



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110859818 A

(43)申请公布日 2020.03.06

(21)申请号 201911052120.5

A61P 35/00(2006.01)

(22)申请日 2019.10.31

B82Y 5/00(2011.01)

(71)申请人 河南省生物工程技术研究中心

地址 450018 河南省郑州市郑东新区商务
外环路12号7层3号

申请人 郑州倍赛泰生物科技有限公司

(72)发明人 王云龙 支开旗 李玉林 王继创

张怡清 王敏 程蕾

(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 9/51(2006.01)

A61K 47/42(2017.01)

A61K 31/4745(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页

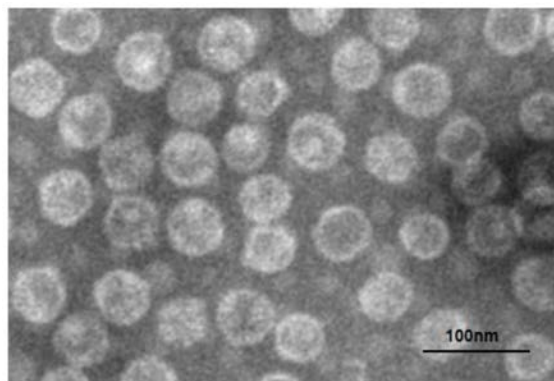
序列表3页 附图2页

(54)发明名称

一种低毒喜树碱纳米复合物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,具体涉及一种低毒喜树碱纳米复合物及其制备方法和用途。本发明的低毒喜树碱纳米复合物是通过将喜树碱/喜树碱衍生物包封于HBc VLPs载体中制备得到的,可有效降低喜树碱/喜树碱衍生物的细胞毒性。



1. 一种低毒喜树碱纳米复合物,其特征在于,所述喜树碱纳米复合物包括HBc VLPs纳米载体和包封于所述HBc VLPs纳米载体内的喜树碱和/或喜树碱衍生物。

2. 根据权利要求1所述的低毒喜树碱纳米复合物,其特征在于,所述HBc VLPs纳米载体具有如下氨基酸序列:从N端到C端依次为HBc-144和NS5A多肽且所述HBc-144的主要免疫区域插设有靶向肽,所述靶向肽的两端分别通过连接肽与HBc-144相连。

3. 根据权利要求2所述的低毒喜树碱纳米复合物,其特征在于,所述NS5A多肽的氨基酸序列为AGSWLRDIWDWICEVLSDFKTWLKAKAKLMPTM;所述靶向肽为RGD序列,所述连接肽的氨基酸序列为GTSGSSGSGSGSGSGGGG;所述靶向肽和连接肽序列替代所述HBc-144的第79和80位氨基酸。

4. 根据权利要求2或3所述的低毒喜树碱纳米复合物,其特征在于,所述HBc-144载体的C端还连接有6xHis标签。

5. 根据权利要求1-4中任意一项所述的低毒喜树碱纳米复合物的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:(1)通过基因工程的方法制备HBc VLPs纳米颗粒;(2)使所述HBc VLPs纳米颗粒解聚成所述HBc VLPs载体;(3)使所述喜树碱和/或喜树碱衍生物包封于所述HBc VLPs载体内,即得所述低毒喜树碱纳米复合物。

6. 根据权利要求5所述的低毒喜树碱纳米复合物的制备方法,其特征在于,所述HBc VLPs纳米颗粒的制备方法为:将编码所述HBc VLPs载体的核苷酸序列作为目的基因插入到质粒载体上;将所述质粒载体转化入大肠杆菌感受态细胞;挑取单菌落在LB培养基上扩大培养至OD₆₀₀达到0.6-0.8;用IPTG于18℃诱导培养18h;收集并裂解菌体,纯化制备得到的HBc VLPs纳米颗粒。

7. 根据权利要求5所述的低毒喜树碱纳米复合物的方法,其特征在于,使所述HBc VLPs纳米颗粒解聚成所述HBc VLPs载体的方法为:在1000r/min磁力搅拌下向步骤(1)得到的HBc VLPs纳米颗粒中加入解聚缓冲液,室温解聚2.5h即得所述HBc VLPs载体;所述解聚缓冲液由pH8.0的50mM Tris-HCl,150mM NaCl和2.0M尿素组成。

8. 根据权利要求5所述的低毒喜树碱纳米复合物的方法,其特征在于,所述步骤(3)具体为:在震荡下,向步骤(2)制备得到的所述HBc VLPs载体中加入喜树碱的乙醇溶液,放置在磁力搅拌器上在4℃冰箱内30min,使充分混匀,得混合液;将所述混合液装入透析袋中并置于聚合缓冲液1中4℃透析12h;再将透析袋置于聚合缓冲液中4℃透析12h,期间每4h更换1次聚合缓冲液2;透析结束后即得所述低毒喜树碱纳米复合物,-20℃保存于稳定保存液中;所述聚合缓冲液1的成分为:50mM Tris-HCl,pH8.0,150mM NaCl,10%甘油,1%甘氨酸;所述聚合缓冲液2的成分为:50mM Tris-HCl,pH8.0,150mM NaCl和1%甘氨酸;所述稳定保存液为0.01M PBS。

9. 根据权利要求1-4中任意一项所述的低毒喜树碱纳米复合物在制备肿瘤靶向药物中的应用。

10. 根据权利要求1-4中任意一项所述的低毒喜树碱纳米复合物在制备治疗肺癌、肝癌、乳腺癌、膀胱癌或直肠癌靶向药物中的应用。

一种低毒喜树碱纳米复合物及其制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明属于纳米药物技术领域,具体涉及一种低毒喜树碱纳米复合物及其制备方法和用途。

背景技术

[0002] 喜树碱(Camptothecin,CPT),化学分子式: $C_{20}H_{16}N_2O_4$,CAS号:7689-03-4,相对分子量:348.43,是从中药喜树(*Camptotheca acuminata* Decne. var. *acuminata*)中分离得到的一种单体有效成分,属于细胞毒性喹啉类生物碱,能抑制DNA拓扑异构酶(Topoisomerase I, TOPOI)的作用。喜树碱能有效抑制肿瘤的生长,对肺癌、肝癌、乳腺癌、膀胱癌、直肠癌和白血病等有一定疗效。因其对消化系统及泌尿系统有强烈的毒副作用,使用喜树碱常引发患者腹泻、出血性膀胱炎、严重的骨髓抑制等症状,限制了该类化合物的临床应用。

[0003] 近年来恶性肿瘤发病率居高不下,人们对肿瘤的关注度不断提升,抗肿瘤药物的临床需求越来越大,这对抗肿瘤药物的研发提出了更高的要求。传统化疗药物用药剂量大、毒性强、患者耐受性差;且传统纳米载体不具有肿瘤靶向性、生物相容性差、免疫原性强等诸多缺点。另外,考虑到植物抗癌药喜树碱直接使用毒性大,且羟基喜树碱存在水溶性差、半衰期短、稳定性差等缺点;其钠盐注射液由于具有酚羟基及内酯环分子结构,遇光、遇热易氧化、水解,产生疗效降低等问题,因此喜树碱的应用受到了一定的限制。

[0004] 以喜树碱为基础研制的喜树碱类药物是临床上常用的广谱抗癌药,目前用于临床治疗的喜树碱类药物主要有拓扑替康(Topotecan、TPT)、依立替康(Irinotecan、CPT-11)、贝洛替康(Belotecan、CDK-602),10-羟基喜树碱(HCPT)等。其中HCPT是从喜树中直接分离得到的天然产物,其余几种药物皆为喜树碱结构修饰后的衍生物。TPT的半衰期在所有已知半衰期的喜树碱衍生物中最短,其主要的毒副作用是骨髓抑制,导致中性粒细胞减少和血小板减少,另外服用此药物还存在恶心、呕吐、脱发、粘膜炎肝转氨酶升高、皮疹、发烧等症状。CPT-11的局限性主要表现在对体内羧酸酯酶-2的依赖,治疗效果受到了一定的限制。此外,研究发现CPT-11有中性粒细胞减少、迟发性腹泻和乙酰胆碱能综合征等毒副作用。最新的喜树碱类抗癌药CDIK-602,主要用于卵巢癌以及肺癌的临床治疗,对铂敏感和耐受的卵巢癌患者也具有治疗作用,但会伴随有中性白细胞减少的副作用。HCPT对胰腺癌、前列腺癌、膀胱癌、胃癌等均有较好的疗效,具有抗癌谱广且无交叉耐药性等优势,但其药物代谢动力学研究表明,HCPT主要从胆汁中排泄,该药的副作用表现为恶心呕吐、食欲下降、排尿灼痛、尿血、脱发、腹泻、乏力、低热及白细胞下降等。

发明内容

[0005] 本发明提供一种低毒喜树碱纳米复合物,以解决现有现有技术中喜树碱/喜树碱衍生物单独使用时毒副作用大的问题。

[0006] 本发明的低毒喜树碱纳米复合物采用如下技术方案:一种低毒喜树碱纳米复合物,所述喜树碱纳米复合物包括HBc VLPs纳米载体和包封于所述HBc VLPs纳米载体内的喜

树碱和/或喜树碱衍生物。具体的,本发明的低毒喜树碱纳米复合物的剂型可为注射剂、粉针剂等。

[0007] 优选的,所述HBc VLPs纳米载体具有如下氨基酸序列:从N端到C端依次为HBc-144和NS5A多肽且所述HBc-144的主要免疫区域插设有靶向肽,所述靶向肽的两端分别通过连接肽与所述HBc-144相连。

[0008] 优选的,所述NS5A多肽的氨基酸序列为AGSWLRDIWDWICEVLSDFKTWLKAK AKLMPTM;所述靶向肽为RGD序列,所述连接肽的氨基酸序列为GTSGSSGSGSGSGSGGGG;所述靶向肽和连接肽用于替代所述HBc-144的第79和80位氨基酸。其中,RGD序列可靶向整合素受体,肺癌、肝癌、乳腺癌、膀胱癌、直肠癌等多种实体瘤表面均具有整合素受体;

[0009] 优选的,所述HBc-144的C末端还连接有6xHis标签,即在HBc-144的C端末尾连接6个组氨酸。

[0010] 本发明还提供了如上述任意一项所述的低毒喜树碱纳米复合物的制备方法,具体技术方案为:包括如下步骤:(1)通过基因工程的方法制备HBc VLPs纳米颗粒;(2)使所述HBc VLPs纳米颗粒解聚成所述HBc VLPs载体;(3)使所述喜树碱和/或喜树碱衍生物包封于所述HBc VLPs载体内,即得所述低毒喜树碱纳米复合物。

[0011] 优选的,所述HBc VLPs纳米颗粒的制备方法为:将编码所述HBc VLPs载体的核苷酸序列作为目的基因插入到质粒载体上;将所述质粒载体转化入大肠杆菌感受态细胞;挑取单菌落在LB培养基上扩大培养至OD600达到0.6-0.8;用IPTG于18℃诱导培养18h;收集并裂解菌体,纯化制备得到的HBc VLPs纳米颗粒。

[0012] 优选的,使所述HBc VLPs纳米颗粒解聚成所述HBc VLPs载体的方法为:在1000r/min磁力搅拌下向步骤(1)得到的HBc VLPs纳米颗粒中加入解聚缓冲液,室温解聚2.5h即得所述HBc VLPs载体;所述解聚缓冲液由pH8.0的50mM Tris-HCl,150mM NaCl和2.0M尿素组成。

[0013] 优选的,所述步骤(3)具体为:在震荡下,向步骤(2)制备得到的所述HBc VLPs载体中加入喜树碱的乙醇溶液,4℃放置30min使充分混匀,得混合液;将所述混合液装入透析袋中并置于聚合缓冲液1中4℃透析12h;再将透析袋置于聚合缓冲液中4℃透析12h,期间每4h更换1次聚合缓冲液2;透析结束后即得所述低毒喜树碱纳米复合物,-20℃保存于稳定保存液中;所述聚合缓冲液1的成分为:50mM Tris-HCl,pH8.0,150mM NaCl,10%甘油,1%甘氨酸;所述聚合缓冲液2的成分为:50mM Tris-HCl,pH8.0,150mM NaCl和1%甘氨酸;所述稳定保存液为0.01M PBS。

[0014] 本发明还提供了如上述任意一项所述的低毒喜树碱纳米复合物的用途:在制备治疗癌症药物中的应用。

[0015] 优选的,所述低毒喜树碱纳米复合物在制备治疗肺癌、肝癌、乳腺癌、膀胱癌或直肠癌靶向药物中的应用。

[0016] 本发明的有益效果是:本发明通过将喜树碱或喜树碱包封于HBc VLPs载体,制备得到的低毒喜树碱纳米复合物的细胞毒性相对于喜树碱/喜树碱衍生物的细胞毒性更小。

[0017] 本发明采用HBc VLPs载体利用乙肝核心蛋白病毒样颗粒的可控自组装性,可克服传统纳米载体靶向性和生物相容性差及免疫原性强等诸多缺点。其中,靶向肽RGD序列,可靶向表面有整合素受体的多种实体瘤;6xHis标签使得其具有pH敏感性,在微酸性环境中

(肿瘤组织pH值即为若酸性),内部聚组氨酸被质子化,质子内流,疏水端之间的正电荷排斥力使HBc VLPs载体解聚,快速释放药物,提高了本发明的低毒喜树碱的生物利用度,达到较好的肿瘤治疗效果。

[0018] 本发明的低毒喜树碱纳米复合物可避免由于直接使用植物抗癌药喜树碱的毒性较大,羟基喜树碱钠盐注射液也因具有酚羟基及内酯环分子结构,遇光、遇热易氧化、水解,产生疗效降低等缺陷,本发明的低毒喜树碱纳米复合物可增加药物在组织内的停留时间、延长药物的半衰期、提高喜树碱/喜树碱衍生物内脂环的稳定性,进而可提高其抗肿瘤的疗效。

附图说明

[0019] 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。

[0020] 图1为本发明实施例1制备得到的HBc VLPs纳米颗粒的透射电镜图;

[0021] 图2为本发明实施例1制备得到的低毒喜树碱纳米复合物的透射电镜图;

[0022] 图3为本发明实施例3中对比实验1的实验结果图,其中图3中“空白”是指空白对照组,“VLPs”是指向96孔板中加入HBc VLPs纳米颗粒的实验,“VLPs-CPT”是指向96孔板中加入RGD-HBcVLP-CPT的实验;

[0023] 图4为本发明实施例3中对比实验2的实验结果图,其中图4中“CPT”是指向96孔板中加入CPT的实验,“VLPs-CPT”是指向96孔板中加入RGD-HBcVLP-CPT的实验;

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1制备低毒喜树碱纳米复合物

[0026] 1) 制备HBc VLPs纳米颗粒:

[0027] 基因修饰的HBc VLPs的构建:截短的HBc-144蛋白来自本实验室(HBc-144的氨基酸序列为MDIDHYKEFG ASVELLSFLP SDFFPSIRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQ AIL CWGELMNLAT WVGSNLEDPA SRELVVGYVN VNMGLKIRQI LWFHISCLTF GRETIVL EYLV SFGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLP。将来源于HCV病毒蛋白上的一段疏水性多肽名为NS5A(氨基酸序列:AGS WLRDIWDWICEVLSDFKTWLKAKAKLMPTM)连接至截短的HBc-144的C端,得到HBc-NS5A蛋白(具体氨基酸序列为MDIDHYKEFG ASVELLSFLP SDFFPSIRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL CWGELMNLAT WVGSNLEDPA SRELVVGYVN VNMGLKIRQI LWFHISCLTF GRETIVLEYLV SFGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLPAGSW LRDIWDWICEVLSDFKTWLKAKAKLMPTM)。在此基础上,将RGD序列插入到HBc-144蛋白的第78和81位氨基酸之间(剔除第79和80位氨基酸),并将两个富含甘氨酸的多肽(GTSGSSGSGSGSGSGGGG)作为连接肽分别插入到RGD两端并获得RGD-HBc-NS5A蛋白(氨

氨基酸序列为MDIDHYKEFG ASVELLSFLP SDFFPSIRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHT ALRQAIL CWGELMNLAT WVGSNLEDGT SGSSGSGSGG SGSGGGGRGD GGGGSGSGGS GSGSSGSTGS RELVVGYYVNVNMGKIRQIL WFHISCLTFG RETVLEYLVS FGVWIRTPPA YRPPNAPILS TLPAGSWLRD IWDWICEVLS DFKTTLKAKL MPTMHSHHHH)。所有的重组HBc蛋白都在C-末端附加了6xHis标签。

[0028] 根据上述说明,由上海杰瑞生物技术有限公司合成编码上述RGD-HBc-NS5A蛋白的核苷酸序列(目的基因)并将合成的核苷酸序列连接于质粒(pET21a)。获取购自上海杰瑞生物技术有限公司的含有目的基因的重组质粒后,向大肠杆菌感受态细胞悬液中加入含有目的基因的质粒(100 μ L的感受态细胞加入1ng质粒),置于42 $^{\circ}$ C水浴放置60-90s,之后转移至冰上,冷却2-3min,转化结束后,加入LB培养基37 $^{\circ}$ C培养。

[0029] 表达和纯化基因修饰的HBc VLPs:将含有目的基因的质粒转化到大肠杆菌感受态细胞中后,挑取单菌落在LB培养基中进行扩大培养,直到OD600达到0.6-0.8,用异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG,0.1mM)于18 $^{\circ}$ C诱导培养18h。诱导结束,收集菌液以5000转/分离心收集细菌。超声裂解法裂解菌体,再次以12000转/分离心30min除去细胞碎片后收集上清。上清液中加入饱和的(NH₄)₂SO₄,使蛋白沉淀并再次以12000转/分离心30min,收集沉淀。将HBc-VLP的上样液调节电导至65mS/cm,pH为7.4左右,进料到电导65mS/cm的含有硫酸铵的20mM磷酸缓冲液(pH7.4)平衡的Butyl-S Sepharose 6FF的疏水层析柱(GE Healthcare,15cm \times 1.6cm I.D.)中,进料后经继续淋洗,然后使用电导为1mS/cm磷酸钠缓冲液(pH7.4)洗脱,收集洗脱峰。层析介质采用1.0M氢氧化钠溶液再生。将收集流出液,装进透析带中,采用聚乙二醇-20000浓缩到之前1/2体积,然后过分子筛层析柱(Sepharose CL-4B)。收集蛋白质样品,即为HBc VLPs纳米颗粒,BCA法测定蛋白浓度,分装后储存在-20 $^{\circ}$ C。

[0030] 2) HBc VLPs纳米颗粒的鉴定

[0031] 取少量经大肠杆菌表达纯化后待包封的HBc VLPs纳米颗粒,经SDS-PAGE分析,分子量为约23kDa,采用透射电镜(TEM)观察HBc VLPs纳米颗粒的形貌。取少量待包封的HBc VLPs纳米颗粒滴至覆盖有支持膜的铜网上,用5%的醋酸铀进行负染,室温干燥后,上机观察。

[0032] 结果表明制备得到的HBc VLPs纳米颗粒呈球形,颗粒大小较均一,水合粒径分布为30nm左右(图1),平均粒径约为30.5 \pm 2.5nm,符合重载要求。

[0033] 3) 药物装载

[0034] 取1mLHBc VLPs纳米颗粒(\sim 1mg/mL)与预先配制好的10mL解聚液(包含50mM Tris-HCl,pH8.0、150mM NaCl、2.0M的尿素),首先在25 $^{\circ}$ C下放置2.5h,得到HBc VLPs载体;然后,伴随轻微震荡,加入用有机溶剂乙醇稀释的浓度为1mg/ml的喜树碱,所得混合溶液继续在4 $^{\circ}$ C下放置30min后,将混合溶液转移至分子量为6000 \sim 8000Da的透析袋中,先置于聚合缓冲液1(包含50mM Tris-HCl,pH8.0,150mM NaCl,10%甘油,1%甘氨酸)中,在4 $^{\circ}$ C下透析12h;后更换为聚合缓冲液2(包含50mMTris-HCl,pH8.0,150mMNaCl,1%甘氨酸),4 $^{\circ}$ C下继续透析12h,期间每间隔4小时,更换一次聚合缓冲液2;得到低毒喜树碱纳米复合物,于-20 $^{\circ}$ C下、稳定保存液中保存,其中稳定保存液为0.01M PBS,具体配制方法如下:取20mM NaCl,2.68mM KCL,10mM Na₂HPO₄和1.76mM KH₂PO₄,加入900mL超纯水溶解后,氢氧化钠调节pH值至7.4,定容至1L;121 $^{\circ}$ C高压蒸汽灭菌30min、4 $^{\circ}$ C保存待用。

[0035] 实施例2对实施案例1制得的低毒喜树碱纳米复合物的粒径、包封率进行检测。

[0036] 1) 包封率检测

[0037] 取实施例1所制备的低毒喜树碱纳米复合物用微孔滤膜滤过后得悬液0.5mL,加入适量生理盐水定容至1mL,超声完全破碎后,利用高效液相色谱(采用Waters Symmetry C18 (150×3.9mm,5μm) 高效液相色谱.乙腈:水=35:65 (V/V) 为流动相,1.0mL/min的流速,检测波长254nm,柱温:25℃,进样量10μl.) ,于254.0nm波长处测定喜树碱的吸光值,280.0nm波长处测定低毒喜树碱纳米的吸光值,按下式计算包封率和载药量。

[0038] 包封率=(低毒喜树碱纳米复合物中的喜树碱质量/喜树碱投药量)×100%

[0039] 其中,低毒喜树碱纳米复合物中的喜树碱质量的计算方法如下:通过以不同浓度的喜树碱标准品建立标准曲线,再根据测定的OD值和标准曲线计算低毒喜树碱纳米复合物中喜树碱的质量。

[0040] 高效相色谱分析证实了本实施例1得到病毒样颗粒可有效装载喜树碱包封率在70%以上。

[0041] 2) 形貌观察、粒径检测

[0042] 采用透射电镜(TEM) 观察病毒样颗粒的形貌。将实施案例1中制备的低毒喜树碱纳米复合物(简称为RGD-HBcVLP-CPT) 滴至覆盖有支持膜的铜网上,用5%的醋酸铀进行负染,室温干燥后,上机观察。

[0043] 结果表明制备得到的RGD-HBcVLP-CPT呈球形,颗粒大小较均一,水合粒径分布为30nm(图2),平均粒径约为 30.5 ± 2.5 nm。

[0044] 实施例3实施例1制备得到的RGD-HBcVLP-CPT的细胞毒性测试

[0045] 测试方法:

[0046] (1) 将SGC7901细胞铺于96孔板,每孔细胞的密度为 1×10^5 ,培养基为1640(含10% FBS),在CO₂体积分数为5%的细胞培养箱中培养24h(37℃)。

[0047] (2) 设置2组对比实验:

[0048] 对比实验1:向上述96孔板中分别加入实施例1制备得到的HBc VLPs纳米颗粒(250.000μg/mL,设置4个复孔,图3中的VLPs组)和实施例1制备得到的RGD-HBcVLP-CPT(250.000μg/mL,设置4个复孔,图3中的VLPs-CPT组),并设置空白对照(加入等量的培养液)培养;

[0049] 对比实验2:向上述96孔板中分别加入实施例1制备得到的RGD-HBcVLP-CPT(250.000μg/mL,设置4个复孔,其中使每孔中CPT的浓度为分别为2.5、5.0、8.0和10.0μg/mL,图4中的VLPs-CPT组)和CPT(设置4个复孔,其中使每孔中CPT的浓度为分别为2.5、5.0、8.0和10.0μg/mL,图4中的CPT组)培养。

[0050] (3) 培养24h后弃去培养液,用PBS冲洗2—3遍,加入含10μLMTT(5mg/mL用PBS配制,pH=7.4)的培养液。继续培养4h后,吸去孔内培养液,并加入100μL二甲基亚砜,采用酶标准仪对样品进行测试,取其490nm处吸光值,计算细胞存活率。

[0051] 实验结果:对比实验1的实验结果详见说明书附图图3,对比实验2的实验结果详见说明书附图图4。由图3可知,实施例1制备得到的HBc VLPs纳米颗粒和RGD-HBcVLP-CPT在高浓度(250μg/mL)条件下,能够保持90%以上的细胞存活率,具有良好的生物安全性。

[0052] 由图4可知,当CPT被包载于HBc-VLP载体时,其细胞毒性均小于相同浓度下的CPT。

[0053] 实施例4测定实施案例1所得的RGD-HBcVLP-CPT对肿瘤细胞的抑制作用

[0054] 将MCF-7细胞接种到6孔培养板中,5%CO₂、37℃下孵育12h,分为2组,待细胞贴壁生长后,弃去旧培养液,其中RGD-HBcV1p-CPT实验组加入用无血清培养液稀释的实施例1中不同浓度的样品;空白对照组加入等体积的无血清1640培养基;其中RGD-HBcV1p-CPT实验组中使最终筛选的药物终浓度分别为1、2、5、10、20μg/mL(以所包含的CPT的浓度为准计算);5%CO₂、37℃培养36h后,离心弃去上清液,保留沉淀,加MTT溶液(5mg/ml)20μl继续培养,4h后每孔加入二甲基亚砷,将细胞与MTT的作用产物溶解,混匀后立即用酶联免疫检测仪于492nm处测定吸光度(OD),按如下公式计算细胞生长率,并计算生长抑制率。

[0055] 生长抑制率 = (1 - 实验组平均OD值 / 对照组平均OD) × 100%

[0056] 表1 RGD-HBcV1p-CPT对MCF-7细胞增殖的影响

组别	药物浓度 μg/mL	OD值	抑制率(%)
对照组	0	1.449±0.152	
[0057] RGD-HBcV1p-CPT	1	1.261±0.113	13.0±1.2
	2	0.846±0.102	41.6±1.5
	5	0.649±0.079	55.2±3.2Δ
	10	0.408±0.042	71.8±5.9ΔΔ
	20	0.253±0.073	82.5±1.6ΔΔ

[0058] 实施例4测定实施案例1制得的RGD-HBcV1p-CPT对小鼠移植瘤Heps抑制作用。

[0059] 取肿瘤组织块正常的荷瘤小鼠,颈椎脱臼处死,无菌条件下取出瘤块,制成单细胞悬液,调节细胞浓度为2×10⁶个/ml,接种于健康小鼠右前肢下部位,每只0.2ml。接种24h后,荷瘤鼠随机分为2组,每组10只。空白对照组与RGD-HBcV1p-CPT注射液组分别为阴、阳性对照组,RGD-HBcV1p-CPT给药,每7天一次,共给药4次;停药24h后处死小鼠,称体重,解剖剥离瘤块,称瘤重。按如下公式计算抑瘤率,检验统计处理,进行疗效分析。

[0060] 抑瘤率 = (1 - 给药组平均瘤重 / 对照组平均瘤重) × 100%

[0061] 表2 RGD-HBcV1p-CPT对荷瘤小鼠肿瘤的影响

组别	剂量 mg/kg	小鼠体重(g)		瘤重 (g)	抑瘤率 (%)
		注射前	注射后		
[0062] 对照组	3	19.2±1.52	23.0±1.2	1.80±0.13	
RGD-HBcV1p-CPT	3	19.1±1.13	22.0±1.5	0.39±0.21	78.5

[0063] 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。

35	40	45
Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu		
50	55	60
Leu Met Asn Leu Ala Thr Trp Val Gly Ser Asn Leu Glu Asp Gly Thr		
65	70	75
Ser Gly Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly		
	85	90
Gly Arg Gly Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser		
	100	105
Gly Ser Ser Gly Ser Thr Gly Ser Arg Glu Leu Val Val Gly Tyr Val		
	115	120
Asn Val Asn Met Gly Leu Lys Ile Arg Gln Ile Leu Trp Phe His Ile		
	130	135
Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser		
	145	150
Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala		
	165	170
Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Ala Gly Ser Trp Leu Arg Asp Ile Trp		
	180	185
Asp Trp Ile Cys Glu Val Leu Ser Asp Phe Lys Thr Trp Leu Lys Ala		
	195	200
Lys Leu Met Pro Thr Met His His His His His His		
	210	215
		220

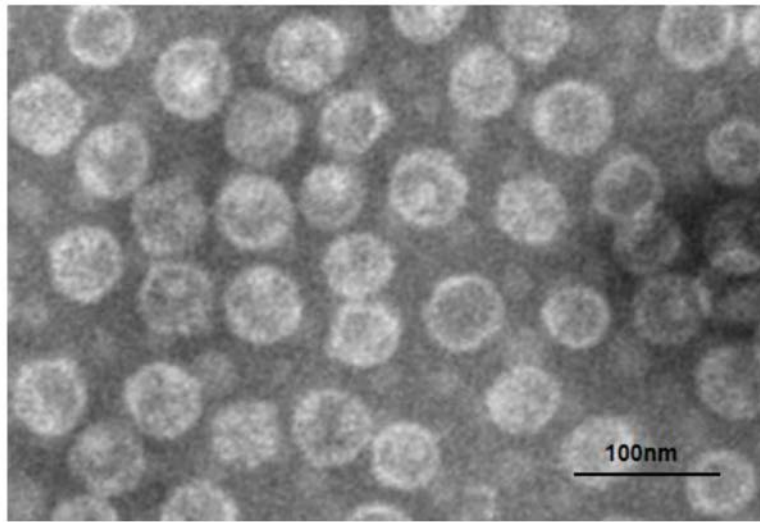


图1

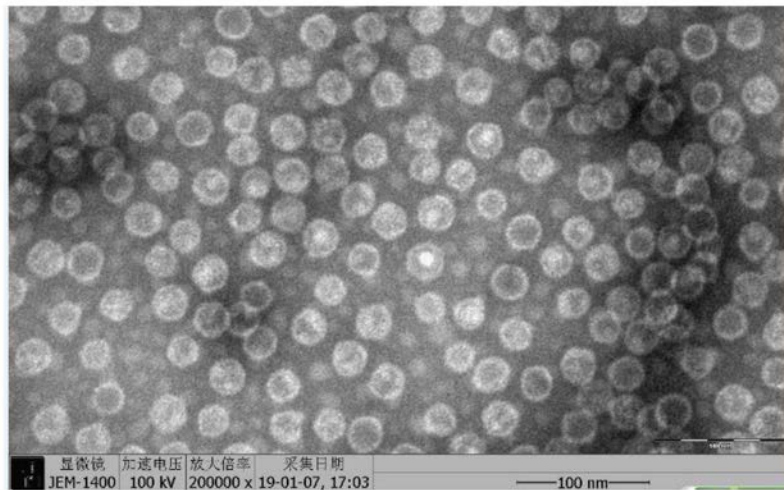


图2

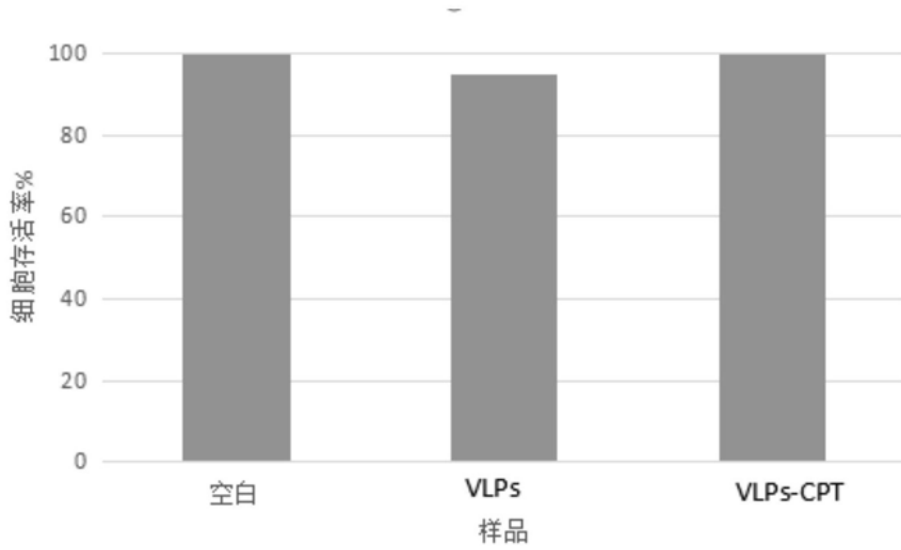


图3

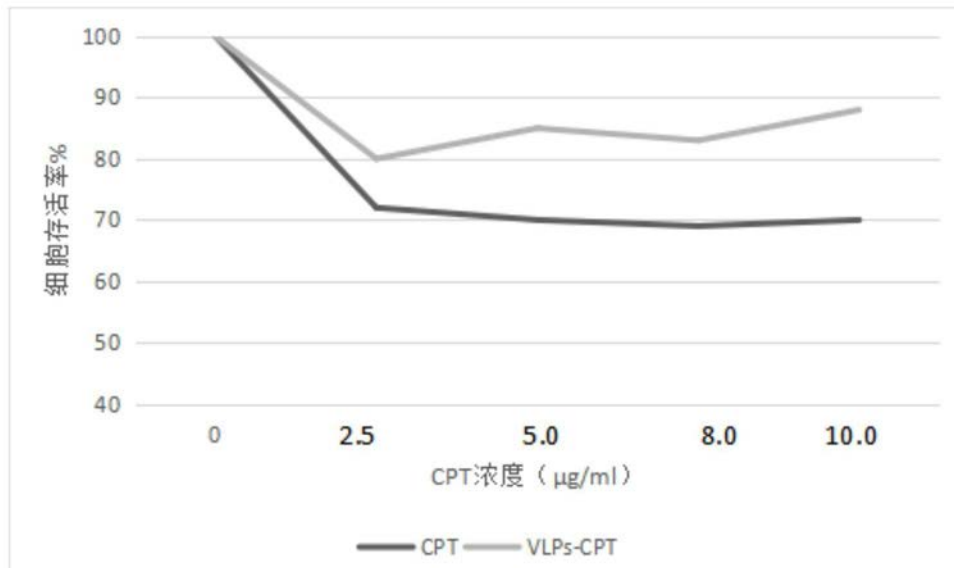


图4