



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103239718 A

(43) 申请公布日 2013.08.14

(21) 申请号 201310174142.5

A61K 31/704 (2006.01)

(22) 申请日 2013.05.13

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

(71) 申请人 江苏大学

地址 212013 江苏省镇江市京口区学府路
301 号

(72) 发明人 戴晓晖 黄雅菲 王志明 潘建明
闫永胜

(74) 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限
公司 32200

代理人 楼高潮

(51) Int. Cl.

A61K 41/00 (2006.01)

A61K 9/16 (2006.01)

A61K 9/10 (2006.01)

A61K 47/34 (2006.01)

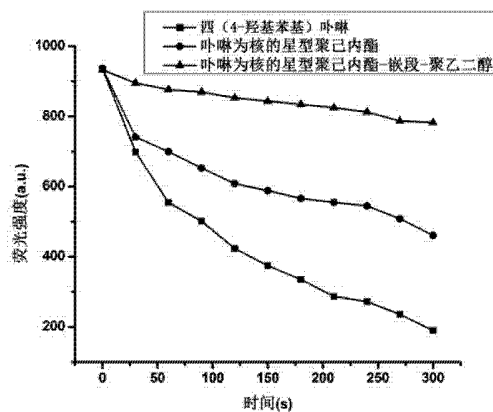
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

负载阿霉素的聚己内酯-嵌段-聚乙二醇纳
米微球的制备方法

(57) 摘要

本发明负载阿霉素的聚己内酯-嵌段-聚乙
二醇纳米微球的制备方法,涉及纳米制备技术领
域。将卟啉为核的聚己内酯-嵌段-聚乙二醇材
料和阿霉素盐酸盐标准品分别用 DMF 溶解,在阿
霉素的 DMF 溶液中加入三乙胺。混合共聚物和阿
霉素溶液,室温下搅拌 24 小时。搅拌下,混合溶液
中逐渐滴加 pH8.4 的磷酸盐缓冲液,在室温下继
续搅拌 24 小时使制备的聚集体平衡。混合溶液在
蒸馏水中透析 72 小时,每隔 12 小时换水一次。制
备得负载阿霉素的共聚物纳米微球。该制备方法
可以通过调节共聚物的支臂长度来控制载药纳米
微球的粒径,且条件温和,操作简单,有望适用于
大规模生产。



1. 负载阿霉素的聚己内酯-嵌段-聚乙二醇纳米微球的制备方法,其特征在于按照下述步骤进行:

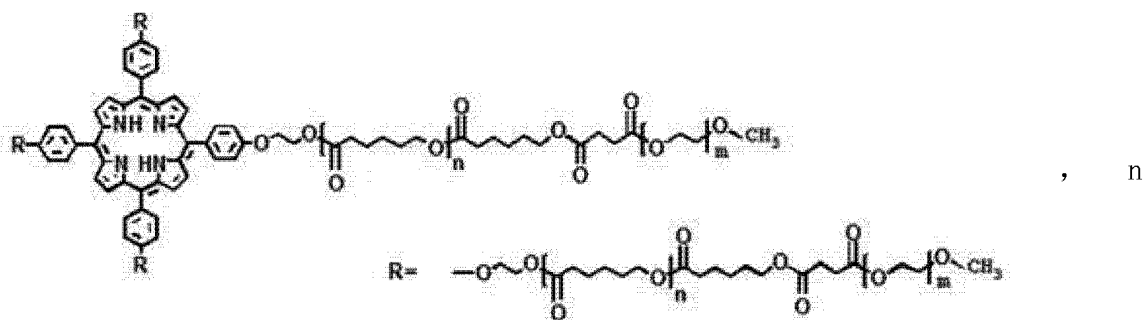
(1) 将卟啉为核的聚己内酯-嵌段-聚乙二醇材料和阿霉素盐酸盐标准品分别用 DMF 溶解,在阿霉素盐酸盐标准品的 DMF 溶液中加入三乙胺;混合共聚物和阿霉素溶液,室温下搅拌 24 小时;

(2) 搅拌下,用微量进样器以 10 微升/分钟的速度向混合溶液中逐渐滴加 pH8.4 的磷酸盐缓冲液,在室温下继续搅拌 24 小时使制备的聚集体平衡;

(3) 混合溶液在蒸馏水中透析 72 小时,每隔 12 小时换水一次;制备得负载阿霉素的共聚物纳米胶束溶液。

2. 根据权利要求 1 所述的负载阿霉素的聚己内酯-嵌段-聚乙二醇纳米微球的制备方法,其特征在于其中步骤(1)中卟啉为核的聚己内酯-嵌段-聚乙二醇材料:阿霉素盐酸盐标准品:DMF:三乙胺的摩尔比为 3:34:969180:5.1。

3. 根据权利要求 1 所述的负载阿霉素的聚己内酯-嵌段-聚乙二醇纳米微球的制备方法,其特征在于其中步骤(1)中卟啉为核的聚己内酯-嵌段-聚乙二醇材料,其分子式为:



表示共聚物中聚己内酯的重复单元数, $n=15-24$; m 表示共聚物中聚乙二醇的分子量, $m=2000-5000$ 。

4. 根据权利要求 1 所述的负载阿霉素的聚己内酯-嵌段-聚乙二醇纳米微球的制备方法,其特征在于其中步骤(2)中磷酸盐缓冲液与混合溶液的体积比为 4:7。

负载阿霉素的聚己内酯-嵌段-聚乙二醇纳 米微球的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种纳米技术领域的制备方法,具体是一种负载阿霉素的聚己内酯-嵌段-聚乙二醇纳米微球的制备方法。

背景技术

[0002] 阿霉素是一种蒽环类抗肿瘤抗生素,易于通过细胞膜,作用于多靶点,所以疗效广泛,具有较强的抗肿瘤活性。在临床上常用来治疗急性白血病、恶性淋巴瘤、乳腺癌、肺癌、胃癌、甲状腺癌、卵巢癌及软组织肿瘤等。在临床治疗过程中,阿霉素有明显的量效关系,即药物剂量越大,疗效越强。但是增加药物剂量同时也增强其对机体的毒副作用,心脏毒性是最主要的毒副作用,是限制阿霉素用量的关键因素。因此,利用两亲性嵌段共聚物在水溶液中的自组装特性,以卟啉为核的聚己内酯-嵌段-聚乙二醇为载体材料,制备负载阿霉素的纳米微球。该载体材料具有良好的生物相容性和肿瘤组织靶向性,使阿霉素在靶器官的浓度增加,在心脏的浓度降低,从而增加疗效,降低毒副作用。且肿瘤细胞对该给药系统的耐受性明显降低,药物摄取率大大提高。此外,这种共聚物纳米微球优化了阿霉素的释放动力学和消除动力学,提高了阿霉素的生物利用度。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于克服现有技术的不足,提供一种负载阿霉素的共聚物纳米微球的制备方法。采用一种卟啉为核的聚己内酯-嵌段-聚乙二醇(4sPCL-b-PEO)杂化材料为药物载体,在水溶液中自组装形成负载阿霉素的纳米微球。该制备方法可以通过调节共聚物支臂长度来控制载药纳米微球的粒径,且条件温和,操作简单,有望适用于大规模生产。

[0004] 本发明是通过以下技术方案实现的,负载阿霉素的聚己内酯-嵌段-聚乙二醇纳米微球的制备方法,按照下述步骤进行:

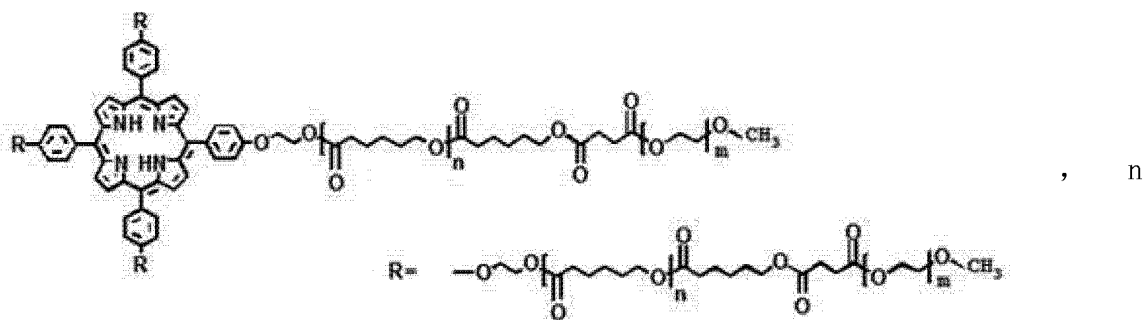
(1) 将卟啉为核的聚己内酯-嵌段-聚乙二醇材料和阿霉素盐酸盐标准品分别用 DMF 溶解,在阿霉素盐酸盐标准品的 DMF 溶液中加入三乙胺;混合共聚物和阿霉素溶液,室温下搅拌 24 小时;

(2) 搅拌下,用微量进样器以 10 微升/分钟的速度向混合溶液中逐渐滴加 pH8.4 的磷酸盐缓冲液,在室温下继续搅拌 24 小时使制备的聚集体平衡;

(3) 混合溶液在蒸馏水中透析 72 小时,每隔 12 小时换水一次;制备得负载阿霉素的共聚物纳米胶束溶液。

[0005] 其中步骤(1)中卟啉为核的聚己内酯-嵌段-聚乙二醇材料:阿霉素盐酸盐标准品:DMF:三乙胺的摩尔比为 3:34:969180:51。

[0006] 其中步骤(1)中卟啉为核的聚己内酯-嵌段-聚乙二醇材料,其分子式为:



表示共聚物中聚己内酯的重复单元数, $n=15-24$; m 表示共聚物中聚乙二醇的分子量, $m=2000-5000$ 。

[0007] 其中步骤(2)中磷酸盐缓冲液与混合溶液的体积比为 4:7。

[0008] 本发明具有如下优点: 1) 采用室温下自组装的方法, 反应温和, 易于操作; 2) 组成载体分子的聚己内酯和聚乙二醇均对机体无毒。3) 载体分子中的卟啉核是一种光敏性物质, 且具有肿瘤组织靶向及损伤作用, 符合肿瘤靶向给药系统的要求。4) 纳米微球的大小可以通过调节载体分子的支臂长度来实现。5) 该共聚物纳米微球的释放具有 pH 依赖性, 在酸性环境中能够快速大量的释放药物, 而在碱性环境中绝大多数药物仍然保留于载体中。机体正常组织的 pH 值为 7.4 左右, 而肿瘤组织的 pH 值为 5-6。所以药物可选择性的在肿瘤细胞中释放, 而对正常组织影响较小。6) 该纳米微球符合抗肿瘤靶向给药系统的要求, 为临床治疗肿瘤疾病提供了一种简单而有效的新途径。

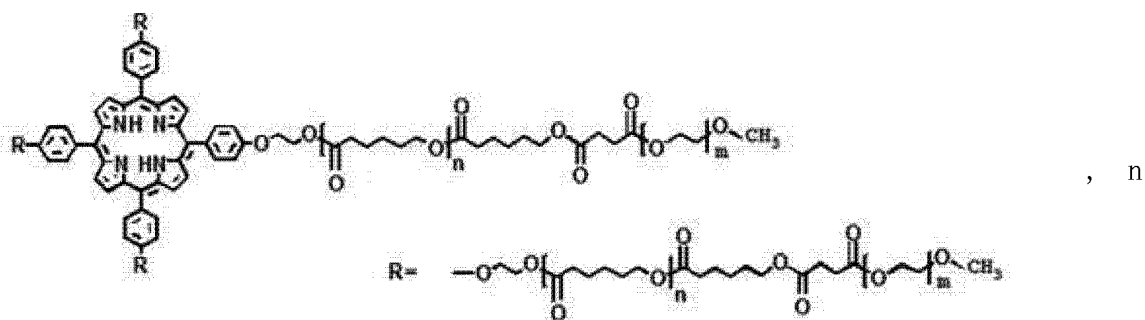
附图说明

[0009] 图 1 为本发明合成路线流程图, 图 2 为四对羟基苯基卟啉、以卟啉为核的聚己内酯和以卟啉为核的聚己内酯嵌段聚乙二醇产生单线态氧能力。

具体实施方式

[0010] 下面对本发明的实施例作详细说明: 本实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施, 给出了详细的实施方式和具体的操作过程, 但本发明的保护范围不限于下述的实施例。

[0011] 本发明实施例的操作路线如图 1 所示。卟啉为核的聚己内酯-嵌段-聚乙二醇材料, 其分子式为:



表示共聚物中聚己内酯的重复单元数, $n=15-24$; m 表示共聚物中聚乙二醇的分子量, $m=2000-5000$ 。

[0012] 实施例 1:负载阿霉素的星型聚己内酯-嵌段-聚乙二醇纳米微球的制备方法:

以 Meso-5, 10, 15, 20-四(4-羟乙基)苯基卟啉为引发剂,辛酸亚锡为催化剂,在 120℃ 下引发 ε-己内酯单体的本体开环聚合,反应时间为 24 小时,得到卟啉为核的四臂星型端羟基化聚己内酯。其次,在环己基碳化二亚胺和 N,N-二甲基氨基吡啶的催化作用下,第一步反应得到的卟啉为核的星型聚己内酯的端羟基与端羧基化聚乙二醇在室温下发生酯化反应,反应时间为 24 小时,制备得以卟啉为核的两亲性四臂星型聚己内酯-嵌段-聚乙二醇共聚物杂化材料。具体步骤如下:加入 ε-己内酯(309mg, 2.71mmol)和四(4-羟乙基)苯基卟啉(34.5mg, 0.045mmol)于干燥的试管中,用翻口塞封口,抽真空通氮气三次后放入 120℃ 恒温油浴锅中磁力搅拌 5 分钟,再用微量进样器加入辛酸亚锡(1.1mg, 2.75mmol)的甲苯溶液,120℃ 下磁力搅拌反应 24 小时。将试管冷却至室温,所得固体溶解于 2mL 的二氯甲烷中,然后沉降于 100mL 冰甲醇中。过滤后得卟啉为核的四臂星型端羟基化聚己内酯(n=15),在 40℃ 下真空干燥至恒重。产量 315.3mg,产率 91.8%。称取卟啉为核的四臂星型端羟基化聚己内酯(n=15)(Mn=7703, 77.0mg, 0.01mmol),端羧基化聚乙二醇(Mn=2000, 90.0mg, 0.045mmol),环己基碳化二亚胺(16.3mg, 0.08mmol)和 N,N-二甲基氨基吡啶(1.9mg, 0.015mmol)溶解于 2.0mL 无水二氯甲烷中,室温氮气流下搅拌反应 24 小时。旋转蒸发掉溶剂,将残渣溶于适量二氯甲烷中,然后沉降于冰乙醚中,过滤得粗产物。粗产物使用乙醚和苯混合溶液(2:1, mol:mol)纯化,得到卟啉为核的聚己内酯-嵌段-聚乙二醇(n=15, m=2000)40℃ 下真空干燥至恒重。产量 151.2mg,产率 96.3%。n=15, m=2000 的嵌段共聚物作为药物载体。将 10.0 mg 载体溶于 6.5mL DMF,取 2 mg (3.4 μmol) 盐酸阿霉素(DOX-HCl)溶于 1mL DMF 并加入 1.5 倍当量的(5.1 μmol) TEA 中和,使之成为疏水状态以利于在纳米粒子生成的过程中进行包载。一段时间后,将两溶液混合搅拌片刻。向溶液中滴加 10mL 的 PBS 溶液(0.1M, pH8.4),搅拌 24h。将混合溶液在 1L 的蒸馏水中透析 72 小时,每 12h 换水一次。最后通过冷冻干燥得到负载阿霉素的星型聚己内酯-嵌段-聚乙二醇纳米微球冻干粉。平均粒径为 52.4nm。pH8.4 的磷酸盐缓冲液滴加入混合溶液中,是因为阿霉素的 pKa=8.4,所以在 pH8.4 的 PBS 溶液中可以得到较高的载药量和包封率。

[0013] 实施例 2:负载阿霉素的星型聚己内酯-嵌段-聚乙二醇纳米微球的制备方法:

以 Meso-5, 10, 15, 20-四(4-羟乙基)苯基卟啉为引发剂,辛酸亚锡为催化剂,在 120℃ 下引发 ε-己内酯单体的本体开环聚合,反应时间为 24 小时,得到卟啉为核的四臂星型端羟基化聚己内酯。其次,在环己基碳化二亚胺和 N,N-二甲基氨基吡啶的催化作用下,第一步反应得到的卟啉为核的星型聚己内酯的端羟基与端羧基化聚乙二醇在室温下发生酯化反应,反应时间为 24 小时,制备得以卟啉为核的两亲性四臂星型聚己内酯-嵌段-聚乙二醇共聚物杂化材料。具体步骤如下:加入 ε-己内酯(309mg, 2.71mmol)和四(4-羟乙基)苯基卟啉(34.5mg, 0.045mmol)于干燥的试管中,用翻口塞封口,抽真空通氮气三次后放入 120℃ 恒温油浴锅中磁力搅拌 5 分钟,再用微量进样器加入辛酸亚锡(1.1mg, 2.75mmol)的甲苯溶液,120℃ 下磁力搅拌反应 24 小时。将试管冷却至室温,所得固体溶解于 2mL 的二氯甲烷中,然后沉降于 100mL 冰甲醇中。过滤后得卟啉为核的四臂星型端羟基化聚己内酯(n=15),在 40℃ 下真空干燥至恒重。产量 315.3mg,产率 91.8%。称取卟啉为核的四臂星型端羟基化聚己内酯(n=15)(Mn=7703, 77.0mg, 0.01mmol),端羧基化聚乙二醇(Mn=5000, 225.0mg, 0.045mmol),环己基碳化二亚胺(16.3mg, 0.08mmol)和 N,N-二甲基氨基吡啶

(1.9mg, 0.015mmol) 溶解于 2.0mL 无水二氯甲烷中, 室温氮气流下搅拌反应 24 小时。旋转蒸发掉溶剂, 将残渣溶于适量二氯甲烷中, 然后沉降于冰乙醚中, 过滤得粗产物。粗产物使用乙醚和苯混合溶液(2:1, mol:mol) 纯化, 得到卟啉为核的聚己内酯-嵌段-聚乙二醇($n=15, m=5000$) 40℃下真空干燥至恒重。产量 203.0mg, 产率 73.3%。

以 $n=15, m=5000$ 的嵌段共聚物作为药物载体, 具体操作过程同实施例 1。载药纳米微球的平均粒径为 83.6nm。

[0014] 实施例 3: 负载阿霉素的星型聚己内酯-嵌段-聚乙二醇纳米微球的制备方法:

以 Meso-5, 10, 15, 20-四(4-羟乙基) 苯基卟啉为引发剂, 辛酸亚锡为催化剂, 在 120℃ 下引发 -己内酯单体的本体开环聚合, 反应时间为 24 小时, 得到卟啉为核的四臂星型端羟基化聚己内酯。其次, 在环己基碳化二亚胺和 N,N-二甲基氨基吡啶的催化作用下, 第一步反应得到的卟啉为核的星型聚己内酯的端羟基与端羧基化聚乙二醇在室温下发生酯化反应, 反应时间为 24 小时, 制备得以卟啉为核的两亲性四臂星型聚己内酯-嵌段-聚乙二醇共聚物杂化材料。具体步骤如下: 加入 e-己内酯(309mg, 2.71mmol) 和四(4-羟乙基) 苯基卟啉(19.5mg, 0.023mmol) 于干燥的试管中, 用翻口塞封口, 抽真空通氮气三次后放入 120℃ 恒温油浴锅中磁力搅拌 5 分钟, 再用微量进样器加入辛酸亚锡(1.1mg, 2.75mmol) 的甲苯溶液, 120℃ 下磁力搅拌反应 24 小时。将试管冷却至室温, 所得固体溶解于 2mL 的二氯甲烷中, 然后沉降于 100mL 冰甲醇中。过滤后得卟啉为核的四臂星型端羟基化聚己内酯($n=24$), 在 40℃ 下真空干燥至恒重。产量 316.4mg, 产率 96.3%。称取卟啉为核的四臂星型端羟基化聚己内酯($n=24$) ($M_n=11812$, 118.1mg, 0.01mmol), 端羧基化聚乙二醇($M_n=5000$, 225.0mg, 0.045mmol), 环己基碳化二亚胺(16.3mg, 0.08mmol) 和 N,N-二甲基氨基吡啶(1.9mg, 0.015mmol) 溶解于 2.0mL 无水二氯甲烷中, 室温氮气流下搅拌反应 24 小时。旋转蒸发掉溶剂, 将残渣溶于适量二氯甲烷中, 然后沉降于冰乙醚中, 过滤得粗产物。粗产物使用乙醚和苯混合溶液(2:1, mol:mol) 纯化, 得到卟啉为核的聚己内酯-嵌段-聚乙二醇($n=24, m=5000$) 40℃ 下真空干燥至恒重。产量 239.2mg, 产率 73.3%。以 $n=24, m=5000$ 的嵌段共聚物作为药物载体, 具体操作过程同实施例 1。载药纳米微球的平均粒径为 179.1nm。

[0015] 作为聚合物内核的卟啉在可见光的激发下将三线态的氧转化为单线态的氧, 单线态氧及其活泼, 能破坏细胞组织, 导致细胞死亡。卟啉的这一特点是它在肿瘤的光动力治疗中得到广泛的应用。单线态氧产率的高低即在一定程度上决定了卟啉作为光敏剂的潜在能力大小, 1,3-二苯基异苯并呋喃(DPBF) 是一种优良的单线态氧捕捉剂, 能够快速与单线态氧发生反应使其共轭结构被破坏而生成无色产物, 因而可检测卟啉产生单线态氧的能力。因此我们使用 1,3-二苯基异苯并呋喃(DPBF) 作为单线态氧捕捉剂, 通过荧光分光光度计分别测定了对羟基苯基卟啉、以卟啉为核的星型聚己内酯和以卟啉为核的星型聚己内酯-嵌段-聚乙二醇三种不同物质在特定波长光照条件下单线态氧产生的能力, 得到图 2。小分子化合物对羟基苯基卟啉在光照 2 分钟内, DPBF 的荧光强度迅速下降, 说明在此期间产生大量的单线态氧, 并与 DPBF 迅速结合反应, 使得 DPBF 的荧光强度大大下降。而以卟啉为核的星型聚己内酯和以卟啉为核的星型聚己内酯-嵌段-聚乙二醇随着光照时间的增加, DPBF 的荧光强度逐渐降低, 因而可通过光照时间的控制单线态氧的产生能力。因此以卟啉为核的星型聚己内酯-嵌段-聚乙二醇是一种新型可用于光动力治疗癌症的生物材料。

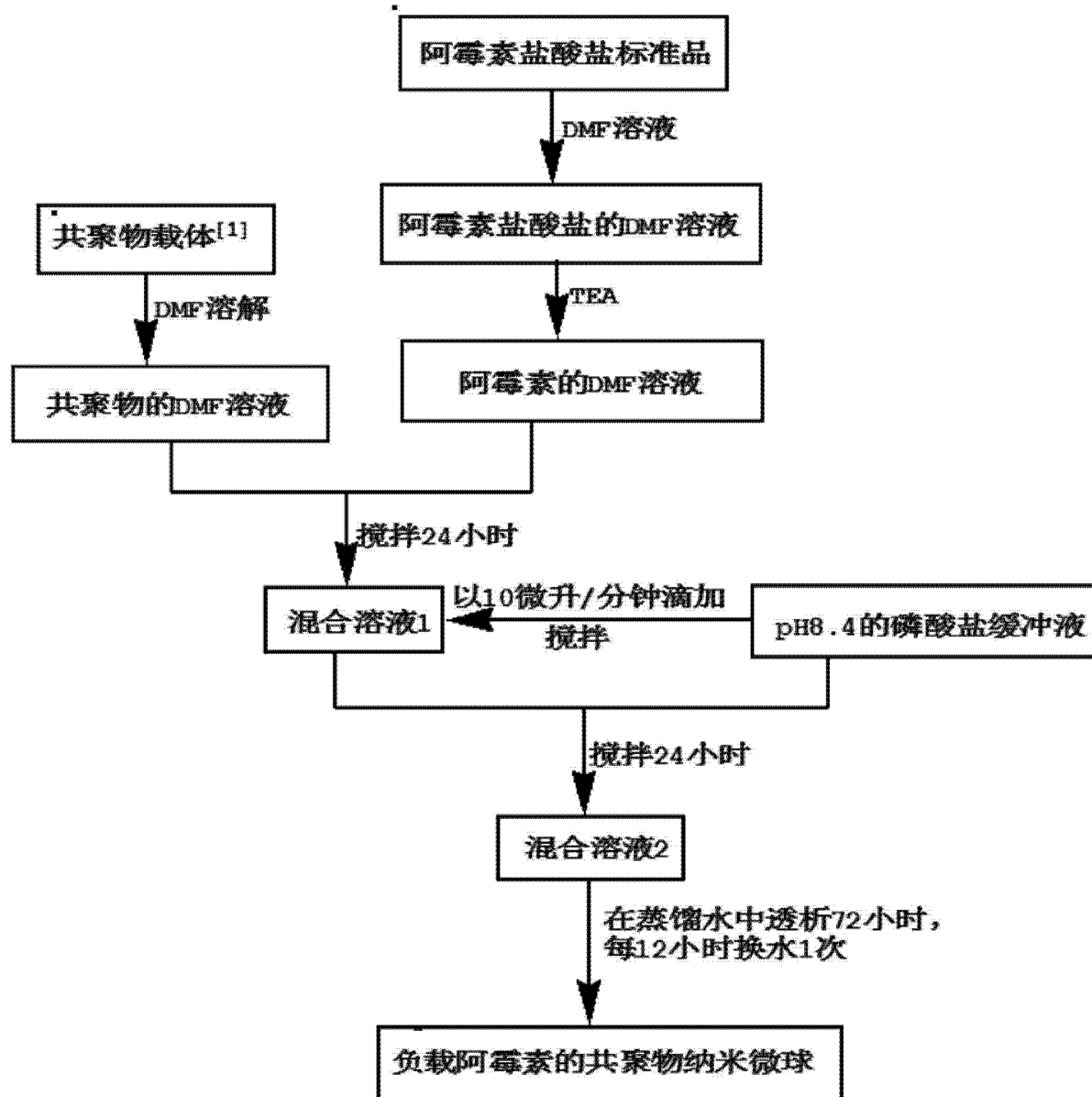


图 1

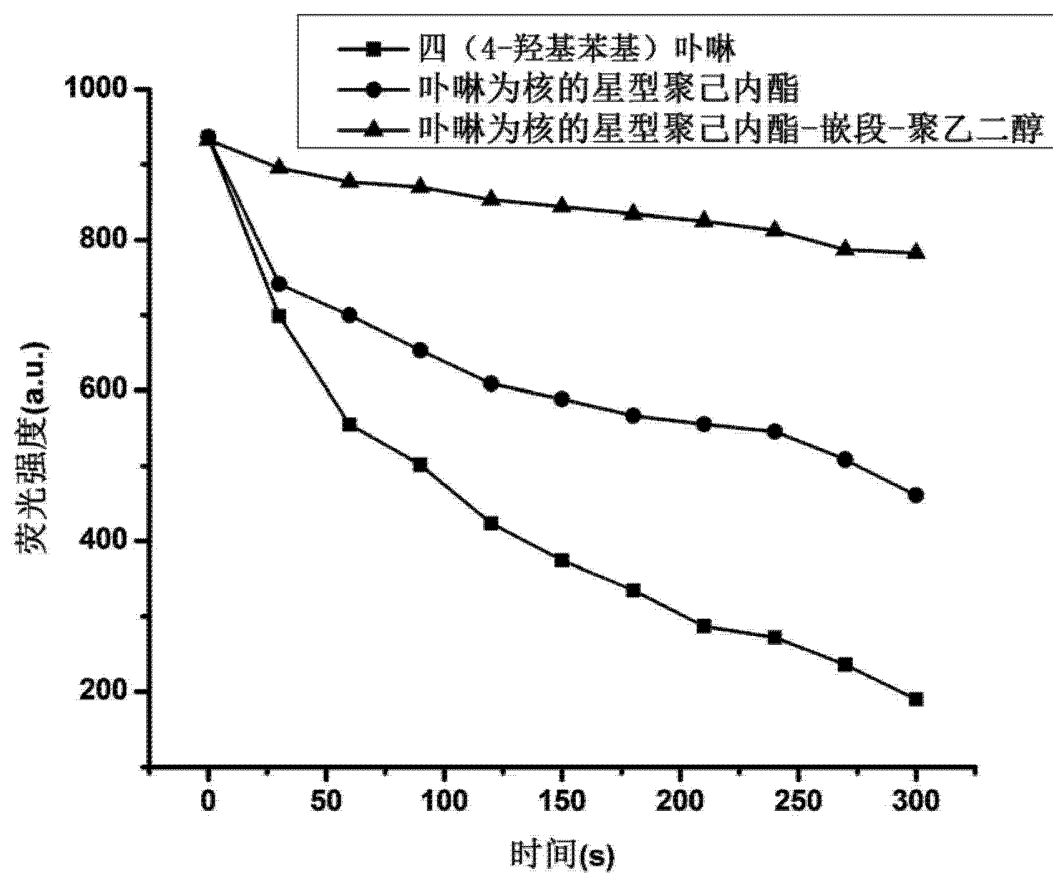


图 2