

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2018 年 6 月 14 日 (14.06.2018)



(10) 国际公布号
WO 2018/102973 A1

- (51) 国际专利分类号:
A61K 9/14 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 31/585 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2016/108628
- (22) 国际申请日: 2016 年 12 月 6 日 (06.12.2016)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (71) 申请人: 江苏大学 (JIANGSU UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省镇江市京口区学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。
- (72) 发明人: 徐希明 (XU, Ximing); 中国江苏省镇江市京口区学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。张辉云 (ZHANG, Huiyun); 中国江苏省镇江市京口区学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。余江南 (YU, Jiangnan); 中国江苏省镇江市京口区学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。

- (74) 代理人: 南京知识律师事务所 (NANJING ZHISHI LAW FIRM OF INTELLECTUAL PROPERTY); 中国江苏省南京市新模范马路 5 号南京科技广场 B 座 9 楼, Jiangsu 210009 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG,

(54) Title: PEGYLATED VITAMIN E PERIPLOCYMARIN CONJUGATE NANOPARTICLES AND PREPARATION METHOD THEREFOR

(54) 发明名称: 一种 PEG 化维生素 E-杠柳次昔偶联物纳米粒及其制法和用途

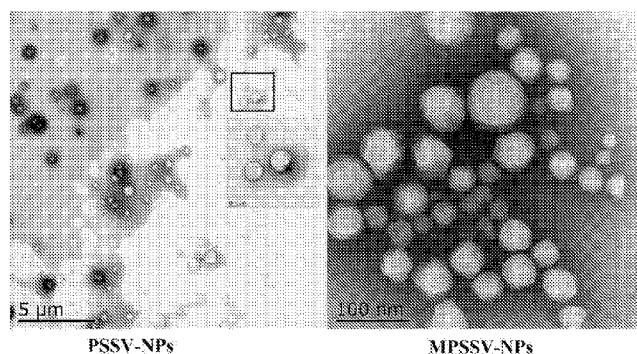


图 3

(57) Abstract: PEGylated vitamin E periplocymarin conjugate nanoparticles. The nanoparticles are prepared in this way: a dithiodiglycolic acid is used as a linker, and the periplocymarin and the vitamin E are coupled to form a prodrug, and the prodrug can be self-assembled into nanoparticles in a water medium. Also disclosed are novel PEGylated vitamin E periplocymarin conjugate nanoparticles (MPSSV-NPs) and a preparation method therefor. Based on the disulfide bond-S-S-coupled vitamin E and the periplocymarin, the PEGylated vitamin E periplocymarin conjugate nanoparticles are self assembled by means of modification of methoxy-2000-linoleic acid (PEG2000-LD). The nanoparticles have the following efficacies: 1, the nanoparticles can improve the stability of the drug prototype periplocymarin in a body and out the body, and prolong the circulation time in the body; 2, the nano prodrug releases and degrade the sensitivity to the glutathione (GSH); 3, significant liver/liver cancer targetability is provided; and 4, the treatment effect of the drug prototype periplocymarin on the liver cancer is improved.



CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则4.17的声明：

— 发明人资格(细则4.17(iv))

本国际公布：

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

(57) 摘要：一种维生素E-杠柳次苷偶联物纳米粒，它是通过二硫醇二羟基乙酸作为连接剂，将杠柳次苷和维生素E进行偶联形成前体药物，该前体药物能在水介质中可自组装为纳米粒。还公开了一种新型PEG化维生素E-杠柳次苷偶联物纳米粒(MPSSV-NPs)及其制备方法，它是在二硫键-S-S-偶联维生素E和杠柳次苷的基础上，再以甲氧基聚乙二醇2000-亚油酸(PEG2000-LD)修饰的自组装PEG化维生素E-杠柳次苷偶联物纳米粒，该纳米粒有如下功效：1、该纳米前药能提高原型药杠柳次苷的体内外稳定性，延长体内循环时间；2、该纳米前药的释放和降解对谷胱甘肽(GSH)敏感；3具有显著的肝/肝癌靶向性；4，提高了原型药杠柳次苷对肝癌的治疗效果。

一种 PEG 化维生素 E-杠柳次苷偶联物纳米粒及其制法和用途

技术领域

本发明涉及维生素 E-杠柳次苷偶联物纳米粒和新型 PEG 化维生素 E-杠柳次苷偶联物纳米粒及其制备方法和作为抗肿瘤药物的用途。

背景技术

强心甙类固醇活性成分应用于肿瘤治疗始于中国的古代，当时记载着蟾蜍分泌物可用于治疗癌症。目前已发现蟾蜍分泌物中起抗肿瘤作用的成分为蟾毒灵，一种甲型强心甙类固醇成分。有研究报道，在因心脏病而使用洋地黄毒苷的患者中发现血液中洋地黄毒苷的浓度高低和血液及泌尿系统肿瘤发生率呈显著负相关性，且使用洋地黄毒苷的乳腺癌患者的死亡率明显低于未使用洋地黄毒苷的患者。目前强心甙类固醇活性成分主要作为强心剂应用于临床，而作为化疗药物用于肿瘤临床治疗的案例还没有报道，大部分强心甙类固醇抗肿瘤活性成分处于临床前研究，其中半合成药物 UNBS-1450 和 PBI-05204 已经在美国进入临床 I 期用于治疗晚期耐药恶性肿瘤的研究。而将前体设计技术应用于具有抗肿瘤活性的强心甙类固醇成分的药物开发研究尚处于起步阶段。目前大部分研究工作者将目光关注于对蟾毒灵的研究，其中包括包载蟾毒灵的脂质体、壳聚糖纳米粒和 PEG 修饰的前体药物。

杠柳次苷 (PPM) 具有多种药理活性，如强心、抗炎、抗肿瘤等。目前 PPM 在临床应用的较少，局限于在细胞和动物水平的研究。有研究表明 PPM 的苷元具有明显体内外抑瘤效果，其效果与 5-Fu 相当，但有一定的不良反应如食欲减退、脱毛、抗拒等[参见：韩宇博和赵爱国，杠柳苷元的抗肿瘤作用研究[J]. 中国小儿血液与肿瘤杂志，2008，13，(1)：1-5]。对 PPM 的研究较少，体外细胞毒性评价显示其明显抑制 PC3、U937、HCT-8、Bel-7402、BGC823、A549 和 A2780 等肿瘤细胞的增殖 (IC₅₀ 值在 0.02-0.29 μ M，显著高于杠柳苷元) (参见：Spera D, Siciliano T, De T N, et al. *Planta Med.* 2007, 73: 384-387)。药动学研究表明 PPM 大鼠口服给药后在 4h 左右达到最大浓度，组织分布研究显示其在肝脏分布最多，

其次为结肠和心脏（参见：Yan K, Wang X, Jia Y, et al.. Biomed Chromatogr. 2015, 30: 1195-1201）。对于杠柳次苷的剂型研究还无见报道。

中国专利申请 CN201010583339.0《一种杠柳次苷的制备方法》，是关于杠柳次苷的制备方法，未涉及到该药在抗肿瘤活性方面的应用。

发明内容

本发明的目的之一是，提供维生素 E-杠柳次苷偶联物及其合成方法。

本发明的目的之二是，提供一种新型 PEG 化维生素 E-杠柳次苷偶联物纳米粒及其制备方法。

本发明的目的之三是，提供所述的偶联物纳米粒在治疗肝癌中的应用。

本发明的技术方案如下：

一种维生素 E-杠柳次苷偶联物纳米粒，它是以二硫键-S-S-偶联维生素 E 和杠柳次苷的自组装纳米粒。

上述的维生素 E-杠柳次苷偶联物纳米粒，所述的杠柳次苷可以由杠柳苷元、蟾毒灵、海葱次苷或杠柳毒苷等其他强心甙类固醇成分所替代，得到的维生素 E-杠柳苷元、蟾毒灵、海葱次苷或杠柳毒苷的偶联物纳米粒。

一种制备上述的维生素 E-杠柳次苷偶联物纳米粒的方法，它包括下列步骤：

步骤 1：称取一定量二硫醇二羟基乙酸加入到乙酸酐中，在 30 °C 搅拌反应 2-24 h，反应后加入适量甲苯，加压旋干甲苯和乙酸酐得油状液体，加入无水二氯甲烷溶解，随后加入维生素 E，维生素 E 与二硫醇二羟基乙酸的物质的量之比为 10：1~5：1，以及加入适量的 4-二甲氨基吡啶（DMAP），DMAP 与维生素 E 的摩尔比为 1：10，室温下搅拌反应 12~36 h，采用硅胶柱纯化，洗脱剂为正己烷/乙酸乙酯/乙酸=10/1/1，得产物 VE-S-S-COOH；

步骤 2：称取步骤 1 的产物 VE-S-S-COOH 和杠柳次苷，VE-S-S-COOH 和杠柳次苷的摩尔比为 1：1~3：1，加入无水二氯甲烷溶解后，加入 DCC 和 DMAP，它们与杠柳次苷的摩尔比为 1：1~2：1，室温搅拌反应 2-24 h，过滤，采用硅胶柱纯化，洗脱剂为石油醚/乙酸乙酯=2/3，收集目标产物 PPM-S-S-VE，即为维生素 E-杠柳次苷偶联物；

步骤 3：配制步骤 2 产物 PPM-S-S-VE 的无水乙醇溶液，浓度为 10 mg/mL~40 mg/mL，在搅拌条件下，慢慢滴加入到双蒸水中，旋干除去乙醇，自组装得

维生素 E-杠柳次苷偶联物纳米粒 (PSSV-NPs)。

上述制备维生素 E-杠柳次苷偶联物纳米粒的方法, 步骤 3 中有机溶剂无水乙醇可以选自甲醇、DMSO、乙腈、丙酮中的一种或者多种混合溶剂所替代。

上述的维生素 E-杠柳次苷偶联物纳米粒的制备方法, 步骤 1 和 2 中的纯化方法不限于硅胶柱纯化, 可以采用 C8、C18 填料柱层析或液相制备纯化。

上述的维生素 E-杠柳次苷偶联物纳米粒的制备方法, 步骤 2 所述的杠柳次苷可以由杠柳苷元、蟾毒灵、海葱次苷或杠柳毒苷等其他强心甙类固醇成分所替代制得维生素 E-杠柳苷元、蟾毒灵、海葱次苷或杠柳毒苷的偶联物纳米粒。

一种新型 PEG 化维生素 E-杠柳次苷偶联物纳米粒 (MPSSV-NPs), 它是在二硫键-S-S-偶联维生素 E 和杠柳次苷的基础上, 再以甲氧基聚乙二醇 2000-亚油酸 (PEG2000-LD) 修饰的自组装 PEG 化维生素 E-杠柳次苷偶联物纳米粒, PEG2000-LD 能通过疏水端亚油酸与维生素 E 通过 $\pi-\pi$ 键和疏水性相亲的双重作用力吸附在 PSSV-NPs 表面, 所述的 PEG 化维生素 E-杠柳次苷偶联物纳米粒的粒径范围为 130nm-230nm 之间, zeta 电位为 -23.16—-28.42 mV 之间, 投射电镜观察纳米粒形态呈规则球形, 分散均匀, 表面有 PEG 化外壳。

上述的新型 PEG 化维生素 E-杠柳次苷偶联物纳米粒 (MPSSV-NPs), 所述的杠柳次苷可以由杠柳苷元、蟾毒灵、海葱次苷或杠柳毒苷等其他强心甙类固醇成分所替代得到 PEG 化维生素 E-杠柳苷元、蟾毒灵、海葱次苷或杠柳毒苷的偶联物纳米粒。

一种制备上述的新型 PEG 化维生素 E-杠柳次苷偶联物纳米粒的方法,

步骤 1: 将一定量亚油酸与 mPEG、DCC 和 DMAP (它们的摩尔比为 2 : 1 : 2 : 1), 加入无水二氯甲烷, 常温下搅拌反应 12-24 h, 过滤, 用饱和氯化钠溶液洗二氯甲烷层后, 加入无水硫酸钠干燥, 过滤有机层, 旋干后加入石油醚洗三次, 过滤得不溶物即为目标产物甲氧基聚乙二醇 2000-亚油酸 (PEG2000-LD);

步骤 2: 配制上述的产物 PPM-S-S-VE 的无水乙醇溶液 (10 mg/mL~40 mg/mL), 并加入不同量的步骤 1 产物 PEG2000-LD, 在搅拌条件下, 将含有 PEG2000-LD 的 PPM-S-S-VE 的无水乙醇溶液慢慢滴加入到双蒸水中, 旋干除去乙醇, 自组装得新型 PEG 化维生素 E-杠柳次苷偶联物纳米粒 (MPSSV-NPs)。

上述制备新型 PEG 化维生素 E-杠柳次苷偶联物纳米粒的方法, 步骤 (2) 中所述的维生素 E-杠柳次苷可以由维生素 E-杠柳苷元、维生素 E-蟾毒灵、维生素

E-海葱次苷或维生素 E-杠柳毒苷等所替代,制得新型 PEG 化维生素 E-杠柳苷元、蟾毒灵、海葱次苷或杠柳毒苷的偶联物纳米粒。

上述制备新型 PEG 化维生素 E-杠柳次苷偶联物纳米粒的方法,步骤(3)中 mPEG 的分子量可以是 200-5000 之间。

本发明进一步提供了新型 PEG 化维生素 E-杠柳次苷偶联物纳米粒的表征。动态光散射法测定纳米粒的粒径范围为 130nm-230nm 之间, zeta 电位为 -23.16—-28.42 mV 之间。投射电镜观察纳米粒形态呈规则球形,分散均匀,表面有 PEG 化外壳。

本发明进一步提供了新型 PEG 化维生素 E-杠柳次苷偶联物纳米粒的稳定性和体外释放特性研究。一个月内该纳米粒在水和 PBS (pH=7.4) 介质中的粒径无明显变化。该纳米粒在 PBS (pH=7.4) 介质中药物释放和降解速率随着谷胱甘肽浓度的升高而提高,具有一定的氧化还原感应性。

本发明进一步提供了新型 PEG 化维生素 E-杠柳次苷偶联物纳米粒的药动学参数。该纳米粒在大鼠体内的循环时间明显长于原型药。

本发明进一步提供了新型 PEG 化维生素 E-杠柳次苷偶联物纳米粒的组织分布特性。以 H22 肝癌实体瘤为模型进行组织分布实验,结果表明,该纳米粒明显具有肝脏和肿瘤靶向性。

本发明进一步提供了新型 PEG 化维生素 E-杠柳次苷偶联物纳米粒在治疗肝癌中的应用。以 H22 肝癌实体瘤为模型进行体内抗肿瘤活性实验。实验结果表明,该纳米粒可以明显抑制 H22 肝癌实体瘤的生长,可用于治疗肝癌。

有益效果

(1) 本发明合成维生素 E-杠柳次苷偶联物,且其在水中能自组装成纳米粒 (PSSV-NPs),并首次采用 PEG2000-LD 修饰 PSSV-NPs 得到新型 PEG 化维生素 E-杠柳次苷偶联物纳米粒。

(2) 本发明制备得到新型 PEG 化维生素 E-杠柳次苷偶联物纳米粒的粒径降低、稳定性提高、体内循环时间延长、肿瘤组织分布提高、体内抑瘤效果增强,为强心甙类固醇活性成分高效低毒和纳米化靶向给药提供了新载体。

附图说明

图 1 为目标产物 (PPM-S-S-VE) 的 ^1H -NMR 图谱;

图 2 为目标产物 (mPEG2000-LD) 的 ^1H -NMR 图谱;

图 3 为 PSSV-NPs 和 MPSSV-NPs 的投射电镜图;

图 4 为 PSSV-NPs 和不同比例 (质量比为 1:0、1:0.1、1:0.2、1:0.4、1:0.8) 的 MPSSV-NPs 在水介质 (A) 和 pH=7.4 的 PBS (B) 介质中的稳定性考察;

图 5 为体外释放实验: MPSSV-NP 在不同 MPSSV-NP 在含 GSH 的四种介质 (10 mM、1 mM、10 μM 、和 1 μM GSH) 中的 PPM 的累计释放率 (A) 和 PPM-S-S-VE 偶联物的降解率 (B);

图 6 为 PSSV-NPs 和 MPSSV-NPs 大鼠注射给药后体内药时曲线;

图 7 为 PSSV-NPs 和 MPSSV-NPs 尾静脉注射给药后各个时间点后血浆及各个脏器中药物含量 ($\mu\text{g/g}$) ($n=5$);

图 8 为 PSSV-NPs 和 MPSSV-NPs 对 H22 肝癌实体瘤的药效图: (A) 给药后实体瘤体积生长变化曲线图; (B) 给药后小鼠的体重变化图; (C) 给药 11 天后的实体瘤; 给药 11 天后的实体瘤的质量 (D)。

具体实施方式

以下所列实施例有助于本领域技术人员更好地理解本发明,但不以任何方式限制本发明。

实施例 1. 维生素 E-杠柳次苷偶联物的制备

称取二硫醇二羟基乙酸 (0.2g, 1.10 mmol) 加入到 3 mL 乙酸酐中, 在 30°C 搅拌反应 2 h, 反应后加入适量甲苯, 加压旋干甲苯和乙酸酐得油状液体, 加入 2 mL 无水二氯甲烷溶解, 随后加入 VE (0.1 g, 0.23 mmol) 和适量 DMAP, 室温下搅拌反应 5 min, 采用硅胶柱纯化, 洗脱剂为正己烷/乙酸乙酯/乙酸=10/1/1, 得产物 VE-S-S-COOH (114 mg)。

称取 VE-S-S-COOH (120mg) 和杠柳次苷 (100mg), 加入 6 mL 无水二氯甲烷溶解后, 加入二环己基碳二亚胺 (DCC) (48mg) 和 4-二甲氨基吡啶 (DMAP) (30mg), 室温搅拌反应 2 h, 过滤除去二环己基脲 (DCU), 采用硅胶柱纯化, 洗脱剂为石油醚/乙酸乙酯=2/3, 收集目标产物 PPM-S-S-VE (80 mg, 得率为 37.6%)。

上述目标产物采用质谱和 $^1\text{H-NMR}$ 进行表征, 如图 1 所示。

实施例 2. mPEG2000-LD 的合成、纯化和表征

称取亚油酸 (500 mg)、mPEG (100mg)、DCC (400mg) 和 DMAP (240 mg), 加入 20 mL 无水二氯甲烷, 搅拌反应 12h, 过滤除去 DCU, 用饱和氯化钠溶液洗二氯甲烷层后, 加入无水硫酸钠干燥, 过滤有机层, 旋干后加入石油醚洗三次, 过滤得不溶物即为目标产物 PEG2000-LD, 采用 $^1\text{H-NMR}$ 进行表征, 如图 2 所示。

实施例 3. PPM-S-S-VE 纳米粒 (PSSV-NPs) 和新型 PEG 化维生素 E-杠柳次苷偶联物纳米粒 (MPSSV-NPs) 的制备

采用一步纳米沉淀法制备纳米粒, 步骤如下: 配制 PPM-S-S-VE 无水乙醇溶液 20 mg/mL, 在搅拌条件下, 吸取 200 μL 慢慢滴加入到 2 mL 双蒸水中, 旋干除去乙醇, 得 PSSV-NPs。新型 PEG 化维生素 E-杠柳次苷偶联物纳米粒 (MPSSV-NPs) 步骤如上, 不同的是在 PPM-S-S-VE 无水乙醇溶液中加入不同含量的 mPEG2000-LD (质量比为 1 : 0.1、1 : 0.2、1 : 0.4、1 : 0.8)。

实施例 4. PSSV-NPs 和新型 PEG 化维生素 E-杠柳次苷偶联物纳米粒 (MPSSV-NPs) 的表征

采用 bruke 粒径与 Zeta 电位分析仪, 以动态光散射法测定纳米粒的粒径与 Zeta 电位。测定前用去离子水稀释样品至适当浓度。取纳米粒溶液适量, 滴加在铜网上, 磷钨酸负染 1 min, 滤纸吸干, 干燥后置于透射电镜下观察纳米粒的外观形态并拍照, 如图 3 所示, PSSV-NPs 和 MPSSV-NPs 纳米粒形态均呈规则球形, 分散均匀, 而 MPSSV-NPs 表面有 PEG 化外壳。

实施例 5 稳定性试验

制备不同质量比例 PEG 化的 MPSSV-NPs (1 : 0.1、1 : 0.2、1 : 0.4、1 : 0.8), 分别分散在水、PBS (pH=7.4) 的介质中, 常温放置, 在时间点第 1、2、3、5、10、15、20、25、30 天时测量粒径, 评价其稳定性。如图 4 所示, mPEG-LD 修饰的 MPSSV-NPs 不仅能提高其在 PBS (pH=7.4) 中的稳定性, 而且 PEG 化后

能提高其在体内的循环时间。

实施例 6 体外释放

将 100 μL 的浓度为 1 mg/mL 的 MPSSV-NPs 放入到介质 2.5 mL 的不同浓度 GSH (1 μM 、10 μM 、1 mM 、10 mM) 的 PBS ($\text{pH}=7.4$) 当中, 放置在 37 $^{\circ}\text{C}$ 中水浴震荡, 转速为 100 rpm, 在时间点 0.5 h、1 h、2 h、4 h、8 h、12 h、24 h 时取 100 μL , 加 300 μL 甲醇溶解, 液相测定 PPM 和 PPM-S-S-VE 的含量, 计算释放率。如图 5 所示, MPSSV-NPs 在 GSH 低浓度时 (1 μM 和 10 μM) 的降解速率明显低于高浓度 (1 mM 和 10 mM), 且在低浓度时 PPM 的释放率明显低于高浓度时, 而体内血浆环境的 GSH 浓度处于 1 μM -10 μM 之间, 而肿瘤环境的 GSH 浓度处于 1 mM -10 mM 之间, 因此 MPSSV-NPs 在体内血浆环境缓慢释放 PPM, 使纳米粒在体内血浆中有足够的时间通过 EPR 效应而聚集在肿瘤组织中, 而到达肿瘤环境后能快速释放 PPM, 表明 MPSSV-NPs 具有一定的肿瘤靶向性。

实施例 7 药动力学实验

15 只健康雄性 SD 大鼠在适应环境三天后进行实验。随机分为 3 组, 每组 5 只大鼠, 给药前禁食 12 小时, 自由饮水。按 4 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量分别尾静脉注射杠柳次苷、PSSV-NPs 和 MPSSV-NPs 溶液。于给药后 0.25、0.5、1、1.5、2、4、6、8、12、24 h 大鼠眼球后丛静脉采血约 0.5 mL , 置肝素抗凝管中, 4000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min 分离血浆, -20°C 下冷冻存储直至分析。如图 6 所示, mPEG-LD 修饰的 PSSV-NPs 能显著提高其在体内血浆中的滞留时间

实施例 8 在 H22 实体瘤小鼠中体内组织分布实验

接种 1 周后, 小鼠右侧腋下皮下瘤体积长到约 1 cm^3 左右大小, 成瘤率为 100%, 逐个称取小鼠体重。30 只雌性 H22 实体瘤 ICR 小鼠随机分组, 每组 5 只小鼠, 进行组织分布实验, 环境适应期间正常进水进食, 于实验前 12 小时禁食, 自由饮水。分别制备浓度为 0.8 mg/mL 的 PPM 及 1.66 mg/mL 的纳米前药 PSSV-NPs 和 MPSSV-NPs, 尾静脉注射给药, 给药剂量分别为 4 mg/kg 和 8.3 mg/kg 。体重为 20 g 的小鼠注射体积为 0.1 mL , 按小鼠实际体重调整注射体积。

于给药后 1、2 和 4 小时处死，取血、心、肝、脾、肺、肾、瘤，小鼠摘眼球取血，静置半小时以后，6000 rpm 离心 10 min 取血浆，置于-20 °C 冰箱保存；精密称取一定量小鼠各脏器，按 $0.2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 加入 0.9%NaCl 溶液，高速剪切机捣碎组织样品，置于-20 °C 冰箱保存。结果如图 7 所示，MPSSV-NPs 具有一定肝和肿瘤靶向性。

实施例 9 纳米前药在 H22 实体瘤小鼠中药效学研究

接种 1 周后，小鼠右侧腋下皮下瘤直径长到约 0.5 cm 左右大小，成瘤率为 100%，逐个称取小鼠体重，用随机数字表法将其分成 4 组，每组 6 只。

- (1) 空白模型组：小鼠尾静脉注射 PBS (pH=7.4) 5 mL/kg，每 2 天给药 1 次。
- (2) PPM 组：小鼠尾静脉注射 4 mg/kg，每 2 天给药 1 次。
- (3) PSSV-NP 组：小鼠尾静脉注射 8.3 mg/kg，每 2 天给药 1 次。
- (4) MPSSV-NP 组：小鼠尾静脉注射 8.3 mg/kg，每 2 天给药 1 次。

结果如图 8 所示，表明 PPM、PSSV-NPs 和 MPSSV-NPs 能显著抑制肿瘤的生长，而 MPSSV-NPs 的抑制作用最强。

权 利 要 求 书

1、一种维生素 E-杠柳次苷偶联物纳米粒，其特征是：维生素 E-杠柳次苷偶联物是通过二硫醇二羟基乙酸作为连接剂，将杠柳次苷和维生素 E 进行偶联形成前体药物，该前体药物能在水介质中可自组装为纳米粒。

2、根据权利要求 1 所述的维生素 E-杠柳次苷偶联物纳米粒，其特征是：所述的杠柳次苷由杠柳苷元、蟾毒灵、海葱次苷或杠柳毒苷所替代，得到的维生素 E-杠柳苷元、蟾毒灵、海葱次苷或杠柳毒苷的偶联物纳米粒。

3、一种制备权利要求 1 所述的维生素 E-杠柳次苷偶联物纳米粒的方法，其特征是它包括下列步骤：

步骤 1：称取一定量二硫醇二羟基乙酸加入到乙酸酐中，在 30 °C 搅拌反应 2 -24 h，反应后加入适量甲苯，加压旋干甲苯和乙酸酐得油状液体，加入无水二氯甲烷溶解，随后加入维生素 E，维生素 E 与二硫醇二羟基乙酸的物质的量之比为 10：1~5：1，以及加入适量的 4-二甲氨基吡啶（DMAP），DMAP 与维生素 E 的摩尔比为 1：10，室温下搅拌反应 12~36 h，采用硅胶柱纯化，洗脱剂为正己烷/乙酸乙酯/乙酸=10/1/1，得产物 VE-S-S-COOH；

步骤 2：称取步骤 1 的产物 VE-S-S-COOH 和杠柳次苷，VE-S-S-COOH 和杠柳次苷的摩尔比为 1：1~3：1，加入无水二氯甲烷溶解后，加入二环己基碳二亚胺（DCC）和 DMAP，它们与杠柳次苷的摩尔比为 1：1~2：1，室温搅拌反应 2 -24 h，过滤，采用硅胶柱纯化，洗脱剂为石油醚/乙酸乙酯=2/3，收集目标产物 PPM-S-S-VE，即为维生素 E-杠柳次苷偶联物；

步骤 3：配制步骤 2 产物 PPM-S-S-VE 的无水乙醇溶液，浓度为 10 mg/mL~40 mg/mL，在搅拌条件下，慢慢滴加入到双蒸水中，旋干除去乙醇，自组装得维生素 E-杠柳次苷偶联物纳米粒（PSSV-NPs）。

4、根据权利要求 3 所述制备维生素 E-杠柳次苷偶联物纳米粒的方法，其特征是：步骤 3 中所述的有机溶剂无水乙醇以甲醇、DMSO、乙腈或丙酮中的一种或者多种的混合溶剂所替代。

5、根据权利要求 3 所述的维生素 E-杠柳次苷偶联物纳米粒的制备方法，其特征是：步骤 1 和 2 中的纯化方法采用 C8 或 C18 填料柱层析或液相制备纯化。

6、根据权利要求3所述的维生素E-杠柳次苷偶联物纳米粒的制备方法，其特征是：步骤2所述的杠柳次苷由杠柳苷元、蟾毒灵、海葱次苷或杠柳毒苷所替代制得维生素E-杠柳苷元、蟾毒灵、海葱次苷或杠柳毒苷的偶联物纳米粒。

7、一种新型PEG化维生素E-杠柳次苷偶联物纳米粒，其特征是：它是在二硫键-S-S-偶联维生素E和杠柳次苷的基础上，再以甲氧基聚乙二醇2000-亚油酸（PEG2000-LD）修饰的自组装PEG化维生素E-杠柳次苷偶联物纳米粒，投射电镜观察纳米粒形态呈规则球形，分散均匀，表面有PEG化外壳，所述的PEG化维生素E-杠柳次苷偶联物纳米粒的粒径范围为130nm-230nm之间，zeta电位为-23.16—-28.42 mV之间。

8、根据权利要求7所述的新型PEG化维生素E-杠柳次苷偶联物纳米粒，其特征是：所述的杠柳次苷由杠柳苷元、蟾毒灵、海葱次苷或杠柳毒苷所替代得到PEG化维生素E-杠柳苷元、蟾毒灵、海葱次苷或杠柳毒苷的偶联物纳米粒。

9、一种制备权利要求7上述的新型PEG化维生素E-杠柳次苷偶联物纳米粒的方法，其特征是它包括如下步骤：

步骤1：将一定量亚油酸与聚乙二醇（mPEG）、DCC和DMAP，加入无水二氯甲烷，（mPEG）、DCC和DMAP的摩尔比为2：1：2：1，常温下搅拌反应12-24 h，过滤，用饱和氯化钠溶液洗二氯甲烷层后，加入无水硫酸钠干燥，过滤有机层，旋干后加入石油醚洗三次，过滤得不溶物即为目标产物PEG2000-LD，所述的mPEG的数均分子量是200-5000之间；

步骤2：配制上述的产物PPM-S-S-VE的无水乙醇溶液，浓度为10 mg/mL～40 mg/mL，并加入不同量的步骤1产物PEG2000-LD，在搅拌条件下，将含有PEG2000-LD的PPM-S-S-VE的无水乙醇溶液慢慢滴加入到双蒸水中，旋干除去乙醇，自组装得新型PEG化维生素E-杠柳次苷偶联物纳米粒（MPSSV-NPs）。

10、根据权利要求9所述的制备新型PEG化维生素E-杠柳次苷偶联物纳米粒的方法，其特征是：步骤（2）中所述的维生素E-杠柳次苷由维生素E-杠柳苷元、维生素E-蟾毒灵、维生素E-海葱次苷或维生素E-杠柳毒苷所替代，制得新型PEG化维生素E-杠柳苷元、蟾毒灵、海葱次苷或杠柳毒苷的偶联物纳米粒。

11、权利要求1所述的维生素E-杠柳次苷偶联物纳米粒或权利要求7所述的新型PEG化维生素E-杠柳次苷偶联物纳米粒在制备抗肿瘤药物中的应用。

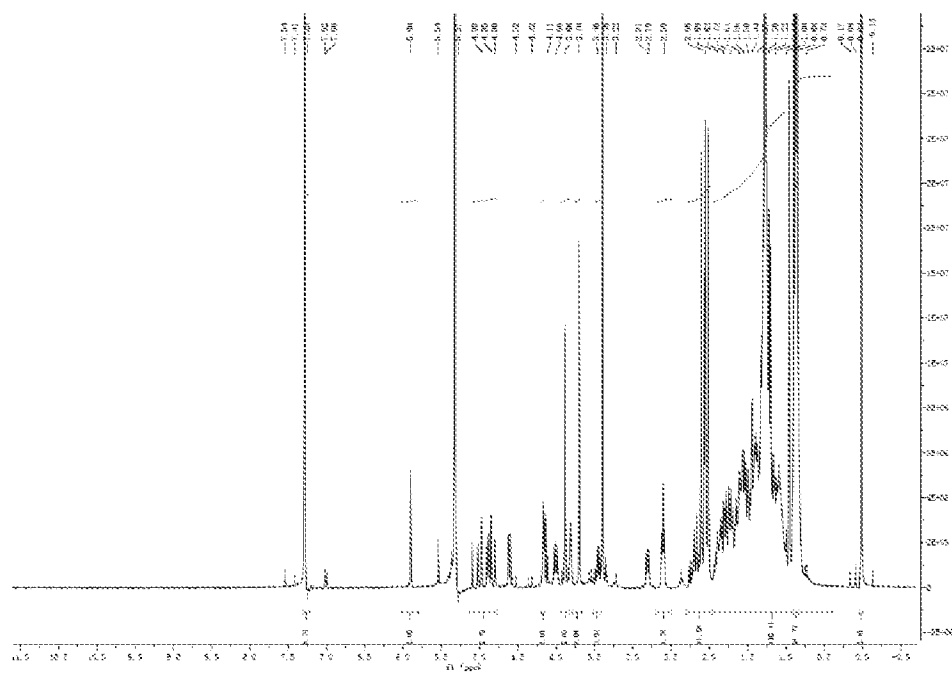


图 1

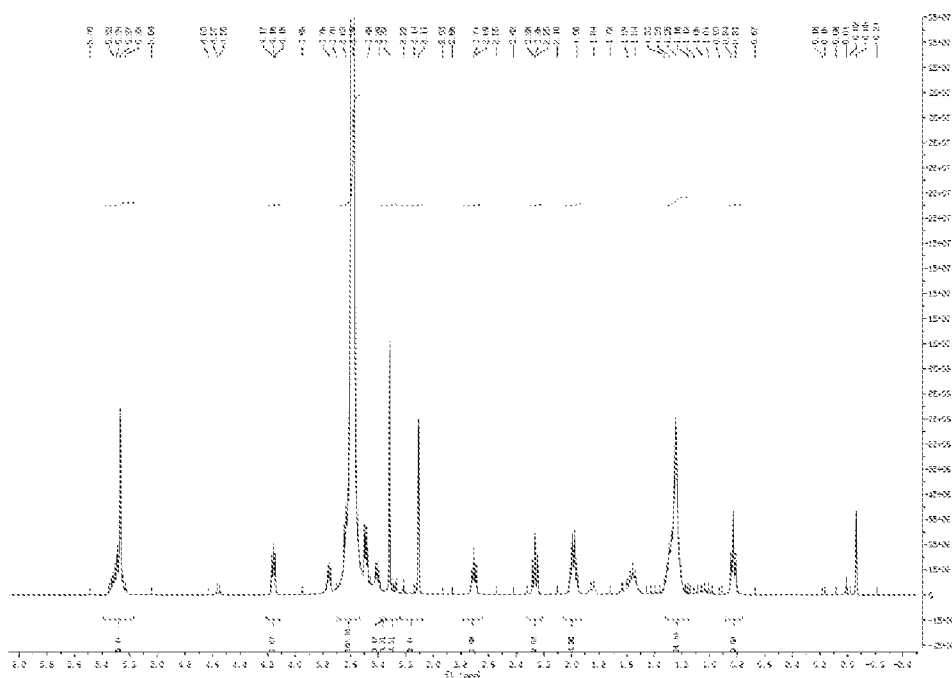


图 2

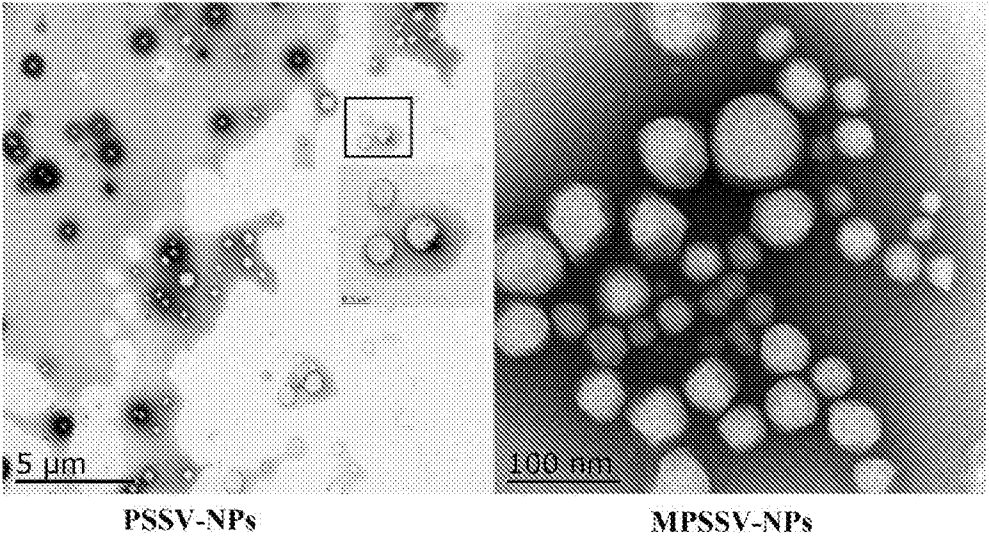


图 3

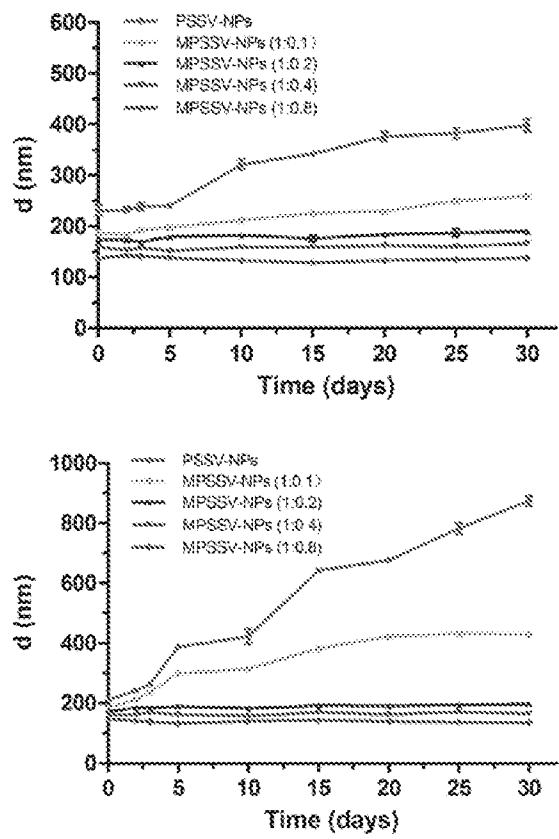


图 4

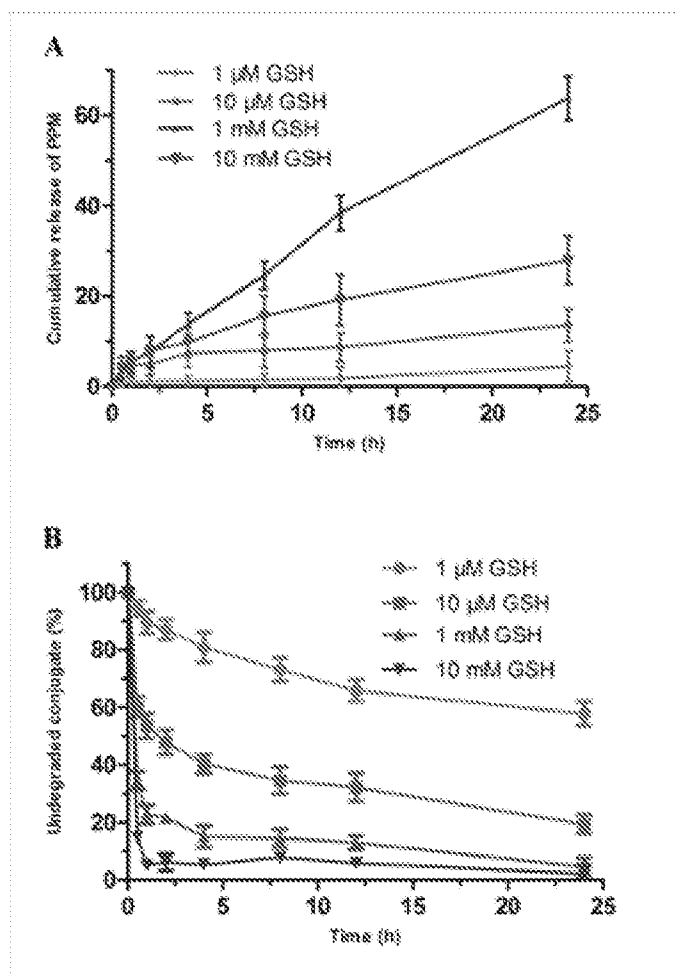


图 5

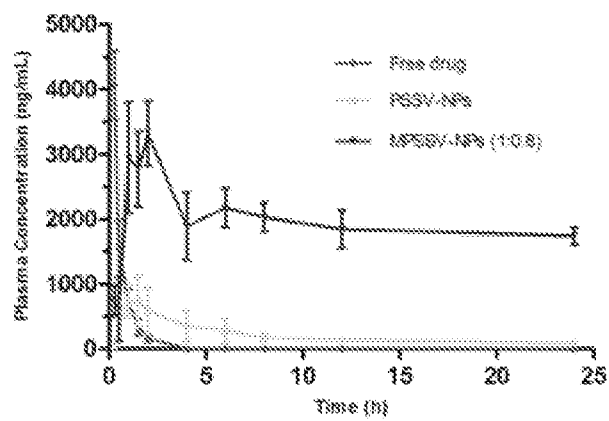


图 6

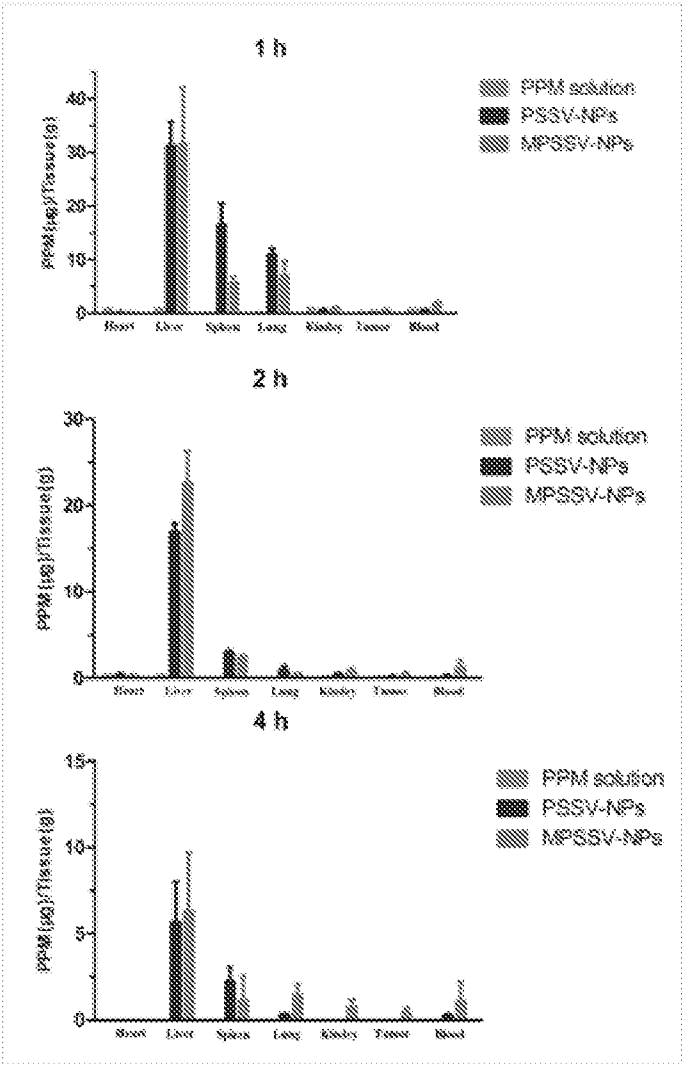


图 7

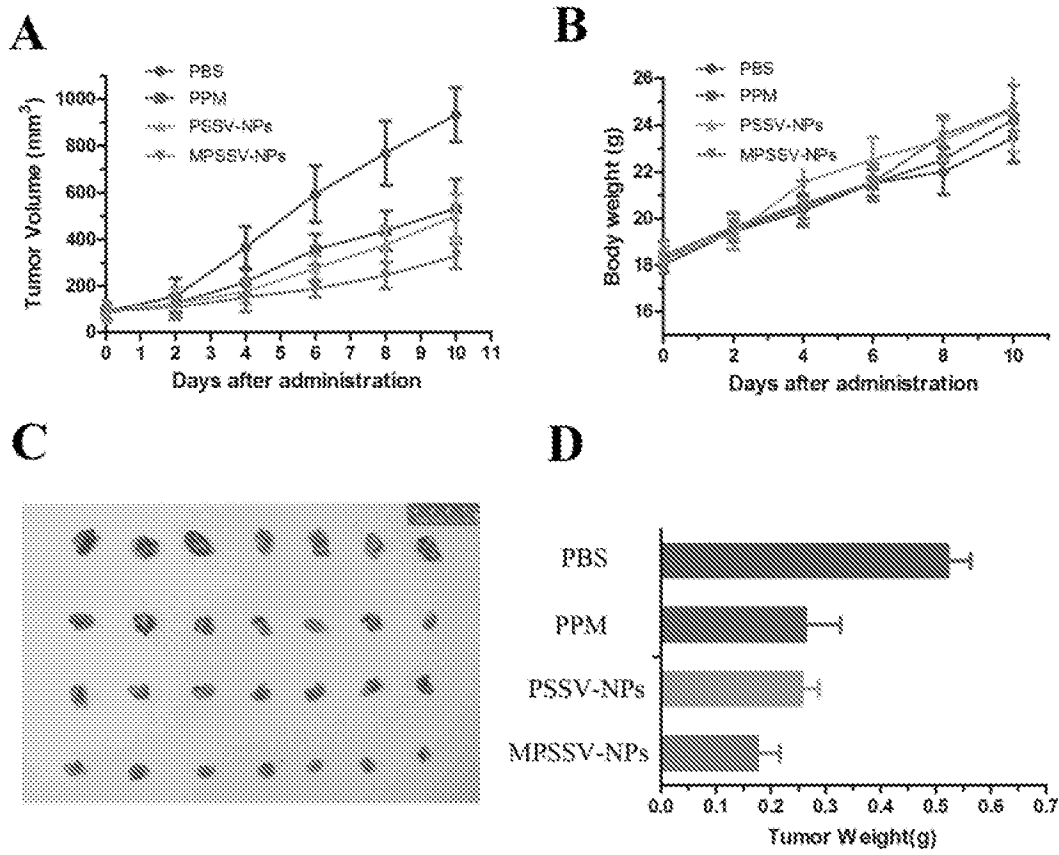


图 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/108628

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 9/14 (2006.01) i; A61K 31/585 (2006.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPODOC, CNKI, CNABS, PubMed, GOOGLE Scholar, ISI Web of Knowledge, 徐希明, 余江南, 徐文倩, 张辉云, 江苏大学, 杠柳苷元, 3BETA, 5BETA, 14BETA-三羟基-8BETA-H-20(22)内酯甙, 杠柳甙元, 杠柳次苷, 杠柳毒苷, 杠柳苷 G, 强心甙类固醇, 维生素 E, 偶联, 纳米粒, 二硫醇二羟基乙酸, 蟾毒灵, 海葱次苷, 杠柳毒苷, 二氯甲烷, PEGylated, self-assembly, Vitamin E, PPM-S-S-VE, PSSV-NPs, cardiotonic steroid, glucoperiplocymarin, periplocoside, Periplogenin, Periplocymarin, conjugate, 514-39-6

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 1850847 A (TIANJIN UNIVERSITY OF TRADITIONAL CHINESE MEDICINE) 25 October 2006 (25.10.2006), claims 1-7, and description, paragraphs [0002]-[0005]	1-11
A	CN 102154417 A (TIANJIN UNIVERSITY OF TRADITIONAL CHINESE MEDICINE) 17 August 2011 (17.08.2011), claims 1-10, and description, paragraphs [0002]-[0005]	1-11
A	CN 103288911 A (JINAN UNIVERSITY) 11 September 2013 (11.09.2013), claims 1-10	1-11
A	CN 105687251 A (THE FOURTH MILITARY MEDICAL UNIVERSITY OF THE CHINESE PEOPLE'S LIBERATION ARMY) 22 June 2016 (22.06.2016), claims 1-7	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 22 June 2017	Date of mailing of the international search report 14 July 2017
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer TU, Haihua Telephone No. (86-10) 62413749

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2016/108628

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 1850847 A	25 October 2006	None	
CN 102154417 A	17 August 2011	None	
CN 103288911 A	11 September 2013	CN 103288911 B	09 September 2015
CN 105687251 A	22 June 2016	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2016/108628

A. 主题的分类

A61K 9/14(2006.01)i; A61K 31/585(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

A61K ; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

WPI, EPODOC, CNKI, CNABS, PubMed, GOOGLE Scholar, ISI Web of Knowledge, 徐希明, 余江南, 徐文倩, 张辉云, 江苏大学, 杠柳昔元, 3BETA, 5BETA, 14BETA-三羟基-8BETA-H-20(22)内酯甙, 杠柳甙元, 杠柳次苷, 杠柳毒苷, 杠柳苷G, 强心甙类固醇, 维生素E, 偶联, 纳米粒, 二硫醇二羟基乙酸, 蟾毒灵, 海葱次苷, 杠柳毒苷, 二氯甲烷, PEGylated, self-assembly, Vitamin E, PPM-S-S-VE, PSSV-NPs, cardiotonic steroid, glucoperiplocymarin, periplocoside, Periplogenin, Periplocymarin, conjugate, 514-39-6

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 1850847 A (天津中医药大学) 2006年 10月 25日 (2006 - 10 - 25) 权利要求1-7, 说明书第2-5段	1-11
A	CN 102154417 A (天津中医药大学) 2011年 8月 17日 (2011 - 08 - 17) 权利要求1-10, 说明书第2-5段	1-11
A	CN 103288911 A (暨南大学) 2013年 9月 11日 (2013 - 09 - 11) 权利要求1-10	1-11
A	CN 105687251 A (中国人民解放军第四军医大学) 2016年 6月 22日 (2016 - 06 - 22) 权利要求1-7	1-11

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2017年 6月 22日

国际检索报告邮寄日期

2017年 7月 14日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

涂海华

电话号码 (86-10)62413749

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/108628

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	1850847	A	2006年 10月 25日	无	
CN	102154417	A	2011年 8月 17日	无	
CN	103288911	A	2013年 9月 11日	CN 103288911	B 2015年 9月 9日
CN	105687251	A	2016年 6月 22日	无	