



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108653741 B

(45) 授权公告日 2021.06.25

(21) 申请号 201810507821.2

A61L 27/22 (2006.01)

(22) 申请日 2018.05.24

A61L 27/54 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61L 27/50 (2006.01)

申请公布号 CN 108653741 A

A61L 27/18 (2006.01)

B01J 13/14 (2006.01)

(43) 申请公布日 2018.10.16

(73) 专利权人 华中科技大学同济医学院附属协和医院

地址 430022 湖北省武汉市解放大道1277号

(72) 发明人 王琳 王征 刘佳 邓炎 李琪琳 万超 付达安 袁野

(74) 专利代理机构 武汉天力专利事务所 42208 代理人 程祥

(51) Int. Cl.

A61K 47/42 (2017.01)

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 9/50 (2006.01)

(56) 对比文件

Yaowalak Srisuwan et al..Preparation of regenerated silk sericin/silk fibroin blend microparticles by emulsification-diffusion method for controlled release drug delivery.《PARTICULATE SCIENCE AND TECHNOLOGY》.2016,第35卷(第4期),387-392.

Hiroataka Ejima et al..One-Step Assembly of Coordination Complexes for Versatile Film and Particle Engineering.《SCIENCE》.2013,第341卷第154-157页以及 Supplementary Materials.

审查员 李双双

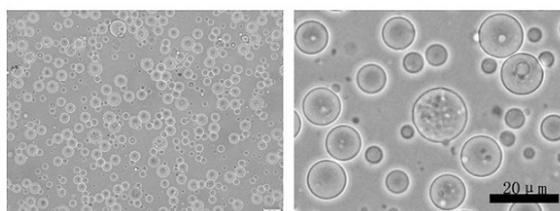
权利要求书2页 说明书8页 附图6页

(54) 发明名称

一种金属有机配位聚合物包裹的天然丝胶蛋白微球及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明涉及一种丝胶蛋白微球及其制备方法与应用,包括:(1)高温碱提法提取蚕茧中的丝胶蛋白,配置成纯丝胶蛋白溶液;(2)将丝胶蛋白溶液加入玉米油中,搅拌分散,滴加交联剂,得到丝胶蛋白微球;(3)将丙酮加入混合乳液中,固化丝胶蛋白微球;(4)洗涤,干燥,得到丝胶蛋白微球固体;(5)将丝胶蛋白微球与药物共孵育,得到载药丝胶蛋白微球;(6)在中性或弱碱性条件下加入酚类物质和金属离子,得到金属有机配位聚合物包裹的载药丝胶蛋白微球。本发明制备的丝胶蛋白微球结构稳定、粒径均一、在水中分散良好,保留了丝胶蛋白本身的荧光特性。由金属有机配位聚合物包裹的载药丝胶蛋白微球兼具载药率高、pH敏感等特点。



CN 108653741 B

1.天然丝胶蛋白微球的制备方法,所述天然丝胶蛋白微球为天然丝胶蛋白制成的多孔微球,其制备方法包括以下步骤:

(1)称取蚕茧,用高温碱提法提取丝胶蛋白,经离心、透析、冻干即可得到纯天然丝胶蛋白固体;

(2)将步骤(1)中所得丝胶蛋白固体溶于水配制成10 wt%浓度的丝胶蛋白溶液;

(3)将步骤(2)中所得丝胶蛋白溶液逐滴加入含乳化剂吐温-20的玉米油中,搅拌使其充分乳化得乳液;丝胶蛋白溶液与含乳化剂吐温-20的玉米油的用量体积比为1:5-100;含乳化剂吐温-20的玉米油中乳化剂吐温-20与玉米油的用量体积比为0.1-10:100,搅拌速度为800 rpm,乳化时间为5-30分钟;

(4)向步骤(3)所得乳液中滴加化学交联剂,搅拌使其充分交联得交联乳液;

(5)向步骤(4)所得交联乳液中滴加丙酮,搅拌使其充分固化;

(6)将步骤(5)所得混合液离心得固化的丝胶蛋白微球,丙酮洗涤三遍,经真空抽干可得纯天然丝胶蛋白微球。

2.根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于:所述步骤(1)中丝胶蛋白固体的提取方法,包括以下步骤:

1)称取普通家蚕蚕茧或丝素缺失型突变蚕茧,将其剪碎,用去离子水清洗,挤压去除多余水分得蚕茧碎片;

2)将步骤1)所得蚕茧碎片浸泡于浓度为0.01-0.2 mol/L的 Na_2CO_3 溶液中,在80-100℃、600 rpm条件下加热搅拌反应0.5-1小时,其中每克蚕茧分散于10-50 mL Na_2CO_3 溶液;

3)将步骤2)中得到的溶液以3500 rpm离心5 min,去除不溶性沉淀,得到澄清溶液I;

4)将步骤3)中所得澄清溶液I在去离子水中透析2-3天,每隔6小时换水一次;得到透析溶液;

5)将步骤4)中所得透析溶液以8000 rpm离心10 min,去除不溶性沉淀,得到澄清溶液II;

6)将步骤5)中所得澄清溶液II于液氮中速冻,置于真空冷冻干燥机中2-3天直至完全冻干,得到纯净的丝胶蛋白固体,置于-20℃冰箱密封保存。

3.根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于:

所述步骤(4)中化学交联剂为戊二醛或京尼平,加入量为乳液体积的5-50%;搅拌速度为800 rpm,交联时间为1-3小时;

所述步骤(5)中加入丙酮的量为交联乳液体积的5-20倍;搅拌速度为800 rpm,固化时间为40分钟。

4.由权利要求1-3所述任一方法制得的天然丝胶蛋白微球。

5.载药丝胶微球,由权利要求4所述天然丝胶蛋白微球与药物物理混合,得到负载药物的载药丝胶微球。

6.根据权利要求5所述的载药丝胶微球,其特征在于:所述药物为抗肿瘤药物、激素或抗生素。

7.金属有机配位聚合物包裹的载药丝胶微球,由权利要求5所述载药丝胶微球在中性或弱碱性条件下与酚类物质和金属离子溶液反应,得到由金属有机配位聚合物包裹的载药丝胶微球;所述酚类物质包括单宁酸、花青素、儿茶素、没食子酸、熊果昔、或邻苯二酚基团

修饰的聚合物；所述金属离子包括铁离子、铝离子、铜离子、镁离子中的一种或几种。

8. 金属有机配位聚合物包裹的天然丝胶微球，由权利要求4所述天然丝胶蛋白微球在中性或弱碱性条件下与酚类物质和金属离子溶液反应，得到由金属有机配位聚合物包裹的天然丝胶微球。

9. 权利要求4所述天然丝胶蛋白微球、权利要求7所述金属有机配位聚合物包裹的载药丝胶蛋白微球、或权利要求8所述金属有机配位聚合物包裹的天然丝胶蛋白微球在制备肿瘤诊疗材料、药物递送材料、细胞载体材料、荧光示踪材料、组织工程材料中的应用。

一种金属有机配位聚合物包裹的天然丝胶蛋白微球及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医用复合材料领域,具体指一种天然丝胶蛋白微球及由金属有机配位聚合物包裹的载药丝胶蛋白微球及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 丝胶蛋白(Silk Sericin)是蚕茧中包裹在丝素蛋白表面的一种天然高分子黏性蛋白,约占整个蚕茧含量的20-30%,主要由分子量为24-400 kDa的多肽组成,包括丝氨酸、天冬氨酸、甘氨酸等18种氨基酸。长期以来由于人们对丝胶蛋白认识的不足导致它在丝织行业中被当成废弃物处理,浪费了大量宝贵的资源,并造成环境污染。近年来人们发现丝胶蛋白在保湿、抗菌、抗氧化、抗凝血及促细胞增殖和黏附等方面均有着突出表现,同时其良好的亲水性、生物可降解性和生物相容性使它在生物医用材料领域得到了广泛的关注。目前已有研究者将丝胶蛋白与其他高分子材料掺杂制备成复合水凝胶支架或复合膜,应用于组织工程修复及药物递送系统。此外,研究者使用溴化锂提取方法获得未降解的丝胶蛋白,利用简单的化学交联制备了多种可注射的丝胶水凝胶,这些水凝胶具有良好的生物相容性和降解性,能够支持细胞粘附和增殖,并且作为组织工程支架材料可以促进多种软组织损伤修复。丝胶蛋白作为一种可持续、易获取的天然高分子材料,具有良好的凝胶性、生物相容性、生物可降解性和天然细胞粘附性能,在组织工程修复和药物载体的研究中备受关注,具有很大的发展前景。

[0003] 微球(microsphere)是利用天然或合成高分子材料制备的粒径在1-100 μm 之间的球形颗粒。由于很多药物无法直接使用,或直接使用的效果不理想,人们利用高分子材料包埋药物制得载药微球,从而达到控制给药的效果。高分子微球不仅具有固相化载体特有的易于分离及提取等优点,还具有价格低廉、比表面积大、分散性良好、易于功能化、以及生物相容性可调等优势。随着人们对丝胶蛋白认识的加深,研究者们对丝胶微球的关注与探索也愈来愈多。目前制备丝胶微球的方法主要包括凝固沉淀法、喷雾干燥法以及喷雾冷冻干燥交联法,然而这些方法存在以下不足:1)制备过程复杂、不易实施,如喷雾冷冻干燥法需将丝胶混合溶液喷雾入 -80°C 空间进行凝结并收集,经冻干后才可获得丝胶微球;2)制得的微球粒径大小难以精确控制,如采用凝固沉淀法制备的丝胶微球,其形貌与大小难以控制;3)搭载药物的释放速率不易控制,如采用凝固沉淀法或喷雾冷冻干燥法制备的载药丝胶微球药物释放速度过快。

[0004] 基于以上,我们首次采用油包水乳化法结合化学交联法成功制备出了形貌规整、粒径均一、分散性良好的丝胶蛋白微球。该方法简单易行、产率高、无毒副产物、制备过程无毒无害;获得的丝胶微球表面光滑、尺寸可控制(5-100 μm)、兼具荧光特性;该微球基于丝胶蛋白本身良好的生物相容性和细胞粘附性,可有效进行药物及细胞的搭载。进一步,利用层层自组装的方法在该载药微球表面包裹上多层金属有机配位聚合物,能够通过改变包裹在微球表面的聚合物的层数控制药物的释放速度,并且能够根据环境的pH值进行响应性智

能释放药物。乳化法制备的天然丝胶蛋白微球及金属有机配位聚合物包裹的丝胶微球在药物载体、细胞载体、肿瘤诊疗、荧光示踪及组织工程等研究领域具有广泛的应用前景。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于克服以往微球制备方法的不足,提供一种工艺简单、产率高、生物相容性良好的丝胶蛋白微球和金属有机配位聚合物包裹的载药丝胶蛋白微球的制备方法和用途。

[0006] 为达到上述目的,本发明提供的丝胶蛋白微球、金属有机配位聚合物包裹的载药丝胶蛋白微球及其制备方法,所述制备方法包括以下步骤:

[0007] (1) 称取一定量蚕茧,用高温碱提法提取丝胶蛋白,经离心、透析、冻干即可得到天然丝胶蛋白固体;

[0008] (2) 将步骤(1)中所得丝胶蛋白固体溶于水配制成10 wt%浓度的丝胶蛋白溶液;

[0009] (3) 将步骤(2)中所得丝胶蛋白溶液逐滴加入玉米油中(含一定量乳化剂吐温-20),搅拌使其充分乳化;

[0010] (4) 向步骤(3)中所得乳液中滴加交联剂,搅拌使其充分交联;

[0011] (5) 向步骤(4)中所得乳液中滴加丙酮,搅拌使其充分固化;

[0012] (6) 将步骤(5)所得混合液离心得固化的丝胶蛋白微球,丙酮洗涤三遍,真空抽干可得纯天然丝胶蛋白微球固体。

[0013] (7) 将步骤(6)所得天然丝胶蛋白微球与药物混合反应,得到负载药物的丝胶蛋白微球。

[0014] (8) 将步骤(7)所得载药丝胶微球在缓冲液中与酚类物质如单宁酸和金属离子如铁离子溶液中反应,得到由金属有机配位聚合物包裹的载药丝胶微球;或使用步骤(6)所得纯天然丝胶蛋白微球缓冲液中与酚类物质如单宁酸和金属离子如铁离子溶液中反应,得到由金属有机配位聚合物包裹的天然丝胶微球。

[0015] 进一步地,所述步骤(1)中选用的蚕茧为正常家蚕蚕茧品种(白玉,皓月等),家蚕丝素缺失型突变品种(185Nd-s,140Nd-s等)购于中国农业科学院蚕业研究所。

[0016] 进一步地,提取丝胶蛋白的具体过程包括以下步骤:

[0017] 1) 称取一定量蚕茧,将其剪碎,用水清洗,挤压去除水分;

[0018] 2) 将步骤1) 所得蚕茧碎片浸泡于浓度为0.01-0.20 mol/L的 Na_2CO_3 水溶液中,80-100℃, 600 rpm加热搅拌反应0.5-1小时,其中每克蚕茧加入20-30 mL Na_2CO_3 水溶液;

[0019] 3) 将步骤2) 中溶液以3500 rpm 离心5-10 min,去除不溶性沉淀,得到澄清溶液;

[0020] 4) 将步骤3) 中所得溶液以MW: 3500 Da的透析袋在去离子水中透析2-3天,每隔6小时换水一次;

[0021] 5) 将步骤4) 中所得溶液以8000 rpm 离心10-15 min,去除不溶性沉淀,得到澄清溶液;

[0022] 6) 将步骤5) 中所得溶液于液氮中速冻,置于真空冷冻干燥机中2-3天直至完全冻干,得到纯净的丝胶蛋白固体,置于-20℃冰箱密封保存。

[0023] 进一步地,所述步骤(3)中丝胶蛋白溶液与玉米油的用量为1:5-20,即1 mL: 5-20 mL;玉米油中乳化剂吐温-20用量为1-10%,即10 mL玉米油中含有吐温-20 100-1000 μL ,搅

拌速度为800 rpm,乳化时间为10-30 min。

[0024] 进一步地,所述步骤(4)中交联剂戊二醛浓度为25%,加入量为反应体系的5-20%,即10 mL反应体系中加入25%戊二醛0.5-2.0 mL;搅拌速度为800 rpm,交联时间为1-4小时。

[0025] 进一步地,所述步骤(5)中加入丙酮的量为反应体系的5-10倍,即10 mL反应体系中加入丙酮50-100 mL;搅拌速度为800 rpm,固化时间为20-60分钟。

[0026] 进一步地,所述步骤(7)中药物为抗肿瘤药物、激素或抗生素。

[0027] 进一步地,所述步骤(8)中pH 7.0-9.0的Tris缓冲液浓度为10-20 mM,加入的单宁酸溶液和六水合氯化铁溶液浓度分别为20-40 mg/mL和10-20 mg/mL,加入量均为0.5-1.0%,即1 mL体系中加入单宁酸和六水合氯化铁溶液各5-10 μ L。

[0028] 进一步地,所述步骤(8)中采用的单宁酸可以替换为如花青素、儿茶素、没食子酸、熊果苷等其他常见天然多酚类物质以及邻苯二酚修饰的聚合物。

[0029] 进一步地,所述步骤(8)中采用的铁离子溶液可以替换为铝离子、铜离子、镁离子等其他金属离子溶液。

[0030] 本发明提供了一种金属有机配位聚合物包裹的天然丝胶蛋白微球载体的制备方法。

[0031] 本发明可以通过调节丝胶蛋白浓度、乳化剂浓度及水油比等来控制微球的大小及形态,同时可以通过改变表面包裹的金属有机配位聚合物的层数来控制药物的释放速度,可用于不同的生物医药用途。

[0032] 本发明的方案具有以下优点:

[0033] (1)该方法操作简单、成本较低、产率高、普遍适用、不需要特殊复杂仪器等;(2)制成的丝胶蛋白微球具有良好的稳定性、生物相容性和生物活性,且相貌规整、尺寸可控、粒径均一、分散性良好;(3)可通过增加或减少微球表面金属有机配位聚合物的层数来控制药物的释放速度。在组织工程、肿瘤诊疗、荧光示踪、药物载体及细胞载体等领域具有广阔的应用前景。

附图说明

[0034] 图1为本发明实施例中以丝胶蛋白溶液浓度为10 wt%,乳化剂浓度2%,水油比1:10,乳化时间15 min,制得的丝胶蛋白微球分散于水中在普通显微镜下的形貌图。

[0035] 图2为本发明实施例中以丝胶蛋白溶液浓度为10 wt%,乳化剂浓度2%,水油比1:10,乳化时间15 min,制得的丝胶蛋白微球分散于水中在荧光显微镜下的形貌图。

[0036] 图3为本发明实施例中以丝胶蛋白溶液浓度为10 wt%,乳化剂浓度2%,水油比1:10,乳化时间15 min,制得的丝胶蛋白微球干燥状态下在普通显微镜下的形貌图。

[0037] 图4为本发明实施例中以丝胶蛋白溶液浓度为10 wt%,乳化剂浓度2%,水油比1:10,乳化时间15 min,制得的丝胶蛋白微球干燥状态下在荧光显微镜下的形貌图。

[0038] 图5为本发明实施例中以丝胶蛋白溶液浓度为10 wt%,乳化剂浓度2%,水油比1:10,乳化时间15 min,制得的丝胶蛋白微球的扫描电镜形貌图。

[0039] 图6为本发明实施例中以丝胶蛋白溶液浓度为15 wt%,乳化剂浓度2%,水油比1:10,乳化时间15 min,制得的丝胶蛋白微球分散于水中在普通显微镜下的形貌图。

[0040] 图7为本发明实施例中以丝胶蛋白溶液浓度为15 wt%,乳化剂浓度2%,水油比1:

10,乳化时间15 min,制得的丝胶蛋白微球分散于水中在荧光显微镜下的形貌图。

[0041] 图8为本发明实施例中以丝胶蛋白溶液浓度为10 wt%,乳化剂浓度6%,水油比1:10,乳化时间15 min,制得的丝胶蛋白微球分散于水中在普通显微镜下的形貌图。

[0042] 图9为本发明实施例中以丝胶蛋白溶液浓度为10 wt%,乳化剂浓度6%,水油比1:10,乳化时间15 min,制得的丝胶蛋白微球分散于水中在荧光显微镜下的形貌图。

[0043] 图10为本发明实施例中以丝胶蛋白溶液浓度为10 wt%,乳化剂浓度2%,水油比1:20,乳化时间15 min,制得的丝胶蛋白微球分散于水中在普通显微镜下的形貌图。

[0044] 图11为本发明实施例中以丝胶蛋白溶液浓度为10 wt%,乳化剂浓度2%,水油比1:20,乳化时间15 min,制得的丝胶蛋白微球分散于水中在荧光显微镜下的形貌图。

[0045] 图12为包裹不同层数单宁酸-铁离子配位聚合物的天然丝胶蛋白微球的大体表现图。

[0046] 图13为包裹不同层数单宁酸-铁离子配位聚合物的载药丝胶蛋白微球的大体表现图。

[0047] 图14 为包裹不同层数单宁酸-铁离子配位聚合物的载药丝胶蛋白微球在不同pH条件下药物释放曲线图。

[0048] 图15 为包裹2层单宁酸-铁离子配位聚合物的丝胶蛋白微球对血液中红细胞的影响。

[0049] 图16 为包裹2 层单宁酸-铁离子配位聚合物的丝胶蛋白微球对肿瘤细胞活力的影响。

[0050] 图17 为包裹2 层单宁酸-铁离子配位聚合物的载药丝胶蛋白微球和游离药物对肿瘤细胞活力的影响。

具体实施方式

[0051] 为了使本发明的技术方案及优点更加清楚,以下结合附图及实施例,对本发明进行进一步的详细说明。此处所描述的具体实施例仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。为了使公众对本发明有更好的了解,在下文对本发明的细节描述中详尽描述了一些特定的细节部分。

[0052] 下面结合实施例对本发明做进一步的说明:

[0053] 本发明中所用的蚕茧是家蚕蚕茧(白玉、皓月等)或丝素缺失型蚕茧(185Nd-s, 140Nd-s等);所用玉米油为食用级非转基因玉米胚芽油;其余所用试剂均为分析纯。

[0054] 实施例1:天然丝胶蛋白微球的合成

[0055] (1)将20 g蚕茧洗净沥干,浸泡于400 mL 0.02 mol/L Na_2CO_3 溶液中,在100°C,600 rpm条件下搅拌加热反应1小时,冷却后3500 rpm 离心5分钟去除不溶性沉淀,取上层澄清溶液以3500 Da透析袋在去离子水中透析2-3天,溶液以8000 rpm离心10分钟去除不溶性沉淀,取上层澄清溶液于液氮中速冻后置于真空冷冻干燥机完全冻干,得到纯净的丝胶蛋白固体;

[0056] (2)配置10 wt%的丝胶蛋白溶液1 mL,即取100 mg丝胶蛋白溶于1 mL 去离子水中,将其逐滴加于含2%乳化剂吐温-20 的玉米油中,水油比为1:10,即所用玉米油10 mL(含乳化剂吐温-20 200 μL),800 rpm室温条件下乳化15分钟;

[0057] (3)向混合乳液中加入交联剂戊二醛,浓度为25%,加入量为反应体系的10%,即加入25%戊二醛1 mL,800 rpm室温条件下交联2小时;

[0058] (4)向混合乳液中加入丙酮,加入量为反应体系的4-5倍,即加入丙酮50 mL,800 rpm室温条件下固化40分钟;

[0059] (5)混合乳液以3500 rpm离心8分钟,弃上清,即可得丝胶蛋白微球颗粒;

[0060] (6)以丙酮洗涤丝胶微球三遍,每次3500 rpm离心8分钟,将最终沉淀物真空抽干即可得到丝胶蛋白微球。

[0061] 结果如图1-5所示,采用该乳化法制备的丝胶蛋白微球为形貌规整的球体,粒径均一,在水中分散性良好,同时具备天然的荧光特性,且干燥后的微球仍可保持其规则形貌并可见明显荧光。

[0062] 实施例2:不同浓度丝胶蛋白对丝胶蛋白微球合成的影响

[0063] (1)将20 g蚕茧洗净沥干,浸泡于400 mL 0.02 mol/L Na_2CO_3 溶液中,在100℃,600 rpm条件下搅拌加热反应1小时,冷却后3500 rpm离心5分钟去除不溶性沉淀,取上层澄清溶液以3500 Da透析袋在去离子水中透析2-3天,溶液以8000 rpm离心10分钟去除不溶性沉淀,取上层澄清溶液于液氮中速冻后置于真空冷冻干燥机完全冻干,得到纯净的丝胶蛋白固体;

[0064] (2)配置15 wt%的丝胶蛋白溶液100 μL ,即取15 mg丝胶蛋白溶于100 μL 去离子水中,将其逐滴加于含2%乳化剂吐温-20 的玉米油中,水油比为1:10,即所用玉米油1 mL(含乳化剂吐温-20 20 μL),800 rpm室温条件下乳化15分钟;

[0065] (3)向混合乳液中加入交联剂戊二醛,浓度为25%,加入量为反应体系的10%,即加入25%戊二醛100 μL ,800 rpm室温条件下交联2小时;

[0066] (4)向混合乳液中加入丙酮,加入量为反应体系的4-5倍,即加入丙酮5 mL,800 rpm室温条件下固化40分钟;

[0067] (5)混合乳液以3500 rpm离心8分钟,弃上清,即可得丝胶蛋白微球颗粒;

[0068] (6)以丙酮洗涤丝胶微球三遍,每次3500 rpm离心8分钟,将最终沉淀物真空抽干即可得到丝胶蛋白微球。

[0069] 结果如图6-7所示,随着丝胶蛋白溶液浓度的增加,微球的粒径逐渐增大,荧光特性不改变。

[0070] 实施例3:不同剂量乳化剂对丝胶蛋白微球合成的影响

[0071] (1)将20 g蚕茧洗净沥干,浸泡于400 mL 0.02 mol/L Na_2CO_3 溶液中,在100℃,600 rpm条件下搅拌加热反应1小时,冷却后3500 rpm离心5分钟去除不溶性沉淀,取上层澄清溶液以3500 Da透析袋在去离子水中透析2-3天,溶液以8000 rpm离心10分钟去除不溶性沉淀,取上层澄清溶液于液氮中速冻后置于真空冷冻干燥机完全冻干,得到纯净的丝胶蛋白固体;

[0072] (2)配置10 wt%的丝胶蛋白溶液100 μL ,即取10 mg丝胶蛋白溶于100 μL 去离子水中,将其逐滴加于含6%乳化剂吐温-20 的玉米油中,水油比为1:10,即所用玉米油1 mL(含乳化剂吐温-20 60 μL),800 rpm室温条件下乳化15分钟;

[0073] (3)向混合乳液中加入交联剂戊二醛,浓度为25%,加入量为反应体系的10%,即加入25%戊二醛100 μL ,800 rpm室温条件下交联2小时;

[0074] (4)向混合乳液中加入丙酮,加入量为反应体系的4-5倍,即加入丙酮5 mL,800 rpm室温条件下固化40分钟;

[0075] (5)混合乳液以3500 rpm离心8分钟,弃上清,即可得丝胶蛋白微球颗粒;

[0076] (6)以丙酮洗涤丝胶微球三遍,每次3500 rpm离心8分钟,将最终沉淀物真空抽干即可得到丝胶蛋白微球。

[0077] 结果如图8-9所示,随着乳化剂剂量的增加,微球的粒径明显增大,荧光特性未改变,但形貌趋于不规整,因此选择2%乳化剂为最适剂量。

[0078] 实施例4:不同水油比对丝胶蛋白微球合成的影响

[0079] (1)将20 g蚕茧洗净沥干,浸泡于400 mL 0.02 mol/L Na_2CO_3 溶液中,在100℃,600 rpm条件下搅拌加热反应1小时,冷却后3500 rpm离心5分钟去除不溶性沉淀,取上层澄清溶液以3500 Da透析袋在去离子水中透析2-3天,溶液以8000 rpm离心10分钟去除不溶性沉淀,取上层澄清溶液于液氮中速冻后置于真空冷冻干燥机完全冻干,得到纯净的丝胶蛋白固体;

[0080] (2)配置10 wt%的丝胶蛋白溶液100 μL ,即取10 mg丝胶蛋白溶于100 μL 去离子水中,将其逐滴加于含2%乳化剂吐温-20 的玉米油中,水油比为1:20,即所用玉米油2 mL (含乳化剂吐温-20 40 μL),800 rpm室温条件下乳化15分钟;

[0081] (3)向混合乳液中加入交联剂戊二醛,浓度为25%,加入量为反应体系的10%,即加入25%戊二醛100 μL ,800 rpm室温条件下交联2小时;

[0082] (4)向混合乳液中加入丙酮,加入量为反应体系的4-5倍,即加入丙酮10 mL,800 rpm室温条件下固化40分钟;

[0083] (5)混合乳液以3500 rpm离心8分钟,弃上清,即可得丝胶蛋白微球颗粒;

[0084] (6)以丙酮洗涤丝胶微球三遍,每次3500 rpm离心8分钟,将最终沉淀物真空抽干即可得到丝胶蛋白微球。

[0085] 结果如图10-11所示,随着水油比的增加,微球的粒径逐渐增大,荧光特性未改变。

[0086] 结合以上实例及图示,可以看出通过控制和改变丝胶蛋白溶液浓度、乳化剂含量及水油比可以制得不同粒径和形貌的丝胶蛋白微球,使其具有更为广泛的应用。

[0087] 实施例5:不同层数金属有机配位聚合物包裹的丝胶蛋白微球的合成

[0088] (1)本研究使用的酚类物质为单宁酸,金属离子为铁离子。将0.80 g单宁酸固体溶于20 mL去离子水配成40 mg/mL的单宁酸溶液。将0.20 g六水合三氯化铁固体溶于20 mL去离子水配成10 mg/mL的铁离子溶液。

[0089] (2)5 mg丝胶蛋白微球分散于0.5 mL去离子水,超声分散后加入5 μL 铁离子溶液,涡旋1分钟后加入5 μL 单宁酸溶液,涡旋1分钟后加入20 mM pH 8.0 Tris缓冲液0.5 mL,6000 rpm离心4分钟得到单宁酸铁离子配位聚合物包封的丝胶蛋白微球,去离子水洗涤3遍。

[0090] (3)重复(2)中步骤得到不同层数金属有机配位聚合物包裹的丝胶蛋白微球。

[0091] 结果如图12所示,从左至右依次为未包裹及包裹1、2、3、5层单宁酸-铁离子配位聚合物的丝胶蛋白微球,可见丝胶蛋白微球分散于水中呈乳白色,经金属有机配位聚合物包裹的丝胶微球则呈灰黑色,且随着包裹层数的增多颜色有所加深。

[0092] 实施例6:不同层数金属有机配位聚合物包裹的载药丝胶蛋白微球的合成

[0093] (1) 本研究使用的酚类物质为单宁酸,金属离子为铁离子。本研究使用的载药微球为搭载阿霉素的丝胶蛋白微球。将0.80 g单宁酸固体溶于20 mL去离子水配成40 mg/mL的单宁酸溶液。将0.20 g六水合三氯化铁固体溶于20 mL去离子水配成10 mg/mL的铁离子溶液。

[0094] (2) 5 mg载药丝胶蛋白微球分散于0.5 mL去离子水,超声分散后加入5 μ L铁离子溶液,涡旋1分钟后加入5 μ L单宁酸溶液,涡旋1分钟后加入20 mM pH 8.0 Tris缓冲液0.5 mL,6000 rpm离心4分钟得到单宁酸铁离子配位聚合物包封的载药丝胶蛋白微球,去离子水洗涤3遍。

[0095] (3) 重复(2)中步骤得到不同层数金属有机配位聚合物包裹的载药丝胶蛋白微球。

[0096] 结果如图13所示,从左至右依次为未包裹及包裹1、2、3、5层单宁酸-铁离子配位聚合物的载药丝胶蛋白微球,可见再阿霉素的丝胶蛋白微球分散于水中呈红色,经金属有机配位聚合物包裹的载药丝胶微球则呈深红色,且随着包裹层数的增多颜色有所加深。

[0097] 实施例7:金属有机配位聚合物包封的载药丝胶蛋白微球在不同pH条件下的释药

[0098] (1) 本研究使用广谱抗肿瘤药物盐酸阿霉素。将100 mg 盐酸阿霉素溶于200 mL PBS (pH 8.5) 中,加入500 mg 丝胶蛋白微球,室温避光搅拌24小时,用去离子水洗3遍,完全冻干可得到载药丝胶蛋白微球;

[0099] (2) 取5 mg 载药丝胶蛋白微球分散于0.5 mL去离子水中,超声分散后加入5 μ L氯化铁溶液(10 mg/mL),涡旋1分钟后加入5 μ L单宁酸溶液(40 mg/mL),涡旋1分钟后加入20 mM pH 8.0 Tris缓冲液0.5 mL,6000 rpm 离心4分钟得到单宁酸包封的载药丝胶蛋白微球,去离子水洗涤3遍重复包封得到不同层数单宁酸包封的载药丝胶蛋白微球;

[0100] (3) 将3 mg 不同层数单宁酸包封的载药丝胶蛋白微球分装在4个2 mL EP管中(1mg每管),分别加入1 mL pH 5.0, 6.5 和7.4的缓冲液,于37 $^{\circ}$ C 温箱中避光缓慢振荡孵育,在不同的时间点取上清用紫外分光光度计检测494 nm处的吸光度,根据阿霉素标准曲线计算不同时间点释放出的阿霉素的量,同时更换不同缓冲液继续孵育。

[0101] 结果如图14所示,说明该载药丝胶蛋白微球的药物释放速度随着单宁酸包封层数的增加而逐渐减缓,同时该载药丝胶蛋白微球具有pH敏感特性,即酸性条件促进药物的释放,因此适于细胞内涵体内药物释放。

[0102] 实施例8:天然丝胶蛋白微球和金属有机配位聚合物包封的丝胶蛋白微球的血液相容性

[0103] (1) 将天然丝胶蛋白微球表面包封两层单宁酸-铁离子配位聚合物,并将包封与未包封的丝胶蛋白微球经酒精消毒后配成不同浓度梯度的溶液,另外以PBS缓冲液作为阴性对照,0.2% Triton X 100溶液作为阳性对照。

[0104] (2) 选取血常规正常的抗凝血标本,800 rpm离心5分钟,弃上清,用PBS缓冲液洗涤红细胞2-3次,收集下层红细胞,配成2%红细胞悬液。

[0105] (3) 将100 μ L不同浓度的微球悬液和900 μ L红细胞悬液混合,于37 $^{\circ}$ C摇床孵育4小时,8000 rpm离心10分钟,收集上清。

[0106] (4) 将收集的上清用酶标仪检测其545 nm处的吸光度。

[0107] 结果如图15所示,可见丝胶蛋白微球或金属有机配位聚合物包裹的丝胶蛋白微球的加入并不会引起红细胞的破裂,即其血液相容性良好。

[0108] 实施例9:天然丝胶蛋白微球和金属有机配位聚合物包封的丝胶蛋白微球的细胞相容性

[0109] (1)将天然丝胶蛋白微球表面包封两层单宁酸-铁离子配位聚合物,并将包封与未包封的丝胶蛋白微球经酒精消毒后配成不同浓度梯度的溶液;

[0110] (2)将天然丝胶蛋白微球及包封两层单宁酸-铁离子配位聚合物的丝胶蛋白微球与4T1细胞共孵育24小时和48小时后采用MTT法检测4T1细胞活力。

[0111] 结果如图16所示,分别为细胞与微球共孵育24、48小时后的结果,表明天然丝胶蛋白微球无论采用单宁酸-铁离子配位聚合物包封与否对4T1细胞的活力都无明显影响,说明该丝胶蛋白微球的生物相容性良好。

[0112] 实施例10:包封两层单宁酸-铁离子配位聚合物的载药丝胶蛋白微球对肿瘤细胞的杀伤作用

[0113] (1)将载有阿霉素的丝胶蛋白微球表面包封两层单宁酸-铁离子配位聚合物,并将包封与未包封的载药蛋白丝胶微球酒精消毒后配成不同浓度梯度的溶液;

[0114] (2)将游离阿霉素、载药丝胶蛋白微球及包封两层单宁酸-铁离子配位聚合物的载药丝胶蛋白微球与4T1细胞共孵育24小时和48小时后采用MTT法检测4T1细胞活力。

[0115] 结果如图17所示,分别为细胞与载药微球共孵育24、48小时后的结果,表明包封两层单宁酸-铁离子配位聚合物的载药丝胶蛋白微球对4T1细胞有一定的杀伤作用,能有效发挥其抗肿瘤作用。

[0116] 最后需申明的是,以上列举的仅为本发明的具体实施例,而本发明并不限于以上实施例,还可有许多变形,因此由本发明所公开的内容直接或联想到的所有变形,均应认为是本发明的保护范围。

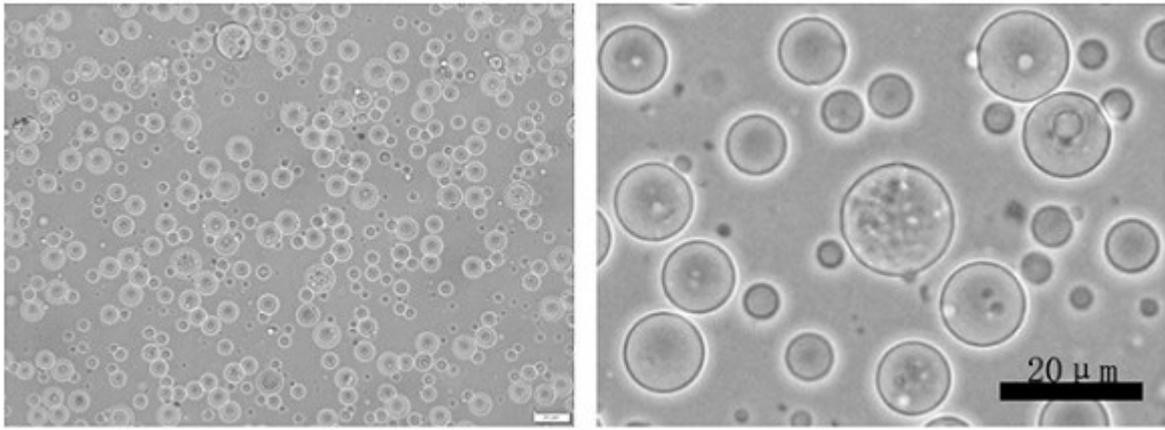


图1

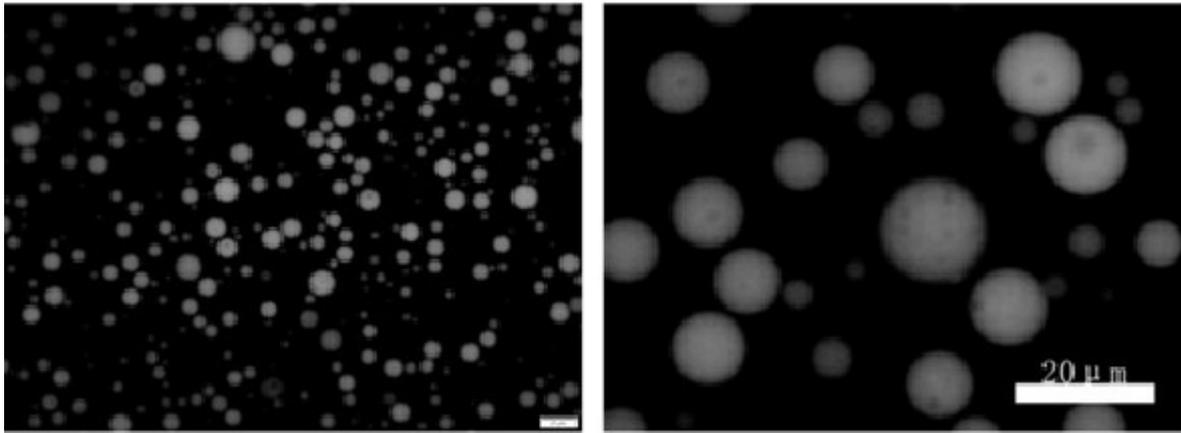


图2

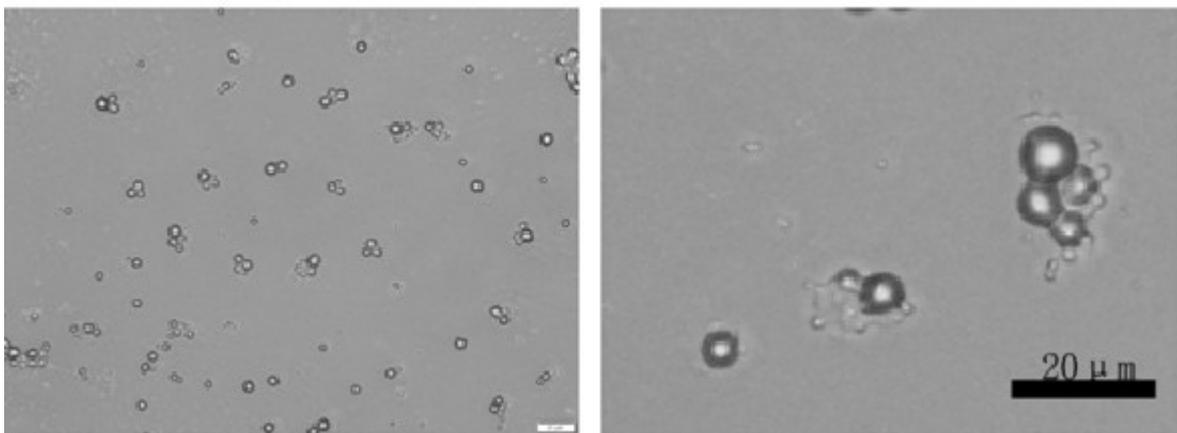


图3

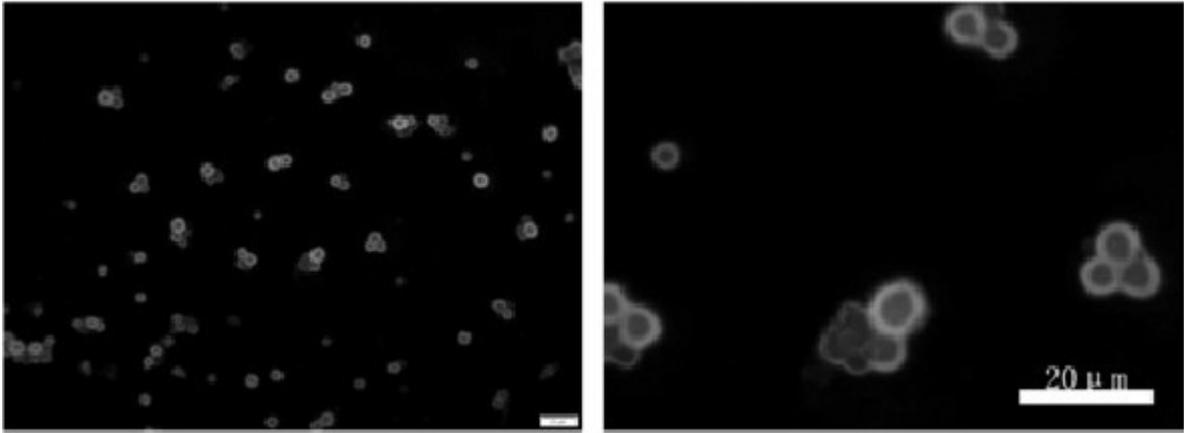


图4

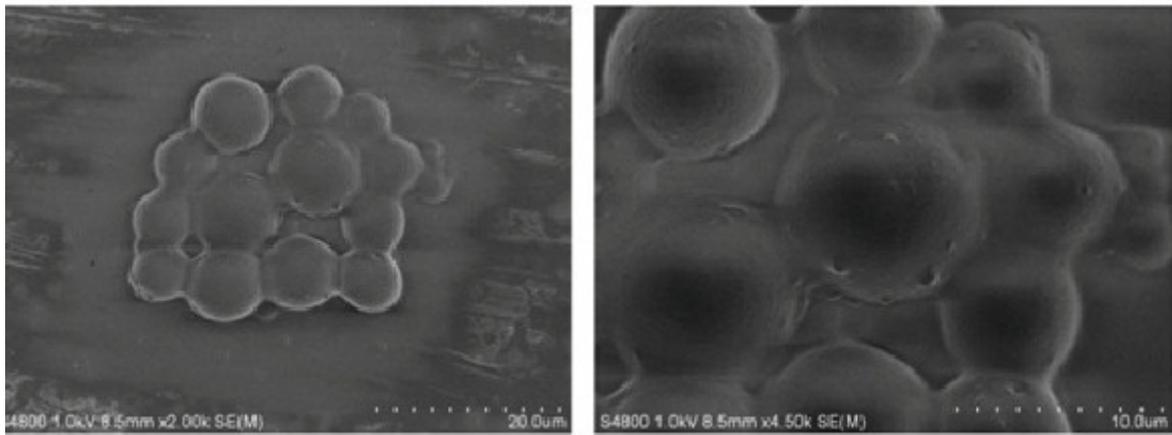


图5

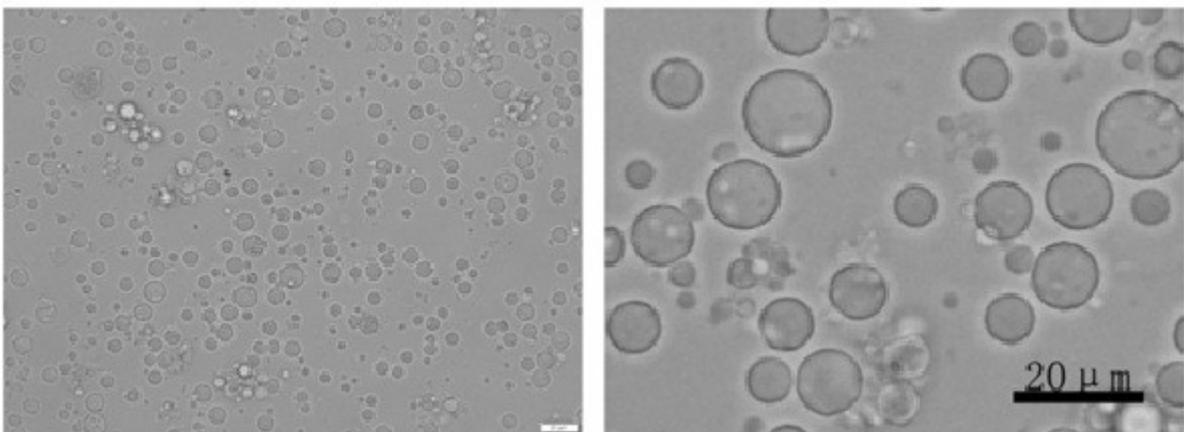


图6

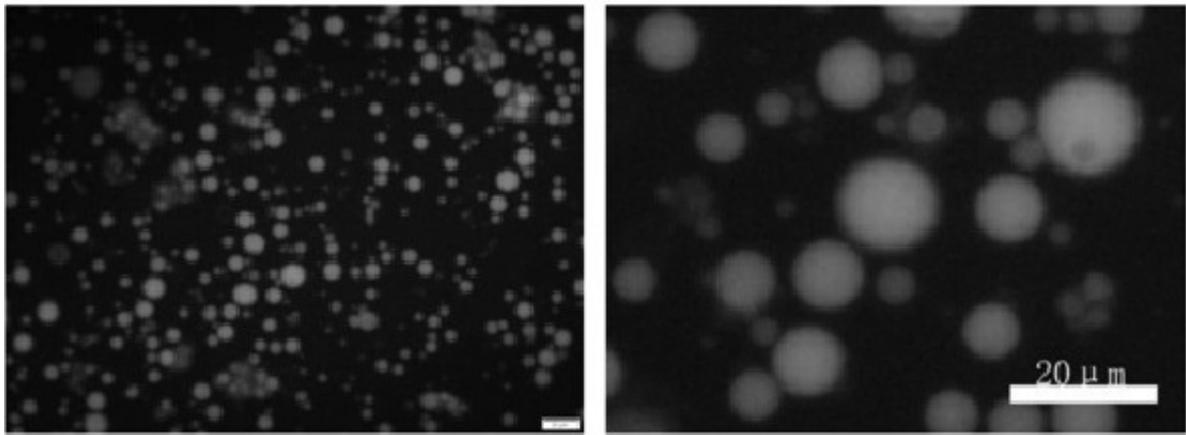


图7

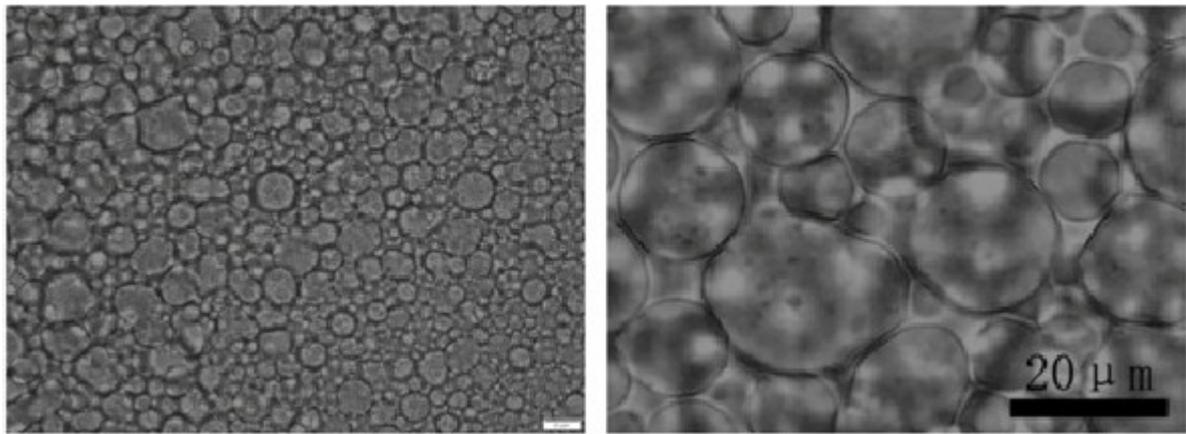


图8

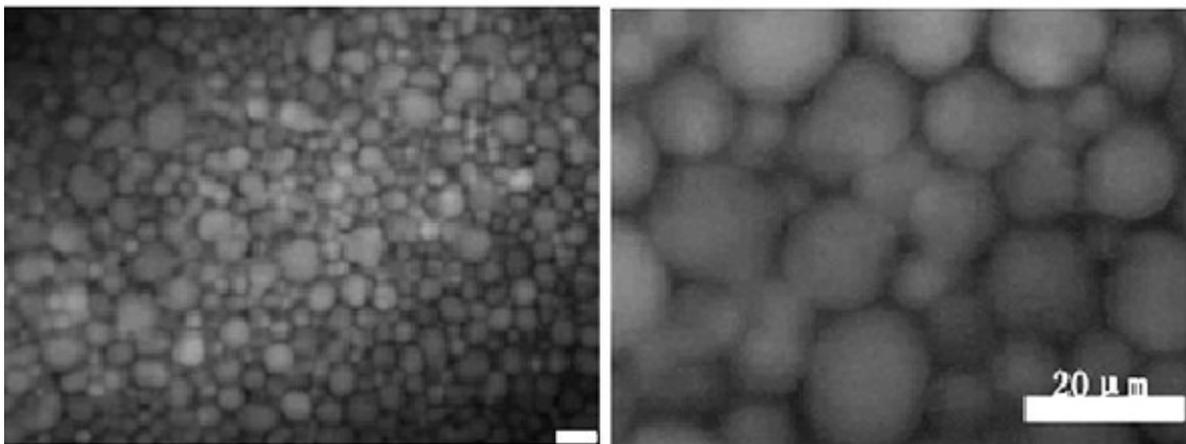


图9

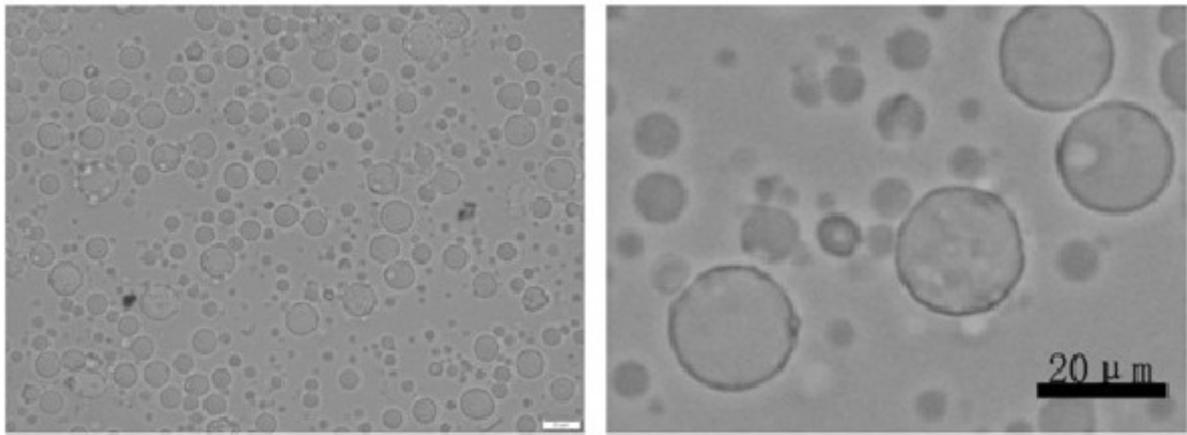


图10

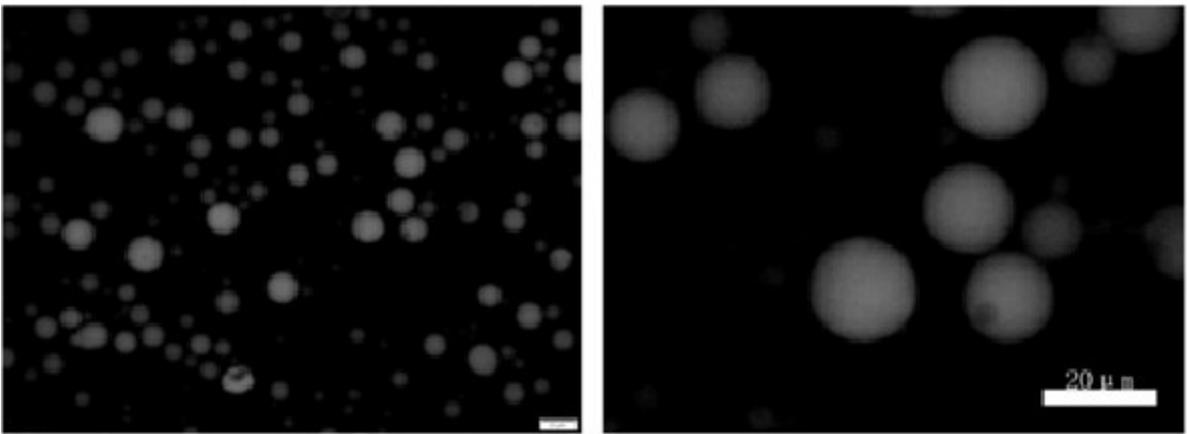


图11

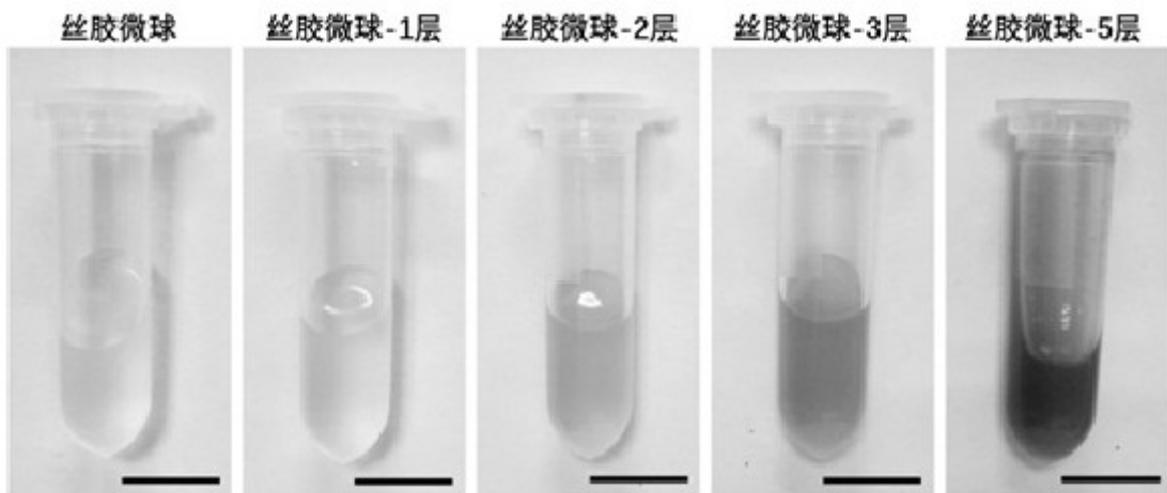


图12

载药丝胶微球 载药丝胶微球-1层载药丝胶微球-2层载药丝胶微球-3层 载药丝胶微球-5层

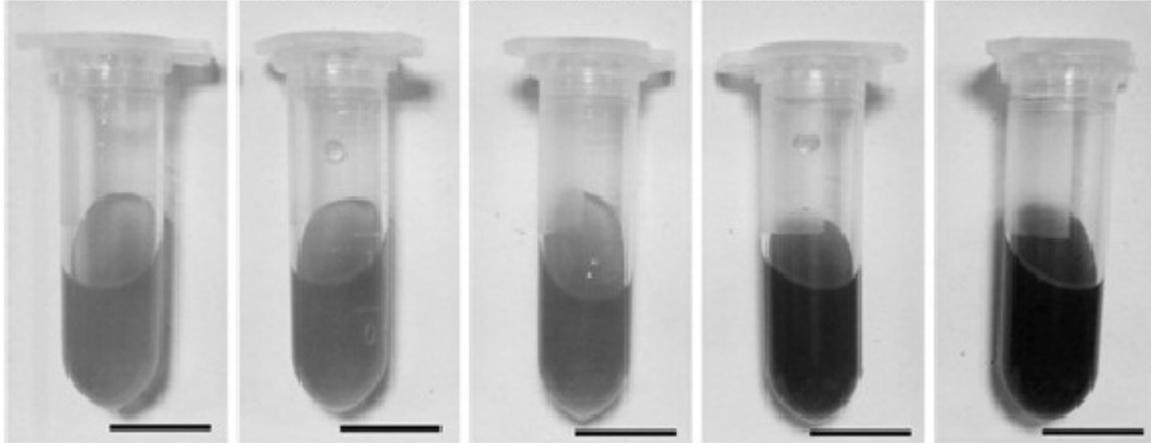


图13

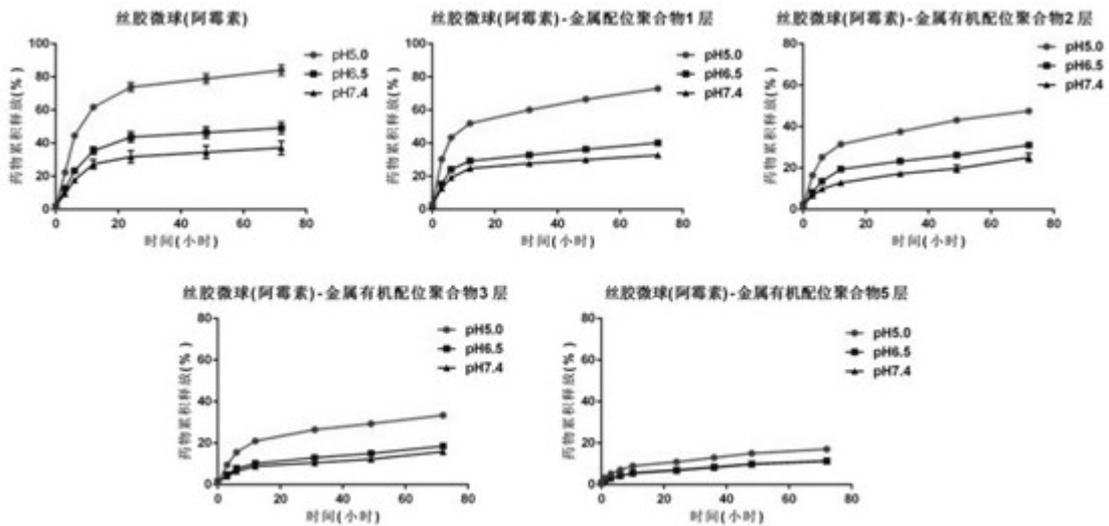


图14

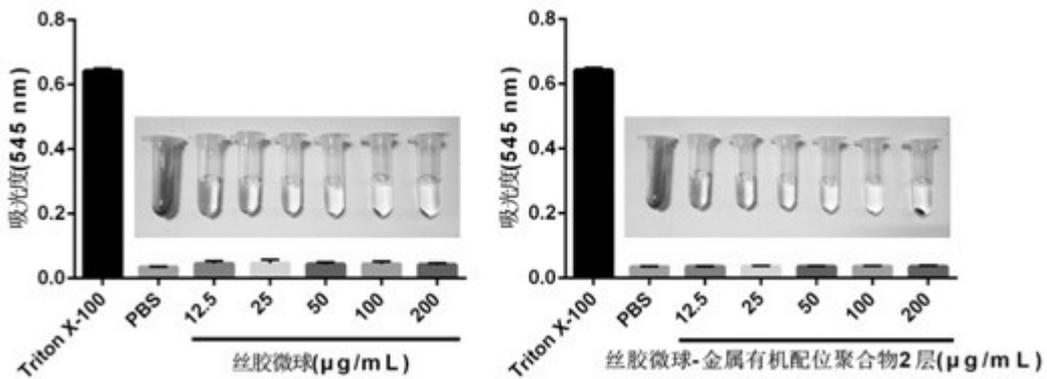


图15

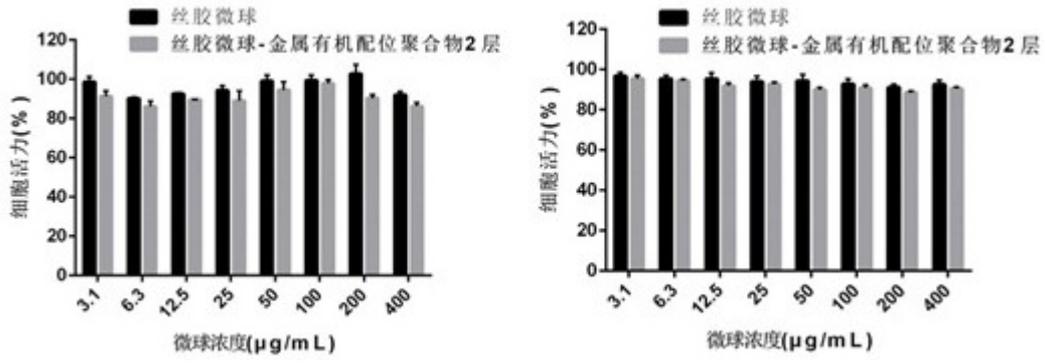


图16

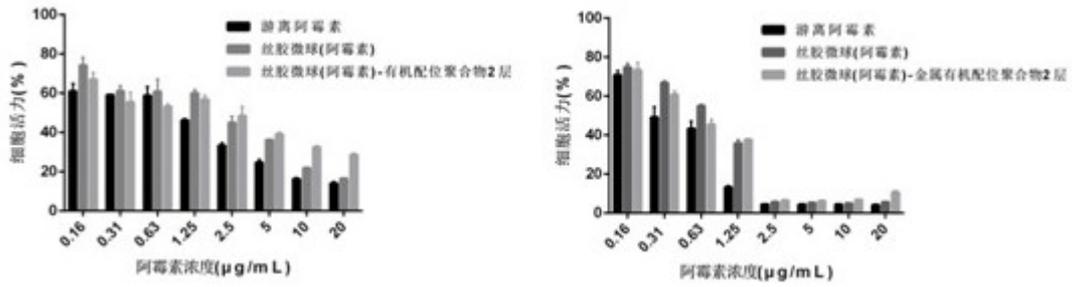


图17