

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2020 年 9 月 3 日 (03.09.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/173475 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 9/107 (2006.01) *A61K 47/32* (2006.01)
A61K 31/55 (2006.01) *A61K 47/34* (2017.01)
A61K 31/704 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 47/10 (2006.01) *A61P 35/02* (2006.01)
A61K 47/24 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/076891

(22) 国际申请日: 2020 年 2 月 27 日 (27.02.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201910146784.1 2019年2月27日 (27.02.2019) CN

(71) 申请人: 中国医学科学院基础医学研究所
(INSTITUTE OF BASIC MEDICAL SCIENCES CHINESE ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES) [CN/CN]; 中国北京市东城区东单三条5号, Beijing 100005 (CN)。

(72) 发明人: 许海燕(XU, Haiyan); 中国北京市东城区东单三条5号, Beijing 100005 (CN)。 闫豆豆(YAN, Doudou); 中国北京市东城区东单三条5号, Beijing 100005 (CN)。 孟洁(MENG, Jie); 中国北京市东城区东单三条5号, Beijing 100005 (CN)。 刘健(LIU, Jian); 中国北京市东城区东单三条5号, Beijing 100005 (CN)。 温涛(WEN, Tao); 中国北京市东城区东单三条5号, Beijing 100005 (CN)。 葛洋洋(GE, Yangyang); 中国北京市东城区东单三条5号, Beijing 100005 (CN)。

(74) 代理人: 北京尚诚知识产权代理有限公司(SHANGCHENG & PARTNERS); 中国北京市平安里西大街28号光大国际中心18层1801, Beijing 100034 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,

GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

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

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

(54) Title: DUAL-DRUG CO-DELIVERY SYSTEM, PREPARATION METHOD THEREFOR AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 一种双药物共递送系统及其制备方法与应用

(57) Abstract: A dual-drug co-delivery system, a preparation method therefor and an application thereof, the dual-drug co-delivery system being prepared from raw materials comprising a block copolymer, homoharringtonine and doxorubicin hydrochloride; the co-delivery system has a stronger killing effect on various blood tumors and solid tumor cells, can provide a feasible drug delivery system for inhibiting tumor growth and leukemia treatment, and has broad prospects.

(57) 摘要: 一种双药物共递送系统及其制备方法与应用, 由包括嵌段共聚物、高三尖杉酯碱和阿霉素盐酸盐的原料制得, 该共递送系统对多种血液肿瘤和实体肿瘤细胞都具有更强的杀伤作用, 可为抑制肿瘤生长和白血病治疗提供可行的药物递送系统, 前景广阔。



WO 2020/173475 A1

一种双药物共递送系统及其制备方法与应用

技术领域

本发明涉及医药技术领域，特别涉及一种双药物共递送系统、其制备方法及在制备抗肿瘤药物方面的应用。

背景技术

化疗是利用化学药物阻止癌细胞的增殖、浸润、转移，直至最终杀灭癌细胞的治疗方式，是大部分实体肿瘤和血液系统肿瘤的主要治疗方式。化疗过程中使用的化学药物称为化疗药物。由于化疗药物耐药性的出现和剂量依赖性的毒副作用，单一用药已无法满足临床需求，于是使用多种化疗药物联用来解决此问题。多种化疗药物的联合使用虽然能够降低单一用药导致的毒副作用和产生耐药的可能性，但存在给药次数多、剂量分配方案不容易确定等问题。

化疗药物共递送系统是解决上述问题的有效方法，该共递送系统是将两种或以上化疗药物包裹在一个载体中，利用药物间协同作用增强其对肿瘤细胞的杀伤效果。与单一用药和联合用药相比，药物共递送系统的优势在于：1) 两种或多种化疗药物发挥协同作用，在较小的剂量下产生更强的抗肿瘤效应，降低毒副作用，避免耐药性的产生；2) 可控制药物释放的时间和空间，以协调不同药物的药物代谢动力学和药效学；3) 减少给药次数，改善病人依从性；4) 单一给药剂量，避免多种药物给药时剂量分配的不确定性。

药物共递送系统主要使用脂质体、聚合物胶束、固体脂质纳米粒、以及无机纳米材料如介孔硅纳米粒、金纳米粒、磁性纳米粒、碳纳米管等作为药物共递送载体。递送的药物可有多种类型，如递送两种作用于不同靶标的小分子化疗药物，以达到最大的肿瘤细胞杀伤效应，降低产生药物耐受的可能性；又如共递送化疗药物和 siRNA，利用 RNA 干扰技术沉默耐药基因，干扰细胞信号通路，从而克服耐药；再如共递送化疗药物和成像剂，实现靶向药物递送和非侵袭性的肿瘤成像。

现有的药物共递送系统的研究多集中于实体肿瘤的化疗治疗，包括乳腺癌、肝癌、宫颈癌、前列腺癌、肺癌、脑瘤、头颈部鳞状细胞癌、胰腺癌、胃癌、黑色素瘤、卵巢癌等。由于血液肿瘤种类很多，且每一个种类中的亚型十分复杂，对治疗其的药物种类也有很多限制，使得治疗血液肿瘤的药物不如治疗实体肿瘤的药物多，因此迄今适用于血液肿瘤，如白血病、淋巴瘤、骨髓异常增生综合症等的药物共递送系统很少，在化疗中面临更大的挑战。除少量基础研究外，目前可用于制备治疗血液肿瘤的药物共递送系统的药物仅有阿糖胞苷和柔红霉素，由其形成药物共递送系统为脂质体共递

送系统 (CPX-351), 已于 2014 年 11 月进入三期临床试验。试验显示 CPX-351 对初治或复发的急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 老年患者有效, 可以作为缓解诱导疗法用于标准诱导疗法无效的患者, 或者作为巩固疗法用于已接受了干细胞移植或未进行过干细胞移植的患者。然而, 上述脂质体共递送系统的制备工艺复杂, 不仅需要使用多种脂质材料, 而且需要在葡萄糖酸铜/三乙胺缓冲体系中制备, 以使药物阿糖胞苷和柔红霉素与缓冲体系 (含有有机溶剂) 中的铜离子按照一定的摩尔比形成复合物, 从而保证药物在脂质体中的滞留时间。该脂质体共递送系统涉及有机溶剂的使用, 因而存在毒副作用风险高的问题。

因此, 本领域急需开发出适用于血液肿瘤, 尤其是复发性、难治性白血病的新型药物共递送系统。

发明内容

本发明的目的是针对现有技术中存在的技术缺陷, 第一方面, 提供一种具有强抗肿瘤作用、低毒副作用、且可用于复发性、难治性白血病的双药物共递送系统, 该双药物共递送系统由包括嵌段共聚物、高三尖杉酯碱和阿霉素盐酸盐的原料制得; 所述嵌段共聚物选自聚乙烯己内酰胺-聚醋酸乙烯酯-聚乙二醇 (Soluplus)、甲氧基聚乙二醇-聚己内酯 (mPEG-PCL)、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000 (DSPE-PEG₂₀₀₀)、聚氧乙烯聚氧丙烯醚嵌段共聚物、聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA) 中的一种或几种, 优选 Soluplus。

其中, 高三尖杉酯碱、阿霉素盐酸盐、嵌段共聚物按重量份数比为 (1-10): (1-40): (4-200); 优选 (1-5): (3-15): (45-200)。

所述系统的平均水合直径为 20-200 nm, 优选 60-180 nm。

所述嵌段共聚物 Soluplus 中聚乙烯己内酰胺、聚醋酸乙烯酯和聚乙二醇的分子量比为 57:30:13。

第二方面, 本发明提供一种制备上述双药物共递送系统的方法, 包括制备载有高三尖杉酯碱的胶束和加载阿霉素。

优选的, 所述载有高三尖杉酯碱的胶束是由高三尖杉酯碱、嵌段共聚物和磷酸盐缓冲液混合搅拌得到的。具体制备过程包括以下步骤:

- 1) 将嵌段共聚物和高三尖杉酯碱加入磷酸盐缓冲液中, 加热搅拌得到液体 B;
- 2) 过滤步骤 1) 得到的液体 B, 滤液即为载有高三尖杉酯碱的胶束, 称胶束 C。

所述加载阿霉素是将所述载有高三尖杉酯碱的胶束与含有嵌段共聚物的磷酸盐缓冲液混合, 再加入阿霉素盐酸盐水溶液搅拌。具体包括以下步骤:

- (1) 将嵌段共聚物溶于磷酸盐缓冲液中, 得到澄清溶液 D;

(2) 将步骤(1)得到的澄清溶液D与载有高三尖杉酯碱的胶束(胶束C)混合,加热搅拌下滴加阿霉素盐酸盐水溶液(优选的,阿霉素盐酸盐水溶液中阿霉素盐酸盐的浓度为3-8 mg/mL),得到液体E;

(3) 将步骤(2)得到的液体E过滤,滤液即为所述双药物共递送系统。

所述加热均为加热至25-70℃。

所述搅拌的速度均为100-1000 r/min。

第三方面,本发明提供上述双药物共递送系统在制备抑制肿瘤生长相关疾病药物或治疗白血病药物中的应用。

所述肿瘤生长相关疾病为高三尖杉酯碱和蒽环类抗生素联合应用有效的肿瘤,包括但不限于急性髓系白血病、慢性髓系白血病、宫颈癌等。

所述急性髓系白血病为复发性、难治性的AML1-ETO急性髓系白血病。

本发明提供的双药物共递送系统中作为载体的嵌段共聚物为两亲性的高分子聚合物,在溶液中可形成亲水性壳-疏水性核结构:两亲性的嵌段共聚物在磷酸盐缓冲液中形成胶束,通过两步组装方法,先后将两种药物高三尖杉酯碱(疏水性)和阿霉素盐酸盐(亲水性)组装进胶束疏水核中,形成双药物共递送系统可实现联合给药。本发明的双药物共递送系统还可通过调整胶束中两种药物的比例从而对肿瘤发挥有差别的治疗作用。本发明的双药物共递送系统对多种血液肿瘤和实体肿瘤细胞都具有更强的杀伤作用,肿瘤细胞包括急性髓系白血病细胞、慢性髓系白血病细胞、宫颈癌细胞、乳腺癌细胞。该系统还可用于治疗复发性、难治性的AML1-ETO急性髓系白血病的药物,效果优异;特别是:在白血病细胞实验中,与联合使用阿霉素和高三尖杉酯碱相比,本发明的双药物共递送系统能更有效地抑制髓系白血病细胞的增殖;在动物实验中,对急性髓系白血病AML1-ETO小鼠具有更好的治疗效果,在延长小鼠生存期的同时还能降低毒副作用。本发明的双药物共递送系统可用于抑制肿瘤生长和白血病的治疗中。

本发明双药物共递送系统在制备过程中不使用任何有机溶剂,安全性高,满足临床用药要求;制备工艺简单,适于工业化生产。

附图说明

图1所示为本发明的双药物共递送系统在磷酸盐缓冲液中的粒径分布曲线图;

图2所示为本发明的双药物共递送系统的磷酸盐缓冲液的照片;

图3所示为本发明的双药物共递送系统(DOX和HHT的重量比为8:1)对HL60/A细胞活力影响的柱状图;

图4所示为本发明的双药物共递送系统(DOX和HHT的重量比为8:1)对U937R细胞活力影响的曲线图;

图 5 所示为本发明的双药物共递送系统 (DOX 和 HHT 的重量比为 15:1) 对 K562 细胞活力影响的曲线图;

图 6 所示为本发明的双药物共递送系统 (DOX 和 HHT 的重量比为 6:1) 对 HeLa 细胞活力影响的曲线图;

图 7 所示为本发明的双药物共递送系统 (DOX 和 HHT 的重量比为 4:1) 对 MCF7 细胞活力影响的曲线图;

图 8 所示为本发明的双药物共递送系统 (DOX 和 HHT 的重量比为 9:1) 延长白血病小鼠生存期的曲线图;

图 9 所示为本发明的双药物共递送系统 (DOX 和 HHT 的重量比为 9:1) 降低小鼠体内白血病细胞数量的柱状图;

图 10-图 11 所示为本发明的双药物共递送系统 (DOX 和 HHT 的重量比为 9:1) 降低毒副作用的柱状图。

具体实施方式

高三尖杉酯碱 (HHT) 是从三尖杉属植物中提取出的一种生物活性成分, 能抑制白血病细胞的增殖, 诱导细胞凋亡。阿霉素盐酸盐是一种广谱抗肿瘤药, 通过破坏 DNA 结构表现出抗肿瘤效应。高三尖杉酯碱和阿霉素 (DOX) 盐酸盐分别为疏水和亲水性药物, 在临床上可用于急性髓系白血病的联合治疗。但是, 两种药物在急性髓系白血病治疗中分别给药, 会导致患者依从性差; 此外, 由于药代动力学不同, 两种药物在体内的浓度无法保持设定的比例。

在这两种药物的共递送系统方面, 目前仅有一种脂质体共递送系统的文献报道 (Shim G, Lee S, Choi J, et al. Liposomal Co-Delivery of Omacetaxine Mepesuccinate and Doxorubicin for Synergistic Potentiation of Antitumor Activity. *Pharmaceutical Research*, 2014, 31(8):2178-2185.), 该递送系统使用脂质体作为载体, 粒径为 126 nm, 在小鼠皮下移植宫颈癌细胞 (HeLa 细胞) 的模型中具有抑制肿瘤生长的作用。该脂质体共递送系统制备过程复杂, 需要使用多种脂质材料, 并加入有机溶剂甲醇使高三尖杉酯碱首先被包裹到脂质体中, 然后通过静电作用进一步包裹阿霉素盐酸盐。该脂质体共递送系统中存在有机溶剂甲醇会带来毒副作用, 除此之外, 该脂质体共递送系统是针对抑制实体肿瘤 HeLa 细胞生长进行设计的, 脂质体比较稳定, 通常利用实体瘤的高通透性和滞留效应在肿瘤组织中蓄积和释放药物, 而不能有效杀伤循环血液中的白血病细胞。而且, 该脂质体共递送系统如果在骨髓中累积, 难以减轻药物本身对骨髓细胞生长的抑制作用, 而急性髓系白血病的治疗需要骨髓细胞的参与, 因而该脂质体共递送系统不适用于在急性髓系白血病治疗中应用。

聚合物胶束是一类受到广泛关注的共递送药物载体，因其一般尺寸在几十纳米，所以也将其称为纳米胶束，是由两亲性聚合物在合适的浓度和温度下于溶剂体系中自发形成，通过亲-疏水作用，将药物包裹在胶束的疏水核中，因此通常作为两种疏水药物的共递送药物载体；其优势是不影响药物本身的活性，显著地对疏水药物进行增溶，制备方法简单，不需要使用有机溶剂。但是，常规设计的聚合物胶束对于亲水性药物则难以应用，特别是难以将疏水和亲水性药物同时负载到胶束的疏水核中。

由于阿霉素盐酸盐是水溶性的，而高三尖杉酯碱是疏水性的，因此，按通常理解难以采用聚合物胶束作为上述双药的共递送药物载体，把两种亲疏水性质不同的药物包裹到胶束的疏水核中。本发明通过使用筛选出的独特高分子作为载体，在不使用有机溶剂的前提下将亲疏水性质不同的两种药物包裹到聚合物胶束中，利用聚合物胶束形成共递送系统。

本发明的双药物共递送系统选用两亲性的嵌段共聚物作为载体，其在水溶液中可形成亲水性壳-疏水性核结构的胶束；通过疏水作用先将高三尖杉酯碱包裹在胶束的疏水核中，再将阿霉素盐酸盐组装进胶束的疏水核中，形成本发明的双药物共递送系统，即用两亲性嵌段共聚物将阿霉素盐酸盐和高三尖杉酯碱共递送。

本发明的双药物共递送系统中选用的嵌段共聚物选自聚乙烯己内酰胺-聚醋酸乙烯酯-聚乙二醇（例如商品名为 Soluplus 的商品）、甲氧基聚乙二醇-聚己内酯（mPEG-PCL）、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000（DSPE-PEG₂₀₀₀）、聚氧乙烯聚氧丙烯醚嵌段共聚物、聚乳酸-羟基乙酸共聚物（PLGA）中的一种或几种，优选 Soluplus。可用的嵌段共聚物均可商购，平均分子量在 1000-150000。

本发明还提供了阿霉素盐酸盐和高三尖杉酯碱形成的双药物共递送系统在制备治疗肿瘤药物方面的应用。

本发明的双药物共递送系统尤其可用作治疗复发性、难治性的急性髓系白血病的药物，包括 AML1-ETO 急性髓系白血病，其特征为 t(8; 21)(q22; q22) 染色体易位，常见于 FAB 分型中的 M2，存在于大约 12%~15% AML 患者中；染色体 21 q22 上的 AML1 基因和染色体 8 q22 上的 ETO 基因重排形成 AML1-ETO 融合基因。

以下结合具体实施例，更具体地说明本发明的内容，并对本发明作进一步阐述，但这些实施例绝非对本发明进行限制。

除非特别指明，以下实施例中所用的细胞系均购自国家实验细胞资源共享平台。

除非特别指明，以下实施例中所用的磷酸盐缓冲液均为 1×PBS 溶液（pH7.4）；所用水溶液的溶剂均为超纯水。

实施例一：制备载有高三尖杉酯碱的胶束

(1) 将 15.0-100.0 mg 嵌段共聚物和 5.0 mg 高三尖杉酯碱溶于 4 mL 磷酸盐缓冲液中，搅拌得到高分子混悬液 A；嵌段共聚物选自聚乙烯己内酰胺-聚醋酸乙烯酯-聚乙二醇 (Soluplus)、甲氧基聚乙二醇 (mPEG)-聚己内酯 (PCL) (mPEG-PCL，分子量：4000 D)、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺 (DSPE)-聚乙二醇 2000 (PEG₂₀₀₀) (DSPE-PEG₂₀₀₀，分子量：2807 D)、聚氧乙烯聚氧丙烯醚嵌段共聚物 (购自德国巴斯夫公司，分子量 9840 D-14600 D，聚氧乙烯和聚氧丙烯的含量比为 80:20)、聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA，10 KD-40 KD，聚乳酸和羟基乙酸的含量比为 50:50) 中的一种或几种，优选 Soluplus (可商购，购自德国巴斯夫公司，分子量 120 KD，聚乙烯己内酰胺、聚醋酸乙烯酯和聚乙二醇的分子量比为 57:30:13)；

(2) 将高分子混悬液 A 在 25-70℃加热、100-1000 r/min 搅拌 20-120 min，获得溶液 B；

(3) 将溶液 B 室温静置约 1 小时，至其呈澄清透明状，然后用 0.22 μm 聚醚砜水系滤膜过滤以除去未包裹进胶束的游离药物，即得载有高三尖杉酯碱的胶束 C；所得到的载有高三尖杉酯碱的胶束 C 平均水合直径在 70 nm，载药量为 14%，包封率为 64%。

按照以上方法，制备得到一系列载有高三尖杉酯碱的胶束 C，仅是调整了使用的原料组成和制备参数，具体见表 1。

表 1 载有高三尖杉酯碱的胶束 C 的制备参数

载有高三尖杉酯碱的胶束 C	嵌段共聚物		高三尖杉酯碱	加热温度 /℃	搅拌		平均水合直径 /nm	载药量 /%	包封率 /%
					转速 /r/min	时间 /min			
C-1	Soluplus	15mg	5mg	50	500	60	70	14	64
C-2	mPEG ₂₀₀₀ -PCL ₂₀₀₀₀	15mg	5mg	60	300	120	80	16	58
C-3	DSPE-PEG ₂₀₀₀	50mg	5mg	30	800	100	55	6	60
C-4	PLGA	50mg	5mg	25	100	80	150	5	50
C-5	聚氧乙烯聚氧丙烯醚嵌段共聚物	75mg	5mg	40	1000	20	120	3	40
C-6	mPEG ₂₀₀₀ -PCL ₂₀₀₀₀ +PLGA	30mg+60mg	5mg	70	750	40	130	3	55

实施例二：加载阿霉素

(1) 将 50.0-200.0 mg 嵌段聚合物溶于 3 mL 磷酸盐缓冲液中，搅拌至完全溶解，得到澄清溶液 D；

(2) 将阿霉素盐酸盐用水溶解，配制成浓度为 3-8 mg/mL 的阿霉素盐酸盐水溶液；

(3) 将澄清溶液 D 与实施例 1 得到的载有高三尖杉酯碱的胶束 C 混合，25-70 °C 加热、100-1000 r/min 搅拌下滴加 1 mL 步骤 (2) 得到的阿霉素盐酸盐水溶液，搅拌 20-120 min，得到溶液 E；载有高三尖杉酯碱的胶束 C 的聚合物与步骤 (1) 中所用的聚合物相同；

(4) 将溶液 E 室温静置，用 0.22 μ m 聚醚砜水系滤膜过滤以除去未包裹进胶束的游离药物，得到同时包载高三尖杉酯碱和阿霉素的胶束 F，即为本发明的双药物共递送系统，见图 2，为红色澄清溶液。

按照以上方法，制备得到一系列双药物共递送系统，仅是调整了加载阿霉素的参数，具体见表 2。通过改变向澄清溶液 D 中加入载有高三尖杉酯碱的胶束 C 的体积，可得到不同 DOX 和 HHT 比例的双药物共递送系统，其平均水合直径如表 3 所示。

表 2 加载阿霉素的参数

实 施 例	胶束 C		澄清溶液 D	阿霉素 盐酸盐 水溶液 浓度	加热 温度	搅拌		包封率/%
	种 类	体积 /mL	嵌段聚合物			转速 /r/min	时间 /min	
1	C-1	0.600	Soluplus 95mg	5 mg/mL	50°C	500	60	75
2	C-2	0.800	mPEG ₂₀₀₀ -PCL ₂₀₀₀₀ 100 mg	3 mg/mL	70°C	100	100	70
3	C-3	1.000	DSPE-PEG ₂₀₀₀ 80 mg	7 mg/mL	25°C	1000	40	72
4	C-4	1.200	PLGA 150 mg	6 mg/mL	60°C	800	20	56
5	C-5	1.500	聚氧乙烯聚氧丙烯醚 嵌段共聚物 100 mg	8 mg/mL	40°C	750	80	60
6	C-6	1.200	mPEG ₂₀₀₀ -PCL ₂₀₀₀₀ +PLGA 100 mg	6 mg/mL	30°C	300	120	45
7	C-1	0.320	Soluplus 95mg	5 mg/mL	50°C	500	60	75
8	C-1	0.530	Soluplus 95mg	5 mg/mL	50°C	500	60	75

实施例 1 的胶束 F 平均水合直径在 80 nm (如图 1 所示)，阿霉素的载药量为 5%，包封率为 75%；其它实施例的性能参数见表 2 和表 3。

表 3 DOX 和 HHT 比例不同的双药物共递送系统

实施 例	平均水合直径 (nm)	多分散指数 PDI	DOX 和 HHT 的 重量比	载阿霉素量 /%	载高三尖杉酯碱量 /%
1	80.0±2.0	0.10±0.01	8:1	5.5	0.7
2	91.4±6.5	0.18±0.01	4:1	2.0	0.5
3	78.1±3.6	0.29±0.05	7:1	5.1	0.7
4	160.4±4.8	0.26±0.06	4:1	2.0	0.5
5	130.1±0.6	0.25±0.03	6:1	3.6	0.6
6	140.7±2.6	0.27±0.08	3:1	2.1	0.7
7	85.2±0.8	0.15±0.04	15:1	5.8	0.4
8	82.5±0.7	0.13±0.04	9:1	4.6	0.5

实验一：单一游离药物、两种游离药物联合以及双药物共递送系统体外对多种血液肿瘤和实体肿瘤细胞增殖的抑制作用

以 HL60/A 细胞（对阿霉素耐药的 HL60 细胞）为例，具体实施方法如下：

在 Corning 96 孔 U 型板中，每孔使用 100 μ L RPMI-1640 培养基（含 10%胎牛血清和 1%青链霉素）培养 5×10^4 个细胞。实验组包括：1) 单一 HHT 组 (H)：HHT 用二甲基亚砜 (DMSO) 溶解得到 10 mg/mL 母液；2) 单一 DOX 组 (D)：阿霉素盐酸盐用水溶解得到 5 mg/mL 母液；3) 游离药物联合组 (DH)：母液 1) 和 2) 分别用培养基稀释后混合得到，DOX 与 HHT 的重量比为 8:1；4) 本发明的双药物共递送系统组 (DHM)：将实施例 1-6 的双药物共递送系统分别用培养基稀释后得到。对照组每孔加入 100 μ L 培养基；实验组每孔加入 100 μ L 稀释后的药物溶液，使 HHT 终浓度为 5 ng/mL、10 ng/mL、25 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL；对应的 DOX 终浓度为 40 ng/mL、80 ng/mL、200 ng/mL、400 ng/mL、800 ng/mL。将 Corning 96 孔 U 型板中的细胞孵育 24 h 后用 PBS 清洗细胞，向每孔加入 110 μ L CCK8 稀释液，孵育 2 h，用酶标仪测定 450 和 630 nm 波长下的吸光度值 (OD 值)，按照公式 1 计算细胞存活率，以实施例 1 的结果为例，见图 3。

公式 1：细胞存活率 = $OD_{450-630}$ (实验组) / $OD_{450-630}$ (对照组) $\times 100\%$

图 3 结果表明，当双药物共递送系统中 HHT 浓度为 25 ng/mL、DOX 浓度为 200 ng/mL 时，单一 DOX 对 HL60 阿霉素耐药株无细胞毒性，单一 HHT 作用下细胞存活率为 56%，

游离药物联合作用下细胞存活率为 54%，双药物共递送系统作用下细胞存活率为 40%，因此相同药物浓度下，本发明双药物共递送系统比单一药物、游离药物联合能够更加有效地抑制肿瘤细胞的增殖。

本发明的双药物共递送系统对 U937R（阿糖胞苷耐药株，发明人所在实验室筛选的急性髓系白血病耐药细胞株）、K562、HeLa 和 MCF7 细胞也有类似效果，各细胞的培养条件见表 4，结果见图 4-图 7。

对于 U937R 细胞，当双药物共递送系统中 HHT 浓度为 15 ng/mL、DOX 浓度为 120 ng/mL 时，单一 DOX、单一 HHT、游离药物联合、本发明实施例 1 双药物共递送系统作用下细胞存活率分别为 55%、59%、34%、21%。

对于 K562 细胞，当双药物共递送系统中 HHT 浓度为 25 ng/mL、DOX 浓度为 375 ng/mL 时，单一 DOX、单一 HHT、游离药物联合、本发明实施例 7 双药物共递送系统作用下细胞存活率分别为 80%、59%、35%、27%。

对于 HeLa 细胞，当双药物共递送系统中 HHT 浓度为 20 ng/mL、DOX 浓度为 120 ng/mL 时，单一 DOX、单一 HHT、游离药物联合、本发明实施例 5 双药物共递送系统作用下细胞存活率分别为 90%、41%、35%、30%。

对于 MCF7 细胞，当双药物共递送系统中 HHT 浓度为 25 ng/mL、DOX 浓度为 100 ng/mL 时，单一 DOX、单一 HHT、游离药物联合、本发明实施例 4 双药物共递送系统作用下细胞存活率分别为 92%、50%、43%、27%。

表 4 肿瘤细胞的培养条件

肿瘤	细胞	培养基	细胞密度	DOX 和 HHT 的重量比
血液肿瘤	HL60/A	RPMI-1640	5×10^4 个/孔	8
	U937R			8
	K562			15
实体肿瘤	HeLa	DMEM 高糖	1×10^4 个/孔	6
	MCF7			4

实验二：游离药物联合、双药物共递送系统对 AML1-ETO 小鼠生存期的影响

本实验所采用的小鼠为 6-8 周大的雌性 C57 鼠（来自中国医学科学院基础医学研究所的动物实验中心），在 SPF 级环境中饲养。用 200 μ L 乙二胺四乙酸钠盐（EDTA）/ PBS 悬浮 1×10^6 个 AML1-ETO 小鼠原代脾脏细胞（GFP 标记），通过尾静脉注射到经亚致死辐照（450 cGy）的 C57 小鼠体内。移植第七天从小鼠尾静脉取血，用流式细胞仪检测外周血白血病细胞阳性率，确认小鼠发病。从移植后的第 8 天开始，腹腔注射

以下各组药物：(1) 游离药物高三尖杉酯碱 0.4 mg/kg、阿霉素盐酸盐 3.6 mg/kg，作为 DH 组；(2) 本发明实施例 8 的双药物共递送系统 (DOX 与 HHT 的重量比为 9:1)，作为 DHM 组；(3) 无菌 PBS 作为溶剂对照组 (con 组)；(4) 无菌 PBS 溶解的 Soluplus 72 mg/kg 作为 Solupus 组。连续给药四天，停药七天，为一个疗程；结果见图 8。

图 8 结果表明，游离药物联合组小鼠终末生存期为 52 天，本发明双药物共递送系统组小鼠在 52 天时存活率高达 9/10，本发明的双药物共递送系统组比游离药物联合组小鼠的生存期更长，且差异显著。

67 天时检测 DHM 组存活小鼠外周血 (PB)、脾 (spleen)、骨髓 (bone) 的 GFP 阳性细胞比例，各小鼠不同脏器的白血病细胞浸润结果见图 9。图 9 结果表明，本发明双药物共递送系统可延长小鼠生存期，同时能减少各器官白血病细胞的浸润。

实验三：游离药物联合、双药物共递送系统对 AML1-ETO 小鼠的药效

实验过程同实验二。

治疗一个疗程后处死小鼠，用流式细胞仪检测外周血 (PB) 和骨髓 (Bone) GFP 阳性细胞比例，同时使用血细胞分析仪 (迈瑞公司 BC-5120 型号) 检测外周血中白细胞 (WBC)、红细胞 (RBC) 和血小板 (PLT) 数量，结果见图 10 和图 11。

图 10 结果表明，治疗后 DHM 组外周血中白血病细胞比例从 DH 组的 40% 降低到 10%；骨髓中白血病细胞比例从 DH 组的 50% 降低到 5%，表明 DHM 能显著降低外周血和骨髓中白血病细胞比例。图 11 结果表明，治疗后 DHM 组 WBC 从 DH 组的 $10 \times 10^9/L$ 降低至 $5 \times 10^9/L$ ，RBC 从 DH 组的 $5.9 \times 10^{12}/L$ 升高至 $6.4 \times 10^{12}/L$ ，PLT 从 DH 组的 $9.3 \times 10^{11}/L$ 升高至 $1.2 \times 10^{12}/L$ ；说明 DHM 治疗在减少白血病细胞的同时，没有降低红细胞和血小板的数量，表明其对骨髓细胞没有抑制作用，在发挥治疗效果的同时还能降低毒副作用。

工业应用性

本发明提供的双药物共递送系统对多种血液肿瘤和实体肿瘤细胞都具有杀伤作用，同时能降低毒副作用，可抑制肿瘤生长和用于白血病治疗；制备过程中不使用任何有机溶剂，制备工艺简单，适于工业应用。

权利要求

1、一种双药物共递送系统，由包括嵌段共聚物、高三尖杉酯碱和阿霉素盐酸盐的原料制得；所述嵌段共聚物选自聚乙烯己内酰胺-聚醋酸乙烯酯-聚乙二醇(Soluplus)、甲氧基聚乙二醇-聚己内酯 (mPEG-PCL)、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000 (DSPE-PEG₂₀₀₀)、聚氧乙烯聚氧丙烯醚嵌段共聚物、聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA) 中的一种或几种，优选 Soluplus。

2、根据权利要求 1 所述双药物共递送系统，其中，高三尖杉酯碱、阿霉素盐酸盐、嵌段共聚物按重量份数比为(1-10):(1-40):(4-200)；优选(1-5):(3-15):(45-200)。

3、根据权利要求 1 或 2 所述双药物共递送系统，所述系统的平均水合直径为 20-200 nm，优选 60-180 nm。

4、根据权利要求 1-3 任一所述双药物共递送系统，所述嵌段共聚物 Soluplus 中聚乙烯己内酰胺、聚醋酸乙烯酯和聚乙二醇的分子量比为 57:30:13。

5、根据权利要求 4 所述双药物共递送系统，高三尖杉酯碱、阿霉素盐酸盐、嵌段共聚物 Soluplus 按重量份数比为(1-10):(1-40):(4-200)；优选(1-5):(3-15):(45-200)。

6、一种制备权利要求 1-5 任一所述双药物共递送系统的方法，包括制备载有高三尖杉酯碱的胶束和加载阿霉素；

优选的，所述载有高三尖杉酯碱的胶束是由高三尖杉酯碱、嵌段共聚物和磷酸盐缓冲液混合搅拌得到。

7、根据权利要求 6 所述方法，所述加载阿霉素是将所述载有高三尖杉酯碱的胶束与含有嵌段共聚物的磷酸盐缓冲液混合，再加入阿霉素盐酸盐水溶液搅拌得到。

8、根据权利要求 6 或 7 所述方法，所述载有高三尖杉酯碱的胶束的具体制备过程包括以下步骤：

- 1) 将嵌段共聚物和高三尖杉酯碱加入磷酸盐缓冲液中，加热搅拌得到液体 B；
- 2) 过滤步骤 1) 得到的液体 B，滤液即为载有高三尖杉酯碱的胶束，称胶束 C。

9、根据权利要求 6-8 任一所述方法，所述加载阿霉素具体包括以下步骤：

- (1) 将嵌段共聚物溶于磷酸盐缓冲液中，得到澄清溶液 D；
- (2) 将步骤(1)得到的澄清溶液 D 与载有高三尖杉酯碱的胶束(胶束 C)混合，加热搅拌下滴加阿霉素盐酸盐水溶液(优选的，阿霉素盐酸盐水溶液中阿霉素盐酸盐的浓度为 3-8 mg/mL)，得到液体 E；
- (3) 将步骤(2)得到的液体 E 过滤，滤液即为所述双药物共递送系统。

10、根据权利要求 8 或 9 所述方法，所述加热均为加热至 25-70℃。

11、根据权利要求 8 或 9 或 10 所述方法，所述搅拌的速度均为 100-1000 r/min。

12、权利要求 1-5 任一所述双药物共递送系统在制备抑制肿瘤生长相关疾病药物或治疗白血病药物中的应用。

13、根据权利要求 12 所述应用，所述肿瘤生长相关疾病为高三尖杉酯碱和蒽环类抗生素联合应用有效的肿瘤，包括但不限于急性髓系白血病、慢性髓系白血病、宫颈癌等。

14、根据权利要求 13 所述应用，所述急性髓系白血病为复发性、难治性的急性髓系白血病。

15、根据权利要求 14 所述应用，所述急性髓系白血病为 AML1-ETO 急性髓系白血病，其表征为 t(8; 21)(q22; q22) 染色体易位，常见于 FAB 分型中的 M2，染色体 21 q22 上的 AML1 基因和染色体 8 q22 上的 ETO 基因重排形成 AML1-ETO 融合基因。

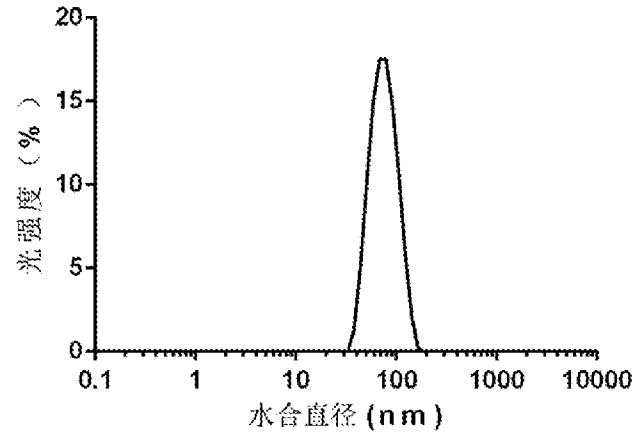


图 1

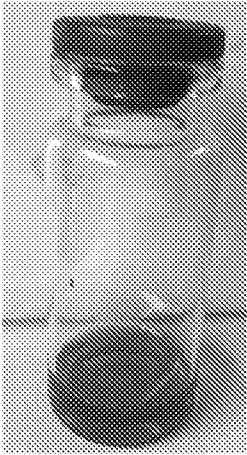


图 2

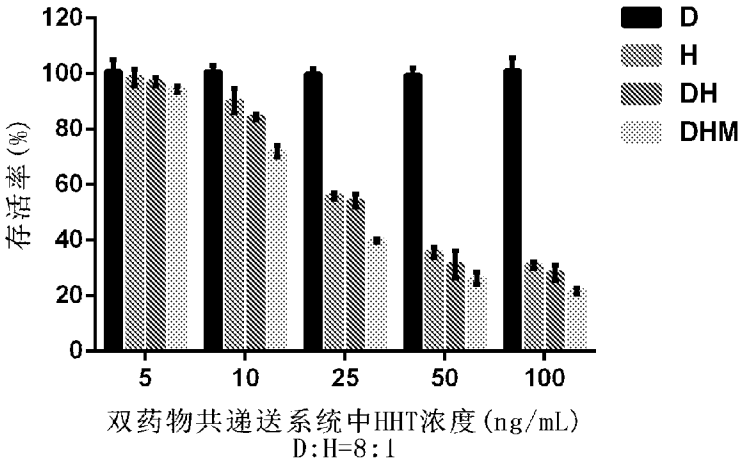


图 3

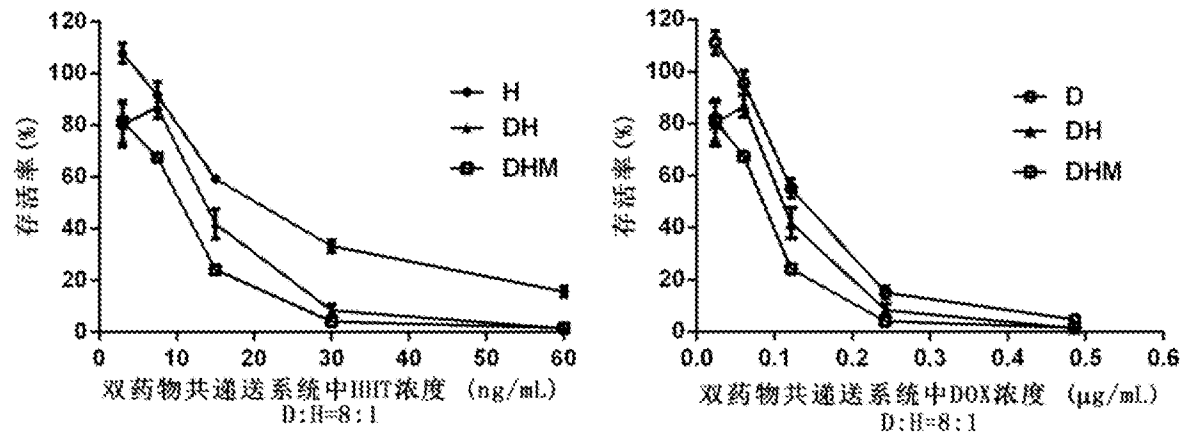


图 4

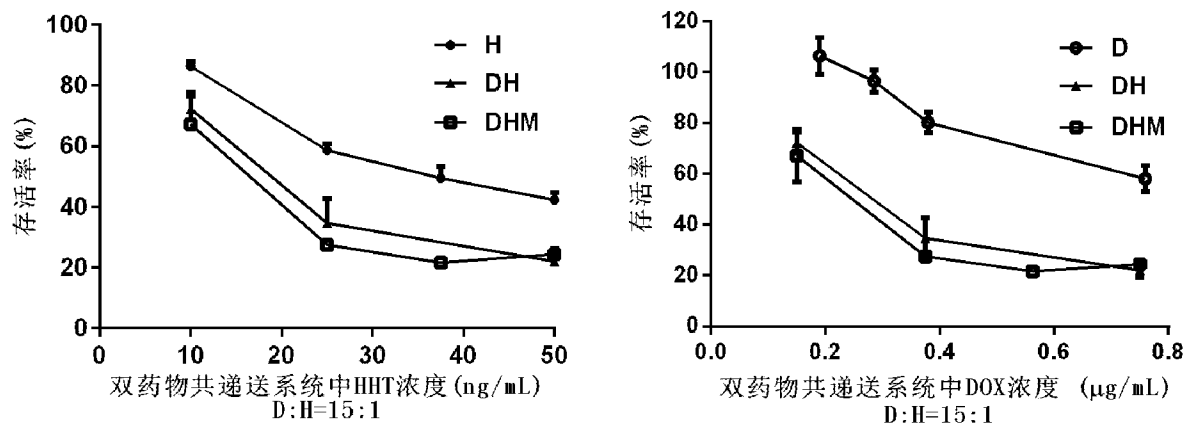


图 5

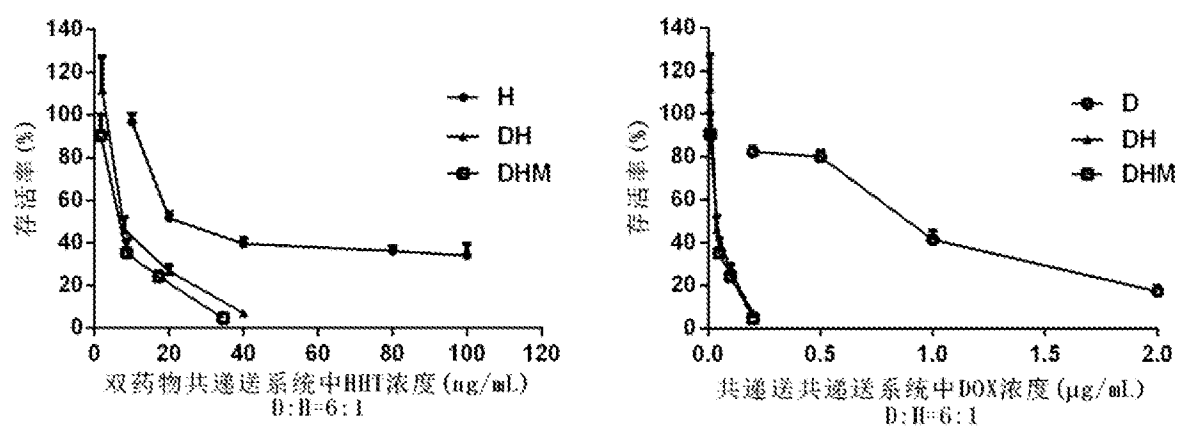


图 6

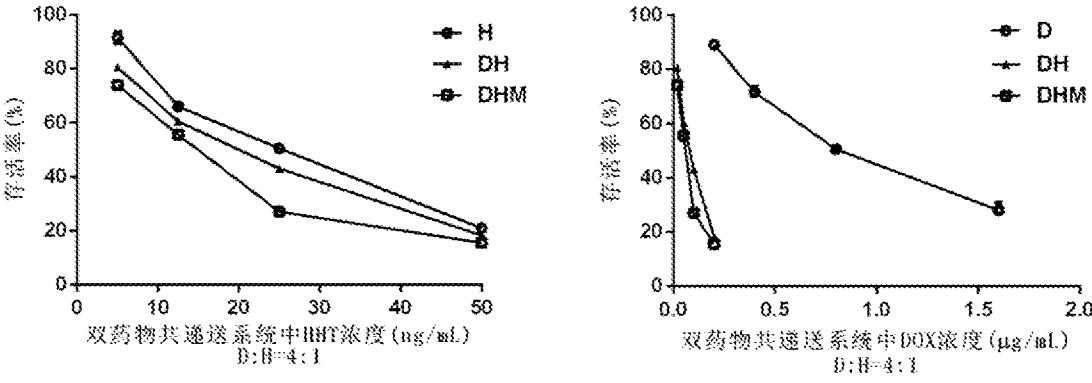


图 7

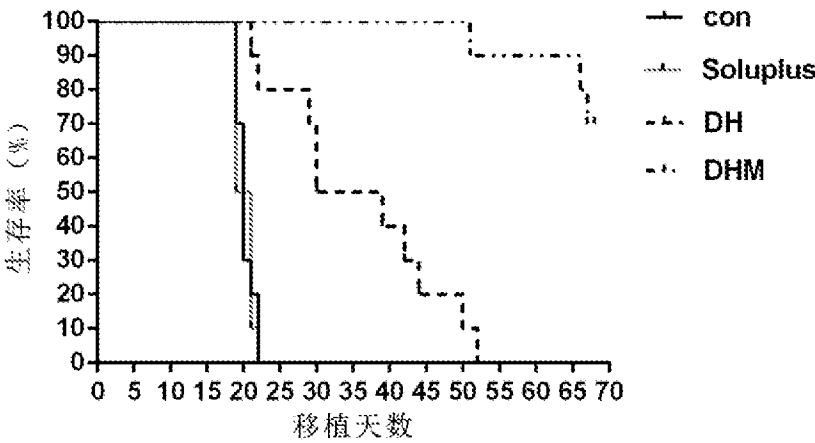


图 8

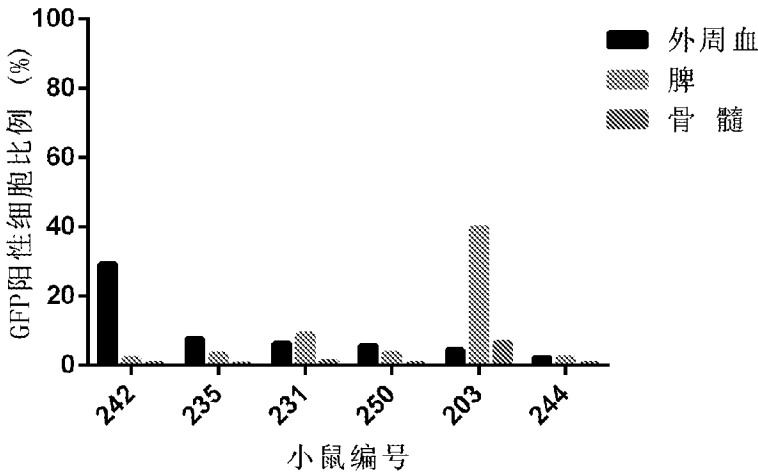


图 9

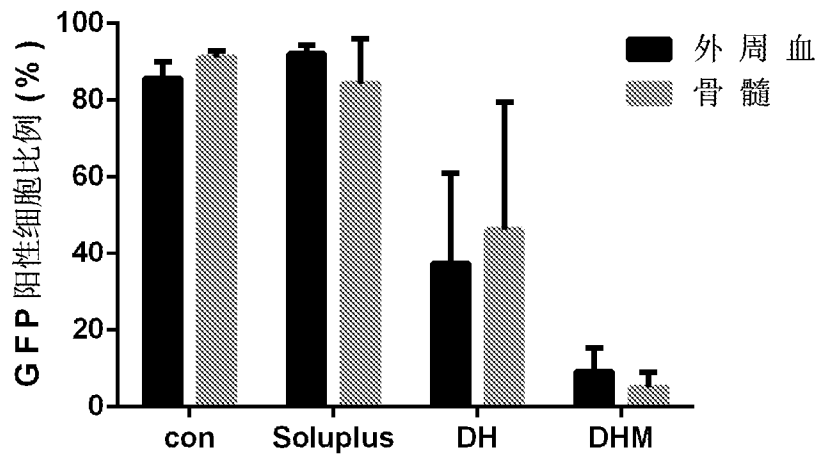


图 10

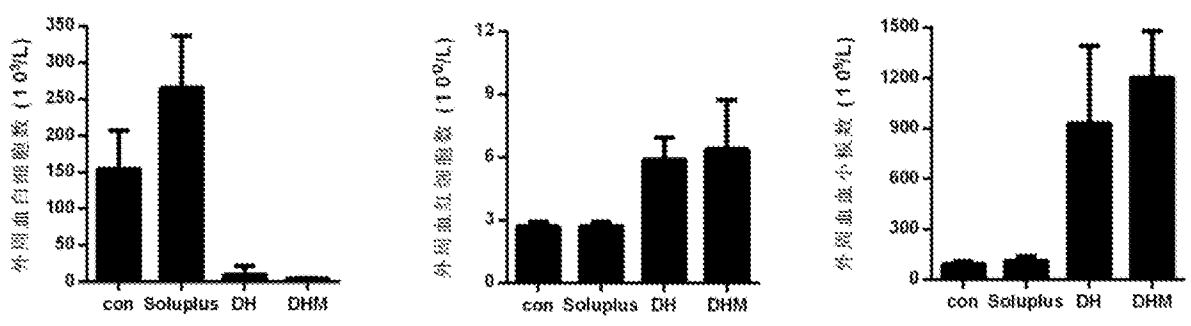


图 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/076891

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 9/107(2006.01)i; A61K 31/55(2006.01)i; A61K 31/704(2006.01)i; A61K 47/10(2006.01)i; A61K 47/24(2006.01)i; A61K 47/32(2006.01)i; A61K 47/34(2017.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 35/02(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

VEN, CNABS, CNKI, CNTXT, PubMed, ISI Web of Knowledge, STN, 百度, 中国医学科学院基础医学研究所, 许海燕, 白血病, 癌症, 肿瘤, 共递送, 嵌段共聚物, 高三尖杉酯碱, 阿霉素, 多柔比星, 聚乙烯己内酰胺-聚醋酸乙烯酯-聚乙二醇, 甲氧基聚乙二醇-聚己内酯, 二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000, 聚氧乙烯聚氧丙烯醚嵌段共聚物, 聚乳酸-羟基乙酸共聚物, DSPE-PEG2000, PLGA, Soluplus, mPEG-PCL, homoharringtonine, doxorubicin, block copolymer, 25316-40-9, 26833-87-4, 936030-92-1

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 109745288 A (INSTITUTE OF BASIC MEDICAL SCIENCES OF CHINESE ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES) 14 May 2019 (2019-05-14) claims 1-10, description, paragraph 44	1-15
Y	优酷网 (YOUKU). "北京八中少年科学院2018级开题报告会-南子怡-双药共递送纳米胶束制备及抗白血病研究 (Non-official translation: Beijing No. 8 High School Youth Academy of Sciences, 2018 Thesis Proposal Presentation by NAN, Ziyi: Preparation of Nanomicelle-based Dual-Drug Delivery and Anti-leukemia Effect)" https://v.youku.com/v_show/id_XMzcxNDg3NTA2MA==.html , 10 July 2018 (2018-07-10), PPT current page displayed in the video starting from 3'45'' to 3'50''	1-15
Y	JIN XIANG et al., "Soluplus® micelles as a potential drug delivery system for reversal of resistant tumor," <i>Biomedicine & Pharmacotherapy</i> , 24 December 2014 (2014-12-24), pp. 1-8	1-15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 May 2020

Date of mailing of the international search report

27 May 2020

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/076891

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	元英进 主编 (Edited by YUAN, Yingjin). "胶束的制备方法及其形成机理 (Non-official translation: Method for Preparing Micelles and Formation Mechanism thereof)" <i>现代制药工艺学 下册 (Non-official translation: Current Pharmaceutical Technology, Vol. 2)</i> , 31 January 2006 (2006-01-31), p. 152	6-11
Y	杨柳 (YANG, Liu). "高三尖杉酯碱联合阿霉素对白血病细胞作用的探讨 (The Effects of Homoharringtonine and Adriamycin Combination Treatment on the Leukemia Cells)" <i>中国优秀硕士学位论文全文数据库 医药卫生科技辑 (Medicine & Public Health, China Master's Theses Full-Text Database)</i> , 15 March 2017 (2017-03-15), E072-258	1-15
A	CN 105055375 A (THE FOURTH MILITARY MEDICAL UNIVERSITY OF PLA) 18 November 2015 (2015-11-18) claim 1	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/076891

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	109745288	A	14 May 2019	None	
CN	105055375	A	18 November 2015	CN 105055375	B 14 November 2017

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/076891

A. 主题的分类

A61K 9/107(2006.01)i; A61K 31/55(2006.01)i; A61K 31/704(2006.01)i; A61K 47/10(2006.01)i;
A61K 47/24(2006.01)i; A61K 47/32(2006.01)i; A61K 47/34(2017.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P
35/02(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

A61K, A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

VEN, CNABS, CNKI, CNTXT, PubMed, ISI Web of Knowledge, STN, 百度, 中国医学科学院基础医学研究所, 许海燕, 白血病, 癌症, 肿瘤, 共递送, 嵌段共聚物, 高三尖杉酯碱, 阿霉素, 多柔比星, 聚乙烯己内酰胺-聚醋酸乙烯酯-聚乙二醇, 甲氧基聚乙二醇-聚己内酯, 二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000, 聚氧乙烯聚氧丙烯醚嵌段共聚物, 聚乳酸-羟基乙酸共聚物, DSPE-PEG2000, PLGA, Soluplus, mPEG-PCL, homoharringtonine, doxorubicin, block copolymer, 25316-40-9, 26833-87-4, 936030-92-1

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 109745288 A (中国医学科学院基础医学研究所) 2019年 5月 14日 (2019 - 05 - 14) 权利要求1-10, 说明书第44段	1-15
Y	优酷网, . "北京八中少年科学院2018级开题报告会-南子怡-双药共递送纳米胶束制备及抗白血病研究," https://v.youku.com/v_show/id_XMzcxNDg3NTA2MA==.html , , 2018年 7月 10日 (2018 - 07 - 10), 视频3分45秒-3分50秒, 当前页PPT展示内容	1-15
Y	JIN XIANG et al, . "Soluplus® micelles as a potential drug delivery system for reversal of resistant tumor," 《Biomedicine & Pharmacotherapy》, 2014年 12月 24日 (2014 - 12 - 24), 第1-8页	1-15
Y	元英进主编, . " "胶束的制备方法及其形成机理" " 《现代制药工艺学 下册》, 2006年 1月 31日 (2006 - 01 - 31), 第152页	6-11

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件	“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件
---	---

国际检索实际完成的日期

2020年 5月 11日

国际检索报告邮寄日期

2020年 5月 27日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

授权官员

涂海华

电话号码 (86-10)-53962084

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
Y	杨柳，. “高三尖杉酯碱联合阿霉素对白血病细胞作用的探讨，” 《中国优秀硕士学位论文全文数据库 医药卫生科技辑》，2017年 3月 15日 (2017 - 03 - 15)， E072-258	1-15
A	CN 105055375 A (中国人民解放军第四军医大学) 2015年 11月 18日 (2015 - 11 - 18) 权利要求1	1-15

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/076891

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	109745288	A	2019年 5月 14日	无	
CN	105055375	A	2015年 11月 18日	CN 105055375	B 2017年 11月 14日