



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105315455 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 10

(21) 申请号 201510863004. 7

A61P 35/00(2006. 01)

(22) 申请日 2015. 12. 01

(71) 申请人 沈阳药科大学

地址 110016 辽宁省沈阳市沈河区文化路  
103 号

(72) 发明人 孙进 何仲贵 李琳 狄兴盛  
仵明瑞

(74) 专利代理机构 沈阳杰克知识产权代理有限  
公司 21207

代理人 靳玲

(51) Int. Cl.

C08G 65/48(2006. 01)

A61K 47/34(2006. 01)

A61K 9/51(2006. 01)

A61K 31/337(2006. 01)

权利要求书2页 说明书9页 附图9页

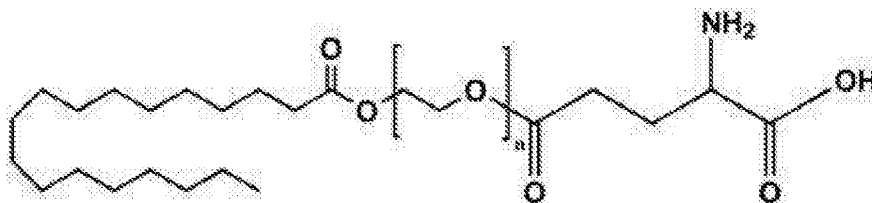
(54) 发明名称

谷氨酸修饰的聚乙二醇单硬脂酸酯的制备及其在靶向药物传递中的应用

(57) 摘要

本发明涉及一种谷氨酸-聚乙二醇单硬脂酸酯的制备及该两亲性靶向材料修饰的纳米粒在疾病靶向传递中的应用。所述的两亲性靶向材料,以谷氨酸作为靶头,聚乙二醇增加靶头的柔韧性,疏水性的单硬脂酸酯为与聚乳酸聚羟基乙酸共聚物的锚钉部位。该靶向材料修饰的纳米粒可作为多种抗肿瘤药物靶向传递的工具,并能通过表面修饰的谷氨酸与肿瘤细胞膜上高表达的大中性氨基酸转运体 1 相互作用,有效提高纳米粒的细胞摄取和抗肿瘤活性。该纳米粒稳定性好,靶向性佳,可用于静脉注射,有较大的市场应用前景。

1. 谷氨酸修饰的聚乙二醇单硬脂酸酯,其特征在於:以聚乙二醇为亲水端,单硬脂酸酯为疏水端,谷氨酸为靶头,结构式如下:



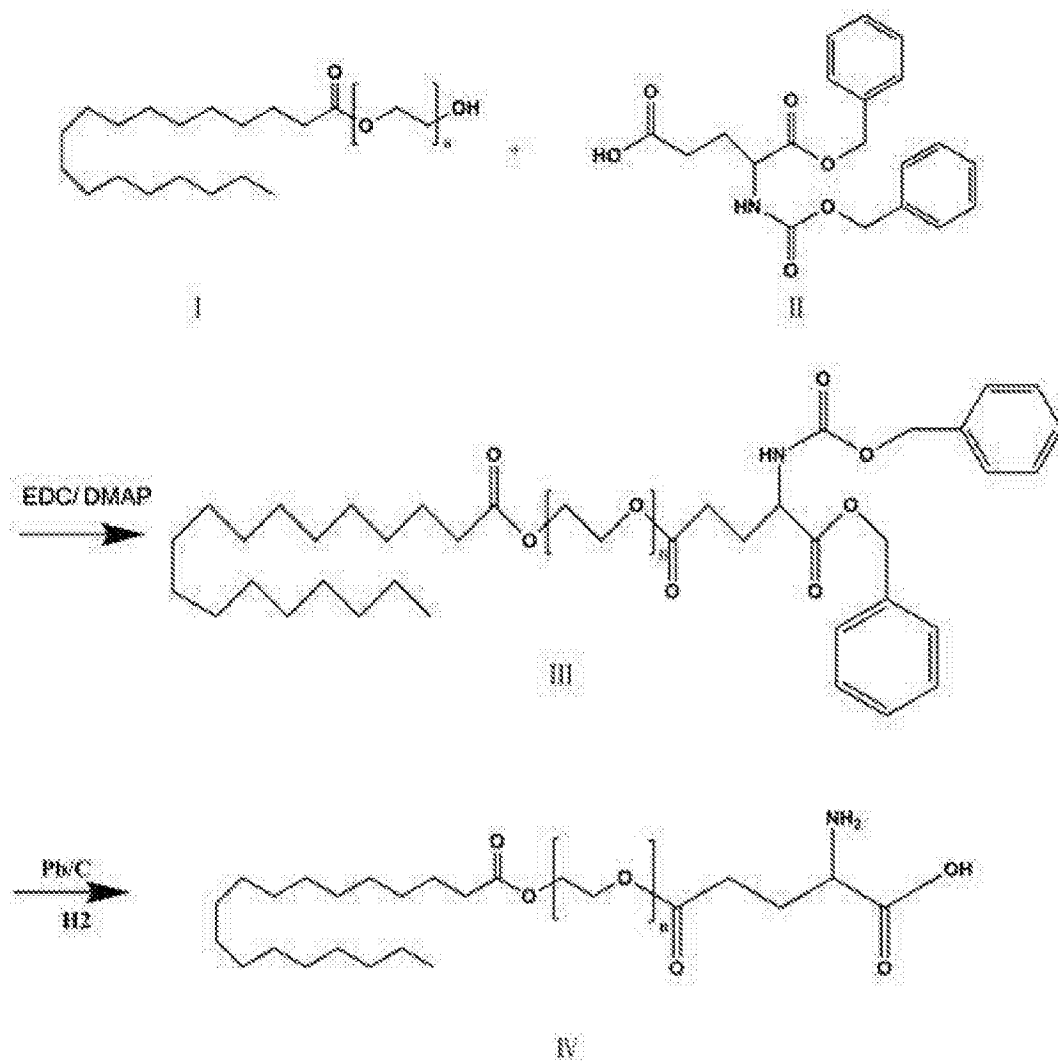
其中,  $n$  为  $10 \sim 40$ 。

2. 根据权利要求 1 所述的谷氨酸修饰的聚乙二醇单硬脂酸酯,其特征在於,为 AB 型嵌段共聚物,聚乙二醇分子量范围在  $500-2000$ 。

3. 根据权利要求 1 所述谷氨酸修饰的聚乙二醇单硬脂酸酯的制备方法,其特征在於,采用如下步骤制备:

将羧基和氨基保护的谷氨酸,溶于适量二氯甲烷、二甲基亚砷类有机良溶剂中,在催化剂的作用下,避光冰浴  $1\text{ h}-2\text{ h}$ ,然后与不同链长聚乙二醇单硬脂酸酯 ( $\text{SP}_n, \text{I}$ ) 在  $25-35\text{ }^\circ\text{C}$   $\text{N}_2$  保护下反应  $12\text{ h}-48\text{ h}$ ,经分离纯化得到淡黄色固体的 III, III 化合物经过钯碳还原反应,脱掉谷氨酸的保护基团,再经过进一步分离纯化得到最终化合物-谷氨酸-聚乙二醇单硬脂酸酯 ( $\text{SPG}_n, \text{IV}$ );

反应式如下:



4. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于,所述的羧基和氨基保护的谷氨酸为谷氨酸 N-苄氧羰基-L-谷氨酸-1-苄酯。

5. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于,所述的催化剂为1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐或4-二甲氨基吡啶或两者的组合。

6. 权利要求1或2所述的谷氨酸修饰的聚乙二醇单硬脂酸酯在药物传递系统中的应用。

7. 权利要求1或2所述的谷氨酸修饰的聚乙二醇单硬脂酸酯作为药物载体或修饰剂在肿瘤主动靶向递送中的应用。

8. 权利要求1或2所述的谷氨酸修饰的聚乙二醇单硬脂酸酯作为药物载体或修饰剂在靶向中性大氨基酸转运体1(LAT1)中的应用。

9. 一种载药纳米粒,其特征在于,以权利要求1或2所述的谷氨酸修饰的聚乙二醇单硬脂酸酯为修饰剂,聚乳酸聚羟基乙酸为药物储库,药物为疏水性药物。

10. 根据权利要求9所述的载药纳米粒,其特征在于:所述的疏水性药物为紫杉烷类、喜树碱类、蒽醌类抗肿瘤药或二氢吡啶类、非甾体抗炎药中的任一物质或其衍生物;基因类药物为DNA或SiRNA。

## 谷氨酸修饰的聚乙二醇单硬脂酸酯的制备及其在靶向药物传递中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于药物制剂新辅料和新剂型领域,涉及不同 PEG 链长的谷氨酸-聚乙二醇单硬脂酸酯的制备,及其作为靶向材料在主动靶向药物传递系统中的应用。

### 背景技术

[0002] 肿瘤的快速生长和转移与肿瘤部位高表达的营养型转运体,如:维生素转运体、氨基酸转运体、葡萄糖转运体,密切相关。因此,这些肿瘤不可或缺的营养型转运体可以开发为肿瘤主动靶向治疗的新靶点。纳米载体由于能够提高抗癌药物的疗效并且减少药物副作用而被广泛用于靶向药物传递系统,PEG 化的纳米载体更能显示出一些独特的优越性,如:延长纳米粒体内循环时间、增加配体的柔韧性和靶向性等。以纳米载体为药物递送工具,以肿瘤高表达转运体为靶点,是一种有效地药物传递系统。

[0003] 近几年来,越来越多目光转移至肿瘤转运体靶向的纳米粒制剂的研究,它们通过对纳米制剂进行转运体底物的表面修饰,底物在接触到转运体时,通过转运体对其表面的底物进行高亲和性识别、结合,然后内陷、入胞。纳米制剂可以依靠肿瘤细胞膜上高表达的转运体达到提高细胞摄取量,增加抑瘤效果的目的。但是,更多的研究将转运体的作用与受体等同,忽略了转运体自身的特性和优势。在此,我们旨在研究不同底物柔韧性和密度的主动靶向纳米粒对肿瘤细胞膜上高表达的中性氨基酸转运体 1 (LAT1) 靶向效果的影响,以及该靶向纳米粒对转运体活性的调控。本发明制备了靶向材料-谷氨酸-聚乙二醇单硬脂酸酯,并将其修饰于纳米粒的表面,该靶向递送工具,具有载药量高、稳定性好、靶向性佳等优势,能够提高体外细胞摄取以及体内抑瘤效果。将此种靶向材料作为载体或纳米制剂的修饰剂应用于药物传递系统,将具有很大的应用前景。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种具有肿瘤靶向性、延长药物半衰期、既可以自身自组装形成胶束又可以作纳米粒修饰剂的两亲性材料-谷氨酸-聚乙二醇单硬脂酸酯。

[0005] 本发明第二个目的在于提供上述不同 PEG 链长的谷氨酸-聚乙二醇单硬脂酸酯的制备方法。

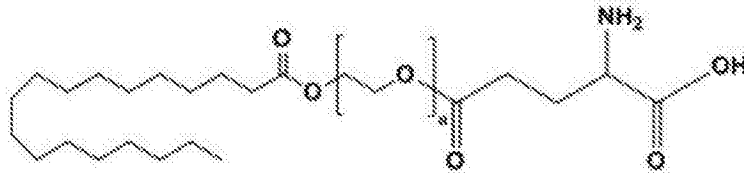
[0006] 本发明的第三个目的是提供谷氨酸-聚乙二醇单硬脂酸酯在靶向药物传递中的作用。

[0007] 本发明通过以下技术方案实现上述目的:

[0008] 谷氨酸-聚乙二醇单硬脂酸酯两亲性共聚物以谷氨酸作为靶头,聚乙二醇提供靶头的柔韧性,疏水性的单硬脂酸酯为与其它药物载体内核的锚钉部位。是一种稳定性好、靶向性佳的主动靶向材料。

[0009] 所述的谷氨酸修饰的聚乙二醇单硬脂酸酯的结构通式如下:

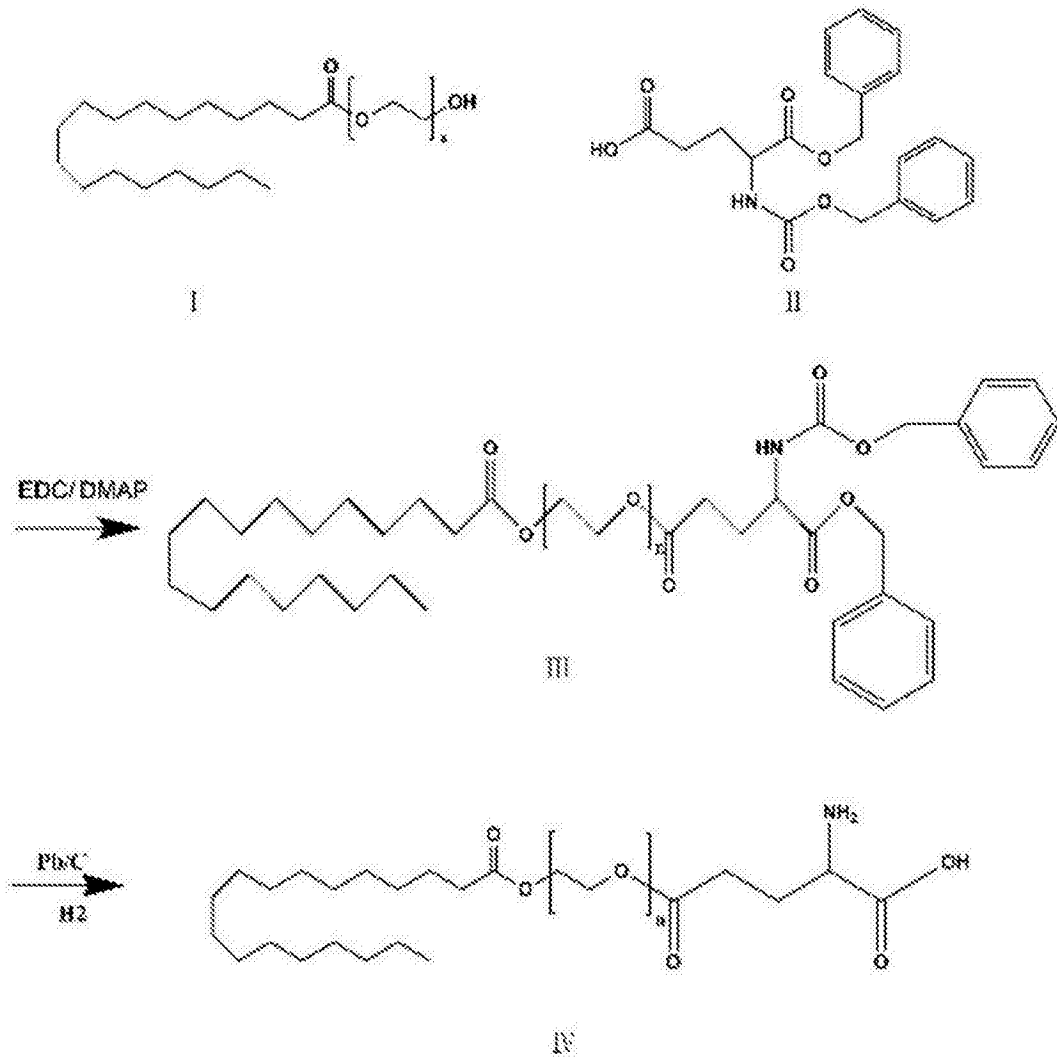
[0010]



[0011] 所述的靶向材料,其特征在于,所用的聚乙二醇的分子量范围 500-2000, n 为 10 ~ 40。

[0012] 其制备过程:将羧基和氨基保护的谷氨酸,如:N-苄氧羰基-L-谷氨酸-1-苄酯(Z-Glu-OBzl, II),溶于适量二氯甲烷、二甲基亚砜等有机良溶剂中,在催化剂的作用下,如:1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和4-二甲氨基吡啶(DMAP),避光冰浴 1h-2h,然后与不同链长聚乙二醇单硬脂酸酯(SP<sub>n</sub>, I)在 30℃ N<sub>2</sub> 保护下反应 12h-48h,经分离纯化得到淡黄色固体的 III。III 化合物经过钯碳还原反应,脱掉谷氨酸的保护基团,再经过进一步分离纯化得到最终化合物-谷氨酸-聚乙二醇单硬脂酸酯(SPG<sub>n</sub>, IV)。

[0013]



[0014] 步骤中 n 为 10 ~ 40。该聚合物为淡黄色固体,易溶于二氯甲烷、N,N-二甲基甲酰胺、二甲基亚砜等有机溶剂。

[0015] 所述的谷氨酸-聚乙二醇单硬脂酸酯是一种稳定性好、靶向性佳的主动靶向材

料。

[0016] 所述的谷氨酸-聚乙二醇单硬脂酸酯可以用于修饰包载紫杉烷类、喜树碱类、葱醌类抗肿瘤药或二氢吡啶类、非甾体抗炎药中的任一物质或其衍生物；基因类药物为 DNA 或 SiRNA 的聚乳酸聚羟基乙酸共聚物纳米粒 (SPG<sub>n</sub> PLGA NPs)，其修饰方法可采用乳化溶剂挥发法制备，并采用下述步骤：将上述的谷氨酸-聚乙二醇单硬脂酸酯和聚乳酸聚羟基乙酸共聚物（质量比 1:1-5）完全溶解于适量的二氯甲烷中，再加至适量的聚乙烯醇水溶液中，探头超声并搅拌适当的时间后，得到具有靶向性的纳米粒。

[0017] 本发明具有以下有益效果：制备一种新型的靶向性强的两亲性聚合物-谷氨酸-聚乙二醇单硬脂酸酯，载体制备过程温和，易操作。所制备谷氨酸-聚乙二醇单硬脂酸酯修饰的纳米粒，制备简便，粒径较小且均一，包封率高，稳定性好，靶向性佳。体外细胞实验和体内抑瘤实验证明本发明的谷氨酸-聚乙二醇单硬脂酸酯修饰的纳米粒具有较好的肿瘤靶向性和抑瘤效果。

### 附图说明

[0018] 图 1 为本发明实施例 1 的谷氨酸-聚乙二醇 500 单硬脂酸酯 (SPG<sub>10</sub>) 嵌段共聚物结构的 <sup>1</sup>HNMR 谱图。


[0019] 图 2 为本发明实施例 1 的谷氨酸-聚乙二醇 1000 单硬脂酸酯 (SPG<sub>25</sub>) 嵌段共聚物结构的 <sup>1</sup>HNMR 谱图。

[0020] 图 3 为本发明实施例 1 的谷氨酸-聚乙二醇 2000 单硬脂酸酯 (SPG<sub>40</sub>) 嵌段共聚物结构的 <sup>1</sup>HNMR 谱图。


[0021] 图 4 为本发明实施例 2 的载药谷氨酸-聚乙二醇 500 单硬脂酸酯修饰的聚乳酸聚羟基乙酸共聚物纳米粒 (SPG<sub>10</sub>PLGA NPs) 的动态光散射测定胶束粒径图和透射电镜图。


[0022] 图 5 为本发明实施例 2 的谷氨酸-聚乙二醇单硬脂酸酯修饰的紫杉醇纳米粒 (PTX SPG<sub>n</sub> PLGA NPs) 在血浆中稳定性试验；


[0023]  5% SPG10 NPs 5% SPG10 修饰的紫杉醇 PLGA 纳米粒；

[0024]  5% SPG25 NPs 5% SPG25 修饰的紫杉醇 PLGA 纳米粒；

[0025]  5% SPG40 NPs 5% SPG40 修饰的紫杉醇 PLGA 纳米粒；

[0026]  10% SPG10 NPs 10% SPG10 修饰的紫杉醇 PLGA 纳米粒；


[0027]  10% SPG25 NPs 10% SPG25 修饰的紫杉醇 PLGA 纳米粒；


[0028]  10% SPG40 NPs 10% SPG40 修饰的紫杉醇 PLGA 纳米粒。


[0029] 图 6 为本发明实施例 2 的谷氨酸-聚乙二醇单硬脂酸酯修饰的紫杉醇纳米粒 (PTX SPG<sub>n</sub> PLGA NPs) 体外释放试验；


[0030]  5% SPG10 NPs 5% SPG10 修饰的紫杉醇 PLGA 纳米粒；

[0031]  5% SPG25 NPs 5% SPG25 修饰的紫杉醇 PLGA 纳米粒；

[0032]  5% SPG40 NPs 5% SPG40 修饰的紫杉醇 PLGA 纳米粒；


[0033]  10% SPG10 NPs 10% SPG10 修饰的紫杉醇 PLGA 纳米粒；


[0034]  10% SPG25 NPs 10% SPG25 修饰的紫杉醇 PLGA 纳米粒；

[0035]  10% SPG40 NPs 0% SPG40 修饰的紫杉醇 PLGA 纳米粒。


[0036] 图 7 为本发明实施例 2 的谷氨酸-聚乙二醇单硬脂酸酯修饰的紫杉醇纳米粒 (PTX


SPG<sub>n</sub> PLGA NPs) 对 HeLa 细胞抑制率曲线；


[0037]  Taxol 紫杉醇溶液剂；


[0038]  5% SPG10 NPs 5% SPG10 修饰的紫杉醇 PLGA 纳米粒；

[0039]  5% SPG25 NPs 5% SPG25 修饰的紫杉醇 PLGA 纳米粒；

[0040]  5% SPG40 NPs 5% SPG40 修饰的紫杉醇 PLGA 纳米粒；

[0041]  10% SPG10 NPs 10% SPG10 修饰的紫杉醇 PLGA 纳米粒；

[0042]  10% SPG25 NPs 10% SPG25 修饰的紫杉醇 PLGA 纳米粒；

[0043]  10% SPG40 NPs 10% SPG40 修饰的紫杉醇 PLGA 纳米粒。

[0044] 图 8 为本发明实施例 2 的谷氨酸 - 聚乙二醇单硬脂酸酯修饰的香豆素 6 纳米粒 (C6 SPG<sub>n</sub> PLGA NPs) 和聚乙二醇单硬脂酸酯修饰的香豆素 6 纳米粒 (C6 SP<sub>n</sub> PLGA NPs) 在 LAT1 高表达的 HeLa 细胞中的细胞摄取情况；

[0045]  SPG NPs SPG 修饰的香豆素 6PLGA 纳米粒；

[0046]  SP NPs SP 修饰的香豆素 6PLGA 纳米粒。



[0047] 图 9 为本发明实施例 2 的谷氨酸 - 聚乙二醇单硬脂酸酯修饰的香豆素 6 纳米粒 (C6 SPG<sub>n</sub> PLGA NPs) 和聚乙二醇单硬脂酸酯修饰的香豆素 6 纳米粒 (C6 SP<sub>n</sub> PLGA NPs) 在 LAT1 低表达的 NIH3T3 细胞中的细胞摄取情况；

[0048]  SPG NPs SPG 修饰的香豆素 6PLGA 纳米粒；

[0049]  SP NPs SP 修饰的香豆素 6PLGA 纳米粒。

[0050] 图 10 为本发明实施例 2 的不同氨基酸底物对谷氨酸 - 聚乙二醇 1000 单硬脂酸酯修饰的香豆素 6 纳米粒 (C6 SPG<sub>25</sub> PLGA NPs) 与 HeLa 细胞膜上中性大氨基酸转运体 1 (LAT1) 低温结合的影响。

[0051] 图 11 为本发明实施例 2 的钠离子对谷氨酸 - 聚乙二醇 1000 单硬脂酸酯修饰的香豆素 6 纳米粒 (C6 SPG<sub>25</sub> PLGA NPs) 摄取的影响；

[0052]  Na<sup>+</sup> 含钠离子的缓冲液； Na<sup>+</sup>free 不含钠离子的缓冲液。





[0053] 图 12 为本发明实施例 2 的不同氨基酸底物对谷氨酸 - 聚乙二醇 1000 单硬脂酸酯修饰的香豆素 6 纳米粒 (C6 SPG<sub>25</sub> PLGA NPs) 和聚乙二醇单硬脂酸酯香豆素 6 纳米粒 (C6 SP<sub>n</sub> PLGA NPs) 与 HeLa 细胞膜上中性大氨基酸转运体 1 (LAT1) 摄取的影响；

[0054] SP :SP 修饰的香豆素 6PLGA 纳米粒 ;SPG :SPG 修饰的香豆素 6PLGA 纳米粒

[0055] 图 13 为本发明实施例 2 的谷氨酸 - 聚乙二醇 1000 单硬脂酸酯修饰的香豆素 6 纳米粒 (C6 SPG<sub>25</sub> PLGA NPs) 的摄取机制。

[0056] 图 14 为本发明实施例 2 的谷氨酸 - 聚乙二醇 1000 单硬脂酸酯修饰的香豆素 6 纳米粒 (C6 SPG<sub>25</sub> PLGA NPs) 对 HeLa 细胞膜上中性大氨基酸转运体 1 (LAT1) 的活性调控。

[0057] 图 15 为本发明实施例 2 的谷氨酸 - 聚乙二醇 1000 单硬脂酸酯修饰的紫杉醇纳米粒 (PTX SPG<sub>25</sub> PLGA NPs) 和聚乙二醇单硬脂酸酯修饰的紫杉醇纳米粒 (PTX SP<sub>n</sub> PLGA NPs) 对肿瘤体积生长的影响。

[0058]  Saline 生理盐水组； Taxol 紫杉醇溶液剂组； SPG25 PTX NPs 10% SPG25 修饰的紫杉醇 PLGA 纳米粒组； SP25 PTX NPs 10% SP25 修饰的紫杉醇 PLGA 纳

米粒组。

### 具体实施方式

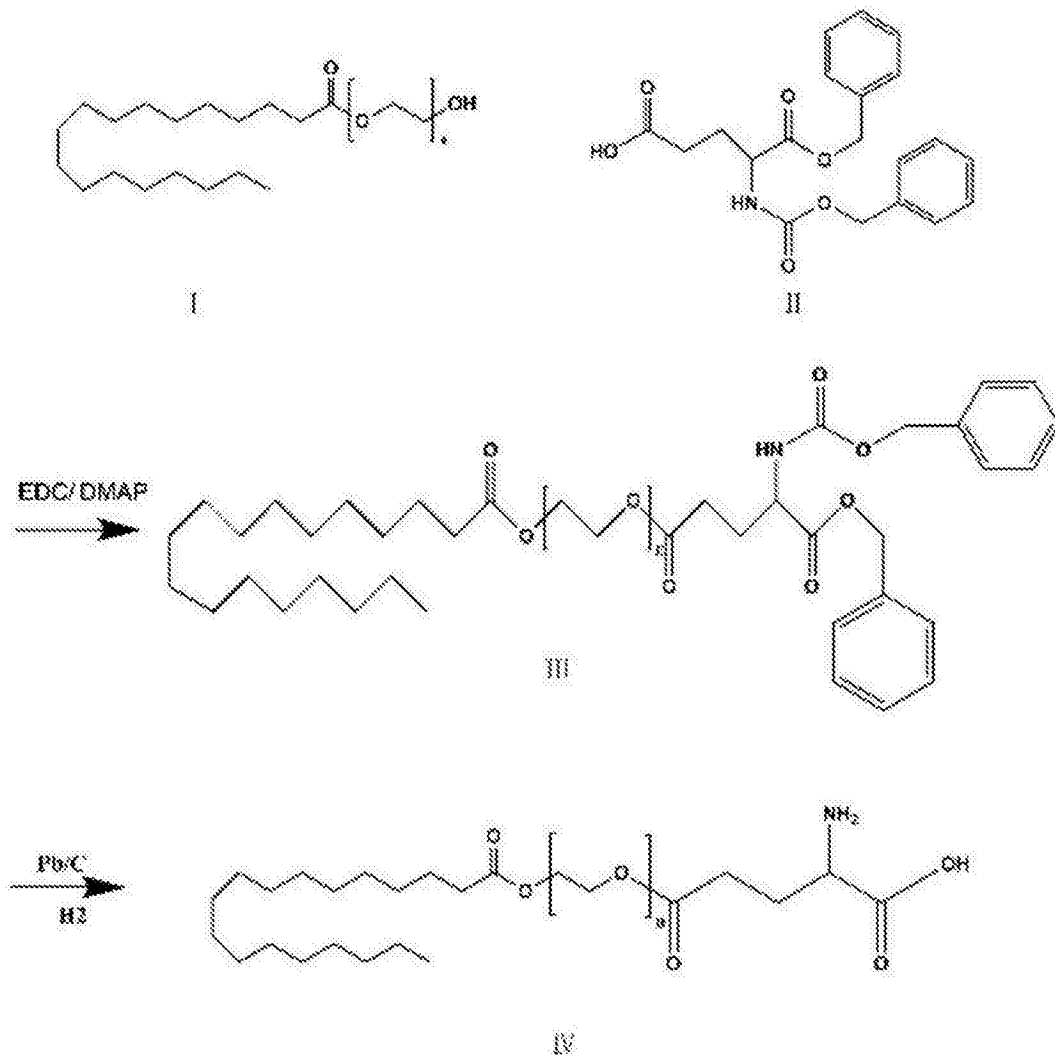
[0059] 下面通过实施例的方式进一步说明本发明,但并不因此将发明限制在所述的实施例范围之中。

#### [0060] 实施例 1

[0061] 四种不同 PEG 链长谷氨酸-聚乙二醇单硬脂酸酯的制备。

[0062] N-苄氧羰基-L-谷氨酸-1-苄酯 (Z-Glu-OBzl, II), 溶于适量二氯甲烷、二甲基亚砜等有机良溶剂中,在催化剂的作用下,如:1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 和 4-二甲氨基吡啶 (DMAP), 避光冰浴 1h-2h, 然后与不同链长聚乙二醇单硬脂酸酯 (SP<sub>n</sub>, I) 在 30°C N<sub>2</sub> 保护下反应 12h-48h, 经分离纯化得到淡黄色固体的 III。III 化合物经过钯碳还原反应, 脱掉谷氨酸的保护基团, 再经过进一步分离纯化得到最终化合物-谷氨酸-聚乙二醇单硬脂酸酯 (SPG<sub>n</sub>, IV)。反应式如下:

[0063]



[0064] 步骤中 n 为 10 ~ 40。即聚乙二醇的分子量为 500, 1000 和 2000, 但是并不限于此, 本发明的聚乙二醇亦可是一端为羟基修饰的聚乙二醇, 但是并不局限于以上三种物质。聚乙二醇的分子量可以为 500-5000 范围内。



[0065] 采用核磁共振测定  $^1\text{H-NMR}$  氢谱来确定实施例 1 中靶向材料的结构,选用的溶剂为  $d\text{-DMSO}$ ,结果如图 1。2.3ppm,1.8ppm 和 4.2ppm 分别为谷氨酸上  $-\text{CH}_2-$  和  $-\text{CH}-$  上的 H,3.52-3.75ppm 间的质子峰为 PEG 中的 H。0.8ppm 为单硬脂酸酯的  $-\text{CH}_3-$  的特征峰。1.2ppm 为单硬脂酸酯的  $-\text{CH}_2-$  的特征峰。

[0066] 实施例 2

[0067] 乳化溶剂挥发法制备载紫杉醇或香豆素 6 的谷氨酸-聚乙二醇单硬脂酸酯修饰的纳米粒

[0068] 称取 1mg 紫杉醇或香豆素 6,溶于 1mL 二氯甲烷中,加入 1mg 或 2mg 实施例 1 制备的不同 PEG 链长的谷氨酸修饰的聚乙二醇单硬脂酸酯或聚乙二醇单硬脂酸酯,以及 20mg 的聚乳酸聚羟基乙酸共聚物。加至 5mL 1% 聚乙烯醇水溶液中,探头超声 300W,10min,搅拌过夜,3500rpm 离心 10min,除去未包裹的药物。

[0069] 将实施例 2 中制备的纳米粒通过动态光散射和透射电镜测定胶束的粒径大小和形态,结果如图 4。动态光散射测定不同配体密度和 PEG 链长的谷氨酸-聚乙二醇单硬脂酸酯修饰的纳米粒,纳米粒的粒径范围在 151.7-180.6nm,粒径分布窄;透射电镜图表明载药胶束为粒径均一的球形。

[0070] 表 1 不同 PEG 链长和靶向材料密度对于 HeLa 细胞的  $\text{IC}_{50}$  值。

[0071]

$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Taoxl	5%	5%	5%	10%	10%	10%
		SPG <sub>10</sub> NPs	SPG <sub>25</sub> NPs	SPG <sub>40</sub> NPs	SPG <sub>10</sub> NPs	SPG <sub>25</sub> NPs	SPG <sub>40</sub> NPs
48 h	0.024254	0.33745	0.65989	0.26098	0.52679	0.60615	0.16809
72 h	0.000415	0.05539	0.03805	0.01717	0.02023	0.04341	0.00273

[0072] 实施例 3

[0073] 谷氨酸-聚乙二醇单硬脂酸酯修饰的载药纳米粒在血浆中的稳定性试验

[0074] 按照实例 2 制备谷氨酸-聚乙二醇单硬脂酸酯修饰的载药纳米粒,将纳米粒置于含有 10% FBS 的 pH 7.4 磷酸盐缓冲液中,通过动态光散射测定各纳米粒在 0h, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h 和 24h 的粒径。

[0075] 图 5 结果表明不同配体修饰密度和 PEG 链长的谷氨酸-聚乙二醇单硬脂酸酯修饰的载药纳米粒具有较好的血浆稳定性。

[0076] 实施例 4

[0077] 谷氨酸-聚乙二醇单硬脂酸酯修饰的载药纳米粒体外释放试验

[0078] 采用透析法考察实例 2 制备谷氨酸-聚乙二醇单硬脂酸酯修饰的载药纳米粒的体外释药特征。移取 200  $\mu\text{g}$  的载药胶束溶液于透析袋中,透析袋两端夹紧,分别置于含有 30mL pH 7.4PBS(含 2% Cremophore EL) 的释放介质的锥形瓶中,在 37 $^{\circ}\text{C}$  恒温振荡器中以 100r/min 进行体外释放度考察。分别在 0.5、1、2、4、6、8、10、12、24h 取样 2mL,同时将透析袋取出并放入新鲜的 30mL 释放介质中,样品经 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤,取 20  $\mu\text{L}$  进行 HPLC 测定。

[0079] 图 6 结果表明谷氨酸 - 聚乙二醇单硬脂酸酯修饰的载药纳米粒释药缓慢, 并且随着 PEG 链长的增加, 释药速度下降; 随着靶向材料修饰密度的增加, 释药速度也随之下落。不同链长的 PEG 对纳米粒的修饰能够在纳米粒表层形成不同状态的保护, PEG 链延长和修饰密度的增加所形成的水化层均有利于延缓药物的释放。

[0080] 实施例 5

[0081] 细胞毒性实验

[0082] 将处于对数生长期的人宫颈癌细胞 (HeLa) 以  $5 \times 10^4$ /孔/0.1mL 的 1640 培养液埋于 96 孔板中, 24h 后将实施例 2 制备的谷氨酸 - 聚乙二醇单硬脂酸酯修饰的载药纳米粒以不同浓度分别加入各孔, 每孔加入 100  $\mu$ L 含纳米粒溶液, 每个浓度 3 个平行孔, 置培养箱中孵育。培养 48h 和 72h 后, 取出 96 孔板, 每孔加入 20  $\mu$ L 的 5mg/mL MTT, 培养箱中孵育 4h, 甩板, 将 96 孔板倒扣于滤纸中充分吸干残留液体, 每孔加入 150  $\mu$ L DMSO 于振荡器中振荡 10min, 酶标仪测定各孔 492nm 处的吸光度。计算抑制率:

[0083] 抑制率 (%) =  $(1 - A_{\text{加药孔}} / A_{\text{对照孔}}) \times 100\%$

[0084] MTT 法测定载有紫杉醇纳米粒细胞毒性结果如图 7, 不同浓度载药纳米粒作用于 HeLa 细胞株 48h 和 72h 后, 细胞抑制率随药物浓度和孵化时间增加而增大, 并且对细胞的抑制作用随着靶向材料密度的增加而增强。

[0085] 实施例 6

[0086] 细胞摄取实验

[0087] 将 LAT1 高表达的 HeLa 细胞和 LAT1 低表达的 NIH3T3 细胞以  $2 \times 10^5$ /孔/0.1mL 的 1640 培养液和 DMEM 培养液埋于 96 孔板中, 24h 后将实施例 2 制备的谷氨酸 - 聚乙二醇单硬脂酸酯修饰的香豆素 6 纳米粒或聚乙二醇单硬脂酸酯修饰的香豆素 6 纳米粒, 由 HBSS 缓冲液稀释相同的香豆素 6 的浓度加入各孔中, 每孔 100  $\mu$ L, 平行 3 孔, 置培养箱中孵育 1h 和 3h。弃上清, 每孔加入 50  $\mu$ L 0.5% TritonX-100 (含 0.2N NaOH) 的 PBS 溶液并置摇床中作用 1h。随后, 在激发波长为 458nm, 发射波长为 525nm 测定细胞内荧光强度, 并对每孔进行蛋白含量测定, 并计算摄取量。

[0088] 细胞摄取的结果见图 8, 图 9, 在 LAT1 高表达瘤株中, 谷氨酸 - 聚乙二醇单硬脂酸酯修饰的香豆素 6 纳米粒的细胞摄取量均比聚乙二醇单硬脂酸酯修饰的香豆素 6 纳米粒高, 并且随着靶向材料修饰密度的增加, 细胞摄取增加。而在 LAT1 低表达瘤株中, 这两种纳米粒细胞摄取未体现出这样的趋势。

[0089] 实施例 7

[0090] 不同氨基酸底物对谷氨酸修饰的纳米粒 (C6-SPG<sub>25</sub>-PLGA NPs) 与 LAT1 结合的影响实验

[0091] 将 LAT1 高表达的 HeLa 细胞以  $2 \times 10^5$ /孔/0.1mL 的 1640 培养液和埋于 96 孔板中, 24h 后将实施例 2 制备的谷氨酸 - 聚乙二醇 1000 单硬脂酸酯修饰的香豆素 6 纳米粒, 由 HBSS 缓冲液稀释致相同的香豆素 6 的浓度, 并与不同氨基酸混合均匀后, 加入各孔中, 每孔 100  $\mu$ L, 平行 3 孔, 置 4 $^{\circ}$ C 中孵育 3h。弃上清, 每孔加入 50  $\mu$ L 0.5% TritonX-100 (含 0.2N NaOH) 的 PBS 溶液并置摇床中作用 1h。随后, 在激发波长为 458nm, 发射波长为 525nm 测定细胞内荧光强度, 并对每孔进行蛋白含量测定, 并计算摄取量。

[0092] 结合影响实验结果见图 10, 结果表明作为 LAT1 高亲和性底物, 亮氨酸和苯丙氨酸

对纳米粒和 LAT1 的结合过程有明显的抑制作用,而 LAT1 低亲和性底物,赖氨酸和谷氨酸对纳米粒和 LAT1 的结合过程并无明显抑制作用,证明靶向纳米粒在能识别并结合 LAT1。

#### [0093] 实施例 8

##### [0094] 钠离子对谷氨酸修饰的纳米粒 (C6 SPG<sub>25</sub> PLGA NPs) 摄取的影响

[0095] 将 LAT1 高表达的 HeLa 细胞以  $2 \times 10^5$  / 孔 / 0.1 mL 的 1640 培养液和埋于 96 孔板中,24h 后将实施例 2 制备的谷氨酸 - 聚乙二醇 1000 单硬脂酸酯修饰的香豆素 6 纳米粒或聚乙二醇 1000 单硬脂酸酯修饰的香豆素 6 纳米粒,由含钠离子的缓冲液或不含钠离子的缓冲液稀释致相同的香豆素 6 的浓度,加入各孔中,每孔 100  $\mu$  L,平行 3 孔,置 37 $^{\circ}$ C 中孵育 3h。弃上清,每孔加入 50  $\mu$  l 0.5% TrtionX-100 (含 0.2N NaOH) 的 PBS 溶液并置摇床中作用 1h。随后,在激发波长为 458nm,发射波长为 525nm 测定细胞内荧光强度,并对每孔进行蛋白含量测定,并计算摄取量。

[0096] 结合影响实验结果见图 11,缓冲液中是否含钠离子对谷氨酸 - 聚乙二醇 1000 单硬脂酸酯修饰的香豆素 6 纳米粒和聚乙二醇 1000 单硬脂酸酯修饰的香豆素 6 纳米粒的摄取并无影响,并且谷氨酸修饰的纳米粒的摄取依然高于未修饰的纳米粒,证明基于 LAT1 纳米粒的摄取是钠离子非依赖性的。

#### [0097] 实施例 9

##### [0098] 不同氨基酸对谷氨酸修饰的纳米粒 (C6 SPG<sub>25</sub> PLGA NPs) 摄取的影响

[0099] 将 LAT1 高表达的 HeLa 细胞以  $2 \times 10^5$  / 孔 / 0.1 mL 的 1640 培养液和埋于 96 孔板中,24h 后将实施例 2 制备的谷氨酸 - 聚乙二醇 1000 单硬脂酸酯修饰的香豆素 6 纳米粒,由 HBSS 缓冲液稀释致相同的香豆素 6 的浓度,并与相应氨基酸混合均匀后,加入各孔中,每孔 100  $\mu$  L,平行 3 孔,置 37 $^{\circ}$ C 中孵育 3h。弃上清,每孔加入 50  $\mu$  l 0.5% TrtionX-100 (含 0.2N NaOH) 的 PBS 溶液并置摇床中作用 1h。随后,在激发波长为 458nm,发射波长为 525nm 测定细胞内荧光强度,并对每孔进行蛋白含量测定,并计算摄取量。

[0100] 结合影响实验结果见图 12,结果表明作为 LAT1 高亲和性底物,亮氨酸和苯丙氨酸对纳米粒和 LAT1 的结合过程有明显的抑制作用,而 LAT1 低亲和性底物,赖氨酸和谷氨酸对纳米粒和 LAT1 的结合过程并无明显抑制作用,证明靶向纳米粒的摄取是经 LAT1 介导的。

#### [0101] 实施例 10

##### [0102] 谷氨酸修饰的纳米粒 (C6 SPG<sub>25</sub> PLGA NPs) 摄取机制实验

[0103] 将 LAT1 高表达的 HeLa 细胞以  $2 \times 10^5$  / 孔 / 0.1 mL 的 1640 培养液和埋于 96 孔板中,24h 后,首先加入一定浓度的各内吞抑制剂,加入各孔中,每孔 100  $\mu$  L,平行 3 孔,置 37 $^{\circ}$ C 中孵育 1h。随后将实施例 2 制备的谷氨酸 - 聚乙二醇 1000 单硬脂酸酯修饰的香豆素 6 纳米粒,由 HBSS 缓冲液稀释致相同的香豆素 6 的浓度,并与相应内吞抑制剂混合均匀后,加入各孔中,每孔 100  $\mu$  L,平行 3 孔,置 37 $^{\circ}$ C 中孵育 2h。弃上清,每孔加入 50  $\mu$  l 0.5% TrtionX-100 (含 0.2N NaOH) 的 PBS 溶液并置摇床中作用 1h。随后,在激发波长为 458nm,发射波长为 525nm 测定细胞内荧光强度,并对每孔进行蛋白含量测定,并计算摄取量。

[0104] 结合影响实验结果见图 13,靶向纳米粒的内吞途径为能量依赖性的网格蛋白介导的内吞。

#### [0105] 实施例 11

##### [0106] 谷氨酸修饰的纳米粒对 LAT1 活性的调控

[0107] 将实施例 2 制备的谷氨酸-聚乙二醇 1000 单硬脂酸酯修饰的纳米粒用 HBSS 稀释到一定浓度加入 HeLa 细胞中,置 37℃ 中孵育 1h 和 3h。收集细胞,并对 HeLa 细胞中的中性大氨基酸转运体 1(LAT1) 进行提取,并进行蛋白电泳分析。电泳样品包括未加纳米粒孵化和加纳米粒作用 1h 和 3h 的 LAT1 总蛋白及 LAT1 在胞浆和膜中蛋白。

[0108] 活性调控结果见图 14,加入靶向纳米粒后, LAT1 总蛋白并没有发生变化,但是对于 LAT1 膜蛋白,在孵育 1h 发生下降,3h 出现明显增加,而对于 LAT1 浆蛋白的变化与膜蛋白相反。说明靶向纳米粒在于 LAT1 识别结合后,与其一同内吞进入细胞,导致 LAT1 在膜上的含量下降,随后,靶向纳米粒与 LAT1 在内含体中分离, LAT1 返回至膜上,膜上的 LAT1 含量出现上升。

[0109] 实施例 12

[0110] 谷氨酸修饰的纳米粒的药效

[0111] 将处于对数生长期的 4T1 乳腺癌细胞用 PBS 洗 3 次,用 PBS 调制细胞混悬液至细胞数为  $2 \times 10^6$  个/mL,将癌细胞悬液接种于小鼠右侧腋窝皮下,0.2mL/只。建立了鼠乳腺癌 4T1 瘤株腋下接种模型。接种 7-14d,待肿瘤体积生长至 100-200mm<sup>3</sup>,对荷瘤小鼠进行尾静脉注射给药。将荷瘤小鼠随机分成 4 组,分别为模型对照组(生理盐水)、Taxol、PTX SPG<sub>25</sub> PLGA NPs、PTX SP<sub>25</sub> PLGA NPs 组。对照组尾静脉给予生理盐水,其余各组分别尾静脉注射给予相应制剂,每隔 2d 给药 1 次,连续给药 4 次,给药剂量为 10mg/kg。给药后,每天观察小鼠的存活状态,称重,用游标卡尺测量肿瘤体积。肿瘤体积计算公式为:

[0112]

$$\text{肿瘤体积} = \frac{\text{最小直径} \times \text{最小直径} \times \text{最大直径}}{2}$$

[0113] 药效结果见图 15,生理盐水组肿瘤体积快速增长, Taxol、PTX SPG<sub>25</sub> PLGA NPs 和 PTX SP<sub>25</sub> PLGA NPs 组能明显抑制肿瘤生长,靶向纳米粒 PTX SPG<sub>25</sub> PLGA NPs 组对于 Taxol 和未修饰的 PTX SP<sub>25</sub> PLGA NPs 组具有更慢的肿瘤生长速度。表明靶向纳米粒在体内能有效地识别并结合 4T1 肿瘤上高表达的 LAT1 促进纳米粒的摄取,释放药物,产生抗肿瘤作用。

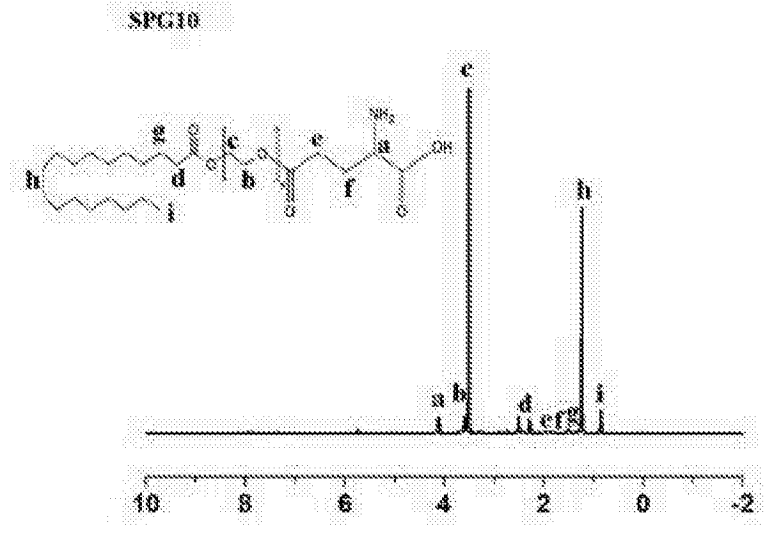


图 1

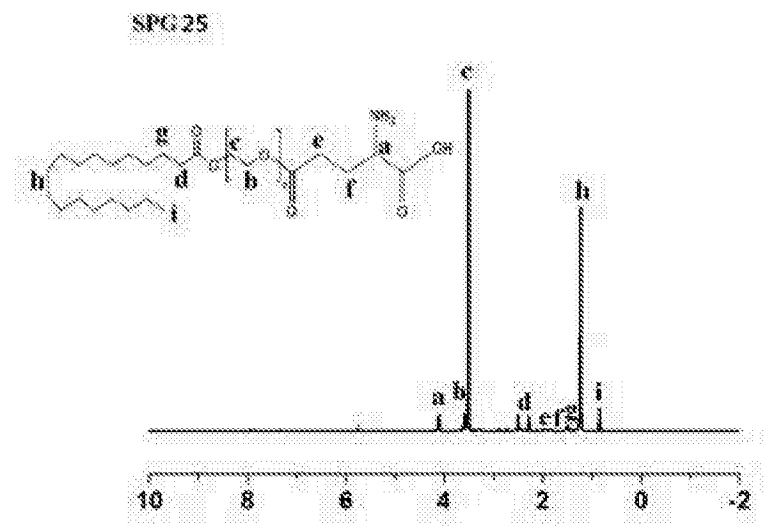


图 2

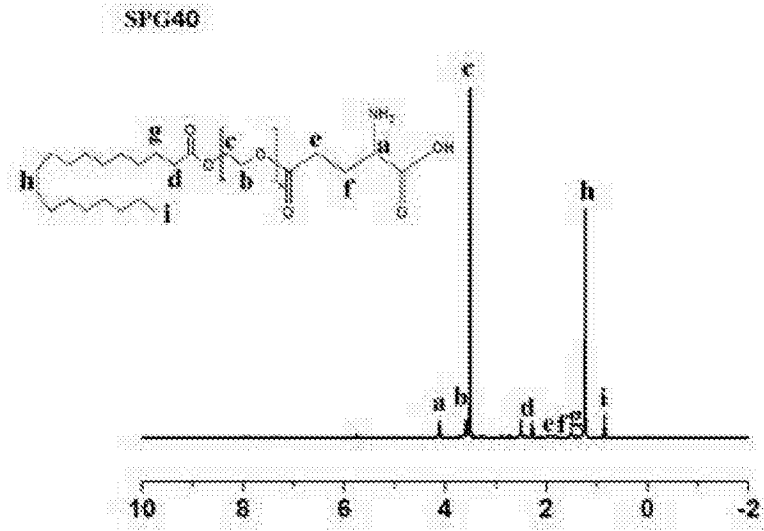


图 3

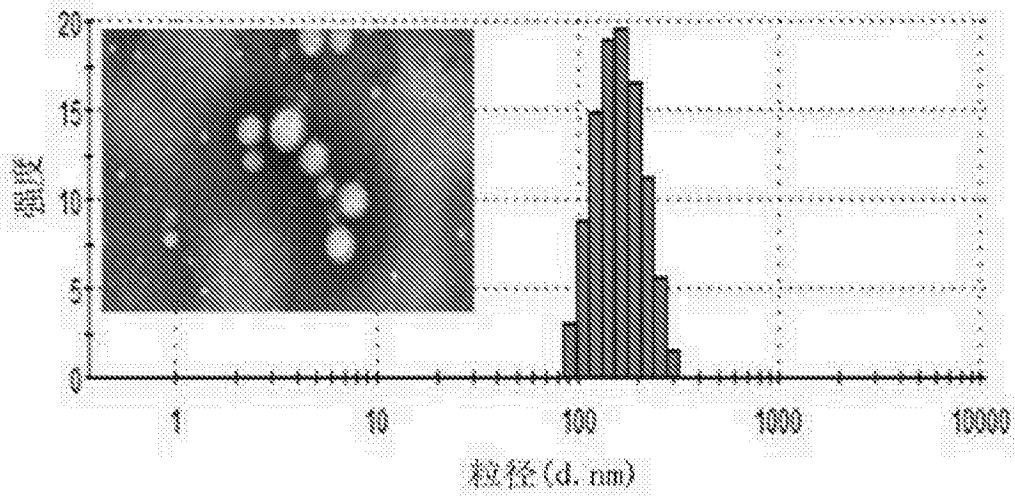


图 4

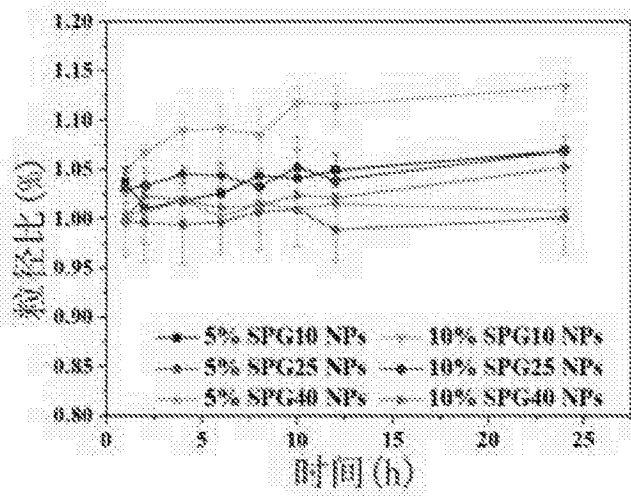


图 5

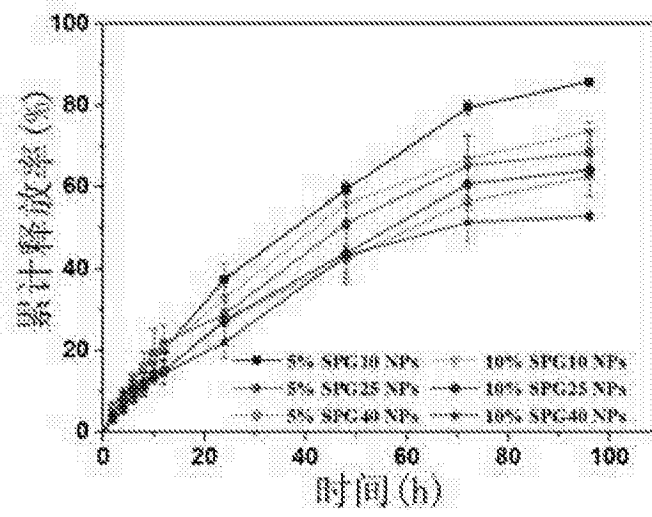


图 6

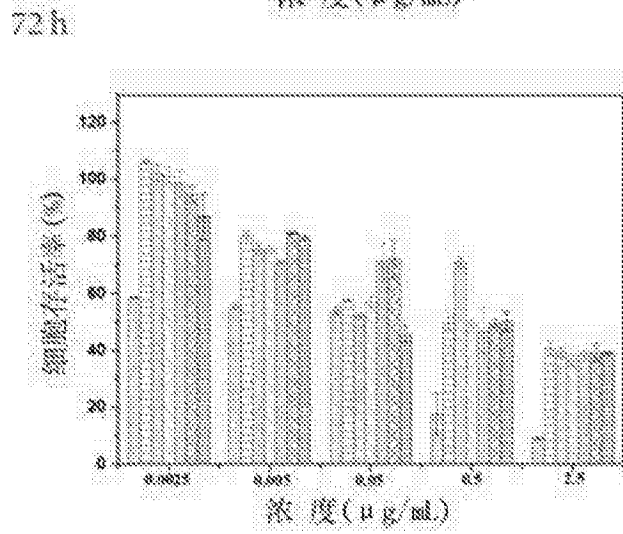
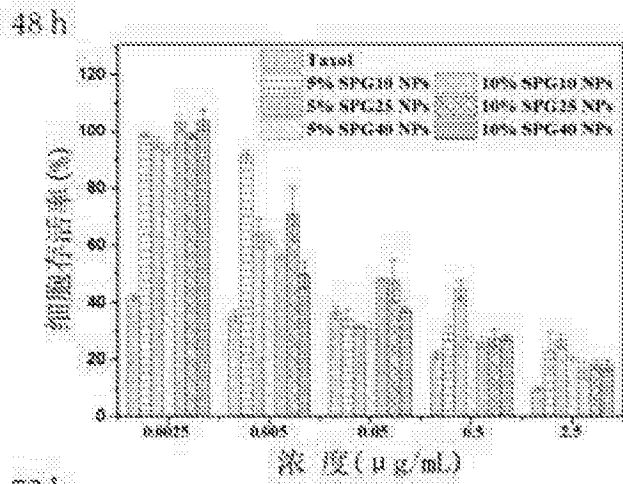


图 7



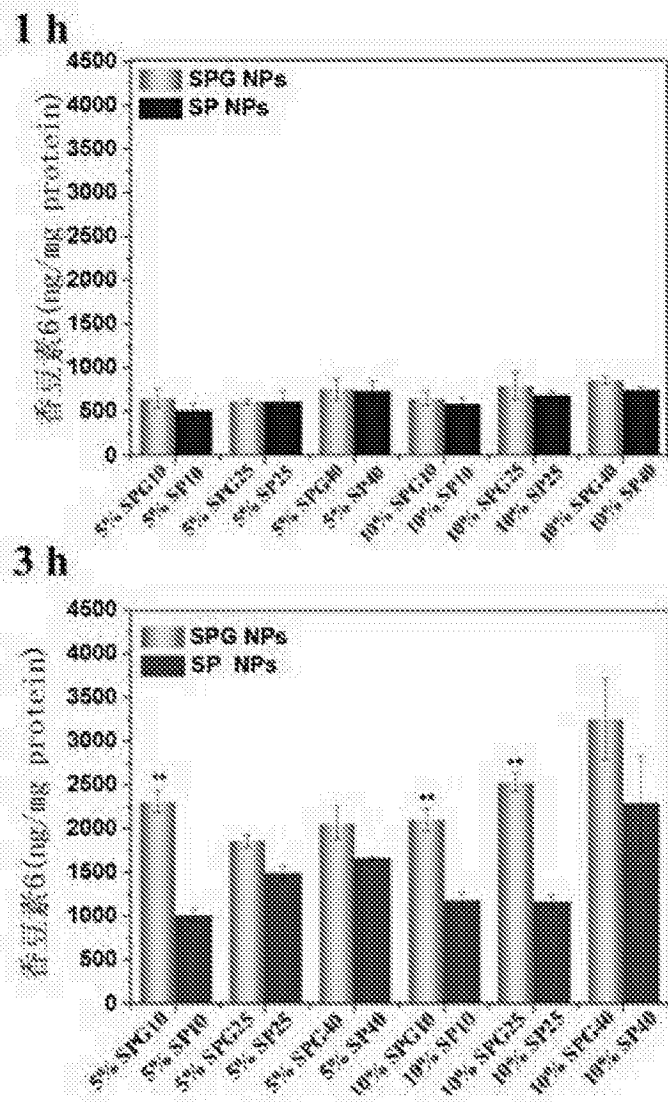


图 8

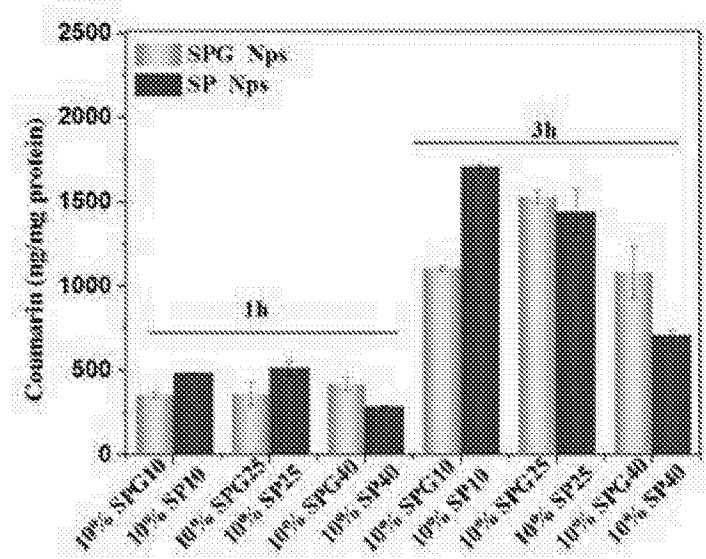


图 9

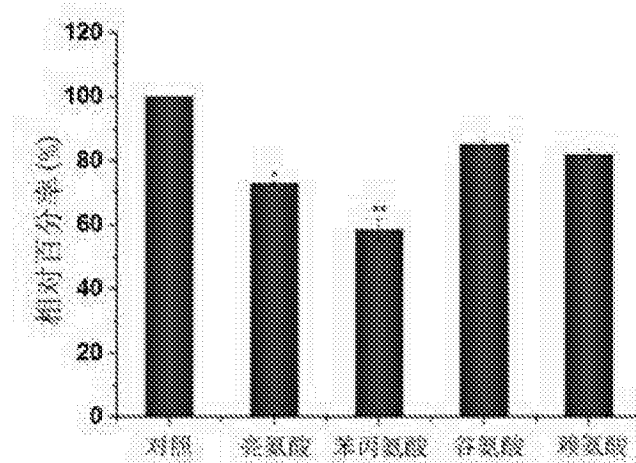


图 10

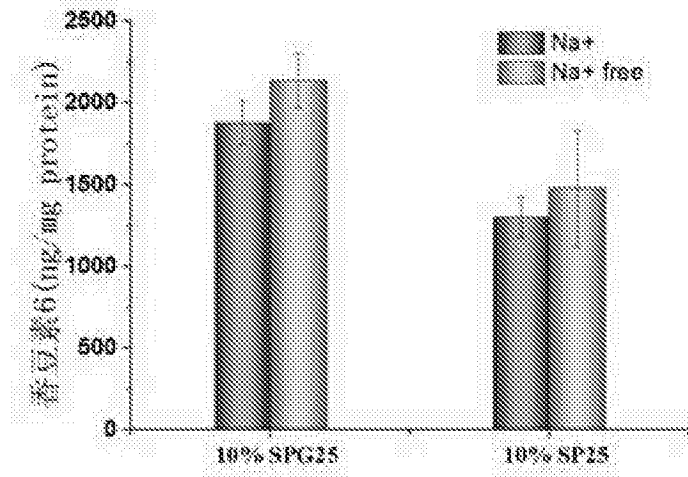


图 11

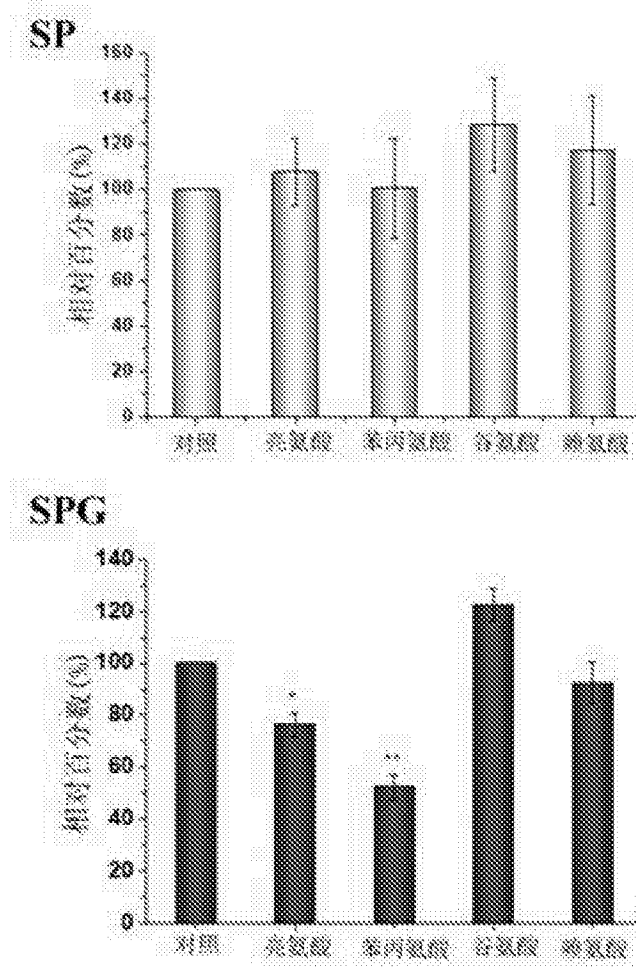


图 12

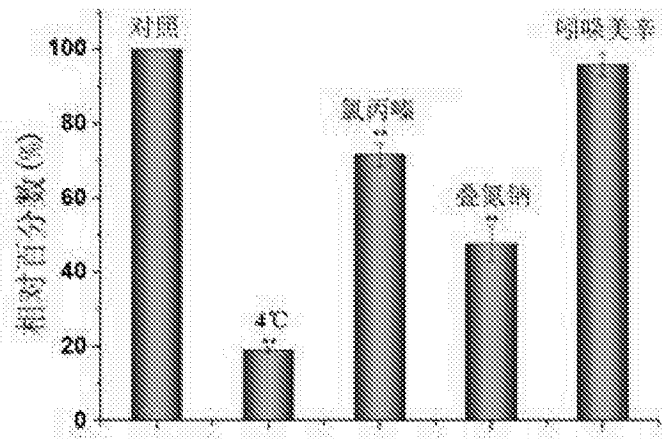


图 13

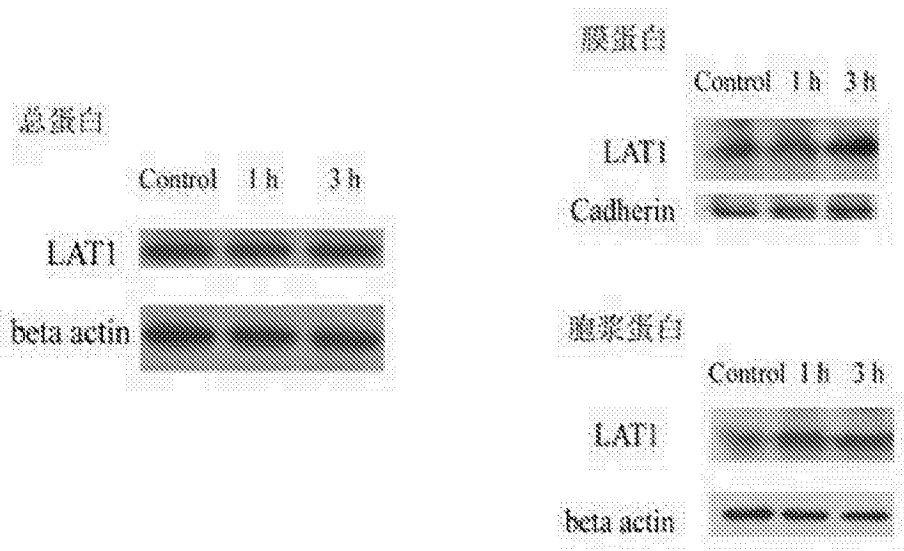


图 14

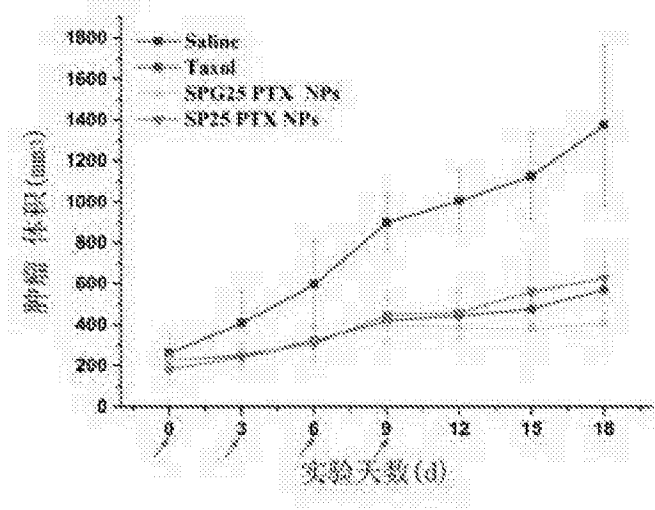


图 15