



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104844790 B

(45)授权公告日 2017.10.03

(21)申请号 201410056873.4

C07J 17/00(2006.01)

(22)申请日 2014.02.19

A61K 47/28(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

A61K 9/107(2006.01)

申请公布号 CN 104844790 A

A61P 35/00(2006.01)

A61K 31/765(2006.01)

(43)申请公布日 2015.08.19

A61K 31/58(2006.01)

(73)专利权人 沈阳药科大学

(56)对比文件

地址 110016 辽宁省沈阳市沈河区文化路103号

CN 102885772 A,2013.01.23,

CN 103181896 A,2013.07.03,

(72)发明人 邓意辉 宋艳志 田清菁 范迪

黄振君 刘欣荣 张婷 全晶晶

程晓波 余振南

Huan Xu, et. al..Esterase-catalyzed dePEGylation of pH-sensitive vesicles modified with cleavable PEG-lipid derivatives.《Journal of Controlled Release》.2008,第130卷第239页第2.2.2节,图5.

(74)专利代理机构 沈阳杰克知识产权代理有限公司 21207

代理人 李宇彤

审查员 朱黎黎

(51)Int.Cl.

C08G 65/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书17页 附图12页

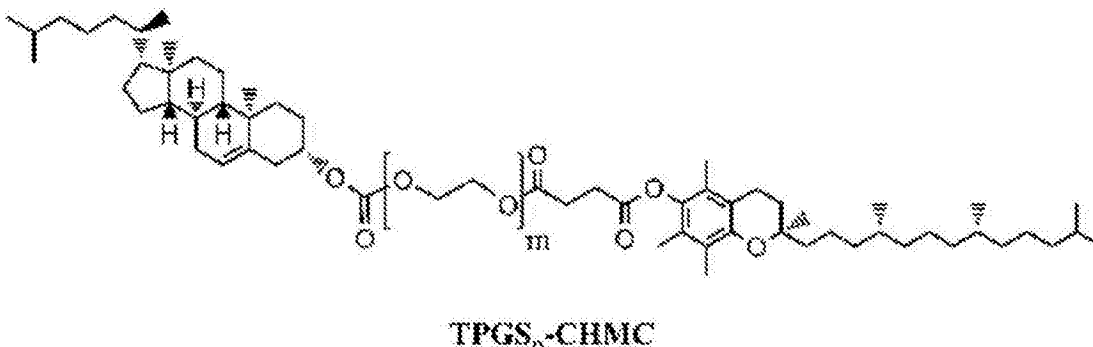
(54)发明名称

聚乙二醇维生素E琥珀酸酯-胆固醇碳酸酯及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明涉及聚合物TPGS<sub>n</sub>-胆固醇碳酸酯及其制备方法和应用。该聚合物以TPGS<sub>n</sub>为基本骨架,在羟基端通过碳酸酯键连接胆固醇得到。制备方法为:取TPGS<sub>n</sub>置于密闭容器中,氮气条件下加入碱性催化剂和缚酸剂,缓慢滴加含胆固醇氯甲酯的二氯甲烷溶液。冰水浴中搅拌混合5-30 min后置于室温反应,待反应结束后减压除去溶剂,得到粗产物;向所得粗产物中加入适量蒸馏水,以二氯甲烷萃取三次,再依次用100 mM盐酸、饱和氯化钠和冰水清洗3次,经冰正己烷沉淀得白色蜡状物;所得白色蜡状物经正己烷反复沉淀精制即可。该聚合物具有良好的生物相容性和生物可降解性,同时还具有临界胶束浓度低、稀释稳定性好、P-糖蛋白抑制作用强、合成工艺简单、应用范围广、成本低廉等优点。

1. 一种聚乙二醇维生素E琥珀酸酯-胆固醇碳酸酯, 其特征在于, 以聚乙二醇维生素E琥珀酸酯为基本骨架, 在其羟基端通过碳酸酯键连接胆固醇得到, 其结构式如下:



其中,  $m=9-136$ 。

2. 根据权利要求1所述的聚乙二醇维生素E琥珀酸酯-胆固醇碳酸酯的制备方法, 其特征在于包括如下步骤:

(1) 取聚乙二醇维生素E琥珀酸酯置于密闭容器中, 氮气条件下加入碱性催化剂和缚酸剂, 缓慢滴加含胆固醇氯甲酯的二氯甲烷溶液, 其中聚乙二醇维生素E琥珀酸酯与胆固醇氯甲酯的摩尔比为1:1-1:10, 碱性催化剂选自吡啶、4-二甲基氨基吡啶或4-吡咯烷基吡啶, 缚酸剂选自氢氧化钠、氢氧化钾、三乙胺、二异丙基乙基胺、碳酸钠、碳酸钾、碳酸氢钠或吡啶, 冰水浴中搅拌混合5-30min后置于室温反应, 反应时间为1-72h, 待反应结束后减压除去溶剂, 得到粗产物;

(2) 向所得粗产物中加入适量蒸馏水, 以二氯甲烷萃取三次, 再依次用100mM盐酸、饱和氯化钠和冰水清洗3次, 经冰正己烷沉淀得白色蜡状物;

(3) 所得白色蜡状物经正己烷反复沉淀精制, 得到白色蜡状的聚乙二醇维生素E琥珀酸酯-胆固醇碳酸酯聚合物纯品。

3. 根据权利要求2所述的制备方法, 其特征在于, 聚乙二醇维生素E琥珀酸酯与胆固醇氯甲酯的摩尔比为1:1-1:5。

4. 根据权利要求2所述的制备方法, 其特征在于, 反应时间为12-36h。

5. 根据权利要求2所述的制备方法, 其特征在于, 缚酸剂为三乙胺。

6. 一种药物组合物, 其特征在于, 包含权利要求1中所述的聚乙二醇维生素E琥珀酸酯-胆固醇碳酸酯和活性药物。

7. 根据权利要求6所述的药物组合物, 其特征在于, 所述的活性药物为难溶性药物, 选自紫杉烷类、阿霉素类、替尼类、埃坡霉素类、维A酸类、二氢吡啶类、人参皂甙类、脂溶性维生素类、他汀类、头孢类、激素类、康唑类、泊昔类、大环内酯类、多烯/多肽类、醌类化合物、金属铂类化合物、萜类化合物、黄酮类、姜黄素类、联苯酚类化合物、吡唑酮类、嘧啶类似物、嘌呤类似物、呋喃类、非甾体抗炎药、非黄酮类多酚类化合物、生物碱类、阿糖腺苷类似物、沙坦类、有机碘化合物、烷基酚类、马洛替酯、去甲斑蝥素、环扁桃酯。

8. 根据权利要求7所述的药物组合物, 其特征在于, 所述紫杉烷类选自紫杉醇、多西他赛、卡巴他赛, 阿霉素类选自阿霉素、表阿霉素、柔红霉素、伊达霉素、吡柔比星, 替尼类选自来他替尼、埃克替尼、阿法替尼、奥替尼啶、多韦替尼、苏尼替尼、坦度替尼、马赛替尼、吉非替尼、巴非替尼, 埃坡霉素类选自伊沙匹隆、埃坡霉素A、埃坡霉素B、埃坡霉素C、埃坡霉素D、

脱氧埃坡霉素,维A酸类选自维甲酸、全反式维甲酸、阿维A酯、芳维甲酸,二氢吡啶类选自尼群地平、尼莫地平、氨氯地平、西尼地平,人参皂甙类选自人参皂甙Re、人参皂甙Rg3、人参皂甙Rh1、人参皂甙Rh2、人参皂甙Rh3、人参皂甙Rh5,脂溶性维生素类选自维生素A、维生素D、维生素E、维生素K、胆骨化醇、钙三醇、VE烟酸酯,他汀类选自辛伐他汀、洛伐他汀、普伐他汀、美伐他汀,激素类选自地塞米松、地塞米松棕榈酸酯、醋酸地塞米松、非那雄胺、2-甲氧基雌二醇、乙烯雌酚、醋酸甲羟孕酮、可的松、氢化可的松、泼尼松、氢化泼尼松、前列地尔,康唑类选自伊曲康唑、伏立康唑、酮康唑、氟康唑、益康唑,泊苷类选自依托泊苷、替尼泊苷,头孢类选自头孢他啶、头孢曲松、头孢唑肟,大环内酯类选自红霉素、罗红霉素、阿奇霉素、克拉霉素、雷帕霉素,多烯/多肽类选自曲古霉素、两性霉素B、环孢菌素A、放线菌素D,醌类化合物选自辅酶Q10、丹参酮IIA、丝裂霉素,金属铂类化合物选自顺铂、卡铂、奈达铂、阿劳铂、奥沙利铂,萜类化合物选自 $\beta$ -榄香烯、青蒿素、二氢青蒿素、冬凌草甲素、冬凌草乙素、细辛醚、细辛脑、葫芦素提取物、蒿本内酯、马蔺子素,黄酮类选自葛根素、水飞蓟素、藤黄酸,姜黄素类选自姜黄素、单去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素,联苯酚类化合物选自厚朴酚、和厚朴酚,吡唑酮类选自氨基比林、保泰松,嘧啶类似物选自氟尿嘧啶、齐多夫定棕榈酸酯、齐多夫定肉豆蔻酸酯、齐多夫定硬脂酸酯、齐多夫定胆固醇酯,嘌呤类似物选自恩替卡韦、疏嘌呤、磺疏嘌呤钠,呋喃类选自呋喃唑酮、呋喃妥英、呋喃丙胺,非甾体抗炎药选自尼美舒利、布洛芬、吲哚美辛、萘普生、双氯芬酸、双氯芬酸钠、美洛昔康,五环三萜类化合物选自齐墩果酸、甘草酸、乌苏酸、桦木酸、23-羟基桦木酸,非黄酮类多酚类化合物选自白藜芦醇,生物碱类选自高三尖酯碱,阿糖腺苷类似物选自阿德福韦酯,沙坦类选自坎地沙坦、氯沙坦、缬沙坦、依普罗沙坦、缬沙坦苄酯、坎地沙坦、坎地沙坦乙酯、洛沙坦、厄贝沙坦、奥美沙坦、替米沙坦、阿齐沙坦,有机碘化合物选自胺碘酮,烷基酚类选自丙泊酚。

9. 权利要求1所述的聚乙二醇维生素E琥珀酸酯-胆固醇碳酸酯作为药物制剂载体的应用。

10. 根据权利要求9所述的应用,其特征在于,制剂为液体制剂、固体制剂或半固体制剂,选自胶束、脂质体、乳剂、囊泡、纳米粒、微球、微丸、固体分散体、颗粒剂、胶囊剂、片剂、软膏剂、栓剂及液体微粒制剂的干燥品。

## 聚乙二醇维生素E琥珀酸酯-胆固醇碳酸酯及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于药物制剂领域,具体涉及到聚乙二醇维生素E琥珀酸酯-胆固醇碳酸酯的制备方法及其在药物传递系统中的应用。

### 背景技术

[0002] 聚乙二醇维生素E琥珀酸酯(d- $\alpha$ -tocopherol polyethyleneglycol succinate, TPGS<sub>n</sub>,其中n代表聚乙二醇的分子量)是维生素E的水溶性衍生物,由维生素E琥珀酸酯(vitamin E succinate,VES)的羧基与聚乙二醇(polyethylene glycol,PEG)酯化而成,其中PEG的分子量从几十到几万不等。随着PEG分子量的不同,其亲水亲油平衡值(HLB)和油水分配系数(P)等理化性质也存在着差异。聚乙二醇维生素E琥珀酸酯最早由美国Eastman公司开发并上市,PEG分子量为1000的TPGS<sub>n</sub>(简称TPGS<sub>1000</sub>)已被收载入《美国药典》。TPGS<sub>1000</sub>可作为增溶剂、乳化剂、增塑剂、稳定剂、吸收促进剂以及水难溶性和脂溶性药物传递系统的载体,其应用涵盖了液体微粒制剂(如胶束、脂质体、乳剂和纳米粒等)及固体制剂(如微球、微丸、固体分散体等)多种剂型。(Guo,Y.,et al.,The applications of Vitamin E TPGS in drug delivery.European Journal of Pharmaceutical Sciences,2013)

[0003] 聚乙二醇维生素E琥珀酸酯结构中PEG和VES的连接键为酯键,在体内酯酶作用下可以水解,易于被代谢排出体外,具有较高的安全性。Eastman公司的研究表明,成年大鼠口服TPGS<sub>1000</sub>的半数致死量(LD<sub>50</sub>)大于7g/kg。连续90天在饲料中添加质量分数为0.002%、0.2%和2.0%的TPGS<sub>1000</sub>,受试大鼠的体质量、器官质量、摄食量、血液学、显微形态学及生长率均正常,按上述方案饲养大鼠175天后,受试鼠的生育指标无异常,幼鼠胚胎发育也一切正常。Krasavage,W.J.and C.J.Terhaar,d-.alpha.-Tocopheryl poly(ethylene glycol)1000succinate:acute toxicity,subchronic feeding, reproduction,and teratologic studies in the rat.Journal of agricultural and food chemistry,1977.25(2):p.273-278)

[0004] 另外,由于聚乙二醇维生素E琥珀酸酯的极性PEG头部和非极性VES尾部均具有较大的表面积,其与油水两相的作用力都很强,是一种高效的乳化剂。Mu等以TPGS<sub>1000</sub>作为乳化剂制备载紫杉醇的PLGA纳米球,并测定药物的包封率和体外释放速率。结果显示,TPGS<sub>1000</sub>的乳化效率比传统乳化剂聚乙烯醇(PVA)高67倍,且对药物的包封率高达100%,体外释放更加缓慢。(Si-Shen,F.,et al.,Nanoparticles of biodegradable polymers for clinical administration of paclitaxel.Current medicinal chemistry,2004.11(4): p.413-424)进一步研究发现,TPGS<sub>1000</sub>纳米粒可明显改善包载药物的体内药动学参数,显著延长药物的血浆半衰期。Feng课题组的实验数据表明,以10mg/kg剂量给大鼠静脉注射多西他赛时,市售制剂Taxotere的有效浓度仅能维持23h,而PLA-TPGS<sub>1000</sub>纳米粒可长达360h。此外,研究者还发现,随着聚乙二醇维生素E琥珀酸酯的亲水PEG链延长,所制备的纳米粒具有更好的稳定性和体内循环时间。(Zhang,Z.,S.Tan,and S.-S.Feng,Vitamin E TPGS as a

molecular biomaterial for drug delivery. *Biomaterials*, 2012. 33 (19) :p.4889-4906) Duhem等以TPGS<sub>2000</sub>为稳定剂制备的阿霉素纳米粒载药量高达34%，且室温放置7天仅有2%的药物泄漏。(Duhem, N., et al., Self-Assembling Doxorubicin-Tocopherol Succinate Prodrug as a New Drug Delivery System: Synthesis, Characterization, and in Vitro and in Vivo Anticancer Activity. *Bioconjug Chem*, 2013) TPGS<sub>1000</sub>作为乳化剂的另一个优势是易于洗去。用X-射线光电子能谱(XPS)分别对PVA及TPGS<sub>1000</sub>纳米球进行乳化剂残留检测,发现相对于PVA纳米球来说,TPGS<sub>1000</sub>纳米球表面的乳化剂残留量更少,这种较低的乳化剂残留对制剂的安全性是十分必要的。(Mu, L. and S.-S. Feng, PLGA/TPGS nanoparticles for controlled release of paclitaxel: effects of the emulsifier and drug loading ratio. *Pharmaceutical research*, 2003. 20 (11) :p.1864-1872)

[0005] 聚乙二醇维生素E琥珀酸酯具有良好的增溶和渗透促进作用。以安普那韦为例,在pH为7的缓冲液中,当TPGS<sub>1000</sub>的质量浓度由0.02%增加到2%时,安普那韦的溶解度提高了20多倍。(Yu, L., et al., Vitamin E-TPGS increases absorption flux of an HIV protease inhibitor by enhancing its solubility and permeability. *Pharmaceutical research*, 1999. 16 (12) :p.1812-1817) Shen等研究了TPGS<sub>1000</sub>对雌二醇溶解度和皮肤渗透作用的影响。结果显示,TPGS<sub>1000</sub>可以增强雌二醇的溶解度和皮肤渗透性,且随着TPGS<sub>1000</sub>浓度的增加,这种渗透促进作用增强。(Sheu, M.-T., et al., Influence of micelle solubilization by tocopheryl polyethylene glycol succinate (TPGS) on solubility enhancement and percutaneous penetration of estradiol. *Journal of Controlled Release*, 2003. 88 (3) :p.355-368)

[0006] 近年来多项研究证实聚乙二醇维生素E琥珀酸酯对P-糖蛋白有抑制作用。对于PEG分子量为200-6000的聚乙二醇维生素E琥珀酸酯来说,TPGS<sub>1000</sub>对P-糖蛋白的抑制作用和细胞毒性是最强的。(Collnot, E.-M., et al., Influence of vitamin E TPGS poly(ethylene glycol) chain length on apical efflux transporters in Caco-2 cell monolayers. *Journal of Controlled Release*, 2006. 111 (1) :p.35-40) 值得注意的是,与其他已经被证明具有此作用的非离子表面活性剂(如Cremophor EL、Tween 80及Pluronic等)相比,TPGS<sub>1000</sub>的抑制作用也最为突出。(Dintaman, J.M. and J.A. Silverman, Inhibition of P-glycoprotein by D- $\alpha$ -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS). *Pharmaceutical research*, 1999. 16 (10) :p.1550-1556) (Bogman, K., et al., The role of surfactants in the reversal of active transport mediated by multidrug resistance proteins. *Journal of pharmaceutical sciences*, 2003. 92 (6) :p.1250-1261) 。P-糖蛋白是一种ATP依赖性外排泵,可以逆梯度将某些药物运出细胞,使它们在胞内的浓度降低至有效浓度以下。由于P-糖蛋白在小肠上皮细胞中分布,且有广泛的底物特异性,所以是许多药物口服吸收的限制性因素;同时,P-糖蛋白的过表达也是肿瘤细胞产生多药耐药现象的重要原因。Ho等考察了TPGS<sub>400</sub>对小鼠紫杉醇口服吸收的影响,结果显示,含TPGS<sub>400</sub>制剂组的C<sub>max</sub>和AUC值比市售组分别提高了2倍和3倍。(Ho, P.-Y., et al., Enhanced oral bioavailability of paclitaxel by d- $\alpha$ -tocopheryl polyethylene glycol 400 succinate in mice. *International journal of pharmaceuticals*, 2008. 359 (1) :p.174-181) Bogman等报道了TPGS<sub>1000</sub>可显著提高健康受试者

口服他林洛尔的 $C_{max}$ 和AUC,分别比溶液组提高了39%和100%。(Bogman,K.,et al.,P-glycoprotein and surfactants:effect on intestinal talinolol absorption.Clinical Pharmacology&Therapeutics,2005.77(1):p.24-32)Dintaman和Silverman等在研究TPGS<sub>1000</sub>对P-糖蛋白的抑制作用时发现,对于耐药肿瘤细胞G185来说,TPGS<sub>1000</sub>的加入逆转了它对不同作用机理抗肿瘤药物(如阿霉素、长春碱、紫杉醇及秋水仙碱)的耐药性,(Dintaman,J.M.and J.A.Silverman,Inhibition of P-glycoprotein by D- $\alpha$ -tocopheryl polyethylene glycol 1000succinate (TPGS).Pharmaceutical research,1999.16(10):p.1550-1556)且这种逆转作用同样也适用于其他P-糖蛋白过表达的肿瘤细胞。(Zhao,S.,et al.,pH-Sensitive Docetaxel-Loaded d- $\alpha$ -Tocopheryl Polyethylene Glycol Succinate-Poly( $\beta$ -amino ester)Copolymer Nanoparticles for Overcoming Multidrug Resistance.Biomacromolecules,2013.14(8):p.2636-2646)(Shieh,M.-J.,et al.,Reversal of doxorubicin-resistance by multifunctional nanoparticles in MCF-7/ADR cells.Journal of Controlled Release,2011.152(3):p.418-425)(Tang,J.,et al.,Vitamin E reverses multidrug resistance in vitro and in vivo.Cancer Lett,2013.336(1):p.149-57)

[0007] 更重要的是,聚乙二醇维生素E琥珀酸酯本身也是一种肿瘤细胞调节因子,可以通过选择性线粒体介导的凋亡途径与抗癌药物协同发挥肿瘤抑制作用,且对正常细胞无毒性。目前,该抑制作用已经在乳腺癌细胞、肺癌细胞及口腔上皮样癌细胞等多种肿瘤细胞上得到证实。(Mi,Y.,Y.Liu,and S.S.Feng,Formulation of Docetaxel by folic acid-conjugated d-alpha-tocopheryl polyethylene glycol succinate 2000 (Vitamin E TPGS(2k))micelles for targeted and synergistic chemotherapy.Biomaterials,2011.32(16):p.4058-66)(Saxena,V.and M.D.Hussain,Poloxamer 407/TPGS mixed micelles for delivery of gambogic acid to breast and multidrug-resistant cancer.International journal of nanomedicine,2012.7:p.713)(Youk,H.J.,et al.,Enhanced anticancer efficacy of alpha-tocopheryl succinate by conjugation with polyethylene glycol.J Control Release,2005.107(1):p.43-52)(Zhao,H.and L.Y.L.Yung.Folate Conjugated Polymer Micelles Formulated with TPGS for Selective Tumor Targeting.in The2006Annual Meeting.2006)

[0008] 不仅如此,聚乙二醇维生素E琥珀酸酯还可以显著抑制细胞色素P450 3A4(CYP 3A4)的活性。细胞色素P450 3A4是体内极为重要的药物代谢酶,约参与38个类别150多种药物(约占全部药物50%)的代谢。该酶的抑制可以减缓药物的代谢速率,延长活性药物在体内的存在时间。(Christiansen,A.,et al.,Effects of non-ionic surfactants on cytochrome P450-mediated metabolism in vitro.European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,2011.78(1):p.166-172)Bittner等将TPGS<sub>1000</sub>作为表面活性剂,对细胞色素P450 3A4底物秋水仙碱进行研究。结果显示,大鼠口服给与含10%(w/v)TPGS<sub>1000</sub>的秋水仙碱溶液后,AUC值比单纯的溶液组增加了2倍。(Bittner,B.,et al.,Improvement of the bioavailability of colchicine in rats by co-administration of D- $\alpha$ -tocopherol polyethylene glycol 1000succinate and a polyethoxylated derivative of 12-hydroxy-stearic acid.Arzneimittelforschung,

2002.52 (09) :p.684-688)

[0009] 虽然聚乙二醇维生素E琥珀酸酯具有上述令人欣喜的特点,但是也应该意识到绝大多数TPGS<sub>n</sub>的临界胶束浓度(critical micelle concentration,CMC)都相对较高(如TPGS<sub>1000</sub>的CMC值为0.02%,w/v),作为药物载体时存在着载药量低及稀释稳定性差等问题。研究者们曾采用与其他聚合物(如Pluronic P123和PEG衍生物)联合制备混合胶束的方式来解决上述问题,有效的提高了胶束的稳定性和所包载药物的生物利用度。Dabholkar等将聚乙二醇<sub>2000</sub>-磷脂酰乙醇胺(mPEG<sub>2000</sub>-PE)与TPGS<sub>1000</sub>按物质的量比1:1制备混合胶束,所制备胶束的CMC仅为 $1.5 \times 10^{-5}$ M,包载紫杉醇后在37℃、体外模拟的胃液环境中孵育12h未见沉淀析出,制剂稳定性良好。(Dabholkar,R.D.,et al.,Polyethylene glycol-phosphatidylethanolamine conjugate(PEG-PE)-based mixed micelles:some properties,loading with paclitaxel,and modulation of P-glycoprotein-mediated efflux.International journal of pharmaceuticals,2006.315(1):p.148-157)Gill等以mPEG<sub>2000</sub>-DSPE和TPGS<sub>1000</sub>制备共载紫杉醇和欧昔菊的混合胶束,药物的包封率可达95%,具有良好的缓释作用。(Gill,K.K.,A.Kaddoumi,and S.Nazzal,Mixed micelles of PEG<sub>2000</sub>-DSPE and vitamin-E TPGS for concurrent delivery of paclitaxel and parthenolide:Enhanced chemosensitization and antitumor efficacy against non-small cell lung cancer(NSCLC) cell lines.European Journal of Pharmaceutical Sciences,2012.46(1):p.64-71)此外,将聚乙二醇维生素E琥珀酸酯与药物直接偶联也是一个研究方向,偶联后TPGS<sub>n</sub>的CMC降低,药物作为疏水核心载入胶束内核中,溶解度和生物利用度均得到改善和提高。Feng等将TPGS<sub>1000</sub>与阿霉素偶联后直接注射,与溶液组相比,肿瘤细胞对阿霉素-TPGS<sub>1000</sub>偶联物的摄取量显著提高,细胞毒性也明显增强。大鼠体内药动实验结果显示,血浆半衰期和AUC分别比溶液组提高了4.5倍和24倍,同时制剂对心和胃肠道的毒副作用也比溶液组明显降低。(Anbharasi,V.,N.Cao,and S.S.Feng,Doxorubicin conjugated to D-alpha-tocopheryl polyethylene glycol succinate and folic acid as a prodrug for targeted chemotherapy.J Biomed Mater Res A,2010.94(3):p.730-43)目前,研究较多的是以聚乙二醇维生素E琥珀酸酯为骨架,对其进行结构修饰。如在其羟基端连接PLA、PLGA、PCL和聚β-氨基酸等。(Zhang,Z.,et al.,In vitro and in vivo investigation on PLA-TPGS nanoparticles for controlled and sustained small molecule chemotherapy.Pharmaceutical research,2008.25(8):p.1925-1935)(Tao,W.,et al.,Docetaxel-loaded nanoparticles based on star-shaped mannitol-core PLGA-TPGS diblock copolymer for breast cancer therapy.Acta biomaterialia,2013.9(11):p.8910-8920)(Zhang,Z.and S.-S.Feng,Nanoparticles of poly(lactide)/vitamin E TPGS copolymer for cancer chemotherapy:synthesis,formulation,characterization and in vitro drug release.Biomaterials,2006.27(2):p.262-270)(Zhao,S.,et al.,pH-Sensitive Docetaxel-Loaded d-α-Tocopheryl Polyethylene Glycol Succinate-Poly(β-amino ester) Copolymer Nanoparticles for Overcoming Multidrug Resistance.Biomacromolecules,2013.14(8):p.2636-2646)从上述文献的实验结果来看,所合成聚乙二醇维生素E琥珀酸酯衍生物的CMC值均较低,载药能力良好。其中,PLA-TPGS<sub>1000</sub>还可作为蛋白质药物的载体,有效提高蛋白质类药物的稳定性。(Lee,

S.H., Z. Zhang, and S.-S. Feng, Nanoparticles of poly(lactide)-tocopheryl polyethylene glycol succinate (PLA-TPGS) copolymers for protein drug delivery. *Biomaterials*, 2007. 28 (11) :p. 2041-2050) 对聚乙二醇维生素E琥珀酸酯进行结构改造虽然可行,但在配基的选择上应该慎重。一个好的配基,不仅起到降低聚乙二醇维生素E琥珀酸酯临界胶束浓度的作用,还应该具有低毒、生物相容性好等特点,最好本身就具有某些生物学功能。

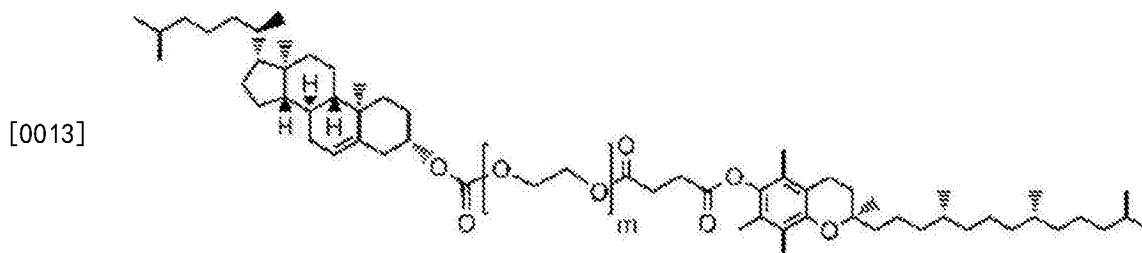
[0010] 胆固醇又称胆甾醇,是一种环戊烷多氢菲的衍生物,广泛存在于动物体内,是动物组织细胞中不可缺少的重要物质,它不仅参与细胞膜的形成,还是合成胆汁酸、维生素D以及甾体激素的原料。一些研究表明由于肿瘤细胞的快速增殖,需要从血浆中大量摄取胆固醇来满足有丝分裂,导致机体胆固醇代谢紊乱,发生低胆固醇血症现象。(Scali, J., et al., Relationship of serum cholesterol, dietary and plasma beta-carotene with lung cancer in male smokers. *Eur J Cancer Prev*, 1995. 4 :p. 169-174) (Boyd, N., et al., Plasma lipids, lipoproteins, and familial breast cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 1995. 4 (2) :p. 117-122)。临床试验结果也显示,前列腺癌、乳腺癌、肝癌、胃癌及食管癌等患者的血清中胆固醇含量较低,癌细胞中胆固醇含量较高。(Freeman, M.R. and K.R. Solomon, Cholesterol and prostate cancer. *Journal of cellular biochemistry*, 2003. 91 (1) :p. 54-69) (Danilo, C. and P.G. Frank, Cholesterol and breast cancer development. *Current Opinion in Pharmacology*, 2012. 12 (6) :p. 677-682) (Dessi, S., et al., Cholesterol content in tumor tissues is inversely associated with high-density lipoprotein cholesterol in serum in patients with gastrointestinal cancer. *Cancer*, 2006. 73 (2) :p. 253-258) 近年来对胆固醇的研究还集中在siRNA的递送和转染方面。在siRNA的递送过程中,胆固醇不仅介导载体与细胞膜的融合和内吞,还起到靶向配基的作用。(董文娟,周银键,梁伟, siRNA脂质纳米输送载体的研究进展. 2012. 39 (5) :p. 396-401) 与不含胆固醇的载体相比,含胆固醇的载体可以显著提高siRNA的转染效率。(Liu, Y., et al., Factors influencing the efficiency of cationic liposome-mediated intravenous gene delivery. *Nature biotechnology*, 1997. 15 (2) :p. 167-173) (Liu, Y., et al., Cationic liposome-mediated intravenous gene delivery. *Journal of Biological Chemistry*, 1995. 270 (42) :p. 24864-24870) (Soutschek, J., et al., Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*, 2004. 432 (7014) :p. 173-178) Xu等的研究结果显示,叶酸-胆固醇修饰的脂质体比叶酸-DSPE修饰的脂质体转染效率提高了50倍。(Xu, L. and T.J. Anchordoquy, Effect of cholesterol nanodomains on the targeting of lipid-based gene delivery in cultured cells. *Molecular Pharmaceutics*, 2010. 7 (4) :p. 1311-1317) 最近的研究还发现,胆固醇与具有多环结构的难溶性药物亲和力较强,二者可以形成立体复合物。Lee等合成了含胆固醇的聚合物P (MDS-CO-CES),并用其制备载紫杉醇的胶束,仅通过简单的自组装方法就可以使载药量和包封率分别达到14%和92%,制剂稳定性良好。(Lee, A.L., et al., Synergistic Anticancer Effects Achieved by Co-Delivery of TRAIL and Paclitaxel Using Cationic Polymeric Micelles. *Macromolecular bioscience*, 2011. 11 (2) :p. 296-307)



[0011] 因此,如果将胆固醇与聚乙二醇维生素E琥珀酸酯结合,将具有以下优势:首先,由于胆固醇具有较强的亲脂性,可以显著降低TPGS<sub>n</sub>的临界胶束浓度,提高其载药能力,对于具有多环结构难溶性药物的包封将有极大改善;其次,可以利用胆固醇调节膜融合、胞饮及胞吞等特点,增加细胞对制剂的摄取,尤其对于胆固醇需求量较大的肿瘤细胞来说,还具有一定的靶向性;最后,由于此衍生化过程并未破坏TPGS<sub>n</sub>的活性中心,因此仍然保留着TPGS<sub>n</sub>的上述多种优点。

### 发明内容

[0012] 基于上述基础,我们设计合成了一种生物相容性好,临界胶束浓度低的聚乙二醇维生素E琥珀酸酯衍生物,即TPGS<sub>n</sub>-胆固醇碳酸酯(TPGS<sub>n</sub>-CHMC),它是以聚乙二醇维生素E琥珀酸酯为基本骨架,羟基端通过碳酸酯键连接胆固醇得到。具体结构如下:



[0014] 其中 $m=1-400$

[0015] 优选地, $m=9-136$ (即PEG的分子量为400-6000)

[0016] 本发明所述TPGS<sub>n</sub>-胆固醇碳酸酯的制备方法如下:

[0017] (1) 取聚乙二醇维生素E琥珀酸酯置于密闭容器中,氮气条件下加入碱性催化剂和缚酸剂,缓慢滴加含胆固醇氯甲酯的二氯甲烷溶液,其中聚乙二醇维生素E琥珀酸酯与胆固醇氯甲酯的摩尔比为1:1-1:10,碱性催化剂选自4-二甲基吡啶、4-二烯丙基氨基吡啶或4-吡咯烷基吡啶,缚酸剂选自氢氧化钠、氢氧化钾、三乙胺、二异丙基乙基胺、碳酸钠、碳酸钾、碳酸氢钠或吡啶,冰水浴中搅拌混合5-30min后置于45℃条件下回流反应,反应时间为1-72h,待反应结束后减压除去溶剂,得到粗产物。

[0018] (2) 向所得粗产物中加入适量蒸馏水,以二氯甲烷萃取三次,再依次用100mM盐酸、饱和氯化钠和冰水清洗3次,经冰正己烷沉淀得白色蜡状物。

[0019] (3) 所得白色蜡状物经正己烷反复沉淀精制,得到产物纯品。

[0020] 在上述方法中,优选的是聚乙二醇维生素E琥珀酸酯与胆固醇氯甲酯的摩尔比为1:1-1:5,反应时间为12-36h。催化剂优选为4-二甲基吡啶,缚酸剂为三乙胺。

[0021] 通过实验我们还惊奇的发现,本发明所述的聚乙二醇维生素E琥珀酸酯衍生物可以极显著地降低TPGS<sub>n</sub>的CMC值。例如,经胆固醇修饰后TPGS<sub>1000</sub>的CMC值由0.2mg/mL降低至0.002mg/mL,降低了100倍,当用该聚合物包载难溶性药物时,制剂的包封率和稳定性均得到显著提高。不仅如此,体外细胞实验结果显示,与TPGS<sub>n</sub>相比,TPGS<sub>n</sub>-CHMC对P-糖蛋白的抑制作用更强,从而使P-糖蛋白过表达的细胞对其底物类药物的摄取增多。体内药效实验结果也显示,载多西他赛的TPGS<sub>n</sub>-CHMC胶束比相同药物浓度的TPGS<sub>n</sub>胶束的毒性更低,抑瘤作用更强。更令我们意外的是,空白的TPGS<sub>n</sub>-CHMC胶束也具有一定的抑制肿瘤生长的作用,该作用甚至与某些市售抗癌药物制剂相当。

[0022] 因此,本发明还提供了一种药物组合物,其包含上述的TPGS<sub>n</sub>-CHMC和活性药物。所述的活性药物选自紫杉醇(烷)类(如紫杉醇、多西他赛、卡巴他赛)、喜树碱类(如羟基喜树碱、硝基喜树碱)、长春碱类(如长春新碱、长春瑞滨)、阿霉素类(如阿霉素、表阿霉素、柔红霉素、伊达霉素、吡柔比星)、替尼类(如来他替尼、埃克替尼、阿法替尼、奥替尼啉、多韦替尼、苏尼替尼、坦度替尼、马赛替尼、吉非替尼、巴非替尼)、埃坡霉素类(如伊沙匹隆、埃坡霉素A、埃坡霉素B、埃坡霉素C、埃坡霉素D、脱氧埃坡霉素)、维A酸类(如(全反式)维甲酸、阿维A酯、芳维甲酸)、二氢吡啶类(如尼群地平、尼莫地平、氨氯地平、西尼地平)、人参皂甙类(如人参皂甙Re、人参皂甙Rg3、人参皂甙Rh1、人参皂甙Rh2、人参皂甙Rh3、人参皂甙Rh5)、脂溶性维生素类(如维生素A、维生素D、维生素E、维生素K、胆骨化醇、钙三醇、VE烟酸酯)、他汀类(如辛伐他汀、洛伐他汀、普伐他汀、美伐他汀)、激素类(如地塞米松、地塞米松棕榈酸酯、醋酸地塞米松、非那雄胺、2-甲氧基雌二醇、乙烯雌酚、醋酸甲羟孕酮、可的松、氢化可的松、泼尼松、氢化泼尼松、前列地尔)、康唑类(如伊曲康唑、伏立康唑、酮康唑、氟康唑、益康唑)、泊苷类(如依托泊苷、替尼泊苷)、头孢类(如头孢他啶、头孢曲松、头孢唑肟)、大环内酯类(如红霉素、罗红霉素、阿奇霉素、克拉霉素、雷帕霉素)、多烯/多肽类(如曲古霉素、两性霉素B、环孢菌素A、放线菌素D)、醌类化合物(如辅酶Q10、丹参酮IIA、丝裂霉素)、金属铂类化合物(如顺铂、卡铂、奈达铂、阿劳铂、奥沙利铂)、萜类化合物(如β-榄香烯、青蒿素、二氢青蒿素、冬凌草甲素、冬凌草乙素、细辛醚、细辛脑、蒿本内酯、马薊子素)、黄酮类(如葛根素、水飞蓟素、藤黄酸)、姜黄素类(如姜黄素、单去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素)、联苯酚类化合物(如厚朴酚、和厚朴酚)、吡唑酮类(如氨基比林、保泰松)、嘧啶类似物(如氟尿嘧啶、齐多夫定棕榈酸酯、齐多夫定肉豆蔻酸酯、齐多夫定硬脂酸酯、齐多夫定胆固醇酯)、嘌呤类似物(如恩替卡韦、巯嘌呤、磺巯嘌呤钠)、咪唑类(如咪唑啉酮、咪唑妥英、咪唑丙胺)、非甾体抗炎药(如尼美舒利、布洛芬、吲哚美辛、萘普生、双氯芬酸(钠)、美洛昔康)、五环三萜类化合物(齐墩果酸、甘草酸、乌苏酸、桦木酸、23-羟基桦木酸)、非黄酮类多酚类化合物(如白藜芦醇)、生物碱类(如高三尖酯碱)、阿糖腺苷类似物(如阿德福韦酯)、沙坦类(如坎地沙坦、氯沙坦、缬沙坦、依普罗沙坦、缬沙坦苄酯、坎地沙坦、坎地沙坦乙酯、洛沙坦、厄贝沙坦、奥美沙坦、替米沙坦、阿齐沙坦)、有机碘化合物(如胺碘酮)、烷基酚类(如丙泊酚),其他(如马洛替酯、去甲斑蝥素、环扁桃酯)、葫芦素提取物(如葫芦素B、葫芦素D、葫芦素E)。

[0023] 此外,本发明还提供了TPGS<sub>n</sub>-CHMC作为药物制剂载体的应用,所述的制剂可为液体制剂、固体制剂或半固体制剂,例如胶束、脂质体、乳剂、囊泡、纳米粒、微球、微丸、固体分散体、颗粒剂、胶囊剂、片剂、软膏剂、栓剂或液体微粒制剂的干燥品。

[0024] 本发明的优点在于:(1)所合成的TPGS<sub>n</sub>-CHMC生物可降解,毒性低,无致敏性和刺激性等问题;(2)TPGS<sub>n</sub>-CHMC具有临界胶束浓度低,载药量大,稀释稳定性好的特性,能够满足临床用药的要求,具有良好的缓释作用;(3)可以广泛用于胶束、脂质体、乳剂、囊泡及纳米粒等微粒制剂的制备;与未衍生化的TPGS<sub>n</sub>相比,短PEG链的TPGS<sub>n</sub>-CHMC具有更强的渗透促进作用,长PEG链的TPGS<sub>n</sub>-CHMC具有长循环特性,包载难溶性抗癌药物后,可以更好的利用EPR效应实现靶向性;(4)体外细胞摄取和细胞毒实验结果显示,TPGS<sub>n</sub>-CHMC比TPGS<sub>n</sub>抑制P-糖蛋白的能力更强;(5)体内抗肿瘤实验结果显示,空白的TPGS<sub>n</sub>-CHMC胶束本身就具有促进肿瘤细胞凋亡活性,所以作为抗癌药物的载体可以协同发挥抗肿瘤作用;(6)由于肿瘤细胞对胆固醇需求量大,用该衍生物制备的制剂某种程度上具有靶向配基的作用;(7)合成工艺

简单,成本低廉,产物易于纯化,产率高,具有广阔的工业化前景。

#### 附图说明:

- [0025] 图1:TPGS<sub>n</sub>-CHMC的合成示意图
- [0026] 图2:CHM的红外图谱
- [0027] 图3:TPGS<sub>1000</sub>的红外图谱
- [0028] 图4:TPGS<sub>1000</sub>-CHMC的红外图谱
- [0029] 图5:TPGS<sub>1000</sub>-CHMC的<sup>1</sup>H-NMR图谱
- [0030] 图6:TPGS<sub>400</sub>的红外图谱
- [0031] 图7:TPGS<sub>400</sub>-CHMC的红外图谱
- [0032] 图8:TPGS<sub>400</sub>-CHMC的<sup>1</sup>H-NMR图谱
- [0033] 图9:TPGS<sub>6000</sub>的红外图谱
- [0034] 图10:TPGS<sub>6000</sub>-CHMC的红外图谱
- [0035] 图11:TPGS<sub>6000</sub>-CHMC的<sup>1</sup>H-NMR图谱
- [0036] 图12:TPGS<sub>1000</sub>-CHMC的CMC
- [0037] 图13:TPGS<sub>n</sub>-CHMC修饰的各种制剂结构示意图
- [0038] 图14:TPGS<sub>1000</sub>-CHMC的溶血曲线
- [0039] 图15:DTX/TPGS<sub>1000</sub>-CHMC的透射电镜图
- [0040] 图16:DTX/TPGS<sub>n</sub>与DTX/TPGS<sub>n</sub>-CHMC胶束稀释示意图
- [0041] 图17:Caco2细胞对不同Dox制剂的摄取。

#### 具体实施例:

[0042] 下面结合实施例进一步阐述本发明,这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。

[0043] 实施例1:TPGS<sub>1000</sub>-CHMC的合成

[0044] 取1g TPGS<sub>1000</sub> (0.66mmol)置于密闭容器中,氮气条件下加入41.5mg 4-二甲基吡啶(DMAP)和142.9 $\mu$ L三乙胺(TEA),缓慢滴加胆固醇氯甲酯(CHM,1mmol)的二氯甲烷(DCM)溶液20mL,冰水浴中搅拌混合10min后45 $^{\circ}$ C下回流反应24h,待反应结束后减压除去溶剂。(合成过程如图1所示)向所得粗产物中加入一定量蒸馏水,以二氯甲烷萃取三次,再分别以100mM盐酸、饱和氯化钠和冰水洗3次,经冰正己烷沉淀得乳白色蜡状物,继续用正己烷反复沉淀精制3次即得TPGS<sub>1000</sub>-CHMC聚合物纯品。

[0045] 反应中使用硅胶薄层色谱(TLC)进行反应进度监测和纯度分析。展开剂:二氯甲烷:乙酸乙酯:甲醇=4.5:1:1。TPGS<sub>1000</sub>:Rf=0.42;TPGS<sub>1000</sub>-CHMC:Rf=0.62;CHM:Rf=1。反应结束后,反应液中TPGS<sub>1000</sub>的点消失。

[0046] 使用IFS-55傅立叶变换红外光谱仪(Bruker公司,瑞士)对所得产物进行红外分析,测试谱图见附图:图2为CHM;图3为TPGS<sub>1000</sub>;图4为TPGS<sub>1000</sub>-CHMC。TPGS<sub>1000</sub>结构中本身存在碳酸酯键和羧酸酯键,且从红外谱图可以看出,碳酸酯键羰基( $\nu$ C=O)伸缩振动的信号强度(1741.2 $\text{cm}^{-1}$ )弱于羧酸酯键的信号强度(1738.6 $\text{cm}^{-1}$ )。但是在TPGS<sub>1000</sub>-CHMC红外图谱中,碳酸酯键羰基( $\nu$ C=O)伸缩振动信号(1741.2 $\text{cm}^{-1}$ )明显加强,甚至掩盖了羧酸酯键的特征

峰,说明胆固醇已经成功的以碳酸酯键连接于TPGS<sub>1000</sub>上。

[0047] 使用BRUKER AVANCE-600MHz超导核磁共振仪(Bruker公司,瑞士)对所得产物进行氢谱分析。在<sup>1</sup>H-NMR谱中(如图5所示), $\delta$ 0.787ppm、 $\delta$ 1.434ppm、 $\delta$ 1.157ppm、 $\delta$ 2.510ppm、 $\delta$ 1.900ppm、 $\delta$ 2.742ppm和 $\delta$ 3.593ppm处的七个峰分别对应于TPGS<sub>1000</sub>-CHMC结构中a、b、c、d、e、f和g上的H,其余各峰与胆固醇氯甲酯相似。(具体的峰归属见表1)

[0048] 所合成的TPGS<sub>n</sub>-CHMC可以用于制备胶束、脂质体、乳剂及纳米粒等微粒制剂,制剂的结构示意图如图13所示。

[0049] 表1:TPGS<sub>1000</sub>-CHMC的<sup>1</sup>H-NMR图谱峰归属分析

	质子	化学位移 (ppm)	质子丰度
	a	0.787	12
	b	1.434	8
	c	1.157	16
[0050]	d	2.510	2
	e	1.900	9
	f	2.742	4
	g	3.593	92

[0051] 实施例2:TPGS<sub>400</sub>-CHMC的合成

[0052] 取0.6g TPGS<sub>400</sub> (0.66mmol)置于密闭容器中,氮气条件下加入41.5mg 4-二甲基吡啶(DMAP)和142.9 $\mu$ L三乙胺(TEA),缓慢滴加胆固醇氯甲酯(CHM,1mmol)的二氯甲烷(DCM)溶液20mL,冰水浴中搅拌混合10min后45 $^{\circ}$ C下回流反应24h,待反应结束后减压除去溶剂。(合成过程如图1所示)向所得粗产物中加入一定量蒸馏水,以二氯甲烷萃取三次,再分别以100mM盐酸、饱和氯化钠和冰水洗3次,经冰正己烷沉淀得乳白色蜡状物,继续用正己烷反复沉淀精制3次即得TPGS<sub>400</sub>-CHMC聚合物纯品。

[0053] 反应中使用硅胶薄层色谱(TLC)进行反应进度监测和纯度分析。展开剂:二氯甲烷:乙酸乙酯:甲醇=4.5:1:1。TPGS<sub>400</sub>:Rf=0.51;TPGS<sub>400</sub>-CHMC:Rf=0.69;CHM:Rf=1。反应结束后,反应液中TPGS<sub>400</sub>的点消失。

[0054] 使用IFS-55傅立叶变换红外光谱仪(Bruker公司,瑞士)对所得产物进行红外分析,测试谱图见附图:图2为CHM;图6为TPGS<sub>400</sub>;图7为TPGS<sub>400</sub>-CHMC。TPGS<sub>400</sub>结构中本身存在碳酸酯键和羧酸酯键,且从红外谱图可以看出,碳酸酯键羰基( $\nu$ C=O)伸缩振动的信号强度(1739.5 $\text{cm}^{-1}$ )弱于羧酸酯键的信号强度(1738.6 $\text{cm}^{-1}$ )。但是在TPGS<sub>400</sub>-CHMC红外图谱中,碳酸酯键羰基( $\nu$ C=O)伸缩振动信号(1739.5 $\text{cm}^{-1}$ )明显加强,甚至掩盖了羧酸酯键的特征峰,说明胆固醇已经成功的以碳酸酯键连接于TPGS<sub>400</sub>上。

[0055] 使用BRUKER AVANCE-600MHz超导核磁共振仪(Bruker公司,瑞士)对所得产物进行氢谱分析。在<sup>1</sup>H-NMR谱中(如图5所示), $\delta$ 0.768ppm、 $\delta$ 1.437ppm、 $\delta$ 1.153ppm、 $\delta$ 2.512ppm、 $\delta$ 1.905ppm、 $\delta$ 2.732ppm和 $\delta$ 3.591ppm处的七个峰分别对应于TPGS<sub>400</sub>-CHMC结构中a、b、c、d、e、f和g上的H,其余各峰与胆固醇氯甲酯相似。(具体的峰归属见表2)

[0056] 所合成的TPGS<sub>n</sub>-CHMC可以用于制备胶束、脂质体、乳剂及纳米粒等微粒制剂,制剂的结构示意图如图13所示。

[0057] 表2:TPGS<sub>400</sub>-CHMC的<sup>1</sup>H-NMR图谱峰归属分析

	质子	化学位移 (ppm)	质子丰度
	a	0.768	12
	b	1.437	8
	c	1.153	16
[0058]	d	2.512	2
	e	1.905	9
	f	2.732	4
	g	3.591	32

[0059] 实施例3:TPGS<sub>6000</sub>-CHMC的合成

[0060] 取4.3g TPGS<sub>6000</sub> (0.66mmol) 置于密闭容器中,氮气条件下加入41.5mg 4-二甲基吡啶(DMAP)和142.9 $\mu$ L三乙胺(TEA),缓慢滴加胆固醇氯甲酯(CHM,1mmol)的二氯甲烷(DCM)溶液20mL,冰水浴中搅拌混合10min后45 $^{\circ}$ C下回流反应24h,待反应结束后减压除去溶剂。(合成过程如图1所示)向所得粗产物中加入一定量蒸馏水,以二氯甲烷萃取三次,再分别以100mM盐酸、饱和氯化钠和冰水洗3次,经冰正己烷沉淀得乳白色蜡状物,继续用正己烷反复沉淀精制3次即得TPGS<sub>6000</sub>-CHMC聚合物纯品。

[0061] 反应中使用硅胶薄层色谱(TLC)进行反应进度监测和纯度分析。展开剂:二氯甲烷:乙酸乙酯:甲醇=4.5:1:1。TPGS<sub>6000</sub>:Rf=0.35;TPGS<sub>6000</sub>-CHMC:Rf=0.54;CHM:Rf=1。反应结束后,反应液中TPGS<sub>6000</sub>的点消失。

[0062] 使用IFS-55傅立叶变换红外光谱仪(Bruker公司,瑞士)对所得产物进行红外分析,测试谱图见附图:图2为CHM;图6为TPGS<sub>400</sub>;图7为TPGS<sub>400</sub>-CHMC。TPGS<sub>400</sub>结构中本身存在碳酸酯键和羧酸酯键,且从红外谱图可以看出,碳酸酯键羰基( $\nu$ C=O)伸缩振动的信号强度(1741.4 $\text{cm}^{-1}$ )弱于羧酸酯键的信号强度(1738.6 $\text{cm}^{-1}$ )。但是在TPGS<sub>6000</sub>-CHMC红外图谱中,碳酸酯键羰基( $\nu$ C=O)伸缩振动信号(1741.4 $\text{cm}^{-1}$ )明显加强,甚至掩盖了羧酸酯键的特征峰,说明胆固醇已经成功的以碳酸酯键连接于TPGS<sub>6000</sub>上。

[0063] 使用BRUKER AVANCE-600MHz超导核磁共振仪(Bruker公司,瑞士)对所得产物进行氢谱分析。在<sup>1</sup>H-NMR谱中(如图5所示), $\delta$ 0.765ppm、 $\delta$ 1.427ppm、 $\delta$ 1.158ppm、 $\delta$ 2.509ppm、 $\delta$ 1.914ppm、 $\delta$ 2.734ppm和 $\delta$ 3.593ppm处的七个峰分别对应于TPGS<sub>6000</sub>-CHMC结构中a、b、c、d、e、f和g上的H,其余各峰与胆固醇氯甲酯相似。(具体的峰归属见表2)

[0064] 所合成的TPGS<sub>n</sub>-CHMC可以用于制备胶束、脂质体、乳剂及纳米粒等微粒制剂,制剂的结构示意图如图13所示。

[0065] 表3:TPGS<sub>400</sub>-CHMC的<sup>1</sup>H-NMR图谱峰归属分析

	质子	化学位移 (ppm)	质子丰度
	a	0.765	12
	b	1.427	8
[0066]	c	1.158	16
	d	2.509	2
	e	1.914	9
	f	2.734	4
	g	3.593	552

[0067] 实施例4:TPGS<sub>1000</sub>-CHMC临界胶束浓度的测定

[0068] 由于TPGS<sub>1000</sub>-CHMC的分子结构中具有亲水基团和亲脂基团,因此能够在水中自发形成胶束,可以利用荧光探针法测定其临界胶束浓度。

[0069] 精密移取0.1mL浓度为 $1 \times 10^{-5}$ M芘工作液若干份于容量瓶中,氮气吹干,精密称取TPGS<sub>1000</sub>-CHMC若干份,置于上述容量瓶中,分别加10mL纯水,得到芘工作液的浓度为 $10^{-7}$ M(芘在水中的饱和溶解度为 $7 \times 10^{-7}$ M),水浴超声30min,放置过夜,即得到浓度分别为 $5 \times 10^{-4}$ , $1 \times 10^{-3}$ , $5 \times 10^{-3}$ , $1 \times 10^{-2}$ , $5 \times 10^{-2}$ , $1 \times 10^{-1}$ , $5 \times 10^{-1}$ ,1g/L的TPGS<sub>1000</sub>-CHMC溶液。将上述芘的水溶液以397nm作为发射波长在300nm-350nm波长范围内扫描,叠加各激发波长图谱并记录数据。以339nm和334nm的荧光强度( $I_{339}/I_{334}$ )之比为纵坐标,对数浓度值为横坐标作图,曲线的拐点即为TPGS<sub>1000</sub>-CHMC的CMC。结果见图12。由图12可知,TPGS<sub>1000</sub>-CHMC的CMC为0.002mg/mL,比TPGS<sub>1000</sub>的CMC(0.2mg/mL)低100倍。

[0070] 实施例5:TPGS<sub>1000</sub>-CHMC空白胶束的溶血试验

[0071] 溶血试验过程如下:首先制备2%健康家兔红细胞悬浮液,保存于4℃冰箱中待用。然后分别取洁净玻璃离心管进行编号,1-6号管分别加入不同体积的空白TPGS<sub>1000</sub>-CHMC胶束溶液(母液浓度为50mg/mL),7号管和8号管分别作为阴性对照管和阳性对照管(实验方案见表4),混匀后,立即置于 $37 \pm 0.5$ ℃的恒温振荡器中进行温浴,每隔15min观察1次,共观察1h。将孵育后的制剂于3000rpm离心5min,以生理盐水为空白对照,在575nm处测定上清液的吸光度值。按下式计算溶血百分率。实验结果见图14

[0072] 溶血百分率 =  $(A_s - A_n) / (A_p - A_n) \times 100\%$

[0073] 其中 $A_s$ 为供试管的吸光度; $A_n$ 为阴性对照管的吸光度; $A_p$ 为阳性对照管的吸光度。

[0074] 表4:TPGS<sub>1000</sub>-CHMC空白胶束溶血试验方案

试管编号	1	2	3	4	5	6	7	8
2%红细胞悬液 (mL)	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50
[0075] 生理盐水 (mL)	2.45	2.40	2.20	2.00	1.80	1.50	2.50	/
灭菌注射用水 (mL)	/	/	/	/	/	/	/	2.50
制剂 (mL)	0.05	0.10	0.30	0.50	0.70	0.90	/	/

[0076] 由图14可以看出,当TPGS<sub>1000</sub>-CHMC的浓度低于1mg/mL时,溶血百分数低于5%,无溶血现象发生。

[0077] 实施例6:TPGS<sub>1000</sub>-CHMC的急性毒性试验

[0078] 取昆明种小白鼠60只,体重18-20g,随机分成6组,雌雄各半,以最大耐受剂量(MTD)进行试验。试验中以900mg/kg、1000mg/kg和1100mg/kg的剂量静脉注射TPGS<sub>1000</sub>-CHMC空白胶束溶液,连续观察7d内小鼠的变化,无不良反应及死亡现象说明此剂量对小鼠无毒副作用。试验结果显示,雌性小鼠给予1000mg/kg、雄性小鼠给予1100mg/kg时,部分小鼠开始出现狂躁、小便失禁及死亡现象。所以雌性小鼠对TPGS<sub>1000</sub>-CHMC的静脉注射最大耐受剂量在900-1000mg/kg之间,雄性小鼠静脉注射的最大耐受剂量在1000-1100mg/kg之间。

[0079] 实施例7:载多西他赛(Docetaxel, DTX) TPGS<sub>1000</sub>-CHMC胶束(DTX/TPGS<sub>1000</sub>-CHMC)的制备

[0080] 采用自组装法制备DTX/TPGS<sub>1000</sub>-CHMC胶束,具体操作如下:称取10mg DTX及100mg TPGS<sub>1000</sub>-CHMC于西林瓶中,加入0.5mL无水乙醇使之溶解,随后向其中注入生理盐水至终体积为10mL,摇匀即可得到澄清透明的胶束溶液(DTX的浓度为1mg/mL),过0.22 $\mu$ m的醋酸纤维素酯膜备用。所制得的胶束粒径为20.8 $\pm$ 1.9nm,48h内稳定性良好无晶体析出。在透射电镜下观察到胶束粒子呈球形,表面光滑,大小均匀。(如图15所示)

[0081] 实施例8:DTX/TPGS<sub>1000</sub>-CHMC胶束的稀释稳定性

[0082] 按“实施例7”中的方法制备DTX/TPGS<sub>1000</sub>和DTX/TPGS<sub>1000</sub>-CHMC胶束制剂,其中DTX的浓度为0.5mg/mL,载体材料的浓度为15mg/mL。用PBS缓冲液(pH 7.4)稀释5-100倍,以粒径为考察指标来进行稀释稳定性考察,结果见表5。

[0083] 表5:TPGS<sub>n</sub>和TPGS<sub>n</sub>-CHMC的稀释稳定性

稀释倍数	TPGS <sub>n</sub>		TPGS <sub>n</sub> -CHMC	
	Size (nm)	PI	Size (nm)	PI
0	13.7 $\pm$ 1.2	0.183	16.4 $\pm$ 2.2	0.102
5	12.4 $\pm$ 2.3	0.370	16.2 $\pm$ 1.6	0.132
10	13.3 $\pm$ 3.1	0.640	15.8 $\pm$ 1.3	0.124
25	13.2 $\pm$ 2.2	1.166	16.7 $\pm$ 2.0	0.143
50	↓	/	15.9 $\pm$ 1.5	0.144
100	↓	/	16.8 $\pm$ 3.2	0.256

[0085] 由结果可知,对于DTX/TPGS<sub>1000</sub>胶束来说,随着稀释倍数的增加,PI值也增加,且当浓度稀释至50和100倍时,测定前即有沉淀析出,说明TPGS<sub>1000</sub>胶束制剂的稀释稳定性较差。而对于DTX/TPGS<sub>1000</sub>-CHMC胶束来说,即使制剂稀释至100倍,粒径和PI的仍无明显变化,说明TPGS<sub>1000</sub>-CHMC胶束的稀释稳定性良好。TPGS<sub>n</sub>与TPGS<sub>n</sub>-CHMC胶束稀释稳定性显著不同的原因可能是:(1) TPGS<sub>n</sub>经衍生化后CMC值显著降低。一般来说,CMC值越低,制剂的稳定性越好。(2) TPGS<sub>n</sub>-CHMC相当于在PEG两端都进行了疏水化处理,其中的VES和胆固醇都参与了疏水内核的形成,并且PEG被牢牢的锁在了胶团外围。而对于仅单侧连接VES的TPGS<sub>n</sub>来说,由于仅仅以VES建立疏水核心,一方面疏水的内核较小,载药量低;另一方面由于PEG的一端可以在水中自由摆动,易与水分子等发生分子间作用而离去,从而导致药物的泄漏。(如图16所示)

[0086] 实施例9:DTX/TPGS<sub>1000</sub>-CHMC胶束的过敏试验

[0087] 取健康豚鼠18只,按体重随机分为3组,分别为阴性对照组、阳性对照组和受试组,每组6只。阴性对照组豚鼠腹腔注射生理盐水(2mL/只);阳性对照组腹腔注射2%卵白蛋白溶液(2mL/只);受试组豚鼠腹腔注射“实施例7”中的DTX/TPGS<sub>1000</sub>-CHMC胶束溶液(1mg/mL, 2mL/只),隔日1次,共5次。致敏期间每日观察各豚鼠的状态,初次和末次致敏及激发当日称

量各豚鼠的体重,观察是否有异常改变。最后一次给药后14d,阴性对照组豚鼠静脉注射生理盐水(4mL/只),阳性对照组豚鼠静脉注射2%的卵白蛋白溶液(4mL/只),受试组豚鼠静脉注射“实施例7”中的DTX/TPGS<sub>1000</sub>-CHMC胶束溶液(1mg/mL,4mL/只),给药后详细观察并记录各豚鼠的过敏反应症状,评分标准见表6,如果反应级数超过2则记为阳性反应。实验结果如表7所示。

[0088] 表6:过敏试验判定标准

[0089]	反应症状	反应级数
	无明显症状	0
	只有轻微抓鼻、颤抖或竖毛现象	1
[0090]	偶尔咳嗽、有抓鼻、颤抖或竖毛现象	2
	多次或连续咳嗽、伴有呼吸困难或痉挛、抽搐等现象	3
	痉挛、抽搐、大小便失禁、休克死亡现象	4

[0091] 表7:DTX/TPGS<sub>1000</sub>-CHMC胶束的过敏性试验结果

[0092]	组别	动物数	过敏反应数	死亡数	反应级数
	生理盐水组	6	0	0	0
	2%卵白蛋白溶液组	6	6	6	4
	DTX/TPGS <sub>1000</sub> -CHMC	6	0	0	0

[0093] 致敏期间各豚鼠的饮食、活动等状态均正常。对于生理盐水组与DTX胶束组,豚鼠的初次和末次致敏及激发当日的体重未见异常差异且均有所增加。末次给药后14d激发时,2%卵白蛋白溶液组的各豚鼠均不同程度地出现搔鼻、喷嚏、咳嗽、抽搐、跳跃、喘息、休克、步态不稳、大小便失禁等过敏反应症状,且多数于15min左右死亡,过敏发生率100%,呈强或极强阳性过敏反应。生理盐水组及DTX/TPGS<sub>1000</sub>-CHMC胶束组的豚鼠无1例出现过敏症状,过敏反应均为阴性,表明DTX/TPGS<sub>1000</sub>-CHMC胶束溶液对豚鼠无全身致敏作用。

[0094] 实施例10:DTX/TPGS<sub>1000</sub>-CHMC胶束的血管刺激性试验

[0095] 取新西兰家兔12只,随机分成3组,分别为阴性对照组、市售DTX制剂组、及“实施例7”中DTX/TPGS<sub>1000</sub>-CHMC胶束溶液组。给药组是在家兔的左耳缓慢注射10mg/kg(以DTX计)的市售DTX制剂和DTX/TPGS<sub>1000</sub>-CHMC胶束制剂,阴性对照组是在相同部位注射同体积的生理盐水。每日一次,连续5d,每天给药前后及末次给药后24h观察家兔注射部位的血管及周围组织是否有红肿、丘斑等刺激反应,按表8对制剂的血管刺激进行评分。结果见表9。观察期结束后处死家兔,剪去离注射部位1-5cm距离的血管及周围组织,在10%甲醛中固定,石蜡包埋,HE染色,进行组织病理学检查。

[0096] 表8:血管刺激性评分标准



观察指标	现象	评分	判断标准	
[0097]	正常	0	≤0.5 无刺激性	
	充血	1		
	血管充血	血管纹路不清	2	≤2.5 轻微刺激
		血管呈紫红色	3	
周围组织水肿	无水肿	0	≤4.5 中度刺激	
	轻微水肿	1		
	明显水肿	2	≤6.0 重度刺激	
[0098]	严重水肿	3		

[0099] 表9:DTX/TPGS<sub>1000</sub>-CHMC胶束溶液血管刺激性评分结果

组别	兔耳数/只	肉眼观察评分	评价
生理盐水	4	0	无刺激
[0100] 市售 DTX 制剂	4	3	中度刺激
DTX/TPGS <sub>1000</sub> -CHMC	4	0	无刺激

[0101] 各组家兔连续注射5d后,市售DTX组出现水肿和充血等症状,病理切片结果也显示该组家兔的血管壁及周围组织纹理紊乱,炎症细胞浸润明显。而对于DTX/TPGS<sub>1000</sub>-CHMC胶束溶液组,肉眼观察注射部位及远离注射处血管和组织,均未见出血、淤血、水肿、坏死及炎性细胞浸润等病理改变,与注射生理盐水组相比无明显差异。

[0102] 实施例11:DTX/TPGS<sub>1000</sub>-CHMC胶束对人卵巢癌紫杉醇耐药细胞A2780/T的细胞毒实验

[0103] 细胞毒实验采用MTT法。将人卵巢癌紫杉醇耐药细胞A2780/T以浓度5000个/孔接种于96孔板中,隔天待细胞贴壁后更换含有不同浓度DTX制剂的培养液继续培养72h。之后加入5mg/mL的MTT液20μL,继续孵育2h后于450nm酶标仪测定吸光度。以空白组为100%计算细胞的死亡数,并依据该曲线初步预测各组制剂的IC<sub>50</sub>值,结果见表10。其中制剂组分别为DTX的DMSO溶液、市售DTX溶液、DTX/TPGS<sub>1000</sub>胶束及“实施例7”中DTX/TPGS<sub>1000</sub>-CHMC胶束,其中药物浓度均为1mg/mL,临用前以含血清培养液稀释至0.1-10μg/mL。

[0104] 表10:不同DTX制剂对A2780/T的IC<sub>50</sub>值

[0105]

	DTX/DMSO	市售 DTX	DTX/TPGS	DTX/TPGS-CHMC
IC <sub>50</sub> (μg)	7.61	4.48	1.98	1.34

[0106] 由表10可知,各组制剂孵育72h后,IC<sub>50</sub>值存在显著性差异。与游离DTX相比,市售DTX制剂、DTX/TPGS<sub>1000</sub>胶束及DTX/TPGS<sub>1000</sub>-CHMC胶束均可不同程度的逆转A2780/T细胞的耐药性,其中DTX/TPGS<sub>1000</sub>-CHMC的逆转作用最强。

[0107] 实施例12:Dox/TPGS<sub>1000</sub>-CHMC胶束对人结直肠癌细胞(Caco2)的细胞摄取实验

[0108] 将Caco2细胞以 $1.0 \times 10^5$  cells/孔的密度接种于24孔板中,接种后每隔一天换一

次液,一周后每日更换培养液,培养15天后用于药物的细胞摄取实验。用37℃的HBSS轻柔的洗涤细胞单层3次,洗去细胞单分子层表面的杂质,置于37℃培养箱中培养30min。然后吸走HBSS缓冲液,分别加入阿霉素溶液(Dox)、含有环孢素(20μg/mL)的阿霉素溶液(Dox+CysA)、阿霉素的TPGS<sub>1000</sub>胶束(Dox/TPGS)及载阿霉素的TPGS<sub>1000</sub>-CHMC胶束溶液(Dox/TPGS<sub>1000</sub>-CHMC),分别于摇床中孵育1h后,吸走药物溶液,加入4℃的PBS溶液终止细胞摄取。清洗细胞3次,加入0.3mL的0.1%Triton 100振摇1h,将细胞从24孔板中刮下,收集细胞悬液,于冰浴下超声破碎细胞,UPLC/MS/MS测定,采用BCA蛋白测定试剂盒测定蛋白含量,计算药物的摄取量。结果见图17。由图17可知,TPGS<sub>1000</sub>和TPGS<sub>1000</sub>-CHMC都能够增加Caco2细胞对阿霉素的摄取,且TPGS<sub>1000</sub>-CHMC增加摄取的能力更强。

[0109] 实施例13:DTX/TPGS<sub>1000</sub>-CHMC胶束的药效学研究

[0110] 将人肺癌耐药细胞A549/T按常规条件培养,待细胞长到80-90%融合度时,制备 $5 \times 10^6$  cells/mL的单细胞悬液,接种到雌性裸鼠的右腋皮下,每只接种0.2mL,共接种50只。当肿瘤长至50-100mm<sup>3</sup>时,将荷瘤小鼠随机分成5组,即生理盐水组、市售DTX溶液组、空白TPGS<sub>1000</sub>胶束组、空白TPGS<sub>1000</sub>-CHMC胶束组和“实施例7”中DTX/TPGS<sub>1000</sub>-CHMC胶束组,每组10只动物。自荷瘤成功后第0、3、6、9天通过尾静脉以10mg/kg的剂量给药(空白胶束组给药剂量与DTX/TPGS<sub>1000</sub>-CHMC胶束组中所用的载体量相当),共给药4次。于第12天颈椎脱臼处死动物,称量体重和瘤重,并根据下面公式计算抑瘤率,结果如表11所示。

$$[0111] \quad \text{重量抑瘤率(\%)} = \frac{\text{对照组平均瘤重(g)} - \text{试验组平均瘤重(g)}}{\text{对照组平均瘤重(g)}} \times 100$$

[0112] 表11:DTX/TPGS<sub>1000</sub>-CHMC胶束的抑瘤效果

组别	死亡数	体重变化 (终-始)	瘤重(g)	抑瘤率(%)
生理盐水组	0	6.07±0.22	1.53±0.24	/
[0113] 市售 DTX 组	2	4.38±0.25	0.98±0.14	35.94%
空白 TPGS <sub>1000</sub> 组	0	5.89±0.31	1.39±0.21	9.01%
空白 TPGS <sub>1000</sub> -CHMC 组	0	6.00±0.48	1.02±0.21	33.33%
DTX/TPGS <sub>1000</sub> -CHMC 组	0	5.17±0.18	0.62±0.13	59.48%

[0114] 由动物体重变化、死亡数和抑瘤率可以看出,与市售DTX组相比,本发明所制备的胶束制剂毒性低,抑瘤率高,逆转肿瘤耐药性的作用强。同时,空白TPGS<sub>1000</sub>-CHMC胶束制剂也显示出较好的肿瘤抑制作用,该抑制作用甚至与市售制剂相当(P<0.05)。

[0115] 实施例14:载紫杉醇混合胶束的制备

[0116] 称取10mg紫杉醇、80mg TPGS<sub>1000</sub>-CHMC及20mg TPGS<sub>2000</sub>-CHMC于西林瓶中,加入0.5mL无水乙醇使之溶解,随后向其中注入生理盐水至终体积为10mL,摇匀即可得到澄清透明的胶束溶液(DTX的浓度为1mg/mL),过0.22μm的醋酸纤维素酯膜备用。所制得的胶束粒径为 $20.8 \pm 1.9$ nm,48h内稳定性良好无晶体析出。在透射电镜下观察到胶束粒子呈球形,表面光滑,大小均匀。

[0117] 实施例15:卡巴他赛TPGS<sub>1000</sub>-CHMC纳米混悬剂的制备

[0118] 称取10mg卡巴他赛溶于2mL乙醇和2mL乙酸乙酯组成的混合溶剂中作为油相,另称取50mg TPGS<sub>1000</sub>-CHMC溶于10mL去离子水中作为水相,将油相缓慢匀速的注入到水相中,用高剪切乳匀机搅拌10min(转速10000r/min)得到含药物结晶的初悬液,旋转蒸发1h除去初悬液中的有机溶剂,再将浓缩液用高压均质机匀化即可制得卡巴他赛纳米混悬剂。实验结果表明,所得卡巴他赛纳米混悬剂的平均粒径为 $211.6 \pm 3.8$ nm,4℃放置1个月粒径无明显变化,也无分层和粒子聚集等现象,制剂稳定性良好。

[0119] 实施例16:TPGS<sub>2000</sub>-CHMC修饰的辅酶Q<sub>10</sub>乳剂的制备

[0120] 称取25mg辅酶Q<sub>10</sub>、250mg中MCT和80mg DOPC于55℃下搅拌至全部溶解作为油相,另称取50mg TPGS<sub>2000</sub>-CHMC溶于去离子水中作为水相预热至55℃备用,将水相缓慢滴加入油相中,高速分散,经探头超声(200w×2min;400w×6min)处理后,过0.22μm微孔滤膜即可。实验结果表明,所得辅酶Q<sub>10</sub>乳剂的平均粒径为 $132.6 \pm 4.9$ nm,4℃放置1个月粒径无明显变化,也无分层和乳滴合并现象,制剂稳定性良好。

[0121] 实施例17:伊曲康唑纳米晶体的制备

[0122] 称取10mg伊曲康唑、20mg TPGS<sub>1000</sub>-CHMC和24mg聚乙烯醇,用5mL甲醇和15mL氯仿组成的混合溶剂超声溶解,旋蒸除去溶剂形成含药脂膜,25℃真空干燥过夜,将1.5mL的生理盐水加入到上述脂膜中,水化40min,涡旋10min,再水浴超声10-15min即可。透射电镜下的纳米晶呈短棒状,粒径为 $213 \pm 3.8$ nm。

[0123] 实施例18:TPGS<sub>4000</sub>-CHMC修饰的米托蒽醌脂质体的制备

[0124] 将74mg氢化大豆卵磷脂、25mg胆固醇和1mg TPGS<sub>4000</sub>-CHMC溶于1mL无水乙醇中,快速注入5mL含300mM pH4.0的(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液中,氮气下依次挤压通过200nm和100nm聚碳酸酯膜。再用含10%蔗糖的水溶液超滤置换脂质体分散介质中的(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>得空白脂质体。将10mg米托蒽醌溶于适量去离子水后加入到空白单室脂质体中,55℃水浴1h即可。所制得的米托蒽醌脂质体的药物浓度为1mg/mL,平均粒径为 $128.6 \pm 7.1$ nm,4℃放置1个月粒径无明显变化,也无分层和乳滴合并现象,制剂稳定性良好。

[0125] 实施例19:TPGS<sub>3350</sub>-CHMC修饰的羟基喜树碱脂质囊泡的制备

[0126] 称取10mg羟基喜树碱、100mg司盘60和45mg TPGS<sub>3350</sub>-CHMC,用氯仿溶解,40℃条件下减压旋干溶剂,向其中加入预热至65℃的磷酸盐缓冲液(pH 6.8),搅拌水化45min,过0.22μm微孔滤膜即可。所得羟基喜树碱脂质囊泡的平均粒径为 $65.7 \pm 5.2$ nm,4℃放置1个月粒径和包封率无明显变化,制剂稳定性良好。

[0127] 实施例20:氨氯地平纳米粒的制备

[0128] 称取10mg氨氯地平和150mg PLGA溶于适量丙酮中作为油相,另称取50mg TPGS<sub>1000</sub>-CHMC溶于去离子水中作为水相,将油相缓缓滴入水相中,常压下匀速搅拌12h,挥发除去丙酮,过0.22μm微孔滤膜即可。所得纳米粒粒径为 $122.1 \pm 5.7$ nm,4℃放置1个月粒径和包封率无明显变化,稳定性良好。

[0129] 实施例21:长春新碱微球的制备

[0130] 称取10mg长春新碱和30mg TPGS<sub>2000</sub>-CHMC溶于5mL二氯甲烷中,在搅拌条件下,加入到100mL浓度为0.2%聚乙烯醇(PVA)水溶液中,800rpm转速下搅拌2h,形成水包油型乳液,500rpm的转速下挥发过夜。2500rpm离心15min沉淀出微球后,用去离子水洗涤3次以除去未包载的长春新碱和过量的乳化剂PVA。所得沉淀重悬于10mL去离子水中,冷冻干燥得到

载长春新碱的TPGS<sub>2000</sub>-CHMC的微球。所得微球粒径约12 $\mu$ m,表面光滑圆整。

[0131] 实施例22:辛伐他汀自乳化微乳的制备

[0132] 将20mg中链脂肪酸三甘油酯、50mg Solutiol HS15、15mg TPGS<sub>1000</sub>-CHMC及10mg无水乙醇加热溶解使之混合均匀,再加入1mg辛伐他汀于40℃磁力搅拌使之溶解即可,将上述溶解物在37℃水中分散后测得平均粒径为75.3 $\pm$ 21.6nm。

[0133] 实施例23:尼美舒利固体分散体的制备

[0134] 称取1g尼美舒利与5g TPGS<sub>6000</sub>-CHMC,用丙酮溶解后,挥干溶剂,于-20℃冷冻固化8h后转移至真空干燥箱中干燥约12h,经超微粉碎机粉碎并过180 $\mu$ m筛即可。该固体分散体可以进一步装于胶囊中或压制成片。

[0135] 实施例24:氢化可的松软膏的制备

[0136] 称取700mg TPGS<sub>400</sub>-CHMC、500mg甘油、10mg羟苯乙酯溶于适量蒸馏水中,加热至75℃作为水相备用,另取10mg氢化可的松、1000mg十六醇、1500mg白凡士林和1000mg液体石蜡于75℃水浴上加热至全部溶解作为油相。将油相缓缓加入到水相中,边加边沿同一方向搅拌,继续搅拌至冷凝即可。所得软膏剂色泽均匀,粘度适中。

[0137] 实施例25:载葫芦素B的TPGS<sub>1000</sub>-CHMC冻干胶束的制备

[0138] 称取10mg葫芦素B和30mg TPGS<sub>1000</sub>-CHMC,用0.5mL叔丁醇溶解,加入去离子水至终体积为10mL,制成葫芦素B的胶束溶液,将上述胶束溶液分装于不同的西林瓶中,于-80℃冰箱中预冻4h后,再冷冻干燥24h即可。所得胶束的冻干品质地疏松,再分散性良好。再分散后的粒径稍有增加,由原来的22.4 $\pm$ 2.3nm增加到24.5 $\pm$ 5.8nm。其他的含TPGS<sub>1000</sub>-CHMC的液体制剂也可以按照上述方法冻干,必要时在冻干前加入甘露醇、葡萄糖、乳糖、海藻糖或聚乙二醇等冻干保护剂。

[0139] 实施例26:吡哌美辛栓剂的制备

[0140] 称取研细的吡哌美辛250mg置于小研钵中,另取30g PEG<sub>4000</sub>、5g PEG<sub>6000</sub>及5g TPGS<sub>400</sub>-CHMC置于蒸发皿中,水浴加热至基质2/3熔化时,立即取下蒸发皿,搅拌至全部溶解。将已熔化的基质分次加至研钵中与吡哌美辛细粉研匀,然后注入涂过润滑剂的栓模中用冰水浴迅速冷却固化,削去溢出部分,脱模即可。

[0141] 实施例27:双氯芬酸钠贴剂的制备

[0142] 称取15g油酸、10g TPGS<sub>400</sub>-CHMC、15g水和适量柠檬酸于研钵中,加入1g粉碎的双氯芬酸钠,混合研磨成微乳后,再加入控速膜乙烯-醋酸乙烯共聚物和压力敏感粘合剂聚硅氧烷压敏胶,搅匀,水溶保温脱气,涂膜于聚乙烯底片上,烘干,切片即可。

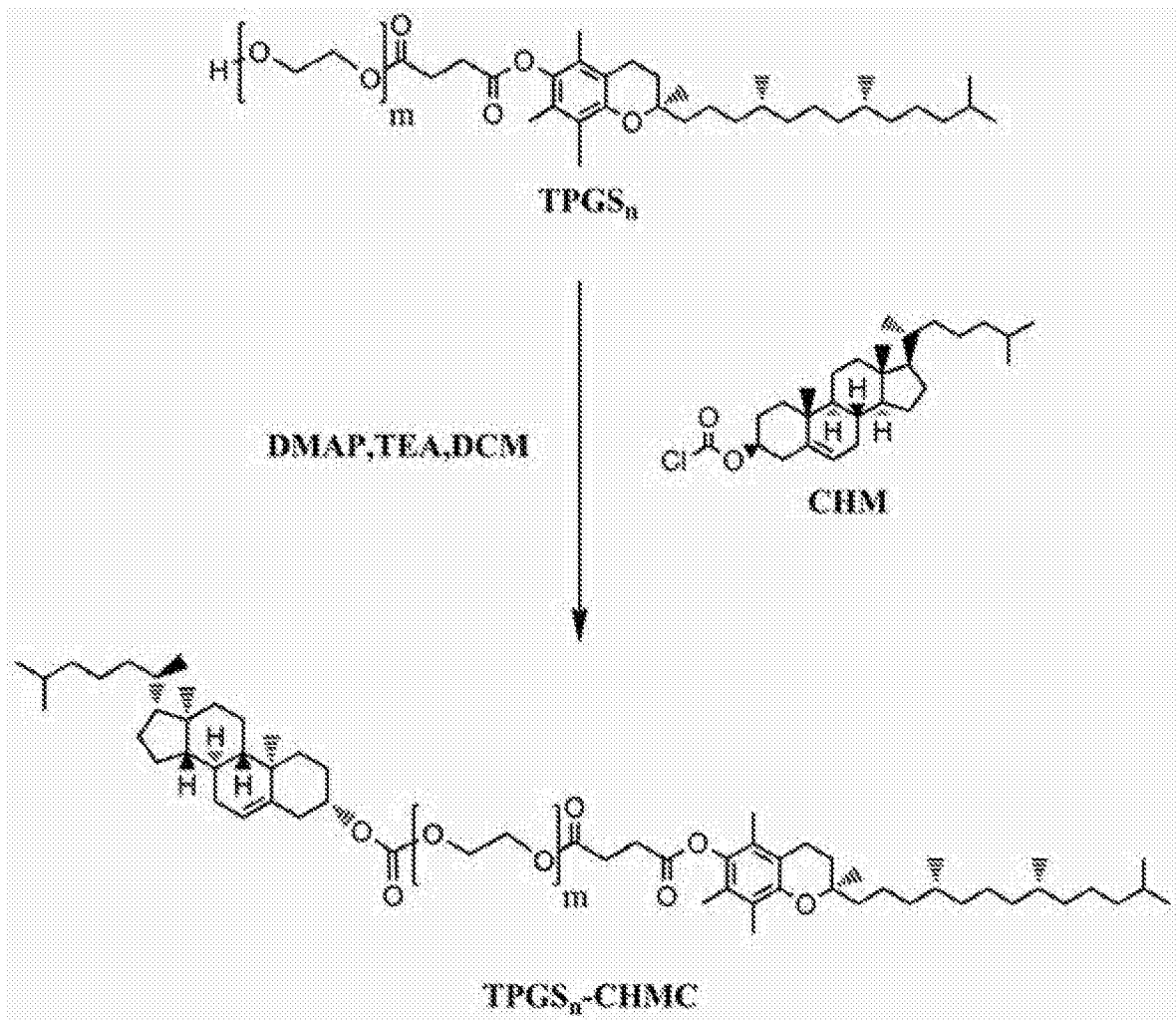


图1

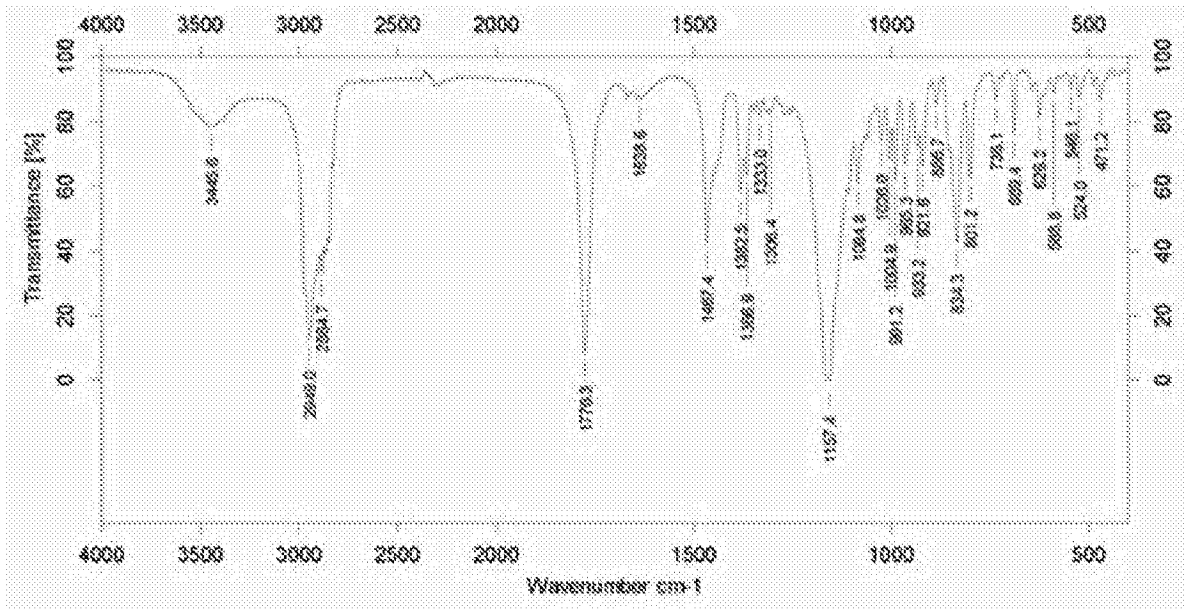


图2

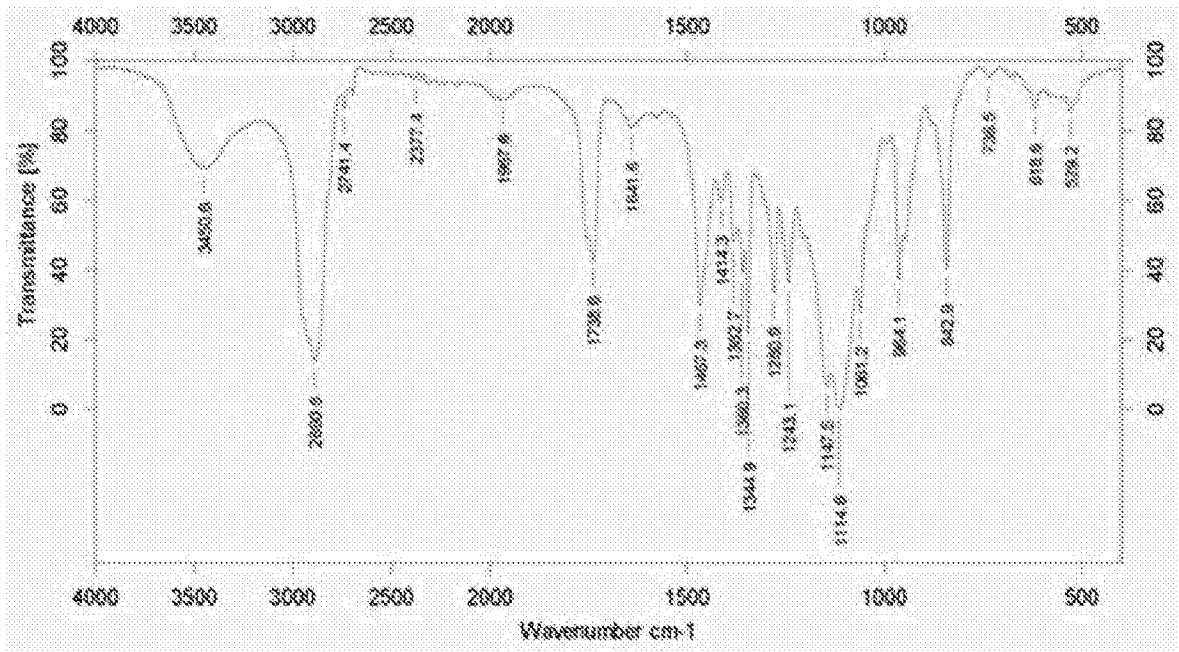


图3

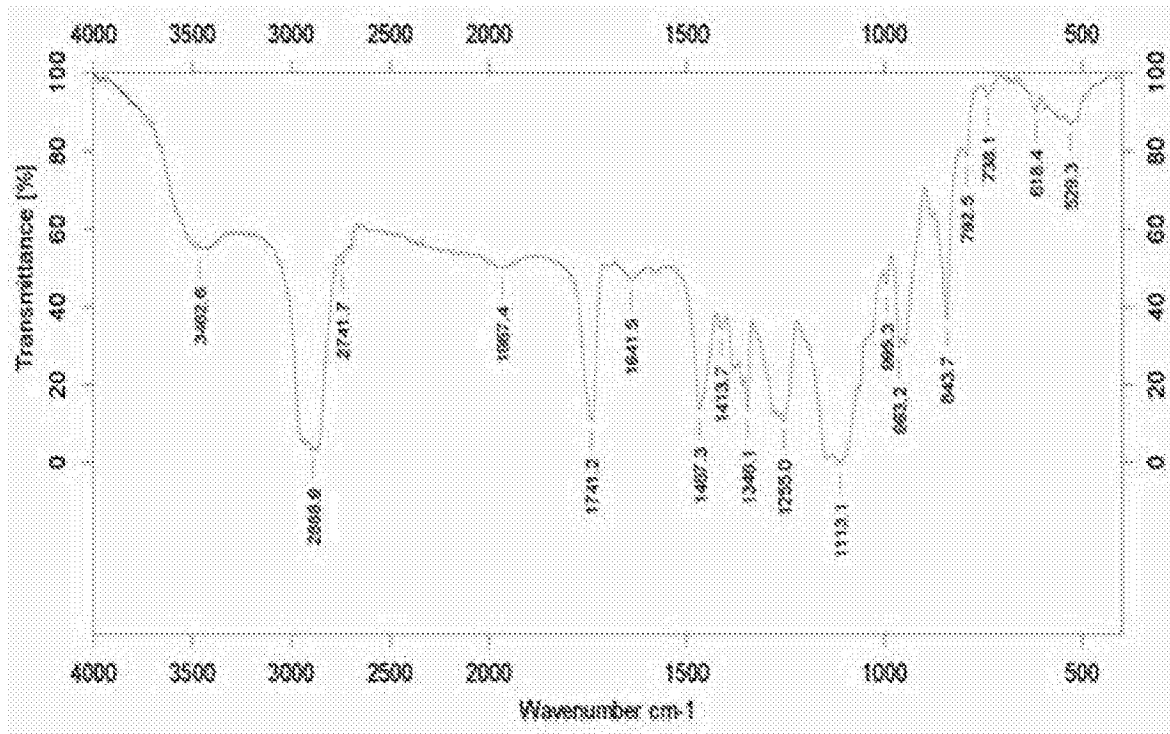


图4

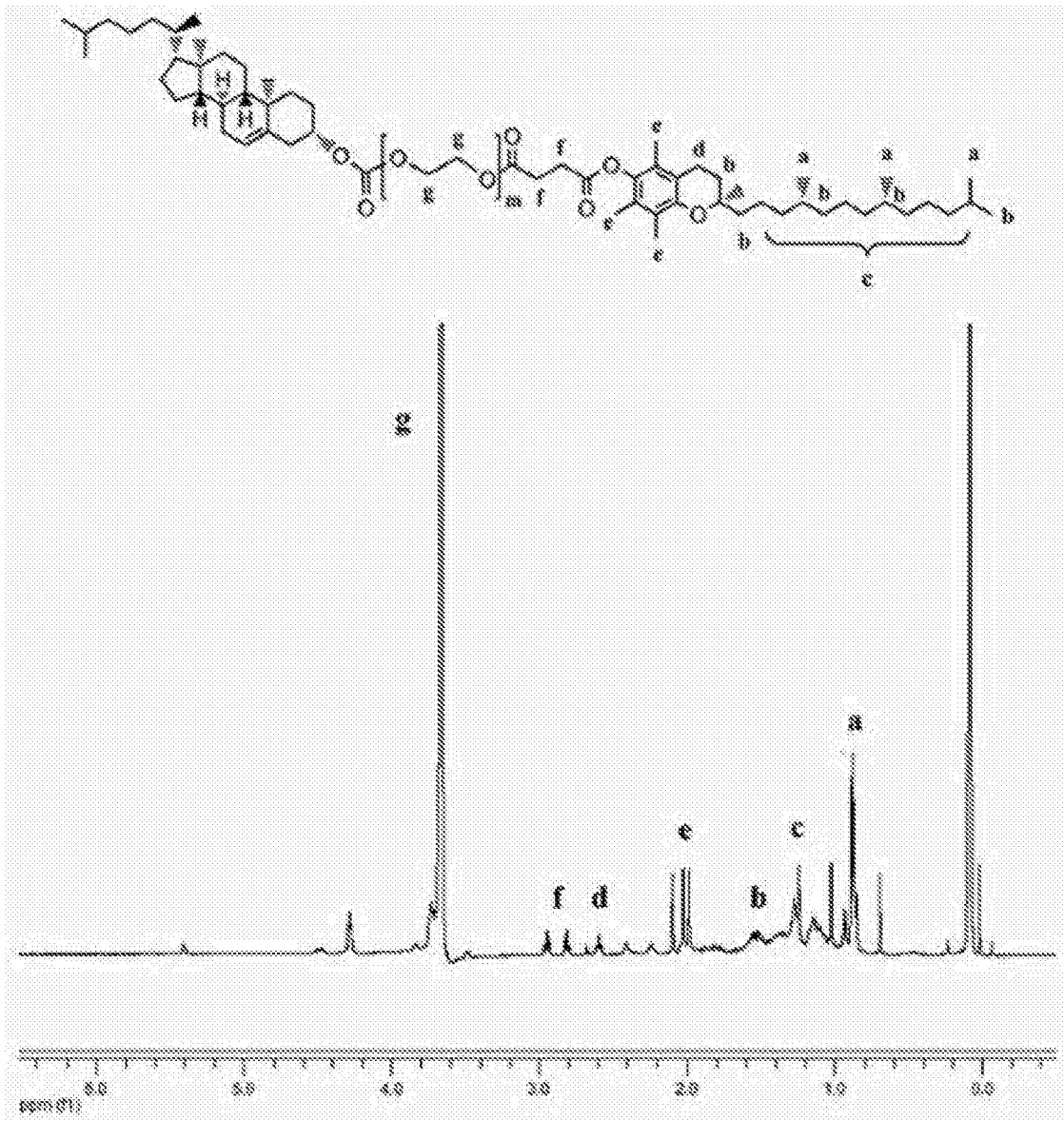


图5



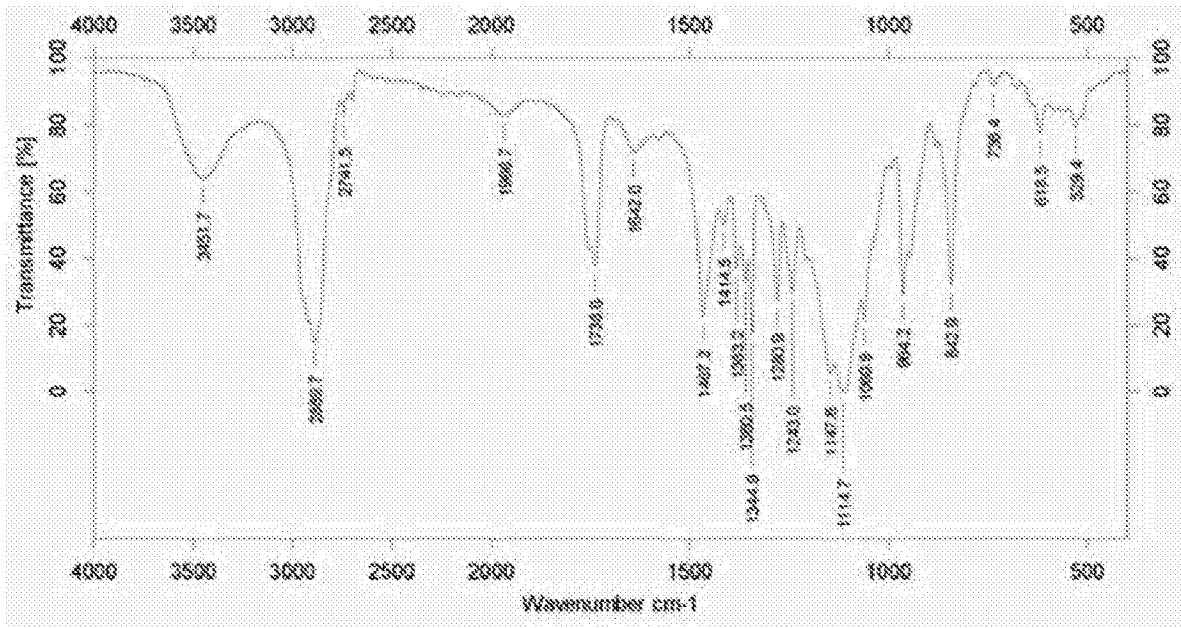


图6

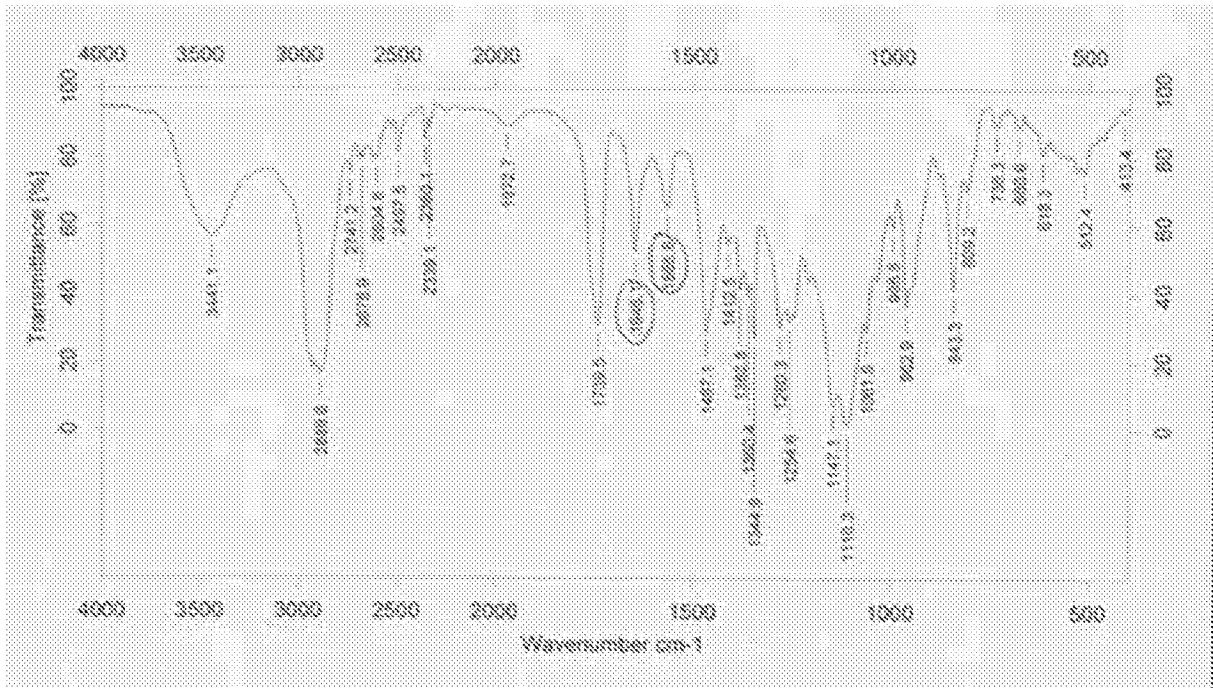


图7

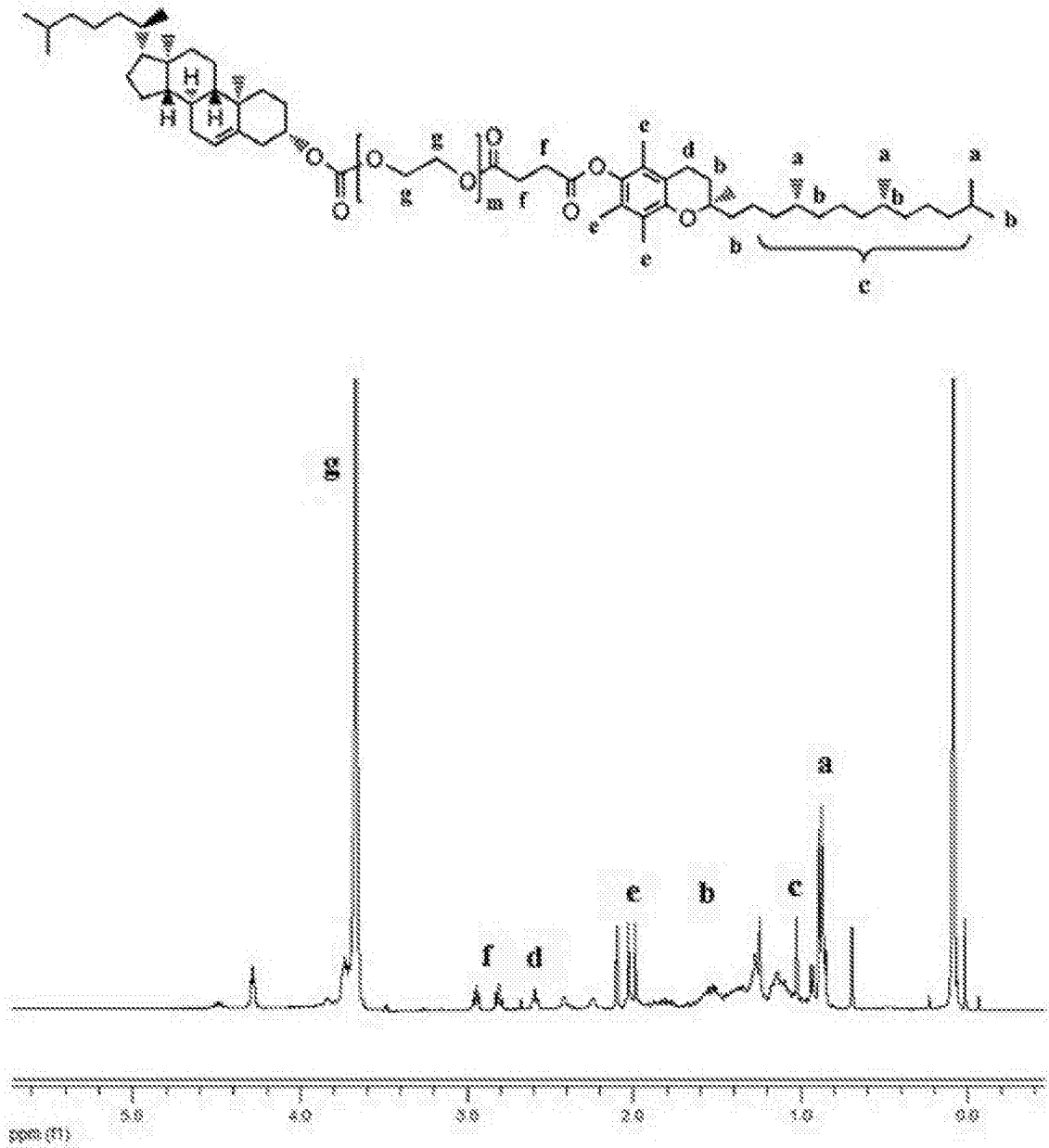


图8

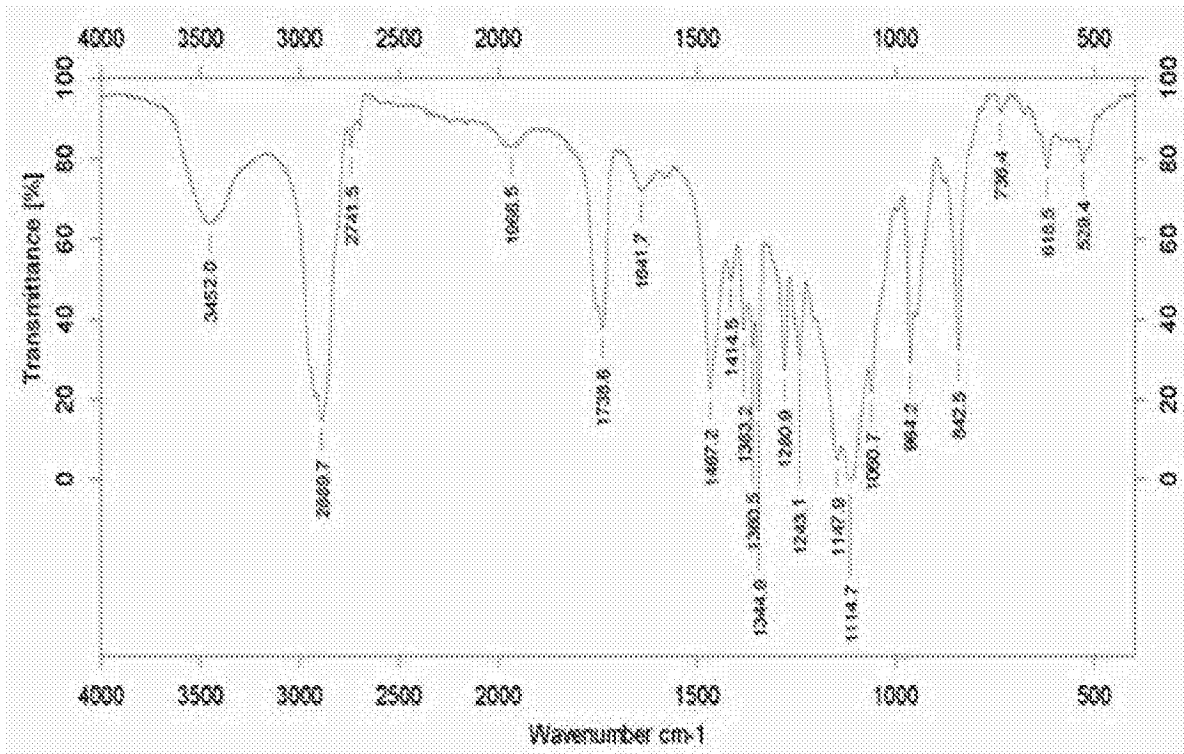


图9

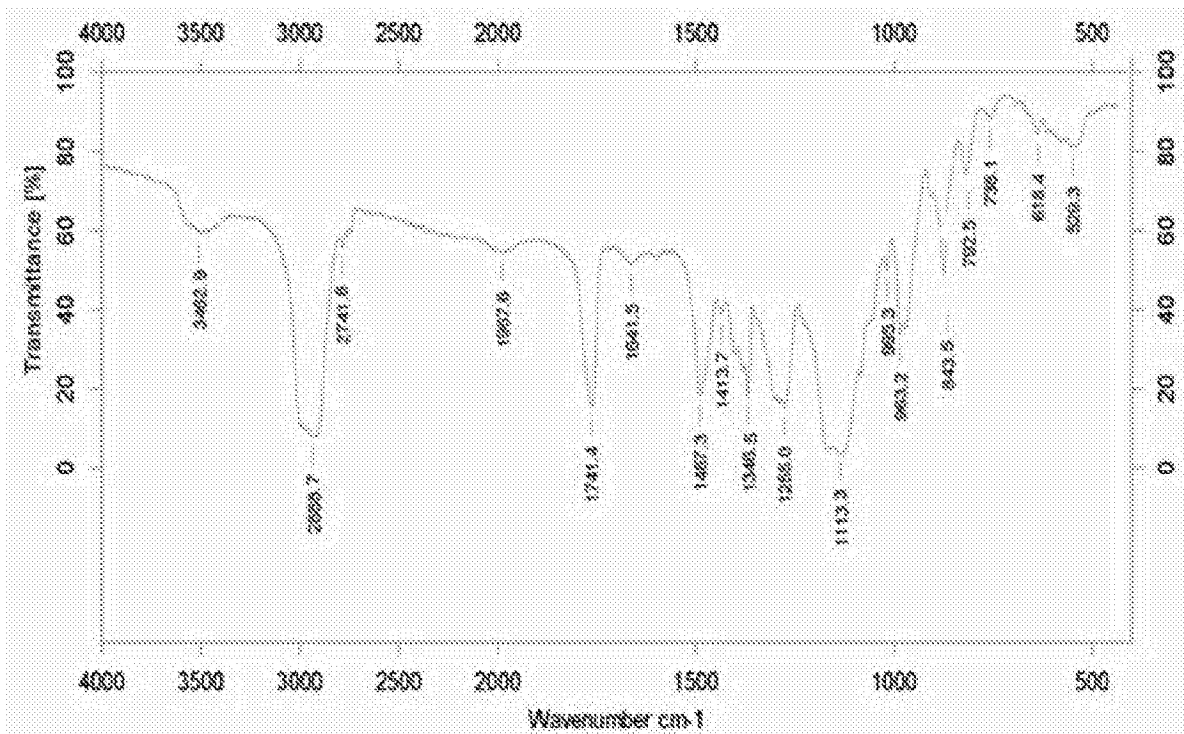


图10

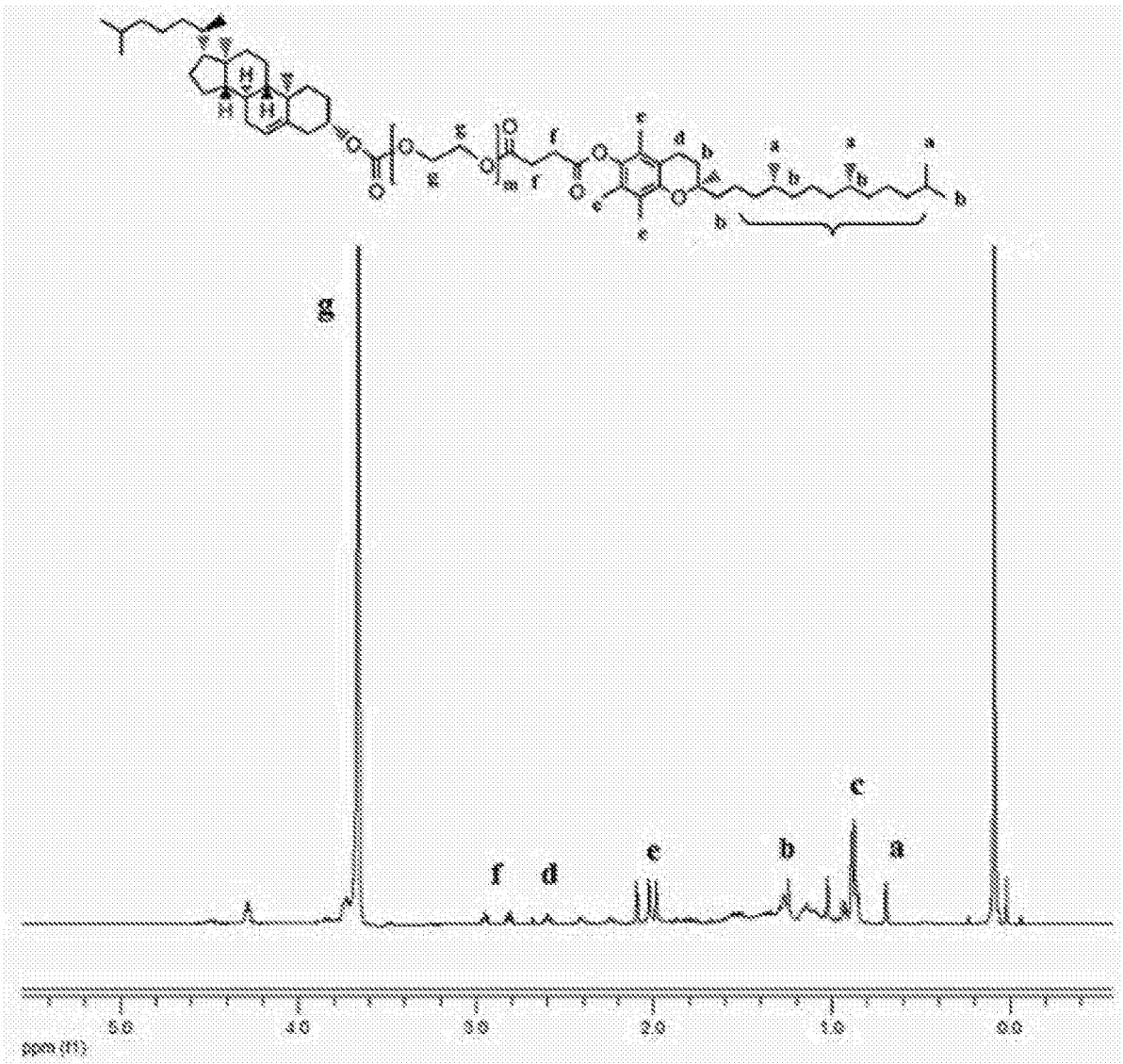


图11

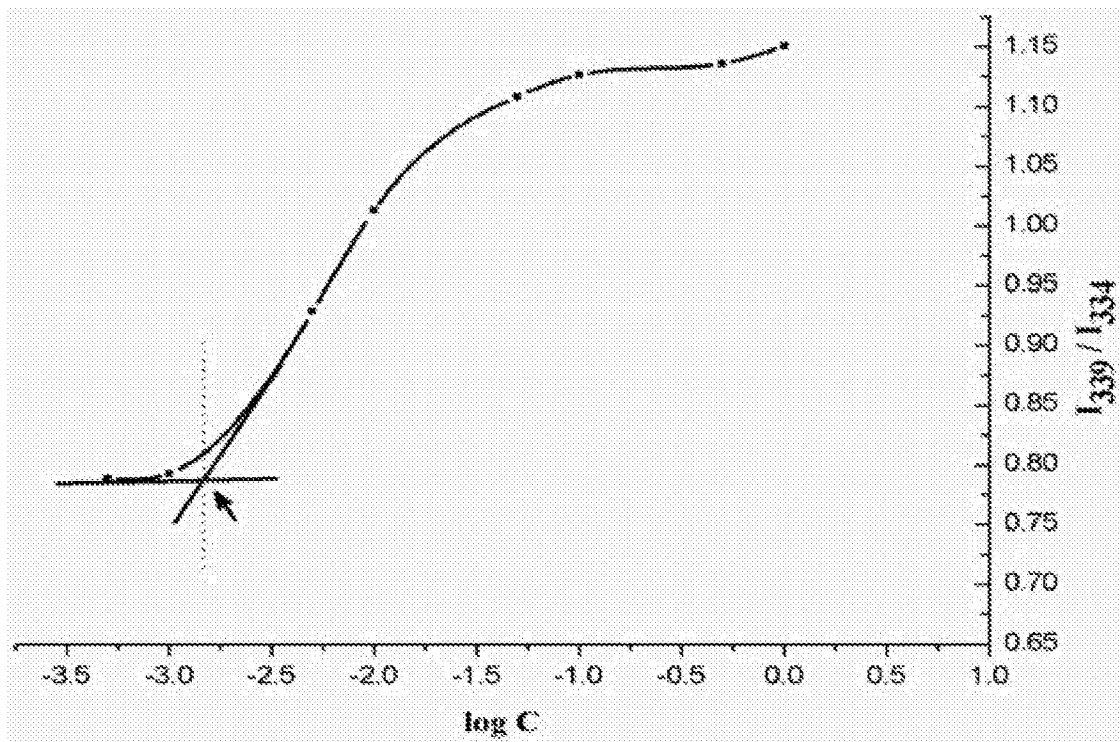


图12

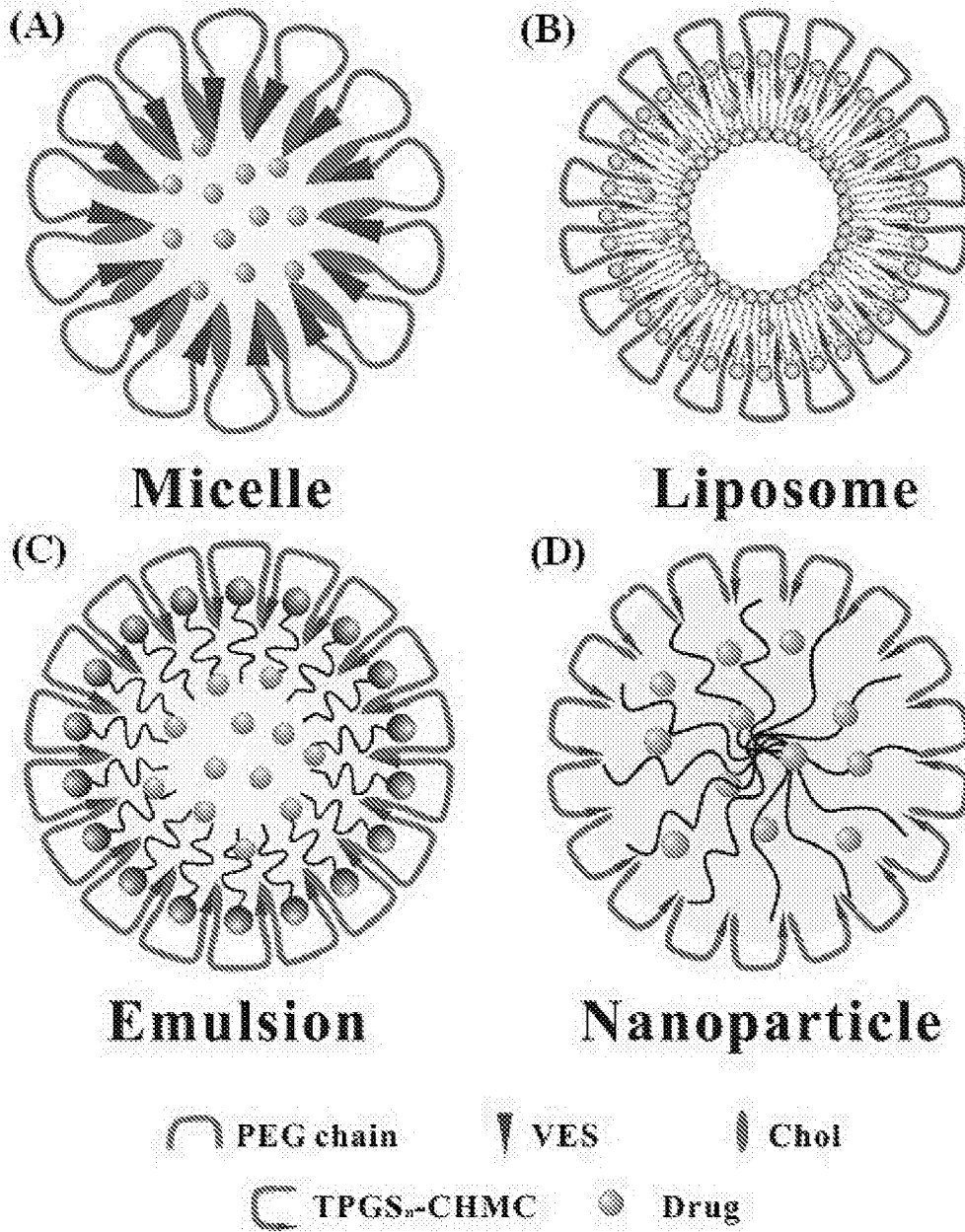


图13

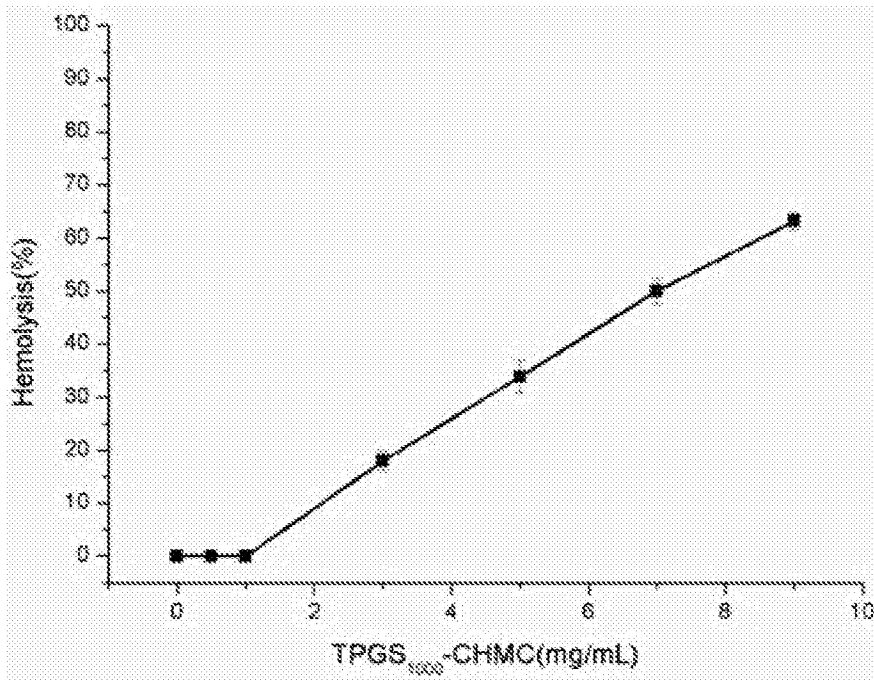


图14

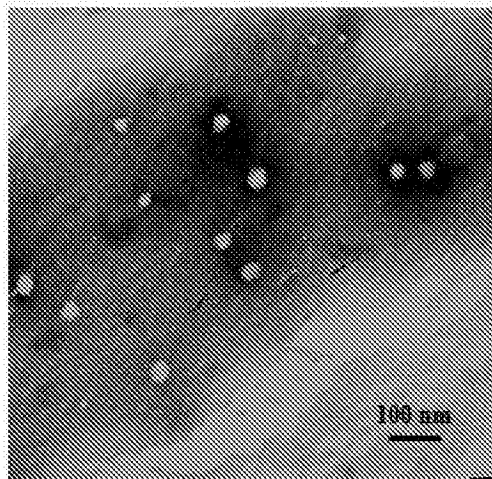


图15

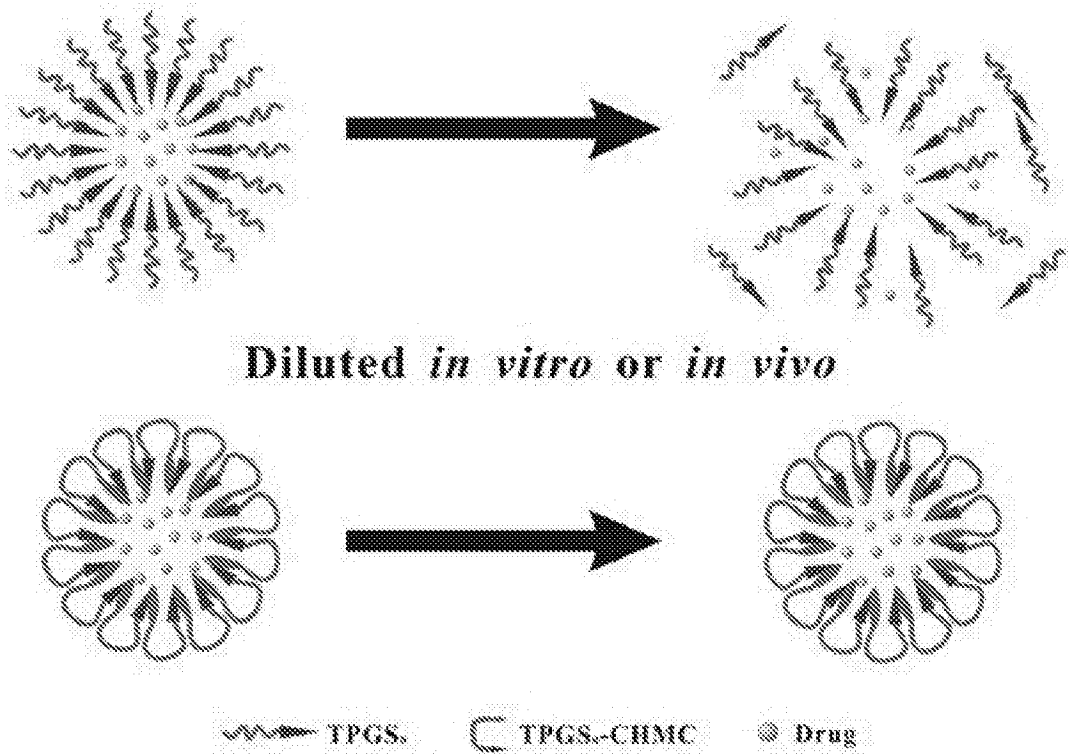


图16

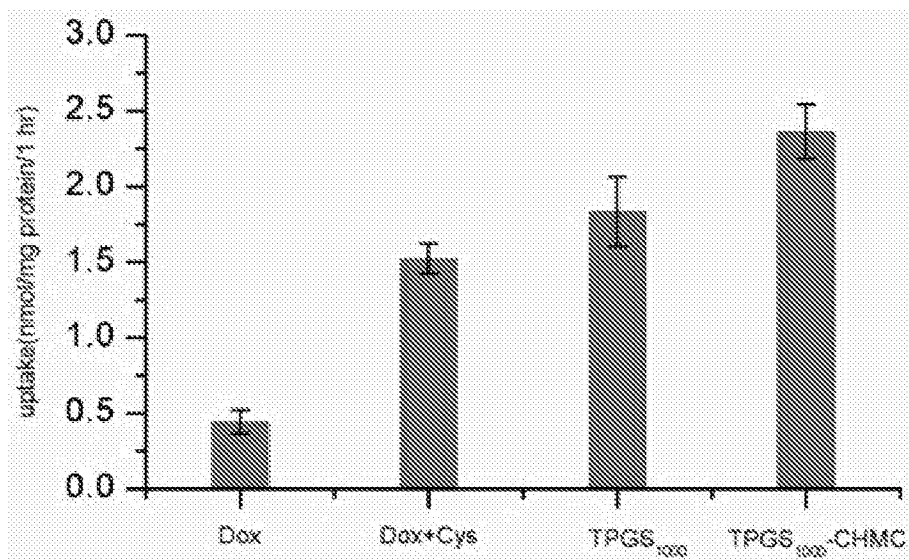


图17