

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200580023278.X

[51] Int. Cl.

C08F 220/56 (2006.01)

C08F 293/00 (2006.01)

A61K 47/32 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

[45] 授权公告日 2010 年 1 月 20 日

[11] 授权公告号 CN 100582130C

[22] 申请日 2005.5.24

[21] 申请号 200580023278.X

[30] 优先权

[32] 2004.6.10 [33] US [31] 10/865,681

[86] 国际申请 PCT/SG2005/000164 2005.5.24

[87] 国际公布 WO2005/121196 英 2005.12.22

[85] 进入国家阶段日期 2007.1.10

[73] 专利权人 新加坡科技研究局

地址 新加坡新加坡城

[72] 发明人 杨义燕 库马列什·索皮马思

[56] 参考文献

US4675362 A 1987.6.23

US2004/0010080 A 2004.1.15

US5108568 A 1992.4.28

审查员 肖 刚

[74] 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

代理人 顾晋伟 刘继富

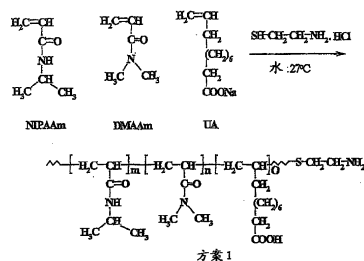
权利要求书 3 页 说明书 35 页 附图 31 页

[54] 发明名称

新的温度和 pH 敏感性共聚物

[57] 摘要

本发明涉及包含至少三类单体单元的共聚物，所述三类单体单元包含：温度敏感性单元；亲水单元和包含至少一个 pH 敏感性部分的疏水单元；其中所述疏水单体单元衍生自可共聚的不饱和脂肪酸。



聚合物	NIPAAm/ DMAAm/ UA (mol %)	CTA (mol %)	M_n, M_w (M_n/M_w)	T_g (°C)	NIPAAm/ DMAAm/ UA (mol %)	温度 (°C)	溶解性
聚合物 I	4.80:1.20:0.5	0.2	30804, 18185 (1.70)	133.0	4.17:1.00	8.0	437.8
聚合物 II	3.75:1.25:0.5	0.4	8903, 5209 (1.70)	134.4	3.82:1.25	9.68	438.8
聚合物 III	3.50:1.50:0.5	0.4	11092, 5374 (1.73)	135.1	3.13:1.50	8.80	437.8

¹ 由 GPC 确定；² 由 DSC 确定；³ 由 ¹H NMR 估计；⁴ 由酸碱滴定估计；⁵ 由 TGA 估计

1. 一种包含至少三类单体单元的共聚物，所述三类单体单元包含：
温度敏感性单体单元，
亲水单体单元，和
包含至少一个 pH 敏感性部分的疏水单体单元；
其中所述疏水单体单元衍生自可共聚的不饱和脂肪酸，
其中所述脂肪酸包含 5-50 个或更多的主链碳原子，其中所述脂肪酸是 ω -1 脂肪酸，其中双键位于与所述脂肪酸的羧基基团位置相反的所述脂肪酸的第一和第二碳原子之间。
2. 如权利要求 1 所述的共聚物，其中所述脂肪酸选自：4-戊烯酸、7-辛烯酸、10-十一碳烯酸、15-十六碳烯酸和 19-二十碳烯酸。
3. 如权利要求 1-2 中任一项所述的共聚物，其中所述温度敏感性单体单元衍生自 N-丙烯酰哌啶、N-叔丁基丙烯酰胺、N-哌啶基-甲基丙烯酰胺和 N-异丙基丙烯酰胺。
4. 如权利要求 1-2 中任一项所述的共聚物，其中所述亲水单体单元衍生自丙烯酸、丙烯酰胺、丙烯酸酯、吡咯烷酮、乙二醇及其取代的衍生物。
5. 如权利要求 4 所述的共聚物，其中所述丙烯酰胺及其取代衍生物选自：丙烯酰胺 (AAm)、N,N'-二甲基丙烯酰胺 (DMAAm) 和 N-(羟甲基)丙烯酰胺。
6. 如权利要求 1-2 中任一项所述的共聚物，还包含含有至少一个部分的端基，所述部分选自：末端部分、配体、药物、标记物、放射免疫偶联物和间隔物，其中所述末端部分由选自羟基、羧基、羰基和氨基官能团中的至少一个官能团组成。
7. 如权利要求 6 所述的共聚物，其中所述末端部分通过链转移剂或基团转移剂导入。
8. 如权利要求 6 所述的共聚物，其中所述末端部分通过活性聚合方法导入。
9. 如权利要求 6 所述的共聚物，其中所述末端部分是聚合物的单体单

元的一部分。

10. 如权利要求 7 所述的共聚物，其中所述链转移剂选自：氯仿、四氯化碳、烷基硫醇、氨基乙硫醇、巯基丙酸、巯基琥珀酸、巯基乙酸、巯基乙醇及其仲醇、卤代烷和氧化数小于 5 的磷酸盐。

11. 如权利要求 10 所述的共聚物，其中所述烷基硫醇选自：辛硫醇、癸硫醇、正十二硫醇或叔十二硫醇。

12. 如权利要求 6 所述的共聚物，其中所述配体直接连接至末端部分的官能团。

13. 如权利要求 6 所述的共聚物，其中所述配体通过间隔物连接至末端部分。

14. 如权利要求 13 所述的共聚物，其中所述间隔物包含超过 10 个主链原子。

15. 如权利要求 14 所述的共聚物，其中所述配体选自：小的靶向分子、蛋白质、肽和碳水化合物。

16. 如权利要求 15 所述的共聚物，其中所述间隔物包含聚（乙二醇）和聚（丙二醇）。

17. 如权利要求 1-2 中任一项所述的共聚物，其中所述共聚物是无规共聚物。

18. 如权利要求 1-2 中任一项所述的共聚物，其中所述共聚物是嵌段共聚物。

19. 一种温度和 pH 敏感性组合物，其包含：

治疗剂，和

如权利要求 1 所述的共聚物。

20. 如权利要求 19 所述的组合物，其中所述治疗剂选自：抗癌药物、抗炎药物和治疗神经疾病的药物。

21. 如权利要求 19 所述的组合物，其中所述抗癌药物选自：多柔比星、阿那曲唑、依西美坦、环磷酰胺、表柔比星、托瑞米芬、来曲唑、曲妥珠单抗、甲地孕酮、他莫昔芬、紫杉醇、多西他赛、卡培他滨、醋酸戈热瑞林、羟基脲、红霉素、环孢菌素和顺铂。

22. 如权利要求 19 所述的组合物, 其中所述共聚物的分子量小于 40,000。
23. 如权利要求 19 所述的组合物, 其中在 pH 低于 7.2 时, 所述共聚物的低临界溶解温度小于 37℃。
24. 如权利要求 19 所述的组合物, 其中在 pH 7.4 时, 所述共聚物的低临界溶解温度大于 37℃。
25. 如权利要求 19 所述的组合物, 其中存在于所述共聚物中的温度敏感性单体单元/亲水单体单元/包含至少一个 pH 敏感性部分的疏水单体单元的摩尔比为约 3.75:1.25:0.5。
26. 如权利要求 19 所述的组合物, 其中所述共聚物被排列成至少一个包含疏水核和亲水壳的纳米颗粒; 并且其中所述治疗剂包含在所述疏水核中。
27. 如权利要求 26 所述的组合物, 其中所述组合物是口服递送的。
28. 如权利要求 26 所述的组合物, 其中所述组合物是局部递送的。
29. 如权利要求 26 所述的组合物, 其中所述组合物是静脉内递送的。
30. 如权利要求 26 所述的组合物, 其中所述组合物是热递送的。
31. 如权利要求 26 所述的组合物, 其中所述组合物是肠道外递送的。
32. 如权利要求 26 所述的组合物, 其中所述组合物是通过吸入递送的。
33. 如权利要求 26 所述的组合物, 其中所述组合物是通过眼睛途径递送的。

新的温度和 pH 敏感性共聚物

技术领域

本发明涉及新型共聚物，具体涉及温度和 pH 敏感的两性共聚物。本发明还涉及包含对药物递送有用的新型共聚物的组合物，以及对动物和人提供选择的治疗剂的方法。

背景技术

研发可以提供治疗药物的准确靶向、时机和剂量的复杂药物制品和药物递送的方法已经十分必要，这种必要性部分是由于在治疗例如癌症、HIV/AIDS、囊性纤维变性等疾病所致的器官特异性疾病上的复杂需求。一些对复杂的治疗需求有贡献的因素包括用于治疗这种疾病的药物的毒性、药物的限制性治疗活性以及患病器官的难接近性和异质性。

在药物的递送上已经取得了进展，尤其是在药物载体的研发上，所述药物载体表现出低毒性并且能够改善对患病细胞的靶向。已经研究了一些类型的药物载体，包括脂质体、药物聚合物结合体和纳米微粒。

近来，已经出现聚合物核-壳纳米颗粒作为使难溶于水的和两性药物以及基因靶向肿瘤位点的有前景的胶体载体 [Kataoka et al. - Advanced Drug Delivery Rev. 47 (2001) 113-131; V.P. Torchilin - J. Control. Rel. 73 (2001) 137-172; Allen et al. - Cool. Surf. B: Biointerfaces 16 (1999) 3-27]。聚合物核-壳纳米颗粒尺寸很小，通常小于 200 nm，并且可以在其内核中通过疏水性相互作用、静电相互作用和氢键结合等增溶疏水药物、基因或蛋白质，同时将其疏水壳暴露于外界环境。这有效地防止了包封的生物活性化合物的降解，并且通过

避免被网状内皮系统 (RES) 吸收而使它们能够在体循环中表现出延长的活性。使用聚合物核-壳纳米颗粒可以通过增强的渗透和保持作用 (EPR effect) 被动地和主动地实现靶向 [Matsumura et al. – Cancer Research 46 (1986) 6387-6392] 和将识别信号引入胶束表面 [Kabanov et al. – FEBS Lett. 258 (1989) 343-345] 或导入对生理环境变量例如温度或 pH 敏感的聚合物。

近来, 由于聚合物的热响应性, 使得具有由温度敏感的聚 (N-异丙基丙烯酰胺) (PNIPAAm) 构成壳的聚合物纳米颗粒吸引了相当大的注意力。PNIPAAm 在水溶液中表现出约 32°C 的低临界溶解温度 (LCST), 低于该温度时聚合物是水溶性的, 高于该温度时聚合物不溶于水 [Taylor et al. – J. Polym. Sci.: Polym. Chem. Ed. 13(1975) 2551-2570]。聚合物的温度敏感性有利地提供了通过热使药物载体靶向的方法。

Okano et al. 报道了引入多柔比星的胶束结构的合成, 所述胶束结构衍生自 PNIPAAm-*b*-聚(甲基丙烯酸丁酯) 和 PNIPAAm-*b*-聚(D,L-丙交酯) 嵌段共聚物 [Chung et al. – J. Control. Rel. 62 (1999) 115-127; Kohori et al. – Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 16 (1999) 195-205]。核-壳纳米颗粒在 LCST 下很好地形成, 但是在高于 LCST 温度下核-壳纳米颗粒变形。药物的释放通过局部加热和冷却循环来调节。然而, 发现单独温度调节对靶向深部组织或肿瘤不太有效。

温度敏感性药物载体的一种替代方案是 pH 敏感性药物载体。例如已知大多数固体肿瘤的细胞外 pH 为 5.7-7.8 [Vaupel et al. – Cancer Research 41 (1981) 2008-2013], 而肿瘤间质流体的 pH 很少低于 pH 6.5。提供具有这样窄的 pH 窗口的药物载体是个挑战 [Drummond et al. – Progress in Lipid Research 39 (2000) 409-460]。

Chen 和 Hoffman 报道了 NIPAAm 和丙烯酸的共聚物的合成及其 pH 依赖性的 LCST, 并且提出其在药物靶向方面的可能应用 [Nature 373 (1995) 49-52]。更近一些, 报道了由聚(L-组氨酸)-*b*-聚(乙二醇)

(PEG) 制成的核-壳纳米颗粒是 pH 敏感性的, 其在 pH 7.4-6.8 下释放包封的药物 - 链霉素 (DOX) [Lee et al. - J. Control. Rel. 90 (2003) 363-374; J. Control. Rel. 91 (2003) 103-113]。酸性环境引起核-壳纳米颗粒的不稳定并因此在肿瘤组织处释放包封的药物分子。

WO 01/87227 A2 公开了由具有疏水核和亲水壳的聚合物胶束组成的胶体组合物的用途。所述 pH 和温度敏感性胶束衍生自 NIPAAm、甲基丙烯酸和丙烯酸十八醇酯的共聚物。温度敏感性和 pH 敏感性部分定位于胶束的壳上。

尽管已经取得了进展, 但目前的药物载体仍存在限制, 为此需要进一步改善其性能。

因此, 本发明的目的是提供聚合化合物, 其可以用作具有改善的 pH 和温度敏感性的药物载体, 并且因此提供改善的药物递送性能。

发明内容

本发明提供 pH 和温度敏感性共聚物, 其可以用作药物递送材料。在一个方面, 本发明涉及包含至少三类单体单元的共聚物, 所述三类单体单元包含:

温度敏感性单元,

亲水单元, 和

包含至少一个 pH 敏感性部分的疏水单元;

其中所述疏水单体单元衍生自可共聚的不饱和脂肪酸。

在另一方面, 本发明涉及温度和 pH 敏感性组合物, 其包含:

治疗剂, 和

包含至少三类单体单元的共聚物, 所述三类单体单元包含:

温度敏感性单元,

亲水单元, 和

包含至少一个 pH 敏感性部分的疏水单元;

其中所述疏水单体单元衍生自可共聚的不饱和脂肪酸。

在又一个方面，本发明提供一种向动物或人提供选择的治疗剂的方法，所述方法包括向动物或人施用温度和 pH 敏感性组合物，所述组合物包含：

治疗剂，和

包含至少三类单体单元的共聚物，所述三类单体单元包含：

温度敏感性单元，

亲水单元，和

包含至少一个 pH 敏感性部分的疏水单元；

其中所述疏水单体单元衍生自可共聚的不饱和脂肪酸；

其中所述共聚物被排列成至少一个包含疏水核和亲水壳的纳米颗粒；和

其中所述治疗剂包含在所述疏水核中。

根据以下描述、附图和非限制性实施例将更全面地理解本发明的这些方面。

附图说明

图 1 示出方案 1，其出于说明性目的描述了使用单体 *N*-异丙基丙烯酰胺、*N,N'*-二甲基丙烯酰胺和 10-十一碳烯酸与链转移剂 - 氨基乙硫醇进行合成本发明共聚物的一种可能方案。表 1 示出在示例性试验中用来形成本发明共聚物的各种进料摩尔比和所得共聚物的物理特征，也就是分子量、玻璃化转变温度、亲水单元对温度敏感性单元的实际摩尔比、酸度和热降解温度。氨基乙硫醇用作链转移剂将末端部分引入这些共聚物中。

图 2 示出聚合物的典型 ^1H NMR 谱，该聚合物由单体 *N*-异丙基丙烯酰胺、*N,N'*-二甲基丙烯酰胺和 10-十一碳烯酸以 3.5:1.5:0.5（聚合物 III）的进料摩尔比在 CDCl_3 中合成得到。

图 3 示出聚合物 III 的典型 FT-IR 谱。

图 4 示出在 500 nm 和变化的 pH 下，聚合物的光透射率作为温度

的函数的图, 所述聚合物由单体 *N*-异丙基丙烯酰胺、*N,N'*-二甲基丙烯酰胺和 10-十一碳烯酸以 4.0:1.00:0.5 (聚合物 I) 的进料摩尔比合成得到。

图 5 示出在 500 nm 和变化的 pH 下, 聚合物的透射率作为温度的函数的图, 所述聚合物由单体 *N*-异丙基丙烯酰胺、*N,N'*-二甲基丙烯酰胺和 10-十一碳烯酸以 3.75:1.25:0.5 (聚合物 II) 的进料摩尔比合成得到。

图 6 示出在 500 nm 和变化的 pH 下, 聚合物 III 的透光率作为温度的函数的图。

图 7 示出在 500 nm 和含有 10 (w/v)%BSA 的 PBS (pH7.4) 中, 聚合物 II 的透光率作为温度的函数的图。

图 8 示出 I_3/I_1 作为聚合物浓度 (聚合物 II) 的函数的图。

图 9 示出负载 DOX 的纳米颗粒的尺寸分布的典型图形。

图 10 示出负载药物的纳米颗粒的 TEM 图。

图 11 示出聚合物 II 对 L929 细胞的细胞毒性。

图 12 示出在 37°C 和变化的 pH 下, DOX 从聚合物 II 纳米颗粒的释放曲线。

图 13 示出方案 2, 其描述了叶酸与 *N*-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 的活化作用。

图 14 示出方案 3, 其描述了叶酸与聚合物 II 的结合。

图 15 示出方案 4, 其描述了胆固醇与聚合物 II 通过 NHS 活化作用的结合。

图 16 示出结合叶酸的聚合物 II 的 NMR 谱。

图 17 示出接枝胆固醇的聚合物 II 的 NMR 谱。

图 18 示出在 500 nm 和变化的 pH 下, 作为温度的函数的聚叶酸和聚合物 II 的光透射率图。

图 19 示出在 500 nm 下和 pH 7.4 时, 作为温度的函数的聚胆固醇的光透射率。

图 20 示出在 500 nm 下和不同 pH 时, 作为温度的函数的聚胆固醇-叶酸的光透射率。

图 21 示出描述聚胆固醇-叶酸对 L929 细胞的细胞毒性的柱状图。

图 22 示出共聚物、紫杉醇和负载紫杉醇的核-壳纳米颗粒的 DSC 分析。

图 23 示出盐酸多柔比星结构式。

图 24 示出结合多柔比星的聚合物 II 的合成。

图 25 示出结合多柔比星的聚合物 II 的凝胶渗透色谱图。

图 26 示出结合多柔比星的聚合物 II 的差示扫描量热图。

图 27 示出在 pH 7.4 的 PBS 中, 结合药物的胶束的温度敏感性可逆颗粒尺寸。

图 28 示出方案 5, 其描述了由 NIPAAm 和 DMAAm 组成的温度嵌段的合成以及聚(10-十一碳烯酸)的合成。

图 29 示出方案 6, 其描述了嵌段共聚物的合成。

图 30 示出温度敏感性嵌段和嵌段共聚物的凝胶渗透色谱图。

图 31 示出嵌段共聚物的 LCST 测量。

具体实施方式

本发明基于以下发现, 即由引入脂肪酸作为疏水、pH 敏感官能团的共聚物得到的核-壳纳米颗粒具有极好的作为药物载体的特征。本发明的共聚物可以自组装成核-壳结构, 所述核-壳结构包含被亲水壳包围的疏水核, 在疏水核中安置疏水部分例如脂肪酸, 所述亲水壳包含共聚物的亲水部分。药物可以通过物理截留或化学结合而包封在核内。这些纳米颗粒能够响应环境 pH 变化的狭窄窗口来改变它们的物理构造, 引起包封在纳米颗粒疏水核中的药物的释放。

本发明的共聚物的一个优点是, 可以使由这些共聚物形成的核-壳纳米颗粒的低临界溶解温度(LCST)依赖于环境 pH, 这意味着核-壳纳米颗粒的这种结构变形可以通过环境 pH 变化引起。可以将这种

特性用于靶向特征为酸性的环境中的器官或肿瘤组织。在正常生理 pH 下，核-壳纳米颗粒的 LCST 高于正常体温（大约 37℃）。然而，在微酸环境中，纳米颗粒的 LCST 低于正常体温。这意味着核-壳纳米颗粒在生理环境中是稳定的，但在酸性环境中不稳定或凝聚。

不希望受到理论的束缚，认为使用脂肪酸作为共聚物的疏水、pH 敏感部分有助于使本发明共聚物更加 pH 敏感。pH 敏感性官能团与脂肪酸的疏水片段结合，意味着它们被组装到核-壳纳米颗粒中。还认为由这些聚合物制成的核-壳纳米颗粒堆积松散，使得 pH 敏感性官能团虽然位于纳米颗粒的内核但仍然可以接近外部环境。当外部环境的 pH 改变时，pH 敏感性官能团也可以改变，例如离子化或去离子化。这导致脂肪酸的疏水性改变，并且因此改变纳米颗粒的 LCST，引起药物分子释放。此外，由于脂肪酸是天然化合物，因此认为它们是高生物相容性的并且应该在人体内具有非常低的毒性。

本发明的共聚物包含至少三类单体单元。为清楚起见，本文提到的术语“单体单元”指已经聚合成聚合物的单体。它不同于术语“单体”，“单体”表示能够聚合成聚合物的确定的分子实体。

本发明共聚物中所需的一类单体单元是温度敏感性/响应性单元。在本发明中，温度敏感性单体单元被用来赋予共聚物以温度敏感性，导致形成温度敏感性共聚物。温度敏感性共聚物通常表现出明确的 LCST 或 UCST（高临界溶解温度），还被称为相转变温度。具有明确的 LCST 的共聚物（在后面称为‘LCST 系统’）在大于 LCST 时不溶于水，而那些具有明确的 UCST 的共聚物在低于 UCST 时是不可溶的。这种特性通过当温度改变跨越临界溶解温度发生时或者共聚物的临界溶解温度响应 pH 变化而移动跨越静态环境温度时共聚物中构型的变化得到证实。一般而言，大多数药物递送利用 LCST 系统。当环境温度高于 LCST 时，LCST 系统的突然收缩和得到的不溶性使得本发明共聚物离开水相并且呈现疏水相，由此促进与细胞膜的相互反应。此外，温度敏感性单体单元可以与亲水的共聚单体例如丙烯酰胺（AAm）

或者与其它类型的改性共聚单体共聚合，实现较高或较低的 LCST。这种共聚物可以用作控制药物释放速率的功能性药物递送材料。

适用于本发明的温度敏感性单体单元可以含有一种或多种极性官能团，例如伯、仲或叔氨基、酰胺基、羧基、羰基或羟基，所有这些基团性质上都是极性的。通常，由于存在极性官能团，温度敏感性单体单元因此在性质上是亲水的。可以用于本发明的温度敏感性单体单元的实例包含衍生自下列单体的单体单元，例如取代的丙烯酰胺、丙烯酸酯、吡咯烷酮、哌啶和纤维素。适合的温度敏感性单体单元的实例包括但不限于那些衍生自例如 N-异丙基丙烯酰胺 (NIPAAm)、N-丙烯酸羟乙酯、N-丙烯酰吡咯烷酮 (APy)、N-丙烯酰哌啶、N-丙烯酰哌啶 (N-acroylpiperadine)、羟甲基纤维素、N-叔丁基丙烯酰胺、N-哌啶基-甲基丙烯酰胺的单体单元。目前用作本发明的温度敏感性单体单元的优选单体是 NIPAAm。引入 NIPAAm 单体单元的聚合物是高度温度敏感的，并且表现出负温度敏感性 (即 LCST 系统)，意味着它们在温度降至低于其 LCST 时变为水溶性。

本发明共聚物中所需的另一类单体单元是亲水单元。一般，亲水单元提供改变/移动本发明共聚物的 LCST 的手段。当亲水单元比温度敏感性亲水单元相对更亲水时，共聚物的 LCST 可以增加；相反地，如果存在亲水性相对较低的单元或疏水单元，则共聚物的 LCST 可以降低。适合本发明的亲水单体单元包括任何适合的可共聚单体，其可以具有一个或多个极性官能团，例如伯、仲或叔氨基、酰胺基、硫氢基、羧基、羰基或羟基。与其中还可以存在极性官能团并因而还可以在性质上亲水的温度敏感性单体单元相反，本发明所要求的亲水单体单元不一定是温度敏感性的。

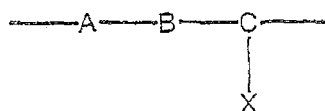
在特定实施方案中，亲水单体单元比温度敏感性亲水单元更亲水。这用以增加所得共聚物的 LCST。这些实施方案中存在的亲水单体单元可以衍生自，但不限于下列单体：丙烯酸、丙烯酰胺、丙烯酸酯、吡咯烷酮、乙二醇及其衍生物。在具体实施方案中，亲水单体单元可

以衍生自丙烯酰胺和 N-取代的丙烯酰胺衍生物单体,其包括但不限于丙烯酰胺 (AAm)、N,N'-二甲基丙烯酰胺 (DMAAm) 和 N-(羟甲基)丙烯酰胺。在本发明共聚物中存在 DMAAm 的优选实施方案中,增强了热敏性,从而使“开-关”药物释放能够响应更小的体温变化。另外,由于本发明共聚物中存在 NIPAAm 和 DMAAm,因此本发明共聚物的 LCST 升高(至稍微高于 37°C)。通常期望在生理条件下使用 LCST 稍微高于体温的聚合物。认为对 LCST 不需要上限,只要环境 pH 从正常生理 pH(典型为 7.4)至 7.2 和更小的变化能够使 LCST 从高于正常体温的值变为低于正常体温的值即可。

本发明共聚物中所需的第三类单体单元是疏水单元,其衍生自可共聚的不饱和脂肪酸并且包含至少一个 pH 敏感性部分。本发明可以使用含有至少一个 pH 敏感性官能团的任何适合的不饱和脂肪酸。适合的不饱和脂肪酸包括所有天然和人工修饰/合成的脂肪酸和所有具有 1、2、3、4、5、6、7、8 个或更多碳-碳双键和/或三键的单不饱和与多不饱和脂肪酸,以及其顺式-和反式异构体。脂肪酸的不饱和部分,即碳-碳双键可以存在于脂肪酸主碳链的任何位置处。

不饱和脂肪酸的碳氢链构成共聚物的主要疏水部分。疏水部分对赋予本发明共聚物以疏水特性起作用。需要疏水部分来形成核-壳结构并且使共聚物与其它疏水材料例如抗癌药物分子相互反应。适合的脂肪酸的碳氢链可以是通常在天然脂肪酸中发现的直的、无分支的烷基链(包括支化的烷基链)。碳氢链还可以是环状或支化的烷基链,任选取代有官能团例如羧酸、胺或羟基。对官能团的位置没有限制。其中,羧酸基团为共聚物提供 pH 敏感性以及结合适当配体的能力。脂肪酸中存在的任何其它 pH 敏感性官能团也可以起到这些功能。

在一个实施方案中,本发明共聚物含有下列结构式(I):



上式中限定的 A、B 和 C 是指分别随机共聚的单体单元，也就是温度敏感性单元、亲水单元和疏水单元或其聚合物嵌段。X 表示羧酸官能团，其直接与脂肪酸的疏水片段结合。

在另一个实施方案中，不饱和脂肪酸包含 5-50 个（包括端点）或更多主链碳原子。在这个实施方案中，脂肪酸可以包含单个碳-碳双键，意味着它是单不饱和脂肪酸。衍生疏水单体单元的具体单体包括例如戊烯酸、己烯酸、庚烯酸、辛烯酸、壬烯酸、癸烯酸、十一碳烯酸和十二碳烯酸。脂肪酸中碳-碳双键的位置没有特殊限制。

目前优选的单不饱和脂肪酸包括，但不限于下列脂肪酸，选自：(Z)-9-十四碳烯酸、(E)-9-十六碳烯酸、(Z)-9-十六碳烯酸、(E)-9-十八碳烯酸、(Z)-9-十八碳烯酸、(Z)-11-十八碳烯酸、(Z)-11-二十碳烯酸、(Z)-13-二十二碳烯酸和(Z)-15-二十四碳烯酸。

在一个实施方案中，单不饱和脂肪酸是 ω -1 脂肪酸，意味着双键存在于与羧酸官能团位置相反的脂肪酸末端的第一和第二碳原子之间。使用 ω -1 脂肪酸的优点是，它使得脂肪酸能够容易与所需的温度敏感性单体单元和亲水单体单元共聚，这是因为碳-碳双键空间上不受巨大烷基链的阻碍。目前优选的 ω -1 脂肪酸选自 4-戊烯酸、7-辛烯酸、10-十一碳烯酸、15-十六碳烯酸和 19-二十碳烯酸。

在另一个实施方案中，脂肪酸包含至少两个碳-碳双键，意味着脂肪酸是多不饱和的。合适的多不饱和脂肪酸包含 ω -3、 ω -6 和 ω -9 脂肪酸以及其它类型的脂肪酸。可用于本发明的多不饱和脂肪酸的具体实例包括(E,E)-9,12-十八碳二烯酸、(Z,Z)-9,12-十八碳二烯酸、(E,E)-9,11-十八碳二烯酸、(Z,Z,Z)-9,12,15-十八碳三烯酸、(Z,Z,Z)-6,9,12-十八碳三烯酸、(Z,Z,Z,Z)-6,9,12,15-十八碳四烯酸、(Z,Z)-11,14-二十碳二烯酸、(Z,Z,Z)-5,8,11-二十碳三烯酸、(Z,Z,Z)-11,14,17-二十碳三烯酸、(Z,Z,Z)-8,11,14-二十碳三烯酸、(Z,Z,Z,Z)-8,11,14,17-二十碳四烯酸、(Z,Z,Z,Z)-5,8,11,14-二十碳四烯酸、(Z,Z,Z,Z,Z)-5,8,11,14,17-二十碳五

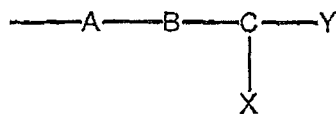
烯酸、(Z,Z)-13,16-二十二碳二烯酸、(Z,Z,Z)-13,16,19-二十二碳三烯酸、(Z,Z,Z,Z)-7,10,13,16-二十二碳四烯酸、(Z,Z,Z,Z,Z)-4,7,10,13,16-二十二碳五烯酸、(Z,Z,Z,Z,Z)-7,10,13,16,19-二十二碳五烯酸、(Z,Z,Z,Z,Z,Z)-4,7,10,13,16,19-二十二碳六烯酸和(Z,Z,Z,Z,Z,Z)-6,9,12,15,18,21-二十四碳六烯酸。

本发明的共聚物可以仅包含上述 3 类单体单元，或者可以另外包含其它类型的单体单元。例如，还可以使用两种或多种温度敏感性单体单元，例如 NIPAAm 和 N-叔丁基丙烯酰胺，或 NIPAAm 和 N-哌啶基-甲基丙烯酰胺。同样可以使用两种或多种亲水单体单元，例如 DMAAm 和 AAm，或 DMAAm 和 APy。还可以将其它类型的单体单元引入共聚物主链来调节共聚物的物理化学特性，或导入官能团或间隔物以进一步结合配体，这些单体单元包括例如 N-(羟甲基)丙烯酰胺或杂二官能 PEG。

本发明共聚物可以是无规共聚物，其中三类主要单体单元，即温度敏感性单体单元、亲水单体单元和疏水单体单元随机分布在共聚物中。还有可能是可以将共聚物合成为嵌段共聚物例如双嵌段或三嵌段的嵌段共聚物，以及嵌段-接枝共聚物。在一个实施方案中，将温度敏感性单体和亲水单体共聚形成一个聚合物嵌段，并且将疏水单体共聚形成另一个聚合物嵌段，从而形成双嵌段共聚物。

在一个实施方案中，所述共聚物还包含至少一个端基。所述端基包含至少一个部分，其选自末端部分、配体、药物分子、标记物、放射免疫偶联物、修饰共聚物的物理-化学特性的部分和间隔物（连接物）。

在具体的实施方案中，本发明的聚合物包含端基，所述端基由具有根据式 (II) 结构的末端部分组成：



其中 Y 是末端部分。

在这个实施方案中，端基与共聚物的碳主链（即，连接单体单元的碳链）中的末端碳原子连接。典型地，可以通过将包含期望的末端结构的链转移剂加入反应单体的混合物中而将末端部分导入共聚物，或可以通过活性聚合方法产生末端部分。链转移剂可以通过向增长链末端的活性种提供‘猝灭’原子来停止增长聚合物链的生长。其反过来作为可以攻击未反应单体的自由基留下，并且因此开始新链的生长。因此，链转移剂可以用于本发明以提供适当的反应性官能基团给共聚物，以及得到低分子量聚合物。链转移剂的实例包括氯仿、四氯化碳、氨基乙硫醇、烷基硫醇、辛硫醇、癸硫醇、正十二硫醇或叔十二硫醇、巯基丙酸、巯基琥珀酸、巯基乙酸、巯基乙醇及其仲醇、卤代烷、氧化数小于 5 的磷酸盐，以及本领域技术人员已知的其它添加剂/链限制剂。可以用于本发明的链转移剂的其它实例包括溶剂、杂质或适合的改性剂。

在另外的实施方案中，所述末端部分包含至少一个官能团，其选自羟基、羧基、羰基和氨基官能团。氨基官能团目前是优选的，包括伯或仲氨基。氨基可以例如存在于与共聚物的末端连接的烷硫基中，例如 2-氨基-乙硫醇或 2,2-二氨基-乙硫醇。末端部分中氨基的存在使得可以例如通过与配体结合来修饰聚合物和靶向基团，所述配体包括但不限于小的靶向分子（例如叶酸、其它维生素和乙酰胆碱等）、蛋白质（例如转铁蛋白和单克隆/多克隆抗体等）、肽（例如 TAT）和碳水化合物（例如半乳糖和多糖），它们可以在期望的细胞、组织或器官上被特殊受体识别。另外，氨基还可以与药物或标记物（例如在感兴趣的生物系统中显示或识别纳米颗粒的荧光探针）或放射免疫偶联物或化

学基团来修饰聚合物特性,例如连接疏水片段来增加聚合物的疏水性。

本领域技术人员将理解,末端部分 Y 可以适合作为能够与存在于配体或标记物或放射免疫偶联物或药物或其它化学基团例如蛋白质中的官能团反应的官能团。例如,当一个或多个羧酸官能团存在于选择的配体中时,具有氨基的末端部分可以用于促进结合。相反地,包含氨基的生物分子可以连接到具有羧酸官能团的末端部分。

为了对靶向受体的生物识别提供适当的官能团,所述共聚物可以与一个或多个能够连接共聚物上存在的官能团的配体结合。可以使用的配体包括但不限于小的靶向分子、蛋白质、肽和碳水化合物。

在一个实施方案中,所述端基由末端部分和配体组成。负载配体的共聚物可以用来有效地靶向体内的期望组织或具体细胞类型或细胞段。通过本发明共聚物的 pH 敏感性来增强共聚物的靶向有效性。

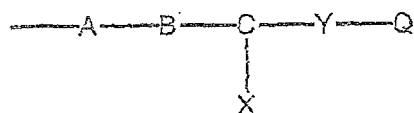
可以用于结合本发明共聚物的配体包括但不限于小的靶向分子(例如叶酸、其它维生素和乙酰胆碱等)、蛋白质(例如转铁蛋白和单克隆/多克隆抗体等)、肽(例如 TAT)和碳水化合物(例如半乳糖和多糖)。可以存在于单一共聚物的生物活性配体的数目为 1、2、3、4、5 或更多。

用于本发明的生长因子(蛋白质和肽)的示例性实例包括血管内皮细胞生长因子(VEGF)、上表皮生长因子(EGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)、成纤维细胞生长因子(FGFs)、转化生长因子-b (TGFs-b)、转化生长因子-a (TGFs-a)、红血球生成素(Epo)、胰岛素样生长因子-I (IGF-I)、胰岛素样生长因子-II (IGF-II)、干扰素-g (INF-g)、集落刺激因子(CSFs)。期望使用的细胞因子(蛋白质)包括淋巴因子以及单核因子,实例包括白介素-1 (IL-1)、白介素-2 (IL-2)、白介素-6 (IL-6)、白介素-8 (IL-8)。如果待治疗的疾病是癌症,则选择的配体应该优选被癌细胞上的特殊受体识别。期望与本发明共聚物一起使用的特殊类

型的癌细胞受体配体包括叶酸、贝沙罗汀 (targretin)、阿利维 A 酸 (alitretinoin)、大肠杆菌毒素、C3 切割片段 (C3d、C3dg 和 iC3b)、Epstein-Barr 病毒膜 gp350/220 和 CD23 可以与本发明共聚物结合。还可以使用抗体作为癌细胞配体, 其包括从小鼠、兔、鸡、山羊和绵羊得到的单克隆和多克隆免疫球蛋白, 以及重组抗体例如 Fu 片段、scFu 片段、Fab 片段或本领域技术人员已知的双功能抗体。期望使用的细胞因子包括细胞因子的 TNF 家族, 其包括肿瘤坏死因子-a (TNF-a)、肿瘤坏死因子-b (TNF-b)、Fas 配体 (FasL) 和涉及诱导细胞凋亡配体的 TNF (TRAIL)。其它适合的配体包括转铁蛋白、乙酰胆碱、生物素标记和叶酸。如果需要, 可以进行配体或本发明共聚物的预先修饰 (例如通过引入可以与配体上补充的官能团反应的官能团)。

在另一个实施方案中, 所述端基选自末端部分、配体、标记物、药物分子、放射免疫偶联物或任何其它化学部分, 例如修饰共聚物物理化学特性的部分。

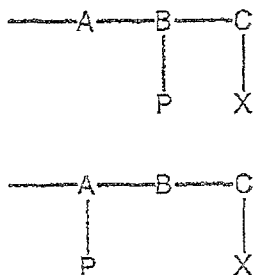
引入配体、药物、标记物、放射免疫偶联物或任何其它化学部分的共聚物可以含有根据式 (III) 的一般结构:



末端部分 Y 可以与配体、标记物、药物、放射免疫偶联物或如上式所示 Q 表示的化学部分连接。

所述配体、标记物、药物、放射免疫偶联物或化学部分与末端部分非限制性地连接。在其它实施方案中, 所述配体、标记物、药物、放射免疫偶联物或化学部分可以与温度敏感性单元或亲水单元上的官能团连接或结合。作为选择, 所述端基可以与任何一种单体单元连接, 例如与亲水单元或温度敏感性单元中的官能团连接, 而不是与末端部分 Y 连接。在这个实施方案中, 可以存在或不存在末端部分。下式 (IV)

和 (V) 示出这个实施方案:

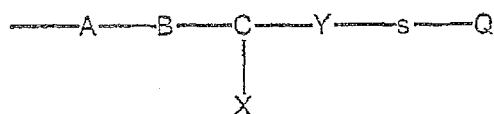


在这个实施方案中, P 可以是配体、标记物、药物、放射免疫偶联物或化学部分。

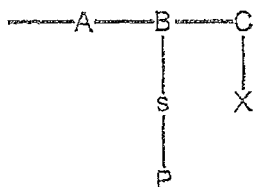
在另一个实施方案中, 疏水分子 P', 例如药物分子 (例如多柔比星) 或修饰共聚物的疏水性基团与 X 结合。这样, 所述共聚物可以被安排到核壳结构中, 其中疏水分子位于核中(式 (VI)):



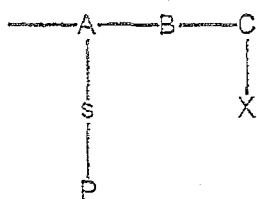
上式(III)、(IV)、(V)和(VI)中所示的实施方案中, 间隔物-s-可以任选地位于配体或标记物或放射免疫偶联物或药物或化学分子与末端部分之间 (式 III):



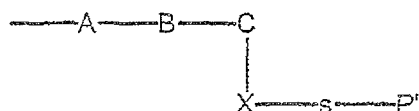
或任选地在 B 和 P 之间 (见式 IV):



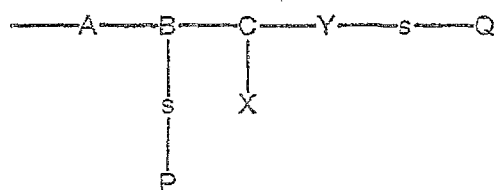
或任选地在 A 和 P 之间 (见式 V):



或任选地在 P' 和羧基之间 (见式 VI):



P、P' 和 Q 还可以分别与末端部分 (Y) 和亲水单体单元的官能团、或 B 和 X、或 X 和 Y、或 X 和 A、或 Y 和 A、或 A 和 B、或在一个共聚物中 A、B、X 和 Y 中的任何三个结合, 如下式 (VII) 所示:



上式 (VII) 中的各个间隔物-s-可以相同或不同。

所述间隔物可以含有任何适合的主链原子长度或数目, 只要配体或标记物或放射免疫偶联物在共聚物自组装成纳米颗粒之后自由进入细胞或组织或器官即可。

在优选的实施方案中, 使用一个间隔物, 所述间隔物包含超过 10 个主链原子。这种间隔物的实例可以例如衍生自聚氧化乙烯化合物, 例如聚(乙二醇)和聚(丙二醇)。所述配体或标记物或放射免疫偶联物可以存在于间隔物分子上的任何位置处。在一个实施方案中, 所述配体或标记物或放射免疫偶联物与位于间隔物分子的末端主链原子上的官能团连接。在其它实施方案中, 如果存在, 所述配体或标记物或放射免疫偶联物与位于间隔物分子的任何一个侧链上的官能团连接。

有利的是，本发明共聚物可以用作药物递送材料，尤其是用于递送性质上疏水的药物。由于所述共聚物在性质上是两性的，并且由于所述共聚物的水溶性可以通过温度和/或 pH 变化来调节，因此疏水性药物可以方便地使用所述共聚物包封在核-壳结构中，通常已知为核-壳纳米颗粒。当本发明组合物在低于所述共聚物的 LCST 的水相中制备时，共聚物和疏水性药物将自组装成核-壳排列，其中所述疏水性药物位于核内，在此它与脂肪酸单体单元的疏水片段相互反应。温度敏感性和亲水单体单元位于壳内，它与溶剂（水）分子或其它极性分子反应并且使疏水性药物在水相中溶解。这样，疏水性药物可以溶于水中并且可以在血液流中运输。由于在疏水片段（即脂肪酸单元）中存在羧酸基，因此亲水性药物、蛋白质或肽也可以封装在纳米颗粒的核内，通过避免网状内皮系统（RES）的清除来保护包封的药物、蛋白质和肽不降解并且使它们在体循环中表现出延长的活性。当药物被包封在核-壳纳米颗粒中时，其形成组合物，可以容易通过静脉内、口腔、肌肉内、局部或经眼睛或吸入而施用于患者。一般来说，对用于形成纳米颗粒的共聚物的分子量没有限制。然而，为了使聚合物能从肾脏排出，优选保持共聚物的分子量小于 40,000。一些参数可以影响使用本发明共聚物形成的纳米颗粒的尺寸，包括聚合物浓度、药物装载水平和纳米颗粒的制作条件。由本文公开的共聚物合成的纳米颗粒的尺寸通常可以小于 200 nm，尤其是对增强的渗透和保持作用（EPR）和在血浆中的长循环而言。

至少三种单体单元的每一个都可以以任何适合的比率存在于本发明共聚物中。一般来说，单体单元的比率可以改变以达到期望的 LCST 和 pH 特征。所述比率还取决于其它因素，例如存在于共聚物的各个单体单元和 pH 与温度敏感性官能团的类型和数目。存在于共聚物内的单体单元的摩尔比主要取决于用于制备共聚物的各个单体单元的摩尔比。

在一个实施方案中，存在于本发明共聚物中的温度敏感性单体单元的摩尔量大于亲水单体单元的摩尔量，以避免亲水单体单元对最终共聚物的温度敏感性的稀释作用；反过来，亲水单体单元的摩尔量大于共聚物中疏水单体单元的量。在特定的实施方案中，用于制备本发明共聚物的温度敏感性单体的进料摩尔量为亲水单体进料摩尔量的约2-6倍，并且是疏水单体进料摩尔量的约4-8倍。可以用来形成有用的共聚物的进料摩尔比的实例为温度敏感性单体的摩尔比为1-4；亲水单体的摩尔比为0.5-1.5；疏水单体的摩尔比为0.01-0.75。在尤其适合的实施方案中，根据这个范围的进料摩尔比使用的各个单体是 *N*-异丙基丙烯酰胺、*N,N'*-二甲基丙烯酰胺和 10-十一碳烯酸。

在一个优选的实施方案中，在 pH 小于 7 或优选小于 7.2 时，核-壳纳米颗粒的 LCST 小于 37°C。在另一个实施方案中，核-壳纳米颗粒的低临界溶解温度在正常生理条件 (pH 7.4) 下高于 37°C。注意到，可以通过改变单体单元的百分比或用来形成共聚物的亲水单体单元的性质来控制所述共聚物的 LCST 升高或降低。在目前优选的共聚物中，核-壳纳米颗粒在生理 pH 下高于正常体温，即 37°C，并且在酸性环境中低于正常体温。相反，pH 依赖性的 LCST 和相变特征通过使用本发明共聚物形成的纳米颗粒表现出来。例如，在一个具体试验中，核-壳纳米颗粒在水溶液中由 3.75:1.25:0.5 摩尔比的 *N*-异丙基丙烯酰胺、*N,N'*-二甲基丙烯酰胺和 10-十一碳烯酸的共聚物自组装，在这个具体组合物中形成的核-壳纳米颗粒的 LCST 在磷酸盐缓冲盐水 (PBS, pH 7.4) 中为 38.5°C，在微酸环境 (例如小于 pH 6.6) 中明显降低 (35.5°C)。

期望用于本发明的药物包括但不限于抗癌药物、抗炎药物、治疗神经系统疾病的药物和免疫抑制剂等。例如，多柔比星、阿那曲唑、依西美坦、环磷酰胺、表柔比星、托瑞米芬、来曲唑、曲妥珠单抗、甲地孕酮、他莫昔芬、紫杉醇、多西他赛、卡培他滨、醋酸戈热瑞林、

环孢菌素、顺铂、茚甲新、倍他米松和强力霉素。

为了有效地递送药物，对药物载体有利的是促进损伤靶向和细胞内进入。特定条件下药物载体的靶向和随后的内在化可以通过将药物载体与正常胞吞配体结合，利用天然胞吞途径来实现。使用这种策略，本发明共聚物可以引入各种配体，例如单克隆抗体、生长因子或细胞因子，它们可以用来促进将载体摄取到靶向细胞。为了避免扩散通过生物障碍物例如靶向细胞的细胞壁的困难以及免疫原性，目前期望用于本发明的是小的和非抗原配体。

在一个实施方案中，使用叶酸作为配体。叶酸 (MW=441 Da) 是低分子量和非抗原配体，适合作为肿瘤细胞的靶向信号。叶酸是一种维生素，其受体经常表达在人类癌细胞的表面上。另外，其显示出对它的细胞表面受体 ($K_d \sim 10^{-10}$ M) 的非常高的亲和力并且可以移动到细胞质中。已经发现叶酸按照质膜微囊调节的胞吞作用，而不是在溶酶体中结束，此时其含量快速下降。因此，通过使用叶酸作为本文公开的使用共聚物的药物组合物中的配体，可以将药物递送到期望的细胞内位点，避开降解酶。还已知的是，通过质膜微囊途径可达到的核内体也是酸性的。由于它们的酸度，核内体可以改变纳米颗粒的 LCST (从高于体温的温度到低于体温的温度)，分解核内体膜。所以，可以实现细胞内药物到细胞质的递送。

应该注意到，本发明指定的组合物不限于治疗药物通过与共聚物中疏水部分的疏水反应而被装载至纳米颗粒的疏水核内的核-壳结构纳米颗粒。可以通过药物分子与位于共聚物的任意部分上的合适官能团反应，例如通过脂肪酸的羧基与药物分子的氨基或羟基反应，从而将治疗药物的分子与共聚物共价结合。药物分子与共聚物结合的组合物可以采取核-壳结构或胶束结构或任何其它适合促进药物递送的稳定结构。药物与本发明共聚物的结合提供了递送药物到靶向器官/细胞位置的作为选择但类似的有效方式。

在另一个实施方案中，其中多柔比星用作本发明组合物的治疗药物，多柔比星通过碳化二亚胺化学与共聚物结合。多柔比星的胺官能团与本发明共聚物的羧基官能团结合，如图 23 和 24 所示。

为了更全面地说明本发明，提供下列实施例，但其不限制本发明的范围。

实施例 1: 合成聚(N-异丙基丙烯酰胺-co-N,N'-二甲基丙烯酰胺-co-10-十一碳烯酸) [P(NIPAAm-co-DMAAm-co-UA)]

A) 试验部分

i) 材料

除了另有说明外，所有试剂和溶剂都是商品级的，并以收到的形式使用。N-异丙基丙烯酰胺、N,N'-二甲基丙烯酰胺和 10-十一碳烯酸（98%）购自 Aldrich，并且分别通过结晶（正己烷）和减压蒸馏纯化。链转移剂（CTA）、2-氨基乙硫醇盐酸（AET.HCl）购自 Sigma、Aldrich。三硝基苯磺酸（TNBS）1M 水溶液购自 Fluka。盐酸多柔比星由 Sun Pharmaceuticals, India 友好提供。在 5 mg/mL PBS (pH 7.4) 溶液中使用 3-[4,5-二甲基噻唑基-2]-2,5-联苯四唑溴（MTT, Duchefa）来定量细胞。用 0.22 μ m 过滤器来过滤溶液除去蓝色甲臞（formazan）结晶。

ii) 合成

使用氧化还原对过硫酸胺（APS）和 2-氨基乙硫醇盐酸（AET.HCl），通过自由基共聚合来合成具有各种组成的 P(NIPAAm-co-DMAAm-co-UA) 聚合物（图 1）[Bokias et al. Macromol. Chem. Phys. 199 (1998) 1387-1392]。下面简要说明聚合过程。将 N-异丙基丙烯酰胺（3.965 g, 34.99 mmol）和 N,N'-二甲基丙烯酰胺（1.48 g, 14.99 mmol）溶解在 10 mL 超纯水中。通过与 5 mL 4% 的氢氧化钠溶液反应将十一碳烯酸（0.921 g, 5.0 mmol）转化为钠盐，然后将澄清

的钠盐溶液加入 *N*-异丙基丙烯酰胺和 *N,N'*-二甲基丙烯酰胺溶液中。用纯化的氮气吹扫混合物 15 分钟。将 APS (0.254 g, 4.0 mol% 的单体进料) 和 AET.HCl (0.244 g, 2.16 mmol, 4.0 mol% 的单体进料) 溶解在 5.0 mL 超纯水中。将溶液缓慢地加入单体溶液中并不停搅拌。所述反应在氮气中于 27℃ 下进行 48 小时。完成时, 通过加入过量的氯化钠来沉淀粗产物并在真空下干燥。将粗产物溶解在乙醇中, 使用透过分子量为 2000 的膜 (Spectra/Por) 对超纯水然后对乙醇渗析。蒸发乙醇之后收集纯化产物。

通过 ^1H NMR (Bruker AVANCE 400) 和傅立叶变换红外 (Perkin Elmer Spectrum 2000, KBr) 分光光度法表征聚合物的化学结构。通过凝胶渗透色谱法 (GPC、水、聚苯乙烯标样) 在 THF (洗脱速率: 1ml/min) 中于 25℃ 下确定聚合物的分子量。使用升降温速度为 3℃/分钟的 TA2920 调制 DSC 设备 (CT, USA) 进行差示扫描量热 (DSC) 试验。使用 TGA 7 (Perkin Elmer, USA) 进行热失重分析。

iii) 酸碱滴定和氨基测定

进行酸碱滴定来估计羧酸基和共聚物的 pK_a 。简要地, 将 100 mg 共聚物溶解在 10 mL 超纯水中并且用 0.01 N NaOH 滴定, 使用酚酞作为指示剂。通过这种滴定方法在加入碱的过程中不断测量 pH 还可以测定聚合物的表观分配系数 pK_a 。从 pH-碱体积的曲线中, 以当量点处碱的体积一半时的 pH 来计算 pK_a 。通过分光光度测定来估计聚合物中的游离胺基。将已知量的聚合物溶解在 2.0 mL 含 0.01 M TNBS 的碳酸氢钠水溶液 (2.0 w/v%) 中。在 40℃ 下保持溶液 2 小时, 然后冷却并稀释到特定体积。通过使用 UV-VIS 分光光度计 (UV-2501PC, Shimadzu) 在 345 nm 以 L-丙氨酸作为标准, 测定样品中用 TNBS 得到的胺官能团的量。

iv) 透射率测量

通过监控作为温度函数的光透射率变化来测定不同 pH 值的缓冲液中聚合物的 LCST。在缓冲液例如中性的邻苯二甲酸盐缓冲液 (pH 5.0)、PBS (pH 6.0、6.6 和 7.4) 以及 pH 9.0 和 10.0 的碱性硼酸盐缓冲液中制备样品溶液 (0.5 wt%)。所有缓冲液使用 154 mM 的离子强度制备。在 500 nm 处用 UV-VIS 分光光度计测量聚合物溶液的光透射率, 使用温度控制仪 (TCC-240A, Shimadzu) 控制样品细胞温度。加热速率设定为 0.1°C/分钟。在显示光透射率为 50% 的温度下测定聚合物溶液的 LCST 值。还在 10 (w/v) % 牛血清蛋白 (BSA 作为模型蛋白质) 的存在下研究蛋白质对 LCST 的影响。

v) 荧光测量

通过荧光光谱使用芘作为探针测定 PBS (pH 7.4) 中聚合物的 CMC 值。将等分的芘溶液 (1.54×10^{-5} M 的丙酮溶液, 400 μ l) 加入 10 mL 容量瓶中, 然后蒸发丙酮。在 PBS 中制备浓度为 1.0×10^{-5} -1.0 g/L 的聚合物溶液。然后将 10 mL 聚合物水溶液加入含有芘残基的容量瓶中。应该注意到, 所有样品溶液包含 6.16×10^{-7} M 相同浓度的过量芘。将溶液在室温 (20°C) 下平衡 24 小时。然后在室温下在 LS50B 荧光光谱仪 (Pekin Elmer, USA) 上记录聚合物溶液的荧光光谱。用 340 nm 的激发波长记录 350-500 nm 的发射光谱。激发和发射带宽都设定为 5 nm。从芘发射光谱, 分析作为聚合物浓度函数的第三带 (391 nm, I_3) 与第一带 (371 nm, I_1) 的强度 (峰高) 比率 (I_3/I_1)。CMC 值取自曲线变形的切点与通过低浓度点的水平切线的交叉点。

vi) 制备空白的和装载药物的核-壳纳米颗粒

制备空白核-壳纳米颗粒来研究 pH 和温度对纳米颗粒的尺寸的影响。将聚合物溶解在浓度为 0.5 (w/v) % 的二甲基乙酰胺中, 然后在室温下使用透过分子量为 2000 的膜 (Spectra/Por) 分别对 0.02 wt% HCl 和 0.02 wt% NaOH 渗析 24 小时。在用 0.45 μ m 注射过滤器过滤后将得到的纳米颗粒溶液冻干, 并且在进一步分析之前储存在 4.0

℃下。将 DOX 装载到核-壳纳米颗粒中，使用 F. Kohori et al. [*supra*] 报道的类似方案。简要地，用 3 mL DMAc 中的 2 摩尔过量三乙胺来中和 7.5 mg DOX，然后搅拌溶液至药物溶解。然后将 15 mg 聚合物溶解在溶液中。将混合物对 500 mL 去离子水渗析 48 小时。过滤并且冻干装载 DOX 的纳米颗粒。为了测定 DOX 的装载水平，将已知量的装载 DOX 的纳米颗粒溶解在 1 mL 甲醇中然后用 PBS 稀释。使用 UV-VIS 分光光度计在 485 nm 估计 DOX 浓度。基于 PBS (pH 7.4) 的 DOX 得到的标准曲线来计算药物装载。

vii) 动态光散射 (DLS) 分析

使用配备有 He-Ne 激光束 (670 nm) 的 ZetaPals (Brookhaven instruments corporations, CA, USA) 分析不同 pH 下制造的核-壳纳米颗粒的尺寸。每个测量重复 5 次，并找到良好的一致性。从 5 次测量中得到平均值。还在各种温度下测量纳米颗粒的尺寸来研究纳米颗粒的相可逆性。通过测量在含有 10 (w/v) % 牛血清蛋白 (BSA) 的 PBS (pH 7.4) 中纳米颗粒的尺寸来监控重新分散的冻干纳米颗粒的稳定性。

viii) 透射电子显微镜 (TEM) 检测

通过 TEM 分析核-壳纳米颗粒的形态。将新鲜制备的包含 0.01 (w/v) % 磷钨酸的纳米颗粒溶液的液滴放置在涂布聚合物膜的铜网上，并且在室温下空气干燥。在 JEM-2010 显微镜上用 200 keV 的电子动能进行 TEM 观察。

ix) 细胞毒性研究

在 stock 浓度下制备聚合物溶液。这些溶液用 0.22 μm 注射过滤器灭菌并且用 PBS (pH 7.4) 和生长培养基稀释得到最终浓度为 10、100、300 和 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 的聚合物。使用聚 (L-赖氨酸) 和浓度为 33.3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 的 PEG (Mw 8,000) 分别作为阳性和阴性对照物。使用 PBS (pH

7.4) 作为空白样品。

将 L929 小鼠成纤维细胞培养在补充的 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, 10% 牛胎血清, 1%L-谷氨酸酯, 1%青霉素-链霉素) (GibcoBRL) 中, 并在 37℃, 5%CO₂ 下培养。将细胞以每孔 10,000 个细胞接种到 96 孔板上。然后将板放回培养箱并且使细胞生长至融合。在开始检验的早上, 用 150 μl 预先制备的生长培养基-样品混合物替换孔中的培养基。然后将板放回培养箱并且保持在 37℃, 5%CO₂ 下 24、48 和 72 小时。对于暴露周期, 每天早上用新鲜的等分溶液替换各个孔中的混合物。每个板每个样品测量八次。各个暴露周期使用三个板, 每个样品重复一共 24 次。

在指定的暴露周期之后使用新鲜的生长培养基和 20 μL 等分的 MTT 溶液置换各个孔中的混合物。然后将板放回培养箱并且保持在 37℃, 5%CO₂ 下再 3 小时。然后除去各个孔中的生长培养基和过量的 MTT。然后向各个孔中加入 150 μL DMSO 来溶解紫色甲臞结晶。从各个孔中取出 100 μL 等分溶液然后转移到新的 96 孔板上。随后将新的板在 550 nm 和 690 nm 下化验。甲臞结晶的吸光度读数取自 690 nm 下的读数减去 550 nm 下的读数。结果表示为空白的吸光度的百分比, 其包含加入生长培养基的比较体积的 PBS。

x) 体外药物释放研究

在 pH 6.0、6.6 和 7.4 下研究纳米颗粒的 DOX 释放。将特定量的装载 DOX 的冻干纳米颗粒分散在 200 μL 的各个缓冲液中并且在放到透过分子量为 2000 的渗析膜 (Spectra/Por) 之前稳定 30 分钟。然后将渗析袋在 37℃ 下浸入 pH 6.0、6.6 和 7.4 的 25 mL PBS 中。以特定的时间间隔取出样品, 使用本实施例的 A 段 (vi) 中所述的 UV-VIS 分光光度计分析药物浓度。

B) 结果和讨论

i) 聚合物合成与表征

表 1 给出了所述共聚物的合成和表征的总结。在这些反应中，NIPAAm/DMAAm 的进料摩尔比改变，但是 10-十一碳烯酸的含量固定。在 0.2 mol% 和 0.4 mol% 的单体进料下使用 CTA。通过硫醇自由基引发聚合，硫醇自由基根据下式由 AET.HCl 与过硫酸盐的反应产生：



其中 R 代表氨乙基。此外已知硫醇基是有效的链转移剂[Greeg et al., J. Am. Chem. Soc. 70 (1948) 3740-3743]。因此在这种情况下，通过 AET.HCl 与单体进料的摩尔比和引发聚合与链转移反应的有效性来控制所产生的链的长度。这种通过氧化还原系统中硫醇自由基的引发机制已经建立[Khune et al., Polym. Prpr. 22 (1981) 76-77]。另外，对于用这种引发对制备的聚合物，各个聚合物分子中的胺官能团的平均数估计为 1.3-1.7。结果稍微高于估计值，这可能是由于聚合物的平均分子量是计算得来所致。观察到反应介质的 pH 进一步降低，这显示酸性 HSO_4^- 的产生。通过 GPC 测定的分子量显示，增加的 CTA 含量引起分子量的降低，这与 G. Bokias et al.[*supra*]报道的一致。

所有三种聚合物的 ^1H NMR 光谱具有类似的图案。图 2 示出 CDCl_3 中聚合物 III (NIPAAm:DMAAm:UA=3.50:1.50:0.50) 的典型 ^1H NMR 光谱。链转移剂存在下 NIPAAm、DMAAm 和 10-十一碳烯酸的共聚的成功由 δ 5.4-6.6 处乙烯质子信号的缺失得以证实。 δ 1.5-1.8 (信号 a+a') 和 δ 2.1-2.4 (信号 b+b') 处的宽峰分别是 NIPAAm 和 DMAAm 基团中 $-\text{CH}_2-$ 和 $-\text{CH}-$ 基团的质子的结果。还观察到来自异丙基 (分别为 δ 4.0 处 $-\text{CHMe}_2$ 和 δ 1.15 处 $-\text{CHMe}_2$, 信号 d 和 e) 和 δ 2.9 (信号 f) 处 $-\text{NMe}_2$ 基团的其它质子信号，它们的化学位移类似于单体的化学位移。由信号 e 和信号 f 的融合率估计 m/n 比率，其近似等于两种单体的进

料比率。这意味着,两种单体在聚合反应中具有类似的反应性。图 3 示出聚合物 III 的 FT-IR 谱。其在约 1647 cm^{-1} ($\nu_{\text{C}=\text{O}}$) 和 1548 cm^{-1} ($\nu_{\text{C}=\text{N}}$) 处显示来自 NIPAAm 和 DMAAm 片段的强吸收。10-十一碳烯酸片段中 $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ 的吸收出现在约 1713 cm^{-1} 。通过酸碱滴定分析(表 1)估计 UA 的含量位 44.2 mg/g 的聚合物 II。聚合物 II 的 pK_a 为约 6.8。聚合物在水和常用有机溶剂(CHCl_3 、 CH_2Cl_2 、丙酮和 THF 等)中都表现出良好的溶解度。

ii) 聚合物的 LCST 和 pH 与蛋白质的影响

PNIPAAm 在水中表现出限定良好的 32°C 的 LCST。可以通过导入疏水或亲水单体来调节 LCST。在这个研究中合成的聚合物包含聚(10-十一碳烯酸)作为疏水片段。因此,环境 pH 可以通过羧酸基来影响 10-十一碳烯酸片段的疏水性,其可以最终影响聚合物的 LCST。图 4-6 示出各个 pH 值的缓冲液中浓度为 $0.5\text{ wt}\%$ 的聚合物的光透射率作为温度的函数变化。从 DLS 分析可知,缓冲液中的聚合物自组装成浓度为 $0.5\text{ wt}\%$ 的核-壳纳米颗粒。由具有 4.00:1.00:0.5 的 NIPAAm/DMAAm/UA 比率的聚合物 I 自组装的核-壳纳米颗粒的 LCST 在 pH 6.0、6.6 和 7.4 时分别为 32.5°C 、 33.0°C 和 33.2°C (图 4)。然而,在 pH 5.0 时,LCST 戏剧性地降至 27.8°C 。在聚合物 II 具有增加长度的亲水 DMAAm 片段(NIPAAm:DMAAm:UA=3.75:1.25:0.5)的情况下,与聚合物 I 相比,在所有 pH 值下核-壳纳米颗粒的 LCST 均增加(图 5)。pH 值对聚合物 II 纳米颗粒的 LCST 有显著影响。例如,在 pH 9.0 和 7.4 时,发现 LCST 分别为 40.5°C 和 38.5°C ,高于正常体温。然而,在 pH 6.6 和 5.0 时,LCST 分别下降至 35.5°C 和 35.2°C ,大大低于正常体温。如果纳米颗粒具有良好分离的核-壳结构或核足够坚硬,则纳米颗粒的 LCST 应该不受环境 pH 的影响,因为 pH 敏感性部分在疏水片段中。由这些聚合物制成的核-壳纳米颗粒可以松散堆积。因此,纳米颗粒的核可以很好地接近外界环境。随着外界环境 pH

的增加, 10-十一碳烯酸片段中羧酸基团进一步去质子化, 并且因此降低了 10-十一碳烯酸片段的疏水性。这可能引起聚合物的 LCST 增加, 并且因此引起纳米颗粒的 LCST 增加。尽管聚合物 I 和聚合物 II 具有类似的羧酸基团含量, 但羧酸基团的去质子化对聚合物 II 的 pH 敏感性的影响明显大于对聚合物 I 的影响。这可能是因为聚合物 I 的分子量更高的缘故。混合熵随着分子量的增加而降低, 因为跨越 LCST 的热动力相分离是由低混合熵引起的[Stile et al. *Biomacromolecules* 3 (2002) 591-600; Lessard et al., *Can. J. Chem.* 79 (2001) 1870-1874]。这暗示分子量是影响聚合物 pH 敏感性的重要因素。

亲水片段长度的进一步增加导致如图 6 所示较高的 LCST。在聚合物中, 具有 3.5:1.75:0.5 的 NIPAAm/DMAAm/UA 比率的聚合物 III 在所有 pH 条件下提供最高 LCST 的核-壳纳米颗粒, 高于正常体温。例如, 聚合物 III 纳米颗粒的 LCST 在 pH 11.0、7.4、6.6、6.0 和 5.5 时分别为 43.0、43.0、41.0、40.7 和 39.0℃。聚合物 III 纳米颗粒的 LCST 还取决于 pH。然而, 它的温度敏感性低。这可能由于 DMAAm 的稀释作用所致, 也就是说, 共聚物中的 PNIPAAm 片段很好的分离并且被高摩尔比的 DMAAm 片段所稀释, 这可以减少相邻的 NIPAAm 的酰胺基之间分子内氢键。结果, 共聚物的温度响应性低[Liu et al., *J. App. Poly. Sci.* 90 (2003) 3563-3568; Katsumoto et al., *J. Phys. Chem. A.* 106 (2002) 3429-3435]。

使用聚合物 II 研究蛋白质对 LCST 的影响。如图 7 所示, 10 wt%BSA 的存在不改变核-壳纳米颗粒的 LCST。

这些结果表明, 聚合物可以设计成具有不同的 LCST 值, 其在变化的 pH 环境下高于或低于正常体温。由所有三种聚合物自组装的核-壳纳米颗粒事实上表现出 pH 依赖性的 LCST, 其可以主要由聚合物的疏水片段中羧酸基团的离子化或去离子化所引起。纳米颗粒的 LCST 受到 NIPAAm/DMAAm 的摩尔比的很大影响。具体而言, 聚合

物 II 纳米颗粒的 LCST 在正常生理环境 (pH 7.4) 中高于正常体温,但在微酸环境中低于正常体温。这意味着,纳米颗粒在生理环境中可溶且稳定,但在酸性环境中不稳定/凝聚。可以利用这种独特的性质使药物靶向肿瘤组织或环境特征酸性的细胞内部。

iii) 聚合物 II 的 CMC

CMC 是表征核-壳纳米颗粒稳定性的重要参数。大于 CMC,则两性聚合物分子可以自组装成核-壳结构的纳米颗粒。通过荧光光谱使用芘作为探针研究水中聚合物 II 纳米颗粒的疏水微环境。监控 I_3/I_1 的比率作为聚合物浓度的函数。图 8 示出聚合物 II 的 I_3/I_1 图。当芘位于更疏水的环境中时得到较高的比率[Dong et al. Can. J. Chem. 62 (1984) 2560-2565]。可以利用芘的这种特性来研究核-壳纳米颗粒的形成和变形。测定 CMC 值为约 10.0 mg/L。注意到,形成核-壳纳米颗粒之后 I_3/I_1 的变化小。这可能是因为由于羧基的存在和/或 UA 片段的不充分疏水性导致核松散堆积。

iv) 由 pH 和温度变化引起的聚合物 II 纳米颗粒的尺寸变化

发现聚合物 II 纳米颗粒的尺寸是 pH 依赖性的。在 0.02 wt% HCl 溶液中,聚合物 II 纳米颗粒的平均直径为约 319 nm,在 0.02 wt% NaOH 溶液中,纳米颗粒的尺寸降至 240 nm。在酸性溶液中形成的明显较大的纳米颗粒尺寸表明,由于低 pH 时 UA 的较高疏水性,使得酸性溶液中的纳米颗粒包含较高程度的凝聚。另一方面,高 pH 时去离子化的羧酸基的排斥引起较低程度的凝聚,产生较小尺寸。装载 DOX 的纳米颗粒的平均尺寸为 160-200 nm 左右,如图 9 所示具有窄尺寸分布。从 TEM 图(图 10)可见,在固体状态下纳米颗粒的尺寸为约 50-60 nm,这可能是由于聚合物的游离亲水片段的折叠以及聚合物链的脱水所致。同时,观察到纳米颗粒在 pH 7.4、37°C (低于 LCST) 时稳定并且尺寸为 265 nm 左右。将溶液加热到 40°C (高于 LCST),由于凝聚使得尺寸增加至约 988 nm。在冷却时凝聚物重新分散并且尺

寸降低到原始水平。在 pH 6.6 时观察到纳米颗粒的类似现象。这些结果进一步支持以下事实，即核-壳纳米颗粒是 pH 和温度敏感性的。pH 和温度响应是可逆的。

在含有 10 (w/v) % BSA 的 PBS (pH 7.4) 中研究装载药物的核-壳纳米颗粒的稳定性。用 BSA 试验 7 小时之后尺寸稍微增加 (从 104 到 164 nm)。最初的尺寸增加可能由于冻干纳米颗粒的水合作用。水合作用之后，尺寸恢复到原始水平并在接下来的 3 小时保持不变。这表明纳米颗粒在 BSA 存在时是稳定的。

v) 聚合物 II 的细胞毒性研究

将 L929 细胞暴露于浓度为 10-400 mg/L (ppm) 的聚合物中。从图 11 可见，与阴性对照相比较，聚合物 II 样品没有表现出任何明显的细胞毒性。72 小时后，所有聚合物 II 的样品表现出比阳性对照小的细胞毒性。

vi) 体外释放

在用于本研究中的制造条件下，DOX 的实际装载水平为约 2.7 重量%。在模拟肿瘤 pH 的微酸环境 (pH 6.0 和 6.6) 下和生理环境 (PBS, pH 7.4) 下进行体外药物释放研究。图 12 示出 DOX 的释放曲线。pH 7.4、37°C 时纳米颗粒的药物释放明显缓慢，仅为最初爆发的约 18%。这种最初爆发可能由于存在于纳米颗粒壳内的药物分子所致。然而，在 pH 6.0 和 6.6、37°C 时药物释放相当快。在研究的 48 小时内药物释放了约 70%。另外，观察到装载药物的纳米颗粒在 pH 7.4 时很好的分散在缓冲液中，但在 pH 6.0 和 6.6 时凝聚和沉积在渗析袋的底部。这些结果表明，所述纳米颗粒实际上是 pH 敏感的，pH 从 7.4 到 6.6 或 6.0 的微小变化导致装载药物的核-壳纳米颗粒的变形和沉淀，由此释放包封的药物内含物。另外，在 pH 7.4 和 6.0 时研究 DOX 从渗析袋的释放。没有观察到 pH 的显著影响，其进一步证实了 DOX 从纳米颗

粒的 pH 依赖性释放主要由于纳米颗粒的 pH 反应,而不是由于药物的溶解性。

C) 总结

通过与游离胺末端基团的自由基溶液聚合合成具有各种组成的两性三元共聚物聚(*N*-异丙基丙烯酰胺-*co*-*N,N'*-二甲基丙烯酰胺-*co*-10-十一碳烯酸)。由具有 3.75:1.25:0.5 的 NIPAAm/DMAAm/UA 比率的聚合物自组装的核-壳纳米颗粒在 pH 7.4 时具有大于正常体温而在微酸环境中远小于正常体温的 LCST。聚合物在最高 72 小时的周期中不显示明显的细胞毒性。装载 DOX 的纳米颗粒在 pH 7.4、37°C 时是稳定的,并且尺寸为约 160-200 nm。然而,在 pH 6.0 和 6.6 时,纳米颗粒的结构变形,从而释放包封的药物分子。这些特性可以帮助选择性地积累纳米颗粒并且选择性地酸性肿瘤组织中释放药物。合成的聚合物的又一个优点是,具有游离的胺官能团,其可以通过连接用于活性靶向的生物信号来进一步修饰聚合物。

实施例 2: 合成具有叶酸靶向基团的聚(*N*-异丙基丙烯酰胺-*co*-*N,N'*-二甲基丙烯酰胺-*co*-10-十一碳烯酸) [P(NIPAAm-*co*-DMAAm-*co*-UA)]

A) 试验部分

i) 材料

通过实施例 1 中描述的自由基聚合来合成聚(*N*-异丙基丙烯酰胺-*co*-*N,N'*-二甲基丙烯酰胺-*co*-10-十一碳烯酸) [P(NIPAAm-*co*-DMAAm-*co*-UA), 聚合物 II]。二水合叶酸、*N*-羟基丁二酰亚胺(NHS)、二环己基碳二亚胺(DCC)、二甲亚砜(DMSO)购自 Sigma, Aldrich。紫杉醇购自 Merck。

ii) 叶酸与 P (NIPAAm-co-DMAAm-co-UA)的结合和叶酸与接枝有胆固醇的 P (NIPAAm-co-DMAAm-co-UA)的结合

通过下列方法制备叶酸的 NHS 酯 (NHS-叶酸酯): 叶酸 (5 g, 溶解在 100 mL DMSO 加 2.5 mL 三乙胺中) 与 *N*-羟基丁二酰亚胺 (2.6 g) 在 DCC (4.7 g) 存在下室温反应过夜。通过过滤除去副产物 - 二环己基脲 (如图 13 所示方案 2)。为了结合叶酸和聚合物 II (聚-FA), 将 DMSO 中活化的 NHS-叶酸酯加入 PBS (pH 7.4) 缓冲液中的聚合物 II 中, 在室温下不断搅拌 5 小时 (图 14, 方案 3)。通过 PBS (pH 7.4) 缓冲液存在下的渗析纯化结合叶酸的聚合物 24 小时, 随后使用透过分子量为 2000 的渗析膜 (Spectra/Por) 对超纯水渗析 24 小时。将聚合物冻干并且储存在密封的容器中待用。叶酸还与接枝有胆固醇的聚合物 II (聚-CH-FA) 结合。通过将用 NHS 活化的聚合物 II (过程类似于通过使用 1:2:2 摩尔比的聚合物 II、NHS 和 DCC 来活化叶酸的过程) 与等摩尔浓度的胆固醇在水醇溶液中室温反应 48 小时 (图 15, 方案 4) 来合成接枝有胆固醇的聚合物 II (聚-CH)。

通过 ^1H NMR (Bruker AVANCE 400) 和傅立叶变换红外 (Perkin Elmer Spectrum 2000, KBr) 分光光度法测定聚合物的化学结构。使用升降温速度为 $3^\circ\text{C}/\text{分钟}$ 的 TA2920 调制 DSC 设备 (CT, USA) 进行差示扫描量热 (DSC) 试验。

iii) 制备装载药物的聚合物-CH-FA 核-壳纳米颗粒

如下将多柔比星装载到核-壳纳米颗粒中: 将 7.5 mg 或 5.0 mg DOX 溶解在 3 mL DMAc 或 DMF 中, 同时搅拌。然后将 15 mg 聚合物溶解在溶液中。将混合物对 500 mL 去离子水渗析 48 小时。为了测定 DOX 装载水平, 将已知量的装载 DOX 的纳米颗粒溶解在 1 mL 甲醇中, 然后用 PBS 稀释。利用 UV-VIS 估计 DOX 浓度。通过用紫杉醇 - 一种水溶性抗癌药物装载核-壳纳米颗粒进行初步研究。简要地, 将 15 mg 聚合物和 2.5 mg 紫杉醇溶解在 3 mL DMF 中, 在超纯水存在

下渗析聚合物药物溶液 24 小时。装载药物的纳米颗粒通过 $0.45\ \mu\text{m}$ 孔径大小的盘状过滤器过滤并且冻干。为了测定紫杉醇的装载水平, 通过将纳米颗粒溶解在 1 mL 氯仿中来从聚合物纳米颗粒提取紫杉醇, 通过加入 2 mL 二乙醚来沉淀聚合物。离心后, 收集上清液, 干燥并且通过 HPLC (水, 型号 2690, C8 $15\times 4.6\ \text{cm}$ 柱) 分析。流动相由 20 mM 醋酸铵、乙腈和甲醇以 35:45:20 的体积比组成。在甲醇中以 5-100 ppm 的浓度制备标准紫杉醇溶液。

B) 结果和讨论

叶酸成功地与聚合物 II 和接枝胆固醇的聚合物 II 结合。这通过 NMR 研究证实 (图 16 和 17)。叶酸成功结合的证据为, 在 $\delta\ 6.6-6.8$ 和 $\delta\ 7.5-7.7$ 处存在来自叶酸分子中芳香族质子 2、6 和 3、5 质子信号 (图 14, 方案 3)。还通过来自胆固醇的 5 个 CH_3 基团的质子信号 ($\delta\ 0.6-1.1$) 证实胆固醇结合到聚合物 II 上。

从实施例 1 可见, 聚合物 II 在 pH 7.4 时的 LCST 为 38.5°C , 其在 pH 6.6 时降至 35.5°C 。这是由于随着 pH 的变化聚合物的质子化和去质子化所导致, 这改变了聚合物的疏水性。pH 7.4 时, 聚-FA 和聚合物 II 的 LCST 没有明显区别。然而, 在 pH 6.6 时 LCST 增加, 并且温度敏感性降低 (图 18)。这可能由于在此 pH 时叶酸提高了聚合物的亲水性。然而, 在 pH 5.0 时, 聚合物的溶解度低且溶液混浊。所述聚合物的 LCST 降至 36°C 且温度敏感性较高 (未示出数据)。这可能是由于叶酸具有 pH 5.4 左右的 pK_a , 其羧基官能团在 pH 5.0 时质子化, 增加了聚合物的疏水性。由于 LCST 在 pH 5.0 时低于正常体温 (核内体中), 使得这种特性可以帮助药物细胞内递送, 这可以帮助破坏核内体膜。当胆固醇与聚合物 II 结合时, 如图 19 所示, 聚合物的 LCST 在 pH 7.4 时是 35.7°C , 低于聚合物 II 的 LCST。这是因为接枝胆固醇增加了聚合物的疏水性, 降低了 LCST。另一方面, 聚-CH-FA 的 LCST 在 pH 7.4 和 pH 6.6 时分别是 39.0 和 34.5°C (图 20)。这可能是由于

通过导入胆固醇引起的聚合物的疏水性增加恰好被叶酸分子所补充。

将 ATCC L929 细胞暴露于浓度为 10-100 mg/L (ppm) 的聚合物。从图 21 可见, 与阴性对照物[聚(乙二醇)]相比, 聚-CH-FA 样品没有表现出任何显著的细胞毒性。然而, 所有聚-CH-FA 样品比阳性对照物[聚(L-赖氨酸)]的细胞毒性小。

使用典型的渗析方法制备聚-CH-FA 的空的和装载药物的核-壳纳米颗粒。选择盐酸多柔比星和紫杉醇作为水溶性和水不溶性药物。研究溶剂对多柔比星的药物装载的影响。通过使用 DMAc, 药物装载为 4.31 重量%时包封效率为 12.9%。颗粒的平均直径为约 265 nm。然而, 在使用 DMF 作为溶剂的渗析方法情况下, 药物装载降至 0.6%, 包封效率为 2.4%, 平均颗粒尺寸为 100-160 nm。后一配方中药物装载的减少可能是由于 DMF 的溶解度 (12.1 cal/cm^3) 比 DMAc (10.8 cal/cm^3) 高, 这可能有助于在包封之前使药物漏出。降低的颗粒尺寸可能有助于降低药物装载。

将紫杉醇装载到平均直径为 96 nm 的核-壳纳米颗粒中, 包封效率为 13.0%, 药物装载为 1.9%。紫杉醇是熔点为 220°C 的结晶药物(图 22)。紫杉醇的熔点在包封至纳米颗粒中之后消失, 指示药物是分子分布的。

C) 总结

合成对肿瘤细胞具有活性靶向信号(叶酸)的核-壳纳米颗粒。所述纳米颗粒保持 pH 敏感特性并且拥有低细胞毒性。将两种抗癌药物装载到核-壳纳米颗粒内。可以通过改变制造条件控制药物的颗粒尺寸和装载水平。

实施例 3: 合成结合多柔比星的聚(N-异丙基丙烯酰胺-co-N,N-二甲基丙烯酰胺-co-10-十一碳烯酸) [P(NIPAAm-co-DMAAm-co-UA)]

i) 多柔比星与共聚物的结合

聚合物 II 还可以与含有反应性官能团的药物结合。多柔比星通过碳二亚胺化学而结合 (图 23), 其中多柔比星的胺官能团与聚合物 II 的羧基官能团结合, 如图 24 所示。简要地, 通过将用 NHS 活化的聚合物 II (过程类似实施例 2 中描述的叶酸的活化) 与多柔比星 (浓度为聚合物 II 的两倍) 在磷酸缓冲液 (pH7.4) 中室温反应 48 小时, 合成结合多柔比星的聚合物 II (聚-DOX)。在超纯水存在下使用 2000 分子量透过的渗析膜渗析 48 小时后得到血红色产物, 然后冻干。通过凝胶渗透色谱法确认聚合物 II 的分子量增加, 从 $M_w:9,051$ 、 $M_n:6,781$ 至 $M_w:11,129$ 、 $M_n:9,118$, 如图 25 所示停留时间也增加了。此外, 结合物的差示扫描量热显示, 多柔比星 202℃的熔点没有出现转化 (如图 26 所示), 这暗示药物是聚合物链的一部分。

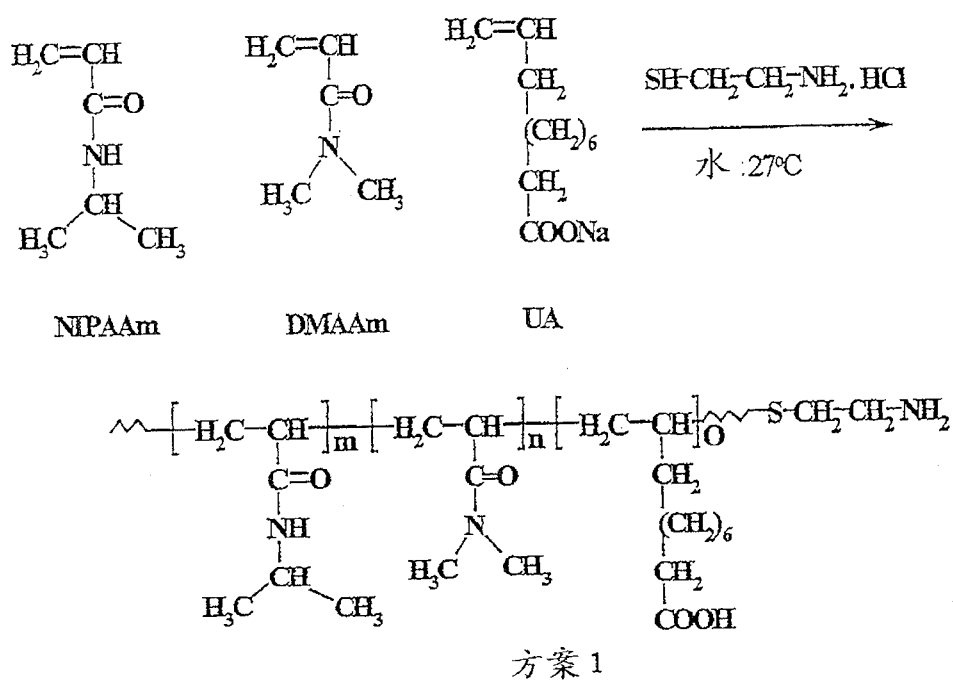
ii) 由结合多柔比星的聚合物 II 制备胶束

在药物结合到聚合物链上之后, 观察到聚合物在水中相对不可溶。尝试使用这种聚合物通过渗析和溶剂蒸发方法制备核-壳纳米颗粒 (胶束)。发现由于聚合物更加疏水, 因此渗析不是合适的方法, 导致聚合物的沉淀或形成 800-1000 nm 的较大颗粒。然而, 通过使用溶剂蒸发方法, 能够产生平均直径为 280 nm 的胶束。溶剂蒸发的过程如下: 将 15 mg 结合的聚合物溶解在 4 mL 的二甲基乙酰胺和 1 mL 二氯甲烷中, 将聚合物溶液在 20 mL 超纯水中乳化并且超声波处理 5 分钟。蒸发溶剂, 离心溶液并且测量颗粒尺寸。药物与胶束的结合改变了引起聚合物温度敏感性的 pH。观察到在大于 38℃时 (大于 LCST) 颗粒尺寸降低, 这可能是由于 pH 7.4 时温度敏感性片段折叠所致。发现这种现象是可逆的和可再现的 (图 27)。

实施例 4: 合成嵌段共聚物聚 (N-异丙基丙烯酰胺-co-N,N-二甲基丙烯

酰胺)-*b*-聚(10-十一碳烯酸) [P(NIPAAm-*co*-DMAAm)-*b*-PUA]

通过分别合成温度敏感性/亲水片段和 pH 敏感性脂肪酸片段,然后将它们结合产生如图 28 和 29 (方案 5 和 6) 所示嵌段共聚物,来进行聚合物 II 的嵌段共聚物的合成。简要地,合成温度敏感性片段是通过使纯化的 *N*-异丙基丙烯酰胺和 *N,N*-二甲基丙烯酰胺以 3.75:1.25 的单体比率,在 40 mL 乙醇中利用 0.4 mol% 的链转移剂、2-氨基乙醇盐酸 (AET.HCl),在引发剂偶氮二异丁腈存在下于 70°C 反应 24 小时。通过将聚合物溶解在氯仿中并且在二乙醚中沉淀来纯化聚合物。通过 GPC 分析聚合物的分子量,发现 M_w 为 11,221。另一方面,通过使单体的钠盐 (0.097 mol) 在过硫酸铵 (0.8 g) 存在下在水中于 70°C 反应 24 小时来合成聚(10-十一碳烯酸)。在冷乙醇存在下沉淀聚合物。利用 NHS 在 DCC 存在下活化聚(10-十一碳烯酸),所得产物进一步与温度敏感性嵌段在水中在碱性 pH 下结合。聚合物分子量为 M_w 29,177 (图 33)。通过测量 LCST 分析嵌段共聚物的 pH 和温度敏感性。如图 31 所示,确认嵌段共聚物实际上是 pH 和温度敏感性的。在 PBS (pH 7.4) 中,嵌段共聚物的 LCST 为 39.5°C,当与聚(10-十一碳烯酸)嵌段时降至 38.5°C。pH 6.0 时,嵌段共聚物表现出 36.7°C 的 LCST。



聚合物	NIPAAm/ DMAAm/ UA (进料 摩尔比)	CTA (mol %)	M _w , M _n ¹ (M _w /M _n)	T _g ² (°C)	NIPAAm/ DMAAm/ (实际 摩尔比) ³	酸度 (mg NaOH/g) ⁴	热降解 (开始温度 °C) ⁵
聚合物 I	4.00:1.00:0.5	0.2	30804,19185 ~(2.02)	133.0	4.17:1.00	8.0	437.8
聚合物 II	3.75:1.25:0.5	0.4	9303,5209 (1.78)	134.4	3.62:1.25	9.68	458.8
聚合物 III	3.50:1.50:0.5	0.4	11090,6374 (1.73)	135.1	3.13:1.50:	8.80	437.8

¹ 由GPC确定; ² 由DSC确定; ³ 由¹H-NMR估计; ⁴ 由酸碱滴定估计; ⁵ 由TGA估计

表1

图 1

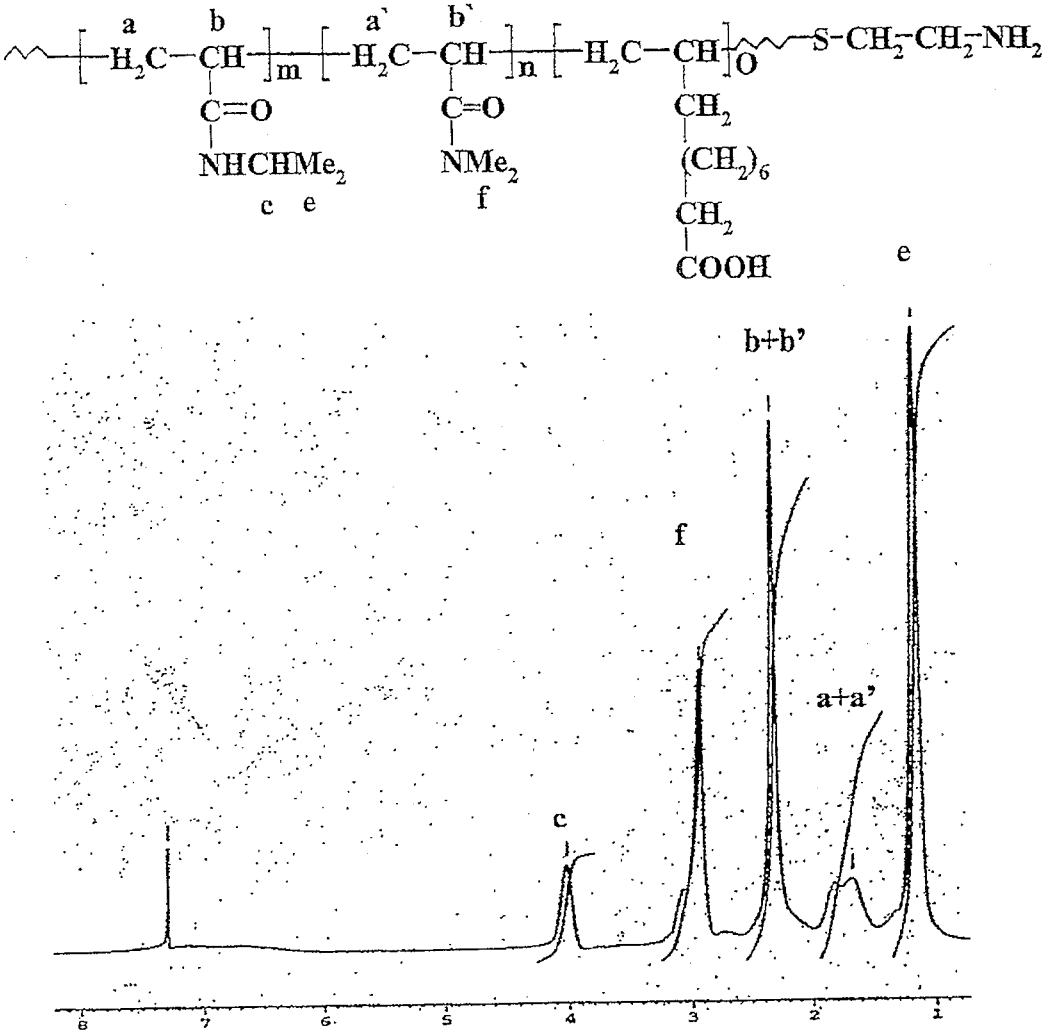


图 2

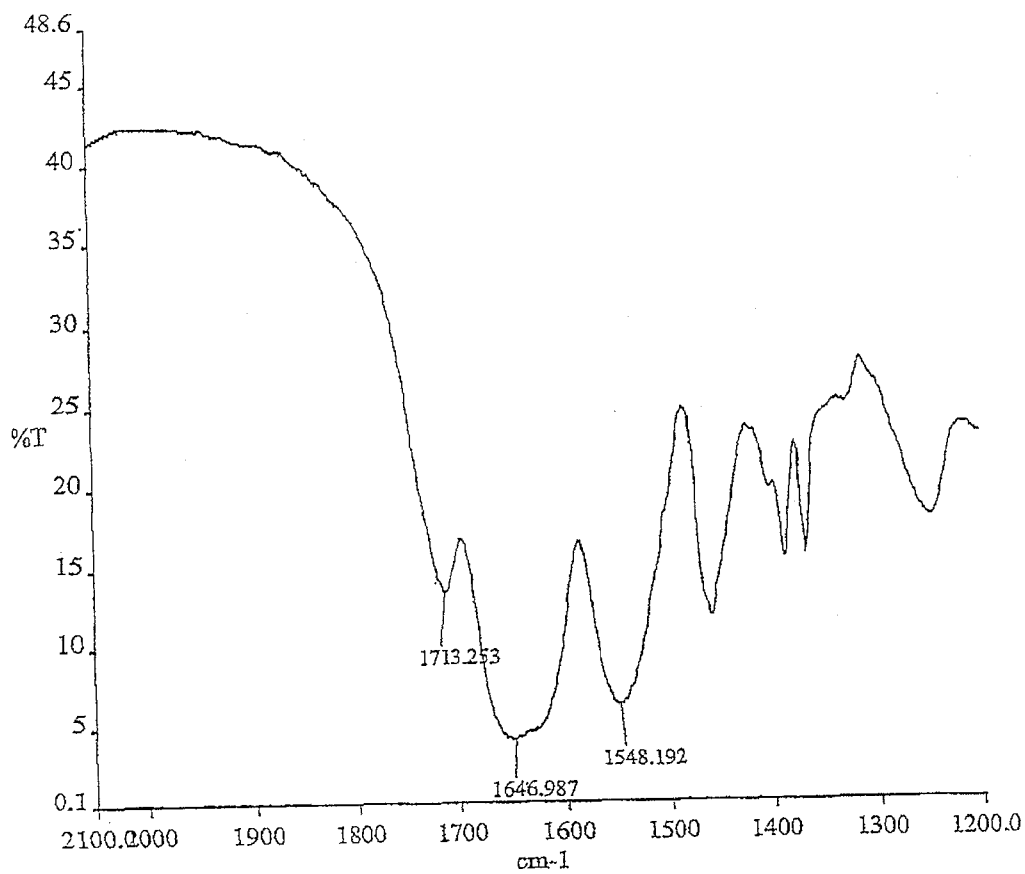


图 3

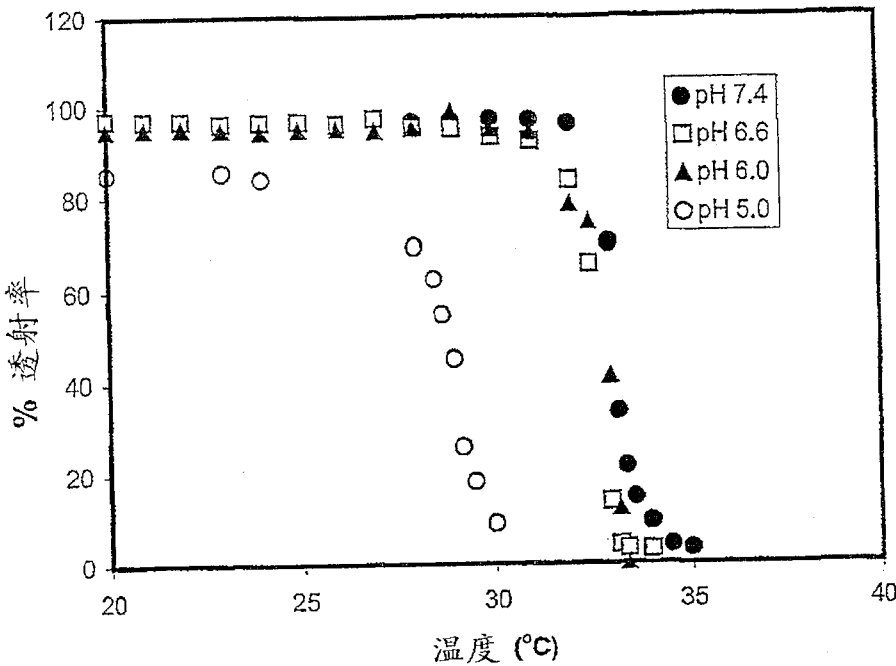


图 4

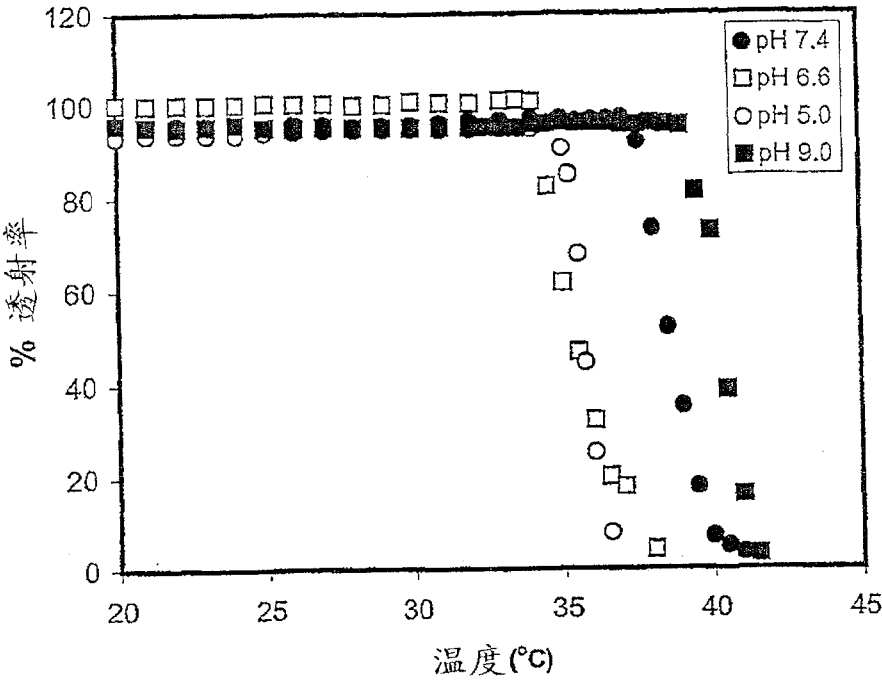


图 5

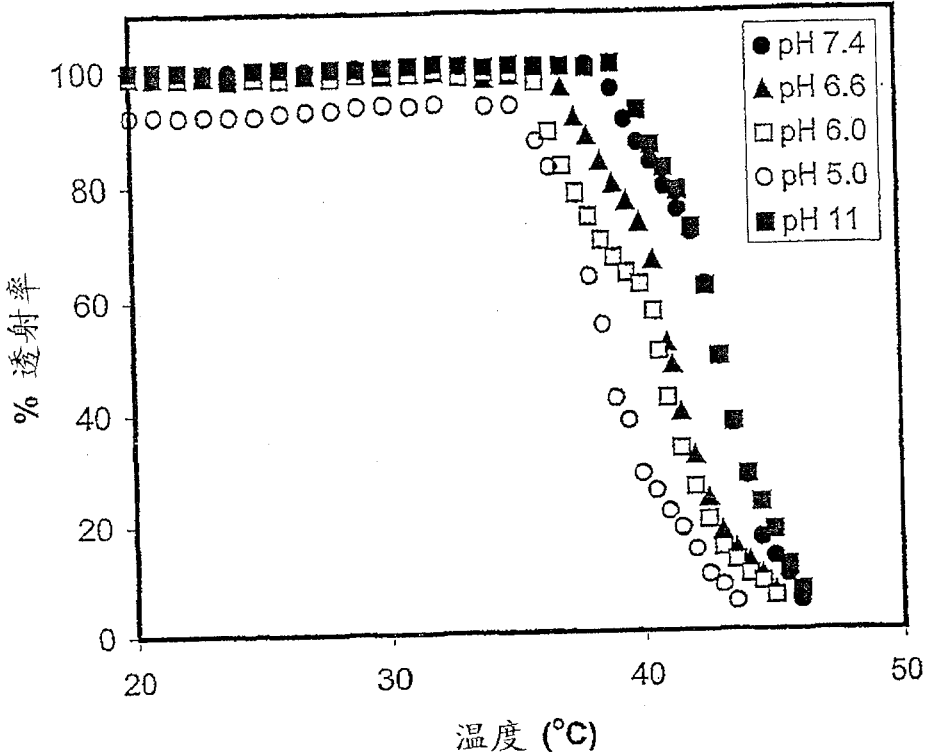


图 6

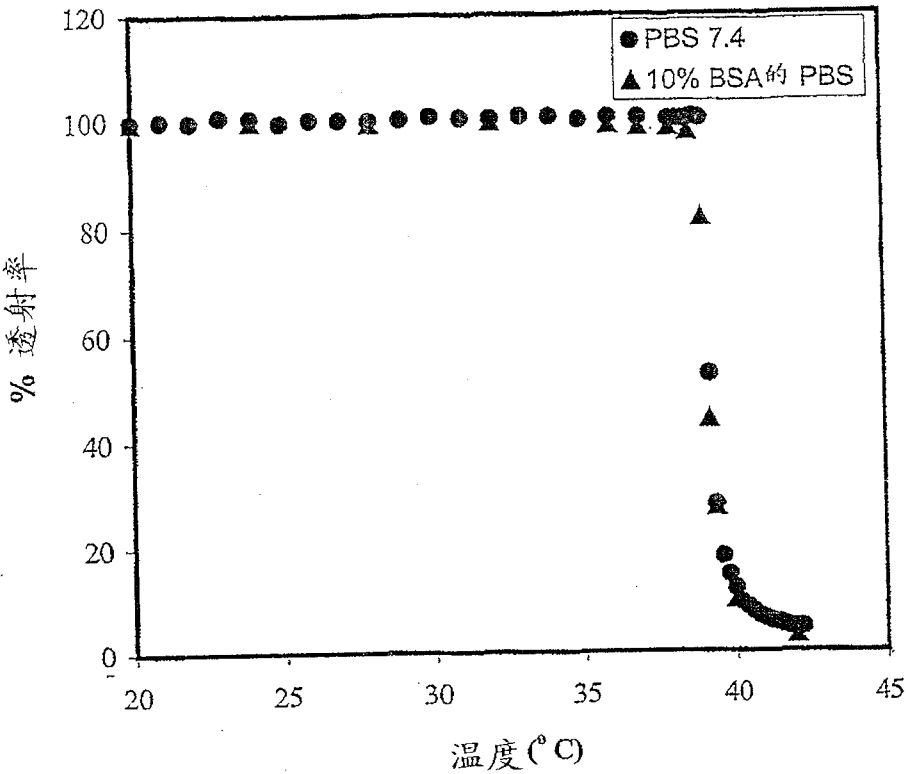


图 7

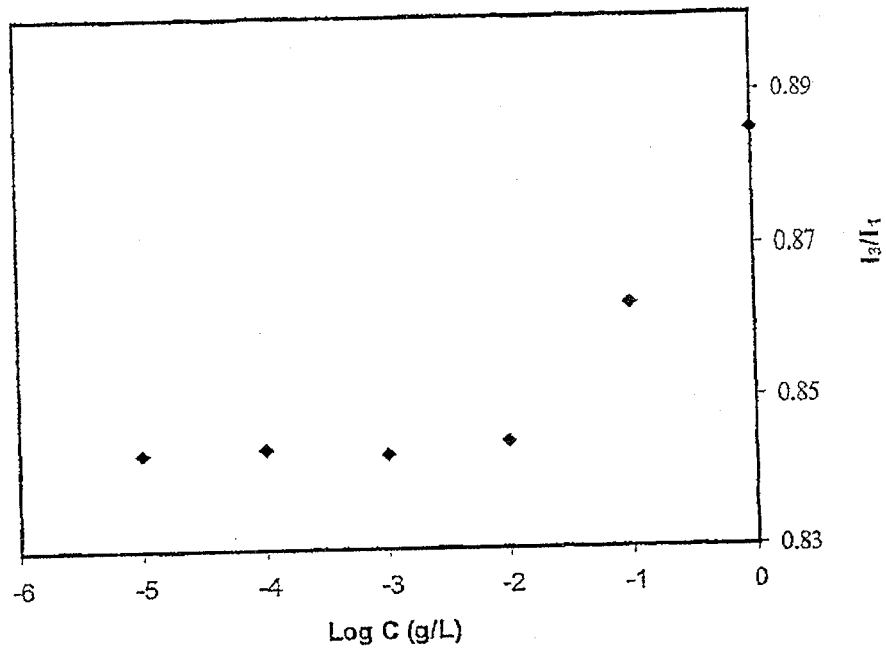


图 8

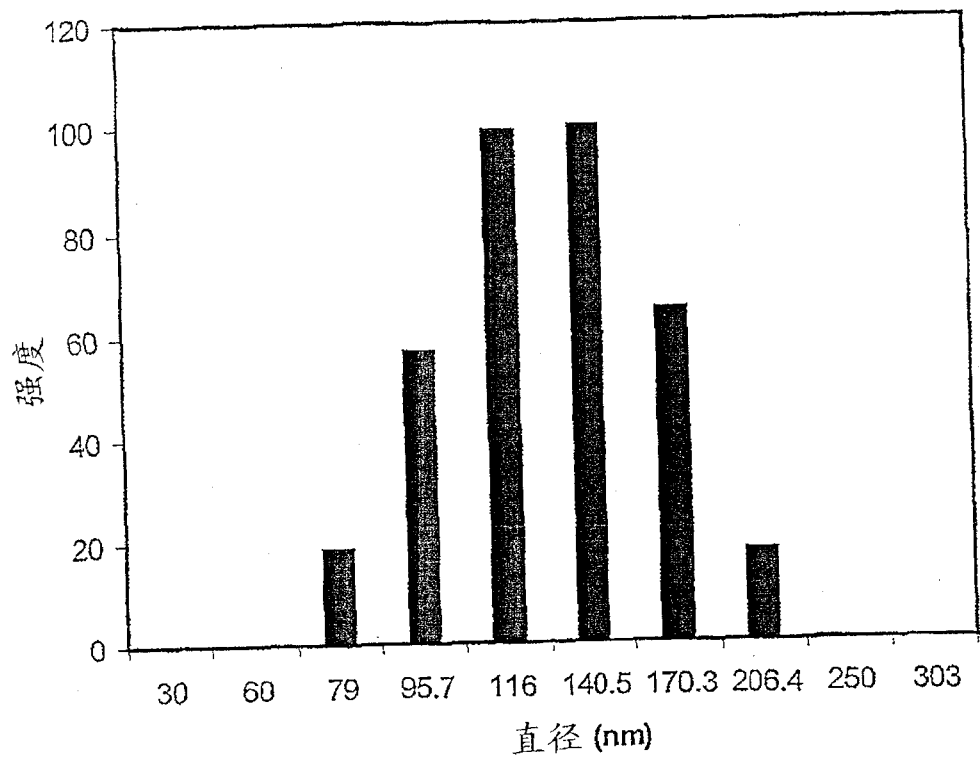


图9

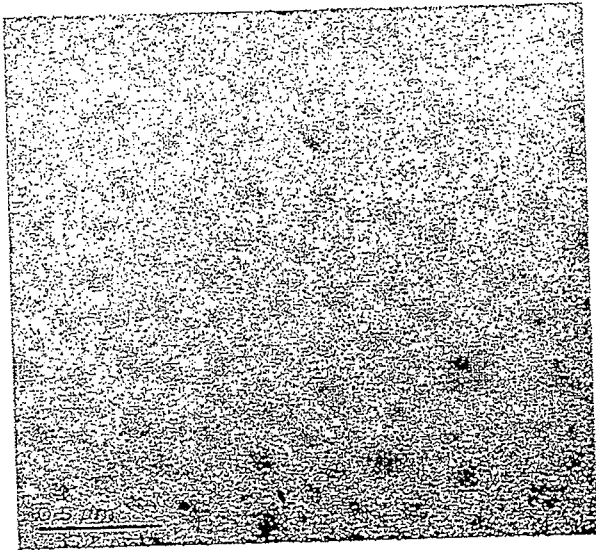


图 10

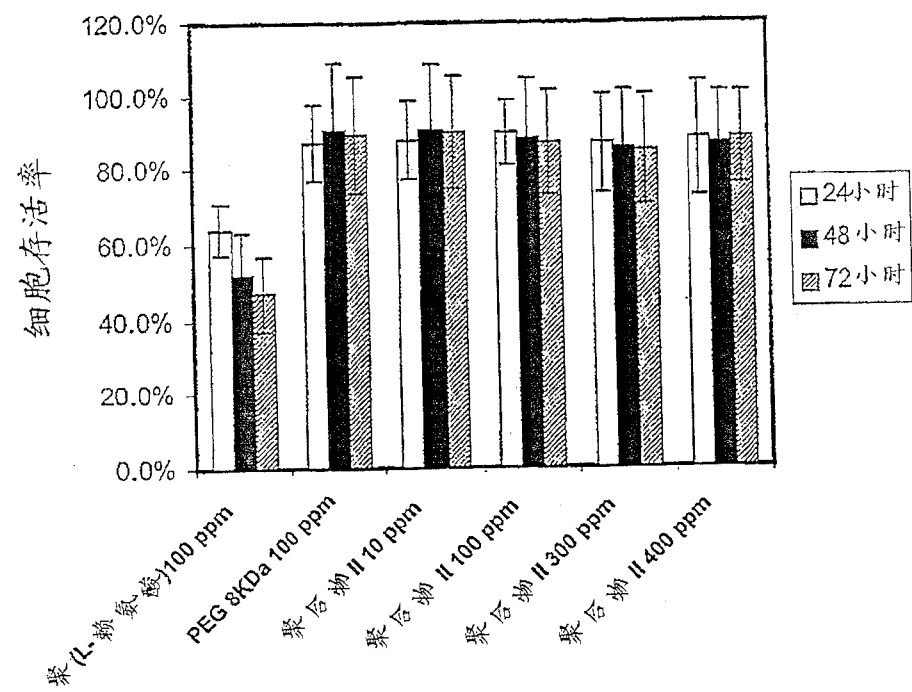


图 11

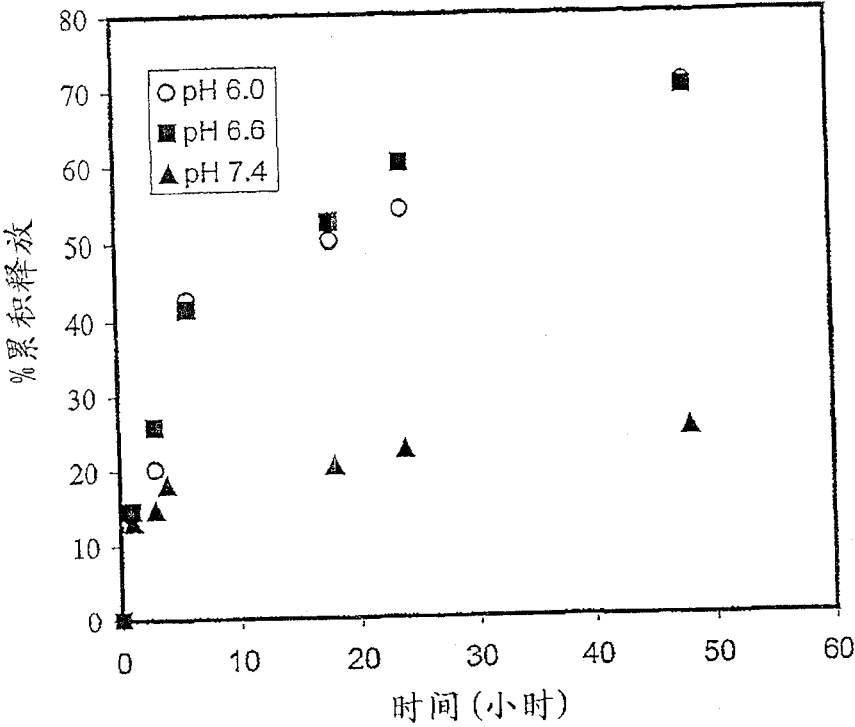
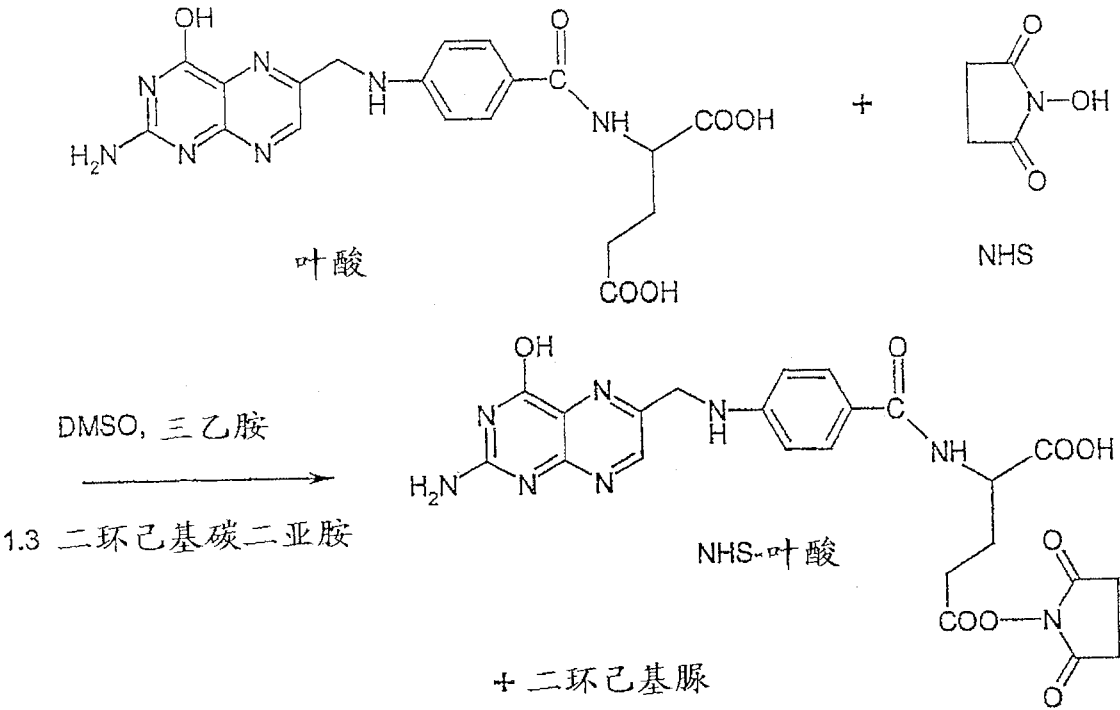
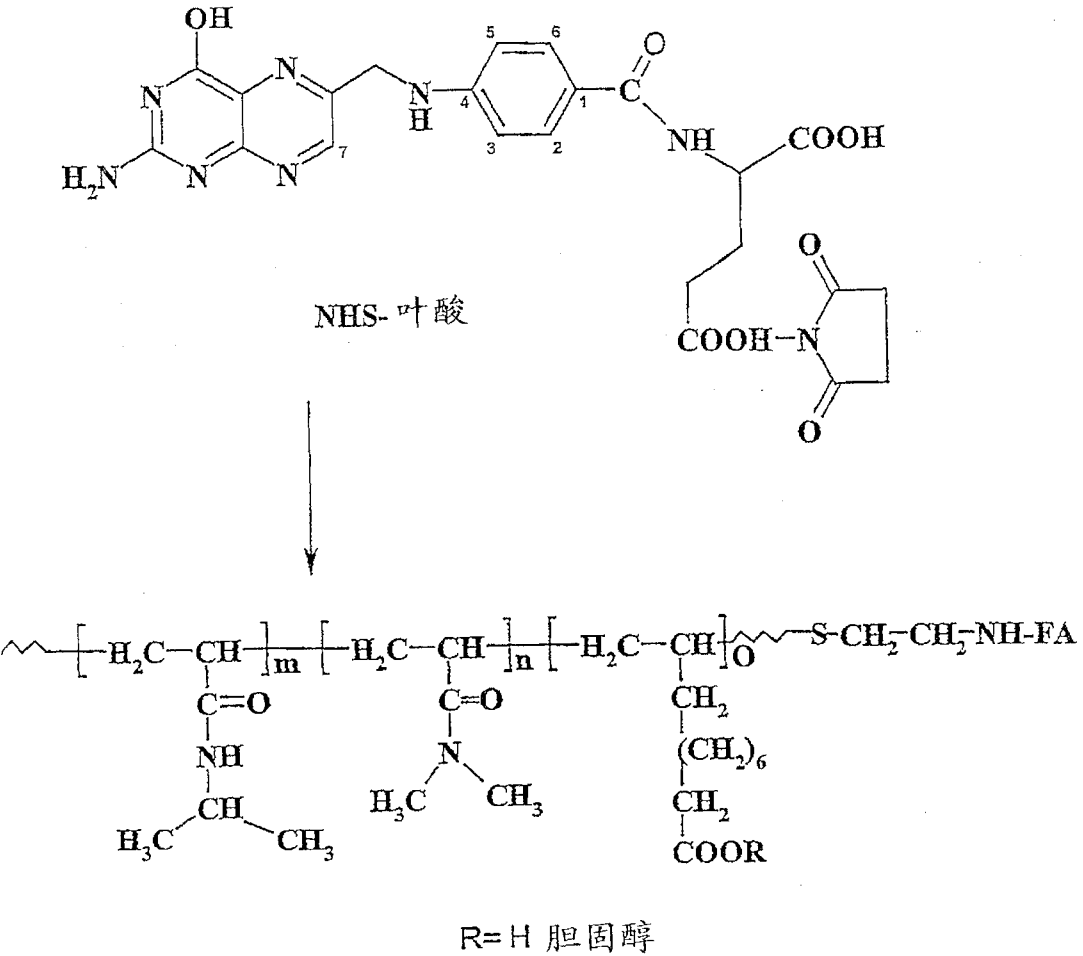


图 12



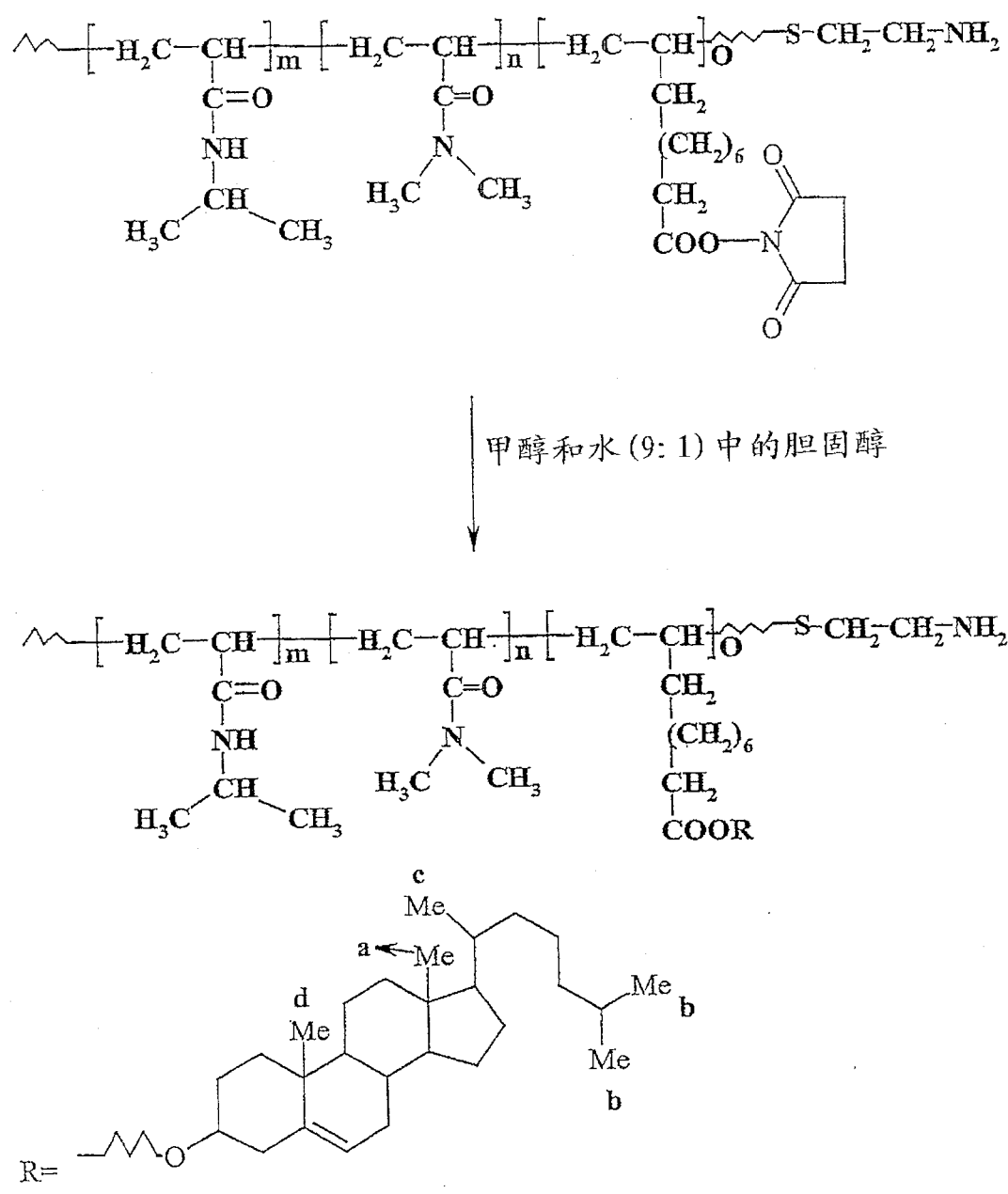
方案 2

图 13



方案 3

图 14



方案 4

图 15

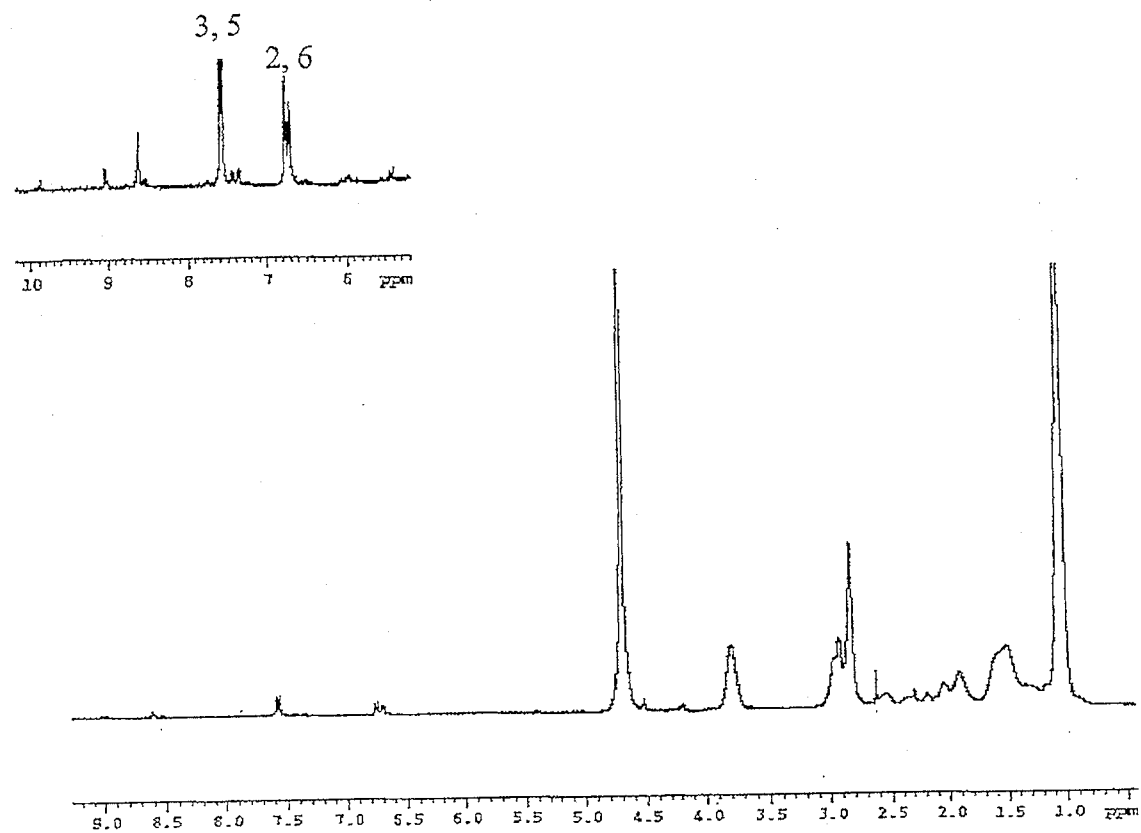


图 16

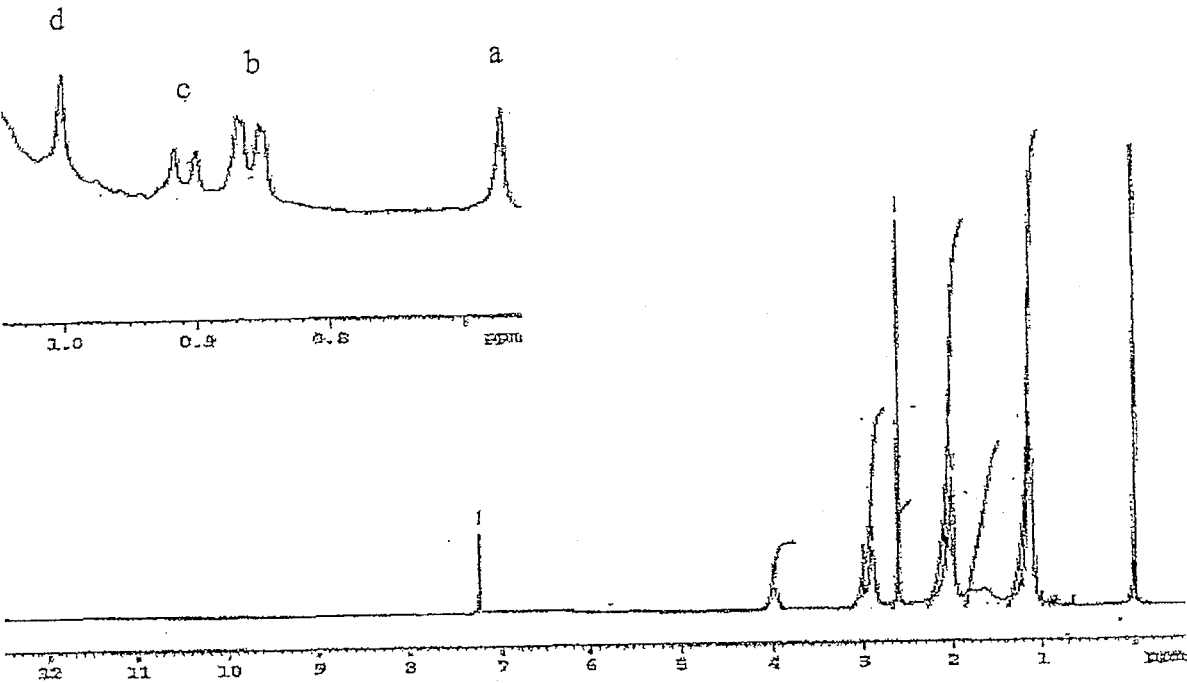


图 17

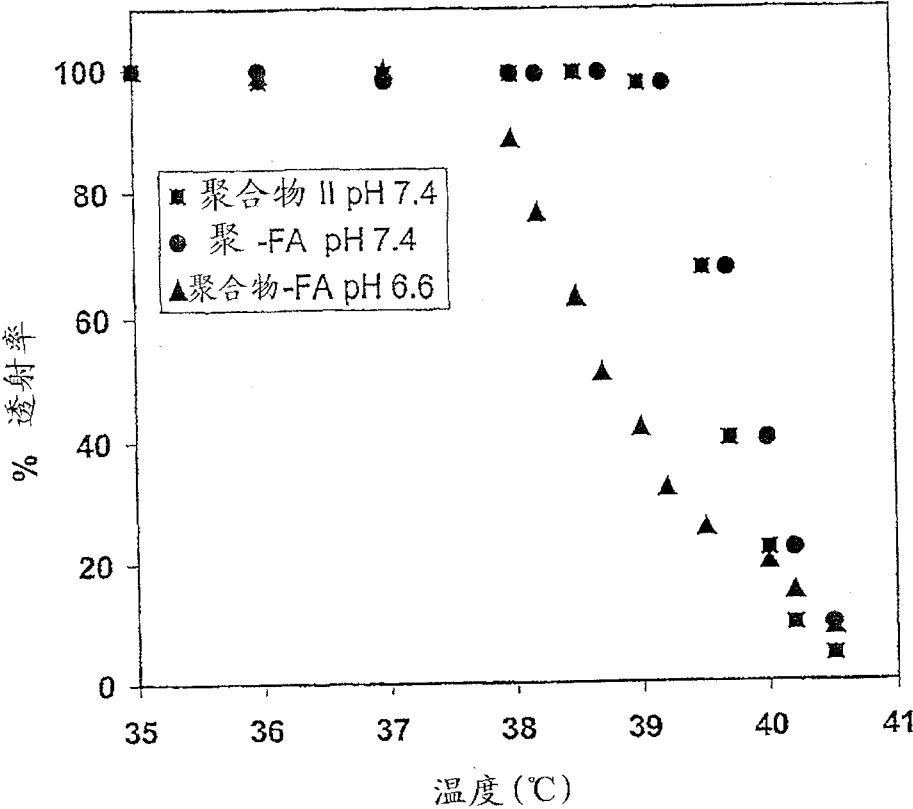


图 18

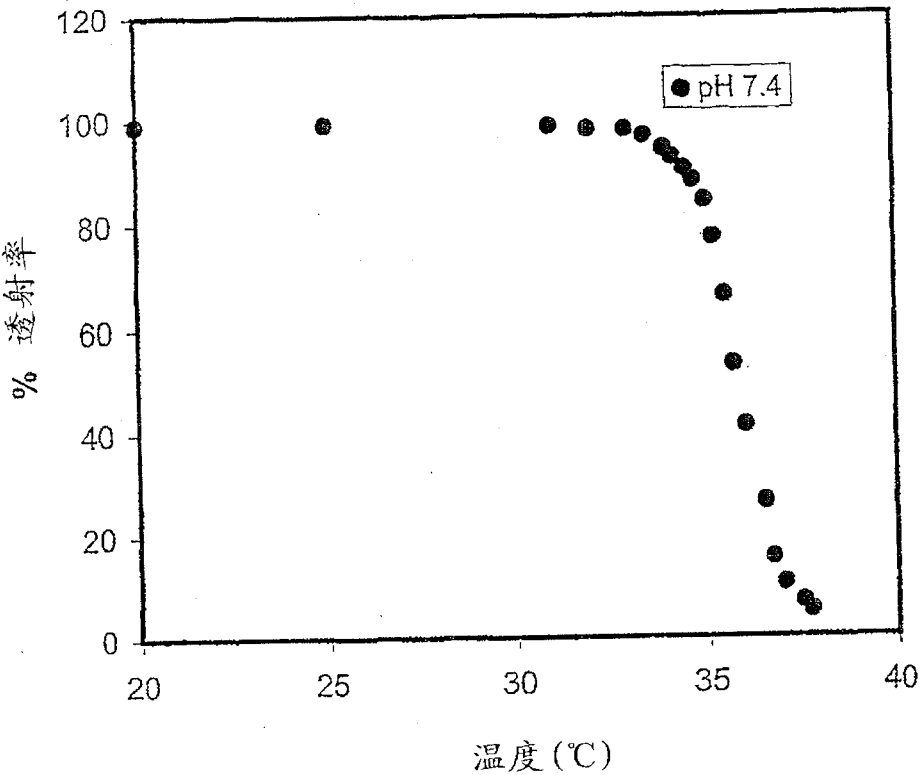


图 19

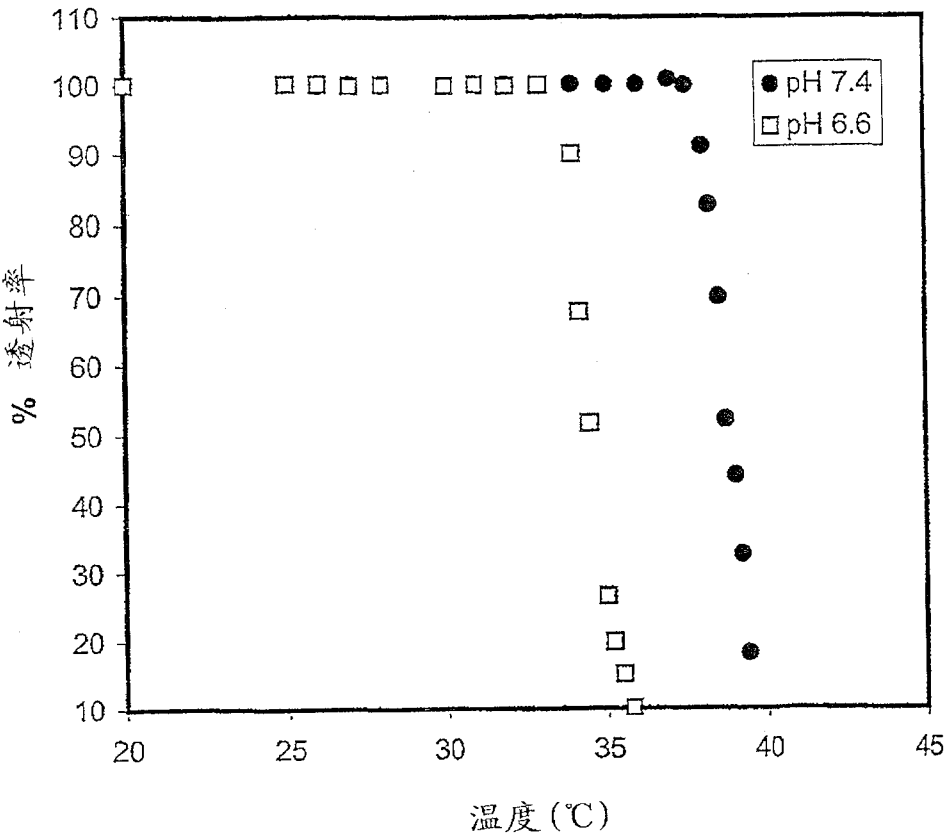


图 20

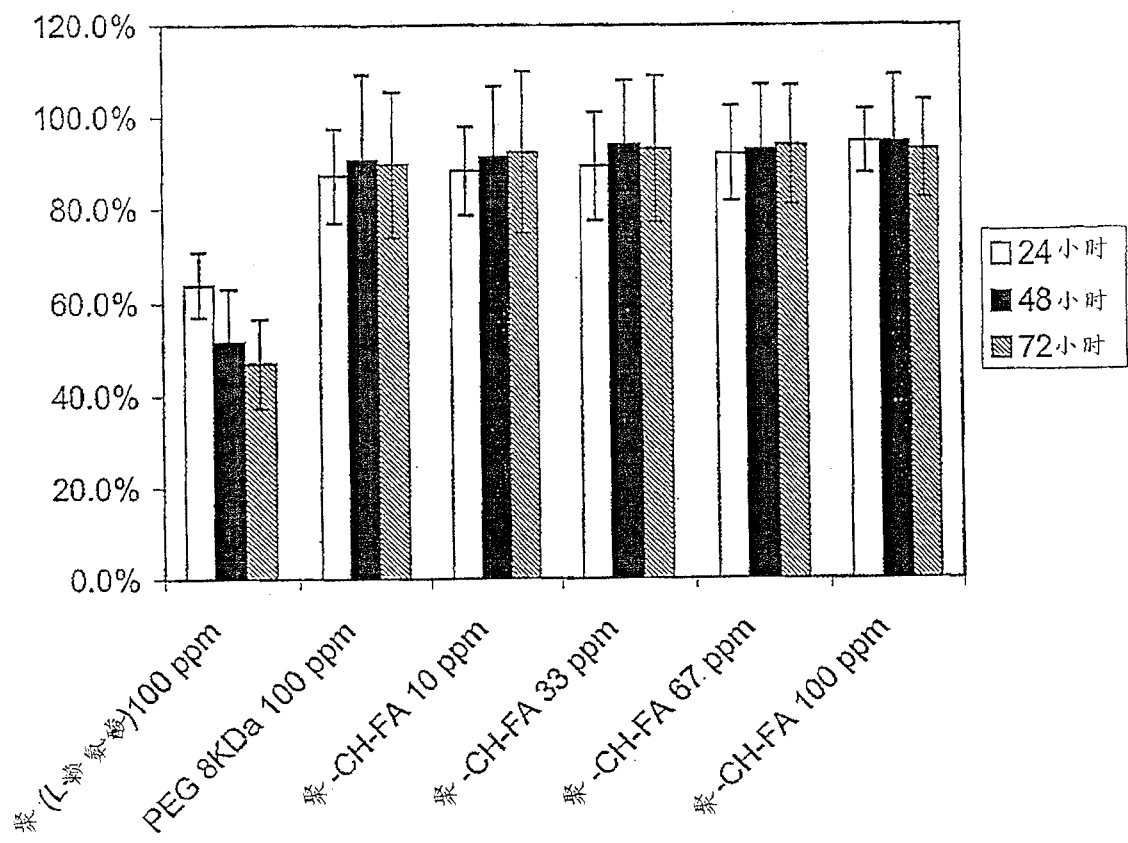


图 21

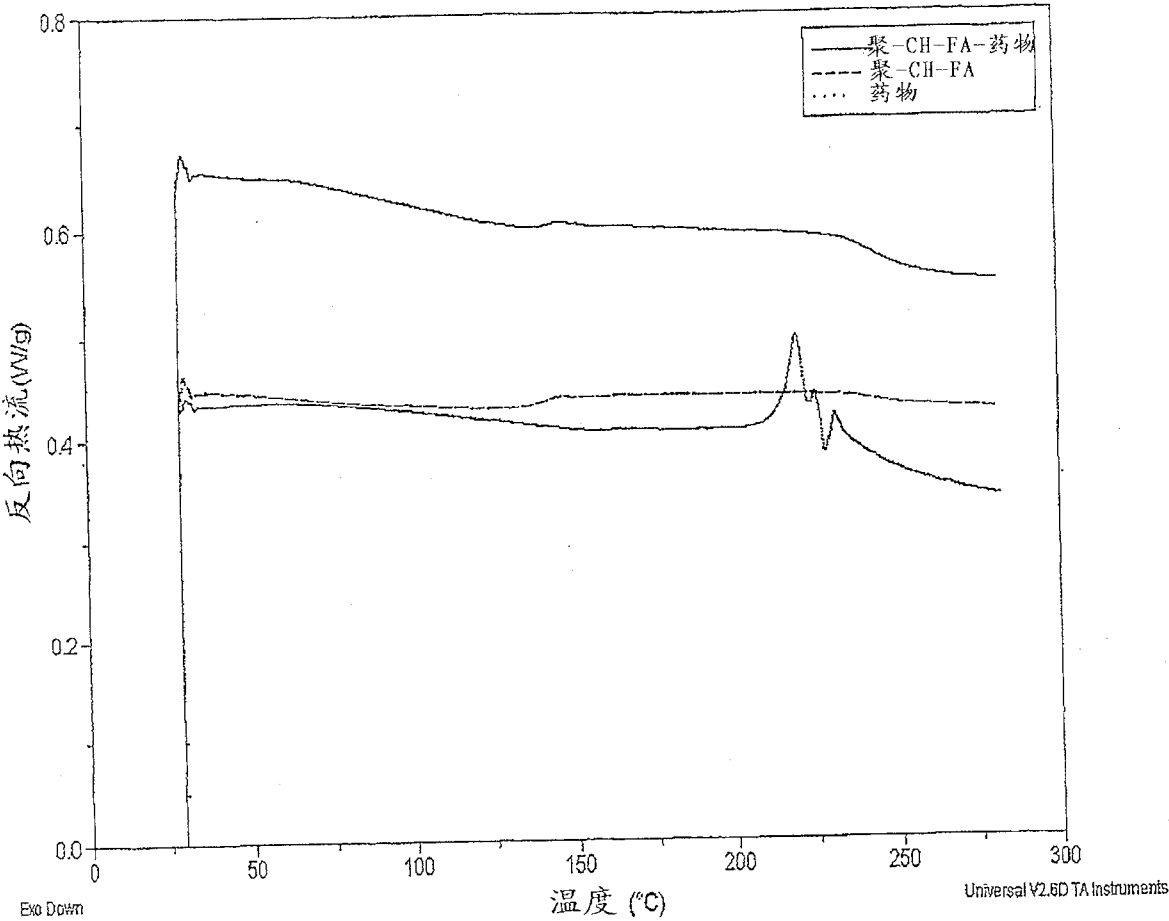


图 22

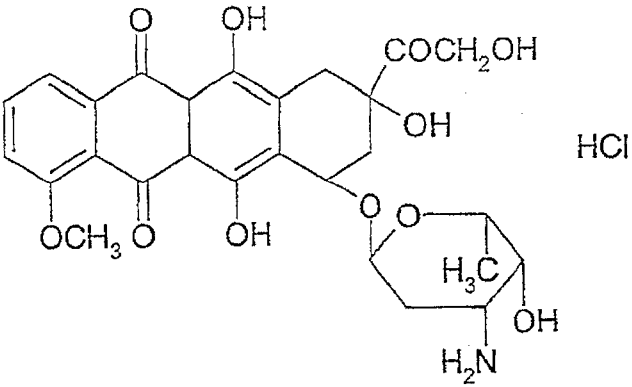


图 23

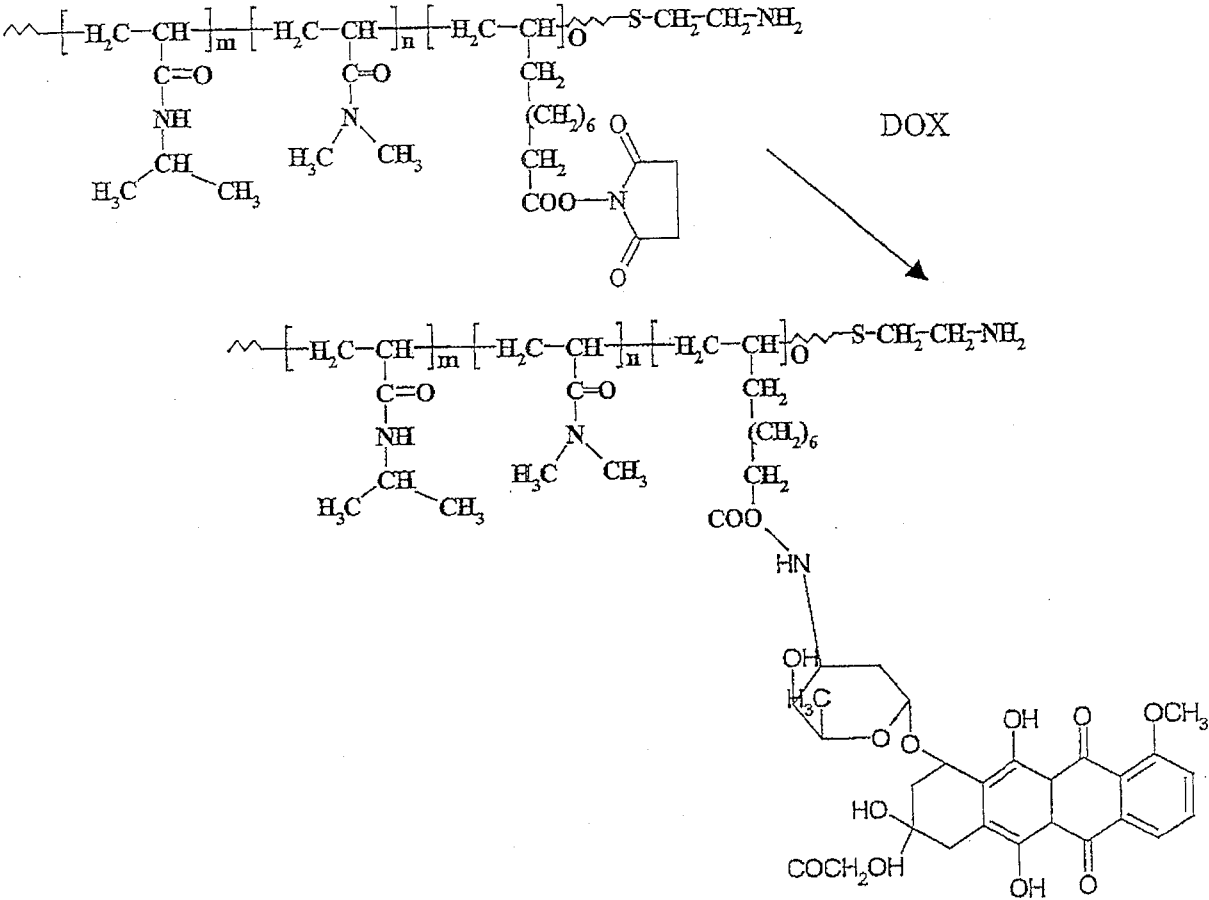


图 24

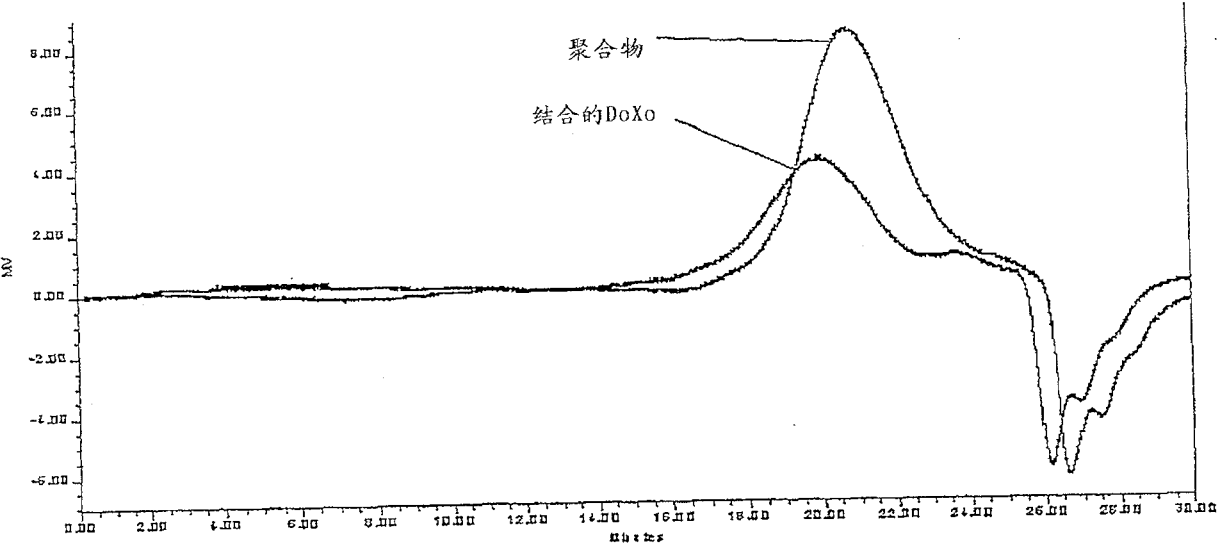


图 25

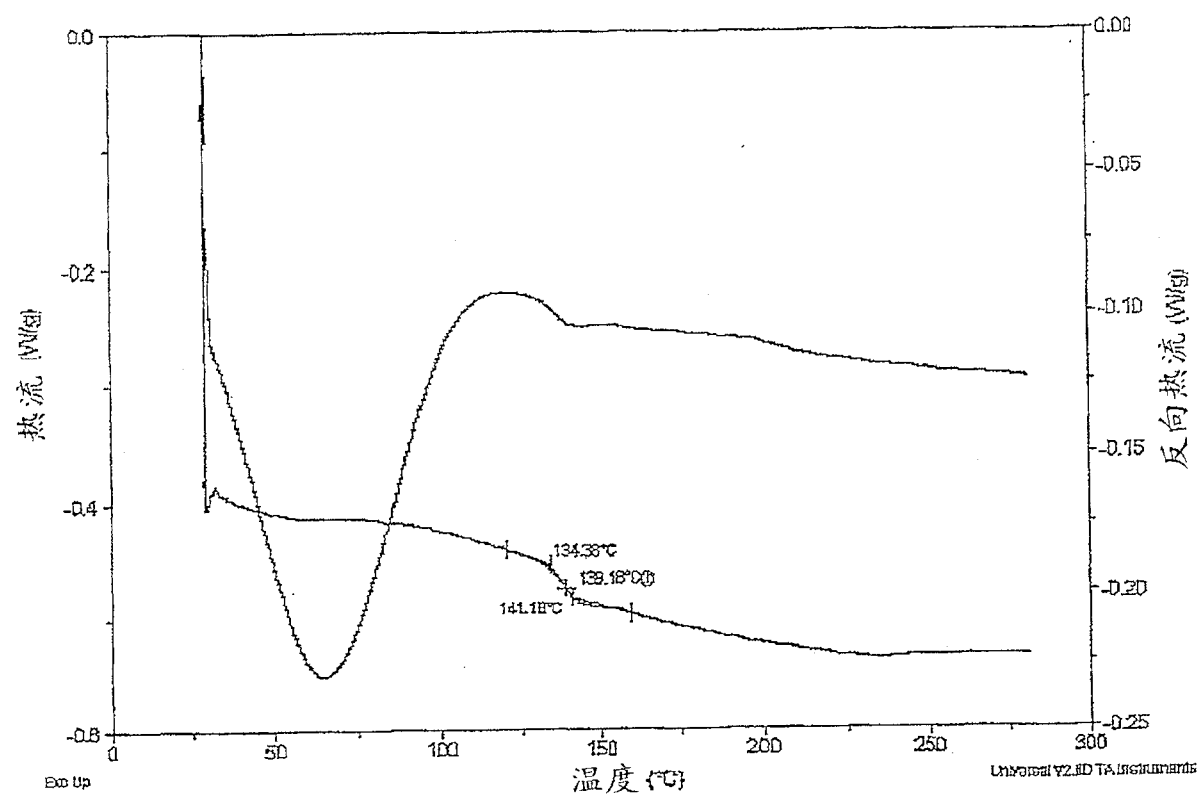


图 26

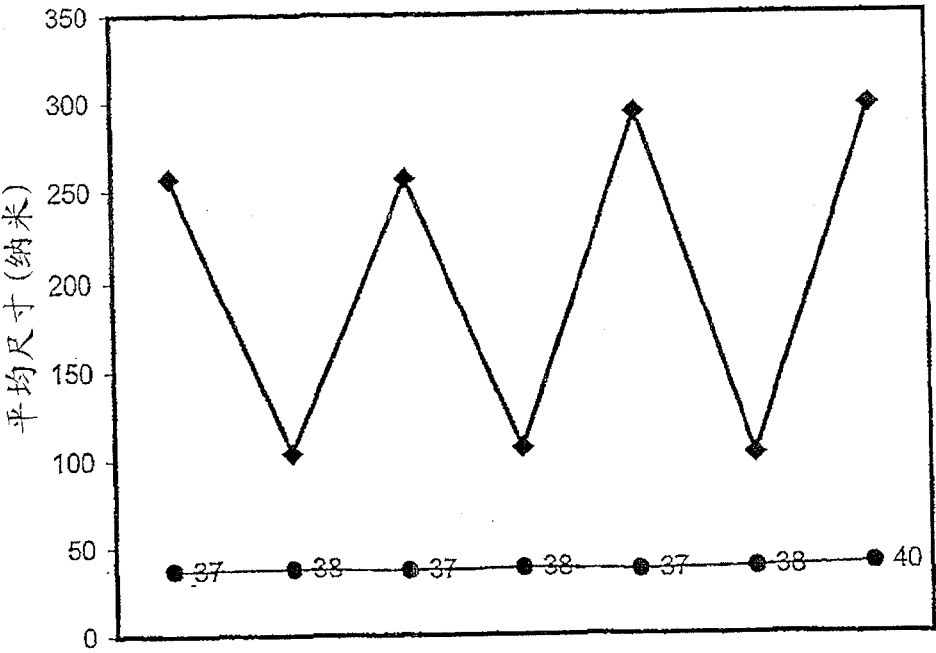
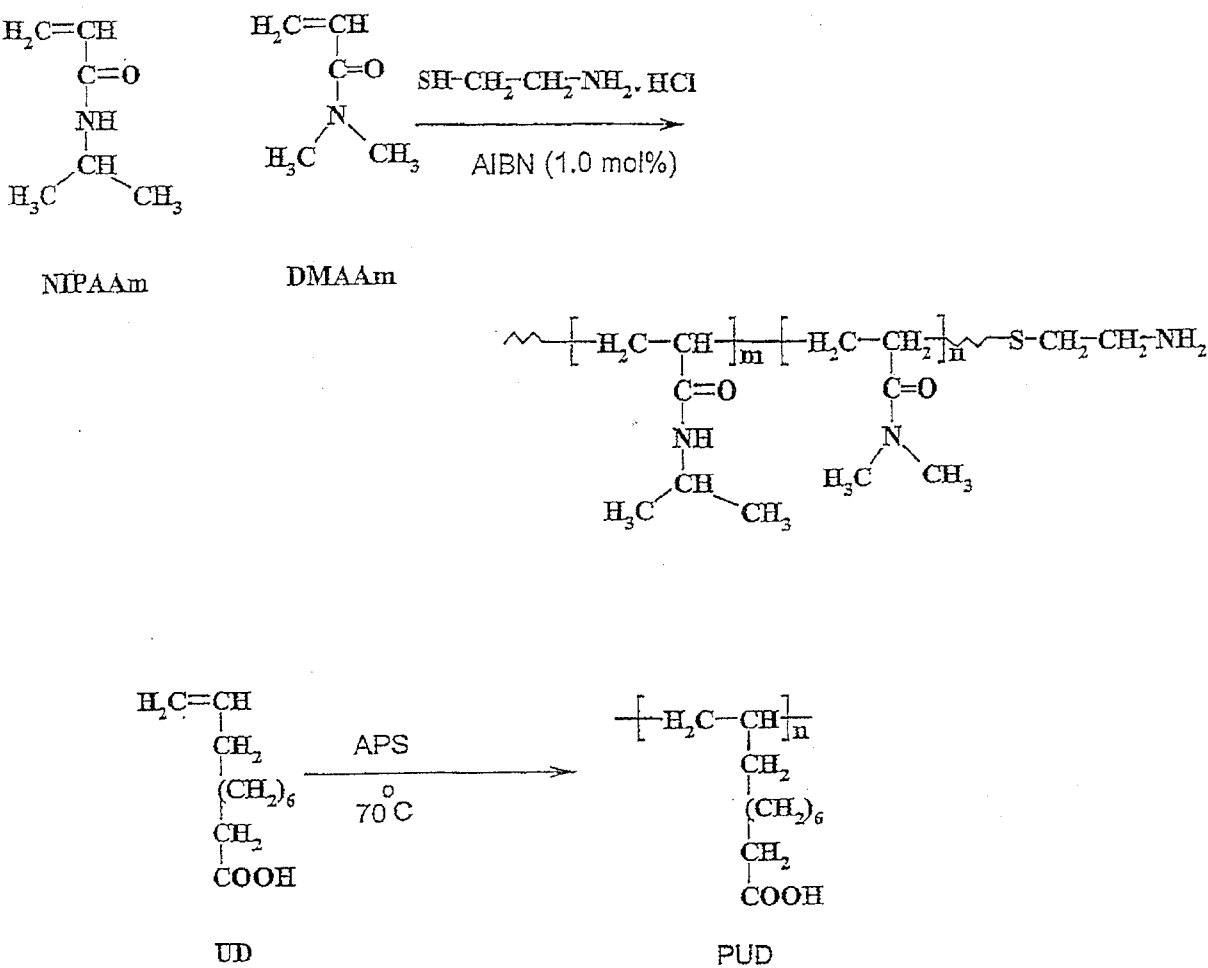
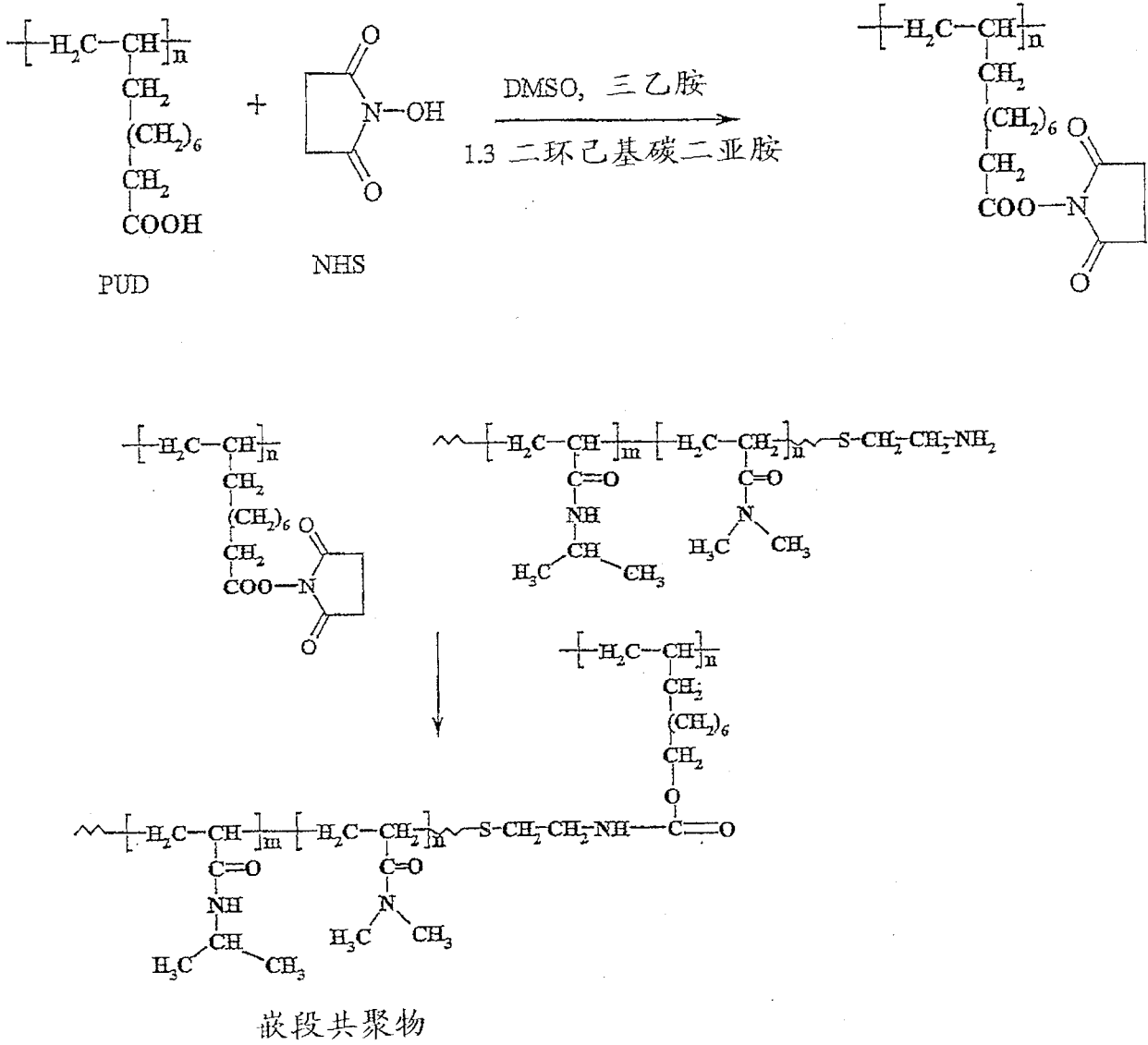


图 27



方案 5

图 28



方案 6

图 29

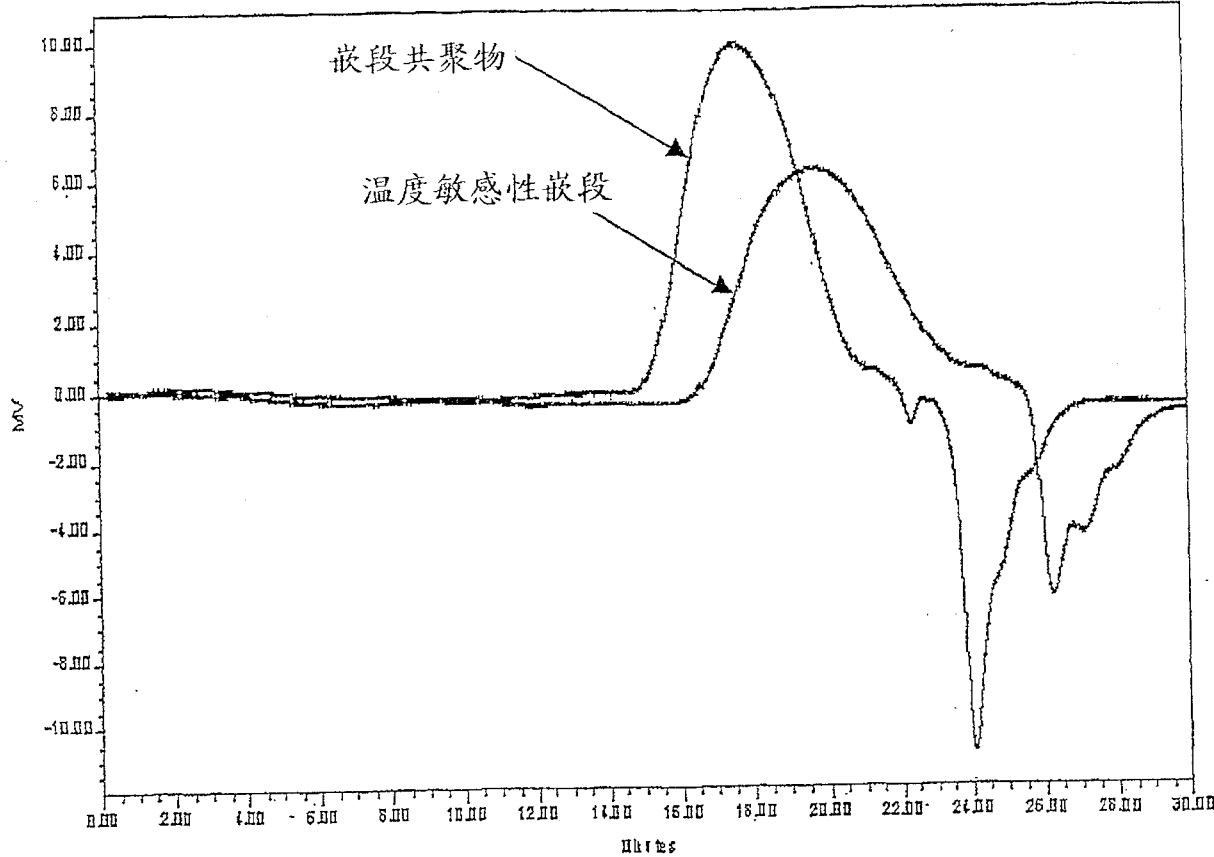


图 30

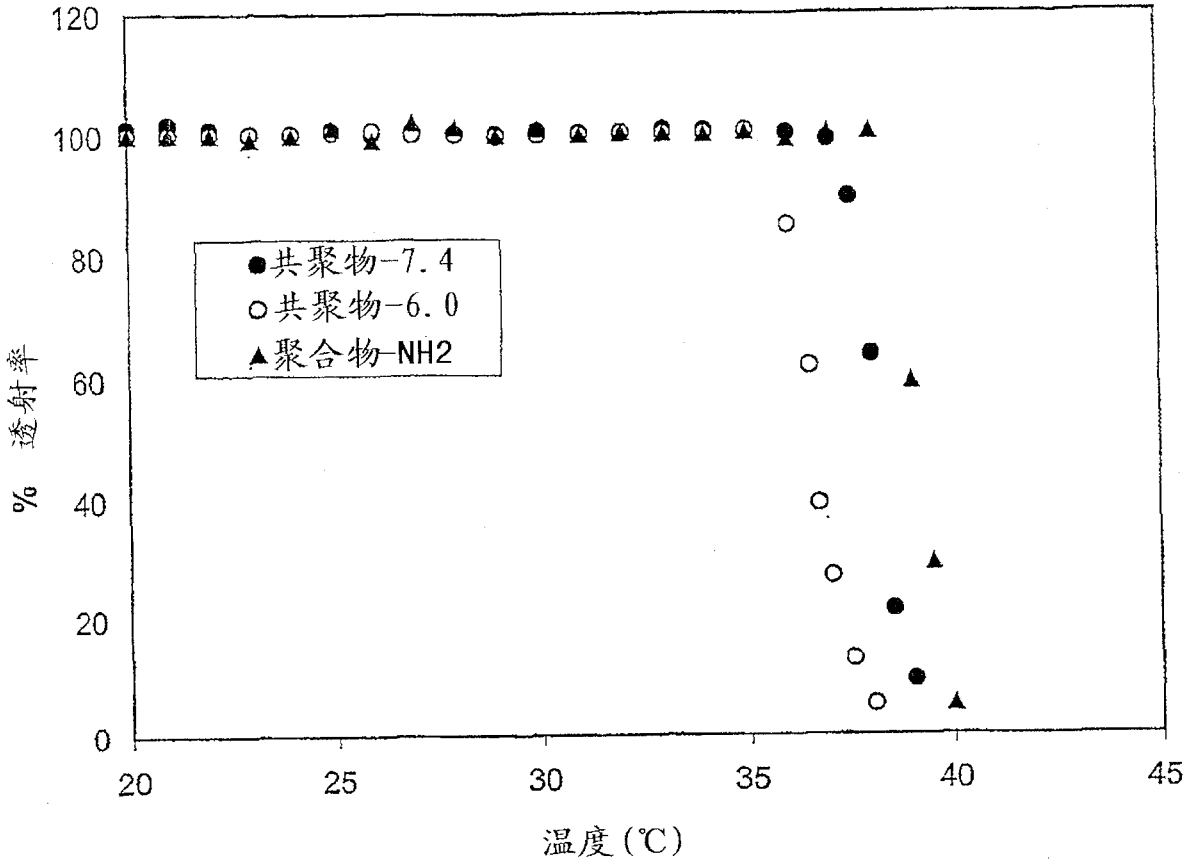


图 31