



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107375199 A

(43)申请公布日 2017. 11. 24

(21)申请号 201710799532.X

A61K 31/704(2006.01)

(22)申请日 2017.09.07

A61K 31/4745(2006.01)

(71)申请人 中国药科大学

A61K 31/12(2006.01)

地址 211198 江苏省南京市江宁区龙眠大道639号

A61P 35/00(2006.01)

(72)发明人 大卫欧佩奇 孙敏捷 张斐然

(74)专利代理机构 南京正联知识产权代理有限公司 32243

代理人 黄智明

(51) Int. Cl.

A61K 9/06(2006.01)

A61K 47/61(2017.01)

A61K 47/36(2006.01)

A61K 31/4706(2006.01)

A61K 31/337(2006.01)

权利要求书2页 说明书9页 附图5页

(54)发明名称

一种聚合氯喹的纳米凝胶递送系统及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种聚合氯喹的纳米凝胶递送系统及其制备方法,所述递送系统包含聚合氯喹的纳米凝胶微粒及包裹于微粒中的抗肿瘤药物,其中所述聚合氯喹的纳米凝胶由经过羟基氯喹及疏水性侧链修饰的聚多糖骨架形成。本发明的药物递送系统针对恶性肿瘤及其转移双管齐下,抑制癌细胞增殖的同时,阻断其向周边及远处组织转移的信号级联,实现对恶性癌症的有效治疗。



1. 一种聚合氯喹的纳米凝胶递送系统,其特征在于,所述递送系统包含聚合氯喹的纳米凝胶微粒及包裹于微粒中的抗肿瘤药物,所述聚合氯喹的纳米凝胶由经过羟基氯喹及疏水性侧链修饰的聚多糖骨架形成,其中聚多糖的分子量范围为5-500kD,羟基氯喹在聚多糖骨架上的摩尔取代度为1%-20%,疏水性侧链在聚多糖骨架上的摩尔取代度为1%-20%,微粒粒径范围为50-400 nm。

2. 如权利要求1所述的聚合氯喹的纳米凝胶递送系统,其特征在于,骨架聚多糖是选自透明质酸、羟乙基淀粉、糊精、葡聚糖、壳聚糖。

3. 如权利要求2所述的聚合氯喹的纳米凝胶递送系统,其特征在于,聚多糖骨架是选自羟乙基淀粉或糊精。

4. 如权利要求1所述的聚合氯喹的纳米凝胶递送系统,其特征在于,疏水性侧链是选自C4-C18脂肪酸、C4-C18烷烃、胆固醇、C2-C8全氟化物。

5. 一种聚合氯喹的纳米凝胶递送系统的制备方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

1) 疏水性侧链对聚多糖骨架的取代:在极性溶剂中,在催化剂及脱水剂存在下使疏水性侧链取代聚多糖主链上的羟基,获得经疏水性侧链取代的聚多糖骨架;

2) 羟基氯喹对聚多糖骨架的取代:首先在极性溶剂中,在惰性氛围下,合成羟基氯喹-羰基二咪唑,然后在极性溶剂中,在惰性氛围中,使合成的羟基氯喹-羰基二咪唑与上一步骤合成的经疏水性侧链取代的聚多糖骨架反应,获得羟基氯喹-侧链-聚多糖偶联物;

3) 纳米凝胶递送系统的合成:将以上制备的羟基氯喹-侧链-聚多糖偶联物和抗肿瘤药物一起溶解于有机溶剂中,形成混合溶液,然后将该混合溶液逐滴加入到含水溶液中,并在滴加的过程中不断搅拌,制得初乳液,利用高压均质机将初乳液进一步分散,并减压真空除去有机溶剂,得到载有抗肿瘤药物的纳米凝胶。

6. 如权利要求5所述的聚合氯喹的纳米凝胶递送系统的制备方法,其特征在于,所述聚多糖骨架的分子量范围为5-500kD,疏水性侧链是选自C4-C18脂肪酸、C4-C18烷烃、胆固醇、C2-C8全氟化物,所形成的羟基氯喹-侧链-聚多糖偶联物中,羟基氯喹在聚多糖骨架上的摩尔取代度为1%-20%,疏水性侧链在聚多糖骨架上的摩尔取代度为1%-20%,微粒粒径范围为50-400 nm。

7. 如权利要求5所述的聚合氯喹的纳米凝胶递送系统的制备方法,其特征在于,在步骤1)中,极性溶剂为二甲亚砜,脱水剂为二环己基碳二亚胺,催化剂为二甲氨基吡啶,该反应步骤包括将聚多糖溶解于二甲亚砜中,分别加入二环己基碳二亚胺、二甲氨基吡啶及疏水性侧链,在惰性氛围下反应,产物经处理后获得经疏水性侧链取代的聚多糖骨架。

8. 如权利要求5所述的聚合氯喹的纳米凝胶递送系统的制备方法,其特征在于,步骤2)包括将羟基氯喹与N,N'-羰基二咪唑分别溶解于二甲基甲酰胺中,在惰性氛围下使二者反应获得羟基氯喹-羰基二咪唑,然后将合成的羟基氯喹-羰基二咪唑与步骤1)合成的经疏水性侧链取代的聚多糖骨架溶于二甲亚砜中,在惰性氛围下搅拌反应,处理后获得羟基氯喹-侧链-聚多糖偶联物。

9. 如权利要求5所述的聚合氯喹的纳米凝胶递送系统的制备方法,其特征在于,步骤3)中所用有机溶剂为脂溶性有机溶剂,含水溶液选自纯水、5%w/v葡萄糖溶液、生理盐水或磷酸盐缓冲液,偶联物与抗肿瘤药物的投料质量比为1-50:1,所用含水溶液与有机溶剂的体

积比为1-100:1,高压均质处理次数为1-10次,高压均质温度为0-50℃,减压真空温度为10-60℃。

10.如权利要求5所述的聚合氯喹的纳米凝胶递送系统的制备方法,其特征在于,步骤3)中所述的抗肿瘤药物是选自紫杉醇、阿霉素盐酸盐、多西紫杉醇、羟基喜树碱或姜黄素。

一种聚合羧喹的纳米凝胶递送系统及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及药物制剂领域和生物医药技术领域,具体来说涉及一种以聚合羧喹的羟乙基淀粉为载体的化疗药物递送系统及其制备方法。

背景技术

[0002] 肿瘤是严重威胁人类健康和生命的恶性疾病。而绝大部分恶性肿瘤在疾病后期才会被发现,此时癌细胞已经在肺部、肝脏、淋巴结等组织出现严重的浸润和转移,并常常伴有预后更糟糕的神经周浸润。尽管纳米给药系统在治疗大多数肿瘤方面取得了很多成果,但对于转移性恶性肿瘤的治疗效果却不显著,这与其无法在癌症继发转移灶富集有关。因此,必须寻求新的方法来治疗这类肿瘤。

[0003] 趋化因子通过与体内表达的对应趋化因子受体的信号响应控制着细胞的迁移。尽管不同的恶性肿瘤表达不同的趋化因子受体,但CXCR4是迄今为止最常见的在人体肿瘤中过度表达的趋化因子受体,而它的配体CXCL12则在一些常见的肿瘤转移部位如肝、肺、淋巴结、骨髓等中组成性表达,这些CXCL12表达丰富的器官对于CXCR4表达上调的肿瘤细胞就是肥沃的土壤。

[0004] 纳米凝胶(Nanogel)是指能够在水溶液中分散并具有纳米尺寸的水凝胶颗粒,通常由物理或化学交联的聚合物网络结构所组成。由于纳米凝胶本身具有某些特定的优势,例如优异的药物负载能力,较高的化学结构稳定性,对外界环境的变化具有灵敏的刺激响应性等等,使得它在药物载体领域的研究越来越受到关注。纳米凝胶能通过离子键、氢键及疏水相互作用等将生物活性分子嵌合到交联的网络结构中,各种经过化学修饰而具有特殊功能的纳米凝胶更能实现多种用途,例如通过修饰靶向分子使其具有靶向输送药物的能力;将可以酶促降解或可以刺激断裂的交联剂整合进纳米凝胶的体系,使得它能实现细胞内的药物释放。

[0005] 多糖具有良好的生物相容性,低毒性,生物可降解性,被广泛用于医药、化妆品、食品等领域,尤其是羟乙基淀粉(HES)是FDA认可的药用辅料,其优良的生物相容性及可降解性使之被广泛应用于生物医药领域。其结构中含有大量的羟基,易于修饰成为功能多样的药用载体。有研究者制备悬挂型的羟乙基淀粉-药物共价结合物,称之为生物响应性前药。

[0006] 现有技术中用羟乙基淀粉作为基质材料制备纳米系统作为载体的方法主要有以下:第一种是直接抗肿药物与羟乙基淀粉偶联结合,超声乳化后得到具有一定粒径的纳米制剂,如中国专利201610830917.3;第二种现有技术为对羟乙基淀粉进行疏水修饰,疏水修饰后的羟乙基淀粉为两亲性分子,可进行自组装形成纳米粒子,如中国专利201610875153.X。第一种现有技术通过形成前药来实现化疗药物的递送,但是其粒径较大,且不能同时递送多种物质;第二种现有技术同样只能包载疏水性药物,无法实现多功能的修饰。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于开发一种具有抑制癌细胞增殖和转移的双重协同治疗作用的聚多糖纳米凝胶递送系统,对高转移性癌细胞增殖快、易转移的恶性发展特征进行源头控制。

[0008] 为实现上述目的,本发明采用的技术方案示意图如下:

一种聚合氯喹的纳米凝胶递送系统,其特征在于,所述递送系统包含聚合氯喹的纳米凝胶微粒及包裹于微粒中的抗肿瘤药物,所述聚合氯喹的纳米凝胶由经过羟基氯喹及疏水性侧链修饰的聚多糖骨架形成,其中聚多糖的分子量范围为5-500kD,羟基氯喹在聚多糖骨架上的摩尔取代度为1%-20%,疏水性侧链在聚多糖骨架上的摩尔取代度为1%-20%,微粒粒径范围为50-400 nm。

[0009] 其中,聚多糖骨架作为凝胶微粒的载体主体,具有亲水性,羟基易于被取代修饰,在本发明中,所述聚多糖骨架是选自透明质酸、羟乙基淀粉、糊精、葡聚糖、壳聚糖,优选为羟乙基淀粉和糊精。

[0010] 疏水性侧链在形成凝胶微粒时提供疏水性,通过疏水作用形成微粒,包裹药物。在本发明中,考虑到疏水作用的强度和羟基氯喹的影响,所用疏水性侧链优选是选自C4-C18脂肪酸、C4-C18烷烃、胆固醇、C2-C8全氟化物,更优选月桂酸、胆固醇,最优选是月桂酸。

[0011] 本发明还公开了制备上述聚合氯喹的纳米凝胶递送系统的方法,所述方法包括以下步骤:

1) 疏水性侧链对聚多糖骨架的取代:在极性溶剂中,在催化剂及脱水剂存在下使疏水性侧链取代聚多糖主链上的羟基,获得经疏水性侧链取代的聚多糖骨架;

2) 羟基氯喹对聚多糖骨架的取代:首先在极性溶剂中,在惰性氛围下,合成羟基氯喹-羰基二咪唑,然后在极性溶剂中,在惰性氛围中,使合成的羟基氯喹-羰基二咪唑与上一步骤合成的经疏水性侧链取代的聚多糖骨架反应,获得羟基氯喹-侧链-聚多糖偶联物;

3) 纳米凝胶递送系统的合成:将以上制备的羟基氯喹-侧链-聚多糖偶联物和抗肿瘤药物一起溶解于有机溶剂中,形成混合溶液,然后将该混合溶液逐滴加入到含水溶液中,并在滴加的过程中不断搅拌,制得初乳液,利用高压均质机将初乳液进一步分散,并减压真空除去有机溶剂,得到载有抗肿瘤药物的纳米凝胶。

[0012] 在以上方法中,优选在步骤1)中,极性溶剂为二甲亚砜,脱水剂为二环己基碳二亚胺,催化剂为二甲氨基吡啶,该反应步骤包括将聚多糖溶解于二甲亚砜中,分别加入二环己基碳二亚胺、二甲氨基吡啶及疏水性侧链,在惰性氛围下反应,产物经处理后获得经疏水性侧链取代的聚多糖骨架。

[0013] 另外优选地,步骤2)包括将羟基氯喹与N,N'-羰基二咪唑分别溶解于二甲基甲酰胺中,在惰性氛围下使二者反应获得羟基氯喹-羰基二咪唑,然后将合成的羟基氯喹-羰基二咪唑与步骤1)合成的经疏水性侧链取代的聚多糖骨架溶于二甲亚砜中,在惰性氛围下搅拌反应,处理后获得羟基氯喹-侧链-聚多糖偶联物。

[0014] 而另外在步骤3)中,所用有机溶剂为脂溶性有机溶剂,含水溶液选自纯水、5%w/v葡萄糖溶液、生理盐水或磷酸盐缓冲液,偶联物与抗肿瘤药物的投料质量比为1-50:1,所用含水溶液与有机溶剂的体积比为1-100:1,高压均质处理次数为1-10次,高压均质温度为0-50℃,减压真空温度为10-60℃。

[0015] 另外其中在步骤3)中所述的抗肿瘤药物是选自紫杉醇、阿霉素盐酸盐、多西紫杉

醇、羟基喜树碱或姜黄素。

[0016] 在另一个实施方案中,本发明的凝胶递药系统是通过消化道外给药方式进行施用,例如可以通过静脉内、皮下、腹膜内、颅内、硬膜内、动脉内、肌肉内等方式进行给药。

[0017] 有益效果:

单一的给药系统难以实现多种药物的共同递送,因此难以在抑制癌细胞增殖的同时,阻断其向周边及远处组织转移的信号级联。而本发明中使用纳米凝胶体系,在修饰羟基氯喹以达到组织癌细胞转移的同时,还可以通过疏水作用包载抗肿瘤药物,如紫杉醇,双管齐下增强对恶性肿瘤的治疗。并且所得的纳米凝胶结构稳定,修饰量和包载量可控,是一种具有良好生物相容性的多功能递送体系。采用本发明的方案,针对恶性肿瘤及其转移作用双管齐下,抑制癌细胞增殖的同时,阻断其向周边及远处组织转移的信号级联,实现对恶性癌症的有效治疗。

附图说明

[0018] 图1是本发明递送系统骨架化合物的合成路径示意图;

图2是合成包含抗肿瘤化合物的纳米凝胶的示意图;

图3是通过本发明实施例1制备的羟基氯喹-月桂酸-羟乙基淀粉系列产物的核磁共振谱图(氢谱);

图4是本发明实施例6制备的羟基氯喹-月桂酸-羟乙基淀粉纳米凝胶的相关体外表征数据;

图5是本发明制备的羟基氯喹-羟乙基淀粉-紫杉醇纳米凝胶在不同pH条件下释放的曲线图;

图6是本发明制备的羟基氯喹-羟乙基淀粉-紫杉醇纳米凝胶在不同药物浓度下对肿瘤细胞的杀伤作用;

图7显示的是聚合的氯喹相对于游离的氯喹表现出了很大程度上的抗细胞侵袭功能;

图8显示本发明制备的羟基氯喹-月桂酸-羟乙基淀粉载体的CXCR4再分布实验测定结果;

图9是用不同方法处理小小鼠肿瘤生长情况的对比结果。

具体实施方式

[0019] 本发明的目的是联合使用化疗药物如紫杉醇(PTX)和CXCR4拮抗剂,针对恶性肿瘤及其转移作用双管齐下,抑制癌细胞增殖的同时,阻断其向周边及远处组织转移的信号级联,实现对恶性癌症的有效治疗。本发明的新型聚多糖纳米凝胶递送系统,以羟乙基淀粉(HES)或糊精等聚多糖为亲水骨架材料,表面修饰有抗转移的基元羟基氯喹(HCQ),基于疏水链如月桂酸(LA)之间的疏水作用包载抗肿瘤药物,如紫杉醇(PTX),从而制备新型的具有抑制癌细胞增殖和转移的双重协同治疗作用的纳米凝胶。

[0020] 羟基氯喹(HCQ)是4-氨基喹啉衍生物类抗疟药,具有免疫调节、抗炎、抗增生、抗血小板等多种药理作用。近期研究发现,当HCQ共价结合到特定载体上后,其抗肿瘤转移的效果相对于游离药物表现出了很大程度上的增强。进一步的试验表明,如果将HCQ结合到递药载体形成纳米凝胶,则HCQ的作用会进一步增强,并且可以与化疗药物联用(如多西紫杉醇

等),在晚期实体瘤(如胶质母细胞瘤、软组织肉瘤等)和黑色素瘤方面具有辅助抗肿瘤的功效,且耐受性和安全性良好。

[0021] 因此本发明提供了一种新型聚多糖纳米凝胶递送系统,以羟乙基淀粉(HES)、糊精等聚多糖为亲水骨架材料,表面修饰有抗转移的基元羟基氯喹(HCQ),基于疏水链如月桂酸(LA)之间的疏水作用包载抗肿瘤药物如紫杉醇(PTX),从而制备新型的具有抑制癌细胞增殖和转移的双重协同治疗作用的纳米凝胶。

[0022] 本发明还进一步提供了上述新型纳米凝胶递药系统的制备方法,包括载体的制备及纳米凝胶的形成。载体的制备包括羟基氯喹的合成、疏水链修饰的亲水性骨架的合成以及羟基氯喹-疏水链-聚多糖骨架偶联物的合成。下面以羟基氯喹-月桂酸-羟乙基淀粉为例来对其进行简单说明。

[0023] (a) 羟基氯喹的合成:将硫酸羟氯喹溶于纯水中,在不断搅拌的条件下滴加过量30%氨水直至产生白色不溶产物,加入二氯甲烷萃取水相4-6次,收集有机相并加入无水硫酸钠过夜,减压蒸出溶剂,得到最终脱盐产物羟基氯喹。

[0024] (b) 月桂酸-羟乙基淀粉的合成:将羟乙基淀粉溶解于二甲亚砜中,分别加入二环己基碳二亚胺,4-二甲氨基吡啶以及月桂酸,在惰性气体保护下反应12-18小时,抽滤除去不溶物后,将反应液加入10倍量的无水乙醚中,抽滤,固体用超纯水溶解后透析,冻干得月桂酸-羟乙基淀粉。优选地,所述羟乙基淀粉HES 70/0.5,平均分子量为70 kDa,羟乙基的摩尔取代度为0.5;所述羟乙基淀粉中的糖环、二环己基碳二亚胺、4-二甲氨基吡啶以及月桂酸投料摩尔比为1:1:1:0.25-0.5,优选1:1:1:0.25。

[0025] (c) 羟基氯喹-月桂酸-羟乙基淀粉的合成:将(a)所得羟基氯喹和N,N'-羰基二咪唑分别溶解于二甲基甲酰胺中,在惰性气体保护下,逐滴加入N,N'-羰基二咪唑溶液,继续搅拌反应5-6小时。加入适量水终止反应后,加入二氯甲烷溶液,并用超纯水洗涤5-10次,收集有机相,减压蒸出溶剂,得到羟基氯喹-羰基二咪唑。将羟基氯喹-羰基二咪唑和月桂酸-羟乙基淀粉溶于二甲亚砜中,惰性气体保护下不断搅拌,反应4天。将反应液加入10倍量的无水乙醚中,抽滤,固体用超纯水溶解后透析,冻干得羟基氯喹-月桂酸-羟乙基淀粉。所述羟基氯喹和N,N'-羰基二咪唑的投料摩尔比为1:3-4,优选1:3。所述羟基氯喹-羰基二咪唑和月桂酸-羟乙基淀粉的投料摩尔比为1:1-1.5,优选1:1.5。

[0026] 制备得到的偶联物进一步包裹抗肿瘤药物形成载有抗肿瘤药物的纳米凝胶。下面结合以上制备的羟基氯喹-月桂酸-羟乙基淀粉偶联物和以紫杉醇为例来对纳米凝胶的制备作进一步说明。

[0027] (i) 将所述的羟基氯喹-月桂酸-羟乙基淀粉偶联物以及紫杉醇溶解于有机溶剂中,得到羟基氯喹-月桂酸-羟乙基淀粉偶联物以及紫杉醇的混合有机溶液。其中有机溶剂可选二氯甲烷、三氯甲烷等脂溶性有机溶剂,优选三氯甲烷。所述的羟基氯喹-月桂酸-羟乙基淀粉偶联物和紫杉醇的投料质量比为1-50:1,优选10:1。

[0028] (ii) 将步骤(i)获得的羟基氯喹-月桂酸-羟乙基淀粉合成物以及紫杉醇的混合有机溶液逐滴加入含水溶液中,并在滴加的过程中不断搅拌,制备得到初乳液。含水溶液可选纯水、体积百分数为5%葡萄糖溶液、生理盐水和磷酸盐缓冲液等,优选纯水。所用的含水溶液与有机溶剂的体积比为1:1~100:1,优选为10:1~20:1。

[0029] (iii) 利用高压均质机将步骤(ii)得到的初乳液进行进一步分散,减压真空除去

有机溶剂,得到载有紫杉醇的聚合氯喹的羟乙基淀粉纳米凝胶。高压均值次数为1~10次,优选1~5次;高压均质温度为0~50℃,优选4~15℃;减压真空温度为10~60℃,优选25~37℃。

[0030] 所得到的纳米载药系统中,载有抗转移抗肿瘤药物的纳米凝胶的粒径为100~200nm,优选为100~150nm,载药量为3%~10%,优选为5%,Zeta电位为2~10mV,优选为5mV。所载抗肿瘤药物是选自紫杉醇、阿霉素盐酸盐、多西紫杉醇、羟基喜树碱或姜黄素,优选为紫杉烷类抗肿瘤药物,更优选为紫杉醇抗肿瘤药物。

[0031] 下面将结合具体实施例对本发明进行进一步的详细说明。应了解,实施例中所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可通过正规渠道购买得到的常规产品。

[0032] 在本发明的实施例中,所述抗肿瘤药物以紫杉醇为例进行说明。

[0033] 除非特别指明,否则以下实施例中所用水溶液的溶剂均为无菌超纯水溶液。

[0034] 除非特别指明,否则以下实施例中所用的试剂均为分析纯试剂。

[0035] 除非特别指明,否则以下实施例中所用的癌细胞均为购自中国科学院细胞库的乳腺癌细胞系4T1。

[0036] 除非特别指明,否则以下实施例中所用的动物均购自湖北省医学实验动物中心。

[0037] 应了解,在以上例示性描述以及以下具体实例中,对一些物质、范围、用量等作了具体性的描述,但是应该知道的是,这些具体性的描述应该仅仅视为作为示例以便对本发明的方案进行具体详细的说明,而不应理解为本发明的保护范围仅限于这些相应的物质或者范围,本发明的保护范围应以权利要求书为准。

[0038] 实施例1 一种羟基氯喹-月桂酸-羟乙基淀粉的制备方法

(1) 羟基氯喹的合成:将1 g硫酸羟氯喹溶于2 ml纯水中,在不断搅拌的条件下滴加2 ml 30% 氨水直至产生白色不溶产物,加入二氯甲烷萃取水相4~6次,收集有机相并加入无水硫酸钠过夜,减压蒸出溶剂,得到最终脱盐产物羟基氯喹。

[0039] (2) 月桂酸-羟乙基淀粉的合成:将100 mg羟乙基淀粉溶解于2 ml二甲亚砜中,分别加入124 mg二环己基碳二亚胺、127 mg 4-二甲氨基吡啶以及30 mg月桂酸,在惰性气体保护下反应12~18小时,抽滤除去不溶物后,将反应液加入10倍量的无水乙醚中,抽滤,固体用超纯水溶解后透析,冻干得月桂酸-羟乙基淀粉。

[0040] (3) 羟基氯喹-月桂酸-羟乙基淀粉的合成:将(1)所得500 mg羟基氯喹和972.5 mg N,N'-羰基二咪唑分别溶解于2 ml二甲基甲酰胺中,在惰性气体保护下,逐滴加入N,N'-羰基二咪唑溶液,继续搅拌反应5~6小时。加入5 ml水终止反应后,加入20 ml二氯甲烷溶液,并用超纯水洗涤5~10次,收集有机相,减压蒸出溶剂,得到羟基氯喹-羰基二咪唑。将200 mg羟基氯喹-羰基二咪唑和100 mg月桂酸-羟乙基淀粉溶于二甲亚砜中,惰性气体保护下不断搅拌,反应4天。将反应液加入10倍量的无水乙醚中,抽滤,固体用超纯水溶解后透析,冻干得羟基氯喹-月桂酸-羟乙基淀粉。

[0041] 图3为本实施例1制备的羟基氯喹-月桂酸-羟乙基淀粉系列产物的核磁共振谱图(氢谱);图3的结果证实本实施例制备合成的产物为羟基氯喹-月桂酸-羟乙基淀粉。

[0042] 实施例2 一种羟基氯喹-月桂酸-透明质酸的制备方法

(1) 羟基氯喹的合成:将1 g硫酸羟氯喹溶于2 ml纯水中,在不断搅拌的条件下滴加2 ml 30%氨水直至产生白色不溶产物,加入二氯甲烷萃取水相4~6次,收集有机相并加入无水

硫酸钠过夜,减压蒸出溶剂,得到最终脱盐产物羟基氯喹。

[0043] (2) 月桂酸-透明质酸的合成:将100 mg透明质酸溶解于2 ml二甲亚砜中,分别加入103 mg二环己基碳二亚胺,103 mg 4-二甲氨基吡啶以及25.7 mg月桂酸,在惰性气体保护下反应12-18小时,抽滤除去不溶物后,将反应液加入10倍量的无水乙醚中,抽滤,固体用超纯水溶解后透析,冻干得月桂酸-透明质酸。

[0044] (3) 羟基氯喹-月桂酸-透明质酸的合成:将(1)所得500 mg羟基氯喹和972.5 mg N,N'-羰基二咪唑分别溶解于2 ml二甲基甲酰胺中,在惰性气体保护下,逐滴加入N,N'-羰基二咪唑溶液,继续搅拌反应5-6小时。加入5 ml水终止反应后,加入20 ml二氯甲烷溶液,并用超纯水洗涤5-10次,收集有机相,减压蒸出溶剂,得到羟基氯喹-羰基二咪唑。将200 mg羟基氯喹-羰基二咪唑和100 mg月桂酸-透明质酸溶于二甲亚砜中,惰性气体保护下不断搅拌,反应4天。将反应液加入10倍量的无水乙醚中,抽滤,固体用超纯水溶解后透析,冻干得羟基氯喹-月桂酸-透明质酸。

[0045] 实施例3 一种羟基氯喹-月桂酸-葡聚糖的制备方法

(1) 羟基氯喹的合成:将1 g硫酸羟基氯喹溶于2 ml纯水中,在不断搅拌的条件下滴加2 ml 30%氨水直至产生白色不溶产物,加入二氯甲烷萃取水相4-6次,收集有机相并加入无水硫酸钠过夜,减压蒸出溶剂,得到最终脱盐产物羟基氯喹。

[0046] (2) 月桂酸-葡聚糖的合成:将100 mg葡聚糖溶解于2 ml二甲亚砜中,分别加入240 mg二环己基碳二亚胺,240 mg 4-二甲氨基吡啶以及60 mg月桂酸,在惰性气体保护下反应12-18小时,抽滤除去不溶物后,将反应液加入10倍量的无水乙醚中,抽滤,固体用超纯水溶解后透析,冻干得月桂酸-葡聚糖。

[0047] (3) 羟基氯喹-月桂酸-葡聚糖的合成:将(1)所得500 mg羟基氯喹和972.5 mg N,N'-羰基二咪唑分别溶解于2 ml二甲基甲酰胺中,在惰性气体保护下,逐滴加入N,N'-羰基二咪唑溶液,继续搅拌反应5-6小时。加入5 ml水终止反应后,加入20 ml二氯甲烷溶液,并用超纯水洗涤5-10次,收集有机相,减压蒸出溶剂,得到羟基氯喹-羰基二咪唑。将200 mg羟基氯喹-羰基二咪唑和100 mg月桂酸-葡聚糖溶于二甲亚砜中,惰性气体保护下不断搅拌,反应4天。将反应液加入10倍量的无水乙醚中,抽滤,固体用超纯水溶解后透析,冻干得羟基氯喹-月桂酸-葡聚糖。

[0048] 实施例4 一种羟基氯喹-月桂酸-糊精的制备方法

(1) 羟基氯喹的合成:将1 g硫酸羟基氯喹溶于2 ml纯水中,在不断搅拌的条件下滴加2 ml 30%氨水直至产生白色不溶产物,加入二氯甲烷萃取水相4-6次,收集有机相并加入无水硫酸钠过夜,减压蒸出溶剂,得到最终脱盐产物羟基氯喹。

[0049] (2) 月桂酸-糊精的合成:将100 mg糊精溶解于2 ml二甲亚砜中,分别加入124 mg二环己基碳二亚胺,127 mg 4-二甲氨基吡啶以及18.5 mg月桂酸,在惰性气体保护下反应12-18小时,抽滤除去不溶物后,将反应液加入10倍量的无水乙醚中,抽滤,固体用超纯水溶解后透析,冻干得月桂酸-糊精

(3) 羟基氯喹-月桂酸-糊精的合成:将(1)所得500 mg羟基氯喹和972.5 mg N,N'-羰基二咪唑分别溶解于2 ml二甲基甲酰胺中,在惰性气体保护下,逐滴加入N,N'-羰基二咪唑溶液,继续搅拌反应5-6小时。加入5 ml水终止反应后,加入20 ml二氯甲烷溶液,并用超纯水洗涤5-10次,收集有机相,减压蒸出溶剂,得到羟基氯喹-羰基二咪唑。将200 mg羟基氯喹-

羰基二咪唑和100 mg月桂酸-糊精溶于二甲亚砜中,惰性气体保护下不断搅拌,反应4天。将反应液加入10倍量的无水乙醚中,抽滤,固体用超纯水溶解后透析,冻干得羟基氯喹-月桂酸-糊精。

[0050] 实施例5 一种羟基氯喹-胆固醇-透明质酸的制备方法

(1) 羟基氯喹的合成:将1 g硫酸羟基氯喹溶于2 ml纯水中,在不断搅拌的条件下滴加2 ml 30%氨水直至产生白色不溶产物,加入二氯甲烷萃取水相4-6次,收集有机相并加入无水硫酸钠过夜,减压蒸出溶剂,得到最终脱盐产物羟基氯喹。

[0051] (2) 胆固醇-透明质酸的合成:将100 mg透明质酸溶解于10 ml二氯甲烷中,分别加入200 mL DIPA,以及50 mg胆固醇,在真空干燥的条件下反应24小时,抽滤除去二氯甲烷后,将反应液加入10倍量的无水乙醚中冲洗,固体用超纯水溶解后透析,冻干得胆固醇-透明质酸。

[0052] (3) 羟基氯喹-胆固醇-透明质酸的合成:将(1)所得500 mg羟基氯喹和972.5 mg N,N'-羰基二咪唑分别溶解于2 ml二甲基甲酰胺中,在惰性气体保护下,逐滴加入N,N'-羰基二咪唑溶液,继续搅拌反应5-6小时。加入5 ml水终止反应后,加入20 ml二氯甲烷溶液,并用超纯水洗涤5-10次,收集有机相,减压蒸出溶剂,得到羟基氯喹-羰基二咪唑。将200 mg羟基氯喹-羰基二咪唑和100 mg胆固醇-透明质酸溶于二甲亚砜中,惰性气体保护下不断搅拌,反应4天。将反应液加入10倍量的无水乙醚中,抽滤,固体用超纯水溶解后透析,冻干得羟基氯喹-胆固醇-透明质酸。

[0053] 实施例6 一种羟乙基淀粉纳米凝胶载药系统的制备方法

取10 mg实施例1制备得到的羟基氯喹-月桂酸-羟乙基淀粉合成物以及紫杉醇溶解于100 μ L DMSO中,超声使其充分溶解。另取10 mL纯水,逐滴滴加羟基氯喹-月桂酸-羟乙基淀粉合成物以及紫杉醇复合溶液,在滴加的过程中超声以制备初乳,超声功率为400W,温度为10 $^{\circ}$ C,超声5分钟,再利用高压均质机将超声后得到的初乳进行进一步分散,高压均质温度为10 $^{\circ}$ C,压力为500bar,循环2次。37 $^{\circ}$ C下减压真空除去有机溶剂,即得到载紫杉醇的聚合氯喹羟乙基淀粉纳米凝胶,其载药量为5%,Zeta电位为5mV。

[0054] 图4为本实施例3制备的羟基氯喹-月桂酸-羟乙基淀粉纳米凝胶的相关体外表征数据。

[0055] 实施例7 一种羟乙基淀粉纳米凝胶载药系统的制备方法

取10 mg实施例1制备得到的羟基氯喹-月桂酸-羟乙基淀粉合成物以及阿霉素溶解于100 μ L DMSO中,超声使其充分溶解。另取10 mL纯水,逐滴滴加羟基氯喹-月桂酸-羟乙基淀粉合成物以及紫杉醇复合溶液,在滴加的过程中超声以制备初乳,超声功率为400W,温度为10 $^{\circ}$ C,超声5分钟,再利用高压均质机将超声后得到的初乳进行进一步分散,高压均质温度为10 $^{\circ}$ C,压力为500 bar,循环2次。37 $^{\circ}$ C下减压真空除去有机溶剂,即得到载紫杉醇的聚合氯喹羟乙基淀粉纳米凝胶,其载药量为4%,Zeta电位为7 mV。

[0056] 实施例8 一种羟乙基淀粉纳米凝胶载药系统的制备方法

取10mg实施例1制备得到的羟基氯喹-月桂酸-羟乙基淀粉合成物以及多西紫杉醇溶解于100 μ L DMSO中,超声使其充分溶解。另取10 mL纯水,逐滴滴加羟基氯喹-月桂酸-羟乙基淀粉合成物以及紫杉醇复合溶液,在滴加的过程中超声以制备初乳,超声功率为400W,温度为10 $^{\circ}$ C,超声5分钟,再利用高压均质机将超声后得到的初乳进行进一步分散,高压均质温

度为10℃,压力为500bar,循环2次。37℃下减压真空除去有机溶剂,即得到载紫杉醇的聚合氯喹羟乙基淀粉纳米凝胶,其载药量为6%,Zeta电位为4.5 mV。

[0057] 实施例9 载紫杉醇的聚合氯喹羟乙基淀粉纳米凝胶中紫杉醇体外释放的测定:

将实施例6中制备的羟基氯喹-羟乙基淀粉-紫杉醇纳米凝胶装入截留分子量为14000的透析袋中,将透析袋分别转入以下三种条件的释放介质中:(1)磷酸缓冲液,pH=7.4,含0.05%吐温-80;(2)磷酸缓冲液,pH=6.8,含0.05%吐温-80;(3)磷酸缓冲液,pH=5.0,含0.05%吐温-80。然后置于摇床上进行释放实验,转速为100转/分,在第2、4、6、12、24小时从释放液中取样,每次取样1mL,每次取样后向体系中补充相应体积的释放介质。每次取出的样品使用如下方法进行萃取:向每次取出的样品中加入1mL甲基叔丁基醚,涡旋1分钟,静置3分钟后5000转/分条件下离心5分钟,萃取2次,收集有机相,氮气吹干,用100微升色谱级乙腈复溶,10000转/分条件下离心5分钟,取上清用高效液相色谱检测紫杉醇的含量。高效液相色谱柱为反相C18硅胶柱(Hypersil ODS,4.6×250mm,5μm),流动相为乙腈/水=60:40(v/v),流速为1.0 mL/分,进样量为20微升,紫外检测波长为227nm,柱温为25℃。根据各个时间点的紫杉醇含量绘制释放曲线。图5为羟基氯喹-羟乙基淀粉-紫杉醇纳米凝胶在不同pH条件下释放的曲线图,从图中可以看到在酸性条件下,羟基氯喹-羟乙基淀粉-紫杉醇纳米凝胶具有较快的释放药物速度,而在正常生理条件下的磷酸盐缓冲液中,只有约10%的药物释放出来。从而说明了羟基氯喹-羟乙基淀粉-紫杉醇纳米凝胶在肿瘤内可以实现药物释放,从而达到治疗肿瘤的效果。

[0058] 实施例10 羟基氯喹-羟乙基淀粉-紫杉醇纳米凝胶体外还原响应细胞毒性的测定:

按照实施例6的方法制备羟基氯喹-羟乙基淀粉-紫杉醇纳米凝胶。将乳腺癌4T1细胞接种于96孔板中,接种密度为 8×10^3 个细胞/孔,培养基体积为100μL,置于37℃,5%CO₂培养箱中孵育24小时。含有不同浓度羟乙基淀粉-紫杉醇纳米粒的培养基,孵育24小时或48小时后,加入20μL 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT),孵育4小时后,弃去孔内溶液,加入150μL二甲基亚砷溶解紫色结晶,利用酶标仪在492nm波长下测定各孔吸光值,计算细胞存活率。图6显示的是羟基氯喹-羟乙基淀粉-紫杉醇纳米凝胶在不同药物浓度下对肿瘤细胞的杀伤作用。从图中可以看出,相对于游离氯喹,聚合的氯喹表现出了显著的低毒性,而且羟基氯喹-羟乙基淀粉-紫杉醇纳米凝胶对肿瘤细胞的杀伤能力明显高于游离紫杉醇,这是由于氯喹的正电性使得纳米凝胶膜穿透变强,从而使得毒性增强。

[0059] 实施例11 羟基氯喹-月桂酸-羟乙基淀粉载体抗细胞侵袭的测定

Matrigel用含1% FBS的1640培养液1:3稀释,每孔40μL加入小室,37℃下放置,使Matrigel聚合成凝胶。使用时吸除小室内多余的液体。铺胶应尽量均匀。指数生长期的4T1细胞换用含无血清的1640培养液,于37℃、5% CO₂培养箱中继续培养24小时,去除血清的影响。24小时后细胞常规消化,调整细胞浓度,加入已包被好Matrigel的Transwell小室内,4×10⁴个细胞/100 μL/小室。置小室于24孔培养板,小室外每孔加入60μL含10% FBS的DMEM培养液,于37℃、5% CO₂培养箱中继续培养。6小时后分别于不同制剂共同孵育24h,培养结束取出Transwell小室,用棉签擦净小室内的细胞,PBS清洗4遍,无水甲醇固定20分钟,0.2%的结晶紫染色30分钟。在50倍倒置显微镜下观察,随机取5个视野计数细胞数,计算均值。比较载体组与对照组穿膜细胞数作为评价肿瘤细胞侵袭能力强弱的指标。

[0060] 图7显示的是聚合的氯喹相对于游离的氯喹表现出了很大程度上的抗细胞侵袭功能,而细胞侵袭这一特性正是恶性肿瘤转移的体外表现,因此修饰了羟基氯喹的羟乙基淀粉具有很强的抗细胞转移功能。

[0061] 实施例12 羟基氯喹-月桂酸-羟乙基淀粉载体的CXCR4再分布实验测定

将表达绿色荧光蛋白的U2OS以每孔8000个细胞种于黑色的96孔板中培养24小时,细胞用100 μ L DMEM培养基(含2 mM L-谷氨酰胺、1% FBS、1% 链霉素和10 mM HEPES)清洗两遍,然后与含0.25% DMSO的不同制剂孵育30分钟,最后再加入SDF-1孵育一个小时。4%甲醛固定20分钟后用PBS清洗4次,用EVOS荧光显微镜观察。

[0062] 图8显示的是聚合的氯喹与SDF-1并非竞争拮抗的关系,而是通过使U2OS细胞表面CXCR4内陷,使得SDF-1无法与CXCR4结合,从而达到抑制细胞迁移的作用,因此修饰了羟基氯喹的羟乙基淀粉具有很强的抗细胞转移功能。

[0063] 实施例13 羟基氯喹-羟乙基淀粉-月桂酸-紫杉醇纳米凝胶动物实验

取对数期生长活跃的鼠乳腺癌4T1 细胞株,用生理盐水调整细胞浓度为 3×10^7 /ml,每只健康Ba1b/C小鼠于乳房接种 0.1 ml,正常饲养 7~10 天。选取肿瘤长径为 4.5~6.0 mm(平均5.2mm)左右的荷瘤小鼠 40 只,按体重大小随机分组:5 组用于肿瘤抑制实验,包括生理盐水组,游离HCQ和PTX组,羟基氯喹-羟乙基淀粉-月桂酸纳米凝胶组,羟乙基淀粉-月桂酸-紫杉醇组和羟基氯喹-羟乙基淀粉-月桂酸-紫杉醇纳米凝胶组,每组 8 只。小鼠经尾缘静脉每三天给药一次(也可使用肌肉注射,口服以及肺部吸入给药),共三次,给药总量为含有紫杉醇(10mg/kg)和HCQ(10mg/kg)。每日测量瘤径和体重,21天后完整剥除牺牲动物的肿瘤,利用称量天平检测肿瘤的质量,并统计学分析。其组织器官也相应剥除,对其进行H&E切片染色。

[0064] 图9是按如上步骤给药后所得的肿瘤体积增长情况,小鼠体重及最终的瘤重,由图可知羟基氯喹-羟乙基淀粉-月桂酸-紫杉醇纳米凝胶体现出良好的抗肿瘤效果,且与生理盐水组相比具有显著性差异($P < 0.01$)。

[0065] 与传统的载体纳米系统相比,该纳米凝胶载药系统具有更好的体内稳定性和生物相容性。此外,其骨架赋予了其多功能修饰的特点,从而提高抗肿瘤及抗转移的效果,降低毒副作用,为新型纳米药物的设计和构建提供了新思路。

[0066] 上面结合具体实施例和附图对本发明的实施方式作了详细的说明,但是本发明不限于上述实施方式,在所属技术领域普通技术人员所具备的知识范围内,还可以在不脱离本发明宗旨的前提下做出各种变化。

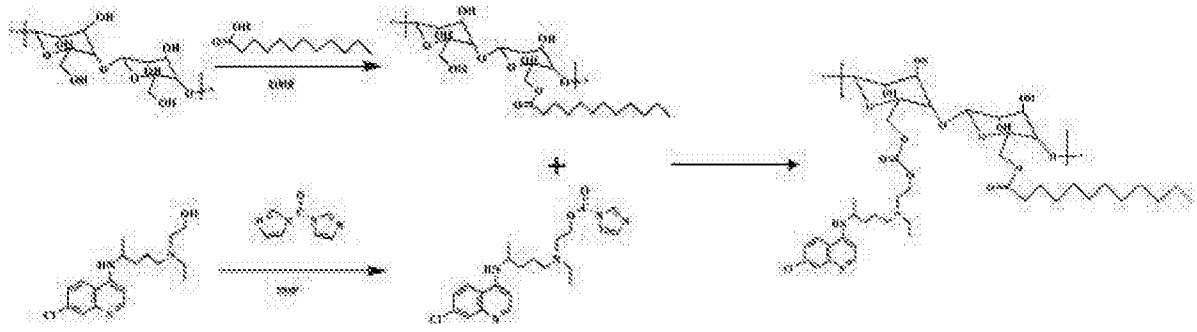


图1

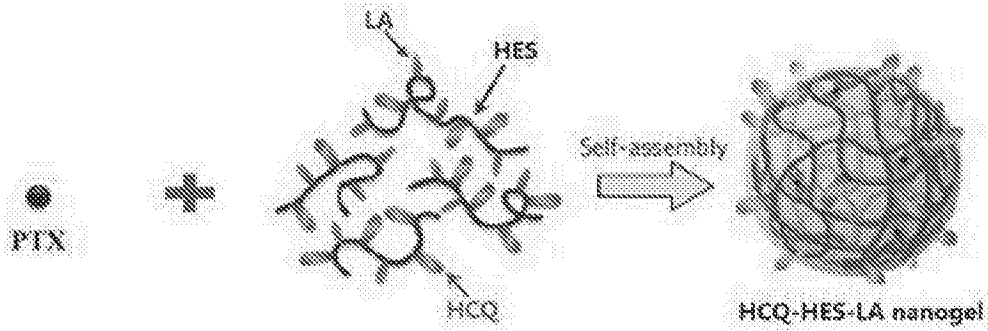


图2

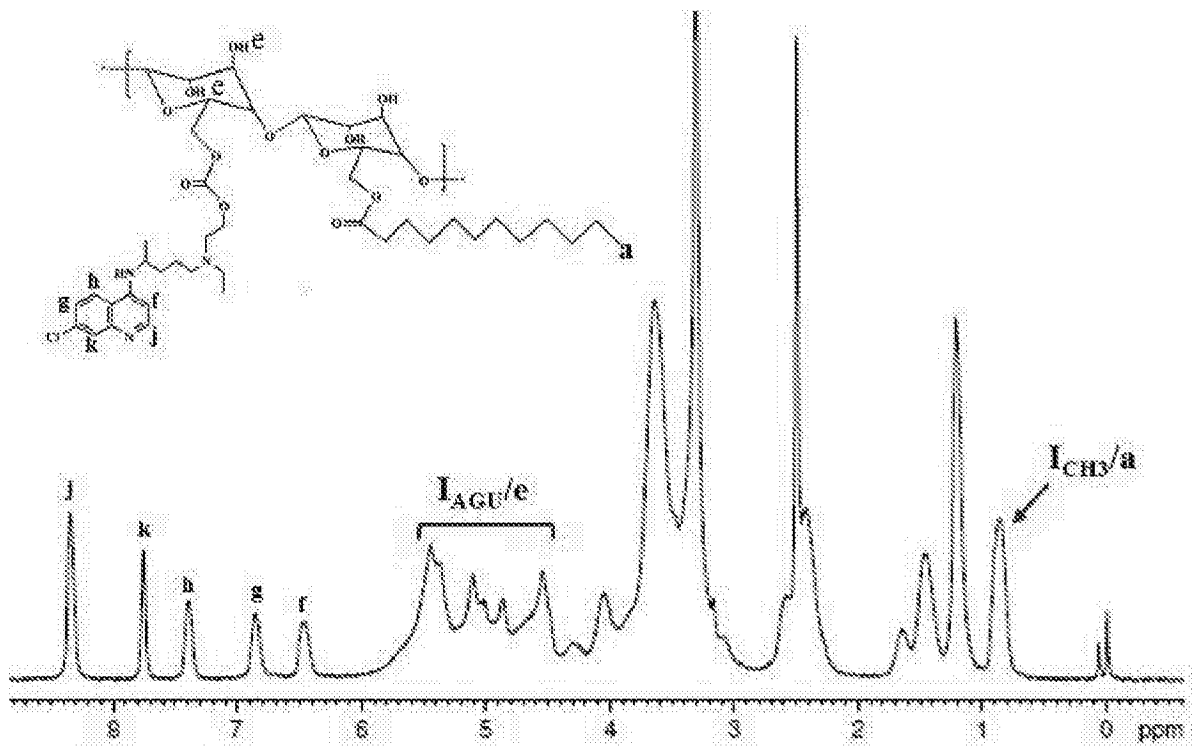


图3

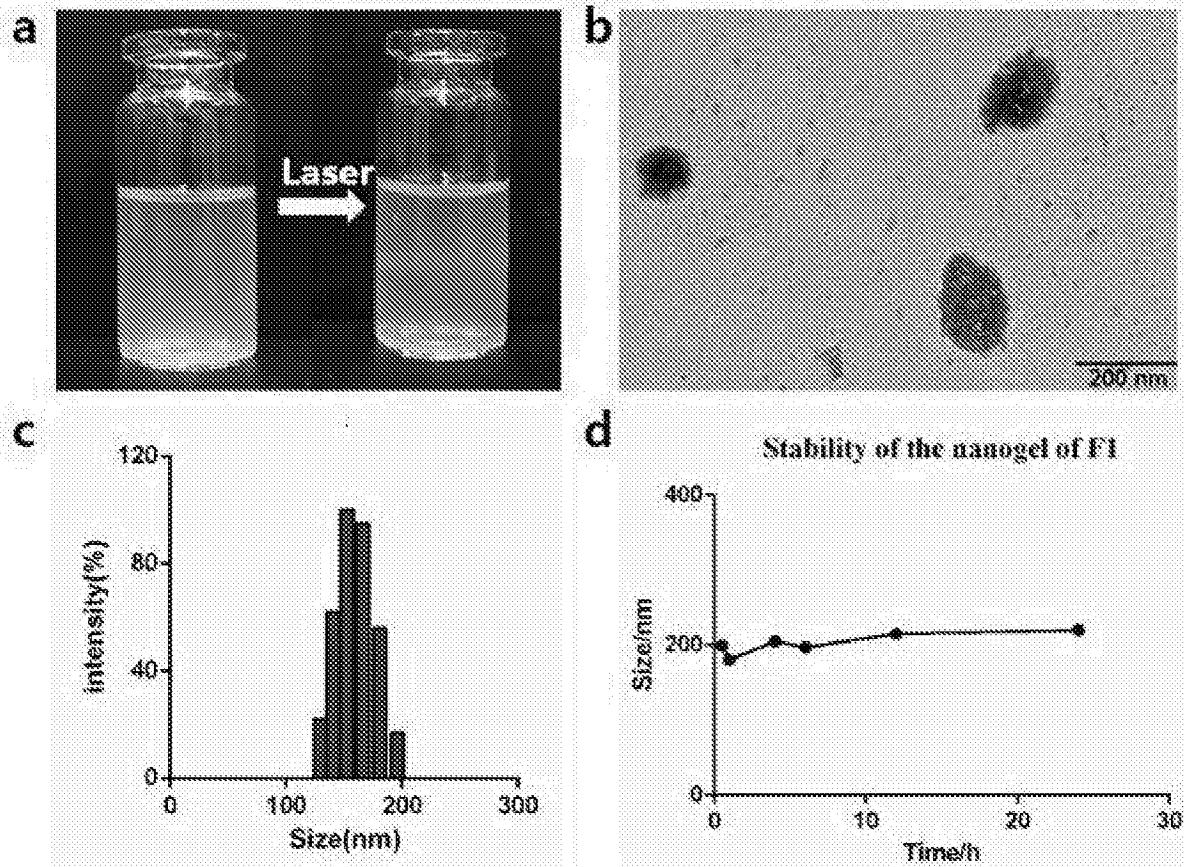


图4

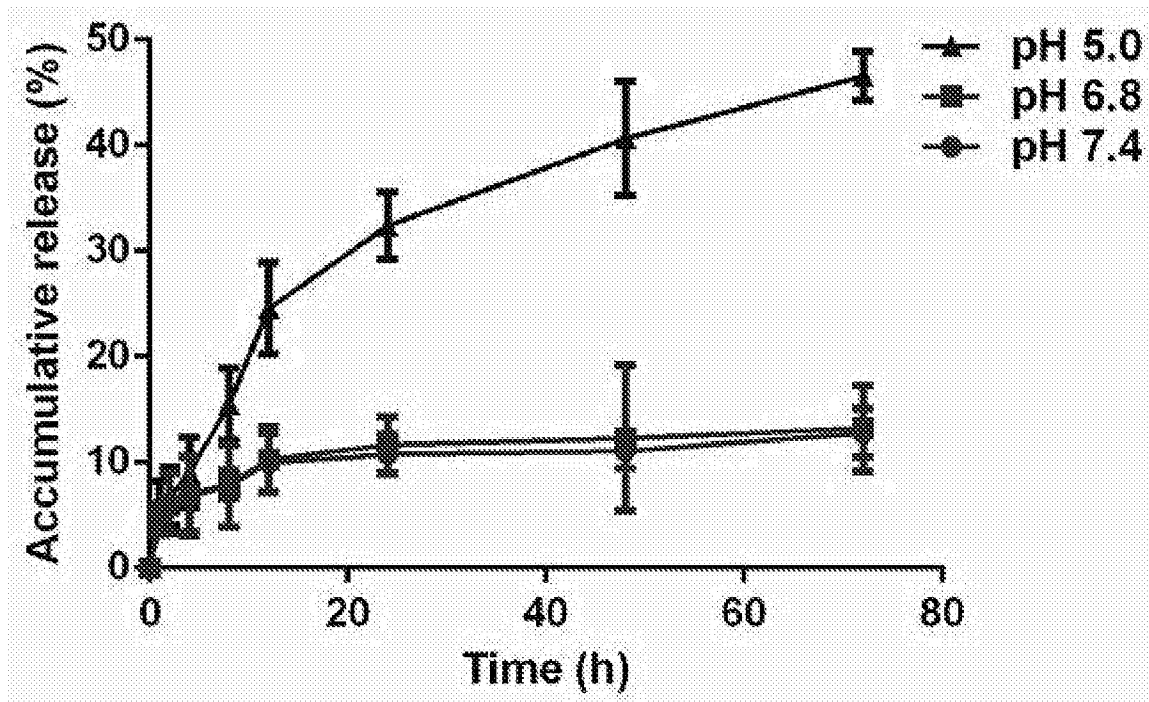


图5

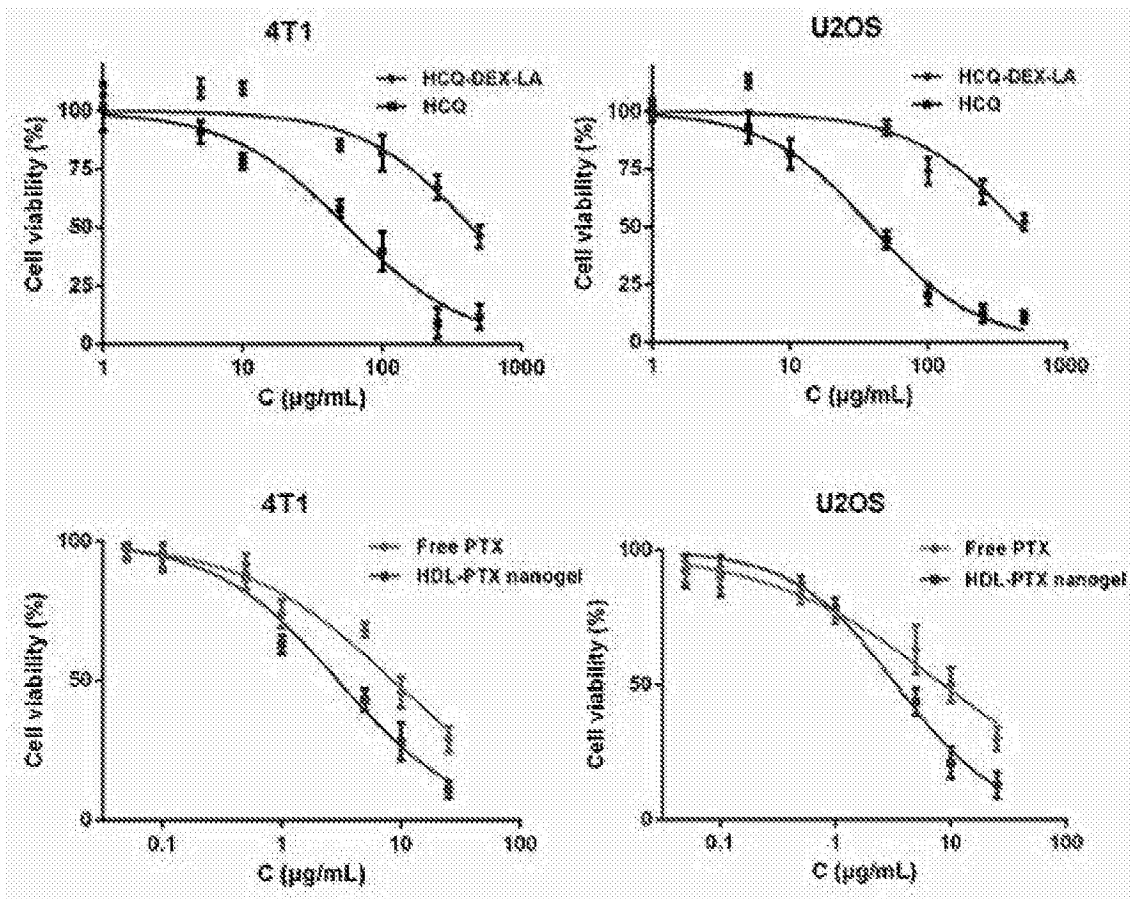


图6

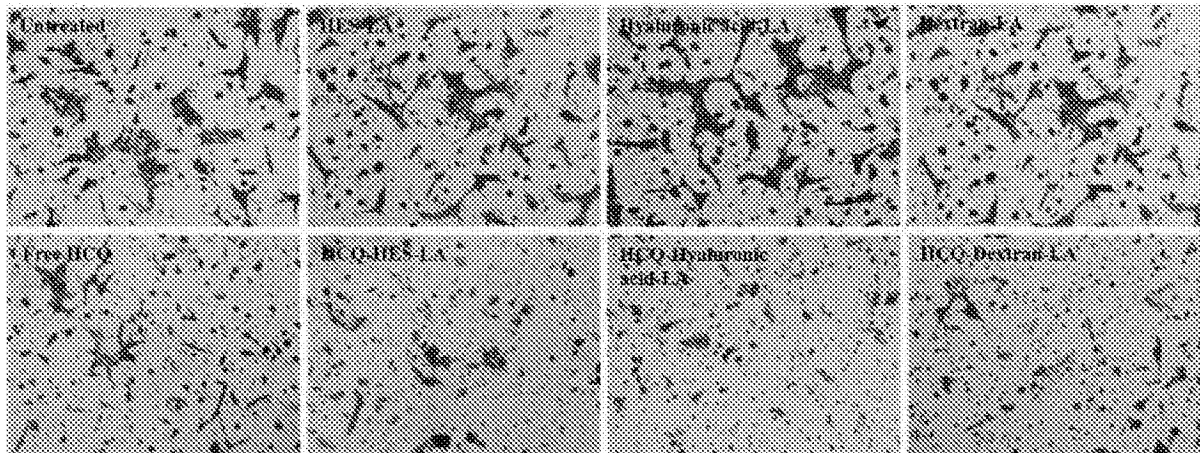


图7

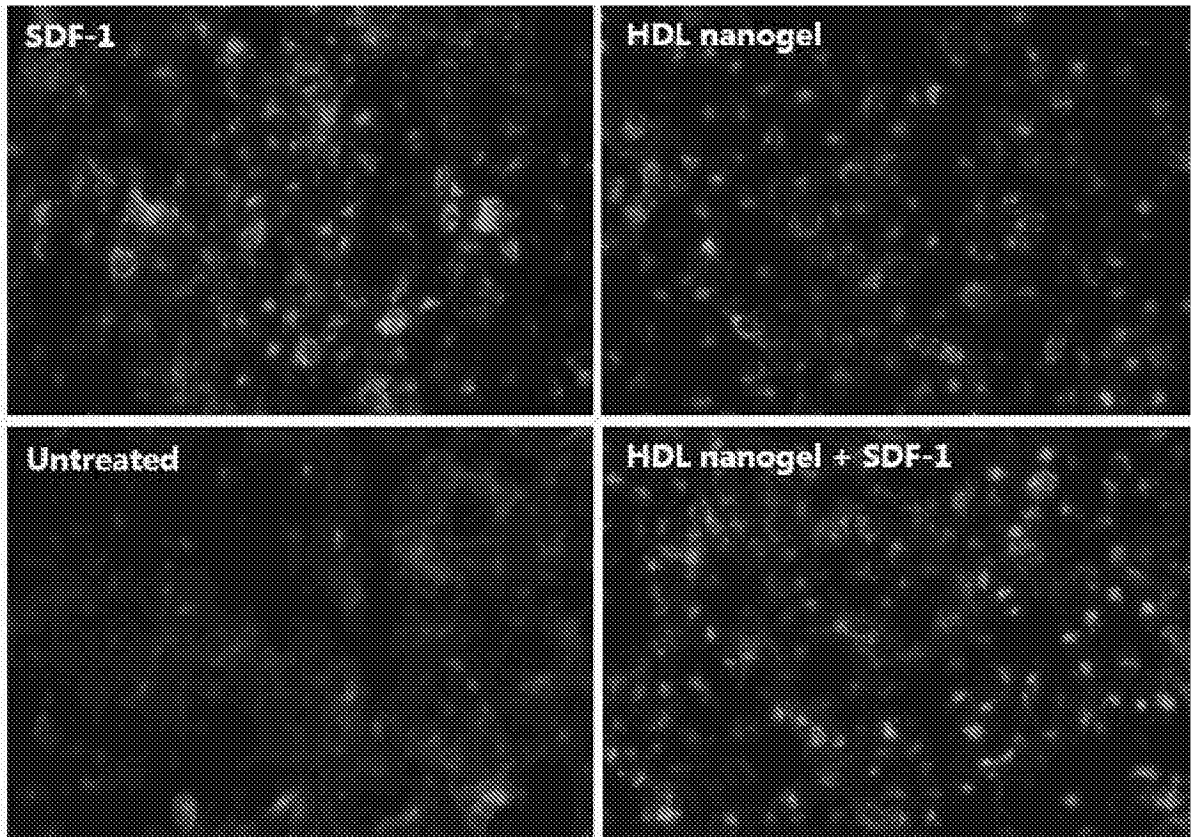


图8

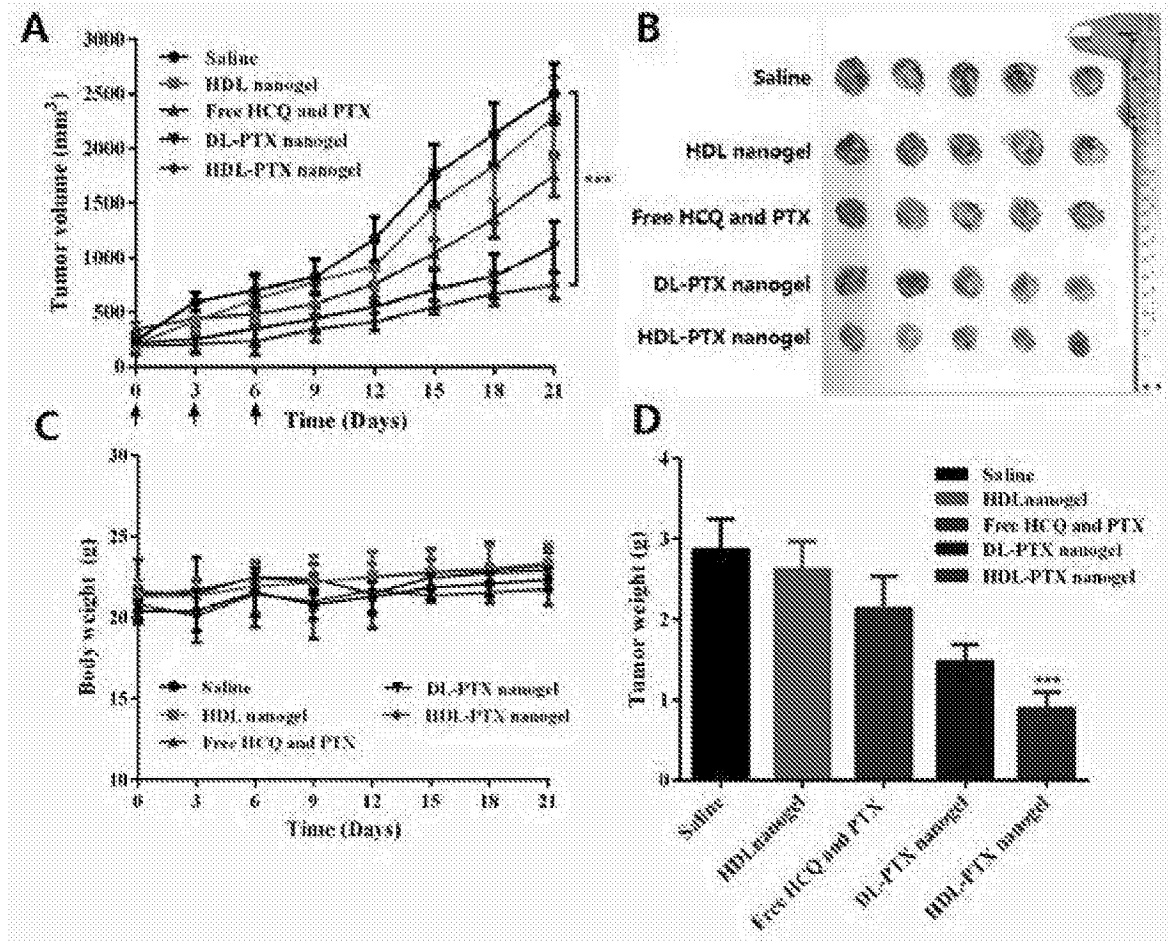


图9