



SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,  
US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

- (84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则4.17的声明:

- 发明人资格(细则4.17(iv))

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

---

(57) 摘要: 一种药学领域可特异性吸附血浆中载脂蛋白, 且能介导药物跨血脑屏障的多肽修饰的复合物和靶向递送系统及其在制备诊断与治疗脑肿瘤及其它脑部疾病的制剂中的应用。所述的淀粉样蛋白 $\beta$ (amyloid, 涉及一种)的多肽片段(SP)经共价键修饰荧光探针、药物分子和脂质体递药系统, 经试验显示, 所修饰的递送系统在与血浆蛋白作用形成蛋白冠后, 增加其被血管内皮细胞的摄取; 所修饰的脂质体递送系统更有效的将药物递送至病灶部位, 显著提高药物治疗效果。所述的SP吸附血浆蛋白后, 可介导药物跨血脑屏障和/或靶向肿瘤新生血管和肿瘤细胞, 其修饰的药物和递送系统在治疗脑肿瘤及脑内其它疾病时获得更好的治疗效果。

# 一种淀粉样蛋白 $\beta$ 短肽介导的脑靶向递送系统及其制备方法和用途

## 5 相关申请的交叉引用

本申请要求 2018 年 06 月 19 日提交的第 CN201810626652.4 号中国发明专利申请的优先权，所述申请以引用的方式整体并入本文。

## 技术领域

10 本发明属药学领域，涉及一种淀粉样蛋白  $\beta$  短肽（SP）介导的脑靶向递送系统，尤其涉及一种可特异性吸附血浆中载脂蛋白，且能介导药物跨血脑屏障的多肽修饰的复合物和靶向递送系统及其在制备诊断与治疗脑肿瘤（含脑转移瘤和原发性脑肿瘤）及其它脑部疾病的制剂中的应用。

## 15 背景技术

现有技术公开了中枢神经系统疾病已成为严重危害人类健康的疾患，但相关新药的研发进展仍十分缓慢，其主要原因之一是所述药物中的绝大部分药物分子难以透过血—脑屏障，而设计可跨血—脑屏障的药物或递药系统乃是目前药物研发领域的重点和难点之一。研究公开了脑靶向递药系统主要利用受体介导方式跨越血脑屏障入脑，但目前的  
20 有关药物设计多为侧重于脑靶向分子与血脑屏障上相关受体的结合效率，常忽略了递药系统体内传输过程中体液成分的影响，如：结合血浆蛋白形成蛋白冠可极大影响递药系统的靶向性和体内循环时间等，因此，导致体外设计的脑靶向递药系统在体内应用中靶向效率欠佳。如何从全新的角度设计脑靶向递药系统，精准调控其在体内传输过程中与相关蛋白或细胞的相互作用，包括：血浆蛋白吸附和解离、其他细胞吞噬作用、蛋白降  
25 解、免疫反应等，发挥更有效的靶向功能，是当前业内研究的热点。

基于现有技术的现状，本申请的发明人拟提供一种淀粉样蛋白  $\beta$  短肽（下文简称为 SP）介导的脑靶向递送系统，尤其涉及一种可特异性吸附血浆中载脂蛋白，且能介导药物跨血脑屏障的多肽修饰的复合物和靶向递送系统及其在制备诊断与治疗脑肿瘤（含脑转移瘤和原发性脑肿瘤）及其它脑部疾病的制剂中的应用。该多肽修饰的靶向递送系统  
30 将通过调控纳米药物在血浆中形成蛋白冠的组分和生物活性，克服传统靶向纳米药物的缺陷，构建可跨血脑屏障，同时靶向血管内皮细胞、肿瘤细胞的 SP-药物复合物和 SP 修饰的纳米递药系统，实现脑肿瘤的靶向诊断和治疗及其他脑部疾病的药物递送。

## 发明内容

35 本发明的目的在于，针对现有技术存在的缺陷，提供一种淀粉样蛋白  $\beta$  短肽（SP）

介导的脑靶向递送系统，尤其涉及一种可特异性吸附血浆中载脂蛋白，且能介导药物跨血脑屏障的多肽修饰的复合物和靶向递送系统及其在制备诊断与治疗外周肿瘤、脑肿瘤及其它脑部疾病的制剂中的应用。该多肽修饰的靶向递送系统将通过调控纳米药物在血浆中形成蛋白冠的组分和生物活性，克服传统靶向纳米药物的缺陷，构建可跨血脑屏障，  
5 同时靶向血管内皮细胞、肿瘤细胞的 SP-药物复合物和 SP 修饰的纳米递药系统，实现脑肿瘤（含脑转移瘤和原发性脑肿瘤）的靶向诊断和治疗及其他脑部疾病的药物递送。

在阐述本发明内容之前，定义本文中所使用的术语如下：

术语“SP”是指：淀粉样蛋白  $\beta$  短肽。

10 术语“PLA”是指：聚乳酸。

术语“PLGA”是指：乳酸羟基乙酸共聚物。

术语“PCL”是指：聚己内酯。

本发明 SP 多肽的序列（从 N 到 C 端）为  $\text{NH}_2\text{-GSNKGAIIGLM-CONH}_2$ 。

本发明的第一方面提供了淀粉样蛋白  $\beta$  短肽在制备用于介导药物分子、荧光探针或  
15 递送系统靶向脑肿瘤和/或脑部其它疾病病灶的制剂中的应用，其中所述的淀粉样蛋白  $\beta$  短肽为特异性吸附血浆中载脂蛋白的淀粉样蛋白  $\beta$  短肽；优选地，所述脑肿瘤为脑转移瘤和/或原发性脑肿瘤。

根据本发明第一方面的用途，其中，所述的淀粉样蛋白  $\beta$  短肽以共价键与影像物质 X 连接制得 SP-X，用于脑肿瘤及脑内其它疾病病灶的示踪；

20 优选地，所述的 SP-X 中，X 是荧光分子 Fluorescein 或近红外染料分子 Cy5、Cy5.5、Cy7、IR820、ICG、DiR、DiD、DiI；

更优选地，所述脑肿瘤为脑转移瘤和/或原发性脑肿瘤。

根据本发明第一方面的用途，其中，按所述的淀粉样蛋白  $\beta$  短肽以共价键与抗肿瘤药物 Y 连接制得 SP-Y，用于脑肿瘤及脑内其它疾病病灶的靶向干预；

25 优选地，所述的 SP-Y 中，Y 是吉非替尼、埃克替尼、安罗替尼、克唑替尼、厄洛替尼、奥希替尼、阿雷替尼、紫杉醇、多西他赛、卡巴他赛、阿霉素、表阿霉素、喜树碱、羟基喜树碱、9-硝基喜树碱或长春新碱小分子抗肿瘤药物；和/或

所述的 SP-Y 中，Y 是 p53 激活肽或多肽毒素多肽抗肿瘤药物；

更优选地，所述脑肿瘤为脑转移瘤和/或原发性脑肿瘤。

30 根据本发明第一方面的用途，其中，所述的淀粉样蛋白  $\beta$  短肽用共价键与聚乙二醇

-Z 连接制得的 SP-聚乙二醇-Z，用于制备纳米递送系统；

优选地，所述的 SP-聚乙二醇-Z 中，Z 是磷脂、聚乳酸、乳酸羟基乙酸共聚物或聚己内酯；和/或

5 优选地，所述的纳米递送系统选自以下一种或多种：脂质体递送系统、胶束递送系统、纳米圆盘递送系统和和聚合物纳米粒递送系统；

更优选地，所述的 SP-聚乙二醇-磷脂用于制备脂质体递送系统、胶束递送系统或纳米圆盘递送系统；和/或所述的 SP-聚乙二醇-聚乳酸、SP-聚乙二醇-乳酸羟基乙酸共聚物、SP-聚乙二醇-聚己内酯，用于制备胶束递送系统和聚合物纳米粒递送系统；

10 进一步优选地，所述的脂质体递送系统、胶束递送系统、纳米圆盘递送系统或聚合物纳米粒递送系统，用于包载诊断分子，进行脑肿瘤（含脑转移瘤和原发性脑肿瘤）或脑部其它疾病病灶的示踪；优选地，所述的递送系统所包载诊断分子是 5-羧基荧光素 5-FAM 或近红外染料 Cy5、Cy5.5、Cy7、IR820、ICG、DiR、DiD、DiI；和/或

15 所述的纳米粒递送系统、脂质体递送系统、胶束递送系统、聚合物纳米粒递送系统或纳米圆盘递送系统，用于包载抗肿瘤药物，进行脑肿瘤（含脑转移瘤和原发性脑肿瘤）或脑部其它疾病病灶的靶向干预；优选地，所述的递药系统所包载药物是吉非替尼、埃克替尼、安罗替尼、克唑替尼、厄洛替尼、奥希替尼、阿雷替尼、紫杉醇、多西他赛、卡巴他赛、阿霉素、表阿霉素、喜树碱、羟基喜树碱、9-硝基喜树碱、长春新碱、p53 激活肽或多肽毒素；

更进一步优选地，所述脑肿瘤为脑转移瘤和/或原发性脑肿瘤。

20 本发明的第二方面提供了一种用于制备介导药物分子、荧光探针或递送系统靶向脑肿瘤或脑部其它疾病病灶制剂的淀粉样蛋白  $\beta$  短肽，所述的淀粉样蛋白  $\beta$  短肽为特异性吸附血浆中载脂蛋白的淀粉样蛋白  $\beta$  短肽；优选地，所述脑肿瘤为脑转移瘤和/或原发性脑肿瘤。

25 本发明的第三方面提供了一种用于脑肿瘤及脑内其它疾病病灶的示踪分子，所述示踪分子为第二方面所述的淀粉样蛋白  $\beta$  短肽以共价键与影像物质 X 连接制得 SP-X；

优选地，所述的 SP-X 中，X 是荧光分子 Fluorescein 或近红外染料分子 Cy5、Cy5.5、Cy7、IR820、ICG、DiR、DiD、DiI；

更优选地，所述脑肿瘤为脑转移瘤和/或原发性脑肿瘤。

本发明的第四方面提供了一种用于脑肿瘤及脑内其它疾病病灶的靶向干预的药物，

所述药物为第二方面所述的淀粉样蛋白  $\beta$  短肽以共价键与抗肿瘤药物 Y 连接制得 SP-Y;

优选地, 所述的 SP-Y 中, Y 是吉非替尼、埃克替尼、安罗替尼、克唑替尼、厄洛替尼、奥希替尼、阿雷替尼、紫杉醇、多西他赛、卡巴他赛、阿霉素、表阿霉素、喜树碱、羟基喜树碱、9-硝基喜树碱或长春新碱小分子抗肿瘤药物; 和/或

5 所述的 SP-Y 中, Y 是 p53 激活肽或多肽毒素多肽抗肿瘤药物;

更优选地, 所述脑肿瘤为脑转移瘤和/或原发性脑肿瘤。

本发明的第五方面提供了一种纳米递送系统, 所述纳米递送系统包含第二方面所述的淀粉样蛋白  $\beta$  短肽用共价键与聚乙二醇-Z 连接制得的 SP-聚乙二醇-Z;

10 优选地, 所述的 SP-聚乙二醇-Z 中, Z 是磷脂、聚乳酸、乳酸羟基乙酸共聚物或聚己内酯;

更优选地, 所述的纳米递送系统选自以下一种或多种: 脂质体递送系统、胶束递送系统、纳米圆盘递送系统和和聚合物纳米粒递送系统;

15 进一步优选地, 当所述的 SP-聚乙二醇-Z 为 SP-聚乙二醇-磷脂时, 所述的纳米递送系统选自以下一种或多种: 脂质体递送系统、胶束递送系统和纳米圆盘递送系统; 当所述的 SP-聚乙二醇-Z 为 SP-聚乙二醇-聚乳酸、SP-聚乙二醇-乳酸羟基乙酸共聚物、SP-聚乙二醇-聚己内酯时, 所述的纳米递送系统为胶束递送系统和/或聚合物纳米粒递送系统;

20 进一步优选地, 所述的脂质体递送系统、胶束递送系统、纳米圆盘递送系统或聚合物纳米粒递送系统, 用于包载诊断分子, 进行脑肿瘤或脑部其它疾病病灶的示踪; 优选地, 所述的递送系统所包载诊断分子是 5-羧基荧光素 5-FAM 或近红外染料 Cy5、Cy5.5、Cy7、IR820、ICG、DiR、DiD、DiI; 和/或

25 进一步优选地, 所述的纳米粒递送系统、脂质体递送系统、胶束递送系统、聚合物纳米粒递送系统或纳米圆盘递送系统, 用于包载抗肿瘤药物, 进行脑部肿瘤(含脑转移瘤和原发性脑肿瘤)或脑部其它疾病病灶的靶向干预; 优选地, 所述的递药系统所包载药物是吉非替尼、埃克替尼、安罗替尼、克唑替尼、厄洛替尼、奥希替尼、阿雷替尼、紫杉醇、多西他赛、卡巴他赛、阿霉素、表阿霉素、喜树碱、羟基喜树碱、9-硝基喜树碱、长春新碱、p53 激活肽或多肽毒素;

更进一步优选地, 所述脑肿瘤为脑转移瘤和/或原发性脑肿瘤。

本发明的第六方面提供了第五方面所述的纳米递送系统的制备方法, 所述方法包括以下步骤:

称取天然磷脂，胆固醇，甲氧基-PEG-DSPE，与SP-聚乙二醇-Z，模型药物或探针分子，溶解于溶媒中，成膜，水化，过膜，柱层析除去游离探针分子或药物，制得所述纳米递送系统；和/或

5 称取天然磷脂，胆固醇，甲氧基-PEG-DSPE，与SP-聚乙二醇-Z溶解于溶媒中，成膜，水化，过膜，主动包封探针分子或药物，柱层析除去游离探针分子或药物，制得所述纳米递送系统。

本发明的第七方面提供了一种药物组合物，所述药物包含：1) 第二方面所述的淀粉样蛋白 $\beta$ 短肽、第三方面所述的示踪分子、第四方面所述的药物和/或第五方面所述的纳米递送系统；以及2) 药学上可接受的载体。

10 本发明的第八方面提供了一种诊断制剂，所述诊断制剂包含：第二方面所述的淀粉样蛋白 $\beta$ 短肽、第三方面所述的示踪分子、第四方面所述的药物和/或第五方面所述的纳米递送系统。

15 本发明的第九方面提供了一种用于治疗脑部疾病的方法，所述方法包括：对有需要的受试者给予第二方面所述的淀粉样蛋白 $\beta$ 短肽、第三方面所述的示踪分子、第四方面所述的药物和/或第五方面所述的纳米递送系统；

优选地，所述脑部疾病为脑肿瘤或脑部其它疾病；

更优选地，所述脑肿瘤为脑转移瘤和/或原发性脑肿瘤。

20 本发明的第十方面提供了一种用于诊断脑肿瘤及脑内其它疾病病灶的方法，所述方法包括：对有需要的受试者给予第二方面所述的淀粉样蛋白 $\beta$ 短肽、第三方面所述的示踪分子、第四方面所述的药物和/或第五方面所述的纳米递送系统；优选地，所述脑肿瘤为脑转移瘤和/或原发性脑肿瘤。

25 本发明的第十一方面提供了一种脑肿瘤或脑部其它疾病病灶的靶向干预方法，所述方法包括：对有需要的受试者给予第二方面所述的淀粉样蛋白 $\beta$ 短肽、第三方面所述的示踪分子、第四方面所述的药物和/或第五方面所述的纳米递送系统；优选地，所述脑肿瘤为脑转移瘤和/或原发性脑肿瘤。

30 本发明的第十二方面提供了一种一种药物介导方法，所述方法包括：对有需要的受试者给予第二方面所述的淀粉样蛋白 $\beta$ 短肽、第三方面所述的示踪分子、第四方面所述的药物和/或第五方面所述的纳米递送系统；优选地，所述脑肿瘤为脑转移瘤和/或原发性脑肿瘤。

本发明中，仿生脑内淀粉样蛋白 $\beta$ 以载脂蛋白（如 Apolipoprotein E、Apolipoprotein A1 和 Apolipoprotein J）为分子伴侣、经受体介导转运至外周的清除机制，以淀粉样蛋白 $\beta$ 为

模板，设计了可特异性结合载脂蛋白脂质结合域的短肽（SP），通过将该短肽修饰在脂质体表面，在体内血液循环过程中特异性吸附血浆中载脂蛋白并保持其生物活性，进而利用载脂蛋白与血脑屏障上多种受体 [包括 Low-density lipoprotein-related protein 1 (LRP-1)， Scavenger receptor class B member 1 (SRB1) 和 Low-density lipoprotein-related protein 2 (LRP-2)] 结合，介导脂质体转运入脑；该多肽修饰的脂质体通过调控纳米药物在血浆中形成蛋白冠的组分和生物活性，能克服传统靶向纳米药物的缺陷，构建可跨血脑屏障，同时靶向血管内皮细胞、肿瘤细胞的 SP-药物复合物和 SP 修饰的纳米递药系统，实现脑肿瘤的靶向诊断和治疗及其他脑部疾病的药物递送。

10 本发明中，SP 以共价键修饰在聚乙二醇-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺（PEG-DSPE）、聚乙二醇-聚乳酸（PEG-PLA）、聚乙二醇-乳酸羟基乙酸共聚物（PEG-PLGA）、聚乙二醇-聚己内酯（PEG-PCL）等材料上，构建 SP 短肽修饰的脂质体、胶束、纳米圆盘、纳米粒等递送系统。

15 所述的 SP 修饰的纳米递送系统可包载吉非替尼、埃克替尼、安罗替尼、克唑替尼、厄洛替尼、奥希替尼、阿雷替尼、紫杉醇、多西他赛、卡巴他赛、阿霉素、表阿霉素、喜树碱、羟基喜树碱、9-硝基喜树碱、长春新碱、p53 激活肽、蜂毒肽、蝎毒肽等抗肿瘤药物；以及，可包载荧光物质，如 FAM、近红外染料 Cy5、Cy5.5、Cy7、IR820、ICG、DiR、DiD、DiI 等。

20 本发明中，SP 修饰的药物或探针包括通过马来酰亚胺己肼衍生物反应形成 pH 敏感胺键，涉及阿霉素、表阿霉素、p53 激活肽、多肽毒素等药物、或通过 3-(2-吡啶二巯基)丙酸衍生物反应形成二硫键，涉及吉非替尼、埃克替尼、安罗替尼、克唑替尼、厄洛替尼、奥希替尼、阿雷替尼、紫杉醇、多西他赛、卡巴他赛、喜树碱、羟基喜树碱、9-硝基喜树碱、长春新碱、p53 激活肽、多肽毒素等药物、或通过稳定化学键连接荧光探针，涉及 Fluorescein、Cy5、Cy5.5、Cy7、ICG、IR820。

25 进一步的，本发明提供了淀粉样蛋白  $\beta$  短肽在制备介导药物分子、荧光探针或递送系统靶向脑肿瘤（含脑转移瘤和原发性脑肿瘤）或脑部其它疾病病灶制剂中的应用，所述的淀粉样蛋白  $\beta$  短肽（SP）为特异性吸附血浆中载脂蛋白的淀粉样蛋白  $\beta$  短肽。

30 所述的淀粉样蛋白  $\beta$  短肽（SP）以共价键与影像物质 X 连接制得 SP-X，用于脑肿瘤（含脑转移瘤和原发性脑肿瘤）及脑内其它疾病病灶的示踪；所述的 SP-X 中，X 是荧光分子 Fluorescein 或近红外染料分子 Cy5、Cy5.5、Cy7、IR820、ICG、DiR、DiD、DiI；

35 所述的淀粉样蛋白  $\beta$  短肽（SP）以共价键与抗肿瘤药物 Y 连接制得 SP-Y，用于脑肿瘤（含脑转移瘤和原发性脑肿瘤）及脑内其它疾病病灶的靶向干预中；所述的 SP-Y 中，Y 是吉非替尼、埃克替尼、安罗替尼、克唑替尼、厄洛替尼、奥希替尼、阿雷替尼、紫杉醇、多西他赛、卡巴他赛、阿霉素、表阿霉素、喜树碱、羟基喜树碱、9-硝基喜树碱或长春新碱小分子抗肿瘤药物；所述的 SP-Y 中，Y 是 p53 激活肽或多肽毒素多肽抗肿

瘤药物；

所述的淀粉样蛋白  $\beta$  短肽 (SP) 用共价键与聚乙二醇-Z 连接制得的 SP-聚乙二醇-Z, 用于制备纳米递送系统; 所述的 SP-聚乙二醇-Z 中, Z 是磷脂、聚乳酸 (PLA)、乳酸羟基乙酸共聚物 (PLGA) 或聚己内酯 (PCL);

5 本发明中所述的 SP-聚乙二醇-磷脂用于制备脂质体递送系统、胶束递送系统或纳米圆盘递送系统;

本发明中所述的 SP-聚乙二醇-聚乳酸、SP-聚乙二醇-乳酸羟基乙酸共聚物、SP-聚乙二醇-聚己内酯, 用于制备胶束递送系统和聚合物纳米粒递送系统;

本发明中所述的脂质体递送系统、胶束递送系统、纳米圆盘递送系统或聚合物纳米粒递送系统, 用于包载诊断分子, 进行脑肿瘤 (含脑转移瘤和原发性脑肿瘤) 或脑部其它疾病病灶的示踪; 所述的递送系统所包载诊断分子是 5-羧基荧光素 5-FAM 或近红外染料 Cy5、Cy5.5、Cy7、IR820、ICG、DiR、DiD、DiI;

本发明中所述的纳米粒递送系统、脂质体递送系统、胶束递送系统、聚合物纳米粒递送系统或纳米圆盘递送系统, 用于包载抗肿瘤药物, 进行脑肿瘤 (含脑转移瘤和原发性脑肿瘤) 或脑部其它疾病病灶的靶向干预; 所包载药物是吉非替尼、埃克替尼、安罗替尼、克唑替尼、厄洛替尼、奥希替尼、阿雷替尼、紫杉醇、多西他赛、卡巴他赛、阿霉素、表阿霉素、喜树碱、羟基喜树碱、9-硝基喜树碱、长春新碱、p53 激活肽或多肽毒素。

更具体的, 本发明通过下述技术方案实现,

20 1. 制备 SP 修饰的脂质体递送系统

将含半胱氨酸巯基的 SP 与马来酰亚胺-PEG-DSPE 在 PH 7.4 的磷酸缓冲液中反应, 纯化后冻干产物, 制备 SP-PEG-DSPE 备用,

称取一定量的天然磷脂, 胆固醇, 甲氧基-PEG-DSPE(mPEG-DSPE), 与 SP-PEG-DSPE, 模型药物或探针分子, 溶解于溶媒中, 成膜, 水化, 脂质体挤压器过膜, 柱层析除去游离探针分子或药物, 制得 SP 多肽修饰的脂质体, 动态光散射粒度仪表征其粒径和表面电位。或称取一定量的天然磷脂, 胆固醇, 甲氧基-PEG-DSPE(mPEG-DSPE), 与 SP-PEG-DSPE, 溶解于溶媒中, 成膜, 水化, 脂质体挤压器过膜, 主动包封探针分子或药物, 柱层析除去游离探针分子或药物, 制得 SP 修饰的脂质体, 动态光散射粒度仪表征其粒径和表面电位。

30 2. SP 修饰的递送系统在与血浆共孵育形成蛋白冠后对其结合活性的影响实验,

将 SP 修饰的递送系统与新鲜血浆共孵育一段时间后, 用 western blot 和放射性标记方法检测其与 LRP-1 受体的结合活性, 未与血清孵育的 SP 修饰的递送系统和未修饰 SP 的递送系统作为阴性对照。

3. SP 修饰对递送系统被血管内皮细胞系统摄取的影响实验,

35 用血管内皮细胞 (如 bEND.3 细胞) 在血清孵育前后, 分别比较内皮细胞对 SP 修饰

的与未修饰的递送系统摄取量。

4. SP 修饰的递送系统在正常小鼠体内跨 BBB 能力的评价，

正常小鼠（如昆明种，C57BL/6 等），尾静脉注射包载荧光素的递送系统，比较不同时间点小鼠脑内 SP 修饰与未修饰的递送系统的蓄积量。

5 5. SP 修饰的递送系统在正常大鼠体内的药代动力学的评价

正常 SD 大鼠，尾静脉注射荧光素 DiI 标记的多肽修饰与未修饰的递送系统，在不同的时间点收集血液，分离血浆，通过荧光定量检测血浆中 DiI 的含量，以评价 SP 修饰的递送系统在大鼠体内的药代动力学。

6. SP 修饰的递送系统在正常小鼠体内的免疫原性的评价

10 制备含 Lipid A 的多肽修饰与未修饰的递送系统，腹腔注射于 Balb/c 小鼠体内，四周内每七天注射一次，在每次注射后第七天眼眶取血，收集血浆冷冻备用。利用 ELISA 法检测不同时间点在小鼠体内产生针对 PEG 和 SP 的 IgG 和 IgM 含量，评价免疫原性。

7. SP 修饰的递送系统体内抗肿瘤效果评价

15 通过荷原位 U87 神经胶质瘤模型裸鼠尾静脉注射 SP 修饰的递送系统、未修饰多肽的递送系统、游离药物和生理盐水，以模型裸鼠的中位生存期、肿瘤组织细胞凋亡和新生血管密度为指标评价 SP 修饰的递送系统体内抗肿瘤效果。

本发明经试验显示，所述的 SP 介导的药物或递药系统靶向 LRP-1 高表达的细胞和组织，具有跨生物膜屏障的能力，特别是跨血脑屏障（BBB）的能力，可用于脑肿瘤（含脑转移瘤和原发性脑肿瘤）及其它疾病的靶向诊断和治疗。

20 本发明实验显示 SP 修饰在递药系统表面，与血浆中的载脂蛋白结合，形成蛋白冠后增加血管内皮细胞的摄取；SP 可同时介导药物跨血脑屏障，和/或靶向肿瘤新生血管和肿瘤细胞，其修饰的药物和递药系统在治疗脑肿瘤（含脑转移瘤和原发性脑肿瘤）及脑内其它疾病时可获得更好的治疗效果。

## 25 附图的简要说明

### 图 1. SP 修饰的脂质体与血浆蛋白的体外结合鉴定

SP 通过化学偶联的方式修饰在脂质体表面得到 SP-sLip，与小鼠血浆混合 37°C 孵育 1 h 后，高速离心获得含有蛋白冠的脂质体沉淀。经 Biorad 4%-20% 梯度 SDS-PAGE 分离，快速银染法得到脂质体吸附的血浆蛋白成分分析（如附图 1A 所示）。结果发现，相比于甲氧基聚乙二醇修饰的长循环脂质体（sLip），SP-sLip 吸附的血浆蛋白在 45KDa（条带 1），30 38KDa（条带 2）和 25KDa（条带 3）处的条带有显著性增加。将两者三处相同位置对应的 PAGE 胶经 LC-MS/MS 和 western blot（如附图 1B 所示）结果分析，鉴定三处的蛋白分别是小鼠来源的 ApoJ，ApoE 和 ApoA1。Western blot 半定量法亦证实，SP-sLip 相比于 sLip 吸附的三种载脂蛋白有显著增加（如附图 1C-E 所示）。

35 图 2. 荧光标记的 sLip 和 SP-sLip 在体内吸附血浆功能性载脂蛋白的鉴定

为了验证目标小肽修饰的脂质体在动物体内经全身给药后，仍能吸附相关的目的蛋白，我们将等量的 DiI 荧光标记的脂质体经尾静脉注射至小鼠体内，1 h 后取血，分离血浆中的含蛋白冠的脂质体。如附图 2A 所示，经过 western blot 方法检测到，相同含量的脂质体在小鼠体内吸附的三种载脂蛋白（ApoJ，ApoE，ApoA1）的含量有显著差异。这一结果证明，相对于普通脂质体，SP 修饰的脂质体（SP-sLip）在小鼠体内能够快速并特异性的吸附血浆蛋白中的载脂蛋白。（见附图 2B-D 半定量分析）

### 图 3. sLip 和 SP-sLip 吸附血浆蛋白后，与 LRP-1 受体的结合活性评价

SP 修饰的脂质体（SP-sLip）自身能够特异性吸附溶液中的重组蛋白 LRP-1（如附图 3A 所示）。我们通过 western blot 方法证实 SP-sLip 与 ApoE 预孵育之后，仍保留与 LRP-1 结合的能力（如附图 3B-C 所示）。而附图 3DE 通过 ELISA 实验证明，游离的 SP 和修饰的脂质体（SP-sLip）均能够竞争固定在 96 孔板上 SP 与抗体相互作用，而血浆孵育之后的 SP-sLip 失去竞争抗体结合能力，说明脂质体表面的 SP 与 ApoE 等血浆蛋白结合之后，其功能域被封闭。SP-sLip 表面特异性结合的载脂蛋白如 ApoE 具有与 BBB 受体 LRP-1 结合的活性，成为介导 SP-sLip 跨越 BBB 入脑的有效途径。

### 图 4. 血管内皮细胞对血浆孵育前后脂质体的摄取

SP 修饰的脂质体（SP-sLip）与血浆共孵育形成蛋白冠后，内皮细胞对其摄取增加（如附图 4A-B 所示）。

### 图 5. SP 修饰的脂质体在小鼠体内的药动学参数和免疫原性评价

SP 修饰在脂质体表面（SP-sLip），未影响脂质体体内药动学参数（如附图 5A 所示），也未增加普通长循环脂质体产生的免疫原性（以血液中 IgG 和 IgM 为评价指标，如附图 5B-D）。图 6. SP 修饰的脂质体在小鼠体内入脑效率评价

通过体内检测小鼠脑内的荧光素，发现 SP-sLip 组跨 BBB 的量显著高于 sLip 组，说明 SP 可介导递送系统跨血脑屏障。

### 图 7. 载阿霉素的脂质体体内抗脑胶质瘤的药效

生理盐水组、DOX 组、sLip/DOX 组、SP-sLip/DOX 组小鼠的中位生存期分别为：27 天，31 天，33 天，50 天，SP 修饰的脂质体可显著延长脑原位瘤模型鼠的中位生存期。

### 图 8. 载阿霉素的脂质体对肿瘤组织中新生血管的影响

SP 修饰的脂质体包载阿霉素组（SP-sLip/DOX）肿瘤组织内的血管密度显著低于未修饰组（sLip/DOX），说明 SP 可介导递送系统靶向肿瘤新生血管。

### 图 9. 载阿霉素的脂质体对胶质瘤细胞凋亡的影响

SP 修饰的脂质体包载阿霉素组（SP-sLip/DOX）肿瘤组织内细胞凋亡数量显著高于未修饰组，说明 SP 可介导递药系统靶向肿瘤细胞。

### 图 10. 安全性评价

SP 在体外培养的神经细胞系 PC12 上并未显示出细胞毒性（如附图 10A 所示），同时 SP 修饰的脂质体包载阿霉素组（SP-sLip/DOX）小鼠脏器的组织切片无明显异常（如附图

10B 所示)，说明 SP 修饰在脂质体表面并未引起毒副作用。

## 实施发明的最佳方式

5 下面通过具体的实施例进一步说明本发明，但是，应当理解为，这些实施例仅仅是用于更详细具体地说明之用，而不应理解为用于以任何形式限制本发明。

本部分对本发明试验中所使用到的材料以及试验方法进行一般性的描述。虽然为实现本发明目的所使用的许多材料和操作方法是本领域公知的，但是本发明仍然在此作尽可能详细描述。本领域技术人员清楚，在上下文中，如果未特别说明，本发明所用材料  
10 和操作方法是本领域公知的。

### 实施例 1 制备脂质体

#### 脂质体 sLip/DiI 和 SP-sLip/DiI 的制备：

脂质体 sLip/DiI 的制备：称取制备脂质体的膜材天然磷脂（HSPC）：7.85 mg 胆固醇：3.35 mg；  
15 mPEG-2000-DSPE: 2.78 mg；DiI:0.4 mg，溶于 10 mL CHCl<sub>3</sub> 中，40 度水浴悬蒸成膜，真空干燥去除有机溶剂，将膜溶于 1 mL 双蒸水中得 60 度水浴中摇匀水化，在脂质体挤压器经 400 nm，200 nm，100 nm 孔径挤压得到 sLip/DiI；

脂质体 SP-sLip/DiI 的制备：称取 50 mg Mal-PEG-DSPE 溶于 5 mL CHCl<sub>3</sub> 中 37 度成膜，真空干燥半小时后溶于 4 mL 双蒸水中，37 度水化，超声以去除大颗粒。称取 26  
20 mg SP-Cys 蛋白溶于 2 mL 双蒸水中，于上述膜材料溶液混合，并用 1 mL 双蒸水润洗容器后混合，加入 40 μL EDTA 溶液（500 mM，pH 8.0），3 mL PB 溶液（0.1 M，pH 7.4），室温搅拌反应 6 h，使之无絮状沉淀。使用 8000-10000 Da 孔径透析膜，蒸馏水中透析 48h-72 h，得到的溶液冻干制品为 SP-PEG-DSPE；

称取制备脂质体的膜材 HSPC: 7.85 mg 胆固醇: 3.35 mg；mPEG-2000-DSPE: 1.67 mg；  
25 SP-PEG-DSPE: 1.82 mg；DiI:0.4 mg，溶于 10 mL CHCl<sub>3</sub> 中，40 度水浴悬蒸成膜，真空干燥去除有机溶剂，将膜溶于 1 mL 双蒸水中得 60 度水浴中摇匀水化，在脂质体挤压器经 400 nm，200 nm，100 nm 孔径挤压得到 SP-sLip/DiI；

#### 脂质体 sLip/DOX 和 SP-sLip/DOX 的制备：

脂质体 sLip/DOX 的制备：称取制备脂质体的膜材 HSPC：7.85 mg 胆固醇: 3.35 mg；  
30 mPEG-2000-DSPE: 2.78 mg，溶于 10 mL CHCl<sub>3</sub> 中，40 度水浴悬蒸成膜，真空干燥去除有机溶剂，将膜溶于 1 mL 硫酸铵溶液（0.32 M）中得 60 度水浴中摇匀水化，在脂质体挤压器经 400 nm，200 nm，100 nm 孔径挤压得到硫酸铵溶液水化的 sLip，经 G50 洗脱柱置换成生理盐水溶剂后，加入阿霉素水溶液混合（药脂比 1:10），经 G50 层析柱去除未包载阿霉素，得到 sLip/DOX；

35 脂质体 SP-sLip/DOX 的制备: 称取制备脂质体的膜材 HSPC: 7.85 mg 胆固醇: 3.35 mg；

mPEG-2000-DSPE: 1.67 mg; SP-PEG-DSPE: 1.82 mg, 其余步骤同上(脂质体 sLip/DOX 的制备), 得 SP-sLip/DOX。

## 5 实施例 2 脂质体在血清中形成蛋白冠后与 LRP-1 受体的结合活性及其被血管内皮细胞摄取的影响

### 脂质体在血清中形成蛋白冠的特征:

取 C57BL/6 小鼠的血清(含蛋白酶抑制剂, 以 EDTA 为抗凝剂)与脂质体 1:1 混合, 37 °C 孵育 1 h 后, 15000 rpm 离心 30 min, 用冷的 PBS 洗 2 次后溶于 30  $\mu$ L PBS 中, 以血清做阳性对照, PBS 为阴性对照, 加入 6  $\mu$ L 的 SDS-PAGE 上样缓冲液和 3  $\mu$ L 的  $\beta$ -巯基乙醇, 煮沸 10 分钟使蛋白变性, 用 4-20% 的聚丙烯酰胺胶使不同分子量的蛋白分离, 快速银染试剂盒显色。将 PAGE 胶中的明显差异条带处(如红色箭头所示)及对照的同一位置处切下, 分别用胰蛋白酶消化, 重悬于 0.1% 的甲酸溶液中, LC-MS/MS 分析各条带的蛋白组分, 实验结果如图 1 所示;

体内实验实施方法如下: 将荧光 DiI 标记的多肽修饰与未修饰的脂质体通过尾静脉注射到 C57BL/6 小鼠体内, 1 h 后取血并低速离心分离血浆, 蛋白冠分离方法如上述体外实验, 通过 SDS-PAGE 和 western blot 方法鉴定其在体内吸附的蛋白冠成分, 如图 2 所示。

### 血清孵育前后 SP-sLip 与 LRP-1 受体的结合活性:

ELISA 法检测血清孵育前后 SP-sLip 与 SP 抗体的结合活性, 以判断 SP 与受体的活性结合域在血浆蛋白相互作用后的变化, 检测其吸附的载脂蛋白活性, 具体操作如下: ELISA 板中每孔加入 0.1  $\mu$ g SP-PEG-DSPE, 室温过夜, PBS 洗 3 遍后, 用 3% BSA 封闭 1 h, 吸去 BSA 溶液, 加入 SP 抗体 37°C 孵育 1 h, PBS 洗三遍, 加入预先与血清或者 PBS 孵育并梯度稀释的脂质体, 在 37°C 孵育 1 h, PBS 洗三遍, 加入相应的辣根过氧化物酶标记的二抗, 1h 后与 TMB 显色液反应 3-15 min, 用 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应, 在 450 nm 波长测其吸光度值, 实验结果如图 3 所示。

### SP-sLip 在血清中形成蛋白冠后被血管内皮细胞摄取的影响:

血管内皮细胞 bEND3 的复苏: 将冷冻 bEND3 细胞, 快速融化并转移至预先加有培养液的离心管中, 1000 r/min 离心 3 min 后弃上清, 加入含 10% FBS 的 DMEM 培养液, 轻轻吹打均匀并滴加至培养皿中, 混匀。于显微镜下观察细胞形态及生长情况并置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、相对湿度 95% 的培养箱中培养;

血管内皮细胞 bEND3 的培养: 观察 bEND3 细胞的生长情况即细胞数量、形态和贴壁情况。吸弃旧培养液, 加入新鲜的含 10% FBS 的 DMEM 培养液, 混匀, 在 37°C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱中继续培养, 每天观察细胞生长情况, 每隔 2-3 天传代, 约 10 天左右细胞处于对数生长期, 可用于体外细胞实验;

血管内皮细胞 bEND3 传代: 吸弃培养液, 用 PBS 冲洗 2 次, 加入 0.25% 胰酶少许,

置培养箱中 1 min 后加入 2-3 mL 培养液终止消化，将该细胞悬液等份分装入数个离心管中，离心后弃去上清液，加入新的培养液后转入培养皿中，置培养箱中培养；

血管内皮细胞 bEND3 的冻存：细胞实验结束后，冻存细胞以便下次使用，预先配制冻存液（含 10% DMSO 和 90% 胎牛血清），于 4℃ 预冷。用胰酶消化细胞后加入预冷的冻存液，用滴管轻轻吹打混匀。在每支冻存管中加入 1 mL 细胞液，密封后标记冻存细胞名称和冻存日期，置 -80℃ 过夜，液氮罐中保存并登记备案；

将合适密度的 bEND3 接种于 6 孔板中，置于细胞培养箱中培养过夜，将荧光素 DiI 标记的脂质体（血清孵育的及未与血清孵育的）分别用不含血清的 DMEM 培养基稀释 50 倍，每孔加入 1ml，与细胞共孵育 4h，将培液吸出，快速用 PBS 洗两遍，胰酶消化细胞，含血清的培养基终止消化，离心，并用 PBS 洗一遍，最后细胞分散于 300 μL 的 PBS 中，流式细胞仪测定摄取包载 DiI 脂质体的阳性细胞百分率和荧光强度（激发波长 555nm，发射波长 570 nm）。实验结果如图 4 所示；

#### SP 修饰对脂质体体内药动学参数及免疫原性的影响：

SD 大鼠，每组 3 只，通过尾静脉注射 sLip/DiI 和 SP-sLip/DiI，分别在给药前，5 min，30 min，1 h，2 h，4 h，8 h，12 h 和 24 h 后，尾部取血（EDTA 抗凝），血样分离上清，并用正常大鼠血清梯度稀释血浆中的 DiI，利用荧光分光光度计进行定量（激发波长 555 nm，发射波长 570 nm），实验结果如图 5a 所示，腹腔注射载 Lipid A 的 sLip 和 SP-sLip 于 Balb/c 小鼠，每 7 天注射一次，每次注射后第七天取血备用，利用 ELISA 法检测不同时间点在小鼠体内产生针对 PEG 和 SP 的 IgG 和 IgM 含量，实验结果如图 5b-c 所示。

20

#### 实施例 3 SP 修饰的脂质体可跨越 BBB

体内实验证实荧光素 DiI 标记的 SP 修饰的脂质体(SP-sLip/DiI)可跨越血脑屏障：

将荧光标记的 SP-sLip/DiI(磷脂含量 10 mg/mL, DiI 含量 0.4 mg/mL)，尾静脉注射到 C57BL/6 小鼠体内（10 μL/g），1 h 后，用乙醚麻醉小鼠，取出脑组织，在 4% 的多聚甲醛中固定 24 h，30% 蔗糖脱水，OCT 包埋，冰冻切片，DAPI 染细胞核，CD31 抗体标记血管，置于显微镜下观察并拍照，荧光素 DiI 标记的甲氧基脂质体作对照，按相同步骤处理，实验结果如图 6 所示。

#### 实施例 4 载阿霉素的 SP-sLip 在体内的药效学实验

30 原位瘤模型鼠的中位生存期：

脑胶质瘤裸鼠模型的建立：取对数生长期的 U87 细胞，消化细胞并计数，用适量的 PBS 缓冲液悬浮，每只裸鼠接种  $6 \times 10^5$  个细胞（分散于 5 μL PBS 缓冲液中），实验前将裸鼠用 7% 水合氯醛麻醉后，用脑立体定位仪固定，将悬浮细胞接种于纹状体部位（即前囟向前 0.6 mm，向右 1.8 mm，纵深 3 mm），定期观察手术后裸鼠的状态；

35 将原位脑瘤模型裸鼠随机分成 4 组（n=13），分别在第 7、9、11、13、15 天记

录小鼠体重，尾静脉注射 200  $\mu$ L 生理盐水，阿霉素，sLip/DOX，SP-sLip/DOX，单次阿霉素的注射剂量为 2 mg/kg，记录模型裸鼠的生存时间，实验结果如图 7 所示。

**载阿霉素的 SP-sLip 抑制肿瘤中新生血管和促肿瘤细胞凋亡实验：**

5 原位脑胶质瘤模型鼠在给药完成后的第 18 天，水合氯醛麻醉，分离脑组织，多聚甲醛固定，脱水，石蜡包埋切片。通过 CD31 抗体的免疫荧光染色观察检测对新生血管的抑制效果，采用末端脱氧核苷酸转移酶（TDT）介导的 dUTP 缺口末端标记法（Terminal deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL）检测肿瘤细胞的凋亡程度，通过共聚焦荧光显微镜观察并拍照，实验结果如图 8,9 所示。

10 **安全性评价：**将梯度浓度的 SP 与神经细胞系 PC12 共培养，评价其在体外培养条件下的细胞毒性，同时将原位瘤药效学试验的各给药组小鼠的心、肝、脾、肺、肾组织解剖后固定于 4%多聚甲醛的 PBS 溶液中，石蜡包埋切片，进行 HE 染色，在显微镜下观察并拍照，实验结果如图 10 所示。

15 尽管本发明已进行了一定程度的描述，明显地，在不脱离本发明的精神和范围的条件下，可进行各个条件的适当变化。可以理解，本发明不限于所述实施方案，而归于权利要求的范围，其包括所述每个因素的等同替换。

## 权 利 要 求

1. 淀粉样蛋白 $\beta$ 短肽在制备用于介导药物分子、荧光探针或递送系统靶向脑肿瘤和/或脑部其它疾病病灶的制剂中的应用，其中所述的淀粉样蛋白 $\beta$ 短肽为特异性吸附血浆中载脂蛋白的淀粉样蛋白 $\beta$ 短肽；优选地，所述脑肿瘤为脑转移瘤和/或原发性脑肿瘤。

2. 根据权利要求1所述的用途，其特征在于，所述的淀粉样蛋白 $\beta$ 短肽以共价键与影像物质X连接制得SP-X，用于脑肿瘤及脑内其它疾病病灶的示踪；

优选地，所述的SP-X中，X是荧光分子Fluorescein或近红外染料分子Cy5、Cy5.5、Cy7、IR820、ICG、DiR、DiD、DiI；

更优选地，所述脑肿瘤为脑转移瘤和/或原发性脑肿瘤。

3. 根据权利要求1所述的用途，其特征在于，按所述的淀粉样蛋白 $\beta$ 短肽以共价键与抗肿瘤药物Y连接制得SP-Y，用于脑肿瘤及脑内其它疾病病灶的靶向干预中；

优选地，所述的SP-Y中，Y是吉非替尼、埃克替尼、安罗替尼、克唑替尼、厄洛替尼、奥希替尼、阿雷替尼、紫杉醇、多西他赛、卡巴他赛、阿霉素、表阿霉素、喜树碱、羟基喜树碱、9-硝基喜树碱或长春新碱小分子抗肿瘤药物；和/或

所述的SP-Y中，Y是p53激活肽或多肽毒素多肽抗肿瘤药物；

更优选地，所述脑肿瘤为脑转移瘤和/或原发性脑肿瘤。

4. 根据权利要求1所述的用途，其特征在于，所述的淀粉样蛋白 $\beta$ 短肽用共价键与聚乙二醇-Z连接制得的SP-聚乙二醇-Z，用于制备纳米递送系统；

优选地，所述的SP-聚乙二醇-Z中，Z是磷脂、聚乳酸、乳酸羟基乙酸共聚物或聚己内酯；和/或

优选地，所述的纳米递送系统选自以下一种或多种：脂质体递送系统、胶束递送系统、纳米圆盘递送系统和和聚合物纳米粒递送系统；

更优选地，所述的SP-聚乙二醇-磷脂用于制备脂质体递送系统、胶束递送系统或纳米圆盘递送系统；和/或所述的SP-聚乙二醇-聚乳酸、SP-聚乙二醇-乳酸羟基乙酸共聚物、SP-聚乙二醇-聚己内酯，用于制备胶束递送系统和聚合物纳米粒递送系统；

进一步优选地，所述的脂质体递送系统、胶束递送系统、纳米圆盘递送系统或聚合物纳米粒递送系统，用于包载诊断分子，进行脑肿瘤或脑部其它疾病病灶的示踪；优选地，所述的递送系统所包载诊断分子是5-羧基荧光素5-FAM或近红外染料Cy5、Cy5.5、Cy7、IR820、ICG、DiR、DiD、DiI；和/或

所述的纳米粒递送系统、脂质体递送系统、胶束递送系统、聚合物纳米粒递送系统或纳米圆盘递送系统，用于包载抗肿瘤药物，进行脑肿瘤或脑部其它疾病病灶的靶向干预；优选地，所述的递药系统所包载药物是吉非替尼、埃克替尼、安罗替尼、克唑替尼、厄洛替尼、奥希替尼、阿雷替尼、紫杉醇、多西他赛、卡巴他赛、阿霉素、表阿霉素、喜树碱、羟基喜树碱、9-硝基喜树碱、长春新碱、p53激活肽或多肽毒素；

更进一步优选地，所述脑肿瘤为脑转移瘤和/或原发性脑肿瘤。

5. 一种用于制备介导药物分子、荧光探针或递送系统靶向脑肿瘤或脑部其它疾病病灶制剂的淀粉样蛋白 $\beta$ 短肽，其特征在于，所述的淀粉样蛋白 $\beta$ 短肽为特异性吸附血浆中载脂蛋白的淀粉样蛋白 $\beta$ 短肽；优选地，所述脑肿瘤为脑转移瘤和/或原发性脑肿瘤。

6. 一种用于脑肿瘤及脑内其它疾病病灶的示踪分子，其特征在于，所述示踪分子为权利要求5所述的淀粉样蛋白 $\beta$ 短肽以共价键与影像物质X连接制得SP-X；

优选地，所述的SP-X中，X是荧光分子Fluorescein或近红外染料分子Cy5、Cy5.5、Cy7、IR820、ICG、DiR、DiD、DiI；

更优选地，所述脑肿瘤为脑转移瘤和/或原发性脑肿瘤。

7. 一种用于脑肿瘤及脑内其它疾病病灶的靶向干预的药物，其特征在于，所述药物为权利要求5所述的淀粉样蛋白 $\beta$ 短肽以共价键与抗肿瘤药物Y连接制得SP-Y；

优选地，所述的SP-Y中，Y是吉非替尼、埃克替尼、安罗替尼、克唑替尼、厄洛替尼、奥希替尼、阿雷替尼、紫杉醇、多西他赛、卡巴他赛、阿霉素、表阿霉素、喜树碱、羟基喜树碱、9-硝基喜树碱或长春新碱小分子抗肿瘤药物；和/或

所述的SP-Y中，Y是p53激活肽或多肽毒素多肽抗肿瘤药物；

更优选地，所述脑肿瘤为脑转移瘤和/或原发性脑肿瘤。

8. 一种纳米递送系统，其特征在于，所述纳米递送系统包含权利要求5所述的淀粉样蛋白 $\beta$ 短肽用共价键与聚乙二醇-Z连接制得的SP-聚乙二醇-Z；

优选地，所述的SP-聚乙二醇-Z中，Z是磷脂、聚乳酸、乳酸羟基乙酸共聚物或聚己内酯；

更优选地，所述的纳米递送系统选自以下一种或多种：脂质体递送系统、胶束递送系统、纳米圆盘递送系统和和聚合物纳米粒递送系统；

进一步优选地，当所述的SP-聚乙二醇-Z为SP-聚乙二醇-磷脂时，所述的纳米递送系统选自以下一种或多种：脂质体递送系统、胶束递送系统和纳米圆盘递送系统；当所述的SP-

聚乙二醇-Z为SP-聚乙二醇-聚乳酸、SP-聚乙二醇-乳酸羟基乙酸共聚物、SP-聚乙二醇-聚己内酯时，所述的纳米递送系统为胶束递送系统和/或聚合物纳米粒递送系统；

进一步优选地，所述的脂质体递送系统、胶束递送系统、纳米圆盘递送系统或聚合物纳米粒递送系统，用于包载诊断分子，进行脑肿瘤或脑部其它疾病病灶的示踪；优选地，所述的递送系统所包载诊断分子是5-羧基荧光素5-FAM或近红外染料Cy5、Cy5.5、Cy7、IR820、ICG、DiR、DiD、DiI；和/或

进一步优选地，所述的纳米粒递送系统、脂质体递送系统、胶束递送系统、聚合物纳米粒递送系统或纳米圆盘递送系统，用于包载抗肿瘤药物，进行脑肿瘤或脑部其它疾病病灶的靶向干预；优选地，所述的递药系统所包载药物是吉非替尼、埃克替尼、安罗替尼、克唑替尼、厄洛替尼、奥希替尼、阿雷替尼、紫杉醇、多西他赛、卡巴他赛、阿霉素、表阿霉素、喜树碱、羟基喜树碱、9-硝基喜树碱、长春新碱、p53激活肽或多肽毒素；

更进一步优选地，所述脑肿瘤为脑转移瘤和/或原发性脑肿瘤。

9. 根据权利要求8所述的纳米递送系统的制备方法，其特征在于，所述方法包括以下步骤：

称取天然磷脂，胆固醇，甲氧基-PEG-DSPE，与SP-聚乙二醇-Z，模型药物或探针分子，溶解于溶媒中，成膜，水化，过膜，柱层析除去游离探针分子或药物，制得所述纳米递送系统；和/或

称取天然磷脂，胆固醇，甲氧基-PEG-DSPE，与SP-聚乙二醇-Z溶解于溶媒中，成膜，水化，过膜，主动包封探针分子或药物，柱层析除去游离探针分子或药物，制得所述纳米递送系统。

10. 一种药物组合物，其特征在于，所述药物包含：1) 权利要求5所述的淀粉样蛋白 $\beta$ 短肽、权利要求6所述的示踪分子、权利要求7所述的药物和/或权利要求8所述的纳米递送系统；以及2) 药学上可接受的载体。

11. 一种诊断制剂，其特征在于，所述诊断制剂包含：权利要求5所述的淀粉样蛋白 $\beta$ 短肽、权利要求6所述的示踪分子、权利要求7所述的药物和/或权利要求8所述的纳米递送系统。

12. 一种用于治疗脑部疾病的方法，其特征在于，所述方法包括：对有需要的受试者给予权利要求5所述的淀粉样蛋白 $\beta$ 短肽、权利要求6所述的示踪分子、权利要求7所述的药物和/或权利要求8所述的纳米递送系统；

优选地，所述脑部疾病为脑肿瘤或脑部其它疾病；

更优选地，所述脑肿瘤为脑转移瘤和/或原发性脑肿瘤。

13. 一种用于诊断脑肿瘤及脑内其它疾病病灶的方法，其特征在于，所述方法包括：对有需要的受试者给予权利要求 5 所述的淀粉样蛋白  $\beta$  短肽、权利要求 6 所述的示踪分子、权利要求 7 所述的药物和/或权利要求 8 所述的纳米递送系统；优选地，所述脑肿瘤为脑转移瘤和/或原发性脑肿瘤。

14. 一种脑肿瘤或脑部其它疾病病灶的靶向干预方法，其特征在于，所述方法包括：对有需要的受试者给予权利要求 5 所述的淀粉样蛋白  $\beta$  短肽、权利要求 6 所述的示踪分子、权利要求 7 所述的药物和/或权利要求 8 所述的纳米递送系统；优选地，所述脑肿瘤为脑转移瘤和/或原发性脑肿瘤。

15. 一种药物介导方法，其特征在于，所述方法包括：对有需要的受试者给予权利要求 5 所述的淀粉样蛋白  $\beta$  短肽、权利要求 6 所述的示踪分子、权利要求 7 所述的药物和/或权利要求 8 所述的纳米递送系统。

图 1

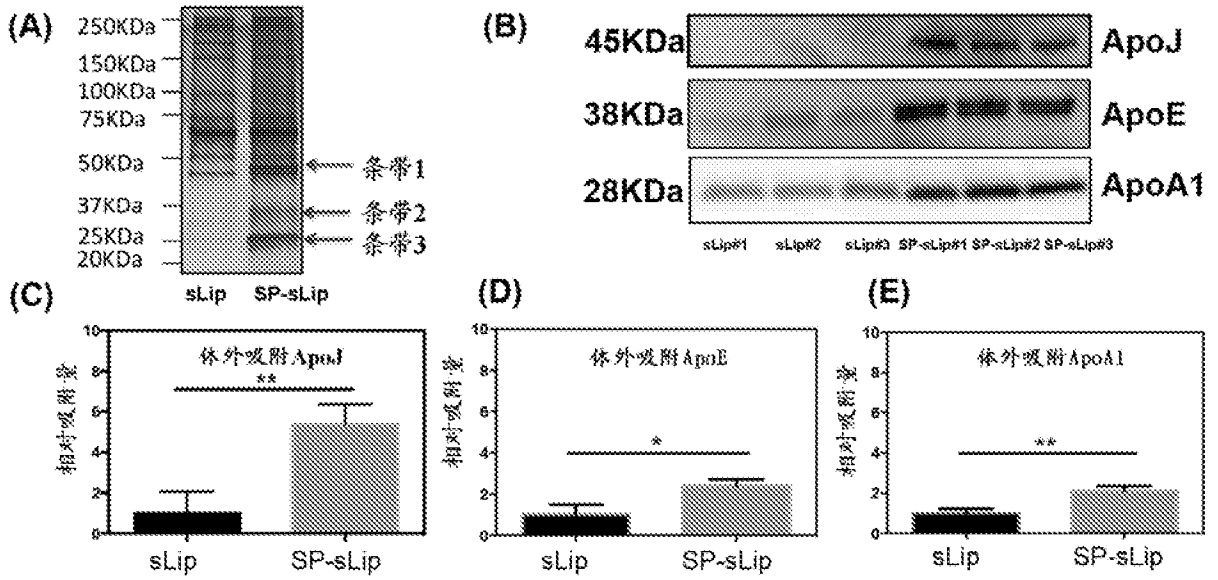


图 2

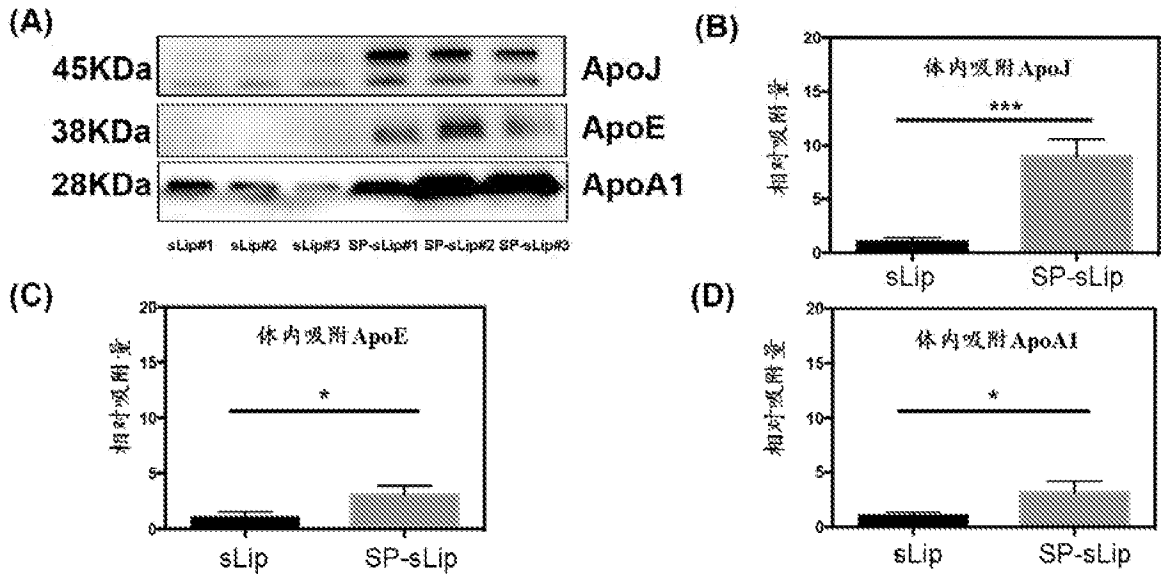


图 3

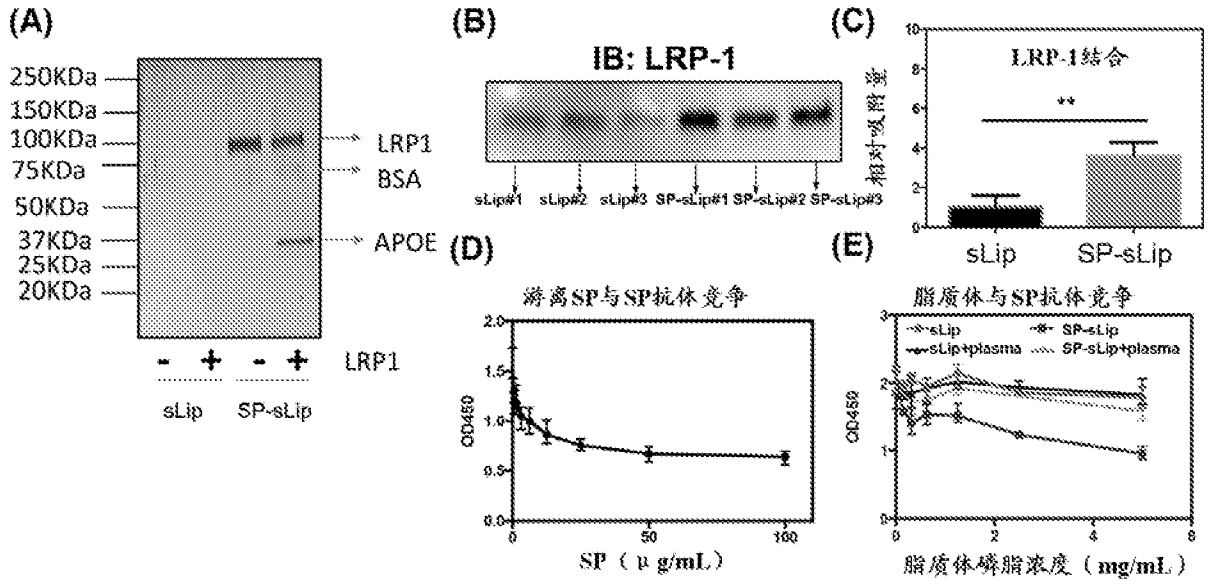


图 4

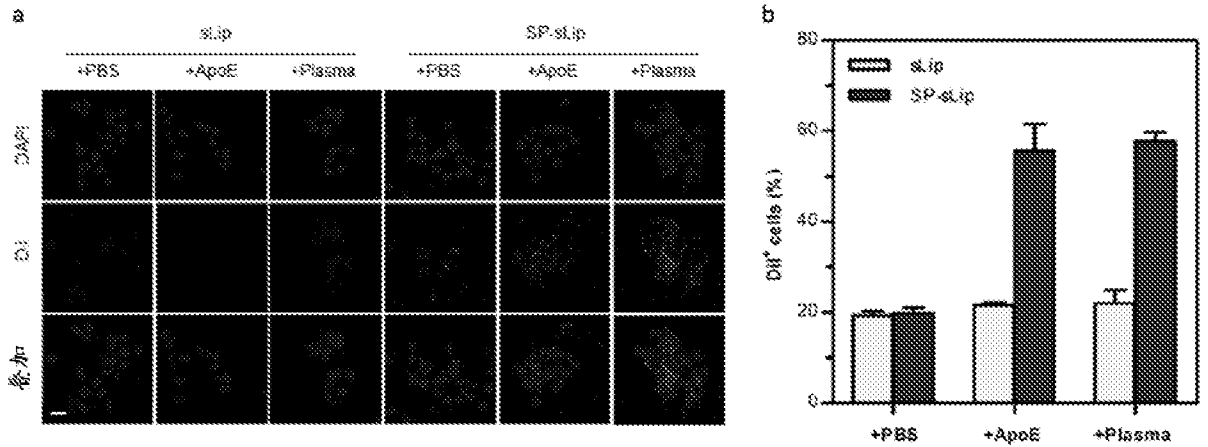


图 5

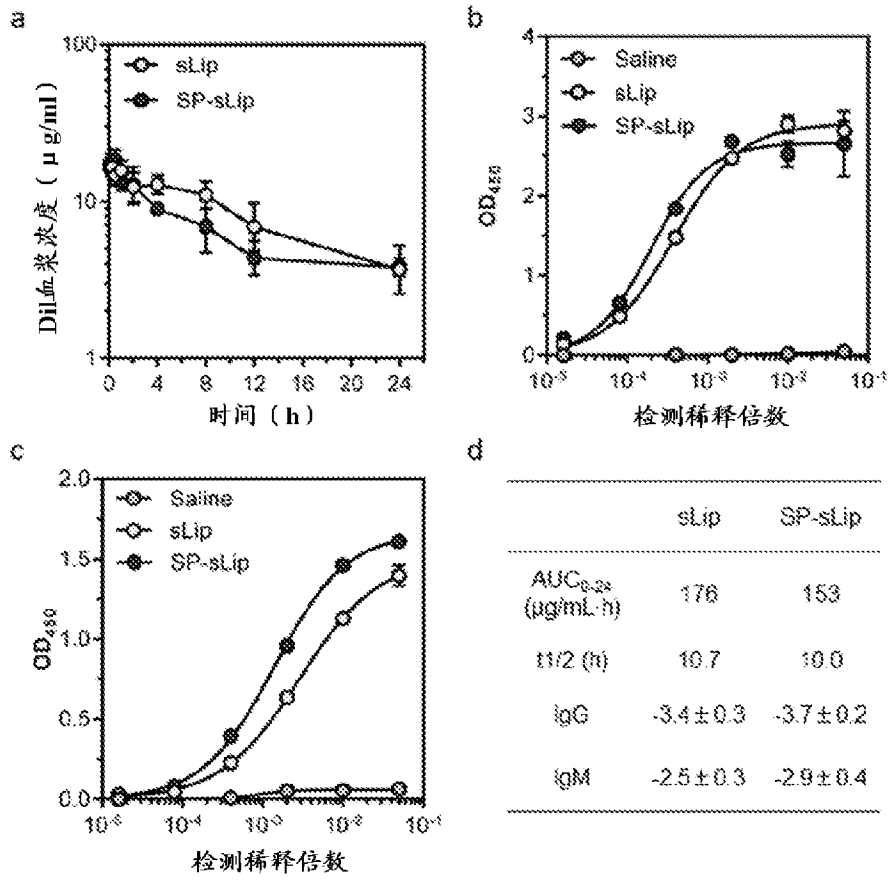


图 6

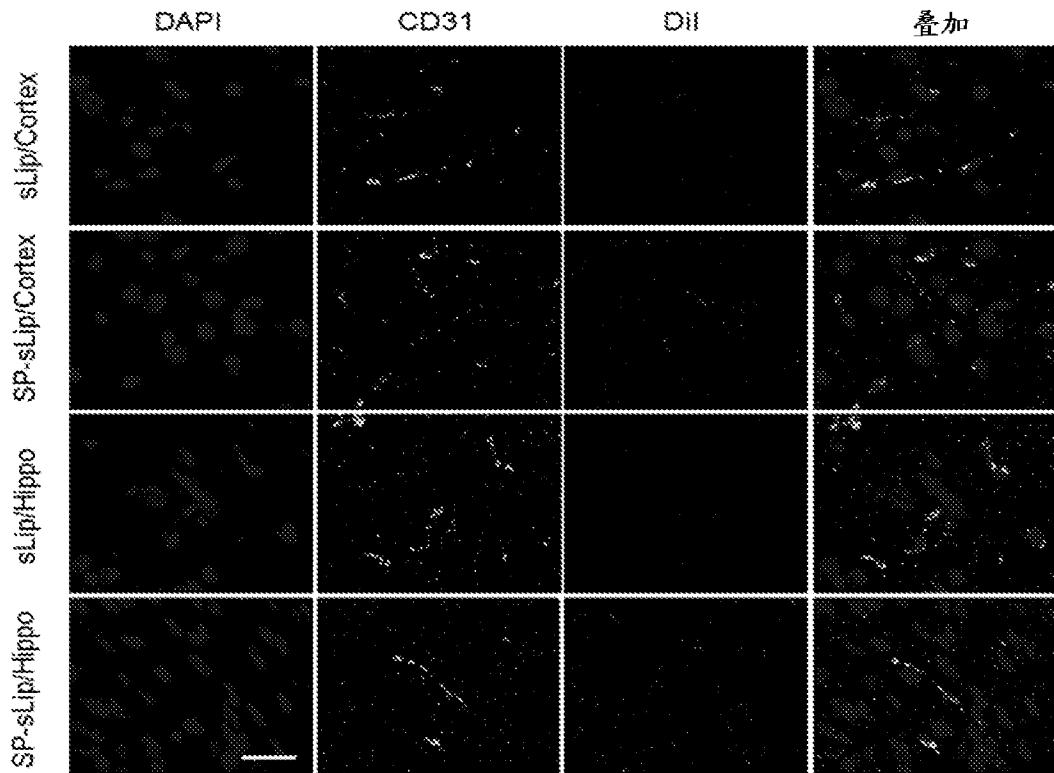


图 7

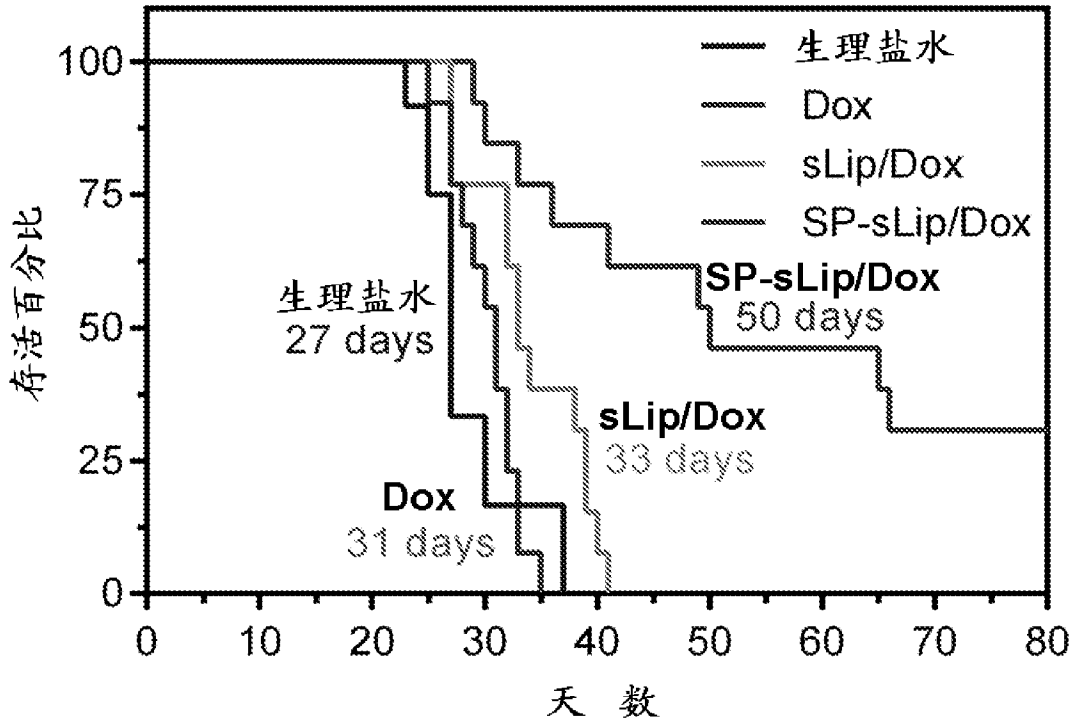


图 8

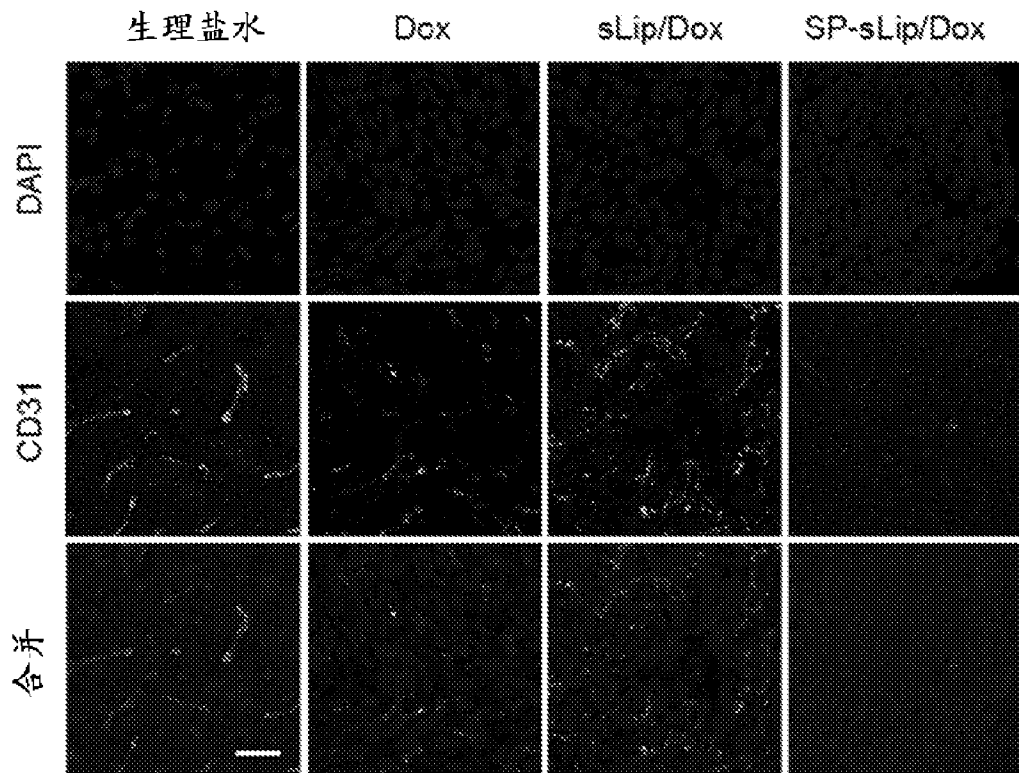


图 9

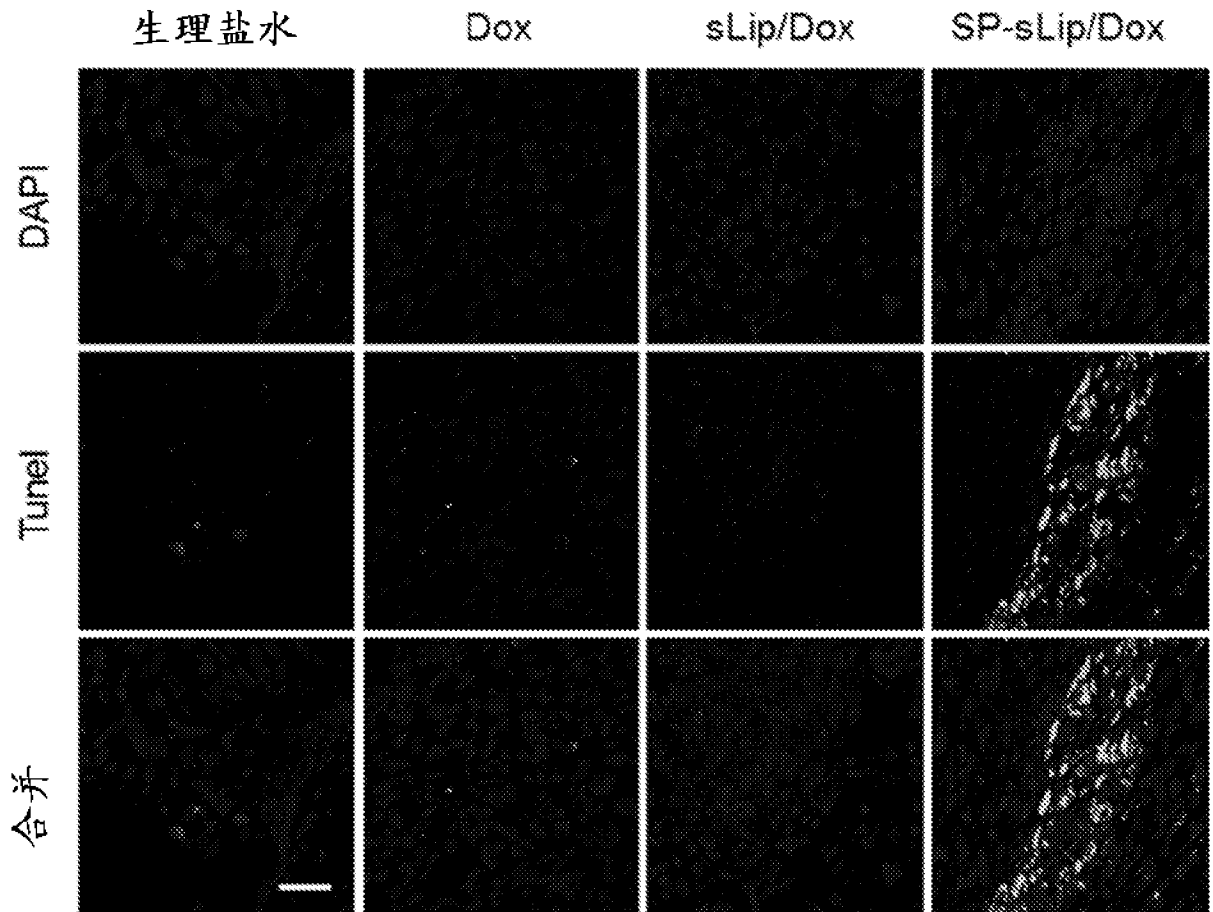
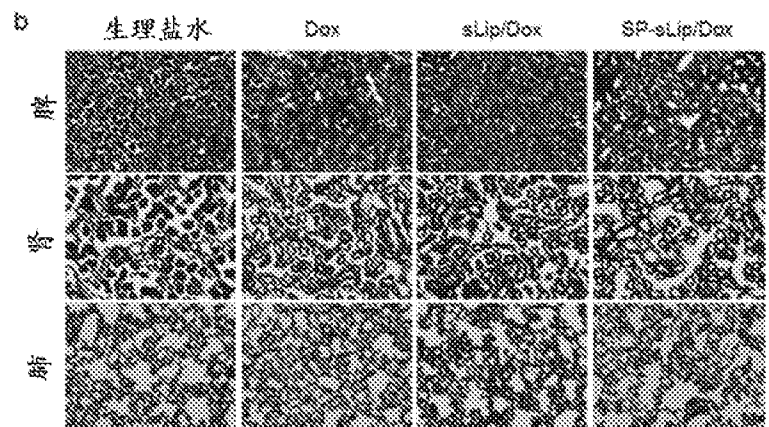
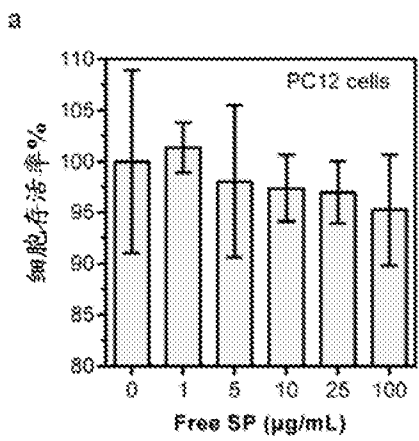


图 10



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/087363

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
A61K 47/42(2017.01)i; A61K 49/00(2006.01)i; A61K 9/127(2006.01)i; A61K 47/34(2017.01)i; A61P 35/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K; A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS; CNTXT; DWPI; USTXT; WPTXT; EPTXT; STN; NEXT; ISI WEB OF KNOWLEDGE; 占昌友, 复旦大学, 短肽, $\beta$ 淀粉样蛋白, 偶联, 脑靶向, 血脑屏障, short peptide, $\beta$ amyloid, conjugate, brain target, blood brain barrier		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 104558117 A (FUDAN UNIVERSITY) 29 April 2015 (2015-04-29) claims 2-3 and 9-11, and description, paragraphs 0007 and 0012	1-15
Y	BACHMEIER, C. et al. "A Multifaceted Role for apoE in the Clearance of Beta-Amyloid across the Blood-Brain Barrier" <i>Neurodegener Diseases</i> , Vol. vol. 11, 03 November 2012 (2012-11-03), 13-21	1-15
Y	CN 103622915 A (FUDAN UNIVERSITY) 12 March 2014 (2014-03-12) claims 1-8	1-15
Y	CN 102212116 A (FUDAN UNIVERSITY) 12 October 2011 (2011-10-12) claims 1-7	1-15
Y	CN 106333926 A (FUDAN UNIVERSITY) 18 January 2017 (2017-01-18) claims 1-11	1-15
Y	CN 102151336 A (FUDAN UNIVERSITY) 17 August 2011 (2011-08-17) claims 1-11	1-15
A	US 9790286 B2 (GONZALEZ, L.I.) 17 October 2017 (2017-10-17) entire document	1-15
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search <b>06 August 2019</b>		Date of mailing of the international search report <b>20 August 2019</b>
Name and mailing address of the ISA/CN <b>China National Intellectual Property Administration No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088 China</b>		Authorized officer
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No.

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: **12-15**  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  - [1] Claims 12-15 set forth a diagnosis or treatment method for brain tumour or brain diseases, and do not comply with PCT Rule 39.1(iv). The search is carried out based on the designation of the subject matter “a use of the  $\beta$ -amyloid short peptide of claim 5, the labelled molecule of claim 6, the drug of claim 7 and/or the nano delivery system of claim 8 in preparation of drugs for diagnosis or treatment of brain tumour or brain diseases and polypeptide-mediated brain-targeted drugs”.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2019/087363**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	104558117	A	29 April 2015	CN	104558117	B	16 January 2018
CN	103622915	A	12 March 2014	CN	103622915	B	07 October 2015
CN	102212116	A	12 October 2011	CN	102212116	B	10 July 2013
CN	106333926	A	18 January 2017	None			
CN	102151336	A	17 August 2011	CN	102151336	B	29 May 2013
US	9790286	B2	17 October 2017	US	2015050351	A1	19 February 2015

<p><b>A. 主题的分类</b></p> <p>A61K 47/42(2017.01)i; A61K 49/00(2006.01)i; A61K 9/127(2006.01)i; A61K 47/34(2017.01)i; A61P 35/00(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																										
<p><b>B. 检索领域</b></p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>A61K; A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS; CNTXT; DWPI; USTXT; WPTXT; EPTXT; STN next; ISI Web of Knowledge: 占昌友, 复旦大学, 短肽, <math>\beta</math> 淀粉样蛋白, 偶联, 脑靶向, 血脑屏障, short peptide, <math>\beta</math> amyloid, conjugate, brain target, blood brain barrier</p>																										
<p><b>C. 相关文件</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>CN 104558117 A (复旦大学) 2015年 4月 29日 (2015 - 04 - 29) 权利要求2-3, 9-11; 说明书第0007, 0012段</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>BACHMEIER C. et al. "A Multifaceted Role for apoE in the Clearance of Beta-Amyloid across the Blood-Brain Barrier" Neurodegener Diseases, 第11卷, 2012年 11月 3日 (2012 - 11 - 03), 13-21</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 103622915 A (复旦大学) 2014年 3月 12日 (2014 - 03 - 12) 权利要求1-8</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 102212116 A (复旦大学) 2011年 10月 12日 (2011 - 10 - 12) 权利要求1-7</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 106333926 A (复旦大学) 2017年 1月 18日 (2017 - 01 - 18) 权利要求1-11</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 102151336 A (复旦大学) 2011年 8月 17日 (2011 - 08 - 17) 权利要求1-11</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 9790286 B2 (GONZALEZ LUCIA IRENE) 2017年 10月 17日 (2017 - 10 - 17) 全文</td> <td>1-15</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	Y	CN 104558117 A (复旦大学) 2015年 4月 29日 (2015 - 04 - 29) 权利要求2-3, 9-11; 说明书第0007, 0012段	1-15	Y	BACHMEIER C. et al. "A Multifaceted Role for apoE in the Clearance of Beta-Amyloid across the Blood-Brain Barrier" Neurodegener Diseases, 第11卷, 2012年 11月 3日 (2012 - 11 - 03), 13-21	1-15	Y	CN 103622915 A (复旦大学) 2014年 3月 12日 (2014 - 03 - 12) 权利要求1-8	1-15	Y	CN 102212116 A (复旦大学) 2011年 10月 12日 (2011 - 10 - 12) 权利要求1-7	1-15	Y	CN 106333926 A (复旦大学) 2017年 1月 18日 (2017 - 01 - 18) 权利要求1-11	1-15	Y	CN 102151336 A (复旦大学) 2011年 8月 17日 (2011 - 08 - 17) 权利要求1-11	1-15	A	US 9790286 B2 (GONZALEZ LUCIA IRENE) 2017年 10月 17日 (2017 - 10 - 17) 全文	1-15
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																								
Y	CN 104558117 A (复旦大学) 2015年 4月 29日 (2015 - 04 - 29) 权利要求2-3, 9-11; 说明书第0007, 0012段	1-15																								
Y	BACHMEIER C. et al. "A Multifaceted Role for apoE in the Clearance of Beta-Amyloid across the Blood-Brain Barrier" Neurodegener Diseases, 第11卷, 2012年 11月 3日 (2012 - 11 - 03), 13-21	1-15																								
Y	CN 103622915 A (复旦大学) 2014年 3月 12日 (2014 - 03 - 12) 权利要求1-8	1-15																								
Y	CN 102212116 A (复旦大学) 2011年 10月 12日 (2011 - 10 - 12) 权利要求1-7	1-15																								
Y	CN 106333926 A (复旦大学) 2017年 1月 18日 (2017 - 01 - 18) 权利要求1-11	1-15																								
Y	CN 102151336 A (复旦大学) 2011年 8月 17日 (2011 - 08 - 17) 权利要求1-11	1-15																								
A	US 9790286 B2 (GONZALEZ LUCIA IRENE) 2017年 10月 17日 (2017 - 10 - 17) 全文	1-15																								
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																										
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>"&amp;" 同族专利的文件</p>																										
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2019年 8月 6日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2019年 8月 20日</p>																								
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>吴铁生</p> <p>电话号码 010-53961870</p>																								

## 第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1.  权利要求： 12-15  
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：  
[1] 权利要求12-15请求保护脑肿瘤或脑部疾病的诊断或治疗方法，其不符合PCT实施细则39.1(IV)的规定，基于主题名称：权利要求5所述的 $\beta$ 淀粉样短肽、权利要求6所述的示踪分子、权利要求7所述的药物和/或权利要求8所述的纳米递送系统在制备诊断或治疗脑肿瘤或脑部疾病药物及多肽介导的脑靶向药物中的用途进步检索。
2.  权利要求：  
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3.  权利要求：  
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/087363

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	104558117	A	2015年 4月 29日	CN	104558117	B	2018年 1月 16日
CN	103622915	A	2014年 3月 12日	CN	103622915	B	2015年 10月 7日
CN	102212116	A	2011年 10月 12日	CN	102212116	B	2013年 7月 10日
CN	106333926	A	2017年 1月 18日	无			
CN	102151336	A	2011年 8月 17日	CN	102151336	B	2013年 5月 29日
US	9790286	B2	2017年 10月 17日	US	2015050351	A1	2015年 2月 19日