



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103301470 A

(43) 申请公布日 2013.09.18

(21) 申请号 201310274160.0

(22) 申请日 2013.07.02

(71) 申请人 安徽师范大学

地址 241002 安徽省芜湖市花津南路

(72) 发明人 龚仁敏 邱叶艳 王建婷 朱军  
张健

(51) Int. Cl.

A61K 47/36 (2006.01)

C08B 37/08 (2006.01)

A61K 31/704 (2006.01)

A61K 9/19 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

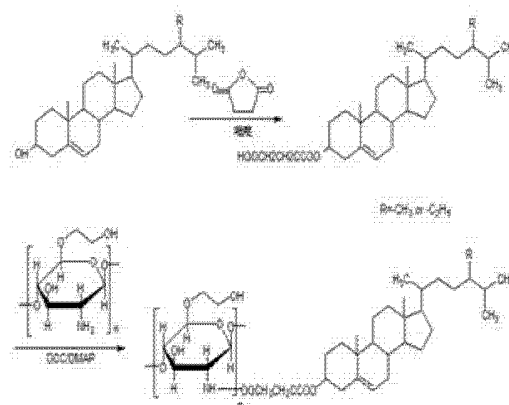
权利要求书1页 说明书5页 附图3页

## (54) 发明名称

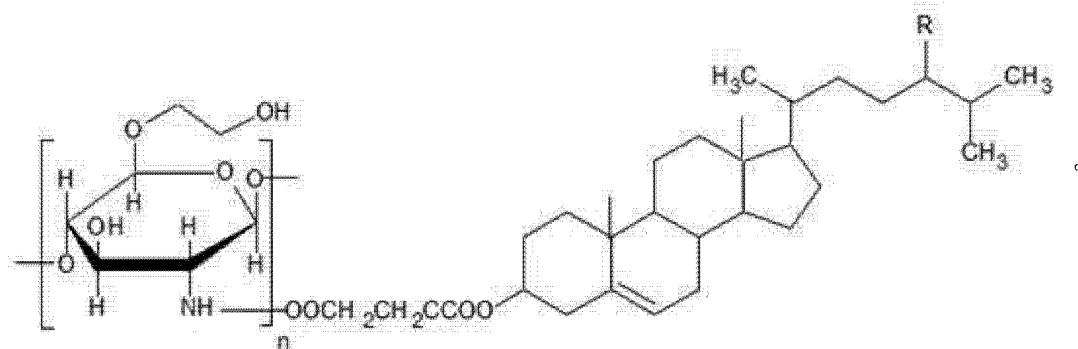
一种植物甾醇乙二醇壳聚糖靶向载体、制备方法及其应用

## (57) 摘要

本发明公开了一种植物甾醇乙二醇壳聚糖靶向载体,所述植物甾醇乙二醇壳聚糖靶向载体为球形核-壳纳米粒结构,其中,亲水性乙二醇壳聚糖相互盘绕构成纳米粒的球形外壳骨架,疏水性植物甾醇基团构成纳米粒的内核,纳米粒粒径不大于400nm。采用自组装的方法制备载体及载药纳米粒,所制备的药物载体,具有结构稳定,药物载体对肿瘤组织具有被动靶向输送作用,载药纳米粒可以较长时间滞留肿瘤组织,长时间释放药物。



1. 一种植物甾醇乙二醇壳聚糖靶向载体,其结构式如下:



2. 如权利要求1所述植物甾醇乙二醇壳聚糖靶向载体为球形核-壳纳米粒结构,其中,亲水性乙二醇壳聚糖相互盘绕构成纳米粒的球形外壳骨架,疏水性植物甾醇基团构成纳米粒的内核,纳米粒粒径不大于400nm。

3. 如权利要求2所述植物甾醇乙二醇壳聚糖靶向载体的制备方法,包括以下步骤:

(1) 植物甾醇半琥珀酸酐制备:

将琥珀酸酐和植物甾醇混合溶解于吡啶中,于室温下反应24h,加入冰稀盐酸析出白色絮状沉淀,沉淀再分别用四氢呋喃和乙醇重结晶,过滤,烘干得植物甾醇半琥珀酸酐;

(2) 植物甾醇乙二醇壳聚糖靶向载体的制:

将制备的植物甾醇半琥珀酸酐和乙二醇壳聚糖溶解于二甲亚砜中,然后加入N,N'-二环己基碳二亚胺和4-二甲氨基吡啶,搅拌,置于室温下反应24h,将反应后的混合物装入透析袋,置于蒸馏水中透析,每隔4h换一次蒸馏水,连续透析2天,透析过程重复3次,用乙醚和蒸馏水分别洗涤3-4次,冻干,得到植物甾醇乙二醇壳聚糖靶向载体。

4. 如权利要求3所述植物甾醇乙二醇壳聚糖靶向载体的制备方法,其特征在于,所述琥珀酸酐和植物甾醇的混合质量比为1:1.53,所述植物甾醇半琥珀酸酐和乙二醇壳聚糖质量比为3:10。

5. 如权利要求2所述的植物甾醇乙二醇壳聚糖靶向载体在制备抗肿瘤药物中的应用,采用下述方法:

以植物甾醇乙二醇壳聚糖为载体,加入到以阿霉素与其3倍摩尔量的三乙胺混合并溶解于二甲基乙酰胺溶液中,将上述得到的混合溶液保存在4℃中静置反应24h,将混合物置于透析袋中,在1/15M, pH 7.4的磷酸盐缓冲液中室温下进行透析,将制备的载药植物甾醇乙二醇壳聚糖通过孔径为1.0 μm微孔过滤器去除不溶物,收集清澈溶液,冻干,即得到阿霉素/植物甾醇乙二醇壳聚糖载药纳米粒。

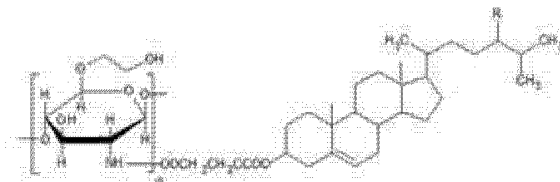
6. 如权利要求5所述的植物甾醇乙二醇壳聚糖靶向载体在制备抗肿瘤药物中的应用,其特征在于,所述抗肿瘤药物为疏水性小分子药物。

7. 如权利要求5所述的植物甾醇乙二醇壳聚糖靶向载体在制备抗肿瘤药物中的应用,其特征在于,所述抗肿瘤药物为阿霉素。

## 一种植物甾醇乙二醇壳聚糖靶向载体、制备方法及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种植物甾醇乙二醇壳聚糖靶向载体,具体是一种结构式为



的植物甾醇乙二醇壳聚糖靶向载体、制备方法和以此载体制备的阿霉素 / 植物甾醇乙二醇壳聚糖载药纳米粒,以及在抗肿瘤药物中应用。

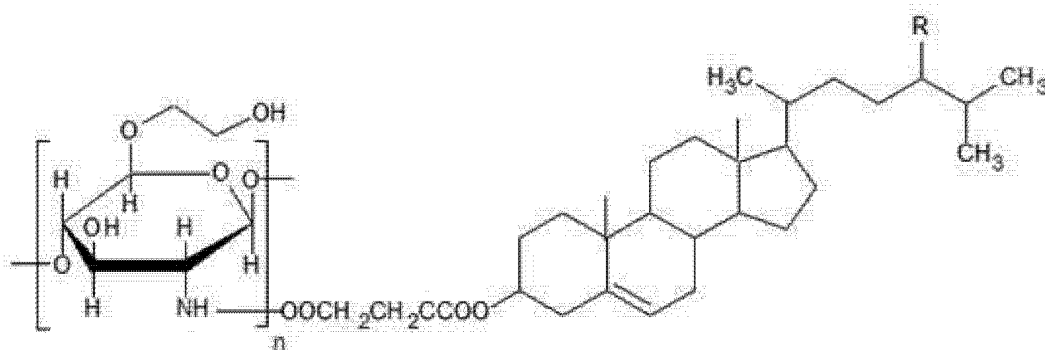
### 背景技术

[0002] 抗肿瘤药物通常为小分子疏水性有机物,使用时需要加入有机溶剂,有机溶剂对机体有毒,另外小分子抗肿瘤药物没有肿瘤组织靶向作用,在抑制肿瘤细胞的同时也杀灭了正常细胞。因此临床上亟待能包载疏水性小分子药物且具有肿瘤组织靶向作用的抗肿瘤药物载体的开发应用。

### 发明内容

[0003] 本发明要解决的技术问题是制造出能包载疏水性小分子药物且有肿瘤组织靶向作用的抗肿瘤药物载体。

[0004] 本发明解决技术问题的技术方案为:一种植物甾醇乙二醇壳聚糖靶向载体,其结构式如下:



所述植物甾醇乙二醇壳聚糖靶向载体为球形核-壳形微球结构,其中,亲水性乙二醇壳聚糖相互盘绕构成纳米粒的球形外壳骨架,疏水性植物甾醇基团构成纳米粒的内核,球的粒径不大于 400nm。

[0005] 所述植物甾醇乙二醇壳聚糖靶向载体的制备方法,包括以下步骤:

(1) 植物甾醇半琥珀酸酐制备:

将琥珀酸酐和植物甾醇混合溶解于吡啶中,于室温下反应 24h,加入冰稀盐酸析出白色

絮状沉淀,沉淀再分别用四氢呋喃和乙醇重结晶,过滤,烘干得植物甾醇半琥珀酸酐;

(2) 植物甾醇乙二醇壳聚糖靶向载体的制:

将制备的植物甾醇半琥珀酸酐和乙二醇壳聚糖溶解于二甲亚砜中,然后加入 N, N' - 二环己基碳二亚胺和 4-二甲氨基吡啶,搅拌,置于室温下反应 24h,将反应后的混合物装入透析袋,置于蒸馏水中透析,每隔 4h 换一次蒸馏水,连续透析 2 天,透析过程重复 3 次,用乙醚和蒸馏水分别洗涤 3-4 次,冻干,得到植物甾醇乙二醇壳聚糖靶向载体。上述植物甾醇乙二醇壳聚糖靶向载体的制备方法中,所述琥珀酸酐和植物甾醇的混合质量比为 1:1.53,所述植物甾醇半琥珀酸酐和乙二醇壳聚糖质量比为 3:10。所得到的植物甾醇乙二醇壳聚糖靶向载体应用于制备抗肿瘤药物;所述抗肿瘤药物为疏水性小分子药物,例如阿霉素。

[0006] 以植物甾醇乙二醇壳聚糖为载体,加入到以阿霉素与其 3 倍摩尔量的三乙胺混合并溶解于二甲基乙酰胺溶液中,将上述得到的混合溶液保存在 4℃ 中静置反应 24h,将混合物置于透析袋中,在 1/15M, pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中室温下进行透析,将制备的载药植物甾醇乙二醇壳聚糖通过孔径为 1.0 μm 微孔过滤器去除不溶物,收集清澈溶液,冻干,即得到阿霉素/植物甾醇乙二醇壳聚糖载药纳米粒。植物甾醇乙二醇壳聚糖靶向载药纳米粒应用于包载抗肿瘤药物。

[0007] 本发明与现有技术相比,所制备的药物载体,具有结构稳定,药物载体对肿瘤组织具有被动靶向输送作用,载药纳米粒可以较长时间滞留肿瘤组织,长时间释放药物。

#### 附图说明

[0008] 图 1 是实验原理图。

[0009] 图 2 是植物甾醇乙二醇壳聚糖纳米粒的荧光光谱图。

[0010] 图 3 是  $I_{386}/I_{374}$  的比值直线图。

[0011] 图 4 是植物甾醇乙二醇壳聚糖自组装纳米粒透射电镜图。

[0012] 图 5 是 DOX<sub>1</sub> 在不同 pH 下的释放。

[0013] 图 6 是 DOX<sub>1</sub>、DOX<sub>2</sub>、DOX<sub>3</sub> 在 pH7.4 的释放。

#### 具体实施例

[0014] 植物甾醇和琥珀酸酐反应产生植物甾醇半琥珀酸酐,然后在 N, N' - 二环己基碳二亚胺 (DCC) 与 4-二甲氨基吡啶 (DMAP) 的偶联作用下,植物甾醇半琥珀酸酐连接到水溶性乙二醇壳聚糖的氨基上,得到植物甾醇疏水改性乙二醇壳聚糖自组装纳米聚合物,在水溶液中植物甾醇疏水改性乙二醇壳聚糖自组装成具有疏水内核及亲水外壳的纳米颗粒,其疏水内核可包载疏水性抗肿瘤药物,并由于肿瘤组织的增强透过及滞留效应实现抗肿瘤药物的肿瘤组织靶向输送。实验原理如图 1。

[0015] 3.6g 琥珀酸酐和 5.5g 植物甾醇混合溶解于 20ml 吡啶中,于室温下反应 24h,然后加入冰稀盐酸析出白色絮状沉淀,沉淀再分别用四氢呋喃和乙醇重结晶。过滤烘干得到产物植物甾醇半琥珀酸酐。

[0016] 1g 乙二醇壳聚糖和 300mg 植物甾醇半琥珀酸酐溶解于 50ml 二甲亚砜中,然后加入 160mg N, N' - 二环己基碳二亚胺和 80mg 4-二甲氨基吡啶,充分搅拌后置于室温下反应 24h。

将反应后的混合物装入透析袋,置于蒸馏水中透析,每隔 4h 换一次蒸馏水,连续透析 2 天。透析过程重复 3 次。过滤植物甾醇乙二醇壳聚糖产物并用乙醚和蒸馏水分别洗涤 3-4 次,冻干。

[0017] 以芘为探针分子,研究植物甾醇乙二醇壳聚糖在水溶液中的自组装行为,并测定其最低临界自组装浓度。重结晶纯化后的荧光探针芘制成  $1.0 \times 10^{-4} \text{M}$  的丙酮溶液,分别取 1ml 芘丙酮溶液置于 10ml 容量瓶中,50℃ 水浴挥去丙酮, 然后加入不同浓度的植物甾醇乙二醇壳聚糖溶液,溶液中最终芘的浓度为  $6 \times 10^{-7} \text{M}$ , 接近于其在 22℃ 水中的溶解度。所制备的系列植物甾醇乙二醇壳聚糖浓度分别为:1.0、0.5、0.2、0.1、0.05、0.02、0.01、0.005、0.002、0.001mg/ml。激发波长为 343nm,发射波长为 360-420nm,激发和发射狭缝分别为 10nm、2.5nm,时间间隔为 1s 条件下测定吸光度值。由图 2 中荧光波长为 386nm 和 374nm 处的吸光度值计算出不同浓度下  $I_{386}/I_{374}$  的比值,作图,两直线的交点值即为植物甾醇乙二醇壳聚糖的临界自组装浓度数值。

[0018] 图 2 为不同浓度的植物甾醇乙二醇壳聚糖纳米粒的芘荧光光谱图,从图中可以看出,随着植物甾醇乙二醇壳聚糖浓度增加,荧光强度也提高。当植物甾醇乙二醇壳聚糖溶液浓度高于其临界自组装浓度时,386nm 处的吸光度值有很大增加,而此时 374nm 处的吸光度值无明显变化。因此本实验中用  $I_{386}/I_{374}$  的比值来确定植物甾醇乙二醇壳聚糖的临界自组装浓度。

[0019] 图 3 显示植物甾醇乙二醇壳聚糖的临界自组装浓度为  $10^{-1.4}$ ,即 0.036mg/mL。该值低于很多文献报导的经不同疏水基修饰的壳聚糖分子的临界自组装浓度值。低临界自组装浓度值是包载疏水性药物的重要条件,因此,植物甾醇乙二醇壳聚糖作为疏水性抗肿瘤药物载体有很大的潜能。

[0020] 制备 1mg/mL 的植物甾醇乙二醇壳聚糖溶液,用毛细滴管吸取一滴均匀涂抹在 500 目铜网上,并用滤纸吸干铜网边缘多余的水分,然后将铜网置于透射电镜下观察如图 4。

[0021] 从图 4 中可以清晰看到植物甾醇乙二醇壳聚糖纳米粒的球形核-壳结构,球的粒径不大于 400nm。亲水性乙二醇壳聚糖相互盘绕构成纳米粒的球形外壳骨架而疏水性植物甾醇基团形成纳米粒的内核。乙二醇壳聚糖分子间和分子内的氢键使核-壳结构包裹紧密。植物甾醇乙二醇壳聚糖纳米粒的稳定结构非常适于装载疏水性药物。

[0022] 抗肿瘤药物-阿霉素的包载与释放。阿霉素(DOX)为用于临床肿瘤治疗的抗癌谱较广的疏水性药物,本实验以其为例研究植物甾醇乙二醇壳聚糖纳米粒对小分子疏水性抗肿瘤药物的包载与释放。称取 10mg 的阿霉素与其 3 倍摩尔量的三乙胺混合溶解于 2mL 的二甲基乙酰胺溶液中。再分别加入植物甾醇乙二醇壳聚糖 200mg,300mg,400mg,500mg 于 4 份上述溶液中,以制备载药阿霉素植物甾醇乙二醇壳聚糖  $\text{DOX}_0$ ,  $\text{DOX}_1$ ,  $\text{DOX}_2$ ,  $\text{DOX}_3$ 。将其保存在 4℃ 中 24h。然后将阿霉素/植物甾醇乙二醇壳聚糖混合物置于透析袋中,在 1/15M, pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中室温下进行透析,第一天,透析介质每 4h 更换一次,第二,第三天,缓冲液一天更换一次。3 天后,将制备的载药植物甾醇乙二醇壳聚糖通过孔径为 1.0  $\mu\text{m}$  微孔过滤器去除不溶物,收集清澈溶液,冻干,即得到阿霉素/植物甾醇乙二醇壳聚糖载药纳米粒。其它疏水性抗肿瘤药物如紫杉醇、长春碱等均可采用上述方法包载。

[0023] 称量冻干的载药纳米粒分散于蒸馏水中,以空白植物甾醇乙二醇壳聚糖载体为对照,用紫外分光光度法在 490nm 处测定吸收度。计算包载的药物含量,然后分别计算载药纳

米粒的载药量与药物包载率：

$$\text{载药量}(\%) = \frac{\text{载药纳米粒中阿霉素的质量}}{\text{载药纳米粒的质量}} \times 100$$

$$\text{包载率}(\%) = \frac{\text{载药纳米粒中阿霉素的质量}}{\text{载药前阿霉素投入的质量}} \times 100$$

测量结果如下：

表 1. 植物甾醇乙二醇壳聚糖纳米粒的载药量和包载率

样品	药物/载体	载药量(100%)	包载率(100%)
DOX <sub>0</sub>	1/20	3.9	61
DOX <sub>1</sub>	1/30	23	69
DOX <sub>2</sub>	1/40	19	77
DOX <sub>3</sub>	1/50	17	85

植物甾醇乙二醇壳聚糖载体的载药量和包载率见表 1。随着药物 / 载体比值的降低, 载药量随之降低, 而包载率显著增加。当药物 / 载体的比值为 1/50 时, 其包载率达到 85%。

[0024] 制备不同 pH(5.5、6.5、7.4) 的 1/15M 磷酸盐缓冲液 (PBS) 作为释放介质, 研究载药纳米粒在不同 pH 环境下的释放特征。将阿霉素 / 植物甾醇乙二醇壳聚糖载药纳米粒置于不同的释放介质中, 制备 1mg/mL 的阿霉素 / 植物甾醇乙二醇壳聚糖溶液, 使用移液器精密移取 1.0mL 上述载药纳米粒放入透析袋中, 然后将密封的透析袋置于 30mL 的磷酸盐缓冲溶液中, 每组平行 3 个样品, 在 37℃、100 次 /min 震荡的条件下进行体外释放试验, 于 2、4、6、8、10、12、18、24、36、48h 取出全部释放介质, 并补充等体积的新鲜介质, 用紫外分光光度法在 490nm 处测定吸收光度, 计算累积释放量。

[0025] 由于肿瘤组织的 pH 值在 5.0-5.6 之间, 比正常组织的 pH 值低, 用三种不同 pH 值的磷酸盐缓冲液溶液作为释放介质模拟生物体内环境研究载药纳米粒中阿霉素的释放特征。从图 5 中可知, 载药纳米粒的阿霉素释放具有 pH 敏感的特征, 即在低 pH 环境下, 可以较快的释放纳米粒中阿霉素药物; 而在较高的生理 pH 下, 释放较为缓慢。如 DOX<sub>1</sub> 在 pH7.4 的条件下 48h 内释放约 31.3%, 明显低于在 pH5.5 和 pH6.5 时的药物释放量, 同样的结果在 DOX<sub>2</sub> 和 DOX<sub>3</sub> 纳米粒的体外释放中也可以观察到。这种现象主要是由于在低 pH 值下, 纳米粒中的疏水药物阿霉素发生解离, 很大程度上提高了溶解度, 促进了阿霉素的释放。对于抗肿瘤给药体系, 这种 pH 敏感特性能够更好的将滞留在肿瘤组织的药物快速释放, 发挥抗肿瘤作用, 而降低对正常细胞的细胞毒性作用。

[0026] 如图 6 所示, 随着纳米粒载药量增大, 药物释放速度降低。DOX<sub>1</sub> 在 pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液中 48h 内释放量为 31.3%, 显著低于在同样条件下 DOX<sub>2</sub> 的释放量与 DOX<sub>3</sub> 的释放量, 这是由于药物从纳米粒的释放主要以扩散的方式进行, 随着药物量的增加, 纳米粒释放速度减慢。有文献报道, 疏水性抗肿瘤药物包封进入疏水性内核的过程中, 有可能形成疏水性抗肿瘤药物结晶体, 疏水性抗肿瘤药物结晶体有很强的疏水性, 在水中更难溶解, 这一特性可以促进阿霉素在载体疏水内核中的包载并延缓药物释放。这种特性有利于滞留在肿瘤组织的载药纳米粒较长时间的发挥抗肿瘤作用。本领域技术人员根据同类物质特性, 可知

利用植物甾醇乙二醇壳聚糖载体包载其它疏水性抗肿瘤药物如紫杉醇、长春碱等载药纳米粒药物释放特性相似。

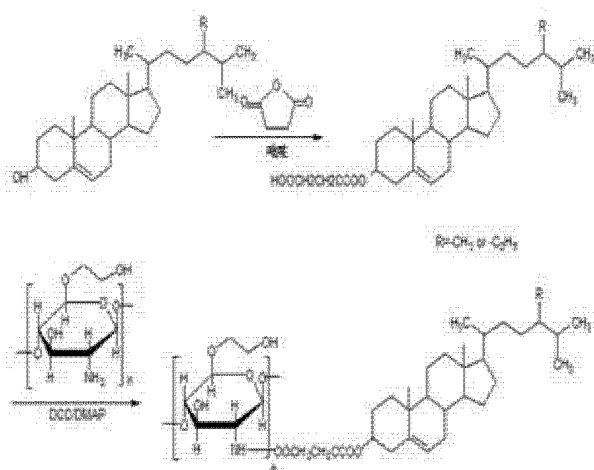


图 1

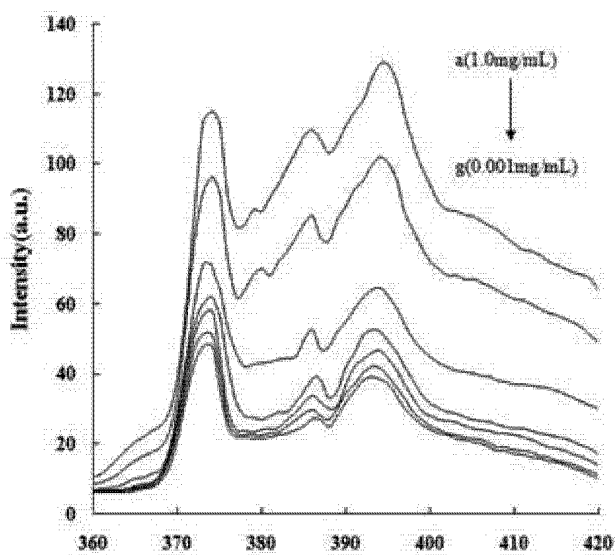


图 2



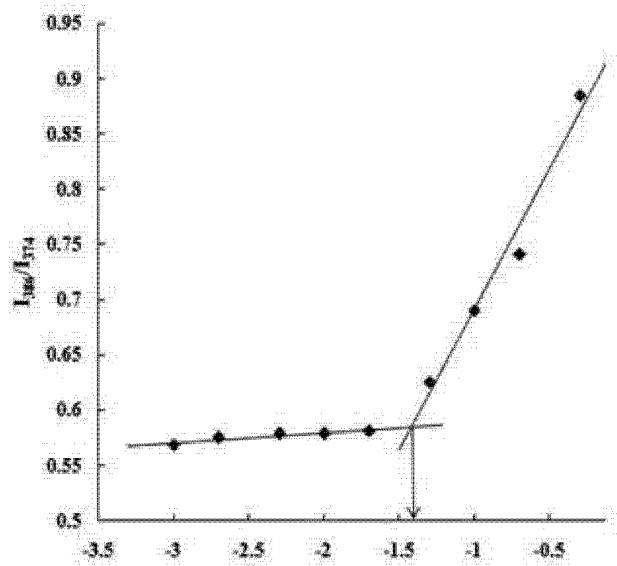


图 3

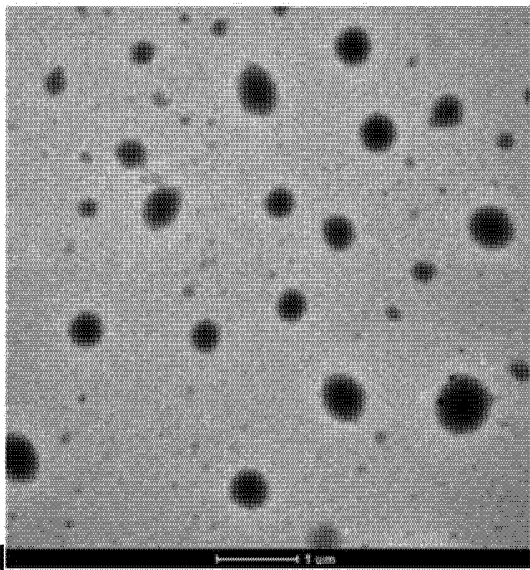


图 4

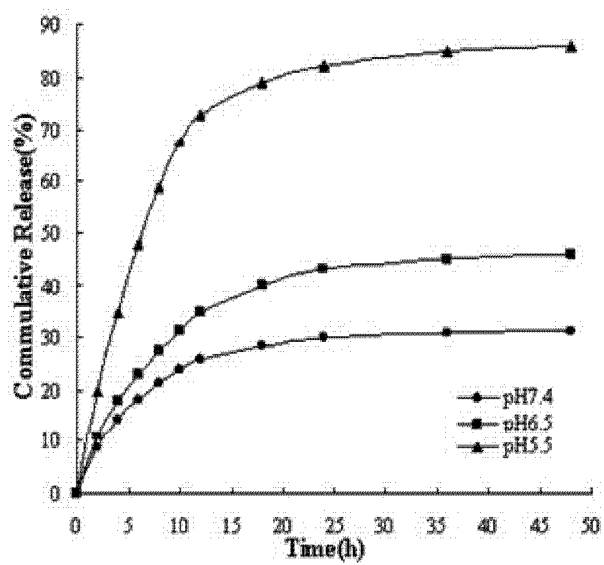


图 5

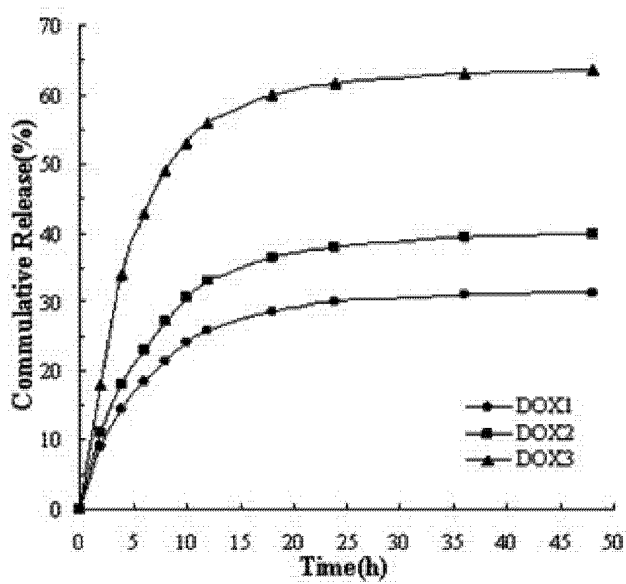


图 6