



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108619528 A

(43)申请公布日 2018. 10. 09

(21)申请号 201810535739.0

(22)申请日 2018.05.29

(71)申请人 温州生物材料与工程研究所

地址 325000 浙江省温州市龙湾区高新技术产业园区新三路16号高新大厦

(72)发明人 钱宇娜 沈建良

(74)专利代理机构 浙江纳祺律师事务所 33257

代理人 陈钢

(51)Int. Cl.

A61K 47/69(2017.01)

A61K 31/704(2006.01)

A61K 31/7088(2006.01)

A61K 47/61(2017.01)

A61P 35/00(2006.01)

B82Y 5/00(2011.01)

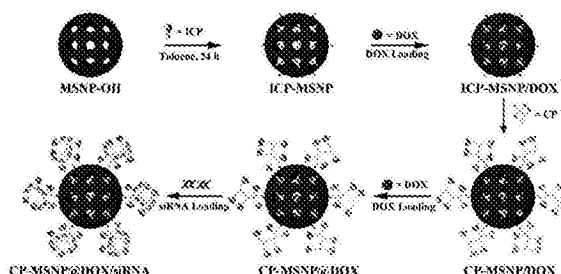
权利要求书1页 说明书3页 附图4页

(54)发明名称

一种环糊精-介孔硅多功能纳米载药颗粒

(57)摘要

本发明公开了一种环糊精-介孔硅多功能纳米载药颗粒和其制备方法,使用异氰酸丙基三乙氧基硅烷修饰介孔硅纳米颗粒;装载化疗药物阿霉素盐酸盐得到ICP-MSN/DOX纳米颗粒,在纳米颗粒表面修饰环糊精接枝的聚阳离子(CP),环糊精表面再次装载阿霉素盐酸盐,并利用聚阳离子的表面正电荷吸附带负电荷的siRNA,获得阿霉素/小干扰RNA共载药纳米颗粒,其可以保护siRNA以免受到核酸酶、血清等的降解,并在肿瘤环境中选择性释放,并在细胞水平上高效促进药物的细胞摄取。



1. 一种环糊精-介孔硅多功能纳米载药颗粒,其特征在于:由包括以下步骤的方法制备得到:

1) 将介孔二氧化硅加入异氰酸丙基三乙氧基硅烷溶液中,加热反应,分离,得到修饰后的介孔二氧化硅纳米颗粒;

2) 将阿霉素盐酸盐负载到步骤1)中修饰后的介孔二氧化硅的内孔道里;

3) 将步骤2)中所得到的产物加和环糊精混合,再次充分反应后,固液分离、洗涤并烘干,得到修饰环糊精接枝的聚阳离子后的介孔二氧化硅载药颗粒;

4) 将步骤3)中所得到的产物依次加入阿霉素盐酸盐溶液和siRNA水溶液中,分离,阿霉素盐酸盐和siRNA共同负载到步骤3)中修饰后的介孔二氧化硅的环糊精表面。

2. 根据权利要求1所述的一种环糊精-介孔硅多功能纳米载药颗粒,其特征在于:步骤1)所用异氰酸丙基三乙氧基硅烷和介孔二氧化硅中硅元素的摩尔比为1:1~5:1。

3. 根据权利要求3所述的一种环糊精-介孔硅多功能纳米载药颗粒,其特征在于:步骤4)所用siRNA与二硫键修饰的介孔二氧化硅中硅元素的摩尔比为1:3~1:1。

4. 根据权利要求1所述的一种环糊精-介孔硅多功能纳米载药颗粒,其特征在于:所述阿霉素水溶液的浓度为0.8~1g/L。

5. 根据权利要求4所述的一种环糊精-介孔硅多功能纳米载药颗粒,其特征在于:所述的异氰酸丙基三乙氧基硅烷的浓度为1.5~1.8Mol/L。

6. 根据权利要求5所述的一种环糊精-介孔硅多功能纳米载药颗粒,其特征在于:所述的加热反应均在80~85℃下反应12~24h。

7. 根据权利要求1~6任一项所述的环糊精-介孔硅多功能纳米载药颗粒在制备抗癌药物中的应用。

一种环糊精-介孔硅多功能纳米载药颗粒

技术领域

[0001] 本发明涉及药物载体领域,更具体的说是涉及一种环糊精-介孔硅多功能纳米载药颗粒。

背景技术

[0002] siRNA (small interfering RNA, siRNA) 为RNA干扰 (RNA interfering, RNAi) 的效应分子。通过特殊设计的siRNA可以靶向沉默特定的信使RNA (message RNA, mRNA), 引起相关蛋白降解从而抑制细胞的增殖和肿瘤生长。因此, siRNA在治疗包括肿瘤在内的人类疾病中具有广阔的应用潜能。但同时, 双链siRNA的应用也存在一些问题, 包括易被酶降解导致药代动力学差、表面负电荷不利于细胞摄取、缺乏细胞靶向性导致副作用大等。因此, 为了实现RNA干扰的临床应用, 有必要开发特定组织靶向, 低毒高效的siRNA运输载体。

发明内容

[0003] 针对现有技术存在的不足, 本发明的目的在于提供一种环糊精-介孔硅多功能纳米载药颗粒。

[0004] 为实现上述目的, 本发明提供了如下技术方案: 一种环糊精-介孔硅多功能纳米载药颗粒, 由包括以下步骤的方法制备得到:

[0005] 1) 将介孔二氧化硅加入异氰酸丙基三乙氧基硅烷溶液中, 加热反应, 分离, 得到修饰后的介孔二氧化硅纳米颗粒;

[0006] 2) 将阿霉素盐酸盐负载到步骤1) 中修饰后的介孔二氧化硅的内孔道里;

[0007] 3) 将步骤2) 中所得产物加和环糊精混合, 再次充分反应后, 固液分离、洗涤并烘干, 得到修饰环糊精接枝的聚阳离子后的介孔二氧化硅载药颗粒;

[0008] 4) 将步骤3) 中所得到的产物依次加入阿霉素盐酸盐溶液和siRNA水溶液中, 分离, 阿霉素盐酸盐和siRNA共同负载到步骤3) 中修饰后的介孔二氧化硅的环糊精表面。

[0009] 具体地, 步骤1) 所用异氰酸丙基三乙氧基硅烷和介孔二氧化硅中硅元素的摩尔比为1:1~5:1。

[0010] 具体地, 步骤4) 所用siRNA与二硫键修饰的介孔二氧化硅中硅元素的摩尔比为1:3~1:1。

[0011] 具体地, 所述阿霉素水溶液的浓度为0.8~1g/L。

[0012] 具体地, 所述的异氰酸丙基三乙氧基硅烷的浓度为1.5~1.8mol/L。

[0013] 具体地, 所述的加热反应均在80~85℃下反应12~24h。

[0014] 鉴于现有技术的不足, 本发明通过异氰酸丙基三乙氧基硅烷修饰装载在介孔二氧化硅的内孔道里, 阿霉素盐酸盐负载在异氰酸丙基三乙氧基硅烷上容纳于介孔二氧化硅的内孔道里, 在纳米颗粒表面修饰环糊精接枝的聚阳离子后, 阿霉素盐酸盐负载再次装载在介孔二氧化硅表面的环糊精表面上, 并利用聚阳离子的表面正电荷吸附带负电荷的siRNA, 这一方面提高了单位质量份的介孔二氧化硅纳米颗粒的载药量, 另一方面提高了siRNA的

稳定性和阿霉素盐酸盐的生物相容性,让其可进入细胞内充分发挥作用;本发明提供的纳米载药颗粒可以在酸性环境下选择性释放,释放环境高效靶向,能够在肿瘤环境中释放,提高其抗肿瘤效果。因此,本发明所得靶向纳米颗粒可用于制成肿瘤治疗的靶向药物。

[0015] 本发明的有益效果为:

[0016] 1) 本发明公开的纳米载药颗粒可以保护siRNA以免受到核酸酶、血清等的降解。

[0017] 2) 本发明公开的纳米载药颗粒可以在酸性环境下选择性释放siRNA和阿霉素。纳米载药颗粒可以使得药物在肿瘤环境中选择性释放,避免对正常组织的伤害。

[0018] 3) 本发明公开的纳米载药颗粒可以在细胞水平上高效促进药物的细胞摄取。

[0019] 4) 体内水平上,纳米载药颗粒能通过被动靶向到达目标病发部位。纳米载体可以通过高通透性和滞留效应在肿瘤部位有效富集。

附图说明

[0020] 图1为本发明介孔二氧化硅的TEM图;

[0021] 图2为本发明制备的共载药纳米颗粒溶解于模拟血液环境中不同时间后siRNA的电泳图;

[0022] 图3为本发明制备的共载药纳米颗粒在不同PH值下siRNA和阿霉素的选择性释放值;

[0023] 图4为MDA-MB-231人乳腺癌细胞在随时间增长对本发明制备的共载药纳米颗粒的摄取率;

[0024] 图5为给药肿瘤小鼠模型后其血管造影;

[0025] 图6为本发明共载药纳米颗粒的制备过程演示图。

具体实施方式

[0026] 下面将结合附图所给出的实施例对本发明做进一步的详述。

[0027] 本发明所用原料的纯度只要达到化学纯以上即可,来源均可从市场购得。

[0028] 实施例1:一种环糊精-介孔硅多功能纳米载药颗粒的制备

[0029] 介孔二氧化硅的制备:将1000mg的十六烷基三甲基溴化铵溶解在500ml蒸馏水里,然后加入3.5mL NaOH水溶液(2mol/L),混合溶液在剧烈搅拌下加热到80℃。当温度稳定后,将4mL正硅酸乙酯缓慢加入混合溶液。静置2h后,纳米粒子通过12000转离心5min收集,用乙醇和蒸馏水洗涤三遍。将收集的纳米粒子重新悬浮在150ml乙醇含8mL浓缩盐酸(37%)中,在80℃下回流24h,通过12000转离心5min收集,用乙醇和蒸馏水洗涤三遍,纳米粒子50℃下真空干燥过夜。其形貌通过TEANAI-10型透射电子显微镜(TEM)观察,如图1所示。其粒径在50nm左右。

[0030] 所得介孔二氧化硅分散在无水乙醇中,加入1.5mol/L异氰酸丙基三乙氧基硅烷溶液,于85℃下,避光反应24h;

[0031] 配制0.9g/L的阿霉素水溶液,将上述50mg经过异氰酸丙基三乙氧基硅烷修饰的介孔二氧化硅纳米粒子分散到溶液中,超声12h,颗粒通过离心收集(12000转,5min),得到ICP-MSN/DOX纳米颗粒;

[0032] 将上步制备的ICP-MSN/DOX纳米颗粒分散于甲醇与pH值为7.0的PBS缓冲液的混

合溶液中,超声12h,分散均匀后,加入100mg叠氮化修饰的环糊精,在氮气氛围保护下于室温反应3天,经过离心并用二次水和甲醇清洗,真空干燥后得到修饰环糊精接枝的聚阳离子后ICP-MSN/DOX纳米颗粒;

[0033] 将上步制备的经过环糊精接枝的聚阳离子修饰的ICP-MSN/DOX纳米颗粒分散到0.9g/L的阿霉素水溶液中,并加入10 μ siRNA,超声12h,分散均匀后,粒通过离心收集(12000转,5min),得到阿霉素/siRNA共载药纳米颗粒(ICP-MSN@DOX/siRNA);

[0034] 通过透射电镜可以观测到纳米颗粒表面的介孔结构,如图1所示。使用激光共聚焦显微镜可以观测到纳米颗粒装载的阿霉素显示红色荧光,荧光标记的siRNA(siRNAFAM)显示绿色荧光,其整个制备过程的演示图如图6所示。

[0035] 实施例2:将上述制备的阿霉素/siRNA共载药纳米颗粒(ICP-MSN@DOX/siRNA)置于模拟血液环境中检测siRNA含量;

[0036] 琼脂糖凝胶电泳的结果表明:在表面活性剂(SDS)的处理下,siRNA可以成功从纳米载药颗粒释放。而且,纳米载药颗粒可以保护siRNA避免被RNA酶降解。使用磷酸盐缓冲液和血清混合孵育纳米载药颗粒模拟血液环境,可以观察到siRNA可以稳定存在60个小时以上,而普通siRNA在血液中存在时间不超过12小时;实验结果如图2所示。

[0037] 实施例3:将上述制备的阿霉素/siRNA共载药纳米颗粒(ICP-MSN@DOX/siRNA)置于不同酸碱度环境中的释放速率;

[0038] 释放实验的结果表明,如图3所示,在中性条件下(pH=7.4),siRNA的累积释放为30%,阿霉素的累积释放为10%;而在酸性条件下(pH=5.0),siRNA的累积释放为60%,阿霉素的累积释放为80%。肿瘤微环境有别于正常组织,其中最典型的特征就是呈酸性。因此,纳米载药颗粒可以使得药物在肿瘤环境中选择性释放,避免对正常组织的伤害。

[0039] 实施例3:将上述制备的阿霉素/siRNA共载药纳米颗粒(ICP-MSN@DOX/siRNA)在体外细胞摄取水平的测定;

[0040] 本实验选择人乳腺癌细胞(MCF-7,赛齐(上海)生物工程有限公司)作为功能化介孔二氧化硅载药体系抗癌实验对象。

[0041] 通过流式细胞技术分析MDA-MB-231人乳腺癌细胞对纳米颗粒的摄取结果表明,如图4所示,在孵育2小时,6小时和24小时后,细胞对本发明公开的纳米颗粒的摄取率分别为78.8%(2h),95.4%(6h)和98.8%(24h)。而siRNA因为其表面负电荷,不能直接通过被动扩散机制进入细胞。

[0042] 实施例4:阿霉素/siRNA共载药纳米颗粒(ICP-MSN@DOX/siRNA)作为抗癌药物的体外实验

[0043] 实验室制备的小鼠肿瘤模型,在其尾静脉注射阿霉素/siRNA共载药纳米颗粒,可以观察到尾静脉注射30分钟之后,CP-MSN@DOX/siRNAFAM纳米颗粒成功到达肿瘤部位,部分纳米颗粒成功穿过肿瘤血管,如图中5a中的箭头出所示。而使用共聚焦显微静观察注射30分钟之后,肿瘤部位的切片也可以发现纳米颗粒的荧光点,如图5b所示。

[0044] 以上仅是本发明的优选实施方式,本发明的保护范围并不仅局限于上述实施例,凡属于本发明思路下的技术方案均属于本发明的保护范围。应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理前提下的若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

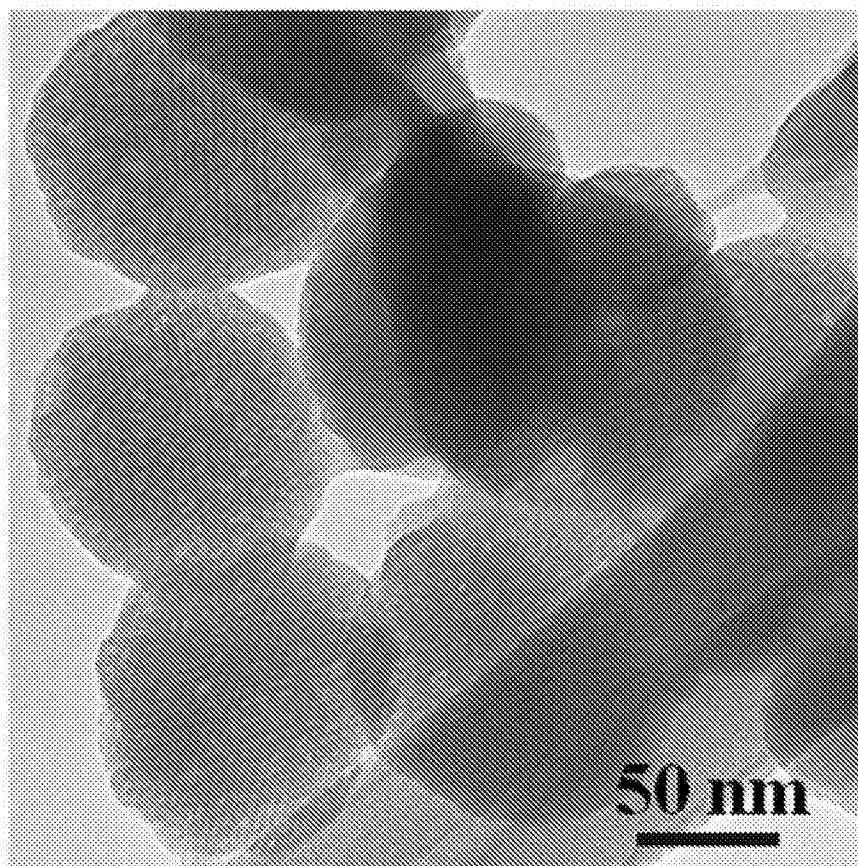


图1

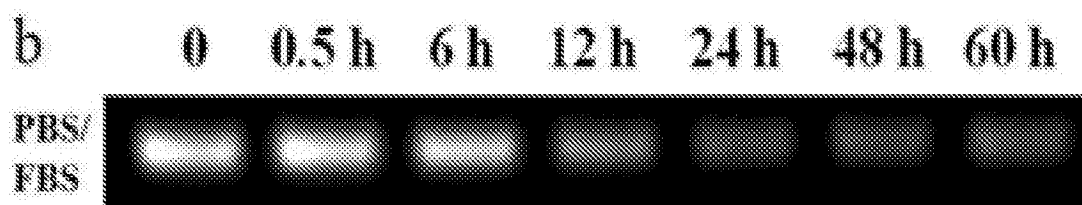


图2

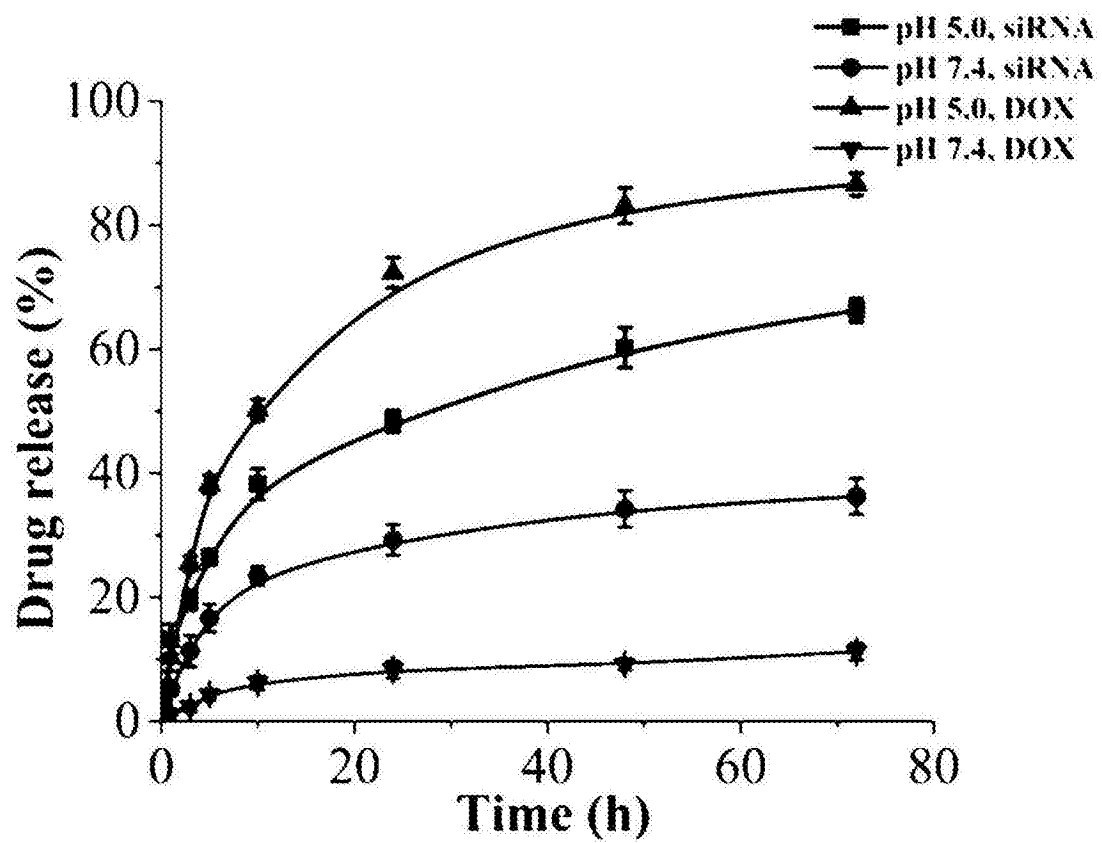


图3

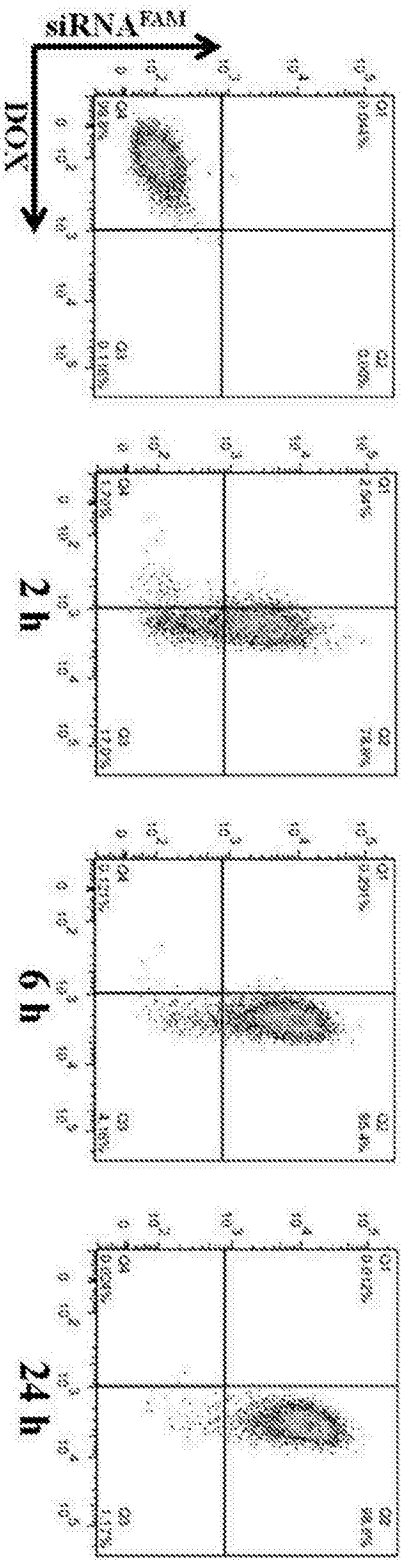


图4

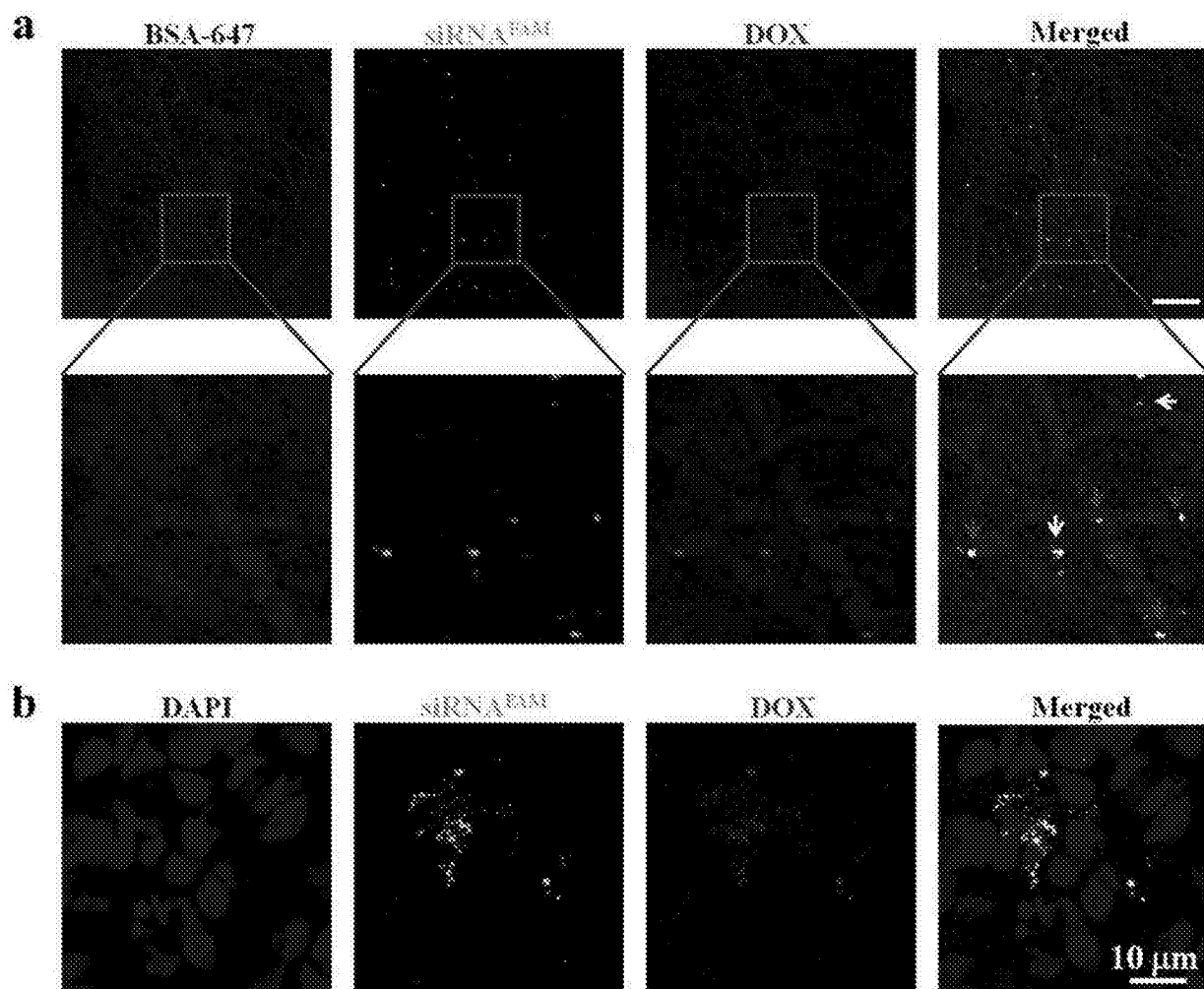


图5

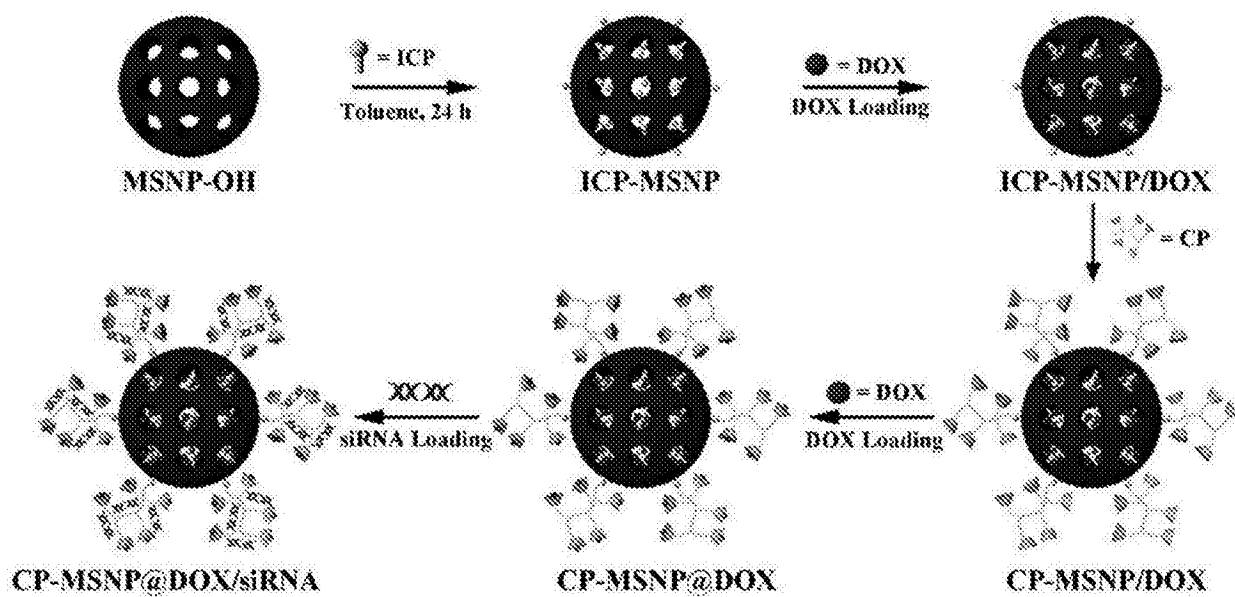


图6