



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115417889 A

(43) 申请公布日 2022. 12. 02

(21) 申请号 202210679578.9

A61P 35/00 (2006.01)

(22) 申请日 2022.06.15

(71) 申请人 苏州大学

地址 215137 江苏省苏州市相城区济学路8号

(72) 发明人 邓超 章强 刘媛媛 谢吉国 钟志远

(74) 专利代理机构 苏州创元专利商标事务有限公司 32103

专利代理师 孙周强 陶海锋

(51) Int. Cl.

C07F 5/02 (2006.01)

C08G 69/42 (2006.01)

A61K 47/34 (2017.01)

A61K 47/69 (2017.01)

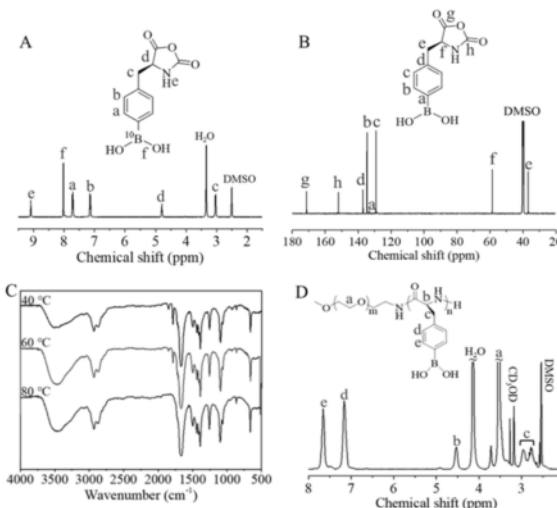
权利要求书2页 说明书11页 附图7页

(54) 发明名称

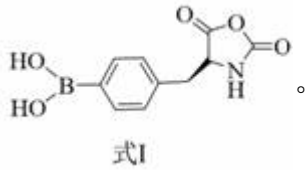
一种L-4-二羟基硼苯丙氨酸-N-羧酸内酸酐单体和聚氨基酸及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种L-4-二羟基硼苯丙氨酸-N-羧酸内酸酐单体和聚氨基酸及其制备方法和应用,构建了一种具有生物响应性和良好生物相容性的聚多肽纳米材料,具体涉及一种L-4-二羟基硼苯丙氨酸N-羧基内酸酐的合成,以及由其开环聚合制备的一系列聚合物和药物递送方面的应用。本发明公开的聚合物具有优异的生物相容性,可以制备(肿瘤靶向)聚合物胶束,可适用于亲疏水性化药、含顺式1,2或1,3-二醇药物、多肽药物、蛋白药物以及核酸药物等的高效装载与递送。

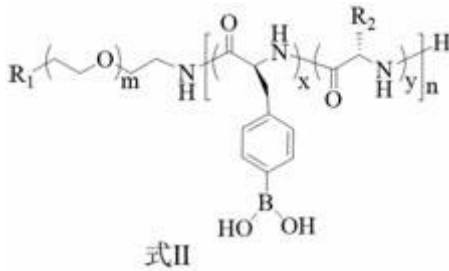


1. 一种具有式I结构的L-4-二羟基硼苯丙氨酸N-羧基内酸酐:



2. 权利要求1所述L-4-二羟基硼苯丙氨酸N-羧基内酸酐的制备方法,其特征在于,以L-4-二羟基硼苯丙氨酸、 $\alpha$ -蒎烯、三光气为反应物,在溶剂中反应,制备得到所述L-4-二羟基硼苯丙氨酸-N-羧基内酸酐。

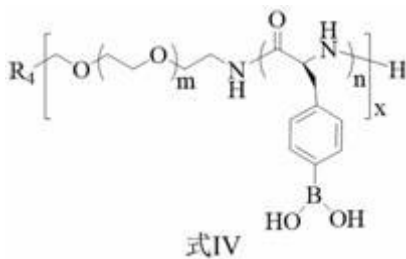
3. 一种具有式II结构的线型嵌段共聚物:



其中, $R_1$ 来自引发剂聚乙二醇; $R_2$ 来自其他类型的氨基酸; $m$ 为70~210, $x$ 为5~30, $y$ 为0~15, $n$ 为5~45。

4. 权利要求3所述线型嵌段共聚物的制备方法,其特征在于,以线型聚乙二醇为引发剂,L-4-二羟基硼苯丙氨酸为单体或者L-4-二羟基硼苯丙氨酸与其他类型N-羧基内酸酐为单体,开环聚合,得到线性嵌段共聚物。

5. 一种具有式IV结构的支化嵌段共聚物:



其中, $m$ 为20~150, $n$ 为2~20, $x$ 为2~8; $R_4$ 为引发剂支化聚乙二醇的支化中心。

6. 权利要求5所述支化嵌段共聚物的制备方法,其特征在于,以支化聚乙二醇为引发剂,L-4-二羟基硼苯丙氨酸为单体,开环聚合,得到支化嵌段共聚物。

7. 一种靶向嵌段共聚物,其特征在于,由权利要求3所述线型嵌段共聚物偶联靶向分子得到,或者由权利要求5所述支化嵌段共聚物偶联靶向分子得到。

8. 一种药物递送体系,其特征在于,由权利要求3所述线型嵌段共聚物或者权利要求5所述支化嵌段共聚物装载药物得到;或者由权利要求3所述线型嵌段共聚物或者权利要求5所述支化嵌段共聚物装载药物后偶联靶向分子得到;或者由权利要求3所述线型嵌段共聚物与权利要求7所述靶向嵌段共聚物共装载药物得到;或者由权利要求5所述支化嵌段共聚物与权利要求7所述靶向嵌段共聚物共装载药物得到。

9. 权利要求1所述L-4-二羟基硼苯丙氨酸N-羧基内酸酐、权利要求3所述线型嵌段共聚物、权利要求5所述支化嵌段共聚物、权利要求7所述靶向嵌段共聚物或者权利要求8所述药

物递送体系在制备药物中的应用。

10. 权利要求1所述L-4-二羟基硼苯丙氨酸N-羧基内酸酐、权利要求3所述线型嵌段共聚物、权利要求5所述支化嵌段共聚物、权利要求7所述靶向嵌段共聚物在制备药物载体中的应用。

## 一种L-4-二羟基硼苯丙氨酸-N-羧基内酸酐单体和聚氨基酸及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明构建了一种具有生物响应性和良好生物相容性的聚多肽纳米材料,具体涉及一种L-4-二羟基硼苯丙氨酸-N-羧基内酸酐的合成,以及由其开环聚合制备的一系列聚合物和药物递送方面的应用。

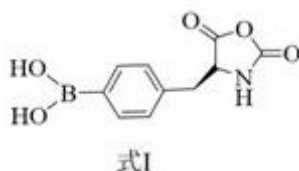
### 背景技术

[0002] 聚多肽由于其独特的二级结构和生物相容性等特性使其在药物递送、组织工程等领域得到广泛应用。但现有的聚多肽材料通常存在功能性不足、功能性基团引入复杂繁琐、制备条件苛刻等问题。另外,基于聚多肽的纳米药物虽然在一定程度上可改善药物溶解度和药代动力学,降低对正常细胞的毒性,扩宽治疗窗口,但依然存在稳定性差和药物释放不可控(即循环期间药物过早释放和肿瘤部位药物释放缓慢)等局限性。因此,构建出具有良好的生物相容性和生物响应性(还原响应性、pH响应性、ROS响应性或酶响应性等)释放的聚多肽纳米药物载体成为研究的热点。

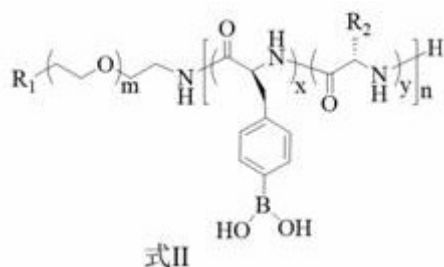
### 发明内容

[0003] 本发明设计合成了一种L-4-二羟基硼苯丙氨酸-N-羧基内酸酐单体,并用聚乙二醇引发L-4-二羟基硼苯丙氨酸-N-羧基内酸酐单体或/和其他类型N-羧基内酸酐单体开环聚合制备系列嵌段共聚物,这些嵌段聚合物能自组装形成聚合物胶束用于药物递送。

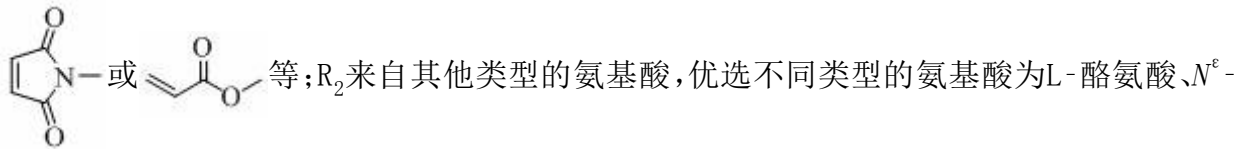
[0004] 为达到上述目的,本发明采用的技术方案是:一种具有式I结构的L-4-二羟基硼苯丙氨酸-N-羧基内酸酐:



一种具有式II结构的线型嵌段共聚物:

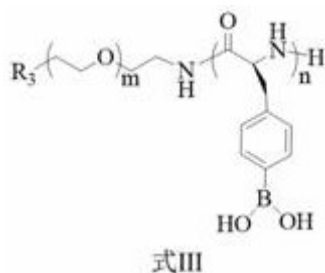




其中, $R_1$ 来自引发剂聚乙二醇,为其末端官能基团,优选为 $-\text{CH}_3$ ,  $\text{—CH}_2\text{—}$ ,  $\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—}$ ,

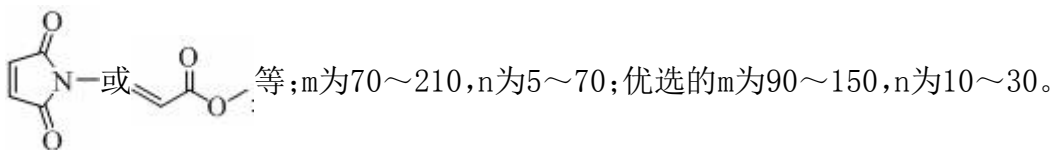


[0005] 本发明具有式 II 结构的线型嵌段共聚物中,  $y$  为 0 时, 为线型聚乙二醇引发 L-4-二羟基硼苯丙氨酸  $N$ -羧基内酸酐开环聚合形成聚乙二醇-聚(L-4-二羟基硼苯丙氨酸) 共聚物;  $y$  不为 0 时, 为线型聚乙二醇引发 L-4-二羟基硼苯丙氨酸  $N$ -羧基内酸酐与其他类型  $N$ -羧基内酸酐开环聚合形成聚乙二醇-聚(L-4-二羟基硼苯丙氨酸)-聚其他类型氨基酸共聚物; 其他类型氨基酸是指与聚(L-4-二羟基硼苯丙氨酸) 不同的氨基酸, 比如 L-酪氨酸、 $N^{\epsilon}$ -Boc-L-赖氨酸、 $\beta$ -苄基-L-天冬氨酸等。

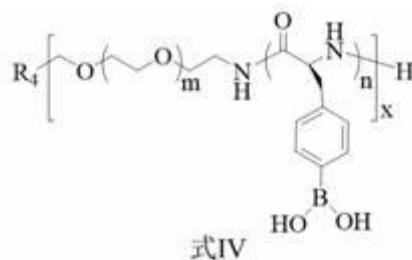
[0006] 本发明中,  $y$  为 0 时聚乙二醇-聚(L-4-二羟基硼苯丙氨酸) 共聚物如式 III:



其中,  $R_3$  来自引发剂聚乙二醇, 为其末端官能基团, 优选为  $-\text{CH}_3$ , , ,



[0007] 一种具有式 IV 结构的支化嵌段共聚物:



其中,  $m$  为 20~150,  $n$  为 2~20,  $x$  为 2~8; 优选的  $m$  为 50~120,  $n$  为 4~8,  $x$  为 4 或 8;  $R_4$  为引发剂支化聚乙二醇的支化中心, 本发明优选四臂或八臂聚乙二醇氨为引发剂。

[0008] 本发明公开了上述 L-4-二羟基硼苯丙氨酸  $N$ -羧基内酸酐的制备方法, 以 L-4-二羟基硼苯丙氨酸、 $\alpha$ -蒎烯、三光气为反应物, 在无水四氢呋喃中反应, 制备得到所述的 L-4-二羟基硼苯丙氨酸  $N$ -羧基内酸酐。具体反应过程如下: 在氮气保护环境下将 L-4-二羟基硼苯丙氨酸和  $\alpha$ -蒎烯加入到无水四氢呋喃溶液中, 然后滴加三光气的四氢呋喃溶液, 在 50~60°C 下反应 3~7 小时, 反应结束后滤掉没有参与反应的反应物, 再将反应液旋蒸浓缩后在冰石油醚中沉淀得到粗产物。粗产品复溶于四氢呋喃, 再次沉淀, 重复进行 2~3 次, 得到最终的白色粉末固体, 即为 L-4-二羟基硼苯丙氨酸  $N$ -羧基内酸酐 (BPA-NCA)。

[0009] 上述技术方案中,L-4-二羟基硼苯丙氨酸、 $\alpha$ -蒎烯和三光气的摩尔比为2:4~6:1~2,优选2:5:1。

[0010] 本发明以线性聚乙二醇为引发剂,L-4-二羟基硼苯丙氨酸-N-羧基内酸酐为单体,或者L-4-二羟基硼苯丙氨酸-N-羧基内酸酐与其他类型N-羧基内酸酐为单体,开环聚合,得到线性嵌段共聚物。以支化聚乙二醇为引发剂,L-4-二羟基硼苯丙氨酸-N-羧基内酸酐为单体,开环聚合,得到支化嵌段共聚物。

[0011] 上述线型或支化型嵌段共聚物的制备在有机溶剂如N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、二氯甲烷(DCM)、三氯甲烷、四氢呋喃(THF)中进行,本发明优选N,N-二甲基甲酰胺(DMF)作溶剂;开环聚合的温度为30~90℃,本发明优选聚合温度为80℃;聚合反应时间为1~5天,本发明优选反应时间为3天。

[0012] 本发明公开了一种靶向嵌段共聚物,由具有式II结构的线型嵌段共聚物偶联靶向分子得到,或者由式IV结构的支化嵌段共聚物偶联靶向分子得到。本发明的嵌段聚合物中,PEG末端或氨基酸末端均可以化学偶联特异性靶向分子,包括短肽(ApoE、Angiopep-2、cRGD、cNGQ等)、小分子靶向分子(葡萄糖、叶酸等)、抗体及抗体片段等。

[0013] 本发明进一步公开了上述嵌段共聚物,尤其是两亲性聚合物聚乙二醇-聚(L-4-二羟基硼苯丙氨酸)自组装成纳米胶束在药物递送方面的应用;药物为亲疏水性化药、含顺式1,2或1,3-二醇药物、多肽药物、蛋白药物或者核酸药物,优选的,药物为姜黄素(Cur)和/或甲苯磺酸索拉非尼(Sor)。具体地,上述嵌段共聚物,尤其是两亲性聚合物聚乙二醇-聚(L-4-二羟基硼苯丙氨酸)在制备药物载体中的应用。由于本发明聚合物具有合适的亲疏水比例,因此可以通过溶剂置换法制备得到一系列尺寸可控的聚合物胶束,具体的,聚合物胶束是通过溶剂置换法制备得到,即将嵌段共聚物溶于二甲基亚砜(DMSO)或N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中,得到聚合物溶液,然后将聚合物溶液逐滴滴加到HEPES或PB等缓冲溶液中,最后使用截留分子量(MWCO)为7000的透析袋透析除去有机溶剂得到粒径在18~200 nm的聚合物胶束。本发明可以通过调节靶向嵌段共聚物和非靶向嵌段共聚物的比例制备得到特异性靶向的聚合物胶束。此外,还可通过后修饰的方式将靶向分子引入到制备好的非靶向聚合物胶束表面,比如在胶束的PEG端引入短肽(ApoE、Angiopep-2、cRGD、cNGQ等),小分子靶向分子(葡萄糖、叶酸等),抗体及抗体片段等。

[0014] 由于上述技术方案的应用,本发明与现有技术相比具有下列优点:

本发明制备的 $\alpha$ -氨基酸-N-羧基内酸酐为一种新型内酸酐单体,可以通过开环聚合得到性能可控的聚多肽,该类聚氨基酸相较于其他聚氨基酸具有更优异的生物响应性和更宽泛的适用性。

[0015] 本发明利用聚乙二醇氨为引发剂、通过开环聚合得到分子量可控、分子量分布较窄聚合物,极大拓宽了两亲性聚多肽的种类。

[0016] 本发明公开的聚合物具有优异的生物相容性,可以制备(肿瘤靶向)聚合物胶束,可适用于亲疏水性化药、含顺式1,2或1,3-二醇药物、多肽药物、蛋白药物以及核酸药物等的高效装载与递送。

[0017] 富含硼-10的L-4-二羟基硼苯丙氨酸是硼中子俘获治疗重要的的硼携带剂,本发明公开的合成工艺同样适用于富含硼-10的聚多肽的合成,得到的聚多肽也同样适用于上述胶束的制备工艺,这将会拓宽L-4-二羟基硼苯丙氨酸的应用范围,有望用作硼中子俘获

治疗的新型硼携带剂。

[0018] 本发明制备方法简单,所用原料来源广泛,从而具有良好的应用前景。

### 附图说明

[0019] 图1是实施例二、实施例三、实施例四的反应示意图。

[0020] 图2是实施例一中BPA-NCA的核磁氢谱图(A)、核磁碳谱图(B)、以及实施例二中 $\text{PEG}_{5k}$ -PBPA $_{4k}$ 合成时的红外监测图(C)和 $\text{PEG}_{5k}$ -PBPA $_{4k}$ 的核磁氢谱图(D)。

[0021] 图3是实施例三中 $\text{PEG}_{5k}$ -P(Tyr $_{1k}$ -BPA $_{4k}$ )的核磁氢谱图(A)、 $\text{PEG}_{5k}$ -P(BLA $_{1k}$ -BPA $_{4k}$ )的核磁氢谱图(B)、 $\text{PEG}_{5k}$ -P(Lys $_{1k}$ -BPA $_{4k}$ )的核磁氢谱图(C)和4-arm- $\text{PEG}_{20k}$ -PBPA $_{3k}$ 的核磁氢谱图(D)。

[0022] 图4是实施例四中ApoE- $\text{PEG}_{5k}$ -PBPA $_{4k}$ 的核磁氢谱图(A)、4-arm- $\text{PEG}_{20k}$ -PBPA $_{1.5k}$ -Glucose的核磁氢谱图(B)。

[0023] 图5是实施例五中聚合物PEG-PBPA自组装形成的胶束包载药物Cur和Sor的粒径分布(内嵌TEM图)(A),稀释、血清以及长期存放稳定性(B)和体外响应性(C)和体外释放(D)。

[0024] 图6是实施例六中空聚合物胶束对L929小鼠成纤维细胞、U87 MG-luc人脑胶质瘤细胞和B16F10小鼠黑色素瘤细胞和的细胞毒性结果图(A)、游离Cur和Sor以及单载药物胶束PBN-Cur和PBN-Sor对U87 MG-luc细胞的毒性(B)、聚合物胶束装载姜黄素和甲苯磺酸索拉非尼对U87 MG-luc小鼠黑色素瘤细胞的细胞毒性(C)和细胞长期抑制效果图(D)。

[0025] 图7为Cur、Sor、PBN-Cur、PBN-Sor、PBN-Cur/Sor(低)和PBN-Cur/Sor(高)等处理红细胞的溶血实验(A)和溶血率(B)。

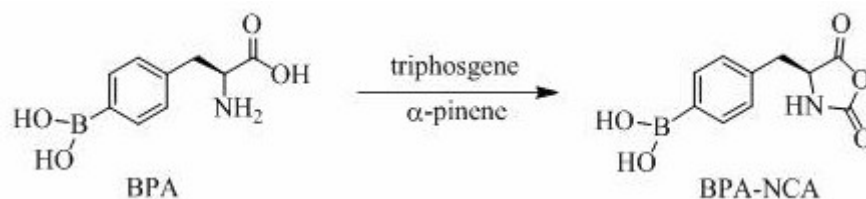
[0026] 图8是Cur、Sor、PBN-Cur、PBN-Sor和PBN-Cur/Sor(Cur: 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Sor: 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )处理的U87 MG-luc细胞凋亡(A)和用Cur和PBN-Cur(Cur: 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )处理的U87 MG-luc细胞的细胞周期阻滞(B)。

[0027] 图9是富含硼-10的 $^{10}\text{BPA-NCA}$ (A)和 $\text{mPEG-P}^{10}\text{BPA}$ 核磁谱图(B)。

### 具体实施方式

[0028] 本发明首次公开了L-4-二羟基硼苯丙氨酸-N-羧基内酸酐,其与顺式1,2或1,3-双羟基化合物以及单糖、多糖、核酸等络合形成可逆的五元或六元环内酯或硼氮配位作用结合,从而构建得到纳米药物或水凝胶等载体,能实现对各种药物的稳定高效包载,形成的硼酸酯键和硼氮配位作用是一种动态作用,在一定条件下(如ROS、低pH)能解离释放出包载的药物,还能与肿瘤细胞表面高表达的唾液酸作用。因此,本发明用于生物传感及药物递送等众多领域。

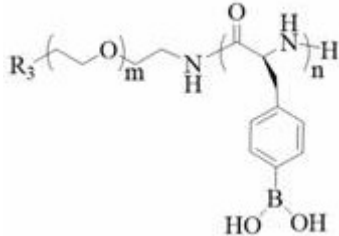
[0029] 上述L-4-二羟基硼苯丙氨酸-N-羧基内酸酐(BPA-NCA)的制备方案可表示如下:



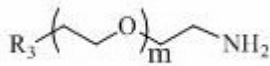
本发明还公开了用线型或支化型聚乙二醇为引发剂引发上述L-4-二羟基硼苯丙

氨酸-*N*-羧基内酸酐单体开环聚合制备的嵌段共聚物(聚乙二醇-聚(L-4-二羟基硼苯丙氨酸)共聚物),其中聚乙二醇的分子量为2000~40000,聚(L-4-二羟基硼苯丙氨酸)的分子量为1000~50000。

[0030] 线型嵌段共聚物通过线型聚乙二醇引发上述L-4-二羟基硼苯丙氨酸-*N*-羧基内酸酐单体开环聚合制备得到化学结构式如下所示:

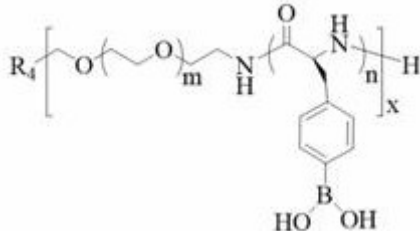


其中,m为70~210,n为5~70;优选的m为90~150,n为10~30; $R_3$ 为聚乙二醇引发剂的末端官能基团,本发明优选聚乙二醇氨引发剂,分子式如下:



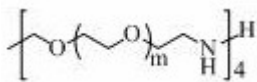
其中, $R_3$ 优选为 $-CH_3$ ,  $\text{CH}_2=\text{CH}_2$ ,  $\text{C}\equiv\text{C}$ ,  $\text{N}$ -或  $\text{O}$  等。

[0031] 支化型聚合物是通过支化型聚乙二醇引发上述L-4-二羟基硼苯丙氨酸-*N*-羧基内酸酐单体开环聚合制备得到,化学结构式如下所示:

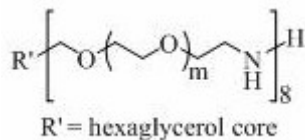


其中,m为20~150,n为2~20,x为2~8;优选的m为50~120,n为4~8,x为4或8; $R_4$ 为支化聚乙二醇引发剂的支化中心,本发明优选现有四臂或八臂聚乙二醇氨为引发剂。

[0032] 四臂聚乙二醇氨:



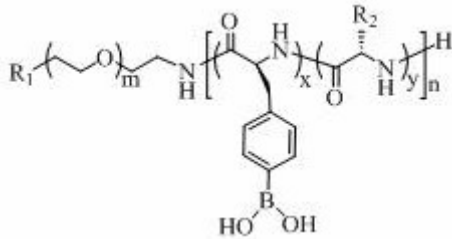
八臂聚乙二醇氨:



本发明还公开了用线型聚乙二醇为引发剂引发上述L-4-二羟基硼苯丙氨酸-*N*-羧基内酸酐单体和其他类型*N*-羧基内酸酐单体无规共聚制备的嵌段共聚物,其中聚乙二醇的分子量为2000~20000,聚(氨基酸-co-L-4-二羟基硼苯丙氨酸)的分子量为1000~50000,



此处的氨基酸指其他类型N-羧基内酸酐单体聚合得到的产物。由线型聚乙二醇为引发剂引发上述L-4-二羟基硼苯丙氨酸-N-羧基内酸酐单体和其他类型N-羧基内酸酐单体无规共聚制备得到嵌段共聚物,化学结构式如下所示:



其中,m为70~210,x为5~30,y为0~15,n为5~45; $R_1$ 为聚乙二醇引发剂的末端官能基团,本发明优选 $\alpha$ -甲氧基- $\omega$ -氨基-聚乙二醇和 $\alpha$ -马来酰亚胺- $\omega$ -氨基-聚乙二醇为引发剂; $R_2$ 为不同类型的氨基酸,本发明优选L-酪氨酸、 $N^{\epsilon}$ -Boc-L-赖氨酸、 $\beta$ -苄基-L-天冬氨酸。

[0033] 上述聚合物的制备过程在有机溶剂如N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、二氯甲烷(DCM)、三氯甲烷、四氢呋喃(THF)中进行,本发明优选N,N-二甲基甲酰胺(DMF)作溶剂;开环聚合的温度为30~90℃,本发明优选聚合温度为80℃;聚合反应时间为1~5天,本发明优选反应时间为3天。

[0034] 本发明的反应,参见图1,采用的原料都是市售产品,具体制备方法以及测试方法都为常规技术,下面结合附图以及实施例对本发明作进一步描述:

#### 实施例一L-4-二羟基硼苯丙氨酸-N-羧基内酸酐(BPA-NCA)的合成

在氮气气体环境下,将L-4-二羟基硼苯丙氨酸(500 mg, 2.39 mmol)和 $\alpha$ -蒎烯(948  $\mu$ L, 5.97 mmol)加入干燥处理的三颈圆底烧瓶中,随后加入无水四氢呋喃(THF, 150 mL),然后再将三光气的THF溶液滴加到上述悬浊液中,反应体系置于55℃的油浴中搅拌均匀,反应5小时后将反应液自然冷却至室温,用砂芯漏斗过滤,再将澄清的下清反应液旋蒸浓缩至10 mL,随后在预冷的石油醚中沉淀得到粗产物;再将粗产物复溶于四氢呋喃,再次沉淀,重复进行3次,得到白色粉末固体,即为L-4-二羟基硼苯丙氨酸-N-羧基内酸酐单体(BPA-NCA,产率: 60%)。BPA-NCA核磁表征见附图2,<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ): 9.09 (s, 1H, -CONH-), 8.03 (s, 2H, -B(OH)<sub>2</sub>), 7.71 and 7.14 (d,  $J = 7.6$  Hz, 4H, -C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-), 4.79 (t,  $J = 5.2$  Hz, 1H, -COCHNH-), 3.03 (d,  $J = 5.2$  Hz, 2H, -C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>-); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ): 171.27, 152.09, 137.05, 134.67, 133.31, 129.19, 58.62, 36.81. BPA-NCA的元素分析为: C, 53.19; H, 4.85; N, 5.53(理论: C, 51.11; H, 4.29; N, 5.96);质谱: MS (m/z): 235.1(理论: 235.1)。

#### [0035] 实施例二嵌段共聚物PEG-PBPA的制备

本发明以末端为氨基的聚乙二醇为引发剂引发L-4-二羟基硼苯丙氨酸-N-羧基内酸酐开环聚合,通过调节聚乙二醇与L-4-二羟基硼苯丙氨酸-N-羧基内酸酐的摩尔比可制备得到不同链长的聚合物PEG-PBPA(表1)。以合成PEG-PBPA( $M_n = 5.0$ -4.0 kg/mol)为例:在氮气氛围下,将PEG-NH<sub>2</sub>(0.25 g, 0.05 mmol)的DMF溶液加入到密闭反应器中,在搅拌的条件下将BPA-NCA(0.25 g, 1.06 mmol)的DMF溶液加入密闭反应器,在80℃的恒温油浴中反应3天(红外谱图中对应的BPA-NCA单体的羰基伸缩峰1770  $\text{cm}^{-1}$ 和1845  $\text{cm}^{-1}$ 完全消失,表

明聚合完全)。反应结束后,聚合物溶液用冰的无水乙醚沉淀、离心,接着用甲醇复溶,重复沉淀3次,收集固体沉淀并真空干燥48小时,得到白色固体产物,产率:81%。PEG-PBPA嵌段共聚物的核磁表征见附图2。 $^1\text{H NMR}$  ( $\text{DMSO}-d_6/\text{CD}_3\text{OD}$  ( $v/v = 2/1$ ), 400 MHz,  $\delta$ ): 7.68 and 7.22 ( $-\text{C}_6\text{H}_4\text{B}(\text{OH})_2$ ), 4.49 ( $-\text{COCHNH}-$ ), 3.51 ( $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ ), 2.96-2.78 ( $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2-$ )。

[0036] 同样,以4/8臂PEG-NH<sub>2</sub>为引发剂合成了基于BPA的支化型聚合物。例如,将溶解在无水DMF中的四臂PEG-NH<sub>2</sub> (1.32 g, 0.066 mmol) 在氮气气氛下添加到BPA-NCA (0.250 g, 1.06 mmol) 溶液中,反应在80℃下进行24小时。反应结束后,聚合物溶液用冰的无水乙醚沉淀、离心,接着用甲醇复溶,重复沉淀3次,收集固体沉淀并真空干燥48小时,得到4-arm-PEG-PBPA ( $M_n = 20.0-3.0$  kg/mol)。 $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6/\text{CD}_3\text{OD}$  ( $v/v = 2/1$ ),  $\delta$ ): 7.68 and 7.22 ( $-\text{C}_6\text{H}_4\text{B}(\text{OH})_2$ ), 4.50 ( $-\text{COCHNH}-$ ), 3.51 ( $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ ), 2.98-2.74 ( $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2-$ ); 同样方法,采用八臂PEG-NH<sub>2</sub>得到8-arm-PEG-PBPA ( $M_n = 20.0-12.0$  kg/mol),  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6/\text{CD}_3\text{OD}$  ( $v/v = 2/1$ ),  $\delta$ ): 7.68 and 7.22 ( $-\text{C}_6\text{H}_4\text{B}(\text{OH})_2$ ), 4.50 ( $-\text{COCHNH}-$ ), 3.51 ( $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ ), 2.98-2.74 ( $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2-$ )。

表 1 不同分子量的 PEG-PBPA

聚合物	$M_n$ (kg/mol)			$M_w/M_n$	收率(%)
	理论	$^1\text{H NMR}^a$	GPC <sup>b</sup>		
PEG-PBPA	5.0-3.0	5.0-2.9	8.1	1.26	83%
PEG-PBPA	5.0-4.0	5.0-3.7	9.3	1.26	81%
PEG-PBPA	5.0-5.0	5.0-5.1	12.0	1.33	85%
Mal-PEG-PBPA	5.0-4.0	5.0-3.8	9.1	1.29	79%
4-arm-PEG-PBPA	20.0-3.0	20.0-2.7	23.2	1.05	92%
8-arm-PEG-PBPA	20.0-3.0	20.0-2.8	23.7	1.12	89%
8-arm-PEG-PBPA	20.0-12.0	20.0-11.6	33.1	1.22	88%

<sup>a</sup>通过 $^1\text{H NMR}$ 计算; <sup>b</sup>通过GPC测定 (标准参照物: PMMA, 流动相: DMF, 流速: 1.0 mL/min)。

表 2 PEG-PBPA 的溶解性

组别	聚合物分子量	CH <sub>3</sub> OH	DMF	DMSO	CHCl <sub>3</sub>	PEG350
1	mPEG <sub>5k</sub> -PBPA <sub>5k</sub>	++	-	-	-	+
2	mPEG <sub>5k</sub> -PBPA <sub>4k</sub>	+++	++	++	-	++
3	mPEG <sub>5k</sub> -PBPA <sub>3k</sub>	+++	+++	+++	-	+++
4	Mal-PEG <sub>5k</sub> -PBPA <sub>4k</sub>	+++	-	-	-	++

+++ : 非常好溶解; ++ : 好溶解; + : 一定条件下可溶解; - : 不溶。

[0037] 实施例三嵌段共聚物PEG-P(Tyr-co-BPA)、PEG-P(Lys-co-BPA)以及PEG-P(BLA-co-BPA)等的合成

本发明以线型聚乙二醇为引发剂引发上述L-4-二羟基硼苯丙氨酸-N-羧基内酸酐单体和其他类型N-羧基内酸酐单体(如Tyr-NCA、Lys(Boc)-NCA以及BLA-NCA等)无规共聚得到具有不同分子结构、不同亲疏水性、不同电荷和不同功能基团的苯硼酸基聚多肽材料(表3)。以合成PEG-P(Tyr-co-BPA) ( $M_n = 5.0-1.0-4.0$  kg/mol)为例:用甲氧基聚乙二醇氨为引发剂,在氮气环境下将PEG-NH<sub>2</sub>(0.25 g, 1.06 mmol)的DMF溶液加到Tyr-NCA(0.121 g, 0.396 mmol)和BPA-NCA(0.25 g, 1.06 mmol)的DMF溶液中,然后在80°C下反应3天。反应结束后,聚合物溶液用冰的无水乙醚沉淀、离心,接着用甲醇复溶,重复沉淀3次,收集固体沉淀并真空干燥48小时,得到灰白色产物,产率:78%。PEG-P(Tyr-co-BPA)嵌段共聚物的核磁表征见附图3。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>/CD<sub>3</sub>OD (v/v = 2/1), 400 MHz, δ): 7.68 and 7.22 (-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>B(OH)<sub>2</sub>), 6.95 and 6.61 (-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>OH), 4.47 and 4.37 (-COCHNH-), 3.52 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-), 2.82-2.63 (-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>-)。

[0038] PEG-P(Lys(Boc)-co-BPA)、PEG-P(BLA-co-BPA)以及4-arm-PEG-PBPA的合成同样遵循上述操作流程,PEG-P(Lys(Boc)-co-BPA)在三氟乙酸中脱保护后得到PEG-P(Lys-co-BPA)。

表 3 BPA-NCA 单体与其他类型 N-羧基内酸酐单体共聚合

聚合物	$M_n$ (kg/mol)			$M_w/M_n$	收率 (%)
	理论	<sup>1</sup> H NMR <sup>a</sup>	GPC <sup>b</sup>		
PEG-P(Tyr-co-BPA)	5.0-1.0-4.0	5.0-1.0-3.8	11.0	1.20	78%
PEG-P(Tyr-co-BPA)	5.0-2.0-3.0	5.0-1.8-2.8	10.7	1.25	75%
PEG-P(Tyr-co-BPA)	5.0-3.0-2.0	5.0-2.7-1.9	10.4	1.23	75%
PEG-P(BLA-co-BPA)	5.0-2.0-4.0	5.0-1.2-2.9	8.3	1.30	61%
PEG-P(Lys(Boc)-co-BPA)	5.0-1.5-4.0	5.0-1.6-4.1	11.2	1.27	79%
Mal-PEG-P(Tyr-co-BPA)	5.0-1.5-4.0	5.0-1.0-4.2	10.9	1.28	80%

<sup>a</sup>通过<sup>1</sup>H NMR计算; <sup>b</sup>通过GPC测定(标准参照物: PMMA, 流动相: DMF, 流速: 1.0 mL/min)。

[0039] 实施例四 ApoE修饰的PEG-PBPA聚合物(ApoE-PEG-PBPA)的合成

参照上述方法,本发明以马来酰亚胺修饰的聚乙二醇为引发剂引发上述L-4-二羟基硼苯丙氨酸-N-羧基内酸酐单体和/或其他类型N-羧基内酸酐单体得到(Mal-PEG-PBA或Mal-PEG-P(BPA-co-Tyr))等嵌段聚合物,然后其PEG末端可化学偶联ApoE、Angiopep-2、cRGD等特异性靶向分子。以合成ApoE-PEG-PBPA为例:在氮气氛围下,将Mal-PEG-PBPA(100 mg, 0.011 mmol)和ApoE肽(30.7 mg, 0.013 mmol)溶解在除氧的DMSO/CH<sub>3</sub>OH(v/v = 9/1, 0.1 mL)中,在37°C下反应24小时,得到聚多肽溶液。反应结束后,将聚多肽溶液置于DMSO/CH<sub>3</sub>OH中透析24小时,接着置于二次水中透析以置换有机溶剂,最后冻干后得到白色固体产物

ApoE-PEG-PBPA, 产率:78%。ApoE-PEG-PBPA嵌段共聚物的核磁表征见附图4A。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>/CD<sub>3</sub>OD (v/v = 2/1),  $\delta$ ): 7.68 and 7.22 (-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>B(OH)<sub>2</sub>), 4.49 (-COCHNH-), 3.51 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-), 2.98-2.74 (-CH<sub>2</sub>NH-), 0.78-2.41 (ApoE)。通过9,10-菲醌法测得ApoE的接枝效率为92%。同样地,在聚合物末端可修饰葡萄糖分子,附图4B为修饰了葡萄糖的聚合物核磁谱图,产率:82%。通过核磁可以算出大约有3.6个葡萄糖修饰到聚合物4-arm-PEG-PBPA上。

[0040] 实施例五 PEG-PBPA聚合物胶束(PBN)装载姜黄素和甲苯磺酸索拉非尼及体外释放

将聚合物PEG-PBPA ( $M_n = 5.0-4.0$  kg/mol)、药物姜黄素(Cur)、甲苯磺酸索拉非尼(Sor)分别溶解在DMSO溶液中,并按一定的量混合后滴加到搅拌状态的HEPES、PB缓冲溶液或超纯水中,然后用截留分子量为7000的透析袋透析除去有机溶剂和游离药物,透析过程在pH = 7.4的HEPES、PB缓冲液或纯水中进行(表4)。以共包载Cur和Sor(理论载药量均为10 wt%)为例:取10  $\mu$ L溶解好的PEG-PBPA聚合物溶液(100 mg/mL)、5.55  $\mu$ L的Cur溶液和5.55  $\mu$ L的Sor溶液充分混合后,滴加到979  $\mu$ L的HEPES缓冲溶液中,并在HEPES缓冲溶液中透析以除去有机溶剂和未包载的药物。最终,通过动态光散射粒度分析仪(DLS)测得聚合物胶束的尺寸为95 nm,粒径分布较窄( $< 0.2$ )。通过HPLC测得Cur和Sor的实际载药量分别达到7.8 wt%和9.8 wt%。而且,该聚合物胶束在高倍稀释(50倍)、10%的胎牛血清(FBS)以及4  $^{\circ}$ C长期放置条件下均具有良好的稳定性。

表 4 PBN-Cur、PBN-Sor 和 PBN-Cur/Sor 的表征

胶束	Cur/Sor (wt%)		DLE <sup>a</sup> (%)	Size <sup>b</sup> (nm)	PDI <sup>b</sup>	$\zeta$ <sup>c</sup> (mV)	自组装 溶剂
	Theo.	Deter. <sup>a</sup>					
PBN-Cur	5/0	3.9/0	76.2/-	90	0.06	-6.5	HEPES
PBN-Cur	10/0	7.9/0	76.8/-	102	0.12	-6.1	HEPES
PBN-Sor	0/10	0/8.3	-81.1	103	0.08	-7.6	HEPES
PBN-Sor	0/20	0/18.4	-88.6	112	0.05	-7.0	HEPES
PBN-Sor	0/30	0/26.7	-85.0	121	0.08	-6.8	HEPES
PBN-Cur/Sor	10/5	7.4/4.7	72.2/94.2	94	0.07	-6.5	HEPES
PBN-Cur/Sor	10/10	7.8/9.7	76.1/96.3	95	0.06	-6.7	HEPES
PBN-Cur/Sor	10/20	7.6/19.2	76.1/95.4	96	0.08	-6.6	HEPES
PBN-Cur/Sor	10/30	8.1/29.2	79.8/96.1	101	0.03	-6.2	HEPES

<sup>a</sup>高效液相色谱法测定; <sup>b</sup>DLS测定(1.0 mg/mL, 25 $^{\circ}$ C, n = 3); <sup>c</sup>HEPES缓冲液(1.0 mg/mL, 25 $^{\circ}$ C, n = 3)电泳测定。

[0041] Cur和Sor的体外释放实验是在37 $^{\circ}$ C, 200 rpm的恒温摇床中进行的。具体地,将1.0 mL的PBN-Cur/Sor (Cur和Sor载药量为10 wt%)胶束溶液转移到释放袋(MWCO = 12-14 KD)中,并浸没在25.0 mL不同条件的释放介质(pH 7.4、100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)中,在预定时间点吸取5.0

mL释放介质并补充等体积的新鲜释放介质,待所有样品冷冻冻干后用0.3 mL的乙腈复溶,通过HPLC测定Cur和Sor的含量。附图5D为Cur和Sor累积释放量与时间的关系,从图中可以看出载药胶束能通过扩散作用释放药物。

#### [0042] 实施例六 MTT法测试空聚合物胶束和载药胶束的细胞毒性

通过MTT法评价空聚合物胶束PBN对肿瘤细胞(B16F10细胞、U87 MG-luc细胞)和正常鼠成纤维细胞(L929细胞)的毒性。具体为:将细胞铺到96孔板(80  $\mu$ L,  $5 \times 10^3$ 个细胞/孔)中,在37 $^{\circ}$ C培养箱中孵育24小时,随后向每个孔加入20  $\mu$ L不同浓度梯度的PBN胶束溶液,使孔内最终浓度为0.05、0.1、0.2、0.5、0.75和1.0 mg/mL。共孵育48小时后,向每孔再加入10  $\mu$ L浓度为5.0 mg/mL的MTT溶液继续培养4小时,除去孔内培养基并加入150  $\mu$ L的DMSO溶解MTT与活细胞作用产生的紫色甲瓞结晶,最后通过多功能酶标仪测定孔板中每孔在570 nm处的吸光值。细胞存活率通过各样品组吸光值与空白对照组的比值测定,其中空白对照组是加入等体积的PBS。每组设定5个平行孔。附图6A为聚合物PEG-PBPA ( $M_n = 5.0-4.0$  kg/mol)自组装形成的胶束对B16F10、U87 MG-luc和L929和的细胞毒性结果,可看出,当聚合物胶束的浓度从0.1增到1.0 mg/mL时,所有组别细胞的存活率仍高于80%,说明该聚合物胶束具有良好的生物相容性。

[0043] 研究实施例五的载药胶束(PBN-Cur、PBN-Sor和PBN-Cur/Sor)对U87 MG-luc细胞的毒性,细胞培养操作同上述一致。当加入不同梯度浓度的PBN-Cur、PBN-Sor(Cur或Sor终浓度为0.01、0.1、0.5、1、2、4、6、8和10  $\mu$ g/mL)以及不同药物比的PBN-Cur/Sor胶束溶液与细胞共孵育48小时后加入MTT,处理和测定吸光度同上述一致。实验结果参见附图6B&C,图中结果显示出Cur和Sor均表现出一定的杀伤效果,PBN-Cur和PBN-Sor相比于自由药,杀伤效果有提升。对于两种药物共同作用于U87 MG-luc,当两种药物的质量比为1/1时,对肿瘤细胞的协同效果( $CI = C_{CA}/C_A + C_{CB}/C_B$ ;  $C_{CA}$ :联用药物A、B时A的 $IC_{50}$ 浓度、 $C_{CB}$ :联用药物A、B时B的 $IC_{50}$ 浓度、 $C_A$ 和 $C_B$ 分别为A和B的 $IC_{50}$ 浓度)最为显著,其半数致死浓度( $IC_{50}$ )为1.47  $\mu$ g/mL。说明本发明的胶束具有很好的递送Cur和Sor的能力,并实现有效的释放,最终杀死肿瘤细胞。

[0044] 此外,细胞克隆形成实验对PBN-Cur、PBN-Sor以及PBN-Cur/Sor的细胞毒性进行验证。具体步骤为:将U87 MG-luc细胞( $2 \times 10^5$ 个细胞/孔)接种于6孔板内,培养24小时后分别加入Cur、Sor、PBN-Cur、PBN-Sor以及PBN-Cur/Sor(Cur: 1.5  $\mu$ g/mL, Sor: 1.5  $\mu$ g/mL, Cur/Sor: 1.5/1.5  $\mu$ g/mL)共孵育48小时。随后用胰酶消化细胞,将各样品组细胞(300个细胞/孔)重新接种于6孔板内,放置在细胞培养箱中培养9天,期间每隔三天更换一次培养基。最后吸去培养基,PBS浸洗2次后用4%多聚甲醛溶液固定细胞15分钟,接着用结晶紫染色液对孔内细胞进行染色,最后缓慢洗去结晶紫并空气干燥。从图6D可以看出,PBN-Cur(Cur: 1.5  $\mu$ g/mL)和PBN-Sor(Sor: 1.5  $\mu$ g/mL)均具有一定的长期抑制肿瘤细胞增殖效果,且PBN-Sor组的抑制效果要略微优于PBN-Cur组,双药联用的PBN-Cur/Sor组具有最优异的抑制效果,这一结果与MTT实验结果具有一致性。

#### [0045] 实施例七载药胶束的溶血结果

本实验以去离子水作阳性对照,0.9% NaCl为阴性对照,研究了Cur、Sor、PBN-Cur、PBN-Sor、PBN-Cur/Sor(低)和PBN-Cur/Sor(高)的溶血情况(图7A)。药物浓度设置为50  $\mu$ g/mL,PBN-Cur/Sor(高;Cur: 110  $\mu$ g/mL,Sor: 110  $\mu$ g/mL)组除外。图7B的结果显示出,游离

Sor具有明显的血液毒性,在50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度下诱导约45%的溶血率,而相同浓度下的纳米药物PBN-Sor仅表现出轻微的溶血(HR为4.3%)。此外,低浓度(Cur: 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; Sor: 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )和高浓度的PBN-Cur/Sor也显示出优越的血液相容性,HR约为2.3%,可为同时静脉注射Cur和Sor提供有效策略。

#### [0046] 实施例八载药胶束的细胞凋亡和细胞克隆实验

本发明采用Annexin V-FITC/Propidium iodine (PI) 双染技术,利用流式细胞仪研究Cur、Sor、PBN-Cur、PBN-Sor以及PBN-Cur/Sor对U87 MG-luc细胞的凋亡效果。具体地,取对数生长期的U87 MG-luc细胞( $2 \times 10^5$ 个细胞/孔)接种于6孔板中,置于培养箱中培养过夜,每孔加入Cur、Sor、PBN-Cur、PBN-Sor或PBN-Cur/Sor(Cur: 1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Sor: 1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Cur/Sor: 1.5/1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )共孵育48小时,随后弃去培养基并用PBS洗涤2次,加入胰酶(不含EDTA)消化细胞后离心收集,用4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的PBS洗涤2次后加入100  $\mu\text{L}$ 结合缓冲液(binding buffer)进行细胞重悬( $1 \times 10^6$ 个细胞/mL),取100  $\mu\text{L}$ 细胞悬液转入流式管,并依次加入5  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC染液和10  $\mu\text{L}$  PI染液,混合均匀后于室温下避光染色15分钟,最后补加400  $\mu\text{L}$  PBS,混合均匀后用流式细胞仪检测细胞处于各个凋亡阶段的百分数。对照组的双染样品处理步骤同样品组。另外,早凋样品的制备是将细胞放入50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中处理5分钟,晚凋样品的制备是加入4%多聚甲醛处理5分钟。所有数据均使用Flowjo软件进行分析。附图8A可知,PBN-Cur/Sor处理引起了超过50%的凋亡,明显高于PBN-Cur(7.1%)、PBN-Sor(23.4%)、Cur(6.8%)和Sor(21.5%)。

[0047] 此外,据文献报道Cur具有抑制细胞周期的能力,因此PBN-Cur对于U87 MG-luc细胞的细胞周期阻滞能力也进行了相应地测试。具体地,将U87 MG-luc细胞( $2 \times 10^5$ 个细胞/孔)接种于6孔板内,孵育24小时后将Cur或PBN-Cur(Cur: 1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )加入再孵育24小时。接着用胰酶消化并收集细胞,用4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的PBS洗涤细胞3次,最终使细胞分散在1.0 mL的PBS中,将细胞悬液滴加到4.0 mL匀速震荡的95%乙醇中,4 $^{\circ}\text{C}$ 固定24小时,随后用细胞周期试剂盒染色30分钟,并通过流式细胞仪进行细胞周期检测。从图8B中可知,PBS组多数处于G1期(67.28%),S期细胞只有23.98%,G2/M期含量仅为8.74%,而Cur和PBN-Cur对U87 MG-luc细胞的周期阻滞情况优于PBS组,且PBN-Cur组较Cur组有略微提升。

#### [0048] 实施例八富含硼-10的 $^{10}\text{BPA-NCA}$ 和 $\text{mPEG-P}^{10}\text{BPA}$ 的合成

$^{10}\text{BPA-NCA}$ 的合成和 $\text{mPEG-P}^{10}\text{BPA}$ 的合成分别遵循实施例一和实施例二。唯一不同是在单体合成过程中,使用的是富含硼-10的BPA,图9A&B为其表征。 $^{10}\text{BPA-NCA}$ 的 $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$ ): 9.09 (s, 1H), 8.03 (s, 2H), 7.71 (d,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 7.14 (d,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 4.79 (t,  $J = 5.2$  Hz, 1H), 3.03 (d,  $J = 5.2$  Hz, 2H)。 $\text{mPEG-P}^{10}\text{BPA}$ 的 $^1\text{H NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6/\text{CD}_3\text{OD}$  (v/v = 2/1), 400 MHz,  $\delta$ ): 7.68 ( $-\text{C}_6\text{H}_2\text{B}(\text{OH})_2$ ), 7.22 ( $-\text{C}_6\text{H}_2\text{CH}_2-$ ), 4.49 ( $-\text{COCHNH}-$ ), 3.51 ( $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ ), 3.26-2.85 ( $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2-$ )。

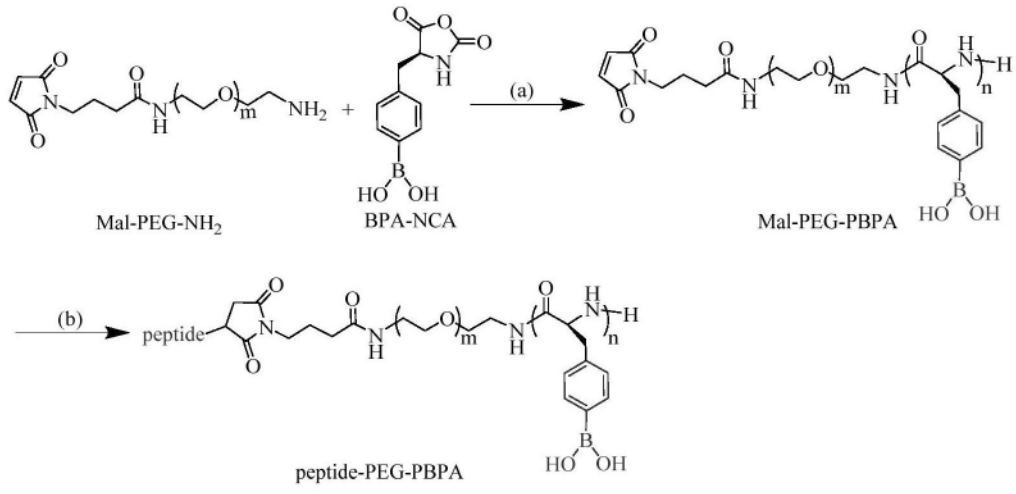
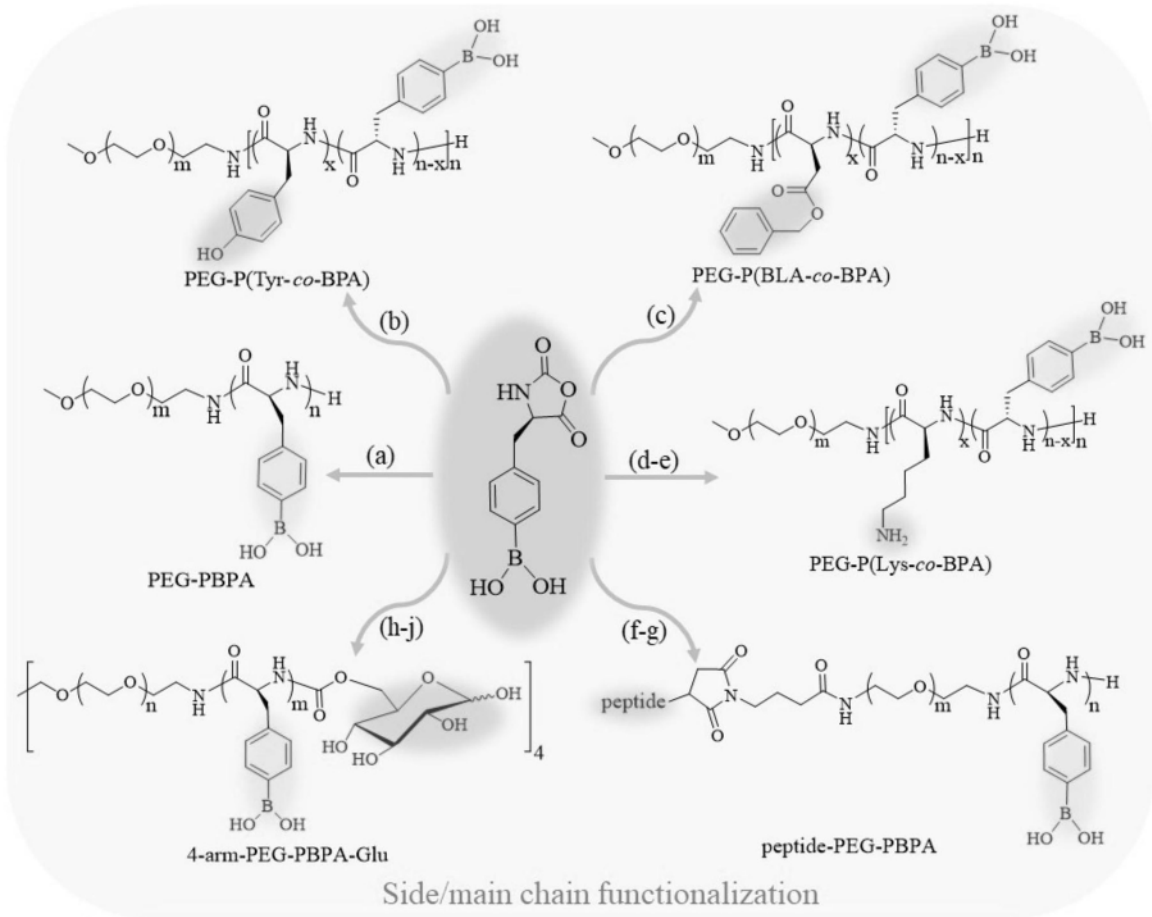


图1

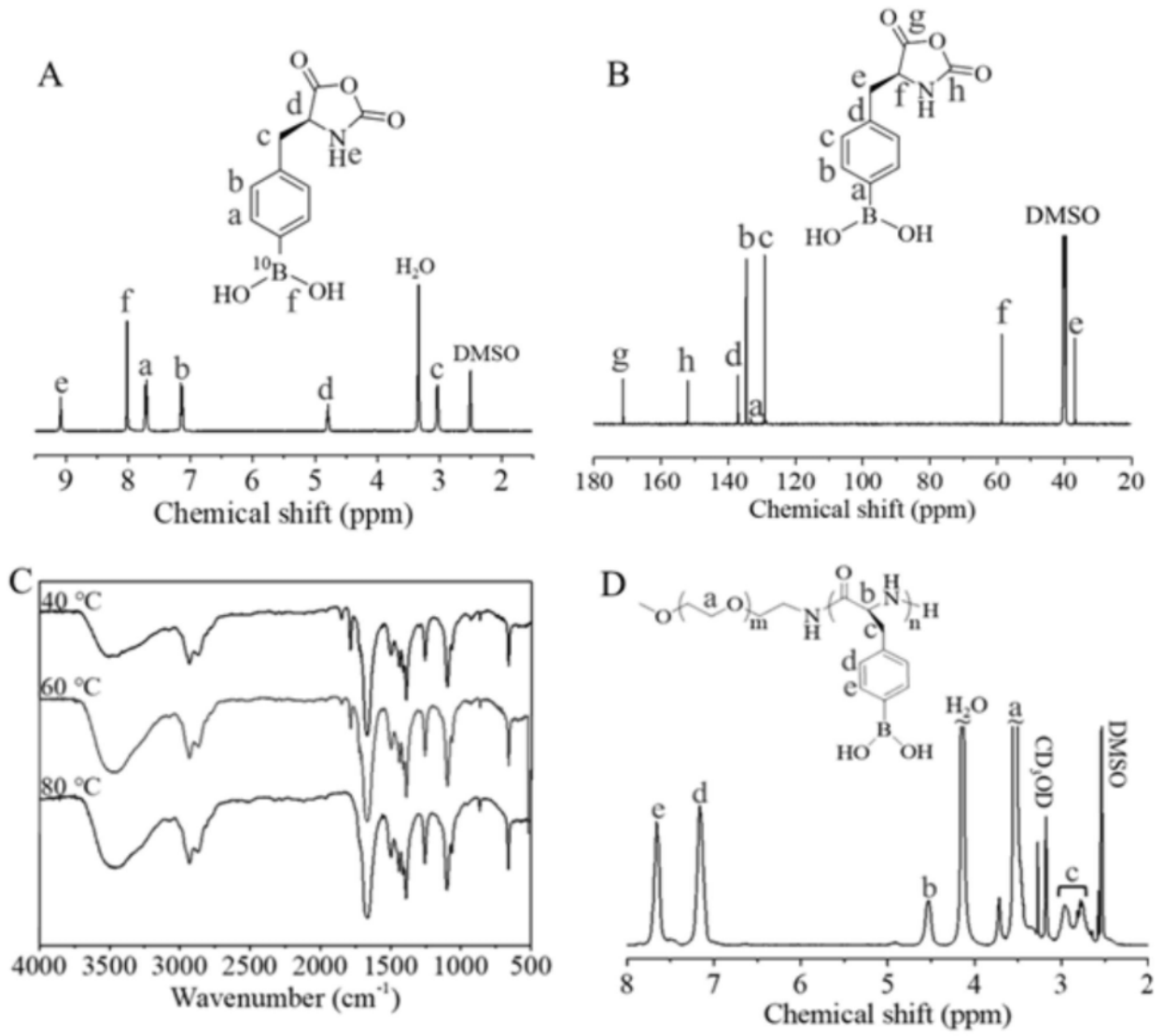


图2



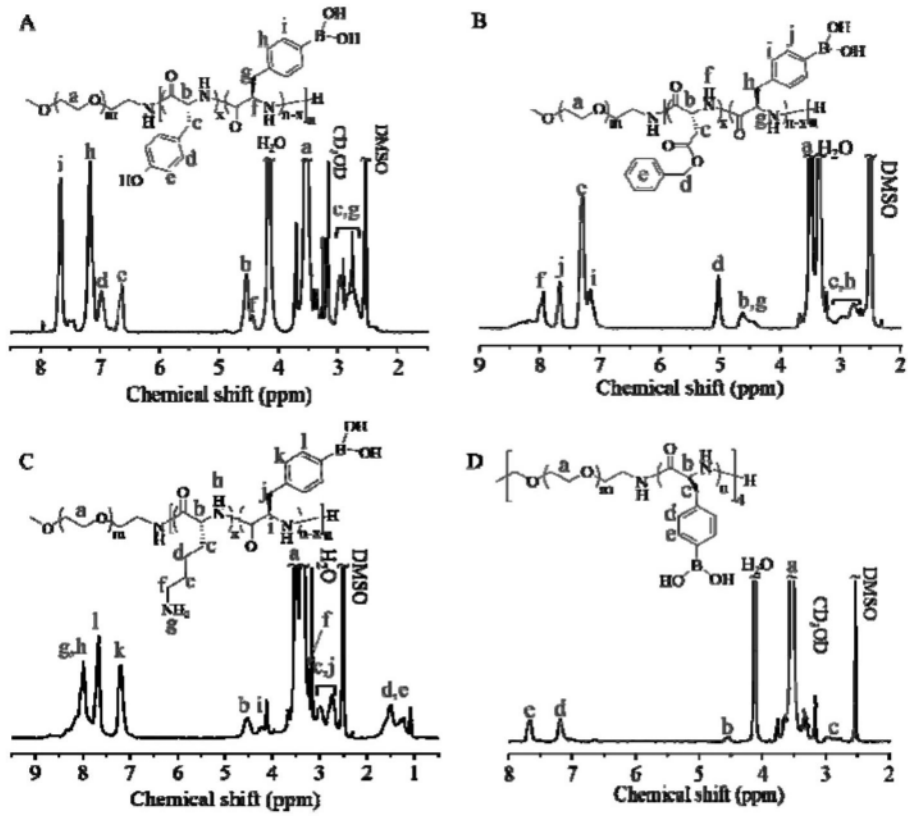


图3

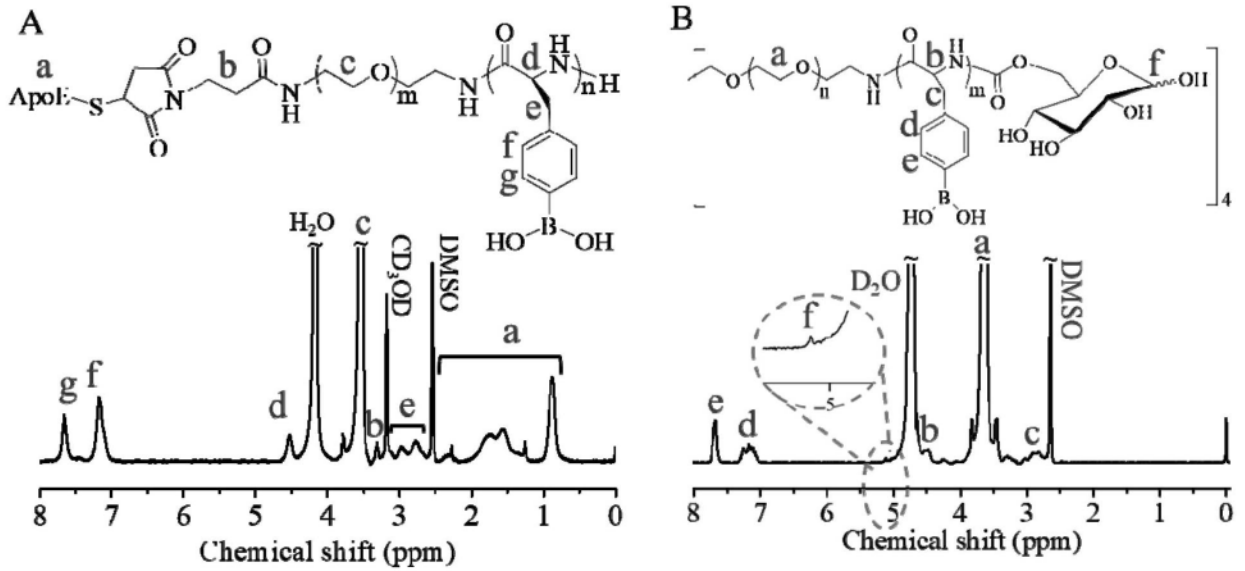


图4

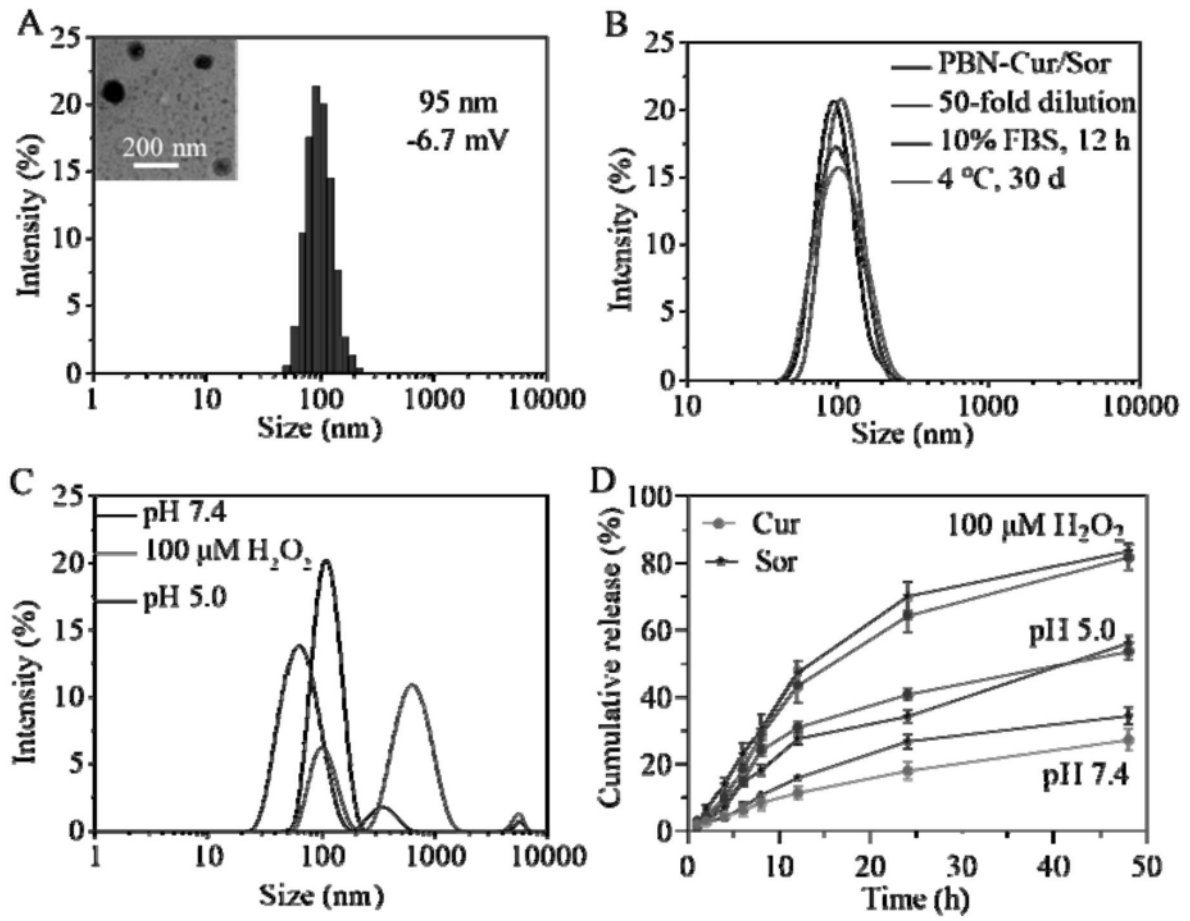


图5

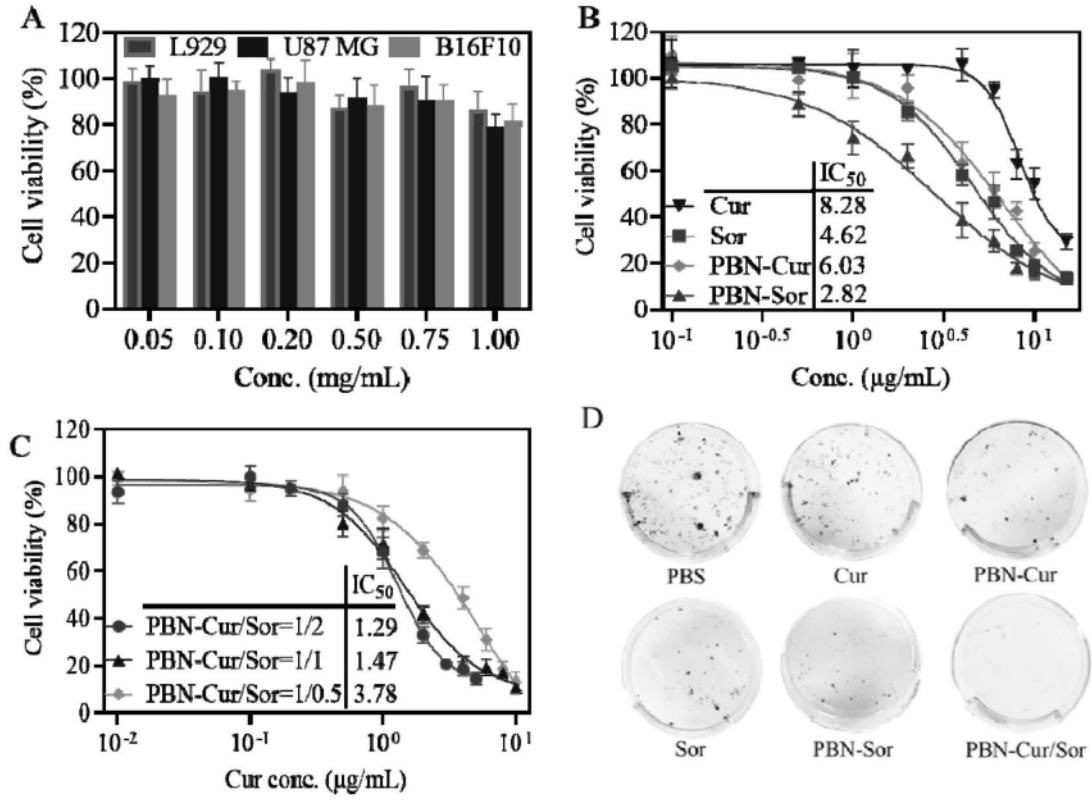


图6

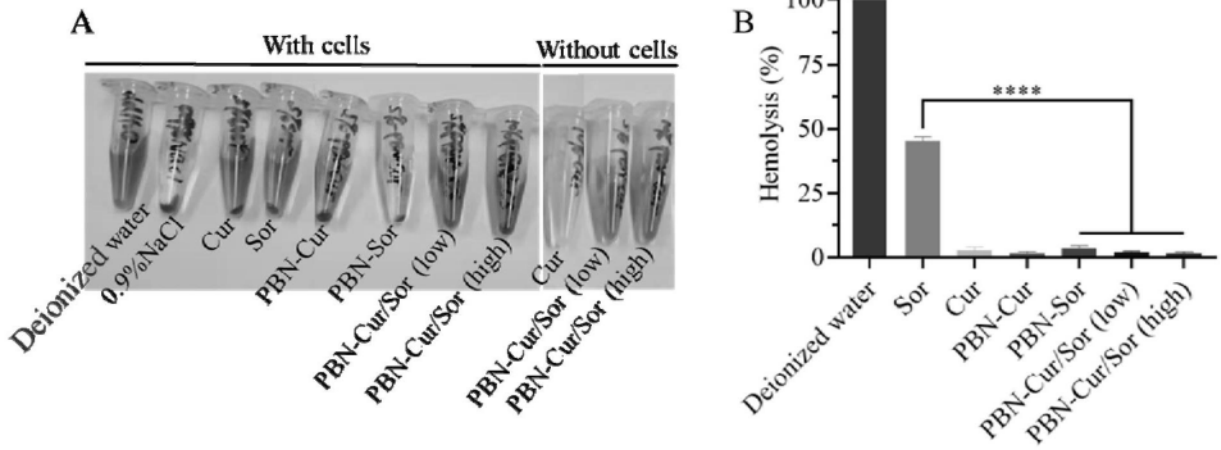


图7

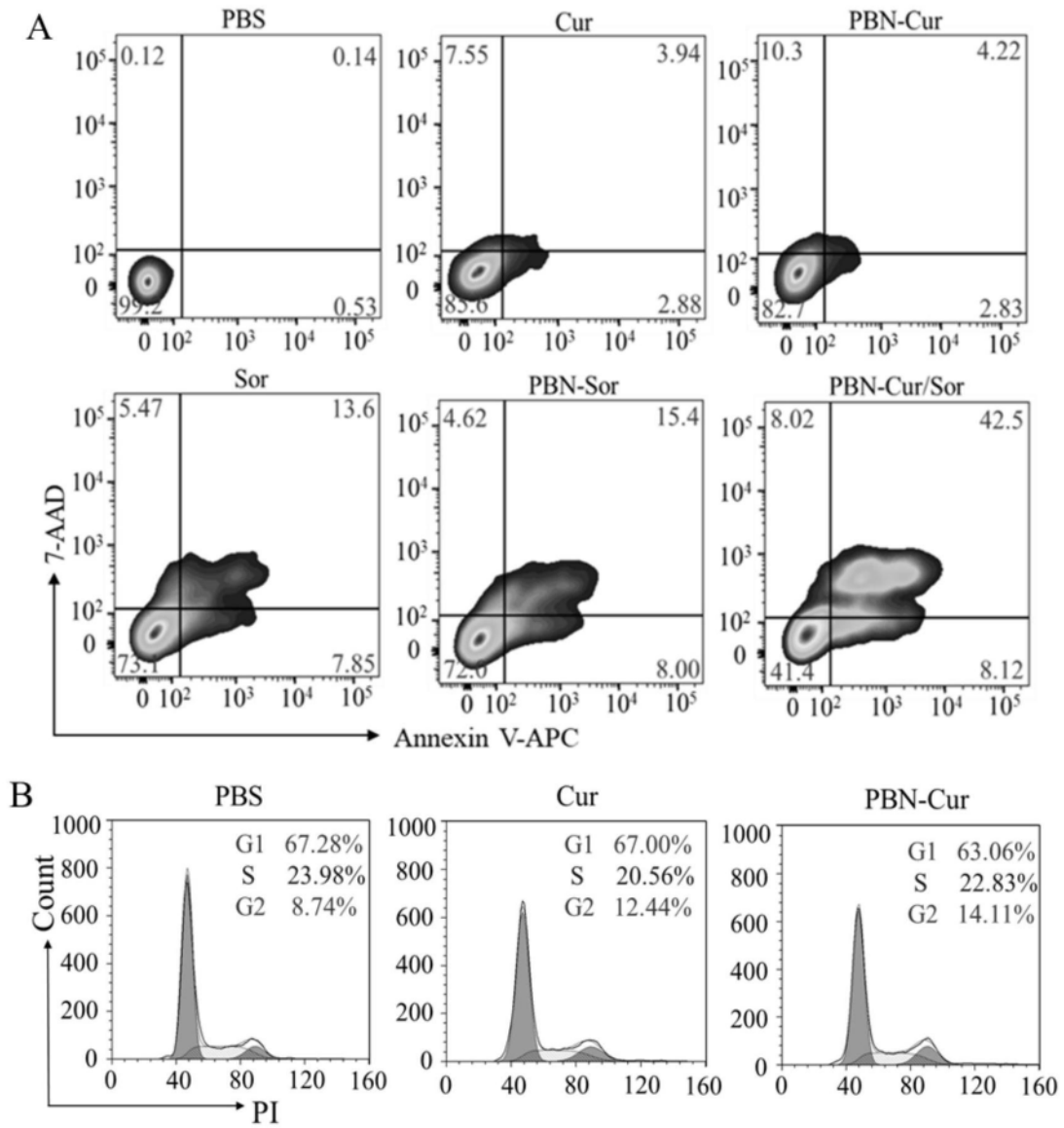


图8

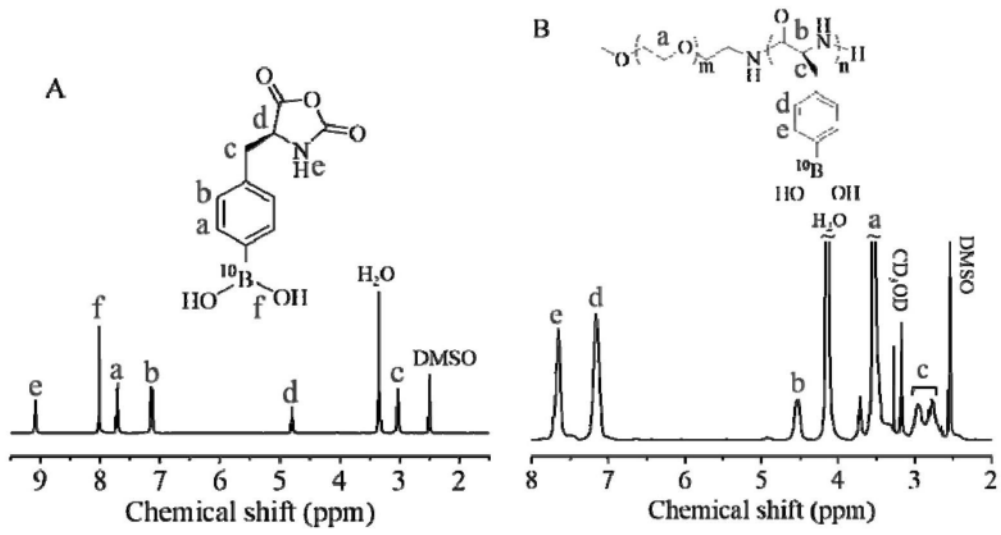


图9