



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112105390 A

(43) 申请公布日 2020.12.18

(21) 申请号 201980031778.X

(22) 申请日 2019.04.01

(30) 优先权数据

62/651,365 2018.04.02 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.11.11

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/025174 2019.04.01

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/195164 EN 2019.10.10

(71) 申请人 威斯康星校友研究基金会

地址 美国威斯康星州

(72) 发明人 G·S·权 Y·T·谭

(74) 专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限公司 11713

代理人 王思琪 王建秀

(51) Int.Cl.

A61K 47/59 (2006.01)

A61K 47/69 (2006.01)

A61K 31/7068 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

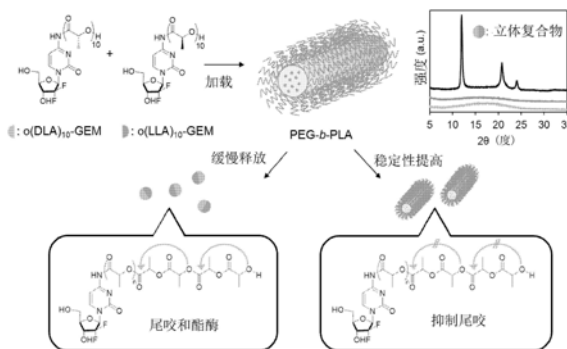
权利要求书2页 说明书16页 附图10页

(54) 发明名称

用于提高物理稳定性和增强抗肿瘤功效的胶束中低聚乳酸缀合物的立体复合物

(57) 摘要

本技术一般涉及吉西他滨和吉西他滨衍生物的低聚乳酸缀合物和缀合物的立体复合物,包含此类缀合物或缀合物的立体复合物的胶束组合物,以及制备和使用这种组合物治疗各种癌症的方法。低聚乳酸缀合物和缀合物的立体复合物可以包括包含2至20个乳酸亚基的低聚乳酸,并且可以通过酰胺键连接到吉西他滨或吉西他滨衍生物的4(N)的氮上。可以容易地制备包含水和包含含聚乳酸的聚合物和低聚乳酸缀合物或缀合物的立体复合物的胶束的组合物。还提供了抑制或杀死癌细胞和治疗吉西他滨敏感性癌症的方法。



1. 吉西他滨或吉西他滨衍生物的4(N)-低聚-L-乳酸缀合物,其中所述缀合物中的低聚-L-乳酸包含2至20个乳酸亚基,并通过酰胺键连接至吉西他滨或吉西他滨衍生物的4-氨基的氮。

2. 根据权利要求1所述的4(N)-低聚-L-乳酸缀合物,其中所述低聚-L-乳酸包含7至20个乳酸亚基。

3. 吉西他滨或吉西他滨衍生物的4(N)-低聚-D-乳酸缀合物,其中所述缀合物中的低聚-D-乳酸包含2至20个乳酸亚基,并通过酰胺键连接至吉西他滨或吉西他滨衍生物的4-氨基的氮。

4. 根据权利要求3所述的4(N)-低聚-D-乳酸缀合物,其中所述低聚-D-乳酸包含7至20个乳酸亚基。

5. 一种包含吉西他滨或吉西他滨衍生物的4(N)-低聚-L-乳酸缀合物和吉西他滨或吉西他滨衍生物的4(N)-低聚-D-乳酸缀合物的立体复合物的组合物;其中:

每个缀合物中的低聚-L-乳酸和低聚-D-乳酸包含7至20个乳酸亚基;和

所述低聚-L-乳酸或所述低聚-D-乳酸通过酰胺键连接至所述吉西他滨或吉西他滨衍生物的4-氨基的氮。

6. 根据权利要求5所述的组合物,其中吉西他滨或吉西他滨衍生物的4(N)-低聚-L-乳酸缀合物与吉西他滨或吉西他滨衍生物的4(N)-低聚-D-乳酸缀合物的摩尔比在大约2:1到大约1:2的范围。

7. 一种包含水和胶束的组合物,其中所述胶束包含:

权利要求5或权利要求6中任一项所述的组合物;

权利要求1或权利要求2所述的吉西他滨或吉西他滨衍生物的4(N)-低聚-L-乳酸缀合物;或

权利要求3或权利要求4所述的吉西他滨或吉西他滨衍生物的4(N)-低聚-D-乳酸缀合物。

8. 根据权利要求7所述的组合物,其中相对于所述胶束的质量,所述立体复合物的负载量为约1重量%至约50重量%。

9. 根据权利要求7所述的组合物,其中相对于所述组合物中的水的体积,所述立体复合物的浓度为约0.6mg/mL至约40mg/mL。

10. 根据权利要求5-9中任一项所述的组合物,其进一步包含聚(乙二醇)-嵌段-聚乳酸(PEG-b-PLA)共聚物。

11. 根据权利要求10所述的组合物,其中所述PEG-b-PLA共聚物的聚(乙二醇)嵌段的分子量为约1,000g/mol至约35,000g/mol;所述PEG-b-PLA共聚物的聚(乳酸)嵌段的分子量为约1,000g/mol至约15,000g/mol;或其组合。

12. 根据权利要求10或权利要求11所述的组合物,其中所述PEG-b-PLA共聚物的聚(乙二醇)嵌段的分子量为约1,500g/mol至约14,000g/mol;所述PEG-b-PLA共聚物的聚(乳酸)嵌段的分子量为约1,500g/mol至约7,000g/mol;或其组合。

13. 一种制备权利要求1-4中任一项所述的吉西他滨或吉西他滨衍生物的4(N)-低聚-L-乳酸缀合物或吉西他滨或吉西他滨衍生物的4(N)-低聚-D-乳酸缀合物的方法,包括使具有游离4-氨基的吉西他滨或吉西他滨衍生物与偶联剂和具有羟基的低聚-L-乳酸或具有羟

基的低聚-D-乳酸接触；

其中：

所述低聚-L-乳酸和所述低聚-D-乳酸包含2至20个乳酸亚基。

14. 根据权利要求13所述的方法，其中所述羟基是先前受保护的羟基。

15. 根据权利要求13所述的方法，其中所述低聚-L-乳酸或所述低聚-D-乳酸包含7至20个乳酸亚基。

16. 一种制备根据权利要求5至12中任一项所述的组合物的方法，包括冷冻干燥第一组合物的叔丁醇/水溶液，所述第一组合物包含吉西他滨或吉西他滨衍生物的4(N)-低聚-L-乳酸缀合物和吉西他滨或吉西他滨衍生物的4(N)-低聚-D-乳酸缀合物的立体复合物；

其中：

每个缀合物中的所述低聚-L-乳酸或所述低聚-D-乳酸包含2至20个乳酸亚基；和

所述低聚-L-乳酸或所述低聚-D-乳酸通过酰胺键连接至所述吉西他滨或吉西他滨衍生物的4-氨基的氮。

17. 一种抑制或杀死对吉西他滨或吉西他滨衍生物敏感的癌细胞的方法，包括使所述癌细胞与有效抑制量或致死量的权利要求5-12中任一项所述的组合物接触。

18. 根据权利要求17所述的方法，其中所述接触在体外发生。

19. 一种在有需要的受试者中治疗癌症的方法，包括向所述受试者施用有效量的权利要求5-12中任一项所述的组合物，其中所述癌症对吉西他滨或吉西他滨衍生物敏感。

20. 根据权利要求19所述的方法，其中所述癌症选自由以下组成的组：卵巢癌、白血病、血管肉瘤、乳腺癌、结直肠癌、前列腺癌、肺癌、胰腺癌、胆管癌、脑癌（例如神经胶质瘤）、腺癌、肝癌和胆道癌。

21. 根据权利要求19或权利要求20所述的方法，其中所述癌症选自由卵巢癌、乳腺癌、肺癌、胰腺癌、胆管癌和胆道癌组成的组。

22. 根据权利要求19-21中任一项所述的方法，其中所述癌症是肺癌或胰腺癌。

23. 根据权利要求19-22中任一项所述的方法，其中所述组合物通过局部、鼻内、全身、静脉内、皮下、腹膜内、皮内、眼内、离子电渗、透粘膜或肌内施用。

用于提高物理稳定性和增强抗肿瘤功效的胶束中低聚乳酸缀合物的立体复合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2018年4月2日提交的美国临时专利申请62/651,365的权益和优先权，出于任何和所有目的其全部公开内容特此以引用的方式并入本文中。

[0003] 政府支持声明

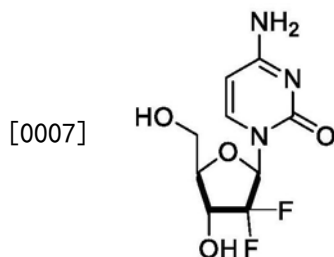
[0004] 本发明是在国家卫生研究院颁发的AI101157的政府支持下完成的。政府对本发明享有一定权利。

技术领域

[0005] 本技术总体上涉及吉西他滨及其吉西他滨衍生物的低聚乳酸缀合物和缀合物的立体复合物。与吉西他滨的标准制剂相比，可以将缀合物和缀合物的立体复合物配制在合成胶束中，以在癌症的治疗中提供优异的血浆稳定性和/或增强的功效。

背景技术

[0006] 吉西他滨是一种有效的化学治疗剂，可用于治疗多种癌症，其结构如下所示。



[0008] 吉西他滨是一种高度水溶性的核苷类似物，旨在模拟天然存在的嘧啶、胞苷。吉西他滨进入细胞后，需要进行一系列的翻译后修饰才能发挥作用。然而，吉西他滨在血浆中迅速脱氨为非活性代谢物2',2'-二氟脱氧尿苷，并迅速通过尿液排泄。为了提高血液中的治疗水平，吉西他滨需要大剂量(约1000mg/m²)施用，以克服短的半衰期短。

发明内容

[0009] 本技术提供了吉西他滨或吉西他滨衍生物的4(N)-低聚-L-乳酸缀合物；吉西他滨或吉西他滨衍生物的4(N)-低聚-D-乳酸缀合物；以及4(N)-低聚-L-乳酸缀合物和4(N)-低聚-D-乳酸缀合物的立体复合物。所述缀合物或立体复合物通常包含2至20个乳酸亚基，其可通过吉西他滨或吉西他滨衍生物的4-氨基的酰胺键连接。在任何实施方案中，立体复合物中的缀合物可包含7至20个乳酸亚基。

[0010] 在一些实施方案中，本技术提供了低聚乳酸与吉西他滨或吉西他滨衍生物的缀合物和立体复合物，其具有增强的血浆稳定性和抗癌功效。可将本文提供的缀合物配制在胶束中，作为可用于治疗癌症的药物组合物和药物。还提供所述缀合物在制备医药制剂和药物中的用途。

附图说明

[0011] 图1显示了根据实施方案的用于PEG-b-PLA胶束的 α -(LLA)_n-GEM和 α -(DLA)_n-GEM的立体复合物前药:负载量、稳定性和释放后通过尾咬(backbit)和酯酶的前药转化率。

[0012] 图2示出了根据实施例的 α -(LLA)_n-GEM和 α -(DLA)_n-GEM的合成方案。

[0013] 图3A显示了根据实施例的 α -(LLA)₁₀-GEM、 α -(DLA)₁₀-GEM和两种前药的立体复合物混合物从CH₃CN蒸发后的粉末XRD图。图3B显示了根据实施例的 α -(LLA)₁₀-GEM、 α -(DLA)₁₀-GEM和两种前药的立体复合物混合物从CH₃CN蒸发后的DSC热分析图。图3C显示了根据实施例的 α -(LLA)₆-GEM、 α -(DLA)₆-GEM和两种前药的立体复合物混合物从CH₃CN蒸发后的粉末XRD图。图3D显示了根据实施例的 α -(LLA)₆-GEM、 α -(DLA)₆-GEM和两种前药的立体复合物混合物从CH₃CN蒸发后的DSC热分析图。

[0014] 图4A和4B显示了根据实施例的立体复合物 α -(L+DLA)₁₀-GEM负载的PEG-b-PLA胶束的AFM图像。

[0015] 图5说明了根据实施例在5%和15%负载下从PEG-b-PLA胶束体外释放 α -(LLA)₆-GEM、 α -(LLA)₁₀-GEM或立体复合物 α -(L+DLA)₁₀-GEM(平均值±SEM,n=3-4)。

[0016] 图6A示出根据实施例的 α -(L+DLA)₁₀-GEM及其在37°C、pH 7.4的1:1CH₃CN/10mM PBS中孵育0至72小时后的尾咬转化产物的物理混合物的相对量(平均值±SD,n=3)。图6B显示了根据实施例的在15%负载下 α -(L+DLA)₁₀-GEM负载的PEG-b-PLA胶束及其在25°C的MilliQ水中孵育0至8周后的转化产物的相对量(平均值±SD,n=3)。

[0017] 图7A显示了根据实施例的在37°C下孵育0至24小时后大鼠血浆中GEM的相对量(平均值±SEM,n=3)。图7B显示了根据实施例的在37°C下孵育0至24小时后大鼠血浆中 α -(L+DLA)₁₀-GEM的相对量(平均值±SEM,n=3)。图7C显示了根据实施例的在15%负载下PEG-b-PLA胶束中 α -(L+DLA)₁₀-GEM前药及其在大鼠血浆中在37°C孵育0至24小时后的转化产物GEM的相对量(平均值±SEM,n=3)。

[0018] 图8A显示了根据实施例的GEM和在15%负载下 α -(L+DLA)₁₀-GEM胶束对人A549非小肺癌细胞的体外细胞毒性。图8B显示了根据实施例的GEM和在15%负载下 α -(L+DLA)₁₀-GEM胶束对PANC-1胰腺癌细胞的体外细胞毒性。五次测定的平均值±SEM。

[0019] 图9A和9B显示了根据实施例的GEM和 α -(L+DLA)₁₀-GEM胶束在A549非小细胞肺癌异种移植模型中的体内抗肿瘤功效。根据实施例,每周给小鼠I.V.施用GEM(10mg/kg)或 α -(L+DLA)₁₀-GEM胶束(5%负载量,相当于10mg/kg GEM)三周(如箭头所示)。图9A显示了相对肿瘤体积(平均值±SEM,n=3-4,*:p<0.05)。图9B显示了相对体重(平均值±SEM,n=3-4,*:p<0.05)。

具体实施方式

[0020] 如以下所定义,以下术语贯穿始终。

[0021] 如本文和所附权利要求中所使用的,除非在本文中另有说明或与上下文明显矛盾,否则在描述元素的上下文中(特别是在以下权利要求的上下文中)如“一(a)”和“一(an)”和“所述(the)”之类的单个物品和类似的指示物应解释为涵盖单数和复数。除非在本文中另外指示,否则对本文中值范围的叙述仅意图充当个别提及属于所述范围的每一单独值的速记方法,并且每一单独值并入本说明书中,如同在本文中个别地叙述一般。除非在本

文另外指示或以其它方式与上下文明显相矛盾,否则本文所述的所有方法可按任何适合的顺序进行。除非另有说明,否则本文中提供的任何和所有实例或示范性语言(例如“如”)的使用仅意图更好地说明实施例并且不对权利要求书的范围构成限制。在说明书中的语言不应理解为指示任何未要求的元素为必需的。

[0022] 如本文所使用的,关于数字的术语“约”通常被认为包括在该数字的任一方向(大于或小于)的1%、5%或10%的范围内的数字,除非另外陈述或另外从上下文中明显看出(除了该数字小于可能值的0%或超过可能值的100%)。

[0023] 本技术提供了药物组合物和药物,其包含本文公开的化合物(药物和/或药物缀合物)和胶束的实施方案中的任一个和药学上可接受的载体或一种或多种赋形剂。组合物可用于本文中所描述的方法和治疗中。药物组合物可以包含有效量的本文公开的本技术的化合物的实施方案中的任何一个。在任何实施方案中,可以相关于受试者确定有效量。“有效量”指产生所需作用所需要的化合物、缀合物、胶束或组合物的量。有效量的一个实例包括产生用于治疗性(医药学)用途(包括但不限于癌症或心血管疾病例如再狭窄的治疗)的可接受毒性和生物可用性程度的量或剂量。

[0024] 如本文所用,“个体”或“患者”为哺乳动物,如猫、狗、啮齿动物或灵长类动物。通常,受试者是人,并且优选地是患有对吉西他滨或其衍生物敏感的癌症即能够用有效量的吉西他滨或其衍生物治疗的癌症的人。术语“个体”和“患者”可互换使用。

[0025] 如本文所用,“吉西他滨衍生物”是保留吉西他滨的嘧啶/核昔骨架但包含至少一个修饰的侧链的化合物。其他吉西他滨衍生物是本领域技术人员已知的,并且包括但不限于阿糖胞苷(AraC)、恩曲他滨、拉米夫定、扎西他滨、氮杂胞苷和曲沙他滨。

[0026] 术语“立体复合物”是指立体选择性地结合的预先形成的低聚乳酸缀合物的组合物,其包含吉西他滨或吉西他滨衍生物的4(N)-低聚-L-乳酸缀合物和吉西他滨或吉西他滨衍生物的4(N)-低聚-D-乳酸缀合物。

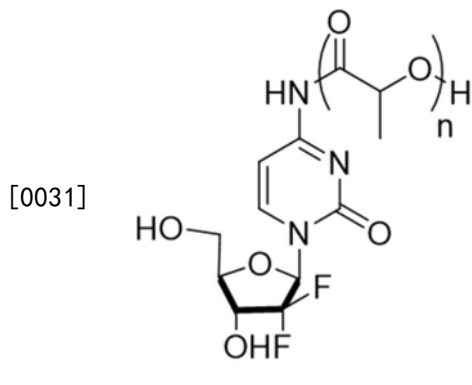
[0027] 如本文所用,“羟基保护基”是指-O-G基团。G是羟基保护基。羟基保护基是所属领域的普通技术人员众所周知的。在一些实施方案中,羟基保护基团可以选自:甲氧基甲基醚(MOM),甲氧基乙氧基甲基醚(MEM),苄氧基甲基醚(BOM),四氢吡喃基醚(THP),苄基醚(Bn),对甲氧基苄基醚,三甲基甲硅烷基醚(TMS),三乙基甲硅烷基醚(TES),三异丙基甲硅烷基醚(TIPS),叔丁基二甲基甲硅烷基醚(TBDMS),叔丁基二苯基甲硅烷基醚(TBDPS),邻硝基苄基醚,对硝基苄基醚,三丁基醚,乙酸酯,氯乙酸酯,二氯乙酸酯,三氯乙酸酯,三氟乙酸酯,苯甲酸酯(Bz),碳酸甲酯,碳酸烯丙酯(alloc),二甲基硫代氨基甲酸酯(DMTC),碳酸苄酯(Cbz),碳酸叔丁酯(Boc)和9-(芴基甲基)碳酸酯(Fmoc)。用于羟基官能团的保护基的详尽列表可见于《有机合成中的保护基(Protective Groups in Organic Synthesis)》,Greene,T.W.;Wuts,P.G.M.,John Wiley&Sons,New York,NY,(第3版,1999)中,其可使用其中阐述的程序添加或移除并且其以全文引用的方式并入本文中和用于任何和所有目的,如同在本文中全面阐述一般。

[0028] 一方面,本技术提供了低聚-L-乳酸与吉西他滨和吉西他滨衍生物的缀合物。在另一方面,本技术提供了低聚-D-乳酸与吉西他滨和吉西他滨衍生物的缀合物。在另一方面,本技术提供了立体复合物与吉西他滨和吉西他滨衍生物的缀合物。

[0029] 在本技术的缀合物和立体复合物中,低聚乳酸可以是乳酸的线性聚酯。在本技术

的缀合物和立体复合物中,低聚乳酸可以通过酰胺键连接到吉西他滨或吉西他滨衍生物的4-氨基的氮上。在这种缀合物和立体复合物中,低聚乳酸通常包含2至20个乳酸亚基。本领域技术人员将理解,本发明的缀合物和立体复合物可具有2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个乳酸亚基或前述值中任意两个之间的亚基范围。例如,缀合物和立体复合物可包含7至20个乳酸亚基。在任何实施方案中,低聚-L-乳酸和低聚-D-乳酸可各自包含至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个或至少7个乳酸亚基。

[0030] 在任何实施方案中,缀合物和立体复合物可具有式I所示的结构:



[0032] 其中每次出现的n分别为2到20的整数或之间的范围,包含端点(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20)。在任何实施方案中,每次出现的n可以是7至20的整数或之间的范围,包括端点。在一些实施方案中,低聚乳酸可以是L-低聚乳酸。在一些实施方案中,低聚乳酸可以是D-低聚乳酸。

[0033] 本技术提供了包含吉西他滨或吉西他滨衍生物的4(N)-低聚-L-乳酸缀合物和吉西他滨或吉西他滨衍生物的4(N)-低聚-D-乳酸缀合物的立体复合物的组合物。如上所述,每个缀合物中的低聚-L-乳酸或低聚-D-乳酸可以包含2至20个乳酸亚基和/或可以通过酰胺键连接至吉西他滨或吉西他滨衍生物的4-氨基的氮。低聚乳酸的长度可以如上所述变化,例如低聚乳酸可以具有7至20个乳酸残基。在立体复合物中,两种缀合物的摩尔比可以为约1:1。然而,包含立体复合物的组合物可以包括范围为2:1至1:2例如3:2或2:3或1:1的吉西他滨或吉西他滨衍生物的4(N)-低聚-L-乳酸缀合物和吉西他滨或吉西他滨衍生物的4(N)-低聚-D-乳酸缀合物的摩尔比。图1示意性地示出了本技术的一个实施方案立体复合物 $\alpha(L+DLA)_n$ -GEM,以及它们向胶束中的负载。

[0034] 在任何实施方案中,本技术的缀合物可以通过使具有游离4-氨基的吉西他滨或吉西他滨衍生物与偶联剂和具有2至20个乳酸亚基和羟基的低聚乳酸接触而制备。在任何实施方案中,羟基可以是被保护的羟基或先前被保护的羟基。在任何实施方案中,羟基可在与吉西他滨或吉西他滨衍生物接触之前脱保护。在任何实施方案中,被保护的羟基可包括苄基保护基。在任何实施方案中,在羟基脱保护之前,低聚乳酸可以是具有2至20个乳酸亚基的苄基-低聚乳酸。仅作为示例,图2提供了制备本发明缀合物的方法的说明性实施方案。在图2中,吉西他滨在合适的有机溶剂中使用偶联剂偶联至L-或D-低聚乳酸中间体上的羧基。合适的偶联剂包括碳二亚胺,例如DCC和EDCI。合适的有机溶剂包括卤代溶剂(例如二氯甲烷、氯仿)、乙酸烷基酯(例如乙酸乙酯)或其他极性非质子溶剂(例如DMF、THF)。

[0035] 在另一方面,本技术提供了由水、含聚乳酸的聚合物和本文所述的本技术的任何吉西他滨/吉西他滨衍生物低聚乳酸-缀合物形成的胶束的水性组合物。在另一方面,本技

术提供了由水、含聚乳酸的聚合物和本文所述的本技术的吉西他滨/吉西他滨衍生物低聚乳酸-缀合物的任何立体复合物形成的胶束的水性组合物。

[0036] 在任何实施方案中,胶束可包括嵌段共聚物PEG-b-PLA(也称为PEG-PLA)。聚(乳酸)嵌段可包括(D-乳酸)、(L-乳酸)、(D,L-乳酸)或其组合。各种形式的PEG-b-PLA可商购,例如来自Polymer Source, Inc., Montreal, Quebec,或可以根据本领域技术人员众所周知的方法制备。在任何实施方案中,聚(乙二醇)嵌段(PEG嵌段)的分子量可以为约1,000至约35,000g/mol,或在所述范围内约500g/mol的任何增量。(除非另有说明,否则本文所指的所有聚合物分子量应理解为重均分子量。)例如,PEG嵌段的分子量可以为约1,000、1,500、2,000、2,500、3,000、3,500、4,000、4,500、5,000、6,000、7,000、8,000、9,000、10,000、11,000、12,000、13,000、14,000、15,000、16,000、17,000、18,000、19,000、20,000、21,000、22,000、23,000、24,000、25,000、26,000、27,000、28,000、29,000、30,000、31,000、32,000、33,000、34,000、35,000或上述任意两个值之间的范围,包括两个值。在任何实施方案中,聚(乳酸)嵌段(PLA嵌段)的合适的嵌段可具有约1,000至约15,000g/mol的分子量,或在所述范围内约500g/mol的任何增量。例如,PLA嵌段的分子量可以是约1,000、1,500、2,000、2,500、3,000、3,500、4,000、4,500、5,000、6,000、6,500、7,000、7,500、8,000、8,500、9,000、9,500、10,000、10,500、11,000、11,500、12,000、12,500、13,000、13,500、14,000、14,500、15,000,或介于前述值中的任何两个之间的范围,包括这两个值。在任何实施方案中,PEG嵌段可以终止于烷基,例如甲基(例如甲氧基醚)或任何合适的保护、封端或封闭基团。在任何实施方案中,PEG嵌段的分子量可以为约1,000至约35,000g/mol,PLA嵌段的分子量可以为约1,000至约15,000g/mol,或其组合。在任何实施方案中,PEG嵌段的分子量可以为约1,500至约14,000g/mol,PLA嵌段的分子量可以为约1,500至约7,000g/mol,或其组合。

[0037] 在任何实施方案中,本技术的胶束可以使用各种嵌段尺寸(例如上述范围内的嵌段尺寸)和各种比例的PEG-b-PLA聚合物制备。例如,PEG:PLA比率可以为约1:10至约10:1,或在所述范围内的任何整数比率,包括但不限于1:5、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1和5:1。例如,PEG-PLA聚合物的数均分子量(M_n)可包括但不限于约2K-2K、3K-5K、5K-3K、5K-6K、6K-5K、6K-6K、8K-4K、4K-8K、12K-3K、3K-12K、12K-6K、6K-12K(分别为PEG-PLA)或上述值中的任意两个之间的范围,包括这两个值。

[0038] 一种合适的PEG-PLA聚合物包括以大约1:1的比例的大约1-3kDa(例如约2K道尔顿)的嵌段。使用这种嵌段聚合物导致胶束中高水平的药物-偶联物负载。PEG-PLA分子量的其他具体例子包括4.2K-b-1.9K;5K-b-10K;12K-b-6K;2K-b-1.8K以及在以下实施例中描述的那些。可以使用的其他合适的两亲嵌段共聚物描述于美国专利4,745,160(Churchill等人)和6,322,805(Kim等人)中,其各自通过引用并入本文。药物与聚合物的比例可以为约1:20至约2:1,或在所述范围内的任何整数比。合适的药物-聚合物比例的具体实例包括但不限于约2:1,约3:2,约1.2:1,约1:1,约3:5,约2:5,约1:2,大约1:5;大约1:7.5;约1:10,约1:20或介于前述值之间的范围,包括端点。

[0039] 本技术的胶束可装载多种量的本文所述的缀合物和立体复合物,包括大量。例如,相对于胶束的质量,缀合物和立体复合物的负载量可以为约1重量%至约50重量%。胶束中的缀合物和立体复合物负载的实例包括相对于胶束的质量约1重量%,约2重量%,约3重量%,约4重量%,约5重量%,约10重量%,约15重量%,约20重量%,约25重量%,约30重

量%，约35重量%，约40重量%，约45重量%或约50重量%，或在前述任意两个之间的范围，包括这两个值。在任何实施方案中，缀合物和立体复合物的负载量可以为约5重量%至约15重量%。

[0040] 胶束中每种缀合物和缀合物立体复合物的负载量也可以浓度表示。例如，相对于组合物中水的体积，每种缀合物和缀合物的立体复合物的浓度可以为约0.5mg/mL至约40mg/mL。可以用本技术获得的每种缀合物浓度的实例包括相对于组合物中水的体积约0.6mg/mL，约1mg/mL，约2mg/mL，约3mg/mL，约4mg/mL，约5mg/mL，约6mg/mL，约8mg/mL，约10mg/mL，约12mg/mL，约15mg/mL，约20mg/mL，约25mg/mL，约30mg/mL，约35mg/mL，或约40mg/mL，或介于前述值中的任何两个之间的范围，包括这两个值。在任何实施方案中，L-低聚乳酸缀合物的浓度可以为约1至约15mg/mL或甚至约2至约12mg/mL，D-低聚乳酸缀合物的浓度可以为约1至约20mg/mL或甚至约1.5至约10mg/mL，和/或缀合物的立体复合物的浓度可为约0.5至约15mg/mL或甚至约1至约10mg/mL。

[0041] 胶束中每种缀合物和立体复合物的负载也可以负载效率来表示。例如，相对于胶束的质量，每种缀合物和立体复合物的负载效率可以为约25重量%至约100重量%。胶束中的缀合物和缀合物的立体复合物的负载效率的实例包括相对于胶束的质量约30重量%，约35重量%，约40重量%，约45重量%，约50重量%，约55重量%，约60重量%，约65重量%，约70重量%，约75重量%，约80重量%，约85重量%，约90重量%，约95重量%，约99重量%或约100重量%，或介于前述值中的任何两个之间的范围，包括这两个值。在任何实施方案中，L-低聚乳酸缀合物的负载效率可以为至少约50重量%，包括约80重量%至约90重量%，并且立体复合物的负载效率可以为至少约50重量%，包括约90重量%至约100重量%。

[0042] 在任何实施方案中，本技术提供了包括水以及包含PEG-b-PLA和本文所述的L-低聚乳酸缀合物、D-低聚乳酸缀合物和立体复合物中的至少一种的胶束的组合物。在任何实施方案中，相对于胶束的质量，L-低聚乳酸缀合物的负载量可以为约1重量%至约50重量%；D-低聚乳酸缀合物的负载量可以为约1重量%至约50重量%，和/或立体复合物的负载量可以为约1重量%至约50重量%。在任何实施方案中，PEG-b-PLA的PEG嵌段的分子量可以为约1,500至约14,000g/mol；和PEG-b-PLA的PLA嵌段的分子量可以为约1,500至约7,000g/mol，或其组合。这样的组合物可以包含本文所述的吉西他滨的任何负载量，包括例如约1重量%至约50重量%、约1至约15mg/mL或约2至约12mg/mL的任何L-低聚乳酸缀合物；约5重量%至约50重量%、约1至约20mg/mL或约2至约10mg/mL的任何D-低聚乳酸缀合物；和/或约2重量%至约30重量%、约1至约15mg/mL或约2至约15mg/mL的任何立体复合物。在任何实施方案中，组合物可包含任何L-低聚乳酸缀合物、任何D-低聚乳酸缀合物、本文所述的任何立体复合物，或其两种或更多种的组合。

[0043] 数量超过临界胶束浓度(CMC)的存在于溶剂中的两亲聚合物的两亲单链聚集成胶束，一种具有疏水性内部以及亲水性外部或外壳的核-冠状结构。载有药物或缀合物的PEG-b-PLA胶束的质子NMR光谱研究表明，尽管胶束在水性环境中容易形成，但它们在有机溶剂(如DMSO)中分解。本发明的胶束组合物通常基本上不含有机溶剂，例如基于组合物的重量小于约2重量%的乙醇、二甲基亚砷、蓖麻油和蓖麻油衍生物(即聚乙氧基化樟脑化合物，例如Cremophor EL)。在任何实施方案中，有机溶剂的量可小于约1重量%，小于约0.5重量%，小于约0.1重量%，或基本不含可检测量的有机溶剂。

[0044] PEG-b-PLA胶束可如以下本节以及以下实施例中所述制备。本文所述的胶束的组合可以通过将水与含聚乳酸的聚合物和吉西他滨的药物/药物衍生物的混合物组合来制备。在另一个实施方案中,本文所述的胶束组合可以通过将水与含聚乳酸的聚合物和本文所述的药物/药物衍生物缀合物/缀合物的立体复合物中的至少一种的混合物组合来制备。在任何实施方案中,含聚乳酸的聚合物可以包括PEG-b-PLA。

[0045] 下面给出的过程仅是说明性的。如本领域技术人员将容易认识到的,过程可以根据所需的制备规模而变化。该过程的一个优点是它不需要透析胶束溶液。准备过程:冷冻干燥。在一实施方案中,胶束制备可以如下进行。载于PEG-b-PLA胶束中的至少一种本文所述的缀合物或立体复合物可通过从叔丁醇-水混合物中冷冻干燥来制备。例如,可以在60°C下将2-20mg的PEG4000-b-PLA2200(加拿大蒙特利尔Advanced Polymer Materials Inc.)和1.0mg的本文所述的缀合物溶解在1.0mL的叔丁醇中,然后在剧烈混合下在60°C加入1.0mL预热双蒸馏水。使混合物在-70°C的干冰/乙醇冷却浴中冷冻。然后,在整个实验过程中,可在-20°C的架子入口温度下于架子冷冻干燥机上于100 μ Bar下进行冻干72小时。然后将冻干的滤饼在60°C下与1.0mL的0.9%盐溶液再水化,离心,通过0.22 μ m的再生纤维素滤器过滤,并通过HPLC分析。在一些实施方案中,该过程用于制备低聚-L-乳酸缀合物或低聚-D-乳酸缀合物的胶束。在一些实施方案中,该过程用于制备立体复合物的胶束。

[0046] 一旦制备,可将胶束-缀合物或胶束-立体复合物组合在冷藏下,优选在低于约5°C的温度下保存更长的时间。已经发现约-20°C至约4°C之间的温度是用于储存大多数胶束-缀合物和胶束-立体复合物组合物的合适条件。例如,本发明的缀合物负载的胶束的水溶液可以储存在约4°C下。如本文所述的冷冻干燥的胶束组合可以在-20°C下长时间保存,然后再水合。使用棕色玻璃瓶或其他不透明的容器来保护胶束组合免受光照,可以进一步延长组合物的有效寿命。

[0047] 在任何实施方案中,本技术提供了抑制或杀死对吉西他滨或吉西他滨衍生物敏感的癌细胞的方法。在任何实施方案中,该方法可以包括使细胞与有效抑制或致死量的本文所述的任何组合物接触。在任何实施方案中,接触可以在体外或体内进行。还提供了治疗方法,包括对患有对吉西他滨或吉西他滨衍生物敏感的癌症的哺乳动物施用有效量的本文所述的胶束组合。对吉西他滨敏感的癌症的例子包括卵巢癌、白血病、血管肉瘤、乳腺癌、结直肠癌、前列腺癌、肺癌、胰腺癌、胆管癌、脑癌(例如神经胶质瘤)、腺癌、肝癌和胆道癌。在任何实施方案中,癌症可以是肺癌或胰腺癌。

[0048] 在本文描述的本技术的任何实施方案中,药物组合物可以包装为单位剂型。单位剂型可有效治疗癌症。通常,包含本发明技术的组合物的单位剂量将视患者考虑因素而变化。这类考虑因素包括例如年龄、方案、病状、性别、疾病程度、禁忌症、伴随疗法等。基于这些考虑因素的示范性单位剂量也可由所属领域的医生调节或修改。例如,包含本发明技术化合物的患者的单位剂量可以为 1×10^{-4} g/kg到1g/kg,优选 1×10^{-3} g/kg到1.0g/kg。本发明技术的化合物的剂量也可以在0.01mg/kg到100mg/kg,或优选0.1mg/kg到10mg/kg范围内变化。

[0049] 包含吉西他滨或吉西他滨衍生物的缀合物/立体复合物的胶束组合可如本文所述制备,并用于治疗癌症和心血管疾病。本文所述的缀合物、立体复合物和组合物可用于制备用于治疗再狭窄或癌症例如卵巢癌、白血病、血管肉瘤、乳腺癌、结直肠癌、前列腺癌、肺

癌、胰腺癌、胆管癌、脑癌(例如神经胶质瘤)、腺癌、肝癌或胆道癌的制剂和药物。这类组合物可为例如颗粒、粉末、片剂、胶囊、糖浆、栓剂、注射剂、乳剂、酞剂、悬浮液或溶液的形式。本发明的组合物可经配制用于多种施用途径,例如通过胃肠外、经直肠、经鼻、经阴道给药,或通过植入式基质或贮器,或对于再狭窄,通过药物涂覆的支架或基于球囊的递送。胃肠外或全身给药包括但不限于皮下、静脉内、腹膜内和肌肉内注射。以下剂型通过实例的方式给出,并且不应解释为限制本发明技术。

[0050] 可注射剂型通常包括溶液或水性悬浮液或水包油悬浮液,其可使用适合的分散剂或湿润剂和悬浮剂制备。可注射剂型可为溶液相或悬浮液形式,其用溶剂或稀释剂制备。可接受的溶剂或媒剂包括无菌水、林格氏溶液(Ringer's solution)或等渗水性盐水溶液。

[0051] 对于注射,医药制剂和/或药物可以是适于用适合的如上文所描述的溶液复原的膜或粉末。这些粉末的实例包括但不限于冷冻干燥的粉末、旋转干燥的粉末或喷雾干燥的粉末、非晶形粉末、颗粒、沉淀物或微粒。对于注射,制剂可任选地含有稳定剂、pH调节剂、表面活性剂、生物可用性调节剂和这些的组合。在任何实施方案中,可注射制剂包括等渗剂(例如NaCl和/或葡萄糖)、缓冲剂(例如磷酸盐)和/或防腐剂。

[0052] 除上述代表性剂型以外,所属领域的技术人员通常已知药学上可接受的赋形剂和载剂并且因此包括于本发明技术中。这类赋形剂和载剂描述于例如“《雷氏药学大全(Remingtons Pharmaceutical Sciences)》”马克出版有限公司(Mack Pub.Co.),新泽西州(1991),其通过引用并入本文。

[0053] 如下文所述,本发明技术的制剂可设计成短效、快速释放、长效和持续释放形式。因此,医药制剂也可以经配制用于控制释放或缓慢释放。

[0054] 可视疾病病状、个体的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食、给药时间间隔、给药途径、分泌速率和游离药物/缀合物的组合来调节特定剂量。含有有效量的任何上述剂型都恰好在常规实验的界限之内,并且因此也恰好在本发明技术的范围之内。仅作为实例,这种剂量可以用于向患者施用有效量的游离药物/缀合物,并且可以包括约10mg/m²、约20mg/m²、约30mg/m²、约40mg/m²、约50mg/m²、约75mg/m²、约100mg/m²、约125mg/m²、约150mg/m²、约200mg/m²、约250mg/m²、约300mg/m²,或介于上述任意两个值之间的范围,包括这两个值。此类量可以如本文所述肠胃外施用,并且可以发生在一段时间内,包括但不限于5分钟、10分钟、20分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、3小时、5小时、10小时、12小时、15小时、20小时、24小时或在任一前述值之间并包括任一前述值的范围。施用频率可以变化,例如每天一次、每2天一次、每3天一次、每周一次、每10天一次、每2周一次,或在任一前述频率之间并包括任一前述频率的范围。

[0055] 对于每一种本文中所描述的指定病状,与用安慰剂处理或其它适合的对照个体相比,测试个体将展现由个体中的病症引起或与其相关的一种或多种症状的10%、20%、30%、50%或更大程度的减少,直到75-90%,或95%或更大程度的减少。

[0056] 在一个相关的实施方案中,提供了一种用于治疗受试者的方法,其中该方法涉及向患有癌症或心血管疾病的受试者施用本技术的组合物的任何一个实施方案。在该方法中,癌症可以是卵巢癌、白血病、血管肉瘤、乳腺癌、结直肠癌、前列腺癌、肺癌、胰腺癌、胆管癌、脑癌(例如神经胶质瘤)、腺癌、肝癌或胆道癌。

[0057] 在该方法的任何实施方案中,该方法可涉及药物组合物的施用,其中该药物组合

物包括本技术的缀合物或包含游离药物或缀合物的胶束以及药学上可接受的载体的实施方案的任一种。

[0058] 本文中提供实例以说明本发明技术的优点以及进一步帮助所属领域的普通技术人员制备或使用本发明技术的缀合物和胶束组合物、医药组合物、衍生物、代谢物、前药、外消旋混合物或互变异构形式。就游离药物/缀合物/立体复合物包括可电离的吉西他滨或其衍生物的游离药物/缀合物/立体复合物而言,还可以使用盐,例如药学上可接受的盐。还呈现本文中的实例以便更全面地说明本发明技术的优选方面。实例决不应被解释为限制由所附权利要求限定的本发明技术的范围。实例可以包括或并入有上述本技术的任何变体、一种或多种方面。上述变化、方面或方面也可以进一步各自包括或合并有本发明技术的任何或所有其它变化、方面或方面的变化。

[0059] 实施例

[0060] 通过以下实施例进一步举例说明本技术,其不应以任何方式解释为限制。

[0061] 实施例1:实验材料和方法

[0062] 材料。所有化学品均购自Sigma-Aldrich(密苏里州圣路易斯)并按原样使用。分析级有机溶剂和所有其他试剂均购自Fisher Scientific(Pittsburgh,PA)。吉西他滨(GEM)购自LC实验室(马萨诸塞州沃本)。PEG-b-PLA购自Advanced Polymer Materials Inc.(加拿大蒙特利尔):PEG和PLA的 M_n 分别为4,000和2,200g/mol;PDI 1.05。从ATCC(Manassas,VA)购买A549人肺腺癌细胞和PANC-1胰腺腺癌细胞,并分别在补充有10%胎牛血清(FBS)、100IU/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素和2mM β -谷氨酰胺的RPMI 1640培养基和DMEM中在5%CO₂培养箱中于37 $^{\circ}$ C培养。肝素化的Sprague-Dawley大鼠血浆和人源血浆购自Innovative Research Inc.(Novi,MI)。

[0063] 仪器。质子核磁共振(¹H NMR)数据记录在Varian Unity-Inova两通道500MHz NMR光谱仪(Palo Alto,CA)上,调节温度为25 $^{\circ}$ C。相对于CDCl₃在7.26ppm处的残余质子化溶剂共振,化学位移(δ)以百万分之一(ppm)报告。质谱数据是使用威斯康星大学麦迪逊分校化学系化学仪器中心的Waters LCT(ESI-TOF)(Waters Corp.,Milford,MA)获得的。从10mM NH₄OAc/CH₃CN溶液中喷雾样品。使用配备了LC-20AT泵、SIL-20AC HT自动进样器、CTO-20AC柱温箱和SPD-M20A二极管阵列检测器的Shimadzu Prominence HPLC系统(Shimadzu, Kyoto, Japan)进行反相HPLC(RP-HPLC)分析。用Waters Symmetry ShieldTM RP₁₈色谱柱(4.6mm \times 250mm,5 μ m,100 \AA)分离样品。在典型的实验中,以0.8mL/min的流速进样10 μ L样品,柱温为25 $^{\circ}$ C,对于GEM,UV检测波长为270nm,对于o(LA)_n-GEM,为300nm。o(LA)_n-GEM转化产物的分离以梯度模式进行,其中有机相含有100%CH₃CN作为溶剂A,水相含有100%milliQ水(含有0.1%甲酸)作为溶剂B。如下进行梯度洗脱:0分钟,20%溶剂A,80%溶剂B;30分钟,68%溶剂A和32%溶剂B;和35分钟的平衡。使用Zetasizer Nano-ZS(Malvern Instruments Inc.,Malvern,England)在25 $^{\circ}$ C下以173 $^{\circ}$ 的检测角和He-Ne离子激光作为光源(4mW,633nm),通过动态光散射(DLS)测量PEG-b-PLA胶束的流体力学直径。在测量之前,将PEG-b-PLA胶束溶液用milliQ水或PBS(10mM,pH 7.4)稀释,以使PEG-b-PLA的水平达到约0.1mg/mL,然后将每个样品1mL放入一次性施胶试管(BrandTech Scientific Inc.,Essex,CT)。使用累积量法对相关函数进行曲线拟合,并分别从Stokes-Einstein方程和相关函数的斜率计算出PEG-b-PLA胶束的z平均直径和多分散指数(PDI)。所有测量均重复三次。在云

母上吸附了50.0mg/mL的聚合物后,使用原子力显微镜(AFM)在AC模式下观察立体复合物 $(L+DLA)_{10}$ -GEM加载的PEG-b-PLA胶束的形态。在Infinity Bioscope (Asylum Research, Santa Barbara, CA)上使用AC40 biolever在MilliQ水中对胶束成像。

[0064] 合成单分散的苜基-低聚(L-乳酸) $_n$ (Bn-o(LLA) $_n$)或苜基-低聚(D-乳酸) $_n$ (Bn-o(DLA) $_n$)。根据修改的先前报道的方法(参见De Jong, S.J. et al., *Macromolecules*, 1998, 31(19):6397-6402),用乙基己酸锡(II)(Sn(Oct) $_2$)开始多分散体的合成。例如,平均聚合度为8,将环状L-丙交酯或环状D-丙交酯与苯甲醇以4:1的摩尔比混合。将混合物在130°C下搅拌直至熔融。随后,加入0.01当量Sn(Oct) $_2$ 的甲苯(100mg/mL)溶液。将混合物在130°C下搅拌4小时,然后冷却至室温,以获得多分散体Bn-o(LLA) $_n$ 或Bn-o(DLA) $_n$ 。使用C $_{18}$ 反相色谱,通过CombiFlash Rf 4x系统,对单分散的Bn-o(LLA) $_6$ 、Bn-o(LLA) $_{10}$ 、Bn-o(DLA) $_6$ 或Bn-o(DLA) $_{10}$ 进行分馏。进行乙腈在0.1%甲酸中的梯度洗脱,水在0.1%甲酸中的梯度洗脱。将纯化的产物在减压下浓缩以提供无色液体。(收率:Bn-o(LLA) $_6$ 为8.3%,Bn-o(DLA) $_6$ 为8.0%,Bn-o(LLA) $_{10}$ 为6.7%和Bn-o(DLA) $_{10}$ 为7.9%)。Bn-o(LLA) $_6$ 的ESI-TOF:m/z计算的C $_{25}$ H $_{32}$ O $_{13}$ [M+Na] $^+$:558.2181,实测值558.2179;Bn-o(DLA) $_6$ 的ESI-TOF:m/z计算的C $_{25}$ H $_{32}$ O $_{13}$ [M+Na] $^+$:558.2181,实测值558.2178;Bn-o(LLA) $_{10}$ 的ESI-TOF:m/z计算的C $_{37}$ H $_{48}$ O $_{21}$ [M+Na] $^+$:846.3026,实测值846.3027;Bn-o(DLA) $_{10}$ 的ESI-TOF:m/z计算的C $_{37}$ H $_{48}$ O $_{21}$ [M+Na] $^+$:846.3026,实测值846.3023。

[0065] 寡(L-乳酸) $_n$ -吉西他滨(o(LLA) $_n$ -GEM)或寡(D-乳酸) $_n$ -吉西他滨(o(DLA) $_n$ -GEM)的合成。通过酰胺化o(LLA) $_n$ 或o(DLA) $_n$ 上的羧酸基和吉西他滨分子上的胺基来制备o(LLA) $_n$ -GEM或o(DLA) $_n$ -GEM。通常,在钯/活性炭上(10重量%)可以实现Bn-o(LLA) $_n$ 或Bn-o(DLA) $_n$ 的直接加氢,得到o(LLA) $_n$ 或o(DLA) $_n$,这是根据以前发表的报告(收率:约90-99%,参见Takizawa, K. et al., *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.*, 2008, 46:5977-5990)。随后,将1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDCI)(1.5当量)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)(1.5当量)添加到o(LLA) $_n$ 或o(DLA) $_n$ (1当量)在干燥DMF的溶液中,并在室温下在氩气下搅拌2小时。将GEM(1当量)溶解在干燥的DMF中,并滴加到上述混合物中。将反应混合物在室温下在氩气下搅拌24小时。将粗产物用乙酸乙酯(20倍)稀释,用0.5%w/v盐酸、饱和NaHCO $_3$ 和盐水溶液洗涤。然后收集有机层,经MgSO $_4$ 干燥并过滤。减压除去溶剂,并将所得浓缩物通过CombiFlash Rf 4x系统使用己烷和乙酸乙酯的梯度洗脱进行纯化。将纯化的产物在减压下浓缩以提供白色固体(产率:o(LLA) $_6$ -GEM为80%,o(DLA) $_6$ -GEM为63%,o(LLA) $_{10}$ -GEM为87%,和o(DLA) $_{10}$ -GEM为74%)。o(LLA) $_6$ -GEM的 1 H NMR(CDC $_{13}$, 500MHz): δ =8.09(d, J=7.6Hz, 1H), 7.36(br. s., 1H), 6.20(br. s., 1H), 5.30(s, 1H), 5.14-5.29(m, 5H), 4.45-4.57(m, 1H), 4.37(q, J=7.1Hz, 1H), 4.00-4.09(m, 2H), 3.92(d, J=10.5Hz, 1H), 1.46-1.62ppm(m, 18H)。ESI-TOF:m/z计算的C $_{27}$ H $_{35}$ F $_2$ N $_3$ O $_{16}$ [M+H] $^+$:696.2058,实测值696.2061;o(DLA) $_6$ -GEM的 1 H NMR(CDC $_{13}$, 500MHz): δ =8.10(d, J=7.3Hz, 1H), 7.40(br. s., 1H), 6.17(br. s., 1H), 5.34(d, J=7.1Hz, 1H), 5.10-5.31(m, 5H), 4.58(br. s., 1H), 4.37(q, J=6.8Hz, 1H), 3.99-4.09(m, 2H), 3.92(d, J=10.7Hz, 1H), 1.47-1.61ppm(m, 18H)。ESI-TOF:m/z计算的C $_{27}$ H $_{35}$ F $_2$ N $_3$ O $_{16}$ [M+H] $^+$:696.2058,实测值696.2058;o(LLA) $_{10}$ -GEM的 1 H NMR(CDC $_{13}$, 500MHz): δ =8.08(d, J=7.3Hz, 1H), 7.39(d, J=5.9Hz, 1H), 6.19(br. s., 1H), 5.13-5.33(m, 10H), 4.54(br. s., 1H), 4.37(q, J=6.8Hz, 1H), 4.05(d, J=10.3Hz, 2H), 3.93(d, J=10.0Hz, 1H), 1.46-1.63ppm(m,

30H)。ESI-TOF:m/z计算的 $C_{39}H_{51}F_2N_3O_{24} [M+H]^+$:984.2903,实测值984.2907;o (DLA)₁₀-GEM的¹H NMR (CDCl₃,500MHz): $\delta=8.04$ (d,J=8.1Hz,1H),7.32-7.49 (m,1H),6.18 (br.s.,1H),5.11-5.41 (m,10H),4.56-4.70 (m,1H),4.36 (d,J=6.3Hz,1H),4.02-4.09 (m,2H),3.93 (d,J=10.0Hz,1H),1.48-1.65ppm (m,30H)。ESI-TOF:m/z计算的 $C_{39}H_{51}F_2N_3O_{24} [M+H]^+$:984.2903,实测值984.2905。

[0066] 立体复合物o (LLA)₁₀-GEM和o (DLA)₁₀-GEM的形成和表征。差示扫描量热法(DSC)测量是使用TA Q2000差示扫描量热计在具有约5-10mg材料的卷曲铝盘中进行的。将样品冷却并在50ml/min N₂吹扫下以10K/min的速度加热。使用Bruker D8 Advance衍射仪(Bruker, Billerica,MA)在室温从2至40°2 θ 下以0.02°的步长和1s的积分时间收集粉末X射线衍射(PXRD)图。为了制备o (LLA)₁₀-GEM和o (DLA)₁₀-GEM的立体复合物,首先将等量的o (LLA)₁₀-GEM(4mg)和o (DLA)₁₀-GEM(4mg)溶解在玻璃小瓶中的100 μ L乙腈中,涡旋30秒。然后将溶液放置在DSC基板或硅片上,并在70°C的真空中干燥12小时,得到固体。

[0067] 包含立体复合物o (L+DLA)₁₀-GEM、o (LLA)₁₀-GEM或o (LLA)₆-GEM的PEG-b-PLA胶束的制备和表征。立体复合物o (L+DLA)₁₀-GEM、o (LLA)₁₀-GEM或o (LLA)₆-GEM加载的PEG-b-PLA胶束从叔丁醇-水混合物冷冻干燥制备(参见Fournier,E.et al.,Pharm.Res.,2004,21(6):962-968)。在典型的实验中,将1.0mg的o (LLA)₁₀-GEM和1.0mg的o (DLA)₁₀-GEM以及10.0mg或20.0mg的PEG-b-PLA在60°C溶解于1.0mL的叔丁醇中,然后在剧烈搅拌下于60°C加入1.0mL预热的双蒸馏水。使混合物在-70°C的干冰/乙醇冷却浴中冷冻2小时。然后在VirTis AdVantage Pro冷冻干燥机(SP Scientific,Gardiner,NY)上在整个实验过程中在-20°C的架子入口温度下于100 μ Bar下进行冻干72小时。然后将冻干的滤饼在60°C下用1.0mL MilliQ水或0.9%盐溶液再水化,离心,并使用0.2 μ m过滤器过滤。通过RP-HPLC表征上清液中的药物含量。采用类似方法制备负载o (LLA)₆-GEM或负载o (LLA)₁₀-GEM的PEG-b-PLA胶束。

[0068] 立体复合物o (L+DLA)₁₀-GEM前药在pH 7.4的CH₃CN/PBS混合物中的转化。首先将o (LLA)₁₀-GEM(1.0mg/mL)和o (DLA)₁₀-GEM(1.0mg/mL)的混合物溶于CH₃CN和PBS的1:1(v/v)混合物中(10mM,pH 7.4),置于1.5mL Eppendorf管中,并在37°C的温度调节水浴中孵育(GCA Corporation,IL)(参见Tam,Y.T.et al.,J.Am.Chem.Soc.,2016,138:8674-8677)。在预定的时间点取出10 μ L溶液,并在进行RP-HPLC分析之前用90 μ L CH₃CN稀释。类似地,通过RP-HPLC测量o (LLA)₆-GEM或o (LLA)₁₀-GEM在CH₃CN和PBS(10mM,pH 7.4)的1:1(v/v)混合物中的转化率。计算o (LLA)₁₀-GEM和o (DLA)₁₀-GEM、o (LLA)₁₀-GEM或o (LLA)₆-GEM的混合物的降解动力学的一级常数。每个实验进行了三次评估,并报告了平均值和标准偏差。

[0069] 立体复合物o (L+DLA)₁₀-GEM加载的PEG-b-PLA胶束在水中的稳定性。通过冻干制备立体复合物o (L+DLA)₁₀-GEM加载的PEG-b-PLA胶束(2.0mg/mL),并用MilliQ水再水化。在室温下监测立体复合物o (L+DLA)₁₀-GEM胶束在水中的稳定性。在预定时间点取出10 μ L溶液,并在进行RP-HPLC分析之前用90 μ L CH₃CN稀释。

[0070] 在大鼠血浆中立体复合物o (L+DLA)₁₀-GEM加载的PEG-b-PLA胶束、o (LLA)₁₀-GEM和o (DLA)₁₀-GEM的混合物和GEM的稳定性。用肝素化的Sprague-Dawley大鼠血浆(Innovative Research Inc.,Novi,MI)测定大鼠血浆中立体复合物o (L+DLA)₁₀-GEM加载的PEG-b-PLA胶束、o (LLA)₁₀-GEM和o (DLA)₁₀-GEM的混合物或GEM的稳定性。使用前,将冷冻的血浆样品在37°C下孵育5分钟。在水中以2.0mg/mL制备立体复合物o (L+DLA)₁₀-GEM胶束或GEM的储备溶液。

将100 μ L立体复合物 \circ (L+DLA)₁₀-GEM胶束或GEM水溶液添加到900 μ L血浆样品中,以达到0.2mg/mL的最终浓度。对于 \circ (LLA)₁₀-GEM和 \circ (DLA)₁₀-GEM的混合物,将其在DMSO中的储备溶液制备为4.0mg/mL。将DMSO中的10 μ L混合物添加到990 μ L血浆样品中,以达到0.04mg/mL的最终浓度。将样品在温度调节的水浴(GCA Corporation, IL)中于37 $^{\circ}$ C孵育。在预定的时间间隔(0、0.5、1、2、4和24小时),取出50 μ L血浆样品,并用100 μ L含0.1%甲酸的乙腈稀释。将沉淀的样品以13,000rpm离心10分钟,然后通过RP-HPLC分析所得的上清液。

[0071] 体外释放研究。在pH 7.4的10mM PBS溶液中,将立体复合物 \circ (L+DLA)₁₀-GEM、 \circ (LLA)₁₀-GEM或 \circ (LLA)₆-GEM加载的PEG-b-PLA胶束稀释至0.5mg/mL。带有MWC0 20K的Slide-A-LyzerTM透析盒(ThermoFisher, Waltham, MA)用于加载2.5mL稀释的胶束溶液。将三个透析盒在37 $^{\circ}$ C置于Corning Hotplate Stirrer(Corning Inc., Corning, NY)上的4L PBS溶液(10mM, pH 7.4)中。在0、1、2、3、6、9、24、48、72、120、168、216、312和504h时,从透析盒中取出100 μ L样品,并向该盒中补充100 μ L新鲜的PBS溶液(10mM, pH 7.4)。在2、6、24、72和168h用4L新鲜缓冲液替换外部培养基,以近似下沉条件。通过RP-HPLC测定PEG-b-PLA胶束中立体复合物 \circ (L+DLA)₁₀-GEM、 \circ (LLA)₁₀-GEM或 \circ (LLA)₆-GEM的药物定量。计算累积药物释放百分比,并根据一级速率方程计算药物释放一半。

[0072] 体外细胞毒性研究。GEM或在15%负载下立体复合物 \circ (L+DLA)₁₀-GEM胶束对人A549非小肺癌细胞和PANC-1胰腺癌细胞的体外细胞毒性通过CellTiter-Blue[®] Cell Viability Assay(Promega, Madison, WI)研究。将A549细胞以1,500个细胞/100 μ L/孔的接种密度接种到96孔板中,并在RPMI 1640培养基中培养,或者将PANC-1细胞以5,000个细胞/100 μ L/孔的接种密度接种到96孔板中并在Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM)中于37 $^{\circ}$ C在5%CO₂培养箱中培养24小时。将GEM或立体复合物 \circ (L+DLA)₁₀-GEM胶束在PBS溶液(10mM, pH 7.4)中以15%加载量添加到孔中,以达到1-10,000nM的最终浓度。将在培养基中用稀释的PBS培养的细胞用作对照。将经过药物处理的细胞在5%CO₂的培养箱中于37 $^{\circ}$ C放置72h。抽吸每个孔中的培养基,并加入在无血清RPMI1640或DMEM中的100 μ L 20%(v/v) CellTiter-Blue试剂,然后在5%CO₂气氛中于37 $^{\circ}$ C孵育1.5h。用SpectraMax M2酶标仪(Molecular Devices, San Jose, CA)测量荧光强度,分别在560和590nm激发和发射。通过使用适用于Windows的GraphPad Prism版本5.00(GraphPad Software, La Jolla, CA)确定半最大抑制药物浓度(IC₅₀)。

[0073] 体内抗肿瘤功效研究。所有动物实验都是根据威斯康星大学麦迪逊分校的机构动物护理和使用委员会批准的方案进行的,符合实验动物的护理和使用的机构和NIH指南。从威斯康星大学麦迪逊分校医学院和公共卫生学院的实验动物资源中获得了6-8周大的雌性无胸腺裸鼠(每只20-25g)。将小鼠关在通风的笼子中,自由进水和进食,并在注射肿瘤细胞前适应1周。胰蛋白酶消化后,从亚融合培养物中收获A549细胞(在100 μ L无血清RPMI 1640培养基中的 2×10^6 细胞),并皮下注射到每只小鼠的右肋腹中。当肿瘤体积达到约200-400mm³时,将小鼠随机分为3个治疗组(n=3-4/组):10mg/kg GEM,5%负载量、10mg/kg GEM当量的立体复合物 \circ (L+DLA)₁₀-GEM胶束和生理盐水对照。通过尾静脉施用药物,每周注射3次。在研究过程中监测体重和肿瘤体积。使用以下公式计算肿瘤体积: $V = (a \times b^2) / 2$,其中V是肿瘤体积,a是肿瘤长度,b是肿瘤宽度。

[0074] 统计分析。使用5%显著性水平的学生t检验进行统计分析。使用Windows的

GraphPad Prism版本5.00(GraphPad Software,La Jolla,CA)进行所有数据分析。

[0075] 实施例2: α -(LLA)_n-GEM、 α -(DLA)_n-GEM、或立体复合 α -(L+DLA)_n-GEM的合成

[0076] 通过使用苯甲醇作为引发剂和乙基己酸锡(II)(Sn(Oct)₂)作为催化剂的环状L-丙交酯或环状D-丙交酯的开环聚合(ROP),然后进行分馏和直接氢化,合成单分散的 α -(LLA)_n或 α -(DLA)_n。 α -(LLA)_n或 α -(DLA)_n通过酰胺键在4-(N)位与GEM的偶联是通过1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDCI)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)介导的,产生了 α -(LLA)_n-GEM和 α -(DLA)_n-GEM前药(n=6或10)(图2)。化学结构由¹H NMR光谱和电喷雾质谱分析支持。

[0077] 为了探索 α -(LLA)_n-GEM和 α -(DLA)_n-GEM的立体复合物形成,将两种前药以等质量比在玻璃小瓶中混合,然后溶解在乙腈(CH₃CN)中。然后将所得溶液置于70℃的真空烘箱中12h,以完全除去溶剂。粉末X射线衍射(PXRD)(图3A和3C)和差示扫描量热法(DSC)(图3B和3D)用于通过鉴定不同的衍射图和熔融转变(T_m)与前药的每种对映体形式相比来确认结晶立体复合物的形成。当n=10时, α -(LLA)₁₀-GEM和 α -(DLA)₁₀-GEM都是无定形的,如宽的衍射图和不存在DSC熔融吸热所证明。相比之下, α -(LLA)₁₀-GEM和 α -(DLA)₁₀-GEM的1:1混合物在12.0°、20.8°和23.9°处显示三个不同的结晶峰;这是形成结晶PLA立体复合物的独特衍射特征(参见Ikada,Y.et al.,Macromolecules,1987,20:904-906)。结晶立体复合物的存在通过117.8℃的吸热峰进一步证明。有趣的是,当n=6时,在混合等质量比的 α -(LLA)₆-GEM和 α -(DLA)₆-GEM之后,没有形成结晶立体复合物,如通过宽衍射峰并且不存在熔融吸热所证明的(图3C和3D)。

[0078] 实施例3:含有 α -(LLA)_n-GEM、 α -(DLA)_n-GEM或立体复合 α -(L+DLA)_n-GEM的PEG-b-PLA胶束的表征

[0079] 通过从叔丁醇-水混合物中冻干,实现将 α -(LLA)₆-GEM、 α -(LLA)₁₀-GEM或立体复合物 α -(L+DLA)₁₀-GEM掺入PEG-b-PLA胶束中。如表1所示, α -(LLA)₆-GEM和 α -(LLA)₁₀-GEM都成功地掺入了PEG-b-PLA中,形成了平均流体动力学直径为约30 μ m和药物负载量为约7%的胶束。

[0080] 表1. 负载 α -(LLA)₆-GEM、 α -(LLA)₁₀-GEM和立体复合物 α -(L+DLA)₁₀-GEM的PEG-b-PLA胶束的理化特性(均值 \pm SD,n=3)。

	药物	粒径(nm)	PDI	负载效率(%)	负载含量(%)	稳定性(h) ^{d)}
	α -(LLA) ₆ -GEM ^{a)}	27.4 \pm 0.3	0.23 \pm 0.01	67.5 \pm 11.3	6.3 \pm 1.1	<24
[0081]	α -(LLA) ₁₀ -GEM ^{a)}	29.4 \pm 0.1	0.13 \pm 0.03	82.1 \pm 11.4	7.6 \pm 1.1	<1
	α -(L+DLA) ₁₀ -GEM ^{b)}	139.5 \pm 24.9	0.35 \pm 0.08	56.7 \pm 4.3	5.4 \pm 0.4	>168
	α -(L+DLA) ₁₀ -GEM ^{c)}	202.3 \pm 19.0	0.33 \pm 0.07	90.3 \pm 4.4	15.3 \pm 0.9	>168

[0082] ^{a)}使用1.0mg的 α -(LLA)₆-GEM或 α -(LLA)₁₀-GEM和10.0mg的PEG₄₀₀₀-b-PLA₂₂₀₀。^{b)}使用1.0mg的 α -(LLA)₁₀-GEM、1.0mg的 α -(DLA)₁₀-GEM和20.0mg的PEG₄₀₀₀-b-PLA₂₂₀₀。^{c)}使用1.0mg的 α -(LLA)₁₀-GEM、1.0mg的 α -(DLA)₁₀-GEM和10.0mg的PEG₄₀₀₀-b-PLA₂₂₀₀。^{d)}将制剂分散在25℃的MilliQ水中。

[0083] 不希望受理论的束缚,据信将 α -(LLA)_n作为前部分引入GEM中可以增强GEM在PEG-b-PLA胶束的PLA核中的相容性。然而,胶束内 α -(LLA)₆-GEM或 α -(LLA)₁₀-GEM的负载没有显示出改善的物理稳定性,分别在<24小时或<1小时内沉淀。相比之下,含有立体复合物 α -(L+DLA)₁₀-GEM的PEG-b-PLA胶束表现出优异的物理稳定性,粒径没有明显变化,并且>168小时没有药物沉淀。有趣的是,在PEG-b-PLA胶束中以5.4%和15.3%并入立体复合物 α -(L+DLA

)₁₀-GEM, 与其非复合对应物相比, 分别使流体动力学直径从30nm增大至约140nm和200nm。

[0084] 使用原子力显微镜 (AFM) 进一步研究了 α -(L+DLA)₁₀-GEM胶束的形态。图4A和4B显示了立体复合胶束的出乎意料的细长结构。与其他含有二嵌段共聚物的胶束相比, 该系统的显著差异是立体复合物 α -(L+DLA)₁₀-GEM前药被装载在PEG-b-PLA胶束的核心内, 而不是在共聚物核心嵌段之间直接立体复合。

[0085] 图5证明了 α -(LLA)₆-GEM和 α -(LLA)₁₀-GEM从PEG-b-PLA胶束的释放在体外相对较快, $t_{1/2}$ 分别是约0.8小时和约4小时。可能归因于GEM的亲水性, 导致药物在PEG-b-PLA胶束的疏水胶束核心中的分配减少, 因此药物释放更快。相比之下, 在5.4%和15.3%, 立体复合物 α -(L+DLA)₁₀-GEM从PEG-b-PLA胶束中逐渐释放, 在开始的3天中 $t_{1/2}$ 约60小时, 然后在随后的三周中释放速率慢得多(图5)。这些数据表明立体复合物 α -(L+DLA)₁₀-GEM被稳定地加载在PEG-b-PLA胶束中, 具有出乎意料的圆柱形形态, 证明了优异的物理稳定性和持续的药物释放。

[0086] 在乙腈和磷酸盐缓冲盐水的混合物(1:1v/v CH₃CN/PBS)中, α -(LA)_n的倒数第二个酯键上的末端羟基的分子内尾咬反应驱动了低聚乳酸缀合物的降解, 在逐步的末端切割中切割了乳酰乳酸酯。由于PLA立体复合物的强相互作用, 预计 α -(L+DLA)₁₀-GEM的尾咬动力学较慢, 然而, 发现 α -(L+DLA)₁₀-GEM的转化($\lambda_{max}=300nm$)在1:1v/v CH₃CN/PBS中具有相似的尾咬动力学, $t_{1/2}$ 为约6.6小时而 α -(LA)₈-PTX的为约7.3小时(图6A), 参见Tam, Y.T. et al., J. Am. Chem. Soc., 2016, 138:8674-8677)。比较而言, α -(L+DLA)₁₀-GEM在PEG-b-PLA胶束中的降解明显慢, $t_{1/2}$ 约630小时(图6B)。 α -(L+DLA)₁₀-GEM在PEG-b-PLA胶束中的优良的稳定性可以归因于在PEG-b-PLA胶束的PLA核心中 α -(LLA)₁₀和 α -(DLA)₁₀前体部分之间的稳定的立体复合作用, 其可能抑制了尾咬。然而, 当将 α -(L+DLA)₁₀-GEM溶解在CH₃CN/PBS混合物中时, 由于 α -(L+DLA)₁₀-GEM的完全溶解而没有形成立体复合物, 因此进行了尾咬转化。

[0087] GEM易受血浆中胞嘧啶脱氨酶等代谢酶的去氨作用, 使其失去药理活性。不希望受理论的束缚, 据信在GEM的4-(N)位引入前体部分的附接将使脱氨位点模糊, 并因此改善GEM的代谢稳定性。因此, 在大鼠血浆中研究了 α -(L+DLA)₁₀-GEM在PEG-b-PLA胶束中的代谢稳定性和将 α -(L+DLA)₁₀-GEM与GEM相比。图7A证明GEM在血浆中不稳定, 在37°C的血浆中孵育24小时后, 检测不到完整GEM的50%。出人意料的是, 血浆中 α -(L+DLA)₁₀-GEM的降解非常迅速, 生成了降解种类的随机分布和在第一采样时间点期间约20%的GEM, 表明除了尾咬之外还有易脆的酰胺键和酯酶的贡献(图7B)。当将 α -(L+DLA)₁₀-GEM加载到PEG-b-PLA胶束中时, α -(L+DLA)₁₀-GEM通过立体复合获得了额外的稳定性, 在24小时内缓慢生成GEM作为血浆中唯一的主要降解物质(图7C)。值得注意的是, 在整个研究过程中均未产生降解中间体, 这表明PEG-b-PLA胶束中 α -(L+DLA)₁₀-GEM的稳定的立体复合可能阻止了 α -(LLA)_n和 α -(DLA)_n的酯酶降解。

[0088] 实施例4: 立体复合的 α -(L+DLA)_n-GEM胶束的体外和体内抗癌活性

[0089] 通过体外细胞生存力测定评估 α -(L+DLA)₁₀-GEM胶束的生物活性, 以测试相对于GEM的半数最大抑制浓度(IC₅₀)。由于GEM用作非小细胞肺癌(NSCLC)和胰腺癌的一线治疗, 因此使用CellTiter-Blue测定研究了人A549 NSCLC细胞系和PANC-1胰腺癌细胞系。GEM对A549(图8A)和PANC-1(图8B)细胞具有相对低的IC₅₀值, 分别为约1.1 μ M和约9.2 μ M。比较而言, 温育72小时后, α -(L+DLA)₁₀-GEM胶束在A549(图8A)和PANC-1(图8B)细胞中的细胞毒性比GEM小, IC₅₀值分别约12.7 μ M和约97.9 μ M。体外细胞毒性数据提供了 α -(L+DLA)₁₀-GEM立体复合物在PEG-b-PLA胶束中的高度稳定性以及前药从胶束中释放显著缓慢(其导致降低的细胞毒

性)的进一步支持证据。

[0090] 为了验证 α (L+DLA)₁₀-GEM胶束在体内的抗肿瘤功效,将具有A549异种皮下移植物的老鼠通过每周3次静脉注射以生理盐水、GEM或 α (L+DLA)₁₀-GEM胶束(相当于10mg/kg的GEM)进行处理。值得注意的是,与GEM或盐水对照相比,施用 α (L+DLA)₁₀-GEM胶束显示出显著的肿瘤生长抑制作用(图9A)。有趣的是,用GEM治疗的老鼠中的肿瘤以比盐水对照更快的速率生长,表明GEM是无效的(图9A)。在第一剂量的 α (L+DLA)₁₀-GEM胶束后记录到体重略有下降,但是在所有治疗组之间均未观察到显著差异(图9B)。以10mg/kg的GEM递送通常对老鼠的皮下肿瘤无效。通常,由于其代谢不稳定性,需要100mg/kg的GEM抑制带有皮下肿瘤的老鼠的肿瘤生长。报告的老鼠中角鲨烯基GEM纳米组件的最大耐受剂量(MTD)(20mg/kg)比GEM(100mg/kg)低5倍。这些发现支持了这项研究的体内功效结果。尽管使用了相对较低剂量的GEM(10mg/kg),但 α (L+DLA)₁₀-GEM胶束在体内显示出强大的抗肿瘤作用,表明PEG-b-PLA胶束中稳定的 α (L+DLA)₁₀-GEM立体复合物可以有效地将GEM传递到肿瘤部位以进行药物作用。

[0091] 等效物

[0092] 尽管已经说明和描述了某些实施例,但是本领域普通技术人员在阅读上述说明书后,可以对本文所列的本技术的缀合物和胶束或其衍生物、前药或药物组合物进行改变、等同物的替代和其它类型的改变。上述每个方面和实施例也可以已经包括或并入其中,例如关于任何或所有其它方面和实施例所公开的变化或方面。

[0093] 本发明技术也不限于本文描述的特定方面,其旨在作为本发明技术的个别方面的单个说明。可以在不脱离本发明技术的精神和范围的情况下对本发明技术进行多种修改和变化,这对本领域技术人员而言将是显而易见的。除了本文中列举的方法以外,所属领域的技术人员从上述描述还将显而易见在本发明技术范围内的功能上等效的方法。此类修改和变化旨在落入所附权利要求的范围内。应该理解,本技术不限于特定的方法、缀合物、试剂、化合物、组合物、标记的化合物或生物系统,它们当然可以变化。还应理解,本文所使用的术语仅出于描述特定方面的目的,并且并不旨在为限制性的。因此,希望本说明书仅被视为示范性的,其中本发明技术的广度、范围和精神仅由所附权利要求书、其中的定义和其任何等效物指示。

[0094] 本文中说明性描述的实施例可以适当地在缺少本文中未具体公开的任何一个或多个要素、一个或多个限制的情况下实践。因此,例如,应广泛地而非限制性地阅读术语“包含(comprising)”、“包括(including)”、“含有(containing)”等。另外,本文所用术语和表达已被用作描述而非限制性的术语,并且无意使用这种术语和表达来排除所示和所述特征的任何等效物或其部分,但应认识到,在所要求保护的技术的范围内可以进行各种修改。另外,短语“主要由...组成”将理解为包括那些特定列举的元素和那些并未显著影响所要求的技术的基本和新颖特征的另外的元素。短语“由...组成”不包括任何未指定的元素。

[0095] 此外,在根据马库什(Markush)基团描述本公开的特征或方面的情况下,本领域技术人员将认识到本公开也根据马库什基团的任何单个成员或成员子组进行描述。属于通用公开内容的较狭义类型和亚属组中的每一个也形成本发明的一部分。这包括本发明的通用说明,其限制条件或负面限制从所述属中移除任何标的物,无论所删除的材料是否在本文中特定叙述。

[0096] 如本领域技术人员将理解的,对于任何和所有目的,特别是就提供书面描述而言,

本文公开的所有范围还包括任何和所有可能的子范围及其子范围的组合。任何所列范围都可以容易地识别为充分描述并使得能够将相同范围拆分为至少相等的两份、三份、四份、五份、十份等。作为非限制性实例,本文所讨论的每个范围可以容易地被拆分为下三分之一、中三分之一和上三分之一等。如所属领域的技术人员还将理解,例如“最多”、“至少”、“大于”、“小于”等的所有语言都包括所叙述的数值并且指随后可以拆分为如上文所讨论的子范围的范围。最后,所属领域的技术人员应理解,范围包括每一个别成员。

[0097] 本说明书中引用的所有出版物、专利申请、已授权的专利和其它文件(例如期刊、文章和/或教科书)均通过引用并入本文,就好像每个单独的出版物、专利申请、已授权的专利或其它文件都被具体地和单独地指示通过引用整体并入。在与本公开中的定义相抵触的程度上,排除通过引用并入的文本中含有的定义。

[0098] 在以下权利要求中阐述了其它实施方案,以及此类权利要求所赋予的等效物的全部范围。

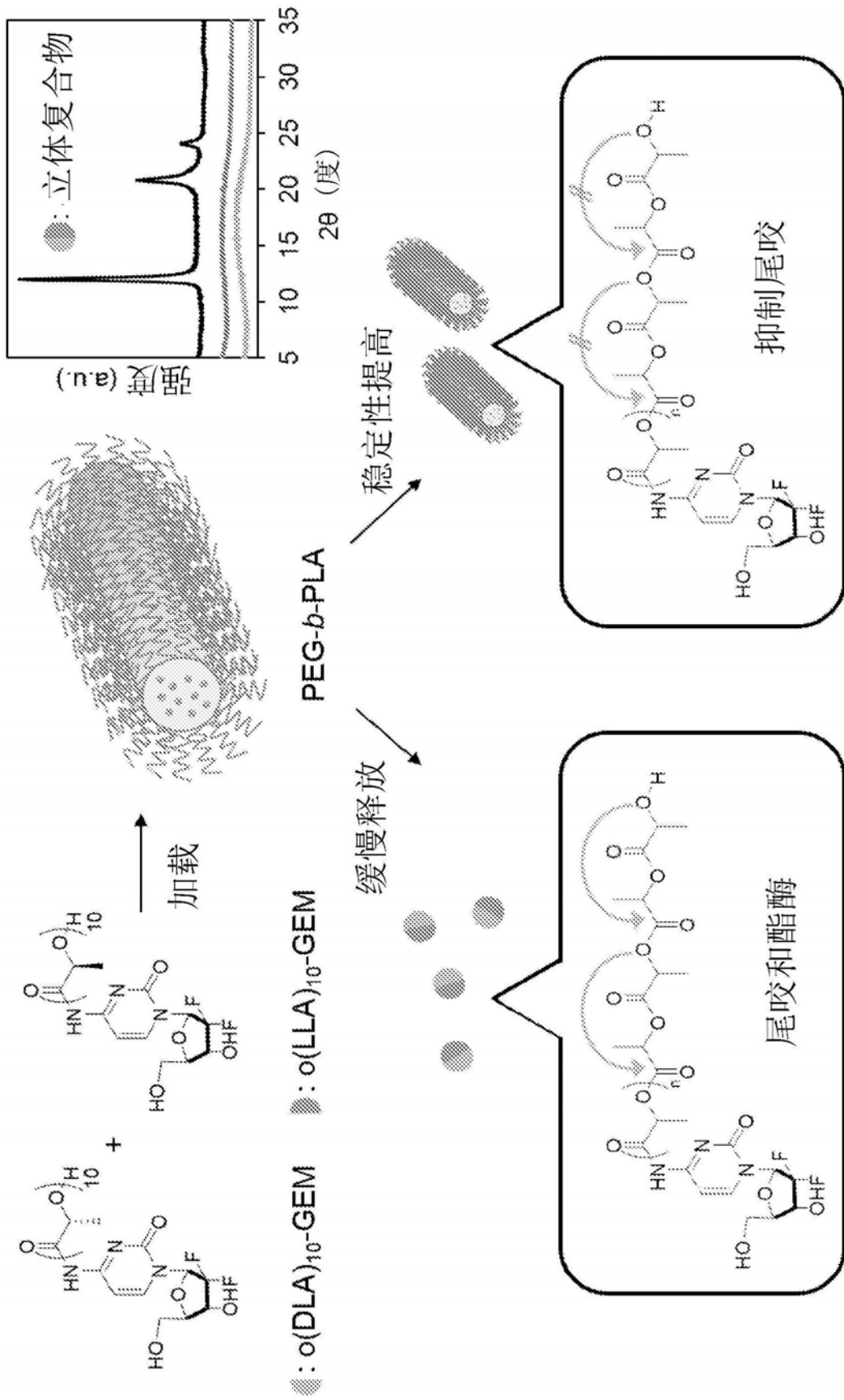


图1

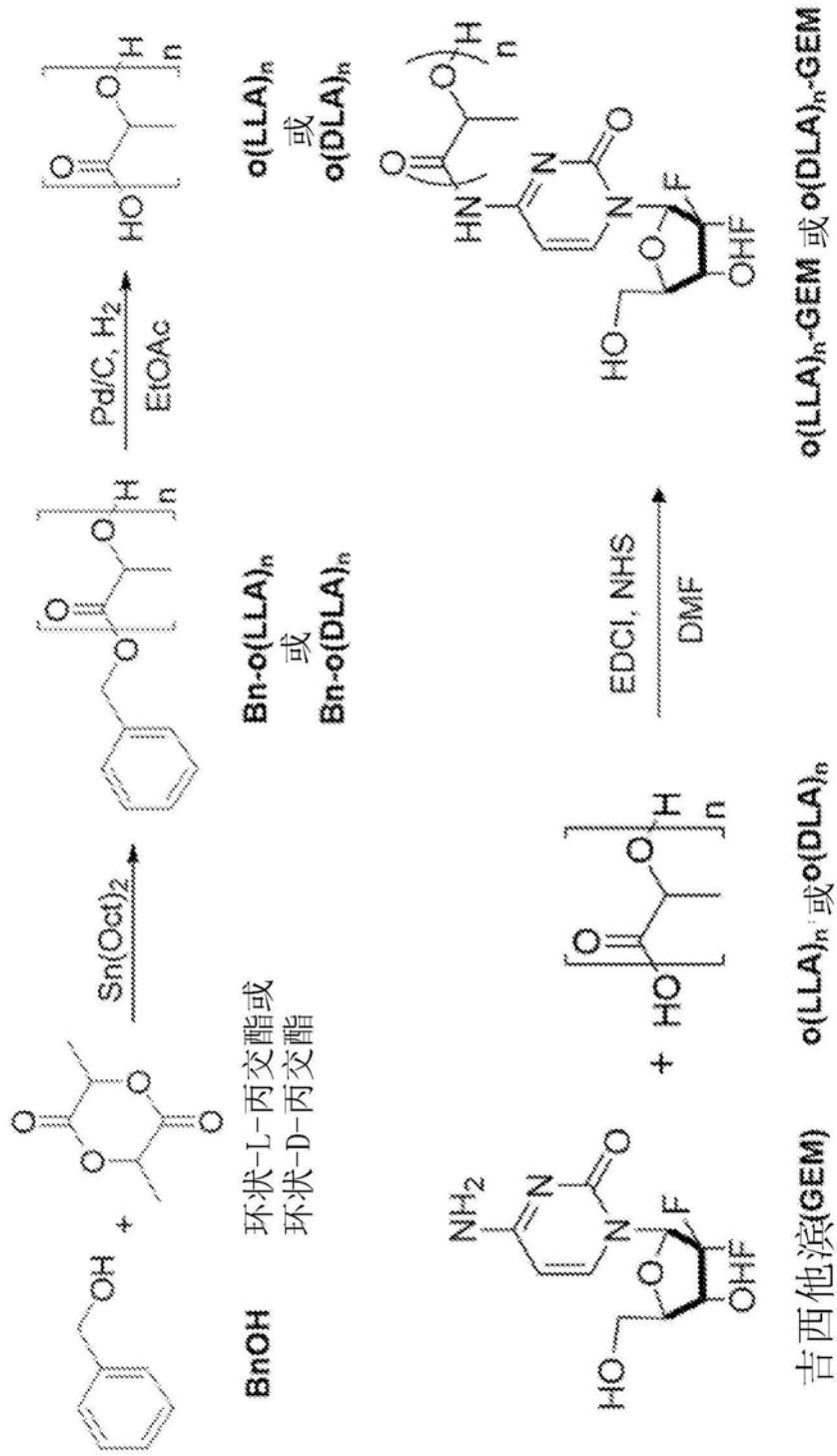


图2

粉末XRD图谱

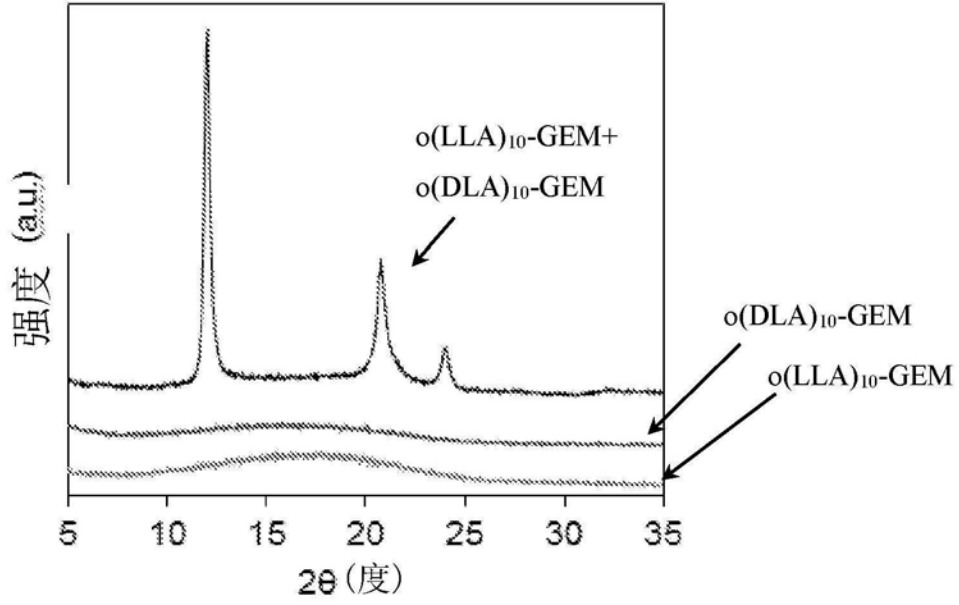


图3A

DSC 热图

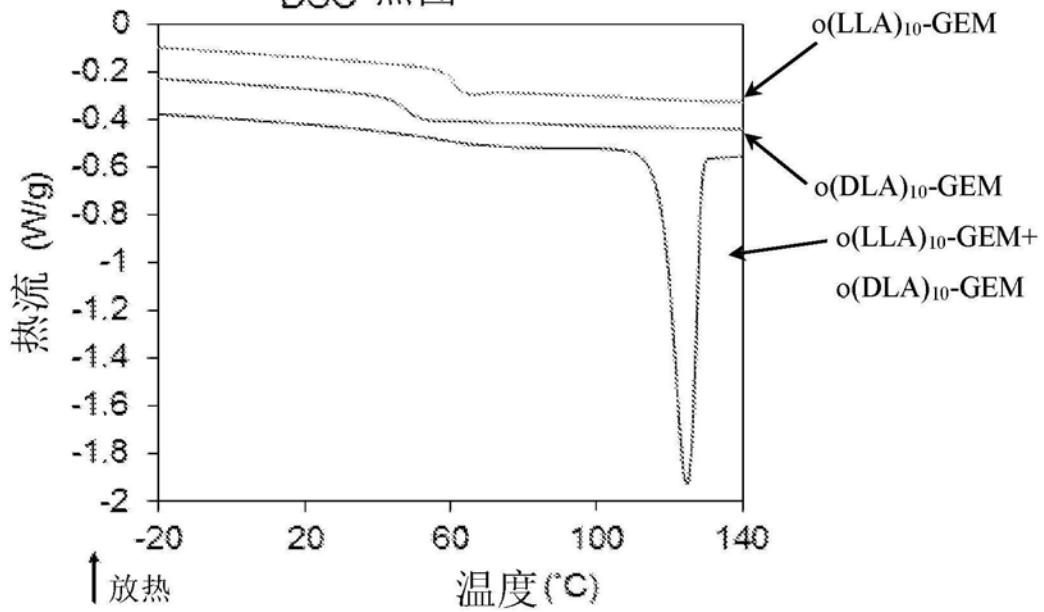


图3B

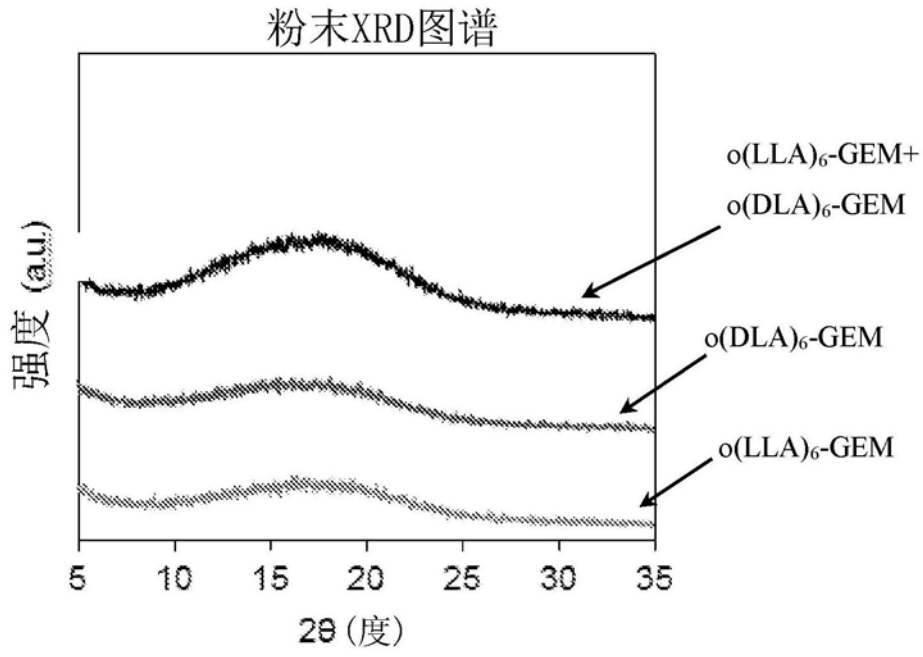


图3C

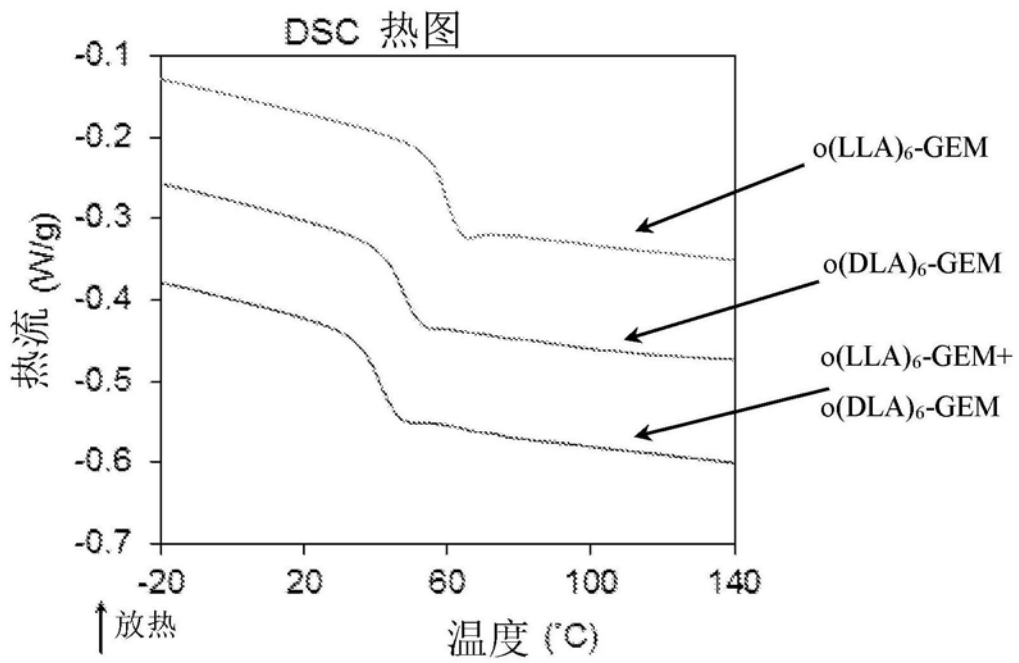


图3D

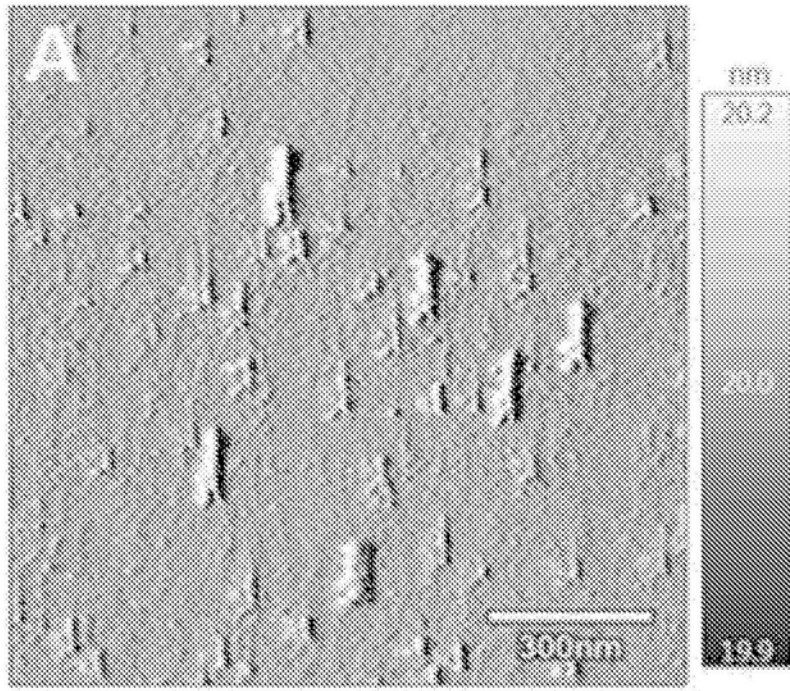


图4A

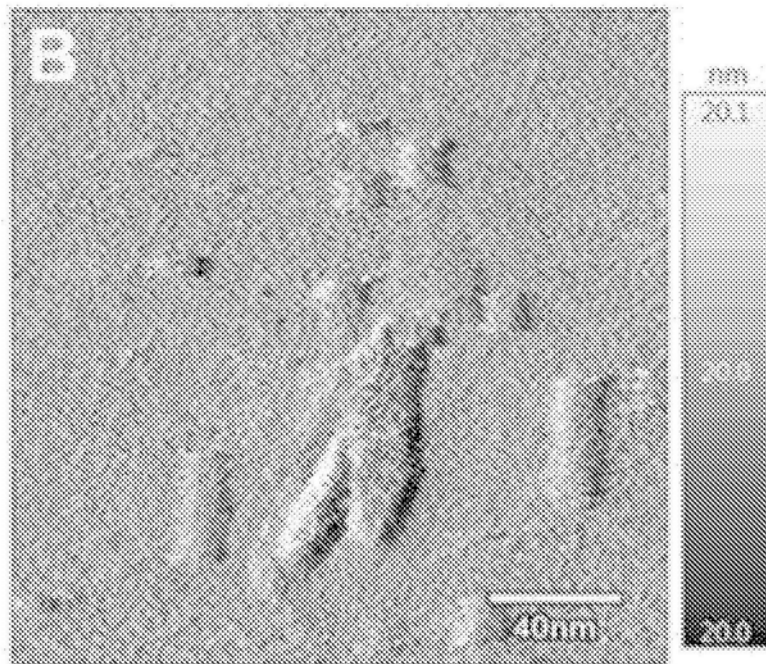


图4B

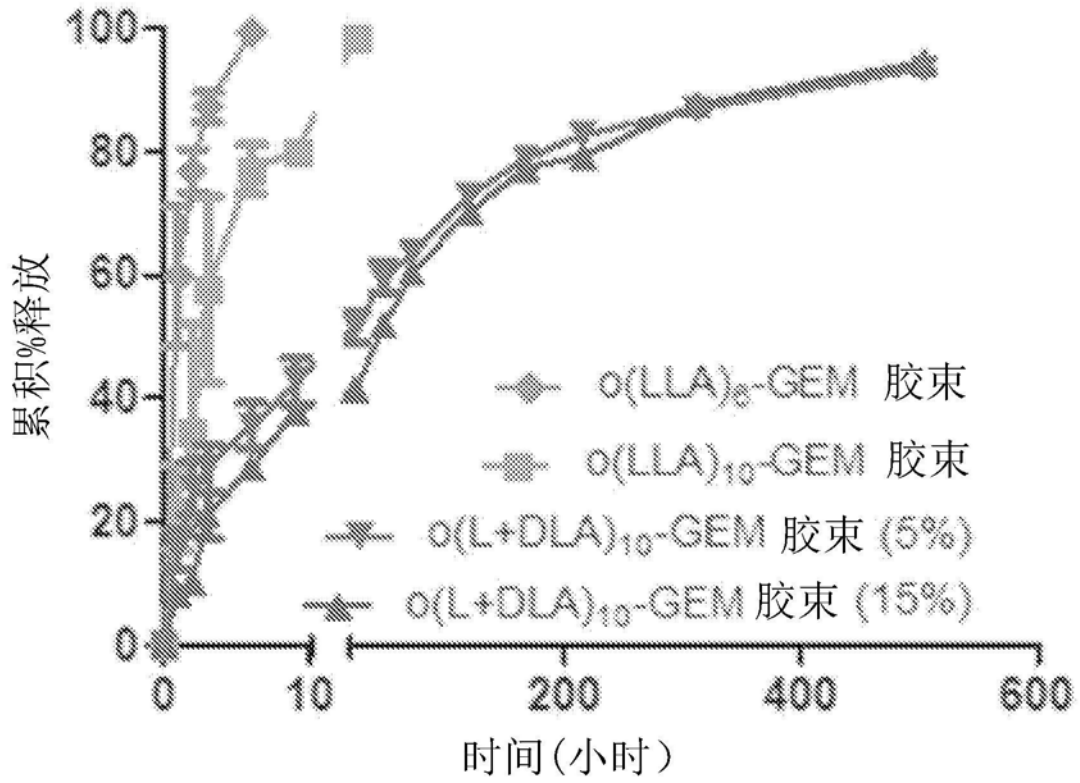


图5

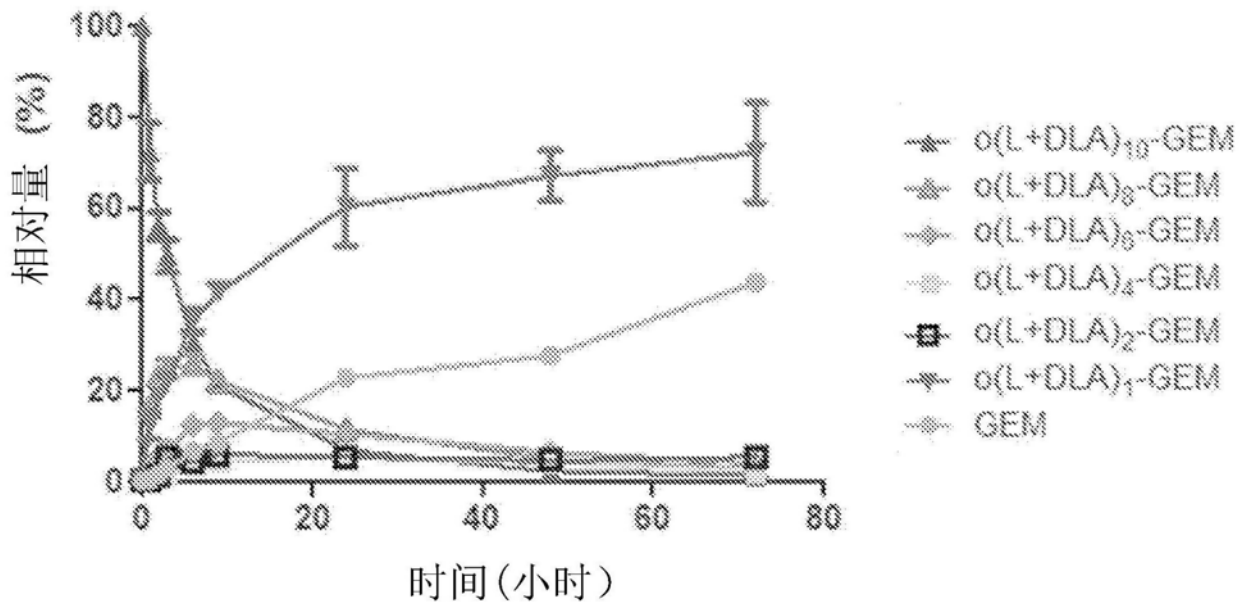


图6A

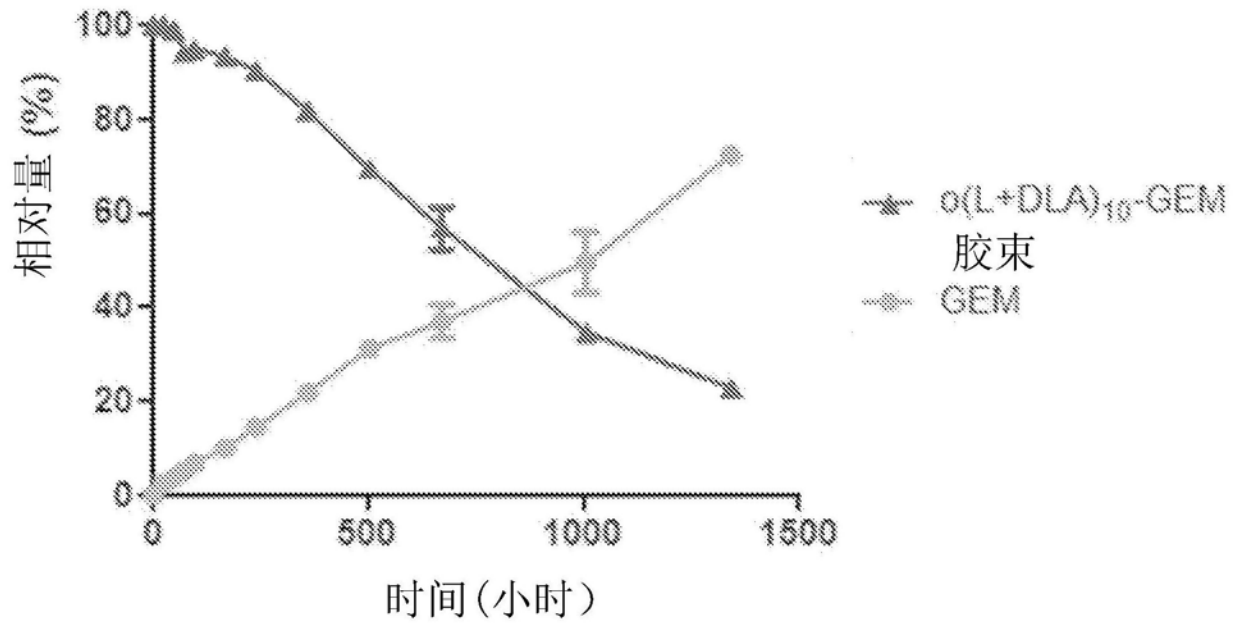


图6B

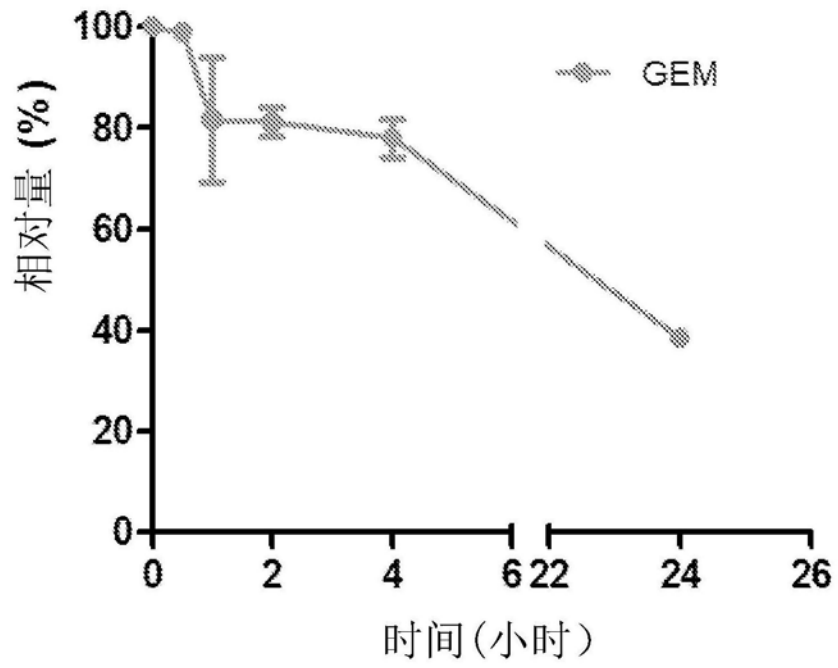


图7A

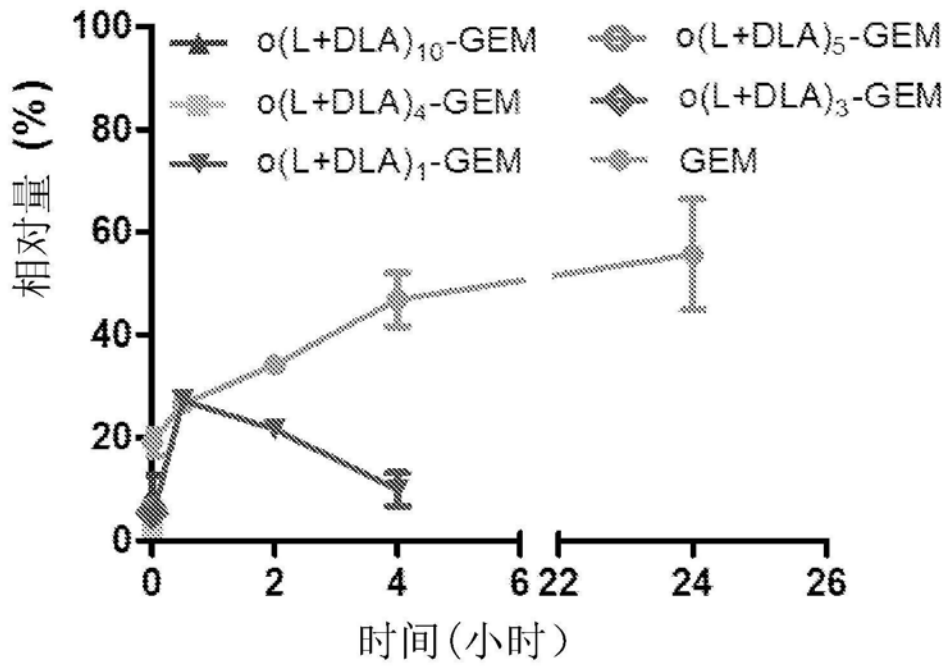


图7B

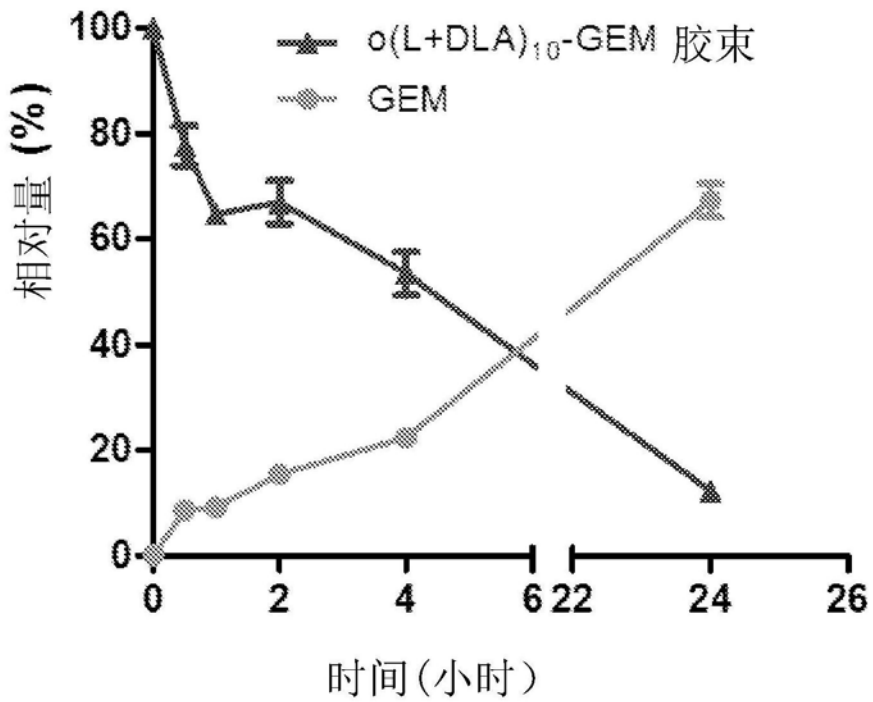


图7C

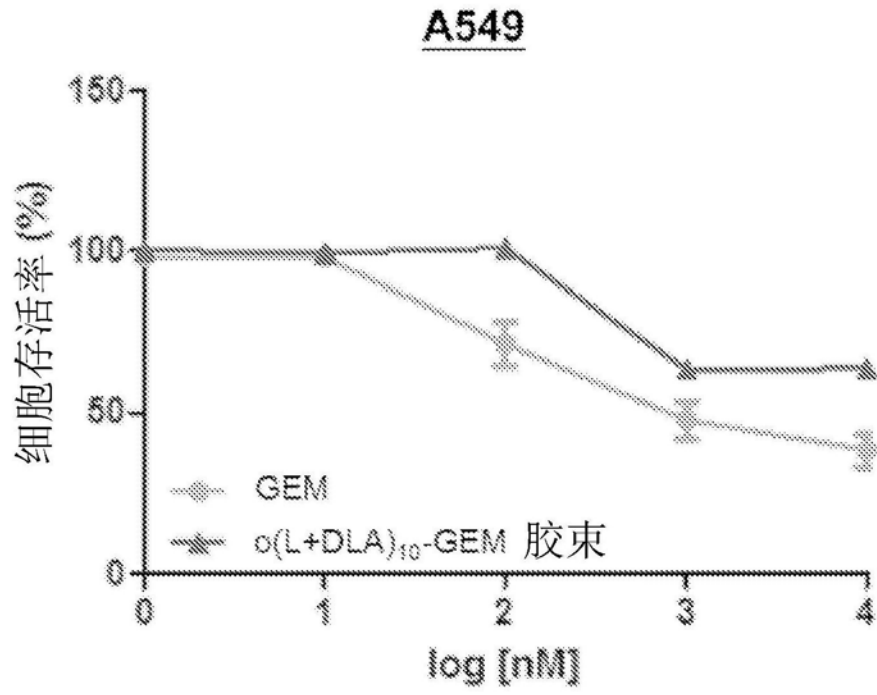


图8A

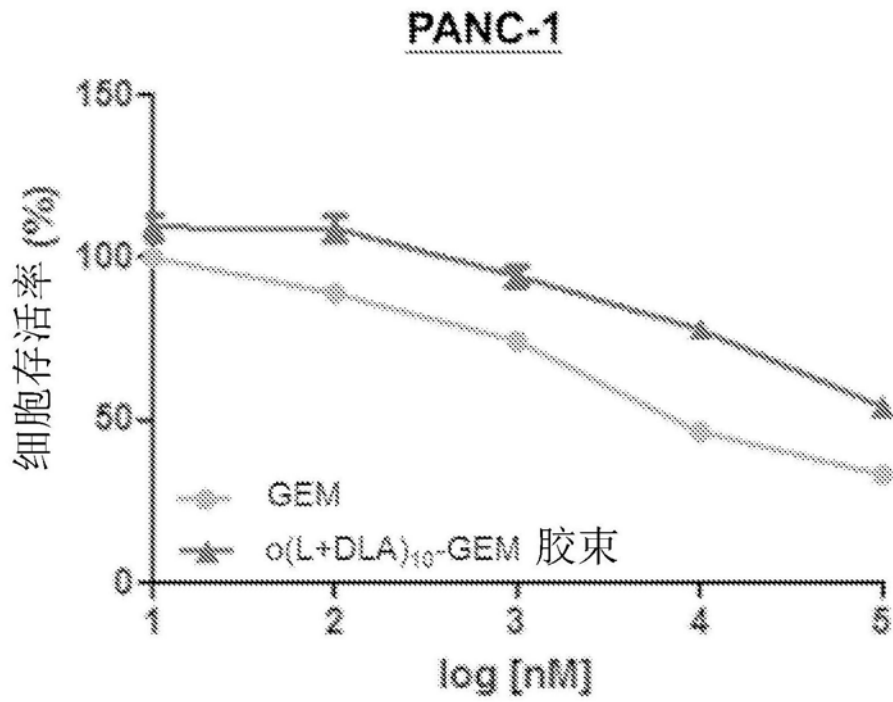


图8B

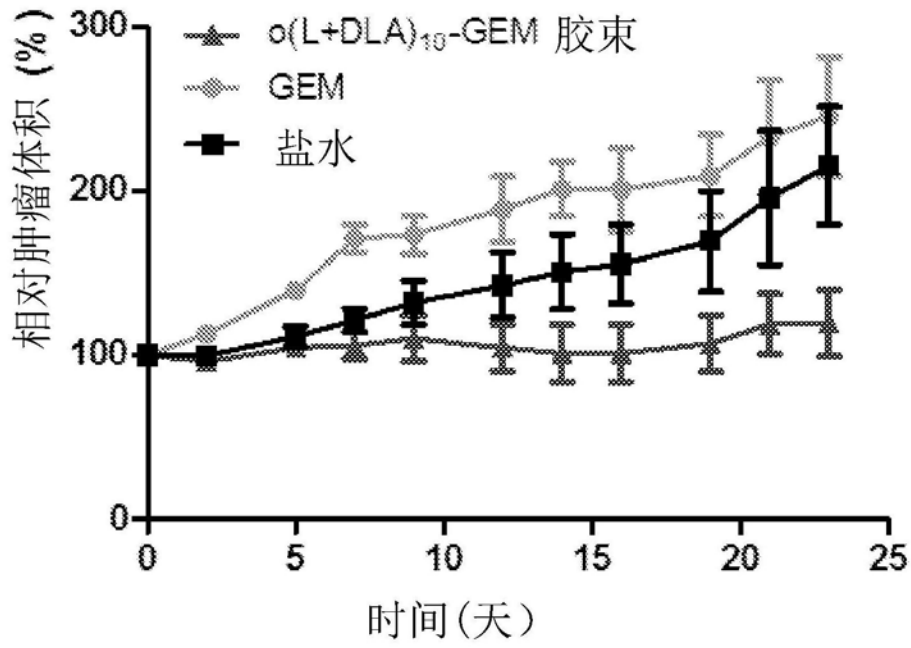


图9A

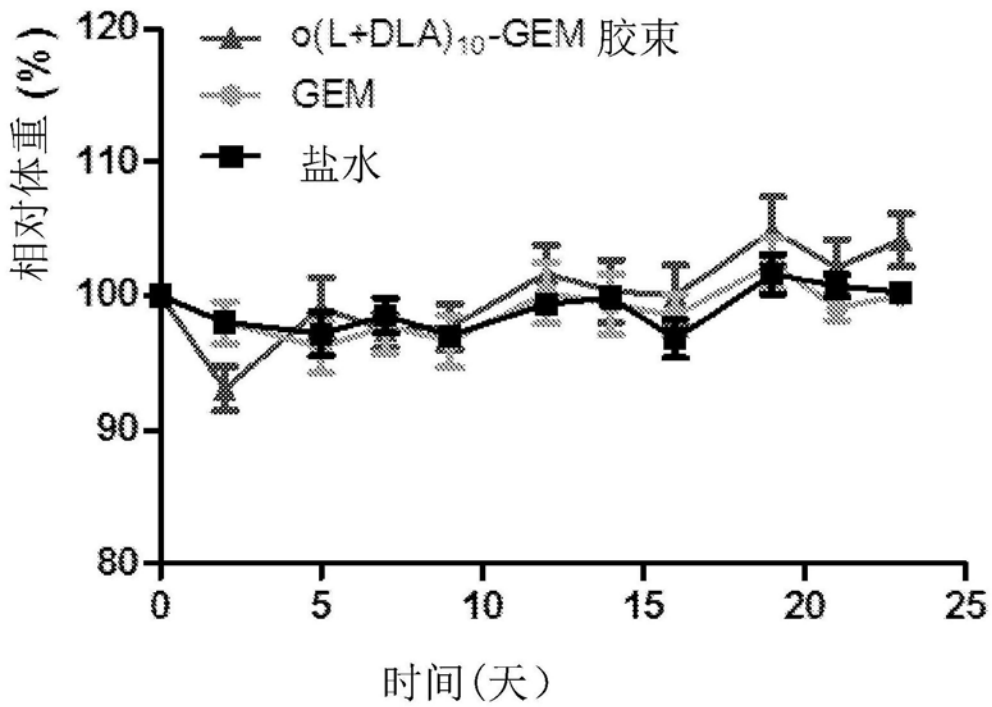


图9B