[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
*A61K 9/127* (2006.01)

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200380104235.5

[45] 授权公告日 2008 年 2 月 13 日

[11] 授权公告号 CN 100367932C

[22] 申请日 2003.11.26
[21] 申请号 200380104235.5
[30] 优先权
[32] 2002.11.26 [33] US [31] 60/429,122
[86] 国际申请 PCT/US2003/037964 2003.11.26
[87] 国际公布 WO2004/047801 英 2004.6.10
[85] 进入国家阶段日期 2005.5.26
[73] 专利权人 吉里德科学公司
地址 美国加利福尼亚
[72] 发明人 G·M·詹森 M·苏里文 S·杨
胡 宁
[56] 参考文献
US5380531A 1995.1.10
US5795589A 1998.8.18
WO9913816A2 1999.3.25
审查员 卫 军
[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
代理人 顾颂廷

权利要求书 8 页 说明书 25 页 附图 2 页

[54] 发明名称

借助梯度的脂质体中药物装填的方法

[57] 摘要

本发明提供了优选具有高药物：脂质之比的将药物(例如抗肿瘤药物)在脂质体中包囊的方法。借助使用跨膜 pH 梯度的活性机理装填药物的方法能制备脂质体。利用这项技术，捕获率达到 100%。使用的药物：脂质之比高于对于旧的传统脂质体制剂使用的药物：脂质之比，减小了药物从脂质体的释放速度。装填之后，用猝灭剂终止残留的酸，所述猝灭剂是在低温下可渗透的碱。这样减小了残留的酸度并且增强了化学稳定性(例如抗水解)。于是在给药之前保持了脂质体和药物两者的稳定性。但是当体内施用脂质体时存在 pH 梯度，因为猝灭剂快速逸出脂质体。

1. 形成具有内低/外高 pH 梯度的梯度装填的脂质体的方法，该方法包括:

(a)在至少 60 mM 的酸水溶液中，在 40℃-70℃的温度下，使脂质体溶液与药物接触;

(b)将溶液冷却至 0℃-30℃的温度;和

(c)使溶液与弱碱接触，所述弱碱的量可有效提高内部脂质体的 pH 以提供具有内低/外高 pH 梯度的梯度装填的脂质体;

其中所述的弱碱是铵盐或烷基胺。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述的脂质体包括磷脂酰胆碱。

3. 权利要求 2 的方法,其中所述的磷脂酰胆碱选自二硬脂酰磷脂酰胆碱、 氢化大豆磷脂酰胆碱、氢化卵磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰胆碱、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱和二反式油酰磷脂酰胆碱。

4. 权利要求 1 的方法,其中所述的脂质体进一步包括胆固醇。

5. 权利要求 1 的方法,其中所述的脂质体进一步包括磷脂酰甘油。

6. 权利要求 1 的方法,其中所述的脂质体进一步包括非磷脂酰脂质。

7. 权利要求 6 的方法,其中所述的非磷脂酰脂质为鞘磷脂。

8. 权利要求 5 的方法,其中所述的磷脂酰甘油选自二肉豆蔻酰磷脂酰甘油、二月桂酰磷脂酰甘油、二棕榈酰磷脂酰甘油和二硬脂酰磷脂酰甘油。

9. 权利要求 1 的方法,其中所述的脂质体包括磷脂酰胆碱,并且进一步包括胆固醇。

10. 权利要求 1 的方法,其中所述的脂质体包括磷脂酰胆碱,并且进一步包括胆固醇,其中磷脂酰胆碱与胆固醇的摩尔比是 1: 0.01 至 1 :1。

11. 权利要求 1 的方法,其中所述的脂质体包括磷脂酰胆碱,并且进一步包括胆固醇,其中磷脂酰胆碱与胆固醇的摩尔比是 1.5 : 1.0 至 3.0 : 1.0。

12. 权利要求 1 的方法,其中所述的脂质体是单层的并且小于 100nm。

13. 权利要求 1 的方法,其中所述的脂质体与药物的重量比为至多 200: 1。

14. 权利要求 1 的方法,其中所述的脂质体与药物的重量比是 1:1 至 100: 1。

15. 权利要求 1 的方法,其中所述的脂质体与药物的重量比是 1:1 至 50: 1。

16. 权利要求 1 的方法,其中所述酸具有小于 1 $x10^{-2}$ 的酸解离常数。

17. 权利要求 1 的方法,其中所述酸具有小于 1 $x10^{-4}$ 的酸解离常数。

18. 权利要求 1 的方法,其中所述酸具有小于 1 $x10^{-5}$ 的酸解离常数。

19. 权利要求 1 的方法,其中所述酸对于权利要求 1 所述的脂质体具有大于 1 $x10^{-4}$cm/sec 的渗透系数。

20. 权利要求 1 的方法,其中所述酸选自甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、柠檬酸、草酸、琥珀酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、富马酸、苯甲酸、乌头酸、藜芦酸、磷酸、硫酸及其组合。

21. 权利要求 1 的方法,其中所述酸是柠檬酸。

22. 权利要求 1 的方法,其中使用至少 100 mM 的酸。

23. 权利要求 1 的方法,其中当药物溶解于含水介质中时,以带电荷状态存在。

24. 权利要求 1 的方法,其中所述药物是包含至少一个能被质子化的非环或环氨基有机化合物。

25. 权利要求 1 的方法,其中所述药物是包含至少一个伯胺基团、至少一个仲胺基团、至少一个叔胺基团、至少一个季胺基团或者它们的任意组合的有机化合物。

26. 权利要求 1 的方法,其中所述药物是抗肿瘤药物。

27. 权利要求 1 的方法,其中所述药物是两种或多种抗肿瘤药物的组合。

28. 权利要求 1 的方法，其中所述药物是可电离的碱性抗肿瘤药物。

29. 权利要求 1 的方法，其中所述药物是蒽环类化疗药物或长春花生物碱。

30. 权利要求 1 的方法，其中所述药物是两亲性药物。

31. 权利要求 29 的方法，其中所述蒽环类化疗药物为蒽二酮。

32. 权利要求 29 的方法，其中所述蒽环类化疗药物选自多柔比星，表柔比星和柔红霉素。

33. 权利要求 31 的方法，其中所述蒽二酮是米托蒽醌。

34. 权利要求 30 的方法，其中所述两亲性药物是亲脂性胺。

35. 权利要求 29 的方法，其中所述长春花生物碱选自长春新碱和长春碱。

36. 权利要求 1 的方法，其中所述药物是抗肿瘤抗菌素。

37. 权利要求 1 的方法，其中所述药物不是喜树碱或者其类似物。

38. 权利要求 1 的方法，其中所述药物是烷基化试剂。

39. 权利要求 38 的方法，其中所述烷基化试剂选自环磷酰胺和氮芥盐酸盐。

40. 权利要求 1 的方法,其中所述药物是噁唑或嘧啶衍生物。

41. 权利要求 40 的方法,其中所述噁唑或嘧啶衍生物是 5-氟尿嘧啶。

42. 权利要求 1 的方法,其中步骤(a) 中的温度是 50℃至 60 ℃。

43. 权利要求 1 的方法,其中通过包括下面步骤的方法制备步骤(a)中的溶液 :

(i) 使脂质体与酸的水溶液接触;

(ii)将溶液均匀化;和

(iii)任选地去除任何外部酸。

44. 权利要求 43 的方法,其中通过过滤外部酸而在步骤(iii)中去除外部酸。

45. 权利要求 1 的方法,其中所述弱碱是带有一价或多价抗衡离子的铵盐。

46. 权利要求 45 的方法,其中所述的铵盐选自硫酸铵、氢氧化铵、乙酸铵、氯化铵、磷酸铵、柠檬酸铵、琥珀酸铵、乳糖酸铵、碳酸铵、酒石酸铵和草酸铵，以及它们的组合。

47. 权利要求 1 的方法,其中所述的烷基胺选自甲胺、乙胺、二乙胺，乙二胺和丙胺的烷基-胺。

48. 权利要求 1 的方法,进一步包括,在步骤(c)期间或之后去除任何没有装填的药物。

49. 权利要求 48 的方法，其中没有装填的药物的去除采用通过交叉过滤或透析去除没有装填的药物。

50. 权利要求 1 的方法，进一步包括，在步骤(c)之后使脂质体脱水。

51. 权利要求 50 的方法，其中脱水是在低于 1 大气压的压力下进行的。

52. 权利要求 50 的方法，其中脱水通过脂质体的事先冷冻进行。

53. 权利要求 50 的方法，其中脱水在一种或多种保护性单糖、一种或多种保护性双糖或者它们的组合的存在下进行。

54. 权利要求 53 的方法，其中保护性糖选自海藻糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖。

55. 权利要求 50 的方法，进一步包括在脱水之后将脂质体再次水合。

56. 权利要求 1 的方法，其中脂质体是单层脂质体。

57. 权利要求 1 的方法，其中脂质体是多层脂质体。

58. 权利要求 1 的方法，其中 90 wt% 以上的药物被捕获到脂质体中。

59. 权利要求 1 的方法，进一步包括，在步骤(c)之后，使脂质体与

药学可接受载体接触。

60. 制备药物组合物的方法，包括:

(a)在至少 60 mM 的酸水溶液中，在 40℃-70℃的温度下，使脂质体溶液与药物接触;

(b)将溶液冷却至 0℃-30℃的温度;和

(c)使溶液与弱碱接触，所述弱碱的量可有效提高内部脂质体的 pH 以提供具有内低/外高 pH 梯度的梯度装填的脂质体;

(d)使脂质体与药学可接受载体混合提供药物组合物;

其中所述的弱碱是铵盐或烷基胺。

61.根据权利要求 60 的方法制得的药物组合物用于制备治疗癌症的药物的用途，其中所述的药物是抗肿瘤药物。

62. 权利要求 61 的用途,其中通过脂质体制剂的抗肿瘤药物的施用具有比和游离形式的抗肿瘤药物施用相关的毒性分布更低的毒性分布。

63. 权利要求 62 的用途,其中所述毒性选自胃肠毒性和积蓄性剂量依赖性不可逆心肌病。

64. 权利要求 61 的用途,其中抗肿瘤药物的施用具有比和游离形式的抗肿瘤药物施用相关的不期望的副作用较低的发生率、严重程度或其组合的不期望的副作用。

65. 权利要求 64 的用途,其中不期望的副作用选自骨髓抑制、脱发、粘膜炎、恶心、呕吐和厌食。

66. 通过包括下面步骤的方法制备的具有内低/外高 pH 梯度的梯

度装填的脂质体，所述方法包括:

(a)在至少 60 mM 的酸水溶液中，在 40℃-70℃的温度下，使脂质体溶液与药物接触;

(b)将溶液冷却至 0℃-30℃的温度;和

(c)使溶液与弱碱接触，所述弱碱的量可有效提高内部脂质体的 pH 以提供具有内低/外高 pH 梯度的梯度装填的脂质体;

其中所述的弱碱是铵盐或烷基胺。

# 借助梯度的脂质体中药物装填的方法

## 本发明的优先权

本发明要求2002年11月26日申请的美国临时申请号60/429,122的优先权。

## 发明背景

脂质体是含有包载（entrap）的含水性体积的完全密闭的脂双层膜。脂质体可以是单层脂质体（unilamellar vesicles）(具有单一膜双层)或多层脂质体（multilamellar vesicles）(特征在于各自与下一个通过含水层而分开的多个膜双层的洋葱样结构)。所述双层由具有疏水性“尾”区和亲水性“头”区的两个脂单层组成。膜双层的结构如此,使得脂单层的疏水性（非极性）“尾”朝向脂双层的中心，而亲水性“头” 朝向含水相。

Bangham等(J. Mol. Biol. , 1965, 13: 238-252)的最初的脂质体制剂涉及将磷脂悬浮于有机溶剂中，然后将其蒸发至干，在反应容器上形成磷脂膜。接着,加入适当量的含水相，使混合物膨胀，并且通过机械方法分散得到的由多层脂质体(MLVs)构成的脂质体。这种制剂为开发 Papahadjopoulos 等(Biochim. Biophys, Acta., 1967, 135 : 624-638)描述的小的超声处理过的单层脂质体和大的单层脂质体提供了基础。

制备大单层脂质体(LUVs)的技术,例如反相蒸发,输注方法和洗涤剂稀释可被用来制备脂质体。文献中可以查到有关综述文章和制备脂质体的其他方法，Liposomes, Marc Ostro,编著, Marcel Dekker, Inc. , New York, 1983, 第一章。还可以参见 Szoka Jr.等 , (1980, Ann. Rev. Biophys. Bioeng. , 9: 467)。生成 LUVs 的特别优选的方法描述于 Cullis 等 , PCT 公开 No. 87/00238, 1986 年 1 月 16 日, 标题是 "

制备单层脂质体的挤出技术"。

用来制备囊泡的其他技术包括生成反相蒸发囊泡(REV)的那些技术，Papahadjopoulos 等，美国专利 No. 4,235,871。能使用的另一类脂质体是特征在于具有基本上相等层状溶质分布的那些。根据 Lenk 等人的美国专利 No. 4,522, 803 中的定义，这类脂质体命名为稳定多层脂质体 (SPLV)，并且如 Fountain 等人的美国专利 No. 4,588, 578 所述，包括单层脂质体，和如上所述冷冻并解冻的多层脂质体 (FATMLV)。

在脂质体-药物送递系统中,生物活性物质、如药物被包载到脂质体中之后对要治疗的患者施用。例如,参见 Rahman 等,美国专利 No. 3,993, 754; Sears, 美国专利 4,145,410; Paphadjopoulos 等,美国专利 No. 4,235,871; Schneider, 美国专利 No. 4,224,179; Lenk 等, 美国专利 No.4,522,803; 和 Fountain 等，美国专利 No.4,588,578。或者,如果活性物质是亲脂性的，则它可与脂双层发生缔合。典型地,术语"包载"包括脂质体含水体积中的药物以及与脂双层缔合的药物。

多柔比星是一种广泛使用的抗肿瘤药物，属于真菌波塞链霉菌（Streptomyces peucetius） 产生的蒽环类抗生素。多柔比星被用来治疗各种肿瘤、白血病、肉瘤和乳腺癌。多柔比星（以及其他抗肿瘤药物）通常给药剂量可见毒性包括骨髓抑制、脱发、粘膜炎和胃肠毒性，包括恶心、 呕吐和厌食。最严重的多柔比星毒性是接受大于每平方米体表面积 550 mg 剂量的患者中 1－10％发生导致充血性心衰的积蓄性剂量依赖性不可逆心肌病。这些毒性严重限制象多柔比星这样的抗肿瘤药物的临床使用。

根据很多研究人员所确认的，使用抗肿瘤物质的癌症治疗在很多情况下能通过应用传统方法将抗肿瘤物质包载在脂质体中包囊来显著改善,而不是将游离的物质直接施用到体内。参见,例如， Forssen, 等, (1983), Cancer Res. , 43: 546; 和 Gabizon 等 , (1982), Cancer Res. , 42: 4734。与直接施用相比，这些物质被动掺入脂质体中能改变它们的抗肿瘤活性、清除率、组织分布和毒性 。参见,例如， Rahman

等，(1982)，Cancer Res.，42: 1817; Rosa,等，(1982)，Transport in Biomembranes: Model Systems and Reconstitution, R. Antoline 等，编著，Raven Press，New York. 243- 256; Rosa，等，(1983)，Pharmacology，26: 221; Gabizon 等，(1983)，Cancer Res.，43: 4730; Forssen 等，上文; Gabizon，等，上文;和 Olson，等，(1982)，Br. J. Cancer Clin. Oncol.，18: 167。收集的证据表明，利用不同组成和大小的脂质体，通过引导药物离开靶器官能减小多柔比星的急性和慢性毒性。例如,已知蒽环类抗生素柔红霉素和多柔比星和它们药学可接受衍生物和盐的心脏的毒性能通过被动脂质体包囊而显著减小。参见，例如，Forssen，等,上文，Olson 等，上文; 和 Rahman 等，上文。这种毒性的缓冲显示主要由于减小在心脏中的积累，与心脏毒性减小有关（Rahman 等，(1980)，Cancer Res.，40: 1532; Olson 等，上文; Berman 等，1983，Cancer Res.，43:5427;和 Rahman 等，(1985)，Cancer Res.，45: 796）。这种毒性通常是游离多柔比星积蓄性剂量极限(Minow 等，1975，Cancer Chemother。Rep。6: 195)。在脂质体中掺入高毒性抗肿瘤物质还能降低这样的物质接触施用中所涉及的人的风险。

虽然上述研究清楚地确认使用脂质体包囊的抗肿瘤药物例如多柔比星的可能性,但是商业上还没有获得上述类型脂质体的脂质体制剂。例如，这些制剂很多由于与稳定性、包载率、规模化生产的可能性以及使用的脂质的成本相关的问题而具有可疑的制药潜能。另外,遇到了与将药物进行包囊的效率相关的问题。这样的问题伴随着迄今为止使用的被动包载方法。

与先前含有抗肿瘤药物的脂质体相关的另一个问题是以前抗肿瘤药物的脂质体制剂中没有一种能完全满足基本的稳定性要求。抗肿瘤药物在脂质体制剂中的保留通常以小时计，而药物应用通常要求一年或更长时间的稳定性。此外,脂质成分的化学稳定性由于高比例的非常不饱和脂质例如心磷脂而值得怀疑。其他问题包括带负电荷脂质的高成本和规模化问题 。因为抗肿瘤药物例如多柔比星具有两亲性质的事

实,它可渗透双层膜使得脂质体制剂由于药物从囊泡渗漏而不稳定(Gabizon 等, 1982, 上文; Rahman 等, 1985, 上文; 和 Ganapathi 等 , 1984, Biochem. Pharmacol., 33: 698)。

Mayer 等发现通过使用跨膜离子梯度能减小与抗肿瘤药物的有效脂质体包载相关的问题(参见PCT 申请86/01102, 1986年2月27日)。除了诱导多柔比星吸收之外, 这样的跨膜梯度还起到延长药物在脂质体中停留的作用。

据报道, 在先前静脉内给药的人临床试验中, 脂质体本身没有明显毒性。 Richardson 等, (1979), Br. J. Cancer 40: 35; Ryman 等, (1983), "Targeting of Drugs", G. Gregoriadis,等,编著, pp 235-248, Plenum, N. Y.; Gregoriadis G. , (1981), Lancet 2: 241, 和 Lopez-Berestein 等, (1985) J. Infect. Dis. , 151: 704。据报道, 脂质体主要在通过 sinosoidal 毛细管连接的网状内皮组织器官, 例如肝, 脾和骨髓中集中, 并且由这些器官中的吞噬细胞吞噬。

利用脂质体施用抗肿瘤药物已经产生有关药物包囊和包载率以及治疗期间药物释放的问题。关于包囊, 需要不断提高包载率以使向患者治疗期送递的脂载量最小化。另外, 高包载率意味着只有少量药物在包囊过程中损失, 而当与目前癌症治疗中使用的昂贵药物联系在一起时, 这具有非常重要的优势。关于药物释放, 发现很多抗肿瘤药物、例如多柔比星在包囊之后从传统脂质体中快速释放。这样的快速释放减小了脂质体包囊对药效的有益作用,并且加速药物向循环中的释放,引起毒性, 因此通常是不期望的。因此, 本领域工作者不断努力发现减小抗肿瘤药物和其他药物从脂质体释放速度的途径。

除了这些与包囊和释放相关的问题之外, 存在发现向医师提供包含抗肿瘤药物的脂质体的商业上可接受途径的重要问题。虽然在“根据需要”的基础上的脂质体的制备和装填在实验室规模下是可接受的程序, 但是在临床实施中一般不令人满意。因此, 显著而不断需求这样的方法, 即有或没有包囊药物的脂质体能通过常规商业分布通道运载、储存并且移动而没有实质性损失。

50Mm 柠檬酸梯度装填的柔红霉素 DaunoXome 已经商品化。脂质 pegylated 的脂质体多柔比星 Doxil 也已经商品化，但是其中多柔比星药物是针对硫酸铵离子梯度装载，而不是酸梯度装填。

Moynihan 等人的公开的 PCT 专利申请 WO99／13816 公开了脂质体喜树碱制剂及其制备方法。该方法包括用含有 pH 范围是 2.0 至 7.4 的赋形剂的水溶液使脱水的脂质体（膜或粉末）水合，形成脂质体分散体系。这里公开的为了水合目的的优选的水溶液是柠檬酸或硫酸的酸、钠盐或铵盐形式的缓冲溶液。这里公开的优选缓冲液是> 5mM，更优选 50 mM，柠檬酸(pH 2.0-5.0)，柠檬铵(pH 2.0-5.5)，或硫酸铵(pH 2.0-5.5)，参见 第 12 页,第 12-23 行。公开的 PCT 专利申请 WO 99/13816 还描述，一旦加填完，使用硫酸铵猝灭脂质体配制。

但是公开的 PCT 专利申请 WO 99/13816 没有教导或提示施用脂质体制剂时获得最初梯度。另外,该篇公开的 PCT 专利申请没有教导或提示能使用大于 50 mM 的柠檬酸(虽然它通常状态确实高于 5nM)，而同时保持装填相对大量药物的能力 (GI147211，一种喜树碱类似物)。该篇公开的 PCT 专利申请没有教导或提示能在这样的脂质体制剂中应用除了喜树碱之外的药物。

发明概述

提供了将药物(例如抗肿瘤药物)在脂质体中包囊的方法,优选具有高药物: 脂质之比。通过使用跨膜 pH 梯度通过活性机理装填药物的方法能制备脂质体。使用这项技术,捕获率达到 100%。使用的药物: 脂质之比高于对于旧的传统脂质体制剂使用的比例,并且药物从脂质体的释放率减小。装填之后,使用在低温下可渗透的碱的猝灭剂猝灭残留的酸。因此残留的酸性减小并且提高化学稳定性(例如抗水解) 。这样，在给药之前保持脂质体和药物两者的稳定性。但是体内施用脂质体时存在 pH 梯度，因为猝灭剂快速逸出脂质体。

本发明提供形成具有内低/外高 pH 梯度的梯度装填脂质体的方法。该方法包括: (a)在至少大约 60 mM 的酸水溶液中，在其中药物的

质子化形式带电荷并且不能透过脂质体膜、并且其中药物的非质子化形式不带电荷并且能透过脂质体膜的温度下，使脂质体溶液与药物接触；(b)将溶液冷却至药物的非质子化形式不能透过脂质体膜的温度；和(c)使溶液与弱碱接触，所述的弱碱量可有效提高内部脂质体的 pH 以提供具有内低/外高 pH 梯度的梯度装填脂质体。

本发明还提供制备药物组合物的方法。该方法包括(a)在至少大约 60 mM 的酸水溶液中，在其中药物的质子化形式带电荷并且不能透过脂质体膜、并且其中药物的非质子化形式不带电荷并且能透过脂质体膜的温度下，使脂质体溶液与药物接触；(b)将溶液冷却至药物的非质子化形式不能透过脂质体膜的温度；(c)使溶液与弱碱接触，所述的弱碱量可有效提高内部脂质体的 pH 以提供具有内低/外高 pH 梯度的梯度装填脂质体；和(d)使脂质体与药学可接受载体组合，得到药物组合物。

本发明还提供一种方法，包括对哺乳动物施用本发明的药物组合物。

本发明还提供一种治疗癌症患者的方法。该方法包括对哺乳动物施用本发明的药物组合物，其中所述药物是抗肿瘤药物。

本发明还提供具有内低/外高 pH 梯度的梯度装填的脂质体，其中通过包括下面步骤的方法制备所述梯度装填的脂质体：(a)在至少大约 60 mM 的酸水溶液中，在其中药物的质子化形式带电荷并且不能透过脂质体膜、并且其中药物的非质子化形式不带电荷并且能透过脂质体膜的温度下，使脂质体溶液与药物接触；(b)将溶液冷却至药物的非质子化形式不能透过脂质体膜的温度；和(c)使溶液与弱碱接触，所述的弱碱量可有效提高内部脂质体的 pH 以提供具有内低/外高 pH 梯度的梯度装填脂质体。

## 附图的简要描述

参照下面的描述和详细说明这些实施方案的附图，可以更好地理解本发明的实施方案，在附图中：

图1详细说明长春瑞滨脂质体对小鼠中的人乳腺肿瘤MaTu生长的作用。

图2详细说明通过本发明的方法制备脂质体制剂的方块流程图。

本发明的详细描述

说明书中引用的"一个实施方案"、"实施方案"、"一个例举的实施方案",等指描述的实施方案可以包括特定特征、结构或特性,但是每一个实施方案可以不必须包括特定特征、结构或特性。并且,这样的短语不一定指相同的实施方案。此外,当所描述的特定特征、结构或特性与某实施方案相关联时,可以根据本领域技术人员的知识改变与其他实施方案相关联的这样的特征、结构或特性,不管是否得到过明确描述。

本发明提供在显示出跨膜 pH 梯度的脂质体中抗肿瘤药物的有效包载。本发明的脂质体制剂在施用时提供基本上具有原来 pH 梯度的脂质体。本发明的脂质体具有显著高于旧的传统脂质体系统的药物脂质比。本发明的脂质体制剂可以用作包载药物例如抗肿瘤药物的药物载体系统。本发明的脂质体具有改善的药物动力学,提高的药效(生物活性),低毒性,并且与游离药物相比提供改善的治疗指数。正因为此如,当本发明的脂质体制剂用作包载毒性抗肿瘤药物例如蒽环类抗菌素(例如,多柔比星、表柔比星和柔红霉素);蒽二酮类(例如,米托蒽醌);长春花生物碱(例如,长春新碱和长春碱);抗肿瘤抗生素;烷基化试剂(例如,环磷酰胺和氮芥盐酸盐);和嘌呤或嘧啶衍生物(例如,5-氟尿嘧啶)的药物载体系统时,这样的脂质体制剂能用来减小抗肿瘤药物的毒性作用。

本发明涉及制备脂质体制剂的新方法,涉及从该方法获得的脂质体制剂以及药物治疗方法,包括施用脂质体制剂。当描述所述方法,从这样的方法获得的产物,包括这样的产物的制剂和使用这种产品的方法时,除非另有说明,下面的术语具有下面的定义。

定义

根据这里使用的,术语"脂质体"指单层脂质体或多层脂质体,例如

美国专利 No. 4,753, 788 中描述的。

"单层脂质体"也称作"单层脂质体" ,是包括限定单一封闭含水隔间的一个脂双层膜的球形囊泡。双层膜包括两层脂质：内层和外层(小叶)。脂质分子的外层的取向是,它们的亲水性头部朝向外部含水环境,并且它们的疏水性尾部朝向脂质体内部。脂质层的内层直接位于外层的下面,脂质的取向是,它们的头部朝向脂质体含水内部,并且它们的尾部朝向脂质外层的尾部。

"多层脂质体"也称作"多层脂质体"或"多腔室囊泡", 包括多于一个的脂双层膜,膜限定多于一个的封闭含水隔间。膜共中心排列,使得不同的膜通过含水隔室分开,很象洋葱。

术语药物包括但不限于止痛剂、麻醉剂、抗痙疼药、抗生素、抗菌剂、抗癌药、抗胆碱能药物、抗凝剂、抗运动障碍药、止吐药、抗纤维化药、抗真菌药、抗青光眼药、抗炎药、抗肿瘤药、抗骨质疏松药、抗变型性骨炎药、抗帕金森病药、抗芽孢形成药、退热药、杀菌剂、抗血栓形成药, 抗病毒药、钙调节药、角质软化剂或硬化药。

本文使用的术语"包囊"和"包载"指在脂质体中掺入的或者与脂质体缔合的药物。药物可以与脂双层缔合或者存在于脂质体的含水内部中, 或者两种情况都有。在一个实施方案中, 包囊的药物采取在脂质体内部沉淀的盐的形式。药物本身也可以在脂质体内部沉淀。

本文所使用的术语“赋形剂”、“抗衡离子”和“抗衡离子赋形剂”是指可以启动或者加快药物装填的物质, 它还可以启动或加快药剂在脂质体内部水中沉淀析出。赋形剂的实例包括但并不限于下述离子的酸、钠盐或铵盐形式：单价阴离子例如氯离子、醋酸根、乳糖酸根、甲酸根; 二价阴离子例如天冬氨酸根、琥珀酸根和硫酸根; 三价离子例如柠檬酸根和磷酸根。优选的赋形剂包括柠檬酸盐和硫酸盐。

“磷脂”是指任何一种能够形成脂质体的磷脂或者它们的联合物。磷脂酰胆碱(PC)适合用于本发明中, 磷脂酰胆碱包括那些来自鸡蛋、大豆或者其它植物来源的磷脂酰胆碱或者部分或完全合成的、或者具有可变脂质链长度和不饱和度的磷脂酰胆碱。合成、半合成和天然磷

脂酰胆碱产品包括但并不仅仅限于二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)、氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)、大豆磷脂酰胆碱(大豆 PC)、卵磷脂酰胆碱(卵 PC)、氢化卵磷脂酰胆碱(HEPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)以及二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)是适合用于本发明中的磷脂酰胆碱。所有的这些磷脂可商购得到。优选的 PC 是 HSPC 和 DSPC; 最优选的是 HSPC。

另外,磷脂酰甘油(PG)和磷酸(PA)也是适合用于本发明中的磷脂,其包括但并不仅仅限于二肉豆蔻酰磷脂酰甘油(DMPG)、二月桂酰磷脂酰甘油(DLPG)、二棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG)、二硬脂酰磷脂酰甘油(DSPG)、二肉豆蔻磷脂酸(DMPA)、二硬脂酰磷脂酸(DSPA)、二月桂酰磷脂酸(DLPA)、以及二棕榈酰磷脂酸(DPPA)。当在制剂中使用时,二硬脂酰磷脂酰甘油(DSPG)是最优选的带负电荷脂质。其它适宜的磷脂包括磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇以及含有月桂酸、肉豆蔻酸、硬脂酰和棕榈酸链的磷脂酸。另外,本发明还预期了可以合并入含有磷脂的聚乙二醇(PEG)。

本文所使用的术语"非肠道"是指静脉内给药(IV)、肌内给药(IM)、皮下给药(SubQ)或者腹膜内给药(IP)。

术语"改善了的治疗指数"是指相对于游离药物而言具有更高的治疗指数。治疗指数可以表示为 50%动物的致死剂量相对于有效剂量的比值。

本文使用的"治疗"或"处理"指: (i) 防止发生病理状态(例如 ,乳腺癌)(例如预防)或与此相关的症状; (ii)抑制病理状态或者阻止其发展或者与此相关的症状;或者(iii)减轻病理状态或者与此相关的症状。

本发明涉及任选地在脂质体制剂中包括胆固醇。已知胆固醇提高脂质体稳定性并且防止磷脂变为脂蛋白的体内损失。

本发明涉及有效的任何合适的脂质:药物之比。优选的脂质:药物摩尔比包括大约 5: 1 至大约 100: 1,更优选大约 10: 1 至大约 40: 1。最优选的脂质:药物摩尔比包括大约 15: 1 至大约 25: 1。优选的脂质

体制剂包括磷脂:胆固醇摩尔比范围是 1.5 : 0.5 至 2: 1.5。最优选的脂质体制剂是 2: 1 PC:胆固醇，有或没有 1-4 摩尔百分比的磷脂酰甘油。最优选的脂质体大小是小于 100 nm。优选的药物装填率是大约 70%或更大的包囊的药物百分比。制备胶囊包括脂质体内部含水空间存在分子,膜双层内部或外部小叶存在的分子,部分包埋在双层外部小叶内并且部分在脂质体外部的分子,和与脂质体表面缔合的分子,例如，通过静电相互作用。

通常,本发明制备包埋的(embodied)制剂的方法从形成脂质体的溶液的制备开始。这通过例如下面的操作进行: 称量一定量的磷脂酰胆碱、任选的胆固醇和任选的磷脂酰甘油，将它们溶解于有机溶剂中，有机溶剂优选是氯仿和甲醇 1:1 混合物 (v/v) 或者是净氯仿。将溶液蒸发形成固体脂质相，例如膜或粉末，例如，使用旋转蒸发器,喷雾干燥器或其他装置。然后使用含有 pH 范围是 2.0 至 7.4 的赋形剂的水溶液将膜或粉末水合，形成脂质体分散液。用于水合作用目的的优选的水溶液是柠檬酸或硫酸的酸、钠盐或铵盐形式的缓冲溶液。优选的缓冲液是至少大约 60 mM,柠檬酸(pH 2.0-5.0)，柠檬酸铵(pH 2.0-5.5)或硫酸铵(pH 2.0-5.5)。本领域技术人员明白可以使用其他阴离子酸缓冲液，例如磷酸。根据使用的磷脂，将缓冲液中分散的脂质膜或粉末加热至大约 25℃至大约 70℃ 。

通过本发明的方法形成的脂质体在亲水性试剂的存在下被冻干或脱水。

通过剧烈搅拌分散体系，优选通过使用薄膜蒸发仪如美国专利 No. 4,935, 171 所述，或者通过摇动或涡流混合，形成多室脂质体。

通过对脂质固相的含水分散体系施加剪切力，例如，通过超声处理或者使用微流化仪器例如匀化器或 French 压力机，形成单层脂质体。使用注射、冷冻和解冻、从脂质透析出洗涤剂溶液或者用来制备脂质体的其他方法也能施加剪切力。使用各种各样的公知的技术能控制脂质体的大小，包括剪切力施加时间。优选地，在 3,000 至 14,000 psi，优选 10,000 至 14,000 psi 的压力和大约脂质聚集转变温度的温

度下，使用匀化器以形成具有小于200纳米直径的单层脂质体。

未捕获的赋形剂可以被去除或者不被去除，或者利用透析、大小排阻柱色谱法(Sephadex G-50 树脂)或超滤 (100,000-300,000 截留分子量)，用 9%蔗糖的缓冲液从脂质体分散体系中交换。然后对每一个小单层脂质体制剂活性装填药物，对抗例如膜电势的梯度进行大约10- 30 分钟,所述的膜电位是由于外部pH用氢氧化钠滴定至5.0范围或更高产生的。药物装填步骤中的温度范围一般是大约50℃至70℃之间，脂质: 药物之比在5: 1至100: 1之间。通过用换为9%蔗糖的缓冲液，利用透析、大小排阻柱色谱法(Sephadex G-50 树脂)或超滤(100,000-300,000 截留分子量)从脂质体分散体系中去除没有捕获的药物。一般在大约 55℃至 65℃通过由乙酸纤维素或聚醚砜构成的0.22微米过滤器过滤。

如上所述,一般使用公知的装填方法将药物装填到预先形成的脂质体中(参见，例如Deamer 等， BBA 274: 323-335 (1972); Forssen 美国专利No.4,946,683; Cramer等 BBRC 75: 295-301 (1977); Bally 美国专利 No. 5,077, 056)。装填通过 pH 梯度。优选以大约 pH 2-3 的内部 pH 开始。赋形剂是装填过程中的抗衡离子，并且当它在脂质体内部接触药物时,赋形剂可以引起药物实质性部分的沉淀。药物本身也可以在脂质体内部沉淀。这种沉淀作用保护药物和脂质不降解(例如，水解)。赋形剂例如柠檬酸盐或硫酸盐可以沉淀药物，并且能在脂质体内部和梯度(pH或氨)一起被利用，以促进药物装填。

通过 pH 梯度的药物装填包括脂质体内部含水空间的低 pH,通过设计，这种内部酸度在药物装填过程中不完全中和。这种残留的内部酸度能引起脂质体制剂中的化学不稳定性(例如,脂质水解)，导致贮存期的有限性。为了终止这种残留的内部酸度,在药物装填之后，以能足以将残留的内部酸度减小至最小值（例如pH是4或高于4）的有效量加入膜可渗透碱，例如胺(例如，铵盐或烷基胺) 。可以使用的铵盐包括具有一价或多价抗衡离子的那些，例如，包括但不限于硫酸铵、氢氧化铵、乙酸铵、氯化铵、磷酸铵、柠檬酸铵、琥珀酸铵、乳糖酸

铵、碳酸铵、酒石酸铵和草酸铵。也能使用膜渗透性任何烷基胺化合物的类似物盐，包括但不限于甲胺、乙胺、二乙胺、乙二胺和丙胺。储藏期间，例如在 2-8℃，脂质体制剂将保持猝灭状态，相对于没有猝灭的制剂来说，减小了赋形剂或药物的水解倾向。但是，当注射时，这种猝灭的物质从脂质体中快速渗漏出来，恢复残留梯度，该梯度对于药物在体内的停留是必需的。

脂质体的治疗应用包括通常以游离形式有毒性的药物的递送。在脂质体形式中，毒性药物可以背离能产生毒性的敏感组织并且朝向它们能发挥它们的治疗作用的选择的区域。通过增强的药物动力学曲线，脂质体在治疗上还能用于在延长的时间期间缓慢释放药物，从而减少给药次数。另外，脂质体能提供形成用于静脉内递送的疏水性药物的含水分散体系的方法。

脂质体的递送途径还能影响它们在体内的分布。被动送递脂质体包括利用各种给药途径，例如，肠胃外，但是也可以利用其他有效给药形式，例如动脉内注射、吸入剂罩、口服活性制剂、透皮离子透入法（iotophoresis）或栓剂。各种途径在脂质体定位产生差异。

本发明还提供抑制肿瘤生长、药物抗性和药物过敏性两者的方法，所述方法是通过向肿瘤、优选哺乳动物中的肿瘤递送治疗或有效量的脂质体喜树碱。因为药物的给药方案对于内科医师是公知的，用于哺乳动物特别是人治疗上面提到的疾病或症状的有效或治疗性脂质体药物制剂的量对于本领域技术人员是显而易见的。根据要治疗的病症的性质和程度，给药形式、途径和部位以及待治疗的具体患者可以确定制剂各种剂量的最佳给药量和给药间隔，并且通过常规技术能确定这样的最适条件。 本领域技术人员还明白，本领域技术人员使用常规的治疗判定实验方法能确定治疗的最佳过程，即对于确定天数的每天用药次数。

本发明包括与所有的癌症相关的肿瘤生长的抑制，包括多药物抗性癌症。在抑制方面所述脂质体制剂对其特别有用的癌症是卵巢癌、小细胞肺癌(SCLC)，非小细胞肺癌(NSCLC)、结肠癌、乳腺癌和头和颈

癌。另外,描述的和要求的制剂能与现存抗癌治疗联合应用。例如,这里描述的制剂能与紫杉烷类联合使用,例如(1)与紫杉醇(紫杉醇)和铂络合物联合治疗卵巢癌;(2) 与 5FU 和亚叶酸或左旋咪唑联合治疗结直肠癌;和(3)与顺铂和依托泊苷联合治疗 SCLC。

本发明的含有治疗药物(例如抗肿瘤药物)和其药物制剂的脂质体以及通过其方法制备的脂质体能在动物(包括人)中治疗性应用来治疗需要下面各项的感染或病症:(1)反复给药,(2) 生物活性形式的药物的持续释放,或者(3)与所研究的游离药物相比毒性降低并且有合适的药效。这样的病症包括但不限于肿瘤,例如能用抗肿瘤药物治疗的那些。

含有药物(例如抗肿瘤药物)及其药物制剂的脂质体的给药方式确定将要对其送递化合物的生物体中的部位和细胞。本发明的脂质体可以单独给药,但是一般以根据想要的给药途径和标准医疗实践选择的药学载体混合给药。制剂可以是肠胃外注射的,例如静脉内注射。对于肠胃外给药,可以使用例如含有其他溶质如足够的盐或葡萄糖,以制备等渗溶液的其他溶质的灭菌水溶液形式。例如,以至少大约 20mg/m$^2$的剂量作为 60 分钟静脉内输入,可以施用多柔比星脂质体。它们还可以通过注射用于腹膜灌洗或鞘内给药。它们也可以例如在淋巴结转移部位皮下给药。根据制剂的特定性质,本领域技术人员可以想到其他应用。

对于口服给药方式,可以以片剂、胶囊、锭剂、糖锭剂、粉末剂、糖浆、酏剂、水溶液和混悬液的形式使用本发明的脂质体治疗药物(例如,抗肿瘤药物)。在片剂情况下,能使用的载体包括乳糖、柠檬酸钠和磷酸的盐。片剂中通常使用各种崩解剂例如淀粉和润滑剂例如硬脂酸镁、月桂基硫酸钠和滑石。对于以胶囊形式口服给药,有用的稀释剂是乳糖和高分子量聚乙二醇。当含水悬浮液对于口服使用是必需的时,活性成分与乳化剂和悬浮剂混合。如果期望,可以加入一些甜味剂和/或调味剂 。

对于局部给药方式,可以将本发明的治疗药物(例如抗肿瘤药物)

制剂掺入到如凝胶、油、乳状液等这样的剂型中。这样的制剂可以作为乳膏、糊剂、软膏、凝胶、洗剂等直接施用给药。

对于对人给药以治愈、减轻、阻滞或预防性治疗肿瘤疾病、处方医生将最终确定给定的人受治疗者的抗肿瘤药物的合适的剂量，预期该剂量根据个体的年龄、体重和个体反应以及患者疾病的性质和严重性而不同。脂质体形式的药物剂量一般大约为游离药物所使用的剂量。但是在某些情况下，必须施用这些限制之外的剂量。

下面提供的例举的实施方案中的特定范围和值只是为了详细说明的目的，而不是限制如权利要求书定义的本发明的范围。

本发明的例举性实施方案

[1]本发明提供形成具有内低/外高 pH 梯度的梯度装填的脂质体的改进方法，该方法包括:

(a)在至少大约 60 mM 的酸水溶液中，在其中药物的质子化形式带电荷并且不能透过脂质体膜、并且其中药物的非质子化形式不带电荷并且能透过脂质体膜的温度下，使脂质体溶液与药物接触;

(b)将溶液冷却至药物的非质子化形式不能透过脂质体膜的温度下;和

(c)使溶液与弱碱接触，所述弱碱的量足以有效提高内部脂质体的 pH 以提供具有内低/外高 pH 梯度的梯度装填的脂质体。

[2]本发明还提供实施方案[1]的方法，其中脂质体包括磷脂酰胆碱。

[3] 本发明还提供实施方案[1]-[2]任一项的方法，其中脂质体包括选自二硬脂酰磷脂酰胆碱、氢化大豆磷脂酰胆碱、氢化卵卵磷脂、二棕榈酰磷脂酰胆碱、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱和二反式油酰（dielaidoyl）磷脂酰胆碱的磷脂酰胆碱。

[4] 本发明还提供实施方案[1]-[3]任一项的方法，其中脂质体进一步包括胆固醇。

[5] 本发明还提供实施方案[1]-[4]任一项的方法，其中脂质体进

一步包括磷脂酰甘油。

[6] 本发明还提供实施方案[1]-[5]任一项的方法，其中脂质体进一步包括非磷脂酰脂质。

[7] 本发明还提供实施方案[6]的方法，其中所述非磷脂酰脂质包括鞘磷脂。

[8] 本发明还提供实施方案[1]-[7]任一项的方法，其中脂质体进一步包括选自二肉豆蔻酰磷脂酰甘油，二月桂酰磷脂酰甘油，二棕榈酰磷脂酰甘油和二硬脂酰磷脂酰甘油的磷脂酰甘油。

[9] 本发明还提供实施方案[1]-[8]任一项的方法，其中脂质体包括磷脂酰胆碱，并且进一步包括胆固醇。

[10] 本发明还提供实施方案[1]-[9]任一项的方法，其中脂质体包括磷脂酰胆碱，并且进一步包括胆固醇，其中磷脂酰胆碱与胆固醇的摩尔比是大约1: 0.01至大约 1 :1。

[11] 本发明还提供实施方案[1]-[10]任一项的方法，其中脂质体包括磷脂酰胆碱，并且进一步包括胆固醇，其中磷脂酰胆碱与胆固醇的摩尔比是大约1.5 : 1.0至大约3.0 : 1.0。

[12] 本发明还提供实施方案[1]-[11]任一项的方法，其中脂质体是单层的并且小于大约100nm。

[13] 本发明还提供实施方案[1]-[12]任一项的方法，其中脂质体与药物的重量比为多至大约200: 1。

[14] 本发明还提供实施方案[1]-[13]任一项的方法，其中脂质体与药物的重量比是大约1 :1 至大约100: 1。

[15] 本发明还提供实施方案[1]-[14]任一项的方法，其中脂质体与药物的重量比是大约1 :1 至大约50: 1。

[16] 本发明还提供实施方案[1]-[15]任一项的方法，其中所述酸具有小于大约1 $x10^{-2}$的酸解离常数。

[17] 本发明还提供实施方案[1]-[16]任一项的方法，其中所述酸具有小于大约1 $x10^{-4}$的酸解离常数。

[18] 本发明还提供实施方案[1]-[17]任一项的方法，其中所述酸

具有小于大约 1 $x10^{-5}$ 的酸解离常数。

[19] 本发明还提供实施方案[1]-[18]任一项的方法，其中所述酸具有对于脂质体的大于大约 1 $x10^{-4}$cm/sec 的渗透系数。

[20] 本发明还提供实施方案[1]-[19]任一项的方法，其中所述酸选自甲酸，乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、柠檬酸、草酸，琥珀酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、富马酸、苯甲酸、乌头酸、藜芦酸、磷酸、硫酸及其组合。

[21] 本发明还提供实施方案[1]-[20]任一项的方法，其中所述酸是柠檬酸。

[22] 本发明还提供实施方案[1]-[21]任一项的方法，其中使用至少大约 100 mM 的酸。

[23] 本发明还提供实施方案[1]-[22]任一项的方法，其中当药物溶解于含水基质中时，以带电荷状态存在。

[24] 本发明还提供实施方案[1]-[23]任一项的方法，其中所述药物是包含至少一个能被质子化的非环或环氨基有机化合物。

[25] 本发明还提供实施方案[1]-[24]任一项的方法，其中所述药物是包含至少一个伯胺基团，至少一个仲胺基团，至少一个叔胺基团，至少一个季胺基团，或者它们的任意组合的有机化合物。

[26] 本发明还提供实施方案[1]-[25]任一项的方法，其中所述药物是抗肿瘤药物。

[27] 本发明还提供实施方案[1]-[26]任一项的方法，其中所述药物是两种或多种抗肿瘤药物的组合。

[28] 本发明还提供实施方案[1]-[27]任一项的方法，其中所述药物是可电离的碱性抗肿瘤药物。

[29] 本发明还提供实施方案[1]-[28]任一项的方法，其中所述药物是蒽环类化疗药物、蒽二酮、两亲性药物或长春花生物碱。

[30] 本发明还提供实施方案[29]的方法，其中所述蒽环类化疗药物选自多柔比星、表柔比星和柔红霉素。

[31] 本发明还提供实施方案[29]的方法，其中所述蒽二酮是米托

蒽醌。

[32] 本发明还提供实施方案[29]的方法，其中所述两亲性药物是亲脂性胺。

[33] 本发明还提供实施方案[20]的方法，其中所述长春花生物碱选自长春新碱和长春碱。

[34] 本发明还提供实施方案[1]-[28]任一项的方法，其中所述药物是抗肿瘤抗生素。

[35] 本发明还提供实施方案[1]-[34]任一项的方法，其中所述药物不是喜树碱或者其类似物。

[36] 本发明还提供实施方案[1]-[28]任一项的方法，其中所述药物是烷基化试剂。

[37] 本发明还提供实施方案[36]的方法，其中所述烷基化试剂选自环磷酰胺和氮芥盐酸盐。

[38] 本发明还提供实施方案[1]-[28]任一项的方法，其中所述药物是嘌呤或嘧啶衍生物。

[39] 本发明还提供实施方案[38]的方法，其中所述嘌呤或嘧啶衍生物是 5-氟尿嘧啶。

[40] 本发明还提供实施方案[1]-[39]任一项的方法，其中步骤(a)中的温度是大约 40℃至大约 70 ℃。

[41] 本发明还提供实施方案[1]-[40]任一项的方法，其中步骤(a)中的温度是大约 50℃至大约 60 ℃。

[42] 本发明还提供实施方案[1]-[41]任一项的方法，其中步骤(b)中溶液冷却至大约 0℃至大约 30℃的温度。

[43] 本发明还提供实施方案[1]-[42]任一项的方法，其中通过包括下面步骤的方法制备步骤(a)中的溶液 ：

(i)使脂质体接触酸的水溶液;

(ii)将溶液均匀化;和

(iii)任选地去除任何外部的酸。

[44] 本发明还提供实施方案[43]的方法，其中通过将外部的酸过

滤在步骤(iii)中去除外部的酸。

[45] 本发明还提供实施方案[1]-[44]任一项的方法,其中所述弱碱是膜可渗透胺。

[46] 本发明还提供实施方案[1]-[45]任一项的方法,其中所述弱碱是铵盐或烷基胺。

[47] 本发明还提供实施方案[1]-[46]任一项的方法,其中所述弱碱是带有一价或多价抗衡离子的铵盐。

[48] 本发明还提供实施方案[1]-[47]任一项的方法,其中所述弱碱选自硫酸铵、氢氧化铵、乙酸铵、氯化铵、磷酸铵、柠檬酸铵、琥珀酸铵、乳糖酸铵、碳酸铵、酒石酸铵、和草酸铵以及它们的组合。

[49] 本发明还提供实施方案[1]-[47]任一项的方法,其中所述弱碱是选自甲胺、乙胺、二乙胺、乙二胺和丙胺的烷基-胺。

[50] 本发明还提供实施方案[1]-[49]任一项的方法,进一步包括,在步骤(c)期间或之后,去除任何没有装填的药物。

[51] 本发明还提供实施方案[50]的方法,其中通过交叉过滤或透析去除没有装填的药物。

[52] 本发明还提供实施方案[1]-[51]任一项的方法,进一步包括,在步骤(c)之后,将脂质体脱水。

[53] 本发明还提供实施方案[52]的方法,其中脱水是在低于大约1大气压的压力下进行的。

[54] 本发明还提供实施方案[52]的方法,其中脱水通过脂质体的事先冷冻进行。

[55] 本发明还提供实施方案[52]的方法,其中脱水在一种或几种保护性单糖、一种或几种保护性双糖或者它们的组合的存在下进行。

[56] 本发明还提供实施方案[55]的方法,其中保护性糖选自海藻糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖。

[57] 本发明还提供实施方案[52]的方法,进一步包括在脱水之后将脂质体再次水合。

[58] 本发明还提供实施方案[1]-[57]任一项的方法,其中脂质体

是单层脂质体。

[59] 本发明还提供实施方案[1]-[57]任一项的方法,其中脂质体是多层脂质体。

[60] 本发明还提供实施方案[1]-[59]任一项的方法,其中大约90 wt% 以上的药物被捕获到脂质体中。

[61] 本发明还提供实施方案[1]-[60]任一项的方法,进一步包括,在步骤(c)之后,使脂质体与药学可接受载体接触。

[62] 本发明还提供实施方案[1]-[61]任一项的方法,其中所述酸以至少大约100mM、至少大约200 mM、至少大约300 nM、至少大约400 nM 或者至少大约500 nM存在。

[63] 本发明还提供一种制备药物组合物的方法,包括:

(a)在至少大约60 mM的酸水溶液中,在其中药物的质子化形式带电荷并且不能透过脂质体膜、并且其中药物的非质子化形式不带电荷并且能透过脂质体膜的温度下,使脂质体溶液与药物接触;

(b)将溶液冷却至药物的非质子化形式不能透过脂质体膜的温度;

(c)使溶液与弱碱接触,所述的弱碱的量可有效提高内部脂质体的pH 以提供具有内低/外高 pH梯度的梯度装填的脂质体;和

(d)使脂质体与药学可接受载体混合提供药物组合物。

[64]本发明还提供一种方法,包括对哺乳动物施用实施方案[63]的药物组合物。

[65]本发明还提供一种治疗患有癌症的哺乳动物的方法,该方法包括对哺乳动物施用实施方案[63] 的药物组合物,其中所述药物是抗肿瘤药物。

[66] 本发明还提供实施方案[65]的方法,其中所述癌症是肿瘤,卵巢癌、小细胞肺癌(SCLC)、非小细胞肺癌(NSCLC)、白血病、肉瘤、结直肠癌、头部癌症、颈部癌症或乳腺癌。

[67] 本发明还提供实施方案[65]的方法,其中脂质体制剂抗肿瘤药物的施用具有比和游离形式的抗肿瘤药物施用相关的毒性分布更低的毒性分布。

[68] 本发明还提供实施方案[67]的方法，其中所述毒性选自胃肠毒性和积蓄性剂量依赖性不可逆心肌病。

[69] 本发明还提供实施方案[65]的方法，其中所述抗肿瘤药物的施用具有比和游离形式的抗肿瘤药物施用相关的不期望的副作用较低的发生率、严重程度或者这些组合的不期望的副作用。

[70] 本发明还提供实施方案[69]的方法，其中不期望的副作用选自骨髓抑制、脱发、粘膜炎、恶心、呕吐和厌食。

[71] 通过包括下面的步骤的方法制备的具有内低/外高 pH 梯度的梯度装填脂质体，其中所述方法包括:

(a)在至少大约 60 mM 的酸水溶液中，在其中药物的质子化形式带电荷并且不能透过脂质体膜，并且其中药物的非质子化形式不带电荷并且能透过脂质体膜的温度下，使脂质体溶液与药物接触;

(b)将溶液冷却至药物的非质子化形式不能透过脂质体膜的温度;和

(c)使溶液与弱碱接触，所述的弱碱的量可有效提高内部脂质体的 pH 以提供具有内低/外高 pH 梯度的梯度装填脂质体。

给出下面的实施例只是为了详细说明的目的，而不是要限制本发明的范围。

用已知的动物模型排列能确定制剂的最大耐受剂量。例如可以采用实验 B 确定。

实验方法 B-最大耐受剂量(MTD)

通过 I.V.给药对裸鼠(NCr. nu/nu-小鼠)施用各种制剂，然后测定各种制剂的最大耐受剂量(MTD)。 典型地，给出剂量范围直到发现 MTD,每个剂量组 2 只小鼠。通过评价体重、致死率、行为变化和/或尸体解剖状况来判断 MTD 估计值。实验的典型时间是对小鼠观察四周，每周测定体重两次。

用已知的动物模型排列能确定制剂的抗癌活性。例如,利用实验 A

对大鼠测定。

实验方法 A-乳腺癌异种移植物模型

对裸鼠皮下移植 MaTu 或 MT-3 人乳腺癌细胞，并且接着用制剂和盐水对照物处理。植入肿瘤之后第十天开始治疗，包括分别以各种药物的 MTD 一次或者每天一次连续三天对动物给药。在研究期间的几个时间点测定肿瘤体积并且在植入肿瘤之后大约 34 天结束研究。以相对肿瘤体积中值(各肿瘤大小测量是相对于研究的第十天测定的肿瘤的大小) 对各种分析物质作图。图 1 给出含有长春瑞滨制剂的代表性数据。

参照下面的实施例进一步明确本发明。本领域技术人员明白，不脱离本发明的目的和利益，可以对材料和方法进行很多改进。

实施例

脂质体制备的一般方法

制备以不同摩尔比含有各种磷脂、包括氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)、胆固醇(Chol)和二硬脂酰磷脂酰甘油(DSPG)的喷雾干燥的脂质粉末。研究的脂质比是:

HSPC: Chol : DSPG 以 a). 2: 1: 0 ; b). 2: 1: 0.1

喷雾干燥的脂质粉末的制备

称出所有的脂质成分并且在圆底烧瓶中混合,向脂质粉末加入氯仿: 甲醇 1: 1 (v/v) 溶剂，最终脂质浓度在 200mg/ml 左右。然后使用 YAMATO GB-21 喷雾干燥器以指定的参数设置将脂质溶液喷雾干燥形成脂质粉末。通过真空干燥 3－5 天去除脂质粉末中的残留溶剂。

药物储备溶液的制备

称出需要的药物并且溶解于注射用水(WFI)中。药物储备溶液的浓度一般是 20mg/ml 左右。制备长春储备(NAV)、表柔比星(EPR)，米托蒽醌(MITO)、长春新碱(VCR)和多柔比星(DOXO)的储备溶液。

抗衡离子储备溶液的制备

根据预定浓度，称出抗衡离子粉末并且溶解于 WFI。如果需要，将抗衡离子溶液的最终 pH 调节至指定的 pH。制备下面抗衡离子的溶液：柠檬酸(CA)、硫酸铵($(NH_4)_2SO_4$)、柠檬酸三铵 ( $(NH_4)_3$柠檬酸根)和乳糖酸(LBA)。

从脂质膜或喷雾干燥脂质粉末通过探头超声处理制备装填药物之前的脂质体(空脂质体)

称出脂质膜或喷雾干燥脂质粉末，并且根据实验指定以 100mg/ml 至 150mg/ml 之间的脂质浓度用期望的抗衡离子溶液进行水合作用。对水合的溶液进行探头超声处理，直到溶液变得半透明。超声处理的典型温度是 65℃，并且一般超声处理时间是 15－20 分钟。超声处理完成之后，将脂质体进行下面的清洗步骤中的一项：a)脂质体冷却至室温，将澄清溶液加给交联葡聚糖凝胶 G-50 柱子，用 9%蔗糖缓冲交换；或 b)超声处理完成之后，立刻用相同的抗衡离子溶液将脂质体溶液按 1:3 稀释，并且对稀释的溶液进行超滤 (U.F.)，以清洗／用 9%蔗糖缓冲交换。通过 U.F.操作，使脂质体最终脂质浓度保持在 50mg/ml 左右。

通过均化作用从喷雾干燥脂质粉末制备脂质体

称出脂质粉末，并且以 50 mg/ml 至 75 mg/ml 之间的脂质浓度用期望的溶液进行水合作用。使用 Niro 匀化器以 10,000 PSI 在 55℃左右将水合的溶液匀化，直到溶液变得半透明。典型的匀化过程需要大约 10 遍。匀化作用完成之后，对脂质体溶液进行超滤，以清洗／用 9%蔗糖缓冲交换。

装填药物的脂质体的制备

测定合适量的空脂质体，向空脂质体加入计算量的药物储备溶液，典型的初始脂质与药物的重量比是 20:1。该体系然后在 55℃下保温，并且使用氢氧化钠将体系的 pH 调节至期望的 pH，典型地是 pH 5.8 至 pH 6.5。对该体系所给的装填／保温时间一般是 20－30 分钟。装填药物后的脂质体然后通过柱分离或者通过 U.F.操作，处理用 9%蔗糖或指定的缓冲液(用于中止)交换的缓冲液[注意：允许在洗涤阶段中终止-例如在过柱子或 U.F.清除过程中或者之后使用猝灭剂阻止进入洗涤

过的脂质体中]，去除任何没有装填的药物。室温下，使脂质体通过醋酸纤维素 0.22 微米过滤器过滤。

实施例 4 表柔比星脂质体

表柔比星(EPR)储备溶液是 20mg/ml 左右。空脂质体的脂质浓度是 50mg/ml。测定合适量的空脂质体，向空脂质体加入计算量的药物储备溶液，脂质与药物的重量比是 20: 1。该体系然后在 55℃下保温，并且使用氢氧化钠将体系的 pH 调节至 pH 6.0。该体系在 55℃下保温 20 分钟以装填药物。装填药物后的脂质体然后通过清洗程序、借助补充有猝灭剂的 9%蔗糖缓冲交换，去除所有没有装填的游离药物。室温下，脂质体通过 0.22 微米醋酸纤维素过滤器过滤。下面表中给出脂质体的表征结果。

| 脂质制剂 | 摩尔比 | 抗衡离子 | 猝灭剂 | A750<br>A600 | 大小<br>(nm) | 体积<br>% | pH |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| HSPC/Chol | 2:1 | 150mM<br>LBA | 无 | 0.346 | 53.3 | 100 | 5.62 |
| HSPC/Chol | 2:1 | 50mM<br>$(NH_4)_3$柠檬酸 | 无 | 1.073 | 78.8 | 80 | 7.01 |
| HSPC/Chol | 2:1 | 50mM<br>CA | 无 | 0.465 | 53.0 | 94 | 5.03 |
| HSPC/Chol | 2:1 | 75mM<br>$(NH_4)_2SO_4$ | 无 | 0.876 | 61.5 | 89 | 6.68 |
| HSPC/Chol | 2:1 | 75mM<br>$(NH_4)_2SO_4$ | 无 | 0.926 | 74.0 | 72 | 6.12 |
| HSPC/Chol | 2:1 | 50mM<br>CA | 9%庶糖<br>10mM $NH_4Cl$ | 1.963 | 76.1 | 100 | 6.54 |
| HSPC/Chol | 2:1 | 50mM<br>CA | 9%庶糖<br>10mM $NH_4Cl$ | 0.427 | 50.0 | 100 | 6.62 |
| HSPC/Chol | 2:1 | 200mM<br>$(NH_4)_2SO_4$ | 无 | 0.302 | 47.4 | 100 | 6.78 |
| HSPC/Chol/DSPG | 2:1:0.1 | 250mM<br>$(NH_4)_2SO_4$ | 9%庶糖<br>2mM $NH_4Cl$ | 0.753 | 43.4 | 100 | 6.38 |
| HSPC/Chol/DSPG | 2:1:0.1 | 250mM<br>$(NH_4)_2SO_4$ | 9%庶糖<br>2mM $NH_4Cl$ | 1.083 | 41.6 | 100 | 6.32 |

实施例 5 多柔比星脂质体

多柔比星储备溶液是 16mg/ml 左右。空脂质体的脂质浓度是 40mg/ml。测定合适量的空脂质体,向空脂质体加入计算量的药物储备溶液,脂质与药物的重量比是 20: 1。该体系然后在 55℃下保温,并且使用氢氧化钠将体系的 pH 调节至 pH 7.4。该体系在 55℃下保温 20 分钟以装填药物。装填药物后的脂质体然后用猝灭溶液按 1: 3 稀释,然后通过清洗程序,借助猝灭剂溶液进行缓冲交换去除所有没有装填的游离药物。完成 UF 之后,脂质体通过 0.2 微米 PES 过滤器过滤。下面表中给出脂质体的表征结果。

| 脂质制剂 | 摩尔比 | 抗衡离子 | 猝灭剂 | A750<br>A600 | 大小<br>(nm) | 体积<br>% | pH |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| HSPC/Chol/DSPG | 2: 1: 0.1 | 250mM<br>$(NH_4)_2SO_4$ | 20mM $CaCl_2$/<br>2mM $NH_4Cl$ | 0.413<br>0.952 | 49.4 | 93 | 7.4 |

实施例 6. 下面详细说明用于对人治疗或预防应用的含有本发明基于脂质的分散体系的代表性药物剂型。

| (i) 注射剂 1 (1 mg/ml) | mg/ml |
|---|---|
| '治疗药物' | 1.0 |
| 磷脂酰胆碱 | 40 |
| 胆固醇 | 10 |
| 蔗糖 | 90 |
| 0.1N 氢氧化钠溶液<br>(pH 调节至 7.0-7.5) | 适量 |
| 注射用水 | 适量加至 1 mL |

| (ii) 注射剂 2 (10mg/ml) | mg/ml |
|---|---|
| '治疗药物' | 10 |
| 磷脂酰胆碱 | 60 |
| 胆固醇 | 15 |

| | |
|---|---|
| 阴离子磷脂 | 3 |
| 0.1N 氢氧化钠溶液 (pH 调节至 7.0-7.5) | 适量 |
| 蔗糖 | 90 |
| 注射用水 | 适量加至 1 mL |

通过制药领域公知的常规方法可以获得上述制剂。

本文所引用的所有出版物、专利文献在此引入作为参考，就好像将其单独引入作为参考一样。本发明已经参考各种具体和优选的实施方案和方法进行了描述，然而应该理解，只要不偏离本发明的主旨和范围，可以对其进行各种变型和改良。

应该理解的是，本发明的某些特征为了清楚起见是在各个单独实施方案中进行描述的，它们也可以组合出现在同一实施方案中。相反，本发明有些不同的特征为了简洁起见是在单独的实施方案中进行描述的，它们也可以分开出现或者再次对其进行任意组合。

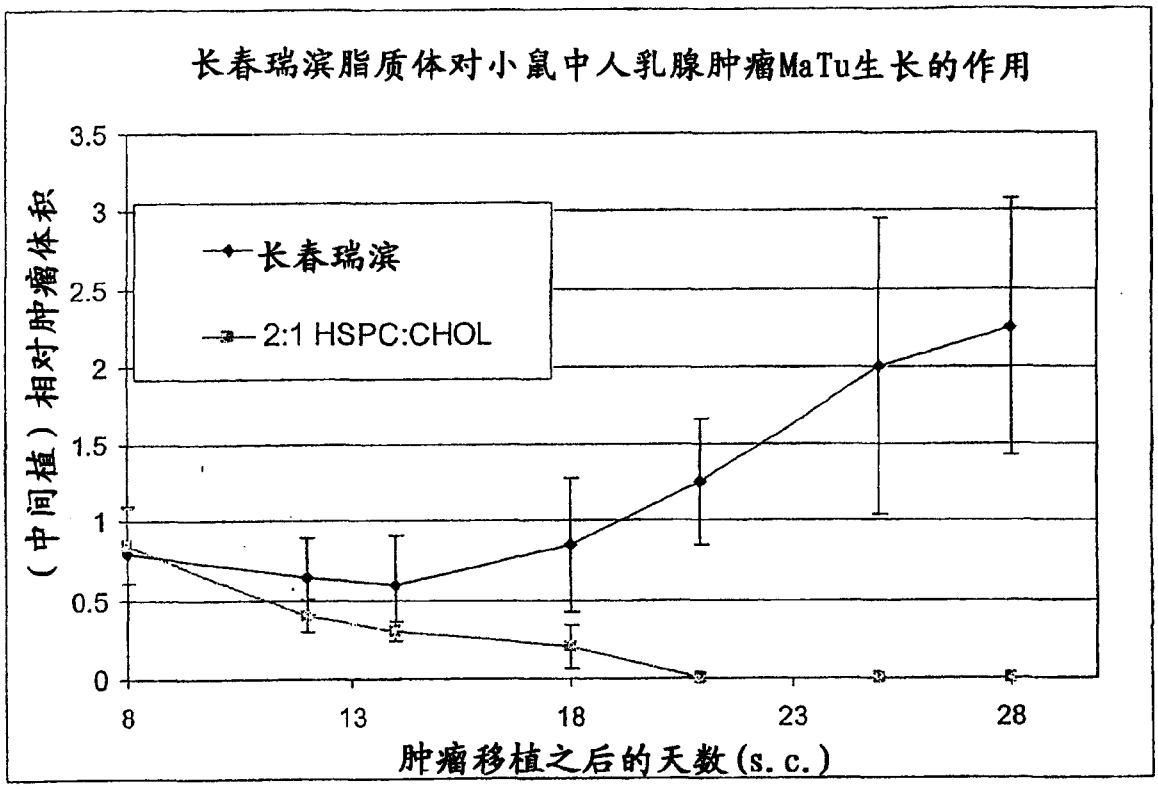
长春瑞滨脂质体对小鼠中人乳腺肿瘤MaTu生长的作用
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
8
13
18
23
28
长春瑞滨
2:1 HSPC:CHOL
（中间植）相对肿瘤体积
肿瘤移植之后的天数(s.c.)

图1

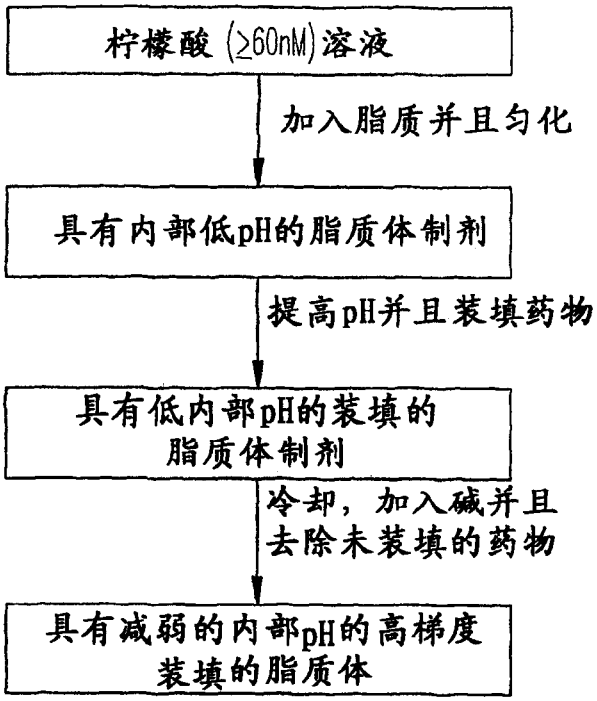
柠檬酸 (≥60nM) 溶液
加入脂质并且匀化
具有内部低pH的脂质体制剂
提高pH并且装填药物
具有低内部pH的装填的
脂质体制剂
冷却，加入碱并且
去除未装填的药物
具有减弱的内部pH的高梯度
装填的脂质体

图2