



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117069630 A

(43) 申请公布日 2023. 11. 17

(21) 申请号 202310957793.5
 (22) 申请日 2023.08.01
 (71) 申请人 上海大学
 地址 200444 上海市宝山区上大路99号
 (72) 发明人 栗意 高艺峻 廖峻 肖志程
 孟沙 谢辰辰 王庭芳 熊礼燕
 王芸 陈颀 张川
 (74) 专利代理机构 上海恒慧知识产权代理事务
 所(特殊普通合伙) 31317
 专利代理师 张宁展

A61K 47/54 (2017.01)
 A61K 47/24 (2006.01)
 A61K 31/192 (2006.01)
 A61P 9/10 (2006.01)
 A61P 25/28 (2006.01)
 A61P 25/00 (2006.01)
 A61P 35/00 (2006.01)

(51) Int. Cl.
 C07C 323/41 (2006.01)
 C07C 319/20 (2006.01)
 A61P 9/00 (2006.01)
 A61K 9/51 (2006.01)

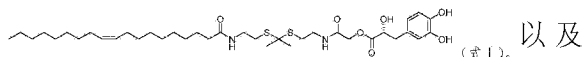
权利要求书1页 说明书7页 附图4页

(54) 发明名称

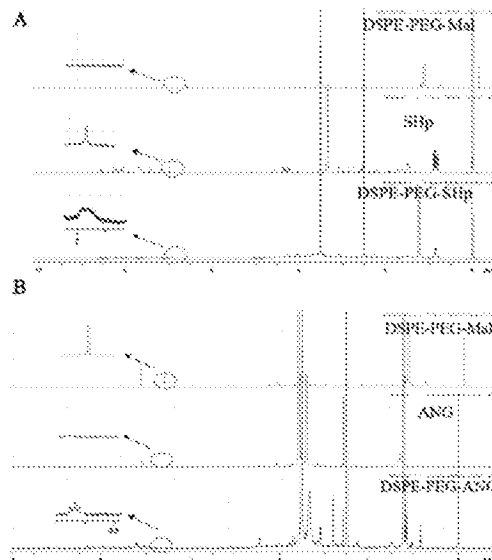
一种ROS响应前药和逐级靶向纳米药物递送系统及其制备方法和应用

(57) 摘要

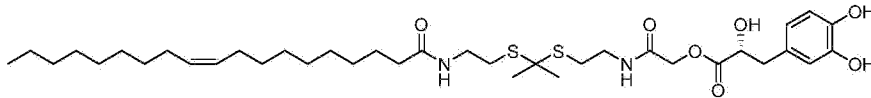
本发明公开了一种ROS响应前药和逐级靶向纳米药物递送系统及其制备方法和应用。该ROS响应性纳米前药,具有式I所示的结构:



ROS响应型纳米药物递送系统,包括:以OARB、DSPE-PEG、DSPE-PEG-SH和DSPE-PEG-ANG为基础材料,采用薄膜分散法自组装成纳米颗粒。本发明提供的ROS响应逐级靶向递送系统可实现特异性血脑屏障靶向,和脑损伤区域的特异性靶向,克服了传统药物递送无法实现精准送达的难题,为脑卒中及相关疾病的精准诊疗奠定技术基础。



1. 一种ROS响应性纳米前药,具有式I所示的结构:



(式 I)。

2. 根据权利要求1所述的一种ROS响应性纳米前药的制备方法,包括:

1) 将油酸、ROS链、EDCI和HOBT在溶剂中进行缩合反应,得到OAR;其中,所述油酸、ROS链、HOBT和EDCI的摩尔比为1~2:1~5:1~5:1~5;

2) 将步骤1)得到的OAR、溴乙酰氯和三乙胺在溶剂中反应得到OARB;其中,所述OAR、溴乙酰氯和三乙胺摩尔比为1~2:1~5:1~5;

3) 将步骤2)中得到的OARB与丹参素直接缩合,制得ROS响应性纳米前药产物OAD;其中,所述OARB和丹参素的摩尔比为1:1~5。

3. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于:所述步骤1)中的油酸、ROS链、HOBT和EDCI的摩尔比为1~1.2:1~3:1.2~2:1.2~2;缩合反应的温度为室温,反应时间24h~48h。

4. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于:所述步骤2)中的OAR、溴乙酰氯和三乙胺摩尔比为1~1.2:1.5~2:1~1.5;所述步骤2)中的反应温度为室温,反应时间4h~10h。

5. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于:所述步骤3)中的缩合反应温度为室温,反应时间24h~48h。

6. 一种包含权利要求1所述纳米前药OAR的ROS响应型纳米药物递送系统,包括:

所述纳米给药系统以OARB、DSPE-PEG、DSPE-PEG-SHp和DSPE-PEG-ANG为基础材料,采用薄膜分散法自组装成纳米颗粒。

7. 根据权利要求6所述的ROS响应型纳米药物递送系统的制备方法,包括:

将OARB、DSPE-PEG、DSPE-PEG-SHp和DSPE-PEG-ANG混合于溶剂中,旋转蒸发除去溶剂,然后在摇床中进行水化处理,水化后的体系经过滤,即得ROS响应型纳米药物递送系统。

8. 根据权利要求7所述的ROS响应型纳米药物递送系统的制备方法,其特征在于:所述的OARB、DSPE-PEG、DSPE-PEG-SHp和DSPE-PEG-ANG的摩尔比为1~5:2~10:1~10:1~10。

9. 根据权利要求7所述的ROS响应型纳米药物递送系统的制备方法,其特征在于:所述的水化处理所用纯水体积为4~10mL,温度37~45℃,时间1~2h;转速100~200r/min。

10. 根据权利要求1所述的ROS响应性纳米前药、权利要求6所述的ROS响应型纳米药物递送系统在制备治疗脑部疾病药物中的应用。

11. 根据权利要求10所述的应用,其特征在于:所述脑部疾病包括脑卒中、阿尔兹海默症、创伤性脑损伤或脑胶质瘤。

一种ROS响应前药和逐级靶向纳米药物递送系统及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于纳米药物技术领域,具体的说,涉及一种ROS响应前药和逐级靶向纳米药物递送系统及其制备方法以及治疗脑损伤中的应用。

背景技术

[0002] 研究显示,全世界约有15亿人患有中枢神经系统疾病。中枢神经系统疾病如神经退行性疾病,包括中风、阿尔兹海默症、帕金森病、脊髓损伤和脑肿瘤等,是一类伤害性比较大,治疗费用昂贵的疾病,给患者带来巨大的精神和经济负担。尽管药物发现已技术取得了进步,但治疗中枢神经系统(CNS)疾病的药物开发仍然具有挑战性。与大多数其他药物发现领域相比,针对重要中枢神经系统疾病的新药的失败率很高。目前有多种治疗方法,包括手术、脑深部刺激、静脉注射(IV)、口服和局部剂型以及康复治疗。然而,传统疗法有一定的局限性,有助于药物在通过不同的生理屏障(如血脑屏障)后进入一般血液循环,血脑屏障是表观血液分布体积的一部分。仅有少量药物到达大脑,疗效有限。相比之下,短期和高度侵入性的手术方法和大脑植入被认为是不安全治疗方法。因此,开发具有能穿越血脑屏障进入脑内的药物用于增强向中枢神经系统疾病的治疗具有很大的前景。

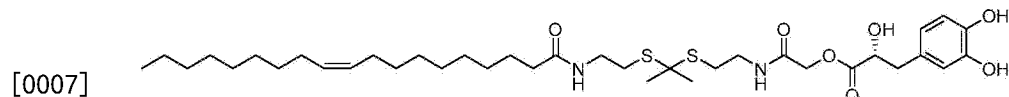
[0003] 越来越多的研究表明,丹参素是一种治疗中枢神经系统的潜在药物。然而,DSS和血脑屏障的固有特性显著限制了其在大脑中的应用。因此,需要替代方法来取代传统的药物递送方法,以有效地将DSS靶向递送到大脑。纳米递送技术被认为是向脑部递送药物的有效途径。纳米策略可以根据疾病的微环境和或与靶向配体结合,来改善药物在脑内的浓度,提高作用效率。

发明内容

[0004] 本发明针对现有技术不足,提供了一种ROS响应前药和一种逐级靶向纳米递送系统及其制备方法和应用。本发明提供的ROS响应逐级靶向递送系统能够在脑损伤区域释放药物,靶向性好,且能有效减轻脑部损伤,改善脑神经功能,可实现特异性血脑屏障靶向,和脑损伤区域的特异性靶向,克服了传统药物递送无法实现精准送达的难题,为脑卒中及相关疾病的精准诊疗奠定技术基础。

[0005] 本发明的目的可通过下列技术方案来实现:

[0006] 本发明第一方面提供了一种ROS响应性纳米前药,具有式I所示的结构:



(式 I)。

[0008] 本发明第二方面提供了上述ROS响应性纳米前药的制备方法,包括:

[0009] 1) 将油酸、ROS链(2,2'-(丙烷-2,2'-二基双(磺胺二基))双(乙烷-1-胺))、EDCI(1-

乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐和HOBT(1-羟基苯并三唑)在溶剂中进行缩合反应,得到OAR((Z)-N-(2-(2-((2-氨基乙基)硫代)丙-2-基)硫代)乙基)壬癸-10-烯酰胺);其中,所述油酸、ROS链、HOBT和EDCI的摩尔比为1~2:1~5:1~5:1~5;

[0010] 2) 将步骤1)得到的OAR、溴乙酰氯和三乙胺在溶剂中反应得到OARB((Z)-N-(2-((2-(2-溴乙酰胺基)乙基)硫代)丙-2-基)硫代)乙基)壬癸-10-烯酰胺);其中,所述OAR、溴乙酰氯和三乙胺摩尔比为1~2:1~5:1~5;

[0011] 3) 将步骤2)中得到的OARB与丹参素直接缩合,制得ROS响应性纳米前药产物OAD((Z)-7,7-二甲基-2,12-二氧代-6,8-二硫-3,11-二氮杂三嗪-21-烯-1-基(R)-3-(3,4-二羟基苯基)-2-羟基丙酸酯);其中,所述OARB和丹参素的摩尔比为1:1~5。

[0012] 进一步的,所述步骤1)中的油酸、ROS链、HOBT和EDCI的摩尔比为1~1.2:1~3:1.2~2:1.2~2。

[0013] 进一步的,所述步骤1)中的缩合反应的温度为室温,反应时间24h~48h。

[0014] 进一步的,所述步骤2)中的OAR、溴乙酰氯和三乙胺摩尔比为1~1.2:1.5~2:1~1.5。

[0015] 进一步的,所述步骤2)中的反应温度为室温,反应时间4h~10h。

[0016] 进一步的,所述步骤3)中的缩合反应温度为室温,反应时间24h~48h。

[0017] 本发明的第三方面提供了一种包含上述纳米前药OAD的ROS响应型纳米药物递送系统,包括:所述纳米给药系统以OARB、DSPE-PEG(磷脂-聚乙二醇)、DSPE-PEG-SHp(磷脂-聚乙二醇-中峰归巢肽)和DSPE-PEG-ANG(磷脂-聚乙二醇-血管紧张素II)为基础材料,采用薄膜分散法自组装成纳米颗粒。

[0018] 本发明的第四方面提供了上述ROS响应型纳米药物递送系统的制备方法,包括:

[0019] 将OARB、DSPE-PEG、DSPE-PEG-SHp和DSPE-PEG-ANG混合于溶剂中,旋转蒸发除去溶剂,然后在摇床中进行水化处理,水化后的体系经过滤,即得ROS响应型纳米药物递送系统。

[0020] 进一步的,所述的OARB、DSPE-PEG、DSPE-PEG-SHp和DSPE-PEG-ANG的摩尔比为1~5:2~10:1~10:1~10。

[0021] 进一步的,所述的DSPE-PEG-SHp,其制备包括:

[0022] 将Ma1-PEG-DSPE和SHp分别溶于DMF和磷酸盐缓冲液中,在氮的保护下,将SHp溶液加入到Ma1-PEG-DSPE溶液中,SHp肽通过半胱氨酸的硫醇共价偶联到Ma1-PEG-DSPE的马来酰亚胺基团,DSPE-PEG-SHp共聚物采用截留分子量为3.5~10kDa的膜,透析24~48h,即得。

[0023] 进一步的,所述的DSPE-PEG-ANG,其制备包括:

[0024] 将摩尔比为1:3的DSPE-PEG-Ma1和Angiopep-2溶于PBS缓冲液中,并在室温下反应24~48h,DSPE-PEG-ANG共聚物经去离子水透析48小时以除去游离的ANG,即得。

[0025] 进一步的,所述步的旋转蒸发温度37~45℃,转速80~120r/min。

[0026] 进一步的,所述的水化处理所用纯水体积为4~10mL,温度37~45℃,时间1~2h;转速100~200r/min。

[0027] 进一步的,所述过滤采用的是220nm滤膜。

[0028] 本发明的另一方面还提供了上述ROS响应性纳米前药、ROS响应型纳米药物递送系统在制备治疗脑损伤药物中的应用。

[0029] 进一步的,所述脑损伤包括脑卒中、阿尔兹海默症、创伤性脑损伤、脑胶质瘤等。

[0030] 本发明的ROS响应型纳米药物递送系统能够于脑内皮细胞上受体结合,帮助整个体系穿越血脑屏障进入脑内,在DSPE-PEG-SHp的作用下将整个体系带到脑损伤的区域,在ROS的作用下,ROS响应链断裂导致纳米粒崩解。

[0031] 纳米粒崩解一方面可以清除损伤环境中过量的ROS,抑制氧化应激。另一方面释放出药物丹参素,作用于小胶质细胞,调节小胶质细胞向M2抗炎表型转化,抑制炎症因子的产生。

[0032] 与现有技术相比,本发明线采用化学方法将水溶性比较强的小分子药物丹参素,制备成具有ROS响应性的两亲性前药,再通过自组装的方法将前药利用DSPE-PEG,DSPE-PEG-SHp和DSPE-PEG-ANG将前药制备成响应性纳米粒,用于脑部疾病的治疗。制备完好的纳米粒不仅能延长丹参素的体内循环时间,还赋予纳米粒靶向能力,使纳米粒能有效地到达损伤部位,定点释放药物。

[0033] 本发明提供的ROS响应型纳米递送药物系统,该系统中包括血脑屏障靶向改性肽DSPE-PEG-ANG帮助整个纳米粒穿越血脑屏障,延长体内循环作用的DSPE-PEG能够提高药物在体内的循环时间,脑损伤区域靶向作用的改性肽DSPE-PEG-SHp能够将整个纳米粒带入脑损伤的部位,以及自制前药OAD具有很好的生物相容性,可以自组装成为纳米粒。本发明所提供的纳米递送药物能有效清除过的ROS,抑制炎症因子产生,降低脑梗死,改善神经功能。

[0034] 本发明构建的TOAD NPs纳米给药体系能够通过逐级靶向和ROS响应有效释放药物,同时达到ROS响应和抗炎协同治疗作用,产生高效的降低脑梗死的效果。该纳米平台的构建为ROS响应性的逐级靶向纳米递送系统为脑部疾病的治疗提供了新的策略。

附图说明

[0035] 图1为DSPE-PEG-SHp和DSPE-PEG-ANG的¹H NMR图谱;其中,(A)为DSPE-PEG-SHp,(B)为DSPE-PEG-ANG;

[0036] 图2为TEM图;其中,(A)为OAD NPs,(B)为TOAD NPs(scale bar=100nm);

[0037] 图3为水和粒径和zeta电位;其中,(A)为OAD NPs和TOAD NPs粒径,(B)为OAD NPs和TOAD NPs电位;

[0038] 图4为TOAD NPs在不同pH条件下药物释放曲线;

[0039] 图5为细胞摄取和脑内皮细胞靶向的结果;其中,(A)为HBMEC的摄取实验,(B)为流式细胞仪检测TOAD NPs对脑内皮细胞靶向结果,(C)为B图的荧光定量结果;

[0040] 图6为细胞于不同制剂孵育后的细胞存活率;

[0041] 图7为TOAD NPs体系清除细胞内ROS的结果;其中,(A)为利用DCFH-DA作为ROS探针检测ROS的荧光显微镜图片,(B)为DCF的荧光强度统计;

[0042] 图8为体内抗脑缺血再灌注损伤评价;其中,(A)为不同制剂治疗7d后对缺血再灌注损伤得保护作用,(B)为不同制剂治疗14d后对缺血再灌注损伤得保护作用,(C)为不同制剂治疗7d后对缺血再灌注损伤得保护作用的量化图,(D)不同制剂治疗14d后对缺血再灌注损伤得保护作用的量化图;注:* $P \leq 0.05$,** $P \leq 0.01$ 。N=4,mean \pm SD;

[0043] 图9为体内不同制剂处理后对脑内炎症的抑制作用;其中,(A)为对M1型小胶质细胞的调节作用,(B)为对M2型小胶质细胞的调节作用,(C)为CD86的荧光强度统计,(D)为CD206的荧光强度统计。

具体实施方式

[0044] 下面结合具体实施例对本发明进行详细说明。以下实施例将有助于本领域的技术人员进一步理解本发明,但不以任何形式限制本发明。应当指出的是,对本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干调整和改进。这些都属于本发明的保护范围。

[0045] 以下实施例所用试剂均可通过市售途径获得。

[0046] 实施例1:ROS响应性前药的制备

[0047] (1) 中间产物OAR的合成

[0048] 称取油酸(200mg, 0.7mmol)溶于DMF中,加入HOBT(143mg, 1.1mmol), EDCI(203mg, 1.1mmol), 室温下反应30min,加入TEA(214.5mg, 2.1mmol), ROS linker(137mg, 0.7mmol)室温下反应24小时,柱层析纯化(石油醚:乙酸乙酯=10:1~1:1v/v),得到化合物OAR,结构由¹H NMR鉴定;¹H NMR(500MHz, CDCl₃) δ0.84-0.88(m, 3H), 1.23-1.35(m, 20H), 1.59-1.62(m, 8H), 1.97-2.05(m, 4H), 2.14-2.17(m, 2H), 2.76-2.87(m, 4H), 2.87(s, 2H), 2.93-2.96(m, 2H), 3.43-3.46(q, J=6.5Hz, 2H), 5.27-5.39(m, 2H), 6.23-6.24(m, 1H)。

[0049] (2) 中间产物OARB的合成

[0050] 称取OAR(20.0g, 43.7mmol)、溴乙酰氯(8.2g, 52.2mmol)和三乙胺(5.3g, 52.4mmol)在THF中进一步反应得到OARB,并将混合物在氮气下室温搅拌6小时,直到反应完成;用二氯甲烷萃取后,用Na₂SO₄干燥有机层,并在真空中冷凝,得到粗产物;使用色谱柱进行进一步纯化(二氯甲烷:甲醇=50:1~20:1, v/v),得到化合物OARB,结构由¹H NMR鉴定;¹H NMR(500MHz, CDCl₃) δ0.87-0.90(m, 3H), 1.29-1.36(m, 20H), 1.62-1.63(m, 8H), 1.97-2.07(m, 4H), 2.17-2.20(m, 2H), 2.76-2.83(m, 4H), 3.45-3.49(m, 2H), 3.50-3.55(m, 2H), 3.90-3.91(m, 2H), 5.30-5.41(m, 2H), 5.95(s, 1H), 7.04(s, 1H)。

[0051] (3) ROS前药OAD的合成

[0052] 将化合物OARB(10g, 40.82mmol)溶于N,N-二甲基甲酰胺中,在磁力搅拌下向溶液中加入丹参素DSS(10g, 45.5mmol),室温下反应24h,直到反应完成;在70℃下通过真空旋转蒸发去除溶剂,并向混合物中加入乙醇以获得粗品;柱层析纯化(二氯甲烷:甲醇=50:1~20:1, v/v)以获得淡黄色油状物,结构由¹H NMR鉴定。¹H NMR(500MHz, CDCl₃) δ0.87-0.90(m, 3H), 1.25-1.36(m, 20H), 1.57(s, 6H), 1.60-1.63(m, 2H), 1.96-2.07(m, 4H), 2.19-2.24(m, 2H), 2.66-2.72(m, 2H), 2.72-2.81(m, 2H), 2.93-2.96(m, 1H), 3.02-3.05(m, 1H), 3.35-3.47(m, 4H), 4.49-4.51(m, 2H), 4.89-4.61(m, 2H), 5.31-5.41(m, 2H), 6.31(s, 2H), 6.61-6.62(m, 1H), 6.80-6.84(m, 2H)。

[0053] 实施例2:靶向ROS响应型纳米药物递送系统的制备

[0054] (1) DSPE-PEG-SHp的制备

[0055] 将马来酰亚胺-PEG-DSP E(Ma1-PEG-DPE, 2000Da的MW, 4mg)和SHp(10mg)分别溶于N,N-二甲基甲酰胺(DMF)和磷酸盐缓冲液(0.2M, pH 7.4)中;在氮的保护下,将SHp溶液加入到Ma1-PEG-DSPE溶液中,SHp肽通过半胱氨酸的硫醇共价偶联到Ma1-PEG-DDPE的马来酰亚胺基团;DSPE-PEG-SHp共聚物用透析袋(3.5kDa的MWCO)对去离子水进行透析;最后,将得到的DSPE-PEG-SHp冷冻干燥并通过¹H NMR进行鉴定(图1A);

[0056] (2) DSPE-PEG-ANG的制备

[0057] 将摩尔比为1:3的DSPE-PEG-Mal和Angiopep-2溶于PBS缓冲液(pH 7.4)中,并在室温下反应12~24h;通过对去离子水透析(MWCO 35kDa)48h来分离产物DSPE-PEG-ANG以除去游离的ANG,然后冷冻干燥并通过¹H-NMR进行鉴定(图1B);

[0058] (3) 靶向纳米递送系统的制备

[0059] 采用薄膜水化法制备TOAD NPs,将OAD、DSPE-PEG2k(西安瑞禧生物科技有限公司)、DSPE-PEG-SHp、DSPE-PEG-ANG按质量比为1:4:1:1溶解在DCM和MeOH中(v:v=3:2),37℃、转速120r/min旋转蒸发溶液以形成薄膜,然后在真空下干燥过夜以除去任何残留的有机溶剂;然后用5mL的ddH₂O在40℃下将形成的膜水合2h以实现完全平衡;然后通过0.22μm滤膜,获得具有ROS响应性的纳米粒TOAD NPs;

[0060] (4) 非靶向纳米递送系统的制备

[0061] 采用薄膜水化法制备OAD NPs,将OAD、DSPE-PEG2k按质量比为1:4溶解在DCM和MeOH中(v:v=3:2),37℃、转速120r/min旋转蒸发溶液以形成薄膜,然后在真空下干燥过夜以除去任何残留的有机溶剂;然后用5mL的ddH₂O在40℃下将形成的膜水合2h以实现完全平衡;然后通过0.22μm滤膜,获得具有ROS响应性的纳米粒OAD NPs。

[0062] 实施例3:纳米粒的理化性质表征

[0063] (1) 透射电子显微镜(TEM)

[0064] 在超碳薄膜上滴加上述制备的OAD NPs以及TOAD NPs溶液,待溶剂挥干后,在2%的磷钨酸中染色5min后挥干,在TEM下观察其形态并采集图像,加速电压为100kV,结果如图2所示。从结果中可以看出,制备的纳米粒分散性较好,OAD NPs粒径在10nm左右(图2A),TOAD NPs粒径在12nm左右(图2B)。

[0065] (2) 粒径和Zeta电位的测定

[0066] 采用DLS分析仪测定OAD NPs以及TOAD NPs溶液的粒径和Zeta电位。将少量样品分散至超纯水中,超声分散均匀后进行测定,测试温度25℃。从图3的结果可以看出纳米粒的平均number为10nm,与图2的透射电镜结果一致。

[0067] 实施例4:载药量的测定及药物体外释放

[0068] (1) 载药量测定

[0069] 采用高效液相色谱(HPLC)分别测定OAD NPs以及TOAD NPs载药量。将制备好的TOAD NPs用甲醇破坏溶解,离心去掉其中的脂质长链。用HPLC对上清液和沉淀进行测定峰面积,计算负载量。HPLC测定条件为:吸收波长为280nm;流动相为甲醇:0.05%冰醋酸水=90:10,流速为1mL/min。测得OAD NPs以及TOAD NPs中OAD的负载量即DSS的负载量。TOAD NPs的载药率3.8%,包封率95.3%。

[0070] (2) 药物释放

[0071] 在PBS、pH6和pH6.2时的条件下测定了TOAD NPs中DSS的释放曲线。即将TOAD NPs分散在PBS、pH6和pH6.2的溶液中,将样品置于透析袋中,37℃条件下在恒温震荡箱中进行释放试验,并分别在0.5、1、2、4、8、12、24、48h和72h取出500μL释放液,同时重新补加500μL相应的溶液。并用HPLC测定释放液中DSS的浓度,最后计算两种药物的累积释放率。

[0072] 结果显示,纳米粒在生理条件下释放量比较少,在低的PH条件下能快速释放,在48h内能完全释放,说明在脑损伤的环境中能够有效释放(图4)。

[0073] 实施例5:细胞摄取和体外血脑屏障靶向

[0074] (1) 细胞摄取

[0075] 用FITC对纳米载体进行荧光标记,以测量OAD NPs和TOAD NPs用于细胞摄取测量。将HBMEC细胞接种在激光共聚焦培养皿中并孵育过夜。将OAD NPs和TOAD NPs (10 μ g/mL) 加入每个孔中并孵育不同的时间(0.5h、1h、2h、4h)。用4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)对细胞核进行染色,在激光共聚焦CLSM下进行可视化拍摄。

[0076] 结果表明,靶向性纳米粒TOAD NPs在2h时已经有部分被细胞摄取,随着时间的增加,细胞摄取的纳米粒逐渐增多,在4h时被完全摄取。而非靶向性纳米粒OAD NPs在与细胞共孵育后,在2h时细胞摄取量较少,4h时有一部分摄取,直到8h时才完全摄取,说明靶向肽的加入能明显增加细胞对纳米粒的摄取(图5A)。

[0077] (2) 体外血脑屏障靶向性

[0078] 利用trans-well法测定TOAD NPs的靶向性根据。将细胞以 2×10^5 个细胞/孔的密度接种在12孔跨孔板(聚酯膜,0.4 μ m,美国康宁)的上部插入物中,并培养一周。跨内皮电阻(TEER)用于测试细胞电阻计(Millicell ERS2,USA),并且TEER超过300ohm \cdot cm²的用于测量。然后,将 2×10^5 cell/well接种在下室中,孵育24h后。然后,将OAD NPs和TOAD NPs溶液加入到上层室中,继续培养24h。使用CytoFLEX检测底部室中SH-SY5Y细胞的荧光强度。

[0079] 结果表明,非靶向性纳米粒OAD NPs和靶向性纳米粒TOAD NPs在与细胞孵育相同时间时,靶向性纳米粒TOAD能快速到达下层小室被神经细胞摄取,这些数据说明了靶向肽能与脑内皮细胞的受体结合,帮助纳米粒穿越血脑屏障(图5B)。

[0080] 实施例6:体外细胞活性实验

[0081] 将SH-SY5Y细胞以 1×10^5 个细胞/孔的密度接种在96孔板中,并孵育过夜。为了建立ROS损伤的细胞模型,将SH-SY5Y细胞与200 μ M的叔丁基过氧化氢(t-BHP)孵育2小时,然后用正常培养基代替。之后分别用OAD和TOAD处理。未经任何处理的受伤SH-SY5Y细胞作为阳性对照,未经任何治疗的未受伤SH-SY5Y细胞用作阴性对照。之后用CCK8检测细胞活性。

[0082] 结果表明,经t-BHP刺激的细胞,细胞活力明显下降,在OAD和TOAD NPs作用后细胞的活力有一定的恢复,且TOAD NPs作用后效果更明显(图6)。

[0083] 实施例7:细胞内ROS清除

[0084] 将SH-SY5Y细胞以 5×10^5 个细胞/孔的密度接种在6孔板中,并孵育过夜。为了建立ROS损伤的细胞模型,将SH-SY5Y细胞与200 μ M的叔丁基过氧化氢(t-BHP)孵育2小时,然后用正常培养基代替。之后分别用OAD和TOAD NPs处理。未经任何处理的受伤SH-SY5Y细胞作为阳性对照,未经任何治疗的未受伤SH-SY5Y细胞用作阴性对照。为了检测ROS清除能力,将每次处理的SH-SY5Y细胞用DCFH-DA(Abcam,Britain)染色20分钟,以使用倒置荧光显微镜(Leica,Germany)进行进一步可视化拍照。

[0085] 结果表明,在t-BHP刺激的细胞,细胞内的ROS荧光明显上升,在OAD作用后细胞内的荧光有所下降,在TOAD NPs作用后细胞内的ROS水平显著下降,说明靶向纳米粒能降低细胞的ROS缓解细胞内的氧化环境(图7)。

[0086] 实施例8:TOAD NPs降低脑梗死**[0087] (1) 大鼠MCAO/R模型的构建**

[0088] 采用缝合闭塞法建立大鼠MCAO/R模型。简言之,雄性SD大鼠通过气动大麻机用异氟烷麻醉。左颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA)分离。然后,将尼龙缝线从

ECA插入ICA,以阻断大脑中8动脉的血液供应。2小时后取出缝合线以允许再灌注。假手术组只分离动脉而不插入缝线。

[0089] (2) 动物分组和给药

[0090] 将MCAO/R模型后的大鼠随机分为4组,模型组、OAD组、OAD NPs组和TOAD NPs组,假手术组作为对照组。大鼠尾静脉注射PBS或OAD组、OAD NPs组和TOAD NPs组(基于ORD 5mg/kg浓度的统一换算)14d。最后一次注射后12小时,分别于第7天、第14天和第21天进行行为测试。然后处死大鼠,取材,脑组织用于后续染色的脑组织。

[0091] TTC结果显示,在MCAO后,大鼠脑袋出现了明显的梗死,在给药7d时,游离的药物并没有显示出治疗效果,非靶向纳米粒有一定的治疗效果,而靶向性纳米粒能显著降低脑梗死,在给药14d后,游离的药物显示出了一定的治疗效果,非靶向性纳米粒也能降低脑梗死,但靶向性纳米效果最显著。说明,纳米粒在一定程度上能增加细胞的摄取,比游离的药物更容易进入脑内。而加入靶向肽之后,在靶向肽的作用下进一步增加了脑内靶向纳米粒的含量,因此,靶向性纳米粒的作用更为明显(图8)。

[0092] 进一步的对脑组织进行免疫荧光染色,发现在MCAO后,脑组织内的炎性胶质细胞(CD86)含量显著升高,抗炎表型小胶质细胞(CD206)几乎不可见。在给药治疗之后,游离药物组,非靶向纳米粒组,靶向纳米粒组均能促进小胶质细胞向抗炎表型转化,其中靶向性纳米粒作用最显著,说明靶向纳米粒能改善细胞的炎性环境(图9)。

[0093] 最后应说明的是:以上各实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述各实施例对本发明进行了详细的说明,但本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分或者全部技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的范围。

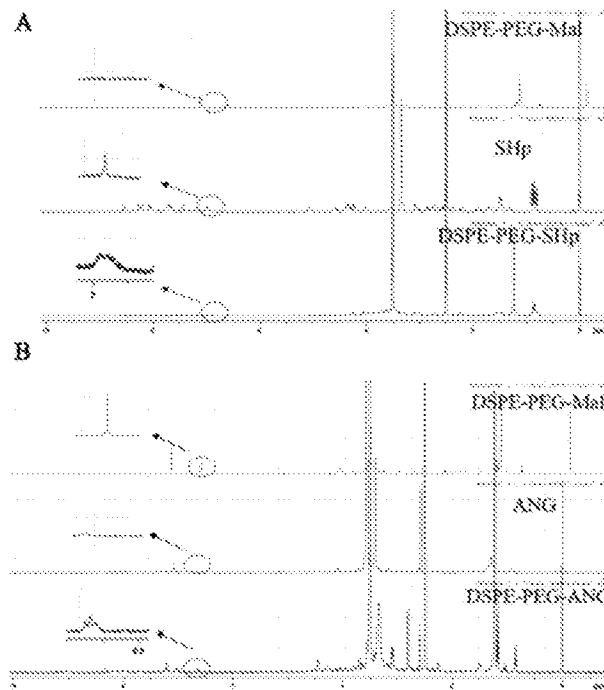


图1

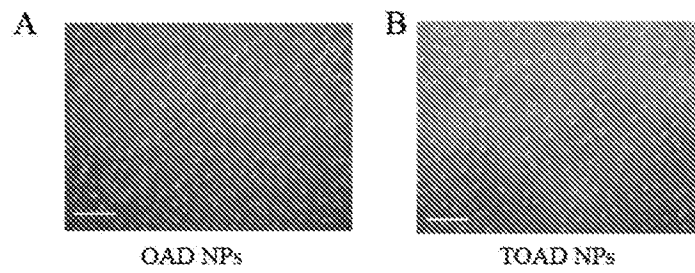


图2

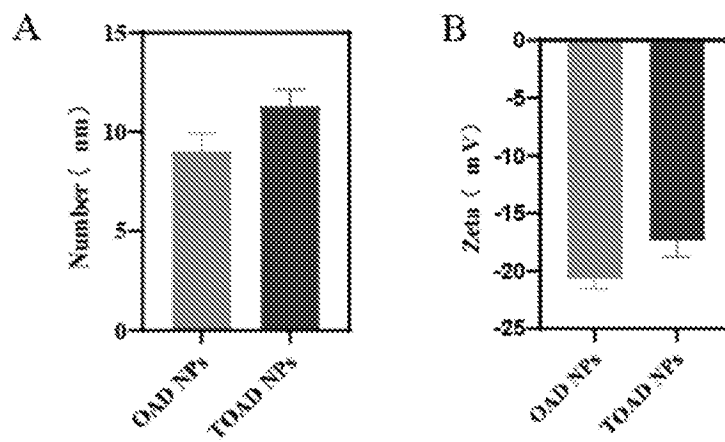


图3

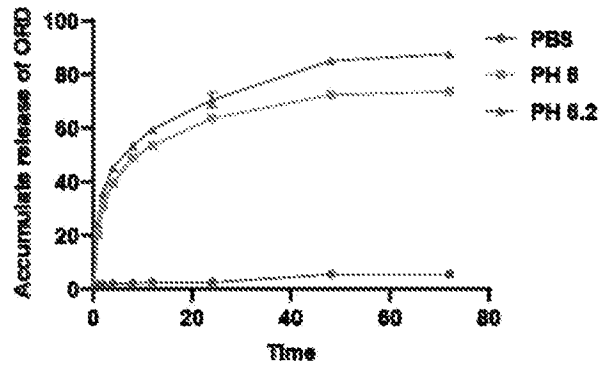


图4

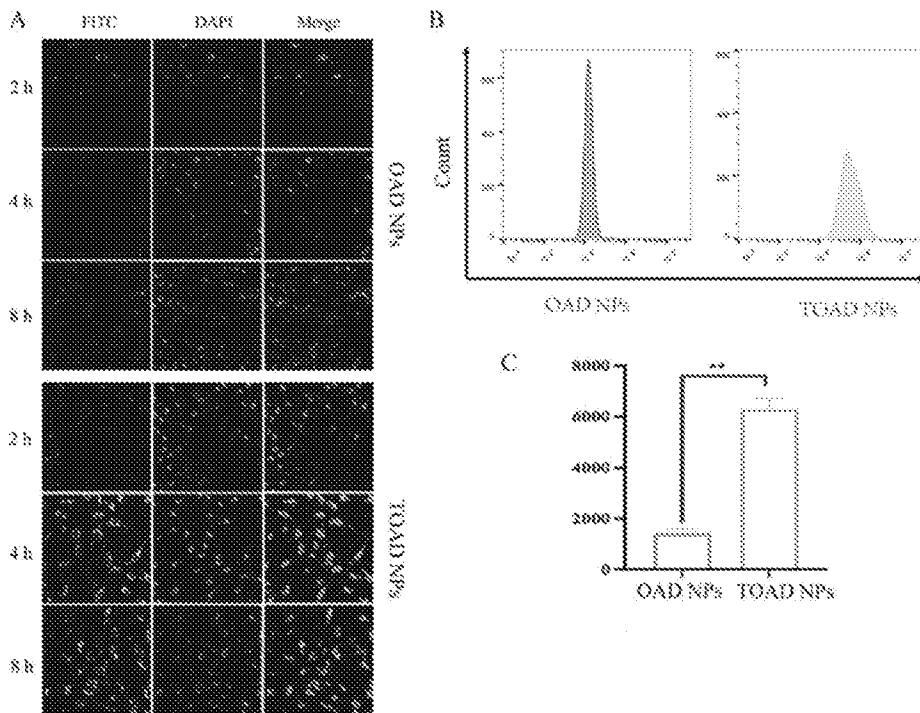


图5

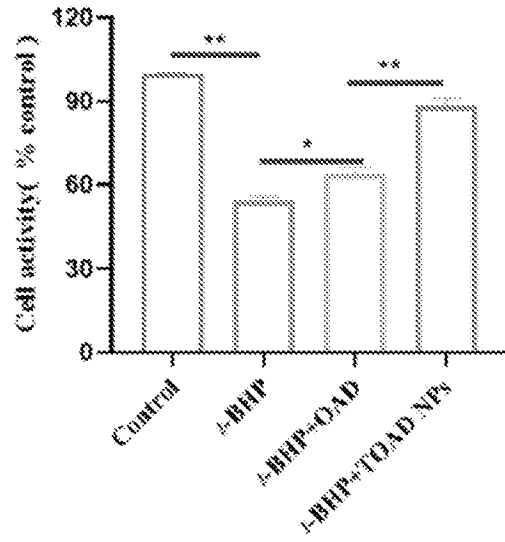


图6

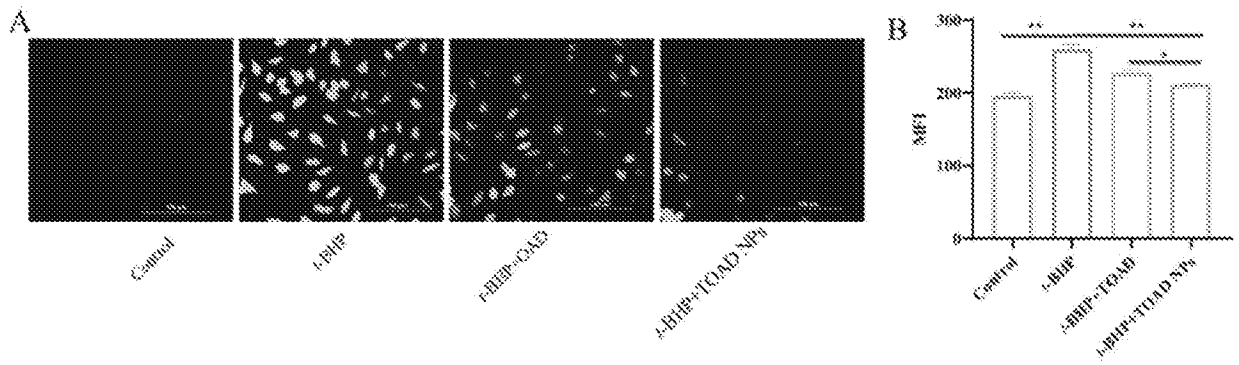


图7

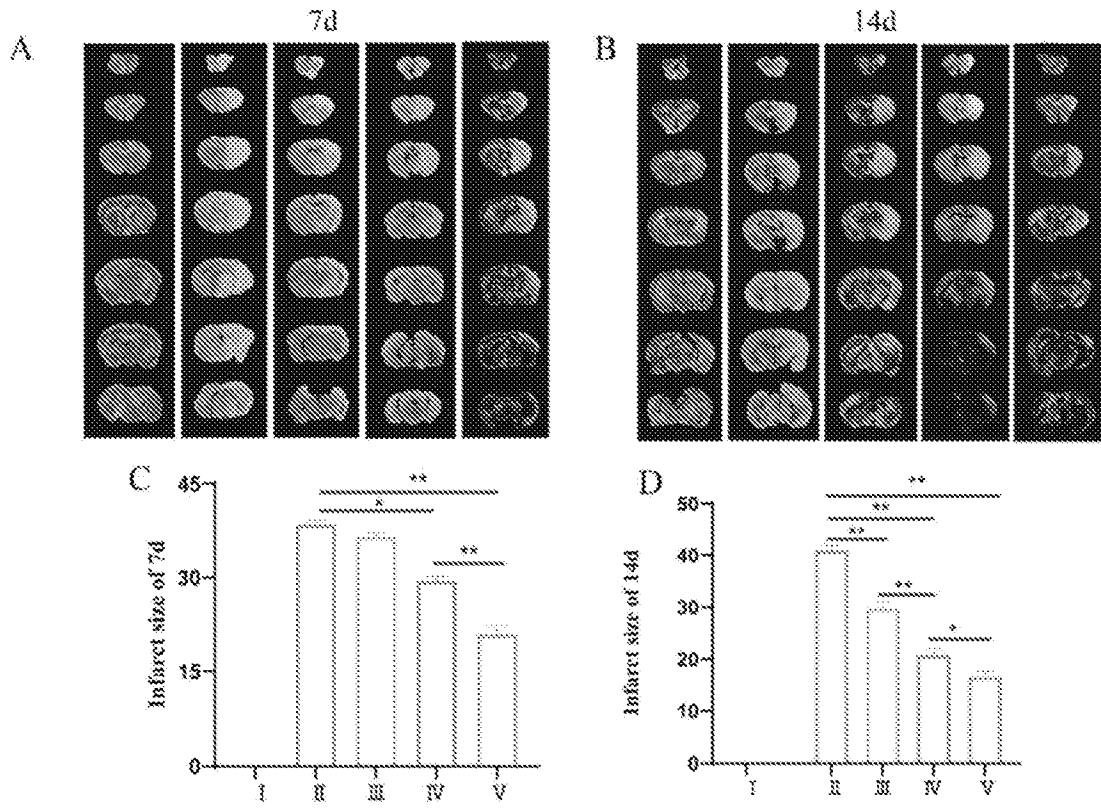


图8

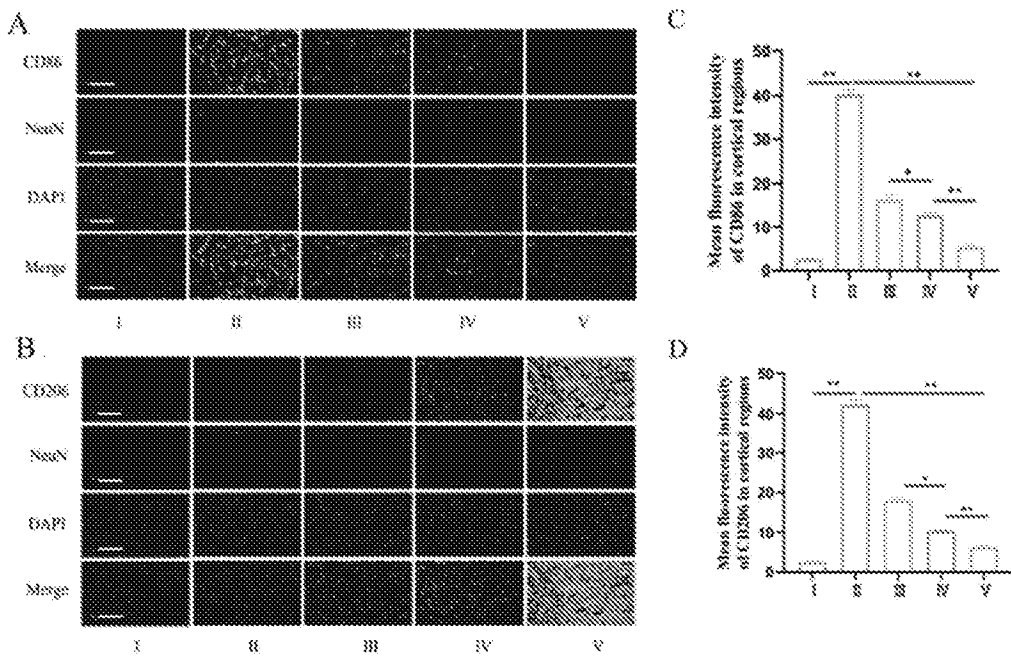


图9