



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107281164 A

(43)申请公布日 2017. 10. 24

(21)申请号 201710554136.0

(22)申请日 2017.07.10

(71)申请人 福州大学

地址 350108 福建省福州市闽侯县上街镇
大学城学园路2号福州大学新区

(72)发明人 邵敬伟 沈志春 吴月煌

(74)专利代理机构 福州元创专利商标代理有限公司 35100

代理人 蔡学俊 林捷

(51)Int.Cl.

A61K 9/51(2006.01)

A61K 47/34(2017.01)

A61K 47/36(2006.01)

A61K 31/517(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

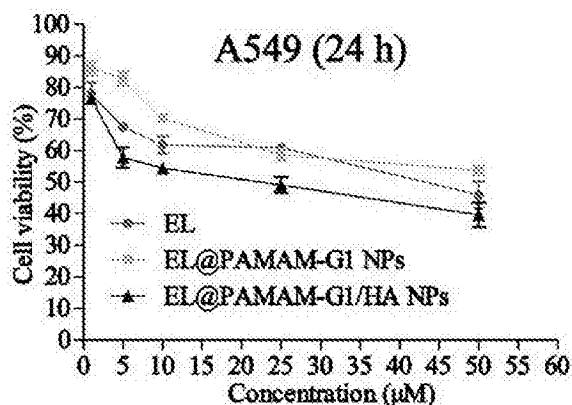
权利要求书2页 说明书8页 附图9页

(54)发明名称

一种基于低代PAMAM树状分子负载抗癌药物的自组装纳米粒及其在抗肿瘤方面的应用

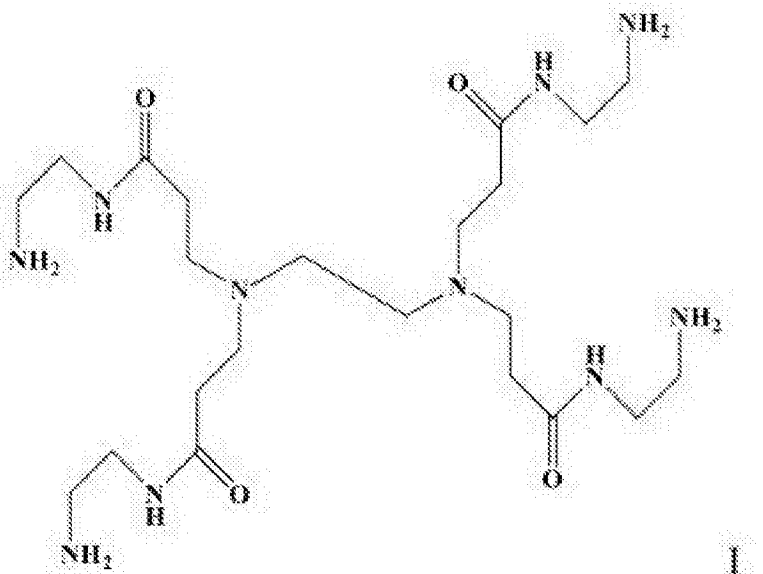
(57)摘要

本发明属于生物医药技术领域,具体涉及一种纳米给药系统EL@PAMAM/HA自组装纳米粒的制备及抗肿瘤应用。本发明基于低代树状大分子PAMAM(G0/G1)和肿瘤细胞CD44受体靶向的透明质酸(HA),采用溶剂交换法制备靶向自组装纳米给药系统EL@PAMAM/HA NPs,该小分子自组装纳米载药系统可以包载厄洛替尼这种抗肿瘤药物,具有pH响应,在酸性条件下释药更多,并能够靶向CD44高表达肿瘤细胞,可特异性地输送更多治疗药物至肿瘤部位发挥药效,有显著的治疗优势。

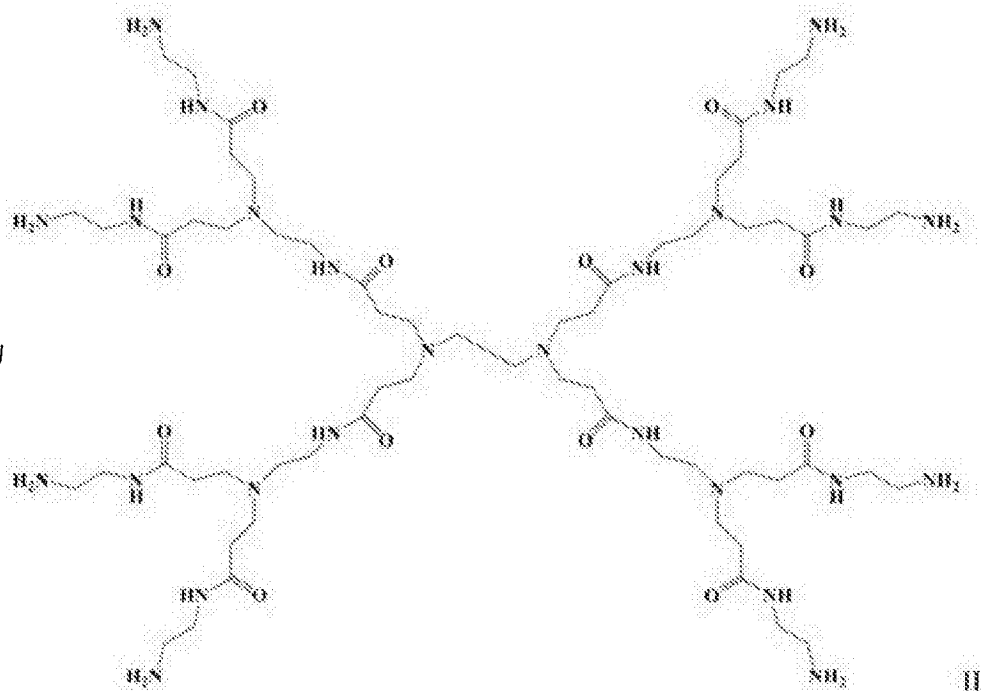


1. 一种基于低代PAMAM 树状分子负载抗癌药物的自组装纳米粒,其特征在于:基于低代树状大分子PAMAM和肿瘤细胞CD44受体靶向的透明质酸HA,采用溶剂交换法制备靶向自组装纳米给药系统EL@PAMAM/HA。

2. 根据权利要求1所述的一种基于低代PAMAM 树状分子负载抗癌药物的自组装纳米粒,其特征在于:其中低代树状大分子PAMAM为低代树状大分子PAMAM G0或者低代树状大分子PAMAM G1,其中G0 结构式为



G1结构式为



3. 根据权利要求1所述的一种基于低代PAMAM 树状分子负载抗癌药物的自组装纳米粒,其特征在于:具体制备方法为:室温下,将 100 μ L 厄洛替尼EL的良溶剂溶液逐滴加入到700 μ L不良溶剂中,然后加入100 μ L PAMAM水溶液,振荡1分钟后再加入 100 μ L HA 的水溶液,超声震荡15分钟,室温静置,制得 EL@PAMAM/HA 自组装纳米复合物。

4. 根据权利要求3所述的一种基于低代PAMAM 树状分子负载抗癌药物的自组装纳米粒,其特征在于:其中良溶剂为无水乙醇,不良溶剂为水。

5. 一种如权利要求1所述的一种基于低代PAMAM 树状分子负载抗癌药物的自组装纳米粒用于制备抗肿瘤药物的应用。

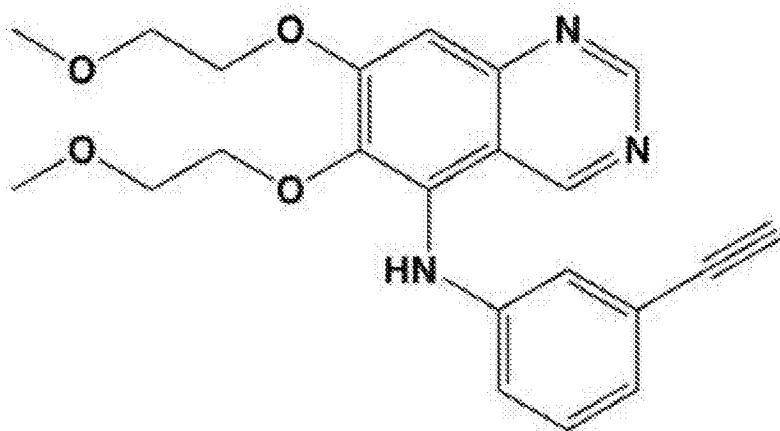
一种基于低代PAMAM树状分子负载抗癌药物的自组装纳米粒 及其在抗肿瘤方面的应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,具体涉及一种纳米给药系统EL@PAMAM/HA自组装纳米粒的制备及抗肿瘤应用。

背景技术

[0002] 厄洛替尼(Erlotinib)的通用商品名称为特罗凯,是于2004年正式获得美国FDA批准上市的抗肿瘤靶向治疗药物,同时得到了我国国家食品药品监督管理总局(CFDA)的认证,并已于2007年批准进入我国市场。厄洛替尼(本发明简称EL)的化学结构式为

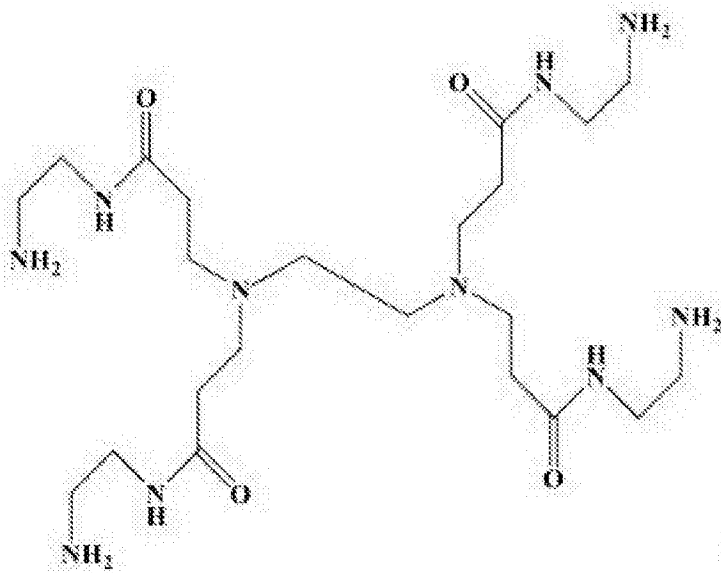


,化学名为 N-(3-乙炔苯基)-6,7-双(2-甲氧乙氧基)-4-喹啉胺盐酸盐,是一种对表皮生长因子受体(Epithelial Growth Factor Receptor, EGFR)具有高选择性的小分子喹唑啉类衍生物。EL用于两个或两个以上的化疗失败后的局部晚期或转移的非小细胞肺癌(NSCLC)的三线治疗方案,也常与抗癌药吉西他滨联合用于治疗局部晚期或转移性的胰腺癌。厄洛替尼主要在肝脏清除,经体外细胞色素酶P450分析表明厄洛替尼主要通过CYP3A4代谢,少量通过CYP1A2和肝外同工酶CYP1A1代谢。口服EL最常见的不良反应是皮疹(75%)和腹泻(54%),皆为不明原因的不良反应且较为轻微,无需中断用药即可处理。

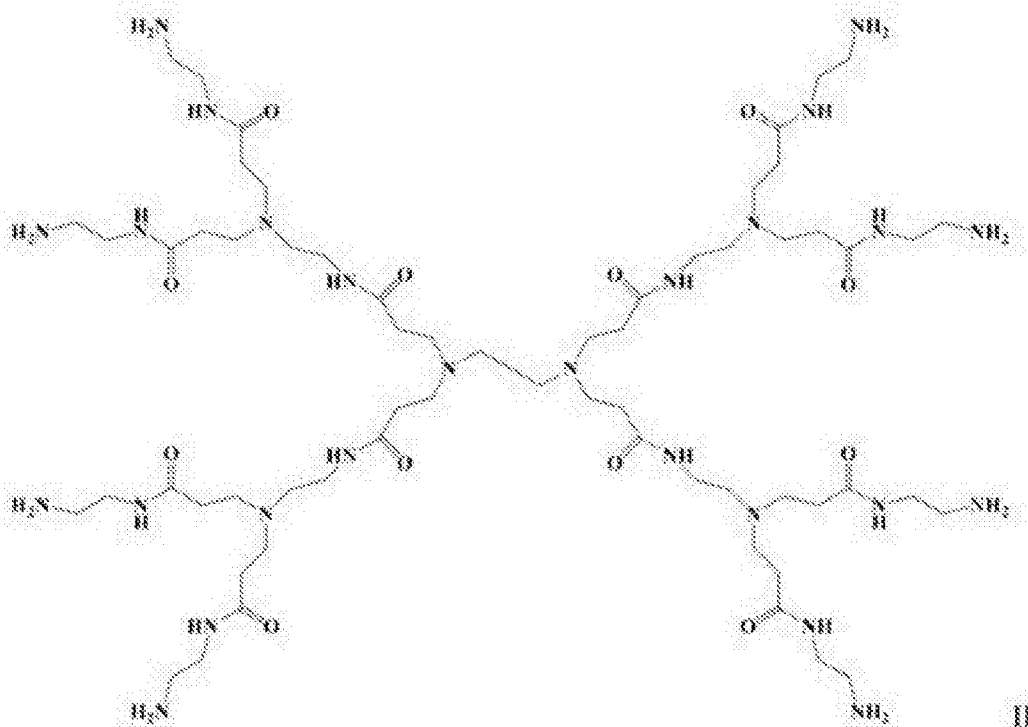
[0003] 大量研究表明EL针对EGFR突变的非小细胞肺癌(NSCLC)的抗肿瘤作用是体现在其能够抑制与表皮生长因子受体(EGFR)相关的细胞内酪氨酸激酶(TK)的磷酸化,进而阻断表皮生长因子(HER1)的信号传导,其中,TK是肿瘤细胞生长的重要物质,EL可通过抑制TK的活性来抑制肿瘤生长。本发明以人肺腺癌细胞(A549)为代表的非小细胞肺癌(NSCLC)细胞验证基于低代树状大分子PAMAM(G0/G1)和肿瘤细胞CD44受体靶向的透明质酸(HA)构建具有靶向功能的自组装纳米给药系统EL@PAMAM/HA NPs。

[0004] 聚酰胺-胺(PAMAM)树状大分子是一类由中心向外对称发散并高度分枝的新型纳米生物材料,由于具有纳米尺度、高水溶性、单分散性以及结构可调性,可通过分子自组装形成大小适宜的纳米粒子,提高药物的生物相容性、生物利用度和靶向性,因此可用作抗癌药物和成像药物的输送载体。目前PAMAM的应用仍然是以药物载体为主,例如专利CN201410271351中公布了一种具有肿瘤靶向的叶酸-PAMAM-熊果酸纳米药物,该纳米药物

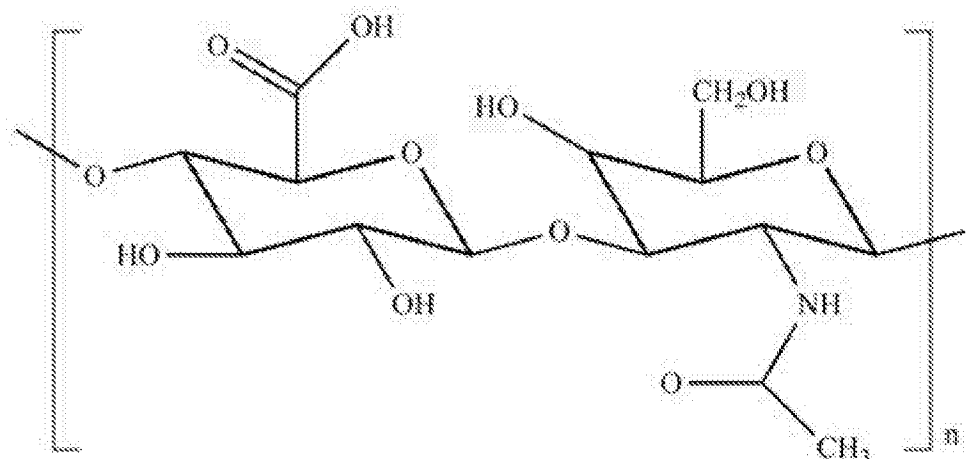
所采用的初始材料是高毒性的G3和G5代聚酰胺-胺型树状大分子(PAMAM),需将PAMAM 表面的氨基置换成羟基以降低材料本身的毒性,再将叶酸和熊果酸与PAMAM 表面的羟基反应,最终合成目标产物,该反应过程复杂,生产成本较高,产率却不高,这在一定程度上限制了它的应用。低代PAMAM分子(G0 如式 I,G1 如式 II)所示,表面氨基数为4和8,合成简单,毒性较低,价格低廉,可改善疏水性药物的溶解度,提高生物利用度,因此被选用作本发明的纳米输送载体。



[0005]



透明质酸(Hyaluronic Acid, HA)是一种在生物体内广泛存在的天然线性糖胺多糖,其化学结构式为



透明质酸的特异性受体 CD44 分子在多种恶性肿瘤如乳腺癌、皮肤癌、卵巢癌等细胞表面都高度表达。HA 通过与特异性受体-配体机制与 CD44 分子相结合,经细胞内吞作用进入细胞质内,可以选择性地进入肿瘤细胞,然后在透明质酸酶以及酸性水解酶等酶的作用下降解,实现靶向给药,故透明质酸常被用作纳米药物的靶标。

[0006] 正常组织中的微血管内皮间隙致密、结构完整,纳米粒不易透过,但是肿瘤微环境较复杂,肿瘤血管丰富,血管壁间隙较宽,结构完整性差,淋巴回流缺失,可以让尺寸几百纳米的纳米给药体系通过,因此将药物制备成纳米给药体系已经成为肿瘤治疗领域的新趋势,具有广阔的应用前景。自组装是在平衡条件下分子间发生非共价键弱相互作用,如范德华力、氢键、疏水作用、静电作用、 π - π 相互作用等,自发组合形成具有一定结构和功能的稳定的聚集体或超分子的过程,能够将一个无序的系统转化成一个有序的系统,常用于制备纳米粒。分子自组装形成的纳米粒通常具有单分子或低级分子聚集体所不具有的一些特性,如电、光、生物特性等,同时分子自组装还具有结构放大效应,这种放大效应能够赋予纳米粒一些新颖的特性,比如形貌和结构更加紧密丰富和兼具功能化和智能响应等特点,这些优势都使得自组装纳米给药体系的应用前景日益广阔。本发明基于低代树状大分子 PAMAM(G0/G1 PAMAM) 和肿瘤细胞 CD44 受体靶向的透明质酸(HA),利用自组装技术构建 EL@PAMAM/HA 纳米给药体系。

[0007] 本发明构建的自组装纳米载药体系能够包载厄洛替尼这种抗肿瘤药物,并且兼具 pH 响应和 CD44 受体靶向性,因此本发明涉及的纳米给药系统创新性地利用自组装技术将低代 PAMAM 树状分子、EL 和 HA 共制,操作简单易行,为厄洛替尼抗肿瘤治疗提供了一个新的研究方向。

发明内容

[0008] 本发明的目的在于基于低代树状大分子 PAMAM(G0/G1) 和肿瘤细胞 CD44 受体靶向的透明质酸(HA),采用溶剂交换法制备靶向自组装纳米给药系统 EL@PAMAM/HA NPs,使其能够靶向运载药物至肿瘤部位发挥疗效。

[0009] 本发明所述的 EL@PAMAM/HA NPs 制备步骤如下:

1. EL@PAMAM(G0/G1)/HA 的制备

室温下,将 100 μ L EL 的良溶剂溶液逐滴加入到 700 μ L 不良溶剂中,然后加入 100 μ L PAMAM(G0/G1) 水溶液,振荡 1 分钟后再加入 100 μ L HA 的水溶液,超声震荡 15 分钟,室温

静置,制得 EL@PAMAM (G0/G1) /HA 自组装纳米复合物,其中上述的良溶剂和不良溶剂分别选为无水乙醇和水。

[0010] 2.EL@PAMAM (G0/G1) /HA 自组装纳米复合物的粒径和电位分析检测

低代PAMAM树状分子带正电,HA带负电,自组装过程中会产生静电吸附作用,对制得的纳米粒的形貌产生影响,使用马尔文粒径仪测量通过不同电荷比制备的纳米复合物的粒径分布及Zeta电位。

[0011] 表1 不同电荷比的EL@PAMAM (G0) /HA纳米复合物粒径分布

Ratio of + to -	Z-Average (d.nm)	PDI
1:5	579.2	0.788
2:5	491.1	0.479
3:5	447.2	0.364
4:5	322.6	0.286
5:5	471.9	0.336
6:5	561.4	0.447
7:5	727.6	0.536
8:5	1079	0.902

表2 不同电荷比的EL@PAMAM (G1) /HA纳米复合物粒径分布

Ratio of + to -	Z-Average (d.nm)	PDI
1:5	921.1	0.318
2:5	315.9	0.271
3:5	146.1	0.283
4:5	647.1	0.260
5:5	558.8	0.332
6:5	502.1	0.284
7:5	501.2	0.315
8:5	554.5	0.280

采用“溶剂交换法”制备 EL@PAMAM (G0/G1) /HA,电荷比是影响 EL@PAMAM (G0/G1) /HA纳米复合物粒径的重要因素,PDI值则能反应纳米粒径的分布,EL@PAMAM (G0) /HA 的最佳电荷比为 4:5,EL@PAMAM (G1) /HA 的最佳电荷比则为 3:5。当正负电荷比为 4:5 时,EL@PAMAM (G0) /HA 纳米复合物的平均粒径为322.6 nm,PDI 为 0.286,电势为-5.72 mV;当正负电荷比为 3:5 时,EL@PAMAM (G1) /HA纳米复合物的平均粒径为 146.1 nm,PDI 为 0.283,电势为-6.92 mV,相比而言,EL@PAMAM (G1) /HA纳米粒粒径更小,分布更均匀。

[0012] 3. 自组装纳米复合物的稳定性实验

利用马尔文激光粒度仪检测纳米的粒径分布,结果如图6所示,EL@PAMAM/HA 纳米复合物的粒径分布在连续的一周里没有发生显著的变化,表明EL@PAMAM/HA 纳米复合物稳定性较好。

[0013] 4. 载药量与包封率的测定

使用超滤管离心获得未负载的游离厄洛替尼和纳米复合物,冻干称量纳米总质量,用紫外分光光度计测定游离厄洛替尼紫外吸光度,根据厄洛替尼标准曲线即可计算出其对应浓度,进而计算出自组装纳米复合物的载药量和包封率。

[0014] 根据厄洛替尼的标准曲线计算,当正负电荷比为 4:5 时,EL@PAMAM (G0) /HA 的载药量和包封率分别为 32.43%、62.43%;当正负电荷比为 3:5时,EL@PAMAM (G1) /HA 的载药量和包封率分别为 19.22%、76.51%。

[0015] 5. 厄洛替尼在不同 pH 条件下的释放

将 EL@PAMAM (G0) /HA 和 EL@PAMAM (G1) /HA 纳米复合物溶液移至分子量为1000的透析袋内,室温下在不同pH值的透析介质中进行避光磁力搅拌,利用紫外分光光度计测定每个时间点样品的吸光度,根据厄洛替尼的标准曲线,计算出每个时间点的累积释放量,绘制出厄洛替尼在不同 pH 值下随时间变化的释放曲线,结果见图7、图8和图9。

[0016] 6. MTT法检测细胞毒性

MTT法检测载EL的纳米给药系统对宫颈癌细胞HeLa和非小细胞肺癌细胞A549的增殖抑制作用

① 取处于对数生长期的肿瘤细胞一瓶,消化后制成 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 的细胞悬液。

[0017] ② 将细胞悬液移入96孔板,每孔100 μL ,置37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 培养箱中培养24 h。

[0018] ③ 移去培养基,按照浓度梯度加入自组装纳米复合物,每孔100 μL ,另设EL单药组和PAMAM-G0/G1组。作用24 h后,去除含药培养基,于每孔中加入无血清、无酚红培养基100 μL ,再加入MTT溶液10 μL ,继续孵育24 h。

[0019] ④ 弃去板内上清液,每孔加入100 μL DMSO,置于摇床上低速振荡10min,结晶物充分溶解后,使用酶标仪检测各孔光吸收值(OD值),并计算细胞的增殖抑制率:细胞存活率(%)=用药组平均OD值 $\div$ 空白对照组平均OD值 $\times 100\%$,用 GraphPad Prism 软件进行数据处理,在酶联免疫检测仪 OD 570 nm 处测量各孔的吸光值,并计算对应细胞存活率。其结果如图10、图 11、图12和图13 所示。从图中可知,EL@PAMAM (G0) /HA 和 EL@PAMAM (G1) /HA 对 HeLa均未表现出明显的细胞毒性,对A549细胞的细胞毒性比对 HeLa细胞的细胞毒性更强。A549 细胞中CD44 受体高表达,同时厄洛替尼又是非小细胞肺癌A549细胞的靶向药物,故对A549细胞的毒性显著升高。

[0020] 7. 细胞摄取实验

将EL@PAMAM (G1) /HA纳米给药系统接上FITC用于表征A549细胞对该纳米给药系统的摄取情况,结果如图14。没有靶标HA的EL@PAMAM NPs本身也会有少量达到细胞,因此可以检测到细胞中会有少量的荧光出现,与此形成明显对比的是基于低代树状大分子PAMAM(G0/G1)和CD44受体靶使向的透明质酸(HA)构建的自组装纳米给药系统EL@PAMAM (G1) /HA NPs使药物进入细胞的量明显增加,表明其确实有良好的靶向性。

[0021] 本发明的优点在于:

1. 本发明所制备的EL@PAMAM (G0) /HA 和 EL@PAMAM (G1) /HA通过溶剂交换法制得,操作简便易行。

[0022] 2. 本发明所构建的小分子自组装纳米载药系统可以包载厄洛替尼这种抗肿瘤药物,具有 pH 响应,在酸性条件下释药更多,适于在肿瘤部位释药。

[0023] 3. 本发明所构建的小分子自组装纳米载药系统可以包载厄洛替尼这种抗肿瘤药物并能够靶向CD44 高表达肿瘤细胞,可特异性地输送更多治疗药物至肿瘤部位发挥药效,有显著的治疗优势。

[0024] 4. 本发明所制备的EL@PAMAM (G0) /HA 和 EL@PAMAM (G1) /HA小分子自组装纳米给药系统,靶向治疗非小细胞肺癌,不仅可以为肿瘤治疗提供了一个新方法,也为靶向载药系统研究指明了一种新思路。

附图说明

[0025] 图1. 基于低代树状大分子PAMAM (G0/G1 PAMAM) 和肿瘤细胞CD44受体靶向的透明质酸(HA)构建的具有靶向功能的自组装纳米载药系统EL@PAMAM (G0) /HA纳米复合物电荷比为4:5时纳米的粒径大小;

图2. 基于低代树状大分子PAMAM (G0/G1 PAMAM) 和肿瘤细胞CD44受体靶向的透明质酸(HA)构建的具有靶向功能的自组装纳米载药系统EL@PAMAM (G0) /HA纳米复合物电荷比为4:5时纳米的电势大小;

图3. 基于低代树状大分子PAMAM (G0/G1 PAMAM) 和肿瘤细胞CD44受体靶向的透明质酸(HA)构建的具有靶向功能的自组装纳米载药系统EL@PAMAM (G1) /HA纳米复合物电荷比为3:5时纳米的粒径大小;

图4. 基于低代树状大分子PAMAM (G0/G1 PAMAM) 和肿瘤细胞CD44受体靶向的透明质酸(HA)构建的具有靶向功能的自组装纳米载药系统EL@PAMAM (G1) /HA纳米复合物电荷比为3:5时纳米的电势大小;

图5. 基于低代树状大分子PAMAM (G0/G1 PAMAM) 和肿瘤细胞CD44受体靶向的透明质酸(HA)构建的具有靶向功能的自组装纳米载药系统EL@PAMAM (G1) /HA纳米复合物电荷比为3:5时纳米的AFM图像;

图6. 基于低代树状大分子PAMAM (G0/G1 PAMAM) 和肿瘤细胞CD44受体靶向的透明质酸(HA)构建的具有靶向功能的自组装纳米载药系统EL@PAMAM/HA的稳定性检测;

图7. 厄洛替尼在不同pH条件下的释放曲线;

图8. 基于低代树状大分子PAMAM (G0/G1 PAMAM) 和肿瘤细胞CD44受体靶向的透明质酸(HA)构建的具有靶向功能的自组装纳米给药系统EL@PAMAM-G1/HA NPs在不同pH条件下的释放曲线;

图9. 基于低代树状大分子PAMAM (G0/G1 PAMAM) 和肿瘤细胞CD44受体靶向的透明质酸(HA)构建的具有靶向功能的自组装纳米给药系统EL@PAMAM-G0/HA NPs在不同pH条件下的释放曲线;

图10. 基于低代树状大分子PAMAM (G0) 和肿瘤细胞CD44受体靶向的透明质酸(HA)构建的具有靶向功能的自组装纳米载药系统 MTT法检测HeLa细胞毒性结果;

图11. 基于低代树状大分子PAMAM (G1) 和肿瘤细胞CD44受体靶向的透明质酸(HA)构建

的具有靶向功能的自组装纳米载药系统 MTT法检测HeLa细胞毒性结果;

图12. 基于低代树状大分子PAMAM(G0)和肿瘤细胞CD44受体靶向的透明质酸(HA)构建的具有靶向功能的自组装纳米载药系统 MTT法检测A549细胞毒性结果;

图13. 基于低代树状大分子PAMAM(G1)和肿瘤细胞CD44受体靶向的透明质酸(HA)构建的具有靶向功能的自组装纳米载药系统 MTT法检测A549细胞毒性结果;

图14. 基于低代树状大分子PAMAM(G0/G1 PAMAM)和肿瘤细胞CD44受体靶向的透明质酸(HA)构建的具有靶向功能的自组装纳米载药系统的细胞摄取图。

具体实施方式

[0026] 为了使本发明所述的内容更加便于理解,下面结合具体实施方式对本发明所述的技术方案做进一步的说明,但是本发明不仅限于此。

[0027] 1. EL@PAMAM(G0)/HA 的制备

50 °C 下,在振荡的过程中将 100 μ L 25 μ M 厄洛替尼的无水乙醇溶液快速加入到 700 μ L 水中(制备 7 份),然后分别将 100 μ L 25、50、75、100、125、150、175、200 μ M 的 PAMAM(G0)水溶液迅速地加入到上述溶液中,振荡一分钟后,再将 100 μ L 500 μ M HA 水溶液分别加入上述 7 份溶液中,然后进行 5 分钟的振荡处理。结束后,再对样品进行 15 分钟超声处理后,室温静置,即可制得不同电荷比的 EL@PAMAM(G0)/HA 自组装纳米复合物。

[0028] 2. EL@PAMAM(G1)/HA 的制备

50 °C下,在振荡的过程中将 100 μ L 250 μ M 厄洛替尼的无水乙醇溶液快速加入到 700 μ L 水中(制备 7 份),然后分别将 100 μ L 12.5、25、37.5、50、62.5、75、87.5、100 μ M 的 PAMAM(G1)水溶液迅速地加入到上述溶液中,振荡一分钟后,再将 100 μ L 500 μ M HA 水溶液分别加入上述 7 份溶液中,然后进行 5 分钟的振荡处理。结束后,再对样品进行 15 分钟超声处理后,室温静置,即可制得不同电荷比的 EL@PAMAM(G1)/HA 自组装纳米复合物。

3. 载药量与包封率的测定

使用超滤管离心获得未负载的游离厄洛替尼和纳米复合物,冻干称量纳米总质量,用紫外分光光度计测定游离厄洛替尼紫外吸光度,根据厄洛替尼标准曲线即可计算出其对应浓度,进而计算出自组装纳米复合物的载药量和包封率。

[0029] 计算公式:

载药量 = (厄洛替尼总质量 - 游离厄洛替尼质量) / 纳米总质量 * 100%

包封率 = (厄洛替尼总质量 - 游离厄洛替尼质量) / 厄洛替尼总质量 * 100%

4. 厄洛替尼在不同 pH 条件下的释放曲线

将1 mL EL@PAMAM(G0)/HA 和 EL@PAMAM(G1)/HA纳米复合物溶液移至透析袋内(MWCO=1000),然后放入到装有49 mL PBS (pH 7.4/ pH 5.5)的透析介质中,在 37 °C下恒温磁力搅拌,进行厄洛替尼在不同 pH 值下的释放实验。在预先设定的时间点(0.5、1、2、4、6、8、12、24、48、72 h)取样,每次取 2mL 的透析液,然后再补加 2 mL 新鲜透析介质,然后利用紫外分光光度计测定每个时间点样品的吸光度,根据厄洛替尼的标准曲线,计算出每个时间点的累积释放量,绘制出厄洛替尼在不同 pH 值下随时间变化的释放曲线。

[0030] 本发明应用纳米自组装技术对抗癌药物厄洛替尼用于肿瘤治疗有了突破,为非小

细胞肺癌靶向治疗奠定了理论基础,同时也为纳米技术应用于肿瘤治疗有了一定的借鉴意义。

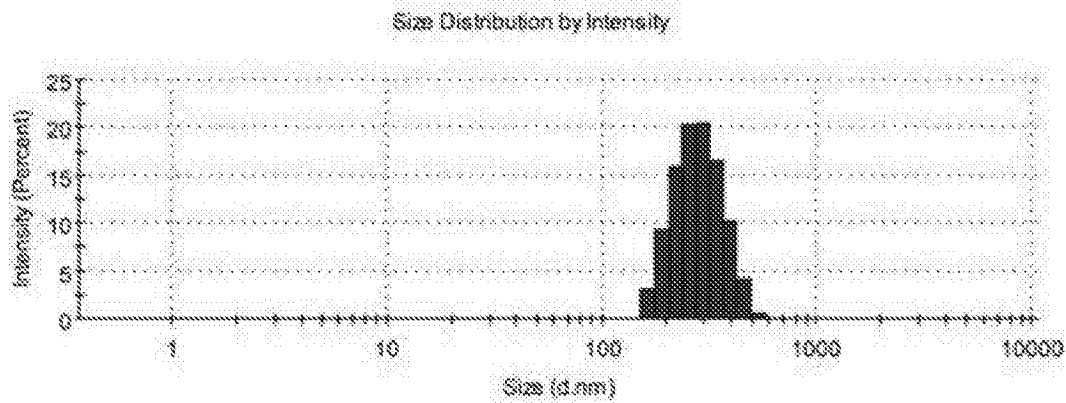


图1

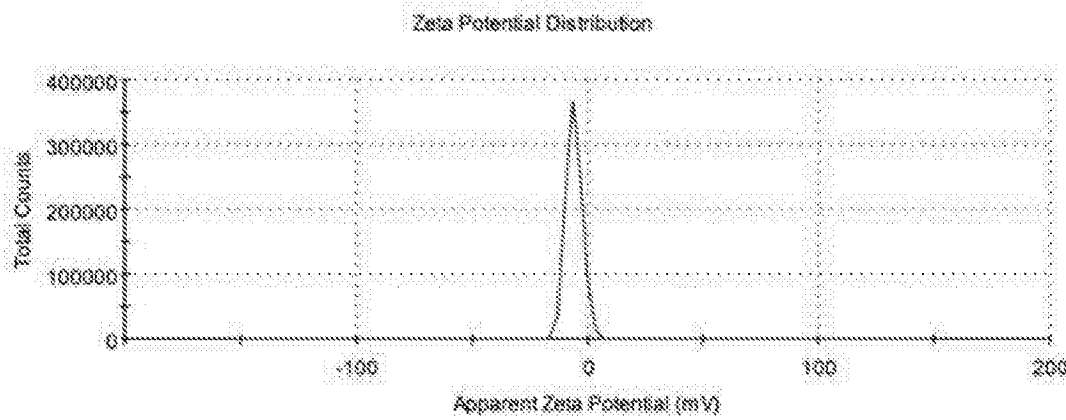


图2

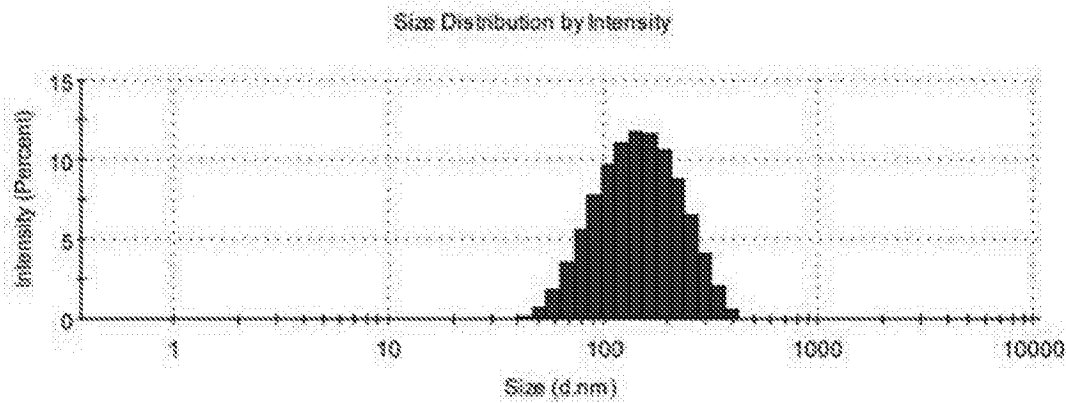


图3

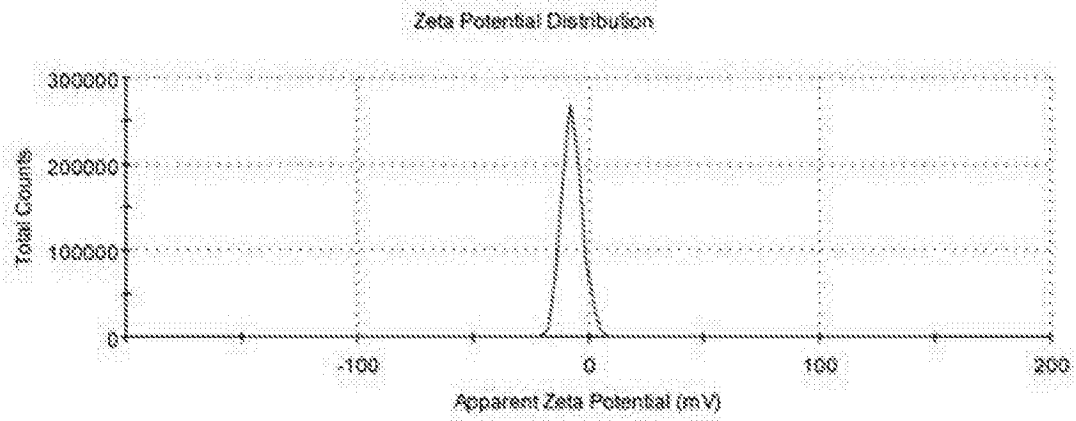


图4

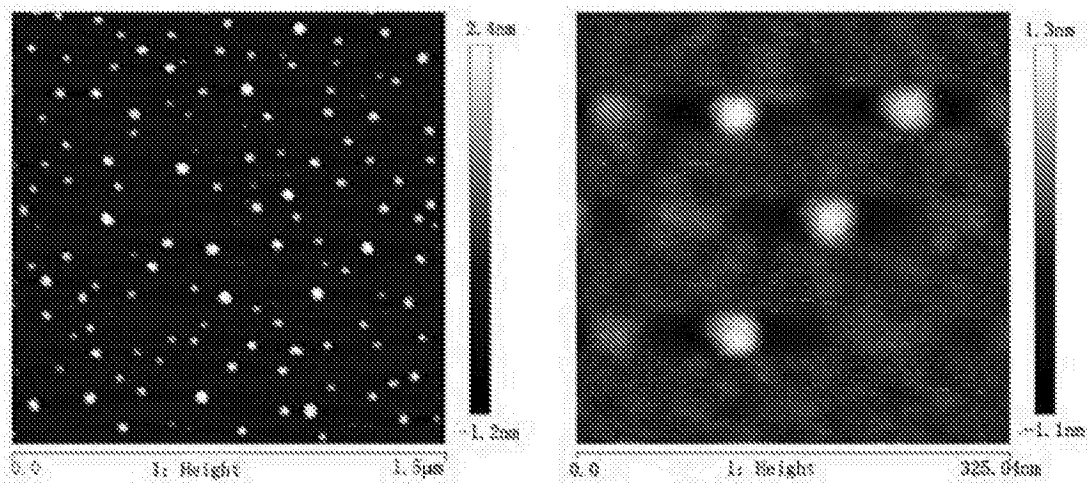


图5

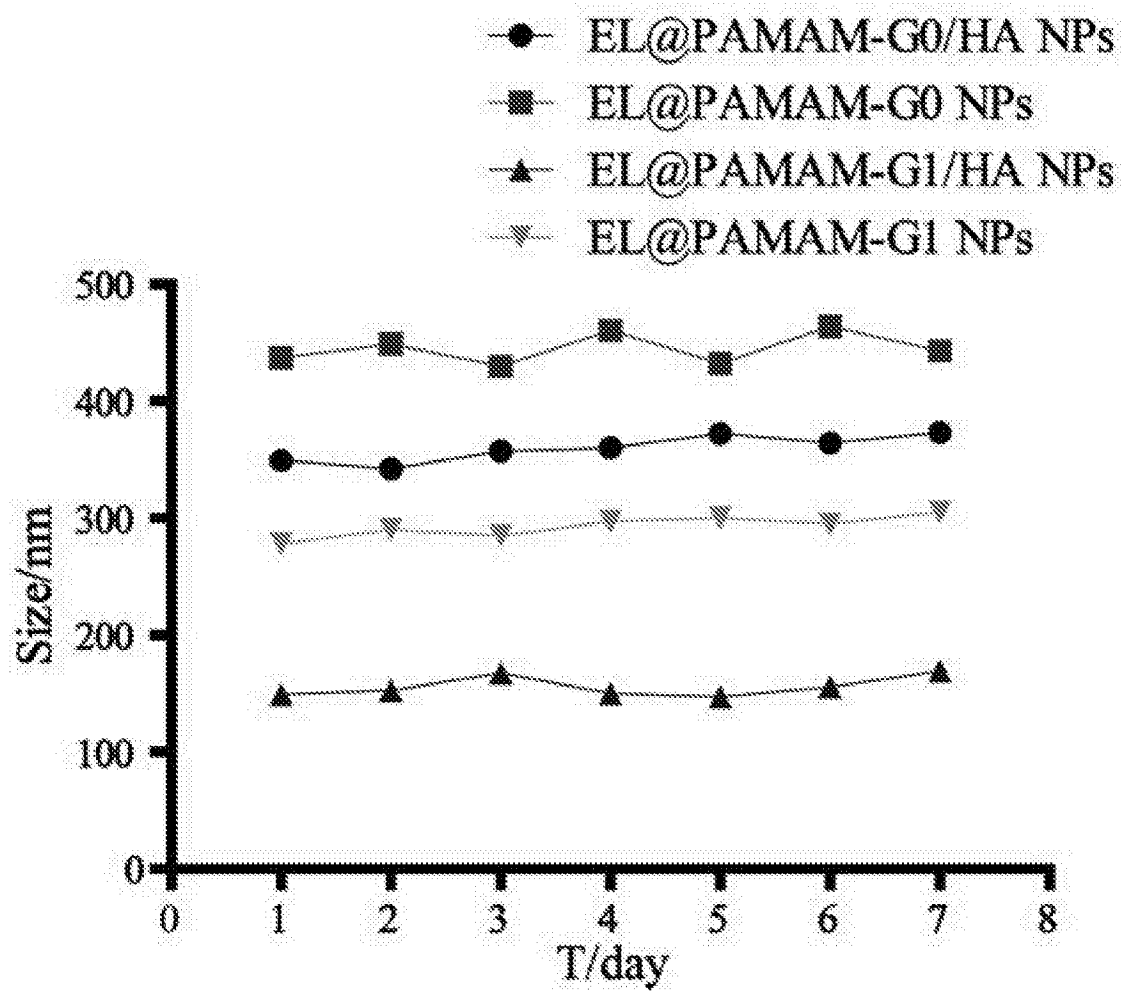


图6

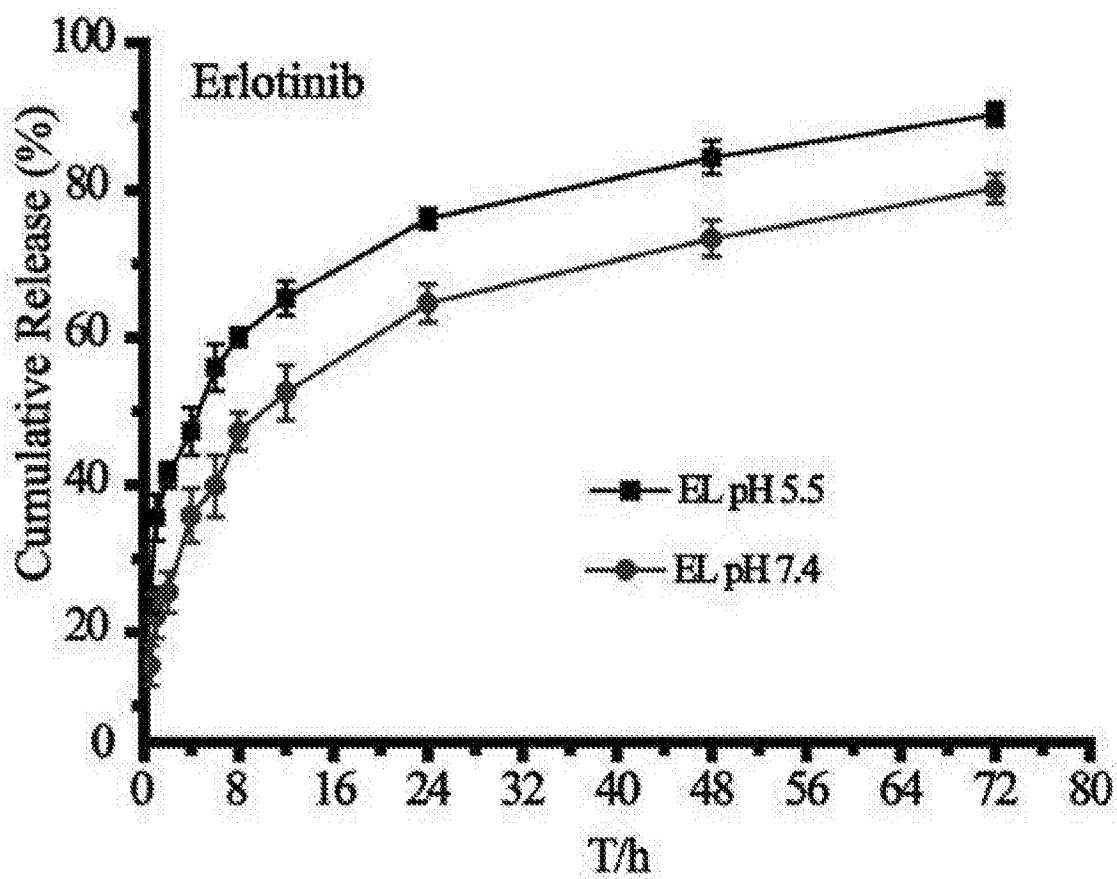


图7

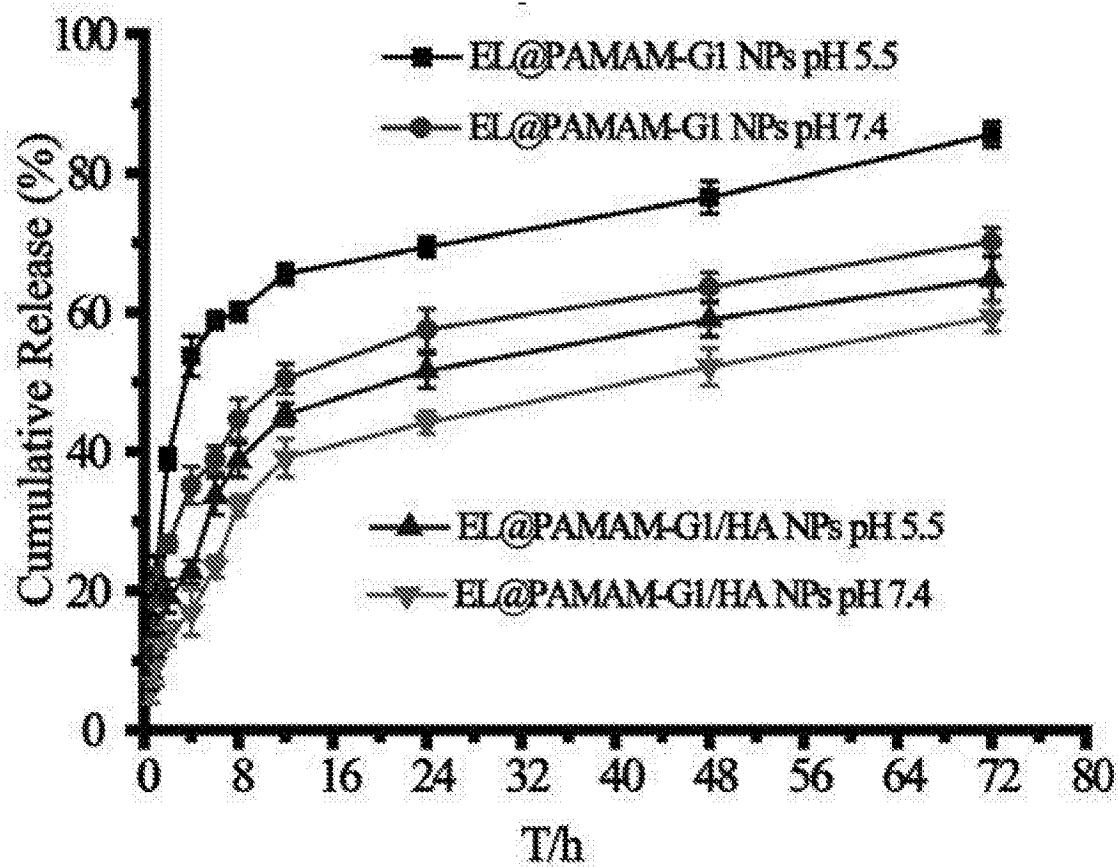


图8

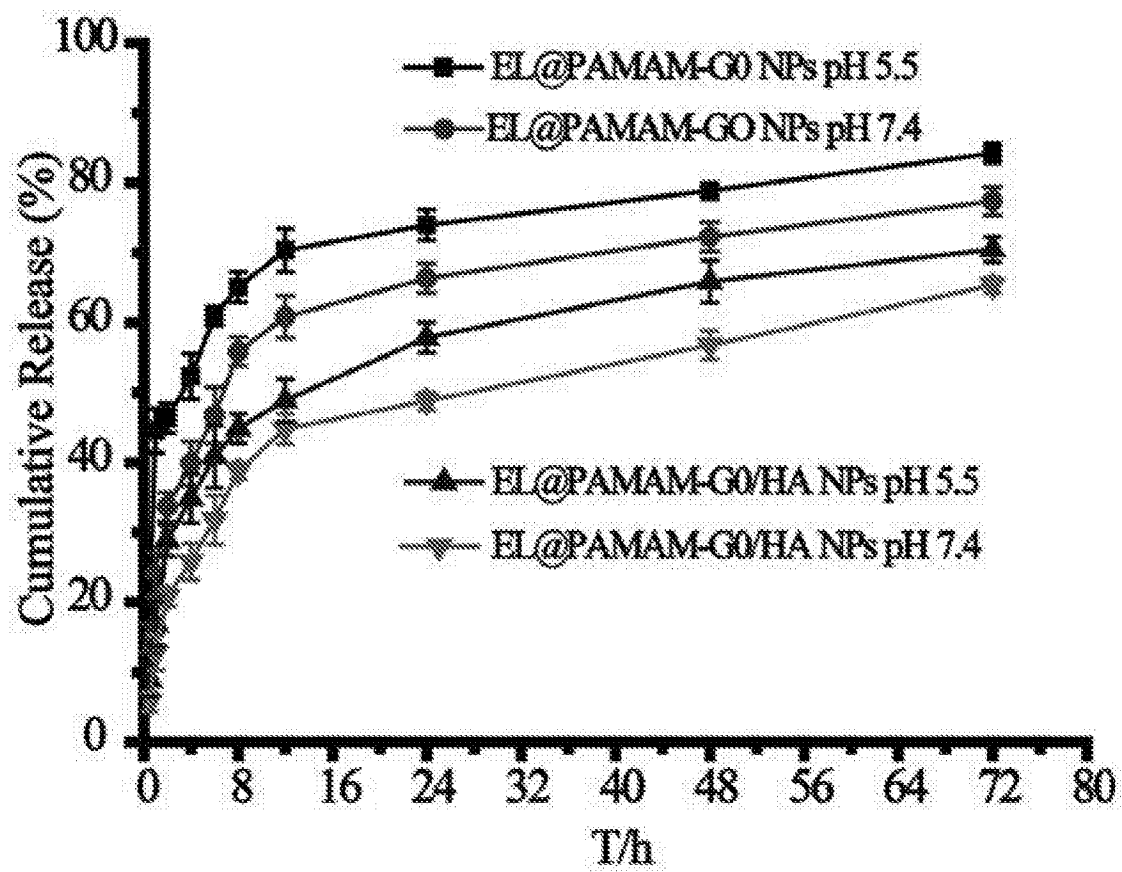


图9

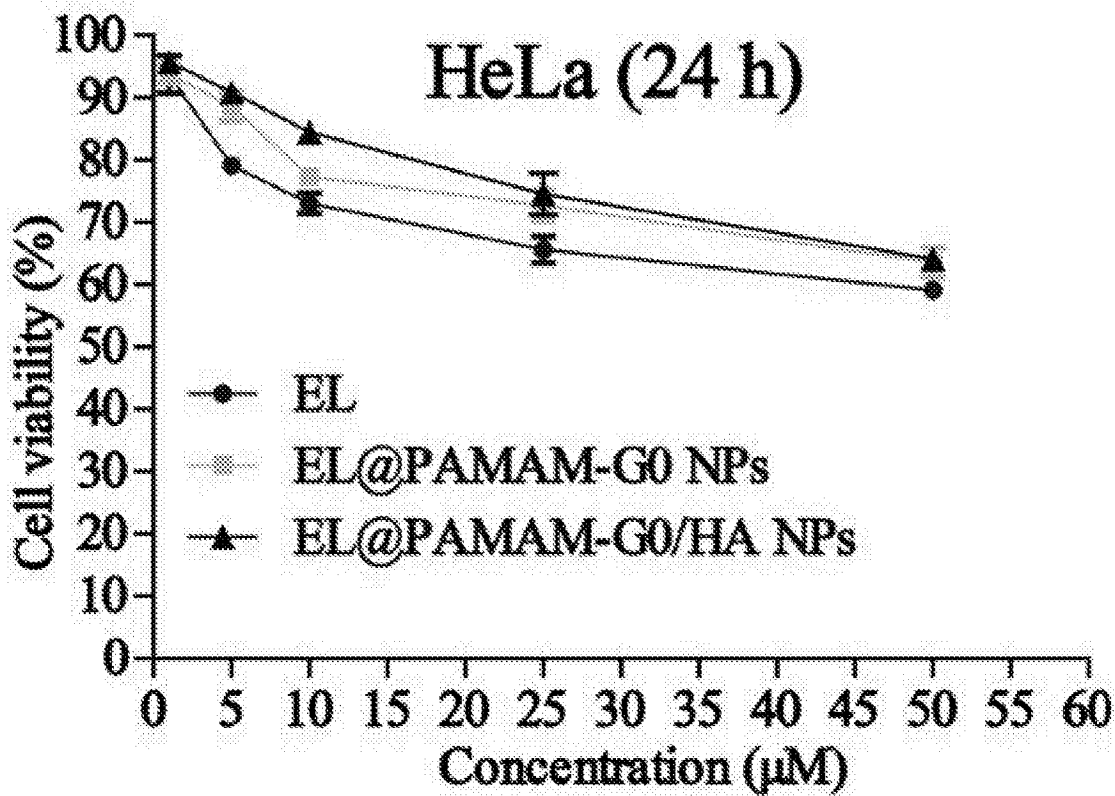


图10

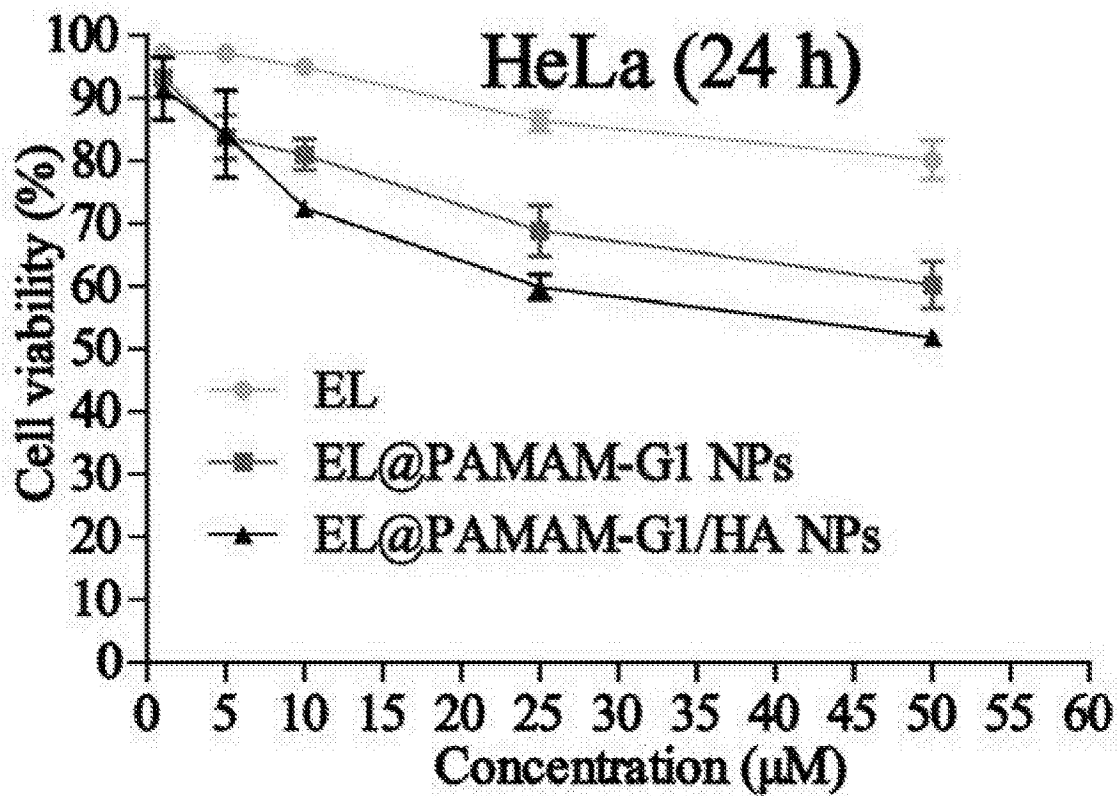


图11

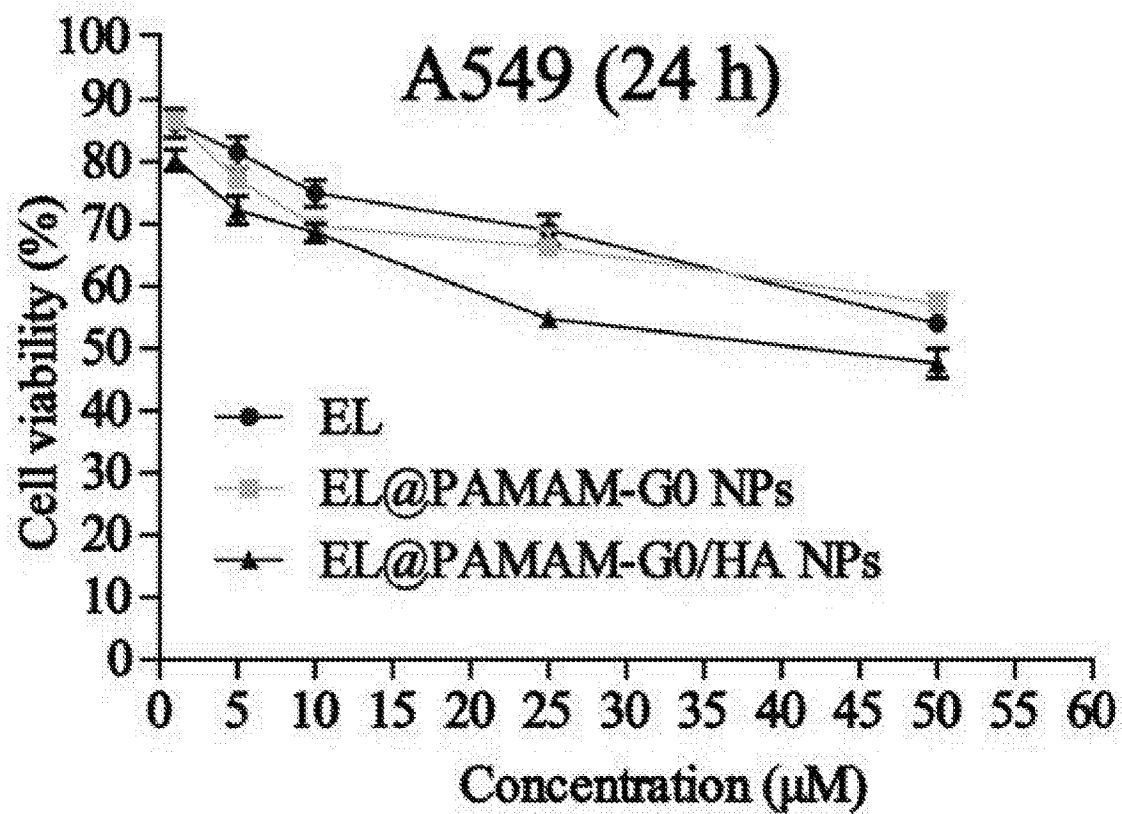


图12

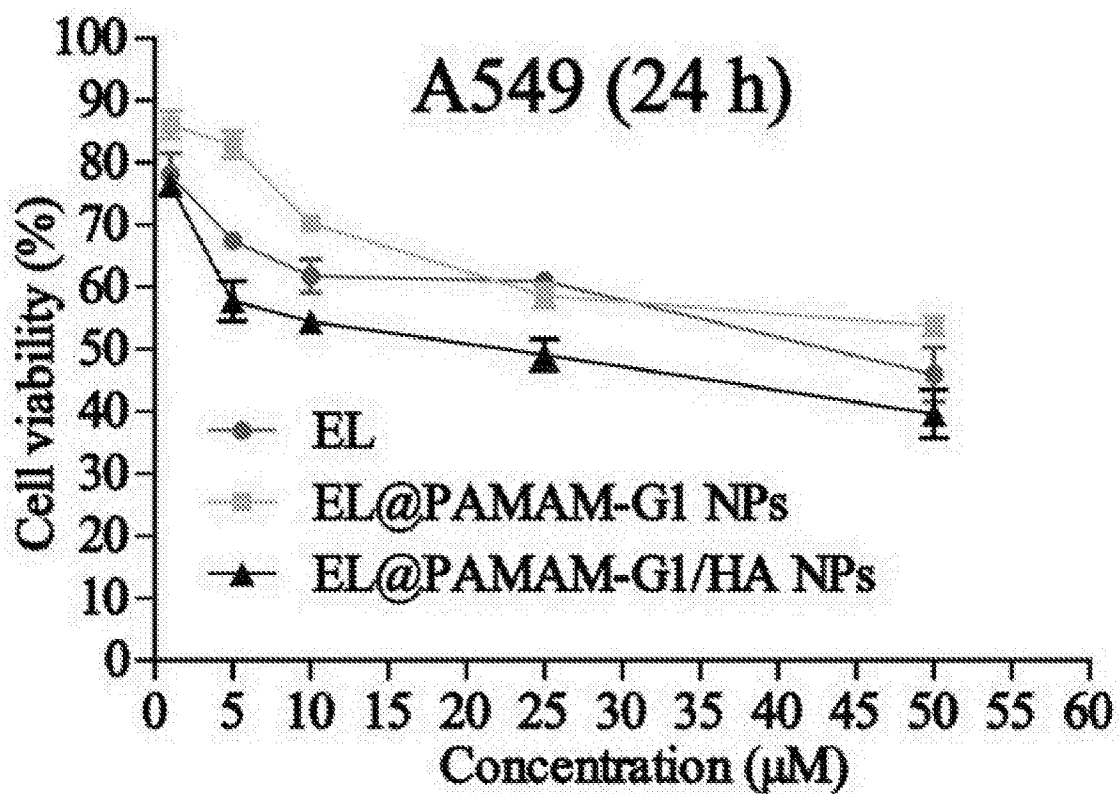


图13

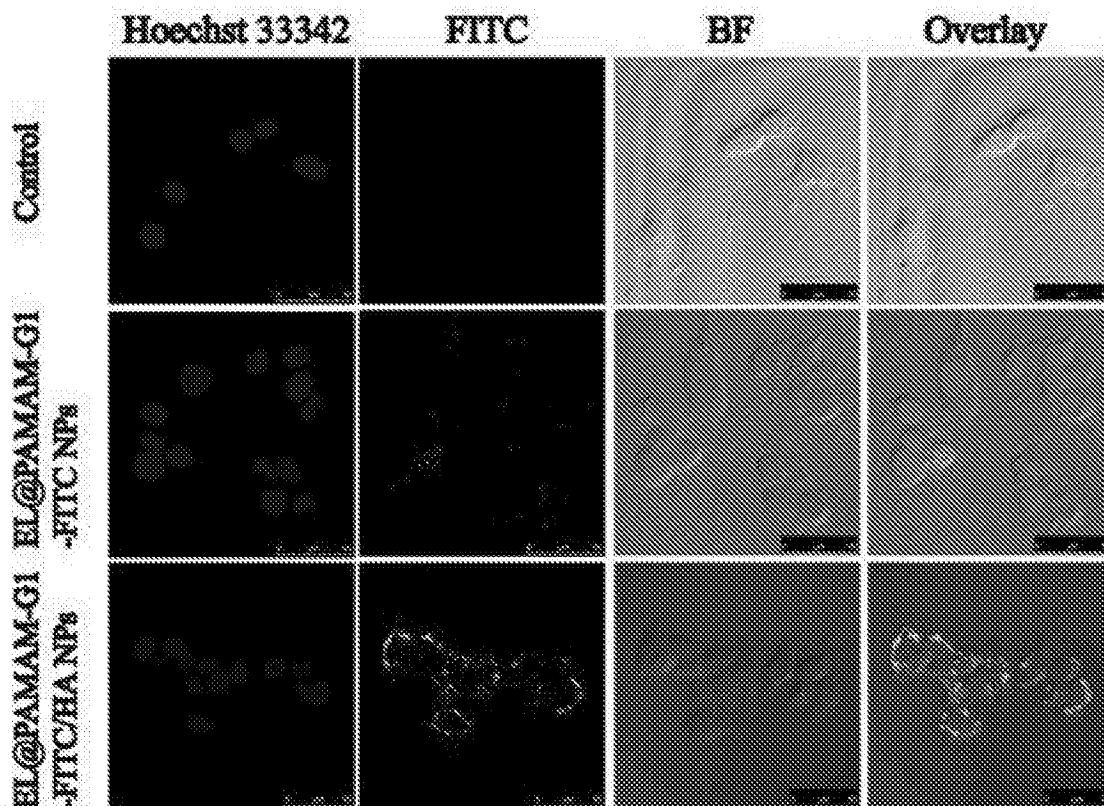


图14