



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108472246 A

(43)申请公布日 2018.08.31

(21)申请号 201680073237.X

(22)申请日 2016.10.14

(30)优先权数据

1518172.0 2015.10.14 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.06.13

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2016/074759 2016.10.14

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/064276 EN 2017.04.20

(71)申请人 剑桥生物制药专利有限公司

地址 马耳他瓦莱塔

(72)发明人 威廉·亨利

理查德·沃尔夫-加拉韦

约翰·梅奥

(74)专利代理机构 广州华进联合专利商标代理有限公司 44224

代理人 刘培培 黄爱娇

(51)Int.Cl.

A61K 9/00(2006.01)

A61K 9/127(2006.01)

权利要求书2页 说明书16页

(54)发明名称

用于在药物中使用的胶体颗粒

(57)摘要

本发明提供一种包含胶体颗粒的、用于在药物中使用的组合物,其中,所述胶体颗粒包含约0.5-20摩尔百分比的、用生物相容性亲水聚合物衍生化的两亲性脂质,其中所述组合物不含任何药物活性剂。

1. 一种包含胶体颗粒的、用于在药物中使用的组合物,其特征在于,所述胶体颗粒包含约0.5-20摩尔百分比的、用生物相容性亲水聚合物衍生化的两亲性脂质,其中所述组合物不含任何药物活性剂。

2. 根据权利要求1所述的用于使用的组合物,其特征在于,所述胶体颗粒基本上是中性的,并且所述聚合物基本上不带净电荷。

3. 根据权利要求1所述的用于使用的组合物,其特征在于,所述胶体颗粒的平均粒径为约0.03微米至约0.4微米(μm)之间。

4. 根据权利要求3所述的用于使用的组合物,其特征在于,所述胶体颗粒的平均粒径为约0.1微米(μm)。

5. 根据权利要求1至4任一项所述的用于使用的组合物,其特征在于,所述两亲性脂质为来自天然或合成来源的磷脂。

6. 根据权利要求5所述的用于使用的组合物,其特征在于,所述两亲性脂质为磷脂酰乙醇胺(PE)。

7. 根据权利要求1至4任一项所述的用于使用的组合物,其特征在于,所述两亲性脂质为氨基甲酸酯连接的不带电的脂质聚合物。

8. 根据权利要求7所述的用于使用的组合物,其特征在于,所述两亲性脂质为二硬脂酰氨基丙二醇(DS)。

9. 根据权利要求1所述的用于使用的组合物,其特征在于,所述胶体颗粒进一步包含从天然或合成来源获得的第二两亲性脂质。

10. 根据权利要求9所述的用于使用的组合物,其特征在于,所述第二两亲性脂质为磷脂酰胆碱。

11. 根据权利要求10所述的用于使用的组合物,其特征在于,所述胶体颗粒包含棕榈酰-油酰磷脂酰胆碱(POPC)和1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DSPE),且POPC:DSPE的比值为85至99:15至1。

12. 根据权利要求11所述的用于使用的组合物,其特征在于,所述POPC:DSPE的比值为90至99:10至1。

13. 根据权利要求12所述的用于使用的组合物,其特征在于,所述POPC:DSPE的比值为97:3。

14. 根据权利要求9所述的用于使用的组合物,其特征在于,所述组合物添加有胆固醇。

15. 根据权利要求1至14任一项所述的用于使用的组合物,其特征在于,所述生物相容性亲水聚合物选自聚烷基醚、聚乳酸和聚乙醇酸。

16. 根据权利要求15所述的用于使用的组合物,其特征在于,所述生物相容性亲水聚合物为聚乙二醇。

17. 根据权利要求16所述的用于使用的组合物,其特征在于,所述聚乙二醇具有约500道尔顿至约5000道尔顿的分子量。

18. 根据权利要求17所述的用于使用的组合物,其特征在于,所述聚乙二醇具有约2000道尔顿的分子量。

19. 根据权利要求16至18任一项所述的用于使用的组合物,其特征在于,所述衍生化的两亲性脂质为1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[聚(乙二醇)]。

20. 根据权利要求16至18任一项所述的用于使用的组合物,其特征在于,所述衍生化的两亲性脂质为1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[聚(乙二醇)-2000] (DSPE-PEG 2000)。

21. 根据权利要求1至20任一项所述的用于使用的组合物,其特征在于,所述组合物用于治疗血液因子疾病、内分泌紊乱或激素缺乏症。

22. 一种治疗患有疾病或创伤的患者,其特征在于,所述方法包括对所述患者给药权利要求1至21任一项所定义的组合物。

23. 根据权利要求22所述的方法,其特征在于,所述疾病为血液因子疾病、内分泌紊乱或激素缺乏症。

24. 部件的试剂盒,该部件包括权利要求1至21任一项所述的组合物以及可注射溶液的、用于给药的给药工具。

25. 一种权利要求1至21任一项所述的药物组合物的剂型。

用于在药物中使用的胶体颗粒

技术领域

[0001] 本发明涉及用于在药物中使用的胶体颗粒。

背景技术

[0002] 患者中的许多疾病的特征在于内源性因子或激素在血液或细胞外环境中的次优水平。患者具有低水平的循环内源性因子或激素,这不足以向细胞、组织或器官提供必要水平的生物作用或信号传导。患者的特征可以是患有轻度形式的所讨论的疾病。

[0003] 例如,具有低于1%的活性因子VIII的个体可归类为具有严重血友病A,具有1-5%的活性因子VIII的个体归类为具有中度血友病A,以及具有5-40%正常水平的凝血活性因子VIII的个体归类为具有轻度血友病A。

[0004] 传统上通过让患者接受常规剂量的因子或激素的替代疗法来治疗以缺乏或不足量的内源性因子或激素为特征的疾病。然而,具有轻度到中度形式的疾病的受试者不需要与没有或几乎没有所讨论的内源性因子或激素的患者相同剂量的用于治疗这种病症的治疗组合物。

[0005] 如在治疗任何疾病时一样,避免给患者开过高剂量的药是很重要的,因为许多治疗剂会引起显著毒性。替代疗法的其他问题包括通过在患者体内形成自身抗体而对替代因子或激素形成“抗性”。

[0006] 替代疗法旨在通过给药外源版本的因子或激素来修复内源性因子或激素的生物功能,所述外源版本的因子或激素可通过多种手段制备,包括化学合成、重组DNA技术、来自同种异体供体的捐献或从尸体来源的分离。例如,血友病的治疗依赖于血液因子的给药,糖尿病的治疗使用胰岛素。这些疗法已经使用了具有各种不同的制剂和给药途径的所讨论的药剂的各种来源。然而,从供体来源获得的因子和激素会带来污染风险,并且合成的制备途径的成本很高。

[0007] 该方法的例子可见于用外源性血液因子治疗血友病中。通常,已将血液因子制备为用于静脉给药的药物组合物。该组合物基于活性蛋白质,常偶联至诸如聚乙二醇(PEG)的聚合物以提高循环半衰期。因此,PEG化血液因子作为治疗剂的静脉给药是很好理解且广泛接受的。裸露的(即未偶联的和未经修饰的)血液因子(例如因子VIII和因子IX)物质的脂质体制剂也是已知的,例如参见WO 95/04524。

[0008] WO 99/55306中描述了包含通过聚乙二醇的存在而修饰的因子VIII和脂质体的药物组合物,其中血液因子未包封在脂质体中。然而,该制剂制备为用于静脉给药。WO 2004/091723中描述了其他蛋白质的额外制剂,其中该蛋白质包括凝血因子。该蛋白质据称通过与存在于脂质体表面上的聚乙二醇的相互作用,以非共价方式结合至脂质体。然而,根据该文献的实施例制备的凝血因子的制剂也用于静脉给药。

[0009] WO 2011/135307和WO 2011/135308中分别展示了作为与PEG的偶联物存在的血液因子(因子VIII和因子VIIa)的制剂的其他示例,其中制备的实际制剂用于静脉给药。WO2013/156488还描述了用于皮下给药的修饰的治疗剂的剂型,包括血液因子例如因子

VIII (FVIII) 和因子VIIa (FVIIa)。

[0010] 还发现血液因子因子VIII能够与PEG化的脂质体联合,即血液因子未包封在脂质体内 (Baru et al Thromb.Haemost,93,pages 1061-1068, (2005))。然而,FVIII的组合物仅制备为用于静脉给药的制剂。

[0011] Peng et al在The AAPS Journal,14(1),pages 25-42 (2011) 中的进一步研究公开了基于包封在脂质体中的FVIII的替代方法,随后通过在制备后向脂质体中被动地添加PEG而将脂质体PEG化。在Peng et al的一个实验中,皮下 (SC) 给药脂质体制剂以探究免疫原性,但没有暗示该给药的治疗目的。在Peng et al中,还特别提到了Baru et al (2005) 的论文以及Baru et al的“将FVIII暴露于诸如蛋白酶和IgGs的血浆组分”的方法的叙述。根据Baru et al (2005) 的方法制备的含有重组因子VIII的脂质体已经静脉给药于受试者 (Spira et al Blood,108(12),pages 3668-3673 (2012))。

[0012] 因此,对于患有轻度到中度形式的这种疾病的患者来说,以不一定需要所讨论的因子或激素的外部来源的方式来补充该因子或激素的内源水平的手段是优选的。

发明内容

[0013] 根据本发明,提供一种包含胶体颗粒的、用于在药物中使用的组合物,所述胶体颗粒包含约0.5至20摩尔百分比的、用生物相容性亲水聚合物衍生化的两亲性脂质。该组合物由不存在任何其他药物活性剂的胶体颗粒组成。该药物活性剂定义为对受试者的身体具有药理作用的药品、物质、分子或化合物。

[0014] 包含本发明的胶体颗粒的组合物可用于治疗特征为受试者中的内源性因子或激素水平不足的受试者的疾病。该疾病可能是由于与内源性因子或激素的产生有关的基因的功能丧失或功能部分丧失造成的。

[0015] 因此,本发明的组合物为内源性生物活性多肽或蛋白质的活性提供保护和延长。本发明提供对疾病或病情的治疗,无需给药经过或未经过进一步衍生化的外源性蛋白质。在局部给药组合物的情况下,本发明还意味着受试者不需要像常规疗法那样接受任何注射以维持治疗有效循环水平的生物活性多肽或蛋白质。如果受试者已经定期接受生物活性多肽或蛋白质的外源性注射,则该组合物将延长多肽或蛋白质在体内的寿命,使这种多肽或蛋白质的给药剂量减少、剂量之间的间隔增加或者兼具两种益处的组合。

[0016] 该疾病可以选自血液因子疾病、内分泌紊乱或激素缺乏症。

[0017] 血液因子疾病可以是血友病 (血友病A、B或C)、血管性血友病、因子V缺乏症、因子X缺乏症、因子XII缺乏症。

[0018] 内分泌紊乱可以是肢端肥大症、艾迪生氏病 (Addison's Disease)、库欣综合征 (Cushing's Syndrome)、德奎尔万氏甲状腺炎 (De Quervain's Thyroiditis)、肥胖症、糖尿病 (1型糖尿病或2型糖尿病)、尿崩症、甲状腺肿、格雷夫斯病 (Graves' Disease)、生长障碍、生长激素缺乏症、桥本氏甲状腺炎 (Hashimoto's Thyroiditis)、高血糖症、甲状旁腺功能亢进症、低血糖症、甲状旁腺功能减退症、低睾酮、更年期、骨质疏松症、甲状旁腺疾病、垂体功能障碍、多囊卵巢综合征、前驱糖尿病、特纳综合征。

[0019] 胶体颗粒可以基本上是中性的,并且聚合物可以基本上不带净电荷。胶体颗粒的平均粒径可以为约0.03至约0.4微米 (μm),例如平均粒径为约0.1微米 (μm)。在此范围内的

平均粒径可增加颗粒在体内的循环时间并防止其被网状内皮系统 (RES) 吸附。

[0020] 如本领域所熟知的, 本发明的胶体颗粒通常为脂质囊泡或脂质体的形式。除非文中另有规定, 否则本说明书中提及胶体颗粒时包括脂质体和脂质囊泡。

[0021] 在胶体颗粒中, 两亲性脂质可以是来自天然或合成来源的磷脂。两亲性脂质可包含约0.5至约20摩尔百分比(%)的颗粒, 例如约1至20%, 或约1至6%, 或约3%。

[0022] “两亲性脂质”是指包括亲水区和疏水区的物质, 例如磷脂。两亲性脂质可以是两性离子磷脂、两性离子脂质、具有净负电荷的脂质和具有净正电荷的脂质。例如, 两亲性脂质包括但不限于磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇、鞘磷脂、大豆磷脂(大豆卵磷脂)、鸡蛋卵磷脂、溶血磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰乙醇胺、磷脂酰甘油、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酸、心磷脂、酰基三甲基铵丙烷、二酰基二甲基铵丙烷、硬脂胺、乙基磷脂酰胆碱等。大豆卵磷脂主要是天然存在的磷脂的组合; 磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)和磷脂酰肌醇(PI)。

[0023] 这种两亲性脂质的合适例子包括磷脂酰乙醇胺(PE)、氨基甲酸酯连接的不带电的脂质聚合物或氨基丙二醇二硬脂酰(DS)、或其混合物。

[0024] 磷脂酰乙醇胺磷脂的例子包括: 1,2-二芥酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二月桂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1-棕榈酰-2-油酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺。磷脂酰乙醇胺(PE)的合适例子可以是1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DSPE)。生物相容性亲水聚合物的目的是在空间上稳定SUVs, 从而防止体外囊泡的融合, 并使囊泡避免体内RES的吸附。

[0025] 胶体颗粒可以进一步包含从天然或合成来源获得的第二两亲性脂质。第二两亲性脂质可以是磷脂酰胆碱(PC)。磷脂酰胆碱磷脂的例子包括: 1,2-二癸酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二芥酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二亚油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二月桂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1-肉豆蔻酰-2-棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1-肉豆蔻酰基-2-硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1-棕榈酰-2-肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1-棕榈酰-2-油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1-棕榈酰-2-硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1-硬脂酰-2-肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1-硬脂酰-2-油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1-硬脂酰-2-棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱。磷脂酰胆碱(PC)的合适例子可以是棕榈酰-油酰磷脂酰胆碱(POPC)或大豆磷脂酰胆碱。其他天然来源的磷脂酰胆碱包括鸡蛋磷脂酰胆碱。磷脂酰胆碱可以是氢化或未氢化的。

[0026] 在一个实施例中, 药物组合物可以由胶体颗粒组成, 所述胶体颗粒包含棕榈酰-油酰磷脂酰胆碱(POPC)和1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DSPE), 其摩尔比(POPC:DSPE)为85至99:15至1。在一些情况下, POPC:DSPE的摩尔比可以为90至99:10至1。在一个实施例中, POPC:DSPE的摩尔比可以为97:3。这些脂质的97:3的摩尔比等同于97:10的重量比。

[0027] 在一个替代实施例中, 本发明的药物组合物可以添加有胆固醇。

[0028] 生物相容性聚合物可具有约500至约5000道尔顿的分子量, 例如约2000道尔顿。

[0029] 根据本发明使用的生物相容性亲水聚合物可以选自由聚烷基醚、聚乳酸和聚乙醇酸。生物相容性亲水聚合物可以是聚乙二醇(PEG)。用于本发明的组合物中的聚乙二醇可具

有约500至约5000道尔顿的分子量,例如其可具有约1000、2000或3000道尔顿的分子量。在一个实施例中,PEG的分子量可以为2000道尔顿。聚乙二醇可以是支化或未支化的。

[0030] 合适的衍生化的两亲性脂质的例子可以是1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[聚(乙二醇)]。如果PEG具有2000道尔顿的分子量,则衍生化的两亲性脂质可以描述为1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[聚(乙二醇)-2000] (DSPE-PEG 2000)。

[0031] 可以相应地调整衍生化的两亲性脂质在胶体颗粒的最终制剂中的浓度以适应组合物的期望性能。然而,合适的浓度可以为5.0mg/mL至15mg/mL,例如7.5mg/mL至12.5mg/mL或7.6mg/mL至9.0mg/mL。脂质在最终制剂中的总含量可以在4%至12%的范围内,例如4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%或12%。

[0032] 该组合物可以包含任意合适的赋形剂、缓冲剂和/或佐剂,并且可以配制成药物组合物。这种赋形剂、缓冲剂和/或佐剂的例子包括磷酸盐缓冲盐水(PBS)、磷酸钾、磷酸钠和/或柠檬酸钠。其他生物缓冲剂可以包括PIPES、MOPS等。

[0033] 组合物的合适pH值包括用于体内给药的任意一般可接受的pH值,例如pH 5.0至pH 9.0,合适地pH 6.8至pH 7.2或pH 7.0。

[0034] 本发明人惊讶地发现用生物相容性聚合物衍生化的胶体颗粒(脂质体)的制剂可以成功给药,并且在受试者中实现治疗有效剂量。合适地,生物相容性聚合物为聚乙二醇。

[0035] 因此,本发明的这个方面延伸至治疗患有如上定义的疾病或病情的受试者的方法,所述方法包括对受试者给药包含如上定义的胶体颗粒的组合物。本发明包括这种胶体颗粒在制造用于治疗这种疾病或病情的药物中的用途。

[0036] 不希望受理论束缚,我们认为根据本发明使用的胶体颗粒可以增强受试者中的因子或激素的活性。在许多疾病中,当受试者具有次优水平的因子或激素时,可以表现出疾病的症状。

[0037] 当该因子为血液因子时,其可以选自因子VII、因子VIIa、因子VIII、因子IX、因子X、因子Xa、因子XI、因子VIIa、因子V、因子XIII、血管性血友病因子(von Willebrand's Factor)和蛋白质C。在一些实施例中,凝血因子可以合适地为因子VII、因子VIII或因子IX。

[0038] 其它因子或激素包括但不限于:降钙素、促红细胞生成素(EPO)、粒细胞集落刺激因子(GCSF)、血小板生成素(TPO)、 α -1蛋白酶抑制剂、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GMCSF)、生长激素、肝素、人生长激素(HGH)、生长激素释放激素(GHRH)、干扰素 α 、干扰素 β 、干扰素 γ 、白细胞介素-1受体,白细胞介素-2,白细胞介素-1受体拮抗剂、白细胞介素-3、白细胞介素-4、白细胞介素-6、促黄体激素释放激素(LHRH)、胰岛素、前胰岛素、胰淀素、C肽、生长抑素、加压素、促卵泡激素(FSH)、胰岛素样生长因子(IGF)、促胰岛素(insulintropin)、巨噬细胞集落刺激因子、神经生长因子(NGF)、组织生长因子、角质细胞生长因子(KGF)、胶质细胞生长因子(GGF)、肿瘤坏死因子(TNF)、内皮生长因子、甲状旁腺激素(PTH)、胰高血糖素样肽(GLP)。

[0039] 该因子还可以是抗体或抗体片段,例如单域抗体、 V_L 、 V_H 、Fab、 $F(ab')_2$ 、Fab'、Fab3、scFv、di-scFv、sdAb、Fc和/或其组合。

[0040] 各种已知的偶联反应可用于制备用亲水聚合物衍生化的囊泡形成脂质。例如,可以通过三聚氯氰基团将聚合物(例如PEG)衍生为脂质,例如磷脂酰乙醇胺(PE)。或者,可以用羰基二咪唑偶联剂活化封端的PEG,以形成活化的咪唑化合物。氨基甲酸酯连接的化合物

可以通过以下方法制备：将MPEG (甲氧基PEG) 的末端羟基与对硝基苯基氯甲酸酯反应，以得到对硝基苯基碳酸酯。然后将该产物与1-氨基-2,3-丙二醇反应，得到中间物氨基甲酸酯。将二醇的羟基基团酰化以得到最终产物。如WO 01/05873中所述，使用甘油代替1-氨基-2,3-丙二醇进行类似合成，可用于生产碳酸酯连接的产物。其他反应也是熟知的并在例如US5,013,556中进行了描述。

[0041] 可根据各种参数对胶体颗粒(脂质体)进行分类。例如，当使用薄片的尺寸和数量(结构参数)作为参数时，可以描述三种主要类型的脂质体：多层囊泡(MLV)、小单层囊泡(SUV)和大单层囊泡(LW)。

[0042] MLV是干磷脂在其凝胶至液晶相变温度(cm)以上水合时自发形成的物种。MLV的尺寸是不均匀的，并且其结构类似于交替的同心水层和脂质层的洋葱皮。

[0043] SUV是从MLV通过声处理或其他方法例如挤出、高压均化或高剪切混合形成的，并且是单层的。它们是具有高的表面积-体积比值的最小物种，因此具有最低的储水空隙捕获体积-脂质重量的比。

[0044] 第三类脂质体LUV具有大的含水隔室和单个(单层)或仅少数(寡层)脂质层。在D.Lichtenberg和Y.Barenholz的“Liposomes:Preparation,Characterization,and Preservation,inMethods of Biochemical Analysis”,Vol.33,pp.337-462(1988)中公开了进一步细节。

[0045] 如本文所用，术语“装载”是指待装载的生物聚合物质的任何种类型的相互作用，例如，诸如包封、粘附(至囊泡的内壁或外壁)或嵌入壁中(伴随或不伴随生物聚合物质的挤压)的相互作用。

[0046] 如本文所用和上文所指出的，术语“脂质体”是指胶体颗粒，并且旨在包括任何可以自发或非自发发泡的两亲性化合物的全部球体或囊泡，例如至少一个酰基基团被复合磷酸酯取代的磷脂。脂质体可以在玻璃态到液晶的任何物理状态中存在。大多数三酰甘油酯是合适的，并且适用于本发明的最常见的磷脂是卵磷脂(也称为磷脂酰胆碱(PC))，其是连接至磷酸胆碱酯的硬脂酸、棕榈酸和油酸的甘油二酯的混合物。卵磷脂存在于所有动物和植物中，例如鸡蛋、大豆和动物组织(脑、心脏等)，也可以合成生产。磷脂的来源或其合成方法不是至关重要的，可以使用任何天然存在的或合成的磷脂。

[0047] 具体的磷脂的例子为：L- α -(二硬脂酰)卵磷脂、L- α -(二棕榈酰)卵磷脂、L- α -磷脂酸、L- α -(二月桂酰)磷脂酸、L- α -(二肉豆蔻酰)磷脂酸、L- α -(二油酰)磷脂酸、DL- α -(二棕榈酰)磷脂酸、L- α -(二硬脂酰)磷脂酸和从脑、肝脏、蛋黄、心脏、大豆等制备或合成制备的各种类型的L- α -磷脂酰胆碱及其盐。其他合适的修饰包括磷脂酰胆碱(PC)和两性离子两亲物中的脂肪酰基残基交联剂的受控过氧化，两性离子两亲物自身或与诸如PC的烷基类似物的PCs混合时形成胶束。

[0048] 磷脂的纯度可以变化，也可以完全或部分氢化。氢化降低不需要的氧化的水平，并且修饰和控制凝胶至液体/结晶相的转变温度(try)，该温度影响包装和渗漏。

[0049] 脂质体可以根据包括各种生物流体在内的任何特定储液囊的要求进行“调整”，维持其稳定性而不发生聚集或色谱分离，并在注入流体中保持良好分散和悬浮。原位流动性由于组成、温度、盐度、二价离子以及蛋白质的存在而改变。脂质体可以与或不与任意其他溶剂或表面活性剂一起使用。

[0050] 一般合适的脂质可具有一种特有的酰基链组合物,至少对于鸡蛋或大豆PC中酰基链组分的转变温度(T_m)而言,即一条饱和链和一条不饱和链或两条不饱和链。但是,不排除使用两条饱和链的可能性。

[0051] 脂质体可以含有其他脂质组分,只要它们不会引起不稳定性和/或聚集和/或色谱分离。这可以通过常规实验确定。

[0052] 生物相容性亲水聚合物可以物理地附着到脂质体的表面,或者插入到脂质体的膜中。因此聚合物可以与脂质体共价结合。

[0053] 可以修饰胶体颗粒或生物活性多肽或蛋白质中的一种或两种以调节胶体颗粒与多肽或蛋白质之间的关联动力学。这种调节可以通过定制胶体颗粒或生物活性多肽或蛋白质上的区域或结合序列来实现。

[0054] 用于生产单层或多层的修饰脂质体的各种方法是已知的且可获得的(参见Lichtenberg和Barenholz, (1988)):

[0055] 1. 将磷脂薄膜与水介质水合,随后通过合适的过滤器进行机械振荡和/或超声波照射和/或挤压;

[0056] 2. 将磷脂溶解在合适的有机溶剂中,与水介质混合,然后除去溶剂;

[0057] 3. 使用临界点以上的气体(即,氟利昂和其他气体,例如 CO_2 或 CO_2 和其他气态烃的混合物)或

[0058] 4. 制备脂质洗涤剂混合胶束,然后将洗涤剂的浓度降低至低于脂质体形成的临界浓度的水平。

[0059] 一般地,这些方法生产具有约0.02至10 μm 或更大的不均匀尺寸的脂质体。由于本发明优选使用尺寸较小且尺寸明确定义的脂质体,因此定义为“脂质体尺寸减小”的第二加工步骤可以用于减小脂质体悬浮液的尺寸和尺寸不均匀性。

[0060] 可以调整脂质体悬浮液的尺寸以实现尺寸范围小于约5 μm ,例如<0.4 μm 的囊泡的选择性尺寸分布。在本发明的一个实施例中,胶体颗粒的平均粒径为约0.03至0.4微米(μm),合适地约0.1微米(μm)。

[0061] 通过合适的过滤器过滤可以容易地对在这个范围内的脂质体进行杀菌。储存时较小的囊泡也显示出较小的聚集趋势,从而当静脉或皮下注射脂质体时潜在地减少严重的阻塞或堵塞问题。最后,尺寸降至亚微米范围的脂质体显示出更均匀的分布。

[0062] 有几种技术可用于以适合于本发明的方式减小脂质体的尺寸和尺寸不均匀性。通过标准浴或探针超声处理对脂质体悬浮液进行超声波照射,使尺寸逐渐减小至尺寸为0.02 μm 和0.08 μm 之间的小单层囊泡(SUV)。

[0063] 均化是另一种依赖于剪切能将大脂质体破碎为较小脂质体的方法。在一个典型的均化过程中,通过标准乳液均化器将脂质体悬浮液再循环,直至观察到选择的脂质体尺寸(通常在约0.1 μm 和0.5 μm 之间)。在两种方法中,可以通过传统的激光束粒度测定来监测粒度分布。

[0064] 通过小孔聚碳酸酯过滤器或等效膜来挤压脂质体也是降低脂质体尺寸的一种有效方法,将其尺寸降低至相对明确的尺寸分布,其平均范围在约0.02 μm 和5 μm 之间(取决于膜的孔径)。

[0065] 通常,使悬浮液循环通过一层或两层堆叠的膜几次,直到获得期望的脂质体尺寸

分布。可以挤压脂质体使其通过孔依次减小的膜以实现脂质体尺寸的逐渐减小。

[0066] 离心和分子筛色谱法是可用于生产颗粒尺寸低于选择阈值(小于1 μm)的脂质体悬浮液的其他方法。这两种方法都涉及优先除去大脂质体,而不是将大颗粒转化为较小的颗粒。相应地降低了脂质体产量。

[0067] 可将经尺寸加工的脂质体悬浮液通过颗粒分辨尺寸为约0.4 μm 的杀菌膜,例如常规的0.45 μm 深度的膜过滤器,可容易地对其进行杀菌。脂质体在冻干形式下是稳定的,并且可以在使用前不久通过放入水中而重组。

[0068] 上面描述了用于形成脂质体的合适的脂质。合适的例子包括但不限于,例如二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)和/或二肉豆蔻酰-磷脂酰甘油(DMPG)的磷脂,以及在部分或完全纯化后直接或随后进行部分或完全氢化后获得的鸡蛋和大豆衍生化的磷脂。

[0069] WO 95/04524中描述了以下四种方法,并且一般适用于制备根据本发明使用的胶体颗粒(脂质体)。

[0070] 方法A

[0071] -a) 混合两亲性物质,例如适合在与水不混溶的有机溶剂中形成囊泡的脂质。

[0072] -b) 在固体载体存在的情况下除去溶剂,或者可以以任何形式(粉末、粒状等)直接使用干燥的两亲性物质或其混合物,

[0073] -c) 将步骤b)的产物放入生物聚物质在生理相容性溶液中的溶液中,

[0074] -d) 添加具有增溶或分散性能的有机溶剂,以及

[0075] -e) 在保持生物聚合物的功能的条件下,干燥步骤d)中获得的部分。

[0076] 根据方法A的步骤a),将如上所述的适于形成囊泡的两亲性物质在与水不混溶的有机溶剂中混合。与水不混溶的有机溶剂可以是极性质子溶剂,例如氟化烃、氯化烃等。

[0077] 在本发明方法的步骤b)中,在固体载体存在的情况下除去溶剂。固体载体可以是具有珠状结构的惰性有机或无机材料。无机载体材料可以是玻璃,有机材料可以是TeflonTM或其他类似的聚合物。

[0078] 本发明的方法A的步骤c)用于将步骤b)的产物放入到待包封的物质在生理相容性溶液中的溶液中。

[0079] 生理相容性溶液可以等同于重量高达约1.5%的氯化钠溶液。例如也可以使用其他盐作为冷冻保护剂,只要它们是生理上相容的即可,例如糖和/或氨基酸即可。例如,乳糖、蔗糖或海藻糖可以用作冷冻保护剂。

[0080] 任选地,在步骤a)和b)之间可以设置病毒灭活、杀菌、除热原、过滤步骤a)的部分等的步骤。为了在制备的早期阶段获得药学上可接受的溶液,这可能是有利的。

[0081] 方法A的步骤d)是添加具有增溶或分散性能的有机溶剂。

[0082] 该有机溶剂可以是与水混溶的有机极性质子溶剂。也可以使用烷基链中具有1至5个碳原子的低级脂肪醇,例如叔丁醇(*tert*-butanol)。

[0083] 任选地,在步骤d)之后,可以对步骤d)之后得到的部分进行病毒灭活、杀菌和/或分份。

[0084] 本发明的步骤e)是在保持待装载物质的功能的条件下干燥步骤d)中获得的部分。一种干燥混合物的方法是冻干。冻干可以在冷冻保护剂(例如乳糖或其他糖类或氨基酸)存在的情况下进行。或者,可以使用蒸发或喷雾干燥。

[0085] 然后可以在使用前将干燥的剩余物放入水介质中。在放入固体后,其形成各个脂质体的分散体。水介质可以含有盐水溶液,并且所形成的分散体可以任选地通过合适的过滤器,以便在需要时减小脂质体的尺寸。合适地,脂质体可以具有0.02 μm 至5 μm 的尺寸,例如在<0.4 μm 的范围内。

[0086] 本发明的组合物也可以是通过分离方法A的步骤c)或步骤d)的部分获得的中间产物。因此,本发明的制剂还包含将方法A的步骤e)的产物放入到分散体形式的水中之后可获得的水分散体(水介质中的脂质体)。

[0087] 或者,本发明的药物组合物也可以通过称为方法B、C、D和E的以下方法获得。

[0088] 方法B

[0089] 该方法也包括方法A的步骤a)、b)和c)。然而,省略方法A的步骤d)和e)。

[0090] 方法C

[0091] 在方法C中,用必须重复至少两次的冷冻和解冻循环取代方法A的步骤d)。该步骤是现有技术中公知的制备脂质体的步骤。

[0092] 方法D

[0093] 方法D不包括使用任何渗透组分。在方法D中,涉及囊泡的制备,混合待装载物质的基本上不含盐的溶液并且将如此获得的部分进行共干燥的步骤。

[0094] 方法E

[0095] 方法E比上述方法A-D简单。它需要将用于脂质体制备的化合物(脂质抗氧化剂等)溶解在与水混溶的极性质子溶剂(例如叔丁醇)中。然后将该溶液与含有血液因子的水溶液或水分散体混合。该混合在维持活性所需的最佳体积比下进行。

[0096] 然后在存在或不存在冷冻保护剂的情况下,冻干混合物。在使用脂质体制剂之前需要进行再水合。这些脂质体是多层的,其尺寸减小可以通过WO 95/04524中描述的方法之一来实现。

[0097] 如本文所用,术语“治疗”包括能够使人类或非人类的哺乳动物受益的任何方案。“非人类的哺乳动物”的治疗延伸至家养哺乳动物的治疗,包括马和伴侣动物(例如猫和狗)以及包括绵羊、山羊、猪、牛和马家族成员的农场/农业动物的治疗。治疗可以针对任何现有的病情或病症,或者可以是预防性的(预防性治疗)。治疗可以是针对遗传性或获得性疾病。治疗可以是针对急性或慢性病情。

[0098] 凝血级联中的活性水平可以通过任何合适的测定来测量,例如全血凝血时间(WBCT)测试或活化部分凝血活酶时间(APTT)。

[0099] 全血凝血时间(WBCT)测试测量全血在外部环境(通常是玻璃管或盘)中形成凝块所花费的时间。

[0100] 活化部分凝血活酶时间(APTT)测试测量凝血途径的的部分的参数。它在血友病中异常升高(通过静脉注射肝素治疗)。APTT需要从静脉取几毫升血液。APTT时间是称为“内在途径”的凝血系统的一部分的量度。APTT值是在实验室测试中发生特定凝血过程的时间,以秒为单位。常常将该结果与正常血液的“对照”样品相比较。如果测试样品比对照样品需要更长的时间,则表明内在途径中的凝血功能降低。一般医学疗法通常针对45至70秒量级的APTT范围,但是该值也可以表达为测试与正常的比值,例如正常的1.5倍。不存在肝素治疗的情况下的高APTT可能是由于血友病,这可能需要进一步的测试。

[0101] 本发明还提供部件的试剂盒,该部件包含本发明组合物以及用于给药的包括可注射溶液的给药工具,所述试剂盒适当地包含其使用说明书。

[0102] 因此本发明也可以合适地提供本发明组合物的剂型。该剂型可以作为含有适合患者剂量的合适的容器或小瓶而提供。

[0103] 可以对患者给药高达每千克体重2.000mg/脂质体脂质的剂量。

[0104] 因此,在本发明的另一方面,用于递送到患者体内的制剂体积可以不超过2ml。合适地,递送体积可以为5 μ l、10 μ l、25 μ l、50 μ l、100 μ l、250 μ l、500 μ l、750 μ l或1ml。在替代实施例中,用于递送的制剂的体积可以不超过1.5ml、2ml、2.5ml、3.0ml或3.5ml。

[0105] 本发明的制剂可以至少每天一次,至少每天两次,大约每周一次,大约每周两次,大约每两周一次或大约每月一次进行给药。

[0106] 根据本发明使用的包含胶体颗粒的组合物可以配制为用于通过任何方便的途径进行给药,例如皮下、静脉或局部给药。胶体颗粒因此可以配制成药物组合物,其中该组合物不含任何药物活性剂。

[0107] 适用于局部、皮下或静脉给药的制剂可以合适地制备成含水或基本上含水的制剂。根据需要,该制剂可以包含这些额外的盐、防腐剂和稳定剂和/或赋形剂或佐剂。本发明的剂型可以无水粉末提供,该粉末用于在合适的水介质中进行临时配制。

[0108] 合适地,该剂型可以配制为缓冲水制剂。合适的缓冲溶液可以包括但不限于氨基酸(例如组氨酸)、无机酸和碱金属或碱土金属的盐(例如钠盐、镁盐、钾盐、锂盐或钙盐-例如氯化钠、磷酸钠或柠檬酸钠)。可以存在其它组分如洗涤剂或乳化剂(例如,Tween 80[®]或Tween80[®]的任何其他形式)和稳定剂(例如苯甲脒或苯甲脒衍生物)。也可以存在赋形剂例如糖(例如蔗糖)。合适的pH值是生理pH,例如pH 6.8至7.4或pH 7.0。可以用合适的酸或碱例如盐酸调节pH值。可以制备液体剂型以备在例如3.5ml或7.0ml的小瓶的给药工具中使用。

[0109] 在一个具体实施例中,提供了如下用于根据本发明使用的静脉或皮下给药的组合物:

[0110] -50mM柠檬酸钠

[0111] -pH 7.0

[0112] -100mM磷脂-97:3摩尔比的棕榈酰-油酰磷脂酰胆碱(POPC)和1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[聚(乙二醇)-2000](DSPE-PEG 2000)。

[0113] 可以使用包含选自表面活性剂、防腐剂、增稠剂、缓冲剂和水的一种或多种组分的局部用凝胶配制用于局部给药的制剂。在一个实施例中,表面活性剂可以是选自聚氧乙烯脱水山梨糖醇、聚羟基乙烯硬脂酸酯或聚羟基乙烯月桂基醚的非离子表面活性剂,任选地该表面活性剂为聚山梨醇酯80(Tween 80)。磷脂与表面活性剂的比值可以为30:1至15:1、10:1,合适地为15:1、8:1或2:1。表面活性剂浓度可以为0.25wt%至5wt%,例如1wt%至3wt%,1wt%至2wt%,一些示例性值可以为0.47wt%,0.85wt%或3.5wt%。WO 2010/140061和WO 2011/022707中描述了用于局部给药的该制剂的示例。

具体实施方式

[0114] 现在将通过参考以下实施例来进一步描述本发明,所述实施例仅出于说明目的,

而不应认为是对本发明的限制：

[0115] 实施例1：脂质体的合成

[0116] 由棕榈酰-油酰磷脂酰胆碱 (POPC) 和用PEG-2000 (分子量为2000道尔顿的PEG) 衍生物的1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[聚(乙二醇)-2000] (DSPE-PEG 2000) 制备混合脂质,如下:

[0117] POPC的分子量:760.08g/mol

[0118] DSPE-2kPEG的分子量:2789.5g/mol

[0119] 最终制剂具有100mM的磷脂浓度。15%w/v的脂质混合物是由97:3摩尔比的POPC:DSPE-2kPEG制备的。将以下物质进行称重和混合:

[0120] 2.04g POPC

[0121] 0.232g DSPE-2kPEG

[0122] 14.9mL叔丁醇(在35℃水浴中熔化),全部置于100mL Schott瓶中。

[0123] 将混合物在水浴中于35℃维持并间歇搅拌直至所有固体溶解/分散。最终的材料是清澈的无色混合物。将该混合物在-80℃下冷冻过夜。

[0124] 在通风橱中维持该操作,以便在使用后的干燥/浓缩溶剂的清理过程中进行控制。将Christ Alpha 1-2LD冷冻干燥机和真空泵预热20分钟,并将冷冻的脂质/溶剂混合物从-80℃的储存中移出并干燥过夜。

[0125] 第二天早上从干燥机中回收干燥的脂质。它们呈现为干燥的结晶饼形式。需要100mM脂质溶液用于进一步的加工。通过约82微摩尔的DSPE-2kPEG和2.69毫摩尔的POPC来计算所存在的脂质的量;所以存在约2.77毫摩尔的脂质。因此需要27.7mL稀释剂。向干燥的脂质中加入27.7mL的50mM柠檬酸钠缓冲剂,并且搅拌所得混合物并加热至约35℃。约120分钟后,得到没有明显大固体的白色乳液。如下进行挤压。

[0126] 组装Sartorius 47mm不锈钢压力过滤外壳,并用维持在35℃的水套(通过热循环器包裹管)包裹。该外壳安装了聚碳酸酯径迹蚀刻膜(详见下文),并由玻璃纤维预过滤器(WhatmanGF/D)覆盖。将乳液倒入外壳中并在4巴氮气下挤出,将滤液收集到50mL管中。测定并记录每次挤压的持续时间。

[0127] 过滤顺序为:0.8μm,0.4μm,0.2μm,0.2μm,0.1μm和0.1μm(即,单次通过较大的过滤器并且两次通过较小的0.2μm和0.1μm的过滤器),在通过之间使滤液回温至35℃。将脂质体挤出,列表数据如下:

[0128] 表1

[0129]

孔径 (μm)	持续时间	回收 (g)
0.8	<4秒	28.19
0.4	<4秒	26.91
0.2	50秒	23.76
0.2	22秒	21.77
0.1	12分钟	20.18
0.1	4分钟	19.47

[0130] 将所得挤出脂质在+5℃下储存。将15mL的“挤出脂质体”从冷冻原料中移出并分配

到微生物安全箱内的无菌的50mL管中。使用ALV5000光子相关光谱仪分析挤出脂质体的尺寸。平均半径确定为 $75.40 \pm 0.86\text{nm}$, 平均峰宽为 $22.21 \pm 3.86\text{nm}$, 平均直径为 150.80nm , 多分散指数为0.087。

[0131] 实施例2:用于局部给药的PEG化脂质体的制剂

[0132] 根据Baru et al. (2005) 的方法, 根据上述实施例1生产柠檬酸盐缓冲剂中的PEG化脂质体。脂质体制剂具有以下组成: 50mM柠檬酸钠; pH 7.0; 含有100mM磷脂; 包含棕榈酰-油酰磷脂酰胆碱 (POPC) 和1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[聚(乙二醇)-2000] (DSPE-PEG 2000) 的摩尔比为97:3的混合物。

[0133] 示例性的局部制剂可以根据以下来制备:

[0134] 表2

[0135]

成分	百分比; g 每 100g
大豆磷脂酰胆碱	6.680
聚山梨醇酯 80 (Tween [®] 80)	0.850
苯甲醇	0.525
4-羟基苯甲酸甲酯	0.250
4-羟基苯甲酸乙酯	0.250

[0136]

成分	百分比：g 每 100g
丁基羟基甲苯	0.020
芳樟醇	0.100
mPEG-DSPE-2,000 Mw	0.760
EDTA 二钠	0.100
正磷酸氢二钠十二水合物	0.061
正磷酸二氢钠二水合物	0.755
甘油	3.000
乙醇*	3.081
氢氧化钠	0.630
Carbopol 974P NF	1.250
水	81.688
总计	100.000
pH	7.5

[0137] 实施例3：用于局部给药和治疗轻度至中度血友病A的PEG化脂质体

[0138] 给测试受试者服药是为了增强轻度至中度血友病A中内源性因子VIII的作用。

[0139] 将PEG化脂质体给受试者服用后，观察测试受试者的临床体征。通过在服药后48小时和5天进行CBC和血清化学测试来筛选意想不到的毒性。评估纤维蛋白原、FDPs和凝血酶时间(TT)以测试增加的血栓形成风险。

[0140] 在给药后的以下时间点从服用SQ的受试者中取得血液样品(5ml)：

[0141] 给药前和服药后0.5、1、2、4、8、12、24、36、48、60、72、84、96、108和120小时。

[0142] 将全血(非柠檬酸盐；1ml)用于全血凝血测定和活化凝血时间测定。将剩余的4ml血液样品转移到冰上含有0.109M柠檬酸三钠抗凝剂(9:1v/v)的管中。

[0143] 活化部分凝血活酶时间(aPTT)，活化凝血时间(ACT)和血栓弹力图(TEG)测定是在柠檬酸化的全血上进行的。

[0144] 通过将剩余的柠檬酸化血液进行离心来制备血浆，并将所得血浆样品以约100μl的等分试样在-80℃下储存。

[0145] 测定

[0146] (i) 非柠檬酸化全血：全血凝血测定

[0147] 将血液样品分在2个真空管(2×0.5ml)中，仔细观察，并定期和审慎地对管进行调

平,直到完全水平位置中的流动发生中断而确定凝块。将管保持在完全倒立的位置,并观察凝块的质量。将两个样品从样品提取直到目视观察到血凝块的总时间的平均值记录为全血凝血时间,并记录倒立位置的凝块质量。

[0148] (ii) 柠檬酸化全血:血栓弹力图 (TEG) 测定

[0149] 根据制造商的推荐,使用凝血分析仪5000型 (Haemoscope公司) 血栓弹力图仪,用重新钙化的柠檬酸化全血进行TEG。简言之,将1ml柠檬酸化全血置于含有高岭土的市场上可买到的 (Teg®凝血系统高岭土,Haemonetics) 小瓶中。将含有高岭土的小瓶轻轻倒立5次以确保混合。根据制造商推荐的标准程序将针和杯置于TEG分析仪中。将每个标准TEG杯置于37℃预热的仪器支架中,并装满20μl氯化钙 (0.2M)。然后,添加340μl高岭土活化的柠檬酸化全血,总体积为360μl。

[0150] (iii) 活化凝血时间 (ACT) 和活化部分凝血活酶时间 (aPTT)

[0151] 根据制造商的说明使用Haemachron Jr凝血分析仪 (International Technidyne Corps.) 进行ACT和aPTT测试。

[0152] (iv) 血浆:FVIII活性测定 (显色)

[0153] 使用Coatest测定 (Dia Pharma, 西切斯特, 俄亥俄州) 来确定FVIII血浆活性。用分析稀释液将血浆样品稀释为1:20至1:80,并根据制造商的说明进行测定。使用正常凝血参照血浆 (American Diagnostica Inc, 斯坦福德, 康涅狄格州) 和纯化的FVIII蛋白质建立标准曲线。

[0154] (v) 血浆:FVIII ELISA

[0155] 根据制造商的说明,使用来自Affinity Biologicals (安卡斯特, 安大略, 加拿大) 的VisulizeFVIII抗原试剂盒通过ELISA确定血浆样品中FVIII抗原的浓度。

[0156] (vi) 血浆:免疫原性

[0157] 将测试血浆用FVIII缺陷型人血浆以1:4、1:10和1:20稀释,并进行Bethesda测定。将等体积的稀释的测试血浆和正常人参照血浆在37℃下孵育2小时,并使用如上所述的aPTT测定和正常人血浆标准曲线来测定Bethesda滴定度。

[0158] 实施例4:用于静脉 (IV) 或皮下 (SQ) 给药的PEG化脂质体的制剂

[0159] 根据Baru et al. (2005) 的方法,根据上述实施例1生产柠檬酸盐缓冲剂中的PEG化脂质体,其包含棕榈酰-油酰磷脂酰胆碱 (POPC) 和1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[聚(乙二醇)-2000] (DSPE-PEG 2000) 的混合物。

[0160] 可以根据以下来制备示例性的SQ或IV制剂:

[0161] 表3

[0162]

物质	SQ/IV 制剂 9% 总 脂质(mg/mL)	SQ/IV 制剂 7% 总 脂质(mg/mL)	SQ/IV 制剂 4% 总脂质(mg/mL)
1-棕榈酰-2-油酰 -sn-甘油-磷酸胆 碱 (POPC)	81	63	36
N-(羧基-甲氧基 聚乙二醇-2000) -1,2-二硬脂酰 -sn-甘油-3-磷酸 乙醇胺, 钠盐 (MPEG-2000-D SPE)	9	7	4
柠檬酸钠	9	9	9
盐酸	适量(1)	适量(1)	适量(1)
水	适量(2)	适量(2)	适量(2)
总计	1000	1000	1000

[0163] 适量(1)-足以将pH调整到6的量。

[0164] 适量(2)-足以将体积调整到1mL的量。

[0165] 实施例5:具有变化水平的表面活性剂的用于局部给药的PEG化脂质体的凝胶和喷雾制剂

[0166] 根据Baru et al. (2005) 的方法,根据上述实施例1生产柠檬酸盐缓冲剂中的PEG化脂质体,其包含大豆磷脂酰胆碱 (SPC) 和1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[聚(乙二醇)-2000] (DSPE-PEG 2000) 的混合物。制备该制剂以测试作为用于局部给药的凝胶或喷雾的不同物理形式。

[0167] 表4

[0168]

物质	局 部 制 剂 (0.85% 表 面 活 性 剂)(mg/mL)	局 部 制 剂 (3.5%表面活 性剂)- 喷 雾 (mg/mL)	局 部 制 剂 (3.5%表面活 性剂)- 凝 胶 (mg/mL)	局 部 制 剂 (0.47% 表 面 活 性 剂)(mg/mL)
大豆磷脂酰胆碱	68.700	64.516	64.516	71.460
聚山梨醇酯 80	8.500	35.484	35.484	4.720
N-(羧基-甲氧基聚 乙二醇-2000)-1,2- 二硬脂酰-sn-甘油 -3-磷酸乙醇胺, 钠 盐 (MPEG-2000-DS PE)	7.6 至 9.0	7.6 至 9.0	7.6 至 9.0	7.6 至 9.0
苯甲醇	5.250	5.250	5.250	5.250
对羟基苯甲酸甲 酯	2.500	2.500	2.500	7.500
对羟基苯甲酸乙 酯	2.500	1.700	1.700	0.000
对羟基苯甲酸丙 酯	0.000	0.000	0.000	2.500
丁基羟基茴香醚	0.000	0.200	0.200	0.200
丁基羟基甲苯	0.200	0.000	0.000	0.000
芳樟醇	1.000	1.000	1.000	1.000
焦亚硫酸钠	0.500	0.000	0.000	0.000
乙二胺四乙酸二	1.000	3.000	3.000	3.000

[0169]

物质	局 部 制 剂 (0.85% 表 面 活 性 剂)(mg/mL)	局 部 制 剂 (3.5%表面活 性 剂)- 喷 雾 (mg/mL)	局 部 制 剂 (3.5%表面活 性 剂)- 凝 胶 (mg/mL)	局 部 制 剂 (0.47% 表 面 活 性 剂)(mg/mL)
钠				
正磷酸氢二钠十二水合物	7.550	7.720	7.720	7.720
磷酸二氢钠二水合物	0.610	4.440	4.440	4.440
甘油	30.000	30.000	30.000	50.000
乙醇	36.510	30.000	30.000	30.000
氢氧化钠	6.300	0.000	0.000	0.000
氨丁三醇 (TRIS)	0.000	0.000	12.677	0.000
Carbopol 974P NF	12.500	0.000	10.000	0.000
水	适量至 1 mL	适量至 1 mL	适量至 1 mL	适量至 1 mL
总计	1000.000	1000.000	1000.000	1000.000

[0170] 适量-足以将体积调整到1mL的量。