



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118001425 A

(43) 申请公布日 2024. 05. 10

(21) 申请号 202410187801.7
(22) 申请日 2024.02.20
(71) 申请人 上海市第六人民医院
地址 200030 上海市徐汇区宜山路600号
(72) 发明人 陈浩 梁宇晴 薛丽霞 魏来
(74) 专利代理机构 上海申汇专利代理有限公司
31001
专利代理师 翁若莹
(51) Int. Cl.
A61K 47/69 (2017.01)
A61K 31/52 (2006.01)
A61K 35/19 (2015.01)
A61K 33/42 (2006.01)
A61K 33/06 (2006.01)
A61K 47/42 (2017.01)
A61P 7/04 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)
B82Y 40/00 (2011.01)
A61K 47/54 (2017.01)

权利要求书1页 说明书6页 附图4页

(54) 发明名称

一种可靶向脑损伤部位用于创伤性脑损伤治疗的纳米颗粒制备方法和用途

(57) 摘要

本申请涉及生物医学领域,公开了一种可靶向脑损伤部位用于创伤性脑损伤治疗的纳米颗粒制备方法和用途,所述纳米颗粒为BCA@GP;制备方法包括以下步骤:BSA活化;BSA@COA的合成;BSA@COA-CaP合成;糖脂DPG的合成;葡萄糖修饰血小板;BCA@GP的制备。本申请方法制备的纳米颗粒,偶联葡萄糖的血小板能够迅速靶向受损区域,发挥止血凝血功能,破碎后释放出大量 Ca^{2+} ,放大凝血过程中的级联反应,与血小板协同发挥快速止血功能,负载的COA-C1在损伤期间能够促进血管生成,发挥神经保护作用,同时丰富的 Ca_2^+ 流入内皮细胞也能促进内皮细胞迁移、粘附、增殖和血管生成。

1. 一种可靶向脑损伤部位用于创伤性脑损伤治疗的纳米颗粒的制备方法,其特征在于,所述纳米颗粒为BCaP-COA-Cl@Glu-PLT;

所述制备方法,包括以下步骤:

步骤1,BSA活化;

步骤2,BSA@COA的合成:取活化后的BSA溶液,加入COA-Cl溶液合成,合成结束后,超滤,取上清液,得到BSA@COA;

步骤3,BSA@COA-CaP合成:取步骤2中超滤的上清液,分多次缓慢滴加CaCl₂,然后分多次继续缓慢滴加(NH₄)₂HPO₄,调节pH至10.0,超滤,取上清液,得到BSA@COA-CaP;

步骤4,糖脂DSPE-PEG-Glu的合成:将末端羧基化的PEG脂质共聚物DSPE-PEG-2000-COOH,溶于蒸馏水,加入EDC搅拌后,加入NHS活化,继续搅拌,加入氨基葡萄糖,搅拌反应,得到糖脂DSPE-PEG-Glu;

步骤5,葡萄糖修饰血小板:将血小板与DSPE-PEG-Glu混合后振荡孵育,得膜表面修饰葡萄糖的血小板;

步骤6,BCaP-COA-Cl@Glu-PLT的制备:以共挤压的方式,将BSA@COA-CaP用葡萄糖修饰血小板充分包裹均匀,得到BCaP-COA-Cl@Glu-PLT。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述步骤1的具体步骤为:称取120mg BSA,60mg十二烷基硫酸钠,4.4mg二硫代苏糖醇加于5mL样品瓶中,加入3mL超纯水,充分溶解,90℃油浴,油浴条件为180r,2h。

3. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述步骤2的具体步骤为:以1mL体系为例,取10mg活化后的浓度为40mg/mL的BSA溶液,加入950μLMES,再加入25μL、4mg/mL的COA-Cl溶液,用24孔板在37℃,800r/min振荡合成4h,接着用100kd的超滤管,4000r/min,10min洗涤两到三次,取上清液,得到BSA@COA。

4. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述步骤3的具体步骤为:取步骤2中超滤的上清液2mL,置于5mL玻璃瓶中,转速设置520rpm,缓慢滴加1000μL、2.5mM的CaCl₂,每次间隔10min滴加200μL,然后继续缓慢滴加1200μL、2.5mM的(NH₄)₂HPO₄,每次间隔10min滴加200μL,用氨水将溶液的pH值调至10.0,搅拌30min后,分别用15mL超滤管,4000r/min,10min,超滤1~2次,取上清液,得到BSA@COA-CaP。

5. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述步骤4的具体步骤为:称取末端羧基化的PEG脂质共聚物DSPE-PEG-2000-COOH,溶于蒸馏水,按照DSPE-PEG-COOH:EDC:NHS摩尔比为1:15:15,加入EDC,搅拌30min后,加入NHS活化SPE-PEG-COOH的羧基,继续搅拌3h后,按照与DSPE-PEG-2000-COOH摩尔比为35:1的比例加入氨基葡萄糖,室温搅拌,反应24h,得到糖脂DSPE-PEG-Glu。

6. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述步骤5的具体步骤为:将血小板与DSPE-PEG-Glu混合在水浴振荡器中振荡孵育2h,得膜表面修饰葡萄糖的血小板。

7. 一种可靶向脑损伤部位用于创伤性脑损伤治疗的纳米颗粒的用途,其特征在于,所述纳米颗粒在受损区域快速止血凝血中的用途。

一种可靶向脑损伤部位用于创伤性脑损伤治疗的纳米颗粒制备方法 and 用途

技术领域

[0001] 本申请涉及生物医学领域,更具体地说,它涉及一种可靶向脑损伤部位用于创伤性脑损伤治疗的纳米颗粒制备方法和用途。

背景技术

[0002] 创伤性脑损伤(Traumatic brain injury, TBI)是指头部受到外力撞击、冲击、震荡等造成的脑组织损伤,常见于交通事故、运动伤害、暴力冲突等意外事件中,是一种严重威胁人类生命和健康的常见损伤。全世界每年有超过5000万人受到TBI的威胁,约一半人口可能在一生中遭遇一次或多次TBI,其高发生率、高死亡率和高致残率已成为世界诸多国家突出的公共健康和社会经济问题。此外,TBI后的神经功能障碍给伤者及家庭带来长期的经济负担和严重的精神压力。

[0003] TBI根据病理生理过程,分为原发性脑损伤和继发性脑损伤,原发性损伤是指伤后立刻发生的,由于外部机械力等造成的破坏,继发性损伤则是指从损伤发生开始持续变化的病理生理过程。而其中,由于TBI造成的血管损伤,在时间点上早于其他损伤机制,可继发出血、血脑屏障损伤、脑组织缺血缺氧、脑水肿和神经血管毒副作用等,被认为是TBI损伤与修复的关键机制。因此,探索颅脑创伤后血管修复的治疗手段和策略,对于改善患者的预后,降低TBI患者的死亡率和致残率,具有重要的意义。

[0004] 此外,由TBI导致的凝血功能障碍,可加重颅内出血并进一步增加死亡率和发病率。在TBI的治疗过程中,改善凝血功能和促进血管修复有助于改善患者的预后。当血管破损时,血小板受到损伤部位激活因素刺激开始聚集,成为血小板凝块,起到初级止血作用,接着血小板又经过复杂的变化产生凝血酶,使邻近血浆中的纤维蛋白原变为纤维蛋白,互相交织的纤维蛋白使血小板凝块与血细胞缠结成血凝块,同时血小板的突起伸入纤维蛋白网内,随着血小板的收缩,血栓变得更坚实,能更有效地起止血作用,发挥二级的止血作用。钙离子作为凝血过程中必不可少的重要因子,一方面可以启动血小板释放反应,使血小板外形改变,有利于血小板的粘连和聚集,使浆膜构象发生改变,促进血小板活化;另一方面可激活血小板系统的收缩蛋白,使血小板收缩放出其内的凝血因子,促使血液凝固和血块收缩。钙离子与血小板的相互反应,在血小板凝集和止血中起重要的作用,二者都是凝血过程中必不可少的一环。

[0005] 近年来,随着神经影像学的发展、治疗理念的进步,神经重症多模态监护的应用以及颅脑创伤规范化诊治的完善和推广,TBI患者的预后有所改善。尽管如此,目前国际上仍旧缺乏公认有效的治疗创伤性脑损伤的药物或方法,尤其是颅脑创伤后血管修复方面,其难点之一就在于,药物难以持续稳定地透过血脑屏障,到达损伤部位发挥作用。

[0006] TBI后由于血脑屏障的破坏,其通透性增强有助于药物递送入脑,但随着血脑屏障功能的恢复,在TBI亚急性期以及随后漫长的康复期,药物都难以到达损伤部位发挥疗效。纳米颗粒有望解决这个问题。在过去的几十年里,纳米技术的迅速发展已经开始用于生物

和医学应用。在给药领域,纳米给药系统由于具有许多无可比拟的优势,已经开始显示出巨大的潜力。这些优点包括但不限于减少副作用、延长血液循环、提高药物稳定性、生物利用度和靶向效率。因此以纳米颗粒为载体,搭载治疗药物,或能成为创伤性脑损伤后药物治疗的有效方案。

[0007] 目前临床常见的神经系统给药方式有很多种,相对于采取侵入性方法如脑立体定位注射、鞘内注射等,外周给药技术要求不高,损伤小,更加安全,但也存在给药时药物分布广泛,难以在特定部位达到有效治疗浓度等问题。在设计纳米治疗药物时,加入靶向识别物质,从而使纳米颗粒具备高度靶向识别脑损伤部位的能力,就能以相对安全的外周给药方式,实现创伤性脑损伤后的精准靶向治疗。

[0008] 随着纳米技术的发展和功能性纳米颗粒的开发,血小板因其独特的生理特性受到广泛关注。它在人体血液中存量丰富,能够对血管损伤部位迅速响应,靶向人体感染病灶并与肿瘤转移和免疫治疗密切相关,是一种性能优异的潜在药物载体,其表面的糖蛋白可产生免疫调节、生物黏附以及靶向识别功能,同时膜表面的大量伯胺基团,可用于修饰性基团或配体的化学连接。

[0009] 在促进血管生成方面,COA-C1是由德岛文理大学香川药学部合成的新型化合物,是具有促进血管生成作用的小分子化合物,其促进血管生成作用可总结为介导血管内皮细胞的S1P1受体促进血管生成以及在NHDF等周边细胞中促进VEGF分泌。它以从微生物中分离出的具有抗病毒活性的核酸衍生物Oxetanocin A为基础骨架,将其中的氧杂环丁烷环(C-CC-O的环醚)替换为环丁烷环(Carbo Oxethane)并在腺嘌呤碱基上引入了C1(图1),在细胞模型及动物模型上均验证了其血管生成活性。

发明内容

[0010] 发明目的:提供一种具有靶向能力,易于穿透血脑屏障,发挥促凝血及促血管生成作用的纳米治疗药物及其制备方法,用于解决现有药物治疗的难点。

[0011] 为实现上述目的及其他相关目的,本发明提供一种纳米药物,所述纳米药物至少包括糖基化修饰的工程化血小板膜、负载的小分子化合物COA-C1及其BSA模板,由生物矿化技术得到的磷酸钙离子层。

[0012] 第一方面,本申请提供的一种可靶向脑损伤部位用于创伤性脑损伤治疗的纳米颗粒的制备方法,所述纳米颗粒为BCaP-COA-C1@Glu-PLT;

[0013] 所述制备方法,包括以下步骤:

[0014] 步骤1,BSA活化;

[0015] 步骤2,BSA@COA的合成:取活化后的BSA溶液,加入COA-C1溶液合成,合成结束后,超滤,取上清液,得到BSA@COA;

[0016] 步骤3,BSA@COA-CaP合成:取步骤2中超滤的上清液,分多次缓慢滴加CaCl₂,然后分多次继续缓慢滴加(NH₄)₂HPO₄,调节pH至10.0,超滤,取上清液,得到BSA@COA-CaP;

[0017] 步骤4,糖脂DSPE-PEG-Glu的合成:将末端羧基化的PEG脂质共聚物DSPE-PEG-2000-COOH,溶于蒸馏水,加入EDC搅拌后,加入NHS活化,继续搅拌,加入氨基葡萄糖,搅拌反应,得到糖脂DSPE-PEG-Glu;

[0018] 步骤5,葡萄糖修饰血小板:将血小板与DSPE-PEG-Glu混合后振荡孵育,得膜表面

修饰葡萄糖的血小板；

[0019] 步骤6,BCaP-COA-Cl@Glu-PLT的制备:以共挤压的方式,将BSA@COA-CaP用葡萄糖修饰血小板充分包裹均匀,得到BCaP-COA-Cl@Glu-PLT。

[0020] 进一步地,所述步骤1的具体步骤为:称取120mg BSA,60mg十二烷基硫酸钠,4.4mg二硫代苏糖醇加于5mL样品瓶中,加入3mL超纯水,充分溶解,90℃油浴,油浴条件为180r, 2h。

[0021] 进一步地,所述步骤2的具体步骤为:BSA@COA的合成:以1mL体系为例,取10mg活化后的浓度为40mg/mL的BSA溶液,加入950μLMES,再加入25μL、4mg/mL的COA-Cl溶液,用24孔板在37℃,800r/min振荡合成4h,接着用100kd的超滤管,4000r/min,10min洗涤两到三次,取上清液,得到BSA@COA。

[0022] 进一步地,所述步骤3的具体步骤为:取步骤2中超滤的上清液2mL,置于5mL玻璃瓶中,转速设置520rpm,缓慢滴加1000μL、2.5mM的CaCl₂,每次间隔10min滴加200μL,然后继续缓慢滴加1200μL、2.5mM的(NH₄)₂HPO₄,每次间隔10min滴加200μL,用氨水将溶液的pH值调至10.0,搅拌30min后,分别用15mL超滤管,4000r/min,10min,超滤1~2次,取上清液,得到BSA@COA-CaP。

[0023] 进一步地,所述步骤4的具体步骤为:称取末端羧基化的PEG脂质共聚物DSPE-PEG-2000-COOH,溶于蒸馏水,按照DSPE-PEG-COOH:EDC:NHS摩尔比为1:15:15,加入EDC,搅拌30min后,加入NHS活化SPE-PEG-COOH的羧基,继续搅拌3h后,按照与DSPE-PEG-2000-COOH摩尔比为35:1的比例加入氨基葡萄糖,室温搅拌,反应24h,得到糖脂DSPE-PEG-Glu。

[0024] 进一步地,所述步骤5的具体步骤为:将血小板与DSPE-PEG-Glu混合在水浴振荡器中振荡孵育2h,得膜表面修饰葡萄糖的血小板。

[0025] 第二方面,本申请提供的一种可靶向脑损伤部位用于创伤性脑损伤治疗的纳米颗粒的用途,即所述纳米颗粒在受损区域快速止血凝血中的用途。

[0026] 综上所述,本申请具有以下有益效果:

[0027] 制备了体积小(粒径约为70nm),可以穿过血脑屏障的纳米颗粒,偶联葡萄糖的血小板能够迅速靶向受损区域,发挥止血凝血功能。血小板破碎后释放出CaP,由于损伤部位的微酸环境,CaP释放出大量Ca²⁺,放大凝血过程中的级联反应,与血小板协同发挥快速止血功能。负载的COA-Cl在损伤期间能够促进血管生成,发挥神经保护作用,同时丰富的Ca²⁺流入内皮细胞也能促进内皮细胞迁移、粘附、增殖和血管生成。

附图说明

[0028] 图1显示为本发明BCA@GP的合成示意图。

[0029] 图2显示为纳米颗粒(BSA@COA、BSA@COA-CaP、BCA@GP)的粒径分布结果。

[0030] 图3显示为纳米颗粒(BSA@COA、BSA@COA-CaP、BCA@GP)的电位值结果。

[0031] 图4显示为纳米颗粒(BSA@COA、BSA@COA-CaP、BCA@GP)的紫外-可见吸光度结果。

[0032] 图5显示为BCA@GP的载药量和包封率。

[0033] 图6显示为载药粒子48h药物释放曲线。

[0034] 图7显示为BCA@GP纳米颗粒的电镜图。

[0035] 图8显示为BCA@GP纳米颗粒的元素映射图。

具体实施方式

[0036] 以下结合实施例对本申请的结构和效果作进一步详细说明。可以理解的是,此处所描述的具体实施例仅仅用于解释本发明创造,而非对本发明创造的限定。

[0037] 制备材料如下:

[0038]	试剂名称	CAS号	品牌	货号	厂家
	BSA	9048-46-8	Sigma	a1933-25g	Sigma
	COA-Cl	\	\	\	\
	氨基葡萄糖	3416-24-8	麦克林	G887809	麦克林
	血小板	\	\	\	\
	氢氧化钠	1310-73-2	阿拉丁	S11501-500g	阿拉丁
	十二烷基硫酸钠	151-21-3	阿拉丁	S108350-100g	阿拉丁
	二硫代苏糖醇	3483-12-3	阿拉丁	D265376-5g	阿拉丁
	磷酸氢二铵	7722-76-1	阿拉丁	A141011	阿拉丁
	二水合氯化钙	10035-04-8	阿拉丁	K2103645	阿拉丁
	乙醇	64-17-5	沪试	\	沪试
	氨水	1336-21-6	阿拉丁	A112077	阿拉丁
	PBS	\	碧云天	c0221a	碧云天

[0039] 仪器如下:

[0040]	仪器	型号	品牌
	分析天平	BSA124S-CV	赛多利斯
	超声波清洗仪	KQ5200DA	昆山舒美
	磁力搅拌器	IKA RCT basic	IKA
	粒径仪	Zetasizer Nano ZS90	马尔文
	冷冻离心机	3-18R	卢湘仪
	微孔板恒温振荡器	RC-22V-0088	杭州瑞成
	TEM	Tecnai G2 F20 S-Twin	美国FEI

[0041] 本发明为治疗创伤性脑损伤,靶向损伤部位,促进凝血和血管生成,采用牛血清白蛋白(BSA)为模板,生物矿化合成CaP,同时负载药物COA-Cl,利用葡萄糖修饰的血小板包覆纳米颗粒,得到BCaP-COA-Cl@Glu-PLT,简称BCaP@GP,用于受损区域的快速止血凝血。

[0042] 主要采用的实验方法有自组装法和化学交联法。即利用生物大分子模板效应,在溶液中通过静电力作用、螯合作用、氢键、范德华力等作用在有机-无机界面处成核。驱动力来自quadrupole-quadrupole, T-shape, π - π 堆叠,氢键和阳离子- π 相互作用。

[0043] 实施例:BCA@GP的合成

[0044] 用于治疗创伤性脑损伤的纳米颗粒(BCaP-COA-Cl@Glu-PLT, BCA@GP)的制备方法,包括以下步骤:

[0045] 步骤1,BSA活化,称取120mg BSA,60mg十二烷基硫酸钠(SDS),4.4mg二硫代苏糖醇(DTT)加于5mL样品瓶中,加入3mL超纯水,充分溶解,90℃油浴,油浴条件为180r,2h;

[0046] 步骤2,BSA@COA的合成:以1mL体系为例,取25μL(10mg)活化后的BSA溶液(40mg/mL),加入950μLMES,再加入25μL(4mg/mL)的COA-Cl溶液,用24孔板在37℃,800r/min振荡合成4h,接着用100kd的超滤管,4000r/min,10min洗涤两次,取上清液,得到BSA@COA,测试粒径与电位,下滤液用作紫外定量(COA-Cl);

[0047] 步骤3,BSA@COA-CaP合成:取步骤2中超滤的上清液2mL,置于5mL玻璃瓶中,转速设置520rpm,缓慢滴加1000μL的CaCl₂(2.5mM),每次间隔10min滴加200μL,然后继续缓慢滴加1200μL的(NH₄)₂HPO₄(2.5mM),每次间隔10min滴加200μL,用氨水将溶液的pH值调至10.0,搅拌30min后,分别用15mL超滤管,4000r/min,10min,超滤2次,取上清液,得到BSA@COA-CaP,测试粒径与电位,下滤液用作紫外定量(COA-Cl);

[0048] 步骤4,糖脂DSPE-PEG-Glu(DPG)的合成:称取末端羧基化的PEG脂质共聚物DSPE-PEG-2000-COOH,溶于蒸馏水,按照DSPE-PEG-COOH:EDC(1乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐):NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)摩尔比为1:15:15,加入EDC,搅拌30min后,加入NHS活化SPE-PEG-COOH的羧基,继续搅拌3h后,按照与DSPE-PEG-2000-COOH摩尔比为35:1的比例加入氨基葡萄糖,室温搅拌,反应24h,得到糖脂DSPE-PEG-Glu;

[0049] 步骤5,葡萄糖修饰血小板:将血小板与DSPE-PEG-Glu混合在水浴振荡器中振荡孵育2h,得膜表面修饰葡萄糖的血小板GP;

[0050] 步骤6,BCaP-COA-Cl@Glu-PLT(BCA@GP)的制备:以共挤压的方式,将BSA@COA-CaP用GP充分包裹均匀,得到BCA@GP,测试粒径与电位。

[0051] 检测试验

[0052] 试验1:粒径分布和电位值

[0053] 采用马尔文激光粒度仪检测纳米颗粒(BSA@COA、BSA@COA-CaP、BCA@GP)的粒径分布和电位值,检测结果如图2和图3所示。

[0054] 试验2:紫外-可见吸光度

[0055] 检测纳米颗粒(BSA@COA、BSA@COA-CaP、BCA@GP)的紫外-可见吸光度,检测结果如图4所示。

[0056] 试验3:载药量和包封率

[0057] 检测BCA@GP纳米颗粒的载药量和包封率,检测结果如图5所示。

[0058] 试验4:药物释放

[0059] 检测BCA@GP纳米颗粒的药物释放性能,结果如图6所示,可见BCA@GP纳米颗粒48h可以累积释放约70%的药物。

[0060] 试验5:BCA@GP纳米颗粒形态观察

[0061] 如图7所示,透射结果显示BCA@GP复合纳米颗粒的形貌为球状,尺寸在60-70nm,与粒径测量结果一致。

[0062] 试验6:BCA@GP纳米颗粒的元素映射

[0063] BCA@GP的元素映射图如图8所示,矿化的Ca、P元素均匀的分散在纳米颗粒外壳上,表明成功在纳米颗粒表面矿化了一层CaP。

[0064] 本发明的有益效果是,制备了体积小(粒径约为70nm),可以穿过血脑屏障的纳米

颗粒,偶联葡萄糖的血小板能够迅速靶向受损区域,发挥止血凝血功能。血小板破碎后释放出CaP,由于损伤部位的微酸环境,CaP释放出大量Ca²⁺,放大凝血过程中的级联反应,与血小板协同发挥快速止血功能。负载的COA-C1在损伤期间能够促进血管生成,发挥神经保护作用,同时丰富的Ca²⁺流入内皮细胞也能促进内皮细胞迁移、粘附、增殖和血管生成。

[0065] 本具体实施例仅仅是对本申请的解释,其并不是对本申请的限制,本领域技术人员在阅读完本说明书后可以根据需要对本实施例做出没有创造性贡献的修改,但只要在本申请的权利要求范围内都受到专利法的保护。

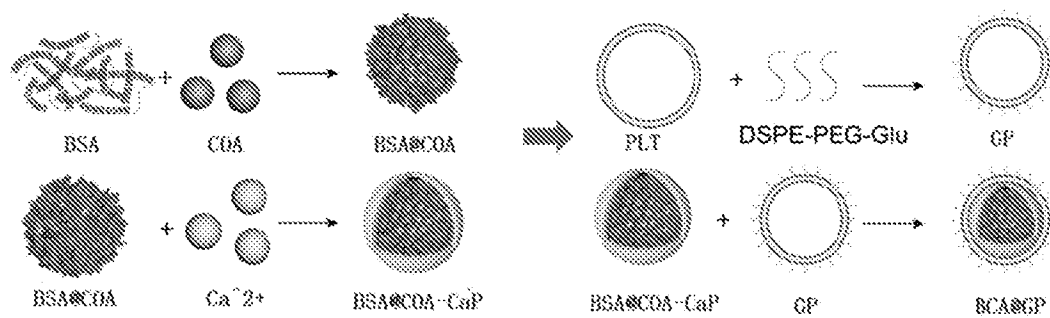


图1

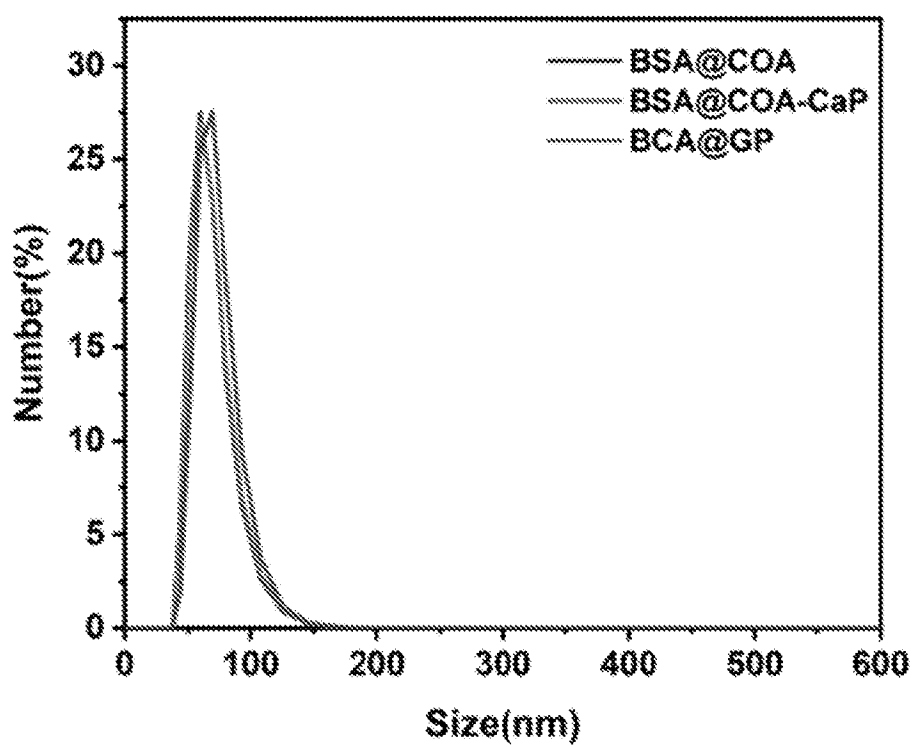


图2

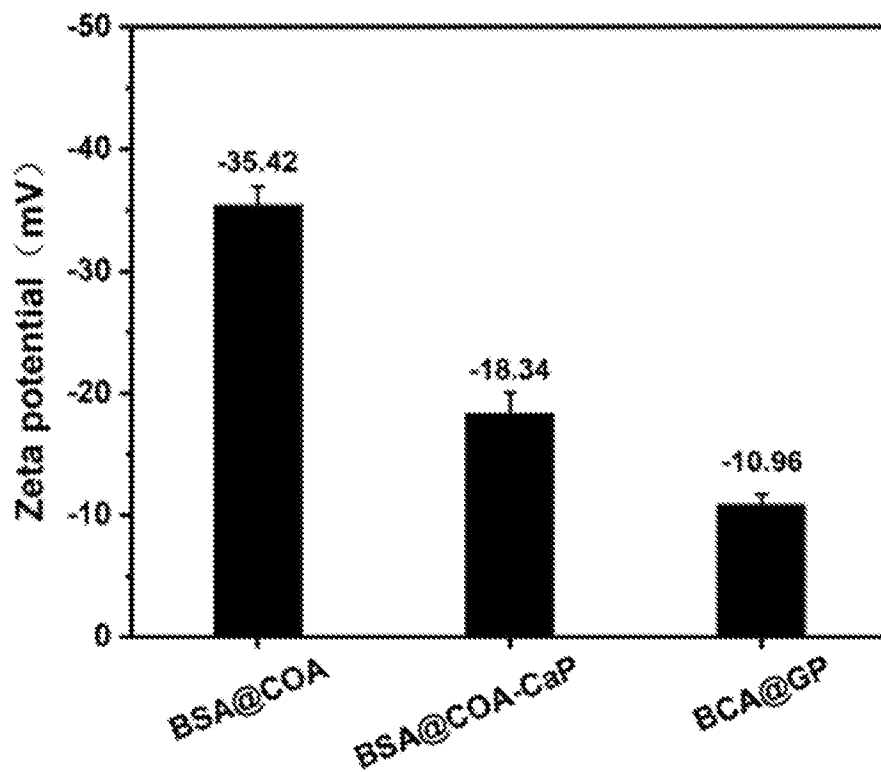


图3

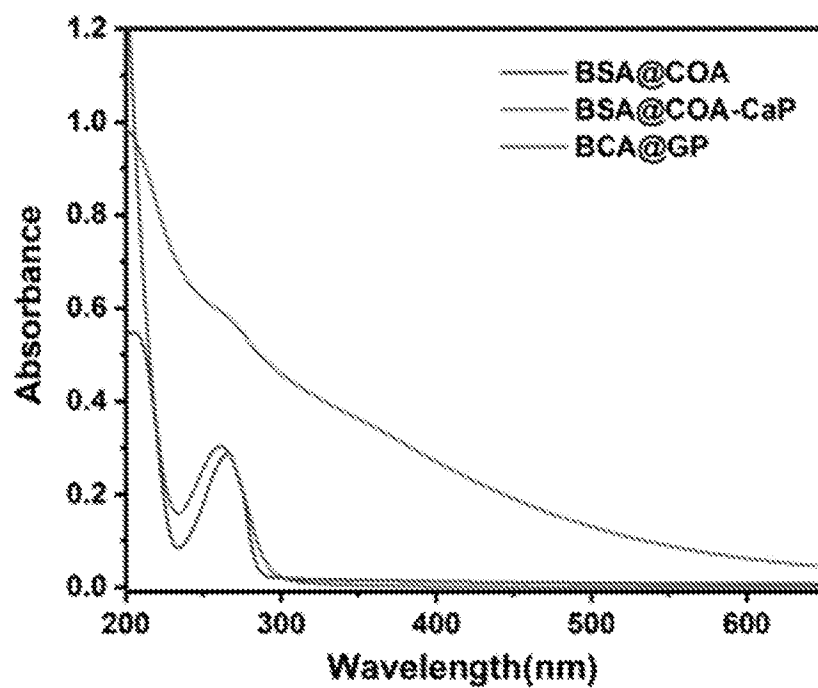


图4

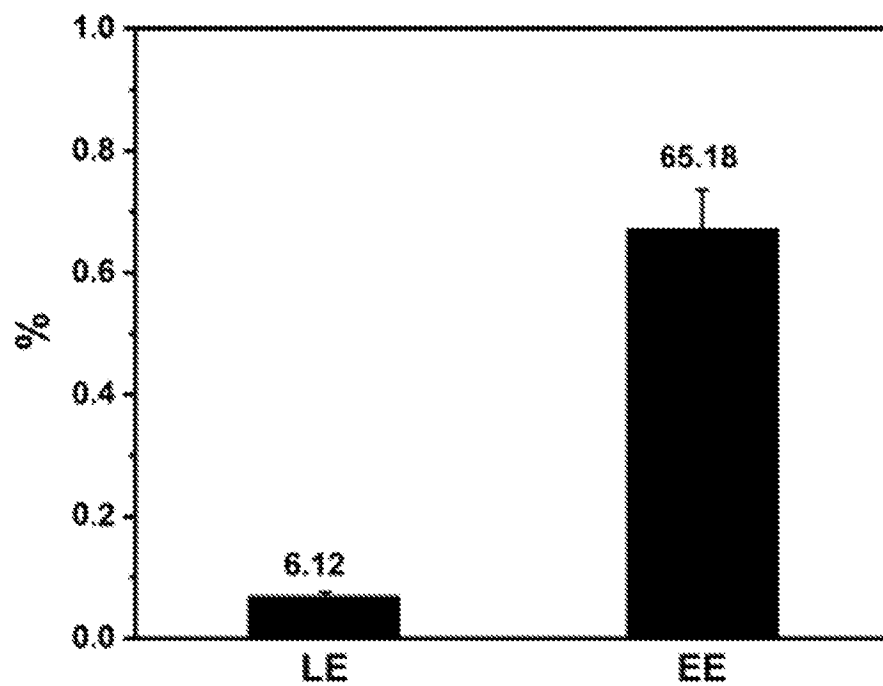


图5

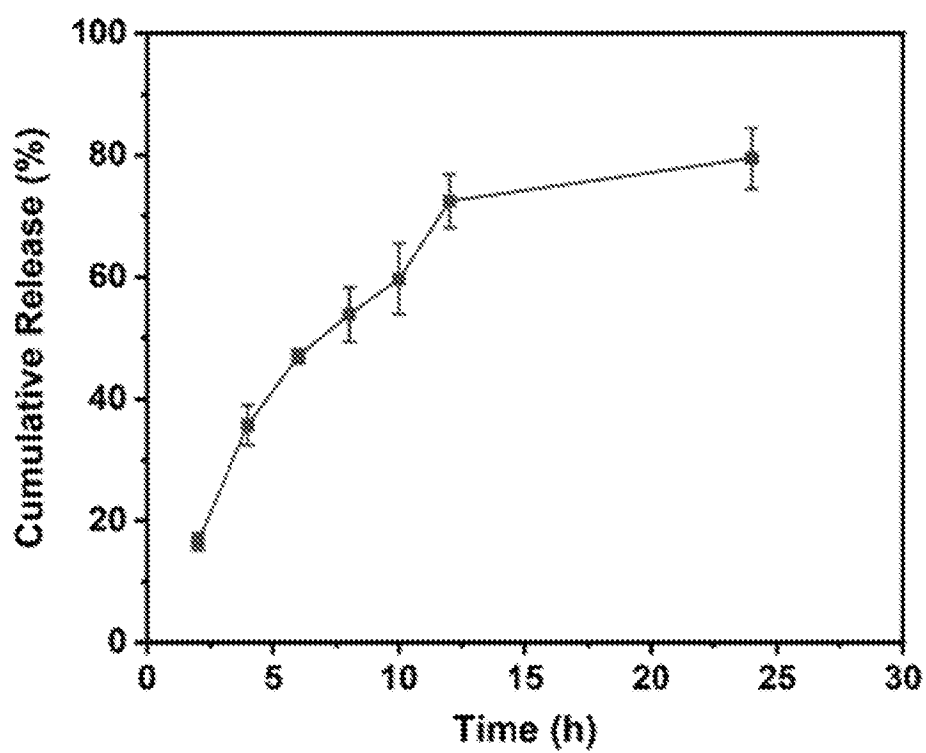


图6

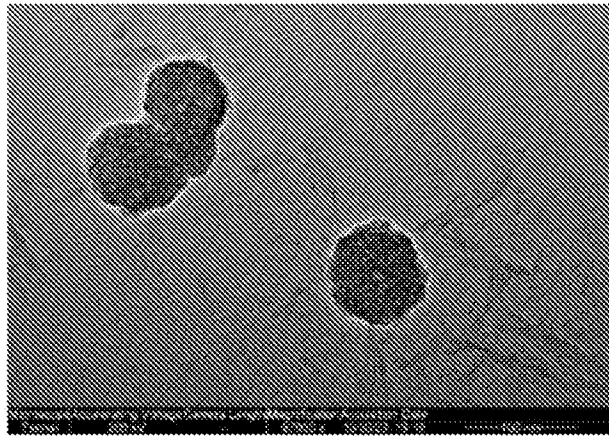


图7

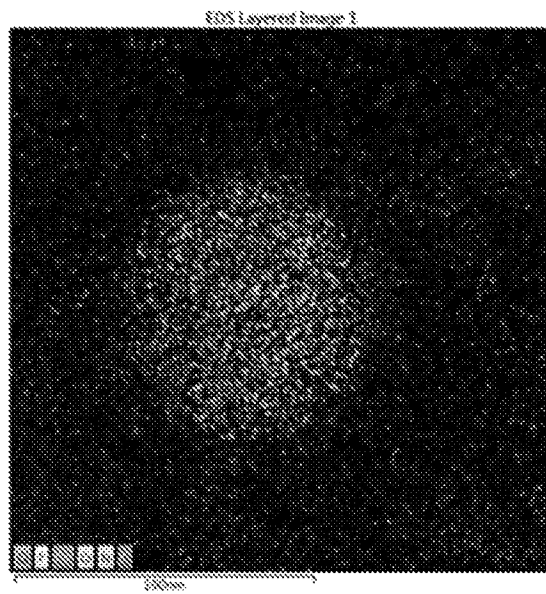


图8