



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117547535 A

(43) 申请公布日 2024. 02. 13

(21) 申请号 202311513706.3

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2022.10.12

A61K 31/4745 (2006.01)

(66) 本国优先权数据

A61K 47/42 (2017.01)

202111202739.7 2021.10.15 CN

A61K 47/22 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

A61K 47/28 (2006.01)

202280025871.1 2022.10.12

A61P 35/00 (2006.01)

(71) 申请人 昆山新蕴达生物科技有限公司

地址 215300 江苏省苏州市昆山市玉山镇

元丰路168号6号房生物楼301

(72) 发明人 柯天一 檀琳 温佰刚 劳芳

刘岩 王宁霞 居尚 崔冬雪

杜旭召 欧阳芳幸

(74) 专利代理机构 北京永新同创知识产权代理

有限公司 11376

专利代理师 郭晓永 崔依同

权利要求书4页 说明书67页 附图16页

(54) 发明名称

包含抗肿瘤药物的组合物及其制备方法和用途

(57) 摘要

本申请涉及包含抗肿瘤药物的组合物及其制备方法和用途,具体地涉及包含7-乙基-10-羟基喜树碱的组合物及其制备方法和用途,所述组合物包含SN-38、脂质、白蛋白和Span 20。

1. 组合物,其包含SN-38、脂质、白蛋白和Span 20,其特征在于,所述组合物包含纳米粒子,其中在所述纳米粒子中,所述白蛋白包封至少部分所述SN-38和任选的至少部分所述脂质;并且

其中:

脂质:SN-38为(0.8-1.8):1(w:w)、(0.9-1.7):1(w:w)、(1-1.4):1、或(1-1.2):1(w:w);

白蛋白:SN-38为(9-21):1(w:w)、(11-18):1(w:w)、(11-17.5):1(w:w)、或(11.1-17.3):1(w:w);以及

Span 20:SN-38为(3-12):100(w:w)、(4-10):100(w:w)、或(7-9):100(w:w);并且

所述脂质为胆固醇。

2. 权利要求1的组合物,其特征在于,白蛋白:脂质为(6-21):1(w:w)、(6.7-13):1(w:w)、或(11-13):1(w:w)。

3. 权利要求1或2的组合物,其特征在于,以所述组合物中的SN-38、脂质和白蛋白的总量计,

所述SN-38的含量为4w/w%至9w/w%;和/或

所述脂质的含量为4w/w%至12.5w/w%;和/或

所述白蛋白的含量为79w/w%至92w/w%;

或者,

所述SN-38的含量为4.5w/w%、5w/w%、6w/w%、6.5w/w%、7w/w%、7.5w/w%、8w/w%、或8.5w/w%;和/或

所述脂质的含量为4.5w/w%、5w/w%、6w/w%、7w/w%、7.5w/w%、8w/w%、8.5w/w%、9w/w%、9.5w/w%、10w/w%、10.5w/w%、11w/w%、11.5w/w%、或12w/w%;和/或

所述白蛋白的含量为80w/w%、81w/w%、82w/w%、83w/w%、84w/w%、84.5w/w%、85w/w%、86w/w%、87w/w%、87.5w/w%、88w/w%、89w/w%、90w/w%、91w/w%、或91.5w/w%;和/或

以所述组合物中的SN-38、脂质、白蛋白和Span 20的总量计,Span 20的含量为0.14w/w%至1w/w%、0.2w/w%、0.22w/w%、0.24w/w%、0.26w/w%、0.28w/w%、0.3w/w%、0.32w/w%、0.34w/w%、0.36w/w%、0.38w/w%、0.4w/w%、0.42w/w%、0.44w/w%、0.46w/w%、0.48w/w%、0.5w/w%、0.52w/w%、0.54w/w%、0.56w/w%、约0.58w/w%、0.6w/w%、0.65w/w%、或0.8w/w%。

4. 权利要求1至3中任一项的组合物,其特征在于,

脂质:SN-38为1.2:1;和/或

白蛋白:SN-38为(12.5-15):1(w:w);和/或

Span 20:SN-38为7:100(w:w);和/或

白蛋白:脂质为(11-12.7):1(w:w)。

5. 权利要求1至4中任一项的组合物,其特征在于,以所述组合物中的SN-38、脂质和白蛋白的总量计,所述SN-38的含量为6w/w%至6.5w/w%、6w/w%、或6.5w/w%;和/或

所述组合物中的脂质的含量为7w/w%至7.5w/w%、7w/w%、或7.5w/w%;和/或

所述组合物中的白蛋白的含量为86w/w%至87w/w%;

和/或

以所述组合物中的SN-38、脂质、白蛋白和Span 20的总量计,Span 20的含量为0.42w/w%至0.44w/w%。

6.权利要求1至5中任一项的组合物,其特征在于,存在于所述纳米粒子中的SN-38占所述组合物中的SN-38、胆固醇和白蛋白的总量的至少3w/w%,例如3w/w%至13w/w%,4w/w%至12w/w%,4w/w%、5w/w%、6w/w%、7w/w%、8w/w%、9w/w%、10w/w%或11w/w%。

7.权利要求1至6中任一项的组合物,其特征在于,白蛋白:胆固醇为(11-12):1(w:w)。

8.权利要求1至7中任一项的组合物,其特征在于,

存在于所述纳米粒子中的SN-38占所述组合物中的SN-38、胆固醇和白蛋白的总量的至少6w/w%至12w/w%,例如7w/w%至11w/w%、8w/w%至10w/w%、8.3%或9w/w%;和/或

存在于所述纳米粒子中的SN-38占所述组合物中的SN-38的总量的95w/w%至99w/w%,例如96w/w%至99w/w%,97w/w%至99w/w%、98w/w%至99w/w%,99w/w%或更高。

9.权利要求1至8中任一项的组合物,其特征在于,所述组合物为液体、半固体或固体形式;

任选地,所述固体形式为粉末形式,优选为冻干粉;更优选地,SN-38以无定形和/或纳米晶体的形式存在于固体形式的所述组合物中。

10.权利要求1至9中任一项的组合物,其特征在于,所述组合物不包含额外的稳定剂;或者

优选地,所述组合物还包含额外的稳定剂,例如冻干稳定剂,所述额外的稳定剂的量使得当所述组合物通过复溶形成水性组合物时,所述额外的稳定剂的含量为至少2w/v%,例如至少3w/v%,例如至少5w/v%,5w/v%至30w/v%,10w/v%至25w/v%或15w/v%至20w/v%;和/或

以所述组合物的总量计,所述额外的稳定剂的含量为85w/w%至95w/w%,90w/w%或91w/w%;

和/或

所述额外的稳定剂选自:单糖、二糖、多糖、甘露醇及其任意组合;优选地选自:甘露醇、乳糖、麦芽糖、海藻糖、右旋糖苷、葡萄糖和蔗糖及其任意组合;优选为蔗糖。

11.权利要求1至10中任一项的组合物,其特征在于,所述组合物中开环的SN-38占SN-38总量的2w/w%或更低,例如1.8w/w%或更低;和/或

所述组合物中不存在或基本不存在白蛋白多聚体;例如,所述组合物中单体形式的白蛋白占白蛋白总量的至少95w/w%,例如至少96%,至少98%,至少99%,至少99.2%,至少99.4%,或者至少99.5%。

12.权利要求1至11中任一项的组合物,其特征在于,所述白蛋白选自:人血清白蛋白(HSA)、重组人白蛋白(rHA)、牛血清白蛋白和猪血清白蛋白;例如,所述白蛋白包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列;

优选地,所述白蛋白选自人血清白蛋白(HSA)和重组人白蛋白(rHA)。

13.制备权利要求1至12中任一项所述的组合物的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

(1)将所述SN-38、所述脂质和Span 20溶解于有机溶剂中形成有机相;以及制备白蛋白的水溶液以作为水相;

(2) 将所述有机相和所述水相混合以形成乳液,所述乳液包含所述纳米粒子,其中在所述纳米粒子中,所述白蛋白包封至少部分所述SN-38和任选的至少部分所述脂质;

(3) 去除所述乳液中的有机溶剂以得到包含所述纳米粒子的产物;

优选地,所述方法包括以下步骤:

(1) 用包含 C_{1-3} 醇的第一有机溶剂和选自 $CHCl_3$ 及 CH_2Cl_2 和 $CHCl_3$ 的混合物的第二有机溶剂的混合有机溶剂溶解所述SN-38、所述脂质和Span 20以形成有机相,其中在所述混合有机溶剂中,所述第二有机溶剂与所述 C_{1-3} 醇的体积比为1:20(v/v)至20:1(v/v),例如1:5至5:1(v/v),1:2至4:1(v/v),1:1至4:1(v/v),1.5:1(v/v)至3:1(v/v)或2:1(v/v)至7:3(v/v);以及制备白蛋白的水溶液以作为水相;

(2) 将所述有机相与所述水相混合以制备乳液,所述乳液包含所述纳米粒子,其中在所述纳米粒子中,所述白蛋白包封至少部分所述SN-38和任选的至少部分所述脂质;

(3) 除去所述有机溶剂;

(4) 任选地,将步骤(3)中得到的产物灭菌,优选通过0.2 μ m的滤膜过滤来除菌;

优选地,其中所述 C_{1-3} 醇为乙醇,和/或所述第二有机溶剂是 CH_2Cl_2 和 $CHCl_3$ 的混合物,其中优选地,所述混合物中 CH_2Cl_2 和 $CHCl_3$ 的体积比为2:5-1:1,优选为2:5。

14. 权利要求13的方法,其特征在于,在步骤(2)中,所述有机相:所述水相为1:2(v/v)至1:50(v/v),例如1:5(v/v)至1:20(v/v),1:7(v/v)至1:15(v/v),1:10(v/v)至1:12(v/v);例如1:5(v/v)至1:12(v/v),1:5(v/v)至1:12(v/v),1:6(v/v)、1:7(v/v)或1:10(v/v)。

15. 药物组合物,其包含权利要求1至12中任一项的组合物以及任选存在的药学上可接受的载体。

16. 权利要求1至12中任一项的组合物或者权利要求15的药物组合物在制备用于治疗个体的对SN-38敏感的肿瘤的药物中的用途;优选地,所述肿瘤选自结直肠癌、小细胞肺癌、淋巴瘤、乳腺癌(优选三阴性乳腺癌)、食管癌、胃癌、肝癌、肾癌、胰腺癌、子宫癌和卵巢癌。

17. 制备具有改善的性质的组合物的方法,其中所述组合物包含SN-38、脂质和白蛋白,并且所述白蛋白包封至少部分所述SN-38和任选的至少部分所述脂质以形成纳米粒子,

所述方法的特征在于在制备所述组合物的过程中加入Span 20;

其中任选地,所述组合物不包含额外的稳定剂;和/或

其中任选地,所述改善的性质包括提高的稳定性,例如当所述组合物为液体形式时,所述提高的稳定性包括:在所述组合物的制备、储存和/或使用中,减少的白蛋白多聚体的产生或含量(例如所述组合物中不存在或基本不存在白蛋白多聚体,或者白蛋白多聚体占白蛋白总量至多5w/w%,例如至多4%、至多2%、至多1.5%、至多1.2%、至多1.1%、至多1%、或至多0.8%),和/或降低的纳米粒子粒径;并且

其中所述组合物如权利要求1至12中任一项所定义;

优选地,所述方法包括以下步骤:

(1) 将所述SN-38、所述脂质和Span 20溶解于有机溶剂中形成有机相;以及制备白蛋白的水溶液以作为水相;

(2) 将所述有机相和所述水相混合以形成乳液,所述乳液包含所述纳米粒子,其中在所述纳米粒子中,所述白蛋白包封至少部分所述SN-38和任选的至少部分所述脂质;

(3) 去除所述乳液中的有机溶剂以得到包含所述纳米粒子的产物;

更优选地,所述方法包括以下步骤:

(1) 用包含 C_{1-3} 醇的第一有机溶剂和选自 $CHCl_3$ 及 CH_2Cl_2 和 $CHCl_3$ 的混合物的第二有机溶剂的混合有机溶剂溶解所述SN-38、所述脂质和Span 20以形成有机相,其中在所述混合有机溶剂中,所述第二有机溶剂与所述 C_{1-3} 醇的体积比为1:20 (v/v) 至20:1 (v/v),例如1:5至5:1 (v/v), 1:2至4:1 (v/v), 1:1至4:1 (v/v), 1.5:1 (v/v) 至3:1 (v/v) 或2:1 (v/v) 至7:3 (v/v);以及制备白蛋白的水溶液以作为水相;

(2) 将所述有机相与所述水相混合以制备乳液,所述乳液包含所述纳米粒子,其中在所述纳米粒子中,所述白蛋白包封至少部分所述SN-38和任选的至少部分所述脂质;

(3) 除去所述有机溶剂;

(4) 任选地,将步骤(3)中得到的产物灭菌,优选通过0.2 μ m的滤膜过滤来除菌;

优选地,其中所述 C_{1-3} 醇为乙醇,和/或所述第二有机溶剂是 CH_2Cl_2 和 $CHCl_3$ 的混合物,其中优选地,所述混合物中 CH_2Cl_2 和 $CHCl_3$ 的体积比为2:5-1:1,优选为2:5。

包含抗肿瘤药物的组合物及其制备方法和用途

[0001] 本申请是2022年10月12日提交的发明名称为“包含抗肿瘤药物的组合物及其制备方法和用途”中国专利申请202280025871.1的分案申请。

技术领域

[0002] 本申请涉及7-乙基-10-羟基喜树碱(SN-38)的组合物,其包含SN-38、脂质、白蛋白和Span 20,还涉及其制备方法和用途。

背景技术

[0003] SN-38是已上市药物盐酸伊立替康(CPT-11)在体内的活性代谢物,其对某些肿瘤细胞的效力大约是CPT-11的100-1000倍(Zhang J A,Xuan T,Parmar M,et al.Development and characterization of a novel liposome-based formulation of SN-38,[J].International journal of pharmaceutics,2004,270(1):93-107)。SN-38对多种肿瘤细胞均有抑制作用,如结直肠癌、小细胞肺癌、淋巴瘤、乳腺癌、食管癌、子宫癌、卵巢癌等。然而,CPT-11在体内转化为SN-38的效率很低,仅为2-8%(Rowinsky E K,Grochow L B,Ettinger D S,et al.Phase I and pharmacological study of the novel topoisomerase I inhibitor CPT-11administered as a ninety-minute infusion every 3weeks,[J].Cancer research,1994,54(2):427-436)。

[0004] 有研究表明SN-38闭合的内酯环结构是其发挥抗癌活性的有效成份,但该闭环结构的SN-38在大部分生物相容和药剂学上可接受的溶剂中都很难溶解,成药性差。上述因素大大限制了其发展及临床应用。目前为止,还没有一个SN-38作为活性成分的药物制剂获得上市批准。

[0005] 因此,目前仍迫切需要解决SN-38的可溶性和成药性的问题。为了解决SN-38的可溶性问题,有的研究致力于对SN-38进行结构修饰。所述修饰又可分为水溶性修饰和脂溶性修饰,前者可见于例如W01995022549A1,后者可见于例如US20060229359A等。脂溶性修饰的方式一般涉及将SN-38制备成为脂质体,其制备过程一般包括用长链脂肪酸或者胆固醇、维生素E、亲脂性有机酸等疏水性分子修饰喜树碱分子,然后与一定比例的磷脂、胆固醇等辅料制备成喜树碱-脂质体产品。CN108567742A未进行SN-38疏水性修饰,而是通过改进辅料来获得喜树碱-脂质体产品。上述这些报道的产物中均不含白蛋白,而是通过脂质修饰使得喜树碱能够维持更多比例的闭环活性结构,从而在进入体内后能够被白蛋白包载,从而延长药效。

[0006] 另外,SN-38与紫杉醇类药物相比,由于其更特殊的理化特性,如更易在水中结晶、表面携带正电荷等,制剂制备工艺的的稳定和工艺的放大一直是其成药的痛点。

[0007] 无论是水溶性还是脂溶性修饰/脂质体制备,制备获得的纳米脂质体、纳米混悬液等均存在SN-38的载药量不理想,制备工艺复杂,或工艺放大后重复性差,制剂不稳定的缺点。如何通过优化制剂组成和工艺获得具有更高载药量的SN-38、易于稳定工艺放大、成本经济的SN-38纳米制剂,仍然是亟待解决的问题。

[0008] 本发明人的在先申请(PCT/CN2021/102332)记载了一种高载药量的包含SN-38、脂质和白蛋白的组合物,获得了适合成药的SN-38制剂。在上述工作的基础上,本发明人意外地发现,向所述组合物中添加Span 20能够减少制备过程中高压均质的次数,有效减小制剂粒径,提高过滤通量,减少原料损耗和降低成本,同时获得的药物制剂稳定性更好,崩解后粒径控制更好,药效更稳定。PCT/CN2021/102332的内容以其整体通过援引加入本文。

发明内容

[0009] 概述

[0010] 国际专利申请PCT/CN2021/102332公开了包含SN-38、脂质和白蛋白的组合物。本发明人发现,当以较更大规模(例如,百毫克级或更多的SN-38原料)的制备,包括在放大工艺,例如中试规模的制备中,向该组合物添加Span 20能够减少制备过程中高压均质的次数,有效减小组合物中纳米颗粒的粒径,提高过滤通量,减少原料损耗和降低成本,同时在崩解后能控制纳米粒子的粒径;通过进一步控制所述组合物中白蛋白的含量,能够控制纳米颗粒的粒径,使其更接近于适合成药的尺寸。本发明的组合物同样具有PCT/CN2021/102332的组合物的优点,包括:(1)提高的SN-38载药量和包封率;(2)包含低水平的开环结构的SN-38;(3)不包含白蛋白多聚体,免疫原性低,安全性高;(4)纳米粒子的粒径小,粒径分布窄;(5)优异的稳定性(包括优异的稀释稳定性和储存稳定性);(6)SN-38以无定形形式和/或纳米晶体存在,具有溶出速率快和生物利用度高的优点;以及(7)优异的体内抗肿瘤效力。

[0011] 在第一方面,本申请提供组合物,其包含SN-38、脂质、白蛋白和Span 20,其特征在于,所述组合物包含纳米粒子,其中在所述纳米粒子中,所述白蛋白包封至少部分所述SN-38和任选的至少部分所述脂质,其中所述脂质选自胆固醇、胆固醇衍生物、胆固醇类似物和脂肪酸酯以及它们中的两者或更多者的任意组合。

[0012] 在第二方面,本申请提供制备根据第一方面的组合物的方法。

[0013] 在第三方面,本申请提供制备包含SN-38、脂质、白蛋白和Span 20的组合物的方法。

[0014] 在第四方面,本申请提供可由根据第三方面所述的方法制备的组合物。

[0015] 在第五方面,本申请还提供制备具有改善的性质的组合物的方法。

[0016] 本申请的其他方面还提供包含上文所述的组合物的药物组合物及其用途。

[0017] 附图说明:

[0018] 图1为实施例1制备的制品中SN-38的含量测定的HPLC典型图谱。

[0019] 图2为实施例1制备的制品中胆固醇的含量测定的HPLC典型图谱。

[0020] 图3为实施例1制备的制品中不同结构的SN-38的含量测定的HPLC典型图谱。

[0021] 图4为实施例1制备的制品中白蛋白聚集体测定的SEC-HPLC典型图谱。

[0022] 图5为实施例2制备的冻干制品、SN-38以及HSA的XRD图谱。

[0023] 图6显示了实施例19中在梯度稀释下进行的崩解实验的结果。

[0024] 图7显示了实施例20中在梯度稀释下进行的崩解实验的结果。

[0025] 图8显示了实施例21中接受实施例1的rHA-SN-38制品给药的动物体重变化。

[0026] 图9显示实施例1的制品抑制人三阴性乳腺癌MDA-MB-23的体内实验的结果。

- [0027] 图10显示实施例2的制品抑制人结肠癌HT-29的体内实验结果。
- [0028] 图11显示了实施例24中试验动物的体重变化。
- [0029] 图12显示了实施例24中试验动物的肿瘤体积变化。
- [0030] 图13显示了实施例25中试验动物的体重变化。
- [0031] 图14显示了实施例25中试验动物的肿瘤体积变化。
- [0032] 图15显示了实施例26中试验动物的体重变化。
- [0033] 图16显示了实施例26中试验动物的肿瘤体积变化。
- [0034] 图17显示了实施例27中试验动物的体重变化。
- [0035] 图18显示了实施例27中试验动物的肿瘤体积变化。
- [0036] 图19显示了实施例28中试验动物的体重变化。
- [0037] 图20显示了实施例28中试验动物的肿瘤体积变化。
- [0038] 图21显示了实施例30中制备的包含Span 20的制剂在梯度稀释下进行的崩解实验的结果。
- [0039] 图22显示了实施例30中制备的不含Span 20的制剂在梯度稀释下进行的崩解实验的结果。
- [0040] 图23显示了实施例30中制备的包含Span 20的制剂的冷冻透射电镜观察结果。
- [0041] 图24显示了实施例30中制备的不含Span 20的制剂的冷冻透射电镜观察结果。
- [0042] 图25显示了实施例34中试验动物的肿瘤体积变化。
- [0043] 图26显示了实施例34中试验动物的体重变化。
- [0044] 图27显示了实施例34中试验动物的瘤块大小。
- [0045] 图28显示了实施例38中试验动物的体重变化。
- [0046] 图29-图30显示了实施例38中试验动物的肿瘤体积变化。
- [0047] 图31显示了实施例39中试验动物的体重变化。
- [0048] 图32-图33显示了实施例39中试验动物的肿瘤体积变化。

具体实施方式

[0049] 定义

[0050] 除非在下文中另有定义,本文中所用的所有技术术语和科学术语的含义意图与本领域技术人员通常所理解的相同。提及本文中使用的技术意图指在本领域中通常所理解的技术,包括那些对本领域技术人员显而易见的技术的变化或等效技术的替换。虽然相信以下术语对于本领域技术人员很好理解,但仍然阐述以下定义以更好地解释本发明。

[0051] 术语“纳米粒子”表示在至少一个维度(例如一个、两个或三个维度)上具有纳米级尺寸的粒子,例如约1nm、约10nm、约100nm或约200-300nm级别的尺寸,优选不超过200nm级别的尺寸。

[0052] 术语“纳米晶体”指尺寸为1至1000nm的晶体,尤其指50至300nm内的晶体,可以是单晶,也可以是多晶体。

[0053] 术语“囊泡”是指分散于水相中时会自发形成的一类具有外层结构的分子有序组合体。

[0054] 术语“Span 20”也称作山梨醇酐单月桂酸酯(sorbitan monolaurate)或司盘20,

是一种表面活性剂。

[0055] 术语“水性组合物”是指水基组合物,其为液体或半固体形式,优选液体形式。液体形式包括但不限于溶液(例如蛋白纳米粒子溶液)、胶体、乳液和悬浮液。

[0056] 术语“载药量(LD)”和“包封率(EE)”可以按照实施例部分中提供的公式计算。

[0057] 术语“有机酸”包括具有1至24个碳原子的饱和或不饱和脂肪酸,特别是具有2至4个碳原子的短链脂肪酸、具有6至12个碳原子的中链脂肪酸以及具有14-24个碳原子的长链脂肪酸;以及芳族羧酸。可以特别提及的一个例子是辛酸。“长链脂肪酸”包括但不限于棕榈酸(C16:0)、硬脂酸(C18:0)、油酸(C18:1)、亚油酸(C18:2)、 α -亚麻酸(C18:3)、花生四烯酸(C20:4)、二十碳五烯酸(C20:5)、二十二碳六烯酸(C22:6)。可以特别提及的例子是棕榈酸和硬脂酸。

[0058] 术语“包括”、“包含”、“具有”、“含有”或“涉及”及其在本文中的其它变体形式为包含性的(inclusive)或开放式的,且不排除其它未列举的元素或方法步骤,尽管其它未列举的元素或方法步骤不一定存在(即,这些术语也涵盖术语“基本上由……组成”和“由……组成”)。

[0059] 术语“约”是指在所述数值的 $\pm 10\%$ 范围内,优选 $\pm 5\%$ 范围内,更优选 $\pm 2\%$ 范围内。

[0060] 本文中所述的数值范围应理解为涵盖其中包含的任何和所有子范围。例如,范围“1至10”应理解为不仅包括明确记载的1至10的值,而且还包括1至10范围内的任何单个值(例如2、3、4、5、6、7、8和9)和子范围(例如1至2、1.5至2.5、1至3、1.5至3.5、2.5至4、3至4.5等等)。该原则亦适用于仅用一个数值作为最小值或最大值的范围。

[0061] 本文中提及的文献均以其整体援引加入本文中。

[0062] 在第一方面,本申请提供组合物,其包含SN-38、脂质、白蛋白和Span 20,其特征在于,所述组合物包含纳米粒子,其中在所述纳米粒子中,所述白蛋白包封至少部分所述SN-38和任选的至少部分所述脂质;

[0063] 脂质:SN-38为约(0.1-10):1(w:w);

[0064] 白蛋白:SN-38为约(1-100):1(w:w);以及

[0065] Span 20:SN-38为约(3-60):100(w:w);并且

[0066] 其中所述脂质选自胆固醇、胆固醇衍生物、胆固醇类似物和脂肪酸酯以及它们中的两者或更多者的任意组合。

[0067] 在一些实施方案中,脂质:SN-38为约(0.5-6):1(w:w),例如约(0.5-5):1(w:w),约(0.5-3):1(w:w),约(1-4):1(w:w),约(1.2-4):1(w:w)、约(1.4-2):1(w:w)、约(1.5-2.5):1(w:w)或约1:1(w:w)。

[0068] 在一些实施方案中,白蛋白:SN-38为约(1-50):1(w:w),例如约(3-25):1(w:w),约(5-25):1(w:w),约(5-20):1(w:w)或约(5-18):1(w:w),约(6-15):1(w:w),约(7-15):1(w:w)、约(6-12):1(w:w)、约(7-12):1(w:w)、约(9-11):1(w:w)或约10:1(w:w)。

[0069] 在一些实施方案中,Span 20:SN-38为约(4-60):100(w:w),例如约(5-60):100(w:w)、约(6-60):100(w:w)、约(7-55):100(w:w)、约(8-50):100(w:w)、约(10-45):100(w:w)、约(12-40):100(w:w)、约(14-35):100(w:w)、约(15-30):100(w:w)、约(16-25):100(w:w)或约(18-20):100(w:w)。

[0070] 在一些实施方案中,白蛋白:脂质为约(1-100):1(w:w),例如约(2-20):1(w:w),约(3-15):1(w:w)或约(5-10):1(w:w),例如约7:1(w:w)或约10:1(w:w)。

[0071] 在一些实施方案中,以所述组合物中的SN-38、脂质和白蛋白的总量计,所述SN-38的含量为约1w/w%至约25w/w%。在一些实施方案中,以所述组合物中的SN-38、脂质和白蛋白的总量计,所述脂质的含量为约1w/w%至约35w/w%。在一些实施方案中,以所述组合物中的SN-38、脂质和白蛋白的总量计,所述白蛋白的含量为约50w/w%至约98w/w%。

[0072] 在一些实施方案中,以所述组合物中的SN-38、脂质和白蛋白的总量计,所述SN-38的含量为约3w/w%至约20w/w%。在一些实施方案中,以所述组合物中的SN-38、脂质和白蛋白的总量计,所述脂质的含量为约2w/w%至约30w/w%。在一些实施方案中,以所述组合物中的SN-38、脂质和白蛋白的总量计,所述白蛋白的含量为约55w/w%至约95w/w%。

[0073] 在一些实施方案中,以所述组合物中的SN-38、脂质和白蛋白的总量计,所述SN-38的含量为约3w/w%至约15w/w%,例如约4w/w%、约5w/w%、约6w/w%、约6.5w/w%、约7w/w%、约7.5w/w%、约8w/w%、约8.5w/w%、约9w/w%、约10w/w%、约11w/w%、约12w/w%、约13w/w%或约14w/w%。

[0074] 在一些实施方案中,以所述组合物中的SN-38、脂质和白蛋白的总量计,所述脂质的含量为约3w/w%至约30w/w%,例如约4w/w%、约5w/w%、约6w/w%、约7w/w%、约8w/w%、约8.5w/w%、约9w/w%、约9.5w/w%、约10w/w%、约10.5w/w%、约11w/w%、约11.5w/w%、约12w/w%、约12.5w/w%、约13w/w%、约13.5w/w%、约14w/w%、约15w/w%、约16w/w%、约17w/w%、约18w/w%、约19w/w%、约20w/w%、约21w/w%、约24w/w%、约26w/w%或约28w/w%。

[0075] 在一些实施方案中,以所述组合物中的SN-38、脂质和白蛋白的总量计,所述白蛋白的含量为约60w/w%至约94w/w%,例如约64w/w%至约93w/w%,约66w/w%至约92w/w%、约68w/w%至约91w/w%、约70w/w%至约90w/w%、约75w/w%至约90w/w%,约75w/w%、约76w/w%、约77w/w%、约78w/w%、约79w/w%、约80w/w%、约81w/w%、约82w/w%、约83w/w%、约84w/w%、约85w/w%、约86w/w%、约87w/w%、约88w/w%或约89w/w%。

[0076] 不希望受任何理论的限制,本发明人发现,随着脂质用量的增加,所述组合物趋向于具有更小的平均粒径,更高的包封率和更高的SN-38利用率;增加白蛋白的用量可能会造成载药量的降低,过高的白蛋白含量还会增大纳米粒子粒径,影响成药。在一个实施方案中,以所述组合物中的SN-38、脂质和白蛋白的总量计,所述脂质的含量为约5w/w%至约24w/w%。在一个实施方案中,以所述组合物中的SN-38、脂质和白蛋白的总量计,所述白蛋白的含量为约60w/w%至约90w/w%。

[0077] 另一方面,组合物中脂质成分含量过高可能会给个体带来不利的影响。从减少通过所述组合物的施用导致的脂质摄入的角度,预期优选的是,以所述组合物中的SN-38、脂质和白蛋白的总量计,所述组合物中的脂质的含量不超过约18w/w%,例如不超过约16w/w%、或不超过约14w/w%。然而,这并不表示具有较高脂质含量的组合物不是合意的。

[0078] 在一些实施方案中,以所述组合物中的SN-38、脂质、白蛋白和Span 20的总量计,Span 20的含量为约0.03w/w%至约12w/w%,例如约0.06w/w%至约10w/w%、0.08w/w%至约9w/w%、约0.1w/w%至约8w/w%、约0.2w/w%至约7w/w%、约0.4w/w%至约6w/w%、约0.6w/w%至约5w/w%、约0.8w/w%至约4w/w%、约1w/w%至约2w/w%。

[0079] 在一些实施方案中,脂质:SN-38为约(1-10):1(w:w),例如约(1-8):1(w:w)、约(1-6):1(w:w)、约(1-5):1(w:w)、约(1-4.5):1(w:w)、约(1-4):1(w:w)、约(1.2-3.8):1(w:w)、约1:1(w:w)、约(1.4-3.6):1(w:w)、约(1.6-3.4):1(w:w)、约(1.8-3.2):1(w:w)、约(2-3):1(w:w)、约(2.2-2.8):1(w:w)、约(2.4-2.6):1(w:w)、约1:1(w:w)或约2.5:1(w:w)。在另一些实施方案中,脂质:SN-38为约(0.8-1.8):1(w:w)、约(0.9-1.7):1(w:w)或约(1-1.4):1。

[0080] 在一些实施方案中,白蛋白:SN-38为约(5-40):1(w:w),例如约(5-小于40):1(w:w)、约(5-35):1(w:w)、约(5-30):1(w:w)、约(8-25):1(w:w)、约(10-22.5):1(w:w)、约(12.5-20):1(w:w)、约(15-17.5):1(w:w)、约(16-18):1(w:w)或约10:1(w:w)。在另一些实施方案中,白蛋白:SN-38为约(9-21):1(w:w)、约(9-20):1(w:w)、约(11-18):1(w:w)、或约(11.1-17.3):1(w:w)。

[0081] 在一些实施方案中,Span 20:SN-38为约(5-60):100(w:w),例如约(6-60):100(w:w)、约(7-55):100(w:w)、约(8-50):100(w:w)、约(10-45):100(w:w)、约(12-40):100(w:w)、约(14-35):100(w:w)、约(15-30):100(w:w)、约(16-25):100(w:w)或约(18-20):100(w:w)。在另一些实施方案中,Span 20:SN-38为约(5-10):100(w:w)、约(5-9):100(w:w)、约(6-8.6):100(w:w)、约(6-8):100(w:w)、或约(6.5-7):100(w:w)。

[0082] 在一些实施方案中,白蛋白:脂质为约(1-40):1(w:w),例如约(1-小于40):1(w:w)、约(2-35):1(w:w)、约(3-15):1(w:w)、约(5-10):1(w:w)或约(6-8):1(w:w),例如约7:1(w:w)或约10:1(w:w)。在一些实施方案中,白蛋白:脂质为约(6-21):1(w:w)、约(6.7-13):1(w:w)、约(7-13):1(w:w)、约(11-12.7):1(w:w)。

[0083] 在一些实施方案中,以所述组合物中的SN-38、脂质和白蛋白的总量计,所述SN-38的含量为约2w/w%至约16w/w%。在一些实施方案中,以所述组合物中的SN-38、脂质和白蛋白的总量计,所述脂质的含量为约2w/w%至约35w/w%。在一些实施方案中,以所述组合物中的SN-38、脂质和白蛋白的总量计,所述白蛋白的含量为约75w/w%至约96w/w%。

[0084] 在一些实施方案中,以所述组合物中的SN-38、脂质和白蛋白的总量计,所述SN-38的含量为约2.5w/w%至约15w/w%,例如约4w/w%至约10w/w%,约4.5w/w%至约9.5w/w%,约5w/w%至约9w/w%,或约7.5w/w%至约8w/w%。在一些实施方案中,以所述组合物中的SN-38、脂质和白蛋白的总量计,所述组合物中的脂质的含量为约2.5w/w%至约30w/w%,例如约4w/w%至约12.5w/w%,约4.5w/w%至约12w/w%,约7w/w%至约10w/w%,或约7.5w/w%至约8w/w%。在一些实施方案中,以所述组合物中的SN-38、脂质和白蛋白的总量计,所述组合物中的白蛋白的含量为约76w/w%至约95w/w%,例如约78w/w%至约93w/w%,约79w/w%至约91.5w/w%,约80w/w%至约90w/w%,约82w/w%至约89w/w%,约84w/w%至约88w/w%,或约84.5w/w%至约87.5w/w%。

[0085] 在一些实施方案中,以所述组合物中的SN-38、脂质和白蛋白的总量计,所述SN-38的含量为约3w/w%至约14w/w%,例如约3.5w/w%至约12w/w%、约4w/w%、约4.2w/w%、约4.5w/w%、约4.6w/w%、约4.8w/w%、约5w/w%、约5.5w/w%、约6w/w%、约6.5w/w%、约7w/w%、约7.5w/w%、约7.6w/w%、约7.8w/w%、约8w/w%、约8.5w/w%、约9w/w%、约9.2w/w%、约9.5w/w%、约9.6w/w%、约9.8w/w%、约10w/w%、约10.5w/w%、约11w/w%或约11.5w/w%。

[0086] 在一些实施方案中,以所述组合物中的SN-38、脂质和白蛋白的总量计,所述脂质

的含量为约4w/w%至约25w/w%，例如约4.5w/w%至约20w/w%、约4.3w/w%、约4.5w/w%、约4.7w/w%、约5w/w%、约5.5w/w%、约6w/w%、约6.5w/w%、约7w/w%、约7.5w/w%、约7.6w/w%、约7.8w/w%、约8w/w%、8.5w/w%、约9w/w%、约9.5w/w%、约10w/w%、约10.5w/w%、约11w/w%、约11.5w/w%、约12w/w%、约12.1w/w%、约12.3w/w%、约12.5w/w%、约13w/w%、约13.5w/w%、约14w/w%、约14.5w/w%、约15w/w%、约15.5w/w%、约16w/w%、约16.5w/w%、约17w/w%、约17.5w/w%、约18w/w%、约18.5w/w%、约19w/w%或约19.5w/w%。

[0087] 在一些实施方案中,以所述组合物中的SN-38、脂质和白蛋白的总量计,所述白蛋白的含量为约78w/w%至约92w/w%，例如约79w/w%、约79.2w/w%、约79.4w/w%、约79.6w/w%、约79.8w/w%、约80w/w%、约81w/w%、约82w/w%、约83w/w%、约84w/w%、约84.3w/w%、约84.5w/w%、约84.7w/w%、约84.9w/w%、约85w/w%、约86w/w%、约87w/w%、约87.3w/w%、约87.5w/w%、约87.7w/w%、约87.9w/w%、约88w/w%、约89w/w%、约90w/w%、约91w/w%、约91.3w/w%、或约91.5w/w%。

[0088] 在一些实施方案中,以所述组合物中的SN-38、脂质、白蛋白和Span 20的总量计,Span 20的含量为约0.14w/w%至约5w/w%，例如约0.2w/w%至约2.5w/w%、约0.22w/w%至约2.0w/w%、约0.24w/w%至约2w/w%、约0.26w/w%至约1.5w/w%、约0.28w/w%至约1.0w/w%、约0.3w/w%至约0.9w/w%、约0.32w/w%至约0.8w/w%、约0.34w/w%至约0.7w/w%、约0.36w/w%至约0.6w/w%、约0.38w/w%至约0.58w/w%、约0.4w/w%至约0.56w/w%、约0.42w/w%至约0.54w/w%、约0.44w/w%至约0.52w/w%、约0.46w/w%、约0.48w/w%或约0.5w/w%。在另一些实施方案中,Span 20的含量为约0.2w/w%至约0.8w/w%、约0.24w/w%至约0.7w/w%、约0.26w/w%至约0.7w/w%、约0.3w/w%至约0.65w/w%、约0.36w/w%至约0.6w/w%、约0.4w/w%至约0.58w/w%、约0.44w/w%至约0.56w/w%、约0.48w/w%至约0.54w/w%、或约0.5w/w%至约0.52w/w%。

[0089] 在一些实施方案中,存在于所述纳米粒子中的SN-38占所述组合物中的SN-38、脂质和白蛋白的总量的至少约1w/w%或至少约2w/w%，例如至少约3w/w%，约3w/w%至约13w/w%，约4w/w%至约12w/w%，约4w/w%、约5w/w%、约6w/w%、约7w/w%、约8w/w%、约9w/w%、约10w/w%或约11w/w%。

[0090] 在一些实施方案中,存在于所述纳米粒子中的SN-38占所述组合物中的SN-38的总量的约80w/w%至约99w/w%，例如约88w/w%至约98w/w%，约89w/w%、约90w/w%、约91w/w%、约92w/w%、约93w/w%、约94w/w%、约95w/w%、约96w/w%或约97w/w%。

[0091] 在一些实施方案中,所述胆固醇衍生物选自胆固醇与有机酸形成的酯,优选选自胆固醇棕榈酸酯和胆固醇辛酸酯及其组合。

[0092] 在一些实施方案中,所述胆固醇类似物选自维生素D2、维生素D3及其组合。

[0093] 在一些实施方案中,所述脂肪酸酯选自脂肪酸甘油酯,优选长链脂肪酸甘油酯,优选硬脂酸甘油酯,更优选单硬脂酸甘油酯。

[0094] 在一些优选的实施方案中,所述脂质选自胆固醇、胆固醇棕榈酸酯、胆固醇辛酸酯、维生素D2、维生素D3、单硬脂酸甘油酯以及它们中的两者或更多者的任意组合。

[0095] 在一些优选的实施方案中,所述脂质选自胆固醇、胆固醇棕榈酸酯、维生素D3、单硬脂酸甘油酯以及它们中的两者或更多者的任意组合。

[0096] 在一些优选的实施方案中,所述脂质为:胆固醇、胆固醇棕榈酸酯、维生素D3或单

硬脂酸甘油酯;胆固醇和胆固醇棕榈酸酯的混合物;胆固醇和维生素D3的混合物;胆固醇和单硬脂酸甘油酯的混合物;或胆固醇棕榈酸酯和单硬脂酸甘油酯的混合物。

[0097] 在一些更优选的实施方案中,所述脂质为胆固醇。优选地,胆固醇作为唯一的脂质。在一些此类实施方案中,胆固醇:SN-38为约(1-6):1(w:w),例如约(1.2-5):1(w:w),例如约(1.4-4):1(w:w)、约3:1(w:w)、约2:1(w:w)或约1:1(w:w)。在另一些实施方案中,胆固醇:SN-38为约(0.8-1.8):1(w:w)、约(0.9-1.7):1(w:w)、约(1-1.4):1。在一些此类实施方案中,白蛋白:SN-38为约(3-25):1(w:w),例如约(4-20):1(w:w),约(5-15):1(w:w),约(6-12):1(w:w)、约(7-12):1(w:w)、约(9-11):1(w:w)或约10:1(w:w)。在另一些实施方案中,白蛋白:SN-38为约(9-21):1(w:w)、约(9-20):1(w:w)、约(11-18):1(w:w)、或约(11.1-17.3):1(w:w)。在一些此类实施方案中,白蛋白:胆固醇为约(2-20):1(w:w),例如约(3-15):1(w:w)、约(5-10):1(w:w)或约7:1(w:w)。在另一些实施方案中,白蛋白:胆固醇为约(6-21):1(w:w)、约(6.7-13):1(w:w)、约(7-13):1(w:w)、约(11-12.7):1(w:w)。

[0098] 在一些此类实施方案中,以所述组合物中的SN-38、胆固醇和白蛋白的总量计,所述SN-38的含量为约3w/w%至约15w/w%,例如约4w/w%至约15w/w%、约6w/w%至约10w/w%或约8w/w%至约12w/w%。在另一些实施方案中,所述SN-38的含量为约4w/w%至约10w/w%、约4.5w/w%至约9.5w/w%、约5w/w%至约9w/w%、或约7.5w/w%至约8w/w%。在一些此类实施方案中,以所述组合物中的SN-38、胆固醇和白蛋白的总量计,所述胆固醇的含量为约5w/w%至约25w/w%,例如约6w/w%至约22w/w%、或约15w/w%至约20w/w%。在另一些实施方案中,所述胆固醇的含量为约4w/w%至约12.5w/w%、约4.5w/w%至约12w/w%、约7w/w%至约10w/w%、或约7.5w/w%至约8w/w%。在一些此类实施方案中,以所述组合物中的SN-38、胆固醇和白蛋白的总量计,所述白蛋白的含量为约64w/w%至约90w/w%,例如约70w/w%至约90w/w%。在另一些实施方案中,所述白蛋白的含量为约78w/w%至约93w/w%、约79w/w%至约91.5w/w%、约80w/w%至约90w/w%、约82w/w%至约89w/w%、约84w/w%至约88w/w%、或约84.5w/w%至约87.5w/w%。在一些此类实施方案中,存在于所述纳米粒子中的SN-38占所述组合物中的SN-38、胆固醇和白蛋白的总量的至少约3w/w%,例如约3w/w%至约13w/w%,约4w/w%至约12w/w%,约4w/w%、约5w/w%、约6w/w%、约7w/w%、约8w/w%、约9w/w%、约10w/w%或约11w/w%。

[0099] 在另一些实施方案中,所述脂质为胆固醇棕榈酸酯。在一些实施方案中,所述脂质为维生素D3。在一些实施方案中,所述脂质为单硬脂酸甘油酯。在一些实施方案中,胆固醇棕榈酸酯、维生素D3或单硬脂酸甘油酯作为唯一的脂质。

[0100] 还可以涵盖的是,所述脂质为胆固醇和单硬脂酸甘油酯的混合物,其中胆固醇:单硬脂酸甘油酯为例如约(0.2-5):1(w:w),约(0.5-3):1(w:w),约(0.5-2):1(w:w),或约1:1(w:w)。

[0101] 在一些实施方案中,所述脂质为胆固醇棕榈酸酯和单硬脂酸甘油酯的混合物;其中胆固醇棕榈酸酯:单硬脂酸甘油酯为例如约(0.2-5):1(w:w),约(0.5-3):1(w:w),约(0.5-2):1(w:w),或约1:1(w:w)。

[0102] 在一些实施方案中,所述脂质为胆固醇和胆固醇棕榈酸酯的混合物,其中胆固醇:胆固醇棕榈酸酯为例如约(0.2-5):1(w:w),约(0.5-3):1(w:w),约(0.5-2):1(w:w),或约1:1(w:w)。

[0103] 对于上述包含除胆固醇之外的脂质或者胆固醇和其他脂质的组合的实施方案,所述脂质:SN-38为例如约(1-6):1(w:w),约(1.2-5):1(w:w),约(1.4-4.5):1(w:w)、约4.3:1(w:w)、约3:1(w:w)、约1:1(w:w)或约2:1(w:w)。在一些此类实施方案中,白蛋白:SN-38为例如约(5-25):1(w:w),约(10-20):1(w:w),约(6-15):1(w:w),约(7-15):1(w:w)、约(9-12):1(w:w)、约(9-11):1(w:w)、约9.5:1(w:w)或约10:1(w:w)。在一些此类实施方案中,白蛋白:所述脂质为例如约(2-10):1(w:w),约(3-7):1(w:w)或约(4-6):1(w:w)。在一些此类实施方案中,以所述组合物中的SN-38、所述脂质和白蛋白的总量计,所述SN-38的含量为例如约5w/w%至约15w/w%,约6w/w%至约12w/w%、约7w/w%至约10w/w%、约8w/w%或约9w/w%。在一些此类实施方案中,以所述组合物中的SN-38、所述脂质和白蛋白的总量计,所述脂质的含量为例如约5w/w%至约32w/w%,约10w/w%至约30w/w%、约18w/w%、约20w/w%、约22w/w%、约24w/w%、约26w/w%、约28w/w%或约29w/w%。在一些此类实施方案中,以所述组合物中的SN-38、所述脂质和白蛋白的总量计,所述白蛋白的含量为例如约60w/w%至约90w/w%,约64w/w%至约85w/w%、约70w/w%至约80w/w%、或约75w/w%。在一些此类实施方案中,存在于所述纳米粒子中的SN-38占所述组合物中的SN-38、所述脂质和白蛋白的总量的至少约3w/w%,例如约3w/w%至约10w/w%,约4w/w%至约9w/w%,约4w/w%、约5w/w%、约6w/w%、约7w/w%或约8w/w%。

[0104] 在一些根据上文所述的实施方案中,所述组合物为液体、半固体或固体形式。

[0105] 在一些实施方案中,所述组合物为固体形式,优选为粉末形式。更优选地,所述组合物为冻干粉。

[0106] 在一些此类实施方案中,SN-38优选地以无定形和/或纳米晶体形式存在于所述组合物中,如通过电镜或X射线衍射法(Cu-K α)分析所测定的。所述纳米晶体的粒径范围可以为约30-500nm,优选约50-200nm。所述纳米晶体形式的SN-38占总SN-38的75%或更高,例如80%、85%、90%或更高。

[0107] 不希望受任何理论的限制,在本申请的组合物中,Span 20起到提高所述组合物的稳定性,调节纳米粒子的粒径以及使其更加分散的作用。

[0108] 在一些实施方案中,所述组合物不包含额外的稳定剂。在另一些实施方案中,所述组合物优选地还包含额外的稳定剂,例如冻干稳定剂,所述额外的稳定剂的量使得当所述组合物通过复溶形成水性组合物(包括溶液和乳液)时,所述额外的稳定剂的含量为至少约2w/v%,例如至少约3w/v%,至少约5w/v%,约5w/v%至约30w/v%,约10w/v%至约25w/v%或约15w/v%至约20w/v%。

[0109] 在一些此类实施方案中,所述组合物还包含额外的稳定剂,以所述组合物中的总量计,所述额外的稳定剂的含量为约60w/w%至约98w/w%,例如约65w/w%至约97w/w%,约68w/w%至约96w/w%,约69w/w%至约95w/w%,约70w/w%至约94w/w%、约71w/w%至约93w/w%、约72w/w%至约92w/w%、约73w/w%、约74w/w%、约75w/w%、约76w/w%、约77w/w%、约78w/w%、约79w/w%、约80w/w%、约81w/w%、约82w/w%、约83w/w%、约84w/w%、约85w/w%、约86w/w%、约87w/w%、约88w/w%、约89w/w%、约90w/w%或约91w/w%。

[0110] 在一些实施方案中,当所述组合物通过复溶形成水性组合物(包括溶液和乳液)而具有约0.1 μ g/mL至约30.0mg/mL(或下文关于水性组合物所述的SN-38的含量值)的SN-38的含量时,所述纳米粒子具有约50至200nm,例如约90至150nm、约95至140nm、约100至130nm、

约105至125nm或约110至120nm的平均粒径。

[0111] 在另一些实施方案中,所述组合物为液体形式的水性组合物,包括溶液和乳液。

[0112] 在一些实施方案中,所述液体形式的组合物包含以纳米晶体和/或囊泡的形式SN-38。所述纳米晶体的粒径范围可以为约30-500nm,优选约50-200nm。

[0113] 在一些此类实施方案中,所述组合物为溶液的形式;在一些此类实施方案中,所述组合物为乳液的形式。

[0114] 本发明人发现,本申请的水性组合物具有优异的稀释稳定性。在一些实施方案中,当稀释(例如用pH约7.4的1x PBS稀释)所述组合物致使SN-38在稀释后的组合物中的含量达到约4 μ g/mL或更低,例如约2 μ g/mL或更低,约1 μ g/mL或更低,或约0.4 μ g/mL或更低,例如约0.1 μ g/mL或0.04 μ g/mL时,所述纳米粒子不发生崩解。由于优异的稳定性,所述水性组合物可以作为浓缩液或稀释液存在。

[0115] 因此,所述水性组合物的各种组分可以具有较宽的含量范围。在一些此类实施方案中,以所述组合物的总量计,SN-38的含量为约0.1 μ g/mL至约30.0mg/mL、约0.2 μ g/mL至约27.0mg/mL、约0.5 μ g/mL至约24.0mg/mL、约1.0 μ g/mL至约21.0mg/mL、约5.0 μ g/mL至约18.0mg/mL、约10.0 μ g/mL至约15.0mg/mL、约20.0 μ g/mL至约12mg/mL、约25.0 μ g/mL至约9mg/mL、约50.0 μ g/mL至约6.0mg/mL或约100.0 μ g/mL至约3.0mg/mL。

[0116] 在一些实施方案中,以所述组合物的总量计,所述脂质的含量为约0.05 μ g/mL至约100.0mg/mL、约0.1 μ g/mL至约90.0mg/mL、约0.25 μ g/mL至约80.0mg/mL、约0.5 μ g/mL至约70.0mg/mL、约2.5 μ g/mL至约60.0mg/mL、约5.0 μ g/mL至约50.0mg/mL、约10.0 μ g/mL至约40.0mg/mL、约12.5 μ g/mL至约30.0mg/mL、约25.0 μ g/mL至约20.0mg/mL、或约50.0 μ g/mL至约10.0mg/mL。

[0117] 在一些实施方案中,以所述组合物的总量计,白蛋白的含量为约3.0 μ g/mL至约300.0mg/mL、约6.0 μ g/mL至约270.0mg/mL、约15.0 μ g/mL至约240.0mg/mL、约30.0 μ g/mL至约210.0mg/mL、约150.0 μ g/mL至约180.0mg/mL、约300.0 μ g/mL至约150.0mg/mL、约600.0 μ g/mL至约120.0mg/mL、约750.0 μ g/mL至约90.0mg/mL、约1500.0 μ g/mL至约60.0mg/mL、或约3.0mg/mL至约30.0mg/mL。

[0118] 一般而言,以所述组合物的总量计,SN-38的含量可以为约100.0 μ g/mL至约3.0mg/mL,例如约200.0 μ g/mL至约2.5mg/mL、约300.0 μ g/mL至约2.0mg/mL、约400.0 μ g/mL至约1.5mg/mL、约500.0 μ g/mL至约1.0mg/mL、或约600 μ g/mL至约800 μ g/mL;和/或

[0119] 所述脂质的含量可以为约50.0 μ g/mL至约10.0mg/mL,例如约100.0 μ g/mL至约8.0mg/mL、约200.0 μ g/mL至约6.0mg/mL、约300.0 μ g/mL至约4.0mg/mL、约400.0 μ g/mL至约3.0mg/mL、约500.0 μ g/mL至约2.5mg/mL、约600.0 μ g/mL至约2.0mg/mL、约700.0 μ g/mL至约1.5mg/mL、约800 μ g/mL至约1.0mg/mL、或约200 μ g/mL至约1.5mg/mL;和/或

[0120] 白蛋白的含量可以为约3.0mg/mL至约30.0mg/mL,例如约4.0mg/mL至约25.0mg/mL、约5.0mg/mL至约20.0mg/mL、约6.0mg/mL至约15.0mg/mL、约7.0mg/mL至约12.0mg/mL、或约8.0mg/mL至约10.0mg/mL。

[0121] 理想的是,在水性组合物(包括溶液和乳液)中,所述纳米粒子有不超过约200nm、例如不超过约150nm的平均粒径,优选在施用之前在储存一定时间后,其平均粒径仍然满足上述要求。本发明人发现,本申请的水性组合物具有这样的优异性质。

[0122] 在一些实施方案中,所述纳米粒子具有约50至200nm,例如约90至150nm,或约100至130nm的平均粒径。

[0123] 在一些实施方案中,当在4℃下保存24h后,所述纳米粒子具有约50至200nm,例如约90至150nm,或约100至130nm的平均粒径。

[0124] 在一些实施方案中,所述纳米粒子具有不超过约0.30、例如不超过约0.2、不超过约0.10或不超过约0.01的粒径分布指数(PDI)。

[0125] 在一些实施方案中,所述组合物具有约-35mV至约-20mV,例如约-31mV的Zeta电位。

[0126] 在一些此类实施方案中,所述组合物不包含额外的稳定剂。在一些此类实施方案中,所述组合物还包含额外的稳定剂,其中以所述组合物的总量计,所述额外的稳定剂的含量为至少约2w/v%,优选至少约3w/v%,例如至少约5w/v%,约5w/v%至约30w/v%,约10w/v%至约25w/v%或约15w/v%至约20w/v%。

[0127] 上文所述的额外的稳定剂可以选自:白蛋白类(例如人血清白蛋白、重组人白蛋白、牛血清白蛋白、脱脂奶粉)、单糖、二糖、多糖及其任意组合;优选地选自葡萄糖和蔗糖;优选为蔗糖。

[0128] 额外的稳定剂的使用有利于保持纳米粒子的平均粒径。本发明人发现,当在4℃下保存24h后,与不存在额外的稳定剂的情况相比,额外的稳定剂的存在减小了所述水性组合物中纳米粒子的平均粒径的增加。同时,对于最终以冻干粉形式提供的组合物而言,额外的稳定剂、特别是糖类稳定剂的使用还提供额外的优势,因为它们将所述水性组合物冷冻干燥的过程中可以同时起到冻干赋形剂的作用,从而能够避免其他冻干赋形剂、特别是在现有技术中用作冻干赋形剂的白蛋白(例如HSA)的使用,从而具有成本效益以及有利于降低发生药物过敏反应的风险。因此,在一些实施方案中,所述组合物优选不包含额外的冻干赋形剂。当然,必要时,所述组合物也可以包含额外的冻干赋形剂,例如蔗糖、甘露醇、乳糖、麦芽糖、海藻糖、右旋糖酐中的一种或多种。

[0129] 在该第一方面的第一子集中,本申请提供组合物,其包含SN-38、脂质、白蛋白和Span 20,其中所述脂质为胆固醇,其特征在于,所述组合物包含纳米粒子,其中在所述纳米粒子中,所述白蛋白包封至少部分所述SN-38和任选的至少部分所述脂质,

[0130] 其中:

[0131] 胆固醇:SN-38,在一些实施方案中,为约(1-3):1(w:w),例如约(1.2-2.5):1(w:w)、约(1.4-2):1(w:w)、约(1.5-2):1(w:w)、约(1.3-1.8):1(w:w)、约(1.4-1.6):1(w:w)、约(1.5-1.7):1(w:w)、约(1.2-1.5):1(w:w)、约1:1(w:w)或约(1.4-1.5):1(w:w),或者,在另一些实施方案中,为约(0.8-1.8):1(w:w)、约(0.9-1.7):1(w:w)或约(1-1.4):1;

[0132] 白蛋白:SN-38,在一些实施方案中,为约(5-15):1(w:w),例如约(5-12):1(w:w)、约(6-12):1(w:w)或约(7-12):1(w:w),约(9-11):1(w:w),约(10-12):1(w:w),或约11:1(w:w),或者,在另一些实施方案中,为约(9-21):1(w:w)、约(9-20):1(w:w)、约(11-18):1(w:w)、或约(11.1-17.3):1(w:w);

[0133] 白蛋白:胆固醇,在一些实施方案中,为约(3-10):1(w:w)、约(4-8):1(w:w)或约(5-7):1(w:w),或者,在另一些实施方案中,为约(6-21):1(w:w)、约(6.7-13):1(w:w)、约(7-13):1(w:w)、约(11-12.7):1(w:w);以及

[0134] Span 20:SN-38如上文所述。

[0135] 在一些实施方案中,以所述组合物中的SN-38、胆固醇和白蛋白的总量计,所述SN-38的含量为约6w/w%至约14w/w%,例如约6.5w/w%至约13w/w%,约7w/w%至约12w/w%,约7.5w/w%至约12w/w%、约8w/w%至约11w/w%、约8.5w/w%至约10w/w%,或约9w/w%。在另一些实施方案中,所述SN-38的含量为约4w/w%至约10w/w%,约4.5w/w%至约9.5w/w%,约5w/w%至约9w/w%,或约7.5w/w%至约8w/w%。在一些实施方案中,以所述组合物中的SN-38、胆固醇和白蛋白的总量计,所述胆固醇的含量为约8w/w%至约18w/w%,例如8.5w/w%至约17w/w%、约9w/w%至约16w/w%、约9.5w/w%至约16w/w%、约10w/w%至约16w/w%、约10.5w/w%至约16w/w%、约11w/w%至约15w/w%、约11.5w/w%至约15w/w%、约12w/w%至约15w/w%、约12.5w/w%至约14w/w%、或约13w/w%至约13.5w/w%。在另一些实施方案中,所述胆固醇的含量为约4w/w%至约12.5w/w%,约4.5w/w%至约12w/w%,约7w/w%至约10w/w%,或约7.5w/w%至约8w/w%。在一些实施方案中,以所述组合物中的SN-38、胆固醇和白蛋白的总量计,所述白蛋白的含量为约66w/w%至约90w/w%,例如约68w/w%至约89w/w%、约70w/w%至约88w/w%、约70w/w%至约87w/w%、约70w/w%至约86w/w%、约70w/w%至约85w/w%、约75w/w%至约85w/w%、约76w/w%、约77w/w%、约78w/w%、约79w/w%、约80w/w%、约81w/w%、约82w/w%、约83w/w%或约84w/w%。在另一些实施方案中,所述白蛋白的含量为约78w/w%至约93w/w%,约79w/w%至约91.5w/w%,约80w/w%至约90w/w%,约82w/w%至约89w/w%,约84w/w%至约88w/w%,或约84.5w/w%至约87.5w/w%。

[0136] 在该第一方面的第二子集中,本申请提供组合物,其包含SN-38、脂质、白蛋白和Span 20,其中所述脂质为胆固醇,其特征在于,所述组合物包含纳米粒子,其中在所述纳米粒子中,所述白蛋白包封至少部分所述SN-38和任选的至少部分所述脂质,

[0137] 其中:

[0138] 胆固醇:SN-38,在一些实施方案中,为约(1-5):1(w:w),例如约(1-4.5):1(w:w)、约(1-4):1(w:w)、约(1.2-3.8):1(w:w)、约(1.4-3.6):1(w:w)、约(1.6-3.4):1(w:w)、约(1.8-3.2):1(w:w)、约(2-3):1(w:w)、约(2.2-2.8):1(w:w)、约(2.4-2.6):1(w:w)、约2.5:1(w:w)或约1:1(w:w),或者,在另一些实施方案中,为约(0.8-1.8):1(w:w)、约(0.9-1.7):1(w:w)或约(1-1.4):1;和/或

[0139] 白蛋白:SN-38,在一些实施方案中,为约(5-25):1(w:w),例如约(5-20):1(w:w)、约(6-19):1(w:w)、约(7-18):1(w:w)、约(8-16):1(w:w)、约(9-14):1(w:w)或约(10-12):1(w:w),或者,在另一些实施方案中,为约(9-21):1(w:w)、约(9-20):1(w:w)、约(11-18):1(w:w)、或约(11.1-17.3):1(w:w);和/或

[0140] 白蛋白:胆固醇,在一些实施方案中,为约(5-25):1(w:w),例如约(6-20):1(w:w)、约(7-18):1(w:w)、约(8-16):1(w:w)、约(9-14):1(w:w)或约(10-12):1(w:w),或者,在另一些实施方案中,为约(6-21):1(w:w)、约(6.7-13):1(w:w)、约(7-13):1(w:w)、约(11-12.7):1(w:w);和/或

[0141] Span 20:SN-38,在一些实施方案中,为约(5-15):100(w:w),例如约(6-12):100(w:w)、约(7-10):100(w:w)或约7.5:100(w:w),或者,在另一些实施方案中,为约(5-10):100(w:w)、约(5-9):100(w:w)、约(6-8.6):100(w:w)、约(6-8):100(w:w)、约(6.5-7):100(w:w)。

[0142] 在一些此类实施方案中,以所述组合物中的SN-38、胆固醇和白蛋白的总量计,所述SN-38的含量为约3w/w%至约10w/w%,例如约3.5w/w%至约9.5w/w%、约4w/w%、约4.5w/w%、约5w/w%、约5.5w/w%、约6w/w%、约6.5w/w%、约7w/w%、约7.5w/w%、约8w/w%、约8.5w/w%或约9w/w%。在另一些实施方案中,所述SN-38的含量为约4w/w%至约10w/w%,约4.5w/w%至约9.5w/w%,约5w/w%至约9w/w%,或约7.5w/w%至约8w/w%。

[0143] 在一些此类实施方案中,以所述组合物中的SN-38、胆固醇和白蛋白的总量计,所述胆固醇的含量为约4w/w%至约18w/w%,例如约4.5w/w%至约17.5w/w%、约5w/w%、约5.5w/w%、约6w/w%、约6.5w/w%、约7w/w%、约7.5w/w%、约8w/w%、8.5w/w%、约9w/w%、约9.5w/w%、约10w/w%、约10.5w/w%、约11w/w%、约11.5w/w%、约12w/w%、约12.5w/w%、约13w/w%、约13.5w/w%、约14w/w%、约14.5w/w%、约15w/w%、约15.5w/w%、约16w/w%、约16.5w/w%或约17w/w%。在另一些实施方案中,所述胆固醇的含量为约4w/w%至约12.5w/w%,约4.5w/w%至约12w/w%,约7w/w%至约10w/w%,或约7.5w/w%至约8w/w%。

[0144] 在一些此类实施方案中,以所述组合物中的SN-38、胆固醇和白蛋白的总量计,所述白蛋白的含量为约78w/w%至约92w/w%,例如约79w/w%、约80w/w%、约81w/w%、约82w/w%、约83w/w%、约84w/w%、约85w/w%、约86w/w%、约87w/w%、约88w/w%、约89w/w%、约90w/w%或约91w/w%。在另一些实施方案中,所述白蛋白的含量为约78w/w%至约93w/w%,约79w/w%至约91.5w/w%,约80w/w%至约90w/w%,约82w/w%至约89w/w%,约84w/w%至约88w/w%,或约84.5w/w%至约87.5w/w%。

[0145] 在一些进一步的实施方案中,本发明提供上文所述的组合物,其中:

[0146] 胆固醇:SN-38为约(1-2.5):1(w:w),例如约1.25:1(w:w)、约1:1(w:w);和/或

[0147] 白蛋白:SN-38为约(8-25):1(w:w),例如约(10-20):1(w:w)、约(12-18):1(w:w)、约(12.5-17):1(w:w)、约(15-16):1(w:w)、约10:1(w:w)或约16.7:1(w:w);和/或

[0148] 白蛋白:胆固醇为约(5-10):1(w:w),例如约(6-9):1(w:w)、约(7-8):1(w:w)、约10:1(w:w)或约6.7:1(w:w);和/或

[0149] Span 20:SN-38为约(5-40):100(w:w),例如约(6-30):100(w:w)、约(7-25):100(w:w)、约(8-20):100(w:w)、约(9-15):100(w:w)或约(10-12):100(w:w)。

[0150] 在一些实施方案中,以所述组合物中的SN-38、胆固醇和白蛋白的总量计,所述SN-38的含量为约3w/w%至约9w/w%,例如约3.5w/w%至约8.5w/w%、约4w/w%、约4.5w/w%、约5w/w%、约5.5w/w%、约6w/w%、约6.5w/w%、约7w/w%、约7.5w/w%、约8w/w%。

[0151] 在一些实施方案中,以所述组合物中的SN-38、胆固醇和白蛋白的总量计,所述胆固醇的含量为约8w/w%至约18w/w%,例如约8.5w/w%至约17.5w/w%、约9w/w%、约9.5w/w%、约10w/w%、约10.5w/w%、约11w/w%、约11.5w/w%、约12w/w%、约12.5w/w%、约13w/w%、约13.5w/w%、约14w/w%、约14.5w/w%、约15w/w%、约15.5w/w%、约16w/w%、约16.5w/w%或约17w/w%。

[0152] 在一些实施方案中,以所述组合物中的SN-38、脂质、白蛋白和Span 20的总量计,Span 20的含量为约0.2w/w%至约0.6w/w%,例如约0.22w/w%至约0.58w/w%、约0.24w/w%至约0.56w/w%、约0.26w/w%至约0.54w/w%、约0.28w/w%至约0.52w/w%、约0.3w/w%至约0.5w/w%、约0.32w/w%至约0.48w/w%、约0.34w/w%至约0.46w/w%、约0.36w/w%至约0.44w/w%、约0.38w/w%至约0.42w/w%、或约0.4w/w%。

[0153] 在另一些进一步的实施方案中,本发明提供上文所述的组合物,其中:

[0154] 胆固醇:SN-38为约(0.8-1.8):1(w:w)、约(0.9-1.7):1(w:w)或约(1-1.4):1;和/或

[0155] 白蛋白:SN-38为约(9-21):1(w:w)、约(9-20):1(w:w)、约(11-18):1(w:w)、或约(11.1-17.3):1(w:w);和/或

[0156] 白蛋白:胆固醇为约(6-21):1(w:w)、约(6.7-13):1(w:w)、约(7-13):1(w:w)、约(11-12.7):1(w:w);和/或

[0157] Span 20:SN-38为约(5-10):100(w:w)、约(5-9):100(w:w)、约(6-8.6):100(w:w)、约(6-8):100(w:w)、约(6.5-7):100(w:w);和/或

[0158] 以所述组合物中的SN-38、胆固醇和白蛋白的总量计,

[0159] 所述SN-38的含量为约4w/w%至约10w/w%,约4.5w/w%至约9.5w/w%,约5w/w%至约9w/w%,或约7.5w/w%至约8w/w%;和/或

[0160] 所述胆固醇的含量为约4w/w%至约12.5w/w%,约4.5w/w%至约12w/w%,约7w/w%至约10w/w%,或约7.5w/w%至约8w/w%;和/或

[0161] 所述白蛋白的含量为约78w/w%至约93w/w%,约79w/w%至约91.5w/w%,约80w/w%至约90w/w%,约82w/w%至约89w/w%,约84w/w%至约88w/w%,或约84.5w/w%至约87.5w/w%;和/或

[0162] Span 20的含量为约0.2w/w%至约0.8w/w%、约0.24w/w%至约0.7w/w%、约0.26w/w%至约0.7w/w%、约0.3w/w%至约0.65w/w%、约0.36w/w%至约0.6w/w%、约0.4w/w%至约0.58w/w%、约0.44w/w%至约0.56w/w%、约0.48w/w%至约0.54w/w%、或约0.5w/w%至约0.52w/w%。

[0163] 根据所述第二子集的组合物在较大规模(例如,百毫克级或更多的SN-38原料)的制备,包括在放大工艺,例如中试规模的制备中具有优势,例如在制备过程中减少高压均质的次数,有效减小组合物中纳米颗粒的粒径,提高过滤通量,生理条件下崩解后粒径可控,减少原料损耗和降低成本;以及具有适合的白蛋白的含量,从而能够控制纳米颗粒的粒径,使其更接近于适合成药的尺寸。

[0164] 在根据所述第一和第二子集的一些实施方案中,存在于所述纳米粒子中的SN-38占所述组合物中的SN-38、胆固醇和白蛋白的总量的至少约6w/w%至约12w/w%,例如约7w/w%至约11w/w%、约8w/w%至约10w/w%、约8.3%或约9w/w%。

[0165] 在一些实施方案中,存在于所述纳米粒子中的SN-38占所述组合物中的SN-38的总量的约95w/w%至约99w/w%,例如约96w/w%至约99w/w%,约97w/w%至约99w/w%、约98w/w%至约99w/w%,或约99w/w%或更高。

[0166] 在一些根据上文所述的实施方案中,所述组合物为液体、半固体或固体形式。

[0167] 在一些实施方案中,所述组合物为固体形式,优选为粉末形式,更优选为冻干粉。

[0168] 在一些此类实施方案中,SN-38优选地以无定形和/或纳米晶体形式存在于所述组合物中,如通过电镜和X射线衍射法(Cu-K α)分析所测定的。

[0169] 在一些实施方案中,所述组合物不包含额外的稳定剂。在一些实施方案中,所述组合物还包含额外的稳定剂,所述额外的稳定剂的量使得当所述组合物通过复溶形成水性组合物(包括溶液和乳液)时,所述额外的稳定剂的含量为至少约2w/v%,例如至少约3w/v%,

至少约5w/v%，约5w/v%至约30w/v%，约10w/v%至约25w/v%或约15w/v%至约20w/v%。

[0170] 在一些此类实施方案中，所述组合物还包含额外的稳定剂，以所述组合物的总量计，所述额外的稳定剂的含量为约70w/w%至约96w/w%，例如约70w/w%至约90w/w%，约72w/w%至约89w/w%、约74w/w%至约88w/w%，约76w/w%至约87w/w%，约80w/w%至约86w/w%，约81w/w%至约86w/w%，约82w/w%至约85w/w%、或约83w/w%至约84w/w%。在另一些实施方案中，所述组合物还包含额外的稳定剂，以所述组合物的总量计，所述额外的稳定剂的含量为约80w/w%至约96w/w%或约84w/w%至约95w/w%。

[0171] 所述额外的稳定剂可以选自甘露醇、乳糖、麦芽糖、海藻糖、右旋糖苷、葡萄糖和蔗糖及其任意组合，优选为蔗糖。

[0172] 在另一些实施方案中，所述组合物为液体形式的水性组合物，包括溶液和乳液。

[0173] 在一些此类实施方案中，所述液体形式的组合物包含以纳米晶体和/或囊泡的形式存在的SN-38。

[0174] 在一些此类实施方案中，所述组合物为溶液的形式；在一些实施方案中，所述组合物为乳液的形式。

[0175] 在一些此类实施方案中，以所述组合物的总量计，SN-38的含量为约500.0μg/mL至约1.0mg/mL，例如约600μg/mL至约800μg/mL。

[0176] 在一些此类实施方案中，以所述组合物的总量计，白蛋白的含量为约5.0mg/mL至约10.0mg/mL，例如约6.0mg/mL至约10mg/mL，或约7.0mg/mL至约8.0mg/mL。

[0177] 在一些实施方案中，所述组合物中的纳米粒子具有约90至160nm的平均粒径，例如约95至150nm、约100至140nm、约105至130nm、约110至125nm、约110nm、约115nm、约120nm、约125nm、约130nm、135nm、约140nm或约145nm。

[0178] 在一些实施方案中，所述纳米粒子具有不超过约0.30、例如不超过约0.2、不超过约0.10或不超过约0.01的粒径分布指数(PDI)。

[0179] 在一些实施方案中，所述组合物具有约-35mV至约-20mV，例如约-31mV的Zeta电位。

[0180] 在一些实施方案中，当稀释(例如用pH约7.4的1x PBS稀释)所述组合物致使SN-38在稀释后的组合物中的含量达到约4μg/mL或更低，例如约2μg/mL或更低，约1μg/mL或更低，约0.4μg/mL或更低，约0.1μg/mL或更低，约0.04μg/mL或更低，约0.02μg/mL或更低，或约0.01μg/mL或更低时，所述纳米粒子不发生崩解。

[0181] 在一些此类实施方案中，所述组合物不包含额外的稳定剂。在一些实施方案中，所述组合物还包含额外的稳定剂，其中以所述组合物的总量计，所述额外的稳定剂的含量为至少约2w/v%，例如至少约3w/v%，至少约5w/v%，约5w/v%至约30w/v%，约10w/v%至约25w/v%或约15w/v%至约20w/v%。

[0182] 所述额外的稳定剂可以选自甘露醇、乳糖、麦芽糖、海藻糖、右旋糖苷、葡萄糖和蔗糖及其任意组合，优选为蔗糖。

[0183] 开环的SN-38是SN-38的无活性形式。本发明人令人惊讶地发现，在本申请的组合物中，开环的SN-38仅以非常低的量存在。在一些实施方案中，所述组合物中开环的SN-38占SN-38总量的约2w/w%或更低，优选约1.8w/w%或更低。

[0184] 作为载体的白蛋白可能形成多聚体，包括二聚体、三聚体、多聚体等。白蛋白多聚

体的存在增加了药物、特别是胃肠外给药的药物产生免疫原性的风险。因此,有利的是,含有尽可能地少的白蛋白多聚体。本发明人令人惊讶地发现,本申请的组合物中不存在或基本不存在白蛋白多聚体。优选地,所述组合物中单体形式的白蛋白占白蛋白总量的至少约95w/w%,优选至少约96%,更优选至少约98%,更优选至少约99%,至少约99.2%,至少约99.4%,或者至少约99.5%。可以预期的是,本申请的组合物具有免疫原性低的优势,因而安全性高。

[0185] 可用于本申请的白蛋白选自:人血清白蛋白(HSA)、重组人白蛋白(rHA)、牛血清白蛋白和猪血清白蛋白。例如,所述白蛋白包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。优选地,所述白蛋白选自人血清白蛋白(HSA)和重组人白蛋白(rHA)。

[0186] 在第二方面,本申请提供制备上文所述的根据第一方面的组合物的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

[0187] (1) 将所述SN-38、所述脂质和Span 20溶解于有机溶剂中形成有机相;以及制备白蛋白的水溶液以作为水相;

[0188] (2) 将所述有机相和所述水相混合以形成乳液,所述乳液包含所述纳米粒子,其中在所述纳米粒子中,所述白蛋白包封至少部分所述SN-38和任选的至少部分所述脂质;

[0189] (3) 去除所述乳液中的有机溶剂以得到包含所述纳米粒子的产物。

[0190] 在一些实施方案中,所述方法包括如下步骤:

[0191] (1) 用包含选自DMSO和C₁₋₃醇中的第一有机溶剂和选自CHCl₃及CH₂Cl₂和CHCl₃的混合物的第二有机溶剂的混合有机溶剂溶解所述SN-38、所述脂质和Span 20以形成有机相;以及制备白蛋白的水溶液以作为水相;

[0192] (2) 将所述有机相与所述水相混合以制备乳液,所述乳液包含所述纳米粒子,其中在所述纳米粒子中,所述白蛋白包封至少部分所述SN-38和任选的至少部分所述脂质;

[0193] (3) 除去所述有机溶剂;

[0194] (4) 任选地,将步骤(3)中得到的产物灭菌。

[0195] 在一些优选的实施方案中,在步骤(1)所述的混合有机溶剂中,所述第二有机溶剂与所述DMSO或C₁₋₃醇的体积比为约1:20(v/v)至约20:1(v/v),例如约1:5至约5:1(v/v),约1:2至约4:1(v/v),约1:1至约4:1(v/v),约1.5:1(v/v)至约3:1(v/v)或约2:1(v/v)至约7:3(v/v)。

[0196] 在一些优选的实施方案中,在步骤(2)中,所述有机相:所述水相为约1:2(v/v)至约1:50(v/v),例如约1:5(v/v)至约1:20(v/v),约1:7(v/v)至约1:15(v/v),1:10(v/v)至约1:12(v/v);例如约1:5(v/v)至约1:12(v/v),约1:5(v/v)至约1:12(v/v),约1:6(v/v)、约1:7(v/v)或约1:10(v/v)。

[0197] 在一些优选的实施方案中,步骤(2)包括以下步骤:

[0198] (2-1) 在剪切下,使所述有机相分散在所述水相中以得到粗乳液;和

[0199] (2-2) 将所述粗乳液在高压下均质化以得到包含所述纳米粒子的细乳液。

[0200] 所述C₁₋₃醇包括甲醇、乙醇和异丙醇及其任意组合,例如为乙醇(EtOH)。

[0201] 在一些实施方案中,所述混合有机溶剂包含约7:3(v/v)的所述第二有机溶剂和乙醇。在一些实施方案中,所述混合有机溶剂包含约1:1(v/v)的所述第二有机溶剂和DMSO。

[0202] 在一些进一步的实施方案中,本发明提供上文所述的方法,其中所述方法包括如

下步骤:

[0203] (1) 用1:1 (v/v) 的所述第二有机溶剂/DMSO混合有机溶剂或7:3 (v/v) 的所述第二有机溶剂/乙醇混合有机溶剂溶解所述SN-38、所述脂质和Span 20以形成有机相;以及制备白蛋白的水溶液以作为水相;

[0204] (2) 将所述有机相与所述水相以约1:10 (v/v) 至约1:15 (v/v)、例如约1:12 (v/v) 的比例混合以制备乳液,所述乳液包含所述纳米粒子,其中在所述纳米粒子中,所述白蛋白封装至少部分所述SN-38和任选的至少部分所述脂质;

[0205] (3) 除去所述有机溶剂;

[0206] (4) 任选地,将步骤(3)中得到的产物灭菌。

[0207] 在一些实施方案中,所述第二有机溶剂是 CHCl_3 。在另一些实施方案中,所述第二有机溶剂是 CH_2Cl_2 和 CHCl_3 的混合物,其中优选地,所述混合物中 CH_2Cl_2 和 CHCl_3 的体积比为约2:5-1:1,优选为约2:5。与单独的 CHCl_3 相比,使用 CH_2Cl_2 和 CHCl_3 的混合物作为所述第二有机溶剂具有降低最终产品中 CHCl_3 残留水平的优势,从而减少溶剂残留对临床用药剂量的限制。

[0208] 在一些实施方案中,所述水相不包含额外的稳定剂。

[0209] 在另一些实施方案中,所述水相已经包含额外的稳定剂;在另一些实施方案中,所述方法还包括在步骤(2)之中添加额外的稳定剂。例如,所述额外的稳定剂的量使得在步骤(3)或(4)得到的产物中,所述额外的稳定剂的含量为至少约2w/v%,例如至少约3w/v%,至少约5w/v%,约5w/v%至约30w/v%,约10w/v%至约25w/v%或约15w/v%至约20w/v%。优选地,所述额外的稳定剂可选自:白蛋白类(例如人血清白蛋白、重组人白蛋白、牛血清白蛋白、脱脂奶粉)、单糖、二糖、多糖、甘露醇及其任意组合;优选地选自:甘露醇、乳糖、麦芽糖、海藻糖、右旋糖苷、葡萄糖和蔗糖及其任意组合;优选地为蔗糖。

[0210] 在一些实施方案中,在步骤(2)中,在将所述有机相与所述水相混合之前,向所述水相中添加步骤(1)中所述的混合有机溶剂。例如,所添加的混合溶剂的体积等于或小于所述有机相的体积。例如,所添加的混合有机溶剂与所述有机相的体积比为约1:1 (v/v) 至约1:5 (v/v),例如约1:2 (v/v) 至约1:4 (v/v) 或约1:3 (v/v)。

[0211] 在一些实施方案中,在步骤(1)所述的有机相中,SN-38的浓度为约5-17mg/mL,例如约5.25-12mg/mL,约7-12mg/mL,例如约10mg/mL。

[0212] 在另一些实施方案中,在步骤(1)所述的有机相中,SN-38的浓度为4-10mg/mL,例如约6-8mg/mL。

[0213] 在一些实施方案中,在步骤(1)所述的有机相中,所述脂质的浓度为约3-50mg/mL,例如约5-45mg/mL或约7.5-30mg/mL,约10-25mg/mL或约15-20mg/mL。

[0214] 在另一些实施方案中,在步骤(1)所述的有机相中,所述脂质的浓度为约10-20mg/mL,例如约15mg/mL。

[0215] 在一些实施方案中,在步骤(1)所述的有机相中,所述Span 20的浓度为约0.3-6mg/mL,例如约0.3-2mg/mL或约0.6-1mg/mL。

[0216] 在一些实施方案中,在所述水相中,白蛋白的浓度为约5-15mg/mL,例如约6-12mg/mL,优选约6-10mg/mL。

[0217] 在另一些实施方案中,在所述水相中,白蛋白的浓度为约8-30mg/mL,例如约12-

20mg/mL或约16-18mg/mL。

[0218] 在一些实施方案中,所述方法包括步骤(4)将步骤(3)中得到的产物灭菌。对用于灭菌的方法没有特别的限制。在优选的实施方案中,通过将步骤(3)中得到的产物通过约0.2 μ m的滤膜过滤来除菌。

[0219] 在一些实施方案中,所述方法还包括以下步骤:

[0220] (5)将步骤(3)或(4)得到的产物干燥,优选喷雾干燥或冷冻干燥,以提供固体形式,优选为粉末,更优选为冻干粉的组合物;

[0221] 优选地,SN-38以无定形和/或纳米晶体形式存在于所述组合物中,如通过电镜或X射线衍射法(Cu-K α)分析所测定的。

[0222] 在一些进一步的实施方案中,步骤(5)还包括:在干燥前,向步骤(3)或(4)得到的产物中添加额外的稳定剂,其中所述额外的稳定剂的量使得当步骤(5)所得的固体形式通过复溶形成水性组合物(包括溶液和乳液)时,所述额外的稳定剂的含量为至少约2w/v%,例如至少约3w/v%,至少约5w/v%,约5w/v%至约30w/v%,约10w/v%至约25w/v%或约15w/v%至约20w/v%。

[0223] 所述额外的稳定剂可选自:白蛋白类(例如人血清白蛋白、重组人白蛋白、牛血清白蛋白、脱脂奶粉)、单糖、二糖、多糖、甘露醇及其任意组合;优选地选自:甘露醇、乳糖、麦芽糖、海藻糖、右旋糖苷、葡萄糖和蔗糖及其任意组合;优选为蔗糖。

[0224] 在第三方面,本申请提供制备包含SN-38、脂质、白蛋白和Span 20的组合物的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

[0225] (1)将所述SN-38、所述脂质和Span 20溶解于有机溶剂中以形成有机相;以及制备白蛋白的水溶液以作为水相;

[0226] (2)将所述有机相和所述水相混合以形成乳液,所述乳液包含纳米粒子,其中在所述纳米粒子中,所述白蛋白包封至少部分所述SN-38和任选的至少部分所述脂质;

[0227] (3)去除所述乳液中的有机溶剂以得到含有纳米粒子的产物。

[0228] 所述方法的实施方案如上文关于第二方面的方法所述。

[0229] 在根据第二和第三方面的方法中,部分白蛋白可以包封部分SN-38从而形成纳米粒子,或者可以包封部分脂质从而形成纳米粒子。因此,在一些实施方案中,根据第一方面和下文第四方面的组合物可包含由部分所述白蛋白包封部分所述SN-38而形成的纳米粒子;和/或由部分所述白蛋白包封部分所述脂质而形成的纳米粒子。

[0230] 在第四方面,本申请提供组合物,其可以通过如上文述的根据第三方面的方法制备。

[0231] 在第五方面,本申请还提供制备具有改善的性质的组合物的方法,其中所述组合物包含SN-38、脂质和白蛋白,并且所述白蛋白包封至少部分所述SN-38和任选的至少部分所述脂质以形成纳米粒子,

[0232] 所述方法的特征在于在制备所述组合物的过程中加入Span 20。

[0233] 在一些实施方案中,所述组合物不包含额外的稳定剂。

[0234] 在一些实施方案中,所述改善的性质包括提高的稳定性。

[0235] 在一些实施方案中,当所述组合物为液体形式时,所述提高的稳定性包括:在所述组合物的制备、储存和/或使用中,减少的白蛋白多聚体的产生或含量,和/或降低的纳米粒

子粒径。优选地,所述组合物中不存在或基本不存在白蛋白多聚体,或者白蛋白多聚体占白蛋白总量至多5w/w%,例如至多约4%、至多约2%、至多约1.5%、至多约1.2%、至多约1.1%、至多约1%、或至多约0.8%。

[0236] 在一些实施方案中,所述组合物如在上文第一方面中所述。

[0237] 在一些实施方案中,所述方法包括以下步骤:

[0238] (1) 将所述SN-38、所述脂质和Span 20溶解于有机溶剂中形成有机相;以及制备白蛋白的水溶液以作为水相;

[0239] (2) 将所述有机相和所述水相混合以形成乳液,所述乳液包含所述纳米粒子,其中在所述纳米粒子中,所述白蛋白包封至少部分所述SN-38和任选的至少部分所述脂质;

[0240] (3) 去除所述乳液中的有机溶剂以得到包含所述纳米粒子的产物。

[0241] 进一步地,所述方法的实施方案如上文关于第二方面的方法所述。

[0242] 在第六方面,本申请提供药物组合物,其包含上文所述的组合物以及任选存在的药学上可接受的载体。

[0243] 在第七方面,本申请提供药物组合物,其包含经干燥的上文所述的组合物以及任选存在的药学上可接受的载体。所述干燥优选是冷冻干燥或喷雾干燥,更优选冷冻干燥。优选地,所述药物组合物为固体形式,优选为冻干粉。优选地,SN-38以无定形和/或纳米晶体形式存在于所述组合物中。

[0244] 对本申请的组合物或药物组合物的给药途径没有特别的限制。可以考虑的给药途径包括但不限于口服、经鼻、局部和胃肠外给药。优选地,所述药物组合物用于胃肠外给药,包括但不限于静脉内、动脉内、皮下、皮内和肌内注射给药,更优选静脉内注射(例如,推注或输注)给药。

[0245] 药学上可接受的载体的选择取决于药物或药物组合物的剂型,首先取决于剂型的施用途径(例如用于口服、经鼻、皮内、皮下、局部、肌内或静脉施用的剂型),其次取决于剂型的配方。例如,所述药学上可接受的载体可以包括水(如注射用水)、缓冲液、等渗盐溶液如PBS(磷酸盐缓冲液)、葡萄糖、甘露醇、右旋葡萄糖、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、纤维素、碳酸镁、0.3%甘油、透明质酸、抗坏血酸、乳酸、乙醇、聚亚烷基二醇如聚乙二醇(例如聚乙二醇4000)或聚丙二醇、甘油三酯等。

[0246] 在第八方面,本申请提供上文所述的组合物或者药物组合物在制备用于治疗个体的对SN-38敏感的肿瘤的药物的用途。

[0247] 在第九方面,本申请提供上文所述的组合物或者药物组合物,其用于治疗个体的对SN-38敏感的肿瘤。

[0248] 在第十方面,本申请提供治疗个体的对SN-38敏感的肿瘤的方法,其包括向所述个体施用治疗有效量的上文所述的组合物或者药物组合物。

[0249] 在一些实施方案中,所述个体为哺乳动物,包括但不限于小鼠、大鼠、兔、豚鼠、狗、猫、绵羊、牛、羊、马。在一些实施方案中,所述个体为人。

[0250] “对SN-38敏感的肿瘤”指的是对SN-38的给药有应答的肿瘤,所述应答包括肿瘤细胞的减少、肿瘤尺寸的缩小、肿瘤转移的消除、肿瘤生长的抑制,等等。优选地,所述对SN-38敏感的肿瘤选自结直肠癌、小细胞肺癌、淋巴癌、乳腺癌(优选三阴性乳腺癌)、食管癌、胃癌、肝癌、肾癌、胰腺癌、子宫癌和卵巢癌。

[0251] 实验研究表明抗肿瘤药物与白蛋白结合后,可以显著提高药物的抗肿瘤效果,例如纳米白蛋白结合型紫杉醇,具有肿瘤组织选择性和独特的转运机制,与溶液剂紫杉醇相比,肿瘤中紫杉醇药物的浓度增加33% (Desai N,Trieu V,Yao Z,et al.,Increased antitumor activity,intratumor paclitaxel concentrations,and endothelial celltransport of cremophor-free,albumin-bound paclitaxel,ABI-007,compared with cremophor-based paclitaxel,[J].Clinical cancer research,2006,12(4):1317-1324)。上述结果的产生是因为药物与白蛋白结合后,可以利用肿瘤组织gp60受体与白蛋白结合,达到肿瘤主动靶向作用,以及利用药物白蛋白结合物纳米粒的EPR效应,达到肿瘤被动靶向作用,从而大大提高了药物的肿瘤分布,提高疗效、减小毒副作用。可以预期的是,本申请的组合物或药物组合物具有有利的抗肿瘤功效。通过初步的实验,本发明人发现本申请的组合物具有优于市售盐酸伊立替康注射液的抗肿瘤活性。

[0252] 在第十一方面,本申请提供药盒,其包含上文所述的组合物或者药物组合物。必要时,所述药盒还可包含使用说明书、包装、容纳所述组合物或者药物组合物的容器。

[0253] 尽管在上文第一至十一方面中以SN-38作为活性成分描述了本发明的实施方案,但这些只是本发明概念的一个方面。本发明的概念还涵盖了其他喜树碱类药物作为活性成分的技术方案。预期上文所述的实施方案在SN-38被替换为其他喜树碱类药物时仍然适用。换言之,本申请还包括上文第一至十方面中任一方面所述的任意和全部实施方案,只是其中的SN-38被替换为其他喜树碱类药物,除非上下文中存在抵触。所述其他喜树碱类药物可选自:伊立替康(CPT-11)、10-羟基喜树碱(HCPT)、拓扑替康(TPT)、鲁比替康(9-NC)、9-氨基喜树碱(9-AC)、贝洛替康(Cas.No.:256411-32-2)、Dxd(Cas.No.:1599440-33-1)、DX-8951(依沙替康)、CKD602(倍罗替康(belotecan))、勒托替康(lurtotecan)、Namitecan(Cas.No.:372105-27-6)、ST1481(gimatecan,Cas.No.:292618-32-7)、BNP-1350(Cas.No.203923-89-1)和BN80915(二氟替康(Diflomotecan))。本领域技术人员会理解,此类实施方案也会实现下文所述的有益效果。

[0254] 如本申请的发明内容所述的本发明的实施方案包括:

[0255] 实施方案1.组合物,其包含SN-38、脂质、白蛋白和Span 20,其特征在于,所述组合物包含纳米粒子,其中在所述纳米粒子中,所述白蛋白包封至少部分所述SN-38和任选的至少部分所述脂质;

[0256] 脂质:SN-38为约(0.1-10):1(w:w),约(0.5-6):1(w:w),约(0.5-5):1(w:w),约(0.5-3):1(w:w),约(1-4):1(w:w),约(1.2-4):1(w:w),约(1.4-2):1(w:w),约(1.5-2.5):1(w:w)或约1:1;

[0257] 白蛋白:SN-38为约(1-100):1(w:w),约(1-50):1(w:w),约(3-25):1(w:w),约(5-25):1(w:w),约(5-20):1(w:w),约(5-18):1(w:w),约(6-15):1(w:w),约(7-15):1(w:w),约(6-12):1(w:w),约(7-12):1(w:w)、约(9-11):1(w:w),约10:1(w:w);以及

[0258] Span 20:SN-38为约(3-60):100(w:w),约(4-60):100(w:w),约(5-60):100(w:w),约(6-60):100(w:w),约(7-55):100(w:w),约(8-50):100(w:w),约(10-45):100(w:w),约(12-40):100(w:w),约(14-35):100(w:w),约(15-30):100(w:w),约(16-25):100(w:w),或约(18-20):100(w:w);并且

[0259] 其中所述脂质选自胆固醇、胆固醇衍生物、胆固醇类似物和脂肪酸酯以及它们中

的两者或更多者的任意组合。

[0260] 实施方案2.实施方案1的组合物,其特征在于,白蛋白:脂质为约(1-100):1(w:w),例如约(2-20):1(w:w),约(3-15):1(w:w),约(5-10):1(w:w),约7:1(w:w),或约10:1(w:w)。

[0261] 实施方案3.实施方案1或2的组合物,其特征在于,以所述组合物中的SN-38、脂质和白蛋白的总量计,

[0262] 所述SN-38的含量为约1w/w%至约25w/w%;和/或

[0263] 所述脂质的含量为约1w/w%至约35w/w%;和/或

[0264] 所述白蛋白的含量为约50w/w%至约98w/w%;

[0265] 或者,

[0266] 所述SN-38的含量为约3w/w%至约20w/w%;和/或

[0267] 所述脂质的含量为约2w/w%至约30w/w%;和/或

[0268] 所述白蛋白的含量为约55w/w%至约95w/w%;

[0269] 或者,

[0270] 所述SN-38的含量为约3w/w%至约15w/w%、约4w/w%、约5w/w%、约6w/w%、约6.5w/w%、约7w/w%、约7.5w/w%、约8w/w%、约8.5w/w%、约9w/w%、约10w/w%、约11w/w%、约12w/w%、约13w/w%或约14w/w%;和/或

[0271] 所述脂质的含量为约3w/w%至约30w/w%、约4w/w%、约5w/w%、约6w/w%、约7w/w%、约8w/w%、约8.5w/w%、约9w/w%、约9.5w/w%、约10w/w%、约10.5w/w%、约11w/w%、约11.5w/w%、约12w/w%、约12.5w/w%、约13w/w%、约13.5w/w%、约14w/w%、约15w/w%、约16w/w%、约17w/w%、约18w/w%、约19w/w%、约20w/w%、约21w/w%、约24w/w%、约26w/w%或约28w/w%;和/或

[0272] 所述白蛋白的含量为约60w/w%至约94w/w%、约64w/w%至约93w/w%、约66w/w%至约92w/w%、约68w/w%至约91w/w%、约70w/w%至约90w/w%、约75w/w%至约90w/w%、约76w/w%、约77w/w%、约78w/w%、约79w/w%、约80w/w%、约81w/w%、约82w/w%、约83w/w%、约84w/w%、约85w/w%、约86w/w%、约87w/w%、约88w/w%或约89w/w%。

[0273] 实施方案4.实施方案1至3中任一项的组合物,其特征在于,以所述组合物中的SN-38、脂质、白蛋白和Span 20的总量计,Span 20的含量为约0.03w/w%至约12w/w%、约0.06w/w%至约10w/w%、0.08w/w%至约9w/w%、约0.1w/w%至约8w/w%、约0.2w/w%至约7w/w%、约0.4w/w%至约6w/w%、约0.6w/w%至约5w/w%、约0.8w/w%至约4w/w%、约1w/w%至约2w/w%。

[0274] 实施方案5.实施方案1至4中任一项的组合物,其特征在于,

[0275] 脂质:SN-38为约(1-10):1(w:w)、约(1-8):1(w:w)、约(1-6):1(w:w)、约(1-5):1(w:w)、约(1-4.5):1(w:w)、约(1-4):1(w:w)、约(1.2-3.8):1(w:w)、约(1.4-3.6):1(w:w)、约(1.6-3.4):1(w:w)、约(1.8-3.2):1(w:w)、约(2-3):1(w:w)、约(2.2-2.8):1(w:w)、约(2.4-2.6):1(w:w)、约1:1(w:w)、约2.5:1(w:w)、或约(0.8-1.8):1(w:w)、约(0.9-1.7):1(w:w)、约(1-1.4):1;和/或

[0276] 白蛋白:SN-38为约(5-40):1(w:w)、约(5-小于40):1(w:w)、约(5-35):1(w:w)、约(5-30):1(w:w)、约(8-25):1(w:w)、约(10-22.5):1(w:w)、约(12.5-20):1(w:w)、约(15-17.5):1(w:w)、约(16-18):1(w:w)、约10:1(w:w)、或约(9-21):1(w:w)、约(9-20):1(w:w)、

约(11-18):1(w:w)、约(11.1-17.3):1(w:w);和/或

[0277] Span 20:SN-38为约(5-60):100(w:w)、约(6-60):100(w:w)、约(7-55):100(w:w)、约(8-50):100(w:w)、约(10-45):100(w:w)、约(12-40):100(w:w)、约(14-35):100(w:w)、约(15-30):100(w:w)、约(16-25):100(w:w)、约(18-20):100(w:w)、或约(5-10):100(w:w)、约(5-9):100(w:w)、约(6-8.6):100(w:w)、约(6-8):100(w:w)、约(6.5-7):100(w:w);和/或

[0278] 白蛋白:脂质为约(1-40):1(w:w)、约(1-小于40):1(w:w)、约(2-35):1(w:w)、约(3-15):1(w:w)、约(5-10):1(w:w)、约(6-8):1(w:w)或约7:1(w:w)、或约(6-21):1(w:w)、约(6.7-13):1(w:w)、约(7-13):1(w:w)、约(11-12.7):1(w:w)。

[0279] 实施方案6.实施方案1至5中任一项的组合物,其特征在于,以所述组合物中的SN-38、脂质和白蛋白的总量计,

[0280] 所述SN-38的含量为约2w/w%至约16w/w%;和/或

[0281] 所述脂质的含量为约2w/w%至约35w/w%;和/或

[0282] 所述白蛋白的含量为约75w/w%至约96w/w%;

[0283] 或者,

[0284] 所述SN-38的含量为约2.5w/w%至约15w/w%,约4w/w%至约10w/w%,约4.5w/w%至约9.5w/w%,约5w/w%至约9w/w%,或约7.5w/w%至约8w/w%;和/或

[0285] 所述组合物中的脂质的含量为约2.5w/w%至约30w/w%,约4w/w%至约12.5w/w%,约4.5w/w%至约12w/w%,约7w/w%至约10w/w%,或约7.5w/w%至约8w/w%;和/或

[0286] 所述组合物中的白蛋白的含量为约76w/w%至约95w/w%,约78w/w%至约93w/w%,约79w/w%至约91.5w/w%,约80w/w%至约90w/w%,约82w/w%至约89w/w%,约84w/w%至约88w/w%,或约84.5w/w%至约87.5w/w%;

[0287] 或者,

[0288] 所述SN-38的含量为约3w/w%至约14w/w%,约3.5w/w%至约12w/w%、约4w/w%、约4.2w/w%、约4.5w/w%、约4.6w/w%、约4.8w/w%、约5w/w%、约5.5w/w%、约6w/w%、约6.5w/w%、约7w/w%、约7.5w/w%、约7.6w/w%、约7.8w/w%、约8w/w%、约8.5w/w%、约9w/w%、约9.2w/w%、约9.5w/w%、约9.6w/w%、约9.8w/w%、约10w/w%、约10.5w/w%、约11w/w%或约11.5w/w%;和/或

[0289] 所述脂质的含量为约4w/w%至约25w/w%、约4.5w/w%至约20w/w%、约4.3w/w%、约4.5w/w%、约4.7w/w%、约5w/w%、约5.5w/w%、约6w/w%、约6.5w/w%、约6.7w/w%、约6.9w/w%、约7w/w%、约7.5w/w%、约7.6w/w%、约7.8w/w%、约8w/w%、约8.5w/w%、约9w/w%、约9.5w/w%、约10w/w%、约10.5w/w%、约11w/w%、约11.5w/w%、约12w/w%、约12.1w/w%、约12.3w/w%、约12.5w/w%、约13w/w%、约13.5w/w%、约14w/w%、约14.5w/w%、约15w/w%、约15.5w/w%、约16w/w%、约16.5w/w%、约17w/w%、约17.5w/w%、约18w/w%、约18.5w/w%、约19w/w%或约19.5w/w%;和/或

[0290] 所述白蛋白的含量为约78w/w%至约92w/w%、约79w/w%、约79.2w/w%、约79.4w/w%、约79.6w/w%、约79.8w/w%、约80w/w%、约81w/w%、约82w/w%、约83w/w%、约84w/w%、约84.3w/w%、约84.5w/w%、约84.7w/w%、约84.9w/w%、约85w/w%、约86w/w%、约87w/w%、约87.3w/w%、约87.5w/w%、约87.7w/w%、约87.9w/w%、约88w/w%、约89w/w%、约90w/w%、约91w/w%、约91.3w/w%、或约91.5w/w%。

[0291] 实施方案7.实施方案1至6中任一项的组合物,其特征在于,以所述组合物中的SN-38、脂质、白蛋白和Span 20的总量计,Span 20的含量为约0.14w/w%至约5w/w%、约0.2w/w%至约2.5w/w%、约0.22w/w%至约2.0w/w%、约0.24w/w%至约2w/w%、约0.26w/w%至约1.5w/w%、约0.28w/w%至约1.0w/w%、约0.3w/w%至约0.9w/w%、约0.32w/w%至约0.8w/w%、约0.34w/w%至约0.7w/w%、约0.36w/w%至约0.6w/w%、约0.38w/w%至约0.58w/w%、约0.4w/w%至约0.56w/w%、约0.42w/w%至约0.54w/w%、约0.44w/w%至约0.52w/w%、约0.46w/w%、约0.48w/w%、约0.5w/w%、约0.2w/w%至约0.8w/w%、约0.24w/w%至约0.7w/w%、约0.26w/w%至约0.7w/w%、约0.3w/w%至约0.65w/w%、约0.36w/w%至约0.6w/w%、约0.4w/w%至约0.58w/w%、约0.44w/w%至约0.56w/w%、约0.48w/w%至约0.54w/w%、或约0.5w/w%至约0.52w/w%。

[0292] 实施方案8.实施方案1至7中任一项的组合物,其特征在于,

[0293] 存在于所述纳米粒子中的SN-38占所述组合物中的SN-38、脂质和白蛋白的总量的至少约1w/w%或至少约2w/w%,例如至少约3w/w%,约3w/w%至约13w/w%,约4w/w%至约12w/w%,约4w/w%、约5w/w%、约6w/w%、约7w/w%、约8w/w%、约9w/w%、约10w/w%或约11w/w%;和/或

[0294] 存在于所述纳米粒子中的SN-38占所述组合物中的SN-38的总量的约80w/w%至约99w/w%,例如约88w/w%至约98w/w%,约89w/w%、约90w/w%、约91w/w%、约92w/w%、约93w/w%、约94w/w%、约95w/w%、约96w/w%或约97w/w%。

[0295] 实施方案9.实施方案1至8中任一项的组合物,其特征在于,

[0296] 所述胆固醇衍生物选自胆固醇与有机酸形成的酯,包括胆固醇棕榈酸酯和胆固醇辛酸酯及其组合;和/或;

[0297] 所述胆固醇类似物选自维生素D2、维生素D3及其组合;和/或

[0298] 所述脂肪酸酯选自脂肪酸甘油酯,例如长链脂肪酸甘油酯,包括硬脂酸甘油酯,例如单硬脂酸甘油酯。

[0299] 实施方案10.实施方案1至9中任一项的组合物,其特征在于,所述脂质为胆固醇。

[0300] 实施方案11.实施方案10的组合物,其特征在于,

[0301] 胆固醇:SN-38为约(1-6):1(w:w)、约(1.2-5):1(w:w)、约(1.4-4):1(w:w)、约3:1(w:w)、约2:1(w:w)、约1:1(w:w)、或约(0.8-1.8):1(w:w)、约(0.9-1.7):1(w:w)、约(1-1.4):1;和/或

[0302] 白蛋白:SN-38为约(3-25):1(w:w)、约(4-20):1(w:w)、约(5-15):1(w:w)、约(6-12):1(w:w)、约(7-12):1(w:w)、约(9-11):1(w:w)或约10:1(w:w)、或约(9-21):1(w:w)、约(9-20):1(w:w)、约(11-18):1(w:w)、约(11.1-17.3):1(w:w);和/或

[0303] 白蛋白:胆固醇为约(2-20):1(w:w)、约(3-15):1(w:w)、约(5-10):1(w:w)或约7:1(w:w)、或约(6-21):1(w:w)、约(6.7-13):1(w:w)、约(7-13):1(w:w)、约(11-12.7):1(w:w);和/或

[0304] 以所述组合物中的SN-38、胆固醇和白蛋白的总量计,

[0305] 所述SN-38的含量为约3w/w%至约15w/w%、约4w/w%至约15w/w%、约6w/w%至约10w/w%或约8w/w%至约12w/w%、或约4w/w%至约10w/w%、约4.5w/w%至约9.5w/w%、约5w/w%至约9w/w%、约7.5w/w%至约8w/w%;和/或

[0306] 所述胆固醇的含量为约5w/w%至约25w/w%、约6w/w%至约22w/w%、约15w/w%至约20w/w%、或约4w/w%至约12.5w/w%、约4.5w/w%至约12w/w%、约7w/w%至约10w/w%、约7.5w/w%至约8w/w%；和/或

[0307] 所述白蛋白的含量为约64w/w%至约90w/w%、约70w/w%至约90w/w%、或约78w/w%至约93w/w%、约79w/w%至约91.5w/w%、约80w/w%至约90w/w%、约82w/w%至约89w/w%、约84w/w%至约88w/w%、约84.5w/w%至约87.5w/w%；和/或

[0308] 存在于所述纳米粒子中的SN-38占所述组合物中的SN-38、胆固醇和白蛋白的总量的至少约3w/w%，例如约3w/w%至约13w/w%，约4w/w%至约12w/w%，约4w/w%、约5w/w%、约6w/w%、约7w/w%、约8w/w%、约9w/w%、约10w/w%或约11w/w%。

[0309] 实施方案12.实施方案10的组合物，其中胆固醇:SN-38为约(1-3):1(w:w)、约(1.2-2.5):1(w:w)、约(1.4-2):1(w:w)、约(1.5-2):1(w:w)、约(1.3-1.8):1(w:w)、约(1.4-1.6):1(w:w)、约(1.5-1.7):1(w:w)、约(1.2-1.5):1(w:w)、约1:1(w:w)、约(1.4-1.5):1(w:w)、或约(0.8-1.8):1(w:w)、约(0.9-1.7):1(w:w)、约(1-1.4):1；

[0310] 白蛋白:SN-38为约(5-15):1(w:w)、约(5-12):1(w:w)、约(6-12):1(w:w)或约(7-12):1(w:w)、约(9-11):1(w:w)、约(10-12):1(w:w)、约11:1(w:w)、或约(9-21):1(w:w)、约(9-20):1(w:w)、约(11-18):1(w:w)、或约(11.1-17.3):1(w:w)；以及

[0311] 白蛋白:胆固醇为约(3-10):1(w:w)、约(4-8):1(w:w)、约(5-7):1(w:w)、或约(6-21):1(w:w)、约(6.7-13):1(w:w)、约(7-13):1(w:w)、约(11-12.7):1(w:w)。

[0312] 实施方案13.实施方案12的组合物，其特征在于，以所述组合物中的SN-38、胆固醇和白蛋白的总量计，

[0313] 所述SN-38的含量为约6w/w%至约14w/w%，约6.5w/w%至约13w/w%，约7w/w%至约12w/w%，约7.5w/w%至约12w/w%、约8w/w%至约11w/w%、约8.5w/w%至约10w/w%，约9w/w%，或约4w/w%至约10w/w%，约4.5w/w%至约9.5w/w%，约5w/w%至约9w/w%，或约7.5w/w%至约8w/w%；和/或

[0314] 所述胆固醇的含量为约8w/w%至约18w/w%，约8.5w/w%至约17w/w%、约9w/w%至约16w/w%、约9.5w/w%至约16w/w%、约10w/w%至约16w/w%、约10.5w/w%至约16w/w%，约11w/w%至约15w/w%，约11.5w/w%至约15w/w%，约12w/w%至约15w/w%、约12.5w/w%至约14w/w%、约13w/w%至约13.5w/w%，或约4w/w%至约12.5w/w%，约4.5w/w%至约12w/w%，约7w/w%至约10w/w%，或约7.5w/w%至约8w/w%；和/或

[0315] 所述白蛋白的含量为约66w/w%至约90w/w%，约68w/w%至约89w/w%、约70w/w%至约88w/w%、约70w/w%至约87w/w%、约70w/w%至约86w/w%，约70w/w%至约85w/w%，约75w/w%至约85w/w%，约76w/w%、约77w/w%、约78w/w%、约79w/w%、80w/w%、81w/w%、约82w/w%约83w/w%，约84w/w%，约78w/w%至约93w/w%，约79w/w%至约91.5w/w%，约80w/w%至约90w/w%，约82w/w%至约89w/w%，约84w/w%至约88w/w%，或约84.5w/w%至约87.5w/w%。

[0316] 实施方案14.实施方案10的组合物，其特征在于，

[0317] 胆固醇:SN-38为约(1-5):1(w:w)、约(1-4.5):1(w:w)、约(1-4):1(w:w)、约(1.2-3.8):1(w:w)、约(1.4-3.6):1(w:w)、约(1.6-3.4):1(w:w)、约(1.8-3.2):1(w:w)、约(2-3):1(w:w)、约(2.2-2.8):1(w:w)、约(2.4-2.6):1(w:w)、约2.5:1(w:w)、约1:1(w:w)、或约

(0.8-1.8):1(w:w)、约(0.9-1.7):1(w:w)、约(1-1.4):1;和/或

[0318] 白蛋白:SN-38为约(5-25):1(w:w)、约(5-20):1(w:w)、约(6-19):1(w:w)、约(7-18):1(w:w)、约(8-16):1(w:w)、约(9-14):1(w:w)或约(10-12):1(w:w)、或约(9-21):1(w:w)、约(9-20):1(w:w)、约(11-18):1(w:w)、或约(11.1-17.3):1(w:w);和/或

[0319] 白蛋白:胆固醇为约(5-25):1(w:w)、约(6-20):1(w:w)、约(7-18):1(w:w)、约(8-16):1(w:w)、约(9-14):1(w:w)、约(10-12):1(w:w)、或约(6-21):1(w:w)、约(6.7-13):1(w:w)、约(7-13):1(w:w)、约(11-12.7):1(w:w);和/或

[0320] Span 20:SN-38为约(5-40):100(w:w)、约(6-30):100(w:w)、约(7-25):100(w:w)、约(8-20):100(w:w)、约(9-15):100(w:w)、约(10-12):100(w:w)、或约(5-10):100(w:w)、约(5-9):100(w:w)、约(6-8.6):100(w:w)、约(6-8):100(w:w)、约(6.5-7):100(w:w);和/或

[0321] 以所述组合物中的SN-38、胆固醇和白蛋白的总量计,

[0322] 所述SN-38的含量为约3w/w%至约10w/w%、约3.5w/w%至约9.5w/w%、约4w/w%、约4.5w/w%、约5w/w%、约5.5w/w%、约6w/w%、约6.5w/w%、约7w/w%、约7.5w/w%、约8w/w%、约8.5w/w%、约9w/w%、或约4w/w%至约10w/w%、约4.5w/w%至约9.5w/w%、约5w/w%至约9w/w%、约7.5w/w%至约8w/w%;和/或

[0323] 所述胆固醇的含量为约4w/w%至约18w/w%、约4.5w/w%至约17.5w/w%、约5w/w%、约5.5w/w%、约6w/w%、约6.5w/w%、约7w/w%、约7.5w/w%、约8w/w%、8.5w/w%、约9w/w%、约9.5w/w%、约10w/w%、约10.5w/w%、约11w/w%、约11.5w/w%、约12w/w%、约12.5w/w%、约13w/w%、约13.5w/w%、约14w/w%、约14.5w/w%、约15w/w%、约15.5w/w%、约16w/w%、约16.5w/w%、约17w/w%、或约4w/w%至约12.5w/w%、约4.5w/w%至约12w/w%、约7w/w%至约10w/w%、约7.5w/w%至约8w/w%;和/或

[0324] 所述白蛋白的含量为约78w/w%至约92w/w%、约79w/w%、约80w/w%、约81w/w%、约82w/w%、约83w/w%、约84w/w%、约85w/w%、约86w/w%、约87w/w%、约88w/w%、约89w/w%、约90w/w%、约91w/w%、或约78w/w%至约93w/w%、约79w/w%至约91.5w/w%、约80w/w%至约90w/w%、约82w/w%至约89w/w%、约84w/w%至约88w/w%、或约84.5w/w%至约87.5w/w%。

[0325] 实施方案15.实施方案12至14中任一项的组合物,其特征在于,

[0326] 存在于所述纳米粒子中的SN-38占所述组合物中的SN-38、胆固醇和白蛋白的总量的至少约6w/w%至约12w/w%,例如约7w/w%至约11w/w%、约8w/w%至约10w/w%、约8.3%或约9w/w%;和/或

[0327] 存在于所述纳米粒子中的SN-38占所述组合物中的SN-38的总量的约95w/w%至约99w/w%,例如约96w/w%至约99w/w%、约97w/w%至约99w/w%、约98w/w%至约99w/w%、约99w/w%或更高。

[0328] 实施方案16.实施方案1至15中任一项的组合物,其特征在于,所述组合物为液体、半固体或固体形式。

[0329] 实施方案17.实施方案1至16中任一项的组合物,其特征在于,所述组合物为固体形式,优选为粉末形式,更优选为冻干粉;

[0330] 优选地,SN-38以无定形和/或纳米晶体的形式存在于所述组合物中。

[0331] 实施方案18.实施方案1至17中任一项的组合物,其特征在于,所述组合物不包含

额外的稳定剂;或者

[0332] 优选地,所述组合物还包含额外的稳定剂,例如冻干稳定剂,所述额外的稳定剂的含量使得当所述组合物通过复溶形成水性组合物(包括溶液和乳液)时,所述额外的稳定剂的含量为至少约2w/v%,例如至少约3w/v%,例如至少约5w/v%,约5w/v%至约30w/v%,约10w/v%至约25w/v%或约15w/v%至约20w/v%。

[0333] 实施方案19.实施方案17或18的组合物,其特征在于,所述组合物还包含额外的稳定剂,以所述组合物的总量计,

[0334] 所述额外的稳定剂的含量为约60w/w%至约98w/w%,例如约65w/w%至约97w/w%,约68w/w%至约96w/w%,约69w/w%至约95w/w%,约70w/w%至约94w/w%、约71w/w%至约93w/w%、约72w/w%至约92w/w%、约73w/w%、约74w/w%、约75w/w%、约76w/w%、约77w/w%、约78w/w%、约79w/w%、约80w/w%、约81w/w%、约82w/w%、约83w/w%、约84w/w%、约85w/w%、约86w/w%、约87w/w%、约88w/w%、约89w/w%、约90w/w%或约91w/w%;

[0335] 例如,所述额外的稳定剂的含量为约70w/w%至约96w/w%、约70w/w%至约90w/w%、约72w/w%至约89w/w%、约74w/w%至约88w/w%、约76w/w%至约87w/w%,或约80w/w%至约96w/w%、约80w/w%至约86w/w%、约81w/w%至约86w/w%、约82w/w%至约85w/w%、约83w/w%至约84w/w%、约84w/w%至约95w/w%。

[0336] 实施方案20.实施方案18或19的组合物,其中所述额外的稳定剂选自:白蛋白类(例如人血清白蛋白、重组人白蛋白、牛血清白蛋白、脱脂奶粉)、单糖、二糖、多糖、甘露醇及其任意组合;优选地选自:甘露醇、乳糖、麦芽糖、海藻糖、右旋糖苷、葡萄糖和蔗糖及其任意组合;优选为蔗糖。

[0337] 实施方案21.实施方案17至20中任一项的组合物,其中当所述组合物通过复溶形成水性组合物(包括溶液和乳液)而具有约0.1 μ g/mL至约30.0mg/mL时,所述纳米粒子具有约50至200nm,例如约90至150nm、约95至140nm、约100至130nm、约105至125nm或约110至120nm的平均粒径。

[0338] 实施方案22.实施方案1至16中任一项的组合物,其特征在于,所述组合物为液体形式的水性组合物,包括溶液和乳液;

[0339] 特别地,所述液体形式的组合物包含以纳米晶体和/或囊泡的形式存在的SN-38。

[0340] 实施方案23.实施方案22的组合物,其特征在于,以所述组合物的总量计,

[0341] SN-38的含量为约0.1 μ g/mL至约30.0mg/mL、约0.2 μ g/mL至约27.0mg/mL、约0.5 μ g/mL至约24.0mg/mL、约1.0 μ g/mL至约21.0mg/mL、约5.0 μ g/mL至约18.0mg/mL、约10.0 μ g/mL至约15.0mg/mL、约20.0 μ g/mL至约12mg/mL、约25.0 μ g/mL至约9mg/mL、约50.0 μ g/mL至约6.0mg/mL或约100.0 μ g/mL至约3.0mg/mL;和/或

[0342] 所述脂质的含量为约0.05 μ g/mL至约100.0mg/mL、约0.1 μ g/mL至约90.0mg/mL、约0.25 μ g/mL至约80.0mg/mL、约0.5 μ g/mL至约70.0mg/mL、约2.5 μ g/mL至约60.0mg/mL、约5.0 μ g/mL至约50.0mg/mL、约10.0 μ g/mL至约40.0mg/mL、约12.5 μ g/mL至约30.0mg/mL、约25.0 μ g/mL至约20.0mg/mL、或约50.0 μ g/mL至约10.0mg/mL;和/或

[0343] 白蛋白的含量为约3.0 μ g/mL至约300.0mg/mL、约6.0 μ g/mL至约270.0mg/mL、约15.0 μ g/mL至约240.0mg/mL、约30.0 μ g/mL至约210.0mg/mL、约150.0 μ g/mL至约180.0mg/mL、约300.0 μ g/mL至约150.0mg/mL、约600.0 μ g/mL至约120.0mg/mL、约750.0 μ g/mL至约90.0mg/

mL、约1500.0 μ g/mL至约60.0mg/mL、或约3.0mg/mL至约30.0mg/mL。

[0344] 实施方案24.实施方案22或23的组合物,其特征在于,以所述组合物的总量计,

[0345] SN-38的含量为约100.0 μ g/mL至约3.0mg/mL,例如约200.0 μ g/mL至约2.5mg/mL、约300.0 μ g/mL至约2.0mg/mL、约400.0 μ g/mL至约1.5mg/mL、约500.0 μ g/mL至约1.0mg/mL、或约600 μ g/mL至约800 μ g/mL;和/或

[0346] 所述脂质的含量为约50.0 μ g/mL至约10.0mg/mL,例如约100.0 μ g/mL至约8.0mg/mL、约200.0 μ g/mL至约6.0mg/mL、约300.0 μ g/mL至约4.0mg/mL、约400.0 μ g/mL至约3.0mg/mL、约500.0 μ g/mL至约2.5mg/mL、约600.0 μ g/mL至约2.0mg/mL、约700.0 μ g/mL至约1.5mg/mL、约800 μ g/mL至约1.0mg/mL、或约200 μ g/mL至约1.5mg/mL;和/或

[0347] 白蛋白的含量为约3.0mg/mL至约30.0mg/mL,例如约4.0mg/mL至约25.0mg/mL、约5.0mg/mL至约20.0mg/mL、约6.0mg/mL至约15.0mg/mL、约7.0mg/mL至约12.0mg/mL、或约8.0mg/mL至约10.0mg/mL。

[0348] 实施方案25.实施方案22至24中任一项的组合物,其特征在于,所述纳米粒子具有约50至200nm,例如约90至150nm、约95至140nm、约100至130nm、约105至125nm或约110至120nm的平均粒径。

[0349] 实施方案26.实施方案22至25中任一项的组合物,其特征在于,当在4 $^{\circ}$ C下保存24h后,所述纳米粒子具有约50至200nm、例如约90至150nm或约100至130nm的平均粒径。

[0350] 实施方案27.实施方案22至26中任一项的组合物,其特征在于,所述纳米粒子具有不超过约0.30、例如不超过约0.2、不超过约0.10或不超过约0.01的粒径分布指数(PDI)。

[0351] 实施方案28.实施方案22至27中任一项的组合物,其特征在于,所述组合物具有约-35mV至约-20mV,例如约-31mV的Zeta电位。

[0352] 实施方案29.实施方案22至28中任一项的组合物,其特征在于,当稀释(例如用pH约7.4的1x PBS稀释)所述组合物致使SN-38在稀释后的组合物中的含量达到约4 μ g/mL或更低,例如约2 μ g/mL或更低,约1 μ g/mL或更低,约0.4 μ g/mL或更低,约0.1 μ g/mL或更低,约0.04 μ g/mL或更低,约0.02 μ g/mL或更低,或约0.01 μ g/mL或更低时,所述纳米粒子不发生崩解。

[0353] 实施方案30.实施方案22至29中任一项的组合物,其特征在于,所述组合物不包含额外的稳定剂;或者

[0354] 优选地,所述组合物还包含额外的稳定剂,其中以所述组合物的总量计,所述额外的稳定剂的含量为至少约2w/v%,例如至少约3w/v%,至少约5w/v%,约5w/v%至约30w/v%,约10w/v%至约25w/v%或约15w/v%至约20w/v%。

[0355] 实施方案31.实施方案30的组合物,其中所述额外的稳定剂选自:白蛋白类(例如人血清白蛋白、重组人白蛋白、牛血清白蛋白、脱脂奶粉)、单糖、二糖、多糖、甘露醇及其任意组合;优选地选自:甘露醇、乳糖、麦芽糖、海藻糖、右旋糖苷、葡萄糖和蔗糖及其任意组合;优选为蔗糖。

[0356] 实施方案32.实施方案1至31中任一项的组合物,其特征在于,所述组合物中开环的SN-38占SN-38总量的约2w/w%或更低,例如约1.8w/w%或更低;和/或

[0357] 所述组合物中不存在或基本不存在白蛋白多聚体;例如,所述组合物中单体形式的白蛋白占白蛋白总量的至少约95w/w%,例如至少约96%,至少约98%,至少约99%,至少约99.2%,至少约99.4%,或者至少约99.5%。

[0358] 实施方案33. 实施方案1至32中任一项的组合物, 其特征在于, 所述白蛋白选自: 人血清白蛋白(HSA)、重组人白蛋白(rHA)、牛血清白蛋白和猪血清白蛋白; 例如, 所述白蛋白包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列;

[0359] 优选地, 所述白蛋白选自人血清白蛋白(HSA)和重组人白蛋白(rHA)。

[0360] 实施方案34. 制备实施方案1至33中任一项所述的组合物的方法, 其特征在于, 所述方法包括以下步骤:

[0361] (1) 将所述SN-38、所述脂质和Span 20溶解于有机溶剂中形成有机相; 以及制备白蛋白的水溶液以作为水相;

[0362] (2) 将所述有机相和所述水相混合以形成乳液, 所述乳液包含所述纳米粒子, 其中在所述纳米粒子中, 所述白蛋白包封至少部分所述SN-38和任选的至少部分所述脂质;

[0363] (3) 去除所述乳液中的有机溶剂以得到包含所述纳米粒子的产物。

[0364] 实施方案35. 实施方案34所述的方法, 其特征在于, 所述方法包括以下步骤:

[0365] (1) 用包含选自DMSO和C₁₋₃醇(包括甲醇、乙醇和异丙醇及其任意组合, 优选乙醇(EtOH))中的第一有机溶剂和选自CHCl₃及CH₂Cl₂和CHCl₃的混合物的第二有机溶剂的混合有机溶剂溶解所述SN-38、所述脂质和Span 20以形成有机相, 其中在所述混合有机溶剂中, 所述第二有机溶剂与所述DMSO或C₁₋₃醇的体积比为约1:20(v/v)至约20:1(v/v), 例如约1:5至约5:1(v/v), 约1:2至约4:1(v/v), 约1:1至约4:1(v/v), 约1.5:1(v/v)至约3:1(v/v)或约2:1(v/v)至约7:3(v/v); 以及制备白蛋白的水溶液以作为水相;

[0366] (2) 将所述有机相与所述水相混合以制备乳液, 所述乳液包含所述纳米粒子, 其中在所述纳米粒子中, 所述白蛋白包封至少部分所述SN-38和任选的至少部分所述脂质;

[0367] (3) 除去所述有机溶剂;

[0368] (4) 任选地, 将步骤(3)中得到的产物灭菌, 优选通过约0.2μm的滤膜过滤来除菌;

[0369] 任选地, 其中所述第二有机溶剂是CHCl₃; 或CH₂Cl₂和CHCl₃的混合物, 其中任选地, 所述混合物中CH₂Cl₂和CHCl₃的体积比为约2:5-1:1, 优选为约2:5。

[0370] 实施方案36. 实施方案34或35的方法, 其特征在于, 在步骤(2)中, 所述有机相: 所述水相为约1:2(v/v)至约1:50(v/v), 例如约1:5(v/v)至约1:20(v/v), 约1:7(v/v)至约1:15(v/v), 约1:10(v/v)至约1:12(v/v); 例如约1:5(v/v)至约1:12(v/v), 约1:5(v/v)至约1:12(v/v), 约1:6(v/v)、约1:7(v/v)或约1:10(v/v)。

[0371] 实施方案37. 实施方案34至36中任一项的方法, 其特征在于, 步骤(2)包括以下步骤:

[0372] (2-1) 在剪切下, 使所述有机相分散在所述水相中以得到粗乳液; 和

[0373] (2-2) 将所述粗乳液在高压下均质化以得到包含所述纳米粒子的细乳液。

[0374] 实施方案38. 实施方案34至37中任一项的方法, 其特征在于,

[0375] 所述水相不包含额外的稳定剂; 或者

[0376] 所述水相已经包含额外的稳定剂; 或者

[0377] 所述方法还包括在步骤(2)之中添加额外的稳定剂; 并且

[0378] 其中所述额外的稳定剂的量使得在步骤(3)或(4)得到的产物中, 所述额外的稳定剂的含量为至少约2w/v%, 例如至少约3w/v%, 至少约5w/v%, 约5w/v%至约30w/v%, 约10w/v%至约25w/v%或约15w/v%至约20w/v%。

[0379] 实施方案39. 实施方案38的方法, 其中所述额外的稳定剂选自: 白蛋白类(例如人血清白蛋白、重组人白蛋白、牛血清白蛋白、脱脂奶粉)、单糖、二糖、多糖、甘露醇及其任意组合; 优选地选自: 甘露醇、乳糖、麦芽糖、海藻糖、右旋糖苷、葡萄糖和蔗糖及其任意组合; 优选为蔗糖。

[0380] 实施方案40. 实施方案34至39中任一项的方法, 其特征在于, 在步骤(2)中, 在将所述有机相与所述水相混合之前, 向所述水相中添加步骤(1)中所述的混合有机溶剂。

[0381] 实施方案41. 实施方案40的方法, 其特征在于, 所添加的混合有机溶剂的体积等于或小于所述有机相的体积; 例如, 所添加的混合有机溶剂与所述有机相的体积比为约1:1(v/v)至约1:5(v/v), 例如约1:2(v/v)至约1:4(v/v)或约1:3(v/v)。

[0382] 实施方案42. 实施方案34至41中任一项的方法, 其特征在于, 在步骤(1)所述的有机相中,

[0383] SN-38的浓度为约5-17mg/mL, 例如约5.25-12mg/mL, 约7-12mg/mL, 或约10mg/mL; 和/或

[0384] 所述脂质的浓度为约3-50mg/mL, 例如约5-45mg/mL或约7.5-30mg/mL, 约10-25mg/mL或约15-20mg/mL; 和/或

[0385] 在所述水相中, 白蛋白的浓度为约5-15mg/mL, 例如约6-12mg/mL, 或约6-10mg/mL。

[0386] 实施方案43. 实施方案34至41中任一项的方法, 其特征在于, 在步骤(1)所述的有机相中,

[0387] SN-38的浓度为约4-10mg/mL, 例如约6-8mg/mL; 和/或

[0388] 所述脂质的浓度为约10-20mg/mL, 例如约15mg/mL; 和/或

[0389] 所述Span 20的浓度为约0.3-6mg/mL, 例如约0.3-2mg/mL或约0.6-1mg/mL; 和/或

[0390] 在所述水相中, 白蛋白的浓度为约8-30mg/mL, 例如约12-20mg/mL或约16-18mg/mL。

[0391] 实施方案44. 实施方案34至43中任一项的方法, 所述方法包括步骤(4)将步骤(3)中得到的产物灭菌, 优选通过约0.2 μ m的滤膜过滤来除菌。

[0392] 实施方案45. 实施方案34至44中任一项的方法, 其特征在于, 所述方法还包括以下步骤:

[0393] (5) 将步骤(3)或(4)得到的产物干燥, 优选喷雾干燥或冷冻干燥, 以提供固体形式, 优选为粉末, 更优选为冻干粉的组合物;

[0394] 优选地, SN-38以无定形形式存在于所述组合物中。

[0395] 实施方案46. 实施方案45所述的方法, 其特征在于, 步骤(5)还包括: 在干燥前, 向步骤(3)或(4)得到的产物中添加如实施方案39所述的额外的稳定剂, 其中所述额外的稳定剂的量使得当步骤(5)所得的固体形式通过复溶形成水性组合物(包括溶液和乳液)时, 所述额外的稳定剂的含量为至少约2w/v%, 例如至少约3w/v%, 至少约5w/v%, 约5w/v%至约30w/v%, 约10w/v%至约25w/v%或约15w/v%至约20w/v%。

[0396] 实施方案47. 药物组合物, 其包含实施方案1至33中任一项的组合物以及任选存在的药学上可接受的载体。

[0397] 实施方案48. 药物组合物, 其包含经干燥的实施方案1至33中任一项的组合物以及任选存在的药学上可接受的载体。

[0398] 实施方案49. 实施方案48的药物组合物, 其中所述干燥是冷冻干燥或喷雾干燥, 优选冷冻干燥。

[0399] 实施方案50. 实施方案48或49的药物组合物, 其为固体形式, 优选为冻干粉; 优选用于胃肠外给药, 更优选静脉内注射给药。

[0400] 实施方案51. 实施方案1至33中任一项的组合物或者实施方案47至50中任一项的药物组合物在制备用于治疗个体的对SN-38敏感的肿瘤的药物中的用途; 优选地, 所述肿瘤选自结直肠癌、小细胞肺癌、淋巴瘤、乳腺癌(优选三阴性乳腺癌)、食管癌、胃癌、肝癌、肾癌、胰腺癌、子宫癌和卵巢癌。

[0401] 实施方案52. 实施方案1至33中任一项的组合物或者实施方案47至50中任一项的药物组合物, 其用于治疗个体的对SN-38敏感的肿瘤; 优选地, 所述肿瘤选自结直肠癌、小细胞肺癌、淋巴瘤、乳腺癌(优选三阴性乳腺癌)、食管癌、胃癌、肝癌、肾癌、胰腺癌、子宫癌和卵巢癌。

[0402] 实施方案53. 治疗个体的对SN-38敏感的肿瘤的方法, 其包括向所述个体施用治疗有效量的实施方案1至33中任一项的组合物或者实施方案47至50中任一项的药物组合物; 优选地, 所述肿瘤选自结直肠癌、小细胞肺癌、淋巴瘤、乳腺癌(优选三阴性乳腺癌)、食管癌、胃癌、肝癌、肾癌、胰腺癌、子宫癌和卵巢癌。

[0403] 实施方案54. 药盒, 其包含实施方案1至33中任一项的组合物或者实施方案47至50中任一项的药物组合物。

[0404] 实施方案55. 制备具有改善的性质的组合物的方法, 其中所述组合物包含SN-38、脂质和白蛋白, 并且所述白蛋白包封至少部分所述SN-38和任选的至少部分所述脂质以形成纳米粒子,

[0405] 所述方法的特征在于在制备所述组合物的过程中加入Span 20;

[0406] 其中任选地, 所述组合物不包含额外的稳定剂; 和/或

[0407] 其中任选地, 所述改善的性质包括: 提高的稳定性, 例如当所述组合物为液体形式时, 所述提高的稳定性包括: 在所述组合物的制备、储存和/或使用中, 减少的白蛋白多聚体的产生或含量(例如所述组合物中不存在或基本不存在白蛋白多聚体, 或者白蛋白多聚体占白蛋白总量至多5w/w%, 例如至多约4%、至多约2%、至多约1.5%、至多约1.2%、至多约1.1%、至多约1%、或至多约0.8%), 和/或降低的纳米粒子粒径; 和/或

[0408] 其中任选地, 所述组合物如实施方案1至33中任一项所定义。

[0409] 实施方案56. 实施方案55的方法, 其特征在于, 所述方法包括以下步骤:

[0410] (1) 将所述SN-38、所述脂质和Span 20溶解于有机溶剂中形成有机相; 以及制备白蛋白的水溶液以作为水相;

[0411] (2) 将所述有机相和所述水相混合以形成乳液, 所述乳液包含所述纳米粒子, 其中在所述纳米粒子中, 所述白蛋白包封至少部分所述SN-38和任选的至少部分所述脂质;

[0412] (3) 去除所述乳液中的有机溶剂以得到包含所述纳米粒子的产物。

[0413] 实施方案57. 实施方案56所述的方法, 其特征在于, 所述方法包括以下步骤:

[0414] (1) 用包含选自DMSO和C₁₋₃醇(包括甲醇、乙醇和异丙醇及其任意组合, 优选乙醇(EtOH))中的第一有机溶剂和选自CHCl₃及CH₂Cl₂和CHCl₃的混合物的第二有机溶剂的混合有机溶剂溶解所述SN-38、所述脂质和Span 20以形成有机相, 其中在所述混合有机溶剂中,

所述第二有机溶剂与所述DMSO或C₁₋₃醇的体积比为约1:20(v/v)至约20:1(v/v),例如约1:5至约5:1(v/v),约1:2至约4:1(v/v),约1:1至约4:1(v/v),约1.5:1(v/v)至约3:1(v/v)或约2:1(v/v)至约7:3(v/v);以及制备白蛋白的水溶液以作为水相;

[0415] (2) 将所述有机相与所述水相混合以制备乳液,所述乳液包含所述纳米粒子,其中在所述纳米粒子中,所述白蛋白包封至少部分所述SN-38和任选的至少部分所述脂质;

[0416] (3) 除去所述有机溶剂;

[0417] (4) 任选地,将步骤(3)中得到的产物灭菌,优选通过约0.2 μ m的滤膜过滤来除菌;

[0418] 任选地,其中所述第二有机溶剂是CHCl₃;或CH₂Cl₂和CHCl₃的混合物,其中任选地,所述混合物中CH₂Cl₂和CHCl₃的体积比为约2:5-1:1,优选为约2:5。

[0419] 有益效果

[0420] 本发明人发现,本发明能够减少制备过程中高压均质的次数,有效减小组合物中纳米颗粒的粒径,提高过滤通量,稳定崩解后纳米粒子的粒径,减少原料损耗和降低成本,尤其是在放大工艺,例如中试规模的制备中。另外,通过进一步控制组合物中白蛋白的含量,本发明能够控制纳米颗粒的粒径。因此,本发明组合物的纳米颗粒的粒径更接近于适合成药的尺寸。另外,在储存过程中,由于Span 20的存在,白蛋白多聚体的形成被阻止,因此本发明的组合物的免疫原性低,安全性高,同时具有优异的储存稳定性。

[0421] 实施例

[0422] 在以下的实施例中将进一步举例说明本发明。这些实施例仅用于说明本发明,但不以任何方式限制本发明。

[0423] 在实施例中使用的各缩写具有以下含义。

缩写	中文名称	缩写	中文名称
rHA	重组人血清白蛋白	HSA	人血清白蛋白
HPLC	高效液相色谱法	EtOH	乙醇
SEC-HPLC	分子排阻色谱法	CHCl ₃	氯仿
PDI	聚合物分散性指数	Chol	胆固醇
Chol-PA	胆固醇棕榈酸酯	SA-Gly	单硬脂酸甘油酯

[0425] 测定实施例中制备的制品的各种参数的方法

[0426] 1. 粒径及粒径分布测定

[0427] 使用Malvern Nano ZSE粒度电位仪测定样品中纳米粒子的粒径及粒径分布。仪器激光束波长为633nm,入射光与散射光夹角为173°。设定参数:样品材料为蛋白,分散剂为水,测定温度为25℃,自动扫描检测。每个样品平行测定三次,结果取平均值。

[0428] 2. Zeta电位的测定

[0429] 使用Malvern Nano ZSE粒度电位仪测定样品中纳米粒子的Zeta电位。设定参数:样品材料为蛋白,分散剂为水。选用DTS1070样品池,测定温度为25℃,自动扫描检测。测试样品均用去离子水稀释10倍体积后进行检测。每个样品平行测定三次,结果取平均值。

[0430] 3. 体系中SN-38的含量测定

[0431] 取10mg制备得到的样品,用去离子水稀释5倍后,再用异丙醇稀释10倍,超声萃取15min,然后于10000rpm/min下离心12min。取上清液,用HPLC测定体系中的SN-38,将峰面积带入到标准曲线中,计算出体系中SN-38的含量。

[0432] HPLC色谱条件如表1所示。

[0433] 表1:HPLC测定SN-38含量的色谱条件

[0434]	色谱柱型号	Agilent Poroshell 120EC-C18 2.7 μ m 3.0 $\times$ 150mm
	检测器波长	265nm、381nm
	柱温	50 $^{\circ}$ C
	样品盘温度	室温
	流动相	A:25mM NaH ₂ PO ₄ , pH 3.1; B:乙腈 (ACN)
	流速	0.6mL/min
	洗脱方式	梯度洗脱
	进样体积	5 μ L
	运行时间	25min

[0435] 梯度洗脱条件如表2所示。

[0436] 表2:在HPLC测定SN-38含量中使用的梯度洗脱条件

[0437]	时间 (min)	A %	B %
	0	80	20
	5	80	20
	15	15	85
	20	15	85
	22	80	20
	25	80	20

[0438] 获得的SN-38含量测定的典型图谱如图1所示 (以实施例1为例)。

[0439] 4. 体系中白蛋白的含量测定

[0440] 使用BCA法测定体系中白蛋白含量。以BSA作为标准品,将样品稀释10倍。取25 μ L稀释后的样品,加200 μ L检测液,在振荡器上震荡混匀,再将微孔板密封,在37 $^{\circ}$ C孵育120min。用酶标仪于562nm处测定吸光度,根据标准曲线计算样品中白蛋白的浓度。

[0441] 5. 体系中胆固醇的含量测定

[0442] 用HPLC测定样品中的胆固醇含量。样品的稀释方法同上述SN-38含量测定。色谱条件如表3所示。

[0443] 表3:HPLC测定胆固醇含量的色谱条件

	色谱柱型号	Agilent Eclipse XDB-C18 5 μ m 4.6 $\times$ 250 mM
	色谱柱编号	ZJ-RP-001
[0444]	检测器波长	205 nm
	柱温	30 $^{\circ}$ C
	样品盘温度	15 $^{\circ}$ C
	流速	1mL/min
	流动相	甲醇
[0445]	洗脱方式	等度洗脱
	进样体积	5 μ L
	运行时间	20 min

[0446] 获得的胆固醇含量测定的典型图谱如图2所示(以实施例1为例)。

[0447] 6.载药量(LD)及包封率(EE)的计算

$$[0448] \quad LD(\%) = \frac{\text{体系中总 SN-38 的含量} - \text{体系中游离的 SN-38 的含量} -}{\text{体系中白蛋白的含量} + \text{体系中总 SN-38 的含量} + \text{体系中脂质的含量}} \times 100\%$$

$$[0449] \quad EE(\%) = \frac{\text{体系中总 SN-38 的含量} - \text{体系中游离的 SN-38 的含量}}{\text{体系中总 SN-38 的含量}} \times 100\%$$

[0450] 其中,体系中总SN-38含量由上述“3.体系中SN-38的含量测定”中描述的方法测定。

[0451] 体系中游离的SN-38的含量由固相萃取法萃取后进行HPLC测定。固相萃取的具体方法如下:

[0452] 1)SPE小柱(Select Core™HLB,1mL)活化:先用3mL甲醇,然后用3mL超纯水活化。

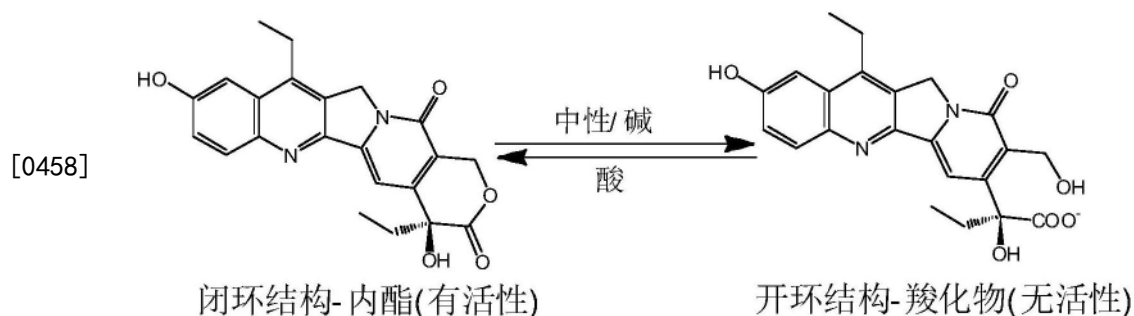
[0453] 2)将200μL待分离样品上样,重力作用过柱。

[0454] 3)用2mL水洗脱,重力洗脱即得。

[0455] 4)用2mL甲醇洗脱,重力洗脱。收集甲醇相,得到游离SN-38的检测溶液。

[0456] 7.SN-38的两种结构的检测

[0457] 两种不同活性的SN-38的结构如下示意式所示



[0459] 样品的处理方法同上述SN-38的含量测定,HPLC方法色谱条件如表4。

[0460] 表4:用于不同结构的SN-38的含量测定的HPLC色谱条件

[0461]

色谱柱型号	Agilent Poroshell 120EC-C18 4μm 3.0×150mm
色谱柱编号	QCCA-RP-007
检测器波长	265nm, Ref 460nm, 40nm
柱温	40℃
样品盘温度	室温
流速	1mL/min
流动相	A:25mM KH ₂ PO ₄ ;B:ACN
洗脱方式	梯度洗脱
进样体积	5μL
运行时间	20min

[0462] 梯度洗脱条件如表5所示。

[0463] 表5:在HPLC测定不同结构的SN-38的含量中使用的梯度洗脱条件

[0464]

时间(min)	A%	B%
0	95	5

15	40	60
18	40	60
18.1	95	5
20	95	5

[0465] 获得的不同结构的SN-38的含量测定的典型图谱如图3所示(以实施例1为例)。

[0466] 根据谱图中开环结构与内酯环结构的峰面积比可以计算出样品中SN-38的开环比例。在根据本发明的实施例所制备的样品中,SN-38的开环比例均<2.0%。

[0467] 8.样品中白蛋白聚集体的测定

[0468] 用SEC-HPLC测定样品中白蛋白的聚集情况。直接取制备获得的样品5 μ l进行检测,色谱条件如表6所示。

[0469] 表6:测定样品中白蛋白聚集体的SEC-HPLC色谱条件

[0470]

色谱柱型号	TSKgel G4000SWxl 7.8 $\times$ 300mm,8 μ m
色谱柱编号	QCCA-RP-007
检测器波长	280nm、260nm
柱温	30 $^{\circ}$ C
样品盘温度	10 $^{\circ}$ C
流速	0.5mL/min
流动相	0.05M Tris-HCl,pH 7.0
洗脱方式	等度洗脱
进样体积	5 μ L
运行时间	30min

[0471] 所获得的白蛋白聚集体测定的典型图谱如图4所示(以实施例1为例)。结果表明,样品中无白蛋白多聚体存在,仅有少量二聚体,表明此制品不会产生由于白蛋白多聚体而产生的免疫原性。

[0472] 9.稳定性及崩解实验

[0473] 样品的稳定性主要通过将制备的样品分别置于室温以及4 $^{\circ}$ C储存,每隔一段时间观察样品中是否有明显的析出或者沉淀;同时取样品检测粒径及粒径分布,研究样品中纳米粒子的粒径变化情况。

[0474] 崩解实验则是研究样品中白蛋白与SN-38结合的稳定性。用pH $\sim$ 7.4的1 $\times$ PBS稀释样品,测定不同稀释倍数下样品的粒径及粒径分布,研究纳米粒子在稀释多少倍的情况下会发生崩解,析出SN-38原料。稀释倍数越高,则表明纳米粒子的稳定性越好。

[0475] 10.XRD检测方法

[0476] 用X射线衍射法(Bruker,D8 ADVANCE)评价样品中活性药物成分(API)的晶型变化。分别检测白蛋白冻干粉、白蛋白-SN-38冻干粉以及SN-38的晶型。用Cu-K α 射线,以2 $^{\circ}$ /min的速度扫描2 $^{\circ}$ -40 $^{\circ}$ 的2 θ 范围。

[0477] 11.电镜检测方法

[0478] 制样条件:将各个样品用注射用水调整到API浓度为2mg/mL。温度为4度,湿度为100%,blot time(吸附时间)为9秒,blot force(吸附力度)为3。用冷冻透射电镜(Talos L120C)在120Kv下观察样品中囊泡和晶体的形态。

[0479] 根据具体情况,选择上述测定方法,对以下各实施例所制备的样品进行测定。

[0480] 实验材料:

[0481] 除非另有说明,以下实施例中使用的SN-38来自四川协力制药股份有限公司;胆固醇来自江苏东南纳米材料有限公司;rHA来自华北制药股份有限公司;HSA来自广州双林生物制药有限公司;盐酸伊立替康注射液(CPT-11,60mg/kg)来自江苏恒瑞医药股份有限公司。

[0482] 除非另有说明,在下文所述的各个动物实验研究中,rHA-SN-38或HSA-SN-38制品以及CPT-11的剂量是以活性成分计;溶媒指注射用水,用作空白对照。

[0483] 实施例1:rHA-SN-38制品1的制备

[0484] 1. 制备工艺

[0485] 1) 配制体积比为2/3的EtOH/CHCl₃有机溶剂;

[0486] 2) 称取21mg SN-38以及30mg胆固醇,加入3mL步骤1)中的有机溶剂使之完全溶解,得到药物溶液;

[0487] 3) 用去离子水配制总体积约为21mL的rHA水溶液,作为水相,使得水相中rHA的总含量为200mg;

[0488] 4) 剪切分散:将步骤2)的药物溶液与步骤3)的水相混合后,剪切分散10-15min,得到粗乳液;

[0489] 5) 将粗乳液转移到高压均质机中,在1300-1500bar的压力下均质2-7min;

[0490] 6) 在40-45℃旋蒸4-8min;

[0491] 7) 用0.2μm的PES针头滤膜(Sartorius药业)过滤。在过滤前后,分别测定制品样品的粒径以及包封率、载药量等参数。

[0492] 2. 测定结果

[0493] 实施例1制备的样品的各参数的测定结果如表7所示。

[0494] 表7:实施例1制备的样品的各参数的测定结果

参数	过膜前样品	过膜后样品
粒径 (nm)	171.2±8.04 nm	124.6±3.62 nm
PDI	0.243±0.015	0.217±0.015
Zeta 电位 (mV)	-33.5	-31.3
载药量 (%)	—	3.27
包封率 (%)	—	90.10
开环 SN-38 的比例 (%)	1.987	1.833
崩解浓度	—	原样品稀释 1000 倍时粒径分布变宽,但未崩解析出 SN-38 粒子。稀释 10000 倍后明显发生崩解,即样品中 SN-38 的浓度稀释到<0.05 μg/mL 时纳米粒子快速发生崩解。
稳定性	—	样品置于 4℃ 冰箱中保存 24h 后,样品粒径为 138.2±5.36 nm,粒径增加比例为 10.91%。

[0496] 注:粒径增加比例=(放置后粒径-放置前粒径)×100%/放置前粒径)

[0497] 实施例2:HSA-SN-38制品1冻干剂及其复溶液的制备

[0498] 1.制备工艺

[0499] 1) 配制体积比为2/3的EtOH/CHCl₃有机溶剂;

[0500] 2) 称取21mg SN-38以及30mg胆固醇,加入3mL步骤1)中的有机溶剂使之完全溶解,得到药物溶液;

[0501] 3) 用去离子水配制总体积约为32mL的HSA水溶液,作为水相,使得水相中HSA的总含量为200mg;

[0502] 4) 剪切分散:将步骤2)的药物溶液与步骤3)的水相混合后,剪切分散10-15min,得到粗乳液;

[0503] 5) 将粗乳液转移到高压均质机中,在1300-1500bar的压力下均质2-7min;

[0504] 6) 在40-45℃旋蒸4-8min;

[0505] 7) 向步骤6)中得到产物中添加蔗糖,搅拌使之完全溶解以得到30mg/mL的蔗糖浓度;

[0506] 8) 用0.2μm的PES针头滤膜过滤,然后灌装至西林瓶中,经真空冷冻干燥得到HSA-SN-38纳米粒子冻干制剂。

[0507] 对冻干后的制品进行XRD分析。

[0508] 取两支冻干样品,其中一支用去离子水稀释使得SN-38的浓度与冻干前浓度相同(复溶液1),另一支用去离子水稀释使得SN-38的浓度是冻干前浓度的6倍(复溶液2)。分别测定两种复溶液的粒径和包封率等参数。

[0509] 2、测定结果

[0510] (1) 复溶液的参数测定结果

[0511] 实施例2制备的冻干制品的复溶液的参数测定结果如表8所示。

[0512] 表8:实施例2制备的冻干制品的复溶液的参数测定结果

参数	复溶液1	复溶液2
pH	6.91	6.90
粒径 (d, nm)	158.3±3.4	178.2±3.2
PDI	0.210±0.018	0.241±0.018
Zeta电位 (mV)	-31.4±0.6	-29.3±0.9
开环比例 (%)	1.86	1.92
包封率 (%)	98.64	98.97
载药量 (%)	5.08	5.08

[0514] 备注:在此处的包封率测定中,游离SN-38含量的测定方法为:将样品高速离心(以21000rpm离心1h),取上清液,然后添加9倍体积的乙腈进行萃取用于检测。

[0515] 结果表明,复溶后,当活性成分浓度增加到高达6倍时,粒径仅稍有增加且仍然小于200nm。样品其他性质未受到大的影响。因此,本申请的冻干剂可根据需要稀释成不同的浓度进行使用。

[0516] (2) XRD分析结果

[0517] 取冻干制品以及SN-38晶体和HSA进行XRD检测,结果如图5所示。

[0518] 结果显示,对比HSA-SN-38和SN-38的测定结果,冻干粉中的SN-38为无定形状态。

据报道,与晶体形式相比,无定形形式的药物活性成分更易溶解,生物利用度更高(例如,Wang,D.,Liang,N.,Kawashima,Y.et al.Biotin-modified bovine serum albumin nanoparticles as a potential drug delivery system for paclitaxel.J Mater Sci 54,8613-8626(2019))。相较于晶体状态的SN-38,本申请的制剂具有SN-38溶出速率快和生物利用度高的优点。

[0519] 实施例3:rHA-SN-38制品2的制备

[0520] 1.制备工艺

[0521] 1) 配制体积比为2/3的EtOH/CHCl₃有机溶剂;

[0522] 2) 称取42mg SN-38以及60mg胆固醇,加入3mL步骤1)中的有机溶剂使之完全溶解,得到药物溶液;

[0523] 3) 用去离子水配制总体积约为21mL的rHA水溶液,作为水相,使得水相中rHA的总含量为500mg;

[0524] 4) 剪切分散:将步骤2)的药物溶液与步骤3)的水相混合后,剪切分散10-15min,得到粗乳液;

[0525] 5) 将粗乳液转移到高压均质机中,在1300-1500bar的压力下均质2-7min;

[0526] 6) 在40-45℃相旋蒸4-8min;

[0527] 7) 用0.2μm的PES针头滤膜过滤,在过滤前后,分别测定制品样品的粒径以及包封率、载药量等参数。

[0528] 2.测定结果

[0529] 制品2的测定结果如表9所示。

[0530] 表9:实施例3制备的样品的各参数的测定结果

参数	过膜前样品	过膜后样品
粒径/PDI (nm/---)	177.6nm/0.24	124.4nm/0.214
zeta电位	-26.2	-25.2
载药量 (%)	4.61	3.21
包封率 (%)	92.21	91.01

[0532] 实施例4:rHA-SN-38制品3的制备

[0533] 1.制备工艺

[0534] 1) 配制体积比为2/3的EtOH/CHCl₃有机溶剂;

[0535] 2) 称取42mg SN-38以及60mg胆固醇,加入3mL步骤1)中的有机溶剂使之完全溶解,得到药物溶液;

[0536] 3) 用去离子水配制总体积约为21mL的rHA水溶液,作为水相,使得水相中rHA的总含量为200mg;

[0537] 4) 剪切分散:将步骤2)的药物溶液与步骤3)的水相混合后,剪切分散10-15min,得到粗乳液;

[0538] 5) 将粗乳液转移到高压均质机中,在1300-1500bar的压力下均质2-7min;

[0539] 6) 在40-45℃旋蒸4-8min;

[0540] 7) 用0.2μm的PES针头滤膜过滤。在过滤前后,分别测定制品样品的粒径以及包封率、载药量等参数。

[0541] 2.测定结果

[0542] 制品3的测定结果如表10所示。

[0543] 表10:实施例4制备的样品的各参数的测定结果

参数	过膜前样品	过膜后样品
粒径/PDI (nm/---)	150.7nm/0.264	117.1nm/0.204
载药量 (%)	10.6	9.3
包封率 (%)	80.3	79.10

[0545] 实施例5:rHA-SN-38制品4的制备

[0546] 1.制备工艺

[0547] 1) 配制体积比为2/3的EtOH/CHCl₃有机溶剂;

[0548] 2) 称取10mg SN-38以及60mg胆固醇,加入3mL步骤1)中的有机溶剂使之完全溶解,得到药物溶液;

[0549] 3) 用去离子水配制总体积约为21mL的rHA水溶液,作为水相,使得水相中rHA的总含量为150mg;

[0550] 4) 剪切分散:将步骤2)的药物溶液与步骤3)的水相混合后,剪切分散10-15min,得到粗乳液;

[0551] 5) 将粗乳液转移到高压均质机中,在1300-1500bar的压力下均质2-7min;

[0552] 6) 在40-45℃旋蒸4-8min;

[0553] 7) 用0.2μm的PES针头滤膜过滤。在过滤前后,分别测定制品样品的粒径以及包封率、载药量等参数。

[0554] 2.测定结果

[0555] 制品4的测定结果如表11所示。

[0556] 表11:实施例5制备的样品的各参数的测定结果

参数	过膜前样品	过膜后样品
粒径/PDI (nm/---)	180.7nm/0.226	146.3nm/0.207
zeta电位	-26.1	-35.6
载药量 (%)	4.1	3.13
包封率 (%)	92.1	90.4

[0558] 实施例6:在不存在脂质的条件下制备rHA-SN-38制品

[0559] 除了在实施例1的制备工艺的步骤2)中不添加任何脂质(例如胆固醇)之外,按照实施例1的制备工艺,制备和测试了实施例6的rHA-SN-38制品。该rHA-SN-38制品的各参数的测定结果如表12所示。

[0560] 表12:实施例6制备的rHA-SN-38制品的各参数的测定结果

参数	过膜前样品	过膜后样品
粒径/PDI (nm/---)	248.5nm/0.205	160.3nm/0.157
24h后粒径/PDI (nm/---)	——	271.1nm/0.228
载药量 (%)	——	2.15
包封率 (%)	——	82.70

[0562] 结果表明,在不添加脂质的条件下制备的样品稳定性较差,在4℃冰箱中保存24h后,样品粒径增加69.12%。相比之下,实施例1制备的样品(添加了脂质)在4℃冰箱中保存24h后,样品粒径仅增加10.91%。这表明,胆固醇的添加大幅度增加样品的稳定性。另外,在不添加脂质的条件下的载药量和包封率低于添加胆固醇的条件下的结果。

[0563] 实施例7:在添加其它脂质的条件下制备rHA-SN-38制品

[0564] 除了将实施例1的制备工艺之步骤2)中的胆固醇替换为胆酸或软脂酸之外,按照实施例1的制备工艺,制备和测试了所获得的两种rHA-SN-38制品。这些rHA-SN-38制品的各参数的测定结果如表13所示。

[0565] 表13:实施例7制备的rHA-SN-38制品的各参数的测定结果

[0566]	样品		粒径 (nm)	PDI
	有机溶剂中添加 5 mg/mL 的胆酸	过膜前样品	295.7 nm	0.191
		过膜后样品	--	--
	有机溶剂中添加 5 mg/mL 的软脂酸	过膜前样品	533.4 nm	0.222
		过膜后样品	--	--

[0567] 结果显示,使用胆酸或者软脂酸作为脂质,在相同的制备工艺下制备得到的样品的粒径较大,添加软脂酸的样品的粒径比添加胆酸的样品的粒径更大,且粒径分布更宽。过膜处理后,样品中的纳米粒子的含量极少,粒径分布很大,粒径和PDI无法给出客观结果。

[0568] 实施例8:对不同有机溶剂体系的研究

[0569] 除了将实施例1的制备工艺之步骤1)中的有机溶剂替换为表14所示的有机溶剂体系之外,按照实施例1的制备工艺,制备和测试了所获得的rHA-SN-38制品。还测定了所得制品于4℃冰箱中保存过夜后的粒径。所制得的rHA-SN-38制品的各参数的测定结果如表14所示。

[0570] 表14:使用不同有机溶剂体系制备的rHA-SN-38制品的各参数的测定结果

[0571]	有机溶剂体系 (v/v)	过膜前粒径 /PDI (nm/--)	过膜后粒径/PDI (nm/--)	4℃ 过夜后粒径 /PDI(nm/--)	载药量 (%)	SN-38 绝对回收率 (%)
	氯仿:乙醇=1:1	178.2/0.251	118.2/0.177	137.1/0.197	4.21	34.39
	氯仿:异丙醇=1:1	230.1/0.253	132.8/0.186	153.8/0.171	2.66	22.92
	氯仿:甲醇=1:1	209.2/0.311	128.5/0.245	150.1/0.180	2.80	26.93
	二氯甲烷:乙醇=1:1	247.1/0.206	148.3/0.198	168.4/0.125	1.63	14.63
	二氯甲烷:甲醇=1:1	287.0/0.191	151.6/0.189	171.2/0.183	1.02	7.68
	二氯甲烷:异丙醇=1:1	283.2/0.164	148.7/0.266	161.9/0.249	0.28	1.87

[0572] 注:SN-38回收率根据下式计算:

$$[0573] \quad \text{SN-38 绝对回收率}(\%) = \frac{\text{HPLC 测定的过膜后样品中 SN-38 浓度} \times \text{过膜后样品体积}}{\text{SN-38 的投料量}} \times 100\%$$

[0574] 结果显示,以氯仿/乙醇体系作为有机溶剂制备得到的样品的粒径最小,载药量最高。

[0575] 实施例9:对有机溶剂的不同比例的考察

[0576] 将实施例1的制备工艺之步骤1)中的有机溶剂替换为表15所示的不同比例的EtOH/CHCl₃,同时将体系中rHA的用量调整为300mg,其它按照实施例1的制备工艺,制备和测试了所获得的rHA-SN-38制品。所获得的rHA-SN-38制品的各参数的测定结果如表15所示。

[0577] 表15:使用不同比例的EtOH/CHCl₃制备的rHA-SN-38制品的各参数的测定结果

[0578]	样品		粒径 (nm)	PDI	载药量 (%)	包封率 (%)
	EtOH/CHCl ₃ =1/1 (v/v)	过膜前样品	154.7	0.220	—	—
		过膜后样品	125.0	0.197	3.89	92.74
	EtOH/CHCl ₃ =2/8 (v/v)	过膜前样品	175.2	0.248	—	—
		过膜后样品	119.2	0.214	3.82	89.43
	EtOH/CHCl ₃ =1/9 (v/v)	过膜前样品	318.3	0.348	—	—
		过膜后样品	120.7	0.235	1.34	84.02

[0579] 可见,不同比例的EtOH/CHCl₃有机溶液均可获得粒径、载药量和包封率符合要求的rHA-SN-38制品。

[0580] 实施例10:对不同胆固醇浓度的考察

[0581] 除了将实施例1的制备工艺之步骤2)中的胆固醇用量调整至表16所示的量之外,按照实施例1的制备工艺,制备和测试了所获得的rHA-SN-38制品。所获得的rHA-SN-38制品的各参数的测定结果如表15所示。

[0582] 表16:使用不同浓度的胆固醇制备的rHA-SN-38制品的参数测定结果

[0583]	样品		粒径 (nm)	PDI	载药量 (%)	包封率 (%)
	胆固醇 9 mg	过膜前样品	220.0	0.233	—	—
		过膜后样品	145.1	0.189	1.94	92.74
	胆固醇 15 mg	过膜前样品	170.8	0.214	—	—
		过膜后样品	132.7	0.179	3.79	90.47
	胆固醇 45 mg	过膜前样品	173.6	0.371	—	—
		过膜后样品	126.8	0.247	3.60	94.07

[0584] 结果表明,增加配方中胆固醇的用量,过膜后样品的粒径更小,样品中SN-38的包封率越高,载药量也较高。

[0585] 实施例11:对不同SN-38浓度的考察

[0586] 除了将实施例1的制备工艺之步骤2)中的SN-38用量调整至表17所示的量之外,按照实施例1的制备工艺,制备和测试了所获得的rHA-SN-38制品。所获得的rHA-SN-38制品的各参数的测定结果如表17所示。

[0587] 表17:使用不同浓度的SN-38制备的rHA-SN-38制品的参数测定结果

[0588]	样品		粒径 (nm)	PDI	载药量 (%)	包封率 (%)
	SN-38 15 mg	过膜前样品	175.1	0.265	—	—
		过膜后样品	122.3	0.246	2.57	91.29
	SN-38 30 mg	过膜前样品	180.3	0.226	—	—
		过膜后样品	126.7	0.195	4.60	88.94

[0589] 结果表明,配方中SN-38的浓度增加对粒径影响不大,而载药量增大。

[0590] 实施例12:对水相中不同rHA浓度的考察

[0591] 除了将实施例1的制备工艺之步骤3)中的rHA用量或水相体积调整至表18所示的数值之外,按照实施例1的制备工艺,制备和测试了所获得的rHA-SN-38制品。所获得的rHA-SN-38制品的各参数的测定结果如表18所示。

[0592] 表18:使用不同浓度的rHA制备的rHA-SN-38制品的参数测定结果

样品		粒径 (nm)	PDI	载药量 (%)	包封率 (%)
[0593]	rHA 150 mg	过膜前样品	170.6	0.231	——
		过膜后样品	125.8	0.198	3.98
	rHA 250 mg	过膜前样品	177.6	0.240	——
		过膜后样品	124.4	0.214	2.81
					91.01

[0594] 结果表明,白蛋白用量的增加使得载药量略有降低,而对包封率影响不大。

[0595] 实施例13:对不同的有机溶剂/水相体积比的考察

[0596] 除了将实施例1的制备工艺之步骤2)中的有机溶剂体积或步骤3)中的水相体积调整至表19所示的数值之外,按照实施例1的制备工艺,制备和测试了所获得的rHA-SN-38制品。所获得的rHA-SN-38制品的各参数的测定结果如表19所示。

[0597] 表19:以不同的有机溶剂/水相体积比制备的rHA-SN-38制品的各参数的测定结果

样品		粒径 (nm)	PDI	载药量 (%)	包封率 (%)
[0598]	有机溶剂体积 2mL	过膜前样品	176.5	0.248	——
		过膜后样品	120.7	0.235	3.56
	有机溶剂体积 4mL	过膜前样品	190.5	0.223	——
		过膜后样品	121.6	0.222	2.66
	水相体积 17mL	过膜前样品	175.2	0.251	——
		过膜后样品	122.1	0.209	1.81
	水相体积 27mL	过膜前样品	164.9	0.236	——
		过膜后样品	129.6	0.206	3.46
					94.22

[0599] 结果表明,有机溶剂:水相的体积比越小,制品的载药量越高,且SN-38的包封率提高。

[0600] 实施例14:包含额外的稳定剂的HSA-SN-38制品的制备

[0601] 1. 制备工艺

[0602] 1) 配制体积比为2/3的EtOH/CHCl₃有机溶剂;

[0603] 2) 称取21mg SN-38以及30mg胆固醇,加入3mL步骤1)中的有机溶剂使之完全溶解,得到药物溶液;

[0604] 3) 用去离子水配制HSA溶液,并加入作为稳定剂的蔗糖或葡萄糖,作为水相(约32mL),其中水相中HSA的总含量为200mg,并且蔗糖或葡萄糖在终制品中的浓度如表20所示;

[0605] 4) 剪切分散:将步骤2)的药物溶液与步骤3)的水相混合后,剪切分散10-15min,得到粗乳液;

[0606] 5) 将粗乳液转移到高压均质机中,在1300-1500bar的压力下均质2-7min;

[0607] 6) 在40-45℃旋蒸4-8min;

[0608] 7) 用0.2μm的PES针头滤膜过滤。在过滤前后,分别测定制品样品的粒径以及包封率、载药量等参数;

[0609] 8) 将所得制品置于4℃冰箱中保存过夜后再次测定其粒径。

[0610] 2. 测定结果

[0611] 所制备的HSA-SN-38制品的各参数的测定结果如表20所示。

[0612] 表20:包含额外的稳定剂的HSA-SN-38制品的各参数的测定结果

[0613]	糖含量 (w/v)	过膜前粒径/PDI (nm/--)	过膜后粒径/PDI (nm/--)	4°C 过夜后粒径/PDI (nm/--)	载药量 (%)	SN-38 绝对回收率 (%)
	3%蔗糖	176.6/0.265	117.0/0.263	124.2/0.251	3.86	34.25
	10%蔗糖	149.1/0.267	100.3/0.221	112.5/0.225	5.01	43.99
	3%葡萄糖	185.9/0.248	132.1/0.235	159.7/0.230	6.46	58.57
	10%葡萄糖	152.6/0.250	118.5/0.225	139.7/0.224	5.76*	64.50

[0614] 注:*由于葡萄糖为还原性糖,会对BCA检测蛋白浓度的结果造成影响,因此,添加葡萄糖的制品的载药量测定结果可能偏低。

[0615] 结果表明,相较于葡萄糖,在水相中添加蔗糖制备得到制品的粒径相对更小,稳定性更好,但载药量低于添加葡萄糖制备得到的制品。对于同一稳定剂,随着其浓度增加,各参数进一步改进。

[0616] 本发明人还测定了环糊精(5%、10%和15%)作为稳定剂的作用,发现所制备的制品在室温下放置24h后,制品已浑浊析出或者粒径大于250nm。因而,环糊精可能不适合作为稳定剂。

[0617] 实施例15:以不同制备工艺制备HSA-SN-38制品

[0618] 1. 制备工艺

[0619] 1) 配制体积比为2/3的EtOH/CHCl₃有机溶剂;

[0620] 2) 称取21mg SN-38以及30mg胆固醇,加入3mL步骤1)中的有机溶剂使之完全溶解,得到药物溶液;

[0621] 3) 用去离子水配制HSA溶液,并加入蔗糖,作为水相(约32mL),其中水相中HSA的总含量为200mg,并且蔗糖在终制品中的浓度为10% (w/v);

[0622] 4) 剪切分散:取1mL步骤1)中的有机溶剂,加入到步骤3)中的水相中,剪切分散5min,然后加入步骤2)的药物溶液,继续剪切分散5min,得到粗乳液;

[0623] 5) 将粗乳液转移到高压均质机中,在1300-1500bar的压力下均质2-7min;

[0624] 6) 在40-45°C旋蒸4-8min;

[0625] 7) 用0.2μm的PES针头滤膜过滤。在过滤前后,分别测定制品样品的粒径以及包封率、载药量等参数;

[0626] 8) 将所得制品置于4°C冰箱中保存过夜后再次测定其粒径。

[0627] 2. 测定结果

[0628] 所制备的HSA-SN-38制品的各参数的测定结果如表21所示。

[0629] 表21:以不同制备工艺制备的HSA-SN-38制品的各参数的测定结果

[0630]	样品	过膜前粒径/PDI (nm/--)	过膜后粒径/PDI (nm/--)	4°C 过夜后粒径/PDI (nm/--)	载药量 (%)	SN-38 绝对回收率 (%)
	实施例 15 的制品	156.2 nm /0.243	121.1 nm /0.210	145.5 nm /0.203	8.41	60.04

[0631] 结果表明,通过先用少量有机溶剂处理白蛋白溶液,然后添加药物溶液制备的HSA-SN-38制品的各参数良好,尤其是载药量较高。

[0632] 实施例16:使用其它脂质制备rHA-SN-38制品

[0633] 除了将实施例1的制备工艺之步骤2)中的胆固醇替换为下表22中的脂质(胆固醇棕榈酸酯(Chol-PA, TCI试剂有限公司);单硬脂酸甘油酯(SA-Gly, damas-beta试剂有限公

司);维生素D3(阿拉丁试剂有限公司))之外,按照实施例1的制备工艺制备和测试了所获得的rHA-SN-38制品。还测定了所得制品于4℃冰箱中保存过夜后的粒径。这些rHA-SN-38制品的各参数的测定结果如表22所示。

[0634] 表22:使用其它脂质制备的rHA-SN-38制品的各参数的测定结果

[0635]	脂质及用量	过膜前粒径/PDI (nm/--)	过膜后粒径/PDI (nm/--)	4℃ 过夜后粒径 /PDI (nm/--)	载药量 (%)	SN-38 绝对 回收率 (%)
	30 mg Chol-PA	184.4/0.255	128.1/0.238	165.3/0.281	4.74	38.43
	60 mg Chol-PA	177.0/0.265	121.5/0.283	131.7/0.283	5.34	44.43
	90 mg Chol-PA	151.1/0.342	100.1/0.290	119.5/0.409	5.50	49.00
	30 mg 维生素 D3	172.7/0.224	111.5/0.271	—	2.76	35.83
	30 mg SA-Gly	183.6/0.211	141.3/0.160	458.1/0.546	7.04	65.99

[0636] 结果表明,Chol-PA和SA-Gly均能获得粒径均一、载药量高的制品。Chol-PA的用量越高,制品的粒径越小,SN-38绝对回收率以及载药量越高,但粒径分布变宽。添加SA-Gly制备得到的制品的粒径较大,SN-38的绝对回收率和载药量较高,但制品的稳定性较差。

[0637] 实施例17:使用脂质组合制备rHA-SN-38制品

[0638] 除了将实施例1的制备工艺之步骤2)中的胆固醇替换为下表23中的脂质组合之外,按照实施例1的制备工艺制备和测试了所获得的rHA-SN-38制品。还测定了所得制品于4℃冰箱中保存过夜后的粒径。这些rHA-SN-38制品的各参数的测定结果如表23所示。

[0639] 表23:使用脂质组合制备的rHA-SN-38制品的各参数的测定结果

[0640]	添加剂及用量	过膜前粒径/PDI (nm/--)	过膜后粒径/PDI (nm/--)	4℃ 过夜后粒径 /PDI (nm/--)	载药量 (%)	SN-38 绝对回 收率 (%)
	30 mg Chol + 15 mg Chol-PA	178.6/0.281	112.6/0.241	131.2/0.213	4.43	43.43
	30 mg Chol + 30 mg Chol-PA	157.5/0.278	101.3/0.232	114.0/0.186	5.12	46.55
	15 mg Chol + 30 mg Chol-PA	176.2/0.290	103.2/0.230	114.9/0.197	4.05	35.63
	30 mg Chol + 30 mg SA-Gly	213.6/0.235	168.8/0.202	—	5.52	49.71
	30 mg Chol-PA + 30 mg SA-Gly	195.6/0.226	143.7/0.183	153.6/0.152	5.19	41.49

[0641] 结果表明:配方中添加Chol-PA能降低制品粒径,且添加量越大,制品粒径越小,稳定性越好;配方中添加SA-Gly制备得到的制品粒径较大,但粒径分布降低;同时添加Chol-PA及SA-Gly制备得到的制品粒径分布较低且储存稳定性较好。

[0642] 实施例18:在提高的脂质比例的条件下制备rHA-SN-38制品

[0643] 在本实施例中,除了胆固醇的量为60mg之外,其它原料与实施例1相同。为了获得液体和冻干粉两种制剂,将原料分成两组,分别按照实施例1的方法制备液体制剂,按照实施例2的方法(不进行步骤7))制备冻干粉制剂。获得的rHA-SN-38液体制剂和冻干粉制剂的各参数的测定结果如下表所示:

[0644]	液体制剂			冻干粉		
	冻干前粒径/PDI (nm/---)	载药量 (%)	rHA 多聚体含 量 (%)	复溶后粒径/PDI (nm/---)	载药量 (%)	rHA 多聚体 (%)
	142.5/0.259	4.56	0.95	164.0/0.226	4.4	0.57

[0645] 实施例19:大规模制备HSA-SN-38制品

[0646] 在前述小试制备的基础上研究中试放大制备工艺,在大规模条件下制备本实施例的HSA-SN-38制品。

[0647] 1. 制备工艺

[0648] 1) 配制乙醇(152mL)和CHCl₃(228mL)的混合有机溶剂;

[0649] 2) 称取3.36g SN-38以及4.8g胆固醇,使之完全溶解在步骤1)中的有机溶剂中,然后在50℃孵育30min以上,得到药物溶液;

[0650] 3) 用去离子水配制HSA(32g)的水溶液(3360mL),作为水相;

[0651] 4) 剪切分散:将步骤2)的药物溶液与步骤3)的水相混合后,剪切分散10-15min,得到粗乳液;

[0652] 5) 将粗乳液转移到高压均质机中,在900-1200bar的压力下均质10个循环;

[0653] 6) 向步骤5)中得到产物中添加蔗糖溶液(100g/L,2.16L)并混合;

[0654] 7) 用旋转蒸发在60-70mbar下蒸发步骤6)中得到的混合物,再用切向流超滤(苏州塞恩斯仪器有限公司)浓缩样品;

[0655] 8) 用囊式滤器过滤(Sartorius, SARTOBRAN P)过滤。在过滤前后分别取样品,用于测定粒径以及包合效果。将滤液灌装至西林瓶中,经真空冷冻干燥得到HSA-SN-38纳米粒子冻干制剂。

[0656] 2. 测定结果

[0657] (1) 粒径结果

[0658] 步骤8)中制备的滤液样品的粒径为124.6nm(PDI=0.187)。

[0659] (2) 包合效果

[0660] 表24. 实施例19步骤8)中制备的滤液样品的包合效果

[0661]	SN-38 浓度 (mg/mL)	SN-38 相 对回收率 (%)	SN-38 绝 对回收率 (%)	SN-38 纯度 (%)	HSA 含量 (mg/mL)	HSA 多 聚体含量 (%)	HSA 绝 对回收 率(%)	有机溶剂 残 留(mg/mL)	载药 量(%)
	0.605	73.083	57.638	99.851	6.7	0.5	66.608	乙醇 0.76; 氯仿 0.0049	8.329

[0662] 注:SN-38相对回收率(%)表示过膜前后样品中SN-38的浓度差占过膜前样品中SN-38浓度的百分比;

[0663] HSA绝对回收率(%)表示过膜后制品中HSA的量占HSA投料量的百分比。

[0664] 3. 崩解实验

[0665] 将制备的冻干制剂用pH~7.4的1×PBS复溶至1mg/mL的SN-38浓度,然后继续梯度稀释至100μg/mL、10μg/mL、1μg/mL、0.1μg/mL和0.01μg/mL,并测定不同浓度下的粒径以及粒径分布。

[0666] 获得的结果如图6所示。结果显示,当SN-38的浓度小于1μg/mL时,HSA-SN-38纳米

粒子才开始发生崩解;当SN-38的浓度达到0.01 μ g/mL时才缓慢发生崩解。这表明实施例19制备的HSA-SN-38冻干制品具有优异的稳定性,大大优于目前市售的其它白蛋白纳米制剂。

[0667] 实施例20:大规模制备HSA-SN-38制品

[0668] 在前述小试制备的基础上研究中试放大制备工艺,在大规模条件下制备本实施例的HSA-SN-38制品。

[0669] 1. 制备工艺

[0670] 1) 配制乙醇(222mL)和CHCl₃(333mL)的混合有机溶剂;

[0671] 2) 称取4.41g SN-38以及6.30g胆固醇,使之完全溶解在480mL步骤1)的有机溶剂中,在50℃孵育30min以上之后,与剩余的有机溶剂混合,得到药物溶液;

[0672] 3) 用去离子水配制HSA(32g)的水溶液(3360mL),作为水相;

[0673] 4) 剪切分散:将步骤2)的药物溶液与步骤3)的水相混合后,剪切分散10-15min,得到粗乳液;

[0674] 5) 将粗乳液转移到高压均质机中,在900-1200bar的压力下均质10个循环;

[0675] 6) 向步骤5)中得到产物中添加蔗糖溶液(36g/L,6L)并混合;

[0676] 7) 用旋转蒸发在60-70mbar下蒸发步骤6)中得到的混合物,再用切向流超滤(苏州塞恩斯仪器有限公司)浓缩样品;

[0677] 8) 用囊式滤器过滤(Sartorius, SARTOBRAN P)过滤。在过滤前后分别取样品,用于测定粒径以及包合效果。将滤液灌装至西林瓶中,经真空冷冻干燥得到HSA-SN-38纳米粒子冻干制剂。

[0678] 2. 测定结果

[0679] (1) 粒径结果

[0680] 步骤8)中制备的滤液样品粒径为146.9nm(PDI=0.208)。

[0681] (2) 包合效果

[0682] 表25. 实施例20步骤8)中制备的滤液样品的包合效果

[0683]	SN-38 含量 (mg/mL)	SN-38 相 对回收率 (%)	SN-38 绝 对回收率 (%)	SN-38 纯度 (%)	HSA 含量 (mg/mL)	HSA 多 聚体含量 (%)	HSA 绝 对回收 率(%)	有机溶剂 残留 (mg/mL)	载药 量(%)
	0.772	71.015	46.236	99.882	8.5	0.1	69.838	乙醇 1.18; 氯仿 0.0048	8.358

[0684] 3. 崩解实验

[0685] 将制备的冻干制剂用注射用水复溶至1mg/mL的SN-38浓度,然后继续梯度稀释至100 μ g/mL、10 μ g/mL、1 μ g/mL、0.1 μ g/mL和0.01 μ g/mL,并测定不同浓度下的粒径以及粒径分布。

[0686] 获得的结果如图7所示。结果显示,与实施例19的制品类似,本实施例的HSA-SN-38制品在SN-38的浓度小于约1 μ g/mL时开始发生崩解,粒径分布明显变宽;在SN-38的浓度达到0.1 μ g/mL时快速崩解。本实施例的HSA-SN-38制品仍具有良好的稳定性,明显优于市售的其它白蛋白纳米制剂。

[0687] 实施例21:实施例1的rHA-SN-38制品的毒性研究

[0688] 将实施例1制备的rHA-SN-38制品在人Hep 3B细胞(ATCC HB-8064细胞)的BALB/c裸鼠皮下移植瘤模型中进行药效学实验,同时评价安全性。

[0689] 经尾静脉注射,向筛选合格的荷瘤BALB/c裸鼠(每组5只)给药实施例1制备的rHA-SN-38制品(30mg/kg),每周给药1次,一共连续给药6次。分别在给药后第13、16、20、23、27、30、34、37和41天测定各动物的体重,结果如图8所示。

[0690] 结果显示,实施例1的制品(30mg/kg)对动物的体重没有影响,安全性好,同时抑制肿瘤的效力好。

[0691] 实施例22:rHA-SN-38制品的抗乳腺肿瘤活性研究

[0692] 利用实施例1制备的rHA-SN-38制品在人三阴性乳腺癌MDA-MB-231(ATCC:CRM-HTB-26TM)的BALB/c裸鼠皮下移植瘤肿瘤模型中进行药效学实验,以研究本发明的组合物在癌症治疗上的应用。

[0693] 该研究分两种实验方案进行。

[0694] 方案一:

[0695] 筛选合格的荷瘤BALB/c裸鼠21只,随机分为3组,每组7只,分别给予无菌注射用水、市售盐酸伊立替康注射液(60mg/kg)、rHA-SN-38制品(15mg/kg)。尾静脉注射给药,每周给药2次,连续给药3周。第一次给药当天为第0天,当天测定各动物的肿瘤体积。给药期间每天观察动物的一般临床,每周进行2次体重和肿瘤体积的测量。

[0696] 实验结果见表26。本发明的rHA-SN-38制品在人三阴性乳腺癌MDA-MB-231的BALB/c裸鼠皮下移植瘤模型中具有极显著的抑瘤效果,且明显优于市售盐酸伊立替康注射液。给药3次后,rHA-SN-38制品(15mg/kg)的抑瘤率为95%,市售盐酸伊立替康注射液(60mg/kg)的抑瘤率为71%。

[0697] 表26:rHA-SN-38制品对人三阴性乳腺癌MDA-MB-231裸鼠皮下移植瘤的疗效

组别	给药剂量 (mg/kg)	第0天的肿瘤体 积(mm ³)	第16天的肿瘤体 积(mm ³)	抑瘤率 (%)
[0698] 注射用水	-	138	2624	-
rHA-SN-38 制品	15	143	128	95
市售盐酸伊立替康注射液	60	141	754	71

[0699] 方案二:

[0700] 筛选合格的荷瘤BALB/c裸鼠42只,随机分为6组,每组7只,分别给予无菌注射用水、市售盐酸伊立替康注射液(60mg/kg、80mg/kg)、rHA(220mg/kg)和rHA-SN-38制品(1.67mg/kg、5mg/kg、15mg/kg)。尾静脉注射给药,每周给药1次,连续给药3周。第一次给药当天为第0天,当天测定各动物的肿瘤体积。给药期间每天观察动物的一般临床,每周进行2次体重和肿瘤体积的测量。

[0701] 实验结果见图9。如图9所示,所采用的不同剂量的rHA-SN-38制品显示出优异的抑瘤优势,且呈现剂量依赖性。

[0702] 由以上实验结果可见,本发明的rHA-SN-38制品给药剂量小,抑瘤率高,治疗效果明显优于市售盐酸伊立替康注射液,对人三阴性乳腺癌具有优异的治疗效果。

[0703] 实施例23:rHA-SN-38制品的抗结肠癌活性(HT-29模型)研究

[0704] 将实施例2制备的rHA-SN-38冻干粉制品复溶,在人结肠癌HT-29(ATCC:HTB 3BTM)的BALB/c裸鼠皮下移植瘤肿瘤模型中进行药效学实验,以研究本发明的组合物在癌症治疗

中的应用。

[0705] 该研究分两种实验方案进行。

[0706] 方案一：

[0707] 筛选合格的荷瘤BALB/c裸鼠21只,随机分为3组,每组7只,分别给予无菌注射用水、市售盐酸伊立替康注射液(60mg/kg)、rHA-SN-38制品(30mg/kg)。尾静脉注射给药,每周给药1次,连续给药3周。第一次给药当天为第0天,当天测定各动物的肿瘤体积。给药期间每天观察动物的一般临床,每周进行2次体重和肿瘤体积的测量。

[0708] 实验结果见表27。本发明的rHA-SN-38制品(30mg/kg)在人结肠癌HT-29的BALB/c裸鼠皮下移植瘤模型中具有极显著的抑瘤效果,且明显优于市售盐酸伊立替康注射液(60mg/kg)。给药4次后,rHA-SN-38制品(30mg/kg)的抑瘤率为72%,市售盐酸伊立替康注射液(60mg/kg)的抑瘤率为47%。

[0709] 表27:rHA-SN-38制品对人结肠癌HT-29裸鼠皮下移植瘤的疗效

组别	给药剂量 (mg/kg)	第 0 天肿瘤体积 (mm ³)	第 26 天肿瘤体积 (mm ³)	抑瘤率 (%)
注射用水	-	97	1082	-
rHA-SN-38 制品	30	99	308	72
市售盐酸伊立替康注射液	60	97	578	47

[0711] 方案二：

[0712] 筛选合格的荷瘤BALB/c裸鼠15只,随机分为3组,每组5只,分别给予无菌注射用水、市售盐酸伊立替康注射液(60mg/kg、80mg/kg)、rHA-SN-38制品(3.3mg/kg、10mg/kg、30mg/kg)。尾静脉注射给药,每周给药1次,连续给药4周。第一次给药当天为第0天,当天测定各动物的肿瘤体积。给药期间每天观察动物的一般临床,每周进行2次体重和肿瘤体积的测量。

[0713] 如图10所示,不同剂量的rHA-SN-38制品也显示了优异的抑瘤优势,且呈现剂量依赖性。

[0714] 由以上实验结果可见,本发明的rHA-SN-38制品的给药剂量小,抑瘤率高,治疗效果明显优于市售盐酸伊立替康注射液,对人结肠癌具有优异的治疗效果。

[0715] 实施例24:对MDA-MB-231肿瘤的体内药效学研究

[0716] 目的:评价不同剂量的实施例19(溶媒复溶后给药)的HSA-SN-38制品在人三阴性乳腺癌细胞系MDA-MB-231(ATCC:CRM-HTB-26TM)皮下异种移植BALB/c裸鼠模型中的抗肿瘤活性,并与市售注射用盐酸伊立替康(CPT-11)进行比较。

[0717] 1.实验设计

[0718] 表28.测试药剂在MDA-MB-231人乳腺癌模型中的抗肿瘤作用实验设计

[0719]

组别	治疗	动物数	剂量 (mg/kg)	给药途径	给药体积 (mL/kg)	给药方案
1	溶媒 (空白)	7	-	iv	10	QW x 3
2	CPT-11	7	60	iv	10	QW x 3
3	CPT-11	7	80	iv	10	QW x 3
4	A01S	7	240	iv	10	QW x 3
5	HSA-SN-38	7	15	iv	10	QW x 3
6	HSA-SN-38	7	5	iv	10	QW x 3
7	HSA-SN-38	7	1.67	iv	10	QW x 3

[0720] 注:QW:每周给药1次;

[0721] A01S:人血清白蛋白(广州双林生物制药有限公司),用作阴性对照。

[0722] 2.实验方法

[0723] 选取49只6-8周龄的Balb/c雌性裸鼠,将MDA-MB-231瘤块接种到裸鼠的右侧肩胛处。瘤块接种16天后随机分组,每组7只动物,尾静脉注射给药测试药剂。最后一次给药1周后,从所有小鼠取肿瘤,并称重。

[0724] 3.实验观察和数据收集

[0725] 肿瘤细胞接种后,除了观察肿瘤生长情况,还检测治疗对动物行为的影响:实验动物的活动性,摄食和饮水,体重变化(体重每周测量2次),眼睛、被毛及其它异常情况。实验过程中观察到的临床症状均记录在原始数据中。通过以下公式计算肿瘤体积:

[0726] 肿瘤体积(mm^3) = $1/2 \times (a \times b^2)$ (其中a表示长径,b表示短径)。

[0727] 当单只动物的体重下降超过15%时(BWL>15%),停止向该单只动物给药,并在体重下降恢复到10%以下,恢复给药。当单只动物体重下降>20%时,按照动物福利对其实施安乐死。

[0728] 4.疗效评价标准

[0729] 相对肿瘤增殖率(T/C(%))表示在某一时间点,治疗组和对照组的相对肿瘤体积或瘤重的百分比值,通过如下公式计算:

[0730] $T/C(\%) = T_{RTV}/C_{RTV} \times 100\%$ [0731] 其中 T_{RTV} :治疗组平均RTV; C_{RTV} :溶媒对照组平均RTV;

[0732] 其中:

[0733] $RTV = V_t/V_0$,[0734] 其中 V_0 为分组时该动物的瘤体积, V_t 为治疗后该动物的瘤体积;

[0735] 或者

[0736] $T/C\% = T_{TW}/C_{TW} \times 100\%$ [0737] T_{TW} :治疗组实验终结时平均瘤重; C_{TW} :溶媒对照组实验终结时平均瘤重。

[0738] 相对肿瘤抑制率(TGI(%))通过如下公式计算:

[0739] $TGI(\%) = (1 - T/C) \times 100\%$,

[0740] 其中T和C分别为治疗组和对照组在某一特定时间点的相对肿瘤体积(RTV)或瘤重(TW)。

[0741] 5.统计分析

[0742] 本实验用one-way ANOVA进行各组间肿瘤均值的比较。方差齐性分析得出F值有显著性差异,在ANOVA分析之后用Dunnet's T3(方差不齐)法再进行多重比较。用SPSS17.0进行所有数据分析。 $p < 0.05$ 认为有显著性差异。

[0743] 6.实验结果

[0744] 6.1体重变化:如图11所示。

[0745] 6.2肿瘤体积变化:如图12所示。

[0746] 6.3抗肿瘤效力评价指标

[0747] 下表29显示HSA-SN-38及CPT-11等药剂对MDA-MB-231异种移植瘤模型的抑瘤效力评价指标。

[0748] 表29.MDA-MB-231人乳腺癌模型中各治疗组效力分析

药剂	N ^a	瘤体积 (mm ³)		RTV (D33)	肿瘤重量(mg) (D33)	T/C (%)		p 值	
		D16	D33			RTV	TW	TV	TW
溶媒	7/7	138±22	2624±433	19.01±1.31	2451±354	100	100	1.000	1.000
CPT-11 60 mg/kg	7/7	141±23	754±218	4.59±1.04	680±212	24	28	0.058	0.027
CPT-11 80 mg/kg	7/6	144±27	389±120	2.46±0.41	391±143	13	16	0.023	0.011
A01S 240 mg/kg	7/7	145±27	2811±432	20.67±2.65	2399±304	109	98	1.000	1.000
HSA-SN-38 15 mg/kg	7/7	143±28	128±25	0.89±0.05	69±17	5	3	0.015	0.007
HSA-SN-38 5 mg/kg	7/7	143±28	1074±116	8.42±1.02	920±90	44	38	0.130	0.057
HSA-SN-38 1.67 mg/kg	7/7	135±19	2022±438	16.98±4.16	1641±367	89	67	0.998	0.873

[0750] 注:a.代表给药前动物数/实验结束时动物数

[0751] 7.总结

[0752] HSA-SN-38高剂量(15mg/kg)具有明显的抑瘤效果,优于CPT-11。在实验结束时(肿瘤接种后33天),在给药3次后,HSA-SN-38高剂量组的肿瘤体积为128mm³,RTV为0.89,T/C值为5%, $p = 0.015$ 。HSA-SN-38中剂量(5mg/kg)对肿瘤生长也有一定的抑制作用,但与溶媒组无显著性差异($p = 0.130$)。HSA-SN-38低剂量(1.67mg/kg)治疗组未观察到明显的抗肿瘤活性。瘤重的分析与肿瘤体积基本一致。

[0753] 各组荷瘤鼠的体重变化影响如图11所示。实验过程中,CPT-11高剂量(80mg/kg)治疗组在第二次给药后,1只动物死亡,剩余6只动物体重未见明显降低;结束实验时,体重相较于给药前增加1.95%。CPT-11低剂量(60mg/kg)治疗组无动物死亡,末次给药后,体重相较于给药前增加2.41%。HSA-SN-38的3个剂量组均无动物死亡,也未见其它任何异常的毒性反应。末次给药后体重相较于给药前不同程度增加,高、中、低3个剂量组体重增加分别为3.70%、7.63%及4.85%。溶媒及A01S两个对照组的体重增加最明显,实验结束时,相较于给药前分别增加了10.84%和9.04%。

[0754] 综上所述,HSA-SN-38在15mg/kg剂量下在MDA-MB-231人乳腺癌模型中具有显著抑制肿瘤生长的作用。CPT-11在80mg/kg剂量下同样具有明显的抑制肿瘤生长的作用,但较HSA-SN-38高剂量组弱;而且在第二次给药后有1只动物死亡。整体而言,HSA-SN-38的抗肿瘤活性强于CPT-11,且耐受性较好,在实验过程中无动物死亡,也未见其它毒性反应。

[0755] 实施例25:对HCT116肿瘤的体内药效学研究

[0756] 目的:验证实施例20制备的HSA-SN-38(溶媒复溶后给药)在人结肠癌细胞系HCT116(ATCC CCL-247)皮下异种移植BALB/c裸鼠模型中的抗肿瘤活性,并与市售注射用盐酸伊立替康(CPT-11)进行比较。

[0757] 1.实验设计

[0758] 表30.测试药剂在人结肠癌细胞系HCT116中的抗肿瘤作用实验设计

[0759]

组别	治疗	动物数	剂量 (mg/kg)	给药途径	给药体积 (mL/kg)	给药方案
1	溶媒 (空白)	7	-	iv	10	QW x 4
2	CPT-11	7	60	iv	10	QW x 4
3	CPT-11	7	80	iv	10	QW x 4
4	A01S	7	450	iv	10	QW x 4
5	HSA-SN-38	7	30	iv	10	QW x 4
6	HSA-SN-38	7	10	iv	10	QW x 4
7	HSA-SN-38	7	3.3	iv	10	QW x 4

[0760] 2.实验方法:

[0761] 将状态较好的HCT116瘤块切成20-30mm³的小瘤块,接种到裸鼠的右侧肩胛处,一共接种70只裸鼠。瘤块接种15天后肿瘤平均体积达到约121mm³时,剔除瘤体过小或过大的小鼠,将剩余的49只小鼠根据瘤体体积随机分组(7组,每组7只)并开始给药(尾静脉注射),每周给药1次,共给药4次。根据相对肿瘤抑制率(TGI)进行疗效评价,根据动物体重变化和死亡情况进行安全性评价。最后一次给药1周后,从所有小鼠取肿瘤,并称重、拍照。

[0762] 3.统计分析

[0763] 本实验用one-way ANOVA进行各组间肿瘤均值的比较。方差齐性分析得出F值有显著性差异,在ANOVA分析之后用Dunnet's T3(方差不齐)法再进行多重比较。用SPSS17.0进行所有数据分析。p<0.05认为有显著性差异。

[0764] 4.实验结果

[0765] 4.1体重变化:如图13所示。

[0766] 4.2肿瘤体积变化

[0767] 各组的肿瘤体积变化如表31和图14所示。

[0768] 表31.各组动物在不同时间点的肿瘤体积

时间 (D)	肿瘤体积 (mm ³ , Mean±SEM)						
	空白	CPT-11 60 mg/kg	CPT-11 80 mg/kg	A01S 450 mg/kg	HSA-SN-38 30 mg/kg	HSA-SN-38 10 mg/kg	HSA-SN-38 3.3 mg/kg
15	117±13	117±15	119±15	117±14	123±18	124±20	117±12
19	221±31	194±36	171±21	184±23	134±21	175±38	184±19
[0769] 22	306±40	221±36	194±24	244±36	144±20	194±35	243±30
26	533±66	287±44	233±30	403±37	138±28	222±34	342±40
29	637±82	327±48	238±32	521±28	134±25	265±27	447±50
33	869±133	378±65	249±37	723±41	125±22	293±29	599±72
36	990±154	411±79	252±39	794±54	125±23	316±34	653±72
40	1200±177	437±85	236±43	863±57	117±20	355±37	763±90
43	1487±193	477±103	231±44	1176±77	113±20	433±35	865±99

[0770] 4.3抗肿瘤效力评价指标

[0771] 表32显示HSA-SN-38及CPT-11等药剂对HCT116异种移植瘤模型的抑瘤效力评价指标。

[0772] 表32.HCT116人结肠癌模型中各治疗组效力分析

药物	N ^a	瘤体积 (mm ³)		RTV (D43)	肿瘤重量 (mg) (D43)	T/C (%)		p 值	
		D15	D43			RTV	TW	TV	TW
空白	7/7	117±13	1487±193	12.58±1.05	1441±216	100	100	1.000	1.000
CPT-11 60 mg/kg	7/7	117±15	477±103	4.42±1.05	370±87	35	26	0.019	0.026
CPT-11 80 mg/kg	7/7	119±15	231±44	1.95±0.31	173±34	16	12	0.007	0.013
[0773] A01S 450 mg/kg	7/7	117±14	1176±77	11.22±1.87	982±78	89	68	0.895	0.640
HSA-SN-38 30 mg/kg	7/7	123±18	113±20	0.92±0.13	86±18	7	6	0.005	0.010
HSA-SN-38 10 mg/kg	7/7	124±20	433±35	3.75±0.36	342±42	30	24	0.018	0.026
HSA-SN-38 3.3 mg/kg	7/7	117±12	865±99	7.65±0.96	778±100	61	54	0.227	0.262

[0774] 注:a.代表给药前动物数/实验结束时动物数

[0775] 5.总结与讨论

[0776] 本实验中观察到,HSA-SN-38高剂量(30mg/kg)具有明显的抑瘤效果,优于CPT-11。在实验结束时(肿瘤接种后43天(D43)),在给药4次后,HSA-SN-38高剂量组的肿瘤体积为113mm³,RTV为0.92,T/C值为7%,与溶媒组比较有显著性差异(p=0.005)。HSA-SN-38中剂量(10mg/kg)的抗肿瘤活性与CPT-11低剂量组(60mg/kg)相当,肿瘤体积为433mm³,RTV为3.75,T/C值为30%,与溶媒对照组比较,有显著性差异(p=0.018)。瘤重的分析结果与肿瘤体积基本一致。

[0777] 实验过程中,各治疗组均无动物死亡。但包括溶媒组在内的各组动物的体重都不同程度下降。实验结束时的动物体重相较于给药前的体重的降低在溶媒组为1.83%;在A01S组为5.41%,在CPT-11高、低剂量组(80和60mg/kg)分别为16.00%和14.41%;在HSA-SN-38的3个剂量组(30、10和3.3mg/kg)分别为11.84%、13.85%和12.57%。考虑到本实验中溶媒组及A01S组动物体重也不同程度降低,且在其它模型的药效实验中未观察到HSA-

SN-38治疗组动物体重的明显降低,因此认为,在本实验中各HSA-SN-38治疗组动物体重的降低可能与HCT116模型的恶病质特征有关。

[0778] 综上所述,HSA-SN-38 (30mg/kg和10mg/kg剂量) 在人结肠癌模型中具有显著抑制肿瘤生长的作用,优于阳性对照CPT-11,且耐受性较好,在实验给药过程中无动物死亡,也未见其它毒性反应。

[0779] 实施例26:对SKOV-3人卵巢癌模型的体内药效学研究

[0780] 目的:验证不同剂量的实施例19 (溶媒复溶后给药) 的HSA-SN-38在人卵巢癌细胞系SKOV-3 (ATCC HTB 77) 皮下异种移植NU/NU裸鼠模型中的抗肿瘤活性,并与市售注射用盐酸伊立替康 (CPT-11) 进行比较。

[0781] 1. 实验设计

[0782] 表33. 测试药剂在SKOV-3人卵巢癌模型中的抗肿瘤作用实验设计

[0783]	组别	治疗	动物数	剂量 (mg/kg)	给药途径	给药体积 (mL/kg)	给药方案
	1	溶媒 (空白)	8	-	iv	10	QW x 4
	2	CPT-11	8	60	iv	10	QW x 4
	3	CPT-11	8	80	iv	10	QW x 4
	4	A01S	8	450	iv	10	QW x 4
[0784]	5	HSA-SN-38	8	30	iv	10	QW x 4
	6	HSA-SN-38	8	10	iv	10	QW x 4
	7	HSA-SN-38	8	3.3	iv	10	QW x 4

[0785] 2. 实验方法

[0786] 皮下接种SKOV-3瘤块至80只BALB/c裸小鼠。接种14天后,筛选出56只荷瘤小鼠,平均分为7组,每组8只。通过尾静脉注射给药,每周给药1次,共给药4次。根据相对肿瘤抑制率 (TGI) 进行疗效评价,根据动物体重变化和死亡情况进行安全性评价。

[0787] 3. 统计分析

[0788] 本实验用one-way ANOVA进行各组间肿瘤均值的比较。方差齐性分析得出F值有显著性差异,在ANOVA分析之后用Dunnet's T3 (方差不齐) 法再进行多重比较。用SPSS17.0进行所有数据分析。 $p < 0.05$ 认为有显著性差异。

[0789] 4. 实验结果

[0790] 4.1 体重变化:如图15所示。

[0791] 4.2 肿瘤体积变化

[0792] 各组的肿瘤体积变化如表34和图16所示。

[0793] 表34. 各组动物在不同时间点的肿瘤体积

时 间 (D)	肿瘤体积 (mm ³ , Mean±SEM)						
	空白	CPT-11 60 mg/kg	CPT-11 80 mg/kg	A01S 450 mg/kg	HSA-SN-38 30 mg/kg	HSA-SN- 38 10 mg/kg	HSA-SN- 38 3.3 mg/kg
[0794]	14	160±23	161±16	162±17	163±17	162±16	162±16
	18	313±48	246±30	224±21	300±39	186±23	250±31
	21	450±83	405±44	343±33	458±58	248±32	372±50
	25	687±135	497±51	429±65	708±89	249±39	470±60
	28	866±152	642±68	598±62	857±91	296±46	615±74
	32	1103±163	834±90	743±133	1199±149	299±54	883±134
	35	1256±215	1010±96	933±149	1607±249	334±63	1218±171
	39	1658±309	1214±119	1332±85	2206±360	355±78	1382±189
	42	2151±351	1430±136	1854±120	2933±513	445±117	1596±269

[0795] 4.3抗肿瘤效力评价指标

[0796] 表35显示HSA-SN-38及CPT-11对SKOV-3异种移植瘤模型的抑瘤效力评价指标。

[0797] 表35.SKOV-3人卵巢癌模型中各治疗组效力分析

药物	N ^a	瘤体积 (mm ³)		RTV (D42)	肿瘤重量 (mg) (D42)	T/C (%)		p 值	
		D14	D42			RTV	TW	TV	TW
空白	8/8	160±15	2151±351	14.44±2.33	1747±327	100	100	1.000	1.000
CPT-11 60 mg/kg	8/8	161±16	1430±136	9.20±0.79	1179±150	64	67	0.691	0.870
CPT-11 80 mg/kg	8/2	162±17	1854±120	11.44±0.21	1664±258	79	95	1.000	1.000
A01S 450 mg/kg	8/8	163±17	2933±513	18.75±3.69	2611±477	130	149	0.975	0.912
HSA-SN-38 30 mg/kg	8/8	163±17	445±117	2.65±0.60	285±96	18	16	0.023	0.037
HSA-SN-38 10 mg/kg	8/8	162±16	1596±269	9.85±1.36	1336±238	68	76	0.977	0.997
HSA-SN-38 3.3 mg/kg	8/8	162±16	1792±307	11.13±1.90	1532±290	77	88	1.000	1.000

[0800] HSA-SN-38高剂量(30mg/kg)具有明显的抑瘤效果,优于CPT-11低剂量(60mg/kg)。在实验结束时(肿瘤接种后42天(D42)),在给药4次后,HSA-SN-38高剂量组的肿瘤体积为445mm³,RTV为2.65,T/C值为18%,与溶媒组比较有显著性差异(p=0.023)。CPT-11低剂量(60mg/kg)组与溶媒组无明显差异(p=0.691)。HSA-SN-38中、低剂量与溶媒组比较无显著性差异(p值分别为0.977和1.000)。瘤重的分析结果与肿瘤体积基本一致。

[0801] 实验过程中,CPT-11高剂量(80mg/kg)治疗组有6只动物死亡,其它组无动物死亡。试验结束时,动物体重较给药前均不同程度增加;HSA-SN-38高、中和低三个剂量组动物体重分别增加5.60%、5.65%及7.03%;CPT-11低剂量组动物体重相较给药前增加6.97%,高剂量组存活的两只动物体重增加11.94%。溶媒及A01S两个对照组的动物体重增加最明显,实验结束时,相较给药前分别增加了8.86%和11.99%。

[0802] 结论:

[0803] HSA-SN-38在30mg/kg剂量下,在SKOV-3人卵巢癌模型中具有显著抑制肿瘤生长的作用,明显强于CPT-11,且耐受性较好,在实验过程中无动物死亡,也未见其它毒性反应。

[0804] 实施例27:对SW620人结肠癌模型的体内药效学研究

[0805] 目的:验证不同剂量的实施例4制备的rHA-SN-38在人结肠癌细胞系SW620(ATCC:CCL-227)皮下异种移植BALB/c裸鼠模型中的抗肿瘤活性,并与市售注射用盐酸伊立替康(CPT-11)进行比较。

[0806] 1.实验设计

[0807] 表36.测试药剂在SW620人结肠癌模型中的抗肿瘤作用实验设计

[0808]

组别	治疗	动物数	剂量 (mg/kg)	给药途径	给药体积 (mL/kg)	给药方案
1	溶媒 (空白)	7	-	iv	10	QW x 4
2	CPT-11	7	60	iv	10	QW x 4
3	CPT-11	7	80	iv	10	QW x 4
4	A01S	7	420	iv	10	QW x 4
5	HSA-SN-38	7	30	iv	10	QW x 4
6	HSA-SN-38	7	10	iv	10	QW x 4
7	HSA-SN-38	7	3.3	iv	10	QW x 4

[0809] 2.实验方法

[0810] 皮下接种SW620瘤块至75只BALB/c裸小鼠。接种后第13天(D13),筛选出49只荷瘤小鼠,平均分为7组,每组7只。通过尾静脉注射给药,每周给药1次,共给药4次。根据相对肿瘤抑制率(TGI)进行疗效评价,根据动物体重变化和死亡情况进行安全性评价。

[0811] 3.统计分析

[0812] 本实验用one-way ANOVA进行各组间肿瘤均值的比较。方差齐性分析得出F值有显著性差异,在ANOVA分析之后用Dunnet's T3(方差不齐)法再进行多重比较。用SPSS17.0进行所有数据分析。 $p < 0.05$ 认为有显著性差异。

[0813] 4.实验结果

[0814] 4.1体重变化:如图17所示。

[0815] 4.2肿瘤体积变化

[0816] 各组的肿瘤体积变化如表37和图18所示。

[0817] 表37.各组动物在不同时间点的肿瘤体积

时 间 (D)	肿瘤体积 (mm ³ , Mean±SEM)						
	空白	CPT-11 60mg/kg	CPT-11 80mg/kg	A01S 420mg/kg	rHA-SN-38 30mg/kg	rHA-SN-38 10mg/kg	rHA-SN-38 3.3mg/kg
[0818]	13	125±14	126±14	129±16	130±17	129±17	124±13
	16	268±54	219±33	226±30	227±34	229±28	192±32
	20	388±92	315±46	408±50	377±49	233±27	209±35
	23	535±122	362±48	476±63	578±78	221±24	214±34
	27	766±191	408±54	586±73	892±132	145±11	193±32
	30	998±252	486±71	724±123	1129±170	90±10	136±16
	34	1164±307	516±73	716±119	1434±210	49±11	105±12
	37	1580±384	563±91	732±125	1772±262	28±4	99±10
	41	2158±452	551±94	714±117	2364±331	21±2	101±10

[0819] 4.3抗肿瘤效力评价指标

[0820] 表38显示rHA-SN-38及CPT-11对SW620异种移植瘤模型的抑瘤效力评价指标。

[0821] 表38.SW620人结肠癌模型中各治疗组效力分析

药物	N ^a	瘤体积 (mm ³)		RTV (D41)	肿瘤重量 (mg) (D41)	T/C (%)		p 值	
		D13	D41			RTV	TW	TV	TW
空白	7/7	125±14	2158±452	16.43±1.94	1754±354	100	100	1.000	1.000
CPT-11 60 mg/kg	7/7	126±14	551±94	4.69±1.12	465±91	28	27	0.133	0.121
CPT-11 80 mg/kg	7/7	129±16	714±117	5.95±1.22	495±91	36	28	0.202	0.132
A01S 420 mg/kg	7/7	130±17	2364±331	18.75±2.38	2089±304	114	119	1.000	1.000
HSA-SN-38 30 mg/kg	7/7	129±17	21±2	0.17±0.01	12±3	1	1	0.040	0.033
HSA-SN-38 10 mg/kg	7/7	128±17	101±10	0.81±0.06	74±11	5	4	0.047	0.039
HSA-SN-38 3.3 mg/kg	7/7	124±13	762±138	6.08±0.83	748±141	37	43	0.231	0.321

[0823] 注:a.代表给药前动物数/实验结束时动物数

[0824] rHA-SN-38高、中剂量(30、10mg/kg)具有明显的抑瘤效果,均优于CPT-11。在实验结束时(肿瘤接种后41天(D41)),在给药4次后,rHA-SN-38高、中剂量组的肿瘤体积分别为21mm³和101mm³,RTV分别为0.17和0.81,T/C值分别为1%和5%,与溶媒组比较有显著性差异(p值分别为0.040和0.047)。CPT-11高、低剂量组(80和60mg/kg)的效力相近,无明显量效关系,而且与溶媒组比较均无明显差异(p值分别为0.202和0.133)。rHA-SN-38低剂量(3.3mg/kg)组的肿瘤体积在D41时与溶媒组比较无显著性差异(p=0.231)。瘤重的分析结果与肿瘤体积基本一致。

[0825] 各组均无动物死亡,也未见其它异常反应。rHA-SN-38高、中剂量组动物在实验结束时体重相较给药前分别增加2.03%及4.01%。其它各组动物在实验结束时体重相较给药前均不同程度降低:在CPT-11高、低剂量组分别为5.81%和0.99%;在rHA-SN-38低剂量组为0.33%;以及在溶媒及A01S两个对照组分别为5.83%和4.39%。

[0826] 综上所述,rHA-SN-38在30及10mg/kg剂量下在SW620人结肠癌模型中具有显著抑

制肿瘤生长的作用,优于80及60mg/kg剂量的CPT-11。而且,这两个rHA-SN-38治疗组动物体重增加更明显,而两个CPT-11治疗组动物则降低或仅轻微增加。整体而言,rHA-SN-38的抗肿瘤活性明显强于CPT-11,且耐受性较好,实验过程中无动物死亡,也未见其它毒性反应。

[0827] 实施例28:对Hep3B人肝癌模型的体内药效学研究

[0828] 目的:验证实施例5制备的rHA-SN-38在人肝癌细胞系Hep3B(ATCC-8064)皮下异种移植BALB/c裸鼠模型中的抗肿瘤活性,并与市售注射用盐酸伊立替康(CPT-11)进行比较。

[0829] 1.实验设计

[0830] 表39.测试药剂在Hep3B人肝癌模型中的抗肿瘤作用实验设计

[0831]

组别	治疗	动物数	剂量 (mg/kg)	给药途径	给药体积 (mL/kg)	给药方案
1	空白	7	-	iv	10	QW x 4
2	CPT-11	7	60	iv	10	QW x 4
3	CPT-11	7	80	iv	10	QW x 4
4	A01S	7	420	iv	10	QW x 4
5	HSA-SN-38	7	30	iv	10	QW x 4
6	HSA-SN-38	7	10	iv	10	QW x 4
7	HSA-SN-38	7	3.3	iv	10	QW x 4

[0832] 2.实验方法

[0833] 皮下接种Hep3B瘤块至75只BALB/c裸小鼠。接种后第13天(D13),筛选出49只荷瘤小鼠,平均分为7组,每组7只。通过尾静脉注射给药,每周给药1次,共给药4次。根据相对肿瘤抑制率(TGI)进行疗效评价,根据动物体重变化和死亡情况进行安全性评价。

[0834] 3.统计分析

[0835] 本实验用one-way ANOVA进行各组间肿瘤均值的比较。方差齐性分析得出F值有显著性差异,在ANOVA分析之后用Dunnet's T3(方差不齐)法再进行多重比较。用SPSS17.0进行所有数据分析。 $p < 0.05$ 认为有显著性差异。

[0836] 4.实验结果

[0837] 4.1体重变化:如图19所示。

[0838] 4.2肿瘤体积变化:如图20所示。

[0839] 结论

[0840] 受试品rHA-SN-38在30mg/kg和10mg/kg剂量下在Hep3B人肝癌模型中具有显著抑制肿瘤生长的作用,与CPT-11在80mg/kg的剂量下的抑瘤水平类似。CPT-11在60mg/kg的剂量下,有抗肿瘤活性,与HSA-SN-38在3.33mg/mL剂量下的抑瘤效果类似。rHA-SN-38的耐受性较好,实验过程中无动物死亡,也未见其它毒性反应。

[0841] 实施例29:添加不同表面活性剂对SN-38制剂的影响

[0842] 制备工艺:

[0843] 1)配制体积比为3/7的EtOH/CHCl₃混合溶剂;

[0844] 2)称取300mg SN-38、300mg胆固醇以及下表40中所示量的表面活性剂,加入30mL步骤1)中的混合溶剂,加热使完全溶解,得到药物溶液;

[0845] 3)用去离子水配制总体积约为370mL的HSA水溶液作为水相,使得水相中HSA的总

含量为3g;

[0846] 4) 剪切分散:将步骤2) 中的药物溶液与步骤3) 的水相混合,剪切分散10min,得到粗乳液;

[0847] 5) 将粗乳液转移到高压均质机中,在1300-1500bar的压力下均质3-8遍;

[0848] 6) 将均质后的产物转移到烧瓶中;

[0849] 7) 在40-45℃下旋蒸4-6min以除去体系中的氯仿;

[0850] 8) 切向流超滤系统 (TFF) (Millipore) 换液除去体系中的EtOH;

[0851] 9) 用0.2μm的PES针头滤膜过滤;

[0852] 10) 将所得制品置于4℃冰箱中保存。

[0853] 在制备过程中,在剪切分散后、高压均质后以及在过滤前后分别检测样品的粒径。

[0854] 表40:具有不同表面活性剂的组合物的参数

[0855]	表面活性剂及量 (mg)		分散后粒径/PDI (nm/---)	高压均质后粒径 /PDI (nm/---)	过滤前粒径/PDI (nm/---)	过滤后粒径/PDI (nm/---)
	Tween 80	100	278.5 nm/0.406	133.7nm/0.215 (1400 bar 下 3 遍)	2466 nm/0.483	129.4 nm/0.480
	Span 20	18	313.2 nm/0.608	121.3nm/0.174 (1400 bar 下 3 遍)	134.8 nm/0.201	116.2 nm/0.177
	Kolliphor HS15	100	309.4 nm/0.480	193.5nm/0.167 (1400 bar 下 8 遍)	6134 nm/0.800	28.87 nm/1.000
	Poloxamer 188	100	添加后有机相有不溶性颗粒析出, NA			
	未添加表 面活性剂	-	419.2 nm/0.781	140.5nm/0.185 (1400 bar 下 5 遍)	178.2 nm/0.183	153.6 nm/0.080

[0856] 结果表明,在有机相中添加不同量的表面活性剂对制备工艺中的均质次数、粒径均有影响,其中Span 20在降低均质次数、减少纳米颗粒粒径方面均优于添加其它表面活性剂或未添加表面活性剂。

[0857] 实施例30:添加Span 20对SN-38制剂过滤通量的影响

[0858] 为进一步研究Span 20对制备工艺的影响,比较了在添加或不添加Span 20的条件下,在制备SN-38制剂的各个步骤的粒径、过滤通量。制备过程和Span 20的添加量同实施例29。结果示于表41。

[0859] 表41:添加或不添加Span 20对粒径、过滤通量的影响

[0860]	Span 20	高压均质后粒径 /PDI (nm/---)	TFF 后粒径/PDI (nm/---)	过滤后粒径/PDI (nm/---)
	未添加	139.9 nm/0.222	157.6 nm/0.208	131.2 nm/0.192 (过滤通量为 6.5 mL)
	添加	132.9 nm/0.264	148.9 nm/0.222	119.5 nm/0.194 (过滤通量为 10 mL)

[0861] 结果表明,与不添加Span 20制备的制剂对比,在添加Span 20的条件下用同样的制备工艺得到的产物的粒径更小,通过PES针头滤器过滤的通量增加。

[0862] 此外,还参照实施例的前序部分第9项所述的方法,进行了上述两个样品的崩解实验。具体而言,用pH~7.4的1×PBS稀释样品,测定不同稀释倍数下样品的粒径,研究纳米粒子在稀释多少倍的情况下会发生崩解,析出SN-38原料。稀释倍数越高,则表明纳米粒子的

稳定性越好。

[0863] 崩解实验的结果如图21和22所示。结果表明, 无论是否加入Span 20, 稀释到0.1ug/mL时, 两个样品都仍然处于较为稳定的状态, 当继续稀释至10ng/mL时, 二者粒径明显增大, 纳米粒子发生崩解。加入Span 20后, 崩解后粒径变化幅度更小, 更稳定。

[0864] 另外, 再参照实施例前序部分第11项所述的方法, 用冷冻透射电镜观察上述两个样品的形态, 电镜观察结果如图23和24所示。结果发现, 两个样品中, API均存在纳米晶体和囊泡两种不同形态, 且包含Span 20的样品中囊泡更多, 纳米晶体更少。由于囊泡形式的SN-38进入体内后是快速起效的API, 因此提示加入Span 20在更好地保持纳米颗粒粒径的同时, 能帮助制剂在体内尽快发挥药效。

[0865] 实施例31: 添加不同量的Span 20对SN-38制剂的影响

[0866] 制备工艺:

[0867] 1) 按下表42所示配制有机溶剂体系;

[0868] 2) 称取表42所示的SN-38、胆固醇以及Span 20, 加入30mL步骤1) 中的有机溶剂使之完全溶解, 得到药物溶液;

[0869] 3) 用去离子水配制总体积约为370mL的HSA水溶液作为水相, 使得水相中HSA的总含量为3g;

[0870] 4) 剪切分散: 将步骤2) 中的药物溶液与步骤3) 的水相混合, 剪切分散10min, 得到粗乳液;

[0871] 5) 将粗乳液转移到高压均质机中, 在1300-1500bar的压力下均质3-5遍;

[0872] 6) 将均质后的产物转移到烧瓶中;

[0873] 7) 在40-45℃下旋蒸4-6min以除去体系中的氯仿;

[0874] 8) TFF换液除去体系中的DMSO或EtOH;

[0875] 9) 用0.2μm的PES针头滤膜过滤, 并在过滤前后分别检测样品的粒径、API的过滤回收率和载药量等参数;

[0876] 10) 样品置于4℃冰箱中保存。

[0877] 结果示于表42。

[0878] 表42: 添加不同量的Span 20对SN-38制剂的影响

制剂	有机溶剂体系 (v/v)	制剂配方 (mg)	过膜前粒径/ PDI (nm/--)	过膜后粒径/ PDI (nm/--)	载药量 (%)	API 过滤回 收率 (%)
[0879]	1	DMSO/CHCl ₃ 1:1 = SN-38 180mg; 胆固醇 300mg; Span 20 9mg	147.6/0.140	129.6/0.130	4.140%	77.37%
	2	DMSO/CHCl ₃ 1:1 = SN-38 120mg; 胆固醇 450mg; Span 20 9mg	156.5/0.139	137.0/0.135	2.766%	72.38%
	3	DMSO/CHCl ₃ 1:1 = SN-38 180mg; 胆固醇 450mg; Span 20 9mg	131.2/0.161	118.4/0.133	4.265%	81.74%
	4	DMSO/CHCl ₃ 1:1 = SN-38 240mg; 胆固醇 450mg; Span 20 9mg	163.9/0.125	142.9/0.103	4.358%	62.36%
	5	DMSO/CHCl ₃ 1:1 = SN-38 180mg; 胆固醇 450mg; Span 20 18mg	137.6/0.152	123.3/0.138	4.060%	76.86%
	6	DMSO/CHCl ₃ 1:1 = SN-38 180mg; 胆固醇 600mg; Span 20 9mg	139.0/0.130	124.8/0.0062	4.164%	75.04%
	7	DMSO/CHCl ₃ 1:1 = SN-38 120mg; 胆固醇 600mg; Span 20 18mg	117.4/0.164	108.1/0.126	3.319%	84.46%
	8	DMSO/CHCl ₃ 1:1 = SN-38 240mg; 胆固醇 600mg; Span 20 18mg	137.8/0.158	122.2/0.123	5.553%	79.82%
	9	EtOH/CHCl ₃ = 3:7 SN-38 120mg; 胆固醇 300mg; Span 20 18mg	109.4/0.234	98.43/0.211	3.173%	90.49%
	10	EtOH/CHCl ₃ = 3:7 SN-38 240mg; 胆固醇 300mg; Span 20 18mg	125.2/0.228	107.5/0.272	6.040%	87.56%
[0880]	11	EtOH/CHCl ₃ = 3:7 SN-38 300mg; 胆固醇 300mg; Span 20 18mg	138.8/0.214	116.5/0.163	7.298%	81.47%
	12	EtOH/CHCl ₃ = 3:7 SN-38 300mg; 胆固醇 300mg	152.3/0.267	134.9/0.183	4.146%	75.24%

[0881] 结果表明,对于不同含量比例的SN-38和胆固醇,在制备过程中添加Span 20均能减少纳米颗粒的粒径,增加过滤效率和通量,提高过滤回收率。单因素对比表明,Span20能提高载药量和API回收率。

[0882] 实施例32:添加Span 20对SN-38制剂稳定性的影响。

[0883] 通过测定SN-38制剂中人血清白蛋白多聚体的含量来观察Span 20对溶液中白蛋白多聚体产生的影响。

[0884] 实验方法:

[0885] 1) 将来自实施例31的制剂11和12灌装至西林瓶中,经真空冷冻干燥得到HSA-SN-38纳米粒子冻干制剂。存放14天后,后用去离子水稀释使得SN-38的浓度与冻干前浓度相同,在高温、高湿或强光条件下存放5天或10天后作为待测样品。

[0886] 2) 使用SEC-HPLC测定不同制备方法产生的SN-38制剂中人血白蛋白多聚体含量,直接取制备获得的样品5 μ l进行检测,色谱条件如表43所示。

[0887] 表43:测定样品中白蛋白聚集体的SEC-HPLC色谱条件

色谱柱型号	TSKgel G3000Swxl 7.8×300 mm, 5μm Guard SWXL 6.0*40	
色谱柱编号	QCCA-RP-007	
检测器波长	228 nm	
柱温	30°C	
样品盘温度	5°C	
流速	0.4mL/min	
流动相	A: 0.1 mol/L K ₂ HPO ₄ B: ACN	
[0888] 运行时间和流速	时间 (min)	流速 (mL/min)
	0	0.4
	25	0.4
	28	0.9
	55	0.9
	56	0.4
	60	0.4
洗脱方式	等度洗脱: A(98%)+B(2%)	
进样体积	5 μL	
运行时间	30 min	

[0889] 结果示于下表44:

[0890] 表44:添加Span 20对白蛋白稳定性的影响

样品	检测结果						
	0 天	高温 (40°C)		高湿 (75%RH)		强光(5000LX)	
		5d	10d	5d	10d	5d	10d
[0891] 制剂 12	0.4%	/	3.1%	1.7%	2.3%	2.1%	2.4%
制剂 11	0.5%	0.4%	0.5%	0.5%	0.4%	0.4%	0.4%

[0892] 注:表格中的百分含量表示样品中的多聚体的百分含量,数值越小,多聚体越少。

[0893] 结果表明,与未添加Span 20的制剂12相比,添加了Span 20的制剂11的蛋白多聚体含量未发生明显的变化,表明Span 20能够抑制白蛋白聚集。因此,Span 20能够有效地防止溶液中白蛋白的聚集,延长药物的货架期,并且不会产生由于白蛋白多聚体而导致的免疫原性。

[0894] 实施例33:白蛋白的含量对SN-38制剂的影响。

[0895] 按照表45所示的配方,重复实施例29的方法制备SN-38制剂,除了制剂13中不添加Span 20以及制剂15和16中分别包含6和12g HSA。测定在制备SN-38制剂的各个步骤的粒径,还测定了API过滤回收率,以考察HSA含量对于制剂的影响。结果示于表46。

[0896] 表45:制剂的组成

制剂	HSA (g)	SN-38 (mg)	胆固醇 (mg)	Span 20 (mg)
13	3	300	300	0
14	3	300	300	18
15	6	300	300	18
16	12	300	300	18

[0898] 表46:白蛋白的含量对SN-38制剂的影响

样品	分散后粒径 /PDI (nm/---)	高压均质后粒径 /PDI (nm/---)	蒸发后粒径 /PDI (nm/---)	TFF 后粒径 /PDI (nm/---)	过滤后粒径 /PDI (nm/---)	API 过滤回收率 (%)
[0899] 13	312.3/0.284	228.2/0.277	267.3/0.267	151.17/0.198	134.9/0.183	73.24%
14	216.4/0.251	133.4/0.245	138.8/0.214	127.8/0.188	116.5/0.163	83.46%
15	298.6/0.198	190.7/0.186	160.13/0.134	136.77/0.175	121.9/0.141	70.56%
16	456.8/0.489	242.1 /0.213	264.5/0.200	216.8/0.210	173.5/0.147	61.39%

[0900] 结果表明,配方中增加白蛋白用量会增加样品的粒径,明显降低过滤通量,降低API过滤回收率。HSA:API的用量比控制在20:1以内比较合适;高于这个比例,尤其高达40:1以上时,不仅纳米颗粒粒径过大、不稳定,容易聚集产生免疫原性,而且导致过滤困难,API回收率低,无法大批量生产。

[0901] 实施例34:对SW620人结肠癌模型的体内药效学研究

[0902] 目的:验证实施例31中制备的具有不同量的Span 20和HSA的SN-38制剂在人结肠癌细胞系SW620 (ATCC:CCL-227) 皮下异种移植BALB/c裸鼠模型中的抗肿瘤活性及安全性,并与市售注射用盐酸伊立替康(CPT-11)进行比较。

[0903] 表47:实验设计

对照品/受试品	小鼠数目	剂量 (mg/kg)	给药体积 (μl/g)	给药途径	给药方案
空白	6	-	10	iv	QW x 4
CPT-11	6	60	10	iv	QW x 4
[0904] 制剂 9	6	10	10	iv	QW x 4
制剂 10	6	10	10	iv	QW x 4
制剂 11	6	10	10	iv	QW x 4
制剂 12	6	10	10	iv	QW x 4

[0905] 注:QW x 4表示每周给药一次,共计4次。

[0906] 细胞培养

[0907] 在37℃、含5% CO₂空气的培养箱中,在添加10%热灭活胎牛血清和琼脂的1640培养基中进行SW620细胞体外单层培养。一周两次用0.25%胰酶进行消化处理以传代。当细胞呈指数生长期时,收取细胞,计数和接种。

[0908] 肿瘤细胞接种及瘤块传代

[0909] 将 5.0×10^6 SW620肿瘤细胞悬浮于0.1mL PBS中,接种于5只裸鼠右侧肩胛处(P1代)。待肿瘤长至500-800mm³时,将荷瘤小鼠用CO₂麻醉处死,取出瘤块,去除周围坏死的组织,将状态较好的瘤块切成20-30mm³的小瘤块,接种到新的一批裸鼠(P2代)的右侧肩胛处,一共接种40只鼠。

[0910] 瘤块接种及分组给药

[0911] 在本试验中使用P2代肿瘤组织进行受试品的抗肿瘤活性评价。接种7天后肿瘤平均体积达到约159mm³时,剔除瘤体积过小或过大的小鼠,将剩余的36只小鼠根据瘤体积随机分组并开始给药。

[0912] 结果示于图25-27和表48。

[0913] 表48

[0914]

药物	n	剂量 (mg/kg)	体重(g, mean±SEM)			肿瘤体积(TV)/重量(TW) (mean±SEM)						
			第 11 天	第 39 天	变化 (%)	TV (mm ³)		TW (mg)	T/C (%)		p 值	
						第 11 天	第 39 天		TV	TW	TV	TW
空白	6	-	19.1±0.3	19.6±0.8	+2.5	158±21	1921±168	1466±170	100	100	1.000	1.000
CPT-11	6	60	18.5±0.6	19.2±0.7	+3.8	157±18	154±57	99±43	8	7	0.001	0.005
制剂 9	6	10	18.5±0.6	20.1±0.5	+8.7	163±17	38±15	20±7	2	1	0.001	0.005
制剂 10	6	10	19.4±0.2	20.7±0.4	+6.9	158±17	59±12	24±5	3	2	0.001	0.005
制剂 11	6	10	19.0±0.6	20.2±0.7	+6.4	158±17	60±7	29±5	3	2	0.001	0.005
制剂 12	6	10	17.8±0.6	19.5±0.5	+9.7	158±17	91±17	39±9	5	3	0.001	0.005

[0915] 注:T/C (%)是指治疗组(T)的TV或TW相对于空白对照组(C)的百分比,其值越小,说明抑瘤效果越好。

[0916] 结果表明,具有不同量的Span 20的制剂与没有Span 20的制剂均具有优于CPT-11的抗肿瘤活性。

[0917] 实施例35:将EtOH/CHCl₃混合溶剂替换成EtOH/CH₂Cl₂/CHCl₃混合溶剂对制剂的影响

[0918] 1. 制备工艺:

[0919] 1) 按照下表49所示的体积比配制EtOH/CH₂Cl₂/CHCl₃混合溶剂;

[0920] 2) 称取SN-38 300mg,胆固醇300mg以及Span 20 18mg,加入30mL步骤1)中的混合溶剂,在加热下使其完全溶解,得到药物溶液;

[0921] 3) 用去离子水配制总体积约为370mL的HSA水溶液作为水相,使得水相中HSA的总含量为3g;

[0922] 剪切分散:将步骤2)的药物溶液与步骤3)的水相混合,剪切分散10-15min,得到粗乳液;

[0923] 4) 将粗乳液转移到高压均质机中,在1300-1500bar的压力下均质5遍,将均质后的样品转移到烧瓶中;

[0924] 5) 在40℃-45℃下旋蒸4-6min;

[0925] 6) TFF换液除去体系中剩余的EtOH;

[0926] 7) 用0.2μm的PES针头滤膜过滤,并在过滤前后分别检测样品的粒径、API的过滤回收率和载药量等参数;

[0927] 8) 样品置于4℃冰箱中保存。

[0928] 表49:不同有机溶剂体系对包载结果的影响

[0929]	有机溶剂体系 (v/v)	过膜前粒径 / PDI (nm/--)	过膜后粒径 / PDI (nm/--)	API 过滤回收率 (%)	载药量 (%)	过膜后液体中 CHCl ₃ /API
	EtOH/CHCl ₃ = 7/13	133.4/0.206	112.9/0.171	85.735%	7.411%	7.668 ug/mg API
	EtOH/CH ₂ Cl ₂ /CHCl ₃ = 6/7/7	144.6/0.203	121.6/0.121	80.069%	6.875%	3.335 ug/mg API
	EtOH/CH ₂ Cl ₂ /CHCl ₃ = 6/4/10	136.1/0.213	113.5/0.161	84.168%	7.515%	4.841 ug/mg API

[0930] 2. 结果:

[0931] 将有机溶剂体系调整成EtOH/CH₂Cl₂/CHCl₃=6/7/7后,CHCl₃残留量明显降低,同时,粗略定量CH₂Cl₂的残留水平也较低(~2ug/mg API)。按照过滤后液体中的CHCl₃残留量以及CHCl₃的单日最大曝露量(600ug)计算,临床最大使用剂量>100mg/m²,这大大降低了CHCl₃残留导致的剂量限制。但是,由于SN-38在CH₂Cl₂中溶解度更低,有机相分散到水相中时析出晶体的速度更快,因此使用EtOH/CH₂Cl₂/CHCl₃混合溶剂制备得到的粗产品的粒径更大,API的过滤回收率相对较低,载药量相对较低。

[0932] 当调整CH₂Cl₂的用量至EtOH/CH₂Cl₂/CHCl₃=6/4/10后,粗产品的粒径降低,API的过滤回收率等参数与使用EtOH/CHCl₃混合溶剂制备得到的产品一致,但CHCl₃残留水平仍明显降低。

[0933] 实施例36:大规模制备添加SP20的HSA-SN-38制剂

[0934] 制备工艺:

[0935] 1)按下表50所示配制混合有机溶剂300mL;

[0936] 2)称取SN-38 3g,胆固醇3g以及Span 20 0.18g,加入30mL步骤1中的混合有机溶剂,加热使其完全溶解,得到药物溶液;

[0937] 3)取150mL 20%的HSA溶液,加入3550mL去离子水稀释,配置成水相;

[0938] 4)剪切分散和均质:用连续式生产方式将在线式剪切机(Fluke FDHS3/60)与高压均质机(ATS,AH12-150)串联,设置在线式剪切机转速为8000-10000rpm。将步骤3)的水相与步骤2)的有机相以一定比例泵入在线式剪切机,随后药液进入高压均质机,在1300-1500bar的压力下均质5遍;

[0939] 5)蒸发:通过在降膜蒸发器(蒸发列管温度为40℃-45℃)中蒸发,除去体系中的氯仿以及二氯甲烷;

[0940] 6)TFF换液除去体系中剩余的EtOH;

[0941] 7)以80mg/ml的浓度添加蔗糖;

[0942] 8)用0.2μm的囊式滤器过滤,并在过滤前后分别检测样品粒径、API的过滤回收率和载药量等参数;

[0943] 9)将样品分装,每支西林瓶装15mL,然后冻干。检测经冻干的样品中的溶剂残留。

[0944] 表50:10倍放大规模的制备工艺对包载结果的影响

样品	有机溶剂体系 (v/v)	批 量	过膜前粒径 / PDI (nm/--)	过膜后粒径 / PDI (nm/--)	API 过滤 回 收 率 (%)	载 药 量 (%)	过膜后液体 中 CHCl ₃ /API	冻干粉氯 仿 残 留 (ppm)
[0945] 制 剂 17	EtOH/CHCl ₃ = 7/13	4L	137.3/0.190	132.5/0.182	85.961%	7.440%	6.463 ug/mg API	55
制 剂 18	EtOH/CH ₂ Cl ₂ / CHCl ₃ = 6/4/10	4L	131.4/0.205	127.0/0.166	86.808%	7.653%	4.448 ug/mg API	33

[0946] 结果显示,使用EtOH/CH₂Cl₂/CHCl₃ = 6/4/10作为混合有机溶剂制备得到的产品的氯仿残留水平明显降低,且放大生产制备得到的产品的性质与小试批次一致。

[0947] 实施例37:添加Span 20对HSA-SN-38制剂在不同时间的稳定性的影响

[0948] 通过测定SN-38制剂中人血清白蛋白多聚体的含量来研究Span 20对溶液中白蛋白稳定性(多聚体、粒径等)产生的影响。

[0949] 实验方法:

[0950] 1) 将来自实施例31的制剂12和实施例36的制剂18灌装至西林瓶中,经真空冷冻干燥得到HSA-SN-38制剂冻干制剂。稳定性试验开启前,所涉及到的样品存放在冷藏冰箱(2~8℃)中,分别存放0天、3个月和6个月后,后用去离子水稀释使得SN-38的浓度与冻干前浓度相同,而后检测水分、pH值、渗透压、粒径及粒径分布、多聚体和胆固醇含量,结果如表50(制剂18)和表51(制剂12)。

[0951] 2) 使用SEC-HPLC测定不同方法制备的SN-38制剂中人血清白蛋白多聚体含量。直接取制备获得的样品5μl进行检测,色谱条件如表43所示。

[0952] 表51:制剂18的稳定性参数结果

项目	时间点			
	0 天	3 个月	6 个月	
	1mg/ml	1mg/ml	1mg/ml	0.83mg/ml
pH	6.6	6.8	6.7	6.6
水分	1.4%	1.6%	1.9%	
渗透压	352mOsmol/kg	346mOsmol/kg	346mOsmol/kg	287mOsmol/kg
[0953] 粒径及粒径分布	168nm d(0.9):336nm d(0.5):192nm d(0.1):108nm	169nm d90:338nm d50:194nm d10: 111nm	172nm d90:352nm d50:197nm d10: 107nm	170nm d90:332nm d50:193nm d10: 110nm
人血清白蛋白多聚体	0.8%	1.0%	1.1%	
胆固醇含量	12.5mg/瓶	12.6mg/瓶	12.3mg/瓶	
Span 20 含量	<1mg/瓶	<1mg/瓶	<1mg/瓶	

[0954] 表52:制剂12的稳定性参数结果

项目	时间点			
	0 天	3 个月	6 个月	
	1mg/ml	1mg/ml	1mg/ml	0.83mg/ml
pH	6.8	6.7	6.6	6.8
水分	2.5%	2.7%	2.0%	
渗透压	312mOsm/kg	331mOsm/kg	322mOsm/kg	329mOsm/kg
粒径及粒径分布	195nm d90:455nm d50:254nm d10:97.5nm	252nm d90:758nm d50:336nm d10:90.3nm	181nm d90:376nm d50:227nm d10:121nm	180nm d90:400nm d50:225nm d10:116nm
人血白蛋白多聚体	1.7%	1.0%	1.5%	
胆固醇含量	15.0mg/瓶	15.8mg/瓶	15.8mg/瓶	

[0956] 上述结果表明,随着时间推移,添加了Span 20的HSA-SN-38制剂的粒径变化、白蛋白多聚体变化更小,更趋于稳定。

[0957] 实施例38:在SKOV-3人卵巢癌模型中的体内药效学研究

[0958] 1、实验目的:验证实施例31中制备的制剂12和实施例36制备的制剂18在人卵巢癌细胞系SKOV-3(ATCC HTB 77)皮下异种移植BALB/c裸鼠模型中的抗肿瘤活性及安全性。

[0959] 2.实验方法

[0960] 皮下接种SKOV-3瘤块至40只BALB/c裸小鼠。接种后第13天(D13),筛选出18只荷瘤小鼠,平均分为3组,每组6只。通过尾静脉注射给药,每周给药1次,共给药4次,具体给药方案见表53。根据相对肿瘤抑制率(TGI)进行疗效评价,根据动物体重变化和死亡情况进行安全性评价。

[0961] 表53:测试制剂在SKOV-3人卵巢癌模型中的抗肿瘤作用

对照品/受试品	小鼠数目	剂量 (mg/kg)	给药体积 (μl/g)	给药途径	给药方案
空白	6	-	10	iv	QW x 4
制剂 12	6	30	10	iv	QW x 4
制剂 18	6	30	10	iv	QW x 4

[0963] 注:QW x 4表示每周给药一次,共计4次。

[0964] 3.统计分析

[0965] 本实验用one-way ANOVA进行各组间肿瘤均值的比较。方差齐性分析得出F值有显著性差异,在ANOVA分析之后用Dunnet's T3(方差不齐)法再进行多重比较。用SPSS17.0进行所有数据分析。 $p < 0.05$ 认为有显著性差异。

[0966] 4.实验结果

[0967] 4.1体重变化:如图28所示。

[0968] 4.2肿瘤体积变化:如图29-图30所示。

[0969] 4.3表54显示HSA-SN-38制剂12和制剂18对SKOV-3异种移植瘤模型的抑瘤效力评价指标。

[0970] 表54:测试制剂在SKOV-3人卵巢癌模型中的效力

[0971]

药 物	n	剂量 (mg/kg)	体重(g, mean±SEM)			肿瘤体积(TV)/重量(TW) (mean±SEM)							
			第 6 天	第 34 天	变化 (%)	TV (mm³)		TW (mg)	T/C (%)		p 值		
						第 6 天	第 34 天		TV	TW	TV	TW	
空白	6	-	16.9±0.2	18.6±0.5	+9.6	158±11	2264±112	1244±200	100	100	1.000	1.000	
制剂	6	30	17.9±0.4	19.1±0.4	+6.9	157±9	134±6	65±7	6	5	.000	.005	
18 制剂	6	30	17.6±0.4	19.1±0.4	+8.8	157±8	221±34	88±16	10	7	.000	.006	
12													

[0972] 注:T/C (%)是指治疗组(T)的TV或TW相对于空白对照组(C)的百分比,其值越小,说明抑瘤效果越好。

[0973] 结论:

[0974] 制剂12和制剂18在30mg/kg剂量下在SKOV-3人卵巢癌模型中具有显著抑制肿瘤生长的作用,肿瘤最后都基本消除,且实验过程中无动物死亡,也未见其它毒性反应。结果表明,含有Span20的制剂(制剂18)与没有Span 20的制剂(制剂12)的抗肿瘤活性相当。

[0975] 实施例39:在HCT116人结肠癌模型中的体内药效学研究

[0976] 1.实验目的:验证实施例31中制备的制剂12和实施例36制备的制剂18在人结肠癌细胞系HCT116(ATCC CCL-247)皮下异种移植BALB/c裸鼠模型中的抗肿瘤活性及安全性。

[0977] 2.实验方法

[0978] 将状态较好的HCT116瘤块切成20-30mm³的小瘤块,接种到40只裸鼠的右侧肩胛处。瘤块接种15天后肿瘤平均体积达到约121mm³时,剔除瘤体积过小或过大的小鼠,将剩余的18只小鼠根据瘤体积随机分组(3组,每组6只)并开始给药(尾静脉注射),每周给药1次,共给药4次。根据相对肿瘤抑制率(TGI)进行疗效评价,根据动物体重变化和死亡情况进行安全性评价。最后一次给药1周后,从所有小鼠取肿瘤,并称重、拍照。

[0979] 表55:测试制剂在HCT116人结肠癌模型中的抗肿瘤作用

对照品/受试品	小鼠数目	剂量 (mg/kg)	给药体积 (μl/g)	给药途径	给药方案
[0980] 空白	6	-	10	iv	QW x 4
制剂 12	6	10	10	iv	QW x 4
制剂 18	6	10	10	iv	QW x 4

[0981] 注:QW x 4表示每周给药一次,共计4次。

[0982] 3.统计分析

[0983] 本实验用one-way ANOVA进行各组间肿瘤均值的比较。方差齐性分析得出F值有显著性差异,在ANOVA分析之后用Dunnet's T3(方差不齐)法再进行多重比较。用SPSS17.0进行所有数据分析。p<0.05认为有显著性差异。

[0984] 4.实验结果

[0985] 4.1体重变化:如图31所示。

[0986] 4.2肿瘤体积变化:如图32-图33所示。

[0987] 结论:

[0988] 制剂12和制剂18在10mg/kg剂量下在HCT116人结肠癌模型中具有显著抑制肿瘤生

长的作用,肿瘤基本消退,且实验过程中无动物死亡,也未见其它毒性反应。

[0989] 等同以及援引加入

[0990] 本文已经参考某些优选的实施方案描述了本申请的组合物、方法和用途。但是,由于基于本文所述的公开内容,其特定的变化对于本领域技术人员而言是显而易见的,所以本申请不应视为仅限于此。

[0991] 除非另有定义,否则本文中所用的所有技术和科学术语的含义与本公开所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同。在说明书和权利要求书中,单数形式也包括复数,除非上下文另外明确指出。

[0992] 此外,在某种程度上,本申请的方法不依赖于本文所阐述步骤的特定顺序,权利要求中所记载步骤的特定顺序不应被解释为对该权利要求的限制。

[0993] 本文引用的所有专利、专利申请、参考文献和出版物都以其整体通过援引加入本文中。

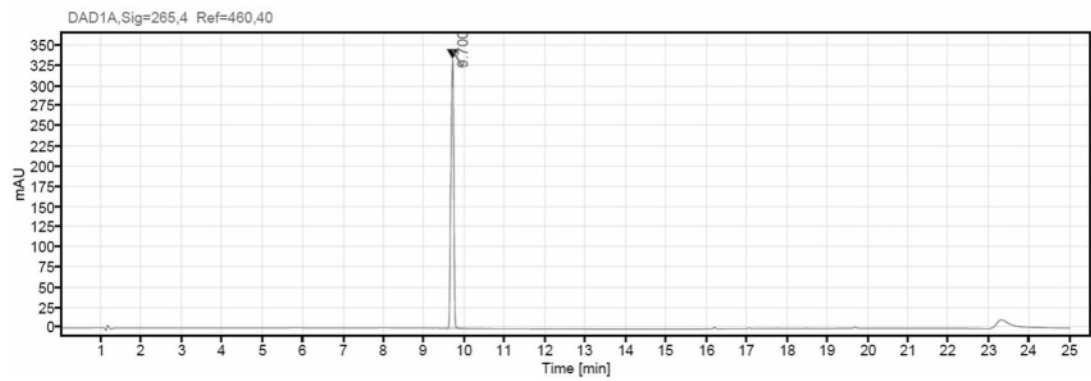


图1

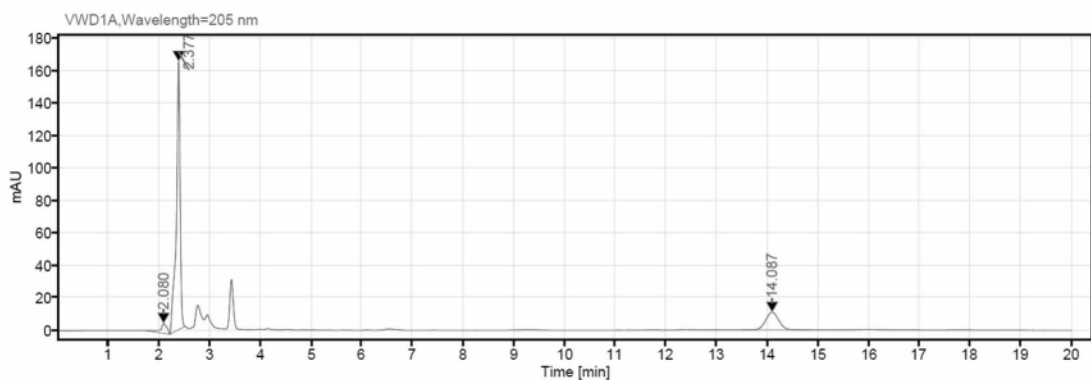
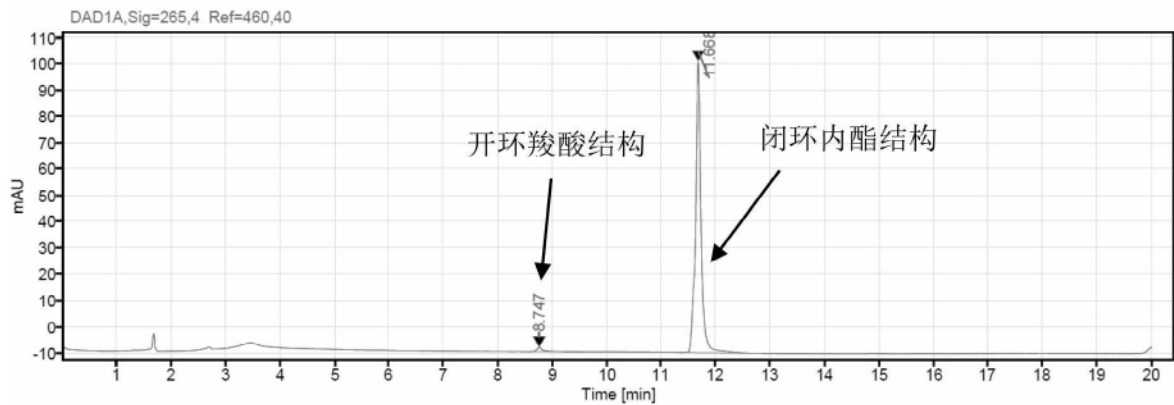


图2



Signal: DAD1A, Sig=265,4 Ref=460,40

RT [min]	Type	Width [min]	Area	Height	Area%	Name
8.747	BB	0.96	15.69	1.66	1.98	
11.668	BB	1.29	776.21	110.48	98.02	
	Sum		791.90			

图3

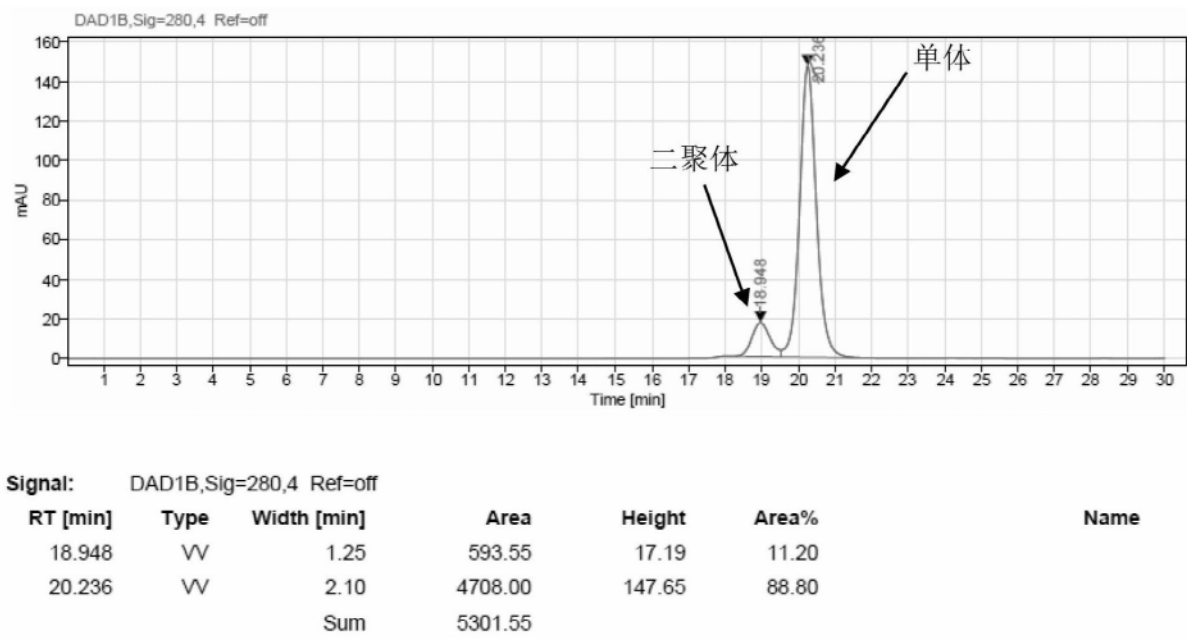


图4

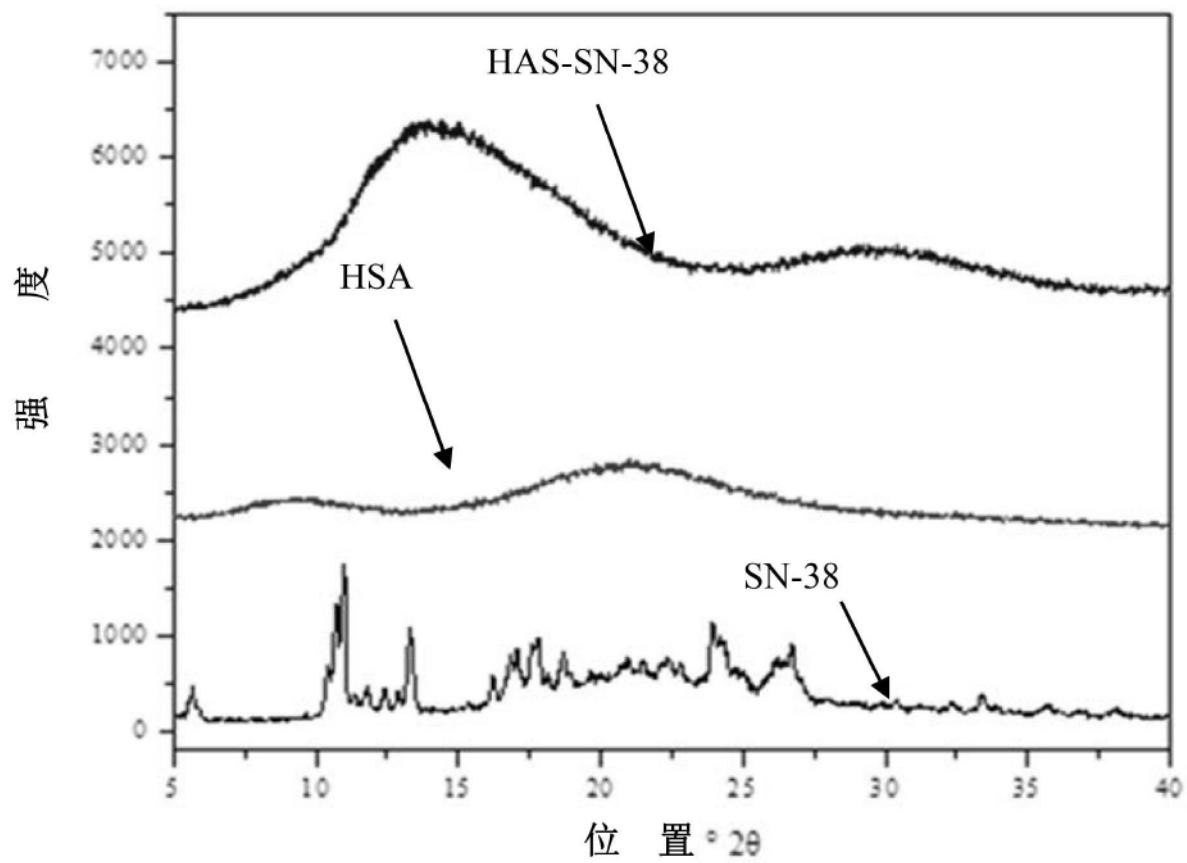


图5

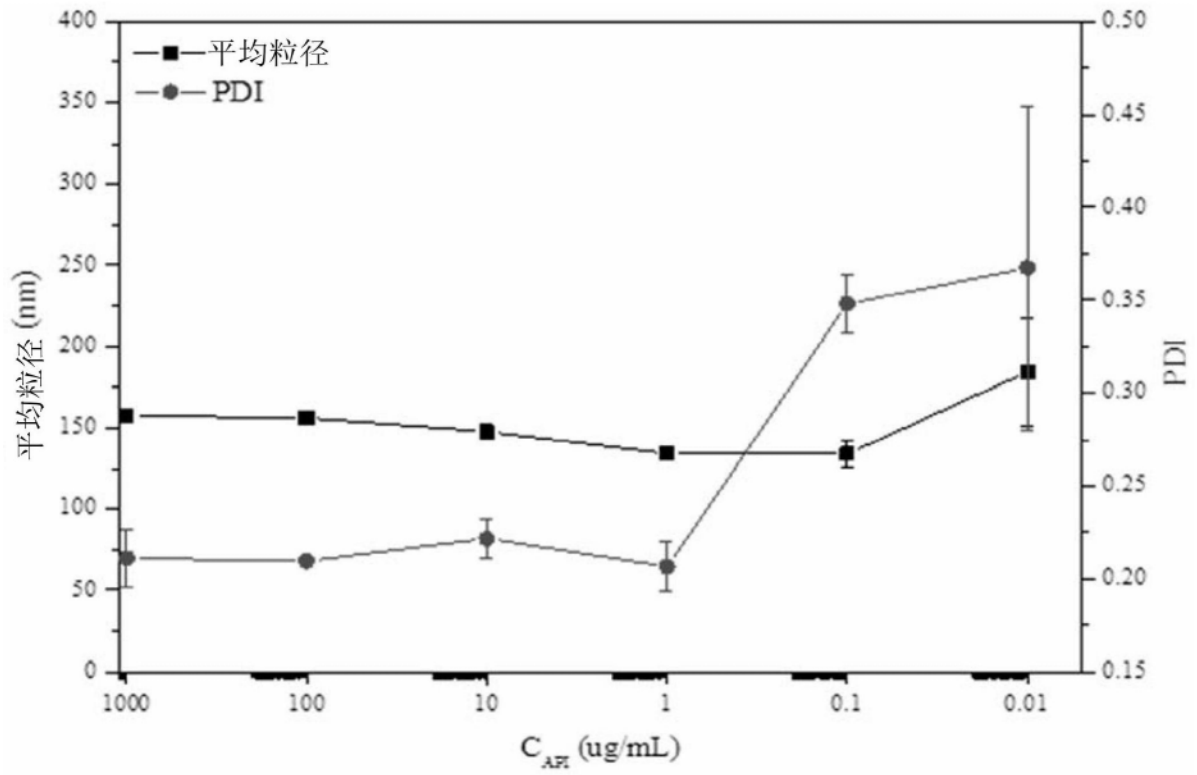


图6

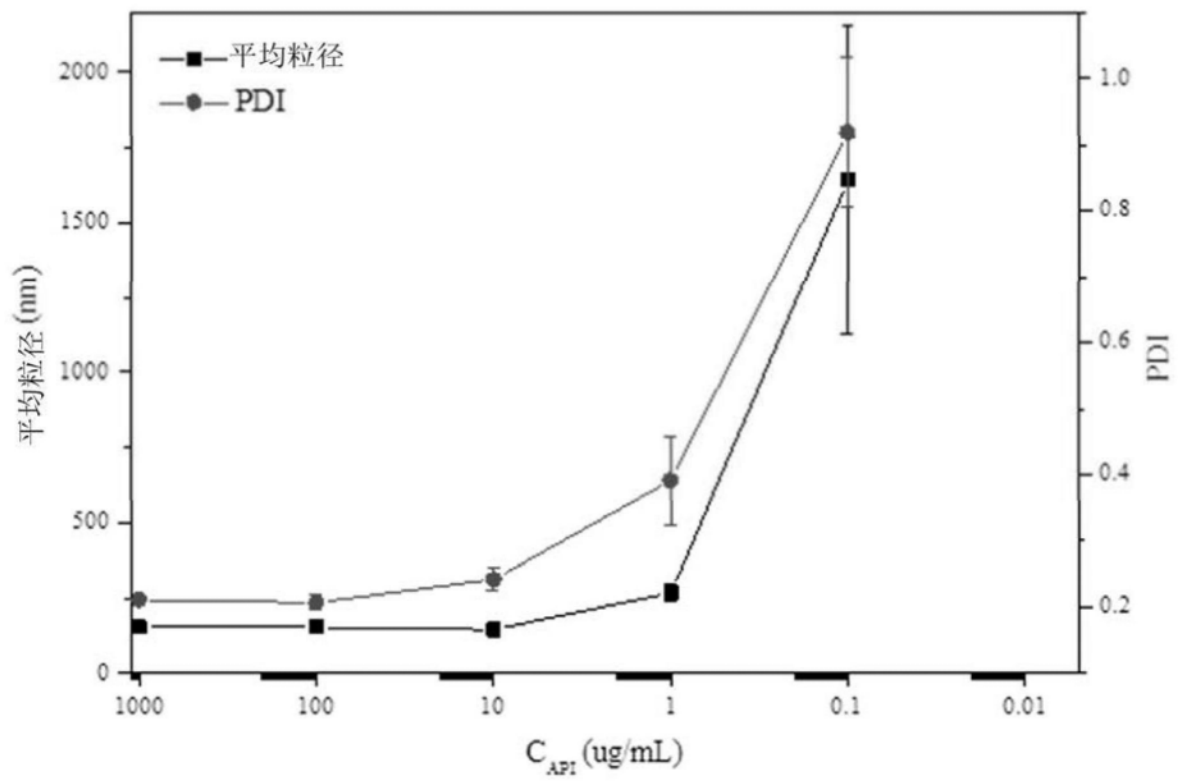


图7

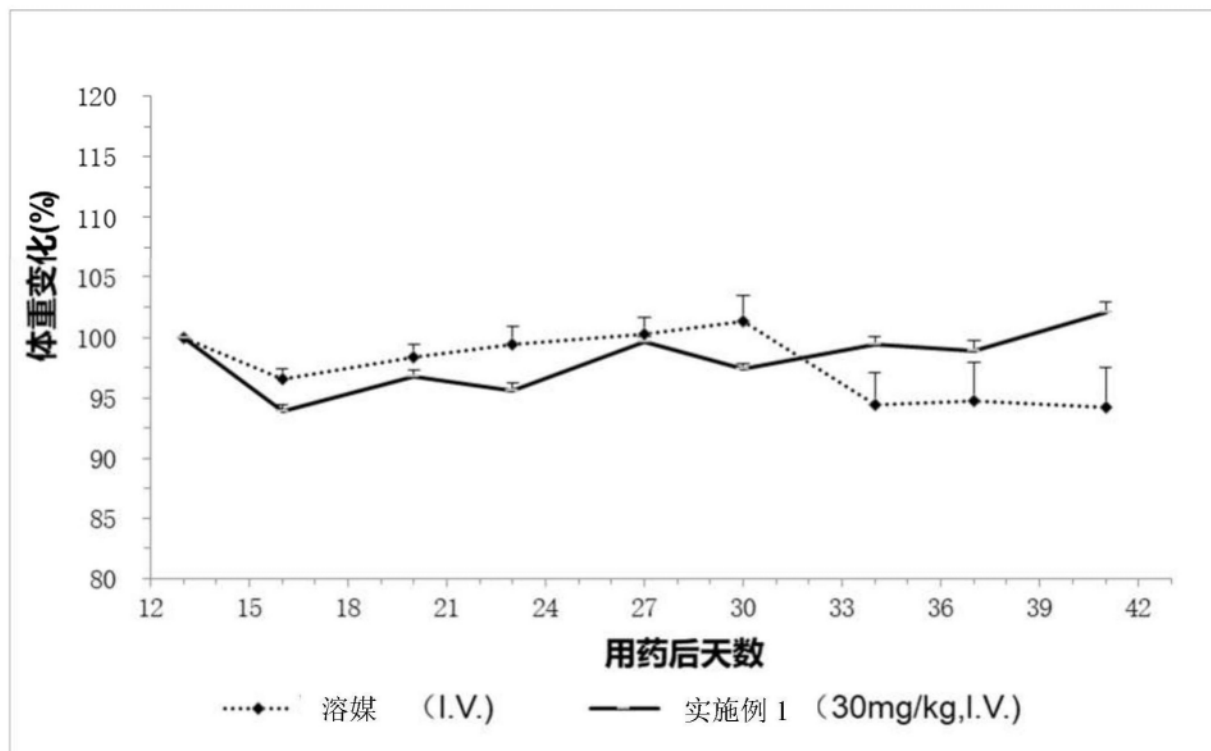


图8

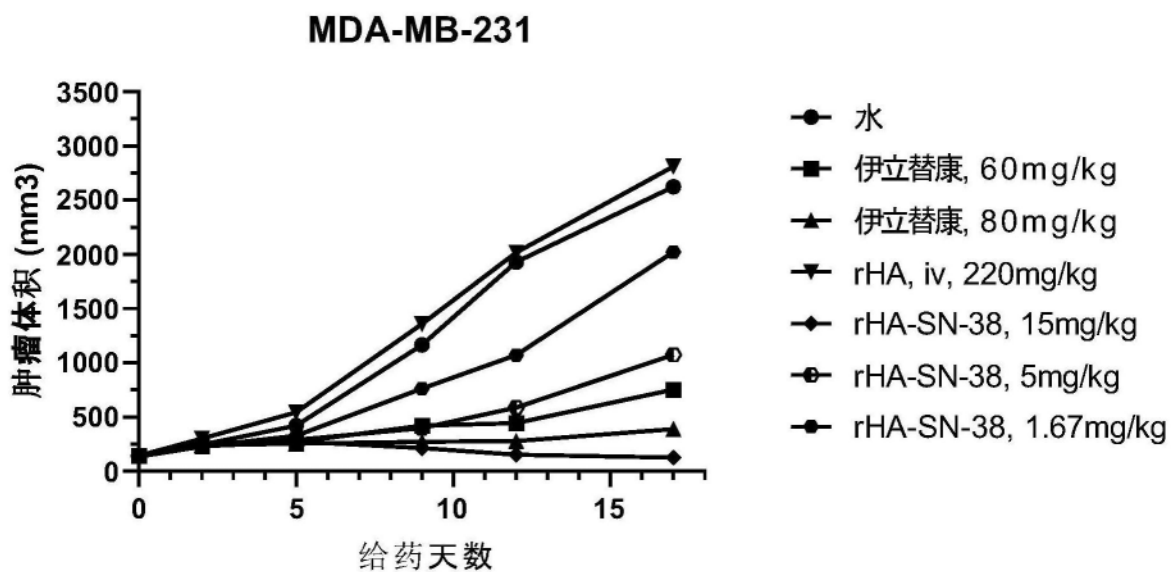


图9

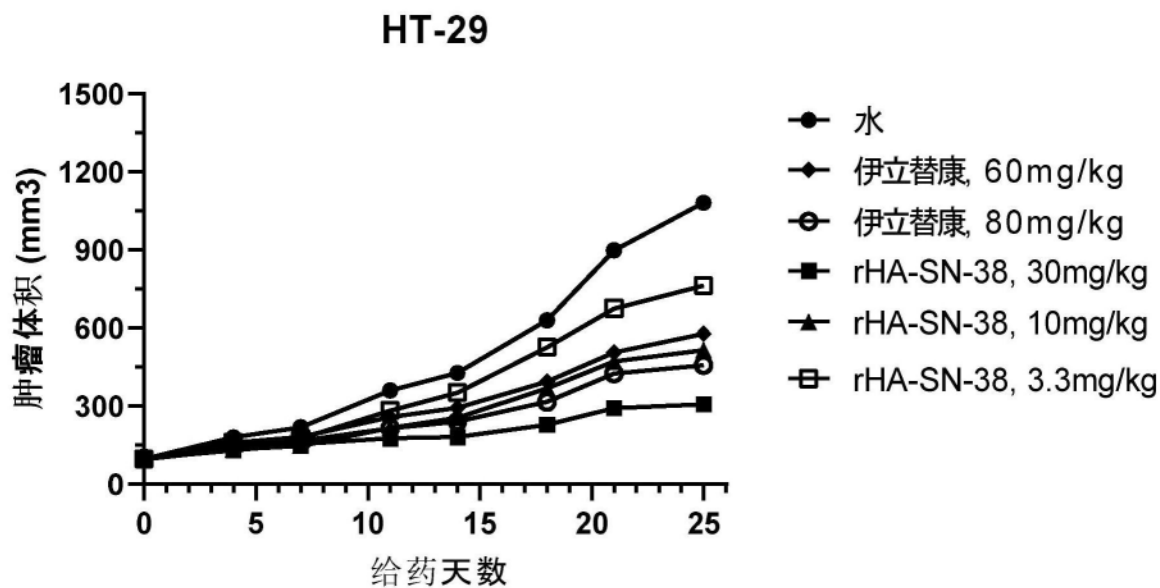


图10

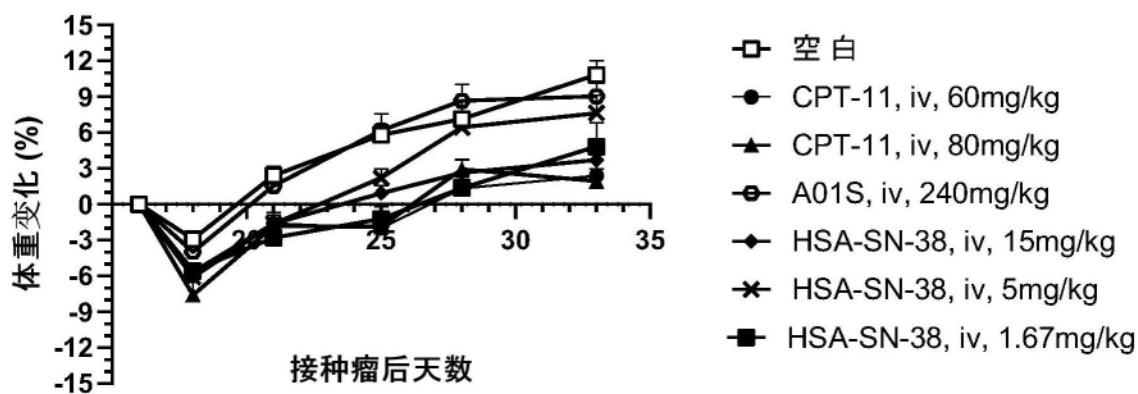


图11

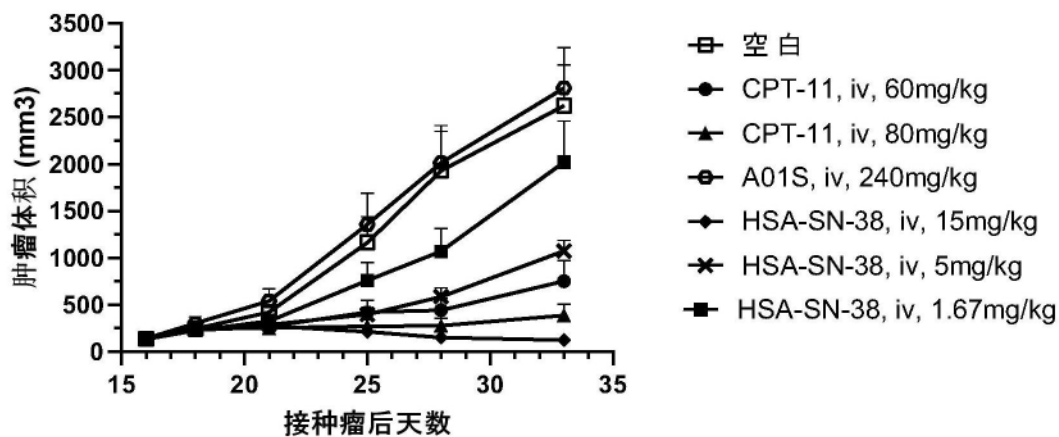


图12

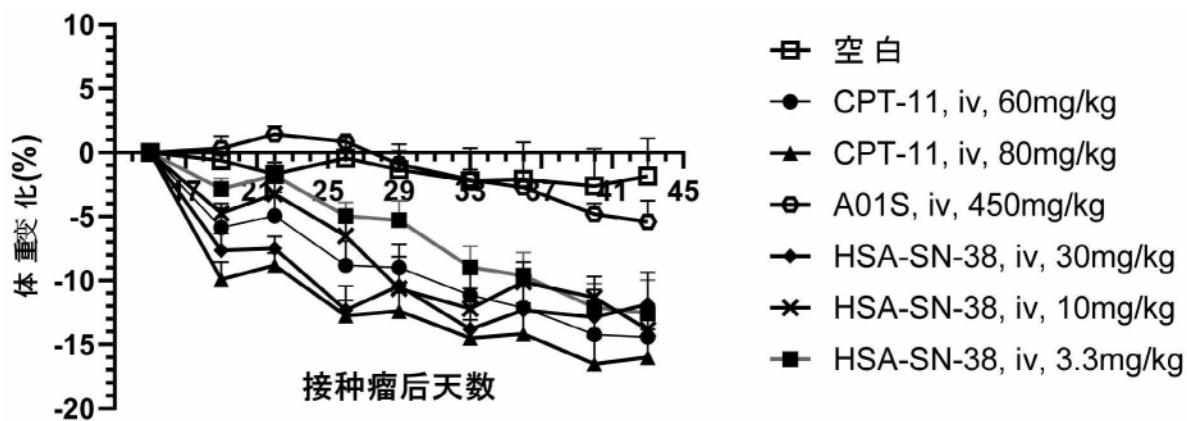


图13

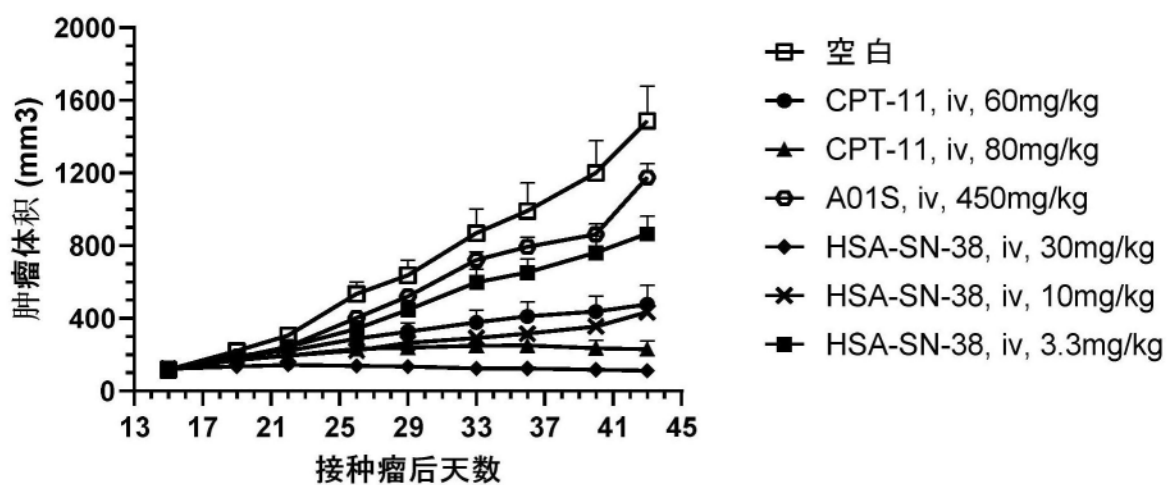


图14

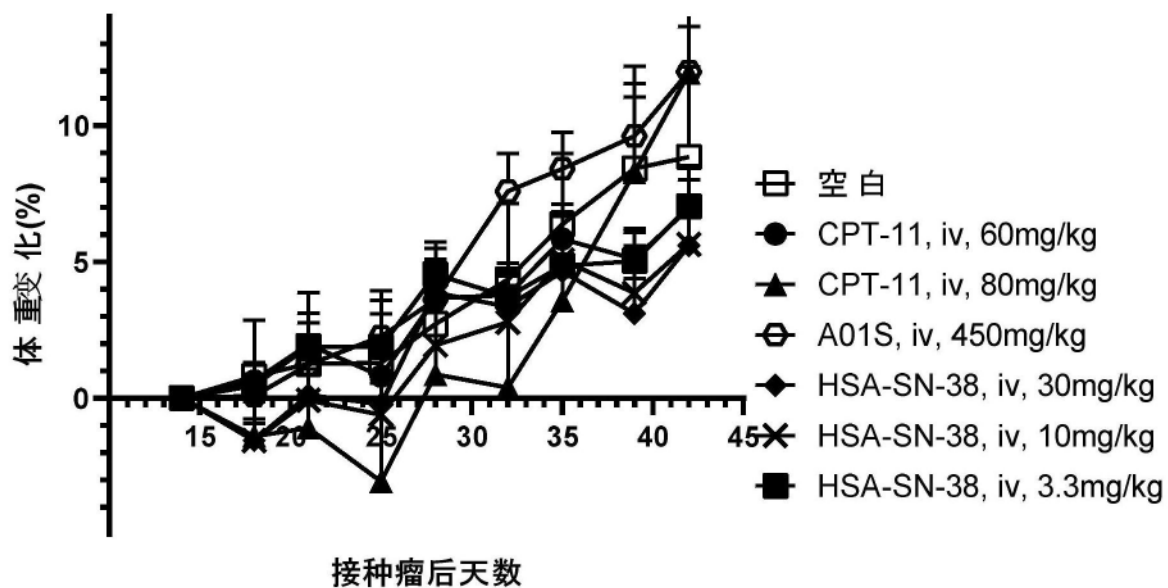


图15

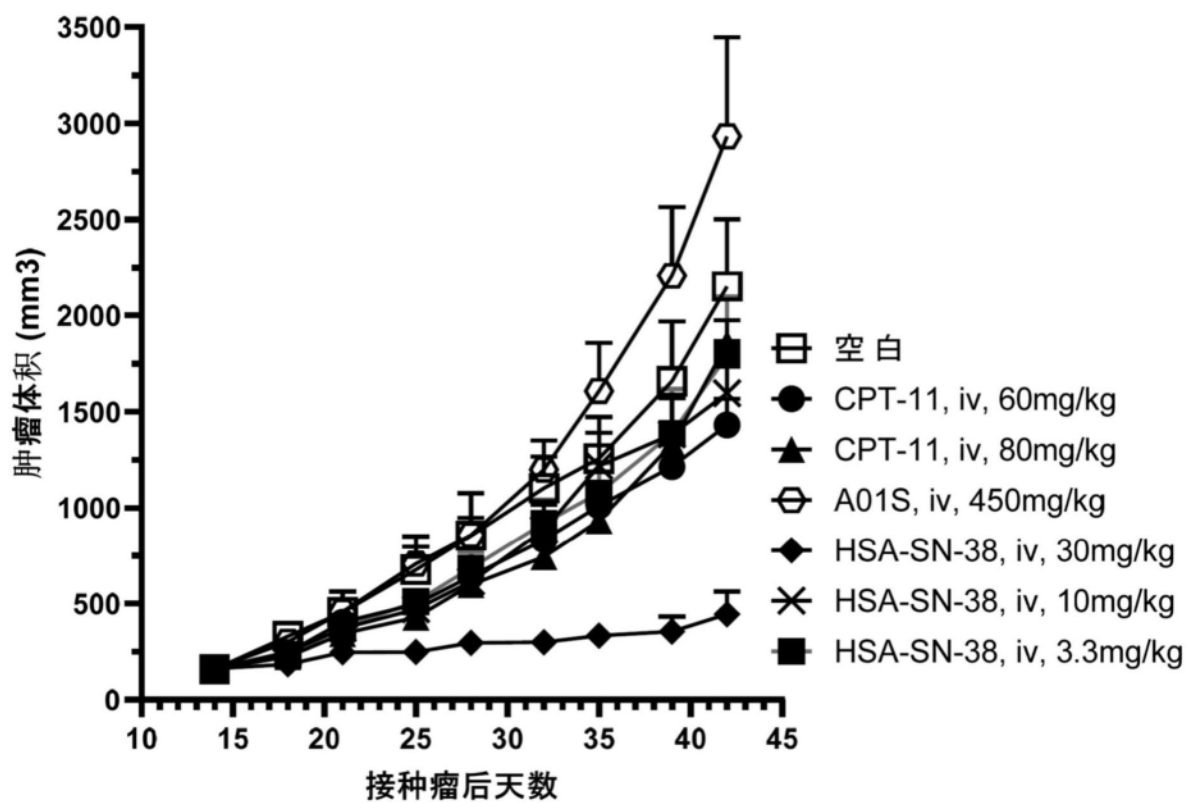


图16

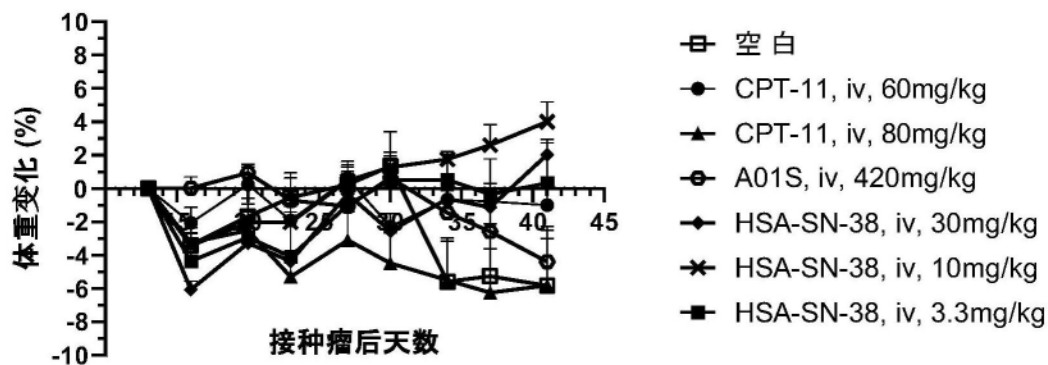


图17

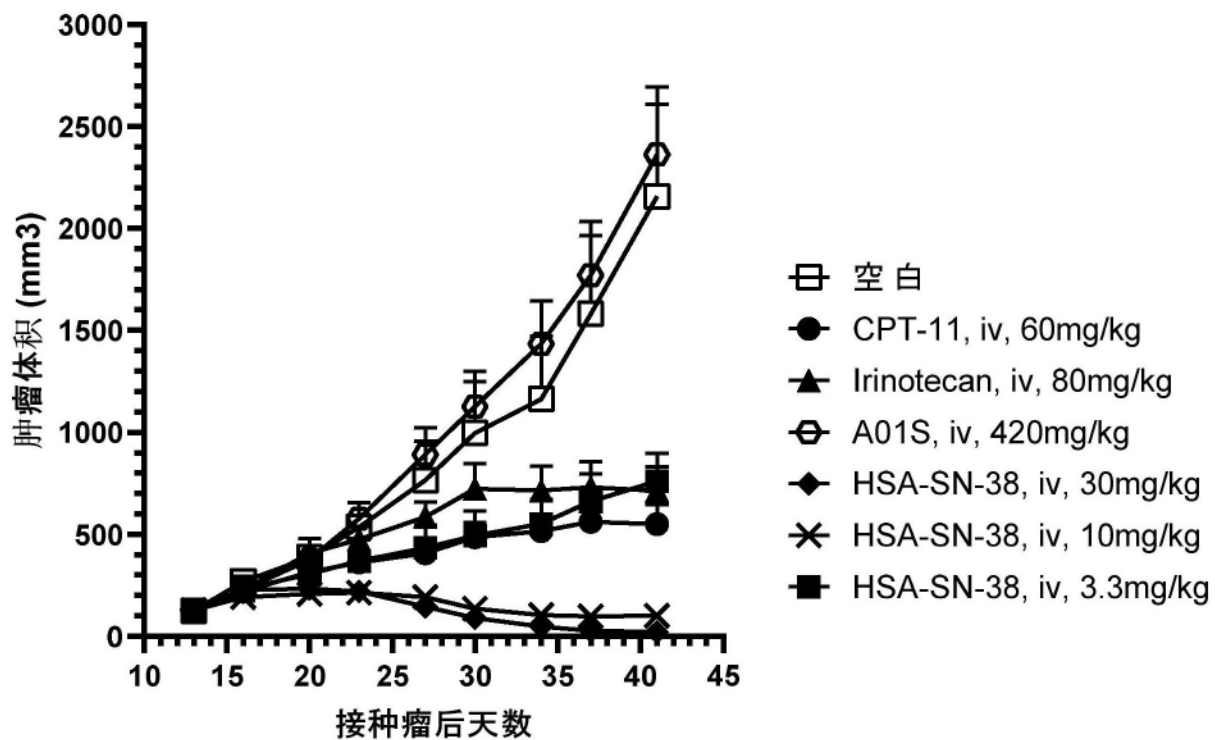


图18

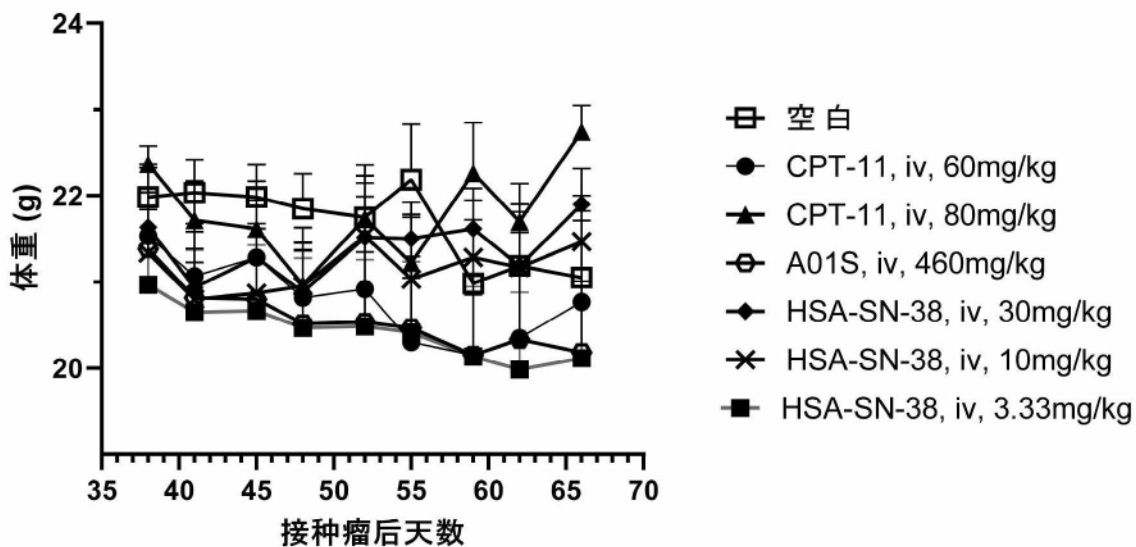


图19

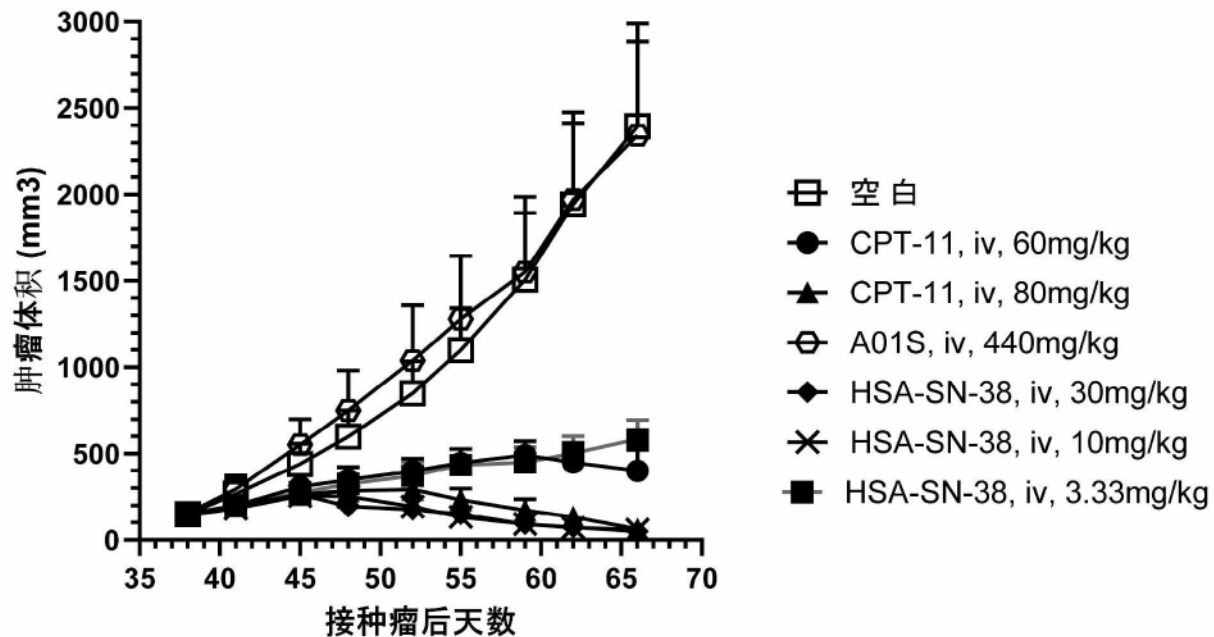


图20

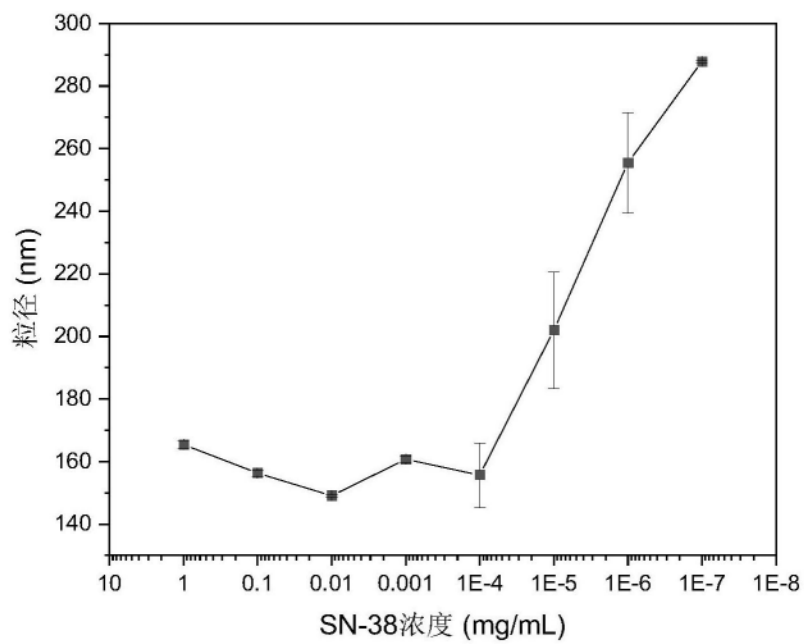


图21

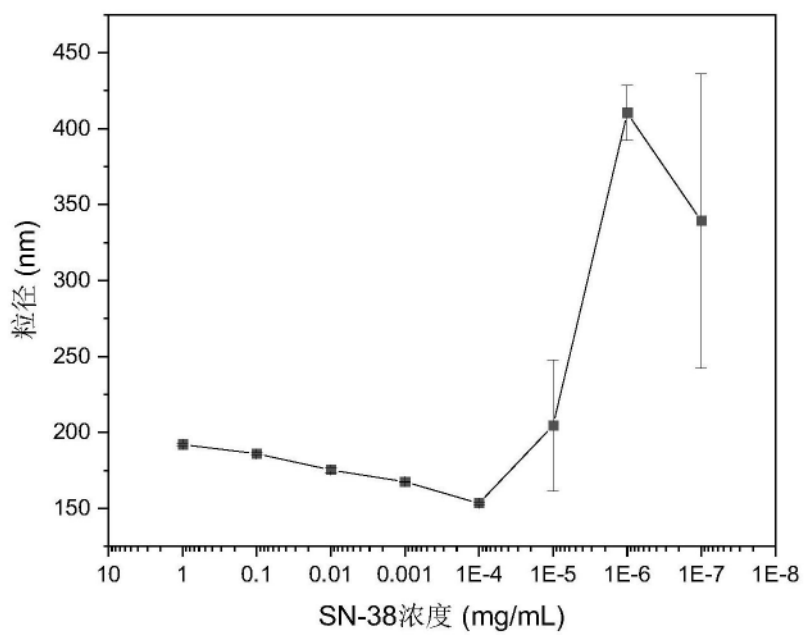


图22

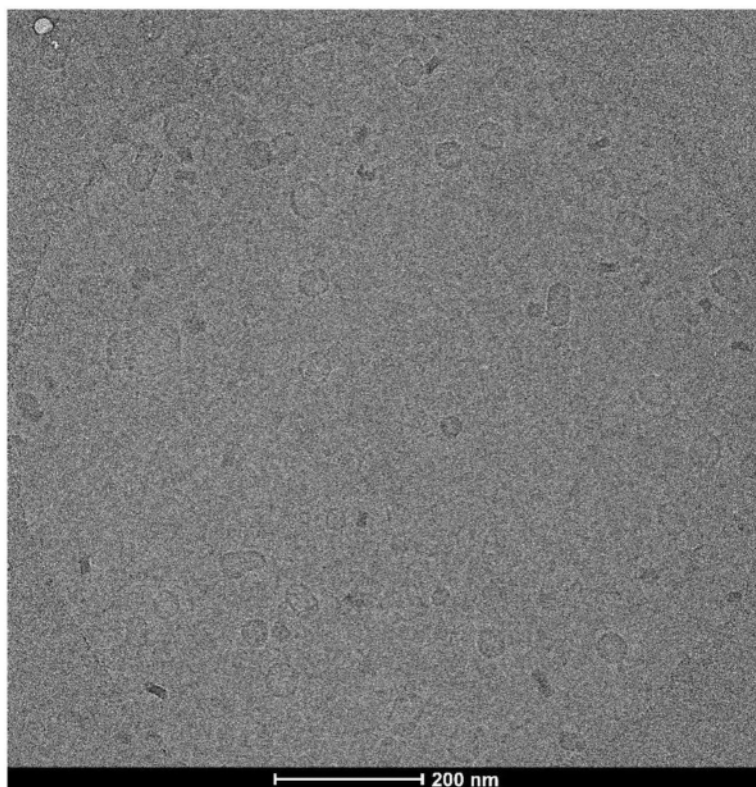


图23

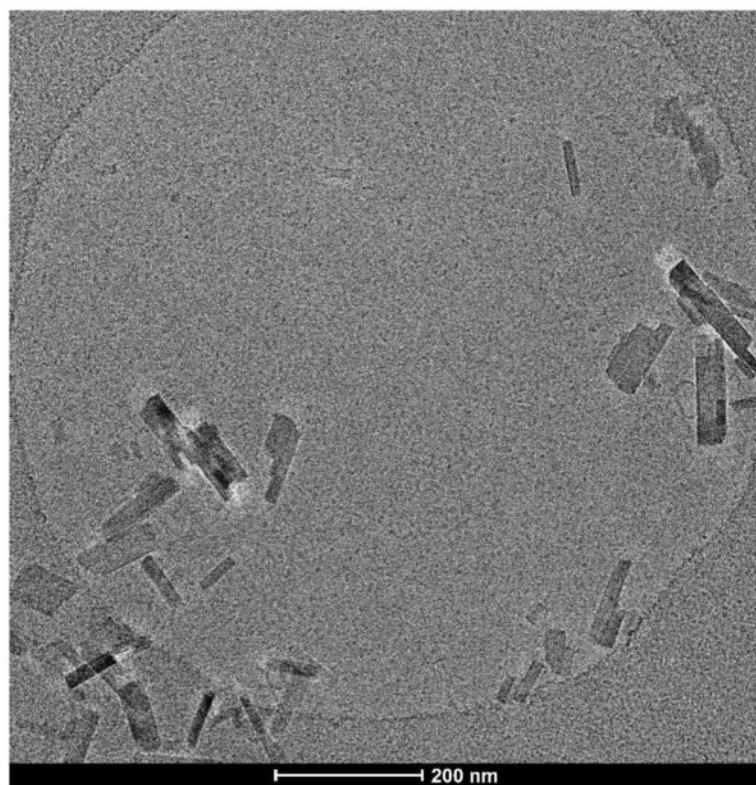


图24

对SW620 模型的抑瘤活性

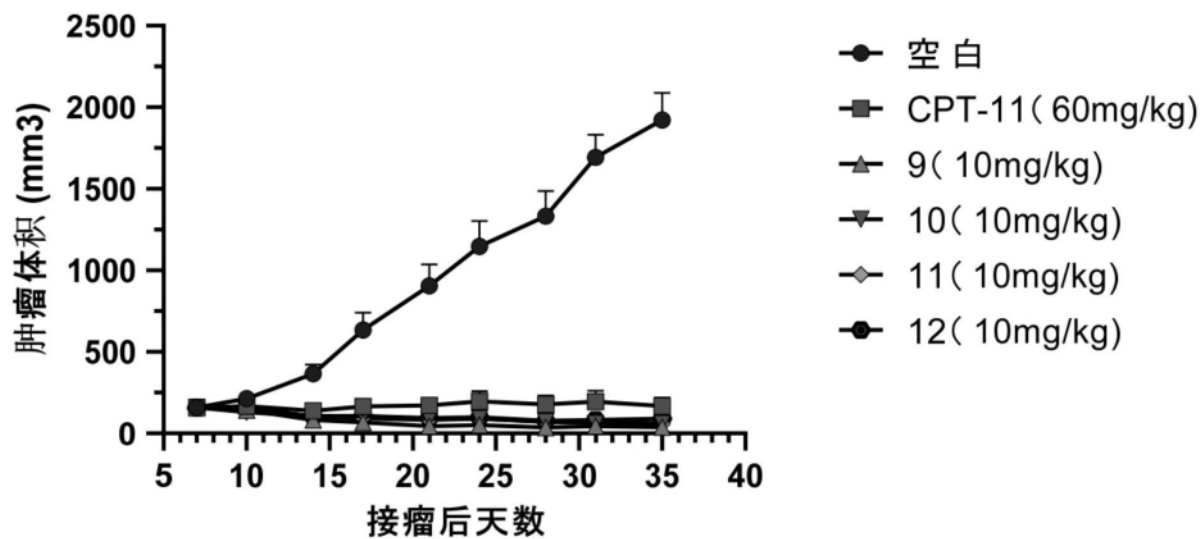


图25

对SW620模型体重的影响

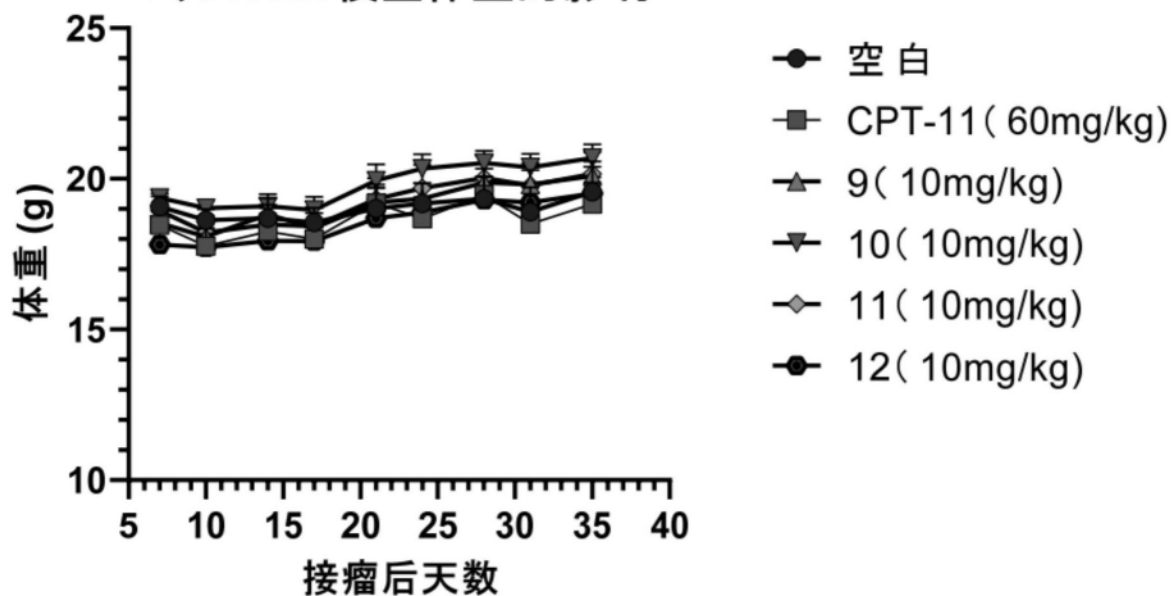


图26

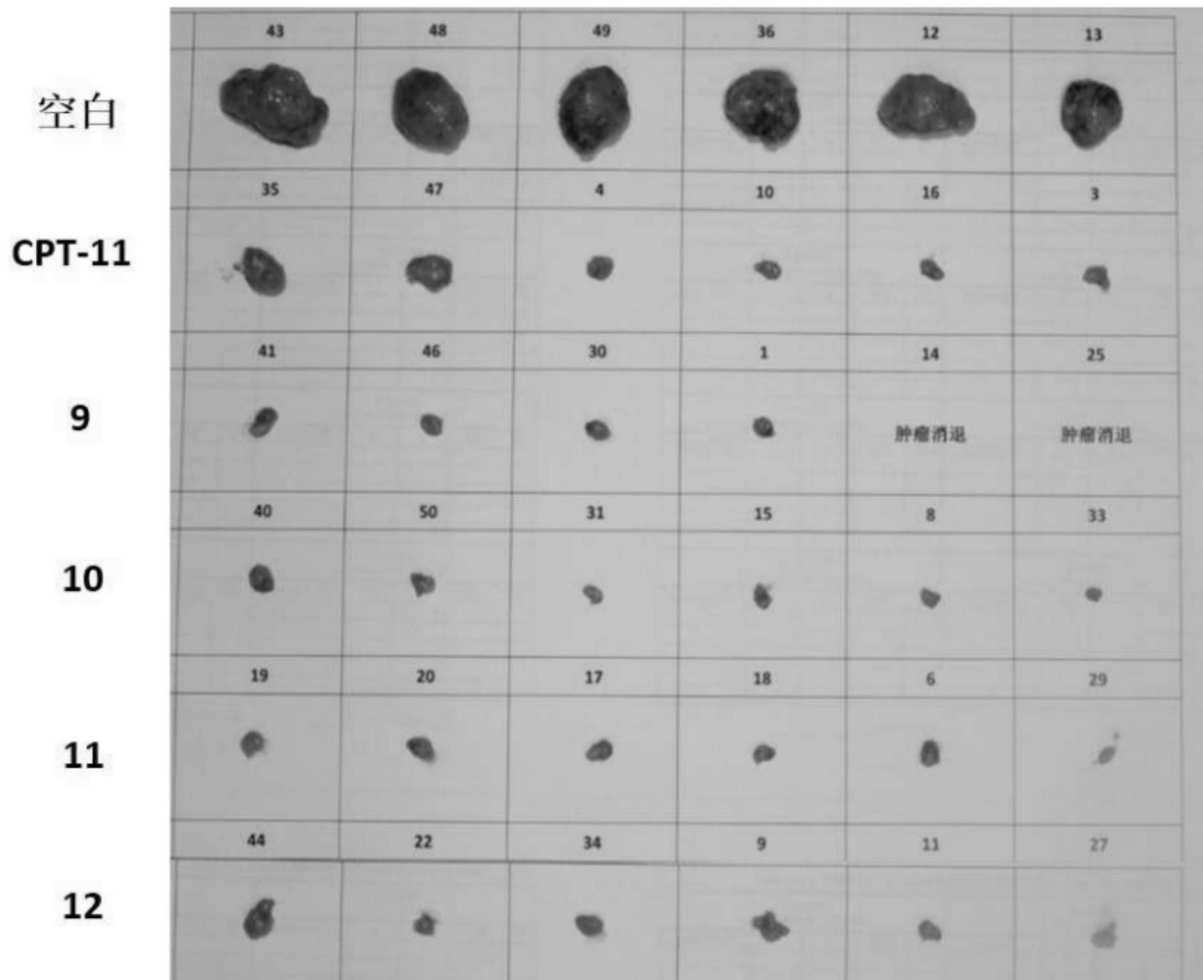


图27

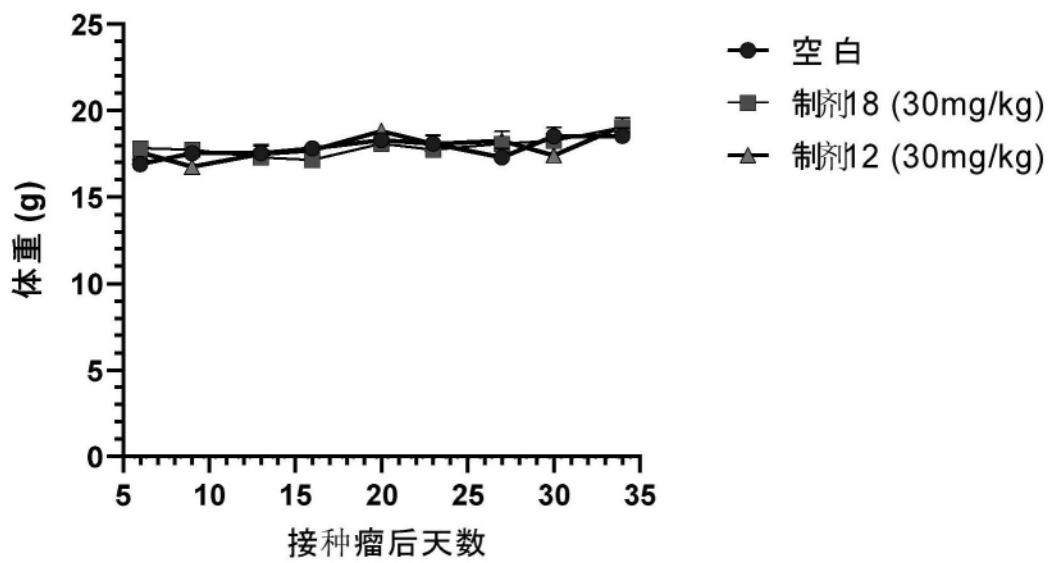


图28

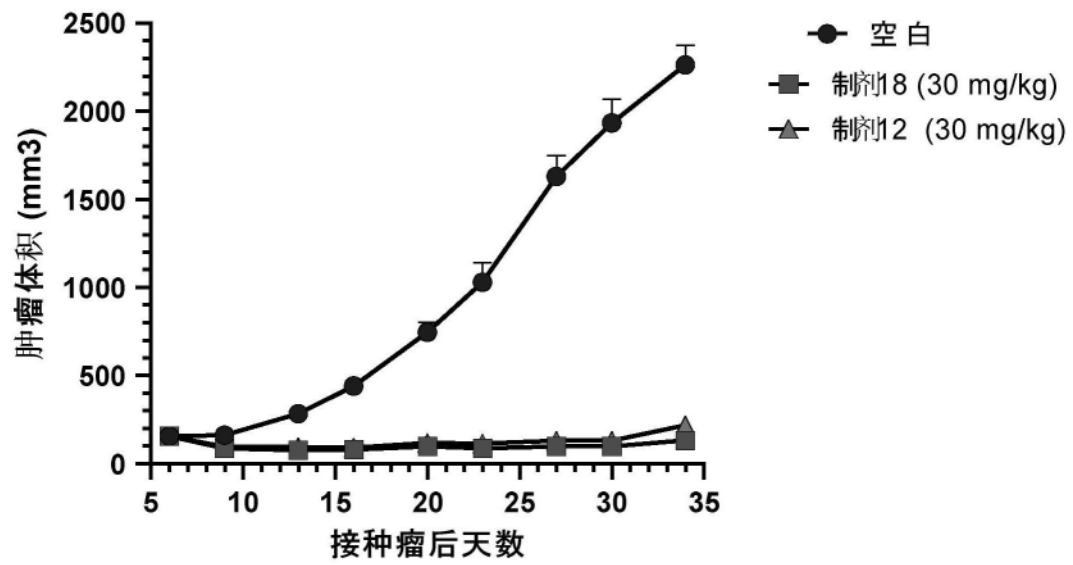


图29

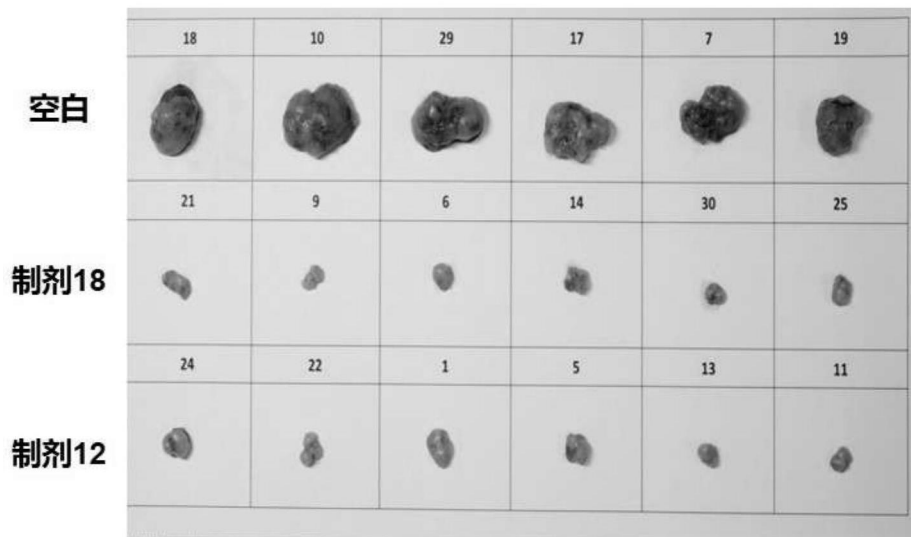


图30

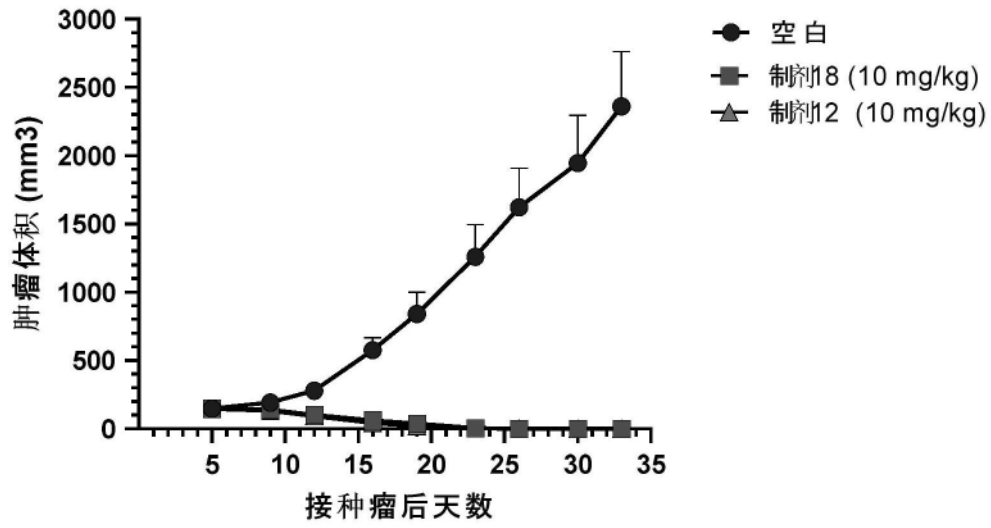


图31

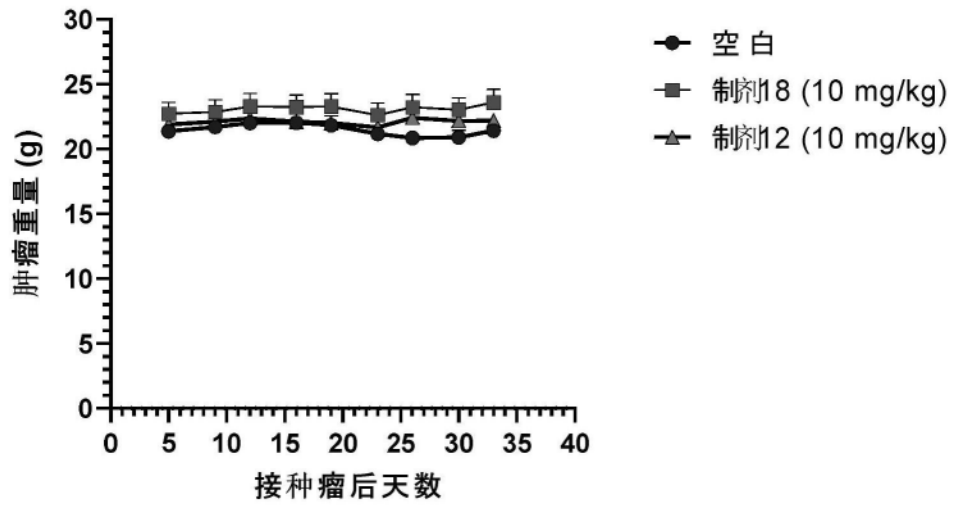


图32

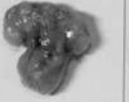
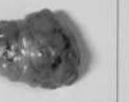
	13	9	7	10	8	1
空白						
	12	17	18	19	25	26
制剂18	肿瘤消退	肿瘤消退	肿瘤消退	肿瘤消退	肿瘤消退	肿瘤消退
	2	15	16	20	21	30
制剂12	肿瘤消退	肿瘤消退	肿瘤消退	肿瘤消退	肿瘤消退	肿瘤消退

图33