(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 113453668 A
(43)申请公布日 2021.09.28

(21)申请号 202080015063.8
(22)申请日 2020.01.11
(30)优先权数据
62/791,718 2019.01.11 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.08.18
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2020/050205 2020.01.11
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/144657 EN 2020.07.16
(71)申请人 利普麦迪克斯制药有限公司
地址 以色列耶路撒冷
申请人 夏尔泽德克科学有限公司
(72)发明人 A·加比宗 P·奥哈纳
H·什米达
(74)专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038
代理人 李程达
(51)Int.Cl.
*A61K 9/127*(2006.01)
*A61K 31/00*(2006.01)
*A61K 47/10*(2006.01)
*A61P 35/00*(2006.01)

权利要求书2页 说明书15页 附图7页

(54)发明名称

# 包含丝裂霉素C的脂质体前药的脂质体组合物及其制备方法

(57)摘要

描述了一种脂质体组合物,其包含具有改善的药代动力学特征谱的丝裂霉素C的亲脂性前药。还描述了使用由以适当比例混合的乙醇和叔丁醇组成的溶剂体系制备组合物的方法。在一个实施方案中,脂质体组合物是脂质纳米颗粒群体和药学上可接受的媒介物,其中脂质纳米颗粒群体由第一部分球形脂质体和第二部分棒状脂质纳米颗粒组成,其中第二部分少于脂质纳米颗粒群体的约15%。

CN 113453668 A

1.一种组合物,其包含:

脂质纳米颗粒群体,和

药学上可接受的媒介物,

其中所述脂质纳米颗粒群体由第一部分球形脂质体和第二部分棒状脂质纳米颗粒组成,其中所述第二部分少于所述脂质纳米颗粒群体的约15%,其中所述球形脂质体由囊泡形成脂质、丝裂霉素C的亲脂性前药和任选的脂质组分组成。

2.权利要求1的组合物,其中丝裂霉素C的亲脂性前药的量是所述囊泡形成脂质、丝裂霉素C的亲脂性前药和任选的脂质组分的总摩尔的以摩尔计约8、9、10、11或12%。

3.权利要求2的组合物,其中丝裂霉素C的亲脂性前药的量是所述囊泡形成脂质、丝裂霉素C的亲脂性前药和任选的脂质组分的总摩尔的以摩尔计约10%。

4.权利要求1-3中任一项的组合物,其中所述第二部分少于所述脂质纳米颗粒群体的约5%。

5.权利要求4的组合物,其中所述第二部分为所述脂质纳米颗粒群体的约0.1-5%。

6.权利要求1-6中任一项的组合物,其中通过包括将所述囊泡形成脂质、丝裂霉素C的亲脂性前药和任选的脂质组分溶解在由乙醇和叔丁醇以乙醇/叔丁醇比例(v/v)为约2:1至20:1组成的溶剂混合物中的方法来制备所述脂质纳米颗粒群体。

7.权利要求6的组合物,其中所述乙醇/叔丁醇比例(v/v)为约5:1至20:1。

8.权利要求7的组合物,其中所述乙醇/叔丁醇比例(v/v)为约9:1。

9.权利要求1-8中任一项的组合物,其中所述组合物的丝裂霉素C的脂质体前药在小鼠中具有至少约15小时的IV血液循环半衰期。

10.权利要求1-9中任一项的组合物,其中与包含等于或大于约15%的棒状脂质纳米颗粒的组合物的丝裂霉素C的脂质体前药相比,所述组合物的丝裂霉素C的脂质体前药在小鼠中具有的IV血液循环半衰期的值更接近于聚乙二醇化的脂质体阿霉素在小鼠中具有的IV血液循环半衰期的值。

11.权利要求1-10中任一项的组合物,其中所述囊泡形成脂质体是HSPC。

12.权利要求11中任一项的组合物,其中所述任选的脂质组分选自mPEG2000-DSPE和胆固醇。

13.权利要求1-12中任一项的组合物,其中所述脂质体包括HSPC、胆固醇、mPEG2000-DSPE和对二硬脂酰-DTB-丝裂霉素C,其中HSPC/胆固醇/mPEG2000-DSPE/对二硬脂酰-DTB-丝裂霉素C以55/30/5/10的摩尔比存在。

14.权利要求1-13中任一项的组合物,其中在将所述组合物静脉注射到小鼠后约24小时,所述丝裂霉素C的脂质体前药在小鼠血浆中的浓度大于小鼠血浆中丝裂霉素C的脂质体前药的Cmax的20%。

15.一种制备脂质体的方法,其包括:

将囊泡形成脂质、丝裂霉素C的亲脂性前药和任选的脂质组分溶解在由乙醇和叔丁醇以乙醇/叔丁醇比例(v/v)为约2:1至20:1组成的溶剂混合物中以形成溶解的脂质溶液,和

形成脂质纳米颗粒群体,其中所述脂质纳米颗粒群体由第一部分球形脂质体和第二部分棒状脂质纳米颗粒组成,其中所述第二部分少于所述脂质纳米颗粒群体的约15%。

16.权利要求15的方法,其中形成脂质纳米颗粒群体包括将溶解的脂质溶液与水性缓

冲液混合以形成悬浮液，将所述悬浮液挤出通过过滤器以及去除乙醇和叔丁醇的混合物。

17.权利要求16的方法，其中形成脂质纳米颗粒群体还包括无菌过滤。

18.权利要求145-17中任一项的方法，其中所述丝裂霉素C的亲脂性前药的量是所述囊泡形成脂质、丝裂霉素C的亲脂性前药和任选的脂质组分的总摩尔的以摩尔计约8、9、10、11或12％。

19.权利要求18的方法，其中所述丝裂霉素C的亲脂性前药的量是所述囊泡形成脂质、丝裂霉素C的亲脂性前药和任选的脂质组分的总摩尔的以摩尔计约10％。

20.权利要求15-19中任一项的方法，其中所述任选的脂质组分选自胆固醇和附接至亲脂性部分的聚乙二醇的缀合物。

21.权利要求15-20中任一项的方法，其中所述乙醇/叔丁醇比例(v/v)为约5:1至20:1。

22.权利要求21的方法，其中所述乙醇/叔丁醇比例(v/v)为约7:1至15:1。

23.权利要求22的方法，其中所述乙醇/叔丁醇比例(v/v)为约9:1。

24.权利要求15-20中任一项的方法，其中所述第二部分少于所述脂质纳米颗粒群体的约5％。

25.权利要求24的方法，其中所述第二部分为所述脂质纳米颗粒群体的约0.1-5％。

26.权利要求15-25中任一项的方法，其中丝裂霉素C的亲脂性前药缀合物是对二硬脂酰-DTB-丝裂霉素C。

27.权利要求15-26中任一项的方法，其中所述囊泡形成脂质体是HSPC。

28.权利要求15-27中任一项的方法，其中所述任选的脂质组分选自胆固醇和mPEG2000-DSPE。

29.权利要求15-28中任一项的方法，其中所述脂质体包括HSPC、胆固醇、mPEG2000-DSPE和对二硬脂酰-DTB-丝裂霉素C，其中HSPC/胆固醇/mPEG2000-DSPE/对二硬脂酰-DTB-丝裂霉素C以55/30/5/10的摩尔比存在。

30.通过方法制备的脂质纳米颗粒群体，所述方法包括：

将囊泡形成脂质、丝裂霉素C的亲脂性前药和任选的脂质组分溶解在由乙醇和叔丁醇以乙醇/叔丁醇比例为约2:1至20:1组成的溶剂混合物中以形成溶解的脂质溶液；和

将所述溶解的脂质溶液与水性缓冲液混合以形成脂质纳米颗粒群体，其中所述脂质纳米颗粒群体由第一部分球形脂质体和第二部分棒状脂质纳米颗粒组成，其中所述第二部分少于所述脂质纳米颗粒群体的约15％。

31.一种治疗癌症的方法，其包括：

提供权利要求1-14中任一项的脂质体组合物；和

以提供丝裂霉素C的治疗有效量的量向有此需要的患者施用脂质体以治疗癌症。

32.权利要求31的方法，其中向有此需要的患者施用脂质体包括结合(第二)化疗剂施用所述脂质体。

33.权利要求31的方法，其中向有此需要的患者施用脂质体包括结合放射疗法施用所述脂质体。

# 包含丝裂霉素C的脂质体前药的脂质体组合物及其制备方法

## 技术领域

[0001] 本文描述的主题涉及包含丝裂霉素C的亲脂性前药的脂质体组合物、其制备及其用途。

## 背景技术

[0002] 癌症是美国的主要死亡原因并且影响全世界的人们。手术、放射疗法和化疗是最广泛使用的治疗方式。化疗剂在细胞内创造了限制细胞生长和复制的条件，并且近年来癌症化疗已经取得了显著进展。化疗剂通常影响正常组织例如骨髓、毛囊和肠上皮的肿瘤细胞和快速增殖的细胞。厌食、恶心、呕吐、腹泻、骨髓功能抑制和脱发是通常与化疗相关的一些负面影响。开发提供有效抗肿瘤疗法且毒性最小的化疗剂将是有利的。

[0003] US 6,365,179中公开了包含5摩尔百分比的丝裂霉素C的脂质体前药缀合物的脂质体制剂及其制备。为了减少用于递送足够剂量的丝裂霉素C前药的脂质赋形剂的量，需要包含超过5摩尔百分比，例如约10摩尔百分比的脂质体丝裂霉素C前药的脂质体制剂。发现乙醇(用于溶解包含5摩尔百分比的丝裂霉素C前药以制备脂质体制剂的脂质体组分的溶剂)不能恰当地溶解包含约10摩尔百分比的丝裂霉素C前药的脂质体组分。在没有叔丁醇的情况下，丝裂霉素C前药的溶解是一个困难且不完全的过程，导致沉淀和囊泡尺寸的增长。乙醇/叔丁醇(50/50，v/v)的溶剂混合物可以溶解包含约10摩尔百分比的丝裂霉素C前药的脂质体组分。

[0004] 通过包括将脂质体组分溶解在乙醇/叔丁醇(50/50，v/v)的溶剂混合物中的方法制备的脂质体制剂存在缺陷，例如形成棒状颗粒(塌陷或盘状脂质体)，以及快速的血浆清除。

[0005] 本申请公开了一种制备包含丝裂霉素C的亲脂性前药缀合物的脂质体制剂的新方法。本文公开的脂质体制剂基本上不含棒状脂质纳米颗粒并且当与包含丝裂霉素C的亲脂性前药缀合物的现有脂质体组合物相比，提供改善的丝裂霉素C前药的血液浓度和丝裂霉素C前药的血液循环时间。

## 发明内容

[0006] 下面描述和示例说明的以下方面及其实施方案旨在是示例性和说明性的，而不是限制范围。

[0007] 在一个方面，提供了一种组合物。该组合物包含脂质纳米颗粒群体和药学上可接受的媒介物，其中所述脂质纳米颗粒群体由第一部分球形脂质体和第二部分棒状脂质纳米颗粒组成，其中所述第二部分少于所述脂质纳米颗粒群体的约15％，其中所述球形脂质体由囊泡形成脂质、丝裂霉素C的亲脂性前药和任选的脂质组分组成。

[0008] 在一个实施方案中，所述丝裂霉素C的亲脂性前药的量是所述囊泡形成脂质、丝裂霉素C的亲脂性前药和任选的脂质组分的总摩尔的以摩尔计大于5％但少于30％。在一些实施方案中，所述丝裂霉素C的亲脂性前药的量是所述囊泡形成脂质、丝裂霉素C的亲脂性前

药和任选的脂质组分的总摩尔的以摩尔计约8、9、10、11或12％。

[0009] 在一个实施方案中，第二部分棒状脂质纳米颗粒少于脂质纳米颗粒群体的约5％。

[0010] 在另一个实施方案中，其中所述第二部分为所述脂质纳米颗粒群体的约0.1-5％。

[0011] 在又一个实施方案中，通过包括将囊泡形成脂质、丝裂霉素C的亲脂性前药和任选的脂质组分溶解在由乙醇和叔丁醇以乙醇/叔丁醇比例(v/v)为约2:1至20:1组成的溶剂混合物中的方法制备脂质纳米颗粒群体。在一些实施方案中，乙醇/叔丁醇比例(v/v)为约5:1至20:1。在一些实施方案中，乙醇/叔丁醇比例(v/v)为约7:1至15:1。在一些实施方案中，乙醇/叔丁醇比例(v/v)为约9:1。

[0012] 在又一个实施方案中，任选的脂质组分选自胆固醇和附接至亲脂性部分的聚乙二醇的缀合物。

[0013] 在又一个实施方案中，本文公开的组合物的丝裂霉素C的脂质体前药在小鼠中具有至少约15小时的IV血液循环半衰期。

[0014] 在又一个实施方案中，本文公开的组合物的丝裂霉素C的脂质体前药在静脉内施用后在小鼠中的血液循环半衰期与静脉内施用聚乙二醇化的脂质体阿霉素组合物(例如**DOXIL®**)后在小鼠中的血液循环半衰期基本上相同，或比静脉内施用聚乙二醇化的脂质体阿霉素组合物(例如**DOXIL®**)后在小鼠中的血液循环半衰期短约10％、15％或20％内。相比之下，包含等于或大于约15％的棒状脂质纳米颗粒的组合物的丝裂霉素C的脂质体前药在静脉内施用后在小鼠中的血液循环半衰期比静脉内施用聚乙二醇化的脂质体阿霉素组合物(例如**DOXIL®**)后在小鼠中的血液循环半衰期短25％、35％或45％。

[0015] 在一个实施方案中，在将本文公开的组合物静脉注射到小鼠后约24小时，丝裂霉素C的脂质体前药在小鼠血浆中的浓度大于静脉注射后小鼠血浆中丝裂霉素C的脂质体前药的Cmax的20％。

[0016] 在另一方面，提供了一种制备脂质纳米颗粒的方法。该方法包括将囊泡形成脂质、丝裂霉素C的亲脂性前药和任选的脂质组分溶解在由乙醇和叔丁醇以乙醇/叔丁醇比例(v/v)为约2:1至20:1组成的溶剂混合物中以形成溶解的脂质溶液并形成脂质纳米颗粒群体，其中所述脂质纳米颗粒群体由第一部分球形脂质体和第二部分棒状脂质纳米颗粒组成，其中所述第二部分少于所述脂质纳米颗粒群体的约15％。

[0017] 在一个实施方案中，形成脂质纳米颗粒群体包括将溶解的脂质溶液与水性缓冲液混合以形成悬浮液，将所述悬浮液挤出通过过滤器以及去除乙醇和叔丁醇的混合物。在一些实施方案中，形成脂质纳米颗粒群体还包括无菌过滤。

[0018] 在一个实施方案中，所述丝裂霉素C的亲脂性前药的量是所述囊泡形成脂质、丝裂霉素C的亲脂性前药和任选的脂质组分的总摩尔的以摩尔计大于5％但少于30％。在一些实施方案中，所述丝裂霉素C的亲脂性前药的量是所述囊泡形成脂质、丝裂霉素C的亲脂性前药和任选的脂质组分的总摩尔的以摩尔计约8、9、10、11或12％。

[0019] 在又一个实施方案中，任选的脂质组分选自胆固醇和附接至亲脂性部分的聚乙二醇的缀合物。

[0020] 在一个实施方案中，乙醇/叔丁醇比例(v/v)为约5:1至20:1或为约7:1至15:1。在一个实施方案中，乙醇/叔丁醇比例(v/v)为约9:1。

[0021] 在一个实施方案中，所述第二部分少于所述脂质纳米颗粒群体的约5％。

[0022] 在一个实施方案中,所述第二部分为所述脂质纳米颗粒群体的约0.1-5%。

[0023] 在又一方面,提供了通过方法制备的脂质纳米颗粒群体,其中该方法包括将囊泡形成脂质、丝裂霉素C的亲脂性前药和任选的脂质组分溶解在由乙醇和叔丁醇以乙醇/叔丁醇比例为约2:1至20:1组成的溶剂混合物中以形成溶解的脂质溶液;和将溶解的脂质溶液与水性缓冲液混合以形成脂质纳米颗粒群体,其中所述脂质纳米颗粒群体由第一部分球形脂质体和第二部分棒状脂质纳米颗粒组成,其中所述第二部分少于所述脂质纳米颗粒群体的约15%。

[0024] 在另一方面,提供了一种治疗癌症的方法。该方法包括提供由悬浮在药学上可接受的媒介物中的脂质纳米颗粒群体组成的脂质体组合物,所述脂质纳米颗粒群体由第一部分球形脂质体和第二部分棒状脂质纳米颗粒组成,其中所述第二部分少于所述脂质纳米颗粒群体的约15%;并且以提供丝裂霉素C前药的治疗有效量的量向有此需要的患者施用脂质体以治疗癌症。

[0025] 除了上述示例性方面和实施方案之外,通过参考附图和通过研究以下描述,进一步的方面和实施方案将变得明显。

[0026] 根据以下描述、附图、实施例和权利要求,每个方面的其他实施方案将是明显的。从前述和以下描述中可以理解,本文描述的每个和各个特征以及两个或更多个这样的特征的每个和各个组合都包括在本公开内容的范围内,只要包括在这样的组合中的特征是互不矛盾的。此外,任何特征或特征的组合可以被明确地排除在本发明的任何实施方案之外。本发明的其他方面和优点在以下描述和权利要求中阐述,特别是当结合所附实施例和附图考虑时。

附图简要说明

[0027] 图1A-1D是通过如下方法制备的脂质体的冷冻透射电子显微镜(cryo-TEM)图像,该方法包括将脂质体组分溶解在具有乙醇/叔丁醇比例(v/v)为50:50(图1D)、75:25(图1C)、90:1(图1A)和100:0(图1B)的溶剂中。

[0028] 图2A是显示通过如下方法制备的脂质体前药的体外二硫苏糖醇(DTT)裂解的图,该方法包括将脂质体组分溶解在具有乙醇/叔丁醇比例(v/v)为50:50的溶剂中或乙醇中。图2B是显示通过如下方法制备的脂质体丝裂霉素C前药的体外二硫苏糖醇(DTT)裂解的图,该方法包括将脂质体组分溶解在具有乙醇/叔丁醇比例(v/v)为50:50或90:10的溶剂中。

[0029] 图3A-3C是显示通过如下方法制备的脂质体的静脉内施用后,在小鼠中丝裂霉素C前药的血浆水平(以μg/mL)随时间(以小时)的函数的图,该方法包括将脂质体组分溶解在具有乙醇/叔丁醇比例(v/v)为50:50、90:10或100:0的溶剂中。

[0030] 图4是显示通过如下方法制备的脂质体的静脉内施用后24小时,以Cmax百分比表示的在小鼠中脂质体丝裂霉素C前药的血浆水平的柱状图,该方法包括将囊泡形成脂质和丝裂霉素C的前药溶解在具有乙醇/叔丁醇比例(v/v)为50:50、90:10或100:0的溶剂中。

[0031] 图5A和5B是显示通过如下方法制备的脂质体丝裂霉素C前药的体外血浆稳定性的图,该方法包括将脂质体组分溶解在具有乙醇/叔丁醇比例(v/v)为50:50(图5A)或90:10(图5B)的溶剂中。

[0032] 图6是显示在通过如下方法制备的脂质体丝裂霉素C前药的IV注射后24小时的时间点,每个肿瘤中脂质体丝裂霉素C前药(MLP)的浓度(MLP(μg)/肿瘤(g))的图,该方法包括

将脂质体组分溶解在具有乙醇/叔丁醇比例(v/v)为90/10或50/50的溶剂中。

发明详述

I.定义

[0033] 现在将在下文中更全面地描述各个方面。然而,这些方面可以以许多不同的形式体现并且不应被解释为限于本文提供的实施方案;相反,提供这些实施方案是为了使本公开内容彻底和完整,并将其范围充分传达给本领域技术人员。

[0034] 如本文所用,“施用给”或“施用”是指将外来分子引入细胞或宿主。该术语旨在与术语“递送”或“递送至”同义。合适的施用途径是但不限于静脉内、动脉内、肌肉内、皮下、腹膜内、胸膜内、鞘内、膀胱内或瘤内、滑膜内、输注、舌下、经皮、口服或局部。

[0035] 如本文所用,Cmax是指在将药物(例如脂质体丝裂霉素C前药)施用给受试者(例如动物,例如小鼠或例如人)后,药物在受试者的血浆中达到的最大浓度。这是用于药代动力学研究的标准量度。

[0036] 如本文所用,短语“化疗剂”与“抗肿瘤剂”或“抗增殖剂”同义并且是指防止癌症或过度增殖细胞进行繁殖的化合物。通常,抗肿瘤剂可以通过以下方式阻止癌细胞进行繁殖:(1)干扰细胞复制DNA的能力和(2)在癌细胞中诱导细胞死亡和/或细胞凋亡。

[0037] 在施用后产生治疗有效量的丝裂霉素C的脂质体-丝裂霉素C前药的量是有效改善或最小化瘤形成的临床损害或症状的丝裂霉素C前药的量,以单剂量或多剂量。

[0038] “静脉内血液循环半衰期”或“IV血液循环半衰期”是指经由静脉注射施用给参考受试者(例如小鼠)的参考药物(例如脂质体丝裂霉素C前药)的血液循环半衰期。

[0039] 如本文所用,“赘生”或“瘤形成”是指以细胞异常增殖为特征的增殖性疾病。通常,瘤形成与癌症和肿瘤形成有关。如本文所用,“实体瘤”是发生在器官(例如乳房或结肠)中的肿瘤。

[0040] 术语“患者”是指罹患以瘤形成为特征的疾病的个体。特别地,患者(即宿主)是动物(即哺乳动物)或人。

[0041] 如本文所用,“药物制剂”包括无显著副作用的人和兽用制剂。如本文所用,“药学上可接受的载体”是指允许将本发明的试剂有效分布在最适合其所需活性的物理位置的组合物或制剂,并且“药学上可接受的载体”是指本领域技术人员熟知的缓冲液、稳定剂或其他材料。这种材料应该是无毒的,并且应该不会干扰活性成分的功效。载体或其他材料的确切性质可以取决于施用的途径。

[0042] 如本文所用,“前药”是指是药物前体的化合物,其在施用给受试者后,经由一些化学或生理过程在体内释放药物,使得前药转化为对赘生的细胞有毒性的产物。

[0043] 提及“治疗有效量”是指足以显示对个体有益的化合物的量。该量防止、减轻、减弱或以其他方式降低与患者中瘤形成相关的症状的严重性,例如肿瘤质量或体积的减少或者肿瘤生长速率的减慢。

[0044] 如本文所用,术语“治疗”、“处理”和“治疗效果”是指降低或停止细胞增殖速率(例如,减缓或停止肿瘤生长)或减少增殖性癌细胞的数量。

[0045] 第二部分棒状脂质纳米颗粒相对于脂质纳米颗粒群体的百分比是指棒状脂质纳米颗粒的数量相对于群体中脂质纳米颗粒的数量的百分比。

[0046] 在提供值的范围的情况下,旨在将该范围的上限和下限之间的每个中间值以及在

该所述范围内的任何其他陈述的或中间值都包含在本公开内容内。例如，如果陈述了1μm至8μm的范围，则旨在还明确地公开了2μm、3μm、4μm、5μm、6μm和7μm，以及大于或等于1μm的值的范围和小于或等于8μm的值的范围。

[0047] 单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数所指对象，除非上下文另有明确说明。因此，例如，提及“脂质体”包括单一脂质体以及两种或更多种相同或不同的脂质体，提及“赋形剂”包括单一赋形剂以及两种或更多种相同或不同的赋形剂，等等。

[0048] 术语“约”，特别是关于给定量，意在包括正负5％、10％、15％或20％的偏差。

II.脂质体组合物

[0049] 在一个方面，提供了一种组合物。该组合物包含脂质纳米颗粒群体和药学上可接受的媒介物，其中所述脂质纳米颗粒群体由第一部分球形脂质体和第二部分棒状脂质纳米颗粒组成，其中所述第二部分少于所述脂质纳米颗粒群体的约15％，并且其中球形脂质体由囊泡形成脂质、丝裂霉素C的亲脂性前药和任选的脂质组分组成。

[0050] 在一个实施方案中，所述丝裂霉素C的亲脂性前药的量是所述囊泡形成脂质、丝裂霉素C的亲脂性前药和任选的脂质组分的总摩尔的以摩尔计大于5％但少于30％，例如大于5％但少于20％。在一些实施方案中，所述丝裂霉素C的亲脂性前药的量是所述囊泡形成脂质、丝裂霉素C的亲脂性前药和任选的脂质组分的总摩尔的以摩尔计约8、9、10、11或12％，例如10％。

[0051] 在一个实施方案中，所述第二部分少于所述脂质纳米颗粒群体的约5％。

[0052] 在一个实施方案中，所述第二部分为所述脂质纳米颗粒群体的约0.1-5％。

[0053] 在一个实施方案中，脂质纳米颗粒群体通过包括将囊泡形成脂质、丝裂霉素C的亲脂性前药和任选的脂质组分溶解在由乙醇和叔丁醇以乙醇/叔丁醇比例(v/v)为约2:1至20:1组成的溶剂混合物中的方法制备。在一些实施方案中，乙醇/叔丁醇比例(v/v)为约5:1至20:1。在一些实施方案中，乙醇/叔丁醇比例(v/v)为约7:1至15:1。在一些实施方案中，乙醇/叔丁醇比例(v/v)为约9:1。

[0054] 在一个实施方案中，本文公开的组合物的丝裂霉素C的脂质体前药在小鼠中具有至少约15小时的IV血液循环半衰期。

[0055] 在一个实施方案中，与包含等于或大于约15％的棒状脂质纳米颗粒的组合物的丝裂霉素C的脂质体前药相比，本文公开的组合物的丝裂霉素C的脂质体前药在小鼠中具有的IV血液循环半衰期的值更接近于聚乙二醇化的脂质体阿霉素在小鼠中具有的IV血液循环半衰期的值。

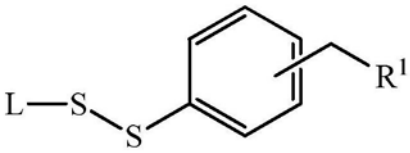
[0056] 在一个实施方案中，本文公开的组合物的丝裂霉素C的脂质体前药在静脉内施用后在小鼠中的血液循环半衰期与静脉内施用聚乙二醇化的脂质体阿霉素组合物后在小鼠中的血液循环半衰期基本上相同，或比静脉内施用聚乙二醇化的脂质体阿霉素组合物后在小鼠中的血液循环半衰期短约10％、15％或20％内。相比之下，包含等于或大于约15％的棒状脂质纳米颗粒的组合物的丝裂霉素C的脂质体前药在静脉内施用后在小鼠中的血液循环半衰期比静脉内施用聚乙二醇化的脂质体阿霉素组合物(例如称为**DOXIL®**的组合物)后在小鼠中的血液循环半衰期短25％、35％或45％。

[0057] 在一个实施方案中，在将本文公开的组合物静脉注射到小鼠后约24小时，丝裂霉素C的脂质体前药在小鼠血浆中的浓度大于静脉注射后小鼠血浆中丝裂霉素C的脂质体前

药的Cmax的20％。

A.脂质体丝裂霉素C前药

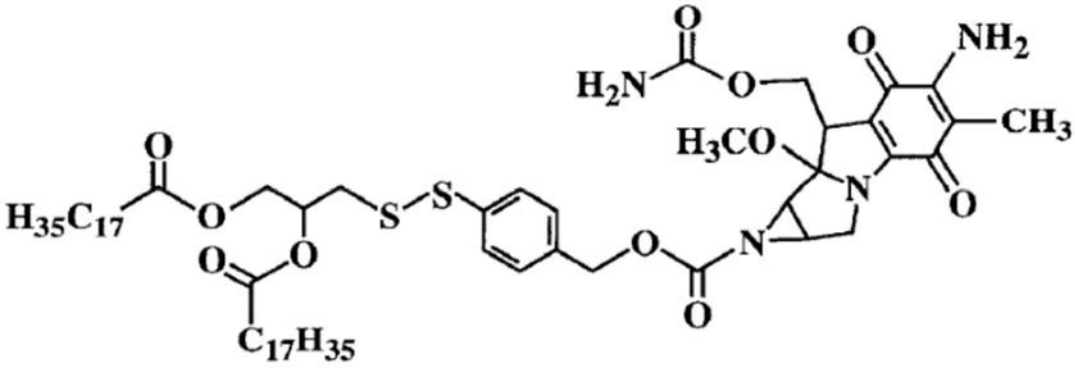
[0058] 提供用于本文描述的组合物和方法的丝裂霉素C的脂质体前药缀合物或脂质体-丝裂霉素C前药缀合物是指掺入脂质体递送平台中的丝裂霉素C的前药缀合物，并且在一个实施方案中，丝裂霉素C的前药缀合物由可释放地附接至亲脂性或疏水性部分的丝裂霉素C组成，并且通常具有下式：




[0059] 其中L是疏水部分，$R^1$代表共价附接至二硫代苄基部分的丝裂霉素C残基。$CH_2R^1$基团的取向选自邻位和对位。美国专利号6,365,179;6,984,396;和7,303,760中描述了缀合物的合成，其中每一个都通过引用并入本文。

[0060] 疏水部分L通常是脂质，例如甘油二酯、甾醇、磷脂、这些脂质的衍生物、其他天然存在的脂质和它们的合成类似物。疏水部分适合掺入脂质体双层中，以将丝裂霉素C缀合物锚定到脂质体递送媒介物。

[0061] 在一个实施方案中，丝裂霉素C的亲脂性前药缀合物具有以下结构：




对二酰基二甘油二硫代苄基-丝裂霉素C(对二硬脂酰-DTB-丝裂霉素C)

[0062] 脂质体-丝裂霉素C前药缀合物在暴露于还原条件(即还原剂，例如半胱氨酸或谷胱甘肽)时分解产生丝裂霉素C。即，缀合物的硫解裂解产生丝裂霉素C以及疏水部分和二硫代苄基部分的无毒副产物。可以理解，前药缀合物可以容易地掺入脂质体中以体内施用给受试者。前药缀合物是无毒的，并且在施用后和暴露于内源性还原剂或暴露于外源性还原剂时，缀合物分解以产生以其天然状态和具有生物活性的丝裂霉素C。

B.脂质体

[0063] 脂质体是用于多种治疗目的的封闭脂质囊泡，并且特别是用于通过脂质体的全身施用将治疗剂携带至靶区域或细胞。特别地，具有亲水性聚合物链(例如聚乙二醇(PEG))的表面涂层的脂质体作为药物载体是合乎需要的，因为这些脂质体提供了优于缺乏聚合物涂层的脂质体的延长的血液循环寿命。该聚合物充当血液蛋白质的屏障，从而阻止蛋白质的结合和脂质体被巨噬细胞和网状内皮系统的其他细胞识别、摄取和去除。超滤尺寸范围内的脂质体(直径小于200nm)被认为是并且通常被称为脂质的脂质纳米颗粒或简称为脂质纳米颗粒。

[0064] 本公开内容范围内的脂质体可以包括与脂质(在一个实施方案中,脂质是囊泡形成脂质),并且任选地至少一种脂质组分组合的缀合物。本公开内容中使用的至少一种任选的脂质组分可以选自胆固醇和脂质双层稳定脂质,例如,聚乙二醇附接至亲脂性部分的缀合物,例如甲氧基-聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(mPEG-DSPE)。

[0065] "囊泡形成脂质"是在水中自发地形成双层囊泡的脂质。囊泡形成脂质优选地具有两条烃链,通常是酰基链,和极性头基团。本领域已知有多种合成的囊泡形成脂质和天然存在的囊泡形成脂质,其中两条烃链的长度通常为约12至约24个碳原子,并且具有不同程度的不饱和度。实例包括磷脂,例如磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酸(PA)、磷脂酰肌醇(PI)和鞘磷脂(SM)。用于本发明的优选脂质是氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)。另一种优选的脂质家族是二酰基甘油。这些脂质可以商购获得或根据公开的方法制备。

[0066] 可选择囊泡形成脂质以达到一定程度的流动性或刚性,以控制脂质体在血清中的稳定性,并控制脂质体中包裹的试剂的释放速率。具有更刚性的脂质双层或液体结晶双层的脂质体可以通过掺入相对刚性的脂质,例如具有相对高的相变温度,例如高达约65℃的脂质来制备。刚性脂质,即饱和的脂质,有助于脂质双层中更大的膜刚性。还已知其他脂质组分(例如胆固醇)有助于脂质双层结构中的膜刚性。

[0067] 脂质流动性是通过掺入相对流动的脂质,通常是具有相对低的液体至液晶相转变温度,例如在室温或低于室温(约20-25℃)的脂质相的脂质来实现的。

[0068] 脂质体还可以包括可以掺入脂质双层中的其他脂质组分,例如甾醇。这些其他脂质组分通常具有与双层膜的内部疏水区域接触的疏水部分,以及朝向膜的外部极性表面取向的极性头部基团部分。

[0069] 脂质体中的另一种脂质组分可以是用亲水聚合物衍生的囊泡形成脂质。在该脂质组分中,衍生的脂质导致在内部和外部脂质双层表面上形成亲水性聚合物链的表面涂层。通常,约1-20摩尔百分比的衍生的脂质包含在脂质组合物中。

[0070] 适用于用囊泡形成脂质进行衍生化的亲水性聚合物包括聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯甲基醚、聚甲基噁唑啉、聚乙基噁唑啉、聚羟丙基噁唑啉、聚羟丙基甲基丙烯酰胺、聚甲基丙烯酰胺、聚二甲基丙烯酰胺、聚羟丙基甲基丙烯酸甲酯、聚羟乙基丙烯酸酯、羟甲基纤维素、羟乙基纤维素、聚乙二醇和聚天冬酰胺。聚合物可以作为均聚物或作为嵌段或无规共聚物使用。

[0071] 优选的亲水性聚合物链是聚乙二醇(PEG),优选地作为具有约500至约10,000道尔顿,优选地约1,000至约5,000道尔顿的分子量的PEG链。PEG的甲氧基或乙氧基封端的类似物也是优选的亲水性聚合物。这些聚合物可以以多种聚合物尺寸商购获得,例如约12至约220,000道尔顿。

[0072] 脂质体通常可包含约1至约30摩尔百分比的脂质-丝裂霉素C前药缀合物,优选地约5至约30摩尔百分比,更优选约5至约20摩尔百分比,例如大于5摩尔百分比但小于30摩尔百分比,大于5摩尔百分比但小于20摩尔百分比,或约8、9、10、11和12摩尔百分比。

[0073] 在一个实施方案中,囊泡形成脂质体可以是HSPC。在一个实施方案中,任选的脂质组分选自mPEG2000-DSPE和胆固醇。

[0074] 在一个实施方案中,脂质体可以包括HSCP、胆固醇、mPEG2000-DSPE和对二硬脂酰-DTB-丝裂霉素C,其中HSCP/胆固醇/mPEG2000-DSPE/对二硬脂酰-DTB-丝裂霉素C以55/30/

5/10的摩尔比存在。

C.制备方法

[0075] 通过包括将脂质体组分溶解在乙醇/叔丁醇(50/50,v/v)的溶剂混合物中的方法制备的脂质体制剂存在缺点,例如快速药代动力学清除。当减少溶剂混合物中叔丁醇的量时,亲脂性丝裂霉素C前药的药代动力学清除率出乎意料地降低,并且棒状脂质体的量也减少。

[0076] 因此,提供了一种制备脂质体的新方法。该方法包括将囊泡形成脂质、丝裂霉素C的亲脂性前药和任选的脂质组分溶解在由乙醇和叔丁醇以乙醇/叔丁醇比例(v/v)为约2:1至20:1组成的溶剂混合物中以形成溶解的脂质溶液并形成脂质纳米颗粒群体,其中所述脂质纳米颗粒群体由第一部分球形脂质体和第二部分棒状脂质纳米颗粒组成,其中所述第二部分少于所述脂质纳米颗粒群体的约15%。

[0077] 在一个实施方案中,形成脂质纳米颗粒群体包括将溶解的脂质溶液与水性缓冲液混合以形成悬浮液,将所述悬浮液挤出通过过滤器以及去除乙醇和叔丁醇的混合物。在一些实施方案中,形成脂质纳米颗粒群体还包括无菌过滤。

[0078] 在一个实施方案中,所述丝裂霉素C的亲脂性前药的量是所述囊泡形成脂质、丝裂霉素C的亲脂性前药和任选的脂质组分的总摩尔的以摩尔计大于5%但少于30%,例如大于5%但少于20%。在一些实施方案中,所述丝裂霉素C的亲脂性前药的量是所述囊泡形成脂质、丝裂霉素C的亲脂性前药和任选的脂质组分的总摩尔的以摩尔计约8、9、10、11或12%。

[0079] 在又一个实施方案中,任选的脂质组分选自胆固醇和附接至亲脂性部分的聚乙二醇的缀合物。

[0080] 在一个实施方案中,乙醇/叔丁醇比例(v/v)为约5:1至20:1或为约7:1至15:1。在一个实施方案中,乙醇/叔丁醇比例(v/v)为约9:1。

[0081] 在一个实施方案中,所述第二部分少于所述脂质纳米颗粒群体的约5%。

[0082] 在一个实施方案中,所述第二部分为所述脂质纳米颗粒群体的约0.1-5%。

[0083] 在一个实施方案中,丝裂霉素C的亲脂性前药缀合物是对二硬脂酰-DTB-丝裂霉素C。

[0084] 在一个实施方案中,囊泡形成脂质体是HSPC。

[0085] 在一个实施方案中,任选的脂质组分包括mPEG2000-DSPE。

[0086] 在一个实施方案中,任选的脂质组分包括胆固醇和mPEG2000-DSPE。

[0087] 在一个实施方案中,脂质体包含HSCP、胆固醇、mPEG2000-DSPE和对二硬脂酰-DTB-丝裂霉素C,其中HSCP/胆固醇/mPEG2000-DSPE/对二硬脂酰-DTB-丝裂霉素C以55/30/5/10的摩尔比存在。

[0088] 还提供了通过方法制备的脂质纳米颗粒群体,该方法包括将囊泡形成脂质、丝裂霉素C的亲脂性前药和任选的脂质组分溶解在由乙醇和叔丁醇以乙醇/叔丁醇比例为约2:1至20:1组成的溶剂混合物中以形成溶解的脂质溶液;和将所述溶解的脂质溶液与水性缓冲液混合以形成脂质纳米颗粒群体,其中所述脂质纳米颗粒群体由第一部分球形脂质体和第二部分棒状脂质纳米颗粒组成,其中所述第二部分少于所述脂质纳米颗粒群体的约15%。

[0089] 在一个实施方案中,所述丝裂霉素C的亲脂性前药的量是所述囊泡形成脂质、丝裂霉素C的亲脂性前药和任选的脂质组分的总摩尔的以摩尔计大于5%但少于30%,例如大于

5％但少于20％。在一些实施方案中，所述丝裂霉素C的亲脂性前药的量是所述囊泡形成脂质、丝裂霉素C的亲脂性前药和任选的脂质组分的总摩尔的以摩尔计约8、9、10、11或12％。

[0090] 在又一个实施方案中，任选的脂质组分选自胆固醇和附接至亲脂性部分的聚乙二醇的缀合物。

[0091] 在一个实施方案中，丝裂霉素C的亲脂性前药的量是脂质的总摩尔的以摩尔计大于5％但少于30％。在一些实施方案中，丝裂霉素C的亲脂性前药的量是脂质体的总摩尔的以摩尔计约10％。

[0092] 在一个实施方案中，乙醇/叔丁醇比例(v/v)为约5:1至20:1或为约7:1至15:1。在一个实施方案中，乙醇/叔丁醇比例(v/v)为约9:1。

[0093] 在一个实施方案中，所述第二部分少于所述脂质纳米颗粒群体的约5％。

[0094] 在一个实施方案中，所述第二部分为所述脂质纳米颗粒群体的约0.1-5％。

[0095] 在一个实施方案中，丝裂霉素C的亲脂性前药缀合物是对二硬脂酰-DTB-丝裂霉素C。

[0096] 在一个实施方案中，囊泡形成脂质体是HSPC。

[0097] 在一个实施方案中，任选的脂质组分包括mPEG2000-DSPE。

[0098] 在一个实施方案中，任选的脂质组分包括胆固醇和mPEG2000-DSPE。

[0099] 在一个实施方案中，脂质体包含HSCP、胆固醇、mPEG2000-DSPE和对二硬脂酰-DTB-丝裂霉素C，其中HSCP/胆固醇/mPEG2000-DSPE/对二硬脂酰-DTB-丝裂霉素C以55/30/5/10的摩尔比存在。

III.治疗方法

[0100] 一方面，提供了一种治疗癌症的方法。该方法包括提供由悬浮在药学上可接受的媒介物中的脂质纳米颗粒群体组成的脂质体组合物，所述脂质纳米颗粒群体由第一部分球形脂质体和第二部分棒状脂质纳米颗粒组成，其中所述第二部分少于所述脂质纳米颗粒群体的约15％；并且以提供丝裂霉素C的治疗有效量的量向有此需要的患者施用脂质体以治疗癌症。

[0101] 在一个实施方案中，球形脂质体包含囊泡形成脂质、丝裂霉素C的亲脂性前药和任选的脂质组分。

[0102] 在一个实施方案中，脂质纳米颗粒群体通过包括将囊泡形成脂质、丝裂霉素C的亲脂性前药和任选的脂质组分溶解在由乙醇和叔丁醇以乙醇/叔丁醇比例(v/v)为约2:1至20:1组成的溶剂混合物中的方法来制备。在一些实施方案中，乙醇/叔丁醇比例(v/v)为约5:1至20:1。在一些实施方案中，乙醇/叔丁醇比例(v/v)为约5:1至20:1。在一些实施方案中，乙醇/叔丁醇比例(v/v)为约9:1。

[0103] 在一个实施方案中，组合物中所述丝裂霉素C的亲脂性前药的量是所述囊泡形成脂质、丝裂霉素C的亲脂性前药和任选的脂质组分的总摩尔的以摩尔计大于5％但少于30％，例如大于5％但少于20％。在一些实施方案中，所述丝裂霉素C的亲脂性前药的量是所述囊泡形成脂质、丝裂霉素C的亲脂性前药和任选的脂质组分的总摩尔的以摩尔计约8、9、10、11或12％。

[0104] 在又一个实施方案中，任选的脂质组分选自胆固醇和附接至亲脂性部分的聚乙二醇的缀合物。

[0105] 在一个实施方案中，丝裂霉素C的亲脂性前药的量是脂质的总摩尔的以摩尔计大于5％但少于30％。在一些实施方案中，丝裂霉素C的亲脂性前药的量是脂质体的总摩尔的以摩尔计约10％。

[0106] 在一个实施方案中，乙醇/叔丁醇比例(v/v)为约5:1至20:1或为约7:1至15:1。在一个实施方案中，乙醇/叔丁醇比例(v/v)为约9:1。

[0107] 在一个实施方案中，所述第二部分少于所述脂质纳米颗粒群体的约5％。

[0108] 在一个实施方案中，所述第二部分为所述脂质纳米颗粒群体的约0.1-5％。

[0109] 在一个实施方案中，丝裂霉素C的亲脂性前药缀合物是对二硬脂酰-DTB-丝裂霉素C。

[0110] 在一个实施方案中，囊泡形成脂质体是HSPC。

[0111] 在一个实施方案中，任选的脂质组分包括mPEG2000-DSPE。

[0112] 在一个实施方案中，任选的脂质组分包括胆固醇和mPEG2000-DSPE。

[0113] 在一个实施方案中，脂质体包含HSCP、胆固醇、mPEG2000-DSPE和对二硬脂酰-DTB-丝裂霉素C，其中HSCP/胆固醇/mPEG2000-DSPE/对二硬脂酰-DTB-丝裂霉素C以55/30/5/10的摩尔比存在。

[0114] 在一个实施方案中，向有此需要的患者施用脂质体包括结合(第二)化疗剂施用所述脂质体。第二化疗剂不是脂质体丝裂霉素C前药或丝裂霉素C或非脂质体丝裂霉素C前药。预期与脂质体丝裂霉素C前药结合使用的化疗剂不限于任何特定化合物或化合物类别。基于下文讨论的研究，已经发现脂质体-丝裂霉素C前药与某些化疗剂组合施用产生协同作用。

[0115] 在一个实施方案中，与脂质体-丝裂霉素C前药组合施用的化疗剂是吉西他滨。吉西他滨是分配给2'-脱氧-2',2'-二氟-胞苷的通用名称。它可以作为单盐酸盐和β-异构体商购获得。它在化学上也被称为1-(4-氨基-2-氧代-1H-嘧啶-1-基)-2-脱氧-2,2-二氟核糖。吉西他滨在美国专利号4,808,614和5,464,826中公开，其关于如何合成、配制和使用吉西他滨用于治疗易感肿瘤的教导通过引用并入本文。盐酸吉西他滨的商业制剂被指示为局部晚期(不可切除的II期或III期)或转移性(IV期)胰腺腺癌患者的一线治疗，并与顺铂或卡铂组合用于非-小细胞肺癌和膀胱癌患者。

[0116] 在另一个实施方案中，与脂质体-丝裂霉素C前药组合施用的化疗剂是长春花生物碱，例如长春碱、长春瑞滨、长春新碱或长春地辛。

[0117] 在另一个实施方案中，与脂质体-丝裂霉素C前药组合施用的化疗剂是蒽环类抗生素，例如阿霉素或柔红霉素。这些蒽环类药物广泛用于人类癌症化疗。并引起DNA损伤例如碎片化和单链断裂。蒽环类的作用机制包括抑制RNA和DNA合成。在一个实施方案中，阿霉素或柔红霉素以脂质体包裹的形式提供。聚乙二醇化的脂质体包裹的阿霉素以商品名**DOXIL®**、**CAELYX®**和**LIPODOX®**为人所知，并且脂质体包裹的柔红霉素以商品名**DAUNOXOME®**为人所知。

[0118] 在另一个实施方案中，与脂质体-丝裂霉素C前药组合施用的化疗剂是紫杉烷。紫杉烷是由红豆杉属植物(紫衫)产生的二萜，并广泛用作化疗剂。紫杉烷剂包括紫杉醇(**TAXOL®**)和多西他赛(**TAXOTERE®**)。

[0119] 在另一个实施方案中，与脂质体丝裂霉素C前药组合施用的化疗剂是氟嘧啶。氟嘧啶类是一种抗代谢药物，广泛用于治疗癌症，包括结肠直肠癌和乳腺癌以及呼吸消化道的癌症。氟嘧啶类包括药物5-氟尿嘧啶(5-FU)和5-FU的前药，例如卡培他滨和替加氟。在一个实施方案中，与脂质体丝裂霉素C前药组合施用的氟嘧啶化疗剂是5-FU的前药，例如卡培他滨。卡培他滨是一种具有抗肿瘤活性的氟嘧啶氨基甲酸酯。它是5'-脱氧-5-氟尿苷(5'-DFUR)的口服施用全身性前药，其转化为5-氟尿嘧啶。卡培他滨的化学名称是5'-脱氧-5-氟-N-[(戊氧基)羰基]-胞苷。它在美国以XELODA®(Roche Laboratories)销售。它适用于通过口服途径治疗转移性乳腺癌和结肠直肠肿瘤患者。卡培他滨描述于美国专利号5,472,949中。

[0120] 安全有效地施用这些化疗剂的方法是本领域技术人员已知的。此外，它们的施用在标准文献中有所描述。例如，在"Physicians' Desk Reference"(PDR)，例如1996年版(Medical Economics Company,Montvale,N.J.)中描述了许多化疗剂的施用。

[0121] 当脂质体-丝裂霉素C前药与至少一种其他试剂组合施用时，所述至少一种其他试剂可以在同一制剂中共同施用。可替代地，可以在单独的制剂中同时(同时地)施用各种试剂。此外，试剂可以在单独的制剂中施用，其中单独的制剂不是同时施用而是在施用之间以极少时间间隔或没有时间间隔立即顺序地施用，或者在同一治疗期间顺序地施用，例如在治疗期间每天或每周施用。

[0122] 因此，在本发明的方法中，脂质体-丝裂霉素C前药与第二化疗剂"组合"施用是指共同施用，其可以是指同时地、顺序地或交替地施用。同时施用是指脂质体-丝裂霉素C前药和第二化疗剂两者在基本上相同的时间施用。可以通过单一的、组合的制剂实现同时施用，制剂包含彼此物理相关联的产生有效量的丝裂霉素C的一定量的脂质体-丝裂霉素C前药和一定量的第二化疗剂两者。单一的、组合的制剂可以由包含一定量的脂质体-丝裂霉素C前药和第二化疗剂两者的液体混合物组成，其可以注射到受试者中。将一定量的脂质体-丝裂霉素C前药和一定量的第二化疗剂从分开的单独制剂同时施用给受试者也在本方法的范围内。例如，脂质体-丝裂霉素C前药可以经由注射施用，并且一定量的第二化疗剂可以口服或经由与脂质体-丝裂霉素C前药注射所用的不同或相同的注射途径施用。

[0123] 在本文描述的方法中，脂质体-丝裂霉素C前药和第二化疗剂也可以从间隔一段时间的分开的、单独的制剂共同施用给受试者，以获得组合的最大功效。每种药物的施用时间范围可以从短暂、快速施用到连续灌注。当间隔一段时间时，脂质体-丝裂霉素C前药和第二化疗剂的共同施用可以是顺序的或交替的。对于顺序共同施用，分开施用一种试剂，然后是另一种。例如，可以完成使用脂质体-丝裂霉素C前药治疗的完整疗程，然后可以接着是使用第二化疗剂治疗的完整疗程。可替代地，对于顺序共同施用，可以完成使用第二化疗剂治疗的完整疗程，然后接着是使用脂质体-丝裂霉素C前药治疗的完整疗程。对于交替的共同施用，使用脂质体-丝裂霉素C前药治疗的部分疗程可以与使用第二化疗剂治疗的部分疗程交替，直到每种药物的全部治疗都已施用。

[0124] 在一个实施方案中，向有此需要的患者施用脂质体包括结合放射疗法施用所述脂质体。放射疗法使用高能放射来破坏和/或杀死癌细胞并缩小肿瘤。高能放射可以包括X射线、伽马射线或带电粒子。放射疗法可以由放置在体外的机器进行递送(外束放射疗法)，或来自放置在体内靠近癌细胞的放射性物质(内部放射疗法，也称为短距离放射疗法)。全身

性放射疗法使用放射性物质，例如放射性碘，其在血液中传送以杀死癌细胞。

[0125] 因此，在一个实施方案中，放射疗法意指外部放射疗法，其中放射来自体外的仪器。外部放射疗法通常是数天或数周内多次治疗的过程，并且在治疗期间，机器将高能放射(通常是X射线)引导至癌症部位及其周围正常组织的小区域。

[0126] 在另一个实施方案中，放射疗法意指内部放射疗法，其中放射来自放置在体内的植入物或材料(液体、固体、半固体或其他物质)。在一个实施方案中，内部放射疗法是短距离放射疗法，其中将固体放射源放置在体腔内或将针放置在肿瘤中。在另一个实施方案中，内部放射疗法包括施用液体放射源，通常是放射性核素(放射性同位素或未密封源)。放射源可以口服施用或注射到静脉中。

IV.示例性研究

[0127] 在第一项研究中，如实施例1所述，将丝裂霉素C的前药缀合物掺入的脂质体递送平台中。通过包括将HSCP/胆固醇/mPEG2000-DSPE/对二硬脂酰-DTB-丝裂霉素C溶解在具有不同比例(v/v)的乙醇/叔丁醇的溶剂混合物中的方法来制备脂质体。脂质体样品使用cryo-TEM进行成像。除非另有说明，否则HSCP/胆固醇/mPEG2000-DSPE/对二硬脂酰-DTB-丝裂霉素C以55/30/5/10(75.5mg/ml脂质和12.5mg/ml前药)的摩尔比存在。

[0128] 图1A-1D是脂质体的cryo-TEM图像，所述脂质体是通过包括将HSPC/胆固醇/mPEG2000-DSPE/对二硬脂酰-DTB-丝裂霉素C溶解在具有乙醇/叔丁醇比例(v/v)为50:50(图1D)、75:25(图1C)、90:10(图1A)或100:0(图1B)的溶剂中的方法制备的。Cryo-TEM图像分析表明，叔丁醇含量越高，形成的棒状颗粒越多。当溶剂混合物中叔丁醇为50％时，形成的棒状颗粒比当叔丁醇为25％时更多。当溶剂混合物中叔丁醇为10％时，实际上没有检测到棒状物。

[0129] 在另一项研究中，对丝裂霉素C的脂质体前药缀合物进行体外DTT诱导的释放/活化测定。图2A-2B显示了通过包括将HSPC/胆固醇/mPEG2000-DSPE/对二硬脂酰-DTB-丝裂霉素C溶解在具有乙醇/叔丁醇比例(v/v)为50:50的溶剂中的方法制备的脂质体与通过包括将HSPC/胆固醇/mPEG2000-DSPE/对二硬脂酰-DTB-丝裂霉素C溶解在100％(图2A)或90％乙醇(图2B)中的方法制备的脂质体相比，对DTT诱导的裂解更敏感。

[0130] 在另一项研究中，对小鼠进行了药代动力学研究。本研究旨在测量静脉内施用通过包括将HSPC/胆固醇/mPEG2000-DSPE/对二硬脂酰-DTB-丝裂霉素C溶解在具有乙醇/叔丁醇比例(v/v)为50:50、90:10或100:0的溶剂中的方法制备的脂质体给小鼠，对二硬脂酰-DTB-丝裂霉素C的血浆水平。图3A-3C显示了丝裂霉素C前药的血浆水平在注射后3小时相当，但在24小时时差距(>3倍)打开，使用低含量叔丁醇制备的批次更利，表明通过使用低含量或不含叔丁醇制备的脂质体递送丝裂霉素C前药的血浆水平更高且循环时间更长。

[0131] 图4是柱状图，显示在静脉内施用后24小时的脂质体丝裂霉素C(MLP)前药的小鼠血浆水平，以静脉内施用通过包括将HSPC/胆固醇/mPEG2000-DSPE/对二硬脂酰-DTB-丝裂霉素C溶解在具有乙醇/叔丁醇比例(v/v)为50:50、90:10或100:0的溶剂中的方法制备的脂质体给小鼠后的Cmax的百分比表示(Cmax通常在静脉注射包含MLP的脂质体制剂后第1小时内达到)。由具有乙醇/叔丁醇的比例(v/v)为90:10的溶剂制备的脂质体在24小时具有最高的Cmax百分比。

[0132] 图5A和5B是显示脂质体丝裂霉素C前药的制剂的体外血浆稳定性的图，该制剂是

通过包括将脂质体组分溶解在具有乙醇/叔丁醇比例(v/v)为50:50(图5A)或90:10(图5B)的溶剂中的方法制备的。该体外血浆稳定性测定显示tBuOH-高和tBuOH-低之间没有差异，表明棒状脂质纳米颗粒的存在不影响脂质体丝裂霉素C前药的血浆稳定性。

[0133] 图6显示了在IV注射脂质体丝裂霉素C前药后24小时的时间点，每个肿瘤中脂质体丝裂霉素C前药(MLP)的浓度(MLP(μg)/肿瘤(g))，所述脂质体丝裂霉素C前药是通过包括将脂质体组分溶解在具有乙醇/叔丁醇比例(v/v)为90/10或50/50溶剂中的方法制备的。用于制备脂质体丝裂霉素C前药的乙醇/叔丁醇比例(v/v)可以影响脂质体丝裂霉素C前药被肿瘤的吸收。通过使用具有乙醇/叔丁醇比例(v/v)为90/10或50/50的溶剂制备的脂质体丝裂霉素C前药IV注射24小时后，肿瘤中脂质体丝裂霉素C前药的浓度在统计学上显著高于通过使用乙醇/叔丁醇比例(v/v)为90/10的溶剂制备的脂质体丝裂霉素C前药。对于使用乙醇/叔丁醇比例为50:50制备的脂质体，MLP的中值浓度为1.63μg/g肿瘤，在1.20-9.76μg/g肿瘤的范围内。对于使用乙醇/叔丁醇比例为90:10制备的脂质体，MLP的中值浓度为6.51μg/g肿瘤，在4.23-9.71μg/g肿瘤的范围内。因此，在施用具有减少的棒状脂质纳米颗粒群体的脂质体组合物后，肿瘤中存在更高浓度的MLP。

[0134] 进行另一项研究以证明棒状脂质体有助于对体外裂解的高敏感性和体内快速清除。在这项研究中，制备了两种具有脂质体丝裂霉素C前药(MLP)的组合物。除了一种组合物具有20％PEG-脂质而不是5％PEG-脂质之外，两种组合物的制备相同。增加PEG-脂质的量促进胶束盘和棒的形成(Sandstrom,M.C.等人,Langmuir,23(8):4192(2007);Zhang,W.等人,European Journal of Pharmaceutical Sciences,125:74-85(2018))。两种组合物的TEM检查证实具有25％PEG-脂质的组合物富含棒状脂质体。使用实施例2中描述的释放测定法在体外测试了两种组合物。具有大部分是棒状脂质体的组合物(即，具有25％PEG-脂质的组合物)对用二硫苏糖醇的裂解更敏感。根据实施例3的方法，在体内测试这两种组合物以评估血浆清除。具有大部分是棒状脂质体的组合物(即，具有25％PEG-脂质的组合物)比根据本文所述的方法制备的具有小部分(例如，小于约15％)的棒状脂质体的脂质体更快地从循环中清除。

## V.实施例

[0135] 以下实施例本质上是说明性的，决不是限制性的。

实施例1

脂质体丝裂霉素C前药制备

[0136] 在实施例2中如美国专利号6,365,179中所述合成可释放地附接至亲脂性部分的丝裂霉素C的前药缀合物，对二酰基二甘油二硫代亚苄(para-diacyldiglyceroldithiobenzal)-丝裂霉素C，该专利以引用方式并入本文。

[0137] 将摩尔比分别为55:30:5:10的HSPC、胆固醇、mPEG2000-DSPE和对二酰基二甘油二硫代苄基-丝裂霉素C的混合物溶解在乙醇/叔丁醇(50:50、75:25、90:10或100:0)中并与5％右旋糖/磷酸钠缓冲液20mM，pH 7.0以20:80v/v比例混合。在65℃下将脂质体悬浮液在高压下挤出通过堆叠的0.08或0.10μm孔径的聚碳酸酯膜。通过透析或针对缓冲液的渗滤去除有机溶剂。将脂质体制剂调节至5mg/mL的最终前药浓度，并通过0.22μm膜进行无菌过滤。

[0138] 脂质体的图像是使用cryo-TEM获得的。(图1B)是使用乙醇/叔丁醇比例(v/v)为

50:50(图1D)、75:25(图1C)、90:10(图1A)或100:0(图1B)的溶剂制备的脂质体的cryo-TEM图像。

实施例2

从脂质体进行丝裂霉素C的DTT诱导的裂解

[0139] 活性丝裂霉素C(MMC)从脂质体制剂中的释放通过MLP(丝裂霉素C的脂质体前药)的减少而发生。通过用强还原剂二硫苏糖醇(DTT)处理并测定MLP的剩余量和释放的游离丝裂霉素C,在MLP的批次(使用100％、90％或50％EtOH制备)中进行检测。

[0140] 开发了一种通过与DTT温育来证明MMC从MLP中释放的测定法,以验证从前药的持续药物释放。将500μg的MLP(0.1ml)与各种浓度的DTT在37℃振荡温育1小时。通过稀释终止反应并使用异丙醇(1:10)进行药物提取。通过HPLC对MLP和MMC进行定量。药物提取后,将上清液过滤并在LaChrom Merck Hitachi HPLC系统上运行,该系统配备有Phenomenex Hypersil BDS C18柱;130A150×4.60mm 5μm,在由甲醇:异丙醇70/30组成的流动相中,流速为1ml/min,使用在360nm处的UV检测。这些条件下的MLP保留时间为5.5min。MMC保留时间接近前沿,在1.5min。对峰面积进行定量并与MLP的标准曲线进行比较。

[0141] 图2A和2B显示了DTT诱导的丝裂霉素C从脂质体的裂解,所述脂质体是从使用乙醇/叔丁醇比例(v/v)为50:50、90:10和100:0的溶剂制备的。

实施例3

体内药代动力学研究

[0142] 测试了MLP脂质体的药代动力学,所述MLP脂质体由使用具有乙醇/叔丁醇比例(v/v)为50:50、90:10或100:0的溶剂制备。向3-4只Sabra小鼠(图3A-3C)或BalbC小鼠(图4)的组IV注射35mg/kg这些批次中的每一个的脂质体MLP。脂质体注射后3小时或24小时,用异氟烷麻醉小鼠,从眶后静脉窦放血到含有肝素的管中,然后处死。通过在3000rpm离心15min来分离血浆,并在IPA中以1:10提取,然后通过离心去除蛋白质。如上所述通过HPLC分析上清液的MLP含量。

[0143] 图3A-3D显示了在静脉内施用从使用具有乙醇/叔丁醇比例(v/v)为50:50、90:10或100:0的溶剂制备的脂质体后,小鼠中丝裂霉素C前药的血浆水平作为时间的函数。

[0144] 图4显示了将从使用具有乙醇/叔丁醇比例(v/v)为50:50、90:10或100:0的溶剂制备的脂质体静脉内施用给小鼠后24小时,以Cmax百分比表示的丝裂霉素C前药的小鼠血浆水平。

实施例4

体外血浆稳定性

[0145] 使用乙醇/叔丁醇(90/10,v/v)制备的批次的温育不影响脂质体丝裂霉素C前药(“MLP”)的血浆稳定性特征谱。MLP的HPLC测定证实在两个批次中,在37℃下暴露于80％人血浆24h期间,它保持约100％完整。在37℃下在血浆中温育24h的两批MLP的凝胶色谱洗脱特征谱。脂质体洗脱在5-7部分中;血浆蛋白主要洗脱在8-13部分中。对于任何制剂,均未观察到MLP显著渗漏至蛋白质和低分子量部分。参见图5A和图5B。

实施例5

脂质体丝裂霉素C前药在肿瘤中的体内摄取

[0146] 通过将脂质(HSPC和MLP(HSPC:胆固醇:mPEG-DSPE:MLP,摩尔比55:30:510)溶解在

乙醇/叔丁醇比例为50:50v/v或乙醇/叔丁醇比例为90:10v/v的溶剂混合物中来制备含有MLP脂质体的两种制剂。然后处理这些制剂以生成具有浓度为5mg/mL的MLP的脂质体悬浮液。

[0147] 8-10周龄的BALB/c雌性小鼠皮下接种M109肿瘤细胞(每只小鼠100万个细胞)。肿瘤接种后20天,将携带可触及肿瘤的小鼠分为两组,并且每组IV注射脂质体组合物(乙醇/叔丁醇50:50和乙醇/叔丁醇90:10)的30mg/kg脂质体MLP。脂质体注射后24小时,处死小鼠。对于MLP的组织提取,将重约140-200mg的组织样品(包括肿瘤)在0.5mL(最终体积)的异丙醇中匀浆并以3000rpm离心15分钟。过滤上清液并在HPLC系统上运行以测定每个肿瘤中MLP的浓度(MLP(μg)/肿瘤(g))。结果示于图6中。

[0148] 虽然上面已经讨论了多个示例性方面和实施方案,但是本领域技术人员将认识到其某些修改、排列、添加和子组合。因此,以下所附权利要求和下文介绍的权利要求旨在解释为包括在其真实精神和范围内的所有此类修改、排列、添加和子组合。

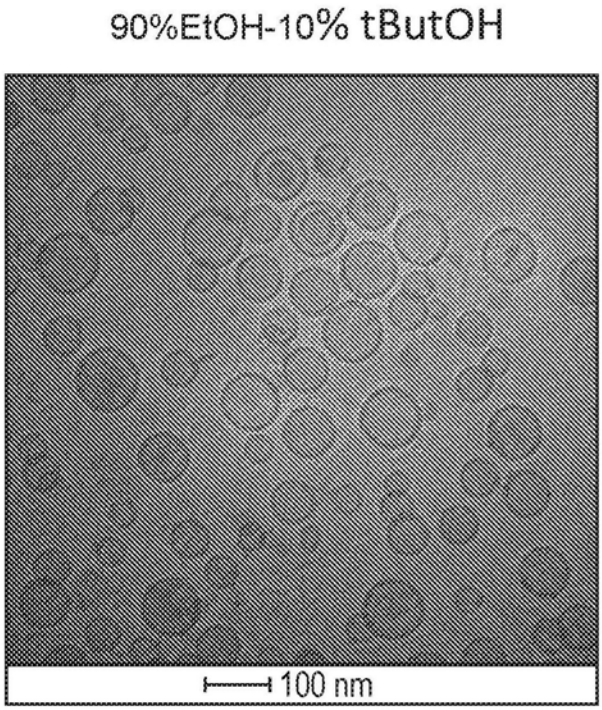



图1A

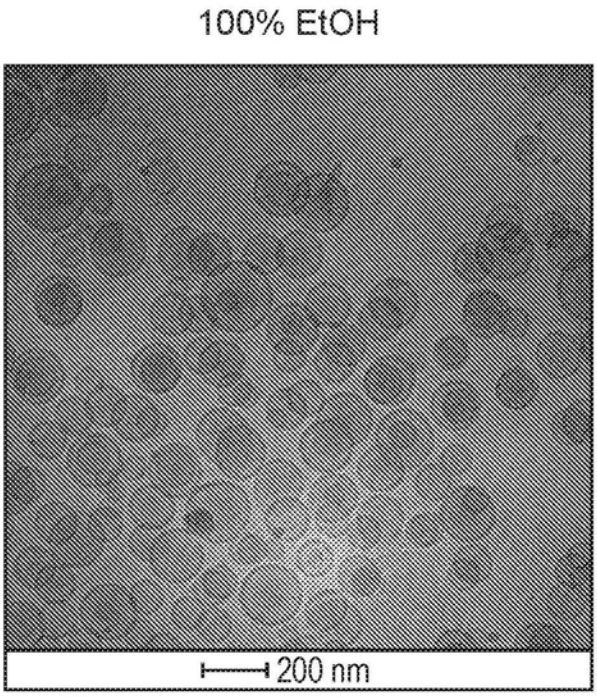



图1B

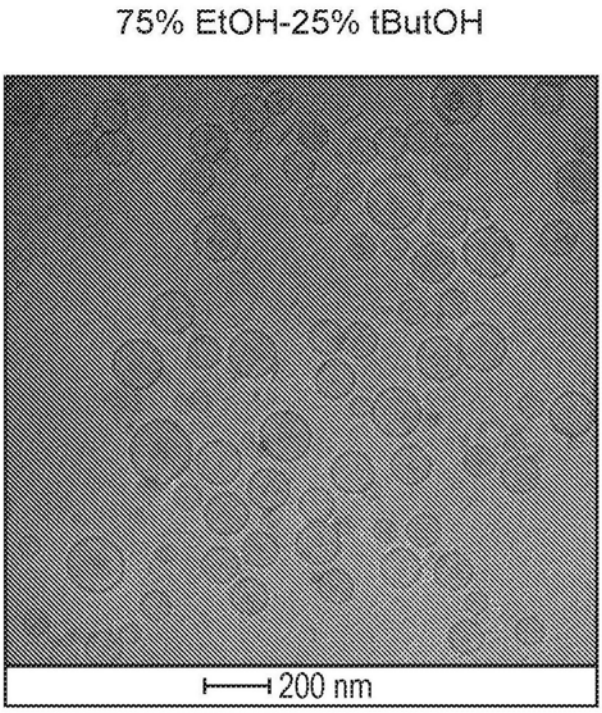



图1C

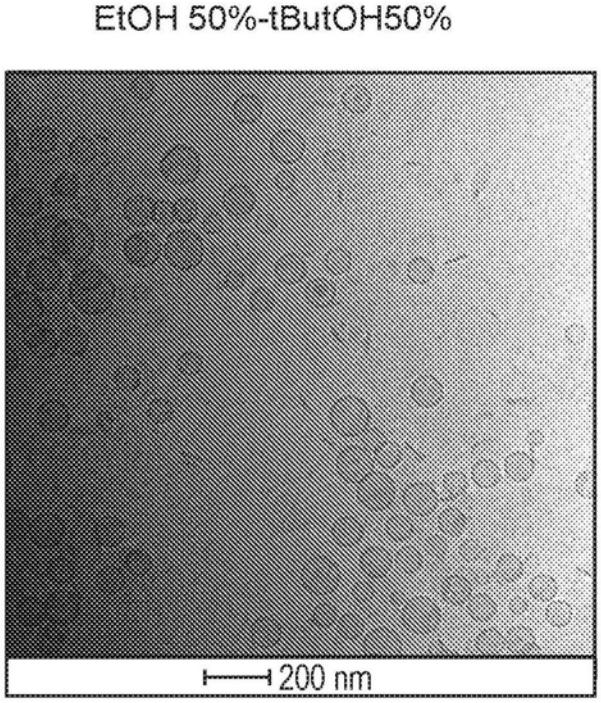



图1D

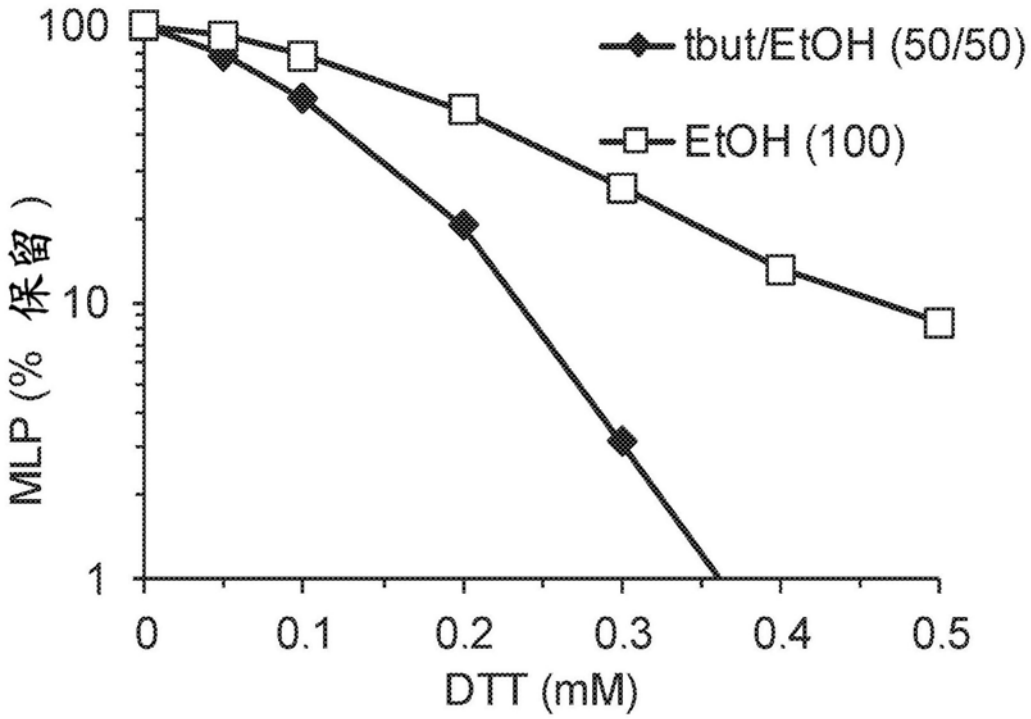

100
10
1
MLP (% 保留)
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
DTT (mM)
tbut/EtOH (50/50)
EtOH (100)

图2A

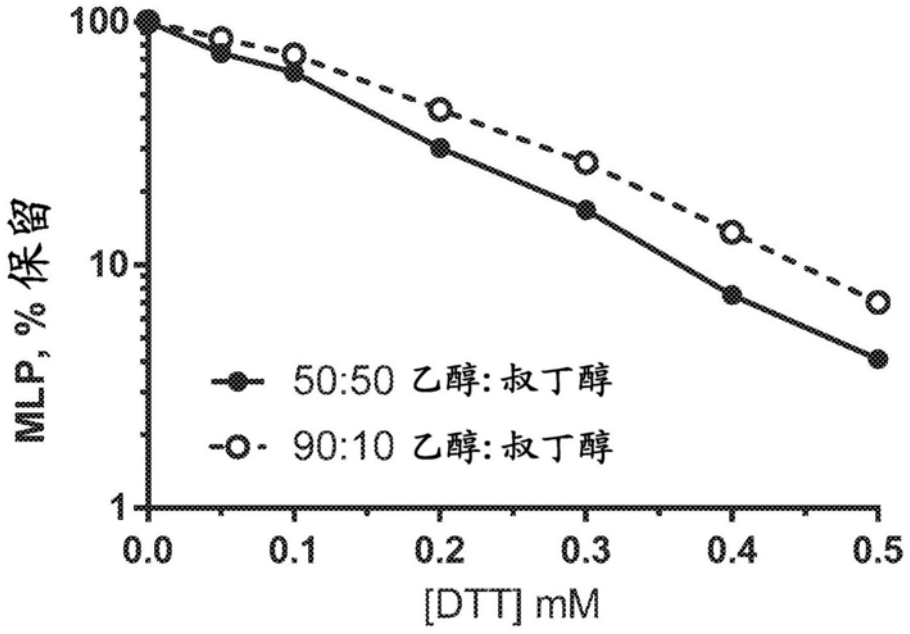

100
10
1
MLP, % 保留
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
[DTT] mM
50:50 乙醇:叔丁醇
90:10 乙醇:叔丁醇

图2B

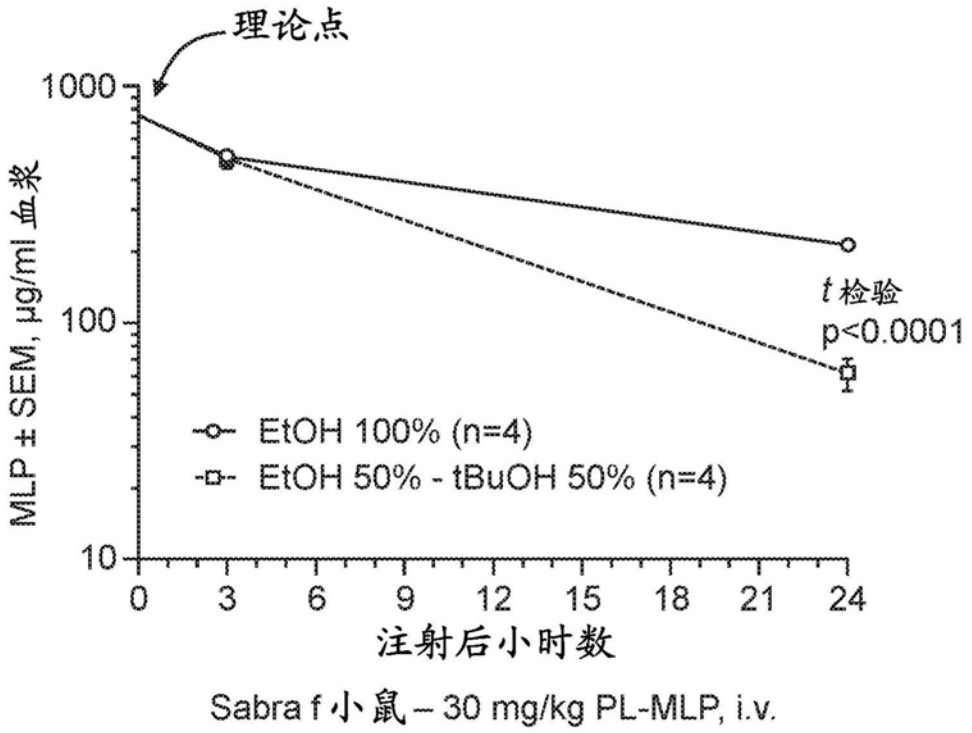

理论点
1000
100
10
MLP ± SEM, µg/ml 血浆
t 检验
p<0.0001
EtOH 100% (n=4)
EtOH 50% - tBuOH 50% (n=4)
0
3
6
9
12
15
18
21
24
注射后小时数
Sabra f 小鼠 – 30 mg/kg PL-MLP, i.v.

图3A

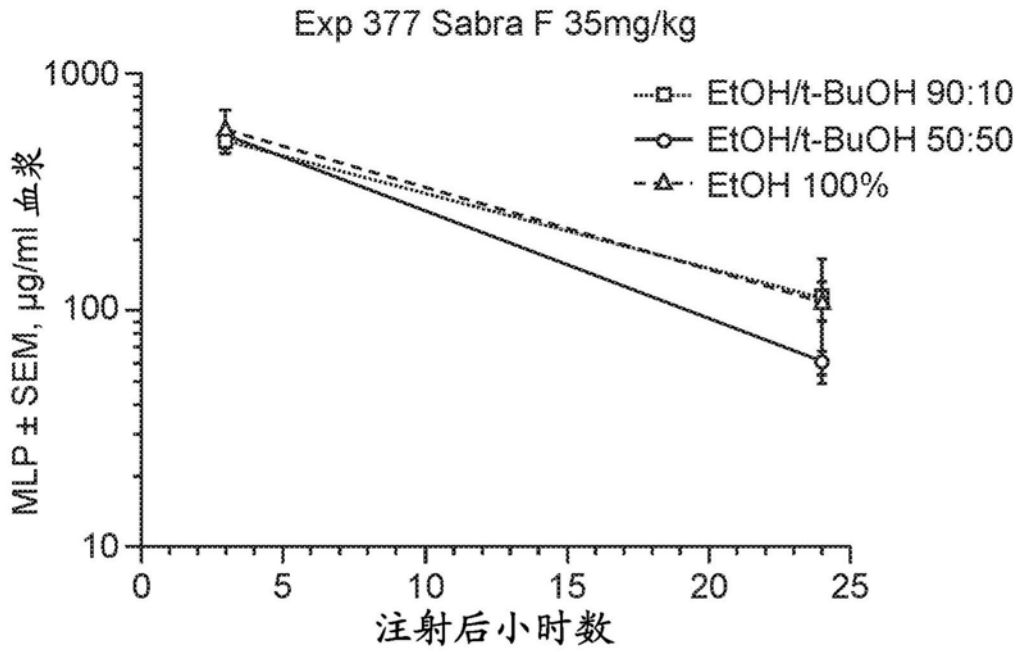

Exp 377 Sabra F 35mg/kg
1000
100
10
MLP ± SEM, µg/ml 血浆
EtOH/t-BuOH 90:10
EtOH/t-BuOH 50:50
EtOH 100%
0
5
10
15
20
25
注射后小时数

图3B

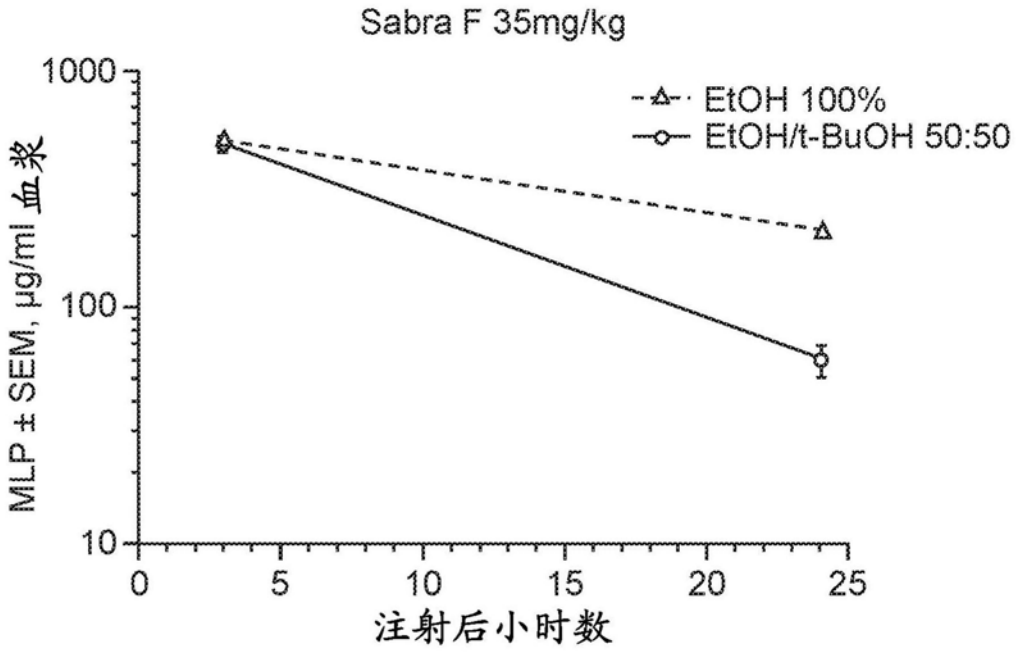

Sabra F 35mg/kg
EtOH 100%
EtOH/t-BuOH 50:50
MLP ± SEM, µg/ml 血浆
1000
100
10
0
5
10
15
20
25
注射后小时数

图3C

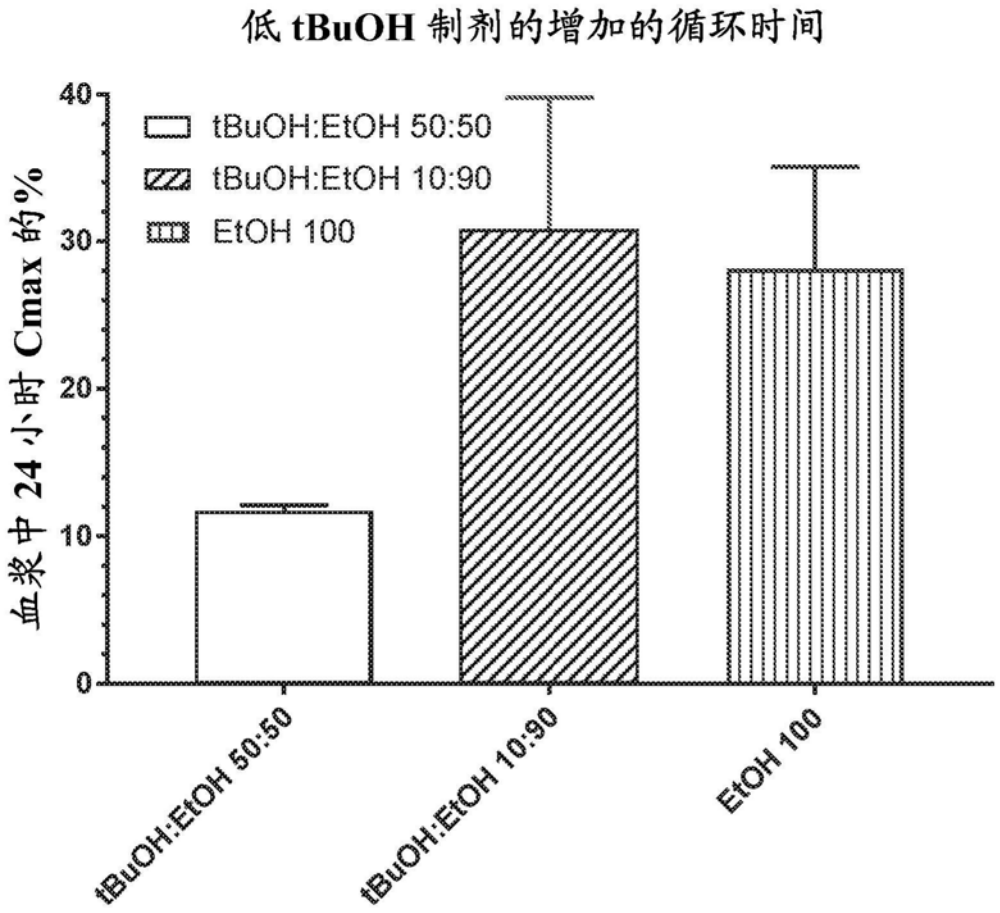

低 tBuOH 制剂的增加的循环时间
tBuOH:EtOH 50:50
tBuOH:EtOH 10:90
EtOH 100
血浆中 24 小时 Cmax 的%
40
30
20
10
0
tBuOH:EtOH 50:50
tBuOH:EtOH 10:90
EtOH 100

图4

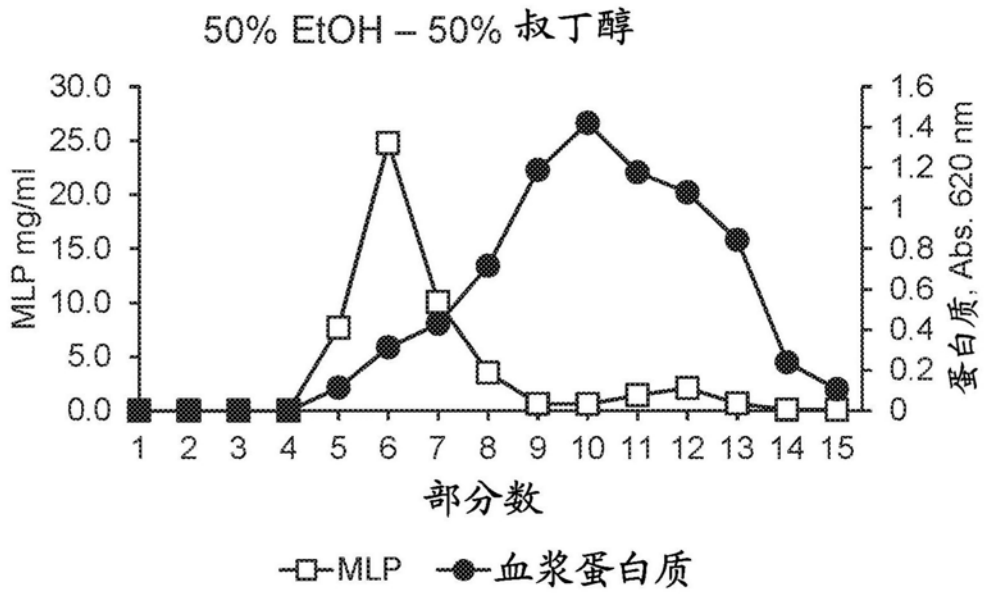

50% EtOH – 50% 叔丁醇
MLP mg/ml
蛋白质, Abs. 620 nm
部分数
MLP
血浆蛋白质

图5A

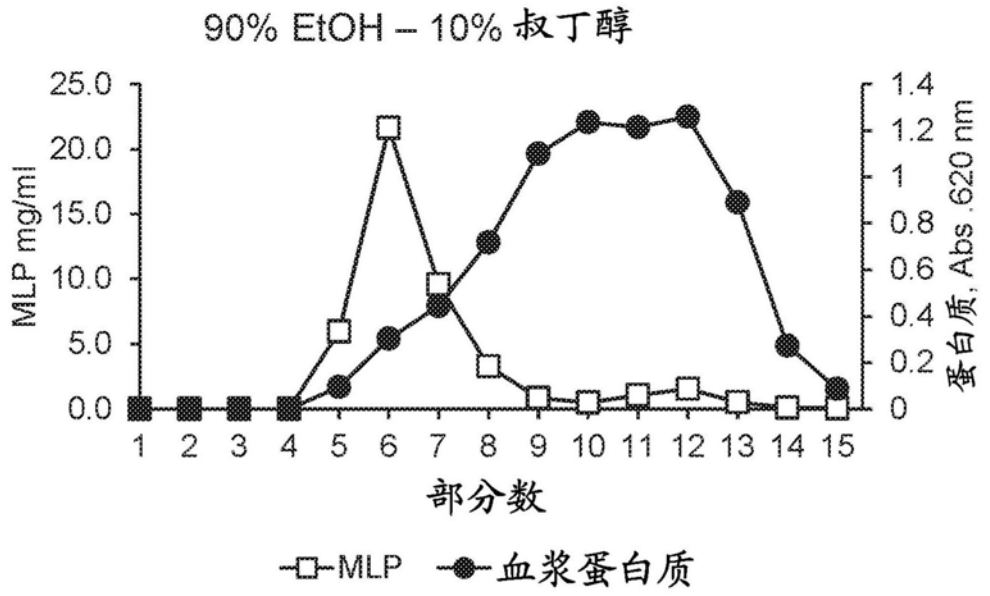

90% EtOH – 10% 叔丁醇
MLP mg/ml
蛋白质, Abs .620 nm
部分数
MLP
血浆蛋白质

图5B

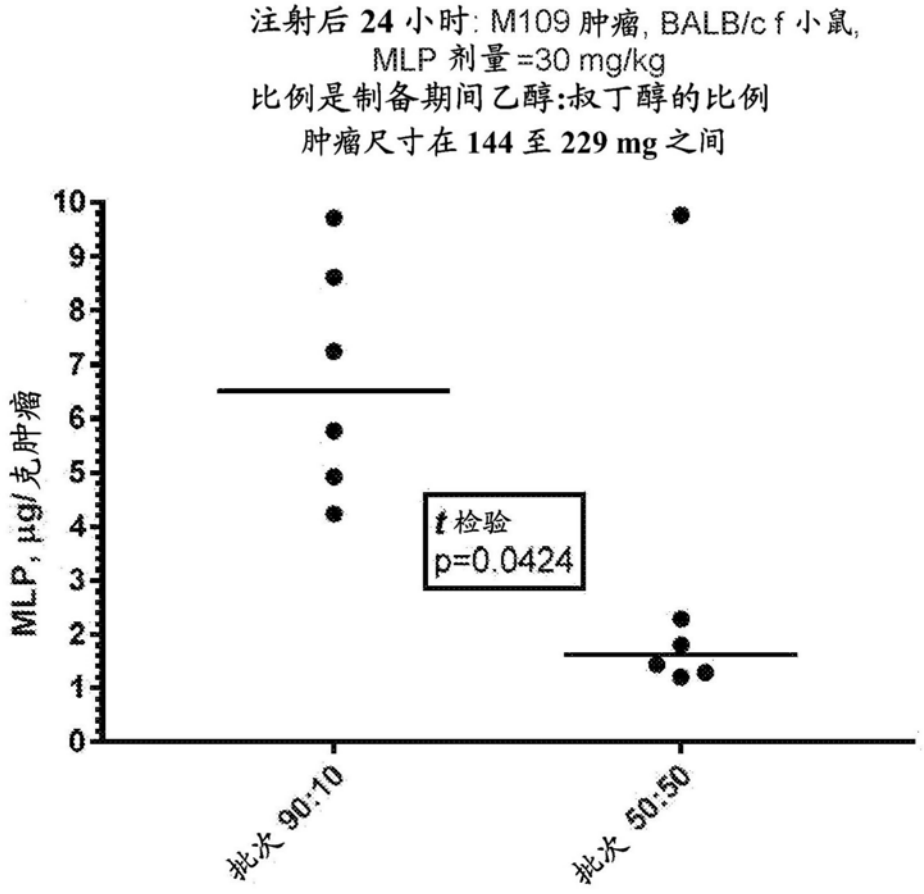

注射后 24 小时: M109 肿瘤, BALB/c f 小鼠,
MLP 剂量 =30 mg/kg
比例是制备期间乙醇:叔丁醇的比例
肿瘤尺寸在 144 至 229 mg 之间
MLP, μg/克肿瘤
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
t 检验
p=0.0424
批次 90:10
批次 50:50

图6