

# (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2023年3月16日 (16.03.2023)



(10) 国际公布号  
**WO 2023/036276 A1**

- (51) 国际专利分类号:  
*A61K 31/337* (2006.01) *A61P 35/04* (2006.01)  
*A61K 38/17* (2006.01) *A61K 47/34* (2017.01)  
*A61P 35/00* (2006.01) *A61K 9/19* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2022/117973
- (22) 国际申请日: 2022年9月9日 (09.09.2022)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:  
202111063703.5 2021年9月10日 (10.09.2021) CN  
202210928962.8 2022年8月3日 (03.08.2022) CN
- (71) 申请人: 先声药业有限公司 (SIMCERE PHARMACEUTICAL CO., LTD) [CN/CN]; 中国江苏省南京市江北新区华康路99号, Jiangsu 210032 (CN)。江苏先声药业有限公司 (JIANGSU SIMCERE PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省南京市玄武区玄武大道699-18号, Jiangsu 210042 (CN)。
- (72) 发明人: 唐任宏 (TANG, Renhong); 中国上海市浦东新区芙蓉花路118弄, Shanghai 201318 (CN)。

杨文清 (YANG, Wenqing); 中国上海市浦东新区芙蓉花路118弄, Shanghai 201318 (CN)。薛黎婷 (XUE, Liting); 中国上海市浦东新区芙蓉花路118弄, Shanghai 201318 (CN)。秦晓康 (QIN, Xiaokang); 中国上海市浦东新区芙蓉花路118弄, Shanghai 201318 (CN)。诸舜伟 (ZHU, Shunwei); 中国上海市浦东新区芙蓉花路118弄, Shanghai 201318 (CN)。邢辉 (XING, Hui); 中国上海市浦东新区芙蓉花路118弄, Shanghai 201318 (CN)。唐建兴 (TANG, Jianxing); 中国上海市浦东新区芙蓉花路118弄, Shanghai 201318 (CN)。李坚 (LI, Jian); 中国上海市浦东新区芙蓉花路118弄, Shanghai 201318 (CN)。郭磊磊 (GUO, Leilei); 中国上海市浦东新区芙蓉花路118弄, Shanghai 201318 (CN)。丁雨寅 (DING, Yuyin); 中国上海市浦东新区芙蓉花路118弄, Shanghai 201318 (CN)。郝元斌 (HAO, Yuanbin); 中国上海市浦东新区芙蓉花路118弄, Shanghai 201318 (CN)。史瑞文 (SHI, Ruiwen); 中国江苏省南京市玄武区玄武大道699-18号, Jiangsu 210042 (CN)。卞祥 (BIAN, Xiang); 中国江苏省南京市玄武区玄武大道699-18号, Jiangsu 210042 (CN)。

(54) Title: USE OF DOCETAXEL POLYMER MICELLE IN PREPARATION OF DRUG FOR PREVENTING OR TREATING MALIGNANT HYDROTHORAX AND ASCITES

(54) 发明名称: 多西他赛聚合物胶束在制备预防或治疗恶性胸腹水的药物中的用途

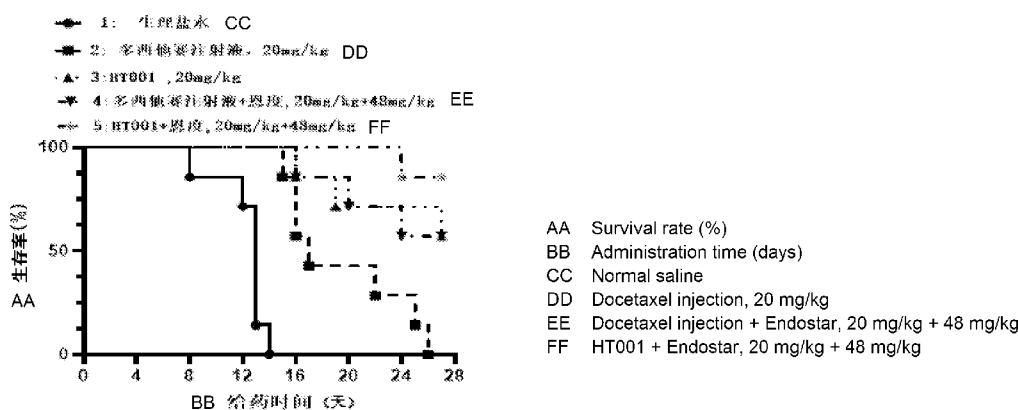


图5

(57) Abstract: Disclosed is the use of a docetaxel polymer micelle in the preparation of a drug for preventing or treating malignant hydrothorax and ascites. The docetaxel polymer micelle is used for treating malignant hydrothorax and ascites, which can significantly prolong survival, improve the treatment effect of hydrothorax and ascites, increase the plasma exposure amount of the drug, and reduce the secretion of VEGF.

(57) 摘要: 公开了多西他赛聚合物胶束在制备预防或治疗恶性胸腹水的药物中的用途。将多西他赛聚合物胶束用于治疗恶性胸腹水, 能够显著延长生存期, 增加胸腹水治疗效果, 提高药物血浆暴露量, 减少VEGF的分泌。



WO 2023/036276 A1

(CN)。刘永东(LIU, Yongdong); 中国江苏省南京市江北新区华康路99号, Jiangsu 210032 (CN)。

李臻(LI, Zhen); 中国海南省海口市秀英区药谷三路2号, Hainan 570311 (CN)。任晋生(REN, Jinsheng); 中国江苏省南京市玄武区玄武大道699-18号, Jiangsu 210042 (CN)。

(74) 共同代表: 江苏先声药业有限公司(JIANGSU SIMCERE PHARMACEUTICAL CO., LTD.); 中国江苏省南京市玄武区玄武大道699-18号, Jiangsu 210042 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

## 多西他赛聚合物胶束在制备预防或治疗恶性胸腹水的药物中的用途

本申请要求 2021 年 09 月 10 日向中国国家知识产权局提交的，专利申请号为 202111063703.5，发明名称为“多西他赛聚合物胶束在制备预防或治疗恶性胸腹水的药物中的用途”以及 2022 年 08 月 03 日向中国国家知识产权局提交的，专利申请号为 202210928962.8，发明名称为“多西他赛聚合物胶束在制备预防或治疗恶性胸腹水的药物中的用途”的中国专利申请的优先权。上述在先申请的全文通过引用的方式结合于本申请中。

### 技术领域

本申请涉及医药领域，具体而言，涉及多西他赛聚合物胶束在制备预防或治疗恶性胸腹水的药物中的用途。

### 背景技术

多西他赛 (docetaxel, DTX) 亦称为多西紫杉醇，分子式  $C_{43}H_{53}NO_{14}$ ，分子量为 807.88，为紫杉醇类抗肿瘤药，其可与游离的微管蛋白结合，促进微管蛋白装配成稳定的微管，同时抑制其解聚，导致丧失了正常功能的微管束的产生和微管的固定，从而抑制细胞的有丝分裂，发挥抗肿瘤作用。但是，多西他赛具有水溶性差、半衰期短及毒性大等缺点，临床上通常是经静脉输注给药。纳米聚合物胶束是近年来发展起来的针对难溶性药物的载药系统，具有核-壳状结构，其中核为疏水性部分，壳为亲水性部分。聚合物胶束可以将难溶性药物包裹于核部分达到对难溶性药物的增溶。

重组人血管内皮抑制素是通过修饰人血管内皮抑制素的核苷酸编码序列使其 N 末端带有 9 个附加氨基酸序列。所生产的重组人血管内皮抑制素由 192 个氨基酸构成，其氨基酸序列为：(M)GGSHHHHHSHRDFQPVLHLVALNSPLSGGMRGIRGADFQCFQQARAVGLAGTFR AFLSSRLQDLYSIVRRADRAAVPIVNLKDELLFPSWEALFSGSEGPLKPGARIFSFDDGKDVLR HPTWPQKSVWHGSDPNRRRLTESYCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQSAASCHHAYI VLCIENSFMTASK。目前市售的重组人血管内皮抑制素为普通注射液，联合 NP 化疗方案用于治疗初治或复治的 III/IV 期非小细胞肺癌患者。

恶性肿瘤患者常常伴有恶性胸腹水并发症，严重影响患者的治疗、生活质量和生存时间。其中 30-40% 的病例是顽固性难治患者，临床上没有标准治疗方案，预后较差。目前临床治疗恶性胸腹水的主要手段是反复胸腔穿刺、置引流管、利尿和全身化疗等，但是效果并不能满足临床需求，而且会引起如壁层和脏层粘连包裹，全身性感染等不良反应。近年来，由于胸腹壁-血浆屏障存在延缓药物进入血浆，减少全身不良反应，增加药物与胸腹水中肿瘤细胞接触时间，提高抑制胸腹水的作用，腔内化疗成为治疗恶性胸腹水的手段，但也仍然存在生存时间短、预后较差、生活质量低等问题。

### 发明内容

本申请的目的是提供多西他赛聚合物胶束在制备预防或治疗恶性胸腹水的药物中的用途。

本申请提供多西他赛聚合物胶束在制备预防或治疗恶性胸腹水的药物中的用途。

本申请提供预防或治疗哺乳动物恶性胸腹水的方法，包括对需要该预防或治疗的哺乳动

物，优选人类，给予多西他赛聚合物胶束。

本申请提供多西他赛聚合物胶束在预防或者治疗恶性胸腹水中的用途。

本申请提供预防或者治疗恶性胸腹水的多西他赛聚合物胶束。

在一些实施方案中，多西他赛聚合物胶束的剂量是 5~200mg/m<sup>2</sup>。

在一些实施方案中，所述多西他赛聚合物胶束的给药频次是一周一次。

本申请提供多西他赛聚合物胶束和重组人血管内皮抑制素联合在制备预防或治疗恶性胸腹水的药物中的用途。

本申请提供预防或治疗哺乳动物恶性胸腹水的方法，包括对需要该治疗的哺乳动物，优选人类，给予多西他赛聚合物胶束和重组人血管内皮抑制素。

本申请提供多西他赛聚合物胶束和重组人血管内皮抑制素联合在预防或者治疗恶性胸腹水中的用途。

本申请提供预防或者治疗恶性胸腹水的多西他赛聚合物胶束和重组人血管内皮抑制素。

在一些实施方案中，多西他赛聚合物胶束的剂量是 5~200mg/m<sup>2</sup>，所述重组人血管内皮抑制素的剂量是 5~200 mg/m<sup>2</sup>。

在一些实施方案中，多西他赛聚合物胶束的剂量是 5~200mg/m<sup>2</sup>，所述重组人血管内皮抑制素的剂量是 5~400mg/次。

本申请提供一种产品，所述产品含有（a）多西他赛聚合物胶束，和（b）重组人血管内皮抑制素，在预防或者治疗恶性胸腹水中作为组合制剂同时、分别或序贯使用。

本申请提供上述产品在制备预防或者治疗恶性胸腹水的药物中的用途。

本申请提供上述产品预防或治疗恶性胸腹水的用途。

在一些实施方案中，恶性胸腹水选自恶性腹水。

在一些实施方案中，所述重组人血管内皮抑制素是注射液。

在一些实施方案中，本申请所述多西他赛聚合物胶束的给药途径为胸腔给药或腹腔给药。

在一些实施方案中，本申请所述重组人血管内皮抑制素的给药途径为或胸腔给药或腹腔给药。

在一些实施方案中，所述多西他赛聚合物胶束的给药频次是一周一次，所述重组人血管内皮抑制素的给药频次是一日一次。

本申请所述的方案中，任选的还包含其它活性成分，所述其它活性成分包括但不限于其他治疗恶性胸腹水的药物等。

本申请所述的“联合”是一种给药方式，是指一定时间期限内给与至少一种剂量的多西他赛聚合物胶束和至少一种剂量的重组人血管内皮抑制素。所述的时间期限可以是一个给药周期内。可以同时或依次给予多西他赛聚合物胶束和重组人血管内皮抑制素。这种期限内包括这样的治疗，其中通过相同给药途径或不同给药途径给予多西他赛聚合物胶束和重组人血管内皮抑制素。本申请所述联合的给药方式选自同时给药、独立地配置并共给药或独立地配置并相继给药。

在一些实施方案中,所述多西他赛聚合物胶束包含多西他赛和聚乙二醇单甲醚-聚乳酸嵌段共聚物。

在一些实施方案中,所述聚乙二醇单甲醚-聚乳酸嵌段共聚物的分子量是 2000~7000,且多分散系数  $PD \leq 1.5$ 。优选地,所述聚乙二醇单甲醚-聚乳酸嵌段共聚物的分子量是 3000~5000,且多分散系数  $PD \leq 1.5$ 。

在一些实施方案中,所述的聚乙二醇单甲醚-聚乳酸嵌段共聚物为 D,L-丙交酯与聚乙二醇单甲醚聚合形成的嵌段共聚物,聚乙二醇单甲醚与 D,L-丙交酯的投料质量比为 1:0.6~1.6,优选 1:0.9~1.3,更优选 1:1.05~1.25,进一步优选 1:1.1~1.2,更进一步优选 1:1.1。

在一些实施方案中,所述聚乙二醇单甲醚的分子量为 1000~20000,优选 1000~5000,更优选 1800~2200,进一步优选 2000。

在一些实施方案中,所述的聚乙二醇单甲醚-聚乳酸嵌段共聚物通过如下方法制备得到:  
(a) 向反应器中加入聚乙二醇单甲醚,加热熔融;(b) 加入 D,L-丙交酯,加入金属催化剂,然后加热至 125~150°C 反应;(c) 反应结束后降温,加入第一有机溶剂溶解,加入第二有机溶剂,过滤,滤饼真空干燥,得到聚乙二醇单甲醚-聚乳酸嵌段共聚物。

在一些实施方案中,所述的聚乙二醇单甲醚-聚乳酸嵌段共聚物通过如下方法制备得到:  
(a) 向反应器中加入聚乙二醇单甲醚,真空下加热熔融,惰性气体置换;(b) 加入 D,L-丙交酯,惰性气体置换,加入金属催化剂,保证反应器中为负压或惰性气体保护,然后加热至 125~150°C 反应;(c) 反应结束后降温,加入第一有机溶剂溶解,加入第二有机溶剂,过滤,滤饼真空干燥,得到聚乙二醇单甲醚-聚乳酸嵌段共聚物。

在一些实施方案中,步骤 (a) 所述聚乙二醇单甲醚真空下加热至 60~130°C。

在一些实施方案中,步骤 (b) 金属催化剂为异辛酸亚锡。

在一些实施方案中,异辛酸亚锡的质量占 D,L-丙交酯和聚乙二醇单甲醚总质量的 0.05~0.5wt%,优选 0.15~0.3wt%。

在一些实施方案中,步骤 (b) 反应时间是 1~20h,优选 3~10h,更优选 4~6h。

在一些实施方案中,步骤 (c) 所述的第一有机溶剂为乙腈、丙酮、二氯甲烷、二甲基甲酰胺、二甲亚砜、四氢呋喃、短链脂肪醇或乙酸乙酯中的一种或几种,优选二氯甲烷、三氯甲烷、甲醇、乙醇、异丙醇中的一种或几种,更优选二氯甲烷;第一有机溶剂的用量占聚乙二醇单甲醚质量 0.1~100 倍体积 (L/kg),优选 0.2~50 倍体积 (L/kg),更优选 0.5~20 倍体积 (L/kg)。

在一些实施方案中,步骤 (c) 所述的第二有机溶剂为乙醚、异丙醚、甲基叔丁基醚、正庚烷、环己烷、石油醚中的一种或几种,优选乙醚、异丙醚或甲基叔丁基醚中的一种或几种,更优选乙醚;第二有机溶剂的用量占聚乙二醇单甲醚总质量 1~100 倍体积 (L/kg),优选 10~50 倍体积 (L/kg),更优选 15~20 倍体积 (L/kg)。

在一些实施方案中,步骤 (b) 反应结束后还包括加入第三有机溶剂和活性炭,搅拌,过滤,滤液减压浓缩的步骤。

在一些实施方案中,所述第三有机溶剂为二氯甲烷、三氯甲烷、乙酸乙酯、乙酸异丙酯、

乙酸丁酯、丁酮、甲苯、丙酮、乙腈、二甲基甲酰胺、二甲亚砜、四氢呋喃、1,4-二氧六环、短链脂肪醇中的一种或几种，优选二氯甲烷、三氯甲烷、甲醇、乙醇、异丙醇中的一种或几种，更优选为二氯甲烷。

在一些实施方案中，所述第三有机溶剂的用量占聚乙二醇单甲醚质量 0.1~100 倍体积 (L/kg)，优选 0.2~50 倍体积 (L/kg)，更优选 0.5~20 倍体积 (L/kg)。

在一些实施方案中，所述活性炭的用量占 D,L-丙交酯和聚乙二醇单甲醚总质量的 1~500wt%，优选 5~200wt%，更优选 5~75wt%，进一步优选 20~50wt%。

在一些实施方案中，所述多西他赛与聚乙二醇单甲醚-聚乳酸嵌段共聚物的质量比为 0.01~0.15:1，优选 0.02~0.12:1，更优选 0.03~0.10:1，进一步优选 0.04:0.96。

在一些实施方案中，所述多西他赛聚合物胶束还包含稳定剂。

在一些实施方案中，所述稳定剂是枸橼酸、盐酸、山梨酸、乳酸、酒石酸、苹果酸、磷酸、醋酸、己二酸、富马酸中的一种或几种，优选是枸橼酸、酒石酸、富马酸中的一种或几种，更优选是枸橼酸。

在一些实施方案中，所述多西他赛与稳定剂的质量比是 1: 0.00125~0.25，优选是 1: 0.005~0.25，更优选是 1: 0.0125~0.125。

在一些实施方案中，所述多西他赛聚合物胶束包含以下配比的组分：

成分	用量
多西他赛	1 重量份
聚乙二醇单甲醚-聚乳酸嵌段共聚物	24 重量份
枸橼酸	0.025 重量份

。

在一些实施方案中，所述多西他赛聚合物胶束通过以下方法制备而成：

(1)将上述聚乙二醇单甲醚-聚乳酸嵌段共聚物和多西他赛溶于有机溶剂，旋转蒸发除去有机溶剂，得到凝胶状药膜，然后向药膜中加入水溶解分散所述药膜，制得胶束溶液；

(2)将步骤(1)制得的胶束溶液经过滤除菌、冷冻干燥后得到多西他赛聚合物胶束冻干制剂。

在一些实施方案中，步骤(1)是将上述聚乙二醇单甲醚-聚乳酸嵌段共聚物、稳定剂和多西他赛溶于有机溶剂，旋转蒸发除去有机溶剂，得到凝胶状药膜，然后向药膜中加入水溶解分散所述药膜，制得胶束溶液。

在一些实施方案中，步骤(1)中所述的有机溶剂选自乙腈、丙酮、二氯甲烷、二甲基甲酰胺、二甲亚砜、四氢呋喃、短链脂肪醇、乙酸乙酯中的任意一种或几种，优选甲醇、乙醇、异丙醇、乙腈、乙酸乙酯中的任意一种或几种，更优选甲醇。

在一些实施方案中，步骤(1)中所述的有机溶剂的用量为每克聚乙二醇单甲醚聚乳酸嵌段共聚物中加入 0.5~12ml 有机溶剂，优选加入 3~12ml 有机溶剂。

在一些实施方案中，步骤(1)中，向药膜中加入水的用量为每克聚乙二醇单甲醚聚乳酸嵌段共聚物加入 2~40ml 水，优选地为每克聚乙二醇单甲醚聚乳酸嵌段共聚物加入 10~20ml 水，更优选地为每克聚乙二醇单甲醚聚乳酸嵌段共聚物加入 10~15ml 水。

在一些实施方案中，步骤(2)中，旋转蒸发去除有机溶剂的条件为：旋转速度 10~150rpm，温度 20~80°C，时间 1~4h。

本申请将多西他赛聚合物胶束单用或与重组人血管内皮抑制素联合用于治疗恶性胸腹水，能够显著延长生存期，提高胸腹水治疗效果，提高药物血浆暴露量，减少 VEGF 的分泌。

### 术语定义和说明

除非本申请另外定义，与本申请相关的科学和技术术语应具有本领域普通技术人员所理解的含义。

“任选”或“任选地”意味着随后所描述的事件可以但不必发生，该说明包括该事件发生或不发生的场合。

“VEGF”是指血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor)，其在腹水形成的病理生理机制中起重要作用，可使血管通透性明显增加，是腹水形成重要因素之一，且恶性腹水中 VEGF 值明显升高，VEGF 值越高，患者预后越差。

恶性胸腹水是指恶性胸水和/或恶性腹水，恶性胸水也可以称为恶性胸腔积液，恶性腹水也可以称为恶性腹腔积液。

“多西他赛聚合物胶束”是指“注射用多西他赛聚合物胶束”。

“多西他赛注射液”均是指多西他赛普通剂型的注射液，例如泰索帝。

聚乙二醇单甲醚可简称为 MPEG 或者 mPEG。

聚乙二醇单甲醚-聚乳酸嵌段共聚物可简称为 MPEG-PDLLA。

剂量单位由 mg/kg 转换成 mg/m<sup>2</sup> 的方法，按照以下步骤：

(1) 由体重推算体表面积：体表面积(m<sup>2</sup>)=K×(W<sup>2/3</sup>/10000)

式中 W 为动物的一般体重 (g)，小鼠按照 20g 计算；K 为常数，小鼠 K 值是 9.1、大鼠 K 值是 9.1、豚鼠 K 值是 9.8、家兔 K 值是 10.1、猫 K 值是 9.8、犬 K 值是 11.2、猴 K 值是 11.8、人 K 值是 10.6。

(2) 剂量 (mg/kg) × W (kg) /体表面积=mg/m<sup>2</sup>

例如，小鼠剂量是 5mg/kg，体表面积是 9.1×(20<sup>2/3</sup>/10000)=0.0067 m<sup>2</sup>，然后 5 mg/kg × 0.02kg/0.0067 m<sup>2</sup>=15 mg/m<sup>2</sup>。因此小鼠剂量 5mg/kg 可以转换成 15 mg/m<sup>2</sup>。

### 附图说明

图 1 为聚乙二醇单甲醚-聚乳酸嵌段共聚物的 <sup>1</sup>HNMR 图谱。

图 2 为多西他赛聚合物胶束冻干制剂透射电镜图。

图 3 为多西他赛聚合物胶束对 H22 腹水瘤模型小鼠腹水量的影响。

图 4 为多西他赛聚合物胶束对 H22 腹水瘤模型小鼠体重的影响。

图 5 为多西他赛聚合物胶束对 H22 腹水瘤模型小鼠生存期的影响。

图 6 为多西他赛聚合物胶束对 H22 腹水瘤模型小鼠血浆中 VEGF 含量的影响。

图 7 为多西他赛聚合物胶束对 ES-2 腹水瘤模型小鼠腹水量的影响。

图 8 为多西他赛聚合物胶束对 ES-2 腹水瘤模型小鼠生存期的影响。

图 9 为在 SD 大鼠、Beagle 犬中通过静脉注射单剂量 HT001 或 DTX 给药后多西紫杉醇的平均血浆浓度-时间曲线。

### 具体实施方式

下面结合具体实施例来进一步描述本申请，本申请的优点和特点将会随着描述而更为清楚。实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市售购买获得的常规产品。

本申请实施例仅是范例性的，并不对本申请的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是，在不偏离本申请的精神和范围下可以对本申请技术方案的细节和形式进行修改或替换，但这些修改和替换均落入本申请的保护范围内。

本申请实施例参考以下方法考察聚乙二醇单甲醚-聚乳酸嵌段共聚物的分子量和分布，本申请制剂实施例参考以下方法考察制剂的包封率、有关物质、粒径和跨距：

#### (1) 分子量及分布检测方法

**<sup>1</sup>HNMR** 取 1%四甲基硅烷的氘代氯仿 10%~20%(g/mL) 本品溶液 0.5~1.0mL，从 0ppm 扫描到 10ppm，以直接比较法定量，具体方法为：3.6ppm 处为聚乳酸中 CH 的峰，5.1ppm 处为聚乙二醇单甲醚中 CH<sub>2</sub> 的峰，峰面积与氢的数目存在以下关系：聚乙二醇单甲醚分子量 2000，L/G=2m/4n，m=2000/44=45.5，则可求出共聚物的组成及分子量。

$$\text{PDLLA/MPEG 的重量比} = \frac{144 \times 2 \times m \times L/G}{2000}$$

共聚物的分子量 = (1 + PDLLA/MPEG 的重量比) × 2000

式中：L 为 5.1ppm 处复合峰的积分面积，代表聚丙交酯的次甲基；

G 为 3.6ppm 处复合峰的积分面积，代表聚氧乙烯的亚甲基；

m 为共聚物结构式中氧乙烯的聚合度；

n 为共聚物结构式中 D,L-丙交酯的聚合度。

**GPC** 照高效液相色谱法（中国药典 2020 年版四部通则<0512>）测定。

色谱条件 采用凝胶色谱柱；示差折光检测；四氢呋喃为流动相；流速 1.0mL/min，柱温 40°C。

测定法 取本品适量，加四氢呋喃制备成 1%的溶液，吸取 20μL，注入液相色谱仪，用聚苯乙烯标准物质作为标样，数据采用 GPC 软件处理。

#### (2) 包封率检测方法

取多西他赛聚合物胶束冻干制剂，用生理盐水溶解至浓度 1mg/ml 后放置在室温条件下（25±2°C），检测包封率。

对照品溶液（含多西他赛约 0.2mg/ml）：精密称取 10mg 多西他赛对照品于 50ml 量瓶中，加稀释剂溶解并稀释至刻度，摇匀，作为含量测定的对照品溶液。

供试品储备溶液（含多西他赛 1mg/ml）：取本品 5 瓶（每瓶含多西他赛 20mg），分别



加 0.9%氯化钠注射液 20ml，涡旋混匀 10 分钟，作为供试品储备溶液。

离心前溶液：取 4ml 供试品储备溶液，10000G 离心力离心 10 分钟，精密量取上清液 2.0ml，置于 10ml 量瓶中，用稀释剂稀释至刻度，摇匀，作为离心后溶液。

HPLC 色谱条件为：以 ODS 为填充剂，0.043mol/L 醋酸铵水溶液-乙腈（45:55）为流动相，检测波长为 230nm。

（3）有关物质检测方法：

色谱条件：

流动相 A：水

流动相 B：乙腈

按下表梯度洗脱：

时间（分钟）	流动相 A（%）	流动相 B（%）
0	53	47
20	53	47
40	23	77
40.1	0	100
50	0	100
50.1	53	47
60	53	47

稀释剂：乙腈-水-冰醋酸（100：100：0.1）

色谱柱：十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂（4.6×250mm, 5 $\mu$ m）

柱温：35℃；

检测波长：230nm；

流速：1.0mL/min；

进样体积：20  $\mu$ L。

供试品溶液：取多西他赛聚合物胶束冻干制剂 1 瓶，加适量稀释剂溶解并转移至 50ml 量瓶中，用适量稀释剂清洗西林瓶不少于 3 次并全部转移至量瓶中，加稀释剂稀释至刻度，摇匀；

对照溶液：精密量取供试品 1ml，置 100ml 量瓶中，加稀释剂至刻度，摇匀。

辅料溶液：精密称取聚乙二醇单甲醚-聚乳酸嵌段共聚物（MPEG-PDLLA）适量，加稀释剂溶解并稀释制成每 1ml 中约含 9.6mg 的溶液。

灵敏度溶液：取多西他赛对照品适量，精密称定，加稀释剂溶解并稀释制成每 1ml 中约含 0.2  $\mu$ g 的溶液。

系统适用性溶液：取多西他赛鉴别用对照品适量，精密称定，加稀释剂溶解并稀释制成每 1ml 中约含 0.4mg 的溶液。

系统适用性要求：系统适用性溶液色谱图中，多西他赛峰与杂质 B、C、D 的分离度应符合要求。灵敏度溶液色谱图中，多西他赛峰高的信噪比应大于 10。

分析过程：照高效液相色谱法（中国药典 2020 年版四部通则<0512>）测定。精密量取供试品溶液与对照品溶液，分别注入液相色谱仪，记录色谱图。

计算公式：

$$\% \text{Impurity} = \frac{A_{\text{SPL}} \times f}{A_{\text{STD}}} \times 1\%$$

$$\text{总杂质 (\%)} = \sum \% \text{单个杂质}$$

其中：

$A_{\text{SPL}}$  供试品溶液中杂质峰面积

$A_{\text{STD}}$  对照溶液中主峰峰面积

$f$  校正因子

判断标准：供试品溶液色谱图中如有杂质峰，扣除辅料峰外，按乘以校正因子（1.0）的主成分自身对照法计算杂质含量。供试品溶液色谱图中小于对照溶液主峰面积0.05倍的峰忽略不计。

杂质名称	相对保留时间
杂质 X	0.62
多西他赛	1.00
杂质 B	1.43
杂质 C	1.58
杂质 D	1.76

（4）粒径与跨距检测方法：取多西他赛聚合物胶束冻干制剂，加 0.9%氯化钠注射液 20mL 配制成溶液，照微粒制剂指导原则（中国药典 2020 年版四部通则<9014>）和粒度和粒度分布测定法（中国药典 2020 年版四部通则<0982>第三法）进行测定。

#### 实施例 1、聚乙二醇单甲醚-聚乳酸嵌段共聚物的制备

氮气保护下向反应釜中加入 4.50 kg 聚乙二醇单甲醚（2000），充氮气、抽真空，加热至 120℃，待全部熔融，继续加热并保持真空，干燥 2h 后用氮气置换，在氮气保护下加入 4.95 kg D,L-丙交酯，充氮气、抽真空，使反应釜中保持真空；搅拌均匀后氮气置换。升温至 140℃，氮气保护下，加入 18.000 g 异辛酸亚锡，氮气置换，氮气保护加热至 140±5℃反应 5h。反应结束后，产物降温至 40℃，加入 36L 二氯甲烷和 4.50kg 活性炭，搅拌脱色 1h，过滤，滤液减压浓缩至干。

加入 4.5 L 二氯甲烷，搅拌下加入 90L 冷无水乙醚，搅拌 30min 后静置，过滤，滤饼按上述操作过程再精制两次，真空干燥得到聚乙二醇单甲醚-聚乳酸嵌段共聚物 6.204kg，收率为 65.65%。得到的共聚物用核磁共振进行表征，结果如图 1 所示。分子量为 3647，GPC 分析结果：多分散系数 PD 值=1.2。

#### 实施例 2、多西他赛聚合物胶束冻干制剂的制备

配方：

成分	用量
多西他赛	50g
聚乙二醇单甲醚-聚乳酸嵌段共聚物	1200g
枸橼酸	1.25g
甲醇	5000 ml
注射用水	15kg

制备工艺：（1）称取处方量的实施例 1 制备得到的聚乙二醇单甲醚-聚乳酸嵌段共聚物，加入至处方量 50%的甲醇中超声直至完全溶解，得到甲醇溶液。

（2）将处方量的枸橼酸加入上述甲醇溶液中溶解，溶解完成后加入处方量的多西他赛和剩余甲醇，继续溶解，然后过滤，滤液在 50-60°C、80~120rpm 条件下旋蒸至少 1h，得到多西他赛聚合物凝胶膜。

（3）向装有多西他赛聚合物药膜的圆底旋蒸瓶中加入 50-60°C左右注射用水 15kg，置于回旋振荡器中水化，待完全水化，将圆底烧瓶置于冷水中冷却，得多西他赛聚合物胶束溶液。除菌过滤，西林瓶灌装，冻干，得到多西他赛聚合物胶束冻干制剂。每瓶含多西他赛 20mg。

取少量多西他赛聚合物胶束冻干制剂，复溶后通过透射电镜进行检测。结果如图 2 所示，显示样品近似圆球型，胶束已形成。

取少量多西他赛聚合物胶束冻干制剂，检测粒径与跨距，粒径 22nm，跨距 0.73。

取少量多西他赛聚合物胶束冻干制剂检测性状、pH 值、复溶后的包封率。结果如下表所示：

检测项目	检测结果
性状	淡蓝色微乳光溶液
pH 值	3.7
包封率	99.9%

### 实施例 3-5、多西他赛聚合物胶束冻干制剂的制备

按照以下用量制备多西他赛聚合物胶束，考察有关物质（总杂）。

实施例编号	多西他赛 (g)	MPEG: D,L-丙交酯质量比	聚乙二醇单甲醚-聚乳酸嵌段共聚物 (g)	枸橼酸 (mg)	有机溶剂	有机溶剂用量 (ml)	纯化水 (g)
3	0.4	1:1	9.6	10	甲醇	100	100
4	0.4	1:1.1	9.6	10	甲醇	100	100
5	0.4	1:1.2	9.6	10	甲醇	100	100

（1）聚乙二醇单甲醚-聚乳酸嵌段共聚物的制备



8	0.06	1:1.1	0.94	1.5	甲醇	10	10
9	0.06	1:1.2	0.94	1.5	甲醇	10	10

结果如下表所示:

考察项目	实施例 8	实施例 9
性状	淡蓝色澄明微乳光液体	淡蓝色澄明微乳光液体
pH 值	3.88	3.85

### 实施例 10-11、多西他赛聚合物胶束冻干制剂的制备

聚乙二醇单甲醚-聚乳酸嵌段共聚物按照实施例 3 步骤 (1) 的方法、多西他赛聚合物胶束按照实施例 2 中的制备方法, 按照以下用量制备多西他赛聚合物胶束, 在水化完全后将胶束溶液降温后, 用 0.9%氯化钠注射液稀释到约含多西他赛 1mg/mL, 考察性状、pH 值。

实施例编号	多西他赛 (g)	MPEG: D,L-丙交酯质量比	聚乙二醇单甲醚-聚乳酸嵌段共聚物 (g)	枸橼酸 (mg)	有机溶剂	有机溶剂用量 (ml)	纯化水 (g)
10	0.1	1:1.1	0.9	2.5	甲醇	10	10
11	0.1	1:1.2	0.9	2.5	甲醇	10	10

结果如下表所示:

考察项目	实施例 10	实施例 11
性状	淡蓝色澄明微乳光液体	淡蓝色澄明微乳光液体
pH 值	3.81	3.80

### 实施例 12、动物实验

#### 1、实验动物

BALB/c 小鼠, 雌性, 6-8 周龄, 体重 18-22 克, 共 53 只。由上海灵畅生物科技有限公司提供, SPF 级。动物供应商许可证号: SCXK(沪)2018-0003, 实验动物合格证号: 20180003016706。

#### 2、受试药物

药物名称	生产厂家	规格	溶媒
注射用重组人血管内皮抑制素 (恩度®)	山东先声制药有限公司	15 mg/支	生理盐水
多西他赛聚合物胶束 (HT001)	由实施例 2 制备得到	20mg/支	生理盐水
多西他赛注射液	江苏恒瑞医药有限公司	20mg/0.5ml	生理盐水

#### 3、实验方法

### 3.1 细胞培养

鼠肝癌 H22 细胞（南京科佰 CBP60230）体外悬浮培养，培养条件为 RPMI Medium 1640 培养基中加 10% 胎牛血清，1% P/S，37 °C，5%CO<sub>2</sub> 孵箱培养。一周一到两次进行常规传代。数量到达要求以及细胞在对数生长期时，收取细胞，计数，接种。

### 3.2 肿瘤细胞接种与分组

收集细胞培养液中 H22 细胞，用 PBS 重悬并调整细胞浓度至  $1 \times 10^7$  个/mL，取 3 只 BALB/c 小鼠，每只小鼠腹腔注射 1 mL 细胞悬液。细胞注射 7 天左右小鼠腹部明显隆起，抽取小鼠腹腔腹水，收集 H22 细胞并用 PBS 洗一遍，PBS 重悬 H22 细胞并调整浓度至  $2.5 \times 10^6$  个/mL，每只小鼠腹腔注射 0.2 mL 细胞悬液。细胞接种 3 天后，将小鼠按体重随机分组到 5 个实验组中，每组 10 只，分组当天为 Day 0 开始给药。

### 3.3 分组给药方案

#### 1) 分组

给药前称重动物，根据动物体重随机分组。

#### 2) 给药

给药方案见下表：

动物实验分组和给药方案

组别	动物数 (只)	受试品	剂量 (mg/kg)	给药途径	给药频率	给药次数
1	10	生理盐水组	N/A	IP	QW	3
2	10	多西他赛注射液	20	IP	QW	3
3	10	HT001	20	IP	QW	3
4	10	多西他赛注射液+恩度 <sup>®</sup>	20+48	IP	QW+QD	3+21
5	10	HT001+恩度 <sup>®</sup>	20+48	IP	QW+QD	3+21

注：1. 给药体积均为 10 ml/kg；

2. IP: 腹腔注射；QD: 一天一次；QW: 一周一次。例如，G5 组：多西他赛聚合物胶束（HT001）的给药剂量是 20mg/kg，给药频次是一周一次，共给药 3 次，恩度<sup>®</sup>的给药剂量是 48mg/kg，给药频次是一天一次，共给药 21 次。均是腹腔注射给药。

### 观察

每天监测动物的健康状况及死亡情况，例行检查包括观察肿瘤生长和药物治疗对动物日常行为表现的影响如行为活动，摄食摄水量，体重变化（每周称量三次体重），外观体征或其它不正常情况。基于各组动物数量记录组内动物死亡数和副作用。

### 3.4 检测指标

体重检测：接种、分组（即首次给药前）、给药期间每周 3 次、安乐死前称取动物体重，使用电子天平称量，以 g 为单位，保留小数点后一位有效数字。

采用差重法对腹水重量进行计量，以 g 为单位，保留小数点后 4 位有效数字。用细胞计数仪对腹水中细胞浓度进行测量，以  $10^6$  个/mL 为单位，保留小数点后 1 位有效数字。

#### 4. 结束实验

1) 每组 3 只小鼠分别于第二次给药前 (第 8 天 0 h) 和给药后 (2/4/8/12/24 h) 采血, 末次采血后安乐死, 无菌注射器腹腔抽取收集腹水并测量腹水重量。实验结束, 提供小鼠体重、腹水量和腹水细胞数量数据, 收集血浆做伴随 PK/PD 实验。

血浆收集方法: 全血用抗凝管收集, 离心后取上清用于伴随 PK/PD 检测, 样品-80℃保存待测。

2) 剩余小鼠继续给药, 观察生存期。实验结束, 提供小鼠体重、生存期数据。

#### 5. 实验结果

##### 1) 腹水情况

组别	受试品	腹水量 (g) 平均数±方差	<i>P</i> 值 <sup>b</sup> 与生理盐水组比较(腹水量)	腹水细胞数(10 <sup>6</sup> ) 平均数±方差	<i>P</i> 值 <sup>b</sup> 与生理盐水组比较(腹水细胞数)	无腹水小鼠比例
1	生理盐水	6.6±1.6	/	887.9±373.7	/	0/3
2	多西他赛注射液	0.7±0.7	**	30.3±20.2	**	0/3
3	HT001	0.2±0.3	**	23.3±40.3	**	2/3
4	多西他赛注射液+恩度 <sup>®</sup>	2.6±4.5	*	326.3±565.1	*	2/3
5	HT001+恩度 <sup>®</sup>	0±0 <sup>a</sup>	**	0±0 <sup>a</sup>	**	3/3

注: a. 实验终点时小鼠腹腔内无腹水。

b. 利用 one-way anova 分析方法用 GraphPad Prism 9.0 对动物腹水量和腹水细胞数进行统计学分析, 在所有分析中  $P < 0.05$  认为有显著性差异 (\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ ; ns: 不显著)。

图 3 为多西他赛聚合物胶束对 H22 腹水瘤模型小鼠腹水量的影响, 给予多西他赛聚合物胶束、多西他赛聚合物胶束联合重组人血管内皮抑制素可以抑制模型小鼠腹水量增加, 甚至完全消退腹水。

##### 2) 体重

图 4 为多西他赛聚合物胶束对 H22 腹水瘤模型小鼠体重的影响, 给予多西他赛聚合物胶束、多西他赛聚合物胶束联合重组人血管内皮抑制素后小鼠体重上升平缓, 有抑制腹水作用。

##### 3) 生存期

组别	受试品	中位生存期(天)	Day28 存活小鼠比例	<i>P</i> 值 <sup>b</sup> 与生理盐水组比较
1	生理盐水	13	0/7	/
2	多西他赛注射液	17	0/7	***
3	HT001	-a	4/7	***

4	多西他赛注射液+恩度®	-a	4/7	***
5	HT001+恩度®	-a	6/7	***

注：a. 至实验终点，小鼠存活比例大于 50%，所有小鼠状态良好。

b. 利用 Log-rank (Mantel-Cox) test 分析方法用 GraphPad Prism 9.0 对动物生存期进行统计学分析，在所有分析中  $P < 0.05$  认为有显著性差异(\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ ; ns: 不显著)。

另外，组 3 (HT001 20mg/kg) vs. 组 2 (多西他赛注射液 20mg/kg)  $P < 0.05$ ，有显著性差异。

图 5 为多西他赛聚合物胶束对 H22 腹水瘤模型小鼠生存期的影响，给予多西他赛聚合物胶束、多西他赛聚合物胶束联合重组人血管内皮抑制素可以显著延长小鼠生存时间。

结果说明：

多西他赛聚合物胶束单药与多西他赛注射液相比，显著延长腹水小鼠生存期，至实验结束有半数以上小鼠存活。

多西他赛聚合物胶束和重组人血管内皮抑制素联合组与多西他赛注射液和重组人血管内皮抑制素联合组相比，延长腹水小鼠生存期，至实验结束只有一只小鼠未存活。

#### 4) PK/PD

##### 1. 伴随 PD 实验(VEGF 含量检测)

用市售的 VEGF 试剂盒 (Mouse VEGF Quantikine™ ELISA Kit, R&D, Catalog Number: MMV00) 进行 VEGF 含量检测。

##### 1.1 溶液制备

1) 使用 5mg 小鼠 VEGF 标准品和 5mL RD5T 稀释液配制 500 pg/mL 小鼠 VEGF 标准品储备溶液。

2) 标准品的制备：使用储备溶液等比稀释配置标准品 (浓度分别为 250pg/mL、125 pg/mL、62.5 pg/mL、31.3 pg/mL、15.6 pg/mL、7.8 pg/mL)，在等比稀释之前，先让储备溶液静置至少 5 分钟。未稀释的小鼠 VEGF 标准品储备溶液 (500 pg/mL) 作为高标准，稀释液 RD5T 作为零标准 (0 pg/mL)。

3) 对照品的制备：用 1.0 mL 去离子水或蒸馏水与小鼠 VEGF 对照品混合配制对照品，在振荡器上充分混匀，测定未稀释的对照品。

4) 底物溶液的制备：将 Color Reagent A 和 Color Reagent B 按照 1:1 比例混合，在振荡器上混匀半分钟，避光放置。底物溶液需在使用前静置 15 分钟。

5) 洗涤缓冲液的制备：向 247 mL 去离子水或蒸馏水中添加 13 mL 洗涤缓冲液浓缩液，制备 260 mL 洗涤缓冲液。

##### 1.2 检测

1) 在 96 孔板中，在相应的孔加入 50μL 的检测稀释液 RD1N。

2) 向每个孔中添加 50μL 标准品、对照品和使用 RD5T 稀释液稀释后的样品溶液。在微



孔板振荡器上震荡 2 分钟，使其充分混合。用提供的胶带盖住，在室温下孵育 2 小时。

3) 对每孔进行抽吸和冲洗，重复该过程四次，共冲洗五次。在每个孔中注入洗涤缓冲液 (400 $\mu$ L)。在第五次清洗后，通过抽吸或倾倒的方式清除剩余的洗涤缓冲液。

4) 向每个孔中添加 100 $\mu$ L 小鼠 VEGF 结合物。用新的胶带盖住，在室温下孵育 2 小时。

5) 重复步骤 4) 中的清洗。

6) 向每个孔中添加 100 $\mu$ L 底物溶液。在室温下孵育 30 分钟，避光。

7) 向每个孔中添加 100 $\mu$ L 反应终止液。在微孔板振荡器上震荡 5 分钟，确保充分混合。

8) 使用 PE EnSight 酶标仪上测量 450 nm 处或附近的吸光度。建立标准曲线，计算每个样本品的 VEGF 含量。

## 2. 伴随 PK 实验

### 2.1 色谱条件

色谱柱: Waters HPLC HSS T3 1.8  $\mu$ m (2.1 mm \* 5 mm)。

流动相 A: 0.1%甲酸; 流动相 B: 乙腈 (0.1%甲酸)。

洗脱程序见下表。

洗脱程序

时间/min	流动相 A	流动相 B
0	55	45
0.1	55	45
0.6	5	95
1	5	95
1.01	55	45
1.5	55	45

柱温: 40°C; 流速: 0.6ml/min; 进样量: 10 $\mu$ l。

### 2.2 质谱条件

电喷雾离子源温度: 5500; 鞘气压力 (GS1)、加热气压力 (GS2) 以及气帘气压力 (CUR) 分别为 55、55 及 35; 离子源喷雾电压 (IS); 正离子扫描模式和多重反应监测模式 (MRM)。

### 2.3 溶液配制

(1) 内标溶液 (Docetaxel 浓度为 50 ng/ml): 取 Docetaxel (多西他赛标准品) 适量, 以乙腈为溶剂, 配制含 Docetaxel 浓度为 50 ng/ml 的溶液。

(2) 多西他赛储备液: 精密称取多西他赛适量, 加二甲基亚砷使样品溶解, 用乙腈稀释至含多西他赛浓度为 1mg/ml, 摇匀即得 (二甲基亚砷与乙腈的体积比为 1: 9)。

(3) 标准曲线溶液: 使用多西他赛储备液, 以 50%乙腈为稀释液进行不同浓度标准曲线工作溶液配制 (300 ug/mL、60 ug/mL、45 ug/mL、30 ug/mL、15 ug/mL、6 ug/mL、3 ug/mL、0.6 ug/mL、0.3 ug/mL、0.15 ug/mL、0.06 ug/mL)。然后取空白血浆 47.5  $\mu$ L, 分别加入各浓度的标准曲线工作溶液 2.5  $\mu$ L, 涡旋混匀, 即得入血溶液 (浓度 3000 ng/mL、2250 ng/mL、1500 ng/mL、750 ng/mL、300 ng/mL、150 ng/mL、30 ng/mL、15 ng/mL、7.5 ng/mL、3 ng/mL)。取入血溶液 20  $\mu$ L 至 2mL 圆底 96 孔板中, 加入 100  $\mu$ L 内标 (Docetaxel 浓度为 50 ng/ml), 涡旋混匀 3min, 4°C/4000rpm 离心 15min, 取上清 20  $\mu$ L 至 2mL 圆底 96 孔板中, 加入超纯水 80  $\mu$ L, 涡旋混匀, 取 10 $\mu$ L 溶液进样分析。

(2) 样品前处理：取 20  $\mu\text{L}$  血浆至 2mL 圆底 96 孔板中，加入 100  $\mu\text{L}$  内标 (Docetaxel 浓度为 50 ng/ml)，涡旋混匀 3min，4 $^{\circ}\text{C}$ /4000rpm 离心 15min，取上清 20  $\mu\text{L}$  至 2mL 圆底 96 孔板中，加入超纯水 80  $\mu\text{L}$ ，涡旋混匀，取 10 $\mu\text{L}$  溶液进样分析。

### 3. 实验结果

PD 结果见图 6 多西他赛聚合物胶束对 H22 腹水瘤模型小鼠血浆中 VEGF 含量的影响，给予多西他赛聚合物胶束、多西他赛聚合物胶束联合重组人血管内皮抑制素可以显著抑制 VEGF 分泌，起到抑制腹水的作用。

PK 结果见下表：

组别	受试品	AUClast h*ng/mL
1	生理盐水	-
2	多西他赛注射液	3031 $\pm$ 937
3	HT001	6432 $\pm$ 318

结果说明：

多西他赛聚合物胶束与多西他赛注射液相比，显著提高药物血浆暴露量，并减少 VEGF 的分泌。

### 实施例 13

#### 1、实验动物

BALB/c nude 小鼠，雌性，6-8 周龄，体重 18-22 克。共 96 只。由上海灵畅生物科技有限公司提供，SPF 级。动物供应商许可证号：SCXK(沪)2018-0003，实验动物合格证号：20180003016704。

#### 2、受试药物

药物名称	生产厂家	规格	溶媒
恩度 <sup>®</sup>	山东先声制药有限公司	15 mg/支	生理盐水
多西他赛聚合物胶束 (HT001)	由实施例 2 制备得到	20mg/支	生理盐水
顺铂	齐鲁制药有限公司	10mg/瓶	生理盐水

#### 3、实验方法

##### 3.1 细胞培养

人卵巢癌 ES-2 细胞(南京科佰 CBP60293)体外单层培养，培养条件为 RPMI Medium 1640 培养基中加 10% 胎牛血清，1% P/S，37  $^{\circ}\text{C}$ ，5% $\text{CO}_2$  孵箱培养。一周一次到两次用 0.25% 胰酶-EDTA 进行常规消化处理传代。数量到达要求以及细胞在对数生长期时，收取细胞，计数，接种。

##### 3.2 肿瘤细胞接种与分组

收集细胞培养液中 ES-2 细胞，用 PBS 重悬并调整细胞浓度至  $2 \times 10^7$  个/mL，每只小鼠腹腔注射 0.5 mL 细胞悬液。细胞接种 7 天后，将小鼠按体重随机分组到 6 个实验组中，每组

16 只，分组当天为 Day 0 开始给药。

3.3 分组给药方案

1) 分组

给药前称重动物，根据动物体重随机分组。

2) 给药

给药方案见下表：

动物实验分组和给药方案

组别	动物数 (只)	受试品	剂量 (mg/kg)	给药途径	给药频率	给药次数
1	16	生理盐水	N/A	IP	QW	3
2	16	顺铂	5	IP	QW	3
3	16	HT001	5	IP	QW	3
4	16	HT001	20	IP	QW	3
5	16	HT001+恩度®	5+8	IP	QW+QD	3+21
6	16	HT001+恩度®	20+8	IP	QW+QD	3+21

注：1. 给药体积均为 10 ml/kg；

2. IP: 腹腔注射；QD: 一天一次；QW: 一周一次。

3) 观察

每天监测动物的健康状况及死亡情况，例行检查包括观察肿瘤生长和药物治疗对动物日常行为表现的影响如行为活动，摄食摄水量，体重变化（每周称量三次体重），外观体征或其它不正常情况。基于各组动物数量记录组内动物死亡数和副作用。

3.4 检测指标

Day8 每组提前结束 6 只动物做腹水量和腹水细胞计数，腹水体积用注射器进行计量，以 mL 为单位，保留小数点后一位有效数字。采用差重法对腹水重量进行计量，以 g 为单位，保留小数点后 4 位有效数字。用细胞计数仪对腹水中细胞浓度进行测量，以 10<sup>6</sup> 个/mL 为单位，保留小数点后 1 位有效数字。

4. 结束实验

1) Day8 每组取 6 只动物安乐死，收集腹水。

2) 剩余小鼠继续给药，观察生存期。实验结束，提供小鼠生存期数据。

5. 实验结果

1) 腹水情况

组别	受试品	腹水量 (g) 平均数±方差	P 值 <sup>a</sup> 与生理盐水组比较(腹水量)	腹水细胞数 (10 <sup>6</sup> ) 平均数±方差	P 值 <sup>a</sup> 与生理盐水组比较 (腹水细胞数)	无腹水小鼠比例
1	生理盐水	5.6±0.7	/	1129.1±578.3	/	0/6
2	顺铂 5mg/kg	1.9±1.3	****	132.4±119.3	****	0/6

3	HT001 5mg/kg	1.7±1.0	****	110.6±96.6	****	1/6
4	HT001 20mg/kg	0.3±0.2	****	12.9±13.2	****	2/6
5	HT001+恩度 <sup>®</sup> 5mg/kg+8mg/kg	1.5±1.2	****	142.9±146.8	****	1/6
6	HT001+恩度 <sup>®</sup> 20mg/kg+8mg/kg	0.1±0.2	****	5.5±12.0	****	4/6

注： a. 利用 one-way anova 分析方法用 GraphPad Prism 9.0 对数据进行统计学分析，在所有分析中  $P < 0.05$  认为有显著性差异。（\*：  $P < 0.05$ ；\*\*：  $P < 0.01$ ；\*\*\*：  $P < 0.001$ ；\*\*\*\*：  $P < 0.0001$ ；ns：不显著）。

图 7 为多西他赛聚合物胶束对 ES-2 腹水瘤模型小鼠腹水量的影响，给予多西他赛聚合物胶束、多西他赛聚合物胶束联合重组人血管内皮抑制素可以抑制模型小鼠腹水量增加。

结果说明：

多西他赛聚合物胶束单药与多西他赛聚合物胶束和重组人血管内皮抑制素联合可以减少 ES-2 模型小鼠腹水量和腹水中细胞数。

2) 生存期

组别	受试品	中位生存期（天）	$P$ 值 <sup>a</sup> 与生理盐水组比较
1	生理盐水	6	/
2	顺铂 5mg/kg	7	ns
3	HT001 5mg/kg	7	*
4	HT001 20mg/kg	11	****
5	HT001+恩度 <sup>®</sup> 5mg/kg+8mg/kg	7.5	**
6	HT001+恩度 <sup>®</sup> 20mg/kg+8mg/kg	11	****

注： a. 利用 Log-rank (Mantel-Cox) test 分析方法用 GraphPad Prism 9.0 对动物生存期进行统计学分析，在所有分析中  $P < 0.05$  认为有显著性差异（\*：  $P < 0.05$ ；\*\*：  $P < 0.01$ ；\*\*\*：  $P < 0.001$ ；\*\*\*\*：  $P < 0.0001$ ；ns：不显著）。

图 8 为多西他赛聚合物胶束对 ES-2 腹水瘤模型小鼠生存期的影响，给予多西他赛聚合物胶束、多西他赛聚合物胶束联合重组人血管内皮抑制素可以显著延长小鼠生存时间。

结果说明：

多西他赛聚合物胶束单药与多西他赛聚合物胶束和重组人血管内皮抑制素联合可以延长腹水小鼠生存期。

实施例 14

1、实验动物

BALB/c 小鼠，雌性，6-8 周龄，体重 18-22 克，共 83 只。由上海灵畅生物科技有限公司提供，SPF 级。动物供应商许可证号：SCXK(沪)2018-0003，实验动物合格证号：20180003016705。

## 2、受试药物

药物名称	生产厂家	规格	溶媒
恩度®	山东先声制药有限公司	15 mg/支	生理盐水
多西他赛聚合物胶束 (HT001)	由实施例 2 制备得到	20mg/支	生理盐水
顺铂	齐鲁制药有限公司	10mg/瓶	生理盐水

## 3、实验方法

### 3.1 细胞培养

鼠肝癌 H22 细胞（南京科佰 CBP60230）体外悬浮培养，培养条件为 RPMI Medium 1640 培养基中加 10% 胎牛血清，1% P/S，37 °C，5%CO<sub>2</sub> 孵箱培养。一周一到两次进行常规传代。数量到达要求以及细胞在对数生长期时，收取细胞，计数，接种。

### 3.2 肿瘤细胞接种与分组

收集细胞培养液中 H22 细胞，用 PBS 重悬并调整细胞浓度至  $1 \times 10^7$  个/mL，取 3 只 BALB/c 小鼠，每只小鼠腹腔注射 1 mL 细胞悬液。细胞注射 7 天左右小鼠腹部明显隆起，抽取小鼠腹腔腹水，收集 H22 细胞并用 PBS 洗一遍，PBS 重悬 H22 细胞并调整浓度至  $2.5 \times 10^6$  个/mL，每只小鼠腹腔注射 0.2 mL 细胞悬液。细胞接种 3 天后，将小鼠按体重随机分组到 5 个实验组中，每组 16 只，分组当天为 Day 0 开始给药。

### 3.3 分组给药方案

#### 1) 分组

给药前称重动物，根据动物体重随机分组。

#### 2) 给药

给药方案见下表：

动物实验分组和给药方案

组别	动物数 (只)	受试品	剂量 (mg/kg)	给药途径	给药频率	给药次数
1	16	生理盐水	N/A	IP	QW	3
2	16	顺铂	5	IP	QW	3
3	16	HT001	5	IP	QW	3
4	16	HT001+恩度®	5+8	IP	QW+QD	3+21
5	16	HT001+恩度®	20+8	IP	QW+QD	3+21

注：1. 给药体积均为 10 ml/kg；

2. IP: 腹腔注射；QD: 一天一次；QW: 一周一次。

#### 3) 观察

每天监测动物的健康状况及死亡情况，例行检查包括观察肿瘤生长和药物治疗对动物日常行为表现的影响如行为活动，摄食摄水量，体重变化（每周称量三次体重），外观体征或

其它不正常情况。基于各组动物数量记录组内动物死亡数和副作用。

### 3.4 检测指标

给药一周后动物做腹水量和腹水细胞计数，腹水体积用注射器进行计量，以 mL 为单位，保留小数点后一位有效数字。采用差重法对腹水重量进行计量，以 g 为单位，保留小数点后 4 位有效数字。用细胞计数仪对腹水中细胞浓度进行测量，以  $10^6$  个/mL 为单位，保留小数点后 1 位有效数字。

### 4. 结束实验

- 1) Day8 每组取 6 只动物安乐死，收集腹水。
- 2) 剩余小鼠继续给药，观察生存期。实验结束，提供生存期数据。

### 5. 实验结果

#### 1) 腹水情况

组别	受试品	腹水量 (g) 平均数±方差	P值 <sup>b</sup> 与生理 盐水组比较 (腹水量)	腹水细胞数 ( $10^6$ ) 平均数±方差	P值 <sup>b</sup> 与生理盐 水组比较 (腹 水细胞数)	无腹 水小 鼠比 例
1	生理盐水	6.5±2.1	/	1181.0±151.3	/	0/6
2	顺铂 5mg/kg	1.7±1.9	****	344.3±403.8	****	2/6
3	HT001 5mg/kg	1.7±2.6	****	343.2±534.8	****	2/6
4	HT001+恩度 <sup>®</sup> 5mg/kg+8mg/kg	0.5±1.4	****	64.6±158.2	****	5/6
5	HT001+恩度 <sup>®</sup> 20mg/kg+8mg/kg	0±0 <sup>a</sup>	****	0±0 <sup>a</sup>	****	6/6

注：a. 实验终点时小鼠腹腔内无腹水。

b. 利用 one-way anova 分析方法用 GraphPad Prism 9.0 对动物腹水量和腹水细胞数进行统计学分析，在所有分析中  $P < 0.05$  认为有显著性差异 (\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ ; ns: 不显著)。

结果说明：

多西他赛聚合物胶束单药、多西他赛聚合物胶束和重组人血管内皮抑制素联合可以减少 H22 模型小鼠腹水量和腹水中细胞数。

#### 2) 生存期

组别	受试品	中位生存期 (天)	Day26 存活小鼠比 例	P值 <sup>b</sup> 与生理盐水组 比较
1	生理盐水	13.5	0/10	/
2	顺铂 5mg/kg	17	0/10	**
3	HT001 5mg/kg	21	3/10	**

4	HT001+恩度 <sup>®</sup> 5mg/kg+8mg/kg	23	5/10	**
5	HT001+恩度 <sup>®</sup> 20mg/kg+8mg/kg	-a	8/10	****

注：a. 至实验终点，小鼠存活比例大于 50%，所有小鼠状态良好。

b. 利用 Log-rank (Mantel-Cox) test 分析方法用 GraphPad Prism 9.0 对动物生存期进行统计学分析，在所有分析中  $p < 0.05$  认为有显著性差异 (\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ ; ns: 不显著)。

#### 实施例 15 大鼠和犬的体内药代动力学 (PK) 试验

Sprague-Dawley (SD) 大鼠，8 周龄，给药开始前体重 215-364g。共 24 只，雌雄各半。购自北京维通利华实验动物科技有限公司，SPF 级。

Beagle 犬 (雄性/雌性)，体重 7.73-8.37kg，约 6-8 月龄，共 12 只，雌雄各半，购自玛氏生物科技有限公司，普通级。

多西他赛注射液 (Taxotere<sup>®</sup>，下称 DTX) 购自 Sanofi-Aventis Deutschland GmbH (德国)。多西他赛注射液按说明书配置为母液，用生理盐水稀释至相应工作液浓度。HT001 组都用生理盐水稀释。

SD 大鼠静脉注射单剂量 2.5、5、10 mg/kg HT001 或 5 mg/kg DTX (每组 6 只大鼠，给药浓度分别为 0.25、0.5、1、0.5mg/mL)。在给药后 0.083、0.25、0.5、1、2、3、4、6、8 和 24 小时从动物颈静脉区全血约 0.5mL，血样采集后放入含有肝素钠抗凝的 EP 管中。将血样以每分钟 3000 转(rpm)的速度离心 10 分钟以获得血浆并通过 LC-MS/MS (Waters Corp., Manchester, UK) 进行分析。

Beagle 犬静脉注射单剂量 1mg/kg 的 DTX 或 HT001 (每组 6 只，给药浓度均为 0.2mg/mL)。在给药后 0.25、0.5、0.55、1、2、4、6、8 和 24 小时采血，每个时间点从前肢或后肢皮下静脉取血约 1mL，血样采集后放入含有肝素钠抗凝的 EP 管中。将血样以 3000 rpm 离心 10 分钟以获得血浆并通过 LC-MS/MS 进行分析。

一般临床观察：

观察时间：每天上午和下午各 1 次，直至 D3。

观察内容：笼旁观察动物死亡或濒死情况、精神状态、行为活动、进食情况、粪便性状等。

数据采集及统计分析：

LCSOLUTION 系统工作软件 (Version 1.25) 输出原始图谱并计算测定样品的浓度。使用 Waters 公司的 Unifi 软件输出原始图谱、浓度、准确度等数据。采用 WinNonlin (V6.2) 软件非房室模型方法 (NCA) 对动物个体进行 AUC、Tmax、Cmax 等主要代谢动力学参数的计算。

实验结果：

在 SD 大鼠中通过静脉注射单剂量 HT001 或 DTX 给药后多西紫杉醇的平均血浆浓度-时间曲线如图 9A 所示。SD 大鼠的 PK 参数列于下表。HT001 在 2.5-10mg/kg 剂量范围内，Cmax 和 AUClast 值均随剂量增加而增加，且增加暴露的比例高于增加剂量。在 5 mg/kg 剂量下，DTX 给药后大鼠体内多西他赛的 AUClast 值显著低于 HT001 治疗组。

在 Beagle 犬中通过静脉注射单剂量 HT001 或 DTX 给药后多西紫杉醇的平均血浆浓度-时间曲线如图 9B 所示。HT001 在非啮齿动物宿主中显示出与 DTX 相似的 PK 和组织分布曲线。另外,在给药期间,DTX 组的全部犬都观察到了皮肤潮红、眼睑肿胀和发红、呼吸急促等过敏反应,但在同剂量 HT001 组中没有观察到这种现象。

HT001 和 DTX 在 SD 大鼠体内的药代动力学 (PK) 参数

Group	t <sub>1/2</sub> (h)	C <sub>max</sub> (ng/mL)	AUC <sub>last</sub> (h*ng/mL)	AUC <sub>inf</sub> (h*ng/mL)
HT001 (2.5 mg/kg)	10.15±3.27	356.63±73.66	378.34±76.05	430.49±72.53
HT001 (5 mg/kg)	8.50±1.35	1467.68±336.31	1059.71±148.37*	1140.22±170.57
HT001 (10 mg/kg)	6.10±0.64	5235.81±542.79	3049.33±425.04	3108.82±429.77
DTX (5 mg/kg)	9.28±1.80	1191.14±183.32	890.52±98.35	972.95±88.17

注: 利用 student's *t* test 分析方法, 计算 HT001 (5mg/kg) 组 vs. DTX 组 AUC<sub>last</sub>(h\*ng/mL) 的 *P* 值, *P* < 0.05, 有显著性差异。



## 权利要求书

1. 多西他赛聚合物胶束在制备预防或治疗恶性胸腹水的药物中的用途。
2. 根据权利要求 1 所述的用途，其中，多西他赛聚合物胶束的人体剂量范围是 5~200mg/m<sup>2</sup>。
3. 多西他赛聚合物胶束和重组人血管内皮抑制素联合在制备预防或治疗恶性胸腹水的药物中的用途。
4. 根据权利要求 3 所述的用途，其中，多西他赛聚合物胶束的人体剂量范围是 5~200mg/m<sup>2</sup>，所述重组人血管内皮抑制素的人体剂量范围是 5~200mg/m<sup>2</sup>。
5. 一种产品，所述产品含有 (a) 多西他赛聚合物胶束，和 (b) 重组人血管内皮抑制素，在预防或者治疗恶性胸腹水中作为组合制剂同时、分别或序贯使用。
6. 权利要求 5 所述产品在制备预防或者治疗恶性胸腹水的药物中的用途。
7. 根据权利要求 1~4、6 任一项所述的用途，其中，多西他赛聚合物胶束的给药途径为胸腔给药或腹腔给药。
8. 根据权利要求 3~4、6 任一项所述的用途，其中，重组人血管内皮抑制素的给药途径为胸腔给药或腹腔给药。
9. 根据权利要求 1~8 任一项所述的用途或产品，其中，恶性胸腹水选自恶性腹水。
10. 根据权利要求 1~8 任一项所述的用途或产品，其中，所述重组人血管内皮抑制素是注射液。
11. 根据权利要求 1~8 任一项所述的用途或产品，其中，所述多西他赛聚合物胶束包含多西他赛和聚乙二醇单甲醚-聚乳酸嵌段共聚物。
12. 根据权利要求 11 所述的用途或产品，其中，所述聚乙二醇单甲醚-聚乳酸嵌段共聚物的分子量是 2000~7000，且多分散系数  $PD \leq 1.5$ ，优选地，所述聚乙二醇单甲醚-聚乳酸嵌段共聚物的分子量是 3000~5000，且多分散系数  $PD \leq 1.5$ 。
13. 根据权利要求 11 所述的用途或产品，其中，所述的聚乙二醇单甲醚-聚乳酸嵌段共聚物为 D,L-丙交酯与聚乙二醇单甲醚聚合形成的嵌段共聚物，聚乙二醇单甲醚与 D,L-丙交酯的投料质量比为 1:0.6~1.6，优选 1:0.9~1.3，更优选 1:1.05~1.25，更进一步优选 1:1.1~1.2，更进一步优选 1:1.1。
14. 根据权利要求 13 所述的用途或产品，其中，所述聚乙二醇单甲醚的分子量为 1000~20000，优选 1000~5000，更优选 1800~2200，进一步优选 2000。
15. 根据权利要求 11~14 任一项所述的用途或产品，其中，所述的聚乙二醇单甲醚-聚乳酸嵌段共聚物通过如下方法制备得到：(a) 向反应器中加入聚乙二醇单甲醚，加热熔融；(b) 加入 D,L-丙交酯，加入金属催化剂，然后加热至 125~150℃ 反应；(c) 反应结束后降温，加入第一有机溶剂溶解，加入第二有机溶剂，过滤，滤饼真空干燥，得到聚乙二醇单甲醚-聚乳酸嵌段共聚物。
16. 根据权利要求 15 所述的用途或产品，其中，所述的聚乙二醇单甲醚-聚乳酸嵌段共聚物通过如下方法制备得到：(a) 向反应器中加入聚乙二醇单甲醚，真空下加热熔融，惰性气体置换；(b) 加入 D,L-丙交酯，惰性气体置换，加入金属催化剂，保证反应器中为负压或惰性气体保护，然后加热至 125~150℃ 反应；(c) 反应结束后降温，加入第一有机溶剂溶解，加

入第二有机溶剂，过滤，滤饼真空干燥，得到聚乙二醇单甲醚-聚乳酸嵌段共聚物。

17. 根据权利要求 15 或 16 所述的用途或产品，其中，步骤 (a) 所述聚乙二醇单甲醚真空下加热至 60~130°C。

18. 根据权利要求 15 或 16 所述的用途或产品，其中，步骤 (b) 金属催化剂为异辛酸亚锡。

19. 根据权利要求 15 或 16 所述的用途或产品，其中，异辛酸亚锡的质量占 D,L-丙交酯和聚乙二醇单甲醚总质量的 0.05~0.5wt%，优选 0.15~0.3wt%。

20. 根据权利要求 15 或 16 所述的用途或产品，其中，步骤 (b) 反应时间是 1~20h，优选 3~10h，更优选 4~6h。

21. 根据权利要求 15 或 16 所述的用途或产品，其中，步骤 (c) 所述的第一有机溶剂为乙腈、丙酮、二氯甲烷、二甲基甲酰胺、二甲亚砜、四氢呋喃、短链脂肪醇或乙酸乙酯中的一种或几种，优选二氯甲烷、三氯甲烷、甲醇、乙醇、异丙醇中的一种或几种，更优选二氯甲烷；第一有机溶剂的用量占聚乙二醇单甲醚质量 0.1~100 倍体积 (L/kg)，优选 0.2~50 倍体积 (L/kg)，更优选 0.5~20 倍体积 (L/kg)。

22. 根据权利要求 15 或 16 所述的用途或产品，其中，步骤 (c) 所述的第二有机溶剂为乙醚、异丙醚、甲基叔丁基醚、正庚烷、环己烷、石油醚中的一种或几种，优选乙醚、异丙醚或甲基叔丁基醚中的一种或几种，更优选乙醚；第二有机溶剂的用量占聚乙二醇单甲醚总质量 1~100 倍体积 (L/kg)，优选 10~50 倍体积 (L/kg)，更优选 15~20 倍体积 (L/kg)。

23. 根据权利要求 15 或 16 所述的用途或产品，其中，步骤 (b) 反应结束后还包括加入第三有机溶剂和活性炭，搅拌，过滤，滤液减压浓缩的步骤。

24. 根据权利要求 23 所述的用途或产品，其中，所述第三有机溶剂为二氯甲烷、三氯甲烷、乙酸乙酯、乙酸异丙酯、乙酸丁酯、丁酮、甲苯、丙酮、乙腈、二甲基甲酰胺、二甲亚砜、四氢呋喃、1,4-二氧六环、短链脂肪醇中的一种或几种，优选二氯甲烷、三氯甲烷、甲醇、乙醇、异丙醇中的一种或几种，更优选为二氯甲烷，所述第三有机溶剂的用量占聚乙二醇单甲醚质量 0.1~100 倍体积 (L/kg)，优选 0.2~50 倍体积 (L/kg)，更优选 0.5~20 倍体积 (L/kg)。

25. 根据权利要求 23 所述的用途或产品，其中，所述活性炭的用量占 D,L-丙交酯和聚乙二醇单甲醚总质量的 1~500wt%，优选 5~200wt%，更优选 5~75wt%，进一步优选 20~50wt%。

26. 根据权利要求 11 所述的用途或产品，其中，所述多西他赛与聚乙二醇单甲醚-聚乳酸嵌段共聚物的质量比为 0.01~0.15:1，优选 0.02~0.12:1，更优选 0.03~0.10:1，进一步优选 0.04:0.96。

27. 根据权利要求 11 所述的用途或产品，其中，所述多西他赛聚合物胶束还包含稳定剂。

28. 根据权利要求 27 所述的用途或产品，其中，所述稳定剂是枸橼酸、盐酸、山梨酸、乳酸、酒石酸、苹果酸、磷酸、醋酸、己二酸、富马酸中的一种或几种，优选是枸橼酸、酒石酸、富马酸中的一种或几种，更优选是枸橼酸。

29. 根据权利要求 27 所述的用途或产品，其中，所述多西他赛与稳定剂的质量比是 1:0.00125~0.25，优选是 1:0.005~0.25，更优选是 1:0.0125~0.125。

30. 根据权利要求 11 所述的用途或产品，其中，所述多西他赛聚合物胶束包含以下配比的组分：

成分	用量
多西他赛	1 重量份
聚乙二醇单甲醚-聚乳酸嵌段共聚物	24 重量份
枸橼酸	0.025 重量份

31. 根据权利要求 11~30 任一项所述的用途或产品，其中，所述多西他赛聚合物胶束通过以下方法制备而成：

(1)将权利要求 11~25 任一项所述的聚乙二醇单甲醚-聚乳酸嵌段共聚物和多西他赛溶于有机溶剂，旋转蒸发除去有机溶剂，得到凝胶状药膜，然后向药膜中加入水溶解分散所述药膜，制得胶束溶液；

(2)将步骤(1)制得的胶束溶液经过滤除菌、冷冻干燥后得到多西他赛聚合物胶束冻干制剂。

32. 根据权利要求 31 所述的用途或产品，其中，步骤（1）是将权利要求 11~25 任一项所述的聚乙二醇单甲醚-聚乳酸嵌段共聚物、稳定剂和多西他赛溶于有机溶剂，旋转蒸发除去有机溶剂，得到凝胶状药膜，然后向药膜中加入水溶解分散所述药膜，制得胶束溶液。

33. 根据权利要求 31 或 32 所述的用途或产品，其中，步骤（1）中所述的有机溶剂选自乙腈、丙酮、二氯甲烷、二甲基甲酰胺、二甲亚砜、四氢呋喃、短链脂肪醇、乙酸乙酯中的任意一种或几种，优选甲醇、乙醇、异丙醇、乙腈、乙酸乙酯中的任意一种或几种，更优选甲醇，步骤（1）中所述的有机溶剂的用量为每克聚乙二醇单甲醚聚乳酸嵌段共聚物中加入 0.5~12ml 有机溶剂，优选加入 3~12ml 有机溶剂。

34. 根据权利要求 31 或 32 所述的用途或产品，其中，步骤（1）中，向药膜中加入水的用量为每克聚乙二醇单甲醚聚乳酸嵌段共聚物加入 2~40ml 水，优选地为每克聚乙二醇单甲醚聚乳酸嵌段共聚物加入 10~20ml 水，更优选地为每克聚乙二醇单甲醚聚乳酸嵌段共聚物加入 10~15ml 水。

35. 根据权利要求 31 或 32 所述的用途或产品，其中，步骤(2)中，旋转蒸发去除有机溶剂的条件为：旋转速度 10~150rpm，温度 20~80℃，时间 1~4h。

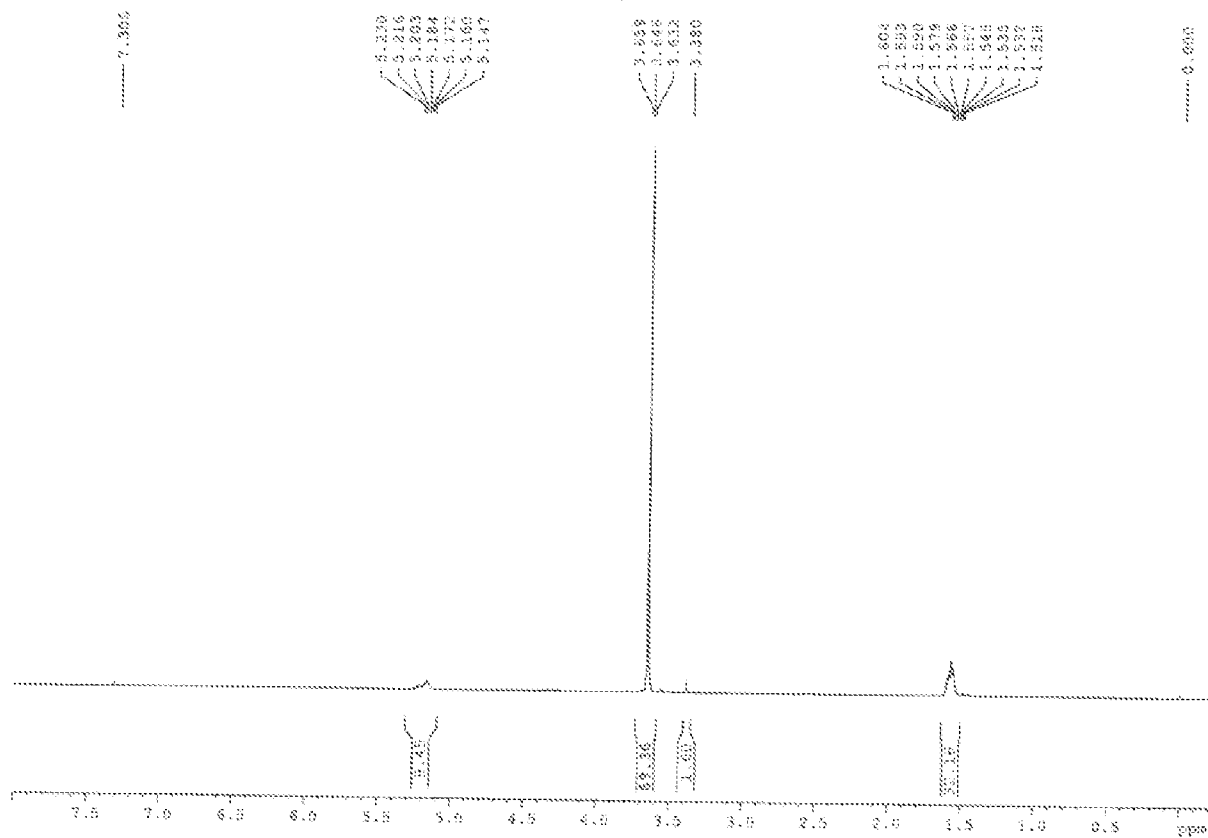


图 1

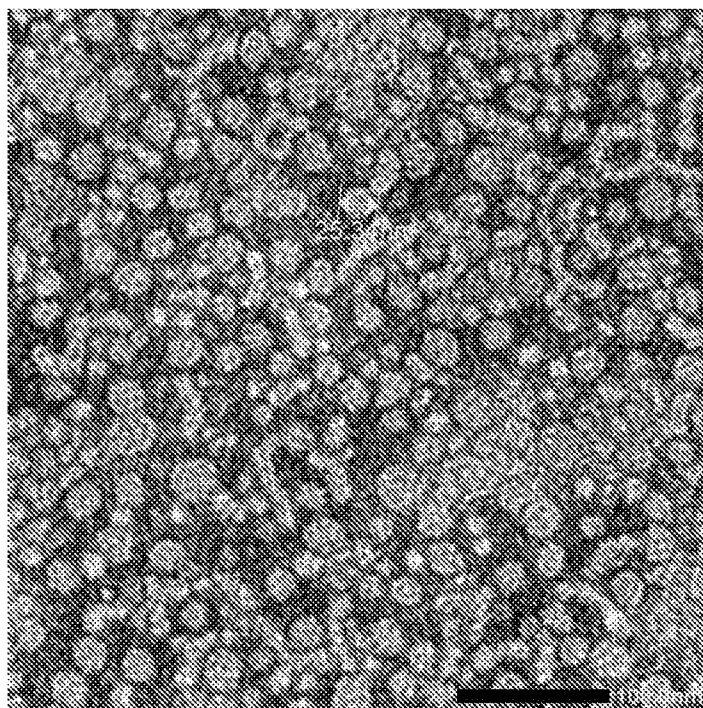


图 2

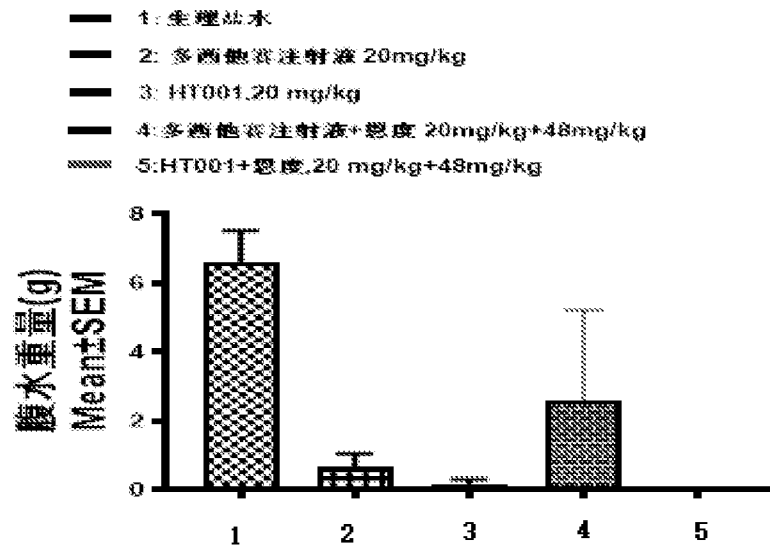


图 3

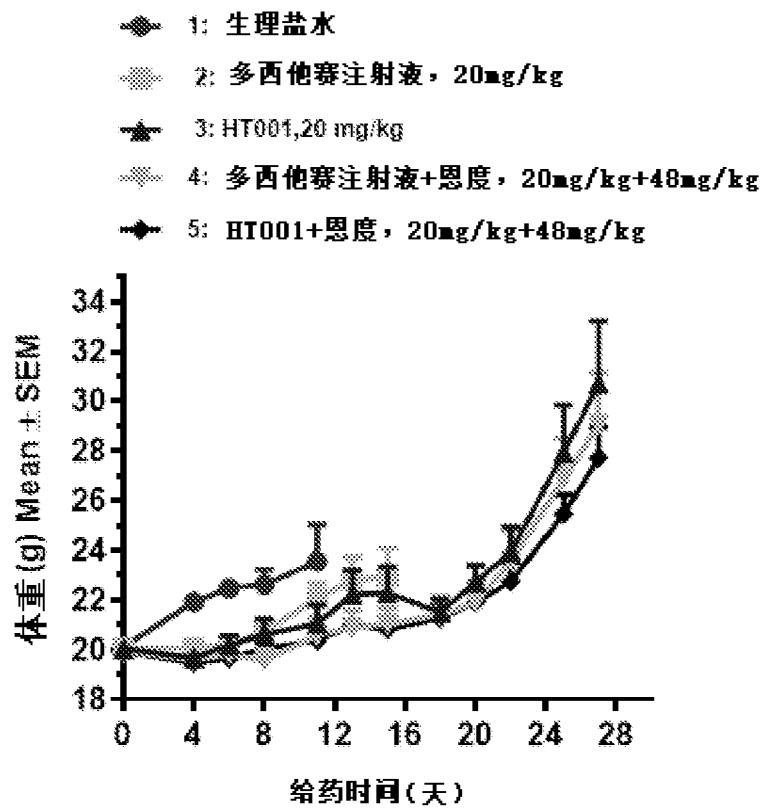


图 4

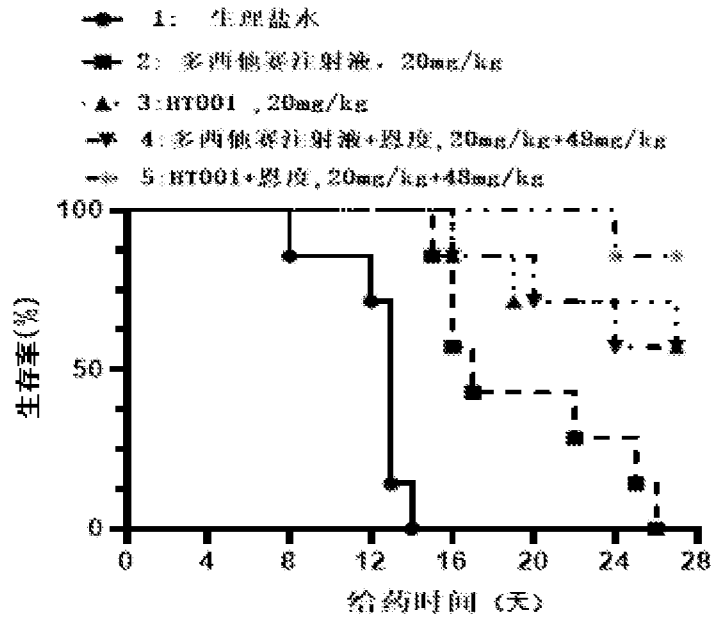


图 5

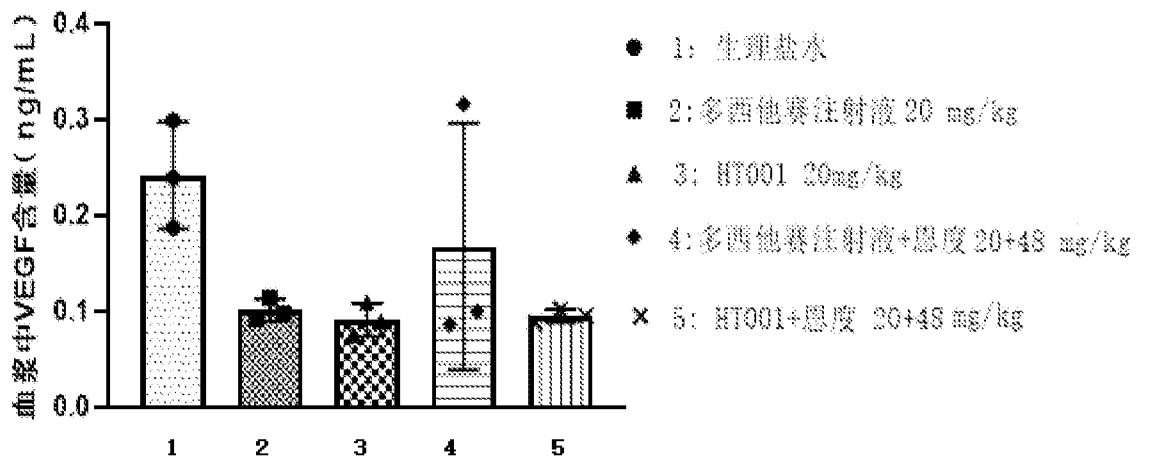


图 6

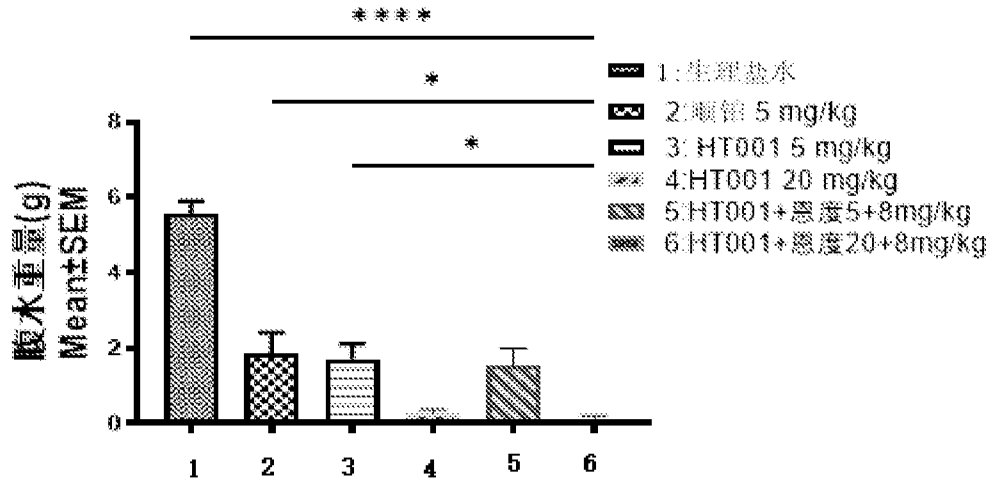


图 7

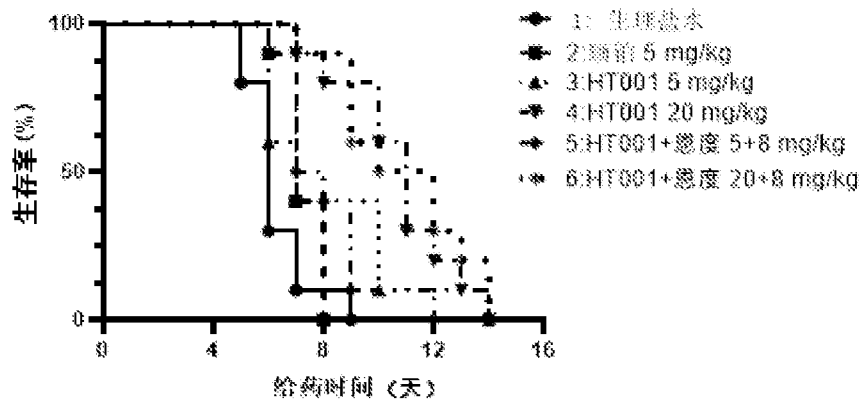


图 8

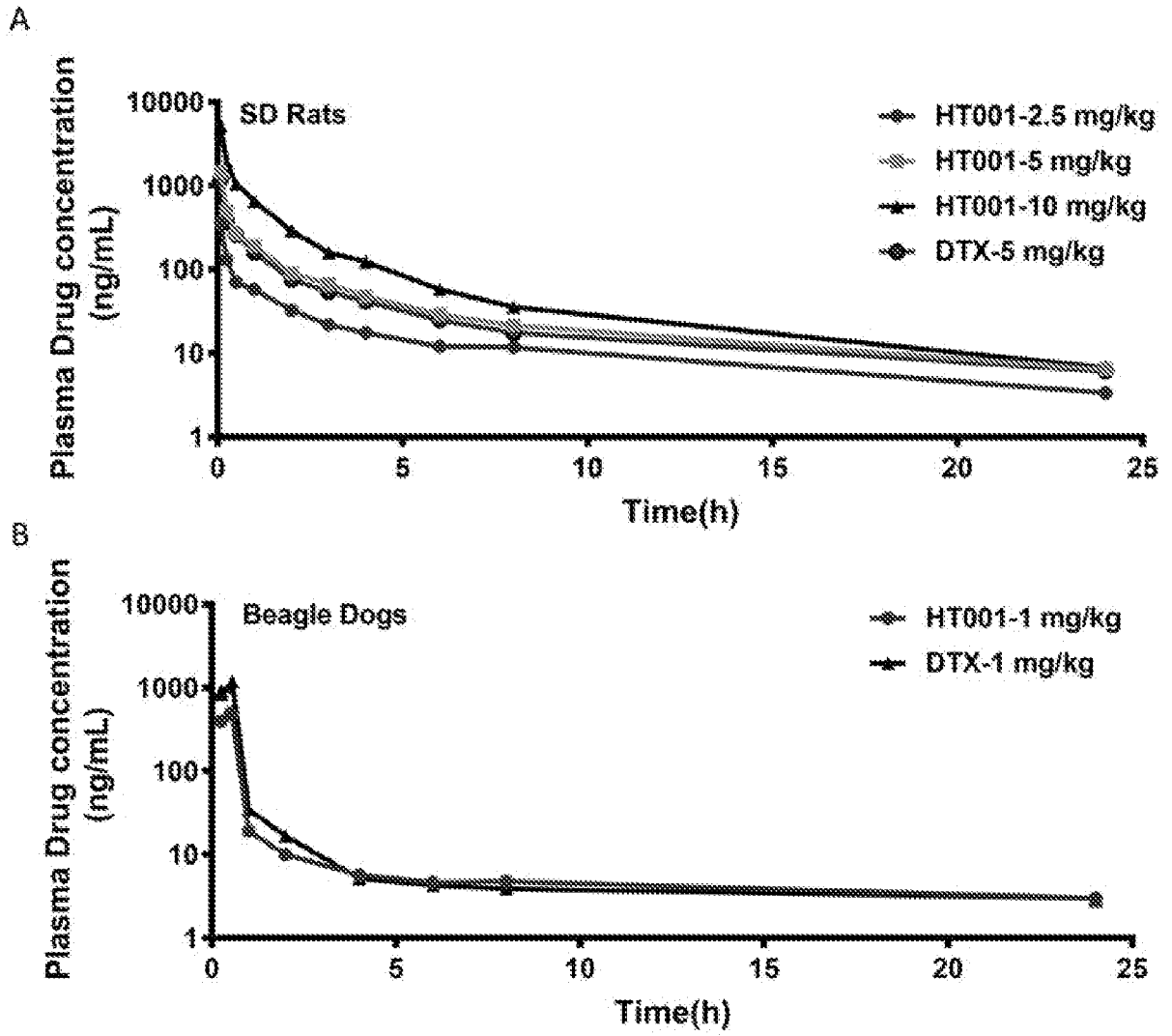


图 9



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/117973

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
A61K 31/337(2006.01)i; A61K 38/17(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 35/04(2006.01)i; A61K 47/34(2017.01)i; A61K 9/19(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K; A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNTXT; CJFD; WPABSC; ENTXTC; VEN; DWPI; WOTXT; USTXT; JPTXT; CNKI; 万方, WANFANG; 读秀学术, DUXIU; Baidu; Pubmed: 多西他赛, 多西紫杉醇, 多烯紫杉醇, 泰索帝, 多西他赛聚合物胶束, 重组人血管内皮抑制素, 重组内抑素, 恩度, 恶性胸腹水, 恶性腹水, 聚乙二醇单甲醚, 甲氧基聚乙二醇, 聚乳酸, 嵌段共聚物, D, L-丙交酯, 血管内皮生长因子, docetaxel, taxotere, HT001, docetaxel polymeric micelles, 114977-28-5, recombinant human endostatin injection, anti-angiogenic agent, endostar, malignant thoracic ascites, malignant ascites, mPEG, MPEG, polyethylene glycol monomethyl ether, PLA, polylactic acid, block copolymer, MPEG-PDLLA, VEGF, vascular endothelial growth factor		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	廖明等 (LIAO, Ming et al.). "多西他赛单药治疗晚期非小细胞肺癌胸腹水的临床观察 (Clinical Observation on Monotherapy of Docetaxel in Treatment of Pleural Fluid and Ascites in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer)," <i>中国现代医生 (China Modern Doctor)</i> , Vol. 54, No. 5, 29 February 2016 (2016-02-29), pp. 101-103	1-35
Y	HAO, Ying et al.. "Novel Approach of Using Near-Infrared Responsive PEGylated Gold Nanorod Coated Poly(L-lactide) Microneedles to Enhance the Antitumor Efficiency of Docetaxel-Loaded MPEG-PDLLA Micelles for Treating an A431 Tumor," <i>ACS Applied Materials &amp; Interfaces</i> , Vol. 9, 18 April 2017 (2017-04-18), pp. 15317-15327	1-35
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search <b>31 October 2022</b>		Date of mailing of the international search report <b>05 December 2022</b>
Name and mailing address of the ISA/CN <b>China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China</b> Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer  Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	金剑英 等 (JIN, Jianying et al.). "重组人血管内皮抑制素注射液联合化疗治疗晚期胃癌合并恶性腹水的临床疗效及对患者生活质量的影响 (Non-official translation: Clinical Efficacy of Recombinant Human Endostatin Injection Combined with Chemotherapy in the Treatment of Advanced Gastric Cancer with Malignant Ascites and its Influence on Patients' Quality of Life)," <i>中国基层医药 (Chinese Journal of Primary Medicine and Pharmacy)</i> , Vol. 23, No. 19, 31 October 2016 (2016-10-31), pp. 2881-2885	3-35
A	HE, Haisheng et al., "The Biological Fate of Orally Administered mPEG-PDLLA Polymeric Micelles," <i>Journal of Controlled Release</i> , Vol. 327, 15 September 2020 (2020-09-15), pp. 725-736	12-14, 31-35
Y	CN 102335119 A (FUJIAN MEDICAL UNIVERSITY UNION HOSPITAL) 01 February 2012 (2012-02-01) description, paragraphs [0003] and [0036], embodiments 1-3, and paragraph [0041], table 2	1-35
Y	Gaucher G et al., "Polyester-based Micelles and Nanoparticles for the Parenteral Delivery of Taxanes," <i>Journal of Controlled Release</i> , Vol. 143, 17 November 2009 (2009-11-17), pp. 2-12	1-35
Y	GONG, Feirong et al., "Drug-interactive mPEG-b-PLA-Phe(Boc) Micelles Enhance the Tolerance and Anti-tumor Efficacy of Docetaxel," <i>Drug Delivery</i> , Vol. 27, No. 1, 31 December 2020 (2020-12-31), pp. 238-247	1-35
Y	郝春艳 等 (HAO, Chunyan et al.), "重组人血管内皮抑制素联合化疗药物治疗恶性胸腹水的临床研究 (The Clinical Research of Recombinant Human Endostatin Combined with Chemotherapy on Malignant Pleural Effusion and Ascites)," <i>中国生化药物杂志 (Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics)</i> , Vol. 32, No. 4, 30 December 2011 (2011-12-30), pp. 320-322	3-35
PX	GUO, Leilei et al., "A Novel Form of Docetaxel Polymeric Micelles Demonstrates Anti-Tumor and Ascites-Inhibitory Activities in Animal Models as Monotherapy or in Combination with Anti-Angiogenic Agents," <i>Frontiers in Pharmacology</i> , 24 August 2022 (2022-08-24), pp. 1-15	1-35
PY	ZHANG, Yumei et al., "mPEG-PDLLA Micelles Potentiate Docetaxel for Intraperitoneal Chemotherapy in Ovarian Cancer Peritoneal Metastasis," <i>Frontiers in Pharmacology</i> , Vol. 13, 06 April 2022 (2022-04-06), pp. 1-12	1-35

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2022/117973**

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN 102335119 A	01 February 2012	CN 102335119 B	16 January 2013

<p><b>A. 主题的分类</b></p> <p>A61K 31/337(2006.01)i; A61K 38/17(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 35/04(2006.01)i; A61K 47/34(2017.01)i; A61K 9/19(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>														
<p><b>B. 检索领域</b></p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>A61K; A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNTXT; CJFD; WPABSC; ENTXTC; VEN; DWPI; WOTXT; USTXT; JPTXT; CNKI; 万方; 读秀学术; Baidu; Pubmed: 多西他赛, 多西紫杉醇, 多烯紫杉醇, 泰索帝, 多西他赛聚合物胶束, 重组人血管内皮抑制素, 重组内抑素, 恩度, 恶性胸腹水, 恶性腹水, 聚乙二醇单甲醚, 甲氧基聚乙二醇, 聚乳酸, 嵌段共聚物, D,L-丙交酯, 血管内皮生长因子, docetaxel, taxotere, HT001, docetaxel polymeric micelles, 114977-28-5, recombinant human endostatin injection, anti-angiogenic agent, endostar, malignant thoracic ascites, malignant ascites, mPEG, MPEG, polyethylene glycol monomethyl ether, PLA, polylactic acid, block copolymer, MPEG-PDLLA, VEGF, vascular endothelial growth factor</p>														
<p><b>C. 相关文件</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>廖明 等, . "多西他赛单药治疗晚期非小细胞肺癌胸腹水的临床观察," 中国现代医生, , 第54卷, 第5期, 2016年2月29日 (2016 - 02 - 29), 第101-103页</td> <td>1-35</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>HAO, Ying等, . "Novel Approach of Using Near-Infrared Responsive PEGylated Gold Nanorod Coated Poly(L-lactide) Microneedles to Enhance the Antitumor Efficiency of Docetaxel-Loaded MPEG-PDLLA Micelles for Treating an A431 Tumor," ACS Applied Materials &amp; Interfaces, 第9卷, 2017年4月18日 (2017 - 04 - 18), 第15317-15327页</td> <td>1-35</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>金剑英 等, . "重组人血管内皮抑制素注射液联合化疗治疗晚期胃癌合并恶性腹水的临床疗效及对患者生活质量的影响," 中国基层医药, , 第23卷, 第19期, 2016年10月31日 (2016 - 10 - 31), 第2881-2885页</td> <td>3-35</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	Y	廖明 等, . "多西他赛单药治疗晚期非小细胞肺癌胸腹水的临床观察," 中国现代医生, , 第54卷, 第5期, 2016年2月29日 (2016 - 02 - 29), 第101-103页	1-35	Y	HAO, Ying等, . "Novel Approach of Using Near-Infrared Responsive PEGylated Gold Nanorod Coated Poly(L-lactide) Microneedles to Enhance the Antitumor Efficiency of Docetaxel-Loaded MPEG-PDLLA Micelles for Treating an A431 Tumor," ACS Applied Materials & Interfaces, 第9卷, 2017年4月18日 (2017 - 04 - 18), 第15317-15327页	1-35	Y	金剑英 等, . "重组人血管内皮抑制素注射液联合化疗治疗晚期胃癌合并恶性腹水的临床疗效及对患者生活质量的影响," 中国基层医药, , 第23卷, 第19期, 2016年10月31日 (2016 - 10 - 31), 第2881-2885页	3-35
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求												
Y	廖明 等, . "多西他赛单药治疗晚期非小细胞肺癌胸腹水的临床观察," 中国现代医生, , 第54卷, 第5期, 2016年2月29日 (2016 - 02 - 29), 第101-103页	1-35												
Y	HAO, Ying等, . "Novel Approach of Using Near-Infrared Responsive PEGylated Gold Nanorod Coated Poly(L-lactide) Microneedles to Enhance the Antitumor Efficiency of Docetaxel-Loaded MPEG-PDLLA Micelles for Treating an A431 Tumor," ACS Applied Materials & Interfaces, 第9卷, 2017年4月18日 (2017 - 04 - 18), 第15317-15327页	1-35												
Y	金剑英 等, . "重组人血管内皮抑制素注射液联合化疗治疗晚期胃癌合并恶性腹水的临床疗效及对患者生活质量的影响," 中国基层医药, , 第23卷, 第19期, 2016年10月31日 (2016 - 10 - 31), 第2881-2885页	3-35												
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <p>* 引用文件的具体类型:                  "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件                  "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利                  "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)                  "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件                  "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件                  "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件                  "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性                  "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性                  "&amp;" 同族专利的文件</p>														
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2022年10月31日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2022年12月5日</p>												
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN)                  中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>葛瀚麟</p> <p>电话号码 (86-10)-53961876</p>												

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	HE, Haisheng 等, . "The biological fate of orally administered mPEG-PDLLA polymeric micelles, " Journal of Controlled Release, , 第327卷, 2020年9月15日 (2020 - 09 - 15), 第725-736页	12-14, 31-35
Y	CN 102335119 A (福建医科大学附属协和医院) 2012年2月1日 (2012 - 02 - 01) 说明书第[0003], [0036]段, 说明书实施例1-3, 说明书第[0041]段表2	1-35
Y	Gaucher G et al., . "Polyester-based micelles and nanoparticles for the parenteral delivery of taxanes, " Journal of Controlled Release, 第143卷, 2009年11月17日 (2009 - 11 - 17), 第2-12页	1-35
Y	GONG, Feirong 等, . "Drug-interactive mPEG-b-PLA-Phe(Boc) micelles enhance the tolerance and anti-tumor efficacy of docetaxel, " DRUG DELIVERY, 第27卷, 第1期, 2020年12月31日 (2020 - 12 - 31), 第238-247页	1-35
Y	郝春艳 等, . "重组人血管内皮抑制素联合化疗药物治疗恶性胸腹水的临床研究, " 中国生化药物杂志, , 第32卷, 第4期, 2011年12月30日 (2011 - 12 - 30), 第320-322页	3-35
PX	GUO, Leilei 等, . "A novel form of docetaxel polymeric micelles demonstrates anti-tumor and ascites-inhibitory activities in animal models as monotherapy or in combination with anti-angiogenic agents, " Frontiers in Pharmacology, 2022年8月24日 (2022 - 08 - 24), 第1-15页	1-35
PY	ZHANG, Yumei 等, . "mPEG-PDLLA Micelles Potentiate Docetaxel for Intraperitoneal Chemotherapy in Ovarian Cancer Peritoneal Metastasis, " Frontiers in Pharmacology, 第13卷, 2022年4月6日 (2022 - 04 - 06), 第1-12页	1-35

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号  
PCT/CN2022/117973

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN 102335119 A	2012年2月1日	CN 102335119 B	2013年1月16日