



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104415003 A

(43) 申请公布日 2015. 03. 18

(21) 申请号 201310379113. 2

(22) 申请日 2013. 08. 27

(71) 申请人 成都市绿科华通科技有限公司

地址 610000 四川省成都市锦江区总府路  
18号1栋1单元21层23号

(72) 发明人 不公告发明人

(51) Int. Cl.

A61K 9/51(2006. 01)

A61K 47/48(2006. 01)

A61K 31/79(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

权利要求书1页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

一种含聚吡咯烷酮的高分子纳米药物微胶囊

(57) 摘要

本发明公开了一种含聚吡咯烷酮的高分子纳米药物微胶囊,包括:利用原子转移自由基聚合方法聚合吡咯烷酮,得到聚吡咯烷酮;聚吡咯烷酮利用叶酸分子进行修饰;利用开环聚合方法聚合谷氨酸十八烷酯羧酸酐,得到聚谷氨酸十八烷酯;聚谷氨酸十八烷酯通过脰键接枝阿霉素;将聚吡咯烷酮和聚谷氨酸通过点击化学方法进行键连,得到嵌段共聚物;将嵌段聚合物分别溶解于四氢呋喃后,移入透析袋中,用纯水透析,透析液用滤膜过滤;过滤后的溶液进行冷冻干燥,得到载药胶束。该药物载体胶束具有核壳双层结构,外层为亲水性聚吡咯烷酮,内层为药物分子包裹层。该材料具有以下优点:属于纳米微粒;可实现药物对癌细胞靶向传递以及癌细胞内 pH 敏感性释放;载药量大;稳定性好;其靶向功能可有效减小药物对正常组织器官毒副作用。

1. 一种含聚吡咯烷酮的高分子纳米药物微胶囊,其结构特征在于:所述的高分子材料是由两条亲水性的聚吡咯烷酮链段和一条疏水性的聚谷氨酸十八烷酯链段偶联而成的 AB<sub>2</sub> 型共聚物。

2. 一种制备权利要求 1 所述的含聚吡咯烷酮的高分子纳米药物微胶囊的方法是通过如下步骤进行的:

- 1) 用于引发吡咯烷酮单体的叠氮小分子引发剂的合成;
- 2) 利用叶酸小分子进行 NHS 活化,制备叶酸-NHS 分子;
- 3) 利用步骤 1) 所制备的叠氮小分子引发剂,引发吡咯烷酮小分子进行原子转移自由基聚合,得到聚吡咯烷酮,同时利用叶酸-NHS 分子修饰聚吡咯烷酮;
- 4) 双臂炔端基聚谷氨酸十八烷酯的合成;
- 5) 利用阿霉素分子对聚谷氨酸十八烷酯进行接枝,该反应是利用腈键进行连接;
- 6) 利用点击化学反应合成星型嵌段共聚物;
- 7) 用透析法制备聚合物纳米胶束。

3. 根据权利要求 2 所述的一种含聚吡咯烷酮的高分子纳米药物微胶囊的制备方法,其特征在于上述方法中步骤 1) 所合成叠氮小分子引发剂所使用的溶剂是丙酮、丁酮、二氧六环、乙腈中的任一种。

4. 根据权利要求 2 所述的一种含聚吡咯烷酮的高分子纳米药物微胶囊的制备方法,其特征还在于上述方法中步骤 4) 所使用的聚合单体为谷氨酸十八烷酯羧酸酐。

5. 根据权利要求 2 所述的一种含聚吡咯烷酮的高分子纳米药物微胶囊的制备方法,其特征还在于上述方法中步骤 6) 所进行的聚合物偶合反应须采用 Huisgen 1,3- 偶极环加成反应。

6. 根据权利要求 2 所述的一种含聚吡咯烷酮的高分子纳米药物微胶囊的制备方法,其特征还在于上述方法中需采用以下小分子引发剂:

- 1) 2- 氯代叠氮乙氧基乙烷
- 2) N- 胺乙基 3,5- 二乙炔氧基苯胺。

7. 根据权利要求 2 所述的一种含聚吡咯烷酮的高分子纳米药物微胶囊,其特征还在于:该高分子材料是由叶酸修饰的聚吡咯烷酮链段和阿霉素接枝的聚谷氨酸通过偶联所形成的星型嵌段共聚物。

8. 根据权利要求 2 所述的一种含聚吡咯烷酮的高分子纳米药物微胶囊,其特征还在于:所述的高分子胶束具有核壳双层结构,外层为亲水性聚吡咯烷酮,内层为药物分子包裹层。

## 一种含聚吡咯烷酮的高分子纳米药物微胶囊

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种含聚吡咯烷酮的高分子纳米药物微胶囊,特别是涉及一种具有癌症细胞靶向性的嵌段高分子材料药物载体微胶囊的制备方法。属于高分子化学及聚合物技术领域。

### 背景技术

[0002] 癌症已成为危害人类健康的最主要疾病,治疗癌症的重要手段之一是药物治疗,然而许多抗癌药物存在着难溶于水、稳定性差等缺陷。如喜树碱、紫杉醇、阿霉素、5-氟尿嘧啶等都因溶解度差而难以被生物体很好地利用,解决其水溶性问题是这类药物制剂临床应用的关键。此外,肿瘤治疗和诊断药物其作用大多是非选择性的,一些正常组织器官常有较多分布,治疗剂量下对正常组织器官毒副作用大。故解决如何增溶难溶性抗癌药物以及增加药物稳定性、提高对癌细胞的选择性迫在眉睫。因此,寻找一种可靠的靶向药物载体是解决以上两个问题的关键。

[0003] 高分子胶束药物载体一般采用的都为线性高分子胶束。Bae 课题组开展的研究工作最为引人注目,其在所发表的研究论文中指出,以脲键将 Dox 键连到聚合物主链上,并利用癌细胞微环境中 pH 呈弱酸性使脲键断裂,实现了 Dox 的靶点释放。而且, Bae 于 2005 年在 *Molecular BioSystems* 杂志上发表的一篇文章(Bae Y, Jang W-D, Nishiyama N, Fukushima S, Kataoka K. *Mol BioSyst* 2005; 1(3): 242-250.),首次同时将 Fo1 和 Dox 分别键连到 PEG 以及 PASP (聚天冬氨酸)上,从而兼具药物的靶向传递以及靶点释放多功能性,流式细胞实验(FCM)表明细胞对聚合物胶束的摄入量较不含 Fo1 的聚合物胶束有明显增加。Gong Shaoqin 课题组也从事了相似的研究。其以聚马来酸-ε-己内酯无规共聚物为内核,PEG 为壳,制备了聚合物纳米胶束。以脲键连接 Dox,并利用 Fo1 修饰了 PEG 端基,制备了 pH 敏感型靶向载药胶束,测试了细胞摄入量以及细胞毒性,证明在酸性条件下 Dox 由于脲键的断裂而快速释放(Yang X, Grailer JJ, Pilla S, Steeber DA, Gong S. *Bioconjugate Chem* 2010; 21(3): 496-504.)。

[0004] 尽管线性聚合物胶束作为水难溶性药物的载体,在递药过程中已显示出巨大的优势和潜力,但仍然存在胶束稳定性差、增溶效果不明显、药物释放率低的问题。目前聚合物胶束的载药量通常只能达到 5% 左右,要获得更高的载药量很困难。研究发现,聚合物通过化学键连接药物单体,可达到较高的载药量。而线性嵌段共聚物负载能力往往偏低,但如果过多键连药物分子其胶束结构又不稳定。而星型聚合物可以克服这个不足。

[0005] 上海交通大学颜德岳(Liu J, Pang Y, Huang W, Huang X, Meng L, Zhu X, Zhou Y, Yan D. *Biomacromolecules* 2011; 12(5): 1567-1577.)合成了树枝状聚磷酸酯-聚乳酸嵌段共聚物应用于药物载体研究,包裹 Dox 后对海拉细胞有明显抑制作用。另一具有代表性的研究是中国科技大学刘世勇,利用功能化β-环糊精制备了用 Fo1 和 Dox 修饰的聚马来酸酐星型聚合物,同时键连了对磁共振效应敏感的钆元素,在小鼠实验中发现,聚合物胶束在肝、肾部位的聚集有明显加强(Liu T, Li X, Qian Y, Hu X, Liu S. *Biomaterials*

2012; 33(8): 2521-2531.)。

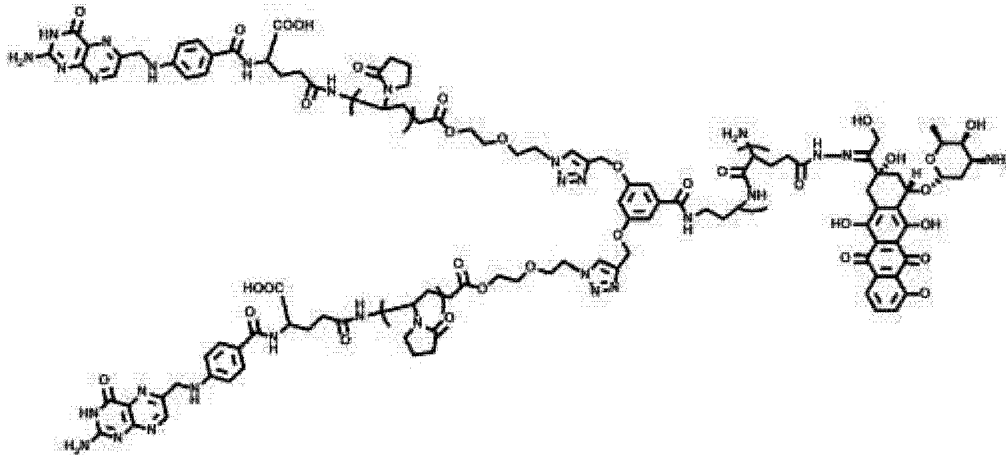
[0006] 但是,由于星型聚合物中聚合物结构较为复杂,所制备的药物载体出现生物相容性差,药物包载能力下降,dendrimer 表面药物分子水溶性降低等问题。此外,dendrimer 结构复杂,合成成本较高。这些问题都限制了星型聚合物纳米载药系统的应用。因此,不论是性聚合物还是普通星型聚合物药物载体,并不能同时具备:药物靶向性,高药物负载能力,胶束结构稳定,靶点释放的 pH 敏感性,生物相容性高这几项对聚合物药物载体系统的临床应用起至关重要作用的性能。

### 发明内容

[0007] 本发明的目的是建立一种含聚吡咯烷酮的高分子纳米药物微胶囊,该药物载体微胶囊具有以下优点:属于纳米微粒;可实现药物对癌细胞靶向传递以及癌细胞内 pH 敏感性释放;载药量大;稳定性好;其靶向功能可有效减小药物对正常组织器官毒副作用。

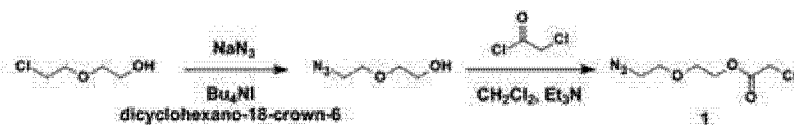
[0008] 该胶束是一种具有亲水性和疏水性嵌段的星型嵌段聚合物;可以将阿霉素键连与嵌段聚合物之上;高分子材料具有两条亲水链段,一条疏水链段;高分子材料其亲水段为聚吡咯烷酮,通过叶酸进行修饰。疏水段为聚谷氨酸,通过脲链接枝阿霉素;高分子的胶束结构具有核壳双层结构,外层为亲水性聚吡咯烷酮,内层为药物分子包裹层。

[0009] 所述的嵌段聚合物为以下结构式中的聚合物:



嵌段共聚物微胶囊的制备技术方案如下:

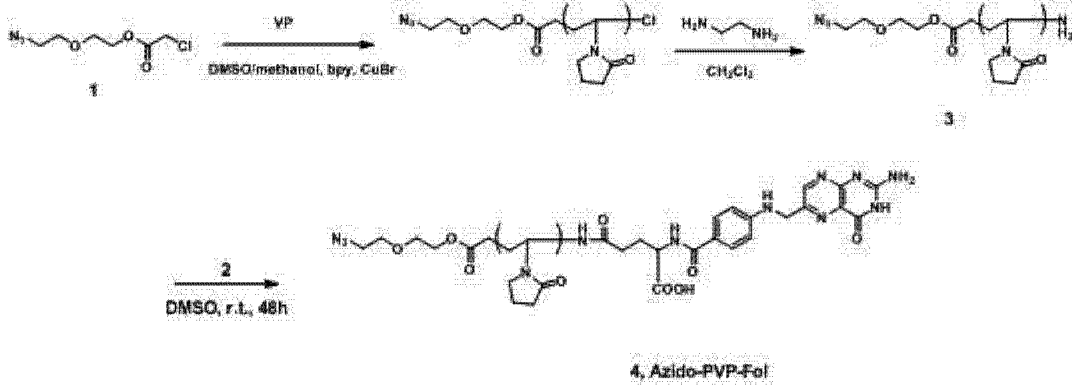
#### 1) 制备叠氮小分子引发剂



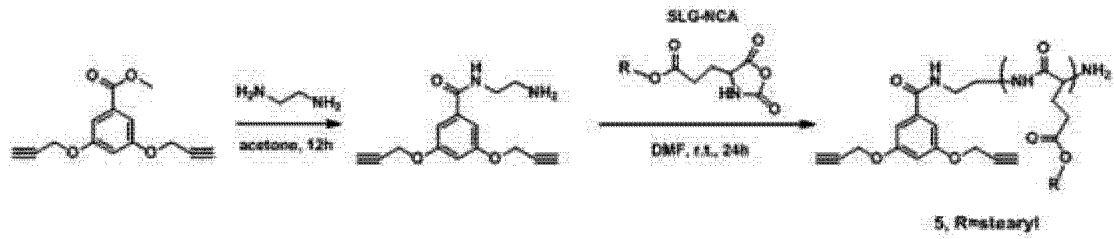
#### 2) 叶酸-NHS 分子的合成



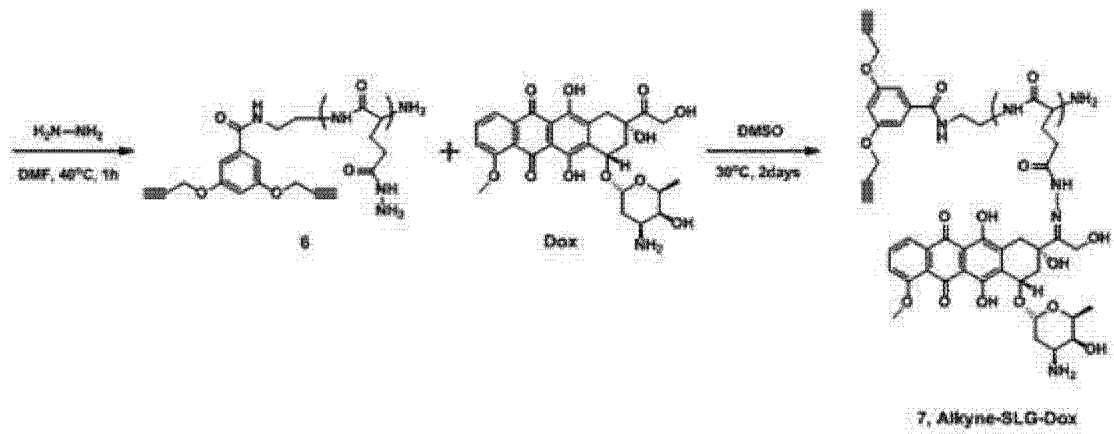
#### 3) 聚吡咯烷酮的原子转移自由基聚合以及叶酸修饰



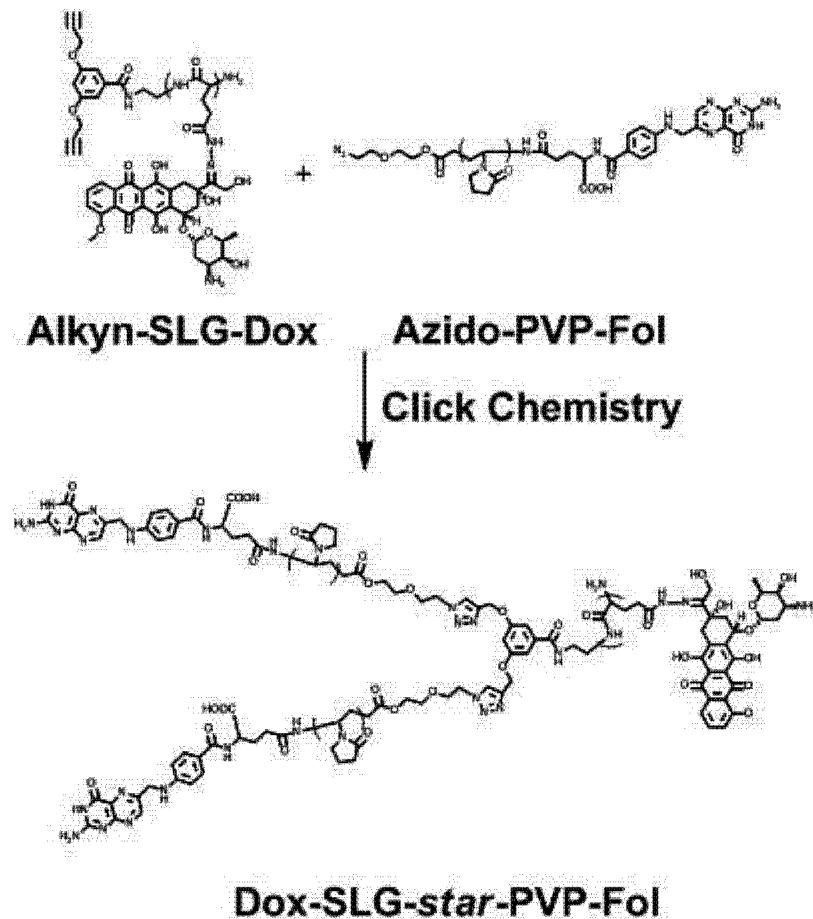
4) 双臂炔端基聚谷氨酸十八烷酯的合成



5) Dox 分子与聚谷氨酸十八烷酯的胺键连接



6) 星型嵌段共聚物的合成



#### 7) 制备纳米微胶囊

用透析法制备聚合物纳米微胶囊。具体方法为：将一种或两种星形聚合物分别溶于 THF 后，移入透析袋中，用 1000 mL 纯水透析，定期换水。透析液用滤膜过滤后，冷冻干燥得到共聚物载药胶束。

[0010] 通过以上技术方案，本发明具有如下优点：

- 1) 含聚吡咯烷酮的高分子纳米药物微胶囊体积小，具有纳米级结构，能够穿越人体内各种屏障；
- 2) 含聚吡咯烷酮的高分子纳米药物微胶囊临界胶束浓度小，结构稳定；
- 3) 含聚吡咯烷酮的高分子纳米药物微胶囊药物负载量大，且生物相容性好；
- 4) 含聚吡咯烷酮的高分子纳米药物微胶囊具有靶向释放药物功能，可有效减小药物对正常组织器官毒副作用。

#### 附图说明

[0011] 图 1 为该高分子的结构示意图；

图 2 为该高分子微胶囊的示意图；

图 3 为该高分子微胶囊的 AFM 扫描图。

#### 具体实施方式

[0012] 为使本发明的实施目的、技术方案和优点更为清楚，下面结合本发明的附图和具体实施例对本发明进行详细说明：

如图 1 所示，为含聚吡咯烷酮的高分子纳米药物微胶囊的化学结构示意图。该高分子

为 AB<sub>2</sub> 型嵌段高分子,具有两个亲水段②,和一个疏水段③所构成。每个链段上的键连了不同的分子结构:

叶酸小分子①键连于聚吡咯烷酮分子链段②上,②是通过原子转移自由基聚合法制备;

利用 1,3-偶极环加成反应所得到的五元环与聚谷氨酸③进行偶联;

利用脰键将链段③与阿霉素分子④键连起来。

[0013] 如图 2 所示,一种含聚吡咯烷酮的高分子纳米药物微胶囊由该 AB<sub>2</sub> 杂臂星型嵌段高分子组装形成。其结构分别由①叶酸小分子;②聚吡咯烷酮分子;③聚谷氨酸;④阿霉素分子等组成。高分子在水溶液中通过疏水相互作用,可以自组装为球状的胶束结构,高分子的微胶囊结构具有核壳双层结构:

外层为亲水性聚吡咯烷酮②;

内层为聚谷氨酸③,为药物分子包裹层,内层可使药物分子包裹于球体内部,从而实现药物运载功能。

[0014] 图 3 所示为 AB<sub>2</sub> 杂臂星型嵌段共聚物在水溶液中自组装形成的球状微胶囊结构的 AFM 扫描图像。证明高分子所形成球状胶束结构均一,分散性好,在水溶液中不发生团聚,有利于实现对药物分子的运载和释放功能。

[0015] 下面给出实施例以对本发明进行具体描述,但值得指出的是以下实施例只用于对本发明进行进一步说明,不能理解为对本发明保护范围的限制,该领域的技术熟练人员根据上述本发明内容对本发明作出的一些非本质的改进和调整仍属于本发明的保护范围。

[0016] 实施例 1:

①制备叠氮小分子引发剂

步骤一:将 2-氯乙氧基乙醇 5mL 溶解于 25mL 丁酮中,溶液中加入 4.5g NaN<sub>3</sub>, 2.5g Bu<sub>4</sub>NI, 10mg 二环己烷并-18-冠醚-6,将混合物加热至沸腾,搅拌 24 小时。将混合物进行过滤,沉淀用丙酮进行彻底冲洗。所得到的混合溶液即为产物的粗品,将混合溶液浓缩以后,在 90°C 进行蒸馏得到纯净物。所得到的 2-叠氮乙氧基乙醇 <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 3.70 (t, 2 H, CH<sub>2</sub>OH), 3.65 (t, 2H, HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.56 (t, 2H, N<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.37 (t, 2H, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), and 2.56 (s, 1H, OH)。

[0017] 步骤二:将步骤一制得的 2-叠氮乙氧基乙醇 2g, α-氯代酰氯 5.09g 溶解于 30mL 二氯甲烷中,将反应体系转移至冰域中,将 6.8g 二环己基碳二亚胺缓慢加入反应容器中,并搅拌。将 0.4g 二甲氨基吡啶溶于二氯甲烷中在 10 分钟内滴入反应容器中。整个反应体系在 0°C 条件下反应 1 个小时,然后在室温下反应 24 小时。将反应过程中沉淀出来的环己基脲过滤,并用二氯甲烷进行洗涤。用碳酸氢钠溶液(5%)进行萃取,然后用无水硫酸镁进行干燥。减压真空干燥后,用硅胶色谱柱进行分离,最后得到产品 2-氯代叠氮乙氧基乙烷。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 4.30 (t, 2H, CH<sub>2</sub>OCO), 3.73 (t, 2H, COOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.67 (t, 2H, N<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.35 (t, 2H, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), and 1.92 (s, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C)。

[0018] ②叶酸-NHS 分子的合成

将 1.0g 叶酸以及 0.495g N, N'-二环己基碳二亚胺 (DCC) 和 0.463g N-羟基丁二酰亚胺 (NHS) 溶于 20mL DMSO,在 N<sub>2</sub> 保护下室温反应 24h,过滤除去反应副产物 N, N'-二环己基尿 (DCU),利用硅胶色谱柱进行分离,可得到叶酸-NHS 分子。

**[0019] ③聚吡咯烷酮的原子转移自由基聚合以及叶酸修饰**

将步骤二中得到的 2-叠氮乙氧基溴代异丁酸 12mg, 与 5.4g 乙烯基吡咯烷酮溶解于 25mL DMSO 中同时按 2:1:1 的比例加入甲醇、联吡啶以及溴化亚铜。通过三次抽气-通气-解冻循环对聚合管进行封管。聚合 24 小时后, 用甲醇将聚合物沉淀出来, 过滤, 烘干待用。将 2g 所制得的聚吡咯烷酮溶于 20mL 二氯甲烷中, 加入 2.8mL 乙二胺, 对聚吡咯烷酮的末端基进行修饰, 得到端基带一级胺的聚合物。将 2g 端基修饰的聚吡咯烷酮升温至 50°C 反应 6h。反应完成后将反应液装入透析袋 (MWC0=3500), 在去离子水中透析 2 天后除去游离叶酸, 每天换水 3 次。透析液用乙醚沉淀, 真空干燥得到产物。

**[0020] ④双臂炔端基聚谷氨酸十八烷酯的合成**

步骤一: 将 16.8g 3,5-二羟基苯甲酸甲酯与 26.2g 炔丙基溴溶解于 300mL 丙酮中, 在溶液中加入 15.1g 碳酸钠, 0.1g 二环己烷并-18-冠醚-6。将反应溶液进行加热至回流, 反应 24 小时。反应结束后将沉淀过滤, 滤液进行减压浓缩, 在甲醇中进行重结晶, 得到产品 3,5-二乙炔氧基苯甲酸甲酯。<sup>1</sup>H NMR in CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  (ppm): 2.55 (2H, CCH), 3.91 (3H, CH<sub>3</sub>O), 4.73 (4H, CH<sub>2</sub>CCH), 6.82 (1H, aromatic), 7.29 (2H, aromatic)。

[0021] 步骤二: 将 6.25g 3,5-二乙炔氧基苯甲酸甲酯溶解于 30mL 甲醇中, 将 73.9g 乙二胺溶解于 120mL 乙二胺中, 并在 0°C 条件下缓慢滴加入反应容器中, 滴加过程需 1 小时左右, 而滴加完成后再室温下反应 96 小时。在小于 40°C 的水浴中旋蒸除掉多余的溶剂, 在利用苯/甲醇 (9/1 v/v) 的混合溶液对混合溶液进行重结晶, 在真空烘箱中干燥 24 小时, 得到产品 N-胺乙基 3,5-二乙炔氧基苯胺。<sup>1</sup>H NMR in CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  (ppm): 1.61 (2H,

CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 2.55 (2H, CCH), 2.95 (2H, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 3.49 (2H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.73 (4H, CH<sub>2</sub>CCH), 6.68 (1H, CONH), 6.76 (1H, aromatic), 7.05 (2H, aromatic)。

[0022] 步骤三: 将 0.16g 步骤二中所得到的产品 N-胺乙基 3,5-二乙炔氧基苯胺作为引发剂, 利用开环聚合方式聚合物聚谷氨酸十八烷酯羧酸酐 5.19g, 将单体与引发剂加入聚合管中, 并加入无水 DMF 15mL, 室温下反应 24 小时。聚合物用无水乙醚进行沉淀, 真空烘箱干燥 24 小时。得到产品双臂炔端基聚谷氨酸十八烷酯。

**[0023] ⑤阿霉素分子与聚谷氨酸十八烷酯的胺键连接**

将 5.8mL 胍与 2.43g 上述步骤中得到的双臂炔端基聚谷氨酸十八烷酯溶于 25mL 干燥 DMF 中, 将反应体系加热到 40°C, 反应 1 小时。将粗产品用无水乙醚进行沉淀, 并将沉淀过滤, 真空烘箱干燥 24 小时, 得到胺基双臂炔端基聚谷氨酸十八烷酯。将该产品 5g 与 0.34g 阿霉素单体溶于 DMSO 中, 将反应体系加热至 30 °C, 反应 48 小时, 得到的反应混合溶液用无水甲醇沉淀, 并将沉淀过滤, 真空烘箱干燥 24 小时。制得阿霉素分子接枝的聚谷氨酸十八烷酯。

**[0024] ⑥ AB<sub>2</sub> 杂臂星型嵌段共聚物的合成**

将 3.8g 端基修饰的聚吡咯烷酮与 7.8g 阿霉素分子接枝的聚谷氨酸十八烷酯溶于 20mL 无水 DMF 中, 并加入 6.93mg PMDETA。将反应体系进行三次抽气-通气-解冻循环, 迅速加入溴化亚铜 5.47mg。反应在 35 °C 条件下反应 24 小时。反应所得到的混合溶液过硅胶柱以除去多余的铜盐以及其他杂质。溶液浓缩以后用无水甲醇进行沉淀, 最终得到 AB<sub>2</sub> 杂臂星型嵌段共聚物。

**[0025] ⑦聚合物纳米微胶囊的制备**



用透析法制备聚合物纳米微胶囊。具体方法为：将一种或两种星形聚合物分别溶于 THF 后，移入透析袋中，用 1000 mL 纯水透析，定期换水。透析液用滤膜过滤后，冷冻干燥得到共聚物载药微胶囊。

[0026] 最后应说明的是，以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制，尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细的说明，本领域的普通技术人员应理解，可以对本发明的技术方案进行修改或者同等替换，而不脱离本发明技术方案的精神和范围，其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。

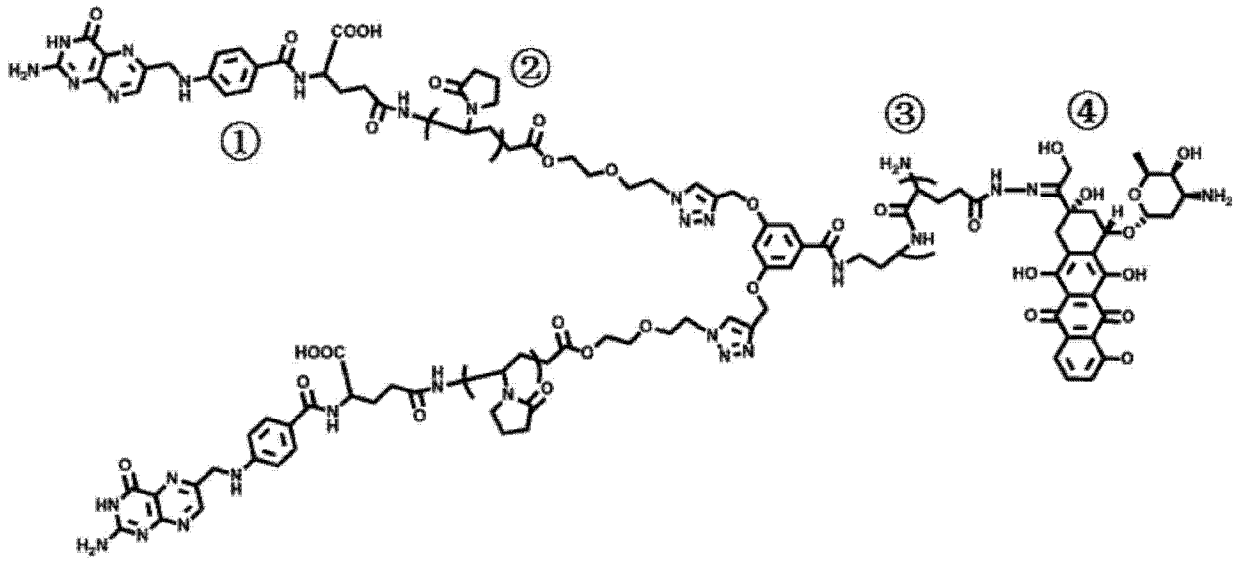


图 1

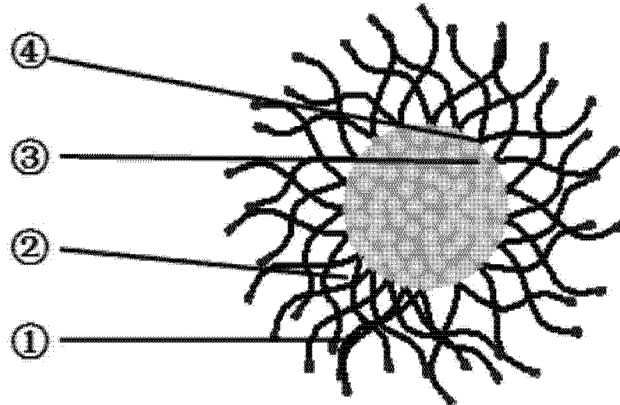


图 2

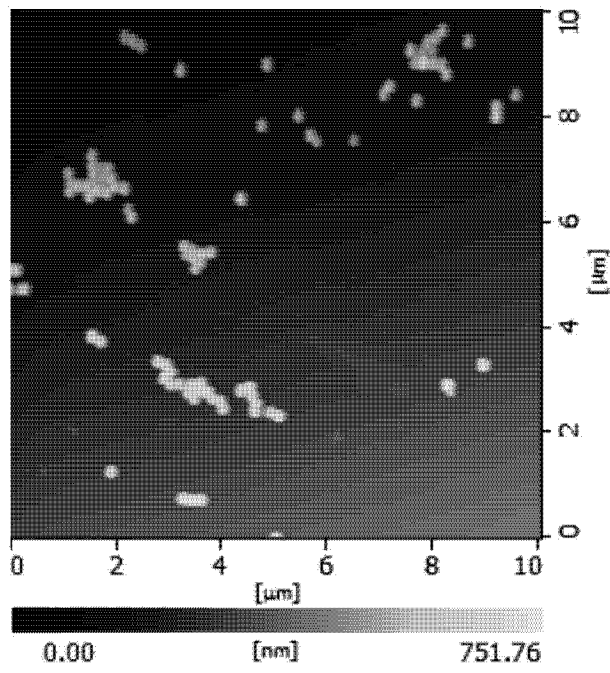


图 3