

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103910868 A

(43) 申请公布日 2014.07.09

---

(21) 申请号 201210595531.0

(22) 申请日 2012.12.31

(71) 申请人 张雅珍

地址 100088 北京市海淀区北太平庄 25 号

(72) 发明人 张雅珍 李铁力 白毅

(51) Int. Cl.

C08G 65/48(2006.01)

C08G 63/91(2006.01)

A61K 47/48(2006.01)

A61K 31/704(2006.01)

A61P 27/02(2006.01)

---

权利要求书3页 说明书11页 附图1页

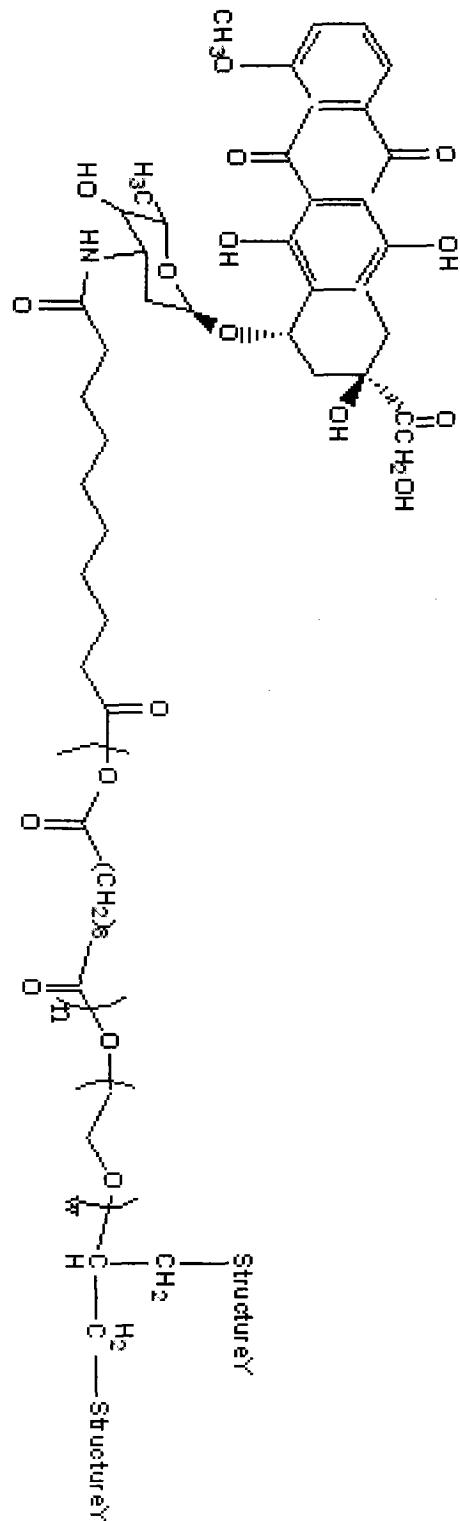
(54) 发明名称

含有多柔比星结构的非线性聚合物以及制备方法和用途

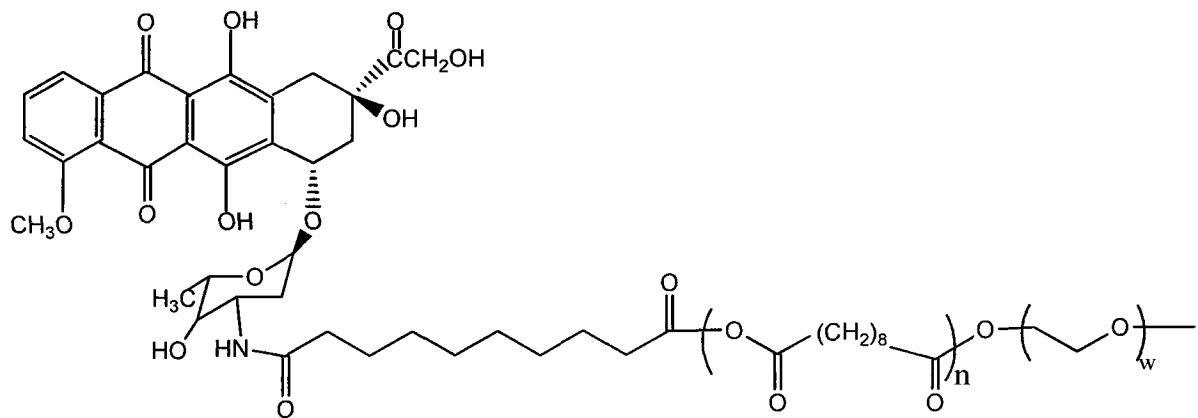
(57) 摘要

本发明公开了含有多柔比星结构的非线性聚合物的以及制备方法和用途。该多柔比星偶联非线性聚合物比其他形式的药物或药剂在治疗年龄相关性黄斑变性的效果更佳。

1. 如下式所示的结构中含有多柔比星的聚合物，其结构如下：



Structure Y 为：

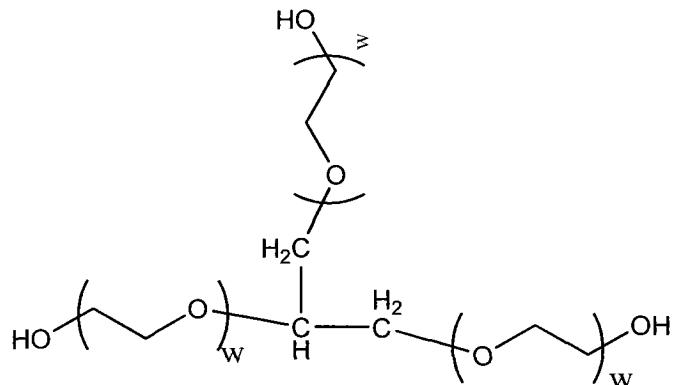


2. 权利要求 1 的聚合物，其中聚合物中的聚乙二醇分子量为 100–200000,  $W = 1–500$  之间的整数，优选  $W = 1–300$  之间的整数， $n = 1–300$ ，优选 1–200 的整数。

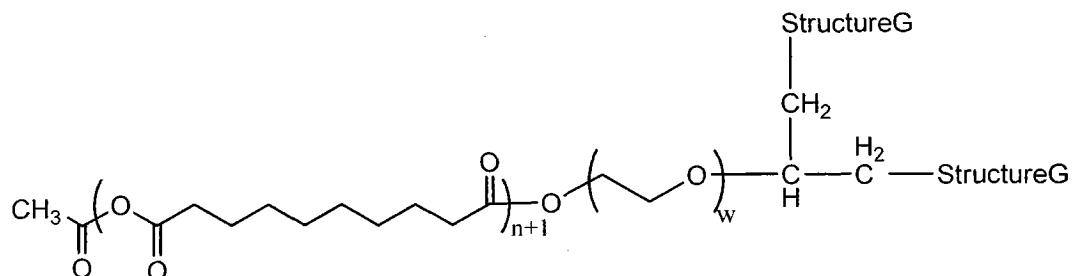
3. 如权利要求 1 的聚合物的制备方法，其特征在于：

1) 含有羟基结尾的 3 臂聚乙二醇 A 和乙酰基化的癸二酸反应得到聚合物 B，其中  $W = 1–500$  的整数，优选 1–300 ;  $n = 1–300$ ，优选 1–200 ；

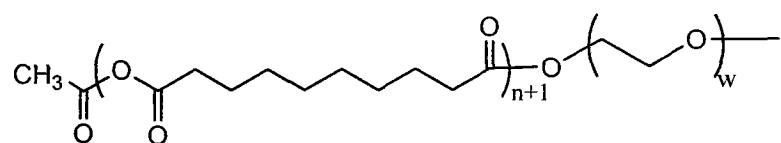
2) 聚合物 B 与多柔比星 C 反应得到最终产物；



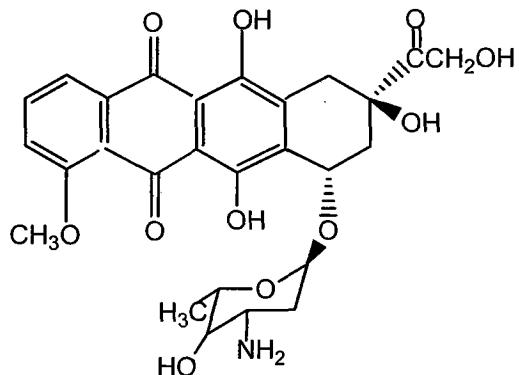
化合物 A；



其中 Structure G 为：



聚合物 B；



多柔比星 C。

4. 权利要求 3 的方法,其中所述化学步骤 1-2 选用溶剂选自 :苯、甲苯、吡啶、四氢呋喃、氯仿、四氯化碳、二氯甲烷、甲醇、乙醇、二氯甲烷、二甲基亚砜、N, N- 二甲基甲酰胺中的一种或多种。
5. 权利要求 1 的化合物可以制备成适于局部给药的纳米制剂,微球制剂。
6. 权利要求 5 所述局部为玻璃体注射给药或眼部其他方式给药。
7. 权利要求 1 的化合物的用途,用途为制备治疗眼部疾病的药物。
8. 权利要求 1 的化合物的用途,用途为制备治疗眼部年龄相关性疾病的药物。
9. 权利要求 8 的化合物的用途,用途为制备治疗视网膜和脉络膜年龄相关性疾病的药物。
10. 权利要求 8 的化合物的用途,用途为制备治疗年龄相关性黄斑病变疾病的药物。

## 含有多柔比星结构的非线性聚合物以及制备方法和用途

### 技术领域

[0001] 本发明公开了含有多柔比星结构的非线性聚合物以及该聚合物的制备方法和用途。

### 背景技术

[0002] 多柔比星是一种抗有丝分裂并且极具细胞毒性的药物。多柔比星能成功抑制多种恶性肿瘤，包括急性白血病、淋巴瘤、软组织和骨肉瘤、儿童恶性肿瘤及成人实体瘤。其作用机理是药物可穿透进入细胞，与染色体结合。药物结构中的平面环插入碱基对之间从而与DNA结合形成复合物，严重干扰DNA合成、DNA依赖性RNA合成和蛋白质合成。但通过该机制产生抗增生作用所需的多柔比星浓度比临床治疗中肿瘤部位的药物浓度要高。此外多柔比星还与氧化还原作用有关，可参与反应得到细胞毒化合物，如过氧化物、活性的氢氧基和过氧化氢等。多柔比星的作用部位可能在细胞膜，目前多柔比星针对各种疾病的药效学作用还没有在科学界达成共识，针对每种疾病的作用机制都没有共性，有待进一步的科学研得以解释。

[0003] 多柔比星目前应用广泛，但是在临床角度往往需要将其变成盐，例如多柔比星，常见药用形式是盐酸多柔比星，即需变成盐酸盐，因多柔比星本身溶解度很低，不转化成盐的形式，无法应用。而变成盐酸盐后，多柔比星的药效学功能大幅下降，因此这给临床应用带来很大困难。

[0004] 多柔比星的另一个缺点是由于本身强的细胞毒作用，因此本身的毒性很大，经常在使用后10天左右出现明显的骨髓抑制，使用一周后，即可表现非常明显的胃肠道不良反应和心脏毒性，因此用药时须精准计算后才能应用，而且此药的半衰期很短，同样给应用带来局限。

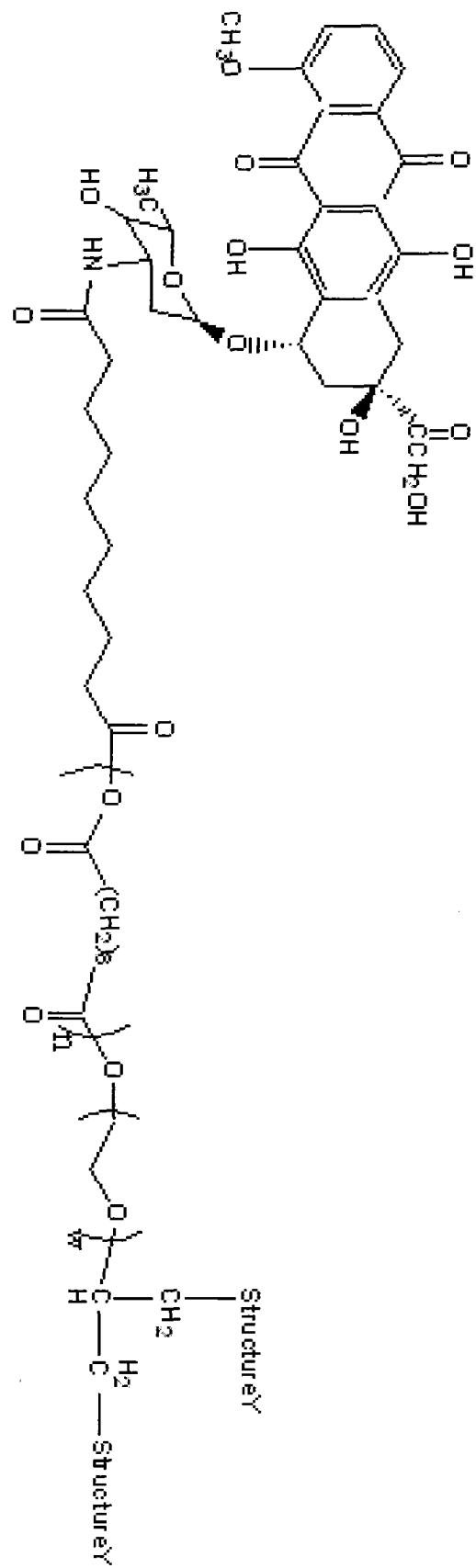
[0005] 本发明的制备方法，可以使制备的含有多柔比星的新结构在水中溶解，延长半衰期，此制备方法一并解决了应用局限性，并使其在年龄相关性黄斑变性疾病中发挥非常好的作用效果。

### 发明内容

[0006] 本发明的内容如下：

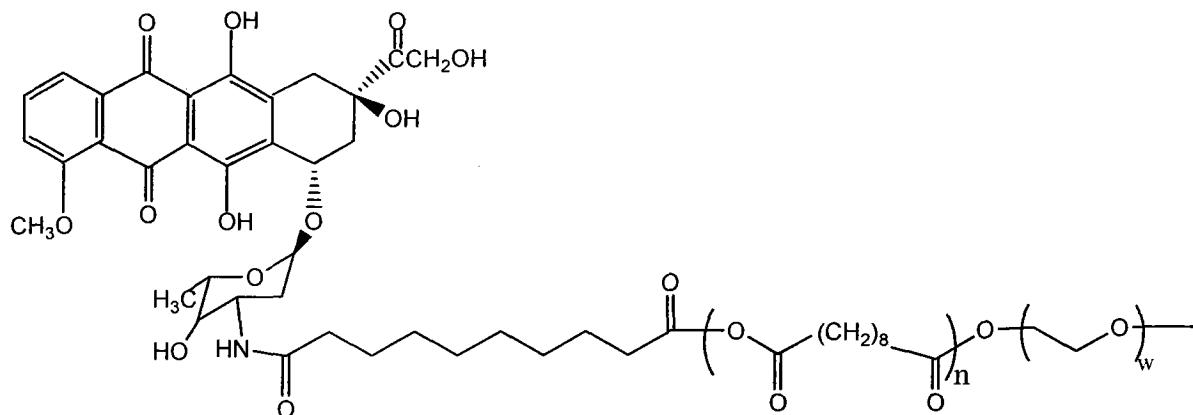
[0007] 本发明公开了下式I所示的多柔比星偶联的多嵌段聚合物，其结构如下：

[0008]



[0009] Structure Y为：

[0010]



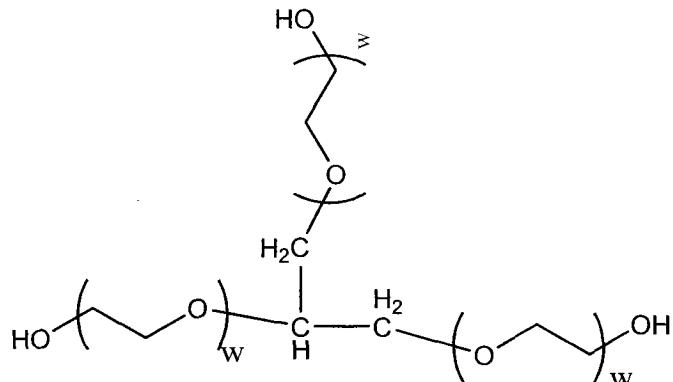
[0011] 其中聚合物中的聚乙二醇分子量为 100-200000,  $w = 1-500$  之间的整数, 优选  $w = 1-300$  之间的整数,  $n = 1-300$ , 优选 1-200 的整数。

[0012] 其特征在于 :

[0013] 1) 含有羟基结尾的 3 臂聚乙二醇 A 和乙酰基化的癸二酸反应得到聚合物 B, 其中  $w = 1-500$  的整数, 优选 1-300 ;  $n = 1-300$ , 优选 1-200 ;

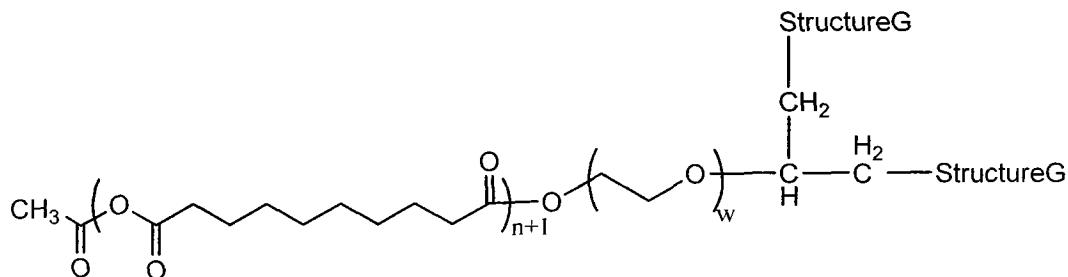
[0014] 2) 聚合物 B 与多柔比星 C 反应得到最终产物 ;

[0015]



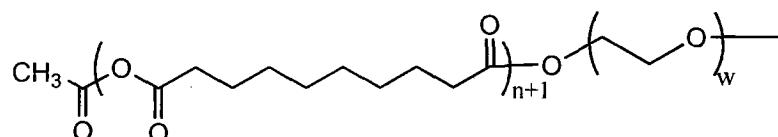
[0016] 化合物 A ;

[0017]



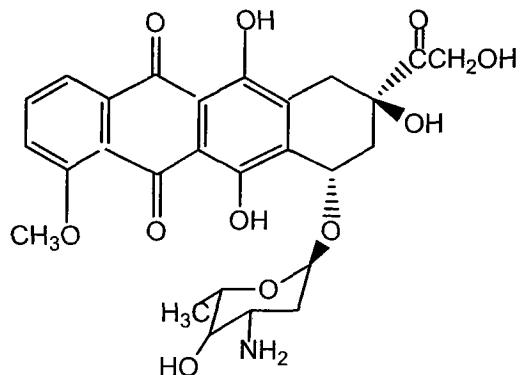
[0018] 其中 Structure G 为 :

[0019]



[0020] 聚合物 B ;

[0021]



[0022] 多柔比星 C

[0023] 其中多柔比星和以羟基结尾的 3 臂聚乙二醇商购。合成的含有多柔比星的新化合物的最终产物的所述化学步骤所需溶剂选自：苯、甲苯、吡啶、四氢呋喃、氯仿、四氯化碳、二氯甲烷、甲醇、乙醇、二氯甲烷、二甲基亚砜、N, N- 二甲基甲酰胺中的一种或多种。

[0024] 新制的化合物可以制备成适于局部给药的纳米制剂，微球制剂。用途为制备治疗年龄相关性黄斑变性的药物。

[0025] 本发明的制备方法具体如下：

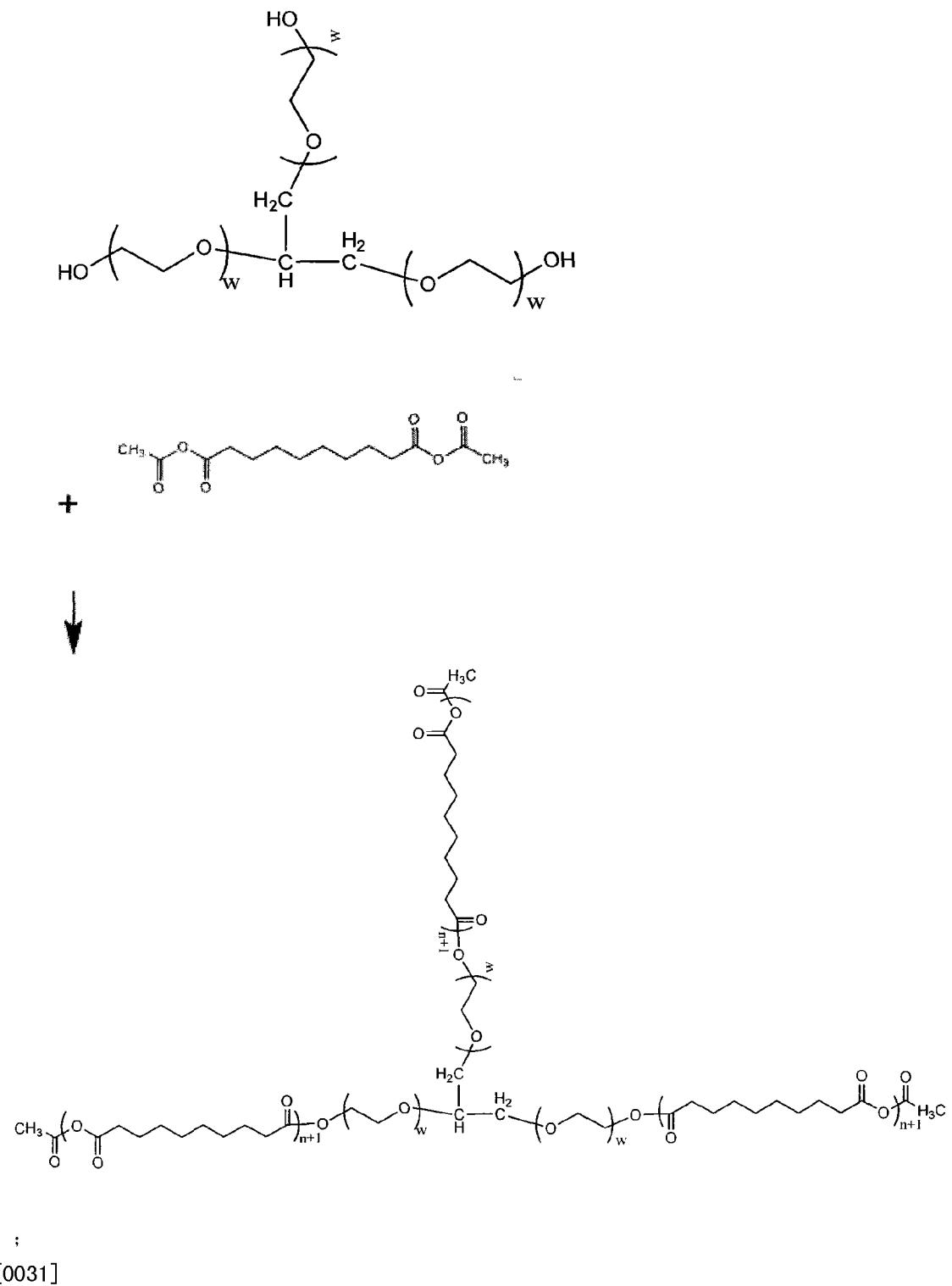
[0026] 1) 将癸二酸在乙酸酐中回流，形成乙酰基 - 癸二酸；

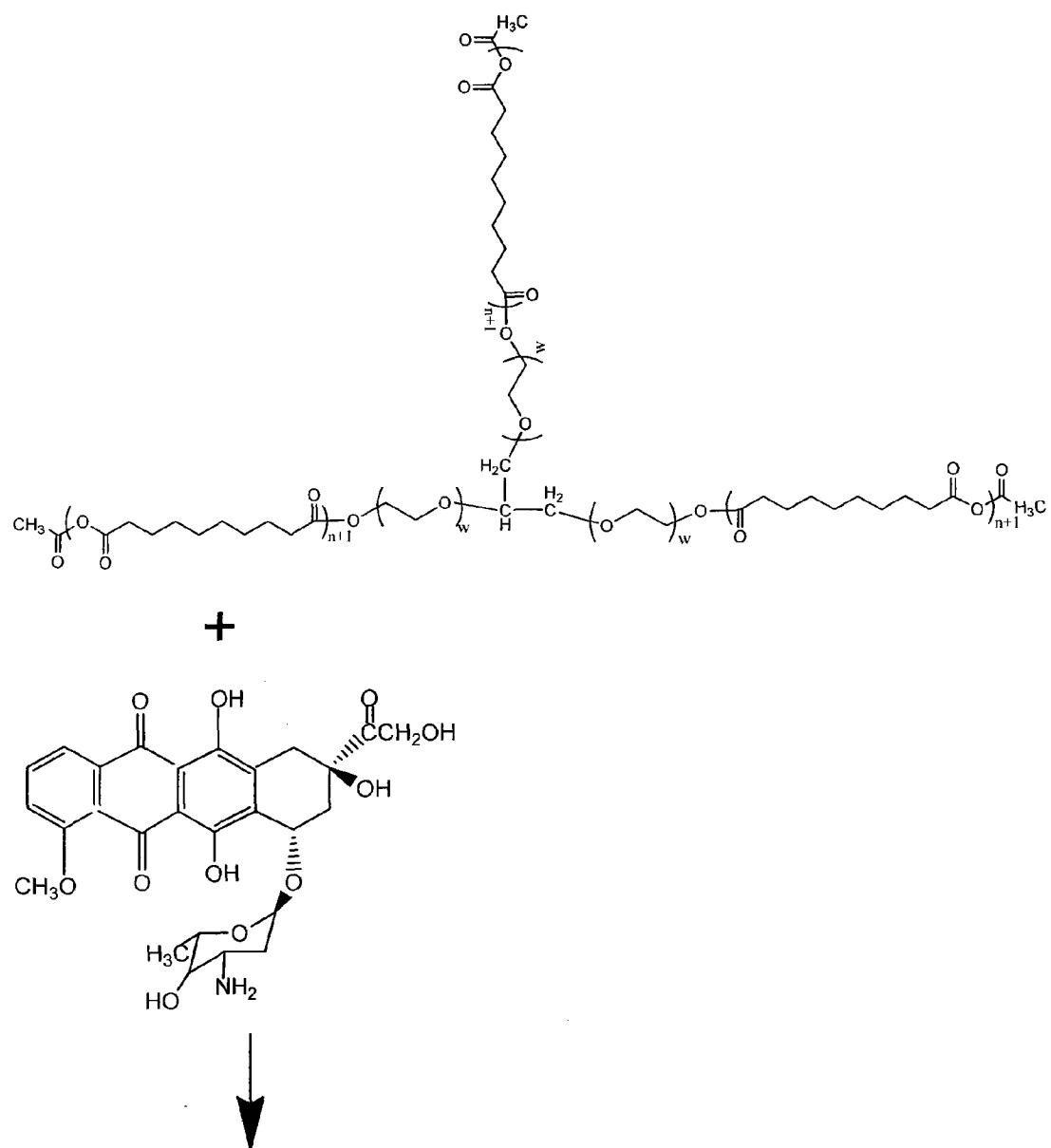
[0027] 2) 将乙酰基 - 癸二酸与带有羟基结尾的 3 臂聚乙二醇化合物 A 混合，在 100–200 °C 下反应，反应时间 10min 至 10h；待反应混合物冷却后，洗涤，干燥得到聚合物 B；

[0028] 3) 将多柔比星 C 与聚合物 B 至于溶剂中 1–96 小时，超声反应 1–30 分钟后，在烘箱中抚育得到式 I 聚合物，而后在 0–零下 30 °C 中均质器高速搅拌 1–10 分钟，旋转挥发得到粗产物，后处理得到终产物式 I 聚合物的纳米制剂。

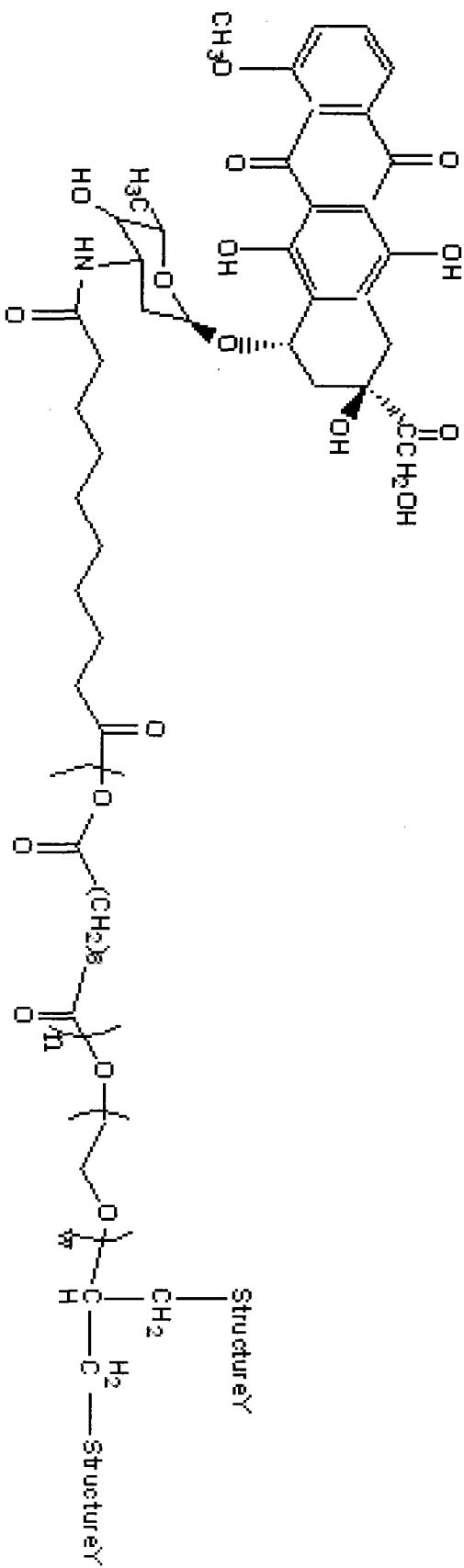
[0029] 其反应方程式如下：

[0030]



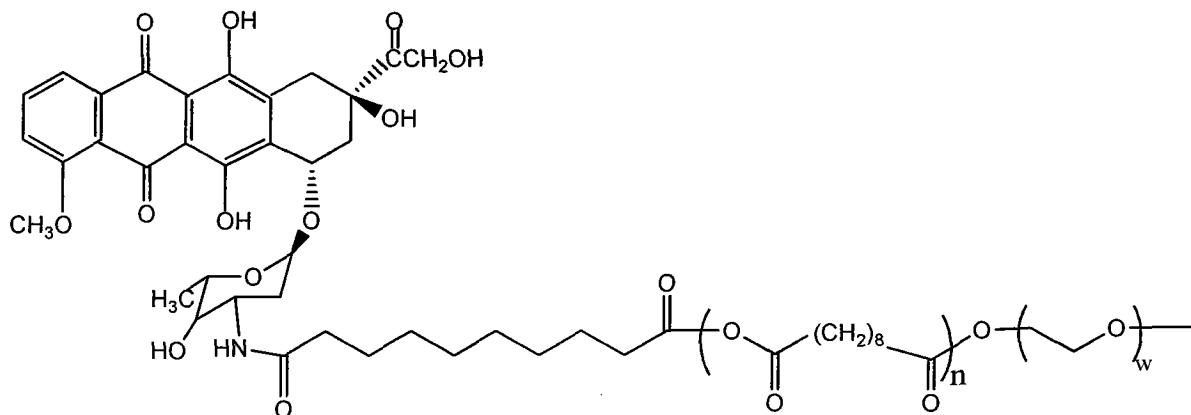


[0032]



[0033] Structure Y 为：

[0034]



[0035] 本发明得到的含有多柔比星结构的聚合物，易于在水中溶解，并且其半衰期比多柔比星延长很多，该类新化合物在治疗年龄相关性黃斑变性的模型时效果极佳。

[0036] 在本专利制备的终产物制成的纳米制剂在治疗眼部疾病的比较中，本专利新化合物的药物治疗效果非常好，完全超越由聚合物直接包裹多柔比星（并未与多柔比星偶联）的纳米制剂。

#### 附图说明：

[0037] 图1实施例1的终产物的核磁共振图谱。

[0038] 图2实施例1制成的纳米粒子、本反应合成的癸二酸-乙二醇聚合物直接包裹多柔比星纳米粒和多柔比星普通制剂的药物累计释放度和时间关系图。

#### 具体实施方式

[0039] 下面具体实施例对本发明作进一步详细说明，但本发明不仅局限以下实施例。

[0040] 制备实施例如下：

[0041] 实施例1

[0042] 1) 癸二酸 80g 在 800ml 乙酸酐中的混合物回流，以形成乙酰基-癸二酸；

[0043] 2) 将第1)步和以羟基结尾的3臂聚乙二醇 10g 产品混合放入烧瓶中，在 180℃ 下减压溶聚反应 1 小时；待聚合物冷却至室温用氯仿溶解，并用石油醚洗涤并干燥；

[0044] 3) 将 120mg 多柔比星和步骤2的 800mg 聚合物放入 8ml 二甲基亚砜和 12ml 的二氯甲烷溶液中 48 小时；超声 3 分钟；然后置入烘箱中 1 小时；于零下 10-20 度中均质器超高速搅拌 3 分钟，而后放入 1% 的聚乙烯醇溶液中 600 转搅拌 2 小时；离心收集后冻干，即得终产物的纳米粒子。

[0045] 实施例2

[0046] 1) 癸二酸 100g 在 900ml 乙酸酐中的混合物回流，以形成乙酰基-癸二酸；

[0047] 2) 将第1)步和以羟基结尾的3臂聚乙二醇 18g 产品混合放入烧瓶中，在 180℃ 下减压溶聚反应 1 小时；待聚合物冷却至室温用氯仿溶解，并用石油醚洗涤并干燥；

[0048] 3) 将 200mg 多柔比星和步骤2的 1000mg 聚合物放入 6ml 二甲基亚砜和 14ml 的二氯甲烷溶液中 24 小时；超声 2 分钟；然后置入烘箱中 2 小时；于零下 10 度中均质器超高速搅拌 2 分钟，而后放入 10% 的胆酸溶液中 600 转搅拌 3 小时；离心收集后冻干，即得终产物的纳米粒子。

[0049] 效果实验如下：

[0050] 将实施例 1-2 制备的样品以及和癸二酸 - 乙二醇聚合物直接包裹的多柔比星的纳米粒药物组（未发生化学偶联反应，多柔比星没有结构变化），多柔比星普通制剂（粉针剂）分别进行稳定性试验、药物体外释放试验以及年龄相关性黄斑变性的药效作用试验。

[0051] 稳定性试验：

[0052] 将实施例 1 组制备的样品以及本专利制备的癸二酸 - 乙二醇聚合物直接包裹的多柔比星的纳米粒药物组（未与多柔比星发生反应），多柔比星普通制剂取同量（以多柔比星计）分别测定吸光度值。而后三组放入 20 度温箱中 3 个月，随后取出测定 480 纳米吸光度值，结果可见实施例 1-2 组与普通制剂组的多柔比星的吸光度值前后无改变，而包裹的纳米粒组吸光度下降 24%。

[0053] 药物体外释放试验：

[0054] 将实施例 1 组，癸二酸 - 乙二醇聚合物直接包裹的多柔比星的纳米粒药物组以及多柔比星普通制剂组分别称取等量的药物（以多柔比星计，每组含 10mg 多柔比星），而后将各组药物至于试管中，用 PBS 缓冲液浸泡后，在摇床中 37 摄氏度下振摇，定时取样后，在紫外分光光度计下测定药物的含量，并记录后计算释放的药物含量百分比，做释放曲线图，横坐标为时间（天），纵坐标为释放的百分比。见图 2，可见实施例释放的药物更长久，使药物半衰期更长。

[0055] 水中溶解度试验：

[0056] 将实施例 1-2 组，癸二酸 - 乙二醇聚合物直接包裹的多柔比星的纳米粒药物组以及多柔比星普通制剂组分别称取等量的药物（以多柔比星计，每组含 100mg 多柔比星），分别放入试管中，用 10mlPBS 缓冲液溶解并振摇，静止后观察溶解状况。记录 3 分钟和 20 分钟的溶解状态，结果如下。

[0057] 表 1 溶解度比较

[0058]

组别	3 分钟	20 分钟
本专利合成的癸二酸-乙二醇聚合物直接包裹多柔比星制备的纳米粒子(未与多柔比星发生反应)	红色混悬溶液	纳米粒沉降到瓶底（分层）
实施例 1	稳定溶液	稳定溶液（未分层）
实施例 2	稳定溶液	稳定溶液（未分层）
多柔比星普通制剂	药物沉降到瓶底	药物沉降到瓶底（分层）

[0060] 药物对脉络膜组织增生的抑制作用：

[0061] 取雄性大鼠 100 只，随机分成 5 组，即对照组、癸二酸 - 乙二醇聚合物直接包裹的

多柔比星的纳米粒药物组(未发生化学偶联反应,多柔比星没有结构变化),实施例1-2组,多柔比星普通剂型组。各组动物数均为20只。每只大鼠随机选取一眼为实验眼,另一眼为对照眼。除对照组外各组均眼内注射10 $\mu\text{g}$ 药物或含10 $\mu\text{g}$ 药物的载药长效制剂,对照组给等体积的PBS溶液。

[0062] 用激光照射大鼠眼球,光凝后有气泡产生或伴有轻度出血(有时伴有轻响)标志击破Bruch膜,记为有效点。激光光凝后,向大鼠右眼眼球注入各组药物。光凝后14d,观察组织增生面积并进行组织学检查。结果如下:

[0063] 表2 视网膜和脉络膜组织增生面积比较(单位: $\text{mm}^2$ )

[0064]

组别	视网膜	脉络膜
对照组	6.04 $\pm$ 0.18	3.49 $\pm$ 0.23
聚癸二酸多臂乙二醇聚合物直接包裹多柔比星	2.73 $\pm$ 0.35** <sup>#</sup>	1.88 $\pm$ 0.39** <sup>#</sup>
实施例1	0.91 $\pm$ 0.29** <sup>##</sup>	0.99 $\pm$ 0.22** <sup>##</sup>
实施例2	0.89 $\pm$ 0.24** <sup>##</sup>	0.92 $\pm$ 0.28** <sup>##</sup>
多柔比星普通制剂	3.07 $\pm$ 0.29* <sup>#</sup>	1.98 $\pm$ 0.23*

[0065] 与对照组组比较 \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , 与普通制剂组比较 <sup>#</sup> $p < 0.05$ , <sup>##</sup> $p < 0.01$

[0066] 上表的结果表明,对照组视网膜和脉络膜发生增生面积较大,各个治疗组分别不同程度的缩小了增生面积。对大鼠眼部组织增生面积的实验表明,各个实施例组能同时减小病变视网膜和脉络膜的组织增生面积,但是效果有所差别,其中发生偶联的实施例1-2组效果更佳。

[0067] 组织学检查的结果为,光镜下对照组光凝斑处可见外层视网膜及脉络膜结构紊乱,视网膜色素上皮细胞、脉络膜新生组织增生、游离伴炎症细胞浸润。药物组与对照组相比,新生组织很少见且较少伴局限性浆液性视网膜脱离;实施例组相比高聚物简单包裹多柔比星而不发生偶联反应的纳米粒药物组作用更加显著,偶联后的化合物能显著减少脉络膜组织增生。组织学检查表明,实施例组比普通制剂组的纳米粒药物组对年龄相关性黄斑病变治疗的更加彻底,对病变的视网膜和脉络膜同时发挥作用。

[0068] 另取5-6周龄的雌性小鼠,平均体重25g,小鼠随机分成5组,即对照组、聚合物直接包裹组、实施例1-2组,普通剂型组。除对照组外各组均球内注射3 $\mu\text{g}$ 药物或含3 $\mu\text{g}$ 药物的制剂,对照组给等体积的PBS溶液。

[0069] 每组小鼠中随机取12只眼进行激光诱导CNV处置,激光光凝后,随后再向小鼠眼球注入上述各组药物(除对照组外各组均球内注射3ug药物或含3ug药物的制剂,对照组给等体积的PBS溶液)。7天后对小鼠进行荧光素眼底血管造影(简称FFA),CNV的形成根据FFA有无荧光渗漏作为判断依据。结果如下:

[0070] 表3 光凝后7d CNV的发生率

[0071]

组别	每只眼光凝产生 CNV 的激光斑数目						CNV 的发生率(%)	总眼数(只)
对照组	4/6	4/6	5/6	3/6	4/6	4/6	63.9	12
	3/6	3/6	4/6	4/6	5/6	3/6		
药物直接包 裹组	3/6	3/6	4/6	3/6	3/6	3/6	58.3	12
	4/6	4/6	3/6	4/6	4/6	4/6		
实施例 1	3/6	3/6	2/6	2/6	3/6	3/6	45.8	12
	3/6	3/6	3/6	2/6	3/6	3/6		
实施例 2	3/6	2/6	3/6	3/6	3/6	3/6	47.2	12
	2/6	3/6	3/6	3/6	3/6	3/6		
普通剂型组	3/6	4/6	3/6	3/6	3/6	4/6	59.7	12
	3/6	4/6	4/6	4/6	4/6	4/6		

[0072] 激光光凝后 7d 行 FFA, 每只眼中 6 点光凝斑形成 CNV 的情况, 分别见上表。

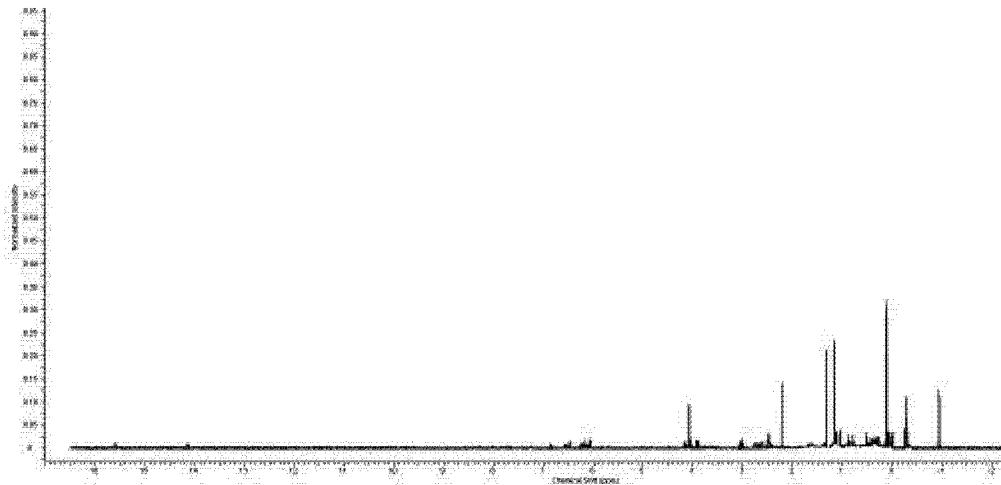


图 1

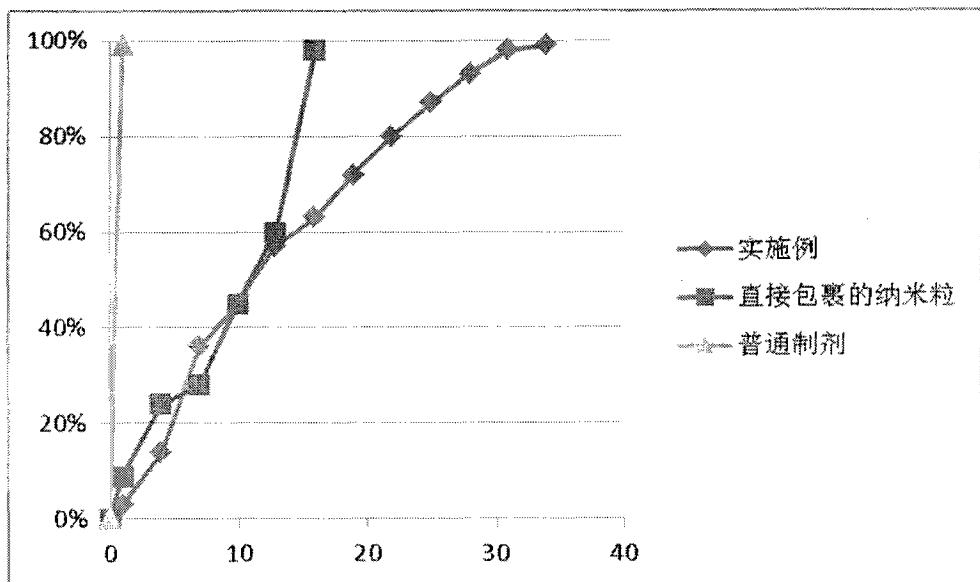


图 2