



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105012234 B

(45)授权公告日 2018.10.16

(21)申请号 201510216062.0

A61P 39/06(2006.01)

(22)申请日 2015.04.30

A61P 31/04(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

A61P 37/02(2006.01)

申请公布号 CN 105012234 A

A61P 3/06(2006.01)

A61P 9/10(2006.01)

(43)申请公布日 2015.11.04

A61P 25/28(2006.01)

(73)专利权人 烟台大学

(56)对比文件

地址 264005 山东省烟台市莱山区清泉路
30号

CN 103772686 A,2014.05.07,

CN 104415029 A,2015.03.18,

(72)发明人 许卉 刘卉 刘珂 江云霞

KR 10-2008-0019787 A,2008.03.05,

李晨晨.一种新型载姜黄素mPEG-PCL-Phe

(51)Int.Cl.

A61K 9/107(2006.01)

A61K 31/12(2006.01)

A61K 47/34(2017.01)

A61K 47/10(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(Boc)胶束的制备及性能评价.《中国优秀硕士学位论文全文数据库 医药卫生科技辑》.2014,(第9期),

审查员 武波

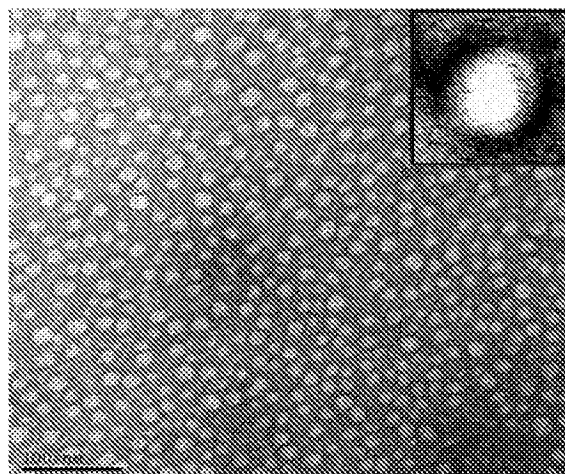
权利要求书1页 说明书10页 附图3页

(54)发明名称

一种二甲氧基姜黄素聚合物胶束及其制备方法
与医药用途

(57)摘要

本发明涉及一种二甲氧基姜黄素聚合物胶束及其制备方法、以及该聚合物胶束的注射或口服给药系统与医药用途。该载药胶束以两亲性嵌段共聚物作为载体材料,在水溶液中经自组装自发形成典型的核-壳结构,粒径分布均匀,二甲氧基姜黄素在水性介质中的溶解度和热力学稳定性显著提高,且有效降低其在体内的渗漏、降解和代谢,实现了长循环和肿瘤组织被动靶向,从而提高药效和安全性。根据临床适应症的具体需要,本发明所提供的载药胶束可制成冻干粉等制剂,注射或口服途径使用,用于抗肿瘤、抗氧化、抗炎、抗菌、抗衰老、免疫调节、降血脂、抗动脉粥样硬化、抗老年痴呆等,特别适用于与肿瘤放疗或化疗药物联用,发挥增敏、增效、减毒的作用。



1. 一种二甲氧基姜黄素聚合物胶束载药系统与盐酸多柔比星脂质体注射液联用在制备治疗抗肿瘤药物中的应用,对肿瘤临床放疗和化疗所致心脏毒性的机体损伤进行预防和治疗,发挥增敏、增效、减毒的作用,

其中,所述二甲氧基姜黄素聚合物胶束载药系统以包括疏水链段和亲水链段的两亲性嵌段共聚物为基础载体材料,所述二甲氧基姜黄素与所述基础载体材料的重量比为1:99~30:70,

所述基础载体材料为亲水嵌段A与疏水嵌段B的重量比为3:7~7:3的AB型两嵌段共聚物,亲水嵌段A为数均分子量在750~5000间的聚乙二醇或聚乙二醇单甲醚,疏水嵌段B为数均分子量在1000~50000间的聚丙交酯、聚乙交酯、聚乙丙交酯、聚己内酯、聚碳酸酯、聚二氧环己酮中的任意一种,并采用疏水性基团BOC-苯丙氨酸封端修饰,二甲氧基姜黄素被包载于胶束的疏水内核中,所得载药胶束平均粒径为10nm~100nm,多分散系数PDI<0.1。

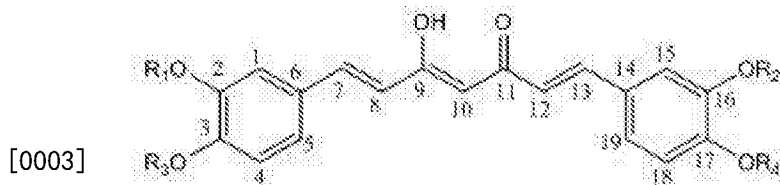
一种二甲氧基姜黄素聚合物胶束及其制备方法与医药用途

技术领域

[0001] 本发明属于纳米医药技术领域,涉及一种二甲氧基姜黄素聚合物胶束及其制备方法与医药用途。

背景技术

[0002] 天然产物始终是药物发现和开发的重要源泉【Newman JD, Cragg MG. Natural products as sources of new drug over the last 25 years. *J Nat Prod* 70 (2007) 461.】。姜黄素(Turmeric)是一种来源于姜黄、郁金、莪术等姜科植物根茎的天然黄色素,在印度等东南亚地区被广泛用作调味品,其在传统医学中的应用历史也十分悠久,药效主要归功于姜黄素类化合物(Curcuminoid)【Sharma RA, *et al.* Curcumin: the story so far. *Eur J Cancer* 41 (2005): 1955.】。



姜黄素 $R_1=R_2=-CH_3, R_3=R_4=-H$

二甲氧基姜黄素 $R_1=R_2=R_3=R_4=-CH_3$

[0004] 在化学结构上,姜黄素类化合物是由 β -二酮连接的二阿魏酰基衍生物,其中的 β -二酮结构存在烯醇-酮互变异构,在固态和溶液中主要以烯醇式存在,并具有显著的还原性,是一种良好的天然抗氧化剂【Heger M, *et al.* The molecular basis for the pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin and its metabolites in relation to cancer. *Pharmacol Rev* 66 (2014): 222.】。以抗氧化作用为基础,天然姜黄素具有广泛的生理活性,如抗炎、抗菌、抗凝、利胆、抗肿瘤、降血脂、抗动脉粥样硬化,以及对神经退行性疾病的有效干预等,是姜黄属中药行气破血、消积止痛、清心解郁的重要功效成分【Kuttan R, *et al.* Potential anticancer activity of turmeric (*Curcuma longa*). *Cancer Lett* 29 (1985): 197;Maheshwari RK, *et al.* Multiple biological activities of curcumin: a short review. *Life Sci* 78 (2006): 2081.】。其中,以姜黄素(Curcumin, $C_{21}H_{20}O_6$)的天然含量最高,来源丰富,可针对肿瘤血管生成以及肿瘤多药耐药等诸多关键环节产生有益的干预和控制,从而发挥多靶点抗癌作用,且具有抗癌谱广、毒副作用小的特点,已被美国国立肿瘤所列为第三代癌症化学预防药物进行开发【Duvoix A, *et al.* Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. *Cancer Lett* 223 (2005): 181;Dhillon N, *et al.* Phase II trial of curcumin in patients with advanced pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 14 (2008): 4491;Sadzuka Y, *et al.* Beneficial effects of curcumin on antitumor activity and adverse reactions of doxorubicin. *Int J Pharm* 432 (2012):42.】。但作为药物,姜黄素在理化性质和药代动

力学上仍存在明显的不足,成为长期以来限制其开发应用于临床的瓶颈。一方面,姜黄素在体内的吸收程度低,且被快速、广泛地代谢,从而导致较低的生物利用度和体内活性。另一方面,姜黄素水溶性差,且水溶液在中性至碱性条件下不稳定,难以通过常规手段实现注射途径给药。因此,姜黄素类似物近年来备受关注,目标旨在针对姜黄素在理化性质和药代动力学特性上的缺陷进行改善,从而提高成药性。

[0005] 二甲氧基姜黄素(Dimethoxycurcumin, DMC)是姜黄素的一种亲脂性结构类似物,可通过全合成或半合成途径制备【Krackov MH, et al. Process for the synthesis of curcumin-related compounds. US005679864A (1997);戴汉松,等. 姜黄素的提取及其甲基化研究. 天然产物研究与开发20 (2008): 254.】。一系列基于细胞和动物的实验研究发现:DMC在代谢稳定性上显著优于姜黄素,并在多种疾病模型上显示明显强于姜黄素的治疗潜力。DMC对多种肿瘤细胞增殖抑制的活性较姜黄素更强,对于正常和突变型雄性激素受体,亦具有更强的拮抗作用,现已作为一种新型的雄激素受体拮抗剂被密切关注【Ohtsu H, et al. Antitumor agents. 217. curcumin analogues as novel androgen receptor antagonists with potential as anti-prostate cancer agents. J Med Chem 45 (2002): 5037;Tamvakopoulos C, et al. Metabolism and anticancer activity of the curcumin analogue, dimethoxycurcumin. Clin Cancer Res 13(2007): 1269;李KH,等. 新的姜黄素类似物及其用途. CN 200580042393.1 (2005).】。尽管如此,由于羟基的甲基化,导致DMC在理化性质,特别是溶解特性上较姜黄素发生了显著改变,给药系统研究因此成为DMC开发药用的新挑战。目前仅有DMC-树枝状聚合物PAMAM复合物和DMC脂质体研究的文献报道【Markatou E, et al. Molecular interactions between dimethoxycurcumin and Pamam dendrimer carriers. Int J Pharm 339 (2007): 231;Hadjidemetriou M, et al. Incorporation of dimethoxycurcumin into charged liposomes and the formation kinetics of fractal aggregates of uncharged vectors. J Liposome Res 23 (2013): 94.】,但均存在载药量和包封率低、热力学不稳定的缺陷,且制剂工艺复杂,质量可控性差,与临床应用的要求相距甚远。当前亟待开发新型适用于临床的、高效低毒且稳定可控的DMC给药系统。

[0006] 纳米药物技术是当今给药系统和靶向治疗中最具吸引力的研究领域之一,其中,聚合物胶束给药系统的开发应用备受关注。聚合物胶束属于胶体给药系统,粒径一般在10~100 nm之间。从热力学角度来看,聚合物胶束由两亲性分子在水溶液中通过自发的自组装过程形成,以系统自由能的降低为主要策动力。其中,疏水链段形成内核,并通过弱相互作用将难溶性药物包载于内核中,从而脱离与水性环境的接触;亲水链段形成表面,与水接触,向外稳定胶束。这种独特的核-壳结构赋予聚合物胶束给药系统的独特优势,包括:(1)疏水性内核可作为难溶性药物的贮库,显著提高难溶性药物的溶解度和载药量,以满足临床用量的需要;(2)可通过增强的血管渗透和滞留效应(Enhanced permeability and retention effect,EPR效应)实现肿瘤组织被动靶向,有助于实现肿瘤靶向治疗,在提高药效的同时减轻毒副作用;(3)聚合物胶束的聚集和解聚在热力学上都是稳定的,因而在体内外的水性环境中具有良好的稳定性和耐稀释性(极低的临界胶束浓度),可有效降低药物的降解和代谢,提高生物利用度;(4)亲水外壳的合理设计可以降低药物的渗漏,提高用药的安全性,并可避免药物在体内被网状内皮系统(RES)和单核巨噬细胞系统(MPS)清除,实现

长循环作用；(5)自组装制备过程简单、稳定可控，易于实现工业化生产；(6)聚合物材料不仅生物相容性和安全性良好，而且具有丰富的化学结构多样性，可根据不同药物的理化性质和治疗用途需要，进行针对性的化学结构设计和合成，应用范围十分广泛。

[0007] 聚合物胶束给药系统已成为解决脂溶性药物亲水性问题并改善成药性和临床适用性的一种有效手段。其中，两亲性二元或三元嵌段共聚物的组成易于确定，在形成胶束时，较随机共聚物和接枝共聚物的重现性更好，且具有更大的柔润性，因而被广泛研究和应用。两亲性嵌段共聚物的亲水嵌段大多采用聚乙二醇(PEG)或聚乙二醇单甲醚(mPEG)，常用的疏水嵌段为聚酯、聚氨基酸、聚苯乙烯或聚氧丙烯。

发明内容

[0008] 本发明的目的在于针对姜黄素的活性脂溶性结构类似物——二甲氧基姜黄素(DMC)，提供一种新型具有适宜的粒径分布以及较高包封率和载药量的聚合物胶束给药系统。该DMC载药聚合物胶束采用两亲性嵌段共聚物制备，与文献报道的现有制剂技术相比，具有良好的体内外稳定性和生物相容性，并能实现体内的长循环和被动靶向，显著提高了DMC的生物利用度，适用于口服、注射等多种途径给药。

[0009] 本发明通过以下技术方案实现。

[0010] 本发明所采用的载体材料为两亲性嵌段共聚物，包括但不限于AB型的二嵌段共聚物，ABA或BAB型的三嵌段共聚物，或者 $(AB)_n$ 型多嵌段共聚物，优选AB型二嵌段共聚物。

[0011] 本发明所述的两亲性嵌段共聚物，其亲水嵌段A包括但不限于聚乙二醇(PEG)、聚乙二醇单甲醚(mPEG)、或其衍生物；优选具有公认安全性的mPEG或PEG；在推荐的实施例中，更优选为mPEG。

[0012] 本发明所述的两亲性嵌段共聚物，其疏水嵌段B包括但不限于聚丙交酯(PLA)、聚乙交酯(PGA)、聚乙丙交酯(PLGA)、聚己内酯(PCL)、聚戊内酯、聚原酸酯、聚酰胺酯、聚丙烯酸酯、聚碳酸酯(PTMC)、聚醚酯、聚氧丙烯、聚二氧环己酮(PPDO)、或其衍生物，优选为聚丙交酯(PLA)、聚乙交酯(PGA)、聚乙丙交酯(PLGA)、聚己内酯(PCL)、聚碳酸酯(PTMC)、聚二氧环己酮(PPDO)、或其衍生物，在推荐的实施例中，更优选为PLA或者PCL。

[0013] 本发明所述的两亲性嵌段共聚物，亲水嵌段A与疏水嵌段B的重量比为1:9~9:1，优选为3:7~7:3。其中，亲水嵌段的数均分子量为200~30000，优选750~5000；疏水嵌段的数均分子量为500~100000，优选为1000~50000；疏水嵌段可进行疏水性封端修饰，封端基团选自C2~C10的直链或支链脂肪酰基、苯甲酰基、氨基酸残基或氨基酸衍生物残基中的一种，优选生物相容性好的内源性氨基酸残基或其衍生物中的一种，在推荐的实施例中，更优选为BOC-苯丙氨酸(BP)。

[0014] 上述两亲性嵌段共聚物与DMC形成的聚合物胶束载药系统，包含至少一种上述两亲性嵌段共聚物、治疗有效量的DMC、以及药学上可接受的药用辅料。

[0015] 上述聚合物胶束载药系统，所述药学上可接受的药用辅料包括但不限于甘露醇、蔗糖、葡萄糖、半乳糖、果糖等冻干保护剂；亚硫酸钠、亚硫酸氢钠和焦亚硫酸钠等抗氧剂；依地酸二钠、依地酸钠钙、环己二胺四醋酸钠等金属离子络合剂；枸橼酸、碳酸氢钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠等pH调节剂；氯化钠、葡萄糖等等渗调节剂。

[0016] 上述聚合物胶束载药系统，DMC与两亲性嵌段共聚物的重量比为(0.5~5):(10~

100), 优选为(1~5):(50~100);在推荐的实施例中,更优选为(2~5):(75~100)。

[0017] 本发明还提供了DMC与两亲性嵌段共聚物形成的聚合物胶束载药系统的制备方法,包括但不限于薄膜水化法、溶剂挥发法、透析法、固体分散法、高能均质乳化法,优选薄膜水化法和固体分散法;在推荐的实施例中,更优选为薄膜水化法。

[0018] 薄膜水化法的具体步骤为:将DMC和嵌段共聚物材料溶解于有机溶剂中,经旋转蒸发去除溶剂以形成均匀的药膜,然后加入水性溶剂于一定温度下水化溶解药膜,得载药胶束水溶液,加入适量冻干保护剂,经过滤除菌冻干后得DMC载药胶束冻干粉。

[0019] 本发明所述DMC载药聚合物胶束冻干粉的制备方法中,所述的有机溶剂为能够同时溶解DMC和两亲性嵌段共聚物的有机溶剂,包括但不限于甲醇、乙醇、异丙醇、叔丁醇、乙酸乙酯、二氯甲烷、氯仿、乙腈、丙酮、四氢呋喃、二甲基甲酰胺等单独或混合使用,优选安全性好、且可与水任意比例互溶的乙醇。其中,乙醇用量与主药DMC的重量比为(0.2~5.0)mL/mg,优选为(0.2~2.0)mL/mg。

[0020] 本发明所述DMC载药聚合物胶束冻干粉的制备方法中,为促进有机溶剂对DMC和嵌段共聚物的溶解,可采取超声、加热或者搅拌等方式中的至少一种。

[0021] 本发明所述DMC载药聚合物胶束冻干粉的制备方法中,所述旋转蒸发去除有机溶剂时控制体系温度为20~60℃,优选为30~50℃;所述旋转蒸发去除有机溶剂的时间控制为0.5~12 h,优选为1~3 h。

[0022] 本发明所述DMC载药聚合物胶束冻干粉的制备方法中,溶解药膜的水性溶剂为符合医药用途的水或其电解质溶液,包括但不限于双蒸水、注射用水、0.9%氯化钠水溶液、5%葡萄糖水溶液、葡萄糖盐水溶液、磷酸盐缓冲液等单独或混合使用。

[0023] 本发明所述DMC载药聚合物胶束冻干粉的制备方法中,所述水性溶剂溶解药膜时的体系温度控制为25~80℃,优选为35~60℃;所用水性溶剂与溶解DMC和嵌段共聚物的有机溶剂体积比为1:(0.1~10),优选为1:(1~5)。

[0024] 本发明所述DMC载药聚合物胶束冻干粉的制备方法中,所述冻干保护剂为甘露醇、木糖醇、蔗糖、果糖、乳糖、半乳糖、葡萄糖、麦芽糖、海藻糖、葡聚糖、木糖、白蛋白、山梨醇、右旋糖酐、氨基酸、氨基酸盐、磷酸盐、聚乙吡咯烷酮、羟丙基β环糊精、明胶或聚乙二醇中的一种或者它们的混合物;所述冻干保护剂占整个体系的重量比为0~99.9%之间,优选为10~70%。

[0025] 本发明提供的DMC载药聚合物胶束一般制成冻干粉制剂,用于注射或口服途径给药。

[0026] 本发明提供的DMC载药聚合物胶束,也可以添加药学上可接受的辅料制成口服固体制剂,用于口服途径给药。所述口服固体制剂包括:将制得的载药聚合物胶束冻干粉未添加药物制剂常用的辅料、或将载药胶束溶液以药物制剂常用的辅料吸附制成的片剂、胶囊、颗粒剂、散剂、微丸等。所述的常用辅料包括但不限于:淀粉、蔗糖、糊精、乳糖、预胶化淀粉、微晶纤维素等填充剂;淀粉浆、纤维素衍生物、聚维酮、明胶、聚乙二醇等粘合剂;羧甲基淀粉钠、低取代羟丙基纤维素、交联羧甲基纤维素钠、交联聚维酮、泡腾崩解剂等崩解剂;硬脂酸镁、微粉硅胶、滑石粉、氢化植物油、聚乙二醇类、月桂醇硫酸钠等润滑剂。

[0027] 基于本发明制备得到的DMC载药聚合物胶束制剂,可单独与其他抗肿瘤制剂联合,用于癌症、恶性肿瘤以及继发于组织损伤的失调组织或细胞增生等的预防和治疗。所述

癌症包括但不限于：肺癌、肝癌、胰腺癌、脑癌、胃肠道癌症、头颈癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、皮肤癌、淋巴瘤、黑色素瘤或白血病；优选与肿瘤放疗或化疗药物联用，对肿瘤临床放疗和化疗所致心脏毒性等机体损伤进行预防和治疗，发挥增敏、增效、减毒的作用。

[0028] 基于本发明制备得到的DMC载药聚合物胶束制剂，还可用于抗炎、抗菌、降血脂、免疫调节、抗动脉粥样硬化、抗老年痴呆，以及对各种自由基氧化损伤的预防和治疗。

[0029] 与现有技术相比，本发明提供的DMC载药聚合物胶束具有以下的特点：

[0030] 1) 本发明根据DMC的疏水性分子结构特征，以生物可降解和生物相容性良好的两亲性嵌段共聚物为载体材料，自组装形成具有核-壳结构的载药聚合物胶束，将药物分子包载于疏水性内核中，使较姜黄素水溶性更差的DMC在水性介质中的溶解度和载药量都显著提高，为实现其临床应用提供了一种可能且有效的技术手段。

[0031] 2) 试验结果证明：本发明采用两亲嵌段共聚物制备得到的DMC载药聚合物胶束的药物包封率高($> 95\%$)，粒径小且分布均匀($10\text{ nm}\sim 100\text{ nm}$ ，多分散系数 $PDI < 0.1$)，注射途径给药在体内可有效发挥EPR效应，呈现明显的肿瘤组织被动靶向，适用于肿瘤靶向治疗。

[0032] 3) 试验结果也证明：本发明采用两亲嵌段共聚物制备得到的DMC载药聚合物胶束，其亲水外壳使制剂具备高度的热力学稳定性，从而有效降低药物在体内的渗漏、降解和代谢，同时避免药物在体内被网状内皮系统(RES)和单核巨噬细胞系统(MPS)清除，提高生物利用度，并延长体循环时间。

[0033] 4) 本发明提供的DMC两亲嵌段共聚物载药胶束具有良好的产业化应用前景。胶束的自发自组装制备过程十分简单，而且稳定、可控性好，易于实现产业化生产。所得载药胶束既可根据临床适应症的需要，添加药学上可接受的辅料制成口服固体制剂，也可以制成冻干粉制剂，用于注射或口服途径给药。

附图说明

[0034] 附图1为mPEG-PCL-BP/DMC载药聚合物胶束的粒径分布图，平均粒径为 17.9 nm ，PDI为 0.045 ；

[0035] 附图2为mPEG-PCL-BP/DMC载药聚合物胶束的透射电镜照片($\times 10^5$)，所得胶束粒子呈球形或类球形，分散均匀，无团聚或粘连，右上角的局部放大结果显示具有典型的壳-核结构；

[0036] 附图3为DMC、空白胶束及载药胶束的差示扫描量热分析(DSC)曲线，DMC载药胶束未显示DMC的熔融峰，表明载药胶束对DMC的包封率接近完全；

[0037] 附图4为mPEG-PCL-BP/DMC载药胶束溶液冻干前后及冻干粉复溶后的外观考察结果；

[0038] 附图5为小鼠尾静脉注射DMC聚合物胶束和DMSO溶液制剂后的血浆药物浓度经时变化曲线；

[0039] 附图6为人肺癌A549荷瘤裸鼠iv 等剂量(50 mg/kg)DMC聚合物胶束和DMSO溶液制剂后的药物组织分布图。

具体实施方式

[0040] 为了便于理解本发明，特列举实施例，以进一步诠释本发明，而不是对本发明的任

何方式的限制。下列实施例中的嵌段共聚物材料直接来源于商业途径,或经常规开环聚合自行制备,并进行疏水基团的封端修饰。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,或按照制造厂商所建议的条件。

[0041] 实施例1 二甲氧基姜黄素的全合成制备

[0042] 参考美国专利(US005679864A)提供的全合成工艺路线制备二甲氧基姜黄原料药。制备过程简述如下。将甲基香兰素(23.3 g)、氧化硼(4.66 g)、无水二甲基甲酰胺(90 mL)、戊二酮(7.2 mL)和二甲氧基丙烷(17.2 mL)依次投入250 mL三口瓶中,密塞,振摇均匀后于N₂保护下缓慢升温至70℃,至固形物完全溶解时,开始缓慢滴加正丁胺(2.8 mL),约120 min内加完,继续反应约1 h,趁热将反应液倒入400 mL煮沸的5%醋酸溶液中,搅拌均匀,待自然冷却至室温后,加入200 mL去离子水,摇匀,于4℃冰箱中静置2天,倾除上层溶液,加乙腈水溶液(~63%),回流溶解下层粘稠状固体30 min,趁热抽滤,滤液置4℃冰箱中放置析晶。过滤,所得固形物经60%乙腈水溶液反复洗涤,干燥,得橙黄色针状结晶(5.6 g)。

[0043] 波谱数据综合分析结果显示:制备所得化合物为具有烯醇式结构的二甲氧基姜黄素。m.p. (DSC): 128.9℃;HR-ESIMS m/z : 397.1639, C₂₃H₂₅O₆ [M+H]⁺; ¹H NMR (in CDCl₃, 400 MHz) δ 3.93 (12H, s, -OCH₃), 5.82 (1H, s, H-10), 6.50 (2H, d, $J=15.76$ Hz, H-8, 12), 6.88 (2H, d, $J=8.32$ Hz, H-4, 18), 7.07 (2H, d, $J=1.64$ Hz, H-1, 15), 7.14 (2H, dd, $J=8.28, 1.64$ Hz, H-5, 19), 7.61 (2H, $J=15.76$ Hz, H-7, 13); ¹³C NMR (in CDCl₃, 100 MHz) δ 55.87 (C_{3, 17}-OCH₃), 55.95 (C_{2, 16}-OCH₃), 101.26 (C-10), 109.69 (C-1, 15), 111.08 (C-4, 18), 121.99 (C-8, 12), 122.60 (C-5, 19), 128.02 (C-2, 16), 140.36 (C-7, 13), 149.19 (C-6, 14), 150.99 (C-3, 17), 183.21 (C-9, 11)。

[0044] 实施例2 二甲氧基姜黄素的半合成制备

[0045] 取姜黄素(10 g)置250 mL三口瓶中,加1:1乙醚-甲醇混合溶液(v/v, 80 mL),摇匀,加入氢氧化钠(3.2 g),搅拌下加热至回流,在30 min内滴加碘甲烷(15 g),薄层色谱监测反应至原料消耗殆尽。减压除尽溶剂,加氨水(60 mL)使大量黄色晶体析出,过滤,用水洗至中性,干燥后行硅胶层析柱分离,以石油醚-乙酸乙酯(8: 2, v/v)混合溶剂系统洗脱,收集、合并中间段黄色馏分,减压除尽溶剂,真空干燥,得橙黄色粉末状固体(3.5 g)。波谱分析与全合成制备产物一致,鉴定为二甲氧基姜黄素。

[0046] 实施例3 二甲氧基姜黄素聚合物胶束及其冻干粉制备

[0047] (1)BOC-苯丙氨酸封端修饰的聚乙二醇单甲醚-聚己内酯嵌段共聚物(mPEG₂₀₀₀-PCL₁₈₀₀-BP)/DMC胶束及其冻干粉

[0048] 称取180 mg 所述共聚物高分子和20 mg二甲氧基姜黄素,置50 mL茄形瓶中,加无水乙醇15 mL,50℃水浴下超声助溶至溶液澄清无不溶物,减压蒸馏除去乙醇,使在瓶底及内壁形成一层均匀薄膜。注入10 mL温热纯化水,置50℃水浴中水化45 min,至药膜完全脱落溶解,加入80 mg甘露醇,所得溶液经0.22 μ m滤膜过滤后冻干,即得二甲氧基姜黄素载药胶束冻干粉。所得胶束理论载药量10.0%,包封率99.73%,平均粒径为17.9 nm,多分散系数PDI为0.045;加生理盐水复溶制成20 mg/mL的溶液,室温下避光放置,160 h内未见有沉淀析出。载药胶束的粒径分布与形态分别见附图1、2,差示扫描量热(DSC)分析见附图3,载药胶束溶液冻干前后及冻干粉复溶后的稳定性外观考察见附图4。

[0049] (2) 聚乙二醇单甲醚-聚己内酯嵌段共聚物 (mPEG₃₅₀₀-PCL₄₀₀₀)/DMC胶束及其冻干粉
[0050] 称取190 mg 所述共聚物高分子和10 mg二甲氧基姜黄素置50 mL茄形瓶中,加无水乙醇10 mL,超声溶解,至溶液澄清无不溶物后,在45℃水浴缓慢减压除尽乙醇,使在瓶底及内壁形成一层均匀薄膜。于茄瓶中注入5 mL温热纯化水,置50℃水浴中水化30 min,至药膜完全脱落溶解后,加入100 mg甘露醇,所得溶液经0.22 μm滤膜过滤后冻干,即得二甲氧基姜黄素载药胶束冻干粉。所得胶束理论载药量5.0%,包封率为98.02%,平均粒径为17.8 nm,多分散系数PDI为0.046;加注射用水复溶制成10 mg/mL的溶液,室温下避光放置,72 h内未见有沉淀析出。

[0051] (3) 聚乙二醇单甲醚-聚乳酸嵌段共聚物 (mPEG₃₄₀₀-PLA₁₈₀₀)/DMC胶束及其冻干粉
[0052] 称取190 mg 所述共聚物高分子和10 mg二甲氧基姜黄素置50 mL茄形瓶中,加无水乙醇10 mL,置45℃水浴中加热助溶,至溶液澄清无不溶物后,减压蒸馏除去乙醇,使在瓶底及内壁形成一层均匀薄膜。于茄瓶中注入10 mL温热纯化水,置45℃水浴中水化30 min,至药膜完全脱落溶解,加入100 mg甘露醇,所得溶液经0.22 μm滤膜过滤后冻干,即得二甲氧基姜黄素载药胶束冻干粉。所得胶束理论载药量5.0%,包封率为97.95%,平均粒径为17.7 nm,多分散系数PDI为0.050;加注射用水复溶制成5 mg/mL的溶液,室温下避光放置,96 h内未见有沉淀析出。

[0053] (4) 聚乙二醇单甲醚-聚乙丙交酯嵌段共聚物 (mPEG₃₄₀₀-PLGA₁₈₀₀)/DMC胶束及其冻干粉

[0054] 称取190 mg 所述共聚物高分子和10 mg二甲氧基姜黄素置50 mL茄形瓶中,加无水乙醇15 mL,超声溶解,至溶液澄清无不溶物后,在40℃水浴缓慢减压除尽乙醇,使在瓶底及内壁形成一层均匀薄膜。于茄瓶中注入15 mL温热纯化水,置50℃水浴中水化30 min,至药膜完全脱落溶解,加入50 mg甘露醇,所得溶液经0.22 μm滤膜过滤后冻干,即得二甲氧基姜黄素载药胶束冻干粉。所得胶束理论载药量5.0%,包封率为97.33%,平均粒径为17.8 nm,多分散系数PDI为0.045;加生理盐水复溶制成10 mg/mL的溶液,室温下避光放置,48 h内未见有沉淀析出。

[0055] (5) BOC-苯丙氨酸封端修饰的聚乙二醇单甲醚-聚乳酸嵌段共聚物 (mPEG₂₀₀₀-PLA₂₀₀₀-BP)/DMC胶束及其冻干粉

[0056] 称取185 mg 所述共聚物高分子和15 mg二甲氧基姜黄素置50 mL茄形瓶中,加无水乙醇20 mL,50℃水浴下超声助溶至溶液澄清无不溶物,减压蒸馏除去乙醇,使在瓶底及内壁形成一层均匀薄膜。注入10 mL温热纯化水,置45℃水浴中水化60 min,至药膜完全脱落溶解,加入50 mg蔗糖,所得溶液经0.22 μm滤膜过滤后冻干,即得二甲氧基姜黄素载药胶束冻干粉。所得胶束理论载药量7.5%,包封率为99.12%,平均粒径为17.9 nm,多分散系数PDI为0.048;加5%葡萄糖溶液复溶制成15 mg/mL的溶液,室温下避光放置,120 h内未见有沉淀析出。

[0057] 实施例4 二甲氧基姜黄素聚合物胶束的药代动力学与组织分布试验

[0058] (1) 小鼠静脉注射给药的药动学比较试验

[0059] 试验药物:二甲氧基姜黄素聚合物胶束冻干制剂,按照实施例3(1)制得,临用前加生理盐水溶解至所需浓度;二甲氧基姜黄素二甲亚砜(DMSO)溶液制剂,以DMSO为溶剂,按常规方法溶解二甲氧基姜黄素原料药,制成每1mL含二甲氧基姜黄素5 mg的溶液。

[0060] 给药与血浆样品采集、测试:雄性昆明小鼠48只,体重 20 ± 2 g,随机分为16组($n=3$),分别经尾静脉注射给予二甲氧基姜黄素聚合物胶束冻干制剂(1~8组)和二甲氧基姜黄素DMSO溶液制剂(9~16组),给药剂量以二甲氧基姜黄素计均为12 mg/kg。分别在给药前及给药后不同时间点经心脏穿刺采集血样,离心,分离血浆。以双脱甲氧基姜黄素为内标,LC-MS/MS法测定各血浆样品的二甲氧基姜黄素药物浓度。

[0061] 结果与结论:两种制剂给药的血浆药物浓度经时变化曲线见附图5,采用WinNonlin V6.2.1非房室模型计算得主要药动学参数。

[0062] 试验结果显示,与DMSO溶液制剂相比,聚合物胶束制剂给药后的血浆药物暴露量显著增加, C_{max} 和AUC_(0-t)分别为前者的2.04倍和3.03倍,因而相同给药剂量下可能具有更强药效作用。另一方面,聚合物胶束制剂组血浆药物清除速率显著降低,血浆药物消除半衰期和平均滞留时间显著延长,分别为前者的6.5倍和6.6倍,表明本发明所提供的聚合物胶束载药系统具有明显的长循环特征,能有效降低药物在体内的清除速度,在更长时间内维持相对更高的血药浓度,因而体内药效作用时间更持久。此外,聚合物胶束制剂组的表观分布容积(V_z)显著增大,为DMSO溶液制剂的2.06倍,表明本发明所提供的聚合物胶束载药系统明显改变了二甲氧基姜黄素的组织分布特征,使药物在体内分布更广,或与组织的特异性结合程度更高,提示该制剂可能具有一定的组织分布靶向性。

[0063] (2) SD大鼠口服生物利用度比较试验

[0064] 试验药物:二甲氧基姜黄素聚合物胶束冻干制剂,按照实施例3(1)制得,临用前加生理盐水溶解至所需浓度;二甲氧基姜黄素CMC-Na混悬制剂,以0.5% CMC-Na 溶液按常规方法分散二甲氧基姜黄素原料药制成,每1mL含二甲氧基姜黄素10 mg。

[0065] 给药与血浆样品采集、测试:雄性SD大鼠18只,体重 200 ± 20 g,随机分为3组($n=6$)。其中,I组经尾静脉注射给予二甲氧基姜黄素聚合物胶束冻干制剂,给药剂量以二甲氧基姜黄素计为15 mg/kg;II、III组分别灌胃给予二甲氧基姜黄素的CMC-Na混悬剂和二甲氧基姜黄素聚合物胶束冻干制剂,给药剂量以二甲氧基姜黄素计均为75 mg/kg。分别采集各组动物给药前及给药后不同时间的血浆样品,以双脱甲氧基姜黄素为内标、乙酸乙酯为溶剂,液-液萃取法从基质中提取二甲氧基姜黄素和内标,LC-MS/MS法定量测定二甲氧基姜黄素的血浆药物浓度。

[0066] 结果与结论:针对血浆药物浓度经时变化数据采用DAS2.0软件进行处理,得各试验组的主要药动学参数。结果显示,I、II、III组的血浆二甲氧基姜黄素AUC分别为6.238 mg/L·h、0.324 mg/L·h、4.803 mg/L·h;以胶束制剂注射给药为参比,校正给药剂量后计算得两种不同制剂中原形药物二甲氧基姜黄素的口服生物利用度分别为1.04%和15.40%,聚合物胶束制剂为普通CMC-Na分散混悬制剂的14.8倍。试验结果表明,本发明所提供的聚合物胶束给药系统显著改善了二甲氧基姜黄素的口服生物利用度,是二甲氧基姜黄素口服应用于临床的一种有效的给药系统。

[0067] (3) 荷瘤裸鼠组织分布比较试验

[0068] 主要试验材料:二甲氧基姜黄素聚合物胶束冻干制剂,按照实施例3(1)制得,临用前加生理盐水溶解至所需浓度;二甲氧基姜黄素二甲亚砜(DMSO)溶液制剂,以DMSO为溶剂,按常规方法溶解二甲氧基姜黄素原料药,制成每1mL含二甲氧基姜黄素5 mg的溶液;5~6周龄雌性Balb/C裸小鼠,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号

11400700059785;人肺癌A549细胞株,来源于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库(CAS),本实验室液氮冷冻保存,备用。

[0069] 试验方法:

[0070] (1)动物模型制备:收取对数生长期的A549细胞,细胞计数后装入50 mL离心管中,重悬于50% PBS缓冲液(pH 7.4)及50% Matrigel中,调整细胞浓度至 8×10^7 细胞/mL,吹打细胞,使其分散均匀。吸取细胞悬液,注射到裸鼠前右侧乳腺脂肪垫,每只动物接种150 μ L (1.2×10^7 细胞/只),建立A549裸鼠移植瘤模型。

[0071] (2)动物分组、给药:肿瘤体积在200 mm^3 左右的荷瘤鼠84只,采用随机区组法分为14 组(每组6只)。1~7组动物经尾静脉注射给予二甲氧基姜黄素胶束,8~14组动物经尾静脉注射给予二甲氧基姜黄素DMSO溶液,给药剂量以二甲氧基姜黄素计均为50 mg/kg。

[0072] (3)组织样本采集、处理与测试:各组动物给药后,按不同的时间点分别采集血浆及肿瘤、心、肝、脾、肺、肾、脑等主要组织器官。组织采集后用生理盐水冲洗干净,称重,加适量5%葡萄糖溶液进行匀浆。以双脱甲氧基姜黄素为内标、乙酸乙酯为溶剂,液-液萃取法从血浆和组织匀浆基质中提取二甲氧基姜黄素和内标,LC-MS/MS法定量测定各组织样本中二甲氧基姜黄素的药物浓度。

[0073] 结果与结论:荷A549肿瘤细胞的雌性Ba1b/C裸小鼠经尾静脉注射分别给予等剂量(50 mg/kg)二甲氧基姜黄素聚合物胶束和DMSO溶液制剂后药物的组织分布见附图6。试验结果显示,与DMSO溶解所得的溶液制剂相比,聚合物胶束制剂显著改变了二甲氧基姜黄在体内的组织分布特征,表现出明显的肿瘤和心脏组织靶向分布。尽管两种制剂在给药后15 min ~ 3h内肝、脾、肺、肾和脑组织的药物分布及其变化趋势相似,但聚合物胶束组动物在心脏及肿瘤组织中的药物浓度显著高于DMSO溶液组,且消除显著变缓,从而使得在给药后相对较长时间内维持较高的组织药物浓度水平。结果提示,本发明所提供的二甲氧基姜黄素聚合物胶束具有明显的肿瘤及心脏组织靶向分布特征,可通过EPR效应实现对肿瘤组织的被动靶向,因此,适用于心脏系统相关疾病以及肿瘤的预防和临床治疗,特别是与肿瘤放疗或化疗药物联用,对肿瘤临床放疗及化疗所致心脏毒性等机体损伤进行预防和治疗,可能在增效的同时实现有效减毒,从而提高肿瘤临床治疗的耐受性和疗效。

[0074] 实施例5 二甲氧基姜黄素聚合物胶束对人白血病阿霉素耐药株K562/ADR细胞裸鼠移植瘤生长抑制作用试验

[0075] 主要试验材料:二甲氧基姜黄素聚合物胶束冻干制剂和不载药的空白胶束制剂,按照实施例3(1)制得,临用前加生理盐水至所需浓度;盐酸多柔比星脂质体注射液,上海复旦张江生物医药股份有限公司产品;Ba1b/C裸小鼠,雌性,5~6周龄,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号11400700059785;人白血病阿霉素耐药株K562/ADR细胞来源于ATCC细胞库,本实验室液氮冷冻保存,备用。

[0076] 试验方法:

[0077] (1)荷瘤模型制备:收取对数生长期的K562/ADR细胞,细胞计数后装入50 mL离心管中,重悬于含50% Matrigel的RPMI 1640细胞培养液中,调整细胞浓度至 8×10^7 细胞/mL,吹打细胞,使其分散均匀。吸取细胞悬液,注射到裸鼠前右侧乳腺脂肪垫,每只动物接种150 μ L (1.2×10^7 细胞/只),建立裸鼠移植瘤模型。

[0078] (2)动物分组与给药规程:至瘤体积达150~200 mm^3 ,将荷瘤动物随机分为4组,每

组动物数 $n=10$ 。其中, I: 阴性对照组(空白胶束)、II: 盐酸多柔比星脂质体注射液组(4 mg/kg)、III: 二甲氧基姜黄素聚合物胶束组(50 mg/kg)、IV: 盐酸多柔比星脂质体注射液(4 mg/kg)+ 二甲氧基姜黄素聚合物胶束(50 mg/kg) 联用组。自分组当日起, 经尾静脉注射连续给药3周, 盐酸多柔比星脂质体注射液每3天给药1次, 二甲氧基姜黄素聚合物胶束每天给药1次, 每次给药体积均为5 mL/kg。阴性对照组每天1次给予等体积空白胶束溶液。

[0079] (3) 观察指标: 给药期间每3天测量一次体重和瘤体积, 于末次给药24h后处死动物, 剥取瘤组织, 称重, 以阴性对照组为参照, 按下式计算瘤重增长抑制率: $TGI = (1 - \text{处理组平均瘤重} / \text{对照组平均瘤重}) \times 100\%$ 。

[0080] 结果与结论: 盐酸多柔比星脂质体注射液组(II组)和二甲氧基姜黄素聚合物胶束组(III组)的瘤重及TGI分别为 695 ± 28 mg、27.1%和 379 ± 24 mg、60.2%。与阴性对照组相比, 对于阿霉素耐药瘤株K562/ADR在裸鼠体内的增殖, 前者几乎不显示抑制作用($p > 0.05$), 而40 mg/kg剂量的二甲氧基姜黄素聚合物胶束能显著延缓肿瘤生长, 且在与盐酸多柔比星脂质体注射液联用时(IV组)显示更强的肿瘤生长抑制作用, 该组的瘤重及TGI分别为 268 ± 13 mg、71.8%。体重测量结果显示, II组动物在给药期间的一般状态较差, 且体重减轻10~15%, 表明盐酸多柔比星脂质体注射液存在明显的系统毒性; III组动物体重略有增加, 与空白对照组无显著差异($p > 0.05$); IV组动物在给药4~8 d内体重略有减轻, 平均~7%, 但此后至试验结束期间, 动物体重恢复至与空白对照组基本一致, 显示二甲氧基姜黄素对盐酸多柔比星所造成机体损伤具有快速恢复的能力。综合以上试验结果表明, 本发明所提供的二甲氧基姜黄素聚合物胶束具有显著的体内抑瘤活性, 并显示对盐酸多柔比星的协同增效减毒作用。

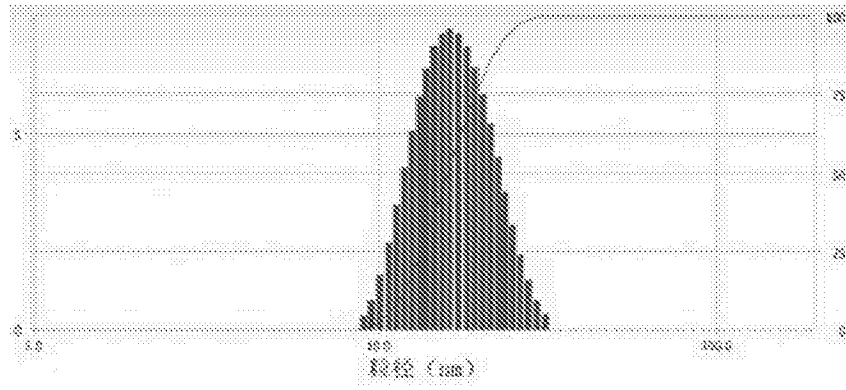


图1

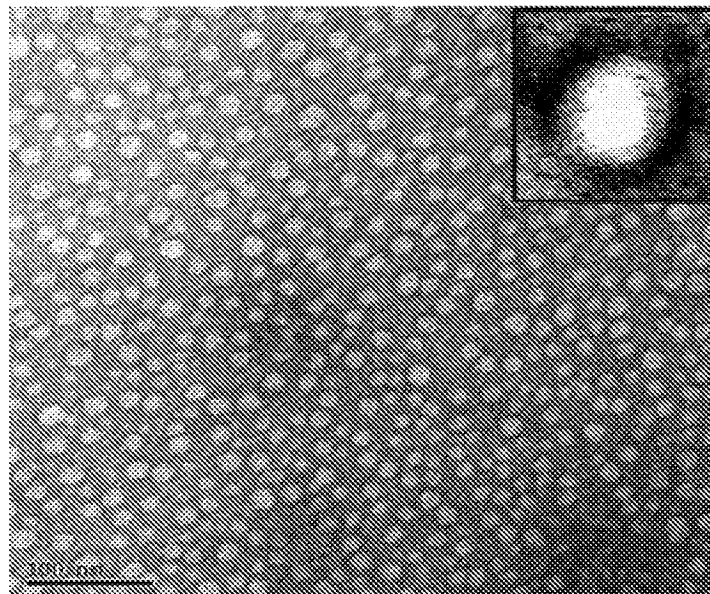


图2

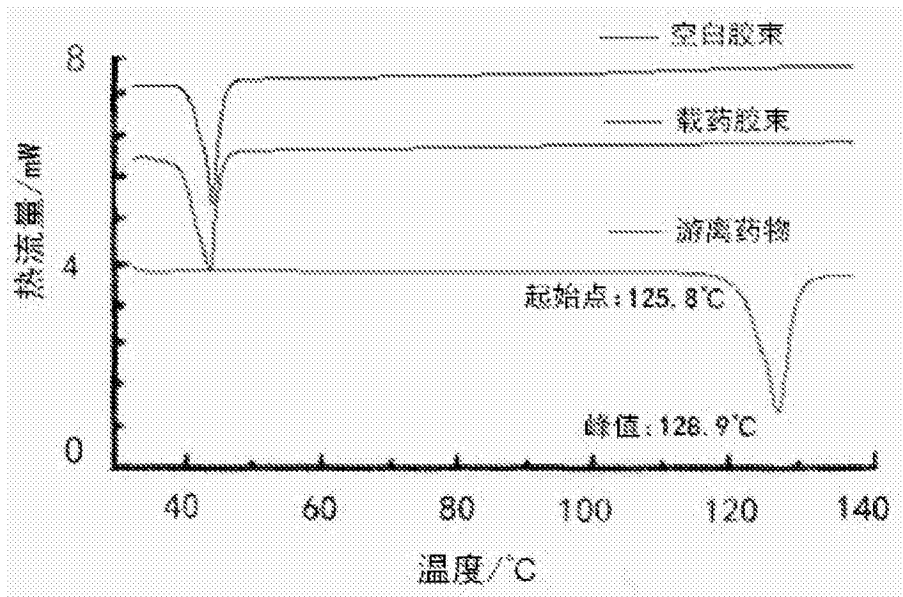


图3



图4

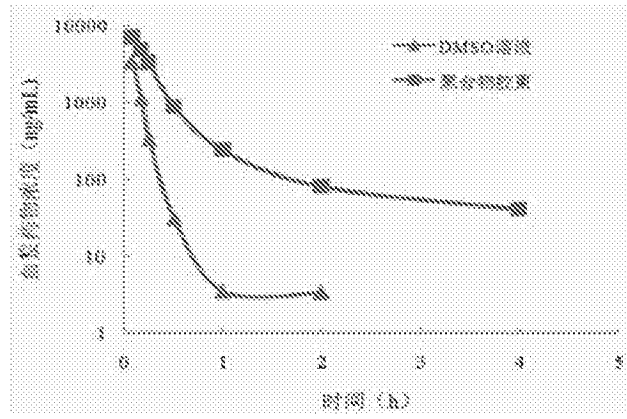


图5

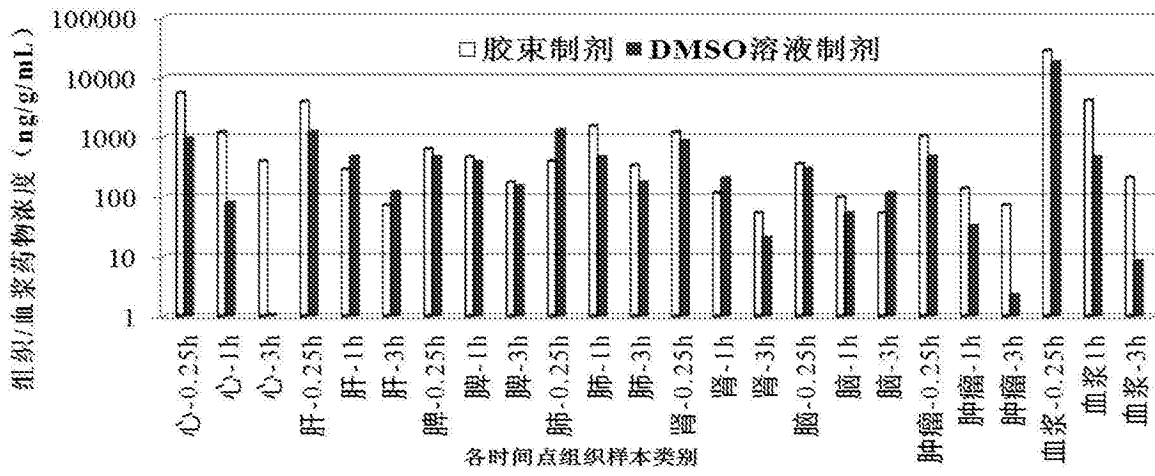


图6