



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103520110 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 22

(21) 申请号 201310436641. 7

A61K 9/51 (2006. 01)

(22) 申请日 2013. 09. 24

A61K 47/48 (2006. 01)

(71) 申请人 中国科学技术大学

A61K 31/4745 (2006. 01)

地址 230026 安徽省合肥市包河区金寨路
96 号

A61P 35/00 (2006. 01)

(72) 发明人 刘世勇 胡祥龙

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 吴胜周

(51) Int. Cl.

A61K 9/14 (2006. 01)

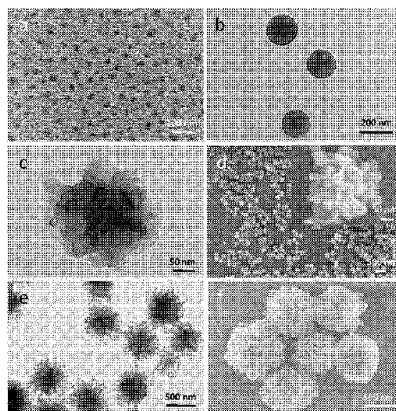
权利要求书3页 说明书13页 附图3页

(54) 发明名称

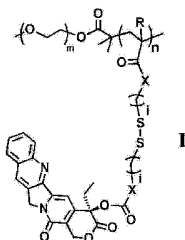
制备喜树碱聚合前药两性分子的纳米粒子的
方法及其产品和用途

(57) 摘要

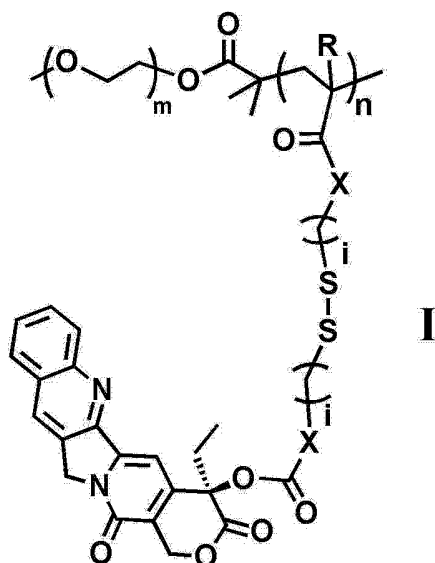
本发明涉及式 I 的还原性响应喜树碱聚合前药两性分子的不同纳米粒子的制备方法及其产品和用途,其中仅通过调节溶剂的种类以及加水方式和加水速度可控制该聚合前药两性分子最终组装体的形貌,得到四种典型的纳米结构:球状,圆盘状,花状复合囊泡和错列堆积的片层纳米粒子。这些纳米结构本身具有高载药量 (>50wt%),并且相比目前研究最多的球状纳米粒子,错列堆积片层结构的组装体血液循环时间最长,其次是圆盘状纳米粒子。另外,相对于球形纳米粒子,非球形粒子具有更大的肿瘤细胞毒性。式 I 中,各个 i 独立地为 2 或 3;各个 X 独立地为 O 或 NH;R 为 H、CH₃或 CH₂CH₃;m=4-400;并且 n=2-300,并且所述还原性响应喜树碱聚合前药两性分子的平均分子量



为 1200-220000。



1. 一种制备式 I 的还原性响应喜树碱聚合前药两性分子的球状纳米粒子的方法,



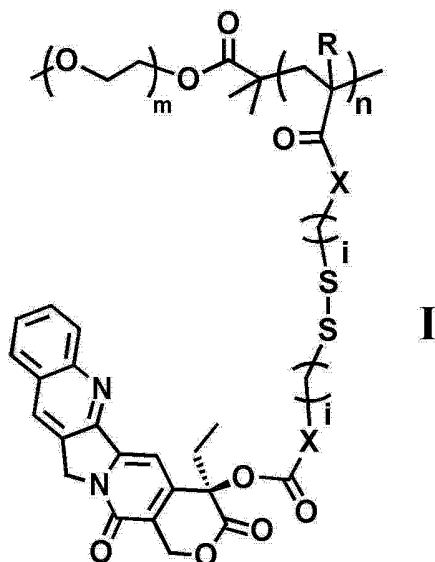
其中,各个 i 独立地为 2 或 3;各个 X 独立地为 0 或 NH ; R 为 H 、 CH_3 或 CH_2CH_3 ; $m=4-400$; 并且 $n=2-300$, 并且所述还原性响应喜树碱聚合前药两性分子的数均分子量为 1200-220000,

所述方法包括:将所述式 I 的化合物溶解在选自 DMSO、DMF 或其以任意比例的混合物的有机溶剂中的有机溶剂中,并将所得的有机溶液一次性快速注入到水中,然后通过透析除去所述有机溶剂而获得所述球状纳米粒子,

其中,在所得到的有机溶液中,所述聚合前药两性分子的浓度为 $0.1\text{mg} / \text{mL} \sim 1000\text{mg} / \text{mL}$,所述水的体积为所使用的有机溶剂体积的 4 ~ 1000 倍。

2. 一种根据权利要求 1 所述的方法制备的式 I 的还原性响应喜树碱聚合前药两性分子的球状纳米粒子,其中所述球状纳米粒子的直径范围为 10 ~ 1000nm。

3. 一种制备式 I 还原性响应喜树碱聚合前药两性分子的圆盘状纳米粒子的方法,



其中,各个 i 独立地为 2 或 3;各个 X 独立地为 0 或 NH ; R 为 H 、 CH_3 或 CH_2CH_3 ; $m=4-400$; 并且 $n=2-300$, 并且所述还原性响应喜树碱聚合前药两性分子的数均分子量为 1200-220000,

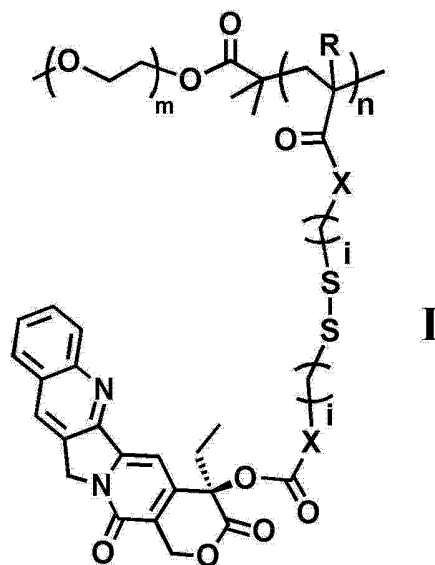
所述方法包括:将所述式 I 的化合物溶解在选自 DMSO、DMF 或其以任意比例的混合物的

有机溶剂中,并向所获得的有机溶液中滴加水,然后通过透析除去所述有机溶剂而获得所述圆盘状纳米粒子,

其中,在所得到的有机溶液中,所述聚合前药两性分子的浓度为 $0.1\text{mg} / \text{mL} \sim 1000\text{mg} / \text{mL}$,所述水的体积为所使用的有机溶剂体积的 $4 \sim 1000$ 倍,并且滴加所述水的时间为 $0.5 \sim 5\text{h}$ 。

4. 一种根据权利要求3所述的方法制备的式I的还原性响应喜树碱聚合前药两性分子的圆盘状纳米粒子,其中所述圆盘状纳米粒子的直径范围为 $50 \sim 800\text{nm}$ 。

5. 一种制备式I还原性响应喜树碱聚合前药两性分子的错列堆积片层纳米粒子的方法,



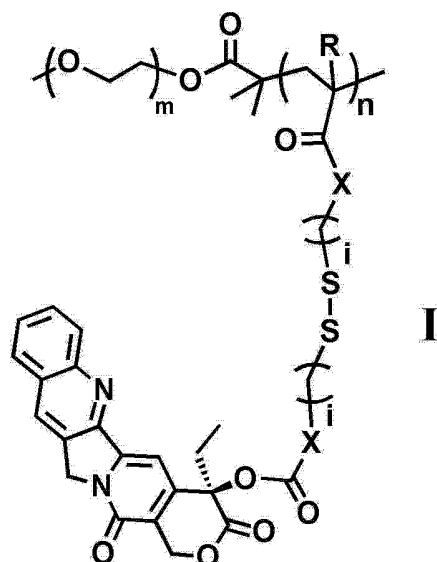
其中,各个 i 独立地为 2 或 3;各个 X 独立地为 O 或 NH ; R 为 H 、 CH_3 或 CH_2CH_3 ; $m=4-400$; 并且 $n=2-300$, 并且所述还原性响应喜树碱聚合前药两性分子的平均分子量为 $1200-220000$,

所述方法包括:将所述式I的化合物溶解在纯的 1,4- 二氧六环或含 70% 以上 1,4- 二氧六环的混合有机溶剂中,并向所获得的有机溶液中滴加水,然后通过透析除去所述有机溶剂而获得所述错列堆积片层纳米粒子,

其中,在所得到的有机溶液中,所述聚合前药两性分子的浓度为 $0.1\text{mg} / \text{mL} \sim 1000\text{mg} / \text{mL}$,所述水的体积为所使用的有机溶剂体积的 $4 \sim 1000$ 倍,并且滴加所述水的时间为 $0.5 \sim 5\text{h}$ 。

6. 一种根据权利要求5所述的方法制备的式I的还原性响应喜树碱聚合前药两性分子的错列堆积层状纳米粒子,其中所述错列堆积片层纳米粒子的直径范围为 $200 \sim 1000\text{nm}$ 。

7. 一种制备式I还原性响应喜树碱聚合前药两性分子的花状复合囊泡纳米粒子的方法,



其中,各个 i 独立地为 2 或 3;各个 X 独立地为 0 或 NH ; R 为 H 、 CH_3 或 CH_2CH_3 ; $m=4-400$; 并且 $n=2-300$, 并且所述还原性响应喜树碱聚合前药两性分子的数均分子量为 1200-220000,

所述方法包括:将所述式 I 的化合物溶解在纯的 1,4- 二氧六环或含 70% 以上 1,4- 二氧六环的混合有机溶剂中,并向所获得的有机溶液中缓慢滴加水,然后通过透析除去所述有机溶剂而获得所述花状复合囊泡纳米粒子,

其中,在所得到的有机溶液中,所述聚合前药两性分子的浓度为 $0.1\text{mg} / \text{mL} \sim 1000\text{mg} / \text{mL}$,所述水的体积为所使用的有机溶剂体积的 4 ~ 1000 倍,并且滴加所述水的时间为 10h 以上。

8. 一种根据权利要求 7 所述的方法制备的式 I 的还原性响应喜树碱聚合前药两性分子的花状复合囊泡纳米粒子,其中所述花状复合囊泡纳米粒子的直径范围为 500 ~ 3000nm。

9. 根据权利要求 1-8 中任一项所述的式 I 的还原性响应喜树碱聚合前药两性分子的球状、圆盘状、错列堆积片层或花状复合囊泡纳米粒子在制备用于治疗癌症的药物载体中的应用,所述纳米粒子能够在肿瘤细胞还原性环境中响应地释放抗癌药物喜树碱。

制备喜树碱聚合前药两性分子的纳米粒子的方法及其产品和用途

技术领域

[0001] 本发明涉及医药领域。更具体地涉及制备喜树碱聚合前药两性分子的分级纳米结构的方法、通过该方法获得的产品及其用途。

背景技术

[0002] 探索复杂生物系统的分级结构和功能,如病毒衣壳,盘状血红细胞,血小板等极大地推动了合成材料的仿生研究。在生物医学领域,合成材料常被用作药物或者成像试剂的载体,材料结构构筑的方法主要包括“自上而下(top-down)”和“自下而上(bottom-up)”两种方法。其中 DeSimone 等人提出的粒子在非润湿模板的复制(打印)技术(Angew. Chem. Int. Ed. 2013, 52 :6580-6589) 和 Mitragotri 等人提出的薄膜拉伸技术(Proc. Natl Acad. Sci. USA2007, 104 :11901-11904) 作为最近发展最快的两种代表性“自上而下”方式在不同形状的微纳米粒子的大量制备方面取得重大进展,但是也存在不足,比如需要巨大的设备投资,操作流程复杂,高能耗,在制备 <100nm 的粒子方面存在挑战。而与自上而下技术相反,自下而上方法制备合成纳米结构已经被广泛应用于药物和基因传输等生物医学领域,如脂质体囊泡,聚合物囊泡和聚合物球状胶束,但是从结构上来看,这些纳米材料都是球形的。

[0003] 最近,科学家们逐渐发现粒子形状可以影响很多生物过程,如粒子与细胞的相互作用,粒子在生物体的分布和血液循环等。例如,研究发现在吞噬作用中,粒子形状相对于粒子大小占主导作用(Proc. Natl Acad. Sci. USA2006, 103 :4930-4934)。另外,盘状纳米粒子相对于球形粒子具有更长的血液循环时间和更高的组织特异性(Biomaterials2005, 26 :3759-3769)。此外,比较研究棒状纳米粒子发现,高纵横比的棒状纳米粒子进细胞比纵横比小的粒子快(Proc. Natl Acad. Sci. USA2008, 105 :11613-11618)。嵌段聚合物组装得到的长度达细胞直径的蠕虫状纳米粒子 比球形粒子具有更长的血液循环时间(Nature Nanotechnology2007, 2 :249-255)。而且,在生物医学领域,非球形粒子与相应的球形纳米粒子比较,还具有很多意想不到的优异功能。

[0004] 纳米材料的结构构筑和仿生方面,自下而上的分级自组装技术在学习和赶超大自然的复杂程度方面,显得更有潜力。例如,嵌段聚合物在溶液中的自组装可以获取很多种复杂纳米结构,包括球状,棒状,层状结构,囊泡和连续相结构。但是特别需要关注的是,重复可靠地制备层状结构仍然是个待解决的问题。层状结构难以制备主要是因为其处于非热力学平衡态,倾向于闭合为囊泡以降低体系能量。

[0005] 另外,传统的聚合物本身一般都不具有药物活性的,常被用作负载药物的骨架或者储存药物的物理仓库,具有内在的局限性,例如低载药量(一般低于 30%),药物非可控释放以及差的储藏稳定性。其次,共价缀合药物的药物载体由于采用共价键连接药物,具有较高的稳定性,但是一般载药量低,微环境响应性差。再次,在生物体微环境下,能够响应性可控释放缀合的药物也是缀合药物载体的必备条件。截至目前,虽然有很多将小分子药

物共价键合到高分子骨架上的报道,但将药物做成响应性前药单体再聚合,实现高效非球形纳米结构调控,并显示出强大生物医学应用前景的例子尚无报道。

[0006] 喜树碱是从中国喜树中提取的一种生物碱,具有很好的抗癌活性,但在水中的溶解性和稳定性都很差。喜树碱的 20- 位羟基是一个改性位点,可进行功能化。为了更好地利用该活性药物,需要更容易递送且稳定、溶解性高的喜树碱衍生物。聚合前药两性分子的自组装与结构相关生物功能的模块化设计是下一代药物载体设计的重要发展方向。

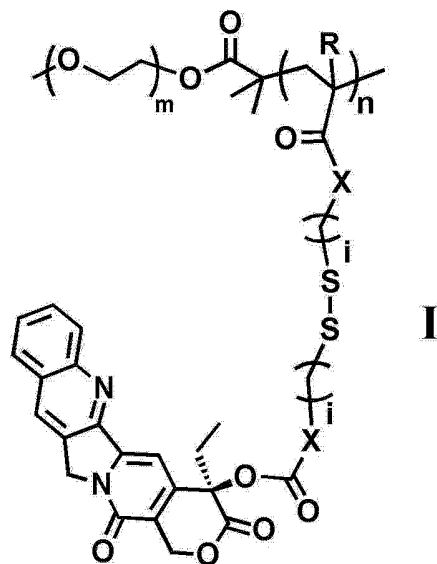
发明内容

[0007] 本发明的目的是通过研究还原性响应喜树碱聚合前药两性分子的纳米结构调控规律,实现对聚合前药两性分子复杂纳米结构调控,探索其生物应用。开拓了抗癌药物载体设计及纳米结构调控的新领域。

[0008] 鉴于本发明的发明人合成得到的聚乙二醇嵌段聚喜树碱前药 (PEG-b-PCPTM),载药量大于 50wt%。高分子骨架和喜树碱药物之间采用含有二硫键的连接基元,不但提高了药物稳定性和水溶性,同时也赋予其肿瘤细胞还原性响应释放喜树碱活性药物的特征,因此本发明的发明人进一步通过分子自组装调控技术,由 PEG-b-PCPTM 可以组装得到四种均一、稳定的纳米结构,包括球状粒子,花状复合囊泡,光滑的圆盘状结构以及错列堆积的片层结构,其中,光滑圆盘结构和错列堆积的片层结构在以前的研究中极少涉及。同时,在没有添加剂或模板存在的情况下,由单一嵌段聚合物组装得到具有明确药用功能的复杂纳米结构也尚无报道。其中,错列堆积的片层结构表现特别突出,血液循环时间最长。非球形纳米粒子相对于传统的球形纳米粒子具有更高的肿瘤细胞毒性。

[0009] 因此,在一方面,本发明提供一种制备式 I 的还原性响应喜树碱聚合前药两性分子的球状纳米粒子的方法,

[0010]



[0011] 其中,各个 i 独立地为 2 或 3;各个 X 独立地为 O 或 NH ; R 为 H 、 CH_3 或 CH_2CH_3 ; $m=4-400$; 并且 $n=2-300$, 并且所述还原性响应喜树碱聚合前药两性分子的数均分子量为 1200-220000,

[0012] 所述方法包括:将所述式 I 的化合物溶解在选自 DMSO、DMF 或其以任意比例的混合

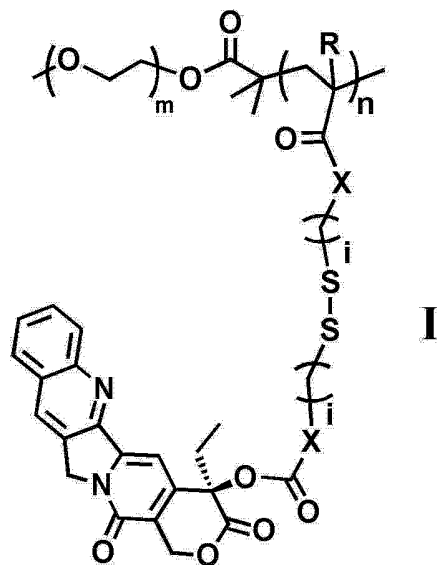
物的有机溶剂中的有机溶剂中,并将所得的有机溶液一次性快速注入到水中,然后通过透析除去所述有机溶剂而获得所述球状纳米粒子,

[0013] 其中,在所得到的有机溶液中,所述聚合前药两性分子的浓度为 $0.1 \text{ mg / mL} \sim 1000 \text{ mg / mL}$,所述水的体积为所使用的有机溶剂体积的 $4 \sim 1000$ 倍。

[0014] 在另一方面,本发明提供一种根据上述方法制备的式 I 的还原性响应喜树碱聚合前药两性分子的球状纳米粒子,其中所述球状纳米粒子的直径范围为 $10 \sim 1000 \text{ nm}$ 。

[0015] 在另一方面,本发明提供一种制备式 I 还原性响应喜树碱聚合前药两性分子的圆盘状纳米粒子的方法,

[0016]



[0017] 其中,各个 i 独立地为 2 或 3;各个 X 独立地为 0 或 NH ; R 为 H 、 CH_3 或 CH_2CH_3 ; $m=4-400$; 并且 $n=2-300$, 并且所述还原性响应喜树碱聚合前药两性分子的数均分子量为 $1200-220000$,

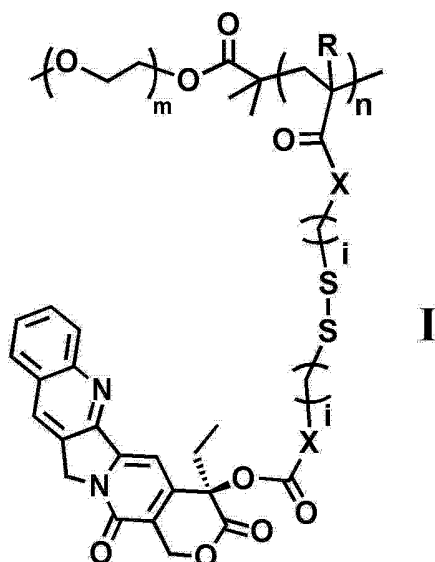
[0018] 所述方法包括:将所述式 I 的化合物溶解在选自 DMSO、DMF 或其以任意比例的混合物的有机溶剂中,并向所获得的有机溶液中滴加水,然后通过透析除去所述有机溶剂而获得所述圆盘状纳米粒子,

[0019] 其中,在所得到的有机溶液中,所述聚合前药两性分子的浓度为 $0.1 \text{ mg / mL} \sim 1000 \text{ mg / mL}$,所述水的体积为所使用的有机溶剂体积的 $4 \sim 1000$ 倍,并且滴加所述水的时间为 $0.5 \sim 5 \text{ h}$ 。

[0020] 在另一方面,本发明提供一种根据上述方法制备的式 I 的还原性响应喜树碱聚合前药两性分子的圆盘状纳米粒子,其中所述圆盘状纳米粒子的直径范围为 $50 \sim 800 \text{ nm}$ 。

[0021] 在另一方面,本发明提供一种制备式 I 还原性响应喜树碱聚合前药两性分子的错列堆积片层纳米粒子的方法,

[0022]



[0023] 其中,各个 i 独立地为 2 或 3;各个 X 独立地为 0 或 NH ; R 为 H 、 CH_3 或 CH_2CH_3 ; $m=4-400$;并且 $n=2-300$,并且所述还原性响应喜树碱聚合前药两性分子的数均分子量为 1200-220000,

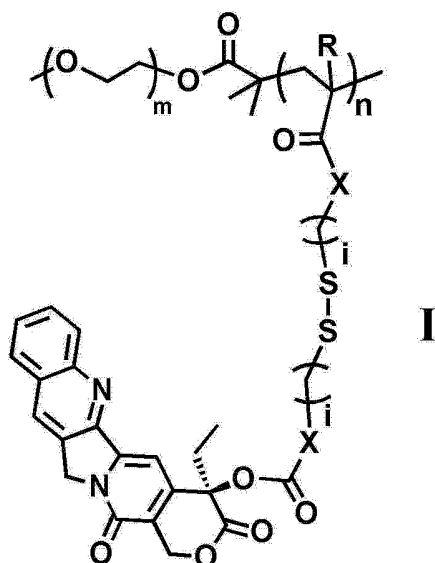
[0024] 所述方法包括:将所述式 I 的化合物溶解在纯的 1,4- 二氧六环或含 70% 以上 1,4- 二氧六环的混合有机溶剂中,并向所获得的有机溶液中滴加水,然后通过透析除去所述有机溶剂而获得所述错列堆积片层纳米粒子,

[0025] 其中,在所得到的有机溶液中,所述聚合前药两性分子的浓度为 $0.1\text{mg} / \text{mL} \sim 1000\text{mg} / \text{mL}$,所述水的体积为所使用的有机溶剂体积的 4 ~ 1000 倍,并且滴加所述水的时间为 0.5 ~ 5h。

[0026] 在另一方面,本发明提供一种根据上述方法制备的式 I 的还原性响应喜树碱聚合前药两性分子的错列堆积片层纳米粒子,其中所述错列堆积片层纳米粒子的直径范围为 200 ~ 1000nm。

[0027] 在另一方面,本发明提供一种制备式 I 还原性响应喜树碱聚合前药两性分子的花状复合囊泡纳米粒子的方法,

[0028]



[0029] 其中,各个 i 独立地为 2 或 3;各个 X 独立地为 O 或 NH ; R 为 H 、 CH_3 或 CH_2CH_3 ; $m=4-400$; 并且 $n=2-300$, 并且所述还原性响应喜树碱聚合前药两性分子的数均分子量为 $1200-220000$,

[0030] 所述方法包括:将所述式 I 的化合物溶解在纯的 1,4- 二氧六环或含 70% 以上 1,4- 二氧六环的混合有机溶剂中,并向所获得的有机溶液中缓慢滴加水,然后通过透析除去所述有机溶剂而获得所述花状复合囊泡纳米粒子,

[0031] 其中,在所得到的有机溶液中,所述聚合前药两性分子的浓度为 $0.1mg / mL \sim 1000mg / mL$,所述水的体积为所使用的有机溶剂体积的 $4 \sim 1000$ 倍,并且滴加所述水的时间为 10h 以上。

[0032] 在另一方面,本发明提供一种根据上述方法制备的式 I 的还原性响应喜树碱聚合前药两性分子的花状复合囊泡纳米粒子,其中所述花状复合囊泡纳米粒子的直径范围为 $500 \sim 3000nm$ 。

[0033] 在另一方面,本发明提供根据上述的式 I 的还原性响应喜树碱聚合前药两性分子的球状、圆盘状、错列堆积片层或花状复合囊泡纳米粒子在制备用于治疗癌症的药物载体中的应用,所述纳米粒子能够在肿瘤细胞还原性环境中响应地释放抗癌药物喜树碱。

[0034] 本发明利用喜树碱聚合前药两性分子构筑含有药物功能基元的多种均匀,稳定的分级纳米结构。典型的是四种:球状粒子,花状复合囊泡,光滑的圆盘状结构以及错列堆积的片层结构。制备方式中仅仅通过调节溶剂的种类和加水速度来控制最终组装体的形貌。四种纳米结构都具有医用价值,但其中错列堆积的片层结构表现特别突出,血液循环时间最长。相对于传统的球形纳米粒子,非球形纳米结构对肿瘤细胞的毒性更大,而且这些纳米结构本身具有高载药量 ($>50wt\%$)。

[0035] 附图说明书

[0036] 图 1:基于聚合前药两性分子 $PEG_{45}-b-PCPTM_{52}$ (其中下标数字“45”表示 PEG 的聚合度,而“52”表示 CPTM 的聚合度)制备的四种典型纳米组装结构(即纳米粒子)的透射电镜(TEM:a, b, c, e)和扫描电镜(SEM:d, f)照片:a,球状;b,圆盘状结构;c 和 d,错列堆积片层结构;e 和 f,花状复合囊泡结构。

[0037] 图 2:根据实施例 5 的错列堆积片层结构的低倍 SEM 照片。

[0038] 图 3:根据实施例 7 以聚合前药两性分子 $PEG_{45}-b-PCPTM_{24}$ 制备的四种典型纳米组装结构的透射电镜(TEM:a, b, c, e)和扫描电镜(SEM:d, f)照片:a,圆盘状结构;b,球状;c 和 d,错列堆积片层结构;e 和 f,花状复合囊泡结构。

具体实施方式

[0039] 本发明涉及一类抗癌药物喜树碱的聚合前药两性分子的分级纳米结构调控及生物应用。通过溶液中分子自组装的调控技术,聚合前药两性分子 $PEG-b-PCPTM$ 可以在没有任何添加剂或模板存在条件下,制备多种均匀,稳定的分级纳米结构。典型的是四种:球状,花状复合囊泡,光滑圆盘状结构以及错列堆积片层纳米结构。这些纳米结构本身具有高载药量 ($>50wt\%$),其中错列堆积的片层结构和圆盘状结构相对于球状结构显示出更加优越的生物应用前景。

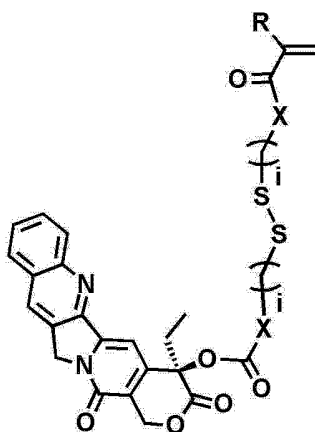
[0040] 本发明通过研究还原性响应喜树碱聚合前药两性分子 $PEG-b-PCPT$ 的纳米结构调

控规律,实现了对聚合前药两性分子复杂纳米结构调节控制。本发明基于发明人已合成制备的喜树碱聚合前药两性分子 PEG-b-PCPTM,通过分子自组装调控技术,可以组装得到四种均一,稳定的纳米结构,包括球状粒子,花状复合囊泡,光滑的圆盘状结构以及错列堆积片层结构。研究了四种不同纳米结构的生物功能。其中,错列堆积片层结构表现特别突出,血液循环时间最长。此外,相对于球形纳米粒子,非球形纳米结构对肿瘤细胞的毒性更大,具有更好的医学应用前景。

[0041] 优选地,本发明中使用的式 I 还原性响应喜树碱聚合前药两性分子通过以下方式获得:

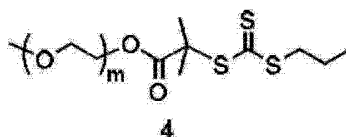
[0042] 使下式的还原性响应喜树碱前药单体

[0043]



[0044] 与式 4 的链转移剂

[0045]

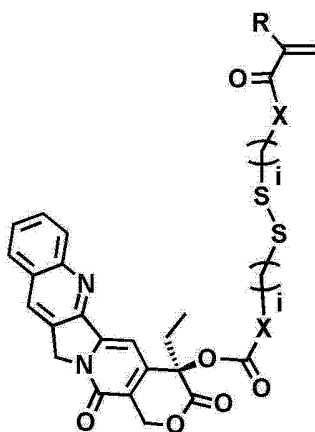


[0046] 在有机溶剂中, AIBN 引发剂存在下,温度控制在 60-90℃,反应 6-100h,然后通过无水乙醚沉淀制得;

[0047] 或者

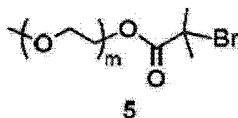
[0048] 使下式的还原性响应喜树碱前药单体与

[0049]



[0050] 与式 5 的链转移剂

[0051]



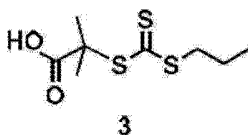
[0052] 在有机溶剂中, CuBr 和 PMDETA 催化下在 60-90℃, 反应 6-100h, 然后通过无水乙醚沉淀制得,

[0053] 其中 i、X、R 和 m 如上所定义。

[0054] 在一个优选实施方案中, 所述式 4 的链转移剂通过以下获得:

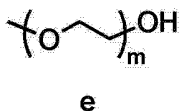
[0055] 使式 3 的化合物

[0056]



[0057] 与式 e 的聚乙二醇单甲醚

[0058]



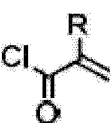
[0059] 在催化剂存在下, 在有机溶剂中反应, 其中 m 如上所定义。

[0060] 在一个优选实施方案中, 所述催化剂是 N, N-二甲氨基吡啶 (DMAP) 和二环己基碳二亚胺 (DCC), 所述有机溶剂是二氯甲烷、氯仿、四氢呋喃、乙酸乙酯、甲苯、乙腈或其混合物。

[0061] 在一个优选实施方案中, 所述式 e 中的聚乙二醇单甲醚的数均分子量为 200-18000, 即 m=4-400。

[0062] 优选地, 上述还原性响应喜树碱前药单体通过以下方法获得, 所述方法包括以下步骤:

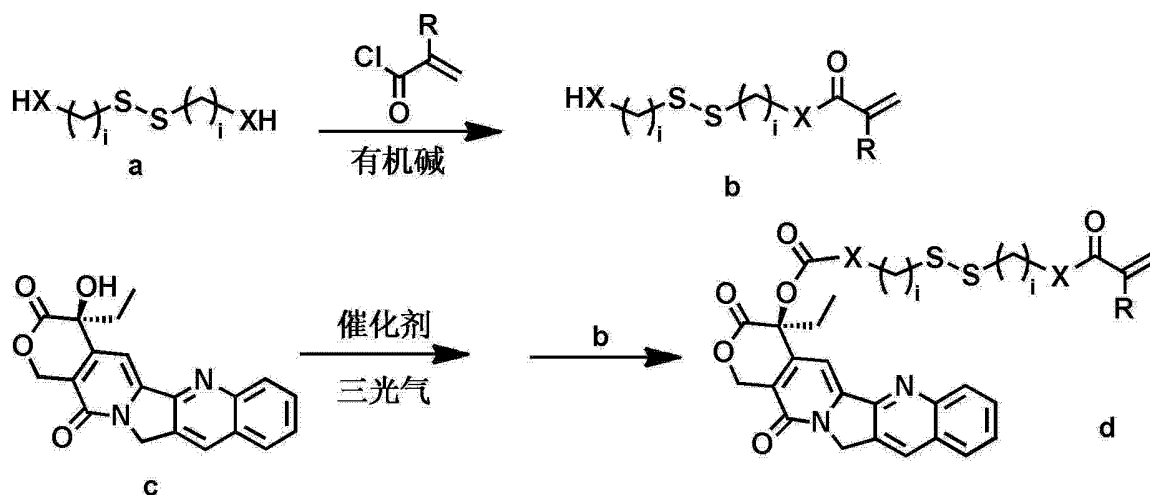
[0063] (1) 使式 a 的二硫醚前体在有机碱催化剂 (如三乙胺) 存在下, 在有机溶剂 (如

四氢呋喃, 二氯甲烷, 甲苯, 乙腈等) 中与  反应以制备式 b 的二硫醚的单端官能化产

物; 和

[0064] (2) 使式 c 的喜树碱原药在催化剂 (如 N, N-二甲氨基吡啶) 存在下, 在有机溶剂中与三光气反应生成酰氯中间体, 其与所述式 b 的化合物反应制得所述含有二硫键的还原性响应喜树碱前药单体 d,

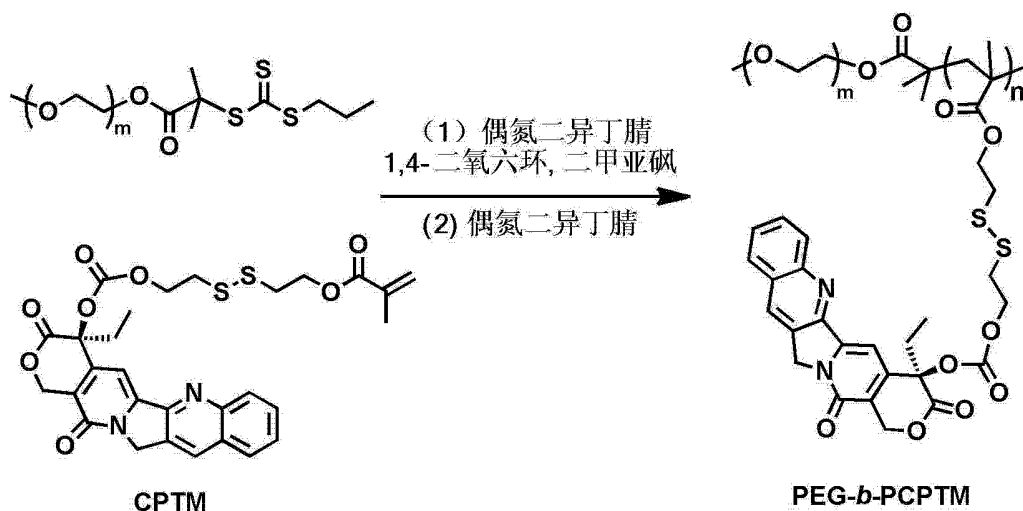
[0065]



[0066] 其中 i、X 和 R 如上所定义。

[0067] 在一个更具体的实施方案中,首先,如以下方案 1 所示,制备基于喜树碱的聚合前药两性分子 PEG-b-PCPTM。在聚乙二醇单甲醚大分子链转移剂(分子 1)存在下,在 1,4-二氧六环和 DMSO 的混合溶剂中,偶氮二异丁腈(AIBN)引发喜树碱前药单体(CPTM)高转化率聚合得到 PEG-b-PCPTM 聚合前药两性分子:

[0068]



[0069] 方案 1:还原性响应喜树碱单体 CPTM 及其聚合前药两性分子 PEG-b-PCPTM。

[0070] 其次,基于所制得的 PEG-b-PCPTM,对其纳米结构进行调控。具体地,例如,将所得到的 PEG-b-PCPTM 溶解在有机溶剂中,采用流动注射泵控制加水速度向上述有机溶液中滴加超纯水,其中 CPTM 嵌段溶解性逐渐降低,坍塌为内核,发生组装,亲水链 PEG 在外围起到稳定作用。控制组装条件,特别是改变初始共溶剂种类、加水方式和速度等,可以得到多种形貌的纳米结构。

[0071] 最后,以上述合成的 PEG-b-PCPTM 制备本发明具有不同形状的纳米粒子,具体地,例如:

[0072] (1) 球状纳米粒子制备:先将聚合前药两性分子 PEG-b-PCPTM 在溶解有机溶剂如 DMSO, DMF 或者其任意比例混合溶剂中。聚合前药两性分子浓度范围为 0.1mg / mL ~ 1000mg / mL。然后将有机溶液快速(例如在 0.5-5h)加入到水中,水的体积为初始有机溶剂体积的 4 ~ 1000 倍,然后透析除去有机溶剂,所制备的球状纳米粒子直径范围为:10 ~

1000nm。

[0073] (2) 圆盘状纳米结构制备:先将聚合前药两性分子 PEG-b-PCPTM 在溶解有机溶剂如 DMSO, DMF 或者其任意比例混合溶剂中。聚合前药两性分子浓度范围为 0.1mg / mL ~ 1000mg / mL, 然后加入 4 ~ 1000 倍体积的水, 滴加水的总时间为 0.5 ~ 5h。然后透析除去有机溶剂, 所制备的圆盘状纳米粒子直径范围为:50 ~ 800nm。

[0074] (3) 错列堆积片层纳米结构制备:先将聚合前药两性分子 PEG-b-PCPTM 在共溶剂中。共溶剂为纯的 1,4- 二氧六环或者总含量不低于 70% 的 1,4- 二氧六环和其它溶剂的混合溶剂。聚合前药两性分子浓度范围为 0.1mg / mL ~ 1000mg / mL, 然后加入 4 ~ 1000 倍体积的水, 滴加水的总时间为 0.5 ~ 5h。然后透析除去有机溶剂, 所制备的错列堆积的片层纳米结构表面很多突起的片层微结构, 类似花样结构, 粒子直径范围为:200 ~ 1000nm。

[0075] (4) 花状复合囊泡纳米结构的制备:先将聚合前药两性分子 PEG-b-PCPTM 溶解在共溶剂中。共溶剂为纯的 1,4- 二氧六环或者总含量不低于 70% 的 1,4- 二氧六环和其它溶剂的混合溶剂。聚合前药两性分子浓度范围为 0.1mg / mL ~ 1000mg / mL, 然后加入 4 ~ 1000 倍体积的水, 滴加水的总时间为 10h 以上。然后透析除去有机溶剂。所制备的粒子很多小囊泡微结构和相互贯穿交错的空腔微结构特征。复合囊泡纳米粒子直径范围为:500 ~ 3000nm。

[0076] 例如, 图 1 显示了基于聚合前药两性分子 $\text{PEG}_{45}\text{-b-PCPTM}_{52}$ (其中下标数字“45”表示 PEG 的聚合度, 而“52”表示 CPTM 的聚合度) 制备的四种典型纳米组装结构的透射电镜 (TEM :a, b, c, e) 和扫描电镜 (SEM :d, f) 照片。如图 1 所示, 具有代表性的有四种, a. 球状结构; b. 圆盘状结构; c 和 d. 错列堆积片层结构; e 和 f. 花状复合囊泡。

[0077] 在本发明中, 比较研究四种不同纳米结构聚合前药两性分子聚集体的性质, 如生物体内血液循环, 体外抗癌活性及还原性响应性释放喜树碱原药。

[0078] 实施例

[0079] 下面结合具体实施例对本发明做进一步说明。实施例中所用原料说明如下:

[0080] 聚乙二醇单甲醚 (PEG-OH), 喜树碱 (CPT), 二硫苏糖醇 (DTT), 羟乙基二硫醚购自 Sigma-Aldrich 公司, 使用时未进一步纯化。偶氮二异丁腈 (AIBN) 购自 Acros 并用 95% 乙醇重结晶纯化。二氯甲烷用氯化钙干燥, 然后蒸馏纯化。四氢呋喃用钠丝干燥回流, 蒸馏后使用。N,N'-二甲氨基吡啶 (DMAP), 二环己基碳二亚胺 (DCC), 乙醚, 乙酸乙酯等其他试剂均为分析纯, 均购自国药集团化学试剂有限公司, 未进一步纯化直接使用。实验中所用的超纯水均由 Milli-QSP 智能超纯水系统制备, 电阻率为 18.4MΩ·cm。采用两种不同的疏水端聚合度的样品 $\text{PEG}_{45}\text{-b-PCPTM}_{52}$ 和 $\text{PEG}_{45}\text{-b-PCPTM}_{24}$ 为例进行纳米结构调控说明。

[0081] 以下实施例将对本发明作进一步说明, 采用 $\text{R}=\text{CH}_3$, 聚乙二醇 (PEG) 分子量为 2000, $m=\sim 45$ 为例说明, 其目的仅在于更好地理解本发明, 而不是限制本发明的保护范围。

[0082] 实施例 1: 还原性响应喜树碱聚合前药两性分子 $\text{PEG}_{45}\text{-b-PCPTM}_{52}$ 制备

[0083] 将聚乙二醇大分子链转移剂 (46mg, 0.02mmol), CPTM (632mg, 1.06mmol) 和 AIBN (0.33mg, 0.002mmol), 6mL 1,4- 二氧六环和二甲基亚砜 (体积比 =1:1) 的混合物加入到安瓿瓶中溶解。将安瓿瓶置于液氮中冷冻 后用油泵抽气, 然后密闭安瓿瓶, 恢复到室温使反应混合物融化, 然后再冷冻抽气, 如此冻融循环反复操作三次, 然后在真空下密封, 在 70℃ 下搅拌反应 24h 后用液氮中止聚合反应, 打开反应瓶, 将反应后混合物在乙醚中沉淀,

离心,再溶解在氯仿中,加入 AIBN(20 倍于大分子链转移剂当量),60℃下搅拌反应 6h 去除链末端链转移剂。然后再用乙醚沉淀,反复三次,最终产物在真空干燥箱中室温过夜干燥,得到灰色粉末(654.9mg,产率:96.6%)。采用前专利所述方法计算 CPTM 的聚合度为 52,将其表示为 PEG₄₅-b-PCPTM₅₂,数均分子量 $M_n=32600$ 。载药量定义为:

[0084] 载药量 $DLC\% = [W_{\text{药物}}] / [(W_{\text{药物}}) + (W_{\text{载体}})] \times 100\%$

[0085] 其中 $W_{\text{药物}}$ 表示药物的总质量, $W_{\text{载体}}$ 表示载体(非药物部分)质量。因此,PEG₄₅-b-PCPTM₅₂ 的载药量为 54.4wt%。

[0086] 实施例 2

[0087] 如实施例 1 所述,所不同的是 CPTM 投料量为 291.7mg,得到聚合前药两性分子 331.9mg,产率为 98.3%,根据 ¹H NMR 分析,CPTM 的聚合度为 24,将其表示为 PEG₄₅-b-PCPTM₂₄,数均分子量 $M_n=15900$,载药量为 50.3%。

[0088] 实施例 3:具有球状纳米结构的 PEG-b-PCPTM 的制备

[0089] 称取 2mg PEG₄₅-b-PCPTM₅₂ 溶解在 1mL 共溶剂二甲亚砜(DMSO)中(2mg / mL),在 1000rpm 条件下搅拌,将该溶液一次性快速注入到 9mL 水中。溶液继续搅拌 2 小时,然后将溶液转移到透析膜对水透析以除去 DMSO(截留分子量:3500),对纯水透析,并多次换水。TEM 照片如图 1a 所示,制得球状纳米粒子,TEM 测得直径为 ~ 43nm。

[0090] 实施例 4:具有圆盘状纳米结构的 PEG-b-PCPTM 的制备

[0091] 称取 2mg PEG₄₅-b-PCPTM₅₂ 溶解在 1mL 二甲亚砜(DMSO)共溶剂中(2mg / mL),恒温 25℃,1000rpm 条件下搅拌,将 9mL 水以 8mL / h 加入上述有机溶液中。水加完后,溶液继续搅拌 2 小时,然后将溶液转移到透析膜中对水透析除去有机溶剂(截留分子量:3500),对水透析,并多次换水。TEM 照片如图 1b 所示,粒子表面电子密度均匀,表明制得圆盘状纳米粒子。TEM 测得直径为 ~ 180nm。

[0092] 实施例 5:具有错列堆积片层纳米结构的 PEG-b-PCPTM 的制备

[0093] 称取 2mg PEG₄₅-b-PCPTM₅₂ 溶解在 1mL 1,4-二氧六环共溶剂中(2mg / mL),恒温 25℃,1000rpm 条件下搅拌,将 9mL 水以 8mL / h 加入其中。水加完后,溶液继续搅拌 2 小时,然后将溶液转移到透析膜中对水透析除去有机溶剂(截留分子量:3500),对水透析,并多次换水。TEM 照片如图 1c 所示,粒子表面很多突起的微结构。从图 1d 的 SEM 特写图可以看出,所制备的纳米粒子是由很多错列堆积的片层结构组成,类似一种花样结构,TEM 测得直径为 ~ 300nm。图 2 显示错列堆积片层结构的低倍 SEM 照片,如图 2 所示,低倍 SEM 图片可以看出该种纳米结构组装体大小均匀分散,可控性极强,这是高分子溶液自组装非常罕见的现象。实施例 6:具有花状复合囊泡结构的 PEG-b-PCPTM 的制备

[0094] 称取 2mg PEG₄₅-b-PCPTM₅₂ 溶解在 1mL 1,4-二氧六环共溶剂中(2mg / mL),恒温 25℃,1000rpm 条件下搅拌,将 9mL 水以 0.5mL / h 加入其中。水加完后,溶液继续搅拌 2 小时,然后将溶液转移到透析膜中对水透析以除去有机溶剂(截留分子量:3500),对水透析,并多次换水。TEM 照片如图 1e 所示,粒子表面很多突起的小囊泡结构。从图 1f 的 SEM 图可以看出,所制备的纳米粒子是由很多突起的小囊泡围绕一个贯穿的内腔组成,纳米粒子总体类似一种花状复合囊泡,TEM 测得直径为 ~ 800nm。

[0095] 实施例 7:基于 PEG₄₅-b-PCPTM₂₄ 聚合前药两性分子制备的四种纳米粒子

[0096] 分别采用实施例 3 ~ 6 所述的程序,只是改用另一个聚合度的聚合前药两性分子

PEG₄₅-b-PCPTM₂₄ 来制备四种不同结构的纳米粒子。如图 3a 所示,圆盘状粒子,TEM 测得直径为 $\sim 110\text{nm}$ 。如图 3b 所示,球状纳米粒子 TEM 测得直径为 $\sim 36\text{nm}$ 。如图 3c 和 d 所示,错列堆积的片层结构,TEM 测得直径为 $\sim 360\text{nm}$ 。如图 3e 和 f 所示,花状复合囊泡结构,TEM 测得直径为 $\sim 980\text{nm}$ 。

[0097] 实施例 8:四种纳米结构组装体的活体血液循环测试

[0098] 健康雄性大鼠($\sim 300\text{g}$, 10 周)购自安徽医科大学动物实验中心。动物实验遵从《实验动物护理和使用指南》规定,并获得中国科学技术大学动物护理和使用委员会批准。将四种由 PEG₄₅-b-PCPTM₅₂ 制备的不同组装体溶液($10\text{mg} / \text{kg}$ CPT 等效浓度)从尾静脉注入。在实验设定的取血时间点,从老鼠眼窝静脉取血 $\sim 0.1\text{mL}$,转移到含有肝素钠的试管中 4°C 保存。采集完所有数据点后,处死实验鼠。将所得血样 1000rpm 离心 10min 获取血清样品,加入过量二硫苏糖醇(DTT)和 9 倍体积的乙腈,混合后室温保持 12h ,最后用高效液相色谱测定 CPT 含量。血液循环半衰期($t_{1/2}$)采用已知的药代动力学一阶衰减拟合方法得到。每个实验条件下平行采集三只老鼠数据并计算标准偏差。实验结果在表 1 中列出。如表 1 所示,上述四种结构的半衰期相对于 CPT 原药均有改善。而且,本发明的发明人进一步验证了关于圆盘状结构具有长血液循环的特征。发现错列堆积片层结构组装体比圆盘状具有更好的血液长循环优势,这进一步说明构筑功能性的复杂纳米结构的重要性,复杂纳米结构往往会有比现有体系更加明显的优势。相对于球状纳米结构的血液循环时间,错列堆积片层结构组装体具有最长的血液循环半衰期(7.62h),显著优于其它三种结构光滑盘状(2.92h)、复合囊泡(0.64h)以及球状胶束(0.53h)的组装体。错列堆积片层结构组装体和光滑盘状优越的循环效果可能是由于它们与血红细胞结构的相似性,同时尺寸上比血红细胞更小。在诊疗医学领域,持久的血液循环非常重要。临床研究表面球状载体在人体内的循环时间是老鼠的三倍。因此,可以估算出错列堆积片层结构和圆盘状结构组装体在人体内的循环时间,它们都具有长的血液循环特点,在生物医学领域有重要应用前景。

[0099] 表 1:不同纳米结构的血液循环半衰期和 HepG2 细胞毒性

[0100]

纳米结构	$t_{1/2}(\text{h})$	$\text{IC}_{50}(\mu\text{g}/\text{mL}^{-1})$
CPT 原药	/	1.63
球状	0.53	6.8
花状复合囊泡	0.64	2.91
圆盘状	2.92	4.15
错列堆积片层	7.62	1.82

[0101] 实施例 9:四种纳米结构组装体的体外药物释放

[0102] 将 $0.1\text{g}/\text{L}$ 四种聚合前药两性分子 PEG₄₅-b-PCPTM₅₂ 纳米组装体溶液包括球状,光滑盘状结构,复合囊泡和错列堆积片层结构分别装入透析袋中(截留分子量: 3500),然后将透析袋置于含有不同 DTT 浓度(0mM 或 10mM)的 PBS 缓冲液中,设定 $\text{pH}7.4$,恒温 37°C 。然后定时取透析外溶液测试,并补充等体积相同 DTT 浓度的新鲜 PBS 缓冲液到透析液中。用高效液相色谱来定量喜树碱药物释放的速率(检测波长 370nm)。

[0103] 如表 2 所示,体外药物释放实验发现在中性条件下(0mM DTT),四种纳米结构都表现出低于 3% 的总药物释放量,表明四种纳米结构在血液循环中都有防止喜树碱药物泄露功能。聚合前药两性分子 PEG-b-PCPM 组装得到多种纳米结构中,CPT 药物基元处于疏水的内核或囊泡的双层膜或层状的结构双层膜中,因此可以有效地防止 CPT 从闭环向开环结构

转变,有利于药物稳定性提高。

[0104] 采用 10mM DTT 模拟肿瘤细胞内部还原性微环境,与组装体共培养 24h,球状结构释放总药量达到~ 81.6%,花状复合囊泡达到~ 70.1%,光滑盘状达到~ 77.3%,错列堆积片层结构达到~ 64.5%。四种纳米结构都能实现比较好的响应性释放。含 CPTM 嵌段的聚合前药两性分子的还原性响应释放药物的机制为,侧链 CPTM 上的二硫键在还原性环境中可以断裂,产生巯基的中间体,然后与碳酸酯键发生分子内亲核取代,生成五元环硫内酯,同时释放 CPT 原药。因此含二硫键功能化的 CPTM 嵌段的聚合前药两性分子都表现出很好的还原性响应释放药物特点。

[0105] 表 2:不同纳米结构在不同环境中喜树碱原药的累积释放量

[0106]

纳米结构	球状	复合囊泡	圆盘状	错列堆积片层
0 mM DTT, 24 h 累积释放量	2.9%	1.8%	2.3%	1.2%
10 mM DTT, 24 h 累积释放量	81.6%	70.1%	77.3%	64.5%

[0107] 实施例 10:四种纳米结构组装体的抗癌活性比较

[0108] 通过 MTT 法评估四种不同纳米结构对人肝癌细胞 HepG2 的毒性。HepG2 细胞先在细胞培养箱中培养两天,然后将细胞接种在 96 孔培养板中,初始密度为~ 5000 个细胞 / 孔。在 DMEM 培养基中培养 24h 后更换新鲜的 DMEM 并加入四种组装体的溶液。然后在培养箱中培养 36h 后更换新鲜 DMEM,每孔加入 20 μ L MTT 的 PBS 溶液 (5mg / mL),继续培养细胞 4h 后,去除 DMEM,每孔加入 180 μ L DMSO。用酶标仪测试细胞毒性,检测波长为 570nm。每个实验条件下做四个平行样品并计算标准偏差 (\pm SD)。如表 1 所示,各种纳米结构均具有抗癌活性。此外,相比于其他三种纳米结构,错列堆积片层纳米结构具有和 CPT 原药相当的细胞毒性 (IC_{50}),这进一步反映出错列堆积片层纳米结构作为药物载体的巨大优势。

[0109] 本发明涉及的还原性响应喜树碱聚合前药两性分子不同纳米结构的制备方法,仅通过简单调节有机溶剂的种类以及加水方式和加水速度可控制该聚合前药两性分子最终组装体的形貌,得到四种典型的纳米结构:球状,圆盘状,花状复合囊泡和错列堆积的片层纳米粒子。这些纳米结构本身具有高载药量 (>50wt%),并且相比目前研究最多的球状纳米粒子,错列堆积片层结构的组装体血液循环时间最长,其次是圆盘状纳米粒子。另外,相对于球形纳米粒子,非球形粒子具有更大的肿瘤细胞毒性,本发明所述四种纳米结构(球状,圆盘状,花状复合囊泡和错列堆积的片层纳米粒子)都具有抗癌应用价值,但是非球形结构显示出更加强大的应用前景。

[0110] 本发明通过研究还原性响应喜树碱聚合前药两性分子的纳米结构调控规律,实现对聚合前药两性分子复杂纳米结构调控,探索其生物应用,开拓了抗癌药物载体设计及纳米结构调控的新领域。本发明进一步拓宽了药物传输载体设计的思路,进一步突出了载体纳米结构的重要影响,密切联系功能与形状的关系。

[0111] 以上所述的实施例仅仅是对本发明的优选实施方式进行描述,并非对本发明的范

围进行限定,在不脱离本发明设计精神的前提下,本领域普通技术人员对本发明的技术方案作出的各种变形和改进,均应落入本发明权利要求书确定的保护范围内。

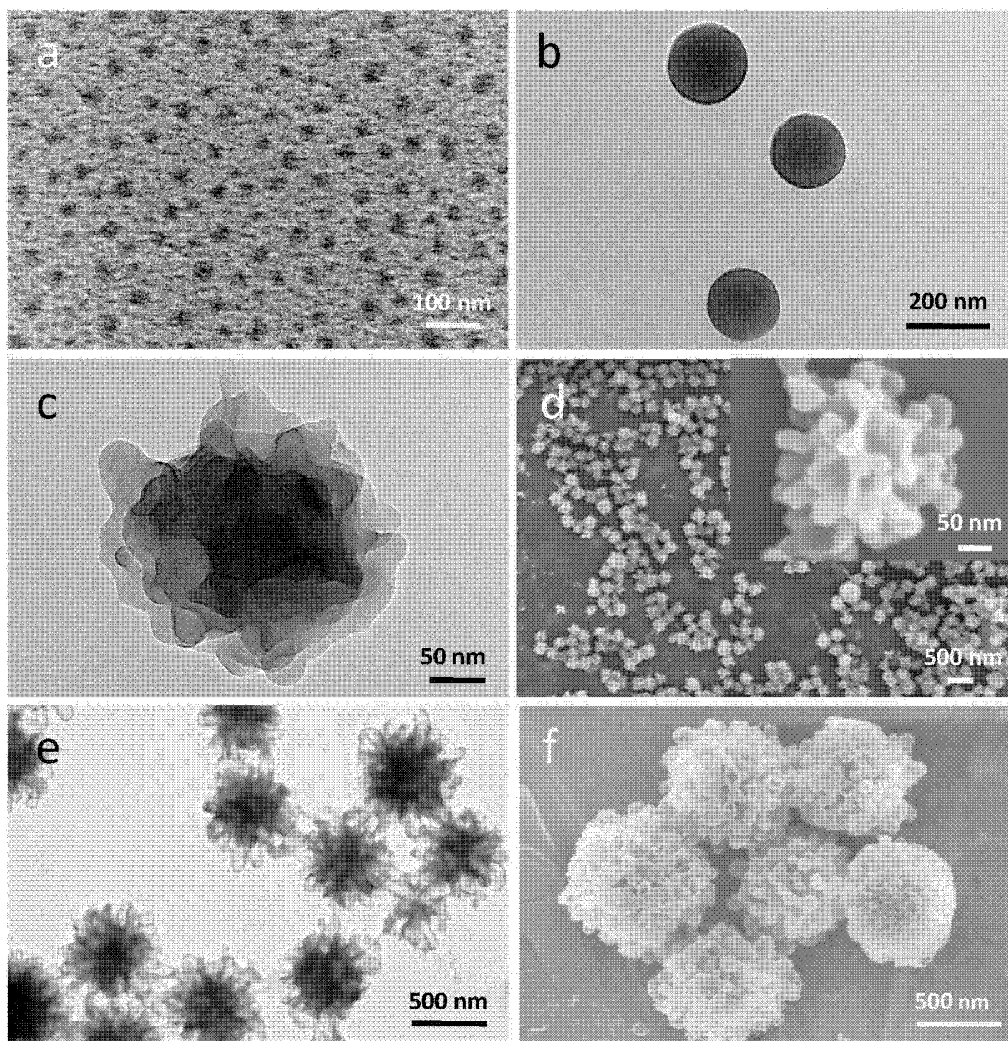


图 1

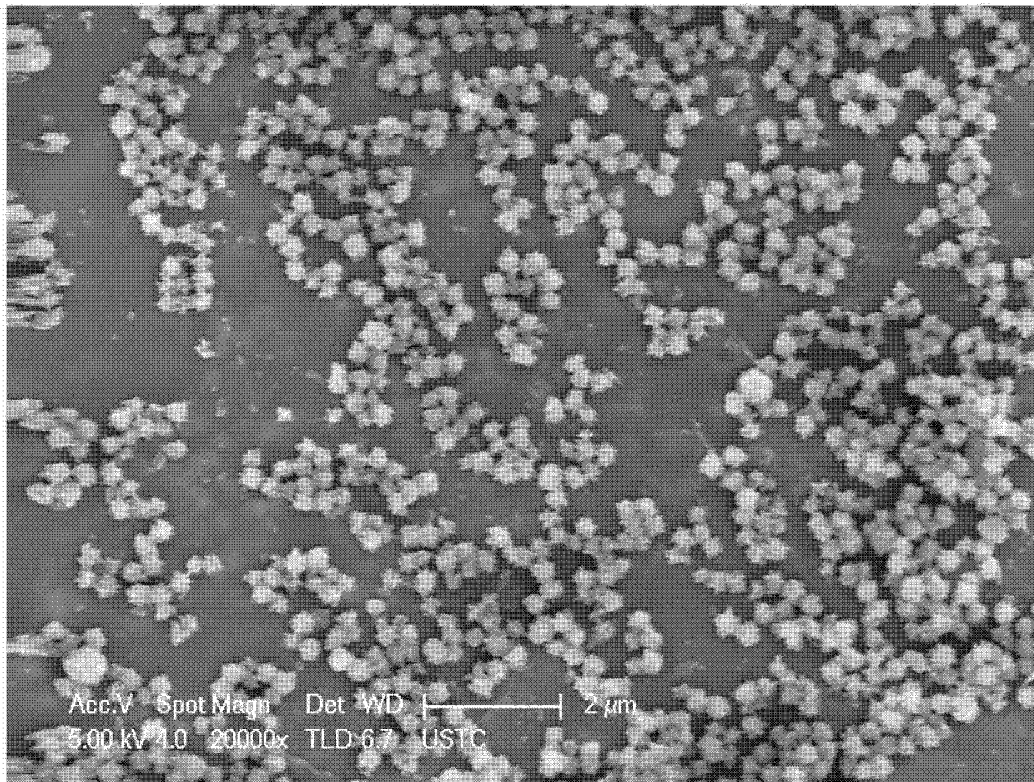


图 2

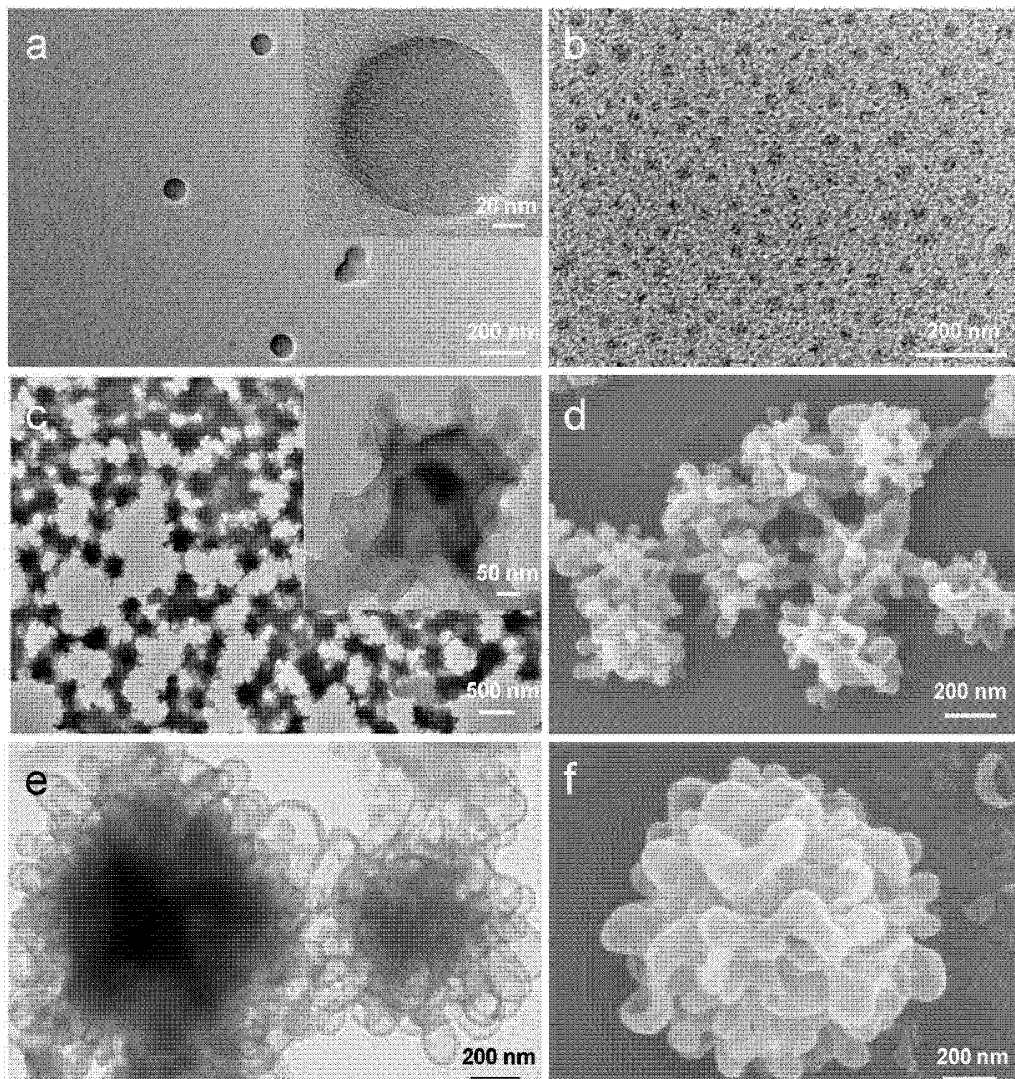


图 3