



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101925365 B

(45) 授权公告日 2013.03.06

(21) 申请号 200880125358.X
(22) 申请日 2008.11.27
(30) 优先权数据
0708296 2007.11.27 FR
(85) PCT申请进入国家阶段日
2010.07.22
(86) PCT申请的申请数据
PCT/FR2008/052147 2008.11.27
(87) PCT申请的公布数据
W02009/071850 FR 2009.06.11
(73) 专利权人 国家科研中心
地址 法国巴黎
专利权人 巴黎第十一大学
(72) 发明人 P·库沃里尔 H·R·拉克尔雷蒂
F·多斯奥 B·斯特拉 L·卡特尔
(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038
代理人 罗菊华
(51) Int. Cl.
A61K 47/48 (2006.01)
(56) 对比文件
WO 0071079 A2, 2000.11.30, 说明书第7页,
权利要求书, 实施例1.
US 5399554 A, 1995.03.21, 说明书第1-2
栏.

WO 2006090029 A, 2006.08.31, 说明书第8
页, 权利要求20-24, 实施例5-8.
WO 9912545 A2, 1999.03.18, 说明书第1页,
权利要求书.
Duan-Yun Si et. al.. 《Biomedical
evaluation of nanomedicines》. 《Asian
Journal of Pharmacodynamics and
Pharmacokinetics》. 2007, 第7卷(第2期), 第
83-97页.
G. Pasut, F.M. Veronese. 《Polymer -
drug conjugation, recent achievements and
general strategies》. 《PROCESS IN POLYMER
SCIENCE》. 2007, 第32卷(第8-9期), 第933-961
页.
Kingston DG, Newman DJ.. 《Taxoids:
cancer-fighting compounds from nature》.
《Curr Opin Drug Discov Devel.》. 2007, 第10
卷(第2期), 第130-144页.
Patrick Couvreur et. al.. 《Squalenoyl
Nanomedicines as Potential Therapeutics》.
《NANO LETTERS》. 2006, 第6卷(第11期), 第
2544-2548页.

审查员 豆波建

权利要求书 4 页 说明书 20 页 附图 2 页

(54) 发明名称
具有低水溶解度的治疗性活性物质的纳米颗
粒

(57) 摘要
本发明涉及具有低水溶解度的治疗性活性物
质的水分散性衍生物,其由与至少一个具有角鲨
烯结构的烃衍生物或类似物的分子共价偶联的至
少一个所述活性物质的分子形成。此外,本发明还
涉及相应的纳米颗粒。

CN 101925365 B

1. 具有低水溶解度的治疗性活性物质的水分散性衍生物,其由与至少一个具有由异戊二烯单元形成的角鲨烯结构的线性烃化合物或类似物的分子共价偶联的至少一个所述活性物质的分子形成,所述活性物质具有在环境温度下所测量的低于 $100 \mu\text{g/ml}$ 的在纯水中的溶解度,所述类似物为角鲨烯结构的取代形式,其能够当与极性介质放在一起时重现角鲨烯结构的行为,和当与所述具有低水溶解度的治疗性活性物质的分子相连接时重现该能力。

2. 根据权利要求 1 的衍生物,其包含至少一个具有角鲨烯结构的基团。

3. 根据权利要求 1 的衍生物,其包含至少两个相同或不同的具有角鲨烯结构的基团。

4. 根据权利要求 1 的衍生物,其中所述活性物质具有在环境温度下所测量的低于 $25 \mu\text{g/ml}$ 的在纯水中的溶解度。

5. 根据权利要求 4 的衍生物,其中所述活性物质具有低于 $20 \mu\text{g/ml}$ 的溶解度。

6. 根据权利要求 5 的衍生物,其中所述活性物质具有低于 $10 \mu\text{g/ml}$ 的溶解度。

7. 根据权利要求 6 的衍生物,其中所述活性物质具有低于 $5 \mu\text{g/ml}$ 的溶解度。

8. 根据权利要求 1 的衍生物,其中所述活性物质选自免疫抑制剂、抗肿瘤化学治疗剂、抗血管发生剂、抗病毒剂、抗菌剂、抗生素和抗寄生虫剂、作用于糖代谢的物质、肽、脂质、作用于钙通道的试剂、非类固醇抗炎剂、以及肽类化合物。

9. 根据权利要求 1 的衍生物,其中所述活性物质为选自多柔比星和表柔比星的抗肿瘤化学治疗剂。

10. 根据权利要求 1 的衍生物,其中所述活性物质选自紫杉烷类化合物。

11. 根据权利要求 1 的衍生物,其中所述活性物质选自多西他赛、紫杉醇和其衍生物。

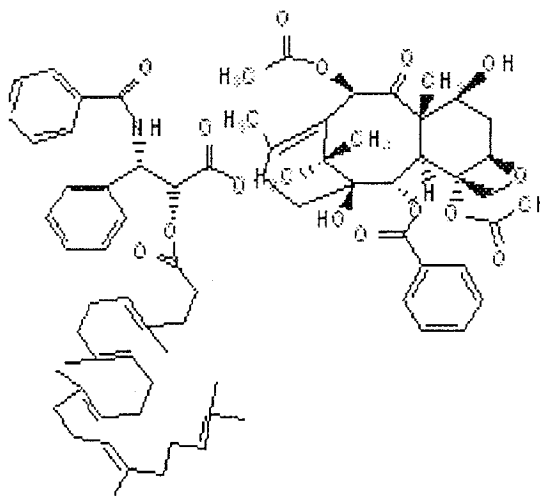
12. 根据权利要求 1 的衍生物,其中所述活性物质为胰岛素。

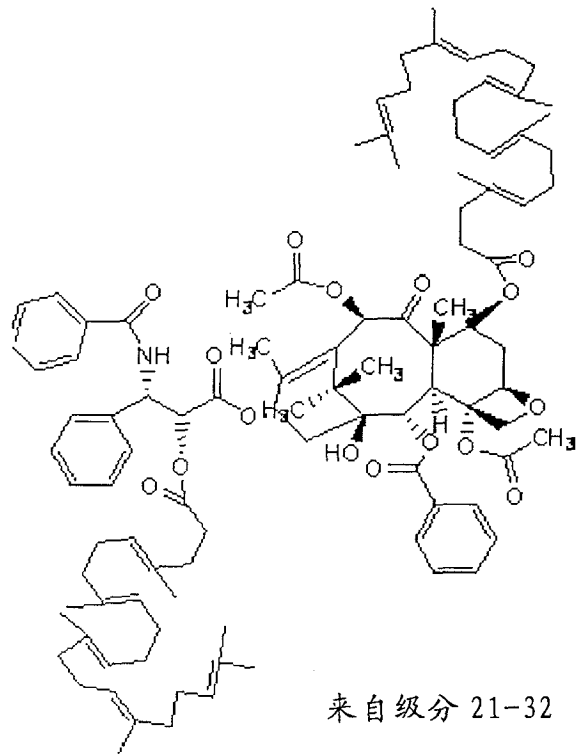
13. 根据权利要求 1 的衍生物,其中存在于所述具有低水溶解度的治疗性活性物质和所述具有角鲨烯结构的烃化合物或类似物的分子之间的共价连接表现为连接臂。

14. 根据权利要求 13 的衍生物,其中所述连接臂选自(聚)氨基酸基元、多元醇、糖类和具有低分子量的聚醚氧化物。

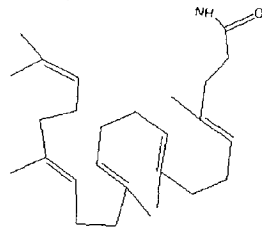
15. 根据权利要求 14 的衍生物,其中所述连接臂选自具有低分子量的聚乙二醇。

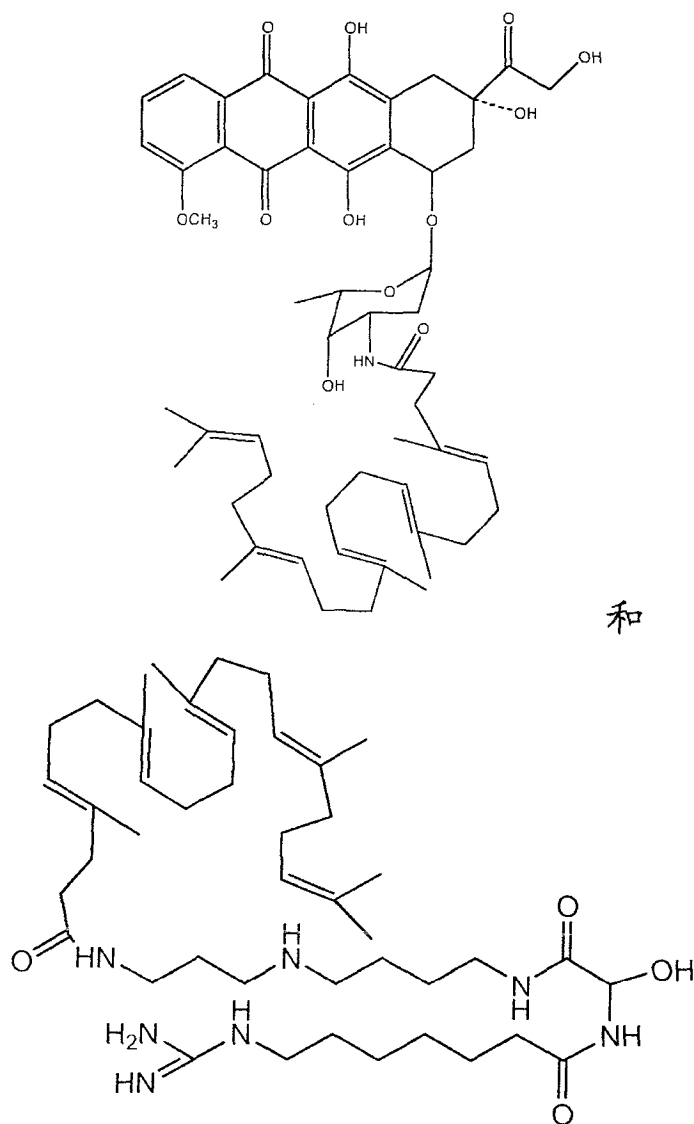
16. 根据权利要求 1 的衍生物,其选自:





H-Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Ala-Ser-Val-Cys-Ser-
Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn-OH
H-Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-
Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-
Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala-OH





17. 至少一种具有低水溶解度的治疗性活性物质的水分散性纳米颗粒,其中所述活性物质在这之中以与至少一种具有由异戊二烯单元形成的角鲨烯结构的线性烃化合物或类似物相联合的形式存在,所述活性物质具有在环境温度下所测量的低于 $100 \mu\text{g/ml}$ 的在纯水中的溶解度,所述类似物为角鲨烯结构的取代形式,其能够当与极性介质放在一起时重现角鲨烯结构的行为,和当与所述具有低水溶解度的治疗性活性物质的分子相连接时重现该能力。

18. 根据权利要求 17 的纳米颗粒,其由根据权利要求 1 至 16 中任一项的衍生物来形成。

19. 根据权利要求 17 的纳米颗粒,其具有 30 至 650nm 的平均尺寸。

20. 根据权利要求 19 的纳米颗粒,其具有 30nm 至 500nm 的平均尺寸。

21. 根据权利要求 20 的纳米颗粒,其具有 50nm 至 250nm 的平均尺寸。

22. 根据权利要求 21 的纳米颗粒,其具有 100nm 至 200nm 的平均尺寸。

23. 根据权利要求 17 至 22 中任一项的纳米颗粒的水分散体。

24. 制备根据权利要求 17 至 22 中任一项的纳米颗粒的方法,其特征在于,所述方法至少包括:

- 将根据权利要求 1 至 16 中任一项的衍生物溶解在至少一种有机溶剂中,其浓度足以当在搅拌下向水相中添加相应的混合物时,获得以在所述水相中的悬浮液形式的纳米颗粒的瞬时形成,和

- 需要时,分离所述纳米颗粒。

25. 根据权利要求 24 的方法,其中所述有机溶剂为醇。

26. 根据权利要求 24 的方法,其特征在于,所述方法不使用表面活性剂。

27. 药物组合物,其包含作为具有活性的物质的至少一种根据权利要求 1 至 16 中任一项的衍生物或者根据权利要求 17 至 22 中任一项的纳米颗粒,以及与之相联合的至少一种药学上可接受的载体。

具有低水溶解度的治疗性活性物质的纳米颗粒

[0001] 本发明旨在提出具有低水溶解度的（甚至疏水的）治疗性活性物质的水分散性纳米颗粒制剂。

[0002] 一般地，当活性物质在环境温度即大约 25°C 的温度下，具有低于 100 $\mu\text{g/ml}$ 的在纯水中的溶解度时，那么该活性物质则被称为是低水溶性的。

[0003] 因此，如下面所描述的，许多治疗性活性物质和 / 或治疗性候选物表现为是低水溶性的，甚至是完全疏水的，这在它们的治疗制剂方面造成显著的困难。尤其是，经证实，以与通过全身途径进行施用相容的形式来配制它们是非常困难的。

[0004] 当然，对于它们中的某些而言可以获得它们在水性介质中的溶解，只要有有机或无机盐的形式来配制它们。

[0005] 然而，这些盐或者衍生物在大多数情况下就合成而言是不容易得到的，和此外并不总是所希望的。这是因为，制备它们可能对活性分子的稳定性造成损害。

[0006] 作为这些差水溶性的治疗性活性物质的举例说明，尤其可以提及环孢菌素类、紫杉烷类化合物（**taxoïdes**）、紫杉烷类（taxanes）和肽类分子例如胰岛素。

[0007] 环孢菌素类是抗真菌化合物，通常具有免疫抑制活性。这些环孢菌素类往往表现出不超过 25 $\mu\text{g/ml}$ 的水溶解度，即比对于机体进行规则吸收而言所需的值低大约一百倍的值。为了获得环孢菌素类的可接受的生物利用率，常规的制剂一般采用联合了亲水相、疏水相和表面活性剂的分散体系。

[0008] 至于它们，因其抗肿瘤特性而知名的紫杉烷类化合物或紫杉烷类是二萜类物质。紫杉醇（其是天然的紫杉烷类化合物）和其半合成的衍生物多西他赛被广泛地用于肿瘤的治疗。一般地，紫杉烷衍生物具有甚至比环孢菌素类还低的水溶解度。因此，该非常低的水溶解度要求制定特殊的制剂。例如，由 BRISTOL MEYERS SQUIBB 以名称 TAXOL[®] 进行销售并用于通过全身途径进行施用的紫杉醇制剂，是以包含 30mg 无水多西他赛的单剂量形式可得非热原性的无菌配方。除了活性物质之外，每一剂量还包含聚氧乙烯二醇的三蓖麻油酸酯、Crémophore EL[®] 和乙醇。最后，该类型的制剂在施用前需要在无菌、无热原和等渗的灌注溶液（0.9% 氯化钠，5% 葡萄糖等）中进行稀释。

[0009] 然而，对于掩盖紫杉醇溶解度的缺陷而言所需的 Crémophore EL[®] 和乙醇的存在，却不幸地是引起不希望效应的性质。因此，为了防止任何出现继发性超敏反应的风险，通常在化学疗法开始前三天，用地塞米松通过口服途径对待治疗的受试者进行前驱用药（prémédication）。

[0010] 紫杉醇制剂的另一个备选方案使用与白蛋白相连接的紫杉醇。该特殊制剂以名称 Abraxane[®] 进行销售。由于显而易见的原因，就其通过白蛋白分子与紫杉醇分子的共价键合而强制导致形成该衍生物而言，该备选方案也不是令人满意的。此外，不能完全排除该偶联对于紫杉醇的治疗活性具有影响。

[0011] 最后，清楚的是，当将活性物质用于通过口服途径（这是对于施用治疗性活性物质来说特别受欢迎的另一途径）进行施用，低水溶性活性物质的生物利用率的该缺陷变成了加剧的障碍。

[0012] 确切地说,本发明旨在用于制备低水溶性的治疗性活性物质的制剂的新型方式,其使得能够弥补此类活性物质的常规制剂的缺点。

[0013] 更特别地,本发明产生于发明者的下列观察结果:经证实,以悬浮在水性介质中且具有减小的尺寸(尤其是对于通过可注射途径进行施用而言是相容的)的纳米颗粒的形式来配制这些低水溶性的(甚至疏水的)治疗性活性物质是可能的,条件是,将这些活性物质与角鲨烯衍生物或类似物相联合。

[0014] 因此,根据第一个方面,本发明涉及具有低水溶解度的治疗性活性物质的水分散性衍生物,其由与至少一个具有角鲨烯结构的烃化合物或类似物的分子共价偶联的至少一个所述活性物质的分子形成。

[0015] 更确切地,本发明涉及前述的水分散性衍生物,其中所使用的治疗性活性物质具有在环境温度下所测量的低于 $100 \mu\text{g/ml}$,特别地低于 $25 \mu\text{g/ml}$,尤其是低于 $20 \mu\text{g/ml}$,甚至低于 $10 \mu\text{g/ml}$,和更特别地低于 $5 \mu\text{g/ml}$ 的在纯水中的溶解度。

[0016] 在本发明的范围内,这样的衍生物也可以称为“缀合物”。

[0017] 更特别地,根据另一个方面,本发明涉及至少一种具有低水溶解度的治疗性活性物质的水分散性纳米颗粒,其中所述活性物质在这之中以与至少一种具有角鲨烯结构的烃化合物或类似物相联合的形式存在。

[0018] 在文献 PCT/FR2005/050488 中,发明者已经提及了,当其被共价偶联至吉西他滨(一种亲水的且极性的分子)时,角鲨烯在水性介质中自发形成具有百来个纳米的纳米颗粒的能力。尤其,通过如此合成的衍生物的两亲性行为(角鲨烯部分代表了疏水部分,而吉西他滨部分代表了亲水部分)来解释在此之中的该能力。

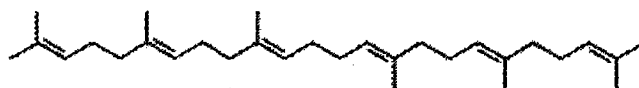
[0019] 然而,与所有预期相反,本发明者发现,将具有低水溶解度的(甚至疏水的)治疗性活性物质的衍生物(产生自至少一个所述治疗性活性物质的分子与至少一个具有角鲨烯骨架的烃化合物的分子的共价偶联)与极性溶剂例如水放在一起,也导致自发形成具有几十至几百纳米的颗粒,其因此有利地与通过全身途径进行施用相容,并且仍然具有所考虑的活性物质的治疗功效。

[0020] 因此,对于已经存在的制剂而言,采用根据本发明的纳米颗粒的形式的这些疏水的治疗性活性物质的制剂是有利的备选方案。

[0021] 具有角鲨烯结构的烃衍生物

[0022] 在本发明的范围内,“角鲨烯结构”意指由异戊二烯单元,更特别是 6 个异戊二烯单元形成的线性的烃结构,例如角鲨烯,其式如下:

[0023]



[0024] 作为这些烃化合物的举例说明,更特别地,可以提及角鲨烯酸及其衍生物。

[0025] 如本发明者所发现的,该角鲨烯结构在本发明的背景下是特别重要的,因为当将其与极性介质(更特别地,水)放在一起时,它自发表现出紧密的构象。

[0026] 出人意料地,本发明者发现,当将这样的衍生物与另一也具有疏水性质的化学实体相联合(尤其是共价连接)时,该能力仍然保留。由此导致产生以纳米颗粒形式的紧密

构造,其中所述两个化学实体彼此紧密交错。

[0027] 在本发明的范围内,类似物是指这样的烃化合物,一方面,当将其与极性介质放在一起时,能够重现角鲨烯衍生物的行为,和另一方面,当将其与具有低水溶解度的治疗性活性物质的分子相连接时,能够重现该能力。在该定义之下尤其涵盖了角鲨烯衍生物的取代形式,特别是角鲨烯酸及其衍生物,尤其是具有取代的那些。

[0028] 这样的衍生物可以例如为 1,1',2-三-去甲角鲨烯酸、角鲨烯酰基乙酸、1,1',2-三-去甲角鲨烯胺、1,1',2-三-去甲角鲨烯醇、1,1',2-三-去甲角鲨烯硫醇、角鲨烯乙酸、角鲨烯基乙醇、角鲨烯基乙硫醇或角鲨烯基乙胺。

[0029] 一般地,将至少一个具有角鲨烯结构的烃分子共价连接至具有低水溶解度的治疗性活性物质的分子。当然,可与治疗性活性物质的分子相互作用的烃衍生物分子的数目可以大于 1。根据本发明的衍生物可以包含至少两个相同或不同的具有角鲨烯结构的基团。

[0030] 一般地,该烃化合物携带可与存在于所考虑的活性物质的分子上的官能团反应的官能团,以便在所述两个实体之间建立共价连接,例如酯、醚、硫醚、二硫化物、磷酸酯或酰胺类型的。有利地,其为羧基官能团。在这种情况下,具有角鲨烯结构的烃衍生物为角鲨烯酸或其衍生物,例如角鲨烯酰基 N-羟基琥珀酰亚胺酯。

[0031] 根据一个实施方案变化形式,存在于所述两种类型的分子之间的共价连接可以表现为“连接体”或者连接臂。当分别存在于具有角鲨烯结构的化合物和具有低溶解度的治疗性活性物质上的官能团相互不具有反应亲和性并因此不能形成所希望的共价连接时,这样的臂可以尤其显得是有用的。这样的臂确切地使得能够通过其骨架的两个末端中的每一个引入适当的官能团,即分别具有所希望的反应亲和性的官能团,其中一个用于存在于具有角鲨烯结构的衍生物上的官能团,和另一个用于存在于所考虑的活性物质上的官能团。

[0032] 还可以设想,该连接臂此外还在其骨架水平上具有不稳定的官能团,其以后适合于将具有角鲨烯结构的化合物与治疗性活性物质相分开。其可以例如为由酶可识别的肽基元。

[0033] 连接臂类型的基元是本领域技术人员所熟知的,并且它们的使用明显地在本领域技术人员的能力范围之内。

[0034] 作为根据本发明可以考虑的连接臂的代表,尤其可以提及(聚)氨基酸基元、多元醇、糖类和具有低分子量的聚乙二醇(聚醚氧化物),特别是多元醇、糖类和具有低分子量的聚乙二醇(聚醚氧化物)。

[0035] 因此,在本发明的范围内,“共价连接”优选地表示共价键(尤其是如上面所描述的),但也涵盖了表现为如前面所定义的连接臂的共价连接。

[0036] 具有低溶解度的治疗性活性物质

[0037] 在本发明的范围内,具有低水溶解度的治疗性活性物质为这样的化合物,其具有在环境温度(即大约 25°C)下所测量的低于 100 $\mu\text{g/ml}$,尤其是低于 25 $\mu\text{g/ml}$,特别地低于 20 $\mu\text{g/ml}$,尤其是低于 15 $\mu\text{g/ml}$,甚至低于 10 $\mu\text{g/ml}$,和更特别地低于 5 $\mu\text{g/ml}$ 的在纯水中的溶解度。在本发明的范围内,纯水是 pH 接近中性(在 pH5 和 pH8 之间)并且没有任何其他化合物例如有机或无机盐的水。

[0038] 在本发明的范围内,更特别地考虑的治疗性活性物质可以选自生物药物分类的第 2 组和第 4 组的物质。

[0039] 作为这些具有低水溶解度的物质的代表,尤其可以提及免疫抑制剂;化学治疗剂,尤其是抗肿瘤化学治疗剂,例如紫杉烷类化合物、多柔比星(也称为阿霉素)和其异构体表柔比星;抗血管发生剂;抗病毒剂;抗菌剂;抗生素;和抗寄生虫剂;作用于糖代谢的物质;肽;脂质;作用于钙通道的试剂;非类固醇抗炎剂;以及肽类化合物(composés peptidiques),例如胰岛素。

[0040] 应当理解,在本发明的背景下,所考虑的仅是前述活性物质的疏水的或者具有非常低的溶解度的形式。在本发明的背景下,可在水性介质中溶解的其离子形式或其他形式并不令人关注,因为对于它们来说,弥补水溶解度的缺陷显得并不是必需的。

[0041] 因此,在本发明的情况下,与至少一个具有角鲨烯结构的分子相偶联的活性物质的形式通常是中性的形式,即非离子或非成盐的形式,除非其本身表现出具有低水溶性。

[0042] 免疫抑制剂是疏水性化合物,并且包括N-甲基化的环状十一肽。在该活性物质家族中,更特别地考虑环孢菌素类。其尤其为环孢菌素A和G。然而,根据本发明,也可以考虑其他大环内酯。

[0043] 还可以涉及诸如脱氧精胍菌素、雷帕霉素或子囊霉素的免疫抑制剂。

[0044] 根据本发明的一个优选的变化形式,具有低溶解度的治疗性活性物质更特别地为紫杉烷类和紫杉烷类化合物。

[0045] 此类化合物尤其描述在申请WO 2005/013968中。更优选地,其为多西他赛、紫杉醇或其衍生物。

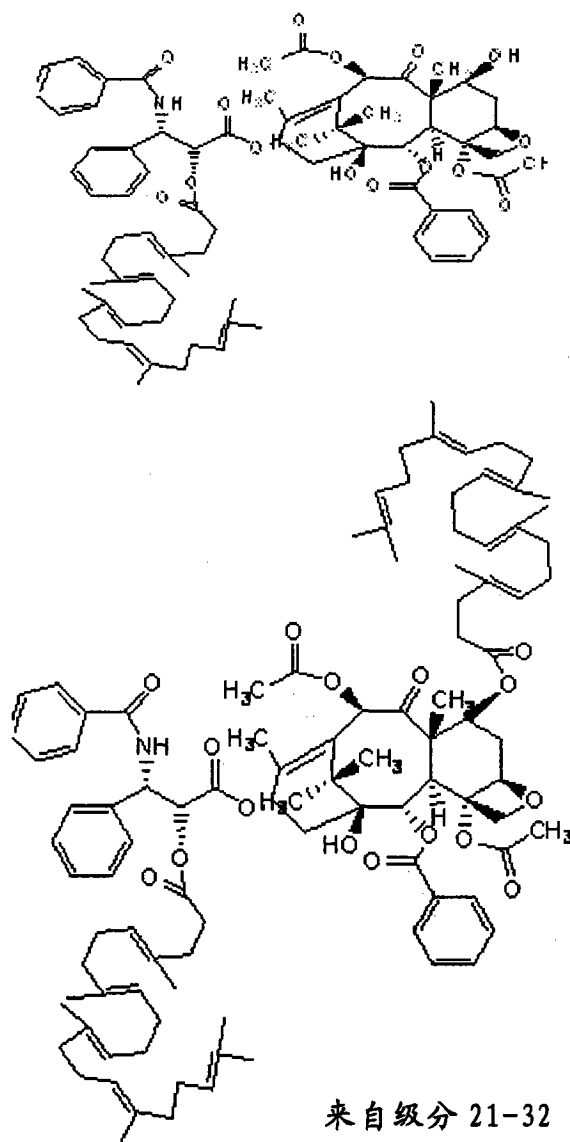
[0046] 如前面所描述的,这些物质用至少一个具有角鲨烯结构的烃化合物或类似物的分子进行官能化。因此,根据本发明所考虑的治疗性活性物质可以包含两个衍生化、三个衍生化、或者更多,这些衍生化可以是相同的或不同的。

[0047] 对于在具有低水溶解度的治疗性活性物质的分子和至少一个具有角鲨烯结构的烃衍生物或类似物的分子之间建立至少一个共价键而言所必需的反应可以根据标准条件来进行,并因此其实施明显地在本领域技术人员知识范围之内。

[0048] 一般地,在至少一种具有角鲨烯结构的化合物存在和过量(相对于所考虑的低水溶性的活性物质)下,例如按照两个当量,根据对于使所述分子中的每个分子所携带的两个特定官能团相互作用所要求的标准条件,在溶液中进行该反应。

[0049] 作为根据本发明的水分散性衍生物的非限制性举例说明,非常特别地可以提及下述的紫杉烷类化合物衍生物:

[0050]

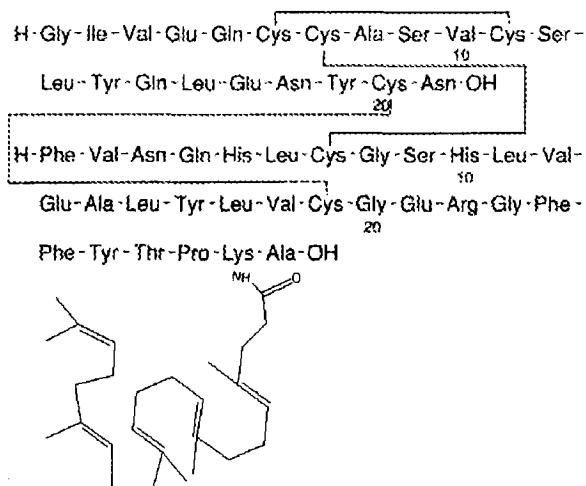


[0051] 它们是由分别用一个和两个角鲨烯酸分子对紫杉醇分子进行官能化而产生的两种化合物。

[0052] 根据本发明的其他水分散性衍生物为：

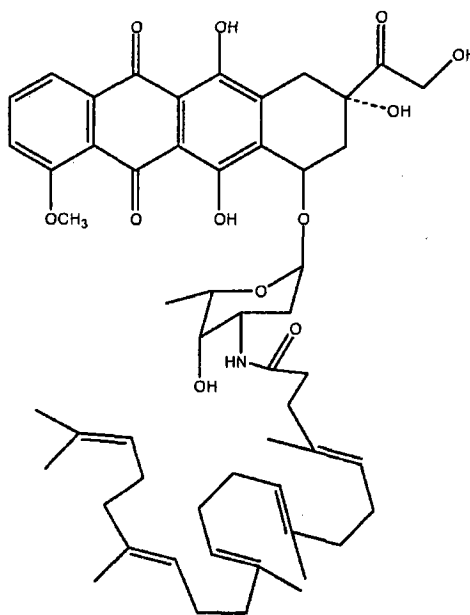
[0053] - 具有如下的式的角鲨烯酰基 - 胰岛素：

[0054]



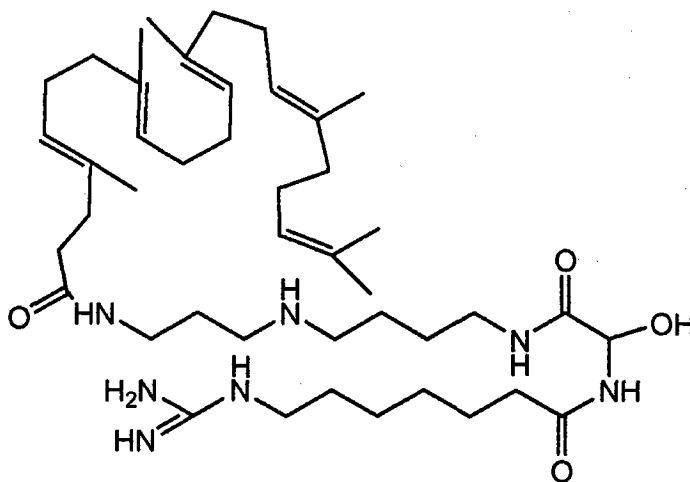
[0055] - 具有如下的式的角鲨烯酰基 - 表柔比星：

[0056]



[0057] - 和具有如下的式的角鲨烯酰基 - 脱氧精脒菌素：

[0058]



[0059] 一般地，以水分散体的形式获得这些化合物。

[0060] 因此，根据本发明的另一个方面，本发明涉及至少一种如前所定义的衍生物的水分散体。

[0061] 根据本发明的纳米颗粒

[0062] 如前面所明确指出的，治疗性活性物质与至少一个具有角鲨烯结构的烃化合物的分子的共价偶联可以赋予用至少一个角鲨烯酰基如此官能化的活性物质以这样的能力，即在极性溶剂介质中组织成紧密形式，从而导致纳米颗粒的形成。

[0063] 一般地，如此获得的纳米颗粒具有 30 至 650nm，特别地 30 至 500nm，和特别地 50 至 250nm，甚至 100 至 200nm 的平均尺寸，其借助于 Coulter[®] N4MD nanosizer, Coulter Electronics, Hialeah, USA 通过光的漫射来测量。

[0064] 因此，根据本发明所考虑的低水溶性的治疗性活性物质与根据本发明的烃衍生物（更特别地，与角鲨烯酸或其衍生物，例如角鲨烯酰基 N- 羟基琥珀酰亚胺酯）的相互作用

赋予所述治疗性物质以这样的物理化学特性,所述物理化学特性足以赋予其形成颗粒的能力,所述颗粒的尺寸表现为对于肠胃外施用,尤其是通过静脉内途径进行施用来说是相容的。

[0065] 根据本发明的另一个方面,本发明涉及制备这些纳米颗粒的方法,其特征在于,所述方法包括:

[0066] - 将根据本发明的衍生物(即预先通过将至少一个具有角鲨烯结构的烃化合物或类似物的分子偶联至具有低水溶解度的治疗性活性物质的分子而形成的衍生物)溶解在至少一种有机溶剂(例如,醇例如乙醇)中,其浓度足以当在搅拌下和通常逐滴地向水相中添加所得的混合物时,获得在所述水相中的悬浮液形式的所述衍生物的纳米颗粒的瞬时形成,和

[0067] - 需要时,分离所述纳米颗粒。

[0068] 一般地,可以在环境温度下进行反应。无论其为何,反应温度不应影响所考虑的活性物质的活性。根据本发明的制备纳米颗粒的方法是特别有利的,因为它不需要表面活性剂的存在。

[0069] 如前面所明确指出的,在具有角鲨烯结构的烃衍生物和活性物质分子之间的偶联可以是直接的或者通过连接臂。

[0070] 此外,本发明者还发现,通过用于纳米沉淀(nanoprécipitation)的治疗性活性物质的量,可以控制这些颗粒的尺寸。这是因为,偶联产物浓度的增加通常导致尺寸的增加,反之亦然。

[0071] 根据一个有利的实施方案,以水分散体的形式配制根据本发明的纳米颗粒,以便将其通常通过全身途径进行施用。

[0072] 根据一个有利的实施方案,该水分散体包含少于5重量%,甚至少于2重量%的C₂至C₄醇,例如乙醇。

[0073] 根据另一个有利的实施方案,该水分散体包含少于5重量%,甚至少于2重量%的表面活性剂或类似物,和更特别地没有表面活性剂或类似物,所述表面活性剂或类似物例如为聚乙二醇、聚甘油或其衍生物例如酯。

[0074] 根据另一个有利的实施方案,该水分散体包含少于5重量%,甚至少于2重量%的聚氧乙基化蓖麻油,和更特别地没有聚氧乙基化蓖麻油,所述聚氧乙基化蓖麻油例如为以名称Crémophore EL[®]进行销售的那些。

[0075] 根据另一个有利的实施方案,该水分散体内在地具有与通过静脉内途径进行施用相容的粘度。

[0076] 因此,借助于角鲨烯酸以水分散性纳米颗粒的形式在水性介质中配制紫杉烷类化合物例如Paclitaxel[®],有利地使得能够获得纳米颗粒的悬浮液,其中除了对于获得可注射悬浮液的等渗性而言所必需的5%右旋糖之外无其他添加剂。因此,看来可能的是:(i)摆脱有毒的Crémophore的使用;(ii)提供可直接注射的水性制剂;和(iii)施用更大浓度(直至4mg/ml)的产品。

[0077] 根据本发明的另一个方面,本发明还涉及这些衍生物和纳米颗粒在药物组合中的用途。

[0078] 此外,本发明还涉及药物组合物,其包含作为具有活性的物质的至少一种根据本

发明的衍生物,所述衍生物尤其以纳米颗粒的形式。

[0079] 根据本发明的衍生物还可以通过所有常规的途径进行施用。然而,如前面所明确指出的,考虑到其颗粒的小尺寸,它们可以以水悬浮液的形式通过静脉内途径进行施用,并因此与血管微循环相容。

[0080] 因此,本发明的另一个方面涉及药物组合物,其至少包含作为具有活性的物质的根据本发明的化合物,所述化合物尤其以纳米颗粒的形式。根据本发明的衍生物在这之中可以与至少一种药学上可接受的载体相联合。

[0081] 作为与根据本发明的组合物相容的药物制剂的例子,尤其可以提及:

[0082] - 静脉内注射液或静脉内灌注液;

[0083] - 盐水溶液或纯化水的溶液;

[0084] - 用于吸入的组合物;

[0085] - 胶囊、糖衣丸剂 (*dragée*) 和扁囊剂,它们尤其掺入有作为载体的水、磷酸钙、糖(例如乳糖、右旋糖或甘露醇)、滑石、硬脂酸、淀粉、碳酸氢钠和 / 或明胶。

[0086] 当所述化合物以在水溶液中的分散体形式进行使用时,它们可以与螯合性试剂或螯合剂、抗氧化剂、pH 调节剂和 / 或缓冲剂类型的赋形剂相联合。

[0087] 当然,根据本发明的纳米颗粒可以在表面上携带许多反应性官能团,例如羟基或胺官能团。因此,可以设想,向这些官能团附着各种各样的分子,尤其是通过共价键。

[0088] 作为可与纳米颗粒相联合的该类型分子的非限制性举例说明,尤其可以提及标记物类型的分子,可确保靶向功能的化合物,以及能够赋予其以特定的药物动力学特性的任何化合物。关于该最后一个方面,因此可以设想在这些纳米颗粒的表面上附着聚乙二醇的亲脂性衍生物,例如聚乙二醇胆固醇或聚乙二醇-磷脂酰乙醇胺,或者更好地,聚乙二醇角鲨烯。这是因为,基于此类化合物的表面包衣对于赋予由于肝巨噬细胞对于纳米颗粒的捕获显著减少而增加的血管暂留来说是有利的。

[0089] 除了前述化合物,根据本发明的药物组合物还可以包含防腐剂、润湿剂、增溶剂和着色剂类型的试剂。

[0090] 由于显而易见的原因,可使用的根据本发明的衍生物的量可以根据使用方式和为其施用所考虑的途径而显著地变化。

[0091] 例如,关于对成年患者用紫杉烷类化合物通过全身途径进行治疗,可以设想以大约 0.1 至 150mg/kg 体重 / 天,和更特别地 1 至 40mg/kg/ 天的剂量施用根据本发明的衍生物。

[0092] 相反地,对于局部施用,可以设想按照相对于所考虑的药物制剂的总重量而言 0.1 至 40 重量%,甚至更多来配制至少一种根据本发明的衍生物。

[0093] 还可能的是,将至少一种根据本发明的衍生物与至少一种可以同样也有益于所考虑的病理学状态的其他具有活性的物质进行共施用。

[0094] 作为这些可与根据本发明的衍生物相组合的具有活性的物质的代表,尤其可以提及其他抗癌的或抑制细胞的分子或大分子(例如铂盐、蒽环类抗生素、有丝分裂纺锤体的毒素、拓扑异构酶的抑制剂、激酶的抑制剂或金属蛋白酶的抑制剂)、皮质激素(例如地塞米松)或非皮质激素类型的抗炎剂或者具有免疫佐剂活性的分子(例如具有抗癌活性的抗体)。可以设想与在某些化学疗法中所使用的高热相联合。根据本发明的衍生物还可以与

手术疗法和 / 或辐射 (用于治疗癌症) 相组合。

[0095] 根据本发明的另一个方面, 本发明还涉及治疗性治疗的方法, 其包括给患者施用有效量的至少一种根据本发明的衍生物和 / 或纳米颗粒, 任选地, 与其他具有活性的物质和 / 或治疗手段 (高热、辐射) 和 / 或手术疗法 (如上面所定义的) 相联合。

[0096] 下面所给出的实施例和附图作为本发明领域的非限制性举例说明而呈现。

[0097] 图 1: 相对于未处理的 KB 细胞 (1A) 而言, 在将 KB 细胞与角鲨烯酰基紫杉醇的纳米颗粒温育 (1B) 后微管蛋白的积累。

[0098] 图 2: 根据实施例 11 所获得的角鲨烯酰基二甘醇酰基 - 紫杉醇衍生物的纳米颗粒的体内抗癌活性的评价, 其通过表征作为时间 (在植入肿瘤后的天数) 的函数的植入到小鼠中的肿瘤的体积 (mm^3) 来进行。

[0099] 图 3: 作为时间 (在静脉内注射 L1210 白血病细胞后的天数) 的函数的携带 L1210 白血病 (通过转移而诱导的) 的小鼠的重量变化的评价, 所述小鼠用角鲨烯酰基 - 多柔比星的纳米颗粒进行处理或不处理。

[0100] 图 4: 作为时间 (在静脉内注射 L1210 白血病细胞后的天数) 的函数的携带 L1210 白血病的小鼠的存活率的评价, 所述小鼠用角鲨烯酰基 - 多柔比星的纳米颗粒进行处理或不处理。

[0101] 实施例 1

[0102] 单角鲨烯酰基紫杉醇的合成

[0103] 在环境温度下, 使在二氯甲烷 (DCM) 中的 450mg 紫杉醇 (0.526mmol) 与 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺 (EDCA, 2.5 摩尔当量, 相对于紫杉醇而言)、二甲基氨基吡啶 (DMAP, 0.5 摩尔当量, 相对于紫杉醇而言) 和角鲨烯酸 (2 摩尔当量, 相对于紫杉醇而言) (事先溶解在 DCM 中) 进行反应。在 1 小时后, 反应结束并用 pH 5 的水来终止, 并且用氯化钠 (NaCl) 水溶液进行萃取。然后, 水相用 DCM 进行洗涤。通过用 DCM/ 乙酸乙酯混合物进行洗脱的 SiO_2 (2.5×40cm) 快速色谱法来进行所获得的混合物的纯化。收集级分 62-80, 并将如此获得的单角鲨烯酰基紫杉醇通过 ^1H NMR (Bruker 300Mhz)、质谱法 (Micromass Waters ESI) 和 RP-HPLC 来进行表征。

[0104] 化学式: $\text{C}_{74}\text{H}_{93}\text{NO}_{15}$; 分子量: 1236.53

[0105] 实施例 2

[0106] 二角鲨烯酰基紫杉醇的合成

[0107] 在环境温度下, 使在二氯甲烷 (DCM) 中的 450mg 紫杉醇 (0.526mmol) 与 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺 (EDCA, 2.5 摩尔当量, 相对于紫杉醇而言)、二甲基氨基吡啶 (DMAP, 0.5 摩尔当量, 相对于紫杉醇而言) 和角鲨烯酸 (2 摩尔当量, 相对于紫杉醇而言) (事先溶解在 DCM 中) 进行反应。在 1 小时后, 反应结束并用 pH 5 的水来终止, 并且用氯化钠 (NaCl) 水溶液进行萃取。然后, 水相用 DCM 进行洗涤。通过用 DCM/ 乙酸乙酯混合物进行洗脱的 SiO_2 快速色谱法 (2.5×40cm) 来进行所获得的混合物的纯化。收集级分 21-32, 并将如此获得的二角鲨烯酰基紫杉醇通过 ^1H NMR (Bruker 300Mhz)、质谱法 (Micromass Waters ESI) 和 RP-HPLC 来进行表征。

[0108] 化学式: $\text{C}_{101}\text{H}_{135}\text{NO}_{16}$; 分子量: 1619.15

[0109] 实施例 3

[0110] 角鲨烯酰基紫杉醇的纳米颗粒的制备

[0111] 将 4mg 角鲨烯酰基紫杉醇溶解在 1.5ml 乙醇中 (2.5mg/ml), 并且在连续搅拌 (速度 500rpm) 下逐滴添加到 1ml 含有 5% 右旋糖的水溶液中。角鲨烯酰基紫杉醇自装配成尺寸为 100 至 200nm 的纳米颗粒的形式。然后, 借助于 rotavapor® 在减压下完全蒸发掉乙醇, 从而获得终浓度为 4mg/ml 的角鲨烯酰基紫杉醇的纳米颗粒悬浮液。

[0112] 实施例 4[0113] 角鲨烯酰基紫杉醇的其他纳米颗粒的制备

[0114] 将变化量 (在下面的表 1 中明确指出) 的角鲨烯酰基紫杉醇溶解在 0.25ml 四氢呋喃 (THF) 中。在连续搅拌 (速度 500rpm) 下, 将所获得的溶液逐滴添加到 0.25ml 水中。角鲨烯酰基紫杉醇以尺寸为 100 至 200nm 的纳米颗粒的形式沉淀出来。然后, 借助于 rotavapor® 在减压下完全蒸发掉 THF, 从而获得其尺寸依照浓度而变化的角鲨烯酰基紫杉醇的纳米颗粒悬浮液 (参见下表)。

[0115] 表 1

[0116]

角鲨烯酰基紫杉醇 (mmol)	直径 (nm)	多分散性指数
0.36	151 ± 84	0.39
0.88	169 ± 92	0.30
1.76	177 ± 99	0.31

[0117] 实施例 5[0118] 向小鼠注射角鲨烯酰基紫杉醇的纳米颗粒, 并与 TAXOL 进行比较

[0119] 以 4 × 50mg/kg (紫杉醇当量) 的剂量, 将在实施例 3 中所制备的角鲨烯酰基紫杉醇的纳米颗粒悬浮液 (4mg/ml) 通过静脉内途径注射给小鼠 (C57BL6); 注射在第 0、5、9 和 14 天进行。注射是容易的, 并且动物没有显示出任何毒性征候。没有记录到任何死亡 (在至少一个月的时间段内)。直接静脉内注射 TAXOL 溶液 (没有在 0.9% NaCl 中进行稀释) 导致 100% 的经处理的小鼠立即死亡。当将 TAXOL 溶液事先在 0.9% NaCl 中进行稀释时, 可以注射的最大剂量为 20mg/kg。

[0120] 实施例 6[0121] 角鲨烯酰基紫杉醇的纳米颗粒的抗癌活性

[0122] 该活性的表征根据下列实验方案通过免疫荧光法来进行:

[0123] 第 1 天: 将源自人宫颈癌的 KB 3.1 细胞和相应于人结肠癌细胞系的 HT-29 细胞, 以 20000 个细胞/孔的密度置于 6 孔平板中 (终体积为 2ml RPMI+FCS)。将细胞在 37°C 的温度和 5% CO₂ 下进行温育。

[0124] 第 2 天: 漂洗细胞, 并向其添加根据实施例 3 中描述的实验方案所制备的角鲨烯酰基紫杉醇的纳米颗粒 (浓度为 5 μM)。

[0125] 第 3 天: 在 14-16 小时后, 用 PBS 漂洗两次, 随后添加提取溶液 (Triton X-100+0.5% PEM-PIPES 100mM, EGTA 2mM, MgCl₂ 2mM pH 6.8)。在 4 分钟后, 进行漂洗,

随后添加 2ml 的在 PEM 中的 3% 甲醛溶液。40 分钟之后,进行漂洗,随后在 30 分钟期间添加 20% 的在 PBS 中的 FCS。然后,再添加鼠类抗 α -微管蛋白-FITC 单克隆抗体(稀释至 1 : 200),并且让其温育 1 小时。最后,用 PBS 进行漂洗,并且通过共焦荧光显微术(Leica TCS SP2)进行分析。

[0126] 如通过图 1B 所图解说明的,在荧光显微术中微管蛋白团的形成是清晰可见的,这表明了角鲨烯酰基紫杉醇的纳米颗粒作为纺锤体的毒素的活性。未处理的 KB 细胞作为对照而呈现(图 1A)。

[0127] 实施例 7

[0128] 角鲨烯酰基-胰岛素的纳米颗粒的制备

[0129] a) 角鲨烯酰基 N-羟基琥珀酰亚胺的获得

[0130] 与胰岛素的反应需要预先制备和分离反应中间体角鲨烯酰基 N-羟基琥珀酰亚胺酯。在实践中,使溶解在 2ml 二氯甲烷(DCM)中的 300mg (0.75mmol) 角鲨烯酸与 72.5mg N-羟基琥珀酰亚胺(2.0 摩尔过量)和 309mg 二环己基碳二亚胺(DCCD) (2 \times) (溶解在二氯甲烷中)进行反应,并在搅拌下维持 2 小时。然后,除去沉淀出的脲,随后将混合物溶解在乙酸乙酯中,将其进行过滤,并保存于 -20 $^{\circ}$ C 的温度下。通过 NMR 和质谱法来表征角鲨烯酰基 N-羟基琥珀酰亚胺酯(Sq-CO-NHS)。

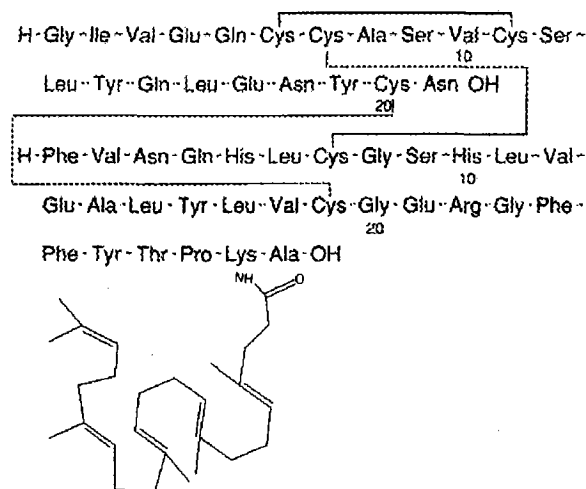
[0131] b) 角鲨烯酰基-胰岛素缀合物的获得

[0132] 将 50mg 胰岛素(源自牛胰腺并且符合 USP 测试的标准)溶解在 5ml 无水二甲亚砜(>99% 的纯度)中,并且添加至 30 μ l 的处于包含 13.2mg Sq-CO-NHS(以 3 : 1 的摩尔过量)的烧瓶中的 N,N-二异丙基乙胺中。反应在环境温度下进行 2 小时,并且将溶液彻底地进行透析以便除去有机溶剂和小分子杂质,随后进行冻干。然后,将固体用 DCM 进行洗涤,随后进行过滤。获得 46mg 的白色粉末。

[0133] 缀合反应通过分析型 HPLC 来进行检查,其中使用 Waters RP C18 柱(150.9mm, 5 μ m, 300 \AA)和作为洗脱溶剂的甲醇/水(梯度 +0.1% TFA)。

[0134] 胰岛素的角鲨烯缀合物的表征通过 MALDI-TOF 和 Orbi-Trap MS 分析来进行。该化合物符合下面的结构式:

[0135]



[0136] c) 角鲨烯酰基-胰岛素的纳米颗粒的制备

[0137] 将 4mg 经纯化的胰岛素的角鲨烯缀合物溶解在无水二甲亚砜 (DMSO) (1ml) 中, 并用蒸馏水彻底地进行透析。在透析过程期间形成纳米颗粒。通过聚乙二醇 (PEG) 10kDa 固体浓缩将终体积减小至 1ml。

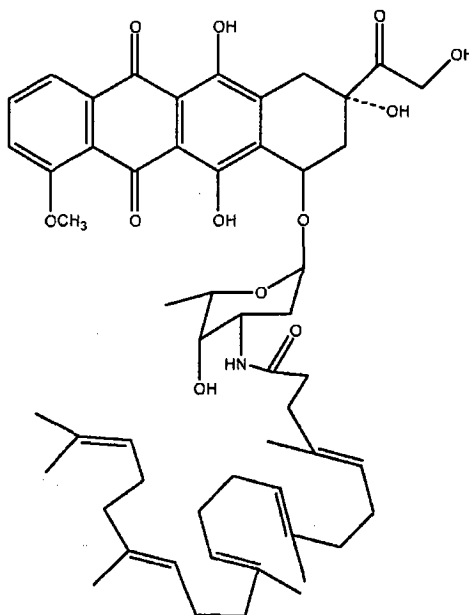
[0138] 实施例 8

[0139] 角鲨烯酰基 - 表柔比星的纳米颗粒的制备

[0140] a) 角鲨烯酰基 - 表柔比星 3' 酰氨基衍生物的获得

[0141] 将 100mg 表柔比星快速溶解在 2ml 无水二甲基甲酰胺 (DMF) 中, 并与事先溶解在无水 DMF 中的 180mg 角鲨烯酰基 N- 羟基琥珀酰亚胺酯 (摩尔过量 :2.0) 的溶液相混合, 并且添加 20 μ l N, N- 二异丙基乙胺。在 25°C 的温度下混合 2 小时后, 用 DCM 将溶液进行稀释, 并用蒸馏水进行洗涤。借助于用 DCM- 乙醇混合物进行洗脱的在 SiO₂ (2.5×25cm) 上的快速色谱法来进行纯化。收集级分 60-67, 并且获得 100mg 角鲨烯酰基 - 表柔比星 3' 酰氨基缀合物, 并通过 NMR 和质谱法进行表征。该化合物符合下面的结构式:

[0142]



[0143] b) 角鲨烯酰基 - 表柔比星的纳米颗粒的制备

[0144] 在剧烈搅拌下, 将 200 μ l 体积的溶解在丙酮中的角鲨烯酰基-3-表柔比星 (10mg/ml) 逐滴添加到 5ml 蒸馏水中。立即获得了红色的微悬浮液。借助于 rotavapor® 在减压下蒸发掉丙酮之后, 获得了稳定的纳米颗粒悬浮液。

[0145] 实施例 9

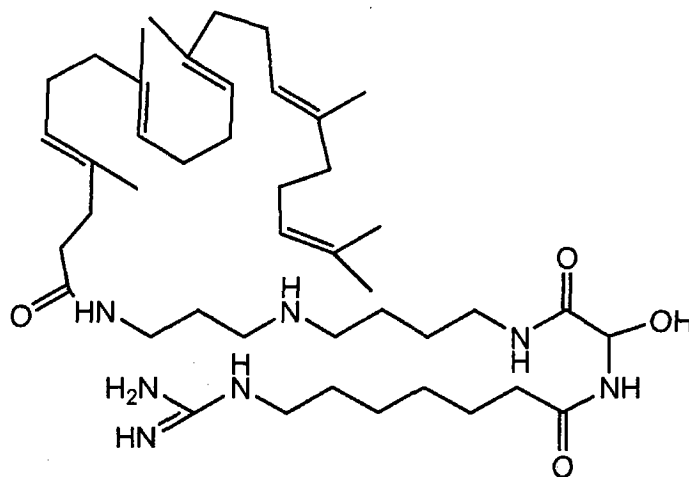
[0146] 角鲨烯酰基 - 脱氧精胍菌素的纳米颗粒的制备

[0147] a) 角鲨烯酰基 - 脱氧精胍菌素的获得

[0148] 首先通过纯化名称为 Gusperimus (Spanidine) 的商业产品来制备脱氧精胍菌素。在两次色谱法过程 (离子交换和凝胶过滤) 后, 使碱形式的脱氧精胍菌素 (在水中低可溶性的) 与角鲨烯酰基 N- 羟基琥珀酰亚胺酯进行反应。为此, 将 24mg 脱氧精胍菌素快速溶解在 1ml 无水 DMF 中, 并添加到预先溶解在相同溶剂中的 29mg 角鲨烯酰基 N- 羟基琥珀酰亚胺酯 (摩尔过量 :1.3) 中。然后, 添加 10 μ l N, N- 二异丙基乙胺。在 25°C 的温度下混

合 2 小时后,用 DCM 将溶液进行稀释,并用蒸馏水进行洗涤。通过用 DCM/ 乙醇 +1% 三乙胺 (TEA) 进行洗脱的在 SiO_2 (1.5×28cm) 上的快速色谱法进行纯化。然后,收集在坂口试验 (Sakaguchi test) (胍基) 中显示为阳性的级分。获得 15mg 角鲨烯酰基 - 脱氧精胍菌素缀合物,随后通过 NMR 和质谱法进行表征。该角鲨烯酰基 - 脱氧精胍菌素缀合物具有下面的结构式:

[0149]



[0150] b) 角鲨烯酰基 - 脱氧精胍菌素的纳米颗粒的制备

[0151] 在强烈搅拌下,将 100 μl 的溶解在乙醇中的角鲨烯酰基 - 脱氧精胍菌素 (4mg/ml) 逐滴添加到 2ml 蒸馏水中。借助于 rotavapor[®] 在减压下蒸发掉乙醇之后,获得尺寸为 162nm 的纳米颗粒的悬浮液 (多分散性指数为 0.12,其通过 27.38+/-2.60mV 的表面电势来表征)。

[0152] 实施例 10

[0153] 角鲨烯酰基琥珀酰基 - 紫杉醇的合成

[0154] 步骤 1

[0155] 将紫杉醇溶解在 4- 二甲基氨基吡啶 (0.1 当量) 和琥珀酸酐 (2 当量) 中,并在真空下干燥 2 小时。在添加无水吡啶后,将反应混合物在环境温度下搅拌 3 小时。在除去溶剂后,将粗混合物溶解在二氯甲烷 (DCM) 中并用盐水进行漂洗。不需要任何额外的纯化紫杉醇 -2' - 琥珀酸酯的步骤。用于检测 2' OH 的不存在、2' C-H 的转化 (在 5.51 处) 以及在正常位置 (4.48) 处 7C-H 的定量存在的 NMR 分析表明,起始材料完全转变为琥珀酸酯衍生物。

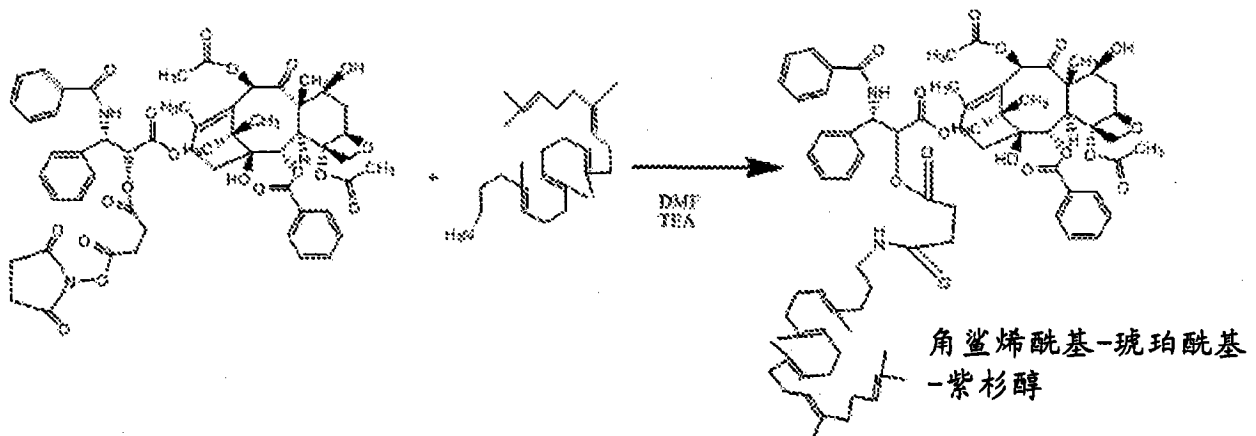
[0156] 步骤 2

[0157] 在 DCM 中,从二苯基磷酰氯、N- 羟基琥珀酰亚胺和三乙胺 (TEA) 开始来制备 N- 羟基琥珀酰亚胺基 - 二苯基磷酸酯 (SDPP)。将粗 SDPP 在醚中进行研磨,溶解在乙酸乙酯中,用水进行漂洗,干燥,并在真空下浓缩,以便获得 SDPP。通过质谱法 (MS) 进行的表征确认了在 348 处的分子峰。

[0158] 向紫杉醇 -2' - 琥珀酸酯的溶液中添加在具有 TEA (4 当量) 的乙腈中的 SDPP (1.5 当量)。将反应混合物在环境温度下搅拌 6 小时,随后在真空下进行浓缩。将粗反应溶解在乙酸乙酯中,并用盐水进行萃取。如上面所描述的,通过 TLC 和 HPLC 分析来检查紫杉醇 -2' - 琥珀酰基 -NHS 的形成,这不需要额外的纯化步骤。

[0159] 步骤 3

[0160]



[0161] 使溶解在无水二甲基甲酰胺 (DMF) 中的紫杉醇-2'-琥珀酰基-NHS 与角鲨烯胺 (1 当量) 在三乙胺 (1 当量) 存在下进行反应。在环境温度下 8 小时和在 5°C 下过夜后, 将混合物用盐水进行萃取, 并在 SiO₂ 凝胶上进行纯化, 其中用 DCM-乙酸乙酯进行洗脱。用 30-50% 乙酸乙酯洗脱下主要产物 (角鲨烯酰基琥珀酰基-紫杉醇), 并且通过在 RP-18 柱上的 HPLC 分析来检查其纯度。

[0162] ¹H-NMR(CDC₁₃): d 8.13(d, 2H, OC(O) o-ArH), 7.75(d, 2H, NC(O) o-ArH), 7.62(t, 1H, OC(O) p-ArH), 7.53±7.49(带, 3H), 7.43±7.35(带, 7H), 6.91(t, 1H, NH), 6.35(s, 1H, C(10)-H), 6.27(t, 1H, C(13)-H), 5.99(t, 1H, C(3')-H), 5.69(d, 1H, C(2)-H), 5.30(dd, 1H, C(7)-H), 5.44(dd, 1H, C(2')-H), 5.20(s, 5H, C(sq)-H), 4.97(d, 1H, C(5)-H), 4.39±4.25(带, 3H), 4.24±4.10(带, 7H), 3.96(d, 1H), 3.85(dd, 1H), 3.75(m, 1H), 3.42(t, 2H, sq CH₂-NH), 2.61(p, 1H, C(6)-H 和 m 4H 琥珀酰基 CH₂), 2.46(d, 3H, C(4)-OAc), 2.41(m, 1H, C(14)-H), 2.29 和 2.20(s, 4H, CH₂ sq. 酸), 2.23(m, 1H, C(14)-H), 2.14(d, 3H, C(10)-OAc), 2.01(s, 3H, C(12)-CH₃), 2.00(m, 16H, CH₂ sq), 1.97(m, 1H, C(6)-H), 1.81(s, 3H, C(8)-CH₃), 1.71(m, 18H, C(sq)-CH₃), 1.41(d, 3H), 1.21(s, 3H, C(15)-CH₃), 1.16(s, 3H, C(15)-CH₃)。

[0163] 实施例 11

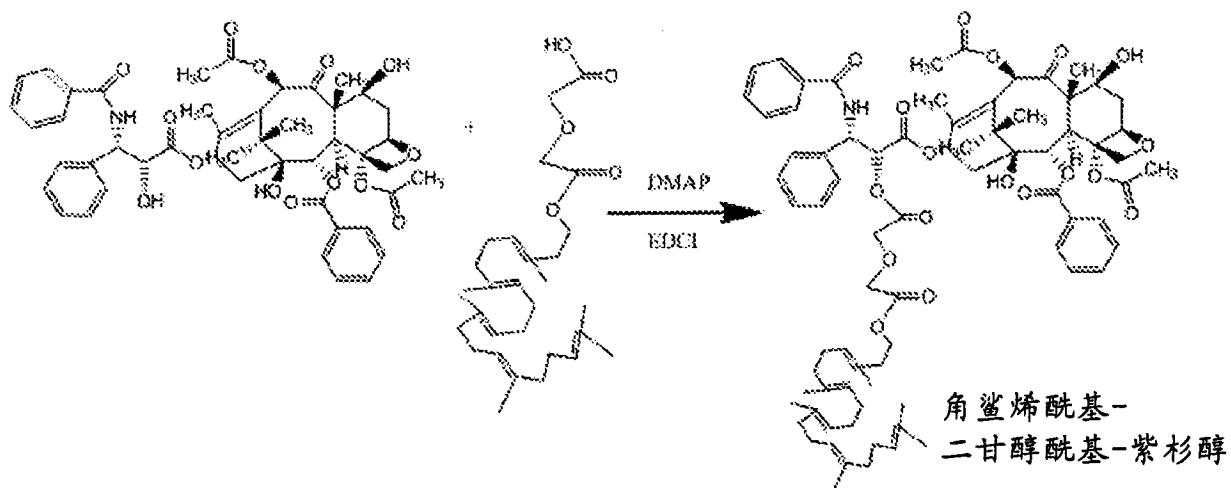
[0164] 角鲨烯酰基二甘醇酰基-紫杉醇的合成

[0165] 步骤 1

[0166] 在搅拌下, 在环境温度下, 使角鲨烯 (以醇的形式) 与二甘醇酸酐 (2.5 当量) 在无水吡啶中混合过夜。除去溶剂, 并将残留物用稀盐酸和盐水 (具有 DCM) 进行萃取。所希望的产物的转化通过 TLC 来进行检查。将如此获得的产物在真空下进行干燥, 并且无需额外的纯化步骤即可使用该酸。

[0167] 步骤 2

[0168]



[0169] 将步骤 1 中所描述的角鲨烯二甘醇酸 (2 当量) 溶解在 DCM 中, 随后添加事先溶解在 DCM 中的紫杉醇 (1 当量) 和 4-N, N- 二甲基氨基吡啶 (3 当量)。在 10 分钟后, 添加 EDCI (1.3 当量) 并在环境温度下搅拌溶液 2 小时。在除去溶剂后, 使粗产物通过硅胶柱 (其中使用 DCM/ 乙醇梯度), 以便获得经纯化的产物, 其纯度通过在 RP-18 柱上的 HPLC 分析来进行检查。

[0170] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) :d 8.13(d, 2H, OC(O) o-ArH), 7.75(d, 2H, NC(O) o-ArH), 7.62(t, 1H, OC(O) p-ArH), 7.53±7.49(带, 3H), 7.43±7.35(带, 7H), 6.91(t, 1H, NH), 6.35(s, 1H, C(10)-H), 6.27(t, 1H, C(13)-H), 5.99(t, 1H, C(3')-H), 5.69(d, 1H, C(2)-H), 5.30(dd, 1H, C(7)-H), 5.44(dd, 1H, C(2')-H), 5.20(s, 5H, C(sq)-H), 4.97(d, 1H, C(5)-H), 4.39±4.25(带, 3H), 4.33(m, 4H 二甘醇酰基 CH₂), 4.24±4.10(带, 7H), 4.12(m, 2H C(1) 角鲨烯), 3.96(d, 1H), 3.85(dd, 1H), 3.75(m, 1H), 2.61(p, 1H, C(6)-H), 2.46(d, 3H, C(4)-OAc), 2.41(m, 1H, C(14)-H), 2.29 和 2.35(s, 4H, CH₂ sq. 酸), 2.23(m, 1H, C(14)-H), 2.14(d, 3H, C(10)-OAc), 2.01(s, 3H, C(12)-CH₃), 2.00(m, 16H, CH₂ sq), 1.97(m, 1H, C(6)-H), 1.81(s, 3H, C(8)-CH₃), 1.71(m, 18H, C(sq)-CH₃), 1.41(d, 3H), 1.21(s, 3H, C(15)-CH₃), 1.16(s, 3H, C(15)-CH₃)。

[0171] 实施例 12

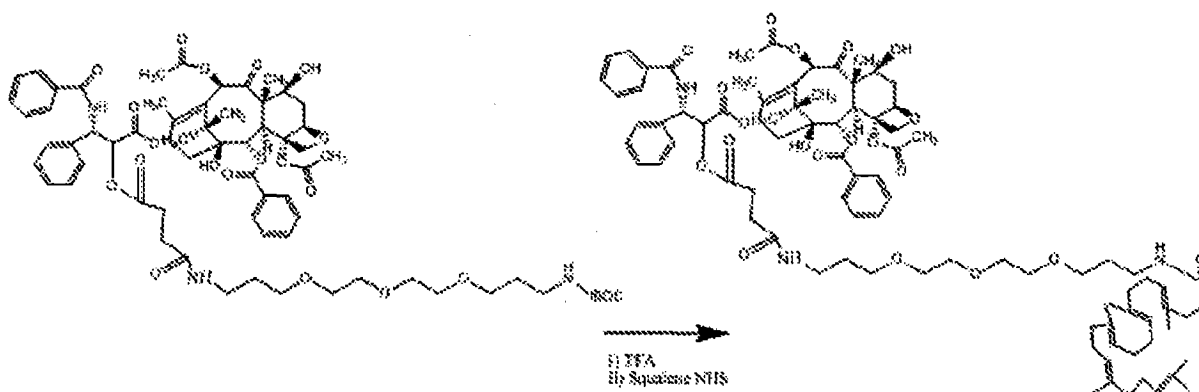
[0172] 角鲨烯酰基琥珀酰基-PEG340-紫杉醇的合成

[0173] 步骤 1

[0174] 将紫杉醇琥珀酰基-NHS (参见实施例 10, 步骤 3) 溶解在 DCM 中, 并在搅拌下向前面的溶液中添加 tBoc-NH-PEG3-NH₂ (1 当量) 在 DCM 中所形成的溶液。在 4°C 的温度下, 添加三乙胺 (0.5 当量), 并将反应在 20°C 的温度下维持 5 小时。将粗反应混合物用 0.1N HCl, 随后用盐水进行萃取。将如此获得的产物用于下面的步骤, 而无需额外的纯化。

[0175] 步骤 2

[0176]



角鲨烯酰基-琥珀酰基-PEG340-紫杉醇

[0177] 将紫杉醇-琥珀酰基-PEG3-NH-tBoc 溶解在无水 DCM 中,并于 20°C 在搅拌下添加三氟乙酸 (TFA)。在 2 小时后,反应结束,并且用乙酸钠溶液,随后用盐水对混合物进行萃取直至中性。

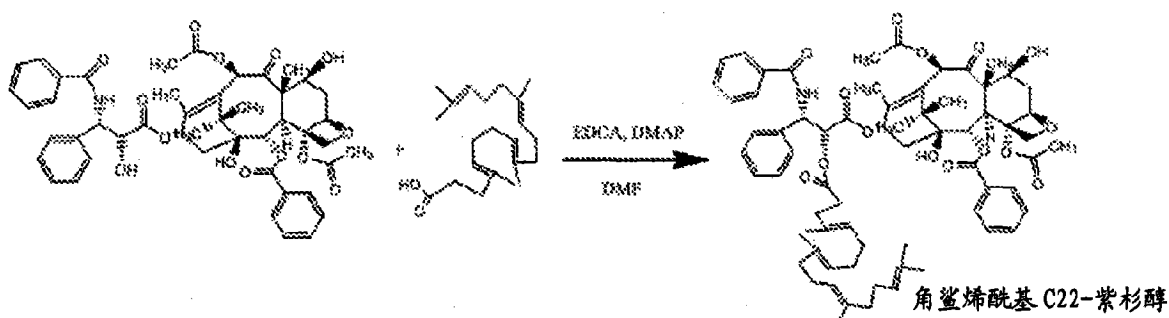
[0178] 将事先通过在 EDCI 存在下使角鲨烯酸和 NHS 反应而制备的角鲨烯 N-羟基琥珀酰亚胺酯 (1.2 当量) 添加至紫杉醇-琥珀酰基-PEG3-胺 (1 当量)。添加三乙胺 (0.3 当量) 并在环境温度下搅拌反应混合物 6 小时。在除去溶剂后,将粗产物通过硅胶柱 (其中使用 DCM/乙醇梯度) 进行纯化,以便获得经纯化的产物,其纯度通过在 RP-18 柱上的 HPLC 分析来进行检查。

[0179] $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$:d 8.13(d, 2H, OC(O) o-ArH), 7.75(d, 2H, NC(O) o-ArH), 7.62(t, 1H, OC(O) p-ArH), 7.53±7.49(带, 3H), 7.43±7.35(带, 7H), 6.91(t, 1H, NH), 6.35(s, 1H, C(10)-H), 6.27(t, 1H, C(13)-H), 5.99(t, 1H, C(3')-H), 5.69(d, 1H, C(2)-H), 5.30(dd, 1H, C(7)-H), 5.44(dd, 1H, C(2')-H), 5.20(s, 5H, C(sq)-H), 4.97(d, 1H, C(5)-H), 4.39±4.25(带, 3H), 4.24±4.10(带, 7H), 3.96(d, 1H), 3.85(dd, 1H), 3.75(m, 1H), 3.42(t, 2H, sq CH₂-NH), 3.54(m, 6H, CH₂-O), 3.37(m, 4H, O-CH₂), 3.13(m, 4H, CH₂-N), 2.61(p, 1H, C(6)-H 和 m 4H 琥珀酰基 CH₂), 2.46(d, 3H, C(4)-OAc), 2.41(m, 1H, C(14)-H), 2.29 和 2.20(s, 4H, CH₂ sq. 酸), 2.23(m, 1H, C(14)-H), 2.14(d, 3H, C(10)-OAc), 2.01(s, 3H, C(12)-CH₃), 2.00(m, 16H, CH₂ sq), 1.97(m, 1H, C(6)-H), 1.81(s, 3H, C(8)-CH₃), 1.71(m, 18H, C(sq)-CH₃), 1.41(d, 3H), 1.21(s, 3H, C(15)-CH₃), 1.16(s, 3H, C(15)-CH₃)。

[0180] 实施例 13

[0181] 角鲨烯酰基 C22-紫杉醇的合成

[0182]



角鲨烯酰基 C22-紫杉醇

[0183] 向角鲨烯酸-C22 在无水 DMF 中所形成的溶液之中添加 EDCA (1.5 当量)、DMAP (0.5

当量)和紫杉醇(1.6当量)(在DMF中)。在5小时后,用pH等于5.0的水中止反应,并用盐水进行萃取。

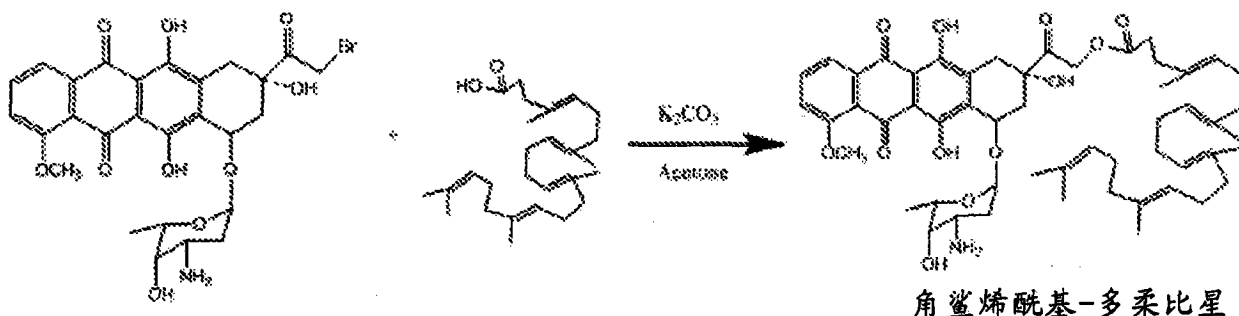
[0184] 将粗混合物通过在SiO₂上的色谱法进行纯化,其中使用经优化的梯度以DCM/乙酸乙酯进行洗脱。用10%乙酸乙酯洗脱出含有所希望的产物的级分。收集纯的角鲨烯酰基C22-紫杉醇级分,并且通过在具有反相极性的RP-18柱上的HPLC分析来检查纯度,其中用乙腈/水混合物进行洗脱。

[0185] ¹H-NMR(CDC13):d 8.13(d,2H,OC(O)o-ArH),7.75(d,2H,NC(O)o-ArH),7.62(t,1H,OC(O)p-ArH),7.53±7.49(带,3H),7.43±7.35(带,7H),6.91(t,1H,NH),6.35(s,1H,C(10)-H),6.27(t,1H,C(13)-H),5.99(t,1H,C(3')-H),5.69(d,1H,C(2)-H),5.30(dd,1H,C(7)-H),5.44(dd,1H,C(2')-H),5.20(s,5H,C(sq)-H),4.97(d,1H,C(5)-H),4.39±4.25(带,3H),4.24±4.10(带,7H),3.96(d,1H),3.85(dd,1H),3.75(m,1H),2.61(p,1H,C(6)-H),2.46(d,3H,C(4)-OAc),2.41(m,1H,C(14)-H),2.29和2.35(s,4H,CH₂sq.酸),2.23(m,1H,C(14)-H),2.14(d,3H,C(10)-OAc),2.01(s,3H,C(12)-CH₃),2.00(m,16H,CH₂sq),1.97(m,1H,C(6)-H),1.81(s,3H,C(8)-CH₃),1.71(m,15H,C(sq)-CH₃),1.41(d,3H),1.21(s,3H,C(15)-CH₃),1.16(s,3H,C(15)-CH₃)。

[0186] 实施例 14

[0187] 14-角鲨烯酰基-多柔比星的合成

[0188]



[0189] 在溴和原甲酸三甲酯存在下,柔红霉素形成柔红霉素的14-溴-13-二甲基缩醛,其在用丙酮进行搅拌下提供出14-溴柔红霉素。使溶解在无水丙酮中的该溴代柔红霉素与角鲨烯酸(3当量)在碳酸钾存在下进行反应。在20小时后,将反应过滤,蒸发掉溶剂,并将粗产物通过在SiO₂柱上的色谱法(4:1,DCM-甲醇)进行纯化,以便获得14-角鲨烯酰基-多柔比星。

[0190] ¹H-NMR(CDC13):8.02(d,1H,H-3),7.87(d,1H,H-1),7.70(t,1H,H-2),5.46(s,1H,H-10),5.3-5.25(m,2H,H-14a,H-14b)和5.20(s,5H,C(sq)-H),5.19(s,1H,H-7),4.15(q,1H,H-50),4.01(s,3H,OCH₃),3.74(m,2H,H-30,H-40),3.24(d,1H,H-10),3.00(d,1H,H-10),2.43(m,1H,H-8),2.29和2.35(s,4H,CH₂sq.酸),2.13(m,1H,H-8),2.03(m,16H,CH₂sq),1.97(m,1H,H-20),1.82(m,1H,H-20),1.71(m,18H,C(sq)-CH₃),1.29(d,3H,CH₃)。

[0191] 实施例 15

[0192] 根据实施例 10 至 14 合成的衍生物的纳米颗粒的制备和表征

[0193] 通过纳米沉淀来制备各种不同活性物质的纳米颗粒。在紫杉醇的情况下,在搅拌

(500rpm) 下, 在 5% 右旋糖水溶液中逐滴添加含有角鲨烯酰基 / 紫杉醇缀合物的乙醇制溶液 (基液, 5-10mg/mL)。自动发生纳米颗粒的沉淀。借助于 Rotavapor® 完全蒸发掉有机溶剂, 以便获得纯的纳米颗粒的水悬浮液。

[0194] 至于角鲨烯酰基 - 聚乙二醇 (以 1 : 0.5 的比率), 将其混合在乙醇制溶液中, 并根据前面所描述的方法来制备纳米颗粒。

[0195] 为了制备角鲨烯酰基 - 多柔比星的纳米颗粒, 使用二氯甲烷和乙醇的混合物代替纯乙醇, 但该过程的其余部分与上面所描述的那些相似。

[0196] 将从前面在实施例 10 至 14 中所描述的缀合物开始而形成的纳米颗粒的组合物显示在下表中:

[0197]

实施例编号	成分	量
10	角鲨烯酰基琥珀酰基-紫杉醇	5.0 mg
	角鲨烯酰基-聚乙二醇 (MM = 2369)	2.5 mg
	右旋糖	0.05 g
	注射用水	对于 1 mL 而言足量
11	角鲨烯酰基二甘醇酰基-紫杉醇	5.0 mg
	右旋糖	0.05 g
	注射用水	对于 1 mL 而言足量
12	角鲨烯酰基琥珀酰基-PEG340-紫杉醇	3 mg
	右旋糖	0.05 g
	注射用水	对于 1 mL 而言足量
13	角鲨烯酰基 C22-紫杉醇	2.5 mg
	右旋糖	0.05 g
	注射用水	对于 1 mL 而言足量
14	角鲨烯酰基-多柔比星	2 mg
	右旋糖	0.05 g
	注射用水	对于 1 mL 而言足量

[0198] 在 20°C 的温度下, 用 zetasizer (Malvern Instruments, UK) 通过光的漫射来测定纳米颗粒的平均尺寸和纳米颗粒的多分散性指数。在 MilliQ® 水中稀释纳米颗粒的悬浮液之后进行测量。

[0199] 将紫杉醇和多柔比星的角鲨烯酰基衍生物的纳米颗粒的尺寸及其多分散性指数列于下表中:

[0200]

实施例编号	缀合物的类型	颗粒的平均直径 (nm)	多分散性指数

10	角鲨烯酰基琥珀酰基 - 紫杉醇	250.9	0.061
11	角鲨烯酰基二甘醇酰基 - 紫杉醇	150.0	0.075
12	角鲨烯酰基琥珀酰基 - PEG340 - 紫杉醇	643.9	0.081
13	角鲨烯酰基 C22 - 紫杉醇	239.3	0.077
14	角鲨烯酰基 - 多柔比星	138.2	0.325

[0201] 实施例 16

[0202] 角鲨烯酰基缀合物的体外抗癌活性的评价

[0203] 以纳米颗粒形式的角鲨烯酰基 / 紫杉醇类型的缀合物的体外抗癌活性在鼠肺肿瘤细胞系 Madison's 109 (M109) 上来实现。将 M109 细胞在补充有 10% 胎牛血清、 $50 \text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$ 青霉素和 $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 链霉素以及 2mM L- 谷氨酰胺的 RPMI 1640 中进行培养。通过使用溴化 3-[4,5- 二甲基噻唑 -2- 基]-3,5- 二苯基四唑鎓 (MTT) 测试, 经测量线粒体脱氢酶活性来进行该分析。将处于指数生长期的细胞接种在 96- 孔平板上, 并在潮湿的气氛 (具有在空气中的 5% CO_2) 中于 37°C 预温育 24 小时。将各种不同稀释度的紫杉醇的纳米颗粒添加至处于培养基中的细胞。每个稀释度测试三次。在 37°C 下 72 小时后, 在每个孔中添加 $200 \mu\text{L}$ 的在细胞培养基中的 MTT 溶液 ($0.5 \text{mg}/\text{ml}$)。在 37°C 下温育 2 小时 30 分钟后, 除去培养基并将所获得的甲臯晶体溶解在 $200 \mu\text{L}$ 提取溶液 (二甲亚砜) 中。通过使用微量培养板阅读器 (Metertech Σ 960, Fisher Bioblock, Illkirch, France), 在 570nm 处测量转化的染料的吸收能力, 其与活细胞的数目成正比。存活细胞的百分比通过测定经处理的细胞和未处理的细胞之间吸收能力的比率来计算。

[0204] 角鲨烯酰基 - 多柔比星的纳米颗粒的体外抗癌活性在鼠白血病细胞系 L1210 WT 上进行评价。将细胞在补充有 10% 胎牛血清、 $50 \text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$ 青霉素和 $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 链霉素以及 2mM L- 谷氨酰胺的 RPMI 1640 中进行培养。该评价根据上面所描述的实验方案来进行。

[0205] 将各种不同的角鲨烯酰基 / 紫杉醇和角鲨烯酰基 - 多柔比星类型的缀合物的纳米颗粒的 50% 抑制浓度 (IC_{50}) 列于下表中:

[0206]

实施例编号	纳米颗粒的类型	(IC_{50}) (μM)
10	角鲨烯酰基琥珀酰基 - 紫杉醇	0.072
11	角鲨烯酰基二甘醇酰基 - 紫杉醇	0.175
12	角鲨烯酰基琥珀酰基 - PEG340 - 紫杉醇	0.490
13	角鲨烯酰基 C22 - 紫杉醇	7.300
14	角鲨烯酰基 - 多柔比星	0.291

[0207] 实施例 17

[0208] 根据实施例 11 所获得的角鲨烯酰基二甘醇酰基 - 紫杉醇衍生物的纳米颗粒的体内抗癌活性的评价

[0209] 将重约 15-18g 的 CD2F1 小鼠 (4-5 周龄) 用于该研究。用用于小鼠的标准膳食和水 (任意获取) 喂养所述小鼠。通过在小鼠下腹部中皮下注射悬浮的处于指数生长的 M109 细胞 (1×10^6 个细胞) 来建立 M109 皮下肿瘤模型 (鼠肺肿瘤)。让可触知的肿瘤 (大约 $50-100\text{mm}^3$) 在注射位点处进行生长。将携带肿瘤的小鼠分成 2 个组 (具有 5-6 只), 即未处理的组和用 $160\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 角鲨烯酰基二甘醇酰基 - 紫杉醇纳米颗粒进行处理 (在连续的 5 天期间进行静脉内注射) 的组。定期检查小鼠以查验肿瘤体积的差异, 并由此评价抗癌效力。

[0210] 角鲨烯酰基二甘醇酰基 - 紫杉醇的纳米颗粒通过控制经皮下植入小鼠中的 M109 肿瘤的进展而显示出抗癌活性。

[0211] 这些结果显示在图 2 中。

[0212] 实施例 18

[0213] 根据实施例 14 所获得的角鲨烯酰基 - 多柔比星衍生物的纳米颗粒的体内抗癌活性的评价

[0214] 将重约 15-18g 的 DBA/2 小鼠 (4-5 周龄) 用于该研究。如关于实施例 17 那样, 使用用于小鼠的标准膳食和水 (任意获取) 喂养所述小鼠。通过在小鼠中经静脉内途径注射悬浮的处于指数生长的 L1210 细胞 (0.1×10^6 个细胞) 来建立 L1210 侵袭性转移性白血病 (鼠白血病) 模型。将携带肿瘤的小鼠分成 2 个组 (具有 5-6 只), 即未处理的组和用角鲨烯酰基 - 多柔比星纳米颗粒 ($13\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 在注射肿瘤细胞后第 1、7 和 14 天通过静脉内途径进行注射) 进行处理的组。在处理, 定期检查小鼠以查验重量和存活率 (使得能够评价抗癌活性效力的参数) 的差异。

[0215] 在代表癌症的侵袭性转移性形式的该模型中, 角鲨烯酰基 - 多柔比星的纳米颗粒显示出有效的抗癌活性 (图 3) 以及经改善的携带白血病的小鼠的存活率 (图 4)。

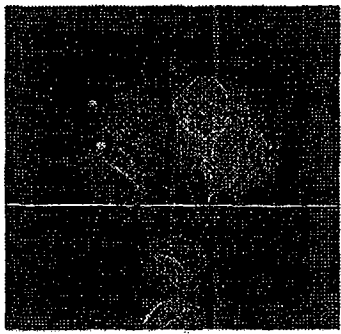


图1A

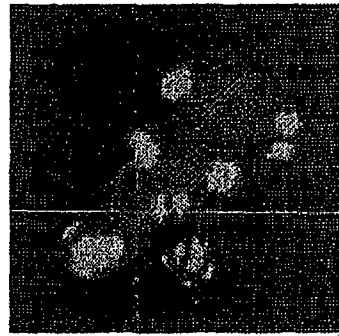


图1B

图 1

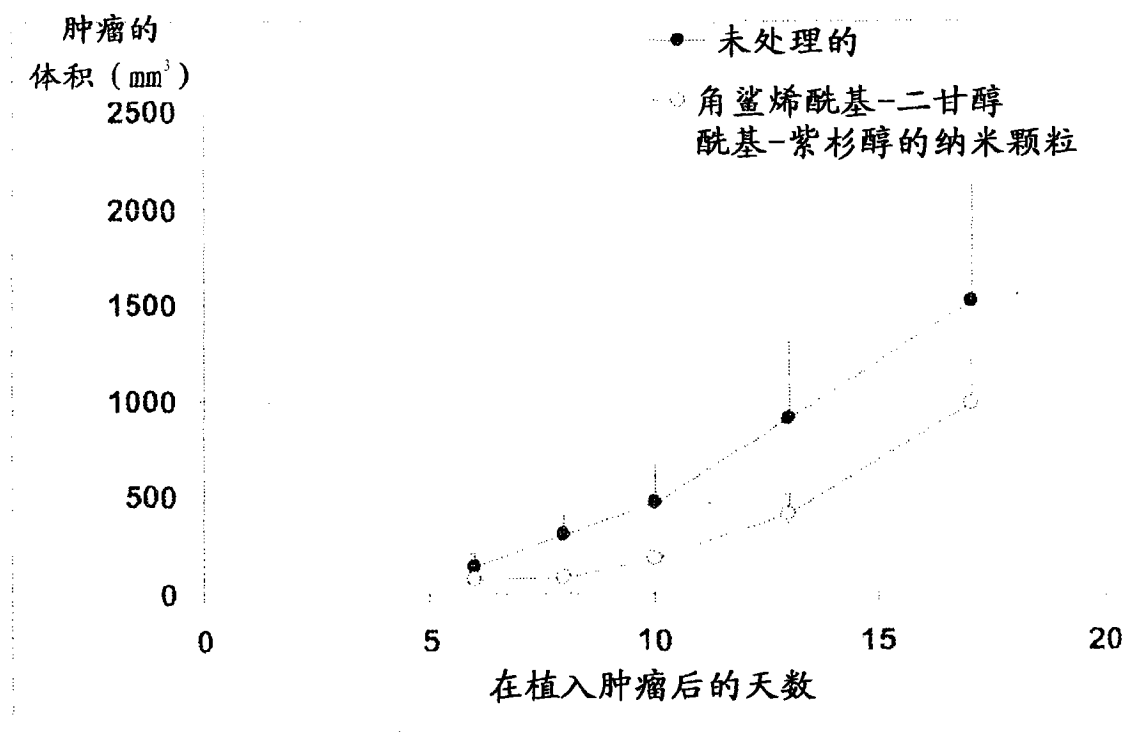


图 2

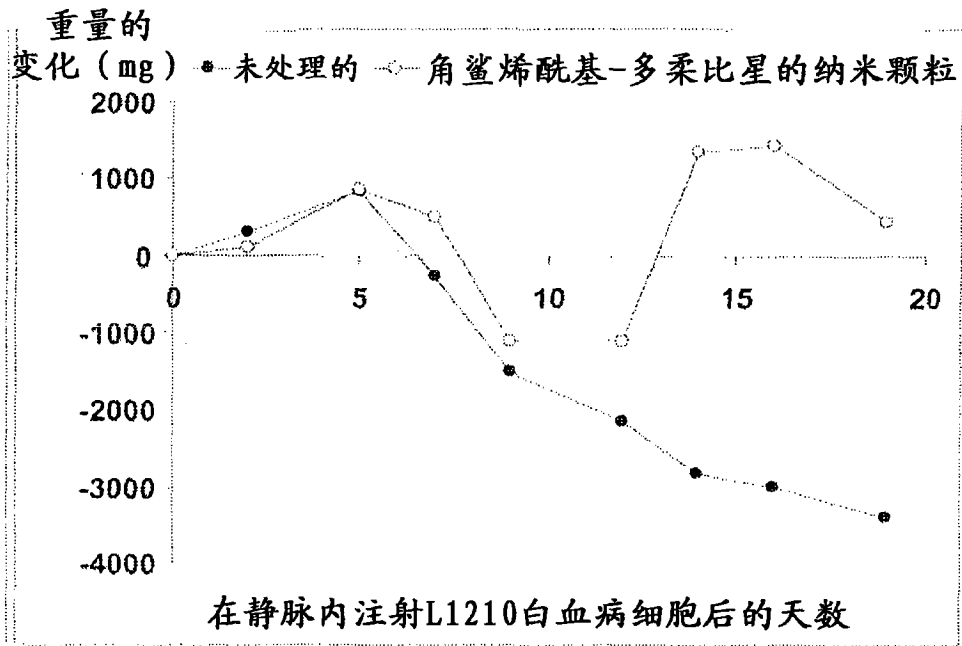


图 3

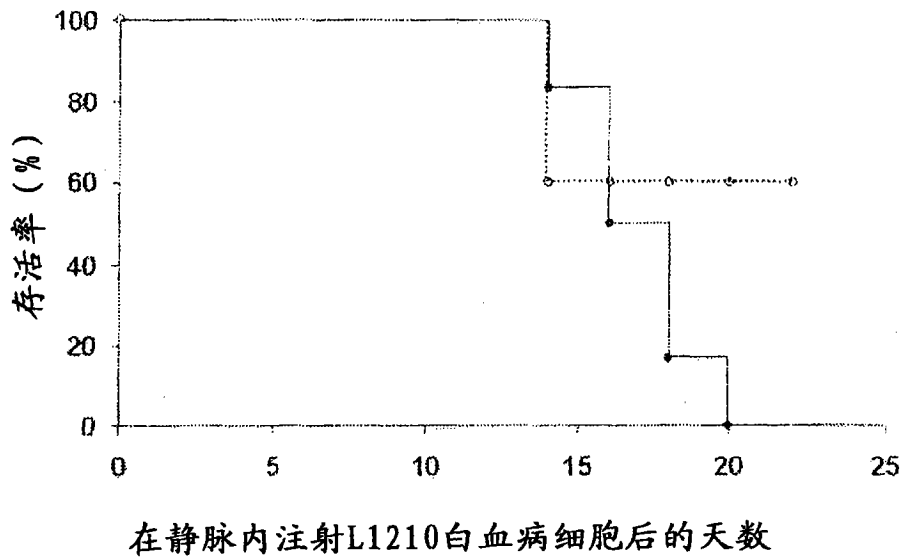


图 4