



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 117643621 B

(45) 授权公告日 2024. 07. 02

(21) 申请号 202311410420.2

(22) 申请日 2023.10.27

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 117643621 A

(43) 申请公布日 2024.03.05

(73) 专利权人 江苏省人民医院(南京医科大学第一附属医院)

地址 210029 江苏省南京市鼓楼区广州路300号

专利权人 东南大学

(72) 发明人 李春坚 杨芳

(74) 专利代理机构 南京科知维创知识产权代理有限公司 32270

专利代理师 杜依民

(51) Int. Cl.

A61K 38/45 (2006.01)

C12N 5/078 (2010.01)

A61K 47/46 (2006.01)

A61K 9/10 (2006.01)

A61K 9/14 (2006.01)

A61P 7/02 (2006.01)

(56) 对比文件

Hua R等.Platelet Membrane-Coated r-SAK Improves Thrombolytic Efficacy by Targeting Thrombus.《ACS Appl Mater Interfaces》.2024,第1-12页.

审查员 王鹏

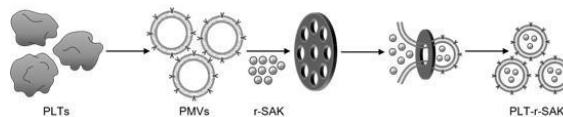
权利要求书2页 说明书8页 附图4页

(54) 发明名称

一种溶栓药PLT-r-SAK及其制备方法

(57) 摘要

本发明提出一种新型溶栓药PLT-r-SAK及其制备方法,包括纳米血小板膜、r-SAK,r-SAK包载在纳米血小板膜内。纳米血小板膜包载r-SAK后,可靶向动脉和/或静脉血栓,实现r-SAK的靶向递送,对血栓进行靶向溶栓。一方面,能有效缩短溶栓至动脉和/或静脉开通的时间;第二,能显著提高血栓动脉和/或静脉溶栓开通率。第三,纳米血小板膜包载形成PLT-r-SAK后,PLT-r-SAK在体和离体溶栓疗效优于其四倍剂量r-SAK的溶栓疗效。第四,采用本发明制备溶栓药PLT-r-SAK的方法,所制备的PLT-r-SAK体外稳定性高,不会聚集或碎裂。



1. 一种溶栓药PLT-r-SAK,其特征在于:由纳米血小板膜、r-SAK构成,所述r-SAK包载在纳米血小板膜内;

制备所述溶栓药PLT-r-SAK的方法包括如下步骤:

S1,采用反复冻融法提取血小板膜,取新鲜血小板悬液,冻融,之后转速离心分离血小板细胞膜与细胞器内容物,并用生理盐水将沉淀洗涤,获得空白纯化的血小板膜囊泡;

S2,配置r-SAK生理盐水溶液,取溶液重悬步骤S1中的空白纯化的血小板膜囊泡沉淀,获得r-SAK重悬的血小板膜囊泡混悬液;

S3.将步骤S2获得的r-SAK重悬的血小板膜囊泡混悬液在冰浴条件下进行超声均质处理,以破碎血小板膜,使其形成初步包裹r-SAK的微米级囊泡结构,得到均质混悬液;

S4,将步骤S3中所制得的匀质混悬液转移到气动脂质体挤出装置中,将匀质混悬液挤出通过滤膜,包封r-SAK,最终形成以血小板膜为膜壳,r-SAK溶液为水相核心的纳米级囊泡结构的悬液;

步骤S1中,空白纯化的血小板膜为人或啮齿类动物血小板;

空白纯化的血小板膜提取时所用的新鲜血小板浓度为 0.5×10^9 个/mL- 1.5×10^9 个/mL;

步骤S2中,r-SAK生理盐水溶液的溶液浓度为0.01-0.25 mg/mL;

步骤S4中,气动脂质体挤出装置所用滤膜孔径尺寸为100nm-800 nm;过膜的次数为5-20次。

2.根据权利要求1所述的溶栓药PLT-r-SAK,其特征在于:所述溶栓药PLT-r-SAK利用纳米血小板膜包载r-SAK,靶向动脉和/或静脉血栓,实现r-SAK的靶向递送,对血栓进行靶向溶栓治疗。

3.根据权利要求1所述的溶栓药PLT-r-SAK,其特征在于:所述溶栓药PLT-r-SAK利用纳米血小板膜包载r-SAK,靶向动脉和/或静脉血栓,实现r-SAK的靶向递送,缩短溶栓至动脉和/或静脉开通的时间。

4.根据权利要求1所述的溶栓药PLT-r-SAK,其特征在于:所述溶栓药PLT-r-SAK利用纳米血小板膜包载r-SAK,靶向动脉和/或静脉血栓,实现r-SAK的靶向递送,提高动脉和/或静脉溶栓开通率。

5.根据权利要求1所述的溶栓药PLT-r-SAK,其特征在于:所述溶栓药PLT-r-SAK为注射剂。

6.根据权利要求1所述的溶栓药PLT-r-SAK,其特征在于:将匀质混悬液依次挤出通过孔径尺寸为800、400、200nm的滤膜,过膜的次数为10次。

7.根据权利要求1所述的溶栓药PLT-r-SAK,其特征在于:步骤S2,生理盐水溶液中r-SAK的浓度为:0.1 mg/mL。

8.一种制备溶栓药PLT-r-SAK的方法,其特征在于包括如下步骤:

(1)采用反复冻融法提取血小板膜,取新鲜血小板悬液冻融,之后离心分离血小板细胞膜与细胞器内容物,并用生理盐水将沉淀洗涤,获得空白纯化的血小板膜囊泡;

(2)配置r-SAK生理盐水溶液,并取溶液于冰浴条件下重悬步骤(1)中的空白纯化的血小板膜囊泡沉淀,获得r-SAK重悬的血小板膜囊泡混悬液;

(3)将步骤(2)中所得混悬液在冰浴条件下进行超声均质处理,以破碎血小板膜,使其形成初步包裹r-SAK的微米级囊泡结构;

(4) 将步骤(3)中所制得的均质混悬液转移到气动脂质体挤出装置中,将混悬液挤出通过滤膜,包封r-SAK,最终形成以血小板膜为膜壳,r-SAK溶液为水相核心的纳米级囊泡结构的悬液;

所述溶栓药PLT-r-SAK由纳米血小板膜、r-SAK构成,所述r-SAK包载在纳米血小板膜内;步骤(1)中,空白纯化的血小板膜为人或啮齿类动物血小板;

空白纯化的血小板膜提取时所用的新鲜血小板浓度为 0.5×10^9 个/mL- 1.5×10^9 个/mL;

步骤(2)中,r-SAK生理盐水溶液的溶液浓度为0.01-0.25 mg/mL;

步骤(4)中,气动脂质体挤出装置所用滤膜孔径尺寸为100nm-800 nm;过膜的次数为5-20次。

一种溶栓药PLT-r-SAK及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及药物制剂领域,尤其是纳米技术、溶栓药物及制备靶向溶栓药物的方法,具体说是一种溶栓药PLT-r-SAK及其制备方法。

背景技术

[0002] 血栓是由血液形成的固体块状物质。若血栓形成于血管内,可导致管腔阻塞、血流中断,产生相应脏器的缺血症状,如肢体寒冷、疼痛、麻木、溃疡,甚至坏死等。若血栓发生于冠状动脉则会发生急性心肌梗死。目前,临床上可采用静脉注射r-SAK或其它溶栓药物进行急性心肌梗死、脑梗死、肺栓塞、外周动脉或静脉血管血栓形成或栓塞等血栓性疾病的溶栓治疗。

[0003] 然而,静脉输注的药物可通过血液循环分布到身体的各个部位,不只是血栓局部。以r-SAK为例,静脉输注后,血栓部位的r-SAK量受血液循环全身分布的影响而减少,从而影响溶栓效果。使用更大剂量r-SAK后血栓部位的r-SAK量可相应增加,溶栓疗效可能会提高,但同时可能带来更多的出血副作用。

发明内容

[0004] 为了解决上述技术问题,本发明提出一种溶栓药PLT-r-SAK及其制备方法。具体如下:

[0005] 本发明提出一种溶栓药PLT-r-SAK,包括纳米血小板膜、r-SAK,所述r-SAK包载在纳米血小板膜内。

[0006] 进一步的,所述溶栓药PLT-r-SAK利用纳米血小板膜包载r-SAK,靶向动脉和/或静脉血栓,实现r-SAK的靶向递送,对血栓进行靶向溶栓治疗。

[0007] 进一步的,所述溶栓药PLT-r-SAK利用纳米血小板膜包载r-SAK,靶向动脉和/或静脉血栓,实现r-SAK的靶向递送,缩短溶栓至动脉和/或静脉开通的时间。

[0008] 进一步的,所述溶栓药PLT-r-SAK利用纳米血小板膜包载r-SAK,靶向动脉和/或静脉血栓,实现r-SAK的靶向递送,提高动脉和/或静脉溶栓开通率。

[0009] 进一步的,所述溶栓药PLT-r-SAK为注射剂,或粉剂。

[0010] 本发明通过以下步骤制备得到PLT-r-SAK:

[0011] (1) 采用反复冻融法提取血小板膜,取新鲜血小板悬液冻融,之后离心分离血小板细胞膜与细胞器等内容物,并用生理盐水将沉淀洗涤,获得空白纯化的血小板膜囊泡;

[0012] (2) 配置r-SAK生理盐水溶液,并取溶液于冰浴条件下重悬步骤(1)中的空白纯化的血小板膜囊泡沉淀,获得r-SAK重悬的血小板膜囊泡混悬液;

[0013] (3) 将步骤(2)中所得混悬液在冰浴条件下进行超声均质处理,以破碎血小板膜,使其形成初步包裹r-SAK的微米级囊泡结构;

[0014] (4) 将步骤(3)中所制得的均质混悬液转移到脂质体挤出装置中,将混悬液挤出通过滤膜,包封r-SAK,最终形成以血小板膜为膜壳,r-SAK溶液为水相核心的纳米级囊泡结构

的悬液。

[0015] 进一步优选的,本发明通过以下步骤制备得到PLT-r-SAK:

[0016] S1,采用反复冻融法提取血小板膜,取新鲜血小板悬液于-80℃冻融,之后转速离心分离血小板细胞膜与细胞器内容物,并用生理盐水将沉淀洗涤,获得空白纯化的血小板膜囊泡;

[0017] 空白纯化的血小板膜提取时所用的新鲜血小板浓度为 0.5×10^9 个/mL- 1.5×10^9 个/mL;

[0018] 作为优选,所述空白纯化的血小板膜提取时所用的新鲜血小板浓度为 1×10^9 个/mL。

[0019] S2,配置r-SAK生理盐水溶液,并取等体积的溶液冰浴条件下重悬步骤S1中的空白纯化的血小板膜囊泡沉淀,获得r-SAK重悬的血小板膜囊泡混悬液;

[0020] S3,将步骤S2中所得混悬液在冰浴条件下进行超声均质处理,以破碎血小板膜,使其形成初步包裹r-SAK的微米级囊泡结构;

[0021] 其中,所述超声均质的参数为超声作用功率200-1000 W,作用时间为30-120s。

[0022] 作为优选,所述超声均质参数为超声作用功率400 W,作用时间60 s。

[0023] S4,将步骤S3中所制得的均质混悬液转移到气动脂质体挤出装置中,将混悬液挤出通过滤膜,包封r-SAK,最终形成以血小板膜为膜壳,r-SAK溶液为水相核心的纳米级囊泡结构的悬液。

[0024] 进一步的,步骤S1中,所述空白纯化的血小板膜为人或啮齿类动物血小板;

[0025] 步骤S2中,r-SAK的溶液浓度为0.01-0.25 mg/mL。

[0026] 步骤S2中,气动脂质体挤出装置所用滤膜孔径尺寸为100nm-800 nm;过膜的次数为5-20次。

[0027] 较佳的,将混合溶液依次基础通过孔径尺寸为800、400、200nm的滤膜,过膜的次数为10次。

[0028] 较佳的,混合生理盐水溶液中的r-SAK浓度为:0.1 mg/mL。

[0029] 本发明中PLT-r-SAK代表纳米血小板膜包载重组葡激酶;r-SAK代表重组葡激酶。有益效果

[0030] 本发明采用纳米血小板膜包载r-SAK,形成的溶栓药PLT-r-SAK靶向动脉和/或静脉血栓,实现r-SAK的靶向递送,对血栓进行靶向溶栓治疗。一方面,能有效缩短溶栓至动脉和/或静脉开通的时间;第二,能显著提高动脉和/或静脉溶栓开通率。第三,纳米血小板膜包载r-SAK后,PLT-r-SAK在体和离体溶栓疗效优于其四倍剂量r-SAK的溶栓疗效。第四,采用本发明制备溶栓药PLT-r-SAK的方法,所制备的PLT-r-SAK体外稳定性高,不会聚集或碎裂。

附图说明

[0031] 图1为PLT-r-SAK的示意图;

[0032] 图2为PLT-r-SAK的透射电镜结构图;

[0033] 图3为动物体外实验研究结果;

[0034] 图4为 PLT-r-SAK在兔股动脉血栓模型中的溶栓效果;其中,r-SAK:重组葡激酶;

PLT-r-SAK:纳米血小板膜包被重组葡激酶;NS:生理盐水;

[0035] 图5为体外实验中生理盐水组、低剂量r-SAK组、高剂量r-SAK组、PLT-r-SAK组溶栓率统计图;

[0036] 图6为培育得到的血凝块图;

[0037] 图7为 PLT-r-SAK的平均粒径变化曲线。

实施方式

[0038] 实施例:本实施例提出一种溶栓药PLT-r-SAK,包括纳米血小板膜、r-SAK,所述r-SAK包载在纳米血小板膜内。以实现(1)有效缩短溶栓至动脉和/或静脉开通的时间。(2)显著提高动脉和/或静脉溶栓开通率。(3)纳米血小板膜包载r-SAK后,PLT-r-SAK在体和离体溶栓疗效优于其四倍剂量r-SAK的溶栓疗效。(4)采用本发明制备溶栓药PLT-r-SAK的方法,所制备的PLT-r-SAK体外稳定性高,不会聚集或碎裂。

[0039] 本发明通过以下步骤制备得到PLT-r-SAK:

[0040] (1)采用反复冻融法提取血小板膜,取2 mL浓度为 1×10^9 /mL的新鲜血小板悬液于 -80°C 冻融3次,之后于4000 g转速离心分离血小板细胞膜与细胞器等内容物,并用生理盐水将沉淀洗涤3次,获得空白纯化的血小板膜囊泡;

[0041] 空白纯化的血小板膜提取时所用的新鲜血小板浓度为 0.5×10^9 个/mL- 1.5×10^9 个/mL;

[0042] 作为优选,所述空白纯化的血小板膜提取时所用的新鲜血小板浓度为 1×10^9 个/mL。

[0043] 其中,所述r-SAK的溶液浓度为0.01-0.25 mg/mL。

[0044] (2)配置浓度为0.1 mg/mL的r-SAK生理盐水溶液,并取等体积的溶液(2 mL)与冰浴条件下重悬步骤(1)中的空白纯化的血小板膜囊泡沉淀,获得r-SAK重悬的血小板膜囊泡混悬液;

[0045] 其中,冰浴条件可以保护血小板膜蛋白和r-SAK的生物活性,避免温度过高导致的活性降低,从而保证了制备得到的PLT-r-SAK的活性,避免因制备过程导致PLT-r-SAK活性降低而影响溶栓效果。

[0046] (3)将步骤(2)中所得混悬液在冰浴条件下进行超声均质处理,以破碎血小板膜,使其形成初步包裹r-SAK的微米级囊泡结构;

[0047] 其中,所述超声均质的参数为超声作用功率200-1000 W,作用时间为30-120s。

[0048] 作为优选,所述超声均质参数为超声作用功率400 W,作用时间60 s。

[0049] (4)将步骤(3)中所制得的均质混悬液转移到脂质体挤出装置中,将混悬液挤出通过孔径为200 nm的滤膜10次,包封r-SAK,最终形成以血小板膜为膜壳,r-SAK溶液为水相核心的纳米级囊泡结构的悬液,血小板膜重组及r-SAK包载的过程如图1所示;

[0050] 采用透射电子显微镜表征制备得到的PLT-r-SAK的微观结构如图2所示:PLT-r-SAK具有良好的球形囊泡结构,内部高衬度区域为所包载的r-SAK,所得PLT-r-SAK的纳米载体粒径均匀,尺寸为200 nm左右。

[0051] 对本发明工艺制备得到的PLT-r-SAK的直径按天在同一时间点进行连续7天测量,得到PLT-r-SAK平均粒径变化曲线,如图7所示。

[0052] 从图7 PLT-r-SAK的平均粒径变化曲线中可以看出,本发明工艺制备得到的PLT-r-SAK具有出色的体外稳定性,随着时间的推移没有聚集或碎裂。

[0053] 所述溶栓药为注射剂。

[0054] 所述溶栓药利用血小板膜包载r-SAK,靶向动脉和/或静脉血栓,实现r-SAK的靶向递送,即对血栓进行靶向溶栓治疗。

[0055] 课题组采用本发明制备方法制备的PLT-r-SAK进行了实验,实验如下:

[0056] 一、实验目的

[0057] 比较PLT-r-SAK与不同剂量r-SAK在溶栓效率、血管开通时间、开通维持时间、开通率和出血风险等方面的差异,探讨PLT-r-SAK溶栓治疗的有效性及其安全性。

[0058] 二、实验动物

[0059] 新西兰白兔,雄性,2.0-2.5kg,由南京市浦口区莱芙养殖场提供,合格证号:SCXK(苏)2019-0005

[0060] 三、实验药物和实验试剂

[0061] r-SAK、生理盐水、丙泊酚、利多卡因、肝素、10%FeCl₃溶液

[0062] 三、实验条件

[0063] 室温22±2°C,湿度55-65%,光照适度,通风洁净良好。

[0064] 电子天平:瑞士梅特勒-托利多公司

[0065] 水浴锅:德国美尔特公司

[0066] PowerLab数据采集系统:澳大利亚埃德公司

[0067] 激光散斑血流成像系统:英国摩尔仪器公司

[0068] 五、实验方法及实验过程

[0069] 见动物体外实验及动物体内实验;

[0070] (1) 培育血凝块,获得血凝块的初始重量

[0071] 采集新西兰白兔(雄性,2.0-2.5kg)腹主动脉新鲜血液,分装于12管圆底冻存管中,腹主动脉新鲜血液1mL/管;

[0072] 于37°C孵育60 min培育血凝块;

[0073] 生理盐水(NS)洗涤培育的血凝块,

[0074] 在纱布上晾干得到的血凝块,并进行如下分组:

[0075] A1、A2、A3;

[0076] B1、B2、B3;

[0077] C1、C2、C3;

[0078] D1、D2、D3。

[0079] 如图6所示;

[0080] 对每一块血凝块进行称重,得到每一块血凝块的初始重量,分别为:

[0081] WA1、WA2、WA3;

[0082] WB1、WB2、WB3;

[0083] WC1、WC2、WC3;

[0084] WD1、WD2、WD3。

[0085] (2) 设立实验组和对照组

- [0086] 设立实验组:分为PLT-r-SAK组、低剂量r-SAK组、高剂量r-SAK组;
- [0087] 设立对照组:生理盐水组;
- [0088] PLT-r-SAK组:取3个复管,每个复管用NS将PLT-r-SAK(含0.2mg r-SAK)稀释至2 mL,置于EP管;
- [0089] 低剂量r-SAK组:取3个复管,每个复管用NS将r-SAK 0.2 mg(低剂量)稀释至2 mL,置于EP管;
- [0090] 高剂量r-SAK组:取3个复管,每个复管用NS将r-SAK 0.8 mg(高剂量)稀释至2 mL,置于EP管;
- [0091] 对照组(生理盐水组):取3个复管,每个复管置入NS 2mL;
- [0092] (3) 实施溶栓实验,获得溶栓后的血凝块重量
- [0093] 将制备得到的血凝块A1、A2、A3,分别置入PLT-r-SAK组中的3个复管;
- [0094] 将制备得到的血凝块B1、B2、B3;分别置入低剂量r-SAK组中的3个复管;
- [0095] 将制备得到的血凝块C1、C2、C3;分别置入高剂量r-SAK组中的3个复管;
- [0096] 将制备得到的血凝块D1、D2、D3;分别置入生理盐水组中的3个复管;
- [0097] 37℃孵育60min,对血凝块进行溶栓;
- [0098] 生理盐水(NS)洗涤溶栓后的血凝块,
- [0099] 在纱布上晾干,得到溶栓后的血凝块,并进行如下分组:
- [0100] RA1、RA2、RA3;
- [0101] RB1、RB2、RB3;
- [0102] RC1、RC2、RC3;
- [0103] RD1、RD2、RD3。
- [0104] 对每一块溶栓后的血凝块进行称重,得到每一块血凝块溶栓后的重量,分别为:
- [0105] WRA1、WRA2、WRA3;
- [0106] WRB1、WRB2、WRB3;
- [0107] WRC1、WRC2、WRC3;
- [0108] WRD1、WRD2、WRD3。
- [0109] (4) 计算溶栓率
- [0110] 采用如下公式,
- [0111] 体外实验溶栓率=(溶栓前血凝块重量-溶栓后血凝块重量)/溶栓前血凝块重量×100%。
- [0112] 分别得到生理盐水组、低剂量r-SAK组、高剂量r-SAK组、PLT-r-SAK组,每组3个溶栓率;如图5所示;
- [0113] 对每组溶栓率求平均值,得到该组的溶栓率,对应于上述四组分别为 $5.03 \pm 2.40\%$, $7.19 \pm 4.31\%$, $17.08 \pm 10.64\%$ 、 $26.81 \pm 11.47\%$,
- [0114] PLT-r-SAK的动物体外实验研究结果如图3所示,生理盐水、低剂量r-SAK、高剂量r-SAK及PLT-r-SAK对动物体外血栓溶栓率分别为 $5.03 \pm 2.40\%$, $7.19 \pm 4.31\%$, $17.08 \pm 10.64\%$ 和 $26.81 \pm 11.47\%$,除生理盐水组与低剂量组之间溶栓率无统计学差异,其余各组之间均有统计学差异($P < 0.05$)。
- [0115] 从图3可以看出,纳米血小板膜包载r-SAK后溶栓率显著提高。PLT-r-SAK的离体溶

栓疗效优于其四倍剂量r-SAK的溶栓疗效。推测纳米血小板膜包载r-SAK后,PLT-r-SAK利用血小板膜靶向血栓,实现r-SAK的靶向递送和靶向溶栓。纳米血小板膜包载r-SAK后,PLT-r-SAK的离体溶栓疗效优于其四倍剂量r-SAK的溶栓疗效。

[0116] (1) 选取20只新西兰白兔(雄性,2.0-2.5kg),分为生理盐水组、低剂量r-SAK组(0.25mg/kg r-SAK)、高剂量r-SAK组(1.00mg/kg r-SAK)及PLT-r-SAK组(含0.25 mg/kg r-SAK),5只/组,共4组。

[0117] 第一组为生理盐水组;

[0118] 第二组为为低剂量r-SAK组;

[0119] 第三组为高剂量r-SAK组;

[0120] 第四组为PLT-r-SAK组;

[0121] (2) 暴露兔耳缘静脉,24G静脉留置针平行进针并胶布固定,经留置针推入丙泊酚(得普利麻,10mg/mL,20mL)麻醉(首剂量2mL,注射泵维持1mL/h);

[0122] (3) 手术台上放保温毯及检查垫,将兔仰卧位放于手术台上,四肢及头部棉绳固定;

[0123] (4) 左右两侧腹股沟部备皮,用手指触摸股动脉搏动,辨明动脉走向,沿该走向皮下注射利多卡因局部麻醉;

[0124] (5) 分离左股静脉:沿局部麻醉方向作长约8-9cm的切口,逐层分离。游离左股静脉3-4cm,远心端及近心端用丝线套取游离备用;

[0125] (6) 分离左右股动脉:游离左股动脉3-4cm,远心端及近心端用丝线套取游离备用。同样操作游离右股动脉。两侧股动脉利多卡因浸润,湿纱布覆盖伤口。

[0126] (7) 左股静脉置管:左股静脉远心端结扎,近心端用动脉夹夹闭,用眼科剪在远心端剪一“V”字切口,自制小拉勾(1mL注射器针头尖端减掉并折弯)轻轻钩住切口,置入中心静脉导管约5cm(16G,20cm,益心达单腔中心静脉导管,置入前肝素水冲管),结扎固定导管,撤去动脉夹。导管远端连接10mL注射器(含有5毫升肝素水,50U/mL),回抽血液,排出空气后注入1-2mL肝素水(50U/mL),肝素帽封管;

[0127] (8) 左股动脉插管:左侧股动脉远心端结扎,近心端用动脉夹夹闭,用眼科剪在远心端剪一“V”字切口,自制小拉勾轻轻钩住切口,插入测压导管0.5-1cm(PE-200,埃德公司,澳大利亚),连接压力检测器(Powerlab,埃德公司,澳大利亚),结扎固定导管,松开动脉夹,打开压力监测软件(LabChart8,埃德公司,澳大利亚),监测左股动脉压力(平均动脉压、收缩压、舒张压、脉压、心率),记录初始数据;

[0128] (9) 右股动脉插管:右股动脉远心端结扎,近心端用动脉夹夹闭,用眼科剪在远心端剪一“V”字切口,自制小拉勾轻轻钩住切口,插入测压导管约0.5-1cm(PE-200,埃德公司,澳大利亚),连接压力检测器(Powerlab,埃德公司,澳大利亚),结扎固定导管,松开动脉夹,打开压力监测软件(LabChart8,埃德公司,澳大利亚),监测右股动脉压力(平均动脉压、收缩压、舒张压、脉压、心率),记录初始数据;

[0129] (10) 右股动脉血栓形成:①非夹闭状态下,用浸泡于10%FeCl₃溶液的滤纸(1×2cm)包裹右股动脉30min;②包裹30min后,非包裹状态下动脉夹夹闭15min(夹闭部位距损伤部位近心端约0.5cm),15min后,撤去动脉夹,观察脉压变化5min,如未降到0左右,继续重复②操作,直至脉压降为0左右或低于左侧脉压10%;

[0130] (11) 经耳缘静脉分别推注生理盐水、低剂量r-SAK (0.25 mg/kg r-SAK)、高剂量r-SAK (1.00mg/kg r-SAK)、PLT-r-SAK (含0.25 mg/kg r-SAK), 推注药物后再推入1mL生理盐水, 送入残余药量;

[0131] (12) 记录两侧股动脉压力5小时, 根据脉压水平将溶栓后右侧股动脉的血管开通状态进行分类。

[0132] (13) 检测结果

[0133] NS组溶栓后5小时股动脉均未开通, 低剂量r-SAK、高剂量r-SAK及PLT-r-SAK溶栓至首次开通时间分别为 140.50 ± 12.02 min、 134.75 ± 49.57 min 和 49.25 ± 35.79 min, 其中PLT-r-SAK组与高剂量r-SAK组及低剂量r-SAK组之间有统计学差异 ($P < 0.05$); 低剂量r-SAK、高剂量r-SAK及PLT-r-SAK维持开通时间分别为 34.00 ± 21.21 min、 98.00 ± 76.99 min 和 137.75 ± 42.41 min。

[0134] 根据检测结果绘制动物体内实验研究结果图, 得到图4。

[0135] 体内实验: 股动脉压力变化; 根据脉压水平将溶栓后右侧股动脉的血管开通状态进行分类:

[0136] ①管腔闭塞: 球囊损伤后脉压降为或下降至小于左侧脉压的10%;

[0137] ②血管再通: 溶栓后脉压完全恢复或恢复至大于等于左侧脉压的50%;

[0138] ③管腔再闭塞: 管腔开通后脉压再度降为0或下降至小于左侧脉压的50%;

[0139] PLT-r-SAK的动物体外实验研究结果如图3所示: 生理盐水、低剂量r-SAK、高剂量r-SAK及PLT-r-SAK在动物体外血栓溶栓率分别为 $5.03 \pm 2.40\%$, $7.19 \pm 4.31\%$, $17.08 \pm 10.64\%$ 和 $26.81 \pm 11.47\%$, 除生理盐水组与低剂量组之间溶栓率无统计学差异, 其余各组之间均有统计学差异 ($P < 0.05$)。

[0140] 从图3可以看出, 纳米血小板膜包载r-SAK后溶栓率显著提高。PLT-r-SAK的离体溶栓疗效优于其四倍剂量r-SAK的溶栓疗效。推测纳米血小板膜包载r-SAK后, PLT-r-SAK利用血小板膜靶向血栓, 实现r-SAK的靶向递送和靶向溶栓。纳米血小板膜包载r-SAK后, PLT-r-SAK的离体溶栓疗效优于其四倍剂量r-SAK的溶栓疗效。

[0141] PLT-r-SAK的动物体内实验研究结果如图4所示: 生理盐水、低剂量r-SAK、高剂量r-SAK及PLT-r-SAK在兔股动脉完全闭塞性血栓形成模型溶栓后股动脉开通状况, 黑色表示闭塞状态, 白色表示开通状态。NS组溶栓后5小时股动脉均未开通, 低剂量r-SAK、高剂量r-SAK及PLT-r-SAK溶栓至首次开通时间分别为 140.50 ± 12.02 min、 134.75 ± 49.57 min 和 49.25 ± 35.79 min, 其中PLT-r-SAK组与高剂量r-SAK组及低剂量r-SAK组之间有统计学差异 ($P < 0.05$); 低剂量r-SAK、高剂量r-SAK及PLT-r-SAK维持开通时间分别为 34.00 ± 21.21 min、 98.00 ± 76.99 min和 137.75 ± 42.41 min。

[0142] 从图4中可以看出, PLT-r-SAK在溶栓后首次开通时间显著优于同等剂量的r-SAK及四倍剂量的r-SAK, 维持开通时间显著优于同等剂量的r-SAK, 且在数值上优于四倍剂量的r-SAK。

[0143] 体外实验结果表明PLT-r-SAK溶栓效果显著优于同等剂量的r-SAK及4倍剂量的r-SAK。

[0144] 体内实验结果表明PLT-r-SAK在溶栓后首次开通时间显著优于同等剂量的r-SAK及四倍剂量的r-SAK, 维持开通时间显著优于同等剂量的r-SAK, 且在数值上优于四倍剂量

的r-SAK。

[0145] 由上述实验可以得出,纳米血小板膜包载r-SAK后可显著提高溶栓疗效。一则,能有效缩短溶栓至动脉和/或静脉开通的时间;第二则,能显著提高血栓动脉和/或静脉溶栓开通率。三则,纳米血小板膜包载r-SAK后,PLT-r-SAK在体和离体溶栓疗效优于其四倍剂量r-SAK的溶栓疗效。

[0146] 实施例1中PLT-r-SAK的制备方法如下:

[0147] 如图1所示,首先配制一定浓度的r-SAK溶液,之后将纯化空白血小板膜囊泡重悬并在冰浴条件下经过挤出过膜重组制备而成。

[0148] 具体包括,使用不同浓度的r-SAK生理盐水溶液重悬血小板膜,制得混悬液;进一步将制得的混悬液转移到气动脂质体挤出装置中,在冰浴条件下将混悬液多次挤出通过不同孔径的滤膜,实现血小板膜纳米囊泡的形成与r-SAK的有效包封,如图2所示。

[0149] 其中,所述空白纯化的血小板膜为人或啮齿类动物血小板,经反复冻融裂解,并多次洗涤去除破膜释放内含物,纯化得到空白血小板膜囊泡。

[0150] 作为优选,混合生理盐水溶液中的r-SAK浓度为:0.1 mg/mL。

[0151] 其中,所述挤出过膜重组为将制得的混悬液转移到脂质体挤出装置中,在冰浴条件下,将混悬液通过滤膜多次挤出,在过膜过程中实现血小板膜的重组纳米囊泡的形成与r-SAK的成功包封。

[0152] 进一步地,所述气动脂质体挤出装置所用滤膜孔径尺寸为100 nm、200 nm、400 nm或者800 nm;所述多次过膜的次数为5-20次。

[0153] 作为优选,将混合溶液依次基础通过孔径尺寸为800、400、200 nm的滤膜,多次过膜的次数为10次。

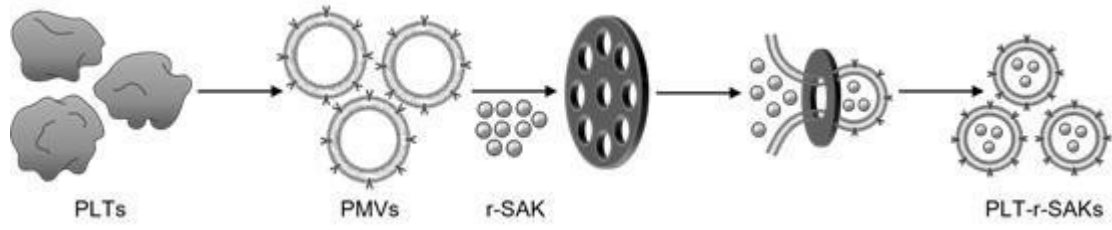


图 1

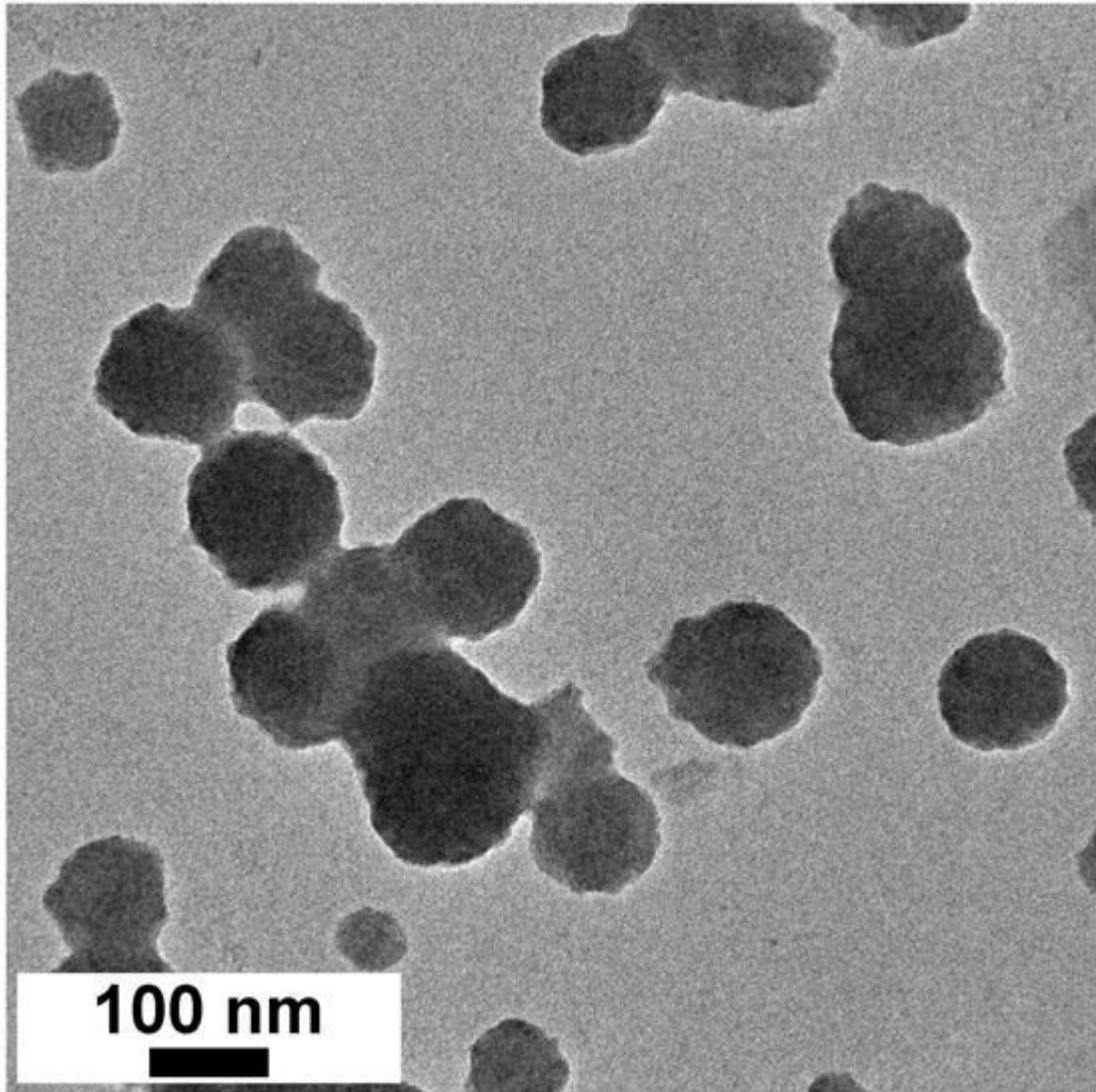


图 2

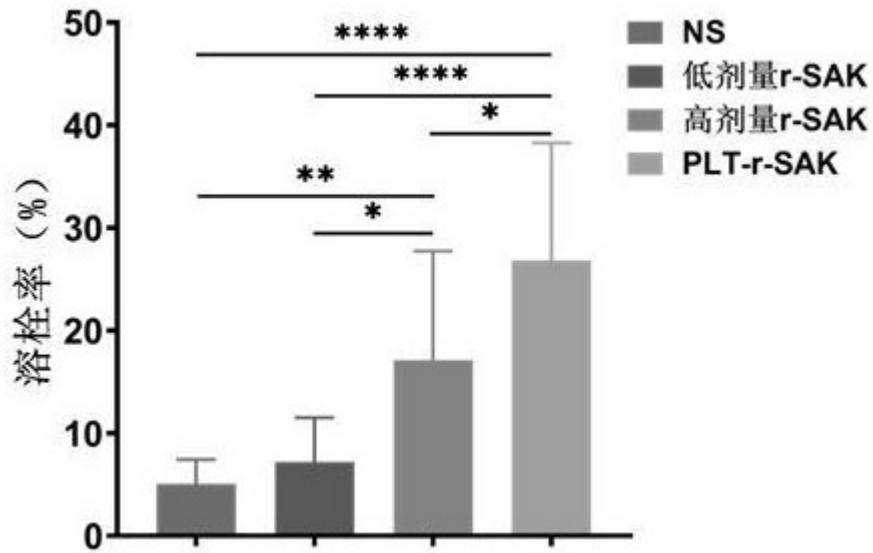


图 3

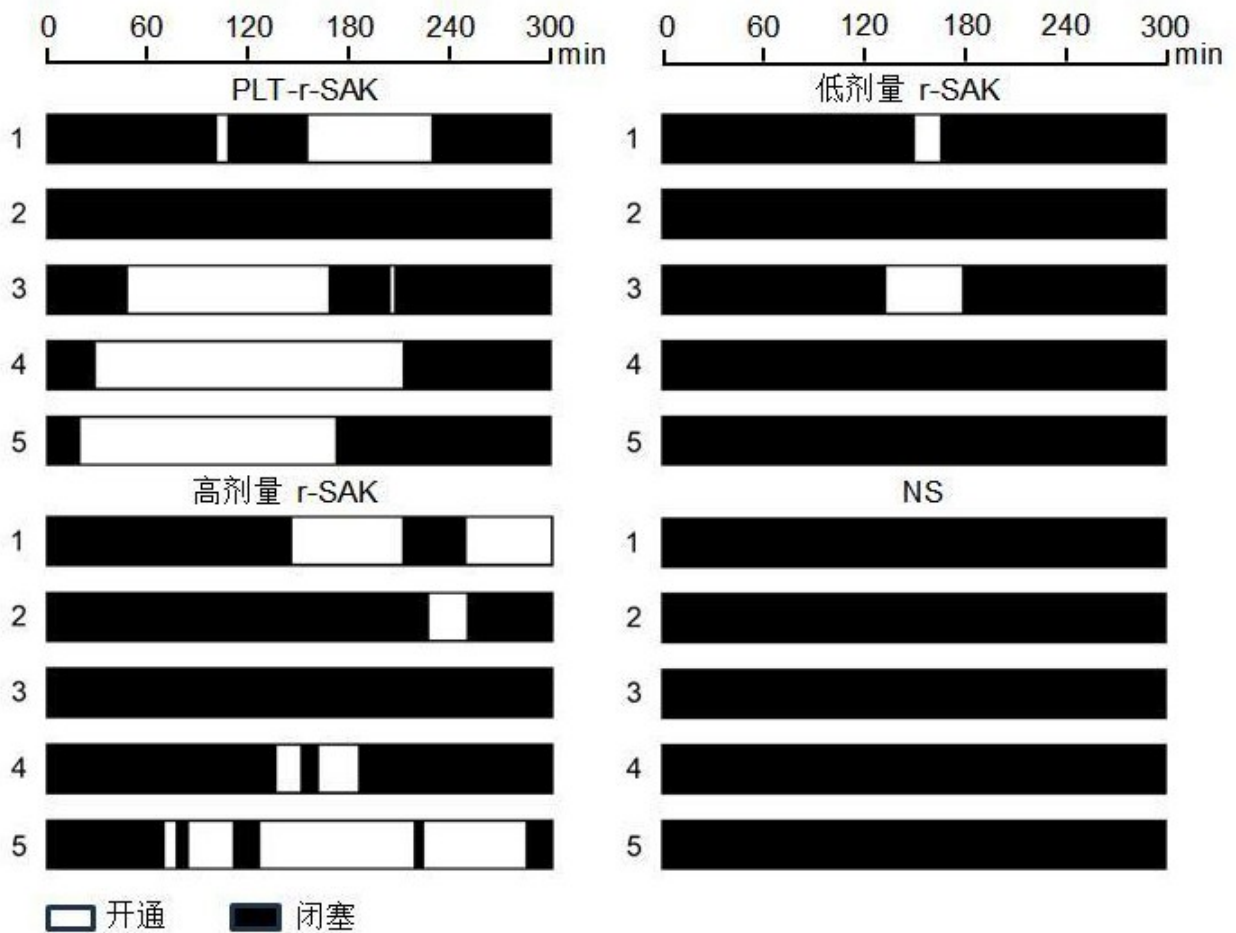


图 4

序号	实验时间	分组	r-SAK 剂 量 (mg)	溶 栓 前 重 量 (mg)	溶 栓 后 重 量(mg)	溶 栓 率 (%)
1	第一次实验	生理盐水组	0.00	151.1	147.8	2.18%
2	第一次实验	生理盐水组	0.00	157.6	144.9	8.06%
3	第一次实验	生理盐水组	0.00	151.2	139.8	7.54%
4	第一次实验	低剂量 r-SAK 组	0.20	153.9	147.4	4.22%
5	第一次实验	低剂量 r-SAK 组	0.20	151.4	143.7	5.09%
6	第一次实验	低剂量 r-SAK 组	0.20	147.9	138.3	6.49%
7	第一次实验	高剂量 r-SAK 组	0.80	150.1	137.9	8.13%
8	第一次实验	高剂量 r-SAK 组	0.80	158.2	142.8	9.73%
9	第一次实验	高剂量 r-SAK 组	0.80	159.1	128.1	19.48%
10	第一次实验	血小板膜包载重组葡激酶组	0.20	159.7	109.5	31.43%
11	第一次实验	血小板膜包载重组葡激酶组	0.20	150.7	101.5	32.65%
12	第一次实验	血小板膜包载重组葡激酶组	0.20	151.1	112.3	25.68%
13	第二次实验	生理盐水组	0.00	283.8	272.2	4.09%
14	第二次实验	生理盐水组	0.00	290.9	276.0	5.12%
15	第二次实验	生理盐水组	0.00	282.5	274.1	2.97%
16	第二次实验	低剂量 r-SAK 组	0.20	273.5	254.5	6.95%
17	第二次实验	低剂量 r-SAK 组	0.20	276.5	263.9	4.56%
18	第二次实验	低剂量 r-SAK 组	0.20	289.3	273.3	5.53%
19	第二次实验	高剂量 r-SAK 组	0.80	281.8	262.2	6.96%
20	第二次实验	高剂量 r-SAK 组	0.80	281.1	255.6	9.07%
21	第二次实验	高剂量 r-SAK 组	0.80	277.8	243.1	12.49%
22	第二次实验	血小板膜包载重组葡激酶组	0.20	276.6	227.2	17.86%
23	第二次实验	血小板膜包载重组葡激酶组	0.20	285.7	236.3	17.29%
24	第二次实验	血小板膜包载重组葡激酶组	0.20	287.8	259.4	9.87%
25	第三次实验	生理盐水组	0.00	301.3	275.9	8.43%
26	第三次实验	生理盐水组	0.00	302.1	289.9	4.04%
27	第三次实验	生理盐水组	0.00	308.5	299.7	2.85%
28	第三次实验	低剂量 r-SAK 组	0.20	302.8	261.2	13.74%
29	第三次实验	低剂量 r-SAK 组	0.20	287.5	243.8	15.20%
30	第三次实验	低剂量 r-SAK 组	0.20	286.4	277.9	2.97%
31	第三次实验	高剂量 r-SAK 组	0.80	282.4	226.0	19.97%
32	第三次实验	高剂量 r-SAK 组	0.80	294.5	193.4	34.33%
33	第三次实验	高剂量 r-SAK 组	0.80	296.3	196.8	33.58%
34	第三次实验	血小板膜包载重组葡激酶组	0.20	292.7	216.9	25.90%
35	第三次实验	血小板膜包载重组葡激酶组	0.20	306.7	154.6	49.59%
36	第三次实验	血小板膜包载重组葡激酶组	0.20	324.6	224.0	30.99%

图 5

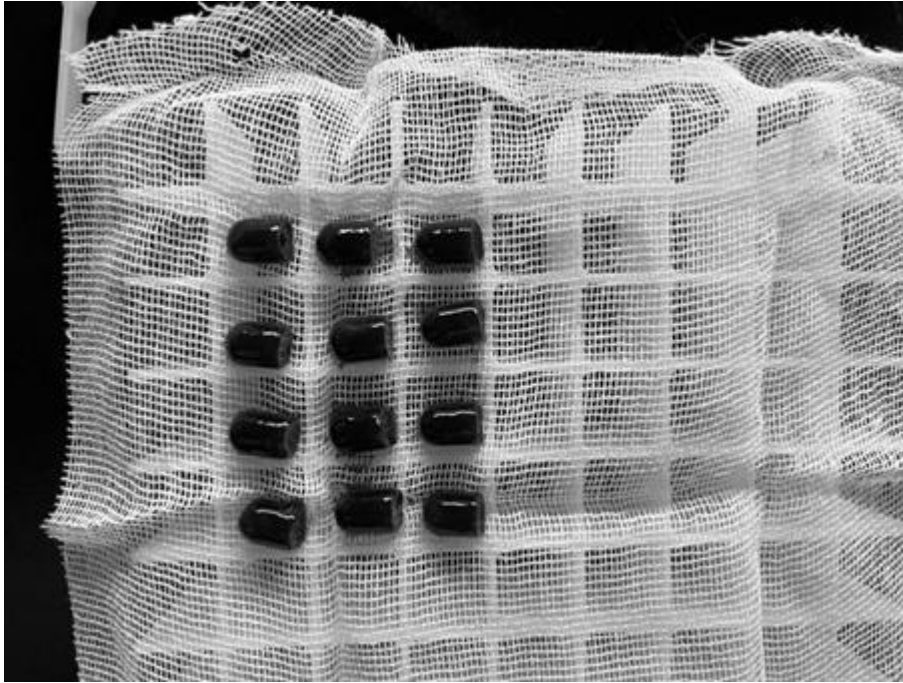


图 6

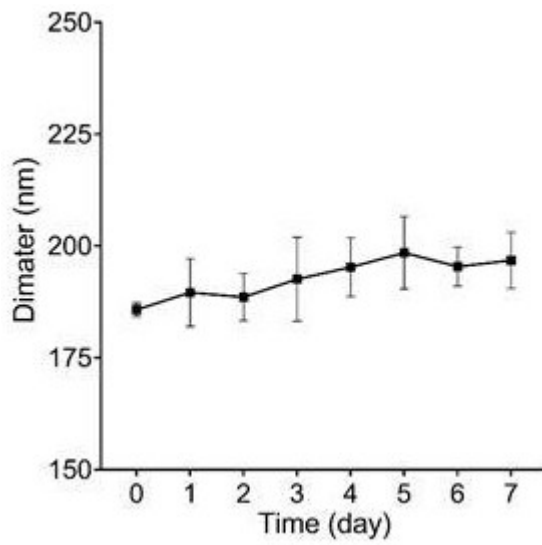


图 7