



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105596368 A

(43) 申请公布日 2016. 05. 25

(21) 申请号 201610069258. 6

(22) 申请日 2016. 02. 01

(71) 申请人 北京福纳康生物技术有限公司

地址 100085 北京市海淀区开拓路 5 号 5 层  
523 室

(72) 发明人 王春儒 甄明明 李雪

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 王春霞

(51) Int. Cl.

A61K 33/44(2006. 01)

A61K 9/10(2006. 01)

A61K 47/44(2006. 01)

A61P 25/16(2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

一种富勒烯橄榄油组合物及其在治疗帕金森病中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一种富勒烯橄榄油组合物及其在治疗帕金森病中的应用。所述富勒烯橄榄油组合物为富勒烯和 / 或金属富勒烯的橄榄油分散液,所述富勒烯和 / 或所述金属富勒烯的浓度为 0. 01 ~ 0. 8mg/mL。本发明通过体外的 ESR 测试证明富勒烯具有强的清除自由基的能力,然后通过细胞水平实验证明其对细胞是没有损伤反而有保护的,并且能够修复自由基引起的细胞损伤,最后通过构建帕金森小鼠模型,利用本发明富勒烯橄榄油组合物进行治疗,发现确实可以改善小鼠的运动能力,证明本发明富勒烯橄榄油组合物具有治疗帕金森病的功效。

1. 一种富勒烯橄榄油组合物, 为富勒烯和/或金属富勒烯的橄榄油分散液。
2. 根据权利要求1所述的富勒烯橄榄油组合物, 其特征在于: 所述富勒烯橄榄油组合物中, 所述富勒烯和/或所述金属富勒烯的浓度为0.01~0.8mg/mL。
3. 根据权利要求1或2所述的富勒烯橄榄油组合物, 其特征在于: 所述富勒烯或所述金属富勒烯的粒径为0.7~1nm。
4. 权利要求1-3中任一项所述富勒烯橄榄油组合物的制备方法, 包括如下步骤:  
将所述富勒烯和/或所述金属富勒烯分散于所述橄榄油中, 得到混合液; 所述混合液经球磨或超声后, 依次经离心和过滤, 收集滤液即得到所述富勒烯橄榄油组合物。
5. 1)或2)中任一种产品在制备预防和/或治疗帕金森病的产品中的应用:
  - 1) 权利要求1-3中任一项所述富勒烯橄榄油组合物;
  - 2) 富勒烯和/或金属富勒烯。
6. 根据权利要求5所述的应用, 其特征在于: 所述应用表现为清除自由基。
7. 根据权利要求5或6所述的应用, 其特征在于: 所述帕金森病由1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶引起。
  8. 1)或2)中任一种产品在制备清除自由基的产品中的应用:
    - 1) 权利要求1-3中任一项所述富勒烯橄榄油组合物;
    - 2) 富勒烯和/或金属富勒烯。

## 一种富勒烯橄榄油组合物及其在治疗帕金森病中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种富勒烯橄榄油组合物及其在治疗帕金森病中的应用,属于生物医药领域。

### 背景技术

[0002] 帕金森病(Parkinson's disease,PD)是一种常见的以黑质纹状体通路的退变为主要特征的中枢神经系统变性疾病,多发于老年人当中,平均发病年龄为60岁左右。PD主要的病理改变是中脑黑质多巴胺能神经元的变性死亡,由此导致纹状体多巴胺含量显著减少而致病。其临床表现主要有静止性震颤、运动迟缓、肌强直和姿势步态障碍等。

[0003] 据调查,帕金森病在65岁以上的发病率达1-2%,随着人口老龄化的发展,帕金森病的研究也渐渐得到人们的关注。对于PD的发病原因目前尚不清楚,年龄老化、遗传因素、环境因素、氧化应激等都有可能与PD有关。目前,大多数学者较为认同的学说是线粒体功能障碍和氧化应激,线粒体I复合物的抑制导致大量的自由基生成,氧化应激产生大量的自由基,又相应的降低线粒体I复合物的活性,从而加重对神经元的毒害。但是,现阶段对于PD还没有很好的治疗方法,药物治疗仍是主要的治疗方法。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种富勒烯橄榄油组合物及其在治疗帕金森病中的应用,本发明将富勒烯单分散于橄榄油中,利用富勒烯的清除自由基功效和单分散性富勒烯通过血脑屏障来治疗帕金森病,具有较好的效果,并将在治疗此类自由基疾病中有更大的应用前景。

[0005] 本发明首先提供一种富勒烯橄榄油组合物,为富勒烯和/或金属富勒烯的橄榄油分散液。

[0006] 所述的富勒烯橄榄油组合物中,所述富勒烯和/或所述金属富勒烯的浓度可为0.01mg/mL~0.8mg/mL,具体可为0.4~0.8mg/mL、0.4mg/mL或0.8mg/mL。

[0007] 所述的富勒烯橄榄油组合物中,所述富勒烯或所述金属富勒烯的粒径可为0.7nm~1nm。

[0008] 所述的富勒烯橄榄油组合物中,所述富勒烯可表示为 $C_{2n}$ , $30 \leq n \leq 60$ ,具体可为 $C_{60}$ 或 $C_{70}$ ;

[0009] 所述金属富勒烯可表示为 $M@C_{2n}$ , $30 \leq n \leq 60$ ,所述M选自Sc、Y和镧系金属元素(La-Lu)中的任意一种,具体可为 $Gd@C_{82}$ 。

[0010] 本发明同时提供了所述富勒烯橄榄油组合物的制备方法,包括如下步骤:

[0011] 将所述富勒烯和/或所述金属富勒烯分散于所述橄榄油中,得到混合液;所述混合液经球磨或超声后,依次经离心和过滤,收集滤液即得到所述富勒烯橄榄油组合物。

[0012] 上述的制备方法中,经球磨或超声后,将所述混合液置于阴凉干燥避光保存,静置一定的时间,再进行所述离心操作。

- [0013] 经本发明证明,富勒烯、金属富勒烯能够用于预防和/或治疗帕金森病。
- [0014] 富勒烯和/或金属富勒烯以及所述富勒烯橄榄油组合物在预防和/或治疗帕金森病中的应用也属于本发明的保护范围。
- [0015] 上述预防和/或治疗帕金森病的应用表现为清除自由基,其中,所述帕金森病由1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶引起。
- [0016] 富勒烯和/或金属富勒烯以及所述富勒烯橄榄油组合物在制备清除自由基的产品中的应用也属于本发明的保护范围。
- [0017] 本发明富勒烯橄榄油组合物中,其中的所述橄榄油是一种健康的植物油,通过球磨或超声的方式,能够使富勒烯和/或金属富勒烯以单分散形式存在;单分散富勒烯和/或金属富勒烯可以通过血脑屏障,进入脑组织。
- [0018] 在本发明提供的一个具体的实施例中,C<sub>60</sub>-橄榄油组合物中,C<sub>60</sub>的浓度为0.8mg/mL,实际使用富勒烯橄榄油在生物体内建议剂量为0.1~10mg/kg,最佳剂量为4mg/kg。另一个具体的实施例中,Gd@C<sub>82</sub>-橄榄油组合物中,Gd@C<sub>82</sub>的浓度为0.8mg/mL,其在生物体内的剂量为10~1000μg/kg。所述生物体为哺乳动物,如:人。
- [0019] 本发明富勒烯橄榄油组合物可以采用口服或腹腔给药的方式。服用疗程为15天,根据病情,可服用短期或长期服用。
- [0020] 本发明富勒烯橄榄油组合物中的富勒烯和/或金属富勒烯具有多个不饱和键,极易与自由基反应,具有很好的清除自由基的能力,因此对于治疗氧化应激引起的帕金森病具有好的功效。
- [0021] 本发明通过体外的ESR测试证明富勒烯具有强的清除自由基的能力,然后通过细胞水平实验证明其对细胞是没有损伤反而有保护的,并且能够修复自由基引起的细胞损伤,最后通过构建帕金森小鼠模型,利用本发明富勒烯橄榄油组合物进行治疗,发现确实可以改善小鼠的运动能力,证明本发明富勒烯橄榄油组合物具有治疗帕金森病的功效。
- [0022] 本发明具有以下优点:
- [0023] (1)生物相容性好,安全无毒副作用。
- [0024] 富勒烯进入体内后可以快速代谢,不会对脏器产生损害,反而可以对由于其他自由基产生损伤的细胞进行修护,橄榄油本身就是保健品,安全,无毒副作用,具有好的生物相容性。
- [0025] (2)效果显著。
- [0026] 现阶段治疗帕金森病的主要方法还是药物治疗,本发明经过实验证明,其治疗效果显著,提高患者生活质量。

## 附图说明

- [0027] 图1为Gd@C<sub>82</sub>的电子自旋核磁共振(ESR)图,其中,虚线为空白,实线为Gd@C<sub>82</sub>。
- [0028] 图2为C<sub>60</sub>的电子自旋核磁共振(ESR)图,其中,虚线为空白,实线为C<sub>60</sub>。
- [0029] 图3为Gd@C<sub>82</sub>对HeLa细胞的药物毒性实验结果。
- [0030] 图4为C<sub>60</sub>对HeLa细胞的药物毒性实验结果。
- [0031] 图5为Gd@C<sub>82</sub>对双氧水诱导自由基细胞损伤的保护结果示意图。
- [0032] 图6为C<sub>60</sub>对双氧水诱导自由基细胞损伤的保护结果示意图。

## 具体实施方式

[0033] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0034] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0035] 实施例1、富勒烯橄榄油组合物的制备

[0036] (1)Gd@C<sub>82</sub>-橄榄油组合物的制备

[0037] 量取20mL橄榄油,称取20mgGd@C<sub>82</sub>(粒径为0.7~1nm),混合搅拌均匀,然后将混合液置于球磨机中球磨,10h,球磨结束后将混合液取出,阴凉干燥避光保存,静置1h离心,使用220nm滤膜过滤,得到富勒烯-橄榄油溶液,即Gd@C<sub>82</sub>-橄榄油组合物,其中Gd@C<sub>82</sub>的含量为0.4mg/mL

[0038] (2)C<sub>60</sub>-橄榄油组合物

[0039] 量取20mL橄榄油,称取20mgC<sub>60</sub>(粒径为0.7~1nm),混合搅拌均匀,然后将混合液置于球磨机中球磨,10h,球磨结束后将混合液取出,阴凉干燥避光保存,静置1h后离心,220nm滤膜过滤,得到富勒烯-橄榄油溶液,即C<sub>60</sub>-橄榄油组合物,其中C<sub>60</sub>的含量为0.8mg/mL。

[0040] 实施例2、富勒烯清除自由基能力检测

[0041] 通过电子自旋共振波谱(ESR)来检测富勒烯清除自由基的能力。

[0042] 测试中以DMP0为电子捕获剂,羟基自由基通过Fenton反应产生,室温加入H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液引发羟基自由基产生后3min,开始检测,得到ESR数据,如图1和图2所示。

[0043] 图1为Gd@C<sub>82</sub>的电子自旋核磁共振(ESR)图,其中,虚线为空白,实线为Gd@C<sub>82</sub>,与空白相比,Gd@C<sub>82</sub>的信号明显降低,说明其有强的清除自由基能力。

[0044] 图2为C<sub>60</sub>的电子自旋核磁共振(ESR)图,其中,虚线为空白,实线为C<sub>60</sub>,与空白相比,C<sub>60</sub>的信号明显降低,说明其有强的清除自由基能力。

[0045] 实施例3、细胞实验

[0046] 取常用细胞HeLa细胞作为细胞实验模型,验证Gd@C<sub>82</sub>和C<sub>60</sub>具有清除自由基,保护细胞的能力。

[0047] (1)药物毒性实验

[0048] 用含10%血清的高糖DMEM培养液培养HeLa细胞,胰酶消化传代至足够数目之后进行药物毒性实验。

[0049] 消化细胞为细胞悬液,密度为 $5 \times 10^4$ 个/mL,种96孔板。每孔加入200 $\mu$ L细胞悬液,孵育24h,吸掉培养液,分别加入空白培养液和不同浓度的Gd@C<sub>82</sub>培养液,浓度为5、10、20、50和100 $\mu$ M,孵育24h,吸掉培养液,用PBS洗3次,每孔加入100 $\mu$ L无色DMED和10 $\mu$ L的CCK-8,孵育1h,用酶标仪检测细胞活力,结果如图3所示。由图3可以看出,细胞活力不仅没有降低,反而有略微增加,由此证明Gd@C<sub>82</sub>无细胞毒性,而对细胞有一定的保护作用。

[0050] 按照上述相同实验步骤,将Gd@C<sub>82</sub>替换为C<sub>60</sub>,进行实验,细胞活力结果如图4所示,由图4可以看出,C<sub>60</sub>无细胞毒性,而对细胞有一定的保护作用。

[0051] (2)清除自由基实验

[0052] 如步骤(1)中进行种板,孵育24h后,吸掉培养液,加入浓度为150 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液孵育1h,吸掉H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液,加入不同浓度的Gd@C<sub>82</sub>培养液,浓度为0、10、20、40和50 $\mu$ M,孵育3h,吸掉培养液,用PBS洗3次,每孔加入100 $\mu$ L无色DMED和10 $\mu$ L的cck-8,孵育1h,用酶标仪检测细胞

活力,结果如图5所示。图5证明Gd@C<sub>82</sub>能够清除H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>产生的羟基自由基,减少自由基对细胞的损伤。

[0053] 按照上述相同实验步骤,将Gd@C<sub>82</sub>替换为C60,进行实验,结果如图6所示,图6结果证明,C60能够清除H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>产生的羟基自由基,减少自由基对细胞的损伤。

[0054] 实施例4、动物行为学实验

[0055] (1)帕金森病模型的建立

[0056] 采用成熟的MPTP致小鼠帕金森病模型。

[0057] 研究发现C57BL/6小鼠对MPTP敏感性最强,因此本发明采用C57BL/6小鼠来进行实验。

[0058] 本发明取40只C57BL/6小鼠,10周龄,体重18~22g,腹腔注射MPTP,浓度为35mg/Kg,每天注射一次,连续7天,小鼠表现出静止性震颤,运动减少,竖尾,竖毛等,证明模型构建成功。

[0059] (2)小鼠治疗实验

[0060] 本发明40只模型鼠中取30只,分别进行Gd@C<sub>82</sub>和C60对帕金森小鼠的治疗实验。随机分为A组、B组和C组,每组10只,A组为Gd@C<sub>82</sub>实验组,B组为C60实验组,C组为对照组,分别进行灌胃给药。A组每天灌胃给药实施例1制备的Gd@C<sub>82</sub>-橄榄油组合物0.1mL,B组每天灌胃给药实施例1制备的C<sub>60</sub>-橄榄油组合物0.1mL,C组每天灌胃给药相同量的生理盐水,连续给药10天,观察并进行行为学实验测试。

[0061] (3)小鼠行为学实验

[0062] 本发明通过常用的自主活动计数,悬挂实验,游泳实验来检测小鼠的治疗效果。

[0063] 1)自主活动计数

[0064] 本发明参经常规自主活动计数方法,自制30cm×30cm×15cm的有机玻璃盒子,在盒子的底部刻线成6cm×6cm的格子,在室温,安静,光线暗的环境中检测,分别取治疗后的实验组和对照组小鼠检测,待小鼠适应10min后,计数5min之内小鼠移动的格子数和站立次数,连测5次取平均值,结果如表1中所示。由表1中数据可知,经Gd@C<sub>82</sub>-橄榄油组合物和C<sub>60</sub>-橄榄油组合物治疗后的的小鼠移动格子数和站立次数都明显增加,证明富勒烯对帕金森小鼠的行为有改善,并且,因为Gd@C<sub>82</sub>-橄榄油组合物比C<sub>60</sub>-橄榄油组合物的清除自由基效果好,其对帕金森小鼠的行为改善更大。

[0065] 2)悬挂实验

[0066] 取治疗后的实验组和对照组小鼠检测,将测试的小鼠悬挂于自制的水平电线上,若小鼠用2支后爪抓住电线,记3分,用1支后爪抓住电线,则记2分,抓不住电线记1分,结果如表1中所示。由表1中数据可知,经过治疗后的小鼠后肢运动和协调能力有显著的改善。

[0067] 3)游泳实验。

[0068] 将小鼠放置于一个20cm×30cm×20cm规格的水箱中,水温为22~25℃,评分标准如下:在1min之内能连续不断游泳的记30分;大部分时间游泳仅偶尔漂浮的记25分,漂浮时间占一半以上的记20分,偶尔游泳者记15分,漂浮在一边的记10分,结果如表1中所示。由表1中数据可知,A和B治疗组比C对照组游泳能力强,说明其四肢运动能力有所改善。

[0069] 表1小鼠行为学实验结果

[0070]

组别	移动格子数	站立次数	悬挂实验	游泳实验
实验组 A	120.21±18.21	35.20±2.98	3.01±0.59	2.98±0.45
实验组 B	110.32±20.45	29.15±3.01	2.85±0.44	2.05±0.60
对照组 C	70.11±20.34	19.01±3.31	1.58±0.74	1.49±0.54

[0071] 本发明主要以Gd@C<sub>82</sub>和C<sub>60</sub>为实施例,通过材料测试、细胞水平测试以及动物水平的实验证明了富勒烯橄榄油组合物具有强的清除自由基的能力,能够改善帕金森病引起的动物肢体的震颤,不协调等,因此能有效地治疗帕金森病。

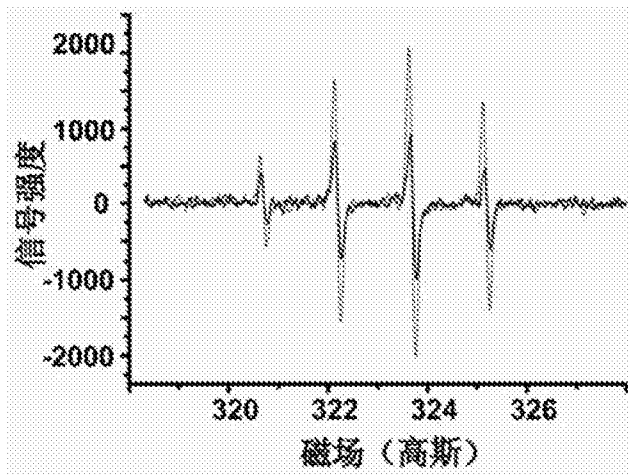


图1

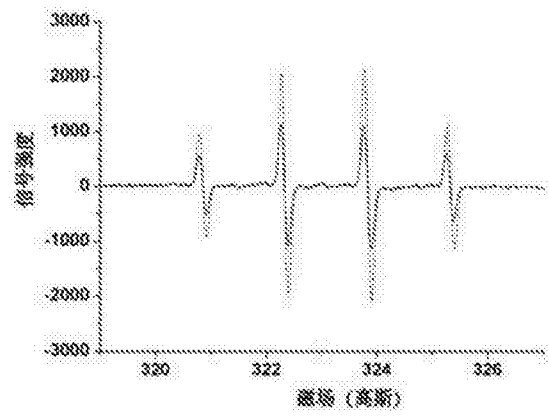


图2

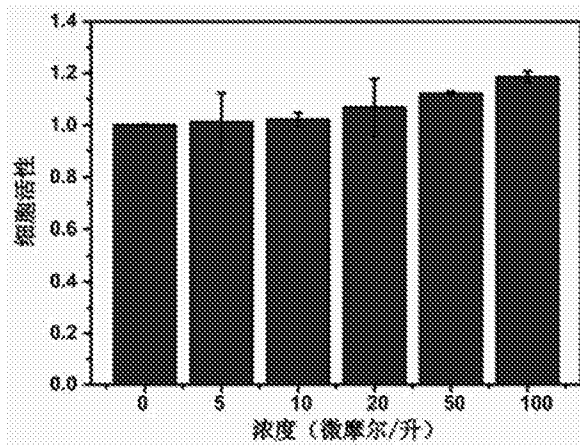


图3

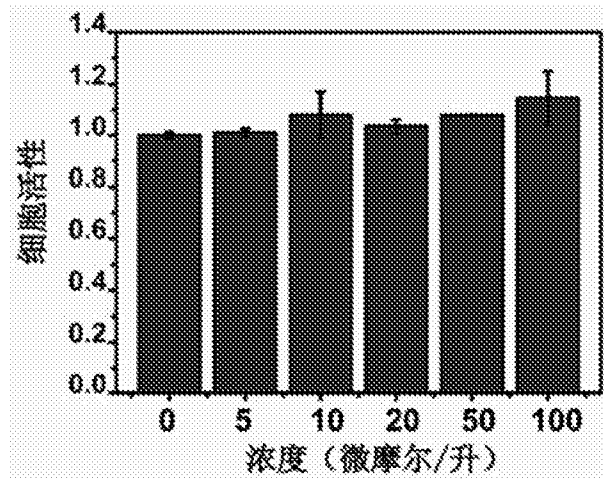


图4



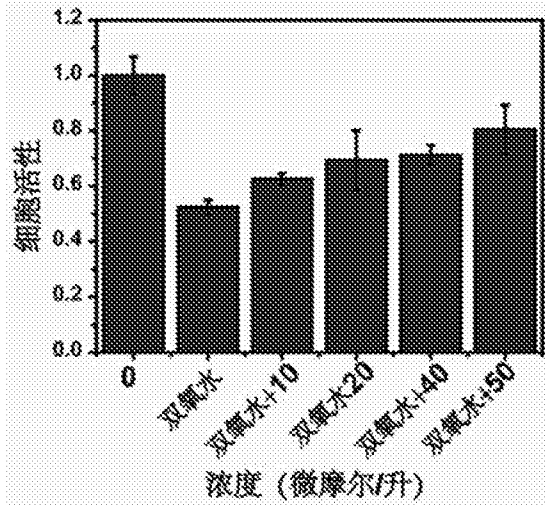


图5

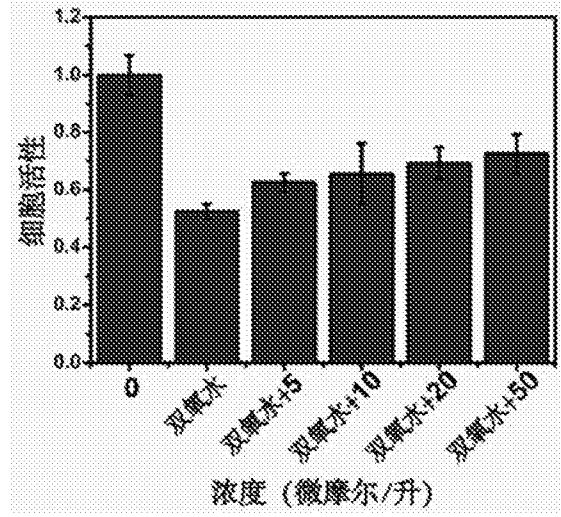


图6