



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115844910 A

(43) 申请公布日 2023. 03. 28

(21) 申请号 202211511739.X

A61K 31/135 (2006.01)

(22) 申请日 2022.11.29

(71) 申请人 嘉兴学院

地址 314033 浙江省嘉兴市越秀南路56号

(72) 发明人 张洁 李悦 丁宝月 李明娟

高欢 郑梦媛 王雪军 朱鹏彬

(74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司

11332

专利代理师 赵颖

(51) Int. Cl.

A61K 31/704 (2006.01)

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 47/34 (2017.01)

C08G 81/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

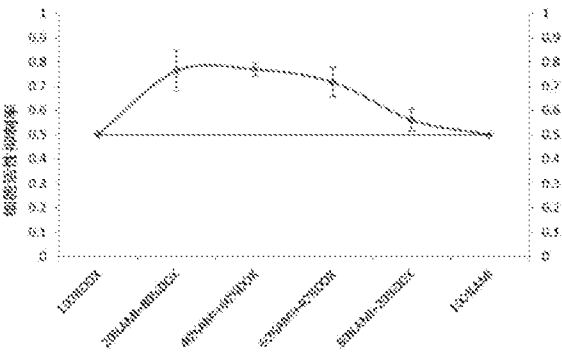
权利要求书1页 说明书10页 附图2页

(54) 发明名称

一种预防或治疗脑胶质瘤的药物及其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明提供了一种预防或治疗脑胶质瘤的药物及其制备方法与应用,所述药物中包括药物组分:阿米替林和阿霉素。本发明创造性地利用阿霉素与阿米替林联合给药协同抗脑胶质瘤,达到杀死脑胶质瘤和抑制脑胶质瘤浸润性生长的效果。本发明创造性地发现:两种药物可协同抑制胶质瘤细胞活性,还可显著抑制胶质瘤细胞分泌外泌体。所述联合给药组合未见文献报道,两种药物的协同效果超出预期。



1. 一种预防或治疗脑胶质瘤的药物,其特征在于,所述药物中包括药物组分:阿米替林和阿霉素。

2. 如权利要求1所述的预防或治疗脑胶质瘤的药物,其特征在于,所述阿米替林与阿霉素的质量比为(0.01-0.02):(2-10)。

3. 如权利要求1或2所述的预防或治疗脑胶质瘤的药物,其特征在于,所述药物中还包
括纳米载体,所述纳米载体包括泊洛沙姆188修饰的聚酰胺-胺。

4. 如权利要求3所述的预防或治疗脑胶质瘤的药物,其特征在于,所述泊洛沙姆188修
饰的聚酰胺-胺由包括如下步骤的制备方法制备得到:

(1) 将丁二酸酐、泊洛沙姆188、溶剂与催化剂三乙胺混合,反应得到F68-SA;

(2) 将F68-SA、NHS、EDC、三乙胺与溶剂混合,反应以活化羧基,得到活化产物;

(3) 将聚酰胺-胺与活化产物混合,反应,即得。

5. 如权利要求4所述的预防或治疗脑胶质瘤的药物,其特征在于,步骤(1)所述反应的
温度为60-80℃,反应的时间为20-30h;

优选地,步骤(1)中丁二酸酐与泊洛沙姆188的摩尔比为(1-3):(1-3);

优选地,步骤(1)所述溶剂包括四氢呋喃;

优选地,步骤(1)所述反应后还包括除去溶剂,干燥;

优选地,步骤(2)所述反应的温度为15-30℃,反应的时间为3-6h;

优选地,步骤(2)中F68-SA、NHS、EDC与三乙胺的摩尔比为(60-70):(2-6):(2-6):(2-4);

优选地,步骤(2)所述溶剂包括二甲基亚砷;

优选地,步骤(3)所述反应的温度为15-40℃,反应的时间为60-90h;

优选地,所述聚酰胺-胺与泊洛沙姆188的摩尔比为(60-70):(0.5-1.5);

优选地,步骤(3)所述反应后还包括干燥;

优选地,所述干燥的方式包括冻干;

优选地,所述干燥前还包括纯化;

优选地,所述纯化的方式包括透析。

6. 一种如权利要求3-5中任一项所述的预防或治疗脑胶质瘤的药物的制备方法,其特
征在于,所述制备方法包括:将药物组分、纳米载体与溶剂混合,反应,即得。

7. 如权利要求6所述的制备方法,其特征在于,所述反应在避光下进行,反应的温度为
33-40℃,时间为18-30h;

优选地,所述药物组分与纳米载体的摩尔量之比为(5-20):1;

优选地,所述药物中药物组分与纳米载体的摩尔量之比为(8-12):1;

优选地,所述溶剂包括甲醇;

优选地,所述反应后还包括除去溶剂和纯化;

优选地,所述纯化的方式包括透析。

8. 如权利要求1-5中任一项所述的药物在制备预防或治疗脑胶质瘤的药物中的应用。

9. 如权利要求1-5中任一项所述的药物在制备抑制脑胶质瘤细胞活性的药物中的应
用。

10. 如权利要求3-5中任一项所述的药物在制备靶向血脑屏障的药物中的应用。

一种预防或治疗脑胶质瘤的药物及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,涉及一种预防或治疗脑胶质瘤的药物及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 脑胶质瘤是常见的恶性肿瘤之一,其多数为原发性颅内恶性肿瘤,具有发病率高,死亡率高,治愈率低,复发率高等特点,是目前肿瘤治疗的难题之一。目前脑胶质瘤的治疗手段主要是手术加放化疗,但由于脑胶质瘤的浸润侵袭性生长,使得肿瘤和正常组织边缘不清晰,因此单纯的手术和放疗治疗效果并不佳,预后差,且极易复发。又由于血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)的存在,使得大多数药物都难以进入大脑发挥最佳治疗效果。而目前的给药方式主要是静脉给药、动脉灌注、开放血脑屏障和颅内给药等方式,这些给药方式存在药物分布不聚集、对血管伤害大、无选择性开放增加其它物质进入大脑的几率,以及给药不便等问题。

[0003] 因此近年来,脑靶向纳米给药系统是治疗脑胶质瘤的研究热点之一。脑靶向纳米给药系统是指药物主要通过受体介导和载体介导进行脑内药物转运。然而,目前的脑靶向纳米给药系统仍存在两方面的技术困难需要克服:首先,现有化疗药物本身的治疗效果不佳;其次,现有的纳米给药系统在跨越BBB方面的效果仍不理想,同时其生物相容性、靶向释放性、及药物释放率也有待提高,因此总体递送效果不理想。

[0004] 因此,如何克服上述技术问题,实现从药物本身及给药系统这两个方面提高对于脑胶质瘤的治疗效果,成为了本领域亟待解决的问题。

发明内容

[0005] 针对现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种预防或治疗脑胶质瘤的药物及其制备方法与应用。

[0006] 为达到此发明目的,本发明采用以下技术方案:

[0007] 第一方面,本发明提供一种预防或治疗脑胶质瘤的药物,所述药物中包括药物组分:阿米替林和阿霉素。

[0008] 单一化疗药物在治疗脑胶质瘤时往往存在局限性。联合两种药物共递送可以克服一些与单一化学治疗相关的问题。药物合适的组合下可以通过不同作用方式来提高化疗疗效,降低药物剂量,降低耐药性等优势。阿霉素(DOX)是一种作用于细胞核的蒽环霉素类广谱抗癌药,通过作用于肿瘤细胞的DNA,诱导细胞凋亡,抗癌效果显著。阿米替林(AMI)是一种三环类酸性鞘磷脂酶抑制剂,临床常用作抗抑郁药,其作用机制明确。外泌体已被证明在肿瘤的发展中起着重要的作用。阿米替林可以破坏酸性鞘磷脂酶的结构,减少神经酰胺的生成(神经酰胺在外泌体的生成方面起着重要的作用),从而降低外泌体的分泌量。两种作用机制不同的药物联合给药,可增强对脑胶质瘤的杀伤力,同时抑制其复发。

[0009] 本发明创造性地发现:阿米替林与阿霉素这两种药物可协同抑制胶质瘤细胞活

性,还可显著抑制胶质瘤细胞分泌外泌体。所述联合给药组合未见文献报道,两种药物的协同效果超出预期。

[0010] 优选地,所述阿米替林与阿霉素的质量比为(0.01-0.02):(2-10)。

[0011] 在上述配比下,两种药物的联合作用指数CDI在0.3-0.4之间,在本领域定义为具有显著协同作用。

[0012] 上述(0.01-0.02)中的具体数值例如0.01、0.011、0.012、0.013、0.014、0.015、0.016、0.017、0.018、0.019、0.02等。

[0013] 上述(2-10)中的具体数值例如2、3、4、5、6、7、8、9、10等。

[0014] 优选地,所述药物中还包括纳米载体,所述纳米载体包括泊洛沙姆188(Pluronic F68)修饰的聚酰胺-胺(PAMAM-NH₂)。

[0015] 聚酰胺-胺(PAMAM-NH₂)树状聚合物,是一类阳离子聚合物材料,常用于药物递送系统。聚酰胺-胺由于表面氨基的存在,具有许多独特的优点:氨基较活泼,易发生化学反应,容易进行配体的连接;具有质子海绵效应,可以逃逸内涵体-溶酶体系统。PAMAM树状大分子具有疏水空腔和表面官能团,由于整代聚酰胺-胺外表面所带氨基为正电,表现出一定的细胞毒性和溶血毒性,可对其表面官能团进行修饰以装载药物等其它治疗物质。泊洛沙姆188(Pluronic F68)具有较强的亲水性,且有与聚乙二醇相似的长循环作用,可以提高给药系统在体内的循环时间。利用泊洛沙姆188对聚酰胺-胺进行修饰,来改善其生物相容性,提高药物递送效果。

[0016] 本发明采用本身具有降低耐药性特性的泊洛沙姆188(Pluronic F68)对PAMAM进行修饰来中和其表面的正电荷,增加载体的生物相容性,减小它对人体的毒性。特别地,Pluronic F68可以吸附血浆中的载脂蛋白A-I(Apo A-I),而Apo A-I可以特异性地与血脑屏障(BBB)的脑毛细血管内皮细胞上大量存在的清道夫受体(scavenger receptor class B type I, SR-BI)相结合,因此本发明此设计通过受体介导的方式实现了跨BBB的目的。

[0017] 优选地,所述泊洛沙姆188修饰的聚酰胺-胺由包括如下步骤的制备方法制备得到:

[0018] (1) 将丁二酸酐(SA)、泊洛沙姆188、溶剂与催化剂三乙胺混合,反应得到F68-SA;

[0019] (2) 将F68-SA、NHS(N-羟基丁二酰亚胺)、EDC(1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺)、三乙胺与溶剂混合,反应以活化羧基,得到活化产物;

[0020] (3) 将聚酰胺-胺与活化产物混合,反应,即得。

[0021] 理论上,采用任何方法制备得到的泊洛沙姆188修饰的聚酰胺-胺均可用作纳米载体,只是不同方法制得的纳米载体载药时,包封率和载药量有所区别,采用本发明上述的制备方法,各参数相互配合,得到的纳米载体的载药效果好于其他制备方法。

[0022] 优选地,步骤(1)所述反应的温度为60-80℃,例如60℃、62℃、64℃、66℃、68℃、70℃、72℃、74℃、76℃、78℃、80℃等,反应的时间为20-30h,例如20h、21h、22h、23h、24h、25h、26h、27h、28h、29h、30h等。

[0023] 优选地,步骤(1)中丁二酸酐与泊洛沙姆188的摩尔比为(1-3):(1-3)。

[0024] 上述(1-3)中的具体数值例如1、1.2、1.5、1.7、2、2.2、2.5、2.7、3等。

[0025] 优选地,步骤(1)所述溶剂包括四氢呋喃。

[0026] 优选地,步骤(1)所述反应后还包括除去溶剂,干燥。

[0027] 优选地,步骤(2)所述反应的温度为15-30℃,例如15℃、17℃、20℃、22℃、25℃、27℃、30℃等,反应的时间为3-6h,例如3h、3.5h、4h、4.5h、5h、5.5h、6h等。

[0028] 优选地,步骤(2)中F68-SA、NHS、EDC与三乙胺的摩尔比为(60-70):(2-6):(2-6):(2-4)。

[0029] 上述(60-70)中的具体数值例如60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70等。

[0030] 上述(2-6)中的具体数值例如2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6等。

[0031] 上述(2-4)中的具体数值例如2、2.2、2.5、2.7、3、3.2、3.5、3.7、4等。

[0032] 优选地,步骤(2)所述溶剂包括二甲基亚砜。

[0033] 优选地,步骤(3)所述反应的温度为15-40℃,例如15℃、17℃、20℃、22℃、25℃、27℃、30℃、32℃、35℃、37℃、40℃等,反应的时间为60-90h,例如60h、62h、65h、67h、70h、72h、75h、77h、80h、82h、85h、87h、90h等。

[0034] 优选地,所述聚酰胺-胺与泊洛沙姆188的摩尔比为(60-70):(0.5-1.5)。

[0035] 上述(60-70)中的具体数值例如60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70等。

[0036] 上述(0.5-1.5)中的具体数值例如0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5等。

[0037] 优选地,步骤(3)所述反应后还包括干燥。

[0038] 优选地,所述干燥的方式包括冻干。

[0039] 优选地,所述干燥前还包括纯化。

[0040] 优选地,所述纯化的方式包括透析。

[0041] 第二方面,本发明提供一种如第一方面所述的预防或治疗脑胶质瘤的药物的制备方法,所述制备方法包括:将药物组分、纳米载体与溶剂混合,反应,即得。

[0042] 优选地,所述反应在避光下进行,反应的温度为33-40℃,例如33℃、34℃、34℃、35℃、36℃、37℃、38℃、39℃、40℃等,时间为18-30h,例如18h、20h、22h、24h、26h、28h、30h等。

[0043] 优选地,所述药物组分与纳米载体的摩尔量之比为(5-20):1,优选为(8-12):1。

[0044] 上述(5-20)中的具体数值例如5、6、7、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、11.5、12、13、14、15、16、17、18、19、20等。

[0045] 当所述药物组分与纳米载体的摩尔量之比为(8-12):1时,药物包封率及载药量综合结果较好。

[0046] 优选地,所述溶剂包括甲醇。

[0047] 优选地,所述反应后还包括除去溶剂和纯化。

[0048] 优选地,所述纯化的方式包括透析。

[0049] 第三方面,本发明提供如第一方面所述的药物在制备预防或治疗脑胶质瘤的药物中的应用。

[0050] 第四方面,本发明提供如第一方面所述的药物在制备抑制脑胶质瘤细胞活性的药物中的应用。

[0051] 第五方面,本发明提供一种抑制脑胶质瘤细胞活性的方法,所述方法包括:对脑胶质瘤细胞给予阿米替林和阿霉素。

[0052] 优选地,所述阿米替林与阿霉素的质量比为(0.01-0.02):(2-10)。

[0053] 第六方面,本发明提供如第一方面所述的药物在制备靶向血脑屏障的药物中的应

用。

[0054] 第七方面,本发明提供一种靶向血脑屏障的方法,所述方法包括对目标动物模型给予纳米载体包载的药物,所述纳米载体包括泊洛沙姆188修饰的聚酰胺-胺。

[0055] 优选地,所述泊洛沙姆188修饰的聚酰胺-胺的制备方法同第一方面所述。

[0056] 本发明所述的数值范围不仅包括上述列举的点值,还包括没有列举出的上述数值范围之间的任意的点值,限于篇幅及出于简明的考虑,本发明不再穷尽列举所述范围包括的具体点值。

[0057] 相对于现有技术,本发明具有以下有益效果:

[0058] (1) 本发明创造性地利用阿霉素与阿米替林联合给药协同抗脑胶质瘤,达到杀死脑胶质瘤和抑制脑胶质瘤浸润性生长的效果。本发明创造性地发现:两种药物可协同抑制胶质瘤细胞活性,还可显著抑制胶质瘤细胞分泌外泌体。所述联合给药组合未见文献报道,两种药物的协同效果超出预期。

[0059] (2) 通过对PAMAM-NH₂表面进行简单的Pluronic F68修饰,得到纳米药物载体,即可同时赋予载体多重功能:①长循环;②较高安全性和生物相容性;③抑制BBB的被动物理屏障,削弱BBB的主动屏障;④可显著提高细胞对药物的摄取量,且药物缓释效果好。所述纳米药物载体设计简单,成本低,更适合临床应用,为抗脑胶质瘤智能纳米给药系统的设计提供新的思路。

[0060] 本发明提供了一种以PluronicF68修饰的PAMAM树状大分子,负载阿霉素和阿米替林(两种药物协同抑制胶质瘤细胞活性,并协同抑制胶质瘤细胞分泌外泌体),构建得到新型的纳米共递送给药系统PAMAM-NH₂-Pluronic F68/DOX/AMI,实现了跨BBB的被动物理屏障和主动屏障、高效杀伤脑胶质瘤和抑制脑胶质瘤浸润性生长的多重目标。

附图说明

[0061] 图1是阿米替林与阿霉素协同抑制脑胶质瘤细胞活性的结果图。

[0062] 图2是药物系统PAMAM-F68-AMI+DOX的药物缓释效果图。

[0063] 图3是脑胶质瘤细胞对药物的摄取结果。

具体实施方式

[0064] 下面通过具体实施方式来进一步说明本发明的技术方案。本领域技术人员应该明了,所述实施例仅仅是帮助理解本发明,不应视为对本发明的具体限制。

[0065] 以下实施例中,若无特殊说明,所有的试剂及耗材均购自本领域常规试剂厂商;若无特殊说明,所用的实验方法和技术手段均为本领域常规的方法和手段。

[0066] 实施例1

[0067] 本实施例考察AMI-DOX对于胶质瘤细胞的协同作用

[0068] (1) AMI-DOX抑制C6细胞分泌外泌体

[0069] 取处于对数生长期的C6细胞(大鼠胶质瘤细胞) 15mL,以 2×10^6 个/皿密度接种于培养皿中,于5%CO₂, 37℃的二氧化碳培养箱中培养24h。总共设置三组(无药物的对照组, 10μg/mL AMI, 10μg/mL AMI+0.06μg/mL DOX), 每组6个皿,过夜待细胞贴壁后加入配置好的15mL含不同药物的培养基,培养48h后收集细胞上清并提取外泌体后用nanodrop测定浓度。

[0070] 外泌体提取方法为：(1) 将90mL的细胞上清液在4℃条件下经4000g×30min离心，去除较大的细胞碎片等杂质；(2) 将离心后的上清液过0.22μm孔径的无菌滤膜，除去尺寸较大的细胞外囊泡和细胞碎片等杂质；(3) 将过滤后的上清液转移至100KDa的超滤管中，4℃，4000g×30min超滤，浓缩样本，之后加PBS缓冲液超滤，使浓缩液澄清，转移至离心管中；(4) 按5:1的比例在浓缩液中加入外泌体提取试剂(按照EXO-Quick试剂盒说明书进行操作)，混匀后4℃静置过夜；(5) 过夜后，将混合液在4℃，1500g×30min离心，去除上清，加灭菌注射用水吹打均匀，4℃，1500g×30min离心，下层白色沉淀即为外泌体。

[0071] 实验结果如表1所示：

[0072] 表1

组别	对照组	10 μg/mL	10 μg/mL AMI+0.06
		AMI	μg/mL DOX
外泌体浓度	61.18	54.54	51.51
(mg/mL)			

[0075] 此结果说明AMI可以抑制外泌体的分泌，AMI+DOX对C6抑制外泌体效果更佳。

[0076] (2) AMI-DOX协同抑制C6细胞活性

[0077] 将处于对数生长期的C6细胞(大鼠胶质瘤细胞)消化重悬后以 8×10^3 个/孔的密度接种于96孔板中，于5%CO₂，37℃的二氧化碳培养箱中培养24h。分别加入不同浓度的阿霉素和阿米替林，进行细胞毒试验。结果得到：AMI与DOX对脑胶质瘤细胞的半数抑制浓度IC₅₀分别为0.06μg/mL和12μg/mL。

[0078] 以上述IC₅₀值为基准(0.06mg/mL AMI:12mg/mL DOX为100%AMI:100%DOX)，设置一系列比例分别使AMI:DOX为：80%:20%，60%:40%，40%:60%和20%:80%。将C6细胞接种于96孔细胞培养板后，分别加入上述不同配比的阿霉素和阿米替林，共孵育48h后。分别测定药物单用和合用的OD值，计算联合作用指数CDI，用CalcuSyn2.0软件处理结果，优化得到二者药物发挥最佳协同效应的浓度与比例，所得结果将应用于协同作用机理考察研究中。CDI计算公式为： $CDI = OD(A+B) / [OD(A) \times OD(B)]$ ；

[0079] 协同作用评价指标：CDI<0.7，表明A与B两种药物具有显著协同作用；CDI<1，表明两种药物具有协同作用；CDI=1，表明两种药物具有加和作用；CDI>1，表明两种药物具有拮抗作用。

[0080] 各药物配比对于C6细胞的抑制率结果如图1所示，联合作用指数CDI结果如表2所示；

[0081] 表2

药物配	20% AMI+	40% AMI+	60% AMI+	80% AMI+
-----	----------	----------	----------	----------

[0083]	比	80%DOX	60%DOX	40%DOX	20%DOX
	CDI 值	0.37	0.30	0.35	0.36

[0084] 结果显示:且四种比例下对应的CDI值在0.3~0.4之间,说明AMI与DOX具有显著协同抑制C6细胞活性的作用。当浓度比例为40%AMI+60%DOX时,协同效果最佳。

[0085] 实施例2

[0086] 本实施例合成了纳米载体PAMAM-F68 (PAMAM-NH₂-Pluronic F68),即Pluronic F68修饰的PAMAM。

[0087] (1) 合成方法:

[0088] 1、称取丁二酸酐0.05g (SA,0.5mmol)、Pluronic F68 4.15g (0.5mmol,购自Aladdin),溶于装有20mL无水四氢呋喃的100mL圆底烧瓶中(摩尔比SA:F68=1:1),加入3滴三乙胺作催化剂,70℃下回流搅拌反应24h。

[0089] 2、反应结束,放冷后,旋蒸减压除去溶剂,加入20mL蒸馏水充分溶解产物。

[0090] 3、将上述溶液分成两份用一次性滴管转移至两张透析袋中(MWC0=1000)在1000mL烧杯中蒸馏水纯化透析48h。

[0091] 4、透析结束后,将PEG10000(聚乙二醇,购自Mackin)撒在透析袋上将袋内液体浓缩至大概10mL左右,再将浓缩后的液体分装于西林瓶中(大约每个西林瓶2mL),先在-20℃预冻2h左右,再在-80℃冰箱过夜,再冻干48h得到白色粉末即为Pluronic F68-SA。

[0092] 5、称取1.8685g PluronicF68-SA和0.0012g NHS(N-羟基丁二酰亚胺)和0.0015mL三乙胺于圆底烧瓶中,加入20mL无水二甲基亚砷(DMSO),再将0.002g EDC(1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳酰二亚胺)溶于2mL无水DMSO中,然后将溶解后的EDC溶液加入到溶有PluronicF68-SA、NHS、三乙胺的混合溶液中(摩尔比PluronicF68:NHS:EDC:三乙胺=64:3:3:3,其中NHS与EDC的比例可以适当增大),22℃左右水浴搅拌反应4h以活化羧基。

[0093] 6、取307.5μL PAMAM-NH₂溶液(甲醇作溶剂,内含有50mg PAMAM-NH₂,PAMAM-NH₂-G4.0购自威海晨源分子新材料有限公司)至西林瓶,将甲醇挥干,然后加入3mL无水DMSO使溶解,然后用注射器将其吸出,缓慢逐滴加入步骤5得到的活化产物中(摩尔比Pluronic F68:PAMAM-NH₂=64:1),室温(25℃)搅拌3d。

[0094] 7、将上述步骤6得到的溶液分成两份,用一次性滴管转移至两张透析袋中(MWC0=10000,透析袋需要裁剪好提前活化:用沸水煮15min,放冷后使用),蒸馏水透析3d。

[0095] 8、然后将PEG10000撒在透析袋上将袋内液体浓缩至大概10mL左右,再将浓缩后的液体分装于西林瓶中,在-20℃预冻2h左右,再在-80℃冰箱过夜,冻干48h得到白色固体即为PAMAM-NH₂-Pluronic F68。

[0096] (2) 表征结果:

[0097] 对纳米载体PAMAM-NH₂-Pluronic F68,以及原料PAMAM-NH₂和中间产物Pluronic F68-SA进行表征,来证明纳米载体的成功合成。

[0098] 1、粒径及电位考察

[0099] 取含有适量待测样品的超纯水溶液,适当稀释后,用0.22μm滤膜过滤,采用粒度仪测定粒径分布和zeta电位,测定温度为25℃。

[0100] 结果显示:PAMAM-NH₂-Pluronic F68的粒径在104.54nm左右,电位在-0.6mV左右。其中,与未修饰的PAMAM-NH₂相比,PAMAM-NH₂-Pluronic F68粒径有所增加,可能的原因为Pluronic分子能在PAMAM-NH₂表面形成亲水层而引起粒径的增大。另外,经修饰后的PAMAM-NH₂的Zeta电位有明显降低至,原因是共价结合到PAMAM-NH₂表面的Pluronic分子降低了其表面氨基的密度,另外PAMAM-NH₂外层亲水层也掩蔽了PAMAM-NH₂表面的一部分正电荷。此结果证实了纳米载体的成功合成。

[0101] 2、红外表征

[0102] 取待测样品粉末与干燥后的溴化钾粉末1:100混合研磨,压制成厚度约1mm的透明薄片,用红外光谱进行测试。

[0103] 结果显示:PAMAM-NH₂-Pluronic F68红外图谱中,1651.45cm⁻¹及1557.36cm⁻¹处出现羰基的特征峰,1107.7cm⁻¹处出现醚-C-O-的伸缩振动峰,表明目标产物的成功合成。

[0104] 3、核磁表征

[0105] 用重水(D₂O)或DMSO溶解适量的待测样品后采用核磁共振波谱仪进行分析,并根据Pluronic和PAMAM-NH₂的特征质子峰计算PAMAM-NH₂氨基的取代度。

[0106] 结果显示,PAMAM-NH₂-Pluronic F68的¹H-NMR核磁图谱中的特征峰归属为:1.06ppm(-CH₃),2.36ppm(-NCH₂CH₂CO-),2.51ppm(-CONHCH₂CH₂N),2.73ppm(-CONHCH₂CH₂N-),2.95ppm,(-NCH₂CH₂CO-),3.20ppm(-CONHCH₂CH₂NH₂,-NCH₂CH₂NHCO-),3.43ppm(-CH₂CH(CH₃)-O-),3.60ppm(-OCH₂CH₂OH)。

[0107] 由PAMAM分子中的羰基相邻的亚甲基(-CH₂-)特征峰和Pluronic分子中甲基特征峰的峰积分面积比来计算PAMAM表面氨基的取代度,得到PAMAM-F68取代度为23.15%,理论分子量为138669.4。

[0108] 综合以上结果可知,本实施例成功合成了纳米载体PAMAM-F68。

[0109] 实施例3

[0110] 本实施例合成了药物系统PAMAM-F68-AMI+DOX。

[0111] (1) 合成方法

[0112] DOX游离储备液:称取5mg的盐酸阿霉素,加入适量10mL甲醇丙酮(1:1,v/v)混合溶剂溶解,加入25mL的三乙胺,室温搅拌反应12h,脱去盐酸盐,37℃旋转蒸发除去溶剂及过量的三乙胺,用适量有机溶剂(甲醇)复溶,制成浓度为1mg/mL的DOX游离储备液。

[0113] AMI游离储备液:称取5mg的盐酸阿米替林,加入适量10mL甲醇丙酮(1:1,v/v)混合溶剂溶解,加入25mL的三乙胺,室温搅拌反应12h,脱去盐酸盐,37℃旋转蒸发除去溶剂及过量的三乙胺,用适量有机溶剂(甲醇)复溶,制成浓度为1mg/mL的AMI游离储备液。

[0114] AMI+DOX储备液:各取一定量的AMI游离储备液和DOX游离储备液,AMI与DOX的比例为40%AMI+60%DOX。

[0115] 精密量取适量脱盐酸DOX游离储备液/AMI游离储备液/AMI+DOX储备液于50mL圆底烧瓶中,按纳米载体PAMAM-F68与药物AMI/DOX/AMI+DOX摩尔分别比为1:5、1:10和1:20(每种药物各做3个配比)称取相应量PAMAM-F68聚合物置于适量甲醇溶液中,加入圆底烧瓶,37℃避光搅拌24h。减压下(旋转蒸发)除去有机溶剂三乙胺和甲醇,加少量(5mL)蒸馏水,将其充分水化溶解。通过透析法除去未包裹的游离药物(NWCO=1000D),以蒸馏水透析12h,即得药物系统PAMAM-F68-AMI、PAMAM-F68-DOX和PAMAM-F68-AMI+DOX。

[0116] (2) 药物包封率及载药量

[0117] 取出透析袋中的溶液用甲醇稀释五倍后用HPLC(高效液相色谱)方法测定药物含量。计算药物包封率及载药量。

[0118] 包封率 $EE\% = \text{包载的药物浓度} / \text{药物加入浓度} \times 100\%$;

[0119] 载药量 $DL\% = \text{包载的药物质量} / \text{药物系统总质量} \times 100\%$;

[0120] 结果见表3。

[0121] 表3

[0122]	纳米载体:药物 (mol/mol)	AMI		DOX	
		EE%	DL%	EE%	DL%
	1:5	60.14	0.68	79.8%	0.0056
	1:10	43.86	0.98	46.06	0.0065
	1:20	32.21	1.44	32.06	0.0090

[0123] 综合来看,载体与药物摩尔比为1:10时药物包封率及载药量结果较好。

[0124] (2) 理化性质考察

[0125] 分别对载体与药物摩尔比为1:10的药物系统PAMAM-F68-AMI、PAMAM-F68-DOX和PAMAM-F68-AMI+DOX进行理化性质考察,结果显示,PAMAM-F68-AMI的粒径为 169.66 ± 8.82 ,电位为 5.4 ± 1.56 ;PAMAM-F68-DOX的粒径为 146.47 ± 12.12 ,电位为 1.87 ± 0.47 ;PAMAM-F68-AMI+DOX的粒径为 178.58 ± 7.52 ,电位为 2 ± 0.85 。所有制剂的粒径均小于200nm,符合纳米药物粒径要求。

[0126] (3) 药物释放

[0127] 分别取适量PAMAM-F68-AMI+DOX、AMI和DOX各1mL放入透析袋中(MWCO=3500D),PAMAM-F68-AMI+DOX中的药物浓度根据所测得的游离药物峰面积而得,AMI和DOX均为1mg/mL。将三种样品分别置于透析袋中,将其分别放于装有20mL的pH 5.0和pH 7.4磷酸盐缓冲液的锥形瓶中,在37℃恒温下,120r/min,间隔一定时间(0.5,1,2,4,6,8,10,12,24,48,72,96h)吸取2mL,然后补加2mL PBS,将吸取的药液进行高效液相检测,代入标准曲线方程,计算不同时间药物的释放量。结果见图2(图中P-F-A+D表示PAMAM-F68-AMI+DOX),可知药物系统的缓释效果优异。

[0128] 实施例4

[0129] 本实施例考察PAMAM-F68-AMI+DOX药物系统对脑胶质瘤的治疗效果

[0130] (1) 抑制C6细胞活性

[0131] 将C6细胞(处于对数生长期)消化重悬后以 8×10^3 个/孔的密度接种于96孔板中,于5%CO₂,37℃的二氧化碳培养箱中培养24h。将药物系统PAMAM-F68-AMI、PAMAM-F68-DOX、PAMAM-F68-AMI+DOX(制备时载体与药物摩尔比为1:10)分别加入培养液稀释成不同浓度,用0.22μm微孔滤膜过滤除菌,各个浓度吸取100μL溶液加入小孔中,平行做六个复孔,对照组加入100μL DMEM培养液,继续于5%CO₂培养箱37℃培养48h。到时间后,每孔加入CCK8试

剂,继续放入培养箱中4h,酶标仪450nm测定吸光度,计算药物系统对C6细胞活性的抑制率。

[0132] 结果表显示:药物载体PAMAM-F68-AMI+DOX比PAMAM-F68-AMI或PAMAM-F68-DOX对C6细胞杀伤力更强,此结果与实施例1中得到的AMI+DOX协同作用的结论一致。

[0133] (2) C6细胞对药物的摄取

[0134] 将C6细胞接种在铺有盖玻片的6孔板中(每孔 2×10^5 个细胞),放入CO₂培养箱中培养24h,除去旧培养基,每孔分别加入DOX、PAMAM-DOX(载有DOX的PAMAM,制备方法与PAMAM-F68-DOX相比的区别仅在于,将PAMAM-F68替换为等摩尔浓度的PAMAM,其他不变)和PAMAM-F68-DOX(浓度为20 μ g/mL),孵育48h后取出6孔板,吸去液体,用PBS润洗3次,每孔各加入0.5mL胰酶消化,待细胞质开始回缩变圆后终止消化,并轻轻吹打直至细胞脱落,移至离心管中,1000r/min离心5min,移去上层培养液,加入1mL PBS缓冲液重悬细胞后继续1000r/min离心5min,加入1mL PBS缓冲液重悬细胞在流式细胞仪下检测。对比细胞对药物的摄取量。结果见图3。

[0135] 结果显示,C6对DOX以及PAMAM-F68-DOX的摄取率最高,在8h左右几乎完全摄取,说明药物经PAMAM-F68包载后不影响C6细胞的摄取。C6细胞对PAMAM-F68-DOX的摄取率明显高于PAMAM-DOX,说明PAMAM经过Pluronic F68修饰后可以显著提高C6细胞对制剂的摄取。

[0136] (3) PAMAM-F68-AMI+DOX药物系统对脑胶质瘤的治疗效果(动物实验)

[0137] 构建荷C6小鼠模型,随机分为2组,分别进行实验A和B:

[0138] 实验A:将小鼠随机分为3组,分别于尾静脉注射等量的DiR标记的PAMAM-F68-AMI+DOX,PAMAM-AMI+DOX和游离的AMI+DOX,注射2、4、12、24和48h后,应用活体成像系统分析小鼠体内PAMAM-F68和PAMAM的分布。

[0139] 实验结果为:2h后PAMAM-F68组脑内荧光信号的强度强于PAMAM组,随着时间的延长,PAMAM-F68组脑胶质瘤部位的荧光信号也逐渐增强,其强度仍高于PAMAM组,此结果证实了:PAMAM-F68可吸附血浆中的载脂蛋白并靶向BBB上的清道夫受体,进而实现靶向血脑屏障。

[0140] 实验B:将小鼠随机分为3组,分别给予PAMAM-F68-AMI+DOX,PAMAM-AMI+DOX和游离的AMI+DOX纳米粒进行治疗,尾静脉注射给药,每隔一天给药1次,一共给药6次,给药量统一为(5mg AMI+0.6mg DOX)/kg将治疗后的荷C6小鼠置于恒温条件下饲养,及时更换小鼠的垫料并补充饮水和鼠粮。每隔一天称量一下小鼠的体重并观察小鼠的体重变化,同时每天观察并记录小鼠的存活状态。

[0141] 实验结果为:PAMAM-F68-AMI+DOX组的中位生存时间显著长于PAMAM-AMI+DOX和AMI+DOX组,此结果进一步证实了AMI与DOX在治疗脑胶质瘤上的协同作用。

[0142] 申请人声明,本发明通过上述实施例来说明本发明的一种预防或治疗脑胶质瘤的药物及其制备方法与应用,但本发明并不局限于上述实施例,即不意味着本发明必须依赖上述实施例才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了,对本发明的任何改进,对本发明产品各原料的等效替换及辅助成分的添加、具体方式的选择等,均落在本发明的保护范围和公开范围之内。

[0143] 以上详细描述了本发明的优选实施方式,但是,本发明并不限于上述实施方式中的具体细节,在本发明的技术构思范围内,可以对本发明的技术方案进行多种简单变型,这些简单变型均属于本发明的保护范围。

[0144] 另外需要说明的是,在上述具体实施方式中所描述的各个具体技术特征,在不矛盾的情况下,可以通过任何合适的方式进行组合,为了避免不必要的重复,本发明对各种可能的组合方式不再另行说明。

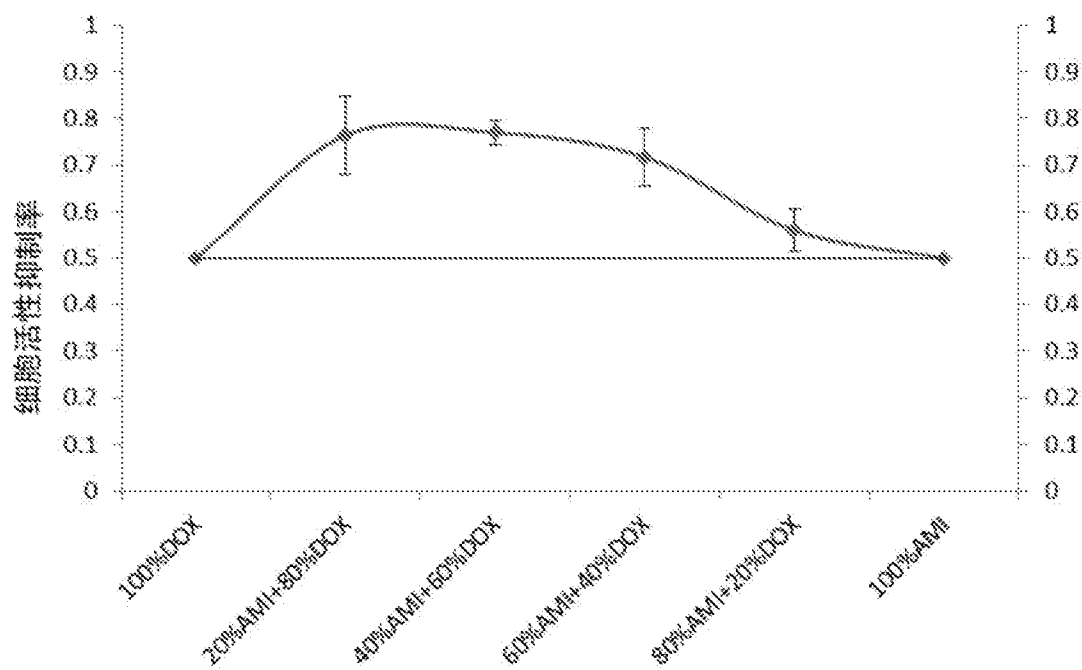


图1

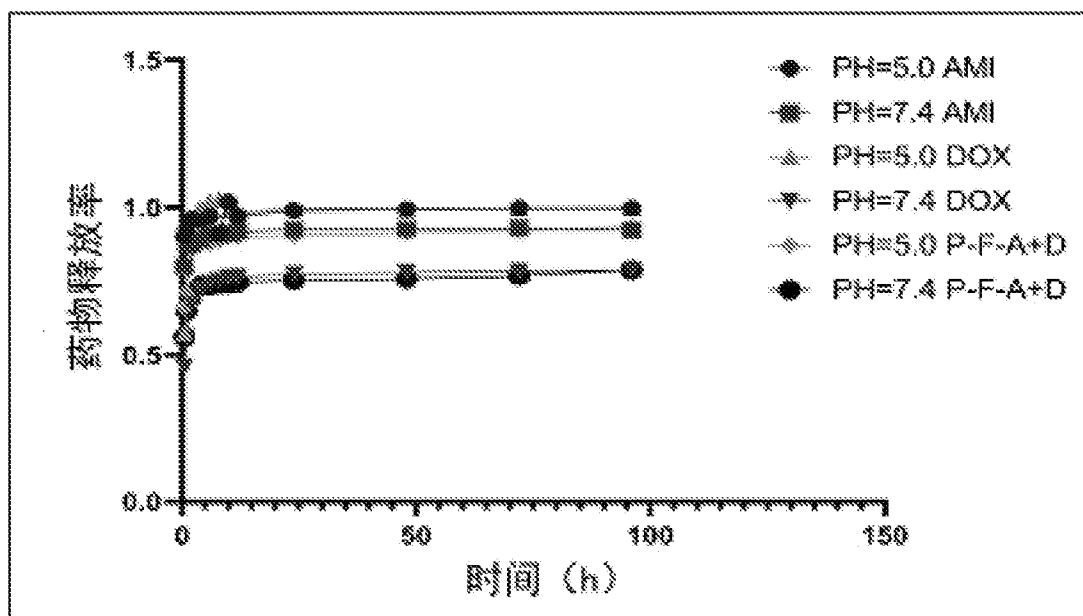


图2

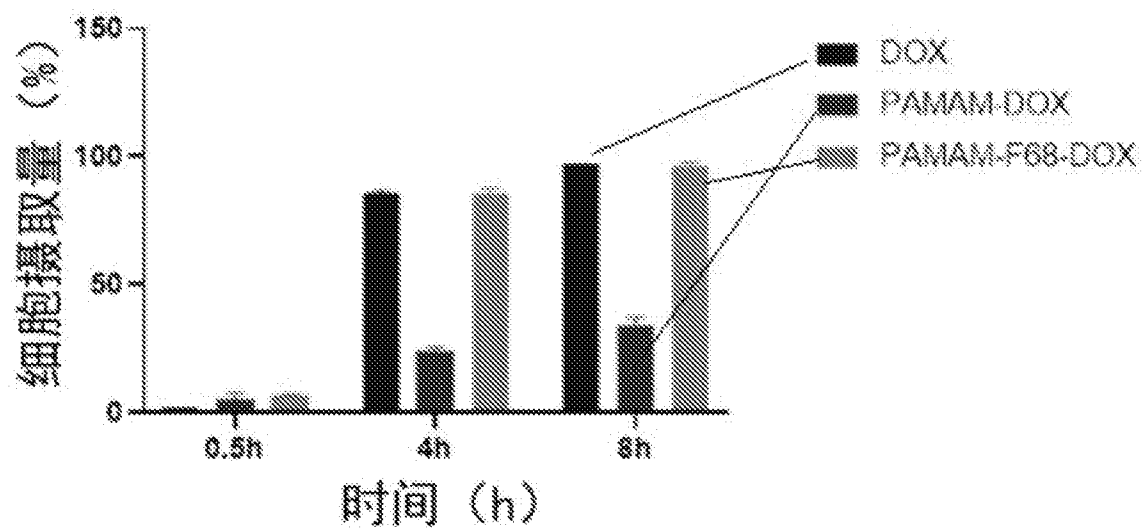


图3