



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1679957 B

(45) 授权公告日 2010.06.09

(21) 申请号 200510053892.2

(22) 申请日 2005.03.14

(30) 优先权数据

073572/04 2004.03.15 JP

(73) 专利权人 尼普洛株式会社

地址 日本国大阪府

(72) 发明人 木村聪城郎 桧垣和孝

大河原贤一 甲斐俊哉 横江淳一

樱木志保 佐藤诚

(74) 专利代理机构 北京三幸商标专利事务所

11216

代理人 刘激扬

(51) Int. Cl.

A61K 45/08(2006.01)

A61K 9/127(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(56) 对比文件

US 4565696 A, 1986.01.21, 说明书全文.

JP 特表 2003-534387 A, 2003.11.18, 说明书全文.

US 5780054 A, 1998.07.14, 第 11-12 栏, 第

7 栏第 31-33 行, 第 11 栏第 6-8 行.

US 5013556 A, 1991.05.07, 摘要.

US 5264221 A, 1993.11.23, 摘要.

刘晓波等. 阿霉素人血清白蛋白微球的制备及其性质的初步研究. 四川大学学报(医学版) 35 1. 2004, 35(1), 摘要.

周平红等. 脂质体阿霉素及其靶向治疗研究进展. 中国临床医学 9 4. 2002, 9(4), 第 331 页.

审查员 陈红霞

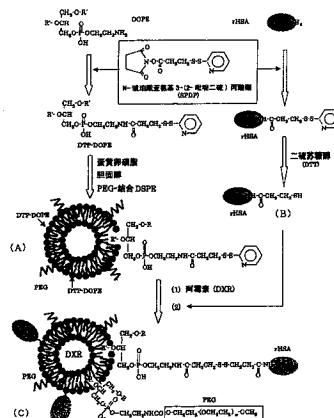
权利要求书 1 页 说明书 15 页 附图 2 页

(54) 发明名称

含脂质体的癌症治疗用药物组合物

(57) 摘要

本发明提供一种含有抗肿瘤活性物质的脂质体制剂,其抗肿瘤活性物质在血液中的滞留性、向肿瘤细胞的迁移性更加提高,在心脏中的残留性等副作用降低。一种用于治疗癌症的药物组合物,其特征在于包括含有抗肿瘤活性物质的、与聚二醇类和白蛋白结合的脂质体,能够被大量地摄入到癌细胞中。



1. 一种用于治疗癌症的药物组合物,其特征在于,包括含有抗肿瘤活性物质的、与聚乙二醇和遗传基因重组型人血清白蛋白结合的脂质体,能够被大量地摄入到癌细胞中。
2. 权利要求 1 所述的药物组合物,其中抗肿瘤活性物质为抗肿瘤抗生素。
3. 权利要求 2 所述的药物组合物,其中抗肿瘤抗生素为蒽环霉素类抗生素抗肿瘤药。
4. 权利要求 3 所述的药物组合物,其中蒽环霉素类抗生素抗肿瘤药为阿霉素或其盐酸盐。
5. 权利要求 1 所述的药物组合物,其中白蛋白的含量相对于构成脂质体的总脂类量为 0.0001 ~ 10 摩尔%。
6. 权利要求 1 所述的药物组合物,其中脂质体的体积平均粒径为 10 ~ 5,000nm。
7. 权利要求 1 所述的药物组合物,其中聚乙二醇的分子量为 200 ~ 4,000,000。
8. 权利要求 1 所述的药物组合物,其为注射剂。

含脂质体的癌症治疗用药物组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及含抗肿瘤活性物质的脂质体制剂,其抗肿瘤活性物质表现出优良的肿瘤细胞滞留性和血液中的滞留性。

背景技术

[0002] 脂质体是由双重脂膜形成的脂类囊,其作为各种药物的载体主要围绕注射剂进行研究。

[0003] 但是,已知道的是脂质体是由生物体适应性脂类构成的,由于受免疫系统的异物识别,被摄入以肝脏和脾脏等为代表的细网状内皮系统中,迅速在血液中消失。因此给药后的药物作用不能持久成为最大的缺陷。

[0004] 为了解决这种缺陷,已报道了在脂质体表面上进行糖蛋白和糖脂类化学修饰的方法、使其与葡糖醛酸衍生物结合的方法等,但是还不能实现制剂化。对此,到了二十世纪 90 年代,广泛地进行着这样的研究:通过对脂质体表面上用亲水性聚乙二醇进行化学修饰,使受免疫系统的异物识别减弱,提高了脂质体在血液中的滞留性,从而使药物作用能够持久。

[0005] 现已开发了应用这种技术的脂质体制剂,抗真菌药两性霉素 B、抗癌药阿霉素、柔红霉素、造影剂钆等作为脂质体制剂在市场上有售(非专利文献 1)。最近,对顺铂、长春新碱、喜树碱等抗癌药也在进行广泛的应用研究(非专利文献 2),作为遗传基因治疗时的遗传基因载体的应用也正在研究中。

[0006] 盐酸阿霉素作为抗肿瘤活性物质现在正被广泛地应用。已知该物质静脉内给药后,通过胆汁排泄迅速地从血液中消失,显示出以心脏蓄积为代表的严重副作用。因此,给药该药物时,必须频繁地进行临床检查(血液检查,肝功能·肾功能检查、心功能检查)等,以充分观察患者的状态。

[0007] 到目前为止,为了提高盐酸阿霉素在血液中的滞留性和避免在心脏中蓄积的目的,将该物质封闭在连接聚乙二醇链的脂质体中所形成的制剂已经上市(参见非专利文献 3)。

[0008] 此外,脂质体表面修饰以使药物靶向于癌细胞和肝脏实质细胞为目的的研究也在热烈地进行,已经报道了使其与抗体和转铁蛋白结合来识别癌细胞的方法、与各种糖链结合使其被摄入到肝脏实质细胞中的方法等。在这些化学修饰中,已报道了使用白蛋白作为间隔基团(非专利文献 4)。

[0009] 本发明者们发现封入了各种生理活性物质、并与白蛋白结合的脂质体,其在血液中滞留性显著提高(WO2004-45583A)。

[0010] 但是,还没有有关含有抗肿瘤活性物质并与白蛋白结合的脂质体制剂的研究报道,并且,也没有使抗肿瘤活性物质被摄入到癌细胞中的研究报道。

[0011] 【非专利文献 1】Troy O. Harasym, Marcel B. Bally, Paul Tardi, "Clearance properties of liposomes involving conjugated proteins for targeting", Advanced Drug Delivery Reviews, 1998, vol. 32, p. 99-118.

[0012] 【非专利文献 2】Naoto Oku, Yoshihiro Tokudome, Tomohiro Asai and Hideo Tsukada, “Evaluation of Drug Targeting Strategies and Liposomal Trafficking”, Current Pharmaceutical Design, 2000, vol. 6, p. 1669-1691.

[0013] 【非专利文献 3】Alberto Gabizon, Hilary Shmeeda and Yechezkel Barenholz, “Pharmacokinetics of Pegylated Liposomal Doxorubicin”, Clinical Pharmacokinetics, 2003, 42(5), p. 419-436.

[0014] 【非专利文献 4】小島周二, 曾川祐介, 田尻芳香、山崎登、“シアル酸修飾による糖蛋白質結合リポソームの細網内皮系 (RES) への取り込み抑制と促進に関する検討”, Drug Delivery System. 2002, vol. 17-1, p. 63-68.

发明内容

[0015] 迄今使用脂质体作为药物载体的抗肿瘤制剂在血液中的滞留性和肿瘤细胞中的滞留性还不够好, 还发现严重的副作用。

[0016] 为此需要开发抗肿瘤活性物质的肿瘤细胞滞留性有所提高、且基本上无副作用的脂质体制剂。

[0017] 本发明者们对脂质体制剂进行了深入的研究, 发现如果使封入了盐酸阿霉素 (阿霉素的盐酸盐) 的脂质体表面上同时结合聚乙二醇 (以下, 也简称为 PEG) 链和白蛋白, 不仅脂质体和内封的阿霉素盐酸盐血液中的滞留性协同效应地提高, 而且被大量地摄入到癌细胞中, 进而这种脂质体制剂能够抑制阿霉素在心脏中的蓄积, 同时高浓度地迁移至癌细胞中, 从而发挥心毒性的降低和优良的治疗效果。本发明者们基于这种认识, 进行了各种研究, 结果完成了本发明。

[0018] 也就是说, 本发明涉及:

[0019] (1) 一种用于治疗癌症的药物组合物 (以下, 也会称之为本发明脂质体制剂), 其特征在于包括含有抗肿瘤活性物质的、与聚二醇类和白蛋白结合的脂质体, 能够被大量摄入到癌细胞中;

[0020] (2) 上述 (1) 所述的药物组合物, 其中抗肿瘤活性物质为抗肿瘤抗生素;

[0021] (3) 上述 (2) 所述的药物组合物, 其中抗肿瘤抗生素为蒽环霉素类抗生素抗肿瘤药;

[0022] (4) 上述 (3) 所述的药物组合物, 其中蒽环霉素类抗生素抗肿瘤药为阿霉素或其盐酸盐;

[0023] (5) 上述 (1) 所述的药物组合物, 其中白蛋白为遗传基因重组型人血清白蛋白;

[0024] (6) 上述 (1) 所述的药物组合物, 其中白蛋白的含量相对于构成脂质体的总脂类量约为 0.0001 ~ 10 摩尔%;

[0025] (7) 上述 (1) 所述的药物组合物, 其中脂质体的体积平均粒径为约 10 ~ 5,000nm;

[0026] (8) 上述 (1) 所述的药物组合物, 其中聚二醇类的分子量约为 200 ~ 4,000,000;

[0027] (9) 上述 (1) 所述的药物组合物, 其中聚二醇类为聚乙二醇;

[0028] (10) 上述 (1) 所述的药物组合物, 其为注射剂;

[0029] (11) 一种癌症的治疗方法, 其特征在于将上述 (1) 所述的药物组合物给药;

[0030] (12) 上述 (11) 所述的药物组合物, 其非经口服给药。

附图说明

[0031] 图 1 为给予实施例 1 的脂质体后,比较血液中阿霉素盐酸盐量的曲线示意图。

[0032] 图 2 为给予实施例 1 的脂质体后,比较癌细胞中阿霉素盐酸盐量的曲线示意图。

[0033] 图 3 为实施例 1 的脂质体药物制剂的制备工序的模式图。使 DOPE 与 SPDP 结合,制备 DTP-DOPE,用此 DTP-DOPE 和 PEG 结合 DSPE 作为构成脂类制备模式图 (A) (图中,R'表示油酰基)表示的脂质体。在模式图 (A) 中,仅仅 DTP-DOPE 显示了化学式。在脂质体 (A) 中培育阿霉素盐酸盐(以下简称 DXR),制造含 DTP-DOPE 的 PEG 修饰的封入 DXR 的脂质体。接着,使该脂质体 (A) 与模式图 (B) 表示的 3-巯基丙酰基-rHSA 反应,制备模式图 (C) (图中,R 表示硬脂酰基)表示的 rHSA·PEG 修饰的封入 DXR 的脂质体。在模式图 (C) 中,DTP-DOPE 与 rHSA 的键中,虽然仅 1 个键用化学式进行具体地表示,其它键也相同。此外,对 DSPE 与 PEG 的键,虽然也只有 1 个键用化学式进行具体地表示,但其它键也相同。

具体实施方式

[0034] 本发明的脂质体制剂与已知的仅结合聚乙二醇链的封入抗肿瘤活性物质的脂质体相比,不仅抗肿瘤活性物质在血液中的滞留性显著地提高,且大量地迁移至癌细胞中。这样扩大了治疗窗口,不仅减轻了副作用如阿霉素的肝脏蓄积所致的心毒性,还可以减少抗肿瘤活性物质的给药量,且能够获得长久持续的药理作用。

[0035] 通常,所谓“脂质体”,是指由膜状聚集的脂类和内部水相构成的封闭小胞(参见 D. D. Lasic,“Liposomes:from basic to applications”,Elsevier Science Publishers, pp. 1-171(1993)),但在本发明中,与是否含有内部水相没有特别的关系,脂类是指聚集的全部微粒。此外,对本发明脂质体的结构也没有特别的限制,可以是多层脂质体,也可以是单层膜脂质体。

[0036] 对本发明脂质体制剂中脂质体的大小没有特别的限制,体积平均粒径为约 10 ~ 5,000nm,优选为约 50 ~ 500nm。脂质体的体积平均粒径可以根据动态光散射法等原理求出(参见 D. D. Lasic,“Liposomes:from basic to applications”,Elsevier Science Publishers, pp. 1-171(1993))。

[0037] 对本发明脂质体制剂中的构成脂质体的脂类也没有特别的限制,可以使用已知的脂类。作为上述脂类,可以列举例如磷脂类、糖脂类、脂肪酸、两亲性二烷基二甲基铵(dialkyl dimethylammoniumamphiphiles)、聚甘油烷基醚、聚环氧乙烷烷基醚等(Liposome Technology, 2nd edition, vol. 1, 141, 1993)、烷基糖甙、烷基甲基葡萄糖酰胺(アルキルメチルグルカミド)、烷基蔗糖酯、二烷基聚环氧乙烷醚、二烷基聚甘油醚等(Liposome Technology, 2nd edition, vol. 1, 141, 1993)、聚环氧乙烷-聚乳酸等两亲性嵌段共聚物等(专利表平 6-508831 号公报),长链烷基胺类(十四烷胺、十六烷胺、十八烷胺等)、或者长链脂肪酸酰肼类(肉豆蔻酸酰肼、软脂酸酰肼、硬脂酸酰肼等)等。

[0038] 作为上述磷脂类,可以列举天然或者合成磷脂类,例如磷脂酰胆碱(大豆磷脂酰胆碱、蛋黄磷脂酰胆碱、二月桂酰磷脂酰胆碱、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰胆碱或二硬脂酰磷脂酰胆碱等)、磷脂酰乙醇胺(二油酰磷脂酰乙醇胺、二月桂酰磷脂酰乙醇胺、二肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺或二硬脂酰磷脂酰乙醇胺等)、磷脂

酰丝氨酸（二月桂酰磷脂酰丝氨酸、二肉豆蔻酰磷脂酰丝氨酸、二棕榈酰磷脂酰丝氨酸或二硬脂酰磷脂酰丝氨酸等）、磷脂酸、磷脂酰丙三醇（二月桂酰磷脂酰丙三醇、二肉豆蔻酰磷脂酰丙三醇、二棕榈酰磷脂酰丙三醇或二硬脂酰磷脂酰丙三醇等）、磷脂酰肌醇（二月桂酰磷脂酰肌醇、二肉豆蔻酰磷脂酰肌醇、二棕榈酰磷脂酰肌醇或二硬脂酰磷脂酰肌醇等）、溶血磷脂酰胆碱、神经鞘磷脂、蛋黄卵磷脂、大豆卵磷或者加氢磷脂类等。

[0039] 作为上述糖脂类,可以列举例如甘油糖脂类、鞘糖脂类、甾醇类等。作为上述甘油糖脂类,可以列举二半乳糖二甘油酯类（二半乳糖二月桂酰甘油酯、二半乳糖二肉豆蔻酰甘油酯、二半乳糖二棕榈酰甘油酯或二半乳糖二硬脂酰甘油酯等）、或者半乳糖二甘油酯类（半乳糖二月桂酰甘油酯、半乳糖二肉豆蔻酰甘油酯、半乳糖二棕榈酰甘油酯或半乳糖二硬脂酰甘油酯等）等。作为上述鞘糖脂类,可以列举例如半乳糖脑苷脂、乳糖脑苷脂或者神经节苷脂等。作为上述甾醇类,可以列举例如胆固醇、胆固醇半琥珀酸酯、 3β -[N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)氨甲酰基]胆固醇、麦角甾醇或者羊毛甾醇等。

[0040] 在本发明中,这些脂类可以单独或者两种或更多组合使用。

[0041] 作为本发明中所用的聚二醇类,对其没有特别的限制,优选亚烷基链碳原子数为1~6。此外,亚烷基链可以被不受本发明限制的取代基例如羟基、羧基、氨基、烷氧基等取代。具体例如可以使用聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇等,特别优选使用聚乙二醇。对聚二醇类的分子量没有特别的限制,分子量为约200~4,000,000,优选为约1,000~50,000。当使用聚乙二醇时,特别优选上述分子量的。

[0042] 在本发明中,对聚二醇类的含量没有特别的限制,但相对于构成脂质体的总脂类量优选为约0.5~30摩尔%。

[0043] 对本发明中所用的白蛋白没有特别的限制,可以列举例如卵清蛋白、血清白蛋白、乳清蛋白或者肌清蛋白(肌浆蛋白)等动物性白蛋白,或者例如麦清蛋白、豆白蛋白或蓖麻蛋白等植物性白蛋白等。其中,在本发明中优选使用与给药对象相同动物的血清白蛋白,特别优选使用人血清白蛋白。此外,本发明中所用白蛋白还可以使用利用遗传基因重组技术获得的白蛋白。上述白蛋白还有具有与野生型白蛋白相同的氨基酸序列。只要不违背本发明的目的,还可以使用缺失、置换或者添加1至多个、优选1至几个氨基酸的变异型白蛋白。这种白蛋白可以通过已知的技术容易地制得。在本发明中,由于没有感染的危险性,优选使用遗传基因重组白蛋白。

[0044] 在本发明中,对白蛋白的含量没有特别的限制,但相对于构成脂质体的脂类总量,优选为约0.0001~10摩尔%。

[0045] 本发明脂质体制剂中所用脂质体,若含有上述聚二醇类和白蛋白,采取怎样的结构都可以。聚二醇类与白蛋白结合的空间连接的形式可以是任何形式。但是,优选脂质体在表面上具有聚二醇类和白蛋白的。此外,聚二醇类和白蛋白与脂质体可以通过例如吸附、电结合、物理结合(范德瓦耳斯力等)、化学键等任何形式进行结合,但优选通过化学键进行结合。

[0046] 作为本发明脂质体制剂中所用的脂质体优选的形式,可以列举(a)聚二醇类和白蛋白分别与脂质体结合的情况。此外,还可以列举(b)脂质体与白蛋白通过聚二醇类进行结合的情况。即,脂质体连接在聚二醇类上,白蛋白在与该结合部位不同的部位连接在聚二醇类上的情况。进一步,(c)还可以列举脂质体与聚二醇类通过白蛋白进行结合的情况。

即,脂质体连接在白蛋白上,聚二醇类在与该连接部位不同的部位连接在白蛋白上的情况。在本发明中,上述(a)~(c)形式的脂质体也可以同时存在。

[0047] 本发明中所用脂质体可以通过本身已知的技术制备。以下对这种脂质体的优选制备方法(a)~(c)进行说明。

[0048] (a)在聚二醇类与白蛋白分别结合在脂质体上的情况中,本发明中所用脂质体的制造方法为:

[0049] (i)使白蛋白结合在结合有聚二醇类的脂质体上的方法。

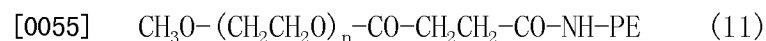
[0050] (ii)使聚二醇类结合在结合有白蛋白的脂质体上的方法。

[0051] (iii)使用结合有聚二醇类的脂类与结合有白蛋白的脂类制造脂质体的方法。

[0052] 上述(i)方法中,结合有聚二醇类的脂质体可以通过已知的方法容易地制得。可以列举例如使用结合有聚二醇类的脂类制造脂质体的方法。作为上述“结合有聚二醇类的脂类”,可以列举聚二醇类修饰的磷脂、聚二醇烷基醚、聚二醇蓖麻油衍生物或者聚二醇山梨聚糖脂肪酸酯类等。这些脂类的“聚二醇”部分优选为聚乙二醇。作为“结合有聚二醇类的脂类”,优选聚乙二醇修饰的磷脂,磷脂更优选为磷脂酰乙醇胺类。

[0053] 具体地,可以列举例如 PEG-DSPE[1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷脂酰乙醇胺-N-(聚乙二醇)]、

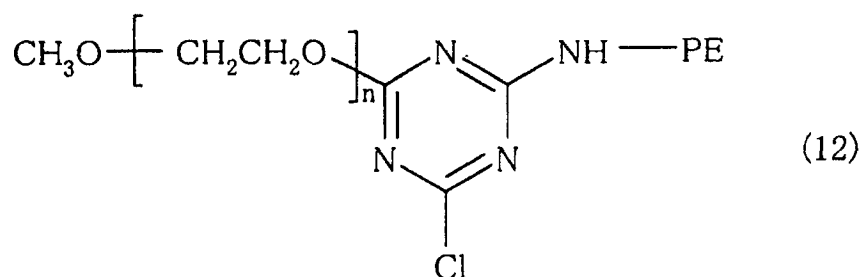
[0054] 下式(11):



[0056] (式中,n表示5~100,000的整数,优选为10~1,200的整数,-NH-PE表示磷脂酰乙醇胺残基)表示的N-(单甲氧基聚乙二醇琥珀酰)磷脂酰乙醇胺类、

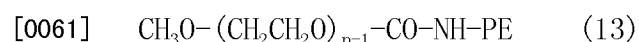
[0057] 下式(12):

[0058]



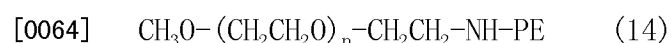
(式中,n和-NH-PE与上述含义相同)表示的N-[单甲氧基聚乙二醇(2-氯-1,3,5-三氮杂苯-4,6-二基)]磷脂酰乙醇胺类、

[0060] 下式(13):



[0062] (式中,n和-NH-PE与上述含义相同)表示的N-(单甲氧基聚乙二醇羰基)磷脂酰乙醇胺类、

[0063] 下式14



[0065] (式中,n和-NH-PE与上述含义相同)表示的N-(单甲氧基聚乙二醇亚乙基)磷脂酰乙醇胺类。

[0066] 上述“结合有聚二醇类的脂类”可以通过已知的技术容易地制备,还可以使用市售

品。对于使用这种脂类作为构成脂类的制备脂质体的方法,没有特别的限制,可以使用已知的方法。例如,可以使用上述脂类和水相,通过薄膜法、反相蒸发法、乙醇注入法、醚注入法、脱水-再水化法等,制备脂质体,通过超声波照射法、冻结融化后的超声波照射法、挤压法、法式冲床法、均化法等方法,可以调节体积平均粒径(参见 D. D. Lasic, "Liposomes: from basic to applications", Elsevier Science Publishers, pp. 1-171 (1993))。这里,所谓“水相”是指构成脂质体内部的水溶液,只要是本技术领域常用的水相,对其没有特别的限制,氯化钠水溶液、磷酸缓冲液或醋酸缓冲液等缓冲液、葡萄糖水溶液、海藻糖等糖水溶液或者它们的混合溶液最佳。通常,为了使给予生物体内的脂质体结构保持稳定,优选脂质体制备中所用的水相与脂质体外部即体液接近等张力,脂质体内外的渗透压小。

[0067] 将白蛋白结合于所得的结合有聚二醇类的脂质体可以使用例如巯基-马来酰亚胺偶合技术(Sulphydryl-maleimide coupling technique) (Derksen, J. T. P. and Scherphof, G. L. (1985) Biochem. Biophys. Acta 814, p. 151-155) 等已知的技术容易地进行。其中,可以适当地使用通过反应性中介基团使上述脂质体与白蛋白结合的方法。作为反应性中介基团,对其没有特别的限制,可以使用该技术领域中公知的基团。

[0068] 作为优选的方式,可以列举以下方法。在制备上述结合有聚二醇类的脂质体时,作为构成脂类,使用添加在结合有聚二醇类的脂类中的具有反应性中介基团的脂类。作为具有反应性中介基团的脂类,优选 1,2-二油酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-(戊二酰)(1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine-N-(Glutaryl), 以下简称为“NGPE”)。用这种构成脂类制备上述结合有聚二醇类的脂质体后,通过上述脂质体所具备的反应性中介基团使白蛋白结合。当使用 NGPE 时,优选使白蛋白的氨基结合在 NGPE 末端羧基上。此时,还可以预先结合使上述脂质体所具有的反应性中介基团的反应性提高的官能基团,再以与这种官能基团置换的方式结合白蛋白。例如,当使用 NGPE 时,使用水溶性碳化二亚胺在 NGPE 上预先结合碳化二亚氨基,再以与上述碳化二亚氨基置换的方式使白蛋白结合在 NGPE 上。

[0069] 作为其它优选的方式,可以列举使用在 1,2-二油酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine, 以下简称为“NOPE”)的氨基上结合 3-(2-吡啶二硫)丙酰基(3-(2-pyridyldithio)propionyl, 以下简称为“DTP 基”)的脂类(以下简称为 DTP-DOPE)的方法。具体地说,使用在结合有聚二醇类的脂类中添加的 DTP-DOPE 作为构成脂类,制备上述结合有聚二醇类的脂质体。另一方面,在白蛋白上导入巯基。对巯基的导入方法没有特别的限制,可以使用公知的方法。优选地,通过在白蛋白上导入 DTP,接着与二硫苏糖醇(dithiothreitol)反应,可以制得导入巯基的白蛋白。通过使上述脂质体与白蛋白反应,可以使结合有聚二醇类的脂质体上结合白蛋白。

[0070] 上述(ii)和(iii)中所述的方法可以根据以上所述内容容易地进行。

[0071] 本发明的脂质体制剂可以通过例如,上述(i)中,在结合有聚二醇类的脂质体中装载抗肿瘤活性物质后再结合白蛋白的方法,上述(ii)中,在结合有白蛋白的脂质体中装载抗肿瘤活性物质后,再结合聚二醇类的方法、或者(iii)使用结合有聚二醇类的脂类、结合有白蛋白的脂类、抗肿瘤活性物质和盐制备脂质体的方法等进行制备。

[0072] 对上述脂质体抗肿瘤活性物质的装载形式没有特别的限制,例如,抗肿瘤活性物质可以被封装在该脂质体内,也可以吸附或结合在该脂质体的表面上。此外,抗肿瘤活性物质也可以吸附或结合在白蛋白或聚二醇类上。

[0073] 装载抗肿瘤活性物质的结合有聚二醇类的脂质体可以通过本身已知的方法制备。更具体地,可以通过例如使结合有聚二醇类的脂质体与抗肿瘤活性物质的溶液或混悬液接触,使抗肿瘤活性物质被摄入脂质体中而制备。

[0074] 例如,向结合有聚二醇类的脂质体中加入抗肿瘤活性物质的水溶液或水混悬液,对所得混合液进行剧烈的振荡、搅拌、进行超声波处理,使其分散均匀,静置。此时,也可以用含硫酸铵等盐的水代替水。没有从分散液中被摄取的抗肿瘤活性物质可以通过已知的分离纯化方法(例如过滤等)除去,得到装载抗肿瘤活性物质的、结合有聚二醇类的脂质体。

[0075] 装载抗肿瘤活性物质的、结合有白蛋白的脂质体使用结合有白蛋白的脂质体和抗肿瘤活性物质,与上述制备方法同样地制备。

[0076] 此外,本发明的脂质体制剂,可以通过在脂类混合物(例如,PEG结合DSPE、DTP-DOPE、蛋黄卵磷脂和胆固醇的混合物等)中添加抗肿瘤活性物质和含盐(例如,氯化铵等)的水溶液,加热使其水化,在形成脂质体的同时,使抗肿瘤活性物质被摄入脂质体内部而制得。

[0077] 还可以在制备结合有聚二醇类和白蛋白的脂质体后,通过本身已知的方法使抗肿瘤活性物质被摄入到脂质体内部中。

[0078] (以下(b)、(c)中也采用与上述同样的方法)

[0079] (b)通过聚二醇类使脂质体与白蛋白结合的情况

[0080] 作为本发明中使用的脂质体的制备方法,可以列举:

[0081] (i)制备结合有聚二醇类的脂质体,在该脂质体的聚二醇类上结合白蛋白的方法,

[0082] (ii)使结合有白蛋白的聚二醇类在与白蛋白结合部位不同的部位与脂质体结合的方法等。

[0083] 上述(i)方法中,结合有聚二醇类的脂质体的制备方法与上述相同。在上述脂质体的聚二醇类上结合白蛋白,可以通过已知的技术进行。其中,可以采用通过反应性中介基团使烷二醇类与白蛋白结合的方法。作为反应性中介基团,对其没有特别的限制,可以是该技术领域中公知的基团,作为优选的例子可以列举马来酰氨基。

[0084] 具体地说,可以列举以下方法。在结合有聚二醇类的脂类中,使聚二醇类上结合反应性官能基团。例如,优选在聚二醇类的羟基上结合马来酰亚氨基。使用所得脂类,与上述同样地制备脂质体。通过使所得脂质体与白蛋白反应,通过脂质体上结合的聚二醇类的反应性官能基团结合白蛋白,得到目标脂质体。此时,为了使上述反应性官能基团与白蛋白容易结合,还可以进行在白蛋白上根据上述反应性官能基团导入取代基等已知的处理。当上述反应性官能基团为马来酰亚氨基时,优选在白蛋白上预先导入巯基。对巯基的导入方法没有特别的限制,可以采用公知的方法。更具体地说,使白蛋白与乙酰硫乙酸酯反应,使白蛋白的氨基与乙酰硫乙酰基结合,接着通过脱除乙酰基,制得导入巯基乙酰基的白蛋白。

[0085] 上述(ii)方法中,对聚二醇类与白蛋白结合的方法没有特别的限制,可以使用公知的技术,优选通过反应性中介基团使其结合。作为反应性中介基团,对其没有特别的限制,可以是该技术领域中公知的基团,作为优选的例子可以列举马来酰亚氨基。接着,使所得结合有白蛋白的聚二醇类在与白蛋白结合部位不同的部位与脂质体结合。对此方法也没有特别的限制,可以使用公知的技术。优选可以列举使用预先结合脂类的聚二醇类,将上述工序中制得的白蛋白-聚二醇类-脂类复合物插入脂质体中的方法。

[0086] 更具体地说,使前述聚二醇类结合在脂类上。接着,在所得脂类的聚二醇类上结合反应性官能基团。例如,优选在聚二醇类的羟基上结合马来酰亚氨基。然后,通过反应性官能基团使白蛋白与所得脂类的聚二醇类反应。此时,为了使上述反应性官能基团容易与白蛋白结合,还可以进行在白蛋白上根据上述反应性官能基团导入取代基等已知的处理。当上述反应性基团为马来酰亚氨基时,优选在白蛋白上预先导入巯基。对巯基的导入方法没有特别的限制,可以采用公知的方法。更具体地说,使白蛋白与乙酰硫乙酸酯反应,使白蛋白的氨基与乙酰硫乙酰基结合,接着通过脱除乙酰基,制得导入巯基乙酰基的白蛋白。另一方面,脂质体通过公知的方法制备,通过使所得白蛋白-聚二醇类-脂类复合物插入脂质体中,可以得到目标脂质体。

[0087] (c) 通过白蛋白,使脂质体与聚二醇类结合的情况

[0088] 作为本发明中所用的脂质体的制备方法,可以列举:

[0089] (i) 使结合有聚二醇类的白蛋白在与聚二醇类结合部位不同的部位与白蛋白结合的方法,

[0090] (ii) 制备结合有白蛋白的脂质体,在上述脂质体的白蛋白上结合聚二醇类的方法等。

[0091] 在上述(i)方法中,对使聚二醇类与白蛋白结合的方法没有特别的限制,可以使用公知的技术,优选通过反应性中介基团使其结合。作为反应性中介基团,对其没有特别的限制,可以是该技术领域中公知的基团,作为优选的例子可以列举马来酰亚氨基。更具体地说,在聚二醇类上结合反应性官能基团。例如,优选在聚二醇类的羟基上结合马来酰亚氨基。然后,通过反应性官能基团使聚二醇类与白蛋白反应。此时,为了使上述反应性官能基团与白蛋白容易结合,还可以进行在白蛋白上根据上述反应性官能基团导入取代基等已知的处理。当上述反应性官能基团为马来酰亚氨基时,优选在白蛋白上预先导入巯基的。对巯基的导入方法没有特别的限制,可以采用公知的方法。更具体地说,使白蛋白与乙酰硫乙酸酯反应,使白蛋白的氨基与乙酰硫乙酰基结合,然后通过脱除乙酰基,制得导入巯基乙酰基的白蛋白。

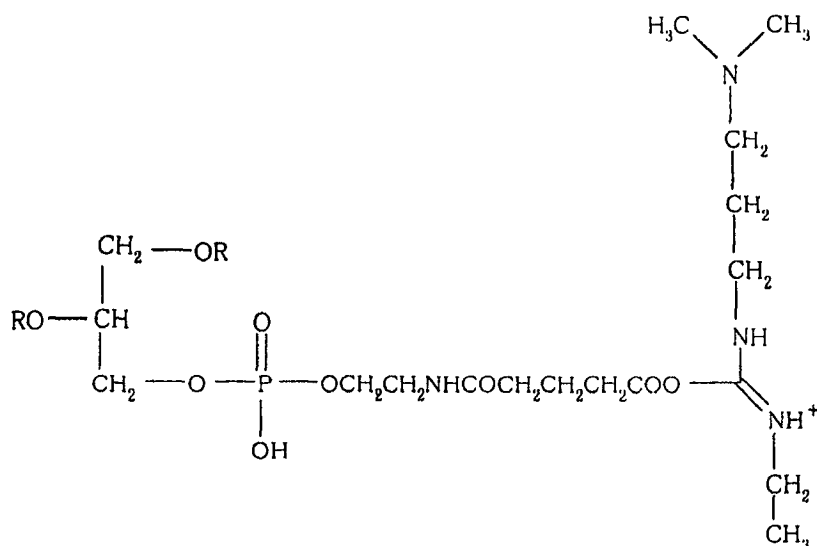
[0092] 然后,使结合有已得到的聚二醇类的白蛋白与脂质体结合。其方法同上述方法。

[0093] 上述(ii)方法中,使白蛋白结合于脂质体的方法同上述方法。然后,在上述白蛋白上结合聚二醇类。其方法也与上述的相同。

[0094] 作为上述制备方法,可以列举例如:

[0095] 使具有下式(1)

[0096]

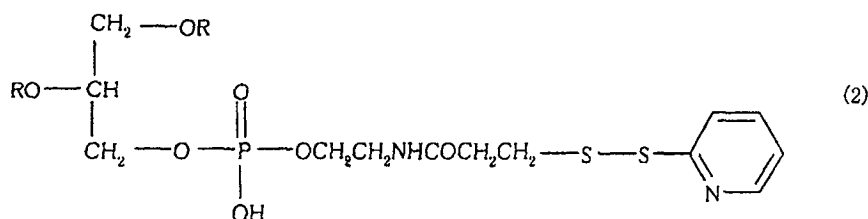


(1)

[0097] (式中, R 表示碳原子数为 2 ~ 35 的脂肪酸衍生的酰基) 表示的化合物作为构成脂类的脂质体与白蛋白结合, 或者,

[0098] 使具有下式 (2)

[0099]



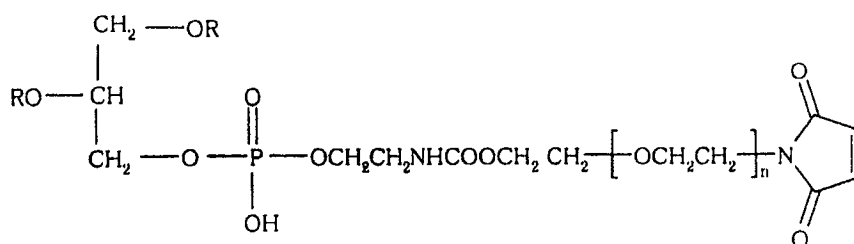
(2)

[0100] (式中, R 与上述定义相同) 表示的化合物作为构成脂类的脂质体与下式 (3)

[0101] (A1b-NH)-CO-CH₂-CH₂-SH (3)

[0102] (式中, A1b-NH 表示白蛋白和白蛋白中的氨基) 表示的化合物结合, 或者, 使具有下式 (4)

[0103]



(4)

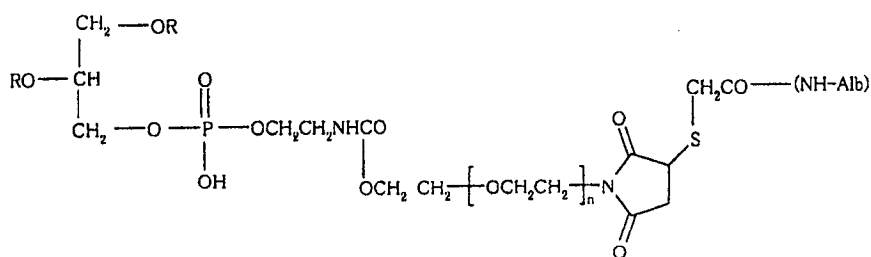
[0104] (式中, n 表示 5 ~ 100, 000 的整数。R 与上述定义相同) 表示的化合物作为构成脂类的脂质体与式 (5)

[0105] (A1b-NH)-CO-CH₂-SH (5)

[0106] (式中, A1b-NH 与上述定义相同) 表示的化合物结合, 或者,

[0107] 使下式 (6)

[0108]

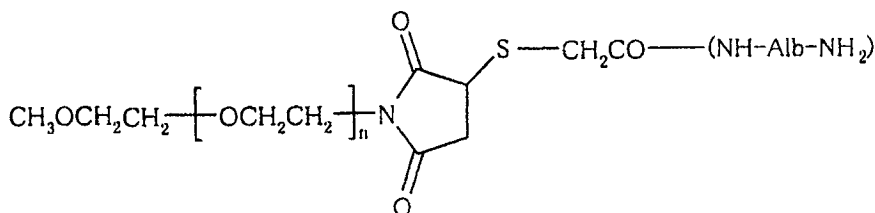


(6)

[0109] (式中, n、R 和 Alb-NH 与上述定义相同) 表示的化合物插入到脂质体中, 或者,

[0110] 使具有上述式 (1) 表示的化合物作为构成脂类的脂质体与下式 (7)

[0111]

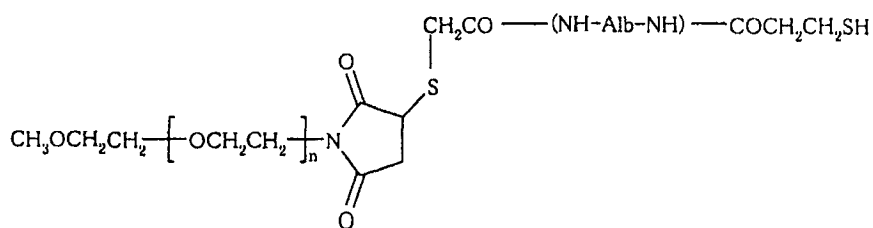


(7)

[0112] (式中, -NH-Alb-NH₂ 表示白蛋白和白蛋白的两个不同的氨基, n 与上述定义相同) 表示的化合物结合, 或者,

[0113] 使具有上述式 (2) 表示的化合物作为构成脂类的脂质体与下式 (8)

[0114]



(8)

[0115] (式中, -NH-Alb-NH- 表示白蛋白和白蛋白的两个不同的氨基, n 与上述定义相同) 表示的化合物结合等方法。

[0116] 其中, 上式表示的制备方法中, 原料脂质体中优选装载抗肿瘤活性物质进行使用。例如, 抗肿瘤活性物质可以被封装在脂质体中, 也可以吸附或者结合在脂质体的表面上。此外, 抗肿瘤活性物质也可以吸附或结合与白蛋白或聚二醇类上。作为上述抗肿瘤活性物质, 只要是可以给予动物、优选人的任意化合物或物质组合物, 对其没有特别的限制。

[0117] 作为本发明脂质体制剂中的抗肿瘤活性物质, 可以列举例如抗肿瘤抗生素、其它抗肿瘤药物、烷化剂、各种代谢拮抗剂、抗肿瘤植物成分、BRM(生物学应答性调节物质)、血管新生抑制剂、细胞粘附抑制剂、基质·金属蛋白酶抑制剂或激素等。其中优选使用抗肿瘤抗生素。

[0118] 作为抗肿瘤抗生素的具体例子, 可以列举例如丝裂霉素 C、博菜霉素、培洛霉素、柔红霉素、阿柔比星、阿霉素、吡柔比星、THP-阿霉素、4'-环阿霉素、表阿霉素等蒽环霉素类抗肿瘤药、色霉素 A3、放线菌素 D 等, 以及他们的盐或复合物。其中优选恩环霉素类

抗生素抗肿瘤药、其盐（碱盐或酸加成盐）或复合物。特别优选阿霉素或其酸加成盐（例如盐酸盐等）。

[0119] 作为其它抗肿瘤药物，可以列举例如顺铂、卡铂、蛇莫西芬、喜树碱、异环磷酰胺、环磷酰胺、苯丙氨酸氮芥、L-门冬酰胺酶、醋葡内酯（アセクラトン）、西佐喃、溶链菌（ピシバニール）、二甲胺基甲基苯甲醇（ウベニメクス）、云芝多糖等，以及其盐或复合物。此外，还可以列举丙卡巴肼、派泊溴烷、新制癌菌素、羟基脲等。

[0120] 作为烷化剂，可以列举例如氮芥、氮芥 N-氧化物、苯丁酸氮芥等烷化剂；例如卡巴醌、噻替哌等氮丙啶类烷化剂；例如二溴甘露醇（ダイブロモマンニトール）、二溴半乳糖醇（ダイブロモダルシトール）等环氧化合物类烷化剂；例如卡氮芥、罗氮介、赛氮芥（セムスチン）、尼氮芥（ニムスチンハイドロクロライド）、链脲霉素、氯脲菌素、雷莫司汀等亚硝基脲类烷化剂；白消安；甲苯磺酸胺丙磺酯（インプロスルファン）；达卡巴嗪等。作为各种代谢拮抗剂，可以列举例如 6-巯基嘌呤、6-巯鸟嘌呤、巯嘌呤苷等代谢拮抗剂氟尿嘧啶、喃氟啶、喃氟啶·尿嘧啶、卡莫氟、脱氧氟尿苷、溴尿苷、阿糖胞苷、依诺他滨等嘧啶代谢拮抗剂、氨甲喋呤、三甲曲沙等叶酸代谢拮抗剂等，以及其盐或复合物。

[0121] 作为抗肿瘤植物成分，可以列举例如长春地辛、长春新碱、长春花碱等长春生物碱类、依托泊苷、替尼泊苷等表鬼臼毒素类，以及其盐或复合物。作为 BRM，可以列举例如肿瘤坏死因子、消炎痛等，以及其盐或复合物。作为血管新生抑制剂，可以列举例如醋酸生育酚（フマジロール）衍生物，以及其盐或复合物。作为细胞粘附抑制剂，可以列举例如具有 RGD 序列的物质，以及其盐或复合物。作为基质·金属蛋白酶抑制剂，可以列举例如马利马斯特（マリマスタット）、巴其马斯特（バチマスタット）等，以及其盐或复合物。作为激素，可以列举例如氢化可的松、地塞米松、甲基强的松龙、泼尼松龙、普拉睾酮、倍他米松、去炎松、康复龙、南诺龙、美替诺龙、磷雌酚、乙炔雌二醇、氯地孕酮、甲羟孕酮等，以及其盐或复合物等。

[0122] 本发明的脂质体制剂可以是仅仅由装载抗肿瘤活性物质的脂质体构成，但是，通常可通过将该脂质体与药学上可接受的载体根据本身已知的方法〔制剂技术领域惯用的方法，例如日本药典（例如第 13 修订版）中所记载的方法等〕进行混合而制备。

[0123] 作为药学上可接受的载体，使用制剂材料中常用的各种有机或无机载体物质，固体制剂中可以列举赋形剂、润滑剂、粘合剂、崩解剂；液体制剂中可以列举溶剂、溶解助剂、混悬剂、等张化剂、缓冲剂、止痛剂等。根据需要，还可以使用表面活性剂、发泡剂、色素、酸味剂、防腐剂、抗氧化剂、着色剂、甜味剂、矫味剂等制剂添加物、

[0124] 作为固体制剂中药学上可接受的载体，更具体地说，可以列举柠檬酸钙、磷酸钙等无机盐赋形剂；例如硬脂酸镁、硬脂酸钙、轻质硅酸酐、含水二氧化硅等润滑剂；羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、 α 化淀粉、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、阿拉伯橡胶粉末、明胶或支链淀粉等粘合剂；低取代度羟丙基纤维和结晶纤维素等纤维素类、玉米淀粉、部分 α 化淀粉或羟丙基纤维素等各种淀粉或淀粉衍生物、交联聚烯吡酮或膨润土等崩解剂等。

[0125] 此外，作为液体制剂中药学上可接受的载体，可以列举盐溶液、葡萄糖溶液或盐溶液与葡萄糖溶液的混合物等溶剂；例如葡聚糖、聚乙烯吡咯烷酮、安息香钠、乙二胺、水杨酰胺、烟酰胺、聚环氧乙烷固化蓖麻油衍生物等溶解助剂；例如硼酸缓冲液、磷酸缓冲液、柠檬酸缓冲液、酒石酸缓冲液、醋酸缓冲液等缓冲液；例如白蛋白、甘油、丙二醇等多元醇、利多

卡因盐酸盐、苄醇等止痛剂等。

[0126] 作为另外的制剂添加剂,可以列举例如脱水山梨糖醇脂肪酸酯、聚环氧乙烷脂肪酸酯、磷脂、甘油脂肪酸酯、聚乙二醇脂肪酸酯、聚环氧乙烷固化蓖麻油、聚环氧乙烷烷基醚、蔗糖脂肪酸酯等表面活性剂;例如碳酸氢钠、碳酸钠、碳酸钙等发泡剂;例如柠檬酸、酒石酸、苹果酸等酸味剂;例如三氧化二铁、黄色三氧化二铁、焦油类色素等色素;例如柠檬、柠檬粉(レモンライム)、柑橘、薄荷、薄荷醇等香料;例如糖精钠、甘草素二钾、糖精、斯替维(ステビア)、竹芋蛋白(ソーマチン)等甜味剂;例如柠檬酸、柠檬酸钠、琥珀酸、酒石酸、富马酸、谷氨酸等矫味剂。

[0127] 另外,作为稳定剂,可以列举例如糖类和亚硫酸钠等。作为糖类,可以列举葡萄糖、果糖、木糖醇、岩藻糖、半乳糖等单糖类;麦芽糖、蔗糖、乳糖、乳果糖、蜜二糖等二糖类;果糖低聚物(フルクトオリゴ)糖、半乳糖低聚物(ガラクトオリゴ)糖、乳糖低聚物(ラクトオリゴ)糖等低聚糖;葡聚糖等多糖等。作为防腐剂,可以列举例如对羟基安息香酸酯、苄醇、氯甲酚、苯乙醇、苯索氯铵等。作为螯合剂,可以列举例如依地(エデト)酸钠、柠檬酸钠等。作为抗氧化剂,可以列举例如亚硫酸钠、亚硫酸氢钠、抗坏血酸钠、硫代硫酸钠等。

[0128] 作为本发明的脂质体制剂的剂型,可以列举例如锭剂、胶囊剂(包括软胶囊、微胶囊、肠溶胶囊)、散剂、颗粒剂、糖浆剂等口服制剂;以及注射剂(例如皮下注射剂、静脉注射剂、肌肉注射剂、腹腔内注射剂等)、外用制剂(例如经鼻给药制剂、经皮制剂、软膏剂等)、栓剂(例如直肠栓剂、阴道栓剂等)、丸剂、滴剂、缓释制剂(例如缓释微胶囊等)等非口服给药制剂。本发明的脂质体制剂特别优选注射剂剂型。

[0129] 本发明的脂质体制剂的给药量,由于根据脂质体所含抗肿瘤活性物质的种类、药物剂型、需治疗疾病状态的种类、症状和疾病的严重程度、患者年龄、性别或体重、给药方法等而不同,不能一概而论,医师可通过对上述状况进行综合判断而决定。

[0130] 对本发明脂质体制剂的给药途径没有特别的限制,根据上述本发明脂质体制剂的剂型,可以口服给药,也可以非经口服给药,优选非口服给药,特别是通过注射给药。当本发明的脂质体制剂是注射剂时,可以例示例如静脉注射、皮下注射、皮内注射、肌肉注射或腹腔内注射之类的药疗上合适的给药方式。

[0131] 本发明的脂质体制剂,根据脂质体中所装载的抗肿瘤活性物质的种类,可以对各种疾病进行预防和治疗。例如,本发明脂质体制剂可以用于例如大肠癌、脑肿瘤、头颈部肿瘤、乳腺癌、肺癌、食道癌、胃癌、肝癌、胆囊癌、胆管癌、胰腺癌、胰岛细胞癌、绒毛膜癌、结肠癌、肾细胞癌、肾上腺皮质腺癌、膀胱癌、睾丸癌、前列腺癌、睾丸肿瘤、卵巢癌、子宫癌、甲状腺癌、恶性类癌(瘤)、皮肤癌、恶性黑色素肿、骨肉肿、软组织肉肿、神经胚细胞癌、维尔姆斯瘤、网膜胚细胞瘤、黑霉、扁平上皮癌等肿瘤的预防或治疗。

[0132] 以下,列举实施例、试验例对本发明进行详细的说明。

[0133] 以下实施例中所用 rHSA 为获自株式会社バイファ。其中,本实施例中所述的简称定义如下:

[0134] DOPE :1,2-二油酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺

[0135] DSPE :1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷脂酰乙醇胺

[0136] DTP 基 :3-(2-吡啶二硫)丙酰基

[0137] DTT :二硫苏糖醇

- [0138] DXR :阿霉素盐酸盐
- [0139] EDTA :乙二胺四乙酸钠盐
- [0140] HEPES :N-2- 羟乙基哌嗪 -N' -2- 乙磺酸
- [0141] NGPE :1,2- 二油酰 -sn- 甘油基 -3- 磷酸乙醇胺 -N-(戊二酰)
- [0142] NHS :N- 羟基琥珀酰亚胺
- [0143] PBS :pH 为 7.4 的磷酸缓冲液 (由氯化钠、氯化钾、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠组成)
- [0144] PEG :聚乙二醇
- [0145] rHSA :重组人血清白蛋白 (遗传基因重组型人血清白蛋白)
- [0146] SATA :N- 琥珀酰亚氨基 -S- 乙酰硫乙酰酯
- [0147] SPDP :N- 琥珀酰亚氨基 3-(2- 吡啶二硫) 丙酸酯
- [0148] WSC :水溶性碳化二亚胺的简称,是指 1- 乙基 -3-(3- 二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺
- [0149] 实施例 1
- [0150] (1) 磷脂 (DTP-DOPE) 的制备
- [0151] 向 0.34ml 含 $10\ \mu\text{mol}$ DOPE 的氯仿溶液中加入 $12\ \mu\text{mol}$ SPDP (Pierce 公司制, 美国), 搅拌 2 小时。向反应液中加入 2ml PBS, 剧烈振荡 5 分钟后, 以 3000rpm 转速离心分离 10 分钟。除去 PBS 层后, 进一步向氯仿层加入纯化水, 剧烈振荡 3 分钟后, 进行离心分离, 除去水层。再次同样地进行这种纯化水洗涤。将下层残留的白色半固体状物质在蒸发仪中减压蒸馏 90 分钟除去溶剂并干燥。向残留物加入 1.0ml 氯仿, 再次溶解, 获得 DTP 结合的 DOPE 氯仿溶液。
- [0152] (2) 含 DTP-DOPE 的 PEG 修饰脂质体的制备
- [0153] 将溶解有脂类的氯仿溶液 (总脂类 : $115\ \mu\text{mol}$, 以蛋黄卵磷脂 (旭化成制) : 胆固醇 (和光纯药公司制) : PEG 结合 DSPE (Avanti 公司制, 美国) = 62 : 33 : 5 的摩尔比溶解) 加入到烧瓶中。向其中加入含 $4.8\ \mu\text{mol}$ 上述所得 DTP-DOPE 的氯仿溶液, 进一步加入氯仿使总量达到 7ml 后, 在旋转蒸发仪中减压蒸馏除去溶剂, 干燥一夜。向生成的脂膜加入 6.0ml 含 250mM 硫酸铵的水溶液, 加热至 60°C , 同时通过涡流进行水化。再用挤压机进行定径, 使粒径为 100nm, 得到含 DTP-DOPE 的 PEG 修饰脂质体的硫酸铵水混悬液。
- [0154] (a) 脂质体粒度分布测定 (粒度分布测定仪, NICOMP 370ZLS, Particle Sizing System 公司制, 美国) : 确认粒径为 100nm。
- [0155] (b) 脂质体表面存在的 PEG 修饰的量的测定 (通过苦味酸盐法测定) : 脂质体表面存在 3.5% 的 PEG。
- [0156] 通过苦味酸盐法对 PEG 的定量按照 International journal of pharmaceuticals, 203 (2000), 255-263 所述的定量方法进行。
- [0157] 向 10ml 脂质体中加入 20ml 的硝酸钠 - 苦味酸溶液并混合。再加入 10ml 1,2- 二氯乙烷, 充分混合 (萃取), 以 $1500g$ 离心分离 10 分钟。分出有机层, 测定 378nm 的吸光度。根据吸光度值, 相对于 $5.75\ \mu\text{mol}$ PEG 脂类, 表面的 PEG 为 $4.01\ \mu\text{mol}$, 由此可知, 总量的 70% 存在于表面。
- [0158] (3) 将 DXR 封入脂质体中
- [0159] 将制备的含 DTP-DOPE 的 PEG 修饰脂质体的硫酸铵水混悬液进行凝胶过滤

(Sephacrose CL-6B, Bio-Rad 公司制, 美国, 柱: 内径 1.5×30cm; 洗脱液: PBS) 得到含 DTP-DOPE 的 PEG 修饰脂质体的 PB S 混悬液。向其中加入 3.5mg DXR, 在 65℃ 下静置保温 1 小时, 再与上述同样地进行凝胶过滤, 将未被封入的 DXR 除去, 得到含 DTP-DOPE 的 PEG 修饰的封入 DXR 的脂质体。

[0160] 凝胶过滤 (Sephacrose CL-6B, Bio-Rad 公司制) 是根据分子量的大小进行分离纯化, 首先, 脂质体中封入阿霉素, 然后将未封入的阿霉素分离。由于阿霉素显示红色荧光, 所以是否存在未封入的阿霉素通过目测进行确定。进一步通过 HPLC 法 (岛津公司制, 荧光检测器 RF-10A, 泵 LC-10AS) 确认不存在未封入的阿霉素。

[0161] (4) 3- 巯基丙酰基 -rHSA 的制备

[0162] 向 0.67 μmol rHSA (バイファ公司制) 的水溶液中加入 13 μmol SPDP 后, 搅拌, 制得 DTP-rHSA。然后进行凝胶过滤 (填充剂: Sephacrose CL-6B, Bio-Rad 公司制; 洗脱液: 醋酸缓冲液 (pH 4.5)), 分离收集 DTP-rHSA 的部分。加入 DTT (关东化学公司制), 使其在 DTP-rHSA 中的终浓度为 50mM, 搅拌 20 分钟使其反应, 使 DTP-rHSA 的 DTP 上的取代基 2-吡啶二硫基置换成巯基。进行凝胶过滤 (填充剂: Sephacrose CL-6B, Bio-Rad 公司制; 洗脱液: PB S (pH 8.0)) 以除去未反应的 DTT, 分离收集 3- 巯基丙酰基 -rHSA 部分。

[0163] 对于 DTP-rHSA 与 DTT 反应的副产物 2- 硫代吡啶酮 (2-TP), 用分光光度计 (日立公司制, U-3300) 测定反应液在 343nm 处的吸光度 (2-TP 特异的吸收峰), 与加入 DTT 前相比, 吸光度大约 0.5, 确认生成了 2-TP, 即, DTP-rHSA 与 DTT 发生了反应。

[0164] (5) rHSA • PEG 修饰的封入 DXR 的脂质体的制备

[0165] 向含 DTP-DOPE 的 PEG 修饰的封入 DXR 的脂质体中加入 3- 巯基丙酰基 -rHSA 溶液, 在室温下搅拌约 24 小时, 使 rHSA 修饰脂质体。然后凝胶过滤反应液 (填充剂: Sephacrose CL-6B, Bio-Rad 公司制; 洗脱液: PBS (pH 8.0)), 使脂质体与未反应的 rHSA 分离, 分离收集脂质体部分, 得到目标 rHSA • PEG 修饰的封入 DXR 的脂质体。

[0166] 产物的 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳

[0167] 发现 rHSA 单体位置带, 确认 rHSA 为良好修饰的单体。

[0168] 粒径的测定: 粒径与上述 2 同样地测定, 约为 100nm (测定装置, NICOMP 370ZLS)。

[0169] 试验例 1 血浆中 DXR 的滞留性

[0170] 向 3 只大鼠移植癌细胞 (大鼠腹水肝癌)。向每只大鼠通过尾静脉给予实施例 1 中所得的脂质体样品 6mg/kg (DXR 量)。经一定时间后, 通过颈动脉取血约 200 μl, 立即进行离心分离 (4℃ 下 1500×g, 5 分钟)。收集上清液 100 μl, 加入 900 μl 硫酸铵饱和水溶液并混合, 加入 2ml 氯仿: 2- 丙醇 = 1: 1 的混合溶液, 振荡 10 分钟。将该样品以 1500×g 离心分离 10 分钟, 收集油层。将油层通过旋转蒸发器蒸馏除去溶剂后, 用流动相进行再溶解, 用液相色谱 (岛津制作所社制, SCL-10A) 进行定量测定。

[0171] 作为比较, 使用表面被 PEG 修饰的封入 DXR 的脂质体及 DXR 水溶液 (800 μg/ml), 进行相同的试验。

[0172] 其结果见图 1。

[0173] 由图 1 可清楚地看出, 实施例 1 的 rHSA • PEG 修饰的封入 DXR 的脂质体, 与仅仅被 PEG 修饰的封入 DXR 的脂质体和 DXR 水溶液相比, 在血浆中的滞留性有着显著的提高。

[0174] 试验例 2 癌细胞中 DXR 的滞留性

[0175] 将上述试验例 1 中血液收集结束的大鼠立即脱血处死。脱血后,收集肿瘤,称重后,用 2.0ml PB S 进行匀浆。收集 1ml 该液体,加入硫酸铵饱和水溶液 3.0ml 并混合。加入 6ml 氯仿:2-丙醇=1:1 的混合溶液,振荡 10 分钟。将该样品以 $1500\times g$ 离心分离 10 分钟,收集油层。将油层通过旋转蒸发仪蒸馏除去溶剂后,用流动相进行再溶解,用液相色谱(岛津制作所社制, SCL-10A) 进行测定。

[0176] 作为比较,使用表面被 PEG 修饰的封入 DXR 的脂质体以及 DXR 水溶液 ($800\ \mu g/ml$), 进行相同的试验。

[0177] 其结果见图 2。

[0178] 由图 2 可清楚地看出,实施例 1 的 rHSA-PEG 修饰的封入 DXR 的脂质体,与仅仅被 PEG 修饰的封入 DXR 的脂质体和 DXR 水溶液相比,在癌细胞中的滞留性有着显著的提高。

[0179] 本发明的脂质体制剂,与现有的封入了抗肿瘤活性物质的脂质体相比,在血中的滞留性显著地提高,且具有大量抗肿瘤活性物质迁移至癌细胞的优良效果。本发明的脂质体制剂适合用于癌症的治疗,不仅能够改善副作用,例如心毒性(阿霉素在心脏中蓄积等),还可以减少抗肿瘤活性物质的给药量,且能够获得长时间持续的药理效果。

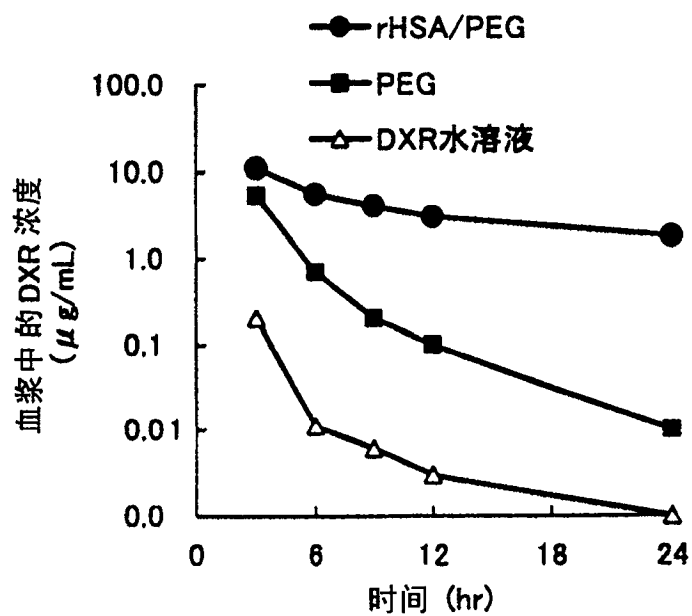


图 1

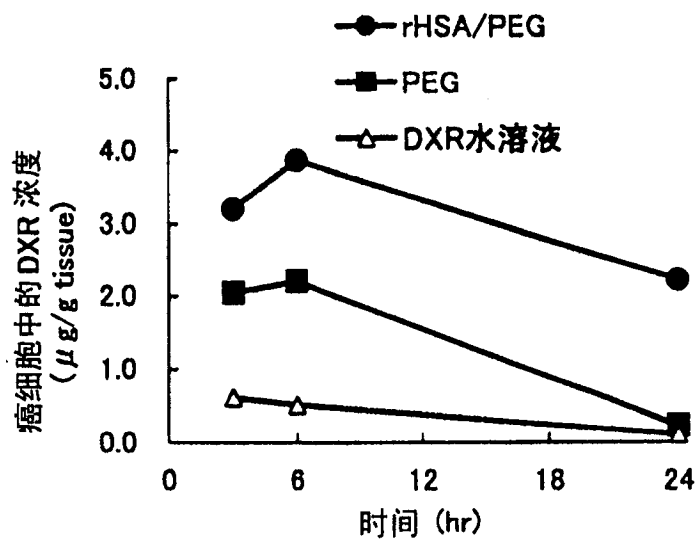


图 2

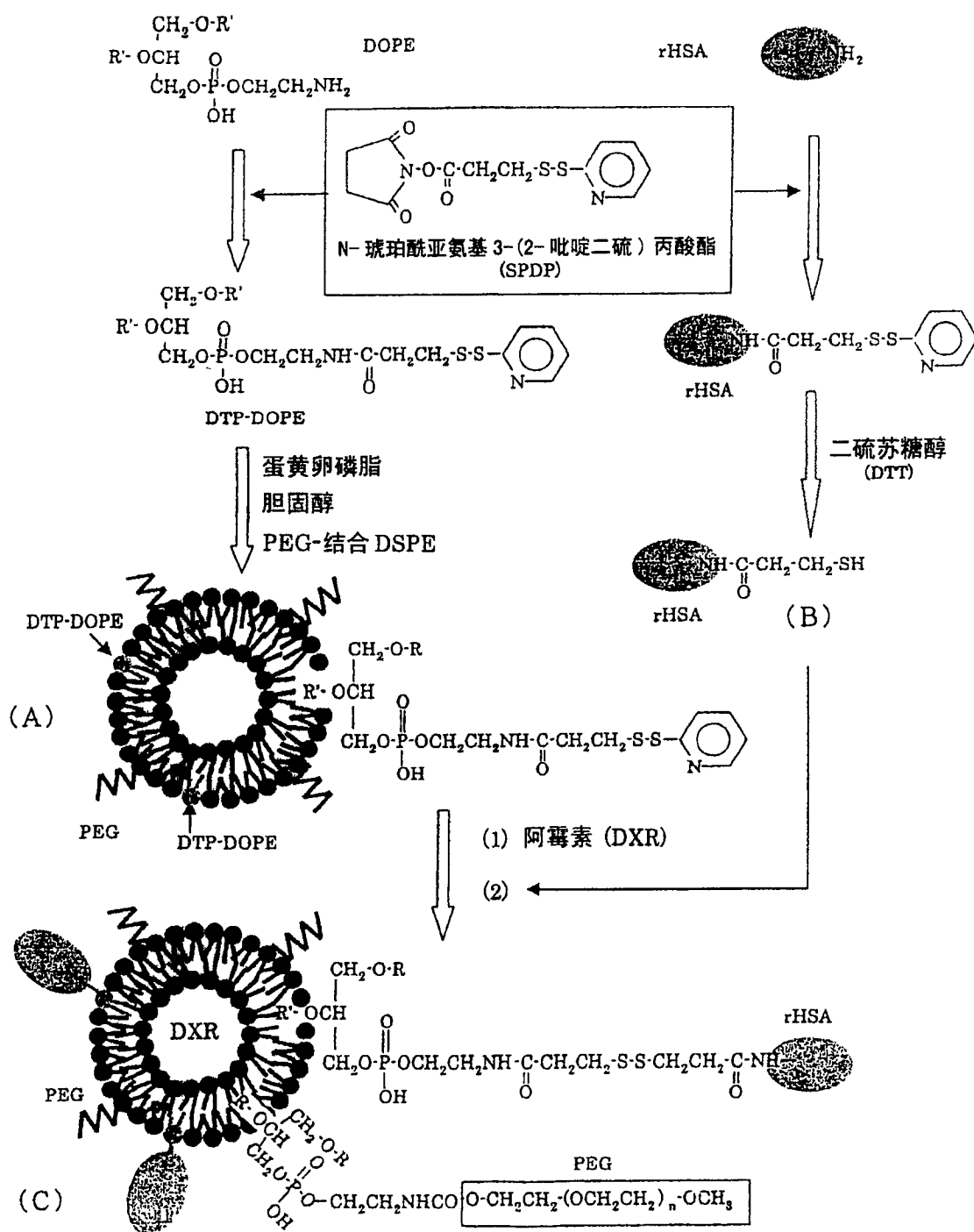


图 3