



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111840527 B

(45) 授权公告日 2022.08.19

(21) 申请号 202010540287.2

(22) 申请日 2020.06.15

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 111840527 A

(43) 申请公布日 2020.10.30

(73) 专利权人 郑州大学  
地址 450001 河南省郑州市高新技术开发  
区科学大道100号

(72) 发明人 张慧娟 裴亚敏 朱玲 侯琳  
张红岭 张振中

(74) 专利代理机构 郑州天阳专利事务所(普通  
合伙) 41113  
专利代理师 聂孟民

(51) Int. Cl.  
A61K 38/49 (2006.01)  
A61K 47/61 (2017.01)  
A61K 47/69 (2017.01)  
A61K 31/737 (2006.01)  
A61P 7/02 (2006.01)  
A61P 9/10 (2006.01)  
A61P 19/02 (2006.01)  
A61P 29/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 103948946 A, 2014.07.30  
CN 109364263 A, 2019.02.22  
CN 108771763 A, 2018.11.09  
US 2015147276 A1, 2015.05.28  
CN 103611165 A, 2014.03.05  
Huijuan Zhang, et al. "Shear force responsive and fixed-point separated system for targeted treatment of arterial thrombus".《Nanotoday》.2021,第38卷  
MayaJuenet, et al. "Thrombolytic therapy based on fucoidan-functionalized polymer nanoparticles targeting P-selectin".《Biomaterials》.2017,  
Hui Gao, et al.. "Conjugates of poly (DL-lactide-co-glycolide) on amino cyclodextrins and their nanoparticles as protein delivery system".《J Biomed Mater Res A.》.2007,  
Himmelein, S., et al.. "A carbohydrate-based hydrogel containing vesicles as responsive non-covalent cross-linkers".《Chemical Science》.2014,

审查员 于地美

权利要求书3页 说明书7页

(54) 发明名称

一种剪切响应性纳米递药系统的制备方法及其应用

(57) 摘要

本发明涉及剪切响应性纳米递药系统的制备方法及其应用,可有效解决靶向血栓能力,减少药物的毒副作用提高疗效,在血栓部位的生理特征高剪切力下进行响应性缓慢释药,实现药物在血栓部位定点释放的问题。将β-CD和金刚烷分别接枝于PLGA和岩藻多糖分子骨架上,利用β-CD和金刚烷的主客体包合作用制备含有β-CD囊泡的岩藻多糖超分子自组装纳米粒,在介导自组装的过程中将尿激酶包封于多糖纳米粒的

网状结构中,构成具有剪切力响应释药特征的抗血小板药物和溶栓药物共转运纳米靶向递药系统,本发明制备方法简单,原料丰富,易生产制备,减少药物的毒副作用,提高疗效。

CN 111840527 B

1. 一种剪切响应性纳米递药系统的制备方法,其特征在于,将 $\beta$ -CD和金刚烷分别接枝于PLGA和岩藻多糖分子骨架上,利用 $\beta$ -CD和金刚烷的主客体包合作用制备含有 $\beta$ -CD囊泡的岩藻多糖超分子自组装纳米粒,在介导自组装的过程中将尿激酶包封于多糖纳米粒的网状结构中,构成具有剪切力响应释药特征的抗血小板药物和溶栓药物共转运纳米靶向递药系统,包括以下步骤:

(1) 岩藻多糖修饰金刚烷的合成:将10-100mg的岩藻多糖加入到1-10mL甲酰胺中,超声溶解,室温搅拌条件下加入4-40mg的4-二甲氨基吡啶、10-100 $\mu$ L三乙胺和5-50mg金刚烷甲酰氯反应24-48h,加入异丙醇浸没,4 $^{\circ}$ C条件下沉淀2-4h,8000-12000rpm离心10-15min,弃上清液,收集沉淀,将沉淀再用异丙醇洗涤至少两次以上,用水溶解沉淀,用MWC0为1000的透析袋或透析膜透析1-2天,冷冻干燥,得岩藻多糖修饰金刚烷;

(2) PLGA- $\beta$ CD的合成:将1.5-3g的聚乳酸-羟基乙酸溶于15-30mL的N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中,室温搅拌过程中加入38.34-76.68mg的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、23.02-46.04mg的N-羟基琥珀酰亚胺,活化羧基30-60min;加入预先溶解的235.4-470.8mg的单(6-乙二胺基-6-去氧)- $\beta$ -环糊精溶液,反应72h,缓慢加入超纯水,使溶液浑浊,再8000rpm离心30min,收集沉淀,将沉淀MWC0为3500的透析袋或透析膜透析1-2天,冷冻干燥,得PLGA- $\beta$ CD干燥物;

(3) 环糊精纳米囊泡的制备:取PLGA- $\beta$ CD干燥物10-50mg溶于1-5mL丙酮溶液中,以0.5mL/min的速度缓慢滴加到质量浓度1%的5-10mL的聚醚溶液中,用MWC0为8000-14000的透析袋或透析膜透析,冷冻干燥,成环糊精纳米囊泡,环糊精纳米囊泡的粒径为50-200nm;

(4) 纳米递药系统的构建:称取20mg岩藻多糖修饰金刚烷溶于1mL超纯水中,并以岩藻多糖修饰金刚烷与环糊精纳米囊泡重量比1:1加入环糊精纳米囊泡,在磁力搅拌下,加入0.5-2mg尿激酶搅拌交联48h,离心洗涤收集纳米粒,冷冻干燥,得纳米递药系统,纳米递药系统粒径为100-500nm。

2. 根据权利要求1所述的剪切响应性纳米递药系统的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 岩藻多糖修饰金刚烷的合成:将10mg的岩藻多糖加入到1mL甲酰胺中,超声溶解,室温搅拌条件下加入4mg的4-二甲氨基吡啶、10 $\mu$ L三乙胺和5mg金刚烷甲酰氯反应24h,加入异丙醇浸没,4 $^{\circ}$ C条件下沉淀2h,8000rpm离心15min,弃上清液,收集沉淀,将沉淀再用异丙醇洗涤至少两次以上,用水溶解沉淀,用MWC0为1000的透析袋或透析膜透析1-2天,冷冻干燥,得岩藻多糖修饰金刚烷;

(2) PLGA- $\beta$ CD的合成:将1.5g的聚乳酸-羟基乙酸溶于15mL的N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中,室温搅拌过程中加入38.34-76.68mg的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、23.02mg的N-羟基琥珀酰亚胺,活化羧基30min;加入预先溶解的235.4mg的单(6-乙二胺基-6-去氧)- $\beta$ -环糊精溶液,反应72h,缓慢加入超纯水,使溶液浑浊,再8000rpm离心30min,收集沉淀,将沉淀MWC0为3500的透析袋或透析膜透析1-2天,冷冻干燥,得PLGA- $\beta$ CD干燥物;

(3) 环糊精纳米囊泡的制备:取PLGA- $\beta$ CD干燥物10mg溶于1mL丙酮溶液中,以0.5mL/min的速度缓慢滴加到质量浓度1%的5mL的聚醚溶液中,用MWC0为8000-14000的透析袋或透析膜透析,冷冻干燥,成环糊精纳米囊泡;

(4) 纳米递药系统的构建:称取20mg岩藻多糖修饰金刚烷溶于1mL超纯水中,加入环糊

精纳米囊泡20mg,在磁力搅拌下,加入0.5mg尿激酶搅拌交联48h,离心洗涤收集纳米粒,冷冻干燥,得纳米递药系统。

3. 根据权利要求1所述的剪切响应性纳米递药系统的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 岩藻多糖修饰金刚烷的合成:将50mg的岩藻多糖加入到5mL甲酰胺中,超声溶解,室温搅拌条件下加入20mg的4-二甲氨基吡啶、50 $\mu$ L三乙胺和25mg金刚烷甲酰氯反应36h,加入异丙醇浸没,4 $^{\circ}$ C条件下沉淀3h,10000rpm离心12min,弃上清液,收集沉淀,将沉淀再用异丙醇洗涤至少两次以上,用水溶解沉淀,用MWC0为1000的透析袋或透析膜透析1-2天,冷冻干燥,得岩藻多糖修饰金刚烷;

(2) PLGA- $\beta$ CD的合成:将2.25g的聚乳酸-羟基乙酸溶于25mL的N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中,室温搅拌过程中加入57.51mg的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、34.53mg的N-羟基琥珀酰亚胺,活化羧基45min;加入预先溶解的353mg的单(6-乙二胺基-6-去氧)- $\beta$ -环糊精溶液,反应72h,缓慢加入超纯水,使溶液浑浊,再8000rpm离心30min,收集沉淀,将沉淀MWC0为3500的透析袋或透析膜透析1-2天,冷冻干燥,得PLGA- $\beta$ CD干燥物;

(3) 环糊精纳米囊泡的制备:取PLGA- $\beta$ CD干燥物25mg溶于2.5mL丙酮溶液中,以0.5mL/min的速度缓慢滴加到质量浓度1%的7.5mL的聚醚溶液中,用MWC0为10000的透析袋或透析膜透析,冷冻干燥,成环糊精纳米囊泡;

(4) 纳米递药系统的构建:称取20mg岩藻多糖修饰金刚烷溶于1mL超纯水中,加入环糊精纳米囊泡20mg,在磁力搅拌下,加入1mg尿激酶搅拌交联48h,离心洗涤收集纳米粒,冷冻干燥,得纳米递药系统。

4. 根据权利要求1所述的剪切响应性纳米递药系统的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 岩藻多糖修饰金刚烷的合成:将100mg的岩藻多糖加入到10mL甲酰胺中,超声溶解,室温搅拌条件下加入40mg的4-二甲氨基吡啶、100 $\mu$ L三乙胺和50mg金刚烷甲酰氯反应48h,加入异丙醇浸没,4 $^{\circ}$ C条件下沉淀4h,12000rpm离心10min,弃上清液,收集沉淀,将沉淀再用异丙醇洗涤至少两次以上,用水溶解沉淀,用MWC0为1000的透析袋或透析膜透析1-2天,冷冻干燥,得岩藻多糖修饰金刚烷;

(2) PLGA- $\beta$ CD的合成:将3g的聚乳酸-羟基乙酸溶于30mL的N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中,室温搅拌过程中加入76.68mg的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、46.04mg的N-羟基琥珀酰亚胺,活化羧基60min;加入预先溶解的470.8mg的单(6-乙二胺基-6-去氧)- $\beta$ -环糊精溶液,反应72h,缓慢加入超纯水,使溶液浑浊,再8000rpm离心30min,收集沉淀,将沉淀MWC0为3500的透析袋或透析膜透析1-2天,冷冻干燥,得PLGA- $\beta$ CD干燥物;

(3) 环糊精纳米囊泡的制备:取PLGA- $\beta$ CD干燥物50mg溶于5mL丙酮溶液中,以0.5mL/min的速度缓慢滴加到质量浓度1%的10mL的聚醚溶液中,用MWC0为14000的透析袋或透析膜透析,冷冻干燥,成环糊精纳米囊泡;

(4) 纳米递药系统的构建:称取20mg岩藻多糖修饰金刚烷溶于1mL超纯水中,加入环糊精纳米囊泡20mg,在磁力搅拌下,加入2mg尿激酶搅拌交联48h,离心洗涤收集纳米粒,冷冻干燥,得纳米递药系统。

5. 权利要求1-4任一项所述方法制备的剪切响应性纳米递药系统在制备治疗动脉粥样

硬化、血栓、肺栓塞血管栓塞性疾病药物中的应用。

## 一种剪切响应性纳米递药系统的制备方法及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及医药,特别是利用环糊精囊泡交联岩藻多糖的剪切响应性纳米递药系统的一种剪切响应性纳米递药系统的制备方法及其应用。

### 背景技术

[0002] 血栓栓塞性疾病已经成为继肿瘤之后的又一大杀手,引发这种疾病的血栓其实是一种血凝块,主要由不溶性纤维蛋白,沉积的血小板,积聚的白细胞和陷入的红细胞构成。现有的抗血栓药物,如链激酶、尿激酶等,由于其活性药物遍布全身而存在一定的出血风险及其他毒副作用。如何克服这些缺陷,选择性地将药物靶向于血流阻塞部位,并将活性药物在此区域集中释放,是亟需解决的技术关键。研究发现,血栓部位血管显示出与正常血管系统不同的物理特征,正常血流剪切力低于 $70\text{dyne}/\text{cm}^2$ ,但在血栓部位,由于血管堵塞流体剪切应力,可以局部增加一到两个数量级,甚至达到 $1000\text{dyne}/\text{cm}^2$ 。受这一自然物理机制的启发,开发一种以局部高剪切应力作为通用机制,可靶向凝块、狭窄或异常收缩的血管区域治疗血栓的纳米递药系统成为可能。

[0003] 岩藻多糖是一种富含岩藻糖的硫酸多糖,主要由褐藻糖、硫酸基团和一定比例的D-木糖、D-甘露糖、L-鼠李糖、葡萄糖、D-葡萄糖醛基和乙酰基构成。多年的研究发现,岩藻多糖不仅具有抗凝血,抗血栓等作用,还可以与血栓部位的活化血小板上高表达的P选择素受体结合,抑制血栓形成的同时也具有血栓靶向作用。 $\beta$ -环糊精是由7个葡萄糖单元以1,4-糖苷键结合成环的化合物,由于连接葡萄糖单元的糖苷键不能自由旋转,环糊精不是圆筒状分子,而是略呈锥形的圆环,其中伯羟基位于窄面的外表面,而仲羟基位于宽面的外表面,导致 $\beta$ -环糊精的结构呈现“外亲水,内疏水”的特殊性。其内部的疏水空腔能够包载疏水的客体分子,因此在岩藻多糖上修饰疏水的客体分子,使用环糊精衍生物形成环糊精纳米囊泡,保留表面的疏水空腔,与多糖上的客体分子可实现基于主客体相互作用的自组装,制备的纳米递药系统具有血栓靶向能力和剪切力响应特性。该系统靶向到达血栓部位后,在血栓局部的高剪切力下,使纳米粒递送系统包载的药物释放从而达到良好的溶栓效果。这种利用生理特点制备的药物递送系统是一种更安全更有效的溶栓,但至今未见有公开报导。

### 发明内容

[0004] 针对上述情况,为克服现有技术之缺陷,本发明之目的就是提供一种剪切响应性纳米递药系统的制备方法及其应用,可有效解决靶向血栓能力,减少药物的毒副作用提高疗效,在血栓部位的生理特征高剪切力下进行响应性缓慢释药,实现药物在血栓部位定点释放的问题。

[0005] 本发明解决的技术方案是,一种剪切响应性纳米递药系统的制备方法,将 $\beta$ -CD和金刚烷分别接枝于PLGA和岩藻多糖分子骨架上,利用 $\beta$ -CD和金刚烷的主客体包合作用制备含有 $\beta$ -CD囊泡的岩藻多糖超分子自组装纳米粒,在介导自组装的过程中将尿激酶包封于多

糖纳米粒的网状结构中,构成具有剪切力响应释药特征的抗血小板药物和溶栓药物共转运纳米靶向递药系统,包括以下步骤:

[0006] (1)岩藻多糖修饰金刚烷的合成:将10-100mg的岩藻多糖加入到1-10mL甲酰胺中,超声溶解,室温搅拌条件下加入4-40mg的4-二甲氨基吡啶、10-100 $\mu$ L三乙胺和5-50mg金刚烷甲酰氯反应24-48h,加入异丙醇浸没,4 $^{\circ}$ C条件下沉淀2-4h,8000-12000rpm离心10-15min,弃上清液,收集沉淀,将沉淀再用异丙醇洗涤至少两次以上,用水溶解沉淀,用MWC0为1000(透析袋或透析膜,下同)透析1-2天,冷冻干燥,得岩藻多糖修饰金刚烷;

[0007] (2)PLGA- $\beta$ CD( $\beta$ CD即 $\beta$ -环状糊精)的合成:将1.5-3g的聚乳酸-羟基乙酸(PLGA,15KD)溶于15-30mL的N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中,室温搅拌过程中加入38.34-76.68mg的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、23.02-46.04mg的N-羟基琥珀酰亚胺,活化羧基30-60min;加入预先溶解的235.4-470.8mg的单(6-乙二胺基-6-去氧)- $\beta$ -环糊精(EDA- $\beta$ -CD)溶液,反应72h,缓慢加入超纯水,使溶液浑浊(即不发生相分离),再8000rpm离心30min,收集沉淀,将沉淀MWC0为3500透析1-2天,冷冻干燥,得PLGA- $\beta$ CD干燥物;

[0008] (3)环糊精纳米囊泡的制备:取PLGA- $\beta$ CD干燥物10-50mg溶于1-5mL丙酮溶液中,以0.5mL/min的速度缓慢滴加到质量浓度1%的5-10mL的聚醚(F68,1%)溶液中,用MWC0为8000-14000透析,冷冻干燥,成环糊精纳米囊泡,环糊精纳米囊泡的粒径为50-200nm;

[0009] (4)纳米递药系统的构建:称取20mg岩藻多糖修饰金刚烷溶于1mL超纯水中,并以岩藻多糖修饰金刚烷与环糊精纳米囊泡重量比1:1加入环糊精纳米囊泡,在磁力搅拌下,加入0.5-2mg尿激酶搅拌交联48h,离心洗涤收集纳米粒,冷冻干燥,得纳米递药系统,纳米递药系统粒径为100-500nm。

[0010] 所述方法制备的剪切响应性纳米递药系统在制备治疗动脉粥样硬化、血栓、肺栓塞血管栓塞性疾病及关节炎药物中的应用,以及在制备抗血栓药物注射剂、冻干粉针中的应用。

[0011] 本发明制备方法简单,原料丰富,易生产制备,其制备的纳米递药系统具有靶向血栓能力,可减少药物的毒副作用,提高疗效,在血栓部位的生理特征高剪切力下进行响应性缓慢释药,实现药物在血栓部位的定点释放,开拓了治疗动脉粥样硬化、血栓、肺栓塞血管栓塞性疾病及关节炎药物的新途径,是治疗动脉粥样硬化、血栓、肺栓塞血管栓塞性疾病及关节炎药物上的一大创新,有显著的经济和社会效益。

## 具体实施方式

[0012] 以下结合实施例对本发明的具体实施方式作详细说明。

[0013] 本发明在具体实施中由以下实施例给出。

[0014] 实施例1

[0015] 本发明在具体实施中,一种剪切响应性纳米递药系统的制备方法,包括以下步骤:

[0016] (1)岩藻多糖修饰金刚烷的合成:将10mg的岩藻多糖加入到1mL甲酰胺中,超声溶解,室温搅拌条件下加入4mg的4-二甲氨基吡啶、10 $\mu$ L三乙胺和5mg金刚烷甲酰氯反应24h,加入异丙醇浸没,4 $^{\circ}$ C条件下沉淀2h,8000rpm离心15min,弃上清液,收集沉淀,将沉淀再用异丙醇洗涤至少两次以上,用水溶解沉淀,用MWC0为1000(透析袋或透析膜,下同)透析1-2天,冷冻干燥,得岩藻多糖修饰金刚烷;

[0017] (2) PLGA- $\beta$ CD ( $\beta$ CD即 $\beta$ -环状糊精)的合成:将1.5g的聚乳酸-羟基乙酸(PLGA,15KD)溶于15mL的N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中,室温搅拌过程中加入38.34-76.68mg的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、23.02mg的N-羟基琥珀酰亚胺,活化羧基30min;加入预先溶解的235.4mg的单(6-乙二胺基-6-去氧)- $\beta$ -环糊精(EDA- $\beta$ -CD)溶液,反应72h,缓慢加入超纯水,使溶液浑浊(即不发生相分离),再8000rpm离心30min,收集沉淀,将沉淀MWC0为3500透析1-2天,冷冻干燥,得PLGA- $\beta$ CD干燥物;

[0018] (3) 环糊精纳米囊泡的制备:取PLGA- $\beta$ CD干燥物10mg溶于1mL丙酮溶液中,以0.5mL/min的速度缓慢滴加到质量浓度1%的5mL的聚醚(F68,1%)溶液中,用MWC0为8000-14000透析,冷冻干燥,成环糊精纳米囊泡;

[0019] (4) 纳米递药系统的构建:称取20mg岩藻多糖修饰金刚烷溶于1mL超纯水中,加入环糊精纳米囊泡20mg,在磁力搅拌下,加入0.5mg尿激酶搅拌交联48h,离心洗涤收集纳米粒,冷冻干燥,得纳米递药系统。

#### [0020] 实施例2

[0021] 本发明在具体实施中,一种剪切响应性纳米递药系统的制备方法,包括以下步骤:

[0022] (1) 岩藻多糖修饰金刚烷的合成:将50mg的岩藻多糖加入到5mL甲酰胺中,超声溶解,室温搅拌条件下加入20mg的4-二甲氨基吡啶、50 $\mu$ L三乙胺和25mg金刚烷甲酰氯反应36h,加入异丙醇浸没,4 $^{\circ}$ C条件下沉淀3h,10000rpm离心12min,弃上清液,收集沉淀,将沉淀再用异丙醇洗涤至少两次以上,用水溶解沉淀,用MWC0为1000(透析袋或透析膜,以下同)透析1-2天,冷冻干燥,得岩藻多糖修饰金刚烷;

[0023] (2) PLGA- $\beta$ CD ( $\beta$ CD即 $\beta$ -环状糊精)的合成:将2.25g的聚乳酸-羟基乙酸(PLGA,15KD)溶于25mL的N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中,室温搅拌过程中加入57.51mg的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、34.53mg的N-羟基琥珀酰亚胺,活化羧基45min;加入预先溶解的353mg的单(6-乙二胺基-6-去氧)- $\beta$ -环糊精(EDA- $\beta$ -CD)溶液,反应72h,缓慢加入超纯水,使溶液浑浊(即不发生相分离),再8000rpm离心30min,收集沉淀,将沉淀MWC0为3500透析1-2天,冷冻干燥,得PLGA- $\beta$ CD干燥物;

[0024] (3) 环糊精纳米囊泡的制备:取PLGA- $\beta$ CD干燥物25mg溶于2.5mL丙酮溶液中,以0.5mL/min的速度缓慢滴加到质量浓度1%的7.5mL的聚醚(F68,1%)溶液中,用MWC0为10000透析,冷冻干燥,成环糊精纳米囊泡;

[0025] (4) 纳米递药系统的构建:称取20mg岩藻多糖修饰金刚烷溶于1mL超纯水中,加入环糊精纳米囊泡20mg,在磁力搅拌下,加入1mg尿激酶搅拌交联48h,离心洗涤收集纳米粒,冷冻干燥,得纳米递药系统。

#### [0026] 实施例3

[0027] 本发明在具体实施中,一种剪切响应性纳米递药系统的制备方法,包括以下步骤:

[0028] (1) 岩藻多糖修饰金刚烷的合成:将100mg的岩藻多糖加入到10mL甲酰胺中,超声溶解,室温搅拌条件下加入40mg的4-二甲氨基吡啶、100 $\mu$ L三乙胺和50mg金刚烷甲酰氯反应48h,加入异丙醇浸没,4 $^{\circ}$ C条件下沉淀4h,12000rpm离心10min,弃上清液,收集沉淀,将沉淀再用异丙醇洗涤至少两次以上,用水溶解沉淀,用MWC0为1000透析1-2天,冷冻干燥,得岩藻多糖修饰金刚烷;

[0029] (2) PLGA- $\beta$ CD ( $\beta$ CD即 $\beta$ -环状糊精)的合成:将3g的聚乳酸-羟基乙酸(PLGA,15KD)溶

于30mL的N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中,室温搅拌过程中加入76.68mg的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、46.04mg的N-羟基琥珀酰亚胺,活化羧基60min;加入预先溶解的470.8mg的单(6-乙二胺基-6-去氧)- $\beta$ -环糊精(EDA- $\beta$ -CD)溶液,反应72h,缓慢加入超纯水,使溶液浑浊(即不发生相分离),再8000rpm离心30min,收集沉淀,将沉淀MWC0为3500透析1-2天,冷冻干燥,得PLGA- $\beta$ CD干燥物;

[0030] (3) 环糊精纳米囊泡的制备:取PLGA- $\beta$ CD干燥物50mg溶于5mL丙酮溶液中,以0.5mL/min的速度缓慢滴加到质量浓度1%的10mL的聚醚(F68,1%)溶液中,用MWC0为14000透析,冷冻干燥,成环糊精纳米囊泡;

[0031] (4) 纳米递药系统的构建:称取20mg岩藻多糖修饰金刚烷溶于1mL超纯水中,加入环糊精纳米囊泡20mg,在磁力搅拌下,加入2mg尿激酶搅拌交联48h,离心洗涤收集纳米粒,冷冻干燥,得纳米递药系统。

[0032] 上述实施例1-3方法制备的剪切响应性纳米递药系统有效用于制备治疗动脉粥样硬化、血栓、肺栓塞血管栓塞性疾病及关节炎药物,以及制备抗血栓药物注射剂、冻干粉针,实现剪切响应性纳米递药系统在制备治疗动脉粥样硬化、血栓、肺栓塞血管栓塞性疾病及关节炎药物中的应用,以及在制备抗血栓药物注射剂、冻干粉针中的应用。

[0033] 本发明采用能够与活化的血小板上高表达的P选择素结合的岩藻多糖作为靶向血栓的材料,在岩藻多糖上修饰金刚烷,环糊精衍生物形成纳米囊泡保留表面空腔,利用金刚烷作为客体分子使环糊精纳米粒表面的空腔能够包含客体分子金刚烷然后使之交联多糖并包覆尿激酶得到纳米递药系统;制备的环糊精纳米囊泡粒径在50-200nm之间,纳米递药系统粒径在100-500nm之间;该系统具有以下特点:1)该系统中的岩藻多糖具有靶向血栓部位的能力,减少药物的使用量降低毒副作用;2)所制备的纳米递药系统具有剪切力响应性,在剪切力高于100dyne/cm<sup>2</sup>时候,使系统中的药物响应性释放;3)所制备的纳米递药系统具有生物相容性,用途广泛。

[0034] 本发明涉及的剪切响应性纳米递药系统的构建。首先,将环糊精与具有端羧基的PLGA进行酯化反应,再利用纳米共沉淀法合成表面具有空腔结构的纳米囊泡。之后,纳米囊泡的疏水空腔能够与岩藻多糖上修饰的金刚烷分子发生主客体交联,并包覆溶栓药物尿激酶得到纳米递药系统。岩藻多糖首先靶向定位于血栓部位,在血栓的高剪切力下,主客体交联作用断裂使尿激酶释放进行溶栓。

[0035] 本发明所使用的岩藻多糖是一类含有岩藻糖和硫酸基团的多糖,具有多种生物学功能,如抗凝血、抗肿瘤、抗血栓、抗病毒等。P选择素存在于血小板 $\alpha$ 颗粒膜上,可与P-选择素糖蛋白配体1(PSG1)进行结合及介导血小板的黏附。岩藻多糖能够与P选择素结合,靶向血栓并抑制活化血小板的聚集。所制备的纳米递药系统在靶向到达血栓部位后,受到血管堵塞部位的高剪切力的作用下,使包载的药物进行释放,达到溶栓的效果,并经多次反复实验均取得了一致的结果,相关实验资料如下(以实施例2为例):

[0036] 实验1:流变仪实验

[0037] 在流变仪(A2-G2 TA仪器公司)中使用20mm锥板结构将载药纳米粒溶液(5mg/mL)剪切1min。然后收集上清液,测定药物的释放量,计算其浓度并相对于最高剪切水平(1000dyne/cm<sup>2</sup>)值进行归一化。

[0038] 上述实验设置1、10、100、1000 dyne/cm<sup>2</sup>四个不同组别,通过测定上清液中药物的

释放量计算出在剪切力为 $10 \text{ dyne/cm}^2$ 释药比低于20%， $100 \text{ dyne/cm}^2$ 时释药比达到70%，结果表明制备的纳米递药系统在剪切力 $100 \text{ dyne/cm}^2$ 时药物释放量明显增加，并且随着剪切力的增加，药物的释放量也增加，提示该递药系统的剪切响应性。

#### [0039] 实验2:体外溶栓

[0040] 血凝块的制备是将 $100 \mu\text{L}$ 的全血与 $50 \text{ U}$ 的凝血酶溶液混合后在 $37^\circ\text{C}$ 下以 $50 \text{ 转/分}$ 的速度持续摇晃30分钟后，将凝块从试管移到24孔板中。制备好的血凝块用PBS、游离uPA、空白载体，载药纳米粒，预剪切后的载药纳米粒处理，凝块在 $37^\circ\text{C}$ ，以 $50 \text{ 转/分}$ 的速度持续振荡300分钟。在处理后的0、30、90、180和300分钟，将 $200 \mu\text{L}$ 上清液放入96个多孔培养皿中，并使用酶标仪测量溶解过程中释放的血红蛋白的光学密度(OD415)，测量并记录其血凝块的溶解情况。

[0041] 结果表明预剪切后的纳米粒组的溶解过程中释放的血红蛋白的光学密度(OD415)较其他组别明显增大，且其血凝块的溶解比其他组明显，提示该纳米粒在剪切力下释放药物溶栓。

#### [0042] 实验3:溶血实验

[0043] 使用EDTA抗凝管收集的大鼠新鲜血液于 $2500 \text{ g}$ 离心 $10 \text{ min}$ ，去除上清后将沉淀用PBS重悬再次离心，重复2次得到红细胞沉淀。将不同浓度的载药纳米粒加入到红细胞中旋转孵育 $4 \text{ h}$ ，以PBS作为阴性对照，超纯水作为阳性对照，每组重复三个。孵育后将溶液 $10000 \text{ g}$ 离心 $1 \text{ min}$ ，在 $541 \text{ nm}$ 波长处测上清液的光吸收度。光吸收度越高载体材料的溶血效应越明显，而光吸收度越低载体材料的溶血效应越低。

[0044] 实验表明不同浓度的载体的对红细胞的溶血效应与阴性对照组PBS相似，光吸收度较低且无明显差异，即不会产生溶血效应。

#### [0045] 实验4:体外靶向

[0046] 首先在体外制备富含血小板的血栓模型，将 $3.2\%$ 枸橼酸钠抗凝的全血， $1800 \text{ g}$ 离心 $10 \text{ min}$ ，离心管中肉眼观察到3层，表层为富含血小板的血浆层(PRP层)，中间层为白细胞层，基层是红细胞层。吸取 $180 \mu\text{L}$ 上清液及少量富含血小板的边界层，混匀后分布到96孔板中，并依次加入氯化钙( $\text{CaCl}_2$   $0.4 \text{ mM}$ )、凝血酶( $0.5 \text{ U/mL}$ )，将96孔板放入 $37^\circ\text{C}$ 恒温箱中孵育 $40 \text{ min}$ 。血栓模型形成后 $1 \text{ min}$ 添加不同浓度荧光标记的纳米载体与血栓共培养，之后使用 $0.9\% \text{ NaCl}$ 冲洗血栓表面，观察其荧光强度值，记录图像并分析结果。设置PBS对照组。

[0047] 结果表明纳米粒处理的血栓较对照组具有较高的荧光信号，荧光信号强度较未靶向组高3倍左右，证明制备的该靶向纳米递药系统的血栓靶向性。

#### [0048] 实验5:动脉损伤模型

[0049] 采用SD雄性大鼠进行颈动脉损伤建立体内血栓模型。将SD雄性大鼠分为四组，均以 $10\%$ 的水合氯醛( $0.5 \text{ mL}/100 \text{ g}$ )麻醉，选择大鼠一侧分离颈动脉，将浸润有 $10\% \text{ FeCl}_3$ 溶液的滤纸环包覆在分离的颈动脉上，并在动脉下方使用塑料垫保护周围组织以防损伤。滤纸环放置 $10 \text{ min}$ 后取下观察血栓形成情况。待血栓形成后，通过尾静脉分别注射uPA，空白纳米粒，载药纳米粒以及生理盐水对照溶液(其中以uPA的给药浓度为 $0.2 \text{ mg/mL}$ )， $90 \text{ min}$ 后取出动脉血栓部分进行H&E切片染色观察血栓。

[0050] 结果显示生理盐水组中有多个大的凝块存在，几乎完全占据管腔；游离uPA组的切片显示仍有一些凝块的存在占据一半左右的管腔，相反，制剂组只有散在的几个血凝块，溶

栓效果明显。

[0051] 实验6:体内组织分布

[0052] 以近红外染料IR783标记纳米载体,通过FX PRO活体成像仪实时监测该递送系统的体内分布。选取具有如前所述血栓模型的6-7周雄性大鼠,随机分成三组:1) IR783组;2) IR783-空白纳米粒组;3) IR783-载药纳米粒组。IR783给药浓度为0.2mg/mL,通过尾静脉注射的方式将上述药物注射到大鼠体内,分别于10min,30min,60min,90min时,将造模大鼠置于FX PRO型荧光活体成像仪中进行荧光和X-Ray成像,参数设置激发波长720nm,发射波长790nm,记录处理数据,分析结果。90min后,处死各组大鼠取出心,肝,脾,肺,肾,PBS浸泡洗涤后,滤纸吸去多余水分,置于荧光活体成像仪中扫描拍照,记录并分析各个组织器官的制剂分布情况。

[0053] 荧光成像显示纳米粒在血栓部位的荧光强度随着时间的推移逐渐增强,在90min时荧光强度是游离IR83的2倍左右,提示该纳米粒能够在血栓部位的高效蓄积的作用。

[0054] 实验7:体内安全性评价

[0055] 选取具有动脉血栓模型的6-7周雄性大鼠,随机分成三组:1)生理盐水组,2)游离uPA组,3)载药纳米粒组,对经生理盐水、游离uPA、载药纳米粒处理的动脉血栓大鼠的凝血指标,aPTT(活化部分凝血活酶时间)、FIB(纤维蛋白原)、PT(凝血酶原时间)、TT(凝血酶时间)进行了分析说明,并将其处死取出心,肝,脾,肺,肾组织固定液固定后进行包埋H&E切片并于显微镜下观察其形态。其中,正常大鼠作为阴性对照。

[0056] 与生理盐水组相比,载药纳米粒组治疗后在凝血参数、活化部分凝血活酶时间、纤维蛋白原时间、凝血酶原时间和凝血酶时间无显著性差异,H&E切片染色显示组织器官无明显病理变化,表明该纳米递药系统的体内安全性。

[0057] 实验8:尾出血实验

[0058] 采用模板尾出血时间法测定大鼠的止血潜能。以尾静脉给药5min后,从距尾部近侧10 mm处开始,在沿尾部左轴的浅尾静脉上进行一个深度为2 mm、长度为4 mm的纵向切口。在20min内对切口处的出血状况进行监测,注意及时用滤纸擦拭血液。

[0059] 本实验设置生理盐水,空白纳米粒,载药纳米粒,预剪切纳米粒和尿激酶溶液,监测各组的尾出血时间并记录。

[0060] 结果表明与生理盐水组的出血时间(约3min)相比,纳米递送系统组均没有明显延长尾出血的时间(4min左右),经尿激酶处理的大鼠尾出血时间较生理盐水组延长约为10min,表明该纳米递送系统明显降低药物的出血副作用。

[0061] 实验9:细胞毒性

[0062] 人脐静脉内皮细胞(HUVEC)以 $5 \times 10^3$ 个/孔接种于96孔板中,在37℃,5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养24h贴壁后,每孔加入200μL分别含有100 μg/mL, 50 μg/mL, 20 μg/mL 以及 10 μg/mL空白纳米粒的培养基,继续培养24h和48h,其中每浓度设置6个复孔。采用SRB法考察对细胞的毒性影响。

[0063] 结果表明24h和48h后该载体纳米粒对HUVEC细胞的无明显毒副作用,细胞存活率均不低于85%,对细胞的影响作用小。

[0064] 在对实施例2实验的同时,还对其他实施例进行了同样的试验,均取得了相同和相近似的结果,这里不一一列举。

[0065] 实验表明,本发明相对于现有技术具有如下突出的特点和有益效果:

[0066] 本发明将 $\beta$ -CD和金刚烷分别接枝于PLGA和岩藻多糖分子骨架上,利用 $\beta$ -CD和金刚烷的主客体包合作用制备含有 $\beta$ -CD囊泡的岩藻多糖超分子自组装纳米粒,在介导自组装的过程中将尿激酶封装于多糖纳米粒的网状结构中,制备具有剪切力响应释药特征的抗血小板药物和溶栓药物共转运纳米靶向递药系统,至今未见有公开报导,是申请人的首创,具有突出的实质性特点,并取得了非常好的有益技术效果:

[0067] 1、能够靶向定位于血栓部位,增强药物在血栓部位的高效蓄积,大大提高了药物的利用率和疗效;

[0068] 2、剪切响应性释药可以减少药物的全身毒副作用,将活性药物集中分布在血流堵塞部位,充分发挥药物的药效 ;

[0069] 3、具有良好的生物相容性及安全性,应用范围广,可有效用于制备治疗动脉粥样硬化、血栓、肺栓塞血管栓塞性疾病及关节炎药物,以及制备抗血栓药物注射剂、冻干粉针,开拓了治疗动脉粥样硬化、血栓、肺栓塞血管栓塞性疾病及关节炎药物、抗血栓药物注射剂、冻干粉针的新途径,有显著的经济和社会效益。