



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103830205 B

(45) 授权公告日 2015.10.28

(21) 申请号 201410072335.4

CN 102614128 A, 2012.08.01, 权利要求

(22) 申请日 2014.02.28

1-7.

(73) 专利权人 中山大学孙逸仙纪念医院

Ralf Smeets 等. A novel homostatic delivery device for thrombin: Biodegradable poly(D, L-lactide-co-glycolide) 50:50 microspheres. 《Wiley Periodicals》. 2010, 第 177-185 页.

地址 510120 广东省广州市越秀区沿江西路 107 号

(72) 发明人 陈汝福 庄宝雄

(74) 专利代理机构 广州市华学知识产权代理有限公司 44245

庞家栋等. 树枝化直链淀粉衍生物用作基因载体的研究. 《2013 年全国高分子学术论文报告会》. 2013, 第 380 页.

代理人 裘晖 张燕玲

审查员 李友

(51) Int. Cl.

A61K 9/51(2006.01)

A61K 38/48(2006.01)

A61K 47/36(2006.01)

A61P 7/04(2006.01)

C08G 81/00(2006.01)

(56) 对比文件

CN 102604114 A, 2012.07.25, 权利要求 1-9.

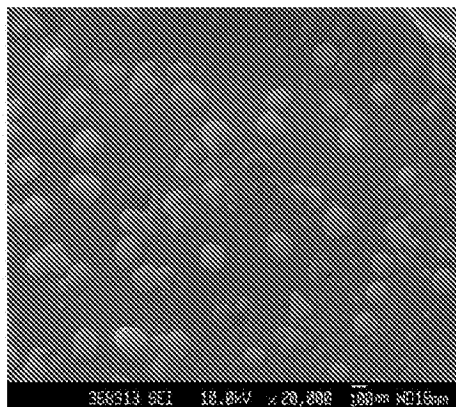
权利要求书2页 说明书8页 附图6页

(54) 发明名称

一种可溶解凝血酶纳米颗粒及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明属于生物医药领域,公开了一种可溶解凝血酶纳米颗粒及其制备方法和应用。该可溶解凝血酶纳米颗粒具有核壳结构,核为凝血酶,壳为由水溶性直链淀粉-聚赖氨酸的阳离子交联形成的纳米粒子。该核壳结构有利于保持凝血酶的生物活性,在室温下稳定保存,具有缓释功能,药物作用时间长,进入体内不容易被降解,经济安全。本发明优选纳米粒子的粒径为 150~250nm,可更好地保持凝血酶的生物活性,进一步提高纳米凝血酶的稳定性及缓释功能。而为了更好地提高纳米凝血酶的稳定性及缓释功能,纳米凝血酶的包封率优选为 50~75%。



1. 一种可溶解凝血酶纳米颗粒的制备方法,其特征包括以下操作步骤:

- (1) 通过点击化学合成直链淀粉-聚赖氨酸纳米颗粒;
- (2) 将直链淀粉-聚赖氨酸纳米颗粒加入到乙酸水溶液中,搅拌至完全溶解,形成直链淀粉-聚赖氨酸乙酸水溶液;
- (3) 将凝血酶加入至 pH6.0 ~ 8.0 缓冲液中,搅拌溶解,形成凝血酶缓冲溶液;
- (4) 将凝血酶缓冲溶液加入到直链淀粉-聚赖氨酸乙酸水溶液中,加入交联剂至质量浓度为 0.01 ~ 0.10%,升温至 30 ~ 50℃,以 100 ~ 800 转/分钟的速度搅拌 20 ~ 60 分钟,将其倾倒入至液体石蜡中,搅拌,再加入分散剂至质量浓度为 1 ~ 10%,以 300 ~ 1500 转/分钟的速度高速搅拌 2 ~ 8 小时进行乳化,得到乳化液;
- (5) 向步骤(4)所得乳化液中加入交联剂至交联剂质量浓度为 0.5 ~ 5.0%,搅拌 20 ~ 60 分钟,使其分散均匀,置于 30 ~ 50℃水浴中进行交联 8 ~ 12 小时,将产物冷却至室温,取出,进行过滤;
- (6) 过滤物用丙酮洗涤,使得丙酮表面无漂浮油斑,即得凝胶状半透明纳米微粒;再以乙醇洗涤脱水,即得固态纳米微粒;
- (7) 将固态纳米微粒在 10 ~ 40℃温度下真空干燥,得到可溶解凝血酶纳米颗粒。

2. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征包括:步骤(1)所述直链淀粉-聚赖氨酸纳米颗粒分子量在 200-300kDa 之间;所述直链淀粉-聚赖氨酸纳米颗粒按照以下制备步骤得到:

(1) 通过酰胺化反应合成第一代树枝状聚赖氨酸:将 1.73g L-2,6-二叔丁氧羰基赖氨酸和 5.5mmol 丙炔胺共溶在 20mL 无水 DMF 中,在通氮气下搅拌 10min,接着冷却至 0℃,再加入 2.18g 苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐和 0.74g 1-羟基苯并三氮唑,继续在室温下搅拌 16h,反应结束后,加入 200mL 乙酸乙酯,用饱和 NaHCO₃溶液、0.1mol/L 的 NaHSO₄、饱和 NaHCO₃溶液和卤水依次冲洗,之后通过旋转蒸发干燥,将获得的粗制产物通过柱层析法纯化,然后旋转蒸发可获得质量分数 90%的第一代树枝状聚赖氨酸;

(2) 合成第二代树枝状聚赖氨酸:在室温下,称取 0.96g 第一代树枝状聚赖氨酸溶解在 15mL 三氟乙酸-二氯甲烷混合溶液中,反应 2h 后,真空去除溶剂;加入 30mL 无水 DMF,随后加入 4mL 三乙胺和 1.75g L-2,6-二叔丁氧羰基赖氨酸,再加入 2.48g 苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐和 0.86g 1-羟基苯并三氮唑,在室温下搅拌 24h,反应结束后,加入 250mL 乙酸乙酯,用饱和 NaHCO₃溶液、0.1mol/L 的 NaHSO₄、饱和 NaHCO₃溶液和卤水依次冲洗,之后通过旋转蒸发干燥,将获得的粗制产物通过柱层析法纯化,然后旋转蒸发可获得质量分数 63%的第二代树枝状聚赖氨酸;

(3) 合成第三代树枝状聚赖氨酸:称取 1.12g 第二代树枝状聚赖氨酸,加入 20mL 三氟乙酸-二氯甲烷混合溶液中,在室温下静置 2h 后去除 L-2,6-二叔丁氧羰基,将获得的固体加入 40mL 无水 DMF,随后加入 6mL 三乙胺和 2.08g L-2,6-二叔丁氧羰基赖氨酸,在通氮气下搅拌 10min,接着冷却至 0℃;反应结束后,通过旋转蒸发干燥,将获得的粗制产物通过柱层析法纯化,然后旋转蒸发可获得质量分数 60%的第三代树枝状聚赖氨酸;

(4) 称取 0.515g 第三代树枝状聚赖氨酸,加入 15mL 三氟乙酸-二氯甲烷混合溶液中,在室温下静置 2h 后去除残留的 L-2,6-二叔丁氧羰基;将溶剂蒸发后,加入 0.05g 直链淀粉和 10mL 二甲基亚砜进行溶解;在通氮气下,加入 18mg CuSO₄·5H₂O 和 65mg 抗坏血酸钠,并将

混合溶液加热至 40℃恒温 48h,反应结束后,将产物在蒸馏水中透析 3d,冻干后可获得质量分数 65%的直链淀粉-聚赖氨酸纳米颗粒。

3. 根据权利要求 2 所述的制备方法,其特征在于:步骤(2)~(4)所述三氟乙酸-二氯甲烷混合溶液中三氟乙酸和二氯甲烷的体积比为 1:1。

4. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于:步骤(2)所述乙酸水溶液的质量浓度为 0.5~2.5%;所述直链淀粉-聚赖氨酸乙酸水溶液中直链淀粉-聚赖氨酸的质量浓度为 0.5~8%。

5. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于:步骤(3)所述凝血酶是人凝血酶、猪凝血酶、牛凝血酶或羊凝血酶;步骤(3)所述凝血酶缓冲溶液中的凝血酶和步骤(2)所述直链淀粉-聚赖氨酸乙酸水溶液中直链淀粉-聚赖氨酸的质量比为 4:0.5~2。

6. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于:步骤(4)所述将凝血酶缓冲溶液加入到直链淀粉-聚赖氨酸乙酸水溶液中的同时要以 100~800 转/分钟的速度进行搅拌。

7. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于:步骤(4)和(5)所述交联剂为聚乙二醇、海藻酸钠或戊二醛;步骤(4)所述分散剂是司盘 80、吐温 80 或泊洛沙姆。

8. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于:步骤(6)所述丙酮洗涤的次数为 2~5 次;步骤(6)所述乙醇洗涤是以体积百分比为 70%的乙醇、体积百分比为 80%的乙醇、体积百分比为 90%的乙醇及无水乙醇依次脱水。

9. 一种根据权利要求 1~8 任一项所述的方法制备的可溶解凝血酶纳米颗粒,其特征在于:该可溶解凝血酶纳米颗粒的粒径为 200~350nm,其包封率为 50~75%。

10. 根据权利要求 9 所述的可溶解凝血酶纳米颗粒在制备止血药物或止血喷剂中的应用。

一种可溶解凝血酶纳米颗粒及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,具体涉及一种可溶解凝血酶纳米颗粒及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 凝血酶(thrombin)是一种专一性很强的丝氨酸蛋白水解酶,它能水解血纤维蛋白原的肽键,产生不溶性的血纤维蛋白,使血液变成凝胶而发生凝固,使血液快速凝固、堵塞出血点而达到止血的目的。由于其止血快,无副作用等优点,广泛应用于创伤和临床手术创面以及消化道粘膜等部位的出血与渗血,止血效果好,疗效确切。然而,普通凝血酶是一种蛋白酶类试剂,容易受光线、温度、湿度,特别是微生物的污染因素影响而导致生物活性下降甚至丧失。在常温下,凝血酶的水溶液在保存 24 天后就完全失活。稳定性较差,使其应用受到了一定限制。

[0003] 利用丰富的可降解高分子纳米材料固化包裹凝血酶,制备凝血酶纳米颗粒,可大大减少光线、温度、湿度等对凝血酶的影响,从而提高凝血酶的稳定性。目前开发出一些包载凝血酶药物,但有的包载凝血酶的载体需溶于有机溶剂中来制备包载凝血酶,有的包载凝血酶的载体溶液呈酸性,有的包载凝血酶需在高温下制备,而有机溶剂、酸性溶液、高温对凝血酶的活性均有较大影响,从而降低制得的包载凝血酶的药效。

[0004] 因此,目前很有必要开发一种对所包载的凝血酶的活性无较大影响,稳定性好、安全高效、使用范围广泛的凝血酶新剂型。

发明内容

[0005] 为了克服现有技术中包载凝血酶药物的药效低、溶解度低、毒性大的缺点与不足,本发明的首要目的在于提供一种可溶解凝血酶纳米颗粒的制备方法;

[0006] 本发明的另一目的在于提供上述制备方法得到的可溶解凝血酶纳米颗粒;

[0007] 本发明的再一目的在于提供上述可溶解凝血酶纳米颗粒的应用。

[0008] 本发明的目的通过下述技术方案实现:一种可溶解凝血酶纳米颗粒的制备方法,包括以下操作步骤:

[0009] (1) 通过点击化学合成直链淀粉-聚赖氨酸纳米颗粒;

[0010] (2) 将直链淀粉-聚赖氨酸纳米颗粒加入到乙酸水溶液中,搅拌至完全溶解,形成直链淀粉-聚赖氨酸乙酸水溶液;

[0011] (3) 将凝血酶加入至 pH6.0 ~ 8.0 缓冲液中,搅拌溶解,形成凝血酶缓冲溶液;

[0012] (4) 将凝血酶缓冲溶液加入到直链淀粉-聚赖氨酸乙酸水溶液中,加入交联剂至质量浓度为 0.01 ~ 0.10%,升温至 30 ~ 50℃,以 100 ~ 800 转/分钟的速度搅拌 20 ~ 60 分钟,将其倾倒入至液体石蜡中,搅拌,再加入分散剂至质量浓度为 1 ~ 10%,以 300 ~ 1500 转/分钟的速度高速搅拌 2 ~ 8 小时进行乳化,得到乳化液;

[0013] (5) 向步骤(4)所得乳化液中加入交联剂至交联剂质量浓度为 0.5 ~ 5.0%,搅拌

20 ~ 60 分钟,使其分散均匀,置于 30 ~ 50℃水浴中进行交联 8 ~ 12 小时,将产物冷却至室温,取出,进行过滤;

[0014] (6) 过滤物用丙酮洗涤,使得丙酮表面无漂浮油斑,即得凝胶状半透明纳米微粒;再以乙醇洗涤脱水,即得固态纳米微粒;

[0015] (7) 将固态纳米微粒在 10 ~ 40℃温度下真空干燥,得到可溶解凝血酶纳米颗粒。

[0016] 步骤(1)所述直链淀粉-聚赖氨酸纳米颗粒分子量在 200-300kDa 之间;所述直链淀粉-聚赖氨酸纳米颗粒按照以下制备步骤得到:

[0017] (1) 通过酰胺化反应合成第一代树枝状聚赖氨酸:将 1.73g L-2,6-二叔丁氧羰基赖氨酸和 5.5mmol 丙炔胺共溶在 20mL 无水 DMF 中,在通氮气下搅拌 10min,接着冷却至 0℃,再加入 2.18g 苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸盐和 0.74g 1-羟基苯并三氮唑,继续在室温下搅拌 16h,反应结束后,加入 200mL 乙酸乙酯,用饱和 NaHCO₃溶液、0.1mol/L 的 NaHSO₄、饱和 NaHCO₃溶液和卤水依次冲洗,之后通过旋转蒸发干燥,将获得的粗制产物通过柱层析法纯化(硅胶,氯仿-甲醇=5:1),然后旋转蒸发可获得质量分数 90% 的第一代树枝状聚赖氨酸;

[0018] (2) 合成第二代树枝状聚赖氨酸:在室温下,称取 0.96g 第一代树枝状聚赖氨酸溶解在 15mL 三氟乙酸-二氯甲烷混合溶液中,反应 2h 后,真空去除溶剂;加入 30mL 无水 DMF,随后加入 4mL 三乙胺和 1.75g L-2,6-二叔丁氧羰基赖氨酸,再加入 2.48g 苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸盐和 0.86g 1-羟基苯并三氮唑,在室温下搅拌 24h,反应结束后,加入 250mL 乙酸乙酯,用饱和 NaHCO₃溶液、0.1mol/L 的 NaHSO₄、饱和 NaHCO₃溶液和卤水依次冲洗,之后通过旋转蒸发干燥,将获得的粗制产物通过柱层析法纯化,然后旋转蒸发可获得质量分数 63% 的第二代树枝状聚赖氨酸;

[0019] (3) 合成第三代树枝状聚赖氨酸:称取 1.12g 第二代树枝状聚赖氨酸,加入 20mL 三氟乙酸-二氯甲烷混合溶液中,在室温下静置 2h 后去除 L-2,6-二叔丁氧羰基,将获得的固体加入 40mL 无水 DMF,随后加入 6mL 三乙胺和 2.08g L-2,6-二叔丁氧羰基赖氨酸,在通氮气下搅拌 10min,接着冷却至 0℃;反应结束后,通过旋转蒸发干燥,将获得的粗制产物通过柱层析法纯化,然后旋转蒸发可获得质量分数 60% 的第三代树枝状聚赖氨酸;

[0020] (4) 称取 0.515g 第三代树枝状聚赖氨酸,加入 15mL 三氟乙酸-二氯甲烷混合溶液中,在室温下静置 2h 后去除残留的 L-2,6-二叔丁氧羰基;将溶剂蒸发后,加入 0.05g 直链淀粉和 10mL 二甲基亚砜进行溶解;在通氮气下,加入 18mg CuSO₄·5H₂O 和 65mg 抗坏血酸钠,并将混合溶液加热至 40℃恒温 48h,反应结束后,将产物在蒸馏水中透析 3d,冻干后可获得质量分数 65% 的直链淀粉-聚赖氨酸纳米颗粒。

[0021] 步骤(2)~(4)所述三氟乙酸/二氯甲烷混合溶液中三氟乙酸和二氯甲烷的体积比为 1:1。

[0022] 步骤(2)所述乙酸水溶液的质量浓度为 0.5 ~ 2.5%;所述直链淀粉-聚赖氨酸乙酸水溶液中直链淀粉-聚赖氨酸的质量浓度为 0.5 ~ 8%。

[0023] 步骤(3)所述凝血酶是人凝血酶、猪凝血酶、牛凝血酶或羊凝血酶;步骤(3)所述凝血酶缓冲溶液中的凝血酶和步骤(2)所述直链淀粉-聚赖氨酸乙酸水溶液中直链淀粉-聚赖氨酸的质量比为 4:0.5 ~ 2。

[0024] 步骤(4)所述将凝血酶缓冲溶液加入到直链淀粉-聚赖氨酸乙酸水溶液中的同时

要以 100 ~ 800 转 / 分钟的速度进行搅拌。

[0025] 步骤(4)和(5)所述交联剂为聚乙二醇、海藻酸钠或戊二醛;步骤(5)所述分散剂是司盘 80、吐温 80 或泊洛沙姆。

[0026] 步骤(4)所述丙酮洗涤的次数为 2 ~ 5 次。步骤(6)所述乙醇洗涤是以体积百分比为 70% 的乙醇、体积百分比为 80% 的乙醇、体积百分比为 90% 的乙醇及无水乙醇依次脱水。

[0027] 一种由权利要求 1 所述的制备方法制备得到的可溶解凝血酶纳米颗粒,该可溶解凝血酶纳米颗粒的粒径为 200 ~ 350nm,其包封率为 50 ~ 75%。该可溶解凝血酶纳米颗粒具有核壳结构,核为凝血酶,壳为由水溶性直链淀粉 - 聚赖氨酸的阳离子交联形成的纳米粒子。该核壳结构有利于保持凝血酶的生物活性,在室温下稳定保存,具有缓释功能,药物作用时间长,进入体内不容易被降解,经济安全。本发明优选纳米粒子的粒径为 150 ~ 250nm,可更好地保持凝血酶的生物活性,进一步提高纳米凝血酶的稳定性及缓释功能。而为了更好地提高纳米凝血酶的稳定性及缓释功能,纳米凝血酶的包封率优选为 50 ~ 75%。

[0028] 上述的可溶解凝血酶纳米颗粒可作为止血药物或止血喷剂的作用。

[0029] 本发明相对于现有技术具有如下的优点及有益效果:

[0030] 本发明可溶解凝血酶纳米颗粒,由于采用核壳结构,核为凝血酶,壳为直链淀粉 - 聚赖氨酸的阳离子交联形成的纳米粒子,即将凝血酶包载在由直链淀粉 - 聚赖氨酸的阳离子交联形成的纳米粒子中,水溶性直链淀粉 - 聚赖氨酸的阳离子是通过分子间或分子内交联反应而形成纳米粒子,是一种静电作用,不涉及热交联过程中的高温及化学交联过程中的共价键形成,对所包载的凝血酶的活性无较大影响;直链淀粉 - 聚赖氨酸是水溶性的,且为无毒性,安全高效,稳定性好,对所包载的凝血酶的活性也无较大影响。因此,本发明提供的纳米凝血酶保持了凝血酶的生物活性。

[0031] 本发明可溶解凝血酶纳米颗粒,由于凝血酶被包载在水溶性直链淀粉 - 聚赖氨酸的阳离子交联成的纳米粒子中,因此可在室温下稳定保存;凝血酶的活性比较稳定;具有缓释功能,适于静脉注射;药物作用时间长,生物利用度高;进入体内不容易被降解,降低了用药剂量;直链淀粉 - 聚赖氨酸可在体内降解为氨基酸和葡萄糖,无毒性且生物兼容性好,使本发明提供的纳米凝血酶安全;通过对纳米粒子表面修饰可制备靶向药物制剂,本发明提供的纳米凝血酶具有良好的药物开发潜力,具有较高的医用价值和广阔的应用前景。

附图说明

[0032] 图 1 是直链淀粉 - 聚赖氨酸纳米颗粒分子结构图。

[0033] 图 2 是直链淀粉 - 聚赖氨酸纳米颗粒的红外谱图分析图。

[0034] 图 3 是本发明可溶解凝血酶纳米颗粒的扫描电镜图。

[0035] 图 4 是本发明可溶解凝血酶纳米颗粒的活性变化曲线图。

[0036] 图 5 是 25℃ 下各时间点凝血酶活性的保留率。

[0037] 图 6 是 0℃ 下各时间点凝血酶活性的保留率。

[0038] 图 7 是 -20℃ 下各时间点凝血酶活性的保留率。

[0039] 图 8 是纳米凝血酶在纤维蛋白原溶液中反应结果,其中 a 为纳米凝血酶溶液,b 为纤维蛋白原凝固物形成,c 为纤维蛋白原凝固物沉积。

[0040] 图 9 是不同浓度纳米凝血酶对血液的凝血效果,其中 a 为不同浓度梯度的凝血酶纳米颗粒,b 为加入 2ml 新鲜血液,c 为不同浓度梯度的纳米凝血酶的血液凝固过程,d 为血液凝固效果。

[0041] 图 10 是纳米凝血酶对肝出血的止血效果,其中 a 为正常大鼠肝脏解剖,b 为大鼠肝脏出血模型,c 为纳米凝血酶对肝脏出血模型的止血效果。

[0042] 图 11 是纳米凝血酶对血管出血的止血作用,其中 a 为大鼠右髂动脉的解剖,b 为大鼠右髂动脉的出血模型,c 为大鼠右髂动脉的出血模型的止血效果。

具体实施方式

[0043] 下面结合实施例对本发明作进一步详细的描述,但本发明的实施方式不限于此。

[0044] 实施例 1

[0045] 直链淀粉-聚赖氨酸纳米颗粒的制备:

[0046] (1) 通过酰胺化反应合成第一代树枝状聚赖氨酸:1.73g L-2,6-二叔丁氧羰基赖氨酸(5mmol)和 350 μ L 丙炔胺(5.5mmol)共溶在 20mL 无水 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)溶液中,在通氮气下搅拌 10min,接着冷却至 0 $^{\circ}$ C,向溶液中加入 2.18g (5.5mmol) 苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐(HBTU)和 0.74g (5.5mmol) 1-羟基苯并三氮唑(HOBT),继续在室温下搅拌 16h,反应结束后,加入 200mL 乙酸乙酯(EtOAc),用饱和 NaHCO₃溶液、0.1mol/L 的 NaHSO₄、饱和 NaHCO₃溶液和卤水依次冲洗,之后通过旋转蒸发干燥,将获得的粗制产物通过柱层析法纯化(硅胶,氯仿-甲醇=5:1),然后旋转蒸发可获得 90% 的第一代树枝状聚赖氨酸。

[0047] (2) 合成第二代树枝状聚赖氨酸:首先用三氟乙酸(TFA)切割第一代树枝状聚赖氨酸;在室温下,称取 0.96g (2.5mmol) 第一代树枝状聚赖氨酸溶解在 15mL 三氟乙酸-二氯甲烷(v/v=1:1)混合溶液中,反应 2h 后,真空去除溶剂,加入 30mL 无水 DMF,随后加入 4mL 三乙胺和 1.75g (5.1mmol) L-2,6-二叔丁氧羰基赖氨酸,接着,加入 2.48g (6.2mmol) HBTU 和 0.86g (6.2mmol) HOBT,在室温下搅拌 24h,反应结束后,加入 250mL 乙酸乙酯,用饱和 NaHCO₃溶液、0.1mol/L 的 NaHSO₄、饱和 NaHCO₃溶液和卤水依次冲洗,之后通过旋转蒸发干燥,将获得的粗制产物通过柱层析法纯化(硅胶,氯仿-甲醇=10:1),然后旋转蒸发可获得质量分数 63% 的第二代树枝状聚赖氨酸。

[0048] (3) 合成第三代树枝状聚赖氨酸:称取 1.12g (1.30mmol) 第二代树枝状聚赖氨酸,加入 20mL 三氟乙酸-二氯甲烷(v/v=1:1),在室温下静置 2h 后去除 L-2,6-二叔丁氧羰基,将获得的固体加入 40mL 无水 DMF,随后加入 6mL 三乙胺和 2.08g (5.5mmol) L-2,6-二叔丁氧羰基赖氨酸,在通氮气下搅拌 10min,接着冷却至 0 $^{\circ}$ C;反应结束后,之后通过旋转蒸发干燥,将获得的粗制产物通过柱层析法纯化(硅胶,氯仿-甲醇=15:1),然后旋转蒸发可获得质量分数 60% 的第三代树枝状聚赖氨酸;

[0049] (4) 制备可溶解凝血酶纳米颗粒:将 0.515g (0.29mmol) 第三代树枝状聚赖氨酸,加入 15mL 三氟乙酸-二氯甲烷(v/v=1:1),在室温下静置 2h 后去除残留的 L-2,6-二叔丁氧羰基;将溶剂蒸发后,加入 0.05g 直链淀粉(Amy-N₃,购买于美国 sigma 公司)和 10mL 二甲基亚砜,溶解后可获得清亮的溶液;接着,在通氮气下,称取 18mg CuSO₄·5H₂O 和 65mg 抗坏血酸钠加入溶液,并将混合溶液加热至 40 $^{\circ}$ C 恒温 48h,反应结束后,将产物在蒸馏水中透析

3d (MWC0=14000), 冻干后可获得质量分数 65% 的树可溶解凝血酶纳米颗粒 (Amy-g-PLLD), 其合成过程如图 1 所示。根据红外谱图分析, 聚赖氨酸已经连接上直链淀粉, 如图 2 所示。

[0050] 实施例 2

[0051] 取实施例 1 所得直链淀粉 - 聚赖氨酸纳米颗粒 20mg, 置入三颈烧瓶中, 加入质量百分数 2% 的乙酸水溶液 500ml, 搅拌使其完全溶解; 另称取凝血酶(购于美国 sigma 公司) 3000u, 加磷酸盐缓冲液 (pH7.4) 100ml, 搅拌溶解, 形成凝血酶缓冲溶液; 在室温下以 100 ~ 800 转 / 分钟的速度搅拌, 将凝血酶缓冲溶液滴加到上述直链淀粉 - 聚赖氨酸乙酸水溶液中, 滴加时间为 30min, 升温至 40℃, 滴加质量分数 0.1% 戊二醛溶液 30ml, 以 200 转 / 分钟的速度连续搅拌 30min, 停止搅拌, 将其倾倒入至 500ml 液体石蜡中, 搅拌 25min, 加入 50ml 的吐温 80, 以 500 转 / 分钟的速度高速搅拌 4 小时进行乳化; 取乳化液再加入质量分数 25% 的戊二醛溶液 100ml, 搅拌 30min 使其分散均匀, 置于 40℃ 水浴锅中进行交联自组装 8h, 将产物冷却至室温, 取出, 进行过滤, 得产物用丙酮洗涤 3 次, 每次 300ml, 即得凝胶状半透明纳米微粒; 后再依次以体积分数 70% 乙醇、体积分数 80% 乙醇、体积分数 90% 乙醇及无水酒精各 200ml 洗涤脱水, 即得固态纳米微球; 将制得固态纳米微球置于真空干燥器中 30℃ 真空干燥, 得可溶解凝血酶纳米颗粒, 测定制得的可溶解凝血酶纳米颗粒的包封率为 75.81%, 平均粒径为 250nm。将制得的可溶解凝血酶纳米颗粒进行扫描电镜下观察, 电镜照片如图 3 所示。

[0052] 实施例 3

[0053] 取实施例 1 所得直链淀粉 - 聚赖氨酸纳米颗粒 40mg, 置入三颈烧瓶中, 加入质量百分数 2% 的乙酸水溶液 1500ml, 搅拌使其完全溶解; 另称取凝血酶(购于美国 sigma 公司) 6000u, 加磷酸盐缓冲液 (pH7.4) 150ml, 搅拌溶解, 形成凝血酶缓冲溶液; 在室温下以 100 ~ 800 转 / 分钟的速度搅拌, 将凝血酶缓冲溶液滴加到上述直链淀粉 - 聚赖氨酸乙酸水溶液中, 滴加时间为 40min, 升温至 40℃, 滴加质量分数 0.1% 戊二醛溶液 40ml, 以 300 转 / 分钟的速度连续搅拌 40min, 停止搅拌, 将其倾倒入至 500ml 液体石蜡中, 搅拌 35min, 加入 100ml 的吐温 80, 以 500 转 / 分钟的速度高速搅拌 4 小时进行乳化; 取乳化液再加入质量分数 25% 的戊二醛溶液 150ml, 搅拌 40min 使其分散均匀, 置于 40℃ 水浴锅中进行交联自组装 10h, 将产物冷却至室温, 取出, 进行过滤, 得产物用丙酮洗涤 3 次, 每次 300ml, 即得凝胶状半透明纳米微粒; 后再依次以体积分数 70% 的乙醇、体积分数 80% 的乙醇、体积分数 90% 的乙醇及无水酒精各 200ml 洗涤脱水, 即得固态纳米微球; 将制得固态纳米微球置于真空干燥器中 30℃ 真空干燥, 得可溶解凝血酶纳米颗粒, 测定制得的可溶解凝血酶纳米颗粒的包封率为 65.26%, 平均粒径为 220nm。

[0054] 实施例 4

[0055] 取实施例 1 所得直链淀粉 - 聚赖氨酸纳米颗粒 30mg, 置入三颈烧瓶中, 加入质量百分数 2% 的乙酸水溶液 1000ml, 搅拌使其完全溶解; 另称取凝血酶(购于美国 sigma 公司) 5000u, 加磷酸盐缓冲液 (pH7.4) 150ml, 搅拌溶解, 形成凝血酶缓冲溶液; 在室温下以 100 ~ 800 转 / 分钟的速度搅拌, 将凝血酶缓冲溶液滴加到上述直链淀粉 - 聚赖氨酸乙酸水溶液中, 滴加时间为 40min, 升温至 50℃, 滴加质量分数 0.5% 海藻酸钠 30ml, 以 250 转 / 分钟的速度连续搅拌 30min, 停止搅拌, 将其倾倒入至 500ml 液体石蜡中, 搅拌 25min, 加入 150g 的泊洛沙姆, 以 800 转 / 分钟的速度高速搅拌 3 小时进行乳化; 取乳化液再加入质量分数 15%

的海藻酸钠溶液 250ml, 搅拌 50min 使其分散均匀, 置于 50℃ 水浴锅中进行交联自组装 12h, 将产物冷却至室温, 一取出, 进行过滤, 得产物用丙酮洗涤 3 次, 每次 400ml, 即得凝胶状半透明纳米微粒; 后再依次以体积分数 70% 的乙醇、体积分数 80% 的乙醇、体积分数 90% 的乙醇及无水酒精各 250ml 洗涤脱水, 即得固态纳米微球; 将制得固态纳米微球置于真空干燥器中 30℃ 真空干燥, 得可溶解凝血酶纳米颗粒, 测定制得的可溶解凝血酶纳米颗粒的包封率为 55.12%, 平均粒径为 200nm。

[0056] 纳米凝血酶活性稳定性分析:

[0057] (1) 分别将实施例 2-4 中制备的可溶解凝血酶纳米颗粒用去离子水溶解, 以凝血酶的浓度计, 分别配制成 50U/mL 的可溶解凝血酶纳米颗粒水溶液, 同时配制凝血酶浓度相同的自由凝血酶水溶液, 均在 110rpm/37℃ 的保存条件下保存, 在不同时间点测定残存酶诱导 PRP 中血小板聚集的能力, 如图 4 所示(图中为实施例 1 的可溶解凝血酶纳米颗粒和自由凝血酶的活性变化曲线, 实施例 3 和 4 的可溶解凝血酶纳米颗粒的活性变化曲线图与实施例 1 的活性变化曲线相似), 可溶解凝血酶纳米颗粒活性变化类似于药物释放曲线, 在 5h 时左右发生药物突释, 在 72h 时左右, 酶活性达到最大, 之后开始缓慢下降, 而自由酶则是一个活性衰减的过程。

[0058] 从上述实施例可以看出, 本发明提供的可溶解凝血酶纳米颗粒, 保持了凝血酶的生物活性, 活性稳定, 具有缓释功能, 药物作用时间长。

[0059] (2) 温度稳定性实验:

[0060] 分别将实施例 2-4 中制备的可溶解凝血酶纳米颗粒和普通凝血酶置于适宜的洁净培养皿中密封, 分别在 25℃、0℃ 和 -20℃ 下放置, 分别于 0 天、5 天、10 天、15 天、20 天、25 天、30 天、35 天、40 天、45 天、50 天、55 天和 60 天取样, 参考中国药典中凝血酶活性测定方法检测检测凝血酶活性。如图 5、图 6 及图 7 所示, 在 25℃、0℃ 和 -20℃ 条件下两组材料的活性均呈现随时间延长逐渐下降的趋势; 其中在 25℃ 条件下, 普通凝血酶活性下降最为显著, 在 60 天时活性保留率下降至 40%, 而纳米凝血酶活性在 60 天时活性保留率下降至 60%; 在 0℃ 和 -20℃ 条件下, 纳米凝血酶活性下降均比普通凝血酶活性下降缓慢, 两组比较 $P < 0.05$, P 纳米凝血酶组在 60 天内的活性保留率高于普通凝血酶组。

[0061] (3) 酸碱稳定性实验:

[0062] 分别将实施例 2-4 中制备的可溶解凝血酶纳米颗粒和普通凝血酶置于适宜的洁净培养皿中, 以不同 PH 值的磷酸盐缓冲液均匀滴加浸润并密封, 使湿润条件下的材料 pH 值分别处于 6.5-6.8, 7.0-7.4, 以及 7.6-8.0 范围中, 于第 3 和第 5 天取样, 参考上述凝血酶活性测定方法进行检测。如在保存期间材料变干燥, 则先以去离子水浸润后测定 pH 值, 之后根据结果重新以磷酸盐缓冲液调节 pH 值至原设定范围。结果表 1 及表 2 所示: 两组材料的活性保留率均有降低; 在接近中性的 pH 值 7.0-7.4 范围内, 两组材料 5 天活性保留率分别为 74.8% (普通凝血酶组) 及 84.9% (纳米凝血酶组); 在相同时间点, 弱酸(pH 值 6.5-6.8) 及弱碱(pH 值 7.6-8.0) 环境下两组材料的活性保留率均低于中性环境(pH 值 7.0-7.4), 弱酸性环境下对材料活性的影响更大, 5 天活性保留率两组材料均低于 70%; 相同条件下的纳米凝血酶组材料活性保留率高于普通凝血酶组。

[0063] (4) 光照稳定性实验:

[0064] 分别将实施例 2-4 中制备的可溶解凝血酶纳米颗粒和普通凝血酶置于适宜

的洁净培养皿中,适宜的洁净培养皿中密封,放在 YB-II 型澄明度检测仪中,于照度为 $4500lx \pm 500lx$ 的条件下放置 10 天,于第 5 和第 10 天取样,参考上述凝血酶活性测定方法进行检测。结果如表 3 所示:两组材料在光照条件下的活性保留率均有降低,5 天普通凝血酶的活性保留率分别为 72.2%,纳米凝血酶的活性保留率分别为 80.6%;10 天普通凝血酶的活性保留率分别为 67.5%,纳米凝血酶的活性保留率分别为 74.9%;相同条件下的纳米凝血酶组材料活性保留率高于普通凝血酶组。

[0065] 表 1 普通凝血酶对酸碱稳定性

[0066]

PH 值 范围	0 天 (对照)			3 天			5 天		
	初凝时 间 (s)	活性 (U)	活性保 留率 (%)	初凝时 间 (s)	活性 (U)	活性保 留率 (%)	初凝时 间 (s)	活性 (U)	活性保 留率 (%)
6.5-6.8				72.5	3.64	70.2	80.6	3.23	62.5
7.0-7.4	61.65	4.51	83.6	65.2	4.05	80.3	69.65	3.68	74.8
7.6-8.0				66.89	3.95	78.5	72.82	3.60	70.2

[0067] 表 2 凝血酶纳米颗粒对酸碱稳定性

[0068]

PH 值 范围	0 天 (对照)			3 天			5 天		
	初凝时 间 (s)	活性 (U)	活性保 留率 (%)	初凝时 间 (s)	活性 (U)	活性保 留率 (%)	初凝时 间 (s)	活性 (U)	活性保 留率 (%)
6.5-6.8				72.60	3.66	72.8	77.48	3.28	67.3
7.0-7.4	53.08	4.68	94.1	58.11	4.48	88.7	60.28	4.26	84.9
7.6-8.0				65.28	4.12	81.6	68.12	3.91	76.8

[0069] 表 3 凝血酶纳米颗粒对光照的稳定性

[0070]

组别	0 天 (对照)			5 天			10 天		
	初凝时 间 (s)	活性 (U)	活性保 留率 (%)	初凝时 间 (s)	活性 (U)	活性保 留率 (%)	初凝时 间 (s)	活性 (U)	活性保 留率 (%)
普通凝血酶	60.08	4.18	84.1	72.00	3.65	72.2	77.18	3.52	67.5
纳米凝血酶	52.82	4.68	93.6	68.32	4.082	80.6	68.56	3.96	74.9

[0071] 纳米凝血酶止血效果分析:

[0072] (1) 实验室检测方法:

[0073] 取 $1.5 \times 15\text{cm}$ 试管,加入质量浓度 3% 的纤维蛋白原生理盐水溶液 5ml,取约含有 5U 凝血酶的纳米颗粒材料置于试管中,观察形成凝固物的情况。5min 内有凝固物形成,认为有效止血。如图 8 所示,纳米凝血酶置于纤维蛋白原溶液中,5min 时可见显著纤维蛋白凝固物沉积。图 9 为纳米凝血酶不同浓度梯度对血液的止血效果,图中显示,随着纳米凝血酶浓度逐渐升高,止血效果逐渐增强。

[0074] (2) 动物实验评估止血效果:

[0075] ① 大鼠肝血管出血模型的止血实验:

[0076] 健康雄性 SD 大鼠, 体重 300--350g, 室温 23-25℃ 下单笼饲养, 自由进食、进水, 12 小时光照 / 黑暗。大鼠及标准大鼠饲料均由中山大学实验动物中心提供。大鼠以 10% 水合氯醛 (0.3ml/100g) 腹腔内注射麻醉, 仰卧位固定, 消毒, 取腹部正中切口长约 5cm, 逐层剪开皮肤、肌肉及腹膜, 进腹。暴露肝脏。将肝脏右叶充分暴露后在其正中以尖刀划取 1×1cm 的正方形边界, 深约 0.5cm。以组织剪将边界内肝组织去除, 并以组织镊刮除创面, 使肝脏创面出现明显渗血。将预先准备好的双层折叠止血材料 (3×3cm, 5U/cm²) 置于创面, 充分覆盖并贴附肝组织, 以干棉球于材料外侧创面上方适当压迫并计时, 记录渗血完全停止时间。对照组采用明胶海绵及普通干纱球行同样操作。每种材料平行测定 10 次, 评估止血效果。如图 10 所示, 纳米凝血酶对肝脏渗血模型有很好的止血作用。

[0077] ②大鼠髂动脉出血模型止血实验:

[0078] 以前述方法麻醉、进腹, 将大鼠肠管推向右侧腹腔, 以盐水棉签钝性分离腹主动脉前方后腹膜及动脉周围脂肪组织, 显露腹主动脉。沿腹主动脉下端向下钝性分离右侧髂总动脉, 游离约 1cm。丝线标记远、近端并预备结扎。提起游离段, 将预先准备好纳米凝血酶。以 5ml 注射器针头穿刺右髂总动脉游离段的中点, 动脉血搏动性喷出后立即以预置的受试材料覆盖穿刺点, 保证材料良好贴附于髂总动脉外壁, 5min 后移除受试材料并记录有无活动性出血。如图 11 所示, 纳米凝血酶对血管渗血模型有很好的止血作用。

[0079] 本发明提供的可溶解凝血酶纳米颗粒, 保持了凝血酶的生物活性; 在室温下稳定保存; 活性稳定; 具有缓释功能, 适于静脉注射; 药物作用时间长, 生物利用度高; 进入体内不容易被降解, 降低了用药剂量; 直链淀粉-聚赖氨酸材料无毒、生物兼容性好, 使本发明提供的可溶解凝血酶纳米颗粒经济安全; 通过对纳米粒子表面修饰可制备靶向药物制剂, 本发明提供的纳米凝血酶具有良好的药物开发潜力, 可广泛应用于外科领域, 如普通外科、骨科、心胸外科、神经外科、妇产科等的组织止血、组织封口和组织粘合, 具有广阔的应用前景。

[0080] 上述实施例为本发明较佳的实施方式, 但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制, 其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化, 均应为等效的置换方式, 都包含在本发明的保护范围之内。

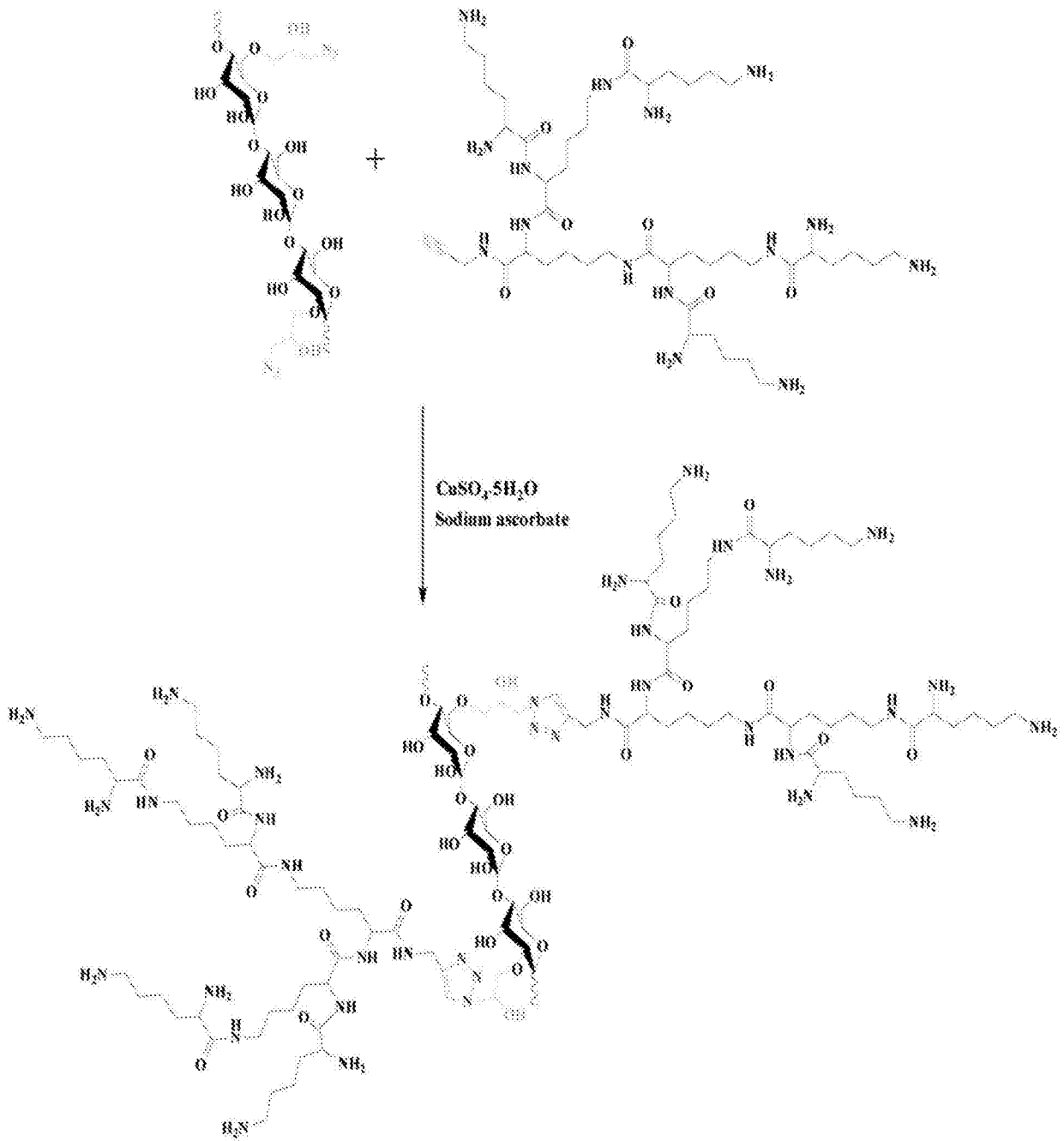


图 1

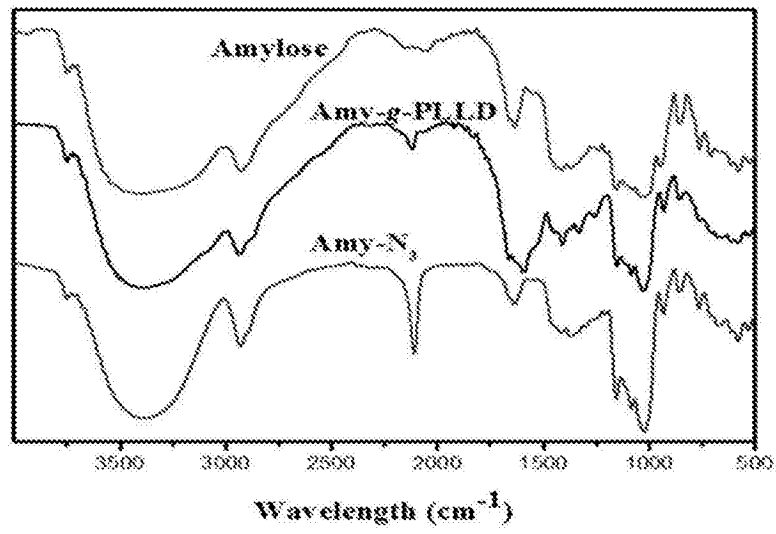


图 2

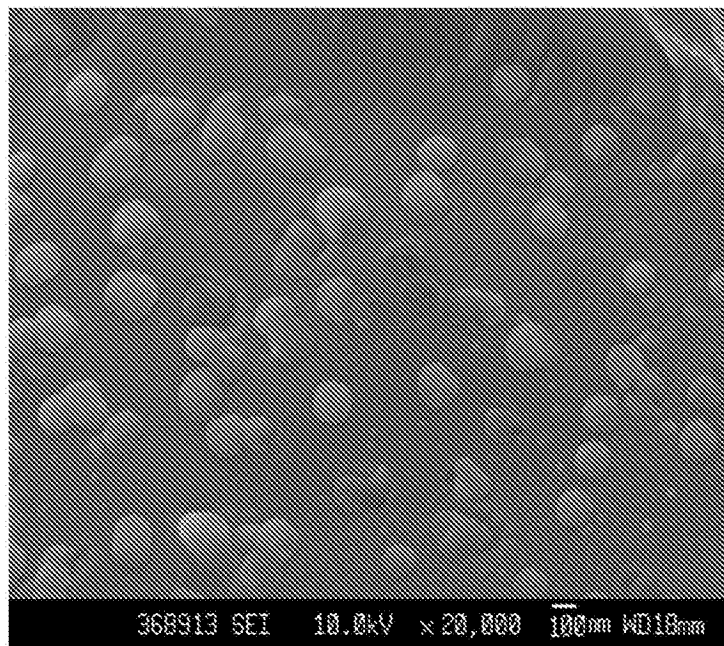


图 3

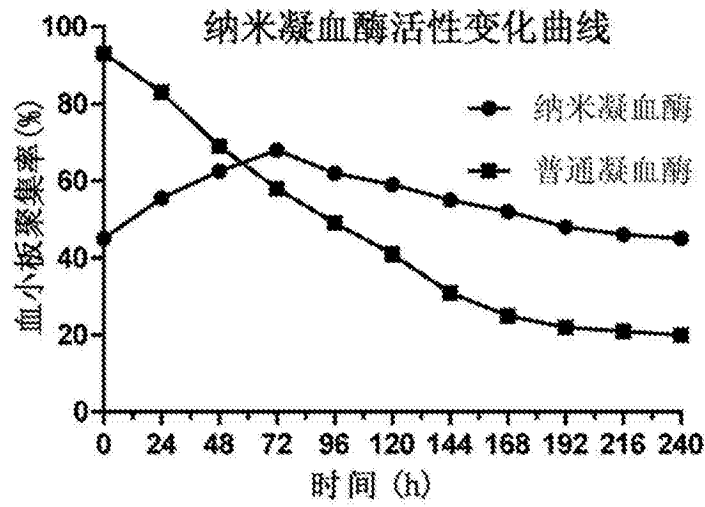


图 4

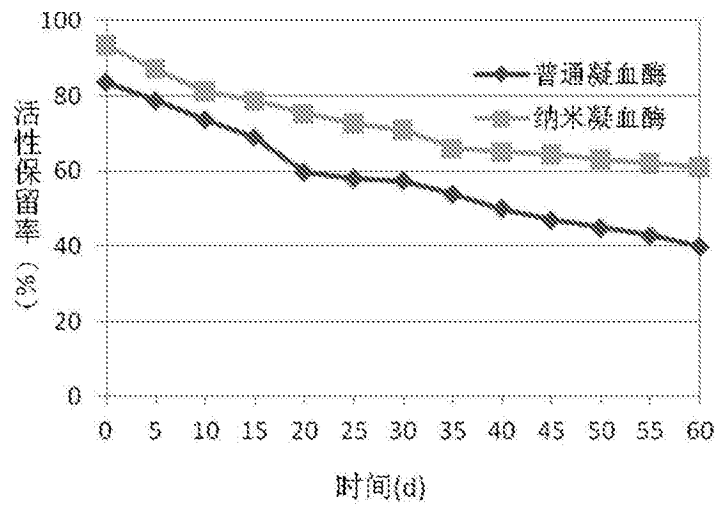


图 5

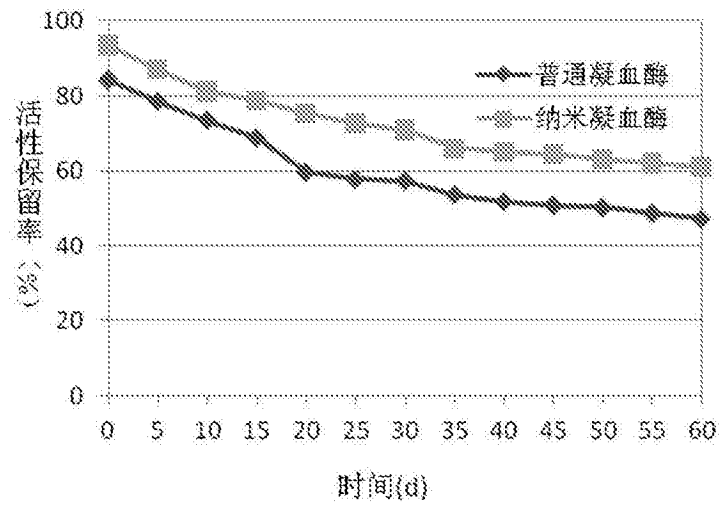


图 6

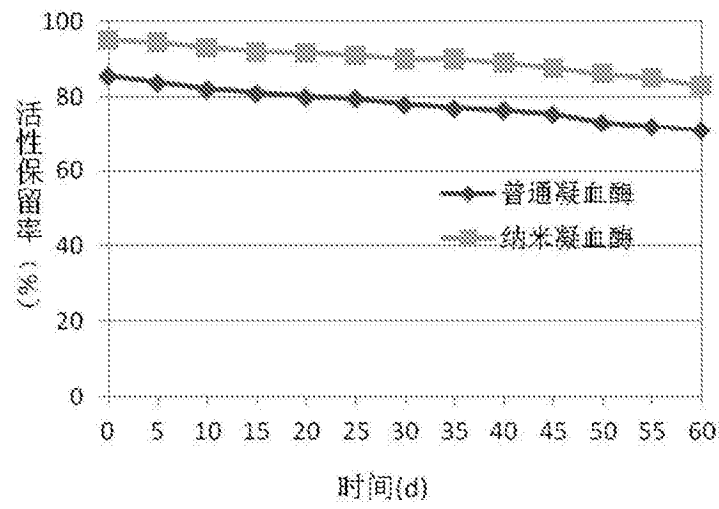


图 7

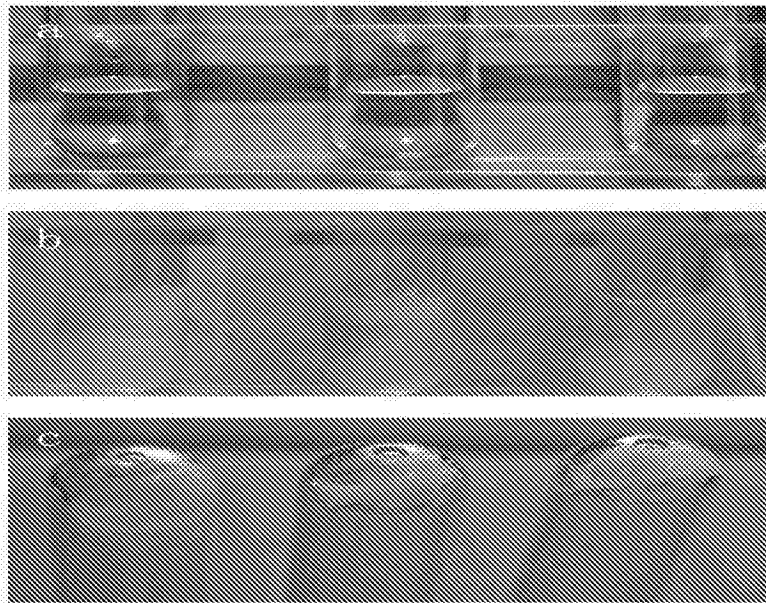


图 8

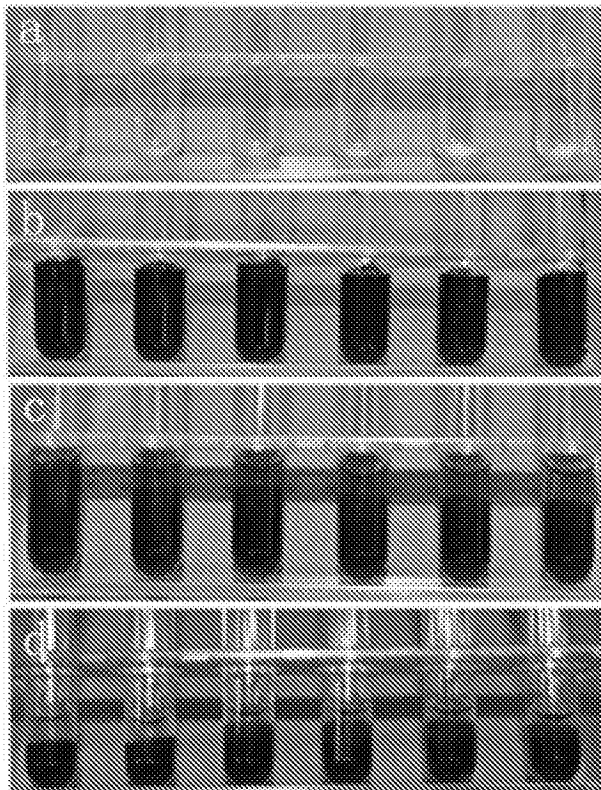


图 9

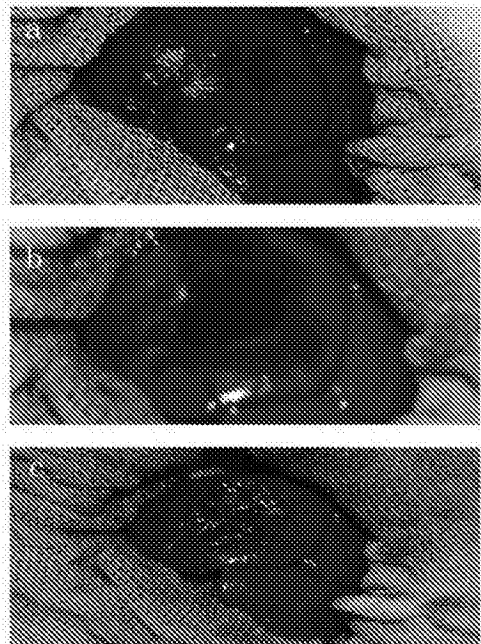


图 10

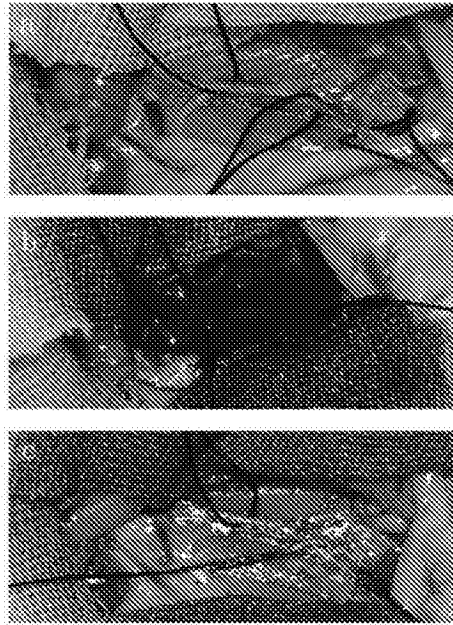


图 11