



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113769112 B

(45) 授权公告日 2023. 05. 23

(21) 申请号 202111137219.2
(22) 申请日 2021.09.27
(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113769112 A

(43) 申请公布日 2021.12.10

(73) 专利权人 宁夏医科大学
地址 750004 宁夏回族自治区银川市胜利
街1160号

(72) 发明人 姜怡邓 张慧萍 尤沛栋 杨安宁
马胜超

(74) 专利代理机构 西安铭泽知识产权代理事务
所(普通合伙) 61223
专利代理师 徐云侠

(51) Int. Cl.
A61K 47/69 (2017.01)

A61K 47/61 (2017.01)
A61K 31/40 (2006.01)
A61K 47/52 (2017.01)
A61K 47/46 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 39/06 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
审查员 杜正午

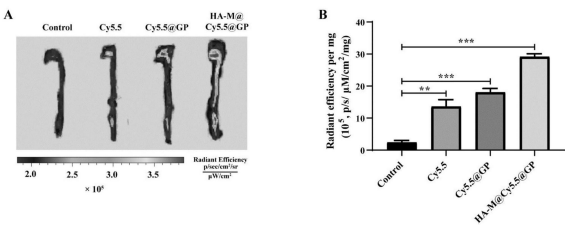
权利要求书2页 说明书8页 附图5页

(54) 发明名称

一种基于GOQDs的pH响应型仿生纳米制剂及其制备方法、应用

(57) 摘要

本发明属于生物医药技术领域,具体涉及一种基于GOQDs的pH响应型仿生纳米制剂及其制备方法和应用。该pH响应型仿生纳米制剂是由PEG化氧化石墨烯量子点、疏水性药物、仿生杂化膜和磷脂化透明质酸构成,疏水性药物负载于PEG化氧化石墨烯量子点上,仿生杂化膜伪装于负载有疏水性药物的PEG化氧化石墨烯量子点的外层,磷脂化透明质酸修饰于仿生杂化膜的表面。该pH响应型仿生纳米制剂能够有效延长仿生纳米制剂在血液中的循环半衰期、增强靶向能力以及在病变部位的可控释放。



1. 一种基于GOQDs的pH响应型仿生纳米制剂,其特征在于,其由PEG化氧化石墨烯量子点、疏水性药物、仿生杂化膜和磷脂化透明质酸构成,所述疏水性药物负载于所述PEG化氧化石墨烯量子点上,所述仿生杂化膜伪装于负载有疏水性药物的PEG化氧化石墨烯量子点的外层,所述磷脂化透明质酸修饰于所述仿生杂化膜的表面;

其中,所述磷脂化透明质酸是将透明质酸表面的羧基活化后加入磷脂聚乙二醇氨基搅拌得到;

所述PEG化氧化石墨烯量子点是将氧化石墨烯量子点表面的羧基活化后加入氨基聚乙二醇氨基搅拌得到;

所述pH响应型仿生纳米制剂的粒径为80nm-100nm;

所述仿生杂化膜是将巨噬细胞膜和红细胞膜破碎后在PBS溶液中搅拌制得。

2. 根据权利要求1所述的基于GOQDs的pH响应型仿生纳米制剂,其特征在于,所述疏水性药物为阿托伐他汀。

3. 一种权利要求2所述的基于GOQDs的pH响应型仿生纳米制剂在制备预防和/或治疗动脉粥样硬化的药物中的用途。

4. 一种权利要求1所述的基于GOQDs的pH响应型仿生纳米制剂的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1、将巨噬细胞膜和红细胞膜破碎后在PBS溶液中搅拌制得仿生杂化膜;

将透明质酸水溶液在活化剂作用下搅拌30min-1h,加入磷脂聚乙二醇氨基搅拌,混合液依次经透析、冷冻干燥得到磷脂化透明质酸;

将氧化石墨烯量子点水溶液在活化剂作用下搅拌30min-1h,加入氨基聚乙二醇氨基搅拌,混合液依次经透析、冷冻干燥得到PEG化氧化石墨烯量子点;

S2、将疏水性药物溶解后加入到所述PEG化氧化石墨烯量子点溶液中进行搅拌处理,所得溶液依次经透析、冷冻干燥得到负载疏水性药物的纳米制剂;

S3、将所述负载疏水性药物的纳米制剂与所述仿生杂化膜的PBS溶液混合后反复挤压,得到仿生纳米制剂;

S4、将所述磷脂化透明质酸溶液加入到所述仿生纳米制剂溶液中,搅拌30min-1h,即得pH响应型仿生纳米制剂。

5. 根据权利要求4所述的基于GOQDs的pH响应型仿生纳米制剂的制备方法,其特征在于,S1中,所述巨噬细胞膜和所述红细胞膜的质量比为1:0.2-5;

所述透明质酸与所述磷脂聚乙二醇氨基的质量比为1:1-5;

所述氧化石墨烯量子点与所述氨基聚乙二醇氨基的质量比为1:5-10。

6. 根据权利要求4所述的基于GOQDs的pH响应型仿生纳米制剂的制备方法,其特征在于,S1中,

所述活化剂为1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺;且

所述透明质酸、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐与N-羟基琥珀酰亚胺的质量比为1:2-8:4-16;

所述氧化石墨烯量子点、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐与N-羟基琥珀酰亚胺的质量比为1:20-60:5-20。

7. 根据权利要求4所述的基于GOQDs的pH响应型仿生纳米制剂的制备方法,其特征在

于,

所述氧化石墨烯量子点与所述疏水性药物的质量比为1-5:1;

所述氧化石墨烯量子点与所述磷脂化透明质酸的质量比为2-4:1;

S3中,所述仿生杂化膜与所述负载疏水性药物的纳米制剂的质量比为1-2:1。

8. 根据权利要求4所述的基于GOQDs的pH响应型仿生纳米制剂的制备方法,其特征在于,S1及S2中,所述透析是使用截留分子量为3.5kDa的透析袋透析24-72h。

9. 根据权利要求4所述的基于GOQDs的pH响应型仿生纳米制剂的制备方法,其特征在于,S1中,所述仿生杂化膜的具体制备过程为:将巨噬细胞膜与红细胞膜在4℃、功率为100W下水浴超声1-2min进行破碎,再在PBS溶液中、37℃、转速500rpm-600rpm下水浴搅拌1-2h。

10. 根据权利要求4所述的基于GOQDs的pH响应型仿生纳米制剂的制备方法,其特征在于,

S1中所述搅拌是搅拌转速为800rpm-1000rpm;

S2及S4中所述搅拌是搅拌转速为600rpm-800rpm;

S3中所述反复挤压是指用孔径100nm的微型挤压器反复挤压至少10次。

一种基于GOQDs的pH响应型仿生纳米制剂及其制备方法、应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,具体涉及一种基于GOQDs的pH响应型仿生纳米制剂及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 作为全球发病率和死亡率最高的疾病,动脉粥样硬化(Atherosclerosis,As)的起始病理机制是氧化低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein,ox-LDL)损伤血管内皮细胞导致局部炎症反应。损伤部位分泌细胞因子募集循环系统单个核细胞并分化为巨噬细胞吞噬ox-LDL,最终形成As斑块。随着疾病的进展,大量的胆固醇聚集于晚期As斑块中,使巨噬细胞自噬流受损导致斑块稳定性下降和诱发心肌梗塞。目前治疗As主要使用降脂、降血压的他汀类药物,如阿托伐他汀(atorvastatin,AT)。虽然现有的治疗方法有效的降低了心血管疾病的发病率,但是由于口服用药存在靶向性低、水溶性差和清除快等缺陷,As仍有较高的残余风险。口服AT由于“首关效应”的存在,很难达到有效血药浓度。此外,As病人在出现心肌梗死等并发症之前,大多数处于无症状状态,导致患者接受治疗时大多数处于As晚期。虽然高剂量的口服AT可有效消融小鼠晚期As斑块,但是由于肝、肾毒性和肌损伤等副作用,高剂量AT应用于人体受限。因此,如何解决口服用药靶向性低、水溶性差、清除快和毒副作用强等缺陷,是目前As防治的关键。

[0003] 近年来,随着纳米技术的发展,纳米材料在输送药物方面以纳米制剂的形式显示出巨大的优势,可有效提高药物的靶向性、水溶性和生物安全性,同时可实现药物在疾病部位的可控释放,为防治As提供了潜在的替代方案。但是,由于人体免疫系统将纳米制剂识别为外来物质将其快速清除,导致纳米制剂只有数小时或更短的半衰期。因此,如何延长纳米制剂血液循环时间,增加其在As斑块部位聚集能力,是目前防治As纳米制剂在递送过程中面临的主要挑战。

[0004] 细胞作为机体组成的最基本单元,其膜上存在特征性蛋白协助其适应机体复杂的内环境,并向特定部位移动。因此,利用细胞膜此特性,构建仿生纳米制剂以逃避机体免疫系统的清除,并通过炎症微环境中配体-受体相互作用增加纳米制剂在疾病部位聚集引起了广泛的关注。这种“自上而下”的技术,在保留了纳米颗粒核心完整理化性质的同时,利用了细胞膜复杂的生理功能,这些功能是单独纳米材料难以复制的。例如,巨噬细胞膜包裹纳米药物可有效增加其血液循环半衰期和As斑块部位靶向能力。但是,由于巨噬细胞在人体含量少,且原代巨噬细胞在体外难以培养增殖,使其大规模临床转化应用受限。除了巨噬细胞膜,红细胞膜因具有良好的生物相容性和广泛的可获得性广泛应用于仿生纳米制剂的构建。

[0005] 虽然仿生纳米制剂可有效降低网状内皮系统对纳米药物的清除和增强斑块部位靶向性,但是,只有进一步将纳米药物靶向至靶细胞,并且使其在疾病部位响应微环境刺激释放药物,才能更有效的杀伤靶细胞以提升药物的疗效。

发明内容

[0006] 有鉴于此,本发明提供一种基于GOQDs的pH响应型纳米制剂及其制备方法、应用,该pH响应型仿生纳米制剂能够有效延长仿生纳米制剂在血液中的循环半衰期、增强靶向能力以及在病变部位的可控释放。

[0007] 本发明提供的基于GOQDs的pH响应型仿生纳米制剂,由PEG化氧化石墨烯量子点(GP)、疏水性药物、仿生杂化膜和磷脂化透明质酸构成,所述疏水性药物负载于所述PEG化氧化石墨烯量子点上,所述仿生杂化膜伪装于负载有疏水性药物的PEG化氧化石墨烯量子点的外层,所述磷脂化透明质酸修饰于所述仿生杂化膜的表面;

[0008] 其中,所述磷脂化透明质酸是将透明质酸表面的羧基活化后加入磷脂聚乙二醇氨基搅拌得到;

[0009] 所述PEG化氧化石墨烯量子点是将氧化石墨烯量子点表面的羧基活化后加入氨基聚乙二醇氨基搅拌得到;

[0010] 所述pH响应型仿生纳米制剂的粒径为80nm-100nm。

[0011] 优选地,所述疏水性药物为阿托伐他汀(AT)。

[0012] 本发明还提供了上述负载有AT的pH响应型仿生纳米制剂在制备预防和/或治疗动脉粥样硬化的药物中的用途。

[0013] 本发明另一方面提供了上述基于GOQDs的pH响应型仿生纳米制剂的制备方法,具体包括以下步骤:

[0014] S1、将巨噬细胞膜和红细胞膜破碎后在PBS溶液中搅拌制得仿生杂化膜;

[0015] 将透明质酸水溶液在活化剂作用下搅拌30min-1h,加入磷脂聚乙二醇氨基(DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂)后搅拌,混合液依次经透析、冷冻干燥得到磷脂化透明质酸;

[0016] 将氧化石墨烯量子点水溶液在活化剂作用下搅拌30min-1h,加入氨基聚乙二醇氨基(NH₂-PEG₂₀₀₀-NH₂)搅拌,混合液依次经透析、冷冻干燥得到PEG化氧化石墨烯量子点(GP);

[0017] S2、将疏水性药物溶解后加入到所述PEG化氧化石墨烯量子点溶液中进行搅拌处理,所得溶液依次经透析、冷冻干燥得到负载疏水性药物的纳米制剂(D@GP);

[0018] S3、将所述负载疏水性药物的纳米制剂与所述仿生杂化膜的PBS溶液混合后反复挤压,得到仿生纳米制剂(M@D@GP);

[0019] S4、将所述磷脂化透明质酸溶液加入到所述仿生纳米制剂(M@D@GP)溶液中,搅拌30min-1h,即得pH响应型仿生纳米制剂(HA-M@D@GP)。

[0020] 优选地,S1中,所述巨噬细胞膜和所述红细胞膜的质量比为1:0.2-5;

[0021] 所述透明质酸与所述磷脂聚乙二醇氨基的质量比为1:1-5;

[0022] 所述氧化石墨烯量子点与所述氨基聚乙二醇氨基的质量比为1:5-10。

[0023] 优选地,S1中,所述活化剂为1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),且所述透明质酸、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐与N-羟基琥珀酰亚胺的质量比为1:2-8:4-16;所述氧化石墨烯量子点、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐与N-羟基琥珀酰亚胺的质量比为1:20-60:5-20。

[0024] 优选地,所述氧化石墨烯量子点与所述疏水性药物的质量比为1-5:1;

[0025] 所述氧化石墨烯量子点与所述磷脂化透明质酸的质量比为2-4:1;

[0026] S3中,所述仿生杂化膜与所述负载疏水性药物的纳米制剂的质量比为1-2:1。

[0027] 优选地, S1及S2中, 所述透析是使用截留分子量为3.5kDa的透析袋透析24-72h。

[0028] 优选地, S1中, 所述仿生杂化膜的具体制备过程为: 将巨噬细胞膜与红细胞膜在4℃、功率为100W下水浴超声1-2min进行破碎, 再在PBS溶液中、37℃、转速500rpm-600rpm下水浴搅拌1-2h。

[0029] 优选地, S1中所述搅拌是搅拌转速为800rpm-1000rpm;

[0030] S2及S4中所述搅拌是搅拌转速为600rpm-800rpm;

[0031] S3中所述反复挤压是指用孔径100nm的微型挤压器反复挤压至少10次。

[0032] 对比现有技术, 本发明的有益效果为:

[0033] 1、本发明设计了一种绿色、可生物降解的仿生纳米制剂, 利用仿生杂化膜和pH响应的设计特点, 实现药物在病变部位的特异性聚集、渗透和可控释放。本发明利用 π - π 共轭和/或静电吸附作用将疏水性药物负载于PEG化氧化石墨烯量子点上, 由于PEG化氧化石墨烯量子点具有高的分散度和亲水性, 疏水性药物负载后形成的复合物会以微晶态或分子分散态存在, 具有良好的可湿润性, 增加了疏水性药物在水中的溶解性。利用磷脂化透明质酸修饰的巨噬细胞膜和红细胞膜融合形成的仿生杂化膜进行伪装(HA-M@D@GP), 实现仿生纳米制剂的长血液循环和病变部位的靶向能力(来自巨噬细胞膜), 同时红细胞膜可以在不影响巨噬细胞膜特异性功能的前提下, 减少巨噬细胞膜的用量。当该pH响应型仿生纳米制剂到达病变部位后, 利用HA和活化巨噬细胞表面受体CD44相互作用, 成功实现pH响应型仿生纳米制剂靶向进入活化巨噬细胞内。同时, 利用微环境中的微酸(pH6.4-6.8)环境促进疏水性药物从pH响应型仿生纳米制剂中释放, 进而实现药物在病变部位的可控释放。

[0034] 2、除了负载治疗和/或预防动脉粥样硬化的疏水性药物, 本发明提供的这种具有微环境响应特性的仿生纳米制剂可以通过替代不同细胞膜类型和疏水性药物, 利用细胞膜的“归巢效应”和不同药物的作用机理, 作为其他疾病治疗的替代平台, 如肿瘤、类风湿关节炎等, 故本发明结合了杂化膜涂层和刺激响应型纳米颗粒, 可以提供多种功能和优势来治疗多种疾病。

[0035] 3、本发明提供的基于GOQDs的pH响应型仿生纳米制剂, 利用AT抗炎、清除氧化应激和促进自噬等抗动脉粥样硬化效应, 辅助以纳米载体和仿生系统, 实现动脉粥样硬化防治效果的最大化。

[0036] 4、本发明解决了动脉粥样硬化早期预防不及时、晚期治疗难逆转和毒副作用大的问题, 同时又能改善药剂的血液半衰期、斑块和活化巨噬细胞靶向效果以及pH响应的可控释放能力, 为开发新型防治动脉粥样硬化的药剂及相关临床预防和治疗提供新理论支持, 具有重要的科学意义、使用价值和经济价值。

附图说明

[0037] 图1为仿生杂化膜的荧光共振能量转移图谱和比值: A、荧光共振能量转移图谱; B、比值;

[0038] 图2为仿生杂化膜的蛋白质免疫印迹图;

[0039] 图3为GOQDs、AT@GP和HA-M@AT@GP的透射电镜图和粒径大小: A、GOQDs; B、AT@GP; C、HA-M@AT@GP;

[0040] 图4为GOQDs、PEG-GOQDs、AT和AT@GP的红外光谱;

- [0041] 图5为不同pH值下AT从AT@GP和HA-M@AT@GP上累计释放量；
- [0042] 图6为AT、AT@GP和HA-M@AT@GP清除ROS、NO和炎症细胞性能；A、清除ROS水平；B、ROS清除统计图；C、清除NO水平；D、对炎症巨噬细胞的清除能力；
- [0043] 图7为HA-M@AT@GP在小鼠体内的血液半衰期；A、不同时间点小鼠血液体外荧光图；B、荧光强度统计图；
- [0044] 图8为HA-M@AT@GP在小鼠体内动脉粥样硬化斑块部位靶向性；A、小鼠血管荧光定位图；B、荧光强度统计图；
- [0045] 图9为不同处理组治疗早期动脉粥样硬化的血管大体油红O染色图片和统计图；A、油红O染色图；B、统计图；
- [0046] 图10为不同处理组治疗晚期动脉粥样硬化的血管大体油红O染色图片和统计图；A、油红O染色图；B、统计图；
- [0047] 图11为不同处理组治疗早期和晚期动脉粥样硬化小鼠心、肝、脾、肺和肾H&E染色图。

具体实施方式

[0048] 以下结合说明书附图和具体优选的实施例对本发明作进一步描述，但并不因此而限制本发明的保护范围。

[0049] 以下实施例中，若无特别说明，所采用的原料和仪器均为市售，所用方法均为本领域常规方法。

[0050] 实施例1

[0051] (1) HA-M@AT@GP仿生纳米制剂的合成

[0052] a. 制备仿生杂化膜(M)

[0053] 取C57BL/6小鼠全血，用PBS (pH7.4) 洗涤，并以3000rpm离心5min除去血浆。将红细胞重悬于 $0.25 \times$ PBS (pH7.4) 中4℃下裂解6-8h。然后将裂解液12000rpm离心10min，获取RBCm并用 $0.25 \times$ PBS (pH7.4) 洗涤直至上清液变为无色。收集洗涤干净的RBCm。巨噬细胞(RAW264.7细胞)膜的制备按照膜蛋白提取试剂盒的说明进行。当细胞培养皿中的RAW264.7细胞长满后，用细胞刮刀将细胞刮下，800rpm离心5min。收集的细胞在4℃下用PBS (pH7.4) 洗涤2遍，然后悬浮在含有PMSF (1mM) 的膜蛋白提取剂A中。混合物在冰浴中裂解30min，4℃水浴超声10min (80W，开0.3s，关0.5s)。37℃和-80℃反复冻融4次，每次20-30min。然后以4℃，800rpm离心10min。取上清液，继续在4℃，13000rpm下离心30min得到巨噬细胞膜(M_{0m})。用BCA蛋白试剂盒测定红细胞膜(RBCm)和巨噬细胞膜(M_{0m})蛋白的浓度，膜的重量是膜蛋白重量的两倍。将RBCm与M_{0m}按总蛋白质量比为1:1混合，4℃水浴超声1min (100W，开0.5s，关0.5s)，37℃，600rpm水浴搅拌1h，完成膜融合；

[0054] b. 制备PEG化氧化石墨烯量子点(GP)

[0055] PEG化GOQDs的合成：利用NH₂-PEG₂₀₀₀-NH₂对GOQDs表面进行修饰。具体操作方法为：向1mL GOQDs溶液 (1mg/mL) 中加入20mg EDC和5mg NHS交联剂，室温800rpm搅拌30min用于活化GOQDs表面的羧基。然后，加入10mg NH₂-PEG₂₀₀₀-NH₂于上述溶液中室温800-1000rpm搅拌24h。将上述混合溶液置于3.5kDa的透析袋中透析3d以去除游离的NH₂-PEG₂₀₀₀-NH₂和交联

剂。最后,利用冷冻干燥法对以纯化的材料进行冻干处理,冻干后的样品置于-20℃冰箱中备用;

[0056] c. 制备磷脂化透明质酸

[0057] 8mg EDC, 16mg NHS和1mg HA溶于PBS中,室温800rpm搅拌30min用于活化HA表面的羧基。然后,加入1mg DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂于上述溶液中室温800-1000rpm搅拌24h。将上述混合溶液置于3.5kDa的透析袋中透析24h以去除游离的EDC、NHS和DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂。最后,利用冷冻干燥法对以纯化的材料进行冻干处理,冻干后的磷脂化透明质酸置于-20℃冰箱中备用;

[0058] d. AT@GP的合成

[0059] AT通过 π - π 共轭和静电吸附作用负载于GP表面。具体操作过程为:称取20mgAT粉末溶于1ml DMSO溶液中形成20mg/ml的AT母液。将合成的GP冻干粉溶于ddH₂O中以形成1mg/mL的GP水溶液(1mL),然后,取10 μ lAT溶液逐滴加入GP溶液中,室温600-800rpm搅拌24h。将上述混合液置于3.5kDa的透析袋中利用去离子水透析24h,最后,利用冷冻干燥法对已纯化的材料(AT@GP)进行冻干处理,冻干后的样品置于-20℃冰箱中备用;

[0060] e. 制备M@AT@GP仿生纳米制剂

[0061] 将AT@GP重新溶解于PBS溶液中,与水浴超声处理后的仿生杂化膜(M)(1mL, 1mg/mL)按质量比1:2混合,通过孔径100nm的微型挤压器反复挤压至少10次,得到M@AT@GP仿生纳米制剂;

[0062] f. 制备HA-M@AT@GP仿生纳米制剂

[0063] 将磷脂化透明质酸重新溶解于PBS溶液中,取250-500 μ g磷脂化透明质酸溶液加入到M@AT@GP溶液中,37℃、600-800rpm水浴搅拌30min-1h,即得到HA-M@AT@GP仿生纳米制剂。

[0064] (2) HA-M@AT@GP仿生纳米制剂的表征

[0065] 如图1和图2所示,对本实施例制得的仿生杂化膜进行荧光能量共振转移和膜特征性蛋白分析,其结果表明仿生杂化膜成功融合和制备。

[0066] 如图3所示,对本实施例中制得的GOQDs、AT@GP和HA-M@AT@GP仿生纳米制剂进行透射电镜图像和DLS粒径大小分析。结果表明均匀分散的球形GOQDs材料被成功制备,并且粒径为8nm左右;负载AT的纳米颗粒(AT@GP)呈现球形,粒径为32nm左右;HA修饰的仿生杂化膜包裹在AT@GP的外层,呈现出明显的“壳核”结构,且粒径为80nm-100nm左右,一个仿生纳米制剂里面包裹3-4个AT@GP纳米颗粒。

[0067] 如图4所示,红外光谱(FT-IR)检测显示,AT@GP纳米颗粒在1216cm⁻¹和843cm⁻¹出现AT的特征峰,说明AT成功负载到GP表面。

[0068] 如图5所示,随着pH值的降低,AT累积释放量逐渐增加。与AT@GP相比,仿生杂化膜包裹以后AT累积释放量减少。说明制得的仿生纳米制剂实现了可控、缓释。

[0069] 实施例2

[0070] 一种基于GOQDs的pH响应型仿生纳米制剂,与实施例1的不同在于PEG化氧化石墨烯量子点制备时EDC的加入量为60mg、NHS交联剂的加入量为20mg。

[0071] 实施例3

[0072] 一种基于GOQDs的pH响应型仿生纳米制剂,与实施例1的不同在于PEG化氧化石墨烯量子点制备时NH₂-PEG₂₀₀₀-NH₂的加入量为5mg。

[0073] 实施例4

[0074] 一种基于GOQDs的pH响应型仿生纳米制剂,与实施例1的不同在于磷脂化透明质酸在制备时EDC的加入量为2mg、NHS的加入量为4mg。

[0075] 实施例5

[0076] 一种基于GOQDs的pH响应型仿生纳米制剂,与实施例1的不同在于磷脂化透明质酸在制备时DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂的加入量为5mg。

[0077] 实施例6

[0078] 一种基于GOQDs的pH响应型仿生纳米制剂,与实施例1的不同在于AT@GP合成时AT溶液的加入量为50μl。

[0079] 实施例7

[0080] 一种基于GOQDs的pH响应型仿生纳米制剂,与实施例6的不同在于取10μlAT溶液逐滴加入GP溶液中,室温600rpm-800rpm搅拌24h。

[0081] 实施例8

[0082] 一种基于GOQDs的pH响应型仿生纳米制剂,与实施例1的不同在于M@AT@GP仿生纳米制剂的制备:将AT@GP重新溶解于PBS溶液中,与水浴超声处理后的仿生杂化膜(M) (1mL, 1mg/mL) 按质量比1:1混合,通过孔径100nm的微型挤压器反复挤压至少10次,得到M@AT@GP仿生纳米制剂。

[0083] 实施例9

[0084] 一种基于GOQDs的pH响应型仿生纳米制剂,与实施例1的不同在于巨噬细胞膜和红细胞膜的质量比为1:0.2。

[0085] 实施例10

[0086] 一种基于GOQDs的pH响应型仿生纳米制剂,与实施例1的不同在于巨噬细胞膜和红细胞膜的质量比为1:5。

[0087] 实施例11

[0088] 一种基于GOQDs的pH响应型仿生纳米制剂,与实施例1的不同在于仿生杂化膜制备时是在500rpm水浴搅拌2h,完成膜融合。

[0089] 实施例12

[0090] 一种基于GOQDs的pH响应型仿生纳米制剂,与实施例1的不同在于PEG化氧化石墨烯量子点在制备时,GOQDs表面羧基的活化过程是1000rpm搅拌1h。

[0091] 实施例13

[0092] 一种基于GOQDs的pH响应型仿生纳米制剂,与实施例1的不同在于磷脂化透明质酸在制备时,HA表面的羧基活化过程是1000rpm搅拌1h。

[0093] 实施例14

[0094] 本发明提供的基于GOQDs的pH响应型仿生纳米制剂在动脉粥样硬化预防和治疗中的应用,以实施例1制得的HA-M@AT@GP仿生纳米制剂为例对此效果进行说明。

[0095] 采用荧光成像和NO检测试剂盒测定了实施例1制备的HA-M@AT@GP仿生纳米制剂对巨噬细胞氧化应激的清除能力。AT浓度为10μM,实验结果如图6A-C所示。结果显示,与单独AT和AT@GP组相比,HA-M@AT@GP仿生纳米制剂可有效清除巨噬细胞中的ROS和NO水平。

[0096] 采用MTT法测定了实施例1制备的HA-M@AT@GP仿生纳米制剂对炎症巨噬细胞的清

除能力。AT浓度为10 μ M,实验结果如图6D所示。结果显示,与单独AT和AT@GP组相比,HA-M@AT@GP仿生纳米制剂可有效清除炎症巨噬细胞。

[0097] 以上结果说明,实施例1制备的HA-M@AT@GP仿生纳米制剂可有效清除炎症和氧化应激。

[0098] 实施例15

[0099] 沿用实施例1制得的HA-M@AT@GP仿生纳米制剂,通过检测荧光强度的半定量手段对HA-M@AT@GP仿生纳米制剂的血液半衰期和体内靶向进行测定。

[0100] 试验一:C57BL/6小鼠尾静脉注射200 μ L剂量浓度为10mg/kg的Cy5琥珀酰亚胺酯活性染料(Cy5.5)、Cy5.5@GP和HA-M@Cy5.5@GP后,在不同时间点采集血样进行荧光强度测定。

[0101] 其中,Cy5.5@GP是按照以下方法制备得到:50mg EDC、100mg NHS和5mg HA溶于ddH₂O中,室温800-1000rpm搅拌30min-1h。然后,加入10mg GP于上述溶液中室温800-1000rpm搅拌24h。将上述混合溶液置于3.5kDa的透析袋中透析24h以去除游离的EDC和NHS。最后,利用冷冻干燥法对以纯化的材料进行冻干处理,冻干后的Cy5.5@GP置于-20℃冰箱中备用。

[0102] HA-M@Cy5.5@GP是按照以下方法制备得到:将上述Cy5.5@GP重新溶解于PBS溶液中,与水浴超声处理后的仿生杂化膜(M) (1mL,1mg/mL)按质量比1:2混合,通过孔径100nm的微型挤压器反复挤压至少10次,得到M@Cy5.5@GP仿生纳米制剂;将磷脂化透明质酸重新溶解于PBS溶液中,取250 μ g磷脂化透明质酸溶液加入到M@Cy5.5@GP溶液中,37℃、600-800rpm水浴搅拌30min-1h,即得到HA-M@Cy5.5@GP仿生纳米制剂。

[0103] 结果如图7所示,Cy5.5、Cy5.5@GP和HA-M@Cy5.5@GP的血液循环半衰期分别为0.82h、2.52h和4.51h。与Cy5.5和Cy5.5@GP相比,HA-M@Cy5.5@GP的血液循环周期显著延长,是Cy5.5的5.5倍(4.51h vs 0.82h),Cy5.5@GP的1.80倍(4.51h vs 2.52h)。说明仿生杂化膜伪装的纳米制剂有利于延长血液循环时间。

[0104] 试验二:ApoE^{-/-}小鼠高脂饮食饲养一个月后,尾静脉注射200 μ L剂量浓度为10mg/kg的Cy5.5、Cy5.5@GP(同试验一)和HA-M@Cy5.5@GP(同试验一)。12h后取小鼠主动脉进行荧光成像。

[0105] 结果如图8所示,与Cy5.5和Cy5.5@GP组相比,HA-M@Cy5.5@GP组在主动脉弓和腹主动脉处显著聚集,说明实施例1制得的HA-M@AT@GP仿生纳米制剂可有效靶向到动脉粥样硬化斑块部位。

[0106] 实施例16

[0107] 沿用实施例1制得的HA-M@AT@GP仿生纳米制剂用于动脉粥样硬化早期预防和晚期治疗。

[0108] ApoE^{-/-}小鼠高脂饮食一个月后,分为两种治疗模式:早期预防性给药组,给药剂量2mg/kg,每周两次,连续给药2个月,期间维持高脂饮食;晚期治疗组,给药剂量10mg/kg,每天一次,连续给药1周,期间维持高脂饮食。均为尾静脉注射给药,给药组分为单独AT组、AT@GP组和HA-M@AT@GP组。在治疗结束后3天,剥离小鼠主动脉进行大体油红O染色以考察不同治疗组的治疗效果。

[0109] 结果如图9和图10所示,HA-M@AT@GP治疗组在早期治疗方案(图9)和晚期治疗方案(图10)中,均显著减少动脉粥样硬化斑块的形成,说明本发明所构建的仿生纳米制剂能够

有效的预防早期动脉粥样硬化进展和治疗晚期动脉粥样硬化。

[0110] 实施例17

[0111] 沿用实施例1制得的HA-M@AT@GP仿生纳米制剂用于体内生物安全性检查。

[0112] 运用实施例16所采取的治疗方案,在ApoE^{-/-}小鼠治疗结束后,采集不同治疗方案下不同治疗组分的小鼠的主要脏器(心、肝、脾、肺和肾)做H&E染色,以考察不同治疗组的生物安全性。

[0113] 结果如图11所示,不同治疗组小鼠脏器均未见明显的器质性病变,说明本发明所构建的仿生纳米制剂有良好的生物安全性。

[0114] 以上所述,仅是本发明的较佳实施例而已,并非对本发明作任何形式上的限制。虽然本发明已以较佳实施例揭示如上,然而并非用以限定本发明。任何熟悉本领域的技术人员,在不脱离本发明的精神实质和技术方案的情况下,都可利用上述揭示的方法和技术内容对本发明技术方案做出许多可能的变动和修饰,或修改为等同变化的等效实施例。因此,凡是未脱离本发明技术方案的内容,依据本发明的技术实质对以上实施例所做的任何简单修改、等同替换、等效变化及修饰,均仍属于本发明技术方案保护的范围内。

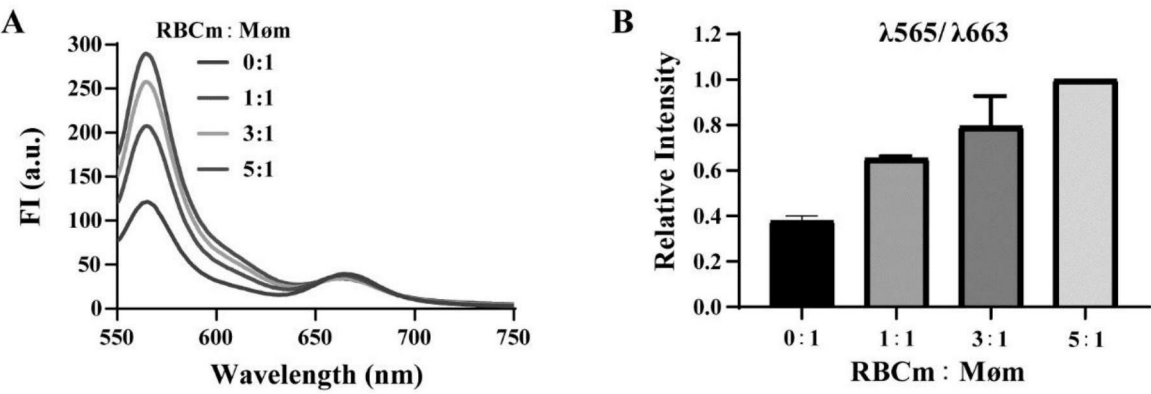


图1

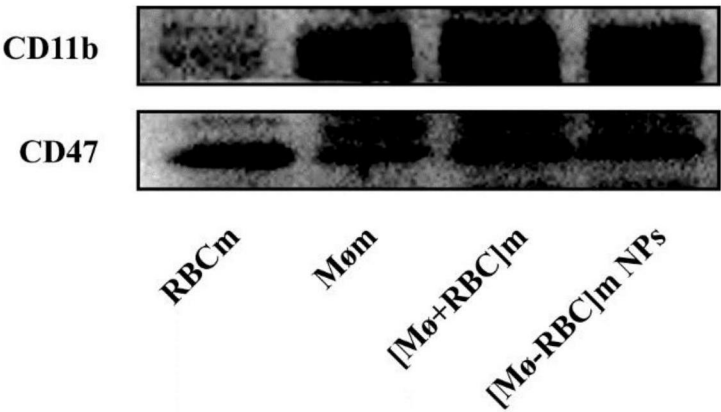


图2

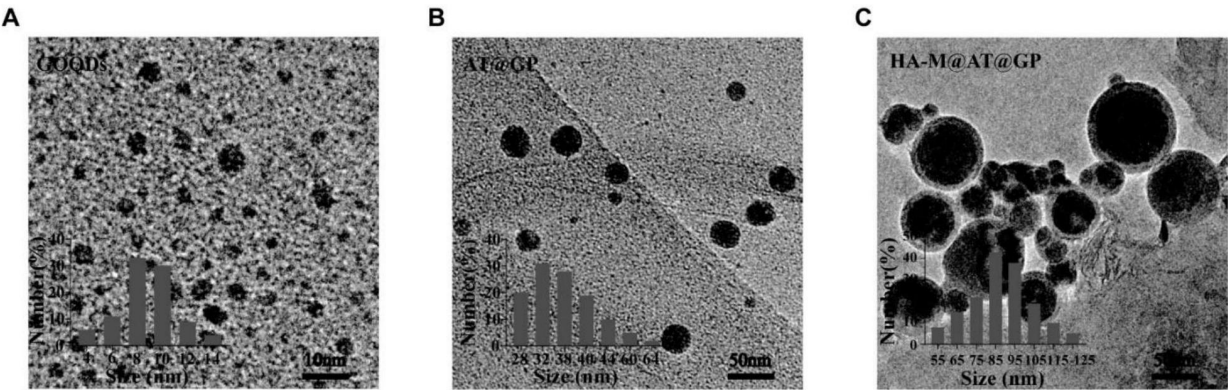


图3

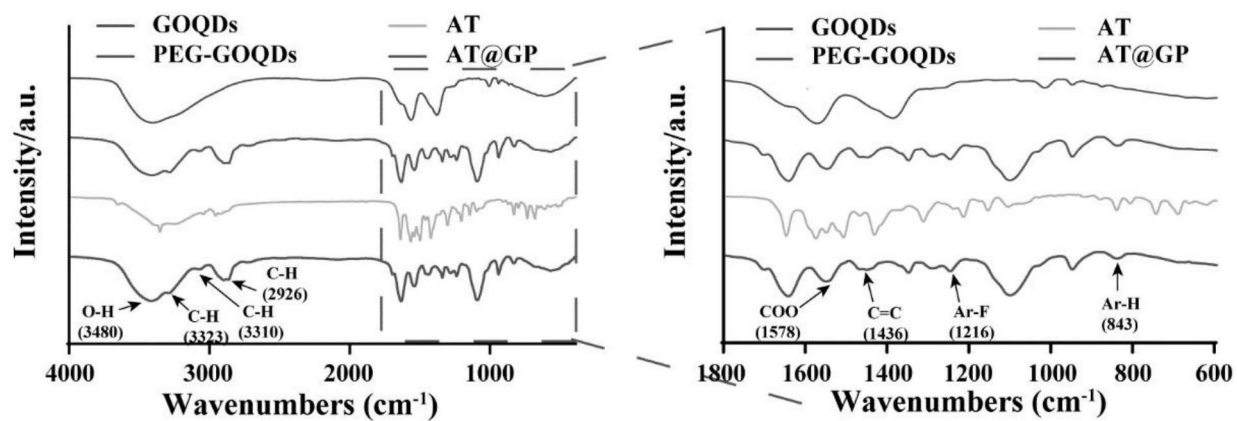


图4

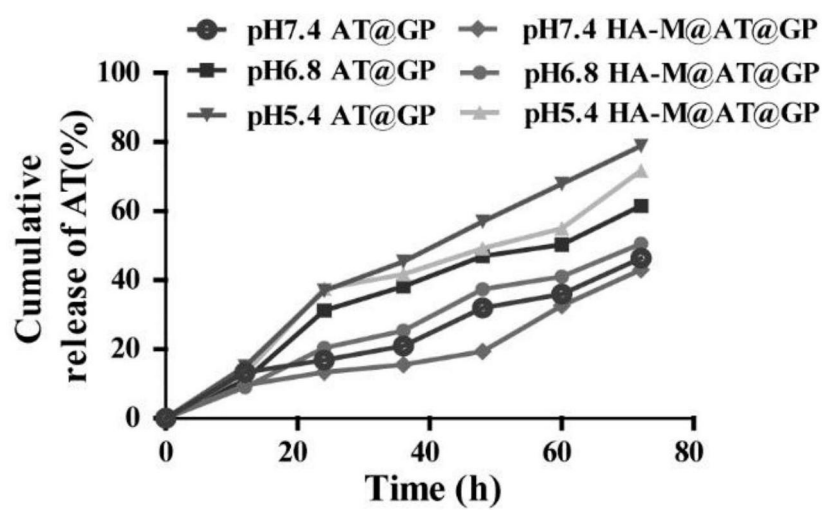


图5

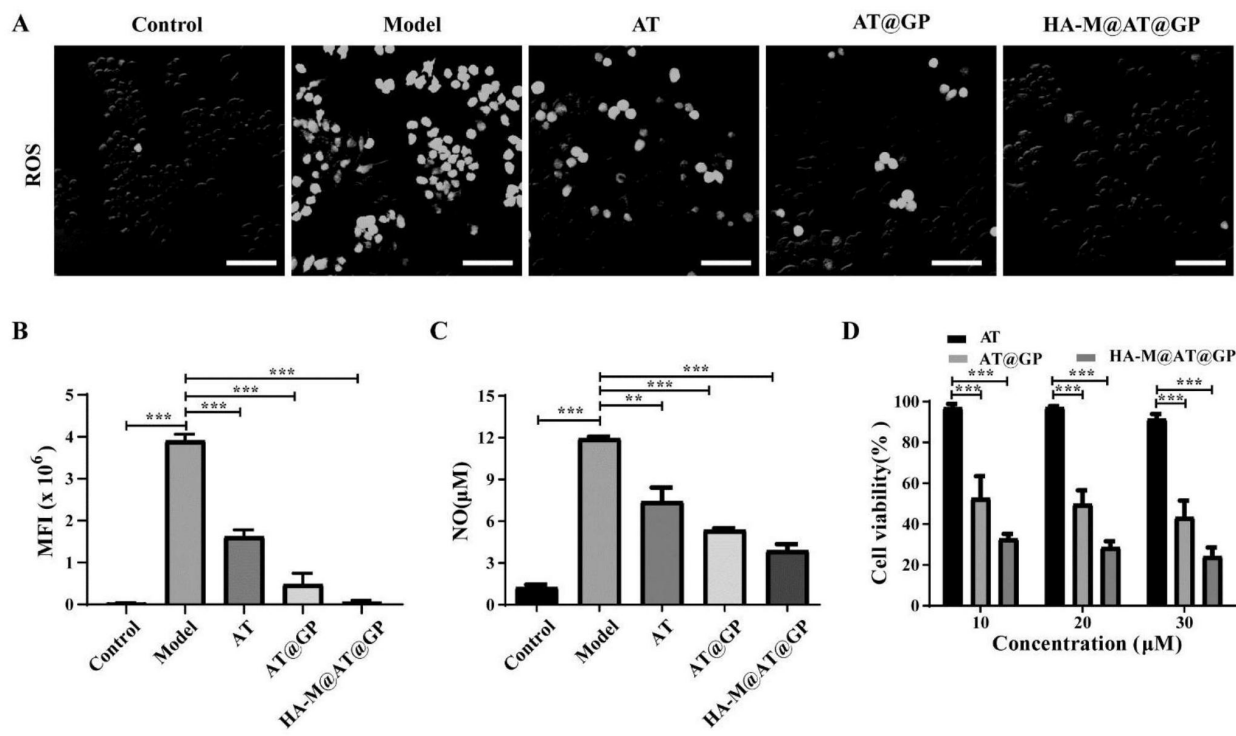


图6

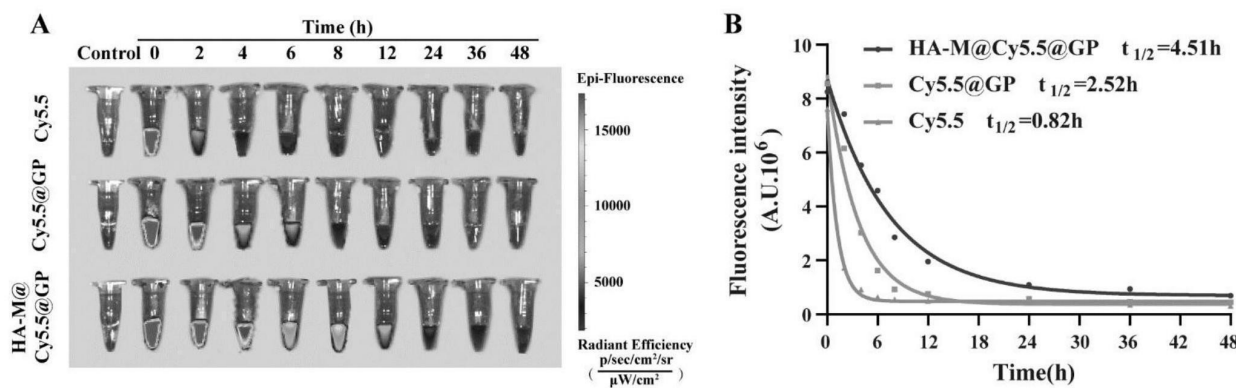


图7

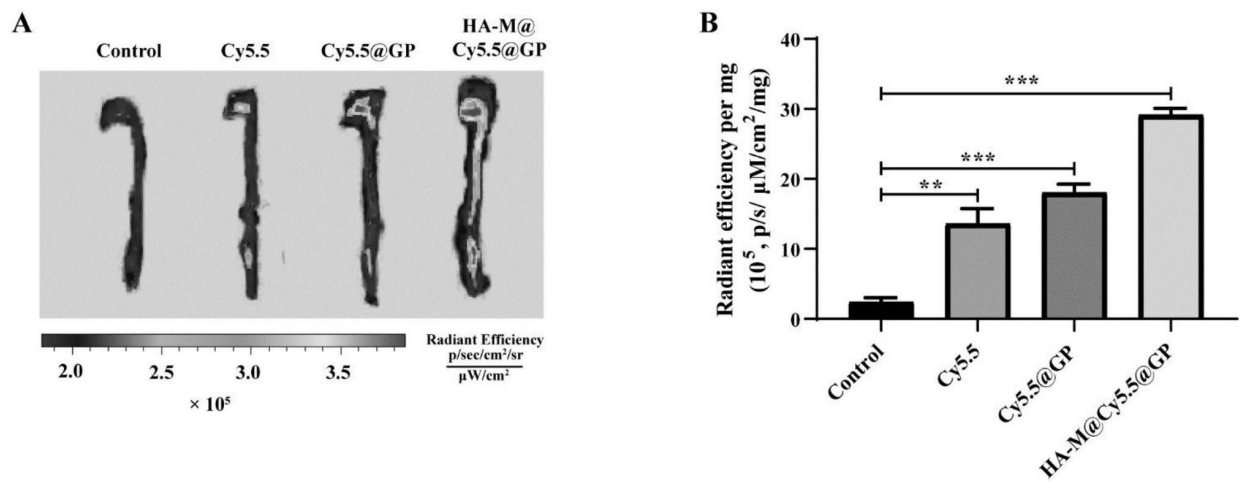


图8

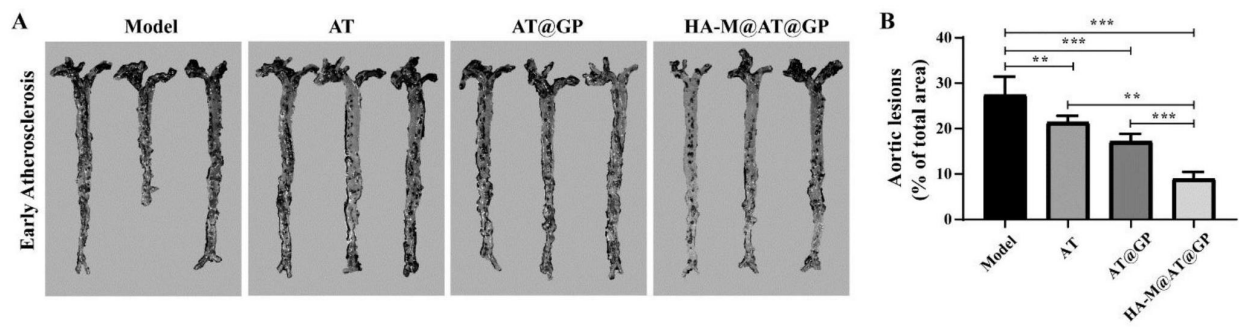


图9

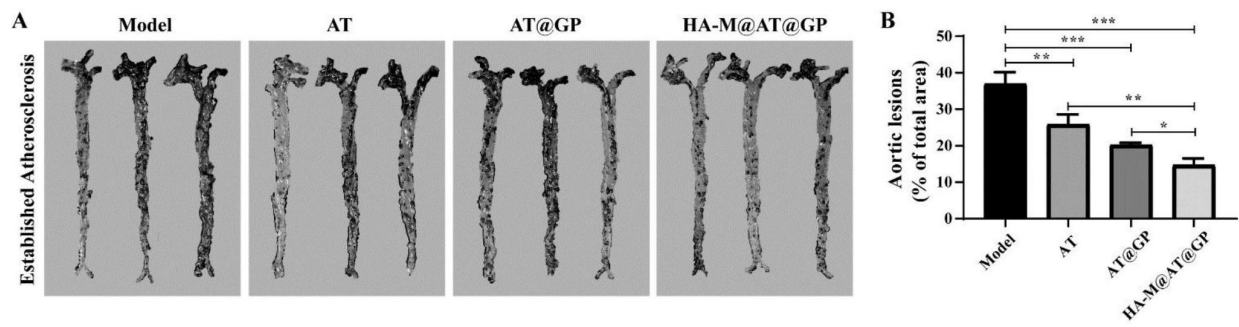


图10

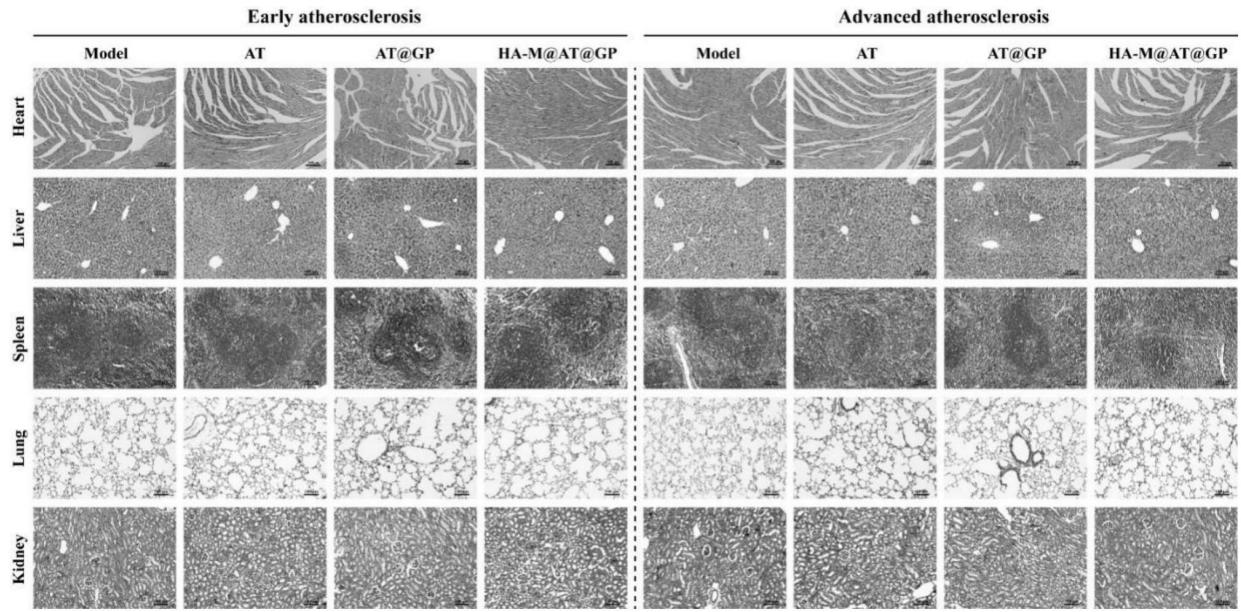


图11