凝血因子Ⅷ的长效缓释温敏型水凝胶的研制

邹茜茜，郜珍叶，张伟捷，吴 飞，金 拓*
（上海交通大学药学院，上海 200240）

摘要：凝血因子Ⅷ（F8）作为治疗血友病常用药物之一，存在半衰期短（10 ～ 14 h）的缺点，其注射剂需每周多次给药。为获得 F8 的长效缓释制剂，该研究通过热开环聚合法得到具反向热敏性质的三嵌段聚合物 PLGA-PEG-PLGA 作为温敏水凝胶基质，制备了一种新型长效缓释的温度敏感型水凝胶载 F8 制剂，在 4 ℃及以下呈溶液，37 ℃附近呈凝胶，并考察了其体外活性及体内外释放行为。结果显示，体外释放试验中，d1 突释了约 17.4%的载药量，总共实现了 3 周左右的释放，22 d 时 F8 的累积释放率达到 92%；制剂成胶前后 F8 活性达到 97%以上，且释放过程中释放液中的 F8 活性仍能维持在 60%以上，提示温敏水凝胶中的 F8 能维持稳定。体内释放曲线表明，大鼠在给药后 1 h 达到血药浓度峰值，为（113.21±14.50）ng/ml，整个缓释周期内，血药浓度可维持在最低治疗浓度（10 ng/ml）以上长达 15 d。该研究成功开发了一种 F8 长效缓释制剂，具有临床应用潜力。

关键词：凝血因子Ⅷ；温敏水凝胶；长效缓释
中图分类号：R944.9 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255(2022)10-1439-06
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.10.009

Preparation of Long-acting Sustained-release Thermosensitive Hydrogels of Coagulation Factor Ⅷ

ZOU Xixi, GAO Zhenye, ZHANG Weijie, WU Fei, JIN Tuo*
(*School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240*)

ABSTRACT: Coagulation factor Ⅷ(F8), one of the most common drug for treating hemophilia, has the disadvantage of a short half-life(10 – 14 h), and its injection needs to be administered several times a week. In order to obtain a long-acting sustained-release preparation of F8, a triblock polymer PLGA-PEG-PLGA with reverse thermosensitive properties synthesized by thermal ring-opening polymerization was used as a thermosensitive hydrogel matrix to prepare a novel long-acting sustained-release preparation loaded with F8. This thermosensitive hydrogels of F8 was an aqueous solution below 4 ℃ and turns into gel at around 37 ℃. *In vitro* activity and *in vitro* and *in vivo* release behaviors of F8-loaded hydrogel formulation were investigated. The results of *in vitro* release test showed that 17.4% of the drug loading, namely initial burst release, was observed on d1 and the drug release from the gels could maintain for 3 weeks. The cumulative amount of F8 at 22 d reached 92%. The results showed that the bioactivities of F8 in the solution before and after gelation was more than 97%, and the bioactivities of F8 in release media were all above 60% during the release process, indicating the stability of F8 in the thermosensitive hydrogels. The results of *in vivo* test showed that F8 quickly reached the peak plasma concentration[(113.21±14.50)ng/ml] within one hour after injection administration to the rats. During the whole release period, the plasma concentration could maintain above the lowest therapeutic concentration(10 ng/ml) for up to 15 days. In this study, we successfully developed a long-acting sustained-release formulation of F8, which had potential for clinical application.

Key Words: coagulation factor Ⅷ; thermosensitive hydrogel; sustained-release

血友病 A 一般是由人体内凝血因子Ⅷ（factor Ⅷ，F8，**1**）缺乏或功能障碍引起的 X 连锁出血性疾病。**1** 由 2 332 个氨基酸组成，是相对分子质量高达 3×10^5 的蛋白质，其中的 1 条重链和 1 条轻链通过金属离子维持非共价键连接[1]。目前对血友病 A 患者的主要治疗方法是替代疗法，即静脉注射外源的 **1** 使其达到体内正常水平，而 **1** 往往从人血浆中提取纯化或通过重组 DNA 技术生产。当前市场上销售的主流重组凝血 **1** 产品有百特国际（Baxter International）公司的 Advate，德国拜耳（Bayer）公司生产的三代产品，Kogenate、Kogenate FS 以及 Kovaltry。这类重组凝血因子在人体内半衰期只有 10 ～ 14 h，因此对预防性治疗的血友病 A 患者来说，需要隔天注射或每周静脉注射 3 次，以维持至少 1% 的体内活性。这对需要终身给药的患者来说，生理上异常痛苦且顺应性差。

目前已有的延长半衰期的手段包括聚乙二醇修饰（PEGylation）、PEG 化脂质体、生成 Fc 融合蛋白等[2—3]。N8-GP（商品名 Esperoct）由诺和诺德公司生产，于 2019 年获得 FDA 批准。这是一种基于 PEG 修饰原理的长效 **1** 制剂，研究表明在患者中的半衰期延长了 1.6 ～ 1.9 倍。DUMONT 等构建了一种重组融合蛋白（rF Ⅷ Fc），在小鼠和狗的动物模型中，发现 rF Ⅷ Fc 的半衰期比 rF Ⅷ延长了约 2 倍[4]。目前的长效缓释研究方法中，**1** 半衰期至多延长至原来的 2 倍，延长更长时间的相关研究几乎是空白的。因此，开发一种新型长效缓释的 **1** 制剂有非常大的临床应用潜力和意义。

水凝胶具有独特的三维网格结构，可包载活性成分形成药物贮库，而独特的流变性能也使其具备可注射性，可递送药物到人体或组织内的特定部位，达到缓释效果[5]。大多数化学物质遵循溶解度随温度升高而增加的规律。温度敏感型水凝胶反而是在低温下可溶、在高温成胶，具有反向热敏性质，使其可以在人体皮下原位形成凝胶。另外，通过调节聚合物中亲水与疏水链段的比例可以调节水凝胶的相变温度以及降解速度，从而控制药物的缓释周期，是当前研究较多的一种缓释手段[6]。本研究拟制备出一种可以在 37 ℃下原位成胶、缓释长达数周的载 **1** 热敏水凝胶，并考察所得该制剂中的药物活性，以及体内外过程中的药物释放行为。采用三嵌段聚合物，即聚乳酸 - 羟基乙酸 - 聚乙二醇 - 聚乳酸 - 羟基乙酸（PLGA-PEG-PLGA）共聚物（**2**）作为热敏水凝胶基质。成胶过程如图 1 所示，T_{gel} 是热敏水凝胶的成胶温度，T_{body} 是动物的体内温度；当环境温度低于 T_{gel} 时，体系呈溶液状态，制剂具备可注射性，注射至动物皮下后，由于 T_{body} 高于 T_{gel}，体系成胶。

1　仪器与试药

Christ Alpha 1-4 型冻干机（德国 Martin Christ Freeze Dryers 公司）；Purist 型超纯水仪（上海乐枫生物科技有限公司）；5810 R 型离心机（德国 Eppendorf 公司）；HZQ-F160 型全温振荡培养箱（太仓市华美生化仪器厂）；Infinite M200 Pro 型多功能酶标仪（捷克 Tescan 公司）；XS105 DualRange 型分析天平（美国 Mettler Toledo 公司）；AVANCE NEO 型 400 MHz 核磁共振波谱仪（德国 Bruker 公司）；EcoSEC HLC-8320GPC 型常温凝胶渗透色谱（GPC）仪（日本东曹株式会社）；EDTA-K2 抗凝离心管（常山九誉贸易有限责任公司）。

1 原料药（成都蓉生药业有限责任公司，效价 6 000 ～ 7 000 IU/mg，0.5 mg/ml，批号 P202004020）；丙交酯（LA）、乙交酯（GA）、聚乙二醇 [PEG，重均分子量（*M*w）为 1 000]、异辛酸亚锡（美国 Sigma-Aldrich 公司）；聚苯乙烯（PS，日本东曹株式会社）；ELISA 试剂盒（上海西唐实业有限公司）；发色底物法活性试剂盒（意大利 Chromogenix 公司）；磷酸盐缓冲液（PBS，10 mmol/L，pH 7.4，美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；0.9% 无菌生理盐水（上海碧云天生物技术有限公司）；水为自制超纯水。

雄性 SD 大鼠（浙江维通利华公司，3 ～ 8 周龄，体质量 150 ～ 250 g），合格证编号为 20211125Aazz061900056。动物试验方案由上海交通大学动物伦理委员会批准，所有动

收稿日期：2022-04-02
基金项目：国家自然科学基金项目（81872802）
作者简介：邹茜茜（1996—），女，硕士研究生，专业方向：蛋白药物的长效缓释递送系统研究。
通信作者：金　拓（1952—），男，教授，博士，从事生物大分子递药系统的研究。
E-mail：tomtjin@gmail.com

物配以标准的无特定病原体（specific pathogen free，SPF）级房间。

2 方法与结果

2.1 聚合物 2 的制备

利用热开环聚合反应制备三嵌段聚合物 **2**[7]。精密称取 PEG（1.00 g，1 mol）、LA（1.58 g，11 mol）、GA（1.28 g，11 mol），置装有磁力搅拌子的三颈烧瓶中，密封后通过冷阱和油泵用氮气置换出该体系内的空气和水分，在 10 Pa 的减压条件下搅拌除水 1 h；油浴加温至 150 ℃，待烧瓶内原料全部熔融为液体后，用注射器加入异辛酸亚锡 10 μl 作为催化剂，在 150 ℃下搅拌反应约 16 h。反应全程在氮气保护下。反应完成后，得到粗产物 3.52 g，在常温下呈黄褐色黏稠状。

粗产物用超纯水（0～4 ℃）溶解，转移至烧杯，在 80 ℃下水浴加热，5 min 内出现白色絮状沉淀，弃上清液，收集析出的沉淀，重复上述步骤 3～5 次以纯化产物，冷冻干燥除去多余的水分后得到淡黄色半透明黏稠物质 2.97 g，产率约 76%，即得温敏水凝胶基质。

2.2 聚合物 2 的表征

核磁共振氢谱结构表征：精密称量聚合物 **2** 15 mg，用氘代氯仿（$CDCl_3$）0.6 ml 在室温下溶解，转移至核磁管，在室温下放入核磁共振波谱仪中检测。在 ^{1}H NMR 谱图中，PEG 和 GA 中的 $-CH_2$ 基的氢原子特征峰 δ 分别在 3.6 和 4.8 附近；LA 中的 −CH 基和 $-CH_3$ 基中氢原子特征峰 δ 分别在 5.2 和 1.5 附近；产物中没有明显杂峰，证明三嵌段化合物成功制备，且几乎没有单体小分子杂质。各个特征峰的积分面积结果见表 1，根据峰值积分和对应氢原子数目的比例关系进行计算，可得出实际产物的相对分子质量约为 4 000，其中 PEG、LA、GA 的实际物质的量比例为 1 ∶ 11.5 ∶ 11.4，与投料比基本一致。

常温凝胶渗透色谱测定相对分子质量：以四氢呋喃（THF）为溶剂，流速 0.35 ml/min，温度 40 ℃，聚苯乙烯作为标准品，用凝胶渗透色谱仪测定聚合物的相对分子质量及分布。根据色谱检测结果，**2** 的 *M*w 为 6 074，数均分子量 *M*n 为 4 652，多分散性指数（PDI）为 1.306，相对分子质量分布窄，此结果与根据核磁氢谱图计算的相对分子质量比较接近。

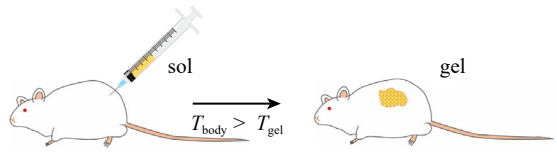


图 1 热敏成胶过程示意图

Fig.1 Schematic Diagram of Thermogelling Process

表 1 三嵌段聚合物 2 的 ^{1}H NMR 谱图中的特征峰及其积分面积

Tab.1 Characteristic Peaks and Their Areas in ^{1}H NMR Spectrum of the Triblock Copolymer **2**

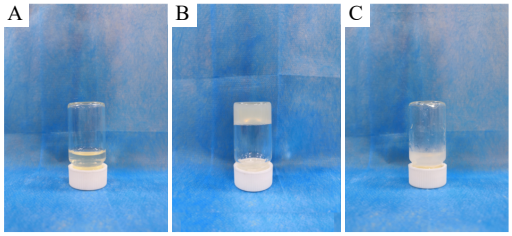
氢原子特征峰	LA的−CH	GA的$-CH_2$	PEG的$-CH_2$	LA的$-CH_3$
δ	5.2	4.8	3.6	1.5
积分面积	1.00	1.99	3.82	3.21

2.3 溶液 - 凝胶相变温度的测定

采用小瓶倒置法测定温敏水凝胶的溶液 - 凝胶相变温度。精密称取聚合物 **2** 400 mg，照质量比 1 ∶ 4 用超纯水配制成质量分数 20% 的聚合物溶液，转移至内径为 22 mm 的小瓶中。将上述小瓶置恒温水浴槽中，从 4 ℃开始以 0.5 ℃ / min 的速度程序升温至 60 ℃，每升高 1 ℃，在该温度下将小瓶倒转，若溶液维持 30 s 不发生流动，则表明溶液在此温度下已发生溶液 - 凝胶相转变。如图 2 所示，在 4 ℃下，**2** 水溶液为透明澄清溶液，且流动性良好；在 37 ℃下，溶液已完成相转变，为半透明半固体的凝胶状态，温度升至 45 ℃以上，溶液从凝胶相向沉淀相转变，出现白色絮状沉淀。因此，上述合成的聚合物 **2** 可在体温附近发生胶凝，因而可用于体内制剂的药物递送。

2.4 PLGA-PEG-PLGA 水凝胶的体外质量损失

精密称取聚合物 **2** 100 μg，照质量比 1 ∶ 4 用超纯水配制成质量分数 20% 的聚合物溶液，取 500 μl 转移至内径为 11 mm 的小瓶中，置 37 ℃的恒温水浴下 5 min，待体系成胶后加入 PBS 1 ml 模拟体液降解环境，然后置 37 ℃、转速 100 r/min 的摇床中，



A：4 ℃，B：37 ℃，C：45 ℃。

图 2　聚合物 2 的水溶液（质量分数 20%）在不同温度下的状态

Fig.2　Different Forms of Copolymer **2** Aqueous Solution (20% of Mass Fraction) under Different Temperatures

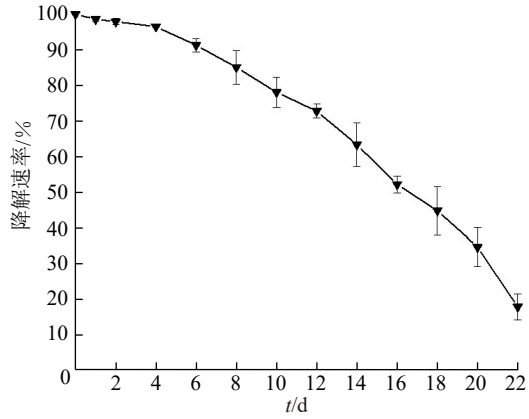


图 3　水溶液中聚合物 2（质量分数 20%）的体外降解速率（*n*=3）

Fig.3　*In vitro* Degradation Rate of Copolymer **2** in Aqueous Solution (20% of Mass Fraction) (*n*=3)

在 1、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20 和 22 d 时取出缓冲液，对凝胶进行称重后加入新的缓冲液，试验样本平行测试 3 次。如图 3 所示，水凝胶在体外存在的时间超过 20 d，并且在 22 d 时仍有约 12%的凝胶未完全降解。本试验中，水凝胶在缓冲液中的质量损失可归因于溶蚀及聚合物自身的降解作用。聚酯型热敏水凝胶的降解机制分为表面侵蚀和整体侵蚀[8]，表面溶蚀以固定速率进行，而整体侵蚀速率随时间改变。热敏水凝胶的降解主要和分子中的疏水链段 PLGA 和聚合物浓度有关[9]，当其处于胶凝状态时，分子中 PLGA 的疏水作用占到主导，因此 PLGA 链越长，热敏水凝胶越稳定，分子降解速率越慢。

2.5　载 **1** 热敏水凝胶的体外释放

*载 **1** 热敏水凝胶的制备*：精密移取一定量的 **1** 到 **2** 水溶液中，使最终聚合物质量分数为 20%且蛋白质量浓度为 20 μg/ml，轻微摇晃使溶液混合均匀，即得到载 **1** 热敏水凝胶。

*载 **1** 热敏水凝胶的体外释放动力学*：将按上述方法制备的载 **1** 热敏水凝胶溶液 500 μl 转移至内径为 11 mm 的小瓶中，于 37 ℃恒温水浴中放置 5 min，待体系成胶后加入 PBS 1 ml，再置 37 ℃、转速 100 r/min 的摇床中，分别于 1 h 和 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21 及 22 d 时吸出并更换相同体积的缓冲液，重复平行测定 3 次。利用 ELISA 试剂盒测定释放液中的蛋白量，绘制成累积释放曲线。图 4A 显示了载 **1** 热敏水凝胶体系的释放曲线，在 d1 时蛋白突释量达到 17.4%，并且从 d1 到 d5 的释放曲线几乎呈线性，体外释放时间一直持续到 d22，累积释放量达到 92%。蛋白累积释放率 - 时间曲线与热敏水凝胶的体外降解速率 - 时间曲线结果展现出一致性，这是由于蛋白药物在初始释放阶段以从水凝胶扩散为主，而在后期通过水凝胶基质的侵蚀而释放[10—11]，受水凝胶降解行为调控。

*载 **1** 热敏水凝胶的体外活性测定*：为确保热敏水凝胶在应用中的实际操作可能，探究了蛋白在制剂中的稳定性。按上述方法制备载 **1** 热敏水凝胶，取一部分溶液待测，记为成胶前。将剩余制剂置 37 ℃恒温水浴中，待体系成胶后，将温度降至 4 ℃，等待体系由凝胶状态回到溶液状态后，再取一部分溶液，记为成胶后。同时，取体外释放试验中第 1、2、4、6、10、14、18、22 d 的释放液。上述样品分别用 PBS 稀释后用发色底物法活性试剂盒测试样品中的 **1** 含量，以 ELISA 测定结果中的 **1** 含量为 100%，计算蛋白活性。平行试验 3 次，结果如图 4B 所示。在制剂过程中，体系成胶前后 **1** 在热敏水凝胶制剂中的活性达到 97%以上，几乎无损失。而在体外释放取样的各时间点内，**1** 的蛋白活性维持在 60%以上，证明其能够在热敏水凝胶制剂及释放介质中稳定存在。

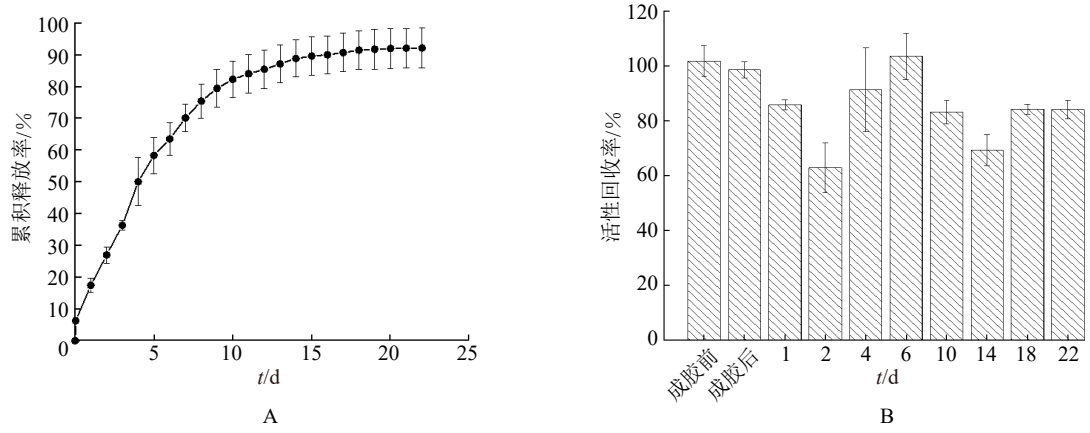


图 4 载 1 热敏水凝胶的体外释放曲线（A）及成胶前后与体外释放过程中的稳定性（B）（*n*=3）

Fig.4 *In vitro* Release Profiles of **1**-Loaded Thermosensitive Hydrogels（A）and Stability of **1** in the Aqueous Solution before and after Gelation as well as th Release Process（B）（*n*=3）

2.6 载 **1** 热敏水凝胶的体内药动学

在 4 ℃下将载 **1** 热敏水凝胶溶液（溶剂为 0.9% 生理盐水）500 μl 注射至雄性 SD 大鼠的腹部皮下，使其在大鼠体温环境下局部凝胶化，成为皮下药物释放贮库，其中 **1** 给药量为 420 μg/kg。分别在给药后 1 h 和 1、2、3、4、5、6、8、10、12、15、18、21、24、28 d 时对大鼠进行眼眶取血 0.5 ～ 1 ml，用含有乙二胺四乙酸二钾的抗凝管采集血样，2 h 内于 4 ℃离心（3 000×g）10 min，收集血浆，于 －40 ℃保存备用。用 ELISA 试剂盒检测血样内的 **1** 浓度。以给药前的大鼠血样（空白血浆）梯度稀释标准蛋白（0、1、1.25、2、2.5、5、10、20 ng/ml），以减少干扰，建立标准曲线（R^2=0.999 2），计算不同时间点血样中的蛋白含量，绘制血药浓度 - 时间曲线。如图 5 所示，大鼠在给药后 1 h 达到血药浓度峰值，峰值为（113.21±14.50）ng/ml，其后血药浓度逐渐降低，在 d5、d8 和 d10 血药浓度曲线有所回升，提示载 **1** 热敏水凝胶在体内存在明显突释现象。体内蛋白的突释行为在体外释放试验中也有一定体现，如在体外试验中 d1 蛋白累积释放 17.4%，前 5 d 的累积释放率即达到近 60%。

水凝胶制剂发生突释与溶液凝胶化的过程息息相关[12—14]。根据肉眼观测成胶过程及参考相关文献可知，温敏水凝胶在 37 ℃下完全凝胶化的时间与胶凝速率和胶凝强度有关，短则数十秒，长则数分钟[15—17]。PLGA-PEG-PLGA 共聚物的成胶机制如下：PLGA-PEG-PLGA 在水溶液中能形成以疏水链段 PLGA 为核心、亲水链段 PEG 为外壳的胶束。在低温下，由于 PEG 和水分子间的氢键作用，体系呈溶液状态。随着温度升高，氢键作用减弱，PLGA 链段的疏水作用力成为主导，胶束聚集收缩形成致密的凝胶。因此，可将突释归结为以下 2 点原因：1）聚合物溶液在皮下注射部位完全凝胶化之前，蛋白质分子可能发生快速扩散，造成突释；2）成胶过程中，由于聚合物胶束发生收缩，导致部分蛋白分子被挤出聚合物凝胶网格，随溶液到达边缘。尽管存在突释，仍可观察到该水凝胶体内给药后可在 15 d 内维持大鼠体内的血药浓度位于最低治疗有效浓度（10 ng/ml，图 5 虚线所示）之上，证明在热敏水凝胶的控释下，**1** 经过最初的突释后在体内仍能继续缓慢平稳释放；直至 18 d 后药物浓度水平回归到正常，表明药物体内释放行为基本结束。

3 讨论

本试验采用热开环聚合法合成三嵌段聚合物 **2** 作为温敏水凝胶基质，质量分数 20%的聚合物水溶液其具有反向热敏性质，可在 4 ℃以下呈溶液状态，在 37 ℃附近发生相变转化成半固体的凝胶状态，用于皮下注射的制剂缓释手段。载 **1** 热敏水凝胶的活性测定试验表明在体系成胶前后，蛋白的活性几乎没有变化，即热敏水凝胶不会对目标药物的活性

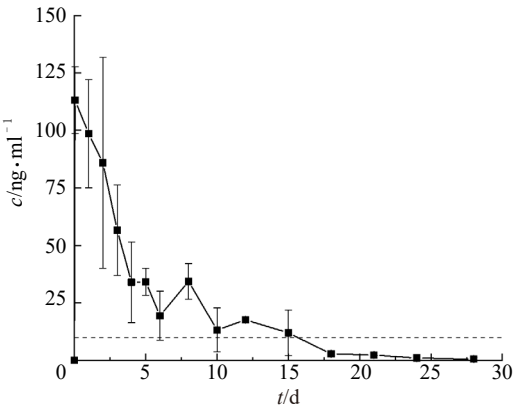


图 5　雄性 SD 大鼠皮下注射载 1 热敏水凝胶后的血药浓度 - 时间曲线（*n*=3）

Fig.5　Plasma Concentrations-time Curve in SD Rats after Subcutaneous Injection of **1**-Loaded Thermosensitive Hydrogels (*n*=3)

造成损害，药物可以在制剂中稳定存在。体外降解和体外释放曲线表明，热敏水凝胶的降解可维持 3 周以上，制剂中的蛋白在水凝胶中扩散并随着水凝胶基质的降解而释放，总释放天数达到 22 d，整个释放阶段的累积释放率达到 92%。在大鼠体内的药动学试验结果与体外释放结果趋势相同，大鼠在给药后 1 h 达到血药浓度峰值，其后长达 15 d 能够维持大鼠体内 **1** 的有效治疗浓度。综上所述，载 **1** 热敏水凝胶有望作为一种新型长效缓释制剂应用于血友病患者，能降低患者注射频次、提高患者顺应性，具有较高的临床应用价值。下一步可针对该制剂在 d1 内高浓度的药物释放量对制剂进行优化改进，缓解突释效应。

参考文献：

[1] 董艳荣, 王　丽. 重组凝血八因子及相关药物研究进展[J]. 中国新药杂志, 2017, **26**(14): 9.

[2] IVENS I A, BANCZYK D, GUTBERLET K, *et al*. Nonclinical safety assessment of a long-acting recombinant PEGylated factor eight (BAY 94-9027) with a 60 kDa PEG [J]. *Toxicol Pathol*, 2019, **47**(5): 585-597.

[3] SPIRA J, PLYUSHCH O P, ANDREEVA T A, *et al*. Evaluation of liposomal dose in recombinant factor Ⅷ reconstituted with pegylated liposomes for the treatment of patients with severe haemophilia A [J]. *Thromb Haemost*, 2008, **100**(3): 429-434.

[4] DUMONT J A, LIU T Y, LOW S C, *et al*. Prolonged activity of a recombinant factor Ⅷ-Fc fusion protein in hemophilia A mice and dogs [J]. *Blood*, 2012, **119**(13): 3024-3030.

[5] BHUJBAL S S, DARADE S B, DHARMADHIKARI S S. Biomaterial based injectable hydrogel for controlled drug delivery: a review [J]. *Int J Pharm Sci Res*, 2020, **11**(3): 1007-1021.

[6] LEGANES J, SANCHEZ-MIGALLON A, MERINO S, *et al*. Stimuli-responsive graphene-based hydrogel driven by disruption of triazine hydrophobic interactions [J]. *Nanoscale*, 2020, **12**(13): 7072-7081.

[7] KHALEDI S, JAFARI S, HAMIDI S, *et al*. Preparation and characterization of PLGA-PEG-PLGA polymeric nanoparticles for co-delivery of 5-Fluorouracil and Chrysin [J]. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2020, **31**(9): 1107-1126.

[8] LIOW S S, DOU Q Q, KAI D, *et al*. Thermogels: *in situ* gelling biomaterial [J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2016, **2**(3): 295-316.

[9] JEONG B, BAE Y H, KIM S W. Drug release from biodegradable injectable thermosensitive hydrogel of PEG-PLGA-PEG triblock copolymers [J]. *J Controlled Release*, 2000, **63**(1/2): 155-163.

[10] CHAN P S, LI Q Q, ZHANG B, *et al*. *In vivo* biocompatibility and efficacy of dexamethasone-loaded PLGA-PEG-PLGA thermogel in an alkali-burn induced corneal neovascularization disease model [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2020, **155**: 190-198.

[11] CHAN P S, XIAN J W, LI Q Q, *et al*. Biodegradable thermosensitive PLGA-PEG-PLGA polymer for non-irritating and sustained ophthalmic drug delivery [J]. *AAPS J*, 2019, **21**(4): 59.

[12] FU X D, ZENG H L, GUO J P, *et al*. A PLGA-PEG-PLGA thermosensitive gel enabling sustained delivery of ropivacaine hydrochloride for postoperative pain relief [J]. *Chem Pharm Bull* (Tokyo), 2017, **65**(3): 229-235.

[13] RON E S, BROMBERG L E. Temperature-responsive gels and thermogelling polymer matrices for protein and peptide delivery [J]. *Adv Drug Delivery Rev*, 1998, **31**(3): 197-221.

[14] SANTOVEÑA A, MONZÓN C, ALVAREZ-LORENZO C, *et al*. Structure-performance relationships of temperature-responsive PLGA-PEG-PLGA gels for sustained release of bone morphogenetic protein-2 [J]. *J Pharm Sci*, 2017,

106(11): 3353-3362.

[15] CESPI M, BONACUCINA G, TIBONI M, *et al*. Insights in the rheological properties of PLGA-PEG-PLGA aqueous dispersions: structural properties and temperature-dependent behaviour [J]. *Polymer*, 2020, **213**: 123216.

[16] VERMONDEN T, M N A, VAN M J, *et al*. Rheological studies of thermosensitive triblock copolymer hydrogels [J]. *Langmuir*, 2006, **22**(24): 10180-10184.

[17] ZHANG W, JIN X, LI H, *et al*. Injectable and body temperature sensitive hydrogels based on chitosan and hyaluronic acid for pH sensitive drug release [J]. *Carbohydr Polym*, 2018, **186**: 82-90.

(上接第1423页)

[6] MATHEW J, KENDALK J L. Methods for the synthese of alfentanil, sufentanil and remifentanil: WO, 2001040184A2 [P]. 2001-06-07.

[7] SRIMURUGAN S, MURUGAN K, CHEN C. A facile method for preparation of [$^{2}H_{3}$]-sufentanil and its metabolites [J]. *Chem Pharm Bull*, 2009, **57**(12): 1421-1424.

[8] 李丽平, 张肖杰, 司朗云, 等. 磷酸可待因有关物质的合成[J]. 中国医药工业杂志, 2020, **51**(10): 1277-1281.

[9] 石予白, 张玉琳, 马少华. *N*-(4-甲氧基甲基哌啶-4-基)-*N*-苯基丙酰胺盐酸盐的合成[J]. 中国医药工业杂志, 2013, **44**(11): 1091-1093.

[10] 陈雪珂, 郭幸雪, 黄 建, 等. 西酞普兰及其相关物质的合成[J]. 安徽化工, 2019, **45**(6): 26-30.

[11] GANT T G, SARSHAR S. Preparation of deuterium enriched substituted 4-amino-piperidines as opioid receptor modulators: US, 20100016365A1 [P]. 2010-01-21.