



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111298132 A

(43)申请公布日 2020.06.19

(21)申请号 202010109627.6

A61K 31/7068(2006.01)

(22)申请日 2020.02.22

A61P 35/00(2006.01)

(71)申请人 新乡医学院

C07H 1/00(2006.01)

地址 453000 河南省新乡市红旗区金穗大道601号新乡医学院

C07H 19/073(2006.01)

(72)发明人 从梅 赵伟栋 杨景瑞 徐广凌
张静 王智慧

(74)专利代理机构 新乡市平原智汇知识产权代理事务所(普通合伙) 41139

代理人 路宽

(51)Int.Cl.

A61K 47/58(2017.01)

A61K 47/59(2017.01)

A61K 47/60(2017.01)

A61K 47/69(2017.01)

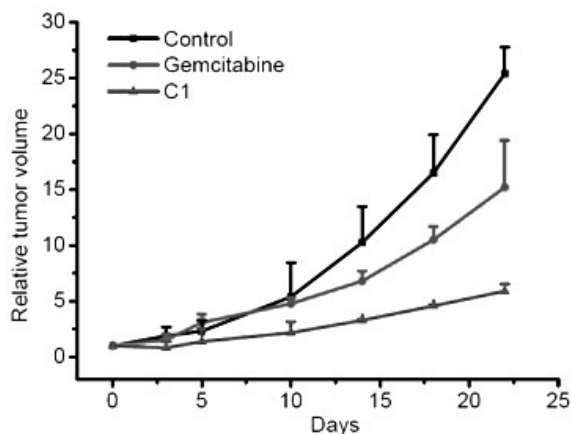
权利要求书5页 说明书10页 附图8页

(54)发明名称

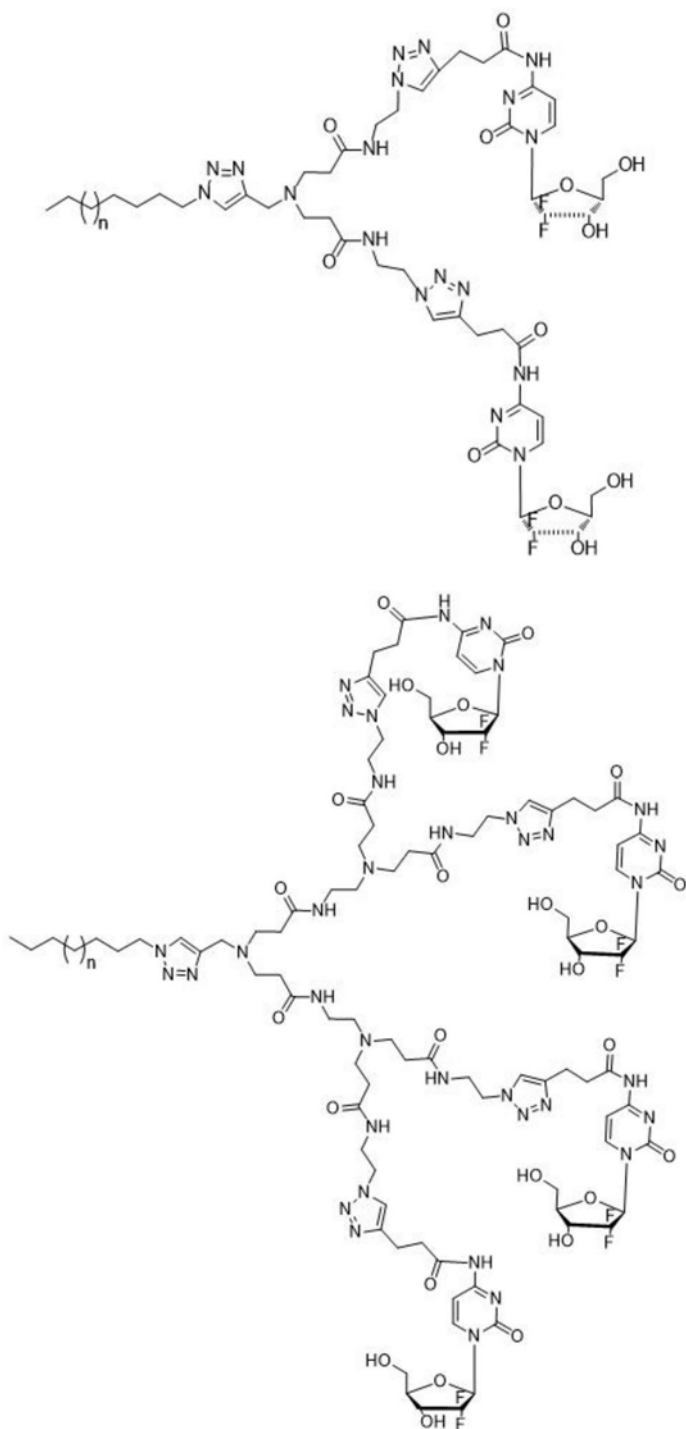
一种树状分子吉西他滨自组装纳米前药及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明公开了一种树状分子吉西他滨自组装纳米前药及其制备方法及其应用,首先使用不同的疏水端或亲水端合成末端叠氮修饰的两亲性树状分子,同时制备含炔键的吉西他滨前药分子,前两步的产物通过“叠氮-炔”点击反应连接得到两亲性树状分子吉西他滨前药,最后通过透析自组装法制得纳米前药颗粒。对该纳米粒的微观结构及酶稳定性进行了研究,进一步通过细胞摄取和小鼠体内实验,证实该自组装纳米前药可明显提高原型药物吉西他滨的代谢稳定性及抗肿瘤活性,且能避免母体小分子药物吉西他滨存在的毒副作用大等问题,可为临床应用提供基础实验依据。



1. 一种树状分子吉西他滨自组装纳米前药,其特征在于该自组装纳米前药具有式II所示结构:



式II

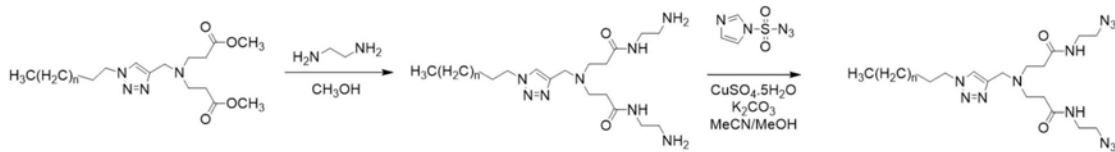
其中n为亚甲基重复单元数,n为2~500之间的任意整数。

2. 根据权利要求1所述的树状分子吉西他滨自组装纳米前药,其特征在于该树状分子吉西他滨自组装纳米前药能够在水溶液中自组装形成纳米颗粒,具体过程为:将两亲性树状分子吉西他滨自组装纳米前药溶于DMSO溶液,浓度为1.0~25.0mg/mL,再装入透析袋,室温条件下在去离子水中透析得到两亲性树状分子吉西他滨自组装纳米颗粒,所述透析袋的

分子量为500~3000Da,透析时间为5~48h,所得两亲性树状分子吉西他滨自组装纳米颗粒的粒径为7~200nm。

3.一种权利要求1所述的树状分子吉西他滨自组装纳米前药的制备方法,其特征在于包括以下步骤:(1)合成末端叠氮修饰的两亲树状分子;(2)合成含有炔键结构的吉西他滨前药分子;(3)通过Click反应,将步骤(2)合成的含有炔键结构的吉西他滨前药分子前药分子接枝到步骤(1)合成的末端叠氮修饰的两亲树状分子表面,最终得到树状分子吉西他滨自组装纳米前药。

4.根据权利要求3所述的树状分子吉西他滨自组装纳米前药的制备方法,其特征在于:步骤(1)中对于一代以烷基长链作为疏水部分的叠氮末端树状分子的合成包含两步反应,具体反应式如下式III所示:

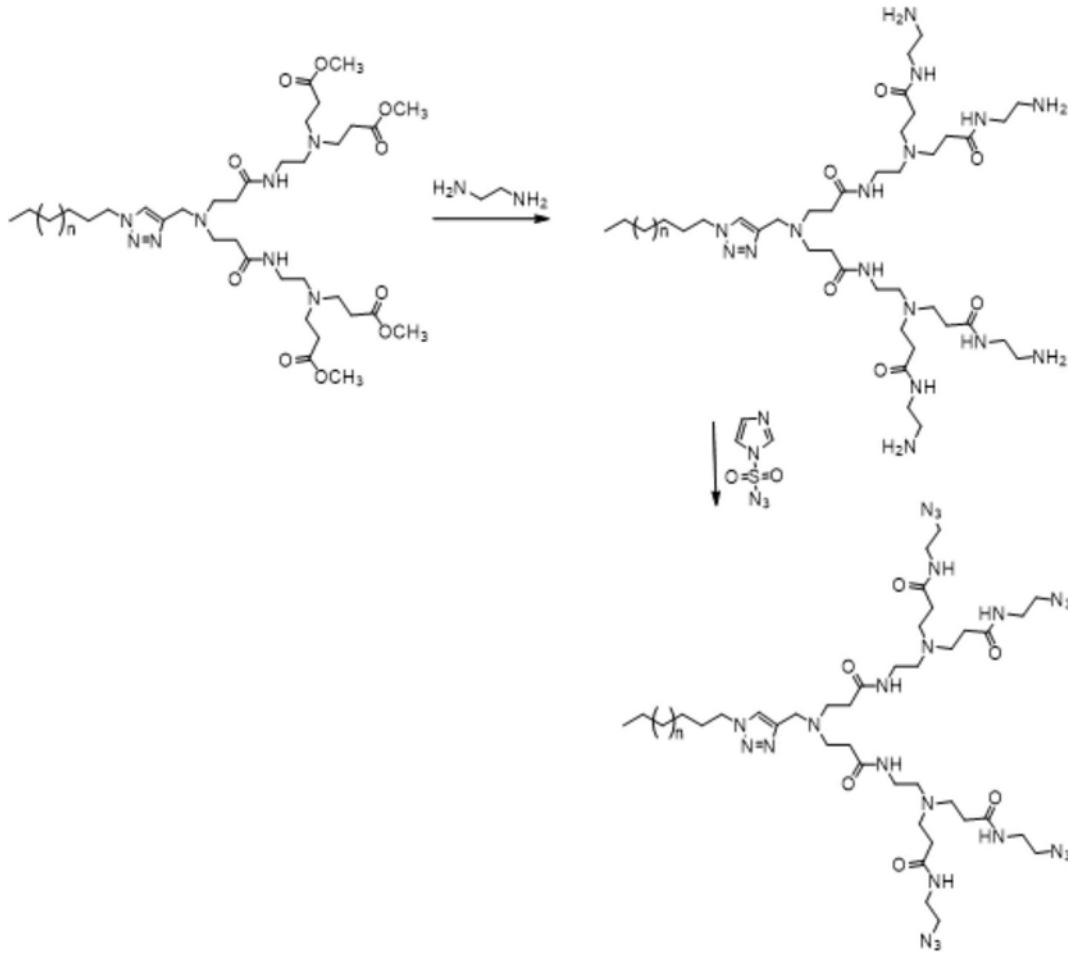


式 III

n为亚甲基重复单元数,n为2~500之间的任意整数;

步骤(1)的具体过程为:第一步合成末端胺基修饰的两亲性树状分子,具体为利用乙二胺与树状分子酯基之间的还原胺反应得到,所用树状分子为一代或二代,该树状分子与乙二胺的摩尔比为1:10~1:80,反应时间为24~168h,反应过程在常温条件下进行,溶剂体系为有机溶剂,产物通过硅胶柱层析或透析,冻干后得到;第二步合成末端叠氮修饰的两亲性树状分子,具体为末端胺基修饰的两亲性树状分子、叠氮磺酸咪唑及碳酸钾在五水硫酸铜催化下反应得到,该末端胺基修饰的两亲性树状分子、叠氮磺酸咪唑、碳酸钾和五水硫酸铜的摩尔比1:1.1:1.5:0.1~1:2.2:2:0.5,反应后体系用乙酸二乙胺二钠盐水溶液/乙酸乙酯体系萃取,抽滤,柱层析后得到纯化产物;

步骤(1)中对于以二代两亲性聚酰胺叠氮末端树状分子的合成包含两步反应,具体反应式如下式IV所示:

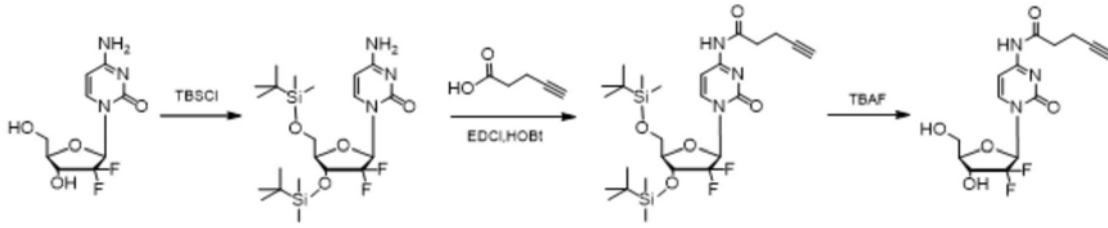


式 IV

n为亚甲基重复单元数,n为2~500之间的任意整数;

具体过程为:第一步合成末端胺基修饰的两亲性树状分子,具体为利用乙二醇与树状分子酯基之间的还原胺反应得到,该树状分子与乙二醇的摩尔比为1:10~1:80,反应时间为24~168h,反应过程在常温条件下进行,溶剂体系为有机溶剂,产物通过沉降得到;第二步合成末端叠氮修饰的两亲性树状分子,具体为末端胺基修饰的两亲性树状分子、叠氮磺酸咪唑和碳酸钾在五水硫酸铜催化下反应得到,该末端胺基修饰的两亲性树状分子、叠氮磺酸咪唑、碳酸钾和五水硫酸铜的摩尔比1:1.1:1.5:0.1~1:2.2:2:0.5,反应后体系用乙二胺二乙胺二钠盐水溶液/乙酸乙酯体系萃取,抽滤,柱层析后得到纯化产物。

5. 根据权利要求3所述的树状分子吉西他滨自组装纳米前药的制备方法,其特征在于:步骤(2)中利用含炔键的羧酸与吉西他滨之间的酰化反应合成炔键结构的吉西他滨前药分子,酰化反应通过常规反应实现,该前药分子结构中酰胺键在体内酶催化下可断裂,具体反应包括三步反应,反应式如式V所示:



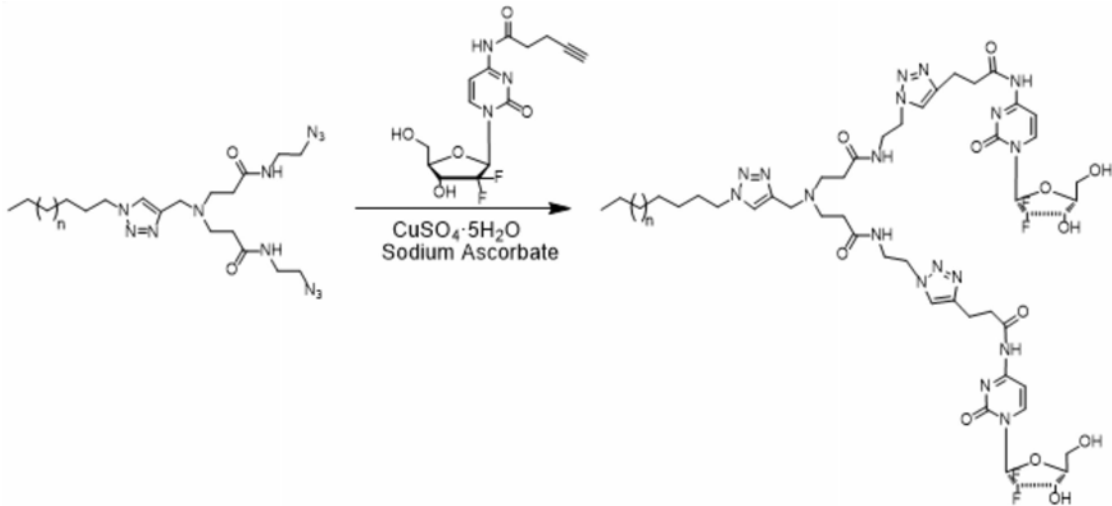
式 V

第一步,以吉西他滨和TBSCl为原料,低温条件下在有机溶剂中发生取代反应,硅胶柱层析分离纯化得到4'和5'位硅甲基保护的吉西他滨中间产物,所述有机溶剂为二氯甲烷或DMF,该吉西他滨与TBSCl的摩尔比为1:2.5~1:5,反应温度为15~30℃,反应时间为12~48h;

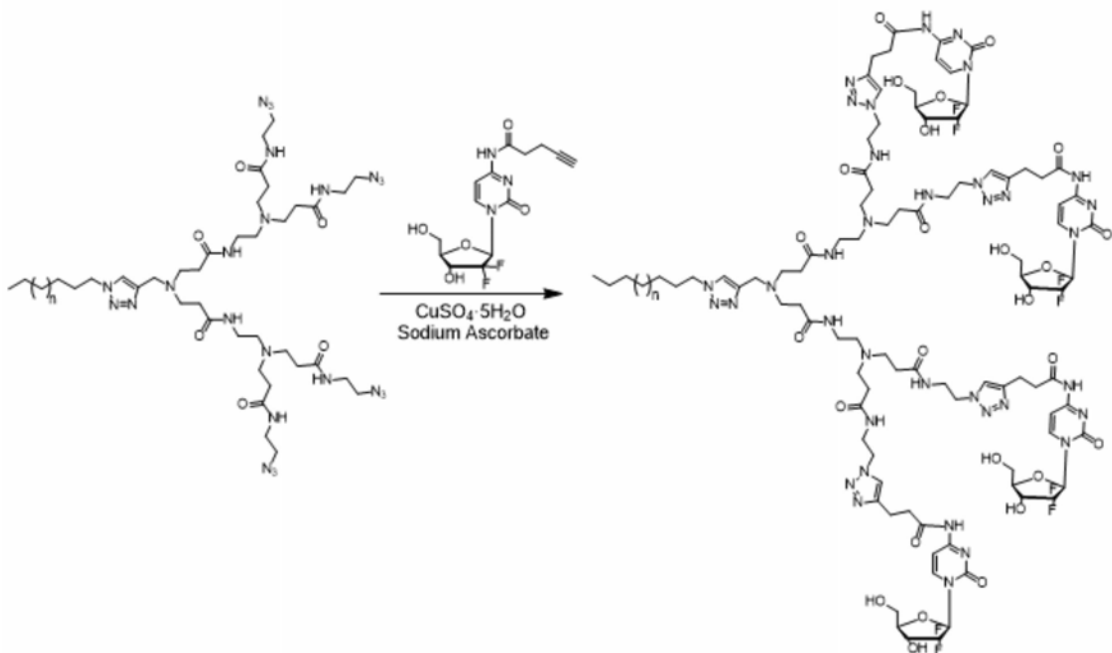
第二步,将第一步所得的产物4'和5'位硅甲基保护的吉西他滨与端炔基羧酸类化合物在有机溶剂中,于低温条件下在1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDCI)和1-羟基苯并三氮唑(HOBT)的催化下反应,硅胶柱层析分离纯化得到N4位和4'和5'位保护的吉西他滨衍生物,所述有机溶剂为二氯甲烷、四氢呋喃或二氧六环,该4'和5'位硅甲基保护的吉西他滨与端炔基羧酸类化合物的摩尔比为1:1~1:1.2,低温条件是指反应温度为-10~0℃,反应时间为12~48h;

第三步,将第二步所得的产物N4位4'和5'位保护的含炔键的吉西他滨衍生物与四正丁基氟化铵(TBAF)通过取代反应得到含有炔键结构的吉西他滨前药分子,该N4位4'和5'位保护的含炔键的吉西他滨衍生物与TBAF的摩尔比为1:2~1:4,反应温度为15-40℃,反应时间为15-60min。

6. 根据权利要求3所述的树状分子吉西他滨自组装纳米前药的制备方法,其特征在于:步骤(3)中一代树状分子吉西他滨纳米前药的制备反应式如式VI所示;二代树状分子吉西他滨纳米前药的制备反应式如式VII所示:



式 VI



式 VII

其中, n 是亚甲基的重复单元数, n 为 2~500 之间的任意整数;

步骤 (3) 的具体过程为: 利用“叠氮-炔”点击化学反应, 将步骤 (2) 得到的含有炔键结构的吉西他滨前药分子接枝到步骤 (1) 得到的末端叠氮修饰的两亲树状分子上得到两亲性树状分子吉西他滨自组装纳米前药, 其中末端叠氮修饰的两亲树状分子与含有炔键结构的吉西他滨前药分子的摩尔比为 1:1.0~1:2.0, 反应温度为 40~80℃, 溶剂体系为四氢呋喃与水的混合溶剂, 反应时间为 1~8h。

7. 权利要求 1~2 中任意一项所述的树状分子吉西他滨自组装纳米前药在抗肿瘤药物的靶向输送及抑制肿瘤细胞增殖药物的制备中的应用。

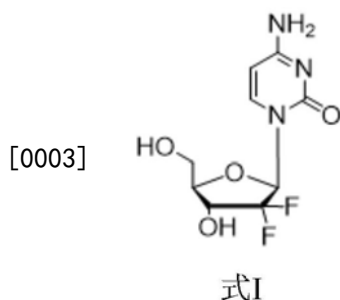
一种树状分子吉西他滨自组装纳米前药及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于纳米递药系统技术领域，具体涉及一种树状分子吉西他滨(Gemcitabine)自组装纳米前药及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 吉西他滨(式I)，1996年经FDA批准进入市场，是治疗晚期非小细胞肺癌、胰腺癌的一线药物，也用于乳腺癌、卵巢癌、鼻咽癌等恶性肿瘤的治疗(Biomed.Pharmacother.2017, 88,635.)。然而，吉西他滨极易被肝脏和血液中存在大量的脱氧胞苷脱氨酶(Cytidine deaminase,CDA)脱去4位氨基生成无活性产物2,2'-双氟脱氧尿嘧啶核苷，导致其代谢稳定性差，在人体内半衰期极短(<17min) (Eur.J.Pharm.Sci.2016,93,147.)。因此，临床通常需要持续的静脉给药或联合用药来维持其细胞毒性作用，这就会增加药物对身体正常组织器官的毒副作用，如肝肾毒性等(Eur.J.Pharm.Sci.2016,93,147.)。此外，吉西他滨是亲水性药物，难以通过自由扩散透过细胞膜，必须借助相应的核苷转运体(如hENT)将其转入细胞发挥作用。然而，这种转运体在多数病人(>65%)体内表现为缺失或表达量低(Biomaterials 2014,35,6482.)，进一步限制了吉西他滨的药效，也是肿瘤细胞对吉西他滨产生耐药的主要原因之一(Cancer Treat.Res.2002,112,27.)。因此，提高吉西他滨的疗效，减少毒副作用，是目前临床亟待研究的科学问题。



[0004] 纳米递药系统可依靠EPR效应，将负载在载体上的药物精准输送至肿瘤组织，这样的给药方式可有效减小吉西他滨类化学药物的毒副作用，进而改善化疗效果。然而，像这样将药物分子被动地包裹在载体中，除了少数可能产生的疏水相互作用或静电作用，药物分子和载体之间通常没有较强的作用力使之连接。因此，大部分药物载体存在药物包裹率低、易渗漏的问题，在制剂贮存阶段以及体内循环时都有可能发生，特别是对于吉西他滨类极性药物。此外，载体材料仅作为药物递送的工具而没有药效，且在整个药物递送系统的组成中占有极大比重，致使药物的负载量相对较低；聚合物载体材料的分子量及其分布控制相对困难；大量辅料的使用会引起不必要的代谢问题和毒副作用，严重限制了纳米药物的临床转化和广泛应用。因此，急需设计开发新型药物递送系统用以提高药物递送效率。

[0005] 基于前体药物的自组装前药纳米递送系统(SAPDs)将前体药物和纳米技术的优点结合到一起，以其载药量高、稳定性好、毒副作用低等优势，已成为化疗药物递送研究的热点(Materials Today Chemistry 2017,4,26.)。所谓自组装前药递送系统主要特征就是将药物分子与各种类型的材料共价结合或其他药物形成两亲性前药，然后通过一定方法将其

分散到水中,制备成为纳米结构或纳米聚集体。Couvreur等人将亲水性药物吉西他滨(dFdC)与角鲨烯酸(SQ)反应得到两亲性共轭分子SQdFdC,并使用化学沉淀法得到SQdFdC自组装前药纳米体系(SQdFdCNAs)(J.Control Release 2007,124,20.)。SQdFdCNAs在荷瘤小鼠体内血液相容性较原型药吉西他滨更好,口服给药时小鼠的存活率明显提高,显示出较好的抗肿瘤效果。Yan研究团队通过酯化反应将亲水药物伊立替康(Ir)与疏水药物苯丁酸氮芥(Cb)连接得到一种两亲性药物-药物共轭体(ADDC-Ir-Cb)。ADDC-Ir-Cb可在水中自组装形成稳定的纳米药物自递送系统(J.Am.Chem.Soc.2014,136,11748.)。与单药相比,该纳米体系能够延长负载药物的体内循环时间,极大促进药物在肿瘤部位的富集。另外纳米尺寸的粒子可以有效克服肿瘤细胞的多药耐药性,最终显示出显著的体内外抗肿瘤活性。可见,在自组装前药递送系统中药物分子不仅仅只是作为治疗药物也是载体的一部分。

[0006] 构建SAPDs的关键是前药分子的设计。前药分子首先要具备两亲性,以保证整个体系可形成稳定的自组装体;其次还需要能够在靶部位以适当的解离速率将原药从聚集体中释放,从而获得控释的效果。因此,通常SAPDs的设计制备因药而异,依赖于药物的化学结构,每种药物SAPDs的制备都需选择合适的组装策略并进行合理的分子设计,而且药物的比例难以调控和优化,在一定程度上限制了这类递送系统的广泛应用。因此,急需简捷有效地解决方案来进一步推广这类药物递送系统的使用。

发明内容

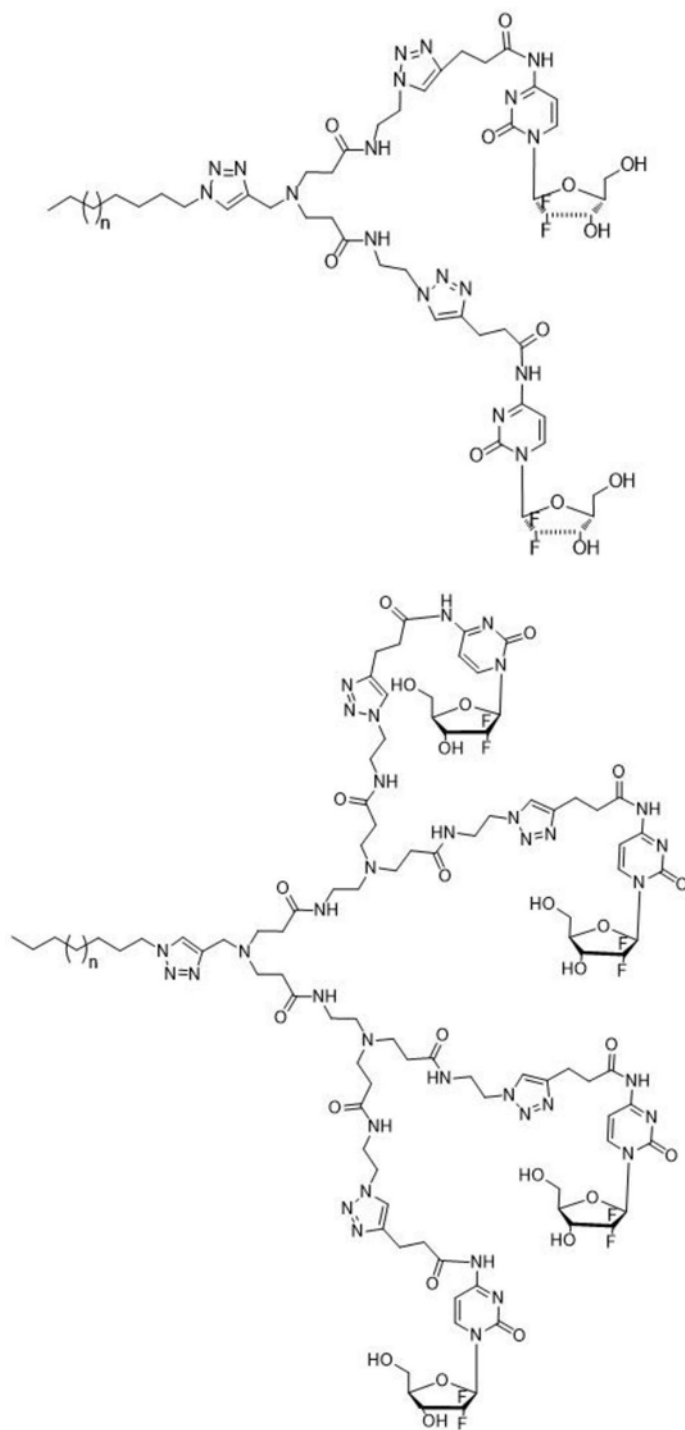
[0007] 为了克服上述现有技术中自组装纳米前药的缺点与不足,本发明的首要目的在于提供了一种树状分子吉西他滨自组装纳米前药,该自组装纳米前药的亲水链段为聚酰胺树状分子,疏水链段为烃基长链或聚乙二醇;亲水链段和疏水链段通过高效能的“叠氮-炔”点击化学反应联接;小分子抗肿瘤药吉西他滨的前药分子被化学键合到树状分子的表面得到树状分子吉西他滨自组装纳米前药;两亲性纳米前药在水溶液中自组装形成纳米胶束,可有效提高原药稳定性;基于树状分子的自组装纳米前药的载药量高,合成便捷,抗肿瘤活性显著高于原型药物。

[0008] 本发明的另一目的在于提供了上述树状分子吉西他滨自组装纳米前药的制备方法。

[0009] 本发明的再一目的在于提供了上述树状分子吉西他滨自组装纳米前药在抗肿瘤药物的靶向递送及抑制肿瘤细胞增殖药物制备中的应用。

[0010] 本发明为实现上述目的采用如下技术方案:一种树状分子吉西他滨自组装纳米前药,其特征在于该自组装纳米前药具有式II所示结构:

[0011]



式II

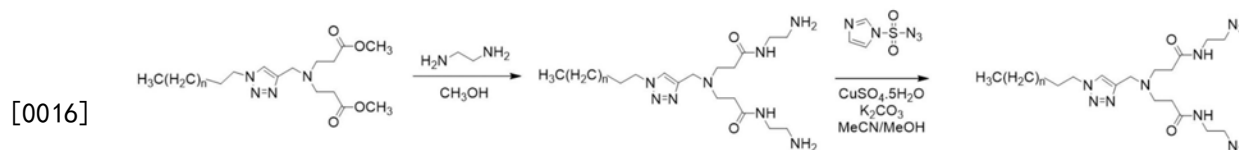
[0012] 其中 n 为亚甲基重复单元数, n 为2~500之间的任意整数。

[0013] 本发明还提供一种树状分子吉西他滨自组装纳米前药的制备方法,其特征在于包括以下步骤:(1)合成末端叠氮修饰的两亲树状分子;(2)合成含有炔键结构的吉西他滨前药分子;(3)通过Click反应,将步骤(2)合成的前药分子接枝到步骤(1)合成的树状分子表面,最终得到树状分子吉西他滨自组装纳米前药。

[0014] 步骤(1)的具体过程为:利用含胺基的一代或二代树状分子与叠氮磺酰咪唑之间的取代反应,合成叠氮末端的树状分子类似物,上述取代反应通过常规反应即可实现,该树

状分子结构中的叠氮基团用于连接药物分子。

[0015] 其中,对于一代以烷基长链作为疏水部分的叠氮末端树状分子的合成包含两步反应,具体反应式如下式III所示:

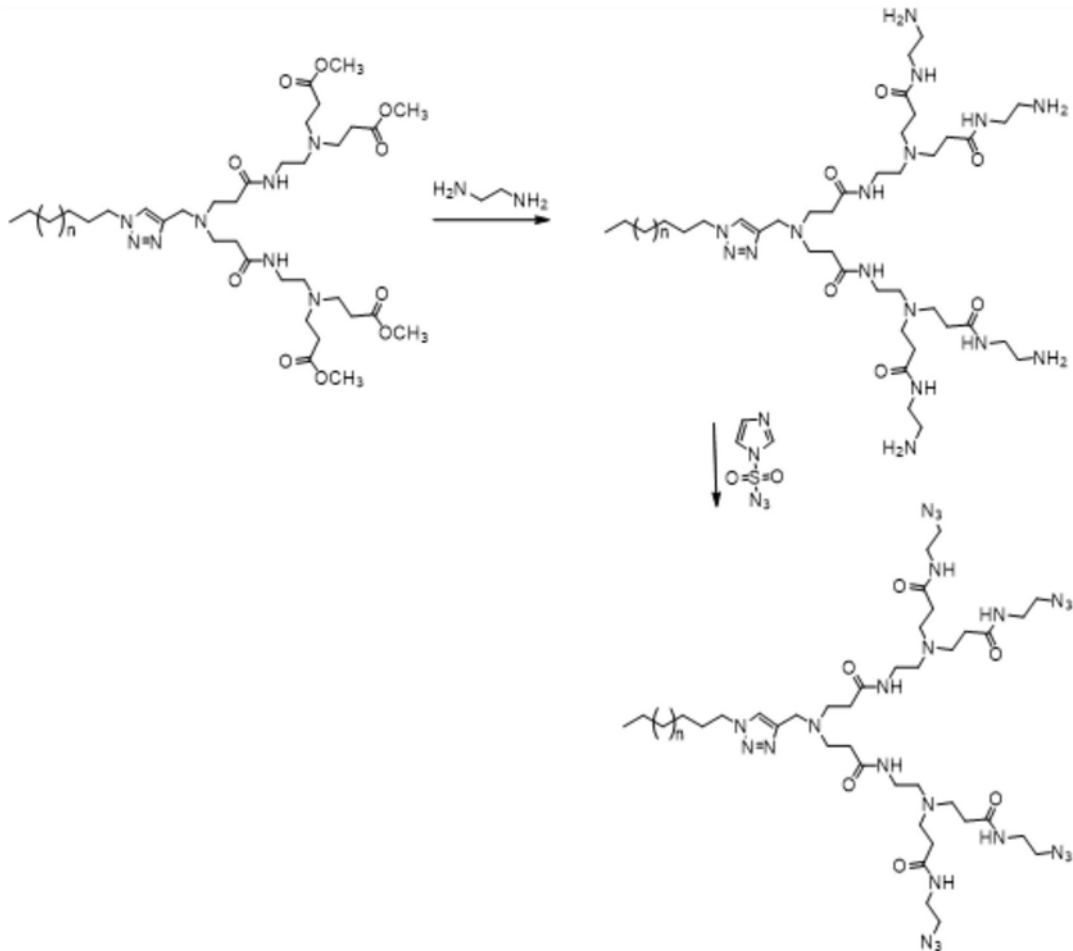


式 III

[0017] n 为亚甲基重复单元数,优选为5~500。

[0018] 第一步合成末端胺基修饰的两亲性树状分子,具体过程为利用乙二胺与树状分子酯基之间的还原胺反应得到,所用树状分子为一代或二代,该树状分子与乙二胺的摩尔比为1:10~1:80,反应时间为24~168h,反应过程优选在常温条件下进行,溶剂体系为有机溶剂,具体为甲醇,产物通过硅胶柱层析或透析,冻干后得到;第二步合成末端叠氮修饰的两亲性树状分子,具体过程为末端胺基修饰的两亲性树状分子、叠氮磺酸咪唑及碳酸钾在五水硫酸铜催化下反应得到,该末端胺基修饰的两亲性树状分子、叠氮磺酸咪唑、碳酸钾和五水硫酸铜的摩尔比1:1.1:1.5:0.1~1:2.2:2:0.5,具体操作过程优选为将叠氮磺酸咪唑溶解在乙醇和甲醇的混合溶剂中,再依次加入末端胺基修饰的两亲树状分子、碳酸钾和五水硫酸铜后继续反应12~36h得到产物,反应后体系用乙二酸二乙胺二钠盐(EDTA)水溶液/乙酸乙酯体系萃取,抽滤,柱层析后得到纯化产物。

[0019] 其中,对于以二代两亲性聚酰胺叠氮末端树状分子的合成包含两步反应,具体反应式如下式IV所示:



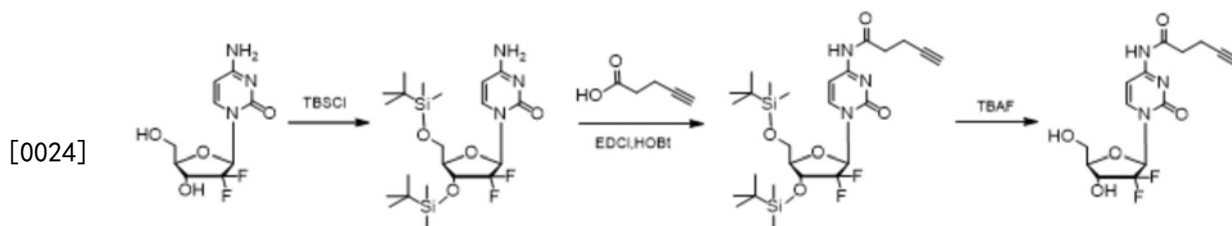
[0020]

式 IV

[0021] n 为亚甲基重复单元数, n 为2~500之间的任意整数。

[0022] 第一步合成末端胺基修饰的两亲性树状分子,具体过程为利用乙二胺与树状分子酯基之间的还原胺反应得到,该树状分子与乙二胺的摩尔比为1:10~1:80,反应时间为24~168h,反应过程优选在常温条件下进行,溶剂体系为有机溶剂,具体为甲醇,产物通过沉降得到;第二步合成末端叠氮修饰的两亲性树状分子,具体过程为末端胺基修饰的两亲性树状分子、叠氮磺酸咪唑和碳酸钾在五水硫酸铜催化下反应得到,该末端胺基修饰的两亲性树状分子、叠氮磺酸咪唑、碳酸钾和五水硫酸铜的摩尔比1:1.1:1.5:0.1~1:2.2:2:0.5,具体操作过程优选为将叠氮磺酸咪唑溶解在乙醇和甲醇的混合溶剂中,再依次加入末端胺基修饰的树状分子、碳酸钾和五水硫酸铜后继续反应12~36h得到产物,反应后体系用乙二酸二乙胺二钠盐(EDTA)水溶液/乙酸乙酯体系萃取,抽滤,柱层析后得到纯化产物。

[0023] 步骤(2)的具体过程为:利用含炔键的羧酸与吉西他滨之间的酰化反应合成炔键结构的吉西他滨前药分子,上述酰化反应通过常规反应即可实现,该前药分子结构中酰胺键在体内酶催化下可断裂,具体反应包括三步反应,反应式如式V所示:



式V

[0025] 第一步,以吉西他滨和TBSCl为原料,低温条件下在有机溶剂中发生取代反应,硅胶柱层析分离纯化得到4'和5'位硅甲基保护的吉西他滨中间产物;所述有机溶剂为二氯甲烷或DMF,吉西他滨与TBSCl的摩尔比为1:2.5~1:5,反应温度为15~30℃,反应时间为12~48h;具体过程为:取吉西他滨溶于有机溶剂中,再向其中加入TBSCl和咪唑,室温下搅拌反应,最后用3-10倍量的蒸馏水淬灭反应,乙酸乙酯萃取,收集有机相,干燥,过滤,浓缩,硅胶柱层析分离,洗脱液为二氯甲烷/甲醇,得到4'和5'位硅甲基保护的吉西他滨。

[0026] 第二步,将第一步所得的产物4'和5'位硅甲基保护的吉西他滨与端炔基羧酸类化合物在有机溶剂中,于低温条件下在1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDCI)和1-羟基苯并三氮唑(HOBT)的催化下反应,硅胶柱层析分离纯化得到N4位和4'和5'位保护的吉西他滨衍生物;所述有机溶剂为二氯甲烷、四氢呋喃或二氧六环,该4'和5'位硅甲基保护的吉西他滨与端炔基羧酸类化合物的摩尔比为1:1~1:1.2,低温条件是指反应温度为-10~0℃,反应时间为12~48h;具体过程为:低温下将端炔基羧酸类化合物、偶联试剂溶于有机溶剂中,继续搅拌30~60min,然后将第一步得到的产物4'和5'位硅甲基保护的吉西他滨缓慢加入反应体系,室温下搅拌反应,最后用蒸馏水淬灭反应,萃取,收集有机相,干燥,过滤,硅胶柱层析分离,洗脱液为石油醚乙酸乙酯,得到产物N4位4'和5'位保护的含炔键的吉西他滨衍生物。

[0027] 第三步,将第二步所得的产物N4位4'和5'位保护的含炔键的吉西他滨衍生物与四正丁基氟化铵(TBAF)通过取代反应得到含有炔键结构的吉西他滨前药分子,该N4位4'和5'位保护的含炔键的吉西他滨衍生物与TBAF的摩尔比为1:2~1:4,反应温度为15-40℃,反应时间为15-60min。

[0028] 步骤(3)的具体过程和产物结构如下所示。其中,式VI是一代树状分子吉西他滨纳米前药的制备反应式;式VII是二代树状分子吉西他滨纳米前药的制备反应式。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/768130071006006070>