

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2016 年 3 月 24 日 (24.03.2016)



(10) 国际公布号
WO 2016/041250 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 47/46 (2006.01) A61K 49/04 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) A61K 31/337 (2006.01)
A61K 49/08 (2006.01) A61K 31/5383 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2014/092340

(22) 国际申请日: 2014 年 11 月 27 日 (27.11.2014)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201410484577.4 2014 年 9 月 20 日 (20.09.2014) CN

(71) 申请人: 中国药科大学 (CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省南京市江宁区龙眠大道 639 号, Jiangsu 211198 (CN)。

(72) 发明人: 张灿 (ZHANG, Can); 中国江苏省南京市江宁区龙眠大道 639 号, Jiangsu 211198 (CN)。薛敬伟 (XUE, Jingwei); 中国江苏省南京市江宁区龙眠大道 639 号, Jiangsu 211198 (CN)。赵泽恺 (ZHAO, Zekai); 中国江苏省南京市江宁区龙眠大道 639 号, Jiangsu 211198 (CN)。张蕾 (ZHANG, Lei); 中国江苏省南京市江宁区龙眠大道 639 号, Jiangsu 211198 (CN)。

(CN)。温雅静 (WEN, Yajing); 中国江苏省南京市江宁区龙眠大道 639 号, Jiangsu 211198 (CN)。

(74) 代理人: 南京天华专利代理有限责任公司等 (NANJING TIANHUA PATENT AGENT CO., LTD. et al.) 等; 中国江苏省南京市鼓楼区山西路 67 号世贸中心大厦 A1 座 23 层, Jiangsu 210009 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, 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)。

[见续页]

(54) Title: INFLAMMATION TARGETED NEUTROPHIL GRANULOCYTE DRUG DELIVERY SYSTEM AND USE THERE-OF

(54) 发明名称: 一种炎症靶向的中性粒细胞递药系统及其应用

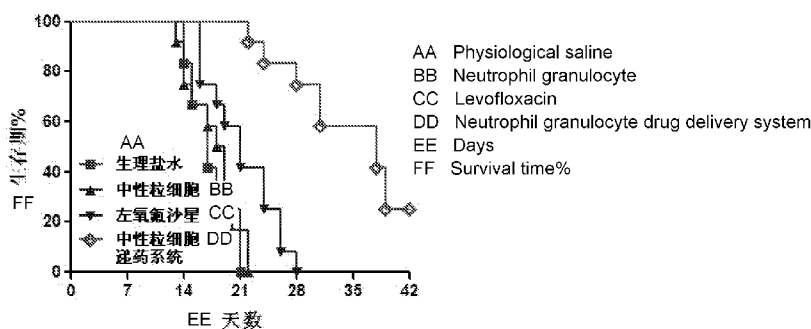


图 11 / Fig. 11

(57) Abstract: Disclosed is an inflammation targeted neutrophil granulocyte drug delivery system and use thereof, wherein the drug delivery system consists of neutrophil granulocytes and a therapeutic substance or a detectable substance loaded into the neutrophil granulocytes or to the surface of the neutrophil granulocytes in a direct or indirect way. Using neutrophil granulocytes as the carrier of the drug can actively target the drug to an inflammatory site, and increase the drug concentration at the inflammatory site. The neutrophil granulocytes arriving at the inflammatory site will be abnormally activated under the stimulation of cytokines, rapidly disintegrate and die in the way of "skynet". This helps to rapidly release the loaded drug to the targeted site, so as to improve the therapeutic effect and reduce the toxic and side-effects.

(57) 摘要: 一种炎症靶向的中性粒细胞递药系统及其应用, 所述的递药系统由中性粒细胞以及以直接或间接地方式载到中性粒细胞内或表面的治疗性物质或者检测性物质组成。将中性粒细胞作为药物的载体, 能够将药物主动靶向到炎症部位, 提高药物在炎症部位的浓度。到达炎症部位的中性粒细胞在细胞因子的刺激下, 异常激活, 快速解体以"天网"形式死亡, 有利于将所荷载的药物快速释放到靶部位, 提高治疗效果, 降低毒副作用。



WO 2016/041250 A1



本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

一种炎症靶向的中性粒细胞递药系统及其应用

技术领域

本发明属于药物制剂领域，涉及一种炎症靶向的中性粒细胞递药系统及其应用，具体涉及一种以中性粒细胞为载体的靶向炎症部位的递送系统。

背景技术

炎症指生物组织受到外伤、出血、或病原感染等刺激，激发的生理反应，其中包括红肿、发热、疼痛等症状。炎症反应是先天免疫系统为移除有害刺激或病原体及促进修复的一种重要防御机制，根据发病的原因分为感染性炎症、非特异性炎症及变态反应性炎症。感染性炎症是由病毒、细菌或细菌产物造成的炎症，通常用抗生素或抗真菌药物来治疗；非特异性炎症是用某种致炎因子于动物体内或体外引起炎症或其某个阶段的细胞组织反应，如缺血再灌注性损伤、术后损伤等，需要系统性治疗；变态反应性炎症是多型变态反应的终末表现如狼疮性皮炎，需要抗免疫治疗。

目前，针对炎症组织全身给药后，由于其独特的病理特征，使得药物的靶向效率较低，全身毒副作用较大。炎症的病理特征主要包括局部组织变质、渗出和增生。由于炎症血管具有较高的通透性，血管内富含蛋白质的液体和白细胞渗出，导致炎症局部组织间质压升高。可见，炎症部位血管的高渗透性为药物从血管溢出并滞留于炎症部位提供了可能，但是由于较高的炎症组织间质压阻碍了药物进入炎症部位。由于抗炎药物较低的靶向性，使得一些感染性炎症如细菌性肺炎，治疗不及时，从而产生耐药性导致较高的死亡率。而对于一些炎症相关疾病的治疗，如缺血再灌注性脑损伤、术后肿瘤复发等，由于原发灶在周围被非特异性炎症组织所包围，治疗药物靶向效率降低，药效下降，副作用增加。

如何以最小的剂量达到最佳的诊断和治疗效果一直以来都是困扰药剂工作者们的关键性问题，随着纳米技术领域的发展和人们对生物体的不断深入了解，靶向递送系统应运而生。靶向递送系统主要分为三大类：被动靶向、主动靶向以及物理化学靶向。与以往的传递系统相比，虽然这些新兴的靶向递送系统已经有了质的飞跃，但是仍然存在靶向性差，毒副作用强，诊断治疗效果难以达到人们预期等的缺点，因此，极其需要寻找一种更为高效、低毒的靶向递送系统。

免疫细胞，包括单核吞噬细胞（树状突细胞，单核细胞和巨噬细胞），中性粒细胞和淋巴

细胞。炎症过程中免疫细胞的渗出是炎症反应最为重要的特征，而中性粒细胞作为炎症发生时的“防御卫士”，被趋化因子吸引能够第一时间到达炎症部位。目前，仍未见中性粒细胞作为载体用于炎症部位药物、探针和显影剂递送研究的相同或相近报导。药物或纳米制剂荷载到中性粒细胞内存在一些有待解决的科学问题，如药物荷载的方式，细胞荷载药物、探针和显影剂的量，所荷载药物在细胞内稳定性以及细胞载体固有生理活性的维持等问题。

发明内容

为了克服上述现有技术的不足，本发明提供了靶向炎症组织的荷载药物的中性粒细胞递药系统。

本发明的另一目的是提供该递药系统的应用。

本发明的又一目的是提供一种治疗炎症的药物。

一种炎症靶向的中性粒细胞递药系统，所述的递药系统由中性粒细胞以及以直接或间接地方式载到中性粒细胞内或表面的治疗性物质或者检测性物质组成。

其中，所述的治疗性物质包括但不限于药物（化学合成药物、天然药物或天然药物提取物）、具有治疗作用的 DNA、RNA、蛋白质或多肽中的一种或多种；所述的检测性物质选自探针、显影剂中的一种或多种。

所述的间接地方式是指将纳米载体作为工具，将治疗性物质或者检测性物质先装载在纳米载体内，组成纳米制剂，再将纳米制剂荷载到中性粒细胞内或表面。

所述的纳米载体优选自正电性、负电性或近中性的粒径为 1-1000 nm 纳米制剂。

所述的纳米载体包括但不限于金纳米粒/棒、磁性纳米粒、介孔二氧化硅纳米粒、石墨烯、脂质体、胶束、纳米乳、纳米球、纳米囊、微球、微丸或树枝状聚合物。

所述的药物选自传出神经系统药物、中枢神经系统药、心血管系统药、激素及呼吸消化系统药、抗菌或抗病毒药物、抗肿瘤药物、维生素中的一种或多种。

所述的药物优选自解热镇痛类药物、非甾体抗炎药物、抗肿瘤类药物、抗生素类药物、利尿药、降压药、降脂药、降血糖药、激素类药物或维生素类药物中的一种或多种。

所述的药物进一步优选地西洋、苯妥英钠、氯丙嗪、氟西汀、美沙酮、甲氯芬酯、氯贝胆碱、硫酸阿托品、异丙肾上腺素、马来酸氯苯那敏、盐酸普鲁卡因、盐酸普萘洛尔、盐酸维拉帕米、盐酸胺碘酮、氯沙坦、硝酸甘油、多巴酚丁胺、辛伐他汀、氯吡格雷、哌唑嗪、西咪替丁、地芬尼多、西沙比利、联苯双酯、阿司匹林、吲哚美辛、盐酸氮芥、氟尿嘧啶、紫杉醇、

阿莫西林、四环素、氨基糖苷、罗红霉素、氯霉素、左氟沙星、异烟肼、磺胺嘧啶、氟康唑、盐酸金刚烷胺、磷酸氟喹、格列苯脲、氢氯噻嗪、前列腺素、胰岛素、雌二醇、维生素 A、维生素 C 中的一种或多种。

本发明所述的炎症靶向的中性粒细胞递药系统在制备治疗或诊断炎症和/或炎症相关疾病的药物或试剂中的应用。

其中，所述的炎症包括感染性炎症、非特异性炎症、变态反应性炎症以及炎症相关性疾病。

所述的感染性炎症包括病毒、细菌或细菌产物造成的炎症；所述的非特异性炎症包括即物理性炎症，包括手术或外伤引起的红肿、疼痛等；变态反应性炎症包括狼疮性皮炎、过敏性哮喘、风湿性关节炎；炎症相关性疾病包括肿瘤术后复发的治疗、动脉粥样硬化、缺血缺氧性脑病。

本发明将治疗性物质或者检测性物质先包覆在不同电性的纳米载体中（正电性、负电性、近中性，1-1000 nm），再将载药纳米载体（即纳米制剂）荷载到中性粒细胞内/表面；或者直接将治疗性物质或者检测性物质荷载到中性粒细胞内/表面，成功制备了以中性粒细胞为载体的递送系统。将所制备的中性粒细胞递药系统静脉注射到人体内，血液循环过程中，受到炎症区域释放的趋化因子的刺激，穿过炎症部位血管，沿着趋化因子浓度梯度，主动定位到炎症部位，提高了炎症部位药物浓度，保障了药效的发挥。研究表明，感染性炎症、非特异性炎症、变态反应性炎症以及炎症相关性疾病如肿瘤手术所引起的急性炎症都与中性粒细胞募集有关，因此利用中性粒细胞作为递药系统治疗炎症或炎症相关的疾病如肿瘤手术后利用急性炎症治疗肿瘤的复发，可以有效提高药物在靶部位的蓄积，提高药物的药效，降低其毒副作用。综上所述，荷载治疗性物质或者检测性物质的中性粒细胞，在炎症因子的引诱下，可以将治疗性物质或者检测性物质成功递送到炎症相关疾病部位，进行疾病的治疗和诊断，抑制疾病的发生和发展。

一种治疗炎症和/或炎症相关疾病的药物，包含本发明所述的炎症靶向的中性粒细胞递药系统。

所述的中性粒细胞递药系统中的治疗性物质可以为常规给药途径中对炎症和/或炎症相关疾病有治疗作用的药物，包括但不限于神经系统类药物、心脑血管类药、血液、呼吸、消化系统药、内分泌系统以及免疫调节药物如免疫增强药干扰素、免疫抑制剂环孢素等。

一种诊断炎症和/或炎症相关疾病的试剂，包含本发明所述的炎症靶向的中性粒细胞递药系统。

所述的中性粒细胞递药系统中的诊断性物质包括但不限于探针如 DNA 探针、荧光探针，造影剂如 X 线观察常用的碘制剂、硫酸钡以及核磁成像造影剂如钆喷酸葡胺等。

本发明中所涉及的某些概念定义如下：

纳米载体：即纳米级药物载体，是一种属于纳米级微观范畴的亚微粒药物载体输送系统。将药物包封于亚微粒（即纳米载体）中，可以调节释药的速度，增加生物膜的透过性、改变在体内的分布、提高生物利用度等。

本发明所述的纳米制剂可按照现有技术中报道过的任何一种方法制备。

脂质体制备：

（1）药物分散于有机相的脂质体制备方法

适合制备脂溶性药物的脂质体，具体说来这一类方法包括薄膜分散法、注入法、前体脂质体法、超声分散法等方法。

（2）药物分散于水相的脂质体制备方法

适合制备水溶性药物的脂质体，但要求药物有比较好的稳定性，具体说来这一类方法包括反相蒸发法、复乳法、熔融法、冻融法、冷冻干燥法、表面活性剂处理法、钙融合法、离心法等方法。

炎症：具有血管系统的活体组织对损伤因子所发生的防御反应为炎症。

有益效果：

中性粒细胞是数量最多的白细胞，占白细胞的 50%~70%，容易从患者体内获得，这为药物递送提供了丰富的后备军。

本发明以中性粒细胞为递药载体，首先，中性粒细胞保护所载药物、探针或显影剂等免受网状内皮系统清除，延长半衰期，有效控制释放，降低免疫原性和毒副作用。其次，中性粒细胞作为载体可以穿过疏水屏障顺利到达发病区域，提高靶部位的浓度。第三，由于中性粒细胞具有趋化性质，能够靶向到损伤、炎症和肿瘤部位释药。因此，中性粒细胞作为低毒的转运体，可以起到靶向递送、延长循环时间，降低细胞和组织的毒性的作用。

所以，鉴于中性粒细胞作为递药系统具有上述优点，将中性粒细胞作为药物的载体，能够

将药物主动靶向到炎症部位，提高药物在炎症部位的浓度。到达炎症部位的中性粒细胞在细胞因子的刺激下，异常激活，快速解体以“天网”形式死亡，有利于将所荷载的药物快速释放到靶部位，提高治疗效果，降低毒副作用。

与现有技术相比，本发明具有的优点如下：

1. 本发明成功制备的中性粒细胞递药系统，顺趋化因子浓度梯度到达炎症组织，成功解决了药物、探针或显影剂等的靶向性问题。
2. 本发明所制备的中性粒细胞递药系统，通过纳米载体的介导，保证了中性粒细胞较高的载药量，并且避免了药物对中性粒细胞生理活性的影响。
3. 本发明所制备的中性粒细胞递送系统，由于中性粒细胞是机体的一种天然免疫细胞，吞噬能力强，因此细胞所载药物、探针或显影剂的量很高。
4. 本发明所使用的药物载体中性粒细胞，是人体内数量最多的免疫细胞，容易从患者体内获得，并且中性粒细胞在炎症部位异常激活后，会以独特的死亡方式裂解，能够将所荷载的药物快速、彻底的释放到炎症组织，这使得本发明具备较高的临床开发应用价值。

附图说明

图 1 瑞氏-吉姆萨对 65%/78% Percoll 分离层形态学鉴定。

图 2 不同表面电位载药脂质体的释放。

图 3 中性粒细胞对不同电性脂质体的摄取量。

图 4 三种电性紫杉醇脂质体在体外模拟不同生理病理条件下在中性粒细胞中的滞留。

图 5 术后脑胶质瘤模型小鼠给药后炎症部位荷载负电性、近中性、正电性纳米制剂的中性粒细胞递药系统相对于市售制剂的相对摄取率。

图 6 小鼠给药后市售制剂与荷载负电性、近中性、正电性纳米制剂的中性粒细胞递药系统靶向效率。

图 7 脑胶质瘤术后模型小鼠给药生理盐水、空白中性粒细胞、市售制剂泰素、荷载负电性、近中性、正电性纳米制剂的中性粒细胞递药系统生存期曲线。

图 8 三种电性左氧氟沙星脂质体在体外模拟不同生理条件下在中性粒细胞中的滞留

图 9 肺炎链球菌肺炎模型小鼠给药后炎症部位中性粒细胞递药系统相对于市售制剂的相对摄取率。

图 10 小鼠给药后市售制剂与中性粒细胞递药系统靶向效率。

图 11 肺炎链球菌肺炎模型小鼠给药生理盐水、空白中性粒细胞、市售制剂左氧氟沙星、载药中性粒细胞递药系统生存期曲线。

图 12 三种电性布洛芬脂质体在体外模拟不同生理条件下在中性粒细胞中的滞留

图 13 耳肿胀模型小鼠给药后炎症部位中性粒细胞递药系统相对于市售制剂的相对摄取率。

图 14 小鼠给药后市售制剂与中性粒细胞递药系统靶向效率。

图 15 耳肿胀模型小鼠小鼠给药生理盐水、空白中性粒细胞、市售制剂布洛芬、载药中性粒细胞递药系统耳肿胀程度。

图 16 三种电性布洛芬脂质体在体外模拟不同生理条件下在中性粒细胞中的滞留

图 17 佐剂性关节炎模型小鼠给药后炎症部位中性粒细胞递药系统相对于市售制剂的相对摄取率。

图 18 小鼠给药后市售制剂与中性粒细胞递药系统靶向效率。

图 19 佐剂性关节炎模型小鼠给药生理盐水、空白中性粒细胞、市售制剂布洛芬、载药中性粒细胞递药系统关节炎指数评分。

具体实施方式

以下结合各实施例对本发明的技术方案做进一步说明，实施例仅是举例说明本发明的技术方案及其效果，并不应作为对本发明保护范围的限制。

实施例 1 荷载不同表面电位紫杉醇脂质体中性粒细胞递药系统对术后脑胶质瘤小鼠模型的靶向性及药效学评价

一、骨髓中性粒细胞的分离和纯化

将 Percoll 母液与 $10\times$ PBS 按 9:1(v/v) 制备成 100%Percoll，以 $1\times$ PBS 稀释制备成 55%、65%、68% (v/v) Percoll 分离液。按照分离液密度先重后轻的顺序，缓慢均匀叠加制备 55%、65% 的两层 Percoll 分离液，将新鲜提取的小鼠胫骨骨髓细胞用 $1\times$ PBS 稀释制备成单细胞悬液，1:1 (v/v) 缓慢均匀加在之前制备 55%、65%Percoll 分离液顶部，1000g 离心 30min。提取 55%、65% 分离液夹层的骨髓细胞，加入一倍体积 $1\times$ PBS 洗涤并重悬，再缓慢叠加到 68% 的 Percoll 分离液上 1000g 离心 30min，提取 68% 分离液层的骨髓细胞，加入一倍体积 $1\times$ PBS 洗涤，重复两次，RPMI1640 培养基重悬制备小鼠骨髓中性粒细胞悬液，备用。

用红色荧光标记的细胞表面蛋白 Gr-1 抗体（北京达科为生物科技有限公司）对提取细胞进行染色；37℃、5% CO₂ 孵育 30min，流式细胞仪检验所提取细胞纯度。用台盼蓝对提取细胞进行活力检测细胞活力为 98%左右；用瑞氏-吉姆萨染色液对提取细胞进行形态学纯度鉴定，结果如图 1 所示，分离得到的中性粒细胞细胞核大多呈成熟杆状或分叶状；用红色荧光标记的细胞表面蛋白 Gr-1 抗体对提取细胞进行染色，结果发现所提取中性粒细胞纯度高于 90%。

二、紫杉醇-脂质体-中性粒细胞（PTX-Liposome-NEs）递药系统的制备

1. 荷载紫杉醇的不同电性脂质体的制备

利用薄膜分散法制备荷载紫杉醇的三种不同电性的脂质体，制备步骤具体为：

精密称取处方量的下列各物质

1) 正电性脂质体：大豆磷脂 90mg+阳离子脂质 10mg+胆固醇 10 mg+紫杉醇 5mg；

2) 近中性脂质体：中性脂质 100 mg+胆固醇 10 mg+紫杉醇 5mg；

3) 负电性脂质体：大豆磷脂 100 mg+胆固醇 10 mg+紫杉醇 5mg；

将处方量各物质溶于氯仿/甲醇（2:1，v:v）混合溶剂中，混匀后，40℃水浴抽真空旋干成膜，并在真空干燥器中放置过夜以完全除去有机溶剂后，用超纯水 37℃下水化脂膜，得到的脂质混悬液用超声波细胞粉碎机冰浴分散，分别过 0.45 μm 和 0.22 μm 微孔滤膜，制得三种不同电性的荷载紫杉醇的脂质体（PTX-Liposome）。

使用 HPLC 法测定 PTX-Liposome 的载药量和包封率，使用激光粒径分析仪测定粒径和电位，如表 1 所示。

表 1

制剂	电位 (mV)	粒径 (nm)	载药量 (%)	包封率 (%)
正电性脂质体	30.67±2.83	100.9±0.5	3	75
近中性脂质体	-5.42±0.74	110.2±2.3	3.5	85
负电性脂质体	-20.48±1.15	104.3±0.9	4	90

采用透析法测定体外释放，结果见图 2。结果表明，所得脂质体在测定时间范围内释放缓慢，24h 累计释放量不足 20%，具有一定的缓释特性。

2. 紫杉醇-脂质体-中性粒细胞递药系统（PTX-Liposome-NEs）的制备

取新鲜制备的中性粒细胞悬液以 1×10^6 个/孔、500 μL 接种于 24 孔板中，不含血清 RPMI640 培养液 37℃、5%CO₂ 稳定培养 1h，移去培养液，将三种不同电性的紫杉醇脂质体用不含血清 RPMI640 培养液稀释成 PTX 100 μg/ml 加入上述 24 孔板，于 37℃孵育 50min 后，

弃去含制剂的培养液，用 4℃PBS 洗三次，即得不同表面电位的紫杉醇脂质体-中性细胞递药系统。

使用 HPLC 测定中性粒细胞对不同电性脂质体的摄取量，结果见图 3。结果表明，中性粒细胞对正电性脂质体的摄取量明显高于近中性和负电性的脂质体，为制备载药量较高的递药系统提供了保证。

体外利用 Ph7.4 RPMI1640 培养基、10nM 趋化三肽以及 100nM 佛波醇分别模拟正常生理条件、趋化过程以及炎症部位三种生理病理环境，使用 HPLC 测定了 4h 三种电性紫杉醇脂质体在不同生理病理条件下在中性粒细胞中的滞留，结果见图 4。结果表明，细胞递药系统在趋化过程中药物累计释放量仅占总摄取量的 5%，释放缓慢，而到达靶部位，中性粒细胞异常激活情况下，药物累计释放量占总摄取量的 85%，保证了大部分药物能够到达靶部位并发挥疗效。

三、术后脑胶质瘤模型小鼠建立

将 KM 小鼠用水合氯醛腹腔注射麻醉后固定于立体定向头架，将小鼠脑胶质瘤细胞 G422 以微量注射器注射于小鼠右侧尾状核(手术暴露颅骨标志，以牙钻于前凶右旁开 4mm，前 1mm，孔径 1.2mm，硬膜下进针深 5mm)。缝合，消毒后放回笼内。

四、紫杉醇-脂质体-中性粒细胞递药系统 (PTX-Liposome-NEs) 的术后脑胶质瘤模型小鼠的相对摄取率和靶向效率。

1. 给药方案

术后脑胶质瘤模型小鼠 144 只，随机分为 4 组，每组 36 只，给药前禁食不禁水过夜，4 组荷瘤小鼠尾分别静脉注射紫杉醇市售制剂泰素 (Taxol) 和荷载不同表面电位载药脂质体的中性粒细胞递药系统，PTX 剂量均为 5 mg/kg，分别于给药后 0.167 h、0.5 h、1 h、2 h、4 h、8 h、12h、24h、48h、72h、96h 和 120h 时间点，每组取 3 只荷瘤小鼠，摘眼球取血后，处死小鼠，取心、肝、脾、肾、脑 5 个组织，用生理盐水洗净，并用滤纸吸干残留生理盐水后称重。各组织按下述方法处理，用 HPLC 方法测各时间点的各组织样品中所含 PTX 浓度。

2. 样品处理

取荷瘤小鼠各组织样品 (心、肝、脾、肺、肾、脑)，称重，置于采血管中，加入 2 mL 的生理盐水，经组织匀浆器高速分散成组织匀浆液。取 200 μ L 各组织匀浆液加入 200 μ L 乙腈，涡旋 5 min 后，10000 $\times$ g 离心 10 min，取上清液，HPLC 进样，根据线性方程计算组织样品中 PTX 的含量。

3. HPLC 方法

色谱柱: Inertsil®ODS-SP column (250 mm × 4.6 mm × 5 μm, GL Sciences Inc., Japan)

流动相: 甲醇:水=80:20 (v:v)

检测波长: 227 nm

柱温: 35 °C

流速: 1.0 mL/min

进样量: 20 μL

组织匀浆的物质不干扰 PTX 的分离测定, PTX 的保留时间约为 8.1 min。

5. 小鼠体内分布结果

表 2 泰素 (Taxol) 在各脏器中分布

脏器 时间 (h)	心 (μg/g)	肝 (μg/g)	脾 (μg/g)	肾 (μg/g)	脑 (μg/g)
0.5	8.26	3.71	8.85	5.62	0.37
1	7.69	2.08	7.23	4.85	0.11
2	7.37	1.95	6.33	3.36	---
4	6.45	1.04	5.81	2.65	---
8	5.57	0.85	4.37	2.08	---
12	3.11	---	2.64	---	---

表 3 荷载正电性纳米制剂中性粒细胞递药系统在各脏器的分布

脏器 时间 (h)	心 (μg/g)	肝 (μg/g)	脾 (μg/g)	肾 (μg/g)	脑 (μg/g)
12	---	3.16	7.15	0.61	8.83
24	---	2.41	6.84	0.45	7.25
48	---	1.52	5.01	0.32	6.81
72	---	0.97	3.4	0.17	5.74
96	---	0.55	1.26	---	3.28
120	---	0.21	0.75	---	1.23

表 4 荷载近中性纳米制剂中性粒细胞递药系统在各脏器的分布

脏器 时间 (h)	心 (μ g/g)	肝 (μ g/g)	脾 (μ g/g)	肾 (μ g/g)	脑 (μ g/g)
12	---	3.00	6.79	0.58	8.39
24	---	2.29	6.50	0.43	6.89
48	---	1.44	4.76	0.30	6.47
72	---	0.92	3.23	0.16	5.45
96	---	0.52	1.20	---	3.12
120	---	0.20	0.71	---	1.17

表 5 荷载负电性纳米制剂中性粒细胞递药系统在各脏器的分布

脏器 时间 (h)	心 (μ g/g)	肝 (μ g/g)	脾 (μ g/g)	肾 (μ g/g)	脑 (μ g/g)
12	---	2.78	6.29	0.54	7.77
24	---	2.12	6.02	0.40	6.38
48	---	1.34	4.41	0.28	5.99
72	---	0.85	2.99	0.15	5.05
96	---	0.48	1.11	---	2.89
120	---	0.18	0.66	---	1.08

HPLC 结果显示：市售制剂泰素在肝脏分布最多，其次为心、脾脏、肾脏，在脑中分布极少；与泰素相比，中性粒细胞递药系统组分布最多的器官为脑和脾脏，其次为肝脏和肾等器官，在其他器官分布较少；荷载不同电位纳米制剂中性粒细胞递药系统各组比较，各脏器中分布没有显著性差异。

5. 靶向性评价

应用 Kinetic 4.0 药代动力学程序统计方法计算静脉注射泰素和荷载不同表面电位载药脂质体的中性粒细胞递药系统后组织中 $AUC_{0-\infty}$ 、 AUC_{0-120h} 等参数，计算相对摄取率(relative ratio, Re)、靶向效率 (brain targeting efficiency, Te)。

相对摄取率 (relative ratio, Re) 是指荷载不同表面电位载药脂质体的中性粒细胞递药

系统与泰素在脑中 AUC 的比值, 相对摄取率越大, 表明该制剂相对于泰素在脑组织的靶向性越强。靶向效率 (brain targeting efficiency, T_e) 是指同一种制剂在脑中的 AUC 与其他组织中 AUC 的比值, T_e 大于 1 表示该制剂对于脑的选择性大于相比较的其他组织, T_e 越大, 则表明相对于被比较的其他组织, 该制剂对脑的选择性越强。

荷载不同表面电位载药脂质体的中性粒细胞递药系统与泰素相比的脑 $Re_{(0-t)}$ 和 $Re_{(0-Int)}$ 如图 5 所示, 并且其 T_e 均大于 1 (图 6), 说明中性粒细胞递药系统具有很好的脑靶向性, 能够快速穿过血脑屏障 (Brain-Blood-Barrier, BBB), 将药物有效传递到脑组织。

五、载药中性粒细胞递药系统对术后脑胶质瘤模型小鼠药效学评价

术后脑胶质瘤模型小鼠 60 只, 随机分成 5 组, 每组 12 只, 分别为术后生理盐水组、市售制剂泰素组、荷载不同表面电位载药脂质体的中性粒细胞递药系统组。其中泰素组的给药剂量为 5 mg PTX/kg, 荷载不同表面电位载药脂质体的中性粒细胞递药系统组每只静脉注射约 5×10^6 个 NES/只, 给药剂量约 5 mg PTX/kg。所有动物分别在术后 1、2、3、4、6、8、10 给药, 共给药 7 次。以原位接种小鼠脑胶质瘤 G422 记为第 0 天, 记录个组小鼠的生存时间, 绘制生存期曲线, 结果见图 7。由图 7 可见, 荷载不同表面电位载药脂质体的中性粒细胞递药系统组能够显著延长术后脑胶质瘤模型小鼠的生存时间。证明本发明所制备的中性粒细胞递药系统有效的抑制炎症相关性疾病的发生及发展。

实施例 2 荷载左氧氟沙星阳离子脂质体中性粒细胞递药系统对肺炎链球菌小鼠模型的靶向性及药效学评价

一、载药中性粒细胞递药系统的制备及表征

中性粒细胞的提取与纯化同实施例 1, 取 10mg 左氧氟沙星, 制备荷载左氧氟沙星阳离子脂质体, 方法同实施例 1。

使用 HPLC 法测定载药量和包封率, 使用激光粒径分析仪测定粒径和电位, 如表 6 所示。

表 6

制剂	电位 (mV)	粒径 (nm)	载药量 (%)	包封率 (%)
左氧氟沙星阳离子脂质体	25.23±0.57	112.5±0.7	3.2	92

使用 HPLC 测定三种电性左氧氟沙星脂质体在体外模拟不同生理条件下在中性粒细胞中的滞留, 结果见图 8 由图可见, 在模拟正常血液循环以及炎症因子趋化过程中, 药物的释放量仅占总摄取量的 7%, 但在炎症部位, 在中性粒细胞异常激活情况下, 药物释放量占总摄取量的

90%，证明在炎症部位药物可以快速而彻底的从细胞中释放出来。

二、炎症动物模型建立

肺炎链球菌肺炎小鼠模型：取体重 18~22g 清洁级雄性小鼠，以 10%水合氯醛 0.3ml/100g (300mg/kg) 腹腔注射麻醉，从鼻腔滴入 40 μ L 制备好的 10^6 CFU/mL 肺炎链球菌悬液。

三、中性粒细胞递药系统炎症模型小鼠靶向性研究

1. 给药方案

取炎症小鼠 72 只，随机分为 2 组，每组 36 只，给药前禁食不禁水过夜，2 组荷瘤小鼠尾分别静脉注射市售左氧氟沙星以及左氧氟沙星阳离子脂质体中性粒细胞递药系统，剂量均为左氧氟沙星 10 mg/kg，分别于给药后 0.167 h、0.5 h、1 h、2 h、4 h、8 h、12h、24h、48h、72h、96h 和 120h 时间点，处死小鼠，取心、肝、脾、肾、肺 5 个组织，用生理盐水洗净，并用滤纸吸干残留生理盐水后称重。各组织按下述方法处理，用 HPLC 方法测各时间点的各组织样品中所含左氧氟沙星浓度。

2. 样品处理

炎症小鼠各组织样品（心、肝、脾、肾、肺），称重，置于采血管中，加入 2 mL 的生理盐水，经组织匀浆器高速分散成组织匀浆液。取 200 μ L 各组织匀浆液加入 200 μ L 乙腈，涡旋 5 min 后，10000 $\times$ g 离心 10 min，取上清液，HPLC 进样，根据线性方程计算组织样品中左氧氟沙星的含量。

3. HPLC 方法

色谱柱：Inertsil®ODS-SP column (250 mm $\times$ 4.6 mm $\times$ 5 μ m, GL Sciences Inc., Japan)

流动相：甲醇:水=80:20 (v:v) 以 0.01mol/L 磷酸二氢钾溶液 (pH3.0)：乙腈=45: 55(v:v)

甲醇:乙腈:(0.01mol/L) 磷酸二氢钾:(0.5mol/L) 溴化四丁基铵=(10:10:80:4) 磷酸调 pH3.5

检测波长：294nm

柱温：室温

流速：1.0 mL/min

进样量：20 μ L

组织匀浆的物质不干扰左氧氟沙星的分离测定，左氧氟沙星的保留时间约为 5.6min。

6. 小鼠体内分布结果

表 7 左氧氟沙星在各脏器中分布

脏器 时间 (h)	心 ($\mu\text{g/g}$)	肝 ($\mu\text{g/g}$)	脾 ($\mu\text{g/g}$)	肾 ($\mu\text{g/g}$)	肺 ($\mu\text{g/g}$)
0.5	8.35	11.41	6.05	1.58	0.46
1	4.70	9.22	3.85	3.32	0.23
2	2.16	7.58	1.92	2.40	0.15
4	1.32	6.50	0.99	1.99	---
8	0.90	4.79	0.20	0.55	---
12	0.59	1.69	---	0.24	---

表 8 左氧氟沙星阳离子脂质体中性粒细胞递药系统在各脏器的分布

脏器 时间 (h)	心 ($\mu\text{g/g}$)	肝 ($\mu\text{g/g}$)	脾 ($\mu\text{g/g}$)	肾 ($\mu\text{g/g}$)	肺 ($\mu\text{g/g}$)
12	---	2.29	7.55	0.48	7.65
24	---	2.34	3.63	0.41	8.87
48	---	2.67	2.37	0.37	5.21
72	---	1.20	0.56	0.31	2.44
96	---	0.42	0.37	0.29	0.71
120	---	1.69	0.11	0.11	0.31

由表 7~8 可知,市售左氧氟沙星注射剂在炎症模型小鼠体内情况,肝脏分布最多,其次为心、脾脏、肾脏,炎症部位分布较少;与市售左氧氟沙星注射剂相比,中性粒细胞递药系统分布最多的器官为肺和脾脏,其次为肝器官,在其他器官分布较少。

5. 靶向性评价

应用 Kinetic 4.0 药代动力学程序统计方法计算静脉注射市售注射液左氧氟沙星、中性粒细胞递药系统后组织中 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 、 $\text{AUC}_{0-120\text{h}}$ 等参数,计算相对摄取率 (relative ratio, Re)、靶向效率 (brain targeting efficiency, Te)。

相对摄取率 (relative ratio, Re) 是指中性粒细胞递药系统与市售制剂左氧氟沙星在肺中 AUC 的比值,相对摄取率越大,表明该制剂相对于市售制剂在炎症组织的靶向性越强。靶向

效率 (brain targeting efficiency, T_e) 是指同一种制剂在肺中的 AUC 与其他组织中 AUC 的比值, T_e 大于 1 表示该制剂对于肺的选择性大于相比较的其他组织, T_e 越大, 则表明相对于被比较的其他组织, 该制剂对细菌感染性肺组织的选择性越强。

中性粒细胞递药系统与市售制剂左氧氟沙星相比的炎症部位 $Re_{(0-t)}$ 和 $Re_{(0-Int)}$ 如图 9 所示, 并且其 T_e 均大于 1 (图 10), 说明中性粒细胞递药系统具有很好的炎症靶向性, 能够快速穿过炎症血管, 将药物有效传递到炎症组织。

四、中性粒细胞递药系统对肺炎链球菌肺炎小鼠模型药效学评价

炎症模型小鼠 48 只, 随机分成 4 组, 每组 12 只, 分别为术后生理盐水组、单纯中性粒细胞组、市售制剂组、中性粒细胞递药系统组, 其中市售制剂组的给药剂量为 10 mg/kg, 中性粒细胞递药系统组每只静脉注射约 5×10^6 个 NES/只, 给药剂量约 10 mg/kg。所有动物分别在术后 1、2、3、4、6、8、10 给药, 共给药 7 次。同时设给予相同细胞密度, 相同生理盐水体积分组作为空白对照。结果如图 11 所示。市售制剂左氧氟沙星对模型小鼠的生存期与生理盐水相仿, 都在 21 天左右, 而中性粒细胞递药系统有效延长了小鼠的生存期在 42 天, 仍有小鼠存活。证明本发明所制备的中性粒细胞递药系统有效的抑制感染性炎症的发生及发展。

实施 3 荷载布洛芬阳离子脂质体中性粒细胞递药系统对耳肿胀小鼠模型的靶向性及药效学评价

一、载药中性粒细胞递药系统的制备及表征

中性粒细胞的提取与纯化同实施例 1, 取 5mg 布洛芬, 制备荷载布洛芬阳离子脂质体同实施例 1。

使用 HPLC 法测定载药量和包封率, 使用激光粒径分析仪测定粒径和电位, 如表 9 所示。

表 9

制剂	电位 (mV)	粒径 (nm)	载药量 (%)	包封率 (%)
布洛芬阳离子脂质体	37.61 ± 1.12	108.5 ± 0.3	3.7	93

使用 HPLC 测定三种电性布洛芬脂质体在体外模拟不同生理条件下在中性粒细胞中的滞留, 结果见图 12 由图可见, 在模拟正常血液循环以及炎症因子趋化过程中, 细胞递药系统在趋化过程中药物累计释放量仅占总摄取量的 7%, 释放缓慢, 但在炎症部位, 中性粒细胞异常激活情况下, 药物释放量占总摄取量的 87%, 证明在炎症部位药物可以快速而彻底的从细胞中释放出来。

二、炎症动物模型建立

耳肿胀小鼠模型：取体重 18~22g 清洁级雄性小鼠，将已浸透二甲苯的直径为 7mm 的圆形滤纸片紧贴在小鼠右耳部 15 s。

三、中性粒细胞递药系统炎症模型小鼠靶向性研究

1. 给药方案

取炎症小鼠 72 只，随机分为 2 组，每组 36 只，给药前禁食不禁水过夜，2 组荷瘤小鼠尾分别静脉注射市售布洛芬以及布洛芬阳离子脂质体中性粒细胞递药系统，剂量均为布洛芬 15 mg/kg，分别于给药后 0.167 h、0.5 h、1 h、2 h、4 h、8 h、12h、24h、48h、72h、96h 和 120h 时间点，摘眼球取血后，处死小鼠，取心、肝、脾、肾、耳 5 个组织，用生理盐水洗净，并用滤纸吸干残留生理盐水后称重。各组织按下述方法处理，用 HPLC 方法测各时间点的各组织样品中所含布洛芬浓度。

2. 样品处理

取炎症小鼠各组织样品（心、肝、脾、肾、耳），称重，置于采血管中，加入 2 mL 的生理盐水，经组织匀浆器高速分散成组织匀浆液。取 200 μ L 各组织匀浆液加入 200 μ L 乙腈，涡旋 5 min 后，10000 $\times$ g 离心 10 min，取上清液，HPLC 进样，根据线性方程计算组织样品中 PTX 的含量。

3. HPLC 方法

色谱柱：Inertsil®ODS-SP column (250 mm $\times$ 4.6 mm $\times$ 5 μ m, GL Sciences Inc., Japan)

流动相：甲醇:水=80:20 (v:v) 以 0.01mol/L 磷酸二氢钾溶液 (pH3.0)：乙腈=45: 55(v:v)

检测波长：263nm

柱温：室温

流速：1.0 mL/min

进样量：20 μ L

组织匀浆的物质不干扰布洛芬的分离测定，布洛芬的保留时间约为 10.2 min。

4. 小鼠体内分布结果

表 10 布洛芬在各脏器中分布

脏器 时间 (h)	心(μ g/g)	肝(μ g/g)	脾(μ g/g)	肾(μ g/g)	耳 (μ g/g)
0.5	6.17	12.96	5.93	2.23	0.29
1	3.99	10.25	3.66	3.74	0.17
2	2.78	7.90	1.65	2.51	---
4	1.55	7.01	1.31	1.72	---
8	0.43	6.32	0.68	0.57	---
12	0.28	3.70	0.43	0.33	---

表 11 布洛芬阳离子脂质体中性粒细胞递药系统在各脏器的分布

脏器 时间 (h)	心 (μ g/g)	肝 (μ g/g)	脾 (μ g/g)	肾 (μ g/g)	耳 (μ g/g)
12	---	3.31	3.09	0.79	4.01
24	---	2.90	3.22	0.63	3.22
48	---	2.77	2.17	0.58	2.90
72	---	1.80	1.47	0.49	1.61
96	---	0.63	0.61	0.33	0.70
120	---	0.31	0.29	0.21	0.49

由上表可知，市售布洛芬注射剂在炎症模型小鼠体内情况，肝脏分布最多，其次为心、肺、脾脏、肾脏，炎症部位分布较少；与市售布洛芬注射剂相比，中性粒细胞递药系统分布最多的器官为炎症部位耳和脾脏，其次为肝脏和肺等器官，在其他器官分布较少。

5. 靶向性评价

应用 Kinetic 4.0 药代动力学程序统计方法计算静脉注射布洛芬、中性粒细胞递药系统后组织中 $AUC_{0-\infty}$ 、 AUC_{0-120h} 等参数，计算相对摄取率 (relative ratio, Re)、靶向效率 (brain targeting efficiency, Te)。

相对摄取率 (relative ratio, Re) 是指中性粒细胞递药系统与市售制剂布洛芬在耳中 AUC 的比值，相对摄取率越大，表明该制剂相对于布洛芬在炎症组织耳的靶向性越强。靶向效

率 (brain targeting efficiency, Te) 是指同一种制剂在耳中的 AUC 与其他组织中 AUC 的比值, Te 大于 1 表示该制剂对于脑的选择性大于相比较的其他组织, Te 越大, 则表明相对于被比较的其他组织, 该制剂对非特异性炎症部位耳的选择性越强。

中性粒细胞递药系统与市售制剂布洛芬相比的炎症部位 $Re_{(0-t)}$ 和 $Re_{(0-Int)}$ 如图 13 所示, 并且其 Te 均大于 1 (图 14), 说明中性粒细胞递药系统具有很好的炎症靶向性, 能够快速穿过炎症血管, 将药物有效传递到炎症组织。

四、中性粒细胞递药系统对耳肿胀小鼠模型药效学评价

炎症模型小鼠 48 只, 随机分成 4 组, 每组 12 只, 分别为术后生理盐水组、单纯中性粒细胞组、市售制剂组、中性粒细胞递药系统组, 同时设原位瘤小鼠 12 只, 为对照组。其中市售制剂组的给药剂量为 15 mg/kg, 中性粒细胞递药系统组每只静脉注射约 5×10^6 个 NEs/只, 给药剂量约 15 mg/kg。所有动物分别在术后 1、2、3、4、6、8、10 给药, 共给药 7 次。同时设给予相同细胞密度, 相同生理盐水体积组作为空白对照。连续给药 3d, 给药 3 次后, 脱颈处死小鼠, 用 7mm 打孔器冲下左耳和右耳同一部位的圆片于分析天平上分别称重, 以两耳重量的差值表示肿胀程度, 比较药物的抗炎作用, 如图 15 所示。与生理盐水组相比, 给予市售制剂布洛芬和单纯中性粒细胞对耳肿胀程度并没显著性改善, 而与载药中性粒细胞组相比耳肿胀程度显著性改善, t 检验发现 $p < 0.05$ 。证明本发明所制备的中性粒细胞递药系统有效的抑制非特异性炎症的发生及发展。

实施 4 荷载布洛芬阳离子脂质体中性粒细胞递药系统对佐剂性关节炎小鼠模型的靶向性及药效学评价

一、载药中性粒细胞递药系统的制备及表征

中性粒细胞的提取与纯化同实施例 1, 取 10mg 布洛芬, 制备荷载布洛芬阳离子脂质体方法同实施例 1。

使用 HPLC 法测定载药量和包封率, 使用激光粒径分析仪测定粒径和电位, 如表 12 所示。

表 12

制剂	电位 (mV)	粒径 (nm)	载药量 (%)	包封率 (%)
布洛芬阳离子脂质体	37.61 ± 1.12	108.5 ± 0.3	3.7	93

使用 HPLC 测定三种电性布洛芬脂质体在体外模拟不同生理条件下在中性粒细胞中的滞留, 结果见图 16 由图可见, 在模拟正常血液循环以及炎症因子趋化过程中, 药物的累计释放

量仅占总摄取量的 8%，但在炎症部位，中性粒细胞异常激活情况下，药物累计释放量占总摄取量的 91%，证明在炎症部位药物可以快速而彻底的从细胞中释放出来。

二、炎症动物模型建立

佐剂性关节炎小鼠模型：将卡介苗 80℃ 水浴灭活 1 小时，与高压灭菌的石蜡充分研磨、混匀，制成 10 mg / ml 完全弗氏佐剂(Complete Freund adjuvant, CFA) ，于每只小鼠右后足跖皮内注射 CFA 0.1 ml 致炎。

三、中性粒细胞递药系统炎症模型小鼠靶向性研究

1. 给药方案

取炎症小鼠 72 只，随机分为 2 组，每组 36 只，给药前禁食不禁水过夜，2 组荷瘤小鼠尾分别静脉注射市售左氧氟沙星以及布洛芬阳离子脂质体中性粒细胞递药系统，剂量均为布洛芬 15 mg/kg，分别于给药后 0.167 h、0.5 h、1 h、2 h、4 h、8 h、12h、24h、48h、72h、96h 和 120h 时间点，摘眼球取血后，处死小鼠，取心、肝、脾、肾、右后足跖 5 个组织，用生理盐水洗净，并用滤纸吸干残留生理盐水后称重。各组织按下述方法处理，用 HPLC 方法测各时间点的各组织样品中所含布洛芬浓度。

2. 样品处理

取荷瘤小鼠各组织样品（心、肝、脾、肾、右后足跖），称重，置于采血管中，加入 2 mL 的生理盐水，经组织匀浆器高速分散成组织匀浆液。取 200 μ L 各组织匀浆液加入 200 μ L 乙腈，涡旋 5 min 后，10000 $\times$ g 离心 10 min，取上清液，HPLC 进样，根据线性方程计算组织样品中布洛芬的含量。

3. HPLC 方法

色谱柱：Inertsil®ODS-SP column (250 mm $\times$ 4.6 mm $\times$ 5 μ m, GL Sciences Inc., Japan)

流动相：甲醇:水=80:20 (v:v) 以 0.01mol/L 磷酸二氢钾溶液(pH3.0)：乙腈=45: 55(v:v)

检测波长：263nm

柱温：室温

流速：1.0 mL/min

进样量：20 μ L

组织匀浆的物质不干扰布洛芬的分离测定，布洛芬的保留时间约为 10.2 min。

4. 小鼠体内分布结果

表 13 布洛芬在各脏器中分布

脏器 时间 (h)	心(μ g/g)	肝(μ g/g)	脾(μ g/g)	肾(μ g/g)	足爪(μ g/g)
0.5	6.35	11.87	6.01	2.79	0.43
1	4.24	10.02	3.99	3.90	0.37
2	2.99	8.32	2.42	2.68	0.21
4	1.87	7.37	1.98	1.91	—
8	0.55	6.33	1.21	0.62	—
12	0.34	2.00	0.67	0.45	—

表 14 布洛芬阳离子脂质体中性粒细胞递药系统在各脏器的分布

脏器 时间 (h)	心(μ g/g)	肝(μ g/g)	脾(μ g/g)	肾(μ g/g)	足爪(μ g/g)
12	—	3.12	3.10	0.68	5.90
24	—	2.55	2.91	0.71	4.81
48	—	2.51	1.95	0.88	3.22
72	—	1.35	1.47	0.73	2.01
96	—	0.38	0.61	0.61	0.97
120	—	0.12	0.29	0.34	0.60

由上表可知，市售布洛芬注射剂在炎症模型小鼠体内情况，肝脏分布最多，其次为心、脾脏、肾脏，炎症部位分布较少；与市售布洛芬注射剂相比，中性粒细胞递药系统分布最多的器官为炎症部位足爪和脾脏，其次为肝脏器官，在其他器官分布较少。

5. 靶向性评价

应用 Kinetic 4.0 药代动力学程序统计方法计算静脉注射布洛芬、中性粒细胞递药系统后组织中 $AUC_{0-\infty}$ 、 AUC_{0-120h} 等参数，计算相对摄取率 (relative ratio, Re)、靶向效率 (brain targeting efficiency, Te)。

相对摄取率 (relative ratio, Re) 是指中性粒细胞递药系统与市售制剂布洛芬在足爪中 AUC 的比值，相对摄取率越大，表明该制剂相对于布洛芬在炎症组织的靶向性越强。靶向效率 (brain targeting efficiency, Te) 是指同一种制剂在炎症部位足爪中的 AUC 与其他组织中

AUC 的比值, T_e 大于 1 表示该制剂对于炎症部位右后足跖的选择性大于相比较的其他组织, T_e 越大, 则表明相对于被比较的其他组织, 该制剂对非特异性炎症部位右后足跖的选择性越强。

中性粒细胞递药系统与市售制剂布洛芬相比的炎症部位 $Re_{(0-t)}$ 和 $Re_{(0-Int)}$ 如图 17 所示, 并且其 T_e 均大于 1 (图 18), 说明中性粒细胞递药系统具有很好的炎症靶向性, 能够快速的穿过炎症血管, 将药物有效传递到炎症组织。

四、中性粒细胞递药系统对佐剂性关节炎小鼠模型药效学评价

炎症模型小鼠 48 只, 随机分成 4 组, 每组 12 只, 分别为炎症模型建立后生理盐水组、单纯中性粒细胞组、市售制剂组、中性粒细胞递药系统组, 其中市售制剂组的给药剂量为 15 mg/kg, 中性粒细胞递药系统组每只静脉注射约 5×10^6 个 NEs/只, 给药剂量约 15 mg/kg。所有动物分别在术后 1、2、3、4、6、8、10 给药, 共给药 7 次。同时设给予相同细胞密度, 相同生理盐水体积组作为空白对照。给药后, 每隔 3 天进行关节炎指数评分, 观察每组大鼠的继发病变。

每只足爪的关节炎指数评分标准: 0 = 正常; 1 = 踝关节出现红斑和轻微肿胀; 2 = 踝关节到跖关节或掌关节红斑和轻微肿胀; 3 = 踝关节到跖趾关节或掌关节出现红斑和中度肿胀; 4 = 踝关节到趾关节出现红斑和重度肿胀。每只小鼠鼠最多评 12 分, 结果如图 19 所示。对于关节炎指数评分出现的峰值以及出现峰值的时间, 与生理盐水组相比, 单纯给予中性粒细胞, 两组的没有显著性差异, 给予市售制剂布洛芬后, 虽然出现的峰值数有所降低, 出现峰值的时间有所延长, 但是给予中性粒细胞递药系统后, 其出现的峰值和峰值出现的时间都有的明显的下降和延长。证明本发明所制备的中性粒细胞递药系统有效的抑制变态反应性炎症的发生及发展。

权利要求书

- 1、一种炎症靶向的中性粒细胞递药系统，其特征在于所述的递药系统由中性粒细胞以及以直接或间接地方式载到中性粒细胞内或表面的治疗性物质或者检测性物质组成。
- 2、根据权利要求 1 所述的炎症靶向的中性粒细胞递药系统，其特征在于所述的治疗性物质选自药物、DNA、RNA、蛋白质或多肽中的一种或多种；所述的检测性物质选自探针、显影剂中的一种或多种。
- 3、根据权利要求 1 或 2 所述的炎症靶向的中性粒细胞递药系统，其特征在于所述的间接地方式是指将纳米载体作为工具，将治疗性物质或者检测性物质先装载在纳米载体内，制成纳米制剂，再将纳米制剂荷载到中性粒细胞内或表面。
- 4、根据权利要求 3 所述的炎症靶向的中性粒细胞递药系统，其特征在于所述的纳米载体选自正电性、负电性或近中性的粒径为 1-1000 nm 的纳米制剂。
- 5、根据权利要求 3 所述的炎症靶向的中性粒细胞递药系统，其特征在于所述的纳米载体为金纳米粒/棒、磁性纳米粒、介孔二氧化硅纳米粒、石墨烯、脂质体、胶束、纳米乳、纳米球、纳米囊、微球、微丸或树枝状聚合物。
- 6、根据权利要求 2 所述的炎症靶向的中性粒细胞递药系统，其特征在于所述的药物选自传出神经系统药物、中枢神经系统药、心血管系统药、激素及呼吸消化系统药、抗菌或抗病毒药物、抗肿瘤药物、维生素中的一种或多种。
- 7、根据权利要求 6 所述的炎症靶向的中性粒细胞递药系统，其特征在于所述的药物选自地西泮、苯妥英钠、氯丙嗪、氟西汀、美沙酮、甲氯芬酯、氯贝胆碱、硫酸阿托品、异丙肾上腺素、马来酸氯苯那敏、盐酸普鲁卡因、盐酸普萘洛尔、盐酸维拉帕米、盐酸胺碘酮、氯沙坦、硝酸甘油、多巴酚丁胺、辛伐他汀、氯吡格雷、哌唑嗪、西咪替丁、地芬尼多、西沙比利、联苯双酯、阿司匹林、吲哚美辛、盐酸氮芥、氟尿嘧啶、紫杉醇、阿莫西林、四环素、氨基糖苷、罗红霉素、氯霉素、左氟沙星、异烟肼、磺胺嘧啶、氟康唑、盐酸金刚烷胺、磷酸氟喹、格列苯脲、氢氯噻嗪、前列腺素、胰岛素、雌二醇、维生素 A 或维生素 C 中的一种或多种。
- 8、权利要求 1 所述的炎症靶向的中性粒细胞递药系统在制备治疗或诊断炎症和/或炎症相关疾病的药物或试剂中的应用。
- 9、根据权利要求 8 所述的应用，其特征在于所述的炎症包括感染性炎症、非特异性炎症、变态反应性炎症以及炎症相关性疾病。
- 10、根据权利要求 9 所述的应用，其特征在于所述的感染性炎症包括病毒、细菌或细菌产物造成的炎症；所述的非特异性炎症为物理性炎症，包括手术或外伤引起的红肿、疼痛；变态反应

性炎症包括狼疮性皮炎、过敏性哮喘或风湿性关节炎；炎症相关性疾病包括肿瘤术后复发的治疗、动脉粥样硬化或缺血缺氧性脑病。

11、一种治疗炎症和/或炎症相关疾病的药物，其特征在于包含权利要求 1 所述的炎症靶向的中性粒细胞递药系统。

12、一种诊断炎症和/或炎症相关疾病的试剂，其特征在于包含权利要求 1 所述的炎症靶向的中性粒细胞递药系统。

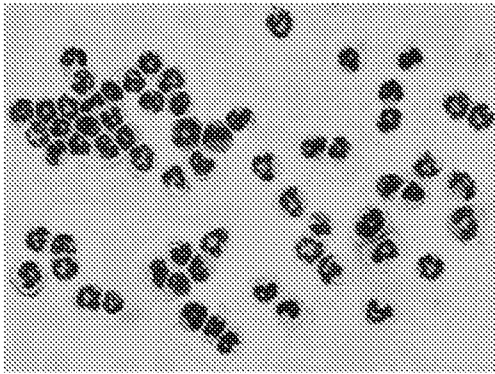


图 1

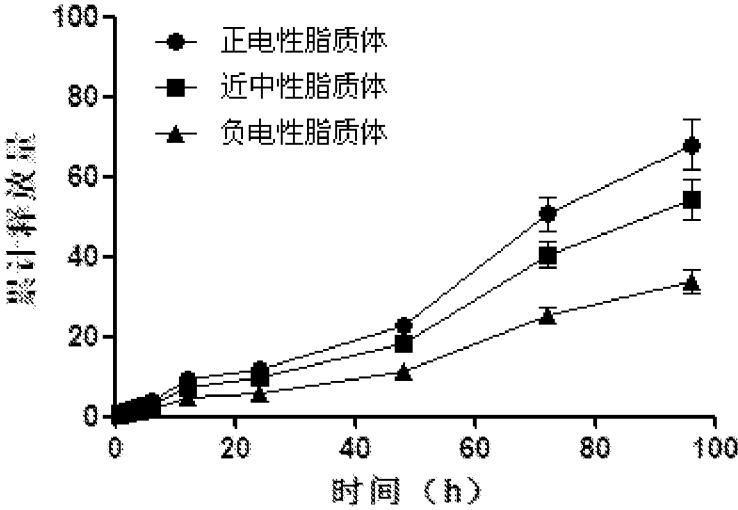


图 2

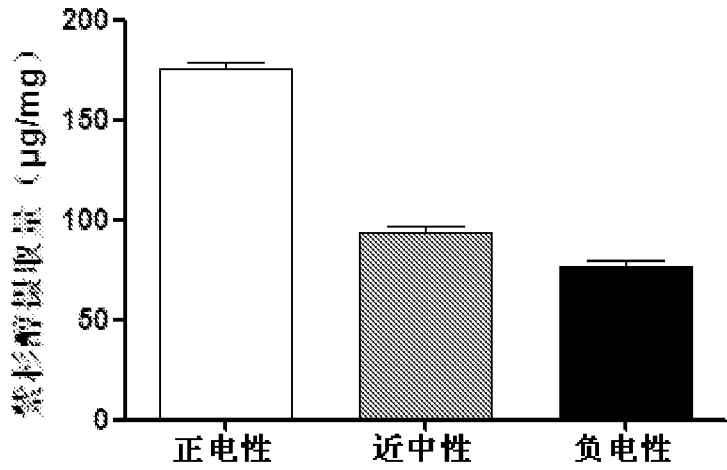


图 3

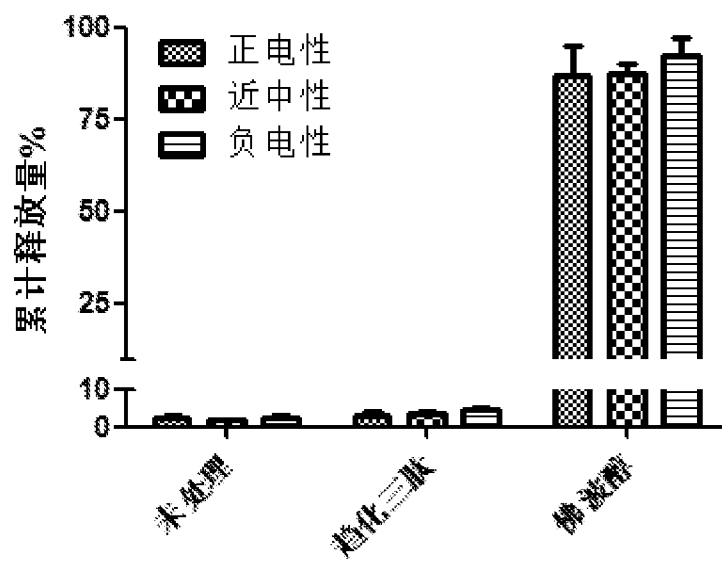


图 4

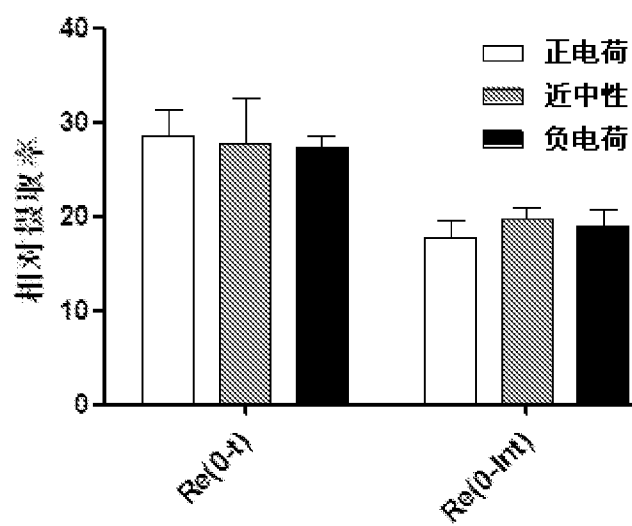


图 5

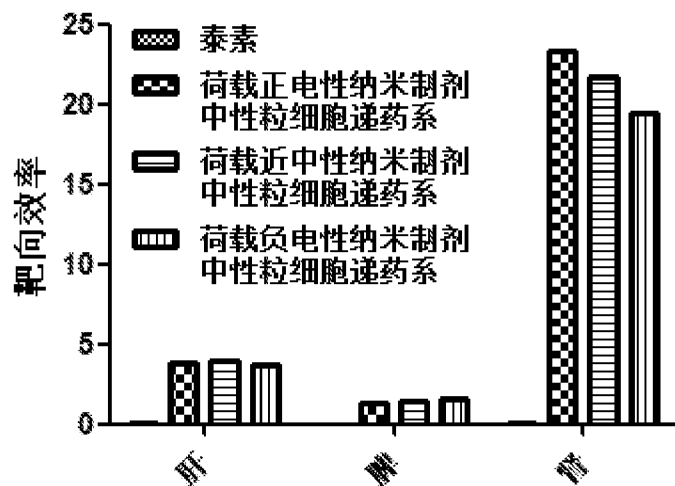


图 6

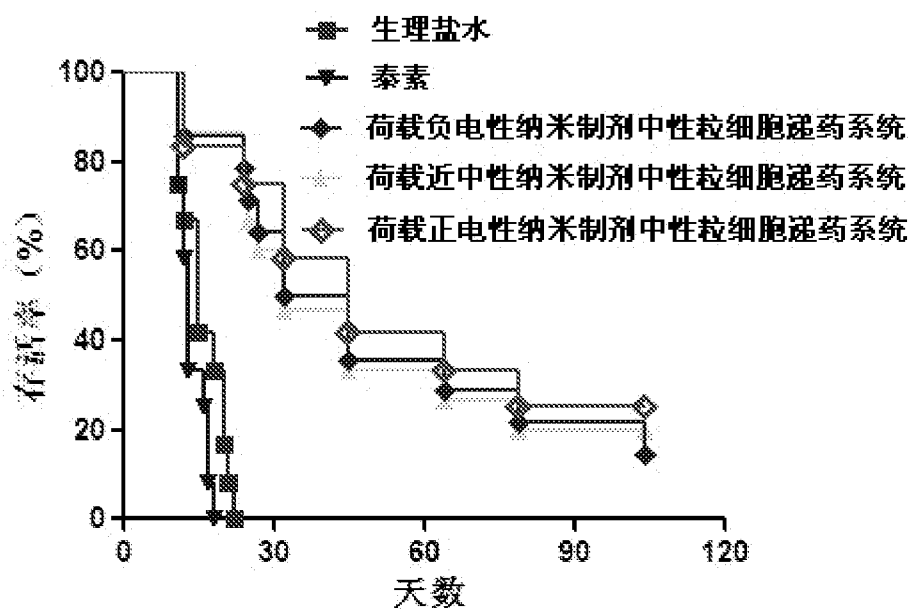


图 7

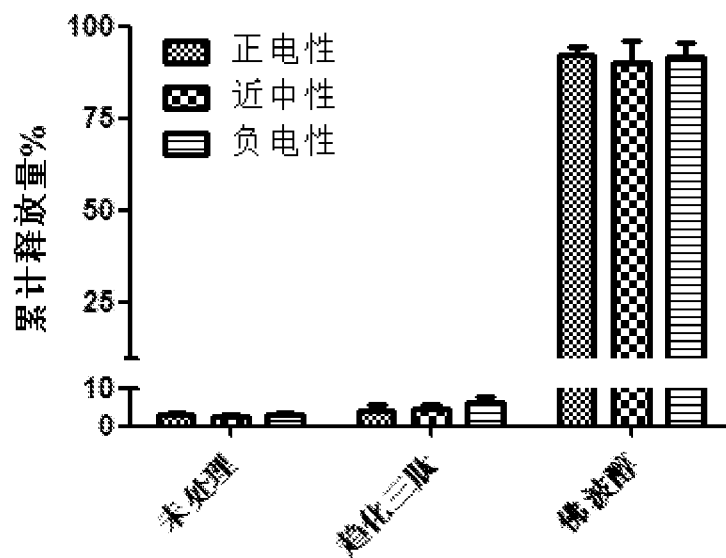


图 8

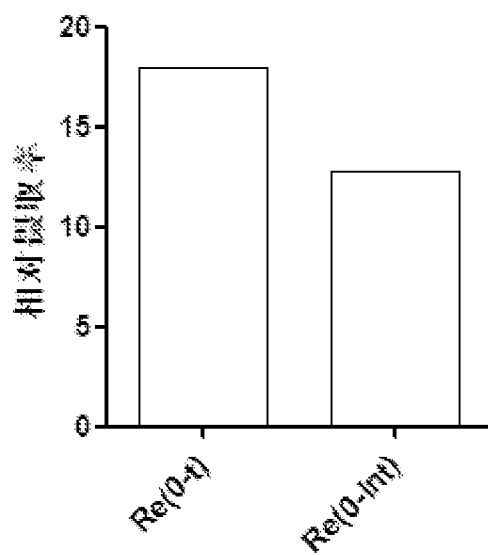


图 9

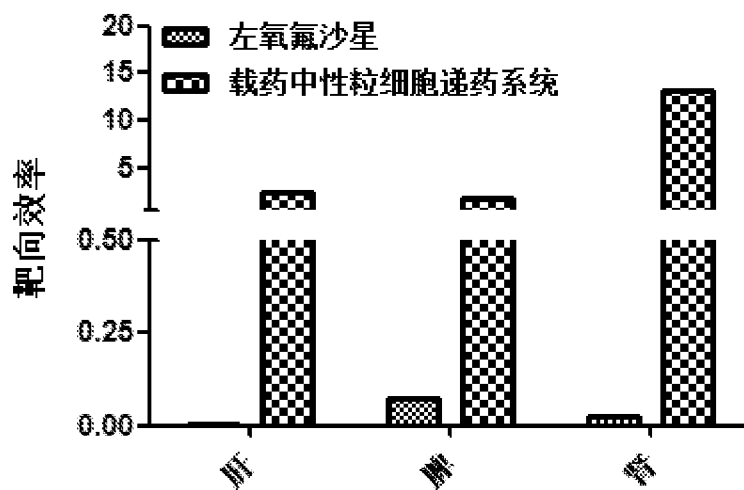


图 10

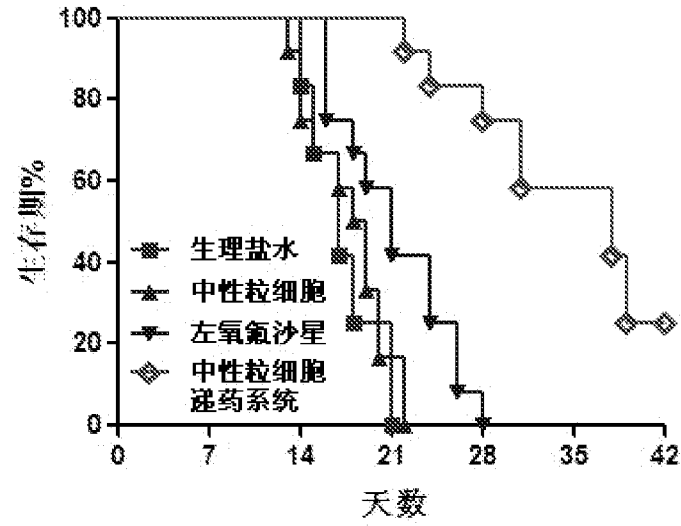


图 11

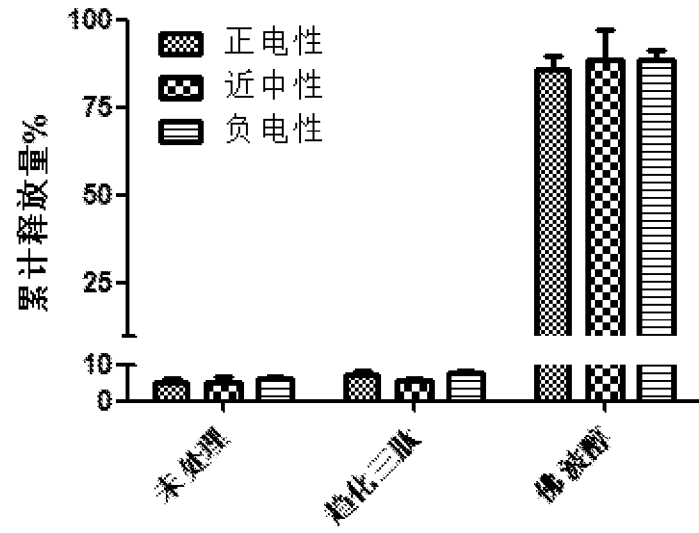


图 12

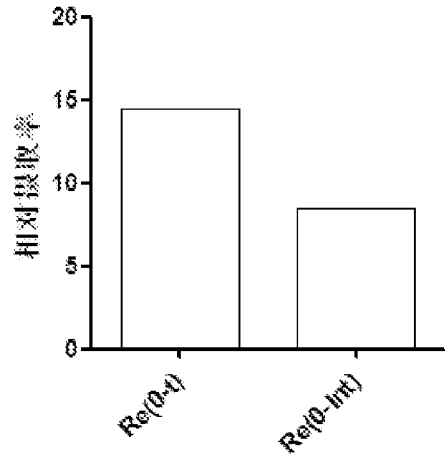


图 13

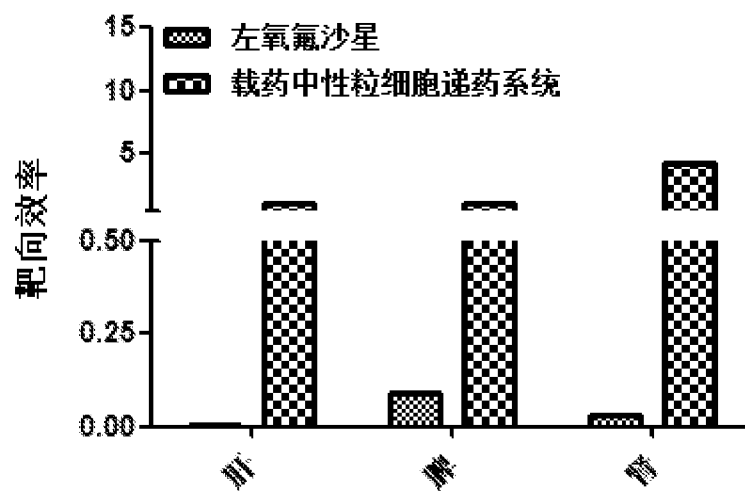


图 14

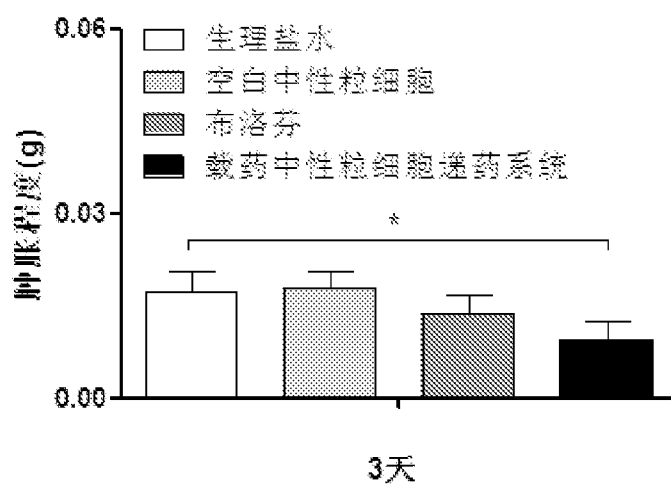


图 15

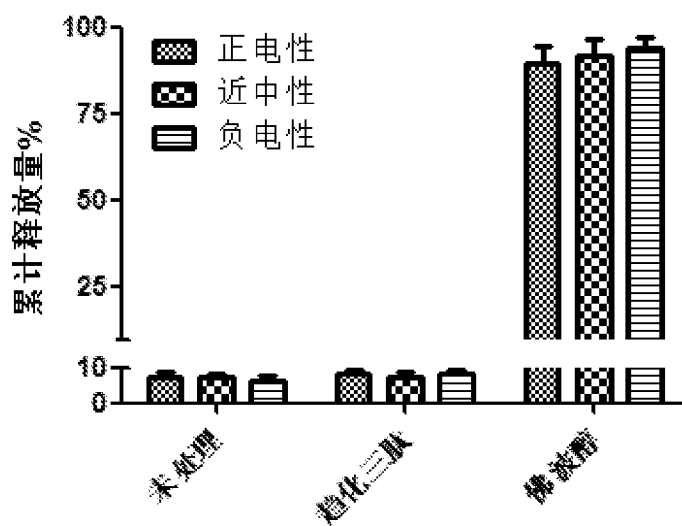


图 16

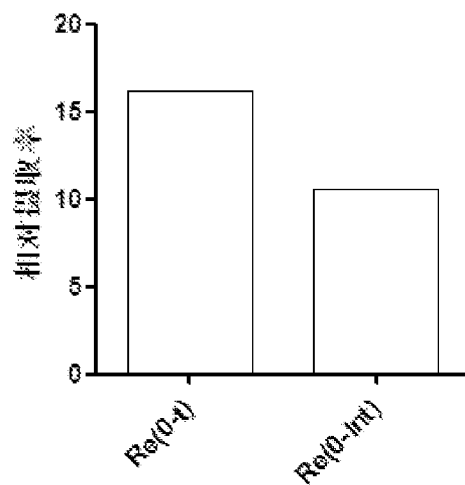


图 17

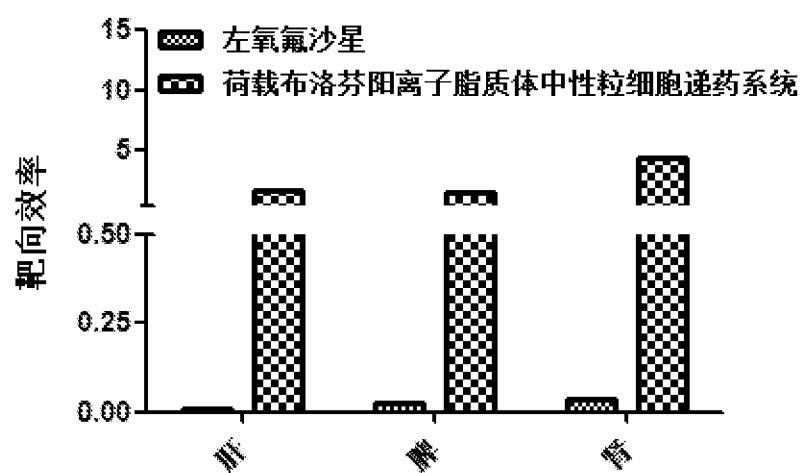


图 18

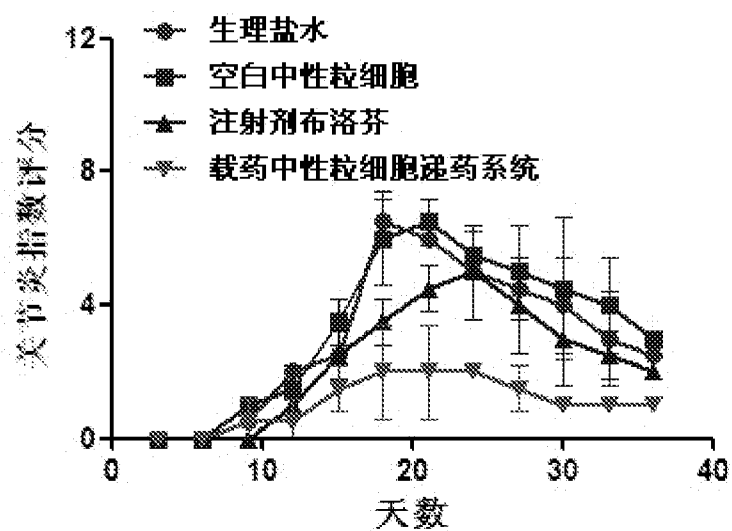


图 19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2014/092340

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 47/46 (2006.01) i; A61K 48/00 (2006.01) i; A61K 49/08 (2006.01) i; A61P 29/00 (2006.01) i; A61K 49/04 (2006.01) i; A61K 31/337 (2006.01) i; A61K 31/5383 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 47/-; A61K 48/-; A61K 49/-; A61K 9/-; A61K 31/-; 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)

CNXT, CNPAT, CNXT, WPI, EPODOC, TWXT, CA: Inflammation, Anti? Inflammatory, target, neutrophil cell, marrow, liposome, nano-carrier, drug delivery system, protein, polypeptide, taxol, Anzatax, 222069-62-4, levofloxacin, 100986-85-4, Ibuprofen, 15687-27-1, 58560-75-1, CMU, ZHANG, Can

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Sanyog Jain et al., "RGD-anchored magnetic liposome for monocytes/neutrophils-mediated brain targeting" International Journal of Pharmaceutics, volume 26, 31 December 2003 (31.12.2003) pages 43-55	1-12
X	Jing QIN et al., "Surface Modification of RGD-Liposomes for Selective Drug Delivery to Monocytes/Neutrophils in Brain" Chem. Pharm. Bull., volume 55, number 8, 31 December 2007 (31.12.2007) pages 1192-1197	1-12
X	QIN, Jing et al., "Studies on RGD-Mediated Brain-Target Ferulic Acid Liposome" CDFD Medical Science and Technology Compiles, volume 9, 15 September 2013 (15.09.213) the abstract	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&"document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 26 May 2015	Date of mailing of the international search report 12 June 2015
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer WEI, Yongyan Telephone No. (86-10) 82245015

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2014/092340

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WANG, Shuang et al., "Progress in Drug Delivery System for Brain Targeting", Chinese Journal of Pharmaceuticals, volume 43, number 12, 31 December 2012 (31.12.2012) pages 137-142	1, 2, 11, 12
A	WO 9640060 A1 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE et al.) 19 December 1996 (19.12.1996) the whole document	1-12
A	WO 2011046842 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 21 April 2011 (21.04.2011) the whole document	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2014/092340

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 9640060 A1	19 December 1996	AU 5928696 A	30 December 1996
		US 5643599 A	01 July 1997
		AU 709166 B2	26 August 1999
		EP 0831778 A1	01 April 1998
		JP 2001515455 A	18 September 2001
WO 2011046842 A1	21 April 2011	TW 201125586 A	01 August 2011
		US 2012269721 A1	25 October 2012

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2014/092340

A. 主题的分类

A61K 47/46(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61K 49/08(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i; A61K 49/04(2006.01)i; A61K 31/337(2006.01)i; A61K 31/5383(2006.01)i

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

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

A61K47/-, A61K48/-, A61K49/-, A61K9/-, A61K31/-, A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

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))

CNKI, CNPAT, CNTXT, WPI, EPDOC, TWXT, CA: 炎症, 抗炎, 靶向, 中性粒细胞, 骨髓中性粒细胞, 脂质体, 纳米, 载体, 蛋白, 肽, 紫杉醇, 左氧氟沙星, 布洛芬, 张灿, 中国药科大学, Inflammation, Anti-inflammatory, Target, neutrophil cell, marrow, liposome, nano-carrier, drug delivery system, protein, polypeptide, Taxol, Anzatax, 33069-62-4, Levofloxacin, 100986-85-4, Ibuprofen, 15687-27-1, 58560-75-1

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	Sanyog Jain等, . "RGD-anchored magnetic liposomes for monocytes/neutrophils-mediated brain targeting, " International Journal of Pharmaceutics, , 第261卷卷, 2003年 12月 31日 (2003 - 12 - 31), 第43-55页	1-12
X	Jing QIN等, . "Surface Modification of RGD-Liposomes for Selective Drug Delivery to Monocytes/Neutrophils in Brain, " Chem. Pharm. Bull., , 第55卷卷, 第8期期, 2007年 12月 31日 (2007 - 12 - 31), 第1192-1197页	1-12
X	秦晶, . "RGD介导脑靶向阿魏酸脂质体的研究, " 中国博士学位论文全文数据库 医药卫生科技辑, , 第09期期, 2013年 9月 15日 (2013 - 09 - 15), 摘要	1-12

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"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)

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"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

"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

"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

"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

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2015年 5月 26日

国际检索报告邮寄日期

2015年 6月 12日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
北京市海淀区蓟门桥西土城路6号
100088 中国

传真号 (86-10)62019451

受权官员

魏永燕

电话号码 (86-10)82245015

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	王爽等，. “脑靶向给药系统研究进展，” 中国医药工业杂志，， 第43卷卷， 第2期期， 2012年 12月 31日 (2012 - 12 - 31)， 第137-142页	1-2, 11-12
A	WO 9640060 A1 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE等) 1996年 12月 19 日 (1996 - 12 - 19) 说明书全文	1-12
A	WO 2011046842 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 2011年 4月 21日 (2011 - 04 - 21) 说明书全文	1-12

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2014/092340

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)
WO	9640060	A1	1996年 12月 19日	AU	5928696	A	1996年 12月 30日
				US	5643599	A	1997年 7月 1日
				AU	709166	B2	1999年 8月 26日
				EP	0831778	A1	1998年 4月 1日
				JP	2001515455	A	2001年 9月 18日
WO	2011046842	A1	2011年 4月 21日	TW	201125586	A	2011年 8月 1日
				US	2012269721	A1	2012年 10月 25日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)