



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104497171 B

(45)授权公告日 2017.05.10

(21)申请号 201510006737.9

A61K 31/704(2006.01)

(22)申请日 2015.01.07

A61K 31/337(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

A61P 35/00(2006.01)

申请公布号 CN 104497171 A

审查员 胡香玉

(43)申请公布日 2015.04.08

(73)专利权人 博瑞生物医药(苏州)股份有限公司

地址 215123 江苏省苏州市苏州工业园区
星湖街218号纳米科技园C25栋

(72)发明人 钟志远 钟伊南 孟凤华

(51)Int.Cl.

C08B 37/08(2006.01)

C08J 3/24(2006.01)

A61K 47/61(2017.01)

A61K 9/51(2006.01)

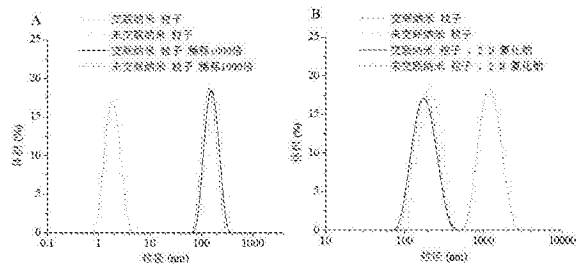
权利要求书1页 说明书16页 附图5页

(54)发明名称

基于透明质酸的两亲聚合物、其制备方法与
应用

(57)摘要

本发明公开了一种基于透明质酸的两亲聚
合物、其制备方法与应用。所述两亲聚合物的主
链为亲水性透明质酸,具有主动靶向能力;侧链
为疏水性的赖氨酸甲酯-硫辛酰基;可负载小分
子抗癌药物,通过化学交联,得到聚合物纳米粒
子,使得纳米粒子在细胞外和血液中不易解离,
从而保证纳米粒子包封的药物稳定;一旦到达肿
瘤组织,纳米粒子表面的透明质酸可以与肿瘤细
胞表面的CD44受体紧密结合并通过受体介导的
内吞作用有效进入肿瘤细胞内,然后快速解交联
而解离,药物快速释放,在肿瘤部位的富集率高,
达到12.71%ID/g,远高于现有技术的水平,从而
产生高效治疗作用;克服了药物在体内易被泄
漏、运载效率低、细胞内吞少、细胞内释放慢等不
足。



1. 一种基于透明质酸的两亲聚合物,其特征在于:所述两亲聚合物主链为透明质酸,侧链为赖氨酸甲酯-硫辛酰基;所述透明质酸的分子量为7~500 kDa;赖氨酸甲酯-硫辛酰基的取代度为5~40%。

2. 权利要求1所述基于透明质酸的两亲聚合物的制备方法,其特征在于,包括以下步骤,首先透明质酸与N-叔丁氧羰基赖氨酸甲酯在1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐/N-羟基琥珀酰亚胺催化下通过酰胺化反应转化成透明质酸-N-叔丁氧羰基赖氨酸甲酯;然后将脱保护之后得到的透明质酸-赖氨酸甲酯,与硫辛酸酐在4-(二甲氨基)吡啶催化下通过酰胺化反应得到所述基于透明质酸的两亲聚合物。

3. 一种交联纳米粒子,其特征在于:所述交联纳米粒子由权利要求1所述的两亲聚合物构成,所述交联纳米粒子的外层亲水层由透明质酸构成,内层疏水层由赖氨酸甲酯-硫辛酰基的五元环交联构成。

4. 权利要求1所述的两亲聚合物在制备药物载体中的应用。

5. 一种载药纳米粒子,包括载体与负载在载体上的小分子抗癌药物,其特征在于:所述载体由权利要求1所述的两亲聚合物构成,所述载体的外层亲水层由透明质酸构成,内层疏水层由赖氨酸甲酯-硫辛酰基的五元环交联构成。

6. 根据权利要求5所述载药纳米粒子,其特征在于:所述小分子抗癌药物为阿霉素、紫杉醇、姜黄素、多西紫杉醇或者喜树碱。

7. 根据权利要求5所述载药纳米粒子,其特征在于:载体对药物的包封率为40%~91%;所述载药纳米粒子的载药量为11%~22%。

8. 根据权利要求5所述载药纳米粒子,其特征在于:所述载药纳米粒子的粒径为50~300纳米,粒径分布为0.02~0.30。

9. 权利要求5所述载药纳米粒子在制备抗肿瘤药物中的应用。

10. 根据权利要求9所述的应用,其特征在于:所述肿瘤为CD44受体过量表达的肿瘤。

基于透明质酸的两亲聚合物、其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种生物可降解聚合物材料及其应用,具体涉及一种基于透明质酸的两亲聚合物、由其制备的纳米粒子与应用,属于医药材料领域。

背景技术

[0002] 双亲性天然聚合物利用分子间的相互作用在水中可以自组装形成包括外部亲水层、内部疏水层的聚合物纳米粒子(Nanoparticles)。纳米粒子作为药物载体进入体内,可以有效地减少人体网状内皮系统(RES)巨噬细胞的吞噬,能穿越细胞间隙,可通过人体最小的毛细血管及血脑屏障(BBB)并被细胞组织吸收。纳米粒子药物载体可以控制药物在靶向部位控制释放、减少药物用量、增强药物疗效并降低药物毒性。理想的两亲聚合物纳米粒子必须具有在血液循环中良好的稳定性避免药物过早释放,同时在肿瘤细胞中快速释放药物的能力。

[0003] Jian You发现表面修饰了聚乙二醇(PEG)的载有阿霉素(DOX)的空心金纳米球经尾静脉注射6小时及24小时之后在肿瘤部位DOX的富集都低于5%ID/g(参见: Jian You等, Photothermal-chemotherapy with doxorubicin-loaded hollow gold nanospheres: A platform for near-infrared light-triggered drug release, Journal of Controlled Release 158 (2012) 319-328)。现有聚合物纳米载药粒子在肿瘤中的分布一般为1-5%ID/g,使得药物的生物利用率差,造成毒副作用。在聚合物纳米载药粒子表面修饰一些靶向分子诸如多肽,糖类,抗体以及适配体等可以通过受体介导的内吞作用有效进入肿瘤细胞内,大大提高纳米粒子在肿瘤部位的富集。但是此举增加了制备成本,并可能对纳米粒子的结构尺寸等造成影响。

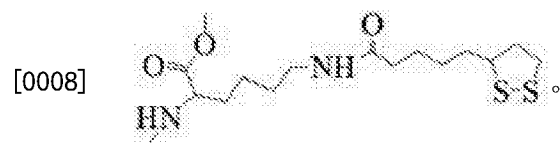
[0004] 同时,药物载体还需具有良好的生物相容性,代谢产物对人体无害,并且来源广泛,重复单元中有多种官能团,易于改性的性质,使其在药物的控制释放上具有巨大应用潜力。

发明内容

[0005] 本发明的目的是,提供一种基于透明质酸的两亲聚合物。

[0006] 为达到上述目的,本发明具体的技术方案为:

[0007] 一种基于透明质酸的两亲聚合物,其主链为透明质酸,侧链为赖氨酸甲酯-硫辛酰基;所述透明质酸的分子量为7~500 kDa;赖氨酸甲酯-硫辛酰基的取代度为5~40%;赖氨酸甲酯-硫辛酰基的化学结构式为:



[0009] 上述基于透明质酸的两亲聚合物称为HA-Lys-LA聚合物,可以通过两步酰胺化反应得到:首先透明质酸(HA)与N-叔丁氧羰基赖氨酸甲酯(H-Lys(Boc)-OMe)在1-(3-二甲基

氨丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐/N-羟基琥珀酰亚胺(EDC/NHS)催化下通过酰胺化反应转化成透明质酸-N-叔丁氧羰基赖氨酸甲酯(HA-Lys(Boc)-OMe),脱保护之后得到透明质酸-赖氨酸甲酯(HA-Lys-OMe);HA-Lys-OMe再与硫辛酸酐(LAA)在4-(二甲氨基)吡啶(DMAP)催化下通过酰胺化反应得到基于透明质酸的两亲聚合物HA-Lys-LA。

[0010] 上述技术方案中,赖氨酸甲酯及硫辛酰基作为疏水链段引入亲水聚合物透明质酸的侧链,得到两亲聚合物;该两亲聚合物可以在水溶液中自组装形成纳米粒,然后可以通过还原剂如二硫代苏糖醇(DTT)来交联硫辛酰基得到交联纳米粒子,这样可增加纳米粒子的稳定性。其中,水溶液可选自:纯水,磷酸盐缓冲溶液(PB),4-羟乙基哌嗪乙磺酸(Hepes)缓冲溶液等。

[0011] 因此本发明还公开了一种交联纳米粒子,所述交联纳米粒子由上述两亲聚合物构成,所述纳米粒子的外层亲水层由透明质酸构成,内层疏水层由赖氨酸甲酯-硫辛酰基的五元环交联构成。

[0012] 制备上述交联纳米粒子的方法包括以下步骤:

[0013] (1)将上述两亲聚合物通过自组装形成纳米粒子,所述纳米粒子的亲水外层由具有主动靶向的透明质酸构成,内层疏水层由赖氨酸甲酯-硫辛酰基构成;

[0014] (2)将步骤(1)中纳米粒子的内层疏水层交联,通过硫辛酰基的五元环的交联来稳定纳米粒子结构,得到交联纳米粒子。

[0015] 上述技术方案中,步骤(1)中所述两亲聚合物在水溶液中自组装形成以赖氨酸甲酯-硫辛酰基为疏水部分的纳米粒子,所述纳米粒子的粒径为50~300 nm。尺寸稳定,分布均一。

[0016] 上述技术方案中,步骤(2)中所述的交联可采用下列方法:

[0017] 利用巯基-二硫键交换反应,通过1,4-二硫代-D,L-苏丁醇(DTT)或谷胱甘肽(GSH)和步骤(1)所得纳米粒子中的含二硫键的五元环发生交换反应,得到还原敏感的化学交联;其中,1,4-二硫代-D,L-苏丁醇(DTT)或谷胱甘肽(GSH)的用量为两亲聚合物中硫辛酰基的摩尔数的5~30%,纳米粒能够交联,稳定性相对于没有交联的纳米粒子大大提高,即使稀释1000倍(模拟IV注射)也不发生解离;对2 M的氯化钠盐的水溶液稳定,粒径不变。

[0018] 上述两亲聚合物的疏水层可以负载小分子药物,并通过交联形成对药物的负载,增加载药纳米粒子的稳定性,所以本发明还公开了上述两亲聚合物在制备药物载体中的应用。

[0019] 本发明进一步公开了一种载药纳米粒,包括载体与负载在载体上的小分子抗癌药物,所述载体由上述的两亲聚合物构成,所述载体的外层亲水层由透明质酸构成,内层疏水层由赖氨酸甲酯-硫辛酰基构成。为了增加载药纳米粒在体内运行的稳定性,可以对载体中的硫辛酰基五元环进行交联,即得到一种载药纳米粒子,包括载体与负载在载体上的小分子抗癌药物,所述载体由上述的两亲聚合物构成,所述载体的外层亲水层由透明质酸构成,内层疏水层由赖氨酸甲酯-硫辛酰基的五元环交联构成。

[0020] 上述技术方案中,所述小分子抗癌药物可选自但不限于:阿霉素、紫杉醇、姜黄素、多西紫杉醇或者喜树碱等。

[0021] 优选的技术方案中,载体对小分子抗癌药物的包封率为40%~91%;所述载药纳米粒子的载药量为11%~22%。

[0022] 优选的技术方案中,载药纳米粒子的粒径为50~300纳米,粒径分布为0.02~0.30。

[0023] 本发明还公开了上述载药纳米粒子的制备方法,包括以下步骤:

[0024] (1)小分子药物先溶在有机溶液中,再与所述两亲聚合物的有机溶液共同搅拌,然后再滴加磷酸盐缓冲溶液,将得到的溶液搅拌0.5小时后透析,得到包裹药物的纳米粒子。

[0025] (2)利用巯基-二硫键交换反应,通过1,4-二硫代-D, L-苏丁醇对步骤(1)所得纳米粒子中的含二硫键的五元环进行化学交联;其中,1,4-二硫代-D, L-苏丁醇的用量为两亲聚合物中硫辛酰基的摩尔数的5~30%。

[0026] 上述方法得到的载药纳米粒子为交联的载药纳米粒子,可提高药物在体内血液中循环的稳定性。

[0027] 上述两亲聚合物构成的小分子药物载体同时具有主动靶向性和还原敏感性,可提高药物在体内血液中循环的稳定性,提高药物被肿瘤细胞内吞的量;同时两亲性聚合物交联纳米粒子在细胞内还原剂存在下,快速解交联、快速释放药物,从而提高药物的生物利用度;并且两亲聚合物交联纳米粒子可方便排出体外。用以解交联的还原剂可选自:含巯基的分子,如1,4-二硫代-D, L-苏丁醇(DTT),谷胱甘肽(GSH)或含三价磷的化合物,如三(2-氯乙基)磷酸酯(tris(2-carboxyethyl)-phosphine, TCEP);例如当谷胱甘肽的浓度为10 mM的时候,上述两亲聚合物构成的交联纳米粒子会被解交联,释放药物,治疗疾病。

[0028] 本发明中,由两亲聚合物构成的纳米粒子的疏水性内核负载小分子抗癌药物;亲水外壳透明质酸具有肿瘤主动靶向能力,能与多种癌细胞表面的CD44受体结合,通过受体介导的内吞作用有效内吞进入肿瘤细胞内,同时交联可以增加载药纳米粒子在体内输送时的稳定性,交联载药纳米粒子进入肿瘤细胞后,对肿瘤细胞内的还原环境敏感,能快速解除交联,释放药物,高效杀死癌细胞。

[0029] 所以本发明公开了上述包括载体与负载在载体上的小分子抗癌药物的载药纳米粒子在制备抗肿瘤药物中的应用。所述肿瘤优选为细胞表面CD44受体过量表达的肿瘤。

[0030] 由于上述方案的实施,本发明与现有技术相比,具有以下优点:

[0031] 1. 本发明首次公开了基于透明质酸两亲聚合物的药物载体,药物包覆率高、体内循环稳定,药物利用率高,并且生物相容性好,副作用小,可方便排出体外。

[0032] 2. 本发明公开的基于透明质酸两亲聚合物的疏水部分为硫辛酰基,通过自组装以及交联作用可以得到稳定的交联纳米粒子,该纳米粒子在细胞外和血液中不易解离,从而保证纳米粒子包封的药物稳定,增加药物体内循环时间;克服了现有技术中药物在体内易被泄漏、运载效率低的缺陷;并且该纳米粒子具有还原敏感性,在还原性环境中发生解交联,释放药物,有效将药物传递至目标组织。

[0033] 3. 本发明公开的基于透明质酸两亲聚合物的药物载体亲水部分为透明质酸,可以主动靶向到肿瘤细胞表面,并通过受体介导的内吞作用进入到肿瘤细胞内,有效增加细胞内吞能力,克服了普通纳米载体细胞摄取能力低的问题。

[0034] 4. 本发明公开的基于透明质酸两亲聚合物的药物载体无需修饰靶向分子即可有效进入肿瘤细胞内,在肿瘤部位的富集率高,达到12.71%ID/g,远高于现有技术的水平;对肿瘤细胞、耐药性肿瘤细胞和肿瘤干细胞都具有高细胞毒性。

[0035] 5. 本发明公开的药物载体制备简单,具有良好的生物相容性,代谢产物对人体无

害,并且来源广泛,重复单元中有多种官能团,易于改性;并且在肿瘤部分能快速解交联而解离,药物快速释放出来,从而产生高效治疗作用,在药物的控制释放上具有巨大应用潜力。

附图说明

- [0036] 图1为实施例中聚合物HA-Lys-LA的合成路线图;
- [0037] 图2为实施例十五中HA-Lys-LA交联纳米粒子在高倍稀释及高盐度条件下尺寸变化结果图;
- [0038] 图3为实施例二十一中载有DOX的HA-Lys-LA交联纳米粒子在谷胱甘肽触发下体外释放结果图;
- [0039] 图4为实施例二十四中载药HA-Lys-LA交联纳米粒子、DOX以及HA封闭的交联纳米粒子在MCF-7/ADR细胞内的药物释放结果图;
- [0040] 图5为实施例二十五中不同HA-Lys-LA纳米粒子对MCF-7/ADR细胞的细胞毒性结果图;
- [0041] 图6为实施例二十九中载有DOX的HA-Lys-LA交联纳米粒子在小鼠体内血液循环结果图;
- [0042] 图7为实施例三十一中载有Cy7的HA-Lys-LA交联纳米粒子在荷MCF-7/ADR肿瘤裸鼠体内的活体成像结果图;
- [0043] 图8为实施例三十三中载有DOX的HA-Lys-LA交联纳米粒子在荷MCF-7/ADR肿瘤裸鼠各脏器的生物分布结果图;
- [0044] 图9为实施例三十四中载有DOX的HA-Lys-LA交联纳米粒子在荷MCF-7/ADR瘤的裸鼠体内的肿瘤生长变化结果图。

具体实施方式

- [0045] 下面结合附图及实施例对本发明作进一步描述:
- [0046] 实施例一 合成聚合物透明质酸-赖氨酸-硫辛酸(HA-Lys-LA) ($M_{nHA} = 35$ kDa, DS = 10 %)
- [0047] 图1为实施例中聚合物HA-Lys-LA的合成路线图。首先,于室温在N-叔丁氧羰基赖氨酸甲酯盐酸盐(H-Lys(Boc)-OMe \times HCl) (240 mg, 0.80 mmol) /无水甲醇溶液(2mL)中加入三乙胺(85 mg, 0.84 mmol)并搅拌1小时,接着在透明质酸(HA) (300 mg, 0.79 mmol 羧基)水溶液(6mL)中依次加入1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC) (460 mg, 2.40 mmol), N-羟基琥珀酰亚胺(NHS) (140 mg, 1.22 mmol)以及脱完盐酸盐的N-叔丁氧羰基赖氨酸甲酯盐酸盐(H-Lys(Boc)-OMe) /甲醇溶液并将整个溶液的pH调节至8.5,室温搅拌反应24小时后,透析,冻干得到透明质酸-N-叔丁氧羰基赖氨酸甲酯(HA-Lys(OMe)-Boc)。在得到的HA-Lys(OMe)-Boc固体中依次加入三氟乙酸/2M 盐酸(v/v 1:1)共6mL,搅拌反应6h,脱保护结束后将溶液pH调节至7.0,透析,冻干,产率92%。核磁结果表明其结构为透明质酸-赖氨酸甲酯(HA-Lys(OMe)),其中赖氨酸甲酯(Lys(OMe))的取代度(DS)为10%。
- [0048] 将硫辛酸(12 mg, 58 μ mol)溶解在2.0 mL二氯甲烷中,加入到25mL的Schlenk真空密封瓶中,通氮气条件下,溶解在1.0 mL的二氯甲烷中的N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)

(6 mg, 29 μ mol)加入密封瓶中,把瓶子放在30 $^{\circ}$ C的油浴中,搅拌反应22小时后,冷却,过滤除去反应中生成的脬,滤液旋蒸,除去溶剂后得到硫辛酸酐。

[0049] 将上面得到的硫辛酸酐溶解在0.5mL经过无水处理的N,N'-二甲基甲酰胺中。氮气保护下,于50mL的三口烧瓶中依次加入溶解在5mL甲酰胺中的HA-Lys (OMe) (60mg, 27 μ mol氨基),硫辛酸酐及溶解在0.5mLN,N'-二甲基甲酰胺中的4-二甲氨基吡啶(DMAP) (4mg, 33 μ mol),反应器放置在30 $^{\circ}$ C的油浴中,搅拌反应48小时后,依次在水/乙醇(1/1)及水中透析,冻干,产率95%。核磁结果表明其结构为透明质酸-赖氨酸-硫辛酸(HA-Lys-LA),其中赖氨酸甲酯-硫辛酰基的取代度(DS)为10%。

[0050] 实施例二 合成聚合物HA-Lys-LA (M_{nHA} =35kDa, DS = 5%)

[0051] 首先,于室温在H-Lys (Boc)-OMe \times HCl (120mg, 0.40mmol)/无水甲醇溶液(2mL)中加入三乙胺(42mg, 0.42mmol)并搅拌1小时,接着在HA (300mg, 0.79mmol 羧基)水溶液(6mL)中依次加入EDC (460mg, 2.40mmol),NHS (140mg, 1.22mmol)以及脱完盐酸盐的H-Lys (Boc)-OMe/甲醇溶液并将整个溶液的pH调节至8.5,室温搅拌反应24小时后,透析,冻干得到HA-Lys (OMe)-Boc。在得到的HA-Lys (OMe)-Boc固体中依次加入三氟乙酸/2M 盐酸(v/v 1:1)共6mL,搅拌反应6h,脱保护结束后将溶液pH调节至7.0,透析,冻干,产率89%。核磁结果表明其结构为HA-Lys (OMe),其中Lys (OMe)的取代度5%。

[0052] 将硫辛酸(12mg, 58 μ mol)溶解在2.0mL二氯甲烷中,加入到25mL的Schlenk真空密封瓶中,通氮气条件下,溶解在1.0mL的二氯甲烷中的DCC(6mg, 29 μ mol)加入密封瓶中,把瓶子放在30 $^{\circ}$ C的油浴中,搅拌反应22小时后,冷却,过滤除去反应中生成的脬,滤液旋蒸,除去溶剂后得到硫辛酸酐。

[0053] 将上面得到的硫辛酸酐溶解在0.5mL经过无水处理的N,N'-二甲基甲酰胺中。氮气保护下,于50mL的三口烧瓶中依次加入溶解在5mL甲酰胺中的HA-Lys (OMe) (60mg, 14 μ mol氨基),硫辛酸酐及溶解在0.5mL N,N'-二甲基甲酰胺中的4-二甲氨基吡啶(4mg, 33 μ mol),反应器放置在30 $^{\circ}$ C的油浴中,搅拌反应48小时后,依次在水/乙醇(1/1)及水中透析,冻干,产率93%。核磁结果表明其结构为HA-Lys-LA,其中赖氨酸甲酯-硫辛酰基的取代度5%。

[0054] 实施例三 合成聚合物HA-Lys-LA (M_{nHA} =35kDa, DS = 28%)

[0055] 首先,于室温在H-Lys (Boc)-OMe \times HCl (480mg, 1.58mmol)/无水甲醇溶液(2mL)中加入三乙胺(42mg, 0.42mmol)并搅拌1小时,接着在HA (300mg, 0.79mmol 羧基)水溶液(6mL)中依次加入EDC (460mg, 2.40mmol),NHS (140mg, 1.22mmol)以及脱完盐酸盐的H-Lys (Boc)-OMe/甲醇溶液并将整个溶液的pH调节至8.5,室温搅拌反应24小时后,透析,冻干得到HA-Lys (OMe)-Boc。在得到的HA-Lys (OMe)-Boc固体中依次加入三氟乙酸/2M 盐酸(v/v 1:1)共6mL,搅拌反应6h,脱保护结束后将溶液pH调节至7.0,透析,冻干,产率90%。核磁结果表明其结构为HA-Lys (OMe),其中Lys (OMe)的取代度28%。

[0056] 将硫辛酸(32mg, 152 μ mol)溶解在2.0mL二氯甲烷中,加入到25mL的Schlenk真空密封瓶中,通氮气条件下,溶解在1.0mL的二氯甲烷中的DCC(16mg, 76 μ mol)加入密封瓶中,把瓶子放在30 $^{\circ}$ C的油浴中,搅拌反应22小时后,冷却,过滤除去反应中生成的脬,滤液旋蒸,除去溶剂后得到硫辛酸酐。

[0057] 将上面得到的硫辛酸酐溶解在0.5mL经过无水处理的N,N'-二甲基甲酰胺中。氮气保护下,于50mL的三口烧瓶中依次加入溶解在5mL甲酰胺中的HA-Lys (OMe) (60mg, 76 μ mol

氨基), 硫辛酸酐及溶解在0.5mL N,N'-二甲基甲酰胺中的4-二甲氨基吡啶(10mg, 83 μ mol), 反应器放置在30℃的油浴中, 搅拌反应48小时后, 依次在水/乙醇(1/1)及水中透析, 冻干, 产率91%。核磁结果表明其结构为HA-Lys-LA, 其中赖氨酸甲酯-硫辛酰基的取代度28%。

[0058] 实施例四 合成聚合物HA-Lys-LA ($M_{nHA} = 8.9kDa$, $DS = 12\%$)

[0059] 首先, 于室温在H-Lys (Boc)-OMe \times HCl (240mg, 0.80mmol)/无水甲醇溶液(2mL)中加入三乙胺(85mg, 0.84mmol)并搅拌1小时, 接着在HA (300mg, 0.79mmol 羧基)水溶液(6mL)中依次加入EDC (460mg, 2.40mmol), NHS (140mg, 1.22mmol)以及脱完盐酸盐的H-Lys (Boc)-OMe/甲醇溶液并将整个溶液的pH调节至8.5, 室温搅拌反应24小时后, 透析, 冻干得到HA-Lys (OMe)-Boc。在得到的HA-Lys (OMe)-Boc固体中依次加入三氟乙酸/2M 盐酸(v/v 1:1)共6mL, 搅拌反应6h, 脱保护结束后将溶液pH调节至7.0, 透析, 冻干, 产率92%。核磁结果表明其结构为HA-Lys (OMe), 其中Lys (OMe)的取代度12%。

[0060] 将硫辛酸(15mg, 70 μ mol)溶解在2.0mL二氯甲烷中, 加入到25mL的Schlenk真空密封瓶中, 通氮气条件下, 溶解在1.0mL的二氯甲烷中的DCC(7mg, 35 μ mol)加入密封瓶中, 把瓶子放在30℃的油浴中, 搅拌反应22小时后, 冷却, 过滤除去反应中生成的脬, 滤液旋蒸, 除去溶剂后得到硫辛酸酐。

[0061] 将上面得到的硫辛酸酐溶解在0.5mL经过无水处理的N,N'-二甲基甲酰胺中。氮气保护下, 于50mL的三口烧瓶中依次加入溶解在5mL甲酰胺中的HA-Lys (OMe) (60mg, 32 μ mol 氨基), 硫辛酸酐及溶解在0.5mL N,N'-二甲基甲酰胺中的4-二甲氨基吡啶(5mg, 40 μ mol), 反应器放置在30℃的油浴中, 搅拌反应48小时后, 依次在水/乙醇(1/1)及水中透析, 冻干, 产率94%。核磁结果表明其结构为HA-Lys-LA, 其中赖氨酸甲酯-硫辛酰基的取代度12%。

[0062] 实施例五 合成聚合物HA-Lys-LA ($M_{nHA} = 8.9kDa$, $DS = 10\%$)

[0063] 首先, 于室温在H-Lys (Boc)-OMe \times HCl (240mg, 0.80mmol)/无水甲醇溶液(2mL)中加入三乙胺(85mg, 0.84mmol)并搅拌1小时, 接着在HA (300mg, 0.79mmol 羧基)水溶液(6mL)中依次加入EDC (460mg, 2.40mmol), NHS (140mg, 1.22mmol)以及脱完盐酸盐的H-Lys (Boc)-OMe/甲醇溶液并将整个溶液的pH调节至8.5, 室温搅拌反应24小时后, 透析, 冻干得到HA-Lys (OMe)-Boc。在得到的HA-Lys (OMe)-Boc固体中依次加入三氟乙酸/2M 盐酸(v/v 1:1)共6mL, 搅拌反应6h, 脱保护结束后将溶液pH调节至7.0, 透析, 冻干得到HA-Lys (OMe)。

[0064] 将硫辛酸(12mg, 58 μ mol)溶解在2.0mL二氯甲烷中, 加入到25mL的Schlenk真空密封瓶中, 通氮气条件下, 溶解在1.0mL的二氯甲烷中的DCC(0.384g, 1.86mmol)加入密封瓶中, 把瓶子放在30℃的油浴中, 搅拌反应22小时后, 冷却, 过滤除去反应中生成的脬, 滤液旋蒸, 除去溶剂后得到硫辛酸酐。

[0065] 将上面得到的硫辛酸酐溶解在0.5mL经过无水处理的N,N'-二甲基甲酰胺中。氮气保护下, 于50mL的三口烧瓶中依次加入溶解在5mL甲酰胺中的HA-Lys (OMe) (60mg, 27 μ mol 氨基), 硫辛酸酐及溶解在0.5mL N,N'-二甲基甲酰胺中的4-二甲氨基吡啶(4mg, 33 μ mol), 反应器放置在30℃的油浴中, 搅拌反应48小时后, 依次在水/乙醇(1/1)及水中透析, 冻干, 产率95%。核磁结果表明其结构为HA-Lys-LA, 其中赖氨酸甲酯-硫辛酰基的取代度10%。

[0066] 实施例六 合成聚合物HA-Lys-LA ($M_{nHA} = 100kDa$, $DS = 10\%$)

[0067] 首先, 于室温在H-Lys (Boc)-OMe \times HCl (240mg, 0.80mmol)/无水甲醇溶液(2mL)

中加入三乙胺(85mg, 0.84mmol)并搅拌1小时,接着在HA (300mg, 0.79mmol羧基)水溶液(6mL)中依次加入EDC (460mg, 2.40mmol), NHS (140mg, 1.22mmol)以及脱完盐酸盐的H-Lys (Boc)-OMe/甲醇溶液并将整个溶液的pH调节至8.5,室温搅拌反应24小时后,透析,冻干得到HA-Lys (OMe)-Boc。在得到的HA-Lys (OMe)-Boc固体中依次加入三氟乙酸/2M盐酸(v/v 1:1)共6mL,搅拌反应6h,脱保护结束后将溶液pH调节至7.0,透析,冻干,产率92%。核磁结果表明其结构为HA-Lys (OMe),其中Lys (OMe)的取代度10%。

[0068] 将硫辛酸(12mg, 58 μ mol)溶解在2.0mL二氯甲烷中,加入到25mL的Schlenk真空密封瓶中,通氮气条件下,溶解在1.0mL的二氯甲烷中的DCC(6mg, 29 μ mol)加入密封瓶中,把瓶子放在30 $^{\circ}$ C的油浴中,搅拌反应22小时后,冷却,过滤除去反应中生成的脬,滤液旋蒸,除去溶剂后得到硫辛酸酐。

[0069] 将上面得到的硫辛酸酐溶解在0.5mL经过无水处理的N,N'-二甲基甲酰胺中。氮气保护下,于50mL的三口烧瓶中依次加入溶解在5mL甲酰胺中的HA-Lys (OMe) (60mg, 27 μ mol氨基),硫辛酸酐及溶解在0.5mL N,N'-二甲基甲酰胺中的4-二甲氨基吡啶(4mg, 33 μ mol),反应器放置在30 $^{\circ}$ C的油浴中,搅拌反应48小时后,依次在水/乙醇(1/1)及水中透析,冻干。核磁结果表明其结构为HA-Lys-LA,其中赖氨酸甲酯-硫辛酰基的取代度10%。

[0070] 实施例七 合成聚合物HA-Lys-LA (M_{nHA} = 300kDa, DS = 10%)

[0071] 首先,于室温在H-Lys (Boc)-OMe \times HCl (240mg, 0.80mmol)/无水甲醇溶液(2mL)中加入三乙胺(85mg, 0.84mmol)并搅拌1小时,接着在HA (300mg, 0.79mmol羧基)水溶液(6mL)中依次加入EDC (460mg, 2.40mmol), NHS (140mg, 1.22mmol)以及脱完盐酸盐的H-Lys (Boc)-OMe/甲醇溶液并将整个溶液的pH调节至8.5,室温搅拌反应24小时后,透析,冻干得到HA-Lys (OMe)-Boc。在得到的HA-Lys (OMe)-Boc固体中依次加入三氟乙酸/2M盐酸(v/v 1:1)共6mL,搅拌反应6h,脱保护结束后将溶液pH调节至7.0,透析,冻干,产率92%。核磁结果表明其结构为HA-Lys (OMe),其中Lys (OMe)的取代度10%。

[0072] 将硫辛酸(12mg, 58 μ mol)溶解在2.0mL二氯甲烷中,加入到25mL的Schlenk真空密封瓶中,通氮气条件下,溶解在1.0mL的二氯甲烷中的DCC(6mg, 29 μ mol)加入密封瓶中,把瓶子放在30 $^{\circ}$ C的油浴中,搅拌反应22小时后,冷却,过滤除去反应中生成的脬,滤液旋蒸,除去溶剂后得到硫辛酸酐。

[0073] 将上面得到的硫辛酸酐溶解在0.5mL经过无水处理的N,N'-二甲基甲酰胺中。氮气保护下,于50mL的三口烧瓶中依次加入溶解在5mL甲酰胺中的HA-Lys (OMe) (60mg, 27 μ mol氨基),硫辛酸酐及溶解在0.5mL N,N'-二甲基甲酰胺中的4-二甲氨基吡啶(4mg, 33 μ mol),反应器放置在30 $^{\circ}$ C的油浴中,搅拌反应48小时后,依次在水/乙醇(1/1)及水中透析,冻干,产率95%。核磁结果表明其结构为HA-Lys-LA,其中赖氨酸甲酯-硫辛酰基的取代度10%。

[0074] 实施例八 HA-Lys-LA (M_{nHA} = 35kDa, DS = 10%) 纳米粒子制备

[0075] 聚合物HA-Lys-LA纳米粒子通过透析方法制备。具体过程是:将5mg聚合物HA-Lys-LA (DS = 10%)溶在1mL甲酰胺中,在25 $^{\circ}$ C搅拌条件下,向其中滴加4.0mL磷酸盐缓冲溶液(10mM, pH 7.4)。得到的溶液搅拌1h后,装入预先准备好的透析袋中(SPECTRA/POR, MWCO: 3500),用磷酸盐缓冲溶液(10mM, pH 7.4)透析24h。纳米粒子平均粒径为198纳米,粒径分布为0.11。

[0076] 实施例九 HA-Lys-LA (M_{nHA} = 35kDa, DS = 5%) 纳米粒子制备

[0077] 聚合物HA-Lys-LA纳米粒子通过透析方法制备。具体过程是：将5mg聚合物HA-Lys-LA (DS = 5%) 溶在1mL甲酰胺中，在25℃搅拌条件下，向其中滴加4.0mL磷酸盐缓冲溶液(10mM, pH 7.4)。得到的溶液搅拌1h后，装入预先准备好的透析袋中(SPECTRA/POR, MWCO: 3500)，用磷酸盐缓冲溶液(10mM, pH 7.4)透析24h。纳米粒子平均粒径为237纳米，粒径分布为0.23。

[0078] 实施例十 HA-Lys-LA ($M_{nHA} = 35kDa, DS = 28\%$) 纳米粒子制备

[0079] 聚合物HA-Lys-LA纳米粒子通过透析方法制备。具体过程是：将5mg 聚合物HA-Lys-LA (DS = 28%) 溶在1mL 甲酰胺中，在25℃搅拌条件下，向其中滴加4.0mL磷酸盐缓冲溶液(10mM, pH 7.4)。得到的溶液搅拌1h后，装入预先准备好的透析袋中(SPECTRA/POR, MWCO: 3500)，用磷酸盐缓冲溶液(10mM, pH 7.4)透析24h。纳米粒子平均粒径为178纳米，粒径分布为0.13。

[0080] 实施例十一 HA-Lys-LA ($M_{nHA} = 8.9kDa, DS = 5\%$) 纳米粒子制备

[0081] 聚合物HA-Lys-LA纳米粒子通过透析方法制备。具体过程是：将5mg聚合物HA-Lys-LA (DS = 5%) 溶在1mL甲酰胺中，在25℃搅拌条件下，向其中滴加4.0mL磷酸盐缓冲溶液(10mM, pH 7.4)。得到的溶液搅拌1h后，装入预先准备好的透析袋中(SPECTRA/POR, MWCO: 3500)，用磷酸盐缓冲溶液(10mM, pH 7.4)透析24h。纳米粒子平均粒径为203纳米，粒径分布为0.25。

[0082] 实施例十二 HA-Lys-LA ($M_{nHA} = 8.9kDa, DS = 13\%$) 纳米粒子制备

[0083] 聚合物HA-Lys-LA纳米粒子通过透析方法制备。具体过程是：将5mg聚合物HA-Lys-LA (DS = 13%) 溶在1mL甲酰胺中，在25℃搅拌条件下，向其中滴加4.0mL磷酸盐缓冲溶液(10mM, pH 7.4)。得到的溶液搅拌1h后，装入预先准备好的透析袋中(SPECTRA/POR, MWCO: 3500)，用磷酸盐缓冲溶液(10mM, pH 7.4)透析24h。纳米粒子平均粒径为185纳米，粒径分布为0.09。

[0084] 实施例十三 HA-Lys-LA ($M_{nHA} = 8.9kDa, DS = 25\%$) 纳米粒子制备

[0085] 聚合物HA-Lys-LA纳米粒子通过透析方法制备。具体过程是：将5mg聚合物HA-Lys-LA (DS = 25%) 溶在1mL甲酰胺中，在25℃搅拌条件下，向其中滴加4.0mL磷酸盐缓冲溶液(10mM, pH 7.4)。得到的溶液搅拌1h后，装入预先准备好的透析袋中(SPECTRA/POR, MWCO: 3500)，用磷酸盐缓冲溶液(10mM, pH 7.4)透析24h。纳米粒子平均粒径为169纳米，粒径分布为0.10。

[0086] 实施例十四 HA-Lys-LA ($M_{nHA} = 35kDa, DS = 5\%$) 纳米粒子交联

[0087] 为了得到交联的聚合物纳米粒子，将上述形成的聚合物纳米粒子(0.5毫克/毫升，2毫升)溶液调节pH至8.5，并通氮气10分钟，加入1mg/mL 1,4-二硫代-D, L-苏丁醇(DTT) 4mL，将混合液在室温氮气保护条件下搅拌反应24小时。得到的交联的纳米粒子用磷酸盐缓冲溶液透析，除去没反应的DTT。交联的纳米粒子尺寸为219纳米，粒径分布为0.27。

[0088] 实施例十五 HA-Lys-LA ($M_{nHA} = 35kDa, DS = 10\%$) 纳米粒子交联

[0089] 为了得到交联的聚合物纳米粒子，将上述形成的聚合物纳米粒子(0.5毫克/毫升，2毫升)溶液调节pH至8.5，并通氮气10分钟，加入1mg/mL 1,4-二硫代-D, L-苏丁醇(DTT) 7mL，将混合液在室温氮气保护条件下搅拌反应24小时。得到的交联的纳米粒子用磷酸盐缓冲溶液透析，除去没反应的DTT。附图2为HA-Lys-LA交联纳米粒子在高倍稀释(A)及高盐度

(B)条件下尺寸变化结果,可以看出交联的纳米粒子尺寸为175纳米,粒径分布为0.12,对高度稀释(模拟静脉注射),高盐度(2 M),有显著的稳定性。

[0090] 实施例十六 HA-Lys-LA ($M_{nHA} = 35\text{kDa}$, DS = 28%) 纳米粒子交联

[0091] 为了得到交联的聚合物纳米粒子,将上述形成的聚合物纳米粒子(0.5毫克/毫升, 2毫升)溶液调节pH至8.5,并通氮气10分钟,加入1mg/mL 1,4-二巯代-D, L-苏丁醇(DTT) 20mL,将混合液在室温氮气保护条件下搅拌反应24小时。得到的交联的纳米粒子用磷酸盐缓冲溶液透析,除去没反应的DTT。交联的纳米粒子尺寸为152纳米,粒径分布为0.16。

[0092] 实施例十七 HA-Lys-LA ($M_{nHA} = 8.9\text{kDa}$, DS = 5%) 纳米粒子交联

[0093] 为了得到交联的聚合物纳米粒子,将上述形成的聚合物纳米粒子(0.5毫克/毫升, 2毫升)溶液调节pH至8.5,并通氮气10分钟,加入1mg/mL 1,4-二巯代-D, L-苏丁醇(DTT) 4mL,将混合液在室温氮气保护条件下搅拌反应24小时。得到的交联的纳米粒子用磷酸盐缓冲溶液透析,除去没反应的DTT。交联的纳米粒子尺寸为199纳米,粒径分布为0.23。

[0094] 实施例十八 HA-Lys-LA ($M_{nHA} = 8.9\text{kDa}$, DS = 13%) 纳米粒子交联

[0095] 为了得到交联的聚合物纳米粒子,将上述形成的聚合物纳米粒子(0.5毫克/毫升, 2毫升)溶液调节pH至8.5,并通氮气10分钟,加入1mg/mL 1,4-二巯代-D, L-苏丁醇(DTT) 7mL,将混合液在室温氮气保护条件下搅拌反应24小时。得到的交联的纳米粒子用磷酸盐缓冲溶液透析,除去没反应的DTT。交联的纳米粒子尺寸为164纳米,粒径分布为0.11。

[0096] 实施例十九 HA-Lys-LA ($M_{nHA} = 8.9\text{kDa}$, DS = 25%) 纳米粒子交联

[0097] 为了得到交联的聚合物纳米粒子,将上述形成的聚合物纳米粒子(0.5毫克/毫升, 2毫升)溶液调节pH至8.5,并通氮气10分钟,加入1mg/mL 1,4-二巯代-D, L-苏丁醇(DTT) 20mL,将混合液在室温氮气保护条件下搅拌反应24小时。得到的交联的纳米粒子用磷酸盐缓冲溶液透析,除去没反应的DTT。交联的纳米粒子尺寸为148纳米,粒径分布为0.23。

[0098] 实施例二十 过量谷胱甘肽使交联的聚合物纳米粒子解交联HA-Lys-LA ($M_{nHA} = 35\text{kDa}$, DS = 10%)

[0099] 氮气保护下,将称好的谷胱甘肽(GSH)加到2.0ml HA-Lys-LA聚合物交联纳米粒子(0.001毫克/毫升)的玻璃样品池中,使最终谷胱甘肽的浓度分别是0,10mM,然后玻璃样品池用橡胶塞封住,摇晃均匀,置于37℃恒温摇床(200rpm)中,在选定时间、37℃下,通过动态激光光散射(DLS)来跟踪测定颗粒的粒径变化。结果表明,10mM谷胱甘肽作用12小时后交联纳米粒子粒径从原来的175纳米增加到几千纳米,稀释1000倍后粒径降至几纳米,说明交联纳米粒子发生解交联。

[0100] 实施例二十一 包裹小分子抗癌药物阿霉素及其谷胱甘肽触发释放

[0101] 将HA-Lys-LA ($M_{nHA} = 35\text{kDa}$, DS = 5%, 10%, 28%) / 甲酰胺溶液(5mg/mL, 1mL) 与阿霉素(DOX) / 二甲亚砜(5mg/mL, 0.25mL) 混合搅拌1小时,在25℃搅拌条件下,向其中滴加4mL磷酸盐缓冲溶液。得到的溶液搅拌1h后,装入预先准备好的透析袋中(SPECTRA/POR, MWC0: 3500),用磷酸盐缓冲溶液透析,形成载药聚合物纳米粒子溶液。

[0102] 将形成的载药聚合物纳米粒子溶液取一半体积,调节pH至8.5,并通氮气10分钟,加入1mg/mL 1,4-二巯代-D, L-苏丁醇(DTT) 17.5mL,将混合液在室温氮气保护条件下搅拌24小时。交联的载药纳米粒子溶液用磷酸盐缓冲溶液透析,除去没反应的DTT。

[0103] 把载有DOX的交联纳米粒子用PB(10mM, pH 7.4)稀释100倍,分成两份:一个加入

等体积GSH的PB溶液(10mM),另一个只加入等体积的PB溶液,温度为37℃,这些溶液被马上分别转移到透析袋中,置于37℃恒温摇床(200rpm)中。前者被浸入25mL相同GSH浓度,相同温度的PB中,后者被浸入25mL相同温度的PB(20mM)中,到一定时间取6mL的透析袋外的透析液用来测定其荧光强度,并把6mL的相应的新鲜液体加入透析袋外。

[0104] DOX在聚合物纳米粒子中的包封率的确定:取一定量的交联和未交联的载药纳米粒子溶液,先通过冷冻干燥法将溶液中的水除去,然后加入0.5mL甲酰胺超声1h充分溶解冷冻干燥后的固体,取该溶液20mL,加入3mL甲酰胺,通过荧光测试,结合阿霉素的标准曲线计算包封率及载药量。

[0105] 包封率=(纳米粒子中阿霉素的质量/投入的阿霉素的质量)×100%

[0106] 载药量=(纳米粒子中阿霉素的质量/纳米粒子的质量与投入的阿霉素的质量总和)×100%

[0107] 当理论载药量为20%时,HA-Lys-LA₁₀交联纳米粒子对阿霉素的包封率为54.5%,实际载药量为12%。

[0108] 图3为载有DOX的HA-Lys-LA交联纳米粒子在谷胱甘肽(GSH)触发下体外释放结果图。结果表明:载有DOX的交联纳米粒子在10 mM GSH、37℃下,很快解交联,DOX在22小时内释放出约86%;而载有DOX的交联纳米粒子在无GSH条件下很稳定,释放很少,仅有24%。

[0109] 实施例二十二 包裹小分子抗癌药物阿霉素及其谷胱甘肽触发释放

[0110] 将HA-Lys-LA ($M_{nHA} = 35\text{kDa}$, $DS = 40\%$)/甲酰胺溶液(5mg/mL, 1mL)与阿霉素(DOX)/二甲亚砜(5mg/mL, 0.25mL)混合搅拌1小时,在25℃搅拌条件下,向其中滴加4mL磷酸盐缓冲溶液。得到的溶液搅拌1h后,装入预先准备好的透析袋中(SPECTRA/POR, MWCO: 3500),用磷酸盐缓冲溶液透析,形成载药聚合物纳米粒子溶液。

[0111] 将形成的载药聚合物纳米粒子溶液取一半体积,调节pH至8.5,并通氮气10分钟,加入1mg/mL 1,4-二硫代-D, L-苏丁醇(DTT) 17.5mL,将混合液在室温氮气保护条件下搅拌24小时。交联的载药纳米粒子溶液用磷酸盐缓冲溶液透析,除去没反应的DTT。

[0112] 把载有DOX的交联纳米粒子用PB(10mM, pH 7.4)稀释100倍,分成两份:一个加入等体积GSH的PB溶液(10mM),另一个只加入等体积的PB溶液,温度为37℃,这些溶液被马上分别转移到透析袋中,置于37℃恒温摇床(200rpm)中。前者被浸入25mL相同GSH浓度,相同温度的PB中,后者被浸入25mL相同温度的PB(20mM)中,到一定时间取6mL的透析袋外的透析液用来测定其荧光强度,并把6mL的相应的新鲜液体加入透析袋外。

[0113] DOX在聚合物纳米粒子中的包封率的确定:取一定量的交联和未交联的载药纳米粒子溶液,先通过冷冻干燥法将溶液中的水除去,然后加入0.5mL甲酰胺超声1h充分溶解冷冻干燥后的固体,取该溶液20mL,加入3mL甲酰胺,通过荧光测试,结合阿霉素的标准曲线计算包封率及载药量。

[0114] 包封率=(纳米粒子中阿霉素的质量/投入的阿霉素的质量)×100%

[0115] 载药量=(纳米粒子中阿霉素的质量/纳米粒子的质量与投入的阿霉素的质量总和)×100%

[0116] 当理论载药量为25%时,HA-Lys-LA₄₀交联纳米粒子对阿霉素的包封率为74.5%,实际载药量为20%。

[0117] 载有DOX的交联纳米粒子在10 mM GSH、37℃下,很快解交联,DOX在22小时内释放

出约78%；而载有DOX的交联纳米粒子在无GSH条件下很稳定，释放很少，仅有19%。

[0118] 实施例二十三：包裹小分子抗癌药物PTX及其DTT触发释放

[0119] 将HA-Lys-LA ($M_{nHA} = 35\text{kDa}$, $DS = 10\%$) /甲酰胺溶液 (5mg/mL, 1mL) 与PTX/N,N'-二甲基甲酰胺 (5mg/mL, 0.25mL) 混合搅拌1小时，在25℃搅拌条件下，向其中滴加4mL磷酸盐缓冲溶液。得到的溶液搅拌1h后，装入预先准备好的透析袋中 (SPECTRA/POR, MWC0: 3500)，用磷酸盐缓冲溶液透析。

[0120] 将形成的载药聚合物纳米粒子溶液取一半体积，调节pH至8.5，并通氮气10分钟，加入1mg/mL 1,4-二硫代-D, L-苏丁醇 (DTT) 17.5mL，将混合液在室温氮气保护条件下搅拌24小时。交联的载药纳米粒子溶液用磷酸盐缓冲溶液透析，除去没反应的DTT。

[0121] 把载有PTX的交联NPs用PB (10mM, pH 7.4) 稀释100倍，分成两份：一个加入等体积DTT的PB溶液 (10mM)，另一个只加入等体积的PB溶液，温度为37℃，这些溶液被马上分别转移到透析袋中，置于37℃ 恒温摇床 (200rpm) 中。前者被浸入25mL相同DTT浓度，相同温度的PB中，后者被浸入25mL相同温度的PB (10mM) 中，到一定时间点取6mL的透析袋外的透析液用来测定其释放药物浓度，并把6mL的相应的新鲜液体加入透析袋外。

[0122] PTX在聚合物纳米粒子中的包封率的确定：取一定量的交联和未交联的载药纳米粒子溶液，先通过冷冻干燥法将溶液中的水除去，然后加入0.5mL乙腈超声1h，过滤，通过高效液相色谱检测，以乙腈和水混合物 (1/1, v/v) 作为流动相，测试在227nm处的吸收强度并结合紫杉醇的标准曲线计算包封率。

[0123] 包封率 = (纳米粒子中紫杉醇的质量 / 投入的紫杉醇的质量) × 100%

[0124] 载药量 = (纳米粒子中紫杉醇的质量 / 纳米粒子的质量与投入的紫杉醇的质量总和) × 100%

[0125] 结果表明：PTX不影响纳米粒子的形成且尺寸基本不变，且当理论载药量为30%时，HA-Lys-LA₁₀交联纳米粒子对紫杉醇的包封率为67.2%，实际载药量为22%。载有PTX的交联纳米粒子在10mM DTT、37℃下，很快解交联，PTX在22小时内释放出约82%。

[0126] 实施例二十四 载DOX的交联纳米粒子在细胞内的药物释放

[0127] 采用共聚焦激光扫描显微镜观察了载有DOX的HA-Lys-LA ($M_{nHA} = 35\text{kDa}$, $DS = 10\%$, $DLC = 12\%$) 交联纳米粒子在CD44受体表达多且对DOX具有耐药性的耐DOX的人乳腺癌细胞 (MCF-7/ADR) 中的细胞内吞和细胞内释放行为。首先将MCF-7/ADR细胞以 1×10^5 个/孔的密度铺于细胞培养板中，并于37℃, 5%二氧化碳条件下，在含有10%血清、100 IU/mL抗生素青霉素和100μg/mL链霉素的1mL1640培养基中培养24h，使细胞的单层覆盖率达到70%。然后向每个孔中加入200μL载有DOX的HA-Lys-LA交联纳米粒子或自由DOX溶液，其中DOX在孔中的最终浓度为5.0μg/mL。在37℃, 5%二氧化碳条件下培养10h后，移去培养基并用PBS溶液洗涤3次。接着用4%的多聚甲醛溶液固定15 min后用PBS溶液清洗3次。接着用FITC标记的鬼笔环肽对细胞骨架进行染色1h，并用PBS溶液清洗3次。最后用DAPI对细胞核进行染色15min，并用PBS溶液清洗3次。封闭受体实验时在加入载有DOX的HA-Lys-LA交联纳米粒子之前将自由的HA溶液 (5mg/mL) 与细胞一起孵育4h，接下来的步骤如前所述。制备好的样品采用共聚焦激光扫描显微镜进行观察和拍照。

[0128] 图4为载药HA-Lys-LA交联纳米粒子、DOX以及HA封闭的交联纳米粒子在MCF-7/ADR细胞内的药物释放结果图 (I是载药纳米粒子，II是自由药，III是用自由HA封闭的载药纳米

粒子)。结果表明:载有DOX的HA-Lys-LA交联纳米粒子可以很快被细胞内吞,并在细胞内将DOX释放出来,培养10h后,其细胞内DOX荧光几乎全部进入细胞核,且强度要明显强于自由DOX和自由HA封闭的对照组,说明该纳米粒子有显著的靶向性和逆转肿瘤细胞耐药性的能力。

[0129] 实施例二十五 HA-Lys-LA纳米粒子对MCF-7/ADR细胞毒性测试

[0130] HA-Lys-LA空纳米粒子($M_{nHA} = 35\text{kDa}$; $DS = 5\%$, 10% , 28%) 在MCF-7/ADR细胞中的毒性通过MTT法测定。首先将100 μL 细胞的1640悬浮液(1640培养基中含10%胎牛血清、100 IU/mL青霉素和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素)铺于96孔培养板中,使细胞的最终密度为 1×10^4 个/孔,并置于37 $^{\circ}\text{C}$,5%二氧化碳条件下培养24h使单层细胞的覆盖率达到70~80%。然后向每孔中加入20 μL 不同浓度的HA-Lys-LA交联或未交联纳米粒子的PB溶液,使空纳米粒子在细胞孔中的最终浓度为0.5或1.0mg/mL。待继续培养24h后,向每孔中加入20 μL 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)的PBS溶液(5mg/mL),并放入培养箱继续培养4h以使MTT与活细胞作用。随后移除含有MTT的培养液,向每孔中加入150 μL DMSO以溶解活细胞与MTT产生的紫色甲瓞结晶,并使用酶标仪(BioTek)测定每个孔在570nm处的吸收。细胞相对存活率通过与只有空白细胞的对照孔在570nm处的吸收相比得到。实验数据均是平行四组进行的。

[0131] 细胞存活率(%) = (OD570样品/OD570对照) \times 100%

[0132] 载有DOX的HA-Lys-LA纳米粒子($M_{nHA} = 35\text{kDa}$; $DS = 5\%$, 10% , 28% ; $DLC=11\%$, 12% , 15%) 的抗癌活性通过与上述空纳米粒子细胞毒性类似的方法进行测定。将100 μL MCF-7/ADR细胞的1640悬浮液铺于96孔培养板中,使细胞的最终密度为 1×10^4 个/孔,并置于37 $^{\circ}\text{C}$,5%二氧化碳条件下培养24h使单层细胞的覆盖率达到70~80%。然后向每孔中加入20 μL 载有DOX的取代度不同的HA-Lys-LA交联或未交联纳米粒子或自由DOX的PB溶液,使DOX在细胞孔中的最终浓度为0.0023~150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。待继续培养4h后,去掉原有培养基补充等量新鲜培养基,培养44h后,向每孔中加入20 μL MTT溶液(5mg/mL),并置于培养箱中培养4h。随后的实验处理及毒性的测定与上述一致。封闭受体实验时在加入载有DOX的HA-Lys-LA交联纳米粒子之前将自由的HA溶液(5mg/mL)与细胞一起孵育4h,即完成HA对肿瘤细胞的封闭,接下来的步骤同上,作为对照组。

[0133] 图5为不同HA-Lys-LA纳米粒子对MCF-7/ADR细胞的细胞毒性结果图。结果表明:HA-Lys-LA交联纳米粒子具有良好的生物相容性,而载有DOX的交联纳米粒子具有抗肿瘤活性,且当取代度为10时其抗肿瘤活性达到最高,因为当取代度太低时所形成的交联纳米粒子不太稳定,而过量修饰透明质酸会影响其靶向能力。

[0134] 实施例二十六 HA-Lys-LA纳米粒子对MCF-7/ADR细胞毒性测试

[0135] HA-Lys-LA空纳米粒子($M_{nHA} = 35\text{kDa}$, $DS = 40\%$) 在MCF-7/ADR细胞中的毒性通过MTT法测定。首先将100 μL 细胞的1640悬浮液(1640培养基中含10%胎牛血清、100 IU/mL青霉素和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素)铺于96孔培养板中,使细胞的最终密度为 1×10^4 个/孔,并置于37 $^{\circ}\text{C}$,5%二氧化碳条件下培养24h使单层细胞的覆盖率达到70~80%。然后向每孔中加入20 μL 不同浓度的HA-Lys-LA交联或未交联纳米粒子的PB溶液,使空纳米粒子在细胞孔中的最终浓度为0.5或1.0mg/mL。待继续培养24h后,向每孔中加入20 μL 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)的PBS溶液(5mg/mL),并放入培养箱继续培养4h以使MTT与活细胞作用。随后移除含有MTT的培养液,向每孔中加入150 μL DMSO以溶解活细胞与MTT产生的紫色

甲瓚结晶,并使用酶标仪 (BioTek) 测定每个孔在570nm处的吸收。细胞相对存活率通过与只有空白细胞的对照孔在570nm处的吸收相比得到。实验数据均是平行四组进行的。

[0136] 细胞存活率 (%) = (OD570样品/OD570对照) × 100%

[0137] 载有DOX的HA-Lys-LA纳米粒子 ($M_{nHA} = 35\text{kDa}$, $DS = 40\%$, $DLC = 20\%$) 的抗癌活性通过与上述空纳米粒子细胞毒性类似的方法进行测定。将100 μL MCF-7/ADR细胞的1640悬浮液铺于96孔培养板中,使细胞的最终密度为 1×10^4 个/孔,并置于37 $^{\circ}\text{C}$, 5%二氧化碳条件下培养24h使单层细胞的覆盖率达到70~80%。然后向每孔中加入20 μL 载有DOX的取代度不同的HA-Lys-LA交联或未交联纳米粒子或自由DOX的PB溶液,使DOX在细胞孔中的最终浓度为0.0023~150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。待继续培养4h后,去掉原有培养基补充等量新鲜培养基,培养44h后,向每孔中加入20 μL MTT溶液 (5mg/mL),并置于培养箱中培养4h。随后的实验处理及毒性的测定与上述一致。封闭受体实验时在加入载有DOX的HA-Lys-LA₄₀交联纳米粒子之前将自由的HA溶液 (5mg/mL) 与细胞一起孵育4h,接下来的步骤同上。

[0138] 结果表明:空的HA-Lys-LA交联纳米粒子具有良好的生物相容性,而载有DOX的交联纳米粒子具有一定的抗肿瘤活性。

[0139] 实施例二十七 对人脑胶质瘤 (U87MG) 细胞毒性测试

[0140] HA-Lys-LA空纳米粒子 ($M_{nHA} = 35\text{kDa}$; $DS = 5\%$, 10% , 28%) 在U87MG细胞中的毒性通过MTT法测定。首先将100 μL 细胞的DMEM低糖培养基 (DMEM低糖培养基中含10%胎牛血清、100 IU/mL青霉素和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素) 铺于96孔培养板中,使细胞的最终密度为 1×10^4 个/孔,并置于37 $^{\circ}\text{C}$, 5%二氧化碳条件下培养24h使单层细胞的覆盖率达到70~80%。然后向每孔中加入20 μL 不同浓度的HA-Lys-LA交联或未交联纳米粒子的PB溶液,使空纳米粒子在细胞孔中的最终浓度为0.5或1.0mg/mL。待继续培养24h后,向每孔中加入20 μL 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 (MTT) 的PBS溶液 (5mg/mL),并放入培养箱继续培养4h以使MTT与活细胞作用。随后移除含有MTT的培养液,向每孔中加入150 μL DMSO以溶解活细胞与MTT产生的紫色甲瓚结晶,并使用酶标仪 (BioTek) 测定每个孔在570nm处的吸收。细胞相对存活率通过与只有空白细胞的对照孔在570nm处的吸收相比得到。实验数据均是平行四组进行的。

[0141] 细胞存活率 (%) = (OD570样品/OD570对照) × 100%

[0142] 载有DOX的HA-Lys-LA纳米粒子 ($M_{nHA} = 35\text{kDa}$; $DS = 5\%$, 10% , 28% ; $DLC = 12\%$, 15% , 18%) 的抗癌活性通过与上述空纳米粒子细胞毒性类似的方法进行测定。将100 μL U87MG细胞的DMEM低糖培养基铺于96孔培养板中,使细胞的最终密度为 1×10^4 个/孔,并置于37 $^{\circ}\text{C}$, 5%二氧化碳条件下培养24h使单层细胞的覆盖率达到70~80%。然后向每孔中加入20 μL 载有DOX的取代度不同的HA-Lys-LA交联或未交联纳米粒子或自由DOX的PB溶液,使DOX在细胞孔中的最终浓度为0.0023~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。待继续培养4h后,去掉原有培养基补充等量新鲜培养基,培养44h后,向每孔中加入20 μL MTT溶液 (5mg/mL),并置于培养箱中培养4h。随后的实验处理及毒性的测定与上述一致。封闭受体实验时在加入载有DOX的HA-Lys-LA交联纳米粒子之前将自由的HA溶液 (5mg/mL) 与细胞一起孵育4h,接下来的步骤同上。

[0143] 结果显示,空白的纳米粒子在U87MG细胞中经48小时后其细胞存活率均大于90%,说明空白的纳米粒子的生物相容性很好;载有DOX的HA-Lys-LA交联纳米粒子对CD44受体表达低的U87MG细胞具有抗肿瘤活性,但取代度不同的载药交联纳米粒子的抗肿瘤活性接近

且远低于自由药物。

[0144] 实施例二十八 对人脑胶质瘤(U87MG)细胞毒性测试

[0145] HA-Lys-LA空纳米粒子($M_{nHA} = 35\text{kDa}$, $DS = 40\%$)在U87MG细胞中的毒性通过MTT法测定。首先将100 μL 细胞的DMEM低糖培养基(DMEM低糖培养基中含10%胎牛血清、100 IU/mL青霉素和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素)铺于96孔培养板中,使细胞的最终密度为 1×10^4 个/孔,并置于37 $^{\circ}\text{C}$,5%二氧化碳条件下培养24h使单层细胞的覆盖率达到70~80%。然后向每孔中加入20 μL 不同浓度的HA-Lys-LA交联或未交联纳米粒子的PB溶液,使空纳米粒子在细胞孔中的最终浓度为0.5或1.0 mg/mL 。待继续培养24h后,向每孔中加入20 μL 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)的PBS溶液(5 mg/mL),并放入培养箱继续培养4h以使MTT与活细胞作用。随后移除含有MTT的培养液,向每孔中加入150 μL DMSO以溶解活细胞与MTT产生的紫色甲瓞结晶,并使用酶标仪(BioTek)测定每个孔在570nm处的吸收。细胞相对存活率通过与只有空白细胞的对照孔在570nm处的吸收相比得到。实验数据均是平行四组进行的。

[0146] 细胞存活率(%) = (OD570样品/OD570对照) \times 100%

[0147] 载有DOX的HA-Lys-LA纳米粒子($M_{nHA} = 35\text{kDa}$, $DS = 40\%$, $DLC = 20\%$)的抗癌活性通过与上述空纳米粒子细胞毒性类似的方法进行测定。将100 μL U87MG细胞的DMEM低糖培养基铺于96孔培养板中,使细胞的最终密度为 1×10^4 个/孔,并置于37 $^{\circ}\text{C}$,5%二氧化碳条件下培养24h使单层细胞的覆盖率达到70~80%。然后向每孔中加入20 μL 载有DOX的取代度不同的HA-Lys-LA交联或未交联纳米粒子或自由DOX的PB溶液,使DOX在细胞孔中的最终浓度为0.0023~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。待继续培养4h后,去掉原有培养基补充等量新鲜培养基,培养44h后,向每孔中加入20 μL MTT溶液(5 mg/mL),并置于培养箱中培养4h。随后的实验处理及毒性的测定与上述一致。封闭受体实验时在加入载有DOX的HA-Lys-LA交联纳米粒子之前将自由的HA溶液(5 mg/mL)与细胞一起孵育4h,接下来的步骤同上。

[0148] 结果显示,空白的纳米粒子在U87MG细胞中经48小时后其细胞存活率均大于88%,说明空白的纳米粒子的生物相容性很好;载有DOX的HA-Lys-LA交联纳米粒子对CD44受体表达低的U87MG细胞具有一定的抗肿瘤活性,与其他取代度的载药纳米粒子的抗肿瘤活性接近,且远低于自由药物。

[0149] 实施例二十九 载DOX的HA-Lys-LA交联纳米粒子在小鼠体内循环研究

[0150] 以下动物实验操作均符合苏州大学实验动物中心的批准协议。将6只体重为18~22g约5~8周龄的裸鼠随机分为两组,每组分别尾静脉给药载有DOX的HA-Lys-LA交联纳米粒子($M_{nHA} = 35\text{kDa}$, $DS = 10\%$, $DLC = 12\%$)或自由DOX(DOX用量为15 mg/kg)。在给药后2min、15min、30min、1h、2h、4h、6h、8h、12h、24h各时间点尾部取血,每次取血量约为10 μL 。取血结束后将血样称重,并溶解在100 μL 1%曲拉通溶液中,后再加入1 mL 0.75 mol/L 的盐酸异丙醇溶液,于-20 $^{\circ}\text{C}$ 避光条件下静置过夜,离心后取上清液进行荧光测试。

[0151] $\%ID/g = (\text{FL样品} \times (\text{V曲拉通} + \text{V盐酸})) / (\text{M血} \times \text{FL标样} \times \text{V标样} \times \text{标样稀释倍数}) \times 100\%$ 。

[0152] 附图6为载DOX的HA-Lys-LA交联纳米粒子($M_{nHA} = 35\text{kDa}$, $DS = 10\%$, $DLC = 12\%$)与DOX在小鼠体内血液循环结果图。结果表明:载DOX的HA-Lys-LA交联纳米粒子具有良好的稳定性,可以在小鼠体内实现长循环,而自由DOX在2h之后几乎无法在小鼠血液中检测到。

[0153] 实施例三十 载DOX的HA-Lys-LA交联纳米粒子在小鼠体内循环研究

[0154] 以下动物实验操作均符合苏州大学实验动物中心的批准协议。将6只体重为18-22g约5-8周龄的裸鼠随机分为两组,每组分别尾静脉给药载有DOX的HA-Lys-LA交联纳米粒子($M_{nHA} = 35kDa$, $DS = 40%$, $DLC = 20%$)或自由DOX(DOX用量为15mg/kg)。在给药后2min、15min、30min、1h、2h、4h、6h、8h、12h、24h各时间点尾部取血,每次取血量约为10 μ L。取血结束后将血样称重,并溶解在100 μ L 1%曲拉通溶液中,后再加入1mL 0.75mol/L的盐酸异丙醇溶液,于-20 $^{\circ}$ C避光条件下静置过夜,离心后取上清液进行荧光测试。

[0155] $\%ID/g = (FL样品 \times (V曲拉通 + V盐酸)) / (M血 \times FL标样 \times V标样 \times 标样稀释倍数) \times 100\%$ 。

[0156] 结果表明:载DOX的HA-Lys-LA交联纳米粒子($M_{nHA} = 35kDa$, $DS = 40%$, $DLC = 20%$)具有良好的稳定性,可以在小鼠体内实现长循环,而自由DOX在2h之后几乎无法在小鼠血液中检测到。

[0157] 实施例三十一 HA-Lys-LA交联纳米粒子在耐药性乳腺癌荷瘤裸鼠体内的活体成像研究

[0158] HA-Lys-LA交联纳米粒子($M_{nHA} = 35kDa$, $DS = 10%$)在体内循环过程中在各个部位分布的情况用Maestro活体成像仪进行实时观测。耐药性乳腺癌裸鼠移植瘤模型通过皮下注射50 μ L、含有 1×10^7 个MCF-7/ADR细胞的悬浮液接种到裸鼠(体重18-22g)的体侧。当肿瘤体积达到100mm³,荷瘤裸鼠通过尾静脉注射0.2mL载有荧光分子Cy7的HA-Lys-LA交联纳米粒子溶液,然后在一定的时间点将裸鼠麻醉,并固定在黑色塑料板上,放入Maestro活体成像仪内,在720nm的发射波长下测定Cy7在体内分布的强度。

[0159] 图7为载有Cy7的HA-Lys-LA交联纳米粒子($M_{nHA} = 35kDa$, $DS = 10%$)在荷瘤裸鼠体内的活体成像结果图;结果表明:随着时间延长,裸鼠肿瘤部位Cy7荧光逐渐增强,且当10h时肿瘤部位的荧光强度达到最强,24h后肿瘤部位Cy7荧光仍然较强,说明HA-Lys-LA交联纳米粒子可以有效地富集在肿瘤部位并维持较长时间。

[0160] 实施例三十二 载DOX的HA-Lys-LA交联纳米粒子在耐药性乳腺癌荷瘤裸鼠各脏器的体外成像研究

[0161] 将六只肿瘤体积达到100mm³的耐药性乳腺癌荷瘤裸鼠随机分成两组,每只裸鼠通过尾静脉分别注射0.2mL的(1)载DOX交联纳米粒子溶液($M_{nHA} = 35kDa$, $DS = 10%$, $DLC = 12%$);(2)自由DOX溶液(最终DOX浓度约为15mg/kg)。10h后,将每只裸鼠的心,肝,脾,肺,肾,及肿瘤取出,洗净,并固定在黑色塑料板上,放入Maestro活体成像仪内,在523nm的发射波长下测定DOX在体内分布的强度。

[0162] 结果表明,载DOX的HA-Lys-LA交联纳米粒子($M_{nHA} = 35kDa$, $DS = 10%$, $DLC = 12%$)在肿瘤部位比其他脏器富集多,释放DOX的荧光强,而自由DOX在肿瘤部位几乎没有富集。

[0163] 实施例三十三 载DOX的HA-Lys-LA交联纳米粒子在耐药性乳腺癌荷瘤裸鼠各脏器的生物分布研究

[0164] 将六只肿瘤体积达到100mm³的荷瘤裸鼠随机分成两组,每只裸鼠通过尾静脉分别注射0.2mL的(1)载DOX交联纳米粒子溶液($M_{nHA} = 35kDa$, $DS = 10%$, $DLC = 12%$);(2)自由DOX溶液(最终DOX浓度约为15mg/kg)。10h后,将每只裸鼠的心,肝,脾,肺,肾,及肿瘤取出,洗净,称重,加入400 μ L 1%曲拉通,用匀浆机匀浆,再加入0.75mol/L的盐酸异丙醇溶液600 μ

L, 置于-20℃度冰箱, 24h后离心, 取上清液进行荧光测试分析。

[0165] $\%ID/g = FL_{\text{器官}} \times (V_{\text{处理液}} + V_{\text{器官}}) / (V_{\text{药物}} \times \text{稀释倍数} \times FL_{\text{药物}} \times M_{\text{器官}}) \times 100\%$

[0166] 图8为载有DOX的HA-Lys-LA交联纳米粒子 ($M_{\text{nHA}} = 35\text{kDa}$, $DS = 10\%$, $DLC = 12\%$) 在荷肿瘤裸鼠各脏器的生物分布结果图。结果表明: 载DOX的HA-Lys-LA交联纳米粒子在肿瘤部位有很高富集达到12.71%ID/g, 而自由DOX在肿瘤部位的富集少, 只有0.63%ID/g。现有的表面修饰了聚乙二醇(PEG)的载有阿霉素(DOX)的空心金纳米球经尾静脉注射6小时及24小时之后在肿瘤部位DOX的富集都低于5%ID/g; 说明本发明基于透明质酸两亲聚合物的药物载体无需修饰靶向分子即可有效进入肿瘤细胞内, 在肿瘤部位的富集率高。

[0167] 实施例三十四 载DOX的HA-Lys-LA交联纳米粒子在耐药性乳腺癌荷瘤裸鼠体内的抗肿瘤效果研究

[0168] 将肿瘤体积达到 50mm^3 的荷瘤裸鼠随机分成三组(每组六只), 这天被定为第0天。通过尾静脉分别注射0.2mL的(1)载DOX交联纳米粒子溶液 ($M_{\text{nHA}} = 35\text{kDa}$, $DS = 10\%$, $DLC = 12\%$); (2)自由DOX溶液; (3)PBS溶液(最终DOX浓度约为 7.5mg/kg)。载药胶束制剂对裸鼠肿瘤生长的影响定期用卡尺进行测量。裸鼠体重变化定期用天平称量。肿瘤的体积大小通过 $V = 0.5 \times L \times W \times H$ 公式计算得到(L是肿瘤最长点的长度; W是测量肿瘤最短点的长度; H是测量肿瘤的高度)。24天后, 每组随机取一只老鼠通过颈与脊椎骨脱臼处死, 将每只老鼠心, 肝, 肿瘤取出, 用4%甲醛固定, 切片, 并用苏木精和曙红(H&E)染色用于组织学分析。其余裸鼠继续观察。在整个治疗过程中, 裸鼠死亡或肿瘤体积超过 1000mm^3 均认为该鼠死亡。

[0169] 相对肿瘤体积(%) = 肿瘤体积/第0天肿瘤体积 $\times 100\%$ 。

[0170] 相对体重变化(%) = 裸鼠体重/第0天裸鼠体重 $\times 100\%$ 。

[0171] 图9为载有DOX的HA-Lys-LA交联纳米粒子 ($M_{\text{nHA}} = 35\text{kDa}$, $DS = 10\%$, $DLC = 12\%$) 在荷瘤裸鼠体内的肿瘤生长变化结果图。结果表明: 载DOX的HA-Lys-LA交联纳米粒子可以有效抑制肿瘤体积增长, 具有很高的抗肿瘤活性; 而自由DOX不能抑制肿瘤生长。裸鼠体重变化情况及存活实验表明载DOX的HA-Lys-LA交联纳米粒子 ($M_{\text{nHA}} = 35\text{kDa}$, $DS = 10\%$, $DLC = 12\%$) 对体重没有影响, 副作用小, 存活时间最长, 而自由DOX使裸鼠体重降低了28%, 毒副作用大, 28天内全部死亡。此外, H&E染色组织学分析结果显示载DOX的HA-Lys-LA交联纳米粒子 ($M_{\text{nHA}} = 35\text{kDa}$, $DS = 10\%$, $DLC = 12\%$) 对应的肿瘤组织有大面积的坏死, 但心脏和肝脏均正常; 而自由DOX和PBS组对应的肿瘤组织生长旺盛, 且自由DOX组对应的肝脏受到很大损伤, 心肌细胞萎缩, 出现空泡并伴有炎症组织浸润。

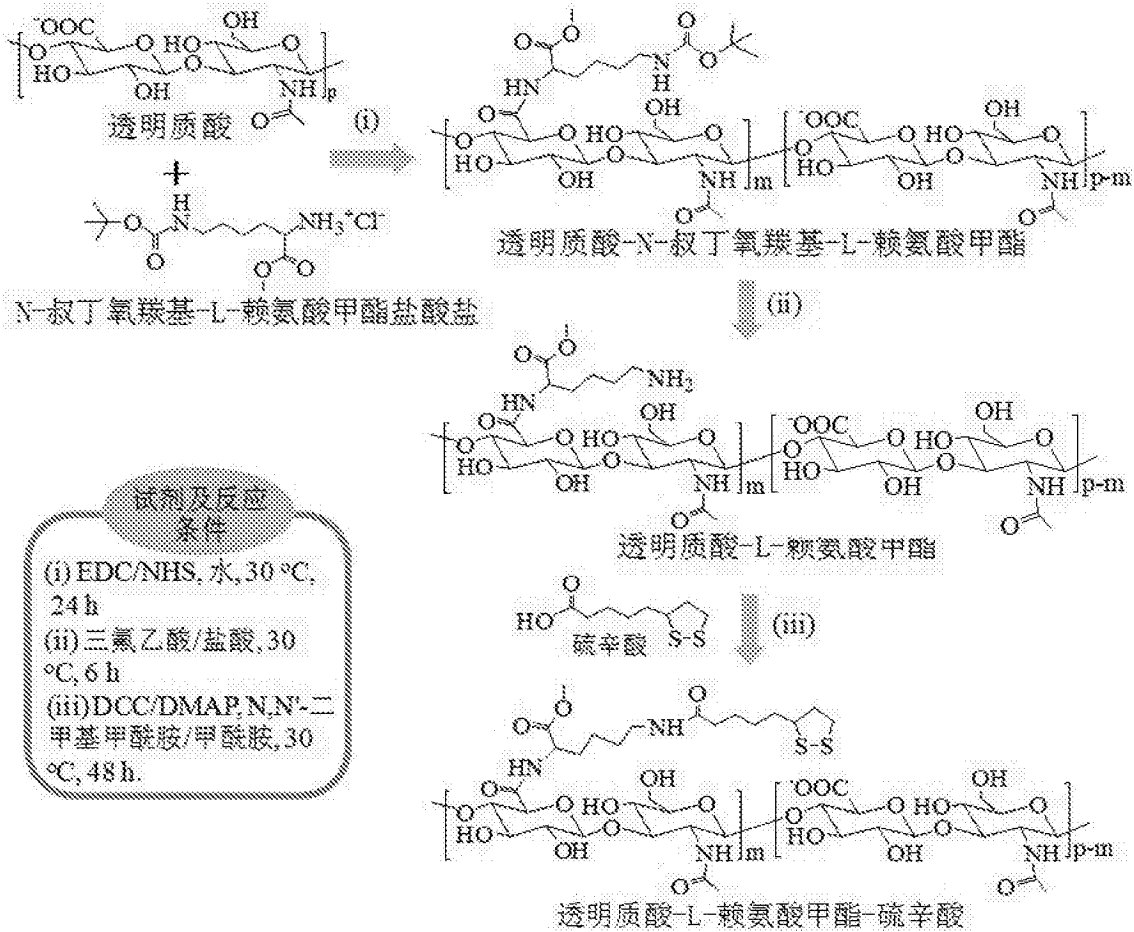


图1

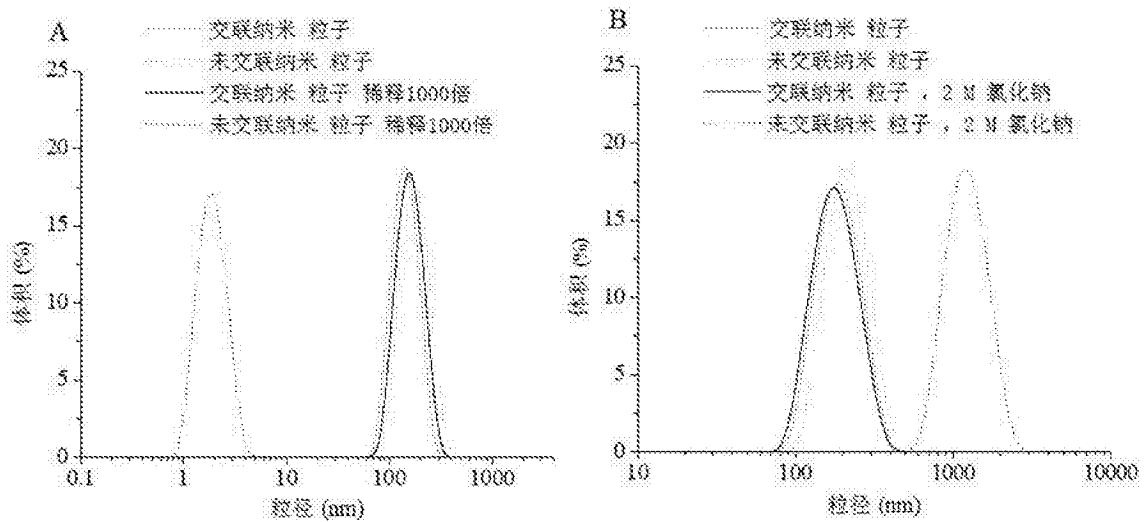


图2

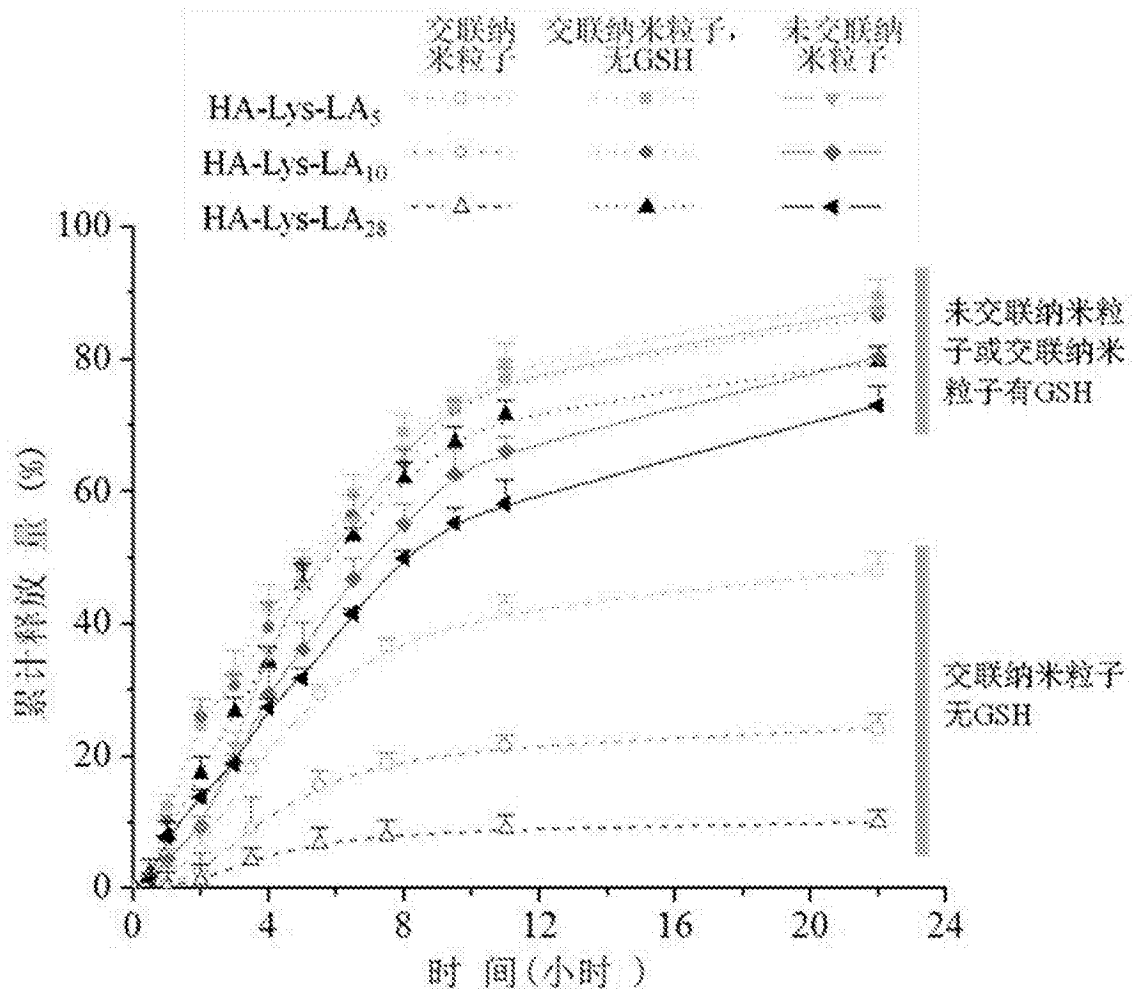


图3

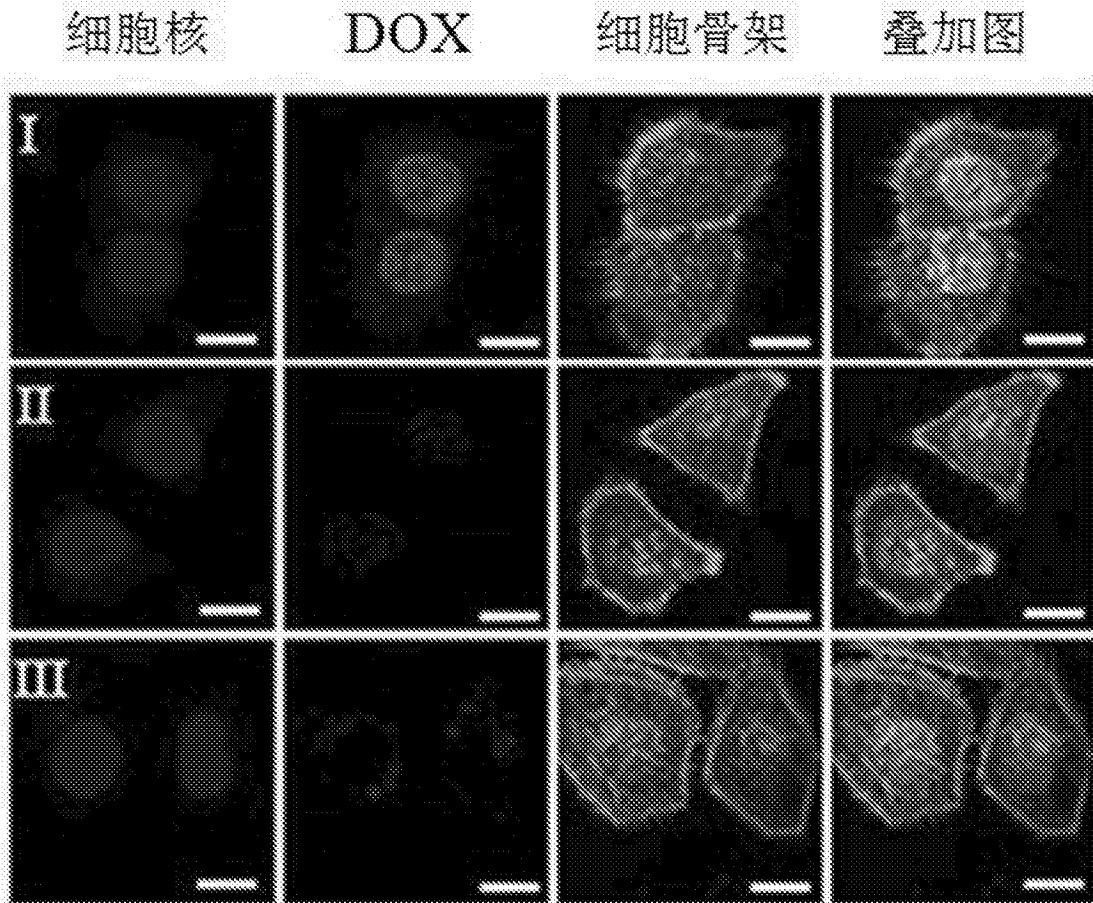


图4

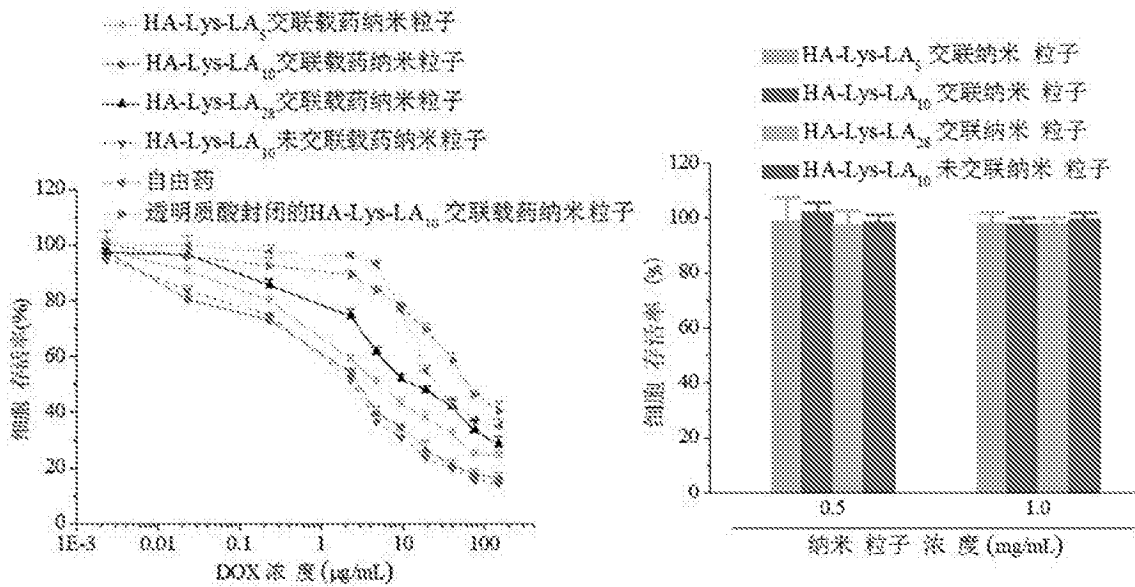


图5

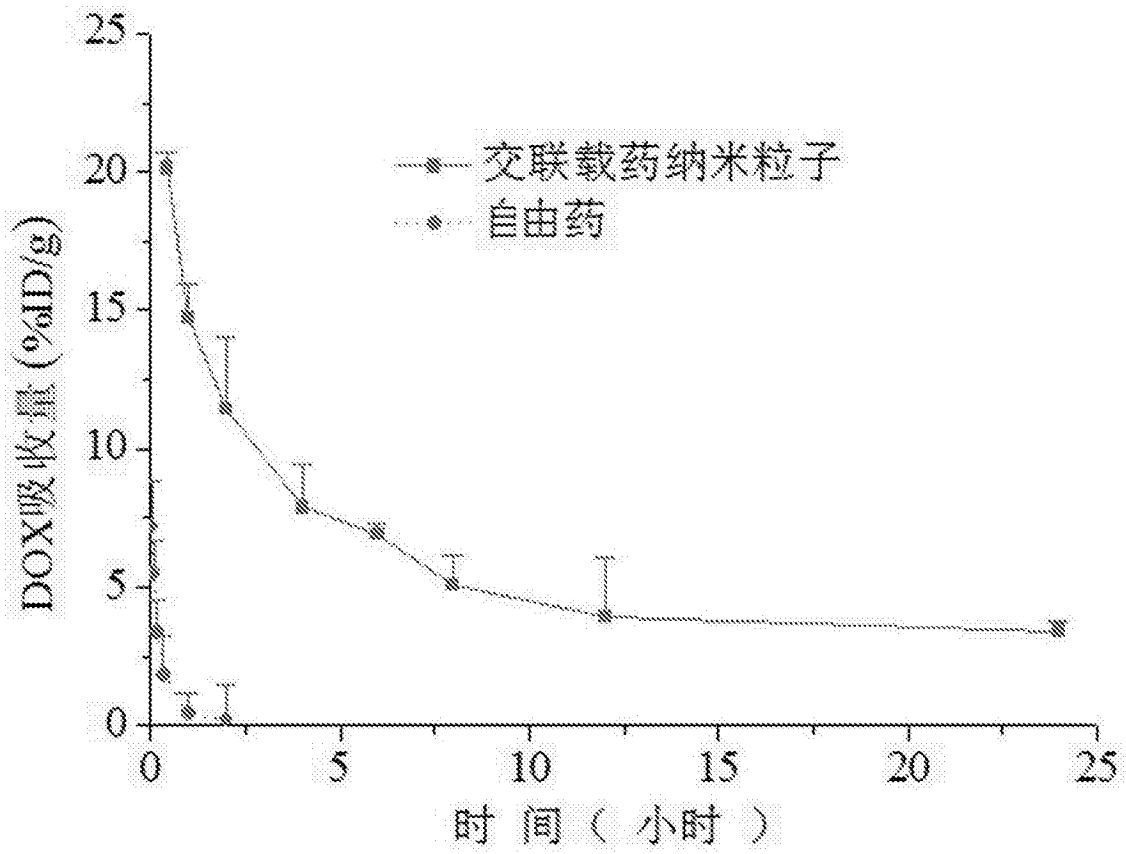


图6

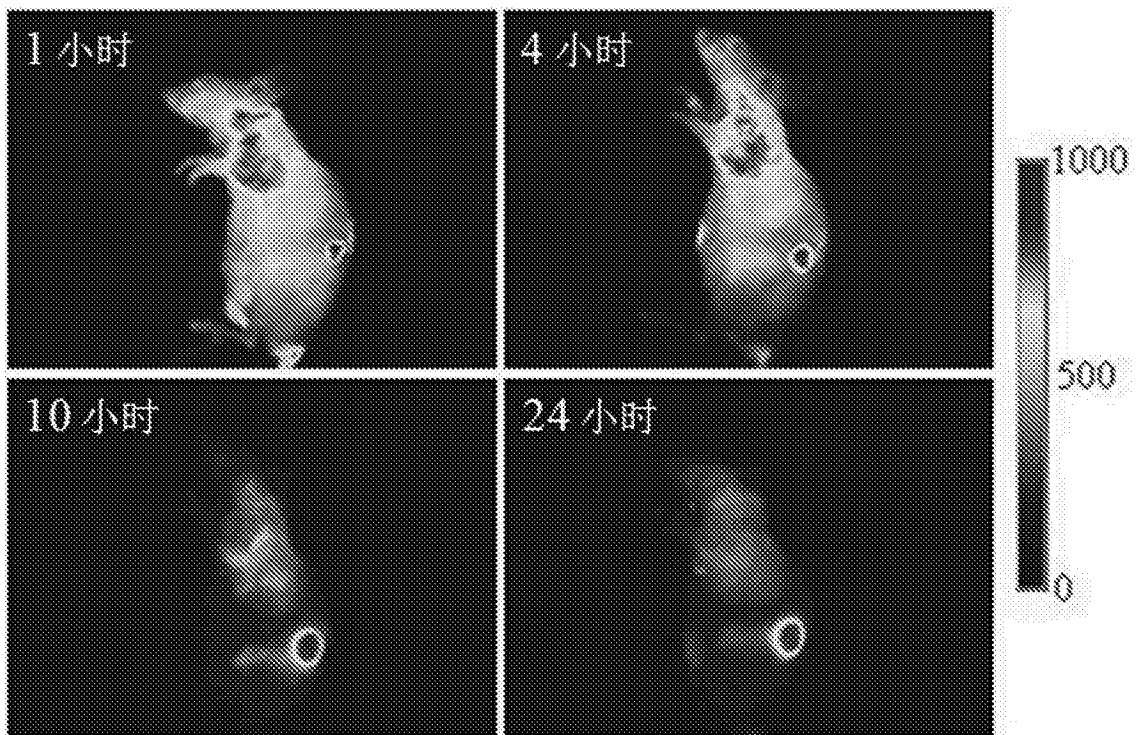


图7

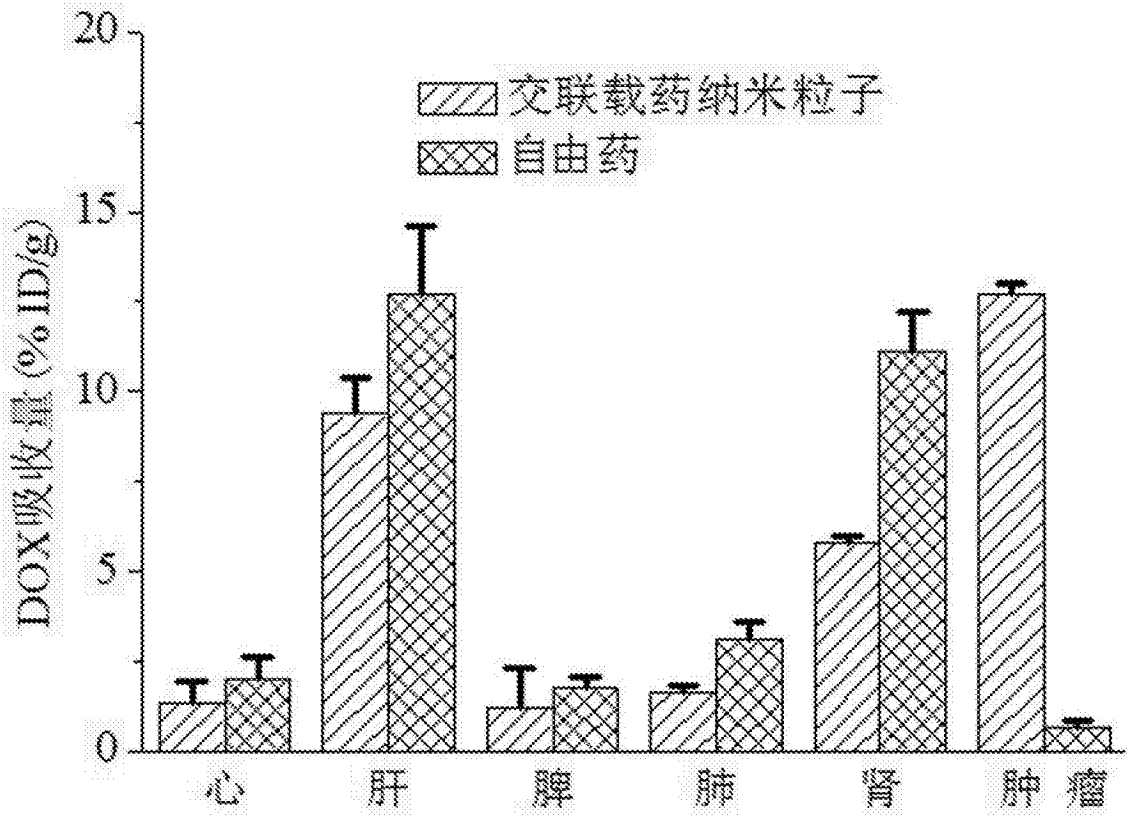


图8

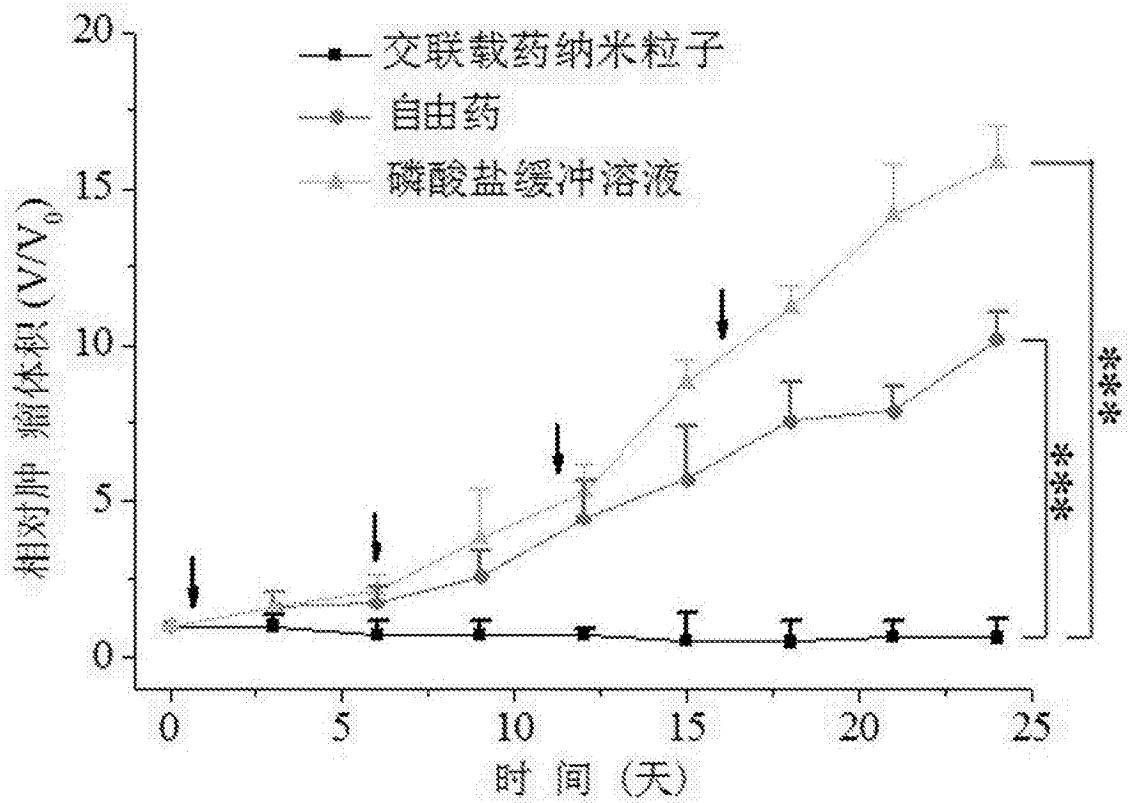


图9