



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101716145 A

(43) 申请公布日 2010.06.02

(21) 申请号 200910213719.2

A61K 31/513(2006.01)

(22) 申请日 2009.12.09

A61P 35/00(2006.01)

(71) 申请人 暨南大学

地址 510632 广东省广州市黄埔大道西 601 号

(72) 发明人 杨培慧 蔡怀鸿 张文豪 蔡继业

(74) 专利代理机构 广州市华学知识产权代理有限公司 44245

代理人 裘晖 陈燕娴

(51) Int. Cl.

A61K 9/16(2006.01)

A61K 47/48(2006.01)

A61K 47/36(2006.01)

A61K 47/42(2006.01)

A61K 47/22(2006.01)

A61K 31/704(2006.01)

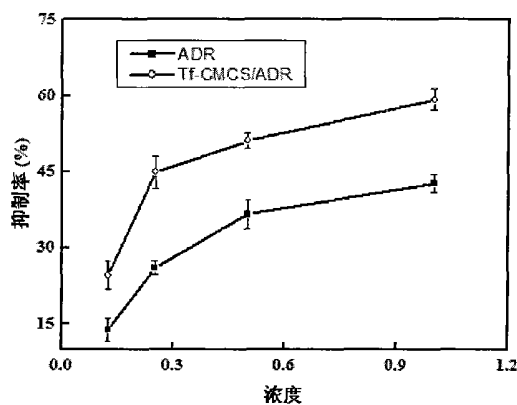
权利要求书 2 页 说明书 6 页 附图 2 页

(54) 发明名称

改性壳聚糖靶向载药纳米微球及其制备方法

(57) 摘要

本发明提供了一种改性壳聚糖靶向载药纳米微球及其制备方法。本发明是将壳聚糖改性为羧甲基壳聚糖,然后用生物交联剂将药物分子上的活性氨基和羧甲基壳聚糖上的活性羧基交联,制成载药纳米微球;最后通过化学修饰方法将靶向性生物分子连接在载药微球的表面,得到改性壳聚糖靶向载药纳米微球。该载药纳米微球粒径小、药物包封率高、载药量大、靶向生物分子偶联效率高、制备条件温和、靶向性强、药物毒副作用低,能提高对肿瘤细胞的靶向作用和缓释作用,从而增强对肿瘤细胞的杀伤率。



1. 一种改性壳聚糖靶向载药纳米微球,其特征在于:是先将壳聚糖改性为羧甲基壳聚糖,然后用生物交联剂将药物分子上的活性氨基和羧甲基壳聚糖上的活性羧基交联,制成载药纳米微球;最后通过化学修饰方法将靶向性生物分子连接在载药微球的表面,得到改性壳聚糖靶向载药纳米微球。

2. 根据权利要求1所述的改性壳聚糖靶向载药纳米微球,其特征在于:所述羧甲基壳聚糖由以下方法制备:将5-15g壳聚糖溶解于50-150ml异丙醇溶液中,在搅拌条件下加入质量浓度为50%的NaOH溶液20-100ml,使壳聚糖在碱性条件下膨胀,在0-10℃下存放6-18h使其碱化完全;在30-50℃下,将2-10g固体氯乙酸加入上述溶液中,制备出羧甲基壳聚糖粗成品;利用冰醋酸调节溶液pH至7.0,然后依次用乙醇溶液洗涤,透析袋透析除去小分子杂质,干燥,得到白色粉状羧甲基壳聚糖。

3. 根据权利要求1所述的改性壳聚糖靶向载药纳米微球,其特征在于:所述靶向性生物分子为能与肿瘤细胞表面的特异性受体分子结合的生物分子。

4. 根据权利要求3所述的改性壳聚糖靶向载药纳米微球,其特征在于:所述靶向性生物分子为转铁蛋白或叶酸。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的改性壳聚糖靶向载药纳米微球,其特征在于:所述载药纳米微球的粒径为80-160nm。

6. 权利要求1所述的改性壳聚糖靶向载药纳米微球的制备方法,其特征在于:将羧甲基壳聚糖、碳二亚胺和药物加入醋酸缓冲溶液,反应完全后,离心收集,干燥,制得纳米载药微球;再在其表面通过化学修饰的方法与靶向性生物分子结合。

7. 一种转铁蛋白靶向羧甲基壳聚糖载阿霉素纳米微球,其特征在于是由以下方法制备的:

(1) 羧甲基壳聚糖载阿霉素纳米微球的制备:

在pH 4.0-7.0的醋酸缓冲溶液介质下,按(1.0-5.0):(0.5-1.5):(0.2-0.8)的摩尔比,将羧甲基壳聚糖、碳二亚胺和阿霉素,搅拌反应5-40min,离心收集载药微球,干燥,制得羧甲基壳聚糖载阿霉素纳米微球;

(2) 步骤(1)所得羧甲基壳聚糖载阿霉素纳米微球用转铁蛋白修饰。

8. 根据权利要求7所述的转铁蛋白靶向羧甲基壳聚糖载阿霉素纳米微球,其特征在于:步骤(2)所述用转铁蛋白修饰具体为:

将1-3mg步骤(1)得到的羧甲基壳聚糖载阿霉素纳米微球溶解于1-3ml水中,制得羧甲基壳聚糖载阿霉素纳米微球溶液;将1-10mg转铁蛋白溶解在1-3ml,30mmol/L,pH 5.0的醋酸钠溶液中,将20-120 μg的高碘酸钠与其混合,冰浴下反应20-160min;在50-100 μl,0.1mol/L的碳二亚胺存在下,将氧化后的转铁蛋白80-100 μg加入1-2ml的羧甲基壳聚糖载阿霉素纳米微球溶液中,反应10-60min,得到转铁蛋白靶向羧甲基壳聚糖载阿霉素纳米微球。

9. 一种转铁蛋白靶向羧甲基壳聚糖载5-氟尿嘧啶纳米微球,其特征在于是由以下方法制备的:

(1) 羧甲基壳聚糖载5-氟尿嘧啶纳米微球的制备:

在pH 4.0-7.0的醋酸缓冲溶液介质下,按(1.0-7.0):(0.5-1.5):(0.5-2.5)的摩尔比,将羧甲基壳聚糖、碳二亚胺和5-氟尿嘧啶,搅拌反应5-60min,离心收集,干燥,制备

出羧甲基壳聚糖载 5- 氟尿嘧啶纳米微球；

(2) 步骤 (1) 所得羧甲基壳聚糖载 5- 氟尿嘧啶纳米微球用转铁蛋白修饰。

10. 根据权利要求 9 所述转铁蛋白靶向羧甲基壳聚糖载 5- 氟尿嘧啶纳米微球, 其特征在于: 步骤 (2) 中所述用转铁蛋白修饰具体为:

将 2-4mg 步骤 (1) 得到的羧甲基壳聚糖载 5- 氟尿嘧啶纳米微球溶解于 2-5ml 水中, 制得羧甲基壳聚糖载 5- 氟尿嘧啶纳米微球溶液; 将 2-12mg 转铁蛋白溶解在 2-5ml, 30mmol/L, pH 5.0 的醋酸钠溶液中, 然后加入 10-140 μ g 的高碘酸钠, 冰浴下反应 10-150min; 在 60-120 μ l, 0.1mol/L 碳二亚胺存在下, 将 90-120 μ g 氧化后的转铁蛋白加入到 1-3ml 的羧甲基壳聚糖载 5- 氟尿嘧啶纳米微球溶液中, 反应 5-50min, 得到转铁蛋白靶向羧甲基壳聚糖载 5- 氟尿嘧啶纳米微球。

改性壳聚糖靶向载药纳米微球及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物纳米材料在生物医药领域的应用,公开了一种具有主动靶向肿瘤细胞能力的改性壳聚糖靶向载药纳米微球及其制备方法。

背景技术

[0002] 抗肿瘤药物的主动靶向性和低毒副作用对疾病的临床治疗十分重要,而作为药物的载体,如何最大程度发挥药物药效,减少用药次数与剂量,提高药物的利用率及其疗效,是其中一个十分关键的问题。研究认为理想的抗肿瘤药物载药系统能将抗肿瘤药物选择性蓄积于体内癌变部位,降低药物对正常组织的毒副作用,提高药物的生物利用度,从而提高药效,这是当前抗肿瘤药物研发领域的热点。

[0003] 壳聚糖是唯一一种天然存在的亲水阳离子可生物降解多糖,其分解产物是可被人体完全吸收的氨基糖,具有良好的生物相容性。壳聚糖分子中富含游离的氨基和羟基,既可以和抗肿瘤药物以酰胺键或酰胺键偶连,也可以与肿瘤细胞表面特异表达的受体或配体进行连接。但现有的以壳聚糖为基础的纳米微球有易离解,控释性能不好,载药量和药物包封率不高,靶向性不强等缺点。

发明内容

[0004] 针对现有的以壳聚糖为基础的纳米微球的缺点,本发明的目的旨在提供一种粒径小、药物包封率高、载药量大、靶向生物分子偶联效率高、制备条件温和、靶向性强的改性壳聚糖靶向载药纳米微球。

[0005] 本发明另一目的旨在提供上述靶向载药纳米微球的制备方法。

[0006] 具体通过以下的技术方案实现本发明的目的:

[0007] 本发明首先提供了一种改性壳聚糖靶向载药纳米微球,是先将壳聚糖改性为羧甲基壳聚糖,然后用生物交联剂将药物分子上的活性氨基和羧甲基壳聚糖上的活性羧基交联,制成载药纳米微球;最后通过化学修饰方法将靶向性生物分子连接在载药微球的表面,得到改性壳聚糖靶向载药纳米微球。

[0008] 生物交联剂常用如碳二亚胺等。

[0009] 优选地,所述羧甲基壳聚糖(CMCS)通过以下方法制备:将5-15g壳聚糖(CS)溶解于50-150ml异丙醇溶液中,在搅拌条件下加入质量浓度为50%的NaOH溶液20-100ml,让壳聚糖在碱性条件下膨胀,在0-10℃下存放6-18h使其碱化完全;在30-50℃下,将2-10g固体氯乙酸加入上述溶液中,制备出羧甲基壳聚糖粗成品;利用冰醋酸调节溶液pH至7.0,然后依次用乙醇溶液洗涤,透析袋透析除去小分子杂质,干燥,得到白色粉状羧甲基壳聚糖。

[0010] 优选地,所述靶向性生物分子是为能与肿瘤细胞表面的特异性受体分子结合的生物分子,如转铁蛋白或叶酸等。

[0011] 优选地,所述改性壳聚糖靶向载药纳米微球的平均粒径为80-160nm。

[0012] 本发明还提供了上述改性壳聚糖靶向载药纳米微球的制备方法,是将羧甲基壳聚糖(CMCS)、碳二亚胺(EDAC)和药物加入醋酸缓冲溶液,反应完全后,离心收集,干燥,制得纳米载药微球;再在其表面通过化学修饰的方法与具靶向作用的生物分子结合。需要根据不同的药物类型调整各组分的加入比例。

[0013] 本发明以阿霉素(ADR)和5-氟尿嘧啶(5-Fu)为典型,提供了两种载药纳米微球优选的制备方法。

[0014] 一种转铁蛋白靶向羧甲基壳聚糖载阿霉素纳米微球(Tf-ADR/CMCS),是由以下方法制备的:

[0015] (1) 羧甲基壳聚糖载阿霉素纳米微球(ADR/CMCS)的制备:

[0016] 在pH 4.0-7.0的醋酸缓冲溶液介质下,按(1.0-5.0):(0.5-1.5):(0.2-0.8)的摩尔比,将羧甲基壳聚糖、碳二亚胺和阿霉素,搅拌反应5-40min,离心收集载药微球,干燥,制得羧甲基壳聚糖载阿霉素纳米微球;

[0017] (2) 步骤(1)所得羧甲基壳聚糖载阿霉素纳米微球用转铁蛋白修饰。

[0018] 所述用转铁蛋白修饰又优选使用如下的方法:

[0019] 将1-3mg步骤(1)得到的羧甲基壳聚糖载阿霉素纳米微球溶解于1-3ml水中,制得羧甲基壳聚糖载阿霉素纳米微球溶液;将1-10mg转铁蛋白溶解在1-3ml,30mmol/L, pH 5.0的醋酸钠溶液中,将20-120 μ g的高碘酸钠与其混合,冰浴下反应20-160min;在50-100 μ l, 0.1mol/L的碳二亚胺存在下,将氧化后的转铁蛋白80-100 μ g加入1-2ml的羧甲基壳聚糖载阿霉素纳米微球溶液中,反应10-60min,得到转铁蛋白靶向羧甲基壳聚糖载阿霉素纳米微球。

[0020] 一种转铁蛋白靶向羧甲基壳聚糖载5-氟尿嘧啶纳米微球(Tf-5-Fu/CMCS),是由以下方法制备的:

[0021] (1) 羧甲基壳聚糖载5-氟尿嘧啶纳米微球(Tf-5-Fu/CMCS)的制备:

[0022] 在pH 4.0-7.0的醋酸缓冲溶液介质下,按(1.0-7.0):(0.5-1.5):(0.5-2.5)的摩尔比,将羧甲基壳聚糖、碳二亚胺和5-氟尿嘧啶,搅拌反应5-60min,离心收集,干燥,制备出羧甲基壳聚糖载5-氟尿嘧啶纳米微球;

[0023] (2) 步骤(1)所得羧甲基壳聚糖载5-氟尿嘧啶纳米微球用转铁蛋白修饰。

[0024] 所述用转铁蛋白修饰又优选使用如下的方法:

[0025] 将2-4mg步骤(1)得到的羧甲基壳聚糖载5-氟尿嘧啶纳米微球溶解于2-5ml水中,制得羧甲基壳聚糖载5-氟尿嘧啶纳米微球溶液;将2-12mg转铁蛋白溶解在2-5ml,30mmol/L, pH 5.0的醋酸钠溶液中,然后加入10-140 μ g的高碘酸钠,冰浴下反应10-150min;在60-120 μ l, 0.1mol/L碳二亚胺存在下,将90-120 μ g氧化后的转铁蛋白加入到1-3ml的羧甲基壳聚糖载5-氟尿嘧啶纳米微球溶液中,反应5-50min,得到转铁蛋白靶向羧甲基壳聚糖载5-氟尿嘧啶纳米微球。

[0026] 本发明的基本技术原理为:是采用改性的羧甲基壳聚糖为药物运输载体来制备纳米载药微球;将靶向性生物分子修饰在载药微球的表面,利用靶向性生物分子和肿瘤细胞表面高度表达的受体分子间特异性结合来实现载药纳米微球的主动靶向作用。将壳聚糖选择性的改性成羧甲基壳聚糖,增加壳聚糖上的活性羧基,提高纳米微球的载药量、药物包封率和靶向生物分子偶联效率。以抗肿瘤药物为模型药物,采用羧甲基壳聚糖为药物运输载

体制备载药纳米微球,将靶向生物分子修饰在载药纳米微球表面,有助于提高载药纳米药物的“主动”靶向作用。

[0027] 相对于现有技术,本发明具有如下有益效果:

[0028] 本发明将壳聚糖上的活性羟基进行选择性改性生成羧甲基壳聚糖,采用生物交联剂将药物(如ADR、5-Fu)上的活性氨基和CMCS上的活性羧基交联生成载药纳米微球;并通过化学修饰方法将具有靶向作用的生物分子(如转铁蛋白)连接在载药微球的表面,从而实现载药微球的主动靶向性能。CMCS靶向载药微球的平均粒径约为100-150nm,具有载药量大、药物包封率高、靶向生物分子偶联效率高等特点,有助于提高药物的靶向性,实现药物缓释和具有较强的肿瘤细胞杀伤效应。

[0029] 体外释放实验结果表明本发明的靶向载药纳米微球能明显延缓药物的释放,具有良好的缓释效果。本发明的载药纳米微球对肿瘤细胞的杀伤率在量效和时效上明显比同剂量的单独药物的杀伤率高,载药微球表面修饰上靶向生物分子后能进一步增强载药纳米药物的靶向杀伤性。

附图说明

[0030] 图1为本发明所制备的ADR/CMCS纳米微球的原子力显微镜图片,颗粒的平均粒径为110nm。

[0031] 图2为ADR/CMCS纳米微球体外释放曲线,溶出介质分别为模拟胃液(pH 4.0 醋酸缓冲液)、模拟体液(pH7.4 磷酸盐缓冲液)。体外释放实验结果表明ADR/CMCS载药微球能明显延缓药物的释放,具有良好的缓释效果。

[0032] 图3为Tf-ADR/CMCS纳米微球对人喉肿瘤细胞的生长抑制图,与单独ADR相比,载药纳米微球修饰上靶向性生物分子后对肿瘤细胞的杀伤率在量效上有了明显的提高。

[0033] 图4为本发明所制得的5-Fu/CMCS纳米微球的原子力显微镜图片,微球平均粒径为100nm。

[0034] 图5为5-Fu/CMCS纳米微球体外释放曲线,溶出介质分别为模拟胃液(pH 4.0 醋酸缓冲液)、模拟体液(pH7.4 磷酸盐缓冲液)。体外释放实验结果表明5-Fu/CMCS纳米微球能明显延缓药物的释放,具有良好的缓释效果。

[0035] 图6为Tf-5-Fu/CMCS纳米微球对人喉肿瘤细胞的生长抑制图,与单独5-Fu相比,载药纳米微球修饰上靶向生物分子后对肿瘤细胞的杀伤率在量效上有了明显的提高。

具体实施方式

[0036] 下面结合实施例,对本发明做进一步地详细说明,但本发明的实现方式并不局限于此。

[0037] 实施例1:Tf-ADR/CMCS纳米微球的制备方法和应用

[0038] (1)羧甲基壳聚糖(CMCS)的制备:将5g壳聚糖(CS)溶解于50ml异丙醇溶液中,在搅拌条件下加入质量浓度为50%的NaOH溶液20ml,使壳聚糖在碱性条件下膨胀,在0℃下存放6h使其碱化完全;在30℃下,将2g固体氯乙酸加入上述溶液中,制备出CMCS粗成品;利用冰醋酸调节溶液pH至7.0,然后依次用乙醇溶液洗涤,透析袋透析除去小分子杂质,干燥,得到白色粉状CMCS。

[0039] (2) ADR/CMCS 纳米微球的制备：在 pH 4.0 的醋酸缓冲溶液介质下，按 1.0 : 0.5 : 0.2 的摩尔比，将 CMCS、碳二亚胺 (EDAC) 和 ADR，搅拌反应 10min，离心收集，干燥，制得 ADR/CMCS 纳米微球。纳米微球的平均粒径为 110nm (图 1)，平均载药量为 35%，平均药物包封率为 55%。

[0040] (3) Tf-ADR/CMCS 纳米微球的制备：将 1mg ADR/CMCS 纳米微球溶解于 1ml 水中，制备 ADR/CMCS 纳米微球溶液；将 1mg 转铁蛋白 (Tf) 溶解在 1ml 醋酸钠溶液 (30mmol/L, pH 5.0) 中，将 20 μ g 的高碘酸钠 (60mmol/L) 与其混合，冰浴下反应 20min；在 50 μ l, 0.1mol/L 碳二亚胺存在下，将 80 μ g 氧化后的 Tf 和 1ml ADR/CMCS 纳米微球溶液反应 10min，制得 Tf-ADR/CMCS 纳米微球。

[0041] (4) Tf-ADR/CMCS 纳米微球作为抗肿瘤药物的体外释药特性：采用动力学透析法进行体外稳定性实验，观察载药纳米微球的体外释药特性。设定温度为 $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ，将载药纳米微球装入透析袋中封严，放在恒温箱中进行透析。溶出介质分别为模拟胃液 (pH 4.0 醋酸缓冲液)、模拟体液 (pH 7.4 磷酸盐缓冲液)，间隔一小时取出 5ml 透析液，测定透析量，同时补充新鲜的介质。采用荧光标准曲线测定不同时间 ADR 的释放量，绘制载药纳米微球的体外释放曲线。体外释放实验结果 (如图 2) 表明，当释药时间达到 5 天时还有 40% ADR 未释放到溶液中，即载药微球能明显延缓药物的释放，具有良好的缓释效果。

[0042] (5) Tf-ADR/CMCS 纳米微球作为抗肿瘤药物的靶向载药系统对肿瘤细胞的生长抑制作用。MTT 法测定上述靶向载药纳米微球对人喉肿瘤细胞的杀伤率，结果表明：靶向载药微球对肿瘤细胞的杀伤率在量效和时效上明显比同剂量的单独 ADR 抗肿瘤药物的杀伤率高，载药纳米微球表面修饰上 Tf 后能显著提高药物对肿瘤细胞的靶向杀伤率 (图 3)。

[0043] 实施例 2：Tf-ADR/CMCS 纳米微球的制备方法和应用

[0044] (1) 羧甲基壳聚糖 (CMCS) 的制备：将 15g 壳聚糖 (CS) 溶解于 150ml 异丙醇溶液中，在搅拌条件下加入质量浓度为 50% NaOH 溶液 100ml，使壳聚糖在碱性条件下膨胀，在 10°C 下存放 18h 使其碱化完全；在 50°C 下，将 10g 固体氯乙酸加入上述溶液中，制备出 CMCS 粗成品；利用冰醋酸调节溶液 pH 至 7.0，然后依次用乙醇溶液洗涤，透析袋透析除去小分子杂质，干燥，得到白色粉状 CMCS。

[0045] (2) ADR/CMCS 纳米微球的制备：在 pH 7.0 的醋酸缓冲溶液介质下，按 5.0 : 1.5 : 0.8 的摩尔比，将 CMCS、碳二亚胺 (EDAC) 和 ADR，搅拌反应 40min，离心收集，干燥，制得 ADR/CMCS 纳米微球。载药纳米微球的平均粒径为 110nm，平均载药量为 40%，平均药物包封率为 60%。

[0046] (3) Tf-ADR/CMCS 纳米微球的制备：将 3mg ADR/CMCS 纳米微球溶解于 3ml 水中，制备 ADR/CMCS 纳米微球溶液。将 10mg 转铁蛋白 (Tf) 溶解在 3ml 醋酸钠溶液 (30mmol/L, pH 5.0) 中，将 120 μ g 的高碘酸钠 (60mmol/L) 与其混合，冰浴下反应 160min；在 100 μ l, 0.1mol/L 碳二亚胺存在下，将 100 μ g 氧化后的 Tf 和 2ml ADR/CMCS 纳米微球溶液反应 60min，制得 Tf-ADR/CMCS 纳米微球。

[0047] (4) Tf-ADR/CMCS 纳米微球作为抗肿瘤药物的体外释药特性。体外释放实验的方法同实施例 1。体外释放实验结果表明，当释药时间达到 5 天时还有 50% ADR 未释放到溶液中，即载药微球能明显延缓药物的释放，具有良好的缓释效果。

[0048] (5) Tf-ADR/CMCS 纳米微球作为抗肿瘤药物的靶向载药系统对肿瘤细胞的生长抑

制作用。MTT 实验的方法同实施例 1。与实施例 1 的结果类似,靶向载药微球对肿瘤细胞的杀伤率在量效和时效上明显比同剂量的单独 ADR 抗肿瘤药物的杀伤率高,载药纳米微球表面修饰上 Tf 后能显著提高药物对肿瘤细胞的靶向杀伤率。

[0049] 实施例 3:Tf-5-Fu/CMCS 纳米微球的制备方法和应用

[0050] (1) 羧甲基壳聚糖 (CMCS) 的制备:将 6g 壳聚糖 (CS) 溶解于 60ml 异丙醇溶液中,在搅拌条件下加入质量浓度为 50% 的 NaOH 溶液 30ml,让壳聚糖在碱性条件下膨胀,在 2℃ 下存放 7h 使其碱化完全;在 35℃ 下,将 6g 固体氯乙酸加入上述溶液中,制备出 CMCS 粗成品;利用冰醋酸调节溶液 pH 至 7.0,然后依次用乙醇溶液洗涤,透析袋透析除去小分子杂质,干燥,得到白色粉状 CMCS。

[0051] (2) 5-Fu/CMCS 纳米微球的制备:在 pH 4.0 的醋酸缓冲溶液介质下,按 1.0 : 0.5 : 0.5 的摩尔比,将 CMCS、碳二亚胺 (EDAC) 和 5-Fu,搅拌反应 10min,离心收集,干燥,制得 5-Fu/CMCS 纳米微球。该纳米微球的平均粒径为 100nm (图 4),平均载药量为 40%,平均药物包封率为 60%。

[0052] (3) Tf-5-Fu/CMCS 纳米微球的制备:将 2mg 5-Fu/CMCS 纳米微球溶解于 2ml 水中,制备 5-Fu/CMCS 纳米微球溶液。将 4mg 转铁蛋白 (Tf) 溶解在 2ml 醋酸钠溶液 (30mmol/L, pH 5.0) 中,将 10 μg 的高碘酸钠 (60mmol/L) 与其混合,冰浴下反应 20min;在 60 μl, 0.1mol/L 碳二亚胺存在下,将 90 μg 氧化后的 Tf 和 1ml 5-Fu/CMCS 纳米微球溶液反应 10min,制得 Tf-5-Fu/CMCS 纳米微球。

[0053] (4) Tf-5-Fu/CMCS 纳米微球作为抗肿瘤药物的靶向载药系统对肿瘤细胞的生长抑制作用。体外释放实验同实施例 1 的步骤。体外释放实验结果表明,当释药时间达到 5 天时还有 30% 5-Fu 未释放到溶液中 (图 5),即载药微球能明显延缓药物的释放,具有良好的缓释效果。

[0054] (5) Tf-5-Fu/CMCS 纳米微球作为抗肿瘤药物的靶向载药系统对肿瘤细胞的生长抑制作用。MTT 实验的方法同实施例 1。结果表明:靶向载药微球对肿瘤细胞的杀伤率在量效和时效上明显比同剂量的单独 5-Fu 抗肿瘤药物的杀伤率高,载药纳米微球表面修饰上 Tf 后能显著提高药物对肿瘤细胞的靶向杀伤率 (图 6)。

[0055] 实施例 4:Tf-5-Fu/CMCS 纳米微球的制备方法和应用

[0056] (1) 羧甲基壳聚糖的制备 (CMCS):将 12g 壳聚糖 (CS) 溶解于 130ml 异丙醇溶液中,在搅拌条件下加入质量浓度为 50% 的 NaOH 溶液 90ml,让壳聚糖在碱性条件下膨胀,在 8℃ 下存放 17h 使其碱化完全;在 45℃ 下,将 8g 固体氯乙酸加入上述溶液中,制备出 CMCS 粗成品;利用冰醋酸调节溶液 pH 至 7.0,然后依次用乙醇溶液洗涤,透析袋透析除去小分子杂质,干燥,得到白色粉状 CMCS。

[0057] (2) 5-Fu/CMCS 纳米微球的制备:在 pH 7.0 的醋酸缓冲溶液介质下,按 7 : 1.5 : 2.5 的摩尔比,将 CMCS、碳二亚胺 (EDAC) 和 5-氟尿嘧啶 (5-Fu),搅拌反应 60min,离心收集,干燥,制得 5-Fu/CMCS 纳米微球。载药纳米微球的平均粒径为 100nm,平均载药量为 45%,平均药物包封率为 65%。

[0058] (3) Tf-5-Fu/CMCS 纳米微球的制备:将 4mg 5-Fu/CMCS 纳米微球溶解于 5ml 水中,制备 5-Fu/CMCS 纳米微球溶液。将 12mg 转铁蛋白 (Tf) 溶解在 5ml 醋酸钠溶液 (30mmol/L, pH 5.0) 中,将 140 μg 的高碘酸钠 (60mmol/L) 与其混合,冰浴下反应 150min;在 120 μl,

0.1mol/L 碳二亚胺存在下,将 120 μ g 氧化后的 Tf 和 3ml 5-Fu/CMCS 纳米微球溶液反应 60min,制得 Tf-5-Fu/CMCS 纳米微球。

[0059] (4) Tf-5-Fu/CMCS 纳米微球作为抗肿瘤药物的靶向载药系统对肿瘤细胞的生长抑制作用。体外释放实验同实施例 1 的步骤。体外释放实验结果表明,当释药时间达到 5 天时还有 35% 5-Fu 未释放到溶液中,即载药微球能明显延缓药物的释放,具有良好的缓释效果。

[0060] (5) Tf-5-Fu/CMCS 纳米微球作为抗肿瘤药物的靶向载药系统对肿瘤细胞的生长抑制作用。MTT 实验的方法同实施例 1。与实施例 3 的结果类似,靶向载药微球对肿瘤细胞的杀伤率在量效和时效上明显比同剂量的单独 5-Fu 抗肿瘤药物的杀伤率高,载药纳米微球表面修饰上 Tf 后能显著提高药物对肿瘤细胞的靶向杀伤率。

[0061] 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。

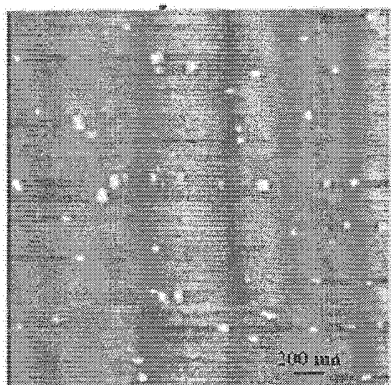


图 1

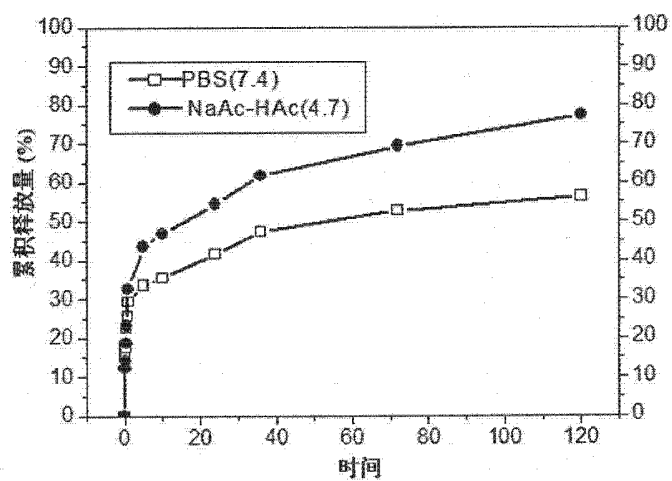


图 2

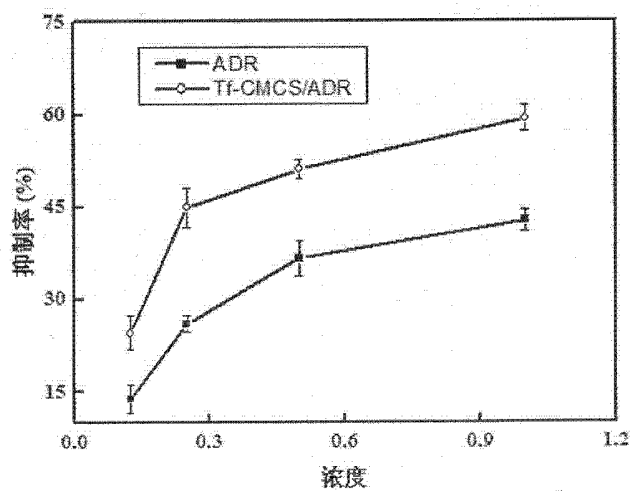


图 3

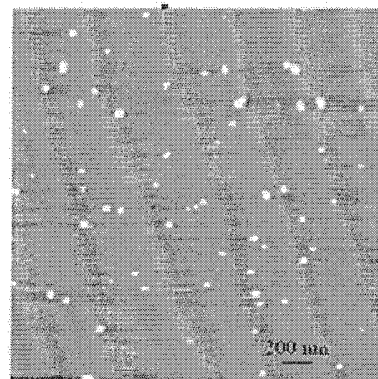


图 4

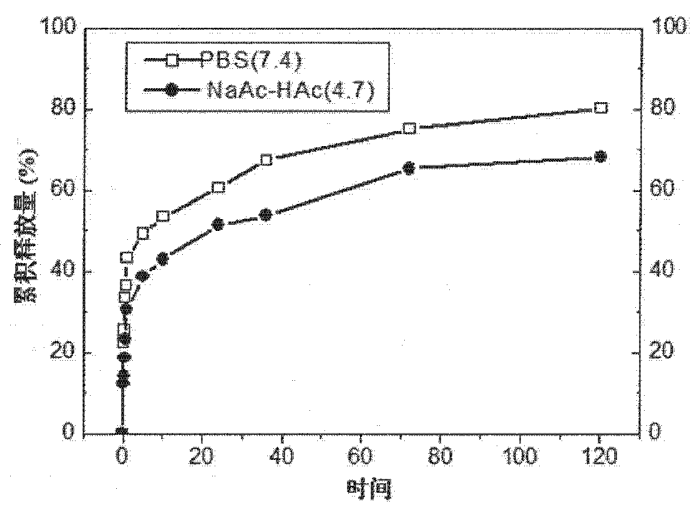


图 5

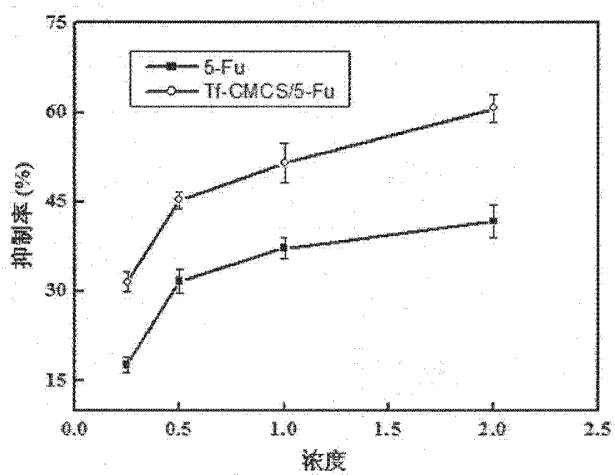


图 6