



(21)申請案號：099139587

(22)申請日：中華民國 93 (2004) 年 02 月 13 日

(51)Int. Cl. : A61K9/127 (2006.01)

A61K31/7048 (2006.01)

(30)優先權：2003/02/14 美國

60/447,508

2003/10/01 美國

60/508,035

(71)申請人：美國奧克蘭兒童醫院研究中心 (美國) CHILDREN' S HOSPITAL & RESEARCH CENTER AT OAKLAND (US)

美國

(72)發明人：雷恩 羅伯 O RYAN, ROBERT O. (US) ; 歐達 麥可 N ODA, MICHAEL N. (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

US 5128318

US 5948411

US 6489297B1

US 6514523B1

US 20020156007A1

審查人員：張榮興

申請專利範圍項數：16 項 圖式數：16 共 0 頁

(54)名稱

親脂藥物傳送媒介物及其使用方法

LIPOPHILIC DRUG DELIVERY VEHICLE AND METHODS OF USE THEREOF

(57)摘要

本發明係提供用於傳送生物活性劑至個人之組合物與方法。提供傳送媒介物，其包含生物活性劑在碟形粒子中，此等粒子包含一或多種脂質結合多肽，外接脂質雙層之周圍，生物活性劑係被定位於其中。嵌合脂質結合多肽亦被提供，且可用以對該傳送粒子增添其他功能性質。

The invention provides compositions and methods for delivery of a bioactive agent to an individual. Delivery vehicles are provided that include a bioactive agent in disc shaped particles that include one or more lipid binding polypeptides circumscribing the perimeter of a lipid bilayer in which the bioactive agent is localized. Chimeric lipid binding polypeptides are also provided and may be used to add additional functional properties to the delivery particles.

(無元件符號說明)

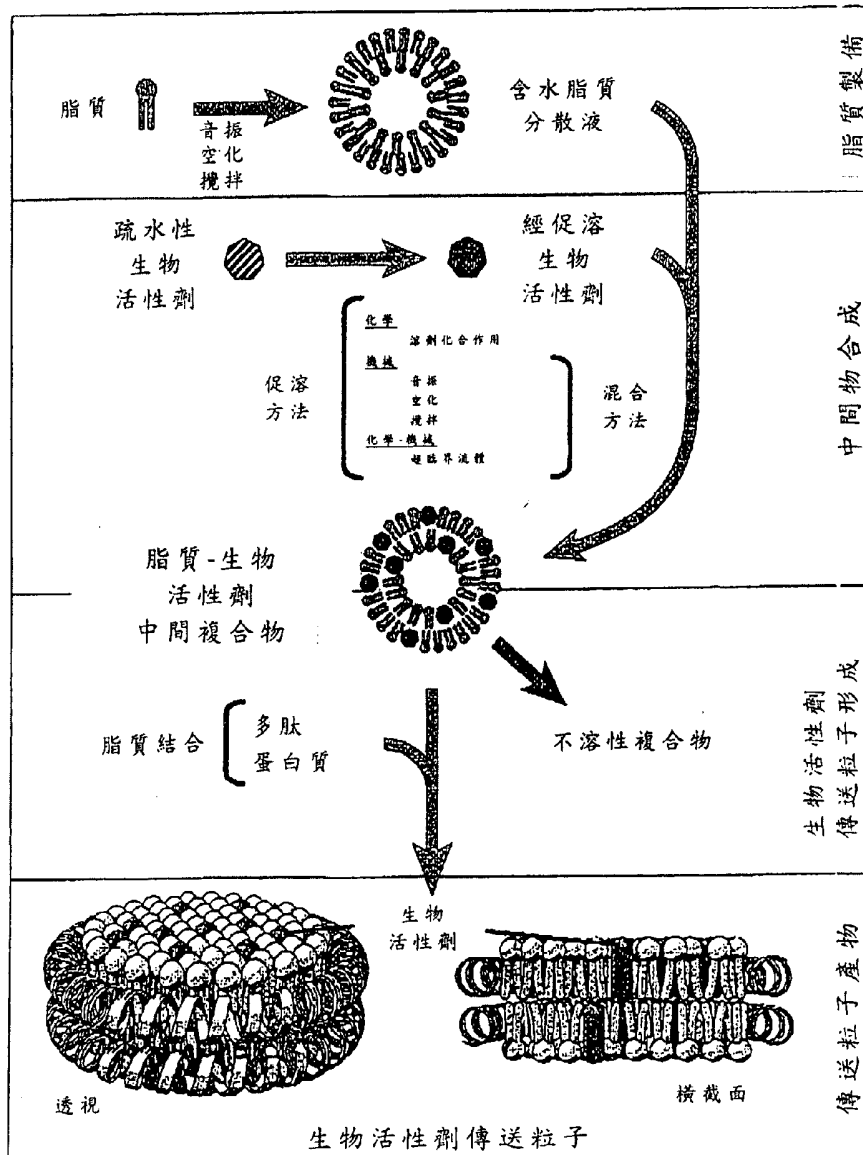


圖13

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本申請案係關於傳送生物活性劑之組合物與方法。特定言之，此申請案係關於生物活性劑傳送粒子，其包含脂質結合多肽、脂質雙層及生物活性劑。

相關申請案之前後參照

本申請案係請求2003年2月14日提出申請之美國臨時專利申請案60/447,508，與2003年10月1日提出申請之60/508,035之權益，兩案之揭示內容均以其全文併於本文供參考。

關於聯邦政府贊助之研究或發展之聲明

本發明一部份係在得自國家衛生研究所之補助金案號HL65159所支持之研究工作期間完成。政府可在本發明中擁有一定權利。

【先前技術】

生物活性物質，譬如治療劑、疫苗免疫原及營養物經常不能以純形式投予，而是必須被摻入生物可相容配方中，其會加強生物活性物質之溶解度，並將其包裝在適當形式中，以達成最適宜有利作用，而同時使不期望之副作用降至最低。生物活性劑之有效傳送經常因藥劑在身體中之短清除時間、對作用位置之無效率瞄準或生物活性劑本身之性質，例如在水性媒質中之不良溶解度或疏水性，而受到阻礙。因此，許多配方策略已被發展，以改良傳送，包括受控釋出配方、乳化液及微脂粒製劑。

微脂粒醫藥傳送系統已被描述。微脂粒為完全封閉之球形脂質雙層薄膜，含有經捕獲之含水體積。此脂質雙層包含兩個脂質單層，由具有一個疏水性尾部區域與一個親水性頭部區域之脂質所組成。此薄膜雙層之結構係致使脂質分子之疏水性非極性尾部朝向雙層中央，而親水性頭部係朝向微脂粒外部與內部兩者上之水相。微脂粒之含水親水性核心區域，可包含經溶解之生物活性物質。

藥學上可使用疏水性物質之傳送，經常是特別有問題的，因其係不溶解或難溶解於含水環境中。對於作為醫藥使用之疏水性化合物，直接注射是不可能的或高度有問題的，而造成一些危險情況，譬如溶血、靜脈炎、過敏性、器官衰竭及/或死亡。有需要疏水性生物活性物質用之經改良配方，其將促進在含水環境中之安定性，並允許此種物質有效傳送至所要之作用位置。

【發明內容】

本發明係提供用於傳送生物活性劑至個人之組合物與方法。

一方面，本發明係提供生物活性劑傳送粒子，其包含脂質結合多肽，具有包含疏水性區域之內部之脂質雙層，及與脂質雙層之疏水性區域締合之生物活性劑。生物活性劑傳送粒子一般並未包含親水性或水性核心。

生物活性劑傳送粒子係包含一或多種生物活性劑，其包含至少一個疏水性區域，且係被摻入脂質雙層之疏水性內部或與其締合。生物活性劑之疏水性區域一般係與脂質

雙層內部之疏水性表面例如脂肪醯基鏈締合。於一項具體實施例中，生物活性劑為兩性霉素B(AmB)。於另一項具體實施例中，生物活性劑為喜樹鹼。

粒子典型上為碟形，具有直徑在約7至約29毫微米之範圍內。

生物活性劑傳送粒子包含可形成雙層之脂質，例如磷脂。在一些具體實施例中，生物活性劑傳送粒子包含可形成雙層與不可形成雙層之兩種脂質。在一些具體實施例中，生物活性劑傳送粒子之脂質雙層包含磷脂。在一項具體實施例中，被摻入傳送粒子中之磷脂包括二肉豆蔻醯基磷脂醯膽鹼(DMPC)與二肉豆蔻醯基磷脂醯甘油(DMPG)。在一項具體實施例中，脂質雙層包含呈7:3莫耳比之DMPC與DMPG。

在一項較佳具體實施例中，脂質結合多肽為載脂蛋白。於脂質結合多肽，例如載脂蛋白分子，與脂質雙層間之主要交互作用，一般為在兩性結構例如脂質結合多肽之 α -螺旋結構之疏水性表面上之殘基，與在粒子周圍之外部表面上之脂質脂肪醯基鏈間之疏水性交互作用。本發明之粒子可包含可交換及/或不可交換載脂蛋白。在一項具體實施例中，脂質結合多肽為載脂蛋白A-I。

在一些具體實施例中，係提供粒子，其包含脂質結合多肽分子，例如載脂蛋白分子，其已被改質以增加粒子之安定性。在一項具體實施例中，改質係包括引進半胱胺酸殘基，以形成分子內及/或分子間二硫化物鍵結。

在另一項具體實施例中，係提供粒子，其包含嵌合脂質結合多肽分子，例如嵌合載脂蛋白分子，具有一或多個經結合之功能性部份基團，例如一或多個瞄靶部份基團及/或一或多個具有所要生物學活性之部份基團，該活性例如抗微生物活性，其可增大被摻入傳送粒子中之生物活性劑之活性，或產生增效。

在另一方面，係提供醫藥組合物，其包含生物活性劑傳送粒子，於藥學上可接受之載劑中。亦提供一種投予生物活性劑至個人之方法，其包括對個人投予含有生物活性劑傳送粒子於藥學上可接受載劑中之醫藥組合物。在一些具體實施例中，治療上有效量之生物活性劑係於藥學上可接受之載劑中投予。在一些具體實施例中，投藥係為非經腸，例如靜脈內、肌內、經黏膜或鞘內。在其他具體實施例中，粒子係以氣溶膠投予。在一些具體實施例中，生物活性劑係經調配供受控釋出。在一項具體實施例中，係提供一種於個人中治療真菌感染之方法，其包括投予已被摻入本發明生物活性劑傳送粒子中之抗真菌劑，例如 AmB，經常以治療上有效量，在藥學上可接受之載劑中。在另一項具體實施例中，係提供一種於個人中治療腫瘤之方法，其包括投予已被摻入本發明生物活性劑傳送粒子中之抗腫瘤劑，例如喜樹鹼，經常以治療上有效量，在藥學上可接受之載劑中。在一項具體實施例中，生物活性劑傳送粒子包含具有經連接影響血管腸肽瞄靶部份基團之脂質結合多肽，且腫瘤為乳房腫瘤。

於又另一方面，係提供調配如上述生物活性劑傳送粒子之方法。在一項具體實施例中，調配方法係包括使包含可形成雙層之脂質混合物與生物活性劑接觸，以形成脂質泡囊-生物活性劑混合物，並使脂質泡囊-生物活性劑混合物與脂質結合多肽接觸。於另一項具體實施例中，調配方法係包括形成含預成形雙層之脂質泡囊之分散液，於其中添加已溶於適當溶劑中之生物活性劑。對此程序而言，用於使生物活性劑促溶之適當溶劑，包括具有極性或親水特性之溶劑，其能夠使欲被摻入本發明傳送粒子中之生物活性劑促溶。適當溶劑之實例包括但不限於二甲亞砒(DMSO)與二甲基甲醯胺(DMF)。於泡囊/生物活性劑混合物中，添加脂質結合多肽，接著培養、音振或兩者。在一項具體實施例中，藉任何上述方法摻入傳送粒子中之生物活性劑，係為兩性霉素B。在一項具體實施例中，兩性霉素B係被溶解於DMSO中。在另一項具體實施例中，生物活性劑為喜樹鹼。於一項具體實施例中，喜樹鹼係被溶解於DMSO中。

本發明係包括根據任何上述方法製成之生物活性劑傳送粒子，及醫藥組合物，其包含根據任何上述方法製成之粒子與藥學上可接受之載劑。

於另一方面，本發明係提供套件，其包含任何上述生物活性劑傳送粒子或醫藥組合物，或藉任何上述方法製成之傳送粒子，及/或調配此等粒子之試劑，及/或對個人投予生物活性劑之方法之使用說明書。

發明詳述

本發明係提供用於傳送生物活性劑至個人之組合物與方法。傳送媒介物係以被摻入粒子中之生物活性劑之形式提供，其包含脂質結合多肽與脂質雙層。粒子內部包含脂質雙層之疏水性區域，其包含脂質分子之疏水性部份，例如脂質之脂肪醯基鏈，與微脂粒對照，微脂粒係包含完全密封之含水內部，被雙層之脂質親水性表面圍繞。本發明粒子內部之疏水性質，允許併入疏水性分子，例如藉由夾入雙層中之脂質分子之間，或多價整合至雙層小葉間之疏水性區域內。包含至少一個疏水性區域之生物活性劑，可被摻入粒子之疏水性內部中。於本文中使用的"摻入"生物活性劑至脂質雙層之疏水性區域中，係指增溶於雙層之脂質分子之疏水性區域或疏水性部份中，或與其締合，例如構成雙層之脂質之脂肪醯基鏈，或夾入脂肪醯基鏈中。

此等粒子大致上為碟形，當藉由自然孔隙限制梯度凝膠電泳測定時，在與已知史托克斯直徑之標準物比較下，具有直徑在約7至29毫微米之範圍內。Blanche等人(1981)*Biochim. Biophys. Acta*665(3):408-19。在一些具體實施例中，粒子係安定於溶液中，並可經凍乾，供長期儲存，接著在水溶液中重配。脂質結合多肽成份係界定碟狀雙層之邊界，並對粒子提供結構與安定性。

亦提供嵌合脂質結合多肽分子(例如載脂蛋白分子)，並可用以併入各種其他功能性質於本發明之傳送粒子中。

可將粒子投予個人，以對個人傳送生物活性劑。

生物活性劑傳送粒子

本發明係提供"粒子"(本文亦稱為"傳送粒子"或"生物活性劑傳送粒子")，其包含一或多種類型之脂質結合多肽，包含一或多種類型可形成雙層之脂質之脂質雙層，及一或多種生物活性劑。在一些具體實施例中，傳送粒子亦包含一或多種類型之不可形成雙層之脂質。亦提供包含此等粒子之組合物。在一項具體實施例中，係提供醫藥組合物，其包含傳送粒子與藥學上可接受之載劑。

粒子內部包含疏水性區域(例如由脂質脂肪鹽基鏈所組成)。本發明粒子典型上不包含親水性或水性核心。粒子大致上為碟形，具有扁平、碟狀、約略圓形之脂質雙層，被脂質結合多肽之兩性 α -螺旋結構及/或 β -薄片外接，其係與環繞碟形物周圍之雙層疏水性表面締合。本發明之碟形生物活性劑傳送粒子之說明例，係概要地描繪於圖6中。

典型上，碟形傳送粒子之直徑為約7至約29毫微米，經常約10至約25毫微米，經常約15至約20毫微米。"直徑"係指碟形物之約略圓形表面之一之直徑。

脂質結合多肽

於本文中使用的"脂質結合多肽"係指任何合成或天然生成之肽或蛋白質，其係與脂質表面形成安定交互作用，並可發揮功用以使本發明粒子之脂質雙層安定化。粒子可包含一或多種類型之脂質結合多肽，意即在單一粒子中之脂質結合多肽可為相同，或可由兩種或多種不同多肽順序所組成。脂質結合多肽係外接粒子之周圍。

在一些具體實施例中，可用於製造根據本發明傳送粒子之脂質結合多肽，包括具有天然生成蛋白質或其片段、天然變種、異構重組物、類似物或嵌合形式之胺基酸順序之蛋白質，具有非天然生成順序之蛋白質，及具有與已知載脂蛋白一致之脂質結合性質，並可純化自天然來源、以重組方式產生或以合成方式產生之任何長度之蛋白質或肽。可使用天然生成蛋白質之類似物。脂質結合多肽可包含一或多種胺基酸類似物，例如D-胺基酸，擬肽結構，其中肽鍵係被一種對代謝降解更具抵抗性之結構置換，或個別胺基酸被類似結構置換。

在一項較佳具體實施例中，脂質結合多肽為載脂蛋白。可使用能夠與磷脂雙層締合以形成本發明碟形生物活性劑傳送粒子之任何載脂蛋白或其片段或類似物。粒子可包含可交換、不可交換或可交換與不可交換混合物之載脂蛋白分子。

載脂蛋白一般具有種類A兩性 α -螺旋共同結構主體 (Segrest等人(1994)*Adv. Protein Chem.* 45:303-369)及/或 β -薄片主體。載脂蛋白一般包含高含量之 α -螺旋二級結構，具有結合至疏水性表面之能力。此等蛋白質之特徵性特色為其與某些脂質雙層泡囊交互作用及使彼等轉變成碟形複合物之能力(關於回顧，可參閱Narayanaswami與Ryan(2000)*Biochimica et Biophysica Acta* 1483:15-36)。在與脂質接觸時，蛋白質係遭受構形變化，修改其結構以順應脂質交互作用。

一般而言，在載脂蛋白與粒子中脂質雙層間之主要交互作用，係經過載脂蛋白分子之兩性 α -螺旋結構之疏水性表面上之殘基，與環繞碟形雙層周圍之脂質鹼基鏈間之疏水性交互作用。載脂蛋白分子之兩性 α -螺旋結構包含一個疏水性表面，在粒子周圍與脂質雙層之脂肪鹼基鏈接觸，及一個親水性表面，當粒子懸浮於水性媒質中時，面向粒子外部並與含水環境接觸。在一些具體實施例中，載脂蛋白可包含兩性 β -薄片結構，其中 β -薄片之疏水性殘基係在碟形物周圍與脂質疏水性表面交互作用。

生物活性劑傳送粒子，每粒子經常包含約1至約10個分子之一或多種類型之載脂蛋白。在粒子中藉由載脂蛋白所貢獻之兩性 α -螺旋結構之量，一般係足以覆蓋位於碟形脂質雙層邊緣(意即粒子周圍)之脂質分子在其他情況下外露之疏水性表面。在一項具體實施例中，其中載脂蛋白為人類載脂蛋白A-I(ApoA-I)，而脂質雙層包括棕櫚鹼基油鹼基磷脂鹼膽鹼，一個粒子包含2個ApoA-I分子，其比例為約80個分子之磷脂對約1分子之ApoA-I。

可用於形成本發明傳送粒子之載脂蛋白之實例，包括但不限於載脂蛋白A-I(ApoA-I)、載脂蛋白E(ApoE)及載脂蛋白III(ApoIII)、載脂蛋白A-IV(ApoA-IV)、載脂蛋白A-V(ApoA-V)、載脂蛋白C-I(ApoC-I)、載脂蛋白C-II(ApoC-II)、載脂蛋白C-III(ApoC-III)、載脂蛋白D(ApoD)、載脂蛋白A-II(ApoA-II)、載脂蛋白B-100(ApoB-100)、載脂蛋白J(ApoJ)、載脂蛋白H(ApoH)，或其片段、天然變種、異

構重組物、類似物或嵌合形式。在一些具體實施例中，載脂蛋白為人類ApoA-I。在其他具體實施例中，載脂蛋白為載脂蛋白E3或其異構重組物之C-末端或N-末端功能部位。在一些具體實施例中，載脂蛋白包含功能性部份基團，其已以無論是合成方式或重組方式連接，譬如瞄靶部份基團或具有生物學活性之部份基團，其並非載脂蛋白所固有的(參閱，例如圖7)。

在一些具體實施例中，係使用可交換載脂蛋白。"可交換載脂蛋白"可自本發明之預成形碟狀粒子，被另一種具有脂質結合親和力之蛋白質或肽置換，而不會破壞粒子之完整性。可交換載脂蛋白包括能夠與脂質形成安定結合交互作用之合成或天然肽或蛋白質。超過十二種獨特可交換載脂蛋白已在脊椎動物與無脊椎動物兩者中被確認(參閱，例如Narayanaswami與Ryan,同前文出處)。

在一些具體實施例中，係使用不可交換載脂蛋白。於本文中使用的"不可交換載脂蛋白"係指會與脂質表面形成安定交互作用，並可發揮功用以使本發明粒子之磷脂雙層安定化，但不能自粒子表面移除而不會破壞粒子固有結構之蛋白質或肽。

生物活性劑

傳送粒子包含一或多種生物活性劑。於本文中使用的"生物活性劑"係指具有生物學活性，包括治療或診斷活性之任何化合物或組合物。生物活性劑可為可使用於醫療處理、診斷或預防上之藥劑、藥物、化合物或組合物。

被摻入如本文中所述傳送粒子中之生物活性劑，一般係包含至少一個能夠與脂質雙層之疏水性部份締合或整合至其中之疏水性(例如親脂性)區域。在一些具體實施例中，至少一部份生物活性劑係被夾入傳送粒子內部之脂質分子之間。可被摻入根據本發明傳送粒子中之生物活性劑之實例，包括但不限於抗菌或抗微生物(例如抗細菌、抗真菌及抗病毒)劑、抗代謝劑、抗腫瘤劑、類固醇、肽、蛋白質，例如細胞受體蛋白質、酵素、內分泌素及神經遞質，放射性標識，譬如放射性同位素與放射性同位素標識之化合物，螢光化合物、麻醉劑、生物活性脂質、抗癌劑、消炎劑、營養物、抗原、殺害劑、殺昆蟲劑、除草劑或被使用於光動態療法中之光敏化劑。在一項具體實施例中，生物活性劑為抗真菌劑兩性霉素B(AmB)。在其他具體實施例中，生物活性劑為喜樹鹼、全反式視黃酸、安那霉素(annamycin)、制霉菌素、培克里他索(paclitaxel)、多謝他索(docetaxel)或本羥基茜草素。包含至少一個疏水性區域之生物活性劑，係為此項技藝中已知，且包括但不限於異丁苯丙酸(ibuprofen)、苯甲二氮革、灰黃霉素、環孢素、可體松、前白血球素、衣托糖苷(etoposide)、紅豆杉烷、 α -母育酚、維生素E、維生素A及脂多糖。參閱，例如 Kagkadis 等人(1996)*PDA J Pharm Sci Tech* 50(5):317-323；Dardel(1976)*Anaesth Scand* 20:221-24；Sweetana與Akers(1996)*PDA J Pharm Sci Tech* 50(5):330-342；美國專利 6,458,373。

在一些具體實施例中，被摻入本發明傳送粒子中之生物活性劑為非多肽。在一些具體實施例中，對個人之投藥而言，生物活性劑及包含該生物活性劑之傳送粒子，當被投予個人時係為實質上非免疫原。

脂質雙層

本發明之粒子包含脂質雙層，具有碟形物之大致上圓形表面，包含面向遠離粒子內部之極性頭部基團，且粒子內部(意即，在圓形表面間之空間)包含可形成雙層之脂質之疏水性脂肪醯基鏈，及其他脂質成份，若存在時。在雙層之邊緣(在生物活性劑傳送粒子周圍之表面)之脂質分子，如上文所討論，係接觸粒子之脂質結合多肽。粒子可包含一或多種類型之可形成雙層之脂質，或一或多種類型之可形成雙層與一或多種類型之不可形成雙層之脂質之混合物。於本文中使用的"脂質"係指生物或合成來源之物質，其係可溶於或部份可溶於有機溶劑中，或當存在於水相時中，其係分配至疏水環境中。

能夠與脂質結合多肽締合以形成碟形結構之任何可形成雙層之脂質，均可根據本發明使用。於本文中使用的"可形成雙層之脂質"係指能夠形成具有疏水性內部與親水性外部之脂質雙層之脂質。可形成雙層之脂質，包括但不限於磷脂、神經鞘脂質、糖脂、烷基磷脂、醚脂質及縮醛磷脂。可使用一種可形成雙層脂質之類型；或兩種或多種類型之混合物。在一些具體實施例中，脂質雙層包含磷脂。適當磷脂之實例，包括但不限於二肉豆蔻醯基磷脂醯膽鹼

(DMPC)、二肉豆蔻醯基磷脂醯甘油(DMPG)、棕櫚醯基油基磷脂醯膽鹼(POPC)、二棕櫚醯基磷脂醯膽鹼(DPPC)、二棕櫚醯基磷脂醯絲胺酸(DPPS)、心磷脂、二棕櫚醯基磷脂醯甘油(DPPG)、二硬脂醯基磷脂醯甘油(DSPG)、蛋黃磷脂醯膽鹼、大豆磷脂醯膽鹼、磷脂醯肌醇、磷脂酸、神經鞘磷脂及陽離子性磷脂。其他適當可形成雙層之脂質之實例，包括陽離子性脂質與糖脂。在一項具體實施例中，粒子包含DMPC與DMPG之磷脂雙層，經常呈約7:3之莫耳比。在另一項具體實施例中，粒子包含POPC之磷脂雙層。在一些具體實施例中，可使用可形成雙層之脂質之混合物，呈至少約1:50，1:20，1:10，1:5，1:2，1:1或7:3之任一個之莫耳比。

粒子亦可包含不可形成雙層脂質之脂質。此種脂質包括但不限於膽固醇、心磷脂、磷脂醯乙醇胺(此脂質可在某些狀況下形成雙層)、氧基固醇、植物固醇、麥角固醇、谷固醇、陽離子性脂質、腦苷脂類、神經鞘胺醇、神經醯胺、二醯基甘油、單醯基甘油、三醯基甘油、神經節苷脂、醚脂質、烷基磷脂、縮醛磷脂、前列腺素及溶血磷脂。在一些具體實施例中，用於製備傳送粒子之脂質可包含一或多個經結合之功能性部份基團，譬如瞄靶部份基團，生物活性劑，或用於純化或偵測之標記。

嵌合脂質結合多肽

本發明係提供嵌合脂質結合多肽，其可用以製備上述傳送粒子。嵌合脂質結合多肽可包含一或多個經連接之"功

能性部份基團"，例如一或多個瞄靶部份基團，具有所要生物學活性之部份基團，幫助純化之親和標記及/或供特徵鑒定或定位研究之報告子分子。具有生物學活性之經連接部份基團，可具有能夠增大被摻入傳送粒子中之生物活性劑生物學活性及/或與其產生增效之活性。例如，具有生物學活性之部份基團可具有抗微生物(例如抗真菌、抗細菌、抗原生動物、制菌、制真菌或抗病毒)活性。在一項具體實施例中，當脂質結合多肽被摻入生物活性劑傳送粒子中時，嵌合脂質結合多肽之經連接功能性部份基團並未與脂質雙層之疏水性表面接觸。在另一項具體實施例中，當脂質結合多肽被摻入生物活性劑傳送粒子中時，經連接功能性部份基團係與脂質雙層之疏水性表面接觸。在一些具體實施例中，嵌合脂質結合多肽之功能性部份基團可為天然蛋白質所固有的。在一些具體實施例中，嵌合脂質結合多肽係包含被細胞表面受體所辨識或能夠與其交互作用之配位體或順序。

在一些具體實施例中，嵌合脂質結合多肽為嵌合載脂蛋白。在一項具體實施例中，嵌合載脂蛋白包含瞄靶部份基團，其並非天然載脂蛋白例如酵母 α -配對因子肽、葉酸、鐵傳遞蛋白或乳酸膽鐵質所固有的。在另一項具體實施例中，嵌合載脂蛋白包含具有所要生物學活性之部份基團，其會使被摻入傳送粒子中之生物活性劑之活性增大及/或與其產生增效，例如西制菌素(histatin)-5、馬甘寧素肽、布魯士菌素、保護素、大腸桿菌素、N-末端乳酸膽鐵質肽、

棘念珠菌素、黑普菌素 (hepcidin)、貝克天菌素 (bactenecin) 或環孢素。在一項具體實施例中，嵌合脂質結合多肽可包含載脂蛋白所固有之功能性部份基團。載脂蛋白固有功能性部份基團之一項實例為大約藉由人類載脂蛋白 E 之胺基酸 130-150 所形成之固有瞄靶部份基團，其包含被低密度脂蛋白受體族群之成員所辨識之受體結合區域。載脂蛋白固有功能性部份基團之其他實例包括 ApoB-100 區域，其會與低密度脂蛋白受體交互作用，及 ApoA-I 區域，其會與清除劑受體類型 B1 交互作用。在其他具體實施例中，功能性部份基團可以合成方式或以重組方式添加，以產生嵌合脂質結合多肽。

於本文中使用的 "嵌合" 係指兩種或多種分子，其能夠個別存在，並接合在一起，以形成具有所有其組成分子所要功能性之單一分子。嵌合分子之組成分子可藉由化學共軛作用，以合成方式接合，或在組成分子全為多肽或其類似物之情況中，使多肽編碼之多核苷酸可以重組方式融合在一起，以致使單一連續多肽被表現。此種嵌合分子係被稱為融合蛋白質。"融合蛋白質" 為嵌合分子，其中組成分子全為多肽，且係連接 (融合) 至彼此，以致嵌合分子係形成連續單鏈。各種組份可直接連接至彼此或可經過一或多種連結劑偶合。

於本文中所使用關於嵌合分子之 "連結劑" 或 "間隔劑"，係指連結或接合嵌合分子之組成分子之任何分子。多種連結劑分子係為市購可得，例如得自 Pierce 化學公司

(Rockford Illinois)。適當連結劑係為熟諳此藝者所習知，且包括但不限於直鏈或分枝鏈碳連結劑、雜環族碳連結劑或肽連結劑。在嵌合分子為融合蛋白質之情況中，連結劑可為接合包含融合蛋白質之蛋白質之肽。雖然間隔劑一般未具有除了接合蛋白質或保存其間之某種最小距離或其他空間關係以外之特定生物學活性，但肽間隔劑之組成胺基酸可經選擇以影響分子之某種性質，譬如折疊、淨電荷或疏水性。

在一些具體實施例中，嵌合脂質結合多肽，譬如嵌合載脂蛋白，係經由以化學方式共軛脂質結合多肽分子與欲被連接之功能性部份基團而製成。以化學方式共軛分子之方式係為熟諳此藝者所習知。此種方式係根據欲被連接部份基團之結構而改變，但可容易地由熟諳此藝者確定。

多肽典型上含有多種官能基，例如羧酸(-COOH)、自由態胺基(-NH₂)或氫硫基(-SH)基團，其可用於與功能性部份基團上或連結劑上之適當官能基反應，以結合同部份基團至其上。功能性部份基團可連接在載脂蛋白分子之N-末端、C-末端處或至內部殘基(意即在N-與C-末端間之中間位置處之殘基)上之官能基。或者，欲被標記之載脂蛋白及/或部份基團可被衍化，以曝露或連接其他反應性官能基。

在一些具體實施例中，包含多肽功能性部份基團之脂質結合多肽融合蛋白質，係使用重組表現系統合成。典型上，此係涉及建立核酸(例如DNA)順序，其係使脂質結合多肽與功能性部份基團編碼，以致當被表現時，此兩種多肽

將在架構上，於啟動子之控制下安置DNA，在宿主細胞中表現蛋白質，及單離經表現之蛋白質。

如本文中所述之脂質結合多肽順序及使功能性部份基團編碼之順序，可經無性繁殖，或藉由活體外方法放大，例如聚合酶連鎖反應(PCR)、連接酶連鎖反應(LCR)、轉錄為基礎之放大系統(TAS)或自身持續順序複製系統(SSR)。極多種無性繁殖與活體外放大操作法係為技術人員所習知。足以指示技術人員經過活體外放大方法之技術，其實例可參閱例如Mullis等人，(1987)美國專利4,683,202；*PCR擬案,方法與應用之指引*(Innis等人編著)大學出版公司，San Diego, CA(1990)(Innis)；Arnheim & Levinson(1990年10月1日)*C&EN* 36-47；*NIH研究期刊*(1991)3:81-94；(Kwoh等人(1989)*Proc. Natl. Acad Sci. USA* 86:1173；Guatelli等人(1990)*Proc. Mad. Acad. Sci. USA* 87,1874；Lomell等人(1989)*J. Clin. Chem.*, 35:1826；Landegren等人，(1988)*Science* 241:1077-1080；VanBrunt(1990)*Biotechnology*, 8: 291-294；Wu與Wallac (1989)*Gene*, 4:560；及Barringer等人(1990)*Gene*, 89:117。

此外，使所要融合蛋白質順序編碼之DNA，可以合成方式使用熟諳此藝者所習知之方法製成，包括例如直接化學合成，藉由一些方法，譬如Narang等人(1979) *Meth. Enzymol.* 68:90-99之磷酸三酯方法，Brown等人(1979) *Meth. Enzymol.* 68:109-151之磷酸二酯方法，Beaucage等人(1981) *Tetra. Lett.*, 22:1859-1862之磷醯胺酸二乙酯方法

，或美國專利4,458,066之固態載體方法。

使嵌合脂質結合多肽融合多肽編碼之核酸，可被併入重組表現載體中，呈適合在宿主細胞中表現之形式。於本文中使用的"表現載體"為一種核酸，當被引進適當宿主細胞中時，其可被轉錄與轉譯至多肽中。此載體亦可包含調節順序，譬如啟動子、增強子或其他表現控制元素(例如聚腺苷酸化作用訊息)。此種調節順序係為熟諳此藝者所已知(參閱例如 Goeddel(1990) *基因表現技術：Meth. Enzymol.* 185，大學出版社，San Diego, CA；Berger與Kimmel，*分子無性繁殖技術指引，酶學方法* 152 大學出版公司，San Diego, CA；Sambrook等人(1989) *分子無性繁殖-實驗室手冊(第2版)第1-3卷*，Cold Spring Harbor實驗室，Cold Spring Harbor出版社，NY,等)。

在一些具體實施例中，用於產生嵌合脂質結合多肽之重組表現載體，係為質粒或黏接質體。在其他具體實施例中，表現載體為病毒或其部份，其允許被引進病毒核酸中之核酸之表現。例如，可使用複製缺陷反轉錄酶病毒、腺病毒及與腺有關聯之病毒。表現載體可衍生自噬菌體，包括所有DNA與RNA噬菌體(例如黏接質體)，或衍生自所有真核細胞病毒之病毒載體，該病毒譬如桿狀病毒與反轉錄酶病毒、腺病毒及與腺有關聯之病毒、疱疹病毒、牛痘病毒，以及所有單股、雙股及部份雙股DNA病毒，所有正與負股RNA病毒，及複製缺陷反轉錄酶病毒。表現載體之另一項實例為酵母人造染色體(YAC)，其含有一個著絲粒與兩

個端粒，允許YAC複製成小線性染色體。另一項實例為細菌人造染色體(BAC)。

本發明之嵌合脂質結合多肽融合蛋白質可被表現於宿主細胞中。於本文中使用的"宿主細胞"一詞，係指任何細胞或細胞系，如上述用於產生嵌合載脂蛋白融合蛋白質之重組表現載體可於其中被轉染以供表現。宿主細胞包括單一宿主細胞之後代，且此後代可能未必完全相同(於形態學上或於總體基因組DNA互補物上)於原始母細胞，此係由於天然、意外或故意突變所致。宿主細胞包括於活體內以如上述表現載體轉染或轉變之細胞。適當宿主細胞包括但不限於細菌細胞(例如大腸桿菌)、真菌細胞(例如釀酒酵母)、無脊椎動物細胞(例如昆蟲細胞，譬如SF9細胞)及脊椎動物細胞，包括哺乳動物細胞。

使嵌合脂質結合多肽融合蛋白質編碼之表現載體，可使用標準技術，被轉染至宿主細胞中。"轉染"或"轉變"係指外源多核苷酸插入宿主細胞中。外源多核苷酸可被保持為未整合載體，例如質粒，或者，可被整合至宿主細胞基因組中。轉染技術之實例包括但不限於磷酸鈣共沉澱、DEAE-葡聚糖所媒介之轉染、帶脂化作用、電擊穿孔及顯微注射。用於轉染宿主細胞之適當方法，可參閱Sambrook等人(1989)分子無性繁殖：實驗室手冊，第2版，ColdSpringHarbor實驗室出版社，及其他實驗室教科書。核酸亦可經由適合活體內引進核酸至細胞中之傳送機制而被轉移至細胞中，譬如經由反轉錄酶病毒載體(參閱，例

如 Ferry 等人(1991)*Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 88:8377-8381 ; 與 Kay 等人(1992)人類基因療法3:641-647)、腺病毒載體(參閱, 例如 Rosenfeld(1992)*Cell* 68:143-155 ; 與 Herz 與 Gerard(1993)*Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 90:2812-2816)、受體所媒介之DNA吸收(參閱, 例如 Wu 與 Wu(1988) *J. Biol. Chem.* 263:14621 ; Wilson 等人(1992) *J. Biol. Chem.* 267: 963-967 ; 與美國專利5,166,320)、DNA之直接注射(參閱, 例如 Acsadi 等人(1991)*Nature* 332:815-818 ; 與 Wolff 等人(1990)*Science*, 247:1465-1468)或粒子撞擊(生物列表) (參閱, 例如 Cheng 等人(1993)*Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 90:4455-4459 ; 與 Zelenin 等人(1993)*FEBS Lett.* 315:29-32)。

一旦經表現, 嵌合脂質結合多肽即可根據此項技藝之標準程序進行純化, 包括但不限於親和純化、硫酸銨沉澱作用、離子交換層析法或凝膠電泳。

在一些具體實施例中, 嵌合脂質結合多肽可使用細胞自由表現系統或經由固態肽合成而產生。

經改質之脂質結合多肽

在本發明之一些具體實施例中, 係提供已被改質之脂質結合多肽, 以致當此多肽被摻入如上述之生物活性劑傳送粒子中時, 此改質將會增加該粒子之安定性, 或賦予瞄靶能力。在一些具體實施例中, 此改質係允許粒子之脂質結合多肽使該粒子之碟形結構或構形安定化。於一項具體實施例中, 改質係包括引進半胱胺酸殘基至載脂蛋白分子中

，以允許形成分子內或分子間二硫化物鍵結，例如藉由位置引導致突變。於另一項具體實施例中，係使用化學交聯劑以形成載脂蛋白分子間之分子間連結，以加強粒子之安定性。分子間交聯係防止或減少載脂蛋白分子自粒子解離，及/或防止被該粒子所投予之個體體內之載脂蛋白分子置換。

在其他具體實施例中，脂質結合多肽係藉由無論是一或多種胺基酸殘基之化學衍化作用或藉由位置引導致突變進行改質，以賦予對細胞表面受體之瞄靶能力或被其辨識。

傳送生物活性劑至個體之傳送系統

本發明係提供用於傳送生物活性劑至個體之傳送系統，其包含如上述之生物活性劑傳送粒子，與載劑，視情況為藥學上可接受之載劑。在一些具體實施例中，此傳送系統包含有效量之生物活性劑。

於本文中使用的"個體"係指吾人想要對其傳送生物活性劑之任何原核生物或真核生物。在一些具體實施例中，個體係為原核生物，譬如細菌。在其他具體實施例中，個體係為真核生物，譬如真菌、植物、無脊椎動物(譬如昆蟲)或脊椎動物。在一些具體實施例中，個體係為脊椎動物，譬如人類，非人類靈長類動物，實驗動物，譬如老鼠或大白鼠，寵物動物，譬如貓或狗，或農場動物，譬如馬、綿羊、乳牛或豬、鳥類(意即鳥類個體)或爬蟲類(意即爬蟲類個體)。

在一些具體實施例中，傳送粒子係經調配在適當載劑中

，以供投予個體。於本文中使用之"載劑"係指幫助生物活性劑投藥之相對較惰性物質。例如，載劑可對組合物賦予劑型或一致性，或可充作稀釋劑。"藥學上可接受之載劑"係指生物可相容(意即對宿主沒有毒性)且適合藥理學上有效物質之特定投藥途徑之載劑。適當藥學上可接受之載劑包括但不限於安定劑、潤濕與乳化劑、改變體積滲透濃度之鹽、包覆劑、緩衝劑及皮膚浸透增強劑。藥學上可接受載劑之實例係描述於 *Remington* 氏醫藥科學 (Alfonso R. Gennaro 編著，第18版，1990) 中。

於本文中使用之"有效量"係指足以達成所要結果之生物活性劑之量。"治療上有效量"或"治療劑量"係指足以達成有利臨床結果之生物活性劑之量，例如降低或減輕疾病之病徵，降低或減輕真菌或細菌感染等。

在一些具體實施例中，傳送系統為一種醫藥組合物，其包含生物活性劑傳送粒子與藥學上可接受之載劑。在一些具體實施例中，醫藥組合物包含生物活性劑傳送粒子，其含有非多肽生物活性劑與藥學上可接受之載劑。在一些具體實施例中，生物活性劑傳送粒子與生物活性劑當被投予個體時，係為非免疫原。致免疫性可藉由此項技藝中所習知之方法度量。例如，致免疫性可藉由 ELISA 方法評估，例如經由對得自己被投予生物活性劑傳送粒子之個體之血清，探測對已結合至免疫吸著板之相等生物活性劑傳送粒子之抗體結合作用。

使用方法

本發明係提供投予生物活性劑至個體之方法。本發明之方法包括投予如上述之傳送粒子，其包含脂質結合多肽、脂質雙層及生物活性劑，其中粒子內部包含脂質雙層之疏水性表面。視情況投予治療上有效量之粒子，視情況在藥學上可接受之載劑中。一般而言，此等粒子為碟形，當藉自然孔隙限制梯度液凝膠電泳度量時，具有直徑為約7至約29毫微米。典型上，生物活性劑包含至少一個疏水性區域，其可被整合至脂質雙層之疏水性區域中。

投藥途徑可根據欲被投予生物活性劑之性質、個體或待治療之症狀而改變。在個體為哺乳動物之情況中，投藥一般為非經腸。投藥途徑包括但不限於靜脈內、肌內、皮下、經黏膜、鼻、鞘內、局部及經皮。於一項具體實施例中，粒子係以氣溶膠投藥。傳送粒子可被調配在藥學上可接受之形式中，供投予個體，視情況在藥學上可接受之載劑或賦形劑中。本發明係提供醫藥組合物，呈傳送粒子在溶液中之形式，供非經腸投藥用。為製備此種組合物，可使用此項技藝中所習知之方法，並可使用正常情況下使用於此項技藝中之任何藥學上可接受之載劑、稀釋劑、賦形劑或其他添加劑。

本發明之傳送粒子可經由併用適當醫藥載劑或稀釋劑，被製成醫藥組合物。例如，傳送粒子可被促溶於常用於製備可注射溶液之溶劑中，例如生理食鹽水、水或右旋糖水溶液。其他適當醫藥載劑及其配方，係描述於前文所述之 *Remington* 氏醫藥科學中。此種配方可在無菌小玻璃瓶中構

成，其中含有傳送粒子與視情況選用之賦形劑，呈乾粉或經凍乾粉末形式。在使用之前，添加生理學上可接受之稀釋劑，並經由注射器抽取溶液，以供投予個體。

傳送粒子亦可經調配以供受控釋出。於本文中使用的"受控釋出"係指生物活性劑自配方釋出，其速率為藥劑在個體中之血液濃度係被保持在治療範圍內，歷經長期時間，涵蓋之時期在數小時、數天、數週或更久之譜。傳送粒子可被調配在生物可侵蝕或生物不可侵蝕受控基質中，其中多種係為此項技藝中所習知。受控釋出基質可包括合成聚合體或共聚物，例如呈水凝膠形式。此種聚合體之實例包括聚酯、聚原酸酯、聚酞類、多醣、聚(磷醯酯)、聚醯胺、聚胺基甲酸酯、聚(醯亞胺基碳酸酯)與聚(磷腈)及聚內交酯-共-乙交酯(PLGA)，聚(乳酸)與聚(乙醇酸)之共聚物。亦可使用含有膠原、白蛋白及血纖維蛋白原之物質。

傳送粒子可根據本文所述之方法投藥，以治療多種症狀，包括但不限於細菌感染、真菌感染、疾病狀態、代謝病症，或作為預防藥物，例如預防細菌或真菌感染(例如以手術前或後之方式)。傳送粒子可用於例如傳送抗腫瘤劑(例如化學治療劑，放射性核素)至腫瘤。於一項具體實施例中，脂質結合多肽包含一種使粒子對特定腫瘤瞄靶之部份基團。傳送粒子亦可用於投予營養物質，意即提供健康利益之食品或飲食補充物。在一些具體實施例中，傳送粒子係與其他習用治療劑共同投藥，例如作為多重藥物"藥液"之一部份，或併用一或多種經口投予之藥劑，例如用

於治療真菌感染。傳送粒子亦可被投予作為殺昆蟲劑或除草劑。

一方面，本發明係提供一種在個體中治療真菌感染之方法。此方法包括對個體投予治療上有效量之抗真菌劑，在藥學上可接受之載劑中，其中抗真菌劑係被摻入粒子中，該粒子包含脂質結合多肽與脂質雙層，其中脂質雙層之內部為疏水性。於一項具體實施例中，抗真菌劑為AmB，被摻入脂質雙層之疏水性內部中。在一些具體實施例中，脂質結合多肽為一種包含瞄靶部份基團及/或具有生物學活性部份基團之嵌合蛋白質。於一項具體實施例中，脂質結合多肽包含瞄靶部份基團酵母 α -配對因子肽。於另一項具體實施例中，脂質結合多肽包含抗微生物肽西制菌素(histatin)5。

於另一方面，本發明係提供一種在個體中治療腫瘤之方法。此方法包括投予治療上有效量之化學治療劑，在如前文所述之生物活性劑傳送粒子中，於藥學上可接受之載劑內。於一項具體實施例中，化學治療劑為喜樹鹼。傳送粒子之脂質結合多肽成份可包含瞄靶部份基團，以使粒子瞄準腫瘤細胞。於一項具體實施例中，係使影響血管腸肽(VIP)連接至脂質結合多肽。由於乳癌細胞經常過度表現此VIP受體，故於一項具體實施例中，係在治療乳癌之方法中使用包含喜樹鹼與脂質結合多肽-VIP嵌合體之生物活性劑傳送粒子。

瞄靶

本發明之傳送粒子可包含瞄靶官能基，例如使粒子瞄準特定細胞或組織類型，或針對傳染劑本身。在一些具體實施例中，粒子包含瞄靶部份基團，經連接至脂質結合多肽或脂質成份。在一些具體實施例中，被摻入粒子中之生物活性劑具有瞄靶能力。

在一些具體實施例中，藉由設計受體辨識性質於脂質結合多肽譬如載脂蛋白分子中，則粒子可被瞄準至特定細胞表面受體。例如，生物活性劑傳送粒子可被瞄準至已知會隱藏特定型式傳染劑之特定細胞類型，例如經由使粒子之脂質結合多肽成份改質，以使其能夠與被瞄準細胞類型表面上之受體交互作用。

一方面，受體所媒介之瞄靶策略可用以傳送抗利什曼原蟲藥劑至巨噬細胞，其係為來自利什曼原蟲屬之原生動物寄生蟲感染之主要位置。此種物種之實例包括主要利什曼原蟲、杜諾凡氏利什曼原蟲及巴西利什曼原蟲。含有抗利什曼原蟲藥之生物活性劑傳送粒子，可被瞄準巨噬細胞，其方式是改變粒子之脂質結合多肽成份，以賦予被巨噬細胞之細胞內包涵物種類A清除劑受體(SR-A)辨識。例如，已以化學方式或以基因方式經改質以與SR-A交互作用之載脂蛋白，可被摻入傳送粒子中，其含有一或多種有效抵抗利什曼原蟲屬物種之生物活性劑，例如AmB，一種五價銻，及/或十六基磷醯膽鹼。含有專一性地對巨噬細胞之抗利什曼原蟲藥劑之傳送粒子之瞄靶，可作為抑制利什曼原蟲屬生長與增生之方式使用。

於一項具體實施例中，係將含有 AmB 之 SR-A 為標的之生物活性劑傳送粒子投予需要治療利什曼原蟲屬感染之個體。於另一項具體實施例中，另一種抗利什曼原蟲藥劑，譬如十六基磷醯膽鹼，係在以含有兩性霉素 B 之粒子治療之前、同時或之後投予。

在一些具體實施例中，瞄靶係經由使欲被摻入生物活性劑傳送粒子中之脂質結合多肽(譬如載脂蛋白)改質，於是對粒子賦予 SR-A 結合能力而達成。在一些具體實施例中，瞄靶係經由改變脂質結合多肽之電荷密度而達成，其方式是以化學方式使一或多種離胺酸殘基改質，例如在鹼性 pH 下使用丙二醛、順丁烯二酐或醋酸酐(參閱，例如 Goldstein 等人(1979)*Proc. Natl. Acad. Sci.* 98:241-260)。於一項具體實施例中，ApoB-100 或其截頭形式，譬如 ApoB-100 之 N-末端 17%(apoB-17 之殘基 1-782)係經由與丙二醛反應而被改質。在其他具體實施例中，載脂蛋白分子，譬如本文中所述之任何載脂蛋白，亦可以化學方式經改質，例如藉由乙醯化作用或順丁烯二醯化作用，且被摻入含有抗利什曼原蟲藥劑之生物活性劑傳送粒子中。

在其他具體實施例中，係對傳送粒子賦予 SR-A 結合能力，其方式是藉由位置引導致突變，以中性或帶負電荷胺基酸置換一或多個帶正電荷胺基酸，使脂質結合多肽改質。

在其他具體實施例中，SR-A 辨識係藉由製備嵌合脂質結合多肽而被賦予，該多肽包含 N-或 C-末端延長物，具有

被SR-A辨識之配位體或具有高濃度帶負電荷殘基之胺基酸順序。帶負電荷多肽延長物不會被吸引至生物活性劑傳送粒子之脂質表面，於是使其較易接近受體之配位體結合位置。

製備生物活性劑傳送粒子之方法

本發明係提供調配生物活性劑傳送粒子之方法。於一項具體實施例中，係提供一種方法，其包括將脂質結合多肽分子添加至包含可形成雙層之脂質與生物活性劑分子之混合物中。

在一些具體實施例中，脂質-生物活性劑混合物亦包含清潔劑，例如膽酸鈉、膽酸或辛基葡萄糖苷，且此方法進一步包括在脂質結合多肽已被添加之後，移除清潔劑。典型上，清潔劑係藉由滲析或凝膠過濾移除。於一項具體實施例中，此方法包括將可形成雙層之脂質與生物活性劑分子合併在溶劑中，以形成生物活性劑混合物，乾燥此混合物以移除溶劑(例如於 N_2 氣流下及/或藉由冷凍乾燥)，使已乾燥之混合物與包含清潔劑之溶液接觸，以形成脂質-生物活性劑-清潔劑混合物，添加脂質結合多肽分子於此混合物中，然後移除清潔劑。

在一些具體實施例中，粒子係使用微流體化床處理器製成。此程序係採用高壓，迫使諸成份一起在反應室中。

在一些具體實施例中，粒子係於脂質結合多肽譬如載脂蛋白存在下，經由使含有生物活性劑之脂質泡囊之懸浮液音振而製成。

在其他具體實施例中，傳送粒子係製自預先形成之泡囊分散液。脂質，例如磷脂，係以緩衝劑水合，並藉由攪拌或音振而被分散。於此脂質雙層泡囊之分散液中，添加適當溶劑中之經促溶生物活性劑，以形成脂質-生物活性劑複合物。在一些具體實施例中，溶劑係為揮發性或可滲析，以在添加生物活性劑至脂質雙層泡囊分散液之後方便移除。在進一步攪拌之後，添加脂質結合多肽，並將試樣培養及/或音振。典型上，泡囊與載脂蛋白係在於或接近被使用之特定可形成雙層之脂質或可形成雙層之脂質混合物之膠凝至液晶相轉移溫度下培養。此相轉移溫度可藉由卡計法測定。

較佳係使用適當可形成雙層之脂質組合物，以致在分散於水性媒質中時，脂質泡囊係提供適當環境，以使生物活性劑從載體溶劑轉移至含水環境，而不會使生物活性劑沉澱或相分離。預先形成之脂質雙層泡囊亦較佳係能夠進行脂質結合多肽所引致之轉變，以形成本發明之傳送粒子。再者，脂質-生物活性劑複合物較佳係保留脂質泡囊之性質，這允許其藉由添加脂質結合多肽而被轉變，以形成生物活性劑傳送粒子。脂質受質-生物活性劑複合物機體形成與脂質結合多肽性質之獨特組合，係合併產生一種系統，而其中在pH、離子強度、溫度及脂質-生物活性劑-脂質結合多肽濃度之適當條件下，係發生此等物質之三元結構重組，其中外接脂質雙層之安定脂質結合多肽係以被摻入雙層之脂質環境中之生物活性劑而產生。

藉任何上述方法製成之粒子，可進一步經純化，例如藉由滲析、密度梯度液離心及/或凝膠滲透層析。

在關於形成生物活性劑傳送粒子之製備方法中，係將較佳為至少約70，更佳為至少約80，又更佳為至少約90，又更佳為至少約95百分比之使用於此程序中之生物活性劑，摻入粒子中。

本發明係提供藉任何上述方法製成之生物活性劑傳送粒子。於一項具體實施例中，本發明係提供一種醫藥組合物，其包含藉任何上述方法製成之傳送粒子及藥學上可接受之載劑。

儲存與安定性

本發明粒子在多種條件下係安定地歷經長期時間(參閱，例如圖5)。粒子或包含本發明粒子之組合物可被儲存於室溫下、經冷凍(例如約4°C)或經冰凍(例如約-20°C至約-80°C)。其可被儲存於溶液中或經乾燥(例如經凍乾)。經凍乾粒子可被儲存於惰性大氣下、經冰凍或在4°C下之溶液中。粒子可被儲存於液體媒質中，譬如緩衝劑(例如磷酸鹽或其他適當緩衝劑)，或於載劑中，例如藥學上可接受之載劑，以供使用於生物活性劑對個體之投藥方法中。或者，可將粒子以乾燥、凍乾形式儲存，然後在使用之前，於液體媒質中重配。

套件

本文中所述之試劑與粒子可被包裝成套件形式。一方面，本發明係提供一種套件，其包含傳送粒子及/或可用於製

備傳送粒子之試劑，在適當包裝中。本發明之套件係個別或合併地包含任何下列物質：脂質結合多肽(例如載脂蛋白)、磷脂、生物活性劑、載體、試劑、酵素、宿主細胞及/或生長培養基，用於無性繁殖及/或表現重組脂質結合多肽

(例如重組載脂蛋白)及/或脂質結合多肽嵌合體(例如載脂蛋白嵌合體)，及試劑及/或藥學上可接受之載劑，用於調配傳送粒子以供投予個體。

各試劑或配方係以固體形式、液體緩衝劑或藥學上可接受之載劑供應，其係適合庫存或視情況供交換或添加至反應物、培養物或可注射媒質中。提供適當包裝。於本文中使用的"包裝"，係指習用於系統中且能夠在固定範圍內容納一或多種試劑或成份(例如傳送粒子)，以供使用於傳送生物活性劑或一或多種用於製備或調配傳送粒子之試劑(例如載脂蛋白分子、磷脂、生物活性劑)之方法中之固體基質或材料。此種材料包括但不限於玻璃與塑膠(例如聚乙烯、聚丙烯及聚碳酸酯)瓶、小玻瓶、紙、塑膠及塑膠箔層合封套等。

套件可視情況提供可用於本發明方法與調配程序之其他組份，譬如緩衝劑、反應表面或純化傳送粒子之設置。

此外，套件視情況包含標記及/或說明書或解釋資料，以提供關於實施本發明方法之指示(意即擬案)，譬如傳送粒子之製備、調配及/或使用。雖然說明書資料典型上係包含書寫或印刷之資料，但其並不限於此等格式。任何能夠

儲存此種說明書並使其傳達至使用者之媒介，均意欲被本發明涵蓋在內。此種媒介包括但不限於電子儲存媒介(例如磁碟、影帶、卡匣、晶片)、光學媒介(例如CDROM)等。此種媒介可包括搜尋提供此種說明書資料之網際網路位置之網址。

下述實例係意欲說明而非限制本發明。

【實施方式】

實例

實例1. ApoA-I-磷脂-兩性霉素B粒子之製備與特徵鑒定 *重組ApoA-I之製備*

重組 Apo-A-I 係按 Ryan 等人 (2003) 蛋白質表現與純化 27:98-103 中所述製成，且係用以製備 ApoA-I-磷脂-AmB 粒子，如下文所述。

ApoA-I-磷脂-AmB 粒子之製備

ApoA-I-磷脂-AmB 粒子係按下述製成：

使 7:3 莫耳比之二肉豆蔻醯基磷脂醯膽鹼 (DMPC) 與二肉豆蔻醯基磷脂醯甘油 (DMPG) 溶於氯仿：甲醇 (3:1, v/v) 中。於 10 毫克 DMPC/DMPG 混合物中，添加 0.25 毫升 AmB (2 毫克/毫升；經促溶於酸化氯仿-甲醇 (3:1, v/v) 中)。使混合物於 N₂ 氣流下乾燥，以在容器壁上產生薄膜。然後，使已乾燥之試樣接受冷凍乾燥十六小時，以移除微量溶劑。

使已乾燥之脂質混合物再懸浮於 0.5 毫升 Tris-鹽水緩衝劑 (10 mM Tris 鹼, 150 mM NaCl, pH 8) 中，並使混合物旋渦 30 秒。

於此再懸浮脂質混合物中，將0.5毫升22 mM膽酸鈉添加至混合物中，並形成旋渦3分鐘。將此混合物在37°C下培養，且每10分鐘形成旋渦，歷經1.25小時，或直到混合物透明為止。於已透明之溶液中，在1.5毫克/毫升之濃度下添加2毫升按實例1中所述製成之經單離重組ApoA-I，並將混合物在37°C下再培養1小時。為移除膽酸鈉，使試樣對著4升Tris-鹽水，於4°C下接受滲析72小時，其中每24小時改變滲析緩衝劑。

使試樣藉密度梯度液超離心進一步純化。藉由添加固體KBr在1.5毫升中，將此溶液調整至1.30克/毫升之密度。將試樣轉移至3毫升離心管，以鹽水覆蓋，並在BeckmanL7-55離心機中，於275,000x克下離心3小時。

粒子安定性

根據此程序製成之粒子，係以凍乾形式安定超過3個月。

粒子之特徵鑒定

對於按上述製成但未添加AmB之ApoA-I-磷脂粒子進行UV/可見光掃描，並與含有AmB之粒子之掃描作比較。圖1顯示未包含AmB之粒子之掃描。所發現之唯一吸收峰為在約280毫微米下之蛋白質吸收峰。圖2顯示按上述製成之含AmB粒子之掃描。除了在約280毫微米下之吸收峰以外，在300-400毫微米光譜區域中發現許多其他吸收峰，確認AmB之存在。自由態AmB係不溶於水性媒質中，且相較於圖2中所發現者具有不同光譜性質。Madden等人(1990)脂

質之化學與物理52:189-98。

特徵鑒定研究發現，ApoA-I、磷脂及AmB當接受密度梯度液超離心分離時，會以離散粒子個體群潛移(圖3)。此複合物係在梯度液中漂浮至特徵密度，其係依粒子中之蛋白質/脂質比例而定。

再者，於非變性條件下之梯度液凝膠電泳發現，所產生之主要複合物係具有均勻大小，顯示史托克斯直徑為8.5毫微米(圖4)。經單離粒子之分析發現，並未發生顯著偏離AmB、磷脂及載脂蛋白之最初莫耳比。

實例2.含有AmB之生物活性劑傳送粒子抵抗釀酒酵母之抗真菌活性

ApoA-I-DMPC/DMPG-AmB粒子係按實例1中所述製成，且用以測定複合物之抗真菌活性。釀酒酵母之培養物係於不同量之ApoA-I-DMPC/DMPG-AmB粒子(0-25微克AmB/毫升)存在下，在YPD培養基中生長。使培養物在30℃下生長16小時，且培養物生長之程度係以分光光度測定方式監測。如圖8中所示，含AmB之粒子在抑制真菌生長上，係極端地有效，呈劑量依存方式。

實例3.生物活性劑傳送粒子之長期安定性

重組ApoEN-末端功能部位(ApoE3NT)係按Fisher等人(1997) *Biochem Cell Biol* 75:45-53中所述製成。含ApoE3NT-AmB之粒子係經由實例1中所述之膽酸鹽滲析方法製成，且用以評估長期安定性。

圖5顯示粒子之自然PAGE4-20%梯度液平板凝膠，被儲

存於4℃下之磷酸鹽緩衝劑中(通道1)，被儲存於-20℃下之磷酸鹽緩衝劑中(通道2)或被冰凍於-80℃下之磷酸鹽緩衝劑中，經凍乾及在分析之前再溶解於H₂O中。含AmB粒子之大小與遷移率不受冷凍與解凍，或不受凍乾與再溶解作用所影響，這表示粒子在此等條件下保有其完整性。這關於AmB傳送粒子之按比例放大與長期儲存，是很重要之參數。

實例4.具有POPC之含AmB生物活性劑傳送粒子之製備

ApoA-I-POPC粒子係使用實例1中所述之膽酸鹽滲析方法製成。ApoA-I-POPC粒子之自然PAGE梯度液凝膠分析，係示於圖4中。未具有AmB之粒子係示於通道1中，而具有AmB之粒子係示於通道2中。此凝膠顯示AmB摻入粒子中不會改變其大小。但是，此凝膠顯示含有POPC之粒子，相較於通道3中所示之DMPC/DMPG粒子，係為不同大小。

實例5.以微流體化床處理器製備含AmB之粒子

將ApoA-I、AmB、蛋PC(磷脂醯膽鹼)、DPPG及膽固醇合併在微流體化床試樣保持器中，並在18,000 psi下通過微流體化床處理器之反應室。收集所形成之溶液，並以粒子形成、疏水性物質之摻入、大小及安定性為觀點作特徵鑒定。獲得約16毫微米直徑之含AmB粒子，其對於凍乾與重配係為安定的。

實例6.使用音振製備含AmB之粒子

含AmB之磷脂泡囊之懸浮液係以下述方式製成，將AmB

在二甲亞砜(DMSO)中之20-40毫克/毫升溶液，相當於2.5毫克AmB之一液份，添加至預先形成之含有7:3莫耳比DMPC:DMPG之磷脂含水分散液中。將此泡囊在磷脂之凝膠至液相轉移溫度(約24°C)下培養。添加4毫克載脂蛋白，導致試樣混濁度上之時間依存性降低，與含AmB之生物活性劑傳送粒子之形成一致。完全試樣透明性係在21-25°C下，藉由溫和浴液音振1-20分鐘，或在4-16小時內，未使用音振，於24°C下達成。所形成之粒子顯示>90% AmB摻入效率，意即在傳送粒子中被回收之AmB起始物質之百分比，且無任何物質在過濾、離心或滲析時損失。其他試驗發現類似結果可使用經調整至高達5毫克/10毫克磷脂之AmB濃度達成。此程序以任何所測試之四種載脂蛋白均同樣良好地進行(ApoA-I、ApoE3NT、家蠶ApoIII，及人類載脂蛋白A-I之變種形式，其包含C-末端延長物，包括抗真菌肽西制菌素(Histatin)5)。

含ApoA-I或ApoE3NT粒子之密度梯度液超離心發現粒子之單一個體群漂浮至特徵密度在1.21克/毫升之範圍內，與脂質-蛋白質複合物之形成一致。在密度梯度液超離心分離後所獲得離份之特徵鑒定發現，磷脂、AmB及載脂蛋白係潛移至梯度液中之相同位置，與含AmB粒子之形成一致。

含ApoA-I-AmB之粒子與在自然PAGE上之已知標準物相對潛移之比較，顯示超過90%之粒子具有史托克斯直徑大約8.5毫微米。此數值類似AmB不存在下所產生之粒子，

這表示添加此生物活性劑不會顯著地改變粒子之大小分佈。

作為含 ApoA-I-AmB 之生物活性劑傳送粒子整體安定性之一種度量方式，使粒子在 -20°C 下冰凍或經凍乾。冰凍/解凍對粒子之大小分佈無影響。同樣地，使粒子接受凍乾與再溶解於 H_2O 中，不會影響大小分佈或試樣外觀。

此等數據強烈地指出 AmB、磷脂及載脂蛋白合併形成生物活性劑傳送粒子之均質個體群，其中 AmB 係完全整合至粒子之雙層部份中。含 AmB 粒子之分光光度測定分析發現，在可見範圍中吸收峰之特徵組合係與在生物活性劑傳送粒子中之 AmB 促溶作用一致。

實例 7. 按實例 6 製成之含 AmB 粒子與藉由交替音振程序

製成之粒子之比較

將使用實例 6 中所述之方法摻入生物活性劑至生物活性劑傳送粒子中，與摻入 "新-HDL" 粒子作比較，後者係根據 Shouten 等人 (1993) *Molecular Pharmacology* 44:486-492 製成，如下述：將三毫克蛋黃磷脂醯膽鹼、0.9 毫克膽固醇及已溶於氯仿中之 1.5 毫克 AmB，在 20 毫升小玻璃瓶中混合，並在氮氣流下蒸發溶劑。添加已使用氮脫氣且飽和之十毫升音振緩衝劑 (10 mM Tris HCl, pH 8.0, 100 mM KCl, 1 mM EDTA 及 0.025% NaN_3)，並將小玻璃瓶之內含物以 Macrotip (14 微米平均產量) 在氮氣流下音振。溫度保持高於 41°C 且低於 50°C 。60 分鐘後停止音振，並調整溫度至 42°C 。持續音振，並以十等份添加已溶於 2 毫升 4 M 尿素中

之20毫克載脂蛋白A-I，歷經10分鐘期間。在添加全部蛋白質之後，使音振在42℃下持續30分鐘。

接著使音振混合物離心3分鐘，以移除大粒子與不溶性物質，並藉由UV/可見分光光度測定法分析上層清液，以評估經促溶於產物粒子中之兩性霉素B之量。發現溶液稍微不透明。試樣係從250毫微米至500毫微米進行掃描。為進行比較，檢視藉由實例6中所述之程序製成之含AmB粒子。其結果係示於圖12中。源自AmB之光譜區域(300-500毫微米)在此兩種試樣之間係十分不同。雖然使用實例6中所述擬案產生之含AmB生物活性劑傳送粒子具有顯示AmB之促溶與摻入粒子中之強特徵吸光率最大值(Madden等人，如前文出處)(圖12B)，但根據Schouten等人所製成之試樣並未導致此等特徵光譜最大值(圖12A)。事實上，所獲得之光譜係極類似由Madden等人如前文出處關於AmB在脂質不存在下之含水分散液所報告者。因此，使用此程序，AmB並未被摻入脂質粒子中，然而實例6中所述之程序會造成顯著AmB摻入。

實例8.含AmB生物活性劑傳送粒子與微脂粒AmB配方之 抗真菌活性之比較

按實例6製成之ApoA-I-AmB粒子與AmB之市售微脂粒配方AmBisome®之抗真菌活性，係關於其抑制酵母釀酒酵母生長之能力作比較。圖10中之數據顯示ApoA-I-AmB生物活性劑傳送粒子係比被調配成AmBisome®之相同量AmB更有效地抑制釀酒酵母生長。ApoA-I-AmB生物活性劑傳送

粒子係在1微克/毫升下達成90%生長抑制，然而此抑制程度需要25微克/毫升之AmBisome®。

ApoA-I-AmB粒子與AmBisomes®之抗真菌活性亦在微滴定培養基全細胞檢測中，針對致病真菌之兩物種白假絲酵母與煙曲霉進行比較。亦測試未具有AmB之粒子作為對照組。其結果係顯示於表1中。

表1

致病真菌生長之兩性霉素B抑制

生物體	ED ₉₀ (微克/毫升)		
	AmBisome	具有AmB之傳送粒子	未具有AmB之對照粒子
白假絲酵母	0.8	0.1	無抑制作用
煙曲霉	1.6	0.2	無抑制作用

所獲得之結果發現含AmB之生物活性劑傳送粒子係在比AmBisome®較低之濃度下，有效抵抗致病真菌物種。缺乏AmB之對照粒子並不有效。含AmB之生物活性劑傳送粒子顯示對白假絲酵母之ED₉₀(發現90%生長抑制下之濃度)係在0.1微克/毫升之濃度下，然而需要0.8微克/毫升AmBisome®以達成相同程度之生長抑制。對煙曲霉，含AmB之生物活性劑傳送粒子係在0.2微克/毫升之濃度下抑制90%真菌生長，然而需要1.6微克/毫升AmBisome®以達成相同效果。

在另一個實驗中，係將含有載脂卟啉III作為脂質-結合多肽之含AmB生物活性劑傳送粒子，與AmBisome®比較其抑制三種致病真菌物種白假絲酵母、煙曲霉及新型隱球酵

母生長之能力。數據係示於表2中。

表 2

致病真菌生長之兩性霉素B抑制

ED ₉₀ (微克/毫升)			
生物體	AmBisome	具有AmB之傳送粒子	未具有AmB之對照粒子
白假絲酵母	0.4	0.03	無抑制作用
煙曲霉	2.5	0.1	無抑制作用
新型隱球酵母	0.31	0.06	無抑制作用

含AmB之生物活性劑傳送粒子係在0.03微克/毫升下抑制90%白假絲酵母生長。以AmBisome[®]獲得相應ED₉₀為0.4微克/毫升。在煙曲霉之情況中，含AmB之生物活性劑傳送粒子係在0.1微克/毫升下抑制90%真菌生長，然而需要2.5微克/毫升濃度之AmBisome[®]以達成相同效果。以類似方式，含AmB之粒子係在比AmBisome[®]較低五倍之AmB濃度下有效抑制新型隱球酵母生長。

所測試之全部試樣均可溶解在用於實驗之RPMI培養基中，且在任何經測試抵抗任何真菌物種之試樣中，均未發現沉澱作用或干擾。此等數據指出AmB在本發明生物活性劑傳送粒子中之配方，比微脂粒配方具有更有效之抗真菌活性。

實例9.喜樹鹼摻入生物活性劑傳送粒子中

含喜樹鹼之生物活性劑傳送粒子係按下述製成：使7:3莫耳比之DMPC:DMPG(總共5毫克)分散於緩衝劑(20mM磷酸鈉，pH 7.0)中，藉由旋渦1分鐘，以產生磷脂雙層泡囊

之分散液。將喜樹鹼在DMSO中之10毫克/毫升溶液之十微升，添加至磷脂雙層分散液中。接著添加兩毫克重組人類載脂蛋白A-I(0.5毫升4毫克/毫升溶液，在20 mM磷酸鈉中，pH 7.0)，然後使試樣接受音振。然後，使已澄清之試樣在13,000x克下離心3分鐘，並將上層清液回收且儲存於4℃下。

含喜樹鹼粒子之螢光光譜，在與十二基硫酸鈉(SDS)促溶之喜樹鹼比較下，係顯示於圖11中。

螢光度量值係在PerkinElmerLS50B發光光譜儀上，於激發波長360毫微米下，使用從400至600毫微米所監測之發射獲得。在藉由SDS微胞中之喜樹鹼引出之螢光發射最大值上之藍移(圖11A)，與被摻入生物活性劑傳送粒子中之喜樹鹼(圖11B)比較，指出藥物對傳送粒子係定位至微胞中之較具疏水性環境。

實例10.含AmB生物活性劑傳送粒子之冷凍斷裂

電子顯微鏡術

按下述製備供冷凍斷裂電子顯微鏡術用之含AmB生物活性劑傳送粒子製備物：將按實例6製成之DMPC:DMPG(7:3莫耳比)AmB生物活性劑傳送粒子(3毫克/毫升蛋白質)試樣，使用夾層技術與液態氮冷卻之丙烷進行驟冷。在處理之前，將低溫固定之試樣儲存於液態氮中，歷經低於2小時。此斷裂程序係在JOELJED-900冷凍蝕刻設備中進行，並將外露之斷裂平面以Pt在25-35度之角度下遮蓋30秒，及使用碳歷經35秒(2 kV/60-80 mA， 1×10^{-5} 托)。依此方式製成

之複製物係以濃發煙HNO₃清理24小時，接著以新的氯仿/甲醇(1:1體積比)重複攪拌至少5次。將依此方式清理之複製物在JOEL100CX或PhilipsCM10電子顯微鏡上檢視。

得自如上述含AmB粒子之冷凍斷裂之電子顯微照片，係顯示於圖9中。取自數份冷凍斷裂製備物之電子顯微照片，顯示小的蛋白質-脂質複合物以高濃度存在。表觀直徑範圍為約20-60毫微米，其中高頻率約40毫微米。粒子之表觀直徑，如藉由冷凍斷裂電子顯微鏡術所觀察到者，係大於藉由自然孔隙限制梯度液凝膠電泳所獲得之數值。此差異可能是由於試樣處理之影響，或用以使粒子藉由電子顯微鏡術形象化之染色程序所致。

實質上球形複合物不會顯示凹的或凸的斷裂表面(個別在結構前方與後方上之陰影)，此係為微脂粒之特徵。再者，未發現關於微胞結構之證據。

實例11.含AmB生物活性劑傳送粒子在免疫活性老鼠中之抗真菌活性之活體內評估

含AmB生物活性劑傳送粒子之活體內抗真菌活性係按下述進行評估：

動物

收容六至八週大之雌性BALB/c老鼠(20-25克)，並保持在標準實驗室條件下。

毒性研究

使三隻一組之老鼠各接受一份劑量(例如1、2、5、10或15毫克/公斤AmB)，在含AmB之生物活性劑傳送粒子中，

或未具有 AmB 之對照粒子，在以 10 mM 磷酸鈉緩衝至 pH 7.4 之鹽水中。單一劑量係以 0.1 毫升體積，以腹膜腔內方式投予。初步研究已顯示生物活性劑傳送粒子在此等條件下係完全可溶。

於注射後，觀察老鼠之任何一般反應，例如異常移動或姿勢，呼吸困難，毛髮豎立或不能夠獲取食物或飲料。對於異常或死亡率之觀察係於投藥後立即開始，且每日兩次持續七天。每日記錄體重，歷經相同期間。

含 AmB 生物活性劑傳送粒子在治療系統性隱球菌屬上之功效

測定含 AmB 粒子之治療範圍，並與 AmBisome® 作比較，如下述：

將容易感受 AmB 之新型隱球菌之臨床單離物進行培養，並製成接種物，以在 2×10^6 個分生孢子/毫升之濃度下供感染。每隻老鼠係於全身麻醉下，以顱內方式接受 0.05 毫升定規鹽液中之 1×10^5 個分生孢子。抗真菌劑係在 0.1 毫升體積中，以腹膜腔內方式每日投藥，歷經 5 天，於感染後 2 小時開始。所使用 AmB 之劑量係基於上述毒性研究作決定。一治療組老鼠係接受 AmBisome®，一治療組接受含 AmB 之生物活性劑傳送粒子，及一對照組未接受治療。

受感染老鼠係每日監測兩次，並記錄疾病或死亡之任何跡象，至高達 28 天。每日記錄體重，歷經相同期間。不能正常活動或服用食物或飲料之垂死動物係被安樂死。以此等研究之結果為基礎，進行第二組研究，以証實且重現此

等發現。所採用之AmB劑量，以及在對照組與治療組中之老鼠數可經調整，以反映出得自前述實驗所獲得之知識。

組織真菌負載量之測定

於治療最後一天之後一天，使老鼠犧牲。以無菌方式移除腎臟與腦部，並稱重。使組織均化，並連續性地稀釋於定規鹽液中。使勻漿於PDA(馬鈴薯右旋糖瓊脂)板上培養48小時，以測定菌落形成單位(CFU)。測定真菌負載量CFU/克組織。

統計分析

於腎臟或腦部中，在存活與平均CFU上之差異，係使用統計試驗按適當方式進行比較。

藥物動力學研究

血液、肝臟、腎臟、肺臟及腦脊髓液試樣係在0.8與2.0毫克/公斤劑量下之靜脈內注射AmB生物活性劑傳送粒子或AmBisome[®]後，於10分鐘，2、8及24小時之時間點，收集自受感染之老鼠。趁老鼠在全身麻醉下時，自腋血管收集全血液。進行胸廓切開術，並將組織試樣灌注定規鹽液，然後以手術方式移除。將組織以含有1-胺基-4-硝基苯之甲醇進行均化。將血清與組織勻漿之上層清液保存直到分析為止。AmB於各試樣中之濃度係藉由高性能液相層析法(HPLC)測定，如在Granich等人(1986) *Antimicrob. Agent Chemother.* 29:584-88中所述者。簡言之，係將血清試樣(0.1毫升)與每毫升含有1.0毫克內標準1-胺基-4-硝基苯之1.0毫升甲醇合併，並藉由旋渦混合。於離心分離後，

使上層清液在減壓下乾燥，接著以0.2毫升甲醇再溶解，以供注射於HPLC管柱(C₁₈逆相)上。使已稱重之潮濕組織試樣，在每毫升含有5.0毫克內標準之10體積甲醇中，以玻璃勻漿器均化，並離心。流動相為乙腈與10 mM醋酸鈉緩衝劑(pH 4.0；11:17(體積/體積))之混合物，在1.0毫升/分鐘之流率下。AmB之濃度係藉由AmB對內標準之峰高比例測得。

實例12.含喜樹鹼之生物活性劑傳送粒子對腫瘤細胞之

瞄靶

製備生物活性劑傳送劑粒子，其具有影響血管腸肽(VIP)瞄靶部份基團，經連接至脂質結合多肽成份。

含喜樹鹼粒子之脂質結合多肽成份可以重組形式在大腸桿菌中產生，該大腸桿菌已被隱藏脂質結合多肽之編碼順序之質粒載體轉變。例如，可採用重組人類載脂蛋白A-I(apoA-I)。將隱藏apoA-I表現質粒之大腸桿菌細胞在培養基中，於37°C下培養。當培養物在600毫微米下之光密度達到0.6時，apoA-I合成係藉由添加異丙基硫半乳糖苷(0.5 mM最後濃度)而引致。於進一步培養3小時後，使細菌藉離心粒化，並藉由音振瓦解。使細胞溶胞產物於4°C下，在20,000x克下離心30分鐘，並自上層清液部份單離出apoA-I。

重組脂質結合多肽嵌合體係藉由設計apoA-I以包含N-末端及/或C-末端肽延長物而製成，該延長物係相應於28胺基酸神經肽，影響血管腸肽(VIP)。可採用ApoA-I-VIP嵌合體

，以產生由磷脂、喜樹鹼及apoA-I-VIP嵌合體所組成之生物活性劑傳送粒子。

例如，apoA-I-VIP嵌合體可經由合成互補寡核苷酸引物而構成，該引物係相應於具有末端HindIII與XbaI位置之VIP順序之編碼順序。使此寡核苷酸(~100個鹼基對)回火以產生具有所要"黏性末端"之雙股DNA，且次代無性繁殖於含ApoA-I編碼順序之血漿載體中，其具有經適當放置之HindIII與XbaI限制酵素位置。在連接、轉變及篩選正嵌合體構造物之後，單離質粒DNA，並使接受自動化二去氧鏈終止順序分析。在確認該順序係相應於所要嵌合體之所預測者之後，重組apoA-I-VIP嵌合體之產生係在大腸桿菌中進行，如上文關於野生型apoA-I所述者。然後，對於經純化之重組嵌合體，藉由凝膠電泳、質量光譜法及其產生本發明生物活性劑傳送粒子之能力，按實例8中所述，以類似野生型apoA-I之方式進行評估。

ApoA-I-VIP嵌合體-喜樹鹼生物活性劑粒子可使用於乳癌細胞生長抑制研究，以度量脂質粒子瞄靶之程度。例如，人類乳癌細胞系MCF-7係得自美國培養物類型收集處，且被保持在37°C下，於潮濕5%CO₂培養器中，在補充10%牛胎兒血清及抗生素青霉素與鏈霉素之變性Eagle氏培養基中，作成單層培養物。使已單離之野生型apoA-I或apoA-I-VIP嵌合體經放射性碘化，並摻入本發明之含喜樹鹼生物活性劑傳送粒子中，且與該細胞一起培養。在經標識之喜樹鹼脂質粒子與經培養之MCF-7細胞，於4°C下培

養後，測定細胞結合之放射活性。VIP競爭apoA-I-VIP嵌合體或生物活性劑傳送粒子締合之apoA-I-VIP嵌合體結合至MCF細胞之能力，係在競爭結合檢測中測定。細胞結合數據係藉由Scatchard分析進行評估。apoA-I-VIP嵌合體生物活性劑傳送粒子之MCF-7細胞內部化作用之程度，係在與放射性碘化之含apoA-I-VIP嵌合體之生物活性劑傳送粒子於37°C下培養時進行評估。在培養與洗滌後，測定三氯醋酸可溶之放射活性，提供脂質結合多肽降解之一種度量方式。

使用不同生物活性劑傳送粒子之生長抑制與細胞毒性研究，係藉由無性繁殖源檢測進行評估。使以指數方式成長中之細胞再懸浮於培養基中，並使用電子計數器測定細胞數目。或者，MCF-7無性繁殖生長之喜樹鹼-apoA-I-VIP嵌合體生物活性劑傳送粒子抑制，可以降低之³⁵S-甲硫胺酸吸收為基礎進行評估。使細胞液份以三份複製接種於培養皿中。於培養後，將特定脂質粒子從儲備溶液添加至培養皿中，以達成最後濃度為0，0.1，1，5，10，50，100及250 nM喜樹鹼。於特定時間間隔範圍從0至72小時後，藉由吸氣移除培養基，並添加新培養基。於各藥物濃度下，隨著不同曝露時間之存活百分比，係由排除細胞之錐藍數目比例測得，並與缺乏喜樹鹼之對照粒子所得之結果作比較。

【圖式簡單說明】

圖1描繪按實例1製成而未具有生物活性劑之ApoA-I-磷

脂粒子之UV/可見吸光率光譜250-450毫微米；

圖2描繪按實例1製成之ApoA-I-磷脂-AmB粒子之UV/可見吸光率光譜250-450毫微米；

圖3描繪ApoA-I-磷脂-AmB粒子在密度梯度液超離心分離後之離份數對蛋白質濃度之圖形。粒子係按實例2中所述製成，並藉由添加KBr調整至1.3克/毫升密度。溶液係在不連續梯度液中，於275,000x克下，在10°C下離心5小時。在離心分離之後，使管件內含物自頂部分級分離，並測定各離份中之蛋白質含量；

圖4描繪載脂蛋白A-I(ApoA-I)-磷脂粒子於4-20%丙烯醯胺梯度液平板凝膠上之自然聚丙烯醯胺凝膠電泳(PAGE)分析。粒子係以ApoA-I及兩種不同脂質製劑DMPC/DMPG或棕櫚醯基油基磷脂醯膽鹼(POPC)製成。凝膠係以柯麥西(Coomassie)藍進行染色。通道1:ApoA-IPOPC粒子；通道2:ApoA-I-POPC-AmB粒子；通道3:ApoA-I-DMPC/DMPG-AmB粒子。大小標準物之相對潛移係顯示於左邊；。

圖5描繪不同儲存條件對於ApoE3NT)-DMPC/DMPG-AmB粒子安定性之大小與結構完整性之影響之比較。粒子係藉由密度超離心單離，然後於自然PAGE4-20%梯度液平板凝膠上接受電泳。凝膠係以醯胺黑染色。通道1：粒子被儲存於磷酸鹽緩衝劑中，於4°C下24小時；通道2：粒子被儲存於磷酸鹽緩衝劑中，於-20°C下24小時；通道3：粒子經凍乾並於-80°C下冷凍24小時，然後再溶解於H₂O中。大小標準物之相對潛移係顯示

於左邊；

圖6係概要地說明生物活性劑傳送粒子之形狀(圖6B)與分子機體形成(圖6A)；

圖7係概要地說明嵌合脂質結合多肽及其摻入生物活性劑傳送粒子中。嵌合蛋白質可包含瞄靶部份基團(圖7A)或具有所要生物學活性之部份基團(圖7B)。圖7C係概要地說明圖7A與7B中所示之嵌合多肽之摻入生物活性劑傳送粒子中；

圖8係以圖形方式描繪含AmB之生物活性劑傳送粒子抵抗培養物中之釀酒酵母之抗真菌活性，如實例2中所述。

圖9為按實例10中所述製成之含AmB生物活性劑傳送粒子之冷凍斷裂電子顯微照片；

圖10顯示ApoA-I-DMPC/DMPG-AmB粒子與AmBisome[®]抑制釀酒酵母生長之能力間之比較，如實例8中所述；

圖11顯示經促溶於SDS中之喜樹鹼(曲線A)與含喜樹鹼之生物活性劑傳送粒子(曲線B)間之螢光光譜比較，如實例9中所述；

圖12描繪AmB摻入按實例7中所述製成之脂質粒子中(曲線A)與按實例6中所述製成之生物活性劑傳送粒子(曲線B)之UV/可見光譜比較；及

圖13為生物活性劑傳送粒子製備程序之具體實施例之圖解。

雖然前述發明已大致詳細地藉由說明與實例方式加以描述，以提供清楚瞭解之目的，但熟諳此藝者將顯而易見的

是，某些改變與修正可在未偏離本發明之精神與範圍下實施。因此，此說明文不應被解釋為限制本發明之範圍，其係由隨文所附之申請專利範圍所記述。

於本文中引用之所有公報、專利及專利申請案，均據此以其全文併於本文供參考，以提供所有目的，且達猶如各個別公報、專利或專利申請案係詳細且個別地顯示以如此併於本文供參考一樣之相同程度。

公告本

發明專利說明書

分割案

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：99139587

※申請日：93.2.13

※IPC 分類：

A61k 9/127

(2006.01)

原申請案號：093103488

A61k 31/7048

(2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

親脂藥物傳送媒介物及其使用方法

LIPOPHILIC DRUG DELIVERY VEHICLE AND METHODS OF USE
THEREOF

二、中文發明摘要：

本發明係提供用於傳送生物活性劑至個人之組合物與方法。提供傳送媒介物，其包含生物活性劑在碟形粒子中，此等粒子包含一或多種脂質結合多肽，外接脂質雙層之周圍，生物活性劑係被定位於其中。嵌合脂質結合多肽亦被提供，且可用以對該傳送粒子增添其他功能性質。

三、英文發明摘要：

The invention provides compositions and methods for delivery of a bioactive agent to an individual. Delivery vehicles are provided that include a bioactive agent in disc shaped particles that include one or more lipid binding polypeptides circumscribing the perimeter of a lipid bilayer in which the bioactive agent is localized. Chimeric lipid binding polypeptides are also provided and may be used to add additional functional properties to the delivery particles.

八、圖式：

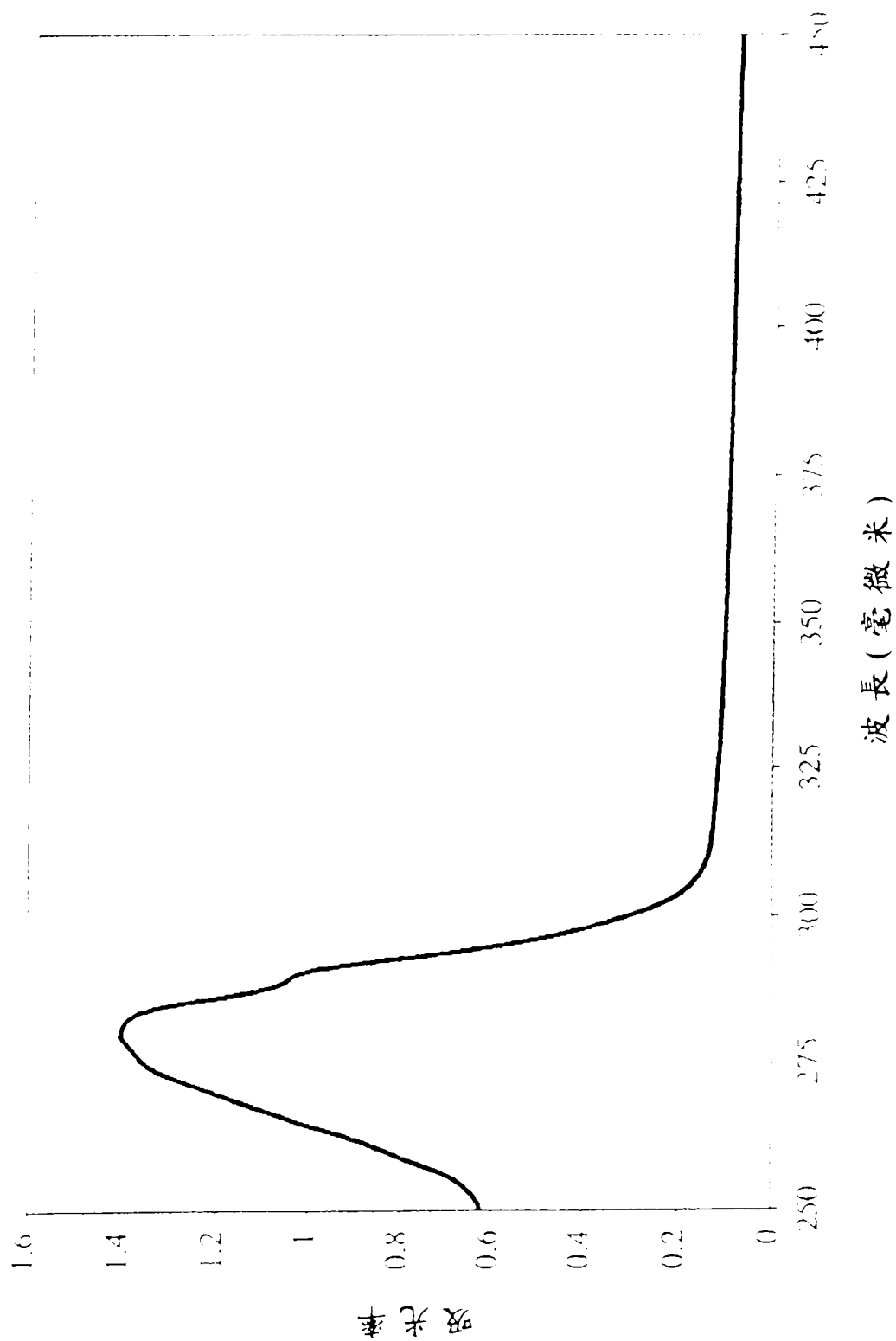
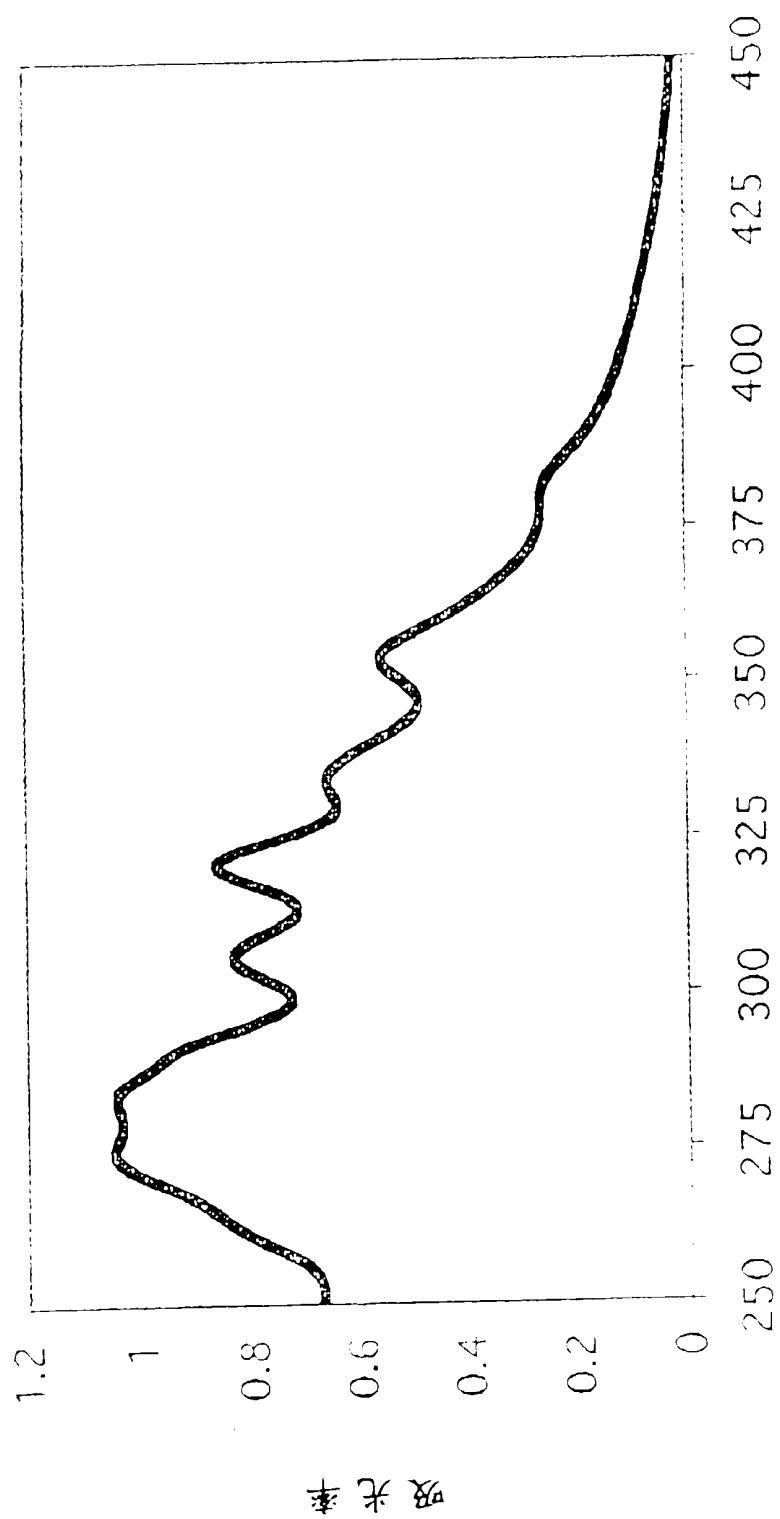
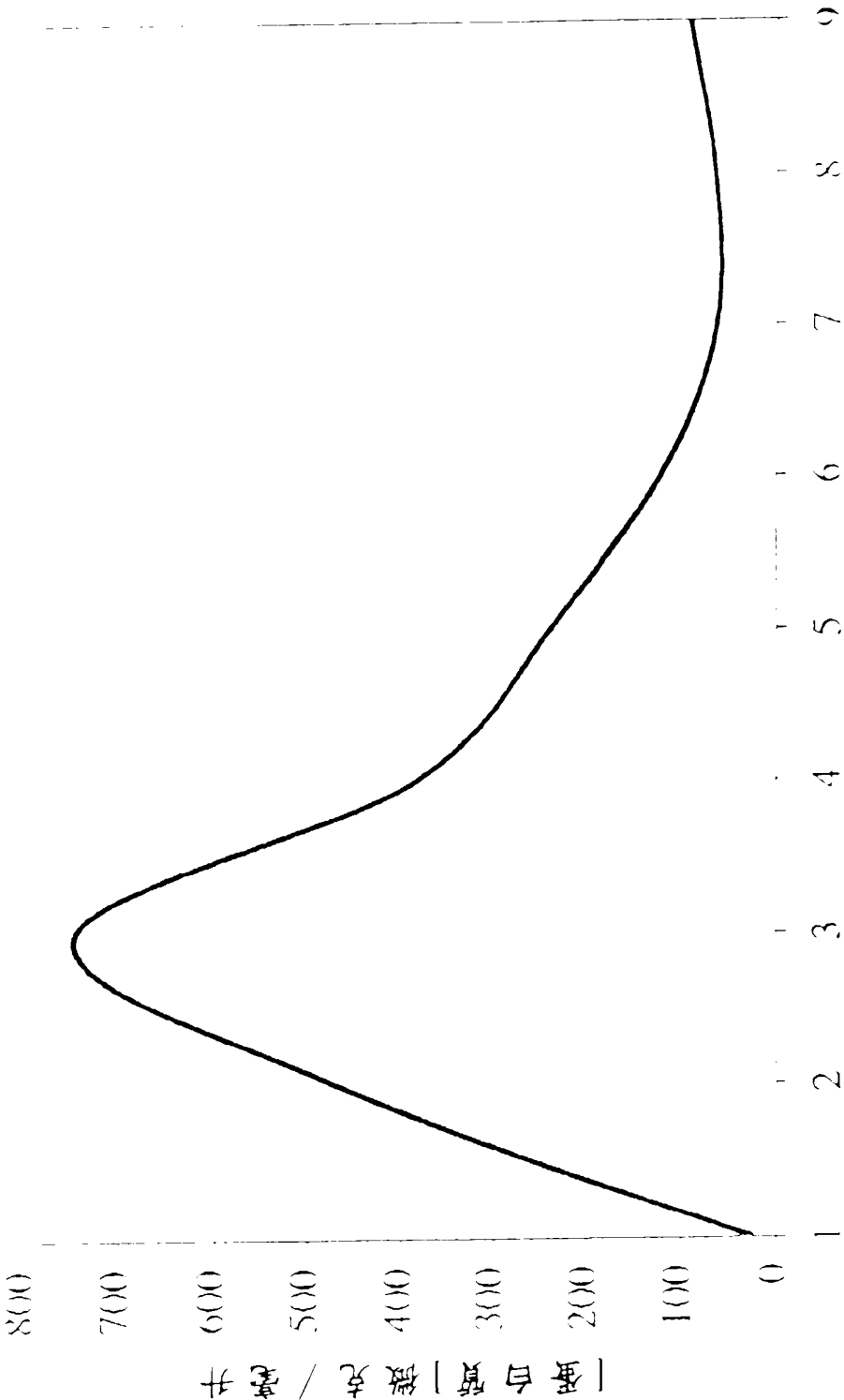


圖 1



波長(毫微米)

圖 2



離份

圖 3

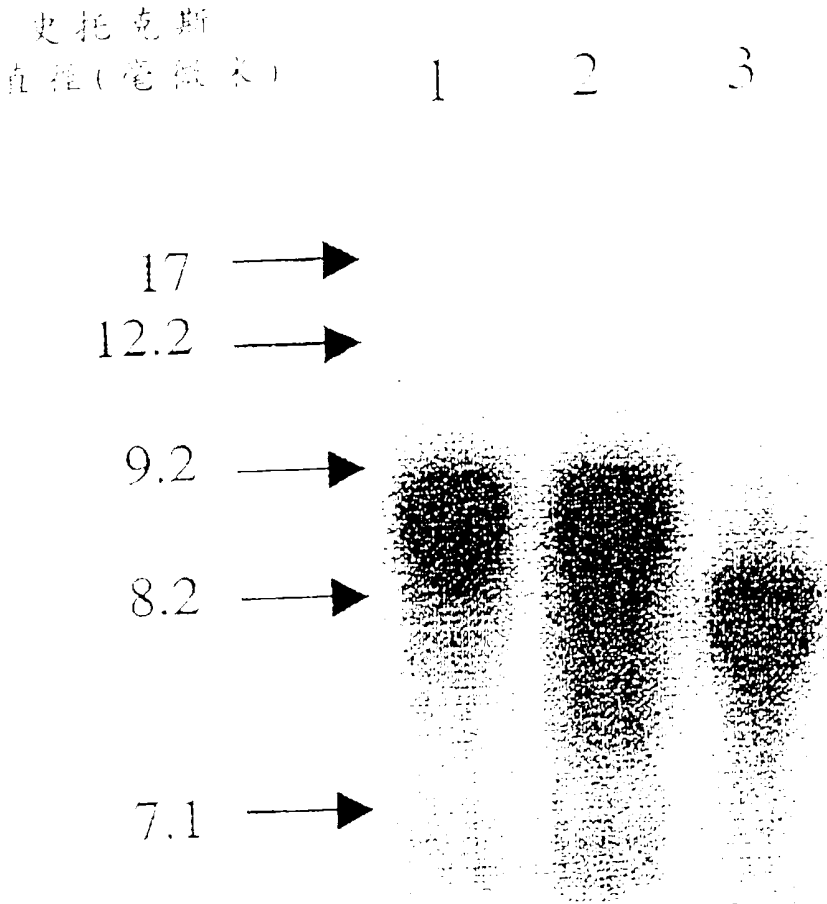


圖 4

史托克斯
位移(毫微米)

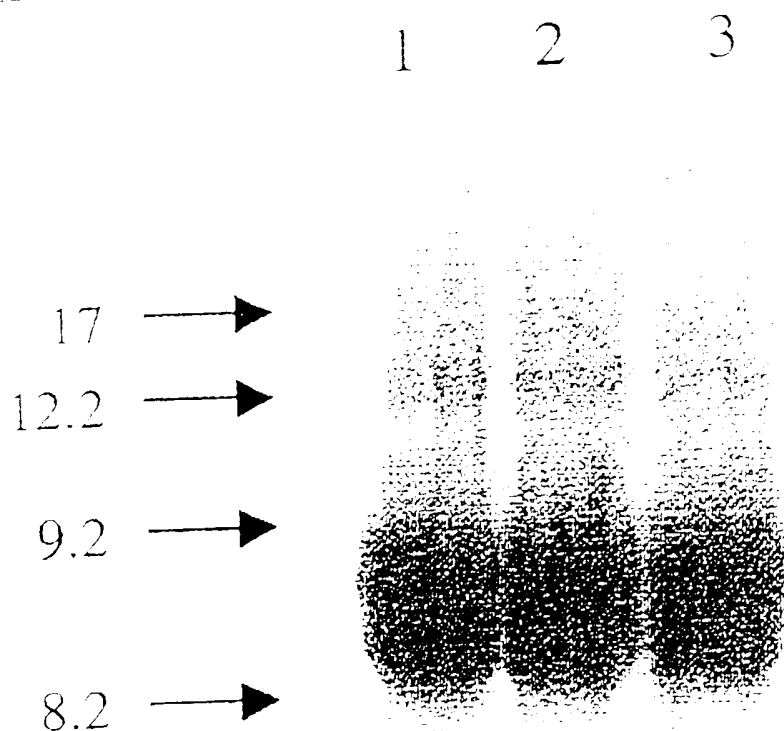


圖 5

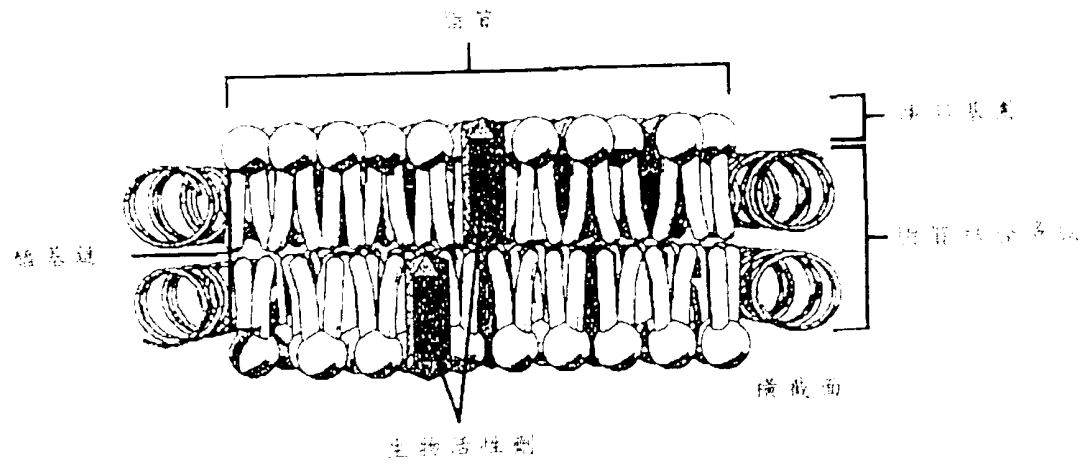


圖 6A

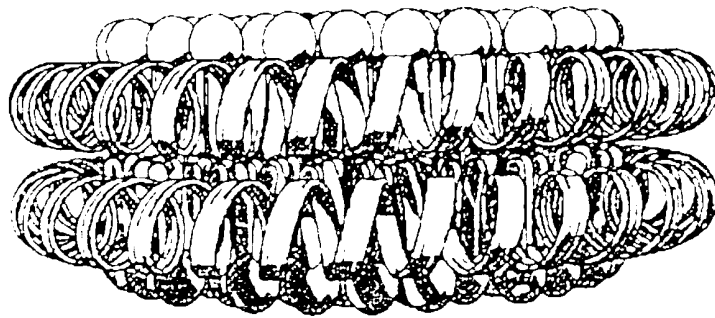


圖 6B

圖 7A

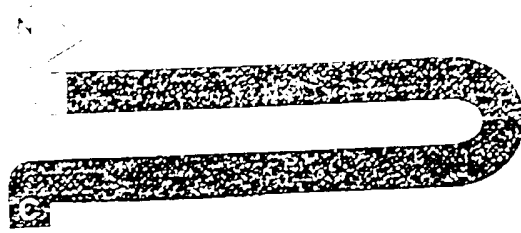


圖 7A

增強效應

Histatin-5

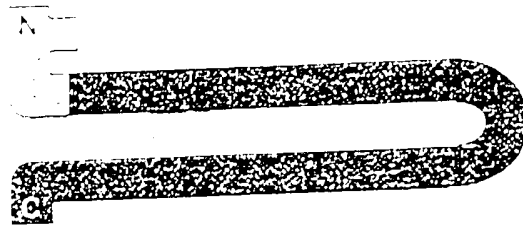


圖 7B

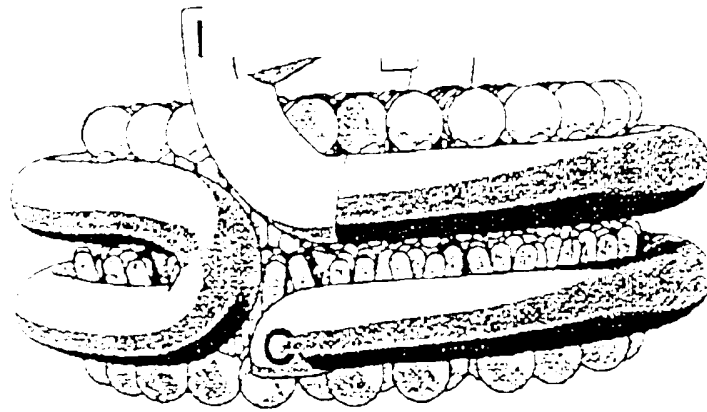


圖 7C

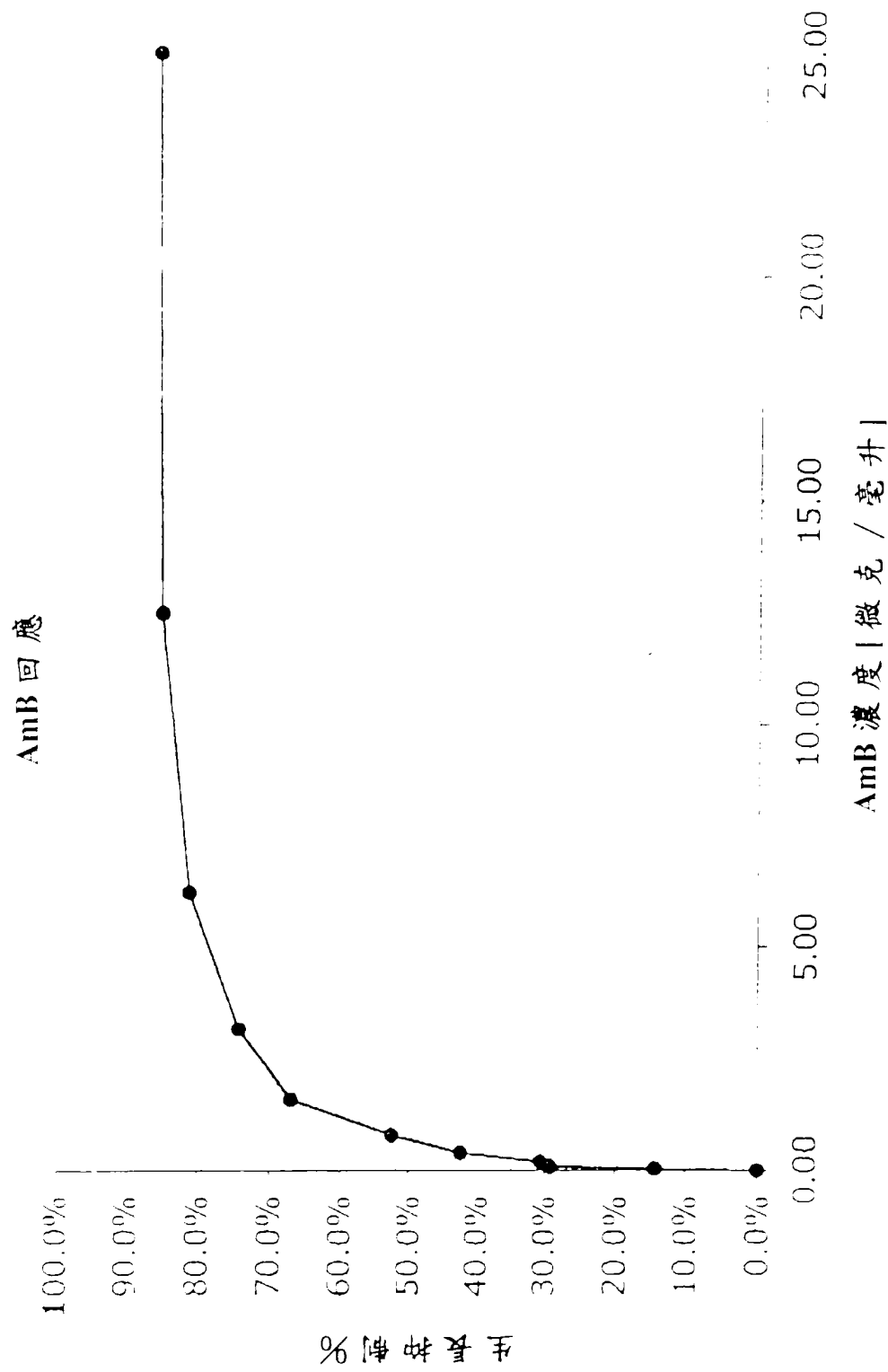
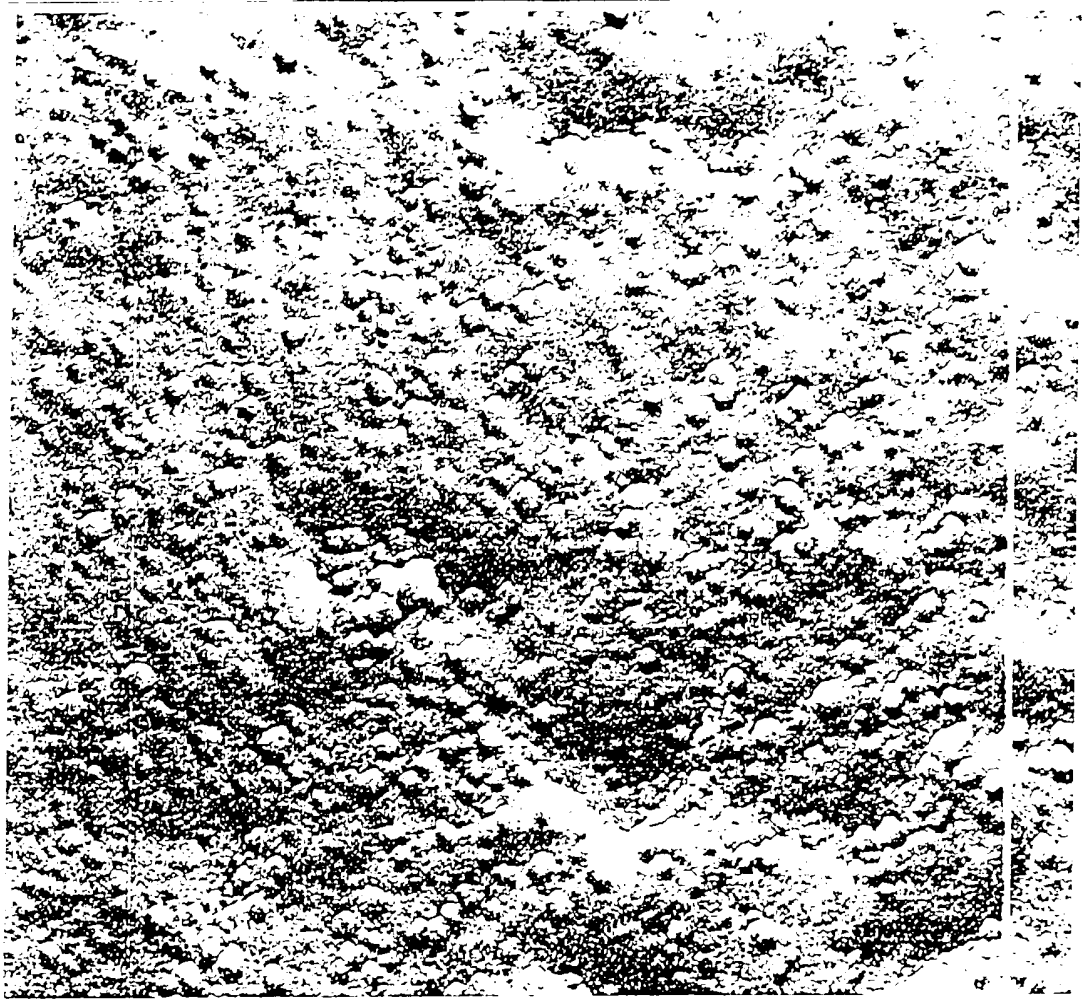


圖 8



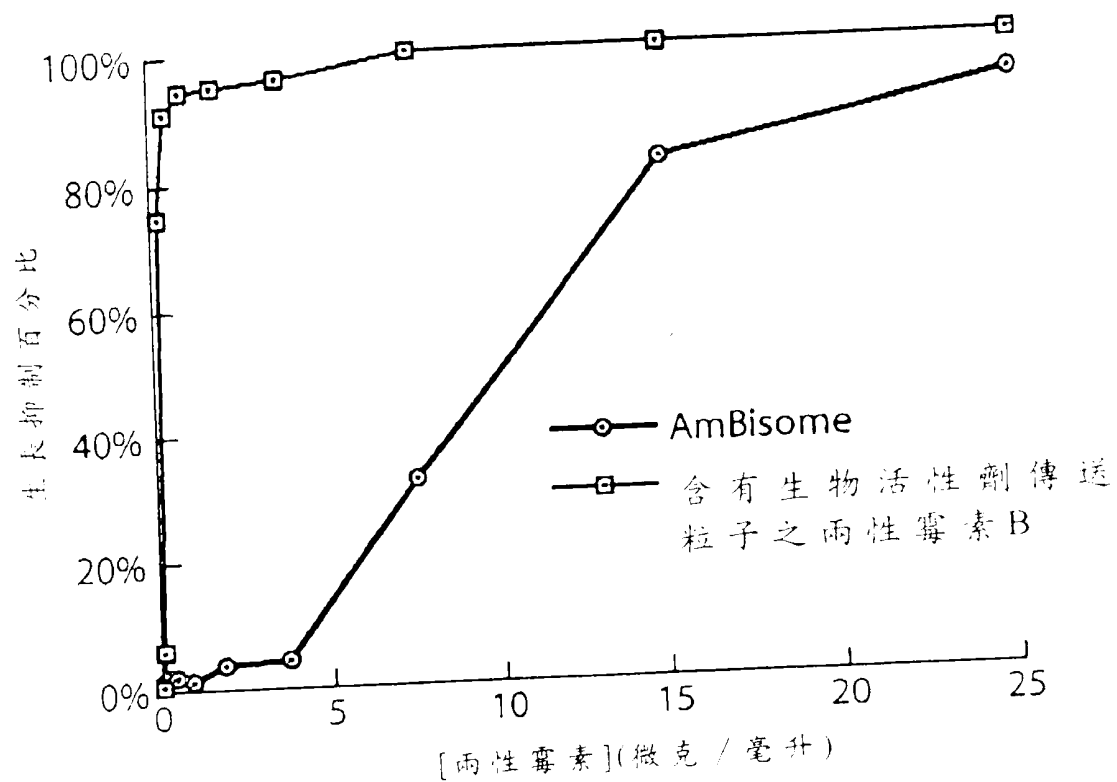


圖 10

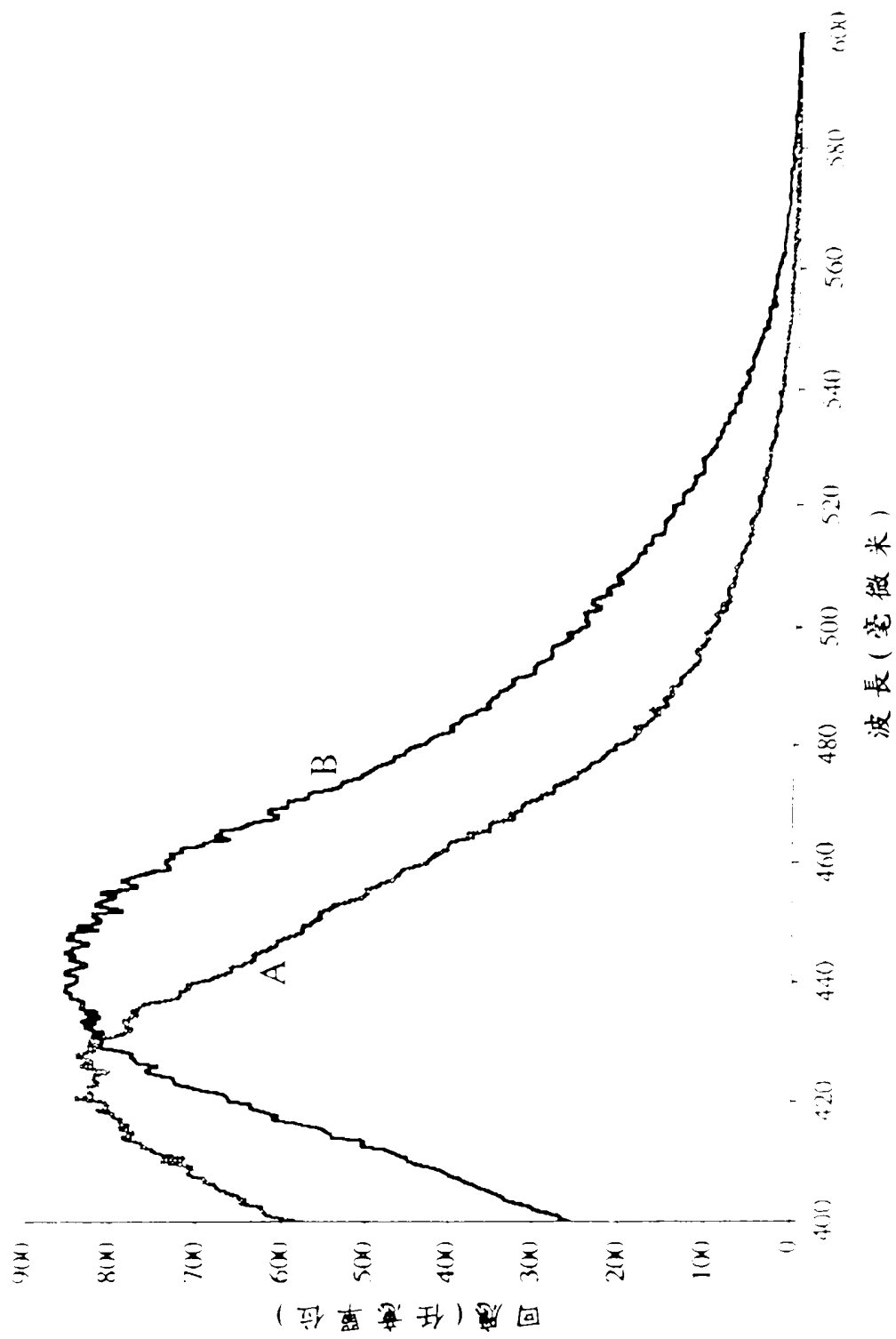


圖 11

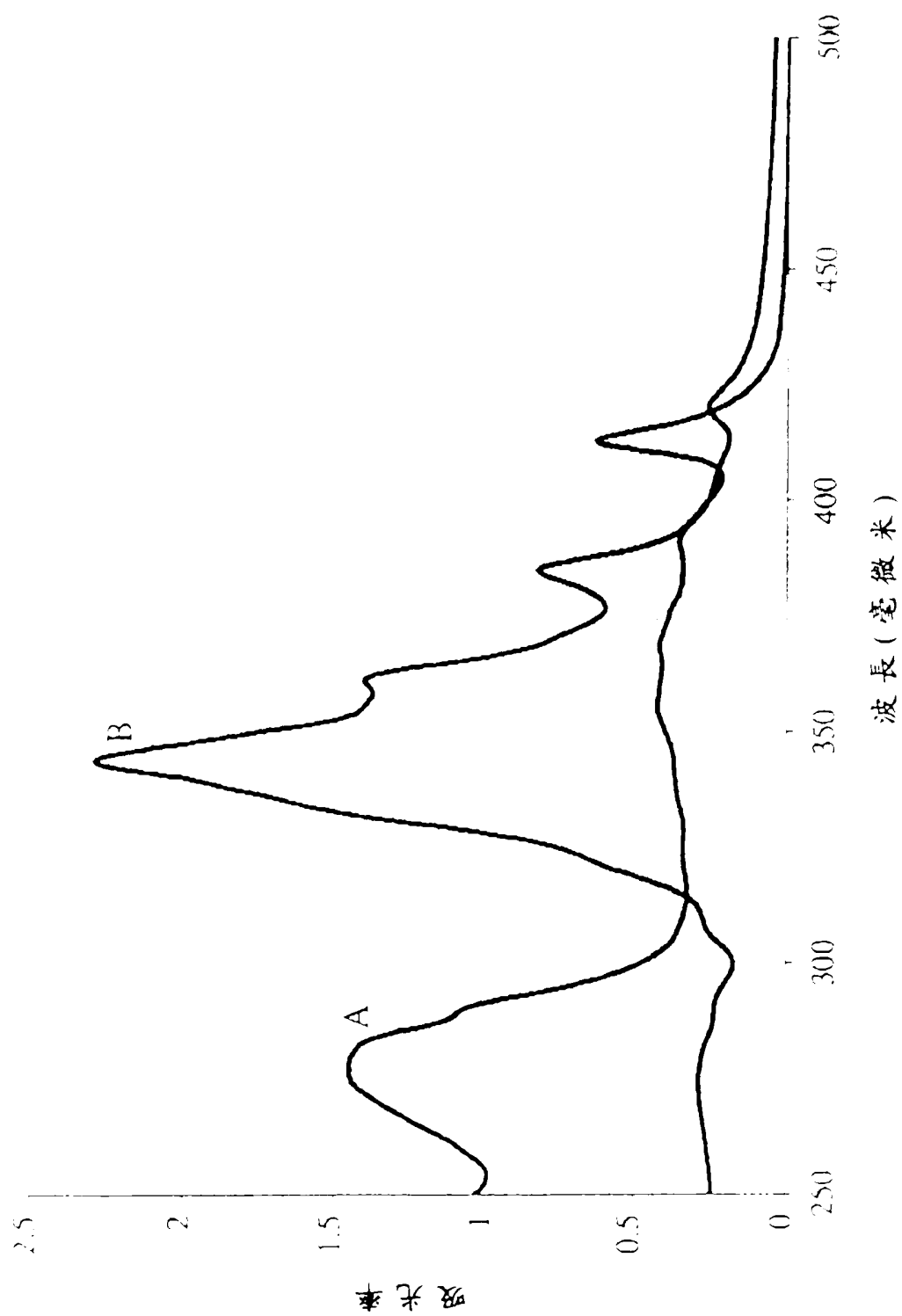


圖 12

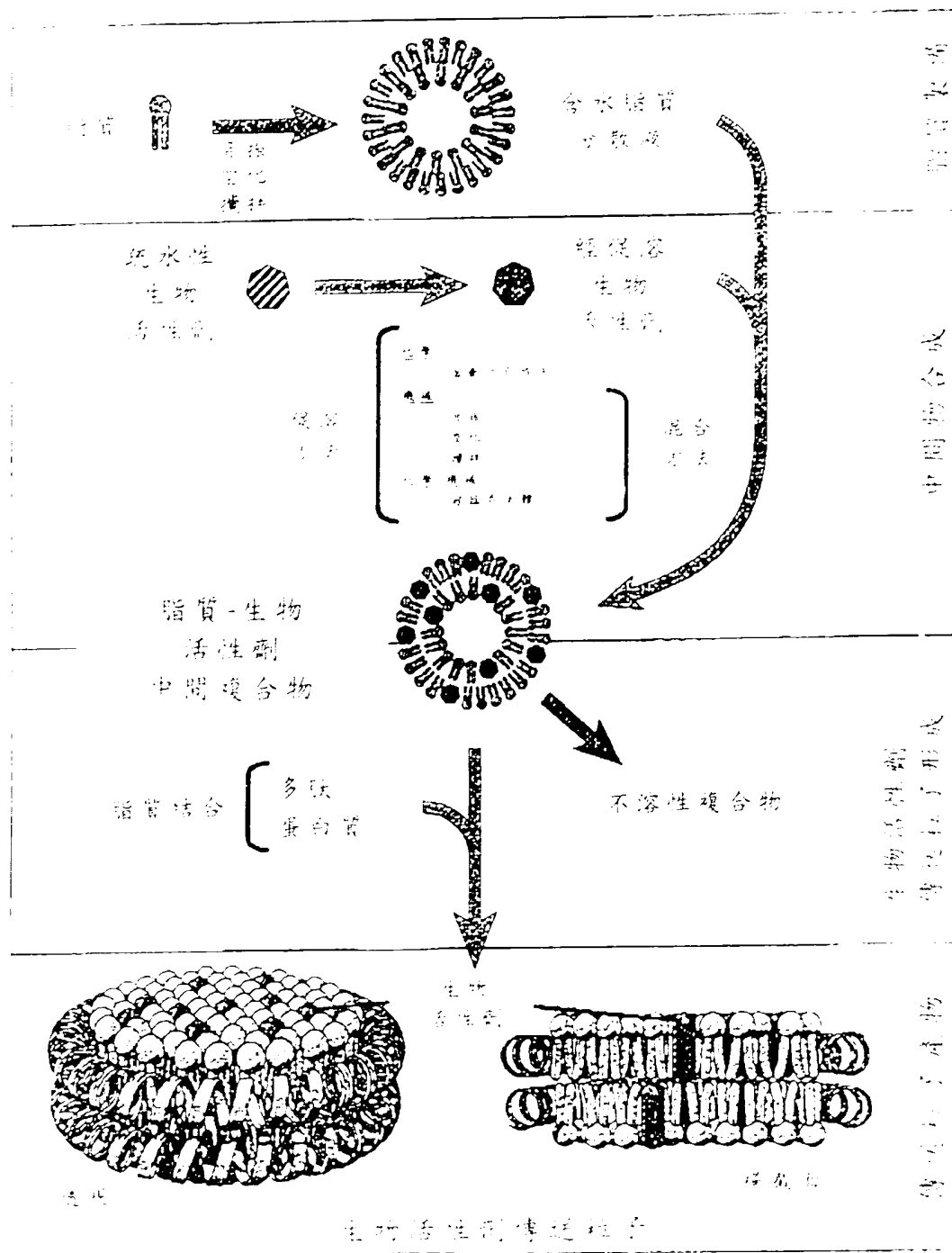


圖 13

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(13)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

103年1月20日
R1~3 補充

七、申請專利範圍：

1. 一種生物活性劑傳送粒子，其包含脂質結合多肽、脂質雙層，及其中該脂質雙層包括具有經一或多個生物活性劑鍵結之脂質，

其中該脂質雙層內部包含一個疏水性區域，且該具有一或多個生物活性劑之脂質係被摻入至脂質雙層之疏水性區域，且

其中該粒子不包含水性核心，

且其中該粒子為碟形且在水性溶液中維持碟形，並具有由脂質結合多肽之兩性 α -螺旋結構及/或 β -薄片所環繞之圓盤狀脂質雙層，該脂質結合多肽係在環繞該粒子周圍與該雙層的疏水性表面締合。

2. 根據請求項1之生物活性劑傳送粒子，其中脂質結合多肽為載脂蛋白。
3. 根據請求項2之生物活性劑傳送粒子，其中載脂蛋白係可交換載脂蛋白、載脂蛋白E或人類載脂蛋白A-I。
4. 根據請求項2至3中任一項之生物活性劑傳送粒子，其中載脂蛋白已被改質以增加粒子之安定性。
5. 根據請求項4之生物活性劑傳送粒子，其中改質係包括引進半胱胺酸殘基，以形成分子間或分子內二硫鍵。
6. 根據請求項1至3中任一項之生物活性劑傳送粒子，其中該脂質雙層包含磷脂。
7. 根據請求項6之生物活性劑傳送粒子，其中該磷脂包含二肉豆蔻醯基磷脂醯膽鹼(DMPC)與二肉豆蔻醯基磷脂醯

甘油 (DMPG)、二棕櫚醯基磷脂醯膽鹼 (DPPC) 或蛋磷脂醯膽鹼。

8. 根據請求項1之生物活性劑傳送粒子，其中該脂質結合多肽係選自由下列所組成之群之載脂蛋白：載脂蛋白A-I、載脂蛋白E(ApoE)及載脂卟啉III (ApoIII)、載脂蛋白A-IV(ApoA-IV)、載脂蛋白A-V(ApoA-V)、載脂蛋白C-I(ApoC-I)、載脂蛋白C-II(ApoC-II)、載脂蛋白C-III(ApoC-III)、載脂蛋白D(ApoD)、載脂蛋白A-II(ApoA-II)、載脂蛋白B-100(ApoB-100)、載脂蛋白J(ApoJ)、載脂蛋白H(ApoH)，或其片段、天然變種、異構重組物、類似物或嵌合形式。
9. 根據請求項1之生物活性劑傳送粒子，其中該脂質結合多肽為兩性肽。
10. 根據請求項2之生物活性劑傳送粒子，其中載脂蛋白為載脂蛋白E3或其異構重組物之N-末端功能部位。
11. 根據請求項1至3及8至10中任一項之生物活性劑傳送粒子，其中該生物活性劑係選自由下列組成之群：抗微生物劑、抗癌劑、殺害劑、殺昆蟲劑、除草劑、放射性標識、螢光化合物、麻醉劑、生物活性脂質、消炎劑、營養物、脂多糖及使用於光動態療法中之光敏化劑。
12. 根據請求項1至3及8至10中任一項之生物活性劑傳送粒子，其中該生物劑活性係非-多肽。
13. 一種傳送生物活性劑至個體之組合物，其包含根據請求項1至12中任一項之生物活性劑傳送粒子及載劑。

14. 根據請求項13之組合物，其中該載劑係藥學上可接受之載劑。
15. 根據請求項13或14之組合物，其中該組合物係經調配以供受控釋出，且以局部投藥或非經腸投藥。
16. 根據請求項15之組合物，其中該非經腸投藥係選自靜脈內、肌內、經皮、皮下、腹膜內、經黏膜或鞘內。