基（LPS 溶液 1000 倍稀释于新鲜培养基中，配制的终浓度为 2.5 μ g/mL）。LPS 处理 2 小时。

实验设两组，分别加入。取 1 ml 荧光标记的脂质体，按体积 10 倍稀释于新鲜的培养基中，此时瑞舒伐他汀浓度为 0.2 mg/ml。96 孔板弃去含有 LPS 的培养液，加入稀释好的荧光标记的供试品，每组三个重复，于 37° C 继续孵育 30 min。

PBS 洗板 1 次，把 2 μl Hoechst33342 母液稀释于 10 ml 新鲜的培养基中配制成稀释好的 Hoechst33342 溶液，并把稀释好的 Hoechst33342 溶液和细胞孵育 10 min 进行细胞核的染色。于 Lionheart FX 智能活细胞成像分析系统进行拍照。将拍照后的孔板，弃去染色液，加入 100 μl RIPA 细胞裂解液，采用荧光读板仪检测孔板中荧光强度。获得的试验数据使用 Graph Pad Prism 8 软件计算均值和标准差并进行 t 检验的统计学分析，$p<0.05$ 为统计学上显著。

3. 试验结果

细胞内吞实验比较了 LPS 刺激后的 THP1 细胞对于 HA@LP/R_C 和 LP/R_C 内吞效率。实验结果见图 25，和非靶向 LP/R_C 脂质体组比较，HA@LP/R_C 组的荧光值显著增加，是非靶向脂质体组的 3 倍。荧光显微镜观察也显示（见图 26），HA@LP/R_C 组的细胞内红色荧光比非靶向 LP/R_C 组的细胞内红色荧光显著增加。表明，LPS 刺激后的 THP1 细胞对 HA@LP/R_C 内吞效率要显著高于其对非靶向脂质体的内吞效率。

结果显示，靶向组中显红色荧光的细胞显著多于非靶向脂质体组。且与

非靶向脂质体组相比，靶向组荧光值也显著增加。可得出结论，含有 HA 靶头的脂质体可以被高表达 CD44 受体的激活的巨噬细胞特异性摄取。

试验例 3 本发明的靶向脂质体纳米载体递送系统在体内的分布和代谢研究

本试验例的目的是初步揭示本发明所述的靶向脂质体纳米药物载体递送系统在动物体内的分布和代谢情况。本试验将试验例 2 中细胞内吞实验的 HA@LP/R_C 和 LP/R_C 脂质体继续用于动物体内分布和代谢初步研究。

具体地，将 6 周龄 ApoE-/-小鼠高脂饮食饲养 28 周，主动脉斑块生成造成 AS 动物模型。靶向纳米他汀制剂（HA@LP/R_C，剂量 5 mg/kg）和非靶向纳米制剂对模型动物静脉给药后组织分布和代谢情况。如图 27 所示，可见纳米制剂在体内主要富集在肝部，不可跨越血脑屏障，靶向和非靶体药物在体内分布代谢未见明显区别。

更进一步地，将实验动物随机分为以下各组，每组 6 只：

瑞舒伐他汀口服组：以 0.5mg 瑞舒伐他汀/kg 体重的剂量进行口服给药处理；

瑞舒伐他汀静脉注射组：以 0.5 mg 瑞舒伐他汀/kg 体重的剂量进行静脉注射给药处理；

治疗组的治疗每隔一天进行 1 次，共计给药 11 次。

动物体重随着治疗时间变化的曲线如图 28 所示。由图 28 可见治疗期间动物体重增加，且未见死亡，说明药物安全性良好。

试验例 4 本发明的靶向脂质体纳米载体递送系统对动脉粥样硬化的影响的体内实验

本试验例的目的是验证本发明所述的靶向脂质体纳米药物载体递送系统，例如 HA_M-LP/R_{A150} 载体递送系统，对动脉斑块的体内治疗作用。

1. 动物模型的建立和实验动物分组

（1）配制游离瑞舒伐他汀的生理盐水溶液，并采用上述实施例 2 中所述的方法制备负载治疗剂的纳米递送系统。

（2）ApoE-/-小鼠动脉粥样硬化模型的建立：

取 SPF 级 ApoE-/-小鼠(42 只，5-6 周龄，体重 20±1 g)作为实验动物。

给予小鼠适应性高脂饮食(脂肪 10% (w/w)，胆固醇 2% (w/w)，胆酸钠 0.5% (w/w)，其余部分为小鼠普通饲料)喂养 4 周后，用 1%的戊巴比妥钠(配制方法为将 1 mg 戊巴比妥钠加入至 100 mL 的生理盐水中)以 40 mg/kg 的剂量腹腔注射麻醉。然后，将小鼠以仰卧位固定于手术板上，用 75 %(v/v)酒精以颈部为中心进行消毒，纵向剪开颈部皮肤，钝性分离颈前腺体，在气管的左侧可见搏动的左颈总动脉。小心分离颈总动脉至分叉处，将长度为 2.5 mm、内径为 0.3 mm 的硅胶管套置于左颈总动脉的外周，套管的近心段和远心段均以细丝线缩窄固定。局部紧缩造成近端血流湍流，剪切力增加，造成的血管内膜损伤。将颈动脉复位，间断缝合颈前皮肤。所有操作均在 10 倍体视显微镜下进行。术后待小鼠苏醒后将其放回笼中，维持环境温度在 20～25 ℃，灯光保持开闭各 12 h。术后第 4 周开始腹腔注射脂多糖(LPS)(1 mg/kg，在 0.2 mL 磷酸盐缓冲盐水中，Sigma, USA) ，每周 2 次，持续 10 周，诱导慢性炎症。术后 8 周将小鼠置入 50 mL 注射器(预留充足通气孔)内造成限制性精神应激，6 小时/天，每周 5 天，共持续 6 周。小鼠动脉粥样硬化模型于术后 14 周造模完毕。

(3) 实验动物分组及治疗：

将实验动物随机分为以下各组，每组 6 只：

动脉粥样硬化模型对照组：该组动物不进行任何治疗性处理；

瑞舒伐他汀口服组：以 0.66 mg 瑞舒伐他汀/kg 体重的剂量进行口服给药处理；

瑞舒伐他汀静脉注射组：以 0.66 mg 瑞舒伐他汀/kg 体重的剂量进行静脉注射给药处理；

纳米制剂给药（HA_M-LP/R_{A150}）组：以 0.66 mg 瑞舒伐他汀/kg 体重的剂量进行静脉注射给药处理；

除动脉粥样硬化模型对照组外，治疗组的治疗每隔一天进行 1 次，共计给药 4 周。对于各组动物，于治疗前后每周进行颈动脉 MRI 扫描以检测斑块和管腔面积，并结合扫描厚度计算斑块体积进展百分比。

斑块体积进展百分比=(治疗后斑块体积-治疗前斑块体积)/ 治疗前的斑块体积。

图 22 和 23 示出了本发明所述的 HA_M-LP/R_{A150} 载体递送系统对动脉粥样硬化的体内治疗效果。如图 22 所示，口服和静脉注射游离他汀仅能延缓斑块进展，而不能使已有斑块消退，靶向纳米载药治疗则不仅明显遏制了

斑块的进展，更出现了斑块体积大幅逆转和消退达 30.3%。如图 23 所示，相比较于口服和注射他汀药物，纳米递送体系显示出了其极其显著的主动脉富集功能，相比较于非靶向递送体系（LP/R_{A150}），这种富集效应在靶向纳米制剂（HA_M-LP/R_{A150}）作用下更为明显。综上所述，对于小鼠体内动脉粥样硬化而言，口服及静脉给予游离的瑞舒伐他汀都未能呈现出逆转斑块的效果。然而，当将他汀负载在本发明所述的纳米递送系统中时，其对于动脉粥样硬化的治疗效果发生了显著的提升，并起到了缩小斑块的治疗效果，带有功能修饰的纳米系统效果更佳。

2. 不同 HA/脂质材料质量比药效对比

6 周龄 ApoE-/-小鼠高脂饮食饲养 28 周，主动脉斑块生成造成 AS 动物模型。将造模成功的动物按血脂和体重随机分为斑块模型对照组，非靶向纳米他汀制剂组（LP/R_{A150}，5 mg/kg），靶向纳米他汀制剂-1（HA_L-LP/R_{A150}，剂量 5 mg/kg），靶向纳米他汀制剂-2（HA_M-LP/R_{A150}，剂量 5 mg/kg，iv），靶向纳米他汀制剂-3（HA_H-LP/R_{A150}，剂量 5mg/kg，iv），每组 10 只。治疗每天一次，共治疗 28 天，疗程 4 周。疗程结束后行主动脉斑块大体病理学（en-face），靶向制剂短时间可实现 AS 模型小鼠主动脉斑块逆转，且在 HA_M-LP/R_{A150} 和 HA_H-LP/R_{A150} 制剂组呈现约显著的斑块逆转。

以上研究表明，开发配体偶联的主动靶向纳米递送体系需要关注配体在纳米载体表面的偶联密度，作为具有特殊生理功能的配体分子，低密度或过量偶联均不能起到良好的靶向效果，提示我们在开发此类产品是尤其需要实现可控的偶联工艺。

图 24a 和图 24b 显示了不同 HA/脂质材料质量比药效的对比。

权 利 要 求 书

1. 一种主动包封脂质体纳米载体递送系统，其特征在于，所述脂质体纳米载体递送系统包括脂质体载体及其主动包封的用于预防和/或治疗动脉粥样硬化或与动脉粥样硬化相关的疾病的物质。

2. 根据权利要求 1 所述的脂质体纳米载体递送系统，其特征在于，所述脂质体载体的材料包含磷脂和胆固醇；

优选地，所述磷脂选自以下一种或多种：氢化大豆磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺、聚乙二醇-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺、二硬脂酰磷脂酰甘油、二硬脂酰磷脂酰丝氨酸、二油酰磷脂酰胆碱、二油酰磷脂酰乙醇胺、二油酰磷脂酰丝氨酸、二油酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇、二肉桂酰磷脂酰胆碱、二肉桂酰磷脂酰乙醇胺、二肉桂酰磷脂酰丝氨酸、二肉桂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇、二棕榈酰磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺、二棕榈酰磷脂酰丝氨酸、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇、二芥酰磷脂酰胆碱、二芥酰磷脂酰乙醇胺、二芥酰磷脂酰丝氨酸、二芥酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇、鞘磷脂、卵磷脂酰胆碱、卵磷脂酰乙醇胺和卵磷脂酰甘油。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的脂质体纳米载体递送系统，其特征在于，所述用于预防和/或治疗动脉粥样硬化或与动脉粥样硬化相关的疾病的物质和所述脂质体载体的质量比为 1:0.1~50，优选为 1：0.2~30，更优选为 1：0.5 ~20。

4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的脂质体纳米载体递送系统，其特征在于，所述用于预防和/或治疗动脉粥样硬化或与动脉粥样硬化相关的疾病的物质为弱酸性物质；

更优选地，所述用于预防和/或治疗动脉粥样硬化或与动脉粥样硬化相关的疾病的物质选自以下一种或多种：他汀类药物、贝特类药物、抗血小板药物、PCSK9 抑制剂、抗凝药物、血管紧张素转换酶抑制剂、钙离子拮抗剂、MMPs 抑制剂、β 受体阻滞剂和糖皮质激素，及其药学上可接受的盐，

以及所述药物或物质的活性制剂；

再优选地，所述用于预防和/或治疗动脉粥样硬化或与动脉粥样硬化相关的疾病的物质选自以下一种或多种：洛伐他汀、阿托伐他汀、瑞舒伐他汀、辛伐他汀、氟伐他汀、匹伐他汀、普伐他汀、苯扎贝特、环丙贝特、吉非贝齐、阿司匹林、阿西美辛、奥扎格雷钠、贝列前素钠和替罗非班以及它们的药效片段或药学上可接受的盐；

进一步优选地，所述用于预防和/或治疗动脉粥样硬化或与动脉粥样硬化相关的疾病的物质为水溶性他汀类药物；优选为瑞舒伐他汀、普伐他汀、阿托伐他汀。

5. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的脂质体纳米载体递送系统，其特征在于，所述脂质体纳米载体递送系统可以通过靶向配体修饰；

优选地，所述靶向配体选自以下一种或多种：GAG、胶原、层黏连蛋白、纤黏连蛋白、选择蛋白、骨桥蛋白(OPN)以及单克隆抗体 HI44a、HI313、A3D8、H90、IM7 和透明质酸或透明质酸的衍生物。

6. 根据权利要求 1 至 5 中任一项所述的脂质体纳米载体递送系统，其特征在于，所述脂质体载体选自小单室脂质体、大单室脂质体或多室脂质体。

7. 一种制备如权利要求 1 至 6 中任一项所述的脂质体纳米载体递送系统的方法，包括通过加入盐溶液水化所述脂质体载体并分离造成脂质体内外溶液酸度梯度的步骤。

8. 根据权利要求 7 所述的制备脂质体纳米载体递送系统的方法，其特征在于，所述盐为弱酸强碱盐；

优选地，所述盐的阴离子部分选自以下一种或多种：

醋酸根、依地酸根、碳酸氢根、次氯酸根、枸橼酸根、苯甲酸根和葡萄糖酸根；和/或

所述盐的阳离子部分选自以下一种或多种：钙离子、铜离子、镍离子、钡离子、镁离子和锌离子；

更优选地，所述盐选自以下一种或多种：醋酸钙、碳酸氢钙、枸橼酸镁

和葡萄糖酸铜。

9. 根据权利要求 7 或 8 所述的脂质体纳米载体递送系统的制备方法，其特征在于，所述方法包括以下步骤：

（1）将脂质体载体材料溶于良溶剂；

（2）向步骤（1）所得产物中加入造成脂质体内外溶液酸度梯度的盐溶液对其进行水化，分散成粗脂液；

（3）降低步骤（2）所得粗脂液的粒径，得到精制脂质体；

（4）对步骤（3）所得到的精制脂质体溶液通过纯化去除外部离子，脂质体内外形成酸度梯度；

（5）在步骤（4）所得到的脂质体溶液加入待包被物质溶液，孵育使药物进入脂质体内部，得到所述脂质体纳米载体递送系统。

10. 根据权利要求 9 的方法，其特征在于，所述步骤（1）中还包括蒸发去除溶剂的使所述脂质体形成脂膜的步骤；

优选地，所述蒸发温度为 40~80℃，优选为 50~70℃，更优选为 50~60℃；

更优选地，所述蒸发方式为旋转蒸发；

进一步优选地，所述旋转蒸发速度为 50~200 r/min，优选为 70~120 r/min，更优选为 80~100 r/min。

11. 根据权利要求 9 或 10 所述的方法，其特征在于，步骤（1）中，所述良溶剂选自以下一种或多种：氯仿、乙醇、甲醇、二氯甲烷、丙酮、甲苯、乙醚、乙酸乙酯、乙酸甲酯、乙腈和二氯乙烷。

12. 根据权利要求 9 至 11 中任一项所述的方法，其特征在于，步骤（1）中，所述脂质体载体材料包含磷脂和胆固醇；

优选地，所述磷脂浓度为 0.1~500 mg/mL，优选为 0.1~200 mg/mL，更优选为 0.2-100 mg/mL；和/或

所述胆固醇浓度为 0.05~200 mg/mL，优选为 0.1~100 mg/mL，更优选为 0.1-50 mg/mL。

13. 根据权利要求 9 至 12 中任一项所述的方法，其特征在于，步骤（2）

中， 所述盐溶液的浓度为 100~500 mM，优选为 200~300 mM，更优选为 200~250 mM；和/或

所述水化温度为 30~90℃，优选为 40~80℃，更优选为 45~65℃。

14. 根据权利要求 9 至 13 中任一项所述的方法，其特征在于，步骤（3）中，所述降低粒径的的方法为通过将所述粗脂液通过滤膜挤出；

优选地，所述滤膜为聚碳酸酯膜；

更优选地，所述滤膜孔径为 30~800 nm，例如 50~400 nm，例如 100 ~200 nm，例如 30 nm、50 nm、100 nm、200 nm、400 nm、600nm 或 800 nm，优选 100-150 nm。

15. 根据权利要求 9 至 14 中任一项所述的方法，其特征在于，步骤（4）中，所述去除外部离子的方法选自以下一种或多种：超滤膜包分离、透析分离和离子交换。

16. 根据权利要求 9 至 15 中任一项所述的方法，其特征在于，步骤（5）中，所述包被物质溶液浓度为 0.01~100 mg/mL，优选为 0.05~50 mg/mL，更优选为 0.1~20 mg/mL，进一步优选为 0.1-10 mg/mL。

17. 根据权利要求 9 至 16 中任一项所述的方法，其特征在于，步骤（5）中，所述孵育温度为 20~80℃，优选为 40~70℃，更优选为 55~65℃。

18. 根据权利要求 9 至 17 中任一项所述的方法，其特征在于，当所述脂质体纳米载体递送系统通过靶向配体修饰时，所述方法还包括以下步骤：

（6）将所述靶向配体与步骤（5）所得的脂质体纳米载体递送系统共同孵育，得到所述修饰后的脂质体纳米载体递送系统。

19. 一种药物，其特征在于，所述药物包含权利要求 1 至 7 中任一项所述的纳米载体递送系统或按照权利要求 8 至 18 中任一项所述的制备方法而制得的纳米载体递送系统，以及药学上可接受的载体。

20. 权利要求 1 至 7 中任一项所述的纳米载体递送系统、按照权利要

求 8 至 18 中任一项所述的制备方法而制得的纳米载体递送系统、权利要求 19 所述的药物在制备用于预防和/或治疗动脉粥样硬化或与动脉粥样硬化相关的疾病的药物中的应用；

优选地，所述动脉粥样硬化相关的疾病选自以下一种或多种：动脉粥样硬化症、冠状动脉粥样硬化性心脏病（包括急性冠脉综合征、无症状心肌缺血-隐匿性冠心病、心绞痛、心肌梗死、缺血性心脏病、猝死、支架内再狭窄）、脑动脉粥样硬化症（包括缺血性脑卒中、出血性脑卒中）、外周血管动脉粥样硬化症（包括颈动脉粥样硬化症、椎动脉粥样硬化症、锁骨下动脉粥样硬化症、闭塞性周围动脉粥样硬化、视网膜动脉粥样硬化症、肾动脉粥样硬化症、下肢动脉粥样硬化症、上肢动脉粥样硬化症、肠系膜动脉粥样硬化症、动脉粥样硬化性阳痿）、主动脉夹层、血管瘤、血栓栓塞、心力衰竭和心源性休克。

21. 权利要求 1 至 7 中任一项所述的纳米载体递送系统、按照权利要求 8 至 18 中任一项所述的制备方法而制得的纳米载体递送系统、权利要求 19 所述的药物在制备用于治疗血管斑块的药物中的应用；

优选地，所述血管斑块为动脉斑块；

更优选地，所述药物用于遏制动脉斑块进展、逆转动脉斑块和/或减小动脉斑块体积。