

(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 1 月 18 日 (18.01.2018)



(10) 国际公布号
WO 2018/010624 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 9/127 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 47/34 (2017.01) *C08G 81/00* (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2017/092424

(22) 国际申请日: 2017 年 7 月 10 日 (10.07.2017)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201610558116.6 2016年7月15日 (15.07.2016) CN

(71) 申请人: 苏州大学(SOOCHOW UNIVERSITY) [CN/
CN]; 中国江苏省苏州市苏州工业园区仁爱
路199号1楼, Jiangsu 215123 (CN)。

(72) 发明人: 孟凤华(MENG, Fenghua); 中国江苏省苏
州市苏州工业园区仁爱路199号1F, Jiangsu 215123
(CN)。 方媛(FANG, Yuan); 中国江苏苏州市苏
州工业园区仁爱路199号1F, 江苏 215123 (CN)。
杨炜静(YANG, Weijing); 中国江苏苏州市苏州工
业园区仁爱路199号1F, 江苏 215123 (CN)。 邹
艳(ZOU, Yan); 中国江苏省苏州市苏州工业园区
仁爱路199号1F, Jiangsu 215123 (CN)。 钟志远
(ZHONG, Zhiyuan); 中国江苏省苏州市苏州工业
园区仁爱路199号1F, Jiangsu 215123 (CN)。

(74) 代理人: 苏州创元专利商标事务所有限公司
(SUZHOU CREATOR PATENT AND TRADEMARK
AGENCY, LTD); 中国江苏省苏州姑苏区干将西
路93号5楼陶海锋, Jiangsu 215002 (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,

(54) Title: REVERSIBLY CROSS-LINKED BIODEGRADABLE POLYMER VESICLE WITH POSITIVELY CHARGED INTERNAL MEMBRANE AND PREPARATION METHOD AND USE FOR PREPARING ANTI-TUMOR DRUG THEREOF

(54) 发明名称: 内膜具有正电的可逆交联生物可降解聚合物囊泡及其制备方法与在制备抗肿瘤药物中的应用

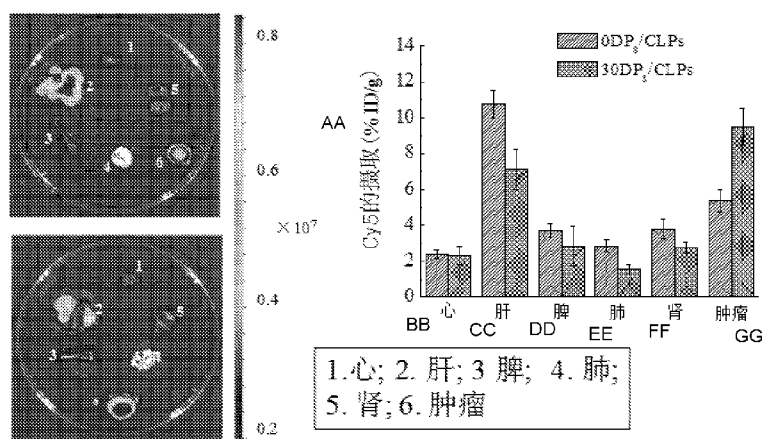


图 6

1, BB Heart
2, CC Liver
3, DD Spleen
4, EE Lung
5, FF Kidney
6, GG Tumor
AA Cy5 intake (% ID/g)

(57) Abstract: A reversibly cross-linked biodegradable polymer vesicle with a positively charged internal membrane, and a preparation method and application for preparing an anti-tumor drug thereof. A tumor-targeting, reduction-sensitive reversibly cross-linked, and intracellularly decrosslinkable biodegradable polymer vesicle with the positively charged internal membrane is based on a block polymer PEG-P(TMC-DTC)-SP or PEG-P(LA-DTC)-SP. The vesicle provides high performance loading and protection of a biomacromolecule, including a protein, DNA and siRNA, and a physiologically negatively charged small molecule drug. The vesicle can also deliver the biomacromolecule and the physiologically negatively charged small molecule drug into a tumor cell *in vivo* to induce apoptosis of the

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, JO, JP, KE, KG, KH, 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, 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))。

tumor cell. The system offers unique advantages, including easy handling during preparation, outstanding biocompatibility, excellent controlled-release for a drug, superb *in vivo* circulation stability, cancer cell targeting, significant induction of cancer cell apoptosis and the like. As such, the invention has great potential to become a nanosystem platform combining the advantages of simplicity, stability, and multiple functionality for use in high-efficiency, active targeting and delivery of a nucleic acid to a carcinoma *in situ*.

(57) 摘要: 内膜具有正电的可逆交联生物可降解聚合物囊泡及其制备方法与在制备抗肿瘤药物中的应用; 基于嵌段聚合物PEG-P(TMC-DTC)-SP或者PEG-P(LA-DTC)-SP的肿瘤靶向、具有带正电荷内膜的、还原敏感可逆交联、细胞内可解交联的生物可降解聚合物囊泡, 能高效装载保护生物大分子如蛋白质、DNA和siRNA和生理环境带负电的小分子药物, 并能输送其到活体的肿瘤细胞内, 诱导其凋亡。该体系拥有多种独特优点, 包括制备的简易操控性、杰出的生物相容性、对药物极好的控制释放性、超强的体内循环稳定性、优越的癌细胞靶向性、显著的癌细胞凋亡能力等。因此, 其有望成为集简易、稳定、多功能等优点于一身的纳米系统平台, 用于高效、主动靶向输送核酸至原位肿瘤。

内膜具有正电的可逆交联生物可降解聚合物囊泡及其制备方法 与在制备抗肿瘤药物中的应用

技术领域

本发明属于药物技术领域，具体涉及一种内膜具有正电的可逆交联生物可降解聚合物囊泡及其制备方法与应用。

背景技术

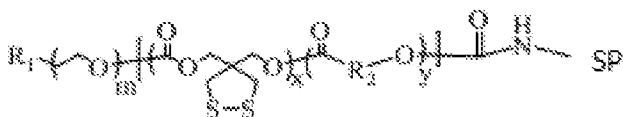
现有囊泡对生物大分子药物以及生理环境带负电的小分子抗癌药物的装载效率低，极大地限制了其在这些药物制剂上的应用；基因药物易被核酸酶降解，进入细胞能力差、非特异性脱靶、免疫源性高等都阻碍了其临床应用。以病毒为核酸药物的载体虽然转染效率很高，但安全性堪忧，存在高免疫原性和潜在的致癌性。因此非病毒基因载体尤其是阳离子聚合物基因载体成为研究的热点，用含阳离子的脂质体和聚离子复合物等纳米载体来装载核酸的研究结果也并不令人满意，存在着体内不稳定、靶向性差、基因复合和转染效率不高、或细胞毒性高的问题。目前尚无能同时解决这些问题的方案。

发明内容

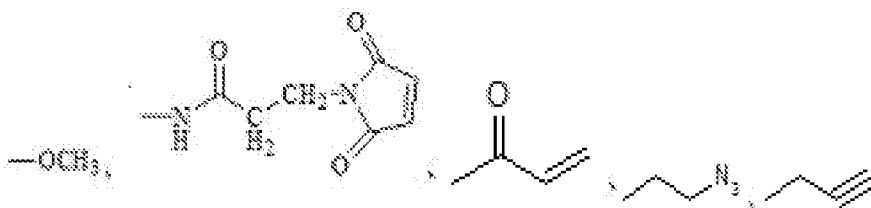
为达到上述发明目的，本发明采用如下技术方案：

一种内膜具有正电的可逆交联生物可降解聚合物囊泡，由聚合物自组装后交联得到；所述聚合物的分子链包括依次连接的亲水链段、疏水链段以及精胺分子；所述疏水链段包括聚碳酸酯链段和/或聚酯链段；所述亲水链段的分子量为 2000-8000Da；疏水链段的分子量为亲水链段分子量的 2.3-8.4 倍。

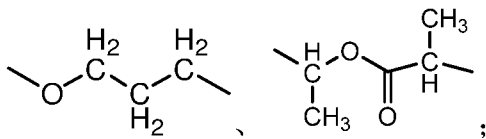
优选的，本发明的聚合物化学结构式如下：



其中， R_1 选自以下基团中的一种：



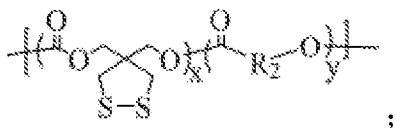
R_2 选自以下基团中的一种：



所述聚合物中，PEG 的分子量为 3000-10000Da；PTMC 或 PLA 的总分子量为 PEG 分子量的 2-6 倍；PDTC 的总分子量为 PTMC 或 PLA 总分子量的 15%-40%。

本发明的聚合物中，精胺作为载体时毒性小，结合 PEG 链段与疏水链段，可以形成良好的药物包载效果，即使当 siRNA 含量高达 80 wt.%，该囊泡仍可以完全、紧实包裹 siRNA，并且能高效装载蛋白质如细胞色素 C；同时本发明的聚合物避免了现有阳离子聚合物体系通过物理缠绕的方式结合核酸带来的不稳定、带正电易与细胞结合而迁移力差、释放效率差的缺陷；本发明通过静电作用力复合核酸、蛋白质或是带负电的小分子药物，再被交联的囊泡膜和外界分隔，避免在输送过程被细胞黏附而造成损失和毒副作用，能够高效送至病灶处，并在体内高浓度盐和还原剂 GSH 的作用下，快速释放核酸药物。

本发明中，聚合物囊泡为内膜具有正电荷的还原敏感可逆交联、细胞内可解交联的生物可降解聚合物囊泡；所述聚合物为 PEG-P(TMC-DTC)-SP 或者 PEG-P(LA-DTC)-SP，即聚合物由 PEG 亲水链段、疏水链段以及精胺分子组成，其中疏水链段的结构为：



当 R_2 为 $\text{---O---CH}_2\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---}$ 时，为 PTMC 链段；当 R_2 为 $\text{---CH(CH}_3\text{)---O---C(=O)---CH(CH}_3\text{)---}$ 时，为 PLA 链段，即疏水链段由 P(TMC-co-DTC)或者 P(LA-co-DTC)组成。

优选的，PEG 分子量为 5000-7500Da；PTMC 或 PLA 的总分子量为 PEG 的 2.5-5 倍；PDTC 的总分子量为 PTMC 或 PLA 总分子量的 18%-38%。

本发明设计的基于内膜具有正电荷的精胺的、可逆交联的生物可降解聚合物囊泡，能够实现对生物大分子药物和带负电的小分子抗癌药物的高效装载。精胺含有两个氨基和两个亚氨基，存在于细菌和大多数动物细胞中，是促进细胞增殖的重要物质。上述三嵌段聚合物 PEG-P(TMC-DTC)-SP 或者 PEG-P(LA-DTC)-SP，其中中间嵌段的 TMC 或者 LA 与 DTC 呈无规排列；精

胺的分子量为 202Da, 远小于 PEG 分子量, 在自组装、交联后得到内膜具有正电荷的交联的聚合物囊泡, 囊泡膜的内壳为精胺用于复合生物大分子如蛋白质、DNA 和 siRNA 和生理环境带负电的小分子药物; 囊泡膜为可逆交联的生物可降解且生物相容性好的 PTMC 或者 PLA, 侧链的二硫戊环类似人体天然的抗氧化剂硫辛酸, 可提供还原敏感的可逆交联, 不但支持生物药物在血液中的长循环, 还可保证在细胞内快速解交联, 释放药物到靶细胞细胞内。

本发明还公开了上述内膜具有正电的可逆交联生物可降解聚合物囊泡的制备方法, 包括以下步骤:

(1) 将 PEG-P(TMC-DTC)或者 PEG-P(LA-DTC)的末端用羟基活化剂比如氯甲酸对硝基苯酯 NPC 活化, 再与精胺反应制得 PEG-P(TMC-DTC)-SP 或者 PEG-P(LA-DTC)-SP;

(2) 在 PEG-P(TMC-DTC)-SP 或者 PEG-P(LA-DTC)-SP 的 PEG 端偶联肿瘤特异性靶向分子, 得到靶向 PEG-P(TMC-DTC)-SP 或者靶向 PEG-P(LA-DTC)-SP;

(3) 以 PEG-P(TMC-DTC)-SP 为原料、以 PEG-P(LA-DTC)-SP 为原料、以 PEG-P(TMC-DTC)-SP 和靶向 PEG-P(TMC-DTC)-SP 为原料、以 PEG-P(LA-DTC)-SP 和靶向 PEG-P(LA-DTC)-SP 为原料、以 PEG-P(TMC-DTC)-SP 和靶向 PEG-P(TMC-DTC)为原料或者以 PEG-P(LA-DTC)-SP 和靶向 PEG-P(TMC-DTC)为原料, 通过溶剂置换法制备内膜具有正电的可逆交联生物可降解聚合物囊泡。

优选以 PEG-P(TMC-DTC)-SP 和靶向 PEG-P(TMC-DTC)为原料, 或者以 PEG-P(LA-DTC)-SP 和靶向 PEG-P(LA-DTC)为原料共混, 自组装、交联得到肿瘤主动靶向、内膜具有正电荷的聚合物囊泡, 外壳为以 PEG 为背景、靶向分子对癌细胞可高特异性结合, 增加载体的靶向性。靶向分子可以为多肽 DP8、cNGQ、cRGD、CC9、叶酸 FA 或半乳糖 Gal。比如通过 PEG-P(TMC-DTC)-SP 或者 PEG-P(LA-DTC)-SP 和偶联了肿瘤主动靶向分子的二嵌段聚合物如 DP8-PEG-P(TMC-DTC)混合, 共自组装、装载药物、交联后得到肿瘤主动靶向、内膜具有正电荷的聚合物囊泡(DP8-RCCPs)。

上述制备方法, 具体包括以下步骤:

步骤(1)为将 PEG-P(TMC-DTC)或者 PEG-P(LA-DTC)、羟基活化剂氯甲酸对硝基苯酯 NPC 溶于干燥的溶剂中反应, 然后沉淀、过滤、真空干燥得到

活化的 PEG-P(TMC-DTC)-NPC 或者 PEG-P(LA-DTC)-NPC；将 PEG-P(TMC-DTC)-NPC 或者 PEG-P(LA-DTC)-NPC 溶液滴加到精胺溶液中反应后，透析、沉淀、抽滤、真空干燥得到 PEG-P(TMC-DTC)-SP 或者 PEG-P(LA-DTC)-SP；步骤（2）为将得到聚合物溶于带有靶向分子的有机溶剂如 DMSO 或 DMF 中；步骤（3）为将原料溶液中加入非离子缓冲溶液中如 HEPES，室温放置少许后对相同缓冲溶液透析，孵育交联，得到内膜具有正电的可逆交联生物可降解聚合物囊泡。本发明可以在加或不加还原剂如二巯代苏糖醇（DTT）和谷胱甘肽（GSH）下室温交联得到内膜具有正电的可逆交联生物可降解聚合物囊泡。

比如：

PEG-P(TMC-DTC)和 NPC 溶于干燥的二氯甲烷(DCM)中冰水浴下反应 12-24 小时，然后在冰乙醚中沉淀、过滤、真空干燥得到 PEG-P(TMC-DTC)-NPC；然后将 PEG-P(TMC-DTC)-NPC 溶于干燥 DCM，滴加到精胺的 DCM 中 30-40℃ 下反应 12-24 小时后，在 DCM 和甲醇(体积比为 1:1)中透析 24-48 小时，接着沉淀、抽滤、真空干燥得到产物 PEG-P(TMC-DTC)-SP；PEG-P(TMC-DTC)-SP 和靶向 PEG-P(TMC-DTC)的 DMSO 溶液混合后加入 HEPES 缓冲液中，室温下放置过夜、透析、在加或不加还原剂如二巯代苏糖醇（DTT）或谷胱甘肽（GSH）时孵育 4 h 囊泡交联，得到内膜具有正电荷的交联聚合物囊泡。

本发明进一步公开了一种抗肿瘤药物，由上述内膜具有正电的可逆交联生物可降解聚合物囊泡装载药物得到；所述药物为蛋白质、核酸或生理环境带负电的小分子药物，如培美曲塞、甲氨蝶呤。本发明的药物以主动靶向、还原敏感可逆交联的纳米囊泡为载体、装载抗肿瘤药物，在小鼠体内治疗肿瘤表现了卓越的疗效和低毒性。

上述抗肿瘤药物的制备方法为将囊泡原料溶液与药物、非离子缓冲液混合，室温放置，然后透析、孵育交联得到抗肿瘤药物；所述囊泡原料为以下一组：PEG-P(TMC-DTC)-SP、PEG-P(LA-DTC)-SP、PEG-P(TMC-DTC)-SP 和靶向 PEG-P(TMC-DTC)-SP、PEG-P(LA-DTC)-SP 和靶向 PEG-P(LA-DTC)-SP、PEG-P(TMC-DTC)-SP 和靶向 PEG-P(TMC-DTC)、PEG-P(LA-DTC)-SP 和靶向 PEG-P(TMC-DTC)。

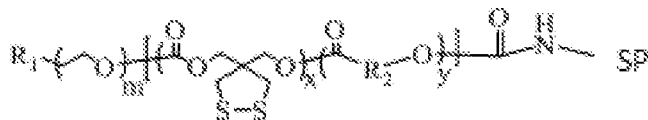
其中，聚合物溶液、抗肿瘤药物溶液和非离子缓冲溶液三者共同混合得到包载药物的内膜具有正电的可逆交联生物可降解聚合物囊泡，优选条件为聚合

物溶液加入至含蛋白质、DNA 和生理环境带负电的小分子药物的 HEPES 缓冲溶液中，或聚合物溶液与 siRNA 溶液混合后再加入 HEPES 中。

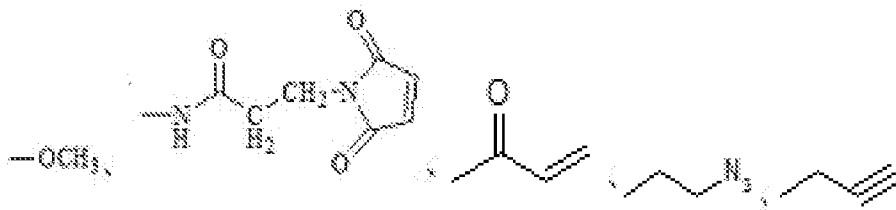
本发明还公开了上述内膜具有正电的可逆交联生物可降解聚合物囊泡作为抗肿瘤纳米药物载体的应用，比如作为蛋白质、siRNA、DNA 和培美曲塞、甲氨蝶呤等生理环境带负电的小分子药物的载体的应用。

本发明还公开了上述内膜具有正电的可逆交联生物可降解聚合物囊泡在制备生物抗肿瘤药物中的应用。

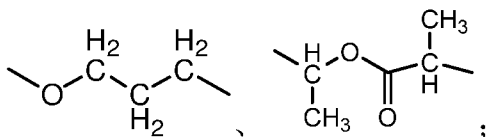
本发明还公开了一种聚合物，其特征在于，所述聚合物的化学结构式如下：



其中， R_1 选自以下基团中的一种：



R_2 选自以下基团中的一种：



聚合物中，PEG 的分子量为 2000-8000Da；PTMC 或 PLA 的总分子量为 PEG 的 2-6 倍；PDTC 的总分子量为 PTMC 或 PLA 总分子量的 15%-40%。

本发明设计了内膜具有正电荷的交联聚合物囊泡用于抗肿瘤药物的体内传递；首先合成了嵌段聚合物 PEG-P(TMC-DTC)-SP，囊泡膜内壳的精胺用于高效装载蛋白质、DNA、siRNA 和生理环境带负电的小分子药物如培美曲塞、甲氨蝶呤；囊泡膜为可逆交联的生物可降解且生物相容性好的 PTMC，侧链的二硫戊环类似人体天然抗氧化剂硫辛酸，可提供还原敏感的可逆交联，不但支持纳米药物在血液中长循环，还可保证在细胞内快速解交联，释放核酸到靶细胞细胞内；外壳以 PEG 为背景同时具有靶向分子，对癌细胞可高特异性结合；囊泡的纳米尺寸以及肿瘤特异性靶向使得囊泡可输送核酸高效进入肿瘤细胞。通过对内部具有带正电的精胺的交联聚合物囊泡能用来装载复合功能性 siRNA 和 DNA 药物、其体内外具有显著的基因沉默效果。精胺是生物体天然

存在的多胺，无毒，在结合 PEG 链段与疏水链段后可形成囊泡结构，具有良好的药物包载效果；聚合物载体避免了现有非病毒阳离子聚合物通过静电相互作用结合核酸形成的复合物带来的不稳定、带正电易与细胞结合而迁移力差、释放效率差的缺陷。内膜具有正电荷的、还原敏感可逆交联、细胞内可解交联囊泡载体避免了现有蛋白质纳米载体装载效率低、蛋白质易变性、或是蛋白质释放慢等导致的生物利用率低、药效低的缺陷；本发明的聚合物载体避免了现有在生理环境下带负电荷的小分子药物缺乏合适的载体、装载效率低、释放慢、药物的生物利用率低、药效低等缺陷。该囊泡体系拥有多种独特的优点，包括制备易操控、杰出的生物相容性、对药物极好的控制释放性、超强的体内循环稳定性、对癌细胞的优越靶向性、显著的特异性基因沉默能、卓越的抑制肿瘤生长和转移的能力。因此，本发明的囊泡有望成为集便捷、稳定、多功能等于一身的纳米药物平台，用于高效、主动靶向输送药物至肿瘤。

附图说明

图 1 为实施例一中 PEG5k-P(DTC4.6k-TMC13.5k)-SP、实施例三中 DP₈-PEG6.5k-P(DTC6k-TMC15k)核磁谱图；

图 2 为实施例八中靶向交联囊泡的稳定性、TEM、还原响应图；

图 3 为实施例十一中载 FITC-CC 交联囊泡 FITC-CC-DP₈/RCCPs 的释放图、实施例十七中 DP₈/RCCPs 对 MCF-7 乳腺癌细胞的毒性图；

图 4 为实施例十八中 GrB-DP₈/RCCPs 对 MCF-7、HepG2 的细胞毒性图；

图 5 为实施例十九中 FITC-CC-DP₈/RCCPs 对 MCF-7、HepG2 的 CLSM 图、实施例二十中 CC-Cy5-DP₈/RCCPs 在小鼠体内的药力动力学曲线图；

图 6 为实施例二十中 CC-Cy5-DP₈/RCCPs 对 MCF-7 模型的生物分布图；

图 7 为实施例二十中 CC-Cy5-DP₈/RCCPs 对 MCF-7 模型的成像图；

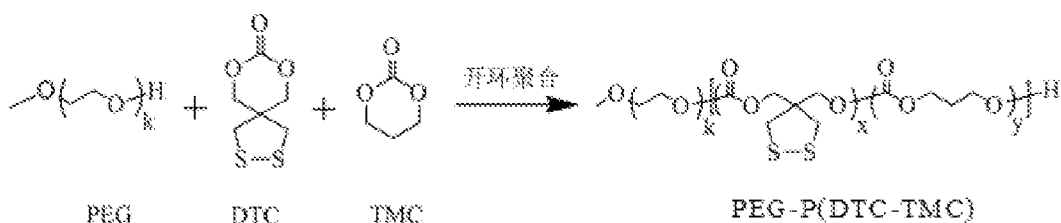
图 8 为实施例二十一中 PEM-CC9-RCCPs 对荷 H460 皮下肺癌治疗实验图。

具体实施方式

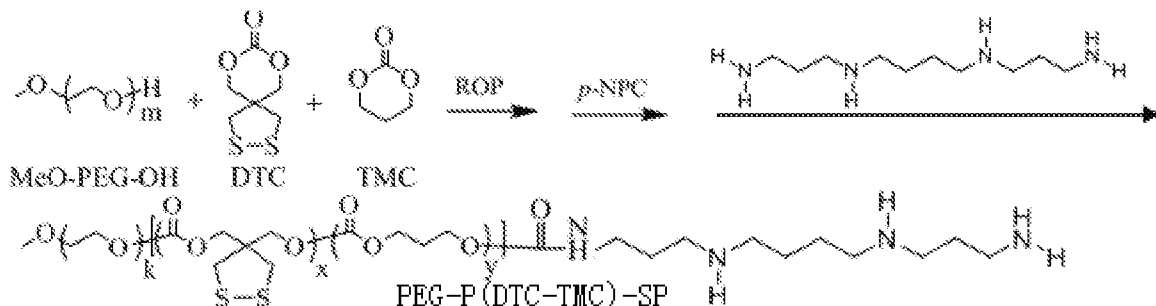
实施例一 合成聚合物 PEG5k-P(DTC4.6k-TMC13.5k)-SP

合成分为两步，首先是开环聚合制备 PEG5k-P(DTC4.6k-TMC13.5k)二嵌段共聚物，具体操作如下，在氮气环境下，依次称取 MeO-PEG-OH ($M_n=5.0$ kg/mol, 0.20 g, 40 μ mol), TMC (0.6 g, 5.9 mmol) 和 DTC (0.192g, 1.0 mmol) 并溶解在二氯甲烷(DCM, 6.8 mL)中，快速加入开环聚合催化剂，如双（双三甲基硅基）胺锌(7.7 mg, 20 μ mol)。密闭反应器密封好放置 40 °C 油浴中磁力搅拌下反应 24 小时。冰醋酸终止反应后在冰乙醚中沉

淀两次、抽滤、常温真空干燥后得到产物。产率：90.3%。 ^1H NMR (400 MHz, DTC1_3): PEG: δ 3.38, 3.65; TMC: δ 4.24, 2.05; DTC: δ 4.32, 3.02, 经核磁计算可知聚合物各段的分子量为 5.0-(4.6-13.5) kg/mol。GPC 测得分子量分布：1.39。



PEG5k-P(DTC4.6k-TMC13.5k) (0.2g, 羟基 0.0087 mmol) 和吡啶 (3.5 μL) 溶于干燥的二氯甲烷(DCM)中, 冰浴下缓慢滴加 NPC(9.2mg, 0.046 mmol) 的 DCM 溶液, 后室温反应 12 小时, 然后在冰乙醚中沉淀两次、过滤、真空干燥得到 PEG5k-P(DTC4.6k-TMC13.5k)-NPC。接下来, 将产物溶于 3 mL DCM 后滴加到 2mL 溶有精胺(SP, 34.7 mg, 0.172 mmol, $M_n=202.34$ kg/mol) 的 DCM 中, 25 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 24 小时后在 DCM 和甲醇(体积比为 1:1)中透析(MWCO 3500) 48 小时, 浓缩、冰乙醚中沉淀两次、抽滤并室温真空干燥得到产物 PEG5k-P(DTC4.6k-TMC13.5k)-SP。产率：87.3%。附图 1A 为 PEG5k-P(DTC4.6k-TMC13.5k)-SP 的核磁图谱, 其 ^1H NMR (400 MHz, DTC1_3) 表征显示除了 PEG 及 P(DTC-TMC) 峰外 (PEG: δ 3.38, 3.65; TMC: δ 4.24, 2.05; DTC: δ 4.32, 3.02), 还有精胺的特征峰在 δ 2.6-2.8 和 3.23。



实施例二 合成嵌段共聚物 Mal-PEG6k-P(DTC4.8k-TMC15.2k)-SP

Mal-PEG6k-P(DTC4.8k-TMC15.2k)-SP 的合成与实施例一类似, 将第一步中的引发剂 MeO-PEG-OH 换为 Mal-PEG6k-OH, 得到 Mal-PEG6k-P(DTC4.8k-TMC15.2k), 然后其末端羟基用 NPC 活化, 再与精胺的伯胺反应制得; 产率: 90.2%。 ^1H NMR (400 MHz, DTC1_3): PEG: δ 3.38, 3.65; TMC: δ 4.24, 2.05; DTC: δ 4.32, 3.02, 以及 Mal 和精胺的特征峰。聚合物数均分子量通过特征峰面积积分比值计算为 6.0-(4.8-15.2)-0.2 kg/mol。

实施例三 合成靶向二嵌段聚合物 DP8-PEG6.5k-P(DTC6k-TMC15k)

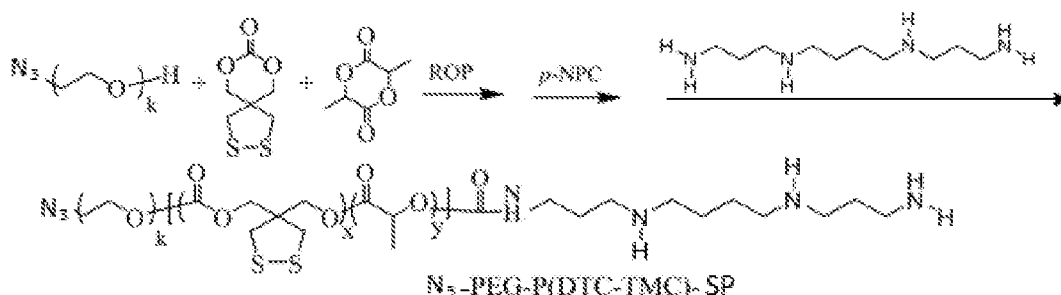
合成与实施例一类似，将实施例一的第一步中的引发剂 MeO-PEG-OH 换为 NHS-PEG6.5k-OH，开环聚合 TMC 和 DTC 得到 NHS-PEG6.5k-P(DTC6k-TMC15k)；第二步，多肽 DMAPTVP(DP8)按照其氨基和 NHS-PEG6.5k-P(DTC6k-TMC15k)摩尔比 3:1 加入，30 度酰胺化反应 24-72 小时，透析除去游离的 DP8，冷冻干燥得到 DP8-PEG6.5k-b-P(DTC6k-TMC15k)，通过核磁（附图 1B）和 TNBSA 计算 DP8 接枝率接近 100%。

实施例四 合成靶向二嵌段聚合物 cNGQ-PEG7k-P(DTC4.8k-TMC19.2k)

合成与实施例一类似，将第一步中的引发剂 MeO-PEG-OH 换为 N-羟基琥珀酰亚胺官能化的 NHS-PEG-OH，开环聚合 TMC 和 DTC 得到 NHS-PEG7k-P(DTC4.8k-TMC19.2k)；其次，具有自由伯胺的多肽 C(NGQGEQ)(cNGQ)与 NHS-PEG7k-P(DTC4.8k-TMC19.2k)通过酰胺化反应而键合。产率：81.2%。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): PEG: δ 3.51; TMC: δ 4.23, 1.94; DTC: δ 4.13, 2.99; cNGQ: δ 6.84–7.61。BCA 蛋白试剂盒(Thermo scientific)测得 cNGQ 的接枝率为 89.7%。通过不同的活性 PEG 可得到不同靶向分子的聚合物。

实施例五 合成聚合物 Azide-PEG6.5k-P(DTC4.0k-LA15.3)-SP

合成与实施例一类似，将其第一步的引发剂 MeO-PEG-OH 换为叠氮官能化的 Azide-PEG6.5k-OH，开环聚合 LA 和 DTC 得到 Azide-PEG6.5k-P(DTC4.0k-LA15.3)，然后其末端羟基用 NPC 活化，再与精胺的伯胺反应制得；产率：90.2%。¹H NMR (400 MHz, D₂O): PEG: δ 3.38, 3.65; TMC: δ 4.24, 2.05; DTC: δ 4.32, 3.02，以及精胺的特征峰。聚合物数均分子量通过特征峰面积积分比值计算为 6.5-(4.0-15.3)-0.2 kg/mol。



通过调整使用的原料比例可得到不同分子量的聚合物，见表 1。

表 1 各个聚合物制备条件和产物的核磁表征结果

聚合物	投料量(mmol)				各部分总分子量(kg/mol)				总分子量(kg/mol)
	PEG 羟基	DTC	TMC/LA	SP	PEG	PDTC	PTMC/PLA	SP	
1	0.02	0.52	3.85	0.4	5	4.4	19.8	0.2	29.4

2	0.017	0.52	3.85	0.34	6	4.8	19.2	0.2	30.2
3	0.015	0.52	3.85	0.30	6.5	4.6	18.6	0.2	29.9
4	0.02	0.52	4.90	0.4	5	5.8	23.0	0.2	34.0
5	0.017	0.52	4.12	0.34	3	4	12	0.2	19.2
6	0.011	0.31	1.93	0.22	7	3	15	0.2	25.2
7	0.009	0.31	1.93	0.18	5	3	15	0.2	23.2
8	0.015	0.53	1.88	0.3	6.5	4	15.3	0.2	26.0
9	0.02	0.42	2.70	0.4	7	4	18.0	0.2	29.2
10	0.06	0.17	1.21	0.12	3	0.9	6	0.2	10.1
11	0.025	1.0	5.13	0.5	8	8	30	0.2	46.2
12	0.013	0.52	2.80	-	7.5	4.0	18	-	29.5
13	0.02	0.42	3.92	-	5.0	4.5	19.3	-	28.8
14	0.015	0.52	3.92	-	6.5	5.8	18.7	-	31.0
15	0.02	0.52	2.08	-	5.0	5.7	18.8	-	29.5

聚 合 物 1-15 分 别 为 : PEG5k-P(DTC4.4k-TMC19.8k)-SP 、 Mal-PEG6k-P(DTC4.8k-TMC19.2)-SP、AA-PEG6.5k-P(DTC4.6k-TMC18.6k)-SP、Alkynyl-PEG5k-P(DTC5.8k-TMC23k)-SP 、 Azide-PEG3k-P(DTC4k-TMC12k)-SP 、 NHS-PEG7k-P(DTC3k-TMC15k)-SP 、 PEG5k-P(DTC3k-TMC15k)-SP 、 Azide-PEG6.5k-P(DTC4.0k-LA15.3)-SP 、 PEG7k-P(DTC4k-LA18k)-SP 、 PEG3k-P(DTC0.9k-TMC6k)-SP 、 PEG8k-P(DTC8k-LA30k)-SP 、 NHS-PEG7.5k-P(DTC4k-LA18k) 、 AA-PEG5k-P(DTC4.5k-TMC19.3k) 、 Azide-PEG6.5k-P(DTC5.8k-TMC18.7k) 、 Mal-PEG5k-P(DTC5.7k-LA18.8k)。

实施例六 制备交联聚合物囊泡 PEG5k-P(DTC4.6k-TMC13.5k)-SP

溶剂置换法制备。室温下向 950 μ L 的 HEPES (5 mM, pH 6.8) 缓冲液中加入 50 μ L 浓度为 5 mg/ml 的 PEG5k-P(DTC4.6k-TMC13.5k)-SP 的 DMSO 溶液, 室温静置 1h, 缓慢转动混合液, 使之分散均匀后, (不) 加入相当于 DTC 摩尔量 10%-30% 的 DTT 溶液 (最终 0.1 mM) 后在 37°C 摇床中震荡 12h 充分 (自) 交联。然后透析 (MWCO: 3500) 12h 除去有机溶剂和游离蛋白, 期间换 5 次介质, 由此得到可逆核交联囊泡, 简称为 RCCPs。

实施例七 靶向聚合物的合成和靶向聚合物囊泡的制备

炔功能化的 Alkynyl-PEG5k-OH 引发 DTC 与 LA 开环聚合、端羟基活化、与精胺反应得到末端为活性炔基的 Alkynyl-PEG5k-P(DTC5.8k-LA23k)-SP; 最后, 与叠氮功能化的靶向分子, 如多肽 cNGQ-N3 或半乳糖 Gal-N3, 通过叠氮-炔基的点击化学反应得到靶向聚合物 Gal-PEG5k-P(DTC5.8k-LA23k)-SP。然后靶向囊泡的制备即是在 Gal-PEG5k-P(DTC5.8k-LA23k)-SP 和

PEG5k-P(DTC5.8k-LA23k)-SP 混合在 DMSO 中后打入 HEPES 溶液中，同实施例六制备得到 Gal-RCCPs。

叠氮功能化的 Azide-PEG3k-OH 引发 DTC 与 TMC 开环聚合、端羟基活化、与精胺反应得到末端为活性叠氮基的 Azide-PEG3k-P(DTC4k-TMC12k)-SP，最后，与炔基功能化的靶向分子，如 alk-CC9 或是 cRGD-alk，通过叠氮-炔基的点击化学得到靶向聚合物 CC9-PEG3k-P(DTC4k-TMC12k)-SP。然后靶向囊泡的制备即是把 CC9-PEG3k-P(DTC4k-TMC12k)-SP 和 PEG3k-P(DTC4k-TMC12k)-SP 混合在 DMSO 中后打入 HEPES 溶液中，同实施例六制备得到 CC9-RCCPs。

叠氮或炔基功能化的聚合物为无末端精胺的二嵌段聚合物，即 Alkynyl-PEG5k-P(DTC5.8k-LA23k)和 Azide-PEG3k-P(DTC4k-TMC12k)，其键合 cNGQ 等多肽的方式和制备靶向囊泡（和无靶向的三嵌段聚合物混合）的方式与上述例子类似。

马来酰亚胺 Mal 功能化的 Mal-PEG6k-OH 或者丙烯酸酯功能化的 AA-PEG6.5k-OH 引发 DTC 与 TMC 开环聚合、端羟基活化、与精胺反应得到聚合物 Mal-PEG6k-P(DTC4.8k-TMC19.2k)-SP 或 AA-PEG6.5k-P(DTC4.6k-TMC18.6k)-SP。然后，他们和相应的无活性端的聚合物 PEG5k-P(DTC4.6k-TMC18.6k)-SP 混合溶于 DMSO 中后，打入 HEPES 溶液中，同实施例六制备得到交联囊泡。最后，在囊泡溶液中加入含有自由巯基的靶向分子如多肽 cNGQ-SH 或叶酸 FA-SH 或 CPP33-SH，通过迈克尔加成反应和表面有活性 Mal 或 AA 的囊泡键合，得到靶向聚合物囊泡 CPP33-RCCPs、FA-RCCP 等。

马来酰亚胺 Mal 和丙烯酸酯功能化的嵌段聚合物为无末端精胺的二嵌段聚合物，即 Mal-PEG6k-P(DTC3.2k-TMC15.4k) 和 AA-PEG5k-P(DTC4.5k-TMC19.3k)，其和末端有精胺的三嵌段聚合物混合制备囊泡、键合 cNGQ 等多肽的方式和制备靶向囊泡的方式与上述例子类似。

实施例八 制备靶向自交联聚合物囊泡 DP8-RCCPs

溶剂置换法制备。靶向聚合物囊泡通过几种方式制备。第一种基于三嵌段聚合物和靶向二嵌段聚合物。例如，实施例三制备的 DP₈-PEG6.5k-P(DTC6k-TMC15k)和 PEG5k-P(DTC4.6k-TMC13.5k)-SP 按特定比例混合，溶于 DMSO 中，加入到 HEPES（5 mM，pH 6.8）缓冲液中，同实施例六静

置、交联、透析，得到靶向交联囊泡，标记为 DP8-RCCPs。靶向聚合物 DP₈-PEG6.5k-b-P(DTC6k-TMC15k)的含量为 5~40wt.%。DLS 测定制备的自交联聚合物囊泡尺寸为 80-125nm 左右，粒径分布为 0.11-0.16。图 2 是上述自交联囊泡粒径分布及稳定性的测试 (A) 及电子透射显微镜图片 (B)，交联囊泡及还原响应性测试 (C)；得到的自交联囊泡的尺寸由动态光散射粒度分析仪 (DLS) 测的形成的纳米粒囊泡为 80~125nm,粒径分布很窄，且高倍稀释后仍然保持不变的粒径和粒径分布 (图 2A)；由图 2B 可知，TEM 测得的纳米粒子为中空的结构；但在模拟肿瘤细胞还原环境下快速释放，解交联 (图 2C)。由此可知，得到的囊泡可自交联，并具有还原敏感的解交联的性质。

实施例九 制备靶向自交联聚合物囊泡 cRGD-RCCPs

基于两种三嵌段聚合物制备靶向聚合物囊泡。例如，按特定比例混合的两种 PEG5k-P(DTC4.6k-TMC13.5k)-SP 和 cRGD-PEG6.5k-P(DTC6k-TMC15k)-SP 溶于 DMSO 中，加入到 HEPES (5 mM, pH 6.8) 缓冲液中，同实施例六静置、加入相当于 DTC 摩尔量 10%-30% 的 DTT 溶液 (最终 0.1 mM)，透析，得到靶向交联囊泡，标记为 cRGD-RCCPs。取决于不同靶向聚合物的比例和聚合物的溶解时间，得到的囊泡平均粒径为 50-125nm 左右，粒径分布为 0.04-0.17。具有囊泡的特征，体外稳定、具有还原敏感性。

实施例十 制备靶向自交联聚合物囊泡 FA-RCCPs

基于三嵌段聚合物和有活性基团的二或三嵌段聚合物，例如，实施例二的 Mal-PEG6k-P(DTC4.8k-TMC15.2k)-SP 和 PEG5k-P(DTC4.6k-TMC13.5k)-SP 按特定比例混合溶于 DMSO，加入到 HEPES (5 mM, pH 6.8) 缓冲液中，同实施例六静置、交联、透析，得到交联囊泡。然后，通过迈克尔加成与含有自由巯基的靶向分子如叶酸 FA-SH 在室温反应后得到靶向交联囊泡，标记为 FA-RCCPs。取决于不同靶向聚合物的比例和聚合物的溶解时间，得到的囊泡平均粒径为 58-130nm，粒径分布为 0.06-0.17。囊泡体外稳定、具有还原敏感性。

实施例十一 制备装载蛋白质或 DNA 的交联囊泡和靶向交联囊泡

载蛋白质如细胞色素 C、颗粒酶 B 和 DNA 的交联囊泡的制备同实施例七，只是 HEPES 溶液中预先溶解有不同浓度的蛋白质或 DNA。例如载不同比例 (2-30wt.%) 的 FITC 标记的细胞色素 C (FITC-CC) 的交联聚合物囊泡的粒径在 90-108 nm，粒径分布在 0.13-0.19。得到的囊泡的为 FITC-CC-DP8-RCCPs。其荧光分光光度计测定 FITC-CC 的包裹效率为 50%-100%。

颗粒酶 B (GrB) 和 DNA 的装载相同。载药靶向囊泡制备同实施例八、九、十, 只是 HEPES 溶液中预先溶解有不同浓度的蛋白质或 DNA, 得到 GrB-DP8-RCCPs 和 DNA-DP8-RCCPs。

体外释放采用透析法。以 FITC-CC 的体外释放为例说明, 在 37°C 恒温摇床中震荡(200rpm) 进行, 每组各有三个平行样。第一组, 载 FITC-CC 的交联聚合物囊泡加入 10mM DTT 的还原环境 PB (10Mm, pH 7.4)中; 第二组, 载 FITC-CC 的聚合物囊泡在 PB(10Mm, Ph7.4)中; 载药交联囊泡的浓度为 50mg/L, 取 0.5 ml 放入透析袋中 (MWCO: 350kDa) 中, 每个试管中加入相应的透析介质 25ml, 在预定时间取 5.0ml 透析袋外介质用作测试, 补加 5.0ml 新鲜介质。荧光光谱仪测定溶液中药物浓度。附图 3A 为 FITC-CC 的累积释放量与时间的关系, 可以看出, 加入模拟细胞内 DTT 后, 其释放明显要快于没加 DTT 的样本, 说明载药交联囊泡在 10 mM 的 DTT 的存在下, 能有效释放药物。

实施例十二 制备装载 DNA 的交联囊泡和靶向交联囊泡

通过溶剂交换法可制备包裹 DNA 的 DNA-RCCPs。DNA 为 pcDEF3-CD8IL-36γ (pIL-36γ), pcDEF3-CD8IL-12 (pIL-12) 或小牛胸腺 DNA 等。例如 PEG5k-P(DTC3.0k-TMC15k)-SP 制备 DNA-RCCPs 具体操作为下, 100 μL PEG5k-P(DTC3.0k-TMC15k)-SP 的 DMSO 溶液(5.0 mg/mL) 缓慢打入 900 μL 溶解了预定数量的 DNA (1 mg/mL)的 HEPES (10 mM, pH 6.8)的混合溶液中, 室温放置过夜, 透析、加入催化量还原剂二硫苏糖醇 (DTT) 交联得到 DNA-RCCPs。DLS 结果显示, DNA-RCCPs 粒径随着 DNA 含量的增加而增大, 见表 2。以后体内试验用含量为 20wt%DNA 的样品。

表 2 DNA-cNGQ/RCCPs 的粒径与 DNA 含量的关系

DNA/Polymer(wt.%)	0	10	20	30	40	50
Size ^a (nm)	96	118	127	141	167	173
PDI ^b	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.3

实施例十三 装载 DNA 的交联靶向囊泡 DNA-cNGQ-RCCPs 的凝胶电泳分析

同实施例十二制备 DNA-cNGQ/RCCPs。按照重量比 4:1 混合 PEG5k-P(DTC4.4k-TMC19.8k)-SP 和 cNGQ-PEG7k-P(DTC4.8k-TMC19.2k)。DNA 采用了 pcDEF3-CD8IL-36γ (pIL-36γ) 和 pcDEF3-CD8IL-12 (pIL-12)。在 70 mL 四溴乙烷(TBE)缓冲溶液中加入 0.7 g 琼脂糖, 加热溶解琼脂糖粉末, 在冷却后加入 1 μL 溴化乙锭, 得到琼脂糖胶待用。DNA-cNGQ-RCCPs 或

DNA-RCCPs 在 DNA 和聚合物的重量百分比(*wt. %*)分别设定为 10%、20%、30%、40%、50%。在胶中分别加入 20 μ L 的 DNA-cNGQ-RCCPs、DNA-RCCPs、自由 DNA, 在 TBE 电泳缓冲液中跑胶(100 V, 30 min)。之后, 由 Molecular Imager FX(Bio-Rad, Hercules, Ex/Em: 532/605 nm)拍照凝胶图片, 通过 Quantity One 软件(Bio-Rad)分析。琼脂糖凝胶阻留实验结果表明, 即使当 DNA 含量达 50 *wt. %*, cNGQ-RCCPs 仍可完全紧实包裹 DNA, 证明 DNA-cNGQ-RCCPs 稳定性优异。结果显示囊泡可有效复合 DNA (pIL-12)。

实施例十四 制备载 siRNA 的交联囊泡和靶向交联囊泡 siRNA-RCCPs

装载 siRNA 的交联囊泡通过溶剂交换法制备。例如, 装载无特异性的对照 siRNA(siScramble) 得到 siRNA-RCCPs 的方法。预定数量 siRNA 的 HEPES 缓冲溶液(1 mg/mL, 10 mM, pH 7.4)和 100 μ L PEG5k-P(DTC4.4k-TMC19.8k)-SP 的 DMSO 溶液(5.0 mg/mL)混合, 再打入 900 μ L 的 HEPES (10 mM, pH 6.8), 室温放置过夜、HEPES 中透析、孵育 4 h 交联得到 siRNA-RCCPs。DLS 结果显示包裹 10 *wt %* siRNA 时, 粒径为 100 纳米左右, 且 TEM 证实了其中空结构。表 3 为 siRNA-cNGQ/RCCPs 的粒径与 siRNA 含量的关系; 随着 siRNA 含量从 0 增加到 50 *wt. %*, siRNA-cNGQ/RCCPs 的粒径也由 109 增长到 175 nm。以后的细胞实验和体内试验如无特殊说明均实验在 siRNA 为 10*wt %* 的样品。

表 3 siRNA-cNGQ/RCCPs 的粒径与 siScramble 含量的关系

	siRNA/Polymer(<i>wt. %</i>)	0	10	20	30	40	50
RCCPs	Size ^a (nm)	107	113	118	126	146	161
	PDI ^b	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.3
cNGQ/RCCPs	Size ^a (nm)	101	109	126	142	160	175
	PDI ^b	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.3

装载荧光标记 Cy5-siRNA 或荧光素酶基因标记 siGL3 或治疗性 siPLK1 的囊泡与此类似。装载不同量 siRNA (10%- 80%) 时, 粒径为 90-180 纳米。

实施例十五 siScramble-cNGQ/RCCPs 的凝胶电泳分析

如实施例十四制备 siScramble-cNGQ/RCCPs, 如实施例十三制备凝胶并跑胶, siRNA-cNGQ/RCCPs 或 siRNA-RCCPs 在 siRNA 和聚合物的重量百分比(*wt. %*)分别设定为 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%和 80%。在胶中分别加入 20 μ L 的 siRNA-cNGQ/RCCPs、siRNA-RCCPs、自由 siRNA, 以及用 10 mM GSH 处理 20 h 后的 siRNA-cNGQ/RCCPs。实验结果表明, 即使当 siRNA

含量高达 80 wt.%, cNGQ/RCCPs 仍可以完全、紧实包裹 siRNA, 证明 siRNA-cNGQ/RCCPs 稳定性优异。然而, 当它在 10 mM GSH 存在下孵育 20 h 后发现, 由于交联囊泡的解交联及溶胀大部分 siRNA 释放出来。

实施例十六 制备载培美曲塞的交联囊泡和靶向交联囊泡 PEM-RCCPs

装载生理环境带负电的小分子药物如培美曲塞的交联囊泡通过溶剂交换法制备, 与实施例十一中蛋白质的包载类似。将 100 μ L 的聚合物 PEG5k-P(DTC4.4k-TMC19.8k)-SP 的 DMSO 溶液(5.0 mg/mL)打入 900 μ L 的含预定数量的培美曲塞的 HEPES 缓冲溶液(1 mg/mL, 10 mM, pH 6.6), 室温放置过夜、HEPES 中透析、孵育 4 h 交联得到 PEM-RCCPs。载 20 wt% 培美曲塞的交联聚合物囊泡的粒径在 90 nm, 粒径分布在 0.14.得到的囊泡的为 PEM-RCCPs。其紫外分光光度计测定 PEM 的包裹效率为 89%。

实施例十七 MTT 法测囊泡对乳腺癌细胞 MCF-7 的毒性

MTT 法使用人乳腺癌细胞 (MCF-7), 计算细胞存活率。图 3B 中结果显示, 当交联聚合物囊泡的浓度从 0.1 增到 0.5 mg/mL 时, MCF-7 的存活率仍高于 85%, 说明该交联聚合物囊泡具有良好的生物相容性。

另外制备了表面具有不同靶向分子的交联囊泡, 例如, 同上 MTT 法研究了 FA 体系对卵巢癌 SKOV-3 细胞、人口腔表皮样癌细胞 KB 细胞的作用, cNGQ 体系对肺癌 A549 细胞, Gal 体系对肝癌细胞 HepG2, 和 cRGD 体系对黑色素瘤 B16 细胞的细胞毒性, 结果也说明了这些空交联靶向囊泡具有良好的生物相容性。

实施例十八 MTT 法测载 GrB 的靶向交联囊泡对乳腺癌细胞 MCF-7 的毒性

测试对象为实施例十一 GrB-DP8-RCCPs, 由图 4A、B 中结果可知, 载 GrB 的含 30%DP₈ 靶向交联聚合物囊泡对 MCF-7 细胞的半致死浓度 (IC₅₀) 为 0.188 μ g/mL, 远低于无靶向囊泡的半致死浓度, 说明本发明的囊泡能很好的将药物传送到细胞内, 并有效的释放, 最终杀死癌细胞, 而靶向纳米粒的效果要更好, 而封端的细胞存活率均在 70%以上。另外, 载药交联囊泡对细胞表面核仁素表达低的 HepG2 肝癌细胞的毒性较差, 由图 4C 中结果显示, 核仁素在 MCF-7 细胞表面的特殊表达以及 DP8 的很好的靶向性。

制备了表面具有不同靶向分子的交联囊泡、装载培美曲塞、甲氨蝶呤、细胞色素 C、或是凋亡素等, 用 MTT 法研究 FA 体系对卵巢癌 SKOV-3 细胞、人口腔表皮样癌细胞 KB 细胞的作用, cNGQ 体系对肺癌 A549 细胞, Gal 体系对

肝癌细胞 HepG2, 和 cRGD 体系对黑色素瘤 B16 细胞的细胞毒性, 均体现了靶向的特异性, 载药的靶向聚合物囊泡能更快的进入细胞并发挥效果。

实施例十九 靶向载药囊泡的内吞和细胞内释放实验

以载药囊泡 FITC-CC-DP8-RCCPs 为例、采用激光共聚焦显微镜 (CLSM) 跟踪测定。将 450 μ L 的 MCF-7 细胞和 HepG2 细胞的 DMEM(含 10%牛血清、100IU/ml 青霉素及 100 μ g/ml 链霉素)悬浮液铺于 24 孔培养板 (每孔 5×10^4 个细胞) 中, 37 $^{\circ}$ C、5%二氧化碳条件下培养 24h。将 50 μ L 的 FITC-CC-RCCPs 和 FITC-CC-DP8-RCCPs 的 PBS 溶液加入孔中 (FITC 终浓度为 10 μ g/ml), 继续孵育 4h、8h、12h 后, 移去培养基并用 PBS 洗三次、用 4%的多聚甲醛溶液 200 μ L 固定 15min、PBS 洗 3 次; CLSM (TCS SP5) 观察拍照。由图 5 左图结果表明 FITC-CC-DP8-RCCPs (A8h、B12h)相对于无靶向 FITC-CC-RCCPs (C 12h)可以通过介导作用更有效内吞进入 MCF-7 细胞且 FITC-CC 在细胞内可以快速释放, 引起有效细胞凋亡, 而对 HepG2 细胞基本上没有靶向效果 (D)。

制备了表面具有不同靶向分子的载药交联囊泡、利用 CLSM 实验研究 FA 体系对卵巢癌 SKOV-3 细胞、人口腔表皮样癌细胞 KB 细胞的作用, cNGQ 体系对肺癌 A549 细胞, Gal 体系对肝癌细胞 HepG2, 和 cRGD 体系对黑色素瘤 B16 细胞的细胞内吞和细胞内释放行为, 结果均表明靶向聚合物囊泡能更快、更有效地被靶细胞内吞并快速释放药物。

实施例二十 囊泡的血液循环、在荷 MCF-7 小鼠的体内分布、活体成像

所有动物实验操作符合苏州大学动物实验中心规定严格进行。实验选用体重为 18~20 克左右、4~6 周龄的 Balb/C 裸鼠。首先用 Cy5-NHS 和 CC 通过酰胺化反应制备 Cy5 标记的蛋白 Cy5-CC。囊泡 Cy5-CC-DP8-RCCPs (130 纳米, 粒径分布为 0.17) 和无靶向 Cy5-CC-RCCPs 尾静脉注射小鼠体内 (Cy5 浓度为 4 μ M), 在 0、0.25、0.5、1、2、4、8、12 和 24 小时定点取血约 10 μ L, 通过差量法准确计算血液重量, 再加 100 μ L、浓度为 1%的曲拉通和 500 μ L 二甲亚砜萃取 (其中含有 20 mM 的 DTT); 然后离心 (20000 转/分钟, 20 分钟) 取上层清液, 通过荧光光谱仪测得每个时间点 Cy5 的量。由计算可知, 靶向交联囊泡、非靶向交联囊泡在小鼠体内的消除半衰期分别为 4.36 和 3.33 小时, 所以本发明的交联囊泡在小鼠体内稳定, 有较长循环时间, 如图 5 右图所示。

研究了几个具有代表性的样品在小鼠体内的循环时间, 结果表明, 载药的 PEG8k-P(DTC8k-LA30k)-SP 交联囊泡、PEG7k-P(DTC4k-LA18k)-SP 交联囊泡

和 PEG3k-P(DTC0.9k-TMC6k)-SP 交联囊泡中药物在小鼠体内的血液循环时间分别为 7.56 小时、6.51 小时和 2.18 小时。在皮下注射 1×10^7 个 MCF-7 细胞，大约 3~4 周后，肿瘤大小为 $100 \sim 200 \text{ mm}^3$ 时开始实验。将 Cy5-CC-DP8-RCCPs、自由蛋白 Cy5-CC 和非靶向 Cy5-CC-RCCPs 尾静脉注射小鼠体内 (Cy5-CC: $0.25 \text{ mg equiv./kg}$)，8 小时后处死老鼠，将肿瘤及心，肝，脾，肺和肾组织取出，清洗称重后加入 $500 \mu\text{L}$ 1% 的曲拉通通过匀浆机磨碎，再加入 $900 \mu\text{L}$ 二甲亚砜萃取 (其中含 20 mM 的 DTT)。离心 (20000 转/分钟 ， 20 分钟) 取上清液，荧光光谱仪测每个时间点 Cy5-CC 的量。由图 6 可知，Cy5-CC-DP8-RCCPs 和 Cy5-CC-RCCPs 注射 8 小时在肿瘤积累的 Cy5-CC 量分别为 9.5 和 $5.4 \text{ ID\%/g}$ ，差 1.76 倍，说明 Cy5-CC-DP8-RCCPs 通过主动靶向在肿瘤积累较多。

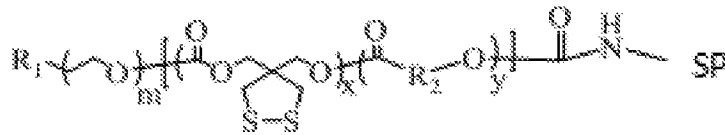
Cy5-CC-RCCPs 和 Cy5-CC-DP8-RCCPs 尾静脉注射小鼠体内，在时间点 4、8、12、24 小时用小动物活体成像仪来追踪囊泡的去向。结果由图 7 可知，Cy5-CC-DP8-RCCPs 在肿瘤部位很快积累，且在 24 小时后荧光仍然很强。说明 Cy5-CC-DP8-RCCPs 能主动靶向富集到乳腺癌部位，对乳腺癌细胞具有极强的特异性；载药 Cy5-CC-RCCPs 交联囊泡在进入肿瘤后很快代谢，荧光强度低。

实施例二十一 PEM-CC9-RCCPs 在荷 H460 小鼠中的抑瘤效果、体重变化和存活率

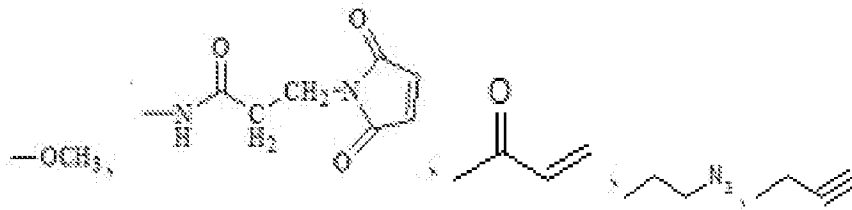
动物选择同实施例二十，在皮下注射 1×10^7 个 H460 人肺癌细胞，大约 3~4 周后，肿瘤大小为 $100 \sim 200 \text{ mm}^3$ 时开始实验。PEM-CC9-RCCPs、PEM-RCCPs、临床注射液 Alimta 以及 PBS 在 0、4、8 和 12 天通过尾静脉注射小鼠体内 (PEM: 12.5 mg/kg ; Alimta: 25 mg/kg)。在 0~18 天，每两天称量小鼠的体重，游标卡尺测量肿瘤体积，肿瘤体积计算方法为： $V = (L \times W \times H) / 2$ ，(其中 L 为肿瘤的长度，W 为肿瘤的宽度，H 为肿瘤的厚度)。持续观察小鼠的生存到 60 天。由图 8 (其中 A 治疗期间各组肿瘤生长曲线，B 为治疗后各组肿瘤图，C 为体重变化曲线) 中可知，PEM-CC₉-RCCPs 治疗组 20 天时，肿瘤得到明显抑制，而载药 PEM-RCCPs 组肿瘤有一定的增长。相比之下，PEM-CPP-RCCPs 和 PEM-RCCPs 组的小鼠体重几乎没有改变，说明载药交联囊泡对小鼠没有毒副作用。PEM-CC₉-RCCPs 治疗组在 60 天后全部存活，PEM-RCCPs 组、Alimta 组、PBS 组分别在 42 天、38 天、30 天全部死亡。因此，本发明的靶向交联囊泡载药后可有效抑制肿瘤的增长，对小鼠没有毒副作用，还可以延长荷瘤老鼠的生存时间。采用类似的实验方法研究了多种不同载药 (凋亡蛋白、植物毒素蛋白、甲氨蝶呤、治疗性 DNA 和 siRNA) 的交联囊泡和靶向交联囊泡对荷瘤小鼠的影响，结果表明均可有效抑制肿瘤增长，对小鼠没有毒副作用，还可以延长荷瘤老鼠的生存时间。

1. 一种内膜具有正电的可逆交联生物可降解聚合物囊泡，由聚合物自组装后交联得到；所述聚合物的分子链包括依次连接的亲水链段、疏水链段以及精胺分子；所述疏水链段包括聚碳酸酯链段和/或聚酯链段；所述亲水链段的分子量为 2000-8000Da；疏水链段的分子量为亲水链段分子量的 2.3-8.4 倍。

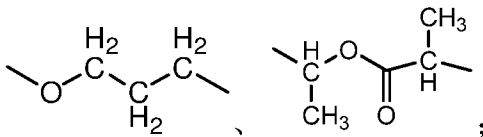
2. 根据权利要求 1 所述内膜具有正电的可逆交联生物可降解聚合物囊泡，其特征在于：所述聚合物的化学结构式如下：



其中， R_1 选自以下基团中的一种：



R_2 选自以下基团中的一种：



所述聚合物中，PEG 的分子量为 2000-8000Da；PTMC 或 PLA 的总分子量为 PEG 分子量的 2-6 倍；PDTC 的总分子量为 PTMC 或 PLA 总分子量的 15%-40%。

3. 根据权利要求 2 所述内膜具有正电的可逆交联生物可降解聚合物囊泡，其特征在于：PEG 的分子量为 4000-8000Da；PTMC 或 PLA 的总分子量为 PEG 分子量的 2.5-5 倍；PDTC 的总分子量为 PTMC 或 PLA 总分子量的 18%-38%。

4. 权利要求 1-3 所述任意一项内膜具有正电的可逆交联生物可降解聚合物囊泡的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：

(1) 将 PEG-P(TMC-DTC)或者 PEG-P(LA-DTC)的端羟基通过羟基活化剂活化，再与精胺反应制得 PEG-P(TMC-DTC)-SP 或者 PEG-P(LA-DTC)-SP；

(2) 在 PEG-P(TMC-DTC)-SP 或者 PEG-P(LA-DTC)-SP 的 PEG 端偶联肿瘤特异性靶向分子，得到靶向 PEG-P(TMC-DTC)-SP 或者靶向 PEG-P(LA-DTC)-SP；

(3) 以 PEG-P(TMC-DTC)-SP、PEG-P(LA-DTC)-SP、靶向

PEG-P(TMC-DTC)-SP、靶向 PEG-P(LA-DTC)-SP 中的一种或几种为原料，通过溶剂置换法制备内膜具有正电的可逆交联生物可降解聚合物囊泡。

5. 根据权利要求 4 所述内膜具有正电的可逆交联生物可降解聚合物囊泡的制备方法，其特征在于，步骤（1）的活化在干燥的溶剂中反应，然后沉淀、过滤、真空干燥；与精胺反应后透析、沉淀、抽滤、真空干燥得到 PEG-P(TMC-DTC)-SP 或者 PEG-P(LA-DTC)-SP；步骤（2）为将步骤（1）的产物和溶于有机溶剂的靶向分子反应得到靶向 PEG-P(TMC-DTC)-SP 或者靶向 PEG-P(LA-DTC)-SP；步骤（3）为将原料溶液中加入非离子缓冲溶液中，室温放置后透析、交联，得到内膜具有正电的可逆交联生物可降解聚合物囊泡。

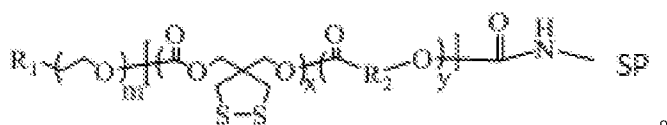
6. 一种抗肿瘤药物，由权利要求 1-3 所述任意一项内膜具有正电荷的可逆交联聚合物囊泡装载药物得到；所述药物为蛋白质、核酸或生理环境带负电的小分子药物。

7. 权利要求 6 所述抗肿瘤药物的制备方法，其特征在于，将囊泡原料溶液与药物、非离子缓冲液混合，室温放置，然后透析、孵育交联得到抗肿瘤药物。

8. 权利要求 1-3 所述任意一项内膜具有正电的可逆交联生物可降解聚合物囊泡作为药物载体的应用；所述药物为蛋白质、核酸或生理环境下带负电的小分子药物。

9. 权利要求 1-3 所述任意一项内膜具有正电的可逆交联生物可降解聚合物囊泡在制备抗肿瘤药物中的应用。

10. 一种聚合物，其特征在于，所述聚合物的化学结构式如下：



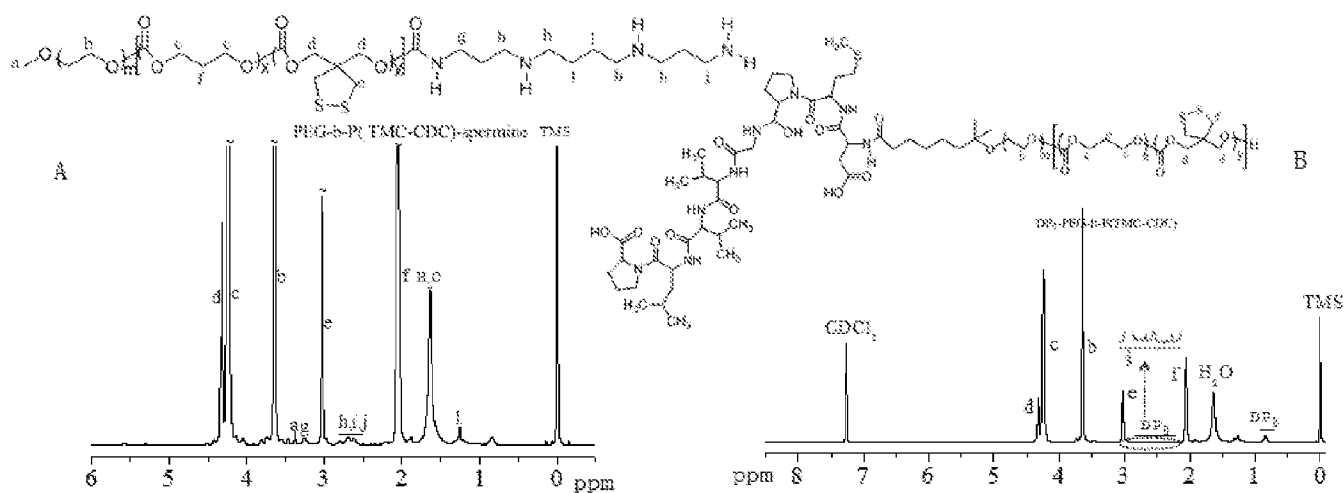


图 1

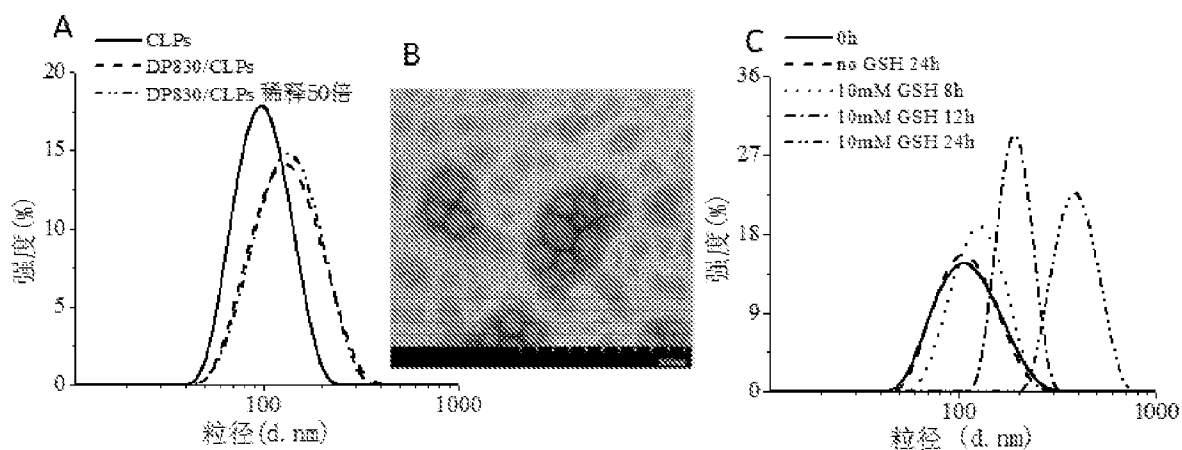


图 2

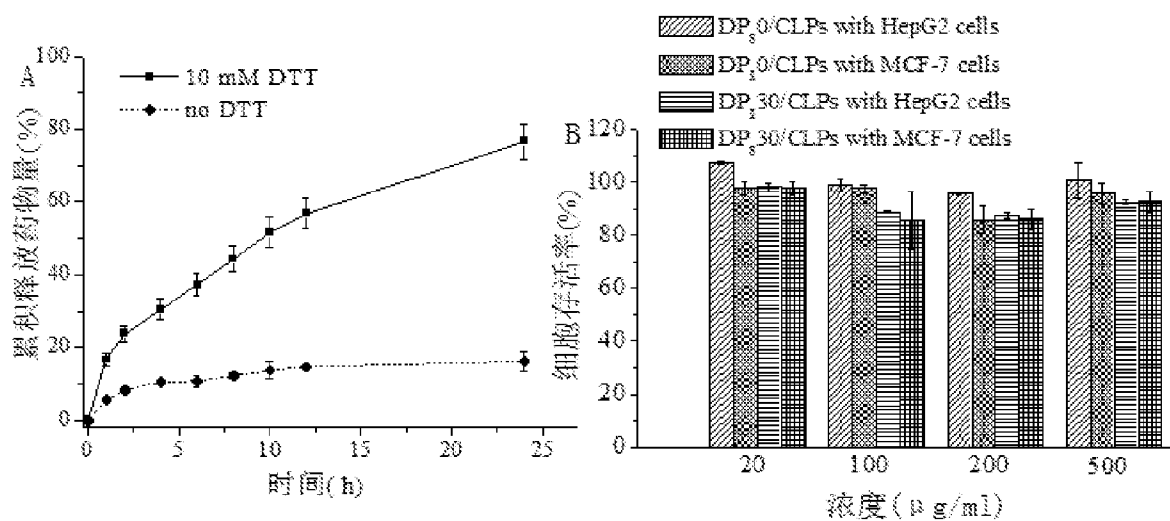


图 3

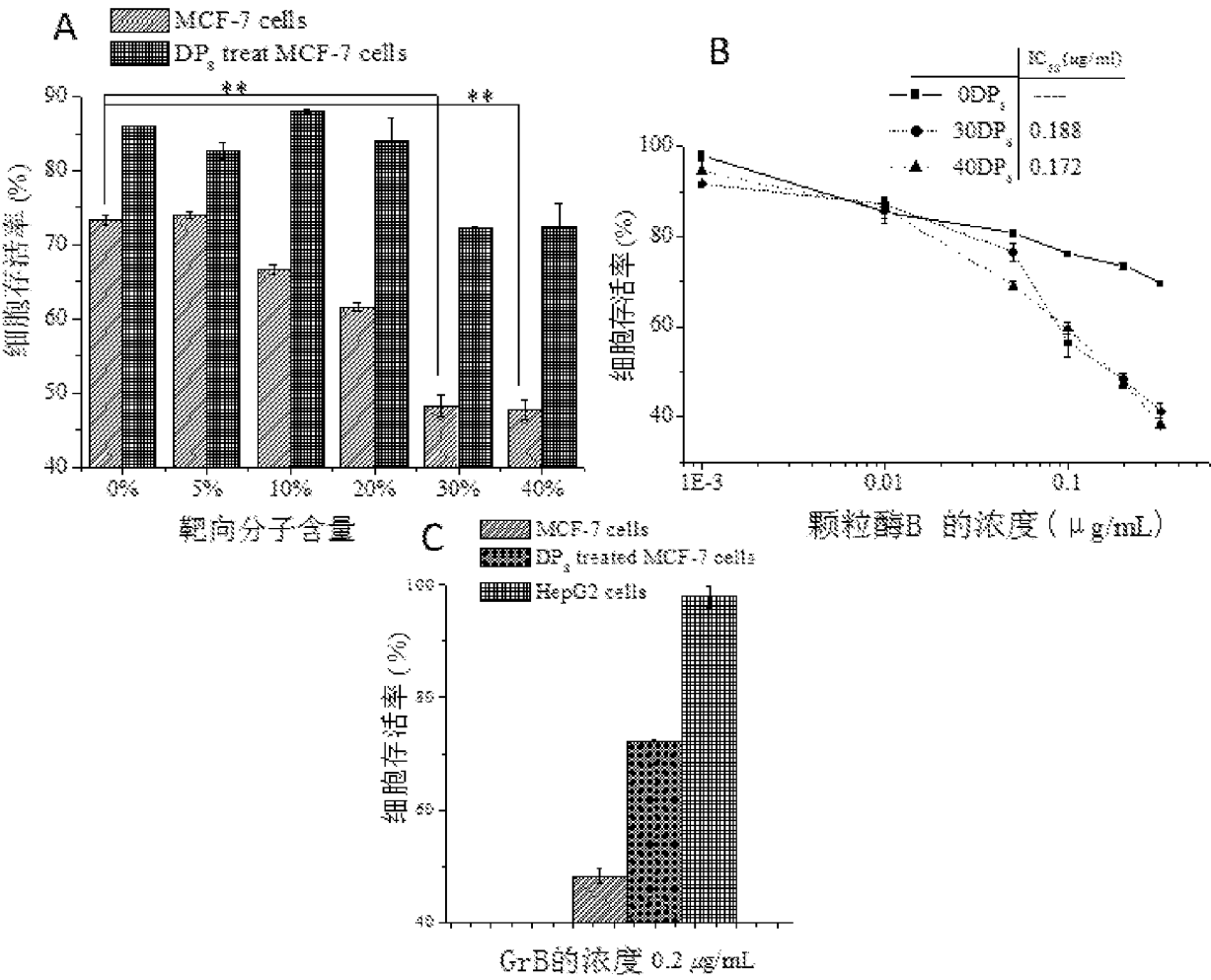


图 4

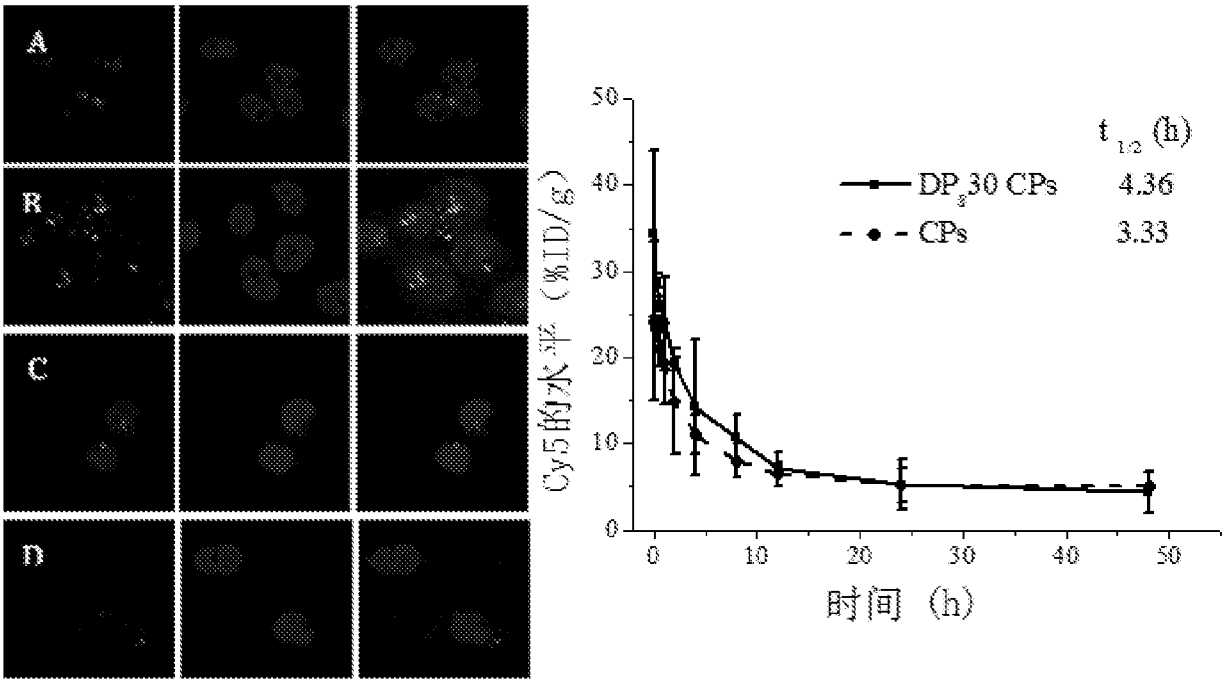


图 5

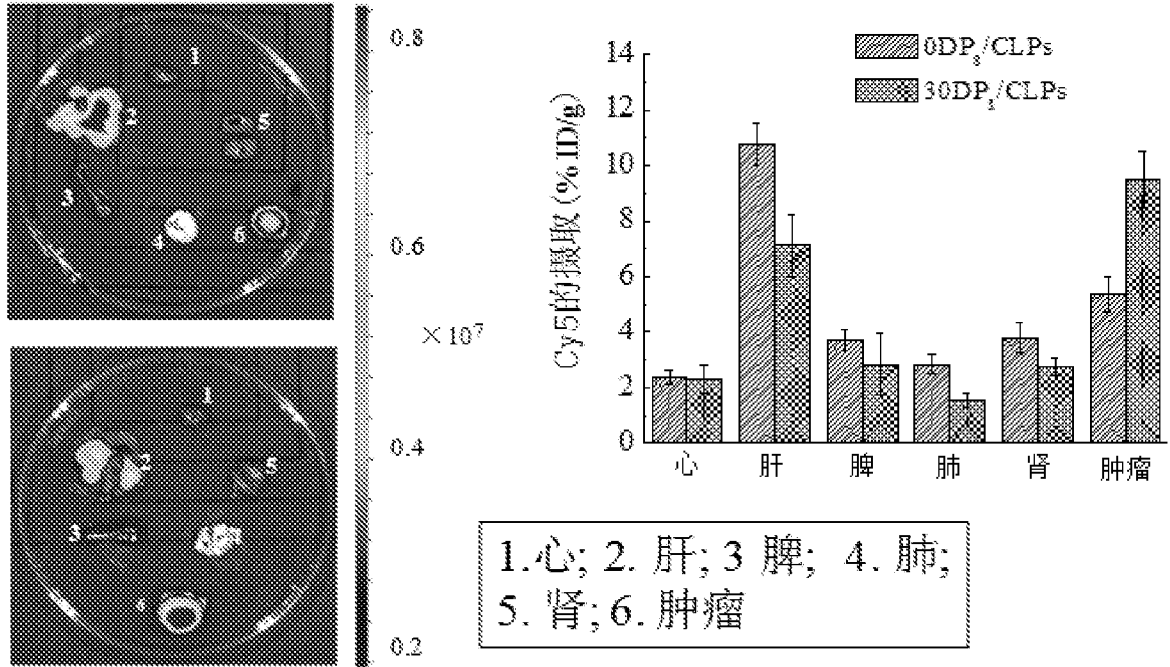


图 6

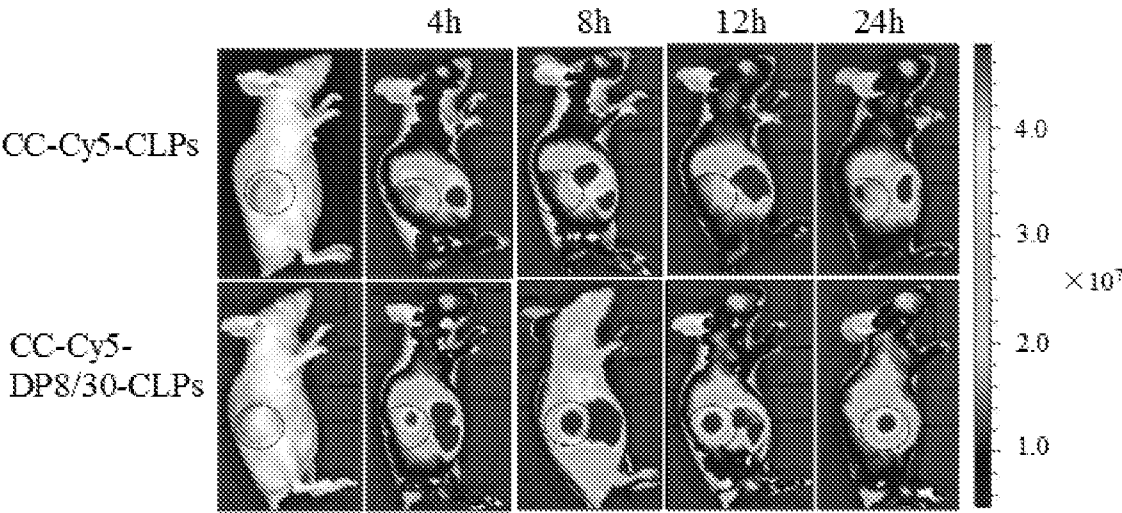


图 7

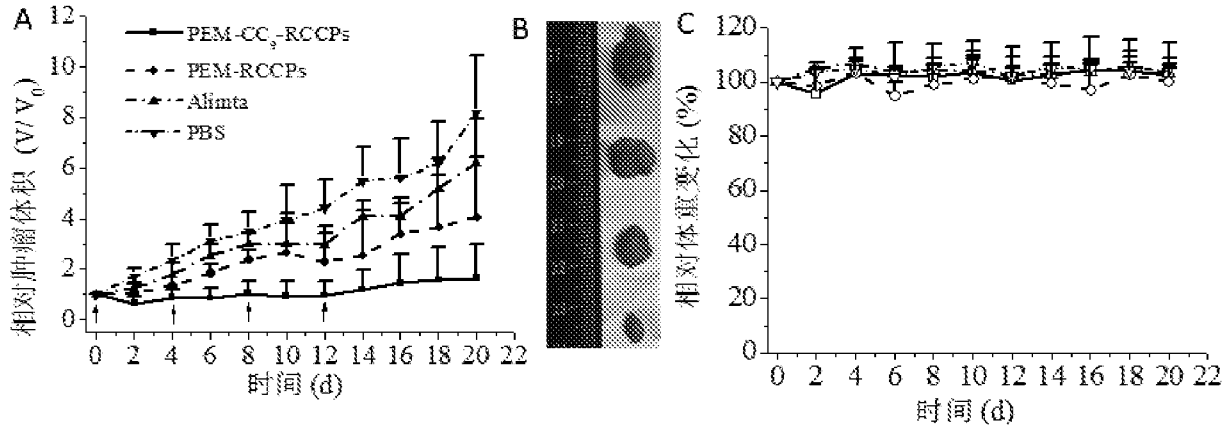


图 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/092424

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 9/127 (2006.01) i; A61K 47/34 (2017.01) i; A61K 45/00 (2006.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i; C08G 81/00 (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; C08G

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)

DWPI; SIPOABS; CNKI; CNABS; GOOGLE Scholar; ISI Web of Knowledge: soochow university, zhong zhiyuan, meng fenghua, PEG, PTMC, DTC, polymer, charged, capsule, Spermine, vesica, positive electricity

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 106137968 A (SOOCHOW UNIVERSITY) 23 November 2016 (23.11.2016) the whole document	1-10
Y	CN 105669964 A (SOOCHOW UNIVERSITY) 15 June 2016 (15.06.2016) the abstract, and claims 1-10	1-10
Y	CN 102786695 A (GUANGZHOU INSTITUTES OF BIOMEDICINE AND HEALTH, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 21 November 2012 (21.11.2012) the abstract, claims 1-7, and description, paragraphs [0035], [0036] and [0048]-[0051]	1-10
A	CN 101792516 A (SOOCHOW UNIVERSITY) 04 August 2010 (04.08.2010) the abstract, and claims 1-6	1-10
A	WO 2013138783 A1 (CALIFORNIA UNIVERSITY) 19 September 2013 (19.09.2013) the abstract, and claims 1-23	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents: “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date “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) “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		“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 “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 “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 “&” document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
25 September 2017	10 October 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 CUI, Chuanming Telephone No. (86-10) 62413775	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/092424

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 104031248 A (SOOCHOW UNIVERSITY) 10 September 2014 (10.09.2014) the abstract, and claims 1-5	1-10
A	CN 102657873 A (SOOCHOW UNIVERSITY) 12 September 2012 (12.09.2012) the abstract, and claims 1-7	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/092424

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 106137968 A	23 November 2016	None	
CN 105669964 A	15 June 2016	WO 2017148431 A1	08 September 2017
CN 102786695 A	21 November 2012	CN 102786695 B	23 April 2014
CN 101792516 A	04 August 2010	CN 101792516 B	23 May 2012
WO 2013138783 A1	19 September 2013	AU 2013231839 A1	30 October 2014
		US 2015071999 A1	12 March 2015
		JP 2015510896 A	13 April 2015
		CA 2907095 A1	19 September 2013
CN 104031248 A	10 September 2014	CN 104031248 B	07 September 2016
		AU 2015266506 B2	03 August 2017
		AU 2015266506 A1	22 December 2016
		JP 2017517622 A	29 June 2017
		WO 2015180656 A1	03 December 2015
		EP 3150651 A1	05 April 2017
		KR 20170012424 A	02 February 2017
		CN 105535983 A	04 May 2016
		CA 2950458 A1	03 December 2015
		US 2017190834 A1	06 July 2017
CN 102657873 A	12 September 2012	CN 102657873 B	14 May 2014

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/092424

A. 主题的分类

A61K 9/127(2006.01)i; A61K 47/34(2017.01)i; A61K 45/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; C08G 81/00(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; C08G

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))

DWPI; SIPOABS; CNKI; CNABS; GOOGLE Scholar; ISI Web of Knowledge:苏州大学, 钟志远, 孟凤华, 聚合物, 精胺, 囊泡, 正电, PEG, PTMC, DTC, polymer, charged, capsule, Spermine

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
PX	CN 106137968 A (苏州大学) 2016年 11月 23日 (2016 - 11 - 23) 全文	1-10
Y	CN 105669964 A (苏州大学) 2016年 6月 15日 (2016 - 06 - 15) 说明书摘要, 权利要求1-10	1-10
Y	CN 102786695 A (中国科学院广州生物医药与健康研究院) 2012年 11月 21日 (2012 - 11 - 21) 说明书摘要, 权利要求1-7, 说明书第35-36、48-51段	1-10
A	CN 101792516 A (苏州大学) 2010年 8月 4日 (2010 - 08 - 04) 说明书摘要, 权利要求1-6	1-10
A	WO 2013138783 A1 (UNIV CALIFORNIA) 2013年 9月 19日 (2013 - 09 - 19) 说明书摘要, 权利要求1-23	1-10
A	CN 104031248 A (苏州大学) 2014年 9月 10日 (2014 - 09 - 10) 说明书摘要, 权利要求1-5	1-10
A	CN 102657873 A (苏州大学) 2012年 9月 12日 (2012 - 09 - 12) 说明书摘要, 权利要求1-7	1-10

☐ 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 9月 25日

国际检索报告邮寄日期

2017年 10月 10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

崔传明

电话号码 (86-10)62413775

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/092424

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	106137968	A	2016年 11月 23日	无			
CN	105669964	A	2016年 6月 15日	WO	2017148431	A1	2017年 9月 8日
CN	102786695	A	2012年 11月 21日	CN	102786695	B	2014年 4月 23日
CN	101792516	A	2010年 8月 4日	CN	101792516	B	2012年 5月 23日
WO	2013138783	A1	2013年 9月 19日	AU	2013231839	A1	2014年 10月 30日
				US	2015071999	A1	2015年 3月 12日
				JP	2015510896	A	2015年 4月 13日
				CA	2907095	A1	2013年 9月 19日
CN	104031248	A	2014年 9月 10日	CN	104031248	B	2016年 9月 7日
				AU	2015266506	B2	2017年 8月 3日
				AU	2015266506	A1	2016年 12月 22日
				JP	2017517622	A	2017年 6月 29日
				WO	2015180656	A1	2015年 12月 3日
				EP	3150651	A1	2017年 4月 5日
				KR	20170012424	A	2017年 2月 2日
				CN	105535983	A	2016年 5月 4日
				CA	2950458	A1	2015年 12月 3日
				US	2017190834	A1	2017年 7月 6日
CN	102657873	A	2012年 9月 12日	CN	102657873	B	2014年 5月 14日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)