



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103536919 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 29

(21) 申请号 201310505945. 4

(22) 申请日 2013. 10. 24

(71) 申请人 天津市肿瘤研究所

地址 300060 天津市河西区体院北环湖西路

(72) 发明人 张宁 任玉 王银松 郭华

(74) 专利代理机构 天津市宗欣专利商标代理有

限公司 12103

代理人 董光仁

(51) Int. Cl.

A61K 41/00 (2006. 01)

A61K 9/14 (2006. 01)

A61K 47/48 (2006. 01)

A61K 31/704 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

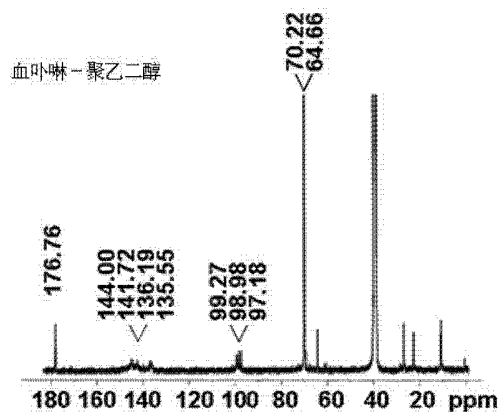
权利要求书2页 说明书8页 附图6页

(54) 发明名称

肿瘤靶向的光动力载药纳米粒子及其制备方法和用途

(57) 摘要

本发明公开了一种肿瘤靶向的光动力载药纳米粒子及其制备方法,属于含有卟啉的医药配制品,或利用波能处理材料的方法制得的医用配制品。本发明将功能基团的卟啉或其衍生物与聚醚链段的聚乙二醇、聚丙二醇之间经化学键或基团的酯键或酰胺键连接,聚合为卟啉或其衍生物纳米粒子水分散液,负载具有共轭结构的化疗药物后透析而成。本方法制备的纳米材料产率高,形状规则、分布均匀。生物安全性好,能够对具有共轭结构的抗肿瘤药物进行有效负载;水溶性的光敏剂经近红外光照射后,可以有效的逆转化疗药物耐受;可高效的靶向定位肿瘤,并有很好的滞留性并有效抑制肿瘤生长,在制备靶向乳腺癌肿瘤的药物方面具有广阔的应用前景。



1. 一种肿瘤靶向的光动力载药纳米粒子,包括由聚醚链段和功能基团制备的聚合物,其特征在于:所述功能基团的卟啉或其衍生物与聚醚链段的聚乙二醇、聚丙二醇之间经化学键或基团的酯键或酰胺键连接,制成卟啉或其衍生物纳米粒子水分散液,并携带具有共轭结构的化疗药物而成,卟啉环在近红外光照激发下产生单线态氧,抑制肿瘤生长,所述纳米粒子的粒径为 20-80nm,外形为球形或接近球形。

2. 根据权利要求 1 所述肿瘤靶向的光动力载药纳米粒子,其特征在于:卟啉或其衍生物-聚乙二醇纳米粒子水分散液冷冻干燥后为红棕色粉末状产物,或紫色粉末状产物。

3. 如权利要求 1 所述肿瘤靶向的光动力载药纳米粒子的制备方法,其特征在于:

①卟啉或其衍生物-聚乙二醇纳米药物载体的合成

a. 按 0.5-3mg/1ml 浓度将卟啉或其衍生物与 2-吗啉乙磺酸(MES)的混合溶液室温搅拌过夜;

b. 将羧基活化基团的 EDC 3-20 mg、NHS 2-15mg 室温活化 5-6h,加入上述混合溶液 10ml 中,室温下搅拌 2~8h 后,加入 2-巯基乙醇 15-85 μ l 淬灭 EDC, NaOH 调整 pH 值至 7.5~8.0,备用;

c. 将淬灭后溶液缓速滴加到浓度为 4-10mg/1ml 双端氨基封端的异丙基聚乙二醇的磷酸盐缓冲液 10ml 中,搅拌过夜,并转移至透析袋中,在硼酸盐缓冲液中透析 48h,得到卟啉或其衍生物纳米粒子水分散液,备用;

②载药卟啉或其衍生物纳米材料的合成

a. 按浓度 1-2mg/1ml 将具有共轭结构化疗药物溶解于双蒸水中,室温下搅拌 1h,备用;

b. 按 0.5mg/ml 浓度,取 2ml 上述药液逐滴加入到 1-8 mL 卟啉或其衍生物纳米粒子水分散液中,4℃室温避光过夜后,置于透析袋中,双蒸水透析 2h,得到粒径为 20-80nm 的肿瘤靶向的光动力载药纳米粒子。

4. 根据权利要求 3 所述瘤靶向的光动力载药纳米粒子的制备方法,其特征在于:具有共轭结构化疗药物是阿霉素,或表阿霉素,或米托蒽醌。

5. 根据权利要求 3 所述瘤靶向的光动力载药纳米粒子的制备方法,其特征在于:所述的卟啉或其衍生物为原卟啉,或血卟啉,或尿卟啉、或粪卟啉。

6. 根据权利要求 3 所述瘤靶向的光动力载药纳米粒子的制备方法,其特征在于:双端氨基封端的异丙基聚乙二醇的分子量为 1500-5000Da。

7. 根据权利要求 3 所述瘤靶向的光动力载药纳米粒子的制备方法,其特征在于:所述具有共轭结构的化疗药物与纳米药物载体中的质量比为 8:1~1:8。

8. 根据权利要求 3 所述瘤靶向的光动力载药纳米粒子的制备方法,其特征在于:羧基活化基团的 EDC、NHS 与卟啉或其衍生物中羧基单元的摩尔比为 2:1~1:1。

9. 根据权利要求 3 所述瘤靶向的光动力载药纳米粒子的制备方法,其特征在于:如②b 所述透析袋的截留分子量为 2000-6000Da,同时大于使用的聚乙二醇分子量;透析后载药纳米粒子的粒径为 20-80nm。

10. 如权利要求 1 或 3 所述肿瘤靶向的光动力载药纳米粒子在制备治疗癌症药物中的应用,

a. 肿瘤靶向光动力载药纳米粒子在制备治疗乳腺癌药物中的应用;

-
- b. 肿瘤靶向光动力载药纳米粒子在制备治疗肝癌药物中的应用。

肿瘤靶向的光动力载药纳米粒子及其制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种含有卟啉的医药配制品,或利用波能处理材料制得的医用配制品,具体涉及一种肿瘤靶向的光动力载药纳米粒子及其制备方法和用途。

背景技术

[0002] 化疗是恶性肿瘤治疗的重要手段之一,然而大量的临床实践表明肿瘤的药物治疗效果并不理想,其原因主要包括:(1) 化疗药物对肿瘤细胞选择性差;目前用于肿瘤治疗的化疗药物在杀死癌细胞的同时,也损伤患者的正常细胞,毒副作用大,极大限制了用药剂量,严重影响治疗效果。(2) 肿瘤细胞的多重耐药机制;肿瘤细胞膜上固有的高表达 ABC 蛋白(如 P-糖蛋白),能将各种抗肿瘤药物从胞内转运至胞外,导致胞内药物浓度降低,表现出天然的耐药特性,并且用药过程中还能诱导这些 ABC 蛋白的表达,从而产生获得性耐药,进一步降低了药物的治疗效果。迄今为止,对于肝癌尚无有效的化疗药物。因此,增强化疗药物的肿瘤靶向性和提高药物对肿瘤细胞的化疗敏感性(即提高药效)是改善肿瘤化疗效果的重要途径。

[0003] 多功能纳米载体能够作为多种药物传递的有效平台,通过识别靶向细胞的独特表面信号以及对药物的可控有序释放,使药物发挥协同增效作用,并显著降低药物的毒副作用,在肿瘤化疗方面具有独特的优势。目前关于纳米材料应用于药物肿瘤靶向投递的已有大量研究,尽管取得了一定的成效,但由于其生物相容性,最终都极大地限制了其临床应用。因此,利用生物体自有材料制备肿瘤药物载体,实现肿瘤的靶向投递,已成为解决肿瘤化疗治疗的关键问题。

[0004] 光动力疗法(photo-dynamic therapy, PDT)是二十世纪 80 年代新发展起来的一种治疗肿瘤的新方法,光敏药物进入体内,富集于病灶后,在匹配吸收波长的激光作用下,能生成活性很强的单态氧,产生细胞毒性作用,进而导致细胞受损乃至死亡。由于光动力疗法对靶组织及损伤程度都具有可选择性,与手术、化疗、放疗等常规治疗手段相比,可减少了对正常组织的损伤。最新研究表明:光动力治疗可以增敏化疗,光动力疗法为肿瘤治疗提供了新思路。

[0005] 尽管光动力治疗在肿瘤的治疗中有很多优势,但还面临很多的问题:1)大部分的光敏剂都是疏水性的,需要用一定的有机溶剂溶解后才能使用,因此很难直接注射到患者的体内;2)光敏剂在体内的代谢较快,因此很难在病灶部位有效的聚集;3)光动力治疗自身抑制肿瘤效果非常有限。因此,光动力疗法在肿瘤治疗中通常作为肿瘤的辅助治疗方案。

发明内容

[0006] 本发明就是为了克服化疗药物靶向定位能力差、长期用药产生的化疗耐药问题,而提供了一种可直接用于临床注射应用的肿瘤靶向的光动力载药纳米粒子及制备方法和用途。

[0007] 本发明的设计原理:构建纳米载药体系以实现药物的肿瘤靶向投递,并结合光动

力疗法提高化疗效果,实现化疗增敏。设计了以生物体自有材料——卟啉为原料制备纳米药物载体,由于卟啉自身形成的大环共轭结构,与含有共轭结构的化疗药物通过 $\pi-\pi$ 共轭高效负载药物;卟啉作为光敏剂能选择性的聚集在肿瘤组织中,负载药物后可实现药物的靶向投递。因此,卟啉材料在医学及材料科学等领域均具有良好的应用前景。尽管在肿瘤中的药物靶向控制投递和光动力药物治疗过程中取得了一定的研究成果,但都存在一些问题,而且至今没有一种将水溶性的光敏剂直接用于靶向药物投递的技术。

[0008] 即本发明以卟啉或其衍生物与功能化基团封端的聚醚为原料合成,血卟啉结构中存在两个羧基和两个羟基,改善了水溶性,并且利用羧基和 / 或羟基的反应活性与聚醚接枝,合成制备纳米粒子的聚合物,并通过透析法制备。

[0009] 本发明是按照以下技术方案实现的。

[0010] 一种肿瘤靶向的光动力载药纳米粒子,包括由聚醚链段和功能基团制备的聚合物,其特征在于:所述功能基团的卟啉或其衍生物与聚醚链段的聚乙二醇、聚丙二醇之间经化学键或基团的酯键或酰胺键连接,制成卟啉或其衍生物纳米粒子水分散液,并携带具有共轭结构的化疗药物而成,卟啉环在近红外光照激发下产生单线态氧,抑制肿瘤生长,所述纳米粒子的粒径为 20-80nm,外形为球形或接近球形。

[0011] 一种肿瘤靶向的光动力载药纳米粒子的制备方法,

①卟啉或其衍生物-聚乙二醇纳米药物载体的合成

a. 按 0.5-3mg/1ml 浓度将卟啉或其衍生物与 2- 吗啉乙磺酸(MES)的混合溶液室温搅拌过夜;

b. 将羧基活化基团的 EDC 3-20 mg、NHS 2-15mg 室温活化 5-6h,加入上述混合溶液 10ml 中,室温下搅拌 2~8h 后,加入 2- 巯基乙醇 15-85 μ l 淬灭 EDC, NaOH 调整 pH 值至 7.5~8.0,备用;

c. 将淬灭后溶液缓速滴加到浓度为 4-10mg/1ml 双端氨基封端的异丙基聚乙二醇的磷酸盐缓冲液 10ml 中,搅拌过夜,并转移至透析袋中,在硼酸盐缓冲液中透析 48h,得到卟啉或其衍生物纳米粒子水分散液,备用;

②载药卟啉或其衍生物纳米材料的合成

a. 按浓度 1-2mg/1ml 将具有共轭结构化疗药物溶解于双蒸水中,室温下搅拌 1h,备用;

b. 按 0.5mg/ml 浓度,取 2ml 上述药液逐滴加入到 1-8 mL 卟啉或其衍生物纳米粒子水分散液中,4℃室温避光过夜后,置于透析袋中,双蒸水透析 2h,得到粒径为 20-80nm 的肿瘤靶向的光动力载药纳米粒子。

[0012] 所述肿瘤靶向的光动力载药纳米粒子在制备治疗癌症药物中的应用,

a. 肿瘤靶向光动力载药纳米粒子在制备治疗乳腺癌药物中的应用;

b. 肿瘤靶向光动力载药纳米粒子在制备治疗肝癌药物中的应用。

[0013] 本发明具有以下优点:

1. 载体载药效率高,载药率达到 80% 以上,并有很好的缓释和控释能力;
2. 纳米材料近红外光照射后,有效的协助化疗药物阿霉素从胞浆进入细胞核;
3. 药物半数抑制浓度降低 8 倍以上,有效的逆转了化疗药物耐受;
4. 近红外光照射纳米药物载体后,有效的启动线粒体一凋亡信号通路,诱导细胞凋

亡；

5. 尾静脉体内注射治疗, 纳米药物载体高效的靶向定位肿瘤, 并有很好的滞留性并有效抑制肿瘤生长。

[0014] 因此, 本发明对肿瘤具有主动靶向性, 能高效携带具有共轭结构的抗肿瘤药物, 实现药物在肿瘤病灶部位的有序释放, 并且在近红外光照响应下有效的抑制肿瘤的体内外生长。

附图说明

[0015] 图 1 是原料血卟啉(HP)的核磁图谱；

图 2 是双端氨基封端异丙基聚乙二醇(PEG)的核磁图谱；

图 3 是合成的血卟啉-聚乙二醇纳米药物载体(HPP)的核磁图谱；

图 4 是实施例 1 中 HP 的原子力显微镜照片；

图 5 是实施例 1 中 HPP 的原子力显微镜照片；

图 6 是实施例 1 中 HP 的透射电镜照片；

图 7 是实施例 1 中 HPP 的透射电镜照片；

图 8 是实施例 1 中不同比例的原料血卟啉、阿霉素(Dox, ADR)合成纳米粒子的荧光谱图；

图 9 是实施例 1 中制备的 HPPD 纳米粒子在不同 pH 值及有无近红外光照条件下的药物释放曲线；

图 10 实施例 1 中制备的 HPPD 纳米粒子的粒径分布图；

图 11 为实施例 1 中制备的 HPPD 纳米粒子对阿霉素耐药乳腺癌细胞(ADR/MCF-7)药物半数抑制浓度测定曲线图；

图 12 是实施例 1 中制备的 HPPD 纳米粒子对 ADR/MCF-7 小鼠模型的体内抑瘤效果和组织分布图；

图 13 是实施例 1 中未光照 HPPD 纳米粒子对 ADR/MCF-7 小鼠模型的组织分布图；

图 14 是实施例 1 中光照 HPPD 纳米粒子对 ADR/MCF-7 小鼠模型的组织分布图。

具体实施方式

[0016] 下面结合附图及实施例对本发明进行具体描述。

[0017] 一种肿瘤靶向的光动力载药纳米粒子, 包括由聚醚链段和功能基团制备的聚合物, 所述功能基团的卟啉或其衍生物与聚醚链段的聚乙二醇、聚丙二醇之间经化学键或基团的酯键或酰胺键连接, 制成卟啉或其衍生物纳米粒子水分散液, 并携带具有共轭结构的化疗药物而成, 卟啉环在近红外光照激发下产生单线态氧, 抑制肿瘤生长, 所述纳米粒子的粒径为 20-80nm, 外形为球形或接近球形。

[0018] 所述肿瘤靶向的光动力载药纳米粒子, 其卟啉或其衍生物-聚乙二醇纳米粒子水分散液冷冻干燥后为红棕色粉末状聚合物, 或紫色粉末状聚合物。

[0019] 一种肿瘤靶向的光动力载药纳米粒子的制备方法,

①卟啉或其衍生物-聚乙二醇纳米药物载体的合成

a. 按 0.5-5mg/1ml 浓度将卟啉或其衍生物与 2-吗啉乙磺酸(MES)的混合溶液室温搅

拌过夜；

b. 将羧基活化基团的 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC) 3-20 mg、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS) 2-15 mg 室温活化 5-6h, 加入上述混合溶液 10ml 中, 室温下搅拌 2~8h 后, 加入 2-巯基乙醇 15-85 μ l 淬灭 EDC, NaOH 调整 pH 值至 7.5~8.0, 备用；

c. 将淬灭后溶液缓速滴加到浓度为 4-10mg/1ml 双端氨基封端的异丙基聚乙二醇的磷酸盐缓冲液(PBS)10ml 中, 搅拌过夜, 并转移至透析袋中, 在硼酸盐缓冲液中透析 48h, 得到卟啉或其衍生物纳米粒子水分散液, 备用；

②载药卟啉或其衍生物纳米材料的合成

a. 按浓度 1-2mg/1ml 将具有共轭结构化疗药物溶解于双蒸水中, 室温下搅拌 1h, 备用；

b. 按 0.5mg/ml 浓度, 取 2ml 上述药液逐滴加入到 1-8 mL 卟啉或其衍生物纳米粒子水分散液中, 4℃室温避光过夜后, 置于透析袋中, 双蒸水透析 2h, 得到粒径为 20-80nm 的肿瘤靶向的光动力载药纳米粒子。

[0020] 所述瘤靶向的光动力载药纳米粒子的制备方法, 其具有共轭结构化疗药物是阿霉素, 或表阿霉素, 或米托蒽醌。

[0021] 所述瘤靶向的光动力载药纳米粒子的制备方法, 所述的卟啉或其衍生物为原卟啉, 或血卟啉, 或尿卟啉、或粪卟啉。

[0022] 所述瘤靶向的光动力载药纳米粒子的制备方法, 其双端氨基封端的异丙基聚乙二醇的分子量为 2000-6000Da。

[0023] 所述瘤靶向的光动力载药纳米粒子的制备方法, 所述具有共轭结构的化疗药物与纳米药物载体中的质量比为 8:1~1:8。

[0024] 所述瘤靶向的光动力载药纳米粒子的制备方法, 其羧基活化基团的 EDC、NHS 与卟啉或其衍生物中羧基单元的摩尔比为 2:1~1:1。

[0025] 所述瘤靶向的光动力载药纳米粒子的制备方法, 其如②b 所述透析袋的截留分子量为 2000-6000Da, 同时大于使用的聚乙二醇分子量；透析后载药纳米粒子的粒径为 20-80nm。

[0026] 所述肿瘤靶向的光动力载药纳米粒子在制备治疗癌症药物中的应用,

a. 肿瘤靶向光动力载药纳米粒子在制备治疗乳腺癌药物中的应用；

b. 肿瘤靶向光动力载药纳米粒子在制备治疗肝癌药物中的应用。

[0027] 实施例一：

1、血卟啉-聚乙二醇(HPP)纳米药物载体的合成

① 称取 22mg 血卟啉, 溶于 22mL 2-吗啉乙磺酸(MES) (200mM, pH=6.0)缓冲液, 室温搅拌过夜；加入 12.6 mg 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC), 7.6 mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS), 其中, 羧基活化基团的 EDC、NHS 与卟啉或其衍生物中羧基单元的摩尔比为 1:1, 室温活化 5-6h, 加入 28 μ L 2-巯基乙醇淬灭 EDC；

② 称取 60 mg 双端氨基封端的异丙基聚乙二醇(NH_2 -PEG- NH_2) (分子量为 1500)溶于 10 mL 200 mM 磷酸盐缓冲液(PBS) (200mM, pH =7.5~8.0), 将步骤①中溶液用 NaOH(1M)迅速调节 pH 值至 7.5~8.0, 移入恒压滴液漏斗, 控制滴加速度(10s/滴), 搅拌反应过夜, 硼

酸缓冲液(200mM, pH= 8.5)透析 48h(截留分子量 2000 Da)。得到 HPP 纳米粒子水分散液。将此分散液冷冻干燥,即得红棕色粉末状产物,其结构确证图谱见图 3。动态光散射测得粒径 29nm,载药纳米材料粒径 24nm。

[0028] 2、载药血卟啉(HPPD)纳米材料的合成

取 20mg 阿霉素(Dox)溶解于 10mL 双蒸水中,室温下搅拌 1h,备用;取 2mL 配好的阿霉素溶液逐滴加入到 5mL HPP 纳米粒子水分散液(0.5mg/mL),4℃过夜后,置于透析袋中,用双蒸水透析处理 2h。其结构确证图谱见图 4-7。粒径分布见图 10。阿霉素的载药量采用紫外分光光度计法检测(检测波长为 480nm),为 85.2%,结果见图 8。载药纳米材料粒径 35nm。

[0029] 3、载药纳米粒子的体外药物释放

将 10mL HPPD 放于透析袋(截留分子量 1000 Da)中,分别置于 50mL pH 5.8 和 pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液(PBS)中,37℃,100 rpm 避光振荡,规定时间点将整个释放介质用新鲜介质置换,紫外分光光度计法检测(检测波长为 480nm)。药物释放百分率按照以下公式进行计算:释放百分率=(药物释放量/药物总量)×100%。结果如图 9 所示,载药纳米粒子可以有效的实现药物控制释放。

[0030] 4、HPPD 对耐药乳腺癌细胞 ADR/MCF-7 的细胞毒性

将指数生长期 ADR/MCF-7 细胞以 6000 个/每孔接种于 96 孔培养板中,置 37℃,5% CO2 培养箱中培养 48 h,倾去培养基,加入 150 μL 培养基及不同浓度的游离 ADR 或 HPPD 纳米分散液及光照条件下的 HPPD 溶液,继续培养 48 h。采用 MTT 法:每孔加入 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)20 μL,37℃继续孵育 4 h,终止培养。吸弃孔内培养上清液,每孔加入二甲基亚砷(DMSO)150 μL,振荡 10 min,选择 490 nm 波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值,以空白调零,并设对照无处理孔。测每孔的光密度值(OD 值),计算存活率;

$$\text{存活率} = (\text{实验孔 OD 值} / \text{对照孔 OD 值}) \times 100 \%$$

根据细胞存活率(如图 11),利用 IC50 计算软件得到 IC50。结果显示,HPPD 照射 IC50 值较单药治疗治疗组降低了近 9 倍,有效降低了药物用量,逆转了化疗耐受。

[0031] 5、HPPD 在 ADR/MCF-7 细胞中的蓄积及分布

称取 10.9 mg 异硫氰酸荧光素(FITC)溶于 1mL DMSO,缓慢加入上述 HPPD 水分散液搅拌反应过夜,透析 48h 备用。

[0032] ADR/MCF-7 细胞培养后接种于玻璃底细胞培养皿中,细胞浓度为 5×10^4 细胞/mL,

分别加入游离 ADR 和 FITC 标记的 HPPD 纳米分散液(ADR 溶度 16.7 μg/mL),37℃孵育 4 h 后近红外光照 70s,24h 后,弃去培养液,用冷 PBS 液洗 3 次,3.7%多聚甲醛固定 15 min,用激光共聚焦显微镜观察(图 12)。结果显示 HPPD 经红外照射后能携带阿霉素药物由胞浆进入细胞核,有利于逆转肿瘤多药耐药。

[0033] 6、HPPD 的体内抑瘤效果

ADR/MCF-7 乳腺癌小鼠模型:取裸鼠(雌性),4~6 周龄,体重 18~22g,随机分为 5 组,分别为对照组、HPP + 照射组、游离阿霉素(Dox)组、HPPD 组和 HPPD + 照射组,每组 8 只小鼠,按 3.2 mg/kg 药物剂量尾静脉给药,每周给药三次,给药三周。测量肿瘤体积,绘制肿瘤生长曲线。结果表明,游离药物组对肿瘤抑制效果不理想,至观察期结束,肿瘤体积一直持续快速生长,相对肿瘤体积比(治疗后肿瘤体积与初始肿瘤体积比)从 1.0 增至 5.0;而 HPPD + 照

射组可以显著抑制肿瘤生长,在观察期第 10 天,即可以完全抑制肿瘤生长。

[0034] MHCC-97H 肝癌小鼠模型:取裸鼠(雌性),4~6 周龄,体重 18~22g,随机分为 5 组,分别为对照组、游离 Dox 组(5mg/kg)、HPPD 组(1.5mg/kg)、HPPD 组(5mg/kg),每周给药三次,给药两周。测量肿瘤体积,绘制肿瘤生长曲线。结果表明,HPPD(1.5mg/kg)给药组在观察期内,相对肿瘤体积比(治疗后肿瘤体积与初始肿瘤体积比)始终维持在 1.0 左右;HPPD(5mg/kg)给药组给药两周后,相对肿瘤体积比由 1 降到了 0.2,结果表明,HPPD 纳米药物可以有效抑制了肿瘤的体内生长。

[0035] 7、HPPD 在小鼠体内的组织分布

取 N-羟基丁二酰亚胺封端封端的 cy-5.5 溶解于 DMSO 中 20 μ L (1 mg/mL),逐滴加入 500 μ L 合成的 HPP,室温搅拌 2h,透析 48h(截留分子量 1000 Da)后,制备 cy5.5-HPPD。

[0036] MHCC-97H 肝癌模型:将裸鼠随机分为 3 组,分别为 PBS-cy5.5、PEG-cy5.5、HPPD-cy5.5,按 0.4 μ g/g 荧光剂量尾静脉给药,2h 和 24 h 运用小动物成像仪观察纳米药物在小鼠各组织脏器中的分布。结果表明,2h 尾静脉注射 PBS-cy5.5 后,荧光信号强,且平均分布在小鼠各组织脏器中,24h 后荧光基本在各组织脏器中全部消失,表明 cy5.5 荧光燃料没有组织靶向性;PEG-cy5.5 组 2h 尾静脉注射后,荧光集中在肿瘤和肾脏中,24h 主要集中在肾脏;HPPD-cy5.5 组 2h 尾静脉注射后,荧光集中在肿瘤和肾脏中,24h 后荧光主要富集在肿瘤,说明纳米药物具有很强的肿瘤靶向性和肿瘤滞留性。

[0037] ADR/MCF-7 乳腺癌模型:将裸鼠随机分为 2 组,分别为 HPPD-cy5.5、HPPD-cy5.5 + 照射组,按 0.4 μ g/g 荧光剂量尾静脉给药,2h 和 24 h 运用小动物成像仪观察纳米药物在小鼠各组织脏器中的分布。结果表明,相对于 HPPD-cy5.5 组,照射组能够更加有效的增加纳米药物在肿瘤部位的富集,减少肾脏的摄取。

[0038] 本发明药物体内分布见图 13、14。

[0039] 8、HPPD 在小鼠体内的急性毒性实验。

[0040] 取裸鼠(雌性),4~6 周龄,体重 18~22 g,随机分为 3 组,分别为对照组、游离 Dox 组、HPPD,每组 3 只小鼠,按 10mg/kg 药物剂量尾静脉给药,24h 后取心、肝、脾、肺、肾、肿瘤等器官,匀浆后,加入甲醇溶液萃取组织中的阿霉素,4 度,5000rpm 离心 10min,2 次,取上清,紫外分光光度计测定阿霉素在各器官中的药物分布。

[0041] 结果表明,Dox 通过 HPPD 的携带,药物在心脏中的分布显著降低(从 84 μ g/g 降低到 60 μ g/g),有利于缓解 ADR 的心脏毒性;此外,通过 HPPD 的携带,Dox 主要分布于肿瘤组织(50 增加至 135 μ g/g),明显高于其它器官组织。

[0042] 实施例二:

血卟啉-聚乙二醇(HPP)纳米药物载体的合成

① 称取 11mg 血卟啉,溶于 22mL MES (200mM, pH=6.0)缓冲液,室温搅拌过夜。加入 12.6 mg EDC, 7.6 mg NHS 室温活化 5-6h,其中,羧基活化基团的 EDC、NHS 与卟啉或其衍生物中羧基单元的摩尔比为 2:1,加入 15 μ L 2-巯基乙醇淬灭 EDC;

② 称取 30 mg NH₂-PEG-NH₂ (分子量为 2500)溶于 10 mL 200 mM PB 缓冲液(200mM, pH =7.5~8.0),将步骤①中溶液用 NaOH (1M)迅速调节 pH 值至 7.5~8.0,移入恒压滴液漏斗,控制滴加速度(10s/滴),搅拌反应过夜,硼酸缓冲液(200mM, pH= 8.5)透析 48h (截

留分子量 3000 Da)。得到 HPP 纳米粒子水分散液。将此分散液冷冻干燥,即得红棕色粉末状产物 2。动态光散射测得粒径 29nm。

[0043] 实施例三:

血卟啉—聚乙二醇(HPP)纳米药物载体的合成

① 称取 22mg 血卟啉,溶于 22mL MES (200mM, pH=6.0)缓冲液,室温搅拌过夜。加入 15 mg EDC, 9 mg NHS 室温活化 5-6h,其中,羧基活化基团的 EDC、NHS 与卟啉或其衍生物中羧基单元的摩尔比为 1.2:1,加入 55 μ L 2- 巯基乙醇淬灭 EDC;

② 称取 50 mg NH₂-PEG-NH₂ (分子量为 4000)溶于 10 mL 200 mM PB 缓冲液(200mM, pH =7.5~ 8.0),将步骤①中溶液用 NaOH (1M)迅速调节 pH 值至 7.5~8.0,移入恒压滴液漏斗,控制滴加速度(10s/ 滴),搅拌反应过夜,硼酸缓冲液(200mM, pH= 8.5)透析 48h (截留分子量 5000 Da)。得到 HPP 纳米粒子水分散液。将此分散液冷冻干燥,即得红棕色粉末状产物 3。动态光散射测得粒径 30nm。

[0044] 实施例四:

粪卟啉—聚乙二醇(PP)纳米药物载体的合成

① 称取 11mg 粪卟啉,溶于 22mL MES (200mM, pH=6.0)缓冲液,室温搅拌过夜。加入 19.3 mg EDC, 11.6 mg NHS 室温活化 5-6h,其中,羧基活化基团的 EDC、NHS 与卟啉或其衍生物中羧基单元的摩尔比为 1.5:1,加入 56 μ L 2- 巯基乙醇淬灭 EDC;

② 称取 60 mg NH₂-PEG-NH₂ (分子量为 1500)溶于 10 mL 200 mM PB 缓冲液(200mM, pH =7.5~ 8.0),将步骤①中溶液用 NaOH (1M)迅速调节 pH 值至 7.5~8.0,移入恒压滴液漏斗,控制滴加速度(10s/ 滴),搅拌反应过夜,硼酸缓冲液(200mM, pH= 8.5)透析 48h (截留分子量 2000 Da)。得到 HPP 纳米粒子水分散液。将此分散液冷冻干燥,即得深紫色粉末状产物 4。

[0045] 实施例五:

载药血卟啉(HPPD)纳米材料的合成

取 20mg 表阿霉素溶解于 10mL 双蒸水中,室温下搅拌 1h,备用;取 1mL 配好的表阿霉素溶液逐滴加入到 0.5mL 实施例 1 中制备的 HPP 纳米粒子水分散液(0.5mg/mL),其中,化疗药物与纳米药物载体的质量比为 8:1,4° C 过夜后,置于透析袋中,用双蒸水透析处理 2h。载药量采用紫外分光光度计法检测,为 80.1%。动态光散射测得粒径 67nm。

[0046] 实施例六:

载药血卟啉(HPPD)纳米材料的合成

取 10mg 表阿霉素溶解于 10mL 双蒸水中,室温下搅拌 1h,备用;取 1mL 配好的表阿霉素溶液逐滴加入到 2mL 实施例 1 中制备的 HPP 纳米粒子水分散液(0.5mg/mL),其中,化疗药物与纳米药物载体的质量比为 1:1,4° C 过夜后,置于透析袋中,用双蒸水透析处理 2h。载药量采用紫外分光光度计法检测,为 86.1%。动态光散射测得粒径 70nm。

[0047] 载药血卟啉(HPPD)纳米材料的合成

取 5mg 表阿霉素溶解于 10mL 双蒸水中,室温下搅拌 1h,备用;取 1mL 配好的表阿霉素溶液逐滴加入到 8mL 实施例 1 中制备的 HPP 纳米粒子水分散液(0.5mg/mL),其中,化疗药物与纳米药物载体的质量比为 1:8,4° C 过夜后,置于透析袋中,用双蒸水透析处理 2h。载

药量采用紫外分光光度计法检测,为 89.3%。动态光散射测得粒径 73nm。

[0048] 实施例七:

载药血卟啉(HPPD)纳米材料的合成

取 10mg 米托蒽醌溶解于 10mL 双蒸水中,室温下搅拌 1h,备用;取 2mL 配好的米托蒽醌溶液逐滴加入到 5mL 实施例 1 中制备的 HPP 纳米粒子水分散液(0.5mg/mL),其中,化疗药物与纳米药物载体的质量比为 4:5,4° C 过夜后,置于透析袋中,用双蒸水透析处理 2h。载药量采用紫外分光光度计法检测,为 85.2%。动态光散射测得粒径 62nm。

[0049] 实施例五和实施例六的载药纳米粒子的体外药物释放、细胞毒性、体内抑瘤效果等实验与实施例 1 中数据相仿,在此不重复叙述。

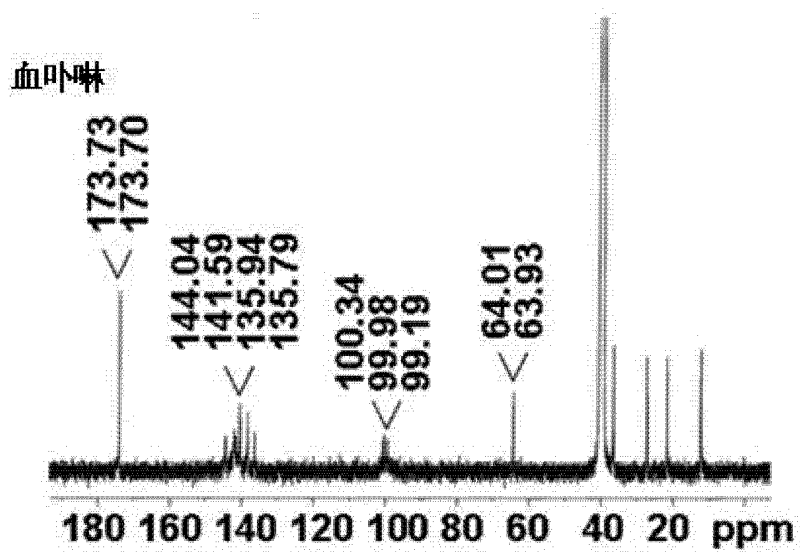


图 1

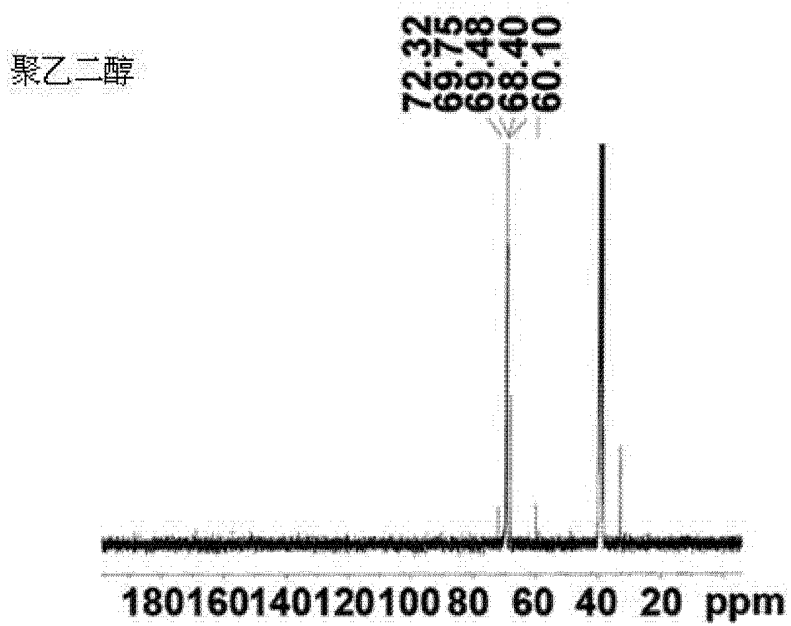


图 2

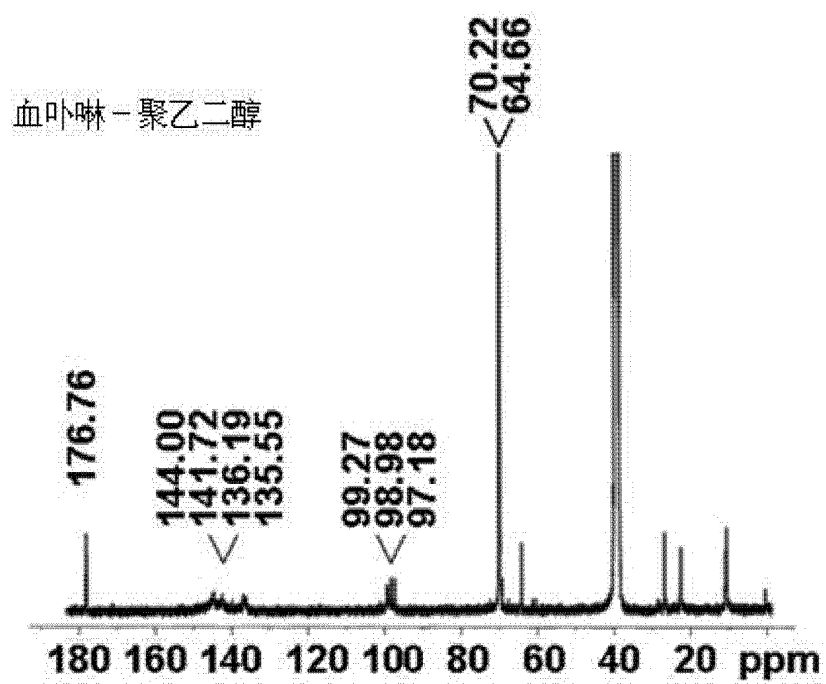


图 3

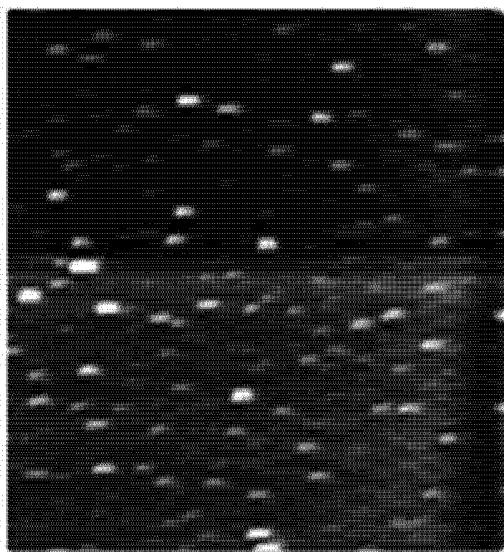


图 4

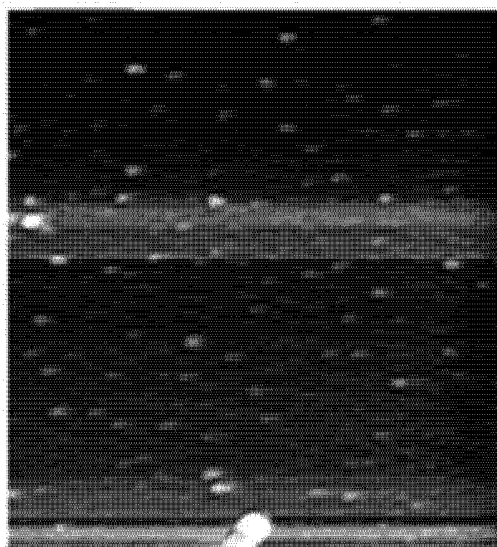


图 5

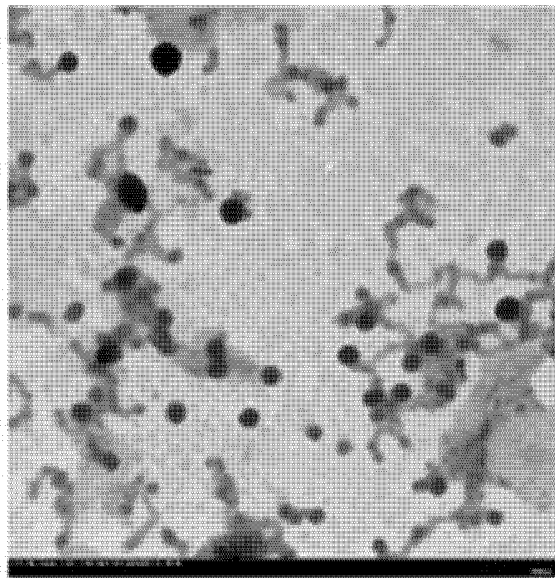


图 6

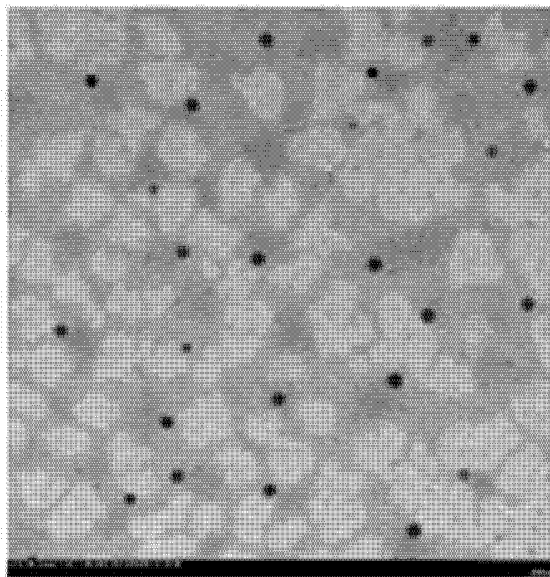


图 7

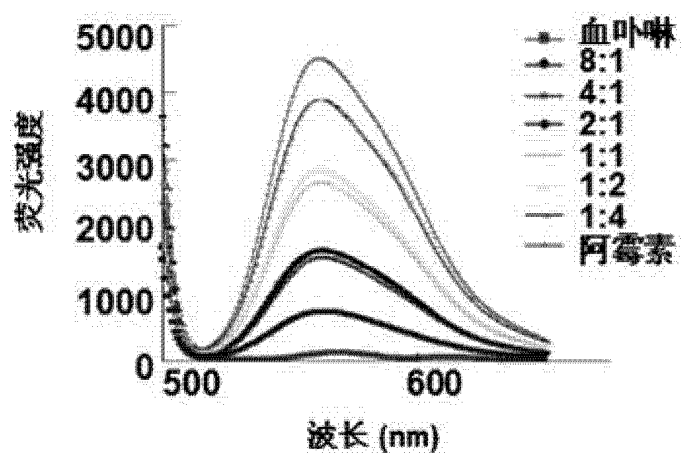


图 8

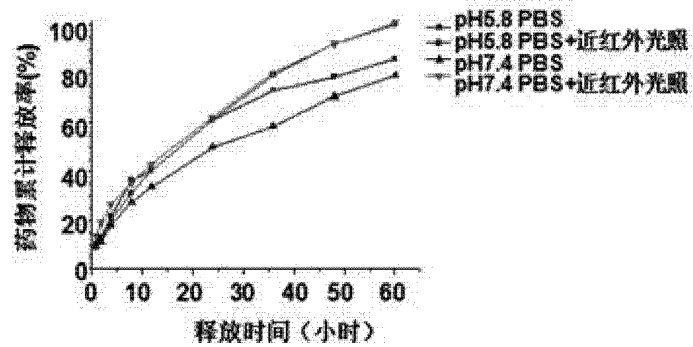


图 9

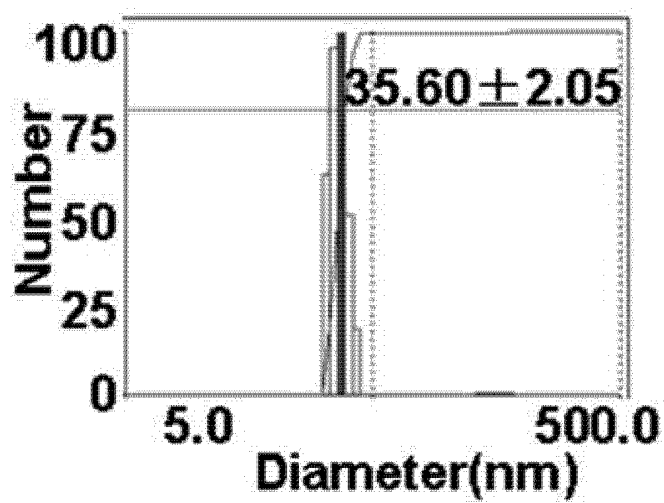


图 10

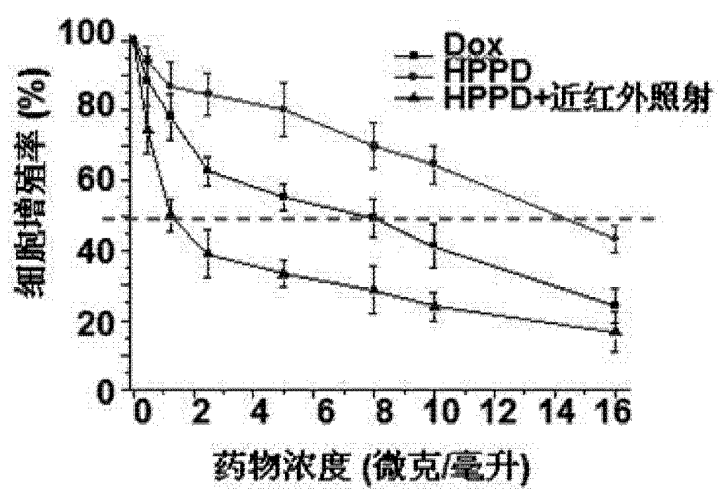


图 11

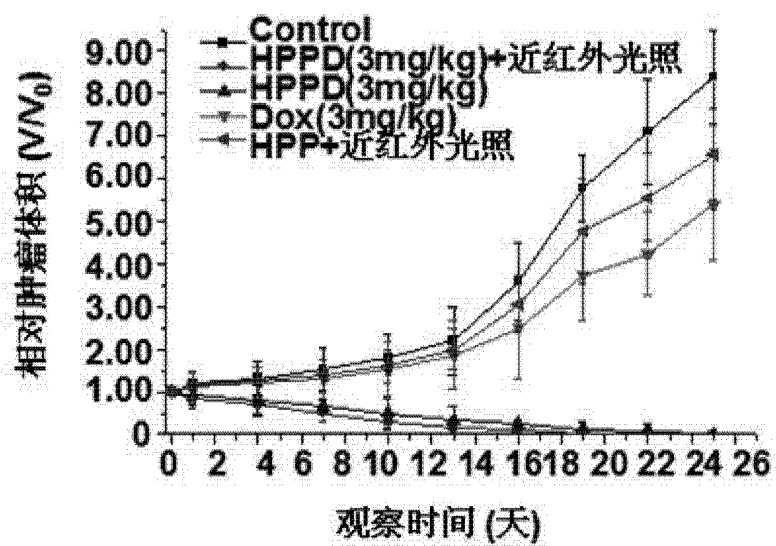


图 12

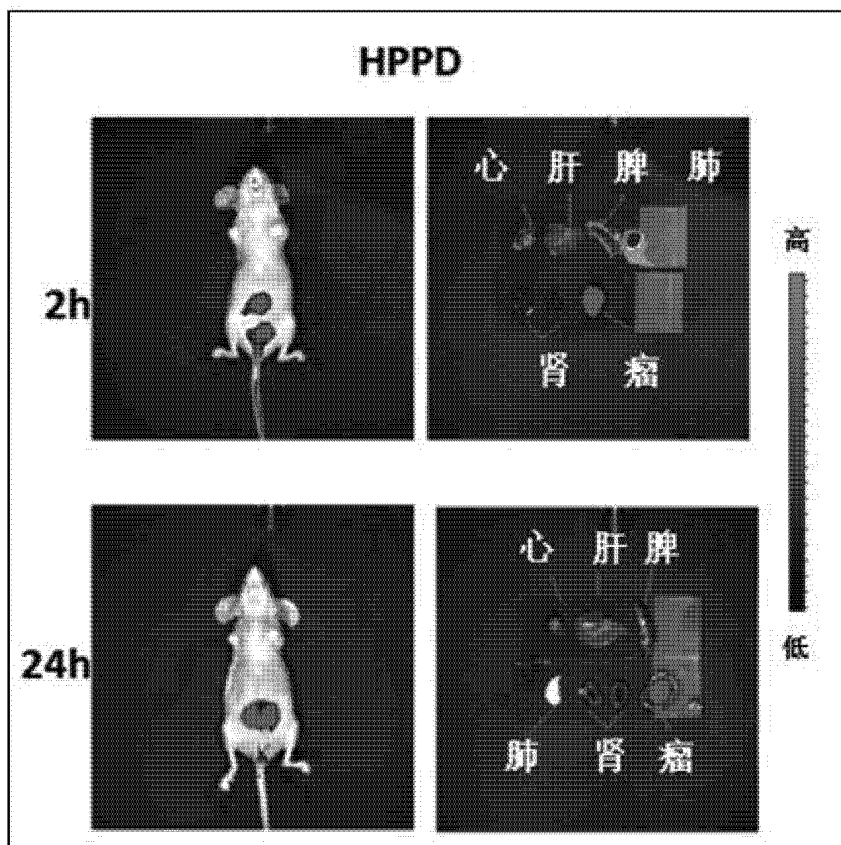


图 13

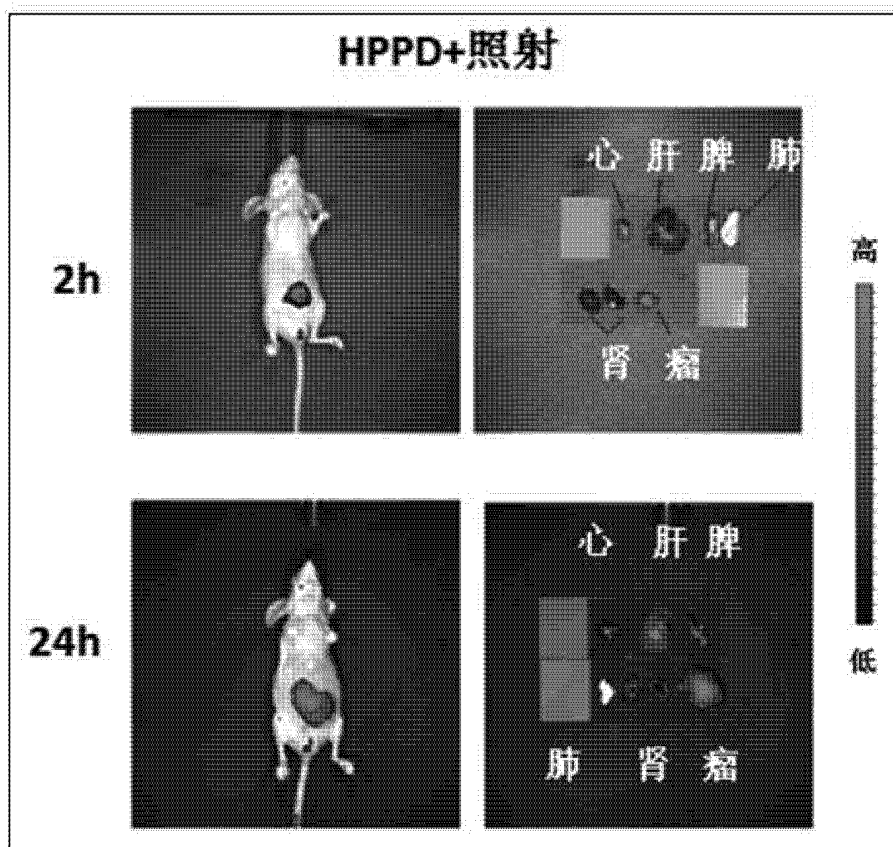


图 14