



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102949346 A

(43) 申请公布日 2013.03.06

(21) 申请号 201110248970.X

(22) 申请日 2011.08.26

(71) 申请人 南京大学

地址 210093 江苏省南京市鼓楼区汉口路
22 号

(72) 发明人 王伟 谢金兵 秦猛 曹毅

(74) 专利代理机构 南京天翼专利代理有限责任
公司 32112

代理人 周静

(51) Int. Cl.

A61K 9/14 (2006.01)

A61K 47/42 (2006.01)

A61K 31/704 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

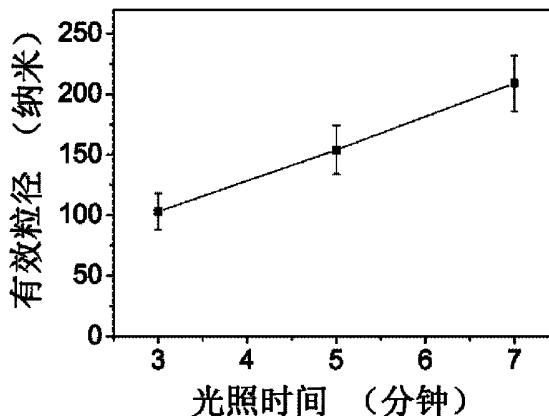
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 2 页

(54) 发明名称

蛋白载药纳米粒子的合成方法

(57) 摘要

本发明涉及蛋白载药纳米粒子的合成方法, 无需添加变性剂、还原剂或者交联剂等辅剂, 同步完成纳米粒子合成和载药过程。蛋白载药纳米粒子的合成方法为: 通过紫外光照射蛋白和疏水药物的混合溶液 3-10 分钟, 使蛋白中的二硫键打开, 蛋白二级结构的圆二色谱的变化比例在 10% 以内, 少量暴露的蛋白疏水基团与疏水药物作用引发聚集, 一步形成载药纳米颗粒, 所述蛋白含有色氨酸及二硫键, 蛋白表面的 zeta 电位绝对值不小于 15mV, 所述混合溶液中蛋白浓度为 0.5 ~ 5mg/ml。本发明所合成的纳米粒子大小可控、均一性、稳定性好, 载药量最大可达 20%。



1. 一种蛋白载药纳米粒子的合成方法,其特征在于通过紫外光照射蛋白和疏水药物的混合溶液 3-10 分钟,使蛋白中的二硫键打开,蛋白二级结构的圆二色谱的变化比例在 10% 以内,少量暴露的蛋白疏水基团与疏水药物作用引发聚集,一步形成载药纳米颗粒,所述蛋白含有色氨酸及二硫键,蛋白表面的 zeta 电位绝对值不小于 15mV,所述混合溶液中蛋白浓度为 0.5 ~ 5mg/ml。

2. 如权利要求 1 所述的蛋白载药纳米粒子的合成方法,其特征在于,所述紫外光波长为 270--310nm、强度为 500 微瓦每平方厘米~ 5 毫瓦每平方厘米。

3. 如权利要求 1 所述的蛋白载药纳米粒子的合成方法,其特征在于,所述蛋白为 α -牛乳白蛋白。

4. 如权利要求 1-3 中任一项所述的蛋白载药纳米粒子的合成方法,其特征在于,所述疏水药物为盐酸阿霉素,所述混合溶液中蛋白与盐酸阿霉素的质量比为 1 : 0.05 ~ 1 : 0.5。

5. 如权利要求 1-3 中任一项所述的蛋白载药纳米粒子的合成方法,其特征在于,所述混合溶液为蛋白和疏水药物溶于 pH 值为 4 ~ 9 的磷酸盐缓冲液的混合溶液。

蛋白载药纳米粒子的合成方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种蛋白载药纳米粒子的合成方法。

背景技术

[0002] 纳米技术的兴起使得基于高分子纳米微粒的药物输送得到了广泛的关注,高分子纳米药物载体除了具备传统药物输送体系所具有的特征如提高药物溶解度、增加药物稳定性以及缓释等优点外,还可以大幅度地改变药物的组织分布和代谢,提高药效并降低副作用。此外,肿瘤等病变部位对大分子类物质具有选择性高通透性和滞留性(EPR效应),当纳米微粒循环至肿瘤所在部位的时候其能够通过这种被动靶向作用进入肿瘤等病变部位。高分子纳米微粒能够有效地延长药物在体内的循环时间,更好地发挥载药纳米微粒的EPR效应,使得药物能够最大限度地发挥在病灶靶部位的疗效。

[0003] 在这些高分子纳米药物载体中,蛋白质因为其生物可降解好、生物相容性好等特点而成为一种重要的纳米药物载体。而通常单个蛋白质的尺寸在几个纳米以内,不适合直接用于载药。目前用于载药的蛋白质纳米粒子通常为蛋白质的复合物,因而在合成过程中往往需要添加一些还原剂或者交联剂,这些辅剂一方面增加了纳米载药粒子的制作工序,另一方面也增加了其潜在的毒性。此外,在目前很多蛋白质纳米载药粒子中,纳米粒子合成过程和载药过程通常分开完成,这样使得制造工序比较繁琐,而且影响到把药物负载到纳米粒子的内核部分。

发明内容

[0004] 本发明提供一种蛋白载药纳米粒子的合成方法,无需添加变性剂、还原剂或者交联剂等辅剂,同步完成纳米粒子合成和载药过程。

[0005] 蛋白载药纳米粒子的合成方法为:通过紫外光照射蛋白和疏水药物的混合溶液3-10分钟,使蛋白中的二硫键打开,蛋白二级结构的圆二色谱的变化比例在10%以内,少量暴露的蛋白疏水基团与疏水药物作用引发聚集,一步形成载药纳米颗粒,所述蛋白含有色氨酸及二硫键,蛋白表面的zeta电位绝对值不小于15mV,所述混合溶液中蛋白浓度为0.5~5mg/ml。

[0006] 优选,所述紫外光波长为270--310nm、强度为500微瓦每平方厘米~5毫瓦每平方厘米。

[0007] 优选,所述蛋白为 α -牛乳白蛋白。

[0008] 优选,所述疏水药物为盐酸阿霉素,所述混合溶液中蛋白与盐酸阿霉素的质量比为1:0.05~1:0.5。

[0009] 优选,所述混合溶液为蛋白和疏水药物溶于pH值为4~9的磷酸盐缓冲液的混合溶液。进一步优选,所述混合溶液中还含有有机溶剂(如DMSO),以利于疏水药物溶解。

[0010] 本发明利用特定波长的紫外光270-310纳米照射蛋白和疏水药物混合组成的化学合成体系,蛋白中的色氨酸能吸收紫外光,并将所吸收的能量转移到相邻的二硫键,并打

断二硫键形成自由巯基,进而使得蛋白质结构发生改变,蛋白质的疏水氨基酸暴露,不同蛋白分子依靠疏水相互作用以及分子间二硫键形成纳米聚集体,在此过程中与疏水性的药物阿霉素形成复合物,而蛋白本身的亲水基团可以保证纳米粒子的稳定性。同时,光照后产生的自由巯基可以被空气中氧气氧化形成分子间的二硫键,进一步提高纳米粒子的稳定性。而聚集的纳米粒子的大小可以通过光照强度和光照时间来调控,在相同光照时间下,光强度越大,所得纳米粒子越大;在相同光照强度下,光照时间越长,所得纳米粒子越大。

[0011] 本发明的合成方法对所选蛋白质本身的物理特性有着严格的要求。如果蛋白质本身的亲水性差,则光照后,容易形成大的聚集体,而不能形成微观的纳米载药颗粒。我们发现通过测量蛋白质表面的 zeta 电位,可以定性地表征蛋白的亲水性。可用于载药的蛋白的表面 zeta 电位绝对值必须不小于 15mV。此外,所选蛋白的二级结构在光照后的变化必须较小,通过圆二色谱表征,其谱图的变化需在 0-10% 之间,否则过多暴露的蛋白疏水基团也会导致形成的聚集体的尺寸过大,不可用于载药。基于上述条件,本发明发现 α -牛乳白蛋白是适合此合成方法的蛋白,其表面的 zeta 电位(光照前)为 -30mV,其二级结构在所有的实施例中在光照后的变化均小于 5%。

[0012] 本发明所合成的纳米粒子大小可控(小于 300nm)、均一性、稳定性好,载药量(所载药物质量占所得载药纳米粒子的百分比)最大可达 20%,体外缓释试验表明其在正常生理条件下不容易分解缓释药物,而在与癌细胞相仿的环境下很容易释放药物,细胞荧光试验表明该载药纳米粒子比自由的药分子更容易进入癌细胞,且细胞毒性试验表明,该蛋白纳米粒子与细胞生物相容性好,而载药纳米粒子比自由的药分子对癌细胞的毒性更大,更容易促进癌细胞凋亡,以人胃癌细胞为例,载药纳米粒子半致死所需药物浓度比自由的药分子低 35%。除阿霉素外,其他的疏水药物均可以采用该技术制备纳米复合物,具有广泛的应用前景。

附图说明

[0013] 图 1:原子力显微镜观察所合成载药纳米粒子图(图 1a 为实施例 5 产品,图 1b 为实施例 6 产品)。

[0014] 图 2:光散射所测得不同光照时间下载药纳米粒子有效粒径尺寸图。(混合溶液中 α -牛乳白蛋白为 1.5mg/ml,盐酸阿霉素 0.3mg/ml,光照强度 3mW/cm²,光照时间 3、5、7 分钟)

[0015] 图 3:实施例 1 所得载药纳米粒子缓释图。在不同溶液条件下该载药纳米粒子药物随时间的释放量变化,纵坐标表示所释放盐酸阿霉素的荧光量。结果表明该载药纳米粒子在正常生理条件下(pH 7.4)药物释放缓慢,而在与肿瘤组织相仿条件下(pH 7.4+DTT)药物迅速释放。

[0016] 图 4:自由盐酸阿霉素(A)、实施例 1 所得载药纳米粒子(B)与人胃癌细胞培养 30 分钟后所拍荧光照片图。从图中可看出载药纳米粒子图中荧光强度要大于自由药物图,说明该载药纳米粒子可以更容易进入细胞。而且在载药纳米粒子图的细胞中可以观测到红色的阿霉素荧光,说明阿霉素被成功地应用纳米粒子体系输运到细胞中。

具体实施方式

[0017] 实施例 1

[0018] 1、配制 α -牛乳白蛋白与盐酸阿霉素的混合溶液

[0019] 1) 称量 6mg 的 α -牛乳白蛋白溶于磷酸盐缓冲液 (pH 值为 7) 中, 制成蛋白质母液 (3mg/ml);

[0020] 2) 称量 1.2mg 的盐酸阿霉素, 制成盐酸阿霉素母液 (3mg/ml, DMSO 溶解),

[0021] 3) 将上两步中的蛋白质母液和盐酸阿霉素母液混合配制成混合溶液, 使得该混合溶液中 α -牛乳白蛋白浓度为 1.5mg/ml, α -牛乳白蛋白与盐酸阿霉素的质量比为 1 : 0.2, 并将该溶液分装到光径为 1-2 毫米的石英比色皿中。

[0022] 2、紫外光照射混合溶液

[0023] 紫外灯 (270-310nm) 照射溶液 5 分钟, 光照强度 3mW/cm²。蛋白质二级结构的变化通过其远紫外的圆二色谱来表征, 几乎无任何变化 (< 1%), 但蛋白的三级结构发生变化, 形成纳米粒子。

[0024] 3、用截留分子量为 3500 的透析袋将未载上的盐酸阿霉素透析掉 (透析 15 分钟即可), 得到纯的载药的纳米粒子溶液。

[0025] 得到纯的载药的纳米粒子有效粒径约为 150nm, 载药量为 12.5%, 20 天内纳米粒子能保持稳定形状, 未见明显的聚集沉淀。

[0026] 实施例 2

[0027] 紫外光照时间为 7 分钟, 其余实验条件同实施例 1。

[0028] 蛋白质的二级结构的圆二色谱变化幅度约为 3%。

[0029] 得到纯的载药的纳米粒子溶液, 其纳米粒子有效粒径约为 200nm, 载药量为 14.1%。20 天内纳米粒子能保持稳定形状, 未见明显的聚集沉淀。

[0030] 实施例 3

[0031] α -牛乳白蛋白与盐酸阿霉素的质量比为 1 : 0.05, 其余实验条件同实施例 1。

[0032] 得到纯的载药的纳米粒子有效粒径约为 79nm, 载药量为 3.3%。20 天内纳米粒子能保持稳定形状, 未见明显的聚集沉淀。

[0033] 实施例 4

[0034] α -牛乳白蛋白与盐酸阿霉素的质量比为 1 : 0.5, 其余实验条件同实施例 1。

[0035] 蛋白质的二级结构的圆二色谱变化幅度约为 1.7%。

[0036] 得到纯的载药的纳米粒子有效粒径约为 210nm, 载药量为 41.7%。20 天内纳米粒子能保持稳定形状, 未见明显的聚集沉淀。

[0037] 实施例 5

[0038] 光照时间为 7 分钟, α -牛乳白蛋白与盐酸阿霉素的质量比为 1 : 0.1, 其余实验条件同实施例 1。

[0039] 蛋白质的二级结构的圆二色谱变化幅度约为 3%。

[0040] 得到纯的载药纳米粒子的有效粒径约为 85nm, 载药量为 6.2%。20 天内纳米粒子能保持稳定形状, 未见明显的聚集沉淀。

[0041] 实施例 6

[0042] 光照时间为 7 分钟, α -牛乳白蛋白与盐酸阿霉素的质量比为 1 : 0.4, 其余实验条件同实施例 1。

- [0043] 蛋白质的二级结构的圆二色谱变化幅度约为 3%。
- [0044] 得到纯的载药纳米粒子的有效粒径约为 230nm,载药量为 26.9%。20 天内纳米粒子能保持形状,未见明显的聚集沉淀。
- [0045] 实施例 7
- [0046] 紫外光强度为 $500 \mu W/cm^2$,其余实验条件同实施例 1。
- [0047] 蛋白质的二级结构的圆二色谱变化幅度约为 5%。
- [0048] 得到纯的载药纳米粒子的有效粒径约为 88nm,载药量为 10.7%。20 天内纳米粒子能保持稳定形状,未见明显的聚集沉淀。
- [0049] 对比例 1
- [0050] 所选蛋白为鸡蛋白溶菌酶,其余实验条件同实施例 1。
- [0051] 蛋白质的二级结构的圆二色谱变化幅度约为 15%,三级结构几乎完全消失。
- [0052] 得到的纳米粒子尺寸约为 850nm,但在 12 小时内发生大面积聚集。
- [0053] 对比例 2
- [0054] 所选蛋白为牛胰核糖核酸酶,其余实验条件同实施例 1。
- [0055] 蛋白质不含色氨酸,在此实验条件下其二级结构的圆二色谱变化幅度 $<1\%$,三级结构变化幅度 $<1\%$ 。
- [0056] 无法得到纳米粒子。即使延长光照时间到 2 小时,也无法形成纳米粒子。
- [0057] 对比例 3
- [0058] 所选用缓冲液为 pH 9.5 的磷酸盐缓冲液,其余条件同实施例 1。
- [0059] 蛋白质的二级结构的圆二色谱变化幅度约为 18%。
- [0060] 得到的纳米粒子尺寸约为 680nm,不适合药物输运;载药量 15.2%。
- [0061] 对比例 4
- [0062] 所选用缓冲液为 pH 3.5 的磷酸盐缓冲液,其余条件同实施例 1。
- [0063] 蛋白质的二级结构的圆二色谱变化幅度约为 26%。
- [0064] 无法得到稳定的纳米粒子,蛋白在此条件下光照变性后可溶。

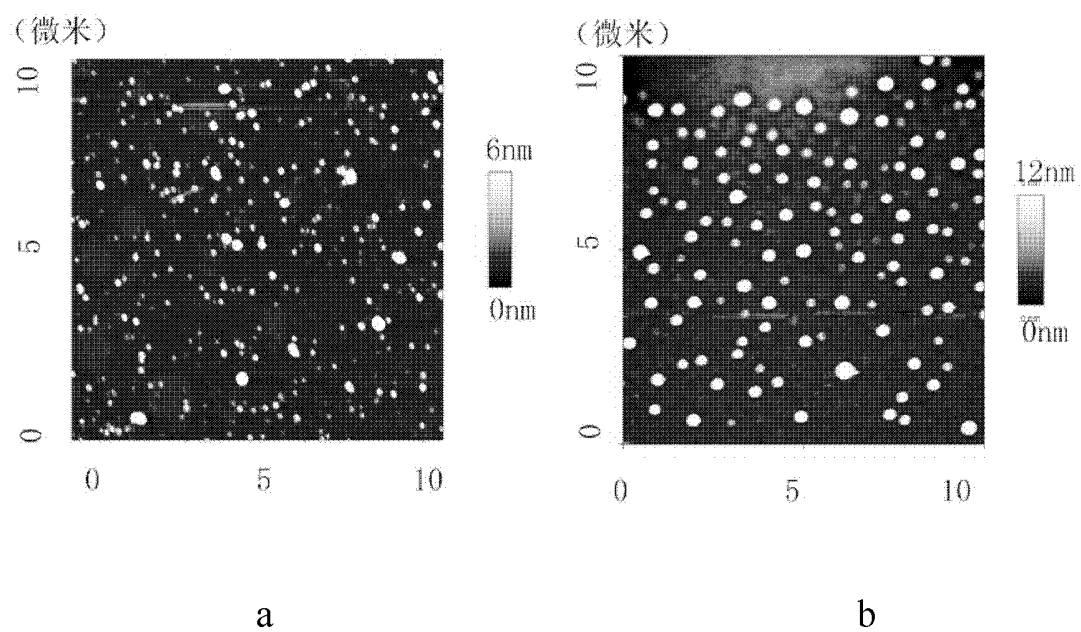


图 1

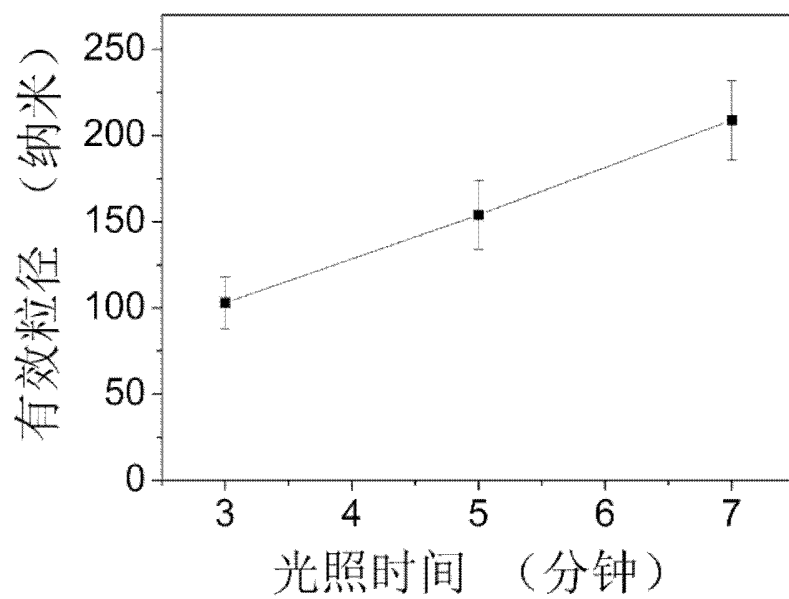


图 2

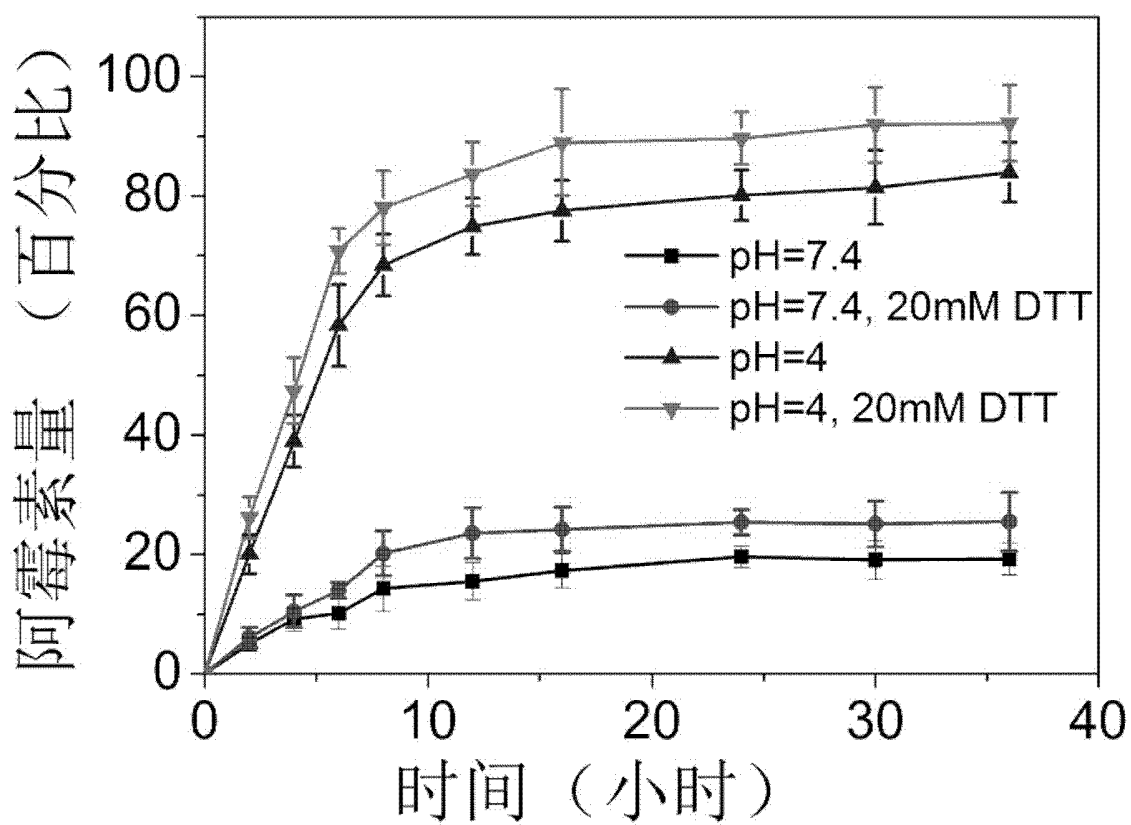


图 3

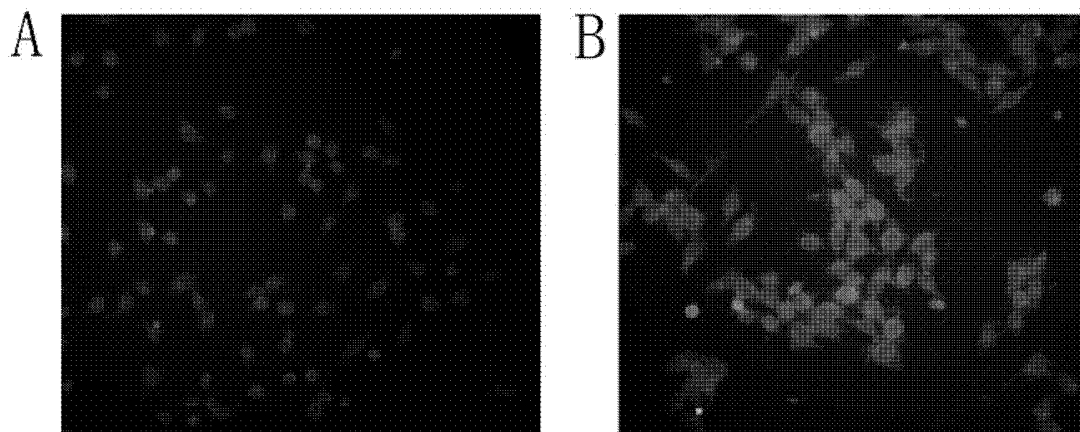


图 4