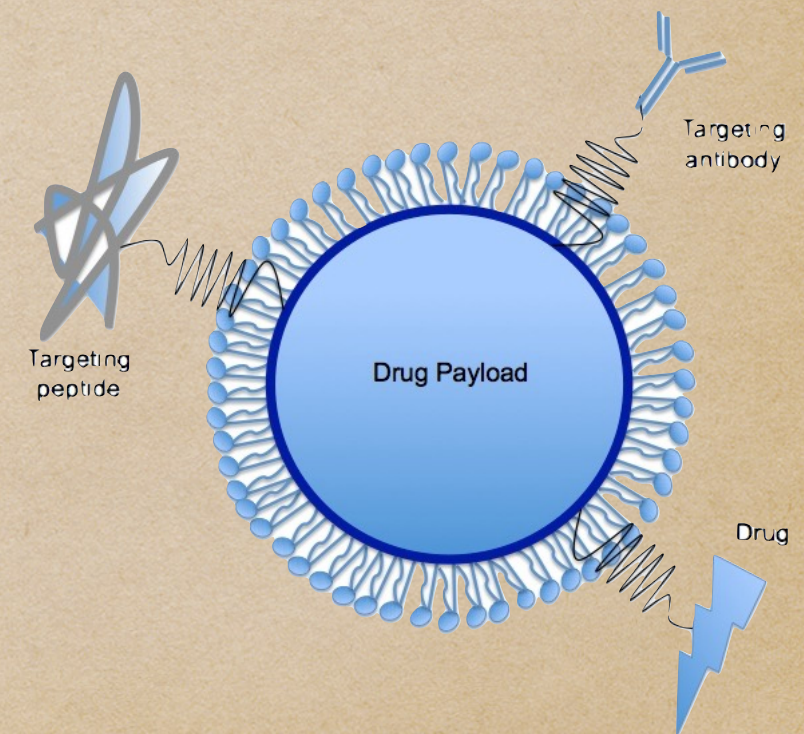


PLGA nanoparticles prepared by nano-emulsion templating using low-energy methods as efficient nanocarriers for drug delivery across the blood-brain barrier

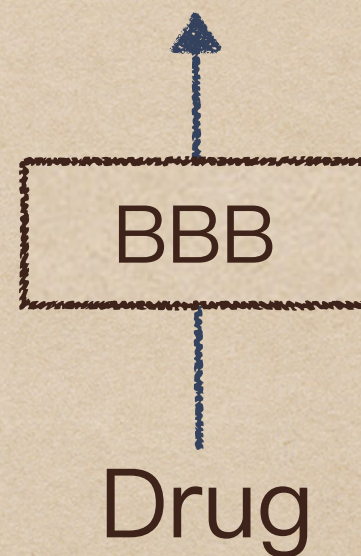


演讲人：李沛毅

摘要

Background

人口老龄化加剧 → Neurodegenerative(神经退化)



摘要

新型给药系统(NNDS):

Polymeric nanoparticles(聚合纳米粒)

材料:

poly-(lactic-co-glycolic acid) (PLGA, 聚乳酸-羟基乙酸共聚物)

原因:

1. biocompatibility(生物适应性)
2. biodegradability(生物可降解性)

目标结构:



● 药物洛哌丁胺



8D3抗体

摘要

制备:

1. 使用 PIC 方法制备 nano-emulsion templating(纳米乳液模板)
2. 药物溶液 + 纳米乳液模板 --蒸掉溶剂--> 产物

优点: 精确尺寸控制, 条件温和。

动物实验方法: hot-plate test(热板实验)

结论: 证明了纳米粒表面被8D3抗体活化时, 能高效率透过BBB。

摘要 – 补充

Neurodegenerative(神经退化):

is the umbrella term for the progressive(逐步) loss of structure or function of neurons(神经元), including death of neurons.

<https://en.wikipedia.org/wiki/Neurodegeneration>

the Phase Inversion Composition(PIC):

Phase inversion is a chemical phenomenon exploited(被利用在) in the fabrication(制造) of artificial(人工) membranes(膜). It is performed by removing the solvent from a liquid-polymer solution, leaving a porous(多孔), solid membrane.

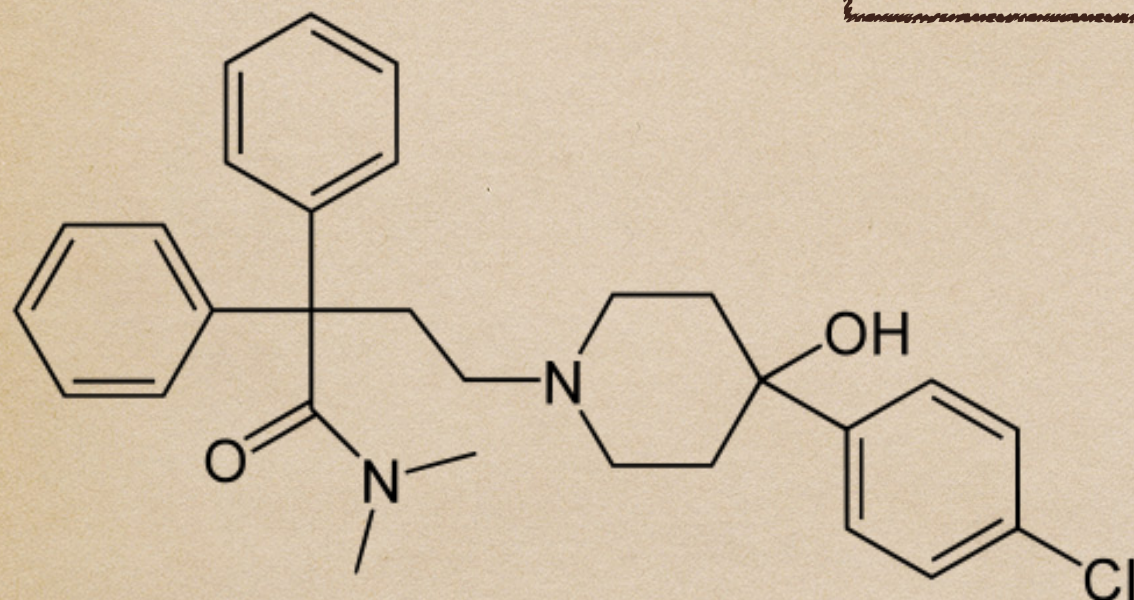
[https://en.wikipedia.org/wiki/Phase_inversion_\(chemistry\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Phase_inversion_(chemistry))

摘要 – 补充

loperamide(洛哌丁胺):

is a medication used to decrease the frequency of diarrhea(腹泻).

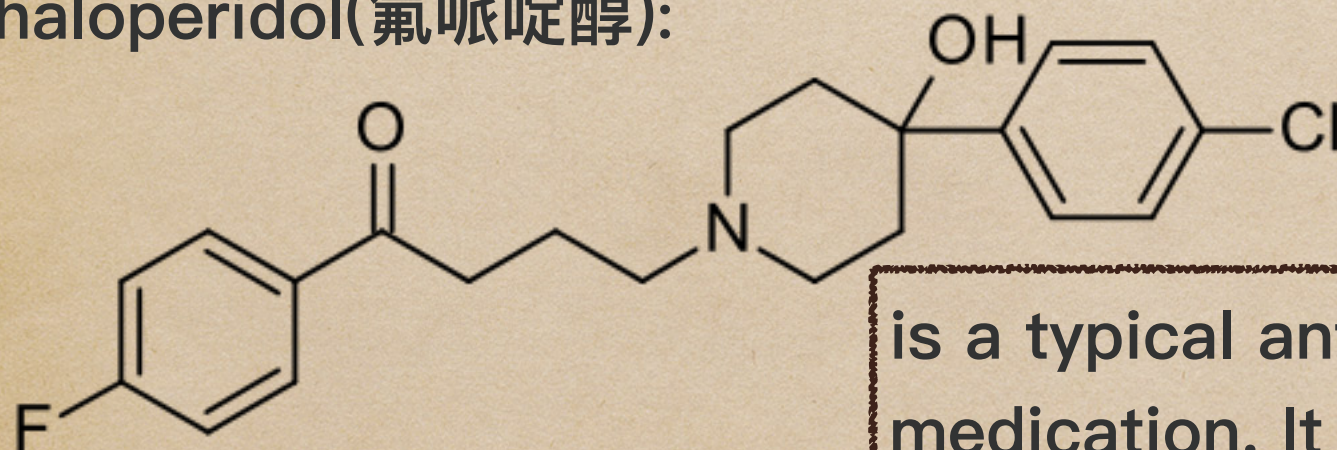
<https://en.wikipedia.org/wiki/Loperamide>



haloperidol(氟哌啶醇):

is a typical antipsychotic(抗精神病) medication. It is used in the treatment of schizophrenia(精神分裂症)...

<https://en.wikipedia.org/wiki/Haloperidol>



摘要 – 补充

8D3抗体:

是一种针对老鼠的, 对抗铁传递蛋白受体(也称: 转铁蛋白受体TfR)的单克隆抗体。它被用于动物体外实验。

TfR: <http://www.docin.com/p-41858747.html>

简介

Nano-emulsions(纳米乳液):

粒径: 20–200 nm

制备:

PIC, 室温

原理:

表面活性剂使PLGA乳化, 形成乳滴。

为何选择洛哌丁胺?

作为一个没有镇痛效果(无法进入CNS)的药物模型。用聚合纳米微粒搭载洛哌丁胺研究BBB透过性有很广泛的应用。

材料和方法 – 材料

- PLGA (Boehringer Ingelheim) / 羟基乙酸 = 75/25
- 乙酸乙酯, 乙醇 (Merck)
- 聚山梨醇 (吐温) 80 (Croda), 表面活性剂
- 盐酸洛哌丁胺 (Sigma-Aldrich)
- 鼠铁传递蛋白受体(8D3)的单克隆抗体(Bionova)
- N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) (Fluka)
- N-hydroxysuccinimide sodium salt (NHS) (Sigma-Aldrich)
- NaCl, Na₂HPO₄·H₂O, NaH₂PO₄·H₂O (Merck)
- Water (微滤)
- CD1雄鼠, 体重 30–35g (Harlan)

材料和方法 – 制备

制备O/W型聚合纳米乳液：

25°C，将(PBS, 磷酸缓冲盐溶液)，逐步加入到吐温80和(乙醇:乙酸乙酯 = 20/80)的混合物中，再加入 4 wt.%(质量百分数)的PLGA以及 0.1 wt.%的LOP(洛哌丁胺)。

– 是否制备成功？

- 看：在水，表面活性剂，油相示意图中可以看到透明，半透明或轻微不透明的，显露出蓝色或红色的地方被认为是纳米乳液。
- 进一步确认：使用动态光散射描绘出粒子的尺寸。

纳米粒：

使用 Buchi R-215V Rotavapor 设备在减压条件下，将溶剂蒸干得到纳米微粒分散态。

25°C，将4g纳米乳液的蒸干的条件是：45mbars的真空环境，150rpm的转速，45min。蒸发完成后，产物用微滤水调整为等渗溶液(300 mOsm/kg)。

材料和方法 – 制备

浓缩:

为了达到LOP的治疗浓度, 用Centriprep® YM-3, 3 kDa 离心过滤器完成。

透析24h:

为了达到生理学的pH(7.4)和等渗值(300 mOsm/kg)。

符号约定:

- NP(0,8D3) – 未载药, 8D3修饰
- NP(0.1) – 载药0.1 wt.%, 无抗体修饰
- NE – 纳米乳液

材料和方法 – 表征

液滴大小及其分布通过 dynamic light scattering(DLS, 动态光源散射) 确定, 条件:

- 分光计(LS Instruments)
- 25°C
- 632.8 nm He-Ne 光源
- 散射角为90°

ζ值由 Electrophoretic 的流动性测量设备和 Zetasizer NanoZS instrument (Malvern Co. Ltd., UK)测定, 条件:

- 633nm He-Ne 光源

纳米乳液和纳米微粒的稳定性, 在25°C由肉眼观察到的宏观改变来评估。

材料和方法 – LOP定量分析

HPLC:

- Breeze HPLC (Waters Corporation, Milford, MA, USA)
- UV检测器, 220nm(LOP具有最大吸收)
- 流动相: 1.824mM, 磷酸:乙腈 = 1:1, pH = 3.5, 30°C
- 流速: 1 mL/min
- 进样: 50 μ L
- 分析50min

LOP的保留时间大约是42min。

材料和方法 – 诱导效率和载药率

离心已载药的纳米微粒，然后用HPLC(同型号和条件)分析游离出来的药物。

离心条件：

- 2300g
- 75min
- 25°C

诱导效率 =

$(\text{起始药物质量分数} - \text{剩余药物质量分数}) / \text{起始药物质量分数} * 100\%$

载药率 =

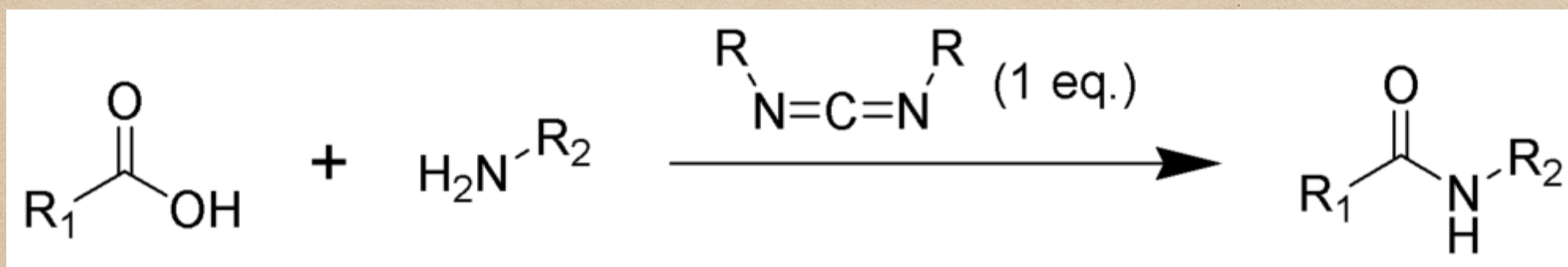
$\text{在纳米微粒上的药物质量} / \text{PLGA的质量} * 100\%$

材料和方法 – 体外释放

透析袋，保温在 25°C 。每间隔一定的时间就取出1 mL溶液，用HPLC分析其中LOP的浓度。

材料和方法 – 抗体修饰

8D3抗体上的氨基与PLGA上的羧基通过碳亚二胺反应共价结合。



<https://en.wikipedia.org/wiki/Carbodiimide>

操作：

1. 用HCl酸化4g纳米微粒分散体(pH = 4.5–6)，加入过量的EDC和NHS，在25 °C下搅拌2h。
2. 取150 μL已活化的纳米微粒分散体，用NaOH调整pH=8。
3. 取150 μL 8D3抗体(浓度：1 mg/mL, 0.5 mg/mL 或 0.25 mg/mL)加入到上面的溶液中。
4. 25 °C下搅拌培养混合物18h。

鉴定：size exclusion chromatography(SEC, 分子排阻色谱)。

材料和方法 – 细胞实验

方法：MTT检验

The MTT assay is a colorimetric(比色) assay for assessing cell metabolic activity(代谢活动).

https://en.wikipedia.org/wiki/MTT_assay

操作：

- 将HeLa细胞接种到96个槽中，每个槽大约 6×10^3 个细胞和200 μL DMEM培养基。
- 在37 °C下培养24h。
- 将培养基替换为制备的合适浓度的样品。
- 在37 °C，5% CO₂气氛下培养24h。
- 加入 0.5 mg/mL (25 μL) MTT试剂，和PBS磷酸缓冲液。
- 在37 °C培养2h。
- 加入DMSO 200 μL 溶解沉淀物。
- 室温下震荡15min。
- 用分光光度计(SpectraMax M5) 在 570nm 处测定吸收值。

材料和方法 – 体内阵痛实验

将老鼠分为4组，保持水和食物供应，适应环境1周。动物实验标准为86/609/EEC。

饲养条件：

- 22 ± 1 °C, 12-h 昼夜循环。
- 自由觅食(standard laboratory diet, PANLAB SL, Barcelona, Spain), 饮水。

热板分析仪 LE 7406 (PANLAB, SL, Barcelona, Spain)。水浴温度 54 ± 0.5 °C

潜伏期的定义：从放置小鼠于热板到小鼠作出疼痛反应(舔前腿，跳出热板)的时间间隔。

每只老鼠做两次试验，分别测试出给药前的潜伏期和给药20min后的潜伏期。

材料和方法 – 体内镇痛实验

实验使用成年雄鼠(22–30g)，采用尾静脉血管注射给药方式。

药物样品：

1. 0.16 M PBS 溶液
2. 0.7 mg/ml (3 mg/kg) 吗啡水溶液
3. NP(0)
4. NP(0,8D3)
5. NP(0.1)
6. NP(0.1,8D3)
7. 0.7 mg/ml (3 mg/kg)洛哌丁胺水溶液(含15%吐温80)
8. 15%吐温80水溶液

定量分析：

1. 用T检验比较每组给药前和给药后的潜伏期的均值。确定显著性差异。
2. %MPE

材料和方法 – 体内镇痛实验

maximal possible effect (MPE) 由下式计算：

$$\% \text{ MPE} = \frac{\text{Post-treatment latency} - \text{Pre-treatment latency}}{\text{Cut-off time} - \text{Pretreatment latency}} \times 100\%.$$

结果和讨论 – 纳米乳液/微粒的制备和表征

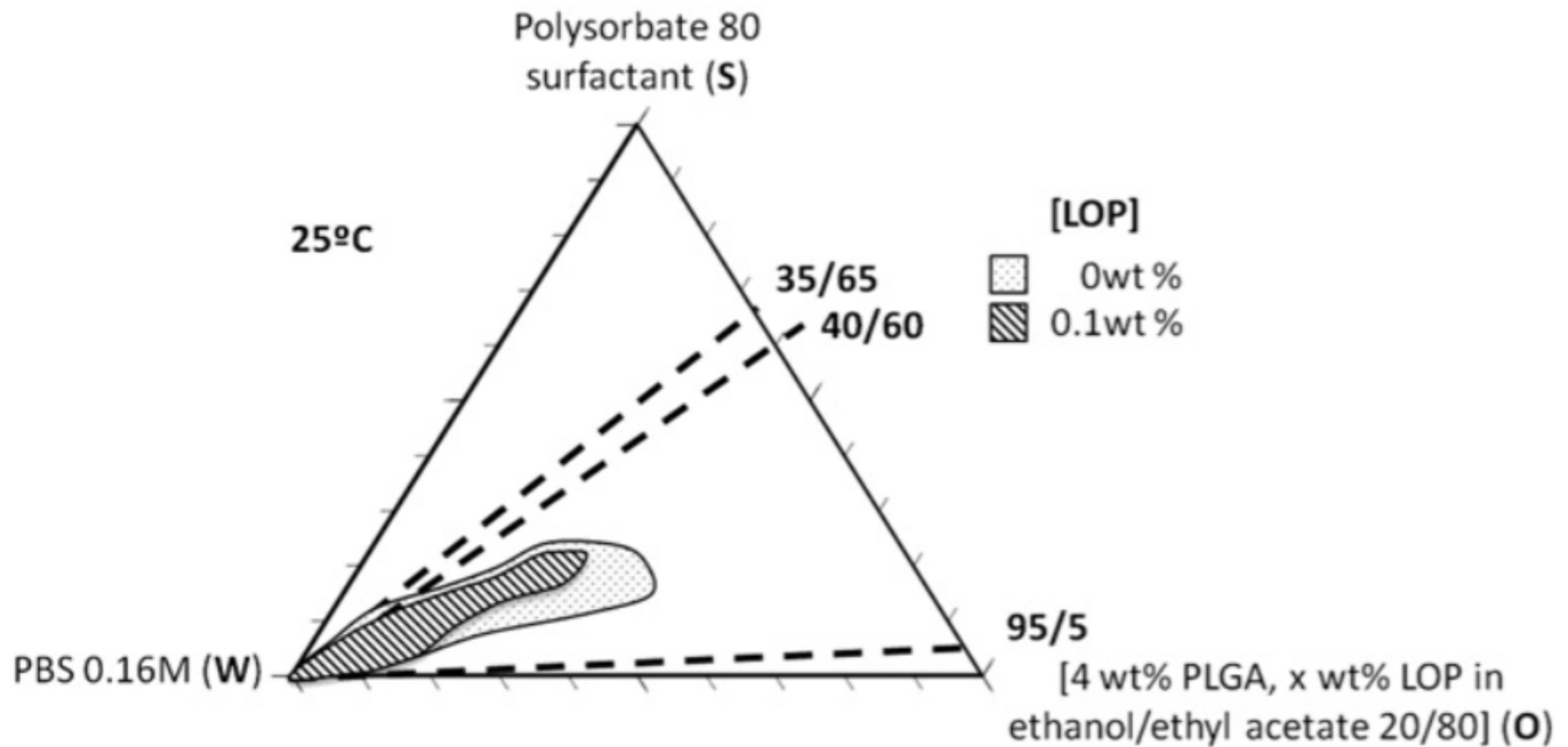


Fig. 1. Nano-emulsion formation region in the system: PBS 0.16 M (W)/polysorbate 80 (S)/[4 wt.% PLGA + x wt.% LOP in ethyl acetate] (O), with 0 and 0.1 wt.% of loperamide content.

结果和讨论 – 洛哌丁胺包装效率

Table 2

Parameters related with the encapsulation of loperamide in PLGA nanoparticles.

| | |
|-----------------------------------|----------------------------|
| Encapsulation efficiency (EE) (%) | 99.92 ± 0.01 |
| Drug loading (mg LOP/g PLGA) | 25.23 ± 1.84 |
| Drug concentration (mg LOP/g NPd) | $9.08 \pm 7 \cdot 10^{-4}$ |

结果和讨论 – 体外释放

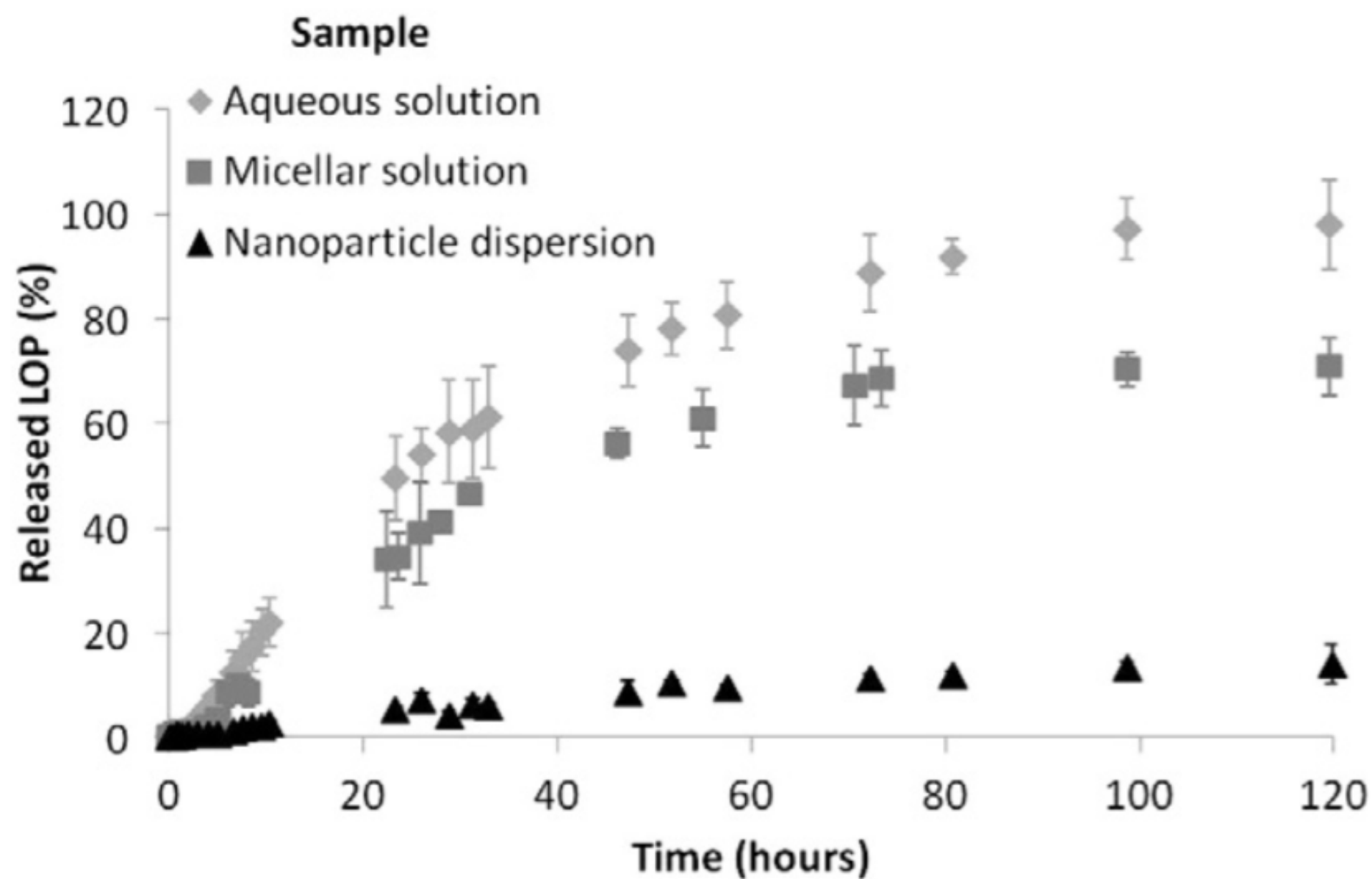


Fig. 3. Loperamide release (%) as a function of time, for a LOP-aqueous solution (diamonds), a LOP-micellar solution (squares) and a nanoparticle dispersion – NP (0.1) (triangles).

结果和讨论 – 抗体修饰

Table 3

Hydrodynamic size, zeta potential (ζ potential) and stability (time to sediment) of 8D3-functionalized loperamide-loaded nanoparticles, NP (0.1, 8D3), as a function of NP/anti-body (N/P) ratio.

| N/P ratio | Hydrodynamic radius (nm) | z potential (mV) | Stability (time to sediment) |
|-----------|--------------------------|-------------------|------------------------------|
| 1/0 | 99.98 ± 2.81 | -16.28 ± 0.34 | >3 months |
| 50/1 | 101.06 ± 3.05 | -15.36 ± 4.25 | >3 months |
| 25/1 | 110.27 ± 5.12 | -18.74 ± 0.77 | >3 months |
| 12.5/1 | 104.98 ± 4.32 | -11.25 ± 4.56 | >3 months |

结果和讨论 – 抗体修饰成功与否？

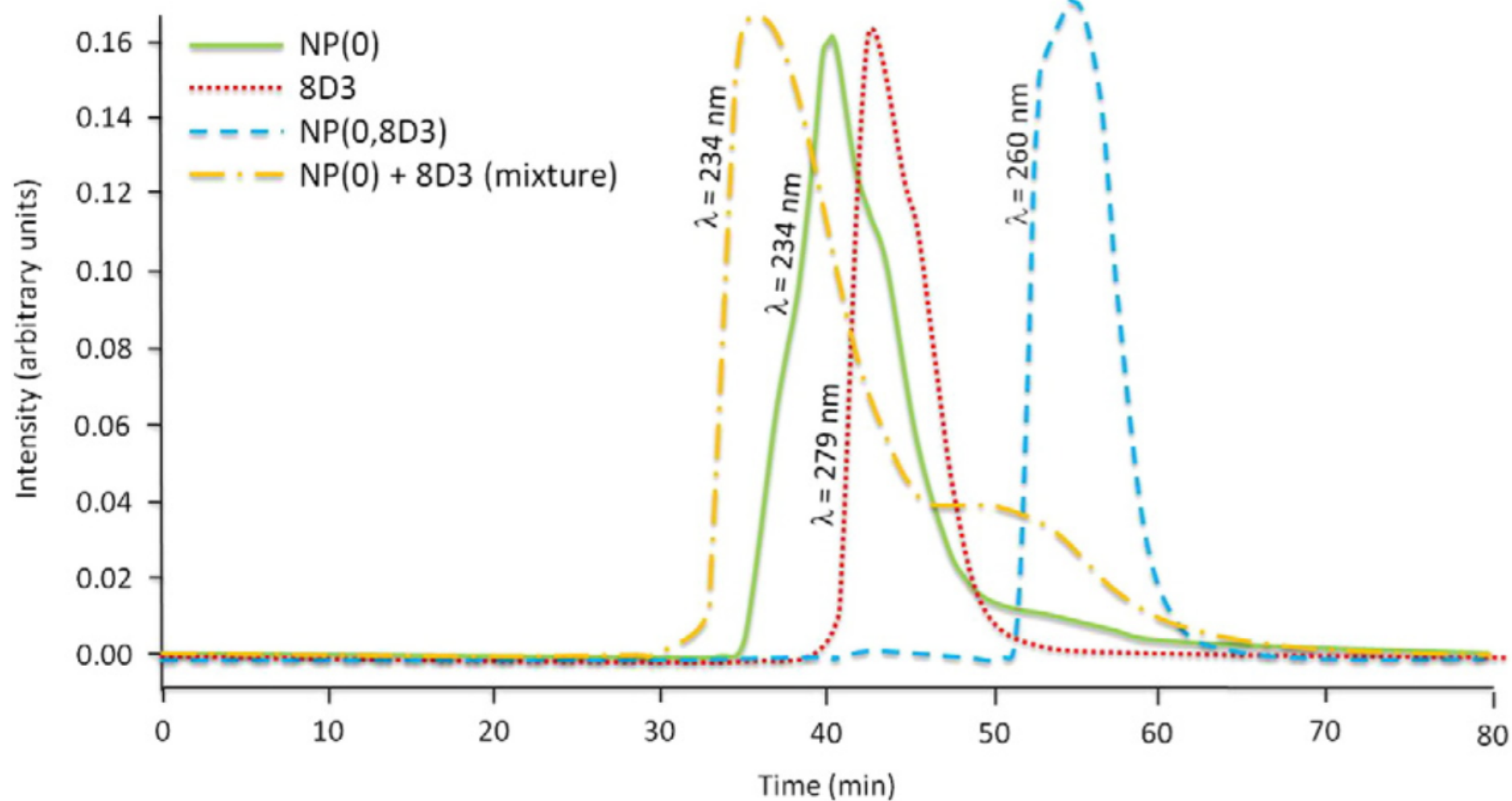


Fig. 4. SEC chromatograms of: a) NP (0), b) 8D3; c) NP (0,8D3) (12.5/1); and d) physical mixture of NP (0) + 8D3 (12.5 + 1 in molar ratio).

结果和讨论 – 体外毒性分析

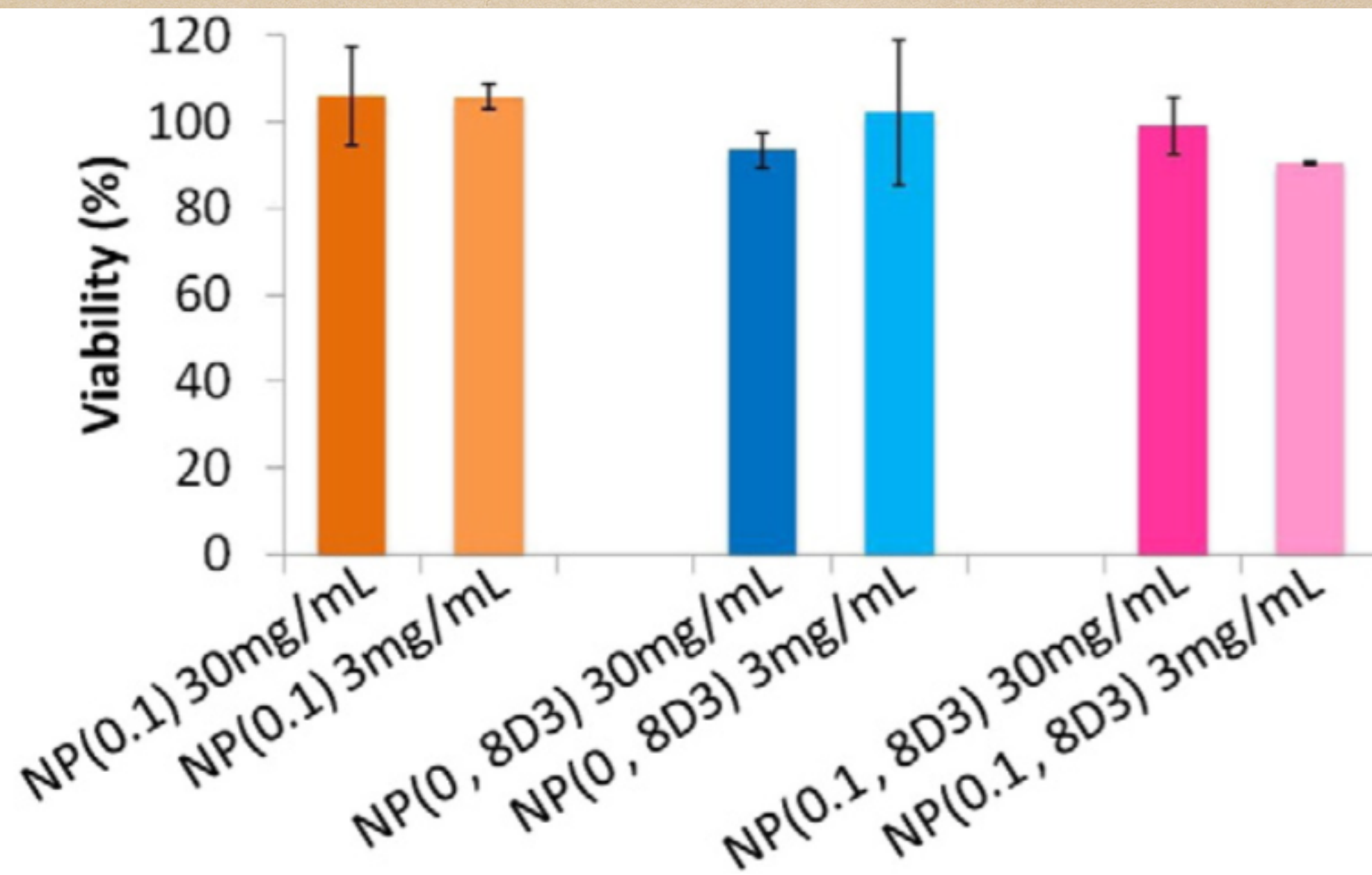
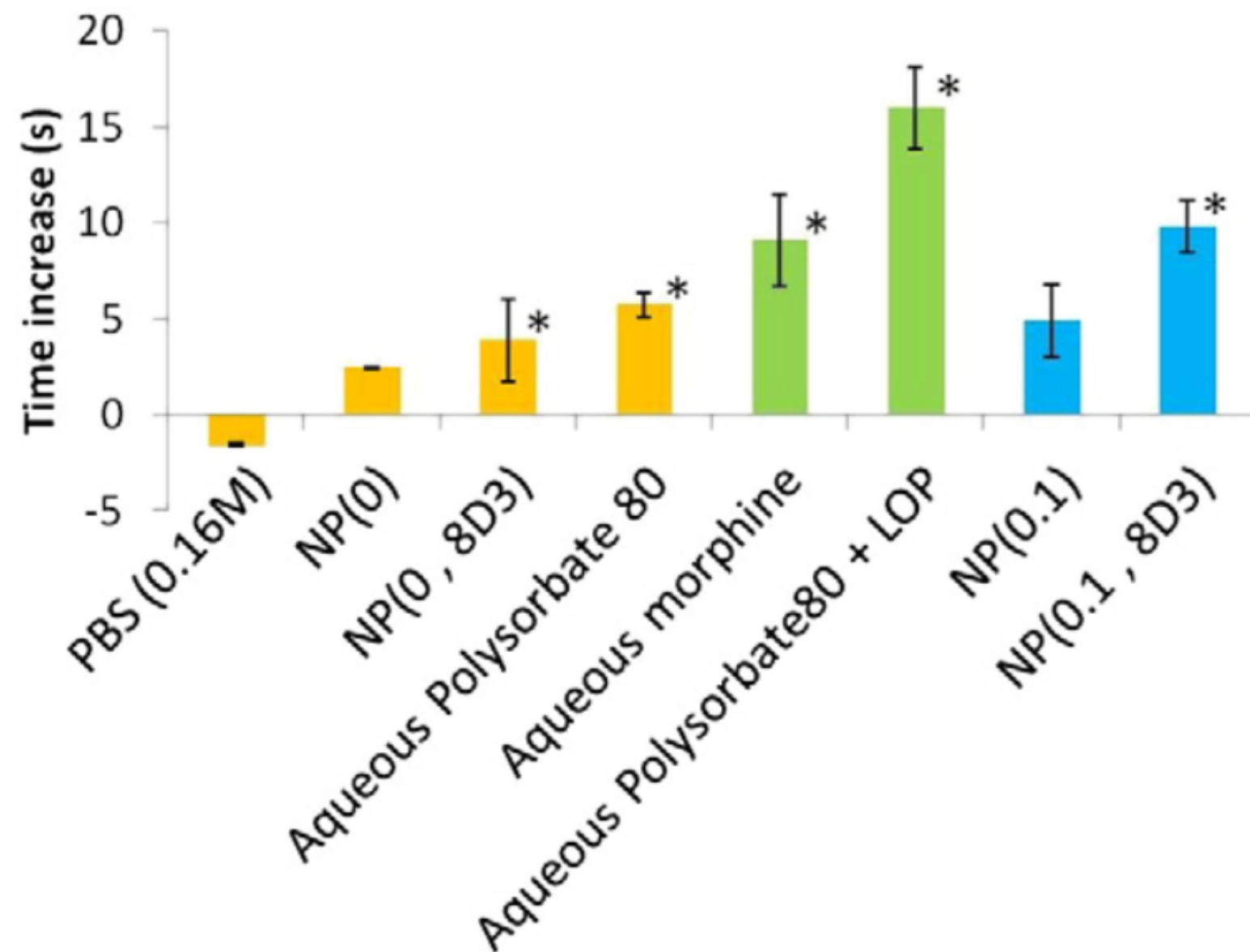


Fig. 5. Viability (in %) of HeLa cells, after 24 h of incubation with different sets of nanoparticles, at the as-prepared and use concentrations.

结果和讨论 – 体内BBB透性



黄色：对照组

绿色：阳性组

蓝色：试验组

Fig. 6. Time differences (in s) from the post-latency time and the pre-latency time of mice of negative controls (yellow), positive controls (green) and test nanoparticles (blue). Stars indicate samples where significant differences were found from the pre- and post-latency time, assessed by the paired-sample t-test.

结论

1. 装载有LOP的纳米微粒能够高效率地穿过BBB到达CNS。
2. 当含有微量的吐温80的载药纳米微粒被8D3抗体修饰后，药效更强。
3. O/W型纳米乳液可由90 wt.%的水相和 $O/S = 70/30$ 组成。
4. 采用简单可控的PIC方法制备纳米乳液模板，非常适合用于制药行业。

资料下载

<https://github.com/micooz/journal-notes>