



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105859990 B

(45)授权公告日 2018.03.09

(21)申请号 201610234759.5

A61K 47/32(2006.01)

(22)申请日 2016.04.14

A61P 35/00(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105859990 A

(43)申请公布日 2016.08.17

(73)专利权人 苏州大学

地址 215123 江苏省苏州市苏州工业园区  
仁爱路199号

(72)发明人 孟凤华 杨炜静 钟志远

(74)专利代理机构 苏州创元专利商标事务所有  
限公司 32103

代理人 陶海锋 孙周强

(51)Int.Cl.

C08F 293/00(2006.01)

C08F 8/34(2006.01)

A61K 9/127(2006.01)

(56)对比文件

CN 101792516 A,2010.08.04,

刘桂景.具有不对称膜结构的可生物降解聚  
合物囊泡用于抗癌药物及蛋白质的细胞内释放.  
《中国优秀硕士学位论文全文数据库 工程科技I  
辑》.2010,(第1期),

魏荣冉.还原敏感可逆核交联的聚合物胶束  
用于阿霉素的触发释放.《万方数据库》.2013,

Ling Lu等.Anisamide-Decorated pH-  
Sensitive Degradable Chimaeric  
Polymersomes Mediate Potent and Targeted  
Protein Delivery to Lung Cancer Cells.  
《Biomacromolecules》.2015,第16卷(第6期),

审查员 马玉玲

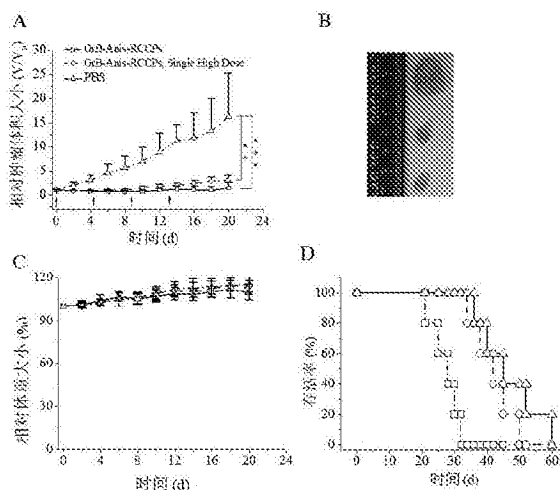
权利要求书2页 说明书15页 附图13页

(54)发明名称

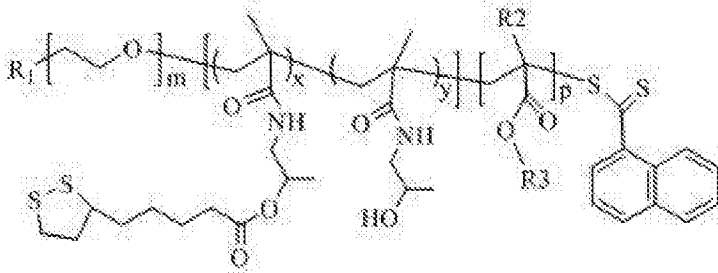
侧链含硫辛酰基的聚合物、其制备方法及其  
其制备的聚合物囊泡及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种侧链含硫辛酰基的聚合  
物、其制备方法及其由其制备的聚合物囊泡及其应  
用。侧链含硫辛酰基的聚合物通过RAFT聚合和酯  
化反应得到,其分子量分布较窄、分子量和LA取  
代度可控具有优异的生物相容性,可用于控制药  
物释放体系,制备的肺癌靶向的还原敏感可逆交  
联的聚合物囊泡纳米药物支持体内稳定长循环,  
但在肺癌组织高富集并高效进入细胞,在细胞内  
快速解交联、释放出药物,高效特异性地杀死癌  
细胞,有效抑制了皮下和原位肺癌的生长而不造  
成毒副作用。



1. 一种侧链含硫辛酰基的聚合物,其特征在于,所述侧链含硫辛酰基的聚合物的结构式如下:



其中,m为68~227, $x/(x+y) = 0.5\sim 1$ ;

R1选自以下基团中的一种:



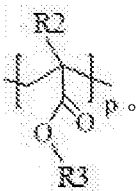
R2、R3选自以下方案之一:

- ①R2、R3同为H;
- ②R2为CH<sub>3</sub>,R3为H或者以下基团中的一种:



P (HPMA-LA) 链段的分子量是PEG链段分子量的3~10倍,PIon链段的分子量是PEG链段分子量的30%~70%;

所述PIon链段的化学结构式如下:



2. 根据权利要求1所述侧链含硫辛酰基的聚合物,其特征在于:所述R1选自以下基团中的一种:



所述m为113~170;PIon链段的分子量是PEG链段分子量的35%~50%。

3. 权利要求1或者2所述侧链含硫辛酰基的聚合物的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 在氮气环境下,氮二羟丙基甲基丙烯酰胺、聚乙二醇化合物和有机引发剂溶在有机溶剂中;然后于密封反应器里,60~70℃反应1~3天;然后将反应物在冰乙醚中沉淀,再经抽滤并真空干燥滤饼得到PEG-PHPMA;

(2) 氮气环境下,将PEG-PHPMA和有机引发剂溶在有机溶剂里,然后加入2-(二甲基氨

基)甲基丙烯酸乙酯;然后于密封反应器里,60~70℃反应1~3天;然后将反应物在冰乙醚中沉淀,再经抽滤并真空干燥滤饼得到PEG-PPMA-PDMA;

(3)在氮气环境下,硫辛酸溶在有机溶剂中,配制硫辛酸溶液;将N,N-二环己基碳二亚胺溶于有机溶剂中,配制N,N-二环己基碳二亚胺溶液;然后冰水浴下,将N,N-二环己基碳二亚胺溶液滴加入硫辛酸溶液中;滴加完成后,密封室温反应10~15小时;反应结束后,过滤反应液,得到硫辛酸酐溶液;

(4)氮气环境下,将硫辛酸酐溶液加入到含有PEG-PPMA-PDMA、4-二甲基氨基吡啶的有机溶剂中,密封条件下,于30℃反应1~3天;然后将反应物在冰乙醚中沉淀,再经抽滤并真空干燥滤饼得到侧链含硫辛酰基的聚合物。

4.一种肺癌特异靶向的聚合物,其特征在于:所述肺癌特异靶向的聚合物由权利要求1所述侧链含硫辛酰基的聚合物键合肿瘤特异性靶向分子制备得到。

5.根据权利要求4所述肺癌特异靶向的聚合物,其特征在于:所述靶向分子为Anis、cRGD、cNGQ、CC-9或者CPP33多肽分子。

6.一种聚合物囊泡,其特征在于,所述聚合物囊泡的制备方法为以下制备方法中的一种:

(1)由权利要求1或者2所述侧链含硫辛酰基的聚合物制备得到;

(2)由权利要求4或者5所述肺癌特异靶向的聚合物制备得到;

(3)由权利要求1或者2所述侧链含硫辛酰基的聚合物与权利要求4或者5所述肺癌特异靶向的聚合物制备得到;

(4)在权利要求1或者2所述侧链含硫辛酰基的聚合物制备的囊泡表面偶联靶向分子后得到。

7.根据权利要求6所述聚合物囊泡在制备治疗肺癌的药物中的应用。

8.根据权利要求7所述的应用,其特征在于:所述治疗肺癌的药物为小分子抗肺癌药物、蛋白质抗肺癌药物或者核酸抗肺癌药物。

9.权利要求1或者2所述侧链含硫辛酰基的聚合物在制备治疗肺癌的药物中的应用。

10.权利要求4或5所述肺癌特异靶向的聚合物在制备治疗肺癌的药物中的应用。

## 侧链含硫辛酰基的聚合物、其制备方法及其制备的聚合物囊泡及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种生物相容性聚合物材料及其应用,具体涉及一种侧链含硫辛酰基的生物相容性双亲聚合物、其制备方法及其制备的聚合物囊泡以及应用。

### 背景技术

[0002] 由双亲性聚合物自组装形成的聚合物囊泡具有非常独特的膜结构,其性能可调度大,能同时装载亲水性药物和疏水性药物,已被广泛应用于生物医学领域尤其是药物控制释放领域。但由现有技术制备的聚合物囊泡纳米载体存在体内循环不稳定、肿瘤细胞摄取低、细胞内药物浓度低的问题,导致纳米药物的药效不高,还存在毒副作用。现有囊泡对穿透能力强的亲水性小分子抗癌药物以及毒副作用小的亲水性生物大分子药物如蛋白药物和核酸类药物的装载效率低,极大地限制了其作为药物载体的应用。

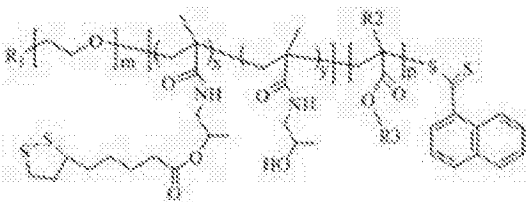
[0003] 癌症是威胁人类健康的主要杀手,其发病率和死亡率呈逐年上升的趋势。肺癌在世界上尤其是在我国的发病率居高不下。手术只能对早期的肺癌患者有利,而对于中晚期无效。肺癌的治疗存在难以早期诊断、愈后差、易转移、易耐药的特点。纳米药物是治疗肺癌的一个关键点和希望所在。但是现有技术中,尚缺乏在体内循环稳定、特异性靶向肺癌、细胞内快速释放药物、毒副作用小的高效纳米药物,尤其是缺少能够运输亲水性小分子抗癌药物的生物相容性优异的纳米载体。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种侧链含硫辛酰基的生物相容性双亲聚合物、由其制备的聚合物囊泡、及其作为抗肺癌药物的载体在制备肺癌靶向治疗药物中的应用。

[0005] 为达到上述目的,本发明具体的技术方案为:一种侧链含硫辛酰基的聚合物,结构式如下:

[0006]



[0007] 其中,  $m$  为  $68 \sim 227$ ,  $x/(x+y) = 0.5 \sim 1$ ;

[0008]  $R_1$  选自以下基团中的一种:

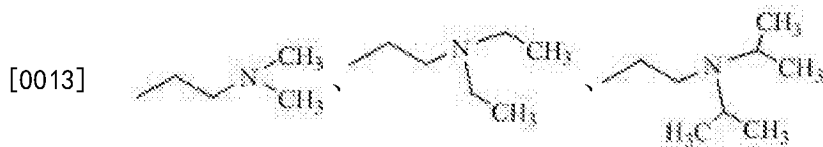
[0009]



[0010]  $R_2, R_3$  选自以下方案之一:

[0011] ①  $R_2, R_3$  同为 H;

[0012] ②  $R_2$  为  $CH_3$ ,  $R_3$  为 H 或者以下基团中的一种:



[0014] P (HPMA-LA) 链段的分子量是PEG链段分子量的3~10倍,PIon链段的分子量是PEG链段分子量的30%~70%。

[0015] 本发明公开的侧链含硫辛酰基的聚合物主体为PEG-P (HPMA-LA) -PIon,为三嵌段聚合物,疏水嵌段为侧链含硫辛酰基的P (HPMA-LA) 链段,即嵌段B,其中xy重复单元无规共聚;还包括PEG链段(嵌段A)和在生理条件下可电离的PIon链段(嵌段C);



[0017] B的分子量是A分子量的3~10倍,C的分子量是A分子量的30%~70%。

[0018] 优选的技术方案中,上述侧链含硫辛酰基的聚合物化学结构式中,R1选自以下基团中的一种:



[0020] 所述m为113~170,PIon链段的分子量是PEG链段分子量的35%~50%。

[0021] 上述侧链含硫辛酰基的聚合物的制备包括以下步骤:

[0022] (1)在氮气环境下,氮二羟丙基甲基丙烯酰胺、聚乙二醇化合物和有机引发剂溶在有机溶剂中;然后于密封反应器里,60~70℃反应1~3天;然后将反应物在冰乙醚中沉淀,再经抽滤并真空干燥滤饼得到PEG-PHPMA;

[0023] (2)氮气环境下,将PEG-PHPMA和有机引发剂溶在有机溶剂里,然后加入2-(二甲基氨基)甲基丙烯酸乙酯;然后于密封反应器里,60~70℃反应1~3天;然后将反应物在冰乙醚中沉淀,再经抽滤并真空干燥滤饼得到PEG-PHPMA-PDMA;

[0024] (3)在氮气环境下,硫辛酸溶在有机溶剂中,配制硫辛酸溶液;将N,N-二环己基碳二亚胺于有机溶剂中,配制N,N-二环己基碳二亚胺溶液;然后冰水浴下,将N,N-二环己基碳二亚胺溶液滴加入硫辛酸溶液中;滴加完成后,密封室温反应10~15小时;反应结束后,过滤反应液,得到硫辛酸酐溶液;

[0025] (4)氮气环境下,将硫辛酸酐溶液加入到含有4-二甲基氨基吡啶的有机溶剂中,密封条件下,于30℃反应1~3天;然后将反应物在冰乙醚中沉淀,再经抽滤并真空干燥滤饼得到侧链含硫辛酰基的聚合物。

[0026] 上述技术方案中,有机引发剂一般为偶氮二异丁腈、偶氮二异庚腈等;有机溶剂可以为四氢呋喃,N,N-二甲基甲酰胺,甲酰胺,二氯甲烷,二甲亚砜等。

[0027] 本发明中,疏水嵌段为侧链含硫辛酰基的PHPMA,即嵌段B,可表示为P (HPMA-LA),由PHPMA中N-2-羟丙基甲基丙烯酰胺单元的羟基酯化反应制备得到,取代度为50~100,为无规共聚物链段。本发明的侧链含硫辛酰基的聚合物的亲水段PEG的末端可以化学偶联肺

癌特异性靶向分子如Anis、cRGD、cNGQ、CC-9或者CPP33等多肽来制备得到肺癌特异靶向的聚合物,具备双亲性、生物相容性。这样的聚合物形成的纳米囊泡具有很好的稳定性,较高的装载效率,同时可以特异性地靶向到肺癌细胞。

[0028] 本发明还公开了一种聚合物囊泡,可以由上述侧链含硫辛酰基的聚合物制备得到;或者由上述肺癌特异靶向的聚合物制备得到;或者由上述侧链含硫辛酰基的聚合物与肺癌特异靶向的聚合物制备得到,比如上述侧链含硫辛酰基的聚合物和肺癌特异靶向的聚合物按照不同比例混合,可制备具有不同靶向密度的聚合物囊泡,即得到肺癌靶向囊泡,可以增加载药囊泡在肺癌细胞中的摄取量;也可以由侧链含硫辛酰基的聚合物制备的聚合物囊泡外表面偶联肺癌细胞特异性靶向分子来制备肺癌靶向聚合物囊泡,以增加肺癌细胞的摄取量,比如在囊泡的PEG端通过酰胺化反应键合靶向多肽如Anis、cRGD、cNGQ、CC-9或者CPP33。

[0029] 本发明公开的侧链含硫辛酰基的聚合物具有优异的生物相容性,其疏水部分(HPMA-LA)的分子量是亲水部分(PEG)分子量的3~10倍,可通过溶剂置换法来制备得到聚合物囊泡,可在催化量的还原剂如二硫代苏糖醇(DTT)或谷胱甘肽(GSH)存在的条件下,制备得到交联聚合物囊泡或者肺癌靶向交联聚合物囊泡,粒径70~180纳米,可以作为治疗肺癌的药物的载体;可以在囊泡的疏水膜中装载疏水性小分子抗肺癌药物紫杉醇(PTX)、多西紫杉醇(DTX)等,也可以在囊泡的大的亲水内腔中装载亲水性抗肺癌药物,尤其是亲水性小分子抗癌药物如甲氨喋呤钠盐(MTX·2Na)、培美曲塞钠盐(PEM·Na)、盐酸多柔比星(DOX·HCl)、盐酸表阿霉素(Epi·HCl)、盐酸伊利替康(CPT·HCl)和盐酸米托蒽醌(MTO·HCl),也可以在囊泡的疏水膜中装载生物药物如蛋白质、多肽和核酸类药物。这样克服了现有的由双亲性聚合物形成的胶束载体只能装载疏水药物和现有技术中没有能高效装载亲水性小分子抗癌药物、并稳定体内循环的相容性载体的缺陷;尤其是本发明的侧链含硫辛酰基的聚合物用作药物载体时,可以装载现有双亲聚合物无法装载的生物药物,而且体内循环效果良好、病灶部位药用效果好。

[0030] 本发明公开的交联聚合物囊泡在疏水膜内形成了稳定的化学交联,从而可在体内稳定长循环;但内吞进入癌细胞后可在细胞内还原性环境下,快速解交联,快速释放出药物,高效杀死肺癌细胞。所以本发明请求保护上述聚合物囊泡在制备治疗肺癌的药物中的应用;进一步的,本发明还公开了上述侧链含硫辛酰基的聚合物以及肺癌特异靶向的聚合物在制备治疗肺癌的药物中的应用;基于本发明聚合物制备的抗肺癌药物为囊泡抗肺癌纳米药物。

[0031] 由于上述技术方案的运用,本发明与现有技术相比,具有以下优点:

[0032] 1. 本发明利用聚乙二醇为引发剂、通过活性RAFT聚合顺序共聚氮二羟丙基甲基丙烯酰胺及(甲基)丙烯酸酯类单体得到分子量可控、分子量分布较窄聚合物,再和硫辛酸酐发生酯化反应得到取代度可控的侧链含硫辛酰基的聚合物,丰富了双亲生物相容性聚合物的种类。

[0033] 2. 本发明公开的侧链含硫辛酰基的聚合物具有优异的生物相容性可以制备聚合物囊泡和肺癌靶向聚合物囊泡,装载不同性质的药物,尤其是生物药物;并可以形成二硫键交联,得到稳定的交联聚合物囊泡纳米药物,从而克服了现有技术中纳米药物体内循环不稳定、药物易早释、造成毒副作用的缺陷。

[0034] 3. 本发明公开的交联聚合物囊泡纳米药物,其交联可逆性,即支持体内长循环,可在肺癌细胞高富集;但是进入肺癌细胞内后却可以快速解交联,释放出药物,实现高效特异性地杀死肺癌细胞而不具有毒副作用;克服了现有技术中交联的纳米药物过于稳定、而在细胞内药物释放缓慢、造成耐药性的缺陷;聚合物囊泡可在制备过程中形成还原敏感的二硫键交联,制备方法简便,从而克服了现有技术中制备交联纳米药物时需要复杂的操作和提纯过程等缺陷。

[0035] 4. 本发明公开的侧链含硫辛酰基的聚合物自组装制备的交联聚合物囊泡可用于亲水抗癌药物包括亲水小分子抗癌药物和蛋白质、多肽和核酸等生物药物的控制释放体系,从而克服了现有纳米胶束载体仅适用装载疏水药物的缺陷和现有技术中没有能高效装载、并稳定体内循环的亲水性抗癌药物的缺陷;进一步地,可键合靶向分子,在肺癌的高效靶向治疗方面具有更广泛的应用价值。

## 附图说明

[0036] 图1为实施例一中PEG5k-P (HPMA11.9k-LA) -PDMA1.8k的氢核磁谱图;

[0037] 图2为实施例二中Anis-PEG7.5k-P (HPMA12.0k-LA) -PDMA2.3k的核磁谱图;

[0038] 图3为实施例六中交联囊泡PEG5k-P (HPMA11.9k-LA) -PDMA1.8k的粒径分布(A)及透射电子显微镜图(B),交联囊泡稳定性(C、D、E)及还原响应性测试(F)图;

[0039] 图4为实施例十中载MTX·2Na交联囊泡Anis-PEG5k-P (HPMA12.0k-LA) -PDMA2.3k和PEG5k-P (HPMA11.9k-LA) -PDMA1.8k的体外释放图;

[0040] 图5为实施例十四中靶向交联囊泡Anis-PEG7.5k-P (HPMA12.0k-LA) -PDMA2.3k/PEG5k-P (HPMA11.9k-LA) -PDMA1.8k对H460肺癌细胞的毒性结果图;

[0041] 图6为实施例十五中载MTX·2Na不同靶向交联囊泡Anis-PEG7.5k-P (HPMA12.0k-LA) -PDMA2.3k/PEG5k-P (HPMA11.9k-LA) -PDMA1.8k对H460细胞的毒性结果图;

[0042] 图7为实施例十五中载MTX·2Na 50%靶向交联囊泡Anis-PEG7.5k-P (HPMA12.0k-LA) -PDMA2.3k/PEG5k-P (HPMA11.9k-LA) -PDMA1.8k对H460细胞的毒性结果图;

[0043] 图8为实施例十六中载MTX·2Na靶向交联囊泡Anis-PEG7.5k-P (HPMA12.0k-LA) -PDMA2.3k/PEG5k-P (HPMA11.9k-LA) -PDMA1.8k在小鼠体内的血液循环研究结果图;

[0044] 图9为实施例十七中靶向交联囊泡PEG5k-P (HPMA9k-LA) -PAA2.4k-Cy5/Anis-PEG7.5k-P (HPMA9.2k-LA) -PAA2.4k在小鼠体内血液循环研究结果图;

[0045] 图 10 为实施例十八中载MTX·2Na靶向交联囊泡Anis-PEG7.5k-P (HPMA12.0k-LA) -PDMA2.3k/PEG5k-P (HPMA11.9k-LA) -PDMA1.8k在荷肺癌皮下瘤裸鼠体内的生物分布图;

[0046] 图 11 为实施例十九中载Cy5-CC靶向交联囊泡PEG5k-P (HPMA9k-LA) -PAA2.4k-Cy5/Anis-PEG7.5k-P (HPMA9.2k-LA) -PAA2.4k在荷肺癌皮下瘤裸鼠体内的生物分布图;

[0047] 图 12 为实施例二十中载MTX·2Na靶向交联囊泡Anis-PEG7.5k-P (HPMA12.0k-LA) -PDMA2.3k/PEG5k-P (HPMA11.9k-LA) -PDMA1.8k在荷肺癌皮下瘤裸鼠体内的抑瘤情况图,其中A为肿瘤生长曲线,B为小鼠治疗后肿瘤图片,C为体重变化,D为生存曲线;

[0048] 图 13 为实施例二十一中载GrB靶向交联囊泡PEG5k-P (HPMA9k-LA) -PAA2.4k/Anis-PEG7.5k-P (HPMA9.2k-LA) -PAA2.4k在荷肺癌皮下瘤裸鼠体内的肿瘤抑制情况图,其

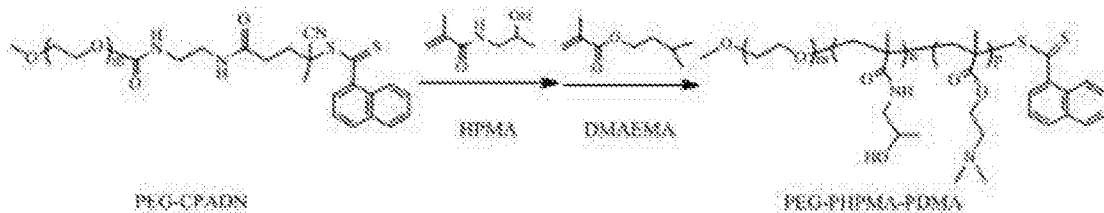
中A为肿瘤生长曲线,B为小鼠治疗后肿瘤图片,C为体重变化,D为生存曲线。

### 具体实施方式

[0049] 下面结合实施例和附图对本发明作进一步描述:

[0050] 实施例一 合成三嵌段聚合物PEG5k-P (HPMA11.9k-LA) -PDMA1.8k

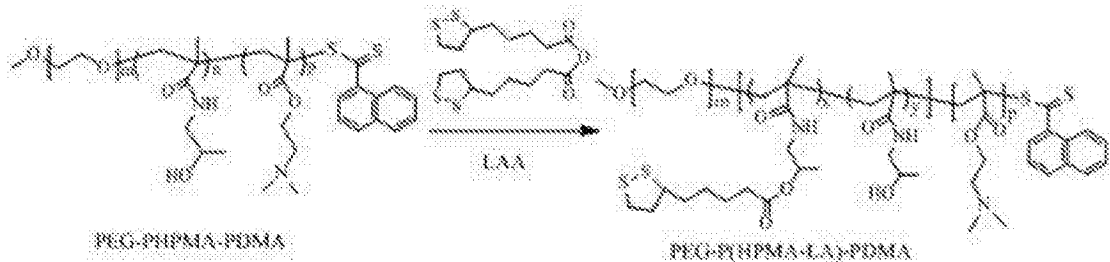
[0051] 首先合成三嵌段聚合物PEG5k-PHPMA11.9k-PDMA1.8k:在氮气环境下,0.28 g (1.96 mmol) 氮二羟丙基甲基丙烯酰胺 (HPMA) 单体和0.1 g (20  $\mu$ mol) 的PEG-CPADN,0.49 mg AIBN (3  $\mu$ mol) 溶在4.5 mL四氢呋喃中,加入密封反应器里,继续通氮气30分钟后,接着把反应器密封好,70  $^{\circ}$ C油浴中反应2天。而后将产物PEG-PHPMA在冰乙醚中沉淀,抽滤并真空干燥得到PEG5k-PHPMA11.9k,产率为83%。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ): PEG:  $\delta$  3.23, 3.51; PHPMA:  $\delta$  0.8-1.02, 2.89, 3.68, 4.71。核磁计算出下式中 $m=114, n=83$ 。GPC测分子量:15.2 kDa,分子量分布:1.09。氮气环境下,将0.1 g (5.95  $\mu$ mol) PEG5k-PHPMA11.9k聚合物和0.15 mg AIBN (0.89  $\mu$ mol) 溶在0.33 mL DMF里,加入到密闭反应中,再向其中加入25.5 $\mu$ L 2-(二甲基氨基) 甲基丙烯酸乙酯 (DMA, 0.15 mmol), 搅拌至溶解,继续通氮气30分钟,把反应器密封好,70  $^{\circ}$ C油浴中反应2天。而后将产物在冰乙醚中沉淀,抽滤并真空干燥得到PEG5k-PHPMA11.9k-PDMA1.8k,产率为71%。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ): PEG:  $\delta$  3.23, 3.51; PDMA:  $\delta$  0.8-1.02, 2.27, 4.25。核磁计算出下式中 $m=114, n=83, p=12$ 。GPC测分子量:16.0 kDa,分子量分布:1.15。



[0052] 然后通过酯化反应制备最终三嵌段侧链含硫辛酰基聚合物。在氮气环境下,0.18 g (0.87 mmol) 硫辛酸 (LA) 溶在2 mL二氯甲烷中,加入两颈瓶内搅拌至溶解,0.11 g (0.52 mmol) N,N-二环己基碳二亚胺 (DCC) 于1 mL二氯甲烷中,冰水浴下,将其逐滴加入LA溶液中。继续通5分钟氮气,将两颈密封好,室温下,反应12小时。反应结束后,过滤掉反应产生的沉淀。将硫辛酸酐 (LAA) 溶液浓缩至0.5 mL,氮气环境下,加入到100 mg (5.4  $\mu$ mol) PEG5k-PHPMA11.9k-PDMA1.8k及53.7 mg (0.44 mmol) DMAP的3.35 mL二甲亚砜溶液中,继续通5分钟氮气,密封烧瓶,置于30 $^{\circ}$ C油浴中反应48 h。而后将产物在冰乙醚中沉淀,抽滤并真空干燥得到PEG5k-P (HPMA11.9k-LA) -PDMA1.8k,产率为74.7%。附图1为其核磁图谱, $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ): PEG:  $\delta$  3.23 和3.51; PHPMA:  $\delta$  0.8-1.13, 3.14, 3.67, 4.71 and 4.83; PDMA ( $\delta$  1.3-1.8, 2.27, 2.64, 4.18); LA:  $\delta$  1.40, 1.58-1.69, 2.29, 1.89/2.43, 3.02, 和3.74。核磁计算出,  $x=79, y=4$ 。取代度 (DS, 指PHPMA中每100个羟基被取代的LA的个数) 是96。



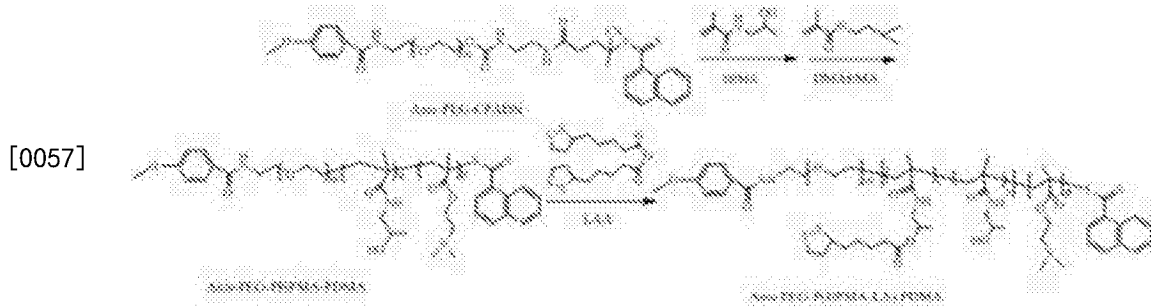
[0053]



[0054] 实施例二 合成靶向聚合物Anis-PEG7.5k-P (HPMA12.0k-LA) -PDMA2.3k

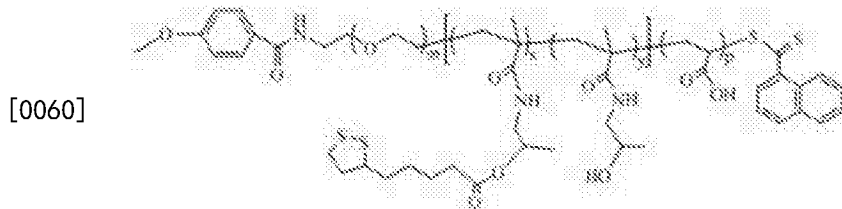
[0055] 用合成的大分子RAFT试剂Anis-PEG-CPADN作为链转移剂,然后同实施例一方法制备聚合物。分三步制备Anis-PEG-CPADN。首先NHS活化的对茴香酸 (Anis-NHS) 的制备:室温下,将4.96 g (24.0 mmol) N,N-二环己基碳二亚胺 (DCC) 的30 mL四氢呋喃溶液逐滴加入到3.04 g (20.0 mmol) 茴香酸和2.76 g (24.0 mmol) N-羟基琥珀酰亚胺的70 mL四氢呋喃溶液中,滴加结束后,密闭两颈瓶,继续反应12小时。反应结束后,过滤除去白色沉淀,将滤液旋转蒸发,得到白色粗产品。向粗产品中加入250 mL异丙醇重结晶,得到白色针状晶体,产率为94%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.08 (d, 2H), 6.96 (d, 2H), 3.69 (s, 3H), 2.89 (s, 2H)。经核磁分析,对茴香酸全部被活化成Anis-NHS。接着,通过酰胺化反应制备Anis-NHS功能化的PEG (Ansi-PEG-OH)。氮气保护下,将α-氨基-ω-羟基聚乙二醇盐酸盐 (HO-PEG-NH<sub>2</sub>·HCl, *M<sub>n</sub>*=7500 g/mol, 300 mg, 0.04 mmol) 溶解在干燥的DCM (3 mL) 中,随后在0 °C下加入三乙胺 (4.45 mg, 0.044 mmol), 搅拌30min后将Anis-NHS (10.97 mg, 0.044 mmol) 的DCM溶液缓慢滴加到混合反应溶液中,滴加完毕后,转移至室温继续搅拌反应20小时。反应结束后,混合物用冷无水乙醚/乙醇 (体积比99/1) 沉淀,真空干燥一天得到白色固体,产率:94%;<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.77 (ArH-CO-), 6.90 (ArH-OCH<sub>3</sub>), 3.84 (ArH-OCH<sub>3</sub>), 3.63 (PEG)。Anis-NHS的取代度通过氢核磁谱图计算,接近100%。第三步制备Anis-PEG-CPADN:氮气环境下,将29.6mg 4-氰基戊酸二硫代萘甲酸酯 (CPADN, 0.09 mmol) 和37.2mg (0.18 mmol) DCC溶解在DCM中,预先搅拌12小时后,向溶液中加入5.5mg的DMAP (0.045 mmol) 和2ml的Anis-PEG-OH (10.97mg, 0.044mmol) 的DCM溶液,继续反应20小时。反应结束后,混合物用冷无水乙醚/乙醇 (体积比99/1) 沉淀,真空干燥一天得到白色固体。产率:80.5%;<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.20, 7.90 and 7.50 (naphthalene), 7.78 (ArH-CO-), 6.90 (ArH-OCH<sub>3</sub>), 4.27 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-), 3.84 (ArH-OCH<sub>3</sub>), 3.63 (PEG) and 1.99 (-C(CN)(CH<sub>3</sub>)-S-)。CPADN的取代度通过比较核磁积分计算出为98%。

[0056] 而后,以Anis-PEG-CPADN来作为链转移剂、HPMA和DMA为单体、同实施例一制备得到三嵌段侧链含硫辛酰基的肺癌特异靶向的聚合物Anis-PEG7.5k-P (HPMA12.0k-LA) -PDMA2.3k。附图2为其核磁图谱,<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.78, 6.90 (茴香酰胺), 6.03 (芳酸质子), 5.83 (Ar-CH-), 4.17 (-COOCH<sub>2</sub>C-), 3.89 (-OCH<sub>2</sub>CCH<sub>2</sub>O-), 3.75 (Ar-OCH<sub>3</sub>), 3.65 (PEG), PHPMA: δ 0.8-1.13, 3.14, 3.67, 4.71, and 4.83; PDMA: δ 1.3-1.8, 2.27, 2.64, 4.18; 硫辛酸: δ 1.40, 1.58-1.69, 2.29, 1.89/2.43, 3.02, and 3.74。核磁计算出下式中m=170, x=84, y=0, p=15, x+y为n, 取代度DS=100。



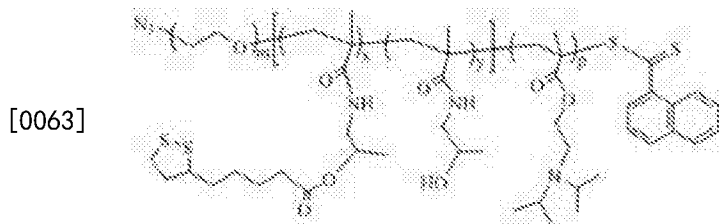
[0058] 实施例三 合成靶向聚合物Anis-PEG7.5k-P (HPMA9.2k-LA)-PAA2.4k

[0059] 按照实施例二的方法、以HPMA和丙烯酸(AA)为单体,可以合成三嵌段侧链含硫辛酰基肺癌特异靶向的聚合物Anis-PEG7.5k-P (HPMA9.2k-LA)-PAA2.4k。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.78, 6.90 (茴香酰胺), 6.03 (芳酸质子), 5.83 (Ar-CH-), 4.17 (-COOCH<sub>2</sub>C-), 3.89 (-OCH<sub>2</sub>CCH<sub>2</sub>O-), 3.75 (Ar-OCH<sub>3</sub>), 3.65 (PEG), PHPMA: δ 0.8-1.13, 3.14, 3.67, 4.71, and 4.83; PAA (δ 1.53-1.74, 2.20); 硫辛酸: δ 1.40, 1.58-1.69, 2.29, 1.89/2.43, 3.02, and 3.74。核磁计算出下式中m=170,x=4,y=21,p=33。取代度DS=67。



[0061] 实施例四 合成三嵌段聚合物N3-PEG10k-P (HPMA21.0k-LA)-PDPA6.2k

[0062] 如实施例二合成分三步。第一步,以N3-PEG10k-OH为原料制备大分子RAFT试剂N3-PEG10k-CPADN,第二步以HPMA和2-(二异丙基氨基)甲基丙烯酸乙酯(DPA)为单体、RAFT聚合制备N3-PEG10k-PHPMA21.0k-PDPA6.2k;第三步,酯化反应接枝LA得到N3-PEG10k-P (HPMA21.0k-LA)-PDPA6.2k。核磁计算出x=75,y=72,p=29,DS=51,m=227。



[0064] 采用上述类似的制备方法,可以制备多种侧链含不同接枝量硫辛酰基、第三嵌段(C嵌段)为PDMA(2-(二甲基氨基)甲基丙烯酸乙酯)、PDEA(2-(二乙基氨基)甲基丙烯酸乙酯)、PDPA(2-(二异丙基氨基)甲基丙烯酸乙酯)、PAA(聚丙烯酸)和PMA(聚甲基丙烯酸)的生物相容性双亲聚合物,具体原料比例以及表征见表1。

[0065] 表1 各个聚合物制备条件、产物的核磁结果

[0066]

	投料量(mmol)				重复单元数(按链)				核磁共振的分子量(kDa)	LA取代度(DS)
	PEG	HPMA	DMA/DEA/MA/DPA/A	LA	m	x	y	p		
PEG5.0kP(HPMA11.8k-LA)-PDMA1.8k	0.02	1.96	0.5	3.92	114	79	4	11	33.5	96
Anis-PEG7.5k-P(HPMA12.0k-LA)-PDMA2.3k	0.013	1.31	0.33	2.61	170	84	0	15	39.1	100
PEG5.0kP(HPMA9.0k-LA)-PAA2.4k	0.02	1.68	1.11	3.36	114	47	16	33	23.4	75
Anis-PEG7.5k-P(HPMA9.2k-LA)-PAA2.4k	0.013	1.12	0.74	2.24	170	43	21	33	29.4	67
PEG3.0k-P(HPMA6.1k-LA)-PMA2.0k	0.02	0.91	0.58	1.82	68	22	21	23	12.4	51
N3-PEG4.0k-P(HPMA6.0k-LA)-PMA2.0k	0.025	1.14	0.73	2.28	91	23	19	23	13.8	55
PEG5kP(HPMA9.3k-LA)-PMA2.5k	0.01	0.70	0.35	1.40	114	35	30	29	23.4	54
N3-PEG7.5k-P(HPMA9.3k-LA)-PMA2.6k	0.013	0.85	0.45	1.70	170	36	29	30	26.2	55
PEG5.0k-P(HPMA7.6k-LA)-PDEA3.0k	0.02	1.12	0.38	2.24	114	30	23	16	21.2	57
Anis-PEG7.5k-P(HPMA7.2k-LA)-PDEA2.8k	0.013	0.73	0.25	1.45	170	30	20	15	23.1	60
N3-PEG6.0k-P(HPMA8.0k-g-LA)-PDEA2.6k	0.017	0.95	0.37	1.90	136	30	26	14	22.2	54
PEG5k-P(HPMA11.0k-LA)-PDEA2.6k	0.01	0.84	0.16	1.68	114	63	14	14	30.5	82
N3-PEG6.0k-P(HPMA11.0k-LA)-PDEA2.4k	0.01	0.84	0.16	1.68	136	62	15	13	31.1	81
N3-PEG10.0k-P(HPMA21.0k-LA)-PDPA6.2k	0.01	1.68	0.33	3.36	227	75	72	29	51.3	51
PEG8.0k-P(HPMA21.4k-LA)-PDPA5.6k	0.01	1.68	0.33	3.36	182	76	74	26	49.3	51

[0067] 实施例五 合成靶向聚合物cRGD-PEG4k-P(HPMA6.1k-LA)-PMA2.0k

[0068] 如实施例四成分三步制备N3-PEG4k-P(HPMA6.1k-LA)-PMA2.0k。第一步如实施例二,以N3-PEG4k-OH为原料制备大分子RAFT试剂N3-PEG4k-CPADN,第二步以HPMA和甲基丙烯酸(MA)为单体、RAFT聚合制备N3-PEG4k-PHPMA6.1k-PMA2.0k;第三步如实施例二、酯化反应接枝LA得到N3-PEG4k-P(HPMA6.1k-LA)-PMA2.0k,LA的DS为55。然后,和炔基修饰的环状多肽cRGD(cRGDFK)发生铜催化的叠氮-炔基Huisgen环加成反应(即点击反应)。先将一定量CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O(0.12 mmol)、抗坏血酸钠(0.24 mmol)及炔基修饰的环状多肽cRGD(1.2 mmol)溶于DMF中,加入N3-PEG4k-P(HPMA6.1k-LA)-PMA2.0k(1 mmol)的DMF(5 mL)溶液,室温下反应24小时,得到最终的靶向聚合物。

[0069] 按照上述类似的方法,使用炔基修饰的cNGQ(cNGQGEQc,cyclic)、CC-9(CSNIDARAC,cyclic)或CPP33(RLWMRWYSPRTRAYG)等多肽分子替换炔基修饰的环状多肽cRGD,发生点击化学反应可以制备不同靶向分子的共聚物,(cNGQ-PEG-P(HPMA-LA)-PMA、CC-PEG-P(HPMA-LA)-PMA和CPP-PEG-P(HPMA-LA)-PMA)。更换不同的第三嵌段(C嵌段),可以得到多种三嵌段侧链含硫辛酰基肺癌特异靶向的聚合物,(cNGQ-PEG-P(HPMA-LA)-PDEA、

CC-PEG-P (HPMA-LA) -PDPA和CPP-PEG-P (HPMA-LA) -PDMA)

[0070] 实施例六 制备聚合物交联囊泡

[0071] 将1 mg PEG5k-P (HPMA11.9k-LA) -PDMA1.8k溶于1mL DMF中,配成1 mg/mL的溶液,氮气条件下,加入10 mM的DTT溶液,密封小瓶子,室温下搅拌10小时使之溶解。然后将该溶液置于透析袋(MWCO3500)内,在20 mL 磷酸盐缓冲溶液(PB,5 mM,pH 7.4)中静置透析2小时(最终DTT浓度为0.5 mM);而后将其在大量透析介质(PB,5 mM,pH 7.4)中透析24小时,换五次水。得到的交联聚合物囊泡的尺寸由动态光散射粒度分析仪(DLS)测的形成的纳米囊泡为170 nm,粒径分布很窄,见图3A,由图3B可知,TEM测得纳米粒子为中空的囊泡结构,交联聚合物囊泡在高浓度盐、高倍稀释和胎牛血清存在下仍然保持不变的粒径和粒径分布(图3C、图3D、图3E),但在模拟肿瘤细胞还原环境下快速释放,解交联(图3F)。由此可知,得到的交联囊泡具有还原敏感的解交联的性质,适用于药物载体。

[0072] 实施例七 制备Anis为靶向分子的靶向交联囊泡

[0073] 在1 mL DMF中按一定质量比将PEG5k-P (HPMA11.9k-LA) -PDMA1.8k和Anis-PEG7.5k-P (HPMA12.0k-LA) -PDMA2.3k溶解,如实施例六制备交联囊泡。靶向聚合物的PEG分子量比非靶向的PEG要长,保证靶向分子更好的支出表面。两者按不同比例混合可制备表面具有不同靶向分子的交联囊泡,PEG5k-P (HPMA11.9k-LA) -PDMA1.8k含量为50 wt.%,DLS测定靶向交联囊泡尺寸为174 nm左右,粒径分布较窄。

[0074] 实施例八 制备cNGQ多肽为靶向分子的的靶向交联囊泡

[0075] 室温下向950  $\mu$ L的PB (5 mg/mL) 缓冲溶液中加入50  $\mu$ L浓度为5mg/mL 的PEG5k-P (HPMA9.0k-LA) -PMA2.0k和cNGQ-PEG6.0k-P (HPMA9.0k-LA) -PMA2.0k 的DMSO溶液,缓慢转动混合液,使之逐渐形成一相。2小时分散均匀后,将纳米粒通氮气30min,加入10%的DTT溶液,37 $^{\circ}$ C恒温摇床中震荡(200 rpm)24 h,使之充分交联。然后转入透析袋(MWCO: 3500 Da),室温下透析24 h除去有机溶剂,透析介质为磷酸盐缓冲溶液(5 mM,pH 7.4),期间至少换5次介质。PEG5k-P (HPMA9.0k-LA) -PMA2.0k含量为5-30 wt.%.DLS测定靶向交联囊泡尺寸为80 nm左右,粒径分布较窄。

[0076] 实施例九 制备cRGD多肽为靶向分子的的靶向交联囊泡

[0077] 将PEG5k-P (HPMA10.0k-LA) -PDEA2.5k和N3-PEG10k-P (HPMA10.0k-LA) -PDEA2.6k按一定质量比溶在1 mL DMF中,如实施例六制备交联聚合物囊泡。两者按不同比例混合可制备表面具有不同N3基团密度的交联聚合物囊泡。然后,通过和大环炔基官能化的多肽如cRGD、cNGQ、CPP33等发生点击化学反应,制备具有不同靶向分子密度的交联囊泡。DLS测定靶向交联囊泡尺寸为130-174 nm左右,粒径分布较窄。

[0078] 实施例十 交联囊泡装载甲氨蝶呤钠盐及体外释放

[0079] 用溶剂置换法制备聚合物囊泡、载药交联囊泡制备、空囊泡的制备方法类似。具体为,将1 mg 的PEG5k-P (HPMA11.9k-LA) -PDMA1.8k和Anis-PEG7.5k-P (HPMA12.0k-LA) -PDMA2.3k溶于1mL DMF中,配成1 mg/mL的溶液,氮气条件下,加入10 mM的DTT溶液,密封小瓶子,室温下搅拌10小时。向聚合物溶液中加入甲氨蝶呤钠盐(MTX $\cdot$ 2Na)的PB (5 mg/mL) 溶液,然后将该溶液于透析袋(MWCO3500)内,于20 mL 磷酸盐缓冲溶液(PB,5 mM,pH 7.4)中静置透析2小时;而后将其在大量透析介质(PB,5 mM,pH 7.4)中透析24小时,换五次水。载不同比例的药(10%-30wt%)的交联聚合物囊泡的粒径在130-150 nm,粒径分布在0.15-

0.19。紫外光光谱仪测定MTX·2Na的包裹效率为62%–86%。得到的载药囊泡命名为MTX-Anis-RCCPs,表示载的药物为MTX·2Na,靶向分子为Anis,其他命名以此类推。

[0080] MTX·2Na的体外释放实验在37 °C恒温摇床中震荡(200 rpm)进行,每组各有三个平行样。第一组,载MTX·2Na的交联囊泡在加入10 mM GSH模拟细胞内还原环境PB (10 mM, pH 7.4) 中;第二组,载MTX·2Na的交联囊泡在PB (10 mM, pH 7.4) 中;载药交联囊泡的浓度为100 mg/L,取0.5 mL 放入透析袋(MWCO: 12,000)中,每个试管中加入相应的透析溶剂25 mL,在预定的时间间隔,取出5.0 mL透析袋外部介质用作测试,同时向试管中补加5.0 mL 相应介质。使用荧光仪测定溶液中药物浓度。附图4为MTX·2Na累积释放量与时间的关系,从图中可以看出,加入模拟肿瘤细胞内GSH后,其释放明显要快于没加GSH的样本,说明载药交联囊泡在10 mM的GSH的存在下,能有效释放药物。

[0081] 实施例十一 靶向交联囊泡载亲水药物PEM·Na及体外释放

[0082] 将PEG5k-P (HPMA11.9k-LA) -PDMA1.8k和Anis-PEG7.5k-P (HPMA12.0k-LA) -PDMA2.3k按质量比1:1溶在1mL DMF中,配成1 mg/mL的溶液,氮气条件下,加入10 mM的DTT溶液,密封小瓶子,室温下搅拌10小时。向聚合物溶液中加入培美曲塞钠盐(PEM·Na)的PB (5 mg/mL) 溶液,然后将该溶液于透析袋(MWCO3500)内,于20 mL 磷酸盐缓冲溶液(PB,5 mM,pH 7.4)中静置透析2小时;而后将其在大量透析介质(PB,5 mM,pH 7.4)中透析24小时,换五次水。载不同比例的药(10%–30wt%)的交联聚合物囊泡的粒径在120–150 nm,粒径分布在0.15–0.19。紫外光光谱仪测定PEM·Na的包裹效率为70%–88%,得到PEM-Anis-RCCPs。PEM·Na的体外释放实验同实施例十。PEM·Na累积释放量与时间的关系可以看出,加入模拟肿瘤细胞内GSH后,其释放明显要快于没加GSH的样本,说明载药交联聚合物囊泡在10 mM的GSH的存在下,能有效释放药物。靶向聚合物的PEG分子量比非靶向的PEG要长,保证靶向分子更好的支出表面。两者按不同比例混合可制备表面具有不同靶向分子密度的交联聚合物囊泡。优选方案为前者含量为50 wt.%。DLS测定尺寸为124 nm,粒径分布较窄。靶向分子能更好的裸露在外侧,而不是被遮藏在里侧,保证其能更好的发挥靶向作用,具有更好的靶向效果。

[0083] 实施例十二 交联聚合物囊泡装载蛋白药物及体外释放

[0084] 室温下向950  $\mu$ L含不同浓度蛋白质(FITC标记的细胞色素C,FITC-CC)的PB (5 mg/mL) 缓冲溶液中加入50  $\mu$ L浓度为5mg/mL 的PEG5k-P (HPMA9k-LA) -PAA2.4k和Anis-PEG7.5k-P (HPMA9.2k-LA) -PAA2.4k 的DMSO(质量1:1)溶液,缓慢转动混合液,使之逐渐形成一相。2小时分散均匀后,通氮气30min,加入10%的DTT溶液,37 °C恒温摇床中震荡(200 rpm)24 h,使之充分交联。然后转入透析袋(MWCO: 300,000),室温下透析24h除去有机溶剂和游离的蛋白,透析介质为磷酸盐缓冲溶液(5 mM,pH 7.4),期间至少换5次介质。载不同比例的蛋白(1%–50wt%)的交联聚合物囊泡的粒径在150–160 nm,粒径分布在0.12–0.18。得到的囊泡为FITC-CC-Anis-RCCPs。荧光光谱仪测定FITC-CC的包裹效率为58%–100%。FITC-CC的体外释放实验是在37 °C恒温摇床中震荡(200 rpm)进行,每组各有三个平行样。第一组,载FITC-CC的交联聚合物囊泡在加入10 mM GSH模拟细胞内还原环境PB (10 mM, pH 7.4) 中;第二组,载FITC-CC的交联聚合物囊泡在PB (10 mM, pH 7.4) 中;载药交联聚合物囊泡的浓度为100 mg/L,取0.5 mL 放入透析袋(MWCO: 30,000 Da)中,每个试管中加入相应的透析介质25 mL,在预定的时间间隔,取出5.0 mL透析袋外部介质用作测试,同时向试管中

补加5.0 mL 相应介质。使用荧光仪测定溶液中药物浓度。加入10 mM DTT后,FITC-CC累积释放量释放明显要快于没加DTT的样本,说明载药交联囊泡在10 mM的DTT的存在下,能有效释放药物。

[0085] 实施例十三 靶向交联聚合物囊泡载亲水药物DOX·HCl及体外释放

[0086] 采用透析法制备囊泡,pH梯度法装载盐酸阿霉素(DOX·HCl)。80  $\mu$ L的PEG5.0k-P(HPMA7.6k-LA)-PDEA3.0k的DMF溶液(5 mg/mL)及20  $\mu$ L的cRGD-PEG6.0k-P(HPMA8.0k-LA)-PDEA2.6k的DMF溶液(5 mg/mL)均匀混合之后,滴加入0.9毫升的柠檬酸钠/柠檬酸缓冲溶液(10 mM,pH 4.0)中,在37  $^{\circ}$ C摇床中4小时后,加入0.05 mL的PB(4M,pH 8.5)建立pH梯度,随后立即加入DOX·HCl(10%-30%),摇床中放置5-10小时;再加入DTT(10.5微克,0.068  $\mu$ M)使囊泡交联。最后装入透析袋(MWCO 7000)中对PB透析过夜,换五次液。载不同比例药(10-30wt%),粒径80-120 nm,粒径分布0.10-0.16,DOX·HCl的包裹效率为65%-80%。DOX·HCl体外释放设计同实施例十。加入模拟肿瘤细胞内GSH后,DOX·HCl累积释放量明显要快于没加GSH的样本,说明载药交联囊泡在10 mM的GSH的存在下,能有效释放药物。

[0087] 更换聚合物以及药物,可以得到如表2的载药量、包封率等结果。

[0088] 表2 聚合物囊泡载药物的载药量、包封率

[0089]

聚合物/药物	进料比 (wt.%)	载药量 (wt.%)	包封率 (%)	尺寸 (nm)	粒径 分布
PEG5k-P(HPMA11.9k-LA)- PDMA1.8k/Anis-PEG7.5k- P(HPMA12.0k-LA)- PDMA2.3k/MTX 2Na	0	--	--	174	0.15
	10	8.8	86.6	135	0.18
	20	15.6	73.9	142	0.15
	30	22.0	65.1	153	0.19
PEG5k-P(HPMA11.9k-LA)- PDMA1.8k/MTX 2Na	0	--	--	169	0.17
	10	8.7	85.8	140	0.16
	20	15.5	73.3	130	0.15
	30	22.9	61.8	147	0.19
Anis-PEG7.5k-P(HPMA9.2k-LA)- PAA2.4k/Anis-PEG7.5k-P(HPMA9.2k- LA)-PAA2.4k/FITC-CC	0	--	--	156	0.12
	1	1	100	154	0.15
	2	1.98	98.9	156	0.12
	5	4.90	98.0	159	0.16
	10	8.76	86.4	162	0.18
	30	38.6	62.9	166	0.13
PEG5k-P(HPMA9.0k-LA)-PAA 2.4k/FITC-CC	0	--	--	161	0.16
	1	1	100	153	0.14
	2	1.97	98.5	154	0.15
	5	4.8	96.0	158	0.13
	10	9.2	91.4	161	0.17
	30	36.5	57.5	165	0.17
PEG5k-P(HPMA9.0k-LA)-PAA 2.0k/GrB	0	--	--	160	0.14
	1	1	100	156	0.12
	2	1.97	98.6	161	0.13
	5	4.86	97.0	164	0.11
cRGD-PEG6.0k-P(HPMA8.0k-LA)- PDEA2.6k/PEG5.0k-P(HPMA7.6k-LA)- PDEA3.0k/PEM Na	20	15.5	73.3	90	0.15
cRGD-PEG6.0k-P(HPMA8.0k-LA)- PDEA2.6k/PEG5.0k-P(HPMA7.6k- LA)-PDEA3.0k/DOX	20	15.3	71.5	85	0.16
cNGQ-PEG4.0k-P(HPMA6.0k-LA)- PMA2.0k/PEG3.0k-P(HPMA6.1k-LA)- PMA2.0k/CC	20	16.3	81.5	100	0.14
CPP33-PEG10k-P(HPMA21.0k-LA)- PDPA6.2k/PEG8.0k-P(HPMA21.4k- LA)-PDPA5.6k/DOX HCl	20	15.8	73.0	150	0.18
CC9-PEG7.5k-P(HPMA9.3k-LA)- PMA2.6k/PEG5k-P(HPMA9.3k-LA)- PMA2.5k/GrB	20	16.4	86.5	140	0.12
cNGQ-PEG6.0k-P(HPMA11.0k-LA)- PAA2.4k/PEG5k-P(HPMA11.0k-LA)- PAA2.6k/Epi	20	14.8	74.8	130	0.17

[0090] 实施例十四 MTT法测试聚合物囊泡的细胞毒性

[0091] MTT法使用人肺癌细胞(H460、A549)和人成纤维细胞(L929)。以 $5 \times 10^3$ 个/mL将细胞种于96孔板,每孔100  $\mu$ L,24小时后养至细胞贴壁70%左右。然后,实验组各孔中分别加入含有不同浓度(0.1-0.5 mg/mL)的囊泡样品(以实施例六的空交联聚合物囊泡和实施例七的空靶向交联聚合物囊泡为例),另设细胞空白对照孔和培养基空白孔(复4孔)。培养24小时后,每孔加入MTT(5.0 mg/mL)10  $\mu$ L,继续培养4小时后每孔加入150  $\mu$ L DMSO溶解生成的结晶子,用酶标仪于570 nm处测吸光度值(A),以培养基空白孔调零,计算细胞存活率。附图5为交联聚合物囊泡对H460的细胞毒性结果,可看出,当交联聚合物囊泡的浓度从0.1增到0.5 mg/mL时,H460的存活率仍高于90%,说明该交联聚合物囊泡具有良好的生物相容性。其他聚合物囊泡的细胞毒性的测定于此类似,毒性均很小,具有良好的生物相容性。

[0092] 实施例十五 MTT法测载药聚合物囊泡对H460肺癌细胞的毒性

[0093] 测试对象为实施例十的MTX-Anis-RCCPs(MTX·2Na浓度为10  $\mu$ g/mL,靶向分子含量从20%、30%、50%到70%,无靶向载药交联聚合物囊泡及游离MTX·2Na组作为对照组。细胞的培养和实施例十四相同,共同培养4小时后,吸出样品换上新鲜培养基继续孵育44 h后,而后的MTT加入、处理和测定吸光度同实施例十四。参见附图6,结果显示,50% 靶向分子含量具有最佳的靶向性。用自由药、无靶向和50%靶向的载药囊泡做对H460细胞的毒性实验,MTX·2Na浓度范围为0.001、0.01、0.1、0.5、1、5、10、20和40  $\mu$ g/mL;附图7是载药交联聚合物囊泡对H460细胞的毒性,可看出载MTX·2Na的含50% Anis靶向交联聚合物囊泡对H460细胞的半致死浓度(IC<sub>50</sub>)为2.4  $\mu$ g/mL,远低于自由药,比无靶向囊泡的半致死浓度小4倍,说明本发明的囊泡能很好的将药物传送到细胞内,并有效的释放,最终杀死癌细胞,而靶向纳米粒的效果要更好。

[0094] 实施例十六 MTX-RCCPs和MTX-Anis-RCCPs交联囊泡的血液循环

[0095] 所有动物实验操作符合苏州大学动物实验中心规定。实验选用体重为18~20 克左右,4~6周龄的Balb/C裸鼠。囊泡Anis-RCCPs由PEG5k-P(HPMA11.9k-LA)-PDMA1.8k和Anis-PEG7.5k-P(HPMA12.0k-LA)-PDMA2.3k按1:1混合而成,此比例形成的载MTX的交联囊泡粒径为147纳米,粒径分布为0.19。将载MTX·2Na的无靶向囊泡MTX-RCCPs、靶向囊泡MTX-Anis-RCCPs和Trexal11通过尾静脉注射小鼠体内(MTX药量为15 mg/kg),在0、0.25、0.5、1、2、4、8、12和24 小时定点取血约10  $\mu$ L,通过差量法准确计算血液重量,再加100  $\mu$ L、1%的曲拉通和500  $\mu$ L 无水甲醇萃取(含有20 mM的DTT);然后离心(20000转/分钟,20分钟),取上层清液,通过高效液相色谱测每个时间点MTX·2Na的量。图8中横坐标为时间,纵坐标为每克血液中的MTX·2Na占总的MTX·2Na注射量(ID %/g)。由图可知,Trexal11的循环时间很短,2小时已很难检测到MTX·2Na,而交联聚合物囊泡在24小时后仍有12 ID %/g。靶向载药交联聚合物囊泡、载药交联聚合物囊泡在小鼠体内的消除半衰期分别为5.24、4.32小时,而Trexal11的仅为0.29小时,所以靶向载药交联聚合物囊泡在小鼠体内稳定,有较长循环时间。

[0096] 实施例十七 RCCPs-Cy5和Anis-RCCPs-Cy5交联囊泡的血液循环

[0097] 动物同实施例十七。首先用Cy5-NH<sub>2</sub>和PEG5k-P(HPMA9.0k-LA)-PAA2.4k通过酰胺化反应制备Cy5标记的聚合物PEG5k-P(HPMA9.0k-LA)-PAA2.4k-Cy5(1个Cy5/分子链)。囊泡Anis-RCCPs-Cy5由PEG5k-P(HPMA9.0k-LA)-PAA2.4k-Cy5、PEG5k-P(HPMA9.0k-LA)-PAA2.4k、和Anis-PEG7.5k-P(HPMA9.2k-LA)-PAA2.4k按1:9:10混合而成,形成的聚合物囊

泡粒径为160纳米,粒径分布为 0.12。将RCCPs-Cy5交联囊泡、Anis-RCCPs-Cy5靶向交联囊泡和Anis-RCNCPs-Cy5囊泡通过尾静脉注射小鼠体内(Cy5浓度为4  $\mu\text{M}$ ),在0、0.25、0.5、1、2、4、8、12和24 小时定点取血约10  $\mu\text{L}$ ,通过差量法准确计算血液重量,再加如100  $\mu\text{L}$ 浓度为1%的曲拉通和500  $\mu\text{L}$  二甲亚砷萃取(其中含有20 mM的DTT);然后离心(20000转/分钟,20分钟)后,取上层清液,通过荧光光谱仪测得每个时间点Cy5的量。图9中横坐标为时间,纵坐标为每克血液中的Cy5占总的Cy5注射量(ID %/g)。由图可知,Anis-RCNCPs-Cy5的循环时间很短,2小时已很难检测到Cy5,而交联聚合物囊泡在24小时后仍有12 ID %/g。由计算可知,靶向交联聚合物囊泡、非靶向交联聚合物囊泡在小鼠体内的消除半衰期分别为6.32、6.10小时,而靶向非交联囊泡的仅为1.61小时,所以本发明的交联聚合物囊泡在小鼠体内稳定,有较长循环时间。

[0098] 实施例十八 MTX-RCCPs和MTX-Anis-RCCPs交联聚合物囊泡在荷H460肺癌小鼠的体内生物分布

[0099] 动物同实施例十七,在皮下注射 $1 \times 10^7$ 个H460人肺癌细胞,大约3~4周后,肿瘤大小为100~200  $\text{mm}^3$ 时开始实验。由PEG5k-P (HPMA11.9k-LA) -PDMA1.8k和Anis-PEG7.5k-P (HPMA12.0k-LA) -PDMA2.3k制备MTX-Anis-RCCPs和无靶向交联聚合物囊泡MTX-RCCPs,尾静脉注射小鼠体内(MTX·2Na:15 mg/kg),8 小时后处死老鼠,将肿瘤及心,肝,脾,肺和肾组织取出,清洗称重后加入500  $\mu\text{L}$  1% 的曲拉通通过匀浆机磨碎,再加入900  $\mu\text{L}$  无水甲醇萃取(其中含有20 mM的DTT)。离心(20000转/分钟,20分钟)后,取上层清液,通过高效液相色谱测得每个时间点MTX·2Na的量。图10中横坐标为组织器官,纵坐标为每克肿瘤或组织中的MTX·2Na占总MTX·2Na注射量(ID%/g)。Anis50/RCCPs、RCCPs和Trexall注射12小时在肿瘤积累的MTX·2Na量分别为5.3、1.2和 0.6 ID%/g,MTX-Anis-RCCPs是MTX-RCCPs和Trexall的4.5和9倍,说明载药MTX-Anis-RCCPs通过主动靶向在肿瘤部位积累较多,结果见表3。

[0100] 实施例十九 Cy5-CC-Anis-RCCPs和泡Cy5-CC-RCCPs载蛋白交联聚合物囊泡在荷H460肺癌小鼠的体内生物分布

[0101] 生物分布实验中肿瘤的接种以及尾静脉给药同实施例十八。由PEG5k-P (HPMA9.0k-LA) -PAA2.4k/Anis-PEG7.5k-P (HPMA9.2k-LA) -PAA2.4k制备的载Cy5标记的CC (Cy5-CC)的靶向交联聚合物囊泡Cy5-CC-Anis-RCCPs。将Cy5-CC-Anis-RCCPs、非靶向交联聚合物囊泡CC-Cy5-RCCPs和自由蛋白Cy5-CC通过尾静脉注射小鼠体内(Cy5-CC:0.25 mg equiv./kg),8 小时后处死老鼠,将肿瘤及心,肝,脾,肺和肾组织取出,清洗称重后加入500  $\mu\text{L}$  1% 的曲拉通通过匀浆机磨碎,再加入900 $\mu\text{L}$ 二甲亚砷萃取(其中含有20mM的DTT)。离心(20000转/分钟,20分钟)后,取上层清液,通过荧光光谱仪测得每个时间点Cy5-CC的量。图11中横坐标为组织器官,纵坐标为每克肿瘤或组织中的Cy5-CC占总CC-Cy5注射量(ID%/g)。Cy5-CC-Anis-RCCPs、Cy5-CC-RCCPs和Cy5-CC注射8小时在肿瘤积累的Cy5-CC量分别为11.5、3.9和 2.5 ID%/g,Cy5-CC-Anis-RCCPs是Cy5-CC-RCCPs和Cy5-CC的3.0和4.6倍,说明载药Cy5-CC-Anis-RCCPs通过在肿瘤积累较多,见表3。

[0102] 实施例二十 MTX-Anis-RCCPs和MTX-RCCPs交联囊泡在荷H460皮下肺癌的小鼠中的抑瘤效果、体重变化和存活率

[0103] 肿瘤的接种以及尾静脉给药同实施例十八,在大约两周后,肿瘤大小为30~50  $\text{mm}^3$ 时开始实验。由PEG5k-P (HPMA11.9k-LA) -PDMA1.8k和Anis-PEG7.5k-P (HPMA12.0k-LA) -



PDMA2.3k按1:1混合制备的载MTX·2Na的靶向交联聚合物囊泡MTX-Anis-RCCPs。将MTX-Anis-RCCPs、MTX-RCCPs、Trexall以及PBS分别在0、3、6、9和12天通过尾静脉注射小鼠体内(MTX·2Na药量为15 mg/kg)。在0~21天,每三天称量小鼠的体重,游标卡尺测量肿瘤体积,肿瘤体积计算方法为: $V=(L \times W \times H)/2$ , (其中L、W、H分别为肿瘤的长度、宽度和厚度)。持续观察小鼠的生存到45天。由图12中可知,MTX-Anis-RCCPs治疗组21天时,肿瘤得到明显抑制,而载药MTX-RCCPs组肿瘤有一定的增长。Trexall不能抑制肿瘤的增长,而且其小鼠体重在15天时降低了23%,说明对小鼠的毒副作用很大。相比之下MTX-Anis-RCCPs和MTX-RCCPs组的小鼠体重几乎没有改变,说明载药交联聚合物囊泡对小鼠没有毒副作用。MTX-Anis-RCCPs治疗组在45天后全部存活,Trexall组在31天时已全部死亡,MTX-RCCPs组在38天时也全部死亡。MTX-Anis-RCCPs治疗21天的老鼠的主要器官没有受到损伤,而Trexall组对小鼠的心、肝脏有很大损伤,结果见表3。

[0104] 实施例二十一 靶向交联囊泡GrB-Anis-RCCPs多次低剂量给药和单次高剂量给药在荷H460皮下肺癌的小鼠中的抑瘤效果、体重变化和存活率

[0105] 肿瘤的接种以及尾静脉给药同实施例十九。由PEG5k-P (HPMA9.0k-LA9)-PAA2.4k和Anis-PEG7.5k-P (HPMA9.2k-LA)-PAA2.4k按1:1混合制备的载GrB的靶向交联聚合物囊泡GrB-Anis-RCCPs(多次给药)、GrB-Anis-RCCPs(单次给药)、及PBS分别在0、4、8和12天通过尾静脉注射小鼠体内(GrB药量为50  $\mu$ g/kg)。在0~21天,每两天称量小鼠的体重,如实施例二十测量肿瘤体积和观察小鼠到60天。由图13中可知,GrB-Anis-RCCPs(多次给药)、GrB-Anis-RCCPs(单次给药)治疗组21天时,肿瘤得到明显抑制,而PBS组肿瘤有明显的增长。所有组的小鼠体重几乎没有改变,说明载药交联聚合物囊泡对小鼠没有毒副作用。PBS组小鼠在32天全部死亡,而GrB-Anis-RCCPs(多次给药)、GrB-Anis-RCCPs(单次给药)治疗组能分别延长至50天和60天。GrB-Anis-RCCPs治疗21天的老鼠的主要器官没有受到损伤,而Trexall组对小鼠的心、肝脏有很大损伤。因此,本发明的靶向交联聚合物囊泡载药后可有效抑制肿瘤的增长,对小鼠没有毒副作用,还可以延长荷瘤老鼠的生存时间。

[0106] 实施例二十二 靶向交联囊泡Epi-cNGQ-RCCPs在荷A549皮下肺癌的小鼠中的抑瘤效果、体重变化和存活率

[0107] A549皮下肿瘤的接种同实施例十九。由cNGQ-PEG6.0k-P (HPMA11.0k-LA)-PAA2.4k/PEG5k-P (HPMA11.0k-LA)-PAA2.6k按1:1混合制备的载Epi·HCl的靶向交联聚合物囊泡Epi-cNGQ-RCCPs。将Epi-cNGQ-RCCPs、Epi-RCCPs、自由Epi以及PBS分别在0、3、6、9和12天通过尾静脉注射小鼠体内(EpiHCl药量为10 mg/kg)。如实施例二十、在0~21天内称量小鼠的体重、量肿瘤体积和观察小鼠到60天。由结果可知,Epi-cNGQ-RCCPs治疗21天时,肿瘤得到明显抑制,而PBS组肿瘤有明显的增长。所有组的小鼠体重几乎没有改变,说明载药交联聚合物囊泡对小鼠没有毒副作用。PBS组小鼠在30天全部死亡,而Epi-cNGQ-RCCPs组能延长寿命至>60天,并对老鼠的主要器官没有受到损伤,结果见表3。

[0108] 实施例二十三 靶向交联囊泡Epi-cNGQ-RCCPs在荷A549原位肺癌的小鼠中的抑瘤效果、体重变化和存活率

[0109] 实验选用体重为18~20克左右,4~6周龄的Balb/C裸鼠,在肺部直接注射 $5 \times 10^6$ 个带有生物发光的A549人肺癌细胞(A549-Luc),大约10天后,通过小动物活体成像系统观察,老鼠肺部出现荧光,成功建立A549原位肺癌模型。接着,如实施例二十二中的药剂Epi-

cNGQ-RCCPs、Epi-RCCPs、自由Epi以及PBS在0、4、8和12天通过尾静脉注射小鼠体内 (Epi · HCl:10 mg/kg)。从0~16天,每四天称量小鼠的体重,用小动物活体成像仪监测小鼠肺部肿瘤生物发光强弱,观察小鼠的生存到60天。结果可知,Epi-cNGQ-RCCPs组16天内,肺部肿瘤生物发光强度持续减弱,而Epi-RCCPs组肺部的肿瘤生物发光强度有一定增长,但两组体重几乎没有改变。Epi · HCl虽然也能抑制肿瘤的增长,但小鼠体重在4天时降低了15%,说明其对小鼠的毒副作用很大。Epi-cNGQ-RCCPs组在60天后仍全部存活,Epi · HCl组在30天时已全部死亡,PBS组在20天时也全部死亡。因此,载药靶向交联聚合物囊泡Epi-cNGQ-RCCPs可有效抑制原位肺癌肿瘤的增长,对小鼠没有毒副作用,并有效延长荷瘤老鼠的生存时间。采用类似的实验方法研究了多种载不同药物 (MTX·2Na、PEM·Na、GrB、DOX·HCl) 的交联聚合物囊泡和靶向交联聚合物囊泡对荷肺癌小鼠的影响,结果见表3。因此,本发明的聚合物制备的药物载体载药后可有效抑制肺癌肿瘤增长,对小鼠没有毒副作用,还可以延长荷瘤老鼠的生存时间。

[0110] 表3 载药交联囊泡对肺癌的体内外抗肿瘤结果

聚合物/抗癌药物	24 h /pH 7.4 体外释放 (%)		肿瘤细胞存活率 %		IC <sub>50</sub> (μg/mL)	循环消除半衰期 (h)	药物肿瘤积累 (%ID/g)	治疗荷瘤小鼠生存时间 (d) 皮下模型
	No GSH	10 mM GSH	空囊泡	载药囊泡				
Anis/PEG5k-P(HPMA11.9k-LA)-PDMA1.8k/MTX·2Na	19	98	>90	25.6	2.4	5.24	5.3	45
PEG5k-P(HPMA11.9k-LA16.3k)-PDMA1.8k/MTX·2Na	19.2	98.1	>90	40.0	8.7	4.32	1.2	38
Anis-PEG7.5k-P(HPMA9.3k-LA)-PAA2.4k/GrB	23.5	99.1	>90	28.4	0.25	5.3	11.5	60
PEG5k-P(HPMA9.0k-LA)-PAA 2.4k/GrB	23.7	99.2	>90	45.1	0.87	5.1	3.9	36
CC9-PEG7.5k-P(HPMA9.3k-LA)-PMA2.6k/PEG5k-P(HPMA9.3k-LA)-PMA2.5k/GrB	22.4	99.3	>90	26.5	0.24	5.2	8.9	65
cRGD-PEG6.0k-P(HPMA8.0k-LA)-PDEA2.6k/PEG5.0k-P(HPMA7.6k-LA)-PDEA3.0k/PEM·Na	20.3	98.4	>90	24.5	2.1	5.3	7.6	50
cNGQ-PEG6.0k-P(HPMA11.0k-LA)-PAA2.4k/PEG5k-P(HPMA11.0k-LA)-PAA2.6k/Epi·HCl	19.4	99.1	>90	31.4	2.8	4.93	6.8	> 60
cRGD-PEG10.0k-P(HPMA21.0k-LA)-PDPA6.2k/PEG8.0k-P(HPMA21.4k-LA)-PDPA5.6k/DOX·HCl	18.8	96.7	>90	30.2	2.6	5.46	6.2	45

[0111]

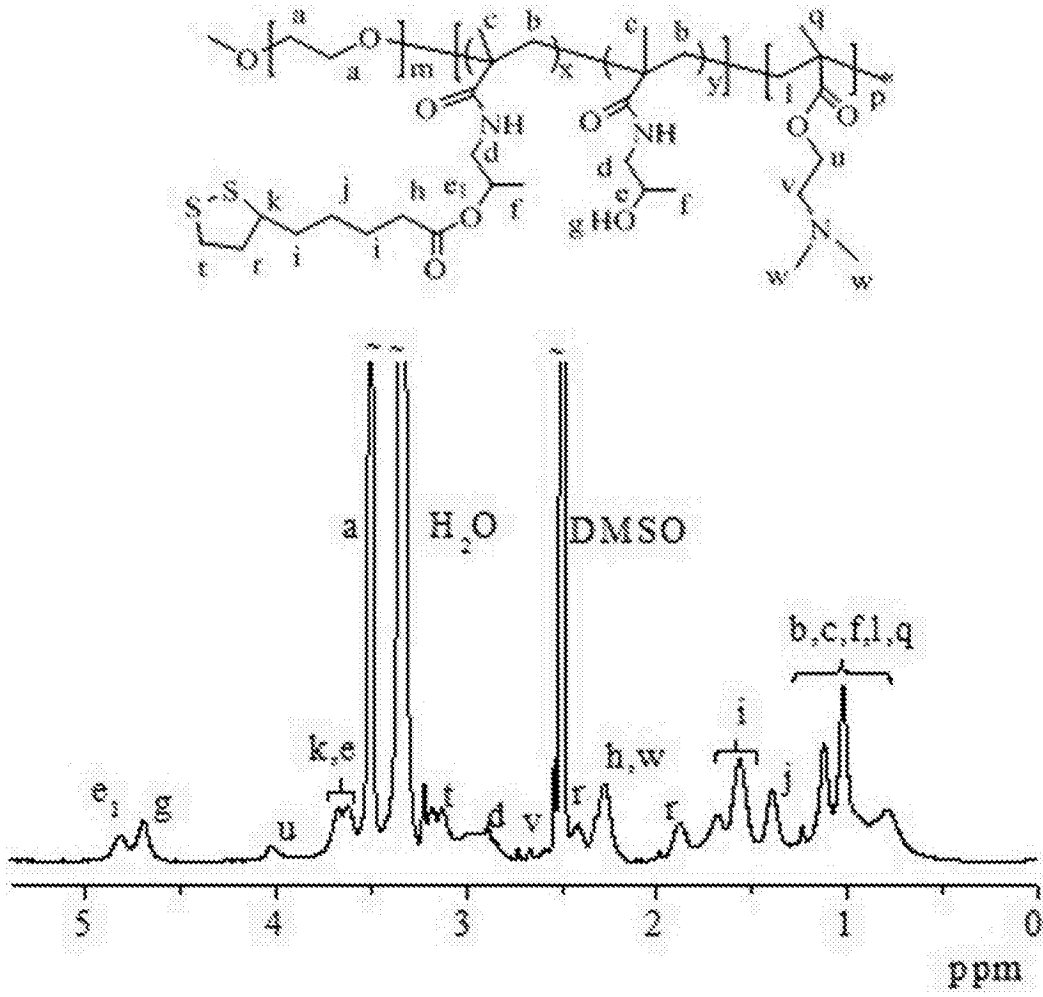


图1

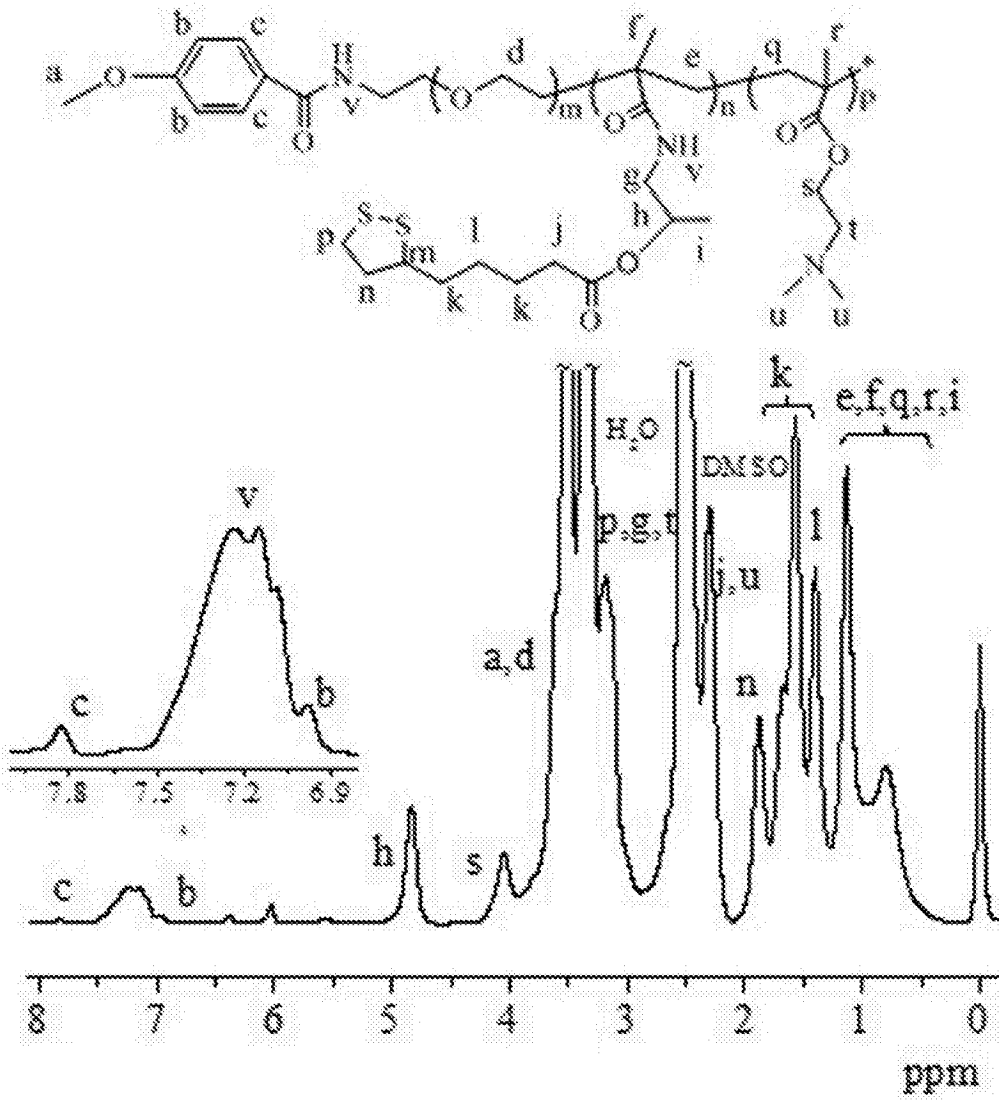


图2

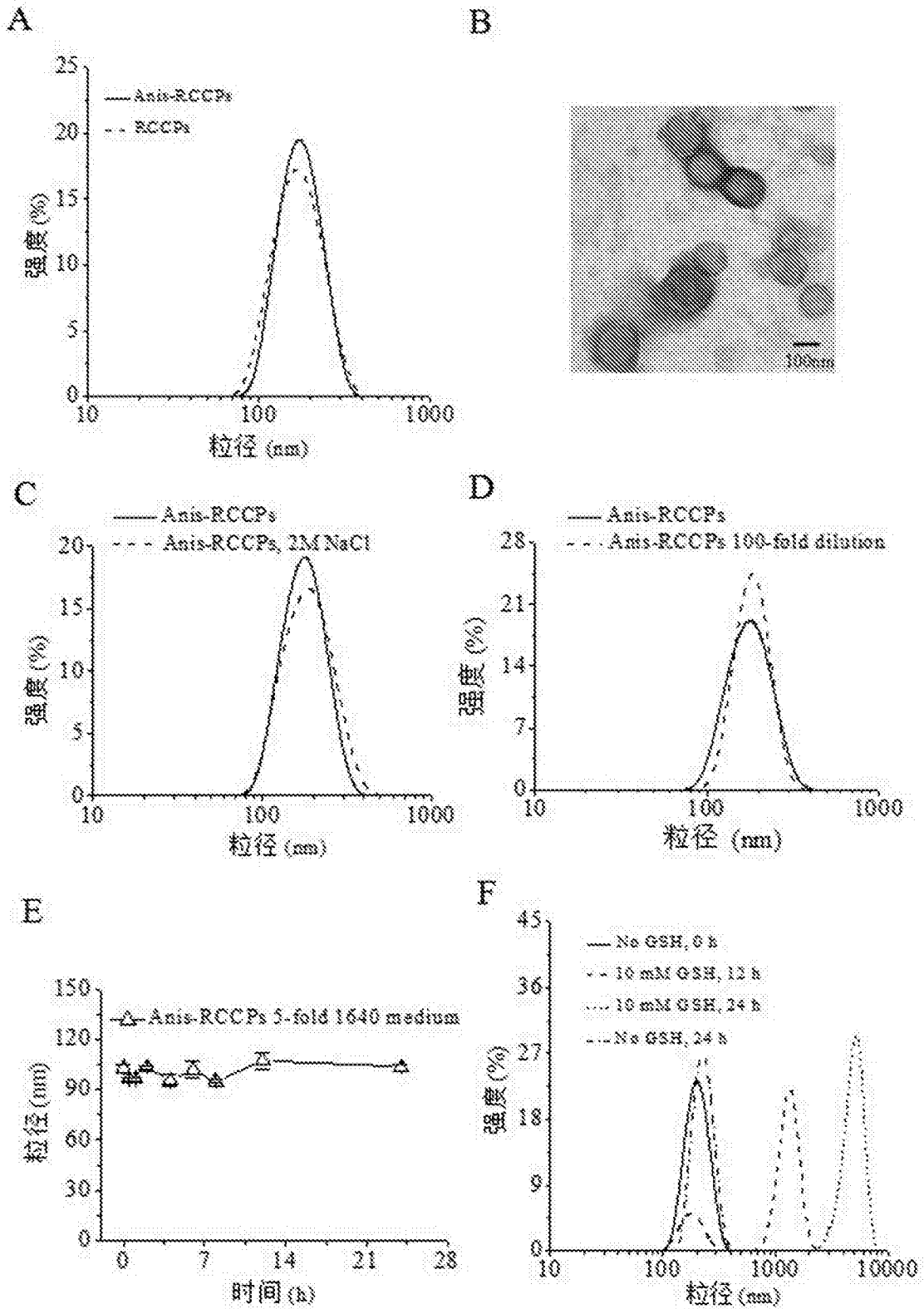


图3

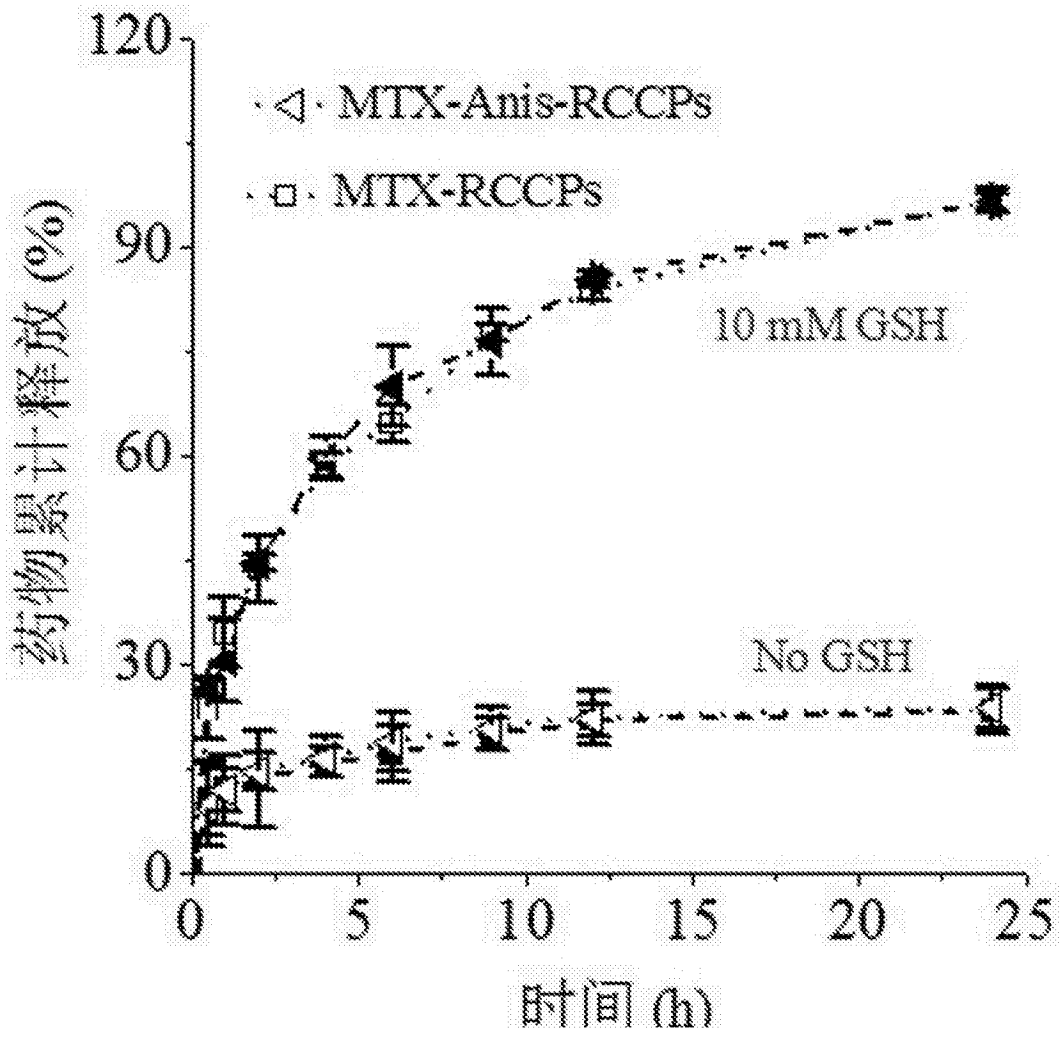


图4

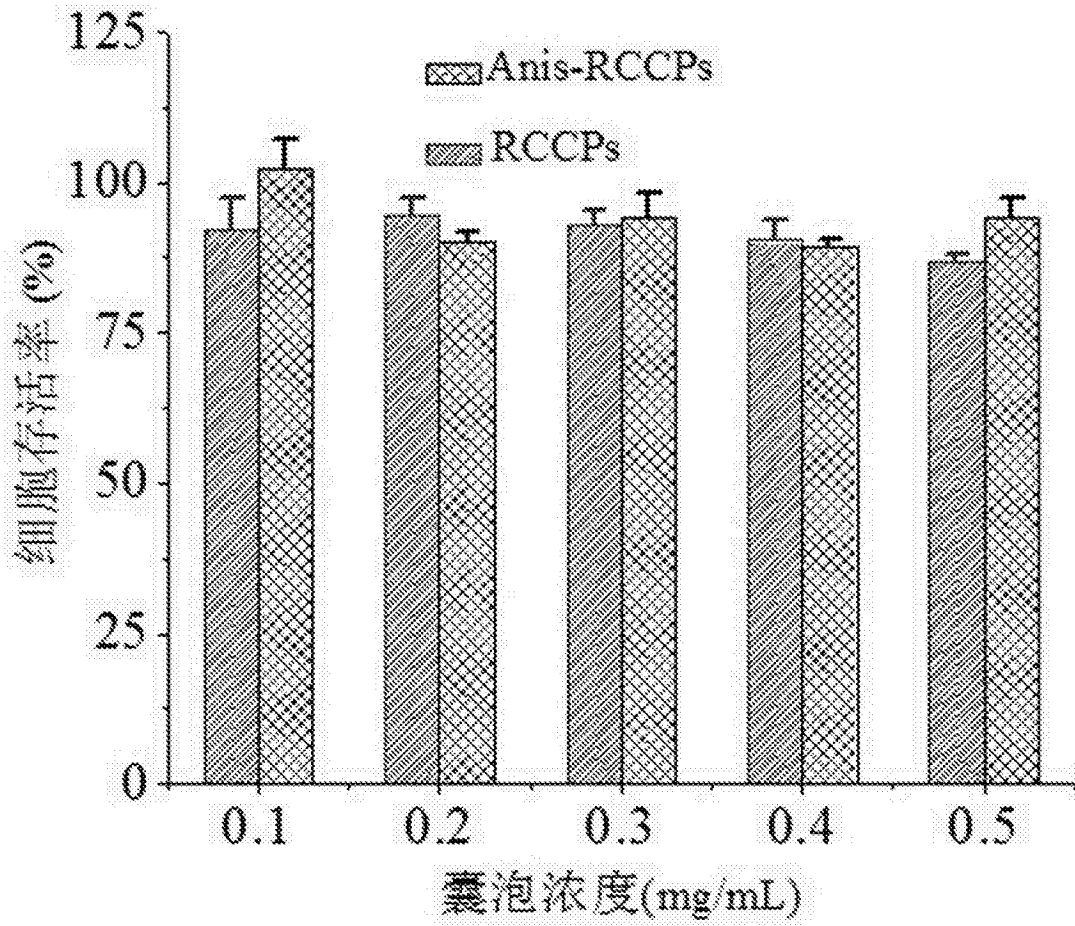


图5

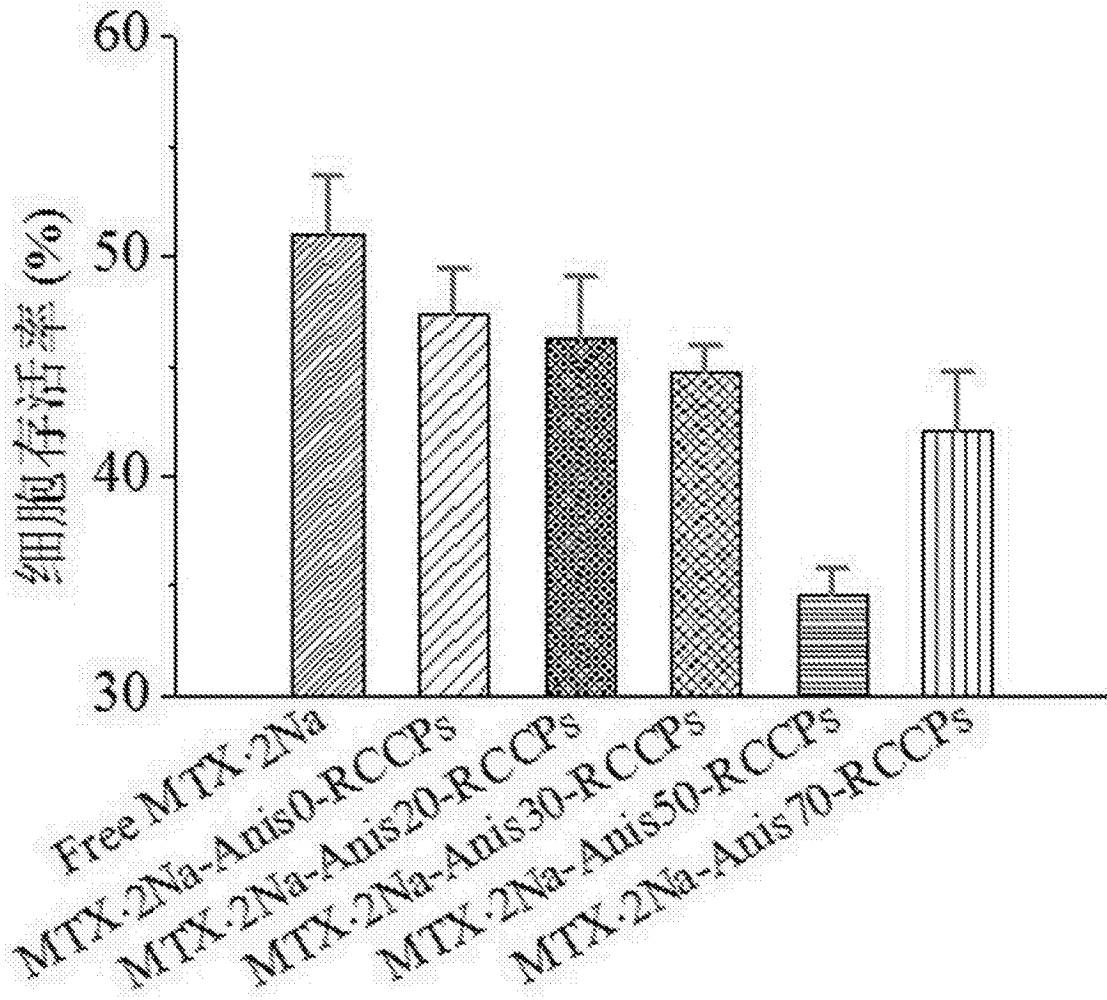


图6



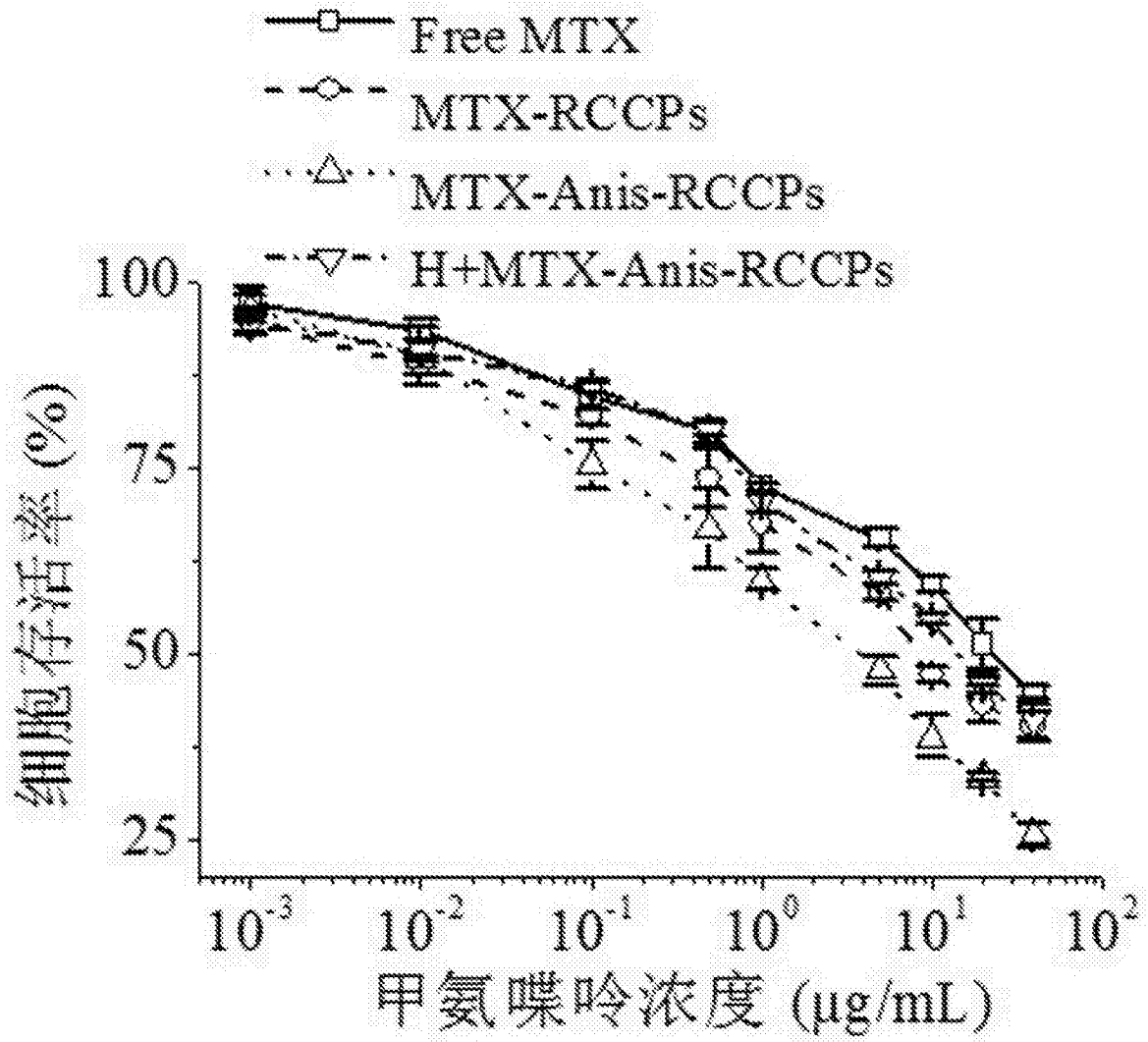


图7

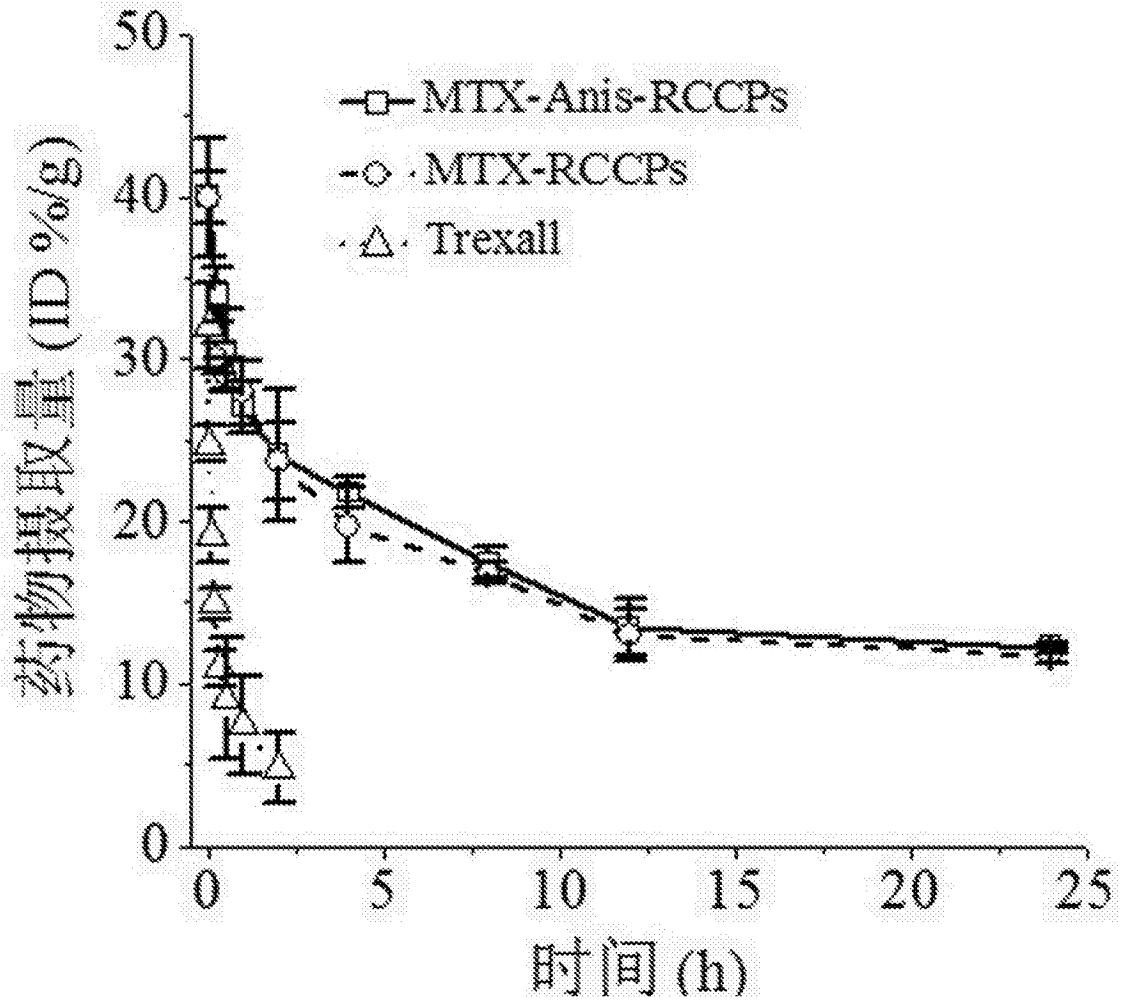


图8

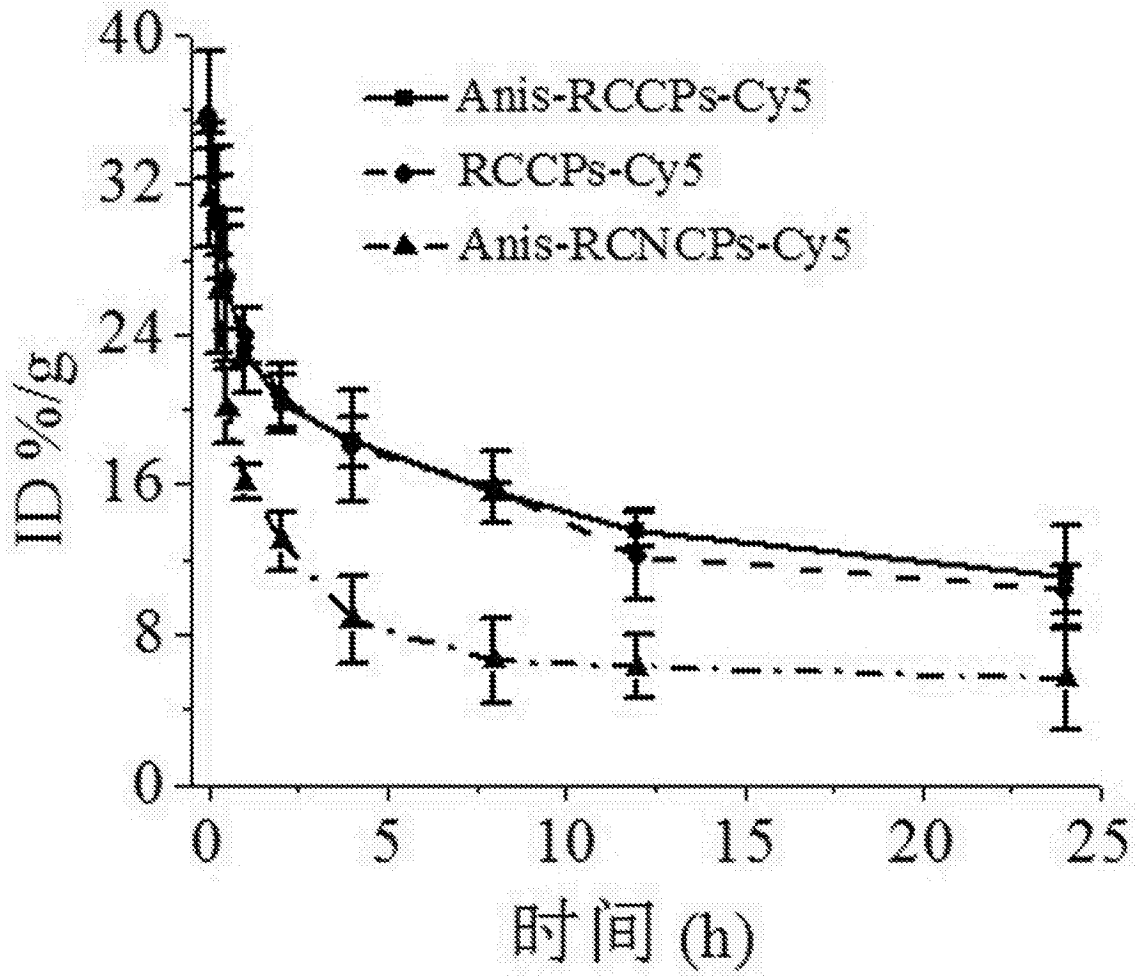


图9

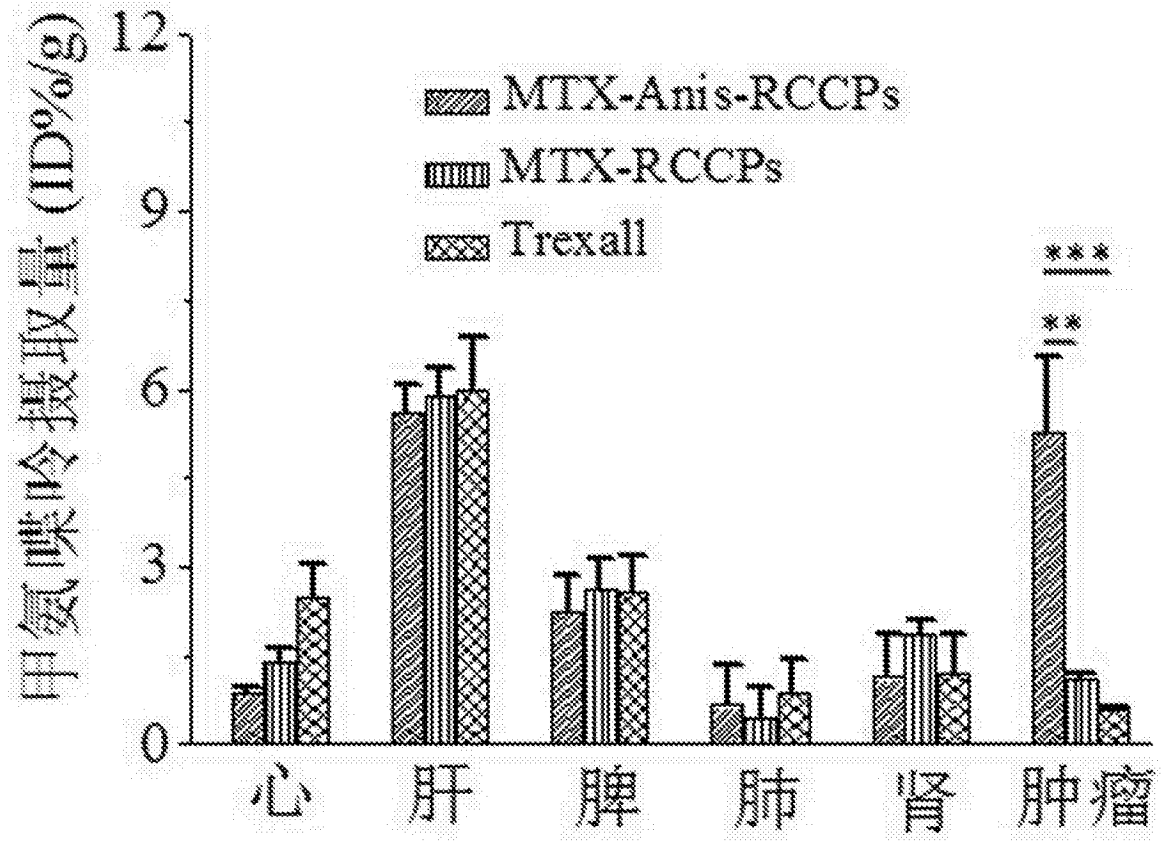


图10

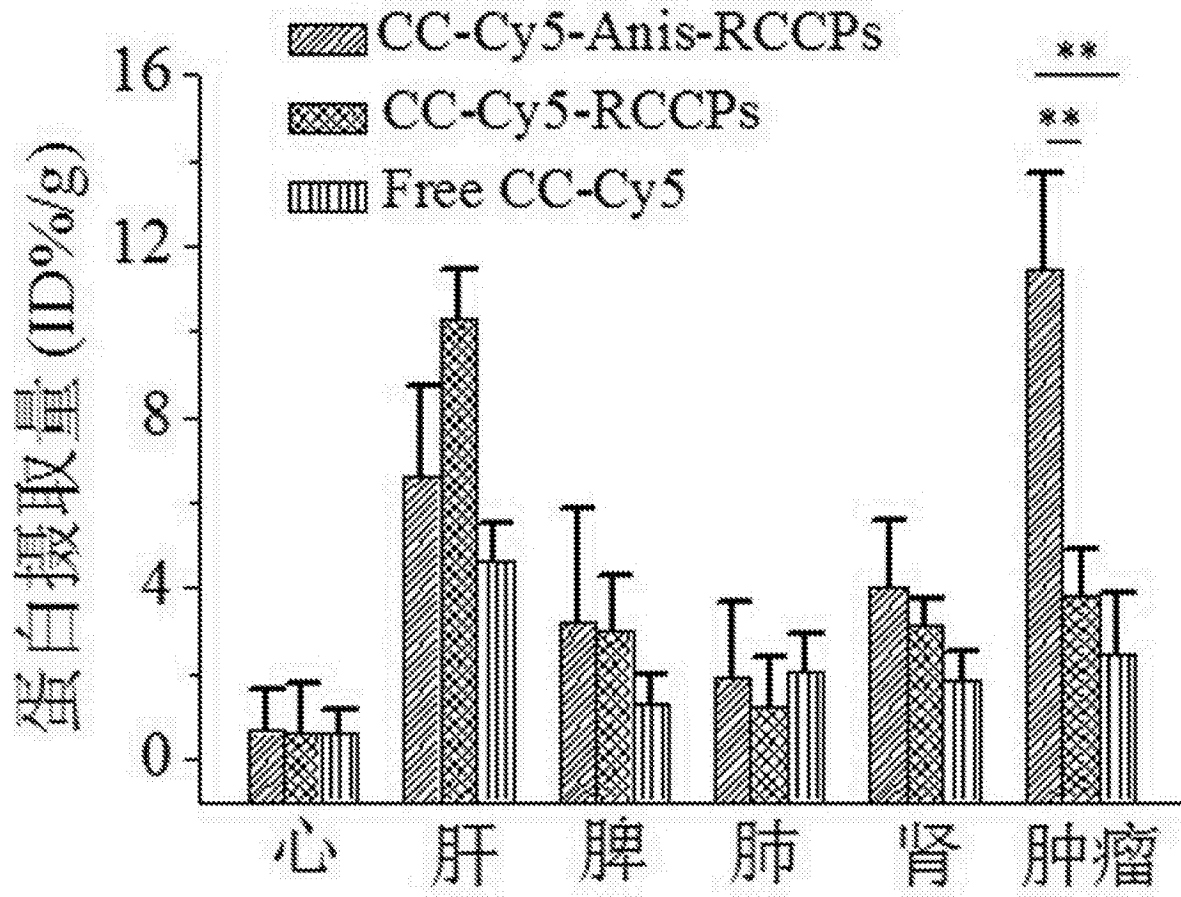


图11

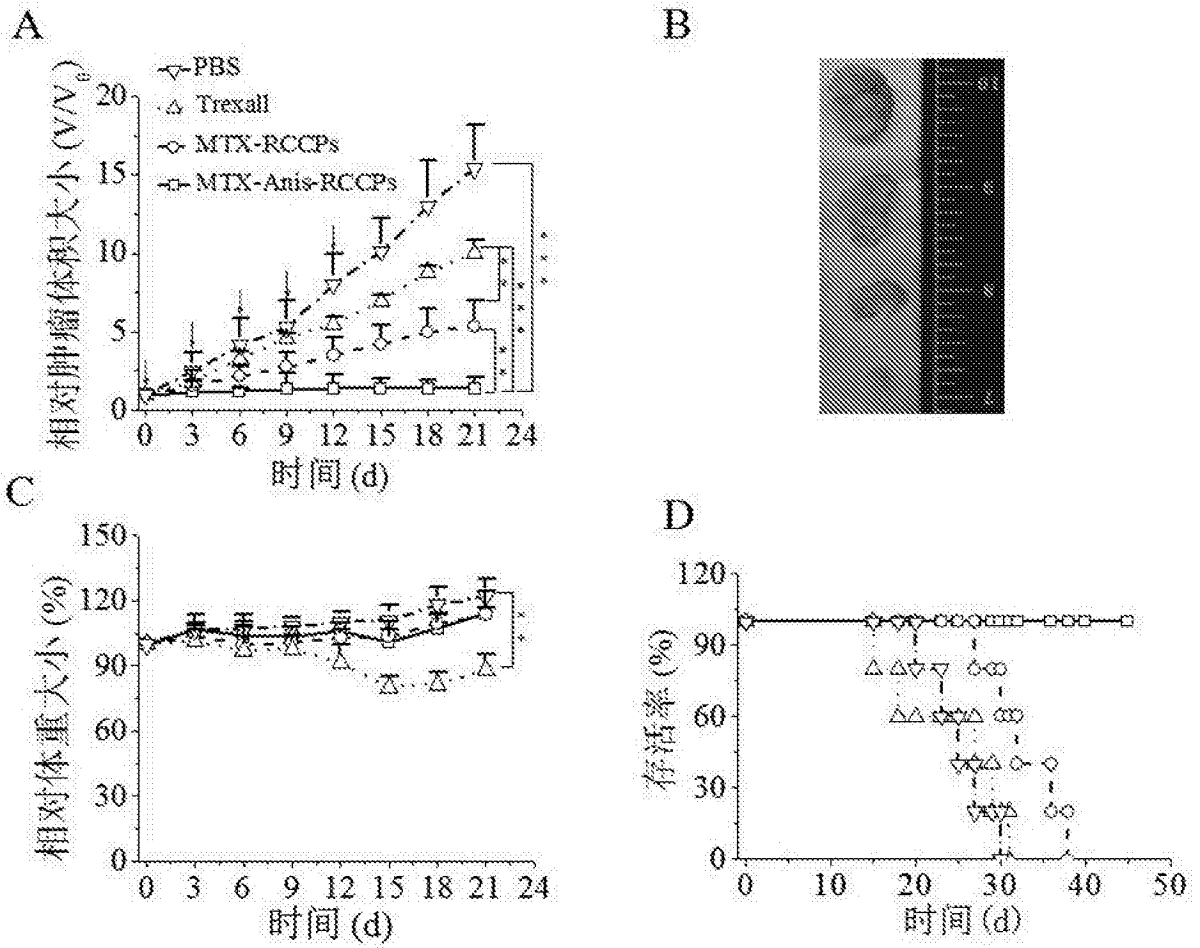


图12

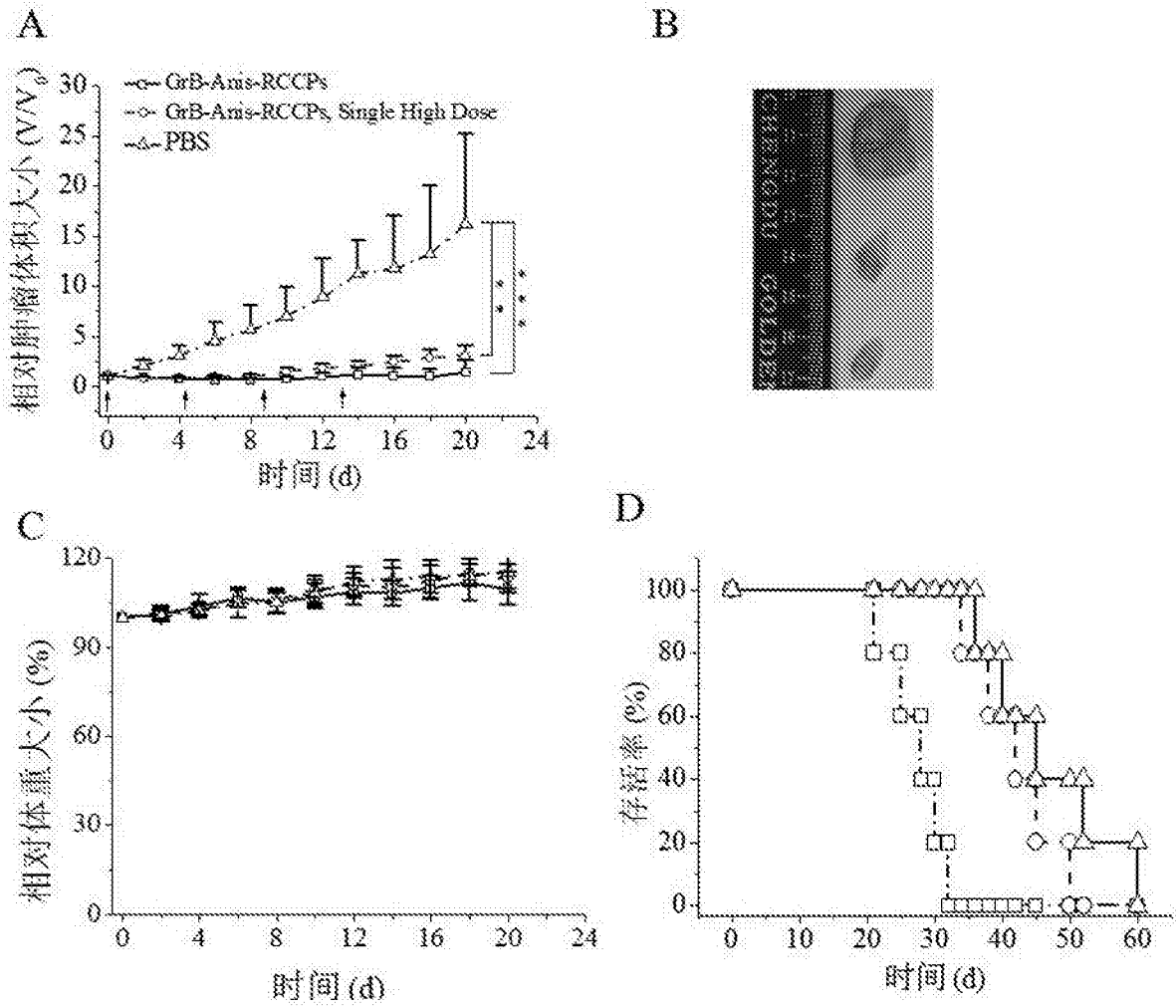


图13