



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110859819 A

(43)申请公布日 2020.03.06

(21)申请号 201911052140.2 *A61P 35/00*(2006.01)

(22)申请日 2019.10.31 *A61P 15/08*(2006.01)

(71)申请人 河南省生物工程技术研究中心 *C12N 15/36*(2006.01)

地址 450018 河南省郑州市郑东新区商务 *C12N 15/70*(2006.01)

外环路12号7层3号 *C07K 14/02*(2006.01)

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 31/12*(2006.01)

*A61K 47/42*(2017.01)

权利要求书1页 说明书8页

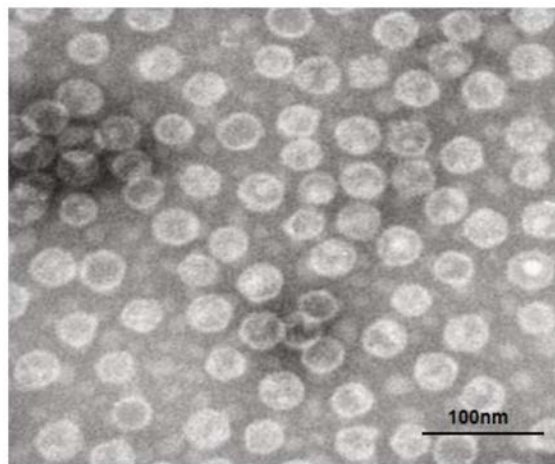
序列表3页 附图2页

(54)发明名称

一种姜黄素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,具体涉及一种姜黄素纳米复合物及其制备方法和用途。该姜黄素纳米复合物包括HBc VLPs载体和包裹于所述HBc VLPs载体内的姜黄素和/或姜黄素衍生物。该姜黄素纳米复合物相对于姜黄素/姜黄素衍生物相对于姜黄素/姜黄素衍生物水溶性和稳定性更好,生物利用度也更高。



1. 一种姜黄素纳米复合物,其特征在于,所述姜黄素纳米复合物包括HBc VLPs载体和包裹于所述HBc VLPs载体内的姜黄素和/或姜黄素衍生物。

2. 根据权利要求1所述的姜黄素纳米复合物,其特征在于,所述HBc VLPs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。

3. 根据权利要求2所述的姜黄素纳米复合物,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用于替代所述HBc-144的第79和80位氨基酸。

4. 根据权利要求2或3所述的姜黄素纳米复合物,其特征在于,所述HBc-144载体的C末端还连接有6xHis标签。

5. 根据权利要求1所述的姜黄素纳米复合物,其特征在于,所述姜黄素纳米复合物为液体剂型或固体剂型,所述液体剂型可选自溶液、悬浮液、乳液、气溶胶;所述固体剂型可选自片剂、贴剂、胶囊、丸剂、颗粒剂、细粒剂或粉剂。

6. 根据权利要求1-5中任意一项所述的姜黄素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HBcVLPs纳米颗粒解聚成所述HBc VLPs载体;(3)使所述姜黄素和/或姜黄素衍生物封装于所述HBc VLPs载体内,即得所述姜黄素纳米复合物。

7. 根据权利要求6所述的姜黄素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。

8. 根据权利要求6所述的姜黄素纳米复合物的方法,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4~6h即得所述HBc VLPs载体;所述解聚缓冲液为pH=7.0的50mM Tris-HCl和0~10M尿素组成。

9. 根据权利要求6所述的姜黄素纳米复合物的方法,其特征在于,所述步骤(3)包括如下步骤:在搅拌下,向所述HBc VLPs载体中加入姜黄素溶液,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中透析过夜,透析温度为4℃,每4h更换1次聚合缓冲液;所述聚合缓冲液的成分为:pH为7.0的50mMTris-HCl,150mM NaCl,10%甘油,1%甘氨酸。

10. 根据权利要求1-5中任意一项所述的姜黄素纳米复合物的用途,其特征在于,所述姜黄素纳米复合物在制备抗卵巢癌药物中的应用。

## 一种姜黄素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,具体涉及一种姜黄素纳米复合物及其制备方法和用途。

### 背景技术

[0002] 姜黄是国家食品药品监督管理局公布的临床药物姜黄清脂片(丸、胶囊)、四味姜黄汤散和姜黄消痤搽剂的主要药材,也是国家卫生部公布的可用于保健食品的中药,其化学成分主要为姜黄素类化合物和挥发油。姜黄素(curcumin, Cur)是姜黄最主要的活性成分,为姜科植物姜黄根茎中的多酚类提取物,具有来源广泛,价格低廉,毒副作用小等优点。其药理作用广泛,通过调节与肿瘤增值、凋亡、浸润和新生血管生成的相关基因实现抗肿瘤作用。美国国家肿瘤研究所已将其列为第三代癌化学预防药。近年研究表明姜黄素对肿瘤癌变的三个阶段均有很强的防治作用,同时还具有确切的抗细胞毒类药物的多药耐药,是一种具有多靶点特征天然肿瘤化学预防剂和治疗剂。因其无毒、广谱等特点已成为当下全球最受瞩目的天然产物之一,被誉为一种可能为肿瘤预防和治疗提供长久解决方案的神奇药物。但其极难溶于水,口服吸收差、生物利用率低,体内的吸收率低,体循环速度快、代谢快等特性,限制了其在临床作为化疗药物的应用。目前主要通过结构改造和制备成载体药物的方式以提高其亲水性,而结构改造难以同时达到良好的水溶性和药效,载体药物因拥有众多优势而成为主要研究方向。

[0003] 靶向给药系统是通过局部或血液循环,选择性地将药物运送到靶细胞、靶组织、靶器官而发挥治疗作用,可提高药物的选择性,从而提高治疗效果,降低药物的毒副作用。由于其能够同时实现靶向和药物控释作用,靶向给药系统是目前研究较多的一种新型靶向治疗癌症的方法,也是目前癌症治疗领域研究的热点问题。脂质体等合成聚合物是目前常用的靶向给药系统载体,但经大量研究发现其存在稳定性差、易渗漏、对水溶性的药物包封率低、靶向性差、专一性低等缺点,限制了其临床应用。在生物性载体中,病毒样颗粒(VLPs)是由病毒单一或多个结构蛋白自行装配而成的高度结构化的蛋白颗粒,保持了病毒抗原蛋白的天然构象,故VLPs不具有感染性,因其具有良好的生物相容性、可降解性和毒性低等优点,具有成为抗肿瘤药物天然纳米载体的优势。VLPs在结构上允许外源基因或基因片段的插入,形成嵌合型VLPs并将外源性抗原展示在其表面,可作为将化疗药物递送至癌细胞的有效载体。在所有VLPs中,HBc VLPs是目前研究最深入的病毒样颗粒之一,其适合结构剪裁,自组装能力强,可以在所有已知的表达系统中合成和组装,更适合作为潜在的生物靶向给药载体。

### 发明内容

[0004] 本发明提供一种姜黄素纳米复合物,该姜黄素纳米复合物可有效改善姜黄素的理化性质。

[0005] 本发明的姜黄素纳米复合物采用如下技术方案:一种姜黄素纳米复合物,所述姜

黄素纳米复合物包括HBc VLPs载体和包裹于所述HBc VLPs载体内的姜黄素和/或姜黄素衍生物。其中,姜黄素(从姜科植物姜黄根茎中提取到的多酚类提取物)可为从天然植物中提取得到的高纯度姜黄素或人工合成高纯度姜黄素或经实验室纯化得到的高纯度姜黄素;姜黄素衍生物包括但不限于去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素、二氢姜黄素、四氢姜黄素或八氢姜黄素等。HBc VLPs载体易于在体内生物降解,可以在大肠杆菌中大量表达。

[0006] 优选的,所述HBc VLPs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。其中,HBc-144为乙肝病毒核心蛋白HBcAg的前144个氨基酸,HBc-144的主要免疫区域是指其78-83位氨基酸。

[0007] 优选的,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;所述靶向肽插设于所述HBc-144C端的第78和81位氨基酸序列之间(剔除HBc-144序列中的第79和80位氨基酸)。

[0008] 优选的,所述HBc-144载体的C端还连接有6xHis标签,即在HBc-144的C端末尾还连接有6个组氨酸。

[0009] 优选的,所述姜黄素纳米复合物为液体剂型或固体剂型,所述液体剂型可选自溶液、悬浮液、乳液、气溶胶;所述固体剂型可选自片剂、贴剂、胶囊、丸剂、颗粒剂、细粒剂或粉剂等。具体给药方法可为通过口服、肠胃外、吸入、局部或经皮、鼻内、眼内、耳、直肠、阴道途径给药。

[0010] 本发明还提供了如上所述的姜黄素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)使所述姜黄素和/或姜黄素衍生物包封于所述HBcVLPs载体内,即得所述姜黄素纳米复合物。

[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4~6h即得所述HBc VLPs载体;所述解聚缓冲液为pH=8.0的50mM Tris-HCl和0~10M尿素组成。

[0013] 优选的,所述步骤(3)包括如下步骤:在搅拌下,向所述HBc VLPs载体中加入姜黄素溶液,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中透析过夜,透析温度为4℃,每4h更换1次聚合缓冲液;所述聚合缓冲液的成分为:pH为7.0的50mM Tris-HCl,150mM NaCl,10%甘油,1%甘氨酸。

[0014] 本发明还提供了如上述任意一项所述的姜黄素纳米复合物的用途,所述姜黄素纳米复合物在制备抗卵巢癌药物中的应用。

[0015] 本发明的有益效果是:本发明的姜黄素纳米复合物具有更好理化性质的特点,根据已经阐明的姜黄素具有抗肿瘤、抗菌、抗氧化和抗炎等多种药理作用,本发明的姜黄素纳米复合物在制备抗肿瘤药物、抗老年痴呆药物、抗菌药物、抗炎药物等领域均具有良好的应

用前景。

[0016] 本发明的姜黄素纳米复合物可有效改善姜黄素/姜黄素衍生物的水溶性和生物利用度,且稳定性好,30d内包封率基本不变。本发明通过采用HBc VLPs载体包裹姜黄素/姜黄素衍生物,来解决姜黄素/姜黄素衍生物自身疏水性和稳定性差的局限性,进而可提高姜黄素/姜黄素衍生物的水溶性、生理条件下的稳定性和生物利用度;本发明的姜黄素纳米复合物还能够起到延长体内循环时间的作用。

[0017] 本发明的姜黄素纳米复合物可靶向具有整合素 $\alpha v\beta 3$ 受体的癌细胞(例如,肺癌、肝癌、乳腺癌等),可用于制备靶向抗肿瘤药物,提高姜黄素对肿瘤组织的靶向性,实现在肿瘤病灶部位的精准、持续给药,并可显著提高对癌细胞的抑制率。

[0018] 本发明的姜黄素纳米复合物在体内和体外实验中对卵巢癌细胞的抑制率均有显著提高。

[0019] 本发明的姜黄素纳米复合物的制备方法简单、包封率高。且制备得到的HBc VLPs载体的粒径分布均匀,生物相容性好,可实现对姜黄素/姜黄素衍生物的高效负载。

## 附图说明

[0020] 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。

[0021] 图1为本发明实施例1经密度梯度离心后得到的姜黄素纳米复合物的电镜图;

[0022] 图2为实施例4测得的姜黄素混悬液和姜黄素纳米复合物的血药浓度随时间变化的对比图;

[0023] 图3为实施例5中A组实验活体成像图片,从左到右依次为6h、12h和24h的成像图片;

[0024] 图4为实施例5中B组实验活体成像图片,从左到右依次为6h、12h和24h的成像图片。

## 具体实施方式

[0025] 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。

[0026] 下述实施例中所用到的裸鼠和鼠卵巢癌转基因细胞系T1、T2、T3均由河南省生物工程技术研究中心提供。

[0027] 实施例1

[0028] 步骤一:制备姜黄素纳米复合物:

[0029] (1) 制备HBc VLPs纳米颗粒:将来源于HCV病毒蛋白上的一段疏水性多肽名为NS5A

[0030] (氨基酸序列:AGSWLRDIWDWICEVLSDFKTWLKAKAKLMPTM)连接至截短的HBc-144(来自本实验室,其氨基酸序列为MDIDHYKEFG ASVELLSFLP SDFFPSIRDL LDTASALYRE

ALESPEHCSP HHTALRQAIL CWGELMNLAT WVGSNLEDPA SRELVVGYVN VNMGLK IRQI LWFHISCLTF GRETVLEYLV SFGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLP)的C端,得到HBc-NS5A蛋白(具体氨基酸序列为MDIDHYKEFG ASVELLSFLP SDFFPSIRDL LDTASALY RE ALESPEHCSP HHTALRQAIL CWGELMNLAT WVGSNLEDPA SRELVVGYVN VNMGLK IRQI LWFHISCLTF GRETVLEYLV SFGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLP AGSWLRDIWDWICE VLSDFKTWLKAKAKLMPTM)。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(GTSGSSGSGSGSGSGGG)作为连接肽分别插入到RGD两端并获得RGD-HBc-NS5A蛋白(氨基酸序列为MDIDHYKEFG ASVELLSFLP SDFFPSIRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL CWGELMNLAT WVGSNLEDGT SGSSGSGSGG SGSGGGGRGD GGGGSGSGGS GSGSSGST GSRELVVGYVNVNMGLKIRQIL WFHISCLTFG RETVLEYLVS FGVWIRTPPA YRPPNAPIL S TLPAGSWLRD IWDWICEVLS DFKTWLKAKL MPTMHHHHH)。所有的重组HBc蛋白都在C-末端附加了6xHis标签(即RGD-HBc-NS5A蛋白氨基酸序列中的HHHHHH)。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)。

[0031] 获取含有目的基因的质粒后按照下述步骤操作:向大肠杆菌感受态细胞悬液中加入购买得到的含有目的基因的质粒(100 $\mu$ 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。

[0032] 表达和纯化基因修饰的HBc VLPs:将连接有目的基因的质粒转化到大肠杆菌中后,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- $\beta$ -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(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,使蛋白沉淀并再次以12000转/分离心30min,收集沉淀。将HBc-VLPs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,BCA法测定蛋白浓度,分装后储存在-20 $^{\circ}$ C。

[0033] (2) 解聚:采用超微量紫外分光光度计检测其含量将步骤(一)制备得到的HBc VLPs纳米颗粒稀释到5mg/mL;在1000r/min磁力搅拌下,加入解聚缓冲液进行解聚,室温25 $^{\circ}$ C左右,解聚4个小时,即得HBc VLPs纳米载体;解聚缓冲液为:50mM Tris-HCl,pH8.0,2M尿素。

[0034] (3) 包封:在1000r/min磁力搅拌下,向HBc VLPs纳米载体中加入预先处理好的待包封药物姜黄素溶液(将姜黄素粉末溶解于80%乙醇中,并调节其浓度至5mg/mL),向425mL HBc VLPs纳米载体中加入85mL姜黄素溶液,4 $^{\circ}$ C放置30min充分混匀。取透析袋放入纯化水中煮沸20min,用透析夹夹住透析袋一边,将上述HBc VLPs纳米载体和姜黄素溶液的混合溶液装入透析袋中,用夹子夹紧,检查是否渗漏,放入聚合缓冲液中透析,每4h换聚合缓冲液1次,4 $^{\circ}$ C透析过夜,即得姜黄素纳米复合物;其中,聚合缓冲液为:50mM Tris-HCl,pH8.0,150mM NaCl,10%甘油,1%甘氨酸;

- [0035] 步骤二:密度梯度离心纯化步骤一制备得到的姜黄素纳米复合物(HBc-VLPs-Cur)
- [0036] (1) 收集包封后所得样品并用PEG浓缩至适当体积;
- [0037] (2) 根据样品体积,加入固体氯化铯,至浓度为12%;
- [0038] (3) 加样:根据样品体积,取用合适数量超离管,向每支超离管中加6mL浓度为12%氯化铯的样品溶液;按顺序用一吹拉管(预先标示刻度0.75mL)分别吸取1.5mL 25%、37.5%、50%不同浓度的氯化铯溶液依次小心加入底部(4)用托盘天平或电子天平配平相对应的超滤管和外管,按照对应的盖子,拧紧超滤管盖子;不要晃动,按顺序小心放入相对应的水平转子上;
- [0039] (5) 29000rpm超离至少3个小时,4~8℃;
- [0040] (6) 超离结束,不要晃动,用镊子从外管中小心取出超离管,在黑色背景下观察分层情况,用吹拉管小心吸出乳白色的病毒样颗粒层蛋白,即制备得到的姜黄素纳米复合物;
- [0041] (7) 蛋白含量检测
- [0042] 取密度梯度离心法分离纯化后样品采用超微量紫外分光光度计检测其蛋白含量。
- [0043] 测得纯化后姜黄素纳米复合物的蛋白含量为1.25mg/mL。
- [0044] (8) 电镜检测
- [0045] 取密度梯度离心法分离纯化样品采用电子显微镜观察颗粒形态。
- [0046] 电镜观察结果如图1,实验制备的姜黄素纳米复合物的平均直径约为30nm,电镜下呈圆形,大小较一致,分散性较好。
- [0047] (9) 包封率检测
- [0048] 准确量取5mg制备得到的姜黄素纳米复合物,溶于2mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中,完全溶解后,加入5mL PBS溶液,漩涡混合器上充分混合,静置1h,使水相与油相分离并收集水相。余下的油相重复上述方法再处理一次,将两次分离收集的水相溶液混合,PBS稀释10倍后低速离心,取上清液,紫外分光光度计测定其470nm处的吸光度,重复检测3次,根据公式计算出姜黄素纳米复合物的包封率。
- [0049] 包封率=纳米复合物的姜黄素含量/姜黄素总量×100%。
- [0050] 经计算,制备得到的姜黄素纳米复合物(HBc-VLPs-Cur)的包封率为81.24%。
- [0051] 实施例2测定实施例1制备得到的姜黄素纳米颗粒的水溶性
- [0052] (1) 最大吸收波长的确定
- [0053] 采用紫外-可见分光光度法,以无水乙醇为溶剂,在200~600nm波长内,对姜黄素对照品进行扫描,最大吸收波长为424nm。取姜黄素溶液0.100g,置25mL容量瓶中,用水稀释至刻度,精密量取上述溶液1.0mL于50mL容量瓶中,稀释至刻度。以水为空白,在200~600nm波长内对姜黄素水溶液进行扫描,最大吸收波长为424nm,故确定424nm为检测波长。
- [0054] (2) 标准曲线的制备
- [0055] 精密称定姜黄素对照品10.25mg,置100mL棕色量瓶,用无水乙醇稀释至刻度,即得。精密量取上述溶液5.0mL于100mL棕色量瓶中,稀释至刻度,摇匀,得储备液。分别精密量取姜黄素储备液2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0mL于10mL棕色量瓶中,稀释至刻度,得1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0μg/mL等不同质量浓度的姜黄素溶液,于424nm处测定吸光度,以吸光度(A)对质量浓度(ρ,μg/mL)作线性回归,得标准曲线方程:A=0.15363ρ-0.00434(r<sup>2</sup>=0.9996),表明在1.0~5.0μg/mL内,吸光度与姜黄素的质量浓度

呈良好的线性关系。

[0056] (3) 分别对姜黄素标准品和实施例1制备得到的姜黄素纳米复合物 (HBc-VLPs-Cur) 的水溶性进行测试

[0057] 溶解度实验结果表明, 实施例1制备得到的姜黄素纳米复合物 (HBc-VLPs-Cur) 在水中的溶解度为80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 而姜黄素标准品在水中的溶解度为0.35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 实施例1制备得到的姜黄素纳米复合物 (HBc-VLPs-Cur) 的水溶性比姜黄素标准品的水溶性提高了228倍。

[0058] 实施例3对制备得到的姜黄素纳米复合物 (HBc-VLPs-Cur) 的稳定性进行检测

[0059] 把制备的姜黄素纳米复合物 (HBc-VLPs-Cur) 装在西林瓶中, 并塞上塞子。并用封口膜封好, 放置在4 $^{\circ}\text{C}$ 中储存起来, 30d后再取出, 测定包封率 (9次重复试验)。

[0060] 表2不同时间包封率测定

[0061]

试验次数编号	原包封率/%	30d后包封率/%
1	89.35	88.34
2	86.57	84.01
3	84.82	85.89
4	82.03	81.05
5	85.47	85.02
6	88.17	86.39
7	85.34	83.12
8	76.08	74.58
9	88.42	88.01

[0062] 由上表2可知, 姜黄素纳米复合物 (HBc-VLPs-Cur) 在存放30d过程中包封率 (以纳米复合物中的姜黄素含量/包封时采用的姜黄素总量) 变化很小 (说明被包封的姜黄素的稳定性好), 姜黄素纳米复合物 (HBc-VLP-Cur) 中的姜黄素相对于包封前的姜黄素易出现光降解、被降解为无效成分的特性, 本发明将姜黄素包封于HBc VLPs纳米载体, 显著提高了其的稳定性。

[0063] 实施例4测定生物利用度和生物活性

[0064] 取雄性SD大鼠10只, 随机分成2组, 给药前禁食12h, 不禁水。分别灌胃给予姜黄素混悬液 (混悬于0.5%的SDS-Na溶液中) 和HBc-VLPs-Cur (姜黄素混悬液和HBc-VLPs-Cur的给药剂量以姜黄素的剂量计, 均为100mg/kg), 给药5、15、30、45、60、120、240、480、720min后眼眶后静脉丛取血0.3ml, 5000r/min离心5min, 取血浆100 $\mu\text{l}$ 加入1ml的乙酸乙酯萃取两次, 合并有机相并通过氮吹仪除去有机溶剂, 用流动相100 $\mu\text{l}$ 超声溶解, 通过LC-MS/MS测定其浓度。色谱条件: 色谱柱Zorbax Eclipse Plus C18 (2.1mm $\times$ 100mm, 3.5 $\mu\text{m}$ ); 流动相: 乙腈-水溶液 (62:38), 柱温30 $^{\circ}\text{C}$ 。通过DAS3.0软件计算药动学参数, 相对生物利用度 =  $\text{AUC}_{\text{HBc-VLPs-Cur}}/\text{AUC}_{\text{混悬液}}$ 。

[0065] 表3



指标	姜黄素混悬液	HBc-VLP-Cur
C <sub>max</sub> (ng/ml)	30.23	80.54
AUC <sub>0-t</sub> [μg/(L·h)]	135.58	232.45
t <sub>max</sub> (h)	0.6	0.4
MRT <sub>0-t</sub> (h)	5.19	3.96
T <sub>1/2Z</sub> (h)	7.56	6.48
Cl <sub>z</sub> (L/h)	322.53	322.53
V <sub>z</sub> (L)	6078.65	3014.82

[0066] 如图2和表3所示,HBc-VLPs-Cur与姜黄素混悬液相比,其达峰时间提前,在给药后2h即出现最大血药浓度(C<sub>max</sub> = 80.54ng/ml)。而姜黄素混悬液组在给药后3h达到最大(C<sub>max</sub> = 30.23ng/ml),说明在相同剂量条件下HBc-VLPs-Cur能有效地提高姜黄素吸收进入血液的速率。另外,HBc-VLPs-Cur的药时曲线下面积(AUC<sub>0-t</sub>)为232.45μg/(L·h),也远远大于姜黄素混悬液组的药时曲线下面积135.58μg/(L·h) (P<0.05),药物生物利用度提高到原来的1.7倍。

[0068] 实施例5靶向性实验

[0069] 实验设置两组,A组是姜黄素的混悬液,B组是HBc-VLP-Cur的颗粒,分别用Cy5.5-NHS溶于少量DMSO均按照摩尔比1.5:1进行混合,在室温下反应30min.后,于pH7.4的PBS缓冲液中透析24h除去过量的Cy5.5-NHS的病毒样颗粒和游离的姜黄素。后按照100μl剂量注射进Balb/c卵巢癌小鼠体内,进行小鼠的活体成像,分别在6h,12h,24h进行成像。

[0070] 通过图3和图4可明显的看出,HBc-VLP-Cur具有良好的靶向性。

[0071] 实施例6测定姜黄素纳米复合物(HBc-VLP-Cur)对卵巢上皮癌细胞株H08910的体外抑制率

[0072] (1) 卵巢上皮性癌细胞株H08910细胞培养:

[0073] 取H08910细胞以 $1 \times 10^5$ 个/mL接种于含15%胎牛血清的RPMI 1640的96孔培养板中,置含37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱内培养至细胞单层铺满孔底,HBc-VLP-Cur实验组于12h后加入不同浓度(0.04、0.2、1.0、5.0、10.0μg·mL<sup>-1</sup>)的HBc-VLP-Cur培养;姜黄素混悬液实验组于12h后加入不同浓度(0.04、0.2、1.0、5.0、10.0μg·mL<sup>-1</sup>)的姜黄素混悬液培养;每种浓度设置3-5个复孔。对照组(空白对照)于生长12h后培养板中不添加HBc-VLP-Cur/姜黄素混悬液,5%CO<sub>2</sub>,37℃培养。

[0074] (2) 抑制率检测

[0075] 将细胞分别在药物中孵育0.5h、1h和2h。药物作用结束后,每孔加入20μL MTT溶液(5mg/ml,即0.5%MTT),继续培养4h后终止培养,小心吸去孔内培养液。每孔加入150μL二甲基亚砷,置摇床上低速振荡10min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪OD490nm处测量各孔的吸光值。同时设置调零孔(培养基、MTT、二甲基亚砷),对照孔(细胞、相同浓度的药物溶解介质、培养液、MTT、二甲基亚砷)。以酶标仪于检测波长492nm测定OD值,按下列公式计算细胞生长抑制率(%)。

$$[0076] \quad \text{细胞生长抑制率} (\%) = \left(1 - \frac{\text{实验组OD值}}{\text{对照组OD值}}\right) \times 100\%$$

[0077] HBc-VLP-Cur和姜黄素混悬液对体外培养卵巢上皮性癌细胞H08910的抑制率结果

如表4。

[0078] 表4不同浓度的姜黄素混悬液及姜黄素靶向药物对H08910细胞的抑制作用(MTT法)

	药物浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	姜黄素混悬液抑制率 (%)	姜黄素靶向药物抑制率(%)
	0	—	—
[0079]	0.2	4.37	30.07
	1.0	14.36	55.19
	5.0	27.46	80.73
	10.0	32.21	81.48

[0080] 由上表可知,HBc-VLP-Cur浓度为10.0 $\mu\text{g/mL}$ 时对体外培养卵巢上皮性癌细胞H08910的抑制率为81.48%。不同浓度下,HBc-VLP-Cur对卵巢上皮性癌细胞H08910的抑制率均显著高于姜黄素混悬液对卵巢上皮性癌细胞H08910的抑制率。

[0081] 实施例7测定HBc-VLP-Cur对卵巢癌肿瘤体内抑瘤效应。

[0082] (1) 卵巢癌建模:20只清洁级BALB/c A-nude雌性裸小鼠,鼠龄6~8周,体质量18~22g。所有小鼠在室温,湿度为55%条件下饲养。适应性喂养1周后,将细胞密度为 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 的SKV03细胞悬液接种于裸小鼠胸壁皮下,细胞悬液接种量为0.2mL,待肿瘤生长至100~250 $\text{mm}^3$ 时即为建模成功。

[0083] (2) 将建模成功的裸小鼠随机分成实验组和对照组,按1mg/kg有效剂量静脉注射给药,向实验组给予HBc-VLP-Cur,对照组给予生理盐水溶解的姜黄素原药,空白对照组仅注射生理盐水。每7天给药一次,共4次。

[0084] (3) 末次给药24h后,采用脱颈法处死小鼠,切取其皮下肿瘤组织,检测小鼠肿瘤瘤体质量,计算肿瘤体积与肿瘤抑制率,其中肿瘤抑制率=(空白对照组肿瘤重量-给药组肿瘤重量)/空白对照组肿瘤重量 $\times 100\%$ 。

[0085] HBc-VLP-Cur和姜黄素原药对卵巢癌肿瘤抑制率结果如表5。

[0086] 表5 HBc-VLP-Cur和姜黄素原药对卵巢癌肿瘤的体内抑制率

	分组	数量	肿瘤重量(mg)	抑制率(%)
[0087]	实验组	5	287.2 $\pm$ 51.6	68.56
	对照组	5	473.4 $\pm$ 64.9	48.17
	空白对照组	5	913.5 $\pm$ 88.1	

[0088] 由上表可知,HBc-VLP-Cur对卵巢癌肿瘤的体内抑制率为68.56%,相对于姜黄素原药提高了20%。

[0089] 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。

## 序列表

<110> 河南省生物工程技术研究中心

郑州倍赛泰生物科技有限公司

<120> 一种姜黄素纳米复合物及其制备方法和用途

<160> 5

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

Ala Gly Ser Trp Leu Arg Asp Ile Trp Asp Trp Ile Cys Glu Val Leu

1                    5                    10                    15

Ser Asp Phe Lys Thr Trp Leu Lys Ala Lys Ala Lys Leu Met Pro Thr

                  20                    25                    30

Met

<210> 2

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

Gly Thr Ser Gly Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser Gly

1                    5                    10                    15

Gly Gly Gly

<210> 3

<211> 144

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

Met Asp Ile Asp His Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Ser Val Glu Leu Leu

1                    5                    10                    15

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Ile Arg Asp Leu Leu Asp

                  20                    25                    30

Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys

                  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 Pro Ala

65	70	75	80
Ser Arg Glu Leu Val Val Gly Tyr Val Asn Val Asn Met Gly Leu Lys			
	85	90	95
Ile Arg Gln Ile Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg			
	100	105	110
Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr			
	115	120	125
Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro			
	130	135	140

<210> 4

<211> 177

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4

Met Asp Ile Asp His Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Ser Val Glu Leu Leu			
1	5	10	15
Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Ile Arg Asp Leu Leu Asp			
	20	25	30
Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys			
	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 Pro Ala			
65	70	75	80
Ser Arg Glu Leu Val Val Gly Tyr Val Asn Val Asn Met Gly Leu Lys			
	85	90	95
Ile Arg Gln Ile Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg			
	100	105	110
Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr			
	115	120	125
Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro			
	130	135	140
Ala Gly Ser Trp Leu Arg Asp Ile Trp Asp Trp Ile Cys Glu Val Leu			
145	150	155	160
Ser Asp Phe Lys Thr Trp Leu Lys Ala Lys Ala Lys Leu Met Pro Thr			
	165	170	175

Met

<210> 5

<211> 220

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 5

Met	Asp	Ile	Asp	His	Tyr	Lys	Glu	Phe	Gly	Ala	Ser	Val	Glu	Leu	Leu
1				5					10					15	
Ser	Phe	Leu	Pro	Ser	Asp	Phe	Phe	Pro	Ser	Ile	Arg	Asp	Leu	Leu	Asp
			20					25					30		
Thr	Ala	Ser	Ala	Leu	Tyr	Arg	Glu	Ala	Leu	Glu	Ser	Pro	Glu	His	Cys
			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				80	
Ser	Gly	Ser	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly
				85						90				95	
Gly	Arg	Gly	Asp	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Ser
			100						105					110	
Gly	Ser	Ser	Gly	Ser	Thr	Gly	Ser	Arg	Glu	Leu	Val	Val	Gly	Tyr	Val
			115					120						125	
Asn	Val	Asn	Met	Gly	Leu	Lys	Ile	Arg	Gln	Ile	Leu	Trp	Phe	His	Ile
			130				135					140			
Ser	Cys	Leu	Thr	Phe	Gly	Arg	Glu	Thr	Val	Leu	Glu	Tyr	Leu	Val	Ser
145					150					155				160	
Phe	Gly	Val	Trp	Ile	Arg	Thr	Pro	Pro	Ala	Tyr	Arg	Pro	Pro	Asn	Ala
					165					170				175	
Pro	Ile	Leu	Ser	Thr	Leu	Pro	Ala	Gly	Ser	Trp	Leu	Arg	Asp	Ile	Trp
					180					185				190	
Asp	Trp	Ile	Cys	Glu	Val	Leu	Ser	Asp	Phe	Lys	Thr	Trp	Leu	Lys	Ala
								200						205	
Lys	Leu	Met	Pro	Thr	Met	His	His	His	His	His	His	His	His	His	His
								210						215	
															220

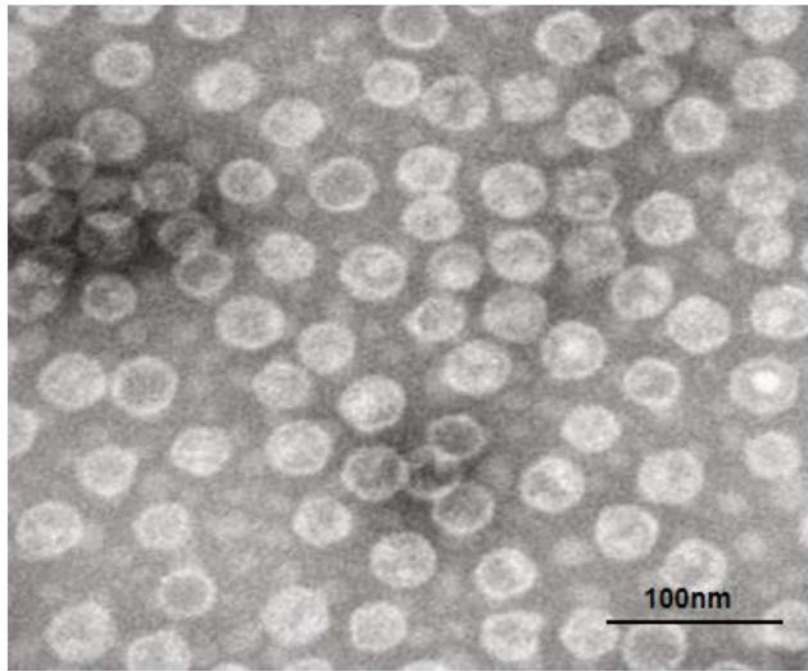


图1

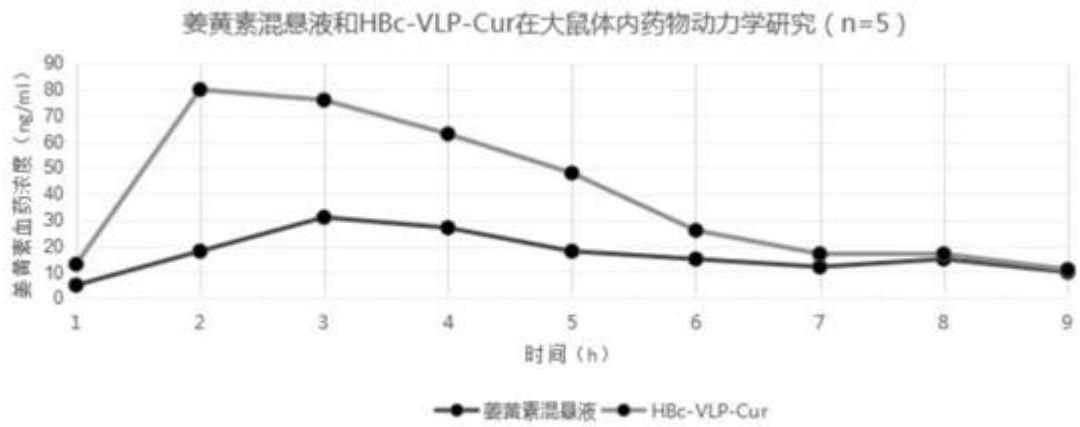


图2

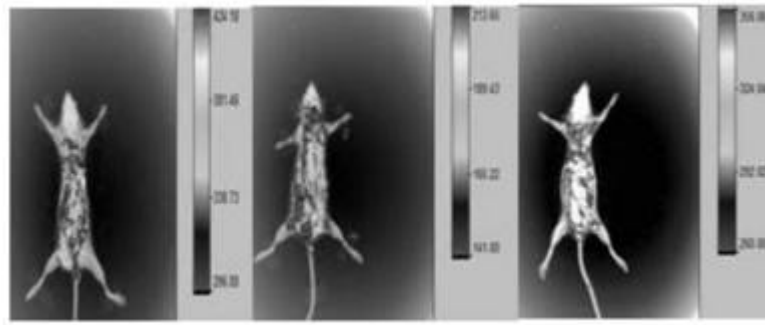


图3

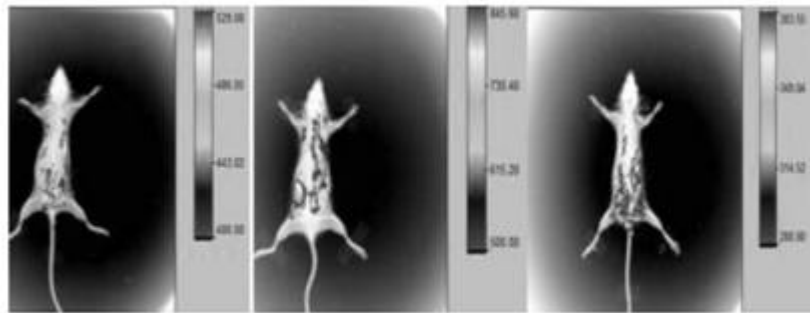


图4