



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111249252 B

(45) 授权公告日 2021.09.14

(21) 申请号 202010154790.4

A61P 35/00 (2006.01)

(22) 申请日 2020.03.08

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 109998996 A, 2019.07.12

申请公布号 CN 111249252 A

CN 109998996 A, 2019.07.12

CN 109730998 A, 2019.05.10

(43) 申请公布日 2020.06.09

CN 109730998 A, 2019.05.10

(73) 专利权人 中国医学科学院医药生物技术研究所

CN 110054659 A, 2019.07.26

CN 101444485 A, 2009.06.03

地址 100050 北京市东城区天坛西里1号医药生物技术所

WO 2011062503 A1, 2011.05.26

WO 2004041203 A2, 2004.05.21

(72) 发明人 夏桂民 刘明亮 郭晓茹

审查员 李林

(51) Int. Cl.

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 31/7068 (2006.01)

A61K 47/42 (2017.01)

A61K 9/19 (2006.01)

权利要求书3页 说明书26页 附图1页

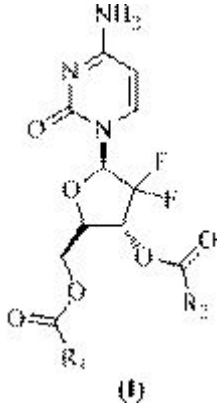
(54) 发明名称

白蛋白纳米粒组合物及其制法

(57) 摘要

本发明涉及白蛋白纳米粒组合物及其制法。所述组合物中包含100重量份的式(I)化合物或其药用盐以及100~1500重量份的白蛋白。所述白蛋白是选自下列的白蛋白:卵白蛋白、牛血白蛋白、人血白蛋白、重组人白蛋白等,优选的是人血白蛋白或重组人白蛋白;所述组合物中还任选的包含一种或多种选自下列的辅料:胆固醇、磷脂、卵磷脂、PEG化磷脂、磷脂酰胆碱、磷脂酰甘油、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、甘油磷脂酸、合成磷脂等类型的磷脂。还提供了该组合物的制备方法和其制药用途,本发明方法呈现如说明书所述优异技术效果。

1. 一种白蛋白纳米粒制剂组合物,其包含:式(I)化合物或其药用盐100重量份,白蛋白150~800重量份,中链脂肪酸2~30重量份,海藻糖20~50重量份;其中,
 所述白蛋白选自:卵白蛋白、牛血白蛋白、人血白蛋白、重组人白蛋白,
 所述中链脂肪酸选自:己酸、辛酸、癸酸、月桂酸,
 所述式(I)化合物具有如下结构:



其中: R_1 和 R_2 相同或不同,各自代表 C_{6-22} 直链或支链的饱和烷基或不饱和烯基,其中碳链中的1个或2个 CH_2 任选地被O替代,

该组合物是通过如下操作制备得到的:将水溶性物料溶解于水中制成水相,将水不溶性物料溶解于有机溶剂中制成油相,将水相和油相混合分散制成粗乳液,进一步将粗乳液在高压均质机中均质至微粒的平均粒径小于200nm,蒸发除去溶剂,得到纳米粒组合物,任选地将其冷冻干燥除去水分;其中,中链脂肪酸与式(I)化合物或其药用盐一起加至有机溶剂中溶解,海藻糖与白蛋白一起添加至水相。

2. 根据权利要求1的组合物,其中包含100重量份的式(I)化合物或其药用盐以及150~600重量份的白蛋白。

3. 根据权利要求1的组合物,其中包含100重量份的式(I)化合物或其药用盐以及200~500重量份的白蛋白。

4. 根据权利要求1的组合物,以每100重量份的式(I)化合物或其药用盐计,其中还包含一种或多种选自下列的辅料:胆固醇2~10重量份、磷脂5~20重量份、PEG化磷脂5~20重量份、磷脂酰胆碱5~20重量份、磷脂酰甘油5~20重量份、磷脂酰乙醇胺5~20重量份、磷脂酰丝氨酸5~20重量份、磷脂酰肌醇5~20重量份、甘油磷脂酸5~20重量份、合成磷脂5~20重量份。

5. 根据权利要求4的组合物,所述磷脂选自:蛋黄卵磷脂、氢化蛋黄卵磷脂、大豆卵磷脂、氢化大豆卵磷脂、鞘磷脂、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱、二肉豆蔻酰磷脂酰甘油、二棕榈酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰胆碱、二油酰磷脂酰胆碱、二月桂酰磷脂酰胆碱、及其组合。

6. 根据权利要求4的组合物,其中PEG化磷脂选自:二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇1000、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇3350、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇4000、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇5000、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇6000、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇8000、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇10000。

7. 根据权利要求1的组合物,其中还包含注射制剂辅料,选自:酸碱调节剂、渗透压调节剂、冻干赋形剂。

8. 根据权利要求7的组合物,所述酸碱调节剂的量是,使该组合物在用注射用水稀释制成式(I)化合物或其药用盐浓度为1mg/ml的溶液时,溶液的pH值为6.0~7.5。

9. 根据权利要求7的组合物,所述渗透压调节剂当存在时,其用量是,使该组合物在用注射用水稀释制成式(I)化合物或其药用盐浓度为1mg/ml的溶液时,溶液的渗透压与浓度为0.9~2%氯化钠溶液的渗透压相当。

10. 根据权利要求7的组合物,以每100重量份的式(I)化合物或其药用盐计,其中的冻干赋形剂的量为0~1000重量份。

11. 根据权利要求7的组合物,冻干赋形剂可以选自:葡萄糖、蔗糖、果糖、乳糖、甘露醇、右旋糖苷、甘氨酸。

12. 根据权利要求1的组合物,以每100重量份的式(I)化合物或其药用盐计,其中中链脂肪酸的量为2~20重量份。

13. 根据权利要求1的组合物,其是照包括如下步骤的方法制备得到的:

(1) 将处方量的白蛋白和海藻糖用水溶解,作为水相;

(2) 将处方量的式(I)化合物或其药用盐和中链脂肪酸用选自如下的有机溶剂溶解:乙醚、乙酸乙酯、叔丁醇、氯仿、二氯甲烷,作为油相;

(3) 将水相与油相混合后,使用分散器分散制得粗乳液;

(4) 将粗乳液转入高压均质机中于均质直至均匀且微粒的平均粒径小于200nm;

(5) 在旋转蒸发器上旋蒸将残余的有机溶剂蒸发除去,接着用0.22 μ m水性微孔滤膜过滤除菌,制成式(I)化合物或其药用盐白蛋白纳米粒组合物,任选地将其冷冻干燥除去水分。

14. 根据权利要求13的组合物,步骤(1)所得水相中白蛋白的浓度为5~10%。

15. 根据权利要求13的组合物,步骤(2)所得油相中式(I)化合物或其药用盐的浓度为5~10%。

16. 根据权利要求13的组合物,步骤(1)和步骤(2)是在35~70 $^{\circ}$ C的温度下使各物料溶解。

17. 根据权利要求13的组合物,步骤(3)中所述分散是在分散器中于8000-10000rpm下分散2-10min。

18. 根据权利要求13的组合物,步骤(4)中,在均质机中以10000~20000psi的压力均质处理20~45min。

19. 根据权利要求13的组合物,步骤(5)中,所述的蒸发是在30~50 $^{\circ}$ C的温度下、在减压0.06~0.09Mpa的压力下进行的旋转蒸发。

20. 根据权利要求1的组合物,所述式(I)化合物为选自下列的化合物1~化合物12:

化合物1:2',2'-二氟-2'-脱氧胞嘧啶核苷-3',5'-二正癸酸酯,

化合物2:2',2'-二氟-2'-脱氧胞嘧啶核苷-3',5'-二月桂酸酯,

化合物3:2',2'-二氟-2'-脱氧胞嘧啶核苷-3',5'-二肉豆蔻酸酯,

化合物4:2',2'-二氟-2'-脱氧胞嘧啶核苷-3',5'-二棕榈酸酯,

化合物5:2',2'-二氟-2'-脱氧胞嘧啶核苷-3',5'-二反油酸酯,

化合物6:2',2'-二氟-2'-脱氧胞嘧啶核苷-3',5'-二正十六烷氧丙基醚,

化合物7:2',2'-二氟-2'-脱氧胞嘧啶核苷-3',5'-二正十八烷氧乙基醚,

化合物8:2',2'-二氟-2'-脱氧胞嘧啶核苷-3'-月桂酸酯-5'-肉豆蔻酸酯,

化合物9:2',2'-二氟-2'-脱氧胞嘧啶核苷-3'-肉豆蔻酸酯-5'-月桂酸酯,

化合物10:2',2'-二氟-2'-脱氧胞嘧啶核苷-3'-正十四烷氧乙基醚-5'-正十六烷氧乙基醚,

化合物11:2',2'-二氟-2'-脱氧胞嘧啶核苷-3'-正十六烷氧丙基醚-5'-正十四烷氧乙基醚,

化合物12:2',2'-二氟-2'-脱氧胞嘧啶核苷-3'-正十六烷氧丙基醚-5'-肉豆蔻酸酯。

21. 权利要求1~20任一项所述组合物在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

22. 根据权利要求21的用途,所述癌症选自:非小细胞肺癌、胰腺癌、卵巢癌、膀胱癌、乳腺癌。

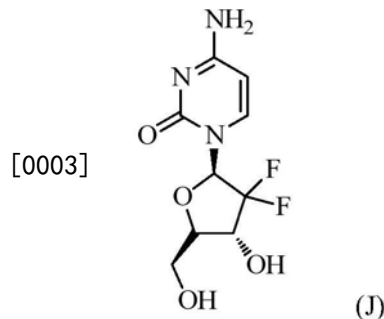
白蛋白纳米粒组合物及其制法

技术领域

[0001] 本发明属于医药化学领域,涉及提高吉西他滨抗肿瘤活性的方法,尤其是涉及一组具有抗肿瘤活性的吉西他滨酯化物及其组合物、制备方法,以及在抗肿瘤方面的应用。本发明还涉及一种包含式(I)化合物或其药用盐的白蛋白纳米粒制剂组合物,以及它们的制备方法。

背景技术

[0002] 吉西他滨,英文名gemcitabine,中文化学名:4-氨基-1-(3,3-二氟-4-羟基-5-羟甲基四氢呋喃-2-基)-1H-嘧啶-2-酮,英文化学名:2'-deoxy-2',2'-difluorocytidine,分子式: $C_9H_{11}F_2N_3O_4$,是一种新型氟代核苷类似物,吉西他滨的化学结构如以下式(J)所示:



[0004] 吉西他滨本身并无药理活性,进入人体内后经脱氧胞嘧啶激酶活化,由胞嘧啶核苷脱氨酶代谢为相应的单磷酸酯、双磷酸酯和三磷酸酯而发挥药效。吉西他滨可用于治疗多种实体瘤(例如,非小细胞肺癌、胰腺癌、卵巢癌、膀胱癌、乳腺癌等),临床用其盐酸盐,但目前仅限于静脉给药治疗胰腺癌和非小细胞肺癌。该疗法的患者依从性差并存在若干不良反应,典型的不良反应包括,①血液系统:有骨髓抑制作用,可出现贫血、白细胞降低和血小板减少。②胃肠道:约2/3的患者出现肝脏转氨酶异常,多为轻度、非进行性损害;约1/3的患者出现恶心和呕吐反应,20%的患者需要药物治疗。③肾脏:约1/2的患者出现轻度蛋白尿和血尿,有部分病例出现不明原因的肾衰。④过敏:约25%的患者出现皮疹,10%的患者出现瘙痒,少于1%患者可发生支气管痉挛。⑤其他:约20%的患者有类似于流感的表现;水肿/周围性水肿的发生率约30%;脱发、嗜睡、腹泻、口腔毒性及便秘发生率则分别为13%,10%,8%,7%和6%。这些不良反应将严重影响吉西他滨临床用药的效益/风险比。此外,本品在静注后可广泛分布于各组织,能被胞苷脱氨酶在肝脏、肾、血液和其他组织中快速代谢,故血浆半衰期短($t_{1/2}$:8-17min),需多次给药(Gang Wang,等.J.Med.Chem.2017,60,2552;Tang Li,等.DRUG DEVELOPMENT AND INDUSTRIAL PHARMACY,2017,43:2016)。

[0005] 现有技术仍然期待有新的方法并且预期具有某种或某些更优异效果来治疗肿瘤,例如期待有更加优良的抗肿瘤活性的药物应用于临床,例如期待有白蛋白纳米粒组合物的形式应用于临床。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供新的方法并且预期具有某种或某些更优异效果来治疗肿瘤，例如提供具有更加优良的抗肿瘤活性的药物应用于临床。本发明人出人意料地发现，具有本发明结构的化合物呈现优异的抗肿瘤活性。本发明的另一目的在于提供一种白蛋白纳米粒制剂组合物，特别是期望该白蛋白纳米粒制剂组合物呈现某个或者某些优良药学性能。本发明人出人意料地发现，当采用本发明配方时能够获得如本发明说明书所述一个或多个方面的有益效果，本发明基于此发现而得以完成。

[0007] 为此，本发明第一方面提供了以下式 (I) 化合物：



[0009] R_1 和 R_2 相同或不同，各自代表 C_{6-22} 直链或支链的饱和烷基或不饱和烯基，其中碳链中的1个或2个 CH_2 任选地被O替代。

[0010] 根据本发明第一方面的化合物，其中 R_1 和 R_2 相同或不同，各自代表 C_{8-22} 直链或支链的饱和烷基或不饱和烯基，其中碳链中的1个或2个 CH_2 任选地被O替代。

[0011] 根据本发明第一方面的化合物，其中 R_1 和 R_2 相同或不同，各自代表 C_{10-22} 直链或支链的饱和烷基或不饱和烯基，其中碳链中的1个或2个 CH_2 任选地被O替代。

[0012] 根据本发明第一方面的化合物或者本发明其它任一方面提及的，其中所述药用盐是与无机酸或者与有机酸形成的盐。

[0013] 根据本发明第一方面的化合物或者本发明其它任一方面提及的，其中所述无机酸选自：盐酸、硫酸、磷酸。尤其优选的药用盐为盐酸盐。

[0014] 根据本发明第一方面的化合物或者本发明其它任一方面提及的，其中所述有机酸选自：乙酸、三氟乙酸、柠檬酸、马来酸、草酸、琥珀酸、苯甲酸、酒石酸、富马酸、扁桃酸、抗坏血酸、苹果酸、氨基酸（例如丙氨酸、天冬氨酸、赖氨酸）、磺酸（例如甲磺酸、对甲苯磺酸）。

[0015] 根据本发明第一方面的化合物，其也可以溶剂化物（如水合物）的形式存在，因此，这些溶剂化物（如水合物）也包括在本发明的化合物之内。

[0016] 根据本发明第一方面的式 (I) 化合物，其为选自下列的化合物1~化合物12：

[0017] 化合物1: 2', 2'-二氟-2'-脱氧胞嘧啶核苷-3', 5'-二正癸酸酯，

[0018] 化合物2: 2', 2'-二氟-2'-脱氧胞嘧啶核苷-3', 5'-二月桂酸酯，

[0019] 化合物3: 2', 2'-二氟-2'-脱氧胞嘧啶核苷-3', 5'-二肉豆蔻酸酯，

[0020] 化合物4: 2', 2'-二氟-2'-脱氧胞嘧啶核苷-3', 5'-二棕榈酸酯，

[0021] 化合物5: 2', 2'-二氟-2'-脱氧胞嘧啶核苷-3', 5'-二反油酸酯，

[0022] 化合物6: 2', 2'-二氟-2'-脱氧胞嘧啶核苷-3', 5'-二正十六烷氧丙基醚，

[0023] 化合物7:2',2'-二氟-2'-脱氧胞嘧啶核苷-3',5'-二正十八烷氧乙基醚,
 [0024] 化合物8:2',2'-二氟-2'-脱氧胞嘧啶核苷-3'-月桂酸酯-5'-肉豆蔻酸酯,
 [0025] 化合物9:2',2'-二氟-2'-脱氧胞嘧啶核苷-3'-肉豆蔻酸酯-5'-月桂酸酯,
 [0026] 化合物10:2',2'-二氟-2'-脱氧胞嘧啶核苷-3'-正十四烷氧乙基醚-5'-正十六烷氧乙基醚,

[0027] 化合物11:2',2'-二氟-2'-脱氧胞嘧啶核苷-3'-正十六烷氧丙基醚-5'-正十四烷氧乙基醚,

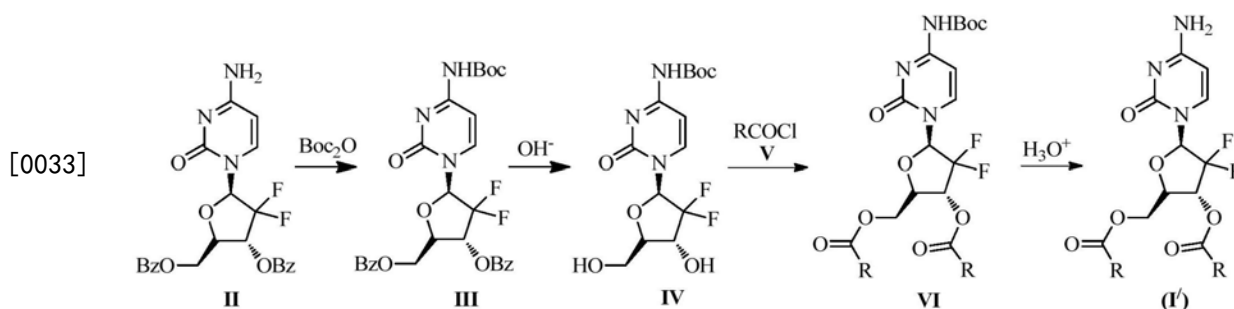
[0028] 化合物12:2',2'-二氟-2'-脱氧胞嘧啶核苷-3'-正十六烷氧丙基醚-5'-肉豆蔻酸酯,

[0029] 或其药用盐。

[0030] 进一步的,本发明第二方面提供了制备式(I)化合物或其药用盐的方法。

[0031] 根据本发明第二方面的方法,当式(I)化合物中的 R_1 和 R_2 相同时,该方法如反应路线1所示。

[0032] 反应路线1:



[0034] 在反应路线1中, R 如本文对 R_1 和/或 R_2 定义的,例如代表 C_{6-22} 直链或支链的饱和烷基或不饱和烯基,其中碳链中的1个或2个 CH_2 任选地被 O 替代。

[0035] 具体地说,该制备方法包括如下步骤:

[0036] 1) 使化合物II(国内市售途径获得)溶于非极性溶剂(例如,二氯甲烷(DCM)、三氯甲烷、四氢呋喃、二氧六环),在适量有机碱[例如,三乙胺、 N,N -二甲基吡啶、吡啶、4-二甲氨基吡啶(DMAP)]存在下,与1~6倍当量的 Boc_2O 在室温~50°C温度下搅拌反应3~15小时,得到氨基保护的式(III)化合物;

[0037] 2) 使式(III)化合物溶于质子性溶剂(例如,水、醇或醇-水混合溶剂,例如甲醇),加入1~2倍当量的无机碱(例如,氢氧化钠、氢氧化钾、碳酸钠、碳酸氢钠),在0°C~室温下搅拌反应3~10小时,得到去羟基保护基的式(IV)化合物;

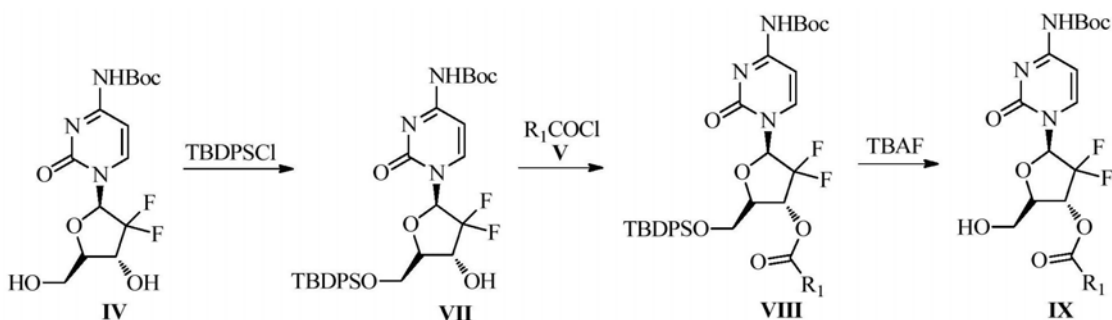
[0038] 3) 使式(IV)化合物溶于非极性溶剂[例如,二氯甲烷(DCM)、三氯甲烷、四氢呋喃、二氧六环],在适量有机碱(例如,三乙胺、 N,N -二甲基吡啶、吡啶、4-二甲氨基吡啶(DMAP))存在下,与1~4倍当量的式(V)化合物(国内市售途径获得)于0°C~室温下搅拌反应4~15小时,得到式(VI)化合物;

[0039] 4) 使式(VI)化合物溶于非极性溶剂(例如,二氯甲烷(DCM)、三氯甲烷、四氢呋喃、二氧六环),加入1~2倍当量的酸[例如,三氟乙酸(TFA)、盐酸],于0°C~室温下搅拌反应0.5~5小时,即得到式(I')化合物,其为 R_1 和 R_2 相同的式(I)化合物。

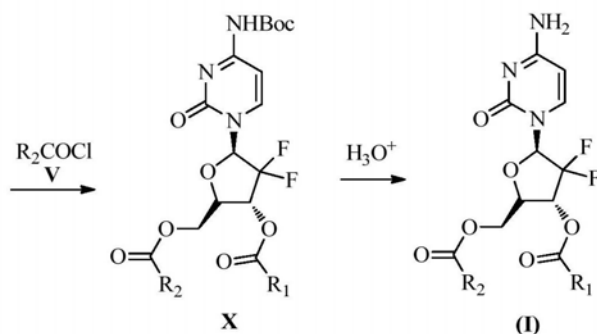
[0040] 根据本发明第二方面的方法,当式(I)化合物中的 R_1 和 R_2 不同时,该方法如反应路

线2所示。

[0041] 反应路线2:



[0042]



[0043] 在反应路线2中, R_1 和 R_2 如本文定义的。

[0044] 具体地说, 该制备方法包括如下步骤:

[0045] 1) 使式 (IV) 化合物溶于偶极溶剂[例如, 二甲基甲酰胺 (DMF)、二甲亚砜], 在适量有机碱(例如, 三乙胺、N,N-二甲基吡啶、吡啶、4-二甲氨基吡啶 (DMAP)) 存在下, 与1~2倍当量的叔丁基二苯基氯硅烷(可缩写为TBDPSCl) 于0℃~室温下搅拌反应8~15小时, 得到糖环5'-位羟基选择性保护的式 (VII) 化合物;

[0046] 2) 使式 (VII) 化合物与式 (V) 化合物(可缩写为 R_1COCl) 发生酯化反应, 得到式 (VIII) 化合物;

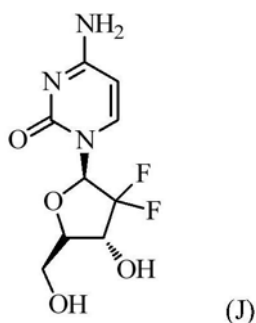
[0047] 3) 使式 (VIII) 化合物溶于非极性溶剂(例如, 二氯甲烷 (DCM)、三氯甲烷、四氢呋喃 (THF)、二氧六环), 加入1~2倍当量的四丁基氟化铵(可缩写为TBAF), 于0℃~室温下搅拌反应4~15小时, 得到去羟基保护基的式 (IX) 化合物;

[0048] 4) 使式 (IX) 化合物与式 (V) 化合物 (R_2COCl) 发生酯化反应, 得到式 (X) 化合物;

[0049] 5) 使式 (X) 化合物去Boc保护基, 即得到式 (I) 化合物, 其中 R_1 和 R_2 不同。

[0050] 进一步的, 本发明第三方面提供了提高式 (J) 化合物或其药用盐的抗肿瘤活性的方法,

[0051]



[0052] 该方法包括如下步骤：

[0053] (1) 将式 (J) 化合物或其药用盐制备成式 (I) 化合物或其药用盐，该式 (I) 化合物或其药用盐如本发明第一方面任一项所述；

[0054] (2) 使式 (I) 化合物或其药用盐制备成包含白蛋白的纳米粒组合物。

[0055] 根据本发明第三方面的方法，其中所述式 (I) 化合物或其药用盐如本发明第一方面任一实施方案所述或者如本发明第二方面任一项所述方法制备得到的。

[0056] 根据本发明第三方面的方法，其中将式 (J) 化合物或其药用盐制备成式 (I) 化合物或其药用盐的方法如本发明第二方面任一项所述。

[0057] 根据本发明第三方面的方法，其中所述纳米粒组合物包含：

[0058] 式 (I) 化合物或其药用盐：100重量份，和

[0059] 100~1500重量份的白蛋白。

[0060] 根据本发明第三方面的方法，其中所述纳米粒组合物包含100重量份的式 (I) 化合物或其药用盐以及150~1000重量份的白蛋白。

[0061] 根据本发明第三方面的方法，其中所述纳米粒组合物包含100重量份的式 (I) 化合物或其药用盐以及150~800重量份的白蛋白。

[0062] 根据本发明第三方面的方法，其中所述纳米粒组合物包含100重量份的式 (I) 化合物或其药用盐以及150~600重量份的白蛋白。

[0063] 根据本发明第三方面的方法，其中所述纳米粒组合物包含100重量份的式 (I) 化合物或其药用盐以及200~500重量份的白蛋白。

[0064] 根据本发明第三方面的方法，其中所述白蛋白是选自下列的白蛋白：卵白蛋白、牛血白蛋白、人血白蛋白、重组人白蛋白等，优选的是人血白蛋白或重组人白蛋白。

[0065] 根据本发明第三方面的方法，其中所述纳米粒组合物中还任选的包含一种或多种选自下列的辅料：胆固醇、磷脂、卵磷脂、PEG化磷脂、磷脂酰胆碱 (PC)、磷脂酰甘油 (PG)、磷脂酰乙醇胺 (PE)、磷脂酰丝氨酸 (PS)、磷脂酰肌醇 (PI)、甘油磷脂酸 (PA)、合成磷脂等类型的磷脂。

[0066] 根据本发明第三方面的方法，其中所述纳米粒组合物以每100重量份的式 (I) 化合物或其药用盐计，其中还任选的包含一种或多种选自下列的辅料：胆固醇2~10重量份、磷脂5~20重量份、卵磷脂5~20重量份、PEG化磷脂5~20重量份、磷脂酰胆碱 (PC) 5~20重量份、磷脂酰甘油 (PG) 5~20重量份、磷脂酰乙醇胺 (PE) 5~20重量份、磷脂酰丝氨酸 (PS) 5~20重量份、磷脂酰肌醇 (PI) 5~20重量份、甘油磷脂酸 (PA) 5~20重量份、合成磷脂5~20重量份。

[0067] 根据本发明第三方面的方法，其中所述纳米粒组合物以每100重量份的式 (I) 化合物或其药用盐计，其中还任选的包含一种或多种选自下列的辅料：胆固醇2~5重量份、磷脂5~10重量份、卵磷脂5~10重量份、PEG化磷脂5~10重量份、磷脂酰胆碱 (PC) 5~10重量份、磷脂酰甘油 (PG) 5~10重量份、磷脂酰乙醇胺 (PE) 5~10重量份、磷脂酰丝氨酸 (PS) 5~10重量份、磷脂酰肌醇 (PI) 5~10重量份、甘油磷脂酸 (PA) 5~10重量份、合成磷脂5~10重量份。

[0068] 根据本发明第三方面的方法，其中所述磷脂选自：蛋黄卵磷脂、氢化蛋黄卵磷脂、大豆卵磷脂、氢化大豆卵磷脂、鞘磷脂、磷脂酰乙醇胺、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱 (即DMPC)、二肉豆蔻酰磷脂酰甘油 (即DMPG)、二棕榈酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰胆碱、二油酰磷脂酰

胆碱、二月桂酰磷脂酰胆碱、及其组合。

[0069] 根据本发明第三方面的方法,其中所述纳米粒组合中还包含聚乙二醇修饰的磷脂。其在本发明中亦可称为PEG化磷脂。在一个实施方案中,所述PEG化磷脂中的聚乙二醇的分子量为1000~10000道尔顿。在一个实施方案中,所述PEG化磷脂是二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇(可缩写为PEG-DSPE)。例如,所述PEG化磷脂选自:二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇1000(可缩写为PEG1000-DSPE,其余亦可类似表述)、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇3350、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇4000、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇5000、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇6000、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇8000、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇10000。

[0070] 根据本发明第三方面的方法,其中所述纳米粒组合还任选的包含注射制剂辅料,例如酸碱调节剂、渗透压调节剂、冻干赋形剂等。

[0071] 根据本发明第三方面的方法,其中所述纳米粒组合中所述酸碱调节剂的量是,使该组合在用注射用水稀释制成式(I)化合物或其药用盐浓度为1mg/ml的溶液时,溶液的pH值为6.0~7.5,例如6.5~7.5。酸碱调节剂优选常规的酸碱调节剂,例如盐酸、氢氧化钠以及它们的水溶液尤其是浓的水溶液。

[0072] 根据本发明第三方面的方法,其中所述纳米粒组合中所述渗透压调节剂当存在时,其用量是,使该组合在用注射用水稀释制成式(I)化合物或其药用盐浓度为1mg/ml的溶液时,溶液的渗透压与浓度为0.9~2%氯化钠溶液的渗透压相当。

[0073] 根据本发明第三方面的方法,其中所述纳米粒组合以每100重量份的式(I)化合物或其药用盐计,其中的冻干赋形剂的量为0~1000重量份,例如0~500重量份,例如0~200重量份。冻干赋形剂可以选自:葡萄糖、蔗糖、果糖、乳糖、甘露醇、右旋糖苷、甘氨酸等。

[0074] 根据本发明第三方面的方法,其中所述纳米粒组合中还包含中链脂肪酸,在一个实施方案中,所述中链脂肪酸选自:己酸、辛酸、癸酸、月桂酸,例如的是辛酸或癸酸。根据本发明第四方面的组合,以每100重量份的式(I)化合物或其药用盐计,其中中链脂肪酸的量为2~50重量份,例如2~40重量份,例如2~30重量份,例如2~20重量份。由于中链脂肪酸为脂溶性,因此本领域技术人员当然地会将其与式(I)化合物或其药用盐一起加至有机溶剂中溶解以便进行制剂配制。已经出人意料地发现,当在本发明组合中添加微量中链脂肪酸时能够显著增加纳米微粒的稳定性特别是以其粒径表征的物理稳定性。

[0075] 根据本发明第三方面的方法,其中所述纳米粒组合是通过如下操作制备得到的:将水溶性物料溶解于水中制成水相,将水不溶性物料溶解于有机溶剂中制成油相,将水相和油相混合分散制成粗乳液,进一步将粗乳液在高压均质机中均质至微粒的平均粒径小于200nm,蒸发除去溶剂,得到纳米粒组合,任选地将其冷冻干燥除去水分。

[0076] 根据本发明第三方面的方法,其中所述纳米粒组合是照包括如下步骤的方法制备得到的:

[0077] (1) 将处方量的白蛋白用水溶解,作为水相;

[0078] (2) 将处方量的式(I)化合物或其药用盐用有机溶剂(例如乙醚、乙酸乙酯、叔丁醇、氯仿、二氯甲烷等;优选的溶剂可以是氯仿;溶剂的用量是本领域技术人员根据技术经验容易确定的,并且通常是至少应保证各物料完全溶解的程度(但又不宜过量以减轻后续

的蒸发除溶剂的工作量)溶解,作为油相;

[0079] (3) 将水相与油相混合后,使用分散器分散制得粗乳液;

[0080] (4) 将粗乳液转入高压均质机中于均质直至均匀且微粒的平均粒径小于200nm;

[0081] (5) 在旋转蒸发器上旋蒸将残余的有机溶剂蒸发除去(直至有机溶剂残余量小于100ppm),接着用0.22 μ m水性微孔滤膜过滤除菌,制成式(I)化合物或其药用盐白蛋白纳米粒组合物,任选地将其冷冻干燥除去水分。

[0082] 根据本发明第三方面的方法,其中所述纳米粒组合物中例如步骤(1)所得水相中白蛋白的浓度为3~15%,例如5~10%。

[0083] 根据本发明第三方面的方法,其中所述纳米粒组合物中例如步骤(2)所得油相中式(I)化合物或其药用盐的浓度为2~20%,例如5~10%。

[0084] 根据本发明第三方面的方法,其中所述纳米粒组合物中,当存在时,所述胆固醇和各类磷脂与所述式(I)化合物或其药用盐一起添加至所述有机溶剂中制成油相。

[0085] 根据本发明第三方面的方法,其中所述纳米粒组合物中,例如步骤(1)和步骤(2)是在35~70 $^{\circ}$ C(例如40~50 $^{\circ}$ C)的温度下使各物料溶解。使各物料溶解的时间是根据操作经验容易确定的,通常可以在2小时以内达到溶解,更通常的可以在1小时以内达到溶解,例如可以在0.5小时以内达到溶解。

[0086] 根据本发明第三方面的方法,其中所述纳米粒组合物中,例如步骤(3)中所述分散是在分散器中于5000-15000rpm下分散1-20min,例如于8000-10000rpm下分散2-10min。

[0087] 根据本发明第三方面的方法,其中所述纳米粒组合物中,步骤(4)中,在均质机中以5000~50000psi的压力均质处理10~60min,例如以10000~20000psi的压力均质处理20~45min,例如以15000psi的压力均质处理30min。

[0088] 根据本发明第三方面的方法,其中所述纳米粒组合物中,例如步骤(5)中,所述的蒸发是旋转蒸发。在一个实施方案中,所述的旋转蒸发是在30~50 $^{\circ}$ C(例如35~45 $^{\circ}$ C)的温度下旋转蒸发。在一个实施方案中,所述的旋转蒸发在减压下进行的。在一个实施方案中,所述的旋转蒸发在减压0.05~0.1Mpa的压力下进行的。在一个实施方案中,所述的旋转蒸发在减压0.06~0.09Mpa的压力下进行的。

[0089] 根据本发明第三方面的方法,其中所述纳米粒组合物中,当存在时,所述酸碱调节剂是在步骤(3)制备粗乳液前添加并调节pH值;必要时所述酸碱调节剂还在步骤(3)制得粗乳液后添加并调节pH值;必要时还在步骤(4)制得均质乳液后添加并调节pH值;必要时还在步骤(5)制得均质乳液后添加并调节pH值;或者,必要时还在步骤(5)冷冻干燥前添加并调节pH值。

[0090] 根据本发明第三方面的方法,其中所述纳米粒组合物中,当存在时,所述渗透压调节剂在预先用注射用水溶解并除菌过滤后,添加至步骤(5)过滤除菌所得式(I)化合物或其药用盐白蛋白纳米粒组合物中。

[0091] 根据本发明第三方面的方法,其中所述纳米粒组合物中,当存在时,所述冻干赋形剂在预先用注射用水溶解并除菌过滤后,添加至步骤(5)过滤除菌所得式(I)化合物或其药用盐白蛋白纳米粒组合物中,任选的调节药液pH值后,再进行冷冻干燥。

[0092] 根据本发明第三方面的方法,其中所述纳米粒组合物中,当存在时,所述中链脂肪酸与所述式(I)化合物或其药用盐一起添加至所述有机溶剂中制成油相。

[0093] 根据本发明第三方面的方法,其中所述纳米粒组合物,其用0.9%氯化钠溶液分散均匀至式(I)化合物或其药用盐浓度为1mg/ml时,pH值为6.0~7.5,例如6.5~7.5。

[0094] 根据本发明第三方面的方法,其中所述纳米粒组合物为冷冻干燥粉针剂,其照水分测定法(中国药典2015年版四部附录第103页第0832节第一法A)测定,含水分低于3.0%。此项目可称为水分或水分含量。

[0095] 根据本发明第三方面的方法,其中所述纳米粒组合物中加入0.9%氯化钠溶液使式(I)化合物或其药用盐浓度为1mg/ml时的量,轻轻振摇,在15分钟内显示完全分散均匀,并且无未分散的固体物。此项目可称为分散时间。

[0096] 根据本发明第三方面的方法,其中所述纳米粒组合物用0.9%氯化钠溶液分散均匀至式(I)化合物或其药用盐浓度为1mg/ml后,用中国药典2005年版二部附录IX C显微计数法测定,每100mg式(I)化合物或其药用盐白蛋白纳米粒组合物中含10 μ m以上的微粒少于1000粒例如少于500粒,含25 μ m以上的微粒少于100粒例如少于50粒。本项目可称为不溶性微粒。

[0097] 根据本发明第三方面的方法,其中所述纳米粒组合物用蒸馏水分散均匀或稀释至式(I)化合物或其药用盐浓度为1mg/ml后,必要时再用蒸馏水适当稀释,用纳米粒度仪测定,平均粒径小于200nm(例如平均粒径为20~200nm,例如平均粒径为30~200nm,例如平均粒径为40~200nm,例如平均粒径为50~200nm,例如平均粒径为30~180nm,例如平均粒径为30~150nm),粒径小于10nm的微粒少于5%(例如粒径小于15nm的微粒少于5%),粒径大于500nm的微粒少于5%(例如粒径大于400nm的微粒少于5%,粒径大于300nm的微粒少于5%)。本项目可称为粒径及粒径分布。

[0098] 根据本发明第三方面的方法,其中所述纳米粒组合物用蒸馏水分散均匀或稀释至式(I)化合物或其药用盐浓度为1mg/ml后,必要时再用蒸馏水适当稀释,用纳米粒度仪测定并计算纳米粒的粒径D10、D50、和D90值(通常亦分别理解为10%粒子小于此值的粒径、50%粒子小于此值的粒径或称中值粒径、90%粒子小于此值的粒径),以下式计算供试品纳米粒的径距Span值:Span = (Dv90 - Dv10) / Dv50;该组合物的Span小于5,特别是小于3,更特别的是小于2.5,更特别的是小于2.Span越小表示微粒的粒度分布越窄,并且越是本领域期待的,本领域公知的是,对于注射用的纳米微粒制剂,Span小于3通常认为是可接受的,Span小于2.5通常认为是满意的,Span小于2通常认为是非常满意的。已经出人意料地发现,本发明方法制备的组合物其纳米粒的平均粒径小于200nm,Span值均小于2.5,并且一些组合物在经历长时间放置后平均粒径和Span值呈现基本不变化的效果。

[0099] 进一步的,本发明第四方面提供了一种包含式(I)化合物或其药用盐的白蛋白纳米粒制剂组合物,该组合物中包含100重量份的式(I)化合物或其药用盐以及100~1500重量份的白蛋白。

[0100] 根据本发明第四方面的组合物,其中包含100重量份的式(I)化合物或其药用盐以及150~1000重量份的白蛋白。

[0101] 根据本发明第四方面的组合物,其中包含100重量份的式(I)化合物或其药用盐以及150~800重量份的白蛋白。

[0102] 根据本发明第四方面的组合物,其中包含100重量份的式(I)化合物或其药用盐以及150~600重量份的白蛋白。

[0103] 根据本发明第四方面的组合物,其中包含100重量份的式(I)化合物或其药用盐以及200~500重量份的白蛋白。

[0104] 根据本发明第四方面的组合物,其中所述白蛋白是选自下列的白蛋白:卵白蛋白、牛血白蛋白、人血白蛋白、重组人白蛋白等,优选的是人血白蛋白或重组人白蛋白。

[0105] 根据本发明第四方面的组合物,其中还任选的包含一种或多种选自下列的辅料:胆固醇、磷脂、卵磷脂、PEG化磷脂、磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰甘油(PG)、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰丝氨酸(PS)、磷脂酰肌醇(PI)、甘油磷脂酸(PA)、合成磷脂等类型的磷脂。

[0106] 根据本发明第四方面的组合物,以每100重量份的式(I)化合物或其药用盐计,其中还任选的包含一种或多种选自下列的辅料:胆固醇2~10重量份、磷脂5~20重量份、卵磷脂5~20重量份、PEG化磷脂5~20重量份、磷脂酰胆碱(PC)5~20重量份、磷脂酰甘油(PG)5~20重量份、磷脂酰乙醇胺(PE)5~20重量份、磷脂酰丝氨酸(PS)5~20重量份、磷脂酰肌醇(PI)5~20重量份、甘油磷脂酸(PA)5~20重量份、合成磷脂5~20重量份。

[0107] 根据本发明第四方面的组合物,以每100重量份的式(I)化合物或其药用盐计,其中还任选的包含一种或多种选自下列的辅料:胆固醇2~5重量份、磷脂5~10重量份、卵磷脂5~10重量份、PEG化磷脂5~10重量份、磷脂酰胆碱(PC)5~10重量份、磷脂酰甘油(PG)5~10重量份、磷脂酰乙醇胺(PE)5~10重量份、磷脂酰丝氨酸(PS)5~10重量份、磷脂酰肌醇(PI)5~10重量份、甘油磷脂酸(PA)5~10重量份、合成磷脂5~10重量份。

[0108] 根据本发明第四方面的组合物,其中所述磷脂选自:蛋黄卵磷脂、氢化蛋黄卵磷脂、大豆卵磷脂、氢化大豆卵磷脂、鞘磷脂、磷脂酰乙醇胺、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(即DMPC)、二肉豆蔻酰磷脂酰甘油(即DMPG)、二棕榈酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰胆碱、二油酰磷脂酰胆碱、二月桂酰磷脂酰胆碱、及其组合。

[0109] 根据本发明第四方面的组合物,其中还包含聚乙二醇修饰的磷脂。其在本发明中亦可称为PEG化磷脂。在一个实施方案中,所述PEG化磷脂中的聚乙二醇的分子量为1000~10000道尔顿。在一个实施方案中,所述PEG化磷脂是二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇(可缩写为PEG-DSPE)。例如,所述PEG化磷脂选自:二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇1000(可缩写为PEG1000-DSPE,其余亦可类似表述)、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇3350、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇4000、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇5000、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇6000、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇8000、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇10000。

[0110] 根据本发明第四方面的组合物,其中还任选的包含注射制剂辅料,例如酸碱调节剂、渗透压调节剂、冻干赋形剂等。

[0111] 根据本发明第四方面的组合物,其中所述酸碱调节剂的量是,使该组合物在用注射用水稀释制成式(I)化合物或其药用盐浓度为1mg/ml的溶液时,溶液的pH值为6.0~7.5,例如6.5~7.5。酸碱调节剂优选常规的酸碱调节剂,例如盐酸、氢氧化钠以及它们的水溶液尤其是浓的水溶液。

[0112] 根据本发明第四方面的组合物,其中所述渗透压调节剂当存在时,其用量是,使该组合物在用注射用水稀释制成式(I)化合物或其药用盐浓度为1mg/ml的溶液时,溶液的渗透压与浓度为0.9~2%氯化钠溶液的渗透压相当。

[0113] 根据本发明第四方面的组合物,以每100重量份的式(I)化合物或其药用盐计,其

中的冻干赋形剂的量为0~1000重量份,例如0~500重量份,例如0~200重量份。冻干赋形剂可以选自:葡萄糖、蔗糖、果糖、乳糖、甘露醇、右旋糖苷、甘氨酸等。

[0114] 根据本发明第四方面的组合物,其中还包含中链脂肪酸,在一个实施方案中,所述中链脂肪酸选自:己酸、辛酸、癸酸、月桂酸,例如的是辛酸或癸酸。根据本发明第四方面的组合物,以每100重量份的式(I)化合物或其药用盐计,其中中链脂肪酸的量为2~50重量份,例如2~40重量份,例如2~30重量份,例如2~20重量份。由于中链脂肪酸为脂溶性,因此本领域技术人员当然地会将其与式(I)化合物或其药用盐一起加至有机溶剂中溶解以便进行制剂配制。根据本发明任一方面的组合物,其中还包含海藻糖;例如,以每100重量份的式(I)化合物或其药用盐计,其中海藻糖的量为20~50重量份;例如,在制备组合物时,所述海藻糖与所述白蛋白一起添加的。已经出人意料地发现,当在本发明组合物中添加微量中链脂肪酸和海藻糖时能够显著增加纳米微粒的稳定性特别是以其粒径表征的物理稳定性。

[0115] 根据本发明第四方面的组合物,其是通过如下操作制备得到的:将水溶性物料溶解于水中制成水相,将水不溶性物料溶解于有机溶剂中制成油相,将水相和油相混合分散制成粗乳液,进一步将粗乳液在高压均质机中均质至微粒的平均粒径小于200nm,蒸发除去溶剂,得到纳米粒组合物,任选地将其冷冻干燥除去水分。

[0116] 根据本发明第四方面的组合物,其是照包括如下步骤的方法制备得到的:

[0117] (1) 将处方量的白蛋白用水溶解,作为水相;

[0118] (2) 将处方量的式(I)化合物或其药用盐用有机溶剂(例如乙醚、乙酸乙酯、叔丁醇、氯仿、二氯甲烷等;优选的溶剂可以是氯仿;溶剂的用量是本领域技术人员根据技术经验容易确定的,并且通常是至少应保证各物料完全溶解的程度(但又不宜过量以减轻后续的蒸发除溶剂的工作量))溶解,作为油相;

[0119] (3) 将水相与油相混合后,使用分散器分散制得粗乳液;

[0120] (4) 将粗乳液转入高压均质机中于均质直至均匀且微粒的平均粒径小于200nm;

[0121] (5) 在旋转蒸发器上旋蒸将残余的有机溶剂蒸发除去(直至有机溶剂残余量小于100ppm),接着用0.22 μ m水性微孔滤膜过滤除菌,制成式(I)化合物或其药用盐白蛋白纳米粒组合物,任选地将其冷冻干燥除去水分。

[0122] 根据本发明第四方面的组合物,其中例如步骤(1)所得水相中白蛋白的浓度为3~15%,例如5~10%。

[0123] 根据本发明第四方面的组合物,其中例如步骤(2)所得油相中式(I)化合物或其药用盐的浓度为2~20%,例如5~10%。

[0124] 根据本发明第四方面的组合物,当存在时,所述胆固醇和各类磷脂与所述式(I)化合物或其药用盐一起添加至所述有机溶剂中制成油相。

[0125] 根据本发明第四方面的组合物,其中例如步骤(1)和步骤(2)是在35~70 $^{\circ}$ C(例如40~50 $^{\circ}$ C)的温度下使各物料溶解。使各物料溶解的时间是根据操作经验容易确定的,通常可以在2小时以内达到溶解,更通常的可以在1小时以内达到溶解,例如可以在0.5小时以内达到溶解。

[0126] 根据本发明第四方面的组合物,其中例如步骤(3)中所述分散是在分散器中于5000-15000rpm下分散1-20min,例如于8000-10000rpm下分散2-10min。

[0127] 根据本发明第四方面的组合物,其中步骤(4)中,在均质机中以5000~50000psi的

压力均质处理10~60min,例如以10000~20000psi的压力均质处理20~45min,例如以15000psi的压力均质处理30min。

[0128] 根据本发明第四方面的组合物,其中例如步骤(5)中,所述的蒸发是旋转蒸发。在一个实施方案中,所述的旋转蒸发是在30~50℃(例如35~45℃)的温度下旋转蒸发。在一个实施方案中,所述的旋转蒸发在减压下进行的。在一个实施方案中,所述的旋转蒸发在减压0.05~0.1Mpa的压力下进行的。在一个实施方案中,所述的旋转蒸发在减压0.06~0.09Mpa的压力下进行的。

[0129] 根据本发明第四方面的组合物,当存在时,所述酸碱调节剂是在步骤(3)制备粗乳液前添加并调节pH值;必要时所述酸碱调节剂还在步骤(3)制得粗乳液后添加并调节pH值;必要时还在步骤(4)制得均质乳液后添加并调节pH值;必要时还在步骤(5)制得均质乳液后添加并调节pH值;或者,必要时还在步骤(5)冷冻干燥前添加并调节pH值。

[0130] 根据本发明第四方面的组合物,当存在时,所述渗透压调节剂在预先用注射用水溶解并除菌过滤后,添加至步骤(5)过滤除菌所得式(I)化合物或其药用盐白蛋白纳米粒组合物中。

[0131] 根据本发明第四方面的组合物,当存在时,所述冻干赋形剂在预先用注射用水溶解并除菌过滤后,添加至步骤(5)过滤除菌所得式(I)化合物或其药用盐白蛋白纳米粒组合物中,任选的调节药液pH值后,再进行冷冻干燥。

[0132] 根据本发明第四方面的组合物,当存在时,所述中链脂肪酸与所述式(I)化合物或其药用盐一起添加至所述有机溶剂中制成油相。

[0133] 根据本发明第四方面的组合物,其用0.9%氯化钠溶液分散均匀至式(I)化合物或其药用盐浓度为1mg/ml时,pH值为6.0~7.5,例如6.5~7.5。

[0134] 根据本发明第四方面的组合物,其为冷冻干燥粉针剂,其照水分测定法(中国药典2015年版四部附录第103页第0832节第一法A)测定,含水分低于3.0%。此项目可称为水分或水分含量。

[0135] 根据本发明第四方面的组合物,其加入0.9%氯化钠溶液使式(I)化合物或其药用盐浓度为1mg/ml时的量,轻轻振摇,在15分钟内显示完全分散均匀,并且无未分散的固体物。此项目可称为分散时间。

[0136] 根据本发明第四方面的组合物,其用0.9%氯化钠溶液分散均匀至式(I)化合物或其药用盐浓度为1mg/ml后,用中国药典2005年版二部附录IX C显微计数法测定,每100mg式(I)化合物或其药用盐白蛋白纳米粒组合物中含10 μ m以上的微粒少于1000粒例如少于500粒,含25 μ m以上的微粒少于100粒例如少于50粒。本项目可称为不溶性微粒。

[0137] 根据本发明第四方面的组合物,其用蒸馏水分散均匀或稀释至式(I)化合物或其药用盐浓度为1mg/ml后,必要时再用蒸馏水适当稀释,用纳米粒度仪测定,平均粒径小于200nm(例如平均粒径为20~200nm,例如平均粒径为30~200nm,例如平均粒径为40~200nm,例如平均粒径为50~200nm,例如平均粒径为30~180nm,例如平均粒径为30~150nm),粒径小于10nm的微粒少于5%(例如粒径小于15nm的微粒少于5%),粒径大于500nm的微粒少于5%(例如粒径大于400nm的微粒少于5%,粒径大于300nm的微粒少于5%)。本项目可称为粒径及粒径分布。

[0138] 根据本发明第四方面的组合物,其用蒸馏水分散均匀或稀释至式(I)化合物或其

药用盐浓度为1mg/ml后,必要时再用蒸馏水适当稀释,用纳米粒度仪测定并计算纳米粒的粒径D10、D50、和D90值(通常亦分别理解为10%粒子小于此值的粒径、50%粒子小于此值的粒径或称中值粒径、90%粒子小于此值的粒径),以下式计算供试品纳米粒的径距Span值: $Span = (Dv90 - Dv10) / Dv50$;该组合物的Span小于5,特别是小于3,更特别的是小于2.5,更特别的是小于2。Span越小表示微粒的粒度分布越窄,并且越是本领域期待的,本领域公知的是,对于注射用的纳米微粒制剂,Span小于3通常认为是可接受的,Span小于2.5通常认为是满意的,Span小于2通常认为是非常满意的。已经出人意料地发现,本发明方法制备的组合物其纳米粒的平均粒径小于200nm,Span值均小于2.5,并且一些组合物在经历长时间放置后平均粒径和Span值呈现基本不变化的效果。

[0139] 进一步的,本发明第五方面提供了一种制备本发明第四方面所述组合物的方法,包括如下步骤:

[0140] (1) 将处方量的白蛋白用水溶解,作为水相;

[0141] (2) 将处方量的式(I)化合物或其药用盐用有机溶剂(例如乙醚、乙酸乙酯、叔丁醇、氯仿、二氯甲烷等;优选的溶剂可以是氯仿;溶剂的用量是本领域技术人员根据技术经验容易确定的,并且通常是至少应保证各物料完全溶解的程度(但又不宜过量以减轻后续的蒸发除溶剂的工作量))溶解,作为油相;

[0142] (3) 将水相与油相混合后,使用分散器分散制得粗乳液;

[0143] (4) 将粗乳液转入高压均质机中于均质直至均匀且微粒的平均粒径小于200nm;

[0144] (5) 在旋转蒸发器上旋蒸将残余的有机溶剂蒸发除去(直至有机溶剂残余量小于100ppm),接着用0.22 μ m水性微孔滤膜过滤除菌,制成式(I)化合物或其药用盐白蛋白纳米粒组合物,任选地将其冷冻干燥除去水分。

[0145] 根据本发明第五方面的方法,其中例如步骤(1)所得水相中白蛋白的浓度为3~15%,例如5~10%。

[0146] 根据本发明第五方面的方法,其中例如步骤(2)所得油相中式(I)化合物或其药用盐的浓度为2~20%,例如5~10%。

[0147] 根据本发明第五方面的方法,当存在时,所述胆固醇和各类磷脂与所述式(I)化合物或其药用盐一起添加至所述有机溶剂中制成油相。

[0148] 根据本发明第五方面的方法,其中例如步骤(1)和步骤(2)是在35~70 $^{\circ}$ C(例如40~50 $^{\circ}$ C)的温度下使各物料溶解。使各物料溶解的时间是根据操作经验容易确定的,通常可以在2小时以内达到溶解,更通常的可以在1小时以内达到溶解,例如可以在0.5小时以内达到溶解。

[0149] 根据本发明第五方面的方法,其中例如步骤(3)中所述分散是在分散器中于5000-15000rpm下分散1-20min,例如于8000-10000rpm下分散2-10min。

[0150] 根据本发明第五方面的方法,其中步骤(4)中,在均质机中以5000~50000psi的压力均质处理10~60min,例如以10000~20000psi的压力均质处理20~45min,例如以15000psi的压力均质处理30min。

[0151] 根据本发明第五方面的方法,其中例如步骤(5)中,所述的蒸发是旋转蒸发。在一个实施方案中,所述的旋转蒸发是在30~50 $^{\circ}$ C(例如35~45 $^{\circ}$ C)的温度下旋转蒸发。在一个实施方案中,所述的旋转蒸发在减压下进行的。在一个实施方案中,所述的旋转蒸发在减压

0.05~0.1Mpa的压力下进行的。在一个实施方案中,所述的旋转蒸发在减压0.06~0.09Mpa的压力下进行的。

[0152] 根据本发明第五方面的方法,当存在时,所述酸碱调节剂是在步骤(3)制备粗乳液前添加并调节pH值;必要时所述酸碱调节剂还在步骤(3)制得粗乳液后添加并调节pH值;必要时还在步骤(4)制得均质乳液后添加并调节pH值;必要时还在步骤(5)制得均质乳液后添加并调节pH值;或者,必要时还在步骤(5)冷冻干燥前添加并调节pH值。

[0153] 根据本发明第五方面的方法,当存在时,所述渗透压调节剂在预先用注射用水溶解并除菌过滤后,添加至步骤(5)过滤除菌所得式(I)化合物或其药用盐白蛋白纳米粒组合物中。

[0154] 根据本发明第五方面的方法,当存在时,所述冻干赋形剂在预先用注射用水溶解并除菌过滤后,添加至步骤(5)过滤除菌所得式(I)化合物或其药用盐白蛋白纳米粒组合物中,任选的调节药液pH值后,再进行冷冻干燥。

[0155] 根据本发明第五方面的方法,当存在时,所述中链脂肪酸与所述式(I)化合物或其药用盐一起添加至所述有机溶剂中制成油相。

[0156] 进一步的,本发明第六方面提供了本发明第一方面任一项所述化合物或者本发明第二方面任一项所述方法制备的化合物或者本发明第四方面所述组合物在制备用于治疗癌症的药物中的用途。例如,所述癌症例如但不限于非小细胞肺癌、胰腺癌、卵巢癌、膀胱癌、乳腺癌。

[0157] 在本发明的任一方面,所制备的呈液体形式的药物组合物或者进一步制成冷冻干燥粉针剂形式的药物组合物,其可以通过控制制备工艺的方式,将该组合物制成供无菌方式使用的无菌制剂。这种工艺的控制是容易的,例如先控制方式,即将各原辅料经无菌处理,再以全程无菌操作制备成无菌制剂;还可以是后控制的方式,即将制备得到的呈液体形式的组合物经例如但不限于微孔滤膜过滤的方式除菌。因此,根据本发明的任一方面,所制备的呈液体形式的药物组合物或者进一步制成冷冻干燥粉针剂形式的药物组合物是无菌制剂。

[0158] 本发明任一方面或该任一方面的任一实施方案所具有的任一技术特征同样适用其它任一实施方案或其它任一方面的任一实施方案,只要它们不会相互矛盾,当然在相互之间适用时,必要的话可对相应特征作适当修饰。下面对本发明的各个方面和特点作进一步的描述。

[0159] 本发明所引述的所有文献,它们的全部内容通过引用并入本文,并且如果这些文献所表达的含义与本发明不一致时,以本发明的表述为准。此外,本发明使用的各种术语和短语具有本领域技术人员公知的一般含义,即便如此,本发明仍然希望在此对这些术语和短语作更详尽的说明和解释,提及的术语和短语如有与公知含义不一致的,以本发明所表述的含义为准。

[0160] 在本发明中如未另外说明,涉及的%是重量/重量百分数。

[0161] 本文各种具体实施例中使用到的各种白蛋白均是从市售途径获得的并且符合相应品种的质量标准,例如重组白蛋白符合美国药典NF35相应品种的规定,人血白蛋白符合中国药典2015年版相应品种的规定。

[0162] 吉西他滨, (+) 2'-脱氧-2'2'-二氟胞嘧啶,临床上通常以其盐酸盐的形式使用,常

见剂型有盐酸吉西他滨冷冻干燥粉针剂。临床上可用于治疗以下疾病：局部晚期或已转移的非小细胞肺癌、局部晚期或已转移的胰腺癌、吉西他滨与紫杉醇联合，适用于治疗经辅助/新辅助化疗后复发，不能切除的、局部复发或转移性乳腺癌。

[0163] 吉西他滨的细胞代谢和作用机制：吉西他滨(dFdC)为嘧啶类抗代谢物，在细胞内经核苷激酶的作用被代谢为具有活性的二磷酸(dFdCDP)及三磷酸核苷(dFdCTP)。dFdCDP和dFdCTP通过两种作用机制抑制DNA合成，从而实现吉西他滨的细胞毒作用。首先，dFdCDP抑制核苷酸还原酶的活性，致使合成DNA所必需的三磷酸脱氧核苷(dCTP)的生成受到抑制。其次，dFdCTP与dCTP竞争掺入至DNA链中(自增强作用)。同样，少量的吉西他滨还可以掺入RNA分子中。因此，细胞内dCTP浓度降低更加有利于dFdCTP掺入到DNA链中。DNA聚合酶 ϵ 不能去除掺入的吉西他滨及修复已形成的DNA链。吉西他滨掺入DNA链后，延伸的DNA链中就增加了一个核苷酸。这个增加的核苷酸可以完全抑制DNA链的进一步合成(隐蔽链终止)。吉西他滨掺入DNA链后引起细胞凋亡。

[0164] 吉西他滨对培养细胞的细胞毒活性：吉西他滨对各种培养的人及鼠肿瘤细胞有明显的细胞毒活性。其作用具有细胞周期特异性，即吉西他滨主要作用于DNA合成期(S-期)的细胞，在一定的条件下，可以阻止G1期/S期交接点的细胞进展。在体外，吉西他滨的细胞毒作用取决于浓度和时间。

[0165] 吉西他滨在动物模型中抗肿瘤活性的研究：在肿瘤动物模型的研究中发现吉西他滨的抗肿瘤活性与给药的方式有关。每天给药的方法会导致动物死亡率很高，而抗肿瘤活性很低。当用每3-4天给药一次的方法，吉西他滨在非致死剂量时对小鼠的多种肿瘤均有很好的抗肿瘤活性。

[0166] 吉西他滨的药代动力学特点：在7项研究，共计353例患者中评价了吉西他滨的药代动力学特点。其中女性患者121例和男性患者232例，年龄29-79之间。在这些患者中，约45%为非小细胞肺癌患者，35%为胰腺癌患者。得到以下药代动力学参数的给药剂量范围是500-2,592mg/m²，输液时间变化范围0.4-1.2小时。血浆峰浓度(输液结束后5分钟内得到)为3.2-45.5 μ g/ml。按照1000mg/m²/30min剂量给药，输液结束30min内母体化合物血浆浓度可持续高于5 μ g/ml，输液结束后1小时内，其血浆浓度亦高于0.4 μ g/ml。

[0167] 分布：中央室的分布容积为女性12.4L/m²和男性17.5L/m²(个体间差异为91.9%)。周边隔室的分布容积为47.4L/m²。周边隔室的容积与性别不相关。血浆蛋白结合可忽略不计。半衰期：半衰期为42-94分钟，与年龄和性别相关。对于推荐的给药方案，吉西他滨在输液开始后的5-11小时内被完全清除。每周给药一次时，吉西他滨不会产生蓄积。

[0168] 吉西他滨在肝脏、肾脏、血液和其他组织中被胞苷脱氨酶快速代谢。在细胞内，吉西他滨在细胞内代谢产生吉西他滨单磷酸、二磷酸和三磷酸核苷(dFdCMP、dFdCDP和dFdCTP)，其中dFdCDP和dFdCTP具有活性。这些细胞内形成的代谢物，在血浆或尿液中都未曾检出。主要代谢物2'-脱氧-2',2'-二氟尿苷(dFdU)没有活性，在血浆和尿中均可检出。

[0169] 吉西他滨的全身清除率为29.2L/hr/m²-92.2L/hr/m²，与性别和年龄相关(个体差异为52.2%)。清除率女性比男性低大约25%。虽然清除速度很快，男性和女性的清除率都随年龄增加而下降。吉西他滨推荐给药剂量为1000mg/m²，静脉滴注30分钟，不必因男性和女性降低的清除率而减少吉西他滨的给药剂量。经尿排泄：少于10%以原药形式排泄。肾清除：2-7L/hr/m²。给药后一周内，吉西他滨给药剂量的92%-98%被检出，其中99%主要以

dFdU形式经尿排泄,1%经粪便排泄。

[0170] 本发明出人意料地发现一类独特的吉西他滨化学结构改造物在制备成白蛋白纳米粒组合物时呈现如本发明所述优异技术效果。

附图说明

[0171] 图1是本明白蛋白纳米粒组合物的典型粒径测量图。

[0172] 图2是本明白蛋白纳米粒组合物的典型zeta电位测量结果图。

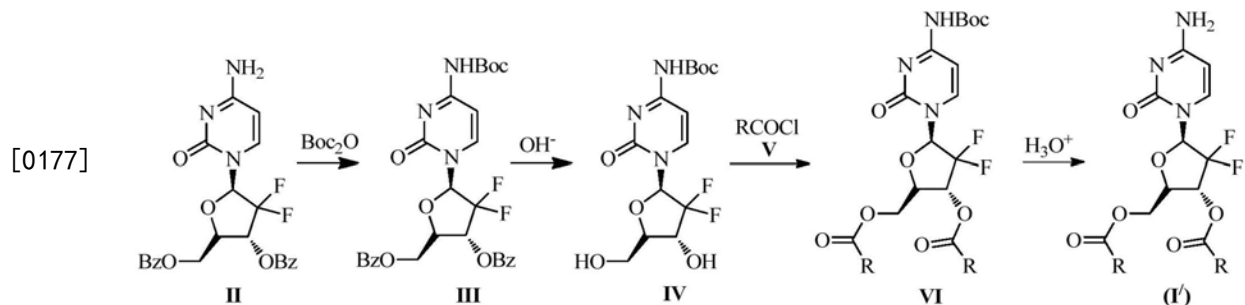
具体实施方式

[0173] 通过下面的实施例可以对本发明进行进一步的描述,然而,本发明的范围并不限于下述实施例。本领域的专业人员能够理解,在不背离本发明的精神和范围的前提下,可以对本发明进行各种变化和修饰。本发明对试验中所使用到的材料以及试验方法进行一般性和/或具体的描述。虽然为实现本发明目的所使用的许多材料和操作方法是本领域公知的,但是本发明仍然在此作尽可能详细描述。

[0174] 在以下具体实例部分,如未另外提及,提供的呈液体形式的药物组合物或者呈冷冻干燥组合物形式的配方是每100mg或100重量份式(I)化合物所制得的组合物中各物料的用量来表示的;在实际制备时,以制备包含10g式(I)化合物的药物组合物的量投料。当需要调节药液pH值时,使用2M盐酸溶液或2M氢氧化钠溶液。以下在制备纳米粒组合物的实施例中所获得纳米粒组合物药液的渗透压均与浓度为1.1~1.5%氯化钠溶液的渗透压相当,因此未特别地进行渗透压的调节。以下各实施例在对组合物进行冷冻干燥时,经检测,所得冷冻干燥粉中有机溶剂含量低于检测限。

[0175] 实施例1、制备2',2'-二氟-2'-脱氧胞嘧啶核苷-3',5'-二正癸酸酯

[0176] 示意性反应路线如下:



[0178] 将市售的2',2'-二氟-2'-脱氧胞嘧啶核苷-3',5'-二苯甲酸酯(式II化合物,4.7g,0.01mol)溶于50mL二氧六环中,然后依次加入三乙胺(4.0g,0.04mol),N,N-二甲基吡啶(1.8g,0.01mol)和Boc₂O(12.9g,0.04mol)。40℃反应5个小时,TLC监测反应结束。后处理:将反应液倒入水中,二氯甲烷萃取,有机相浓缩(得化合物III)后直接进行下一步反应。将上述化合物III溶于20mL甲醇溶液中,然后加入NaOH固体(28mg,0.7mmol),室温搅拌4小时,TLC监测反应结束。后处理:直接用硅胶过滤,滤液浓缩并进行柱层析(乙酸乙酯)得1.8g白色固体IV(两步产率为50%)。

[0179] ¹H NMR(300MHz,CD₃OD) δ8.28(d,J=7.50Hz,1H),7.32(d,J=7.5Hz,1H),6.23(t,J=7.80Hz,1H),4.22-4.36(m,1H),3.96(brs,2H),3.80-3.84(brs,1H),1.54(s,9H)。

[0180] 将上述化合物IV (1.8g, 4.9mmol) 溶于20mL二氯甲烷中, 然后依次加入三乙胺 (1.5g, 14.7mmol), $n\text{-C}_9\text{H}_{19}\text{COCl}$ (2.1g, 10.7mmol)。室温搅拌过夜, TLC监测反应结束。后处理: 加入水中, 二氯甲烷萃取(得化合物VI) 并直接进行下一步。

[0181] 往上述二氯溶液中加入三氟乙酸 (0.7g, 6.0mmol), 室温搅拌4小时, TLC监测反应结束。后处理: 将反应体系用二氯甲烷稀释, 并用碳酸氢钠水溶性洗涤, 有机相浓缩并进行柱层析(乙酸乙酯) 得白色固体2.0g为标题的化合物V' (两步收率: 71%)。

[0182] $^1\text{H NMR}$ (500MHz, CDCl_3) δ 7.45 (d, $J=6.85\text{Hz}$, 1H), 6.45 (brs, 1H), 5.91 (d, $J=7.30\text{Hz}$, 1H), 5.28 (d, $J=11.90\text{Hz}$, 1H), 4.42 (brs, 2H), 4.26 (d, $J=5.00\text{Hz}$, 1H), 2.46 (t, $J=7.00\text{Hz}$, 2H), 2.40 (t, $J=7.35\text{Hz}$, 2H), 1.66-1.71 (m, 4H), 1.31-1.34 (m, 24H), 0.92 (t, $J=6.50\text{Hz}$, 6H). MS-ESI (m/z): 572.3 (M+H)⁺.

[0183] 实施例2、制备2', 2'-二氟-2'-脱氧胞嘧啶核苷-3', 5'-二月桂酸酯

[0184] 制备方法参照实施例1, 化合物IV与月桂酰氯反应, 经三氟乙酸脱Boc保护基, 制得白色固体为标题化合物。

[0185] $^1\text{H NMR}$ (500MHz, CDCl_3) δ 7.55 (brs, 1H), 6.32 (brs, 1H), 6.09 (brs, 1H), 5.29 (brs, 1H), 4.34-4.45 (m, 3H), 2.37-2.40 (m, 4H), 1.60-1.70 (m, 4H), 1.25-1.29 (m, 32H), 0.92 (t, $J=6.50\text{Hz}$, 6H). MS-ESI (m/z): 628.3 (M+H)⁺.

[0186] 实施例3、制备2', 2'-二氟-2'-脱氧胞嘧啶核苷-3', 5'-二肉豆蔻酸酯

[0187] 制备方法参照实施例1, 化合物IV与肉豆蔻酰氯反应, 经三氟乙酸脱Boc保护基, 制得白色固体为标题化合物。

[0188] Mp: 142-144°C; $^1\text{H NMR}$ (500MHz, CDCl_3) δ 7.44 (d, $J=6.85\text{Hz}$, 1H), 6.44 (d, $J=8.85\text{Hz}$, 1H), 5.74 (d, $J=7.30\text{Hz}$, 1H), 5.22 (d, $J=11.90\text{Hz}$, 1H), 4.38 (brs, 2H), 4.26 (brs, 1H), 2.41 (t, $J=7.35\text{Hz}$, 2H), 2.36 (t, $J=7.35\text{Hz}$, 2H), 1.60-1.70 (m, 4H), 1.25-1.29 (m, 40H), 0.87 (t, $J=6.50\text{Hz}$, 6H). MS-ESI (m/z): 684.4 (M+H)⁺.

[0189] 实施例4、制备2', 2'-二氟-2'-脱氧胞嘧啶核苷-3', 5'-二棕榈酸酯

[0190] 制备方法参照实施例1, 化合物IV与棕榈酰氯反应, 经三氟乙酸脱Boc保护基, 制得白色固体为标题化合物。

[0191] $^1\text{H NMR}$ (500MHz, CDCl_3) δ 7.42 (d, $J=6.90\text{Hz}$, 1H), 6.43 (brs, 1H), 5.87 (d, $J=7.30\text{Hz}$, 1H), 5.32 (brs, 1H), 4.42 (brs, 2H), 4.29 (d, $J=5.00\text{Hz}$, 1H), 2.46 (t, $J=7.35\text{Hz}$, 2H), 2.40 (t, $J=7.25\text{Hz}$, 2H), 1.65-1.70 (m, 4H), 1.25-1.31 (m, 48H), 0.92 (t, $J=6.50\text{Hz}$, 6H). MS-ESI (m/z): 740.5 (M+H)⁺.

[0192] 实施例5、2', 2'-二氟-2'-脱氧胞嘧啶核苷-3', 5'-二反油酸酯

[0193] 制备方法参照实施例1, 化合物IV与反油酸进行缩合反应, 经三氟乙酸脱Boc保护基, 制得白色固体为标题化合物。

[0194] $^1\text{H NMR}$ (500MHz, CDCl_3) δ 7.42 (d, $J=6.90\text{Hz}$, 1H), 6.43 (brs, 1H), 5.86 (d, $J=7.30\text{Hz}$, 1H), 5.32-5.37 (m, 5H), 4.42 (brs, 2H), 4.29 (brs, 1H), 2.46 (t, $J=7.35\text{Hz}$, 2H), 2.10-2.43 (m, 12H), 1.65-1.71 (m, 2H), 1.25-1.31 (m, 40H), 0.91 (t, $J=7.20\text{Hz}$, 6H). MS-ESI (m/z): 792.5 (M+H)⁺.

[0195] 实施例6、制备2', 2'-二氟-2'-脱氧胞嘧啶核苷-3', 5'-二正十六烷氧丙基醚

[0196] 将十四烷基溴 (21.7mmol) 和1, 3-丙二醇 (4.9g, 65.1mmol) 溶于DMSO (50mL) 中, 刷

烈搅拌下加入KOH(4.8g, 86.8mmol) 粉末。室温搅拌4小时, TLC监测反应结束。后处理: 反应液用100mL水稀释, 浓盐酸调至酸性, 然后用乙酸乙酯萃取。有机相浓缩并用石油醚进行重结晶得白色固体3g(产率53%)。将上述白色固体溶于二氯甲烷(30mL)中, 依次加入三乙胺(5mL)和甲磺酰氯(2.1g, 13.8mmol), 室温搅拌2小时。后处理: 反应液用水洗涤, 有机相经无水硫酸钠干燥并浓缩后直接进行下一步反应。

[0197] 将化合物IV(2.0g, 5.7mmol)和上一步骤所得化合物溶于乙腈(30mL)中并加入甲醇钠(0.6g, 11.6mmol), 室温搅拌5小时。后处理, 将化合物倒入水中, 析出固体粗品。该粗品经三氟乙酸脱Boc, 制得2.3g标题化合物(产率53%)。

[0198] $^1\text{H NMR}$ (500MHz, CDCl_3) δ 7.32(d, $J=6.00\text{Hz}$, 1H), 6.42(d, $J=8.15\text{Hz}$, 1H), 5.71(d, $J=7.30\text{Hz}$, 1H), 5.21(brs, 1H), 4.31(brs, 2H), 4.15(brs, 1H), 3.57(t, $J=7.15\text{Hz}$, 8H), 3.32(t, $J=6.15\text{Hz}$, 4H), 1.62-1.72(m, 4H), 1.21-1.28(m, 56H), 0.89(t, $J=6.50\text{Hz}$, 6H). MS-ESI (m/z): 828.4 ($M+H$) $^+$.

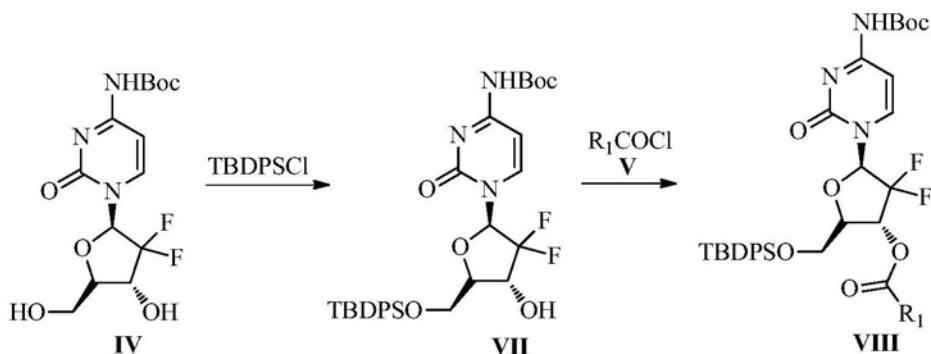
[0199] 实施例7、制备2', 2'-二氟-2'-脱氧胞嘧啶核苷-3', 5'-二正十八烷氧乙基醚

[0200] 制备方法参照实施例6, 选用正十六烷基溴和乙二醇为原料即可制得标题化合物。

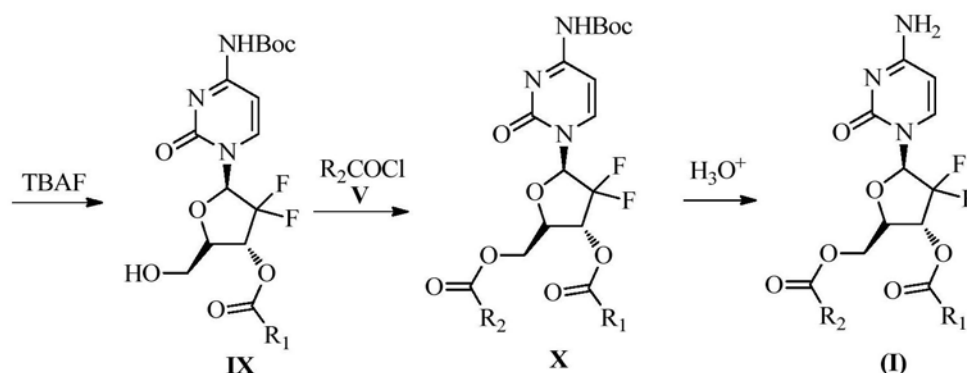
[0201] $^1\text{H NMR}$ (500MHz, CDCl_3) δ 7.30(brs, 1H), 6.42(brs, 1H), 5.73(d, $J=7.30\text{Hz}$, 1H), 5.21(brs, 1H), 4.10-4.24(m, 3H), 3.51-3.56(m, 8H), 3.31(t, $J=6.15\text{Hz}$, 4H), 1.62-1.71(m, 4H), 1.25-1.28(m, 60H), 0.87(t, $J=6.50\text{Hz}$, 6H). MS-ESI (m/z): 856.5 ($M+H$) $^+$.

[0202] 实施例8、2', 2'-二氟-2'-脱氧胞嘧啶核苷-3'-月桂酸酯-5'-肉豆蔻酸酯

[0203] 制备方法照以下反应路线进行:



[0204]



[0205] 将化合物IV(1.8g, 4.9mmol)溶于DMF(20mL)中, 然后依次加入N,N-二甲基吡啶(0.7g, 5.9mmol), 叔丁基二苯基氯硅烷(1.4g, 5.0mmol)。室温搅拌过夜, TLC监测反应结束。后处理: 加入冰水中析出2.1g固体VII(产率69%), 真空干燥(得到式VII化合物)并直接进

行下一步。

[0206] ^1H NMR (300MHz, CD_3OD) δ 8.27 (d, $J=7.50\text{Hz}$, 1H), 7.31 (d, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 7.11-7.25 (m, 10H), 6.21 (brs, 1H), 4.22-4.36 (m, 3H), 3.80-3.84 (brs, 1H), 1.54 (s, 9H), 1.09 (s, 9H).

[0207] 参考实施例1的方法, 化合物VII (2.1g, 3.49mmol) 与月桂酰氯 (0.8g, 3.50mmol) 反应制得2.1g白色固体VIII-1 (产率77%)。化合物VIII-1 (2.1g, 2.68mmol) 溶于THF (20mL) 中, 然后加入四丁基氟化铵 (3mL, 1MTHF溶液)。室温搅拌2小时, TLC监测反应结束。后处理: 反应液加入水中, 用二氯甲烷萃取 (得化合物IX, 3'-月桂酸酯), 并直接进行下一步。

[0208] 参考实施例1的方法, 上述化合物 (IX) 与肉豆蔻酰氯反应, 经三氟乙酸脱Boc制得标题化合物。

[0209] ^1H NMR (500MHz, CDCl_3) δ 7.54 (brs, 1H), 6.31 (brs, 1H), 6.09 (d, $J=8.00\text{Hz}$, 1H), 5.29 (brs, 1H), 4.31-4.42 (m, 3H), 2.31-2.40 (m, 4H), 1.60-1.72 (m, 4H), 1.21-1.26 (m, 36H), 0.91-0.95 (m, 6H). MS-ESI (m/z): 656.3 (M+H) $^+$.

[0210] 实施例9、2', 2'-二氟-2'-脱氧胞嘧啶核苷-3'-肉豆蔻酸酯-5'-月桂酸酯

[0211] 参考实施例8的方法, 化合物VII与肉豆蔻酰氯反应, 然后通过TBAF脱TBDPS保护基, 接着与月桂酰氯反应, 经三氟乙酸脱Boc制得标题化合物。

[0212] ^1H NMR (500MHz, CDCl_3) δ 7.51 (brs, 1H), 6.30 (d, $J=8.15\text{Hz}$, 1H), 6.08 (d, $J=8.10\text{Hz}$, 1H), 5.28 (d, $J=11.00\text{Hz}$, 1H), 4.31-4.41 (m, 3H), 2.32-2.40 (m, 4H), 1.60-1.72 (m, 4H), 1.21-1.27 (m, 36H), 0.91-0.92 (m, 6H). MS-ESI (m/z): 656.3 (M+H) $^+$.

[0213] 实施例10、2', 2'-二氟-2'-脱氧胞嘧啶核苷-3'-正十四烷氧乙基醚-5'-正十六烷氧乙基醚

[0214] 参照例1、例6和例8的方法, 化合物VII经甲磺酸十四烷氧乙基酯反应, 通过TBAF脱TBDPS保护基, 然后经甲磺酸十六烷氧乙基酯反应和三氟乙酸脱Boc制得标题化合物。

[0215] ^1H NMR (500MHz, CDCl_3) δ 7.31 (brs, 1H), 6.42 (d, $J=8.00\text{Hz}$, 1H), 5.73 (brs, 1H), 5.21 (brs, 1H), 4.10-4.23 (m, 3H), 3.51-3.57 (m, 8H), 3.32 (t, $J=6.15\text{Hz}$, 2H), 3.28 (t, $J=6.00\text{Hz}$, 2H), 1.65-1.71 (m, 4H), 1.23-1.28 (m, 48H), 0.87-0.89 (m, 6H). MS-ESI (m/z): 772.5 (M+H) $^+$.

[0216] 实施例11、2', 2'-二氟-2'-脱氧胞嘧啶核苷-3'-正十六烷氧丙基醚-5'-正十四烷氧乙基醚

[0217] 参照例1、例6和例8的方法, 化合物VII经甲磺酸十六烷氧丙基酯反应, 通过TBAF脱TBDPS保护基, 然后经甲磺酸十四烷氧乙基酯反应和三氟乙酸脱Boc制得标题化合物。

[0218] ^1H NMR (500MHz, CDCl_3) δ 7.31 (brs, 1H), 6.41 (brs, 1H), 5.72 (d, $J=8.15\text{Hz}$, 1H), 5.21 (brs, 1H), 4.10-4.20 (m, 3H), 3.51-3.55 (m, 8H), 3.28-3.32 (m, 4H), 1.64-1.71 (m, 4H), 1.23-1.28 (m, 50H), 0.87-0.89 (m, 6H). MS-ESI (m/z): 786.5 (M+H) $^+$.

[0219] 实施例12、2', 2'-二氟-2'-脱氧胞嘧啶核苷-3'-正十六烷氧丙基醚-5'-肉豆蔻酸酯

[0220] 参照例1、例6和例8的方法, 化合物VII经甲磺酸十六烷氧丙基酯反应, 通过TBAF脱TBDPS保护基, 然后经肉豆蔻酰氯反应和三氟乙酸脱Boc制得标题化合物。

[0221] ^1H NMR (500MHz, CDCl_3) δ 7.31 (brs, 1H), 6.31 (d, $J=6.20\text{Hz}$, 1H), 5.70 (d, $J=$

7.20Hz, 1H), 5.21 (brs, 1H), 4.11 (brs, 2H), 4.00-4.03 (m, 1H), 3.97 (t, J=7.20Hz, 4H), 3.89-3.92 (m, 2H), 3.28-3.32 (m, 2H), 1.64-1.71 (m, 4H), 1.23-1.28 (m, 48H), 0.87-0.90 (m, 6H). MS-ESI (m/z): 756.5 (M+H)⁺.

[0222] 实施例21:制备白蛋白纳米粒组合物

[0223] 配方:化合物1(实施例1所得,下同):100mg,人血白蛋白400mg。

[0224] 制法:

[0225] (1) 将处方量的白蛋白用水溶解,作为水相(白蛋白浓度7.5%);

[0226] (2) 式I化合物(三氯甲烷)溶解,作为油相(式(I)化合物浓度7.5%);

[0227] (3) 将水相与油相混合后,使用分散器分散制得粗乳液;

[0228] (4) 将粗乳液转入高压均质机中于均质直至均匀且微粒的平均粒径小于70nm;

[0229] (5) 在旋转蒸发器上旋蒸将残余的有机溶剂蒸发除去(直至有机溶剂残余量小于60ppm),接着用0.22 μ m水性微孔滤膜过滤除菌,制成白蛋白纳米粒组合物;

[0230] 额外地,将一半的组合物分装到玻璃瓶中,接着进行冷冻干燥以除去水分(至水分含量小于3%)。

[0231] 操作条件:步骤(1)和步骤(2)在45 $^{\circ}$ C的温度下使各物料溶解(0.5小时以内溶解);步骤(3)分散器以9000rpm下分散6min;步骤(4)在均质机中以15000psi的压力均质处理30min;步骤(5)蒸发是在40 $^{\circ}$ C的温度下减压至0.075Mpa旋转蒸发;在制得粗乳液以后的操作过程中随时监测pH值并在需要时调节至pH=6.8~7.2。

[0232] 实施例22:制备白蛋白纳米粒组合物

[0233] 配方:化合物1:100mg,人血白蛋白150mg。

[0234] 制法:

[0235] (1) 将处方量的白蛋白用水溶解,作为水相(白蛋白浓度6%);

[0236] (2) 式I化合物(三氯甲烷)溶解,作为油相(式(I)化合物浓度9%);

[0237] (3) 将水相与油相混合后,使用分散器分散制得粗乳液;

[0238] (4) 将粗乳液转入高压均质机中于均质直至均匀且微粒的平均粒径小于160nm;

[0239] (5) 在旋转蒸发器上旋蒸将残余的有机溶剂蒸发除去(直至有机溶剂残余量小于90ppm),接着用0.22 μ m水性微孔滤膜过滤除菌,制成白蛋白纳米粒组合物,

[0240] 额外地,将一半的组合物分装到玻璃瓶中,接着进行冷冻干燥以除去水分(至水分含量小于3%)。

[0241] 操作条件:步骤(1)和步骤(2)在50 $^{\circ}$ C的温度下使各物料溶解(0.5小时以内溶解);步骤(3)分散器以8500rpm下分散8min;步骤(4)在均质机中以10000psi的压力均质处理45min;步骤(5)蒸发是在45 $^{\circ}$ C的温度下减压至0.06Mpa旋转蒸发;在制得粗乳液以后的操作过程中随时监测pH值并在需要时调节至pH=6.9~7.3。

[0242] 实施例23:制备白蛋白纳米粒组合物

[0243] 配方:化合物1:100mg,人血白蛋白600mg。

[0244] 制法:

[0245] (1) 将处方量的白蛋白用水溶解,作为水相(白蛋白浓度9%);

[0246] (2) 式I化合物(三氯甲烷)溶解,作为油相(式(I)化合物浓度6%);

[0247] (3) 将水相与油相混合后,使用分散器分散制得粗乳液;

[0248] (4) 将粗乳液转入高压均质机中于均质直至均匀且微粒的平均粒径小于180nm;

[0249] (5) 在旋转蒸发器上旋蒸将残余的有机溶剂蒸发除去(直至有机溶剂残余量小于100ppm),接着用0.22 μ m水性微孔滤膜过滤除菌,制成白蛋白纳米粒组合物,

[0250] 额外地,将一半的组合物分装到玻璃瓶中,接着进行冷冻干燥以除去水分(至水分含量小于3%)。

[0251] 操作条件:步骤(1)和步骤(2)在40 $^{\circ}$ C的温度下使各物料溶解(0.5小时以内溶解);步骤(3)分散器以90000rpm下分散4min;步骤(4)在均质机中以20000psi的压力均质处理20min;步骤(5)蒸发是在35 $^{\circ}$ C的温度下减压至0.09Mpa旋转蒸发;在制得粗乳液以后的操作过程中随时监测pH值并在需要时调节至pH=7.1~7.5。

[0252] 实施例24:制备白蛋白纳米粒组合物

[0253] 配方:化合物1:100mg,重组人白蛋白200mg。

[0254] 制法:

[0255] (1) 将处方量的白蛋白用水溶解,作为水相(白蛋白浓度10%);

[0256] (2) 式I化合物(叔丁醇)溶解,作为油相(式(I)化合物浓度5%);

[0257] (3) 将水相与油相混合后,使用分散器分散制得粗乳液;

[0258] (4) 将粗乳液转入高压均质机中于均质直至均匀且微粒的平均粒径小于80nm;

[0259] (5) 在旋转蒸发器上旋蒸将残余的有机溶剂蒸发除去(直至有机溶剂残余量小于80ppm),接着用0.22 μ m水性微孔滤膜过滤除菌,制成白蛋白纳米粒组合物,

[0260] 额外地,将一半的组合物分装到玻璃瓶中,接着进行冷冻干燥以除去水分(至水分含量小于3%)。

[0261] 操作条件:步骤(1)和步骤(2)在45 $^{\circ}$ C的温度下使各物料溶解(0.5小时以内溶解);步骤(3)分散器以8000rpm下分散10min;步骤(4)在均质机中以12000psi的压力均质处理40min;步骤(5)蒸发是在40 $^{\circ}$ C的温度下减压至0.07Mpa旋转蒸发;在制得粗乳液以后的操作过程中随时监测pH值并在需要时调节至pH=6.7~7.1。

[0262] 实施例25:制备白蛋白纳米粒组合物

[0263] 配方:化合物1:100mg,牛血白蛋白500mg。

[0264] 制法:

[0265] (1) 将处方量的白蛋白用水溶解,作为水相(白蛋白浓度5%);

[0266] (2) 式I化合物(二氯甲烷)溶解,作为油相(式(I)化合物浓度10%);

[0267] (3) 将水相与油相混合后,使用分散器分散制得粗乳液;

[0268] (4) 将粗乳液转入高压均质机中于均质直至均匀且微粒的平均粒径小于60nm;

[0269] (5) 在旋转蒸发器上旋蒸将残余的有机溶剂蒸发除去(直至有机溶剂残余量小于50ppm),接着用0.22 μ m水性微孔滤膜过滤除菌,制成白蛋白纳米粒组合物,

[0270] 额外地,将一半的组合物分装到玻璃瓶中,接着进行冷冻干燥以除去水分(至水分含量小于3%)。

[0271] 操作条件:步骤(1)和步骤(2)在45 $^{\circ}$ C的温度下使各物料溶解(0.5小时以内溶解);步骤(3)分散器以10000rpm下分散2min;步骤(4)在均质机中以18000psi的压力均质处理25min;步骤(5)蒸发是在40 $^{\circ}$ C的温度下减压至0.08Mpa旋转蒸发;在制得粗乳液以后的操作过程中随时监测pH值并在需要时调节至pH=6.5~6.8。

[0272] 实施例26:制备白蛋白纳米粒组合物

[0273] 配方:化合物1:100mg,人血白蛋白400mg,胆固醇4mg。

[0274] 制法:

[0275] (1) 将处方量的白蛋白用水溶解,作为水相(白蛋白浓度7.5%);

[0276] (2) 将处方量的式(I)化合物和胆固醇用有机溶剂(三氯甲烷)溶解,作为油相(式(I)化合物浓度7.5%);

[0277] (3) 将水相与油相混合后,使用分散器分散制得粗乳液;

[0278] (4) 将粗乳液转入高压均质机中于均质直至均匀且微粒的平均粒径小于100nm;

[0279] (5) 在旋转蒸发器上旋蒸将残余的有机溶剂蒸发除去(直至有机溶剂残余量小于60ppm),接着用0.22 μ m水性微孔滤膜过滤除菌,制成白蛋白纳米粒组合物;

[0280] 额外地,将一半的组合物加入甘露醇(100mg/100mg式(I)化合物),分装到玻璃瓶中,接着进行冷冻干燥以除去水分(至水分含量小于3%)。

[0281] 操作条件:步骤(1)和步骤(2)在45 $^{\circ}$ C的温度下使各物料溶解(0.5小时以内溶解);步骤(3)分散器以9000rpm下分散6min;步骤(4)在均质机中以15000psi的压力均质处理30min;步骤(5)蒸发是在40 $^{\circ}$ C的温度下减压至0.075Mpa旋转蒸发;在制得粗乳液以后的操作过程中随时监测pH值并在需要时调节至pH=6.8~7.2。

[0282] 实施例27:制备白蛋白纳米粒组合物

[0283] 配方:化合物1:100mg,人血白蛋白150mg,胆固醇5mg,PEG4000-DSPE 10mg。

[0284] 制法:

[0285] (1) 将处方量的白蛋白用水溶解,作为水相(白蛋白浓度6%);

[0286] (2) 将处方量的式(I)化合物、胆固醇、PEG4000-DSPE用有机溶剂(三氯甲烷)溶解,作为油相(式(I)化合物浓度9%);

[0287] (3) 将水相与油相混合后,使用分散器分散制得粗乳液;

[0288] (4) 将粗乳液转入高压均质机中于均质直至均匀且微粒的平均粒径小于160nm;

[0289] (5) 在旋转蒸发器上旋蒸将残余的有机溶剂蒸发除去(直至有机溶剂残余量小于90ppm),接着用0.22 μ m水性微孔滤膜过滤除菌,制成白蛋白纳米粒组合物,

[0290] 额外地,将一半的组合物加入乳糖(50mg/100mg式(I)化合物),分装到玻璃瓶中,接着进行冷冻干燥以除去水分(至水分含量小于3%)。

[0291] 操作条件:步骤(1)和步骤(2)在50 $^{\circ}$ C的温度下使各物料溶解(0.5小时以内溶解);步骤(3)分散器以8500rpm下分散8min;步骤(4)在均质机中以10000psi的压力均质处理45min;步骤(5)蒸发是在45 $^{\circ}$ C的温度下减压至0.06Mpa旋转蒸发;在制得粗乳液以后的操作过程中随时监测pH值并在需要时调节至pH=6.9~7.3。

[0292] 实施例28:制备白蛋白纳米粒组合物

[0293] 配方:化合物1:100mg,人血白蛋白800mg,胆固醇2mg,PEG2000-DSPE 5mg,PC 8mg。

[0294] 制法:

[0295] (1) 将处方量的白蛋白用水溶解,作为水相(白蛋白浓度9%);

[0296] (2) 将处方量的式(I)化合物、胆固醇、PEG2000-DSPE、PC用有机溶剂(三氯甲烷)溶解,作为油相(式(I)化合物浓度6%);

[0297] (3) 将水相与油相混合后,使用分散器分散制得粗乳液;

[0298] (4) 将粗乳液转入高压均质机中于均质直至均匀且微粒的平均粒径小于180nm;

[0299] (5) 在旋转蒸发器上旋蒸将残余的有机溶剂蒸发除去(直至有机溶剂残余量小于100ppm),接着用0.22 μ m水性微孔滤膜过滤除菌,制成白蛋白纳米粒组合物(其可称为实施例28a白蛋白纳米粒组合物),

[0300] 额外地,将一半的组合物加入乳糖(50mg/100mg式(I)化合物),分装到玻璃瓶中,接着进行冷冻干燥以除去水分(至水分含量小于3%)。

[0301] 操作条件:步骤(1)和步骤(2)在40 $^{\circ}$ C的温度下使各物料溶解(0.5小时以内溶解);步骤(3)分散器以90000rpm下分散4min;步骤(4)在均质机中以20000psi的压力均质处理20min;步骤(5)蒸发是在35 $^{\circ}$ C的温度下减压至0.09Mpa旋转蒸发;在制得粗乳液以后的操作过程中随时监测pH值并在需要时调节至pH=7.1~7.5。

[0302] 继续本实施例28,参照上述配方和制法,不同的仅是将所用人血白蛋白由800mg改为1000mg和1500mg,得到2批白蛋白纳米粒组合物可分别称为实施例28b和实施例28c,由此本实施例28共制得3批白蛋白纳米粒组合物。

[0303] 实施例29:制备白蛋白纳米粒组合物

[0304] 配方:化合物1:100mg,重组人白蛋白200mg,PEG5000-DSPE 8mg,磷脂酰甘油(PG) 4mg。

[0305] 制法:

[0306] (1) 将处方量的白蛋白用水溶解,作为水相(白蛋白浓度10%);

[0307] (2) 将处方量的式(I)化合物、PEG5000-DSPE、磷脂酰甘油(PG)用有机溶剂(叔丁醇)溶解,作为油相(式(I)化合物浓度5%);

[0308] (3) 将水相与油相混合后,使用分散器分散制得粗乳液;

[0309] (4) 将粗乳液转入高压均质机中于均质直至均匀且微粒的平均粒径小于80nm;

[0310] (5) 在旋转蒸发器上旋蒸将残余的有机溶剂蒸发除去(直至有机溶剂残余量小于80ppm),接着用0.22 μ m水性微孔滤膜过滤除菌,制成白蛋白纳米粒组合物,

[0311] 额外地,将一半的组合物分装到玻璃瓶中,接着进行冷冻干燥以除去水分(至水分含量小于3%)。

[0312] 操作条件:步骤(1)和步骤(2)在45 $^{\circ}$ C的温度下使各物料溶解(0.5小时以内溶解);步骤(3)分散器以8000rpm下分散10min;步骤(4)在均质机中以12000psi的压力均质处理40min;步骤(5)蒸发是在40 $^{\circ}$ C的温度下减压至0.07Mpa旋转蒸发;在制得粗乳液以后的操作过程中随时监测pH值并在需要时调节至pH=6.7~7.1。

[0313] 实施例30:制备白蛋白纳米粒组合物

[0314] 配方:化合物1:100mg,牛血清白蛋白500mg,胆固醇4mg,卵磷脂6mg,磷脂酰乙醇胺(PE) 6mg。

[0315] 制法:

[0316] (1) 将处方量的白蛋白用水溶解,作为水相(白蛋白浓度5%);

[0317] (2) 将处方量的式(I)化合物、胆固醇、卵磷脂、磷脂酰乙醇胺(PE),用有机溶剂(二氯甲烷)溶解,作为油相(式(I)化合物浓度10%);

[0318] (3) 将水相与油相混合后,使用分散器分散制得粗乳液;

[0319] (4) 将粗乳液转入高压均质机中于均质直至均匀且微粒的平均粒径小于60nm;

[0320] (5) 在旋转蒸发器上旋蒸将残余的有机溶剂蒸发除去(直至有机溶剂残余量小于50ppm),接着用0.22 μ m水性微孔滤膜过滤除菌,制成白蛋白纳米粒组合物,

[0321] 额外地,将一半的组合物分装到玻璃瓶中,接着进行冷冻干燥以除去水分(至水分含量小于3%)。

[0322] 操作条件:步骤(1)和步骤(2)在45 $^{\circ}$ C的温度下使各物料溶解(0.5小时以内溶解);步骤(3)分散器以10000rpm下分散2min;步骤(4)在均质机中以18000psi的压力均质处理25min;步骤(5)蒸发是在40 $^{\circ}$ C的温度下减压至0.08Mpa旋转蒸发;在制得粗乳液以后的操作过程中随时监测pH值并在需要时调节至pH=6.5~6.8。

[0323] 实施例31:制备白蛋白纳米粒组合物

[0324] 分别参照实施例21的配方和制法,不同的仅是将其中的活性药物分别改为实施例2~实施例12所得化合物2~化合物12,制备得到11种白蛋白纳米粒组合物。

[0325] 实施例32:制备白蛋白纳米粒组合物

[0326] 分别参照实施例21~实施例31的配方和制法制备白蛋白纳米粒组合物,不同的仅是在参照实施例21~实施例23时分别随式(I)化合物一起添加10mg辛酸(相对于每100重量份的式(I)化合物而言,下同);在参照实施例24~实施例25时分别随式(I)化合物一起添加2mg辛酸;在参照实施例26~实施例27时分别随式(I)化合物一起添加20mg辛酸;在参照实施例28~实施例30时分别随式(I)化合物一起添加10mg己酸、10mg癸酸、10mg月桂酸;在参照实施例31时分别随式(I)化合物一起添加10mg辛酸。

[0327] 实施例33:制备白蛋白纳米粒组合物

[0328] 分别参照实施例21~实施例31的配方和制法制备白蛋白纳米粒组合物,不同的仅是在参照实施例21~实施例23时分别随式(I)化合物一起添加10mg辛酸(相对于每100重量份的式(I)化合物而言,下同)且分别随白蛋白一起添加35mg海藻糖(相对于每100重量份的式(I)化合物而言,下同);在参照实施例24~实施例25时分别随式(I)化合物一起添加2mg辛酸且分别随白蛋白一起添加50mg海藻糖;在参照实施例26~实施例27时分别随式(I)化合物一起添加20mg辛酸且分别随白蛋白一起添加20mg海藻糖;在参照实施例28~实施例30时分别随式(I)化合物一起添加10mg己酸、10mg癸酸、10mg月桂酸且分别随白蛋白一起添加35mg海藻糖;在参照实施例31时分别随式(I)化合物一起添加10mg辛酸且分别随白蛋白一起添加35mg海藻糖。

[0329] 试验例1:纳米粒的粒子形态、粒径和表面电位

[0330] 利用扫描电子显微镜,观察白蛋白纳米粒的粒子形态。

[0331] 使用马尔文Zetasizer Nano ZS纳米粒度电位仪测定白蛋白纳米粒的粒径,并对数据进行统计。各实施例步骤(5)所得水悬液必要时用蒸馏水稀释,步骤(5)所得冷冻干燥粉针剂用蒸馏水分散必要时稀释(通常分散/稀释至式(I)化合物浓度为1mg/ml即可),再进行测定。测定各种样品的粒度及其分布,包括平均粒径、D10、D50、和D90等参数,计算Span值;另外还测定白蛋白纳米粒的表面电位(zeta电位)。

[0332] 典型的,实施例21所得白蛋白纳米粒组合物(步骤(5)所得混悬液)的粒子形态结果与CN 109730998A之图1基本相同,粒径测量结果见本发明图1,zeta电位测量结果见本发明图2,步骤(5)所得冷冻干燥品用蒸馏水复溶后所得混悬液的粒子形态、粒度分布、zeta电位测量结果与上述三图基本相同。实施例22~实施例33所得全部白蛋白纳米粒组合物(包

括步骤(5)所得混悬液、以及经冷冻干燥品用蒸馏水复溶后所得混悬液)的粒子形态、粒度分布、zeta电位测量结果与上述三图基本相同。

[0333] 具体的结果如下:实施例21所得白蛋白纳米粒组合物悬液的平均粒径为72.3nm, 电位约-24.2mv, Span值为1.72;实施例21所得冷冻干燥粉的平均粒径为69.5nm, 电位约-24.6mv, Span值为1.68;实施例22~实施例33所得全部白蛋白纳米粒组合物悬液和冷冻干燥粉的电位均在-16~-28mv的较低范围内, 表明它们将具有较稳定的电位势;并且同一实例所得悬液和冷冻干燥粉之间的电位值几乎相同, 表明冷冻干燥对本发明纳米粒组合物的电位值无影响;实施例22~实施例33所得全部白蛋白纳米粒组合物悬液和冷冻干燥粉的平均粒径均在58~187nm范围内, Span值均在1.35~2.13范围内;并且同一实例所得悬液和冷冻干燥粉之间的平均粒径和Span值几乎相同, 表明冷冻干燥对本发明纳米粒组合物的粒度无影响。

[0334] 使实施例21~实施例33所得全部白蛋白纳米粒组合物悬液置室温放置6个月, 测定6月时的zeta电位和粒度分布, 比较每一试样6月与该试样0月结果的差异, 结果:全部试样的zeta电位未出现变化;全部试样的平均粒径均稍有增加但均未超过240nm, 各组间未显示变化的差异;不同试样的Span值呈现明显不同程度的增加, 实施例21~实施例32所得全部白蛋白纳米粒组合物悬液的Span增加百分数在153~188%范围内(例如实施例21的Span增加百分数为167.3%), 实施例33所得全部白蛋白纳米粒组合物悬液的Span增加百分数在17~28%范围内(例如实施例33参照实施例21时的Span增加百分数为22.6%)。

[0335] 使实施例21~实施例33所得全部白蛋白纳米粒组合物冷冻干燥粉置40℃放置6个月, 测定6月时的zeta电位和粒度分布, 比较每一试样6月与该试样0月结果的差异, 结果:全部试样的zeta电位未出现变化;全部试样的平均粒径均稍有增加但均未超过250nm, 各组间未显示变化的差异;不同试样的Span值呈现明显不同程度的增加, 实施例21~实施例32所得全部白蛋白纳米粒组合物冷冻干燥粉的Span增加百分数在172~208%范围内(例如实施例21的Span增加百分数为193.6%), 实施例33所得全部白蛋白纳米粒组合物冷冻干燥粉的Span增加百分数在26~35%范围内(例如实施例33参照实施例21时的Span增加百分数为28.4%)。

[0336] 可见, 实施例33所得纳米粒在粒度分布稳定性方面显著优于其它实例的纳米粒; 尽管实施例21~实施例32纳米粒在临床应用上尚可接受, 然而从稳定性角度讲, 实施例33纳米粒是优选的。在本文中, Span增加百分数的计算式为:Span增加百分数=[(6月Span值-0月Span值)÷0月Span值]×100%。

[0337] 另外, 与本发明人的CN 109730998A案数据相比, 中链脂肪酸的添加并不能维系纳米粒的粒度分布稳定性, 而在此基础上添加适宜量的海藻糖时能够赋予纳米粒的粒度分布稳定性。这种结果差异可能是由于本发明与上述文献所涉及的活性物质化学结构及其理化性质方面的差异造成的, 文献是铂络合物。因此, 在本发明任一方面中, 在制备纳米粒组合物时, 随白蛋白一起还增补添加(相对于每100重量份式I化合物计的)20~50mg海藻糖。

[0338] 试验例2:白蛋白纳米粒中式(I)化合物的含量测定方法

[0339] 使用高效液相色谱法(参照中国药典2015年版二部922页左栏<含量测定>项下的方法)测定式(I)化合物白蛋白纳米粒的活性成分含量, 方法学能够满足本领域的一般要求。

[0340] 经测定,本发明实施例21~33全部白蛋白纳米粒组合物的混悬液或其冻干品中式(I)化合物含量均在理论投料量的97~101%范围内,表明本发明制备纳米粒组合物的过程中基本没有活性成分的损失。

[0341] 使实施例21~实施例33所得全部白蛋白纳米粒组合物悬液置室温放置6个月,使实施例21~实施例33所得全部白蛋白纳米粒组合物冷冻干燥粉置40℃放置6个月,测定这些混悬液或冷冻干燥粉在0月时以及6月时的式(I)化合物含量,对于每一试样,以其6月含量除以0月含量再乘以100%所得百分数,作为在此6月处置后的式(I)化合物残余百分数,结果:实施例21~实施例33所得全部混悬液的式(I)化合物残余百分数均在97~99%范围内,实施例21~实施例33所得全部冷冻干燥粉的式(I)化合物残余百分数均在97~100%范围内,表明本发明各种组合物呈现优异的活性成分化学稳定性。

[0342] 试验例3:白蛋白纳米粒组合物的性质考察

[0343] 实施例21~实施例33所得全部白蛋白纳米粒组合物悬液和冷冻干燥粉,将其用0.9%氯化钠溶液分散均匀至式(I)化合物浓度为1mg/ml时,pH值均在6.7~7.3范围内。实施例21~实施例33所得全部白蛋白纳米粒组合物冷冻干燥粉,其照水分测定法(中国药典2015年版四部附录第103页第0832节第一法A)测定,水分含量均在1.6~2.3%范围内。实施例21~实施例33所得全部白蛋白纳米粒组合物冷冻干燥粉,其加入0.9%氯化钠溶液使式(I)化合物浓度为1mg/ml时的量,轻轻振摇,均在4~7分钟内显示完全分散均匀,并且无未分散的固体物。实施例21~实施例33所得全部白蛋白纳米粒组合物悬液和冷冻干燥粉,用0.9%氯化钠溶液分散均匀至式(I)化合物浓度为1mg/ml后,用中国药典2005年版二部附录IX C显微计数法测定,每100mg式(I)化合物白蛋白纳米粒组合物中含10 μ m以上的微粒少于100粒,含25 μ m以上的微粒少于10粒。

[0344] 实验例4、抗肿瘤活性

[0345] 参考CN 109998996A(中国专利申请号201910369077.9)“实施例32、脂质组合物的抗肿瘤活性”的方法考察本发明白蛋白纳米粒组合物的抗肿瘤活性,考察各组合物实施例所得呈液体状态的白蛋白纳米粒组合物。在某一肿瘤细胞的测试中,某化学物质在实施例21~33中所得组合物的IC₅₀(μ M)值除以该化学物质IC₅₀(μ M)值再乘以100%所得百分数,作为该组合物的相对抑制百分数(%),该相对抑制百分数(%)值越小表示半数抑制浓度越小,表示纳米粒组合物相对于其原化合物而言抑制肿瘤细胞的活性越强,例如实施例21制得的化合物1组合物对AsPC-1的IC₅₀值除以化合物1对该肿瘤细胞的IC₅₀值再乘以100%所得百分数,即为实施例21所得化合物1组合物的相对抑制百分数(%)。结果显示,对AsPC-1细胞:参照实施例21方法制得的吉西他滨纳米粒组合物的相对抑制百分数为73.8%;实施例21~33所得各种纳米粒组合物的相对抑制百分数均在4.74~8.53%范围内,例如实施例21所得组合物的相对抑制百分数为6.13%;对SU.86.86细胞:参照实施例21方法制得的吉西他滨纳米粒组合物的相对抑制百分数为85.2%;实施例21~33所得各种纳米粒组合物的相对抑制百分数均在3.57~8.45%范围内,例如实施例21所得组合物的相对抑制百分数为7.74%。上述结果表明,采用本发明组合物体系无法显著降低吉西他滨的IC₅₀值即无法显著提高抑制肿瘤细胞的效果,采用本发明组合物体系能够显著降低化合物1~12这类吉西他滨双酯的IC₅₀值即能够显著提高抑制肿瘤细胞的效果。换言之,本发明组合物体系能够显著降低本发明吉西他滨双酯的IC₅₀值即能够显著提高抑制肿瘤细胞的效果,但是令人意

外的发现是,此类组合物体系无法有效提高吉西他滨及其单酯物质的抑制肿瘤细胞的效果,表明本发明组合物体系能够显著提高本发明吉西他滨双酯化合物的抗肿瘤活性。本发明组合物体系能够显著提高双酯化合物抑制肿瘤细胞的效果,却无法有效提高吉西他滨本身及其单酯,这是现有技术根本无法预见的。

[0346] 对于本领域技术人员而言,显然本发明不限于上述示范性实施例的细节,而且在不背离本发明的精神或基本特征的情况下,能够以其他的具体形式实现本发明。因此,无论从哪一点来看,均应将实施例看作是示范性的,而且是非限制性的,本发明的范围由所附权利要求而不是上述说明限定,因此旨在将落在权利要求的等同要件的含义和范围内的所有变化囊括在本发明内。

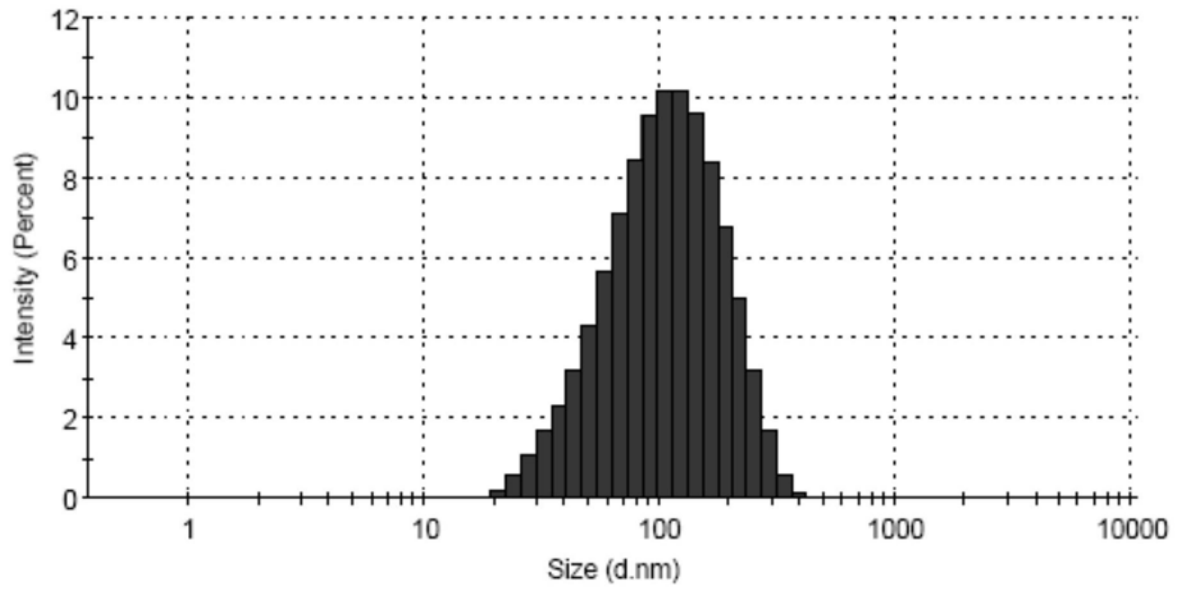


图1

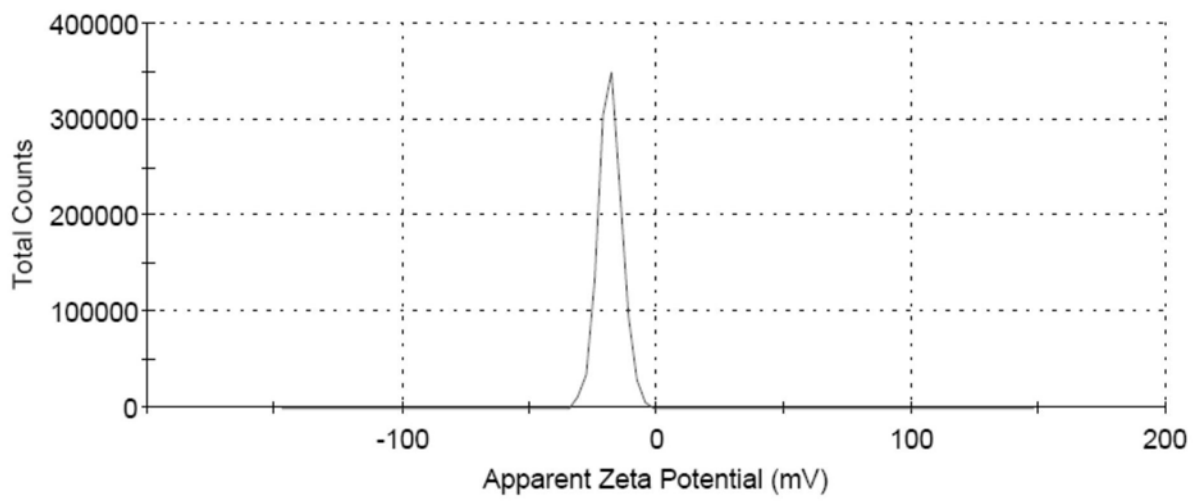


图2