

(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
2017 年 5 月 11 日 (11.05.2017)



(10) 国际公布号
WO 2017/075760 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 47/34 (2006.01) C08G 63/08 (2006.01)
C08G 81/00 (2006.01) C08G 63/685 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2015/093676

(22) 国际申请日: 2015 年 11 月 3 日 (03.11.2015)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 中国科学技术大学 (UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY OF CHINA) [CN/CN]; 中国安徽省合肥市包河区金寨路 96 号, Anhui 230026 (CN)。

(72) 发明人: 王均 (WANG, Jun); 中国安徽省合肥市包河区金寨路 96 号, Anhui 230026 (CN)。 孙春阳 (SUN, Chunyang); 中国安徽省合肥市包河区金寨路 96 号, Anhui 230026 (CN)。 许从飞 (XU, Congfei); 中国安徽省合肥市包河区金寨路 96 号, Anhui 230026 (CN)。 曹志婷 (CAO, Zhiting); 中国安徽省合肥市包河区金寨路 96 号, Anhui 230026 (CN)。 李洪军 (LI, Hongjun); 中国安徽省合肥市包河区金寨路 96 号, Anhui 230026 (CN)。

(74) 代理人: 中科专利商标代理有限责任公司 (CHINA SCIENCE PATENT & TRADEMARK AGENT LTD.);

中国北京市海淀区西三环北路 87 号 4-1105 室, Beijing 100089 (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, 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, 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, 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)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告 (条约第 21 条(3))。

(54) Title: BRIDGED POLYETHYLENE GLYCOL-ALIPHATIC POLYESTER BLOCK COPOLYMER, PREPARATION METHOD FOR SAME, INTERMEDIATE OF SAME, AND USES THEREOF

(54) 发明名称: 桥联的聚乙二醇-脂肪族聚酯嵌段共聚物、其制备方法、中间体和用途

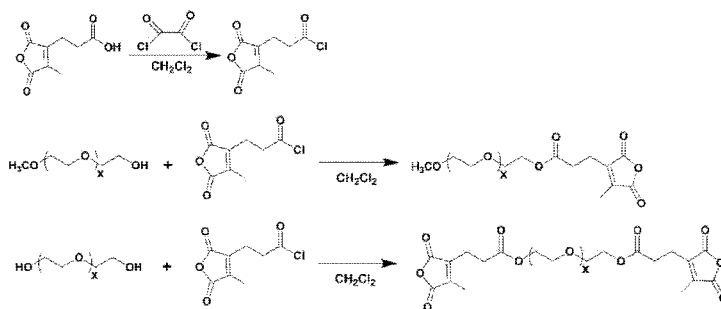


图 1

(57) Abstract: The present invention relates to a bridged polyethylene glycol-aliphatic polyester block copolymer, applicable in preparing a delivery carrier for a small molecule chemotherapy medicament or a nucleic acid medicament. A nano-medicament carrier prepared with the bridged block copolymer produces specific degradation under the pH environment in a tumor tissue or tumor cells, thus changing the structure of nanoparticles, enhancing cellular uptake or intracellular medicament release, and increasing the sensitivity of tumor cells with respect to the medicament.

(57) 摘要: 本发明涉及一种桥联的聚乙二醇-脂肪族聚酯嵌段共聚物, 可用于制备小分子化疗药物和核酸类药物输送载体。所述桥联嵌段共聚物制备的纳米药物载体可在肿瘤组织或肿瘤细胞内 pH 环境下发生特异性降解, 从而改变纳米颗粒结构, 增强细胞摄取或胞内药物释放, 提高肿瘤细胞对药物的敏感性。

WO 2017/075760 A1

桥联的聚乙二醇-脂肪族聚酯嵌段共聚物、其制备方法、中间体和用途

技术领域

本发明涉及药物载体领域，特别涉及包含桥联的聚乙二醇-脂肪族聚酯嵌段共聚物的药物载体领域。

背景技术

纳米尺度的药物载体能保护药物分子，改变药物分子的体内分布和药物代谢动力学，提高药物胞内浓度，增强候选药物成药性，从而显著增强药效并降低毒副作用。基础研究和应用领域已出现大量以两亲性嵌段聚合物为基础的药物辅料及其制剂，已批准上市的基于聚合物的纳米药物也取得了巨大经济效益。其中代表性的两亲嵌段聚合物是具有优良的生物可降解性、生物可吸收性和生物相容性的聚乙二醇-脂肪族聚酯嵌段聚合物，其以聚乙二醇-聚乳酸、聚乙二醇-聚乙醇酸和聚乙二醇-聚己内酯为主。

纳米药物研究初期，通常认为延长颗粒体内循环可改善药物体内分布，可达到增强治疗效果的目的；然而，后续研究发现，在肿瘤的治疗中，荷载药物的纳米颗粒在体内应突破多重屏障才能有效提高药物疗效，这些屏障包括：1) 药物分子或颗粒在血液中需有合适及延长的循环时间；2) 纳米颗粒荷载药物需增强肿瘤组织中药物的富集；3) 需提高肿瘤细胞对药物摄取；4) 需使得药物分子从肿瘤细胞内快速释放。由传统的两亲性嵌段聚合物，例如前述聚乙二醇-脂肪族聚酯嵌段聚合物，与药物分子形成的纳米药物表面被亲水性组份如聚乙二醇（PEG）覆盖，有助于延长药物体内循环时间，并促进药物在肿瘤组织中富集，但覆盖在纳米药物表面的PEG分子阻止肿瘤细胞对纳米药物的摄取，甚至阻止药物分子从进入细胞的纳米颗粒中释放，限制了这些两亲性聚合物作为纳米药物载体的药物输送性能，制约其转化和应用。

研究人员利用肿瘤细胞内特殊的理化微环境，设计了以敏感化学键

“桥联”的两亲性嵌段聚合物，典型的如以二硫键、双硒键“桥联”的两亲性聚合物。这种“桥联”两亲性聚合物是指利用特殊化学键作为亲水性组份（如 PEG）和其它疏水组分（如脂肪族聚酯）“桥联”的一类两亲性聚合物，一般情况下，“桥联”的化学键具有对特殊环境（如 pH、还原环境）的敏感性，能在特定环境下发生快速降解，从而使得亲水疏水组分分离，最终改变由其制备的纳米颗粒的组成，导致纳米颗粒性能的变化或破坏纳米颗粒的结构，从而增强颗粒从内涵体逃逸，或促进药物的释放。这些对肿瘤细胞内特殊的理化微环境敏感的“桥联”两亲性嵌段能解决部分问题，如药物从纳米药物载体在胞内释放的问题，但在肿瘤细胞对纳米药物载体的摄取方面没有作用。

随着桥联化聚合物的发展以及“化学键库”的日益扩大，相关工作逐渐转移至如何改变桥联化学键的组分以实现桥联聚合物细胞外降解，从而克服聚乙二醇对纳米颗粒细胞摄取的阻碍。肿瘤细胞外的肿瘤组织基质特异性微环境主要分为 Warburg 效应造成的弱酸性环境（pH 6.5-7.0）以及相关与肿瘤发生发展相关特异性表达的酶类物质，而后者更易被利用设计相关桥联聚合物。如在对基质金属蛋白酶 2（MMP2）敏感的多肽（XPLG*LAGR9X）末端分别键合聚乙二醇及聚己内酯后形成的桥联化聚乙二醇-九聚精氨酸-聚己内酯嵌段聚合物（PEG-XPLG*LAGR9X-PCL）。但以酶敏感的化学键桥联的聚乙二醇-脂肪族聚酯嵌段共聚物聚合物的实际应用效果并不理想。载体体系的药效缺乏重复性和普适性。此外，这类桥联聚合物的合成工艺通常反应效率低，重复性差，在扩大合成方面不具备可实施性。

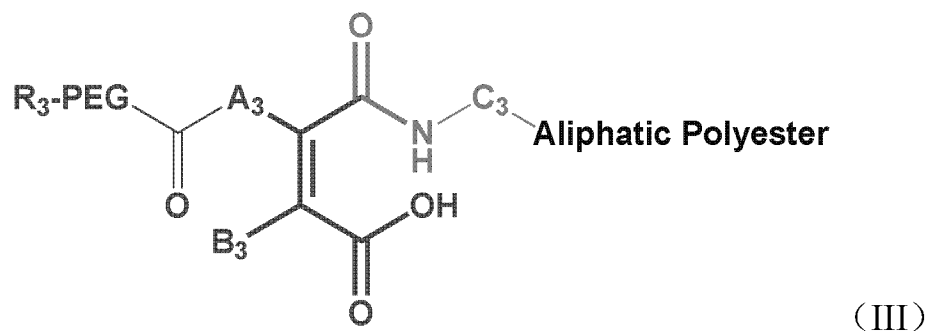
实体瘤内部环境呈现弱酸性（pH 6.5-7.0），而纳米颗粒在内吞进入肿瘤细胞后还要经历内涵体/溶酶体中酸性更强的环境（pH 5.0-5.5），氢离子与化学键的结合速度要远高于酶与多肽化学键的结合，以具备 pH 响应性的化学键构建桥联聚乙二醇-脂肪族聚酯嵌段聚合物的应用范围将更为实际和广泛。然而，由于肿瘤细胞内外上述 pH 值与正常生理环境的 pH 值相差较小，这对“桥联”化学键的设计和响应敏感度提出了更苛刻的要求。因此，本发明重点旨在提供一类肿瘤基质和细胞内 pH 响应酰胺键桥联的聚乙二醇-脂肪族聚酯嵌段共聚物嵌段聚合物，作为小分子化疗药物和核酸

药物输送载体，其能在肿瘤基质和细胞内 pH 环境下发生特异降解，改变纳米颗粒结构，增强肿瘤细胞对纳米颗粒的摄取，提高细胞内药物含量，进而最终提高药物治疗效果。

发明内容

为了解决以上技术问题，本发明首先提供：

第一方面，一种桥联的聚乙二醇-脂肪族聚酯嵌段共聚物，其结构通式 III 如下：



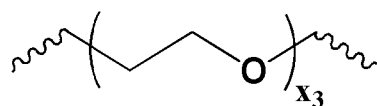
其中， A_3 选自 C_gH_h ， g 、 h 为整数， $0 \leq g \leq 4$ ， $0 \leq h \leq 10$ ； B_3 是甲基或不存在； C_3 选自 C_iH_j ， i 、 j 为整数， $1 \leq i \leq 20$ ， $2 \leq j \leq 42$ ； R_3 不存在或为烷基、烷氧基、芳基、芳氧基、卤素原子或被取代的烷基、烷氧基、芳基、芳氧基；PEG 表示聚乙二醇残基，aliphatic polyester 表示脂肪族聚酯残基。

其中，优选 A_3 不存在，或为碳原子数 1-4 的亚烷基；

优选 C_3 为碳原子数 1-20 的亚烷基，更优选碳原子数 1-6 的亚烷基；

优选 R_3 为碳原子数 1-6 的烷基、碳原子数 1-6 的烷氧基、碳原子数 6-20 的芳基、碳原子数 6-20 的芳氧基、卤素原子，所述的烷基、烷氧基、芳基、芳氧基可以进一步被取代，更优选 R_3 为碳原子数 1-6 的烷氧基。

2. 根据上述第一方面所述的桥联的聚乙二醇-脂肪族聚酯嵌段共聚物，其中聚乙二醇残基以如下通式表示：



其中， x_3 为整数， $1 \leq x_3 \leq 500$ 。

所述脂肪族聚酯残基是聚ε-己内酯、聚乳酸或聚乳酸乙醇酸残基。

其中优选所述脂肪族聚酯的数均分子量为 2000-20000；更优选 5000-15000；

其中优选聚乳酸乙醇酸中乳酸和乙醇酸的重复单元数量的比例为 10-90/90-10，更优选 20-80/80-20，进一步优选 75/25。

3. 根据上述第一或第二方面所述的桥联的聚乙二醇-脂肪族聚酯嵌段共聚物的制备方法，包括：将马来酰胺酸衍生物修饰的聚乙二醇作为引发剂，使脂肪族聚酯单体发生开环聚合反应，既得桥联的聚乙二醇-脂肪族聚酯嵌段共聚物；或将马来酰胺酸衍生物修饰的聚乙二醇与具有氨基端基的脂肪族聚酯发生大分子偶联反应，既得桥联的聚乙二醇-脂肪族聚酯嵌段共聚物。

其中优选在无水条件下进行开环聚合反应；

优选在催化剂存在下进行反应；

优选催化剂是有机杂环分子 1,5,7-三叠氮双环（4.4.0）癸-5-烯；

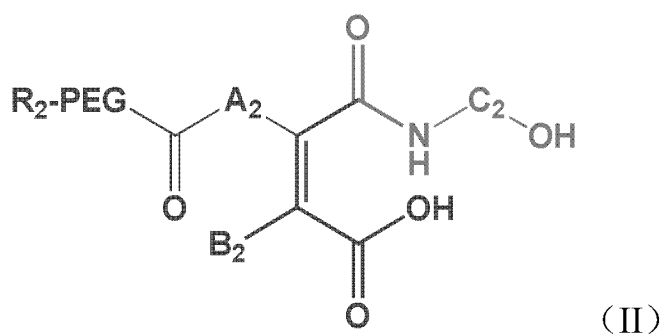
优选溶剂是二氯甲烷；

优选反应在 0℃ 下进行；

优选反应时间是 10-120min；

优选所得粗产物经过纯化处理，例如沉淀处理。

4. 本发明的第四个方面，提供一种马来酰胺酸衍生物修饰的聚乙二醇，其结构通式 II 如下：



其中， A_2 选自 C_eH_d ， c 、 d 为整数， $0 \leq c \leq 4$ ， $0 \leq d \leq 10$ ； B_2 为甲基或不存在； C_2 选自 C_eH_f ， e 、 f 为整数， $1 \leq e \leq 20$ ， $2 \leq f \leq 42$ ； R_2 不存在或为烷基、烷氧基、芳基、芳氧基、卤素原子或被取代的烷基、烷氧基、芳基、芳氧基；PEG 表示聚乙二醇残基。

其中的 A_2 、 B_2 、 C_2 、 R_2 以及 PEG 可以与根据第一方面的桥联的聚乙二醇-脂肪族聚酯嵌段共聚物中的 A_3 、 B_3 、 C_3 、 R_3 以及 PEG 相同，并且优选范围也可以相同。

5. 本发明的第五个方面，提供第四个方面所述的马来酰胺酸衍生物修饰的聚乙二醇的制备方法，包括将氨基醇与端基含马来酸酐基团的聚乙二醇混合，利用氨基醇中的伯胺基团与马来酸酐基团进行开环反应形成酰胺键，既得马来酰胺酸衍生物修饰的聚乙二醇。

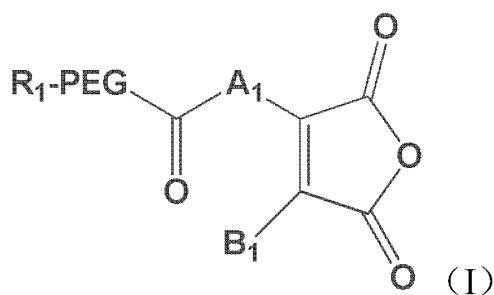
其中优选反应在无水溶液体系或无水条件下进行；

优选在室温下进行反应；

优选对粗产物进行纯化处理；

优选纯化处理包括萃取分液和沉淀。

6. 本发明的第六个方面，提供一种端基含马来酸酐基团的聚乙二醇，结构通式 I 如下：



其中， A_1 选自 C_aH_b ， a 、 b 为整数， $0 \leq a \leq 4$ ， $0 \leq b \leq 10$ ； B_1 为甲基或不存在； R_1 不存在或为烷基、烷氧基、芳基、芳氧基、卤素原子或被取代的烷基、烷氧基、芳基、芳氧基；PEG 表示聚乙二醇残基。

其中的 A_1 、 B_1 、 R_1 以及 PEG 可以与根据第一方面的桥联的聚乙二醇-脂肪族聚酯嵌段共聚物中的 A_3 、 B_3 、 R_3 以及 PEG 相同，并且优选范围也可以相同。

7. 本发明的第七个方面，提供第六个方面所述的端基含马来酸酐基团的聚乙二醇的制备方法，包括将马来酸酐取代基中的羧基进行酰氯化，再与聚乙二醇末端羟基进行反应。

优选酰氯化试剂为草酰氯、二氯亚砷；

优选溶剂为无水二氯甲烷；

优选反应温度为 $0-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ；

优选经过纯化处理粗产物；

优选纯化处理包括萃取、沉淀。

8. 本发明的第八个方面，提供第一或第二个方面所述的桥联的聚乙二醇-脂肪族聚酯嵌段共聚物制备的药物载体或核酸载体。

其中优选所述载体的制备方法是将聚 ϵ -己内酯、聚乳酸或聚乳酸乙醇酸与聚乙二醇形成的桥联嵌段共聚物在与水不互溶的有机相中溶解，与水在超声条件下进行乳化（例如，0 °C，50-200 W，30-120 s），从而制备纳米颗粒；同时，如在有机相中加入疏水性药物，可以完成对药物的包载；

优选所述有机相为二氯甲烷、氯仿、乙酸乙酯；

优选所述疏水性药物为紫杉醇、多西紫杉醇、去盐酸化阿霉素、全反式维甲酸、羟基喜树碱中的一种或多种。

9. 本发明的第九个方面，提供一种由第八个方面所述的药物载体制备的载药纳米颗粒或载核酸纳米颗粒。

其中优选纳米颗粒包括将聚 ϵ -己内酯、聚乳酸或聚乳酸乙醇酸与聚乙二醇形成的桥联嵌段共聚物和阳离子脂质在与水不互溶的有机相中溶解，与 siRNA 水溶液初乳化（例如，0 °C，50-200 W，30-120 s），再与水进行第二次乳化（例如，0 °C，50-200 W，30-120 s），除去有机相后，即可得到高效包载 siRNA 的纳米颗粒。

优选所述有机相为二氯甲烷、氯仿、乙酸乙酯；

优选所述阳离子脂质可以为 *N,N*-二羟乙基-*N*-甲基-*N*-2-(胆固醇氧羰基氨基) 乙基溴化铵和溴化三甲基-2, 3-二油酰氧基丙基铵。

10. 本发明的第十个方面，提供由第四个方面所述的马来酰胺酸衍生物修饰的聚乙二醇制备而得的药物载体或核酸载体，由第六个方面所述的端基含马来酸酐基团的聚乙二醇制备而得的药物载体或核酸载体，第八个方面所述的药物载体或核酸载体或第九个方面所述的载药纳米颗粒或载核酸纳米颗粒在制备抗肿瘤药物中的用途。

附图说明

图 1. 本发明的实施例一中，端基为甲基马来酸酐的 PEG 衍生物的化学结构及合成路线。

图 2. 本发明的实施例一中, 核磁共振氢谱对端基为甲基马来酸酐的 PEG 衍生物进行表征, 溶剂为氘代氯仿。图 3. 本发明的实施例一中, 核磁共振碳谱对端基为甲基马来酸酐的 PEG 衍生物进行表征, 溶剂为氘代氯仿。图 4. 本发明的实施例一中, 核磁共振氢谱对端基为甲基马来酸酐的不同分子量的 PEG 衍生物进行表征, 溶剂为氘代氯仿。

图 5. 本发明的实施例二中, 端基为马来酸酐的 PEG 衍生物的化学结构及合成路线。图 6. 本发明的实施例二中, 核磁共振氢谱对端基为马来酸酐的 PEG 衍生物进行表征, 溶剂为氘代氯仿。图 7. 本发明的实施例二中, 核磁共振碳谱对端基为马来酸酐的 PEG 衍生物进行表征, 溶剂为氘代氯仿。图 8. 本发明的实施例二中, 核磁共振氢谱对端基为马来酸酐的不同分子量的 PEG 衍生物进行表征, 溶剂为氘代氯仿。

图 9. 本发明的实施例三中, α -PEG- β -甲基-6-羟己基马来酰胺酸的化学结构及合成路线。图 10. 本发明的实施例三中, 核磁共振氢谱对 α -PEG- β -甲基-6-羟己基马来酰胺酸进行表征, 溶剂为氘代氯仿。图 11. 本发明的实施例三中, 核磁共振碳谱对 α -PEG- β -甲基-6-羟己基马来酰胺酸进行表征, 溶剂为氘代氯仿。图 12. 本发明的实施例三中, 核磁共振氢谱对不同分子量的 α -PEG- β -甲基-6-羟己基马来酰胺酸进行表征, 溶剂为氘代氯仿。

图 13. 本发明的实施例四中, α -PEG-6-羟己基马来酰胺酸的化学结构及合成路线。图 14. 本发明的实施例四中, 核磁共振氢谱对 α -PEG-6-羟己基马来酰胺酸进行表征, 溶剂为氘代氯仿。图 15. 本发明的实施例四中, 核磁共振碳谱对 α -PEG-6-羟己基马来酰胺酸进行表征, 溶剂为氘代氯仿。图 16. 本发明的实施例四中, 核磁共振氢谱对不同分子量的 α -PEG- β -甲基-6-羟己基马来酰胺酸进行表征, 试剂为氘代氯仿。

图 17. 本发明的实施例五中, 可酸催化水解酰胺键 Dlink_m 桥联的聚乙二醇-Dlink_m-聚乳酸共聚物的化学结构及合成路线。图 18. 本发明的实施例五中, 凝胶渗透色谱表征 Dlink_m 桥联的聚乙二醇-Dlink_m-聚乳酸共聚物。图 19. 本发明的实施例五中, 核磁共振氢谱对 Dlink_m 桥联的聚乙二醇-Dlink_m-聚乳酸共聚物的化学结构进行表征, 溶剂为氘代氯仿。图 20. 本发明的实施例五中, 核磁共振碳谱对 Dlink_m 桥联的聚乙二醇-Dlink_m-聚乳

酸共聚物的化学结构进行表征，溶剂为氘代氯仿。

图 21. 本发明的实施例六中，可酸催化水解酰胺键 Dlink 桥联的聚乙二醇-Dlink-聚乳酸共聚物的化学结构及合成路线。图 22. 本发明的实施例六中，凝胶渗透色谱表征 Dlink 桥联的聚乙二醇-Dlink-聚乳酸共聚物。

图 23. 本发明的实施例六中，核磁共振氢谱可酸催化水解酰胺键 Dlink 桥联的聚乙二醇-Dlink-聚乳酸共聚物的化学结构进行表征，试剂为氘代氯仿。图 24. 本发明的实施例六中，核磁共振碳谱对 Dlink 桥联的聚乙二醇-Dlink-聚乳酸共聚物的化学结构进行表征，溶剂为氘代氯仿

图 25. 本发明的实施例七中，可酸催化水解酰胺键 Dlink(或 Dlink_m) 桥联的聚乙二醇-Dlink-聚己内酯（或聚乙二醇-Dlink_m-聚己内酯）共聚物的化学结构及合成路线。图 26. 本发明的实施例七中，凝胶渗透色谱表征 Dlink_m 桥联的聚乙二醇-Dlink_m-聚己内酯共聚物。图 27. 本发明的实施例七中，凝胶渗透色谱表征 Dlink 桥联的聚乙二醇-Dlink-聚己内酯共聚物。图 28. 本发明的实施例七中，核磁共振氢谱对可酸催化水解酰胺键 Dlink_m 桥联的聚乙二醇-Dlink_m-聚己内酯共聚物的化学结构进行表征，溶剂为氘代氯仿。图 29. 本发明的实施例七中，核磁共振氢谱对可酸催化水解酰胺键 Dlink 桥联的聚乙二醇-Dlink-聚己内酯共聚物的化学结构进行表征，试剂为氘代氯仿。图 30. 本发明的实施例七中，核磁共振碳谱对 Dlink_m 桥联的聚乙二醇-Dlink_m-聚己内酯共聚物的化学结构进行表征，试剂为氘代氯仿。图 31. 本发明的实施例七中，核磁共振碳谱对 Dlink 桥联的聚乙二醇-Dlink-聚己内酯共聚物的化学结构进行表征，试剂为氘代氯仿

图 32. 本发明的实施例八中，可酸催化水解酰胺键 Dlink_m 和 Dlink 桥联的聚乙二醇-聚乳酸乙醇酸共聚物的化学结构及合成路线。图 33. 本发明的实施例八中，凝胶渗透色谱表征 Dlink_m 桥联的聚乙二醇-Dlink_m-聚乳酸乙醇酸共聚物。PLGA 处下标分别代表 D,L-LA 和 GA 的聚合度。图 34. 本发明的实施例八中，凝胶渗透色谱表征 Dlink 桥联的聚乙二醇-Dlink-聚乳酸乙醇酸共聚物。PLGA 处下标分别代表 D,L-LA 和 GA 的聚合度。图 35. 本发明的实施例八中，核磁共振氢谱对可酸催化水解酰胺键 Dlink_m 桥联的聚乙二醇-Dlink_m-聚乳酸乙醇酸共聚物的化学结构进行表征，试剂为氘代氯仿。图 36. 本发明的实施例八中，核磁共振氢谱对可酸催化

水解酰胺键 Dlink 桥联的聚乙二醇-Dlink-聚乳酸乙醇酸共聚物的化学结构进行表征, 试剂为氘代氯仿。图 37. 本发明的实施例八中, 核磁共振碳谱对 Dlink_m 桥联的聚乙二醇-Dlink_m-聚乳酸乙醇酸共聚物的化学结构进行表征, 试剂为氘代氯仿。图 38. 本发明的实施例八中, 核磁共振碳谱对 Dlink 桥联的聚乙二醇-Dlink-聚乳酸乙醇酸共聚物的化学结构进行表征, 试剂为氘代氯仿。

图 39. 本发明的实施例十中, (A) 桥联聚合物降解示意图; 高效液相色谱检测对 (B) mPEG₁₁₃-Dlink_m-PDLLA₄₂、(C) mPEG₁₁₃-Dlink_m-PDLLA₇₁、(D) mPEG₁₁₃-Dlink_m-PDLLA₁₄₂、(E) mPEG₁₁₃-Dlink-PDLLA₁₄₀ 组装形成的纳米颗粒在不同 pH 环境下的降解行为进行检测。

图 40. 本发明的实施例十一中, 流式细胞术对 NP_{PDLLA} 以及 D_m-NP_{PDLLA} 在不同 pH 条件下处理后 MDA-MB-231 细胞的细胞摄取进行检测。荧光标记 D_m-NP_{PDLLA} 和 NP_{PDLLA} 制备方法如实施例九所述, 组分为 mPEG₁₁₃-Dlink_m-PDLLA₁₄₂ 和 mPEG₁₁₃-b-PDLLA₁₄₀。

图 41. 本发明的实施例十二中, ICR 小鼠体内不同组分纳米颗粒的体内循环。RhoB 标记的纳米颗粒 D_m-NP_{PDLLA} 和 NP_{PDLLA} 制备方法如实施例九所述, 组分为 mPEG₁₁₃-Dlink_m-PDLLA₁₄₂ 和 mPEG₁₁₃-b-PDLLA₁₄₀。

图 42. 本发明的实施例十三中, 不同处理组对 MDA-MB-231 原位肿瘤模型的抑制, 多西紫杉醇的给药剂量为 3.5 mg/kg。包载多西紫杉醇的 NP_{PDLLA}/DTXL, D_m-NP_{PDLLA}/DTXL 以及 D-NP_{PDLLA}/DTXL 制备方法如实施例九所述, 组分分别为 mPEG₁₁₃-b-PDLLA₇₂、mPEG₁₁₃-Dlink_m-PDLLA₇₀ 以及 mPEG₁₁₃-Dlink-PDLLA₇₅。通过函数 t-test 计算显著性差异, *p<0.05。

图 43. 本发明的实施例十四中, 双乳化纳米颗粒携载 siRNA 在不同 pH 条件下对 siRNA 的释放。携载 siRNA 的纳米颗粒 D_m-NP_{PLGA/FAM-siNC} 和 NP_{PLGA/FAM-siNC} 制备方法如实施例九所述, 组分为 mPEG₁₁₃-Dlink_m-PLGA_{161/54} 和 mPEG₁₁₃-b-PLGA_{165/56}。

图 44. 本发明的实施例十五中, 流式细胞术检测 MDA-MB-231 细胞对不同 pH 条件下处理携载 siRNA 的双乳化纳米颗粒的摄取行为。携载 siRNA 的纳米颗粒 D_m-NP_{PLGA/Cy5-siNC} 和 NP_{PLGA/Cy5-siNC} 制备方法如实施例九

所述, 组分为 $mPEG_{113}$ -Dlink_m-PLGA_{161/54} 和 $mPEG_{113}$ -b-PLGA_{165/56}。MFI 为细胞内平均荧光强度。通过函数 t-test 计算显著性差异, $**p < 0.01$ 。图 45. 本发明的实施例十五中, 高效液相色谱定量检测 MDA-MB-231 细胞对不同 pH 条件下处理携带 siRNA 的双乳化纳米颗粒的摄取行为。携带 siRNA 的纳米颗粒 $D_m-NP_{PLGA/Cy5-siNC}$ 和 $NP_{PLGA/Cy5-siNC}$ 制备方法如实施例九所述, 组分为 $mPEG_{113}$ -Dlink_m-PLGA_{161/54} 和 $mPEG_{113}$ -b-PLGA_{165/56}。通过函数 t-test 计算显著性差异, $*p < 0.05$ 。图 46. 本发明的实施例十五中, 激光共聚焦扫描显微镜观察 MDA-MB-231 细胞对不同 pH 条件下处理携带 siRNA 的双乳化纳米颗粒的摄取行为。携带 siRNA 的纳米颗粒 $D_m-NP_{PLGA/Cy5-siNC}$ 和 $NP_{PLGA/Cy5-siNC}$ 制备方法如实施例九所述, 组分为 $mPEG_{113}$ -Dlink_m-PLGA_{161/54} 和 $mPEG_{113}$ -b-PLGA_{165/56}。

图 47. 本发明的实施例十六中, 双乳化纳米颗粒携带 siRNA 在 pH 7.4 (A) 和 pH 6.5 (B) 条件下对 MDA-MB-231 细胞的 PLK1 基因进行下调。携带 siRNA 的纳米颗粒 $D_m-NP_{PLGA/Cy5-siNC}$ 、 $NP_{PLGA/Cy5-siNC}$ 、 $D_m-NP_{PLGA/siPLK1}$ 和 $NP_{PLGA/siPLK1}$ 制备方法如实施例九所述, 组分为 $mPEG_{113}$ -Dlink_m-PLGA_{161/54} 和 $mPEG_{113}$ -b-PLGA_{165/56}。通过函数 t-test 计算显著性差异, $*p < 0.05$ 。

图 48. 本发明的实施例十七中, 蛋白质印迹法检测双乳化纳米颗粒携带 siRNA ($D_m-NP_{PLGA/Cy5-siNC}$ 、 $NP_{PLGA/Cy5-siNC}$ 、 $D_m-NP_{PLGA/siPLK1}$ 和 $NP_{PLGA/siPLK1}$) 在 pH 6.5 条件下对 MDA-MB-231 细胞的 PLK1 蛋白的影响。

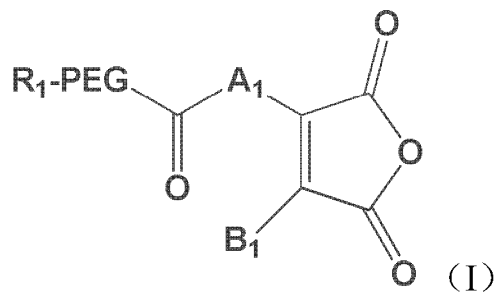
图 49. 本发明的实施例十八中, 双乳化纳米颗粒携带 siRNA 在 pH 6.5 条件下对 MDA-MB-231 细胞的细胞活力影响。携带 siRNA 的纳米颗粒 ($D_m-NP_{PLGA/Cy5-siNC}$ 、 $NP_{PLGA/Cy5-siNC}$ 、 $D_m-NP_{PLGA/siPLK1}$ 和 $NP_{PLGA/siPLK1}$) 制备方法如实施例九所述, 组分为 $mPEG_{113}$ -Dlink_m-PLGA_{161/54} 和 $mPEG_{113}$ -b-PLGA_{165/56}。通过函数 t-test 计算显著性差异, $*p < 0.05$ 。

图 50. 本发明的实施例十九中, MDA-MB-231 荷瘤小鼠体内携带 siRNA 的双乳化纳米颗粒体内分布。携带 siRNA 的纳米颗粒 ($D_m-NP_{PLGA/Cy5-siNC}$ 和 $NP_{PLGA/Cy5-siNC}$) 制备方法如实施例九所述, 组分为 $mPEG_{113}$ -Dlink_m-PLGA_{161/54} 和 $mPEG_{113}$ -b-PLGA_{165/56}。通过函数 t-test 计算显著性差异, $**p < 0.01$ 。

图 51. 本发明的实施例二十中, 不同处理组对 MDA-MB-231 原位肿瘤模型的抑制。携载 siRNA 的纳米颗粒(D_m -NP_{PLGA/siPLK1} 和 NP_{PLGA/siPLK1}) 制备方法如实施例九所述, 组分为 mPEG₁₁₃-Dlink_m-PLGA_{161/54} 和 mPEG₁₁₃-b-PLGA_{165/56}。通过函数 t-test 计算显著性差异, * $p < 0.05$ 。

具体实施方式

本发明首先提供一种端基含马来酸酐基团的聚乙二醇 (PEG) 的衍生物, 本发明涉及的聚乙二醇衍生物结构通式 I 如下:

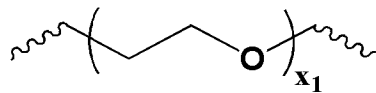


其中, A_1 可以选自 C_aH_b , a 、 b 为整数, $0 \leq a \leq 4$, $0 \leq b \leq 10$; B_1 可以为甲基或不存在; R_1 不存在或为烷基、烷氧基、芳基、芳氧基、卤素原子或被取代的烷基、烷氧基、芳基、芳氧基; PEG 表示聚乙二醇残基。

其中, 优选 A_1 不存在, 或为碳原子数 1-4 的亚烷基;

优选 R_1 为碳原子数 1-6 的烷基、碳原子数 1-6 的烷氧基、碳原子数 6-20 的芳基、碳原子数 6-20 的芳氧基、卤素原子, 所述的烷基、烷氧基、芳基、芳氧基可以进一步被取代, 更优选 R_1 为碳原子数 1-6 的烷氧基。

聚乙二醇 PEG 是以如下通式表示:



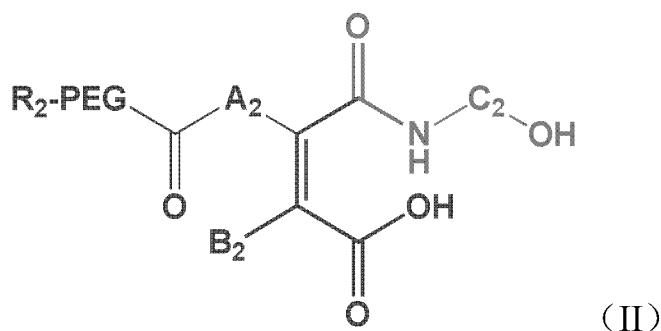
其中, x_1 为整数, $20 \leq x_1 \leq 500$ 。

本发明进一步提供了一种端基含马来酸酐基团的聚乙二醇衍生物的合成方法。

所述合成端基含马来酸酐基团的聚乙二醇衍生物的方法是将马来酸酐取代基中的羧基先进行酰氯化, 制备酰氯化的马来酸酐取代物, 再在温和条件下与聚乙二醇末端羟基进行反应, 经过萃取、沉淀的方式纯化, 从而最终合成端基含马来酸酐基团的聚乙二醇衍生物。所述方法中, 酰氯化

试剂为草酰氯、二氯亚砷等，但不仅限于此范围；选取溶剂为无水二氯甲烷，反应温度为 0-40 °C。

其次，本发明提供另一类马来酰胺酸衍生物修饰的聚乙二醇(PEG)，其结构通式 II 如下：



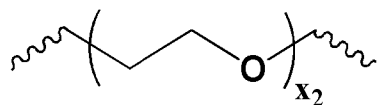
其中， A_2 选自 C_eH_d ， c 、 d 为整数， $0 \leq c \leq 4$ ， $0 \leq d \leq 10$ ； B_2 为甲基或不存在； C_2 选自 C_eH_f ， e 、 f 为整数， $1 \leq e \leq 20$ ， $2 \leq f \leq 42$ ； R_2 不存在或为烷基、烷氧基、芳基、芳氧基、卤素原子或被取代的烷基、烷氧基、芳基、芳氧基；PEG 表示聚乙二醇残基。

其中，优选 A_2 不存在，或为碳原子数 1-4 的亚烷基；

优选 C_2 为碳原子数 1-20 的亚烷基，更优选碳原子数 1-6 的亚烷基；

优选 R_2 为碳原子数 1-6 的烷基、碳原子数 1-6 的烷氧基、碳原子数 6-20 的芳基、碳原子数 6-20 的芳氧基、卤素原子，所述的烷基、烷氧基、芳基、芳氧基可以进一步被取代，更优选 R_2 为碳原子数 1-6 的烷氧基。

聚乙二醇是以如下通式表示：

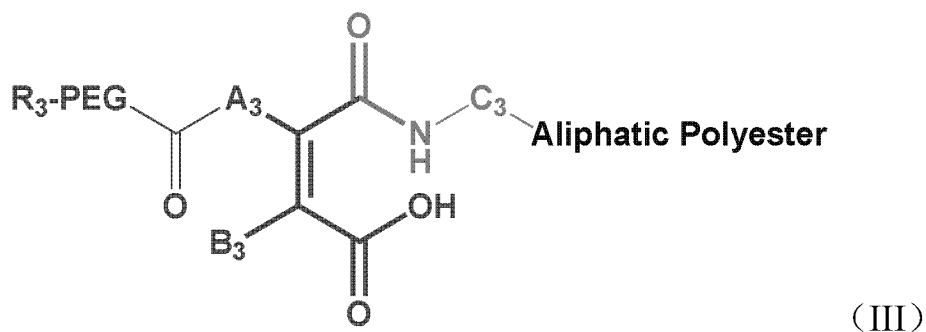


其中， x_2 为整数， $20 \leq x_2 \leq 500$ 。

本发明提供了上述聚乙二醇衍生物的相应合成方法，所述聚乙二醇衍生物的合成方法是在温和的无水溶液体系下，将氨基醇与端基含马来酸酐基团的聚乙二醇衍生物按照一定比例混合，利用氨基醇中的伯胺基团与马来酸酐基团进行开环反应，在室温下形成特定的酰胺键，在反应后经萃取分液和沉淀的方式对产物进行处理纯化，以得到最终的预期产物。

本发明还提供了一类桥联的聚乙二醇-脂肪族聚酯嵌段共聚物

(Aliphatic Polyester), 其结构通式 III 如下:



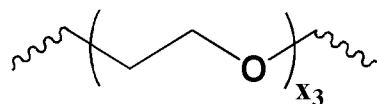
其中, A_3 选自 C_gH_h , g, h 为整数, $0 \leq g \leq 4$, $0 \leq h \leq 10$; B_3 是甲基或不存在; C_3 选自 C_iH_j , i, j 为整数, $1 \leq i \leq 20$, $2 \leq j \leq 42$; R_3 不存在或为烷基、烷氧基、芳基、芳氧基、卤素原子或被取代的烷基、烷氧基、芳基、芳氧基; PEG 表示聚乙二醇残基, aliphatic polyester 表示脂肪族聚酯残基。

其中, 优选 A_3 不存在, 或为碳原子数 1-4 的亚烷基;

优选 C_3 为碳原子数 1-20 的亚烷基, 更优选碳原子数 1-6 的亚烷基;

优选 R_3 为碳原子数 1-6 的烷基、碳原子数 1-6 的烷氧基、碳原子数 6-20 的芳基、碳原子数 6-20 的芳氧基、卤素原子, 所述的烷基、烷氧基、芳基、芳氧基可以进一步被取代, 更优选 R_3 为碳原子数 1-6 的烷氧基。

其中聚乙二醇残基以如下通式表示:

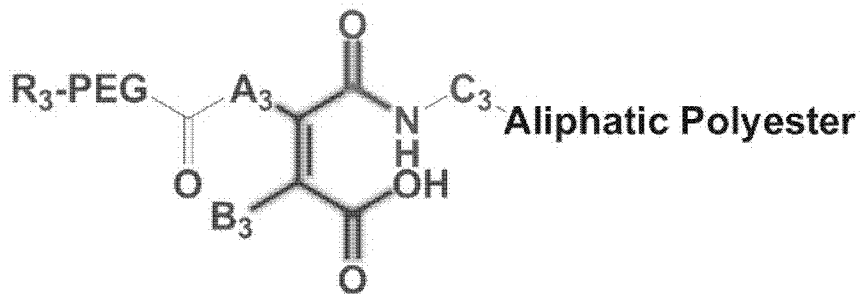


其中, x_3 为整数, $1 \leq x_3 \leq 500$ 。

本发明提供了一种桥联化聚乙二醇-脂肪族聚酯的优选合成方法。

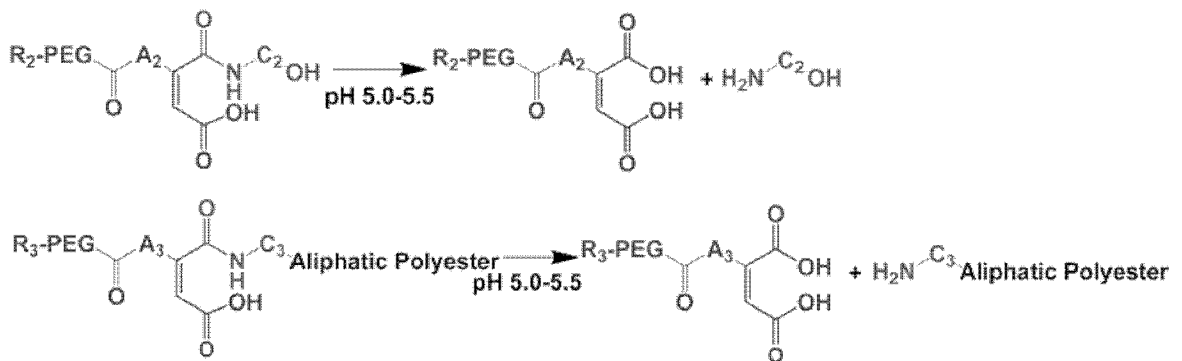
所述合成桥联化聚乙二醇-脂肪族聚酯的优选合成方法为利用通式 II 所示的聚乙二醇衍生物作为大分子引发剂, 在无水条件下利用有机杂环分子 1,5,7-三叠氮双环(4.4.0)癸-5-烯作为催化剂, 使用二氯甲烷作为溶剂, 在 0°C 进行溶液聚合引发 ϵ -己内酯、丙交酯或乙交酯等单体的开环聚合反应, 反应时间为 10-120 min, 经过沉淀等方式最终达到纯化效果, 从而最终合成对应的桥联化聚乙二醇-脂肪族聚酯。与常规合成桥联化聚合物所使用的大分子偶联方法不同, 该合成路线简便可控、利于重复; 产物不包含未反应的高分子均聚物, 便于纯化, 更具备可行性。

以下图为例，与非桥联化嵌段聚合物相比，桥联化聚乙二醇-脂肪族聚酯包含特定结构的酰胺基团。

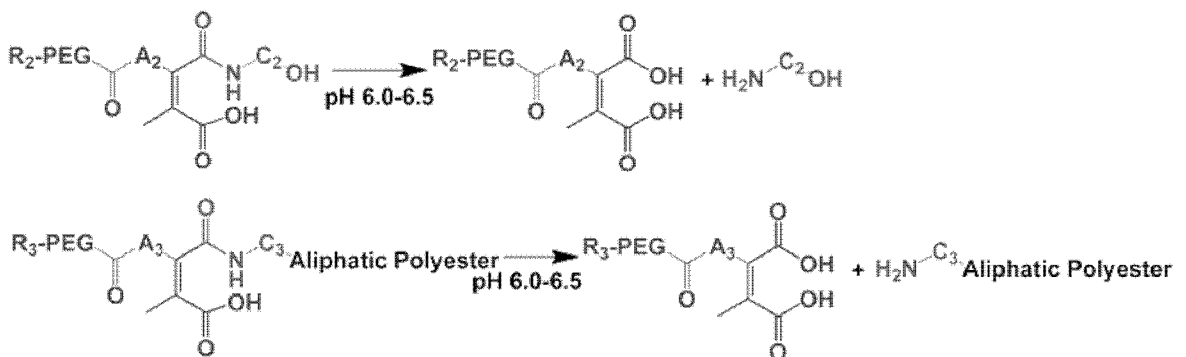


这使得本发明涉及的桥联聚合物具有其他特征，即与处在中性条件下相比，酰胺键结构会在弱酸性条件下发生特异性降解，产生两个不同组分：

当 B_3 或 B_2 为不存在时，桥联酰胺键可在 pH 5.0-6.0 范围发生降解，其中 pH 5.0-5.5 范围内降解速度更快：



当 B_3 或 B_2 为甲基时，桥联酰胺键可在 pH 6.0-7.0 范围发生降解，其中 pH 6.0-6.5 范围内降解速度更快：



本发明还提供了一种通过将嵌段共聚物在水中制备成纳米颗粒,负载疏水性药物从而形成纳米药物输送体系的方法。

本发明所述制备方法是將聚 ϵ -己内酯、聚乳酸或聚乳酸乙醇酸与聚乙二醇形成的桥联嵌段共聚物在与水不互溶的有机相中溶解,与水在超声条件下进行乳化(0 °C, 50-200 W, 30-120 s),从而制备纳米颗粒;同时,如在有机相中加入疏水性药物,可以完成对药物的包载,且包载效率稳定、重复性好。所述有机相为二氯甲烷、氯仿、乙酸乙酯,但不局限于此范围;所述疏水性药物为紫杉醇、多西紫杉醇、去盐酸化阿霉素、全反式维甲酸、羟基喜树碱等中的一种或多种,但不局限于此范围。

本发明提供了通过将嵌段共聚物在水中制备成纳米颗粒,负载亲水性小干扰 RNA (siRNA) 从而形成纳米药物输送体系的方法。

所述合成方法是將聚 ϵ -己内酯、聚乳酸或聚乳酸乙醇酸与聚乙二醇形成的桥联嵌段共聚物和阳离子脂质在与水不互溶的有机相中溶解,与 siRNA 水溶液初乳化(0 °C, 50-200 W, 30-120 s),再与水进行第二次乳化(0 °C, 50-200 W, 30-120 s),除去有机相后,即可得到高效包载 siRNA 的纳米颗粒。所述有机相为二氯甲烷、氯仿、乙酸乙酯,但不局限于此范围;所述阳离子脂质可以为 N,N-二羟乙基-N-甲基-N-2-(胆固醇氧羰基氨基)乙基溴化铵和溴化三甲基-2, 3-二油酰氧基丙基铵,但不局限于此范围。

本发明由聚 ϵ -己内酯、聚乳酸或聚乳酸乙醇酸与聚乙二醇形成的桥联嵌段共聚物,其聚乙二醇嵌段的稳定性与环境的 pH 条件有关,利用此性质,本发明所制备得到的纳米载体可用于针对肿瘤组织的体内药物输送。在血液循环过程中(pH 7.4, PEG 稳定存在)借助聚乙二醇对纳米颗粒的保护作用,可以较好地延长携载药物的循环时间,提高药物生物利用度,降低药物的体内毒性;而当纳米颗粒进入肿瘤组织(pH 6.0-6.5)或肿瘤细胞(pH 5.0-5.5)后,桥联酰胺键响应性降解,PEG 会从纳米颗粒表面脱落,纳米载体的结构被破坏,细胞摄取或药物释放能力显著提高,从而克服传统非桥联聚合物在药物输送过程中面临的数重障碍,增加在肿瘤细胞内的活性分子含量,达到更强的肿瘤细胞增殖抑制。因此,与目前临床

或基础研究领域广泛采用的游离药物相比,本发明的桥联化聚合物可有望提高其疗效并降低毒副作用。

此外,本发明涉及的桥联化聚合物的性质能够通过调节聚合物组分、亲疏水嵌段的分子量来进行调节,反应原料易得,反应条件温和,工艺简便,有利于放大化和批量生产。

本发明得到了针对肿瘤组织或肿瘤细胞内特定 pH 响应化学键桥联的聚乙二醇-脂肪族聚酯嵌段共聚物,可用于小分子药物或大分子核酸药物的包载及其体内输送。与传统的聚乙二醇-脂肪族聚酯嵌段聚合物相比,本发明设计的桥联聚合物在颗粒稳定性、体外药物释放、血液循环等方面有相同性能,但能够借助肿瘤组织或细胞内特异性 pH 调控纳米颗粒表面的 PEG 程度,增强细胞摄取和胞内药物释放,进一步提高药物疗效。本发明为了合成得到桥联聚乙二醇-脂肪族聚酯嵌段共聚物,使用的聚合反应条件温和,来源易得,反应后纯化过程简便;该类聚合物组装形成纳米颗粒后,对肿瘤微环境的响应速度快,能显著提高抗肿瘤药效。

以下以实施例的方式描述本发明的某些具体实施方式,但是这些实施例仅用于说明目的,而不是用于限制本发明的范围。

实施例

实施例中的缩写:

- (1) mPEG, 聚乙二醇单甲醚
- (2) PEG, 聚乙二醇
- (3) CDM, 2-羧乙基-3-甲基马来酸酐
- (4) CSM, 2-羧乙基-马来酸酐
- (5) TBD, 1,5,7-三叠氮双环(4.4.0)癸-5-烯
- (6) ϵ -CL, ϵ -己内酯
- (7) PCL, 聚 ϵ -己内酯
- (8) D,L-LA, 外消旋丙交酯
- (9) PDLLA, 聚乳酸
- (10) GA, 乙交酯
- (11) PLGA, 聚乳酸乙醇酸无规共聚物

(12) BHEM-Chol, N,N-二羟乙基-N-甲基-N-2-(胆固醇氧羰基氨基)乙基溴化铵

(13) RhoB, 罗丹明 B

(14) DIC, N,N-二异丙基碳二亚胺

(15) DMAP, 4-二甲氨基吡啶

(16) PCL-RhoB, 罗丹明 B 标记聚己内酯

(17) DTXL, 多西紫杉醇

(18) siRNA, 小干扰 RNA

实施例中原料来源及处理方法:

(1) mPEG, 分子量 2000, 5000, 10000, 20000, Sigma-Aldrich 公司, 使用前经甲苯共沸蒸馏除水

(2) mPEG, 分子量 3400, 上海景宇生物技术有限公司, 使用前经甲苯共沸蒸馏除水

(3) PEG, 分子量 6000, Sigma-Aldrich 公司, 使用前经甲苯共沸蒸馏除水

(4) D,L-LA, 济南岱罡生物工程有限公司

(5) DTXL, 武汉大华伟业医药化工有限公司

(6) GA, 济南岱罡生物工程有限公司

(7) ϵ -CL, 日本大赛璐化学工业株式会社

(8) TBD, Sigma-Aldrich 公司

(9) α -酮戊二甲酯, Sigma-Aldrich 公司

(10) 噻唑蓝, Sigma-Aldrich 公司

(11) 泰素帝[®], 安万特医药

(12) 红色荧光和绿色荧光标记的 siRNA(Cy5-siNC 和 FAM-siNC), 苏州瑞博生物技术有限公司, 反义链序列: 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAAAdTdT-3'

(13) PLK1 siRNA, 苏州瑞博生物技术有限公司, 反义链序列:

5'-UAAGGAGGGUGAUCUUCUUCAdTdT-3'

(14) 二氯甲烷和氯仿, 液相色谱级, 韩国森山公司, 经布劳恩公司 SPS800 溶剂纯化装置处理

(15) MDA-MB-231 细胞, ATCC 公司

(16) Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 完全培养基, Invitrogen 公司

(17) ICR 小鼠, 北京华阜康生物科技股份有限公司

(18) BALB/c nude 小鼠, 北京华阜康生物科技股份有限公司

(19) 未经特别说明的其它试剂, 均为可从常规化学试剂公司商购获得的分析纯级别的试剂, 直接使用

(20) 阳离子脂质 BHEM-Chol 的具体合成过程如下:

在 500 毫升烧瓶内将 2-溴乙胺氢溴酸盐 (17.4 g, 85.0 mmol) 和氯甲酸胆固醇酯 (34.7 g, 77.3 mmol) 溶解于 -30°C 的氯仿溶液中, 然后将三乙胺 (24 mL, 172 mmol) 滴加到上述溶液中。在室温下反应过夜后, 用 1 M 盐酸的饱和氯化钠溶液 (150 mL) 洗涤三次, 并用饱和氯化钠溶液洗涤一次 (150 mL)。有机相用无水硫酸镁干燥后在减压下除去有机溶剂得到粗产物。粗产物用乙醇和丙酮各重结晶一次后得到 N-(2-溴乙基) 氨基甲酸胆固醇酯。将得到的 N-(2-溴乙基) 氨基甲酸胆固醇酯 (4.8 g, 7.8 mmol) 和 N-甲基二乙醇胺 (1.2 g, 9.7 mmol) 加入到 50 毫升干燥的甲苯中, 回流过夜。反应溶液沉淀到大量的乙醚中, 过滤后收集沉淀并真空干燥, 在乙醇中重结晶产物两次后得到白色固体, 即得 BHEM-Chol。

(21) 聚乙二醇-聚乳酸 (mPEG-b-PDLLA) 具体合成过程如下:

将聚乙二醇单甲醚 (mPEG₁₁₃, 1.0 g, 0.2 mmol) 和外消旋丙交酯 (2.5 g, 17.4 mmol) 在手套箱内加入到干燥的圆底烧瓶中, 130°C 加热至二者熔融, 搅拌条件下加入异辛酸亚锡 (12.2 mg, 0.03 mmol), 继续反应 2 h。粗产物在二氯甲烷中溶解, 并沉淀至冷的无水乙醚/甲醇 (4/1, v/v) 两次。收集沉淀, 真空干燥至恒重, 即得到聚乙二醇-聚乳酸嵌段聚合物。

对该聚合物进行核磁共振氢谱和凝胶渗透色谱分析, 乳酸聚合度为 140, 聚合物分子量分布为 1.14, 记为 mPEG₁₁₃-b-PDLLA₁₄₀。

(22) 聚乙二醇-聚乳酸乙醇酸 (mPEG-b-PLGA) 具体合成过程如下:

将聚乙二醇单甲醚 (mPEG₁₁₃, 1.0 g, 0.2 mmol)、外消旋丙交酯 (2.5 g, 17.4 mmol) 和乙交酯 (0.76 g, 6.6 mmol) 在手套箱内加入到干燥的圆底烧瓶中, 130°C 加热至二者熔融, 搅拌条件下加入异辛酸亚锡 (24.1

mg, 0.06 mmol), 继续反应 2 h。粗产物在二氯甲烷中溶解, 并沉淀至冷的无水乙醚/甲醇 (4/1, v/v) 两次。收集沉淀, 真空干燥至恒重, 即得到聚乙二醇-聚乳酸嵌段聚合物。

对该聚合物进行核磁共振氢谱和凝胶渗透色谱分析, 乳酸聚合度为 165, 乙醇酸聚合度为 56, 聚合物分子量分布为 1.12, 记为 mPEG₁₁₃-b-PLGA_{165/56}。

(23) 聚ε-己内酯 (PCL), 参考文献 (Polymer, 2009, 50, 5048-5054) 合成和表征, 具体过程如下:

称取 ε-CL (0.92 g, 8 mmol), 加入约 15 mL 甲苯, 搅拌约 10 分钟后, 加入 85 μL 含 0.188 mmol Al(OⁱPr)₃ 的甲苯溶液, 于 25°C 下反应 1 小时, 加入乙酸终止反应。将反应液中的甲苯用旋转蒸发仪浓缩后, 沉淀到冷的甲醇中, 过滤, 得到的聚合物在 25 °C 下真空干燥到恒重, 即得到聚己内酯均聚物。

对该聚合物进行核磁共振氢谱和凝胶渗透色谱分析, 己内酯聚合度为 30, 分子量分布为 1.06, 记为 PCL₃₀。

(24) 罗丹明 B 标记聚己内酯 (PCL-RhoB), 合成过程如下:

称取 PCL₃₀ (0.50 g, 0.14 mmol)、RhoB (0.211 g, 0.42 mmol)、DIC (0.055 g, 0.70 mmol) 和 DMAP (0.055 g, 0.70 mmol) 并溶解于 10 mL N,N-二甲基甲酰胺中, 在 25 °C、避光条件下反应 48 小时。反应结束后, 在 N,N-二甲基甲酰胺中透析以除去未参与反应的 RhoB, 真空干燥至恒重即得 PCL-RhoB。

(25) 2-羧乙基-3-甲基马来酸酐 (CDM), 参考文献 (Angewandte Chemie International Edition, 2013, 52, 6218-6221) 合成和表征, 具体过程如下:

将低温下经 50 mL 无水四氢呋喃淋洗两次的 NaH (0.720 g, 0.030 mol) 悬浮于 60 mL 无水四氢呋喃, 在冰浴中搅拌。向悬浮液中缓慢滴加 2-膦酰丙酸三乙酯 (8.568 g, 0.036 mol), 待体系不再产生氢气后, 加入 α-酮戊二甲酯 (6.960 g, 0.040 mmol), 冰浴中反应 0.5 小时, 然后加入 30 mL 饱和 NH₄Cl 溶液终止反应。产物用 100 mL 无水乙醚萃取两次, 收集有机相, 经无水 MgSO₄ 干燥, 浓缩, 用 200 目硅胶柱层析分离纯化, 展开剂

为无水乙醚/正己烷 (v/v, 2/1), 收集 $R_f = 0.6$ 的物质, 干燥, 进一步溶解于 80 mL 无水乙醇, 加入 KOH 溶液 (2.0 M, 80 mL), 加热回流 1 h。体系冷却至室温, 加入盐酸 (6.0 M) 调节 pH 至 2.0, 用 200 mL 乙酸乙酯萃取, 收集有机相, 干燥, 减压蒸馏除去乙酸乙酯溶剂, 粗产物在无水乙醚中重结晶, 得 CDM (3.892 g, 产率 54.6%)。

对 CDM 进行电喷雾电离质谱分析, 该物质理论分子量为 184.15, 而检测到的 $m/z = 185.12$ 即为 $[M+H]^+$ 的信号峰, 证明产物结构与预期吻合。

(26) 2-羧乙基马来酸酐 (CSM), 合成和表征具体过程如下:

将低温下经 50 mL 无水四氢呋喃淋洗两次的 NaH (0.720 g, 0.030 mol) 悬浮于 60 mL 无水四氢呋喃, 在冰浴中搅拌。向悬浮液中缓慢滴加三乙基膦酰乙酸酯 (8.064 g, 0.036 mol), 待体系不再产生氢气后, 加入 α -酮戊二甲酯 (6.960 g, 0.040 mmol), 冰浴中反应 0.5 小时, 然后加入 30 mL 饱和 NH_4Cl 溶液终止反应。产物用 100 mL 无水乙醚萃取两次, 收集有机相, 经无水 $MgSO_4$ 干燥, 浓缩, 用 200 目硅胶柱层析分离纯化, 展开剂为无水乙醚/正己烷 (v/v, 2/1), 收集 $R_f = 0.65$ 的物质, 干燥, 进一步溶解于 80 mL 无水乙醇, 加入 KOH 溶液 (2.0 M, 80 mL), 加热回流 1 h。体系冷却至室温, 加入盐酸 (6.0 M) 调节 pH 至 2.0, 用 200 mL 乙酸乙酯萃取, 收集有机相, 干燥, 减压蒸馏除去乙酸乙酯溶剂, 粗产物在无水乙醚中重结晶, 得 CSM (3.496 g, 产率 52.80%)。

对 CSM 进行电喷雾电离质谱分析, 该物质理论分子量为 170.12, 而检测到的 $m/z = 171.24$ 即为 $[M+H]^+$ 的信号峰, 证明产物结构与预期吻合。

实施例一: 端基为甲基马来酸酐的 PEG 衍生物的合成

端基为甲基马来酸酐的 PEG 衍生物的化学结构及合成路线如附图 1 所示。

在 0 °C 下, 将 CDM (1.840 g, 0.010 mol) 在无水二氯甲烷 (20 mL) 中完全溶解, 依次加入 N,N -二甲基甲酰胺 (50 μ L) 和草酰氯 (3.810 g, 0.030 mol), 反应 10 min 后, 25 °C 下继续反应 1 h。使用旋转蒸发仪除去二氯甲烷, 在 15.0 Pa 下蒸馏除去 N,N -二甲基甲酰胺, 获得中间产物酰氯化 CDM (1.96 g, 产率 97%)。

将 mPEG (或 PEG)、吡啶、酰氯化 CDM 在 0 °C 下按 1.0: 6.0: 3.0

的摩尔比例依次加入到干燥二氯甲烷(聚合物浓度为 0.1 M)中搅拌溶解, 在 0 °C 下反应 30 min 后转入 25 °C 继续反应 2 h。反应结束后, 加入与 CH₂Cl₂ 等体积的饱和 NH₄Cl 溶液, 充分萃取后收集有机相, 将无水 MgSO₄ 干燥后的有机相使用旋转蒸发仪浓缩, 并在 0 °C 下用无水乙醚沉淀, 真空干燥固体至恒重。

对上述合成得到的端基为甲基马来酸酐的 PEG 衍生物进行核磁共振氢谱 (¹H NMR) 分析, 测定其分子结构, ¹H NMR 谱见图 2。对上述端基为甲基马来酸酐的 PEG 衍生物进行核磁共振碳谱 (¹³C NMR) 分析, 以对其分子结构进行进一步确认, ¹³C NMR 见图 3。核磁共振氢谱对不同分子量的端基为甲基马来酸酐的 PEG 衍生物进行表征, 结果见图 4。

图 2 (A) 中, 字母 a 所示信号归属于聚乙二醇单甲醚末端甲基的质子氢, 位于 3.67 ppm 处的信号峰 b 则归属于聚乙二醇骨架-CH₂CH₂O-的质子氢。由于 CDM 的键合, c、d 均为新出现的信号峰, 其中 c 归属于 CDM 中的两个亚甲基的质子氢; 而 d 则归属于 CDM 中甲基的的质子氢。CDM 的键合效率通过 3.67 ppm 的信号峰与 2.13 ppm 处的信号峰的积分面积计算得到, 反应效率高于 98%。

在图 2 (B) 中, 由于使用双羟基为末端的聚乙二醇, 因此不存在聚乙二醇单甲醚末端甲基的质子氢信号, 而其它质子信号则与图 2 (A) 相似, 积分面积计算显示 CDM 的反应效率高于 98%。

图 3 中, 端基为甲基马来酸酐的 PEG 衍生物的所有碳原子均能在 ¹³C NMR 中找到相应的信号归属。其中, 70.4 ppm 附近信号峰归属于聚乙二醇主链的碳原子, 而 174.4 ppm 处的信号峰则是酰氯化反应生成的酯键中碳原子的信号峰, 9.8 ppm 处的信号归属于酸酐取代基中的甲基碳原子, ¹³C NMR 的结果进一步证实制备得到的端基为甲基马来酸酐的 PEG 衍生物结构的正确性。

由图 4 可见不同分子量的聚乙二醇单甲醚与 CDM 键合后产物的 ¹H NMR 图谱, 其各个质子信号峰均与图 2 (A) 相似, 证明了该方法可以合成不同分子量的端基为甲基马来酸酐的 PEG 衍生物。

实施例二: 端基为马来酸酐的 PEG 衍生物的合成

端基为马来酸酐的 PEG 衍生物的化学结构及合成路线如附图 5 所示。

端基为马来酸酐的 PEG 衍生物具体合成方法和端基为甲基马来酸酐的 PEG 衍生物相似,以 2-羧乙基马来酸酐 (CSM) 代替 2-羧乙基-3-甲基马来酸酐 (CDM) 进行。

在 0 °C 下, CSM (3.080 g, 0.020 mol) 在无水二氯甲烷 (35 mL) 中完全溶解, 依次加入 N,N-二甲基甲酰胺 (45 μ L) 和草酰氯 (7.620 g, 0.060 mol), 反应 10 min 后, 25 °C 继续反应 1 h。使用旋转蒸发仪除去二氯甲烷, 在 15.0 Pa 下蒸馏除去 N,N-二甲基甲酰胺, 获得酰氯化 CSM (3.420 g, 产率 91%)。

将 mPEG (或 PEG)、吡啶、酰氯化 CSM 在 0 °C 下按 1.0: 6.0: 3.0 的摩尔比例依次加入到干燥二氯甲烷 (mPEG 或 PEG 浓度为 0.1 M) 中搅拌溶解, 在 0 °C 下反应 30 min 后转入 25 °C 继续反应 2 h。反应结束后, 加入与 CH₂Cl₂ 等体积的饱和 NH₄Cl 溶液, 充分萃取后收集有机相, 将无水 MgSO₄ 干燥后的有机相使用旋转蒸发仪浓缩, 并在 0 °C 下用无水乙醚沉淀, 真空干燥固体至恒重。

对上述合成得到的端基为马来酸酐的 PEG 衍生物进行 ¹H NMR 分析, 测定其分子结构, ¹H NMR 谱见图 6。对上述端基为马来酸酐的 PEG 衍生物进行 ¹³C NMR 分析, 以对其分子结构进行进一步确认, ¹³C NMR 见图 7。核磁共振氢谱对端基为马来酸酐的不同分子量的 PEG 衍生物进行表征, 结果见图 8。

图 6 (A) 中, 字母 a 所示信号峰归属于聚乙二醇单甲醚末端甲基的质子氢, 位于 3.65 ppm 处的单峰 b 则归属于聚乙二醇骨架-CH₂CH₂O-的质子氢。由于 CSM 的键合, c,d,e 均为新出现的信号峰, 其中 d 归属于 CSM 中的两个亚甲基质子氢; 而 e 则归属于马来酸酐中的质子。CSM 的键合效率通过 3.65 ppm 的信号峰与 2.74 ppm 处的多重峰的积分面积计算得到, 反应效率高于 97%。

在图 6 (B) 中, 由于使用双羟基聚乙二醇, 因此不存在聚乙二醇单甲醚末端甲基的质子氢, 而其它质子信号则与图 6 (A) 一致, 积分面积计算显示 CSM 的键合效率高于 98%。

图 7 中, 端基为马来酸酐的 PEG 衍生物的所有碳原子均能在 ¹³C NMR 中找到相应的归属。其中, 70.3 ppm 附近信号峰归属于聚乙二醇主链的

碳原子, 而 174.1 ppm 处的信号峰则是酰氯化反应生成的酯键中碳原子的信号峰, 与核磁共振氢谱对应的是在 9.8 ppm 处归属于 CDM 分子酸酐取代基中的甲基碳原子的信号并未出现, ^{13}C NMR 的结果进一步证实制备得到的端基为马来酸酐的 PEG 衍生物结构的正确性。

由图 8 可见不同分子量的聚乙二醇单甲醚与 CSM 键合后产物 ^1H NMR 谱, 其各个质子信号峰均与图 6 (A) 相似, 证明了该方法可以合成不同分子量的端基为马来酸酐的 PEG 衍生物。

实施例三: α -PEG- β -甲基-6-羟己基马来酰胺酸的合成

α -PEG- β -甲基-6-羟己基马来酰胺酸的化学结构及合成路线如附图 9 所示, 所得产物表示为 mPEG-Dlink_m-OH 或 HO-Dlink_m-PEG-Dlink_m-OH。

在 25 °C 下, 将端基为甲基马来酸酐的 PEG 衍生物与 6-氨基-1-己醇共同在无水 CH_2Cl_2 中完全溶解搅拌反应 (聚合物浓度为 0.1 M, 6-氨基-1-己醇与聚乙二醇羟基摩尔量为 3: 1)。反应 12 h 后, 连续加入饱和 NaCl 溶液进行两次萃取, 收集有机相, 在 0 °C 下用过量的无水乙醚进行沉淀, 减压抽滤后, 真空干燥固体至恒重。

对上述合成得到的 α -PEG- β -甲基-6-羟己基马来酰胺酸进行 ^1H NMR 分析, 测定其分子结构, ^1H NMR 谱见图 10。对上述 α -PEG- β -甲基-6-羟己基马来酰胺酸进行 ^{13}C NMR 分析, 以对其分子结构进行进一步确认, ^{13}C NMR 见图 11。核磁共振氢谱对不同分子量的 α -PEG- β -甲基-6-羟己基马来酰胺酸进行表征, 结果见图 12。

图 10 (A) 中, 字母 a-k 标记了所有核磁氢谱中的信号峰, 并依次归属对应产物的各个质子信号。由于 6-氨基-1-己醇的引入, 3.23 ppm 以及 1.30-1.60 ppm 处发现新的质子信号并能正确归属于反应后的 6-氨基-1-己醇的质子; 而原有端基为甲基马来酸酐的 PEG 衍生物在 2.13 ppm 处酸酐基团中甲基的单信号峰, 则由于酸酐环状结构打开而在 1.85 ppm 及 1.94 ppm 处出现两个信号峰, 证明了开环反应的成功进行。6-氨基-1-己醇与酸酐基团的反应效率则通过 3.38 ppm 的聚乙二醇单甲醚的甲基信号峰与 1.30-1.60 ppm 处的多重峰的积分面积计算得到, 证实开环反应的效率大于 96%。

在图 10 (B) 中, 由于使用双羟基聚乙二醇, 因此不存在单甲醚聚乙二醇单甲醚末端甲基的质子氢信号, 而其它质子信号则与图 10(A)一致, 积分面积计算显示马来酸酐的开环效率高于 96%。

图 11 中, α -PEG- β -甲基-6-羟己基马来酰胺酸的所有碳原子均能在 ^{13}C NMR 中找到相应的归属。其中, 71.2 ppm 附近信号峰归属于聚乙二醇主链的碳原子, 而 173.9 ppm 处的峰则是酰氯化反应生成的酯键中碳原子的信号峰, 7.9 ppm 处归属于酸酐取代基中的甲基碳原子的信号, 20.0-40.0 ppm 处的新出现的信号归属于 6-氨基-1-己醇中部分亚甲基碳原子, ^{13}C NMR 的结果进一步证实制备得到的 α -PEG- β -甲基-6-羟己基马来酰胺酸结构的正确性。

由图 12 可见不同分子量的 α -PEG- β -甲基-6-羟己基马来酰胺酸的 ^1H NMR 谱, 其各个质子信号峰均与图 10 (A) 相似, 证明了该方法对合成不同分子量的 α -PEG- β -甲基-6-羟己基马来酰胺酸均适用。

实施例四: α -PEG-6-羟己基马来酰胺酸的合成

α -PEG-6-羟己基马来酰胺酸的化学结构及合成路线如附图 13 所示, 所得产物表示为 mPEG-Dlink-OH 或 HO-Dlink-PEG-Dlink-OH。

在 25 °C 下, 将端基为马来酸酐的 PEG 衍生物与 6-氨基-1-己醇共同在无水 CH_2Cl_2 中完全溶解搅拌反应 (聚合物浓度为 0.1 M, 6-氨基-1-己醇与聚乙二醇羟基摩尔量为 3: 1)。反应 12 h 后, 连续加入饱和 NaCl 溶液进行两次萃取, 收集有机相, 在 0 °C 下用过量的无水乙醚进行沉淀, 减压抽滤后, 真空干燥固体至恒重。

对上述合成得到的 α -PEG-6-羟己基马来酰胺酸进行 ^1H NMR 分析, 测定其分子结构, ^1H NMR 谱见图 14。对上述 α -PEG-6-羟己基马来酰胺酸进行 ^{13}C NMR 分析, 以对其分子结构进行进一步确认, ^{13}C NMR 见图 15。核磁共振氢谱对不同分子量的 α -PEG- β -甲基-6-羟己基马来酰胺酸进行表征, 结果见图 16。

图 14 (A) 中, 字母 a-k 标记了所有核磁氢谱中的信号峰, 并依次归属对应产物的各个质子。由于 6-氨基-1-己醇的引入, 3.24 ppm 以及 1.20-1.80 ppm 处发现新的质子信号并能正确归属于反应后的 6-氨基-1-己醇的质子。6-氨基-1-己醇与酸酐基团的反应效率则通过 3.37 ppm 的聚乙

二醇单甲醚的甲基信号峰与 1.20-1.80 ppm 处的多重峰的积分面积计算得到, 证实开环反应的效率大于 96%。

在图 14 (B) 中, 由于使用双羟基聚乙二醇, 因此不存在聚乙二醇单甲醚末端甲基的质子氢, 而其它质子信号则与图 14 (A) 一致, 积分面积计算显示马来酸酐的开环效率高于 96%。

图 15 中, α -PEG-6-羟己基马来酰胺酸的所有碳原子均能在 ^{13}C NMR 中找到相应的归属。其中, 71.1 ppm 附近信号峰归属于聚乙二醇主链的碳原子, 而 173.9 ppm 处的峰则是酰氯化反应生成的酯键中碳原子的信号峰, 20.0-40.0 ppm 处的信号可归属于 6-氨基-1-己醇中部分亚甲基碳原子。与图 11 相比, 7.9 ppm 处归属于酸酐取代基中的甲基碳原子的信号消失, ^{13}C NMR 的结果进一步证实制备得到的端基为马来酸酐的 PEG 衍生物结构正确。

由图 16 可见不同分子量的 α -PEG-6-羟己基马来酰胺酸 ^1H NMR 图谱, 各个质子信号峰均与图 14 (A) 相似, 证明了该方法对合成不同分子量的 α -PEG-6-羟己基马来酰胺酸均适用。

实施例五: 可酸催化水解酰胺键 Dlink_m 桥联的聚乙二醇-Dlink_m-聚乳酸共聚物的合成

可酸催化水解酰胺键 Dlink_m 桥联的聚乙二醇-Dlink_m-聚乳酸共聚物的化学结构及合成路线如附图 17 所示。

具有不同分子量的 Dlink_m 桥联的聚乙二醇-Dlink_m-聚乳酸嵌段聚合物是以 α -PEG- β -甲基-6-羟己基马来酰胺酸为引发剂, 在溶液条件下引发 D,L-LA 单体聚合而成。D,L-LA 以及大分子引发剂在使用前经过真空干燥过夜。通过调节反应过程中单体与大分子引发剂的投料比, 可以得到不同分子量聚乙二醇-Dlink_m-聚乳酸嵌段聚合物。1,5,7-三叠氮双环(4.4.0)癸-5-烯(TBD)属于有机杂环非金属催化剂, 其催化效率较高, 已经被证明较适用于内酯及交酯等环状单体的开环聚合。合成的具体实验步骤如下:

聚合反应在惰性气体手套箱(购自: 布劳恩惰性气体系统(上海)有限公司)中进行(O_2 与 H_2O 的浓度均小于 0.1 ppm), 以 mPEG-Dlink_m-OH 或 HO-Dlink_m-PEG-Dlink_m-OH 作为引发剂为例, 合成的具体实验步骤如

下:

1) 将进行反应的圆底烧瓶经多次的抽真空火焰干燥和充氮气的处理后, 放入手套箱。

2) 按表 1 的配比进行投料: 向烧瓶中加入 mPEG-Dlink_m-OH (或 HO-Dlink_m-PEG-Dlink_m-OH)、D,L-LA 单体、CH₂Cl₂ 和 TBD, 在 0 °C 搅拌下反应。

3) 反应结束后, 使用旋转蒸发仪将体系浓缩, 用 0 °C 的乙醚甲醇混合溶剂 (乙醚: 甲醇=20:1, v/v, 100 mL) 沉淀两次, 收集沉淀物, 用油泵抽干至恒重为止, 即得产物。

表 1 不同投料比 (质量比) 合成 Dlink_m 桥联的聚乙二醇-Dlink_m--聚乳酸共聚物

引发剂	引发剂 (g)	CH ₂ Cl ₂ (mL)	D,L-LA (g)	TBD (mg)
mPEG ₁₁₃ -Dlink _m -OH	0.52	5.0	0.41	14.6
mPEG ₁₁₃ -Dlink _m -OH	0.51	5.0	0.65	21.9
mPEG ₁₁₃ -Dlink _m -OH	0.52	10.0	1.14	30.8
mPEG ₁₁₃ -Dlink _m -OH	0.50	15.0	2.36	34.1
mPEG ₄₅ -Dlink _m -OH	0.21	5.0	0.29	7.9
mPEG ₄₅ -Dlink _m -OH	0.22	15.0	2.03	13.4
mPEG ₇₇ -Dlink _m -OH	0.34	5.0	0.39	14.5
mPEG ₇₇ -Dlink _m -OH	0.34	15.0	2.15	29.3
mPEG ₂₂₅ -Dlink _m -OH	1.02	20.0	0.31	16.4
mPEG ₂₂₅ -Dlink _m -OH	1.01	25.0	2.29	37.6
mPEG ₄₅₀ -Dlink _m -OH	2.03	20.0	0.28	11.4
mPEG ₄₅₀ -Dlink _m -OH	2.00	25.0	2.35	34.7
HO-Dlink _m -PEG ₁₃₆ -Dlink _m - OH	0.61	10.0	1.34	18.7

用凝胶渗透色谱(GPC)法以聚苯乙烯为标准分析聚乙二醇-聚乳酸嵌段聚合物的数均分子量和分子量分布宽度指数 (PDI), GPC 谱见图 18, 数均分子量和分子量分布 PDI 见表 2。

由图 18 可见, 嵌段聚合物的 GPC 谱均为单峰, 而且不存在拖尾现象即无大分子引发剂的信号峰, 表明大分子引发剂已完全消耗且得到了预期的嵌段共聚物。

表 2 Dlink_m 桥联的聚乙二醇-聚乳酸共聚物的分子量与组成

嵌段共聚物	嵌段共聚物		
	M _n ^a	M _n ^b	PDI ^c
mPEG ₁₁₃ -Dlink _m -PDLLA ₄₂	5000-3020	9600	1.10
mPEG ₁₁₃ -Dlink _m -PDLLA ₇₁	5000-5100	13000	1.12
mPEG ₁₁₃ -Dlink _m -PDLLA ₁₄₂	5000-10220	18900	1.21
mPEG ₁₁₃ -Dlink _m -PDLLA ₂₈₉	5000-20800	24900	1.25
mPEG ₄₅ -Dlink _m -PDLLA ₃₁	2000-2230	5700	1.12
mPEG ₄₅ -Dlink _m -PDLLA ₂₈₁	2000-20230	26300	1.23
mPEG ₇₇ -Dlink _m -PDLLA ₂₉	3400-2080	6400	1.17
mPEG ₇₇ -Dlink _m -PDLLA ₂₇₅	3400-19800	28140	1.21
mPEG ₂₂₅ -Dlink _m -PDLLA ₃₀	10000-2160	15480	1.18
mPEG ₂₂₅ -Dlink _m -PDLLA ₂₉₃	10000-21090	34620	1.26
mPEG ₄₅₀ -Dlink _m -PDLLA ₃₃	20000-2370	27300	1.27
mPEG ₄₅₀ -Dlink _m -PDLLA ₂₆₄	20000-19000	56480	1.19
PDLLA ₇₁ -Dlink _m -PEG ₁₃₆ -Dlink _m -P DLA ₇₁	5100-6000-5100	19400	1.18

^a 由 ¹H NMR 得到; ^b 由 GPC 得到; ^c 由 GPC 得到。

对上述 Dlink_m 桥联的聚乙二醇-聚乳酸共聚物进行 ¹H NMR 分析, 测定其聚合度和数均分子量, ¹H NMR 谱见图 19。对上述 Dlink_m 桥联的聚乙二醇-聚乳酸共聚物进行 ¹³C NMR 分析, 以进一步对其结构进行确认, ¹³C NMR 谱见图 20。

图 19 中, mPEG-Dlink-PDLLA 的 ¹H NMR 图谱字母 a 到 g 标记了归属于两嵌段聚合物的质子氢。聚乳酸的聚合度通过 1.58 ppm 的多重峰(归属于聚乳酸的-CH₃)与 3.67 ppm 的单峰(归属于聚乙二醇的-OCH₂CH₂-)的积分面积比计算得到。

图 20 为 mPEG₁₁₃-Dlink_m-PDLLA₇₁ 的 ¹³C NMR 图谱, 字母 a 到 r 标记了归属于嵌段聚合物的碳原子。其中, 71.2 ppm 处信号峰归属于聚乙二醇主链中的碳原子, 168.9 ppm 处的信号峰归属于大分子引发剂以及聚乳酸主链中的羰基信号峰, 16.7 ppm 处为聚乳酸嵌段甲基碳原子信号, 核磁共振碳谱的结果进一步验证了嵌段聚合物的结构。

实施例六: 可酸催化水解酰胺键 Dlink 桥联的聚乙二醇-Dlink-聚乳酸共聚物的合成

可酸催化水解酰胺键 Dlink 桥联的聚乙二醇-Dlink-聚乳酸共聚物的化学结构及合成路线如附图 21 所示。

各种分子量 Dlink 桥联的聚乙二醇聚-Dlink-乳酸嵌段聚合物是以 α -PEG-6-羟己基马来酰胺酸为引发剂, 在溶液条件下引发 D,L-LA 单体聚合而成。D,L-LA 以及大分子引发剂在使用前经过真空干燥过夜。通过调节反应过程中单体与大分子引发剂的投料比, 可以得到不同分子量聚乙二醇-Dlink-聚乳酸嵌段聚合物, 合成的具体实验步骤如下:

聚合反应在惰性气体手套箱中进行 (O_2 与 H_2O 的浓度均小于 0.1 ppm), 以 mPEG₁₁₃-Dlink-OH 或 HO-Dlink-PEG₁₃₆-Dlink-OH 作为引发剂为例, 合成的具体实验步骤如下:

1) 将进行反应的圆底烧瓶经多次的抽真空火焰干燥和充氮气的处理后, 放入手套箱。

2) 按表 3 的配比进行投料: 向烧瓶中加入 mPEG₁₁₃-Dlink-OH (或 HO-Dlink-PEG₁₃₆-Dlink-OH)、D,L-LA 单体、 CH_2Cl_2 和 TBD, 在 0 °C 搅拌下反应。

3) 反应结束后, 使用旋转蒸发器将体系浓缩, 用 0 °C 的乙醚甲醇混合溶剂 (乙醚: 甲醇=20:1, v/v, 100 mL) 沉淀两次, 收集沉淀物, 用油泵抽干至恒重为止, 即得产物。

表 3 不同投料比 (质量比) 合成 Dlink 桥联的聚乙二醇-Dlink-聚乳酸共聚物

引发剂	引发剂	CH_2Cl_2	D,L-LA	TBD
	(g)	(mL)	(g)	(mg)

mPEG ₁₁₃ -Dlink-OH	0.52	5.0	0.41	14.6
mPEG ₁₁₃ -Dlink-OH	0.52	5.0	2.65	31.9
HO-Dlink-PEG ₁₃₆ -Dlink-O H	0.61	10.0	1.14	21.8

用凝胶渗透色谱法以聚苯乙烯为标准分析聚乙二醇-Dlink-聚乳酸嵌段聚合物的数均分子量和分子量分布宽度指数, GPC 谱见图 22, 数均分子量和分子量分布 PDI 见表 4。

由图 22 可见, 嵌段聚合物的 GPC 谱均为单峰, 而且不存在拖尾现象即无大分子引发剂的信号峰, 表明大分子引发剂已完全消耗且得到了预期的嵌段共聚物。

表 4 Dlink 桥联的聚乙二醇-Dlink-聚乳酸共聚物的分子量与组成

嵌段共聚物	嵌段共聚物		
	M _n ^a	M _n ^b	PDI ^c
mPEG ₁₁₃ -Dlink-PDLLA ₄₂	5000-3020	11400	1.12
mPEG ₁₁₃ -Dlink-PDLLA ₂₈₉	5000-20800	24900	1.18
PDLLA ₆₄ -Dlink-PEG ₁₃₆ -Dlink-PD LLA ₆₄	4600-6000-4600	17300	1.16

^a 由 ¹H NMR 得到; ^b 由 GPC 得到; ^c 由 GPC 得到。

对上述 Dlink 桥联的聚乙二醇-Dlink-聚乳酸共聚物进行核磁共振氢谱分析, 测定其聚合度和数均分子量, ¹H NMR 谱见图 23。对上述 Dlink 桥联的聚乙二醇-Dlink-聚乳酸共聚物进行核磁共振碳谱分析, 以进一步对其结构进行确认, ¹³C NMR 谱见图 24。

图 23 中, mPEG-Dlink-PDLLA 的 ¹H NMR 图谱字母 a 到 f 标记了归属于两嵌段聚合物的质子氢。聚乳酸的聚合度通过 1.58 ppm 的多重峰(归属于聚乳酸的-CH₃)与 3.65 ppm 的单峰(归属于聚乙二醇的-OCH₂CH₂-)的积分面积比计算得到。

图 24 为 mPEG₁₁₃-Dlink-PDLLA₄₂ 的 ¹³C NMR 图谱, 字母 a 到 q 标记了归属于两嵌段聚合物的碳原子。与图 20 相比, 7.8 ppm 处酸酐取代基中的甲基碳信号峰消失而其它信号峰均较为相似, 进一步验证了嵌段聚合物的结构。

实施例七：Dlink（或 Dlink_m）桥联的聚乙二醇-Dlink-聚己内酯（或聚乙二醇-Dlink_m-聚己内酯）共聚物的合成

Dlink（或 Dlink_m）桥联的聚乙二醇-Dlink-聚己内酯（或聚乙二醇-Dlink_m-聚己内酯）共聚物化学结构及合成路线如附图 25 所示。

各种分子量酸敏感化学键桥联聚乙二醇和聚己内酯的嵌段聚合物是以 α -PEG- β -甲基-6-羟己基马来酰胺酸或 α -PEG-6-羟己基马来酰胺酸为引发剂，在溶液条件下引发 ϵ -CL 单体聚合而成。大分子引发剂在使用前经过真空干燥过夜。通过调节 ϵ -CL 与引发剂的投料比，可以得到不同分子量的酸敏感化学键桥联聚乙二醇和聚己内酯的嵌段聚合物。

聚合反应在惰性气体手套箱中进行（O₂ 与 H₂O 的浓度均小于 0.1 ppm），合成的具体实验步骤如下：

1) 将进行反应的圆底烧瓶经多次的抽真空火焰干燥和充氮气的处理后，放入手套箱。

2) 按表 5 的配比进行投料：向烧瓶中加入大分子引发剂、 ϵ -CL 单体、CH₂Cl₂ 和 TBD，在 0 °C 搅拌下反应。

3) 反应结束后，使用旋转蒸发仪将体系浓缩，用 0 °C 的乙醚甲醇混合溶剂（乙醚：甲醇=20:1，v/v，100 mL）沉淀两次，收集沉淀物，用油泵抽干至恒重为止，即得产物。

表 5 不同投料比（质量比）合成 Dlink（或 Dlink_m）桥联的聚乙二醇-Dlink-聚己内酯（或聚乙二醇-Dlink_m-聚己内酯）共聚物

引发剂	引发剂 (g)	CH ₂ Cl ₂ (mL)	ϵ -CL (g)	TBD (mg)
mPEG ₇₇ -Dlink _m -OH	0.34	5.0	0.36	18.1
mPEG ₇₇ -Dlink _m -OH	0.36	5.0	0.70	24.2
mPEG ₇₇ -Dlink _m -OH	0.35	10.0	1.20	34.7
mPEG ₇₇ -Dlink-OH	0.34	5.0	0.34	15.7
mPEG ₇₇ -Dlink-OH	0.36	15.0	2.44	46.9
HO-Dlink _m -PEG ₁₃₆ -Dlink _m -	0.62	10.0	1.38	28.9

OH				
HO-Dlink-PEG ₁₃₆ -Dlink-O				
H	0.61	10.0	1.47	26.4

用凝胶渗透色谱法以聚苯乙烯为标准分析共聚物的数均分子量和分子量分布，GPC 谱见图 26 和 27，数均分子量和分子量分布 PDI 见表 6。

由图 26 和 27 可见，没有大分子引发剂存在产生的拖尾现象，表明大分子引发剂已完全消耗且得到了预期的两嵌段共聚物。

表 6 Dlink（或 Dlink_m）桥联的聚乙二醇-Dlink-聚己内酯（或聚乙二醇-Dlink_m-聚己内酯）共聚物的分子量与组成

嵌段共聚物	嵌段共聚物		
	M _n ^a	M _n ^b	PDI ^c
mPEG ₇₇ -Dlink _m -PCL ₁₈	3400-2050	7900	1.08
mPEG ₇₇ -Dlink _m -PCL ₄₆	3400-5240	10300	1.12
mPEG ₇₇ -Dlink _m -PCL ₉₅	3400-10830	14500	1.11
mPEG ₇₇ -Dlink-PCL ₂₄	3400-2740	8400	1.11
mPEG ₇₇ -Dlink-PCL ₁₇₉	3400-20406	29200	1.24
PCL ₃₅ -Dlink _m -PEG ₁₃₆ -Dlink _m -PCL ₃₅	3990-6000-3990	10300	1.17
PCL ₃₂ -Dlink-PEG ₁₃₆ -Dlink-PCL ₃₂	3640-6000-3640	14900	1.15

^a 由 ¹H NMR 得到；^b 由 GPC 得到；^c 由 GPC 得到。

对上述 Dlink_m 和 Dlink 桥联的共聚物进行核磁共振氢谱分析，测定其聚合度和数均分子量，¹H NMR 谱见图 28 和 29。对上述 Dlink_m 和 Dlink 桥联的共聚物进行核磁共振碳谱分析，¹³C NMR 谱见图 30 和 31。

图 28 和 29 中，字母 a 到 m 标记了归属于嵌段聚合物的质子氢。聚己内酯的聚合度通过 4.08 ppm 的多重峰（归属于聚己内酯的 -OC(O)CH₂）与 3.65 ppm 的单峰（归属于聚乙二醇的 -OCH₂CH₂-）的积分面积比计算得到。

图 30 为 mPEG₇₇-Dlink_m-PCL₉₅ 的 ¹³C NMR 图谱，字母 a 到 u 标记了归属于嵌段聚合物的碳原子。其中，72.1 ppm 处信号峰归属于聚乙二醇主链中的碳原子，174.2 ppm 和 169.1 ppm 处的信号峰归属于大分子引发

剂以及聚己内酯主链中羰基的信号峰, 20.0-40.0 ppm 处信号峰归属于聚己内酯嵌段亚甲基及 6-氨基-己醇的亚甲基碳原子信号, 9.9 ppm 处则为 Dlink_m 中甲基碳原子信号峰, 核磁共振碳谱的结果进一步验证了嵌段聚合物的结构。

图 31 为 mPEG₇₇-Dlink-PCL₇₀ 的 ¹³C NMR 图谱, 字母 a 到 t 标记了归属于嵌段聚合物的碳原子。与图 30 相比, 7.84 ppm 附近归属于 Dlink_m 中的甲基的信号峰消失而其它信号峰相似。

实施例八: Dlink_m (或 Dlink) 桥联的聚乙二醇-Dlink_m-聚乳酸乙醇酸 (或聚乙二醇-Dlink-聚乳酸乙醇酸) 共聚物的合成

Dlink_m (或 Dlink) 桥联的聚乙二醇-Dlink_m-聚乳酸乙醇酸 (或聚乙二醇-Dlink-聚乳酸乙醇酸) 共聚物的化学结构及合成路线如附图 32 所示。

各种分子量酸敏感化学键桥联聚乙二醇和聚乳酸乙醇酸的嵌段聚合物是以 α -PEG- β -甲基-6-羟己基马来酰胺酸或 α -PEG-6-羟己基马来酰胺酸为引发剂, 在溶液条件下引发 D,L-LA 和 GA 混合单体聚合而成, 其中目标产物中聚乳酸和聚乳酸乙醇酸的重复单元比例为 3 比 1。D,L-LA 和 GA 单体以及大分子引发剂在使用前经过真空干燥过夜。通过调节单体与引发剂的投料比, 可以得到不同分子量的酸敏感化学键桥联聚乙二醇和聚乳酸乙醇酸的嵌段聚合物。

聚合反应在惰性气体手套箱中进行 (O₂ 与 H₂O 的浓度均小于 0.1 ppm), 合成的具体实验步骤如下:

1) 将进行反应的圆底烧瓶经多次的抽真空火焰干燥和充氮气的处理后, 放入手套箱。

2) 按表 7 的配比进行投料: 向烧瓶中加入大分子引发剂、D,L-LA 和 GA 单体、CH₂Cl₂ 和 TBD, 在 0 °C 搅拌下反应。

3) 反应结束后, 使用旋转蒸发仪将体系浓缩, 用 0 °C 的乙醚甲醇混合溶剂 (乙醚: 甲醇=20:1, v/v, 100 mL) 沉淀两次, 收集沉淀物, 用油泵抽干至恒重为止, 即得产物。

表 7 不同投料比（质量比）合成 Dlink_m（或 Dlink）桥联的聚乙二醇-Dlink_m-聚乳酸乙醇酸（或聚乙二醇-Dlink-聚乳酸乙醇酸）共聚物

引发剂	引发剂 (g)	CH ₂ Cl ₂ (mL)	D,L-LA/G A (g)	TBD (mg)
mPEG ₄₅ -Dlink _m -OH	0.22	5.0	0.20/0.08	12.8
mPEG ₄₅ -Dlink _m -OH	0.22	5.0	0.82/0.30	24.6
mPEG ₂₂₅ -Dlink _m -OH	1.02	20.0	1.25/0.52	32.9
mPEG ₄₅₀ -Dlink _m -OH	2.01	25.0	1.67/0.71	44.5
mPEG ₄₅ -Dlink-OH	0.21	10.0	0.24/0.11	15.7
mPEG ₄₅ -Dlink-OH	0.21	20.0	1.59/0.61	26.3
HO-Dlink _m -PEG ₁₃₆ -Dlink _m - OH	0.62	15.0	0.82/0.29	28.9
HO-Dlink-PEG ₁₃₆ -Dlink-O H	0.62	15.0	0.86/0.32	24.4

用凝胶渗透色谱法以聚苯乙烯为标准分析共聚物的数均分子量和分子量分布宽度指数，GPC 谱见图 33 和 34，数均分子量和分子量分布 PDI 见表 8。

由图 33 和 34 可见，共聚物的 GPC 谱为单峰，而没有大分子引发剂存在产生的拖尾现象，表明大分子引发剂已完全消耗且得到了预期的两嵌段共聚物。

表 8 Dlink_m 和 Dlink 桥联聚乙二醇和聚乳酸乙醇酸的嵌段共聚物的分子量与组成

嵌段共聚物	嵌段共聚物		
	M _n ^a	M _n ^b	PDI ^c
mPEG ₄₅ -Dlink _m -PLGA _{22/8}	2000-2040	6720	1.09
mPEG ₄₅ -Dlink _m -PLGA _{112/39}	2000-10300	16200	1.13
mPEG ₂₂₅ -Dlink _m -PLGA _{164/56}	10000-15050	25700	1.15
mPEG ₄₅₀ -Dlink _m -PLGA _{225/74}	20000-20500	38200	1.24
mPEG ₄₅ -Dlink-PLGA _{20/7}	2000-1860	5600	1.18

mPEG ₄₅ -Dlink-PLGA _{201/66}	2000-18400	24100	1.22
PLGA _{56/18} -Dlink _m -PEG ₁₃₆ -Dlink _m -PLG	5110-6000-51	19800	1.16
A _{56/18}	10		
PLGA _{60/21} -Dlink-PEG ₁₃₆ -Dlink-PLGA ₆	5600-6000-56	17500	1.19
0/21	00		

^a 由 ¹H NMR 得到； ^b 由 GPC 得到； ^c 由 GPC 得到。

对上述 Dlink_m 和 Dlink 桥联的聚乙二醇和聚乳酸乙醇酸的嵌段共聚物进行核磁共振氢谱分析，测定其聚合度和数均分子量，¹H NMR 谱见图 35 和 36。对上述 Dlink_m 和 Dlink 桥联的聚乙二醇和聚乳酸乙醇酸的嵌段共聚物进行核磁共振碳谱分析，¹³C NMR 谱见图 37 和 38。

图 35 和 36 中，字母 a 到 g 标记了归属于嵌段聚合物的质子氢。1.59 ppm、4.83 ppm 以及 5.22 ppm 处的多重复归属于聚乳酸乙醇酸嵌段的质子，聚乳酸乙醇酸的聚合度通过 1.59 ppm 的多重峰（归属于聚乳酸中 -CH₃）、4.83 ppm 处多重峰（归属于聚乙醇酸中 -CH₂-）与 3.65 ppm 的单峰（归属于聚乙二醇的 -OCH₂CH₂-）的积分面积比计算得到。

图 37 为 mPEG₄₅-Dlink_m-PLGA_{112/39} 的 ¹³C NMR 图谱，字母 a 到 t 标记了归属于嵌段聚合物的碳原子信号。其中，72.4 ppm 处信号峰归属于聚乙二醇主链中的碳原子，20.0-40.0 ppm 处信号峰归属于聚己内酯嵌段亚甲基及 6-氨基-己醇的碳原子信号，16.7 ppm 处信号峰归属于聚乳酸乙醇酸中甲基的碳原子，7.9 ppm 处则为 Dlink_m 中甲基信号峰，核磁共振碳谱的结果进一步验证了嵌段聚合物的结构。

图 38 为 mPEG₇₇-Dlink-PLGA_{20/7} 的 ¹³C NMR 图谱，字母 a 到 s 标记了归属于嵌段聚合物的碳原子。与图 37 相比，7.9 ppm 附近归属于 Dlink_m 中的甲基的信号峰消失而其它信号峰相似。

实施例九：纳米颗粒制备

两亲性聚乙二醇-脂肪族聚酯可以在一定条件下通过各种方法在水中形成胶束或囊泡状纳米颗粒，同时其疏水内核能够对疏水性药物分子或荧光染料进行包载，亲水结构在阳离子脂质辅助下可结合 siRNA。本实施例采用不同乳化方法制备以下纳米颗粒。

制备空载的纳米颗粒，以 mPEG-Dlink_m-PDLLA 为例，具体方法为：将质量为 10 mg 的 mPEG₁₁₃-Dlink_m-PDLLA₁₄₂ 溶解在 200 μ L 的乙酸乙酯中，向上述溶液中加入 1 mL 的水，然后在冰浴下超声 1 min（130 W，工作 4 s 停 2 s，共 60 s），再加入 2 mL 水，转移至圆底烧瓶，立即减压蒸发除去乙酸乙酯。

制备载药的纳米颗粒，以 mPEG-Dlink-PDLLA 为例，具体方法为：将质量为 10 mg 的 mPEG₁₁₃-Dlink-PDLLA₁₄₂ 以及 1 mg 的多西紫杉醇（DTXL）溶解在 200 μ L 的乙酸乙酯中，向上述油相中加入 1 mL 的水，然后在冰浴下超声 1 min（130 W，工作 4 s 停 2 s，共 60 s），再加入 2 mL 水，转移至圆底烧瓶，立即减压蒸发除去乙酸乙酯，使用切向流超滤系统（颇尔过滤器（北京）有限公司）除去游离的 DTXL。

制备荧光标记纳米颗粒，以 mPEG-Dlink_m-PDLLA 为例，制备方法如下：将 mPEG₁₁₃-Dlink_m-PDLLA₁₄₂ 与 PCL-RhoB 同时溶解于乙酸乙酯，其质量比例为 100:3。取上述聚合物储液 200 μ L（10 mg），向其中加入 1 mL 的超纯水，然后超声 1 min（0 $^{\circ}$ C, 130 W，工作 4s 停 2s，共 60 s），再向体系加入 2 mL 超纯水，转移至圆底烧瓶立即减压蒸发除去乙酸乙酯，使用切向流装置除去游离的 PCL-RhoB。

制备包载 siRNA 的纳米颗粒，以 mPEG-Dlink_m-PLGA 为例，制备方法如下：取 400 μ L 的 mPEG₁₁₃-Dlink_m-PLGA_{161/54} 三氯甲烷储液（62.5 mg/mL），加入 100 μ L 的 BHEM-Chol 储液（10 mg/mL，三氯甲烷），再加入 25 μ L 的 PLK1 siRNA 储液（8 mg/mL），超声 1 min（0 $^{\circ}$ C, 130 W，工作 5 s 停 2 s，共 60 s），再向体系加入 5 mL 无 RNase 水，再次超声 1 min（0 $^{\circ}$ C, 130 W，工作 10 s 停 2 s，共 60 s），转移至圆底烧瓶立即减压蒸发除去三氯甲烷。

实施例十：纳米颗粒降解测定

在弱酸性环境下，如图 39A 所示，可酸水解化学键 Dlink_m 或 Dlink 中的酰胺键会发生降解，生成两组均聚物，分别为聚乙二醇和相应的脂肪族聚酯。本实施例在不同 pH 条件下通过定量分析降解后得到的聚乙二醇，对 Dlink_m 或 Dlink 化学键的酸敏感性进行检测。本实施例中的单乳化纳米

颗粒制备方法如实施例九所示, 选取组分为 $mPEG_{113}$ -Dlink_m-PDLLA₄₂、 $mPEG_{113}$ -Dlink_m-PDLLA₇₁、 $mPEG_{113}$ -Dlink_m-PDLLA₁₄₂ 和 $mPEG_{113}$ -Dlink-PDLLA₁₄₀。

采用单乳化方法制备纳米颗粒后, 利用磷酸盐缓冲液调节颗粒溶液 pH 至 5.50、6.50 和 7.40 (磷酸盐缓冲液浓度为 20 mM), 将溶液在 37 °C、60 rpm 转速下处理, 在不同的时间间隔, 将含有 100 mg 纳米颗粒的磷酸盐缓冲溶液取出, 100000 g 离心 30 min 后, 将上层液体冻干, 通过高效液相色谱检测其 PEG 释放量, 结果见图 39。

由图 39 可见, 在 pH 6.5 条件下, Dlink_m 桥联的嵌段聚合物在 24 h 内约有超过 50% 的 PEG 分子被释放, 而在对照条件下 (pH 7.4) 仅有不足 20% 的释放量; 与此同时, Dlink 桥联两嵌段聚合物在模拟胞内环境的 pH 5.5 条件下同样响应性地释放了大于 60% 的 PEG 分子, 证明了两种酸水解化学键桥联的聚乙二醇脂肪族聚酯组装形成的纳米颗粒能够在不同的肿瘤微环境刺激下, 相对快速地释放 PEG 分子。

实施例十一: 纳米颗粒在微酸性环境下降解 PEG 以增强细胞摄取

在本实施例中, 通过流式细胞术检测细胞对于 RhoB 标记的纳米颗粒的摄取情况来研究酸性环境下降解 PEG 前后纳米颗粒的行为。本实施例以 $mPEG_{113}$ -Dlink_m-PDLLA₁₄₂ 和 $mPEG_{113}$ -b-PDLLA₁₄₀ 制备荧光标记纳米颗粒, 制备方法如实施例九所述, 颗粒命名为 D_m-NP_{PDLLA} 和 NP_{PDLLA}。

在 24 孔板中种入 5×10^4 个 MDA-MB-231 细胞, 加入 0.5 mL 的 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 完全培养基, 置于 CO₂ 培养箱中培养过夜, 吸去旧的培养基, 向每个孔中加入含有 D_m-NP_{PDLLA} 以及 NP_{PDLLA} 的新鲜培养基溶液 (pH 6.5 和 7.4 分别处理不同时间), 于 37°C 的 CO₂ 培养箱中培养 2 h。实验结束后, 将细胞消化用 PBS 洗涤两遍并用 1% 多聚甲醛溶液重悬 (200 μ L), 用流式细胞分析仪 (Becton Dickinson) 进行检测, 其结果如图 40。

由图 40 可见, 对于 NP_{PDLLA} 而言, 由于在两种不同 pH 条件下, 其纳米颗粒组分不存在变化, 因此其摄取行为没有明显区别; 而对于 D_m-NP_{PDLLA}, 其在 pH 7.4 条件下的细胞内吞量与 NP_{PDLLA} 相比有少量增加,

但在 pH 6.5 条件下细胞摄取行为明显增强, 参考实施例十中纳米颗粒的降解行为, 认为在模拟肿瘤环境的 pH 条件下的颗粒降解下调了纳米颗粒表面 PEG 密度, 解决了 PEG 对颗粒摄取的障碍。

实施例十二: 单乳化纳米颗粒在体内的循环情况

在本实施例中, 通过高效液相色谱检测纳米颗粒在小鼠血液中的循环情况, 研究酸水解化学键桥联的嵌段共聚物组装形成的纳米颗粒与非酸水解化学键桥联的嵌段共聚物组装形成的纳米颗粒的血液循环性能。荧光标记的颗粒制备方法如实施例九所述。在本实施例中, 聚合物组分选取为 mPEG₁₁₃-Dlink_m-PDLLA₁₄₂ 和 mPEG₁₁₃-b-PDLLA₁₄₀, 制备得到的纳米颗粒记为 D_m-NP_{PDLLA} 和 NP_{PDLLA}。

本实施例在 ICR 小鼠体内进行, 首先通过尾静脉注射 D_m-NP_{PDLLA} 以及 NP_{PDLLA}, RhoB 的每次给药剂量为 60 μg。在注射后不同时间点经眼底静脉丛摘取血, 得到的血液样本在加入肝素钠后 10000 rpm 离心 5 min 获取血浆, 将血浆通过有机溶剂萃取并经高效液相色谱检测分析其中 RhoB 的含量, 结果见图 41。由图可见, D_m-NP_{PDLLA} 以及 NP_{PDLLA} 两种纳米颗粒在血液中的循环情况基本一致, 没有显著性差异, 说明在体内循环过程中 PEG 层能够保护纳米颗粒, 延长血液循环时间。

实施例十三: 纳米颗粒携载化疗药物对乳腺癌生长的抑制

在本实施例中, 使用 MDA-MB-231 原位乳腺癌小鼠肿瘤模型, 模型建立具体过程如下: 在 DMEM 完全培养基中培养 MDA-MB-231 细胞, 在建立模型前 6 小时用无血清 DMEM 培养细胞, 胰酶消化, 经过 1000 rpm 离心收集细胞, 用 PBS 重悬细胞使细胞密度达到 2×10^7 cells/mL。将 100 μL 细胞悬液注射在裸鼠右侧第二个乳腺中。本实施例以 mPEG₁₁₃-b-PDLLA₇₂、mPEG₁₁₃-Dlink_m-PDLLA₇₀ 和 mPEG₁₁₃-Dlink-PDLLA₇₅ 以及制备载药纳米颗粒, 制备方法如实施例九所述, 颗粒命名为 NP_{PDLLA}/DTXL、D_m-NP_{PDLLA}/DTXL 以及 D-NP_{PDLLA}/DTXL。

原位注射乳腺癌细胞的裸鼠在 SPF 级动物房中饲养 7 天左右可以形

成可见肿瘤。肿瘤的体积按照公式： $V=0.5*a*b*b$ 计算，其中 a 是指肿瘤较长的直径， b 是指肿瘤较短的直径。在裸鼠的肿瘤体积达到 60 mm^3 左右开始进行治疗，将接种了 MDA-MB-231 肿瘤的 20 g 裸鼠按照下述处理方式分为 5 组，每组 5 只裸鼠。分别使用 200 μL PBS、200 μL 溶解 70 μg 泰素帝®的 PBS 溶液、200 μL NP_{PDLLA/DTXL} 的 PBS 溶液、200 μL D_m-NP_{PDLLA/DTXL} 和 200 μL D-NP_{PDLLA/DTXL} 的 PBS 溶液，其中纳米颗粒所包载的 DTXL 量为 70 μg 。每 7 天为一个治疗周期共进行三次给药，每 3 天测量一次肿瘤体积。图 42 显示了肿瘤生长情况，图中的纵坐标为测量得到的肿瘤体积相对治疗第一天肿瘤体积的比例。从图中可以看出，PBS 以及低剂量的 DTXL 对肿瘤的生长没有抑制作用。相比于无法降解的聚乙二醇-聚乳酸组装形成的 NP_{PDLLA/DTXL}，D_m-NP_{PDLLA/DTXL} 以及 D-NP_{PDLLA/DTXL} 载药纳米胶束抑制 MDA-MB-231 乳腺癌的效果更强。

实施例十四：Dlink_m 桥联的聚乙二醇-Dlink_m-聚乳酸共聚物制备的纳米颗粒在不同 pH 条件下的 siRNA 释放测定

本实施例选取 mPEG₁₁₃-Dlink_m-PLGA_{161/54} 和 mPEG₁₁₃-b-PLGA_{165/56}，在双乳化方法下（实施例 9）辅以 BHEM-Chol 制备携载 FAM-siNC 的纳米颗粒，分别命名为 D_m-NP_{PLGA/FAM-siNC} 和 NP_{PLGA/FAM-siNC}。将纳米颗粒溶液分别用 pH 为 5.50、6.50 和 7.40 的缓冲溶液稀释至 5 mL (10 mg/mL)，37 °C、60 rpm 下培养。在不同时间间隔，取 100 μL 纳米颗粒溶液，离心 2 h (20000 g)，高效液相色谱检测上层清液中 FAM-siNC 含量，结果见图 43。

由图 43 可见，在 pH 7.4 三种条件下，D_m-NP_{PLGA/FAM-siNC} 和 NP_{PLGA/FAM-siNC} 两种纳米颗粒的 siRNA 释放行为基本一致。在偏酸环境下 (pH 6.5 和 pH 5.5)，两种纳米颗粒的 siRNA 释放量在 40%-60%，D_m-NP_{PLGA/FAM-siNC} 的 siRNA 释放略快于 NP_{PLGA/FAM-siNC}，说明 Dlink_m 桥联的聚乙二醇-Dlink_m-聚乳酸乙醇酸共聚物制备的纳米颗粒与非酸水解化学键桥联的聚乙二醇脂肪族聚酯组装形成的纳米颗粒在细胞内外多种 pH 条件下对 siRNA 具有相似的释放行为。此外，在 24 h 时有一半的 siRNA 释放出来，有利于快速沉默胞内基因表达。

实施例十五：聚乙二醇-脂肪族聚酯纳米颗粒在微酸性环境下增强细胞摄取

在本实施例中，分别通过半定量流式细胞术、定量高效液相色谱和定性激光共聚焦显微镜分别检测观察细胞对于包载 Cy5-siNC 的纳米颗粒的摄取情况。本实施例选取 mPEG₁₁₃-Dlink_m-PLGA_{161/54} 和 mPEG₁₁₃-b-PLGA_{165/56}，在双乳化方法下辅以 BHEM-Chol 制备携载 Cy5-siNC 的纳米颗粒，分别命名为 D_m-NP_{PLGA/Cy5-siNC} 和 NP_{PLGA/Cy5-siNC}。

首先通过流式细胞术半定量检测酸性环境下细胞对纳米颗粒的摄取情况。在 24 孔板中种入 5×10^4 个 MDA-MB-231 细胞，加入 0.5 mL 的 DMEM 完全培养基，置于 CO₂ 培养箱中培养过夜。吸去旧的培养基，向每个孔中加入含有 D_m-NP_{PLGA/Cy5-siNC} 和 NP_{PLGA/Cy5-siNC} 的新鲜培养基溶液（pH 6.5 和 7.4 分别处理不同时间），于 37°C 的 CO₂ 培养箱中培养 4 h。实验结束后，将细胞消化用 PBS 洗涤两遍并用 4% 多聚甲醛溶液重悬（200 μ L），用流式细胞分析仪（Becton Dickinson）进行检测，其结果如图 44。由图 44 可见，对于 NP_{PLGA/Cy5-siNC}，由于在两种不同 pH 条件下，其纳米颗粒组分不存在变化，因此其摄取行为没有明显区别；而对于 D_m-NP_{PLGA/Cy5-siNC}，其在 pH 7.4 条件下的细胞内吞量与 NP_{PLGA/Cy5-siNC} 相比有少量增加，但在 pH 6.5 条件下细胞摄取行为明显增强，可以认为在模拟肿瘤环境的 pH 条件下的颗粒降解下调了纳米颗粒表面 PEG 密度，增强了细胞对于携载 siRNA 纳米颗粒的摄取。

通过高效液相色谱定量检测酸性环境下降解 PEG 前后细胞对纳米颗粒的摄取情况。在 6 孔板中种入 2×10^5 个 MDA-MB-231 细胞，加入 2 mL DMEM 完全培养基，置于 CO₂ 培养箱中培养过夜，吸去旧的培养基，向每个孔中加入含有 D_m-NP_{PLGA/Cy5-siNC} 和 NP_{PLGA/Cy5-siNC} 的新鲜培养基溶液（pH 6.5 和 7.4 分别处理），于 37°C 的 CO₂ 培养箱中培养 4 h。实验结束后，将细胞消化用 PBS 洗涤两遍后裂解细胞，通过高效液相色谱检测胞内摄取的 Cy5-siNC 含量，其结果如图 45。由图 45 可见，对于 NP_{PLGA/Cy5-siNC} 而言，在 pH 7.4 和 pH 6.5 条件下，每百万细胞的 Cy5-siNC 内吞量都在 15 pmol 左右；而对于 D_m-NP_{PLGA/Cy5-siNC}，经过 pH 6.5 条件处理，其每百

万细胞的 Cy5-siNC 内吞量由 pH 7.4 条件下的 16 pmol 上升到 25 pmol, 这一结果也表明在模拟肿瘤酸性环境下的 Dlink_m 桥联的聚乙二醇-Dlink_m-聚乳酸共聚物制备的纳米颗粒能够增强细胞的摄取。

通过激光共聚焦定性检测酸性环境下降解 PEG 前后细胞对纳米颗粒的摄取情况。在 24 孔板中放入细胞爬片, 种入 5×10^4 个 MDA-MB-231 细胞, 加入 0.5 mL 的 DMEM 完全培养基, 置于 CO₂ 培养箱中培养过夜, 吸去旧的培养基, 向每个孔中加入含有 D_m-NP_{PLGA}/Cy5-siNC 以及 NP_{PLGA}/Cy5-siNC 的新鲜培养基溶液 (pH 6.5 和 7.4 分别处理不同时间), 于 37°C 的 CO₂ 培养箱中培养 4 h。实验结束后, 用 4% 多聚甲醛溶液固定细胞, 0.1% Triton X-100 穿膜后通过 Alexa Fluor 488 标记细胞骨架, DAPI 标记细胞核, 通过激光共聚焦 (蔡司 LSM 710) 进行观察, 其结果如图 46。由图 46 可见, D_m-NP_{PLGA}/Cy5-siNC 组细胞内的 Cy5 荧光信号明显强于 NP_{PLGA}/Cy5-siNC, 这也间接证明了在模拟肿瘤酸性环境下的颗粒降解了 PEG 后能够增强细胞对颗粒的摄取。此外, 细胞内两种颗粒的都是均匀分布在细胞质, 胞内定位没有明显差异。

实施例十六: Dlink_m 桥联的聚乙二醇-Dlink_m-聚乳酸乙醇酸共聚物制备的包载小干扰 RNA 的纳米颗粒在微酸性环境下对乳腺癌细胞 PLK1 基因 mRNA 表达的抑制

在本实施例中, 通过定量聚合酶链式反应 (RT-PCR) 检测细胞摄取包载 PLK1 siRNA 的纳米颗粒后 PLK1 mRNA 表达水平变化来研究酸性环境下降解 PEG 前后纳米颗粒摄取对 PLK1 表达水平的影响。包载 PLK1 siRNA 的纳米颗粒的制备方法如实施例九所述。选取组分为 mPEG₁₁₃-Dlink_m-PLGA_{161/54} 和 mPEG₁₁₃-b-PLGA_{165/56}, 制备得到颗粒记为 D_m-NP_{PLGA}/siPLK1 和 NP_{PLGA}/siPLK1。

在 6 孔板中种入 2×10^5 个 MDA-MB-231 细胞, 加入 2 mL 的 DMEM 完全培养基, 置于 CO₂ 培养箱中培养过夜, 吸去旧的培养基, 向每个孔中分别加入含有 D_m-NP_{PLGA}/siPLK1、NP_{PLGA}/siPLK1, 以及包载对照 siRNA 的纳米颗粒 D_m-NP_{PLGA}/siNC、NP_{PLGA}/siNC 新鲜培养基溶液 (培养基的 pH 值分

别设置为 6.5 和 7.4), 于 37°C 的 CO₂ 培养箱中培养 6 h, 吸去包含纳米颗粒的培养基, 更换为新鲜培养基, 继续于 37°C 的 CO₂ 培养箱中培养 24 h。实验结束后, 将细胞消化用 PBS 洗涤两遍, 然后使用 Takara 公司 RNAiso plus 提取细胞总 RNA, 通过定量 PCR 的方法检测 PLK1 mRNA 表达水平的变化, 其结果如图 47。

由图 47 可见, pH 7.4 条件下, 由于 D_m-NP_{PLGA/siPLK1} 纳米颗粒未发生大量的 PEG 降解, 与 NP_{PLGA/siPLK1} 的表面 PEG 密度没有明显差异, 因此 D_m-NP_{PLGA/siPLK1} 和 NP_{PLGA/siPLK1} 对细胞 PLK1 mRNA 表达的抑制水平没有显著差异; 而 pH 6.5 条件下, 由于 D_m-NP_{PLGA/siPLK1} 纳米颗粒在微酸性环境下降解 PEG 以增强细胞摄取, 因此 D_m-NP_{PLGA/siPLK1} 对细胞 PLK1 mRNA 表达的抑制强于 NP_{PLGA/siPLK1}, 与对照组相比, PLK1 mRNA 的表达量仅在 20%。

实施例十七: Dlink_m 桥联的聚乙二醇-Dlink_m-聚乳酸乙醇酸共聚物制备的包载小干扰 RNA 的纳米颗粒在微酸性环境下对乳腺癌肿瘤细胞 PLK1 基因蛋白表达的抑制

在本实施例中, 通过蛋白质印迹法 (Western blot) 的方法检测细胞摄取包载 PLK1 siRNA 的纳米颗粒后 PLK1 蛋白表达水平变化来研究酸性环境下降解 PEG 前后纳米颗粒摄取对 PLK1 表达水平的影响。包载 PLK1 siRNA 的纳米颗粒的制备方法如实施例九所述, 选取组分为 mPEG₁₁₃-Dlink_m-PLGA_{161/54} 和 mPEG₁₁₃-b-PLGA_{165/56}, 制备得到颗粒记为 D_m-NP_{PLGA/siPLK1} 和 NP_{PLGA/siPLK1}。

在 6 孔板中种入 2×10⁵ 个 MDA-MB-231 细胞, 加入 2 mL 的 DMEM 完全培养基, 置于 CO₂ 培养箱中培养过夜。吸去旧的培养基, 向每个孔中分别加入含有 D_m-NP_{PLGA/siPLK1}、NP_{PLGA/siPLK1} 以及包载对照 siRNA 的纳米颗粒 D_m-NP_{PLGA/siNC}、NP_{PLGA/siNC} 新鲜培养基溶液 (培养基的 pH 值设置为 6.5), 于 37°C 的 CO₂ 培养箱中培养 6 h, 吸去含有纳米颗粒的培养基, 更换为新鲜培养基, 继续于 37°C 的 CO₂ 培养箱中培养 48 h。实验结束后, 将细胞消化用 PBS 洗涤两遍, 然后使用碧云天公司 NP40 蛋白裂解液提取细胞总蛋白, 通过 Western blot 的方法检测 PLK1 蛋白表达水平的变化,

其结果如图 48。

由图 48 可见，在 pH 6.5 条件下，与实施例十六中 RT-PCR 实验结果一致，由于 $D_m\text{-NP}_{\text{PLGA/siPLK1}}$ 发生降解，增强了细胞摄取和胞内 PLK1 基因沉默，因此 $D_m\text{-NP}_{\text{PLGA/siPLK1}}$ 对细胞 PLK1 蛋白表达的下调强于 $\text{NP}_{\text{PLGA/siPLK1}}$ 。

实施例十八：Dlink_m 桥联的聚乙二醇-Dlink_m-聚乳酸乙醇酸共聚物制备的包载小干扰 RNA 的纳米颗粒在微酸性环境下对乳腺癌细胞增殖的抑制

在本实施例中，使用 MTT 法检测检测细胞摄取包载 PLK1 siRNA 的纳米颗粒后细胞活力的变化来研究酸性环境下降解 PEG 前后纳米颗粒摄取对细胞增殖的影响。包载 PLK1 siRNA 的纳米颗粒的制备方法如实施例九所述，选取组分为 $m\text{PEG}_{113}\text{-Dlink}_m\text{-PLGA}_{161/54}$ 和 $m\text{PEG}_{113}\text{-b-PLGA}_{165/56}$ ，制备得到颗粒记为 $D_m\text{-NP}_{\text{PLGA/siPLK1}}$ 和 $\text{NP}_{\text{PLGA/siPLK1}}$ 。

在 96 孔板中种入 5×10^3 个 MDA-MB-231 细胞，加入 0.1 mL 的 DMEM 完全培养基，置于 CO₂ 培养箱中培养过夜。吸去旧的培养基，向每个孔中分别加入含有 $D_m\text{-NP}_{\text{PLGA/siPLK1}}$ 、 $\text{NP}_{\text{PLGA/siPLK1}}$ 以及包载对照 siRNA 的纳米颗粒 $D_m\text{-NP}_{\text{PLGA/siNC}}$ 、 $\text{NP}_{\text{PLGA/siNC}}$ 新鲜培养基溶液（培养基的 pH 值设置为 6.5）于 37°C 的 CO₂ 培养箱中培养 6 h，吸去含有纳米颗粒的培养基，更换为新鲜培养基，继续于 37°C 的 CO₂ 培养箱中培养 72 h。实验结束后，向每个孔中加入 25 μL 5 mg/mL 噻唑蓝，于 37°C 的 CO₂ 培养箱中培养 2 h，向每个孔中加入 100 μL 细胞裂解液，在 37°C 避光孵育 4 h，用酶标仪（Bio-rad）进行检测，其分析结果如图 49。

由图 49 可见，在 pH 6.5 条件下，由于 $D_m\text{-NP}_{\text{PLGA/siPLK1}}$ 能够更好地诱导 PLK1 基因沉默，从而造成了细胞增殖能力下降，因此 $D_m\text{-NP}_{\text{PLGA/siPLK1}}$ 对细胞增殖的抑制能力强于 $\text{NP}_{\text{PLGA/siPLK1}}$ 。

实施例十九：Dlink_m 桥联的聚乙二醇-Dlink_m-聚乳酸乙醇酸共聚物制备的包载小干扰 RNA 的纳米颗粒在体内的分布

在本实施例中，通过高效液相色谱定量检测纳米颗粒携带 siRNA 后在荷瘤小鼠体内各脏器的分布情况。包载 Cy5-siNC 的颗粒制备方法如实

实施例九所述。在本实施例中，聚合物组分选取为 mPEG₁₁₃-Dlink_m-PLGA_{161/54} 和 mPEG₁₁₃-b-PLGA_{165/56}，制备得到的纳米颗粒记为 D_m-NP_{PLGA/Cy5-siNC} 和 NP_{PLGA/Cy5-siNC}。本实施例使用 MDA-MB-231 原位乳腺癌小鼠肿瘤模型，模型建立具体过程如实施例十三所述。

通过尾静脉注射 D_m-NP_{PLGA/Cy5-siNC} 以及 NP_{PLGA/Cy5-siNC}，Cy5-siNC 的给药剂量为 0.5 OD/injection。注射 24 h 后，处死小鼠，取小鼠各个脏器，萃取组织内的 Cy5-siRNA 用高效液相色谱检测脏器内的 siRNA 含量，结果见图 50。由图 50 可见，D_m-NP_{PLGA/Cy5-siNC} 和 NP_{PLGA/Cy5-siNC} 两种纳米颗粒在各个脏器都有不同程度的富集，其中在脑、心、肺等器官富集较少，而在肝、肾和脾等与体内代谢清除机制相关的器官富集较多。除肿瘤外的其他脏器中，两种纳米颗粒的富集没有明显差异。而在肿瘤部位，D_m-NP_{PLGA/Cy5-siNC} 的富集明显高于 NP_{PLGA/Cy5-siNC}，说明肿瘤酸性微环境中 D_m-NP_{PLGA/Cy5-siNC} 降解 PEG 后增强肿瘤细胞摄取能够增加 siRNA 在肿瘤部位的富集。

实施例二十：Dlink_m 桥联的聚乙二醇-Dlink_m-聚乳酸乙醇酸共聚物制备的包载小干扰 RNA 的纳米颗粒对乳腺癌肿瘤生长的抑制

在本实施例中，使用 MDA-MB-231 原位乳腺癌小鼠肿瘤模型，模型建立具体过程如实施例十三所述。本实施例以 mPEG₁₁₃-Dlink_m-PLGA_{161/54} 和 mPEG₁₁₃-b-PLGA_{165/56} 制备携载 PLK1 siRNA 的纳米颗粒，制备方法如实施例九所述，颗粒命名为 D_m-NP_{PLGA/siPLK1} 和 NP_{PLGA/siPLK1}。

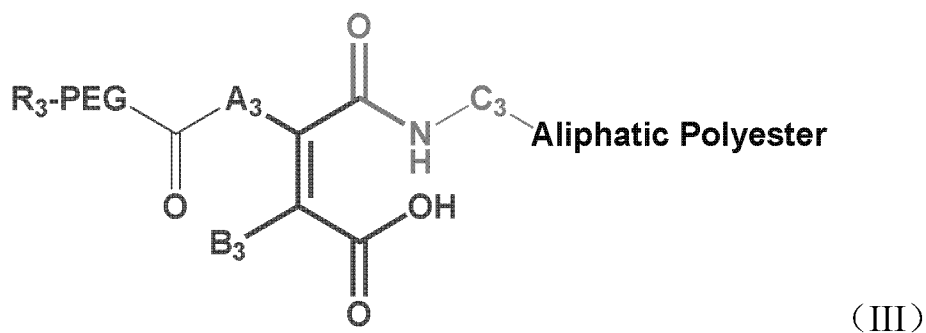
原位注射乳腺癌细胞的裸鼠在 SPF 级动物房中饲养 7 天左右可以形成可见肿瘤。肿瘤的体积按照公式： $V=0.5*a*b*b$ 计算，其中 a 是指肿瘤较长的直径，b 是指肿瘤较短的直径。在裸鼠的肿瘤体积达到 60 mm³ 左右开始进行治疗，将接种了 MDA-MB-231 肿瘤的 20 g 裸鼠按照下述处理方式分为 7 组，每组 5 只裸鼠。按照 PLK1 siRNA 的给药剂量作为计算标准，实验组设置为：PBS 组、Free siPLK1 1 mg/kg、NP_{PLGA/siPLK1} 1 mg/kg、D_m-NP_{PLGA/siPLK1} 1 mg/kg、NP_{PLGA/siPLK1} 0.5 mg/kg、D_m-NP_{PLGA/siPLK1} 0.5 mg/kg、D_m-NP_{PLGA/siPLK1} 0.25 mg/kg，通过 400 uL PBS 配置以上药物进行给药。每 2 天为一个治疗周期共进行 10 次给药，每 2 天测量一次肿瘤体

积。图 51 显示了肿瘤体积的变化,图中的纵坐标为测量得到的肿瘤体积。从图中可以看出,在 1 mg/kg 和 0.5 mg/kg 的给药剂量下, $D_m\text{-NP}_{\text{PLGA/siPLK1}}$ 对肿瘤生长的抑制效果明显优于同等剂量下的 $\text{NP}_{\text{PLGA/siPLK1}}$ 。

尽管出于说明和描述的目的在此给出本发明,但并非意在穷举或限制。许多修改和变化对本领域技术人员来说将是显而易见的。为了解释原则和实际应用而选择和描述所述技术方案,并且使本领域技术人员理解具有各种修改的本发明不同的实施方案适合于预期的具体用途。

权利要求

1.一种桥联的聚乙二醇-脂肪族聚酯嵌段共聚物,其结构通式 III 如下:



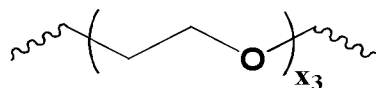
其中, A_3 选自 C_gH_h , g 、 h 为整数, $0 \leq g \leq 4$, $0 \leq h \leq 10$; B_3 是甲基或不存在; C_3 选自 C_iH_j , i 、 j 为整数, $1 \leq i \leq 20$, $2 \leq j \leq 42$; R_3 不存在或为烷基、烷氧基、芳基、芳氧基、卤素原子或被取代的烷基、烷氧基、芳基、芳氧基; PEG 表示聚乙二醇残基, aliphatic polyester 表示脂肪族聚酯残基。

2.根据权利要求 1 所述的桥联的聚乙二醇-脂肪族聚酯嵌段共聚物,其中 A_3 不存在, 或为碳原子数 1-4 的亚烷基。

3.根据权利要求 1-2 中任意一项所述的桥联的聚乙二醇-脂肪族聚酯嵌段共聚物, 其中 C_3 为碳原子数 1-20 的亚烷基, 更优选碳原子数 1-6 的亚烷基。

4.根据权利要求 1-3 中任意一项所述的桥联的聚乙二醇-脂肪族聚酯嵌段共聚物, 其中 R_3 为碳原子数 1-6 的烷氧基。

5.根据权利要求 1-4 中任意一项所述的桥联的聚乙二醇-脂肪族聚酯嵌段共聚物, 其中所述聚乙二醇残基以如下通式表示:



其中, x_3 为整数, $1 \leq x_3 \leq 500$;

所述脂肪族聚酯残基是聚 ϵ -己内酯、聚乳酸或聚乳酸乙醇酸残基。

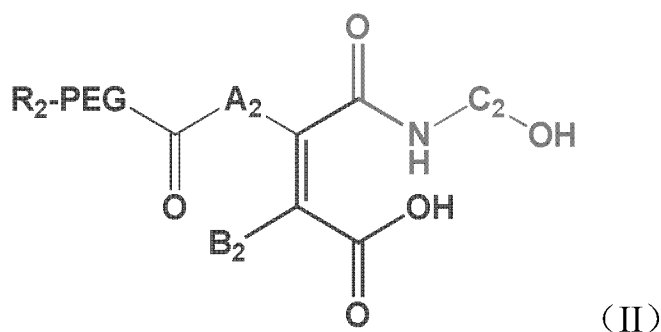
6. 根据权利要求 5 所述的桥联的聚乙二醇-脂肪族聚酯嵌段共聚物, 其中所述脂肪族聚酯的数均分子量为 2000-20000; 更优选 5000-15000。

7. 根据权利要求 6 所述的桥联的聚乙二醇-脂肪族聚酯嵌段共聚物, 其中聚乳酸乙醇酸中乳酸和乙醇酸重复单元的比例为 10-90/90-10, 更优选 20-80/80-20, 进一步优选 75/25。

8. 一种权利要求 1-7 中任意一项所述的桥联的聚乙二醇-脂肪族聚酯嵌段共聚物的制备方法, 包括: 将马来酰胺酸衍生物修饰的聚乙二醇作为引发剂, 使脂肪族聚酯单体发生开环聚合反应, 既得桥联的聚乙二醇-脂肪族聚酯嵌段共聚物; 或将马来酰胺酸衍生物修饰的聚乙二醇与具有氨基端基的脂肪族聚酯发生大分子偶联反应, 既得桥联的聚乙二醇-脂肪族聚酯嵌段共聚物。

9. 根据权利要求 8 所述的桥联的聚乙二醇-脂肪族聚酯嵌段共聚物的制备方法, 其中溶剂是二氯甲烷。

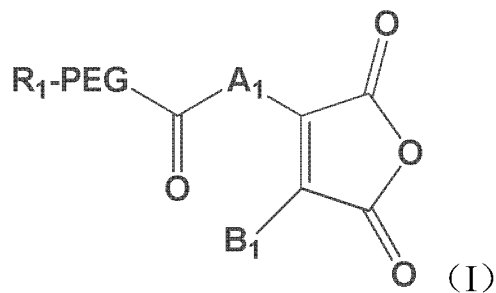
10. 一种马来酰胺酸衍生物修饰的聚乙二醇, 其结构通式 II 如下:



其中, A_2 选自 C_eH_d , c 、 d 为整数, $0 \leq c \leq 4$, $0 \leq d \leq 10$; B_2 为甲基或不存在; C_2 选自 C_eH_f , e 、 f 为整数, $1 \leq e \leq 20$, $2 \leq f \leq 42$; R_2 不存在或为烷基、烷氧基、芳基、芳氧基、卤素原子或被取代的烷基、烷氧基、芳基、芳氧基; PEG 表示聚乙二醇残基。

11. 权利要求 10 所述的马来酰胺酸衍生物修饰的聚乙二醇的制备方法, 包括将氨基醇与端基含马来酸酐基团的聚乙二醇混合, 利用氨基醇中的伯胺基团与马来酸酐基团进行开环反应形成酰胺键, 既得马来酰胺酸衍生物修饰的聚乙二醇。

12. 一种端基含马来酸酐基团的聚乙二醇, 结构通式 I 如下:



其中，A₁选自C_aH_b，a、b为整数，0 ≤ a ≤ 4，0 ≤ b ≤ 10；B₁为甲基或不存在；R₁不存在或为烷基、烷氧基、芳基、芳氧基、卤素原子或被取代的烷基、烷氧基、芳基、芳氧基；PEG表示聚乙二醇残基。

13.权利要求 12 所述的端基含马来酸酐基团的聚乙二醇的制备方法，包括将羧基取代的马来酸酐中的羧基进行酰氯化，再与聚乙二醇末端羟基进行反应。

14.一种由权利要求 1-7 任意一项所述桥联的聚乙二醇-脂肪族聚酯嵌段共聚物制备的药物载体或核酸载体。

15.一种由权利要求 14 所述药物载体或核酸载体制备的载药纳米颗粒或载核酸纳米颗粒。

16.由权利要求 10 所述的马来酰胺酸衍生物修饰的聚乙二醇制备而得的药物载体或核酸载体，由权利要求 12 所述的端基含马来酸酐基团的聚乙二醇制备而得的药物载体或核酸载体，权利要求 14 的药物载体或核酸载体，权利要求 15 的载药纳米颗粒或载核酸纳米颗粒在制备抗肿瘤药物中的用途。

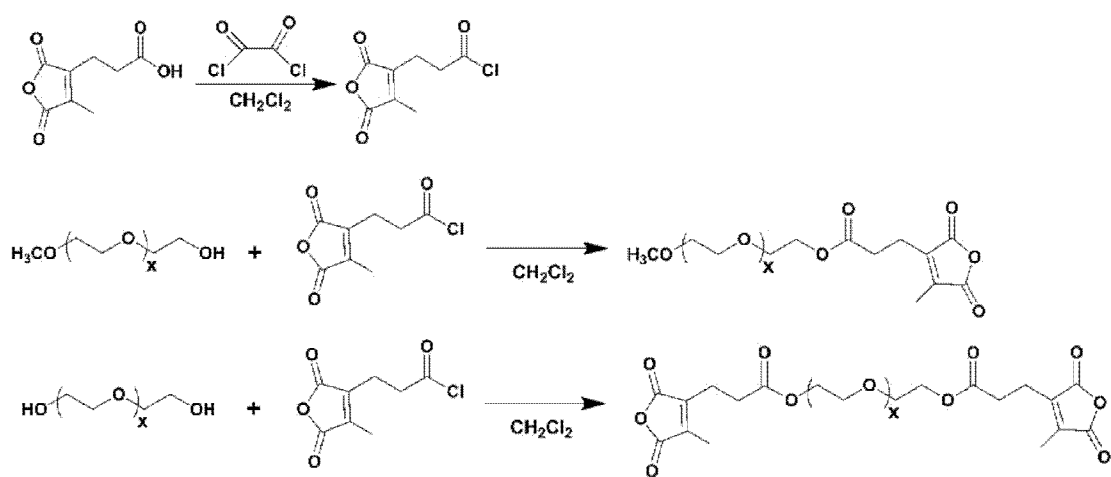
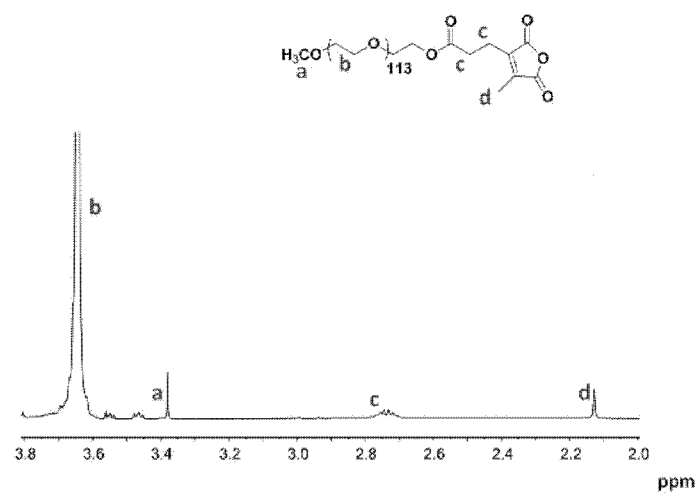


图 1

A



B

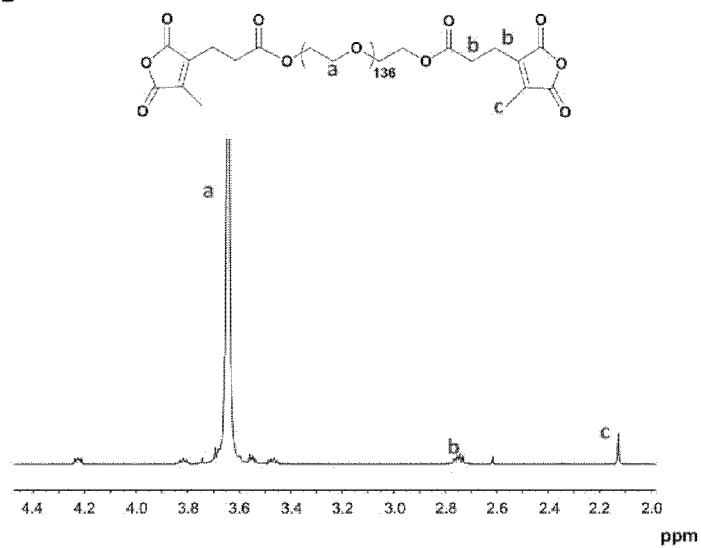


图 2

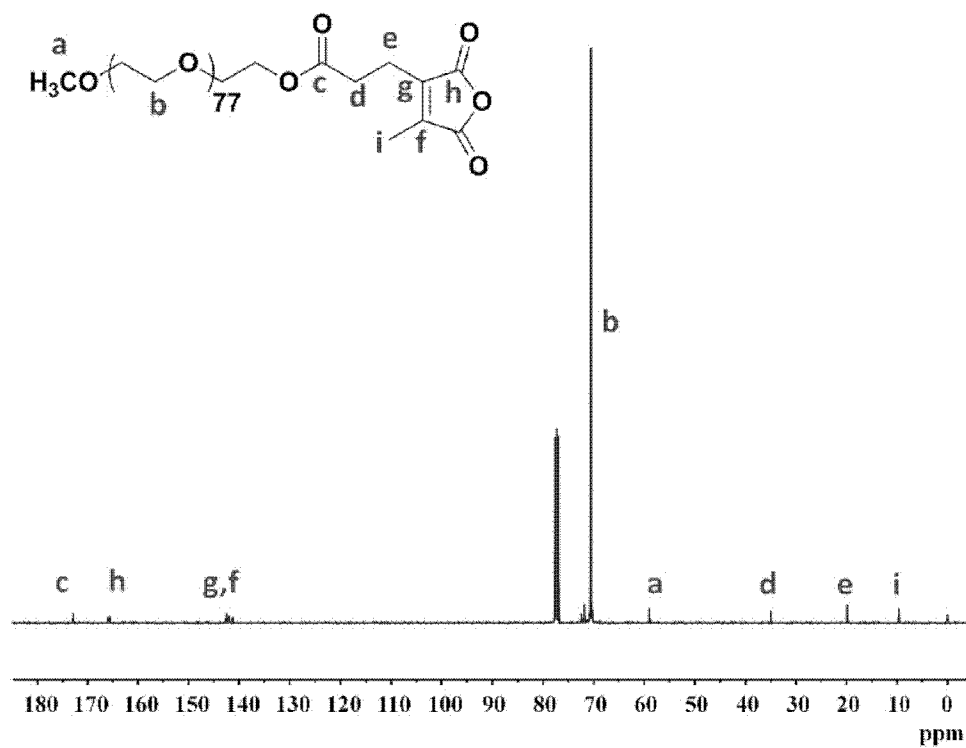


图 3

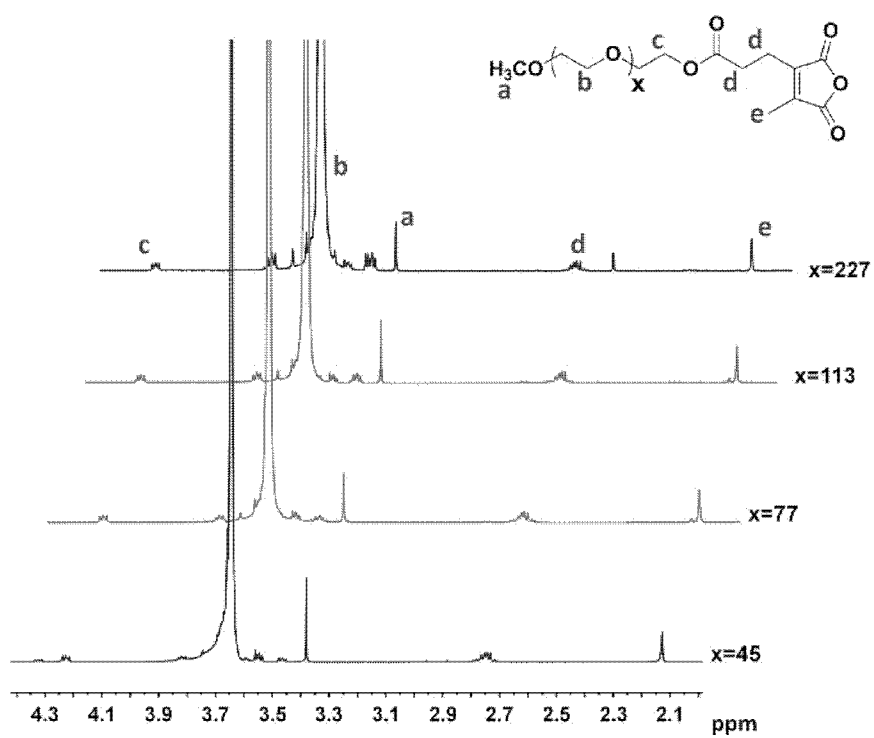


图 4

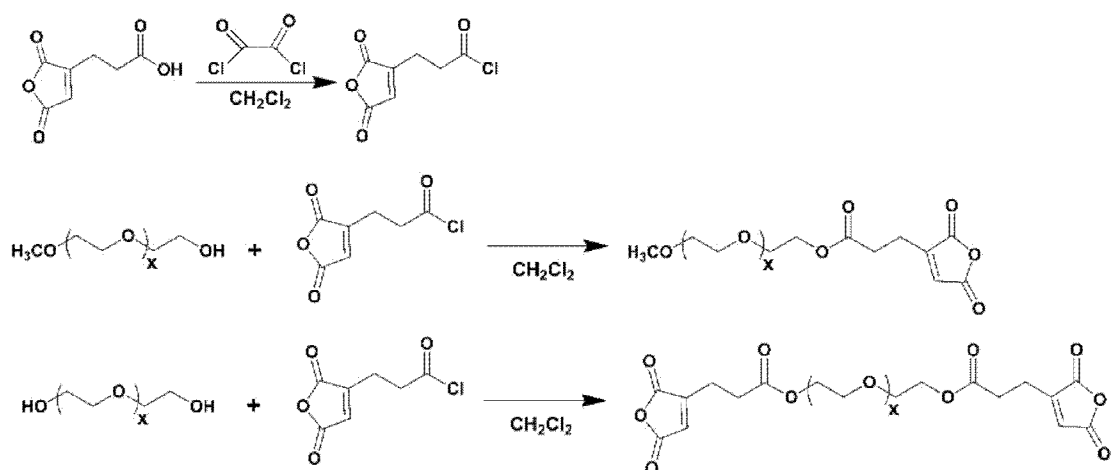
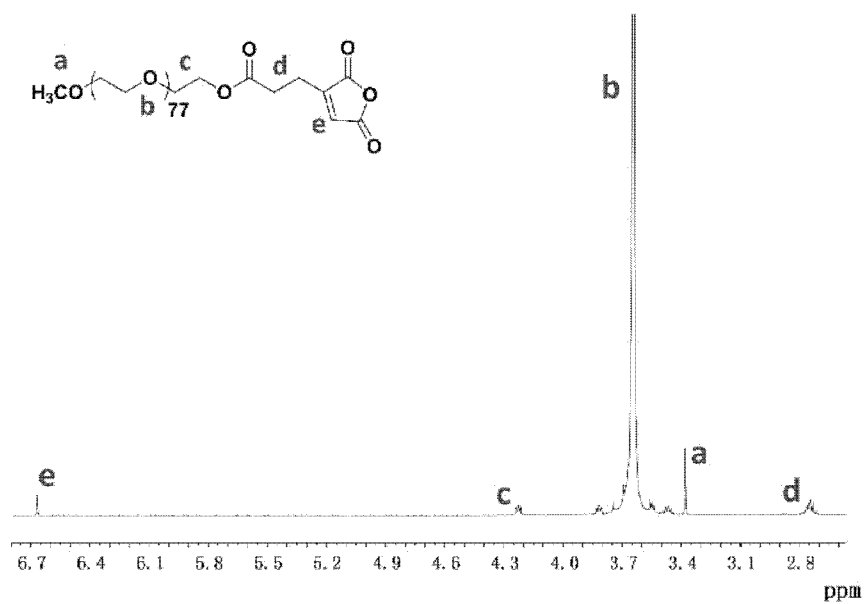


图 5

A



B

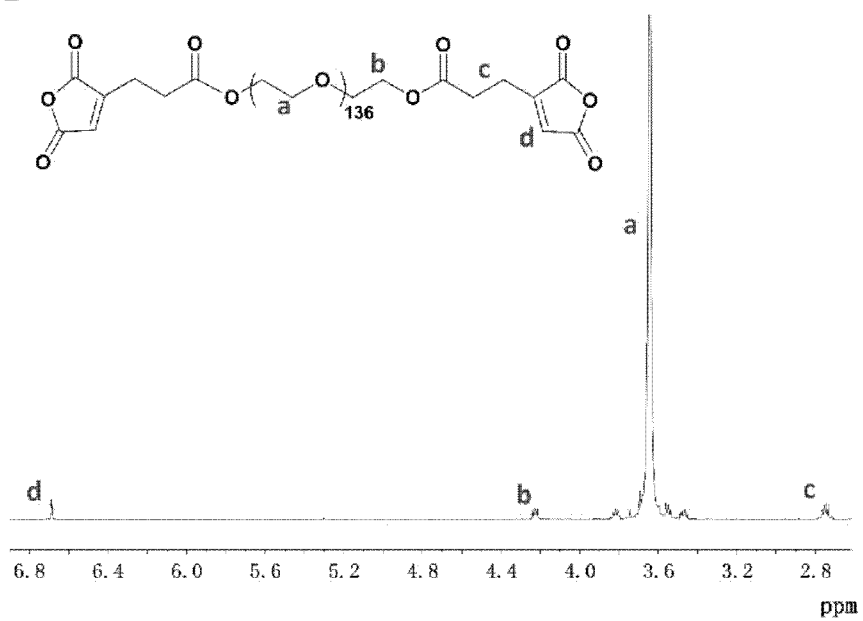


图 6

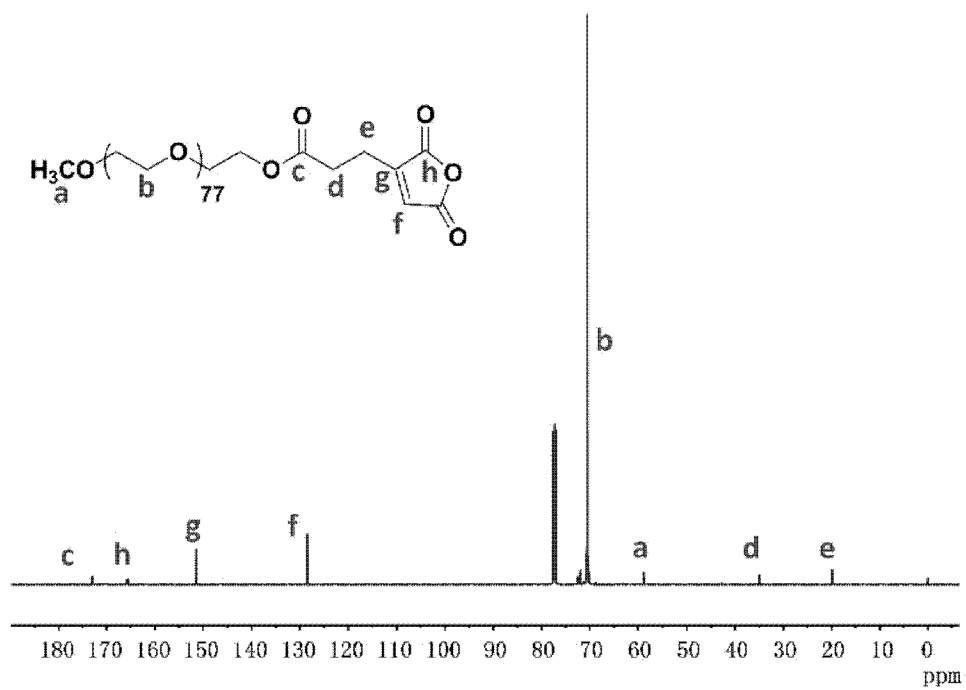


图 7

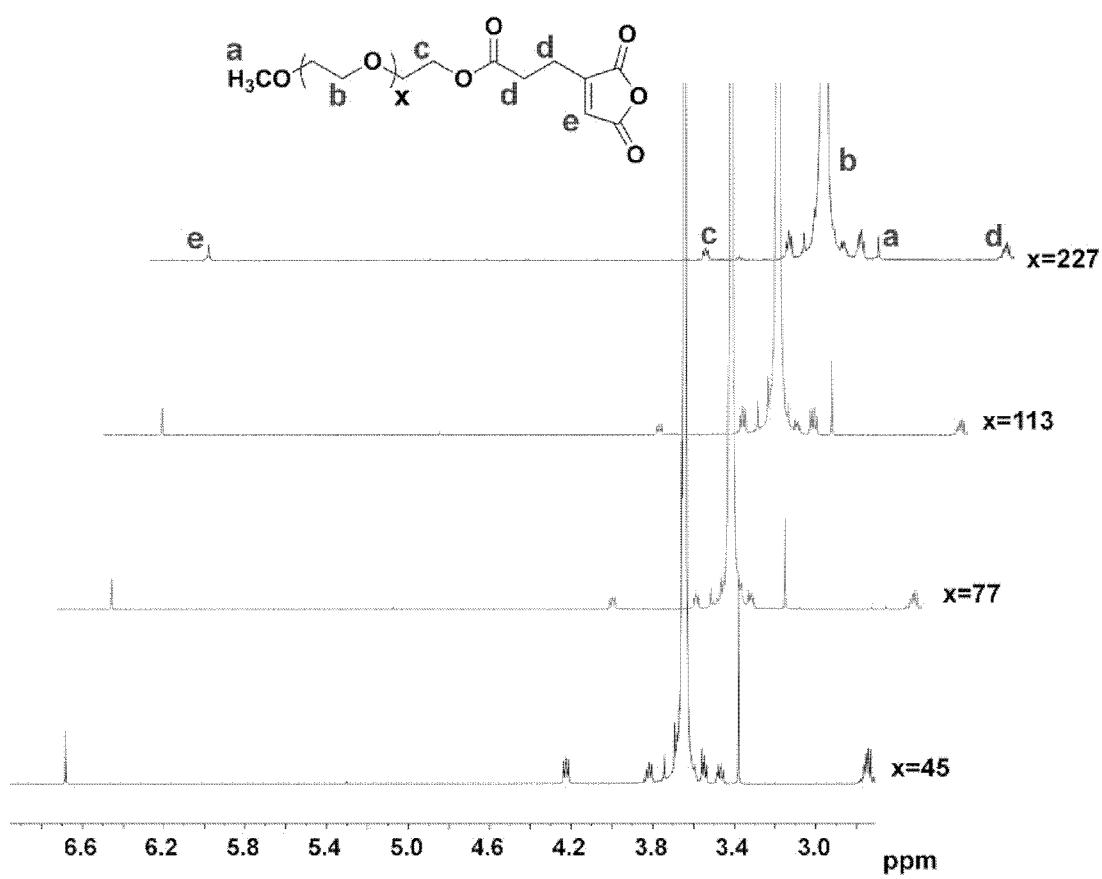


图 8

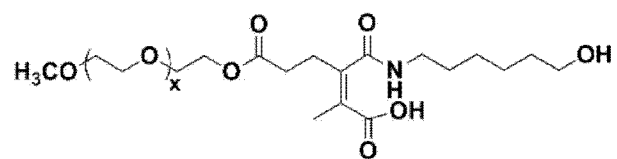
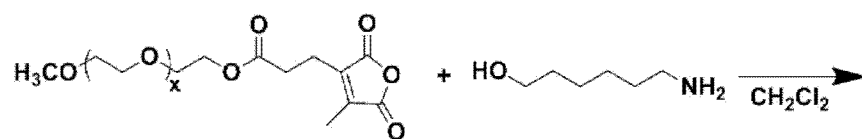
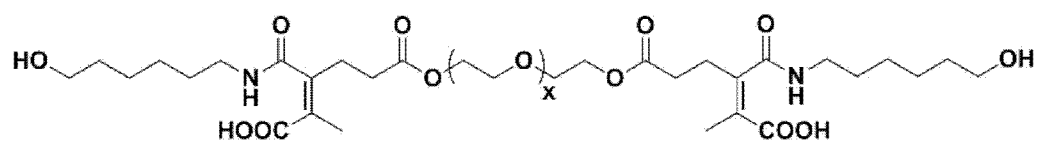
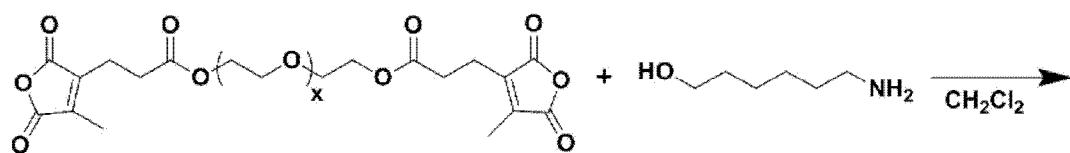
A**B**

图 9

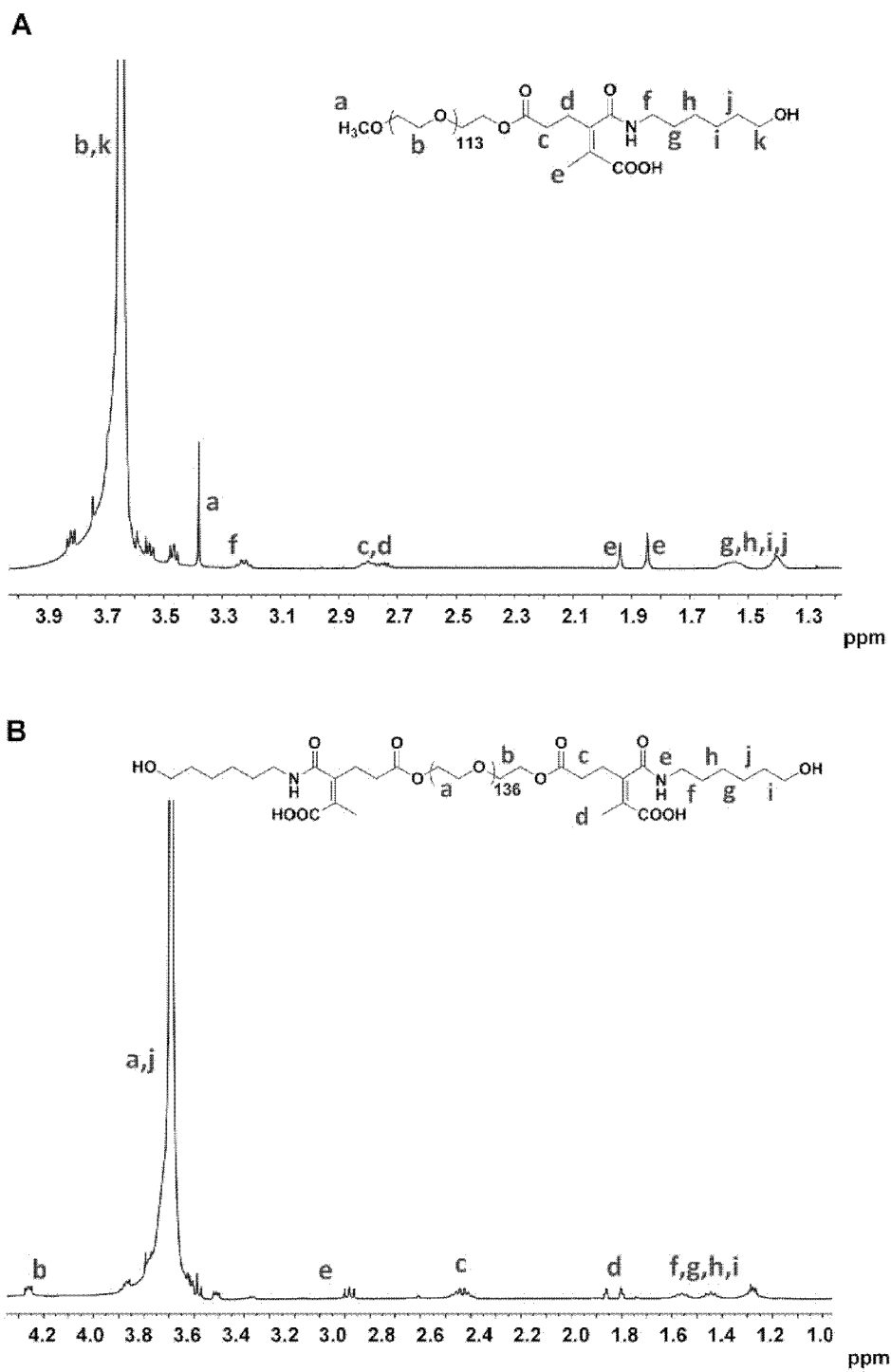


图 10

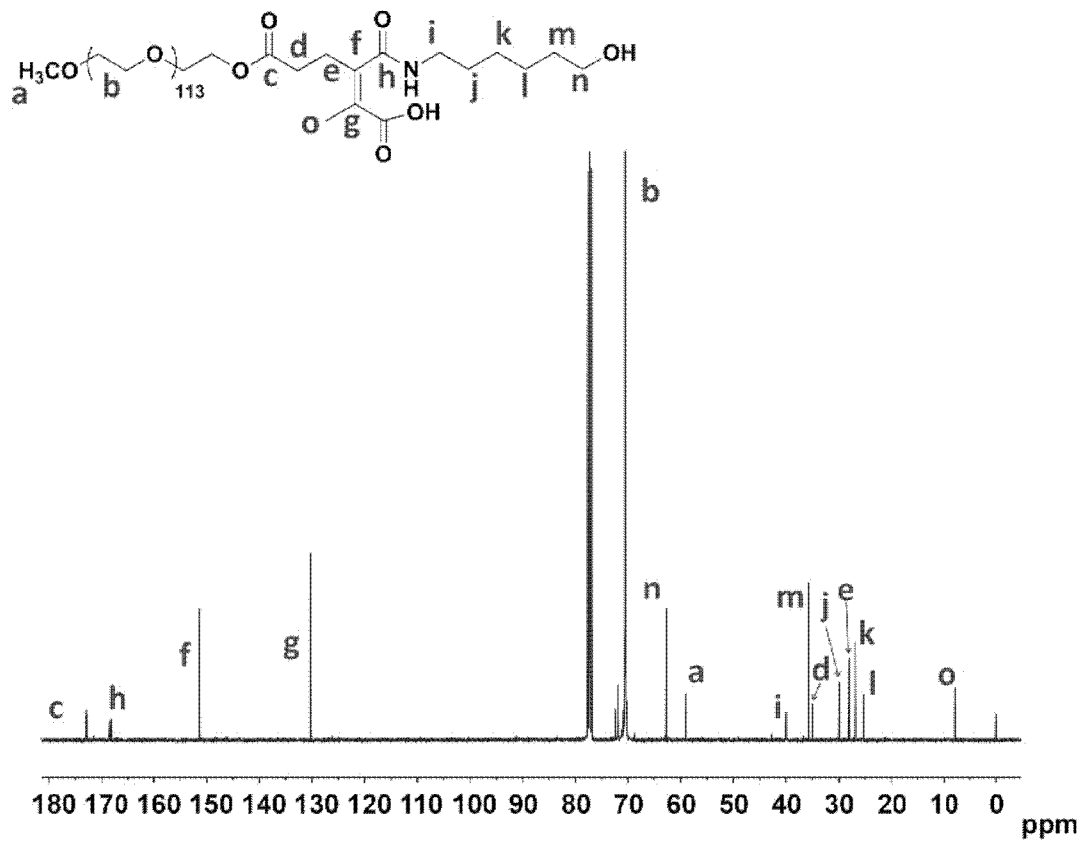


图 11

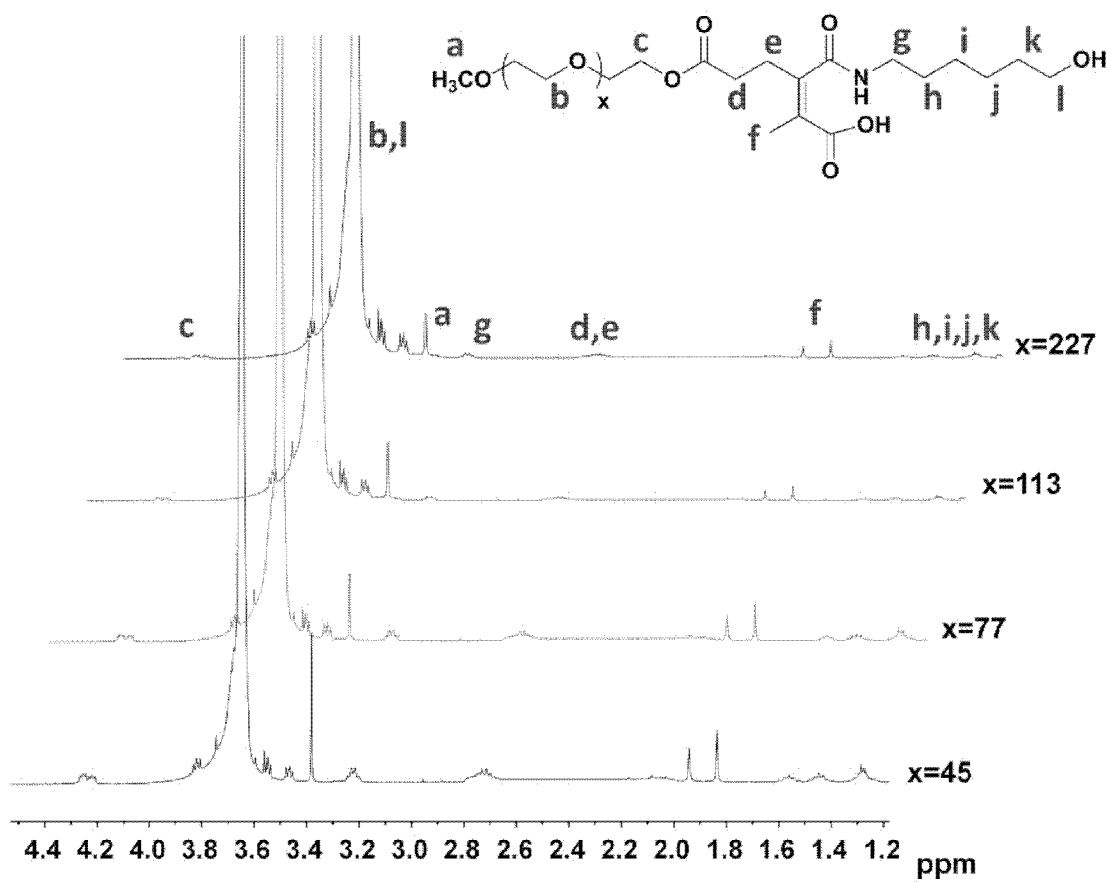


图 12

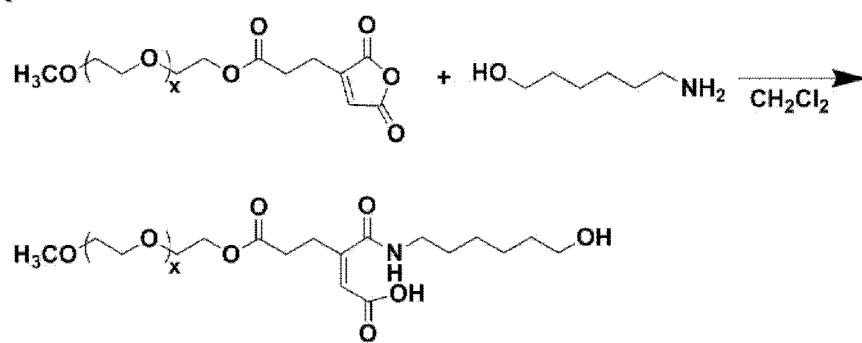
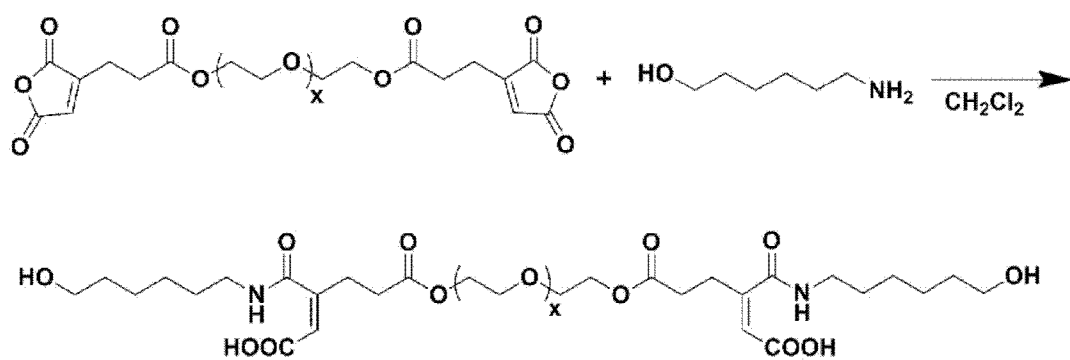
A**B**

图 13

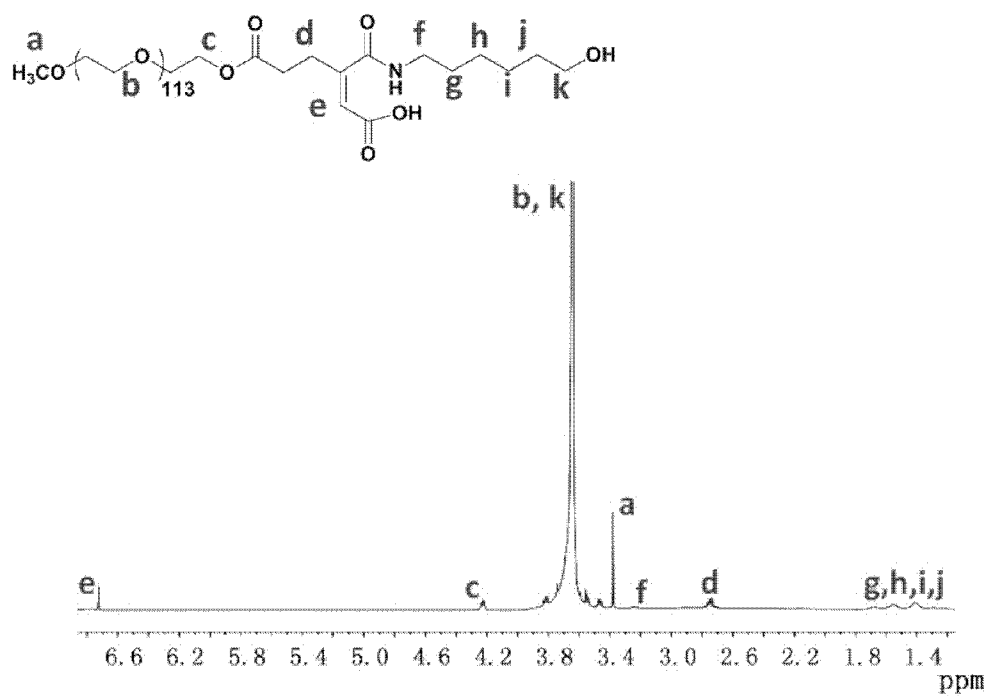
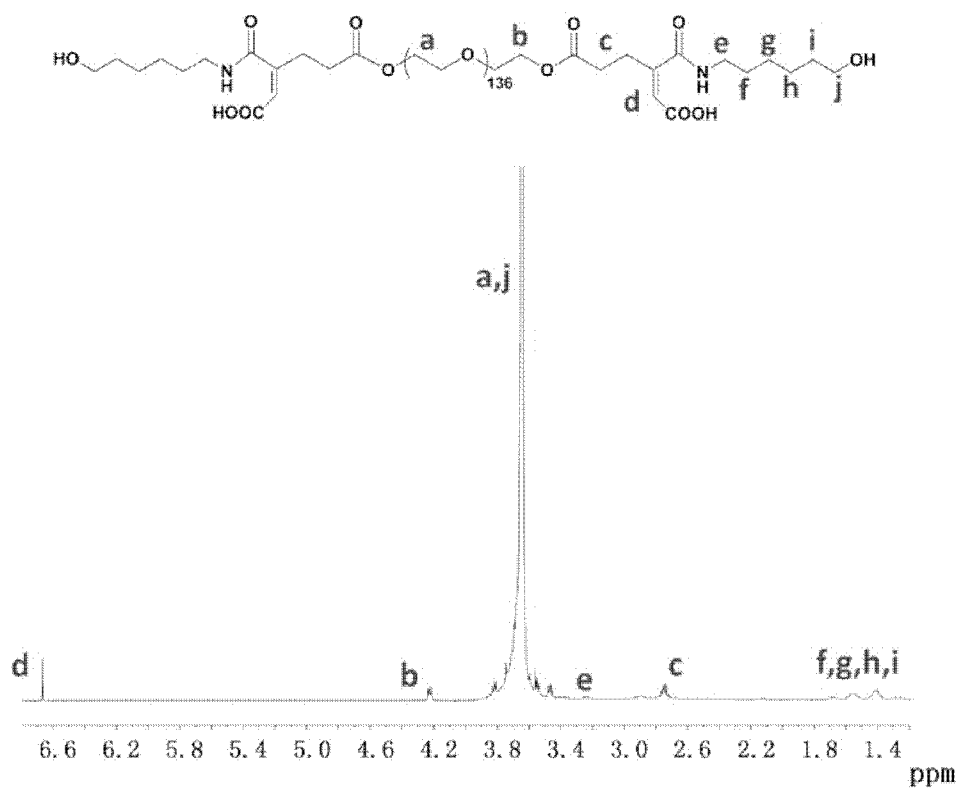
A**B**

图 14

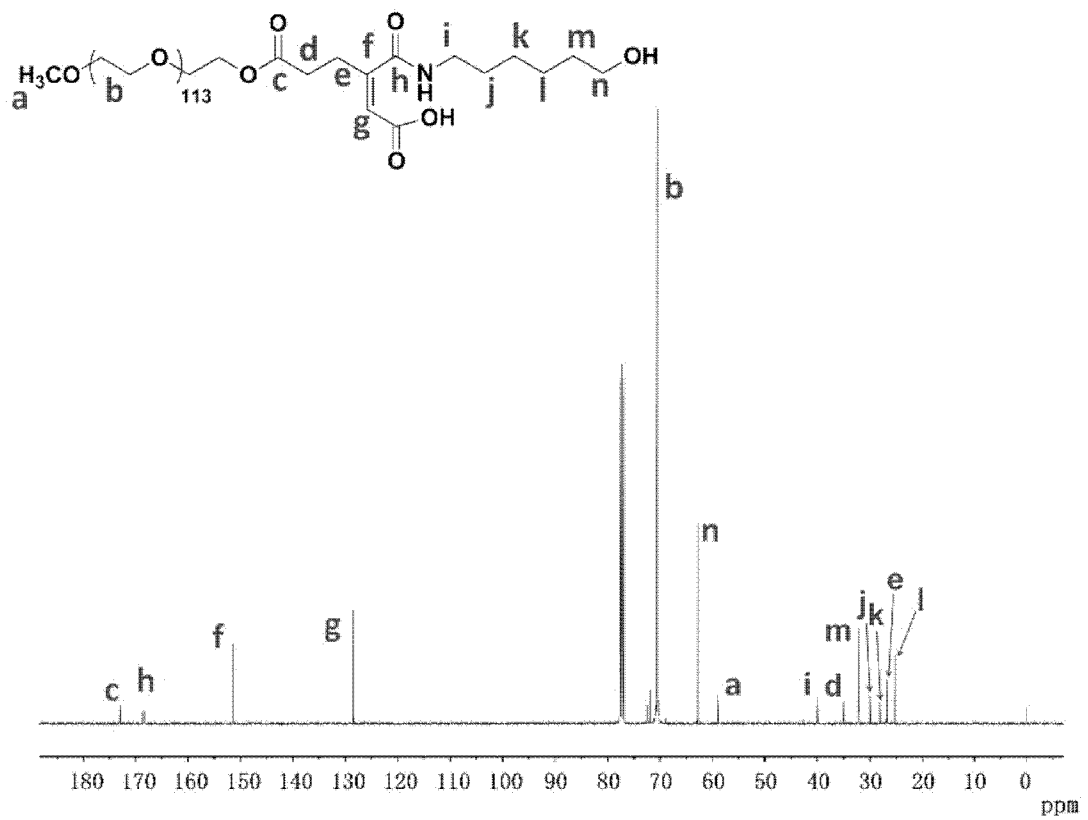


图 15

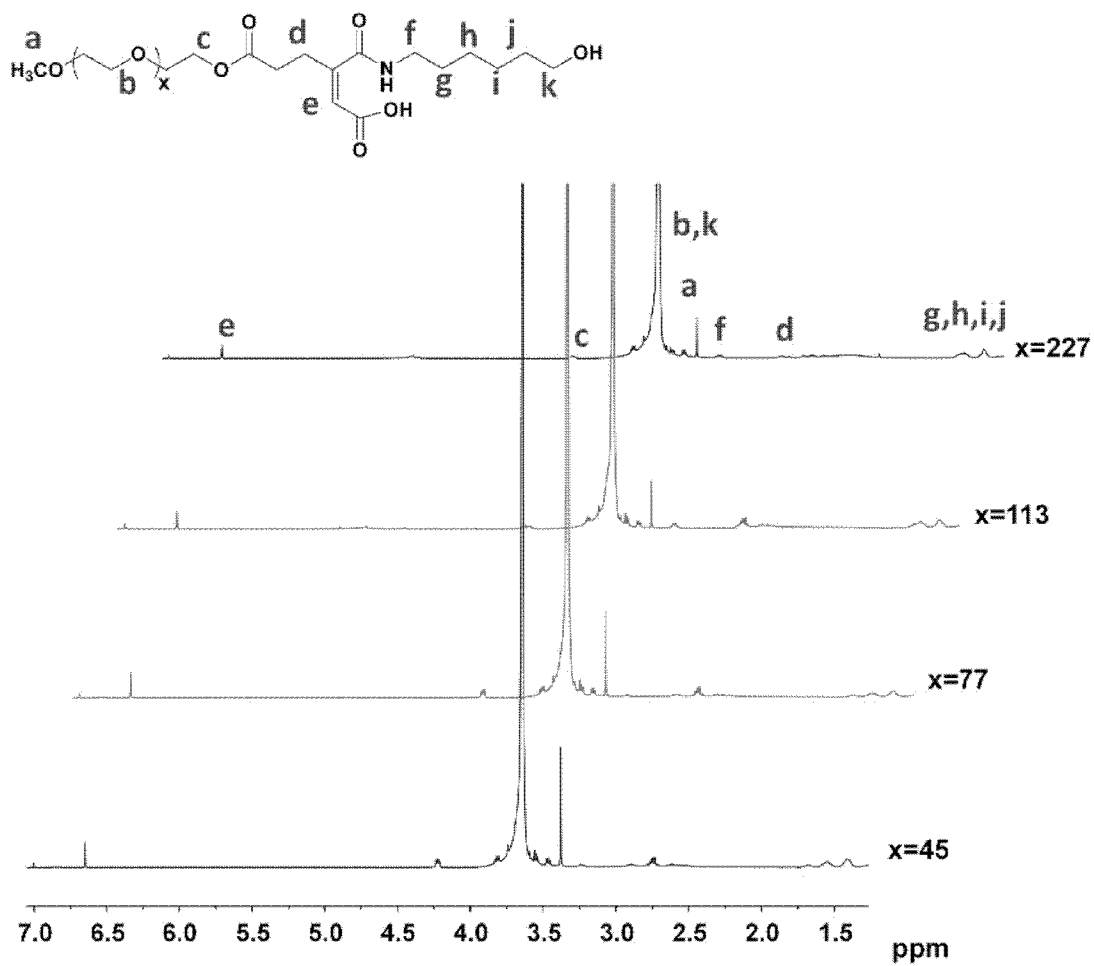


图 16

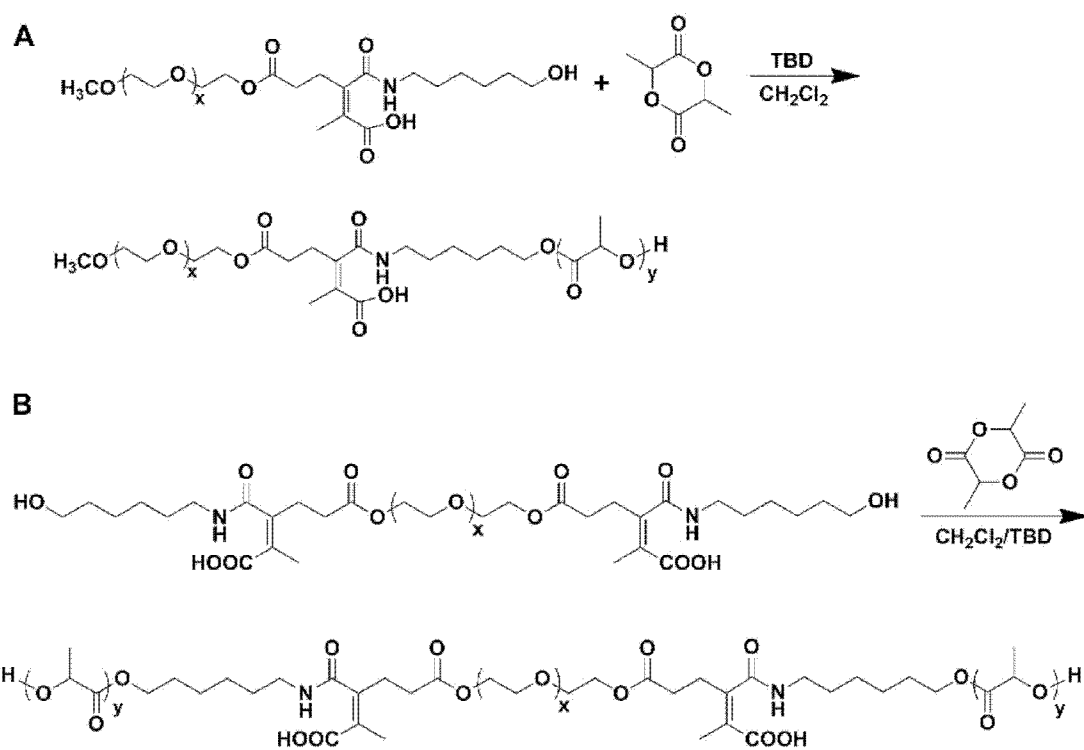
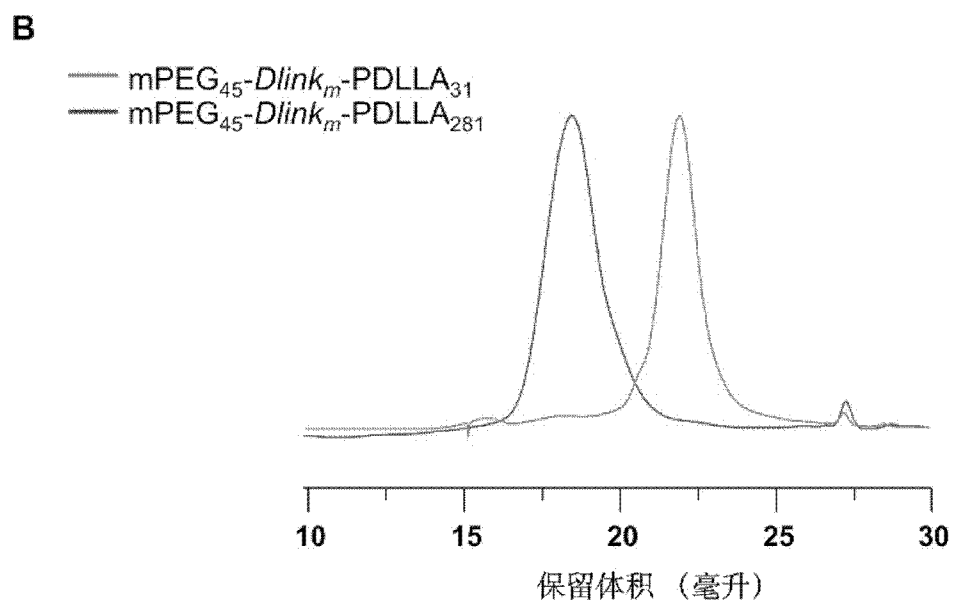
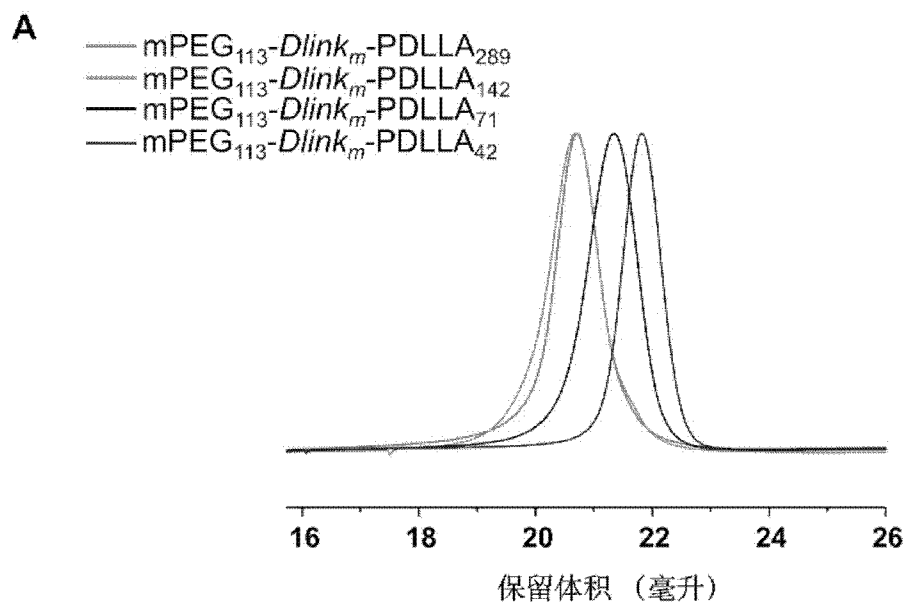
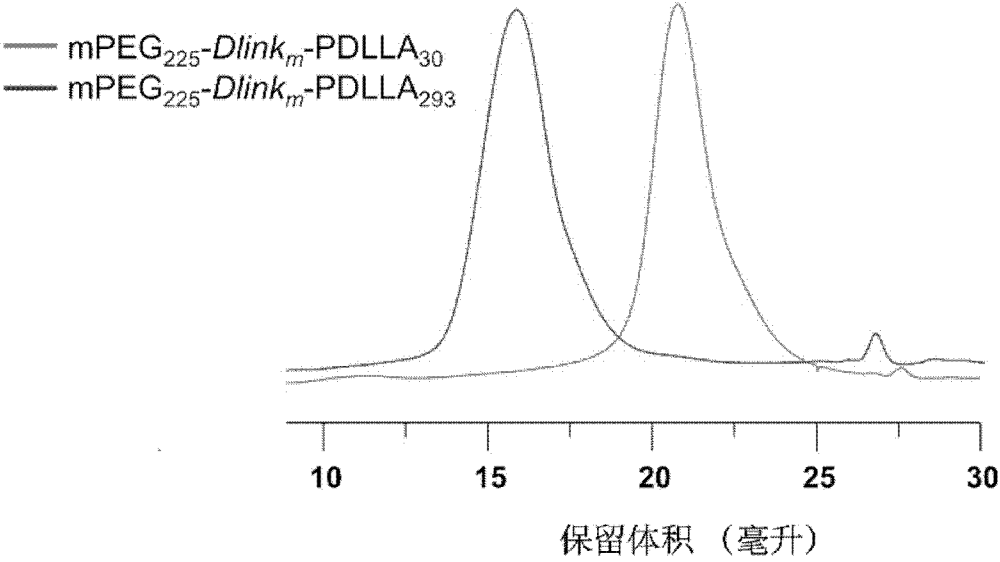


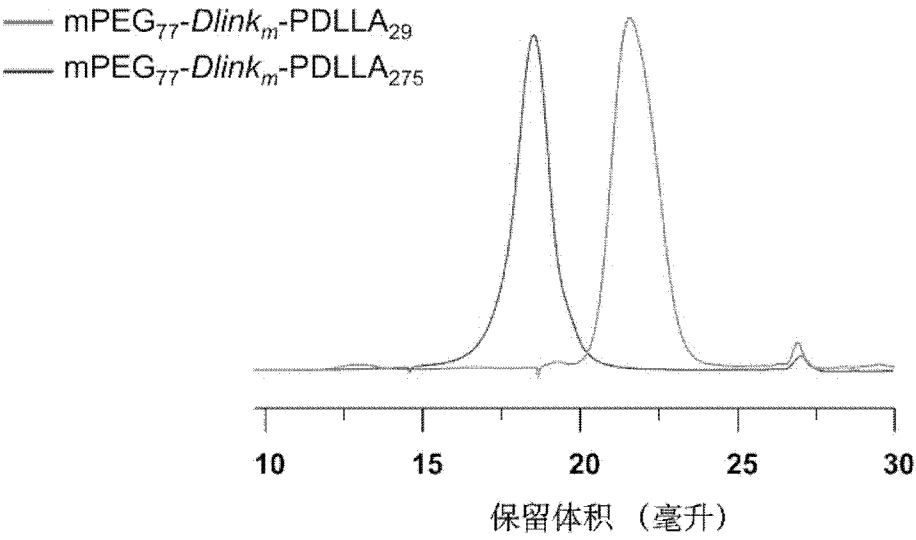
图 17



C



D



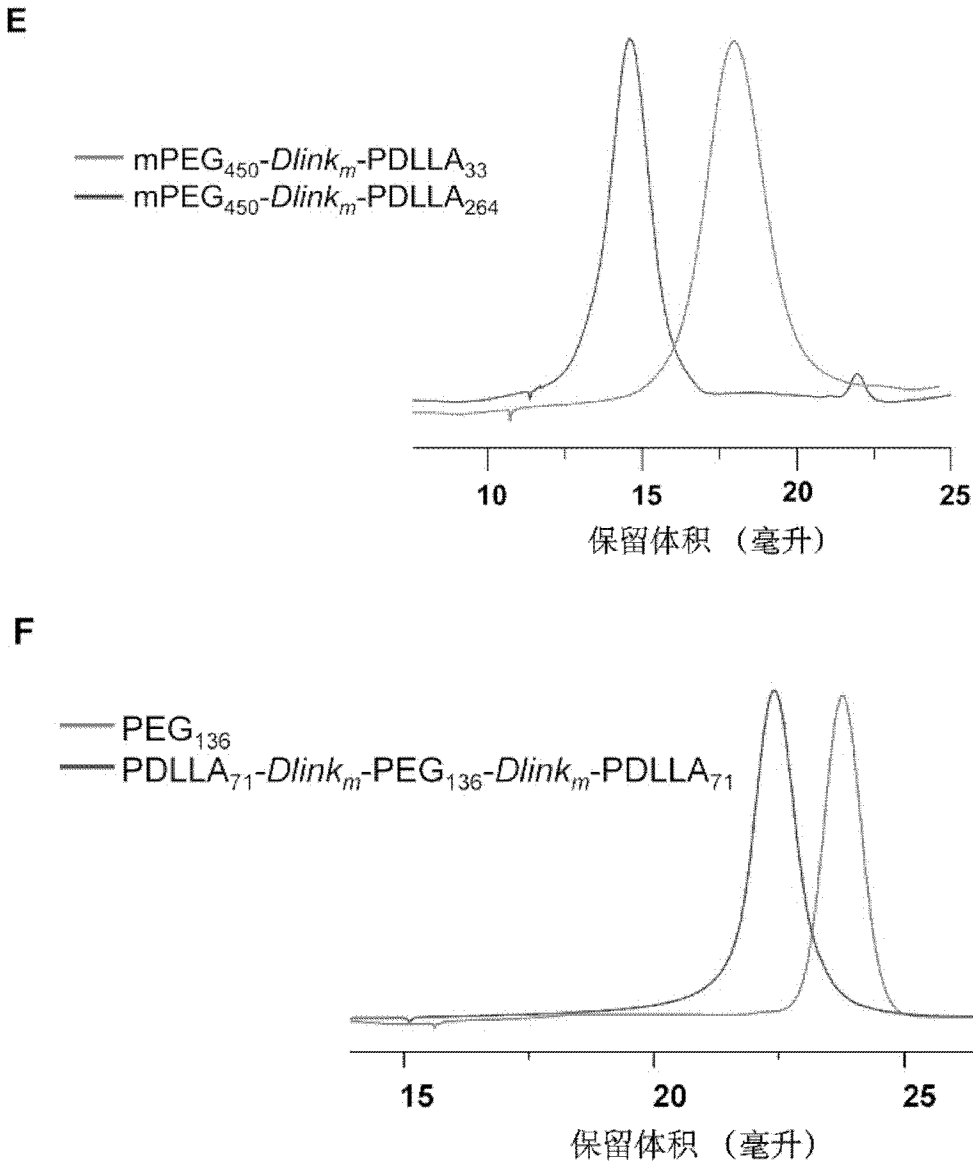
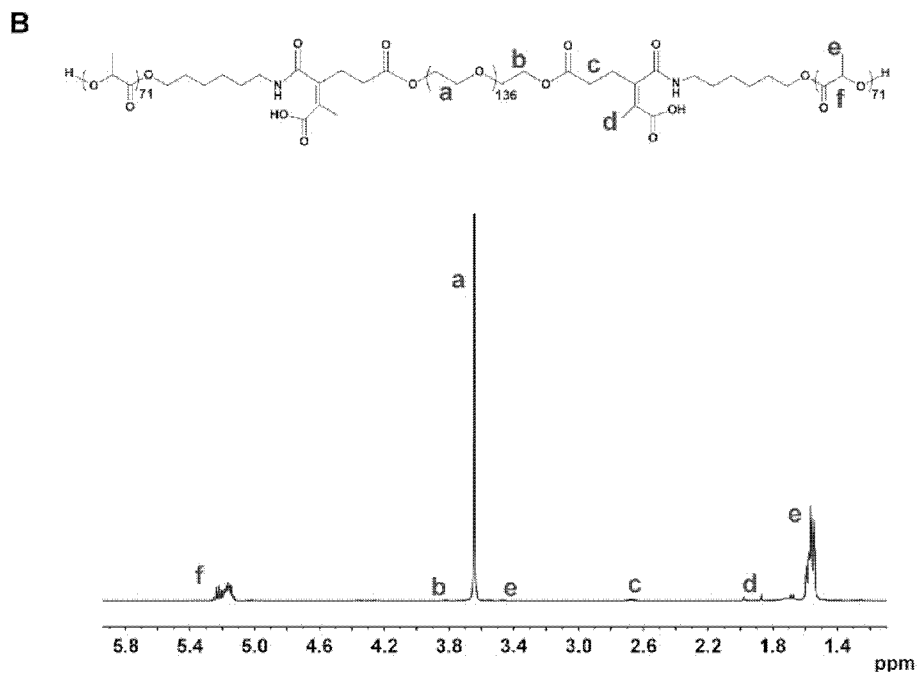
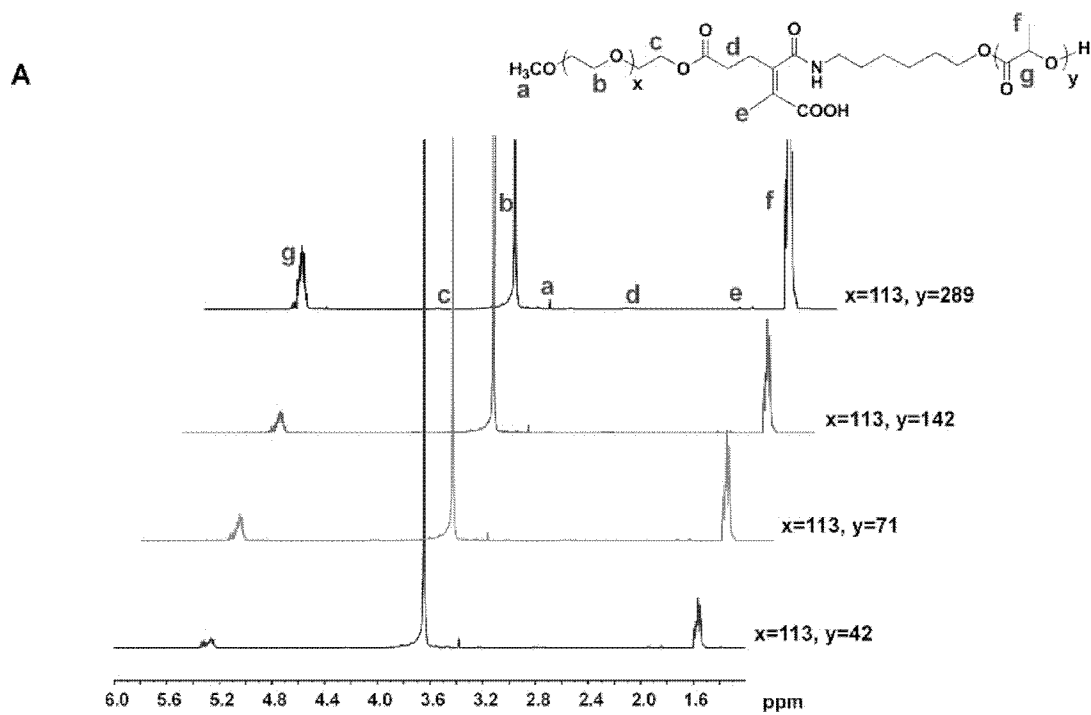
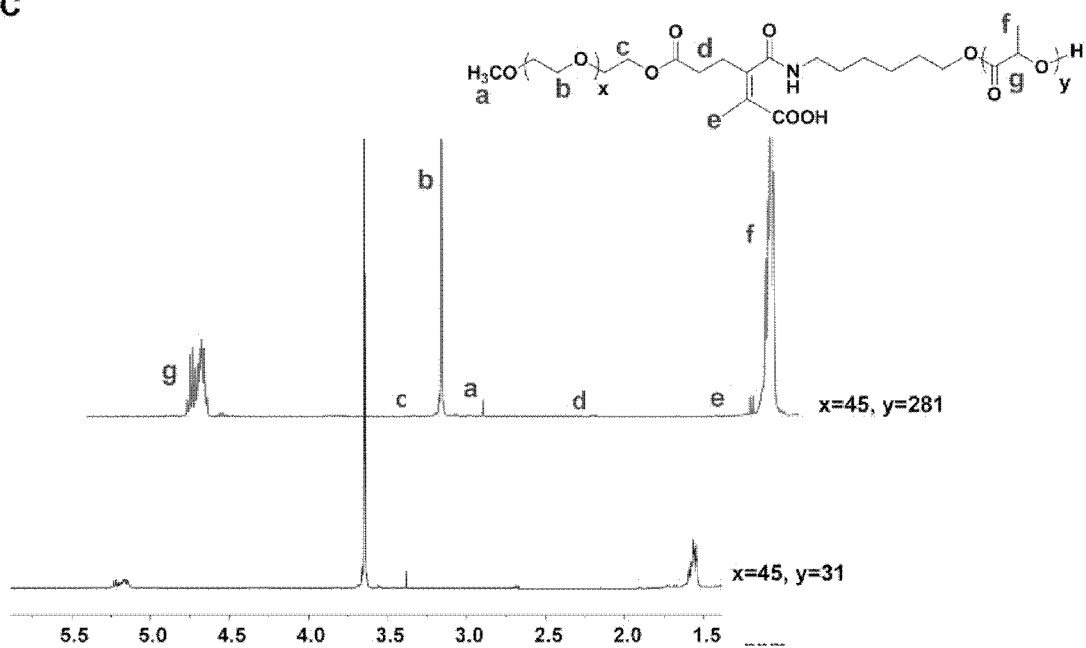


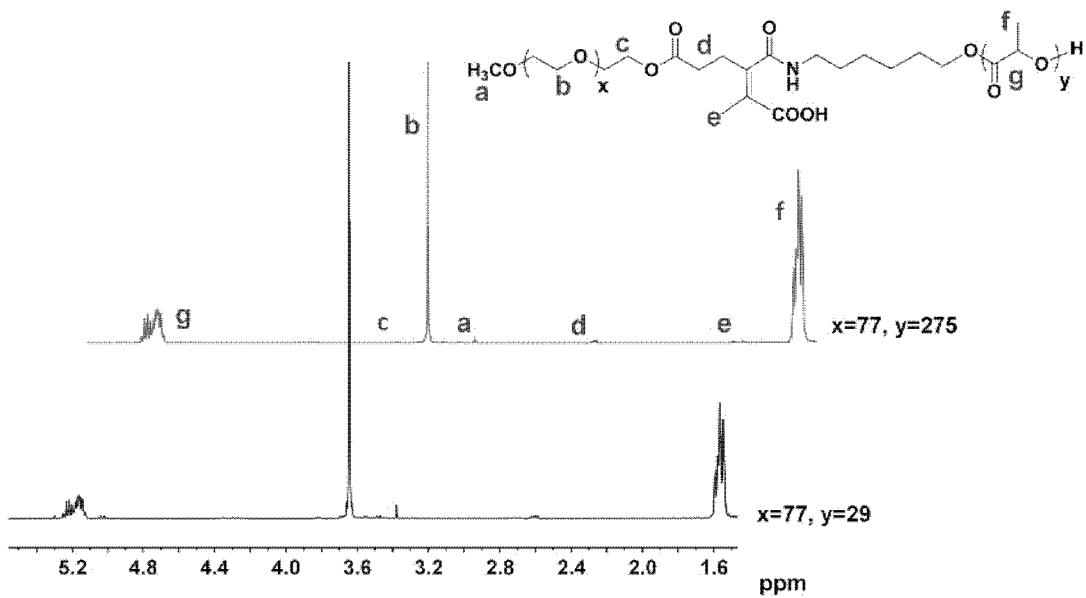
图 18



C



D



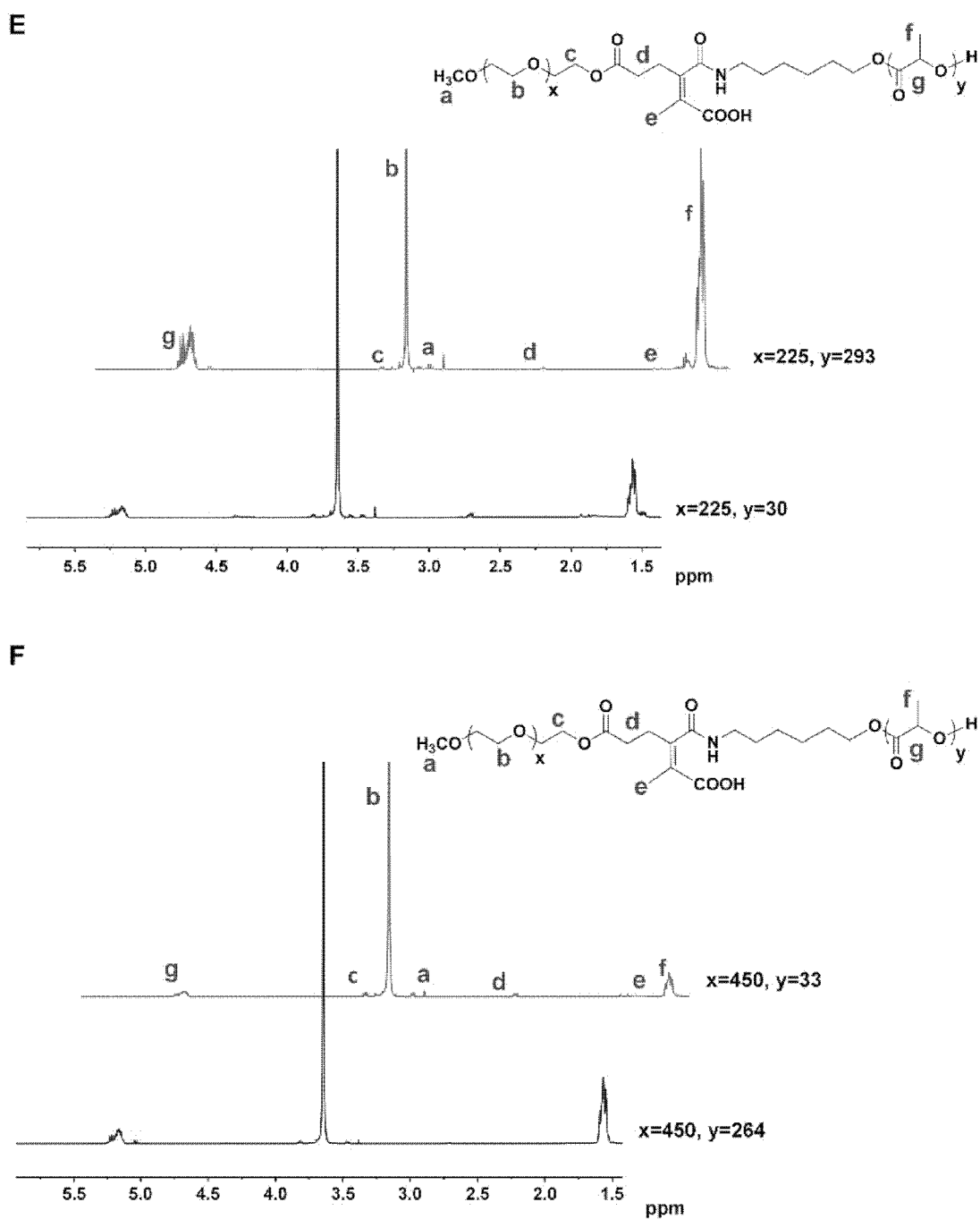


图 19

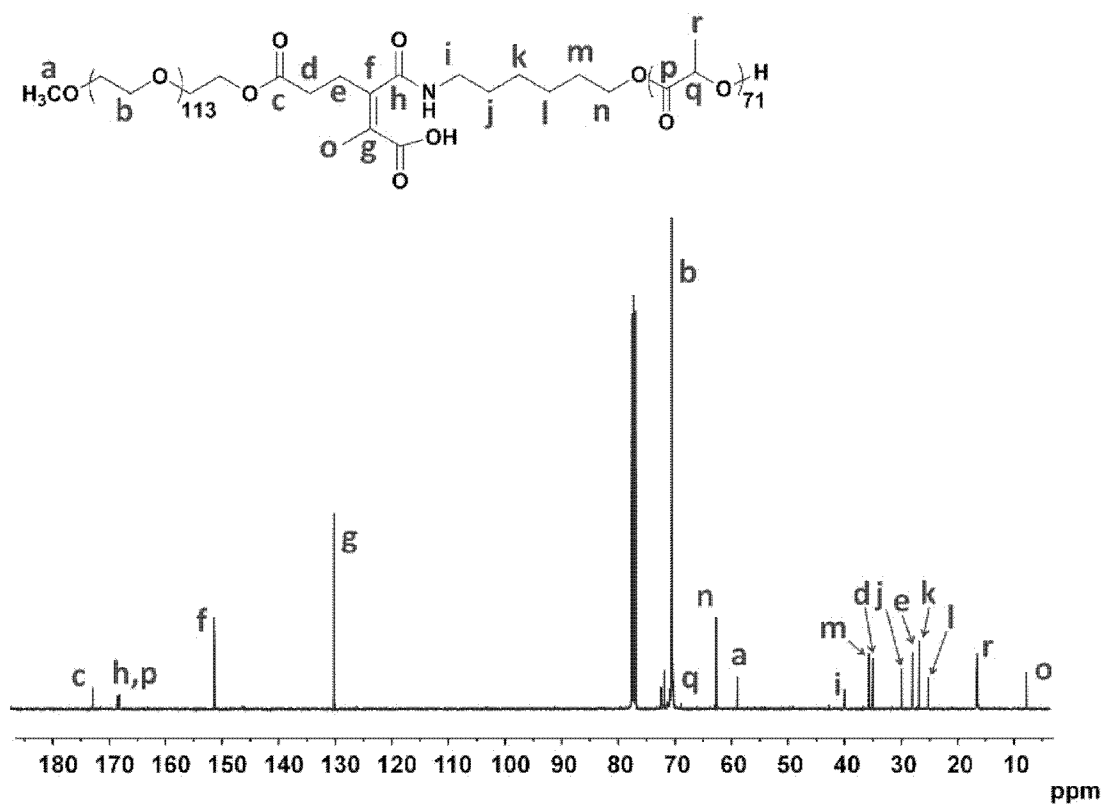


图 20

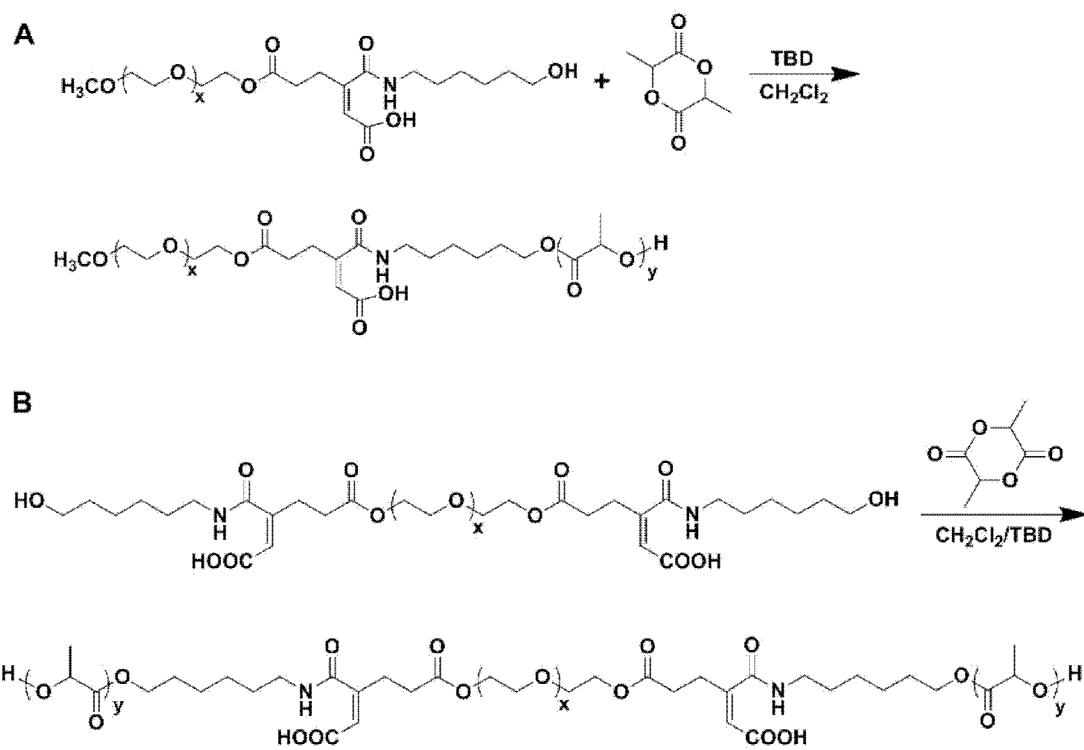
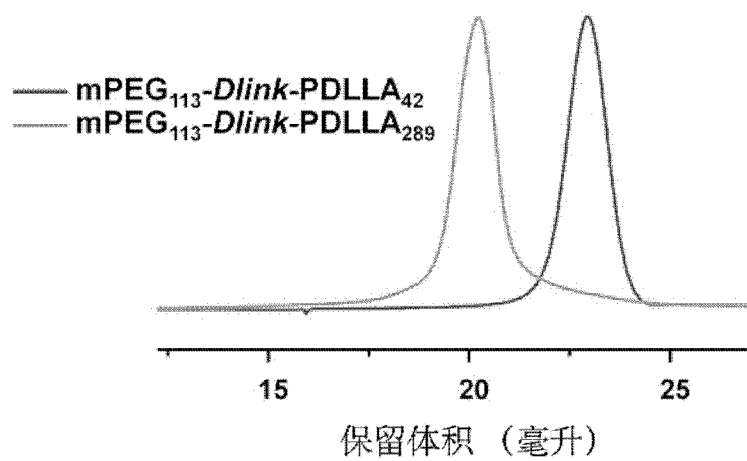


图 21

A



B

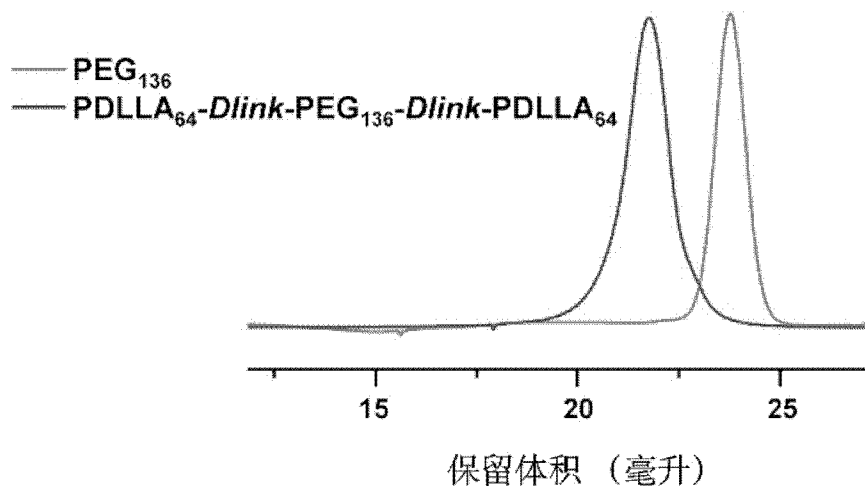


图 22

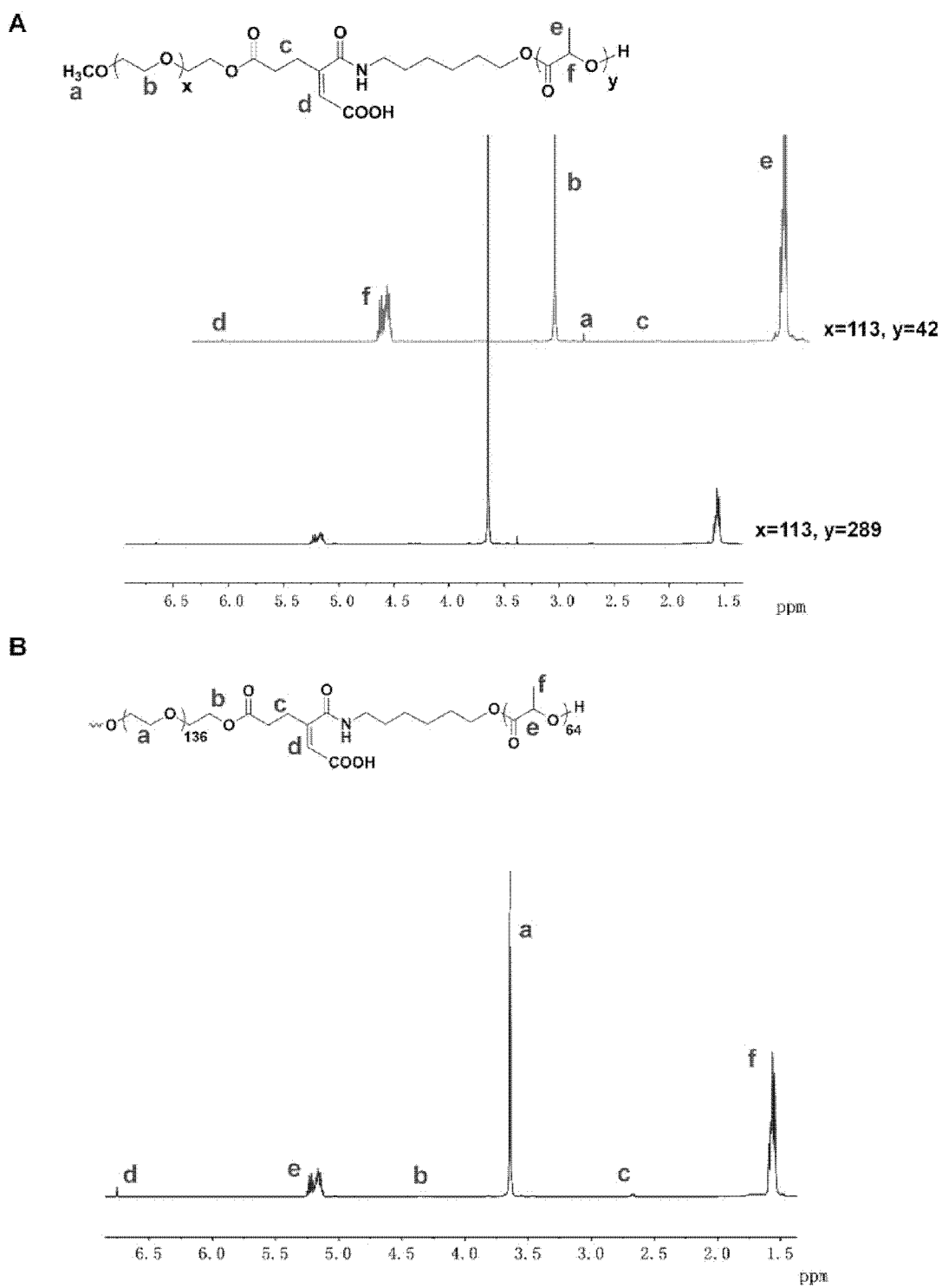


图 23

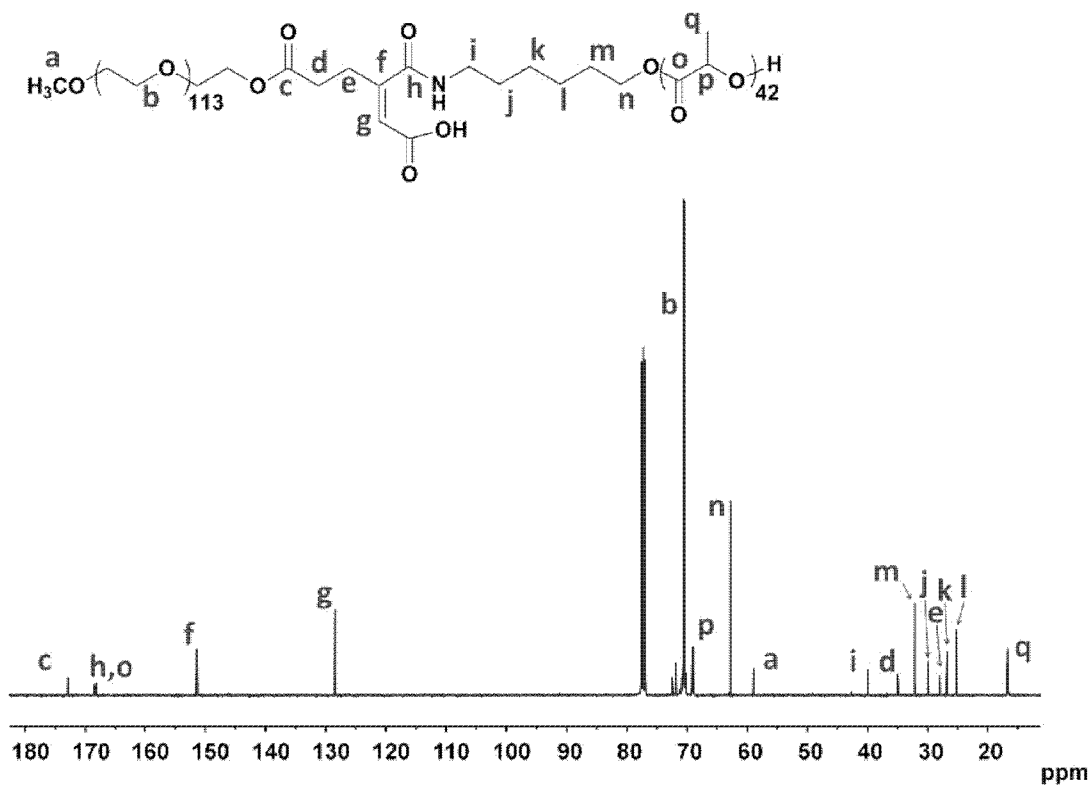


图 24

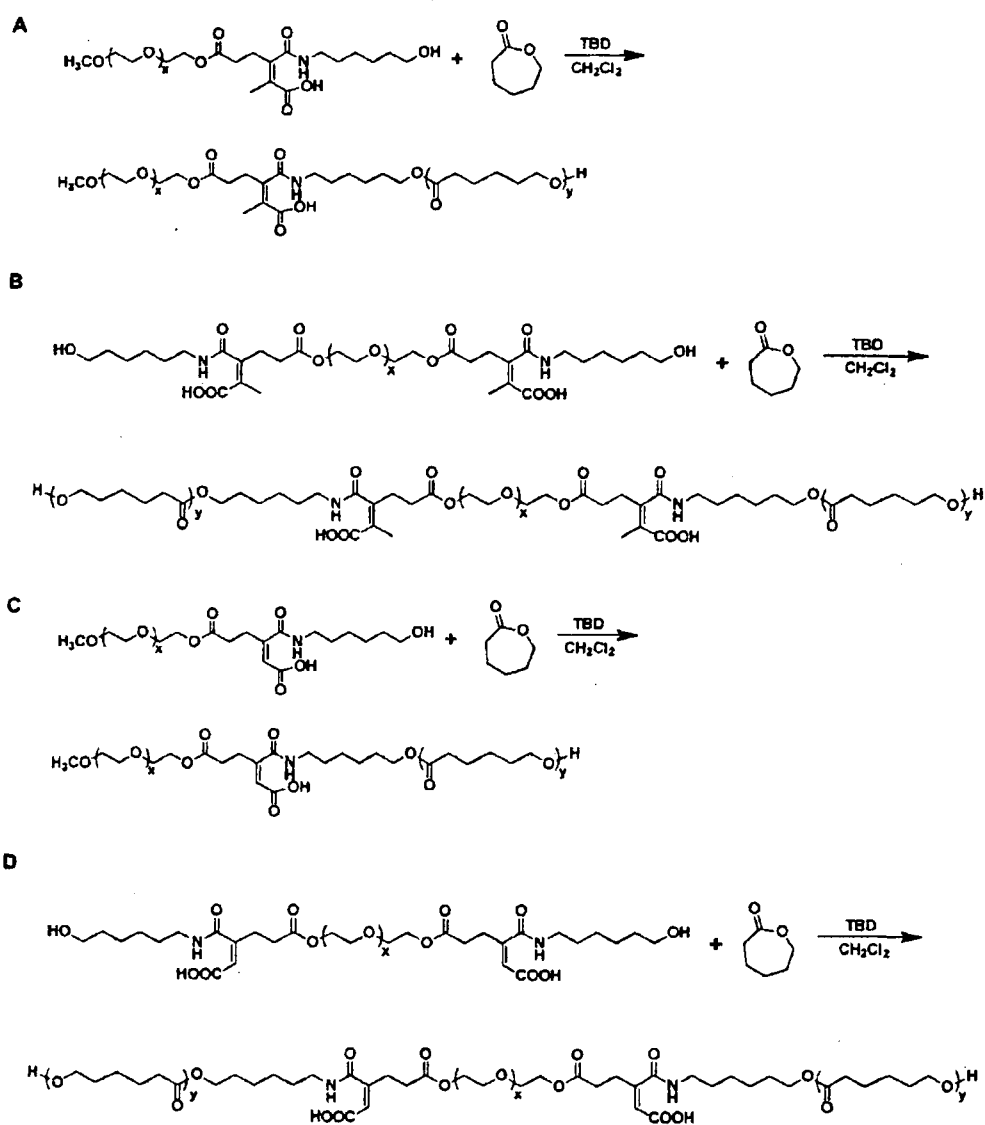


图 25

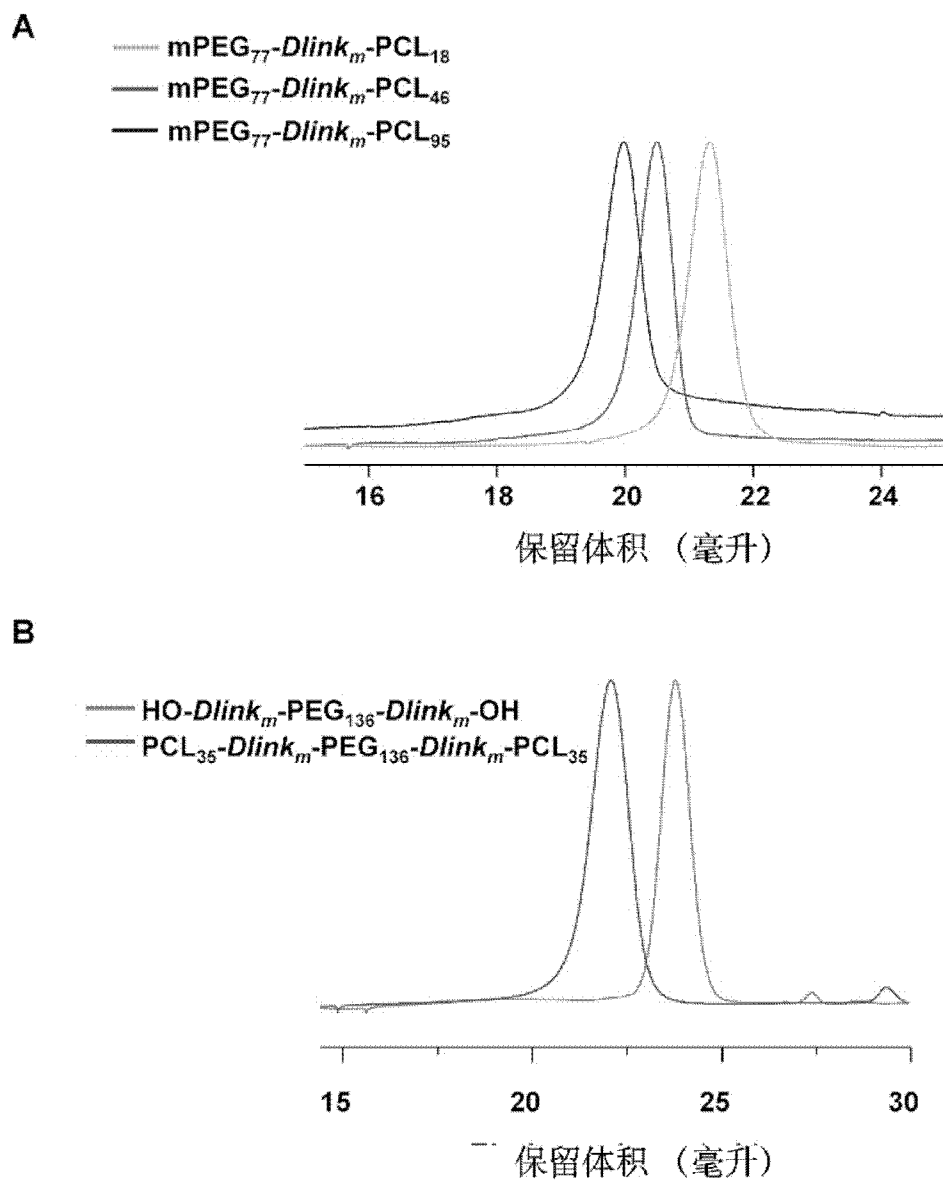


图 26

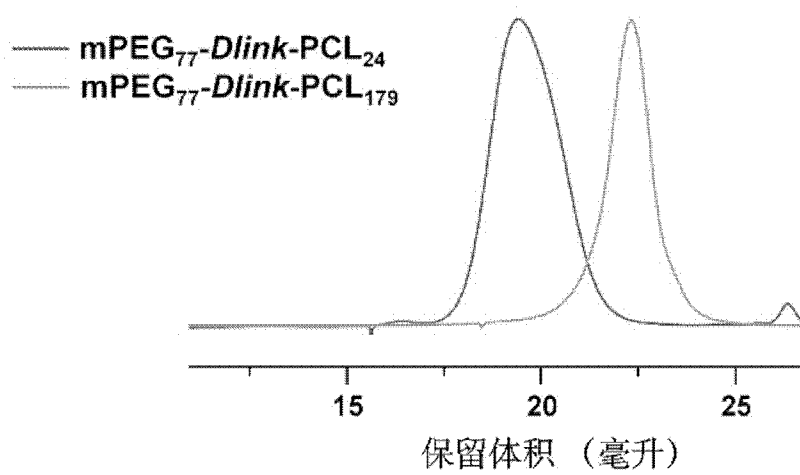
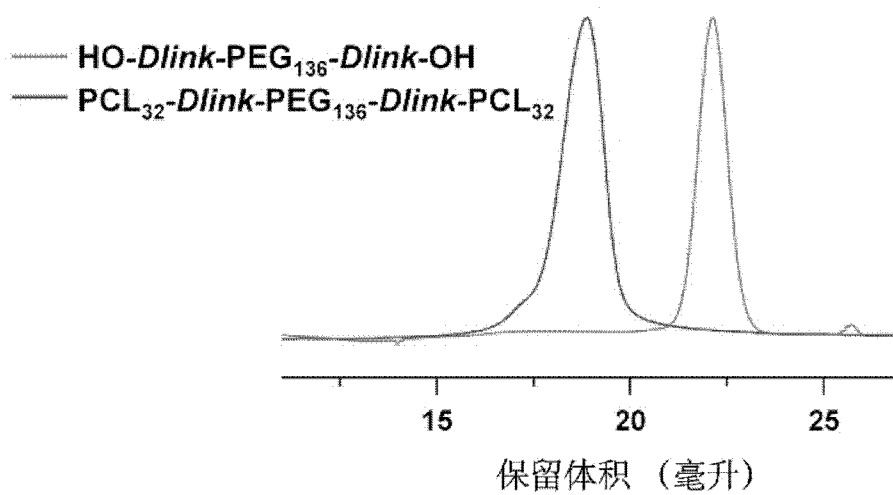
A**B**

图 27

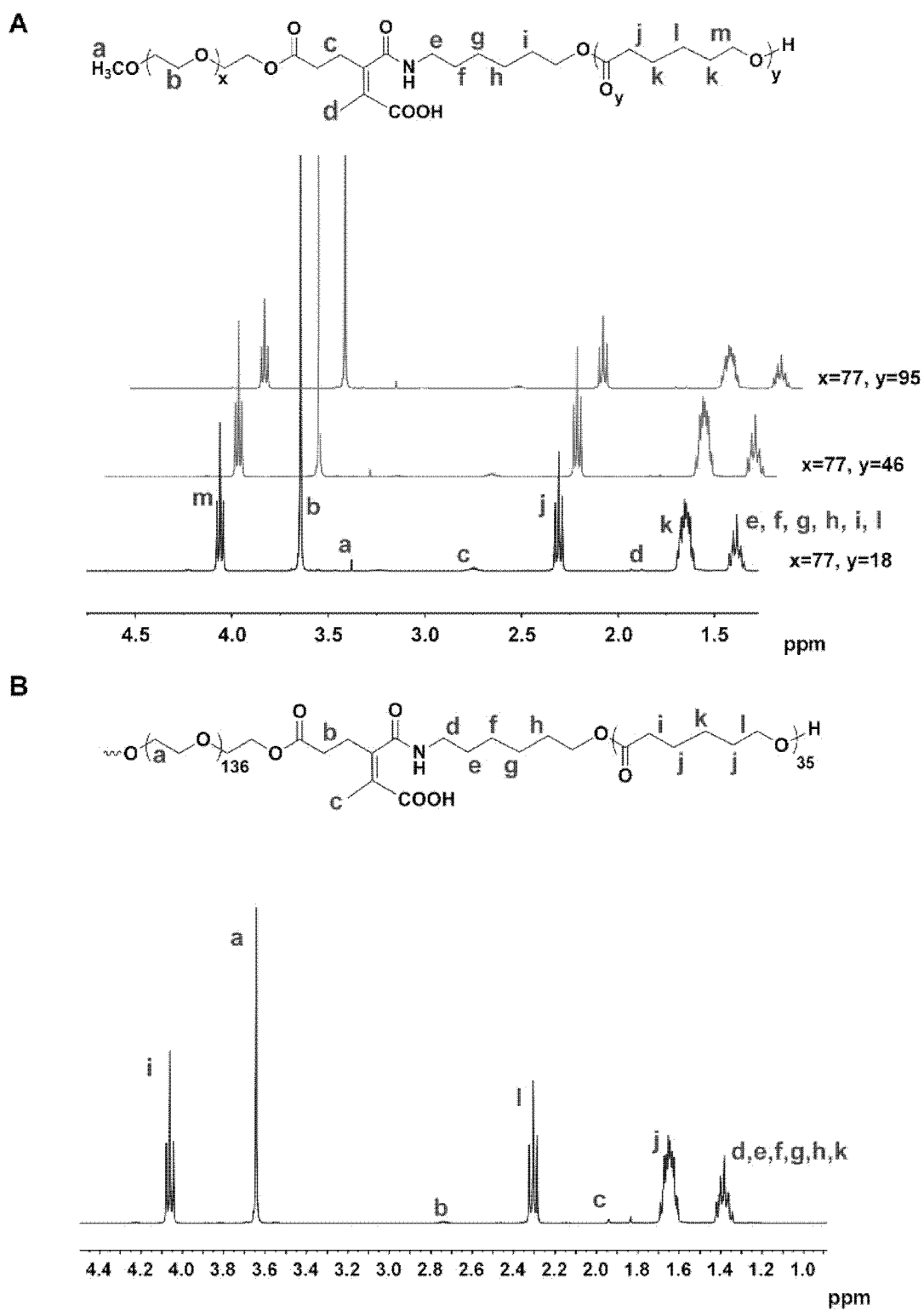


图 28

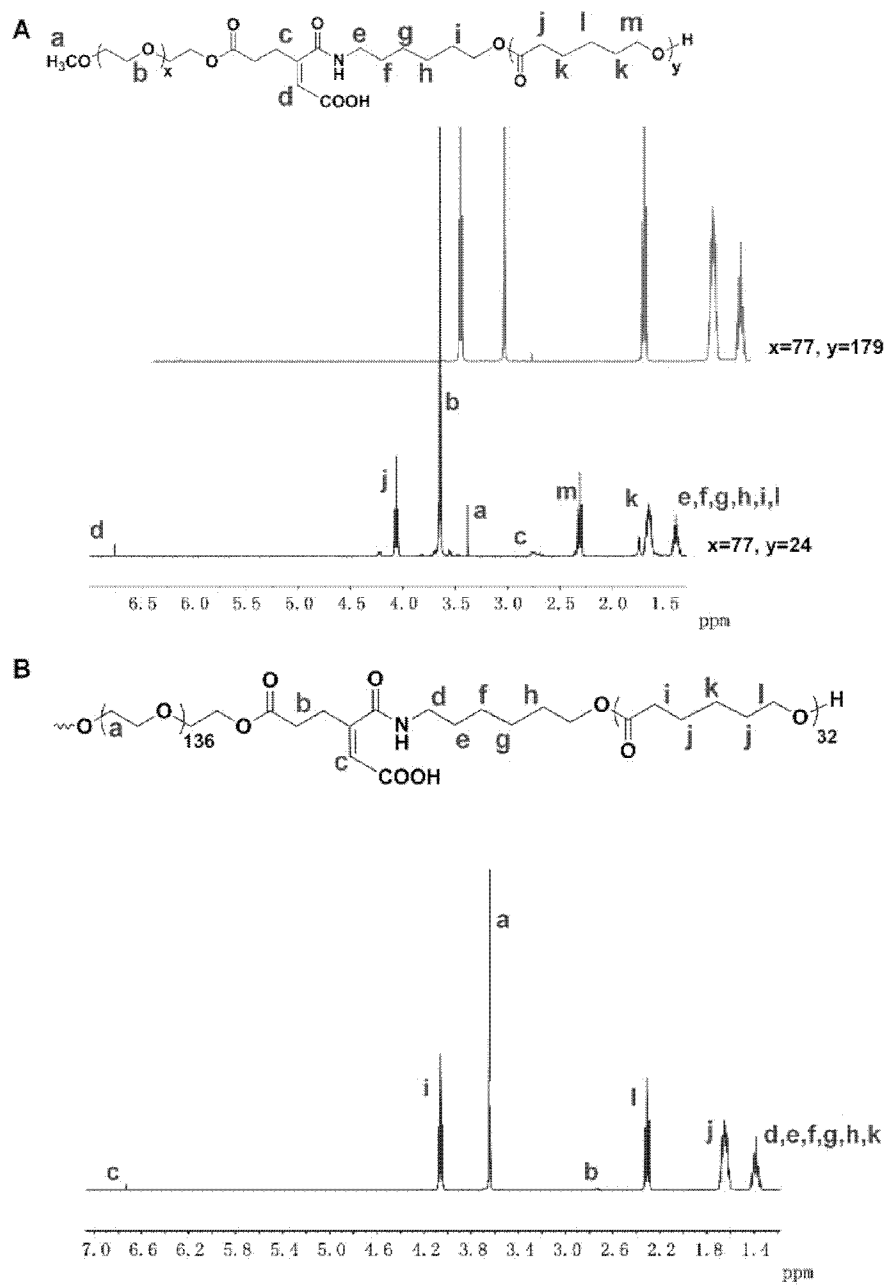


图 29

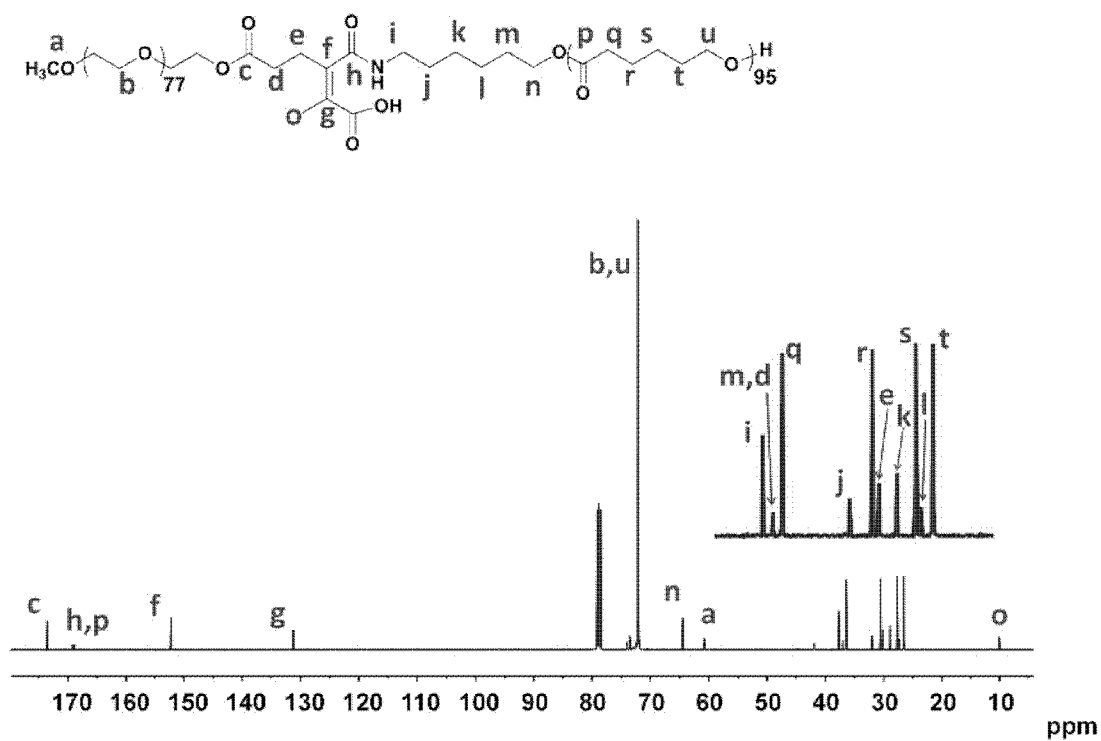


图 30

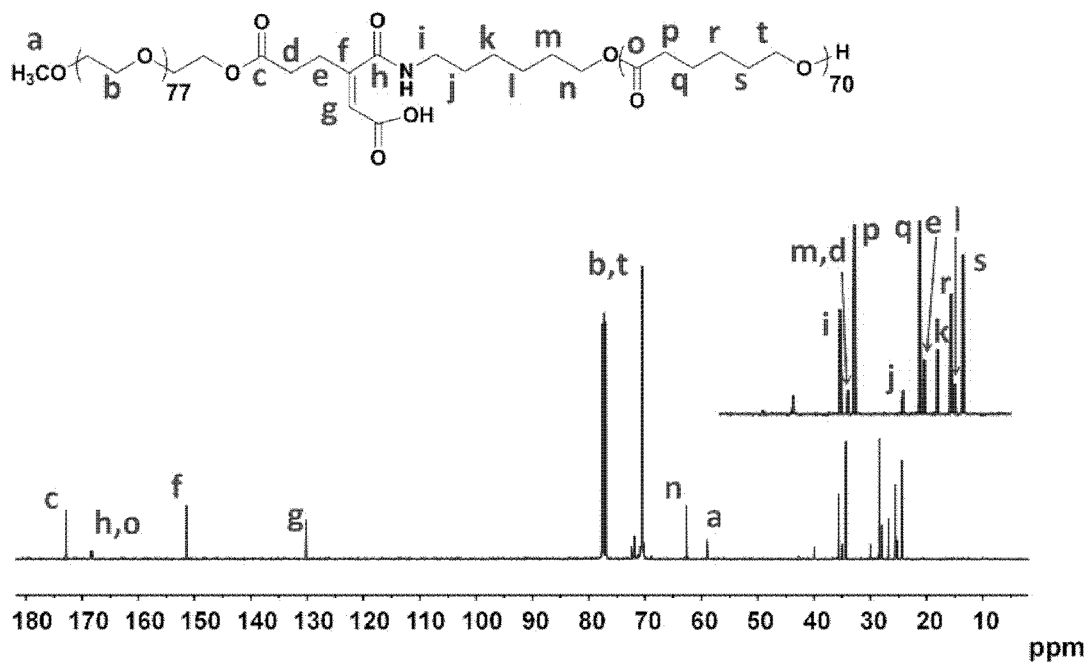


图 31

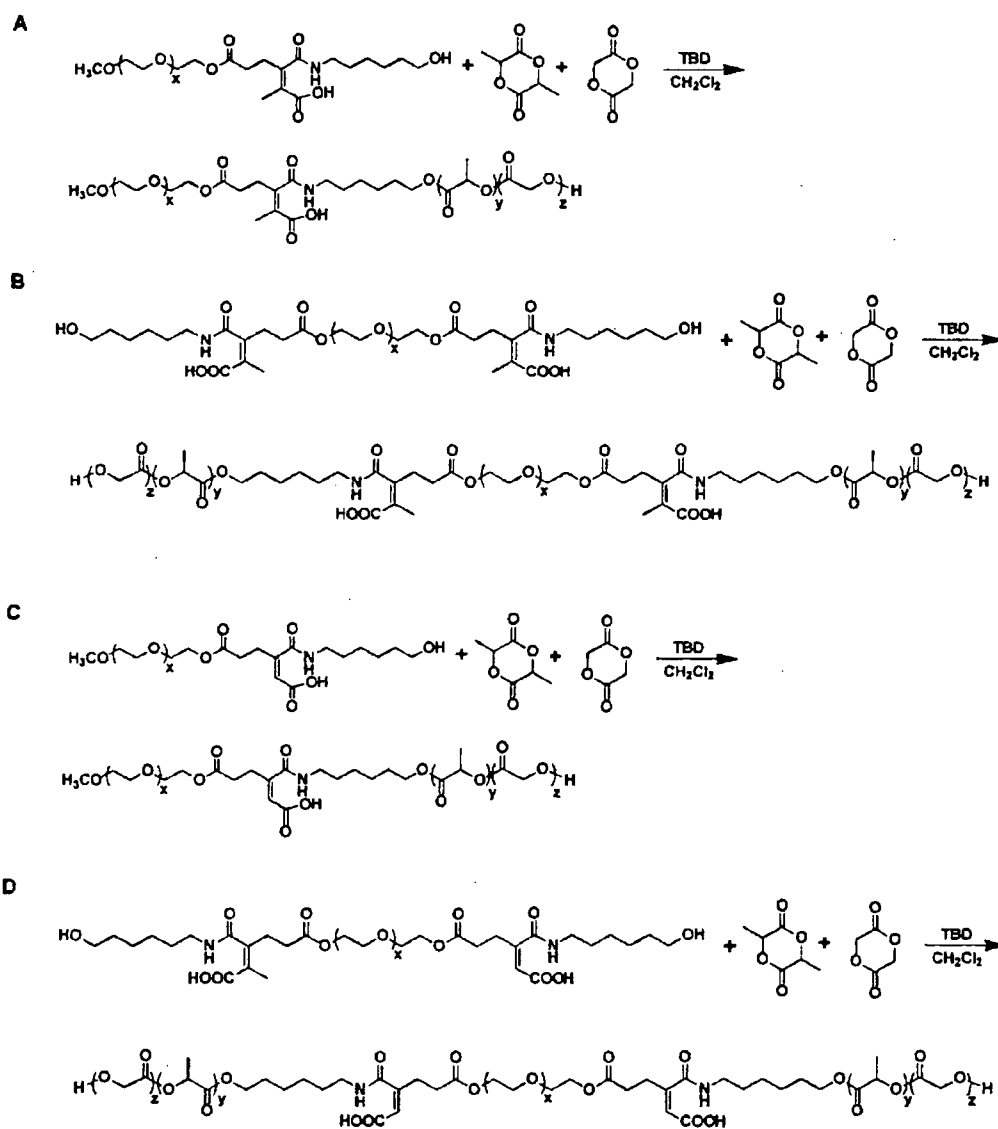


图 32

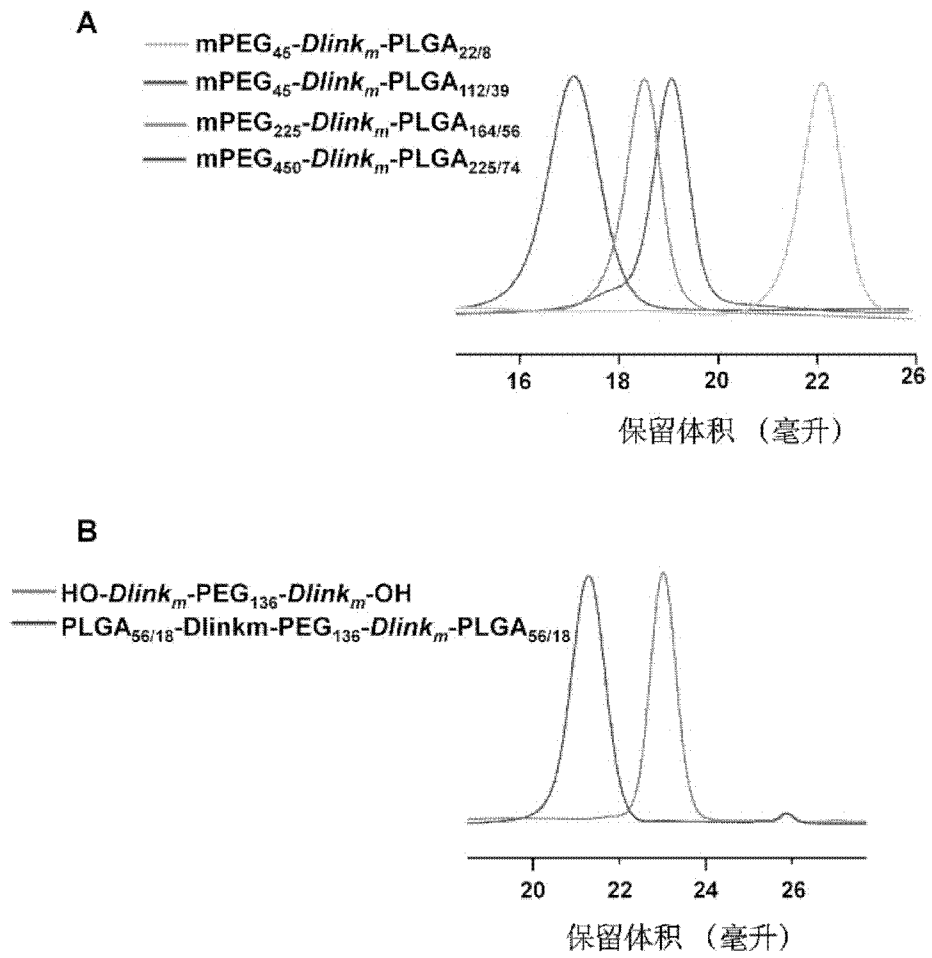


图 33

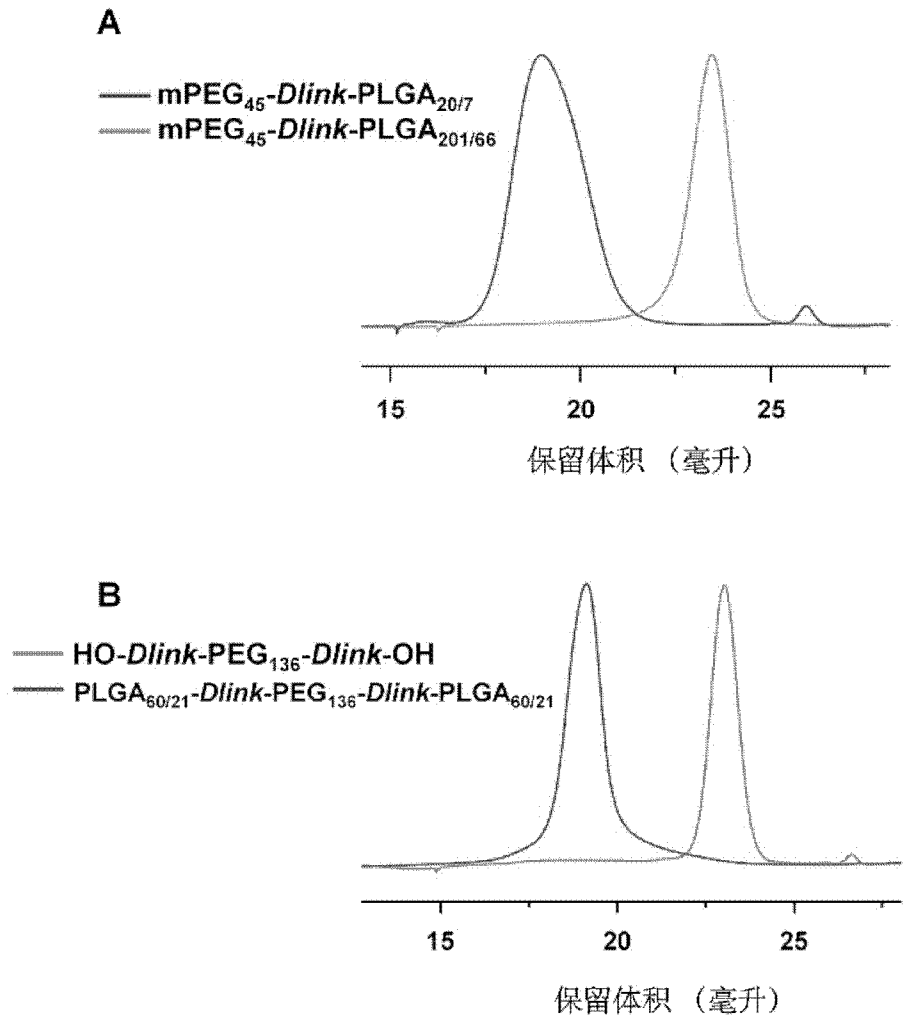


图 34

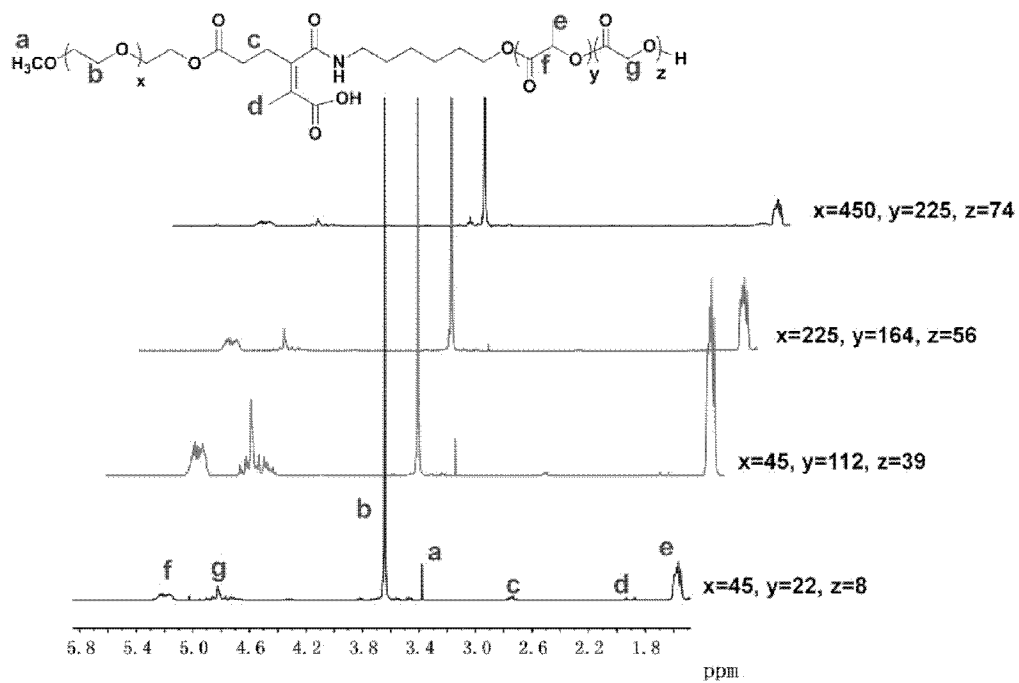
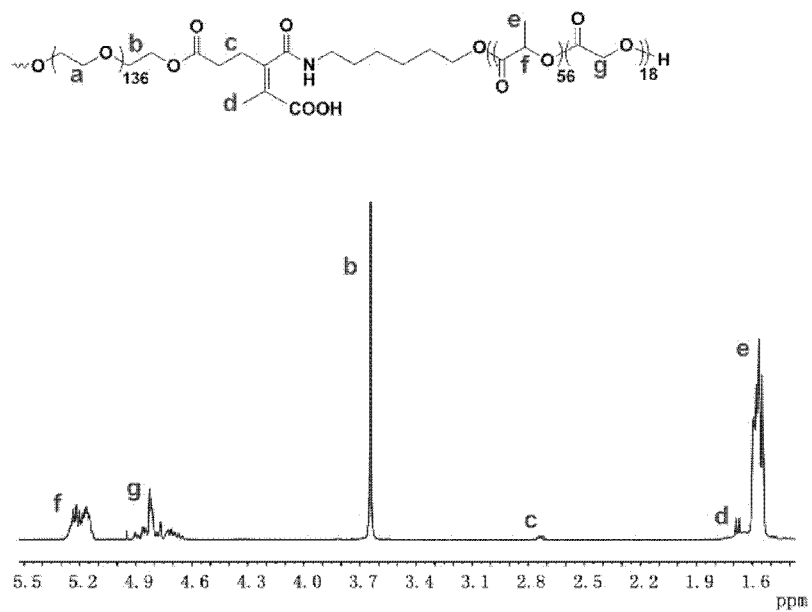
A**B**

图 35

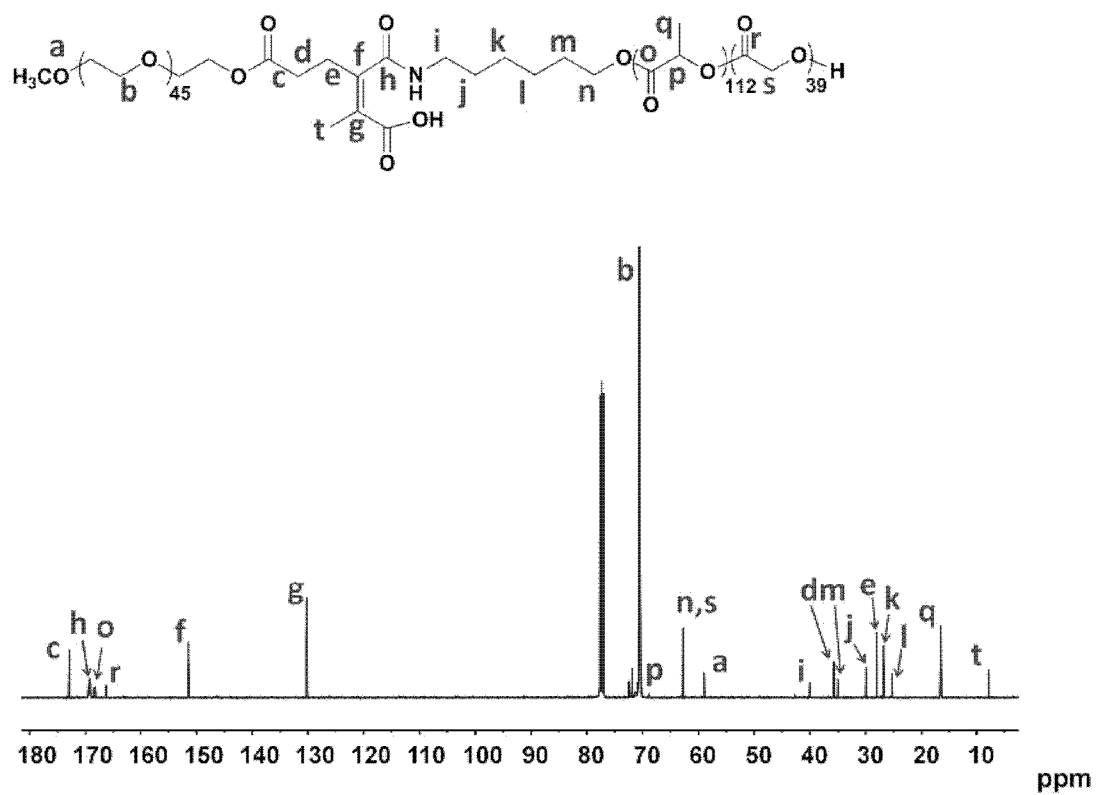


图 37

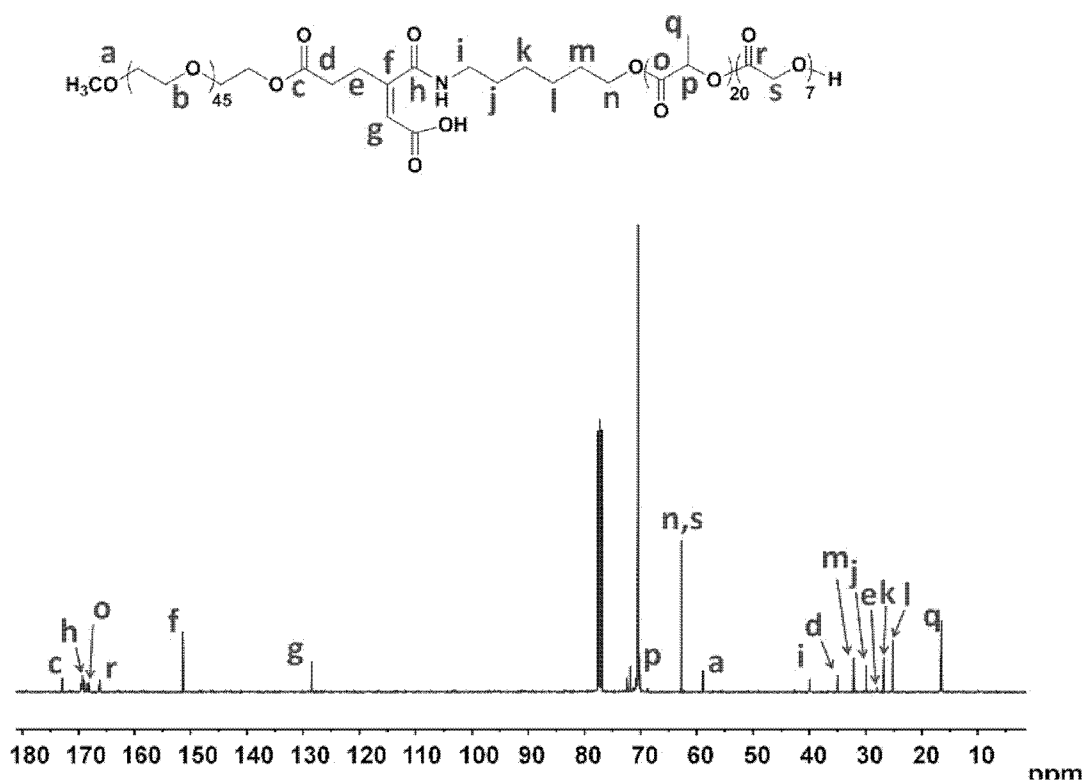


图 38

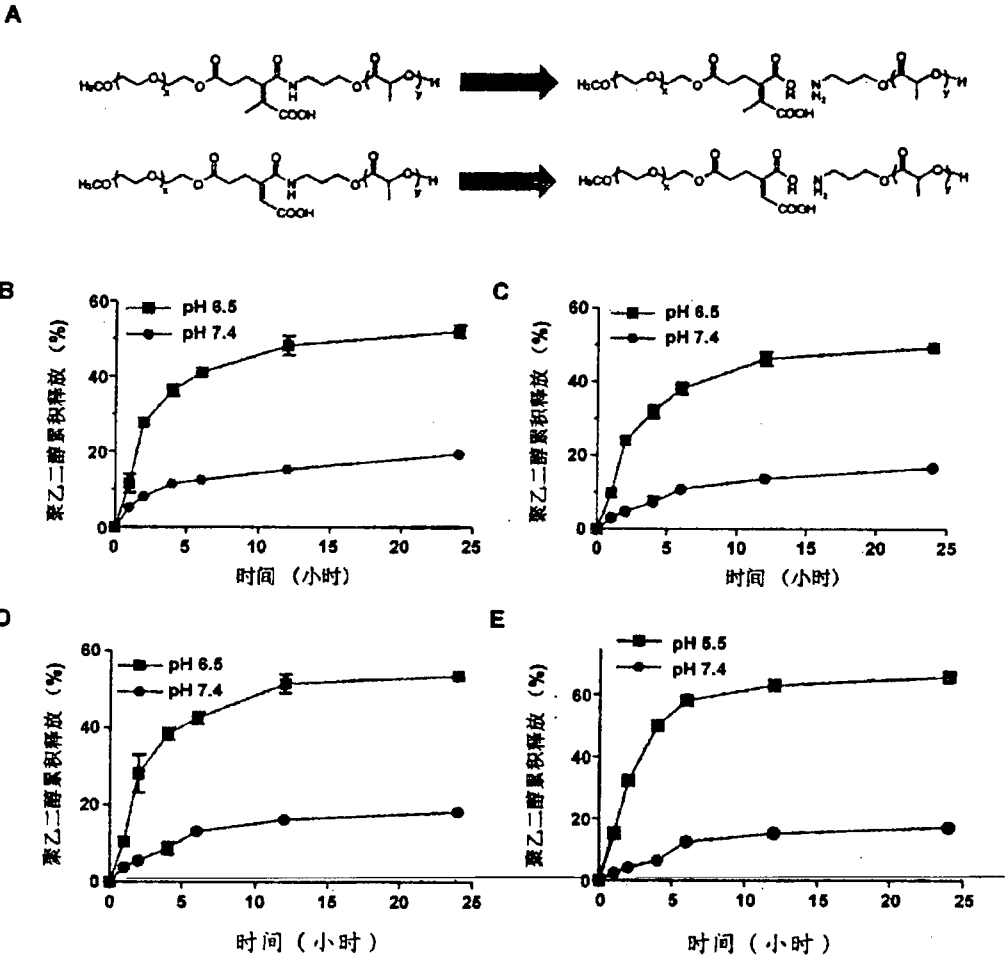


图 39

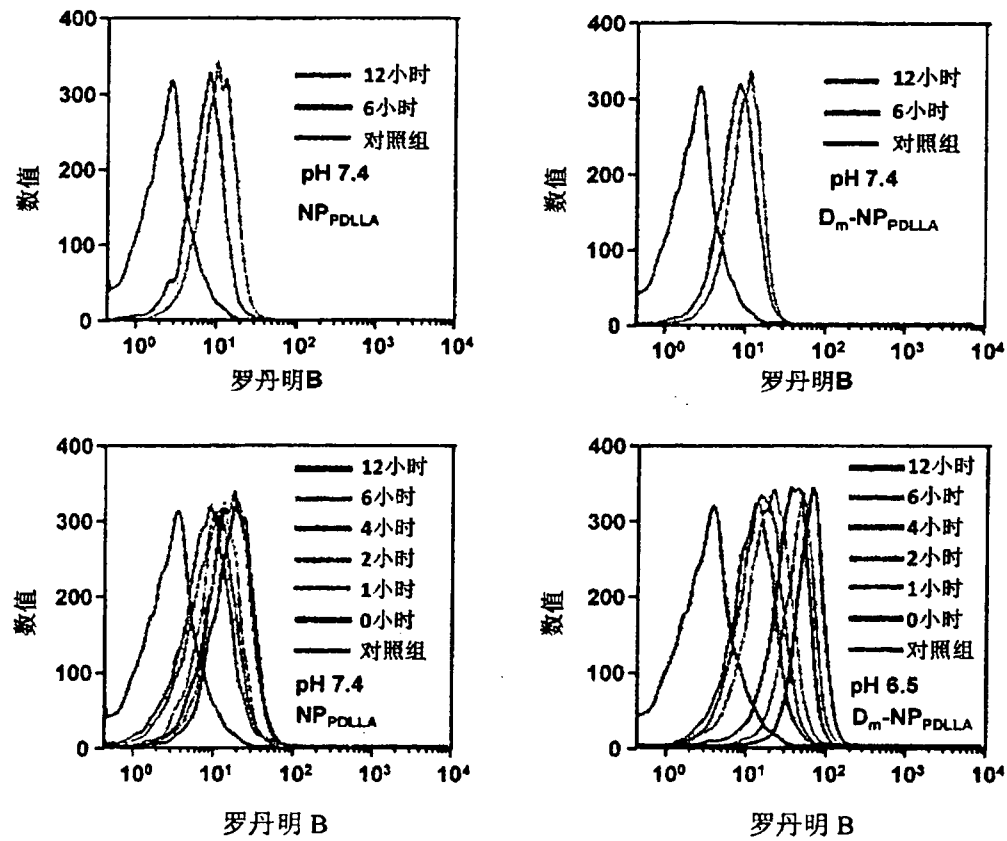


图 40

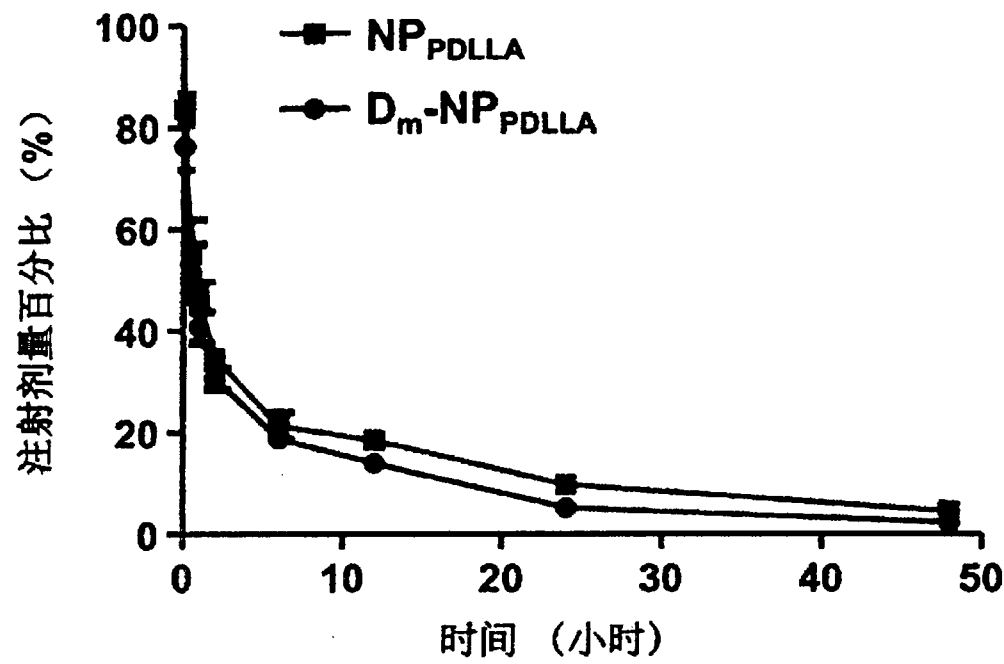


图 41

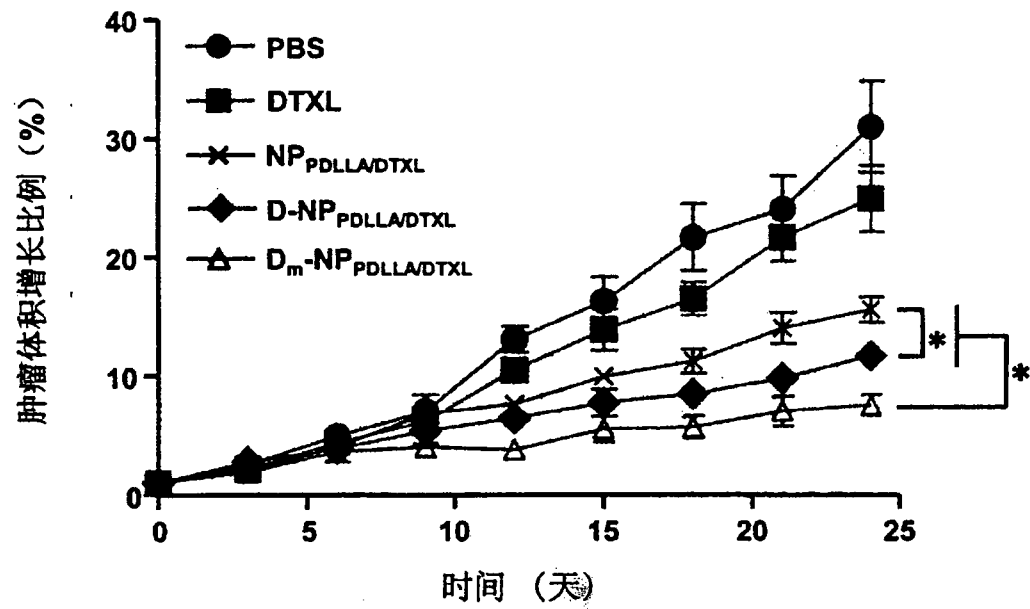


图 42

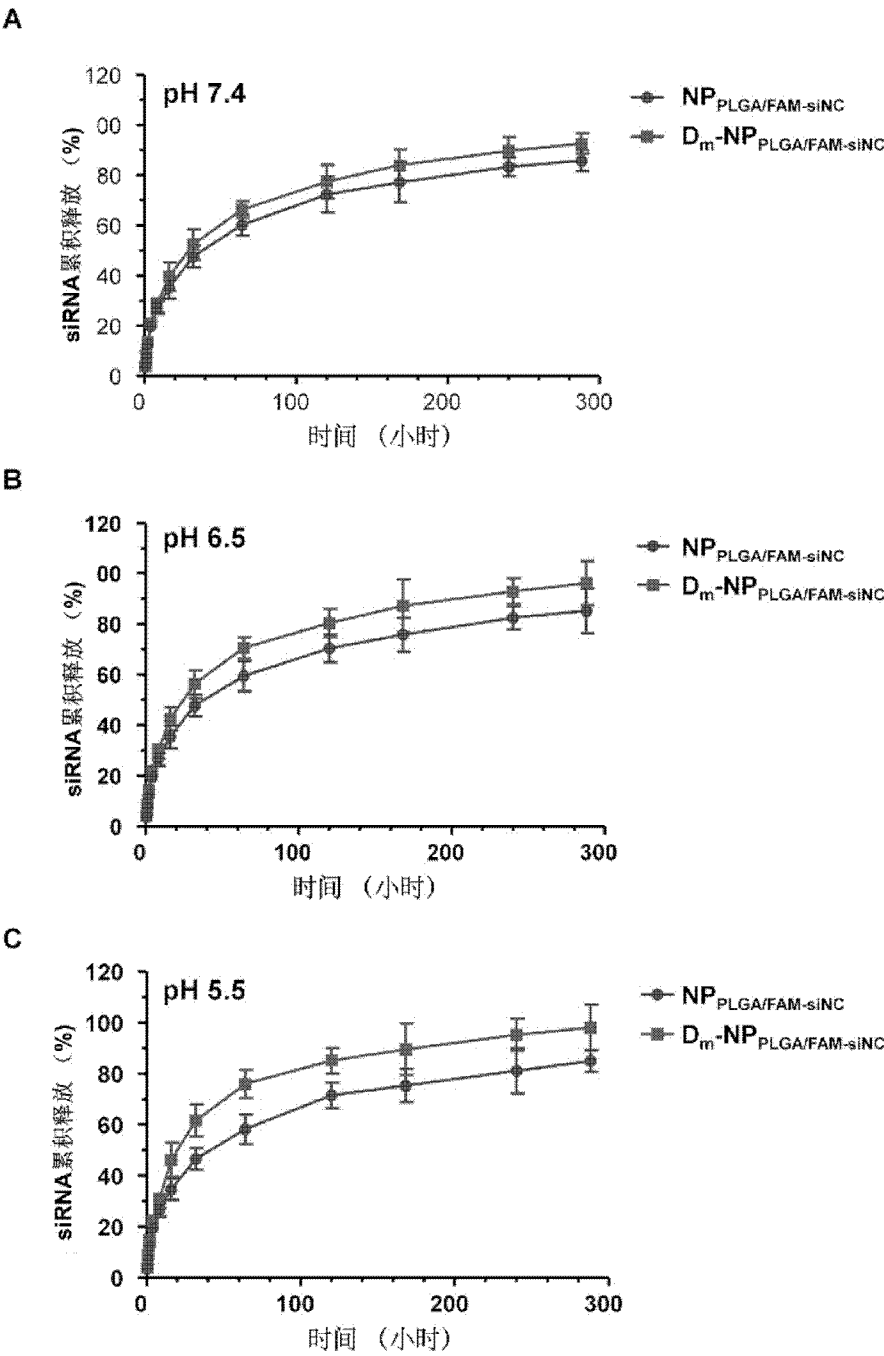


图 43

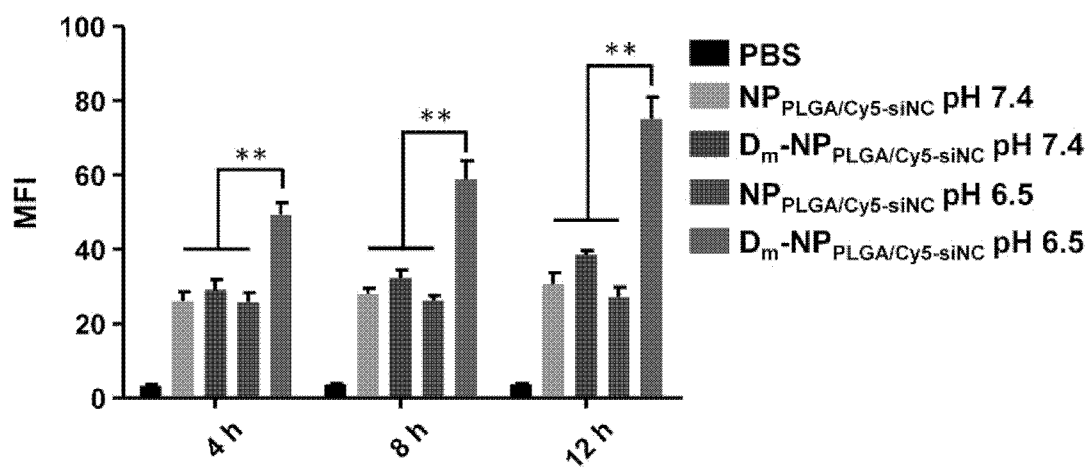


图 44

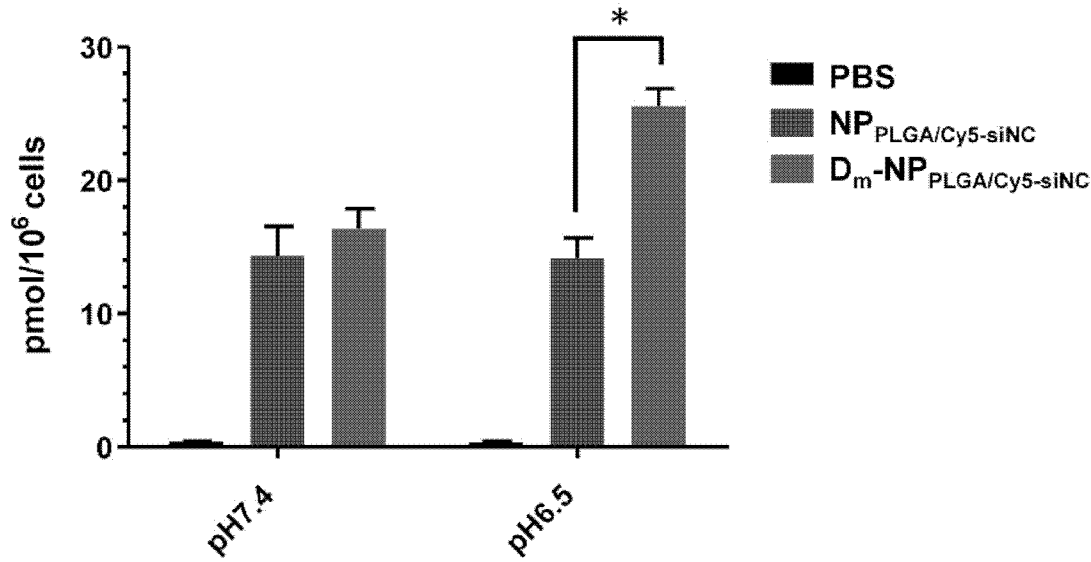


图 45

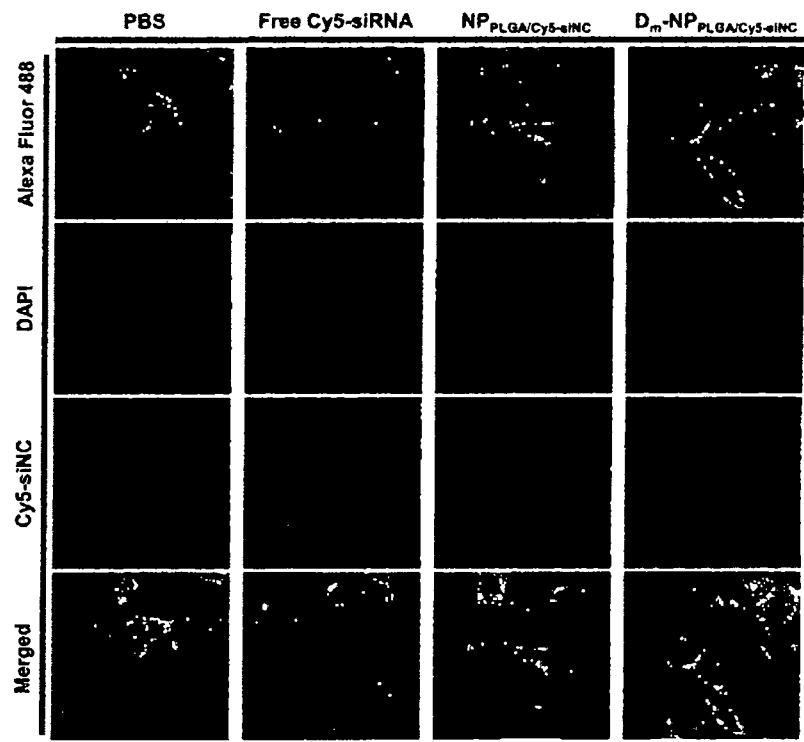
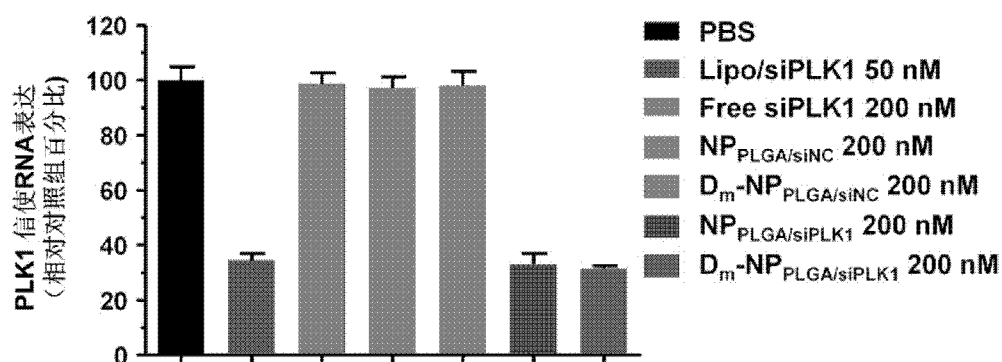


图 46

A



B

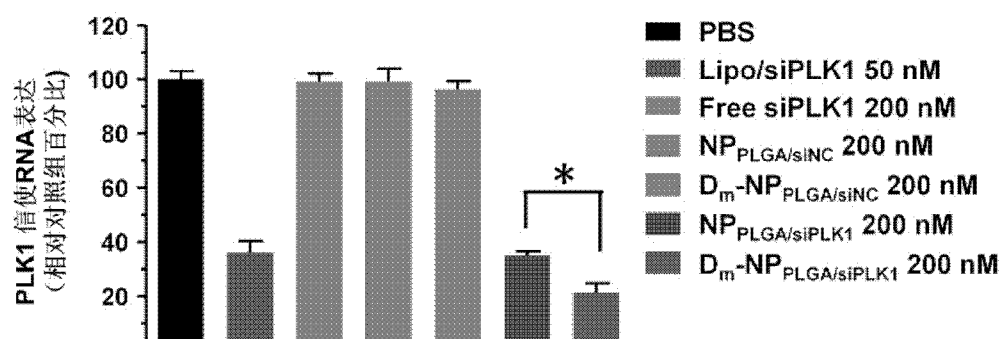


图 47

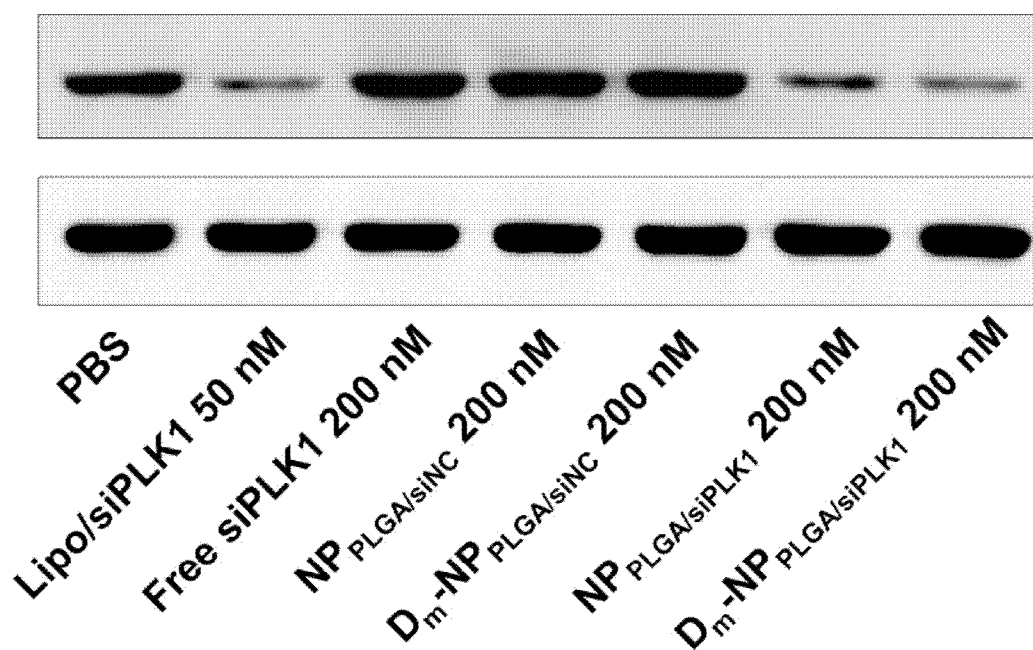


图 48

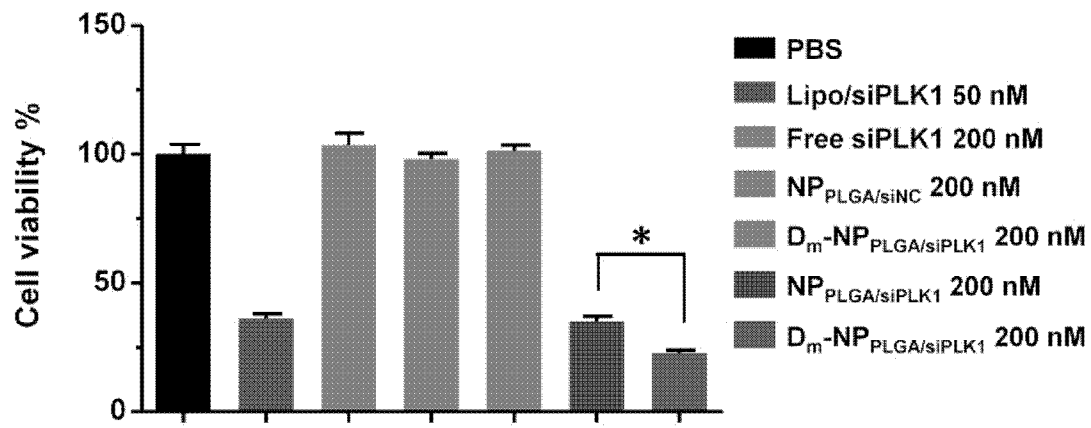


图 49

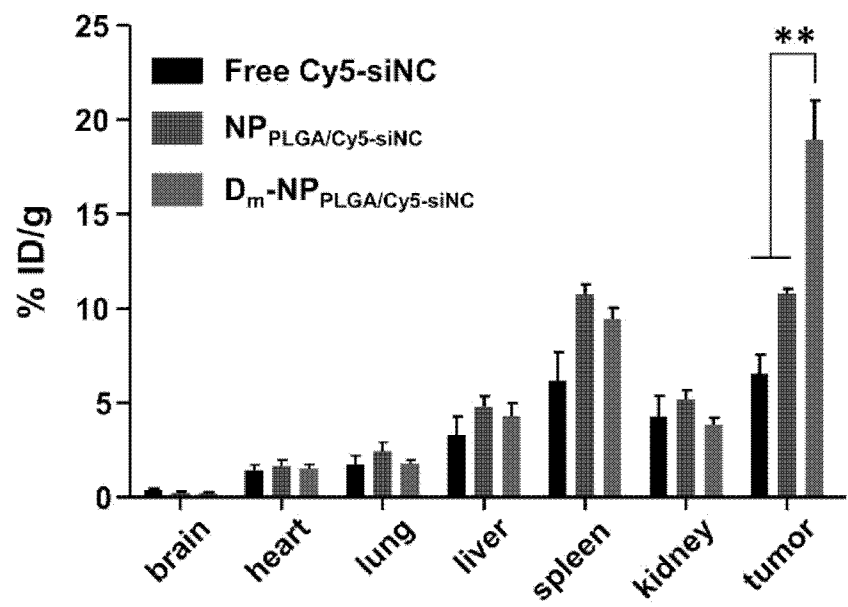


图 50

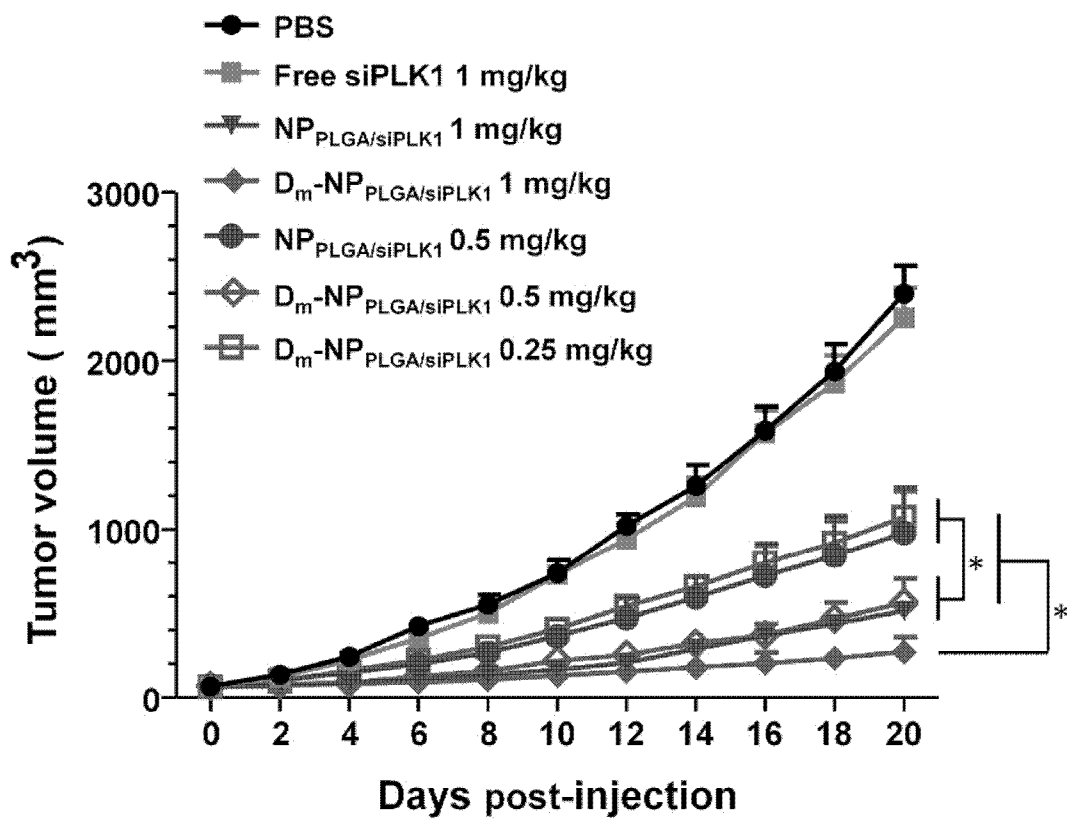


图 51

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2015/093676

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 47/34 (2006.01) i; C08G 81/00 (2006.01) i; C08G 63/08 (2006.01) i; C08G 63/685 (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; C08G; A61K 47; C08G 81; C08G 63

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)

CNPAT, CNKI, WPI, EPODOC: PEG, polyethyleneglycol, polyethylene glycol, polyester, polycaprolactone, polylactic acid, polylactide, maleic anhydride, maleamic acid, aminomaleic acid, maleamate, maleimide, maleinimide, modif+, carboxyethyl, carboxyl, support+, carrier

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 101768276 A (UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY OF CHINA), 07 July 2010 (07.07.2010), the whole document	1-16
A	CN 101474408 A (UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY OF CHINA), 08 July 2009 (08.07.2009), the whole document	1-16
A	CN 1629150 A (CHANGCHUN INSTITUTE OF APPLIED CHEMISTRY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES), 22 June 2005 (22.06.2005), the whole document	1-16
A	CN 101766817 A (UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY OF CHINA), 07 July 2010 (07.07.2010), the whole document	1-16
A	CN 103193900 A (CHANGZHOU UNIVERSITY), 10 July 2013 (10.07.2013), the whole document	1-16
A	WO 2008124634 A1 (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY et al.), 16 October 2008 (16.10.2008), the whole document	1-16

☐ 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 23 June 2016 (23.06.2016)	Date of mailing of the international search report 01 July 2016 (01.07.2016)
Name and mailing address of the ISA/CN: 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 CHEN, Hui Telephone No.: (86-10) 62084415

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2015/093676

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101768276 A	07 July 2010	CN 101768276 B	30 November 2011
CN 101474408 A	08 July 2009	CN 101474408 B	07 September 2011
CN 1629150 A	22 June 2005	CN 100361985 C	16 January 2008
CN 101766817 A	07 July 2010	None	
CN 103193900 A	10 July 2013	CN 103193900 B	17 December 2014
WO 2008124634 A1	16 October 2008	US 8193334 B2	05 June 2012
		US 2010196482 A1	05 August 2010

A. 主题的分类 A61K 47/34(2006.01)i; C08G 81/00(2006.01)i; C08G 63/08(2006.01)i; C08G 63/685(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; C08G; A61K47; C08G81; C08G63 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)) CNPAT, CNKI, WPI, EPDOC: 聚乙二醇, PEG, 聚酯, 聚己内酯, 聚乳酸, 聚丙交酯, 马来酸酐, 马来酰胺酸, 马来酰亚胺, 修饰, 羧乙基, 羧基, 载体, polyethyleneglycol, polyethylene glycol, polyester, polycaprolactone, polylactic acid, polylactide, maleic anhydride, maleamic acid, aminomaleic acid, maleamate, maleimide, maleinimide, modif+, carboxyethyl, carboxyl, support+, carrier																							
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>CN 101768276 A (中国科学技术大学) 2010年 7月 7日 (2010 - 07 - 07) 全文</td> <td>1-16</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 101474408 A (中国科学技术大学) 2009年 7月 8日 (2009 - 07 - 08) 全文</td> <td>1-16</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 1629150 A (中国科学院长春应用化学研究所) 2005年 6月 22日 (2005 - 06 - 22) 全文</td> <td>1-16</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 101766817 A (中国科学技术大学) 2010年 7月 7日 (2010 - 07 - 07) 全文</td> <td>1-16</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 103193900 A (常州大学) 2013年 7月 10日 (2013 - 07 - 10) 全文</td> <td>1-16</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2008124634 A1 (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY等) 2008年 10月 16日 (2008 - 10 - 16) 全文</td> <td>1-16</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	CN 101768276 A (中国科学技术大学) 2010年 7月 7日 (2010 - 07 - 07) 全文	1-16	A	CN 101474408 A (中国科学技术大学) 2009年 7月 8日 (2009 - 07 - 08) 全文	1-16	A	CN 1629150 A (中国科学院长春应用化学研究所) 2005年 6月 22日 (2005 - 06 - 22) 全文	1-16	A	CN 101766817 A (中国科学技术大学) 2010年 7月 7日 (2010 - 07 - 07) 全文	1-16	A	CN 103193900 A (常州大学) 2013年 7月 10日 (2013 - 07 - 10) 全文	1-16	A	WO 2008124634 A1 (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY等) 2008年 10月 16日 (2008 - 10 - 16) 全文	1-16
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																					
A	CN 101768276 A (中国科学技术大学) 2010年 7月 7日 (2010 - 07 - 07) 全文	1-16																					
A	CN 101474408 A (中国科学技术大学) 2009年 7月 8日 (2009 - 07 - 08) 全文	1-16																					
A	CN 1629150 A (中国科学院长春应用化学研究所) 2005年 6月 22日 (2005 - 06 - 22) 全文	1-16																					
A	CN 101766817 A (中国科学技术大学) 2010年 7月 7日 (2010 - 07 - 07) 全文	1-16																					
A	CN 103193900 A (常州大学) 2013年 7月 10日 (2013 - 07 - 10) 全文	1-16																					
A	WO 2008124634 A1 (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY等) 2008年 10月 16日 (2008 - 10 - 16) 全文	1-16																					
☐ 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 2016年 6月 23日		国际检索报告邮寄日期 2016年 7月 1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		授权官员 陈辉 电话号码 (86-10)62084415																					

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2015/093676

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	101768276	A	2010年 7月 7日	CN 101768276 B	2011年 11月 30日
CN	101474408	A	2009年 7月 8日	CN 101474408 B	2011年 9月 7日
CN	1629150	A	2005年 6月 22日	CN 100361985 C	2008年 1月 16日
CN	101766817	A	2010年 7月 7日	无	
CN	103193900	A	2013年 7月 10日	CN 103193900 B	2014年 12月 17日
WO	2008124634	A1	2008年 10月 16日	US 8193334 B2	2012年 6月 5日
				US 2010196482 A1	2010年 8月 5日