

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[ 51 ] Int. Cl<sup>7</sup>  
**A61K 9/14**  
A61K 47/34 A61K 47/42



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410025173.5

[43] 公开日 2005 年 2 月 23 日

[11] 公开号 CN 1582902A

[22] 申请日 2004. 6. 15  
[21] 申请号 200410025173.5  
[71] 申请人 复旦大学  
地址 200433 上海市邯郸路 220 号  
[72] 发明人 陆 伟 蒋新国

[74] 专利代理机构 上海正旦专利代理有限公司  
代理人 包兆宜

权利要求书 2 页 说明书 13 页 附图 1 页

[54] 发明名称 一种可脑内递药的药物传递系统  
[57] 摘要

本发明涉及的是一种新型的具有脑内递药特性的药物传递系统，由纳米粒作为药物的载体，纳米粒表面与阳离子化白蛋白进行共价连接而构成。本传递系统能够传递小分子化学药物、诊断药物、多肽蛋白药物以及基因药物通过血脑屏障进入脑内，发挥预防、治疗和诊断作用。 药物装载于该传递系统内，能够提高药物透过血脑屏障进入脑内的量，从而相应减少外周组织中分布的药量，在增强中枢预防、治疗和诊断效果的同时，降低全身性毒副作用，比传统的剂型给药剂量减少。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种可脑内递药的药物传递系统，其特征在于采用纳米粒作为药物的载体包载药物，所述纳米粒通过表面的功能性聚乙二醇与阳离子白蛋白共价连接，制成可脑内递药的药物传递系统。
2. 按权利要求 1 所述的可脑内递药的药物传递系统，其特征在于所述的纳米粒的制备材料采用聚乙二醇-聚乳酸嵌段共聚物和功能性的聚乙二醇-聚乳酸嵌段共聚物；或氰基丙烯酸聚乙二醇酯-氰基丙烯酸十六烷基酯共聚物和功能性的聚乙二醇酯-氰基丙烯酸十六烷基酯共聚物。
3. 按权利要求 2 的可脑内递药的药物传递系统，其特征在于所述的聚乙二醇-聚乳酸嵌段共聚物或氰基丙烯酸聚乙二醇酯-氰基丙烯酸十六烷基酯共聚物中的聚乙二醇部分，可以是聚乙二醇的衍生物。
4. 按权利要求 2 的可脑内递药的药物传递系统，其特征在于所述的聚乙二醇-聚乳酸嵌段共聚物或氰基丙烯酸聚乙二醇酯-氰基丙烯酸十六烷基酯共聚物中的聚乙二醇部分，是单甲氧基聚乙二醇。
5. 按权利要求 2 的可脑内递药的药物传递系统，其特征在于所述的功能性的聚乙二醇-聚乳酸嵌段共聚物或氰基丙烯酸功能性的聚乙二醇酯-氰基丙烯酸十六烷基酯共聚物中的功能性的聚乙二醇部分，其一端的功能性基团可以是马来酰亚胺基、巯基、酰肼基、生物素或亲和素中的一种。
6. 按权利要求 1 的药物传递系统，其特征在于所述的阳离子白蛋白是阳离子化牛血清白蛋白、阳离子化人血清白蛋白或阳离子化鼠血清白蛋白中的一种或几种。
7. 按权利要求 1 的药物传递系统，其特征在于所述的传递系统的粒径为 1-1000nm。
8. 按权利要求 1 的药物传递系统，其特征在于所述的传递系统的粒径为 1-200nm。
9. 按权利要求 1 的药物传递系统，其特征在于所述的纳米粒包载的

药物可以是小分子化学药物或诊断药物或多肽蛋白药物或基因药物或其中的一种或几种。

10. 按权利要求 1 的可脑内递药的药物传递系统的制备方法，通过下述步骤，

(1) 制备包载药物的纳米粒，

将聚乙二醇-聚乳酸嵌段共聚物和功能性聚乙二醇-聚乳酸嵌段共聚物混合，或将氰基丙烯酸聚乙二醇酯-氰基丙烯酸十六烷基酯共聚物 and 氰基丙烯酸功能性聚乙二醇酯-氰基丙烯酸十六烷基酯共聚物混合后，按乳化聚合法、界面聚合法、溶剂沉淀法、溶剂蒸发法、单体聚合法或乳化交联法制备包载药物的纳米粒；

(2) 将白蛋白进行阳离子化修饰，

将乙二氨或己二氨与白蛋白缩合，形成阳离子白蛋白；

(3) 将载药纳米粒与阳离子白蛋白共价连接。

11. 按权利要求 10 的药物传递系统的制备方法，其特征在于所述药物传递系统其中纳米粒通过其表面功能性聚乙二醇末端的功能性官能团与阳离子白蛋白共价连接。

12. 按权利要求 11 的药物传递系统的制备方法，其中阳离子白蛋白与纳米粒表面功能性聚乙二醇末端的功能性官能团共价连接的方式是先将阳离子白蛋白巯基化修饰，再将其巯基与功能性聚乙二醇末端的马来酰亚胺基连接，或是先将阳离子白蛋白巯基化修饰，再将其巯基与功能性聚乙二醇末端的巯基连接，或是将阳离子白蛋白上酸性氨基酸残基的羧基与功能性聚乙二醇末端的酰肼基团连接，或是阳离子白蛋白与功能性聚乙二醇末端通过生物素-亲和素连接。

## 一种可脑内递药的药物传递系统

### 技术领域

本发明属药物制剂领域，涉及药物传递系统，具体涉及一种将小分子化学药物、诊断药物、多肽蛋白药物以及基因药物传递入脑的新型传递系统。

### 背景技术

血脑屏障（BBB），是由脑血管内皮细胞、基底膜和神经胶质细胞组成，它限制了物质转运入脑。绝大多数的药物不能够或者是无法有效的通过 BBB。因此，常规途径给药后要获得脑部的药物治疗浓度，必须加大给药剂量，由此引起外周组织药物的高浓度而对机体造成严重的副作用。

目前克服 BBB 增加药物脑内传递的技术可以分为侵袭性和非侵袭性两种。侵袭性的给药方法包括高渗休克、颈动脉注射血管活性物质和直接脑室注射给药。这些方法虽然有效，但易造成脑部感染和 BBB 的损伤以及外科性损伤。为能够克服外科手术所带来的创伤和危险，非侵袭性给药途径的给药方法更具有临床价值。其中，采用酯化、化学传递系统和载体介导转运方式增加药物分子脑内摄取的方法，需要将药物直接进行化学修饰，因此，对于药物的分子量和理化性质有较高的要求，具有一定的局限性。此外，载体介导转运系统是由内皮细胞膜上的转运蛋白形成空间结构特异的孔隙而介导转运，由于空间位阻的作用，限制了分子量较大的多肽蛋白类药物的脑内转运。

另一类非侵袭性给药途径的方法是胞吞转运，它利用脑毛细血管内皮细胞膜发生内陷，形成有被小窝，胞吞药物或载体进入内皮细胞，进而在胞内体中包装，穿过胞浆后以胞吐的方式介导相应的药物入脑。由于胞吞转运机制能够介导大分子蛋白质甚至更大的载药微粒系

统（脂质体或纳米粒）转运入脑，克服了上述药物转运途径对药物分子量和空间位阻的限制。同时，将药物包载入微粒载体系统，无需对药物进行化学修饰，因此更适合于多肽蛋白类大分子药物的脑内传递。介导药物胞吞转运的方式包括受体介导的胞吞转运和吸附介导的胞吞转运。其中，利用受体介导胞吞转运药物入脑，在动物实验中已得到证实，如采用小鼠抗大鼠转铁蛋白受体单克隆抗体（OX26）作为靶向头基，可以介导与其连接的药物分子或者药物储库（脂质体）入脑。但是，其免疫原性和动物种属选择性较强，应用到人体需采用抗人转铁蛋白受体单抗，必须通过基因工程技术制备人源化的嵌合抗体，制备技术较为复杂。而吸附介导胞吞转运是由阳离子修饰的蛋白如 IgG 抗体和白蛋白，通过静电吸附血脑屏障上的阴离子电荷，包括腔面侧的唾液酸和基膜侧的硫酸肝素，引起胞吞转运使蛋白进入脑内。阳离子白蛋白目前被认为是这一类阳离子修饰蛋白中的代表。采用阳离子化的人血清白蛋白可以降低临床应用时的免疫原性，制备方法相对比较简便，具有较好的应用前景。

利用阳离子化白蛋白作为靶向头基介导药物的脑内传递，国外已有报道。如将阳离子化白蛋白通过二硫键与  $\beta$ -内啡肽直接连接，可以增加药物的脑内传递；采用生物素、亲和素系统将载体与药物相连的可行性也已得到证实。但以上研究中靶向头基直接与药物连接，载药量非常有限。为了增加该系统的载药能力，有研究报道，将阳离子化白蛋白与载药脂质体连接，通过体外试验证实能够增加脑毛细血管内皮细胞对药物的摄取，但是以脂质体作为药物储库仍存在载药量低，且膜不稳定以及药物容易泄漏等问题。

另有报道，采用吐温表面修饰的纳米粒能够增加脑内药物的传递，但是由于吐温是通过物理吸附的方式修饰在纳米粒的表面，因此纳米粒进入血液后，表面的吐温极易解离而失去效果。

#### 发明内容

本发明的目的是提供一种能够透过血脑屏障，具有脑内递药特性的药物传递系统。具体涉及一种将小分子化学药物、诊断药物、多肽

蛋白药物以及基因药物传递入脑的新型传递系统。

本发明采用纳米粒作为药物的载体包载药物，通过纳米粒表面的功能性聚乙二醇与阳离子化白蛋白共价连接，制成能够透过血脑屏障、具有脑内递药特性的药物传递系统。该传递系统可以传递小分子化学药物、诊断药物、多肽蛋白药物以及基因药物入脑，从而提高中枢预防、治疗和诊断效果，减少外周毒副作用。

本发明与阳离子化白蛋白结合的载药脂质体相比较，避免了以脂质体作为药物储库存在载药量低、膜不稳定以及药物容易泄漏等问题。本发明以阳离子化白蛋白作为药物载体的脑内靶向头基，与单克隆抗体相比较，制备方法较为方便，免疫原性较低，无须制备人源化嵌合抗体。本发明与吐温修饰的纳米粒比较，克服了因吐温物理吸附而引起的修饰不稳定。

通常，药物传递系统，是指能够包载并输送药物的复合体，它可以是通过药剂学手段制备的各种微粒、脂质体、纳米粒等复合体。本发明所涉及的药物传递系统，特指以药剂学手段制备的纳米粒作为药物载体，表面共价连接阳离子化白蛋白的复合体。本发明传递系统能够使包载的药物透过 BBB，以增加其脑内的传递。

本发明所述的纳米粒可选用下述高分子材料制备：

聚乙二醇-聚乳酸嵌段共聚物（PEG-PLA）和功能性聚乙二醇-聚乳酸嵌段共聚物。其中，PEG-PLA 的聚乙二醇的分子量范围是 1000-20000，优选分子量为 2000-5000，聚乳酸的分子量范围是 2000-200000，优选分子量为 10000-100000，所述的 PEG-PLA 的聚乙二醇部分，可以是聚乙二醇的衍生物，如单甲氧基聚乙二醇；功能性聚乙二醇-聚乳酸嵌段共聚物中的功能性聚乙二醇部分，其一端的功能性基团可以是马来酰亚胺基、巯基、酰肼基、生物素或亲和素中的一种，其中，功能性聚乙二醇的分子量范围可以是 1000-20000，优选 2000-5000，聚乳酸的分子量范围可以是 2000-200000，优选 10000-100000。

或选用氰基丙烯酸聚乙二醇酯-氰基丙烯酸十六烷基酯共聚物

[Poly(PEGCA-co-HDCA)]和氰基丙烯酸功能性聚乙二醇酯—氰基丙烯酸十六烷基酯共聚物。其中，Poly(PEGCA-co-HDCA)的聚乙二醇的分子量范围是1000-20000，优选分子量为2000-5000，所述的氰基丙烯酸十六烷基酯单元的数目可以是1-5个；氰基丙烯酸功能性聚乙二醇酯—氰基丙烯酸十六烷基酯共聚物中，功能性聚乙二醇部分，其一端的功能性基团可以是马来酰亚胺基、巯基、酰肼基、生物素或亲和素中的一种，所述氰基丙烯酸功能性聚乙二醇酯—氰基丙烯酸十六烷基酯共聚物中，功能性聚乙二醇的分子量范围可以是1000-20000，优选2000-5000，所述共聚物中氰基丙烯酸十六烷基酯单元的数目可以是1-5个。

本发明将PEG-PLA和功能性聚乙二醇—聚乳酸嵌段共聚物按1-1000:1混合，或将Poly(PEGCA-co-HDCA)和氰基丙烯酸功能性聚乙二醇酯—氰基丙烯酸十六烷基酯共聚物1-1000:1混合后，按下述常规制备方法的一种或几种制备纳米粒，所述方法包括以水相作为连续相的乳化聚合法、以油相作为连续相的乳化聚合法、界面聚合法、溶剂沉淀法、溶剂蒸发法、单体聚合法和水溶性聚合物乳化后交联的方法。其中乳化法制备的乳滴可以是单乳也可以是复乳。

其中，采用乳化/溶剂蒸发法可以包载水溶性小分子药物、多肽蛋白类药物以及基因药物。将所述药物首先溶解于内水相，将高分子材料溶解于有机溶剂，超声乳化形成w/o型初乳，再加入外水相乳化形成w/o/w型复乳，除去有机溶剂后即形成载药纳米粒。对于包载疏水性药物，可与聚合物一起溶解于有机溶剂中，缓慢滴加入水相，以水相作为连续相乳化形成o/w型乳滴，除去有机溶剂后即形成载药纳米粒。

由高分子材料形成的纳米粒，以疏水的聚乳酸或聚氰基丙烯酸酯作为内核包载药物，以亲水的聚乙二醇或其衍生物如单甲氧基聚乙二醇，包裹在外表面，可以减少血浆蛋白吸附，避免单核吞噬系统的吞噬，起到“隐形”作用，显著延长其血浆半衰期，从而增加其到达脑毛细血管部位的机会，提高脑内递药的可能性。

纳米粒通过其表面功能性聚乙二醇末端的功能性官能团与阳离子白蛋白共价连接。纳米粒表面的功能性聚乙二醇，一端是游离的羟基，可以与乳酸或聚氰基丙烯酸酯缩合反应，形成功能性聚乙二醇-聚乳酸嵌段共聚物或氰基丙烯酸酯-聚乙二醇-聚乳酸嵌段共聚物；功能性聚乙二醇可以通过其另一端的功能性基团与阳离子化白蛋白共价结合。所述功能性基团及连接方式可以是功能性聚乙二醇一端的马来酰亚胺基团与阳离子化白蛋白或巯基化阳离子化白蛋白上的巯基连接；功能性聚乙二醇一端的酰肼基团通过羧基活化剂如 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐 (EDAC)，与阳离子化白蛋白酸性氨基酸残基的羧基连接；功能性聚乙二醇一端的巯基可以通过 3-(2-吡啶基巯基) 丙酸-N-琥珀酰亚胺 (SPDP) 与巯基化阳离子化白蛋白上的巯基连接；功能性聚乙二醇一端可以通过生物素-亲和素与阳离子化白蛋白连接。

本发明纳米粒表面共价连接的阳离子化白蛋白可以是阳离子修饰的牛血清白蛋白 (CBSA)、阳离子修饰的人血清白蛋白 (CHSA) 或阳离子修饰的鼠血清白蛋白 (CRSA)。

所述阳离子修饰的白蛋白可以通过 1,2-乙二胺或 1,6-己二胺与白蛋白酸性氨基酸残基的羧基缩合，形成阳离子白蛋白。

阳离子化白蛋白可以与 BBB 上的硫酸肝素或唾液酸部分结合，通过吸附介导胞吞转运方式转运整个药物传递系统进入脑内。本发明药物传递系统的粒径范围为 1-1000nm，优选粒径 1-200nm，最优选粒径为 50nm-150nm，其中，连接在每个纳米粒表面的阳离子化白蛋白个数为 5-1000 个，优选 25-100 个。

纳米粒表面的功能性、非功能性 PEG 也可由鞘磷脂代替。

包载于纳米粒中的药物可以是小分子化学药物、诊断药物、多肽蛋白药物以及基因药物中的一种或者几种。其中，小分子化学药物、诊断药物或多肽蛋白药物可以作用于神经突触连接部位，可以是全身麻醉或局部麻醉药物如阿片受体激动剂或阻断剂，催眠药和镇静药，精神病药物如治疗忧郁症药物或精神分裂症药物，抗癫痫药或抗惊厥

药, 治疗亨廷顿舞蹈病或阿尔采默病药物, 神经保护剂, 如兴奋性氨基酸拮抗剂、神经营养因子或神经再生剂, 营养因子如脑源性神经营养因子、睫状神经营养因子或神经生长因子, 治疗中枢创伤和卒中的药物, 治疗吸毒和缓解成瘾性的药物, 抗寄生虫或微生物感染药物, 免疫抑制剂和抗癌药物, 激素和激素拮抗剂, 重金属和重金属拮抗剂, 核医学诊断试剂, 放射治疗药物, 神经递质及其受体的激动剂和拮抗剂及其前体及代谢产物, 抗组胺药, 止吐药, 肌松弛药, 脑血管扩张和收缩药, 治疗偏头痛药物, 催眠药, 升高和降低血糖药物, 减肥药或治疗哮喘药物。

基因药物是包含有治疗基因的质粒 DNA, 含有至少 100 个核苷酸序列或者分子量在 30000 以上, 质粒或者载体被纳米粒包载, 其表面共价连接阳离子白蛋白, 将基因药物传递入脑。其中治疗基因包括脑源性神经营养因子基因, 用于治疗神经退行性疾病、中风和脑创伤; 酪氨酸羟化酶和/或芳香性氨基酸脱羧酶基因, 用于治疗帕金森病;  $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶基因; 氨基己糖苷酶 A 基因; 肿瘤调亡基因; 单纯疱疹病毒胸苷激酶基因; 或者是编码表皮生长因子受体基因的反义 RNA; 编码获得性免疫缺陷综合症基因的反义 RNA。除了治疗基因以外, 质粒 DNA 还包括在治疗基因前后的 DNA 序列, 可以是起动机、增强子, 促进治疗基因转录的 mRNA 蛋白翻译和稳定的 DNA 序列, 能够使游离基因在被转染的细胞中复制的 DNA 序列。

本发明还可通过多聚阳离子蛋白浓缩核苷酸形成粒径 10-30nm 结构, 再将其包载入纳米粒, 提高纳米粒中包载基因的数目。

载有药物的本传递系统可以通过静脉注射、肌肉注射或皮下注射非侵袭性给药途径给药。

载有药物的本传递系统可以分散在药剂学上可以接受的各种缓冲溶液环境中, 包括生理盐水、Tris 缓冲液、磷酸盐缓冲液以及其它的缓冲溶液环境中。

本发明传递系统, 具有以下优点: (1) 与常规给药系统和给药方法相比, 能够提高药物透过血脑屏障进入脑内的量, 从而相应减少外

周组织中分布的药量；(2)在增强中枢预防、治疗和诊断效果的同时，降低全身性毒副作用；(3)与传统的剂型相比较，可望减少给药剂量。

附图说明

图 1. 37℃条件下，BCECs 分别摄取 100μg/ml 载 6-香豆素 CBSA-NP 和 BSA-NP 的纳米粒数量-时间曲线。

图 2. BCECs 在 37℃和 4℃条件下，分别摄取 10-600μg/ml CBSA-NP 和 BSA-NP 1h 的纳米粒数量-浓度曲线。

### 具体实施方式

本发明通过以下描述和实施例进行说明，以下描述为非限制性的，并不限制本发明的权利要求范围。

#### 实施例 1：制备载有荧光染料 6-香豆素的药物传递系统

1) 将 250ml 0.9mol/L 乙二氨缓慢加入 4ml 50%的牛血清白蛋白 (BSA) 中，边加边搅拌，用盐酸调 pH 至 4.75，加入 EDAC 360mg，室温搅拌 2h 后，加入 1.3ml 4mol/L 醋酸盐缓冲液 (pH 4.75)，溶液浓缩至 25ml，透析 72h 后，冻干得到 CBSA。所合成的 CBSA 用 SDS-PAGE 鉴定分子量，用等电聚焦电泳 (IEF) 鉴定等电点。IEF 结果显示 CBSA 的等电点在 8-9 之间，SDS-PAGE 表明 CBSA 的分子量于 BSA 接近，分子量均为 66000D 左右。

取 10μl 10mg/ml S-乙酰-巯基乙酸-N-琥珀酰亚胺 (SATA) 的二甲基亚砜溶液，加入含 CBSA 1mg (1mg/ml) 的 HEPES 溶液 (pH 7.4) 中，搅拌 30 min，超滤去除二甲基亚砜。每毫升 CBSA 溶液加入 100μl 0.1M 羟胺反应 30min，得到巯基化 CBSA。经 Ellman's 试剂测定 CBSA 和 BSA 的巯基化程度均在 3-4mol 巯基/mol 蛋白之间。

#### 制备载有 6-香豆素的 PEG 化纳米粒

将 50μl 蒸馏水加入 1ml 含有 24mg 单甲氧基聚乙二醇<sub>3000</sub>-聚乳酸<sub>28600</sub> (MPEG-PLA)、2.4mg 马来酰亚胺-聚乙二醇<sub>3400</sub>-聚乳酸<sub>23900</sub> (maleimide-PEG-PLA) 嵌段共聚物和 15μg 6-香豆素的二氯甲烷中，160W 连续超声 30s 制备 w/o 型初乳。将初乳加入 2ml 1%的胆酸钠溶液中，间断超声 160W 30 次 (1s/次)，得到 w/o/w 型复乳。将复乳加

入 38ml 0.5% 的胆酸钠溶液中, 搅拌 1min 后, 40℃ 旋转蒸发除去二氯甲烷, 4℃ 15000rpm 离心 45min, 去除上清, 用 0.01mol/L pH7.0 HEPES 重新混悬。

制备载 6-香豆素的 CBSA 表面共价结合的纳米粒 (CBSA-NP) 和载 6-香豆素 BSA 表面共价结合的纳米粒 (BSA-NP)

将巯基化的 CBSA 按照巯基与纳米粒中马来酰亚胺基的摩尔比 1:1 进行反应, 室温搅拌过夜。反应液经过 1.5cm×20cm Sepharose CL-4B 凝胶柱分离, 得到 CBSA-NP, 淋洗液为 0.01mol/L PBS。BSA-NP 的制备和纯化方法同 CBSA-NP, 巯基化的 BSA 按照巯基与纳米粒中马来酰亚胺基的摩尔比 1:1 进行反应。载 6-香豆素的 BSA-NP 作为实验对照组。

粒径分布: 通过静态光散射仪测定载 6-香豆素的 CBSA-NP 数均粒径分布成两个分布相, 平均粒径分别为 123.6 nm (97.2%) 和 346.8 nm (2.8%)。

2) 大鼠脑毛细血管内皮细胞 (BCECs) 摄取载 6-香豆素的 BSA-NP 和 CBSA-NP 的定量实验

BCECs 以 30000 细胞/孔的密度接种于 24 孔培养板, 3 天后进行摄取实验。吸去培养液, 用 Hank's 液 37℃ 孵育 15min, 将载 6-香豆素的 CBSA-NP 和 BSA-NP 以 10-600 μg/ml 不同浓度加入培养板, 分别考察 37℃ 下细胞对不同浓度 CBSA-NP 和 BSA-NP 的摄取; 考察细胞在 4℃ 和 37℃ 下对相同浓度 (100 μg/ml) CBSA-NP 的摄取。用冰冷的 Hank's 液终止摄取, 并用冰冷的醋酸-巴比妥钠缓冲液 (pH 3.0) 洗去吸附在细胞表面的 CBSA-NP 和 BSA-NP, 用 400 μl 1% 的 Triton-X 100 溶解细胞。其中 25 μl 样品用 BCA 试剂盒测定总蛋白量, 200 μl 样品加入 500 μl 甲醇, 37℃ 水浴振荡提取 18h, 15000rpm 离心 10min, 吸取上清 20 μl 进行 HPLC 分析。

结果: BCECs 对载 6-香豆素的 BSA-NP 和 CBSA-NP 摄取呈浓度依赖性和温度依赖性, 证实所述两种纳米粒的摄取为主动转运过程。结果表明, BCECs 摄取 100 μg/ml BSA-NP 和 CBSA-NP 的量随时间的

增加而增加，对于各个时间点 CBSA-NP 的摄取量均高于 BSA-NP。BCECs 在 37℃条件下对 BSA-NP 和 CBSA-NP 摄取的饱和浓度均为 300μg/ml，且 CBSA-NP 的摄取量是 BSA-NP 的 2 倍。在 4℃条件下，BCECs 对 BSA-NP 和 CBSA-NP 摄取未呈现饱和，摄取量均较低。

3) 载 6-香豆素的 BSA-NP 和 CBSA-NP 的跨体外 BBB 转运

采用大鼠 BCECs 和星形胶质细胞共培养作为体外 BBB 模型进行考察。用 Ringer-HEPES 液 (pH 7.4) 平衡 BBB 模型 20min，在培养池的内部加入 1.0ml 10μg/ml 载 6-香豆素的 BSA-NP 或 CBSA-NP 的 Ringer-HEPES 液，在外测的培养孔中加入 2.3ml Ringer-HEPES 液。于 15min, 30min, 45min 和 60min 将培养池转移至另外的含有相同体积 Ringer-HEPES 液的培养孔中，测定不同时间点培养池外测溶液中的药物浓度。根据公式  $P_{ec+as} = (dQ/dt) / (A \times C_0)$ ，计算 BSA-NP 和 CBSA-NP 在共培养模型中的表观渗透系数 ( $P_{ec+as}$ )。其中  $dQ/dt$  为单位时间药物转运量 (ng/min),  $A$  为转运膜的表面积, 此时  $A$  为  $0.9\text{cm}^2$ ,  $C_0$  为纳米粒的初始浓度 (ng/ml), 6-香豆素的浓度采用 HPLC 测定。

采用只接种星形胶质细胞的细胞培养池进行对照实验，计算 BSA-NP 和 CBSA-NP 在星形胶质细胞中的表观渗透系数 ( $P_{as}$ )。根据公式  $1/P_{ec} = 1/P_{ec+as} - 1/P_{as}$ , 计算 BCECs 的表观渗透系数  $P_{ec}$ ，作为体外 BBB 渗透性的评价指标。

结果表明 CBSA-NP 的  $P_{ec}$  是 BSA-NP 的 7.58 倍。表 1 是载 6-香豆素的 BSA-NP 和 CBSA-NP 在体外 BBB 模型中的表观渗透系数 ( $P_{ec+as}$ )、在星形胶质细胞单层中的表观渗透系数( $P_{as}$ )以及在 BCECs 单层中的表观渗透系数( $P_{ec}$ )。

表 1

| 浓度<br>(10 μg/ml) | $P_{ec+as}$<br>( $\times 10^{-3}$ cm/min) | $P_{as}$<br>( $\times 10^{-3}$ cm/min) | $P_{ec}$<br>( $\times 10^{-3}$ cm/min) | CBSA-NP 与<br>BSA-NP $P_{ec}$ 的比值 |
|------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------|
| CBSA-NP          | 0.9797                                    | 2.4323                                 | 1.6403                                 | 7.58                             |
| BSA-NP           | 0.1797                                    | 1.0587                                 | 0.2164                                 |                                  |

(n=3)

4) 载 6-香豆素的 BSA-NP 和 CBSA-NP 在小鼠脑内的分布

小鼠尾静脉注射 60mg/kg 载 6-香豆素的 BSA-NP 和 CBSA-NP, 于 30min 前乙醚麻醉, 心室灌注生理盐水 20min, 4%多聚甲醛灌注 30min, 断头处死, 取大脑于视交叉后冠状切 1cm 厚的组织块, 用 PBS 漂洗 10 次, 置于 15%和 30%的蔗糖溶液脱水 24h, 包埋, 冰冻切片, 厚度 5 $\mu$ m, PBS 漂洗后用 1 $\mu$ g/ml DAPI 染色 10min, PBS 漂洗后用磷酸甘油封片, 荧光显微镜下观察纳米粒在脑组织中的分布和荧光强度。结果: 荧光显微镜照片结果显示, 小鼠尾静脉分别注射 60mg/kg 载 6-香豆素的 BSA-NP 和 CBSA-NP 30min 后, 在侧脑室脉络丛和第三脑室室周区均有绿色的荧光颗粒分布, CBSA-NP 的荧光分布数目均显著多于 BSA-NP。

#### 实施例 2: 制备载有荧光染料 6-香豆素的药物传递系统

##### 1) 制备 CBSA 和巯基化 CBSA 的方法同实施例 1

##### 制备载有 6-香豆素的 PEG 化纳米粒

将 50 $\mu$ l 蒸馏水加入 1ml 含有 24mg 单甲氧基聚乙二醇<sub>3000</sub>-聚乳酸<sub>28600</sub> (MPEG-PLA)、2.4mg 马来酰亚胺-聚乙二醇<sub>3400</sub>-聚乳酸<sub>23900</sub> (maleimide-PEG-PLA) 嵌段共聚物和 15 $\mu$ g 6-香豆素的二氯甲烷中, 60W 连续超声 30s 制备 w/o 型初乳。将初乳加入 2ml 1%的胆酸钠溶液中, 间断超声 60W 30 次 (1s/次), 得到 w/o/w 型复乳。将复乳加入 38ml 0.5%的胆酸钠溶液中, 搅拌 1min 后, 40 $^{\circ}$ C 旋转蒸发除去二氯甲烷, 4 $^{\circ}$ C 15000rpm 离心 45min, 去除上清, 用 0.01mol/L pH7.0 HEPES 重新混悬。

制备载 6-香豆素的 CBSA 表面共价结合的纳米粒 (CBSA-NP), 制备方法同实施例 1。

粒径分布: 通过静态光散射仪测定载 6-香豆素的 CBSA-NP 数均粒径 900-1000 nm。

#### 实施例 3: 制备载有脑血管扩张药尼莫地平的药物传递系统

##### 1) 将 250ml 0.9mol/L 己二氨缓慢加入到 4ml 50%的人血清白蛋

白(HSA)中,边加边搅拌,用盐酸调 pH 至 4.75,加入 EDAC 360mg。室温搅拌 2h 后,加入 1.3ml 4mol/L 醋酸盐缓冲液(pH 4.75)。溶液浓缩至 25ml,透析 72h 后,冻干得到 CHSA。IEF 显示 CHSA 的等电点在 8-9 之间,SDS-PAGE 表明 CHSA 的分子量于 HSA 接近。

取 150 $\mu$ l 1mg/ml Traut's 试剂(2-iminothiolane)的硼酸盐缓冲液(pH 8.0),加入含 CHSA 2mg (2mg/ml)的硼酸盐缓冲液(pH 8.0)中,搅拌 60 min,反应液过 Sephadex G-100 凝胶柱更换缓冲盐为 pH 7.4 PBS,得到巯基化 CHSA。经 Ellman's 试剂测定 CHSA 的巯基化程度在 3-4mol 巯基/mol 蛋白之间。

## 2) 采用相分离-透析法制备载尼莫地平纳米粒

取 0.2g MPEG -PLA 、0.01g maleimide-PEG-PLA 嵌段共聚物和 0.1g 尼莫地平溶于 6ml DMF 中,搅拌下缓慢滴加到 14ml 水中,所得乳液装入透析袋中,用 3L 水分六次透析 48h 以除去 DMF。将透析好的乳液于 10000rpm 离心 10min,未包封的药物和聚集的载药聚合物纳米粒沉降下来,转移上层胶体液得到载尼莫地平纳米粒。

## 3) 制备载尼莫地平的 CHSA 表面共价结合的纳米粒(CHSA-NP)

将巯基化的 CHSA 按照巯基与纳米粒中马来酰亚胺基的摩尔比 1:3 进行反应,室温搅拌过夜。反应液经 1.5cm $\times$ 20cm Sepharose CL-4B 凝胶柱分离,得 CHSA-NP,淋洗液为 0.01mol/L PBS。

所得载尼莫地平的 CHSA-NP 平均粒径为  $51.5 \pm 21.6$ nm。

## 实施例 4: 制备载有脑源性神经生长因子(BDNF)的药物传递系统

1) 将 250ml 0.9mol/L 己二胺缓慢加入 4ml 50%的鼠血清白蛋白(RSA)中,边加边搅拌,用盐酸调 pH 至 4.75,加入 EDAC 360mg。室温搅拌 2h 后,加入 1.3ml 4mol/L 醋酸盐缓冲液(pH 4.75)。溶液浓缩至 25ml,透析 72h 后,冻干得到 CRSA。IEF 显示 CRSA 的等电点在 8-9 之间,SDS-PAGE 表明 CRSA 的分子量于 RSA 接近。

CRSA 的巯基化方法同实施例 2,CRSA 的巯基化程度在 3-4mol

巯基/mol 蛋白之间。

2) 采用复乳/溶剂蒸发法制备载 BDNF 的纳米粒

将 10%BDNF 水溶液 300 $\mu$ l 加入 3ml 含有 90mg MPEG-PLA、4.5mg 和 maleimide-PEG-PLA 嵌段共聚物的二氯甲烷中, 冰水浴中 55W 连续超声 30s, 得初乳。将初乳加入 12ml 2%的聚乙烯醇溶液中, 冰水浴中搅拌 5min, 超声 2min, 得到 w/o/w 复乳, 搅拌过夜, 15000rpm 离心去上清。用 0.01 mol/L pH7.0 HEPES 重新混悬。

3) 制备载 BDNF 的 CRSA 共价结合的纳米粒 (CRSA-NP)

将巯基化的 CRSA 按照巯基与纳米粒中马来酰亚胺基的摩尔比 1:3 进行反应, 室温搅拌过夜。反应液经 1.5cm $\times$ 20cm Sepharose CL-4B 凝胶柱分离, 得到 CRSA-NP, 淋洗液为 0.01mol/L PBS。

实施例 5: 制备载有 pSV- $\beta$ -半乳糖苷酶质粒的药物传递系统

1) CBSA 的合成及巯基化同实施例 1。

2) 采用复乳/溶剂蒸发法制备载 pSV- $\beta$ -半乳糖苷酶质粒的纳米粒

将 9.2mg pSV- $\beta$ -半乳糖苷酶质粒 PBS 溶液 1ml 加入 3ml 含有 90mg MPEG-PLA、4.5mg 和 maleimide-PEG-PLA 嵌段共聚物的二氯甲烷中, 1000rpm 搅拌, 得初乳。将初乳加入 12ml 2%的聚乙烯醇溶液中, 室温搅拌 5min, 得 w/o/w 复乳, 搅拌过夜, 15000rpm 离心去上清。用 0.01M pH7.0 HEPES 重新混悬。

3) 制备载 pSV- $\beta$ -半乳糖苷酶质粒的 CBSA-NP

将巯基化的 CBSA 按巯基与纳米粒中马来酰亚胺基的摩尔比 1:3 进行反应, 室温搅拌过夜。反应液经 1.5cm $\times$ 20cm Sepharose CL-4B 凝胶柱分离, 得 CBSA-NP, 淋洗液为 0.01 mol/L PBS。

实施例 6: 制备载有  $^{99m}\text{Tc}$  标记的小鼠抗人  $\text{A}\beta_{1-40}$  单克隆抗体 ( $^{99m}\text{Tc}$ - $\text{A}\beta_{1-40}\text{MAb}$ ) 的药物传递系

1) CBSA 的合成及巯基化同实施例 1。

2) 采用复乳/溶剂蒸发法制备载  $^{99m}\text{Tc}$ - $\text{A}\beta_{1-40}\text{MAb}$  的 CBSA-NP

的纳米粒

将 1%  $^{99m}\text{Tc}$ -  $\text{A}\beta_{1-40}\text{MAb}$  水溶液 200 $\mu\text{l}$  加入 2ml 含 40mg 氰基丙烯酸甲氧基聚乙二醇酯-氰基丙烯酸十六烷基酯共聚物 Poly(MPEGCA-co-HDCA) 和 4mg 氰基丙烯酸马来酰亚胺基聚乙二醇酯-氰基丙烯酸十六烷基酯共聚物 Poly(maleimide-PEGCA-co-HDCA) 的二氯甲烷中, 冰水浴中 55W 连续超声 30s, 得初乳。将初乳加入 12ml 2% 的聚乙烯醇溶液中, 冰水浴中搅拌 5min, 超声 2min, 得到 w/o/w 复乳, 搅拌过夜, 15000rpm 离心去上清。用 0.01 mol/L pH7.0 HEPES 重新混悬。

### 3) 制备载 $^{99m}\text{Tc}$ - $\text{A}\beta_{1-40}\text{MAb}$ 的 CBSA-NP

将巯基化的 CBSA 按照巯基与纳米粒中马来酰亚胺基的摩尔比 1:3 进行反应, 室温搅拌过夜。反应液经过 1.5cm $\times$ 20cm Sepharose CL-4B 凝胶柱分离, 得到 CRSa-NP, 淋洗液为 0.01mol/L PBS。

图 1

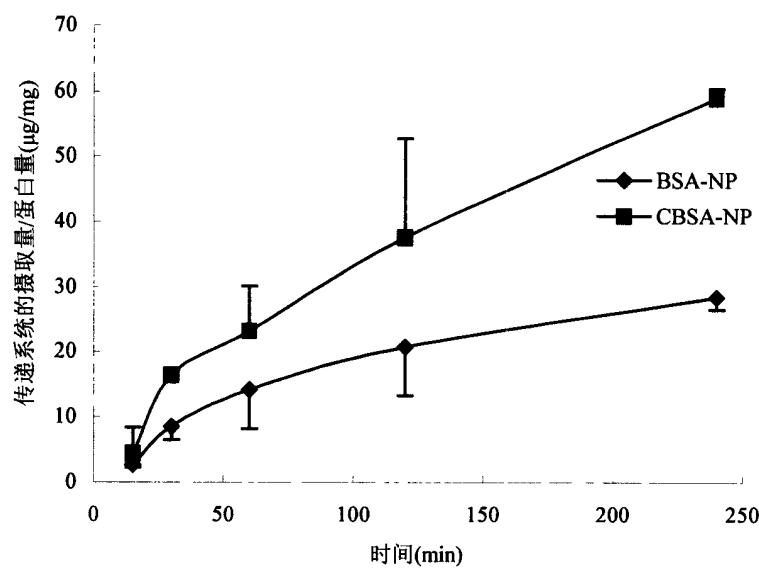


图 2

