



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115282286 A

(43) 申请公布日 2022. 11. 04

(21) 申请号 202210120969.7

(22) 申请日 2022.02.09

(71) 申请人 天津医科大学眼科医院

地址 300384 天津市滨海新区天津滨海高
新技术产业开发区华苑产业区榕苑路
1号

(72) 发明人 李筱荣 张晓敏 苏琳 蒋依琳
樊蕊嫣 张慧

(74) 专利代理机构 天津盛理知识产权代理有限
公司 12209
专利代理师 韩晓梅

(51) Int. Cl.

A61K 47/46 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

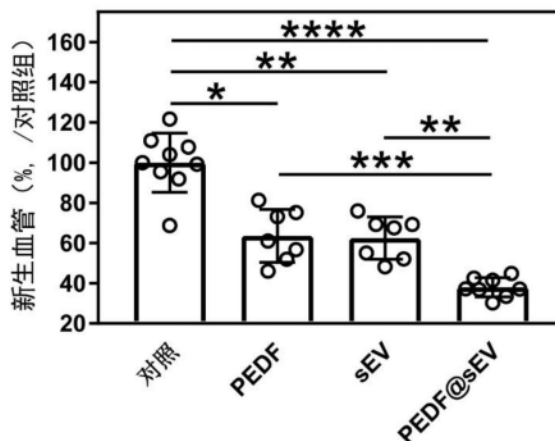
权利要求书2页 说明书8页 附图5页

(54) 发明名称

一种治疗眼部新生血管类疾病的纳米复合
体及应用

(57) 摘要

本发明公开了一种治疗眼部新生血管类疾
病的纳米复合体,所述纳米复合体是利用超声的
方法将色素上皮衍生因子PEDF装载到脐带间充
质干细胞来源的小细胞外囊泡sEV上以制备得到
的PEDF@sEV纳米复合体。本发明经超声法制备得
到的PEDF@sEV纳米复合体新材料,结合了PEDF和
sEV两者的优点:PEDF使纳米复合体在抑制新生
血管增殖方面具有更好的长期安全性,sEV载体
赋予复合体优异的跨屏障性能,PEDF@sEV纳米复
合体与单纯的PEDF相比,同等剂量下治疗效果更
好,与目前临床上应用最广泛的VEGF抗体药物相
比,具有更强的潜在应用价值。



1. 一种治疗眼部新生血管类疾病的纳米复合体,其特征在于:所述纳米复合体是利用超声的方法将色素上皮衍生因子PEDF装载到脐带间充质干细胞来源的小细胞外囊泡sEV上以制备得到的PEDF@sEV纳米复合体。

2. 根据权利要求1所述的治疗眼部新生血管类疾病的纳米复合体,其特征在于:所述纳米复合体包括:

特征A:以sEV为载体,赋予复合体良好的跨屏障特性;

特征B:以PEDF为治疗药物,使复合体在抑制新生血管方面具有更好的长期安全性;

特征C:通过超声的方法将PEDF装载到sEV载体上以构建纳米复合体。

3. 根据权利要求1所述的治疗眼部新生血管类疾病的纳米复合体,其特征在于:采用脐带间充质干细胞来源的sEV作为载体。

4. 根据权利要求1所述的治疗眼部新生血管类疾病的纳米复合体,其特征在于:所述小细胞外囊泡sEV是利用梯度离心的方法获得的sEV,即细胞分泌的,尺寸在50-200nm之间的胞外囊泡。

5. 根据权利要求1所述的治疗眼部新生血管类疾病的纳米复合体,其特征在于:超声制备纳米复合体时sEV的终浓度为0.05-100mg/ml,超声制备纳米复合体时PEDF的终浓度为1-100ug/ml。

6. 根据权利要求1所述的治疗眼部新生血管类疾病的纳米复合体,其特征在于:超声时的sEV与PEDF的质量比为1-1000:1。

7. 根据权利要求1所述的治疗眼部新生血管类疾病的纳米复合体,其特征在于:所述PEDF@sEV纳米复合体的粒径分布在100-200nm之间。

8. 根据权利要求1所述的治疗眼部新生血管类疾病的纳米复合体,其特征在于:超声时的超声功率为20%-50%,时间为:1-30分钟,脉冲为:1-60秒开/1-60秒关,超声时的混合液的温度控制在0-4℃。

9. 根据权利要求1至8任一项所述的治疗眼部新生血管类疾病的纳米复合体,其特征在于:具体制备步骤如下:

(1) sEV的制备与分离

通过原代培养脐带间充质干细胞,收集细胞条件培养基上清,依次经过300g、10分钟,2000g、10-15分钟,10000g、30分钟,110000g、70分钟的梯度离心后得到sEV的沉淀,再次利用足量的PBS重悬后,再次110000g、70分钟离心后,收集相对纯净的sEV;

(2) PEDF@sEV纳米复合体的制备

a. PEDF溶液和sEV溶液的配置

溶液为盐的平衡溶液,按照比例,将两种溶液混合均匀;

PEDF溶液的浓度为1-100 μ g/mL,sEV溶液的浓度为0.05-100mg/mL,所述盐的平衡溶液为PBS平衡盐溶液,sEV与PEDF的质量比为1-1000:1;

b. 超声法制备PEDF@sEV复合体

将PEDF和sEV的混合液在冰上进行超声,设定超声的功率,时间和脉冲3个参数;

超声功率为:20-50%,时间为:1-30分钟,脉冲为:1-60秒开/1-60秒关;

c. PEDF@sEV复合体的修复

超声结束后,将混合液放在25-37℃的环境中进行孵育,孵育时间为30-60分钟,以恢复

sEV的结构;

d. PEDF@sEV复合体的纯化

待PEDF@sEV复合体修复结束后,利用截留分子量为100-150kDa的超滤管进行离心、清洗和纯化2-3次,以PBS作为清洗液,并完成纳米复合体回收,即得治疗眼部新生血管类疾病的纳米复合体;

其中,纯化时,离心转速为2000-20000g,离心时间为5-45分钟,PBS的体积与复合体的体积比为2-10:1;回收时,离心转速为1000-4000g,离心时间为1-30分钟。

10. 如权利要求1至9任一项所述的治疗眼部新生血管类疾病的纳米复合体在作为和/或制备治疗眼部新生血管类疾病药物方面中的应用。

一种治疗眼部新生血管类疾病的纳米复合体及应用

技术领域

[0001] 本发明属于医用纳米复合体新材料技术领域,尤其是一种治疗眼部新生血管类疾病的纳米复合体及应用。

背景技术

[0002] 眼部新生血管是多种致盲性眼病,包括年龄相关性黄斑变性(Age-related Macular Degeneration,AMD)、增殖性糖尿病视网膜病变(Proliferative Diabetic Retinopathy,PDR)、视网膜动静脉阻塞和早产儿视网膜病变(Retinopathy of Prematurity,ROP)等的共同病理特征,也是这类疾病的关键致盲因素。

[0003] 目前临床上治疗眼部新生血管主要以血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor,VEGF)抗体药物、激光光凝和光动力治疗为主,尤其玻璃体腔注射VEGF抗体药物(VEGF水平异常升高是眼内新生血管形成的重要因素)已成为一线临床治疗眼部新生血管疾病的金标准。然而,由于VEGF抗体药物的本身特性和作用机制,患者一般每3个月就需要注射一次,持续1到2年。虽然VEGF抗体药物的短期疗效显著,但由于VEGF在视网膜中也具有正常的神经营养作用,大量VEGF抗体药物的长期使用,会造成眼内VEGF被“一刀切”抑制的问题,从而造成视网膜形成地图样萎缩。

[0004] 色素上皮衍生因子(Pigment Epithelium Derived Factor,PEDF)是目前发现的,眼内天然存在的抗新生血管能力最强的因子,同时PEDF也具有神经营养作用。正常生理条件下,玻璃体液和视网膜内PEDF的含量非常高,当发生新生血管增殖时,PEDF水平下降。已有大量的实验表明,外源性给予PEDF,恢复PEDF含量会明显抑制新生血管的增殖。相对于其他方法,外源性给予PEDF以恢复眼内PEDF水平而抑制新生血管的方法更具生物安全性。

[0005] 小细胞外囊泡(Small extracellular vesicles,sEV),因其天然的生物学特性,与传统的合成载体相比,不仅生物相容性好,而且具有更加优异的跨屏障运输能力。近年来,脐带间充质干细胞来源的sEV因其具有抗炎和神经营养的作用,已成为药物载体中的明星载体。PEDF的分子量为50kDa,属于较大分子量的蛋白。利用sEV装载PEDF以构建PEDF@sEV纳米复合体,可有效提高PEDF的生物利用度,即保护装载的PEDF减少降解而更多的与细胞发生作用,从而增强PEDF抗新生血管的治疗效果。本发明所制备的PEDF@sEV纳米复合体凭借sEV优越的载体性能而使PEDF发挥更好的抗新生血管的治疗效果。然而,目前并没有对于PEDF@sEV纳米复合体在眼部新生血管类疾病中的应用。

[0006] 通过检索,尚未发现与本发明专利申请相关的专利公开文献。

发明内容

[0007] 本发明目的在于克服现有技术中的不足之处,提供一种治疗眼部新生血管类疾病的纳米复合体及应用。

[0008] 本发明解决其技术问题所采用的技术方案是:

[0009] 一种治疗眼部新生血管类疾病的纳米复合体,所述纳米复合体是利用超声的方法

将色素上皮衍生因子PEDF装载到脐带间充质干细胞来源的小细胞外囊泡sEV上以制备得到的PEDF@sEV纳米复合体。

[0010] 进一步地,所述纳米复合体包括:

[0011] 特征A:以sEV为载体,赋予复合体良好的跨屏障特性;

[0012] 特征B:以PEDF为治疗药物,使复合体在抑制新生血管方面具有更好的长期安全性;

[0013] 特征C:通过超声的方法将PEDF装载到sEV载体上以构建纳米复合体。

[0014] 进一步地,采用脐带间充质干细胞来源的sEV作为载体。

[0015] 进一步地,所述小细胞外囊泡sEV是利用梯度离心的方法获得的sEV,即细胞分泌的,尺寸在50-200nm之间的胞外囊泡。

[0016] 进一步地,超声制备纳米复合体时sEV的终浓度为0.05-100mg/ml,超声制备纳米复合体时PEDF的终浓度为1-100ug/ml。

[0017] 进一步地,超声时的sEV与PEDF的质量比为1-1000:1。

[0018] 进一步地,所述PEDF@sEV纳米复合体的粒径分布在100-200nm之间。

[0019] 进一步地,超声时的超声功率为20%-50%,时间为:1-30分钟,脉冲为:1-60秒开/1-60秒关,超声时的混合液的温度控制在0-4℃。

[0020] 进一步地,具体制备步骤如下:

[0021] (1) sEV的制备与分离

[0022] 通过原代培养脐带间充质干细胞,收集细胞条件培养基上清,依次经过300g、10分钟,2000g、10-15分钟,10000g、30分钟,110000g、70分钟的梯度离心后得到sEV的沉淀,再次利用足量的PBS重悬后,再次110000g、70分钟离心后,收集相对纯净的sEV;

[0023] (2) PEDF@sEV纳米复合体的制备

[0024] a. PEDF溶液和sEV溶液的配置

[0025] 溶液为盐的平衡溶液,按照比例,将两种溶液混合均匀;

[0026] PEDF溶液的浓度为1-100μg/mL,sEV溶液的浓度为0.05-100mg/mL,所述盐的平衡溶液为PBS平衡盐溶液,sEV与PEDF的质量比为1-1000:1;

[0027] b. 超声法制备PEDF@sEV复合体

[0028] 将PEDF和sEV的混合液在冰上进行超声,设定超声的功率,时间和脉冲3个参数;

[0029] 超声功率为:20-50%,时间为:1-30分钟,脉冲为:1-60秒开/1-60秒关;

[0030] c. PEDF@sEV复合体的修复

[0031] 超声结束后,将混合液放在25-37℃的环境中进行孵育,孵育时间为30-60分钟,以恢复sEV的结构;

[0032] d. PEDF@sEV复合体的纯化

[0033] 待PEDF@sEV复合体修复结束后,利用截留分子量为100-150kDa的超滤管进行离心、清洗和纯化2-3次,以PBS作为清洗液,并完成纳米复合体回收,即得治疗眼部新生血管类疾病的纳米复合体;

[0034] 其中,纯化时,离心转速为2000-20000g,离心时间为5-45分钟,PBS的体积与复合体的体积比为2-10:1;回收时,离心转速为1000-4000g,离心时间为1-30分钟。

[0035] 如上所述的治疗眼部新生血管类疾病的纳米复合体在作为和/或制备治疗眼部新

生血管类疾病药物方面中的应用。

[0036] 本发明取得的优点和积极效果为：

[0037] 1、本发明经超声法制备得到的PEDF@sEV纳米复合体新材料，结合了PEDF和sEV两者的优点：PEDF使纳米复合体在抑制新生血管增殖方面具有更好的长期安全性，sEV载体赋予复合体优异的跨屏障性能，PEDF@sEV纳米复合体与单纯的PEDF相比，同等剂量下治疗效果更好，与目前临床上应用最广泛的VEGF抗体药物相比，具有更强的潜在应用价值。

[0038] 2、本发明复合体的整个制备过程简单、便捷，可用于低成本生产。所制备的PEDF@sEV纳米复合体的粒径主要分布在100-200nm之间，大小比较集中，在透射电子显微镜的观测中显示典型的脂质双分子层结构。ELISA结果显示，PEDF成功的装载到sEV上，成功构建PEDF@sEV纳米复合体。荧光标记实验证实，装载过程没有明显改变sEV被细胞摄取的生物学行为。

[0039] 3、本发明复合体在制备时通过超声法能够制备PEDF@sEV纳米复合体，制备过程简单便捷。制备过程中只需将PEDF和sEV的平衡盐溶液按照一定的比例混合后，在功率20-50%的条件下，超声1-30分钟，脉冲为：1-60秒开/1-60秒关。超声结束后，在25-37℃条件下孵育30-60分钟，继而利用超滤管进行清洗纯化即可回收PEDF@sEV纳米复合体。

[0040] 4、目前血管内皮生长因子(VEGF)抗体药物是临床一线治疗眼部新生血管类疾病的金标准。VEGF是新生血管增殖的关键因素，VEGF抗体药物主要中和眼内分泌的VEGF以达到治疗效果，因此患者需要每3个月进行一次眼内注射。然而，在眼内正常生理水平的VEGF对视网膜有正常的神经营养作用。随着VEGF抗体药物的长期大量使用，在抑制VEGF引起的新生血管的同时也会抑制VEGF正常的神经营养作用。

[0041] 色素上皮衍生因子(PEDF)是眼内天然存在的抗新生血管能力最强的因子，在罹患眼内新生血管类疾病时，PEDF水平下降。相比于VEGF抗体药物，外源性给予PEDF以恢复眼内PEDF水平而治疗新生血管的方法更具安全性。

[0042] 5、小细胞外囊泡(sEV)是天然药物载体，因其优异的生物相容性和跨屏障运输能力。尤其脐带间充质干细胞来源的sEV，因其具有抗炎和神经营养的作用，已成为药物载体中的明星载体。本发明通过简单便捷的超声法构建PEDF@sEV纳米复合体，可更加有效的将PEDF运输到病灶部位，提高PEDF的治疗作用。

[0043] 综上所述，与临床一线的金标准VEGF抗体药物相比，本发明制备一种治疗眼部新生血管类疾病的纳米复合体，更具生物安全性。借助脐带间充质干细胞来源的sEV的优异载体特性，PEDF@sEV提高了PEDF的治疗效果，将来还有希望应用于视网膜新生血管疾病的眼表给药治疗，有望更进一步完成治疗方法的革新。

[0044] 6、本发明的目的是设计并制备一种治疗眼部新生血管类疾病的纳米复合体。纳米复合物体是利用脐带间充质干细胞来源的小细胞外囊泡(Small extracellular vesicles, sEV)装载色素上皮衍生因子(Pigment epithelium derived factor, PEDF)而构建的PEDF@sEV纳米复合体。我们通过超声sEV和PEDF混合液的方法，将PEDF装载到sEV上，形成纳米复合体。该纳米复合体在透射电镜的检测中，呈现生物囊泡的典型脂质双分子层结构，装载PEDF未对sEV造成明显的形态结构的改变。ELISA试剂盒的检测结果表明，我们成功的将PEDF装载到sEV上。Nanosight(粒度仪)检测结果显示，PEDF的装载未改变sEV整体的粒径分布。荧光标记实验证实PEDF的装载未对sEV的生物活性造成明显影响。体内外实验，分

别在细胞水平和动物水平证明PEDF@sEV纳米复合体,相比对于单纯PEDF明显提高了治疗效果。

附图说明

[0045] 图1为本发明中按照实施例1制备的PEDF@sEV纳米复合体的透射电镜照片;PEDF@sEV纳米复合体在透射电镜下呈现完整的双层膜结构图;

[0046] 图2为本发明中按照实施例1制备的PEDF@sEV纳米复合体的粒径分布图;PEDF@sEV纳米复合体经粒度仪测试,其粒径主要集中分布在100-200nm之间;

[0047] 图3为本发明中按照实施例1制备的PEDF@sEV纳米复合体被细胞有效摄取图;红色染料标记的PEDF@sEV与视网膜血管内皮细胞孵育24小时(A图),48小时(B图),结果显示复合体被细胞有效摄取;

[0048] 图4为本发明中按照实施例1制备的PEDF@sEV对血管内皮生长因子(VEGF)促进内皮细胞增殖作用具有显著抑制作用图;PEDF@sEV纳米复合体相比于单纯的PEDF和sEV对内皮细胞的增殖更显著;

[0049] 图5为本发明中按照实施例1制备的PEDF@sEV对OIR模型小鼠视网膜新生血管具有显著的抑制作用图;PEDF@sEV纳米复合体相比于单纯的PEDF和sEV对OIR动物模型中新生血管增殖的抑制更加明显;

[0050] 图6为本发明中按照实施例1制备的PEDF@sEV对OIR模型小鼠视网膜无灌注区具有显著的抑制作用图;PEDF@sEV纳米复合体相比于单纯的PEDF和sEV对OIR动物模型中无灌注区面积的抑制更加明显;

[0051] 图7为本发明中PEDF@sEV纳米复合体(25%功率)在透射电镜下呈现完整的双层膜结构图;

[0052] 图8为本发明中PEDF@sEV纳米复合体(30%功率)在透射电镜下呈现完整的双层膜结构图。

具体实施方式

[0053] 下面详细叙述本发明的实施例,需要说明的是,本实施例是叙述性的,不是限定性的,不能以此限定本发明的保护范围。

[0054] 本发明中所使用的原料,如无特殊说明,均为常规的市售产品;本发明中所使用的方法,如无特殊说明,均为本领域的常规方法。

[0055] 一种治疗眼部新生血管类疾病的纳米复合体,所述纳米复合体是利用超声的方法将色素上皮衍生因子PEDF装载到脐带间充质干细胞来源的小细胞外囊泡sEV上以制备得到的PEDF@sEV纳米复合体。

[0056] 较优地,所述纳米复合体包括:

[0057] 特征A:以sEV为载体,赋予复合体良好的跨屏障特性;

[0058] 特征B:以PEDF为治疗药物,使复合体在抑制新生血管方面具有更好的长期安全性;

[0059] 特征C:通过超声的方法将PEDF装载到sEV载体上以构建纳米复合体。

[0060] 较优地,采用脐带间充质干细胞来源的sEV作为载体。

[0061] 较优地,所述小细胞外囊泡sEV是利用梯度离心的方法获得的sEV,即细胞分泌的,尺寸在50-200nm之间的胞外囊泡。

[0062] 较优地,超声制备纳米复合体时sEV的终浓度为0.05-100mg/ml,超声制备纳米复合体时PEDF的终浓度为1-100ug/ml。

[0063] 较优地,超声时的sEV与PEDF的质量比为1-1000:1。

[0064] 较优地,所述PEDF@sEV纳米复合体的粒径分布在100-200nm之间。

[0065] 较优地,超声时的超声功率为20%-50%,时间为:1-30分钟,脉冲为:1-60秒开/1-60秒关,超声时的混合液的温度控制在0-4℃。

[0066] 较优地,具体制备步骤如下:

[0067] (1) sEV的制备与分离

[0068] 通过原代培养脐带间充质干细胞,收集细胞条件培养基上清,依次经过300g、10分钟,2000g、10-15分钟,10000g、30分钟,110000g、70分钟的梯度离心后得到sEV的沉淀,再次利用足量的PBS重悬后,再次110000g、70分钟离心后,收集相对纯净的sEV;

[0069] (2) PEDF@sEV纳米复合体的制备

[0070] a. PEDF溶液和sEV溶液的配制

[0071] 溶液为盐的平衡溶液,按照比例,将两种溶液混合均匀;

[0072] PEDF溶液的浓度为1-100μg/mL,sEV溶液的浓度为0.05-100mg/mL,所述盐的平衡溶液为PBS平衡盐溶液,sEV与PEDF的质量比为1-1000:1;

[0073] b. 超声法制备PEDF@sEV复合体

[0074] 将PEDF和sEV的混合液在冰上进行超声,设定超声的功率,时间和脉冲3个参数;

[0075] 超声功率为:20-50%,时间为:1-30分钟,脉冲为:1-60秒开/1-60秒关;

[0076] c. PEDF@sEV复合体的修复

[0077] 超声结束后,将混合液放在25-37℃的环境中进行孵育,孵育时间为30-60分钟,以恢复sEV的结构;

[0078] d. PEDF@sEV复合体的纯化

[0079] 待PEDF@sEV复合体修复结束后,利用截留分子量为100-150kDa的超滤管进行离心、清洗和纯化2-3次,以PBS作为清洗液,并完成纳米复合体回收,即得治疗眼部新生血管类疾病的纳米复合体;

[0080] 其中,纯化时,离心转速为2000-20000g,离心时间为5-45分钟,PBS的体积与复合体的体积比为2-10:1;回收时,离心转速为1000-4000g,离心时间为1-30分钟。

[0081] 如上所述的治疗眼部新生血管类疾病的纳米复合体在作为和/或制备治疗眼部新生血管类疾病药物方面中的应用。

[0082] 具体地,相关制备及检测实施例如下:

[0083] 实施例1:

[0084] 一种治疗眼部新生血管类疾病的纳米复合体,其制备步骤如下:

[0085] 1、sEV的分离纯化

[0086] 通过原代培养脐带间充质干细胞,收集足量的细胞条件培养基上清。依次经过300g(10分钟),2000g(10-15分钟),10000g(30分钟),110000g(70分钟)的梯度离心后得到sEV的沉淀,进而再次利用足量的PBS重悬后,再次110000g(70分钟)离心后,收集相对纯净

的sEV。

[0087] 2、PEDF@sEV的制备

[0088] 利用PBS(平衡盐溶液)分别配置PEDF和sEV的溶液,PEDF的溶液浓度为5ug/ml,sEV的浓度为0.1mg/ml,将sEV与PEDF按质量比为20:1混合,溶液总体积为0.5ml。

[0089] 设置超声的功率为20%,超声时间为3分钟,脉冲参数为4秒开/2秒关。将混合液置于冰上,进行超声。

[0090] 3、PEDF@sEV复合体的修复

[0091] 超声结束后,将混合液放在37℃的环境中进行孵育,孵育时间为60分钟,以恢复sEV的结构。

[0092] 4、PEDF@sEV复合体的纯化

[0093] 待PEDF@sEV复合体修复结束后,利用截留分子量为100kDa的超滤管(浓缩管)进行离心,4000g,10分钟,然后加PBS清洗2次。回收时,1000g离心2分钟回收浓缩的PEDF@sEV纳米复合体。

[0094] 实施例2:

[0095] 一种治疗眼部新生血管类疾病的纳米复合体,其制备步骤如下:

[0096] 1、sEV的分离纯化

[0097] 通过原代培养脐带间充质干细胞,收集足量的细胞条件培养基上清。依次经过300g(10分钟),2000g(10-15分钟),10000g(30分钟),110000g(70分钟)的梯度离心后得到sEV的沉淀,进而再次利用足量的PBS重悬后,再次110000g(70分钟)离心后,收集相对纯净的sEV。

[0098] 2、PEDF@sEV的制备

[0099] 利用PBS(平衡盐溶液)分别配置PEDF和sEV的溶液,PEDF的溶液浓度为10ug/ml,sEV的浓度为0.1mg/ml,将sEV与PEDF按质量比为10:1混合,溶液总体积为0.5ml。

[0100] 设置超声的功率为25%,超声时间为2分钟,脉冲参数为2s/2s。将混合液置于冰上,进行超声。

[0101] 3、PEDF@sEV复合体的修复

[0102] 超声结束后,将混合液放在37℃的环境中进行孵育,孵育时间为30分钟,以恢复sEV的结构。

[0103] 4、PEDF@sEV复合体的纯化

[0104] 待PEDF@sEV复合体修复结束后,利用截留分子量为100kDa的超滤管(浓缩管)进行离心,4000g,10分钟,然后加PBS清洗2次。回收时,1000g离心2分钟回收浓缩的PEDF@sEV纳米复合体。

[0105] 实施例3:

[0106] 一种治疗眼部新生血管类疾病的纳米复合体,其制备步骤如下:

[0107] 1、sEV的分离纯化

[0108] 通过原代培养脐带间充质干细胞,收集足量的细胞条件培养基上清。依次经过300g(10分钟),2000g(10-15分钟),10000g(30分钟),110000g(70分钟)的梯度离心后得到sEV的沉淀,进而再次利用足量的PBS重悬后,再次110000g(70分钟)离心后,收集相对纯净的sEV。

[0109] 2、PEDF@sEV的制备

[0110] 利用PBS(平衡盐溶液)分别配置PEDF和sEV的溶液,PEDF的溶液浓度为5ug/ml,sEV的浓度为0.1mg/ml,将sEV与PEDF按质量比为20:1混合,溶液总体积为1ml。

[0111] 设置超声的功率为30%,超声时间为2分钟,脉冲参数为2s/2s。将混合液置于冰上,进行超声。

[0112] 3、PEDF@sEV复合体的修复

[0113] 超声结束后,将混合液放在37℃的环境中进行孵育,孵育时间为60分钟,以恢复sEV的结构。

[0114] 4、PEDF@sEV复合体的纯化

[0115] 待PEDF@sEV复合体修复结束后,利用截留分子量为100kDa的超滤管(浓缩管)进行离心,4000g,10分钟,然后加PBS清洗2次。回收时,1000g离心2分钟回收浓缩的PEDF@sEV纳米复合体。

[0116] 本发明的相关检测如下:

[0117] 1、采用的检测方法是透射电子显微镜(Transmission Electron Microscope,简称TEM)。其制样方法如下:取30ul适当浓度的PEDF@sEV纳米复合体溶液,滴加在碳支持膜上,室温干燥2分钟后,滴加磷钨酸染色液,静置2分钟后,汞灯下烘干5分钟后进行透射电子显微镜的检测。结果如图1、图7和图8所示,可以看出,超声装载并未明显改变sEV的相对完整的囊泡结构。

[0118] 2、采用的是纳米颗粒分析仪(Nanosight,简称NTA)对PEDF@sEV纳米复合体的粒径大小及分布进行检测。检测结果如图2所示,PEDF@sEV纳米复合体的粒径分布主要集中在100-200nm之间,可以看出,超声载药未明显改变sEV的粒径分布。

[0119] 3、利用红色荧光的亲脂性染料pKH26标记sEV后再构建纳米复合体。将标记红色荧光的PEDF@sEV的纳米复合体与细胞共培养。分别于24小时,48小时进行细胞固定和染色,并利用荧光显微镜观察纳米复合体被细胞摄取的情况。蓝色为细胞核,红色为纳米复合体。结果如图3所示,可以看出,PEDF@sEV纳米复合体可有效被细胞摄取并进入细胞内。

[0120] 4、血管内皮生长因子(简称VEGF)水平的上调是新生血管类眼病发病过程中的重要因素。因此,细胞实验采用VEGF促进人视网膜血管内皮细胞(简称HREC)增殖作为体外实验模型。结果如图4所示,同等浓度下,PEDF@sEV纳米复合体相比于单纯的PEDF和sEV对内皮细胞的增殖更显著,PEDF@sEV纳米复合体具有更强的抑制细胞增殖的能力。这提示sEV装载PEDF后增强了PEDF对增殖抑制的治疗效果,也可以看出,PEDF@sEV纳米复合体中PEDF和sEV具有协同作用。

[0121] 5、氧诱导视网膜病变模型(Oxygen-Induced Retinopathy,简称OIR)是应用非常广泛的眼部新生血管动物模型。OIR模型是将出生7天的幼鼠放入氧舱中(高氧环境)饲养5天,然后返回正常环境中继续饲养5天。小鼠的视网膜血管在出生后才开始发育,OIR模型的有两个病理特点:1.在第7天进入氧舱饲养后,小鼠视网膜中央部位的微血管在高氧环境的刺激下退化,形成无灌注区(无血管区);2.在返回正常环境饲养时,中央无灌注区就会严重缺氧,从而刺激视网膜在无灌注区周围形成大量结构和形态不完整的病理状态的新生血管,并在出生后的第17天达到高峰。因此,针对以上2个病理特点,理想的治疗药物应具备2点效果,1:有效减少无灌注区面积,即恢复无灌注血管的重塑;2:有效抑制病理性新生血管

的增殖。

[0122] 结果如图5和图6所示, PEDF@sEV纳米复合体相比于单纯的PEDF和sEV对OIR动物模型中新生血管增殖的抑制更加明显, PEDF@sEV纳米复合体相比于单纯的PEDF和sEV对OIR动物模型中无灌注区面积的抑制更加明显, PEDF@sEV纳米复合体, 相比于单纯的PEDF, PEDF@sEV纳米复合体中PEDF和sEV具有协同作用, 能够抑制病理行新生血管增殖和减少无灌注的作用更强。这有利的提示, sEV装载PEDF后有力地提高了PEDF的治疗效果。

[0123] 尽管为说明目的公开了本发明的实施例, 但是本领域的技术人员可以理解: 在不脱离本发明及所附权利要求的精神和范围内, 各种替换、变化和修改都是可能的, 因此, 本发明的范围不局限于实施例所公开的内容。

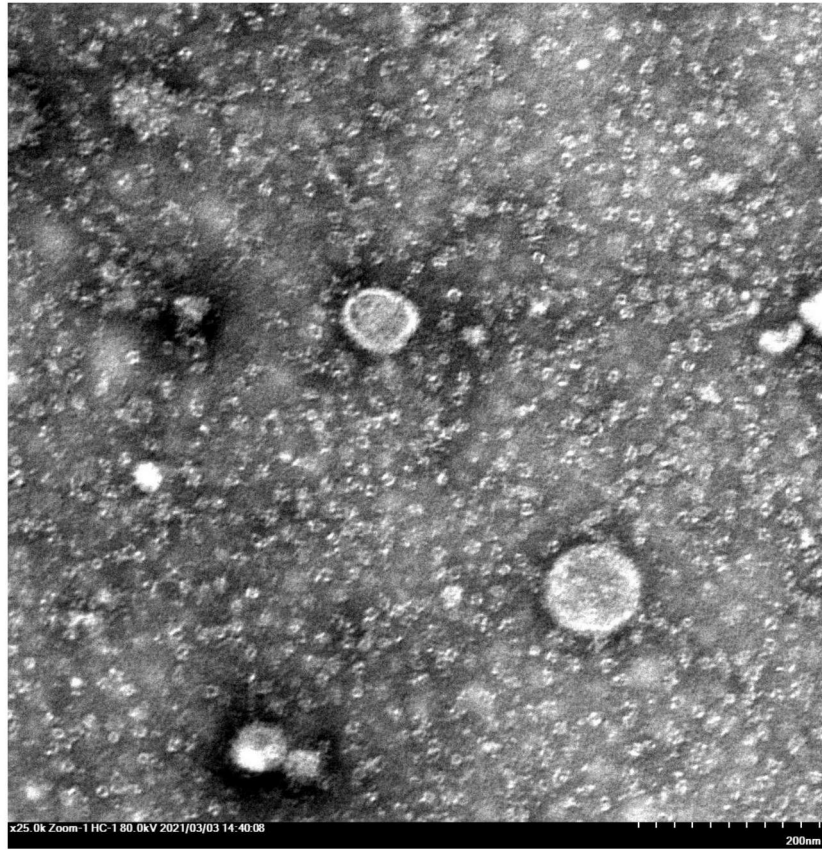


图1

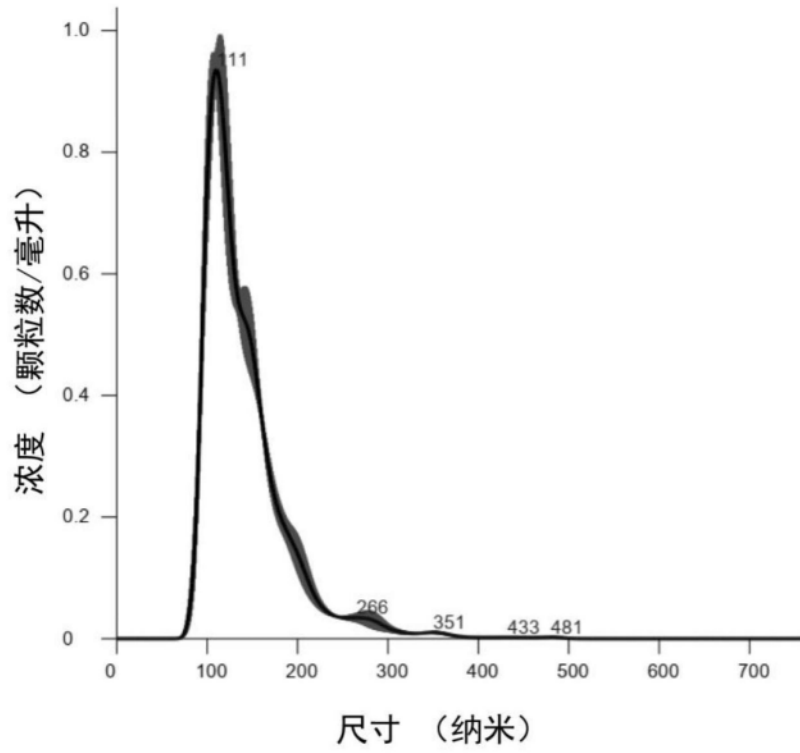


图2

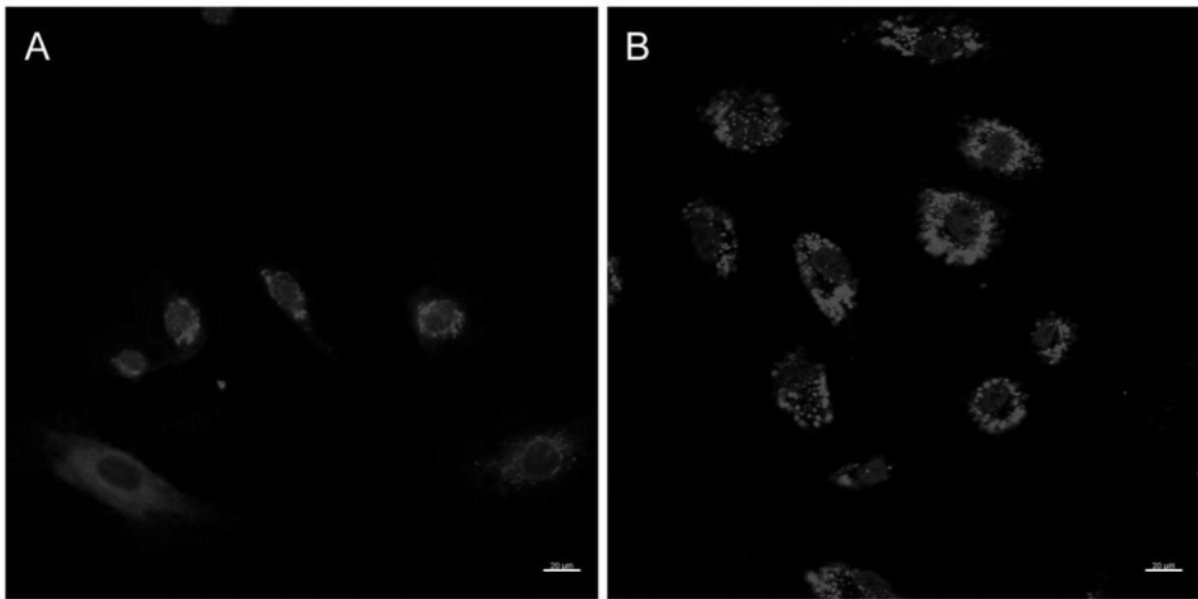


图3

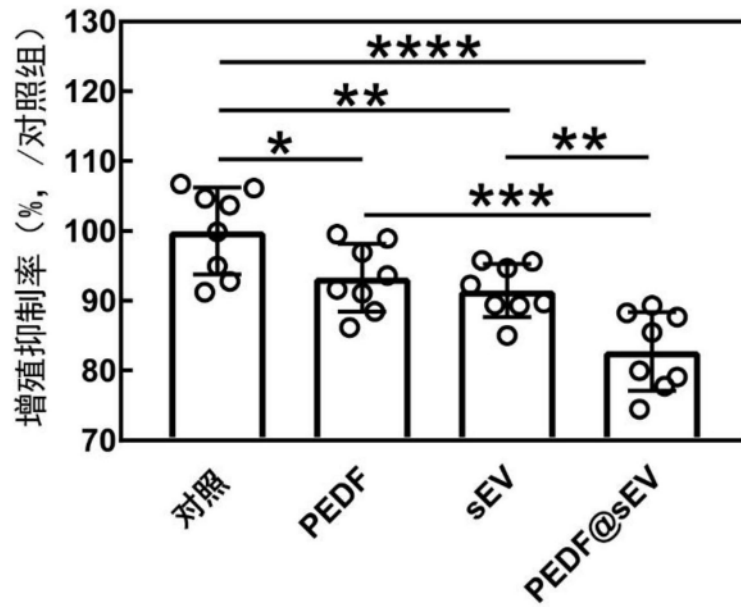


图4

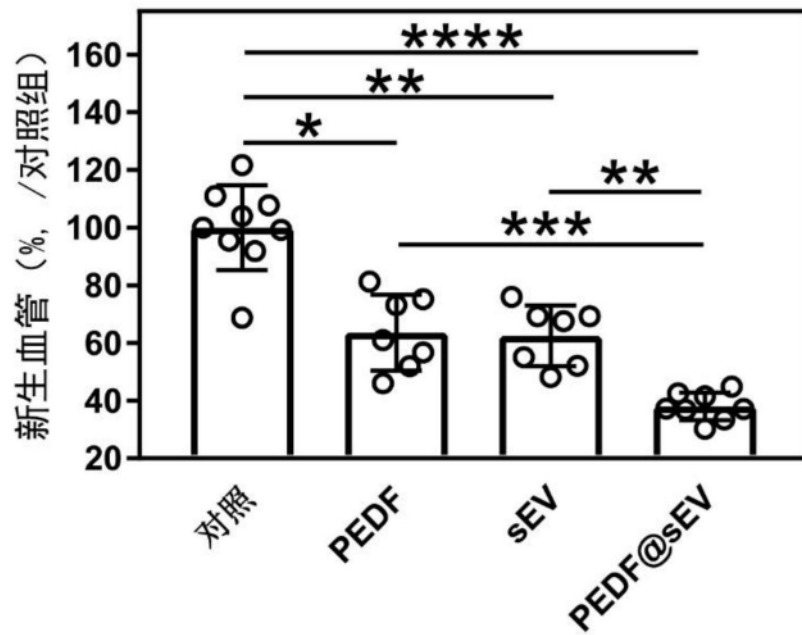


图5

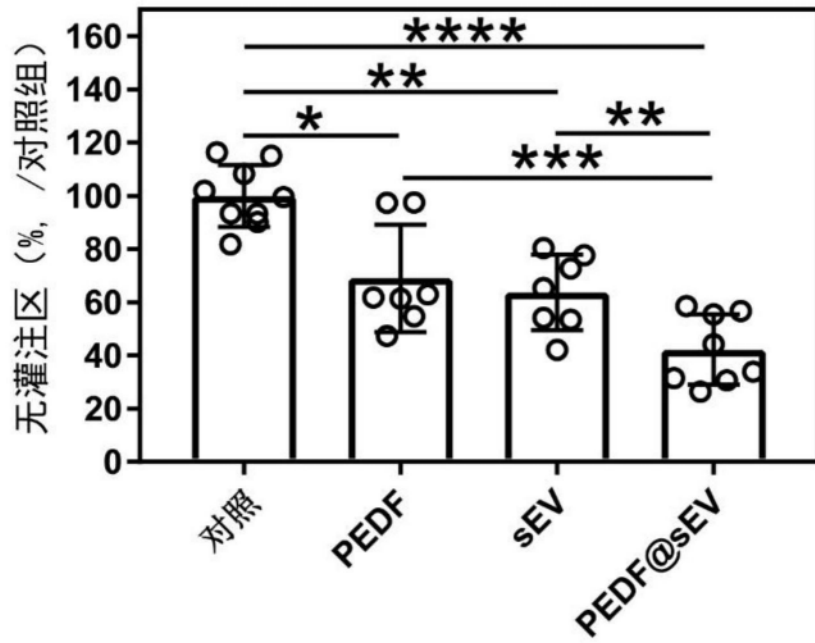


图6

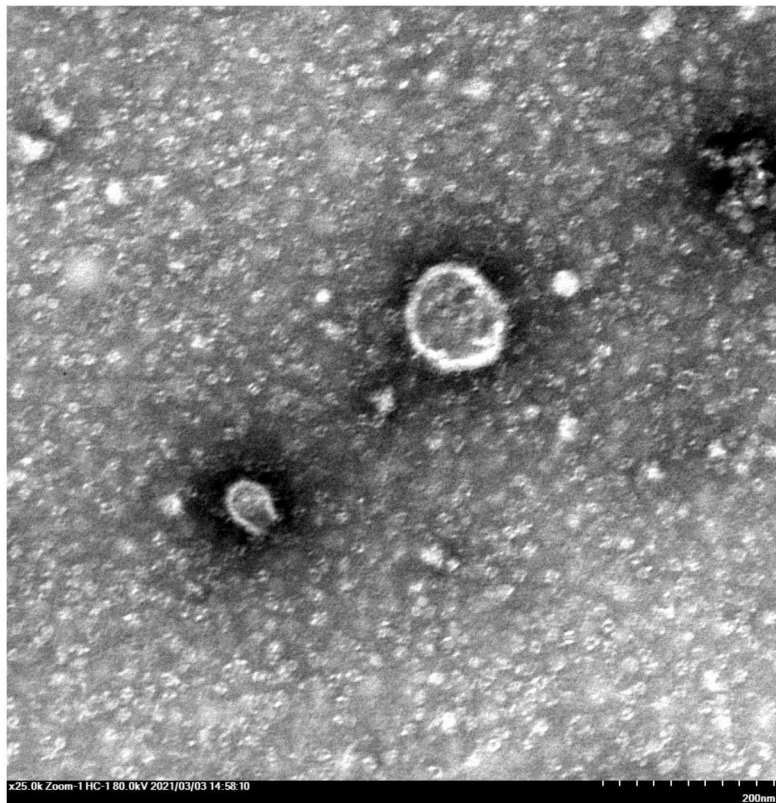


图7



图8