

含有榄香烯的药物组合物及其制备方法和用途

技术领域

本发明涉及药物制剂领域，具体而言，涉及含有榄香烯的药物组合物及其制备方法和用途。

5 背景技术

榄香烯是从植物温郁金 (*Curcuma Wenyujin* Y. H. Chen et C. ling)、香茅 (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) 等植物中提取的挥发性油状化合物。该化合物呈现淡黄色或黄色的澄明液体，有辛辣的茴香气味。目前临床上所用榄香烯为混合物，含有 α -榄香烯、 β -榄香烯、 δ -榄香烯和 γ -榄香烯，广泛用于恶性胸膜腔积液、肺癌、消化道肿瘤以及其他浅表性肿瘤。由于目前上市的榄香烯以及制剂中含有蓖麻油聚羧酯等辅料具有较大的刺激性，因此上市药物用药后大部分病人会有较严重的静脉炎、发热、局部疼痛、过敏反应或者轻度消化道反应，以及发热等不良反应。在实际临床用药过程中由于其静脉炎的发生率过高，且复发率更高，对于静脉滴注的速度要求很高，要严格控制，造成滴注时间很长。

榄香烯在水中几乎不溶，脂溶性很强，尤其在石油醚、乙醚等有机溶剂中溶解性很好，其分子式为 $C_{15}H_{24}$ ，仅由碳氢化合物组成。由于其独特的化学结构和理化性质，制成药物制剂时存在很大的难度和障碍，为了增加榄香烯的溶解度，将其制成注射液的过程中，上市处方添加了蓖麻油聚羧酯等辅料，造成其溶血严重、刺激性大的问题。另外，虽然紫杉醇白蛋白纳米制剂的上市，为解决临床副作用提供了一种新的药物制剂形式，但是常温下为油状的榄香烯的化学结构及其理化性质决定将其制备成白蛋白制剂存在诸多困难，因此，目前并未有相应研究和开发。

发明内容

本申请提供了一种药物组合物，其包含榄香烯、注射用油和蛋白载体，其能有效地减少药物组合物给药到人体内的一种或多种副作用。

在本申请的一个或多个实施方式中，药物组合物中所用的蛋白载体包括蛋白质，可以使用任何合适的蛋白质。合适的蛋白质的实例包括但不限于白蛋白、免疫球蛋白，包括但不限于 IgA、脂蛋白、载脂蛋白 B、 α -酸性糖蛋白、 β -2-巨球蛋白，甲状腺球蛋白、转铁蛋白、纤连蛋白、因子 VII、因子 VIII、因子 IX、因子 X 和类似物。蛋白载体可以是天然来源或是合成制备的。在一些实施方式中，蛋白载体是非血液蛋白质，如酪蛋白、 α -乳清蛋白和 β -乳球蛋白。在一些实施方式中，蛋白载体包括白蛋白，如人血清白蛋白(HSA)，牛血清白蛋白等。人血清白蛋白是高度可溶性球蛋白，Mr65K，由 585 个氨基酸组成。HSA 是血浆中最丰富的蛋白质，并且构成人血浆胶体渗透压的 70-80%。

在本申请的一个或多个实施方式中，药物组合物中所用“可注射用油”包括但不限于油酸乙酯、苯甲酸苄酯、中链甘油三酯 (MCT) 和植物油，其中植物油选自大豆油、红花油、棉籽油、玉米油、向日葵油、花生油、橄榄油的一种或多种。在本申请的一个或多个实施方式中，可注射用油为大豆油。

在本申请的一个或多个实施方式中，药物组合物可以被制成颗粒，其中所述颗粒的粒径小于 180nm，例如约为 70-170nm，优选约为 70-150nm。

在本申请的一个或多个实施方式中，组合物包含任何形状（例如，球形或非球形形状）的纳米颗粒，在一些实施方式中，颗粒的平均或中间直径不大于约 180nm。在一些实施方式中，颗粒的平均或中间直径为约 50 至约 180nm。在一些实施方式中，颗粒的平均或中间直径为约 60 至约 180nm。在一些实施方式中，颗粒的平均或中间直径为约 70 至约 170nm。在一些实施方式中，颗粒的平均或中间直径为约 70 至约 170nm。在一些实施方式中，颗粒的平均或中间直径为约 70 至约 150nm 之间。在一些实施方式中，颗粒的平均或中间直径为约 60nm、70nm、80nm、90nm、100nm、110nm、120nm、130nm、140nm 或 150nm。在一些实施方式中，颗粒是无菌、可过滤的。

在本申请的一个或多个实施方式中，药物组合物中的榄香烯选自 α -榄香烯、 β -榄香烯、 γ -榄香烯以及 δ -榄香烯的一种或多种。在本申请的一个或多个实施方式中，药物组合物中的榄香烯为 β -榄香烯。

在本申请的一个或多个实施方式中，药物组合物中所述白蛋白载体、榄香烯和注射用油的比例为投料的重量比。

在本申请的一个或多个实施方式中，药物组合物中所述蛋白载体与榄香烯的重量比为 0.520；例如 0.5-10。

在本申请的一个或多个实施方式中，药物组合物中所述注射用油与榄香烯的重量比为 0.3510；例如 0.5-10。

在本申请的一个或多个实施方式中，药物组合物还含有冻干保护剂。所述冻干保护剂选自葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、甘露糖、海藻糖、甘氨酸、右旋糖酐中的一种或几种，优选海藻糖或蔗糖。在一个或多个实施方式中，其中所述冻干保护剂的重量与所述药物组合物的溶液的体积之比为 3:100-20:100 g/mL，优选 5:100-10:100 g/mL。

在本申请的一个或多个实施方式中，药物组合物还含有等渗调节剂、抗氧化剂、防腐剂、pH 调节剂中的一种或几种。所述等渗调节剂为甘油、山梨醇、甘露醇或葡萄糖的一种或多种；所述 pH 调节剂为氢氧化钠、柠檬酸钠、柠檬酸、磷酸、醋酸或盐酸的一种或多种；所述防腐剂为羟苯烷基酯类、苯甲酸、苯甲酸钠、山梨酸、醋酸氯乙定、苯扎溴胺的一种或多种；所述抗氧化剂为亚硫酸钠、亚硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、硫代硫酸钠、抗坏血酸、叔丁基对羟基茴香醚、2,6-二叔丁基化羟基甲苯、维生素 E 的一种或多种。

在本申请的一个或多个实施方式中，还提供了一种药物组合物在制备过程中不使用有机溶剂。

在本申请的一个或多个实施方式中，药物组合物可以制成颗粒，其中所述颗粒的粒径小于 180nm；例如约为 70-150nm。

在本申请的一个或多个实施方式中，其中所述药物组合物中所述大豆油与榄香烯的重量比约为 0.35-3，所述人血白蛋白与榄香烯的重量比约为 0.5-20；优选所述大豆油与榄香烯

的重量比约为 0.5-3; 所述人血白蛋白与榄香烯的重量比约为 0.5-2.5; 或者所述药物组合物中所述大豆油与榄香烯的重量比约为 0.35-1.5, 所述人血白蛋白与榄香烯的重量比约为 1.5-10。

在本申请的一个或多个实施方式中, 大豆油与榄香烯的重量比约为 0.5, 人血清白蛋白与榄香烯的重量比约为 1.5。

在本申请的一个或多个实施方式中, 大豆油与榄香烯的重量比约为 0.75, 人血清白蛋白与榄香烯的重量比约为 5。

在本申请的一个或多个实施方式中, 大豆油与榄香烯的重量比约为 1.5, 人血清白蛋白与榄香烯的重量比约为 3-5。

在本申请的一个或多个实施方式中, 还提供了一种药物组合物, 其在制备过程中含有有机溶剂。其中所述有机溶剂选自氯仿、二氯甲烷、叔丁醇、异丙醇、乙酸乙酯、乙醇、四氢呋喃、二氧六环、乙腈、丙酮、二甲基亚砜、二甲基甲酰胺、甲基吡咯烷酮中的一种或几种。其中所述脂溶性有机溶剂为二氯甲烷与乙醇的混合溶剂。

其中所述二氯甲烷与乙醇的体积比 1:1-8, 优选 1:4。

所述药物组合物可以制备成颗粒, 所述颗粒的粒径约为 70-150nm。

所述药物组合物中所述大豆油和榄香烯的重量比约为 2.4-10, 所述人血白蛋白和榄香烯的重量比约为 0.5-10; 优选所述药物组合物中所述大豆油和榄香烯的重量比约为 2.4, 所述人血白蛋白和榄香烯的重量比约为 3。

本申请的一个或多个实施方式提供了本发明申请的药物组合物的制备方法, 其包括以下步骤:

(1) 将榄香烯与注射用油混合均匀, 任选地加入有机溶剂, 得到榄香烯和注射用油的溶液; 将蛋白载体溶解于水, 得到蛋白载体溶液;

(2) 将步骤 (1) 中获得的两份溶液混合形成乳液;

(3) 将步骤 (2) 中所述的乳液高压均质, 任选地将所述乳液减压蒸发除去有机溶剂, 得到纳米粒溶液。

本申请的一个或多个实施方式提供了本发明申请的药物组合物的制备方法, 过程其包括以下步骤:

(1) 取榄香烯和注射用油混合均匀;

(2) 取白蛋白, 溶解于水中;

(3) 将两者混合形成乳液;

(4) 将步骤 (3) 中所述的乳液高压均质, 得到白蛋白纳米粒溶液。

在本申请的一个或多个实施方式中, 其中步骤 (2) 中采用剪切或超声的方法进行混合, 步骤 (3) 中采用高压均质或微射流均质的方法进行均质。

在本申请的一个或多个实施方式中, 步骤 (3) 中还可包括用适量海藻糖水溶液冲洗均质机管路, 将残留在均质机内的均质液置换出来, 再用适量超纯水冲洗均质机管路, 将残

留的海藻糖水溶液置换出来，与均质液合并，混匀后再过滤。

在本申请的一个或多个实施方式中，其中剪切可以用混合机剪切。

在本申请的一个或多个实施方式中，其中用混合机剪切的转速为 5000rpm-10000rpm。

在本申请的一个或多个实施方式中，其中混合机的剪切时间为 1min-20min，优选例如

5 2min-10min 或，更优选 1min-10min。

在本申请的一个或多个实施方式中，其中用混合机剪切优选多次剪切，优选例如大于 2 次。

在本申请的一个或多个实施方式中，优选第一次 5000rpm 剪切 1min，第二次 10000rpm 剪切 5min。

10 在本申请的一个或多个实施方式中，其中高压均质的压力 200-1600 bar，优选例如 250-1550bar。

在本申请的一个或多个实施方式中，其中高压均质的时间为 1-10min，例如优选 2-10min，比如进一步优选 5-8min。

在本申请的一个或多个实施方式中，其中高压均质优选进行多次高压均质，优选例如
15 大于 2 次。

在本申请的一个或多个实施方式中，其中微射流均质的压力为 20000psi。

在本申请的一个或多个实施方式中，其中微射流均质的时间为 30min。

本申请的一个或多个实施方式还提供了本申请的所述药物组合物的制备方法，在制备过程中使用有机溶剂。

20 在本申请的一个或多个实施方式中，本申请药物组合物的制备方法包括以下步骤：

(1) 取榄香烯和注射用油溶于脂溶性有机溶剂；

(2) 取白蛋白，溶解于水中；

(3) 将步骤 (1) 和 (2) 中得到的溶液混合，形成乳液；

(4) 将步骤 (3) 中所述的乳液进行均质；

25 (5) 将步骤 (4) 中所述的乳液减压蒸发除去有机溶剂，得到白蛋白纳米粒溶液。

在本申请的一个或多个实施方式中，步骤 (1) 中所述有机溶剂选自氯仿、二氯甲烷、叔丁醇、异丙醇、乙酸乙酯、乙醇、四氢呋喃、二氧六环、乙腈、丙酮、二甲基亚砜、二甲基甲酰胺、甲基吡咯烷酮中的一种或几种；例如，二氯甲烷与乙醇的混合溶剂，混合溶剂中乙醇与二氯甲烷的体积比为 1:1-8，例如 1:4。

30 在本申请的一个或多个实施方式中，其中所述步骤 (3) 中可以采用剪切或超声的方法进行混合，其中所述步骤 (4) 可以采用高压或微射流的方法进行均质。

在本申请的一个或多个实施方式中，其中剪切可以用混合机剪切。

在本申请的一个或多个实施方式中，其中用混合机剪切的转速为 5000rpm-10000rpm。

在本申请的一个或多个实施方式中，其中混合机的剪切时间为 1min-20min，例如
35 2min-10min。

在本申请的一个或多个实施方式中，其中用混合机剪切优选多次剪切，例如大于 2 次。

在本申请的一个或多个实施方式中，优选第一次 5000rpm 剪切 1min，第二次 10000rpm 剪切 5min。

在本申请的一个或多个实施方式中，其中高压均质的压力 200-1600 bar，例如
5 250-1550bar。

在本申请的一个或多个实施方式中，其中高压均质的时间为 1-10min，例如 2-10min，
比如进一步优选 5-8min。

在本申请的一个或多个实施方式中，其中高压均质优选进行多次高压均质，例如大于
2 次。

10 在本申请的一个或多个实施方式中，其中微射流均质的压力为 20000psi。

在本申请的一个或多个实施方式中，其中微射流均质的时间为 30min。

在本申请的一个或多个实施方式中，本申请的药物组合物的制备方法过程还包括将得
到的白蛋白纳米粒溶液冻干的步骤。

本申请的一个或多个实施方式提供了本申请的药物组合物在预防或治疗癌症的药物中
15 的用途。

在本申请的一个或多个实施方式中，本申请所涉及的癌症包含肾上腺皮质癌、原因不
明的髓样化生、AIDS 相关的癌、肛门癌、阑尾癌、星形细胞瘤、基底细胞癌、胆管癌、膀
胱癌、骨癌、神经胶质瘤、室管膜瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、颅咽管瘤、成血管细胞
瘤、成神经管细胞瘤、神经外胚层肿瘤、视觉通路和下丘脑神经胶质瘤和恶性胶质瘤、支
20 气管腺瘤、类癌瘤、中枢神经系统淋巴瘤、子宫颈癌、结肠癌、结肠直肠癌、慢性骨髓增
生性疾病、子宫内膜癌、室管膜瘤、尤文肿瘤家族、眼癌、胆囊癌、胃癌、胃肠道类癌瘤、
胃肠道间质瘤、生殖细胞癌瘤、妊娠滋养层肿瘤、头颈癌、肝癌、喉癌、白血病、唇及口
腔癌、肺癌、淋巴瘤、成神经管细胞瘤、黑色素瘤、间皮瘤、转移性颈部鳞状细胞癌、多
发性内分泌瘤形成综合征、骨髓增生异常综合征、骨髓增生异常/骨髓增生性疾病、鼻腔和
25 鼻窦癌、成神经细胞瘤、神经内分泌癌、口咽癌、鼻咽癌、脑肿瘤、骨转移癌、肠癌、食
道癌、卵巢癌、胰腺癌、皮肤癌、甲状旁腺癌、阴茎癌、腹膜癌、咽癌、嗜铬细胞瘤、成
松果体细胞瘤和幕上原始神经外胚层肿瘤、垂体瘤、胸膜肺的胚细胞瘤、淋巴瘤、原发性
中枢神经系统淋巴瘤、肺淋巴管肌瘤病、直肠癌、肾癌、肾盂及输尿管癌、横纹肌肉瘤、
唾液腺癌、小肠癌、鳞状上皮细胞癌、睾丸癌、咽喉癌、胸腺瘤及胸腺癌、甲状腺癌、尿道
30 癌、阴道癌。

在本申请的一个或多个实施方式中，本申请所涉及的癌症包含肺癌、肝癌、食道癌、
鼻咽癌、脑肿瘤、骨转移癌、胃癌、肠癌、子宫癌、子宫颈癌、生殖细胞癌瘤、子宫内膜
癌、妊娠滋养层肿瘤、乳腺癌、皮肤癌、淋巴瘤、白血病、恶性黑色素瘤；

在本申请的一个或多个实施方式中，脑肿瘤包含神经胶质瘤、脑干神经胶质瘤、小脑
35 或大脑的星形细胞瘤、恶性神经胶质瘤、室管膜瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、颅咽管瘤、

成血管细胞瘤、成神经管细胞瘤、视觉通路和下丘脑神经胶质瘤或恶性胶质瘤；所述小脑或大脑的星形细胞瘤为纤维状细胞星形细胞瘤或弥漫星形细胞瘤或间变性(恶性)星形细胞瘤。

在本申请的一个或多个实施方式中，本申请的药物组合物可以合并用于对肺癌、肝癌、食道癌、鼻咽癌、脑瘤、骨转移癌等恶性肿瘤的放疗、化疗以增强疗效，降低放疗和化疗的毒副作用，还可用于介入、腔内化疗及癌性胸腹水的治疗。

在本申请的一个或多个实施方式中，本申请的化合物可以与其它药物联用，所述其它药物包含抗癌药物，所述抗癌药物包含替莫唑胺、紫杉醇、多西他赛、紫杉烷、吉西他滨、抗 VEGF 药物、PD-1 抗体药物；其中抗 VEGF 药物包含 AVASTIN、雷珠单抗、阿柏西普或康柏西普；其中 PD-1 抗体药物包含纳武利尤单抗、帕博丽珠单抗、特瑞普利单抗、信迪利单抗、西米普利单抗、阿特珠单抗、阿维单抗或度伐利尤单抗。

本申请的一个或多个实施方式提供了治疗人类疾病的方法，包括给予治疗有效量的本申请的药物组合物。所述药物组合物的给药方式为通过非肠道、通过吸入、腹腔内、膀胱内、肌肉内、静脉内、气管内、皮下、眼内、鞘内、透皮给药、直肠或阴道内。

在本申请的一个或多个实施方式中，本申请的药物组合物可以制成适于静脉给药的药物制剂、胃肠外给药的药物制剂、胃肠给药的药物制剂、气雾剂、阴道给药的药物制剂或其它合适的药物制剂，所述药物制剂为固体制剂、液体制剂或气体制剂。

在本申请的一个或多个实施方式中，本申请的药物组合物可作为注射用液体制剂，其包含榄香烯和药学上可接受的载体，其中药学上可接受的载体包括白蛋白载体和注射用油，其中组合物可以制成颗粒，其中所述颗粒的粒径 70-150nm，所述组合物中白蛋白载体与榄香烯的重量比为白蛋白载体和榄香烯的重量比约为 0.5-20，所述注射用油和榄香烯的比例重量比约为 0.35-10。

在本申请的一个或多个实施方式中，本申请中的液体制剂可以为由无菌冻干粉重建的稳定的水悬浮液。

本申请的一个或多个实施方式提供包含本申请的药物组合物的密封容器，密封容器可以为单位剂量容器或多剂量容器。密封容器可以为预填充注射器。药物组合物为液体组合物或干燥组合物。药物组合物为冻干的、无菌的。

在本申请的一个或多个实施方式中，本文所述的纳米制剂或纳米颗粒可以以干燥制剂形式存在（如冻干组合物）或悬浮于生物相容性介质中。合适的生物相容性介质包括但不限于水、含水缓冲介质、盐水、缓冲盐水、任选缓冲的氨基酸溶液、任选缓冲的蛋白质溶液、任选缓冲的糖溶液、任选缓冲的维生素溶液、任选缓冲的合成聚合物溶液、含脂类乳剂等。

除非另有清楚地指出，在本文中使用的“个体”是哺乳动物，包括但不限于灵长类动物、人、牛、马、猫科动物、犬科动物或啮齿动物。

如在本文所使用，“治疗”是获得包括临床结果在内的有益或所需的结果的方法。对于

本发明目的，有益或所需临床结果包括但不限于下列任一或多个：减少由疾病产生的一种或多种症状的、减轻疾病程度、稳定疾病（例如预防或延迟了疾病的恶化）、预防或延迟疾病播散（例如转移）、预防或延迟疾病发生或复发、延迟或减慢疾病进展、改善疾病状态、提供疾病的缓和（不论是部分或全部的）、减少一种或多种治疗疾病必需的其它药物的剂量、延迟疾病进展、增加生活质量和/或延长生存。在一些实施方式中，与在治疗之前相同受实验者中的相应症状相比或与没有接受组合物的其它受实验者中的相应症状相比，组合物减少了与癌症相关的一种或多种症状的严重性，为至少大约 10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、95 % 或 100 % 中的任一种。“治疗”也包括癌症的病理后果减轻。本发明方法考虑了这些治疗方面中的任一或多种。

10 如在本文所使用的，“药学上可接受的”或“药理学相容的”意思是不是生物学的或另外不想要的物质，例如在没有引起任何显著不想要的生物效果或与组合物中包含的任何其它成分没有以有害方式相互作用的情况下，该物质可以被掺入给予患者的药物组合物中。药学上可接受的载体或赋形剂优选满足毒物学和生产测试要求的标准。

在本文提及“大约”某个值或参数包括（并描述）涉及该值或参数本身的实施方式。
15 例如，提及“大约 X”的描述包括对“X”的描述。

本发明药物组合物有多种合适的制剂。下面的制剂和方法仅仅是示例性的，并不是限制性的。

口服给药的制剂可由（a）液体溶液，例如有效量的溶解在稀释剂如水，盐水或橙汁中的活性成分，（b）胶囊，香囊或片剂，每个含有预定量的固体或颗粒形式的活性成分，（c）
20 在适当液体中的悬浮液，和（d）适当的乳剂。片剂形式可包括乳糖、甘露醇、玉米淀粉、马铃薯淀粉、微晶纤维素、阿拉伯胶、明胶、胶态二氧化硅、交联羧甲基纤维素钠、滑石、硬脂酸镁、硬脂酸和其它赋形剂、着色剂、稀释剂、缓冲剂、润湿剂、防腐剂、调味剂和药理学相容的赋形剂中的一种或多种。含片形式可包含香料中的活性成分，通常是蔗糖和阿拉伯胶或黄蓍胶，以及在惰性基质中包含活性成分的锭剂，例如明胶和甘油，或蔗糖和
25 阿拉伯胶，乳剂，凝胶等，除了活性成分外，还包含本领域已知的赋形剂。

胃肠外给药的制剂包括水性和非水性，等渗无菌注射溶液，其可包含抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使制剂与预期接受者的血液等渗的溶质，以及可包括悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂的含水和非水无菌悬浮液。所述制剂可存在于单位剂量或多剂量的密封容器中，例如安瓿和小瓶中，并且可在使用前立即在冷冻干燥（冻干）条件下储存，仅
30 需要加入无菌液体赋形剂，例如水，用于注射。可由前述类型的无菌粉末，颗粒和片剂制备临时注射溶液和悬浮液。

气雾剂包含本发明的药物组合物，所述药物组合物包括水性和非水性，等渗无菌溶液，其可包含抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和溶质，以及可包含悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂的水性和非水性无菌悬浮液，其单独或与其它合适的组分组合，可制成气雾剂
35 制剂，通过吸入给药。这些气溶胶制剂可被置于加压的可接受的推进剂中，例如二氟甲烷、

丙烷、氮气等。它们也可以配制成非压力制剂的药物，例如在喷雾器或雾化器中。

其它合适的制剂也是可能的，例如栓剂可以通过使用各种碱例如乳化碱或水溶性碱来制备。阴道给药的制剂可呈现为阴道栓剂、棉塞、乳膏、凝胶、糊剂、泡沫剂或喷雾制剂，除了活性成分外，还含有本领域已知的合适的载体。

5

说明书附图

- 图 1 表示 β -榄香烯白蛋白纳米粒水合粒径分布图；
- 图 2 表示 β -榄香烯白蛋白纳米粒电位图；
- 图 3 表示 β -榄香烯白蛋白纳米粒透射电镜图；
- 10 图 4 表示不同冻干样品复溶后粒径稳定性考察；
- 图 5 表示不同冻干样品放置含量稳定性考察；
- 图 6 表示各组荷瘤小鼠生存期；
- 图 7 表示溶血性实验结果；
- 图 8 表示 U87R1 小鼠原位瘤模型的肿瘤生长曲线；
- 15 图 9 表示 U87R1 小鼠原位瘤模型的生存曲线。

具体实施方式

以下实施例是对本发明的进一步说明，并非本发明范围的限制。下面参考实施例进一步详细阐述本发明，但是本领域技术人员应当理解，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。

本发明涉及的大豆油来自大豆油（SIO，注射级，Lot19C4520/Lot18C4816）；本发明涉及的人血清白蛋白（HSA）来自人血清白蛋白（20%，Baxter，LotA1U133A）或（20%，Grifols，LotALAFD03042）。

25 本发明常用检测方法含有粒径及粒径分布、含量测定、溶血实验等，具体如下：

粒径和粒径分布

用粒度仪（MALVERN ZETASIZER NANO ZS90）测定粒径和粒径分布。取 25 μ L 样品，加入 1ml 超纯水稀释后进行检测，检测角：90°；分散介质：水；温度 25℃。

其中粒径为粒度仪测出的 Z-average 值（样品粒径平均值），其中粒径分布为粒度仪测出的 PDI 值。

含量测定

照高效液相色谱法（中国药典 2015 年版四部通则 0512）测定。

色谱柱：CHIRALPAK® IG (4.6 $\times$ 150 mm，5 μ m)，乙腈-水（55：45）为流动相，流速 1.0 ml/min，进样量 20 μ L，柱温为 30 °C，检测波长为 210 nm。

35 对照品溶液（0.2mg/ml）的制备（外标法）：精密称取 β -榄香烯对照品约 10mg 至已

加入少量乙腈的 50ml 量瓶中，加乙腈溶解并稀释至刻度，摇匀，即得。

供试品溶液的制备：取本品 1 瓶去盖，精密称定 (m_1)，加入适量水（使 API 与水的比例为 20mg: 1ml）后，精密称定 (m_2)，振摇使复溶，精密称取复溶溶液约 500mg（约相当于 API 10mg）(m_3)，置 50ml 量瓶中，先加入约 1.5ml 的水，再缓慢加入乙腈至满量程的 80%，超声 10min，放冷，再加乙腈稀释至刻度，摇匀，用孔径 0.45 μ m 的尼龙滤头过滤即得。复溶溶液使用完毕后，用水清洗西林瓶并擦干，精密称定空瓶重量 (m_4)。

精密量取 20 μ l，注入液相色谱仪，记录色谱图。按外标法以峰面积计算供试品中 β -榄香烯 ($C_{15}H_{24}$) 的含量。

计算公式：

$$\text{含量 (\%)} = C_R \times \frac{A_X \times 50 \times (m_2 - m_4)}{A_R \times m_3 \times (m_1 - m_4)} \times 100\%$$

式中

A_X : 供试品溶液中 API 峰面积

A_R : 对照品的峰面积

15 C_R : 对照品的浓度

溶血值的测定方法

血细胞悬液制备：取家兔（雄性新西兰兔、实验室适用性饲养 1 周、体重 2.5kg-3kg，心脏取血）血数毫升，放入烧杯中，用玻璃棒或竹签搅动血液，除去纤维蛋白原，使成脱纤血液。加入 0.9%氯化钠溶液约 10 倍量，混匀，1500 rpm/min 离心 15 min，弃去上清液，20 沉淀的红细胞再用 0.9%氯化钠溶液按上述方法洗涤 2-3 次，至上清液不显红色为止。将所得红细胞用 0.9%氯化钠溶液配成 2%的血细胞悬液，备用。

样品制备：根据样品含量，取适量用生理盐水依次稀释获得 1mg/mL 样品（实际含量）。

反应观察：按下列方式加入各药物，混匀后，立即置于 37 °C 水浴锅中进行温育，3h 后观察溶血情况。

25 药物组：试管中依次加入 2.5mL 2%的血细胞悬液、2.2mL 生理盐水、0.3mL 药物。

阳性组：试管中依次加入 2.5mL 2%的血细胞悬液、2.5mL 蒸馏水。

阴性组：试管中依次加入 2.5mL 2%的血细胞悬液、2.5mL 生理盐水。

OD 值测定：吸取上层液 100 μ L 至 96 孔板中，540nm 波长下测定 OD 值。

溶血值的计算方式：（样品 OD 值-阴性 OD 值）/（阳性 OD 值-阴性 OD 值）。

30 试验例 1

制备 β -榄香烯白蛋白纳米粒，包括如下步骤：1) 称取 200 mg 榄香烯和 600 mg 大豆油，溶于 2 mL 二氯甲烷中，得到油相。2) 取人血清白蛋白 650 mg 加入注射用水溶解，得质量体积百分比为 3.6% (g/ml) 人血清白蛋白水溶液，即得到水相。3) 在水浴超声作用下，将油相逐滴滴加到水相中，探头超声 8 min (250 W) 制成初乳。4) 将所得初乳转移到高压均质仪中进行高压均质，均质压力为 1300 bar，均质次数 9 次。均质完成后的体系通过

旋转蒸发除去有机溶剂，0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌，即得榄香烯白蛋白纳米粒的水溶液，注射用水定容至 10mg/ml，5）往所得榄香烯白蛋白纳米粒中加入 3%蔗糖，冻干。冻干参数为：-45℃预冻 5h；开启真空泵保持真空度为 10Pa 左右，程序升温，-40℃干燥 4h，-30℃干燥 10h，随后依次于-20℃、-10℃、0℃、5℃、10℃分别干燥 4h。将上述制备的冻干样品采用纯水复溶，采用如下方法对纳米粒粒径、电位和微观形态进行考察。

测量前马尔文粒度仪预热 30 min，取榄香烯白蛋白纳米粒水溶液 50 μL，加水稀释至 1mL，轻微震荡摇匀（避免产生气泡），置于马尔文 Nano-ZS90 粒径皿或电位皿中测量粒径及 Zeta 电位。测量温度为 25℃，平衡时间 120 s，其余各项保留仪器默认值，以 Malvern V2.2 工作站进行数据采集处理。所得的榄香烯白蛋白纳米粒粒径图，zeta 电位，见图 1、图 2。由图 1 和图 2 可见，榄香烯白蛋白纳米粒的粒径约为 110 nm 左右，PDI 为 0.127，电位约为-18 mV。

移液枪吸取榄香烯白蛋白纳米粒水溶液，滴于铜网上，自然挥干后同法将 1% 磷钨酸溶液滴于铜网上，自然挥干，吸取纯净水数滴小心冲洗铜网表面，挥干后于透射电镜观察形态如图 3，纳米粒呈圆球形，形状规整，粒径较为均匀，微粒直径为 100 nm 左右。

试验例 2

按照试验例 1 的方法制备榄香烯白蛋白纳米粒，其中注射用油分别采用等量大豆油、玉米油、茶油、中链甘油三酯（MCT），制备出以不同注射用油为原料的榄香烯白蛋白纳米粒，采用激光粒度仪测定制备的纳米粒的粒径，冻干后，分别测定各组制剂冻干前后的药物含量，计算冻干过程中药物的损失率。

制备不含大豆油的榄香烯白蛋白纳米粒，包括如下步骤：1）称取 200 mg 榄香烯溶于 2 mL 二氯甲烷中，得到油相。2）取人血清白蛋白 650 mg 加入注射用水溶解，得质量体积百分比为 3.6%（g/ml）人血清白蛋白水溶液，即得到水相。3）在水浴超声作用下，将油相逐滴滴加到水相中，探头超声 8 min（250 W）制成初乳。4）将所得初乳转移到高压均质仪中进行高压均质，均质压力为 1300 bar，均质次数 9 次。均质完成后的体系通过旋转蒸发除去有机溶剂，0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌，即得榄香烯白蛋白纳米粒的水溶液，注射用水定容至 10mg/ml。5）往所得榄香烯白蛋白纳米粒中加入 3%蔗糖，按试验例 1 冻干参数冻干。分别测定一定体积制剂冻干前后的药物含量，计算冻干过程中药物的损失率。

另按照上述方法制备仅是不含冻干保护剂 3%蔗糖的大豆油、玉米油、茶油、中链脂肪酸甘油酯组，分别测定一定体积制剂冻干前后的药物含量，计算冻干过程中药物的损失率。所述结果如表 1 所示。

表 1 不同注射用油制备样品冷冻干燥后药物损失率

冻干损失率	大豆油	玉米油	茶油	MCT	无
含 3%蔗糖	7.1%	10.4%	9.2%	11.8%	31.4%
无蔗糖	9.5%	13.3%	11.1%	13.0%	39.5%

实验表明，将注射用油与榄香烯混合后制备成白蛋白纳米粒较不加注射用油制备的纳米粒冻干损失率均有不同程度降低。

试验例 3

5 按照试验例 1 的方法，调整大豆油用量，分别按照 β -榄香烯/大豆油质量比为 5:1, 1:1, 1:3, 1:5, 1:10, 1:20 和不加注射用油投料，制备榄香烯白蛋白纳米粒。

采用激光粒度仪测定制备的纳米粒的粒径，加入 3%蔗糖冻干后，将冻干样品放置于室温干燥器内，定期取出样品，复溶，测定 30d 内冻干样品粒径和主药含量的变化情况。具体检测参数：仪器型号：MALVERN ZETASIZER NANO ZS90，检测角：90°；检测模式：

10 自动；检测次数：3；检测类型：纳米粒；待测样品折射率：1.340；分散介质：水；温度 25°C；黏度：0.8872cp；分散介质折射率：1.330；平衡时间：120s；粒径皿型号：DTS0012。

结果如图 4 和图 5 所示，制备过程中不加大豆油的制剂冻干后粒径大于 200 nm，随着存储时间延长，样品复溶后的粒径呈逐渐增大的趋势，药物含量呈不断降低的趋势。逐渐增加制剂中大豆油的比例，冻干后样品复溶的粒径均小于 200 nm，粒径稳定性较好，主药
15 含量稳定性也逐渐增强。其中，当大豆油/榄香烯的质量比在 1-10 时，制备的纳米粒冻干样品室温放置 30 d 内无聚集现象，粒径为 100-150 nm，PDI 小于 0.3， β -榄香烯主药含量变化小。当榄香烯 1 份，大豆油的用量小于 1 份时，制备的纳米粒稳定性欠佳。

试验例 4

20 榄香烯白蛋白纳米粒对小鼠脑胶质瘤的治疗效果考察，实验方法如下所述。

肿瘤建模：将生长良好且处于对数期的 C6 细胞用胰酶消化，离心，弃去上层废液，用 PBS 洗一次，离心弃去上层废液，PBS 重悬，使最终 C6 细胞密度约为 1×10^6 个/5 μ L。健康雄性昆明小鼠（28-30 g），腹腔注射适量 4%水合氯醛使其麻醉，将头顶的毛发剃除后，75%乙醇涂抹消毒，用消毒的眼科剪沿头部矢状中线开一小口，用沾有 10%双氧水的棉签
25 快速去除组织膜，分离出颅骨，再用沾有 PBS 的棉签清洗双氧水；将小鼠的头部固定于脑立体定位仪上，定位距离前囟点右 1.8 mm，后 0.6 mm 的位置，用 2 mL 注射器的针头在定位点钻一个小孔，不得过深以免出血。用微量进样针吸取上述密度为 1×10^6 个/5 μ L 的 C6 细胞 5 μ L，沿小孔垂直方向，进针 4 mm，退针 1 mm，留出细胞空间，缓慢将细胞悬液注入脑内，微针在小孔位置停留 5 min 后取出。用手术线将伤口缝合，最后用沾有双抗的棉
30 签涂抹缝合表面。

接种肿瘤后第 10 天，将荷瘤小鼠分为生理盐水组（NS）、市售榄香烯脂质体（Lip，大连金港，批准文号：国药准字 H10960114）、试验例 1 制备的榄香烯白蛋白纳米粒（NPs），每组 12 只，给药剂量为 30 mg/kg，每 2 天给一次，共给药 4 次，记录每只小鼠存活时间，制作生存曲线。

35 生存期考查结果如图 6 所示，实验的结果表明给予榄香烯白蛋白纳米粒的荷 C6 胶质瘤

小鼠，表现出更长的生存期。生理组的平均生存期为 21 天，榄香烯脂质体组的平均生存时间为 28 天，榄香烯白蛋白纳米粒组的平均生存期为 41 天。因此，实验所制备的榄香烯白蛋白纳米粒具有延长荷 C6 胶质瘤小鼠生存期的作用。

5 试验例 5

溶血实验：

将新西兰兔（雄性，实验室适用性饲养 1 周，体重 2.5kg-3kg）分为市售榄香烯注射液（艾利能，石药集团远大制药有限公司，批号 17050302）和试验例 1 制备的榄香烯白蛋白纳米粒（NPs）两个组，每组 2 只，给药剂量为 50 mg/kg。用葡萄糖溶液分别将两种制剂
10 配制成浓度为 6mg/mL 的药液，静脉滴注给药。

给药完成后 10-15min 内耳缘静脉抽取 1ml 左右静脉血于涂有肝素钠的离心管中，3500r/min 离心 15min，取上清液观察颜色。

所得血浆颜色如图 7 所示，该结果表明给予榄香烯白蛋白纳米粒的新西兰兔未表现出溶血现象，刺激性小，具有较高的安全性。

15

试验例 6

1.1 实验样品的制备

样品 1

称取 3.33 g β -榄香烯、8g 大豆油，混匀，得到油相。量取 20%人血清白蛋白 50ml(10g)，
20 加入适量超纯水稀释均匀，定容至 333ml，得质量体积百分比为 3% (g/ml) 的人血清白蛋白水溶液，即水相。将水相倒入油相中，用混合机（FLUKO，FA30/30F）10000rpm 剪切 10min，形成初乳。将所得初乳转移到微射流均质机（Microfluidizer，M-110-EH）中进行均质，均质压力 20000psi，均质 30min。经 0.45 μ m 和 0.22 μ m PVDF 平板过滤器进行过滤，定容，加入冻干保护剂蔗糖 3% (g/ml)，将加入冻干保护剂后的均质液进行冻干，完成冻
25 干后，用灭菌超纯水复溶冻干粉，用粒径仪检测粒径为 175.97nm，PDI 为 0.188。

样品 2

称取 3.33 g β -榄香烯、8g 大豆油，溶于有机溶剂中，混匀，得到油相。所述有机溶剂为 26.67ml 二氯甲烷与 6.67ml 无水乙醇的混合溶剂。量取 20%人血清白蛋白 50ml(10g)，
加入适量超纯水稀释均匀，定容至 333ml，得质量体积百分比为 3% (g/ml) 的人血清白蛋白水溶液，即水相。将水相溶液倒入油相中，用混合机（FLUKO，FA30/30F）10000rpm
30 剪切 10min，形成初乳。将所得初乳转移到微射流均质机（Microfluidizer，M-110-EH）中进行高压均质，均质压力 20000psi，均质 30min。均质完成后含有机溶剂的乳液通过薄膜蒸发仪（上海德大天一）除去有机溶剂，参数为：温度 30℃，真空度 4000pa，进液速度 100rpm，刮板速度 50rpm。经 0.45 μ m 和 0.22 μ m PVDF 平板过滤器进行过滤，定容，加入冻干保护
35 剂蔗糖 3% (g/ml)。将加入冻干保护剂后的均质液进行冻干，完成冻干后，用灭菌超纯水

复溶冻干粉，用粒径仪检测粒径为 78.34 nm，PDI 为 0.207。

样品 3（榄香烯注射液（商品名：艾利能））:石药集团远大（大连）制药有限公司，批号：19061502；用粒径仪检测粒径为 14.74nm PDI: 0.035

1.2 榄香烯白蛋白纳米粒的 PK 和小鼠脑组织分布

5 采用昆明小鼠（雄性，SPF 级，体重 20-25g）进行实验，通过尾静脉给药：给药剂量 50 mg/kg；脑组织样品于不同时间段采集好后，及时于-20℃冻存，用于脑组织中药物含量检测。三个样品，每种剂型每个时间点 3 只昆明小鼠，共计 45 只，给药后于 5min、15min、30min、1h、2h 摘除眼球取血，收集脑组织，检测脑组织中药物含量。采用 GC-MS 进行昆明小鼠血浆和脑组织生物样品中 β-榄香烯的定量分析，其中脑组织中半衰期及脑组织暴露量
10 量的研究结果见表 2。

表 2 半衰期及脑组织暴露量研究结果

	样品 1	样品 2	样品 3
粒径（nm）	175.97	78.34	14.7
脑组织中半衰期（min）	41.8	57.5	33.6
脑部药物暴露量（mg/L*min）	2808.7	3008.6	2812.7

试验例 7

样品 4 的制备及稳定性考察

15 称取 1 g β-榄香烯、3g 大豆油，混匀，得到油相。量取 20%人血清白蛋白 15ml（3g），加入 85mL 超纯水稀释均匀，得质量体积百分比为 3%（g/ml）的人血清白蛋白水溶液，即水相。将水相溶液倒入油相中，用混合机 5000rpm 剪切 1min，10000rpm 剪切 5min，形成初乳。将所得初乳转移到高压均质机中进行高压均质，均质压力 250-300 bar，均质 2min，1350-1400bar 均质 9min。均质完成后，用量筒测量均质液总体积，约为 50ml，加入 5g 海藻糖，
20 摇匀溶解，用 0.45μm 微孔滤膜过滤，即得榄香烯白蛋白纳米粒溶液。用粒径仪测得粒径为 141.0nm，PDI 为 0.162。将加入海藻糖后的均质液进行冻干，完成冻干后，用灭菌超纯水复溶冻干粉，用粒径仪检测粒径为 144.07nm，PDI 为 0.123。冻干前后榄香烯含量损失率为 1.27%。

样品 5 的制备及稳定性考察

25 称取 4 g β-榄香烯、2g 大豆油，混匀，得到油相。量取 20%人血清白蛋白 30ml（6g），加入 170mL 超纯水稀释均匀，得质量体积百分比为 3%（g/ml）的人血清白蛋白水溶液，即水相。将水相溶液倒入油相中，用混合机 5000rpm 剪切 1min，10000rpm 剪切 10min，形成初乳。将所得初乳转移到高压均质机中进行高压均质，均质压力 250-300 bar，均质 2min，1350-1400bar 均质 24min。均质完成后，用量筒量取 150ml 均质液，加入 15g 海藻糖，
30 匀溶解，用 0.45μm 微孔滤膜过滤，即得榄香烯白蛋白纳米粒溶液。用粒径仪测得粒径为

132.4nm, PDI 为 0.133。将加入海藻糖后的均质液进行冻干, 完成冻干后, 用灭菌超纯水复溶冻干粉, 用粒径仪检测粒径为 123.68nm, PDI 0.144。冻干后榄香烯含量损失率为 1.58%。

样品 6 的制备及稳定性考察

称取 1 g β-榄香烯、2g 蛋黄卵磷脂, 加入 50ml 超纯水, 用混合机 5000rpm 剪切 1min, 5 10000rpm 剪切 5min, 再将粘附于瓶壁上的凝脂刮下至溶液中, 再 15000rpm 剪切 3min, 至未见明显未分散磷脂, 得到初乳。将初乳转移到高压均质机中进行高压均质, 均质压力 250-300 bar, 均质 2min, 1300-1350bar 均质 12min。完成均质后用 0.45μm 滤膜过滤, 量取 50ml 2%的 HSA 溶液 (含 HSA 1g) 加入到过滤后的均质液中, 280bar 均质 1 个循环, 将均质液放出, 用量筒量取 40ml, 加入 4g 海藻糖, 摇匀溶解, 用 0.45μm 微孔滤膜过滤, 即得 10 白蛋白纳米粒溶液。用粒径仪测得粒径为 150.86nm, PDI 0.114。将加入海藻糖后的均质液进行冻干, 完成冻干后, 用灭菌超纯水复溶冻干粉, 用粒径仪检测粒径为 181.56nm, PDI 为 0.251。冻干后榄香烯含量损失率为 16.47%。

样品 7 的制备及稳定性考察

称取 1 g β-榄香烯、2g 蛋黄卵磷脂、0.5g TPGS, 加入 50ml 超纯水, 用混合机 5000rpm 15 剪切 1min, 10000rpm 剪切 5min, 再将粘附于瓶壁上的凝脂刮下至溶液中, 再 15000rpm 剪切 3min, 至未见明显未分散磷脂, 得到初乳。将初乳转移到高压均质机中进行高压均质, 均质压力 250-300 bar, 均质 2min, 1300-1350bar 均质 12min。完成均质后用 0.22μm 滤膜过滤, 量取 50ml 2%的 HSA 溶液 (含 HSA 1g) 加入到过滤后的均质液中, 140bar 均质 1 个循环, 将均质液放出, 用量筒量取 40ml, 加入 4g 海藻糖, 摇匀溶解, 用 0.45μm 微孔滤 20 膜过滤, 即得榄香烯白蛋白纳米粒溶液。用粒径仪测得粒径为 93.11nm, PDI 0.131。将加入海藻糖后的均质液进行冻干, 完成冻干后, 用灭菌超纯水复溶冻干粉, 用粒径仪检测粒径为 811.70nm, PDI 为 0.313。冻干后榄香烯含量损失率为 82.64%。

实施例 1

25 称取 200 mg β-榄香烯和 600 mg 大豆油, 溶于 2 mL 有机溶剂中, 涡旋混匀, 得到油相。所述的有机溶剂是二氯甲烷、或乙酸乙酯或二氯甲烷与乙醇的混合。取人血清白蛋白 650 mg 加入 18 mL 注射用水溶解, 得质量体积百分比为 3.6% (g/ml) 的人血清白蛋白水溶液, 即得到水相。在水浴超声作用下, 将油相逐滴滴加到水相中, 探头超声 8 min (250 W) 制成初乳。将所得初乳转移到高压均质仪中进行高压均质, 均质压力为 1000 bar, 均质次数 16 30 次。均质完成后再通过旋转蒸发除去有机溶剂, 0.22μm 微孔滤膜过滤除菌, 即得榄香烯白蛋白纳米粒的水溶液。

表 3 有机溶剂单因素考查结果

编号	有机溶剂	粒径 (d.nm)	PDI
1	无有机溶剂	142.1	0.094

2	乙酸乙酯	122.0	0.164
3	二氯甲烷	108.8	0.129
4	二氯甲烷/乙醇（4:1）	98.5	0.130

实验结果表明，制备过程中无论是否将β-榄香烯和大豆油溶于有机溶剂中均可制备得到粒径适宜的β-榄香烯白蛋白制剂，多种有机溶剂中，二氯甲烷或二氯甲烷与乙醇的混合溶剂制备得到的纳米粒粒径更小。

5

实施例 2

称取 200 mgβ-榄香烯和 600 mg 大豆油，溶于二氯甲烷与乙醇的混合溶剂（二氯甲烷：乙醇=4:1，2mL）中，涡旋混匀，得到油相体积为 2 mL。取人血清白蛋白 650 mg 采用注射用水溶解，得质量体积百分比为 3.6 %（g/ml）人血清白蛋白水溶液，再加入 100 mg 聚乙
10 二醇-12-羟基硬脂酸酯即得到水相。在水浴超声作用下，将油相逐滴滴加到水相中，探头超声 8 min（250 W）制成初乳。将所得初乳转移到高压均质仪中进行高压均质，均质压力为 1000 bar，均质次数 16 次。均质完成后再通过旋转蒸发除去有机溶剂，0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌，既得榄香烯白蛋白纳米粒的水溶液。测得粒径为 116.4 nm，PDI 为 0.118。

15

实施例 3

称取 200 mgβ-榄香烯和 400 mg 中长链脂肪酸甘油酯，溶于二氯甲烷与乙醇的混合溶剂（二氯甲烷：乙醇=4:1，2mL）中，涡旋混匀，得到油相体积为 2 mL。取人血清白蛋白 900mg 加入 18 mL 注射用水溶解，得质量体积百分比（g/ml）为 5.0 %人血清白蛋白水溶液，即得
20 到水相。在水浴超声作用下，将油相逐滴滴加到水相中，探头超声 8 min（250 w）制成初乳。将所得初乳转移到高压均质仪中进行高压均质，均质压力为 1000 bar，均质次数 16 次。均质完成后通过旋转蒸发除去有机溶剂，0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌，既得榄香烯白蛋白纳米粒的水溶液。测得粒径为 105.3 nm，PDI 为 0.116。

25

实施例 4

称取 800 mgβ-榄香烯和 2400 mg 芝麻油，溶于二氯甲烷与乙醇的混合溶剂（二氯甲烷：乙醇=4:1，10mL）中，涡旋混匀，得到油相。取人血清白蛋白 4000 mg 加入注射用水 100mL 溶解，得质量体积百分比（g/ml）为 4 %人血清白蛋白水溶液，既得到水相。将油相逐滴滴加到水相中，采用组织捣碎机 10000 rpm，剪切 10 min，制成初乳。将所得初乳转移到高压
30 均质仪中进行高压均质，均质压力为 1000 bar，均质次数 20 次。均质完成后再通过旋转蒸发除去有机溶剂，0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌，既得榄香烯白蛋白纳米粒的水溶液。测得粒

径为 121.3 nm, PDI 为 0.133。

实施例 5

称取 800 mg β -榄香烯和 2400 mg 橄榄油, 先后投入二氯甲烷/乙醇混合溶剂(二氯甲烷:
5 乙醇=4:1, 5mL)中, 涡旋混匀, 得到油相。取人血清白蛋白 4000 mg 加入注射用水溶解,
得质量体积百分比为 4% (g/ml) 人血清白蛋白水溶液, 得到水相。将油相逐滴滴加到水相
中, 采用组织捣碎机 12000 rpm, 剪切 10 min, 制成初乳。将所得初乳转移到高压均质仪中
进行高压均质, 均质压力为 1400 bar, 均质次数 20 次。将均质完成后的体系通过旋转蒸发
除去有机溶剂。旋蒸后的药液经过 0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌, 即得榄香烯白蛋白纳米粒
10 的水溶液。加入 3%蔗糖进行冻干, 冻干完成后进行压盖, 4°C保存。取冻干后样品加入注
射用水复溶, 测得粒径为 112.6 nm, PDI 为 0.101。

实施例 6

称取 200 mg β -榄香烯和 600 mg 大豆油, 溶于二氯甲烷与乙醇的混合溶剂(二氯甲烷:
15 乙醇=4:1, 10mL)中, 涡旋混匀, 得到油相。取人血清白蛋白 4000 mg 加入注射用水溶解,
得质量体积百分比(g/ml)为 10%人血清白蛋白水溶液, 即得到水相。在水浴超声作用下,
将油相逐滴滴加到水相中, 探头超声 8 min (250 W) 制成初乳。将所得初乳转移到高压
均质仪中进行高压均质, 均质压力为 1000 bar, 均质次数 16 次。均质完成后通过旋转蒸发
除去有机溶剂, 0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌, 既得榄香烯白蛋白纳米粒的水溶液。测得粒径
20 为 140.3 nm, PDI 为 0.164。

实施例 7

称取 200 mg β -榄香烯和 1000 mg 大豆油, 溶于二氯甲烷与乙醇的混合溶剂(二氯甲烷:
乙醇=4:1, 5mL)中, 涡旋混匀, 得到油相。取人血清白蛋白 650 mg 加入注射用水溶解,
25 得质量体积百分比(g/ml)为 3.6%人血清白蛋白水溶液, 即得到水相。在水浴超声作用下,
将油相逐滴滴加到水相中, 探头超声 8 min (250 W) 制成初乳。将所得初乳转移到高压
均质仪中进行高压均质, 均质压力为 1000 bar, 均质次数 16 次。均质完成后通过旋转蒸发
除去有机溶剂, 0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌, 既得榄香烯白蛋白纳米粒的水溶液。测得粒径
为 125.3 nm, PDI 为 0.148。

30

实施例 8

称取 800 mg β -榄香烯和 2400 mg 大豆油, 溶于二氯甲烷与乙醇的混合溶剂(二氯甲烷:
乙醇=4:1, 10mL)中, 涡旋混匀, 得到油相。取人血清白蛋白 4000 mg 加入注射用水溶解,
得质量体积百分比(g/ml)为 4%人血清白蛋白水溶液, 既得到水相。将油相逐滴滴加到水
35 相中, 采用组织捣碎机 10000 rpm, 剪切 10 min, 制成初乳。将所得初乳转移到高压均质仪

中进行高压均质，均质压力为 1000 bar，均质次数 20 次。均质完成后通过旋转蒸发除去有机溶剂，0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌，即得榄香烯白蛋白纳米粒的水溶液。测得粒径为 119.3 nm，PDI 为 0.143。取制备的纳米粒溶液配置为药物浓度 10mg/ml，加入适量冻干保护剂，冻干保护剂用量为 3%（g/ml），冻干。冻干后加入注射用水复溶，测定粒径。结果如下表所示。

表 4 不同冻干保护剂冻干后榄香烯白蛋白纳米粒的粒径

冻干保护剂	无	葡萄糖	蔗糖	海藻糖	甘露醇	乳糖	麦芽糖
粒径（nm）	187.4	160.7	153.5	167.4	172.1	166.3	164.5
PDI	0.233	0.165	0.125	0.167	0.133	0.178	0.196

实验结果表明，榄香烯白蛋白纳米粒冻干过程中，加入各种冻干保护剂均可以得到结构疏松，质地均匀的冻干粉末，加水均可复溶，复溶后粒径均不超过 200 nm。其中，蔗糖作为冻干保护剂冻干后样品复溶所得的纳米粒粒径最小。

10

实施例 9

称取 500 mg β-榄香烯和 1200 mg 中长链脂肪酸甘油酯，溶于二氯甲烷与乙醇（二氯甲烷：乙醇=4:1，5mL）的混合溶剂中，涡旋混匀，得到油相。取人血清白蛋白 1500 mg 加入 50 mL 注射用水溶解，得质量体积百分比（g/ml）为 3% 人血清白蛋白水溶液，得到水相。将油相逐滴滴加到水相中，探头超声 8 min（250 W）制成初乳。将所得初乳转移到高压均质仪中进行高压均质，均质压力为 1400 bar，均质次数 10 次。均质完成再通过旋转蒸发除去有机溶剂，0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌，稀释配置为药物浓度 15mg/ml，加入 3% 蔗糖，冻干，压盖，4℃保存。取冻干后样品加入注射用水复溶，测定粒径。测得粒径为 103.5 nm，PDI 为 0.123。

20

实施例 10

称取 800 mg β-榄香烯和 2400 mg 芝麻油，先后投入二氯甲烷/异丙醇（二氯甲烷：异丙醇=4:1，5mL）混合溶剂中，涡旋混匀，得到油相。取人血清白蛋白 4000 mg 加入注射用水溶解，得质量体积百分比为 4%（g/ml）人血清白蛋白水溶液，得到水相。将油相逐滴滴加到水相中，采用组织捣碎机 10000 rpm，剪切 10 min，制成初乳。将所得初乳转移到高压均质仪中进行高压均质，均质压力为 1000 bar，均质次数 20 次。将均质完成后的体系通过旋转蒸发除去有机溶剂。旋蒸后的药液经过 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌，即得榄香烯白蛋白纳米粒的水溶液。稀释配置为药物浓度 10mg/ml，加入 3%蔗糖进行冻干，冻干完成后进行压盖，4℃保存。取冻干后样品加入注射用水复溶，测得粒径为 115.2 nm，PDI 为 0.102。

30

实施例 11

称取 800 mg β -榄香烯和 2400 mg 橄榄油, 先后投入二氯甲烷/叔丁醇混合溶剂(二氯甲烷: 叔丁醇=4:1, 5mL)中, 涡旋混匀, 得到油相。取人血清白蛋白 4000 mg 加入注射用水溶解, 得质量体积百分比为 4% (g/ml) 人血清白蛋白水溶液, 得到水相。将油相逐滴滴加到水相中, 采用组织捣碎机 10000 rpm, 剪切 10 min, 制成初乳。将所得初乳转移到高压均质仪中进行高压均质, 均质压力为 1000 bar, 均质次数 20 次。将均质完成后的体系通过旋转蒸发除去有机溶剂。旋蒸后的药液经过 0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌, 即得榄香烯白蛋白纳米粒的水溶液。稀释配置为药物浓度 10mg/ml, 加入 3%葡萄糖进行冻干, 冻干完成后进行压盖, 4°C保存。取冻干后样品加入注射用水复溶, 测得粒径为 109.6 nm, PDI 为 0.113。

实施例 12

称取 800 mg β -榄香烯和 2400 mg 芝麻油, 先后投入二氯甲烷/四氢呋喃混合溶剂(二氯甲烷: 四氢呋喃=4:1, 5mL)中, 涡旋混匀, 得到油相体积为 5 mL。取人血清白蛋白 4000 mg 加入注射用水溶解, 得质量体积百分比为 4% (g/ml) 人血清白蛋白水溶液, 得到水相。将油相逐滴滴加到水相中, 采用组织捣碎机 10000 rpm, 剪切 10 min, 制成初乳。将所得初乳转移到高压均质仪中进行高压均质, 均质压力为 1000 bar, 均质次数 20 次。将均质完成后的体系通过旋转蒸发除去有机溶剂。旋蒸后的药液经过 0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌, 即得榄香烯白蛋白纳米粒的水溶液。加入 3%海藻糖进行冻干, 冻干完成后进行压盖, 4°C保存。取冻干后样品加入注射用水复溶, 测得粒径为 112.6 nm, PDI 为 0.101。

实施例 13

称取 500 mg β -榄香烯和 1200 mg 大豆油, 先后投入异丙醇(5 mL)中, 涡旋混匀, 得到油相。取牛血清白蛋白 1500 mg 加入注射用水溶解, 得质量体积百分比为 3% (g/ml) 牛血清白蛋白水溶液, 得到水相。将油相逐滴滴加到水相中, 探头超声 8 min (250 W) 制成初乳。将所得初乳转移到高压均质仪中进行高压均质, 均质压力为 1400 bar, 均质次数 10 次。均质完成后的体系通过旋转蒸发除去有机溶剂。旋蒸后的药液经过 0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌。稀释配置为药物浓度 10mg/ml, 加入 3%蔗糖进行冻干, 冻干完成后进行压盖, 4°C保存。取冻干后样品加入注射用水复溶, 测得粒径为 128.1 nm, PDI 为 0.132。

实施例 14

称取 500 mg β -榄香烯和 1200 mg 大豆油, 先后投入叔丁醇(5 mL)中, 涡旋混匀, 得到油相。取牛血清白蛋白 1500 mg 加入注射用水溶解, 得质量体积百分比为 3% (g/ml) 牛血清白蛋白水溶液, 得到水相。将油相逐滴滴加到水相中, 探头超声 8 min (250 W) 制成初乳。将所得初乳转移到高压均质仪中进行高压均质, 均质压力为 1400 bar, 均质次数 10 次。均质完成后通过旋转蒸发除去有机溶剂。旋蒸后的药液经过 0.22 μ m 微孔滤膜过滤

除菌。稀释配置为药物浓度 5mg/ml，加入 3%蔗糖进行冻干，冻干完成后进行压盖，4℃保存。取冻干后样品加入注射用水复溶，测得粒径为 116.8 nm，PDI 为 0.113。

实施例 15

- 5 称取 500 mgβ-榄香烯和 1200 mg 芝麻油，先后投入二氯甲烷/异丙醇混合溶剂（二氯甲烷：异丙醇=4:1，5mL）中，涡旋混匀，得到油相。取牛血清白蛋白 1500 mg 加入注射用水溶解，得质量体积百分比为 3%（g/ml）牛血清白蛋白水溶液，得到水相。将油相逐滴滴加到水相中，探头超声 8 min（250 W）制成初乳。将所得初乳转移到高压均质仪中进行高压均质，均质压力为 1400 bar，均质次数 10 次。均质完成后通过旋转蒸发除去有机溶剂。
- 10 旋蒸后的药液经过 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌。稀释配置为药物浓度 1mg/ml，加入 3%蔗糖进行冻干，冻干完成后进行压盖，4℃保存。取冻干后样品加入注射用水复溶，测得粒径为 121.8 nm，PDI 为 0.111。

实施例 16

- 15 称取 500 mgβ-榄香烯和 1200 mg 大豆油，先后投入二氯甲烷/叔丁醇混合溶剂（二氯甲烷：叔丁醇=4:1，5mL）中，涡旋混匀，得到油相。取牛血清白蛋白 1500 mg 加入注射用水溶解，得质量体积百分比为 3%（g/ml）牛血清白蛋白水溶液，得到水相。将油相逐滴滴加到水相中，探头超声 8 min（250 W）制成初乳。将所得初乳转移到高压均质仪中进行高压均质，均质压力为 1400 bar，均质次数 10 次。均质完成后通过旋转蒸发除去有机溶剂。
- 20 旋蒸后的药液经过 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌。稀释配置为药物浓度 10mg/ml，加入 3%蔗糖进行冻干，冻干完成后进行压盖，4℃保存。取冻干后样品加入注射用水复溶，测得粒径为 121.1 nm，PDI 为 0.109。

实施例 17

- 25 称取 500 mgβ-榄香烯和 1200 mg 橄榄油，先后投入二氯甲烷/乙醇混合溶剂（二氯甲烷：乙醇=4:1，5mL）中，涡旋混匀，得到油相。取牛血清白蛋白 1500 mg 加入注射用水溶解，得质量体积百分比（g/ml）为 3%牛血清白蛋白水溶液，得到水相。将油相逐滴滴加到水相中，探头超声 8 min（250 W）制成初乳。将所得初乳转移到高压均质仪中进行高压均质，均质压力为 1400 bar，均质次数 10 次。均质完成后的体系通过旋转蒸发除去有机溶剂。旋蒸后的药液经过 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌。稀释配置为药物浓度 12mg/ml，加入 3%蔗糖进行冻干，冻干完成后进行压盖，4℃保存。取冻干后样品加入注射用水复溶，测得粒径为 109.7 nm，PDI 为 0.105。
- 30

实施例 18

- 35 称取 500 mgβ-榄香烯和 1200 mg 大豆油，先后投入二氯甲烷/四氢呋喃混合溶剂（二氯

甲烷：四氢呋喃=4:1，5mL）中，涡旋混匀，得到油相。取牛血清白蛋白 1500 mg 加入注射用水溶解，得质量体积百分比（g/ml）为 3% 牛血清白蛋白水溶液，得到水相。将油相逐滴滴加到水相中，探头超声 8 min（250 W）制成初乳。将所得初乳转移到高压均质仪中进行高压均质，均质压力为 1400 bar，均质次数 10 次。均质完成后的体系通过旋转蒸发除去有机溶剂。旋蒸后的药液经过 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌。稀释配置为药物浓度 10mg/ml，加入 3% 蔗糖进行冻干，冻干完成后进行压盖，4°C 保存。取冻干后样品加入注射用水复溶，测得粒径为 112.7 nm，PDI 为 0.112。

实施例 19

称取 200 mg 榄香烯和 600 mg 大豆油，溶于二氯甲烷与乙醇的混合溶剂（二氯甲烷：乙醇=4:1，2mL）中，涡旋混匀，得到油相。取人血清白蛋白 650 mg 采用 18 mL 0.5% 氯化钠溶液溶解，得质量体积百分比（g/ml）为 3.6% 人血清白蛋白溶液。在水浴超声作用下，将油相逐滴滴加到水相中，探头超声 8 min（250 W）制成初乳。将所得初乳转移到高压均质仪中进行高压均质，均质压力为 1000 bar，均质次数 16 次。均质完成后的体系通过旋转蒸发除去有机溶剂，0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌，既得榄香烯白蛋白纳米粒的水溶液。测得粒径为 126.1 nm，PDI 为 0.122。

实施例 20

称取 β -榄香烯 500mg 和大豆油 1500mg，溶于 5 mL 二氯甲烷/乙醇（二氯甲烷：乙醇=8:1）混合溶剂中，得到油相，称取人血清白蛋白 2500mg 溶解于 45 mL 水中，即得到水相。在超声作用下，使两相混合均匀，将所得溶液转移到高压均质仪进行高压均质，400-500 bar 4-6 次，1300-1400 bar 8-10 次，均质完成后再通过旋转蒸发除去有机溶剂，微孔滤膜过滤除菌，静置片刻以除去制剂中的气泡，即得榄香烯白蛋白纳米粒溶液。测定纳米粒粒径为 99.4 nm，PDI 为 0.096。将所得的榄香烯白蛋白纳米粒溶液定容至浓度为 10mg/ml，加入 3% 蔗糖，冻干，加入超纯水复溶后测得粒径为 101.6 nm，PDI 为 0.113。

实施例 21

按照表 5 所列组分量称取相应的 β -榄香烯、大豆油、MCT（中链甘油三酯）和表面活性剂（HS-15，即 15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯；吐温 80；泊洛沙姆 P188）混匀，得到油相。量取 20% 人血清白蛋白（按质量折算如表 5 所示），加入超纯水稀释到总体积 50ml，混合均匀，得到人血清白蛋白水溶液，即水相。在水相溶液中加入适量的表面活性剂，倒入油相中，用混合机（IKA，T25）5000rpm 剪切 1min，10000rpm 剪切 5min，形成初乳。将所得初乳转移到高压均质机（ATS，AH-1500）中进行高压均质，均质压力 250-300 bar，均质 2min，1450-1550bar 均质 6min。均质完成后，用量筒测量均质液总体积，按 10%（g/ml）加入海藻糖，摇匀溶解，用 0.45 μm 微孔滤膜过滤，即得榄香烯白蛋白纳米粒溶液。检测粒

径、PDI，并测定溶血值，具体结果见表 5。

表 5

序号	β-榄香烯 /g	大豆油 /g	MCT /g	HSA/g	大豆油/API (g/g)	HSA/API (g/g)	表面活性剂	溶血值	粒径 (nm)	PDI
1	0.5	0.6	0.6g	1.5	1.2	3	0.1g HS-15	31.6	182.7	0.156
2	0.5	0.6	0.6g	1.5	1.2	3	0.1g 吐温 80	22.2	178.3	0.135
3	0.5	0.6	0.6g	1.5	1.2	3	0.1g 泊洛沙姆 P188	53.3	232.5	0.143
4	1	0.4	0.1g	1.5	0.4	1.5	/	6.4	128.3	0.167
5	1	0.6	0.15g	1.5	0.6	1.5	/	9.1	127.6	0.191
6	1	0.4	0.1g	5	0.4	5	/	13.8	103.4	0.162
7	1	0.6	0.15g	5	0.6	5	/	7	101.2	0.092

实施例 22

- 5 按照表 6 所列组分量称取 β-榄香烯、大豆油混匀，得到油相。量取人血清白蛋白（质量折算如表 6 所示），加入超纯水稀释到总体积 50ml，混合均匀，得到人血清白蛋白水溶液，即水相。水相倒入油相中，用混合机（IKA，T25）5000rpm 剪切 1min，10000rpm 剪切 5min，形成初乳。将所得初乳转移到高压均质机（ATS，AH-1500）中进行高压均质，均质压力 250-300 bar，均质 2min，1450-1550bar 均质 6min。均质完成后，用量筒测量均
- 10 质液总体积，按 10%质量/体积比（g/ml）加入海藻糖，摇匀溶解，用 0.45μm 微孔滤膜过滤，即得榄香烯白蛋白纳米粒溶液。检测粒径、PDI，并测定溶血值，具体结果见表 6。

表 6

序号	β-榄香烯 /g	大豆油 /g	HSA /g	大豆油/API (g/g)	HSA/API (g/g)	溶血值	粒径 (nm)	PDI
1	1	0.5	1.5	0.5	1.5	7.8	130.1	0.161
2	1	0.75	1.5	0.75	1.5	5.2	132	0.16
3	1	0.5	5	0.5	5	8.3	111	0.084
4	1	0.75	5	0.75	5	3.8	111.8	0.071
5	1	0.5	10	0.5	10	13.7	94.99	0.107
6	0.5	1.2	1.5	2.4	3	15.1	130.3	0.079
7	0.5	1.2	5	2.4	10	13.1	131.1	0.08
8	0.5	1.2	7.5	2.4	15	11.7	132.9	0.085
9	0.5	1.2	10	2.4	20	13.5	127.3	0.067
10	0.5	1.2	1.5	2.4	3	11	143.2	0.161
11	1	0.35	1.5	0.35	1.5	9	115.43	0.132

实施例 23

称取 3.33 g β-榄香烯、8g 大豆油，混匀，得到油相。量取 20%人血清白蛋白（HSA）50ml（10g），加入适量超纯水稀释均匀，得质量体积百分比（g/ml）为 3%的人血清白蛋白水溶液，即水相。将水相溶液倒入油相中，用混合机（FLUKO，FA30/30F）10000rpm 剪切 10min，形成初乳。将所得初乳转移到微射流均质机（Microfluidizer，M-110-EH）中进行均质，均质压力 20000psi，均质 30min。经 0.45μm 和 0.22μm PVDF 平板过滤器进行过滤，定容，分别加入表 7 中对应的不同的冻干保护剂（g/ml）。将加入冻干保护剂后的均质液进行冻干，完成冻干后，用灭菌超纯水复溶冻干粉，检测粒径、PDI 和溶血值，具体结果见表 7。

表 7

序号	处方	保护剂	溶血值	粒径	PDI
1	3.33 g β-榄香烯 8g 大豆油 HSA 10g	3%蔗糖	13.4	175.97	0.188
2		10%蔗糖	13.4	138.76	0.119
3		3%海藻糖	11.3	170.91	0.192
4		10%海藻糖	14	138.39	0.158

实施例 24

称取 3.33 g β-榄香烯、8g 大豆油，溶于有机溶剂中，混匀，得到油相。所述有机溶剂为 26.67ml 二氯甲烷与 6.67ml 无水乙醇的混合溶剂。量取 20%人血清白蛋白（HSA）50ml（10g），加入适量超纯水稀释均匀，得质量体积百分比为 3%（g/ml）的人血清白蛋白水溶液，即水相。将水相溶液倒入油相中，用混合机（FLUKO，FA30/30F）10000rpm 剪切 10min，形成初乳。将所得初乳转移到微射流均质机（Microfluidizer，M-110-EH）中进行高压均质，均质压力 20000psi，均质 30min。均质完成后含有机溶剂的乳液通过薄膜蒸发仪除去有机溶剂，参数为：温度 30℃，真空度 4000pa，进液速度 100rpm，刮板速度 50rpm。经 0.45μm 和 0.22μm PVDF 平板过滤器进行过滤，定容，加入冻干保护剂 10%（g/ml）海藻糖。将加入冻干保护剂后的均质液进行冻干，完成冻干后，用灭菌超纯水复溶冻干粉。检测粒径为 76.28、PDI 为 0.254 和溶血值为 16.3。

实施例 25

如表 8 所列组分量称取 β-榄香烯、大豆油，溶于有机溶剂中，所述有机溶剂为 1ml 乙醇与 4ml 二氯甲烷的混合溶剂混匀，得到油相。量取适量的 20%的人血清白蛋白（HSA）（折合重量如表 8 所示），加入适量的超纯水稀释至总体积 50ml，即水相。将水相溶液倒入油相中，用混合机（IKA，T25）5000rpm 剪切 1min，10000rpm 剪切 5min，形成初乳。将所得初乳转移到高压均质机（ATS，AH-1500）中进行高压均质，均质压力 250-300 bar，

均质 2min，1450-1550bar 均质 6min。用旋转蒸发仪 35℃，150rpm，真空度 30mbar 除去有机溶剂。完成后，用量筒测量均质液总体积，按 10%质量/体积比（g/ml）加入海藻糖，摇匀溶解，用 0.45μm 微孔滤膜过滤，即得榄香烯白蛋白纳米粒溶液。

表 8

序号	β-榄香烯 /g	大豆油 /g	HSA /g	大豆油/API (g/g)	HSA/API (g/g)
1	0.5	0.1	1.5	0.2	3
2	0.5	1.2	1.5	2.4	3
3	0.5	2.5	1.5	5	3
4	0.5	5	1.5	10	3
5	0.5	1.2	2.5	2.4	5
6	0.5	1.2	5	2.4	10
7	0.5	1.2	10	2.4	20

5

将制备好的样品放入 30℃烘箱，于 0h、24h、48h 取样，进行粒径、PDI 和 β-榄香烯含量的测定，测量结果如表 9 所示。

表 9

序号	0h		24h			48h		
	粒径	PDI	粒径	PDI	含量变化(%)	粒径	PDI	含量变化(%)
1	326.9	0.07	348.5	0.177	-10.14	317.8	0.094	-18.84
2	79.11	0.14	80.22	0.229	-3.19	77.04	0.164	-5.32
3	99.59	0.174	101.6	0.203	-2.56	101.7	0.183	-3.85
4	121.8	0.194	125.4	0.211	0	119	0.216	-1.16
5	88.17	0.187	97.63	0.237	-2.35	99.19	0.219	-4.71
6	82.47	0.259	99.54	0.362	-3.70	102.6	0.271	-6.17
7	77.82	0.283	102.9	0.261	-2.0	104	0.22	-8.69

10

实施例 26

按照表 10 所列组分称取 β-榄香烯、大豆油，得到油相。量取 20%人血清白蛋白（HSA）适量（折合质量如表 10 所示），加入适量超纯水稀释至总体积 50ml，即水相。将水相溶液倒入油相中，用混合机（IKA，T25）5000rpm 剪切 1min，10000rpm 剪切 5min，形成初

乳。将所得初乳转移到高压均质机(ATS, AH-1500)中进行高压均质,均质压力 250-300 bar,均质 2min, 1350-1450bar 均质 6min。完成后,用量筒测量均质液总体积,按质量/体积比(g/ml)加入表 10 所示的海藻糖,摇匀溶解,用 0.45μm 微孔滤膜过滤,即得榄香烯白蛋白纳米粒溶液。

5

表 10

序号	β-榄香烯 /g	大豆油 /g	HSA /g	大豆油/API (g/g)	HSA/API (g/g)	保护剂 (g/ml)
1	1	1	1.5	1	1.5	10%海藻糖
2	1	1.5	1.5	1.5	1.5	10%海藻糖
3	1	2	1.5	2	1.5	10%海藻糖
4	1	2.5	1.5	2.5	1.5	10%海藻糖
5	1	3	1.5	3	1.5	10%海藻糖
6	1	0.5	0.5	0.5	0.5	10%海藻糖
7	1	0.5	1	0.5	1	10%海藻糖
8	1	0.5	1.5	0.5	1.5	10%海藻糖
9	1	0.5	2	0.5	2	10%海藻糖
10	1	0.5	2.5	0.5	2.5	10%海藻糖
11	1	0.5	1.5	0.5	1.5	20%海藻糖
12	1	0.5	1.5	0.5	1.5	15%海藻糖
13	1	0.5	1.5	0.5	1.5	5%海藻糖

将制备好的样品放入 30℃恒温箱,于 0h、24h、48h 取样,进行粒径、PDI 和含量的测定,测量结果如表 11 所示。

表 11

序号	0h		24h			48h		
	粒径	PDI	粒径	PDI	含量变化(%)	粒径	PDI	含量变化(%)
1	140.3	0.127	143.7	0.147	-3.60	135.5	0.165	-5.76
2	146.7	0.204	154.2	0.226	-3.64	149.5	0.208	-4.24
3	141.7	0.213	144.6	0.251	-1.83	141.4	0.265	-2.44
4	131.8	0.192	135.9	0.229	-3.05	132.3	0.222	-1.83

5	105.8	0.31	117.4	0.36	-1.24	106.8	0.285	-1.24
6	152.3	0.188	154.5	0.122	-3.59	151.3	0.13	-3.59
7	143.2	0.108	144.5	0.139	-3.85	142.2	0.129	-5.13
8	123.2	0.059	125.6	0.121	-4.19	121.6	0.089	-5.39
9	117.3	0.15	117.3	0.132	-4.79	116.8	0.126	-7.19
10	154.1	0.145	159.2	0.185	-4.17	163.5	0.167	-6.55
11	133.7	0.095	134.1	0.122	-4.61	131.5	0.118	-5.93
12	139.9	0.097	134	0.115	-5.63	128.4	0.194	-6.88
13	130.6	0.132	122.2	0.115	-4.14	128.7	0.159	-5.33

实施例 27

称取 2gβ-榄香烯、1.5g 大豆油，混匀，得到油相。量取 20%人血清白蛋白 45ml（9g），即水相。将水相溶液倒入油相中，用混合机（IKA，T25）5000rpm 剪切 1min，10000rpm 5 剪切 5min，形成初乳。将所得初乳转移到高压均质机（ATS，AH-1500）中进行高压均质，均质压力 250-300 bar，均质 2min，1450-1550bar 均质 6min，收集均质液。用海藻糖水溶液（25ml 水+10g 海藻糖）冲洗均质机管路，将残留在均质机内的均质液置换出来，再用 30ml 水超纯水冲洗均质机管路，将残留的海藻糖水溶液置换出来，与均质液合并，混匀，用 0.22μm 无菌滤膜过滤。用粒径仪检测得到粒径 106.4nm，PDI 为 0.08。

10

实施例 28

表 13

序号	处方（g）			大豆/API (g/g)	HSA/API (g/g)	保护剂(g/ml)
	API	大豆油	HSA			
1	2	2	10	1	5	10%海藻糖
2	2	3	10	1.5	5	10%海藻糖
3	2	4	10	2	5	10%海藻糖
4	2	5	10	2.5	5	10%海藻糖
5	3	4.5	9	1.5	3	10%海藻糖

称取表 13 所示的 β-榄香烯、大豆油，混匀，得到油相。量取 20%人血清白蛋白（50ml，10g），即水相。将水相溶液倒入油相中，用混合机（IKA，T25）5000rpm 剪切 1min，10000rpm 15 剪切 5min，形成初乳，将所得液体转移到高压均质机（ATS，AH-1500）中进行高压均质，均质压力 250-300 bar，均质 2min，1500-1550bar 均质 6min，称取海藻糖 10g，加入纯水溶

解至 50ml（其中 5 号样品是加入海藻糖 15g，加入纯水溶解至 105ml），将此海藻糖水溶液加入均质机中冲洗均质机管路，将残留在均质机内的均质液置换出来，与均质液合并，混匀，用 0.45μm 无菌滤膜过滤。测试各样品的溶血值。并将样品分装至 EP 管中，存放于 30℃恒温箱，于第 0h、24h、48h 取样进行粒径、PDI 和 β-榄香烯含量的测定，结果见表 14。

表 14

序号	0h		24h			48h			溶血值
	粒径	PDI	粒径	PDI	含量变化%	粒径	PDI	含量变化%	
1	102.9	0.124	99.7	0.090	-4.22%	99.8	0.085	-5.42%	6.0
2	113.7	0.112	108.2	0.095	-1.81%	107.9	0.082	-4.82%	9.3
3	120.9	0.034	128.9	0.052	-2.33%	128.3	0.106	-4.07%	17.4
4	126.4	0.070	126.4	0.168	-2.33%	132.4	0.138	-2.91%	16.5
5	111.8	0.089	111.0	0.108	-5.52%	109.1	0.066	-6.08%	10.2

实施例 29

称取 2g β-榄香烯、1.5g 大豆油，混匀，得到油相。量取 20%人血清白蛋白 50 ml（10g），即水相。将水相溶液倒入油相中，用混合机（IKA，T25）5000rpm 剪切 1min，10000rpm 剪切 5min，形成初乳，并用 5ml 注射用水清洗剪切机头，与初乳合并。将所得液体转移到高压均质机（ATS，AH-1500）中进行高压均质，均质压力 250-300 bar，均质 2min，1500-1550bar 均质 6min，收集均质液。用 22.5ml 海藻糖水溶液（含海藻糖 5g）冲洗均质机管路，将残留在均质机内的均质液置换出来，再用 22.5ml 超纯水冲洗均质机管路，将残留的海藻糖水溶液置换出来，与均质液合并，混匀，用 0.22μm 无菌滤膜过滤。将样品分装至 EP 管中，存放于 2-8℃冰箱，于第 0 天和 2 个月分别取样检测粒径、PDI，结果见表 12。

表 12

时间	粒径	PDI
第 0 天	87.93	0.107
2 个月	89.39	0.119

实施例 30 药效研究

样品的制备:

称取 β -榄香烯 4.5g, 大豆油 10.8g, 将二者混合均匀, 得到油相。量取乙醇 4ml, 二氯甲烷 16ml, 混合均匀得有机相 A。将油相加有机相定溶至 36ml, 得有机相 B。

- 5 称取人血清白蛋白 13.5g 加至 405ml 纯化水中, 搅拌溶解, 将有机相 B 加入到水相中, 使用高速剪切机 A 档搅拌 2min, 然后 B 档搅拌 1min, 得到初乳 A, 初乳 A 分 3 份, 用细胞破碎仪 250w 8min 得初乳 B。将初乳 B 加入高压均质机中, 先 200bar 3 个循环, 再 1300bar 5 个循环, 得白蛋白纳米粒。将上述纳米粒于 37°C 下减压浓缩 1h, 加入 3%蔗糖 12.30g, 0.22 μ m 过滤, 进行冻干。粒径 81.03nm、PDI 为 0.174。

10

实验方法:

人源脑肿瘤异种移植小鼠模型的建立: 用 2.5%异氟烷麻醉 50 只裸鼠, 在裸鼠头骨上钻一个小洞 (<0.5 毫米), 将表达发光报告基因的细胞 (5×10^4 个 U87MGR1 人脑胶质瘤细胞) 注射入左前额 (2.5mm 横向和 0.5mm 前囱前, 深度 2.5mm)。

- 15 活体生物发光成像测定方法: 裸鼠皮下单次注射 D-荧光素溶液 (120mg/kg)。注射荧光素 10 分钟后, 在 1-5 分钟的曝光时间内, 使用暗多色照明拍摄动物的光图像 (对于 Gluc 的生物发光成像, 单次静脉注射腔肠素 (20mg/kg, 总体积为 150 微升))。肿瘤内的荧光素酶活性是在没有照明的情况下, 用 CCD 摄像机记录超过 5 分钟的光子计数来获得的。使用 Perkin Elmer 公司的 Living image 软件 4.3.1 定量分析图像强度。

- 20 裸鼠接种 1 周后, 进行活体生物发光成像评估肿瘤体积, 选取 32 只肿瘤体积相近的裸鼠随机分组, 8 只小鼠 (雌雄各半) /组, 尾静脉注射给药 3 周, 3 次/周:

1) 模型组 (control) (PBS 配制 0.1%DMSO), n=8;

2) 50mg/kg 替莫唑胺 (TMZ), n=8;

3) 50mg/kg 艾利能 (ELE mic), n=8;

- 25 4) 50mg/kg (Alb), n=8;

每周检测肿瘤体积一次。

在实验过程中, 动物将每周称重以监测其健康状况。

- 给药两周停药, 随后观察三周。使用 Graphpad 软件记录各组小鼠的存活情况以及肿瘤体积, 生成 Kaplan-Meier 图。小鼠原位瘤模型的肿瘤生长曲线见图 8 (使用 Alb 制剂处理荷瘤裸鼠, 3 次/周 $\times$ 2 周 (n=8, 雌雄各半); 与替莫唑胺(TMZ)相比较, $p < 0.01$), 小鼠原位瘤模型的生存曲线见图 9 (使用 Alb 处理荷瘤裸鼠, 3 次/周 $\times$ 2 周 (n=8, 雌雄各半); 与替莫唑胺 (TMZ) 相比较, $p < 0.01$)。
- 30

实施例 31 安全性研究

- 35 样品的制备:

- 榄香烯注射液(商品名:艾利能):石药集团远大(大连)制药有限公司(批号:17050302)
- β-榄香烯胶束制剂:
- 称取 RH40 17.08g, 60℃加热溶解, 加入 2ml β-榄香烯, 60℃下加热搅拌 5min, 称取丙二醇 14.40g, 纯化水 38.72g, 混匀后 60℃加热 10min。将丙二醇水溶液加入至含 β-榄香烯的 RH40 溶液中, 60℃水浴搅拌 30min, 即得 β-榄香烯胶束。将上述胶束于 0.22μm 过滤, 分装成 5ml/支。
- β-榄香烯白蛋白制剂:
- 称取 β-榄香烯 2.5001g, 大豆油 6.001g, 将二者混合均匀, 备用。量取乙醇 2ml, 二氯甲烷 8ml, 混合均匀备用。将油相用有机相定溶至 12ml 备用。
- 称取人血清白蛋白 4.5015g 加至 135ml 纯化水中, 搅拌溶解, 将有机相加入到水相中, 使用高速剪切机 A 档搅拌 2min, 然后 B 档搅拌 0.5min, 得到初乳 A, 初乳 A 分 3 份, 用细胞破碎仪 250w 8min 得初乳 B。将初乳 B 加入高压均质机中, 先 200bar 3 个循环, 再 1300-1400bar 5 个循环, 得白蛋白纳米粒。将上述纳米粒于 37℃下减压浓缩 1h, 加入蔗糖 1.20g, 0.22μm 过滤, 进行冻干。
- 溶液配置:**
- 使用生理盐水, 将三种制剂分别配置成 6mg/mL 的溶液。
- 艾利能: 取 20mg/mL 的市售艾利能 7.5mL, 用 17.5mL 生理盐水稀释成 25ml 6mg/mL 的样品溶液。
- β-榄香烯胶束制剂: 取 25.41mg/mL 的 β-榄香烯胶束制剂 5.91mL, 用 19.09mL 的生理盐水, 稀释成 25ml 6mg/mL 的样品溶液。
- β-榄香烯白蛋白制剂: 取 12 支 β-榄香烯白蛋白制剂, 每支加入 2.01mL 生理盐水, 混合既得 24ml 6mg/mL 的样品溶液。
- 试验方法:**
- 取雄性 KM 小鼠, 20-25g/只, 按体重随机分为 13 组, 每组 7 只。根据体重按照既定给药剂量分组, 每个样品剂量设定: 100mg/kg、130mg/kg、170mg/kg、220mg/kg, 另设一组空白组。对小鼠进行尾静脉注射, 给药完成后观察给药部位、给药后反应和死亡情况。研究结果见表 15。

表 15 不同样品的安全性研究

剂量 样品	100mg/kg	130mg/kg	170mg/kg	220mg/kg
艾利能	反应强烈;呼吸窘迫;伏地不动	反应强烈,呼吸窘迫;昏睡,伏地不动。5min 左右开始恢复	死亡 3 只;反应强烈;呼吸窘迫;昏睡;伏地不动,偶见运动失调	死亡 6 只;呼吸窘迫,运动量极低。

β -榄香烯胶束制剂	反应较艾利能组较缓；少数呼吸窘迫	反应较艾利能组较缓；呼吸窘迫，活动减少，2min左右开始恢复	反应强烈；呼吸窘迫；昏睡，伏地不动	死亡 3 只；呼吸窘迫，伏地不动
β -榄香烯白蛋白制剂	无明显不适	无明显不适，偶见轻微呼吸窘迫	无明显不适，偶见轻微呼吸窘迫	无明显不适，偶见呼吸窘迫