



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112274646 A

(43) 申请公布日 2021.01.29

(21) 申请号 202010663991.7	A61K 47/02 (2006.01)
(22) 申请日 2020.07.10	A61K 49/04 (2006.01)
(66) 本国优先权数据	A61K 49/14 (2006.01)
201910629391.6 2019.07.12 CN	A61K 51/08 (2006.01)
(71) 申请人 北京茵诺医药科技有限公司	A61K 45/06 (2006.01)
地址 100195 北京市海淀区西杉创意园四	A61K 9/51 (2006.01)
区9号楼3层101-301号	A61P 9/10 (2006.01)
(72) 发明人 马茜 孙洁芳	A61P 9/04 (2006.01)
(74) 专利代理机构 北京市英智伟诚知识产权代	A61P 7/02 (2006.01)
理事务所(普通合伙) 11521	A61P 9/00 (2006.01)
代理人 刘丹妮 姚望舒	A61P 35/00 (2006.01)
(51) Int.Cl.	A61P 9/02 (2006.01)
A61K 47/42 (2017.01)	
A61K 47/34 (2017.01)	
A61K 47/36 (2006.01)	

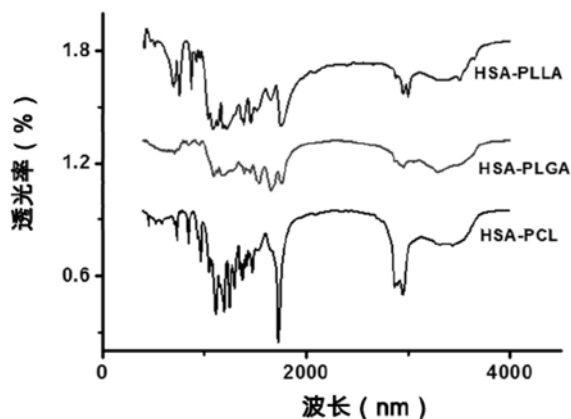
权利要求书4页 说明书28页 附图12页

(54) 发明名称

用于靶向活化CD44分子的双亲性蛋白质-高分子结合体递送系统、其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明提供了一种用于靶向活化CD44分子的双亲性蛋白质-高分子结合体纳米载体递送系统,所述双亲性蛋白质-高分子结合体为蛋白质分子上原位接枝偶联高分子片段后自组装形成的纳米结构,且所述双亲性蛋白质-高分子结合体的表面部分地被靶向配体修饰,所述靶向配体是能与活化的CD44分子特异性结合的配体。还提供了该递送系统的制备方法和应用。本发明设计的ProS自组装结构具有生物相容性好、载药量高,安全性好、稳定性强的优势,是一类具有重要应用价值纳米药物载体。



1. 一种用于靶向活化CD44分子的双亲性蛋白质-高分子结合体纳米载体递送系统,其特征在于,所述双亲性蛋白质-高分子结合体为蛋白质与疏水性高分子片段通过化学键偶联形成,且所述双亲性蛋白质-高分子结合体的表面部分地被靶向配体修饰,所述靶向配体是能与活化的CD44分子特异性结合的配体。

2. 一种用于靶向易损斑块的双亲性蛋白质-高分子结合体纳米载体递送系统,其特征在于,所述双亲性蛋白质-高分子结合体为蛋白质与疏水性高分子片段通过化学键偶联形成,且所述双亲性蛋白质-高分子结合体的表面部分地被靶向配体修饰,所述靶向配体是能与活化的CD44分子特异性结合的配体。

3. 根据权利要求1或2所述的递送系统,其特征在于,所述蛋白质选自以下一种或多种:免疫球蛋白,牛血清白蛋白,人血清白蛋白、基因重组人血清白蛋白,卵白蛋白,明胶、胶原蛋白、牛奶蛋白、丝蛋白、弹性蛋白;优选为人血清白蛋白。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的递送系统,其特征在于,所述高分子片段为具有生物相容性、可生物降解、安全性良好的疏水高分子片段,且所述高分子片段可由一种单体或几种不同单体聚合而成,且所述高分子片段未被修饰改性或被修饰改性;优选地,所述高分子材料选自以下一种或多种:聚苯乙烯,聚乳酸-羟基乙酸共聚物,聚己内酯、聚乙醇酸、聚乳酸、聚(N-异丙基丙烯酰胺)、聚丙烯酸羟乙酯,聚甲基丙烯酸、聚乙烯醇与聚乙二醇二甲基丙烯酸酯,聚四氟乙烯;更优选为聚己内酯、聚左旋乳酸,聚乳酸-羟基乙酸共聚物。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的递送系统,其特征在于,所述蛋白质分子上原位接枝偶联疏水性高分子片段后自组装形成双亲性蛋白质-高分子结合体;

优选地,所述自组装条件为超声诱导两相组装。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的递送系统,其特征在于,所述双亲性蛋白质-高分子结合体被天然高分子聚合物进行表面修饰,所述天然化合物为可发生自聚或和金属离子形成络合网状结构的有机层;

优选地,所述天然化合物选自以下一种或多种:多巴胺、植酸、单宁酸、壳聚糖、海藻糖、植物多酚;优选地,所述天然化合物为多巴胺自聚合或单宁酸- Fe^{3+} 复合物。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的递送系统,其特征在于,所述靶向配体选自GAG、胶原、层黏连蛋白、纤黏连蛋白、选择蛋白、骨桥蛋白以及单克隆抗体HI44a, HI313, A3D8, H90, IM7, 或透明质酸或能够与易损斑块处的细胞表面上的CD44分子特异性结合的透明质酸的衍生物;

优选地,所述靶向配体选自胶原,透明质酸,选择蛋白,骨桥蛋白或单克隆抗体HI44a, IM7。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的递送系统,其特征在于,所述纳米载体表面还可以进行其他修饰,所属修饰优选为在载体表面修饰聚乙二醇、穿膜肽、自身肽中的一种或多种,或者双重配体同时修饰。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的递送系统,其特征在于,所述纳米载体负载有用于诊断、预防和/或治疗与出现CD44分子活化状况相关的疾病的物质;和/或

所述纳米载体负载有用于诊断、预防和/或治疗易损斑块或与易损斑块相关的疾病的物质;

优选地,所述纳米载体同时负载有用于预防和/或治疗易损斑块或与易损斑块相关的

疾病的物质和透明质酸或能够与易损斑块处的细胞表面上的CD44分子特异性结合的透明质酸的衍生物；

更优选地，所述纳米载体同时负载有用于诊断易损斑块或与易损斑块相关的疾病的物质、用于预防和/或治疗易损斑块或与易损斑块相关的疾病的物质、任选的CD44活化剂和任选的透明质酸或能够与易损斑块处的细胞表面上的CD44分子特异性结合的透明质酸的衍生物。

10. 根据权利要求9所述的递送系统，其特征在于，所述用于诊断、预防和/或治疗与出现CD44分子活化状况相关的疾病的物质是CD44活化剂；

优选地，所述CD44活化剂是CD44抗体mAb或IL5、IL12、IL18、TNF- α 、LPS。

11. 根据权利要求9或10所述的递送系统，其特征在于，所述用于诊断、预防和/或治疗易损斑块或与易损斑块相关的疾病的物质选自用于诊断、预防和/或治疗易损斑块或与易损斑块相关的疾病的药物、多肽、核酸和细胞因子中的一种或多种。

12. 根据权利要求9至11中任一项所述的递送系统，其特征在于，所述用于诊断、预防和/或治疗易损斑块或与易损斑块相关的疾病的物质是用于诊断易损斑块或与易损斑块相关的疾病的物质；

更优选地，所述用于诊断易损斑块或与易损斑块相关的疾病的物质是示踪剂；

进一步优选地，所述示踪剂选自CT示踪剂、MRI示踪剂和核素示踪剂；

更进一步优选地：

所述CT示踪剂选自碘纳米造影剂、金纳米造影剂、氧化钽纳米造影剂、铋纳米造影剂、镧系纳米造影剂，或其他类似结构的示踪剂；更优选为碘化造影剂或纳米金，或其他类似结构的示踪剂；进一步优选为碘海醇、碘卡酸、碘佛醇、碘克沙醇、碘普罗胺、碘比醇、碘美普尔、碘帕醇、碘昔兰、醋碘苯酸、胆影酸、碘苯扎酸、碘甘卡酸、泛影酸、碘他拉酸钠、碘苯酯、碘番酸、碘阿芬酸、醋碘苯酸钠、丙碘酮、碘奥酮、碘曲仑、碘吡多、胆影酸葡甲胺、碘他拉酸、泛影葡胺、甲泛影酸、甲泛葡铵、碘化油或乙碘油，或其他类似结构的示踪剂；优选为纳米金；

所述MRI示踪剂选自纵向弛豫造影剂和横向弛豫造影剂；更优选为顺磁性造影剂、铁磁性造影剂和超磁性造影剂；进一步优选为Gd-DTPA及其线型、环型多胺多羧类螯合物和锰的卟啉螯合物，大分子钆螯合物、生物大分子修饰的钆螯合物、叶酸修饰的钆螯合物、树状大分子显影剂、脂质体修饰的显影剂和含钆富勒烯，或其他类似结构的示踪剂；再优选为钆喷酸葡胺、钆特酸葡胺、钆贝葡胺、钆双胺、枸橼酸铁铵泡腾颗粒、顺磁性氧化铁，优选为顺磁性氧化铁或其他类似结构的示踪剂；和/或

所述核素示踪剂选自有碳14、碳13、磷32、硫35、碘131、氢3、锝99、氟18标记的氟代脱氧葡萄糖。

13. 根据权利要求9至12中任一项所述的递送系统，其特征在于，所述用于诊断、预防和/或治疗易损斑块或与易损斑块相关的疾病的物质是用于预防和/或治疗易损斑块或与易损斑块相关的疾病的物质；

优选地，所述用于预防和/或治疗易损斑块或与易损斑块相关的疾病的物质选自他汀类药物、贝特类药物、抗血小板药物、PCSK9抑制剂、抗凝药物、血管紧张素转换酶抑制剂、钙离子拮抗剂、MMPs抑制剂、 β 受体阻滞剂，糖皮质激素或其他的抗炎物质如IL-1抗体

canakinumab,以及它们的药学上可接受的盐中的一种或多种,包括这些种类药物或物质的活性制剂,以及内源性的抗炎细胞因子比如白细胞介素10;

更优选地,所述用于预防和/或治疗易损斑块或与易损斑块相关的疾病的物质选自洛伐他汀、阿托伐他汀、瑞舒伐他汀、辛伐他汀、氟伐他汀、匹伐他汀、普伐他汀,苯扎贝特、环丙贝特、氯贝特、吉非贝齐、非诺贝特、普罗布考,抗PCSK9抗体如evolocumab、alirocumab、bococizumab、RG7652、LY3015014和LGT-209,或adnectin如BMS-962476,反义RNAi寡核苷酸如ALN-PCSsc,核酸如microRNA-33a、microRNA-27a/b、microRNA-106b、microRNA-302、microRNA-758、microRNA-10b、microRNA-19b、microRNA-26、microRNA-93、microRNA-128-2、microRNA-144、microRNA-145反义链以及它们的核酸类似物如锁核酸,阿司匹林、阿西美辛、曲克芦丁、双嘧达莫、西洛他唑、盐酸噻氯匹定、奥扎格雷钠、氯吡格雷、普拉格雷、西洛他唑、贝列前素钠、替格瑞洛、坎格瑞洛、替罗非班、依替巴肽、阿昔单抗、普通肝素、克赛、速碧林、黄达肝葵钠、华法林、达比加群、利伐沙班、阿哌沙班、依度沙班、比伐卢定、依诺肝素、替他肝素、阿地肝素、双香豆素、硝酸香豆素、枸橼酸钠、水蛭素、阿加曲班,贝那普利、卡托普利、依那普利、培多普利、福辛普利、赖诺普利、莫昔普利、西拉普利、培哚普利、喹那普利、雷米普利、群多普利、坎地沙坦,依普罗沙坦、厄贝沙坦、氯沙坦、替米沙坦、缬沙坦、奥美沙坦、他索沙坦、硝苯地平、尼卡地平、尼群地平、氨氯地平、尼莫地平、尼索地平、尼伐地平、伊拉地平、非洛地平、拉西地平、地尔硫卓、维拉帕米、氯己定、米诺环素、MMI-166、美托洛尔、阿替洛尔、比索洛尔、普萘洛尔、卡维地络、巴马司他、马立马司他、普淋司他、BMS-279251、BAY 12-9566、TAA211、AAJ996A、nacetrapib、evacetrapib、Torcetrapib和Dalcetrapib,泼尼松、甲泼尼松、倍他米松、丙酸倍氯米松、得宝松、泼尼松龙、氢化可的松、地塞米松或其他的抗炎物质如IL-1抗体canakinumab,以及它们的药效片段或药学上可接受的盐中的一种或多种,以及它们的药学上可接受的盐中的一种或多种,包括这些种类药物的活性结构片段,以及内源性的抗炎细胞因子比如白细胞介素10。

14. 根据权利要求1至13中任一项所述的递送系统的制备方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

(1) 偶联蛋白质与疏水性高分子片段,制得蛋白质-疏水性高分子复合物;

(2) 步骤(1)制得的蛋白质-疏水性高分子复合物自组装制得双亲性蛋白质-高分子结合体;

(3) 对步骤(2)制得的双亲性蛋白质-高分子结合体偶联靶向配体。

15. 根据权利要求14所述的方法,其特征在于,所述步骤(2)中,所述自组装步骤还包括药物包载过程。

16. 一种药物组合物,其特征在于,所述药物组合物包含权利要求1至13中任一项所述的纳米载体递送系统。

17. 一种诊断制剂,其特征在于,所述诊断制剂包含权利要求1至13中任一项所述的纳米载体递送系统。

18. 权利要求1至13中任一项所述的纳米载体递送系统在制备用于易损斑块或与易损斑块相关的疾病的诊断、预防和治疗的产品中的应用。

19. 根据权利要求18所述的应用,其特征在于,所述易损斑块选自破裂斑块、侵蚀性斑块和部分钙化结节性病变中的一种或多种;

更优选地,所述与易损斑块相关的疾病选自以下一种或多种:动脉粥样硬化症、冠状动脉粥样硬化性心脏病、脑动脉粥样硬化症、外周血管动脉粥样硬化症、主动脉夹层、血管瘤、血栓栓塞、心力衰竭和心源性休克;

优选地,所述冠状动脉粥样硬化性心脏病选自以下一种或多种:急性冠脉综合征、无症状心肌缺血-隐匿性冠心病、心绞痛、心肌梗死、缺血性心脏病、猝死、支架内再狭窄;

所述脑动脉粥样硬化症为脑卒中;和/或

所述外周血管动脉粥样硬化症选自以下一种或多种:颈动脉粥样硬化症、闭塞性周围动脉粥样硬化、视网膜动脉粥样硬化症、肾动脉粥样硬化症、下肢动脉粥样硬化症、上肢动脉粥样硬化症、动脉粥样硬化性阳痿。

用于靶向活化CD44分子的双亲性蛋白质-高分子结合体递送系统、其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于靶向给药技术领域,具体涉及一种用于靶向活化CD44分子,尤其是靶向易损斑块的纳米载体,尤其是双亲性蛋白质-高分子结合体。本发明也涉及所述纳米载体,尤其是双亲性蛋白质-高分子结合体药物递送系统的制备方法、性能改善和用途拓展,特别是在易损斑块或与易损斑块相关的疾病的诊断、预防和治疗中的用途。

背景技术

[0002] 目前,以急性心肌梗死和心源性猝死为主的急性心血管事件已成为危害人类健康的头号杀手。据统计,全世界每年约有2千万人死于急性心血管事件。在中国,情况同样不容乐观,每年有超过70万人死于急性心肌梗死和心源性猝死,这已经成为严重威胁我国居民健康的最重要疾病之一。研究表明,大部分的急性心肌梗死和心源性猝死均是由动脉粥样硬化斑块引起的。自上世纪70年代以来,人们一直在探索慢性动脉粥样硬化斑块导致急性冠脉综合征(ACS)及脑卒中的发生过程及机制。

[0003] 1989年,Muller及其团队提出了“易损斑块”的概念,认为此类斑块是导致大多数急性心脑血管事件的根本原因。易损斑块(vulnerable plaque,又称为“不稳定斑块(unstable plaque)”)是指具有血栓形成倾向或极有可能快速进展成为“罪犯斑块”的动脉粥样硬化斑块,主要包括破裂斑块、侵蚀性斑块和部分钙化结节性病变。大量的研究表明,大部分的急性心肌梗死及脑卒中是由于轻、中度狭窄的易损斑块破裂,继发血栓形成所致。Naghavi及其团队等给出了易损斑块的组织学定义和标准。主要的标准包括活动性炎症、薄的纤维帽和大的脂质核心、内皮剥脱伴表面血小板聚集、斑块有裂隙或损伤以及严重的狭窄。次要的标准包括表面钙化斑、黄色有光泽的斑块、斑块内出血和正性重构。因此,对于易损斑块而言,早期干预至关重要。但是由于一般情况下易损斑块所导致的血管狭窄程度并不高,很多患者没有前驱症状,导致临床上很难进行早期诊断,使得其危险性极高。因此,如何尽早准确的识别和诊断易损斑块,进行有效的干预成为预防及治疗急性心肌梗死中亟待解决的问题。

[0004] 目前常用于易损斑块诊断的技术主要包括冠脉造影、血管内超声(IVUS)、激光相干断层显像(OCT)等技术,但这些技术均属于有创性的检查,并且诊断分辨率和准确性不高,同时这些诊断技术费用昂贵,也在一定程度上限制了临床上的普及。因此,目前急需针对易损斑块的无创诊断技术和制剂。

[0005] 另外,目前治疗易损斑块的方法主要是全身给药,例如口服他汀类药物、阿司匹林、基质金属蛋白酶(MMPs)抑制剂和/或贝特类药物等。这些药物通过调节全身血脂、对抗炎症、抑制蛋白酶和血小板生成等来减少斑块内的脂质,改善血管重构等,从而起到稳定斑块的作用。然而,临床应用中发现目前用于治疗易损斑块的药物的治疗效果并不理想。例如,临床常用的他汀类药物的口服给药生物利用度比较低,如辛伐他汀为<5%,阿托伐他汀为约12%,瑞舒伐他汀为约20%。动物实验也证实,当他汀类药物的剂量增加到1mg/kg以

上时才可以起到增加纤维帽厚度和减少斑块体积的作用,这就使得他汀类药物的口服给药的稳定性及逆转斑块的效果遭遇了瓶颈。目前临床试验也已经证实,口服他汀类药物治疗易损斑块需要采用强化大剂量才能具有稳定易损斑块的作用,而全身大剂量使用他汀类药物治疗也存在严重副作用(例如肝功能异常、横纹肌溶解、II型糖尿病等)发生率升高的风险。

[0006] 对于现有的全身性给药而言,药物在进入体内后通常仅有极少一部分有效成分能够真正作用于病变部位。这是制约药物疗效,并导致药物毒副作用的根本原因。靶向给药系统是指具有靶向给药能力的给药系统。在经某种途径给药以后,靶向给药系统所包含的药物会通过带有靶向探针的载体特异性地富集于靶部位。靶向给药系统能够使药物瞄准特定的病变部位,并在目标病变部位释放有效成分。因此,靶向给药系统可以使药物在目标病变部位形成相对较高的浓度,并减少血液循环中的药量,从而在提高药效的同时抑制毒副作用,减少对正常组织和细胞的伤害。

[0007] 目前,靶向给药系统通常所使用的纳米载体是脂质体。虽然脂质体具有提高药效、降低药物毒副作用的优势,但是由于其体内稳定性差,导致循环时间不足,最终对药物的生物利用度提升有限。另外,脂质体的体外稳定性同样不足,存储期间磷脂易氧化水解,而且脂质体囊泡之间容易相互聚集融合、包裹在其中的药物容易发生渗漏的问题。这均在一定程度上限制了靶向给药系统的发展。

[0008] 另外,在易损斑块的诊断和治疗领域中,也存在一些利用靶向配体修饰纳米载体来诊断易损斑块的技术。然而,此类靶向易损斑块的靶向探针在临床实际应用中的主要问题在于这些制剂的靶向位点的特异性不足。例如,此类制剂的靶向位点大多选择巨噬细胞,但由于巨噬细胞可存在于身体各处,所以所述探针的靶向特异性不够理想。因此,靶向易损斑块的靶向制剂的研制中存在的难点在于发现易损斑块内的细胞中的具有显著靶向特异性的靶位。

[0009] CD44是一类黏附分子,广泛分布于淋巴细胞、单核细胞、内皮细胞等的表面。CD44分子的主要配体是透明质酸(hyaluronic acid,缩写为“HA”)。基于表达细胞的活化状态,可以将CD44分为相对静止状态(不能结合HA)、诱导活化状态(激活后可结合HA)和结构活跃状态(无需激活即可与HA结合),而大多数正常细胞表面的CD44处于相对静止状态,从而不能与HA相结合。

[0010] 继往大量研究表明CD44并不是具有显著靶向特异性的理想靶位。这是因为CD44在人体内广泛分布,尤其是大量存在于网状内皮丰富的器官表面上。因此,以CD44为靶位的靶向给药系统的研发中会遇到如下问题:如果靶位细胞表面的CD44与HA的亲合力不足以提供显著的特异性,那么此类靶向给药系统就不会存在特异性靶向性能。

[0011] 因此,寻找易损斑块部位存在的特异性靶位以及适合于靶向易损斑块的靶向给药系统,由此开发能够特异性地靶向易损斑块,并同时能够实现药物的稳定持续释放的靶向给药系统,已经成为医学领域中的一个亟待解决的技术问题。

[0012] 迄今为止,对于易损斑块内主要存在的巨噬细胞、单核细胞、内皮细胞、淋巴细胞和平滑肌细胞的表面上的CD44的表达状态及其与HA的亲合力尚无任何报道,也不存在任何关于利用HA和CD44的相互作用以及易损斑块的特定微环境设计用于诊断或治疗易损斑块或与易损斑块相关的疾病的能够实现药物的稳定持续释放的靶向给药系统的现有技术。

[0013] 基于生物相容性良好的蛋白质通过偶联疏水高分子片段,能够在生理条件下自组装成纳米载体,蛋白质构成巨型双亲性高分子的亲水段,疏水高分子构成疏水端,用于负载化学药物、微小RNA实现靶向药物递送的目的。蛋白质-高分子结合体集蛋白质和连接的高分子的性能和优势于一体,同时还显示出一些新的性能。蛋白质的存在赋予结合体优异的生物相容性和生物功能,而高分子链的引入可以增加蛋白质的稳定性,提高载药量,同时可以赋予结合体双亲性能和高分子链本身的性能,如引入温度敏感的高分子链可赋予结合体温度敏感性。研究发现,这种新型的双亲性蛋白质-高分子结合体在水溶液中表现出与传统的双亲性小分子和嵌段共聚物相似的组装性能,可以自组装形成多种形貌的组装体。由于载体本身来源于生物分子,细胞毒性很小具有良好的生物相容性,因而体现出良好的应用前景,这为蛋白质组装载体进一步应用方面的研究提供了安全性的保障也为其临床转化提供了有利的条件。

[0014] 为了进一步提升纳米药物递送载体的生物相容性,蛋白质组装体为该领域提供了新的研究方向。人血清白蛋白本身的生物来源保证了该类药物载体的生物安全性,通过在其表面温和衍生生物相容性高分子疏水片段(聚乳酸、聚己内酯等),使得这类分子具有良好的两亲性能,能够通过自组装形成囊泡结构,进而包载各类分子,它还具有无毒、生物相容性好、可生物降解因易于制备与修饰,载体设计灵活,生物相容性高,结构稳定性强是其最大优势。

[0015] 继往研究中,蛋白质-高分子结合体用于构建仿细胞膜结构,模拟生物学过程,并验证了用于药物载体的可能性。现有技术还制备了牛血清白蛋白修饰聚丙烯酰胺片段经过自组装形成纳米囊泡,囊泡结构表面通过形成单宁酸-铁离子配位复合物提高了囊泡的稳定性,将此囊泡用于模拟细胞生理过程,其中负载酶进行催化反应,验证了该囊泡对小分子的通透性。但是这类载体未在表面进行修饰,最大的问题为体内稳定性差,特别容易被体内广泛存在的蛋白质酶快速降解。有研究报道,蛋白组装载体被 $50\mu\text{g mL}^{-1}$ 蛋白酶在10分钟内降解。毫无疑问,这样的脆弱的结构极大程度限制了蛋白质组装体在体内药物输送方面的潜在应用。因此,提高载体的应用性能的关键点在于提出在生理条件下改善蛋白质载体的稳定性方面。

[0016] 在简单生物体中多层细胞表面结构给予的启发,例如在革兰氏阴性细菌中,菌体表面具有由脂多糖组成的一种具有保护细菌免受侵害作用的外膜,这一结构启发本发明人在细胞外进一步包裹类似于细胞壁或者质膜结构类似的生物相容保护层,用于稳定蛋白质-高分子结合体结构,这将极大程度改善此类载体的应用能力。

发明内容

[0017] 中空蛋白质组装体用于构建纳米药物载体,虽然具有很好的应用前景,但仍面临体内稳定性不足,容易被蛋白酶清除的问题。针对这一问题,本申请提出一种在蛋白组装体表面形成几种生物相容保护层的策略,用于稳定蛋白质自组装纳米载体结构,并保证载体的生物相容性。并以靶向治疗易损斑块为实施例,验证了方法的可行性。

[0018] 在阐述本发明内容之前,定义本文中所使用的术语如下:

[0019] “蛋白质-高分子结合体”是指:蛋白质分子上原位接枝偶联生物安全的高分子片段制备出蛋白质-高分子接枝复合物,两亲性蛋白质复合物分子在生理条件下形成的自组

装形成巨型蛋白质纳米结构。

[0020] “生理条件”是指：维持生命活动正常进行所需的温度、离子强度、pH值、蛋白质、酶浓度水平、维持生命运行的生物化学反应。

[0021] “易损斑块”又称“不稳定斑块”，是指具有血栓形成倾向或极有可能快速进展成为“罪犯斑块”的动脉粥样硬化斑块，主要包括破裂斑块、侵蚀性斑块和部分钙化结节性病变。大量的研究表明，大部分的急性心肌梗死及脑卒中是由于轻、中度狭窄的易损斑块破裂，继发血栓形成所致。易损斑块的组织学表现包括活动性炎症、薄的纤维帽和大的脂质核心、内皮剥脱伴表面血小板聚集、斑块有裂隙或损伤以及严重的狭窄，以及表面钙化斑、黄色有光泽的斑块、斑块内出血和正性重构。

[0022] “与易损斑块相关的疾病”主要是指疾病的发生和发展过程中与“易损斑块”相关、以为“易损斑块”特征、由“易损斑块”引起或继发于“易损斑块”的疾病。“与易损斑块相关的疾病”主要包括动脉粥样硬化症、冠状动脉粥样硬化性心脏病（包括急性冠脉综合征、无症状心肌缺血-隐匿性冠心病、心绞痛、心肌梗死、缺血性心脏病、猝死、支架内再狭窄）、脑动脉粥样硬化症（包括脑卒中）、外周血管动脉粥样硬化症（包括闭塞性周围动脉粥样硬化、视网膜动脉粥样硬化症、颈动脉粥样硬化症、肾动脉粥样硬化症、下肢动脉粥样硬化症、上肢动脉粥样硬化症、动脉粥样硬化性阳痿）、主动脉夹层、血管瘤、血栓栓塞、心力衰竭和心源性休克等疾病。

[0023] “靶向给药系统”是指具有靶向给药能力的给药系统。在经某种途径给药以后，靶向给药系统所包含的药物会通过特殊载体或靶向弹头（例如，靶向配体）的作用特异性地富集于靶部位。目前已知的用于实现靶向给药的手段包括利用各种微粒给药系统的被动靶向性能、在微粒给药系统的表面进行化学修饰、利用一些特殊的理化性能、利用抗体介导靶向给药、利用配体介导靶向给药、利用前体药物靶向给药等。其中，利用配体介导靶向给药是利用某些器官和组织上的特定的受体可与其特异性的配体发生专一性结合的特点，将药物载体与配体结合，从而将药物导向特定的靶组织。

[0024] “透明质酸 (hyaluronic acid, 缩写为“HA”)”是一种高分子的聚合物，分子式： $(C_{14}H_{21}NO_{11})_n$ 。它是由单位D-葡萄糖醛酸及N-乙酰葡萄糖胺组成的高级多糖。D-葡萄糖醛酸及N-乙酰葡萄糖胺之间由 β -1,3-配糖键相连，双糖单位之间由 β -1,4-配糖键相连。透明质酸以其独特的分子结构和理化性质在机体内显示出多种重要的生理功能，如润滑关节，调节血管壁的通透性，调节蛋白质，水电解质扩散及运转，促进创伤愈合等。尤为重要的是，透明质酸具有特殊的保水作用，是目前发现的自然界中保湿性最好的物质。

[0025] “透明质酸的衍生物”在本文中是指任何能够保留透明质酸与易损斑块处的细胞表面上的CD44分子的特异性结合能力的透明质酸的衍生物，包括但不限于透明质酸的药学上可接受的盐、低级烷基（含有1-6个碳原子的烷基）酯、在体内能够经水解或其它方式形成透明质酸的前体药物等。判断某种物质是否是“透明质酸的衍生物”可以通过测定该物质与易损斑块处的细胞表面上的CD44分子的特异性结合能力来实现，这属于本领域技术人员的技能范围之内。

[0026] “CD44分子”是一类广泛地表达于淋巴细胞、单核细胞、内皮细胞等细胞的细胞膜上的跨膜蛋白多糖黏附分子，由胞外区段、跨膜区段和胞内区段等三个区段构成。CD44分子可介导多种细胞与细胞、细胞与细胞外基质之间的相互作用，参与体内的多种信号的传导，

从而改变细胞的生物学功能。CD44分子的主要配体是透明质酸,它与透明质酸之间的受体-配体结合决定了细胞在细胞外基质中的黏附和/或迁移。此外,CD44分子还参与透明质酸的代谢。

[0027] “约”代表在其后面给出的数值的 $\pm 5\%$ 的范围内的所有值构成的集合。

[0028] 术语“HSA”是指:人血清白蛋白。

[0029] 术语“PCL”是指:聚己内酯。

[0030] 术语“PLLA”是指:聚左旋乳酸。

[0031] 术语“EDC.HCl”是指:1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐。

[0032] 术语“sulfo-NHS”是指:N-羟基琥珀酰亚胺。

[0033] 术语“Col”是指:胶原蛋白。

[0034] 术语“PEG”是指:聚乙二醇。

[0035] 术语“SP”是指:选择蛋白。

[0036] 术语“OPN”是指:骨桥蛋白

[0037] 术语“Col”是指:胶原蛋白。

[0038] 术语“Asp”是指:阿司匹林。

[0039] 术语“Clo”是指:氯吡格雷。

[0040] 术语“At”是指:阿托伐他汀。

[0041] 术语“DXMS”是指:地塞米松。

[0042] 术语“R”是指:瑞舒伐他汀。

[0043] 术语“FDG”是指:氟代脱氧葡萄糖。

[0044] 术语“DPLA”是指:碘普罗胺。

[0045] 术语“DKSC”是指:碘克沙醇。

[0046] 术语“DFC”是指:碘氟醇。

[0047] 术语“GPA”是指:钆特酸葡胺。

[0048] 术语“GSA”是指:钆双胺。

[0049] 术语“GPS”是指:钆喷酸。

[0050] 本发明的第一方面提供了一种用于靶向活化CD44分子的双亲性蛋白质-高分子结合体纳米载体递送系统,所述双亲性蛋白质-高分子结合体为蛋白质与疏水性高分子片段通过化学键偶联形成,且所述双亲性蛋白质-高分子结合体的表面部分地被靶向配体修饰,所述靶向配体是能与活化的CD44分子特异性结合的配体。

[0051] 本发明的第二方面提供了一种用于靶向易损斑块的双亲性蛋白质-高分子结合体纳米载体递送系统,所述双亲性蛋白质-高分子结合体为蛋白质与疏水性高分子片段通过化学键偶联形成,且所述双亲性蛋白质-高分子结合体的表面部分地被靶向配体修饰,所述靶向配体是能与活化的CD44分子特异性结合的配体。

[0052] 根据第一方面或第二方面提供的递送系统,其中,所述蛋白质选自以下一种或多种:免疫球蛋白,牛血清白蛋白,人血清白蛋白、基因重组人血清白蛋白,卵白蛋白,明胶、胶原蛋白、牛奶蛋白、丝蛋白、弹性蛋白;优选为人血清白蛋白。

[0053] 根据第一方面或第二方面提供的递送系统,其中,所述高分子片段为具有生物相容性、可生物降解、安全性良好的疏水高分子片段,且所述高分子片段可由一种单体或几种

不同单体聚合而成,且所述高分子片段未被修饰改性或被修饰改性;优选地,所述高分子片段选自以下一种或多种:聚苯乙烯(PS),聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA),聚己内酯(PCL)、聚乙醇酸(PGA)、聚乳酸(包括左旋和右旋)(PLA)、聚(N-异丙基丙烯酰胺)(PNIAAm)、聚丙烯酸羟乙酯(PHEA),聚甲基丙烯酸(PMMA)、聚乙烯醇(PVA)与聚乙二醇二甲基丙烯酸酯(PEGDMA),聚四氟乙烯;更优选为聚己内酯(PCL)、聚左旋乳酸(PLLA),聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)。

[0054] 根据第一方面或第二方面提供的递送系统,其中,所述蛋白质分子上原位接枝偶联疏水性高分子片段后自组装形成双亲性蛋白质-高分子结合体;

[0055] 优选地,所述自组装条件为超声诱导两相组装。

[0056] 根据第一方面或第二方面提供的递送系统,其中,所述双亲性蛋白质-高分子结合体被天然高分子聚合物进行表面修饰,所述天然化合物为可发生自聚或和金属离子形成络合网状结构的有机层;

[0057] 优选地,所述天然化合物选自以下一种或多种:多巴胺、植酸、单宁酸、壳聚糖、海藻糖、植物多酚;更优选地,所述天然化合物多巴胺自聚合或单宁酸- Fe^{3+} 复合物。

[0058] 根据第一方面或第二方面提供的递送系统,其中,所述靶向配体选自GAG、胶原、层黏连蛋白、纤黏连蛋白、选择蛋白、骨桥蛋白以及单克隆抗体HI44a,HI313,A3D8,H90,IM7,或透明质酸或能够与易损斑块处的细胞表面上的CD44分子特异性结合的透明质酸的衍生物;

[0059] 优选地,所述靶向配体选自胶原,透明质酸,选择蛋白,骨桥蛋白或单克隆抗体HI44a,IM7。

[0060] 根据第一方面或第二方面提供的递送系统,其中,所述纳米载体表面还可以进行其他修饰,所属修饰优选为在载体表面修饰聚乙二醇、穿膜肽、自身肽中的一种或多种,或者双重配体同时修饰。

[0061] 根据第一方面或第二方面提供的递送系统,其中,所述纳米载体负载有用于诊断、预防和/或治疗与出现CD44分子活化状况相关的疾病的物质;和/或

[0062] 所述纳米载体负载有用于诊断、预防和/或治疗易损斑块或与易损斑块相关的疾病的物质;

[0063] 优选地,所述纳米载体同时负载有用于预防和/或治疗易损斑块或与易损斑块相关的疾病的物质和透明质酸或能够与易损斑块处的细胞表面上的CD44分子特异性结合的透明质酸的衍生物;

[0064] 更优选地,所述纳米载体同时负载有用于诊断易损斑块或与易损斑块相关的疾病的物质、用于预防和/或治疗易损斑块或与易损斑块相关的疾病的物质、任选的CD44活化剂和任选的透明质酸或能够与易损斑块处的细胞表面上的CD44分子特异性结合的透明质酸的衍生物。

[0065] 根据第一方面或第二方面提供的递送系统,其中,所述用于诊断、预防和/或治疗与出现CD44分子活化状况相关的疾病的物质是CD44活化剂;

[0066] 优选地,所述CD44活化剂是CD44抗体mAb或IL5、IL12、IL18、TNF- α 、LPS。

[0067] 根据第一方面或第二方面提供的递送系统,其中,所述用于诊断、预防和/或治疗易损斑块或与易损斑块相关的疾病的物质选自用于诊断、预防和/或治疗易损斑块或与易

损斑块相关的疾病的药物、多肽、核酸和细胞因子中的一种或多种。

[0068] 根据第一方面或第二方面提供的递送系统,其中,所述用于诊断、预防和/或治疗易损斑块或与易损斑块相关的疾病的物质是用于诊断易损斑块或与易损斑块相关的疾病的物质;

[0069] 更优选地,所述用于诊断易损斑块或与易损斑块相关的疾病的物质是示踪剂;

[0070] 进一步优选地,所述示踪剂选自CT示踪剂、MRI示踪剂和核素示踪剂;

[0071] 更进一步优选地:

[0072] 所述CT示踪剂选自碘纳米造影剂、金纳米造影剂、氧化钽纳米造影剂、铋纳米造影剂、钆系纳米造影剂,或其他类似结构的示踪剂;更优选为碘化造影剂或纳米金,或其他类似结构的示踪剂;进一步优选为碘海醇、碘卡酸、碘佛醇、碘克沙醇、碘普罗胺、碘比醇、碘美普尔、碘帕醇、碘昔兰、醋碘苯酸、胆影酸、碘苯扎酸、碘甘卡酸、泛影酸、碘他拉酸钠、碘苯酯、碘番酸、碘阿芬酸、醋碘苯酸钠、丙碘酮、碘奥酮、碘曲仑、碘吡多、胆影酸葡甲胺、碘他拉酸、泛影葡胺、甲泛影酸、甲泛葡铵、碘化油或乙碘油,或其他类似结构的示踪剂;优选为纳米金;

[0073] 所述MRI示踪剂选自纵向弛豫造影剂和横向弛豫造影剂;更优选为顺磁性造影剂、铁磁性造影剂和超磁性造影剂;进一步优选为Gd-DTPA及其线型、环型多胺多羧类螯合物和锰的卟啉螯合物,大分子钆螯合物、生物大分子修饰的钆螯合物、叶酸修饰的钆螯合物、树状大分子显影剂、脂质体修饰的显影剂和含钆富勒烯,或其他类似结构的示踪剂;再优选为钆喷酸葡胺、钆特酸葡胺、钆贝葡胺、钆双胺、枸橼酸铁铵泡腾颗粒、顺磁性氧化铁,优选为顺磁性氧化铁或其他类似结构的示踪剂;和/或

[0074] 所述核素示踪剂选自有碳14、碳13、磷32、硫35、碘131、氢3、镅99、氟18标记的氟代脱氧葡萄糖。

[0075] 根据第一方面或第二方面提供的递送系统,其中,所述用于诊断、预防和/或治疗易损斑块或与易损斑块相关的疾病的物质是用于预防和/或治疗易损斑块或与易损斑块相关的疾病的物质;

[0076] 优选地,所述用于预防和/或治疗易损斑块或与易损斑块相关的疾病的物质选自他汀类药物、贝特类药物、抗血小板药物、PCSK9抑制剂、抗凝药物、血管紧张素转换酶抑制剂、钙离子拮抗剂、MMPs抑制剂、 β 受体阻滞剂,糖皮质激素或其他的抗炎物质如IL-1抗体canakinumab,以及它们的药学上可接受的盐中的一种或多种,包括这些种类药物或物质的活性制剂,以及内源性的抗炎细胞因子比如白细胞介素10;

[0077] 更优选地,所述用于预防和/或治疗易损斑块或与易损斑块相关的疾病的物质选自洛伐他汀、阿托伐他汀、瑞舒伐他汀、辛伐他汀、氟伐他汀、匹伐他汀、普伐他汀,苯扎贝特、环丙贝特、氯贝特、吉非贝齐、非诺贝特、普罗布考,抗PCSK9抗体如evolocumab、alirocumab、bococizumab、RG7652、LY3015014和LGT-209,或adnectin如BMS-962476,反义RNAi寡核苷酸如ALN-PCSSc,核酸如microRNA-33a、microRNA-27a/b、microRNA-106b、microRNA-302、microRNA-758、microRNA-10b、microRNA-19b、microRNA-26、microRNA-93、microRNA-128-2、microRNA-144、microRNA-145反义链以及它们的核酸类似物如锁核酸,阿司匹林、阿西美辛、曲克芦丁、双嘧达莫、西洛他唑、盐酸噻氯匹定、奥扎格雷钠、氯吡格雷、普拉格雷、西洛他唑、贝列前素钠、替格瑞洛、坎格瑞洛、替罗非班、依替巴肽、阿昔单抗、普

通肝素、克赛、速碧林、黄达肝葵钠、华法林、达比加群、利伐沙班、阿哌沙班、依度沙班、比伐卢定、依诺肝素、替他肝素、阿地肝素、双香豆素、硝酸香豆素、枸杞酸钠、水蛭素、阿加曲班、贝那普利、卡托普利、依那普利、培多普利、福辛普利、赖诺普利、莫昔普利、西拉普利、培哌普利、喹那普利、雷米普利、群多普利、坎地沙坦、依普罗沙坦、厄贝沙坦、氯沙坦、替米沙坦、缬沙坦、奥美沙坦、他索沙坦、硝苯地平、尼卡地平、尼群地平、氨氯地平、尼莫地平、尼索地平、尼伐地平、伊拉地平、非洛地平、拉西地平、地尔硫卓、维拉帕米、氯己定、米诺环素、MMI-166、美托洛尔、阿替洛尔、比索洛尔、普萘洛尔、卡维地络、巴马司他、马立马司他、普淋司他、BMS-279251、BAY 12-9566、TAA211、AAJ996A、nacetrapi b、evacetrapi b、Torcetrapi b和Dalcetrapi b,泼尼松、甲泼尼松、倍他米松、丙酸倍氯米松、得宝松、泼尼松龙、氢化可的松、地塞米松或其他抗炎物质如IL-1抗体canakinumab,以及它们的药效片段或药学上可接受的盐中的一种或多种,以及它们的药学上可接受的盐中的一种或多种,包括这些种类药物的活性结构片段,以及内源性的抗炎细胞因子比如白细胞介素10。

[0078] 本发明的第三方面提供了第一方面或第二方面的递送系统的制备方法,所述方法包括以下步骤:

[0079] (1) 偶联蛋白质与疏水性高分子片段,制得蛋白质-疏水性高分子复合物;

[0080] (2) 步骤(1)制得的蛋白质-疏水性高分子复合物自组装制得双亲性蛋白质-高分子结合体;

[0081] (3) 对步骤(2)制得的双亲性蛋白质-高分子结合体偶联靶向配体。

[0082] 根据本发明第三方面的方法,其中,所述步骤(2)中,所述自组装步骤还包括药物包载过程。

[0083] 本发明的第四方面提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含第一方面或第二方面的纳米载体递送系统。

[0084] 本发明的第五方面提供了一种诊断制剂,所述诊断制剂包含第一方面或第二方面的纳米载体递送系统。

[0085] 本发明的第六方面提供了第一方面或第二方面的纳米载体递送系统在制备用于易损斑块或与易损斑块相关的疾病的诊断、预防和治疗的产品中的应用。

[0086] 根据本发明第六方面的应用,其中,所述易损斑块选自破裂斑块、侵蚀性斑块和部分钙化结节性病变中的一种或多种;

[0087] 更优选地,所述与易损斑块相关的疾病选自以下一种或多种:动脉粥样硬化症、冠状动脉粥样硬化性心脏病、脑动脉粥样硬化症、外周血管动脉粥样硬化症、主动脉夹层、血管瘤、血栓栓塞、心力衰竭和心源性休克;

[0088] 优选地,所述冠状动脉粥样硬化性心脏病选自以下一种或多种:急性冠脉综合征、无症状心肌缺血-隐匿性冠心病、心绞痛、心肌梗死、缺血性心脏病、猝死、支架内再狭窄;

[0089] 所述脑动脉粥样硬化症为脑卒中;和/或

[0090] 所述外周血管动脉粥样硬化症选自以下一种或多种:颈动脉粥样硬化症、闭塞性周围动脉粥样硬化、视网膜动脉粥样硬化症、肾动脉粥样硬化症、下肢动脉粥样硬化症、上肢动脉粥样硬化症、动脉粥样硬化性阳痿。

[0091] 近年来,人血清白蛋白作为一种新型的生物材料,因其良好的生物相容性、精确的几何结构,且易于功能化,对药物具有很高结合性,形成的血清白蛋白纳米粒可以高效率的

负载药物。利用血清白蛋白纳米粒表面的功能基团如氨基和羧基可以用来偶联药物和靶向配体。这些优势使其在纳米医药领域受到越来越多的关注。本申请选用人血清白蛋白(HSA)作为基材,从分子设计角度,通过表面引发自由基聚合反应,在蛋白质分子上原位接枝偶联生物安全的高分子片段(聚己内酯、聚乳酸),制备出多种新型的蛋白质-高分子接枝复合物,这些蛋白质-高分子结合体可在生理条件下可形成自组装蛋白质纳米结构(proteinosomes,ProS)用于负载药物。本申请立足于改善这种组装型蛋白质纳米载体的体内稳定性,提出在其表面进一步形成生物相容保护层(聚多巴胺,植酸/稀土离子复合物),提高所得到的自组装纳米结构稳定性,赋予其良好的生物相容性、结构多样性、易功能化等优势。通过将该载体与不同靶分子偶联,实现了该类药物载体在易损斑块治疗领域的应用。通过一系列实验过程,验证了ProS纳米载体的药物/基因递送能力及治疗和显影效果。

[0092] 本发明通过在人血清蛋白表面偶联疏水高分子片段,构建蛋白质自组装结构,用于负载药物和生物分子,通过利用多巴胺在其表面原位聚合、或通过形成配位金属复合物结构加固囊泡结构,进一步在其表面偶联单重或多重配体,靶向识别活化CD44进而对易损斑块进行诊断和治疗。

[0093] 在PorS纳米载体中,蛋白质-高分子结合体可通过偶联疏水高分子片段进行水相组装,进一步在其表面修饰生物相容的复合界面,一方面可以有效提高载体的体内稳定性,增加体内循环时间,避免蛋白质载体被体内蛋白质酶的快速降解。此外,纳米载体表面丰富的官能团结构也非常便于连接靶向载体。该ProS结构具有结构稳定性强,生物相容性好、安全性高的优势,是一类具有重要应用价值纳米药物载体。

[0094] 总而言之,本发明涉及如下方面:

[0095] 本发明提供了一种用于靶向靶向活化的CD44分子的蛋白质-高分子结合体纳米载体递送系统。

[0096] 本发明提供了一种用于靶向易损斑块的蛋白质-高分子结合体纳米载体递送系统。

[0097] 本发明提供了多种提高蛋白质-高分子结合体纳米载体递送系统体内稳定性的表面修饰策略。

[0098] 本发明还提供了一种用于制备本发明所述的靶向易损斑块的蛋白质-高分子结合体递送系统的方法。

[0099] 本发明还提供了一种药物,其包含本发明所述的靶向易损斑块的蛋白质-高分子结合体递送系统和药学上可接受的载体。

[0100] 本发明还提供了一种诊断制剂,其包含本发明所述的靶向易损斑块的蛋白质-高分子结合体递送系统。

[0101] 本发明还提供了本发明所述的靶向易损斑块的蛋白质-高分子结合体在制备用于预防和/或治疗易损斑块或与易损斑块相关的疾病的药物中的用途。

[0102] 本发明还提供了本发明所述的靶向易损斑块的蛋白质-高分子结合体在制备用于诊断易损斑块或与易损斑块相关的疾病的诊断制剂中的用途。

[0103] 本发明还提供了一种用于预防和/或治疗易损斑块或与易损斑块相关的疾病的方法,所述方法包括向需要其的对象施用本发明所述的靶向易损斑块的蛋白质-高分子结合体。

[0104] 本发明还提供了一种用于诊断易损斑块或与易损斑块相关的疾病的方法,所述方法包括向需要其的对象施用本发明所述的靶向易损斑块的蛋白质-高分子结合体。

[0105] 本发明技术方案的具体实施方式及其含义将在下文中进行详细说明。

[0106] 本发明提供了一种用于靶向活化的CD44分子的蛋白质-高分子结合体递送系统,所述蛋白质-高分子结合体的表面部分地被靶向配体修饰,所述靶向配体是能与活化的CD44分子特异性结合的配体。

[0107] 本发明提供了一种用于靶向易损斑块的蛋白质-高分子结合体递送系统,所述蛋白质-高分子结合体的表面部分地被靶向配体修饰,所述靶向配体是能与易损斑块处的细胞表面上的CD44分子特异性结合的配体。

[0108] 蛋白质-高分子结合体表面还可以进行其他修饰,起到更好的效果。在载体表面修饰PEG,可以起到长循环的效果,延长药物的半衰期;在载体表面修饰PEG,穿膜肽Tat,自身肽SEP,或者双重配体同时修饰,都可以起到放大药效的作用。

[0109] 根据本发明的递送系统,其中,所述蛋白质-高分子结合体选自人血清白蛋白与聚左旋乳酸(PLLA)、聚己内酯(PCL),聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)等一系列生物相容性良好的疏水性高分子片段,通过化学键偶联形成两亲蛋白质-高分子结合体(proteinsomes,ProS)。

[0110] 根据本发明第一方面或第二方面的蛋白质-高分子结合体,其中,所述蛋白质-高分子结合体被天然高分子聚合物进行表面修饰,所述天然高分子选自多巴胺、植酸、单宁酸等可发生自聚或和金属离子形成络合网状结构的有机层。

[0111] 根据本发明的蛋白质-高分子结合体递送系统,其中,所述靶向配体选自GAG、胶原、层黏连蛋白、纤黏连蛋白、选择蛋白、骨桥蛋白(OPN)以及单克隆抗体HI44a,HI313,A3D8,H90,IM7,或透明质酸或能够与易损斑块处的细胞表面上的CD44分子特异性结合的透明质酸的衍生物;

[0112] 优选地,所述靶向配体选自胶原,透明质酸,选择蛋白,骨桥蛋白或单克隆抗体HI44a,IM7。

[0113] 根据本发明的纳米载体递送系统,其中,所述纳米载体负载有用于诊断、预防和/或治疗与出现CD44分子活化状况相关的疾病的物质。

[0114] 根据本发明的蛋白质-高分子结合体,其中,所述纳米载体负载有用于诊断、预防和/或治疗易损斑块或与易损斑块相关的疾病的物质;

[0115] 在一个实施方案中,所述物质是用于诊断易损斑块或与易损斑块相关的疾病的物质;

[0116] 在一个实施方案中,所述用于诊断易损斑块或与易损斑块相关的疾病的物质是示踪剂;

[0117] 在一个实施方案中,所述示踪剂选自CT示踪剂,MRI示踪剂和核素示踪剂;

[0118] 在一个实施方案中,所述CT示踪剂选自碘纳米造影剂、金纳米造影剂、氧化钽纳米造影剂、铋纳米造影剂、镧系纳米造影剂,或其他类似结构的示踪剂;更优选为碘化造影剂或纳米金,或其他类似结构的示踪剂;进一步优选为碘海醇、碘卡酸、碘佛醇、碘克沙醇、碘普罗胺、碘比醇、碘美普尔、碘帕醇、碘昔兰、醋碘苯酸、胆影酸、碘苯扎酸、碘甘卡酸、泛影酸、碘他拉酸钠、碘苯酯、碘番酸、碘阿芬酸、醋碘苯酸钠、丙碘酮、碘奥酮、碘曲仑、碘吡多、

胆影酸葡甲胺、碘他拉酸、泛影葡胺、甲泛影酸、甲泛葡铵、碘化油或乙碘油,或其他类似结构的示踪剂,优选为纳米金;和/或

[0119] 所述MRI示踪剂选自纵向弛豫造影剂和横向弛豫造影剂;更优选为顺磁性造影剂、铁磁性造影剂和超磁性造影剂;进一步优选为Gd-DTPA及其线型、环型多胺多羧类螯合物和锰的卟啉螯合物,大分子钆螯合物、生物大分子修饰的钆螯合物、叶酸修饰的钆螯合物、树状大分子显影剂、脂质体修饰的显影剂和含钆富勒烯,或其他类似结构的示踪剂;再优选为钆喷酸葡胺、钆特酸葡胺、钆贝葡胺、钆双胺、枸橼酸铁铵泡腾颗粒、顺磁性氧化铁($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$),或其他类似结构的示踪剂,优选为 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$;

[0120] 所述核素示踪剂选自有碳14 (^{14}C)、碳13 (^{13}C)、磷32 (^{32}P)、硫35 (^{35}S)、碘131 (^{131}I)、氢3 (^3H)、锝99 (^{99}Tc)、氟18 (^{18}F) 标记的氟代脱氧葡萄糖。

[0121] 在一个实施方案中,所述物质是用于诊断、预防和/或治疗易损斑块或与易损斑块相关的疾病的药物、多肽、核酸和细胞因子中的一种或多种。

[0122] 在一个实施方案中,所述物质是CD44活化剂;

[0123] 在一个实施方案中,所述CD44活化剂是CD44抗体mAb或IL5、IL12、IL18、TNF- α 、LPS。

[0124] 在一个实施方案中,所述物质是透明质酸或能够与易损斑块处的细胞表面上的CD44分子特异性结合的透明质酸的衍生物;

[0125] 优选地,所述小分子透明质酸或能够与易损斑块处的细胞表面上的CD44分子特异性结合的透明质酸的衍生物分子量范围为1-500KDa,优选为1-20KDa,更优选为2-10KDa。

[0126] 在一个实施方案中,所述纳米载体同时负载有用于诊断、预防和/或治疗易损斑块或与易损斑块相关的疾病的物质和CD44活化剂;

[0127] 优选地,所述纳米载体同时负载有用于预防和/或治疗易损斑块或与易损斑块相关的疾病的物质和透明质酸或能够与易损斑块处的细胞表面上的CD44分子特异性结合的透明质酸的衍生物;

[0128] 更优选地,所述纳米载体同时负载有用于诊断易损斑块或与易损斑块相关的疾病的物质、用于预防和/或治疗易损斑块或与易损斑块相关的疾病的物质、任选的CD44活化剂和任选的透明质酸或能够与易损斑块处的细胞表面上的CD44分子特异性结合的透明质酸的衍生物。

[0129] 在一个实施方案中,所述物质是用于预防和/或治疗易损斑块或与易损斑块相关的疾病的物质;

[0130] 优选地,所述用于预防和/或治疗易损斑块或与易损斑块相关的疾病的物质选自他汀类药物、贝特类药物、抗血小板药物、PCSK9抑制剂、抗凝药物、血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)、钙离子拮抗剂、MMPs抑制剂、 β 受体阻滞剂,糖皮质激素或其他的抗炎物质如IL-1抗体canakinumab,以及它们的药学上可接受的盐中的一种或多种,包括这些种类药物或物质的活性制剂,以及内源性的抗炎细胞因子比如白细胞介素10(IL-10);

[0131] 更优选地,所述用于预防和/或治疗易损斑块或与易损斑块相关的疾病的物质选自洛伐他汀、阿托伐他汀、瑞舒伐他汀、辛伐他汀、氟伐他汀、匹伐他汀、普伐他汀,苯扎贝特、环丙贝特、氯贝特、吉非贝齐、非诺贝特、普罗布考,抗PCSK9抗体如evolocumab、alirocumab、bococizumab、RG7652、LY3015014和LGT-209,或adnectin如BMS-962476,反义

RNAi寡核苷酸如ALN-PCSsc,核酸如microRNA-33a、microRNA-27a/b、microRNA-106b、microRNA-302、microRNA-758、microRNA-10b、microRNA-19b、microRNA-26、microRNA-93、microRNA-128-2、microRNA-144、microRNA-145反义链以及它们的核酸类似物如锁核酸,阿司匹林、阿西美辛、曲克芦丁、双嘧达莫、西洛他唑、盐酸噻氯匹定、奥扎格雷钠、氯吡格雷、普拉格雷、西洛他唑、贝列前素钠、替格瑞洛、坎格瑞洛、替罗非班、依替巴肽、阿昔单抗、普通肝素、克赛、速碧林、黄达肝葵钠、华法林、达比加群、利伐沙班、阿哌沙班、依度沙班、比伐卢定、依诺肝素、替他肝素、阿地肝素、双香豆素、硝酸香豆素、枸杞酸钠、水蛭素、阿加曲班,贝那普利、卡托普利、依那普利、培多普利、福辛普利、赖诺普利、莫昔普利、西拉普利、培哌普利、喹那普利、雷米普利、群多普利、坎地沙坦,依普罗沙坦、厄贝沙坦、氯沙坦、替米沙坦、缬沙坦、奥美沙坦、他索沙坦、硝苯地平、尼卡地平、尼群地平、氨氯地平、尼莫地平、尼索地平、尼伐地平、伊拉地平、非洛地平、拉西地平、地尔硫卓、维拉帕米、氯己定、米诺环素、MMI-166、美托洛尔、阿替洛尔、比索洛尔、普萘洛尔、卡维地尔、巴马司他、马立马司他、普淋司他、BMS-279251、BAY 12-9566、TAA211、AAJ996A、nacetrapi、evacetrapi、Torcetrapi和Dalcetrapi,泼尼松、甲泼尼松、倍他米松、丙酸倍氯米松、得宝松、泼尼松龙、氢化可的松、地塞米松或其他的抗炎物质如IL-1抗体canakinumab),以及它们的药效片段或药学上可接受的盐中的一种或多种,以及它们的药学上可接受的盐中的一种或多种,包括这些种类药物的活性结构片段,以及内源性的抗炎细胞因子比如白细胞介素10(IL-10)。

[0132] 本发明还提供了一种用于制备用于靶向易损斑块的递送系统的方法,所述方法包括以下步骤:

[0133] 具体研究内容如下:

[0134] (1) 蛋白质-高分子结合体:HSA-聚己内酯(PCL)、HSA-聚左旋乳酸(PLLA),HSA-聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)结合体的合成与结构性能表征。合成了端基马来酰亚胺化的PCL,PLLA,PLGA并利用马来酰亚胺与HSA的自由巯基之间的偶联反应,制备出两亲HSA-PCL、HSA-PLLA。通过红外光谱(FT-IR)验证了HSA-PCL、HSA-PLLA复合物结构,结果表明HSA-PCL、HSA-PLLA,HSA-PLGA在水中可以组装得到不同形貌的纳米组装体,利用透射电子显微镜(TEM)和动态光散射(DLS)等进一步表征了HSA-PCL、HSA-PLLA,HSA-PLGA的组装性能。

[0135] (2) 基于HSA-PCL、HSA-PLLA,HSA-PLGA结合体的纳米靶向药物载体(Proteinsomes,ProS)的构建。利用制备的双亲性HSA-PCL、HSA-PLA结合体的自组装性能,构建了包载各种药物的ProS纳米载体。为了提高纳米载体的稳定性,采取不同的界面修饰策略:①在其表面原位聚合聚多巴胺包裹ProS,极大提高了载体的体内稳定性,聚多巴胺不仅具有很高的生物安全性,还提供丰富的官能团便于下一步偶联靶向配体,通过偶联各种配体验证了纳米载体体外性能。采用细胞和动物模型对构建的ProS纳米载体的细胞内吞和细胞毒性进行了评估。②在其表面原位形成植酸和稀土离子的配位复合物包裹ProS,极大提高了载体的体内稳定性,植酸-稀土离子配位复合物(PA-Re^{nt})不仅具有很高的生物安全性,还有利于下一步偶联靶向配体,通过偶联各种配体验证了纳米载体体外稳定性和药物释放性能。采用细胞和动物模型对构建的靶向ProS纳米载体的细胞内吞和细胞毒性进行了评估。结果表明,相比于未修饰的ProS,经多巴胺包被和配体修饰的ProS具有更好的治疗效果。MTT结果表明,制备的ProS纳米载体具有很低的细胞毒性和较好的生物相容性。包载药物后,靶向修饰的ProS纳米载体对易损斑块的生长都具有明显的抑制效果。

[0136] 本发明提供了一种药物,所述药物包含所述蛋白质-高分子结合体递送系统以及药学上可接受的载体。

[0137] 本发明提供了一种诊断制剂,所述诊断制剂包含所述蛋白质-高分子结合体递送系统。

[0138] 本发明提供了上述蛋白质-高分子结合体递送系统、药物、诊断制剂在制备用于预防和/或治疗与出现CD44分子活化状况相关的疾病的药物中的用途。

[0139] 本发明提供了上述蛋白质-高分子结合体递送系统、药物、诊断制剂在制备用于预防和/或治疗与易损斑块或与易损斑块相关的疾病的药物和/或诊断制剂中的用途。

[0140] 优选地,所述易损斑块选自破裂斑块、侵蚀性斑块和部分钙化结节性病变中的一种或多种;

[0141] 优选地,所述与易损斑块相关的疾病选自动脉粥样硬化症、冠状动脉粥样硬化性心脏病(包括急性冠脉综合征、无症状心肌缺血-隐匿性冠心病、心绞痛、心肌梗死、缺血性心脏病、猝死、支架内再狭窄)、脑动脉粥样硬化症(包括脑卒中)、外周血管动脉粥样硬化症(包括闭塞性周围动脉粥样硬化、视网膜动脉粥样硬化症、颈动脉粥样硬化症、肾动脉粥样硬化症、下肢动脉粥样硬化症、上肢动脉粥样硬化症、动脉粥样硬化性阳痿)、主动脉夹层、血管瘤、血栓栓塞、心力衰竭和心源性休克中的一种或多种。

[0142] 本发明提供了一种用于预防和/或治疗与出现CD44分子活化状况相关的疾病的方法,所述方法包括:对有需要的受试者给予上述蛋白质-高分子结合体递送系统、药物、诊断制剂。

[0143] 本发明还提供了一种用于预防、诊断和/或治疗易损斑块或与易损斑块相关的疾病的方法,所述方法包括:对有需要的受试者给予上述蛋白质-高分子结合体递送系统、药物、诊断制剂。

[0144] 优选地,所述易损斑块选自破裂斑块、侵蚀性斑块和部分钙化结节性病变中的一种或多种。

[0145] 更优选地,所述与易损斑块相关的疾病选自动脉粥样硬化症、冠状动脉粥样硬化性心脏病(包括急性冠脉综合征、无症状心肌缺血-隐匿性冠心病、心绞痛、心肌梗死、缺血性心脏病、猝死、支架内再狭窄)、脑动脉粥样硬化症(包括脑卒中)、外周血管动脉粥样硬化症(包括闭塞性周围动脉粥样硬化、视网膜动脉粥样硬化症、颈动脉粥样硬化症、肾动脉粥样硬化症、下肢动脉粥样硬化症、上肢动脉粥样硬化症、动脉粥样硬化性阳痿)、主动脉夹层、血管瘤、血栓栓塞、心力衰竭和心源性休克中的一种或多种。

[0146] 本发明还提供了一种用于诊断与出现CD44分子活化状况相关的疾病的方法,所述方法包括包括:对有需要的受试者给予第一方面或第二方面所述的纳米载体递送系统、第四方面所述的药物、或第五方面所述的诊断制剂。

[0147] 本发明的蛋白质-高分子结合体纳米载体递送系统可以具有但不限于以下有益效果:

[0148] 纳米粒子和纳米复合材料在生物医学治疗与诊断领域具有巨大的发展潜力。以蛋白质作为极性端基,疏水性高分子作为尾巴形成的巨型两性分子,在结构和性能方面与传统的表面活性剂和双亲性嵌段共聚物具有相似性,可以在溶液中实现自组装,其组装体在药物载体和纳米反应器具有潜在的应用前景。基于生物分子的纳米药物载体较无机纳米材

料具有更好的生物相容性、安全性、可代谢性,这也为有机纳米材料的临床转化提供了有利的条件。本发明设计的ProS自组装结构具有生物相容性好、载药量高,安全性好、稳定性强的优势,是一类具有重要应用价值纳米药物载体。

附图说明

[0149] 以下,结合附图来详细说明本发明的实施方案,其中:

[0150] 图1示出了实施例1中人血清白蛋白和高分子复合物的红外光谱。

[0151] 图2示出了实施例2中HSA-PCL结合体的透射电镜结果。

[0152] 图3示出了实施例2中空白HSA-PCL、HSA-PCL (R) 和HSA-PCL (R) @HA靶向纳米药物的红外光谱。

[0153] 图4示出了实施例3中HSA-PLLA结合体的透射电镜结果。

[0154] 图5示出了实施例3中HSA-PLLA、未连接HA的纳米载体HSA-PLLA (At) 和靶向纳米载体HSA-PLLA (At) @SP/PEG的红外光谱。

[0155] 图6示出了实施例4中HSA-PLLA结合体的透射电镜结果。

[0156] 图7示出了实施例4中未连接靶向配体的纳米载体HSA-PLGA (R) 和靶向纳米载体HSA-PLGA (R) @HA/Tat的红外光谱。

[0157] 图8示出了实施例5中未连接靶向配体的纳米载体HSA-PCL (R) 和靶向纳米载体HSA-PCL (R) @HA/PEG的红外光谱。

[0158] 图9示出了实施例6中未连接靶向配体的纳米载体HSA-PLLA (At) 和靶向纳米载体HSA-PLLA (At) @IM7的红外光谱。

[0159] 图10示出了实施例7中靶向载药纳米载体HSA-PCL (At/miRNA) @SEP的红外光谱。

[0160] 图11示出了实施例8中HSA-PLLA (AuNP/R) @OPN/PEG的TEM结果。

[0161] 图12示出了实施例9中HSA-PLGA (Fe₃O₄/DXMS) @HI44a的红外光谱。

[0162] 图13示出了实施例10中HSA-PCL (Asp/C1o) 和HSA-PCL (Asp/C1o) @Co1/PEG的红外光谱。

[0163] 图14示出了试验例1中不同时间保存时间对水合粒径的影响。

[0164] 图15示出了试验例1中不同保存时间对包封率的影响。

[0165] 图16示出了试验例1中纳米递送系统的体外累积释放率(CRP%)。

[0166] 图17示出了本发明试验例2的HSA-PCL (R) @HA, HSA-PLLA (At) @SP/PEG, HSA-PLGA (R) @HA/Tat, HSA-PCL (At) @HA/PEG, HSA-PLLA (At) @IM7, HSA-PCL (At/miRNA) @SEP纳米递送系统对模型小鼠的颈动脉易损斑块的治疗效果图。

[0167] 图18示出了本发明试验例3中HSA-PLLA (AuNP/R) @OPN/PEG及其他CT示踪剂纳米递送系统对模型小鼠的颈动脉易损斑块的体内示踪效果图。

[0168] 图19示出了本发明试验例3中HSA-PLLA (AuNP/R) @OPN/PEG纳米递送系统对模型小鼠的颈动脉易损斑块的治疗效果图。

[0169] 图20示出了本发明试验例4中HSA-PLGA (Fe₃O₄/DXMS) @HI44a及其他MRI示踪剂纳米递送系统对模型小鼠的颈动脉易损斑块的体内示踪效果图。

[0170] 图21示出了试验例4中HSA-PLGA (Fe₃O₄/DXMS) @HI44a纳米递送系统对模型小鼠的颈动脉易损斑块的治疗效果图。

[0171] 图22示出了试验例5中HSA-PCL (Asp/ClO)@Co1/PEG纳米递送系统对模型小鼠动脉易损斑块破裂的治疗效果图。

具体实施方式

[0172] 下面通过具体的实施例进一步说明本发明,但是,应当理解为,这些实施例仅仅是用于更详细具体地说明之用,而不应理解为用于以任何形式限制本发明。

[0173] 本部分对本发明试验中所使用到的材料以及试验方法进行一般性的描述。虽然为实现本发明目的所使用的许多材料和操作方法是本领域公知的,但是本发明仍然在此作尽可能详细描述。本领域技术人员清楚,在上下文中,如果未特别说明,本发明所用材料和操作方法是本领域公知的。

[0174] 以下实施例中使用的试剂和仪器如下:

[0175] 试剂:HA购于浙江东源生物技术有限公司,HSA,4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯(氨基巯基偶联剂,SMCC),1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC.HCl),N-羟基琥珀酰亚胺购于索莱宝生物技术有限公司。氨基化聚乙二醇(PEG-NH₂分子量1000)氨基化PLGA(PLGA-NH₂分子量1000),氨基化PCL(PCL-NH₂分子量1000),氨基化PLLA(PLLA-NH₂分子量1000)购于西安瑞禧生物技术有限公司,FeCl₃,6-巯基己醇,DMSO,单宁酸,氯仿,氯金酸,NaBH₄,硫辛酸,盐酸多巴胺购于百灵威试剂公司。瑞舒伐他汀(R)阿托伐他汀(At),阿司匹林(Asp),氯吡格雷(ClO),地塞米松(DXMS)购于中国药品生物制品检定所。

[0176] 选择蛋白SP,穿膜肽(Tat),自身肽(SEP),单克隆抗体IM7,骨桥蛋白(OPN),PBS,三氯化铁(FeCl₃),HI44a,胶原蛋白(Co1)购自Sigma-Aldrich,百灵威以及国药集团北京化学试剂公司.miRNA-33于上海生工生物技术公司订制合成。

[0177] 仪器:

[0178] 扫描电子显微镜,购自德国蔡司、型号:EV018

[0179] 激光粒度仪,购自英国马尔文智能激光粒度仪、型号Zetasizer Nano ZS透射电子显微镜,JEOL-2100高分辨透射电子显微镜

[0180] 红外光谱仪:赛默飞世尔科技傅立叶变换近红外光谱仪,型号Antaris II FT-NIR分析仪

[0181] 实施例1制备3种人血清白蛋白-高分子复合物

[0182] 1.1还原人血清白蛋白(rHSA)的制备

[0183] 在三口烧瓶中加入浓度为1mg/mL的HSA的磷酸盐缓冲溶液(PBS缓冲液(pH=8.3, 0.1M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 1mM乙二胺四乙酸(EDTA)),在磁力搅拌下进行抽真空-充氮气三个循环对体系进行除氧,在氮气保护下加入5倍过量于HSA的KBH₄粉末,反应四个小时,超滤管纯化,冻干,得到rHSA,并在-20℃下保存。

[0184] 1.2人血清白蛋白-聚己内酯(HSA-PCL)复合物的制备

[0185] 利用双功能偶联剂SMCC实现PCL-NH₂与rHSA的偶联,将PCL的氨基与rHSA上的巯基实现偶联,具体方法如下:在充氮气的三口烧瓶中加入1mg/mL rHSA的PBS缓冲液(pH=6.8, 0.1M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 1mM EDTA),磁力搅拌下,滴加的PCL-NH₂和SMCC的DMF溶液(PCL-NH₂和SMCC的摩尔比为1:10)。反应过夜,将反应体系置于1L的DMF中透析,透析袋的截留分子量

为 $M_w = 35\ 000$ 。24小时后,透析液换成1升除氧的去离子水,继续透析24小时。冻干,得到HSA-PCL结合体,-20℃下冻干保存。

[0186] 1.3人血清白蛋白-聚左旋乳酸(HSA-PLLA)复合物的制备

[0187] 利用双功能偶联剂SMCC实现PLLA-NH₂与rHSA的偶联,将PLLA-NH₂的氨基与rHSA上的巯基实现偶联,具体方法如下:在充氮气的三口烧瓶中加入1mg/mL rHSA的PBS缓冲液(pH=6.8,0.1M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄,1mM EDTA),磁力搅拌下,滴加的PLLA-NH₂和SMCC的DMF溶液(PLLA-NH₂和SMCC的摩尔比为1:10)。反应过夜,将反应体系置于1L的DMF中透析,透析袋的截留分子量为 $M_w = 35\ 000$ 。24小时后,透析液换成1升除氧的去离子水,继续透析24小时。冻干,得到HSA-PLLA复合物,-20℃下冻干保存。

[0188] 1.4人血清白蛋白-聚乳酸-羟基乙酸复合物的制备(HSA-PLGA)

[0189] 利用双功能偶联剂SMCC实现PLGA-NH₂与rHSA的偶联,将PLGA-NH₂的氨基与rHSA上的巯基实现偶联,具体方法如下:在充氮气的三口烧瓶中加入1mg/mL rHSA的PBS缓冲液(pH=6.8,0.1M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄,1mM EDTA),磁力搅拌下,滴加的PLGA-NH₂和SMCC的DMF溶液(PLGA-NH₂和SMCC的摩尔比为1:10)。反应过夜,将反应体系置于1L的DMF中透析,透析袋的截留分子量为 $M_w = 35\ 000$ 。24小时后,透析液换成1升除氧的去离子水,继续透析24小时。冻干,得到HSA-PLGA,-20℃下冻干保存。图1示出了人血清白蛋白和聚合物复合物的红外光谱。

[0190] 实施例2靶向连接透明质酸(HA)、负载瑞舒伐他汀(R)的HSA-PCL结合体(HSA-PCL(R)@HA)的制备

[0191] 2.1未载药HSA-PCL结合体的制备

[0192] 空白HSA-PCL自组装体通过乳化-溶剂蒸发法制备得到,具体操作如下:称取20毫克HSA-PCL结合体溶解在8毫升去离子水中,将溶液置于冰浴中。在探头式超声波发生器作用下,用注射器匀速注入4毫升二氯甲烷,超声时间为5分钟,超声功率为150W。超声结束,将得到的乳液在30℃下通过旋转蒸发器进行旋蒸30分钟,除去有机相,转速为80转/分钟。待二氯甲烷完全挥发,得到HSA-PCL结合体的组装体溶液,并通过透射电镜对组装体的形貌进行表征。图2示出了HSA-PCL结合体的透射电镜结果。

[0193] 2.2负载瑞舒伐他汀(R)的HSA-PCL结合体HSA-PCL(HSA-PCL(R))的制备

[0194] 称取20毫克HSA-PCL结合体溶解在8毫升去离子水中,将溶液置于冰浴中。将5mg瑞舒伐他汀(R)溶解于5mL DMSO。在探头式超声波发生器作用下,用注射器匀速注入上述DMSO溶液,超声时间为5分钟,超声功率为150W。超声结束,得到乳白色溶液。

[0195] 2.3靶向连接透明质酸(HA)、负载瑞舒伐他汀(R)的HSA-PCL结合体(HSA-PCL(R)@HA)的制备

[0196] 将上述得到的HSA-PCL(R)乳液,中加入1mL 10mM单宁酸溶液和1mL 0.1M的Tris-HCl缓冲溶液(pH8.0),搅拌30分钟后逐滴加入0.5mL 1mM的FeCl₃溶液,通过在HSA-PCL(R)表面形成络合物网络结构(TA-Fe³⁺),从而加固载体,反应2小时后,离心除去未反应PDA,得到纯化的HSA-PCL(R)。

[0197] 将1g透明质酸HA(分子量为约40KDa)充分溶解于超纯水中,加入0.1g 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC.HCl)和0.12g N-羟基琥珀酰亚胺(sulfo-NHS)偶联剂活化羧基。在室温搅拌反应1小时后,加入无水乙醇沉淀活化的HA。将沉淀过滤、用乙

醇洗涤并真空干燥,得到活化的HA。将其配置成为 0.1mg mL^{-1} 的水溶液,吸取 0.2mL 溶液溶于纯化的HSA-PCL (R) 溶液实现HA在HSA-PCL (R) 上的偶联。超滤浓缩,冻干除去有机相,得到靶向识别纳米载体HSA-PCL (R) @HA。图3为空白HSA-PCL、HSA-PCL (R) 和HSA-PCL (R) @HA靶向纳米药物的红外光谱。

[0198] 实施例3同时修饰选择蛋白(SP)和聚乙二醇(PEG)、负载阿托伐他汀(At)的HSA-PLLA结合体(HSA-PLLA(At)@SP/PEG)的制备

[0199] 3.1未载药HSA-PLLA结合体的制备

[0200] 空白HSA-PLLA自组装体通过乳化-溶剂蒸发法制备得到,具体操作如下:称取20毫克HSA-PCL结合体溶解在8毫升去离子水中,将溶液置于冰浴中。在探头式超声波发生器作用下,用注射器匀速注入4毫升二氯甲烷,超声时间为5分钟,超声功率为150W。超声结束,将得到的乳液在 30°C 下通过旋转蒸发仪进行旋蒸30分钟,除去有机相,转速为80转/分钟。待二氯甲烷完全挥发,得到HSA-PLLA结合体的组装体溶液,并通过透射电镜对组装体的形貌进行表征。图4示出了HSA-PLLA结合体的透射电镜结果。

[0201] 3.2负载阿托伐他汀(At)的HSA-PLLA结合体HSA-PLLA(HSA-PLLA(At))的制备

[0202] 称取20毫克HSA-PLLA结合体溶解在8毫升去离子水中,将溶液置于冰浴中。将5mg阿托伐他汀(At)溶解于5mL DMSO。在探头式超声波发生器作用下,用注射器匀速注入上述DMSO溶液,超声时间为5分钟,超声功率为150W。超声结束,得到乳白色溶液。

[0203] 3.3同时连接选择蛋白(SP)和聚乙二醇(PEG)、负载阿托伐他汀(At)的HSA-PLLA结合体(HSA-PLLA(At)@SP/PEG)的制备

[0204] 将上述得到的HSA-PLLA(At)乳液,中加入10mg盐酸多巴胺,并将pH调到9.5,通过多巴胺自聚合反应在HSA-PLLA(At)表面形成聚多巴胺(PDA)层,从而加固载体,反应1小时后,加入2mg PEG-NH₂继续反应1小时。离心除去未反应PDA和PEG-NH₂,得到纯化的HSA-PLLA(At)@PEG。

[0205] 将1mg选择蛋白SP充分溶解于PBS缓冲溶液中,加入0.5mg EDC.HCl和0.5mg sulfon-NHS偶联剂活化羧基。在室温搅拌反应1小时后,将其配置成为 1mg mL^{-1} 的SP水溶液。加入上述纯化的HSA-PLLA(At)@PEG溶液实现SP在HSA-PLLA(At)@PEG上的偶联,超滤浓缩,冻干除去有机相,得到靶向识别纳米载体HSA-PLLA(At)@SP/PEG。图5为未连接HA的纳米载体HSA-PLLA(At)和靶向纳米载体HSA-PLLA(At)@SP/PEG的红外光谱。

[0206] 实施例4同时修饰穿膜肽(Tat)和透明质酸(HA)、负载瑞舒伐他汀(R)的HSA-PLGA结合体(HSA-PLGA(R)@HA/Tat)的制备

[0207] 4.1未载药HSA-PLGA结合体的制备

[0208] 空白HSA-PLGA自组装体通过乳化-溶剂蒸发法制备得到,具体操作如下:称取20毫克HSA-PCL结合体溶解在8毫升去离子水中,将溶液置于冰浴中。在探头式超声波发生器作用下,用注射器匀速注入4毫升二氯甲烷,超声时间为5分钟,超声功率为150W。超声结束,将得到的乳液在 30°C 下通过旋转蒸发仪进行旋蒸30分钟,除去有机相,转速为80转/分钟。待二氯甲烷完全挥发,得到HSA-PLGA结合体的组装体溶液,并通过透射电镜对组装体的形貌进行表征。图6示出了HSA-PLLA结合体的透射电镜结果。

[0209] 4.2负载瑞舒伐他汀(R)的HSA-PLGA结合体HSA-PLGA(HSA-PLGA(R))的制备

[0210] 称取20毫克HSA-PLGA结合体溶解在8毫升去离子水中,将溶液置于冰浴中。将5mg

瑞舒伐他汀 (R) 溶解于5mL DMSO。在探头式超声波发生器作用下,用注射器匀速注入上述DMSO溶液,超声时间为5分钟,超声功率为150W。超声结束,得到乳白色溶液。

[0211] 4.3同时修饰穿膜肽 (Tat) 和透明质酸 (HA)、负载瑞舒伐他汀 (R) 的HSA-PLGA结合体 (HSA-PLGA (R) @HA/Tat) 的制备

[0212] 将上述得到的HSA-PLGA (R) 乳液,中加入10mg盐酸多巴胺,并将pH调到9.5,通过多巴胺自聚合反应在HSA-PLGA (R) 表面形成聚多巴胺 (PDA) 层,从而加固载体,反应1小时后,加入2mg Tat继续反应1小时。离心除去未反应PDA和Tat,得到纯化的HSA-PLGA (R) @Tat。

[0213] 将1g透明质酸HA (分子量为约10KDa) 充分溶解于超纯水中,加入0.1g EDC.HCl和0.12g sulfo-NHS偶联剂活化羧基。在室温搅拌反应1小时后,加入无水乙醇沉淀活化的HA。将沉淀过滤、用乙醇洗涤并真空干燥,得到活化的HA。将其配置成为1mg mL⁻¹的溶液。吸取1mL活化的HA溶液,溶于纯化的HSA-PLGA (R) @Tat溶液实现HA在HSA-PLGA (R) @Tat上的偶联,超滤浓缩,冻干除去有机相,得到靶向识别纳米载体HSA-PLGA (R) @HA/Tat。图7为未连接靶向配体的纳米载体HSA-PLGA (R) 和靶向纳米载体HSA-PLGA (R) @HA/Tat的红外光谱。

[0214] 实施例5同时修饰透明质酸 (HA) 和PEG、负载阿托伐他汀 (At) 的HSA-PCL结合体 (HSA-PCL (At) @HA/PEG) 的制备

[0215] 5.1负载阿托伐他汀 (At) 的HSA-PCL结合体HSA-PCL (HSA-PCL (At)) 的制备

[0216] 称取20毫克HSA-PCL结合体溶解在8毫升去离子水中,将溶液置于冰浴中。将5mg阿托伐他汀 (At) 溶解于5mL DMSO。在探头式超声波发生器作用下,用注射器匀速注入上述DMSO溶液,超声时间为5分钟,超声功率为150W。超声结束,得到乳白色溶液。

[0217] 将上述得到的HSA-PCL (At) 乳液,中加入10mg盐酸多巴胺,并将pH调到9.5,通过多巴胺自聚合反应在HSA-PCL (At) 表面形成聚多巴胺 (PDA) 层,从而加固载体,反应1小时后,加入5mg PEG-NH₂并继续反应2小时,离心除去未反应PDA和PEG-NH₂,得到纯化的HSA-PCL (At) @PEG。

[0218] 将1g透明质酸HA (分子量为约40KDa) 充分溶解于超纯水中,加入0.1g EDC.HCl和0.12g sulfo-NHS偶联剂活化羧基。在室温搅拌反应1小时后,加入无水乙醇沉淀活化的HA。将沉淀过滤、用乙醇洗涤并真空干燥,得到活化的HA。将其配置成为0.1mg mL⁻¹的水溶液,吸取0.2mL溶液溶于纯化的HSA-PCL (At) 溶液实现HA在HSA-PCL (At) @PEG上的偶联。超滤浓缩,冻干除去有机相,得到靶向识别纳米载体HSA-PCL (At) @HA/PEG。

[0219] 图8为未连接靶向配体的纳米载体HSA-PCL (At) 和靶向纳米载体HSA-PCL (At) @HA/PEG的红外光谱。

[0220] 实施例6修饰IM7单抗、负载阿托伐他汀 (At) 的HSA-PLLA结合体 (HSA-PLLA (At) @IM7) 的制备

[0221] 6.1负载阿托伐他汀 (At) 的HSA-PLLA结合体HSA-PLLA (HSA-PLLA (At)) 的制备

[0222] 称取20毫克HSA-PLGA结合体溶解在8毫升去离子水中,将溶液置于冰浴中。在探头式超声波发生器作用下,用注射器匀速注入4mL 1mg mL⁻¹的DMSO溶液,超声时间为5分钟,超声功率为150W。超声结束,得到乳白色溶液。

[0223] 将上述得到的HSA-PLLA (At) 乳液,中加入1mL 10mM单宁酸溶液和1mL 0.1M的Tris-HCl缓冲溶液 (pH 8.0),搅拌30分钟后逐滴加入0.5mL1mM的FeCl₃溶液,通过在HSA-PLLA (At) 表面形成络合物网络结构 (TA-Fe³⁺),从而加固载体,反应2小时后,离心除去未反

应分子,得到纯化的HSA-PCL (R)。

[0224] 将1mg IM7充分溶解于PBS缓冲溶液中,加入0.1g EDC.HCl和0.12g sulfo-NHS偶联剂活化羧基。在室温搅拌反应1小时后,在室温搅拌反应1小时后,通过超滤纯化,将其配置成为1mg mL⁻¹的水溶液将其逐滴加入到纯化的HSA-PLLA (At) 溶液实现IM7在HSA-PLLA (At) 上的偶联,得到靶向识别纳米载体HSA-PLLA (At) @IM7。图9示出了靶向纳米载体HSA-PLLA (At) @IM7的红外光谱。超滤浓缩,冻干除去有机相,得到靶向识别纳米载体HSA-PLLA (At) @IM7。图9为未连接靶向配体的纳米载体HSA-PLLA (At) 和靶向纳米载体HSA-PLLA (At) @IM7的红外光谱。

[0225] 实施例7修饰自身肽 (SEP)、同时负载微小RNA (miRNA-33a) 和阿托伐他汀 (At) HSA-PCL复合体HSA-PCL (At/miRNA) @SEP制备

[0226] 7.1负载阿托伐他汀 (At) 的HSA-PCL结合体HSA-PCL (HSA-PCL (At)) 的制备

[0227] 称取20毫克HSA-PCL结合体溶解在8毫升去离子水中,将溶液置于冰浴中。在探头式超声波发生器作用下,用注射器匀速注入4mL 1mg mL⁻¹阿托伐他汀的DMSO溶液,超声时间为5分钟,超声功率为150W。超声结束,得到乳白色溶液。

[0228] 将上述得到的HSA-PCL (At) 乳液,中加入10mg盐酸多巴胺和1mg miRNA-33a,并将pH调到9.5,同时加入如通过多巴胺自聚合反应在HSA-PLLA (At) 表面形成夹带miRNA-33a聚多巴胺 (PDA) 层,从而起到加固载体负载miRNA-33a的目的,反应2小时后,离心除去未反应PDA和miRNA-33a,得到纯化的HSA-PCL (At/miRNA)。

[0229] 7.2偶联自身肽 (SEP) 的HSA-PCL (At/miRNA) 复合体的制备

[0230] 将1mg自身肽 (SEP) 充分溶解于1mLPBS缓冲溶液中,加入0.5mg EDC.HCl和0.5mg sulfo-NHS偶联剂活化羧基。室温反应1h后,吸取1mL上述SEP-NHS溶液溶于纯化的HSA-PCL (At/miRNA) 溶液实现SEP在HSA-PCL (At/miRNA) 上的偶联,超滤纯化,冻干即可得到纯化的得到靶向识别纳米载体HSA-PCL (At/miRNA) @SEP。图10为靶向载药纳米载体HSA-PCL (At/miRNA) @SEP的红外光谱。

[0231] 实施例8同时偶联聚乙二醇 (PEG),骨桥蛋白 (OPN) 并负载金纳米颗粒 (AuNP) 瑞舒伐他汀 (R) 的HSA-PLLA复合体 (HSA-PLLA (AuNP/R) @OPN/PEG) 的制备

[0232] 8.1合成金纳米颗粒:

[0233] 配置100mL 1mM的氯金酸水溶液,室温搅拌下加入1mL 0.1M的NaBH₄即可得到金纳米颗粒。将溶液pH调至碱性,加入5mL 1mM的6-巯基己醇溶液,室温搅拌24小时,使用3K的超滤管纯化MHO-AuNPs,即可得到疏水性的金纳米颗粒 (MHO-AuNPs)。

[0234] 8.2负载金纳米颗粒 (AuNP) 瑞舒伐他汀 (R) 的HSA-PLLA复合体纳米载体的制备

[0235] 称取20毫克HSA-PLLA结合体溶解在8毫升去离子水中,将溶液置于冰浴中。在探头式超声波发生器作用下,用注射器匀速注入4mL 1mg mL⁻¹瑞舒伐他汀和MHO-AuNPs的DMSO溶液,超声时间为5分钟,超声功率为150W。超声结束,得到乳白色溶液。

[0236] 将上述得到的HSA-PLLA (AuNP/R) 乳液,中加入10mg盐酸多巴胺并将pH调到9.5,反应1h后继续加入4mg PEG-NH₂,继续反应1小时后,离心除去未反应PDA和PEG-NH₂,得到纯化的HSA-PLLA (AuNP/R) @PEG。

[0237] 8.3同时偶联骨桥蛋白 (OPN) 和PEG、负载金纳米颗粒 (AuNP) 瑞舒伐他汀 (R) HSA-PLLA复合体HSA-PLLA (AuNP/R) @OPN/PEG递送系统的制备

[0238] 将1mg骨桥蛋白(OPN)充分溶解于PBS缓冲溶液中,加入0.5mg EDC.HCl和0.5mg sulfo-NHS偶联剂活化羧基。在室温搅拌反应1小时后。将其配置成为1mg mL⁻¹的水溶液,吸取1mL溶液溶于纯化的HSA-PLLA (AuNP/R) @PEG溶液实现OPN在其表面上的偶联,得到靶向识别纳米载体HSA-PLLA (AuNP/R) @OPN/PEG。图11为HSA-PLLA (AuNP/R) @OPN/PEG的TEM结果。

[0239] 8.4HSA-PLLA@OPN/PEG的制备方法

[0240] 称取20毫克HSA-PLLA结合体溶解在8毫升去离子水中,将溶液置于冰浴中。在探头式超声波发生器作用下,用注射器匀速注入4mL 1mg mL⁻¹氯仿溶液,超声时间为5分钟,超声功率为150W。超声结束,得到乳白色溶液。

[0241] 将上述得到的HSA-PLLA乳液,中加入10mg盐酸多巴胺并将pH调到9.5,反应1h后继续加入4mg PEG-NH₂,继续反应1小时后。离心除去未反应PDA和PEG-NH₂,得到纯化的HSA-PLLA@PEG。

[0242] 将1mg骨桥蛋白(OPN)充分溶解于PBS缓冲溶液中,加入0.5mg EDC.HCl和0.5mg sulfo-NHS偶联剂活化羧基。在室温搅拌反应1小时后。将其配置成为1mg mL⁻¹的水溶液,吸取1mL溶液溶于纯化的HSA-PLLA@PEG溶液实现OPN在其表面上的偶联,得到靶向识别纳米载体HSA-PLLA@OPN/PEG。

[0243] 实施例9偶联单克隆抗体HI44a、负载药物地塞米松(DXMS)顺磁性氧化铁(Fe₃O₄ NPs)的HSA-PLGA复合体(HSA-PLGA(Fe₃O₄/DXMS)@HI44a)的制备

[0244] 9.1顺磁性氧化铁(Fe₃O₄ NPs)的制备

[0245] 配置100mL 10mM三氯化铁(FeCl₃)水溶液,剧烈搅拌条件下加入新制备0.1M氨水10mL,制得磁性铁纳米颗粒(Fe₃O₄ NPs),继续加入10mg mL⁻¹的油酸乙醇溶液,继续反应4小时,通过外加磁场纯化材料,浓缩溶液重新分散于纯水中制得10mM疏水性Fe₃O₄ NPs。

[0246] 9.2单克隆抗体HI44a修饰的负载药物地塞米松(DXMS)顺磁性氧化铁(Fe₃O₄ NPs)的HSA-PLGA复合体的制备

[0247] 称取20毫克HSA-PLGA结合体溶解在8毫升去离子水中,将溶液置于冰浴中。在探头式超声波发生器作用下,用注射器匀速注入4mL 1mg mL⁻¹地塞米松(DXMS)和顺磁性氧化铁(Fe₃O₄ NPs)的氯仿溶液,超声时间为5分钟,超声功率为150W。超声结束,得到乳白色溶液。

[0248] 将上述得到的HSA-PLGA(Fe₃O₄/DXMS)乳液,中加入10mg盐酸多巴胺并将pH调到9.5,反应2小时后,离心除去未反应PDA,冻干样品得到纯化的HSA-PLGA(Fe₃O₄/DXMS)。

[0249] 图12为HSA-PLGA(Fe₃O₄/DXMS)的红外结果。将1mg HI44a充分溶解于超纯水中,加入1.0mg EDC.HCl和0.5mg sulfo-NHS偶联剂活化羧基。在室温搅拌反应1小时后,超滤离心纯化获得活化的HI44a。吸取1.0mL HI44a溶液溶于纯化的HSA-PLGA(Fe₃O₄/DXMS)溶液中,实现HI44a在HSA-PLGA(Fe₃O₄/DXMS)上的偶联,得到靶向识别纳米载体HSA-PLGA(Fe₃O₄/DXMS)@HI44a,红外光谱如图12所示。

[0250] 9.3HSA-PLGA偶联HI44a的制备(HSA-PLGA@HI44a)

[0251] 称取20毫克HSA-PLGA结合体溶解在8毫升去离子水中,将溶液置于冰浴中。在探头式超声波发生器作用下,用注射器匀速注入4mL氯仿溶液,超声时间为5分钟,超声功率为150W。超声结束,得到乳白色溶液。将上述得到的HSA-PLGA乳液,中加入10mg盐酸多巴胺并将pH调到9.5,反应2小时后,离心除去未反应PDA,冻干样品得到纯化的HSA-PLGA NP。

[0252] 将1mg HI44a充分溶解于超纯水中,加入1.0mg EDC.HCl和0.5mg sulfo-NHS偶联

剂活化羧基。在室温搅拌反应1小时后,超滤离心纯化获得活化的HI44a。吸取1.0mL HI44a溶液溶于纯化的HSA-PLGA溶液中,实现HI44a在HSA-PLGA上的偶联,得到靶向识别纳米载体HSA-PLGA@HI44a。

[0253] 实施例10修饰胶原蛋白(Co1)、同时负载阿司匹林(Asp)、氯吡格雷(Clo) HSA-PCL复合体(HSA-PCL(Asp/Clo)@Co1/PEG)的制备

[0254] 称取20mg HSA-PCL结合体溶解在8mL去离子水中,将溶液置于冰浴中。在探头式超声波发生器作用下,用注射器匀速注入4mL 1mg mL^{-1} 阿司匹林(Asp)和氯吡格雷(Clo)氯仿溶液,超声时间为5分钟,超声功率为150W。超声结束,得到乳白色溶液。将上述得到的HSA-PCL(Asp/Clo)乳液中加入10mg盐酸多巴胺并将pH调到9.5,反应1小时后,逐滴加入氨基修饰的分子量为1kd的聚乙二醇(PEG-NH₂)水溶液(1mL, 2mg mL^{-1})并继续反应1小时,离心除去未反应药物和PDA,冻干样品得到纯化的HSA-PCL(Asp/Clo)@PEG。

[0255] 将10mg col充分溶解于超纯水中,加入3mg EDC.HCl和3mg sulfo-NHS偶联剂活化羧基。在室温搅拌反应1小时后,超滤离心纯化获得活化的Co1。吸取1.0mL Co1溶液溶于纯化的HSA-PCL(Asp/Clo)@PEG溶液中,实现Co1在HSA-PCL(Asp/Clo)@PEG上的偶联,得到靶向识别纳米载体HSA-PCL(Asp/Clo)@Co1/PEG。图13为HSA-PCL(Asp/Clo)@PEG和HSA-PCL(Asp/Clo)@Co1/PEG的红外光谱。

[0256] 试验例1本发明的纳米递送系统的性质考察

[0257] 在本实施例中,以实施例2至10中制备的负载治疗剂的纳米递送系统为例来证明本发明的递送系统具有稳定可控的性质,从而适合于易损斑块或与易损斑块相关的疾病的诊断、预防和治疗。

[0258] 1. 药物浓度测定法:

[0259] 载体药物瑞舒伐他汀,阿托伐他汀、地塞米松、阿司匹林、氯吡格雷、氟代脱氧葡萄糖具有很强的紫外吸收特性,因此可以通过采用HPLC-UV法(使用Waters2487,沃特世公司(Waters Corporation),美国),利用瑞舒伐他汀,阿托伐他汀、地塞米松、阿司匹林、氯吡格雷,氟代脱氧葡萄糖的紫外吸收特性测定其含量。用不同浓度的瑞舒伐他汀,阿托伐他汀、地塞米松、阿司匹林、氯吡格雷,氟代脱氧葡萄糖溶液的浓度(X)对HPLC色谱峰的峰面积(Y)建立标准定量方程。

[0260] 2. 水合粒径的测定:

[0261] 本发明的递送系统的纳米载体,HSA-PCL(R)@HA,HSA-PLLA(At)@SP/PEG,HSA-PLGA(R)@HA/Tat,HSA-PCL(At)@HA/PEG,HSA-PLLA(At)@IM7,HSA-PCL(At/miRNA)@SEP,HSA-PLLA(AuNP/R)@OPN/PEG,HSA-PLGA(Fe304/DXMS)@HI44a,HSA-PCL(Asp/Clo)@Co1/PEG水合粒径均由激光粒度仪(BI-Zeta Plus/90Plus,布鲁克海文公司(Brookhaven Instruments Corporation),美国)测定,具体结果如表1所示。

[0262] 3. 载药量的测定:

[0263] 取一定量纳米载体,HSA-PCL(R)@HA,HSA-PLLA(At)@SP/PEG,HSA-PLGA(R)@HA/Tat,HSA-PCL(At)@HA/PEG,HSA-PLLA(At)@IM7,HSA-PCL(At/miRNA)@SEP,HSA-PLLA(AuNP/R)@OPN/PEG,HSA-PLGA(Fe304/DXMS)@HI44a,HSA-PCL(Asp/Clo)@Co1/PEG加入过量的pH 2.0的甲醇/甲酸溶液,并水浴加热60度2小时加速水凝胶纳米载体释放药物,并进一步采用超声法,使药物加速从树枝状纳米载体中释放出来。用HPLC(Waters 2487,沃特世公司

(Waters Corporation), 美国) 测定所得液体中的药物含量, 并通过以下公式计算包封率。相关结果见图1

[0264] 包封率(%) = (M包裹药物量/M加入药物量) * 100% 公式1

[0265] 表1各种性质一览表

实施例	名称	水合粒径 (nm)	包封率(%)	表面电位 (mV)
2	HSA-PCL(R)@HA	274	68.73±1.8	-40.3±1.8
3	HSA-PLLA(At)@SP/PEG	265	69.23±1.6	-26.6±1.2
4	HSA-PLGA(R)@HA/Tat	273	68.21±1.7	-36.2±1.5
5	HSA-PCL(At)@HA/PEG	262	66.53±1.2	-42.3±1.7
6	HSA-PLLA(At)@IM7	264	63.42±1.4	-27.8±1.8
7	HSA-PCL(At/miRNA)@SEP	258	65.43±0.85	-28.6±1.4
8	HSA-PLLA(AuNP/R)@OPN/PEG	272	67.53±0.91	-28.2±1.5
9	HSA-PLGA(Fe ₃ O ₄ /DXMS)@HI44a	276	65.53±1.24	-27.6±1.2
10	HSA-PCL(Asp/Clo)@Col/PEG	253	64.64±1.13	-28.3±1.6

[0267] 注: 以上数据均以平行测定5次的结果的“平均值+标准差”的形式表示。

[0268] 4. 长期稳定性考察

[0269] 将本发明的纳米递送系统, HSA-PCL (R) @HA, HSA-PLLA (At) @SP/PEG, HSA-PLGA (R) @HA/Tat, HSA-PCL (At) @HA/PEG, HSA-PLLA (At) @IM7, HSA-PCL (At/miRNA) @SEP, HSA-PLLA (AuNP/R) @OPN/PEG, HSA-PLGA (Fe₃O₄/DXMS) @HI44a, HSA-PCL (Asp/Clo) @Col/PEG在4℃储存, 于不同的时间点取样, 并通过激光粒度仪检测其水合粒径的变化。图10为不同时间保存时间对水合粒径的影响。

[0270] 5. 长期稳定性考察

[0271] 将本发明的纳米递送系统将本发明的纳米递送系统, HSA-PCL (R) @HA, HSA-PLLA (At) @SP/PEG, HSA-PLGA (R) @HA/Tat, HSA-PCL (At) @HA/PEG, HSA-PLLA (At) @IM7, HSA-PCL (At/miRNA) @SEP, HSA-PLLA (AuNP/R) @OPN/PEG, HSA-PLGA (Fe₃O₄/DXMS) @HI44a, HSA-PCL (Asp/Clo) @Col/PEG在4℃储存, 于不同的时间点取样, 通过超滤离心除去游离药物考察其载药量的变化。

[0272] 图11为不同保存时间对包封率的影响。

[0273] 6. 体外释药性能研究

[0274] 取2mL本发明的纳米递送系统HSA-PCL (R) @HA, HSA-PLLA (At) @SP/PEG, HSA-PLGA (R) @HA/Tat, HSA-PCL (At) @HA/PEG, HSA-PLLA (At) @IM7, HSA-PCL (At/miRNA) @SEP, HSA-PLLA

(AuNP/R)@OPN/PEG, HSA-PLGA (Fe3O4/DXMS)@HI44a, HSA-PCL (Asp/C1o)@Co1/PEG置于透析袋内密封。然后将透析袋置于50mL释放介质 (PBS溶液, pH=7.4) 中, 于37℃孵育120h。在不同时间点取2mL释放液并补充相同体积的PBS溶液。用HPLC (Waters2487, 沃特世公司 (Waters Corporation), 美国) 检测释放液中的药物含量, 并通过公式2计算出药物的累积释放率。

$$[0275] \quad CRP(\%) = \frac{V_e \sum_{i=1}^{n-1} C_i + V_0 C_n}{M_{药物}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots \text{公式 2}$$

[0276] 公式3中各参数意义如下:

[0277] CRP: 药物累积释放率

[0278] V_e : 释放液的置换体积, 此处 V_e 为2mL

[0279] V_0 : 释放体系中释放液的体积, 此处 V_0 为50mL

[0280] C_i : 第*i*次置换取样时释放液中药物的浓度, 单位 $\mu\text{g}/\text{mL}$

[0281] $M_{药物}$: 递送系统中的药物的总质量, 单位 μg

[0282] n : 置换释放液的次数

[0283] C_n : 第*n*次置换释放液后测定的释放体系中的药物浓度。

[0284] 图12为纳米递送系统的体外累积释放率 (CRP%)。

[0285] 试验例2本发明的HSA-PCL (R)@HA, HSA-PLLA (At)@SP/PEG, HSA-PLGA (R)@HA/Tat, HSA-PCL (At)@HA/PEG, HSA-PLLA (At)@IM7, HSA-PCL (At/miRNA)@SEP纳米药物递送系统对动脉易损斑块的影响的体内实验

[0286] 透明质酸 (HA), 选择蛋白 (SP) 和IM7是CD44的配体, 能够起到靶向易损斑块的作用, 瑞舒伐他汀 (R) 和阿托伐他汀 (At) 具有逆转斑块的作用, 自身肽 (SEP) 能够增加药物局部穿透和聚集, 穿膜肽 (Tat) 能够增加药物局部穿透和聚集, 在载体表面修饰PEG, 可以起到长循环的效果, 延长药物的半衰期。miRNA-33a能够增加胆固醇流出。本实施例的目的是验证本发明所述的HSA-PCL (R)@HA, HSA-PLLA (At)@SP/PEG, HSA-PLGA (R)@HA/Tat, HSA-PCL (At)@HA/PEG, HSA-PLLA (At)@IM7, HSA-PCL (At/miRNA)@SEP载体递送系统对动脉易损斑块的体内治疗作用。

[0287] 实验方法:

[0288] (1) 配制游离瑞舒伐他汀和阿托伐他汀的生理盐水溶液, 并采用上述实施例1-7中所述的方法制备负载治疗剂的双亲性蛋白质-高分子结合体递送系统。

[0289] (2) ApoE^{-/-}小鼠动脉易损斑块模型的建立:

[0290] 取SPF级ApoE^{-/-}小鼠 (42只, 5-6周龄, 体重 $20 \pm 1\text{g}$) 作为实验动物。给予小鼠适应性高脂饮食 (脂肪10% (w/w), 胆固醇2% (w/w), 胆酸钠0.5% (w/w), 其余部分为小鼠普通饲料) 喂养4周后, 用1%的戊巴比妥钠 (配制方法为将1mg戊巴比妥钠加入至100ml的生理盐水中) 以40mg/kg的剂量腹腔注射麻醉。然后, 将小鼠以仰卧位固定于手术板上, 用75% (v/v) 酒精以颈部为中心进行消毒, 纵向剪开颈部皮肤, 钝性分离颈前腺体, 在气管的左侧可见搏动的左颈总动脉。小心分离颈总动脉至分叉处, 将长度为2.5mm、内径为0.3mm的硅胶管套置于左颈总动脉的外周, 套管的近心段和远心段均以细丝线缩窄固定。局部紧缩造成近端血

流湍流,剪切力增加,造成的血管内膜损伤。将颈动脉复位,间断缝合颈前皮肤。所有操作均在10倍体视显微镜下进行。术后待小鼠苏醒后将其放回笼中,维持环境温度在20~25℃,灯光保持开闭各12h。术后第4周开始腹腔注射脂多糖(LPS)(1mg/kg,在0.2ml磷酸盐缓冲盐水中,Sigma,USA),每周2次,持续10周,诱导慢性炎症。术后8周将小鼠置入50ml注射器(预留充足通气孔)内造成限制性精神应激,6小时/天,每周5天,共持续6周。小鼠动脉粥样硬化易损斑块模型于术后14周造模完毕。

[0291] (3) 实验动物分组及治疗:

[0292] 将实验动物随机分为以下各组,每组6只:

[0293] 易损斑块模型对照组:该组动物不进行任何治疗性处理;

[0294] 瑞舒伐他汀静脉注射组:以0.66mg瑞舒伐他汀/kg体重的剂量进行静脉注射给药处理;

[0295] 阿托伐他汀静脉注射组:以1.2mg阿托伐他汀/kg体重的剂量进行静脉注射给药处理;

[0296] HSA-PCL(R)@HA组:以0.66mg瑞舒伐他汀/kg体重的剂量进行静脉注射给药处理;

[0297] HSA-PLLA(At)@SP/PEG组:以1.2mg阿托伐他汀/kg体重的剂量进行静脉注射给药处理;

[0298] HSA-PLGA(R)@HA/Tat组:以0.66mg瑞舒伐他汀/kg体重的剂量进行静脉注射给药处理;

[0299] HSA-PCL(At)@HA/PEG组:以1.2mg阿托伐他汀/kg体重的剂量进行静脉注射给药处理;

[0300] HSA-PLLA(At)@IM7组:以1.2mg阿托伐他汀/kg体重的剂量进行静脉注射给药处理;

[0301] HSA-PCL(At/miRNA)@SEP组:以1.2mg阿托伐他汀/kg体重的剂量进行静脉注射给药处理。

[0302] 除易损斑块模型对照组外,治疗组的治疗每隔一天进行1次,共治疗5次。对于各组动物,于治疗前后进行颈动脉MRI扫描以检测斑块和管腔面积,并计算斑块进展百分比。

[0303] 斑块进展百分比=(治疗后斑块面积-治疗前斑块面积)/管腔面积。

[0304] 实验结果:

[0305] 图17展示了本发明所述的HSA-PCL(R)@HA,HSA-PLLA(At)@SP/PEG,HSA-PLGA(R)@HA/Tat,HSA-PCL(At)@HA/PEG,HSA-PLLA(At)@IM7,HSA-PCL(At/miRNA)@SEP载体递送系统对动脉易损斑块的体内治疗效果。如图所示,高脂饮食喂养的过程中(10天),对照组(不给于任何治疗处理)的动脉粥样硬化进展了26.9%;采用瑞舒伐他汀治疗,能够延缓斑块的进展,但也进展了25.8%;阿托伐他汀静脉注射同样延缓斑块进展,但也进展了26.7%;而靶向纳米载药治疗则明显遏制了斑块的进展,甚至出现了斑块体积的逆转和消退,HSA-PCL(R)@HA组使斑块消除10.7%,HSA-PLLA(At)@SP/PEG组使斑块消除11.3%,HSA-PLGA(R)@HA/Tat组使斑块消除12.5%,HSA-PCL(At)@HA/PEG组使斑块消除10.2%,HSA-PLLA(At)@IM7组使斑块消除7.1%,HSA-PCL(At/miRNA)@SEP组使斑块消除9.3%。

[0306] 综上所述,对于小鼠体内动脉易损斑块而言,游离的瑞舒伐他汀和阿托伐他汀都未能呈现出逆转易损斑块的效果。然而,当将他汀负载在本发明所述的纳米递送系统中时,

其对于易损斑块的治疗效果发生了显著的提升,并起到了缩小斑块的治疗效果,带有功能修饰的纳米系统效果更佳。

[0307] 试验例3本发明的HSA-PLLA (AuNP/R) @OPN/PEG递送系统对动脉易损斑块的影响的体内实验 (CT示踪及治疗双功能)

[0308] 骨桥蛋白 (OPN) 是CD44的配体,能够起到靶向易损斑块的作用,瑞舒伐他汀 (R) 具有逆转斑块的作用,纳米金 (AuNP) 是CT示踪剂。本实施例的目的是验证本发明所述的负载CT示踪剂和瑞舒伐他汀的纳米递送系统对动脉易损斑块的体内示踪及治疗效果。

[0309] (1) 配制游离阿托伐他汀的生理盐水溶液,并采用上述实施例8中所述的方法制备负载CT示踪剂和治疗剂的双亲性蛋白质-高分子结合体纳米递送系统。

[0310] (2) ApoE^{-/-}小鼠动脉易损斑块模型的建立方法同试验例2。

[0311] (3) 实验动物易损斑块示踪:

[0312] 将实验动物随机分为以下各组,每组6只:

[0313] 游离纳米金颗粒组:纳米金的给药剂量为0.1mg/kg体重;

[0314] HSA-PLLA (AuNP/R) @OPN/PEG组:纳米金的给药剂量为0.1mg/kg体重;

[0315] HSA-PLLA@OPN/PEG组:对HSA-PLLA (AuNP/R) @OPN/PEG组药物进行HSA含量的测定,以HSA浓度为标准使用相同浓度的HSA-PLLA@OPN/PEG。

[0316] 各实验组分别经尾静脉注入相应的示踪剂,并于给药前以及给药后2h进行CT成像,观察各组动物的动脉粥样硬化易损斑块的识别情况。

[0317] (4) 实验动物分组及治疗:

[0318] 将实验动物随机分为以下各组,每组6只:

[0319] 易损斑块模型对照组:该组动物不进行任何治疗性处理;

[0320] 瑞舒伐他汀灌胃组:以10mg瑞舒伐他汀/kg体重的剂量进行灌胃给药处理;

[0321] 瑞舒伐他汀静脉注射组:以0.67mg瑞舒伐他汀/kg体重的剂量进行静脉注射给药处理;

[0322] HSA-PLLA (AuNP/R) @OPN/PEG组:以0.67mg瑞舒伐他汀/kg体重的剂量进行静脉注射给药处理。

[0323] 除易损斑块模型对照组外,治疗组的治疗每隔一天进行1次,共治疗5次。对于各组动物,于治疗前后进行颈动脉MRI扫描以检测斑块和管腔面积,并计算斑块进展百分比。

[0324] 斑块进展百分比 = (治疗后斑块面积 - 治疗前斑块面积) / 管腔面积。

[0325] 实验结果:

[0326] 图18展示了本发明所述的负载示踪剂的双亲性蛋白质-高分子结合体递送系统对动脉易损斑块的体内示踪效果。如图所示,游离的纳米金颗粒对于小鼠体内动脉易损斑块而言呈现出了一定的示踪效果。与游离的纳米金颗粒相比,当将纳米金配制在靶向的双亲性蛋白质-高分子结合体递送系统中时,其对于易损斑块的示踪效果有了非常显著的提高。综上所述,与游离纳米金颗粒相比,使用本发明所述的表面修饰有靶向配体的双亲性蛋白质-高分子结合体递送系统给药可显著提高纳米金对动脉易损斑块的识别作用,产生更好的示踪效果。

[0327] 图19展示了本发明所述的HSA-PLLA (AuNP/R) @OPN/PEG系统对动脉易损斑块的体内治疗效果。如图所示,高脂饮食喂养的过程中(10天),对照组(不给予任何治疗处理)的动

脉粥样硬化进展了28%；采用瑞舒伐他汀灌胃治疗，能够延缓斑块的进展，但也进展了27.1%；瑞舒伐他汀静脉注射同样延缓斑块进展，但也进展了26.4%；而靶向纳米载药治疗则明显遏制了斑块的进展，甚至出现了斑块体积的逆转和消退，HSA-PLLA (AuNP/R) @OPN/PEG使斑块消退了12.4%。综上所述，对于小鼠体内动脉粥样硬化斑块而言，无论是灌胃给药还是静脉注射给药，游离的瑞舒伐他汀都呈现出了一定的治疗效果，但是其无法逆转易损斑块。然而，当将瑞舒伐他汀和纳米金配制在本发明所述的纳米递送系统中时，其对于易损斑块的诊断和治疗效果发生了显著的提升，并起到了高危患者预警，以及缩小斑块的治疗效果。

[0328] 试验例4本发明的HSA-PLGA (Fe₃O₄/DXMS) @HI44a递送系统对动脉粥样硬化斑块的体内示踪实验 (MRI示踪) 及抗炎治疗

[0329] 单克隆抗体 (HI44a) 是CD44的抗体，能够起到靶向易损斑块的作用，地塞米松 (DXMS) 具有抗炎，抑制斑块进展的作用，Fe₃O₄是MRI示踪剂。本实施例的目的是验证本发明所述的负载MRI示踪剂和地塞米松的双亲性蛋白质-高分子结合体递送系统对动脉粥样硬化斑块的体内示踪及治疗效果。

[0330] (1) 采用上述实施例9中所述的方法制备负载MRI示踪剂和治疗剂的双亲性蛋白质-高分子结合体纳米递送系统。(2) ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化斑块模型的建立方法同试验例2。

[0331] (3) 实验动物易损斑块示踪：

[0332] 将实验动物随机分为以下各组，每组6只：

[0333] 游离Fe₃O₄组：Fe₃O₄的给药剂量为0.1mg/kg体重

[0334] HSA-PLGA (Fe₃O₄/DXMS) @HI44a组：Fe₃O₄的给药剂量为0.1mg/kg体重；

[0335] 各实验组分别经尾静脉注入相应的示踪剂，并于给药前以及给药后2h进行MRI成像，观察各组动物的动脉粥样硬化易损斑块的识别情况。

[0336] HSA-PLGA@HI44a组：对HSA-PLGA (Fe₃O₄/DXMS) @HI44a组药物进行HSA含量的测定，以HSA浓度为标准使用相同浓度的HSA-PLGA@HI44a。

[0337] (4) 实验动物分组及治疗：

[0338] 将实验动物随机分为以下各组，每组6只：

[0339] 易损斑块模型对照组：该组动物不进行任何治疗性处理；

[0340] HSA-PLGA (Fe₃O₄/DXMS) @HI44a组：以0.1mg地塞米松/kg体重的剂量进行静脉注射给药处理；

[0341] 除易损斑块模型对照组外，治疗组的治疗每隔一天进行1次，共治疗5次。对于各组动物，于治疗前后进行颈动脉MRI扫描以检测斑块和管腔面积，并计算斑块进展百分比。

[0342] 斑块进展百分比 = (治疗后斑块面积 - 治疗前斑块面积) / 管腔面积。

[0343] 实验结果：

[0344] 图20展示了本发明所述的负载示踪剂的双亲性蛋白质-高分子结合体递送系统对动脉粥样硬化斑块的体内示踪效果。如图所示，游离的Fe₃O₄颗粒对于小鼠体内动脉粥样硬化斑块而言呈现出了一定的示踪效果。与游离的Fe₃O₄颗粒相比，当将Fe₃O₄配制在靶向的双亲性蛋白质-高分子结合体递送系统中时，其对于易损斑块的示踪效果有了非常显著的提高。综上所述，与游离MRI示踪剂相比，使用本发明所述的表面修饰有靶向配体的双亲性蛋白质-高分

子结合体递送系统给药可显著提高MRI示踪剂对动脉易损斑块的识别作用,产生更好的示踪效果。

[0345] 图21展示了本发明所述的高分子-蛋白质-无机纳米递送系统(HSA-PLGA (Fe₃O₄/DXMS) @HI44a)对动脉易损斑块的体内治疗效果。如图所示,高脂饮食喂养的过程中(10天),对照组(不给予任何治疗处理)的动脉粥样硬化进展了28.3%;而靶向纳米载药治疗则明显遏制了斑块的进展,甚至出现了斑块体积的逆转和消退,HSA-PLGA (Fe₃O₄/DXMS) @HI44a使斑块消退了12.4%。综上所述,对于小鼠体内动脉易损斑块而言,当将地塞米松和Fe₃O₄配制在本发明所述的双亲性蛋白质-高分子结合体纳米递送系统中时,其对于易损斑块的诊断和治疗效果发生了显著的提升,并起到了高危患者预警,以及逆转斑块生长(缩小斑块)的治疗效果。

[0346] 试验例5本发明的HSA-PCL (Asp/Cl_o) @Co1/PEG递送系统对动脉易损斑块的影响的体内实验

[0347] 阿司匹林(Asp)和氯吡格雷(Cl_o)是抗血小板药物,能够起到减少血小板聚集的作用,可以减少心血管事件的死亡率。本实施例的目的是验证本发明所述的HSA-PCL (Asp/Cl_o) @Co1/PEG载体递送系统对动脉易损斑块的体内治疗作用。

[0348] 实验方法:

[0349] (1) 配制游离阿司匹林和氯吡格雷的生理盐水溶液,并采用上述实施例10中所述的方法制备负载治疗剂的双亲性蛋白质-高分子结合体纳米递送系统。

[0350] (2) ApoE^{-/-}小鼠动脉易损斑块破裂模型的建立:给予高脂饮食喂养30周,使ApoE^{-/-}小鼠全身动脉形成动脉粥样硬化斑块,给予蛇毒诱导易损斑块破裂,形成急性冠脉综合征。

[0351] (3) 实验动物分组及治疗:

[0352] 将实验动物随机分为以下各组,每组10只:

[0353] 斑块破裂模型对照组:该组动物不进行任何治疗性处理;

[0354] 阿司匹林和氯吡格雷灌胃组:以100mg阿司匹林/kg体重和75mg氯吡格雷/kg体重的剂量进行灌胃给药处理;

[0355] HSA-PCL (Asp/Cl_o) @Co1/PEG组:以10mg阿司匹林/kg体重和7.5mg氯吡格雷/kg体重的剂量进行静脉注射给药处理;

[0356] 除易损斑块模型对照组外,治疗组的治疗每隔一天进行1次,共治疗5次。对于各组动物,观察1月小鼠的死亡率,并断尾检测小鼠出血时间(BT)。

[0357] 实验结果:

[0358] 图22展示了本发明所述的HSA-PCL (Asp/Cl_o) @Co1/PEG系统对动脉易损斑块的体内治疗效果。如图所示,对照组(不给予任何治疗处理)的小鼠死亡率40%;采用阿司匹林和氯吡格雷灌胃治疗,能够使死亡率下降至28%;

[0359] HSA-PCL (Asp/Cl_o) @Co1/PEG治疗能够使死亡率下降至12%。从出血时间来看,HSA-PCL (Asp/Cl_o) @Co1/PEG组未显著延长,而口服阿司匹林和氯吡格雷的小鼠出血时间显著延长。

[0360] 综上所述,对于易损斑块破裂的动物而言,口服双抗血小板治疗可以降低死亡率,但是延长出血时间,增加出血风险。而本发明所述的将抗血小板药物负载至纳米递送系统,起到了比口服药物更好的疗效,且不增加出血风险。

[0361] 尽管本发明已进行了一定程度的描述,明显地,在不脱离本发明的精神和范围的条件下,可进行各个条件的适当变化。可以理解,本发明不限于所述实施方案,而归于权利要求的范围,其包括所述每个因素的等同替换。

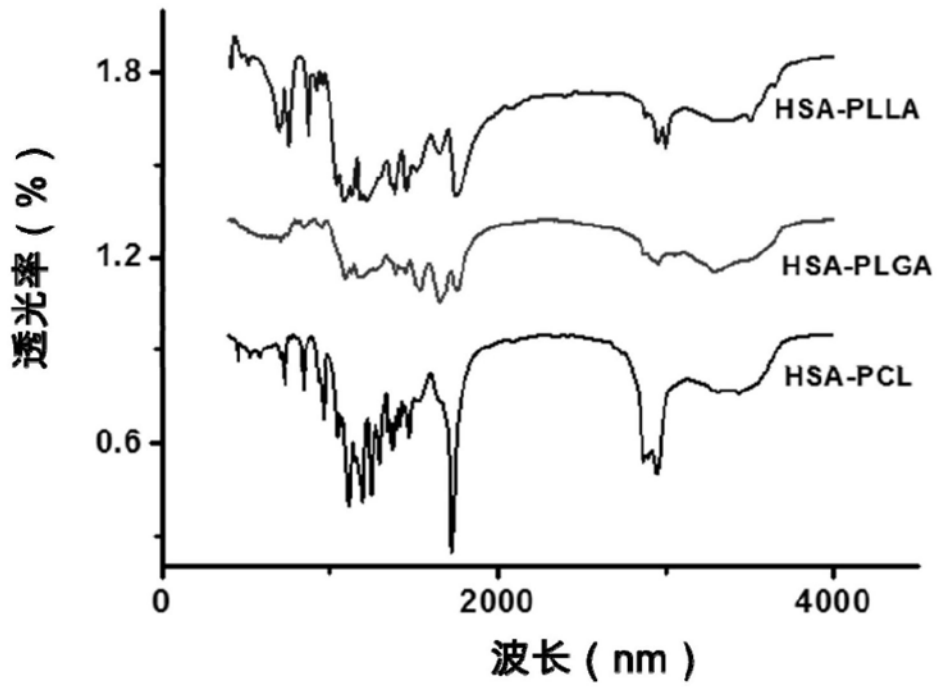


图1

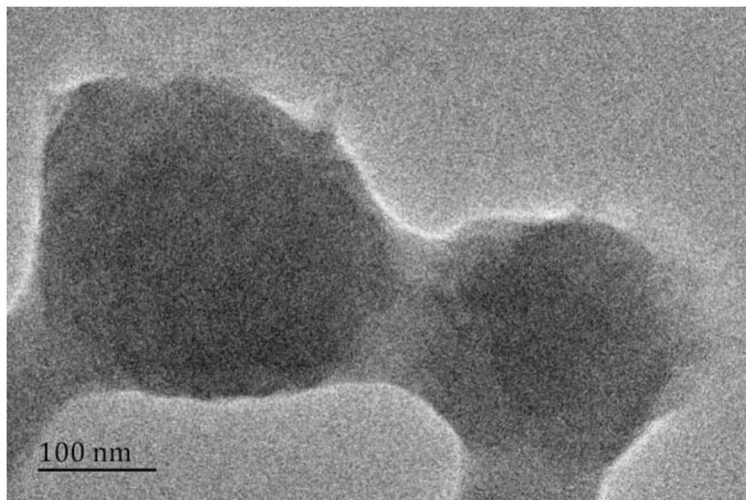


图2

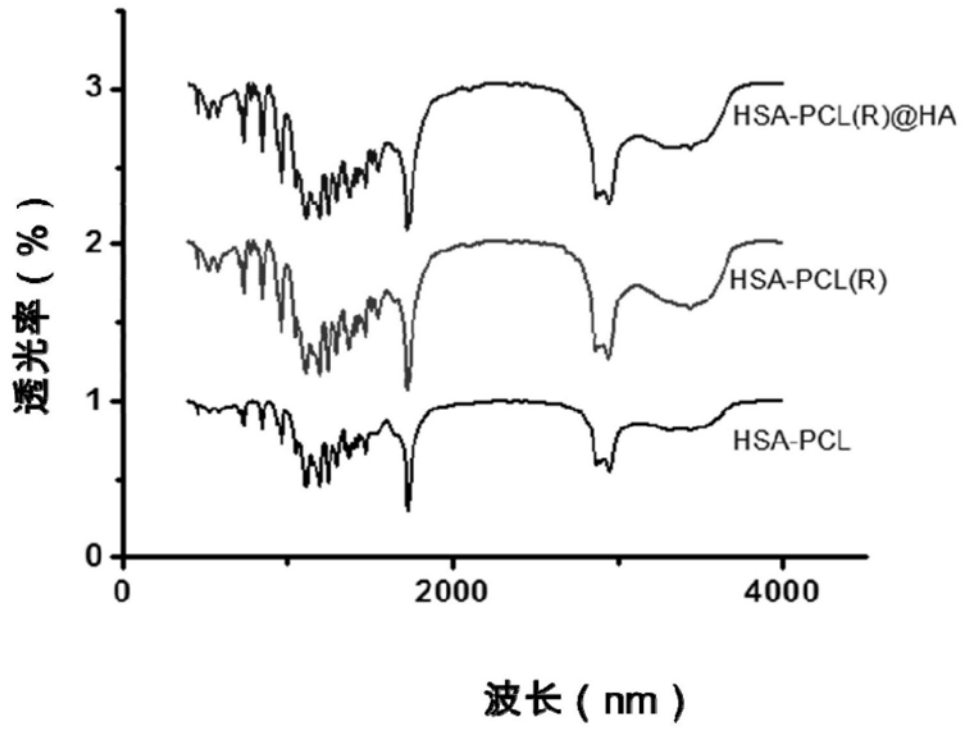


图3

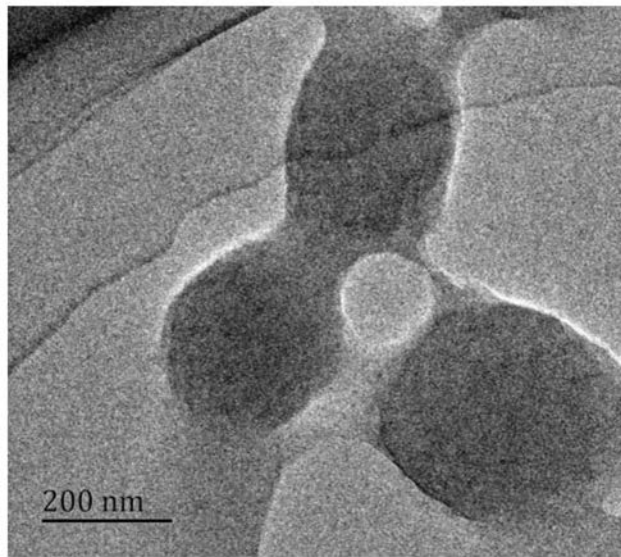


图4

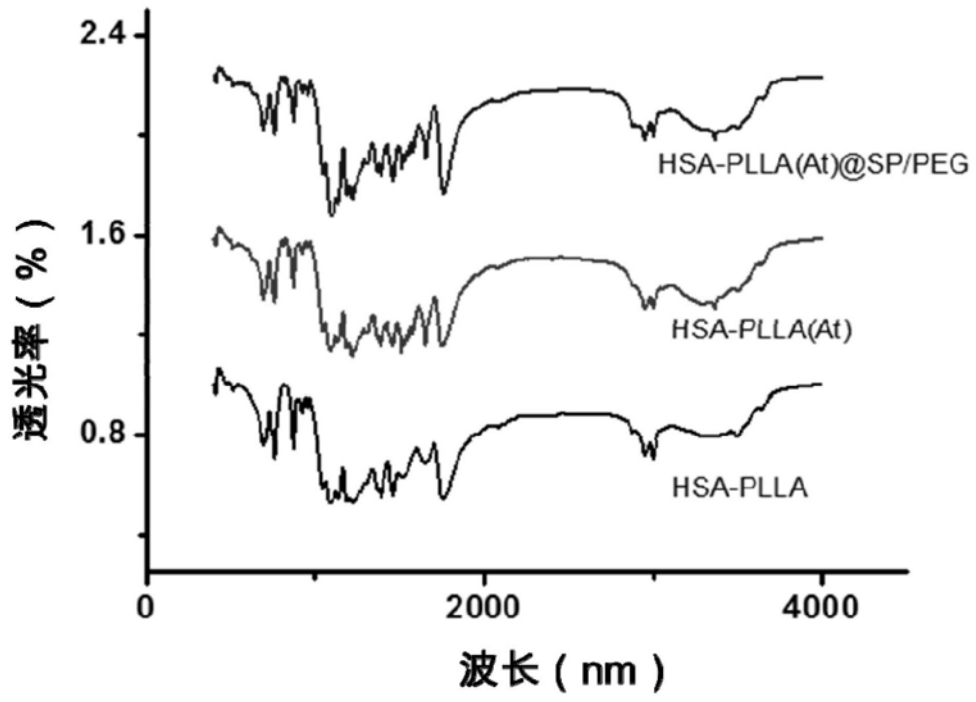


图5

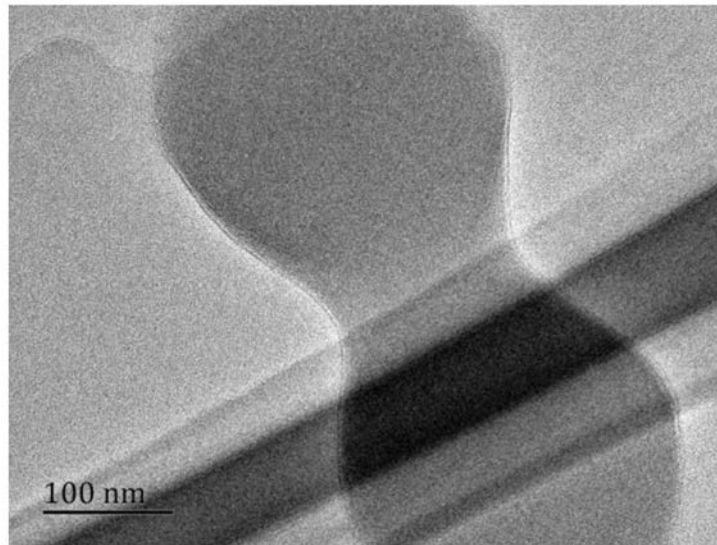


图6

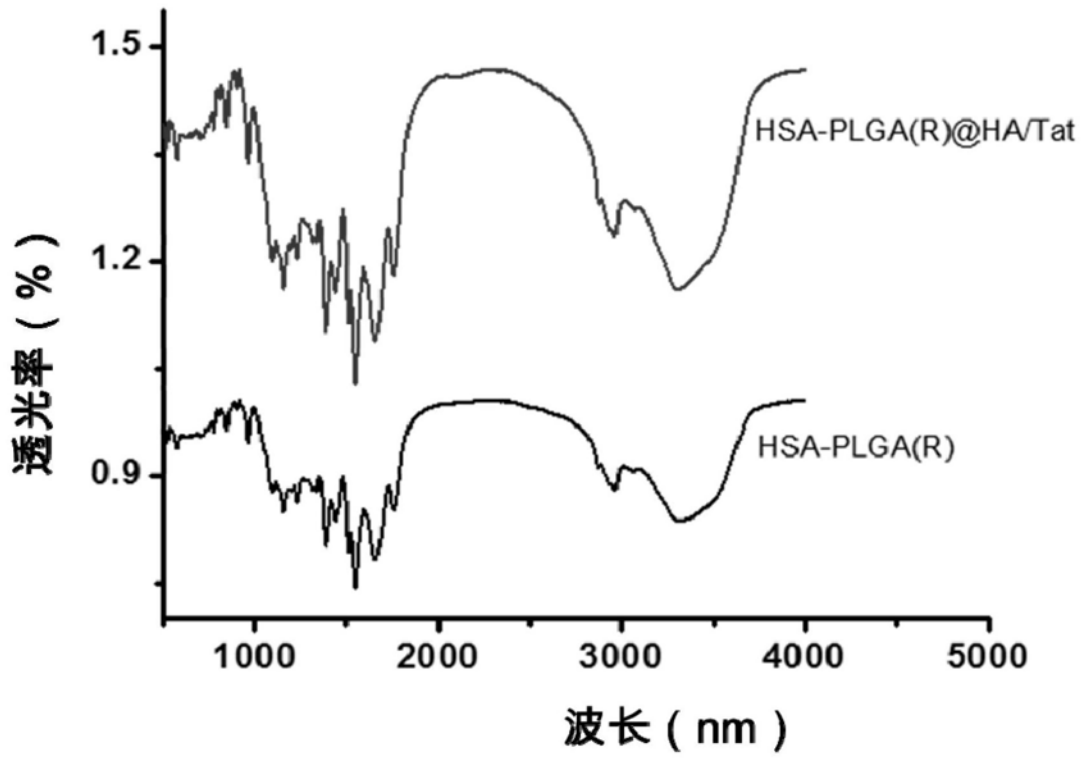


图7

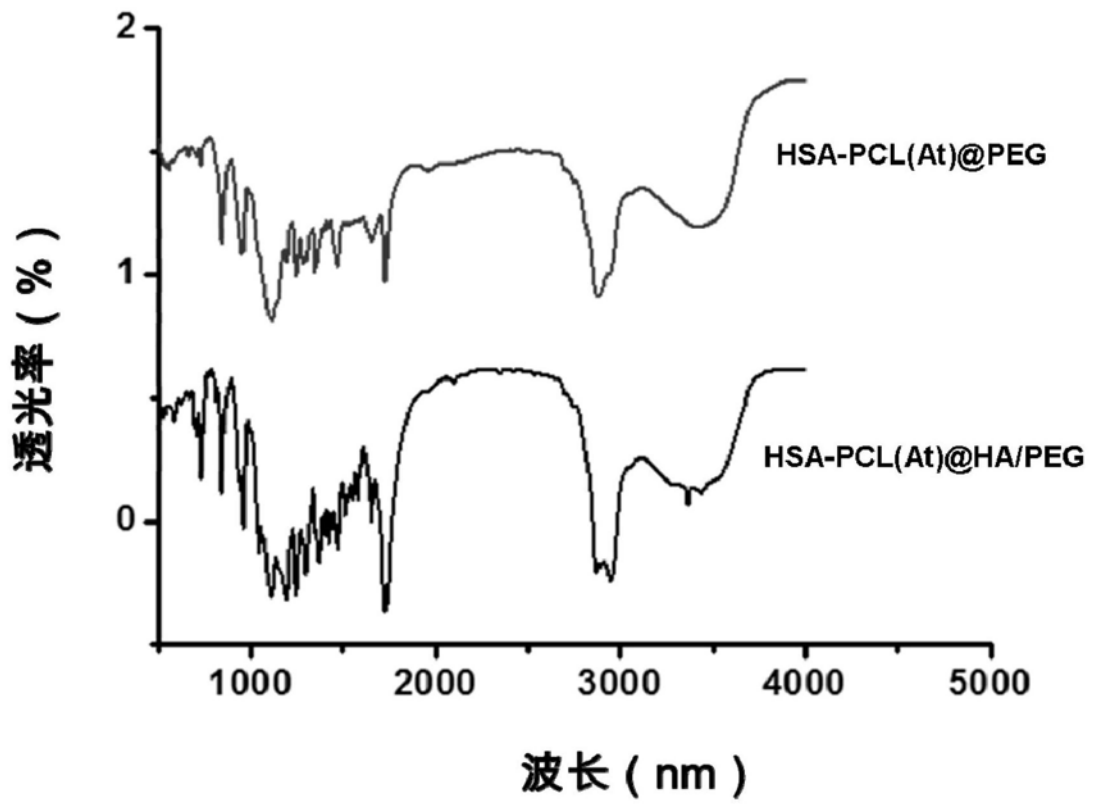


图8

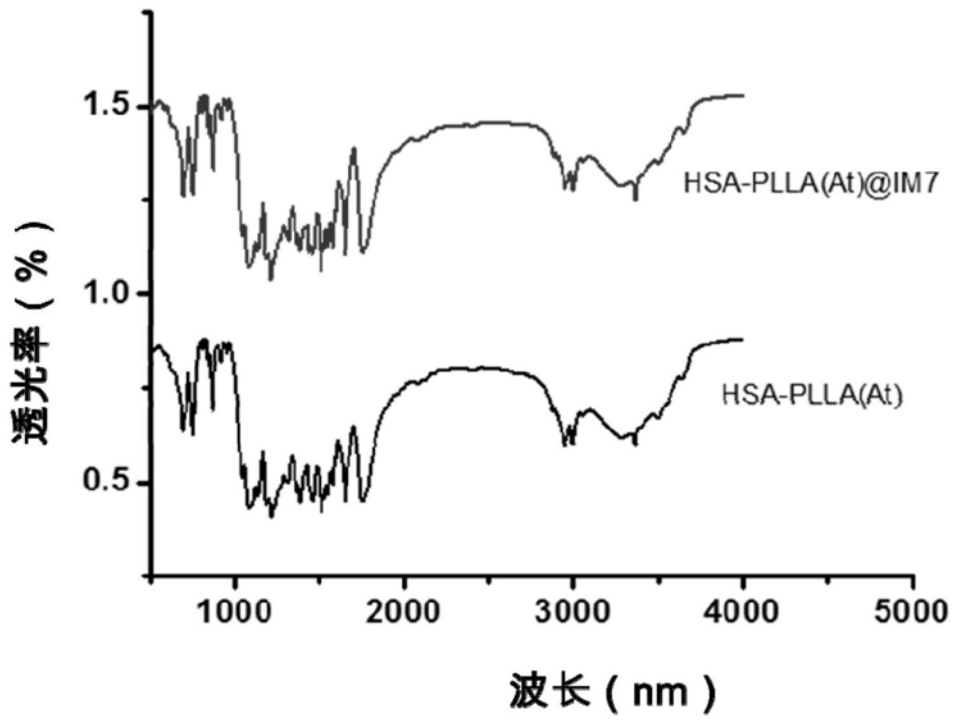


图9

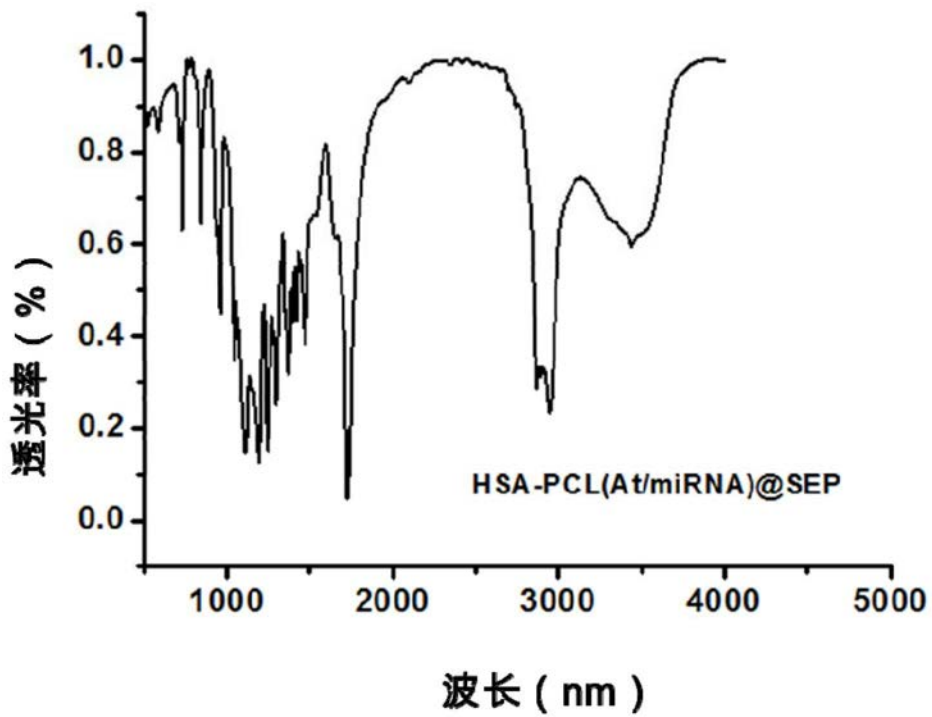


图10

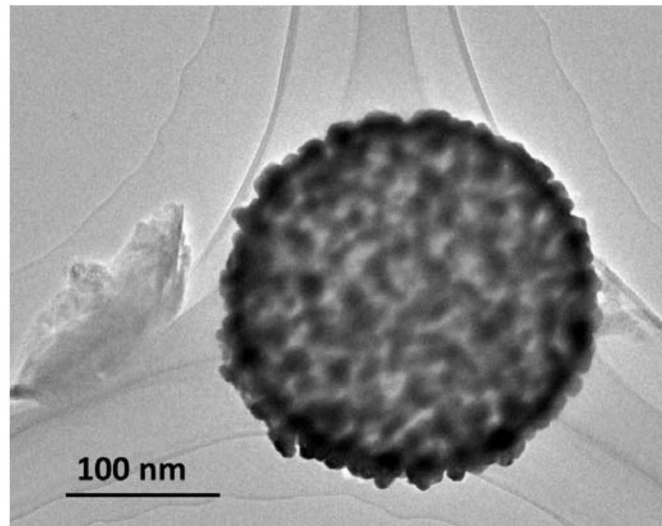


图11

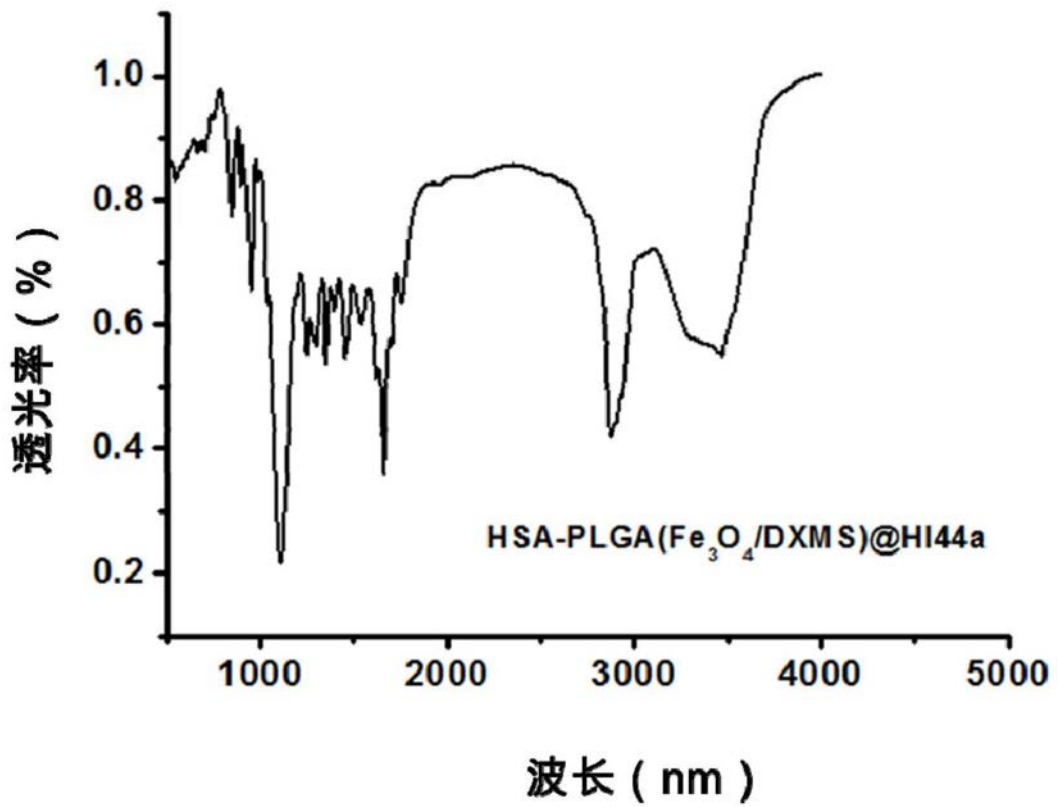


图12

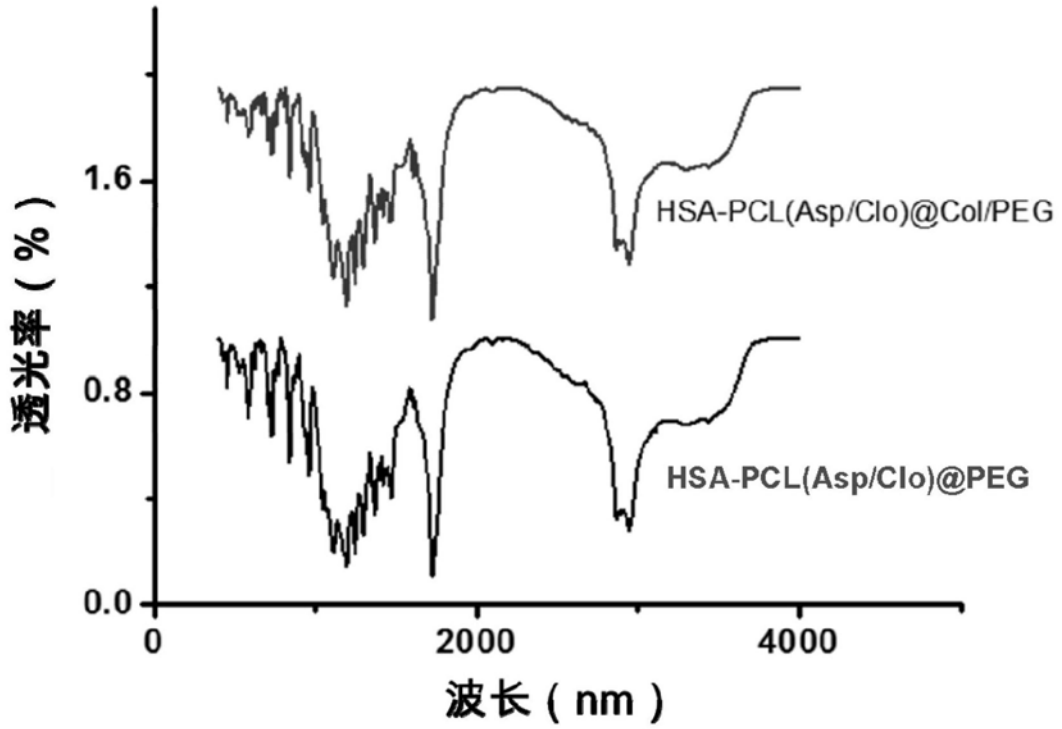


图13

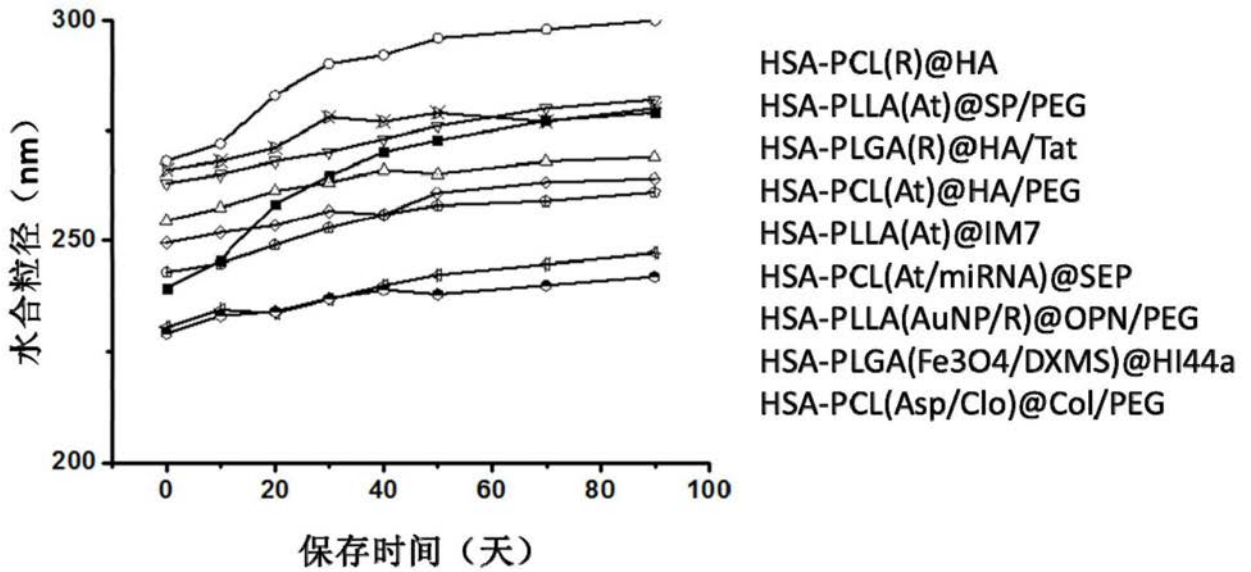


图14

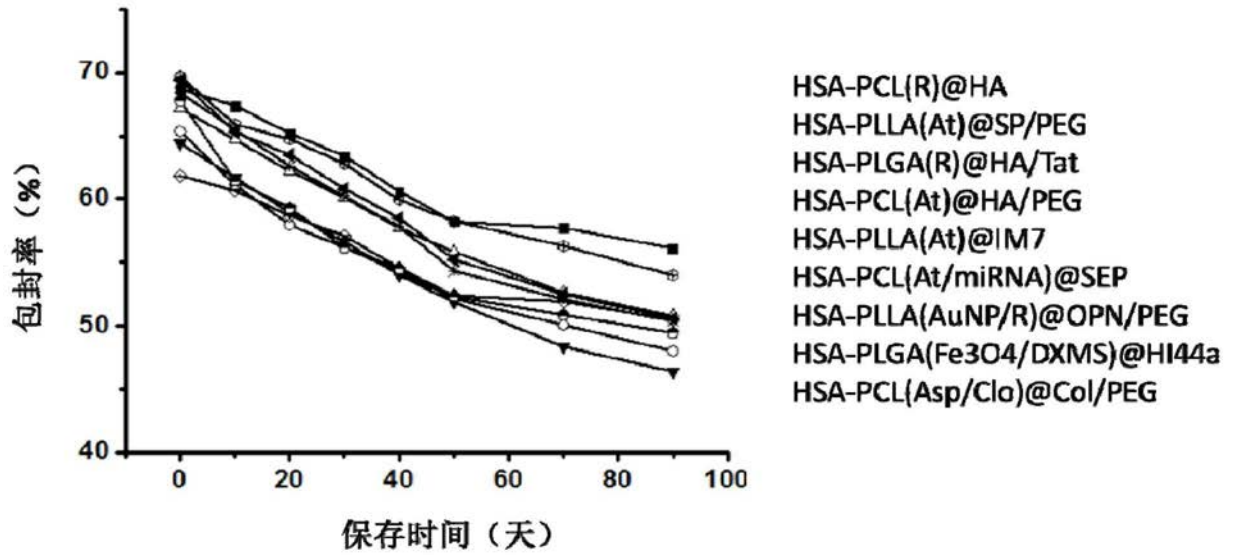


图15

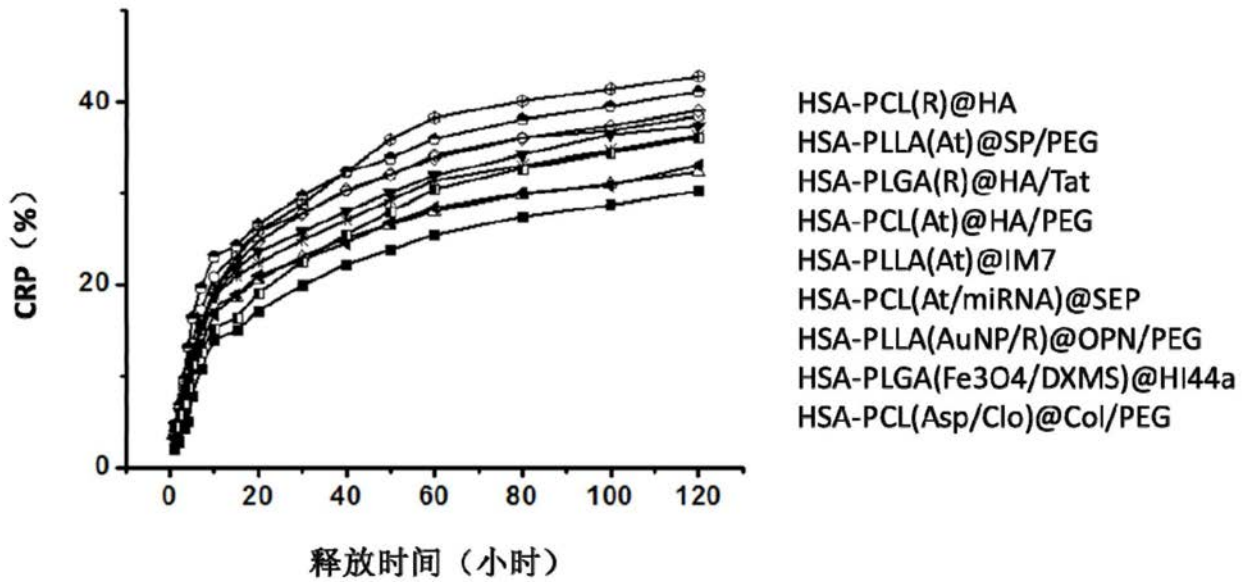


图16

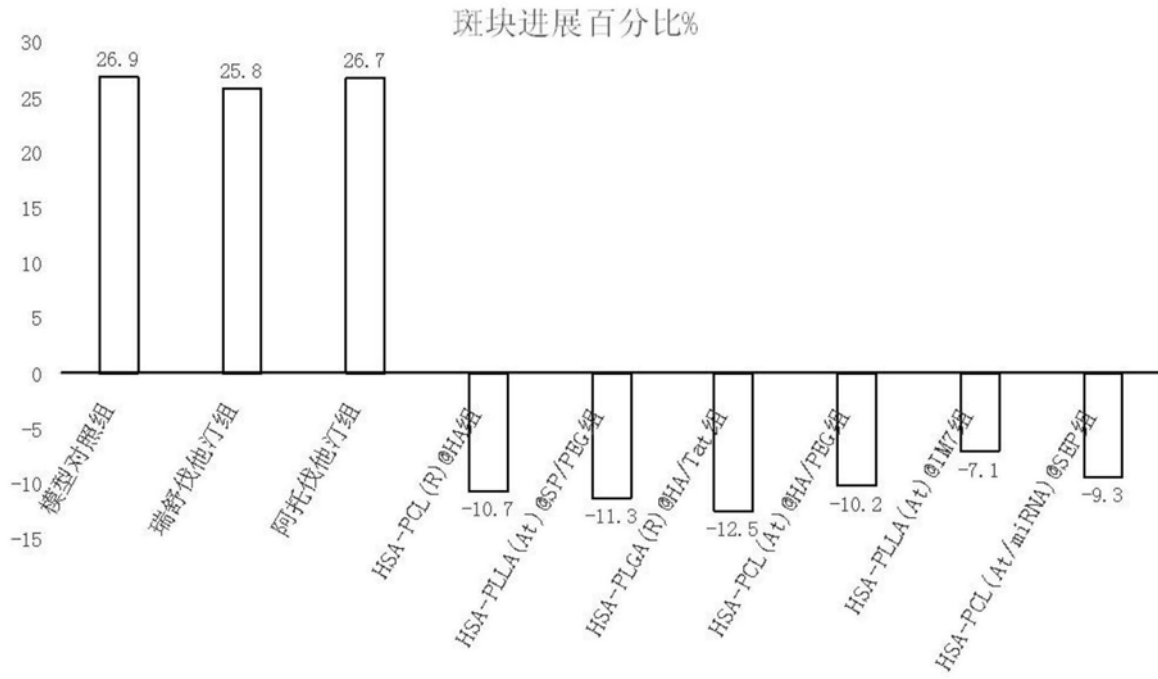


图17

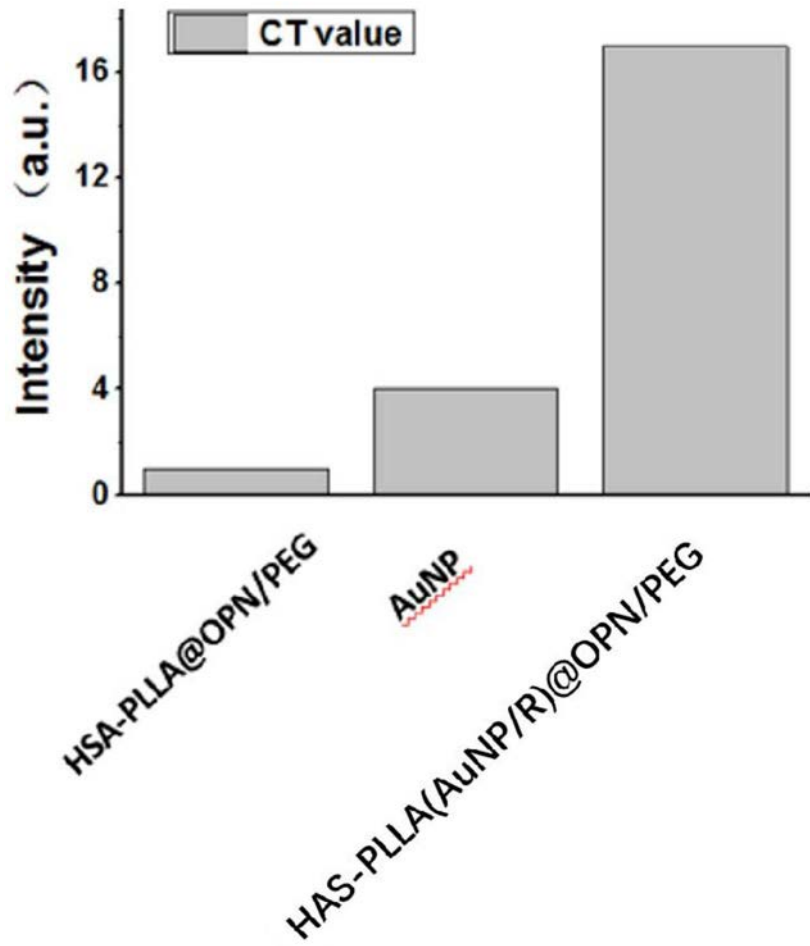


图18

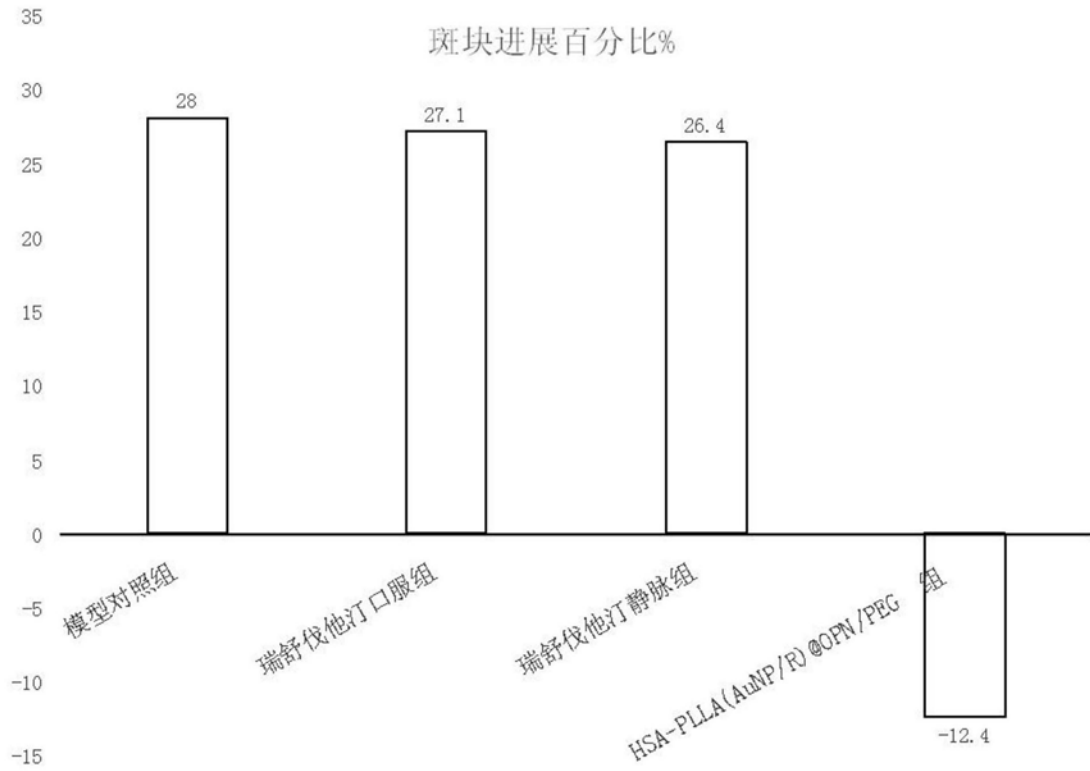


图19

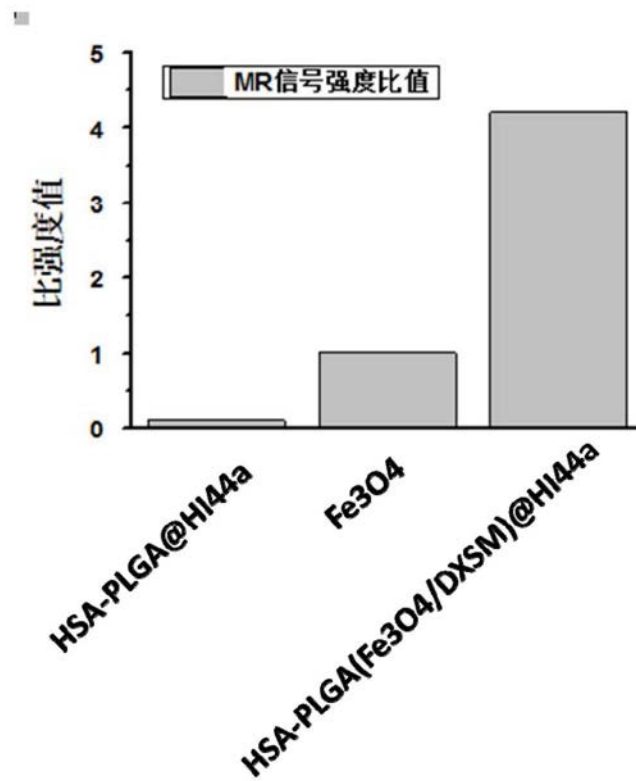


图20

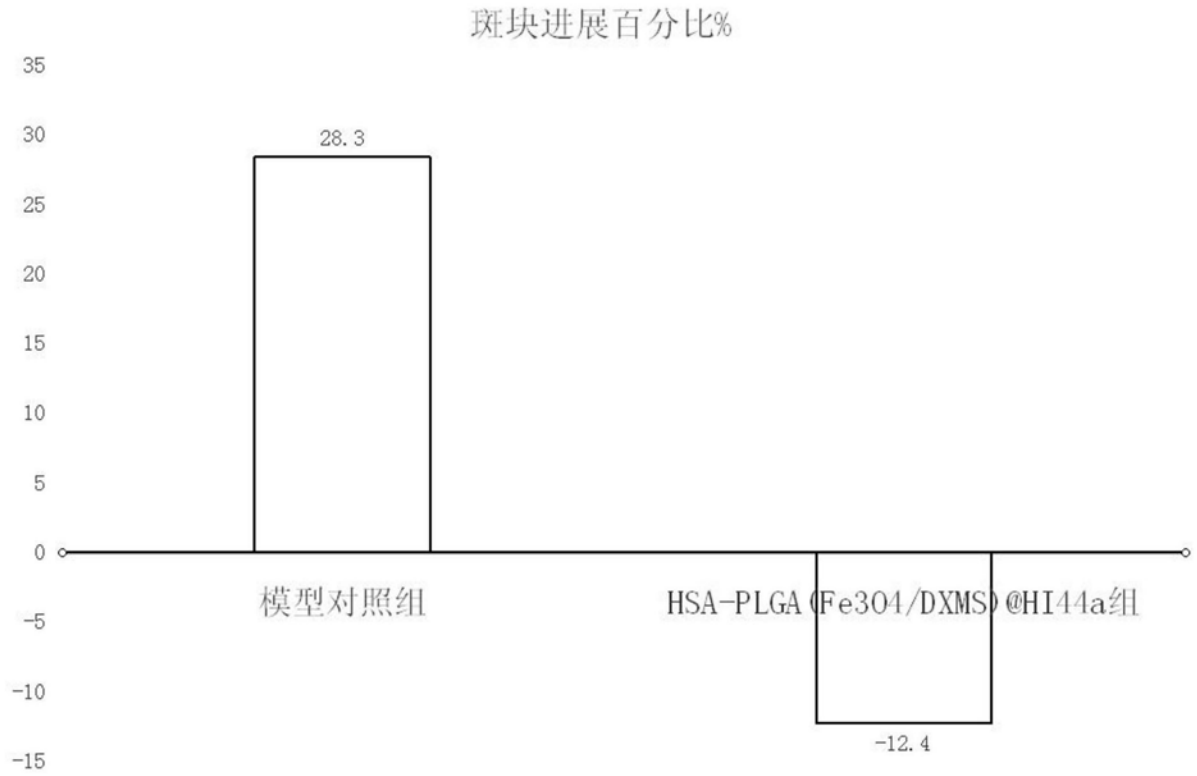


图21

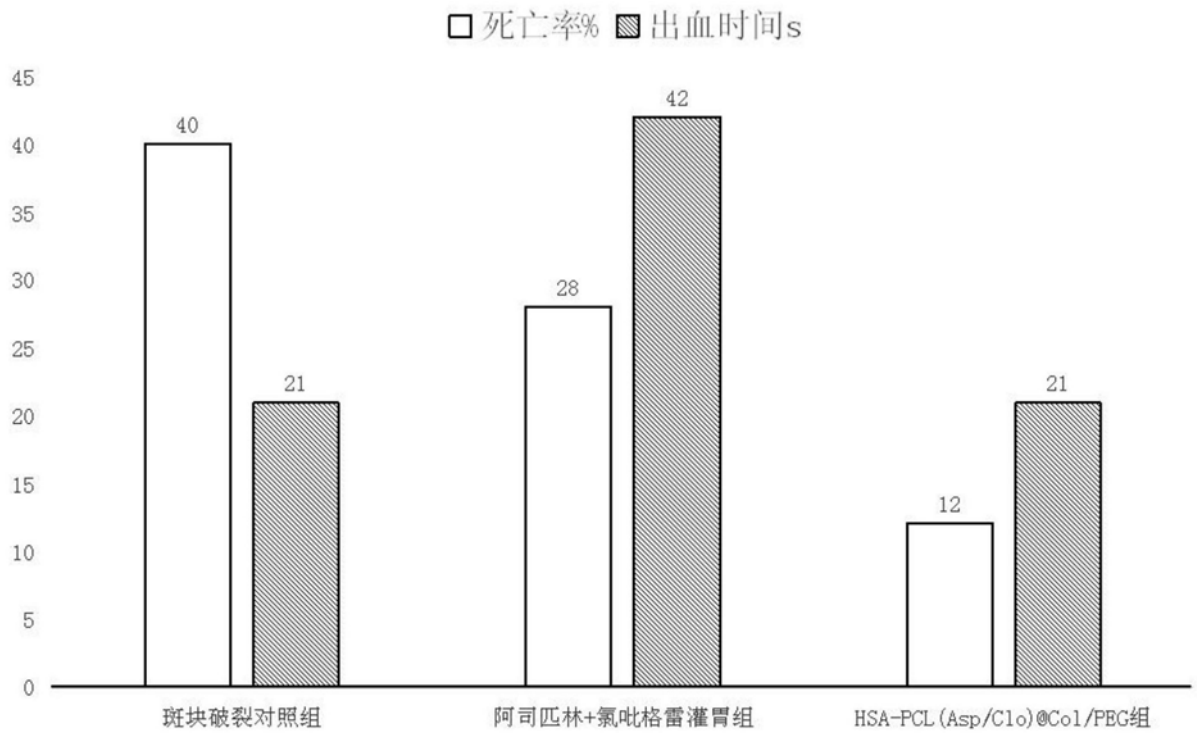


图22