



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112675312 B

(45) 授权公告日 2023.07.25

(21) 申请号 202011643653.3

A61K 47/69 (2017.01)

(22) 申请日 2020.12.30

A61K 45/06 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61K 35/60 (2006.01)

申请公布号 CN 112675312 A

A61K 31/704 (2006.01)

(43) 申请公布日 2021.04.20

A61K 31/4164 (2006.01)

(73) 专利权人 香港理工大学深圳研究院

A61P 25/00 (2006.01)

地址 518057 广东省深圳市南山区粤海街
道高新技术产业园南区粤兴一道18号
香港理工大学产学研大楼205室

A61P 35/00 (2006.01)

(72) 发明人 王奕

A61P 25/16 (2006.01)

(74) 专利代理机构 深圳市君胜知识产权代理事
务所(普通合伙) 44268

A61P 25/08 (2006.01)

专利代理人 刘芙蓉

A61P 37/02 (2006.01)

(51) Int.Cl.

A61P 3/02 (2006.01)

A61K 47/62 (2017.01)

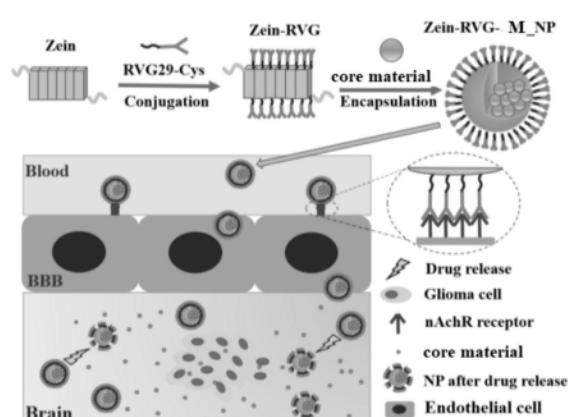
权利要求书1页 说明书7页 附图7页

(54) 发明名称

一种脑靶向纳米递释系统及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开一种脑靶向纳米递释系统及其制备方法,所述纳米递释系统包括内核和包覆所述内核的外壳,所述内核的材料包括药物和营养物质中的一种,所述外壳的材料包括玉米醇溶蛋白和结合于所述玉米醇溶蛋白远离所述内核所在侧的表面的RVG29。本发明提供的纳米递释系统在对大脑具有较好的靶向性的同时可提高药物或营养物质的保存时间,提高了在血液中工作时的稳定性,从而提高了药物和营养物质的作用效果,对于脑疾病和脑发育的生物制药应用有显著的优越性。本发明提供的制备方法工艺简单,制备过程条件温和,有利于广泛使用。



1. 一种脑靶向纳米递释系统,其特征在于,所述纳米递释系统包括内核和包覆所述内核的外壳,所述内核的材料包括药物和营养物质中的一种,所述外壳的材料包括玉米醇溶蛋白和结合于所述玉米醇溶蛋白远离所述内核所在侧的表面的RVG29,所述RVG29的氨基酸序列为YTIWMPENPRPGTPCDIFTNSRGKRASNG;

所述外壳的材料是通过和所述RVG29连接的半胱氨酸中的巯基与所述玉米醇溶蛋白连接的马来酰亚胺基团进行耦合反应得到;

所述脑靶向纳米递释系统呈纳米颗粒状,所述纳米颗粒的粒径为100-300nm;

所述玉米醇溶蛋白与RVG29的质量比为1:1-20:1;

所述药物为抗癌药物、帕金森病药物、癫痫病药物、免疫治疗药物中的一种,所述营养物质为二十二碳六烯酸、二十碳五烯酸、5-氨基酮戊酸、姜黄素、白藜芦醇、槲皮素、花青素、花色苷、维生素、矿物质中的一种;

所述玉米醇溶蛋白与所述内核的材料的质量比为1:1-3:1;

所述的脑靶向纳米递释系统的制备方法,包括步骤:

将玉米醇溶蛋白溶解于溶剂中,并加入第一缓冲液,得到玉米醇溶蛋白溶液;

向所述玉米醇溶蛋白溶液中加入交联剂,进行搅拌、透析,并收集沉淀物;

将RVG29、沉淀物和第二缓冲液混合,进行反应,得到混合液;

将药物的水溶液或营养物质的水溶液与所述混合液混合后,进行透析、冷冻干燥,得到所述纳米递释系统;

所述交联剂为磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯。

2. 一种如权利要求1所述的脑靶向纳米递释系统的制备方法,其特征在于,包括步骤:

将玉米醇溶蛋白溶解于溶剂中,并加入第一缓冲液,得到玉米醇溶蛋白溶液;

向所述玉米醇溶蛋白溶液中加入交联剂,进行搅拌、透析,并收集沉淀物;

将RVG29、沉淀物和第二缓冲液混合,进行反应,得到混合液;

将药物的水溶液或营养物质的水溶液与所述混合液混合后,进行透析、冷冻干燥,得到所述纳米递释系统。

3. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,所述溶剂选自二甲基亚砜、乙醇、异丙醇、丙二醇、醋酸、十二烷基硫酸钠、氢氧化钠中的一种;和/或,

所述第一缓冲液选自磷酸盐缓冲液、醋酸-醋酸钠缓冲液、柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液、柠檬酸-磷酸-氢钠缓冲液中的一种。

4. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,所述玉米醇溶蛋白溶液的pH值为6-8。

5. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,所述搅拌的温度为10-35℃,时间为1-4h;和/或,

所述第二缓冲液为二甲基亚砜-磷酸缓冲盐溶液。

6. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,所述反应的温度为10-35℃,时间为24h。

一种脑靶向纳米递释系统及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医药技术领域,尤其涉及一种脑靶向纳米递释系统及其制备方法。

背景技术

[0002] 血脑屏障由脑血管内皮细胞、周细胞、星形胶质细胞组成,在血液和大脑之间形成坚固的物理屏障,可保护脆弱的大脑免受血液循环中有害物质(包括约98%的药物)的伤害。为了克服血脑屏障,已经发展了多种药物和营养物质递送技术。物理和化学方法可用于破坏血脑屏障,例如:药物的分子结构修饰和设计、利用纳米级载体来保护药物并丰富药物在特定疾病部位的积累、使用识别血脑屏障上过度表达的受体的脑靶向剂对纳米颗粒进行表面修饰,可实现纳米颗粒通过受体介导的胞吞作用进入大脑。然而,药物和营养物质通过血脑屏障进入大脑仍然有很大挑战。

[0003] 因此,现有技术还有待于改进和发展。

发明内容

[0004] 发明人发现,一些病毒,例如人类免疫缺陷病毒(HIV)和狂犬病病毒,表现出强大的靶向中枢神经系统的能力,包括通过血脑屏障进入大脑。源自病毒表面糖蛋白的短肽具有作为脑靶向载体的巨大潜力。狂犬病病毒糖蛋白(RVG)具有与位于血脑屏障中的烟碱型乙酰胆碱受体(nAchR)特异性结合的能力,并且已证实RVG可以增加药物或营养物质被大脑摄取的能力。具有29个氨基酸序列的多肽RVG29衍生自RVG,已被验证具有通过nAchR介导的胞吞作用有效穿越血脑屏障的功能。RVG29的脑靶向能力增强了各种药物和营养物质在缓解和治疗与大脑有关的疾病,例如阿尔茨海默氏病,帕金森氏病和抑郁症的潜力。然而, RVG29作为具有优异的递送效率和最小的细胞毒性的新型细胞递送载体的一个缺点是低代谢抗性,其在血液中容易迅速降解。由于纳米颗粒的亚细胞大小、生物相容性、生物降解性和稳定性,其在生物医学工程领域引起了研究人员的极大兴趣。作为药物载体,纳米颗粒显示出功能剂的高负载效率并增加了在焦点部位的积累和保留。RVG29和纳米颗粒的组合可以实现具有良好稳定性的靶向脑的药物载体。

[0005] 发明人进一步发现,玉米醇溶蛋白(Zein)是一种来自玉米的天然两亲蛋白,在过去的几十年中,玉米醇溶蛋白已被研究为药物和营养载体。来自植物的天然可食用材料具有出色的生物相容性,生物降解性,完全无毒和零副作用,是药物输送载体的绝佳选择。它们属于FDA通常公认的安全(GRAS)类别。它的临床试验比其他药物载体更直接,更快捷,这在药物发现和药物输送领域受到高度赞赏。玉米蛋白,可以自组装成纳米颗粒,能够通过细胞膜和人体屏障(如胎盘和血脑屏障)转移。

[0006] 基于此,本发明的第一方面,提供了一种脑靶向纳米递释系统,其中,所述纳米递释系统包括内核和包覆所述内核的外壳,所述内核的材料包括药物和营养物质中的一种,所述外壳的材料包括玉米醇溶蛋白和结合于所述玉米醇溶蛋白远离所述内核所在侧的表面的RVG29,所述RVG29为狂犬病病毒糖蛋白衍生的一段29个氨基酸序列的多肽,其氨基酸

序列: YTIWMPENPRPGTPCDIFTNSRGKRASNG。

- [0007] 可选地,所述纳米递释系统呈纳米颗粒状,所述纳米颗粒的粒径为100-300nm。
- [0008] 可选地,所述玉米醇溶蛋白与RVG29的质量比为1:1-20:1。
- [0009] 可选地,所述药物为抗癌药物、帕金森病药物、癫痫病药物、免疫治疗药物中的一种,所述营养物质为二十二碳六烯酸(DHA)、二十碳五烯酸(EPA)、5-氨基酮戊酸(ALA)、姜黄素、白藜芦醇、槲皮素、花青素、花色苷、维生素、矿物质中的一种。
- [0010] 本发明的第二方面,提供一种如本发明所述的脑靶向纳米递释系统的制备方法,其中,包括步骤:
 - [0011] 将玉米醇溶蛋白溶解于溶剂中,并加入第一缓冲液,得到玉米醇溶蛋白溶液;
 - [0012] 向所述玉米醇溶蛋白溶液中加入交联剂,进行搅拌、透析,并收集沉淀物;
 - [0013] 将RVG29、沉淀物和第二缓冲液混合,进行反应,得到混合液;
 - [0014] 将药物的水溶液或营养物质的水溶液与所述混合液混合后,进行透析、冷冻干燥,得到所述纳米递释系统。
- [0015] 可选地,所述溶剂选自二甲基亚砜、乙醇、异丙醇、丙二醇、醋酸、十二烷基硫酸钠、氢氧化钠中的一种;和/或,
- [0016] 所述第一缓冲液选自磷酸盐缓冲液、醋酸-醋酸钠缓冲液、柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液、柠檬酸-磷酸一氢钠缓冲液中的一种。
- [0017] 可选地,所述玉米醇溶蛋白溶液的pH值为6-8。
- [0018] 可选地,所述交联剂为碘基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯。
- [0019] 可选地,所述搅拌的温度为10-35℃,时间为1-4h;和/或,
- [0020] 所述第二缓冲液为二甲基亚砜-磷酸缓冲盐溶液。
- [0021] 可选地,所述反应的温度为10-35℃,时间为24h。
- [0022] 有益效果:本发明提供了一种脑靶向纳米递释系统及其制备方法,本发明提供的脑靶向纳米递释系统在对大脑具有较好的靶向性的同时对氧气渗透性低,可有效阻碍药物或营养物质与外界氧气接触,提高药物或营养物质的保存时间,同时保证了在血液中工作时的稳定性,保证纳米递释系统在机体中的释放,提高了药物和营养物质的作用效果,对于脑疾病和脑发育的生物制药应用有显著的优越性。此外,本发明的制备方法工艺简单,制备过程条件温和,有利于广泛使用。

附图说明

- [0023] 图1为本发明实施例提供的一种制备脑靶向纳米递释系统的流程示意图。
- [0024] 图2为本发明实施例2的粒径表征结果图。
- [0025] 图3为本发明实施例3的粒径表征结果图。
- [0026] 图4为本发明实施例3在不同温度下的体外释放测试结果图。
- [0027] 图5为本发明实施例3使用不同缓冲溶液的体外释放测试结果图。
- [0028] 图6为本发明实施例3、对比例1、对比例2体外细胞杀伤力测试结果图。
- [0029] 图7a为Cy5荧光测试结果图。
- [0030] 图7b为本发明实施例3用Cy5荧光标记被体外细胞摄取能力荧光测试结果图。

- [0031] 图7c为本发明对比例2用Cy5荧光标记被体外细胞摄取能力荧光测试结果图。
- [0032] 图7d为Cy5荧光测试结果与对比例3、实施例2用Cy5荧光标记被体外细胞摄取能力荧光测试结果对比图。
- [0033] 图8a为本发明实施例3、对比例2用C-6荧光标记被体外细胞摄取能力共聚焦显微测试结果图。
- [0034] 图8b为本发明实施例3、对比例2用C-6荧光标记被体外细胞摄取能力荧光测试结果图。
- [0035] 图9为实施例3、对比例2的体内动物实验测试结果图。

具体实施方式

[0036] 本发明提供一种脑靶向纳米递释系统及其制备方法,为使本发明的目的、技术方案及效果更加清楚、明确,以下对本发明进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0037] 请结合图1所示,本发明实施例提供一种脑靶向纳米递释系统,其中,所述纳米递释系统包括内核和包覆所述内核的外壳,所述内核的材料包括药物和营养物质中的至少一种,所述外壳的材料包括玉米醇溶蛋白和结合于所述玉米醇溶蛋白远离所述内核所在侧的表面的RVG29,所述RVG29为狂犬病病毒糖蛋白衍生的一段29个氨基酸序列的多肽,其氨基酸序列:YTIWMPENPRPGTPCDIFTNSRGKRASNG。

[0038] 玉米醇溶蛋白是一种疏水大分子,具有良好的生物相容性和可降解性,能够作为药物和营养物质的载体,对药物和营养物质形成包埋。由于所述玉米醇溶蛋白富含含硫氨基酸,蛋白质分子间以较强的二硫键、疏水键相连,能够使得制备得到的纳米递释系统的外壳结构光滑平整,同时对氧气渗透性低,可有效阻碍药物和营养物质与外界氧气接触,提高内核材料药物和营养物质的保存时间,同时也保证在血液中工作时的稳定性,保证纳米递释系统在机体中释放,提高了药物和营养物质的作用效果。

[0039] 靶向血脑屏障乙酰胆碱受体的RVG29提高了纳米递释系统的靶向性,使得药物和营养物质在脑部富集,提高生物利用度,可以针对性的递送在脑部发挥作用的药物和营养物质。

[0040] 因此,本发明实施例提供的脑靶向纳米递释系统,在对大脑具有较好的靶向性的同时对氧气渗透性低,可有效阻碍药物或营养物质与外界氧气接触,提高药物或营养物质的保存时间,同时提高了其在血液中工作时的稳定性,保证纳米递释系统在机体中释放,提高了药物和营养物质的作用效果,对于脑疾病和脑发育的生物制药应用有显著的优越性。

[0041] 在一种实施方式中,所述纳米递释系统由内核和包覆所述内核的外壳组成,所述内核的材料为药物或营养物质,所述外壳的材料为表面修饰有RVG29的玉米醇溶蛋白,所述RVG29修饰于玉米醇溶蛋白远离所述内核所在侧的表面。

[0042] 在一种实施方式中,所述纳米递释系统呈纳米颗粒状,所述纳米颗粒的粒径为100-300nm。纳米尺寸的纳米递释系统保证了其良好的生物相容性、生物降解性和稳定性。

[0043] 在一种实施方式中,内核粒径为50-250nm,外壳厚度为1-100nm。

[0044] 在一种实施方式中,所述玉米醇溶蛋白与RVG29的质量比为1:1-20:1。

[0045] 在一种实施方式中,所述药物为抗癌药物、帕金森病药物、癫痫病药物、免疫治疗

药物等中的一种,但不限于此。

[0046] 在一种实施方式中,所述抗癌药物为多柔比星、紫杉醇、培美曲塞二钠、来那度胺、门冬酰胺酶、白消安、奥沙利铂、卡铂、奈达铂、顺铂、PD-1、PD-L1、舒尼替尼等中的一种,但不限于此。

[0047] 在一种实施方式中,所述营养物质为DHA、EPA、ALA、姜黄素、白藜芦醇、槲皮素、花青素、花色苷、维生素、矿物质等中的一种,但不限于此。

[0048] 请结合图1所示,本发明实施例还提供了一种如上所述的脑靶向纳米递释系统的制备方法,其中,包括步骤:

[0049] S1、将玉米醇溶蛋白溶解于溶剂中,并加入第一缓冲液,得到玉米醇溶蛋白溶液;

[0050] S2、向所述玉米醇溶蛋白溶液中加入交联剂,进行搅拌、透析,并收集沉淀物;

[0051] S3、将RVG29、沉淀物和第二缓冲溶液混合,进行反应,得到混合液;

[0052] S4、将药物的水溶液或营养物质的水溶液与所述混合液混合后,进行透析、冷冻干燥,得到所述纳米递释系统。

[0053] 在一种实施方式中,步骤S1具体包括:将所述玉米醇溶蛋白溶解于溶剂中,进行涡旋处理,然后加入第一缓冲液,得到玉米醇溶蛋白溶液。其中加入第一缓冲液,目的是调节溶液的pH。在一种实施方式中,加入第一缓冲液,调节所述玉米醇溶蛋白溶液的pH值为6-8。

[0054] 在一种实施方式中,所述第一缓冲液可以选自磷酸盐缓冲液、醋酸-醋酸钠缓冲液、柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液、柠檬酸-磷酸一氢钠缓冲液等中的一种或多种。

[0055] 在一种实施方式中,所述溶剂可以选自二甲基亚砜、乙醇、异丙醇、丙二醇、醋酸等酸性溶剂中的一种或多种,也可以选自十二烷基硫酸钠、氢氧化钠等碱性溶剂中的一种或多种。

[0056] 步骤S2中,在一种实施方式中,所述交联剂为磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯。其中交联剂的磺基琥珀酰亚胺基与玉米醇溶蛋白的羧基相连接,得到含有马来酰亚胺基团的玉米醇溶蛋白。

[0057] 在一种实施方式中,所述搅拌的温度为10-35℃,时间为1-4h。

[0058] 步骤S3中,所述RVG29多肽的一端为Cys(半胱氨酸),Cys中的巯基与所述玉米醇溶蛋白中的马来酰亚胺基团进行耦合反应,得到表面修饰有RVG29的玉米醇溶蛋白。

[0059] 在一种实施方式中,所述第二缓冲液为二甲基亚砜-磷酸缓冲盐溶液。加入所述第二缓冲液,直至所述混合液的pH值为6-8。

[0060] 在一种实施方式中,所述反应的温度为10-35℃,时间为24h。

[0061] 步骤S4中,在一种实施方式中,所述将药物的水溶液或营养物质的水溶液与所述混合液混合的步骤中,将药物的水溶液或营养物质的水溶液在1-2分钟内加入到混合液中。

[0062] 在一种实施方式中,在室温下在磷酸缓冲盐溶液中进行透析48小时。

[0063] 本发明实施例首先制备含有马来酰亚胺基团的玉米醇溶蛋白,然后利用RVG29-Cys中的巯基与玉米醇溶蛋白中的马来酰亚胺基团进行耦合反应,通过两步反应制备得到表面修饰有RVG29的玉米醇溶蛋白。然后将药物或者营养物质的水溶液与表面修饰有RVG29的玉米醇溶蛋白结合,得到核壳结构的脑靶向纳米递释系统。本发明实施例中的表面修饰有RVG29的玉米醇溶蛋白作为外壳材料在具有脑靶向性的同时,能够对内核中的药物或营养物质进行保护,提高了药物和营养物质的作用效果。本发明实施例的制备方法工艺

简单,制备过程条件温和,有利于广泛使用。

[0064] 下面通过具体的实施例对本发明作进一步地说明。

[0065] 实施例1

[0066] 以鱼油为内核材料,制备脑靶向纳米鱼油递释系统,提供脑发育的营养物质,以促进胎儿和婴幼儿的脑发育和认知能力的发展。具体制备方法如下:

[0067] 将玉米醇溶蛋白用二甲基亚砜溶解,涡旋30分钟,然后用磷酸缓冲盐溶液调节混合物pH为7.5。将磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯加入到上述混合物,室温下搅拌2小时。然后进行透析,收集沉淀。将RVG29-Cys和上述沉淀在二甲基亚砜-磷酸缓冲盐溶液 (pH 7.4) 中混合,在室温下反应24小时。然后将鱼油在2分钟内加入到上述反应后的混合物中混合均匀,室温下在磷酸缓冲盐溶液中透析48小时后冷冻干燥,得到脑靶向纳米鱼油递释系统。

[0068] 其中,玉米醇溶蛋白和鱼油的质量比分别为1:1、2:1和3:1。对不同比例的脑靶向纳米鱼油递释系统进行表征,结果如下表1所示:

[0069] 表1、表征结果

样品	R _{Z/F}	颗粒尺寸 (nm)	分布系数	Zeta电位 (mV)	包埋率	装载量 (mg/g)
[0070]	1	1:1	149.3 ± 3.35	0.21 ± 0.02	-44.33 ± 0.74	67.5% 183.7
	2	2:1	158.6 ± 1.76	0.24 ± 0.01	-42.47 ± 0.50	94.3% 135.8
	3	3:1	198.7 ± 2.91	0.23 ± 0.04	-41.95 ± 0.45	98.8% 98.9

[0071] 实施例2

[0072] 以抗癌药物多柔比星为内核材料,制备脑靶向纳米多柔比星递释系统,提供对脑瘤的治疗方法,增加多柔比星的药效。具体制备方法如下:

[0073] 将玉米醇溶蛋白用二甲基亚砜溶解,涡旋30分钟,然后用磷酸缓冲盐溶液调节混合物pH为7.5。将磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯加入到上述混合物,室温下搅拌2小时。然后进行透析,收集沉淀。将RVG29-Cys和上述沉淀在二甲基亚砜-磷酸缓冲盐溶液 (pH 7.4) 中混合,在室温下反应24小时。然后将多柔比星在水中溶解并在2分钟内将其加入上述混合物中混合均匀,室温下在磷酸缓冲盐溶液中透析48小时后冷冻干燥,得到脑靶向纳米多柔比星递释系统。

[0074] 对所述脑靶向纳米多柔比星递释系统进行表征,颗粒平均尺寸为237.3±0.4nm,分布系数为0.163±0.015,Zeta电位为-18.86±0.5mV,颗粒尺寸分布如图2。

[0075] 实施例3

[0076] 以抗脑肿瘤药物Dactolisib(N-乙基咪唑)为内核材料,制备脑靶向纳米Dactolisib递释系统,提供对脑瘤的治疗方法,增加Dactolisib的药效。具体制备方法如下:

[0077] 将玉米醇溶蛋白用二甲基亚砜溶解,涡旋30分钟,然后用磷酸缓冲盐溶液调节混合物pH为7.5。将磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯加入到上述混合物,室温下搅拌2小时。然后进行透析,收集沉淀。将RVG29-Cys和上述沉淀在二甲基亚砜-磷酸缓冲盐溶液 (pH 7.4) 中混合,在室温下反应24小时。然后将Dactolisib在水溶中

溶解并在1~2分钟内将其加入到上述混合物中混合均匀,室温下在磷酸缓冲盐溶液中透析48小时后冷冻干燥,得到脑靶向纳米Dactolisib递释系统。

[0078] 对脑靶向纳米Dactolisib递释系统进行表征,颗粒平均尺寸为 $251.9 \pm 0.5\text{nm}$,分布系数为 0.127 ± 0.036 ,Zeta电位为 -12.85 ± 0.4 ,颗粒尺寸分布如图3所示。

[0079] 对脑靶向纳米Dactolisib递释系统进行体外释放测试,分别在4℃和37℃检测脑靶向纳米Dactolisib递释系统在10%血清-磷酸缓冲盐溶液环境中的尺寸变化。所得结果如图4所示。

[0080] 对脑靶向纳米Dactolisib递释系统进行体外释放测试,分别使用pH为7.4的磷酸缓冲盐溶液、pH为7.4的血清-磷酸缓冲盐溶液、pH为6.0的血清-磷酸缓冲盐溶液。所得结果如图5所示。

[0081] 对比例1

[0082] 无内核脑靶向纳米递送系统的制备,具体制备方法如下:

[0083] 将玉米醇溶蛋白用二甲基亚砜溶解,涡旋30分钟,然后用磷酸缓冲盐溶液调节混合物pH为7.5。将碘基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯加入到上述混合物,室温下搅拌2小时。然后进行透析,收集沉淀。将RVG29-Cys和上述沉淀在二甲基亚砜-磷酸缓冲盐溶液(pH 7.4)中混合,在室温下反应24小时。然后将纯水在1~2分钟内加入到上述混合物中混合均匀,室温下在磷酸缓冲盐溶液中透析48小时后冷冻干燥,得到无内核脑靶向纳米递送系统。

[0084] 对比例2

[0085] 纳米Dactolisib颗粒的制备,具体制备方法如下:

[0086] 将玉米醇溶蛋白用二甲基亚砜溶解,涡旋30分钟,将Dactolisib溶解在水中并在1~2分钟内将其加入到上述混合物中混合均匀。然后在室温下磷酸缓冲盐溶液中透析48小时后冷冻干燥得到所述纳米Dactolisib颗粒。

[0087] 对实施例3和对比例1、2进行体外细胞实验。

[0088] 在细胞增殖实验中,将实施例3中的脑靶向纳米Dactolisib递释系统、对比例1中的无内核脑靶向纳米递送系统、对比例2中的纳米Dactolisib颗粒分为三组进行实验,其中,将实施例3中的脑靶向纳米Dactolisib递释系统中的Dactolisib与对比例2中的纳米Dactolisib颗粒中的Dactolisib的摩尔质量相等。

[0089] 所得结果如图6所示,可见实施例3中的脑靶向纳米Dactolisib递释系统与对比例2中的纳米Dactolisib颗粒对细胞的杀伤力相当。对比例1中不含内核的脑靶向纳米递送系统对细胞基本没有杀伤力,说明所述脑靶向纳米递送系统的外核是安全的。

[0090] 对实施例3中的脑靶向纳米Dactolisib递释系统和对比例2中的纳米Dactolisib颗粒进行Cy5荧光标记,并与U87胶质母细胞瘤细胞系共同孵育1小时,使用流式细胞术检测细胞对颗粒的摄取情况,并对细胞摄取颗粒的荧光强度进行定量,结果如图7a-图7d所示。可见RVG修饰增强了细胞对纳米颗粒的摄取。

[0091] 对实施例3中的脑靶向纳米Dactolisib递释系统和对比例2中的纳米Dactolisib颗粒进行C-6荧光标记,并与分别U87胶质母细胞瘤细胞系共同孵育0.5小时和1小时。用共聚焦显微镜拍摄细胞摄取颗粒的分布情况,并对细胞摄取颗粒的荧光强度进行定量,结果如图8a和图8b所示。可见RVG修饰增强了细胞对纳米颗粒的摄取。

[0092] 对所述实施例3、对比例2进行体内动物实验。

[0093] 提供原位脑胶质瘤鼠,从第十天开始,每五天进行尾静脉注射给药。分组为对照组(磷酸盐缓冲液)、Dac组(Dactolisib)、zein-Dac组(纳米Dactolisib颗粒,对比例2)和zein-RVG-Dac组(脑靶向纳米Dactolisib递释系统,实施例3)。每五天检测肿瘤大小,结果如图9所示。可见对药物的包埋以及修饰可以改善Dactolisib在体内的效果,减缓甚至抑制脑胶质瘤的增长,增加其对脑胶质瘤的治疗效果,增加脑胶质瘤小鼠的生存时间。

[0094] 综上所述,本发明提供了一种脑靶向纳米递释系统及其制备方法,本发明提供的脑靶向纳米递释系统为核壳结构的纳米颗粒,内核为药物或营养物质,外壳为递送载体,在对大脑具有较好的靶向性的同时对氧气渗透性低,可有效阻碍药物与外界氧气接触,提高药物或营养物质的保存时间,保证纳米递释系统在机体中释放,提高了药物和营养物质的作用效果,对于脑疾病和脑发育的生物制药应用有显著的优越性。此外,本发明的制备方法工艺简单,制备过程条件温和,有利于广泛使用。

[0095] 应当理解的是,本发明的应用不限于上述的举例,对本领域普通技术人员来说,可以根据上述说明加以改进或变换,所有这些改进和变换都应属于本发明所附权利要求的保护范围。

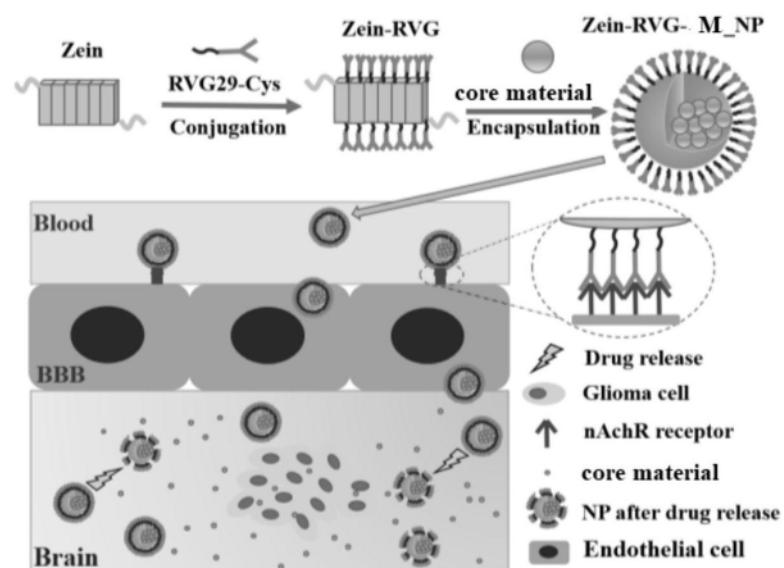


图1

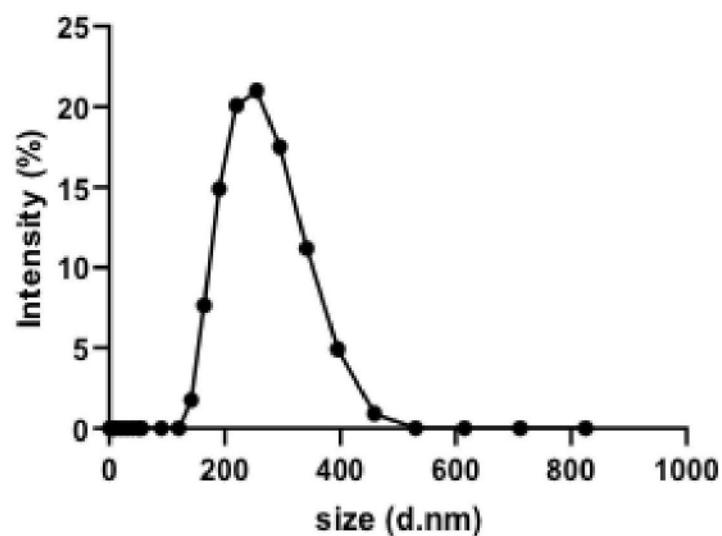


图2

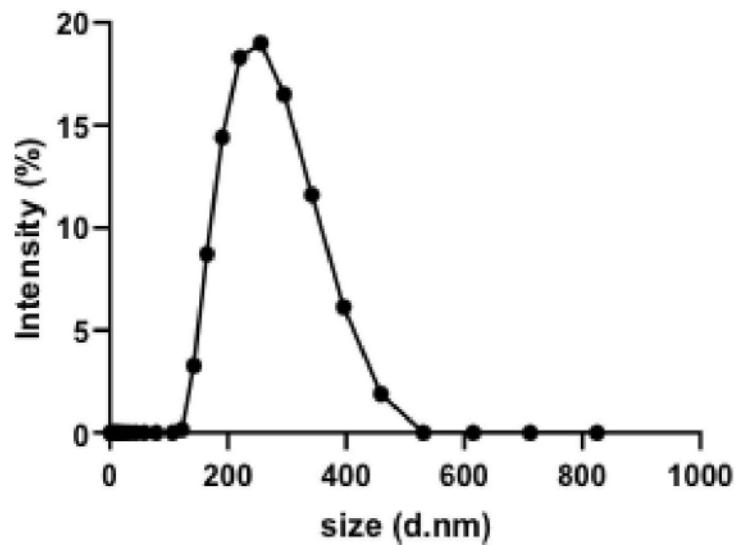


图3

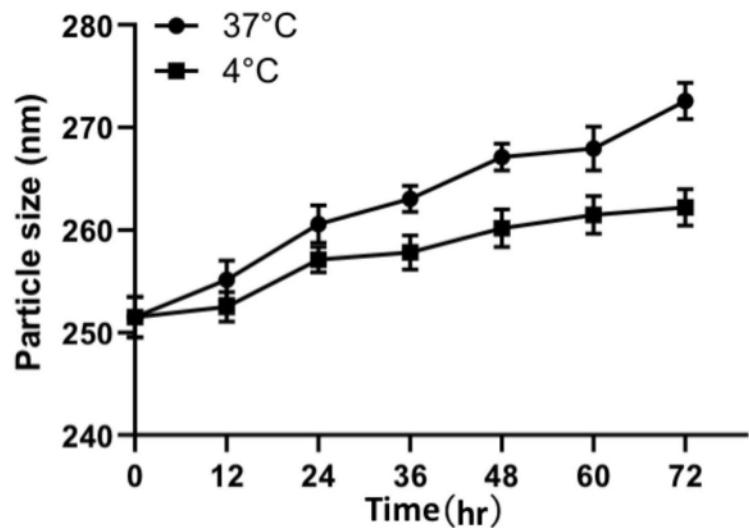


图4

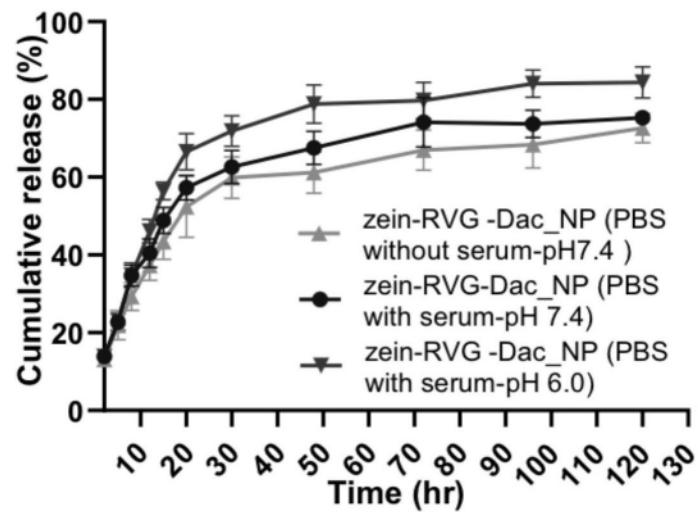


图5

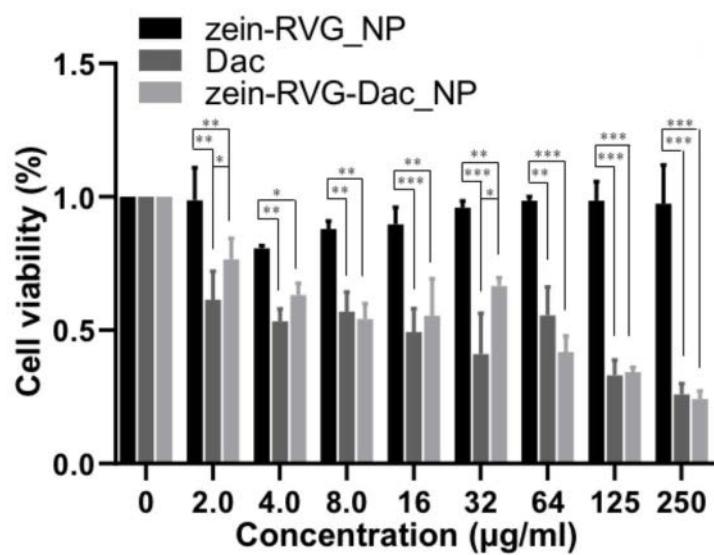
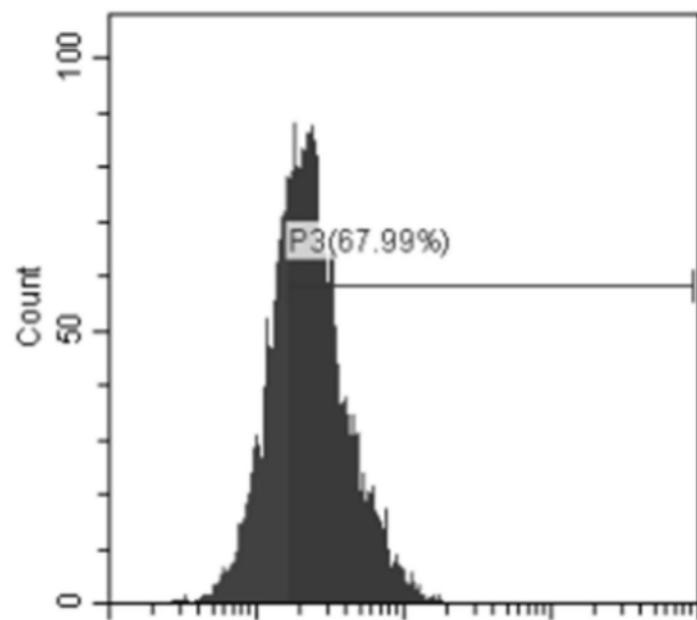
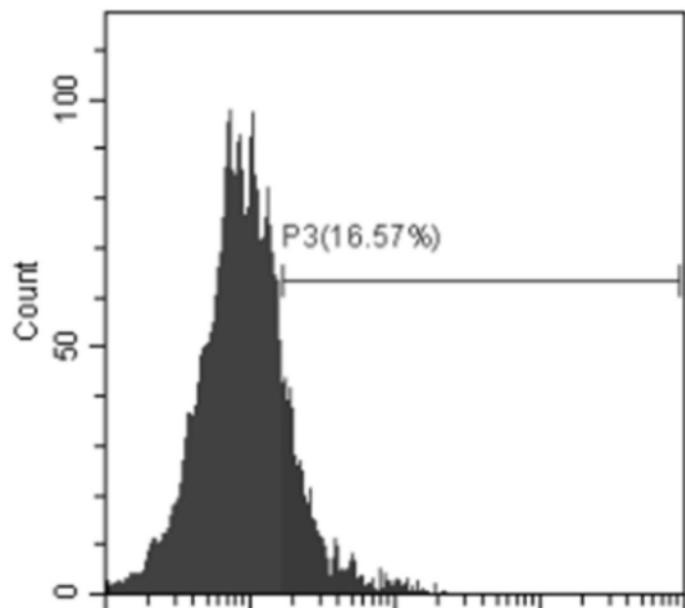


图6



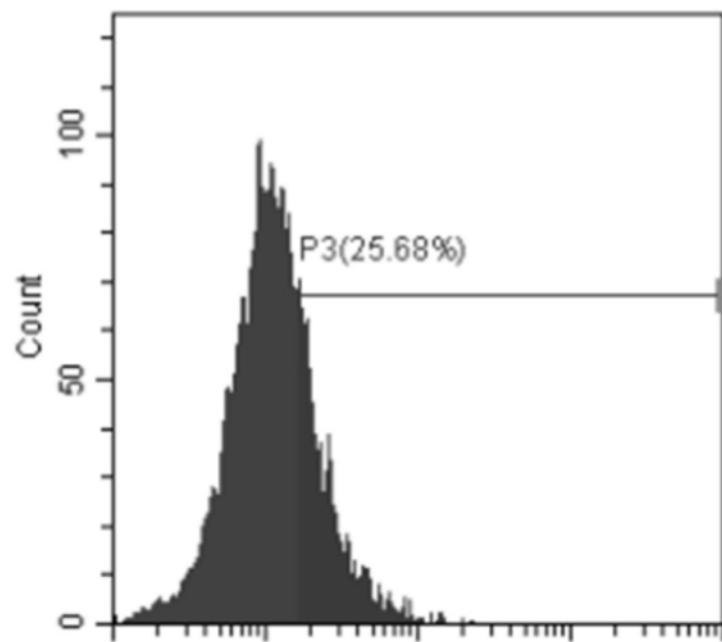
Cy5

图7a



zein-Dac-Cy5

图7b



zein-RVG-Dac-Cy5

图7c

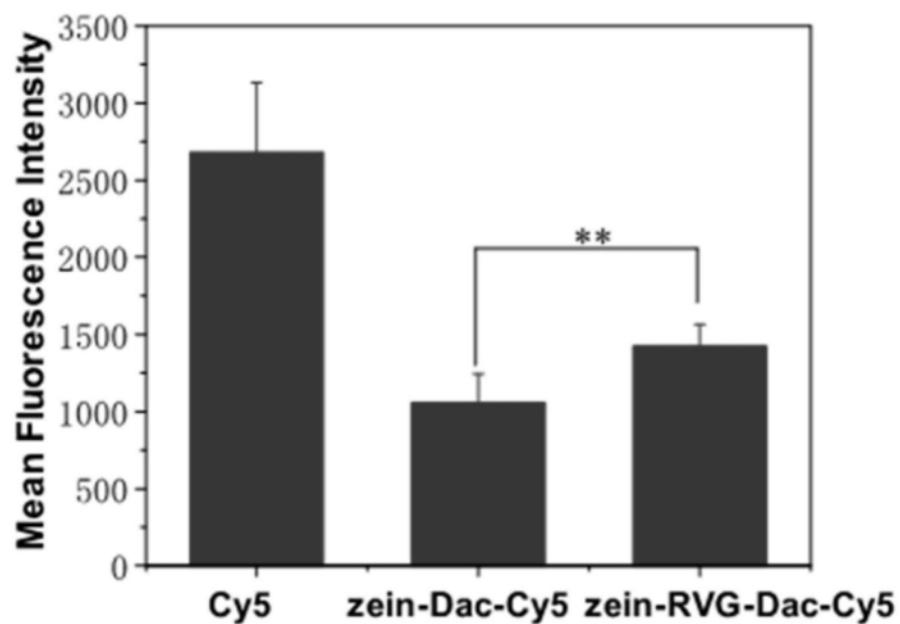


图7d

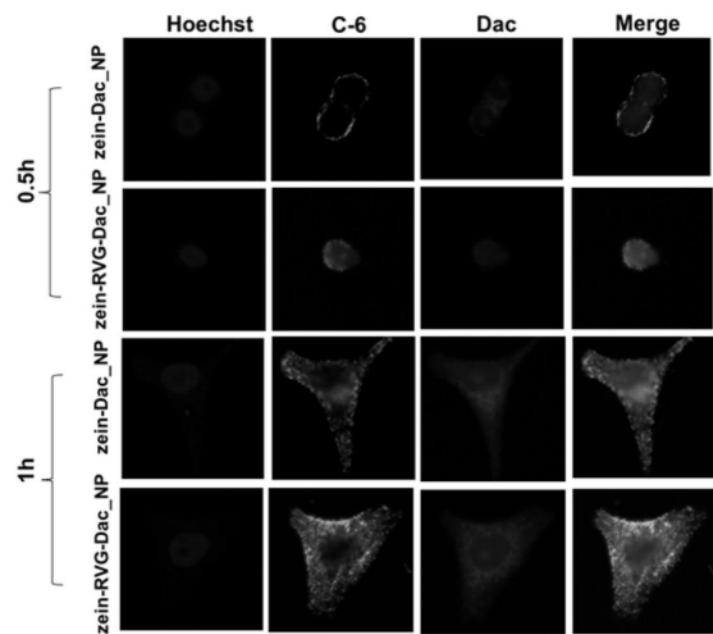


图8a

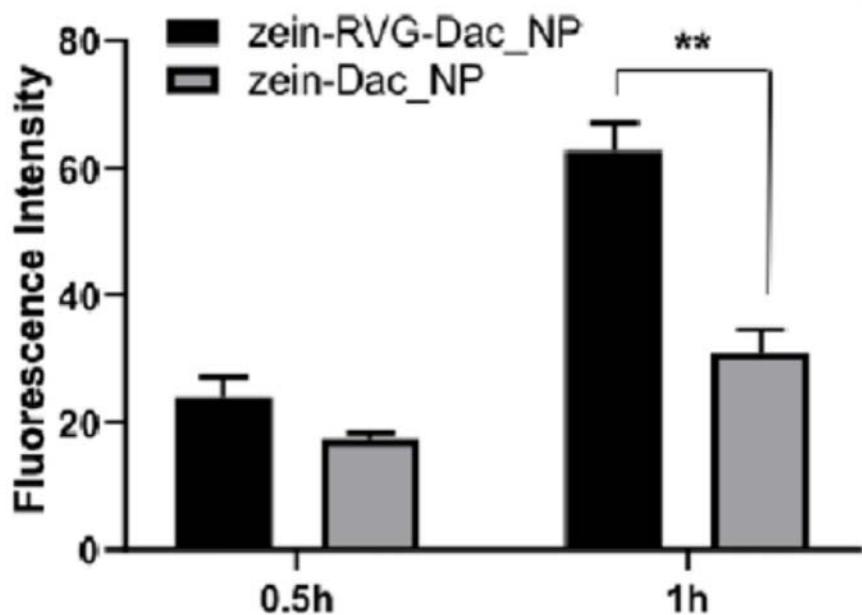


图8b

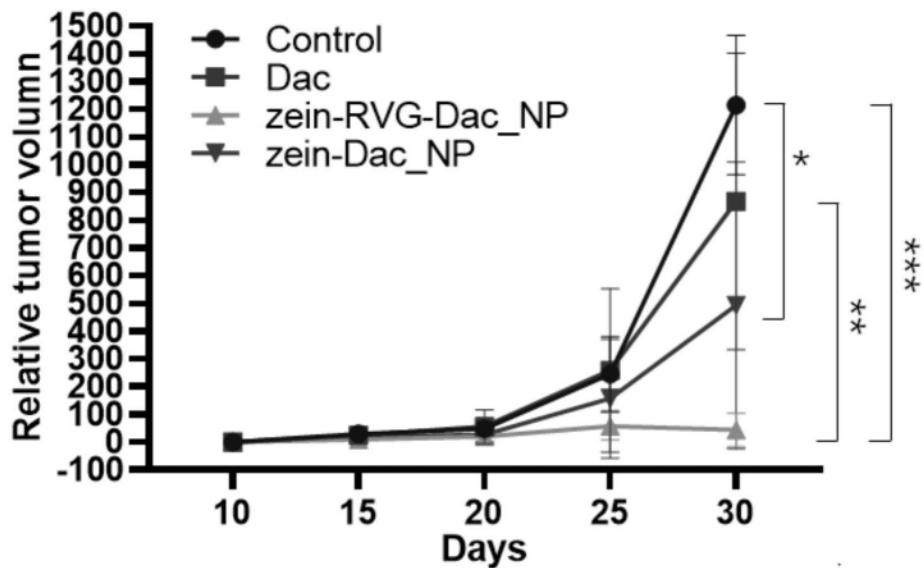


图9