



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113101370 A

(43) 申请公布日 2021.07.13

(21) 申请号 202110378868.5

A61K 31/4745 (2006.01)

(22) 申请日 2021.04.08

A61P 35/00 (2006.01)

(71) 申请人 曲阜师范大学

地址 273165 山东省济宁市曲阜市静轩西路57号

(72) 发明人 刘金锋 宋绍华 武玉婷 张沛
李业军 公培伟 杨革(74) 专利代理机构 济南泉城专利商标事务所
37218

代理人 陈娟

(51) Int. Cl.

A61K 47/02 (2006.01)

A61K 47/34 (2017.01)

A61K 47/22 (2006.01)

A61K 38/44 (2006.01)

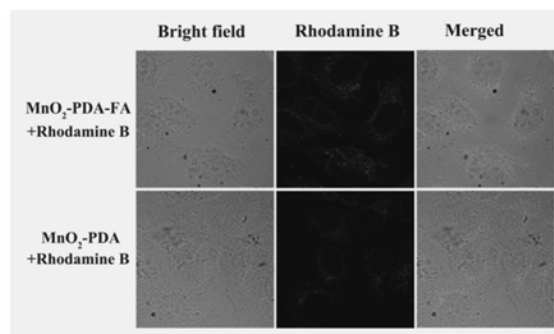
权利要求书1页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

一种二氧化锰靶向纳米药物载体及其制备方法、应用

(57) 摘要

本发明属于生化材料领域,具体涉及一种负载抗癌药物葡萄糖氧化酶和喜树碱的二氧化锰靶向纳米药物载体及其制备方法、应用。该药物载体的载体为 MnO_2 -PDA-FA,所述载体为球状结构,PDA修饰于 MnO_2 表面并且连接可以特异性识别特定癌细胞(例:HeLa细胞)的FA分子;所述纳米药物载体负载的药物为葡萄糖氧化酶和喜树碱。本发明通过结合二氧化锰、聚多巴胺和叶酸,制备得到水溶性、分散性和生物相容性优越的靶向纳米药物载体,具有低毒性、高细胞亲和性及控制释放等特点,适合运载抗癌药物,在生化材料和生物医药领域具有广泛的应用前景。



1. 一种二氧化锰靶向纳米药物载体,其特征在于,所述药物载体的载体为 MnO_2 -PDA-FA,所述载体为球状结构,PDA修饰于 MnO_2 表面,再通过酰胺键连接PDA和FA;所述纳米药物载体负载的药物为葡萄糖氧化酶和喜树碱。

2. 根据权利要求1所述的二氧化锰靶向纳米药物载体,其特征在于,所述 MnO_2 -PDA-FA的制备方法如下:

(1) 将盐酸溶液和 KMnO_4 粉末分散于超纯水中,搅拌后倒入反应釜进行反应;

(2) 将反应液离心除去上清,用超纯水重悬沉淀,离心除去上清,用无水乙醇重悬沉淀,离心除去上清;沉淀用少量超纯水重悬,烘干得到纳米 MnO_2 ;

(3) MnO_2 溶于超纯水中,超声处理至完全溶解;将 MnO_2 悬浮液中加入定量的DA,搅拌混匀后,浓度为10%的浓氨水调节pH,避光搅拌得 MnO_2 -PDA;在反应液中加入定量的FA,继续避光搅拌;

(4) 将反应液装在透析袋中,用超纯水进行透析以除去未连接的前体分子;沉淀用少量超纯水重悬,冷冻干燥得到 MnO_2 -PDA-FA。

3. 根据权利要求2所述的二氧化锰靶向纳米药物载体,其特征在于,步骤(1)中,所述盐酸溶液和 KMnO_4 粉末的液料比为1mL:0.45g;所述盐酸溶液和超纯水的体积比为1:40;所述搅拌时间为15-25min;所述反应为在70℃温度下反应0.5-2 h。

4. 根据权利要求2或3所述的二氧化锰纳米药物载体,其特征在于,步骤(2)中,所述离心为在8000 r/min转速下,离心8 min;所述烘干为恒温60℃,烘干时间为10 h;所述纳米 MnO_2 的平均粒径为100-500 nm。

5. 根据权利要求2所述的二氧化锰纳米药物载体,其特征在于,步骤(3)中,所述超声为在200W功率下超声 1 h;所述 MnO_2 和DA的质量比为10-15:1;所述 MnO_2 悬浮液的浓度为2 mg/mL;所述DA加入到反应体系中的浓度为0.2 mg/mL;所述DA分子量大小为800-1000 D;所述FA加入到反应体系中的浓度为0.2 mg/mL;所述FA分子量大小为600-800 D;所述pH值为8.5;所述避光搅拌的时间分别为24 h和12 h。

6. 根据权利要求2或5所述的二氧化锰纳米药物载体,其特征在于,步骤(4)中,所述透析所使用的透析袋的规格为8-14 kD;所述透析的过程中,每3个小时换一次水,3天后,将透析袋内的反应液进行离心除去上清,用超纯水重悬并离心洗涤,重复3次。

7. 一种如权利要求1-6任一项所述的二氧化锰靶向纳米药物载体负载药物的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

a. 将一定量的 MnO_2 -PDA-FA分散于超纯水中,加入一定量的GOX,在37℃下避光搅拌反应,得到 MnO_2 -PDA-FA+GOX;

b. 在 MnO_2 -PDA-FA+GOX溶液中加入一定量的CPT,在室温下避光搅拌反应,得 MnO_2 -PDA-FA+GOX+CPT。

8. 根据权利要求7所述的制备方法,其特征在于,步骤(a)中,所述 MnO_2 -PDA-FA溶液的浓度为1 mg/mL;所述 MnO_2 -PDA-FA同GOX的质量比为100:0.8-1;所述反应的时间为24 h。

9. 根据权利要求7或8所述的制备方法,其特征在于,步骤(b)中,所述 MnO_2 -PDA-FA同CPT的质量比为20:1-4;所述反应的时间为24 h。

10. 一种如权利要求1-6任一项所述的二氧化锰靶向纳米药物载体的应用,其特征在于:该药物载体可用于生物医药领域,负载抗癌药物。

一种二氧化锰靶向纳米药物载体及其制备方法、应用

技术领域

[0001] 本发明属于生化材料领域,具体涉及一种负载葡萄糖氧化酶和喜树碱的二氧化锰靶向纳米药物载体及其制备方法、应用。

背景技术

[0002] 目前,癌症成为危害人类生命的重要威胁。药物治疗是治疗癌症的重要手段,但是传统化疗存在药物稳定性差、生物利用率低、靶向性差和毒副作用大等缺点,治疗效果不太理想。如果将抗癌药物与运载药物的特殊载体相联而制成前药,抗癌药物可到达病灶,则可以显著提高抗癌效果。基于纳米材料的药物载体由于具有较高的生物相容性、靶向性以及控制释放等优点,在生物医学领域有广泛的应用前景。

[0003] 二氧化锰[manganese dioxide, (MnO_2)]为球状,其表面积大,载药能力强,通过设计可以控制 MnO_2 的表面积,进一步通过 π - π 共轭和范德华力对许多药物表现出很强的吸附。 MnO_2 合成简便,结构和化学控制良好,其尺寸和表面易于控制。此外,二氧化锰具有良好的生物相容性,易于表面功能化,毒性低。二氧化锰还具有肿瘤微环境中可响应性降解的特性, $\text{H}^+/\text{H}_2\text{O}_2$ 和GSH均可诱导 MnO_2 分解成 Mn^{2+} , Mn^{2+} 可随代谢排出。

[0004] 多巴胺[dopamine, (DA)]是水溶性好、功能作用大、生物活性高的低分子量产品,具有优良特性,如分散性、亲水性、与聚合物的兼容性等。多巴胺是一种儿茶酚胺,在神经系统中起重要的神经递质作用,在控制大脑的奖励和快乐中心方面起着关键作用。多巴胺具有良好的生物相容性,无显著毒性。

[0005] 叶酸[folic acid, (FA)]。由于叶酸受体在肿瘤细胞表面过表达,叶酸可通过受体介导的细胞内吞作用靶向进入肿瘤细胞,利用叶酸作为靶向配体与载体连接可以将多种药物有效载荷传递到叶酸受体阳性细胞,从而增强细胞对药物的摄取。

[0006] 目前,负载抗癌药物的纳米载体大多数具有较高载药量,但是因其水溶性和稳定性等方面存在缺点,从而影响其发展。

发明内容

[0007] 本发明的目的是针对上述存在的问题,提供一种新型的抗癌药物靶向纳米药物载体-负载葡萄糖氧化酶和喜树碱的二氧化锰纳米药物载体,具有较高的生物相容性,水溶性及较低的生物毒性,可以提高 MnO_2 的稳定性、分散性及生物相容性。

[0008] 本发明还提供了一种上述二氧化锰靶向纳米药物载体的制备方法。

[0009] 本发明还提供了二氧化锰靶向纳米药物载体的应用,具备较高的载药量或使药物具有缓释、控释的特点,具有良好的抗癌效果。

[0010] 本发明解决技术问题采用如下技术方案:

本发明提供了一种二氧化锰靶向纳米药物载体,所述药物载体的载体为 MnO_2 -PDA-FA,所述载体为球状结构,PDA修饰于 MnO_2 表面,再通过酰胺键连接PDA和FA;所述纳米药物载体负载的药物为葡萄糖氧化酶和喜树碱。

[0011] 本发明所使用的 MnO_2 -PDA-FA的制备方法如下:

(1) 将盐酸溶液和 KMnO_4 粉末分散于超纯水中, 搅拌后倒入反应釜进行反应;

(2) 将反应液离心除去上清, 用超纯水重悬沉淀, 离心除去上清, 用无水乙醇重悬沉淀, 离心除去上清; 沉淀用少量超纯水重悬, 烘干得到纳米 MnO_2 ;

(3) MnO_2 溶于超纯水中, 超声处理至完全溶解; 将 MnO_2 悬浮液中加入定量的DA, 搅拌混匀后, 浓度为10%的浓氨水调节pH, 避光搅拌得 MnO_2 -PDA; 在反应液中加入定量的FA, 继续避光搅拌;

(4) 将反应液装在透析袋中, 用超纯水进行透析以除去未连接的前体分子; 沉淀用少量超纯水重悬, 冷冻干燥得到 MnO_2 -PDA-FA。

[0012] 进一步的, 步骤(1)中, 所述盐酸溶液和 KMnO_4 粉末的液料比为1mL:0.45g; 所述盐酸溶液和超纯水的体积比为1:40; 所述搅拌时间为15-25min; 所述反应为在70℃温度下反应0.5-2 h。

[0013] 进一步的, 步骤(2)中, 所述离心为在8000 r/min转速下, 离心8 min; 所述烘干为恒温60℃, 烘干时间为10 h; 所述纳米 MnO_2 的平均粒径为100-500 nm。

[0014] 进一步的, 步骤(3)中, 所述超声为在200W功率下超声 1 h; 所述 MnO_2 和DA的质量比为10-15:1; 所述 MnO_2 悬浮液的浓度为2 mg/mL; 所述DA加入到反应体系中的浓度为0.2 mg/mL; 所述DA分子量大小为800-1000 D; 所述FA加入到反应体系中的浓度为0.2 mg/mL; 所述FA分子量大小为600-800 D; 所述pH值为8.5; 所述避光搅拌的时间分别为24 h和12 h。

[0015] 进一步的, 步骤(4)中, 所述透析所使用的透析袋的规格为8-14 kD; 所述透析的过程中, 每3个小时换一次水, 3天后, 将透析袋内的反应液进行离心除去上清, 用超纯水重悬并离心洗涤, 重复3次。

[0016] 本发明还提供了一种二氧化锰靶向纳米药物载体负载药物的制备方法, 包括以下步骤:

a. 将一定量的 MnO_2 -PDA-FA分散于超纯水中, 加入一定量的GOX, 在37℃下避光搅拌反应, 得到 MnO_2 -PDA-FA+GOX;

b. 在 MnO_2 -PDA-FA+GOX溶液中加入一定量的CPT, 在室温下避光搅拌反应, 得 MnO_2 -PDA-FA+GOX+CPT。

[0017] 进一步的, 步骤(a)中, 所述 MnO_2 -PDA-FA溶液的浓度为1 mg/mL; 所述 MnO_2 -PDA-FA同GOX的质量比为100:0.8-1; 所述反应的时间为24 h。

[0018] 进一步的, 步骤(b)中, 所述 MnO_2 -PDA-FA同CPT的质量比为20:1-4; 所述反应的时间为24 h。

[0019] 本发明还提供了一种上述二氧化锰靶向纳米药物载体的应用, 该药物载体可用于生物医药领域, 负载抗癌药物。

[0020] 本发明首先利用高锰酸钾和浓盐酸发生氧化还原反应生成二氧化锰, 然后利用多巴胺在碱性条件下能够发生氧化自聚合的特性在二氧化锰表面包裹聚多巴胺层, 再利用麦克·加成反应在聚多巴胺表面连接叶酸分子, 从而对二氧化锰进行改性得到对特定癌细胞具有靶向作用的高分散性材料, 然后利用该复合材料通过 π - π 作用和范德华力实现与葡萄糖氧化酶和喜树碱的物理吸附。该药物载体可用于生物医药领域, 负载抗癌药物并将其运送至特定病灶, 提高治疗效果, 具有良好水溶性、生物相容性、较高的载药量、较低的生物毒

性以及控制释放的特点,可降低药物对人体正常细胞的毒副作用

本发明提供一种新型的靶向抗癌药物纳米载体负载GOX和CPT。 MnO_2 易合成,尺寸可控;具有良好的生物相容性,易于表面改性;在肿瘤微环境中发生响应性释放,对GSH或 $\text{H}^+/\text{H}_2\text{O}_2$ 灵敏响应。DA在pH为8.5的碱性环境中可以发生氧化自聚合生成PDA包裹层,具有良好的生物相容性,对 MnO_2 修饰后降低 MnO_2 的毒性。FA受体在肿瘤细胞过表达,利用FA与其受体的特异性结合,可实现靶向肿瘤效应。因此 MnO_2 -PDA-FA+GOX+CPT表现出响应药物释放,可以在肿瘤部位释放大药量药物,减轻对正常细胞的损伤。

[0021] 本发明的有益效果为:

本发明通过联合二氧化锰、聚多巴胺和叶酸各自优点的基础上,制备得到水溶性、分散性和生物相容性优越的靶向纳米药物载体,具有较高的载药量和较低的生物毒性、细胞的亲和性及控制释放等特点,非常适合运载抗癌药物,在生物医药领域具有广泛的应用前景。

附图说明

[0022] 图1是本发明二氧化锰靶向纳米药物载体在超纯水中的分散液照片。

[0023] 图2是本发明二氧化锰靶向纳米药物载体傅里叶变换红外光谱图(FTIR)。

[0024] 图3 是本发明二氧化锰靶向纳米药物载体负载不同浓度抗癌药物对细胞存活率的影响(MTT)

图4是本发明二氧化锰靶向纳米药物载体连接荧光素Rhodamine B 在处理细胞1 h、2 h和4 h后的荧光强度(FCM)。

[0025] 图5是本发明二氧化锰靶向纳米药物载体和二氧化锰靶向纳米药物载体分别连接荧光素Rhodamine B处理细胞4 h后的细胞成像(CLSM)。

具体实施方式

[0026] 下面结合具体实施例对本发明作进一步说明,但本发明并不限于以下实施例。

[0027] 实施例1

一种二氧化锰靶向纳米药物载体的制备方法,步骤包括:

(1) 二氧化锰(MnO_2)的制备:

1) 取0.45 g KMnO_4 和1 mL浓HCl溶于超纯水中,在200 W的功率下超声5 min,然后搅拌20 min。

[0028] 2) 搅拌后的溶液倒入反应釜,在70℃恒温反应箱中反应0.5 h。

[0029] 3) 待冷却到室温后,离心除去上清。用超纯水重悬沉淀,离心洗涤,重复3次。用无水乙醇重悬沉淀,离心洗涤,重复3次。

[0030] 4) 将获得的沉淀用适量超纯水重悬,放入烘箱,设定恒温60℃,定时10 h。获得二氧化锰。

[0031] (2) 二氧化锰靶向纳米药物载体(MnO_2 -PDA-FA)的制备:

1) 取30 mg MnO_2 ,溶于15 mL超纯水中,采用200W的功率超声30 min,直至完全溶解。

[0032] 2) 超声完的溶液中加入3 mg DA,搅拌待 MnO_2 和DA混匀后,用浓氨水将pH调至8.5。

避光搅拌24 h后,加入3 mg FA后继续搅拌12 h。

[0033] 3) 用超纯水将反应液进行透析。3天后,将反应液离心,除去上清,重复3次。

[0034] 4) 将反应物用超纯水重悬,置于-80℃冰箱过夜。真空冷冻干燥得到 MnO_2 -PDA-FA。

[0035] (3) 二氧化锰靶向纳米药物载体负载葡萄糖氧化酶和喜树碱(MnO_2 -PDA-FA+GOX+CPT):

1) 将10 mg MnO_2 -PDA-FA超声分散于 10 mL超纯水中。

[0036] 2) 向 MnO_2 -PDA-FA溶液中加入16 μg GOX,在37℃恒温磁力搅拌器上避光搅拌反应24 h,实现GOX和 MnO_2 -PDA-FA的物理吸附,合成 MnO_2 -PDA-FA+GOX。

[0037] 3) 在 MnO_2 -PDA-FA+GOX溶液中加入240 mg CPT,在室温下避光搅拌反应24 h,实现CPT和 MnO_2 -PDA-FA+GOX的物理吸附,合成 MnO_2 -PDA-FA+GOX+CPT。

[0038] 图1是二氧化锰靶向纳米药物载体在超纯水中的分散液照片,从图1中可以看出所制备得到的新型靶向纳米药物载体呈高度分散状态。图2是二氧化锰靶向纳米药物载体的傅里叶变换红外光谱图(FTIR),说明 MnO_2 的合成,DA对 MnO_2 的包裹以及FA的有效连接。图3是二氧化锰靶向纳米药物载体负载不同浓度抗癌药物对细胞存活率的影响。图4是二氧化锰靶向纳米药物载体连接荧光素Rhodamine B 在处理细胞1 h、2 h和4 h后的荧光强度(FCM),可以证明随时间的延长,更多的载体携带荧光素进入了细胞并释放,证明了该新型纳米药物载体具有良好的药物负载能力和控制释放能力。

[0039] 本实施例1制得二氧化锰靶向纳米药物载体呈球状结构,直径在100-300 nm,且具有较好的分散性,纳米药物载体持续释放药物可达72 h,具有良好的缓释性能。如图1,经MTT细胞毒性实验证明,细胞存活率为15%以上,具有良好的抗肿瘤效果。

[0040] 实施例2

一种二氧化锰靶向纳米药物载体的制备方法,步骤包括:

二氧化锰(MnO_2)的制备:

(1) 二氧化锰(MnO_2)的制备:

1) 取0.45 g KMnO_4 和1mL浓HCL溶于超纯水中,在200W的功率下超声5 min,搅拌20 min

2) 将搅拌后的溶液倒入反应釜,在70℃恒温反应箱中反应1 h。

[0041] 3) 待冷却到室温后,将得到的反应液置于离心机,离心除去上清。加入超纯水重悬沉淀,离心洗涤,重复3次。加入无水乙醇重悬沉淀,离心洗涤,重复3次。

[0042] 4) 将获得的沉淀用超纯水重悬,放入烘箱,设定恒温65℃,定时12 h。获得二氧化锰。

[0043] (2) 二氧化锰靶向纳米药物载体(MnO_2 -PDA-FA)的制备:

1) 30 mg MnO_2 溶于15 ml超纯水,采用200W的功率超声直至完全溶解。

[0044] 2) 超声完的溶液加入2 mg DA,搅拌待 MnO_2 和DA完全混匀后,用浓氨水将PH调至8.5。避光搅拌24 h后,加入2 mg FA,继续搅拌12 h。

[0045] 3) 将反应液用超纯水透析3天,然后离心除去上清。用超纯水重悬沉淀,离心除去上清,重复3次。

[0046] 4) 将反应物用超纯水重悬,置于-80℃冰箱过夜。真空冷冻干燥得到 MnO_2 -PDA-FA粉末。

[0047] (3) 二氧化锰靶向纳米药物载体负载葡萄糖氧化酶和喜树碱 (MnO_2 -PDA-FA+GOX+CPT):

1) 将10 mg MnO_2 -PDA-FA超声分散于10 ml超纯水中。

[0048] 2) 向 MnO_2 -PDA-FA溶液中加入16 μg GOX, 在37℃避光搅拌反应24 h, 实现GOX和 MnO_2 -PDA-FA的物理吸附, 合成 MnO_2 -PDA-FA+GOX。

[0049] 3) 在 MnO_2 -PDA-FA+GOX溶液中加入240 mg CPT, 室温避光搅拌反应24 h, 实现CPT和 MnO_2 -PDA-FA+GOX的物理吸附, 合成 MnO_2 -PDA-FA+GOX+CPT。

[0050] 本实施例2制得二氧化锰靶向纳米药物载体呈球状结构, 直径较200-500 nm, 且具有较好的分散性, 纳米药物载体持续释放药物可达72 h, 具有良好的缓释性能。经MTT细胞毒性实验证明, 细胞存活率为30%以上, 细胞毒性良好, 生物相容性较好。

[0051] 实施例3

一种二氧化锰靶向纳米药物载体的制备方法, 步骤包括:

(1) 二氧化锰 (MnO_2) 的制备:

1) 取0.45g KMnO_4 和1mL浓HCl溶于超纯水中, 超声后搅拌20 min。

[0052] 2) 将搅拌后的溶液倒入反应釜, 在70℃恒温反应箱中反应1 h。

[0053] 3) 待冷却到室温后, 将得到的反应液置于离心机, 除去上清。加入超纯水重悬沉淀, 离心洗涤, 重复3次。加入无水乙醇重悬沉淀, 离心洗涤, 重复3次。

[0054] 4) 将获得的沉淀用超纯水重悬, 放入烘箱, 设定恒温60℃, 定时10 h。获得二氧化锰。

[0055] (2) 二氧化锰靶向纳米药物载体 (MnO_2 -PDA-FA) 的制备:

1) 30 mg MnO_2 溶于15 mL超纯水, 采用200W的功率超声30min, 直至完全溶解。

[0056] 2) 超声完的溶液中加入3 mg DA, 搅拌待 MnO_2 和DA混匀后, 用浓氨水将PH调至8.5。避光搅拌24 h后, 加入3 mg FA继续搅拌12 h。

[0057] 3) 将反应液透析3天, 然后离心除去上清。用超纯水重悬沉淀, 离心除去上清, 重复3次。

[0058] 4) 将反应物用超纯水重悬, 置于-80℃冰箱过夜。真空冷冻干燥得到 MnO_2 -PDA-FA。

[0059] (3) 二氧化锰靶向纳米药物载体负载葡萄糖氧化酶和喜树碱 (MnO_2 -PDA-FA+GOX+CPT):

1) 将10 mg MnO_2 -PDA-FA超声分散于 10 mL超纯水中。

[0060] 2) 向 MnO_2 -PDA-FA溶液中加入20 μg GOX, 在37℃恒温磁力搅拌器上避光搅拌反应24 h, 实现GOX和 MnO_2 -PDA-FA的物理吸附, 合成 MnO_2 -PDA-FA+GOX。

[0061] 3) 在 MnO_2 -PDA-FA+GOX溶液中加入260 mg CPT, 在室温下避光搅拌反应24 h, 实现CPT和 MnO_2 -PDA-FA+GOX的物理吸附, 合成 MnO_2 -PDA-FA+GOX+CPT。

[0062] 本实施例3制得二氧化锰靶向纳米药物载体呈球状结构, 直径200 nm, 且具有较好的分散性, 持续释放药物可达72 h, 具有良好的缓释性能。经MTT细胞毒性实验证明, 细胞存活率为8 %以上, 细胞毒性良好, 具有良好的肿瘤细胞增殖抑制能力。

[0063] 对比例1

与实施3不同之处在于不加入多巴胺, 只加二氧化锰和叶酸, 一种 MnO_2 靶向纳米药物载体的制备, 包括以下步骤:

(1) 二氧化锰 (MnO_2) 的制备:

1) 取 0.45g KMnO_4 和 1mL 浓 HCl 溶于超纯水中, 超声 5 min 后搅拌 20 min。

[0064] 2) 将搅拌后的溶液倒入反应釜, 在 70°C 恒温反应箱中反应 1 h。

[0065] 3) 待冷却到室温后, 将得到的反应液离心除去上清。加入超纯水重悬沉淀, 离心洗涤, 重复 3 次。加入无水乙醇重悬沉淀, 离心洗涤, 重复 3 次。

[0066] 4) 将获得的沉淀用超纯水重悬, 放入烘箱, 设定恒温 60°C , 定时 10 h。获得二氧化锰。

[0067] (2) 二氧化锰靶向纳米药物载体 (MnO_2 -FA) 的制备:

1) 30 mg MnO_2 溶于 15 mL 超纯水, 采用 200W 的功率超声直至完全溶解。

[0068] 2) 超声完的溶液中加入 3 mg FA, 搅拌待 MnO_2 和 FA 混匀后, 用浓氨水将 PH 调至 8.5, 避光搅拌 12 h。

[0069] 3) 将反应液透析 3 天, 然后离心除去上清。用超纯水重悬沉淀, 离心除去上清, 重复 3 次。

[0070] 4) 将反应物用超纯水重悬, 置于 -80°C 冰箱过夜。真空冷冻干燥得到 MnO_2 -FA。

[0071] (3) 二氧化锰负载葡萄糖氧化酶和喜树碱 (MnO_2 -FA+GOX+CPT):

1) 将 10 mg MnO_2 -FA 超声分散于 10 mL 超纯水中。

[0072] 2) 向 MnO_2 -FA 溶液中加入 16 μg GOX, 在 37°C 避光搅拌反应 24 h, 实现 GOX 和 MnO_2 -FA 的物理吸附, 合成 MnO_2 -FA +GOX。

[0073] 3) 在 MnO_2 -FA+GOX 溶液中加入 240 mg CPT, 在室温下避光搅拌反应 24 h, 实现 CPT 和 MnO_2 -FA+GOX 的物理吸附, 合成 MnO_2 -FA+GOX+CPT。

[0074] 对比例 1 得到的 MnO_2 -PDA 复合纳米药物载体, 经透射电镜发现, 该复合载体呈圆球形, 其粒径在 100-300 nm, 分布较均匀, 放置 30 天左右, 该复合载体出现沉淀。

[0075] 对比例 2

与实施 1 不同之处在于只加入多巴胺和叶酸, 不加二氧化锰, 一种多巴胺靶向纳米药物载体的制备, 包括以下步骤:

(1) 聚多巴胺靶向纳米药物载体的制备:

1) 取 10 mg DA 溶于 10 mL 超纯水中, 用浓氨水将 PH 调至 8.5, 避光搅拌 24 h。

[0076] 2) 将反应液中加入 2 mg FA, 继续避光搅拌 12 h。

[0077] 3) 将反应液透析 3 天, 离心除去上清。用超纯水重悬沉淀, 离心洗涤, 重复 3 次。

[0078] 3) 将反应物用超纯水重悬, 置于 -80°C 冰箱过夜。真空冷冻干燥得到 PDA-FA 粉末。

[0079] (2) 聚多巴胺靶向纳米药物载体负载葡萄糖氧化酶和喜树碱 (PDA-FA+CPT+GOX):

1) 将 10 mg PDA-FA 超声分散于 10 mL 超纯水中。

[0080] 2) 向 PDA-FA 溶液中加入 16 μg GOX, 在 37°C 避光搅拌反应 24 h, 实现 GOX 和 PDA 的物理吸附, 合成 PDA-FA+GOX。

[0081] 3) 在 PDA-FA+GOX 溶液中加入 240 mg CPT, 在室温下避光搅拌反应 24 h, 实现 CPT 和 PDA-FA+GOX 的物理吸附, 合成 PDA-FA+GOX+CPT。

[0082] 对比例 2 所得到的多巴胺纳米药物载体经透射电镜发现, 该载体呈球状结构, 其直径在 100-400 nm。MTT 实验结果证明, 存活率在 70% 以上, 细胞存活率较高。这是因为 MnO_2 在细胞内的降解有利于缓解癌细胞内的缺氧, 促进 GOX 更有效的消耗葡萄糖以达到更好的抗

癌效果。聚多巴胺靶向纳米药物载体不具备为饥饿疗法提供氧气,因此细胞毒性减弱。

[0083] 利用实施例1所获得的 MnO_2 -PDA-FA复合纳米药物载体、对比例1: MnO_2 -FA复合纳米药物载体、对比例2:PDA-FA及喜树碱和葡萄糖氧化酶进行体外细胞毒性实验。结果显示实施例1所获得的二氧化锰复合纳米药物载体的抑制率最高,葡萄糖氧化酶和喜树碱的载药量比较高,对细胞的毒性比较大。在研究二氧化锰复合纳米药物载体释放行为时,在酸性条件和高GSH水平下GOX和CPT释放率远高于中性条件。因此 MnO_2 -PDA-FA+GOX+CPT表现出 H^+ /GSH响应药物释放,同时本发明具有较高的载药量和包封率,以及较好的生物相容性和稳定性。

[0084] 对比例3

与实施例1不同之处在于只加入二氧化锰和多巴胺,不加入叶酸,一种二氧化锰纳米药物载体的制备,包括以下步骤:

(1) 二氧化锰(MnO_2)的制备:

1) 取0.45g KMnO_4 和1mL浓HCl溶于超纯水中,超声后搅拌20 min。

[0085] 2) 将搅拌后的溶液倒入反应釜,在70℃恒温反应箱中反应1 h。

[0086] 3) 待冷却到室温后,将得到的反应液置于离心机,除去上清。加入超纯水重悬沉淀,离心洗涤,重复3次。加入无水乙醇重悬沉淀,离心洗涤,重复3次。

[0087] 4) 将获得的沉淀用超纯水重悬,放入烘箱,设定恒温60℃,定时10 h。获得二氧化锰。

[0088] (2) 二氧化锰靶向纳米药物载体(MnO_2 -PDA)的制备:

1) 30 mg MnO_2 溶于15 mL超纯水,采用200W的功率超声直至完全溶解。

[0089] 2) 超声完的溶液中加入3 mg DA,搅拌待 MnO_2 和DA混匀后,用浓氨水将PH调至8.5。避光搅拌24 h。

[0090] 3) 将反应液离心除去上清。用超纯水重悬沉淀,离心除去上清,重复3次。

[0091] 4) 将反应物用超纯水重悬,置于-80℃冰箱过夜。真空冷冻干燥得到 MnO_2 -PDA。

[0092] (3) 二氧化锰纳米药物载体负载葡萄糖氧化酶和喜树碱(MnO_2 -PDA+GOX+CPT):

1) 将10 mg MnO_2 -PDA超声分散于10 mL超纯水中。

[0093] 2) 向 MnO_2 -PDA溶液中加入16 μg GOX,在37℃避光搅拌反应24 h,实现GOX和 MnO_2 -PDA的物理吸附,合成 MnO_2 -PDA+GOX。

[0094] 3) 在 MnO_2 -PDA+GOX溶液中加入240 mg CPT,在室温下避光搅拌反应24 h,实现CPT和 MnO_2 -PDA+GOX的物理吸附,合成 MnO_2 -PDA+GOX+CPT。

[0095] 图5是二氧化锰靶向纳米药物载体和二氧化锰靶向纳米药物载体分别连接荧光素Rhodamine B处理细胞4 h后的细胞成像(CLSM)。

[0096] 对比例3得到的二氧化锰纳米药物载体经透射电镜发现,该载体呈球状结构,其直径在100-400 nm,形态较规整。细胞靶向摄取和细胞内药物释放实验证明,未连接靶向分子的纳米药物载体 MnO_2 -PDA连接Rhodamine B在HeLa内的荧光强度比连接靶向分子的纳米药物载体 MnO_2 -PDA-FA连接Rhodamine B在HeLa内的荧光强度低,从侧面表明了FA对HeLa细胞的选择性和靶向性。HeLa细胞对该新型靶向纳米药物载体具有高度摄取率和控制释放的能力。



图1

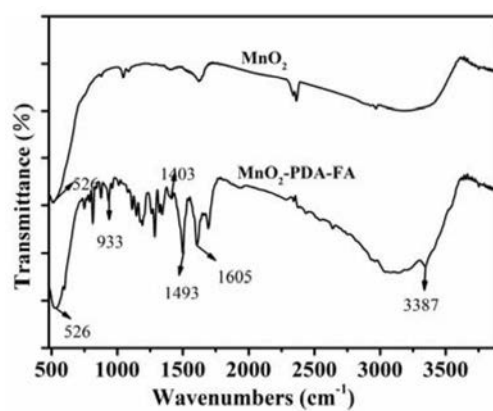


图2

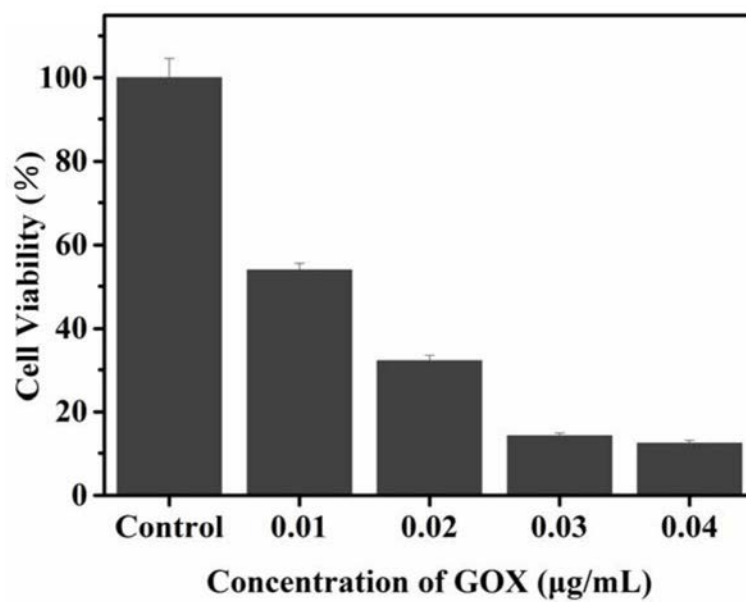


图3

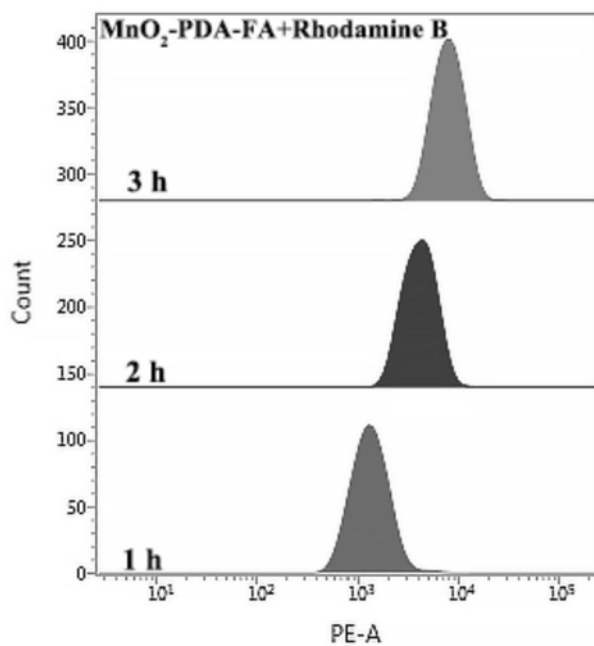


图4

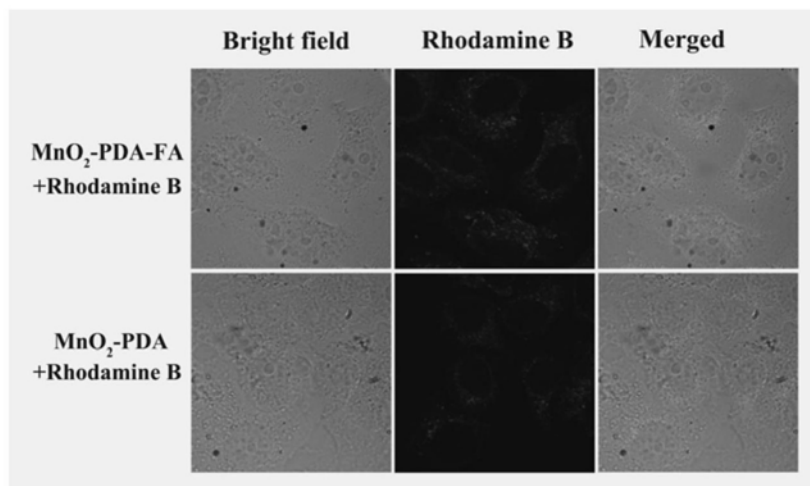


图5