(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108976288 B
(45)授权公告日 2021.09.21

(21)申请号 201710414334.7

(22)申请日 2017.06.05

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108976288 A

(43)申请公布日 2018.12.11

(73)专利权人 复旦大学
地址 200433 上海市杨浦区邯郸路220号

(72)发明人 魏刚 江宽 陆伟跃 刘畅 太玲钰 高欣

(74)专利代理机构 北京天昊联合知识产权代理有限公司 11112
代理人 麦善勇 张天舒

(51)Int.Cl.
C07K 7/08(2006.01) (续)

(56)对比文件
CN 101355970 A,2009.01.28
WO 2010/091294 A2,2010.08.12
WO 2010/091294 A2,2010.08.12
李莉 等.“抗肿瘤活性的新型高效细胞穿膜肽[Cys-CPT2,9] penetratin的设计及活性评价”.《药学学报》.2017,第52卷(第5期),第802页摘要,第803页左栏第2段,表1和第806页讨论部分.
李莉 等.“抗肿瘤活性的新型高效细胞穿膜肽[Cys-CPT2,9] penetratin的设计及活性评价”.《药学学报》.2017,第52卷(第5期),第802页摘要,第803页左栏第2段,表1和第806页讨论部分.
Federica Sgolastra et al..“Designing Mimics of Membrane Active Proteins”.《Acc Chem Res.》.2013,第46卷(第12期),第8页第2段.
Federica Sgolastra et al..“Designing Mimics of Membrane Active Proteins”.《Acc Chem Res.》.2013,第46卷(第12期),第8页第2段.
刘畅.“穿膜肽介导的眼内基因递送系统”.《中国优秀硕士学位论文全文数据库 医药卫生科技辑》.2016,(第3期),第1页第2段,第2页第2段,第47页第3.2节和第68页.
Chang Liu et al..“Facile Noninvasive Retinal Gene Delivery Enabled by Penetratin”.《ACS Appl. Mater. Interfaces》.2016,第8卷第19256-19267页.
P.M. Fischer et al..“Structure± activity relationship of truncated and substituted analogues of the intracellular delivery vector Penetratin”.《J. Peptide Res.》.2000,第55卷第163-172页.
Kuan Jiang et al..“Discerning the composition of penetratin for safe penetration from cornea to retina”.《Acta Biomaterialia》.2017,第63卷第123-134页.

审查员 赵二双

权利要求书2页 说明书12页 附图6页

(54)发明名称

基于野生型穿膜肽penetratin的亲脂性衍生物

(57)摘要

本发明属药物制剂领域,具体涉及基于野生型穿膜肽penetratin的亲脂性衍生物及其用途,本发明提供了基于野生型穿膜肽penetratin经结构改造的亲脂性衍生物penetratin衍生物,所述的penetratin衍生物具有很强的眼组织穿透能力,不产生眼部细胞毒性,作为眼部吸收促进剂可通过无创途径实现眼内药物递送,增加药物的眼部生物利用度。所述penetratin衍生物及其构建的眼部给药系统用于滴眼给药,可替代患者顺应性差的眼内注射给药,增强眼内和眼底疾病治疗的便利性和安全性。

CN 108976288 B

[转续页]

[接上页]

(51)Int.Cl.

A61K 45/00(2006.01)
A61P 27/02(2006.01)
A61P 9/10(2006.01)
A61P 31/02(2006.01)
A61P 31/04(2006.01)
A61P 25/00(2006.01)
A61P 31/10(2006.01)
A61P 3/00(2006.01)

1.基于野生型穿膜肽penetratin的亲脂性衍生物,其特征在于,所述的penetratin衍生物的氨基酸序列为:

$RX_1IKIWFX_2X_3RRMKWKK$

其中,X_1、X_2和X_3代表疏水性氨基酸,X_1、X_2和X_3中的至少二者选自天然来源的氨基酸丙氨酸(alanine,A)、缬氨酸(valine,V)、亮氨酸(leucine,L)、异亮氨酸(isoleucine,I)、脯氨酸(proline,P)、苯丙氨酸(phenylalanine,F)、色氨酸(tryptophan,W)、甲硫氨酸(methionine,M)和非天然来源的氨基酸α-氨基丁酸(α-aminobutyric acid)、α-氨基戊酸(α-aminopentanoic acid)、α-氨基己酸(α-aminohexanoic acid)、α-氨基庚酸(α-aminoheptanoic acid)。

2.根据权利要求1所述的基于野生型穿膜肽penetratin的亲脂性衍生物,其特征在于,所述penetratin衍生物的氨基酸序列为:RWIKIWFWNRRMKWKK,RWIKIWFQWRRMKWKK,RQIKIWFWWRRMKWKK,RWIKIWFWWRRMKWKK。

3.根据权利要求1所述的基于野生型穿膜肽penetratin的亲脂性衍生物,其特征在于,与具有诊断或治疗作用的药物通过化学键连接形成共价复合物,或修饰在包载诊断或治疗药物的给药系统表面制成眼部吸收促进剂。

4.根据权利要求3所述的基于野生型穿膜肽penetratin的亲脂性衍生物,其特征在于,所述的具有诊断或治疗作用的药物,选自白内障治疗药物维生素C、维生素E、吡诺克辛、谷胱甘肽、苄达赖氨酸,或细菌性眼内炎治疗药物万古霉素、头孢他啶、异帕米星、新霉素、庆大霉素、红霉素、地塞米松、曲伐沙星、头孢呋辛钠、米诺环素,或真菌性眼内炎治疗药物伏立康唑、制霉菌素、两性霉素B,或青光眼治疗药物毛果芸香碱、卡巴胆碱、地匹福林、噻吗洛尔、倍他洛尔、美替洛尔、左布诺洛尔、卡替洛尔、多佐胺、布林佐胺、溴莫尼定、拉坦前列素、曲伏前列素、比马前列素、贝美前列素、他氟前列素;或抗代谢药物氟尿嘧啶、丝裂霉素,或葡萄膜疾病治疗药物糖皮质激素类药物、阿昔洛韦、青霉素,或视网膜疾病治疗药物曲安奈德,或视神经疾病治疗药物泼尼松龙、维生素B1、维生素B12、烟酸;或它们的组合。

5.根据权利要求3所述的基于野生型穿膜肽penetratin的亲脂性衍生物,其特征在于,所述的包载诊断或治疗药物的给药系统选自脂质体、胶束和纳米粒。

6.根据权利要求1所述的基于野生型穿膜肽penetratin的亲脂性衍生物,其特征在于,所述的penetratin衍生物与生物大分子药物自组装形成非共价复合物。

7.根据权利要求6所述的基于野生型穿膜肽penetratin的亲脂性衍生物,其特征在于,所述的生物大分子药物选自:

基因药物:质粒DNA、哌加他尼(Pegaptanib)、贝伐西尼(Bevasiranib)、反义寡核苷酸(Antisense oligonucleotide),

单克隆抗体药物:贝伐单抗(Bevacizumab)、雷莫芦单抗(Ramucirumab),或

其他多肽蛋白类药物:康柏西普(Conbercept)、表皮生长因子(Epidermal growth factor,EGF)、防御素、干扰素和环孢菌素,以及

它们的组合。

8.权利要求1所述的基于野生型穿膜肽penetratin的亲脂性衍生物在制备眼部吸收促进剂中的用途。

9.根据权利要求8所述的用途,其特征在于,所述的眼部吸收促进剂经结膜囊内滴眼给

药促进药物吸收进入眼内,眼部应用的药物浓度为1nM-500μM。

10.根据权利要求8所述的用途,其特征在于,所述的眼部吸收促进剂经结膜囊内滴眼给药促进药物吸收进入眼内,眼部应用的药物浓度为10nM-300μM。

11.根据权利要求8所述的用途,其特征在于,所述的眼部吸收促进剂经结膜囊内滴眼给药促进药物吸收进入眼内,眼部应用的药物浓度为100nM-100μM。

基于野生型穿膜肽penetratin的亲脂性衍生物

技术领域

[0001] 本发明属药物制剂领域，涉及多肽类眼部吸收促进剂，具体涉及基于野生型穿膜肽penetratin的亲脂性衍生物，所述的penetratin衍生物具有很强的眼组织穿透能力，而且不会产生眼部细胞毒性，作为眼部吸收促进剂可通过无创途径实现眼内药物递送，增加药物的眼部生物利用度。

背景技术

[0002] 现有技术公开了眼睛是人体最重要的感觉器官，其独特的生理结构保护其免受外源性物质侵入，但也不利于药物的眼内递送。眼部的生理屏障包括静态屏障(如角膜上皮屏障、血-眼屏障等)和动态屏障(如泪液冲刷等)，是阻碍药物吸收的主要原因(Drug Discovery Today,2008,13(3-4):135-143;Adv.Drug Delivery Rev.,2006,58(11):1131-1135)。目前市售的眼用制剂以滴眼剂、眼用凝胶剂和眼膏剂等剂型为主。临床研究显示，滴眼剂滴入结膜囊后，药物主要透过角膜或结膜向眼内转运；由于人眼结膜囊容积有限，加之泪液稀释和鼻泪管流失等原因，通常滴眼剂的生物利用度小于5％，而且，由于从眼表面到眼底较长的扩散距离和房水在眼内的对流，极少药物(<0.001％)可以到达眼后段组织(J.Controlled Release,2014,193:100-112)。

[0003] 目前，全身给药是临床治疗眼部疾病的另一途径，但实践表明，由于血-眼屏障(如血-视网膜屏障)的阻碍，药物经全身给药后很难到达视网膜组织和玻璃体腔内；另外，由于大量药物进入体循环，大剂量和频繁给药还存在引起全身性副作用的风险(Invest.Ophthalmol.Visual Sci.,2000,41(5):961-964)。

[0004] 有研究报道，眼内注射(如玻璃体内注射)和眼周注射(如巩膜下注射)是目前临床上治疗眼内疾病和眼底疾病最为有效的给药途径。借助这些创伤性的给药方式，药物可直接到达眼内，起效快、生物利用度较高，但反复注射会引起多种并发症(如视网膜脱落、眼内炎等)，患者难以接受，顺应性差(EYE,2013,27(7):787-794)。

[0005] 综合考虑各种眼内和眼底药物递送方法，滴眼剂对眼部无创伤性，并且制备成本低、使用方便、患者顺应性好，是临床上最理想的眼用剂型，但其主要的问题在于药物难以吸收到眼内，更难以到达眼底部位，有研究采用药剂学方法，在滴眼剂处方中引入吸收促进剂，可以有效提高其眼内递药效率。由于眼睛极其敏感，有研究报道小分子吸收促进剂(如乙醇、二甲基亚砜等)的眼部刺激性强，并且不易被代谢，不适用于眼部应用(Toxicol.Lett.,2001,122(1):1-8)，因此，新型眼部吸收促进剂的开发十分必要。

[0006] 穿膜肽(cell-penetrating peptides,CPPs)是一种生理条件下荷正电的短肽，可以介导共价或非共价连接的分子或给药系统(如双链DNA、脂质体等)进入细胞(J.Controlled Release,2011,155(1SI):26-33;Biomaterials,2013,34(32):7980-7993)。研究显示，来源于果蝇触角的穿膜肽penetratin具有很强的眼组织穿透能力，而且不会产生眼部细胞毒性(Mol.Pharm.2014,11(4):1218-1227)。有报道在几种非创伤性的眼部递药系统中，penetratin作为吸收促进剂，可以介导报告基因到达眼后段并在视网膜高

效表达(ACS Appl.Mater.Interfaces,2016,8(30):19256-19267;Nanomedicine:NBM 2017,DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2017.04.011;中国发明专利申请:CN201610560173.8),但野生型penetratin的穿膜能力还有进一步提升的空间。

[0007] 基于现有技术的现状,以及对眼组织穿透能力较强的天然来源多肽penetratin的报道,本申请的发明人拟提供设计改造的penetratin衍生物,其构建的眼部给药系统用于滴眼给药,可替代患者顺应性差的眼内注射给药,该类多肽作为眼部吸收促进剂,滴入结膜囊后,可更有效地递送共价连接或非共价连接的药物分子到达眼后段组织,并且保留野生型penetratin良好的眼部安全性,以及避免药物在非靶组织中分布和产生副作用,增强眼内和眼底疾病治疗的便利性和安全性。

发明内容

[0008] 本发明的目的是克服现有技术的吸收促进剂眼部应用的缺陷,提供基于野生型穿膜肽penetratin的亲脂性衍生物,所述的penetratin衍生物具有很强的眼组织穿透能力,而且不会产生眼部细胞毒性,作为眼部吸收促进剂可通过无创途径实现眼内药物递送,增加药物的眼部生物利用度。本发明对于野生型穿膜肽经结构改造获得penetratin的亲脂性衍生物,经改造的穿膜肽作为眼部吸收促进剂,可通过非创伤途径滴眼给药,将共价连接或非共价连接的药物递送至眼内。

[0009] 基于普通滴眼剂在结膜囊内滞留时间短,吸收效果差,特别是基因、多肽和蛋白质等生物大分子药物经局部滴眼给药后,眼部生物利用度极低,并且几乎不能到达眼后段;眼内注射剂和眼内植入剂生物利用度虽高,但患者顺应性差,且容易导致严重的并发症;本发明针对上述问题,基于天然来源的穿膜肽penetratin,采用氨基酸突变的方法,设计并制备系列对眼组织穿透性好、生物安全性高的多肽衍生物,改多肽衍生物可通过非创伤途径将与其共价连接的分子甚至非共价连接的分子递送至眼内;进一步,该多肽作为眼部吸收促进剂,能够介导药物高效地透过眼部的吸收屏障,促进药物进入眼内并到达眼后段,提高药物的眼部生物利用度。

[0010] 具体的,本发明提供了基于野生型穿膜肽penetratin经结构改造的亲脂性衍生物penetratin衍生物,所述野生型多肽penetratin的氨基酸序列为:

[0011] RQIKIWFQNRRMKWKK

[0012] 本发明在保持野生型penetratin基本氨基酸序列不变的前提下,利用氨基酸突变技术,在其分子中引入疏水性氨基酸,进而增强所得到的penetratin衍生物的眼组织穿透能力。

[0013] 更具体地,本发明的基于野生型穿膜肽penetratin的亲脂性衍生物,在野生型penetratin的基础之上,保持其原有碱性氨基酸精氨酸(arginine,R)、赖氨酸(lysine,K)以及原有疏水氨基酸异亮氨酸(isoleucine,I)、苯丙氨酸(phenylalanine,F)、色氨酸(tryptophan,W)、甲硫氨酸(methionine,M)的序列不变,利用多肽固相合成技术,以疏水性氨基酸取代penetratin分子中的亲水性氨基酸谷氨酰胺(glutamine,Q)和天冬酰胺(asparagine,N),获得系列多肽衍生物;

[0014] 所述penetratin衍生物具有下述氨基酸序列:

[0015] $RX_1IKIWFX_2X_3RRMKWKK$

[0016] 其中，X_1、X_2和X_3代表疏水性氨基酸，选自天然来源的氨基酸丙氨酸(alanine，A)、缬氨酸(valine，V)、亮氨酸(leucine，L)、异亮氨酸(isoleucine，I)、脯氨酸(proline，P)、苯丙氨酸(phenylalanine，F)、色氨酸(tryptophan，W)、甲硫氨酸(methionine，M)和非天然来源的氨基酸α-氨基丁酸(α-aminobutyric acid)、α-氨基戊酸(α-aminopentanoic acid)、α-氨基己酸(α-aminohexanoic acid)、α-氨基庚酸(α-aminoheptanoic acid)等，以及它们的组合物；所述组合物为对野生型penetratin不同亲水性氨基酸(谷氨酰胺和天冬酰胺)位点用不同的上述疏水性氨基酸进行取代。

[0017] 本发明中，在野生型penetratin基础之上进行结构改造获得的多肽衍生物，其氨基酸序列如表1所示，其中，突变的氨基酸用下划线标示；该表格中未给出非天然氨基酸突变的实例，不同疏水氨基酸的组合突变仅给出代表性实例。

[0018] 表1野生型penetratin经结构改造后得到的penetratin衍生物

[0019]

缩写	氨基酸序列	缩写	氨基酸序列
2-A	R<u>A</u>IKIWFQNRRMKWKK	2-V	R<u>V</u>IKIWFQNRRMKWKK
8-A	RQIKIWF<u>A</u>NRRMKWKK	8-V	RQIKIWF<u>V</u>NRRMKWKK
9-A	RQIKIWFQ<u>A</u>RRMKWKK	9-V	RQIKIWFQ<u>V</u>RRMKWKK
28-A	R<u>A</u>IKIWF<u>A</u>NRRMKWKK	28-V	R<u>V</u>IKIWF<u>V</u>NRRMKWKK
29-A	R<u>A</u>IKIWFQ<u>A</u>RRMKWKK	29-V	R<u>V</u>IKIWFQ<u>V</u>RRMKWKK
89-A	RQIKIWF<u>AA</u>RRMKWKK	89-V	RQIKIWF<u>VV</u>RRMKWKK
289-A	R<u>A</u>IKIWF<u>AA</u>RRMKWKK	289-V	R<u>V</u>IKIWF<u>VV</u>RRMKWKK
2-L	R<u>L</u>IKIWFQNRRMKWKK	2-I	R<u>I</u>IKIWFQNRRMKWKK
8-L	RQIKIWF<u>L</u>NRRMKWKK	8-I	RQIKIWF<u>I</u>NRRMKWKK
9-L	RQIKIWFQ<u>L</u>RRMKWKK	9-I	RQIKIWFQ<u>I</u>RRMKWKK
28-L	R<u>L</u>IKIWF<u>L</u>NRRMKWKK	28-I	R<u>I</u>IKIWF<u>I</u>NRRMKWKK
29-L	R<u>L</u>IKIWFQ<u>L</u>RRMKWKK	29-I	R<u>I</u>IKIWFQ<u>I</u>RRMKWKK
89-L	RQIKIWF<u>LL</u>RRMKWKK	89-I	RQIKIWF<u>II</u>RRMKWKK
289-L	R<u>L</u>IKIWF<u>LL</u>RRMKWKK	289-I	R<u>I</u>IKIWF<u>II</u>RRMKWKK

[0020]

2-P	RPIKIWFQNRRMKWKK	2-F	RFIKIWFQNRRMKWKK
8-P	RQIKIWFPNRRMKWKK	8-F	RQIKIWFFNRRMKWKK
9-P	RQIKIWFQPRRMKWKK	9-F	RQIKIWFQFRRMKWKK
28-P	RPIKIWFPNRRMKWKK	28-F	RFIKIWFFNRRMKWKK
29-P	RPIKIWFQPRRMKWKK	29-F	RFIKIWFQFRRMKWKK
89-P	RQIKIWFPPRRMKWKK	89-F	RQIKIWFFFRRMKWKK
289-P	RPIKIWFPPRRMKWKK	289-F	RFIKIWFFFRRMKWKK
2-W	RWIKIWFQNRRMKWKK	2-M	RMIKIWFQNRRMKWKK
8-W	RQIKIWFWNRRMKWKK	8-M	RQIKIWFMNRRMKWKK
9-W	RQIKIWFQWRRMKWKK	9-M	RQIKIWFQMRRMKWKK
28-W	RWIKIWFWNRRMKWKK	28-M	RMIKIWFMNRRMKWKK
29-W	RWIKIWFQWRRMKWKK	29-M	RMIKIWFQMRRMKWKK
89-W	RQIKIWFWWRRMKWKK	89-M	RQIKIWFMMRRMKWKK
289-W	RWIKIWFWWRRMKWKK	289-M	RMIKIWFMMRRMKWKK
2-A,8-V	RAIKIWFVNRRMKWKK	2-F,9-W	RFIKIWFQWRRMKWKK
2-V,8-A	RVIKIWFANRRMKWKK	2-W,9-F	RWIKIWFQFRRMKWKK
2-V,9-L	RVIKIWFQLRRMKWKK	2-W,9-M	RWIKIWFQMRRMKWKK
2-L,9-V	RLIKIWFQVRRMKWKK	2-M,9-W	RMIKIWFQWRRMKWKK
2-L,9-I	RLIKIWFQIRRMKWKK	2-M,8-W,9-Y	RMIKIWFWYRRMKWKK
2-I,9-L	RIIKIWFQLRRMKWKK	2-W,8-Y,9-P	RWIKIWFYPRRMKWKK
2-I,8-P	RIIKIWFPNRRMKWKK	2-Y,8-P,9-I	RYIKIWFPIRRMKWKK
2-P,8-I	RPIKIWFINRRMKWKK	2-P,8-I,9-L	RPIKIWFILRRMKWKK
2-P,8-F	RPIKIWFFNRRMKWKK	2-I,8-L,9-V	RIIKIWFLVRRMKWKK
2-F,8-P	RFIKIWFPNRRMKWKK	2-L,8-V,9-A	RLIKIWFVARRMKWKK

[0021] 本发明中，所述的penetratin衍生物可通过酰胺键、二硫键、四氢噻唑环或其他化学键与具有诊断或治疗作用的药物连接在一起；也可以利用一个或多个氨基酸作为桥连，或利用其他双功能基团作为桥连，与具有诊断或治疗作用的药物连接在一起。

[0022] 本发明中，上述起诊断或治疗作用的药物选自但不局限于下列药物中的一种或它们的复方：

[0023] 1)白内障治疗药物：选自维生素C、维生素E、吡诺克辛、谷胱甘肽、苄达赖氨酸等；

[0024] 2)细菌性眼内炎治疗药物：选自万古霉素、头孢他啶、异帕米星、新霉素、庆大霉素、红霉素、地塞米松、曲伐沙星、头孢呋辛钠、米诺环素等；

[0025] 3)真菌性眼内炎治疗药物：选自伏立康唑、制霉菌素、两性霉素B等；

[0026] 4)青光眼治疗药物:选自毛果芸香碱、卡巴胆碱、地匹福林、噻吗洛尔、倍他洛尔、美替洛尔、左布诺洛尔、卡替洛尔、多佐胺、布林佐胺、溴莫尼定、拉坦前列素、曲伏前列素、比马前列素、贝美前列素、他氟前列素等;

[0027] 5)抗代谢药物:选自氟尿嘧啶、丝裂霉素等;

[0028] 6)葡萄膜疾病治疗药物:选自糖皮质激素类药物、阿昔洛韦、青霉素等;

[0029] 7)视网膜疾病治疗药物:选自曲安奈德等;

[0030] 8)视神经疾病治疗药物:选自泼尼松龙、维生素B1、维生素B12、烟酸等。

[0031] 本发明中,所述的penetratin衍生物还可以通过双功能桥连分子,如双功能聚乙二醇(PEG),修饰在脂质体、胶束、纳米粒等给药系统表面,利用这些给药系统包载上述药物,实现上述药物的眼内递送。

[0032] 本发明中,所述的penetratin衍生物保留了野生型penetratin在生理条件下带正电荷的特性,还可以通过静电相互作用与生理条件下带负电荷的基因、多肽和蛋白质等生物大分子药物自组装形成纳米复合物,或者与在阳离子聚合物如聚乙烯亚胺(PEI)、多聚赖氨酸(DGLs)、聚酰胺-胺树枝状大分子(PAMAM)等存在的情况下与生理条件下带负电荷的基因、多肽和蛋白质等生物大分子药物自组装形成纳米复合物,实现上述生物大分子药物的眼内递送;

[0033] 上述生物大分子药物选自但不局限于下列药物中的一种或它们的复方:

[0034] 1)基因药物:选自质粒DNA(pDNA)、哌加他尼(Pegaptanib)、贝伐西尼(Bevasiranib)、反义寡核苷酸(Antisense oligonucleotide)等;

[0035] 2)单克隆抗体药物:选自贝伐单抗(Bevacizumab)、雷莫芦单抗(Ramucirumab)等;

[0036] 3)其他多肽蛋白类药物:选自抗血管内皮生长因子(VEGF)融合蛋白康柏西普(Conbercept)、表皮生长因子(Epidermal growth factor,EGF)、防御素、干扰素和环孢菌素等。

[0037] 本发明中,所述的penetratin衍生物与具有诊断或治疗作用的药物形成共价复合物,或修饰在包载诊断或治疗药物的脂质体、胶束、纳米粒等给药系统表面,或与生理条件下带负电荷的基因、多肽和蛋白质等生物大分子药物自组装形成非共价纳米复合物,经结膜囊内滴眼给药后,可促进药物穿过诸多眼部吸收屏障(角膜、结膜、巩膜等)进入眼内,甚至将其携带的化学药物或基因、多肽、蛋白质类生物大分子药物递送至眼后段的视网膜部位。所述利用penetratin衍生物构建的共价复合物、表面修饰的纳米给药系统或非共价纳米复合物中,penetratin衍生物的浓度为1nM-500μM,优选10nM-300μM,进一步优选100nM-100μM。这种通过非创伤途径给药的眼内递药系统有助于促进药物在眼部的吸收,提高化学药物和生物大分子药物的眼部生物利用度,在临床上可替代眼内注射等患者顺应度低的给药方式。

[0038] 为了直观地展示本发明中所述的penetratin衍生物对与其共价连接的化学药物的眼部吸收促进效果,本申请中以单纯色氨酸(tryptophan,W)取代的penetratin衍生物为例,在色氨酸取代的penetratin衍生物的C端额外接上一个赖氨酸(lysine,K)并将荧光探针羧基荧光素(FAM)连接在赖氨酸的氨基侧链上,形成共价复合物,通过系列体外和体内实验,考察penetratin衍生物修饰的荧光探针的眼部细胞摄取能力、眼部离体组织透过能力以及经结膜囊内滴眼给药后在活体动物眼部的吸收与分布,结果表明,与野生型

penetratin相比，色氨酸取代的penetratin衍生物具有显著增强的眼部吸收促进能力。

[0039] 更重要的是，结果显示，penetratin衍生物对眼组织的穿透能力与其疏水性(亲脂性)相关，疏水性(亲脂性)越强，penetratin衍生物对眼组织的穿透能力也越强，因此，利用其它疏水性氨基酸制备的penetratin衍生物也将获得增强的眼部吸收促进效果，而且，结果证实penetratin衍生物能够有效地将荧光探针递送至眼内，如果用其他具有诊断或治疗作用的药物替代荧光探针，也将获得同样的眼内递送效果。

[0040] 为了直观地展示本发明中所述的penetratin衍生物对纳米药物载体以及与其非共价结合的生物大分子药物的眼部吸收促进效果，本申请中以单纯苯丙氨酸(phenylalanine，F)取代的penetratin衍生物为例，以反义寡核苷酸(Antisense oligonucleotide)为生物大分子药物模型，在聚酰胺-胺树枝状大分子(PAMAM)和透明质酸(hyaluronic acid，HA)存在的条件下，构建了包载反义寡核苷酸的非共价复合物，通过系列体外和体内实验，考察penetratin衍生物修饰的非共价复合物的眼部细胞摄取能力、眼部离体组织透过能力以及经结膜囊内滴眼给药后在活体动物眼部的吸收与分布，结果表明，与野生型penetratin相比，苯丙氨酸取代的penetratin衍生物具有显著增强的眼部吸收促进能力。

[0041] 本发明所述penetratin衍生物的优势在于，相对于因安全性问题极少在眼部应用的小分子吸收促进剂，该种多肽类吸收促进剂易于降解，因而生物安全性更好；另一方面，多肽类吸收促进剂易于修饰和改造，能实现不同的应用目标，尤其本发明所述的penetratin衍生物较天然来源的野生型penetratin具有更强的眼部吸收促进能力。

附图说明

[0042] 图1：实施penetratin衍生物与小分子物质共价连接复合物细胞摄取定性评价，其中，人角膜上皮细胞和人结膜上皮细胞与penetratin衍生物-FAM共价复合物(100nM)分别孵育0.5h，1h，2h和4h，标尺为100μm。

[0043] 图2：实施penetratin衍生物与小分子物质共价连接复合物细胞摄取定量评价，其中，人角膜上皮细胞和人结膜上皮细胞与penetratin衍生物-FAM共价复合物分别孵育4h后测定，Fm为细胞平均荧光强度值。

[0044] 图3：实施penetratin衍生物细胞毒性评价，

[0045] 其中，人角膜上皮细胞和人结膜上皮细胞与penetratin衍生物分别孵育12h，采用MTT法检测实验组相对于阴性对照组细胞存活率。

[0046] 图4：实施penetratin衍生物与小分子物质共价连接复合物离体眼组织透过能力评价，

[0047] 其中，图A中a为penetratin衍生物-FAM共价复合物对离体兔眼角膜透过曲线，b为penetratin衍生物-FAM共价复合物对离体兔眼巩膜透过曲线，c为表观透过系数；图B为空白组与实验组离体组织DAPI染色的荧光切片，标尺为100μm。

[0048] 图5：实施penetratin衍生物与小分子物质共价连接复合物离体组织毒性评价，

[0049] 其中，图A为空白组与penetratin衍生物-FAM共价复合物组角膜水化值；图B为空白组与penetratin衍生物-FAM共价复合物组巩膜水化值；图C为空白组与penetratin衍生物-FAM共价复合物组离体组织HE染色切片，标尺为100μm。

[0050] 图6:实施penetratin衍生物与小分子物质共价连接复合物在活体小鼠眼内的分布,

[0051] 其中,图A为结膜囊给药后,不同时间点(10min,0.5h,1h,2h,4h,6h)penetratin衍生物-FAM共价复合物在小鼠眼前段(角膜)和眼后段(视网膜)分布情况;图B为结膜囊给药后10min,penetratin衍生物-FAM共价复合物在小鼠眼前段(角膜)和眼后段(视网膜)分布情况;图C为给药后10min,1h,6h后,penetratin衍生物-FAM共价复合物眼内分布半定量分析结果。

[0052] 图7实施Penetratin衍生物与反义寡核苷酸药物非共价复合物的眼部吸收

[0053] 其中,结膜囊给药后,不同时间点(1h,2h,6h,8h)各组非共价复合物(ASO/PG5,ASO/PG5/HA,ASO/PG5/HA/Pene)在小鼠视网膜分布情况。

[0054] 图8实施Penetratin衍生物修饰的氟尿嘧啶与反义寡核苷酸药物双载药非共价复合物的细胞摄取评价,

[0055] 其中,小鼠成纤维细胞与不同处方双载药非共价复合物(dual/PG5,dual/PG5/HA,dual/PG5/HA/Pene)孵育4h后,测定各组细胞平均荧光强度值。

具体实施方式

[0056] 以下结合本发明的具体实施例进一步阐明本发明,但并不限制其保护范围。

[0057] 实施例1制备Penetratin衍生物与小分子物质共价连接复合物

[0058] 以野生型penetratin的结构为基础,保持其原有的碱性氨基酸和疏水氨基酸的序列不变,利用多肽固相合成技术,以疏水性的色氨酸(tryptophan,W)分别取代penetratin分子中亲水性的谷氨酰胺(glutamine,Q)和天冬酰胺(asparagine,N),进而得到一系列多肽衍生物。在上述色氨酸取代的penetratin衍生物的C端额外接上一个赖氨酸(lysine,K)并将荧光探针羧基荧光素(FAM)连接在赖氨酸的氨基侧链上,形成共价复合物,其氨基酸序列如表2所示;

[0059] 同时,保持野生型penetratin原有的碱性氨基酸和亲水氨基酸的序列不变,利用多肽固相合成技术,以丙氨酸(alanine,A)取代penetratin分子中疏水性更强的异亮氨酸(isoleucine,I)、苯丙氨酸(phenylalanine,F)、色氨酸(tryptophan,W)和甲硫氨酸(methionine,M),得到一条亲水性的penetratin衍生物6A,并进一步利用FAM对其进行荧光标记,作为亲水性对照多肽;

[0060] 表2 Penetratin衍生物与荧光探针共价复合物的氨基酸序列

[0061]

缩写	氨基酸序列
Penetratin	RQIKIWFQNRRMKWKKK-FAM
2-W	RWIKIWFQNRRMKWKKK-FAM
8-W	RQIKIWFWNRRMKWKKK-FAM
9-W	RQIKIWFQWRRMKWKKK-FAM
28-W	RWIKIWFWNRRMKWKKK-FAM
29-W	RWIKIWFQWRRMKWKKK-FAM
89-W	RQIKIWFWWRRMKWKKK-FAM
289-W	RWIKIWFWWRRMKWKKK-FAM
6A	RQAKAAAQNRRAKAKKK-FAM

[0062] 采用上述方法，分别制备丙氨酸(alanine，A)、缬氨酸(valine，V)、亮氨酸(leucine，L)、异亮氨酸(isoleucine，I)、脯氨酸(proline，P)、苯丙氨酸(phenylalanine，F)、色氨酸(tryptophan，W)、甲硫氨酸(methionine，M)、α-氨基丁酸(α-aminobutyric acid)、α-氨基戊酸(α-aminopentanoic acid)、α-氨基己酸(α-aminohexanoic acid)、α-氨基庚酸(α-aminoheptanoic acid)等天然与非天然氨基酸以及它们的组合物取代的penetratin衍生物，其氨基酸序列如表1所示；

[0063] 采用上述方法，本申请还分别将白内障治疗药物、细菌性眼内炎治疗药物、真菌性眼内炎治疗药物、青光眼治疗药物、抗代谢药物、葡萄膜疾病治疗药物、视网膜疾病治疗药物以及视神经疾病治疗药物与penetratin衍生物通过共价键连接在一起，形成penetratin衍生物与小分子药物共价复合物。

[0064] 实施例2 Penetratin衍生物与小分子物质共价连接复合物的细胞摄取定性评价实验

[0065] 取生长状态良好的人角膜上皮细胞(HCEC)和人结膜上皮细胞(NHC)按5×10^3个细胞/cm^2分别接种到24孔板中，接种后每天换液一次，培养至2～3天后进行实验；弃去培液后，无菌PBS洗三次，分别加入含100nM penetratin衍生物与FAM复合物的无血清DMEM溶液，37℃、5％CO_2条件下孵育一定时间(0.5h、1h、2h和4h)，结束后弃去药液，用含0.02mg/mL肝素钠的PBS缓冲溶液洗去正电性吸附物质，二咪基苯基吲哚(DAPI)染细胞核后在倒置荧光显微镜下观察；

[0066] 结果表明，对于野生型penetratin，孵育4h后，细胞中FAM的荧光信号仍然较弱，对于亲水性penetratin衍生物6A，FAM的荧光信号更弱，结果显示，亲脂性penetratin衍生物有较强的FAM荧光信号，特别是penetratin衍生物9-W、28-W、89-W以及289-W，给药1h后即可见细胞发出明显的FAM荧光信号，并且随孵育时间延长，FAM的荧光信号也随之增强；表明利用疏水性氨基酸取代penetratin分子中原有的亲水性氨基酸，有利于促进多肽携载小分子物质被细胞摄取，而亲水性增强则使细胞摄取减少。

[0067] 实施例3 Penetratin衍生物与小分子物质共价连接复合物的细胞摄取定量评价

实验

[0068] 取生长状态良好的HCEC和NHC细胞按5×10^3细胞/cm^2分别接种到12孔板中，接种后每天换液一次，培养2～3天后进行实验；弃去培液后，无菌PBS洗三次，分别加入含3μM penetratin衍生物与FAM复合物的无血清DMEM溶液，37℃、5％CO_2条件下孵育4h，结束后弃去药液，用含0.02mg/mL肝素钠的PBS缓冲溶液洗去正电性吸附物质，将细胞消化下来，重悬于200μL无菌PBS缓冲溶液中，吹打均匀后进行流式检测，每个样品细胞计数在10^4，未给药细胞作为阴性对照组；

[0069] 在HCEC细胞中，亲脂性penetratin衍生物与FAM复合物的细胞摄取量明显多于野生型penetratin与FAM的复合物($p<0.001$)，平均荧光强度是野生型penetratin组的1.7(29-W)～7.7(89-W)倍不等，而亲水性penetratin衍生物6A的平均荧光强度仅为野生型penetratin组的1/10($p<0.001$)。对于NHC细胞，疏水性penetratin衍生物的平均荧光强度是野生型penetratin的2.8(2-W)～18.9(29-W)倍不等($p<0.01$)，亲水性penetratin衍生物的平均荧光强度则仅为野生型penetratin的1/4($p<0.001$)，结果表明，无论对于HCEC还是NHC细胞，亲脂性penetratin衍生物的细胞摄取量均明显多于野生型penetratin，而亲水性penetratin衍生物则显著低于野生型penetratin，与定性摄取结果一致。

[0070] 实施例4 Penetratin衍生物的细胞毒性评价实验

[0071] 取对数期生长状态良好的HCEC和NHC细胞按3000细胞/孔浓度分别铺于96孔板的60内孔中，边缘用无菌PBS缓冲溶液填充，在37℃、5％CO_2条件下培养至细胞单层铺满板底，弃去培液，无菌PBS缓冲液洗3次后，加入200μL含不同浓度penetratin衍生物的培液，细胞培养箱中孵育12h后，弃去药液，无菌PBS缓冲液洗3次后，加入完全培养基继续培养12h。之后每孔加入20μL噻唑篮(MTT)溶液(5mg/mL)，继续培养4h后，弃去液体，PBS缓冲液洗三次后每孔加入150μL二甲基亚砜(DMSO)，在摇床上低速振荡20min后，于酶标仪OD 490nm处测定各孔吸光度值；同时设置空白调零孔(培养基、MTT、DMSO)和阴性对照孔(细胞、培养基、MTT、DMSO)；

[0072] 结果表明，在考察浓度范围条件下(≤30μM)，细胞生长状况未见显著改变，penetratin及其衍生物对HCEC和NHC细胞未见毒性作用。

[0073] 实施例5 Penetratin衍生物与小分子物质共价连接复合物的离体组织透过性评价实验

[0074] 采用耳缘静脉注射戊巴比妥钠(30mg/kg)麻醉实验兔，并注射过量水合氯醛(150mg/kg)处死后，分离结膜后小心取出整个眼球，在距角膜缘约2mm处环切，取下角膜，并去掉虹膜等组织，得到实验用角膜，剩余眼球部分除去视网膜等组织，得到实验用巩膜，角膜与巩膜均用林格溶液小心冲洗3次后备用；动物处死后30min内开始实验，将新鲜离体的角膜与巩膜小心的夹在两扩散池中间，上皮面均朝向左侧扩散池(供给池)，扩散窗直径10.25mm，扩散面积0.825cm^2，向供给池和右侧接收池分别加入3.5mL林格溶液，通入循环水，水温保持在34℃±0.5℃，系统平衡10min后，撤去供给池中溶液，加入Penetratin衍生物与FAM复合物的溶液，浓度为7.5μM。整个扩散装置置于扩散仪上，保持磁力搅拌，恒温水浴保持在34℃±0.5℃，并向扩散介质中通入混合气体(O_2:CO_2＝95:5，体积比)，实验开始后，在预先设定的时间点取样，每次在接收池取样500μL，并立即补加500μL新鲜林格溶液，实验结束后，立即测定样品荧光强度值。角膜和巩膜取下后，用林格溶液小心冲洗表面3次，

去掉扩散面以外部分，剩余组织用Davidson's溶液固定后，做DAPI染色的冰冻切片，用于观察多肽连接的荧光探针的组织分布；

[0075] 结果如图4A所示，表明与多肽连接的荧光探针透过离体角膜和巩膜的过程是一个时间依赖的线性过程；根据各曲线得到的表观透过系数(P_{app})值可知，对于离体角膜，亲脂性衍生物2-W、28-W、289-W的P_{app}值分别是野生型penetratin的1.2、1.3和1.4倍($p<0.05$)，而亲水性衍生物6A则仅为野生型penetratin的1/5($p<0.001$)，而对离体巩膜，2-W、28-W、289-W的P_{app}值分别是野生型penetratin的1.1、1.5和2.1倍($p<0.001$)，而6A则仅为野生型penetratin的2/3($p<0.001$)；图4B显示了DAPI染色后的离体角膜和巩膜荧光切片结果，空白组织切片未见绿色荧光，表示组织无荧光本底干扰；在离体角膜中，与野生型penetratin组相比，亲脂性penetratin衍生物处理过的角膜荧光强度更强，并且亲脂性越强，进入角膜量越多，而亲水性penetratin衍生物6A组无明显荧光信号；在离体巩膜中，亲脂性衍生物组荧光信号强于野生型penetratin组，而6A则明显弱于penetratin组。

[0076] 实施例6 Penetratin衍生物与小分子物质共价连接复合物的离体组织毒性评价实验

[0077] Davidson's溶液固定后的组织取部分做苏木素-伊红(HE)染色的石蜡切片，用于观察透过实验后组织的完整性；另取部分组织用滤纸吸干表面水分后称重记为m_0，然后置于60℃烘箱中干燥48h，称重后记为m_t，按如下公式计算组织水化值：

[0078] $\Delta H=(m_0-m_t)/m_0\times 100\%$

[0079] 图5A结果显示，penetratin衍生物处理过的离体角膜和巩膜的水化值与未经处理的新鲜角膜和巩膜的水化值相比，没有显著差异，并且与文献报道的正常值相符，表明在7.5μM浓度条件下，penetratin衍生物对离体眼组织未见毒性作用；

[0080] 图5B中HE染色切片结果显示，所有经penetratin衍生物处理过的角膜均保持了完整的角膜上皮结构，无空泡化或损伤的情况。所有经penetratin衍生物处理过的巩膜也保持了完整结构，无纤维断裂情况，表明penetratin衍生物在7.5μM浓度条件下对离体角膜和巩膜未见毒性作用。

[0081] 实施例7 Penetratin衍生物与小分子物质共价连接复合物的眼内分布评价实验

[0082] 向雄性小鼠结膜囊滴入penetratin衍生物与FAM复合物的溶液5μL(浓度30μM)，轻轻闭合眼睑使溶液均匀分布，每10min给药一次，共3次，将最后一次给药时间作为零时刻，在预先设定的时间点腹腔注射过量水合氯醛致死小鼠，取小鼠眼球用Davidson's溶液固定0.5h后包埋，制备眼球冰冻纵向切片并用DAPI染细胞核，在倒置荧光显微镜下观察多肽在眼部分布情况；

[0083] 图6A结果显示，空白组小鼠眼球切片中眼前段(角膜)和眼后段(视网膜)均无绿色荧光信号，表明眼组织无荧光本底干扰，而相比于野生型penetratin组，亲脂性penetratin衍生物组在滴眼10min后小鼠眼前段和眼后段均有更强的绿色FAM荧光信号，表明亲脂性penetratin衍生物眼部透过能力更强，而亲水性penetratin衍生物6A组FAM荧光信号减弱，表明其眼部透过能力弱于野生型penetratin，与离体实验结果相一致；图6B显示，经结膜囊给药后，亲脂性penetratin衍生物可以有效分布于小鼠角膜基质层和视网膜内网层，而6A在角膜中分布较野生型penetratin明显较少，几乎没有FAM的绿色荧光信号，而且在视网膜中6A也只有少量分布；

[0084] 图6C半定量分析结果表明,与野生型penetratin相比,亲脂性penetratin衍生物进入角膜和视网膜的量更多($p<0.001$),并且眼内滞留时间更长,对于亲脂性较强的28-W,29-W,89-W和289-W,滞留时间长达6h,而对于6A,进入眼内的量明显少于野生型penetratin($p<0.05$),表明其对眼部屏障的透过性较差。

[0085] 实施例8制备Penetratin衍生物与反义寡核苷酸药物非共价复合物

[0086] 取60μg拮抗转化生长因子(TGFβ2)基因的反义寡核苷酸(anti-TGFβ2-ASO),加入2mL缓冲液,涡旋30s使其充分溶解,得到浓度为30μg/mL的ASO溶液,取5代氨基端的聚酰胺-胺树状大分子(PAMAM,缩写为PG5)甲醇溶液10μL(PAMAM浓度为0.1mg/μL),于40℃水浴中进行氮气吹干,后将PAMAM复溶于1mL蒸馏水中并用蒸馏水进行稀释,得到实验浓度的PAMAM溶液,取透明质酸(HA)1mg溶于1mL蒸馏水中并用蒸馏水进行稀释,得到实验浓度的HA溶液,取2-M,8-W,9-Y penetratin衍生物(RMIKIWFWYRRMKWKK,缩写为Pene)溶于缓冲液中,得到浓度为500μM的penetratin衍生物溶液;

[0087] 取500μL实验浓度的PAMAM溶液,在涡旋条件下逐滴加入同等体积(500μL)的ASO溶液,滴加完毕后继续涡旋30s,室温静置下稳定30min,得到ASO/PG5复合物;取稳定后的ASO/PG5复合物1mL,在涡旋条件下逐滴加入500μL实验浓度的HA溶液,滴加完毕后继续涡旋30s,室温静置下稳定30min,得到ASO/PG5/HA复合物;取稳定后的ASO/PG5/HA复合物1.5mL,在涡旋条件下逐滴加入500μL浓度为500μM的penetratin衍生物溶液,滴加完毕后继续涡旋30s,室温静置下稳定30min,得到ASO/PG5/HA/Pene复合物。

[0088] 实施例9 Penetratin衍生物与反义寡核苷酸药物非共价复合物的眼部吸收实验

[0089] 用荧光标记的ASO分别制备ASO/PG5,ASO/PG5/HA和ASO/PG5/HA/Pene复合物,所有实验组均含30μg/mL ASO。将小鼠随机分为3组,分别为ASO/PG5,ASO/PG5/HA和ASO/PG5/HA/Pene组,每组12只,分别用10μL实验组溶液进行右眼滴眼给药,每隔10min给药一次,每组每只共给药3次,每组分别自最后一次给药1h,2h,6h和8h后随机取3只小鼠进行处死,摘除小鼠眼球,并在30%蔗糖溶液中脱水过夜,垂直于角膜进行切片,取组织中段切片制备冰冻切片并用DAPI工作液进行细胞核染色,共聚焦显微镜下观察眼后段中复合物的消除情况;

[0090] 冰冻切片观察结果显示,3种复合物递送的ASO均在滴眼1h后在小鼠眼后段有所分布,且分布随着时间延长而增多,但只有ASO/PG5/HA/Pene递送的ASO在眼后段呈现明显分布,且8h后在外网层(OPL)和视网膜色素上皮细胞(RPE)仍有分布;结果表明,利用penetratin衍生物2-M,8-W,9-Y修饰的寡核苷酸复合物可通过滴眼给药将ASO有效送达眼后段并分布于视网膜色素上皮细胞层(RPE),且在眼后段存留时间超过8h(如图7所示);各主要ASO分布层的荧光相对强度对比见(如图7所示)。

[0091] 实施例10制备Penetratin衍生物修饰的氟尿嘧啶与反义寡核苷酸药物双载药非共价复合物

[0092] 取5代氨基端的聚酰胺-胺树状大分子(PAMAM,缩写为PG5)甲醇溶液10μL(PAMAM浓度为0.1mg/μL),于40℃水浴中进行氮气吹干,后将PAMAM复溶于1mL蒸馏水中并用蒸馏水进行稀释,得到浓度为6.23μM的PG5溶液;取氟尿嘧啶(Fu)1mg溶于1mL蒸馏水中,40℃水浴5min后涡旋溶解,后将母液用蒸馏水稀释至所需浓度得到Fu溶液;将Fu溶液滴加入PG5溶液并搅拌一定时间,得到混合溶液。停止搅拌,将混合溶液移至截留分子量为3000Da的超滤离心管中,3000rpm/min的速度下离心去除游离Fu,得到Fu/PG5复合物溶液;

[0093] 取30μg拮抗TGFβ2的反义寡核苷酸(anti-TGFβ2-ASO)，加入3mL缓冲液，涡旋30s使其充分溶解，得到浓度为10μg/mL的ASO溶液；将100μL ASO溶液在涡旋条件下滴加至同体积Fu/PG5溶液中，滴加完毕后继续涡旋30s，室温静置下稳定30min，得到dual/PG5复合物。取稳定后的dual/PG5复合物200μL，在涡旋条件下逐滴加入100μL HA溶液(含HA20μg/mL)，滴加完毕后继续涡旋30s，室温静置下稳定30min，得dual/PG5/HA复合物；取300μL dual/PG5/HA溶液，在涡旋条件下逐滴加入100μL浓度为300μM的289-F penetratin衍生物(RFIKIWFFFRRMKWKK，缩写为Pene)溶液，滴加完毕后继续涡旋30s，室温静置下稳定30min，得到dual/PG5/HA/Pene复合物。

[0094] 实施例11 Penetratin衍生物修饰的氟尿嘧啶与反义寡核苷酸药物双载药非共价复合物的细胞摄取评价实验

[0095] 采用荧光标记的PAMAM制备dual/PG5、dual/PG5/HA及dual/PG5/HA/Pene复合物，以游离荧光素FAM作为阴性对照，在共聚焦显微镜下观察Penetratin衍生物修饰的双载药非共价复合物在L929细胞中的摄取情况，并用流式细胞仪定量检测3种复合物的摄取比例；

[0096] Penetratin衍生物289-F修饰的双载药非共价复合物的胞内平均荧光强度相对于其他实验组有显著性提高，统计结果显示，dual/PG5/HA/Pene相对于dual/PG5及dual/PG5/HA，在L929细胞中的摄取效率分别提高了近3倍及1倍(如图8所示)。

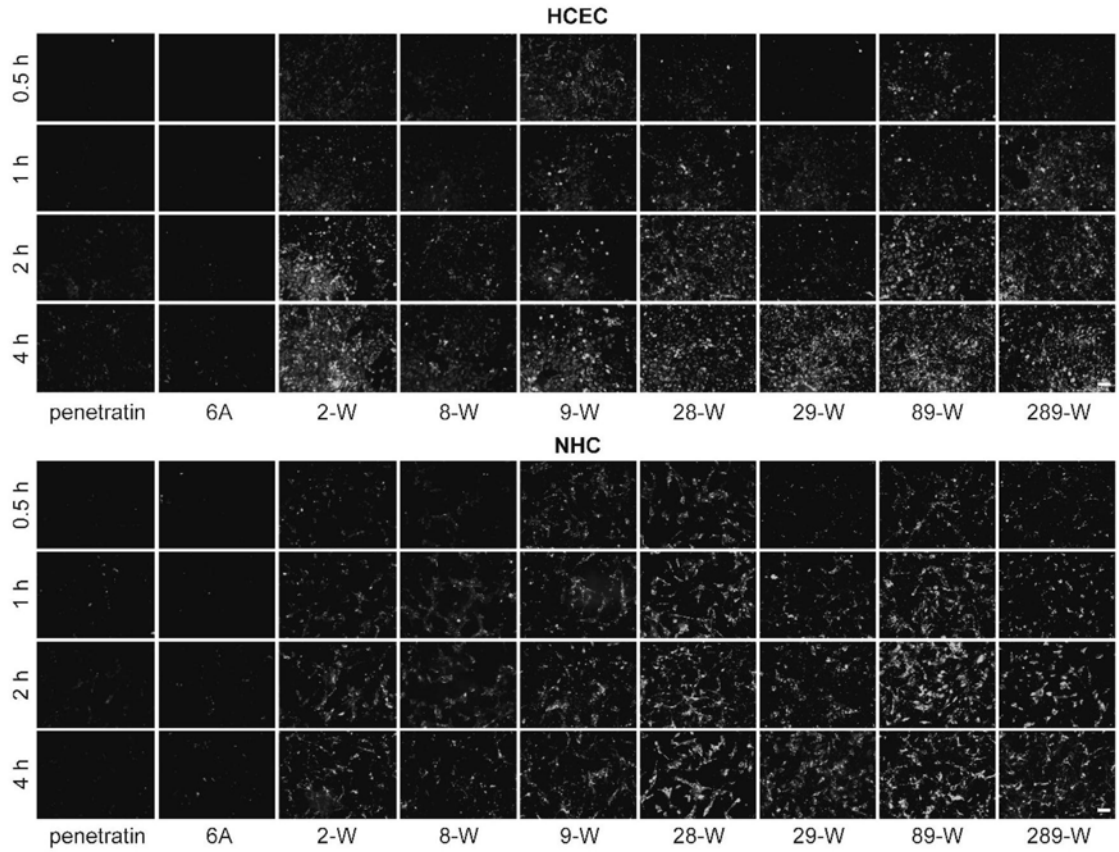

HCEC
0.5 h
1 h
2 h
4 h
penetratin
6A
2-W
8-W
9-W
28-W
29-W
89-W
289-W
NHC
0.5 h
1 h
2 h
4 h
penetratin
6A
2-W
8-W
9-W
28-W
29-W
89-W
289-W

图1

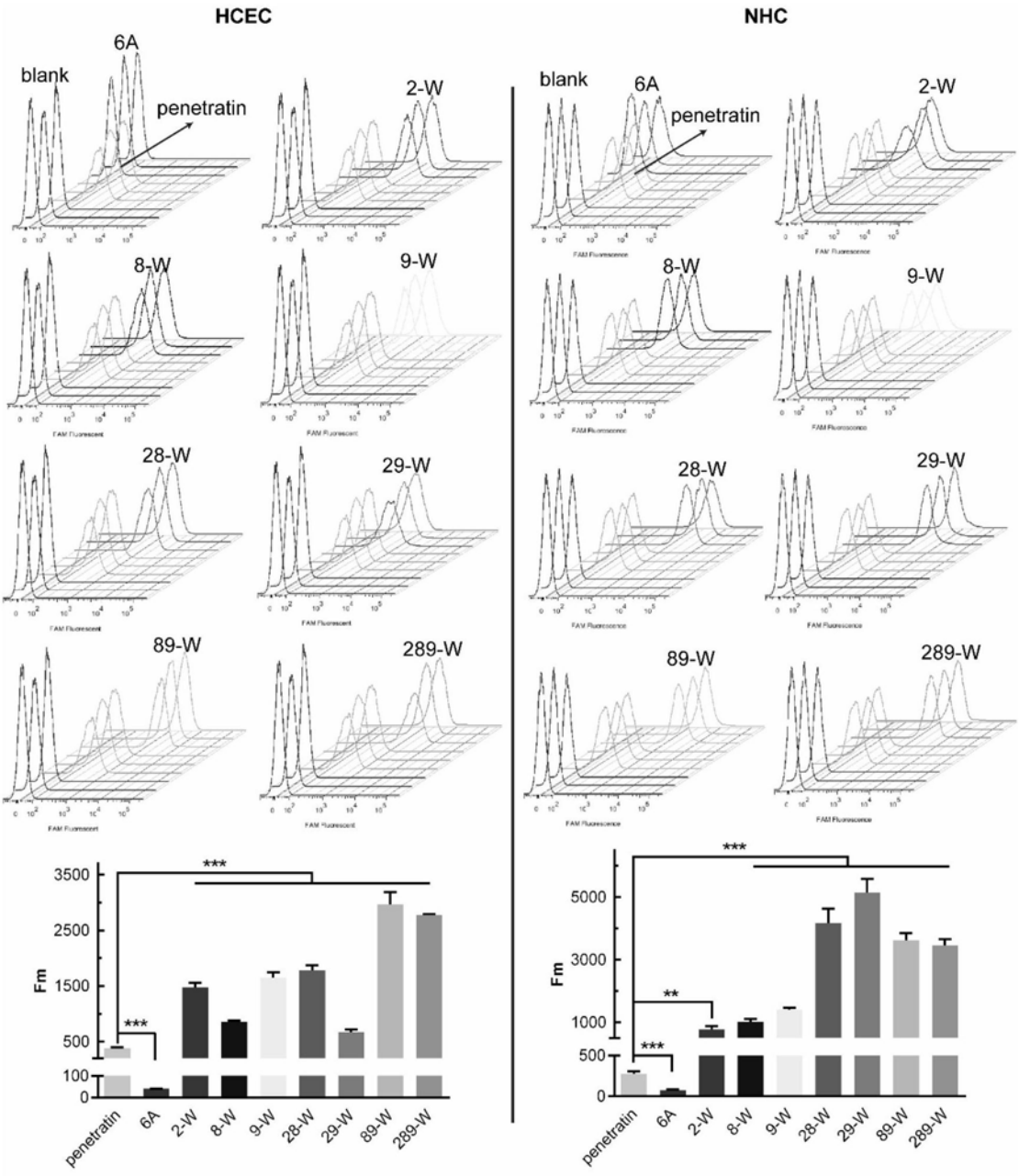

HCEC
NHC
blank
6A
penetratin
2-W
8-W
9-W
28-W
29-W
89-W
289-W
FAM Fluorescent
FAM Fluorescence
Fm
***
**
3500
2500
1500
500
100
0
5000
3000
1000
penetratin
6A
2-W
8-W
9-W
28-W
29-W
89-W
289-W

图2

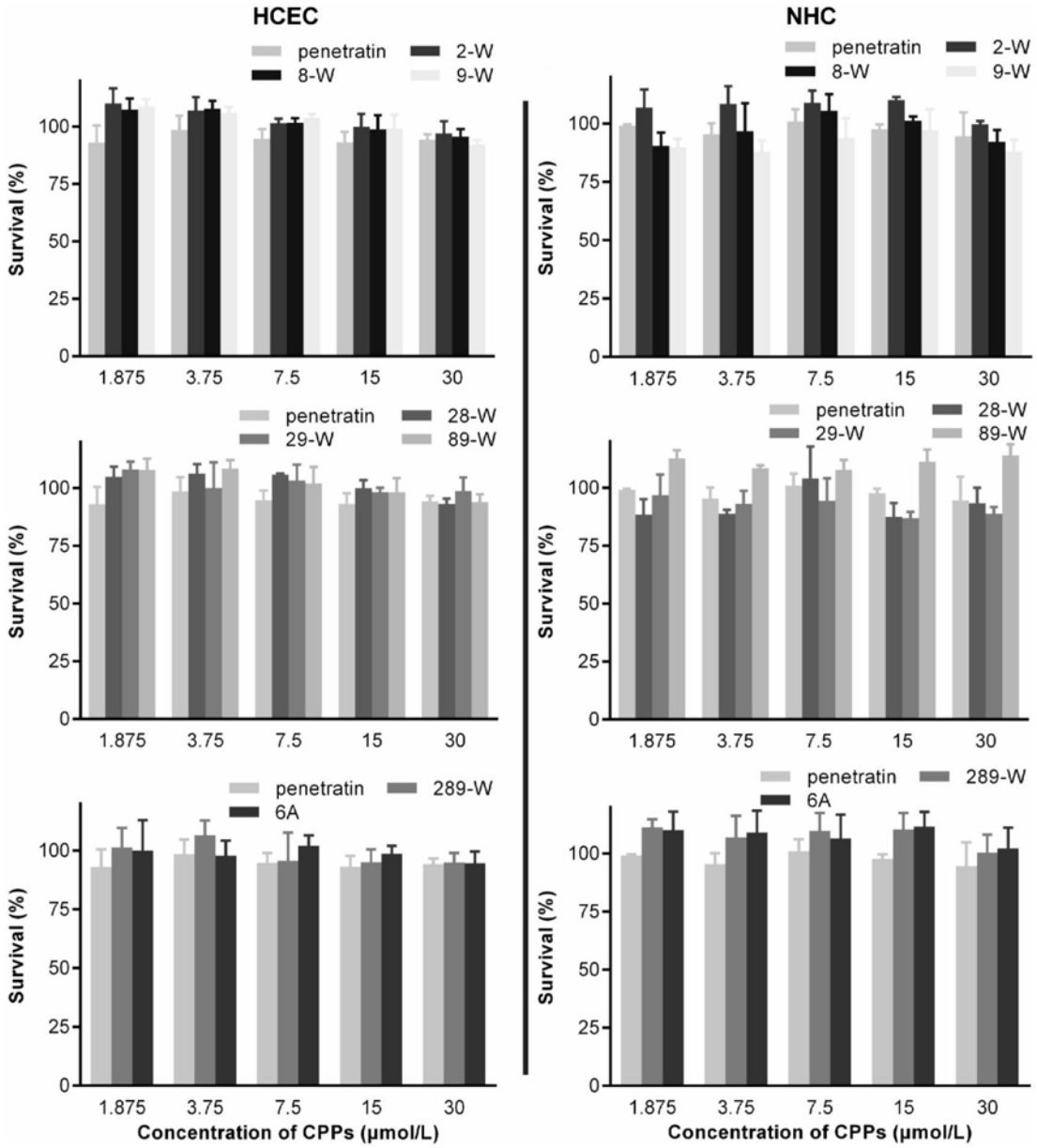

HCEC
NHC
penetratin
2-W
8-W
9-W
28-W
29-W
89-W
289-W
6A
Survival (%)
0
25
50
75
100
1.875
3.75
7.5
15
30
Concentration of CPPs (μmol/L)

图3

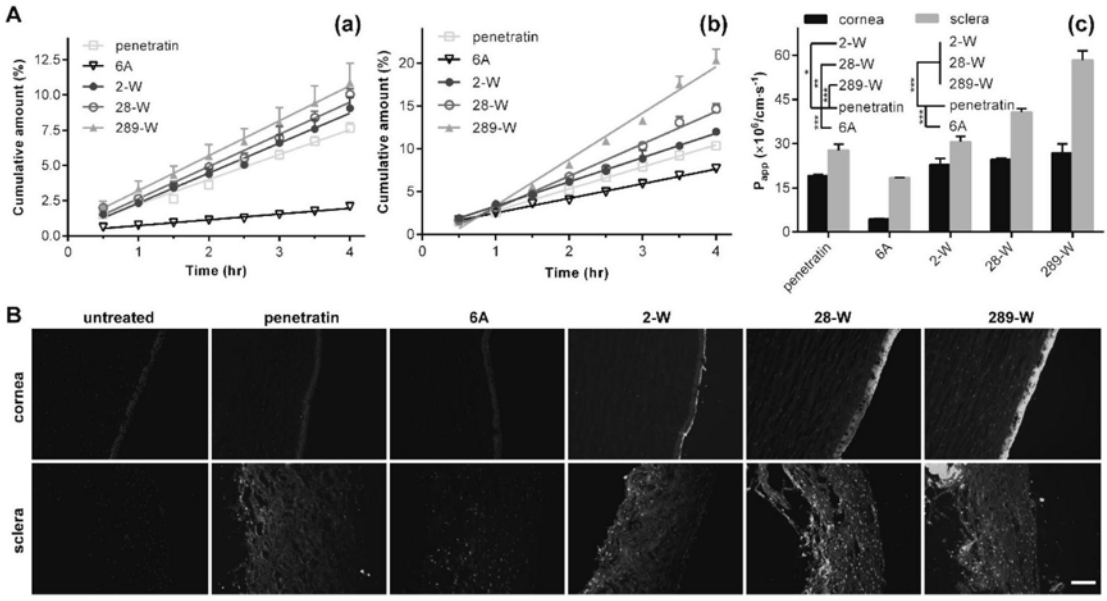

A
(a)
penetratin
6A
2-W
28-W
289-W
Cumulative amount (%)
Time (hr)
(b)
(c)
cornea
sclera
P_{app} ($\times 10^{-6}$/cm·s^{-1})
B
untreated
penetratin
6A
2-W
28-W
289-W
cornea
sclera

图4

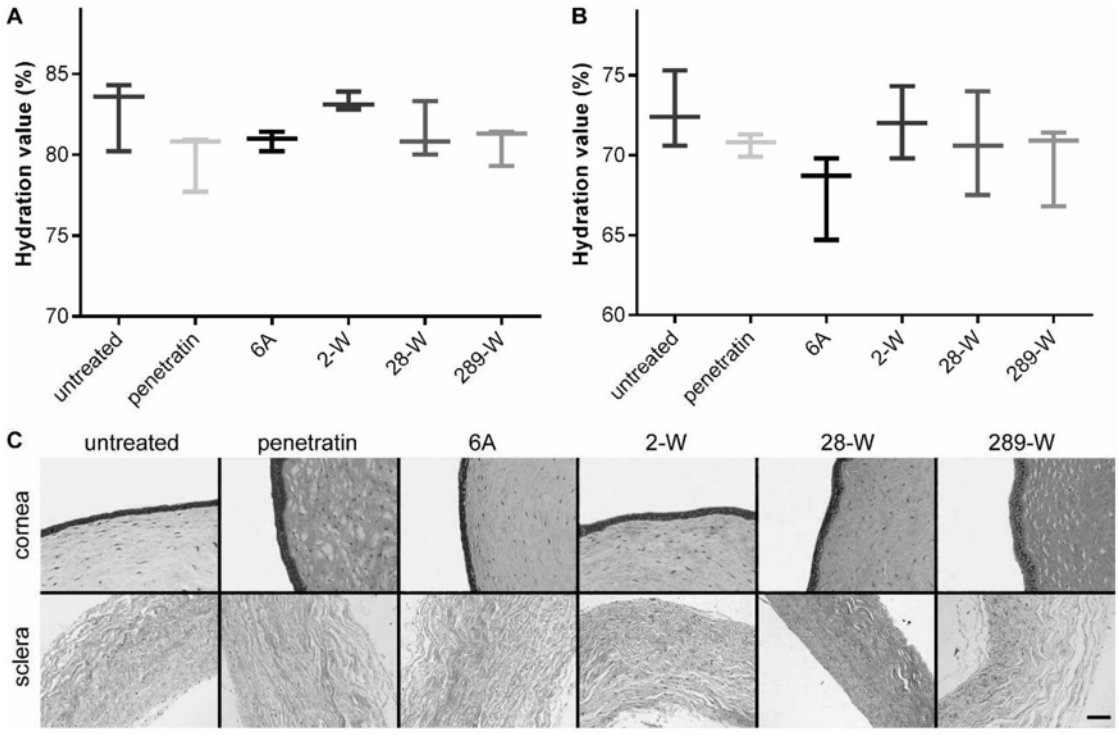

A
Hydration value (%)
B
Hydration value (%)
untreated
penetratin
6A
2-W
28-W
289-W
C
cornea
sclera

图5

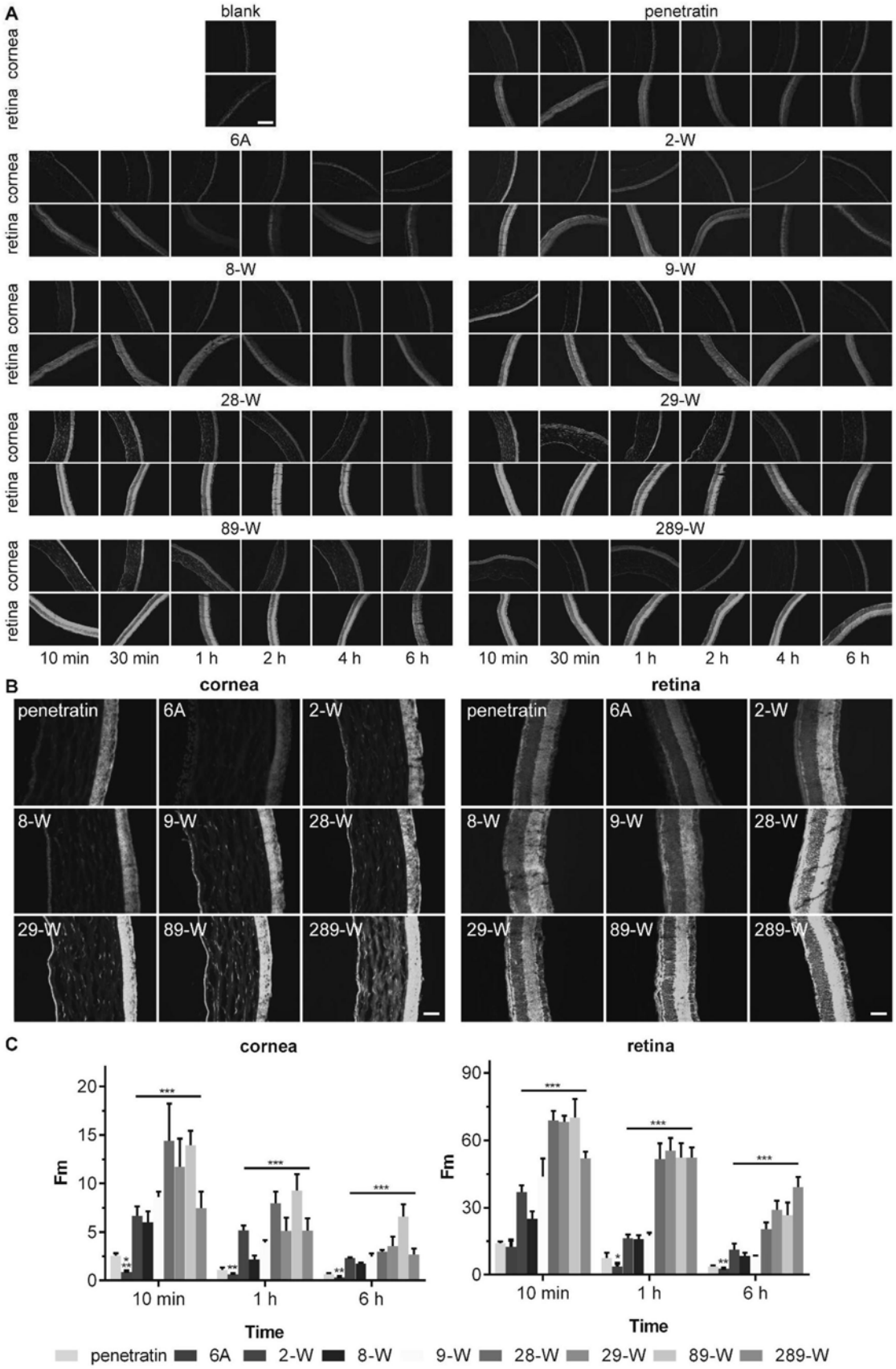

A
blank
penetratin
6A
2-W
8-W
9-W
28-W
29-W
89-W
289-W
cornea
retina
10 min
30 min
1 h
2 h
4 h
6 h
B
cornea
retina
penetratin
6A
2-W
8-W
9-W
28-W
29-W
89-W
289-W
C
cornea
retina
Fm
Time
10 min
1 h
6 h
penetratin
6A
2-W
8-W
9-W
28-W
29-W
89-W
289-W

图6

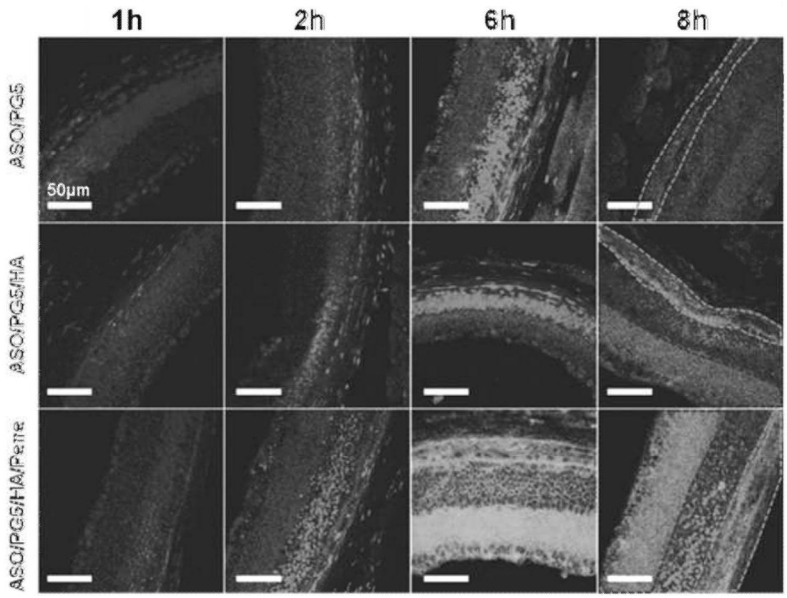

1h
2h
6h
8h
ASO/PG5
ASO/PG5/HA
ASO/PG5/HA/Pene
50μm

图7

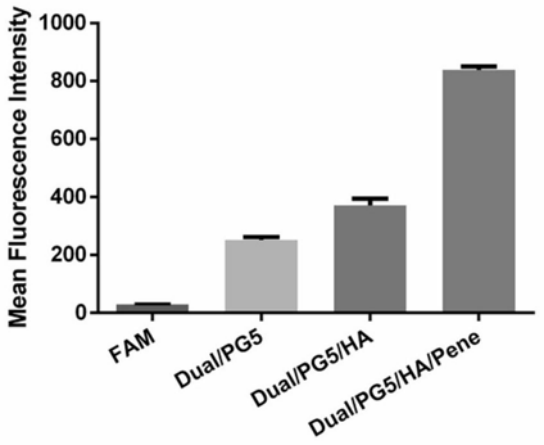

Mean Fluorescence Intensity
1000
800
600
400
200
0
FAM
Dual/PG5
Dual/PG5/HA
Dual/PG5/HA/Pene

图8