(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 102380102 A
(43)申请公布日 2012.03.21

(21)申请号 201110342007.8

(22)申请日 2011.11.02

(71)申请人 东华大学
地址 201620 上海市松江区松江新城人民北路2999号

(72)发明人 何创龙 冯炜 仇可新 曹利军

(74)专利代理机构 上海泰能知识产权代理事务所 31233
代理人 黄志达 谢文凯

(51)Int.Cl.
A61K 47/04(2006.01)
A61K 9/14(2006.01)
A61K 31/704(2006.01)
A61K 31/661(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

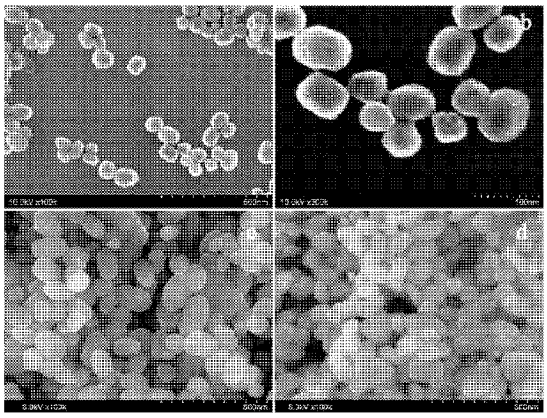
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 3 页

(54)发明名称

一种环境响应性介孔硅纳米粒子的制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种环境响应性介孔硅纳米粒子的制备方法，采用模板提取法制备粒径20-1000nm、孔径2-50nm、比表面积500-1500m^2/g结构可控的介孔硅纳米粒子，并利用自组装技术进行表面功能化，即得。本发明所制备的药物缓释系统，具有良好的生物相容性，制备方法简单且反应条件温和，实验原料价格低廉，载药量高，能够智能受控释放，在组织工程中生长因子和基因释放、酶的固定化及癌症治疗等领域具有良好的应用前景。



CN 102380102 A

1. 一种环境响应性介孔硅纳米粒子的制备方法，包括：

(1) 将模板剂在 50-95℃下溶解于氢氧化钠溶液中，加入正硅酸乙酯，搅拌，抽滤干燥，乙醇回流去模板后真空干燥得介孔硅纳米粒子；其中，模板剂、氢氧化钠与正硅酸乙酯的摩尔比为 1-2 ： 3-5 ： 7-9；

(2) 将上述介孔硅分散于甲苯中，加入 3- 氨基丙基三乙氧基硅烷，在氮气保护下反应，干燥得氨基修饰的介孔硅纳米粒子；其中，介孔硅、3- 氨基丙基三乙氧基硅烷与甲苯的摩尔比为 4-6 ： 0.5-2 ： 400-600；

(3) 将步骤 (1) 制得的介孔硅纳米粒子或者步骤 (2) 制得的氨基修饰的介孔硅纳米粒子制成悬浮液，加入阴离子型聚电解质或阳离子型聚电解质溶液，搅拌 0.2-2h，离心洗涤分散；重复该过程后干燥，获得表面自主装修饰的介孔硅纳米粒子；

(4) 将生物活性分子置于 pH 2.0-8.0 的缓冲溶液中，加入上述表面自主装修饰的介孔硅纳米粒子，搅拌 4-20h，再将 pH 调至 6.0-8.0，搅拌 0.2-2h，离心洗涤干燥，即得。

2. 根据权利要求 1 所述的一种环境响应性介孔硅纳米粒子的制备方法，其特征在于：所述步骤 (1) 中的模板剂为十六烷基三甲基溴化铵。

3. 根据权利要求 1 所述的一种环境响应性介孔硅纳米粒子的制备方法，其特征在于：所述步骤 (1) 中的介孔硅的粒径为 20-1000nm，比表面积为 500-1500m^2/g，平均孔径为 2-50nm。

4. 根据权利要求 1 所述的一种环境响应性介孔硅纳米粒子的制备方法，其特征在于：所述步骤 (3) 中的阴离子聚电解质为马来酸酐钠盐、藻酸钠、聚苯乙烯磺酸钠、聚丙烯酸、聚甲基丙烯酸或聚丙烯酰胺；阳离子聚电解质为壳聚糖、聚烯丙胺盐酸盐、聚二甲基二烯丙基氯化铵或肝素。

5. 根据权利要求 1 所述的一种环境响应性介孔硅纳米粒子的制备方法，其特征在于：所述步骤 (3) 中的阴离子型聚电解质或阳离子型聚电解质溶液浓度均为 0.2-2mg/mL。

6. 根据权利要求 1 所述的一种环境响应性介孔硅纳米粒子的制备方法，其特征在于：所述步骤 (4) 中的生物活性分子为生长因子、基因、生物酶或抗癌药物。

7. 根据权利要求 6 所述的一种环境响应性介孔硅纳米粒子的制备方法，其特征在于：所述生长因子为磷酸鞘氨醇、血管内皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子或表皮生长因子。

8. 根据权利要求 6 所述的一种环境响应性介孔硅纳米粒子的制备方法，其特征在于：所述基因为微 RNA、干扰小 RNA、信使 RNA、转移 RNA 或核糖体 RNA。

9. 根据权利要求 6 所述的一种环境响应性介孔硅纳米粒子的制备方法，其特征在于：所述生物酶为果胶酶、蛋白酶、脂肪酶、过氧化氢酶或淀粉酶。

10. 根据权利要求 6 所述的一种环境响应性介孔硅纳米粒子的制备方法，其特征在于：所述抗癌药为阿霉素、地塞米松、洛莫司汀、卡莫司汀、右雷佐生、磷酸氟达拉滨、卡培他滨、紫杉醇、替吉奥、奥沙利铂、多西他赛、长春瑞滨、榄香烯或羟基喜树碱。

一种环境响应性介孔硅纳米粒子的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于介孔硅纳米粒子的制备领域，特别涉及一种环境响应性介孔硅纳米粒子的制备方法。

背景技术

[0002] 在组织修复过程中，生长因子的受控释放对种子细胞募集、调节细胞功能和促进组织愈合具有重要作用。大多数生长因子在体内半衰期短且易变性，过量释放可能产生毒性和致癌性。因此，建立有效的控释载体是实现其生物学功能的必要条件。在组织工程中，通常采用两种不同的生长因子负载方式：(1) 化学方法将生长因子固定到载体上，生长因子与载体之间通过共价键、氢键或静电作用相结合；(2) 物理包埋的方法将生长因子包覆于聚合物微球或凝胶中，通过扩散或降解来控制生长因子的缓释。因此，构建纳米级和微米级的药物释放载体并与支架结合是实现生长因子控制释放的一个重要策略。

[0003] 当前，癌症仍然是威胁人类健康的杀手之一，而癌症治疗也是医学界面临的重大难题。主要原因是：(1) 现有的抗癌药物普遍存在一定的毒副作用，对人体正常组织带来伤害；(2) 传统的给药方式自身存在很大的缺陷，药物的生物利用度较差；(3) 肿瘤的多药耐药性导致化疗失败和病情复发。据统计资料分析，90％的恶性肿瘤患者死于肿瘤的多药耐药性。因此多药耐药的逆转特性是目前肿瘤治疗研究热点。通常的解决策略包括：结合化学增敏药物以重建主效药，应用生物纳米技术提高给药效率。将上述方法相结合可提供最有效的治疗手段。因此，应用纳米技术构筑抗癌药、化学增敏药的载药系统，在增加药效、逆转多药抗药性方面可起到重要作用。通常，这些纳米载药系统主要基于有机或无机纳米载体，例如脂质体、聚合物胶束和硅、碳介孔纳米材料等。现有的药物释放系统虽具有一定的载药量、良好的稳定性和生物相容性，但存在如药物传递过程中易泄露、装载量小，难以获得可控缓释等弊端。因此提高载药量，弱化抗癌药物的毒副作用，实现药物智能调控，是有效实现癌症治疗的关键。

[0004] 介孔硅纳米粒子在构建药物智能缓释载体方面具有广泛的应用。介孔硅具有生物相容性好、比表面积大、比孔容大、孔径结构均一可调和表面易修饰等特点，作为药物和基因控释载体具有独特的优势。根据介孔硅外表面富含硅羟基易于修饰的特点，可设计出各种环境响应性的介孔硅载药体系。人们利用各种化学实体包括纳米粒子、有机分子、超分子组装体等作为“门禁”对介孔硅进行封孔或加帽，这些化学实体能够对外界刺激如光、温度、pH 值、还原剂和酶等做出快速响应，进而控制孔道的开放与关闭，实现对负载于孔道内的客体药物分子的控制缓释。已有的介孔硅载药体系各有优缺点。如在胶体粒子上包裹聚电解质形成中空微胶囊，可实现 pH 响应性的药物释放，但在制备过程中孔道结构易塌陷，不适合大批量生产；管状介孔材料载药系统具有较大的载药量，但释放速率难以控制。因此，结合介孔硅的优点，通过表面修饰制备环境响应性药物释放体系无疑具有较好的应用前景。例如，阿霉素等是一种广谱的抗肿瘤药物，其对机体可产生广泛的生物化学效应，但有较强的细胞毒性。采用环境响应性缓释载体是控释此类药物的理想选择。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是提供一种环境响应性介孔硅纳米粒子的制备方法，该方法制备的 pH 响应性载药介孔硅纳米粒子载药量高，能够智能受控释放，具有良好的生物相容性。

[0006] 本发明的一种环境响应性介孔硅纳米粒子的制备方法，包括：

[0007] (1) 将模板剂在 50-95℃下溶解于氢氧化钠溶液中，加入正硅酸乙酯，搅拌，抽滤干燥，乙醇回流去模板后真空干燥得介孔硅纳米粒子；其中，模板剂、氢氧化钠与正硅酸乙酯的摩尔比为 1-2 ： 3-5 ： 7-9；

[0008] (2) 将上述介孔硅分散于甲苯中，加入 3- 氨基丙基三乙氧基硅烷，在氮气保护下反应，干燥得氨基修饰的介孔硅纳米粒子；其中，介孔硅、3- 氨基丙基三乙氧基硅烷与甲苯的摩尔比为 4-6 ： 0.5-2 ： 400-600；

[0009] (3) 将步骤 (1) 制得的介孔硅纳米粒子或者步骤 (2) 制得的氨基修饰的介孔硅纳米粒子制成悬浮液，加入阴离子型聚电解质或阳离子型聚电解质溶液，搅拌 0.2-2h，离心洗涤分散；重复该过程后干燥，获得表面自主装修饰的介孔硅纳米粒子；

[0010] (4) 将生物活性分子置于 pH 2.0-8.0 的缓冲溶液中，加入上述表面自主装修饰的介孔硅纳米粒子，搅拌 4-20h，再将 pH 调至 6.0-8.0，搅拌 0.2-2h，离心洗涤干燥，即得。

[0011] 所述步骤 (1) 中的模板剂为十六烷基三甲基溴化铵。

[0012] 所述步骤 (1) 中的介孔硅的粒径为 20-1000nm，比表面积为 500-1500m^2/g，平均孔径为 2-50nm。

[0013] 所述步骤 (3) 中的阴离子聚电解质为马来酸酐钠盐、藻酸钠、聚苯乙烯磺酸钠、聚丙烯酸、聚甲基丙烯酸或聚丙烯酰胺；阳离子聚电解质为壳聚糖、聚烯丙胺盐酸盐、聚二甲基二烯丙基氯化铵或肝素。

[0014] 所述步骤 (3) 中的阴离子型聚电解质或阳离子型聚电解质溶液浓度均为 0.2-2mg/mL。

[0015] 所述步骤 (4) 中的生物活性分子为生长因子、基因、生物酶或抗癌药物。

[0016] 所述步骤 (4) 中 pH 2.0-8.0 的缓冲溶液为 pH 2.0-3.0，盐酸溶液或 pH 3.0-6.0，醋酸缓冲液或 pH 6.0-8.0，磷酸缓冲液。

[0017] 所述生长因子为磷酸鞘氨醇、血管内皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子或表皮生长因子。

[0018] 所述基因为微 RNA、干扰小 RNA、信使 RNA、转移 RNA 或核糖体 RNA。

[0019] 所述生物酶为果胶酶、蛋白酶、脂肪酶、过氧化氢酶或淀粉酶。

[0020] 所述抗癌药为阿霉素、地塞米松、洛莫司汀、卡莫司汀、右雷佐生、磷酸氟达拉滨、卡培他滨、紫杉醇、替吉奥、奥沙利铂、多西他赛、长春瑞滨、榄香烯或羟基喜树碱。

[0021] 有益效果

[0022] (1) 本发明操作简单、反应条件温和，实验原料价格低廉，经济性好，生物相容性好；

[0023] (2) 本发明制备的 pH 响应性载药介孔硅纳米粒子载药量高，能够智能受控释放，具有良好的生物相容性，适用于小分子抗癌药物、基因和生长因子靶向和控制释放，性能稳

定并易于保存，具有良好的应用前景。

附图说明

[0024] 图 1 是实施例 1、2 所得产物的场发射扫描电镜照片；

[0025] 图 2 是实施例 1、2 所得产物的透射电镜照片；

[0026] 图 3 是实施例 1、2 所得自组装过程的 ζ 电位图；

[0027] 图 4 是实施例 1 所得产物的生长因子缓释曲线；

[0028] 图 5 是实施例 2 所得产物的抗癌药物缓释曲线。

具体实施方式

[0029] 下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。此外应理解，在阅读了本发明讲授的内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0030] 实施例 1

[0031] 可调控释放磷酸鞘氨醇的 pH 响应性纳米粒子药物释放体系

[0032] (1) 模板提取法制备介孔硅纳米粒子，将模板剂十六烷基三甲基溴化铵在 50℃下溶解在氢氧化钠溶液中，逐滴加入正硅酸乙酯，剧烈搅拌产生白色沉淀，抽滤干燥，乙醇回流 8h 去除模板后，真空干燥，保存备用；

[0033] (2) 将步骤 1 制备的介孔硅分散在甲苯中，加入 3- 氨基丙基三乙氧基硅烷，二氧化硅、3- 氨基丙基三乙氧基硅烷与甲苯的摩尔比为 5 ： 1 ： 500，在氮气保护下反应 20h，干燥得氨基修饰的介孔硅纳米粒子，保存备用；

[0034] (3) 将步骤 2 制备的氨基修饰介孔硅制成悬浮液 (1.0-2.0wt. %)，加入藻酸钠溶液 (1-2mg/mL)，室温搅拌 0.2-2h，4000r/min 离心 3min，洗涤，分散成悬浮液，加入壳聚糖溶液 (1-2mg/mL)，室温搅拌 0.2-2h，4000r/min 离心 3min，洗涤，分散制成悬浮液，整个过程重复 4 次，获得表面自主装修饰的介孔硅纳米粒子，干燥备用；

[0035] (4) 将步骤 3 制备的表面修饰的介孔硅纳米粒子，加入含磷酸鞘鞍醇的磷酸缓冲溶液 (pH6.5-8.0) 中，搅拌 10-24h 进行药物吸附。再将 pH 调至 5.5-6.5，搅拌 2h，离心洗涤干燥。获得加载生长因子的 pH 响应性介孔硅纳米粒子。

[0036] 实施例 2

[0037] 制备加载阿霉素的 pH 响应性纳米粒子

[0038] (1) 模板提取法制备介孔硅纳米粒子，将模板剂十六烷基三甲基溴化铵在 95℃下溶解在氢氧化钠溶液中，逐滴加入正硅酸乙酯，剧烈搅拌产生白色沉淀，抽滤干燥，乙醇回流 24h 去除模板后，真空干燥，保存备用；

[0039] (2) 将步骤 1 制备的介孔硅纳米粒子制成悬浮液 (1.0-2.0wt. %)，加入聚烯丙胺盐酸盐 (1-2mg/mL)，室温搅拌 0.2-2h，4000r/min 离心 3min，洗涤，分散制成悬浮液，加入聚苯乙烯磺酸钠溶液 (1-2mg/mL)，室温搅拌 0.2-2h，4000r/min 离心 3min，洗涤，分散制成悬浮液，整个过程重复 4 次，进行层层自主装，干燥；

[0040] (3) 将步骤 2 制备的包裹的介孔硅，加入阿霉素等小分子抗癌药物 pH 1.5-4.5 的

磷酸缓冲溶液中，搅拌 10h，进行药物装载吸附，再将 pH 调至 6.5-8.0，搅拌 2h，离心洗涤干燥，即得装载小分子药物的 pH 响应性的介孔硅纳米粒子。

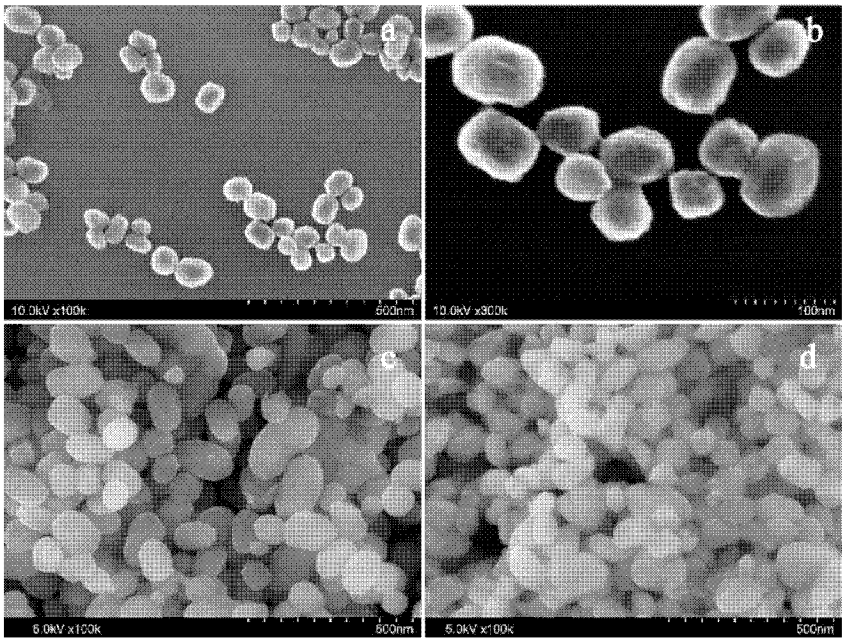

a
10.0kV x100k
500nm
b
10.0kV x300k
100nm
c
5.0kV x100k
500nm
d
5.0kV x100k
500nm

图 1

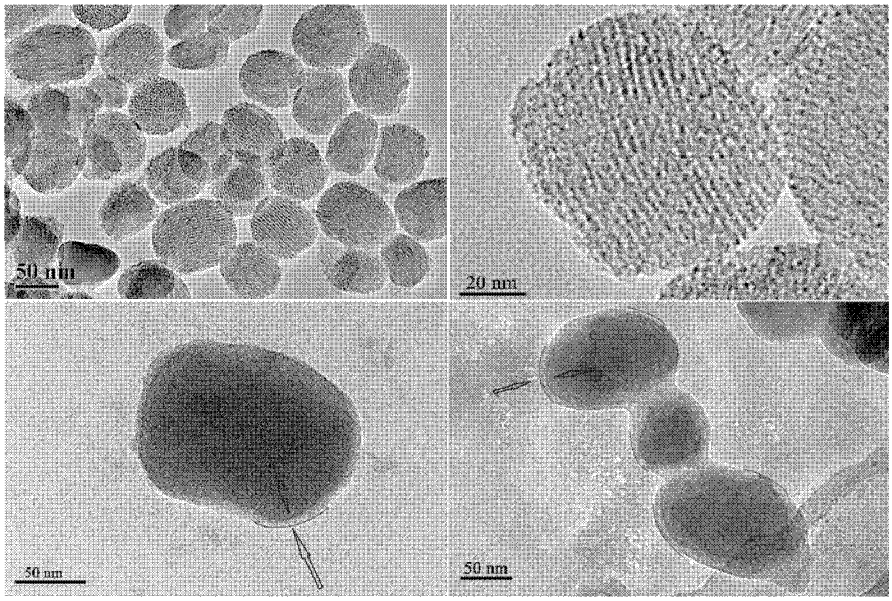

50 nm
20 nm
50 nm
50 nm

图 2

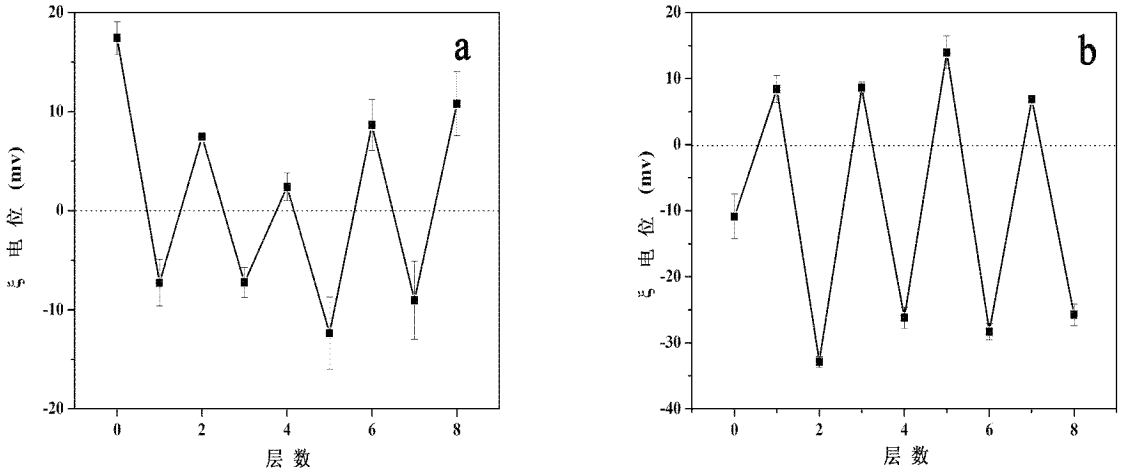


图 3

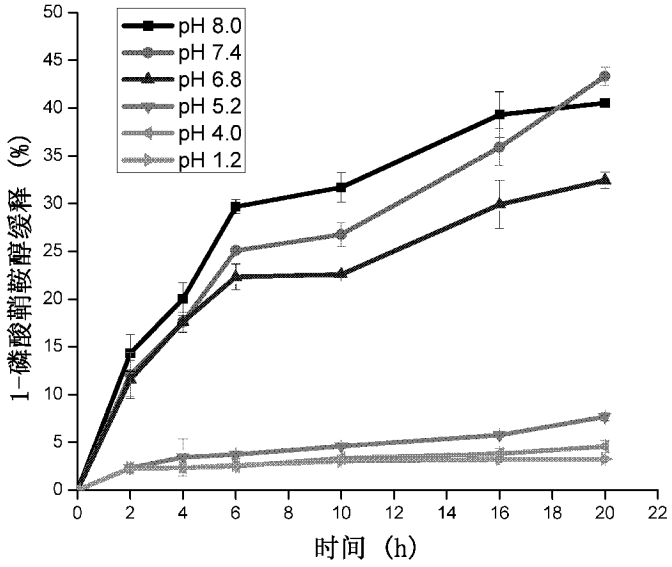


图 4

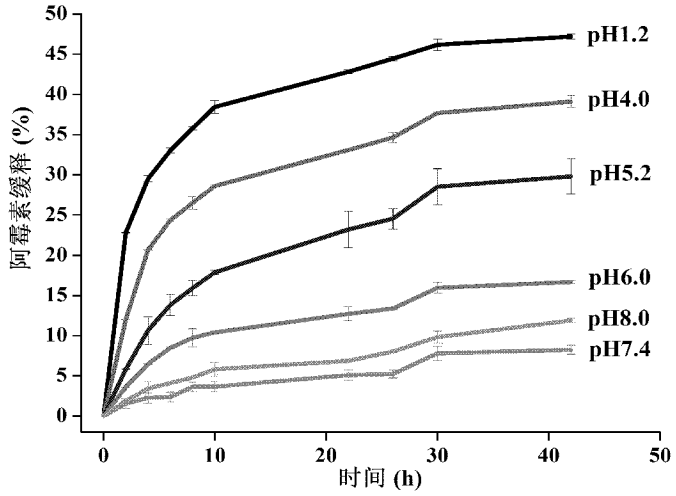

阿霉素缓释 (%)
时间 (h)
pH1.2
pH4.0
pH5.2
pH6.0
pH8.0
pH7.4
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
0
10
20
30
40
50

图 5