



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101732727 A

(43) 申请公布日 2010.06.16

(21) 申请号 200910199867.3

(22) 申请日 2009.12.03

(71) 申请人 东华大学

地址 201620 上海市松江区松江新城区人民
北路 2999 号

(72) 发明人 史向阳 沈明武

(74) 专利代理机构 上海泰能知识产权代理事务
所 31233

代理人 黄志达 谢文凯

(51) Int. Cl.

A61K 47/48(2006.01)

A61K 31/565(2006.01)

C08G 69/48(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

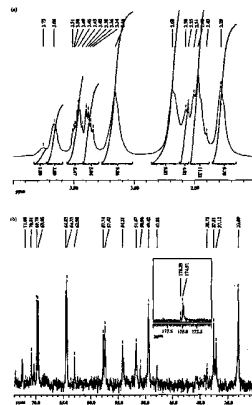
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 6 页

(54) 发明名称

带有末端功能基团的聚酰胺胺树状大分子
/2-甲氧基雌二醇复合物的制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种带有末端功能基团的聚酰胺胺树状大分子 /2-甲氧基雌二醇复合物的制备方法,包括:将聚酰胺胺树状大分子 G5. NH₂溶于有机溶剂中,加入功能化反应物,进行树状大分子末端基团的功能化修饰,反应后去除副产物和多余的反应剂,干燥得到不同末端功能基团的聚酰胺胺树状大分子;然后加入含有 2-甲氧基雌二醇的有机溶剂,混合搅拌,进行对 2-甲氧基雌二醇的包裹,最后经离心、干燥得聚酰胺胺树状大分子 /2-甲氧基雌二醇复合物。本发明的复合物具有不同功能末端的修饰基团,有望用于其它药物的包裹和输送,在药物制剂方面具备较好的应用前景;且制备方法简单,反应条件温和,易于操作,具有产业化实施的前景。



1. 一种带有末端功能基团的聚酰胺胺树状大分子 /2- 甲氧基雌二醇复合物的制备方法, 包括:

(1) 聚酰胺胺树状大分子末端基团的功能化修饰

将聚酰胺胺树状大分子 G5. NH₂ 溶于有机溶剂中, 加入功能化反应物, 室温下反应 24 ~ 48 小时, 进行树状大分子末端基团的功能化修饰, 反应后去除副产物和多余的反应剂, 干燥得末端功能基团的聚酰胺胺树状大分子; 其中, 功能化反应物与 G5. NH₂ 外围氨基的摩尔比为 2 ~ 5 : 1;

(2) 聚酰胺胺树状大分子 /2- 甲氧基雌二醇复合物的制备

在含有 2- 甲氧基雌二醇的有机溶剂中, 加入上述制备的功能化聚酰胺胺树状大分子的水溶液 0.5 ~ 1wt%, 室温下混合搅拌 12 ~ 24 小时, 蒸发去除溶剂, 离心后取上清液, 干燥得聚酰胺胺树状大分子 /2- 甲氧基雌二醇复合物; 其中, 功能化聚酰胺胺树状大分子与 2- 甲氧基雌二醇的摩尔比为 1 : 10 ~ 15。

2. 根据权利要求 1 所述的一种带有末端功能基团的聚酰胺胺树状大分子 /2- 甲氧基雌二醇复合物的制备方法, 其特征在于: 所述步骤 (1) 和 (2) 中的有机溶剂为二甲基亚砜、甲醇。

3. 根据权利要求 1 所述的一种带有末端功能基团的聚酰胺胺树状大分子 /2- 甲氧基雌二醇复合物的制备方法, 其特征在于: 所述步骤 (1) 中的功能化反应物为琥珀酸酐、醋酸酐、环氧丙醇。

4. 根据权利要求 1 所述的一种带有末端功能基团的聚酰胺胺树状大分子 /2- 甲氧基雌二醇复合物的制备方法, 其特征在于: 所述步骤 (1) 中的末端功能基团的聚酰胺胺树状大分子为 G5. SAH、G5. Ac、G5. NGlyOH 或 G5. NH₂。

5. 根据权利要求 1 所述的一种带有末端功能基团的聚酰胺胺树状大分子 /2- 甲氧基雌二醇复合物的制备方法, 其特征在于: 所述步骤 (1) 中的聚酰胺胺树状大分子与有机溶剂的质量体积比为 1 ~ 15mg : 1ml。

6. 根据权利要求 1 所述的一种带有末端功能基团的聚酰胺胺树状大分子 /2- 甲氧基雌二醇复合物的制备方法, 其特征在于: 所述步骤 (1) 中三乙胺与有机溶剂的体积比为 0 ~ 1ml : 30 ~ 50ml。

7. 根据权利要求 1 所述的一种带有末端功能基团的聚酰胺胺树状大分子 /2- 甲氧基雌二醇复合物的制备方法, 其特征在于: 所述步骤 (2) 中的水与有机溶剂的体积比为 4 ~ 6 : 1。

带有末端功能基团的聚酰胺胺树状大分子 /2- 甲氧基雌二醇复合物的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于聚酰胺胺树状大分子复合物的制备领域,特别涉及一种带有末端功能基团的聚酰胺胺树状大分子 /2- 甲氧基雌二醇复合物的制备方法。

背景技术

[0002] 树状大分子是一种新型的高度支化、单分散和合成性的具有精确结构的大分子。可定制的核、内部结构、表面官能团以及与代数相关的几何特性使其成为一个广泛应用于催化、传感器、光学、电子产品、环境修复、药物输送等领域的独特材料。基于树状大分子的纳米医学最新研究进展表明,树状大分子已以两种不同方式应用于药物输送:1) 以树状大分子为平台,共价结合治疗癌症的药物分子;2) 树状大分子或功能化树状大分子在其内部物理封装或络合药物分子,以改善药物的水溶性和生物利用度。前一种方法涉及到将药物分子共价结合到树状大分子表面,形成稳定的树状大分子与药物的共轭物。但是,共轭物一般涉及多步有机反应,因此,必须优化共价共轭化学键,使药物分子在特定的生物条件下被裂解,并释放。后一种方法比较简单,但树状大分子与药物复合物在体内的稳定性则可能是一个非常具有挑战性的问题。这两种方法在研发各种药物制剂的研究中都已经得到了高度重视。

[0003] 可通过用不同功能基团来修饰树状大分子的末端氨基获得理想的树状大分子性能。例如,用乙酰化 PAMAM 树状大分子的外围氨基来避免氨基引起的毒性,用 1,2- 环氧己烷修饰部分 PAMAM 树状大分子的氨基可以得到双亲性的树状大分子,以不同表面功能团功能化的树状大分子为模板合成的有机 / 无机杂化 PAMAM 树状大分子 / 金属纳米粒子则具有不同的性质和应用。如不同表面功能化 PAMAM 树状大分子具有与不同金属离子(如二价铜离子)和质子结合能力,从而提供从废水中去除有毒金属离子的特异性功能。另外,不同功能化的 PAMAM 树状大分子可用于界面自组装,在气水界面形成单分子膜或在平面基体和胶体粒子基体表面形成多层膜,从而在传感器和药物输送系统中提供更多的应用机会。基于树状大分子的多功能纳米器件已证明对癌症的靶向治疗非常有用。大部分树状大分子纳米器件是从表面部分改性的树状大分子开始,同时或者最后取代不同的表面官能团,例如乙酰基,羟基和羧基。

[0004] 药物 2-ME 存在于妇女月经周期中的排卵和黄体期以及怀孕期间的血清中。作为 17- β 雌二醇的代谢产物,2-ME 已经被证实为一种潜在的抗癌物质。当使用临床有效剂量时,2-ME 没有呈现相当大的雌激素活性,它似乎没有促进癌变。此外,在第一 / 二期临床研究发现,它呈现出对肿瘤生长抑制的活性。我们以前的研究表明,通过层层组装法可以将 2-ME 微晶体封装到聚合物多层胶囊中。封装的 2-ME 仍表现出与传统 2-ME 配方(浓缩的乙醇溶液)类似的生物活性。虽然用层层组装法可以得到高载药量的 2-ME,但最终形成的 2-ME 颗粒比较大。据预计,可注射的纳米尺度 2-ME 配方药可以通过封装或络合在修饰了不同表面官能团的树状大分子内部研发出来。这一点对于用于早期的癌症靶向和化学治疗非

常重要。

[0005] 检索国内外有关表面官能团可调制的树状大分子与 2-ME 复合物的合成的相关文献和专利,关于表面官能团可调制的树状大分子与 2-ME 复合物的合成还未见相关报道。

发明内容

[0006] 本发明所要解决的技术问题是提供一种带有末端功能基团的聚酰胺胺树状大分子 /2- 甲氧基雌二醇复合物的制备方法,该复合物具有不同功能末端的修饰基团,有望用于其它药物的包裹和输送,在药物制剂方面具备较好的应用前景;且制备方法简单,反应条件温和,易于操作,具有产业化实施的前景。

[0007] 本发明的一种带有末端功能基团的聚酰胺胺树状大分子 /2- 甲氧基雌二醇复合物的制备方法,包括:

[0008] (1) 聚酰胺胺树状大分子末端基团的功能化修饰

[0009] 将聚酰胺胺树状大分子 G5. NH_2 溶于有机溶剂中,加入功能化反应物,室温下反应 24 ~ 48 小时,进行树状大分子末端基团的功能化修饰,反应后去除副产物和多余的反应剂,干燥得末端功能基团的聚酰胺胺树状大分子;其中,功能化反应物与 G5. NH_2 外围氨基的摩尔比为 2 ~ 5 : 1;

[0010] (2) 聚酰胺胺树状大分子 /2- 甲氧基雌二醇复合物的制备

[0011] 在含有 2- 甲氧基雌二醇的有机溶剂中,加入上述制备的功能化聚酰胺胺树状大分子的水溶液 0.5 ~ 1wt%,室温下混合搅拌 12 ~ 24 小时,蒸发去除溶剂,离心后取上清液,干燥得聚酰胺胺树状大分子 /2- 甲氧基雌二醇复合物;其中,功能化聚酰胺胺树状大分子与 2- 甲氧基雌二醇的摩尔比为 1 : 10 ~ 15。

[0012] 所述步骤 (1) 和 (2) 中的有机溶剂为二甲基亚砜、甲醇;

[0013] 所述步骤 (1) 中的功能化反应物为琥珀酸酐、醋酸酐、环氧丙醇;

[0014] 所述步骤 (1) 中的末端功能基团的聚酰胺胺树状大分子为 G5. SAH、G5. Ac、G5. NGlyOH 或 G5. NH_2 ;

[0015] 所述步骤 (1) 中的聚酰胺胺树状大分子与有机溶剂的质量体积比为 1 ~ 15mg : 1ml;

[0016] 所述步骤 (1) 中三乙胺与有机溶剂的体积比为 0 ~ 1ml : 30 ~ 50ml;

[0017] 所述步骤 (2) 中的水与有机溶剂的体积比为 4 ~ 6 : 1。

[0018] 本发明使用介质辅助的激光脱附离子化飞行时间(质谱)质谱(MALDI-TOF)、尺寸排阻色谱法(SEC)、核磁共振谱(NMR)和高效液相色谱(HPLC)等方法表征本发明制备的表面改性的树状大分子或 2-ME 与表面改性的树状大分子的复合物,同时用 MTT 法和相差显微镜对复合物的细胞生物活性和毒性进行了评估。具体测试结果如下:

[0019] (1)MALDI-TOF 质谱和 SEC 色谱

[0020] 通过 MALDI-TOF 质谱和 SEC 色谱分析,得到了表面改性的第 5 代树状大分子(G5. NGlyOH、G5. NHAc、G5. SAH 和 G5. NH_2) 的分子量数据(如表 1 所示)。参见图 2(图中直线表示所得到的 G5. NGlyOH 和 G5. NH_2 分子量)。

[0021] 表 1. 修饰有不同表面基团的树状大分子及其包裹 2-ME 能力

[0022]

树状大分子	G5. NGlyOH	G5. NHAc	G5. SAH	G5. NH ₂
数均分子量 ^a	38, 382	30, 990	40, 330	26, 010
多分散性 ^a	1. 131	1. 060	1. 054	1. 104
重均分子量 ^b	40955	30065	35111	26462
载药能力 ^c	6. 7	8. 5	7. 2	6. 2

[0023] ^a 由 SEC 测定 ; ^b 由 MALDI-TOF 测定 ; ^c 每个树状大分子包裹的药物分子数。

[0024] (2) NMR 谱

[0025] 核磁共振氢谱和碳谱结果证实了 G5. N(Gly) OH 的结构正确, 参见图 3。

[0026] (3) HPLC 分析

[0027] 采用高效液相色谱法对 2-ME 在第 5 代树状大分子中的有效载荷进行了评估 (参见表 1)。发现不论末端官能团的类型, 每个第 5 代树状大分子可以络合大约 6-9 个 2-ME 分子。冷冻干燥后所得的树状大分子 /2-ME 复合物可以溶于水和 PBS 缓冲液中。在 4℃ 下贮存至少 12 个月溶液依然稳定。

[0028] (4) MTT 法细胞活性评估

[0029] 用 KB 细胞 (人上皮癌细胞) 评估了 2-ME 与第 5 代树状大分子复合物的疗效。2-ME 一般通过诱导细胞的 G2/M 周期阻滞来实施其作用。在细胞培育大约 48 小时后开始出现 G2/M 周期阻滞。因此, 在用第 5 代树状大分子与 2-ME 复合物培育细胞 48 小时后, 采用 MTT 法评估 KB 细胞活力 (参见图 4) 并发现, 和对照组的细胞 (未经处理的细胞) 相比, 纯的 2-ME 和 G5. NH₂/2-ME、G5. NHAc/2-ME、G5. NGlyOH/2-ME 复合物显著地降低了 KB 细胞的活力 (p value < 0. 0001)。相比之下, G5. SAH/2-ME 复合物不显示预期的生物活性。用于溶解 2-ME 的 1 微升乙醇对细胞活力并没有呈现影响 (P = 0. 99)。为了排除可能的树状大分子内在的毒性, 我们对没有络合 2-ME 的末端基团为氨基、乙酰基、羟基和羧基的第 5 代树状大分子也进行了测试。其浓度和 2-ME 复合物中的树状大分子相同。MTT 测定结果表明除了 G5. NH₂ 树状大分子之外, G5. NHAc、G5. SAH 和 G5. NGlyOH 都不显示毒性 (P 分别为 < 0. 0001、0. 22、0. 71 和 0. 99)。这意味着, G5. NH₂/2-ME 复合物的毒性涉及 2-ME 和 G5. NH₂ 两种物质, 而 G5. NHAc/2-ME 和 G5. NGlyOH/2-ME 疗效只与药物 2-ME 有关。G5. SAH/2-ME 复合物的非毒性作用令人感到惊奇 (P = 0. 024)。我们认为, 这可能是由于 G5. SAH 的表面羧基能够和其内部的仲氨基形成很强的离子对作用, 从而使树状大分子空腔结构致密, 即使在细胞溶菌体的环境下 (pH = 5. 5), 也不能释放出药物。与此相反, G5. NHAc/2-ME 和 G5. NGlyOH/2-ME 复合物分别为中性和呈现轻微的正电性, 可能通过两种不同的机制 (细胞吞噬和通过细胞膜的扩散) 被细胞内化。然后, 2-ME 在胞浆中从复合物中分离出来并产生治疗作用。

[0030] 用相差显微镜可视化地跟踪了不同 2-ME/ 树状大分子复合物处理后的细胞形貌变化, 进一步证实了 2-ME/ 树状大分子复合物的药效作用 (参见图 5)。结果表明含有相同 2-ME 浓度 (10 微摩尔 / 升) 2-ME 乙醇溶液 (附图 5e)、G5. NGlyOH/2-ME、G5. NHAc/2-ME 和 G5. NH₂/2-ME 复合物 (附图 5a, 5b 和 5d) 导致了类似的细胞形貌变化。相当部分的细胞变圆了并脱附, 这表面细胞出现了凋亡。相反, 没有 2-ME 处理的对照组的细胞 (附图 5f) 和

1 微升乙醇处理的细胞 (附图 5g) 没有变圆和脱附。另外, 和没有处理过的对照组细胞相比, G5. SAH/2-ME 复合物处理的 KB 细胞没有呈现任何形貌的变化。我们也采用了相同浓度的没有络合 2-ME 的树状大分子处理了 KB 细胞。除 G5. NH₂ 外, 所有其他树状大分子 (G5. NGlyOH, G5. NHAc 和 G5. SAH) 没有表现出任何毒副作用 (附图 6)。这表明了 G5. NGlyOH/2-ME 和 G5. NHAc/2-ME 复合物的生物活性纯粹与药物 2-ME 有关。G5. NH₂ 显示了与表面胺基的局部高浓度有关的内在细胞毒性 (附图说明书 6d)。这些结果与 MTT 法得到的一致。

[0031] 以树状大分子 /2-ME 复合物为配方可以克服水不溶性, 并提高药物生物利用度。预计在体内研究中, 由于树状大分子的保护, 副作用应该大幅度地下降。从本研究中, 我们证明表面电荷略显正电性或接近中性的 G5. NGlyOH/2-ME 和 G5. NHAc/2-ME 复合物应该是改善抗肿瘤治疗的理想药物制剂。分别带有较强的负电和正电荷的 G5. SAH 和 G5. NH₂ 不适合于作为药物输送载体, 因为带负电的 G5. SAH/2-ME 复合物不能有效地输送 2-ME, 而带正电的 G5. NH₂/2-ME 复合物则呈现出 G5. NH₂ 树枝大分子固有的毒性。这表明, 树状大分子的表面电荷明显地影响到药物的疗效。

[0032] 有益效果

[0033] (1) 本发明采用的不同末端基团修饰的树状大分子与 2- 甲氧基雌二醇形成的复合物, 具有可调制的表面电荷, 有望用于其它药物的包裹和输送, 为其在纳米药物制剂方面的应用提供了良好的应用前景;

[0034] (2) 该制备方法简单, 反应条件温和, 易于操作, 具有产业化实施的前景。

附图说明

[0035] 图 1 为本发明的反应机理图;

[0036] 图 2 为本发明制备的羟基化的树状大分子 (G5. N(Gly)OH) 和树状大分子修饰前的 MALDI-TOF 质谱图;

[0037] 图 3 为本发明制备的羟基化的树状大分子 (G5. N(Gly)OH) 的核磁共振氢谱图 (a 图) 和核磁共振碳谱图 (b 图);

[0038] 图 4 为本发明制备的羟基化、羧基化和乙酰基化的树状大分子和 2-ME (10 微摩尔 / 升) 的复合物 (1) G5. NGlyOH/2-ME; (2) G5. NHAc/2-ME; (3) G5. SAH/2-ME; (4) G5. NH₂/2-ME; 表面修饰的树状大分子 (5) G5. NGlyOH; (6) G5. NHAc; (7) G5. SAH; 修饰前的树状大分子 (8) G5. NH₂; 以及溶于 1 微升乙醇溶液中的 2-ME 和 1 微升乙醇处理 48 小时后的 KB 细胞活力 MTT 评估。我们采用平均值 ± 方差形式来表达数据;

[0039] 图 5 为本发明制备的羟基化、羧基化和乙酰基化的树状大分子和 2-ME (10 微摩尔 / 升) 的复合物 (a) G5. NGlyOH/2-ME; (b) G5. NHAc/2-ME; (c) G5. SAH/2-ME; (d) G5. NH₂/2-ME 以及 (e) 溶于 1 微升乙醇溶液中的 2-ME; (f) 不经处理的; (g) 1 微升纯乙醇处理的 KB 细胞的相差显微镜照片;

[0040] 图 6 为本发明制备的羟基化、羧基化和乙酰基化的树状大分子 (a) G5. NGlyOH; (b) G5. NHAc; (c) G5. SAH; (d) G5. NH₂ 处理的 KB 细胞的相差显微镜照片。

具体实施方式

[0041] 下面结合具体实施例, 进一步阐述本发明。应理解, 这些实施例仅用于说明本发明

而不用来限制本发明的范围。此外应理解,在阅读了本发明讲授的内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0042] 实施例 1

[0043] (1) 将 50 毫克的端基为氨基的第五代树状大分子 (G5. NH₂) 溶于 10 毫升的二甲基亚砷溶液中,将琥珀酸酐 (与 G5. NH₂ 外围氨基摩尔比为 2 : 1 或 3 : 1) 溶于 10 毫升的二甲基亚砷溶液中 (末端基团为氨基的树状大分子与琥珀酸酐反应,生成末端基团为羧基的树状大分子),在强力搅拌下混合两种二甲基亚砷溶液,室温下反应 24 小时后,用水透析 3 天 (6 次 4 升) 去除多余的琥珀酸酐和有机溶剂。然后冷冻干燥得到羧基化的树状大分子 (G5. SAH) 固体 (产率 :53.6-75.2%) ;

[0044] (2) 将 10 毫克羧基化的树状大分子 G5. SAH 溶于 1.5 毫升水中,取 10 倍于 G5. SAH 树状大分子摩尔当量的 2-ME 溶于 300 微升甲醇中,然后将二者混合并室温下强力搅拌、过夜、自然蒸发甲醇,离心混合溶液 (7000 转,10 分钟),得到含 G5. SAH/2-ME 复合物的上清液,并收集未包裹的 2-ME 沉淀物,上清液冷冻干燥 3 天,得到 G5. SAH/2-ME 复合物。

[0045] 实施例 2

[0046] (1) 将 0.5 毫升的三乙胺加到溶有 100 毫克 G5. NH₂ 的 10 毫升甲醇溶液中。将与 G5. NH₂ 外围氨基数摩尔比为 2.5 : 1 的醋酸酐溶于 10 毫升甲醇溶液中,在强力搅拌下混合两种甲醇溶液,室温下反应 24 小时后,用旋转蒸发器去除甲醇,将所得物溶于水中并用水透析 3 天 (6 次 4 升) 去除副产品和多余的反应剂,然后冷冻干燥得到乙酰基化的树状大分子 (G5. Ac) 固体 (产率 :91.4-94.2%) ;

[0047] (2) 将 10 毫克乙酰化的树状大分子 G5. Ac 溶于 1.5 毫升水中,取 10 倍于 G5. Ac 树状大分子摩尔当量的 2-ME 溶于 300 微升甲醇中,然后将二者混合并于室温下强力搅拌、过夜、自然蒸发甲醇,离心混合溶液 (7000 转,10 分钟),得到含 G5. Ac/2-ME 复合物的上清液,并收集未包裹的 2-ME 沉淀物。上清液冷冻干燥 3 天,得到 G5. Ac/2-ME 复合物。

[0048] 实施例 3

[0049] (1) 将 0.305 克 G5. NH₂ 溶于 20 毫升甲醇中,在搅拌下逐滴加入溶有 0.418 克环氧丙醇的 10 毫升甲醇溶液 (环氧丙醇 /-NH₂ 摩尔比 = 4.4 : 1),室温下反应 24 小时后,用旋转蒸发器去除甲醇,将所得物溶于水中并用水透析 3 天 (6 次 4 升),去除副产品和多余的反应剂,然后冷冻干燥得到 0.45 克羟基化的 G5. NGlyOH 树状大分子固体 (产率 :93.9%) ;

[0050] (2) 将 10 毫克羟基化的树状大分子 G5. NGlyOH 溶于 1.5 毫升水中,取 10 倍于 G5. NGlyOH 树状大分子摩尔当量的 2-ME 溶于 300 微升甲醇中,然后将二者混合并室温下强力搅拌、过夜、自然蒸发甲醇,离心混合溶液 (7000 转,10 分钟),得到含 G5. NGlyOH/2-ME 复合物的上清液,并收集未包裹的 2-ME 沉淀物。上清液冷冻干燥 3 天,得到 G5. NGlyOH/2-ME 复合物。

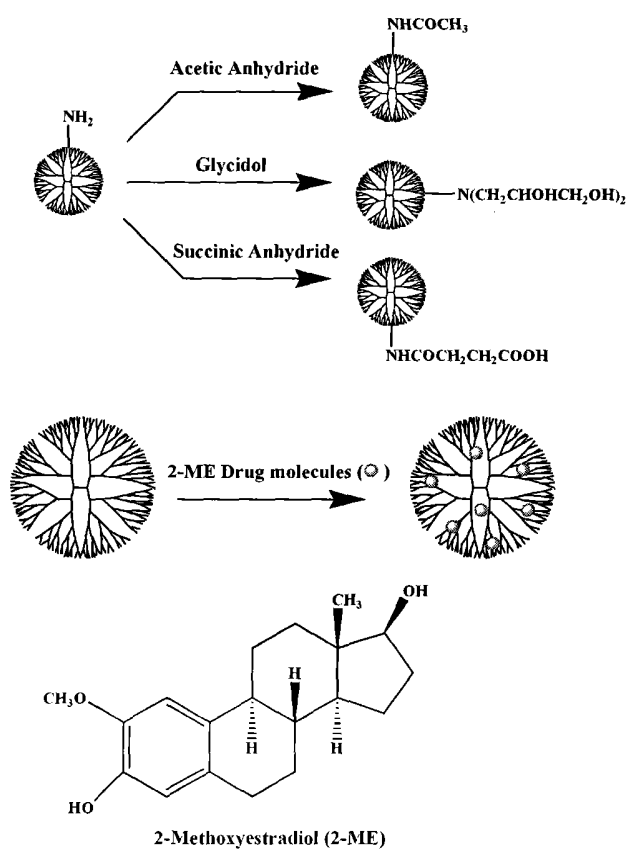


图 1

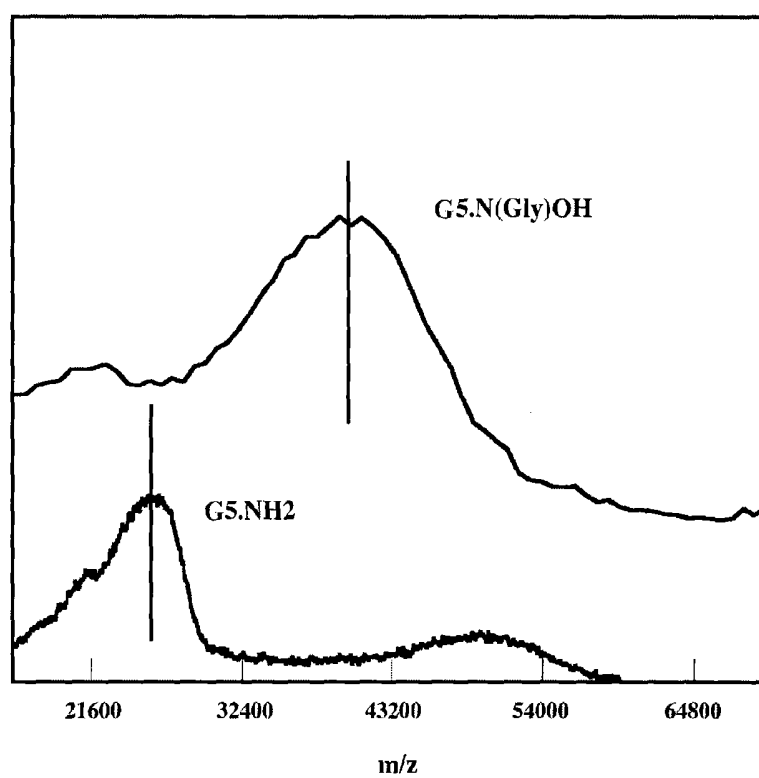


图 2

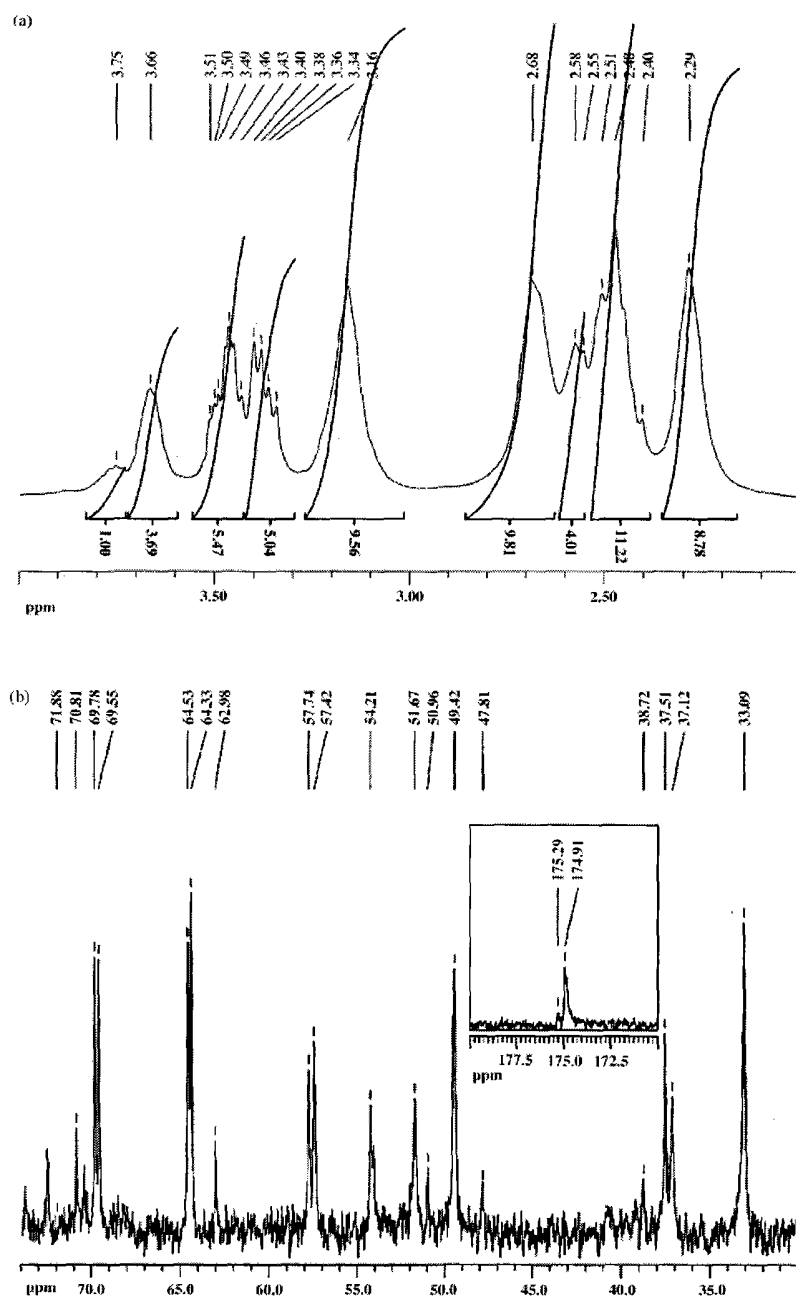


图 3

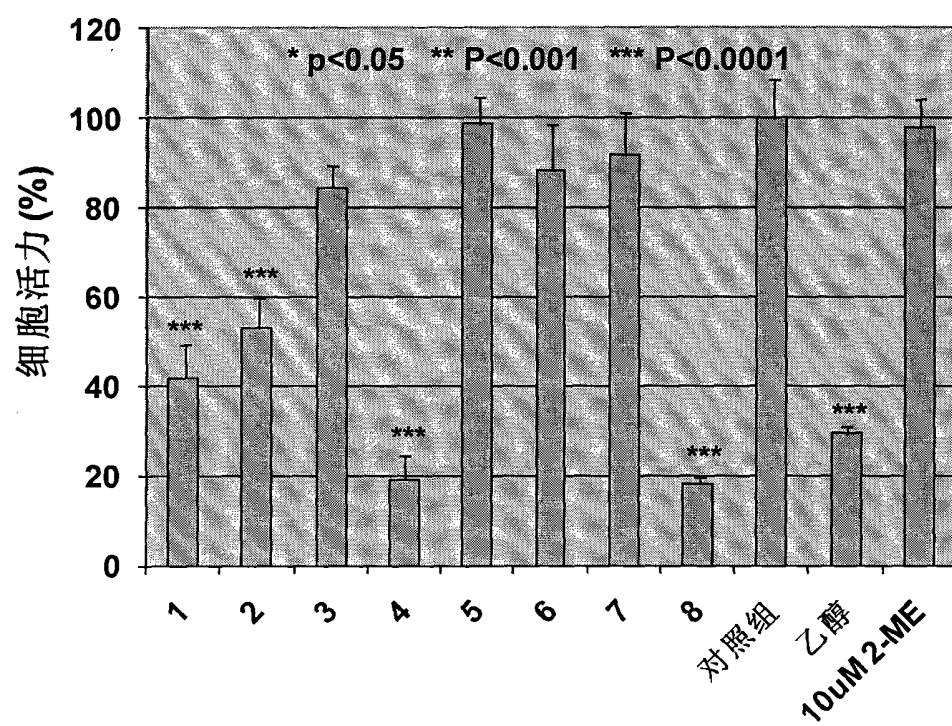


图 4

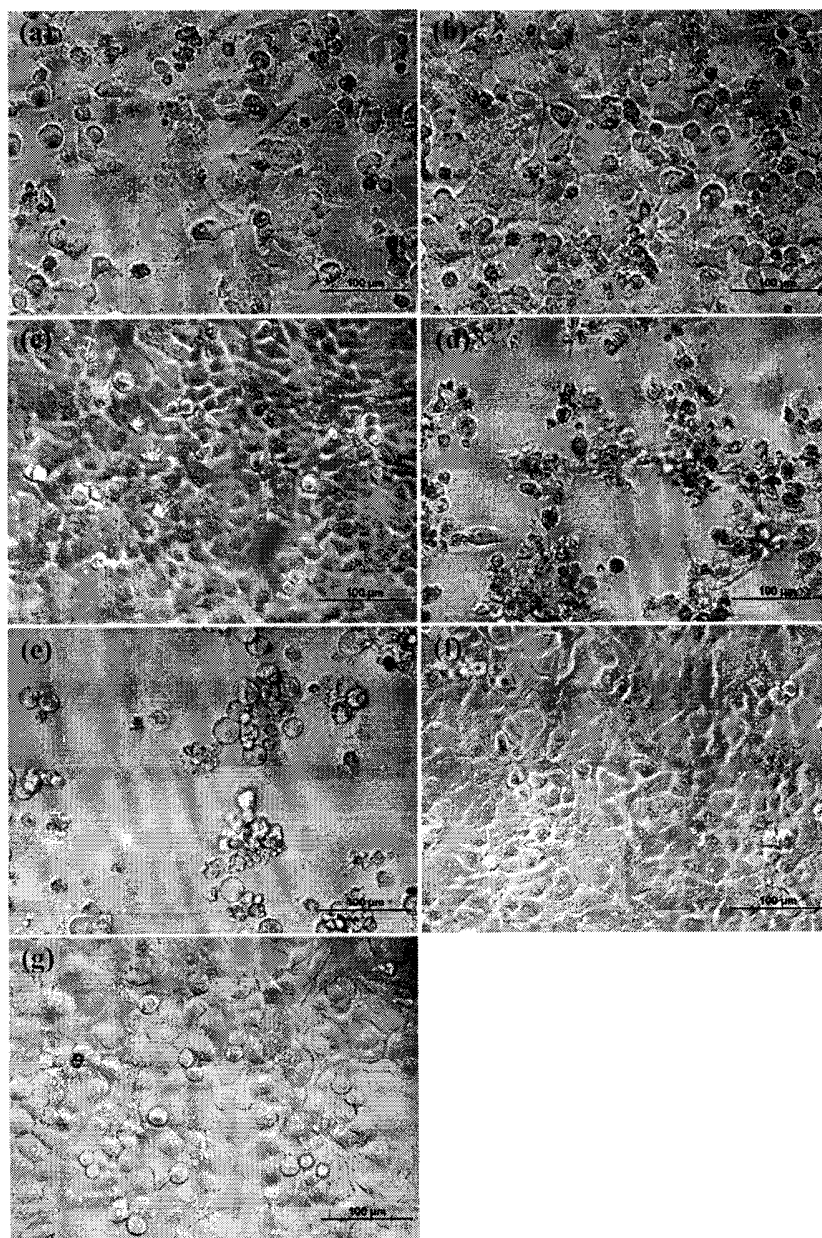


图 5

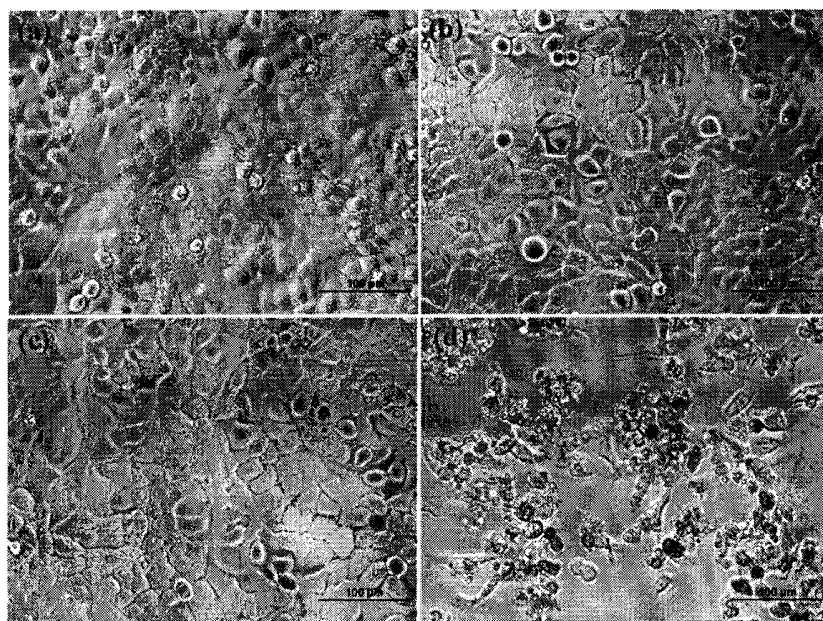


图 6