



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 111773392 A

(43) 申请公布日 2020.10.16

(21) 申请号 202010451097.3

A61K 47/62 (2017.01)

(22) 申请日 2020.05.25

A61K 47/69 (2017.01)

(71) 申请人 河南省生物工程技术研究中心

A61P 35/00 (2006.01)

地址 450018 河南省郑州市郑东新区商务
外环路12号7层3号

B82Y 5/00 (2011.01)

(72) 发明人 王云龙 王继创 张怡青 李玉林
王国强 王敏 程蕾 王运从

(74) 专利代理机构 郑州铭晟知识产权代理事务
所(特殊普通合伙) 41134

代理人 张鹏

(51) Int.Cl.

A61K 47/54 (2017.01)

A61K 31/7105 (2006.01)

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 47/42 (2017.01)

2

10

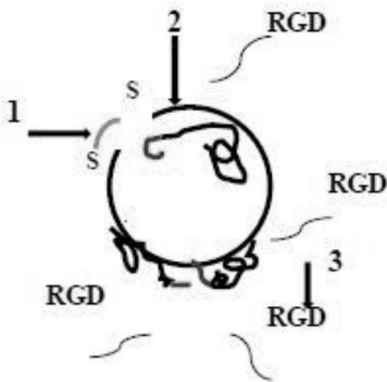
1

(54) 发明名称

一种人血白蛋白/寡核苷酸纳米颗粒及其制
备方法和用途

(57) 摘要

本发明属于纳米药物技术领域,具体涉及一
种人血白蛋白/寡核苷酸纳米颗粒及其制备方
法和用途。该人血白蛋白/赖氨酸-寡核苷酸纳
米颗粒的主要原料包括人血白蛋白纳米空囊和
赖氨酸-寡核苷酸偶合物,赖氨酸-寡核苷酸偶
合物可通过静电吸引力包埋于所述人血白蛋
白纳米空囊内部。赖氨酸-寡核苷酸偶合物通
过将赖氨酸封端于寡核苷酸的3'末端2'位置
处制备而成。本发明的人血白蛋白/赖氨酸-寡
核苷酸纳米颗粒的粒径小,使用效果好。



1. 一种赖氨酸-寡核苷酸偶合物, 其特征在于, 所述赖氨酸-寡核苷酸偶合物通过将赖氨酸封端于寡核苷酸的3'末端2'位置处制备而成, 所述赖氨酸-寡核苷酸偶合物带正电荷。

2. 根据权利要求1所述的赖氨酸-寡核苷酸偶合物, 其特征在于, 所述赖氨酸-寡核苷酸偶合物的制备方法包括如下步骤: (1) 以甲苯磺酸一水合物和N(ϵ)-三氟赖氨酸为原料合成N(ϵ)-三氟辛基-L-赖氨酸苄基酯2; (2) 在DNA/RNA合成器上合成寡核苷酸, 并对其进行硫化, 得到树脂结合寡核苷酸; (3) 向步骤(2)制备得到的树脂结合寡核苷酸转移到Quest 210手动合成器的5ml反应管中, 并加入聚乙烯吡咯烷酮稳定钯纳米粒子和1,4-环己二烯作为氢供体, 通过相转移加氢实现所述树脂结合寡核苷酸上苄基保护基的解离, 得到脱苄基保护基-树脂结合寡核苷酸; (4) 采用1-羟基-1H-苯并三唑和N,N'-二异丙基-碳化二亚胺在DMF中对所述步骤(3)制备得到的寡核苷酸的羧基进行活化; (5) 将所述步骤(4)所得产物与N(ϵ)-三氟辛基-L-赖氨酸苄基酯2以及1-羟基-1H-苯并三唑、N,N'-二异丙基-碳化二亚胺、DMF置于反应容器中, 搅拌反应15-20h, 进行偶联反应; 反应结束后, 分别用DMF和水洗涤包含树脂的产物。

3. 根据权利要求2所述的赖氨酸-寡核苷酸偶合物, 其特征在于, 所述三氟赖氨酸与寡核苷酸的质量比为1:(4-16); 优选的将1,4-环己二烯添加到PVP稳定钯悬浮液中并对溶液进行过滤后, 再使所得滤液作为氢供体用于所述树脂结合寡核苷酸上苄基保护基的解离; 优选的, 含有两个和三个赖氨酸的所述赖氨酸-寡核苷酸偶合物可通过重复脱保护和偶联的过程来制备得到。

4. 一种人血白蛋白/赖氨酸-寡核苷酸纳米颗粒, 其特征在于, 所述人血白蛋白/赖氨酸-寡核苷酸纳米颗粒的主要原料包括人血白蛋白纳米空囊和如权利要求1-3中任意一项所述的赖氨酸-寡核苷酸偶合物, 所述赖氨酸-寡核苷酸偶合物可通过静电吸引力包埋于所述人血白蛋白纳米空囊内部。

5. 根据权利要求4所述的人血白蛋白/赖氨酸-寡核苷酸纳米颗粒, 其特征在于, 所述人血白蛋白/赖氨酸-寡核苷酸纳米颗粒为粒径为70-100nm的球体; 优选的, 所述人血白蛋白纳米空囊的制备方法如下: (1) 向人血白蛋白水溶液中加入谷胱甘肽, 并调整pH至3-4; (2) 将步骤(1)所得溶液中滴加乙醇溶液, 在震荡和磁力搅拌条件下固化3h; (3) 膜过滤分离提纯步骤(2)所得混合溶液; (4) 向步骤(3)所得滤液中加入精氨酸后冷冻干燥, 即得人血白蛋白纳米空囊; 优选的所述人血白蛋白溶液的浓度为4mg/mL, pH为3.5。

6. 根据权利要求4所述的人血白蛋白/赖氨酸-寡核苷酸纳米颗粒, 其特征在于, 所述人血白蛋白纳米空囊表面还修饰有靶向基团RGD。

7. 根据权利要求4-6中任意一项所述的人血白蛋白/赖氨酸-寡核苷酸纳米颗粒的制备方法, 其特征在于, 包括如下步骤: (1) 将所述赖氨酸-寡核苷酸偶合物加入水溶液中溶解并调至zeta电位5.2; (2) 将步骤(1)制备得到的赖氨酸-寡核苷酸偶合物溶液滴加至所述人血白蛋白纳米空囊中, 混合均匀后, 离心, 上清液保存备用; (3) 向步骤(2)所得上清液中加入酸化溶液, 超声分散2s, 即可使所述赖氨酸-寡核苷酸偶合物包封于所述人血白蛋白纳米空囊内部, 完成载药, 得到人血白蛋白/赖氨酸-寡核苷酸纳米颗粒。

8. 根据权利要求7所述的人血白蛋白/寡核苷酸纳米颗粒的制备方法, 其特征在于, 还包括下述步骤: 向所述人血白蛋白/赖氨酸-寡核苷酸中加入20mM磺基-SMCC溶液, 混合后冻干处理, 得到冻干粉A; 将冻干粉A溶解于PBS溶液中得到冻干粉A-PBS溶液, 将含有巯基的

RGD环肽溶解于PBS溶液得到带有巯基的RGD环肽-PBS溶液;将所述冻干粉A-PBS溶液和带有巯基的RGD环肽-PBS溶液混合,并冻干处理,得到冻干粉B,所述冻干粉B即为表面修饰有RGD靶向基团的人血白蛋白/赖氨酸-寡核苷酸;所述冻干保护剂选自精氨酸、白蛋白、甘露醇、甘氨酸和左旋糖苷。

9.根据权利要求7所述的人血白蛋白/赖氨酸-寡核苷酸纳米颗粒的制备方法,其特征在于,所述赖氨酸-寡核苷酸与HSA纳米空囊的质量比为(0.05-25):9.5;优选的,所述赖氨酸-寡核苷酸偶合物与所述人血白蛋白纳米空囊的质量比为1:9.5。

10.根据权利要求1-6中所述的人血白蛋白/赖氨酸-寡核苷酸纳米颗粒在制备抗肿瘤药物中的应用。

一种人血白蛋白/寡核苷酸纳米颗粒及其制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明涉及纳米药物技术领域,具体涉及一种人血白蛋白/寡核苷酸纳米颗粒及其制备方法和用途。

背景技术

[0002] 肿瘤免疫治疗由于其卓越的疗效和创新性,在2013年被《科学》杂志评为年度最重要的科学突破,而免疫系统调节剂是最早用于肿瘤免疫治疗的一种手段。CpG-ODN是免疫系统调节剂的一种,研究发现它能够显著的促进机体的特异性和非特异性免疫应答。尽管CpG-ODN为肿瘤治疗开辟了新途径,但它需要依赖表面修饰或包裹递送才可以到达体内的药理学靶点并发挥作用。目前,在研的用于递送CpG-ODN的纳米载体有脂质体、病毒样颗粒、高分子纳米载体,但这些外源性的纳米颗粒在体内的安全性和有效性仍不确定。例如,病毒样颗粒VLP在CpG-ODN的包封和递送方面有巨大的潜力,但其具有免疫原性因此在体内的安全性仍有待评估。因此开发适用于CpG-ODN这类水溶性免疫佐剂的纳米递送系统是刻不容缓的,这一系统需要具备以下特点:1) 纳米颗粒尺寸在10-100nm之间;2) 纳米颗粒可在肿瘤附近聚集;3) 能较长时间地保持高血药浓度。因此,围绕以上CpG-ODN纳米药物需要具备的特点,利用内源性的材料开发纳米载体,其安全性更高也更有临床价值,如人血白蛋白。

[0003] 白蛋白紫杉醇(Abraxane)就是基于NAB技术利用人血白蛋白为载体包埋的脂溶性的紫杉醇,人血白蛋白载药的安全性已经得到证实。人血白蛋白在脂溶性药物递送方面已有一套完整的理论和技术体系支持,而其在水溶性的药物的包封和递送方面仍需要更多的探索,尤其是使用人血白蛋白制备10-100nm大小的纳米载体用于递送CpG-ODN未见相关报道。

[0004] 此外,由于人血白蛋白带负电荷,不能直接用于包埋和递送同样带负电荷的CPG-ODN。传统的解决办法和传统的人血白蛋白递送水溶性药物的制备工艺导致纳米颗粒粒径相对较大,限制了其应用。

发明内容

[0005] 本发明提供一种赖氨酸-寡核苷酸偶合物,以解决现有技术中带负电荷的人血白蛋白不能用于包埋和递送寡核苷酸(带负电荷)的问题。

[0006] 本发明的赖氨酸-寡核苷酸偶合物采用如下技术方案:一种赖氨酸-寡核苷酸偶合物,所述赖氨酸-寡核苷酸偶合物通过将赖氨酸封端于寡核苷酸的3'末端2'位置处制备而成。由于赖氨酸带正电荷,故制备得到的赖氨酸-寡核苷酸偶合物也带微量正电荷,可用于与带负电荷的纳米载体(如常见的、内源性的带负电荷的人血白蛋白纳米空囊)复合,实现寡核苷酸的递送;此外,赖氨酸封端于寡核苷酸3'末端2'位置处不会改变寡核苷酸的物理化学性质,当其与入血白蛋白纳米空囊等复合时也不会影响最终纳米颗粒的粒径。

[0007] 优选的,所述赖氨酸-寡核苷酸偶合物的制备方法如下:所述赖氨酸-寡核苷酸偶合物的制备方法包括如下步骤:(1)以甲苯磺酸一水合物和N(ε)-三氟赖氨酸为原料合成N

(ϵ)-三氟辛基-L-赖氨酸苄基酯2; (2) 在DNA/RNA合成器上合成寡核苷酸, 并对其进行硫化, 得到树脂结合寡核苷酸; (3) 向步骤(2)制备得到的树脂结合寡核苷酸转移到Quest 210手动合成器的5ml反应管中, 并加入聚乙烯吡咯烷酮稳定钯纳米粒子和1,4-环己二烯作为氢供体, 通过相转移加氢实现所述树脂结合寡核苷酸上苄基保护基的解离, 得到脱苄基保护基-树脂结合寡核苷酸; (4) 采用1-羟基-1H-苯并三唑和N,N'-二异丙基-碳化二亚胺在DMF中对所述步骤(3)制备得到的寡核苷酸的羧基进行活化; (5) 将所述步骤(4)所得产物与(ϵ)-三氟辛基-L-赖氨酸苄基酯2以及1-羟基-1H-苯并三唑、N,N'-二异丙基-碳化二亚胺、DMF置于反应容器中, 搅拌反应15-20h, 进行偶合反应; 反应结束后, 分别用DMF和水洗涤包含树脂的产物。

[0008] 优选的, 所述三氟赖氨酸与寡核苷酸的质量比为1:(4-16); 优选的将1,4-环己二烯添加到PVP稳定钯悬浮液中并对溶液进行过滤后, 再使所得滤液作为氢供体用于所述树脂结合寡核苷酸上苄基保护基的解离; 优选的, 含有两个和三个赖氨酸的所述赖氨酸-寡核苷酸偶合物可通过重复脱保护和偶联的过程来制备得到。

[0009] 本发明的第二目的在于提供一种人血白蛋白/赖氨酸-寡核苷酸纳米颗粒, 本发明的人血白蛋白/赖氨酸-寡核苷酸纳米颗粒采用如下技术方案: 所述人血白蛋白/赖氨酸-寡核苷酸纳米颗粒的主要原料包括人血白蛋白纳米空囊和如上述任意一项所述的赖氨酸-寡核苷酸偶合物, 所述赖氨酸-寡核苷酸偶合物可通过静电吸引力包埋于所述人血白蛋白纳米空囊内部。由于赖氨酸-寡核苷酸比水分子极性更强, 同时赖氨酸-寡核苷酸带微量正电荷, 可通过静电反应被带负电荷的人血白蛋白纳米空囊吸引并包埋。该人血白蛋白/赖氨酸-寡核苷酸纳米颗粒的粒径可小于100nm (70-100nm), 可以在细胞内的还原反应下响应性释放。行业内公认的纳米药物载体颗粒的粒径应在20-300nm之间, 目前大多数被批准的抗癌纳米载体颗粒的粒径大多在100-200nm之间。近期研究显示, 更小的纳米载药颗粒在机体内可能表现出更好的性能, 如更高的组织渗透或肿瘤抑制。

[0010] 优选的, 所述人血白蛋白纳米空囊为粒径为70-100nm的球体; 所述人血白蛋白纳米空囊的制备方法如下: (1) 向人血白蛋白水溶液中加入谷胱甘肽, 并调整pH至3.0-4 (更优选的技术方案为调整pH至3.5-4); (2) 将步骤(1)所得溶液中滴加乙醇溶液, 固化3h; (3) 膜过滤分离提纯步骤(2)所得混合溶液; (4) 向步骤(3)所得滤液中加入精氨酸(冻干保护剂)后冷冻干燥, 即得人血白蛋白纳米空囊; 所述步骤(2)中的固化是在震荡和磁力搅拌条件下进行的; 所述乙醇溶液中乙醇的体积分数为25%。

[0011] 优选的, 所述人血白蛋白纳米空囊表面还修饰有靶向基团RGD。靶向基团RGD的引入可使制备得到的人血白蛋白/赖氨酸-寡核苷酸纳米颗粒具有靶向聚集特性, 进而可用于靶向肿瘤细胞。实际使用过程中可先采用靶向基团对人血白蛋白纳米空囊表面进行修饰, 再将其用于包封赖氨酸-寡核苷酸偶合物; 也可先用人血白蛋白对赖氨酸-寡核苷酸偶合物进行包封, 之后再在人血白蛋白纳米空囊表面修饰以靶向基团RGD。例如, 在人血白蛋白纳米空囊表面修饰以靶向基团RGD的具体方法可为: 使用内源性的谷胱甘肽作为交联剂将二硫键打开, 加入RGD靶向配体使其与人血白蛋白交联, 之后长时间的空气暴露条件下形成RGD配体白蛋白纳米颗粒。溶液的pH、搅拌速度、搅拌方法和预处理速度均有可能影响纳米空囊的粒径大小, 从而影响后续载药纳米颗粒的粒径大小。调节溶液pH值到3.5-4, 用震荡(200rpm)和磁力搅拌(500rpm)的复合方法固化人血白蛋白溶液3小时, 避免长时间高速度

的磁力搅拌使人血白蛋白内部的化学键不稳定;将1:3比例的乙醇/水溶液滴加入溶液中,敞口震荡3小时后,移除乙醇后纯化。采用精氨酸为冻干保护剂,可以维持人血白蛋白纳米颗粒的稳定性。

[0012] 本发明的第三目的在于提供如上述任意一项所述的人血白蛋白/赖氨酸-寡核苷酸纳米颗粒的制备方法,本发明的人血白蛋白/赖氨酸-寡核苷酸纳米颗粒的制备方法采用如下技术方案:包括如下步骤:(1)将所述赖氨酸-寡核苷酸偶合物加入水溶液中溶解并调至zeta电位5.2;(2)将步骤(1)制备得到的赖氨酸-寡核苷酸偶合物溶液滴加至所述人血白蛋白纳米空囊中,混合均匀后,离心,上清液保存备用;(3)向步骤(2)所得上清液中加入酸化溶液,超声分散2s,即可使所述赖氨酸-寡核苷酸偶合物包封于所述人血白蛋白纳米空囊内部,完成载药,得到人血白蛋白/赖氨酸-寡核苷酸纳米颗粒。

[0013] 优选的,还包括下述步骤:向所述人血白蛋白/赖氨酸-寡核苷酸中加入20mM磺基-SMCC溶液,混合后冻干处理,得到冻干粉A;将冻干粉A溶解于PBS溶液中得到冻干粉A-PBS溶液,将含有巯基的RGD环肽溶解于PBS溶液得到带有巯基的RGD环肽-PBS溶液;将所述冻干粉A-PBS溶液和带有巯基的RGD环肽-PBS溶液混合,并冻干处理,得到冻干粉B,所述冻干粉B即为表面修饰有RGD靶向基团的人血白蛋白/赖氨酸-寡核苷酸;所述冻干保护剂选自精氨酸、白蛋白、甘露醇、甘氨酸和左旋糖苷。

[0014] 优选的,所述赖氨酸-寡核苷酸与HSA纳米空囊的质量比为(0.05-25):9.5。

[0015] 本发明还提供了如上述任意一项所述的人血白蛋白/赖氨酸-寡核苷酸纳米颗粒的用途,具体技术方案为:如上述任意一项所述的人血白蛋白/赖氨酸-寡核苷酸纳米颗粒在制备抗肿瘤药物中的应用。

[0016] 本发明的有益效果是:本发明的赖氨酸-寡核苷酸偶合物带正电荷,便于将其包封于带负电荷的纳米载体中;本发明的赖氨酸-寡核苷酸偶合物中赖氨酸修饰于寡核苷酸3'末端2'位置处,有助于维持寡核苷酸的物理化学性质,避免将其包封于纳米载体后,造成纳米复合物的粒径变大,进而影响纳米复合物的效果。

[0017] 本发明的人血白蛋白/赖氨酸-寡核苷酸纳米颗粒以人血白蛋白纳米空囊为载体,可依靠静电作用力将赖氨酸-寡核苷酸包封于人血白蛋白纳米空囊内部,由于人血白蛋白为内源性物质,其安全性更好。

[0018] 本发明的人血白蛋白/赖氨酸-寡核苷酸纳米颗粒的粒径为70-100nm,在机体内可表现出更好的性能。

[0019] 本发明的人血白蛋白/赖氨酸-寡核苷酸纳米颗粒表面还修饰有RGD靶向基团,可靶向肿瘤细胞,增强其免疫治疗的效果。

附图说明

[0020] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动性的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0021] 图1为本发明的RGD-HSA/Lysine-CpG-ODN的结构示意图;

[0022] 图2为本发明的RGD-HSA/Lysine-CpG-ODN的靶向实验结果图;

[0023] 图3为RGD-HSA/Lysine-CpG-ODN高压液相检测图谱。

具体实施方式

[0024] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0025] 实施例一 人血白蛋白/赖氨酸-寡核苷酸纳米颗粒的制备

[0026] 1、带正电荷的寡核苷酸(Lys-CpG-ODN)的制备:

[0027] (1) 用甲苯磺酸一水合物(p-toluenesulfonic acid monohydrate 480mg, 2.52mmol)和N(ε)-三氟赖氨酸(N(ε)-Trifluoroacetyl-L-lysine 1,300mg,1.24mmol)合成N(ε)-三氟辛基-L-赖氨酸苄基酯2(N(ε)-Trifluoroacetyl-L-lysine Benzyl Ester 2)。

[0028] (2) 寡核苷酸的合成在ABI 392应用生物系统DNA/RNA合成器上进行,得到树脂结合寡核苷酸之后硫化,并在使用前纯化,得到硫化-树脂结合寡核苷酸;

[0029] (3) 脱保护:将上述步骤(2)得到的硫化-树脂结合寡核苷酸转移到Quest 210手动合成器的5ml反应管中,以聚乙烯吡咯烷酮稳定钯纳米粒子(0.7ml)和1,4-环己二烯(0.05ml)为氢供体,通过相转移加氢实现树脂结合寡核苷酸上苄基保护基的解离,具体步骤为:将环己二烯添加到钯的pvp-稳定悬浮液中,并对其进行微过滤(0.22μm,确保未向树脂结合寡核苷酸施加沉淀钯),将滤液与树脂结合寡核苷酸混合,通过相转移加氢实现硫化-树脂结合寡核苷酸上苄基保护基的解离;反应结束后,树脂用甲醇洗涤三次,用DMF洗涤三次,得到脱苄基保护基-树脂结合寡核苷酸。

[0030] (4) 偶联反应前,用1-羟基-1H-苯并三唑(HOBT,0.4mg,3.0μmol)和N,N'-二异丙基-碳化二亚胺(DIC,1.1mg,8.7μmol)在1ml DMF中的溶液激活步骤(3)制备得到的寡核苷酸的羧基。将混合物搅拌3h,然后再次过滤掉溶液,得到羧基活化的寡核苷酸。

[0031] (5) 偶联:在1ml DMF中加入步骤(4)制备的羧基活化的寡核苷酸、1-羟基-1H-苯并三唑(0.4mg,3.0μmol)、N,N'-二异丙基碳化二亚胺(0.4mg,8.7μmol)和N(ε)-三氟辛基-L-赖氨酸苄基酯2(2.0mg,6.0μmol)的溶液,搅拌18h,进行耦合。用DMF洗涤树脂三次,用水洗涤树脂三次。

[0032] 对于含有两个和三个赖氨酸的共轭物的制备,重复了脱保护和偶联过程。对于寡核苷酸的裂解和脱保护,添加2ml浓氨并将混合物加热到55℃、18h。过滤溶液,并在真空中蒸发溶剂,即得Lys-CpG-ODN。最后提纯偶合物并用HPLC对偶合物进行检测。

[0033] 2、HSA纳米颗粒空囊的制备:向100ml含有500mgHSA(人血清白蛋白)的水溶液中加入200mg谷胱甘肽粉末,搅拌或震荡2h混匀,调整pH至3.5,得到HSA/r-GSH混合溶液;将乙醇溶液滴入已经混合均匀的HSA/r-GSH混合溶液中,震荡(200rpm)和磁力搅拌(500rpm)条件下固化3h后,用膜过滤分离提纯(100,000cutoff);向所得滤液中加入5%甘露醇后冷冻干燥,获得HSA纳米颗粒空囊。

[0034] 3、将制备得到的Lysine-CpG-ODN 10mg加入水溶液中溶解并调至zeta电位5.2,然后将Lysine-CpG-ODN溶液滴加至离心后的HSA冻干粉10mg中混合均匀后,离心加入酸化溶液(20mM醋酸盐缓冲液,pH5-5.5),用超声分散2s,即可实现在HSA纳米颗粒空囊中装载

Lysine-CpG-ODN,得到HSA/Lysine-CpG-ODN。

[0035] 4、完成载药后在HSA纳米颗粒表面用RGD修饰:在pH7.8下,向制备得到的HSA/Lysine-CpG-ODN中添加20mM过量的碘基-SMCC溶液,混合均匀后冻干,得到冻干粉A;将冻干粉A与带有巯基的RGD环肽分别溶解于PBS溶液中,得到冻干粉A-PBS溶液和带有巯基的RGD环肽-PBS溶液;混合冻干粉A-PBS溶液和带有巯基的RGD环肽-PBS溶液并做冻干处理,得到冻干粉B,冻干粉B即为RGD-HSA/Lysine-CpG-ODN,其结构式如图1所示。

[0036] 图1中:1为还原型谷胱甘肽,2为HSA纳米空囊,红色部分指代赖氨酸,与红色部分相连的不规则曲线部分为CPG-ODN(圆环内为Lysine-CpG-ODN),3为靶向配体RGD

[0037] 5、带有靶向配体RGD的人血白蛋白纳米空壳还可按照下述方法制备:将还原型谷胱甘肽加入到人血白蛋白+带有巯基的RGD溶液(也可为PEG-cRGD,带巯基的RGD更容易修饰)中,使人血白蛋白通过二硫键打开的方式形成纳米空囊的同时,带有巯基的RGD(PEG-cRGD)也通过二硫键加载在纳米空囊表面,而后加入乙醇固化,并将纳米颗粒在空气中暴露3h,最终提纯,冷冻干燥,最终形成RGD-HSA纳米空囊。将lysine作为封端剂连接在CPG上,形成lysine-CPG,以便于最终被RGD-HSA纳米空囊包埋。利用lysine-CPG和RGD-HSA纳米空囊等电点的不同,通过调节等电点从而将lysine-CPG包埋进RGD-HSA纳米空囊中,形成如图1所示的RGD-HSA-CPG纳米颗粒。

[0038] 实施例二

[0039] 1、人血白蛋白溶液与r-GSH反应条件的筛选:

[0040] HSA/Lysine-CpG-ODN纳米复合药物的粒径最终会影响其临床应用及在体内的释药行为,制备工艺及溶液浓度均会影响纳米颗粒的粒径及分散度。

[0041] (1) 考察搅拌转速和摇床转速的影响:称量25mg r-GSH粉末加入到5ml人血白蛋白液中,按照以下不同要求对溶液进行预处理,发现人血白蛋白溶液放在摇床上以80rpm的速度预处理4h溶液出现淡蓝色乳光,r-GSH和人血白蛋白溶液混合后在摇床上以200rpm的速度摇2h后出现淡蓝色乳光。详细实验数据详见下表1。

[0042] 表1

[0043]

制备参数		包封后纳米颗粒粒径 (nm)	外观
预处理时间 转速 80rpm	2h	75	透明变浑浊
	4h	82	淡蓝色乳光
	6h	89	淡蓝色乳光
	8h	94	淡蓝色乳光
	10h	97	淡蓝色乳光
摇床混匀速度 (2h)	100rpm	83	透明变白色乳光
	200rpm	84	淡蓝色乳光
	400rpm	89	淡蓝色乳光

[0044] (2) 考察人血白蛋白浓度和pH的影响:在制备过程中,人血白蛋白溶液的浓度将影响其形成的纳米颗粒的大小,实验证实当人血白蛋白溶液浓度在4mg/ml时为最佳;人血白蛋白溶液和R-GSH混合均匀后,加入NaOH调节溶液的pH,而后逐滴加入乙醇,在50℃条件下减压蒸馏除去乙醇。在pH为3.5时纳米颗粒的粒径最小为最佳pH。具体实验数据详见下表2。

[0045] 表2

制备参数		纳米颗粒 (nm)	外观	
[0046]	淡蓝色乳光		4mg / ml	86
	淡蓝色乳光		4.5mg / ml	92
	淡蓝色乳光		5 mg / ml	99
	/	溶液 pH 值 (溶液浓度 4mg / ml)	3	85
	/		3.5	150
	/		4	225
	/		4. 5	270
	/		5	>500
	/		5.5	>500
	/		6	357
	/		6.5	279
	/		7	213
	/		7.5	109
	/		8	95

[0047] 2、制备的纳米颗粒(RGD-HSA/Lysine-CpG-ODN)需要经过切向透析法纯化后,再进行冻干处理以便于长时间存放,冻干保护剂的选择将影响纳米颗粒的粒径、外观及复水表现。最终选择左旋糖苷为最佳的冻干保护剂。具体实验数据详见下表3。

[0048] 表3

冻干保护剂	冻干前粒径 (nm)	冻干后粒径 (nm)	外观	复水现象
白蛋白	86.92±5.9	92.33±5.93	絮状粉末	复水迅速
甘露醇	86.92±5.9	94.13±6.91	絮状粉末	复水迅速

木糖醇	86.92±5.9	99.13±5.97	粒状粉末	复水慢
聚乙二醇	86.92±5.9	102.33±4.45	轻微结块	复水慢
甘氨酸	86.92±5.9	96.39±7.42	絮状粉末	复水迅速
左旋糖苷	86.92±5.9	90.83±4.91	絮状粉末	复水迅速

[0050] 3、由于CPG-ODN无法直接使用人血白蛋白纳米颗粒空囊进行包埋,因此用Lysine修饰CPG-ODN后,再对复合物进行包埋。带正电荷的Lysine与带负电荷的CPG-ODN的比例最终将影响其极性。Lysine与CPG-ODN的质量比为0.5:6时,其粒径和包封率表现最佳。具体实验数据详见下表4。

[0051] 表4

[0052]

Lysine:CPG-ODN (0.5mg)	HSA-NP (mg)	粒径 (nm)	包封率
0.5:2	9.29	91.2	99.2%
0.5:4	9.25	92.8	99.2%
0.5:6	9.18	91.5	98.9%
0.5:8	9.22	94.8	97.1%

[0053] 4、分别取0.05μl,0.5μl,1μl,5μl,10μl,15μl,25μlLysine-CPG-ODN水溶液 (1mg/ml) 加入到HSA纳米颗粒粉末中,机械混合后将溶液PH调整到4,将溶液在超声下分散后观察复合纳米药物的粒径和物理外观,检测包封率。实验结果表明,1mg Lysine-CPG-ODN与9.5mgHSA-NPs获得的包封率最佳。详细实验数据参见下表5。

[0054] 表5

Lysine-CPG-ODN (mg)	人血白蛋白空颗粒	空白纳米颗粒粒径 (nm)	粒径 (nm)	包封率	物理性质
0.05	粉末, 分布均匀	92.12±4.15	91.2	99.2	93.2
0.5	粉末, 分布均匀	92.12±4.15	92.8	99.2	93.2
1	粉末, 分布均匀	92.12±4.15	91.5	98.9	96.3
5	粉末, 分布均匀	92.12±4.15	94.8	97.1	93.2
10	粉末, 分布均匀	92.12±4.15	99.7	99.85	93.2
15	粉末, 分布均匀	92.12±4.15	105.6	99.77	93.2
25	粉末, 分布均匀	92.12±4.15	124.1	99.79	93.2

[0055]

[0056] 5、纳米复合颗粒在除菌后,在4℃和40℃下保存,分别观察纳米药物的粒径变化和粒径分布。随着时间的推移,纳米颗粒的粒径和粒径分布增大,在4个月内外观表现最佳。详细实验数据参见下表6。

[0057] 表6

时间 (月)	粒径(nm)	
	4℃	40℃
0	92.11±5.25	92.11±5.25
6 月	109.11±8.28	157.20±14.60

[0060] 在临床给药时,人血白蛋白纳米复合药物需经过稀释后再使用,因此测试复合药物在5%葡萄糖溶液和0.9%氯化钠溶液中的稳定性。详细实验数据参见下表7。

[0061] 表7

稀释液	时间 (h)	粒径 (nm)
5%葡萄糖溶液	0	101
	6	112
	12	133
	24	150
	48	172
0.9%氯化钠溶液	0	104
	6	119
	12	147
	24	162
	48	189

[0063] 6、本发明的RGD-HSA/Lysine-CpG-ODN的靶向性研究

[0064] 将4T1乳腺癌细胞用无菌吸管吹打均匀后,调整细胞浓度为 5×10^6 个/ml。将购买的小鼠SPF级饲养一周后无异常现象出现,用于4T1乳腺癌肿瘤模型的建立。随机挑取雌性bab1/c小鼠,对注射部位进行75%的酒精消毒。用1ml的注射器将吹打均匀的细胞浓度为5

$\times 10^6$ 个/ml的4T1乳腺癌细胞以皮下注射的方式注射到后肢腋窝背部,注射后可观察到注射部位皮部凸起,说明注射成功。将注射后的小鼠饲养于SPF级清洁区饲养,使用游标卡尺每隔2天检测一次瘤体大小。瘤体体积大小公式按照计算:瘤体体积大小 $= (a \times b^2) / 2$

[0065] 6.1成像

[0066] 当上述乳腺癌荷瘤鼠瘤体体积为 100mm^3 左右时,可以进行近红外荧光活体成像。使用1ml的注射器,以尾静脉注射的方式注射200 μl ,在注射4h后使用IVIS Lumina III进行近红外荧光活体成像(详见说明书附图图2)。

[0067] 6.2治疗:当上述乳腺癌荷瘤鼠瘤体体积为 100mm^3 左右时,进行疗效验证。使用1ml的注射器,以尾静脉注射的方式注射200 μl ,每隔2天注射到一次,共计三剂。治疗1个疗程(3次)后14天,记录体积(长 $\times$ 宽 $\times$ 高)。实验结果详见下表8:

[0068] 表8

组别	剂量	动物数	平均体重的增加	肿瘤体积	肿瘤重量	肿瘤抑制率
[0069]						

[0070] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

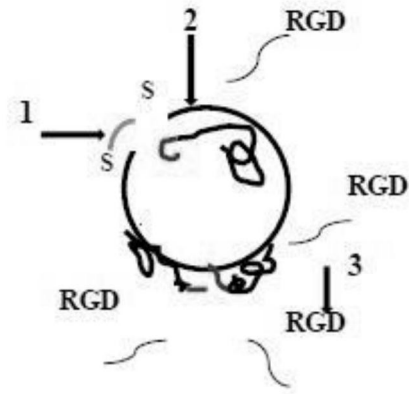


图1



图2

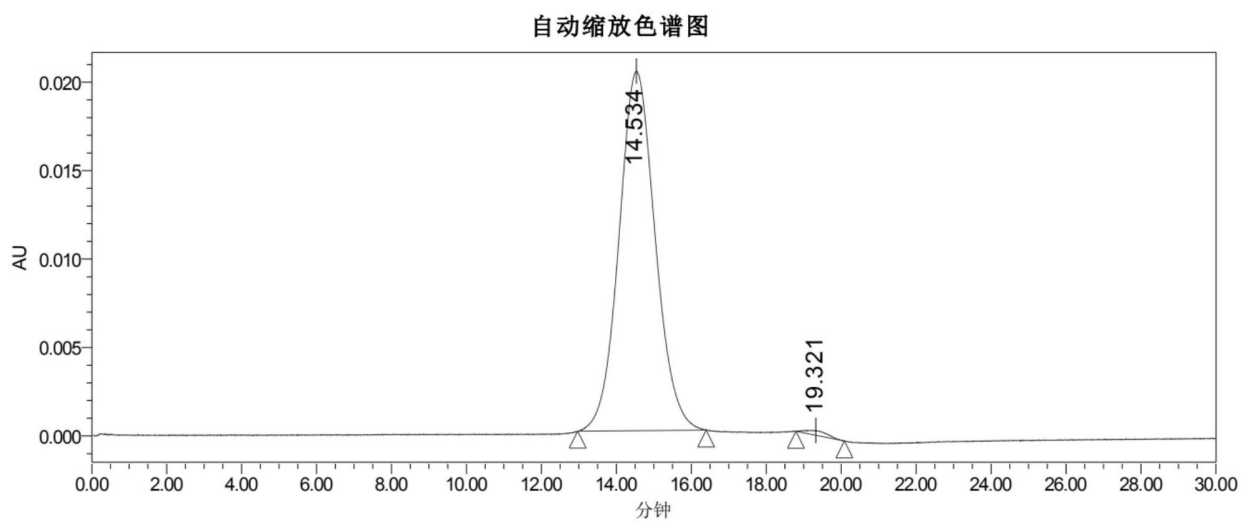


图3