



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105616359 A

(43) 申请公布日 2016.06.01

(21) 申请号 201610151658.1

A61P 35/00(2006.01)

(22) 申请日 2016.03.16

(71) 申请人 四川大学

地址 610065 四川省成都市武侯区一环路南一段 24 号

(72) 发明人 郭刚 范让让 全爱平 魏于全

(74) 专利代理机构 成都科海专利事务有限责任公司 51202

代理人 唐丽蓉

(51) Int. Cl.

A61K 9/16(2006.01)

A61K 47/34(2006.01)

A61K 45/00(2006.01)

A61K 31/337(2006.01)

权利要求书1页 说明书10页 附图3页

(54) 发明名称

一种多嵌段聚合物纳米纤维载药微球及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开的一种多嵌段聚合物纳米纤维载药微球及其制备方法,该微球是先将聚乳酸-泊洛沙姆-聚乳酸多嵌段聚合物和抗肿瘤药物在有机溶剂中充分溶解,然后加入反式泊洛沙姆的分散剂混合均匀并置于液氮中冷冻,再将冷冻物与冰水混合物进行溶剂交换,洗涤、冷冻干燥所得。该微球由纳米纤维丝自然交织构成的中空微球,其粒径为 20 ~ 200 μm ,微球表面的纳米纤维丝直径为 400 ~ 1200nm,理论载药量为 8 ~ 20%,实际载药量为 7.45 ~ 17.50%,包封率为 87.48 ~ 94.18%。本发明不仅避免了添加表面活性剂或致孔剂所带来的问题,降低了成本,还提高了微球的载药量及包封率。

1. 一种多嵌段聚合物纳米纤维载药微球的制备方法, 该方法的工艺步骤和条件如下:

(1) 将46~364份的聚乳酸-泊洛沙姆-聚乳酸多嵌段聚合物和以聚乳酸-泊洛沙姆-聚乳酸多嵌段聚合物的质量计8~20%的抗肿瘤药物加入50~70℃、2500~20000份有机溶剂中, 搅拌使其充分溶解, 得到澄清溶液A;

(2) 先将以溶液A的体积计3~6倍的溶剂B于水浴中预热至50~70℃, 然后加入按溶剂B的体积计0.1~0.3%的分散剂, 形成混合溶液C;

(3) 在搅拌条件下, 将预热的混合溶剂C缓慢加入到澄清溶液A中, 加完后继续搅拌10~30min倒入液氮中, 静置20~40min得到冷冻物;

(4) 以冷冻物体积计向其中加入 ≥ 1 倍体积的冰水混合物, 进行溶剂交换24~48h后用蒸馏水洗涤3~6遍, 冷冻干燥后于20℃以下保存。

2. 根据权利要求1所述的多嵌段聚合物纳米纤维载药微球的制备方法, 该方法中所用的聚乳酸-泊洛沙姆-聚乳酸多嵌段聚合物的理论数均分子量为 $1.0 \times 10^4 \sim 5.0 \times 10^4$ 。

3. 根据权利要求1或2所述的多嵌段聚合物纳米纤维载药微球的制备方法, 该方法中所用的聚乳酸-泊洛沙姆-聚乳酸多嵌段聚合物的泊洛沙姆为泊洛沙姆F68、泊洛沙姆L64或泊洛沙姆L35中的任一种。

4. 根据权利要求1或2所述的多嵌段聚合物纳米纤维载药微球的制备方法, 该方法中所用的抗肿瘤药物为卡巴他赛、紫杉醇或多烯紫杉醇中的任一种。

5. 根据权利要求3所述的多嵌段聚合物纳米纤维载药微球的制备方法, 该方法中所用的抗肿瘤药物为卡巴他赛、紫杉醇或多烯紫杉醇中的任一种。

6. 根据权利要求1或2所述的多嵌段聚合物纳米纤维载药微球的制备方法, 该方法中所用的溶剂B为丙三醇、相对分子质量为200~600的聚乙二醇和季戊四醇中的至少一种。

7. 根据权利要求5所述的多嵌段聚合物纳米纤维载药微球的制备方法, 该方法中所用的溶剂B为丙三醇、相对分子质量为200~600的聚乙二醇和季戊四醇中的至少一种。

8. 根据权利要求1或2所述的多嵌段聚合物纳米纤维载药微球的制备方法, 该方法中所用的分散剂为反式泊洛沙姆10R5或反式泊洛沙姆17R4。

9. 根据权利要求7所述的多嵌段聚合物纳米纤维载药微球的制备方法, 该方法中所用的分散剂为反式泊洛沙姆10R5或反式泊洛沙姆17R4。

10. 一种由权利要求1所述方法制备的多嵌段聚合物纳米纤维载药微球, 该微球是由纳米纤维丝自然交织构成的中空微球, 其粒径为20~200 μm , 微球表面的纳米纤维丝直径为400~1200nm, 理论载药量为8~20%, 实际载药量为7.45~17.50%, 包封率为87.48~94.18%。

一种多嵌段聚合物纳米纤维载药微球及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于可生物降解的载药微球及其制备技术领域,特别是涉及一种多嵌段聚合物纳米纤维载药微球及其制备方法,更具体地讲,是一种在制备过程无需添加任何表面活性剂及致孔剂的方法制备的多嵌段聚合物纳米纤维载药微球。

背景技术

[0002] 现今临床上应用的药物,特别是抗肿瘤的药物,大多数具有较强的副作用,其主要原因是药物对组织或器官的选择性低,分布广,即靶向性差。不仅如此,抗肿瘤药物在对病理细胞有杀灭或抑制作用的同时,对正常的组织细胞的代谢也有影响,从而产生了与治疗目的无关的毒副作用。将抗肿瘤药物负载于微球中,则既可以达到降低药物毒副作用,提高药物稳定性的目的,还能延长半衰期较短药物的作用时间,提高治疗效果。

[0003] 聚合物载药微球(microspheres)是指药物溶解或者分散在高分子材料基质中形成的微小球状实体,是一种较为新型的药物剂型。与传统药物剂型相比具有以下优点:(1)可大大降低给药剂量和频率,提高患者的顺应性;(2)缓释时间长,可延长半衰期较短药物的作用时间,使体内血药浓度稳定;(3)毒副作用小;(4)具有靶向性;(5)可提高药物稳定性,保护装载的多肽及蛋白质免受酸和酶的破坏。

[0004] 目前,属于高分子材料类微球中的多孔/介孔微球,是一种具有特殊表面形态的功能高分子材料,与一般的聚合物微球相比较,因其比表面积更大、稳定性好、可控性强和表面渗透能力强等特点,在材料科学、生物工程、医学研究等领域均有着广泛的应用。如戴平望【可降解聚乳酸多孔微球的制备探究[J].应用化工,2014,43(3),449-452.】就以聚乳酸为壁材,碳酸氢铵为致孔剂,采用溶剂挥发法,制备出具有孔状的聚乳酸微球。虽然以碳酸钠、碳酸氢钠等盐类化合物作为致孔剂的致孔效果还不错,但是因有部分盐离子会留在微球中,故而根据微球的应用过程中的要求还需要进行后续处理,不仅导致制备工序增加,且还不能保证完全除去。另外,虽然碳酸氢铵在分解过程中能直接分解成氨气和二氧化碳,利于微球孔的形成,但所得的微球表面上的介孔实际上是一种极小的针孔状结构,且分布不均匀,也没有达到贯穿整个微球体的效果。而且单纯PLA均聚物有较高的熔点和黏度,流动性和热稳定性较差,大分子链中不含可反应活性基团,因此导致亲水性差、降解速度慢、不利于细胞在材料表面黏附和生长。

[0005] 聚合物载药微球一般采用乳液/溶剂蒸发法来制备,在制备和储存中都需要采用表面活性剂以防止制备过程中乳液滴的合并及存储过程中微球的聚集。如CN 1398584A中介绍了“一种bFGF-PLGA缓释微球及其制备方法和用途”,该方法是以表面活性剂聚乙烯醇(PVA)或者聚乙烯醇-聚乙二醇(PVA-PEG)的混合液为乳化剂,通过溶剂挥发法制备出了以聚乳酸-聚乙醇酸共聚物(PLA-PGA,PLGA)装载成纤维细胞生长因子(bFGF)的缓释微球。虽然该方法改善了微球粒径分布及其体外释药情况,提高了药物的利用效率,但是该方法并未给出如何去除制备过程中加入的表面活性剂PVA的方式,而若PVA残留量较多还会造成微球冻干后相互粘连,不易分开,重分散性较差,影响后续的使用。如果采用常规的水洗方法

除去,则由于水洗过程中需要大量的水反复冲洗,既加大了制备微球的工作量,同时容易导致微球中药量的流失,不能保证稳定的载药量。

发明内容

[0006] 本发明的目的是针对现有技术存在的问题,首先提供一种由泊洛沙姆修饰PLA所得的多嵌段聚合物纳米纤维载药微球的制备方法,该方法在微球的制备过程中,不需要添加任何表面活性剂及致孔剂。

[0007] 本发明的另一目的是提供一种由上述方法制备的多嵌段聚合物纳米纤维载药微球。

[0008] 本发明提供的多嵌段聚合物纳米纤维载药微球的制备方法,该方法的工艺步骤和条件如下:

[0009] (1)将46~364份的聚乳酸-泊洛沙姆-聚乳酸多嵌段聚合物和以聚乳酸-泊洛沙姆-聚乳酸多嵌段聚合物的质量份计8~20%的抗肿瘤药物加入50~70℃、2500~20000份有机溶剂中,搅拌使其充分溶解,得到澄清溶液A;

[0010] (2)先将以溶液A的体积计3~6倍的溶剂B于水浴中预热至50~70℃,然后加入按溶剂B的体积计0.1~0.3%的分散剂,形成混合溶液C;

[0011] (3)在搅拌条件下,将预热的混合溶剂C缓慢加入到澄清溶液A中,加完后继续搅拌10~30min倒入液氮中,静置20~40min得到冷冻物;

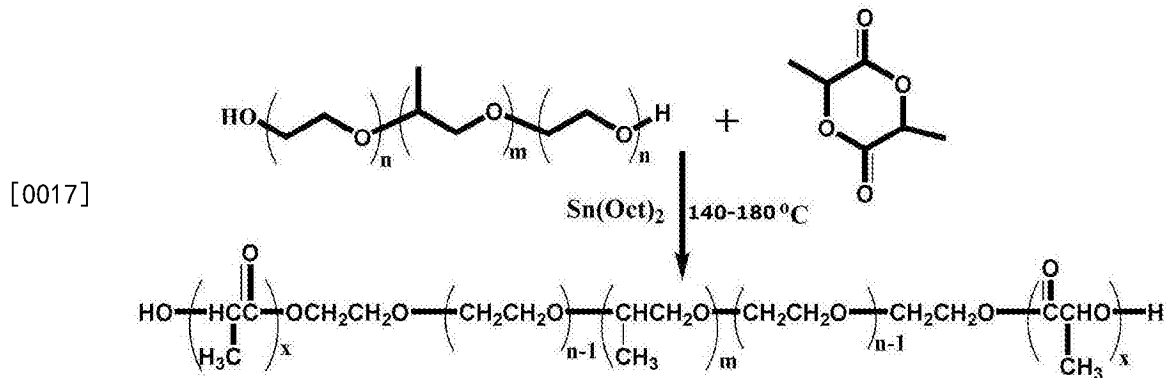
[0012] (4)以冷冻物体积计向其中加入≥1倍体积的冰水混合物,进行溶剂交换24~48h后用蒸馏水洗涤3~6遍,冷冻干燥后于20℃以下保存。

[0013] 以上方法中所用的聚乳酸-泊洛沙姆-聚乳酸多嵌段聚合物的理论数均分子量为 $1.0 \times 10^4 \sim 5.0 \times 10^4$ 。

[0014] 以上方法中所用的聚乳酸-泊洛沙姆-聚乳酸多嵌段聚合物是由以下方法制备而成的:该方法是将质量比为0.786~25.31的L-丙交酯、泊洛沙姆F68及按照L-丙交酯与泊洛沙姆的总质量计0.3%的辛酸亚锡作为催化剂加入到反应容器中,于氮气流保护下,将反应物加热至140-180℃,搅拌反应15-24h,冷却至室温,然后按照常规的方法提纯(李资玲,熊向源,龚妍春,李玉萍.包埋紫杉醇的Pluronic P85/聚乳酸纳米粒子制备及体外释放行为考察.中国实验方剂学杂志.2014.20,1-4.),即用二氯甲烷先溶解反应所得物,再加入以二氯甲烷体积计10倍量的甲醇中,有白色物质析出,过滤,用二氯甲烷溶解白色沉淀物后再放入以二氯甲烷体积计10倍量的乙醚中,过滤,干燥,即得聚乳酸-泊洛沙姆-聚乳酸多嵌段聚合物。

[0015] 以上方法中所用的泊洛沙姆为泊洛沙姆F68、泊洛沙姆L64或泊洛沙姆L35(简称为F68、L64或L35)中的任一种。

[0016] 以上方法的反应路线如下:



[0018] 以上方法中所用的抗肿瘤药物为卡巴他赛(Cabazitaxel, 缩写Cbz)、紫杉醇(Paclitaxel, 缩写PTX)或多烯紫杉醇(Docetaxel, 缩写DOC)中的任一种。

[0019] 以上方法中所用的有机溶剂为三氯甲烷、丙酮、乙醇、乙腈和四氢呋喃中的至少一种, 优选丙酮和四氢呋喃。

[0020] 以上方法中所用的溶剂B为丙三醇、相对分子质量为200-600的聚乙二醇和季戊四醇中的至少一种。

[0021] 以上方法中所用的分散剂为反式泊洛沙姆10R5或反式泊洛沙姆17R4。

[0022] 本发明提供的由上述方法制备的多嵌段聚合物纳米纤维载药微球, 该微球是由纳米纤维丝自然交织构成的中空微球, 其粒径为20~200 μm , 微球表面的纳米纤维丝直径为400~1200nm, 理论载药量为8~20%, 实际载药量为7.45~17.50%, 包封率为87.48~94.18%。

[0023] 本发明与现有技术相比, 具有以下优点:

[0024] 1、由于本发明提供的多嵌段聚合物纳米纤维载药微球是由泊洛沙姆修饰后所得的聚乳酸多嵌段聚合物制备的, 不仅使所得微球呈完全由纳米纤维丝自然交织构成的中空微球, 且壳体上的纤维丝分布均匀, 其间形成的介孔能够贯穿整个微球, 因而既能够增加微球的比表面积, 又能够增加药物在微球纳米纤维丝外壳中的均匀分散程度, 进而提高了微球的载药量及包封率。

[0025] 2、由于本发明提供的多嵌段聚合物纳米纤维载药微球表面为纳米纤维丝状且其内呈中空结构, 具有介孔微球与纳米纤维丝的双重优点, 因而所组成的纳米-微球缓释系统, 不仅能够有效地控制抗肿瘤药物的缓慢释放, 且不会有明显的暴释现象, 可提高药物稳定性, 保护装载的多肽及蛋白质免受酸和酶的破坏, 延长疗效。

[0026] 3、由于本发明提供的多嵌段聚合物纳米纤维载药微球的分子链中既含有聚乳酸, 又含有泊洛沙姆, 因而该微球不仅具有聚乳酸优良的生物相容性、生物可吸收性, 且还克服单纯聚乳酸均聚物亲水性差、降解速度慢、不利于细胞在材料表面黏附和生长的缺点。

[0027] 4、由于本发明提供的是以新型聚乳酸-泊洛沙姆-聚乳酸多嵌段聚合物为基体材料制备的具有良好生物可降解性的微球, 因而可直接注射于肿瘤病灶部位, 进行区域性缓释化疗, 不仅使肿瘤部位药物量多, 作用时间长, 局部疗效好, 也减少了全身药物量, 降低了血药浓度, 几乎无不良反应, 同时还可以避免被体内免疫系统如单核吞噬细胞系统(MPS)以及网状内皮系统(RES)摄取, 并很快在循环系统中被清除的缺点, 在生物医学领域具有潜在的应用价值。

[0028] 5、由于本发明提供的方法是以新型聚乳酸-泊洛沙姆-聚乳酸多嵌段聚合物为基

体材料来制备微球,在制备过程中不需要添加任何表面活性剂或致孔剂就能形成完全由纳米纤维丝自然交织构成的中空微球,因而不仅避免了添加表面活性剂或致孔剂所带来的一系列问题,且也降低了制备成本,简化了操作,提高了制备效率,避免了药量的流失。

[0029] 6、由于本发明提供的方法不仅可以通过调节PLA和泊洛沙姆的投料比例来控制材料的组成,还可以通过改变载药微球的制备工艺来控制微球的大小、载药量和形貌,因而可以获得不同降解速度,不同药物释放速度的载药微球,以满足不同的治疗需求。

附图说明

[0030] 图1为本发明制备的聚乳酸-泊洛沙姆-聚乳酸多嵌段聚合物的红外图谱,其中a为聚乳酸-泊洛沙姆F68-聚乳酸多嵌段聚合物,b为聚乳酸泊洛沙姆L64-聚乳酸多嵌段聚合物,c为聚乳酸-泊洛沙姆L35-聚乳酸多嵌段聚合物。

[0031] 图2为本发明实施例1制备的聚乳酸-泊洛沙姆F68-聚乳酸($M_n = 1.5 \times 10^4$)多嵌段聚合物的核磁图谱。

[0032] 图3为本发明实施例2制备的聚乳酸-泊洛沙姆L64-聚乳酸($M_n = 4.5 \times 10^4$)多嵌段聚合物的核磁图谱。

[0033] 图4为本发明实施例3制备的聚乳酸-泊洛沙姆L35-聚乳酸($M_n = 3.5 \times 10^4$)多嵌段聚合物的核磁图谱。

[0034] 图5为本发明制备的聚乳酸-泊洛沙姆-聚乳酸多嵌段聚合物的热重分析(Thermogravimetric Analysis, TG)曲线,其中a为聚乳酸-泊洛沙姆F68-聚乳酸多嵌段聚合物,b为聚乳酸泊洛沙姆L64-聚乳酸多嵌段聚合物,c为聚乳酸-泊洛沙姆L35-聚乳酸多嵌段聚合物。从图中可见,本发明制备的聚乳酸-泊洛沙姆-聚乳酸多嵌段聚合物的降解过程分为两个阶段,且在500℃残余量为0%,说明在500℃是能完全降解的。

[0035] 图6为本发明制备的纯聚乳酸-泊洛沙姆L35-聚乳酸多嵌段聚合物(a)、纯Cbz(b)、含有10%(w/w)Cbz/聚乳酸-泊洛沙姆L35-聚乳酸多嵌段聚合物纳米纤维载药微球(c)和含有10%(w/w)Cbz与聚乳酸-泊洛沙姆L35-聚乳酸多嵌段聚合物(d)的物理混合物的红外图谱。从图谱可见,在680-800 cm^{-1} 位置,与曲线a相比,曲线c和d新出现的微小特征吸收峰,刚好对应曲线b中在680-800 cm^{-1} 位置特征吸收峰,说明药物已成功装载于纳米纤维微球中。

[0036] 图7为本发明制备的纯聚乳酸-泊洛沙姆L35-聚乳酸多嵌段聚合物(a)、纯Cbz(b)、含有10%(w/w)Cbz/聚乳酸-泊洛沙姆L35-聚乳酸多嵌段聚合物纳米纤维载药微球(c)和含有10%(w/w)Cbz与聚乳酸-泊洛沙姆L35-聚乳酸多嵌段聚合物(d)的物理混合物的X射线衍射图谱。从图中可以看出含有10%(w/w)Cbz与聚乳酸-泊洛沙姆L35-聚乳酸多嵌段聚合物的XRD曲线中有Cbz的衍射峰,而在含有10%(w/w)Cbz/聚乳酸-泊洛沙姆L35-聚乳酸多嵌段聚合物纳米纤维载药微球的XRD曲线则看不到,说明药物以非晶态的形式装载于纳米纤维微球中。

[0037] 图8为纯Cbz(a)及Cbz/聚乳酸-泊洛沙姆L35-聚乳酸多嵌段聚合物纳米纤维载药微球(b)中Cbz的释放曲线。从图中可以看出纳米纤维载药微球中的Cbz的释放速度较纯Cbz的释放速度缓慢许多,说明该纳米纤维载药微球有较明显的缓释效果。

[0038] 图9为本发明制备的纯聚乳酸-泊洛沙姆L35-聚乳酸多嵌段聚合物(a)、纯Cbz(b)、含有10%(w/w)Cbz/聚乳酸-泊洛沙姆L35-聚乳酸多嵌段聚合物纳米纤维载药微球(c)和含

有10%(w/w)Cbz与聚乳酸-泊洛沙姆L35-聚乳酸多嵌段聚合物(d)的物理混合物的TG曲线。从TG曲线可以看出,纳米纤维载药微球与10%(w/w)Cbz与聚乳酸-泊洛沙姆L35-聚乳酸多嵌段聚合物(d)的物理混合物的TG曲线的最终残余量基本吻合,且都位于纯Cbz与聚乳酸-泊洛沙姆L35-聚乳酸多嵌段聚合物的TG曲线之间,可以从侧面反应出药物装载成功。

[0039] 图10为本发明制备的多嵌段聚合物纳米纤维载药微球的(放大倍数500×)SEM图,图像中的标尺为20μm。从图中可以看出微球是一表面呈现纳米纤维丝状的中空圆球体。

[0040] 图11为本发明制备的多嵌段聚合物纳米纤维载药微球的(放大倍数2000×)SEM图,图像中的标尺为5μm。从图中可以看出微球的表面呈现均匀的纳米纤维丝。

[0041] 图12为CT26腹膜转移结肠癌小鼠模型生长曲线。其中a为生理盐水组,b为空白纳米纤维载药微球组,c为纯Cbz组,d为Cbz/聚乳酸-泊洛沙姆L35-聚乳酸多嵌段聚合物纳米纤维载药微球组。可以看出Cbz/聚乳酸-泊洛沙姆L35-聚乳酸多嵌段聚合物纳米纤维载药微球组小鼠的生存期明显延长,这无疑得益于药物的持续缓慢释放。

[0042] 图13为CT26腹膜转移结肠癌小鼠肿瘤的细胞凋亡免疫组化图。其中a为生理盐水组,b为空白纳米纤维载药微球组,c为纯Cbz组,d为Cbz/聚乳酸-泊洛沙姆L35-聚乳酸多嵌段聚合物纳米纤维载药微球组。可以看出Cbz/聚乳酸-泊洛沙姆L35-聚乳酸多嵌段聚合物纳米纤维载药微球组小鼠肿瘤的凋亡细胞数远远大于其余各组。

[0043] 图14为CT26腹膜转移结肠癌小鼠肿瘤的细胞凋亡率统计图。其中a为生理盐水组,b为空白纳米纤维载药微球组,c为纯Cbz组,d为Cbz/聚乳酸-泊洛沙姆L35-聚乳酸多嵌段聚合物纳米纤维载药微球组。可以看出Cbz/聚乳酸-泊洛沙姆L35-聚乳酸多嵌段聚合物纳米纤维载药微球组小鼠肿瘤的凋亡率远远大于其余各组。

具体实施方式

[0044] 下面给出实施例以对本发明的上述内容作进一步的详细说明。但不应将此理解为本发明上述主题的范围仅限于以下的实施例。在不脱离本发明上述技术思想情况下,根据本领域普通技术知识和惯用手段作出的各种替换或变更,均包括在本发明的范围内。

[0045] 值得说明的是:1)以下实施例所用泊洛沙姆F68的 $M_n=8400$,泊洛沙姆L64的 $M_n=2900$,泊洛沙姆L35的 $M_n=1900$,且均购自美国Sigma-Aldrich公司,分析纯。2)以下实施例所得的聚乳酸-泊洛沙姆-聚乳酸多嵌段聚合物的重均分子量(M_w^c)和数均分子量(M_n^c)是采用凝胶渗透色谱仪(GPC)方法测得的, M_n^b 是根据 ^1H-NMR 计算所得, M_n^a 则是根据投料比计算的理论值。3)以下实施例所得载药微球粒径的测定是采用马尔文激光粒度仪(马尔文2000,马尔文仪器有限公司,英国)。4)以下实施例中多嵌段聚合物纳米纤维载药微球中载药量的测定是采用反向高效液相色谱法测定,检测波长为230nm,流动相为乙腈:水(50:50)。5)以下实施例所得微球的载药量和包封率是按以下公式计算的:

[0046] 实际载药量=纳米纤维载药微球中药物量/纳米纤维载药微球总量×100%

[0047] 包封率=纳米纤维载药微球中药物量/投药量×100%

[0048] 实施例1

[0049] 在氮气流保护下,将质量比为0.786的L-丙交酯、泊洛沙姆F68和按照泊洛沙姆与L-丙交酯的总质量计0.3wt%辛酸亚锡加热至150℃搅拌反应15h,冷却至室温,然后加入二氯甲烷将反应所得物溶解,再放入以二氯甲烷体积计10倍量的甲醇中沉淀、过滤,用二氯甲

烷溶解白色沉淀物后放入以二氯甲烷体积计10倍量的乙醚中继续沉淀、过滤、干燥,即得理论分子量 M_n^a 为 1.5×10^4 聚乳酸-泊洛沙姆F68-聚乳酸多嵌段聚合物。

[0050] 本实施例所得多嵌段聚合物的红外图谱见图1中a,核磁氢谱见图2。在图1-a的 1750cm^{-1} 处的吸收峰属于羰基基团的弹性振动, 3508cm^{-1} 处的吸收峰属于PLA的羟基(-OH), $1244-1050\text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰是属于F68链段重复 $-\text{OCH}_2\text{CH}_2$ 单元C-O-C的弹性振动;在图2的5.20ppm处的峰代表了PLA链段中 $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CO}-$ 次甲基中的氢原子,3.35-3.65ppm处的峰代表F68链段中 $-\text{OCH}_2-\text{CH}_2-$ 和 $-\text{OCH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ 中的亚甲基中的氢原子,4.3-4.4ppm处的极小峰代表PLA-CO-OCH₂-CH₂-O-F68片段中亚甲基中的氢原子,由此证明了聚乳酸-泊洛沙姆F68-聚乳酸多嵌段聚合物的成功合成。另外由核磁计算出的 M_n^b 为 1.36×10^4 ,GPC结果测得 M_w^c 为 2.30×10^4 , M_n^c 为 1.52×10^4 。

[0051] 实施例2

[0052] 在氮气流保护下,将质量比为14.5的L-丙交酯、泊洛沙姆L64和按照泊洛沙姆与L-丙交酯的总质量计0.3wt%辛酸亚锡加热至 160°C 搅拌反应20h,冷却至室温,然后加入二氯甲烷将反应所得物溶解,再放入以二氯甲烷体积计10倍量的甲醇中沉淀、过滤,用二氯甲烷溶解白色沉淀物后放入以二氯甲烷体积计10倍量的乙醚中继续沉淀、过滤、干燥,即得理论分子量 M_n^a 为 4.5×10^4 聚乳酸-泊洛沙姆L64-聚乳酸多嵌段聚合物。

[0053] 本实施例所得多嵌段聚合物的红外图谱见图1中b,核磁氢谱见图3。在图1-b的 1709cm^{-1} 处的吸收峰属于羰基基团的弹性振动, 3508cm^{-1} 处的吸收峰属于PLA的羟基(-OH), $1240-1010\text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰是属于L64链段重复 $-\text{OCH}_2\text{CH}_2$ 单元C-O-C的弹性振动;在图3的5.20ppm处的峰代表了PLA链段中 $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CO}-$ 次甲基中的氢原子,3.30-3.65ppm处的峰代表L64链段中 $-\text{OCH}_2-\text{CH}_2-$ 和 $-\text{OCH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ 中的亚甲基中的氢原子,4.3-4.4ppm处的极小峰代表PLA-CO-OCH₂-CH₂-O-L64片段中亚甲基中的氢原子,由此证明了聚乳酸-泊洛沙姆L64-聚乳酸多嵌段聚合物的成功合成。另外由核磁计算出的 M_n^b 为 4.38×10^4 ,GPC结果测得 M_w^c 为 5.40×10^4 , M_n^c 为 4.43×10^4 。

[0054] 实施例3

[0055] 在氮气流保护下,将质量比为17.4的L-丙交酯、泊洛沙姆L35和按照泊洛沙姆与L-丙交酯的总质量计0.3wt%辛酸亚锡加热至 150°C 搅拌反应18h,冷却至室温,然后加入二氯甲烷将反应所得物溶解,再放入以二氯甲烷体积计10倍量的甲醇中沉淀、过滤,用二氯甲烷溶解白色沉淀物后放入以二氯甲烷体积计10倍量的乙醚中继续沉淀、过滤、干燥,即得理论分子量 M_n^a 为 3.5×10^4 聚乳酸-泊洛沙姆L35-聚乳酸多嵌段聚合物。

[0056] 本实施例所得多嵌段聚合物的红外图谱见图1中c,核磁氢谱见图4。在图1-c的 1705cm^{-1} 处的吸收峰属于羰基基团的弹性振动, 3508cm^{-1} 处的吸收峰属于PLA的羟基(-OH), $1250-1014\text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰是属于L35链段重复 $-\text{OCH}_2\text{CH}_2$ 单元C-O-C的弹性振动;在图4的5.20ppm处的峰代表了PLA链段中 $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CO}-$ 次甲基中的氢原子,3.35-3.65ppm处的峰代表L35链段中 $-\text{OCH}_2-\text{CH}_2-$ 和 $-\text{OCH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ 中的亚甲基中的氢原子,4.3-4.4ppm处的极小峰代表PLA-CO-OCH₂-CH₂-O-L35片段中亚甲基中的氢原子,由此证明了聚乳酸-泊洛沙姆L35-聚乳酸多嵌段聚合物的成功合成。另外由核磁计算出的 M_n^b 为 3.25×10^4 ,GPC结果测得 M_w^c 为 4.56×10^4 , M_n^c 为 3.40×10^4 。

[0057] 实施例4

[0058] 在氮气流保护下,将质量比为2.45的L-丙交酯、泊洛沙姆L64和按照泊洛沙姆与L-丙交酯的总质量计0.3wt%辛酸亚锡加热至140℃搅拌反应15h,冷却至室温,然后加入二氯甲烷将反应所得物溶解,再放入以二氯甲烷体积计10倍量的甲醇中沉淀、过滤,用二氯甲烷溶解白色沉淀物后放入以二氯甲烷体积计10倍量的乙醚中继续沉淀、过滤、干燥,即得理论分子量 M_n^a 为 1.0×10^4 聚乳酸-泊洛沙姆L64-聚乳酸多嵌段聚合物。由核磁计算出的 M_n^b 为 0.99×10^4 ,GPC结果测得 M_w^c 为 1.52×10^4 , M_n^c 为 0.98×10^4 。

[0059] 实施例5

[0060] 在氮气流保护下,将质量比为25.31的L-丙交酯、泊洛沙姆L35和按照泊洛沙姆与L-丙交酯的总质量计0.3wt%辛酸亚锡加热至180℃搅拌反应22h,冷却至室温,然后加入二氯甲烷将反应所得物溶解,再放入以二氯甲烷体积计10倍量的甲醇中沉淀、过滤,用二氯甲烷溶解白色沉淀物后放入以二氯甲烷体积计10倍量的乙醚中继续沉淀、过滤、干燥,即得理论分子量 M_n^a 为 5.0×10^4 聚乳酸-泊洛沙姆L35-聚乳酸多嵌段聚合物。由核磁计算出的 M_n^b 为 4.78×10^4 ,GPC结果测得 M_w^c 为 6.12×10^4 , M_n^c 为 4.71×10^4 。

[0061] 实施例6

[0062] 在氮气流保护下,将质量比为2.57的L-丙交酯、泊洛沙姆F68和按照泊洛沙姆与L-丙交酯的总质量计0.3wt%辛酸亚锡加热至180℃搅拌反应24h,冷却至室温,然后加入二氯甲烷将反应所得物溶解,再放入以二氯甲烷体积计10倍量的甲醇中沉淀、过滤,用二氯甲烷溶解白色沉淀物后放入以二氯甲烷体积计10倍量的乙醚中继续沉淀、过滤、干燥,即得理论分子量 M_n^a 为 3.0×10^4 聚乳酸-泊洛沙姆F68-聚乳酸多嵌段聚合物。由核磁计算出的 M_n^b 为 2.85×10^4 ,GPC结果测得 M_w^c 为 4.23×10^4 , M_n^c 为 3.02×10^4 。

[0063] 实施例7

[0064] 将46份理论分子量 $M_n = 1.5 \times 10^4$ 的聚乳酸-泊洛沙姆F68-聚乳酸多嵌段聚合物和以其的质量份计8%的多烯紫杉醇加入50℃、2500份丙酮与四氢呋喃(1:1,v/v)的混合有机溶剂中,搅拌使其充分溶解,得到澄清溶液A;先将以溶液A的体积计3倍的丙三醇和季戊四醇(2:1,v/v)组成的混合溶剂B于水浴中预热至50℃,然后加入按溶剂B的体积计0.1%的分散剂10R5,形成混合溶液C;在搅拌条件下,将预热的混合溶剂C缓慢加入到澄清溶液A中,加完后继续搅拌10min倒入液氮中,静置20min得到冷冻物;以冷冻物体积计向其中加入 ≥ 1 倍体积的冰水混合物,进行溶剂交换24h后用蒸馏水洗涤3~6遍,冷冻干燥后于20℃以下保存。

[0065] 所得纳米纤维载药微球的粒径为50~150 μm ,表面的纳米纤维丝的直径为500~1000nm;实际载药量为7.45%,包封率为93.17%。

[0066] 实施例8

[0067] 将135份理论分子量 $M_n = 3.0 \times 10^4$ 的聚乳酸-泊洛沙姆F68-聚乳酸多嵌段聚合物和以其的质量份计10%的卡巴他赛加入55℃、7500份三氯甲烷与四氢呋喃(1:2,v/v)的混合有机溶剂中,搅拌使其充分溶解,得到澄清溶液A;先将以溶液A的体积计5倍的聚乙二醇($M_n = 200$)溶剂B于水浴中预热至55℃,然后加入按溶剂B的体积计0.1%的分散剂10R5,形成混合溶液C;在搅拌条件下,将预热的混合溶剂C缓慢加入到澄清溶液A中,加完后继续搅拌20min倒入液氮中,静置30min得到冷冻物;以冷冻物体积计向其中加入 ≥ 1 倍体积的冰水混合物,进行溶剂交换36h后用蒸馏水洗涤3~6遍,冷冻干燥后于20℃以下保存。

[0068] 所得纳米纤维载药微球的粒径为75~200 μm ,表面的纳米纤维丝的直径为700~1100nm;实际载药量为8.91%,包封率为88.94%。

[0069] 实施例9

[0070] 将364份理论分子量 $M_n=3.0\times 10^4$ 的聚乳酸-泊洛沙姆F68-聚乳酸多嵌段聚合物和以其的质量份计9%的紫杉醇加入50 $^{\circ}\text{C}$ 、20000份乙醇与丙酮(1:1,v/v)的混合有机溶剂中,搅拌使其充分溶解,得到澄清溶液A;先将以溶液A的体积计4倍的聚乙二醇($M_n=400$)和季戊四醇(3:1,v/v)组成的混合溶剂B于水浴中预热至50 $^{\circ}\text{C}$,然后加入按溶剂B的体积计0.2%的分散剂17R4,形成混合溶液C;在搅拌条件下,将预热的混合溶剂C缓慢加入到澄清溶液A中,加完后继续搅拌20min倒入液氮中,静置20min得到冷冻物;以冷冻物体积计向其中加入 ≥ 1 倍体积的冰水混合物,进行溶剂交换36h后用蒸馏水洗涤3~6遍,冷冻干燥后于20 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存。

[0071] 所得纳米纤维载药微球的粒径为50~160 μm ,表面的纳米纤维的直径为600~1200nm;实际载药量为8.22%,包封率为91.38%。

[0072] 实施例10

[0073] 将132份理论分子量 $M_n=4.5\times 10^4$ 的聚乳酸-泊洛沙姆L64-聚乳酸多嵌段聚合物和以其的质量份计12%的紫杉醇加入60 $^{\circ}\text{C}$ 、7500份三氯甲烷与乙腈(2:1,v/v)的混合有机溶剂中,搅拌使其充分溶解,得到澄清溶液A;先将以溶液A的体积计6倍的聚乙二醇($M_n=600$)和丙三醇(1:2,v/v)组成的混合溶剂B于水浴中预热至60 $^{\circ}\text{C}$,然后加入按溶剂B的体积计0.3%的分散剂17R4,形成混合溶液C;在搅拌条件下,将预热的混合溶剂C缓慢加入到澄清溶液A中,加完后继续搅拌30min倒入液氮中,静置30min得到冷冻物;以冷冻物体积计向其中加入 ≥ 1 倍体积的冰水混合物,进行溶剂交换48h后用蒸馏水洗涤3~6遍,冷冻干燥后于20 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存。

[0074] 所得纳米纤维载药微球的粒径为45~100 μm ,表面的纳米纤维丝的直径为400~800nm;实际载药量为10.77%,包封率为89.73%。

[0075] 实施例11

[0076] 将212.5份理论分子量 $M_n=4.5\times 10^4$ 的聚乳酸-泊洛沙姆L64-聚乳酸多嵌段聚合物和以其的质量份计15%的多烯紫杉醇加入60 $^{\circ}\text{C}$ 、12500份乙醇与四氢呋喃(1:2,v/v)的混合有机溶剂中,搅拌使其充分溶解,得到澄清溶液A;先将以溶液A的体积计4倍的丙三醇溶剂B于水浴中预热至60 $^{\circ}\text{C}$,然后加入按溶剂B的体积计0.1%的分散剂10R5,形成混合溶液C;在搅拌条件下,将预热的混合溶剂C缓慢加入到澄清溶液A中,加完后继续搅拌20min倒入液氮中,静置30min得到冷冻物;以冷冻物体积计向其中加入 ≥ 1 倍体积的冰水混合物,进行溶剂交换48h后用蒸馏水洗涤3~6遍,冷冻干燥后于20 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存。

[0077] 所得纳米纤维载药微球的粒径为40~145 μm ,表面的纳米纤维丝的直径为800~1200nm;实际载药量为13.32%,包封率为88.81%。

[0078] 实施例12

[0079] 将45份理论分子量 $M_n=1.0\times 10^4$ 的聚乳酸-泊洛沙姆L64-聚乳酸多嵌段聚合物和以其的质量份计10%的多烯紫杉醇加入65 $^{\circ}\text{C}$ 、5000份四氢呋喃中,搅拌使其充分溶解,得到澄清溶液A;先将以溶液A的体积计5倍的丙三醇溶剂B于水浴中预热至65 $^{\circ}\text{C}$,然后加入按溶剂B的体积计0.1%的分散剂10R5,形成混合溶液C;在搅拌条件下,将预热的混合溶剂C缓慢

加入到澄清溶液A中,加完后继续搅拌20min倒入液氮中,静置30min得到冷冻物;以冷冻物体积计向其中加入 ≥ 1 倍体积的冰水混合物,进行溶剂交换24h后用蒸馏水洗涤3~6遍,冷冻干燥后于20℃以下保存。

[0080] 所得纳米纤维载药微球的粒径为20~85 μm ,表面的纳米纤维丝的直径为500~1000nm;实际载药量为8.82%,包封率为87.94%。

[0081] 实施例13

[0082] 将160份理论分子量 $M_n = 3.5 \times 10^4$ 的聚乳酸-泊洛沙姆L35-聚乳酸多嵌段聚合物和以其的质量份计20%的紫杉醇加入50℃、10000份丙酮中,搅拌使其充分溶解,得到澄清溶液A;先将以溶液A的体积计3倍的聚乙二醇($M_n = 400$)溶剂B于水浴中预热至50℃,然后加入按溶剂B的体积计0.2%的分散剂17R4,形成混合溶液C;在搅拌条件下,将预热的混合溶剂C缓慢加入到澄清溶液A中,加完后继续搅拌30min倒入液氮中,静置30min得到冷冻物;以冷冻物体积计向其中加入 ≥ 1 倍体积的冰水混合物,进行溶剂交换48h后用蒸馏水洗涤3~6遍,冷冻干燥后于20℃以下保存。

[0083] 所得纳米纤维载药微球的粒径为65~150 μm ,表面的纳米纤维丝的直径为800~1200nm;实际载药量为17.50%,包封率为87.48%。

[0084] 实施例14

[0085] 将180份理论分子量 $M_n = 3.5 \times 10^4$ 的聚乳酸-泊洛沙姆L35-聚乳酸多嵌段聚合物和以其的质量份计10%的卡巴他赛加入70℃、15000份乙腈中,搅拌使其充分溶解,得到澄清溶液A;先将以溶液A的体积计6倍的聚乙二醇($M_n = 600$)与丙三醇(1:1, v/v)组成的混合溶剂B于水浴中预热至70℃,然后加入按溶剂B的体积计0.1%的分散剂10R5,形成混合溶液C;在搅拌条件下,将预热的混合溶剂C缓慢加入到澄清溶液A中,加完后继续搅拌30min倒入液氮中,静置40min得到冷冻物;以冷冻物体积计向其中加入 ≥ 1 倍体积的冰水混合物,进行溶剂交换36h后用蒸馏水洗涤3~6遍,冷冻干燥后于20℃以下保存。

[0086] 所得纳米纤维载药微球的粒径为40~160 μm ,表面的纳米纤维丝的直径为500~900nm;实际载药量为8.90%,包封率为88.86%。

[0087] 实施例15

[0088] 将246份理论分子量 $M_n = 5.0 \times 10^4$ 的聚乳酸-泊洛沙姆L35-聚乳酸多嵌段聚合物和以其的质量份计18%的多烯紫杉醇加入60℃、15000份三氯甲烷中,搅拌使其充分溶解,得到澄清溶液A;先将以溶液A的体积计6倍的季戊四醇溶剂B于水浴中预热至60℃,然后加入按溶剂B的体积计0.3%的分散剂17R4,形成混合溶液C;在搅拌条件下,将预热的混合溶剂C缓慢加入到澄清溶液A中,加完后继续搅拌20min倒入液氮中,静置40min得到冷冻物;以冷冻物体积计向其中加入 ≥ 1 倍体积的冰水混合物,进行溶剂交换48h后用蒸馏水洗涤3~6遍,冷冻干燥后于20℃以下保存。

[0089] 所得纳米纤维载药微球的粒径为35~120 μm ,表面的纳米纤维丝的直径为600~1100nm;实际载药量为16.95%,包封率为94.18%。

[0090] 应用例

[0091] 本应用例是将纳米纤维载药微球用于BALB/c小鼠腹膜转移结肠癌治疗实验的效果评价。以 M_n 为 3.5×10^4 的聚乳酸-泊洛沙姆L35-聚乳酸多嵌段聚合物制备的10%的Cbz/聚乳酸-泊洛沙姆L35-聚乳酸多嵌段聚合物纳米纤维载药微球为例。具体方法是先按照实

施例7制备纳米纤维载药微球,在小鼠腹膜转移结肠癌模型构建一周后,通过腹腔注射给药,其中纳米纤维载药微球组及纳米纤维载药微球/水凝胶组一周给药一次,纯药物组一周给药两次,治疗一定时间后对治疗效果进行评价。

[0092] a. CT26腹膜转移结肠癌模型的建立

[0093] 将培养皿中培养的CT26结肠癌细胞用胰酶消化,然后用无血清的培养基洗涤三次,最后吹打使其完全悬浮在无血清的1640培养基中,用细胞计数器计数,使细胞的浓度为 2×10^6 个/ml。在BALB/c小鼠的腹腔注射0.2ml CT26细胞悬液,其中含约 2×10^5 个细胞,接种后的小鼠继续饲养一周左右,形成肿瘤,此后小鼠被随机分成4组(每组6只):生理盐水组(control)、聚乳酸-泊洛沙姆L35-聚乳酸多嵌段聚合物空白微球组、纯卡巴他赛组、载卡巴他赛的纳米纤维载药微球组,此时,小鼠体重约为 20 ± 2 g。

[0094] b. 体内抗肿瘤效果评价

[0095] 生理盐水组、聚乳酸-泊洛沙姆L35-聚乳酸多嵌段聚合物空白微球组、纯卡巴他赛组、载卡巴他赛的纳米纤维载药微球组,使纯卡巴他赛的浓度为0.5mg/ml,按照纯药物组每次给药时DOC量为5mg/kg,纳米纤维载药微球组每次给药时DOC量为10mg/kg。纯药物一周给两次药,水凝胶组及纳米纤维载药微球组一周给药一次(这是因为微球具有良好的缓释性能,能够一次性给药,而纯药物一次性给药剂量过大会造成局部药物浓度过高,导致严重的毒副作用,故而采用少量多次的给药方式)。连续给药三周。从给药开始每天记录每只小鼠的体重,最后小鼠濒死时,处死小鼠后,处死时间就被认为是其生存期,我们评价了各个处理组的老鼠的生存期且记录了小鼠腹部肿瘤结节数。

[0096] 图12为各实验组小鼠生存曲线,从图中可以看出载卡巴他赛的纳米纤维载药微球组的小鼠生存期明显延长。图13为各实验组小鼠肿瘤的凋亡免疫组化图。图14为各实验组凋亡率统计图。即根据凋亡细胞分布情况在400倍光镜下,每组切片拍摄7个阳性视野,每个视野计数200个细胞,以计算平均凋亡细胞数所占百分比作为凋亡指数。从图中可以看出载卡巴他赛的纳米纤维载药微球组的小鼠肿瘤的凋亡数量远远大于其余各实验组。

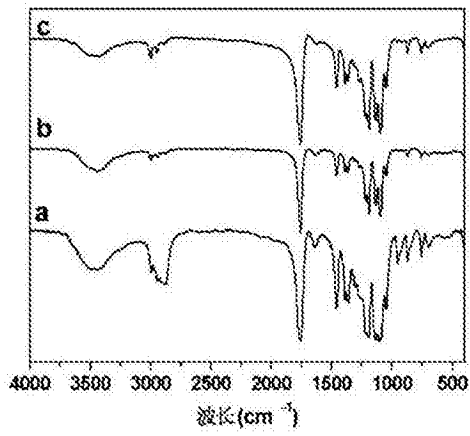


图1

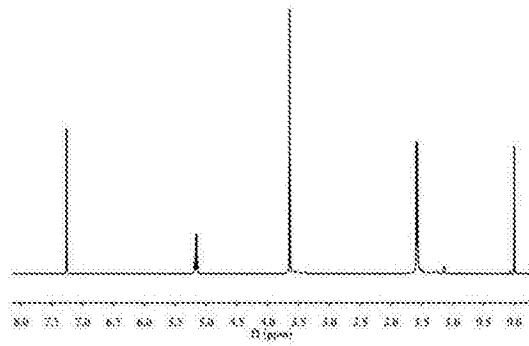


图2

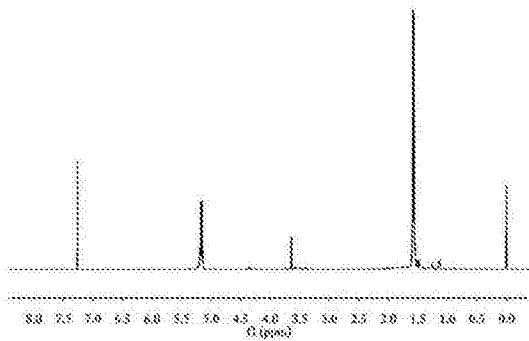


图3

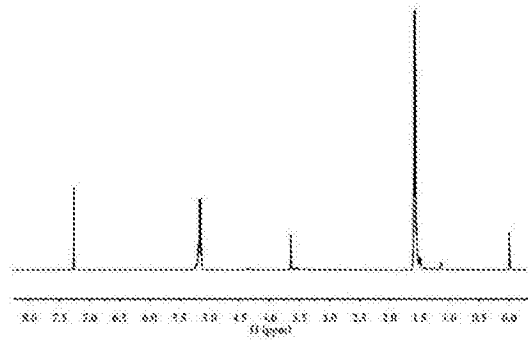


图4

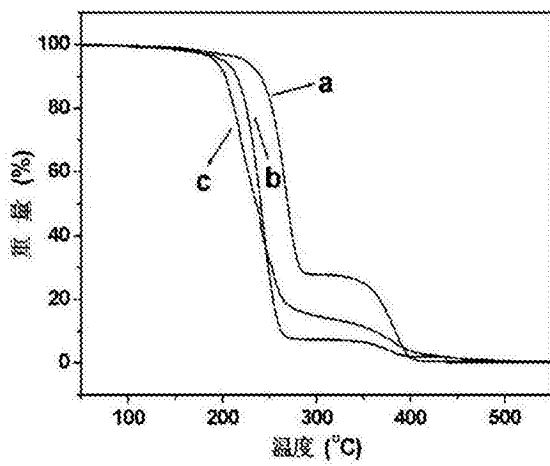


图5

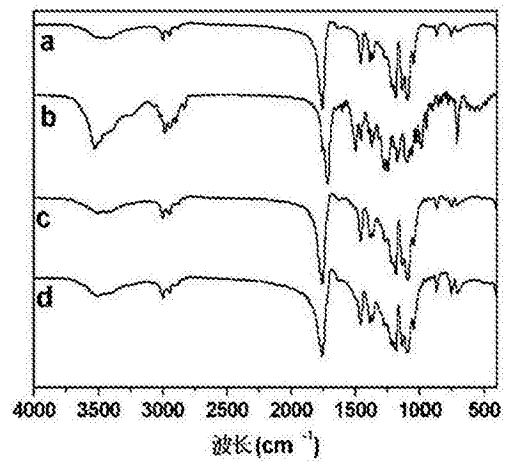


图6

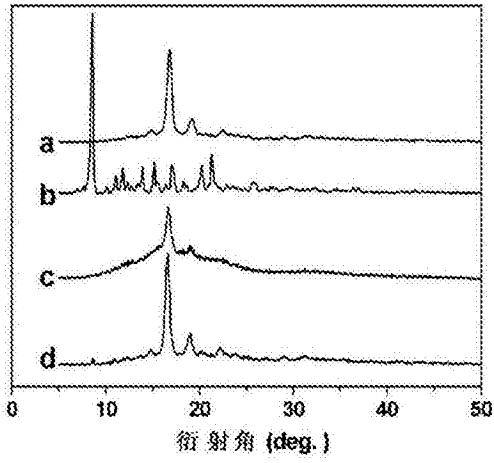


图7

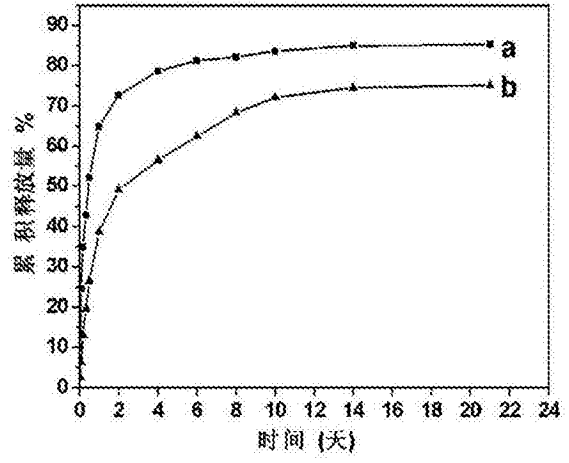


图8

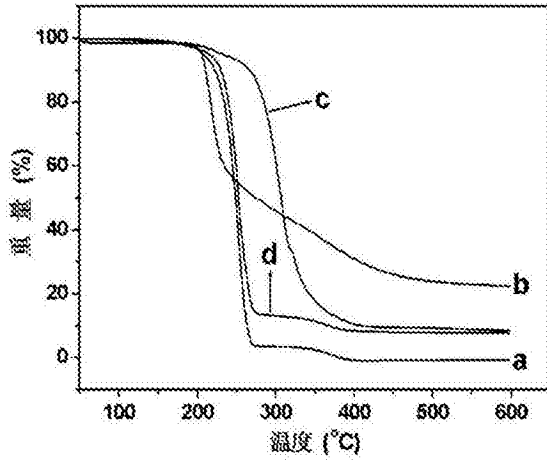


图9

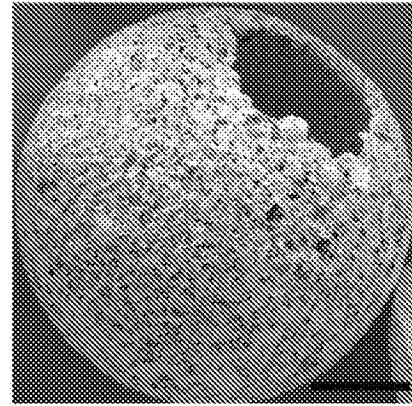


图10

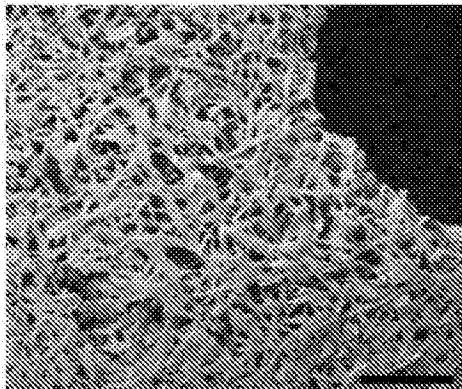


图11

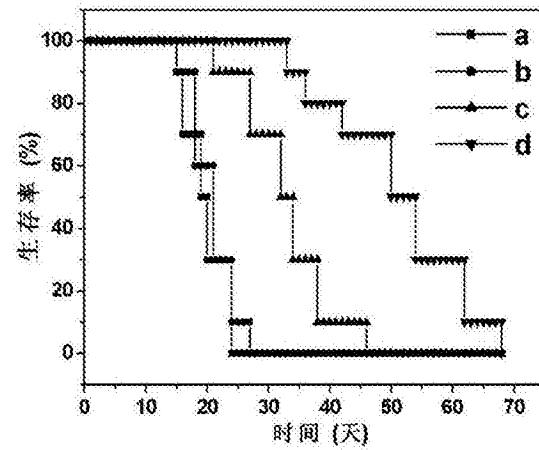


图12

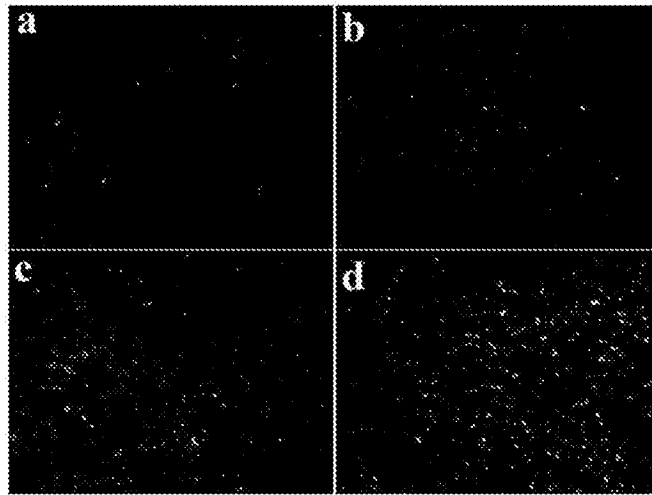


图13

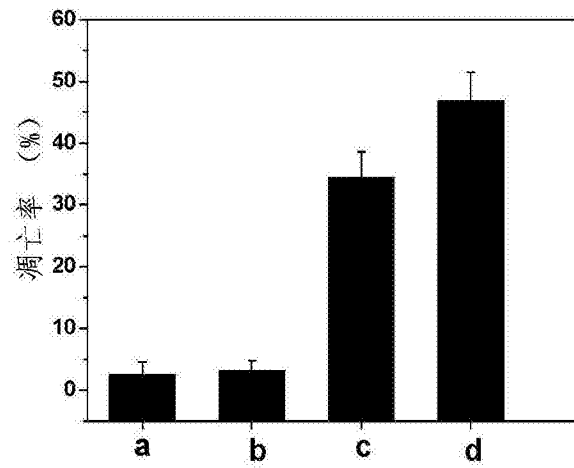


图14