



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 120136830 A

(43) 申请公布日 2025. 06. 13

(21) 申请号 202510296345.4

A61K 47/60 (2017.01)

(22) 申请日 2025.03.13

A61K 47/64 (2017.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(71) 申请人 福建医科大学附属第一医院

地址 350004 福建省福州市台江区茶中路
20号

(72) 发明人 李冠廷 郑顺哲 康德智 朱阳
李浩楠 米蓁 魏鹏辉 林元相

(74) 专利代理机构 沈阳飞扬灵睿知识产权代理
事务所(普通合伙) 21255

专利代理师 靳玲 杨乃力

(51) Int. Cl.

C07D 307/88 (2006.01)

A61K 47/55 (2017.01)

A61K 31/365 (2006.01)

A61K 31/196 (2006.01)

权利要求书2页 说明书14页 附图12页

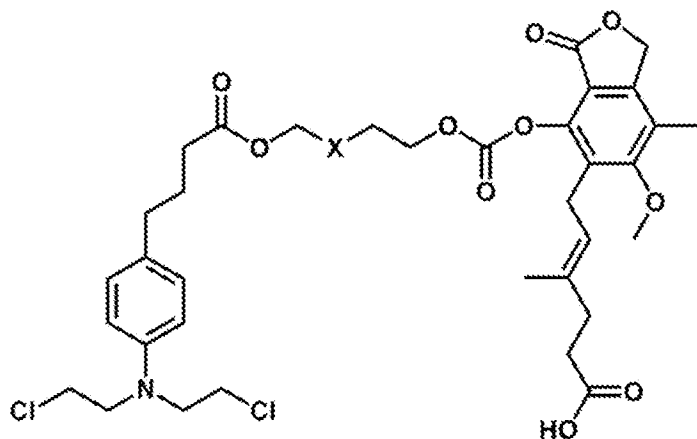
(54) 发明名称

靶向胶质母细胞瘤的纳米制剂及其制备和应用

(57) 摘要

本发明属于药物制剂新辅料和新剂型领域,涉及一种靶向胶质母细胞瘤的纳米制剂及其制备和应用,具体涉及一种靶向胶质母细胞瘤,尤其是替莫唑胺耐药型胶质母细胞瘤的苯丁酸氮芥-霉酚酸前药的纳米制剂及其制备和应用。本发明首先构建一种苯丁酸氮芥-霉酚酸前药或其药学上可接受的盐,然后在此基础上,构建可实现苯丁酸氮芥、霉酚酸和MHY1485三种药物协同递送的前药共组装纳米制剂。同时对前药共组装纳米制剂进行靶向修饰,赋予了其跨越血脑屏障的能力。本发明通过前药共组装技术构建了靶向肽修饰的纳米药物递送系统,实现了跨越血脑屏障并精准递送药物至肿瘤部位,显著提升了药物组合的协同抗肿瘤效果。

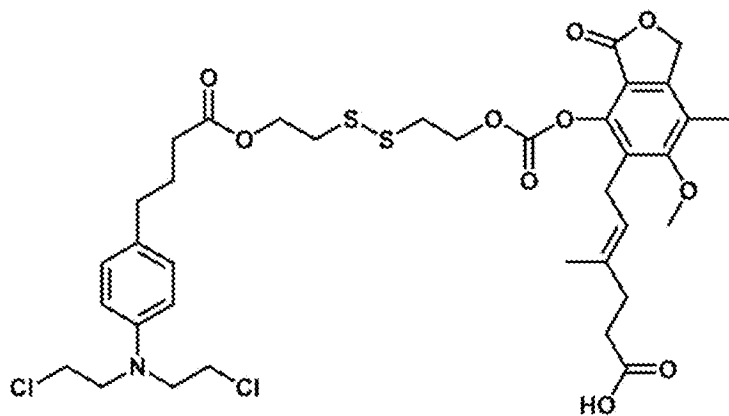
1. 式I所示的苯丁酸氮芥-霉酚酸前药或其药学上可接受的盐:



式 I

其中,X为氧化还原环境敏感键。

2. 权利要求1所述的苯丁酸氮芥-霉酚酸前药或其药学上可接受的盐:



3. 药物组合物,由权利要求1或2所述的苯丁酸氮芥-霉酚酸前药或其药学上可接受的盐和MHY1485组成,所述的苯丁酸氮芥-霉酚酸前药或其药学上可接受的盐与MHY1485的摩尔比为5:1-1:2,优选为5:1-3:1。

4. 权利要求1或2所述的苯丁酸氮芥-霉酚酸前药或其药学上可接受的盐的纳米制剂,包含苯丁酸氮芥-霉酚酸前药、PEG修饰剂/主动靶向修饰剂。

5. 苯丁酸氮芥-霉酚酸前药或其药学上可接受的盐和MHY1485的共组装纳米制剂,包含权利要求1或2的苯丁酸氮芥-霉酚酸前药或其药学上可接受的盐、MHY1485和PEG修饰剂/主动靶向修饰剂。

6. 权利要求5所述的苯丁酸氮芥-霉酚酸前药或其药学上可接受的盐和MHY1485的共组装纳米制剂,其特征在于,苯丁酸氮芥-霉酚酸前药或其药学上可接受的盐与MHY1485的摩尔比为5:1-1:2,优选为5:1-3:1。

7. 权利要求4-6任何一项所述的纳米制剂,其特征在于,所述的PEG修饰剂为DSPE-PEG、TPGS、PEG-PLGA或PEG-P的两亲性聚合物,所述的主动靶向修饰剂为脑靶向肽、抗体缀合物、配体缀合物、细胞穿透肽缀合物、受体靶向缀合物、糖残基、激素能够靶向到特定组织的物质,优选为DSPE-PEG-SHp、DSPE-PEG-Angiopep、DSPE-PEG-T7、DSPE-PEG-RVG29、DSPE-PEG-cRGD、DSPE-PEG-Lactoferrin、DSPE-PEG-NGR、DSPE-PEG-TAT、DSPE-PEG-iRGD、DSPE-PEG-

Mannose、DSPE-PEG-OTC、DSPE-PEG-GE11、DSPE-PEG-CREKA、DSPE-PEG-TH、DSPE-PEG-R8、DSPE-PEG-APOE。

8. 权利要求4-6任何一项所述的纳米制剂,其特征在于,所述的苯丁酸氮芥-霉酚酸前药与PEG修饰剂/主动靶向修饰剂的质量比为1:0.1-1;所述的苯丁酸氮芥-霉酚酸前药或其药学上可接受的盐和MHY1485的总质量与PEG修饰剂/主动靶向修饰剂的质量比为1:0.1-1。

9. 权利要求1或2所述的苯丁酸氮芥-霉酚酸前药或其药学上可接受的盐或权利要求3所述的药物组合物或权利要求4-8任何一项所述的纳米制剂在制备治疗胶质母细胞瘤中的应用。

10. 权利要求1或2所述的苯丁酸氮芥-霉酚酸前药或其药学上可接受的盐或权利要求3所述的药物组合物或权利要求4-8任何一项所述的纳米制剂在制备治疗替莫唑胺耐药型胶质母细胞瘤中的应用。

靶向胶质母细胞瘤的纳米制剂及其制备和应用

技术领域：

[0001] 本发明属于药物制剂新辅料和新剂型领域,涉及一种靶向胶质母细胞瘤的纳米制剂及其制备和应用,具体涉及一种靶向胶质母细胞瘤,尤其是替莫唑胺耐药型胶质母细胞瘤的苯丁酸氮芥-霉酚酸前药的纳米制剂及其制备和应用。

背景技术：

[0002] 肿瘤作为严重威胁人类生命健康的重大疾病,其中胶质母细胞瘤 (Glioblastoma) 因其治疗难度大、致残率高和致死率高等特点,被公认为最难治愈的恶性肿瘤之一。目前,胶质母细胞瘤的标准治疗方案主要采用手术切除联合放疗和化疗的综合治疗模式。然而,该肿瘤具有侵袭性生长的生物学特性,与正常脑组织缺乏明确界限,导致单纯手术难以实现根治性切除。同时,大剂量放化疗在杀伤肿瘤细胞的同时,往往会对患者神经功能造成不可逆损伤,严重影响患者的生活质量。

[0003] 在药物治疗方面,替莫唑胺 (Temozolomide) 作为目前唯一的一线化疗药物,其临床应用面临着严峻的耐药性问题。研究表明,胶质母细胞瘤可通过O6-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶 (MGMT) 和碱基切除修复机制有效清除甲基化损伤区域,从而产生对替莫唑胺的耐药性。因此,开发针对替莫唑胺耐药型胶质母细胞瘤的新型治疗策略,对于提高患者生存率和改善预后具有重要的临床意义。

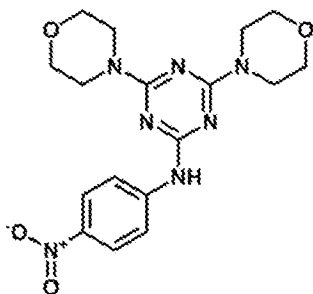
[0004] 在现有化疗药物中,苯丁酸氮芥作为另一类重要的烷化剂,其作用机制与替莫唑胺存在显著差异。该药物通过 SN_2 亲核反应在DNA链间形成不可逆交联,其产生的烷基化损伤不受MGMT识别清除,而是依赖碱基切除修复机制进行修复。

[0005] 目前,苯丁酸氮芥在临床上主要应用于慢性淋巴细胞白血病、霍奇金淋巴瘤及卵巢癌维持治疗。

[0006] 值得注意的是,苯丁酸氮芥诱导的DNA损伤修复过程高度依赖碱基切除修复机制,而该修复过程需要以鸟嘌呤核苷作为关键原料。鸟嘌呤的生物合成与代谢分别受到次黄嘌呤单核苷酸脱氢酶2 (IMPDH2) 和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物1 (mTORC1) 的精密调控,这为开发新型联合治疗策略提供了新的思路。

[0007] MHY1485是一种小分子的mTOR激动剂,可通过稳定Rag GTPase的GTP结合状态激活该通路,这一过程需要鸟苷酸代谢提供GTP分子支持。MHY1485对mTORC1的调控会影响细胞内嘌呤核苷酸池的动态平衡,特别是通过改变鸟苷酸激酶活性重塑核苷酸代谢网络。

[0008]



[0009] 在胶质母细胞瘤的药物治疗中,血脑屏障构成了药物递送的主要障碍。该屏障由

脑微血管内皮细胞、周细胞、基底膜和尾足星形胶质细胞共同构成,具有高度选择性通透特性。此外,化疗药物在脑组织内的非特异性分布可能导致严重的神经毒性,这也是胶质母细胞瘤治疗中需要重点考虑的问题。因此,开发能够有效穿透血脑屏障并实现病变部位特异性药物释放的递送系统,对于提高胶质母细胞瘤的治疗效果具有重要的临床价值。

[0010] 现有技术没有将苯丁酸氮芥、霉酚酸与MHY1485组合使用的相关报道,更没有将苯丁酸氮芥与霉酚酸制成前药后再与MHY1485组合使用的相关报道。

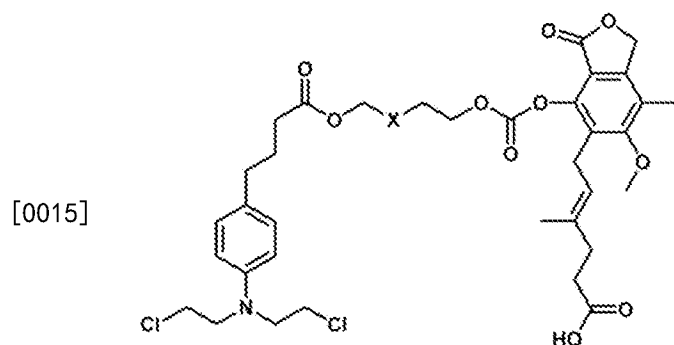
发明内容:

[0011] 针对现有技术在治疗胶质母细胞瘤,尤其是替莫唑胺耐药型胶质母细胞瘤方面存在的局限性,本发明创新性地提出了一种多药协同治疗策略,并构建了具有高效血脑屏障穿透能力的智能药物递送系统。该系统的核心在于:首先利用苯丁酸氮芥产生不受MGMT调控的特异性DNA损伤;其次,通过“开源节流”双重调控机制,即采用mTORC1激动剂MHY1485激活核糖体生物合成途径以加速鸟苷酸消耗,同时利用IMPDH2抑制剂霉酚酸选择性抑制鸟嘌呤核苷的从头合成通路,从而实现细胞内鸟苷水平的有效耗竭,最终阻断碱基切除修复通路。

[0012] 基于如上治疗策略,本发明采用前药共组装技术,首先构建一种苯丁酸氮芥-霉酚酸前药或其药学上可接受的盐,然后在此基础上,构建可实现三种药物协同递送的前药共组装纳米制剂。同时对前药共组装纳米制剂进行靶向修饰,赋予了其跨越血脑屏障的能力。本发明为靶向胶质母细胞瘤,尤其是替莫唑胺耐药型胶质母细胞瘤提供了全新的治疗思路和技术方案。

[0013] 为实现上述目的,本发明采用以下技术方案:

[0014] 本发明提供了如式I所示的苯丁酸氮芥-霉酚酸前药或其药学上可接受的盐:



式 I

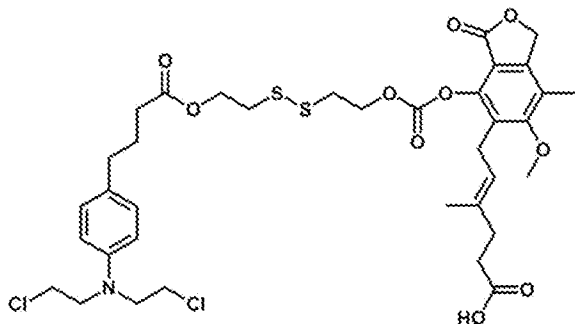
[0016] 其中,X为肿瘤微环境敏感型化学键。

[0017] 上述结构式中,所述的肿瘤微环境敏感型化学键为pH敏感键、氧化还原环境敏感键、酶敏感键、低氧敏感键,所述的pH敏感键包括胺键、亚胺键、缩醛键、 β -氨基酯键中的至少一种,所述的氧化还原环境敏感键包括单硫醚键、二硫键、三硫键、单硒醚键、二硒键、硼酸酯键中的至少一种,所述的酶敏感键包括金属蛋白酶敏感键、酯酶敏感键、磷酸酶敏感键、谷氨酰胺转移酶敏感键、硫氧还蛋白还原酶敏感键中的至少一种,所述低氧敏感键包括偶氮键、硝基芳香键中的至少一种。

[0018] 进一步地,X为氧化还原环境敏感键。

[0019] 具体地,所述的苯丁酸氮芥-霉酚酸前药或其药学上可接受的盐的结构如下:

[0020]



[0021] 本发明进一步提供了上述苯丁酸氮芥-霉酚酸前药的合成方法,具体包括如下步骤:

[0022] 步骤1:苯丁酸氮芥与草酰氯反应生成酰氯中间体,再与二硫代二乙醇缩合,经萃取和制备液相分离,得到苯丁酸氮芥-二硫二乙醇中间体。

[0023] 步骤2:苯丁酸氮芥-二硫二乙醇中间体与对硝基苯基氯甲酸酯反应后,加入霉酚酸和三乙胺,反应过夜,经萃取和制备液相分离,得到苯丁酸氮芥-霉酚酸前药。

[0024] 本发明制备的苯丁酸氮芥-霉酚酸前药纯度在98%以上。

[0025] 本发明的苯丁酸氮芥-霉酚酸前药或其药学上可接受的盐可以自组装成苯丁酸氮芥-霉酚酸前药自组装纳米制剂(CMNP)。

[0026] 所述的苯丁酸氮芥-霉酚酸前药自组装纳米制剂包含苯丁酸氮芥-霉酚酸前药、PEG修饰剂/主动靶向修饰剂。

[0027] 所述的苯丁酸氮芥-霉酚酸前药与PEG修饰剂/主动靶向修饰剂的质量比为:1:(0.1-1)。

[0028] 所述的PEG修饰剂为DSPE-PEG、TPGS、PEG-PLGA或PEG-P等两亲性聚合物或靶向基团,主动靶向修饰剂为脑靶向肽、抗体缀合物、配体缀合物、细胞穿透肽缀合物、受体靶向缀合物、糖残基、激素等能够靶向到特定组织的物质,选自DSPE-PEG-SHp、DSPE-PEG-Angiopep、DSPE-PEG-T7、DSPE-PEG-RVG29、DSPE-PEG-cRGD、DSPE-PEG-Lactoferrin、DSPE-PEG-NGR、DSPE-PEG-TAT、DSPE-PEG-iRGD、DSPE-PEG-Mannose、DSPE-PEG-OTC、DSPE-PEG-GE11、DSPE-PEG-CREKA、DSPE-PEG-TH、DSPE-PEG-R8、DSPE-PEG-APOE,优选为磷脂-聚乙二醇-载脂蛋白E(DSPE-PEG-APOE)。

[0029] 进一步地,本发明提供了所述的苯丁酸氮芥-霉酚酸前药纳米制剂的制备方法,包括如下步骤:

[0030] 将适量的PEG修饰剂/主动靶向修饰剂与苯丁酸氮芥-霉酚酸前药共同溶解于有机溶剂中,充分搅拌混合后,将混合溶液缓慢滴加至水相中。在前药分子自组装的作用下,体系自发形成均匀分散的纳米粒子。随后,采用减压旋转蒸发法彻底去除有机溶剂,最终获得纯净的PEG修饰/主动靶向修饰的苯丁酸氮芥-霉酚酸前药自组装纳米制剂。

[0031] 本发明的苯丁酸氮芥-霉酚酸前药或其药学上可接受的盐也可以与其它小分子化合物共同作为主药成分共组装成苯丁酸氮芥-霉酚酸前药与小分子化合物共组装纳米制剂(tNP)。

[0032] 所述的小分子化合物为MHY1485。

[0033] 所述的苯丁酸氮芥-霉酚酸前药或其药学上可接受的盐与MHY1485的摩尔比为5:

1-1:2,优选为3:1-5:1,更优选为3:1-4:1。

[0034] 所述的苯丁酸氮芥-霉酚酸前药与小分子化合物共组装纳米制剂包含苯丁酸氮芥-霉酚酸前药、MHY1485、PEG修饰剂/主动靶向修饰剂。

[0035] 所述的苯丁酸氮芥-霉酚酸前药和MHY1485的总质量与PEG修饰剂/主动靶向修饰剂的质量比为:1:(0.1-1)。

[0036] 所述的PEG修饰剂为DSPE-PEG、TPGS、PEG-PLGA或PEG-P等两亲性聚合物或靶向基团,主动靶向修饰剂为脑靶向肽、抗体缀合物、配体缀合物、细胞穿透肽缀合物、受体靶向缀合物、糖残基、激素等能够靶向到特定组织的物质,选自DSPE-PEG-SHp、DSPE-PEG-Angiopep、DSPE-PEG-T7、DSPE-PEG-RVG29、DSPE-PEG-cRGD、DSPE-PEG-Lactoferrin、DSPE-PEG-NGR、DSPE-PEG-TAT、DSPE-PEG-iRGD、DSPE-PEG-Mannose、DSPE-PEG-OTC、DSPE-PEG-GE11、DSPE-PEG-CREKA、DSPE-PEG-TH、DSPE-PEG-R8、DSPE-PEG-APOE,优选为磷脂-聚乙二醇-载脂蛋白E(DSPE-PEG-APOE)。

[0037] 本发明还提供了苯丁酸氮芥-霉酚酸前药与MHY1485共组装纳米制剂的制备方法,包括如下步骤:

[0038] 将适量的PEG修饰剂/主动靶向修饰剂、苯丁酸氮芥-霉酚酸前药与MHY1485共同溶解于有机溶剂中,充分搅拌混合后,将混合溶液缓慢滴加至水相中。在前药分子自组装的作用下,体系自发形成均匀分散的纳米粒子。随后,采用减压旋转蒸发法彻底去除有机溶剂,最终获得纯净的PEG修饰/主动靶向修饰的苯丁酸氮芥-霉酚酸前药与MHY1485共组装纳米制剂。

[0039] 所述的有机溶剂为乙醇、丙酮、四氢呋喃、二甲基亚砜、N,N-二甲基甲酰胺等与水互溶的有机溶剂,优选为丙酮。

[0040] 所述的有机溶剂与水的体积比为(0.1-1):1,优选为0.2-0.5:1。

[0041] 本发明的有益效果:

[0042] (1) 本发明提出“开源节流”策略,通过耗竭肿瘤细胞修复DNA损伤所需的鸟苷原料,与苯丁酸氮芥形成高效协同作用,有效规避了替莫唑胺的耐药机制。这一策略不仅丰富了替莫唑胺耐药型胶质母细胞瘤的联合用药设计思路,还为临床治疗提供了新的解决方案。

[0043] (2) 本发明设计并合成了一种苯丁酸氮芥-霉酚酸前药,成功制备了形态规则、粒径均匀的自组装纳米制剂及其与MHY1485的共组装纳米制剂。所制备的纳米制剂粒径小于200nm,最佳范围为50-150nm,分散系数(PDI) < 0.15,制备方法简便易行,具有良好的可重复性和稳定性。

[0044] (3) 本发明通过前药共组装技术构建了靶向肽修饰的纳米药物递送系统,实现了跨越血脑屏障并精准递送药物至肿瘤部位,显著提升了药物组合的协同抗肿瘤效果,有望突破脑部疾病药物递送效率低和治疗效果差的关键瓶颈。此外,前药设计中引入的肿瘤氧化还原响应性二硫键,使纳米制剂在还原高表达的肿瘤细胞内特异性激活药物,而在正常组织中保持惰性,极大降低了脱靶效应对脑实质的损伤,实现了减毒增效的治疗目标。

附图说明:

[0045] 图1为本发明实施例1的苯丁酸氮芥-霉酚酸前药的质谱图。

- [0046] 图2为本发明实施例1的苯丁酸氮芥-霉酚酸前药的¹HNMR谱图。
- [0047] 图3为本发明实施例3的CMNP和tNP的粒径分布图。
- [0048] 图4为本发明实施例3的CMNP和tNP的透射电镜图。
- [0049] 图5为本发明实施例4的CMNP和tNP的胶体稳定性图。
- [0050] 图6为本发明实施例4的CMNP和tNP的长期放置粒径和PDI变化图。
- [0051] 图7为本发明实施例4的CMNP和tNP的长期放置电位变化图。
- [0052] 图8为本发明实施例5的tNP的体外药物释放图。
- [0053] 图9为本发明实施例5的CMNP的体外药物释放图。
- [0054] 图10为本发明实施例7的各处方的彗星实验图。
- [0055] 图11为本发明实施例7的各处方的彗星实验尾矩定量图。
- [0056] n.s.无显著性差异,P<0.05被认为具有显著性差异(单因素方差分析)。
- [0057] 图12为本发明实施例7的各处方的彗星实验尾部DNA含量定量图。
- [0058] n.s.无显著性差异,P<0.05被认为具有显著性差异(单因素方差分析)。
- [0059] 图13为本发明实施例7的各处方的胞内GTP浓度图。
- [0060] n.s.无显著性差异,P<0.05被认为具有显著性差异(单因素方差分析)。
- [0061] 图14为本发明实施例7的各处方的AP位点定量检测图。
- [0062] n.s.无显著性差异,P<0.05被认为具有显著性差异(单因素方差分析)。
- [0063] 图15为本发明实施例8的各处方的在体肿瘤荧光信号图。
- [0064] 图16为本发明实施例8的各处方的在体肿瘤荧光信号定量图。
- [0065] 图17为本发明实施例8的各处方的离体主要组织和肿瘤荧光信号图。
- [0066] 图18为本发明实施例8的各处方的离体主要组织和肿瘤荧光信号定量图。
- [0067] 图19为本发明实施例8的各处方的离体脑部荧光信号图。
- [0068] n.s.无显著性差异,P<0.05被认为具有显著性差异(单因素方差分析)。
- [0069] 图20为本发明实施例9的小鼠替莫唑胺耐药胶质母细胞瘤生物发光图。
- [0070] 图21为本发明实施例9的小鼠替莫唑胺耐药胶质母细胞瘤生物发光定量图。
- [0071] n.s.无显著性差异,P<0.05被认为具有显著性差异(单因素方差分析)。
- [0072] 图22为本发明实施例9的小鼠体重变化曲线图。
- [0073] 图23为本发明实施例9的小鼠生存率曲线图。
- [0074] 图24为本发明实施例9的小鼠中位生存时间图。
- [0075] 图25为本发明实施例9的小鼠脑组织H&E切片图。

具体实施方式:

- [0076] 下面结合实施例对本发明作进一步的详细说明。
- [0077] 实施例1:苯丁酸氮芥-霉酚酸前药的合成
- [0078] 将苯丁酸氮芥(5mmol)与催化量DMF溶于无水二氯甲烷中,冰浴冷却至0-5℃,在搅拌条件下迅速滴加草酰氯(6mmol),滴加完毕后升至室温反应4小时,旋干溶剂得到中间体酰氯。随后,将二硫代乙二醇(6mmol)和三乙胺(10mmol)溶于无水二氯甲烷中,冰浴冷却至0-5℃,缓慢滴加溶解于无水二氯甲烷的酰氯中间体,滴加完毕后升至室温反应过夜,使用10%柠檬酸溶液萃取有机相,旋干后复溶于乙腈,通过制备液相分离纯化,旋干得到苯丁酸

氮芥-二硫二乙醇中间体。

[0079] 将苯丁酸氮芥-二硫二乙醇中间体 (3mmol) 与DIPEA (6mmol) 溶于无水二氯甲烷中, 冰浴冷却至0-5℃, 缓慢滴加溶解于无水二氯甲烷的对硝基苯基氯甲酸酯 (4mmol), 滴加完毕后升至室温反应2小时, 旋干溶剂, 复溶于无水DMF中, 加入霉酚酸 (3mmol), 室温搅拌至完全溶解, 迅速加入三乙胺 (6mmol), 室温反应过夜, 分别使用饱和碳酸氢钠和10%柠檬酸溶液萃取有机相, 旋干后复溶于乙腈, 通过制备液相分离纯化, 旋干得到苯丁酸氮芥-霉酚酸前药。

[0080] 采用质谱法以及核磁共振氢谱法来确定实施例1中苯丁酸氮芥-霉酚酸前药的结构, 结果如图1、图2所示。波谱解析结果如下:

[0081] ^1H NMR (400MHz, Chloroform-d) δ 7.17-6.96 (m, 2H, d), 6.64 (d, $J=8.5\text{Hz}$, 2H, c), 5.30 (s, 1H, p), 5.23-5.03 (m, 2H, k), 4.54 (t, $J=6.8\text{Hz}$, 2H, j), 4.34 (t, $J=6.5\text{Hz}$, 2H, h), 3.91-3.40 (m, 13H, a, b, n, o), 3.07 (t, $J=6.8\text{Hz}$, 2H, e), 2.95-2.56 (t, $J=6.4\text{Hz}$, 4H, i), 2.47-2.14 (m, 9H, g, r, s), 1.91 (p, $J=7.5\text{Hz}$, 2H, f), 1.79 (d, $J=1.4\text{Hz}$, 3H, q). MS (ESI) m/z : 808.1765 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

[0082] 实施例2: 脑靶向前药纳米制剂的处方筛选

[0083] 选择DSPE-PEG-APOE作为表面修饰材料, 采用一步纳米沉淀法制备脑靶向前药纳米制剂, 具体制备过程如下:

[0084] 苯丁酸氮芥-霉酚酸前药自组装纳米制剂的制备: 将苯丁酸氮芥-霉酚酸前药与DSPE-PEG-APOE (质量比20%, w/w) 溶解于0.5mL丙酮中, 形成均匀溶液。在剧烈搅拌条件下, 将该溶液缓慢逐滴加入5mL去离子水中, 充分混合后, 通过减压旋转蒸发去除丙酮, 最终获得苯丁酸氮芥-霉酚酸前药自组装纳米制剂 (CMNP)。

[0085] 苯丁酸氮芥-霉酚酸前药与MHY1485共组装纳米制剂的制备: 将苯丁酸氮芥-霉酚酸前药与MHY1485按5:1、4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:4、1:5的不同摩尔比例混合, 与DSPE-PEG-APOE (质量比20%, w/w) 溶解于0.5mL丙酮中, 形成均匀的溶液。在剧烈搅拌条件下, 将该溶液缓慢逐滴加入到5mL去离子水中, 充分混合后, 通过减压旋转蒸发去除丙酮, 最终获得苯丁酸氮芥-霉酚酸前药与MHY1485共组装纳米制剂。

[0086] 前药纳米制剂的表征: 将前药纳米制剂使用去离子水稀释10倍后, 利用马尔文粒径仪测定其粒径、聚集度指数 (PDI) 及表面电位。

[0087] 前药纳米制剂包封率与载药量的测定: 使用离心法除去前药纳米制剂未包封药物, 使用高效液相色谱法进行包封率测定, 使用C18反相色谱柱 ($4.6 \times 250\text{mm}$, $5\mu\text{m}$), 流动相为甲醇与水, 苯丁酸氮芥-霉酚酸前药检测波长为258nm, MHY1485检测波长为340nm。按照以下公式计算苯丁酸氮芥-霉酚酸前药与MHY1485的包封率和载药量:

[0088] 包封率 = 制剂中药物含量 / 投入的总药物量 $\times 100\%$;

[0089] 载药量 = 理论载药量 $\times$ 包封率 $\times 100\%$ 。

[0090] 前药纳米制剂的协同指数: 首先使用MTT法评估各比例共组装纳米制剂的细胞毒性, 具体操作流程如下: 将U87/TR细胞 (替莫唑胺耐药型U87细胞) 接种至96孔板中 (每孔 2×10^3 个细胞), 并将其置于培养箱中孵育12小时, 以确保细胞能够稳定贴壁。随后, 使用含不同浓度梯度的苯丁酸氮芥-霉酚酸、MHY1485、CMNP及各比例的共组装纳米制剂培养基, 替换原有培养基。未处理的细胞作为对照组。将各组细胞继续在37℃培养箱中孵育48小时后, 每

孔加入20 μ L的MTT溶液,继续孵育4小时以允许甲臞晶体的形成。随后,弃去培养基,加入DMSO溶解甲臞晶体,使用多功能酶标仪在490nm波长下测定吸光度值,并根据测得的数据使用graphpad软件计算半数抑制浓度(IC₅₀)。此外,以苯丁酸氮芥、霉酚酸和MHY1485的IC₅₀作为对照,使用Chou-Talalay方法计算,公式如下:

$$[0091] \quad CI_{50} = \frac{D_1}{IC_{50,1}} + \frac{D_2}{IC_{50,2}} + \frac{D_3}{IC_{50,3}}$$

[0092] 其中,D₁、D₂、D₃分别是前药纳米制剂中苯丁酸氮芥、霉酚酸和MHY1485的实际摩尔浓度;IC_{50,1}、IC_{50,2}、IC_{50,3}分别为苯丁酸氮芥、霉酚酸和MHY1485单药的IC₅₀。CI₅₀<1表明协同作用,CI₅₀=1为相加效应,CI₅₀>1则提示拮抗作用。

[0093] 前药纳米制剂的形态学观察:将前药纳米制剂用纯水稀释至上样体积的10倍,随后取少量稀释液滴加至电镜铜网上,静置自然风干。然后,滴加0.25%磷钨酸溶液避光染色,于室温条件下静置风干。样品制备完成后,使用透射电子显微镜(TEM)观察纳米粒的形态特征。

[0094] 通过考察不同苯丁酸氮芥-霉酚酸前药与MHY1485的摩尔比例对纳米制剂的粒径、包封率和载药量的影响,确定最优的组装比例。结果如表1所示,在苯丁酸氮芥-霉酚酸前药与MHY1485的摩尔比例为5:1、4:1、3:1、2:1、1:1、1:2时,成功制备了胶体状态的纳米制剂。然而,在1:3、1:4和1:5比例下,药物均聚集析出。血脑屏障由致密的单层细胞膜、紧密连接和基质组成,严格控制物质的进出。即使进行表面修饰后,粒径过大的纳米粒子(>200nm)渗透性仍然较差,难以透过血脑屏障。因此,在2:1、1:1和1:2比例下的共组装纳米制剂由于粒径均大于200nm,不能作为候选处方。当苯丁酸氮芥-霉酚酸前药与MHY1485的摩尔比例为5:1-3:1时,纳米制剂的粒径均小于150nm,且分散系数均小于0.15。因此,苯丁酸氮芥-霉酚酸前药与MHY1485的摩尔比优选为5:1-3:1。

[0095] 表1.不同摩尔比例苯丁酸氮芥-霉酚酸前药与MHY1485共组装纳米制剂的表征

	处方 ^{a)}	粒径 (nm)	PDI	Zeta 电位 (mV)
	CMNP	92.35 $\pm$ 1.679	0.073	-51.24 $\pm$ 0.331
	5:1	91.54 $\pm$ 1.377	0.129	-56.29 $\pm$ 1.725
	4:1	104.3 $\pm$ 2.721	0.076	-59.01 $\pm$ 2.378
	3:1	90.69 $\pm$ 2.093	0.128	-58.54 $\pm$ 2.158
[0096]	2:1	226.7 $\pm$ 3.65	0.174	-49.41 $\pm$ 0.91
	1:1	280.2 $\pm$ 10.1	0.045	-51.57 $\pm$ 0.888
	1:2	910.1 $\pm$ 63.04	0.941	-42.03 $\pm$ 0.621
	1:3	析出	-	-
	1:4	析出	-	-
	1:5	析出	-	-

[0097] a) 不同比例为苯丁酸氮芥-霉酚酸前药与MHY1485的摩尔比

[0098] 纳米制剂的包封率和载药量是评价纳米制剂性能的两个关键指标。包封率越高,说明纳米制剂的药物体系自组装能力越强,不同批次之间的重现性越好,越有利于工业化生产和质量可控性。载药量越高,说明纳米制剂的非药成分比例越低,能更有效地避免非药成分带来的潜在毒副作用。如表2所示,当苯丁酸氮芥-霉酚酸前药与MHY1485的摩尔比例为5:1-1:2时,苯丁酸氮芥-霉酚酸前药的包封率可达75%以上,MHY1485的包封率达60%以上,且总载药量均在50%以上。而当两者比例为5:1-3:1时,苯丁酸氮芥-霉酚酸前药的包封率可达98%以上,且MHY1485的包封率约达90%以上,总载药量达60%以上。尤其是当两者比例为3:1的苯丁酸氮芥-霉酚酸前药与MHY1485共组装纳米制剂中,苯丁酸氮芥-霉酚酸前药与MHY1485的包封率均达到99%以上,且总载药量高达65.43%。

[0099] 表2.不同摩尔比例苯丁酸氮芥-霉酚酸前药与MHY1485共组装纳米制剂的包封率与载药量

[0100]	处方 ^{a)}	苯丁酸氮芥-霉酚酸前药 的包封率 (%)	MHY1485 的包封率 (%)	总载药量 (%) b)
	CMNP	99.43	-	63.27
[0101]	5:1	98.42	91.27	63.56
	4:1	99.15	89.32	64.03
	3:1	99.33	99.17	65.43
	2:1	87.45	78.56	57.03
	1:1	88.20	75.34	57.47
	1:2	78.51	63.26	50.27

[0102] a) 不同比例为苯丁酸氮芥-霉酚酸前药与MHY1485的摩尔比b) 总载药量为苯丁酸氮芥、霉酚酸和MHY1485三种药物的载药量之和

[0103] 各比例共组装纳米制剂的 IC_{50} 及 CI_{50} 如表3所示。苯丁酸氮芥-霉酚酸前药与MHY1485在4:1、3:1及1:1摩尔比条件下构建的共组装纳米制剂显示出显著协同效应($CI_{50} < 1$),而5:1、2:1和1:2比例组合则表现出拮抗效应($CI_{50} > 1$)。值得注意的是,苯丁酸氮芥-霉酚酸前药与MHY1485在摩尔比3:1时构建的共组装纳米制剂具有最低的 IC_{50} (15.7 μ M)以及最小的 CI_{50} (0.39)。结合粒径、包封率与载药量的结果综合考察,苯丁酸氮芥-霉酚酸前药与MHY1485的摩尔比例优选为3:1-4:1。而且当苯丁酸氮芥-霉酚酸前药与MHY1485的摩尔比例为3:1时构建的共组装纳米制剂具有最佳的制剂学性质与协同效果,因此3:1被确定为最佳比例构建苯丁酸氮芥-霉酚酸前药与MHY1485共组装纳米制剂。

[0104] 表3.不同摩尔比例苯丁酸氮芥-霉酚酸前药与MHY1485共组装纳米制剂的 IC_{50} 与 CI_{50}

	处方	矫正后摩尔比 ^{a)}	IC ₅₀ ^{b)}	CI ₅₀
	苯丁酸氮芥	-	23.3	-
	霉酚酸	-	93.6	-
	MHY1485	-	75.4	-
[0105]	CMNP	1:1:0	35.4	0.95
	5:1	5.39:5.39:1	54.7	1.40
	4:1	4.44:4.44:1	25.1	0.64
	3:1	3.01:3.01:1	15.7	0.39
	2:1	2.23:2.23:1	53.2	1.29
	1:1	1:1:0.85	32.4	0.74
[0106]	1:2	1:1:1.61	86.5	1.80

[0107] a) 通过包封率矫正后的苯丁酸氮芥:霉酚酸:MHY1485的摩尔比b) IC₅₀单位:μM

[0108] 如下以苯丁酸氮芥-霉酚酸前药自组装纳米制剂(CMNP)和苯丁酸氮芥-霉酚酸前药与MHY1485的摩尔比为3:1构建的苯丁酸氮芥-霉酚酸前药与MHY1485共组装纳米制剂(tNP)进行研究。

[0109] 如图3和图4所示,CMNP和tNP的粒径均约为90nm,且具有均匀的粒径分布(PDI<0.15)。两种纳米制剂的表面电位均约为-50mV,保证了静脉注射给药的生物相容性。此外,透射电子显微镜观察结果表明,两者均呈均一的球形结构,具有良好的形态。

[0110] 实施例3:脑靶向前药纳米制剂的制备

[0111] (1) 苯丁酸氮芥-霉酚酸前药自组装纳米制剂(CMNP)的制备:

[0112] 将苯丁酸氮芥-霉酚酸前药与DSPE-PEG-APOE(质量比20%,w/w)溶解于0.5mL丙酮中,形成均匀溶液。在剧烈搅拌条件下,将该溶液缓慢逐滴加入5mL去离子水中,充分混合后,通过减压旋转蒸发去除丙酮,即得。

[0113] (2) 苯丁酸氮芥-霉酚酸前药与MHY1485共组装纳米制剂(tNP)的制备:

[0114] 将苯丁酸氮芥-霉酚酸前药与MHY1485按3:1的摩尔比例混合,与DSPE-PEG-APOE(质量比20%,w/w)溶解于0.5mL丙酮中,形成均匀的溶液。在剧烈搅拌条件下,将该溶液缓慢逐滴加入到5mL去离子水中,充分混合后,通过减压旋转蒸发去除丙酮,即得。

[0115] 实施例4:脑靶向前药纳米制剂的胶体稳定性长期放置稳定性

[0116] 胶体稳定性:将实施例3制备的CMNP和tNP以1:10的比例使用10%胎牛血清(FBS)的PBS溶液进行稀释,并放置于37℃摇床中进行孵育,于孵育的第0、2、4、8、12、24、48小时取样,使用马尔文粒径仪测定其粒径、聚集度指数(PDI)。

[0117] 长期放置稳定性:将实施例3制备的CMNP和tNP置于4℃冰箱中保存。分别在第1、7、15、30天取样,将前药纳米制剂用去离子水稀释10倍后,使用马尔文粒径仪测定其粒径、聚集度指数(PDI)及表面电位。

[0118] 使用含有10% FBS的PBS来模拟体内生理环境。结果如图5所示,在孵育的12小时内,CMNP和tNP均能保持稳定,没有明显的粒径变化。但在12小时后,CMNP的粒径和PDI迅速

增大,说明其纳米结构的解体。相比之下,tNP在48小时内均能保持稳定。此结果说明,tNP可能具有更良好的体内稳定性。

[0119] 长期放置的结果如图6和图7所示,在30天的储存期内,CMNP和tNP的的粒径和表面电位均未出现显著变化,PDI也保持在0.2以下,说明前药纳米制剂在长期储存期间均能够维持其物理特性,且适合用于后续应用。

[0120] 实施例5:脑靶向前药纳米制剂的体外药物释放

[0121] 使用含有20%乙醇的PBS溶液作为释放介质,并在其中加入不同浓度的二硫苏糖醇(DTT),设置终浓度分别为1和10mM,空白的释放介质作为对照。将实施例3制备的CMNP和tNP分别装入透析袋内,封口后将透析袋放入对应的释放介质中,置于37℃下进行震荡孵育。为评估药物释放过程,我们在孵育后不同时间点(1、2、4、8和12小时)取样,每个时间点的样本重复三次。通过高效液相色谱(HPLC)对采集的样品进行定量分析,苯丁酸氮芥、霉酚酸和MHY1485分别在258nm、250nm和340nm波长下进行检测。

[0122] 如图8和图9所示,tNP和CMNP展现了优异的还原响应释药特性,且两者在苯丁酸氮芥和霉酚酸的释放行为上表现出相似的趋势。在未添加DTT的情况下,前药纳米制剂在12小时内释放的药物量不到10%。而在DTT浓度为1mM时,12小时内几乎所有药物都能够完全释放。当DTT浓度升高至10mM时,苯丁酸氮芥和MHY1485在4小时内即从tNP或CMNP中完全释放,霉酚酸则在8小时内释放完全。特别需要指出的是,MHY1485本身未进行前药修饰,因此不具备还原响应的特性。然而,当其与通过二硫键桥联的苯丁酸氮芥-霉酚酸前药共同组装后,苯丁酸氮芥-霉酚酸前药的还原响应作用导致tNP纳米结构的解体,从而赋予MHY1485同步的还原响应能力。这一特性使得tNP能够实现三重药物的智能响应性释放,从而为减轻毒副作用并提高治疗效果提供了独特的优势。

[0123] 实施例6:脑靶向前药纳米制剂的细胞毒性及选择性评估

[0124] 使用MTT法评估前药纳米制剂的细胞毒性,具体操作流程如下:将人胶质母细胞瘤U87细胞、U87/TR细胞(替莫唑胺耐药型U87细胞)及小鼠海马神经元HT22细胞接种至96孔板中(每孔 2×10^3 个细胞),并将其置于培养箱中孵育12小时,以确保细胞能够稳定贴壁。随后,使用含不同浓度梯度的替莫唑胺溶液、苯丁酸氮芥、霉酚酸与MHY1485的混合溶液(Mixed sol,摩尔比:苯丁酸氮芥:霉酚酸:MHY1485=3:3:1,与tNP中三种药物的比例一致)、CMNP或tNP的培养基,替换原有培养基。未处理的细胞作为对照组。将各组细胞继续在37℃培养箱中孵育48小时后,每孔加入20μL的MTT溶液,继续孵育4小时以允许甲臞晶体的形成。随后,弃去培养基,加入DMSO溶解甲臞晶体,使用多功能酶标仪在490nm波长下测定吸光度值,并根据测得的数据使用graphpad软件计算半数抑制浓度(IC₅₀)。根据得到的IC₅₀计算选择指数(selection index, SI),公式如下:选择指数=处方在肿瘤细胞的IC₅₀/处方在HT22细胞的IC₅₀。结果如表4所示。

[0125] 表4.各处方的IC₅₀及选择指数

	处方	U87	U87/TR	HT22	U87	U87/TR
		IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	选择指数	选择指数
[0126]	替莫唑胺	105.9	912.6	283.7	2.7	0.3
	Mixed sol	2.5	5.2	28.8	11.4	5.5
	CMNP	35.4	41.7	738.7	20.9	17.7
	tNP	15.7	20.2	644.6	41.1	31.9

[0127] 结果表明,在两种胶质母细胞瘤细胞 (U87和U87/TR) 中,由于前药纳米制剂需要通过药物释放后才能发挥活性,其IC₅₀值均高于Mixed sol。作为胶质母细胞瘤的一线治疗药物,替莫唑胺的细胞毒性明显弱于其他联合用药组。特别是在耐药性U87/TR细胞中,与野生型U87相比,替莫唑胺的IC₅₀增加了8.6倍,而其他联合制剂在耐药细胞中的IC₅₀虽有所升高,但增幅均未超过2倍。其中,两种前药纳米制剂的IC₅₀仅上升了1.2倍。值得注意的是,在前药纳米制剂中,tNP由于三重药物的协同作用表现出更强的细胞毒性。这些结果表明,本发明设计的联合用药策略能够靶向胶质母细胞瘤细胞,进一步还能有效克服胶质母细胞瘤对替莫唑胺的耐药性。

[0128] 此外,采用小鼠海马神经元HT22细胞代替正常脑组织,以评估各制剂的脱靶毒性。实验结果显示,Mixed sol在HT22细胞中的毒性最强,而在胶质瘤细胞中具有较强抗肿瘤活性的前药纳米制剂在HT22细胞中的毒性显著降低。为了进一步分析药物的选择性,计算选择指数,该指数用于衡量药物对肿瘤细胞与正常细胞的相对毒性,数值越大,表明药物对肿瘤细胞的毒性越强,而对正常细胞的毒性越低。结果表明,替莫唑胺的选择指数甚至低于1,表明其对正常脑组织具有较高的毒副作用。相比之下,tNP的选择指数最高,这可能归因于其对肿瘤微环境的响应性释药机制,以及相同摩尔浓度下苯丁酸氮芥(高毒性药物)所占比例较低。这一特性不仅赋予tNP更强的抗胶质母细胞瘤活性,同时也降低了其对脑组织的非特异性毒性,并且不受替莫唑胺耐药性的影响,体现出良好的治疗优势。

[0129] 实施例7:脑靶向前药纳米制剂的抗肿瘤机制

[0130] 彗星实验(单细胞凝胶电泳):将U87/TR细胞以每孔 2×10^5 个的密度接种于6孔板,放入培养箱孵育12小时使其贴壁。弃去培养基,更换为含替莫唑胺(1000μM)、Mixed sol、CMNP和tNP(总药量10μM)的培养基,设空白细胞对照,继续孵育24小时。收集并洗涤细胞,与低熔点琼脂糖混合后铺在预处理玻片上。待凝固,将玻片置于裂解液4℃避光孵育裂解细胞膜释放DNA,再转入碱解液使DNA解旋暴露损伤位点,然后在碱性电泳缓冲液中电泳,使受损DNA形成彗星状拖尾。电泳后用中和缓冲液洗涤、EB染色,在荧光显微镜下记录图像,用Image J软件分析尾部DNA含量。

[0131] 胞内GTP浓度检测:把U87/TR和U87细胞按每孔 2×10^5 个接种到6孔板,在培养箱孵育12小时促其贴壁。倒掉U87/TR细胞孔内培养基,换上含替莫唑胺(1000μM)、Mixed sol、CMNP和tNP(总药量10μM)的培养基,设空白U87/TR和U87细胞作对照,继续孵育24小时。收集细胞样本,用细胞裂解液裂解后离心获取上清液。依据GTP浓度检测试剂盒操作,在包被特异性抗体的酶标板中加入已知浓度GTP标准品和细胞裂解上清液孵育,洗板后加酶标二抗再次孵育、洗板,添加底物溶液避光显色,显色合适时加终止液,最后用酶标仪测450nm处吸

光度,通过与标准曲线对比得出胞内GTP浓度。

[0132] AP位点定量检测:将U87/TR细胞按每孔 2×10^5 个接种于6孔板,在培养箱孵育12小时使其贴壁。弃去培养基,替换为含替莫唑胺($1000\mu\text{M}$)、Mixed sol、CMNP和tNP(总药量 $10\mu\text{M}$)的培养基,设空白细胞对照,继续孵育24小时。孵育结束收集细胞,按AP位点检测试剂盒操作,先平衡材料和试剂至室温,纯化基因组DNA并稀释至 $100\mu\text{g/mL}$,进行ARP反应,处理反应产物后将ARP衍生的DNA样品稀释至 $1\mu\text{g/mL}$ 。在DNA高结合板中加入标准品稀释液和样品,依次添加DNA结合溶液、链霉亲和素-酶结合物、底物溶液,每次添加后孵育并洗涤,加入终止溶液后在微孔板读数仪450nm处测吸光度,通过与标准曲线对比计算胞内AP位点含量。

[0133] 彗星实验(单细胞凝胶电泳)是一种高灵敏度的DNA损伤检测方法,其原理是通过电泳使受损的DNA片段迁移,从而形成典型的“彗星状”结构。通常,彗星尾部拖尾长度、尾矩以及尾部DNA含量可定量反映DNA损伤程度,数值越高说明损伤越严重。如图10、图11和图12所示,替莫唑胺处理的U87/TR细胞仅表现出极少量的拖尾,表明其对耐药细胞的DNA损伤作用较弱。而Mixed sol组的彗星尾部拖尾最长,尾矩及尾部DNA含量最高,表明其诱导DNA损伤最为显著,tNP次之。这一趋势与细胞毒性实验的结果一致,进一步证明在替莫唑胺耐药的U87/TR细胞中,单独使用替莫唑胺难以有效诱导DNA损伤,而联合用药组合,尤其是Mixed sol和tNP,仍能显著破坏耐药胶质母细胞瘤细胞的DNA完整性。

[0134] 胶质母细胞瘤的替莫唑胺耐药机制通常涉及鸟苷酸代谢的上调,以增强DNA修复能力并应对化疗诱导的DNA损伤。如图13所示,与野生型U87细胞相比,U87/TR细胞的胞内GTP浓度显著升高,说明耐药细胞中鸟苷酸代谢通路更为活跃。在不同药物处理下,替莫唑胺甚至进一步提升了GTP水平,而Mixed sol和tNP基于“开源节流”的鸟苷酸调控策略,即MHY1485激活mTOR通路促进鸟苷酸消耗(开源),同时IMPDH2抑制鸟苷酸从头合成(节流),最终导致胞内GTP浓度显著下降,引发鸟苷酸耗竭。相较之下,CMNP虽然也降低了GTP水平,但仅通过IMPDH2抑制鸟苷酸合成的单一机制,其作用远不及Mixed sol和tNP的“开源节流”策略。

[0135] AP位点(脱嘌呤位点,Apurinic Site)是指DNA链中因水解、氧化或化学修饰等因素导致嘌呤碱基缺失后形成的无碱基位点。在肿瘤细胞中,当苯丁酸氮芥诱导DNA链交联时,细胞需要切除损伤碱基并激活碱基切除修复通路进行DNA修复,而鸟苷酸是这一修复过程中不可或缺的原料。当胞内鸟苷酸耗竭时,DNA修复受阻,未修复的AP位点积累,从而加剧DNA损伤。如图14所示,AP位点数量的变化趋势与DNA损伤趋势一致,且与胞内GTP浓度呈负相关。这一结果表明,基于“开源节流”策略的联合用药方案通过显著降低胞内鸟苷酸水平,加剧了苯丁酸氮芥诱导的DNA损伤,并有效抑制了替莫唑胺耐药的胶质母细胞瘤细胞的生存能力,提示其克服耐药胶质母细胞瘤的治疗优势。

[0136] 实施例8:脑靶向药纳米制剂的生物分布

[0137] DiR标记的CMNP和tNP的制备:DiR标记的CMNP和tNP采用与实施例3相同的方法制备,唯一的区别是在制备过程中额外添加10% DiR(质量比,w/w)作为荧光标记物,以便于荧光示踪分析。

[0138] DiR标记的非脑靶向tNP(tNP/nT)制备:tNP/nT的制备方法与实施例3中描述的tNP制备方法一致,差异在于制备过程中将DSPE-PEG-APOE替换为等质量的DSPE-PEG,同时额外添加10% DiR(质量比,w/w)作为荧光标记物,以实现荧光示踪。最终,制备所得纳米粒命名

为tNP/nT。

[0139] 替莫唑胺耐药胶质母细胞瘤模型的构建:使用免疫缺陷Balb/c裸鼠构建胶质母细胞瘤原位模型。在异氟烷麻醉后,将裸鼠固定于立体定位仪,在颅骨钻孔后,缓慢注入消化后的U87/TR-luc细胞(5×10^5 个,PBS稀释)至右侧尾状核区域。注射完成后,使用组织胶水封闭伤口。在肿瘤接种10天后,通过腹腔注射荧光素钾(150mg/kg),利用活体成像系统记录并分析肿瘤的生物发光信号。随后,将成功建模的裸鼠随机分组用于后续实验。

[0140] 生物分布实验:通过尾静脉注射给予成模小鼠DiR溶液、DiR标记的CMNP、tNP及tNP/nT,按照DiR当量计算,给药剂量为2mg/kg。在给药后4、8、12和24小时,分别对小鼠进行麻醉,并使用活体成像系统采集肿瘤部位的DiR荧光图像,同时进行定量分析。在24小时终点时,处死小鼠,分离主要脏器(心脏、肝脏、脾脏、肺和肾脏)以及脑组织,并使用活体成像仪对各组织的DiR荧光信号进行成像及定量分析,以评估药物的组织分布情况。

[0141] 实验结果如图15和图16所示,DiR溶液及非脑靶向修饰的DiR标记tNP/nT在脑组织中仅检测出极低的荧光信号,而DiR标记的CMNP与tNP在脑部均显示出明显的荧光累积。随着时间的推移,两种脑靶向前药纳米制剂在脑部的荧光强度逐渐增强,并在12小时达到峰值。这一现象表明,CMNP和tNP均能成功跨越血脑屏障并在脑肿瘤区域蓄积,验证了其良好的脑靶向递送能力,强调了进行脑靶向修饰的重要性。

[0142] 在24小时时,对主要脏器及脑组织的荧光分布如图17和图18,结果与活体荧光成像观察结果一致。DiR溶液和非脑靶向修饰的DiR标记tNP/nT在脑部仅有极低的荧光信号,而是主要分布于肺部和肝脏。而相比之下,DiR标记的CMNP与tNP均成功穿越血脑屏障,并显著富集于脑肿瘤区域。如图19所示,与DiR溶液相比,DiR标记的tNP/nT仅提高了1.5倍的荧光强度,而DiR标记的CMNP与tNP分别提升了6.1倍和6.5倍,进一步证明其在脑部的有效蓄积。两种前药纳米制剂在脑肿瘤的蓄积效果无明显差异,可能与其相同的靶向修饰和相似的表面理化性质相关,从而导致相近的体内分布特征。综上所述,本研究构建的脑靶向前药纳米制剂能够实现精准的脑胶质瘤靶向递送,为其进一步发挥抗肿瘤作用奠定了重要基础。

[0143] 实施例9:脑靶向前药纳米制剂的在体抗肿瘤考察

[0144] 使用免疫缺陷Balb/c裸鼠构建胶质母细胞瘤原位模型。在异氟烷麻醉后,将裸鼠固定于立体定位仪,在颅骨钻孔后,缓慢注入消化后的U87/TR-luc细胞(5×10^5 个,PBS稀释)至右侧尾状核区域。注射完成后,使用组织胶水封闭伤口。在肿瘤接种10天后,通过腹腔注射荧光素钾(150mg/kg),利用活体成像系统记录并分析肿瘤的生物发光信号。随后,将成功建模的裸鼠随机分组用于后续实验。

[0145] 在体抗肿瘤实验:实验采用胶质母细胞瘤裸鼠原位模型评估不同药物的抗肿瘤疗效。替莫唑胺经腹腔注射给药,剂量为60mg/kg(309 μ M/kg);Mixed sol、CMNP、tNP均通过静脉注射给药,总药量设为21.87 μ M/kg,具体剂量如表5,以PBS作为对照。第0天开始给药,每3天给药一次,共计5次。分别在第0、4、8、12、16天,通过腹腔注射荧光素钾(150mg/kg),利用活体成像系统记录并分析肿瘤的生物发光信号,以监测肿瘤生长情况。当小鼠体重下降至初始体重的20%时,终止实验并实施安乐死。在第16天,收集小鼠脑组织进行H&E染色,其余小鼠继续接受生存率实验观察,并每2天监测体重变化及生存率,直至实验终止。

[0146] 表5.各处方的具体给药剂量

	处方	总药量 ^{a)}	苯丁酸氮芥 ^{a)}	霉酚酸 ^{a)}	MHY1485 ^{a)}
[0147]	替莫唑胺	309 ^(μ) ; 60 ^(m)	-	-	-
	Mixed sol	21.87 ^(μ)	16.4 ^(μ) ; 5 ^(m)	16.4 ^(μ) ; 5.25 ^(m)	5.47 ^(μ) ; 2.12 ^(m)
[0148]	CMNP	21.87 ^(μ)	21.87 ^(μ) ; 6.65 ^(m)	21.87 ^(μ) ; 7.01 ^(m)	-
	tNP	21.87 ^(μ)	16.4 ^(μ) ; 5 ^(m)	16.4 ^(μ) ; 5.25 ^(m)	5.47 ^(μ) ; 2.12 ^(m)

[0149] a) (μ) 表示μM/kg; (m) 表示mg/kg

[0150] 肿瘤生长情况如图20、图21和图22所示,小鼠生存情况如图23和图24所示。在PBS对照组中,肿瘤迅速增长,小鼠体重持续下降,中位生存期仅为18天。在替莫唑胺耐药的胶质母细胞瘤模型中,临床一线药物替莫唑胺几乎无法抑制肿瘤生长,小鼠在第14天即开始死亡,未能延长中位生存期。此外,虽然Mixed sol在细胞实验中展现出较好的抗肿瘤活性,但在动物模型中同样未能有效抑制肿瘤生长,其抗肿瘤效果与替莫唑胺相似,小鼠亦在第14天开始死亡,中位生存期甚至缩短至16天,低于PBS对照组。这一结果表明,游离药物形式的Mixed sol无法跨越血脑屏障,难以到达脑部肿瘤区域发挥作用,从而强调了药物递送策略在脑胶质瘤治疗中的关键作用。

[0151] 相比之下,CMNP和tNP由于具备脑靶向能力,在耐药胶质母细胞瘤模型中展现出更优异的抗肿瘤效果。其中,tNP表现出更强的抑制作用,不仅显著减缓了肿瘤生长,还有效延缓了小鼠体重下降,使中位生存期延长至30天。由于在实施例8中已验证CMNP与tNP的脑靶向递送能力相当,因此tNP更强的抗肿瘤活性归因于三重药物基于“开源节流”策略的协同作用。如图25,小鼠脑组织H&E染色结果进一步验证了tNP显著抑制了耐药胶质母细胞瘤的生长,CMNP次之,而替莫唑胺与Mixed sol处理组的肿瘤大小与PBS对照组接近,与药效结果一致。

[0152] 综上所述,本发明构建的脑靶向前药纳米制剂tNP通过“开源节流”策略,加剧肿瘤细胞内鸟苷酸耗竭,从而增强了细胞对烷化剂苯丁酸氮芥的敏感性。同时,脑靶向修饰使tNP能够高效跨越血脑屏障,实现靶向递送至脑肿瘤区域,最终显著抑制替莫唑胺耐药的胶质母细胞瘤生长。该研究为克服胶质母细胞瘤的耐药性提供了一种创新性治疗策略,并为临床上替莫唑胺耐药患者的精准治疗提供了新的理论依据和潜在的应用价值。

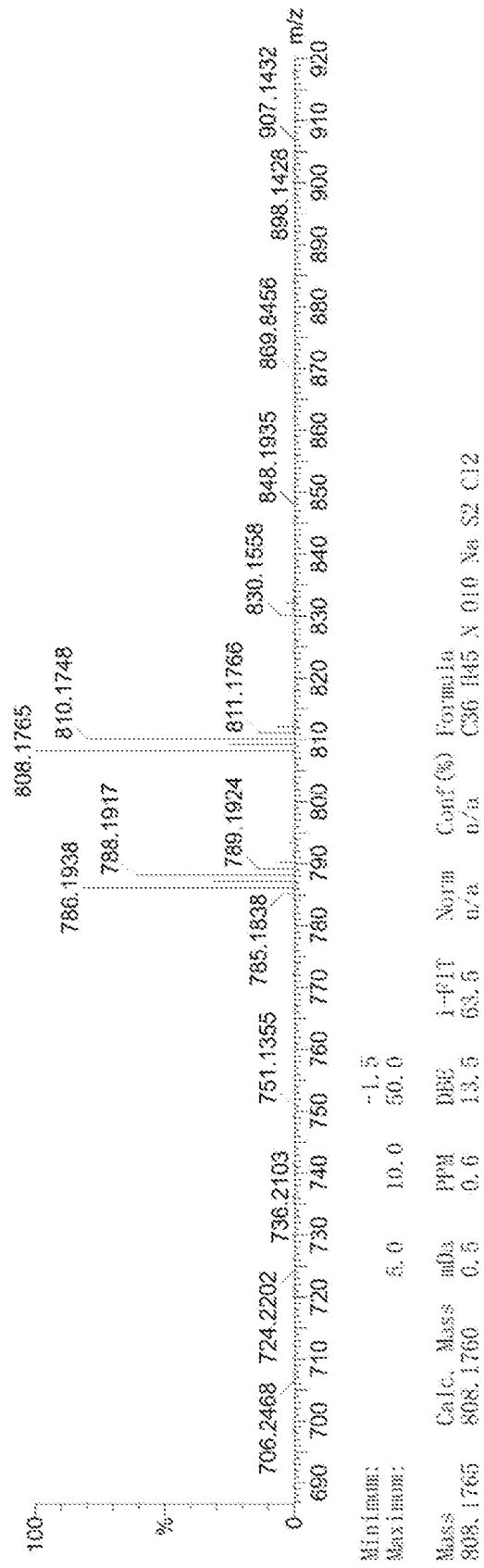


图1

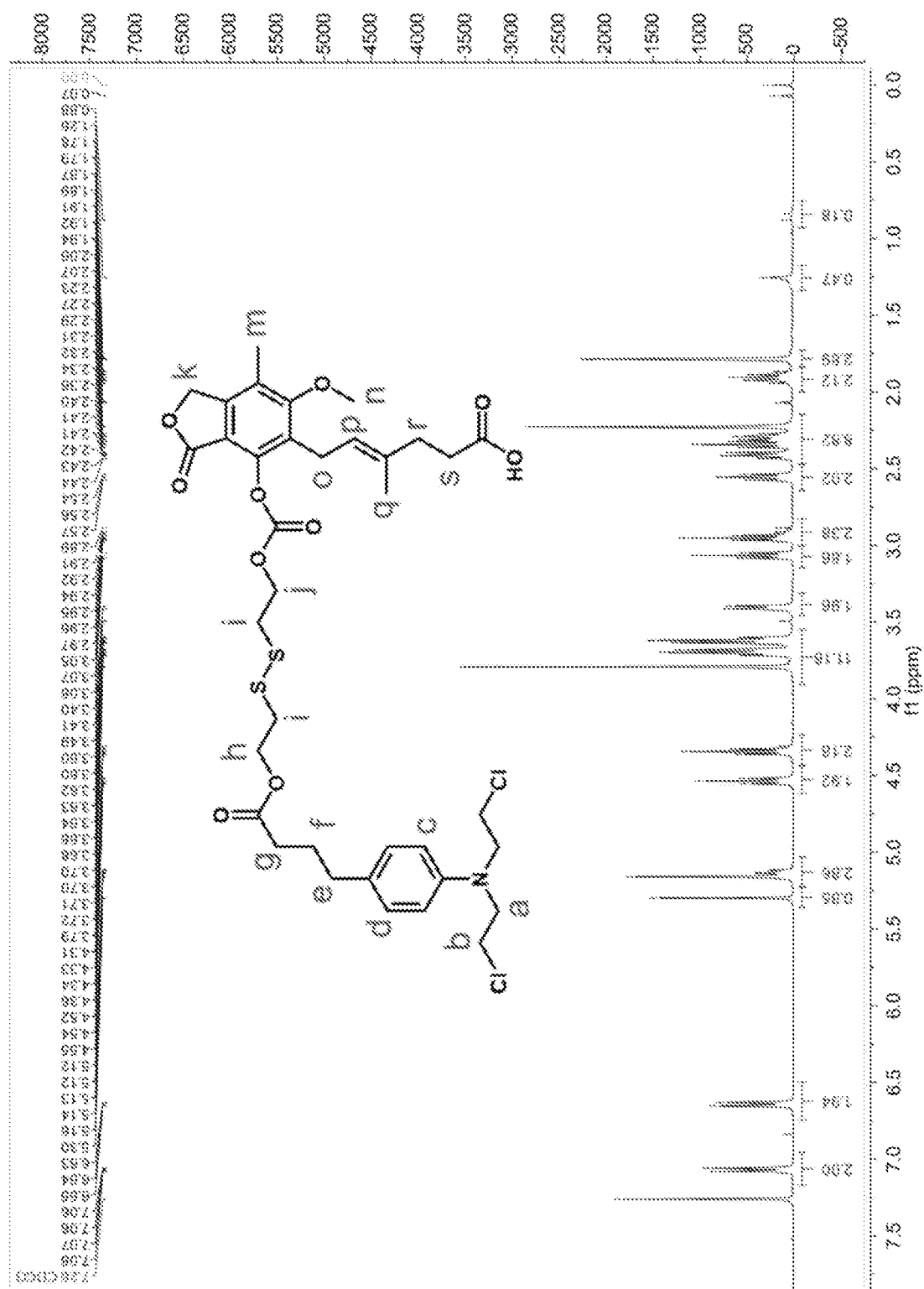


图2

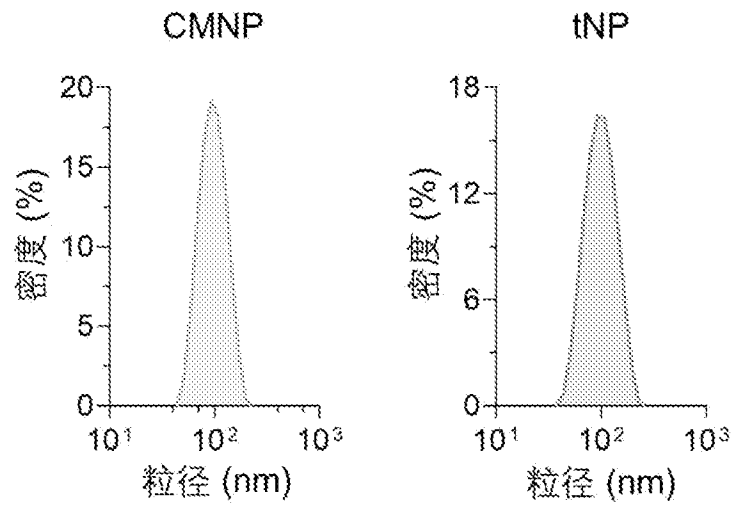


图3

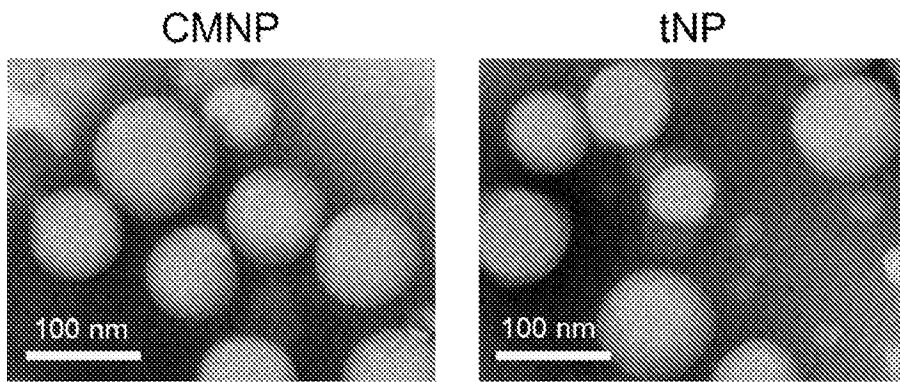


图4

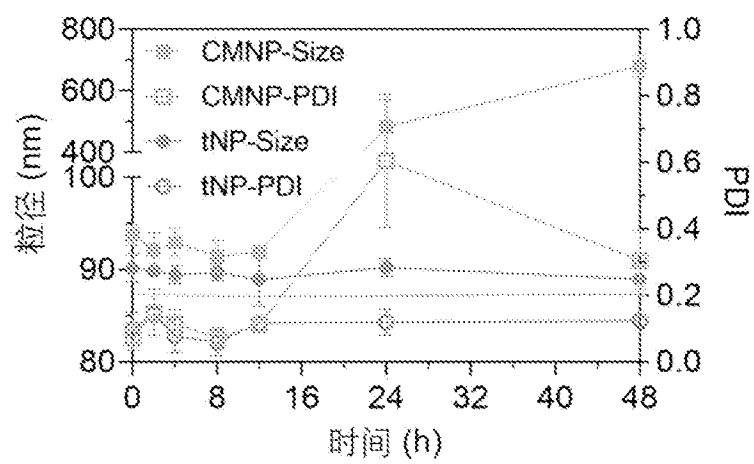


图5

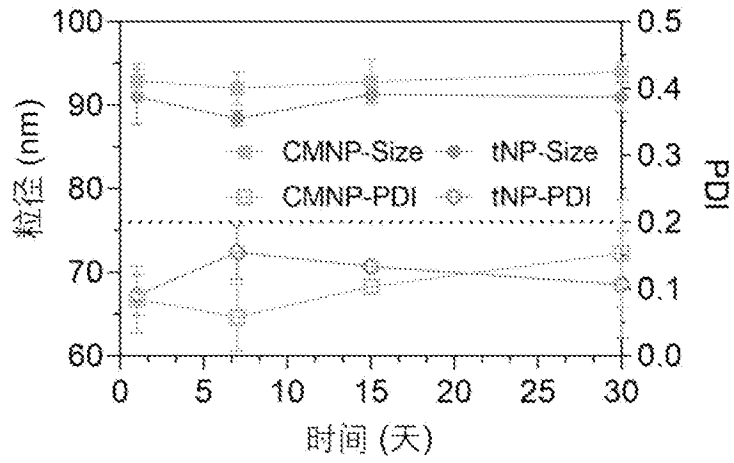


图6

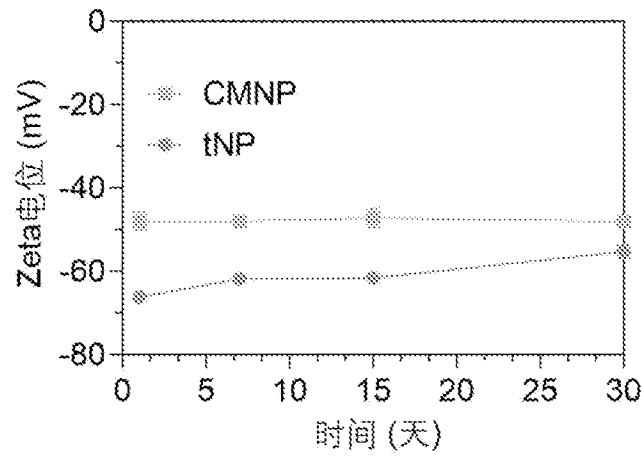


图7

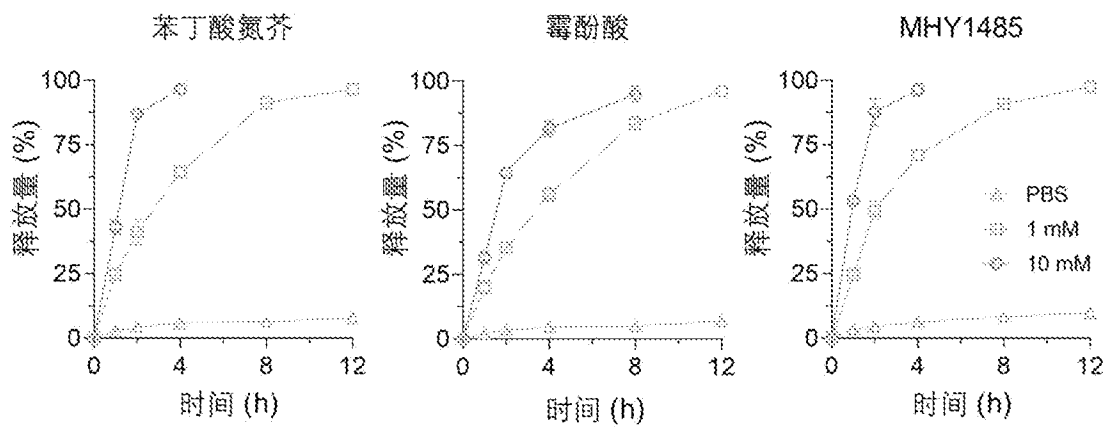


图8

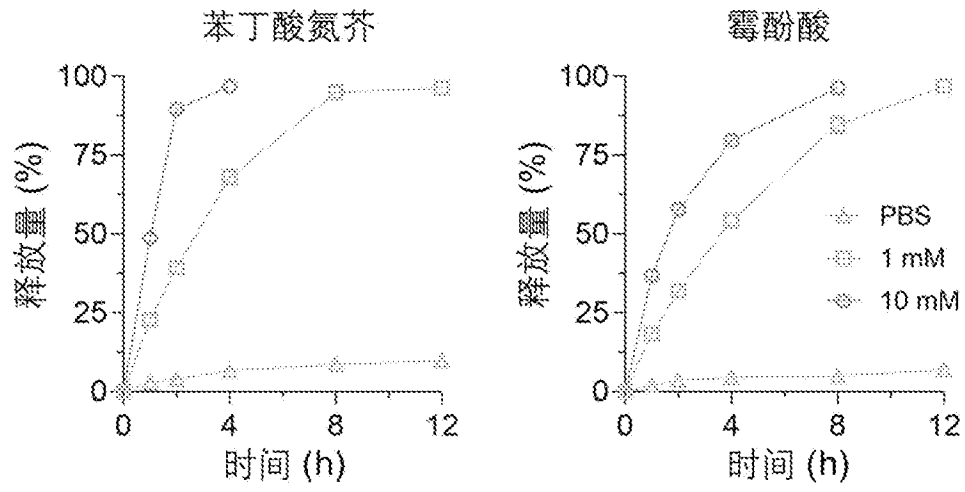


图9

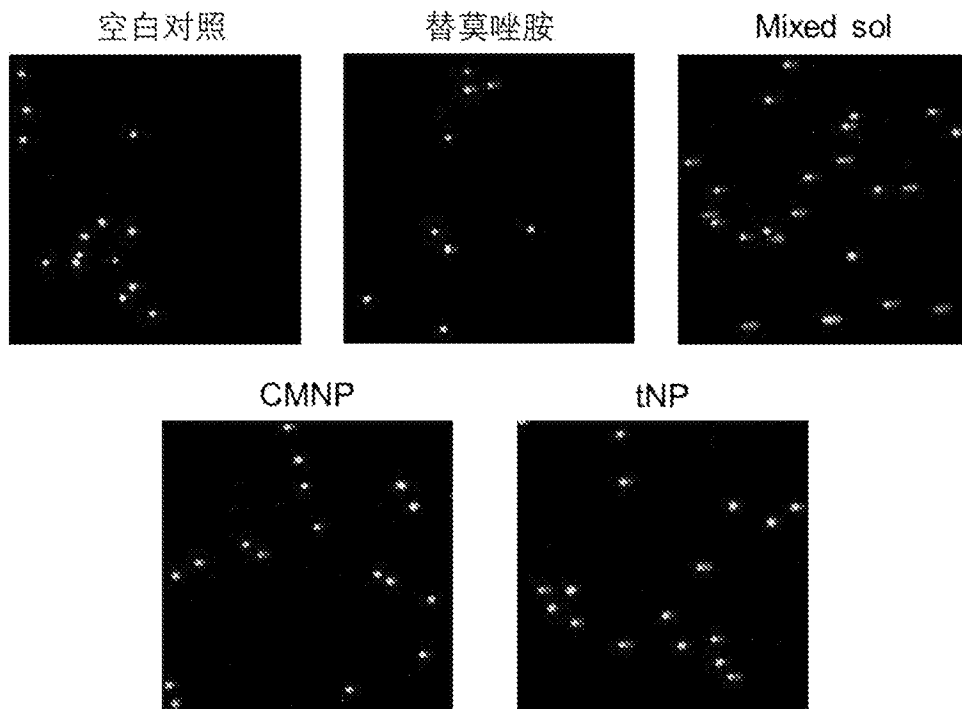


图10

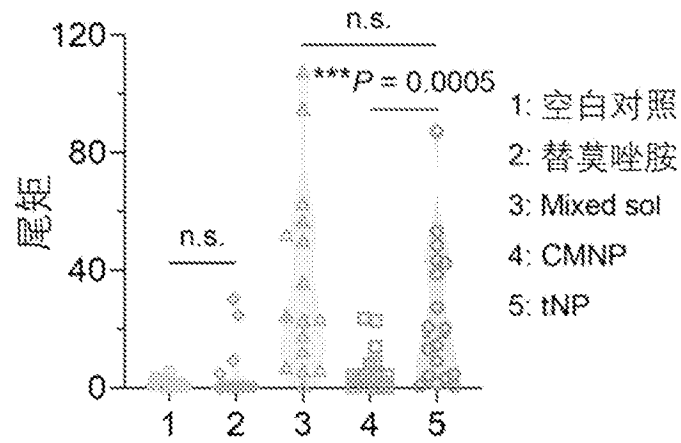


图11

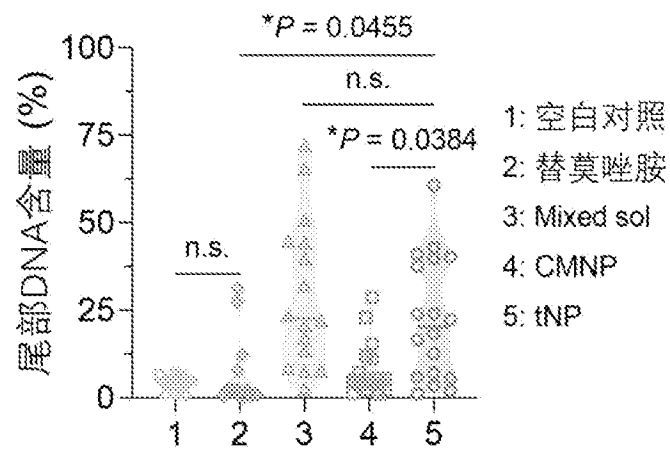


图12

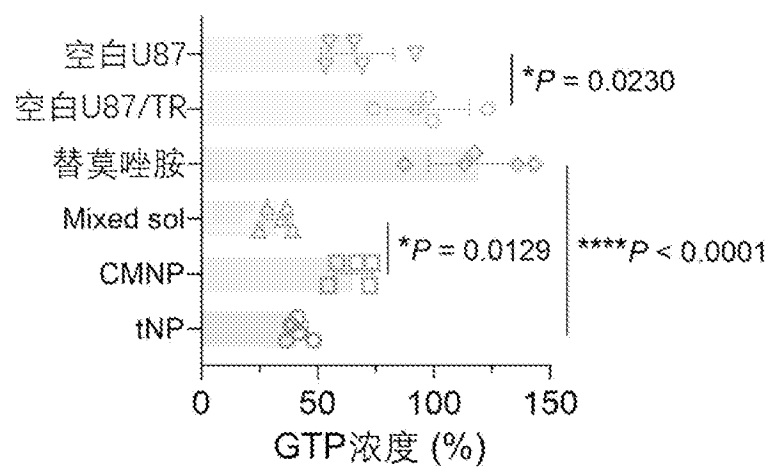


图13

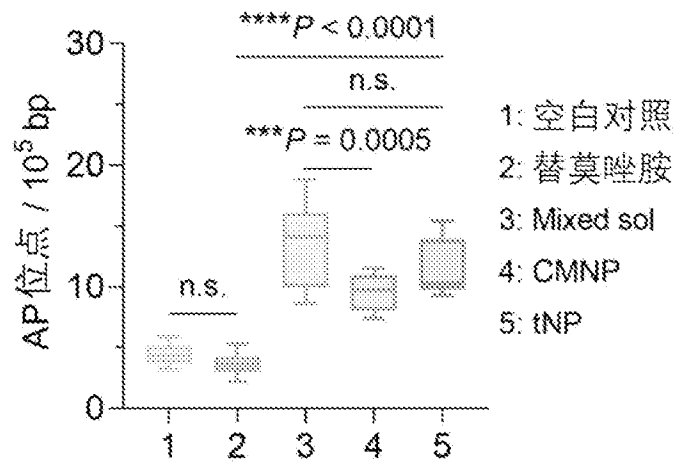


图14

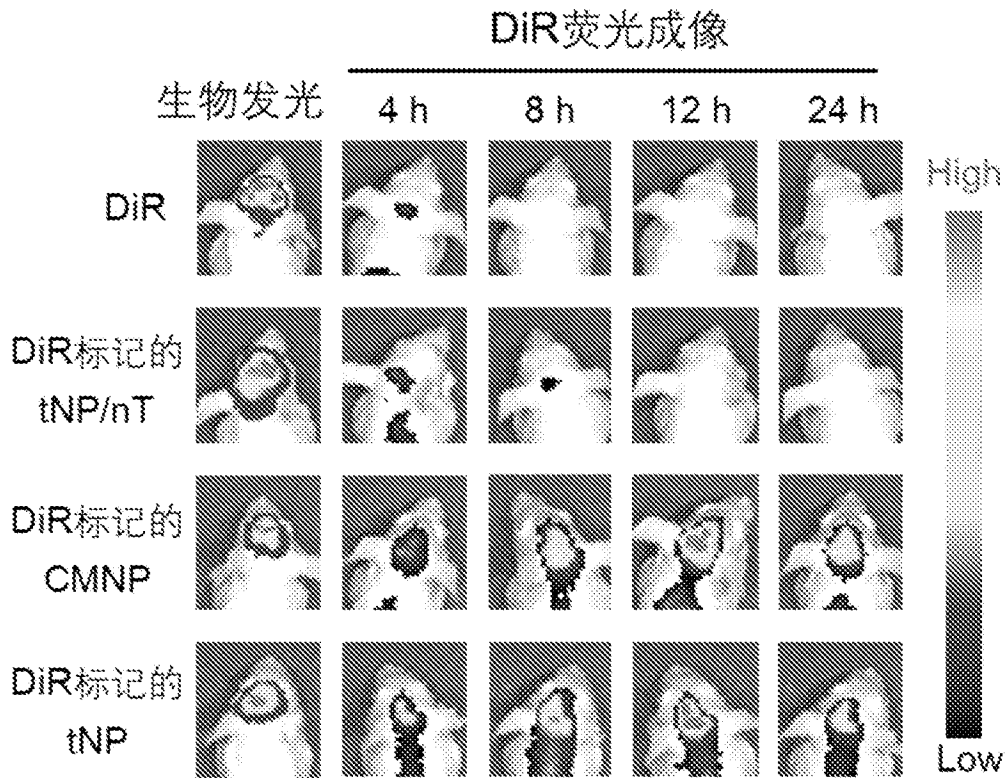


图15

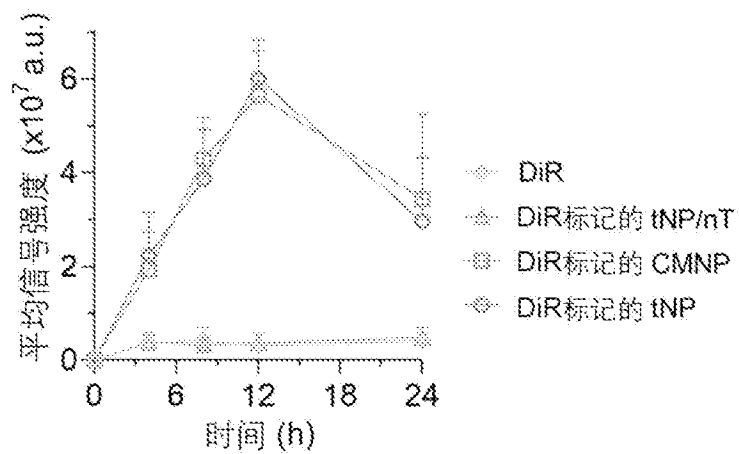


图16

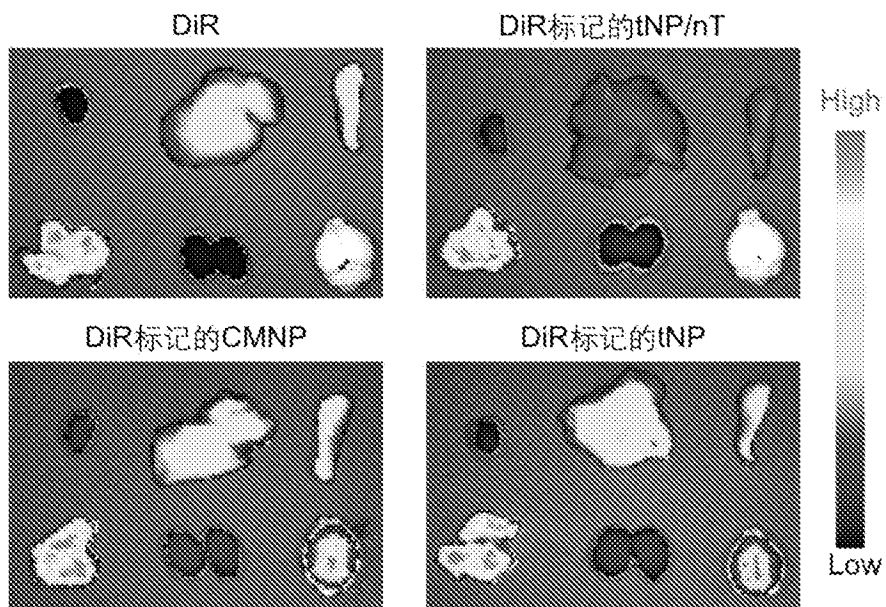


图17

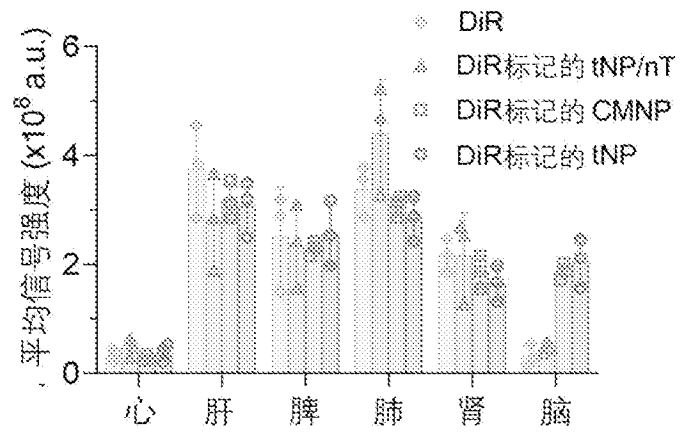


图18

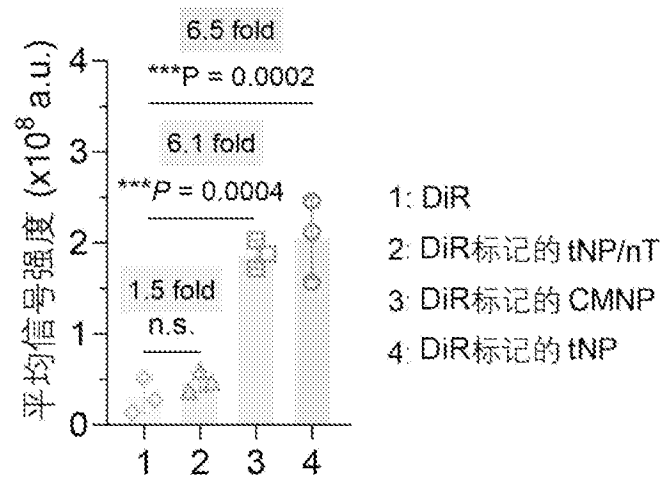


图19

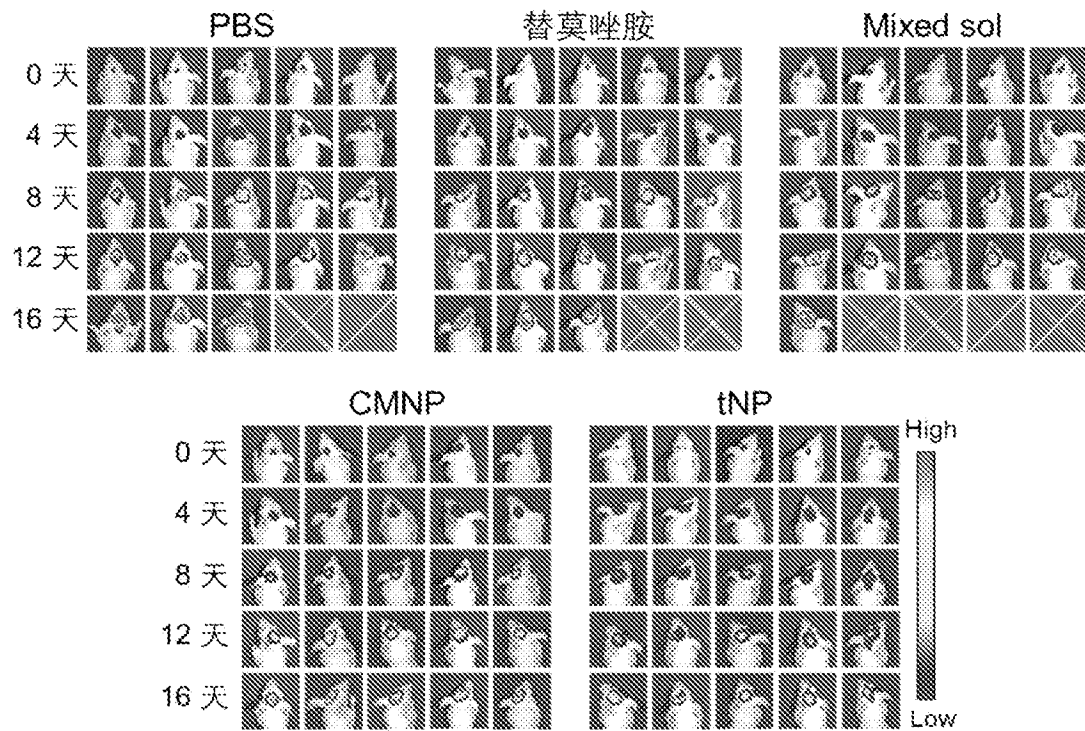


图20

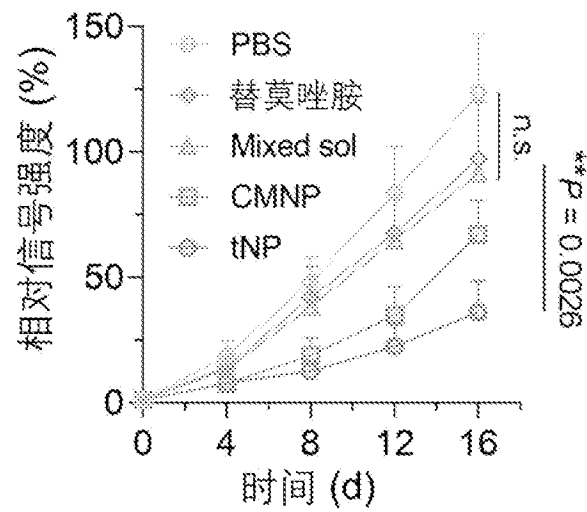


图21

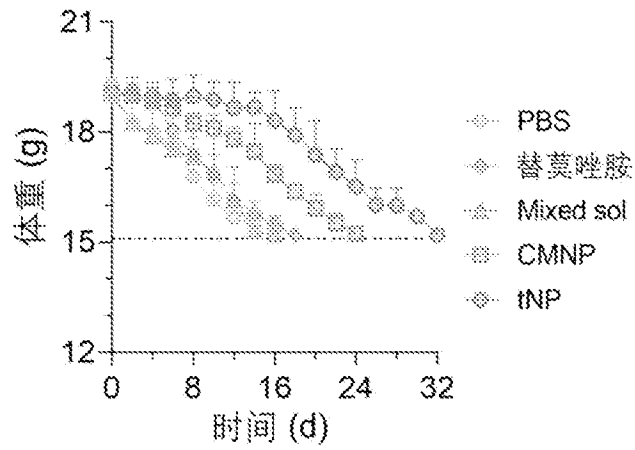


图22

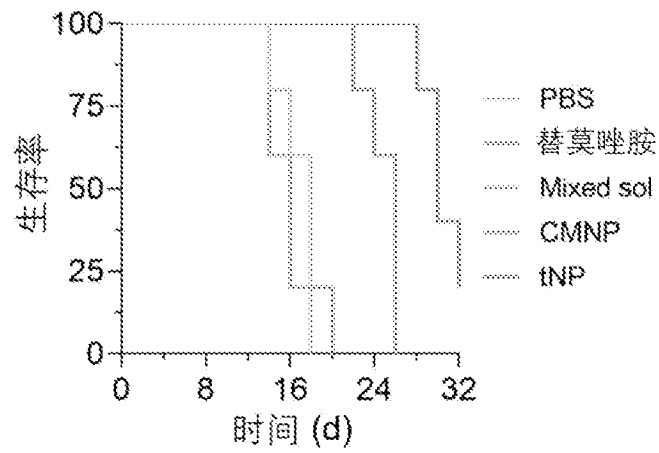


图23

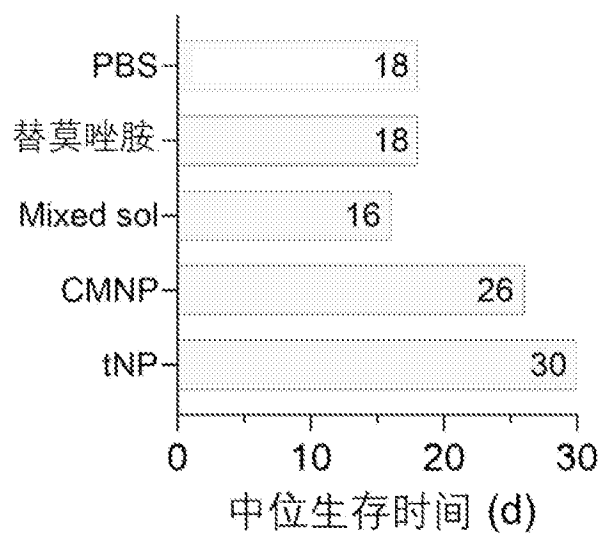


图24

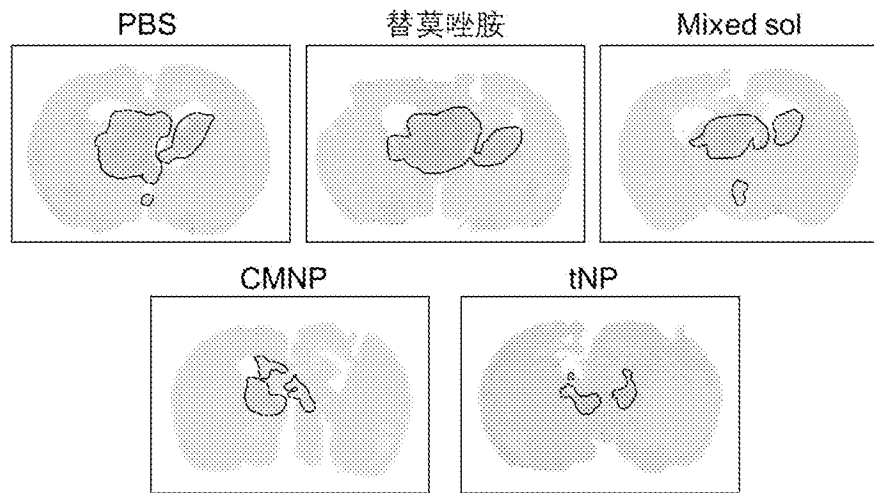


图25