

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
IPC分類：

A6
B6

本案已向：

國(地區) 申請專利，申請日期：1999.11.05 案號：09/434,345 有 無主張優先權

有關微生物已寄存於： ，寄存日期： ，寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明()

發明領域

本發明係關於脂質體包覆之藥物及傳遞系統，特別係為質脂體包覆之順氯氫鉑。此藥物於靜脈注射後可有效地殺死許多人類惡性瘤腫之癌細胞。

發明背景

於本申請案中之各種出版物，專利及刊登之專利說明書係參照以作者及日期或藉由一確認之專利字號。而本刊物的完整著作引用可見諸於揭露書範圍內或之於申請專利範圍前。該等出版物、專利及刊登之專利說明書內容於此亦併入本揭露書以為參考，使得更完整地描述本發明有關之技藝。順氯氫鉑，簡稱順氯氫鉑或順-DDP，係最常被使用以抗腫瘤藥物之一，用以治療睪丸癌、卵巢癌及抗頭頸癌。超過 90% 的睪丸癌係利用順氯氫鉑治療。最嚴重的副作用係腎毒症、骨髓毒及腸胃發炎 (Olive 及 Mead, 1993)。雙眼神經性病變在以 160 mg/m^2 之順氯氫鉑及 640 mg/m^2 之碳化氯氫鉑 (Carboplatin) 治療 (Caraceni 等人, 1997) 卵巢癌所影響之病人上會觀察到雙眼神經性病變 (Caraceni 等人, 1997)。口服六甲基黑色素治療於一群 61 位患有順或碳化氯氫鉑抗藥性 (在結束治療後 6 個月內復發) 之上皮卵巢癌的病患顯示有 14% 標的反應速率 (Vergote 等人, 1992)。

陰離子膽固醇衍生物已被使用以傳遞治療物劑。例如，其被混合與磷脂醯乙醇胺及被音波分裂以形成小的單層

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

泡囊，而可與 DNA 複合並調適自於核內體間室進入到胞質液。脂質體配方之一，DC-Chol 脂質體，已被用於基因臨床治療黑素瘤。人類免疫缺乏病毒-1 轉移活化蛋白基因，在 HIV-1 遠端重覆之控制下與報導基因一起被傳遞。篩選順氯氬鉑抗藥性或分離自無法以順氯氬鉑治療之病人之人類腫瘤細胞，可被陽離子脂質體高度轉移感染。此結建議對惡瘤利用順氯氬鉑及基因療法施以一序列的治療流程 (Farhood 等人,1994)。

測試以 2-胺基-甲基④咯衍生物為載體配位基製備之各種鉑錯合物對直腸 26 癌症及 P388 白血病之抗腫瘤活性，此係利用皮下及／或靜脈注射至老鼠內。證實了 2-胺基④咯係為其胺衍生物中最有效的載體配位基 (Morikawa 等人,1990)。

藉由直角測試以建立最適當的流程，以利用乳液加熱安定化的方式 (平均大小為 148 微米) 製備順氯氬鉑白蛋白中心體 (Cis-DDP-AMS)。鉑半生期的分佈及結束在以 Cis-DDP-AMS 對照 Cis-DDP 之肝動脈化學內陷 (chemoembloization) 後，可相對地延長 3.36 倍及 1.23 倍 (Zhang 等人,1995)。

尋找具有改良治療性質的鉑 (II) 基礎化合物係迅速地設計及合成一新系列之水溶性、第三代順氯二氬鉑 (II) 錯合物並可聯結至尿嘧啶及尿核(8)。然而，無一合成之化合物對所處理的三種細胞株顯示任何重大的細胞毒素 (

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

Kim 等人, 1998)

近所發展之生物還原劑 4-[3-(2-硝咪唑基)-丙氨基]-7-氯(+)-諾⑥鹽酸鹽(NLCQ-1)被發現可增效化療劑左旋溶肉瘤素(L-PAM), 順氣氬鉑(cisDDP)及環磷醯胺(CPM)之抗腫瘤作用且不會同時發生骨髓毒素之增強作用。增效作用係嚴格地定期依賴而當使用 NLCQ-1 於 cisDDP 前 45 分鐘時, 此最適效果(1.5 到 2 超越可加性之對數殺滅值(logs killing beyond additivity)可被觀察到。基於臨床研究, 這些結果支持 NLCQ-1 歸類為化學感光劑(Papadopoulou 等人, 1998)。

結合盤西他素(paciltaxel)與順氣氬鉑做為第二線治療患有非小細胞肺癌(NSCLC)之病人, 而其係利用順氣氬鉑於之前進行了第一線治療, 在 14 位病患中可達到部分回應(40%) (Stathopoulos 等人, 1999)。

Abva 等人(美國專利第 5,945,122 頒自於 8 月 31 日, 1999)描述一含有包覆之不帶電順氣氬鉑於多數的中性脂體內的脂質體組成物。然而, Abva 等人的方法係使用中性脂體, 此可較之於揭露於本專利以為順氣氬鉑包覆之酸性脂體 DPPG。

是故, 當前述報導指出脂質體調適傳遞順氣氬鉑及其他治療藥物係為可能, 治療效率會被順氣氬鉑之低水溶性及低穩定性所限制。治療效能亦為藥物之高毒性所限。因此, 當治療上使用順氣氬鉑時, 存在一需求以降低牽連到

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂
線

五、發明說明()

處理包含順氣氬鉑藥物及其高毒性之困難，本發明係可滿足此需求並提供相關之優點。

發明揭露

在一方面，本發明係提供一種包覆順氣氬鉑及其他帶正電荷藥物於脂質體中的方法，其中此脂質體係具有不同的脂肪組成物於其內外膜層之間且在靜脈注射至動物及人體內後能夠達到初級腫瘤及其轉移。在一方面，此方法包括在順氣氬鉑與 DPPG (二(十八烷醯基)磷脂醯乙二醇)或其脂肪分子之間形成錯合物，以藉由水解轉換順氣氬鉑為其水溶液形成，而此係帶正電性並為原本即具有之抗癌活性的順氣氬鉑之活性型式。在此階段，膜融合胜⑤及其他具有融合基因(fusogenic)性質的分子可被加入以加強穿越此錯合物的細胞膜。水溶液順氣氬鉑-DPPG 微膠粒藉由與泡囊混合轉換至脂質體而形成如預製之脂質體的脂肪或脂肪隨而被透析並排出胞膜，陷入及包覆順氣氬鉑而獲得非常高的產率。阿黴素或其他帶正電荷的化合物於此配方中可以順氣氬鉑替代之。此包覆之順氣氬鉑在根治包括但不限於乳癌及前列腺癌之各種固形之人類腫瘤上具有很高的治療效果。此包覆之順氣氬鉑與包覆之阿黴素或其他抗癌藥物之組合係被宣稱為其療價。在癌症根除之療價上亦被宣稱為包覆之順氣氬鉑與許多抗癌藥物，而其包括但不限於包覆於脂質體之 p53, IL-2, IL-12, 制血管素(angiostatin)及制瘤素(oncostatin), 和結合包覆之順氣氬鉑與 HSV-tk 加上包覆之堅塞克羅維

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

(ganciclovir)的組合物。

圖式簡要說明

第 1 圖 係說明順氣氦鉑之包覆；

第 2 圖 係顯示在包覆之順氣氦鉑 3-4 注射於 SCID 老鼠後 MCF-7 腫瘤之消退；

第 3 圖 係顯示有及無利用順處理之 SCID 老鼠之腫瘤組織圖。第 3A 圖顯示未處

理之 MCF-7 腫瘤生長於 SCID 老鼠之中的 40 倍放大圖。察覺到腫瘤組

織之結構特性的均質型態。第 3B 圖顯示順氣氦鉑處理之老鼠(4 次注

射)。細胞係為阿樸上瞼下垂(apoptotic)，數群細胞進入結構中，而核染較大且黑，阿樸上瞼下垂細胞之特徵。第 3C 圖顯示未處理動物的腫瘤入侵至肌肉之 20 倍放大圖；

第 3D 圖顯示順氣氦鉑處理之老鼠。入侵並不明顯。20 倍放大圖。

第 4 圖 顯示在以包覆之順氣氦鉑處理(A)與未處理(B)之動物間目視之腫瘤

大小差異。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

進行本發明的模式

本發明之施行將使用，除有其他明示，習知之免疫，分子生物、微生物、細

胞分子生物及重組 DNA 技術。這些方法係描述於下列的出版刊物中。見諸如，

Sambrook 等人，MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 第 2 版(1989); CURRENT PROTOCOLS TN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel 等人，諸版本，(1987)); METHODS IN ENZYMOLOGY 諸序列 (Academic Press, Inc.); “PCR: A PRACTICAL APPROACH” (M. MacPherson 等人，IRL Press at Oxford University Press (1991)); PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M.J. MacPherson, B.D. Hames 及 G.R. Taylor 諸版本，(1995)); ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL (Harlow 及 Lane, 諸版本，(1988)); 及 ANIMAL CELL CULTURE (R.I. Freshney 之版本，(1987))。

如用之於此專利說明書及申請專利範圍，單數形式，“一”或“此”包括多

數相關類及，除非其內容清楚地另有明示。例如，詞“一細胞”包括許多細胞及其混合。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

“包含”一詞係意指該組合物及方法包括所引述之元件，但不排除其他者。

“基本上由(下列)組成”當用之以定義組合物及方法時，將意為排除任何實質

重要於此組合物之其他元件。因此，一組合物基本上由此元件組成於此定義為不排除痕跡污染物於此分離純化之方法及藥學上可接受的載體，如磷酸緩衝之生理食鹽水，防腐劑，及其類似品。“由(下列)組成”將意為排除非痕跡元件之其他成分及重要步驟以投藥本發明之組合物。藉由此每一個連接語詞所定義實施例均係落於本發明之範疇中。

“多核(8)酸”及“核酸分子”之語詞係交互使用意指任何長度之核(8)酸的聚合性形成。此多核(8)酸可包括去氧核糖核酸，核糖核(8)酸，及／或其相似體。

核(8)酸可為任意之三級結構，而顯現任何知或已知之功能。名詞“多核(8)酸”包括，例如，單、雙或三鏈分子，一基因或基因片段，外基因，內基因，mRNA，tRNA，rRNA，核⑧(ribozymes)，cDNA，重組多核(8)酸，分枝多核(8)酸，質體，載體，任何長度之分離DNA，任何長度之分離RNA，核酸探針，及引子。一核酸分子亦包含修飾之核酸分子。

“基因”意指一包含至少一開放讀碼框(open reading frame)之多核(8)酸，而該片段係可於轉譯或轉錄

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

後編碼一特定之多胜⑤或蛋白質。

“組合物”係意指活性劑及另一惰性(如,可偵測試劑或標記或藥學可接受載體)或活性之化合物或組合物,如佐劑之組合。

“藥學組合物”係意指包含一活性劑與一惰性或活性之載體的組合物,使得此組合物適以於體外、體內或胞內診斷或治療。

如用於後之“藥學可接受載體”一詞包含任何標準的藥學載體,如一磷酸緩衝之食鹽水溶液、水及如油/水或水/油乳劑之乳狀液,以及各種型式之濕潤劑。此組合物亦可括安定劑及防腐劑。如,載體、安定劑及佐劑,見諸於 Martin, REMINGTON'S PHARM. SCI., 15th Ed. (Mack Publ. Co., Easton (1975))。

“有效劑量”係一劑量足以影響有益或所欲之結果。可投用有效劑量於一或多個投藥、敷劑(應用)或劑量之中。

“受驗者”,“個體”或“病患”於此交互地使用,意指脊椎動物,較佳地為一哺乳類,更佳地為一人類。哺乳類包括,但不限於鼠科動物、猴子、人類,農村動物、競技動物,及寵物。

“控制”係為用於實驗中以為比較之可選擇之標的或樣品。控制可為“正”或“負”。例如,實驗之目的係以

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

決定特定癌症型式之基因的改變表現程度之相關性時，通常較佳以使用正控制（自一受驗者而得之標的或樣品，而受驗者係具有該疾病之徵候的變異及顯現症狀），以及負控制（自一受驗者得之標的或樣品，而受驗者係不具該疾病臨床症狀之改變表現）。

“基因傳遞工具”一詞係定義為任何可攜帶插入之聚核(8)酸進入寄主細胞的分子。基因傳遞工具的例子為脂質體、陽離子脂質體、如桿狀病毒、腺病毒、聯合腺病毒、及反轉錄病毒之病毒、噬菌體、黏接質體、質體、菌載體及其他通常用於各種原核及真核寄主表現之技藝的組合工具，且可被用以基因療法及簡單的蛋白質表現。

“病毒載體”係定義為組合產生之病毒或病毒顆粒，其係包含一多核(8)酸以傳遞入寄主細胞，以體內、胞內或體外。病毒載體的例子包括反轉錄載體、腺病毒載體、聯合腺病毒載體及其類似者。在藉由反轉錄載體調節基因轉移方面，載體組構係指包含反轉錄全體基因或其部分之多核(8)酸及插入之多核(8)酸。如使用於此之“反轉錄調節之基因轉移”或“反轉錄傳遞”具有相同之意義並意指可利用基因或核(8)酸序列安定地轉移入寄主細胞的方式，而此係經由病毒進入該細胞並合併其全體基因入於寄主細胞之全體基因。病毒可經由一般感染途徑或經修飾而結合到不同的寄主細胞表面受體或配位基而進入寄主細胞。用於此之反轉錄病毒係指能導引外來核(8)酸進入細胞之病毒分子，其係經由病毒或似病毒之進入機制。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明()

反轉錄病毒以 RNA 的型式攜帶遺傳訊息；然而，病毒一旦感染細胞，此 RNA 即反轉錄成 DNA 型式，而併合於寄主細胞的全體基因 DNA。此併合之 DNA 型式被稱之為原病毒。

在以如腺病毒 (Ad) 或聯合腺病毒 (AAV) 之 DNA 病毒載體調節之基因轉移方面，載體組構係指包含病毒全體基因或其部分的多核(8)酸，及即將插入之多核(8)酸。腺病毒係表現特徵相當佳並均質之病毒群，其包括超過 50 種血清類型。(見諸如，WO 95/27071)。腺病毒容易生長且不需要併合入寄主細胞全體基因。重組腺病毒-衍生載體，特別是那些可降低野生型病毒重組及產生之可能者，亦可被組構(見諸 WO 95/00655；WO 95/11984)。野生型聯合腺病毒具有高感染力及專一性以併入寄主細胞之全體基因(Hermomat 及 Muzyczka (1984) PNAS USA 81: 6466-6470；Lebkowski 等人，(1988) Mol. Cell. Biol. 8: 3988-3996)。

包含促進子及選殖位址之於可相聯操作的多核(8)酸之載體係為此技藝所熟知。如此之載體係可於體外或體內轉譯 RNA 且可商業化得之於如 Stratagene (La Jolla, CA) 及 Promega Biotech (Madison, WI)。為能最佳化表現及/或體外轉譯，可能須要移去，加入或修飾選殖株之 5' 及/或 3' 不轉錄部分以去除多餘，潛在的干擾或降低在轉譯或轉錄階段的表現之不當修飾轉錄之起始密碼子或其他序列。可改變者，同意核酸糖小體結合位址可立即

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

插入 5' 之起始密碼子以促進表現。

基因傳遞工具亦包括數種非病毒載體，其包括 DNA / 脂質體複合物，及標的病毒蛋白 DNA 複合物。可使用亦包含標的抗體或其片段的脂質體於本發明之此方法中。為加強傳遞到一細胞，本發明之核酸或蛋白質可共軛結合至抗體或其結片段，而其係結合細胞表面抗原，例如，TCR，CD3 或 CD4。

多核(8)酸係利用於此技藝所熟知之方法而被插入載體之全體基因中。例如，在適當情況下，可組構插入之載體 DNA，而此係利用限制(8)於每個分子產生互補端，而可藉由接合(8)彼此配對接合。可改變地合成接合子包含相對應於載體 DNA 中特定(8)切位址之核酸序列。此外，包含終止密碼子及適當之(8)切位址之寡糖核(8)酸可被接合插入載體中，此載體包含如部分或全部如下者：可選擇之標的基因，例如用於哺乳類細胞中以選擇穩定或短暫轉移者之新特徵素基因；源自人類 CMV 最接近啟始基因以為高度轉錄之加強子 / 促進子序列；轉錄終止及源自 SV40 以使 mRNA 穩定之 RNA 處理訊號；做為適切之游離基因複製的 SV40 多瘤複製源及 ColE1；多用途的多選殖位址；安定元件 3' 之於此插入之多核(8)酸，及用於順意及反意股 RNA 之體外轉錄之 T₇ 及 SP6 RNA 促進子。其他於本技藝中習知且可得之方法。

寄主細胞係意指包括任何個體細胞培養液，而可為或

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明（ ）

已為載體之接受者或外來之多核(8)酸，多胜⑤及／或蛋白質的合體。其亦意指包括單一細胞之後代，且此後代不必定完全相同（於外形或於全體基因或全部 DNA 補體）於原來之母細胞，其因係致於自然、意外、或故意之突變。這些細胞可為原核生物或真核生物，及包括但不限於細菌細胞、酵母細胞、植物細胞、昆蟲細胞、動物細胞、及如鼠科動物、老鼠、猿猴或人類之哺乳動物細胞。

如用於此之詞“瘤細胞”、“瘤成細胞”、“腫瘤”、“腫瘤細胞”、“癌症”及“癌症細胞”（交互使用）係指可顯現相當地自主生長的細胞，致使其顯現出異常生長的表現型，其特徵係為明顯細胞增殖之控制（亦即，去調節之細胞分裂）。瘤細胞可為惡性或良性。

“抑制”腫瘤生長係指縮減之生長狀況，當相較於控制之細胞時。腫瘤細胞之生長可以習知於此技藝之任何方法評估之，此方法包括但不限於，測量腫瘤大小、利用³H-胸腺嘧啶核(8)合體測定決定是否為腫瘤細胞，或計算腫瘤細胞數目。“抑制”腫瘤細胞生長意指任何或全部之下列階段：緩慢、延遲、停止腫瘤生長及腫瘤萎縮。

本發明的實施例

微膠粒、脂質體及其獲得的方法。

於此請求者係為一種使包覆順氣氬鉑於脂體的新方法，真可促進每單位體積順氣氬鉑之含量、降低順氣氬鉑之毒性，在靜脈注射後可針對初期腫瘤及其轉移，而顯示出

五、發明說明()

腫瘤之萎縮及於帶有人類腫瘤之 SCID 老鼠的完全治療。

順氯氮鉑係包含二個氯原子及二個氮基於過渡重金屬鉑之二價原子上的順位處的重金屬錯合物。此錯合物係為雙功能之烴基化劑及 DNA 插入劑以抑制 DNA 合成。在某一型式，順氯氮鉑係為分子量 300.1 及於水 1 毫克/毫升之限量溶解度的黃色粉末分子，其係廣泛地被用以治療癌症患者，特別是睪丸、淋巴、子宮內膜、膀胱、卵巢、頭頸鱗片之細胞癌症、乳癌，及其他許多惡性瘤，常結合亞德利亞黴素、長春花生物鹼、博來黴素、腎上腺皮質酮、紫衫醇其他抗瘤藥物和輻射療法。本發明請求降低使用於治療病人之順氯氮鉑的總體積，因其在脂體包覆型式中可增加溶解度。

使用於靜脈注射的體積通常是大量（約每位成人患者 180 毫升或約 20-120 mg/m²）投藥做為 24 小時之注射。以 25-80 min 之快速相接以 58-73 h 之較慢第二相自血漿中清除；血漿蛋白連結並自腎臟排泄之（可解釋於治療之病人中其嚴重的腎臟毒性）。腎毒性相關劑量可利用劇烈之水合作用、甘露醇、磺胺類強利尿劑及其他藥物局部克服。其他自順氯氮鉑所招致的毒性包括耳毒性、噁心及嘔吐、貧血及輕微的骨髓活性受抑制（默克之診斷及治療手冊，The Merck Manual of Diagnosis and Therapy）。本發明可克服前技術方法及組合物之限制。

因此，在一方面，本發明提供用以生產順氯氮鉑微膠

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明()

粒的方法，藉由在 1:1 到 1:2.1 的範圍內結合順氣氮鉑及磷脂醯乙二醇脂體衍生物 (PGL 衍生物) 而形成順氣氮鉑混合物。在可替換之實施例中，順氣氮鉑對 PGL 衍生物之範圍係於 1:1.2；或 1:1.4；或 1:1.5；或 1:1.6；或 1:1.8；或 1:1.9；或 1:2.0；或 1:2.1 之範圍。此混合物稍後與至少 20% 之有效量的有機溶劑，例如乙醇溶液結合而形成順氣氮鉑微膠粒。

使用於此之名詞“磷脂醯乙二醇脂體衍生物 (PGL 衍生物)”係任何能形成微膠粒並具有淨負電荷頭基之脂體衍生物。此衍生物包括但不限於二(十八烷醯基)磷脂醯乙二醇 (DPPG)、二(十四醯基)磷脂醯乙二醇、及二辛基磷脂醯乙二醇。在某方面，具有 10 到 28 個碳之碳鏈及具有不含包和側脂肪側鏈之磷脂醯乙二醇衍生物係於本發明範疇內。具有莫耳比變化的負電荷磷脂醯乙二醇脂體，給予此分子淨正 (1:1) 中性 (1:2) 或微負 (1:2.1) 之電荷將在投藥後允許針對體內之不同組織。然而，與負電荷之 PGL 結合之順氣氮鉑錯合已顯示可促進順氣氮鉑之溶解度，因而降低用以有效的抗瘤治療之藥物需求體積。除此外，順氣氮鉑及負電荷 PGL 的錯合進行到非常高的包覆效率可降低在製程中藥物流失。這些錯合物係穩定、而無沈澱物形成且在 4°C 下貯存至少 4 個月後保有療效。

使用於名詞“順氣氮鉑”包括其類似物。其例子包括碳化氮鉑、歐瑪氮鉑 (ormaplatin)、噁氮鉑、2-胺甲

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

基④咯烷(1,1-環丁烷二羧酸)鉑、珞巴氣氮鉑、1-環丁烷-二羧酸(2-)-(2-甲基-1,4-丁二胺-N,N')鉑、任尼氣氮鉑(zeniplatin)、安羅氣氮鉑(enloplatin)、內達氣氮鉑(nedaplatin)、254-S 氣氮鉑及 JM-216(雙-乙酸-胺-二氯-環己胺-鉑(IV))。

可瞭解到，雖非總以明示，係為其他正電荷藥物，包括但不限於抗瘤藥物阿黴素可用之以替代順氣氮鉑。可替換之，可依其轉換成正電荷藥物而使用其他中性型式的藥物，該轉換係藉由具有正電荷基群的衍生物。中性或負電荷之抗癌劑或其他型式的藥物之修飾而成的正電荷分子可經由有機合成所完好建立的數種方法得到。此可藉由例如置換藥物上之烴基為氨基或三甲氨基，因而導入正電荷至此化合物中。具有氨基之環烴基置換係被討論於美國專利第 5,837,868 號，Wang 等人，頒布於 1998 年 11 月 17 日。

上述之方法並不要求施行其步驟如上述所指之順序。例如，此方法可藉由結合順氣氮鉑與至少 20% 有機溶劑溶液之有效量以形成一溶液而施行之。此溶液與磷脂醯乙二醇脂體衍生物(PGL 衍生物)於 1:1 到 1:2.1 之範圍結合而形成一順氣氮鉑微膠粒。如上，順氣氮鉑對 PGL 衍生物的比例範圍係落於範圍 1:1.2；或 1:1.4；或 1:1.5；或 1:1.6；或 1:1.8 或 1:1.9 或 1:2.0 或 1:2.1。

任何有機溶劑或乙醇或其他任何醇類的配方，並不形

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

成二相系統，或其他有機溶劑（亦即，氣仿），亦即可互溶於 20% 的醇類，於此所述之方法中係為有效。例如，此醇溶液可為任何至少 30%、35%、40%、45% 上至 90%，包括於此間之任何增加。較佳地，此醇溶液係 80% 乙醇之於 DPPG，而於其他脂體之最佳百分比可能不同。

在一實施例中，DPPG 分子之部份置換係利用具有淨負電荷之胜⑤而獲得具有可穿越標的細胞膜之融合基因性質的順氣氫鉑複合物。融合基因胜⑤亦可共價結合至 PEG 及游離者而有較佳之外露。加入少量的陽離子脂體置換順氣氫鉑水溶液在最終順氣氫鉑/DPPG 錯合物之正電荷亦賦予此錯合物融合基因性質；將被陽離子脂體（如，DDAB，溴化二甲基十八烷基銨；DMRLE：溴化 N-[1-(2,3-二(十四烷氧基)丙基)-N,N-二甲基-N-(2-羥乙基)銨；DMTAP：1,2-二(十四醯基)-3-三甲基銨丙烷；DOGS：二(十八烷基)醯胺甘胺醯基精胺；DOTAP：氯化 N-(1-(2,3-二油醯氧基)丙基)-N,N,N-三甲基銨；DPTAP：1,2-二(十八醯基)-3-三甲基銨丙烷；DSTAP：1,2-二硬脂醯基-3-三甲基銨丙烷) 所取代之正電荷的百分比是小的，因為陽離子脂體的毒性。一些組合物含有一定量的融合基因雙親性脂體 DOPE 於微膠粒中。

在又一方面，順氣氫鉑微膠體係包覆入囊泡形成脂體，例如，而用於藥物傳遞。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明()

此脂體包覆順氣氨鉑具有高療效性於根治數種固體腫瘤，包括但不限於乳癌、前列腺癌、神經膠母細胞瘤多種形式、非小肺細胞癌、胰臟癌、頭頸鱗狀細胞癌及下一細胞淋巴瘤。據此之另一方面，本發明係提供利用包覆之順氣氨鉑或可替換地，其他正電荷抗瘤藥物入於脂體以治療各種人類惡瘤之一種方法，其中該脂體介於其內外膜雙層之間係具有不同的脂肪組成分。在靜脈注射入動物及人類體內後，此脂質體包覆藥物可到達初期腫瘤及其轉移。

結合包覆之順氣氨鉑與阿黴素或與其他抗瘤藥物比單一的順氣氨鉑有較高的療效。亦於根治癌症有較高療效者係為結合包覆順氣氨鉑與抗癌基因之一員，此基因包括但不限於包覆於相似型態脂質體之 p53，IL-2，IL-12，制血管素及制瘤素，和結合包覆之順氣氨鉑與 HSV-tk 加上包覆之堅塞克羅維的組合物。

在又一方面，本發明提供包覆順氣氨鉑與下列基因之結合：

(i) 野生型 (wt) p53 Cdna 表現載體在於 CMV 控制之下、肌動蛋白、或其他促進子、及可維持 p53 基因長期表現的人類複製源；需要如 T 抗原之病毒複製啟始蛋白的病毒製源，並不適於轉移 p53 基因，因為 p53 蛋白與 T 抗原互動強烈。

(ii) PAX5 cDNA 表現載體，係唯一的 p53 基因抑制子，並已知其 (wt 及突變 p53 基因兩者) 與介於 p53

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

基因插入序列 1 內之短 (10 核(8)酸) 節調區域互動強烈。在 p53 基因治療的主要缺點係去活化 wt p53 蛋白所利用 p53 之內生突變型式會在腫瘤中超表現及可與 wt p53 四聚物；內生之 p53 基因將被 Pax5 之表現所抑制，Pax5 係為 p53 基因之有效的轉錄抑制子。wt p53 cDNA 載體缺乏插入序列 1 及抑制 Pax5 結合區域的序列。抑制內生突變 p53 基因表現自癌細胞中去除突變之 p53 而可能使阿樸上臉下垂症 (apoptosis) 之誘導及腫瘤抑制，此係為重要。

(iii) 碱疹單一病毒胸腺核(8)激⑧ (HSV-tk) 基因。在動物模式及人類患者之堅塞克羅維 (GCV) 治療後碱疹單一病毒胸腺核(8)激⑧ (HSV-tk) 基因、自殺基因亦將被涵括以結合 p53 及 Pax5 基因致使干擾 DNA 合成；此被期望可增加癌細胞內之斷股並可能促使習知之鍵結至該斷股的 p53 腫瘤抑制功能而傷害 DNA 位址。在又一實施例中，堅塞克羅維係被結合而包覆入脂質體內。

基因療法於針對引入治療性基因至病人之體細胞的生理研究係為一新紀元 (Boulikas 所檢審，1998a；Martin 及 Boulikas, 1998)。兩個主要的障礙抑制了體基因轉移之成功應用：(1) 傳遞細胞的比例少及 (2) 自體外注射約 3-7 天後會失去此治療基因的轉錄訊息。

第一個問題生自於 (i) 傳遞載體無法攜帶該基因到達標的細胞表面 (極大多數的脂質體-DNA 錯合物會快速

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

地被消除於血液循環之中) ; (ii) 很難穿透細胞膜及 (iii) 在細胞內在化後會自核內體釋出該 DNA ; (iv) 無效率地進入細胞核。某些人已使用了秘密的 (stealth) 脂質體 (Martin 及 Boulikas, 1998a) , 此可持續於循環中數日並濃縮於腫瘤中。然而, 傳統的秘密脂質體並不被癌細胞吸收。於此所揭露者係設計以促進脂質體內在化的策略 (融合基因胜⑤) 。

第二個問題係源自於核內質體的失去, 此係因核⑧降解作用而無法自動複製致使在生殖細胞增殖生成稀釋, 或因外來 DNA 併合入寄主細胞之染色體後之先活作用。然而, 使用可維持質體之染色體外複製的人類序列以延伸其質體存在的期間 (見諸 Teni Boulikas 之美國專利“做以設計 (trapping) 人類複製源的選殖方法”案號第 5,894,060 號) 將可克服此限制。

於此亦請求者係為在包覆之順氯氨鉑 (命名 LipoplatinTM) 或包覆之阿黴素及結合這些藥物與包括但不限於 p53、PAX5、及 HSV-tk/ 包覆之堅塞克羅維、IL-2、IL-12、GM-CSF、制血管素、IL-4、IL-7、IFN-、TNF-、RB、BRCA 1、E1 A、聯合與包覆的 5- 氟胞嘧啶、bcl-2、MDR-1、p21、p16、bax、bcl-xs、E2F、IGFI、VEGF、TGF- 的胞嘧啶去胺⑧及類似者傳遞之後, 在動物模式及人類之乳癌、前列腺癌或其他癌症之腫瘤大量體積腫瘤抑制及降微。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

據此，本發明亦提供用以傳遞順氣氬鉑或其他療劑到細胞的方法，包括利用包覆藥物或其他可得自於本發明方法之中間產物接觸細胞。亦藉由本發明提供用以抑制在受體者內之腫瘤生長的方法，包括投藥自本發明之方法所得之包覆藥物之有效劑量至受驗者。此方法於體外、胞內或體內施行之。

因此，本發明亦提供利用包覆藥物及多核(8)酸之組合治療。如使用於此，多核(8)酸包括但不限於編碼蛋白質及胜⑤的基因及編碼核⑧及反意股序列。組合式療法比任何單一治療均較有效以根除癌症，因為此二機制係為不同且可達到相乘作用。例如，p53 蛋白可接到受損之 DNA 區域及 DNA 之自由端之特性係為已知，且亦可激化阿樸上瞼下垂症之機制於嚴重受損的細胞 (Boulikas 所檢審，1998a)。藉由順氣氬鉑強化於此傷後細胞內之阿樸上瞼下垂症合成路徑的誘導而利用轉移之 wt p53 的表現 (許多腫瘤具有突變之 p53 且無法有效的被誘導於此路徑)，可期許在癌細胞內之 DNA 自由端之再製。此一具療性的多核(8)酸亦能在基因轉殖載體併入微膠粒前，插入基因轉殖載體之中。

野生型 p53 基因的轉殖已被成功地使用以減緩在人體內許多研究之細胞培養之腫瘤細胞增殖。在最近的臨床試驗中 (Roth 等人, 1996)，使用腺病毒/p53 載體之腫瘤內注射顯示可有效對抗肺腫瘤以及在動物模式上之前列腺腫瘤 (Boulikas 所檢審，1998a)。然而，腫瘤內注射

五、發明說明()

方法，無法應用到常與癌症末期相關聯的癌細胞遷移。利用包覆之順氯氫鉑及針對體內任何區域的腫瘤之 p53 基因的系統性傳遞係為癌症治療的有效處置。本發明請求改善或部分克服此四個主要障礙的策略以成功的轉殖體基因，其係利用下列物體之脂質體傳遞：wt p53、pax5、HSV-tk、GM-CSF、IL-2、IL-12、IL-4、IL-7、IFN-、TNF-、RB、BRCA 1、E1 A、聯合與包覆的 5-氟胞嘧啶、bcl-2、MDR-1、p21、p16、bax、bcl-xs、E2F、IGFI、VEGF、TGF-、制血管素的胞嘧啶去胺⑧及其他與包覆之順氯氫鉑結合的基因和在即將於臨床測試之動物模式及病人的各種人類癌症的其他藥物。這些策略包括：

(i) 濃縮且包覆藥物及基因彈入於脂質體以降低其毒性；(ii) 藉由聚乙二醇 (PEG)、玻尿酸或其他聚合物披覆於錯合物的表面以針對固體腫瘤及其轉移 (metastases)；(iii) 強化癌細胞之攝取藥物及質體，因融合基因胜⑤或少量之陽離子脂體，及 (iv) 使用可維持游離體複製或治療基因的長期及高度表現之人類複製起點 (ORI_s) 維持基因表現。

在又一實施例中，多核(8)酸或基因更包含調節性 DNA 序列，其能維持基因的表現達數月而非數天。此可轉譯成對病患極少的處置及較低的苦痛。藉此抗癌基因較高度的表現亦可發揮強大的療效；相同的基因置放於弱調節之 DNA 控制下將失去效用。

利用 p53 基因傳送已設計出數個用以治療癌症的實驗

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

策略；本發明之新穎處係由內生型突變之 p53 型組成，其可於超過半數之人類前列腺惡瘤中過度表現，特別是使用 PAX5 表現載體可抑制較嚴重之前列腺癌的惡瘤 p53 突變型的胺基酸取代主要在其 DNA 結合區塊上，但仍可與 wt p53 型四聚物化；p53 扮演一個四聚物而高度存在人體癌症細胞之內生突變株 p53 干擾 wt p53 的腫瘤抑制功能之傳遞。

PAX5 係為一種相同區塊(homeodomain)蛋白可在發育期間決定身體結構；PAX5 係表現於哺乳類及成人發育初期，在於造血幹細胞分化期間；在發育初期，p53 基因表現會被 PAX5 抑制子所消除而允許細胞快速倍增以發育成胚胎。PAX5 在經由成人期在稍後階段會不作用而允許 p53 表現並進行其腫瘤抑制功能而調節阿樸上瞼下垂症，特別是在造血細胞系中。

使用於體基因轉殖之許多傳遞系統，每一個均有其優缺點。重組腺病毒無法有效率地複製；重組老鼠反轉錄病毒會任意併合且經核染質圍繞而失活；重組 AAV 會任意併合且無法在臨床利用性獲得高的效價。因為裝填之限制，所有外來 DNA 之最大載量均係 3.5-7.5kb。在系統傳遞後，裸露的 DNA 會被快速降解（半生期是 5 分鐘）。陽離子脂質體具毒性但不存活於超過一次心搏之循環中，且主要針對肺、肝、及心的內皮。目前，僅有“秘密”脂質體被證實可集中於腫瘤位址上（亦可於肝及脾）並可存活於延長的期間（例如，較之於非秘密之中性脂質體的一

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

天及陽離子脂質體的數秒)。然而，秘密脂質體並不被停留在胞隙空間之腫瘤細胞所攝取，脂質體會在該空間處於溶解後釋放其負載(Martin及Boulikas所檢審，1998)；然而，描述於下之本發明的一方面係利用融合基因^⑤或藉由提供部分陽離子脂體組合物或DOPE於其內雙層改良秘密脂質體，而可藉由致生之脂體雙層擾動進入到腫瘤細胞。

在利用秘密脂質體獲得藥物及基因彈的集中及攝取於動物固形腫瘤內後，第二步係為藥物及基因針對方法的效度。在安德生醫生癌症中心(M.D. Anderson Cancer Center)的人類臨床試驗使用野生型p53基因之轉殖於病患，受損於非小細胞肺癌並且利用一種Ad5/CMV/p53重組腺病毒結合順氣氬鉑局部注射於腫瘤處會顯示出在此腫瘤會具有p53突變。此臨床試驗的第一個結果在p53之腫瘤內注射後係令人鼓舞(Roth等人,1996; Boulikas所檢審，1998a)。

然而，局部注射並無法應用在常相關及較嚴重階段之惡瘤的轉移；特別地，前列腺癌會藉由涉及到特別是自骨頭所分泌之類胰島素生長因子I(IGF-I)所刺激的前列腺腫瘤增殖之機制，而將其轉移到骨頭。因此，於此所提出之傳遞系統，可於系統性注射後集中入於腫瘤細胞質量內，係頗可治療不僅於初級腫瘤，亦及於其轉移。

因本傳遞系統的本質，所提出之順氣氬鉑脂質體將主

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

要針對腫瘤。因所使用之 HSV-tk 及堅塞克羅維會併入複製 DNA，結合治療之基因將主要針對分裂細胞，以及因秘密脂質體之使用，主要在血管形成腫瘤。因此，亦可藉秘密脂質體到達之肝臟及脾臟細胞將不致被殺死。

在又一實施例中，描述於此之脂質體包覆藥物更包含融合基因胜⑤之一有效劑量。融合基因胜⑤屬於特徵為沿著長螺旋軸之厭水性梯度的螺旋雙親性胜⑤類。此厭水性梯度導致此胜⑤傾斜地插入於膜內，故而擾亂脂體核心而，藉此，促成膜融合 (Decout 等人, 1999)。

紅血球凝集素 (HA) 係為一種流行感冒病毒的同質三方 (homotrimeric) 表面糖蛋白。在感染中，於低 pH 值時，其可引導膜融合於病毒及核內體膜之間。每一個單體由受體-結合 HA1 區塊及膜-互動 HA2 區塊。HA2 區塊之 NH₂-末端區域 (胺基酸 1 到 127)，俗稱為“融合胜⑤”，插入標的膜而於促進病毒及核內體膜間之融合扮演關鍵角色。基於具有半胱胺酸在 5-14 區域的八個胺基酸取代及旋轉一標示之電子順磁共振，可結論此胜⑤可形成自具有由磷酸基 15 埃 (Å) 之最中深度的膜平面偏斜約 25 度的 α -螺旋 (Macosko 等人, 1997)。使用流行感冒病毒紅血球凝集素 HA-2 之融合基因胜⑤可很大地增加運鐵蛋白-聚離胺基酸-DNA 錯合物被細胞攝取的效率；在此例中，此胜⑤係被連接到聚離胺基酸且由運鐵蛋白受體一調節之胞噬作用傳遞此錯合物 (Boulikas 所檢審, 1998a)。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂
線

五、發明說明()

負電荷脂體的存在於膜內對一些胜⑤，且非其他的融合基因特性的表現係為重要；其中如胜⑤的融合基因作用，乃表示為飛駝鈴(fertilin)之推定的融合區塊，涉及精子-卵融合的精子表面蛋白，係依賴於負電荷脂體的存在。然而，對 HIV2 胜⑤則非如此(Martin 及 Ruyschaert, 1997)。

例如，分析流行感冒病毒紅血球凝集素 HA 之融合基因胜⑤的兩個區塊，HA-嵌合體被設計在 HA 之細胞質尾部及/或穿透膜區塊被生代(Sendai)病毒之融合基因糖蛋白 F 的相對區塊所取代處。HA 的組構被製造於人類神經纖維元 1 型(neurofibromin type 1, NF1) (殘基 1441 到 1518) 或 c-Raf-1 (殘基 51 到 131) 之胜⑤取代之處。藉由使用牛痘病毒-T7 聚合⑧短暫-表現系統可使此組構表現於 CV-1 細胞中。介於 CV-1 細胞及由母或嵌合體 HA 蛋白調節之不游離人類紅血球(RBC_s)間的膜融合顯示，在降低 pH 之後，水性螢光團鈣黃綠素之流動會發生自於預載之 RBC_s 流入蛋白質表現的 CV-1 細胞的細胞質內。而此顯示膜融合涉及脂體雙層的兩個摺疊而導致水性融合孔洞的形成(Schroth-Diez 等人, 1998)。

一不凡的發現係為 HIV 的 TAT 蛋白可穿越細胞膜(Green 及 Loewenstein, 1988) 及 TAT 的 36 個胺基酸，當其被化學地交互結合到異蛋白，而賦予形變進入細胞之能力。值得一提者係為 TAT 的 11 個胺基酸融合基因胜⑤係為核仁局限訊號(見之於 Boulikas, 1998b)。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂
線

五、發明說明()

另一個 HIV 蛋白，糖蛋白 gp41，包括融合基因胜⑤。衍生自 gp41 外區塊 (ectodomain) 之膜近側區域的線性胜⑤具有相當之應用以為一抗 HIV 試劑且藉由採用螺旋組態抑制感染性。HIV-1 gp41 的 23 個胺基酸殘基 N 端胜⑤具有能力以擾亂具負電荷大的單層囊泡。在缺乏陽離子下，其主要結構係為孔洞形成之 α -螺旋，其中當 Ca^{++} 存在時，其組態轉換至融合基因，主要延伸之 β -型式結構。HIV (ala) 帶有 R22 (某一取代) 之融合活性可被降低 70%，其中當融合基因會被完全的消除當含括一第二取代 CV2 (E) 時強調其並非為一 α -螺旋而被 HIV-1 融合胜⑤所採取之延伸結構，該胜⑤可主動地擾亂包含膽固醇，電中性膜 (Pereira 等人, 1997)。

Prion 蛋白 (PrP) 係不知功能的醣蛋白，通常見於神經及其膠質細胞的表面。其涉及的疾病，例如牛腦海綿狀病，及人類的庫賈氏 (Creutzfeldt-Jakob) 疾病，其中 PrP 係轉換為一改變之形式 (名為 PrP^{S_C})。根據電腦模式計算，PrP 之 120 到 133 及 118 到 135 區塊係傾斜的脂體相關胜⑤可以傾斜方式插入脂體雙層且可與脂質體交互作用以引導包覆鈣黃綠素的隙漏 (Pillot 等人, 1997b)。

阿茲海默類澱粉胜⑤的 C 端片段 (29-40 及 29-42 個胺基酸) 具有相關於能在體外引導脂質體融合之病毒蛋白的融合胜⑤的特性。這些特性可調節類澱粉胜⑤與細胞膜的直接交互作用並可說明類澱粉胜⑤與之部分毒性。就

五、發明說明()

流行病學及生醫連接於阿茲海默症之病歷及脂蛋白體 E (apo E) 多形性之間的觀點而言，檢驗介於三個一般的 apoE 對碘氧基苯甲醚及類澱粉胜⑤ C 段片段間的潛在的交互作用顯示僅 apoE2 及 apoE3，而無 apoE4，係為類澱粉胜⑤融合基因及聚集的特性的有效抑制劑。apoE 的保護效果以防止類澱粉聚集之形成被認為是藉由穩定之 apoE / 類澱粉胜⑤錯合物之形成所調適 (Pillot 等人, 1997a; Lins 等人, 1999)。

雙親性淨負電荷胜⑤之融合基因特性 (WAE 11)，當此胜⑤被固定在脂質體細胞膜時，其所組成之 11 個胺基酸殘基被強烈地提升；此胜⑤之融合活性似無關於 pH，而膜合併及標的膜需要藉由併入離胺基酸耦合的磷脂醯乙二醇 (PE-k)。由於此耦合胜⑤將會經由與 PE-k 之非專一性靜電交互作用，游離胜⑤無法引發 PE-k 囊泡之聚合 (Pecher 等人, 1997)。

許多研究認為在胜⑤插入細胞或脂質體之膜內脂層後，胜⑤之 α -螺旋性二級構造的穩定性係胜⑤之膜融合特性的原因； Zn^{2+} 可穩定 α -螺旋結構故可促進胜⑤的融合基因活性。例如，唾液的抑菌性胜⑤之 HEXXE 區塊，位於組織素-5 (histatin-5) 的 C-端功能區塊，一公認之鋅結合特性係呈一種螺旋狀的構形 (Martin 等人, 1999; Melino 等人, 1999; Curtain 等人, 1999)。

融合胜⑤已可與 DNA 質體組合而形成胜⑤為主之基

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

	蛋白 gp41	插入於中性磷 脂層	
120 至 133 及 118 至 135 區塊	Prion 蛋白	傾斜的脂體相關胜⑤；與脂質體交互作用而引起包覆之鈣綠黃素破裂	Pillot 等人,1997b
29-42 殘基片段	阿茲海默之 β -類澱粉胜⑤	具有代表病毒融合蛋白之傾斜片段的容量	Lins 等人,1999
毫微聚合之類澱粉 β -胜⑤ (1-40)	阿茲海默之 β -類澱粉胜⑤	引導阿樸上臉下垂病毒細胞死亡	Pillot 等人,1999
LCAT56-68 螺旋片段	卵磷脂膽固醇轉醯⑧ (LCAT)	在脂體中形成穩定的 β -鍊 (sheets)	Peelman 等人, 1999 ; Decout 等人,1999
70 個殘基胜⑤ (SV-117)	融合胜⑤及生代病毒之 N-端七價基重覆 (heptad repeat)	引導之脂體混合蛋磷脂醯膽鹽/磷脂醯乙醇與單層囊泡 (LUV _s)	Ghosh 及 Shai,1999
MSGTFGGILAGLIGLL	鴨 B 型肝炎病毒 (DHBV) 之 S 蛋白 N-端區域	插入脂體雙層的厭水核心及引導自中性及負性脂質體兩	Rodriguez-Crespo 等人,1999

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

		者之水溶性成分的隙漏	
MSPSSLLGLLAGLQVV	土撥鼠 B 型肝炎病毒 (WHV) 之 S 蛋白	插入脂體雙層的厭水核心及引導自中性及負性脂質體兩者之水溶性成分的隙漏	Rodriguez-Crespo 等人,1999
胜⑤序列 B18	膜相關海膽精子蛋白結合	引發脂體囊泡間的融合；做為結合鋅之多組織胺酸 motif, 係融合基因功能所必需	Ulrich 等人,1999
	組織素-5 (唾液抑菌胜⑤)	在 Zn^{2+} 存在下, 聚合及融合負電荷小單層囊泡	Melino 等人, 1999
由 11 個殘基組成的雙親性負電荷胜⑤ (WAE)		形成 α -螺旋插入及用定於細胞膜 (喜於 37°C) 方位幾乎平行於脂體醯	Martin 等人, 1999

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

		基鏈；促進大單層脂質體(LUV)融合	
聚離胺酸之聚合物(平均190)部分 由組胺基殘基所取代		組胺基殘基在pH低於6.0時因咪唑基團質子化而成為陽離子；打破紅血球漿質細胞膜	Midoux 及 Monsigny,1999
GLFEALLELLESLWELLLEA		雙親性胜⑤；pH 敏感性裂解劑以幫助質體自核內體釋放出來	Duguid 等人，1998
(LKKL) ₄		雙親性融合基因胜⑤，可與DMPC 四個分子交互作用	Gupta 及 Kothekar 等人，1997
53-70 個殘基(C-端螺旋)	脂蛋白體(apo) AII	引發單層脂質囊泡之融合及排除 HDL 和 Rhdl 之 apoAI	Lambert 等人，1998
90-111 個殘基	PH-30 α (一種可作用於精卵融合之蛋白)	細胞膜-融合基因活性到酸性磷脂雙層	Niidome 等人，1997

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝 · 訂 · 線

五、發明說明()

		者之水溶性成分的隙漏	
MSPSSLLGLLAGLQVV	土撥鼠 B 型肝炎病毒 (WHV) 之 S 蛋白	插入脂體雙層的厭水核心及引導自中性及負性脂質體兩者之水溶性成分的隙漏	Rodriguez-Crespo 等人,1999
胜⑤序列 B18	膜相關海膽精子蛋白結合	引發脂體囊泡間的融合；做為結合鋅之多組織胺酸 motif, 係融合基因功能所必需	Ulrich 等人,1999
	組織素-5 (唾液抑菌胜⑤)	在 Zn^{2+} 存在下, 聚合及融合負電荷小單層囊泡	Melino 等人, 1999
由 11 個殘基組成的雙親性負電荷胜⑤ (WAE)		形成 α -螺旋插入及用定於細胞膜 (喜於 37 °C) 方位幾乎平行於脂體醯	Martin 等人, 1999

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

		基鏈；促進大單層脂質體(LUV)融合	
聚離胺酸之聚合物(平均190)部分 由組胺基殘基所取代		組胺基殘基在pH低於6.0時因咪唑基團質子化而成為陽離子；打破紅血球漿質細胞膜	Midoux及Monsigny,1999
GLFEALLELLESLWELLLEA		雙親性胜⑤；pH敏感性裂解劑以幫助質體自核內體釋放出來	Duguid等人,1998
(LKKL) ₄		雙親性融合基因胜⑤，可與DMPC四個分子交互作用	Gupta及Kothekar等人,1997
53-70個殘基(C-端螺旋)	脂蛋白體(apo)AII	引發單層脂質囊泡之融合及排除HDL和Rhdl之apoAI	Lambert等人,1998
90-111個殘基	PH-30 α (一種可作用於精卵融合之蛋白)	細胞膜-融合基因活性到酸性磷脂雙層	Niidome等人,1997

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

Nef 的 N-端	人類免疫缺乏 型 1 (HIV-1) 的 Nef 蛋白	膜干擾及融合 基因活性於人 造細胞膜中； 致使細胞死亡 於 E.coli 及酵母 菌	Macreadi 等人， 1997
酪蛋白訊息胜⑤	α 2-及 β -酪 蛋白	與二(十四烷 醯基)磷脂醯 基-乙二醇及-膽 鹼脂質體互相 作用；顯示裂 解及融合基因 兩種活性	Creuzenet 等人， 1997
胺基-端序列 F1 聚胜⑤	麻疹病毒 (MV) 之 F1 聚 胜⑤	用於 CTL epitopes 之攜帶 系統	Partidos 等人，1996
23 個厭水性胺基酸於胺基-端區 域	B 型肝炎病毒 (HBV) S 蛋 白	高相似性於其 他病毒所得之 已知融合基因 胜⑤	Rodriguez-Crespo 等 人,1994
19-27 個胺基酸片段	牛白血病毒的 糖蛋白 gp51	採行雙親性結 構並於牛白血 病毒所引導之	Voneche 等人， 1992

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

		融合情況扮演 重要角色	
Ac- (Leu-Ala-Arg-Leu) ₃ - NHCH ₃	鹼性雙親性胜 ⑤	導致含有蛋黃 磷脂酸膽鹽及 蛋黃磷脂酸 (3:1) 之小單層 囊泡之含量隙 漏	Suenaga 等人, 1989 ; Lee 等人, 1992
雙親性陰離子胜⑤ E ₅ 及 E ₅ L		可模倣流行感 冒紅血球凝集 素 HA 的融合 基因活性	Murata 等人, 1991
具有 Glu-Ala-Leu-Ala (GALA) ₇ 主要重複單元的 30 個胺基酸胜 ⑤	設計以模倣病 毒融合病毒蛋 白之融合基因 序列的行為	當 pH 低至 5 時 成為雙親性 α- 螺旋; 利用 GALA 引導之 磷脂醯膽鹽小 單層囊泡的融 合需要大於 16 個胺基酸的胜 ⑤	Parente 等人, 1988
帕得辛 (pardaxin)	雙親性胜⑤; 純化自紅海老	形成電荷-閘門 , 陽離子選擇	Lelkes 及 Lazarovici, 1988

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

	鼠單一比目魚 Pardachirus marmoratus	孔；調適由磷 脂醯絲胺酸但 無磷脂醯膽鹽 之脂質體聚合	
滅革蘭菌素(線性厭水聚脞⑤)		抗生素；引導 囊泡的聚合及 融合	Massari 及 Colonna 等人, 1986; Tournois 等人, 1990
聚(Glu-Aib-Leu-Aib) (Aib 表 示 2-胺基異丁酸)		形成 α -螺旋的 雙親性結構； 利用漸降的 Ph 導致更強烈之 EYPC 脂質體及 二(十八烷醯 基磷脂醯膽鹽 脂質體的融合	Kono 等人, 1993

在微膠粒形成後，與囊泡形成之脂體的有效含量混合而形成含有脂質體的藥物。對此發明有效之脂體包括預製的中性脂質體、在粉末內的脂體、PEG-DSPE 或氫化黃豆磷脂醯膽鹽(HSPC)。囊泡形成的脂體係被擇之以得最終複合物之流動性或強硬性之專一化程度，而此最終複合物係作為外層之脂體組合物。而此可由 10-60% 膽固醇組成及剩餘之含量包括兩極磷脂體，如磷脂醯膽鹽(PC)或磷脂醯乙醇胺(PE)，具有 14-22 範圍碳氫鏈長度，

五、發明說明()

及飽和以一或多個雙 C=C 鍵。用於本發明之較佳的脂體係為膽固醇 (10-60%) 氫化黃豆磷脂醯膽鹽 (HSPC) 於 40-90%，及 1-7% 之衍生的囊泡形成之脂體 PEG-DSPE。脂質體形成具有親水性聚合物，PEG 披覆之外在脂體護層表面。PEG 鏈具有 1,000-5,000 道耳吞之分子量。其他親水性聚合物包括玻尿酸、聚乙烯④咯烷酮，DPSE，羥乙基纖維素及聚天門冬醯胺。PEG-DSPC 及 PEG-HSPC 係購自 Syngena。

在與囊泡混合形成脂體之前，乙醇或其他的有機溶劑可利用習知於此技藝之任何方法去除，例如，經由可通透膜之微膠粒的透析。

診斷和治療的方法

本發明請求治療之對象，舉例之，如老鼠、齧齒鼠類、猿猴及人類患者之具有人類癌症哺乳類動物，該癌症包括但不限於乳癌、前列腺癌、直腸癌、非小肺癌、胰臟癌、睪丸癌、卵巢癌、子宮頸癌、頭頸鱗狀細胞癌。在一方面，本發明請求包覆於脂質體之順氣氬鉑及結合下列物質之靜脈注射：包覆之阿黴素、氟去氧尿嘧啶、博萊黴素 (bleomycin)、亞德里亞黴素、長春花鹼、潑尼松、長春花新鹼，紫衫醇或輻射治療、包覆之寡核(8)酸、賦有抗癌性質的，以及包括但不限於 p53/pax5/HSV-tk 之抗癌基因群。本發明之方法係由二個主要成分組成：(i) 針對癌症細胞的能力 (ii) 此法殺死癌細胞之功效。

五、發明說明()

故而，本發明亦提供做為傳遞順氣氦鉑或其他治療試劑到細胞之方法，此法包含藉由本發明之方法獲得之包覆藥物接觸細胞。亦為本發明所提供之方法係用以抑制患者腫瘤之生長，此法包含投藥藉由本發明之方法獲得之包覆藥物的有效量。視脂體／微膠粒配方之組合分而定，於此亦請求者係為藉由靜脈投藥包覆藥物之有效含量以針對患者體內之固體腫瘤及轉移的方法以及藉由投藥包覆藥物之有效含量以穿透患者體內之腫瘤細胞膜的方法，其中此微膠粒包含一游離的融合基因胜⑤或一融合基因胜⑤脂體耦合。

此方法可於體外、胞內、體內施行之。

此方法之體外實行涉及腫瘤組織切片的移除含有腫瘤細胞之小細胞樣品的培養。此最終脂質體複合物在順氣氦鉑包覆過程所產生的任何中間產物（如示於圖 1A 之微膠粒）在適合此藥物胞內併合的條件下接觸細胞培養液。體外方法係有效以篩選決定對每一位患者最有好的藥物治療。細胞生長或增殖之抑制顯示該療法適以治療此細胞或腫瘤。每一種療法的有效藥含量隨著將被治療之腫瘤及患者而改變。有效含量可由習知此技藝者經驗地決定。

當傳送到動物時，此法可助於進一步確定該藥物或療法對每一種腫瘤型式之效果。舉一適切之動物模式的例子，可利用約 10^5 到約 10^9 於此所定義之癌細胞或標的細胞皮下注射於數群 SCID 老鼠或裸鼠（Balb/c NCR nu/

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明()

nu 雌性，Simonsen, Gilroy, CA)，當腫瘤生成時，投藥此脂質體。

於此所用之“投藥、傳遞或投遞”係意指包括任何最終會供給藥物／脂質體複合物至腫瘤質體的方法。其例子包括，但不限於，局部應用、靜脈投藥、皮下投藥或利用靜脈注射於腫瘤四週。腫瘤量測以決定腫瘤大小的縮減係使用溫尼爾（venier）尺規一週二次之二度量測。

對於人體內投藥，此藥學組合物較佳以皮下投遞，亦即，靜脈、腹膜內、皮下、椎管內注射至脊椎核心、肌內的、關節內的、肛門靜脈注射，或腫瘤內部。較佳地，此藥學組合物係利用靜脈地或腫瘤內快速濃注投藥。在其他方法，此藥學組合物可藉由製備至組織之直接應用而與標的組織接觸。此應用或可利用局部，“開放”或“密閉”步驟而獲得。利用“局部”，其意為藥學製備物之直接應用到外曝於環境中之組織，如皮膚、鼻咽、外聽道、眼睛、吸藥至肺部、生殖器黏膜及其類似者。“開放”步驟係包括切割患者皮膚並直接目視藥學製備物所使用之基本組織的步驟。其係利用如胸廓切開術而通至肺、腹腔剖術而至腹部內臟或其他手術方法可直接至標的組織的手術步驟而完成。“密切”步驟係為侵入步驟，其中內部標的組織並非直接目視，而是經由自皮膚的小傷口插入的儀器所得。例如，此製備物藉由針頭灌洗而投藥至腹膜。同樣的，藥學製備物投藥至腦脊髓膜或脊椎核心，其係藉由妥置患者以為常施於脊椎麻醉或脊椎核心的麥特拉買影像

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 · 訂 · 線

五、發明說明()

(metrazamide imaging)後，在其腰部穿刺期間注射投遞之。此製備物亦可替代之以經由內視鏡裝備而投遞之。

體內投藥可以一劑量，在治療過程中連續或間接而有效。決定最有效的投藥方式及劑量的方法係熟知此技藝者所知悉且隨著用於治療的組合物、治療的目的、被治療的標的細胞，及被治療的患者而改變。單一或多重投藥可與治療醫師所選擇之劑量標準及模式而施行之。熟知此技藝者可由經驗決定投藥試劑的方法及適當之劑量配方。

本發明的試劑及組合物可藉由與如在此藥學組合物中之活性試劑的習知方法相同之投藥而用於藥劑之製備和用於人類及其他動物的治療。

理想上，應可投藥物／脂體配方而達到其活性化合物的高峰濃度於患部上。此係可藉由，例如，藥物／脂體配方之靜脈注射而達成。藥物之所欲濃度可藉由連續注射以供給患部組織內之活性成分的治療劑量所維持。可操作性結合之使用係意圖以提供治療組合以需求每種成分藥物的總劑量較低於當每一單一治療化合物或藥物之可能需求劑量，而藉此降低副作用。

同時藥物／脂體配方可能單獨投遞，較佳地陳述其為一種包含至少一種，如上所定義之活性成分的此藥學組合物與一或多種藥學上可接受的載體因此而可選擇性地其他治療試劑。每一個載體必得“可接受”於可相容與此配方之其他成分之意義中，而不傷害患者。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

設計第三代載體以傳遞抗癌藥物及基因到固體腫瘤於此所述者係基於已有技術之五種主要改良結果：

1) 包覆抗癌藥物於立體穩定之脂質體已降低其多種毒性。此可帶給癌症患者結束化療夢魘的期待。許多目前使用的抗癌藥物具有嚴重的副作用，如落髮、嘔吐、減輕重量和致生血梗而傷害腎臟、腦部、肝臟及其他全部重要的組織。述及於此之抗癌藥物被脂體雙層的管腔所內掩，故無法視之於多數組織而藥中至其腫瘤標的物，其並非在體內的每一組織。視此固體腫瘤攝取之藥物脂質體而定，該脂質體會行使其專一的細胞毒素效果於癌細胞而未傷害一般細胞。

2) 針對全身的固體腫瘤及其轉移。超過 95% 的癌症患者係死於其轉移的併發症，而非初始的腫瘤。不論腫瘤的大小，本發明之基因藥物傳遞系統已設計於此基因和藥物彈之靜脈投藥後可以欺騙動物或人體的免疫系統，而不僅可到達初始腫瘤亦可及於其每一轉移。而此係基於本發明攜帶載體之藥物及基因之長循環時間以及經由腫瘤血管內皮的外滲透作用而定，因為腫瘤初生期之不完整及隙漏（於生長中腫瘤之新血管生成（neoangiogenesis））以及因為介於生長中的固形腫瘤及一般人體組織之液靜壓差異。本發明的脂質體於其內外層間有不同的組成分以允許有效率的包覆及針對腫瘤。

3) 利用癌細胞攝取脂質體子彈。脂質體子彈可促進與

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

胞膜的融合。類似於他處所開發之“秘密”子彈係無法穿越此癌細胞的細胞膜屏障。

4) 脂質體包覆物幾可以 100% 效率用以為抗癌藥物，寡核(8)酸及基因係為主要的改進者。藥物及基因的使用係意為最小的損失及有效的花費。此亦可轉譯成為在製造抗癌子彈時之較簡單的步驟。

5) 描述於此之獨特技術能辨識可持續表現之抗癌子彈基因達數月而非數日之調節性 DNA 序列。而此可 translate into 對病人較少之治療及較少的疼痛。因抗癌基因的較高表現量，此技術亦可行之以強的治療效果；置於弱的調節 DNA 控制下的相同基因將為不具效用。

不列的實例係意以說明，而非限制本發明。

實施例

微膠粒及脂質包覆之順氣氨鉑

做為包覆的一種配方包括下列步驟：(A) 混合順氣氨鉑（以粉末或其他型式）與 DPPG（二（十八烷醯基）磷脂醯乙二醇）或其他負電荷脂體分子於 1：1 到 1：2 莫耳比於在至少 30% 的乙醇、0.1M Tris HCL，pH7.5 以達到約 5mg/ml 的最終順氣氨鉑濃度。於順氣氨鉑及 DPPG 間之莫耳比的改變亦係針對不同組織的治療價值。

(B) 加熱於 50°C。在步驟 A 和 B 之初始粉末懸浮液，此係可產生黃色順氣氨鉑粉末之沉澱，轉換為一膠體（膠

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明()

狀的)型式；在步驟 A 和 B 之間為順氯氨鉑的轉換為水溶液型式(藉氯原子的水解及該原子之被水置換而鍵結至鉑)，此係為具有正電荷的抗瘤活性之順氯氨鉑的活性型態；此水合順氯氨鉑係可同時與負電荷脂體於 30% 乙醇中錯合成微膠體。此順氯氨鉑-DPPG 靜電錯合物已改良了於根除腫瘤之游離順氯氨鉑特性。(C) 在到達其標的物後之穿越腫瘤細胞膜之錯合物(在見於下之步驟 D 後的最終配方)特性可藉由胜⑤及可使錯合物此特性之分子的加入而改善。(D) 順氯氨鉑-DPPG 微膠體錯合物係被轉換為包覆順氯氨鉑-DPPG 單層的脂質體(第 1 圖上方)或其他型式的錯合物，其係藉由直接加入可通透的脂質體續以對生理食鹽水的透析及經由細胞膜排出而縮小這些脂質體至直徑 100-160 nm (第 1 圖的下方)。此係已加入脂質體之脂體組合物，該脂質體可決定本發明最終的順氯氨鉑配方的外表組合。

步驟(A)的改變可允許阿黴素及其他正電荷抗瘤化合物的包覆。正電荷基群的加入於中或負電荷化合物允許其包覆相似地成為脂質體。

治療上的應用

皮下植入 90 天-釋放動情激素片錠於 SCID 雌鼠中。該鼠係已被皮下注射以於 0.1ml 的 PBS 中的 7.5 百萬 MCF-7 (得之於 ATCC 的人類乳癌) 細胞於乳房脂肪厚墊處。在腫瘤形成之後，以 0.1ml 的順氯氨鉑脂質體靜脈

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

注射於此鼠之尾部。結果見於第 2 到 4 圖。

雖然上述為特定具體例的完整說明，但為習知此技藝者所顯而易見者係為在未偏離本發明精神及範疇下可進行多種改變及修飾。

參考文獻

Ban M, Hettich D, Huguet N (1994) Nephrotoxicity mechanism of cis-platinum (II) diamine dichloride in mice. *Toxicol Lett*, 71(2): 161-8

Bellon SF, Coleman JH and Lippard SJ (1991) DNA Unwinding Produced by Site-Specific Intrastrand Cross-Links of the Antitumor Drug cis-Diamminedichloroplatinum(II). *Biochemistry* 30, 8026-8035.

Bongartz J-P, Aubertin A-M, Milbaud PG, and Lebleu B (1994) Improved biological activity of antisense oligonucleotides conjugated to a fusogenic peptide. *Nucleic Acids Res*, 22, 4681-4688.

Boulikas T (1992) Evolutionary consequences of preferential damage and repair of chromatin domains. *J. Mol. Evol.* 35, 156-180.

Boulikas, T (1996a) The nonuniform repair of active and inactive chromatin domains. *Int J Oncol* 8, 65-75.

Boulikas T (1996b) A unified model explaining the preferential repair of active over inactive genes and of the transcribed over the nontranscribed strand: a leading role for transcription factors and matrix anchorage. *Int J Oncol* 8, 77-84.

Boulikas T (1996c) DNA lesion-recognizing proteins and the p53 connection. *Anticancer Res* 16, 225-242.

Boulikas T (1998a) Status of gene therapy in 1997: molecular mechanisms, disease targets, and clinical applications. *Gene Ther Mol Biol* 1, 1-172.

Boulikas T (1998b) Nucleocytoplasmic trafficking: implications for the nuclear import of plasmid DNA during gene therapy. *Gene Ther Mol Biol* 1, 713-740.

Brown SJ, Kellett PJ and Lippard SJ (1993) Ixrl, a Yeast Protein That Binds to Platinated DNA and Confers Sensitivity to Cisplatin. *Science* 261, 603-605.

Bruhn SL, Pil PM, Essigman JM, Housman DE, and Lippard SJ (1992) Isolation and characterization of human cDNA clones encoding a high mobility group

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

box protein that recognizes structural distortions to DNA caused by binding of the anticancer agent cisplatin. Proc Natl Acad Sci USA 89, 2307-2311.

Buchanan RL and Gralla JD (1990) Cisplatin Resistance and Mechanism in a Viral Test System: 5V40 Isolates That Resist Inhibition by the Antitumor Drug Have Lost Regulatory DNA. Biochemistry 29, 3436-3442.

Caraceni A, Martini C, Spatti G, Thomas A, Onofli M (1997) Recovering optic neuritis during systemic cisplatin and carboplatin chemotherapy. Acta Neurol Scand, 96(4):2 60-1.

Chao CC-K, Huang S-L and Lin-Chao S (1991) Ca²⁺-mediated inhibition of a nuclear protein that recognizes UV-damaged DNA and is constitutively overexpressed in resistant human cells: DNA-binding assay. Nucleic Acids Res. 19, 6413-6418.

Chu G and Chang E (1988) Xeroderma Pigmentosum Group E Cells Lack a Nuclear Factor That Binds to Damaged DNA. Science 242, 564-567.

Chu G and Chang E (1990) Cisplatin-resistant cells express increased levels of a factor that recognizes damaged DNA. Proc Natl Acad Sci USA 87, 3324-3327.

Clugston CK, McLaughlin K, Kenny MK and Brown R (1992) Binding of Human Single-Stranded DNA Binding Protein to DNA Damaged by the Anticancer Drug cisDiamminedichloroplatinum (II). Cancer Res 52, 6375-6379.

Creuzenet C, Durand C, Haertle T (1997) Interaction of alpha s2- and beta-casein signal peptides with DMPC and DMPG liposomes. Peptides, 18(4):463-72

Curtain C, Separovic F, Nielsen K, Craik D, Zhong Y, Kirkpatrick A (1999) The interactions of the N-terminal fusogenic peptide of HIV-1 gp41 with neutral phospholipids. Eur Biophys J, 28(5):427-36

Decout A, Labeur C, Vanloo B, Goethals M, Vandekerckhove J, Brasseur R, Rosseneu M (1999) Contribution of the hydrophobicity gradient to the secondary structure and activity of fusogenic peptides. Mol Membr Biol, 16(3):237-46.

Donahue BA, Augot M, Bellon SF, Treiber DK, Toney il-I, Lippard SJ and Essigmann JM (1990) Characterization of a DNA Damage-Recognition Protein from Mammalian Cells That Binds Specifically to Intrastrand d(GpG) and d(ApG) DNA Adducts of the Anticancer Drug Cisplatin. Biochemistry 29, 5872-5880.

Duguid JG, Li C, Shi M, Logan MJ, Alila H, Rolland A, Tomlinson E,

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

Sparrow JT, Smith LC (1998) A physicochemical approach for predicting the effectiveness of peptidebased gene delivery systems for use in plasmid-based gene therapy. *Biophys J*, 74(6):2802-14.

Eapen S, Green M, Ismail IM (1985) Kinetic studies on the diaqua form of cis-platin and various nucleobases. *Inorg Biochem*, 24(3):232-7.

Eliopoulos AG, Kerr DJ, Herod J, Hodgkins L, Krajewski S, Reed JC, Young LS (1995a) The control of apoptosis and drug resistance in ovarian cancer: influence of p53 and Bcl-2. *Oncogene*, 11(7):1217-28.

Eliopoulos AG, Kerr DJ, Maurer HR, Hilgard P, Spandidos DA (1995b) Induction of the c-myc but not the cH-ras promoter by platinum compounds. *Biochem Pharmacol*, 50(1):33-8.

Farhood H, Gao X, Son K, Yang YY, Lazo JS, Huang L, Barsoum J, Bottega R, Epan RM (1994) Cationic liposomes for direct gene transfer in therapy of cancer and other diseases. *Ann NY Acad Sci*, 716:23-34; discussion 34-5.

Fresta M, Chillemi R, Spampinato S, Sciuto S, Puglisi G (1998) Liposomal delivery of a 30-mer antisense oligodeoxynucleotide to inhibit proopiomelanocortin expression. *J Pharm Sci*, 87(5):616-25.

Ghosh IK, Shai Y (1999) Direct Evidence that the N-Terminal Heptad Repeat of Sendai Virus Fusion Protein Participates in Membrane Fusion. *J Mol Biol*, 292(3):531-546.

Green M and Loewenstein PM (1988) Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat transactivator protein. *Cell* 55, 1179-1188.

Gupta D, Kothekar V (1997) 500 picosecond molecular dynamics simulation of amphiphilic polypeptide Ac(LKKL)₄NH₂ with 1,2 di-myristoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine (DMPC) molecules. *Indian J Biochem Biophys*, 34(6):501-11.

Holler E, Bauer R, Bemges F (1992) Monofunctional DNA-platinum(II) adducts block frequently DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* 1992 May 11;20(9):2307-12.

Hughes EN, Engelsberg BN and Billings PC (1992) Purification of Nuclear Proteins That Bind to Cisplatin-damaged DNA. *J. Biol. Chem.* 267, 13520-13527.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

Judice IK, Tom JY, Huang W, Win T, Vennari J, Petropoulos CJ, McDowell RS (1997) Inhibition of HIV type 1 infectivity by constrained alpha-helical peptides: implications for the viral fusion mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(25): 13426-30.

Kim JC, Lee MH, Choi SK (1998) Synthesis and antitumor evaluation of cis-(1,2-diaminoethane) dichloroplatinum (II) complexes linked to 5- and 6-methyleneuracil and uridine analogues. *Arch Pharm Res*, 21(4):465-9.

Kono K, Nishii H, Takagishi T (1993) Fusion activity of an amphiphilic polypeptide having acidic amino acid residues: generation of fusion activity by alpha-helix formation and charge neutralization. *Biochim Biophys Acta*, I 164(1):81-90.

Lambert G, Decout A, Vanloo B, Rouy D, Duverger N, Kalopissis A, Vandekerckhove J, Chambaz J, Brasseur R, Rosseneu M (1998) The C-terminal helix of human apolipoprotein AII promotes the fusion of unilamellar liposomes and displaces apolipoprotein AI from high-density lipoproteins. *Eur J Biochem*, 253(1):328-38.

Lee S, Aoki R, Oishi O, Aoyagi H, Yamasaki N (1992) Effect of amphipathic peptides with different alpha-helical contents on liposome-fusion. *Biochim Biophys Acta*, I 103(1):157-62.

Leilces P1, Lazarovici P (1988) Pardaxin induces aggregation but not fusion of phosphatidylserine vesicles. *FEBS Lett*, 230(1-2): 131-6.

Lins L, Thomas-Soumarmon A, Pillot T, Vandekerckhove J, Rosseneu M, Brasseur R (1999) Molecular determinants of the interaction between the C-terminal domain of Alzheimer's beta-amyloid peptide and apolipoprotein E alpha-helices. *J Neurochem*, 73(2):758-69.

Macosko JC, Kim CH, Shin YK (1997) The membrane topology of the fusion peptide region of influenza hemagglutinin determined by spin-labeling EPR. *J Mol Biol*, 267(5):1 139-48

Macreadie IG, Lowe MG, Curtain CC, Hewish D, Azad AA (1997) Cytotoxicity resulting from addition of HIV-1 Nef N-terminal peptides to yeast and bacterial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 232(3):707- 11.

Martin F and Boulikas T (1998) The challenge of liposomes in gene therapy.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

Gene TherMolBiol 1,173-214.

Martin I, Pecheur El, Ruysschaert 3M, Hoekstra D (1999) Membrane fusion induced by a short fusogenic peptide is assessed by its insertion and orientation into target bilayers. *Biochemistry*, 38(29):9337-47.

Martin I, Ruysschaert 3M (1997) Comparison of lipid vesicle fusion induced by the putative fusion peptide of fertilin (a protein active in sperm-egg fusion) and the NH2-terminal domain of the HIV2 gp41. *FEBS Lett*, 405(3):351-5.

Massari 5, Colonna R (1986) Gramicidin induced aggregation and size increase of phosphatidylcholine vesicles. *Chem Phys Lipids*, 39(3):203-20.

McLaughlin K, Coren G, Masters J, Brown R (1993) Binding activities of cis-platindamage-recognition proteins in human tumour cell lines. *Int J Cancer*, 53(4):662-6.

Melino 5, Rufini 5, Sette M, Morero R, Grottesi A, Paci M, Petruzzelli R (1999) Zn(2+) ions selectively induce antimicrobial salivary peptide histatin-5 to fuse negatively charged vesicles. Identification and characterization of a zinc-binding motif present in the functional domain. *Biochemistry*, 38(30):9626-33.

Midoux P, Monsigny M (1999) Efficient gene transfer by histidylated polylysine/pDNA complexes. *Bioconjug Chem*, 10(3):406-11.

Morikawa K, Honda M, Endoh K, Matsumoto T, Akamatsu K, Mitsui H, Koizumi M (1990) Synthesis of platinum complexes of 2-aminomethylpyrrolidine derivatives for use as carrier ligands and their antitumor activities. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 38(4):930-5.

Morikawa K, Honda M, Endoh K, Matsumoto T, Akamatsu K, Mitsui H, Koizumi M (1990) Synthesis of platinum complexes of 2-aminomethylpyrrolidine derivatives for use as carrier ligands and their antitumor activities. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 38(4):930-5.

Murata M, Kagiwada 5, Hishida R, Ishiguro R, Ohnishi 5, Takahashi 5 (1991) Modification of the N-terminus of membrane fusion-active peptides blocks the fusion activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 179(2):1050-5.

Mymryk JS, Zaniewski E and Archer TK (1995) Cisplatin inhibits chromatin remodeling, transcription factor binding, and transcription from the mouse mammary

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

tumor virus promoter in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 92, 2076-2080.

Niidome T, Kimura M, Chiba T, Ohmori N, Mihara H, Aoyagi H (1997) Membrane interaction of synthetic peptides related to the putative fusogenic region of PH-30 alpha, a protein in sperm-egg fusion. J Pept Res, 49(6):563-9.

Oliver T and Mead G (1993) Testicular cancer. Curr Opin Oncol 5, 559-567.
Ormerod MG, O'Neill C, Robertson D, Kelland LR, Harrap KR (1996) cis-Diamminedichloroplatinum(H)-induced cell death through apoptosis in sensitive and resistant human ovarian carcinoma cell lines. Cancer Chemother Pharmacol, 37(5):463-71.

Pak CC, Erukulla RK, Ahl PL, Janoff AS, Meers P (1999) Elastase activated liposomal delivery to nucleated cells. Biochim Biophys Acta, 1419(2): 111-26.

Papadopoulou MV, Ji M, Bloomer WD (1998) NLCQ-1, a novel hypoxic cytotoxin: potentiation of melphalan, cisDDP and cyclophosphamide in vivo. mt j Radiat Oncol Biol Phys, 42(4):775-9.

Parente RA, Nir S, Szoka FC Jr (1988) pH-dependent fusion of phosphatidylcholine small vesicles. Induction by a synthetic amphipathic peptide. J Biol Chem, 263(10):4724-30.

Partidos CD, Vohra P, Steward MW (1996) Priming of measles virus-specific CTL responses after immunization with a CTL epitope linked to a fusogenic peptide. Virology, 215(1): 107-10.

Pecheur EI, Hoekstra D, Sainte-Marie J, Maurin L, Bienvenue A, Philippot JR (1997) Membrane anchorage brings about fusogenic properties in a short synthetic peptide. Biochemistry, 36(13):3773-81.

Peelman F, Vanloo B, Perez-Mendez O, Decout A, Verschelde JL, Labeur C, Vinaimont N, Verhee A, Duverger N, Brasseur R, Vandekerckhove J, Tavernier J, Rosseneu M (1999) Characterization of functional residues in the interfacial recognition domain of lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT). Protein Eng, 12(1):71-8.

Pereira FB, Goni FM, Muga A, Nieva IL (1997) Permeabilization and fusion of uncharged lipid vesicles induced by the HIV-1 fusion peptide adopting an extended conformation: dose and sequence effects. Biophys J, 73(4): 1977-86.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

Pil PM and Lippard SJ (1992) Specific Binding of Chromosomal Protein HMG1 to DNA Damaged by the Anticancer Drug Cisplatin. *Science* 256, 234-237.

Pillot T, Drouet B, Queille S, Labeur C, Vandekerckhove J, Rosseneu M, Pincon-Raymond M, Chambaz J (1999) The nonfibrillar amyloid beta-peptide induces apoptotic neuronal cell death: involvement of its C-terminal fusogenic domain. *J Neurochem*, 73(4): 1626-34.

Pillot T, Goethals M, Vanloo B, Lins L, Brasseur R, Vandekerckhove J, Rosseneu M (1997a) Specific modulation of the fusogenic properties of the Alzheimer beta-amyloid peptide by apolipoprotein E isoforms. *Eur J Biochem*, 243(3):650-9.

Pillot T, Lins L, Goethals M, Vanloo B, Baert J, Vandekerckhove J, Rosseneu M, Brasseur R (1997b) The 118-135 peptide of the human prion protein forms amyloid fibrils and induces liposome fusion. *J Mol Biol*, 274(3):381-93.

Prasad KN, Hernandez C, Edwards-Prasad J, Nelson J, Borus T, Robinson WA (1994) Modification of the effect of tamoxifen, cis-platin, DTIC, and interferon-alpha 2b on human melanoma cells in culture by a mixture of vitamins. *Nutr Cancer*, 22(3):233-45.

Rodriguez-Crespo I, Gomez-Gutierrez J, Nieto M, Peterson DL, Gavilanes F (1994) Prediction of a putative fusion peptide in the S protein of hepatitis B virus. *J Gen Virol*, 75 (Pt 3):637-9.

Rodriguez-Crespo I, Nunez E, Yelamos B, Gomez-Gutierrez J, Albar JP, Peterson DL, Gavilanes F (1999) Fusogenic activity of hepadnavirus peptides corresponding to sequences downstream of the putative cleavage site. *Virology*, 261(1): 133-42.

Roth, J.A. et al. (1996), "Retrovirus-mediated wild-type p53 gene transfer to tumors of patients with lung cancer" *Nature Med*. 2:985-991.

Schroth-Diez B, Ponimaskin E, Reverey H, Schmidt MF, Herrmann A (1998) Fusion activity of transmembrane and cytoplasmic domain chimeras of the influenza virus glycoprotein hemagglutinin. *J Virol*, 72(1): 133-41.

Stathopoulos GP, Rigatos S, Malamos NA (1999) Paclitaxel combined with cis-platin as second-line treatment in patients with advanced non-small cell lung cancers refractory to cis-platin. *Oncol Rep*, 6(4):797-800.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

Suenaga M, Lee S, Park NG, Aoyagi H, Kato T, Umeda A, Amako K (1989) Basic amphipathic helical peptides induce destabilization and fusion of acidic and neutral liposomes. *Biochim Biophys Acta*, 981(1): 143-50.

Toney JIH, Donahue BA, Kellett PJ, Bruhn SL, Essigmann IM and Lippard SJ (1989) Isolation of cDNAs encoding a human protein that binds selectively to DNA modified by the anticancer drug cis-diamine-dichloroplatinum(II). *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 8328-8332.

Tournois H, Fabrie CH, Burger KN, Mandersloot J, Hilgers P. van Dalen H, de Gier J, de Kruijff B (1990) Gramicidin A induced fusion of large unilamellar dioleoylphosphatidylcholine vesicles and its relation to the induction of type II nonbilayer structures. *Biochemistry*, 29(36):8297-307.

Ulrich AS, Tichelaar W, Forster G, Zschornig O, Weinkauff S, Meyer HW (1999) Ultrastructural characterization of peptide-induced membrane fusion and peptide self-assembly in the lipid bilayer. *Biophys J*, 77(2):829-41.

Vergote I, Himmelmann A, Frankendal B, Scheistroen M, Vlachos K, Trope C (1992) Hexamethylmelamine as second-line therapy in platin-resistant ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 47(3):282-286.

Vilpo JA, Vilpo LM, Szymkowski DE, O'Donovan A and Wood RD (1995) An XPG DNA repair defect causing mutagen hypersensitivity in mouse leukemia L1210 cells. *Mol Cell Biol* 15, 290-297.

Voneche V, Callebaut I, Kettmann R, Brasseur R, Bumy A, Portetelle D (1992) The 19-27 amino acid segment of gp51 adopts an amphiphilic structure and plays a key role in the fusion events induced by bovine leukemia virus. *J Biol Chem*, 267(2 1): 15 193-7.

Zhang YQ, Jiang XT, Sun QR, Zhang GQ, Wang Y (1995) Studies on CDDP-albumin microspheres for hepatic arterial chemoembolization. *Yao Hsueh Hsueh Pao*, 30(7):543-8 [Article in Chinese].

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

四、中文發明摘要 (發明之名稱：利用包覆於脂質體之順氣氬鉑及其他藥物或基因治療人體癌症)

一種用以包覆順氣氬鉑及其他正電荷藥物於內外膜間具有不同脂質體組成分的脂質體的方法係為本發明所揭露。此脂質體可於靜脈注射於動物及人類後到達初級腫瘤及其轉移。此包覆之順氣氬鉑對根除多種固形人類腫瘤具有高的療效，該腫瘤包括但不限於乳癌及前列腺癌。結合包覆之順氣氬鉑與包覆之阿黴素或與其他的抗瘤藥物係被宣稱為本治療價值。亦為本治療價值於根除癌症者係被請求以結合包覆之順氣氬鉑與許多包覆入脂質體的抗癌基因，此基因包括但不限於包覆於脂質體之 p53，IL-2，IL-12，制血管素和制瘤素，以及結合包覆之順氣氬鉑與HSV-tk加上包覆之堅塞克羅維的組合物。

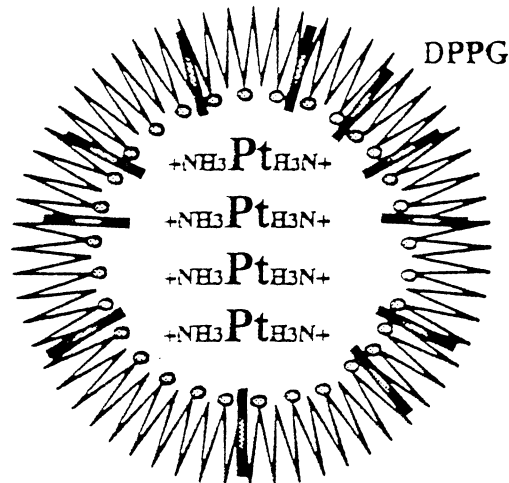
英文發明摘要 (發明之名稱：THERAPY FOR HUMAN CANCERS USING CISPLATIN AND OTHER DRUGS OR GENES ENCAPSULATED INTO LIPOSOMES)

A method for encapsulating cisplatin and other positively-charged drugs into liposomes having a different lipid composition between their inner and outer membrane bilayers is disclosed. The liposomes are able to reach primary tumors and their metastases after intravenous injection to animals and humans. The encapsulated cisplatin has a high therapeutic efficacy in eradicating a variety of solid human tumors including but not limited to breast carcinoma and prostate carcinoma. Combination of the encapsulated cisplatin with encapsulated doxorubicin or with other antineoplastic drugs are claimed to be of therapeutic value. Also of therapeutic value in cancer eradication are claimed to be combinations of encapsulated cisplatin with a number of anticancer genes including but not limited to p53, IL-2, IL-12, angiostatin, and oncostatin encapsulated into liposomes as well as combinations of encapsulated cisplatin with HSV-tk plus encapsulated ganciclovir.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

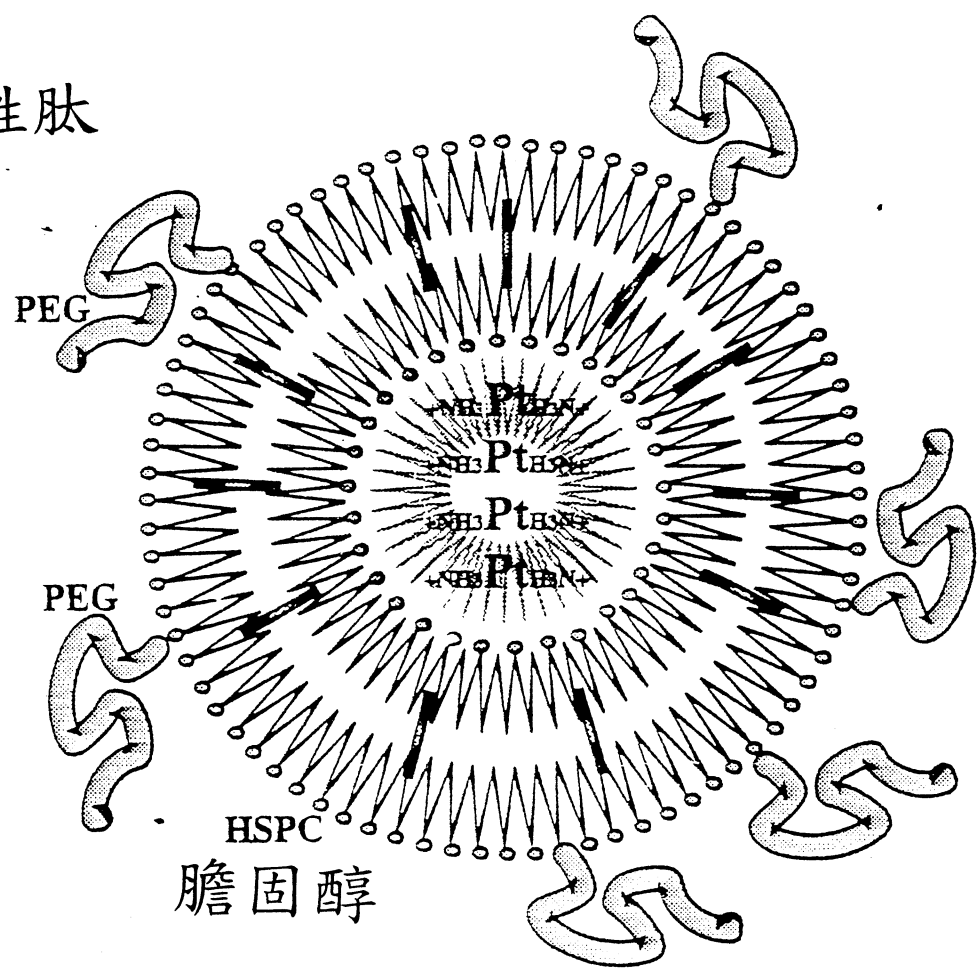
裝

訂



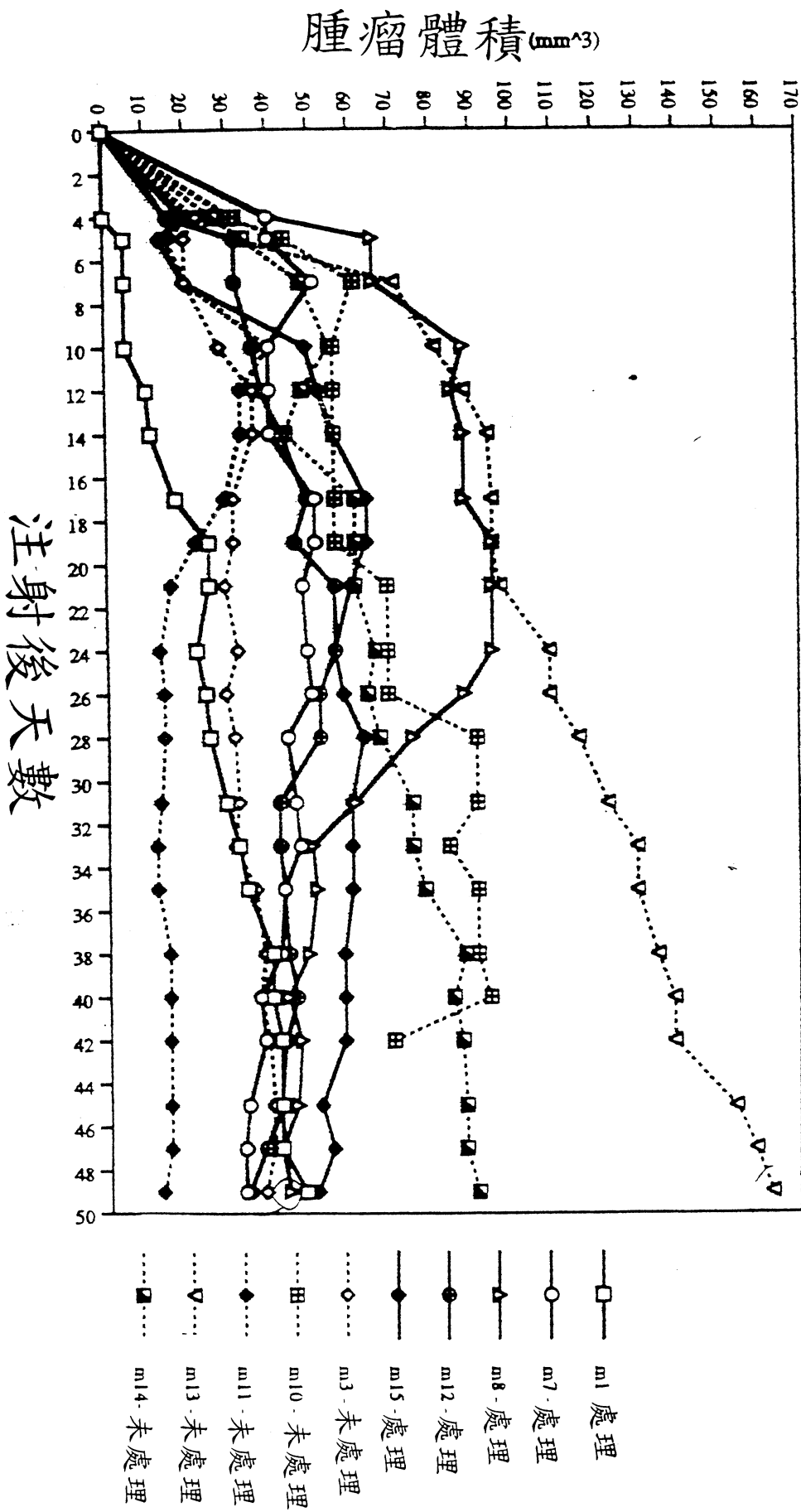
30%
乙醇微膠粒

融合基因胜肽



第 1 圖

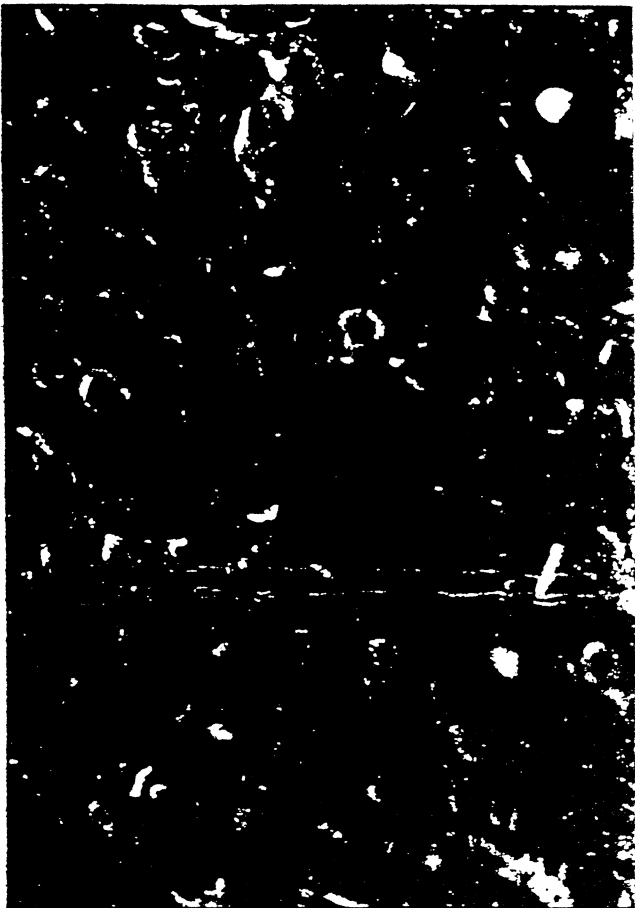
MCF-7 腫瘤生長



在 20、27、34、及 41* 天施以處理

* 僅對老鼠 1 及 8

有及無利用順處理之 SCID 老鼠之腫瘤組織圖



A. 未處理之 MCF-7 對照組

40x



C. 未處理者顯示入侵至肌肉

20x



B. 順氣氬鉑處者細胞係為阿樸上臉下垂 (apoptotic) 40x

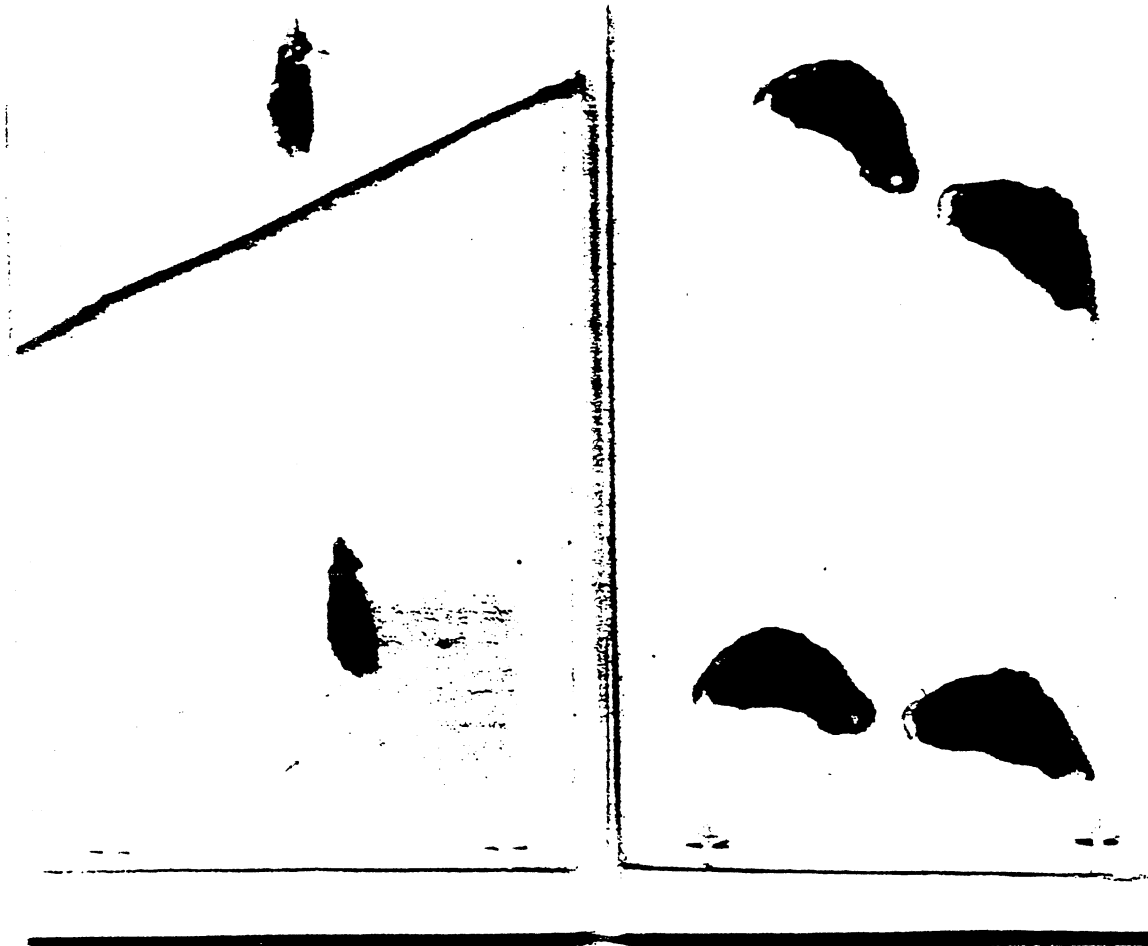


D. 順氣氬鉑處理者 入侵停止

第 4 圖

(A)

(B)



1259770

告 本

申請日期	89. 11. 3
案 號	89123244
類 別	A6DK31/00

A4
C4

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書

新 型

一、發明 名稱	中 文	利用包覆於脂質體之順氯氣鉑及其他藥物或基因治療人體癌症的醫藥組成物
	英 文	THERAPY FOR HUMAN CANCERS USING CISPLATIN AND OTHER DRUGS OR GENES ENCAPSULATED INTO LIPOSOMES
二、發明 創作人	姓 名	泰尼 保利卡斯
	國 籍	美國
	住、居所	美國加利福尼亞州 94306 帕洛奧圖市馬塔地羅大道 249 號
三、申請人	姓 名 (名稱)	泰尼 保利卡斯
	國 籍	美國
	住、居所 (事務所)	美國加利福尼亞州 94306 帕洛奧圖市馬塔地羅大道 249 號
	代 表 人 姓 名	

J:\ching\b07767.doc

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

裝 訂 線

因傳遞系統。用以濃縮質體於 40 到 200nm 毫微分子的 YKAKnWK 胜⑤與 GLFEALLELLESLWELLLEA (SEQ ID NO: 3) 雙親性胜⑤之組合，係為一種 pH 靈敏性解離劑被設計以增加質體自含有 β -半乳糖(8)⑧報導基因之核內體強化表現系統釋離出走 (Duguid 等人, 1998)。

DOPE (二油基磷脂醯乙醇胺) 係為一種融合基因脂體；N-甲基-succinly-Ala-Ala-Pro-Val-DOPE (SEQ ID NO:10) 的彈性⑧解使此衍生物成為 DOPE (總電荷為正電荷) 而傳遞一種包覆之螢光探針，鈣綠黃素，進入細胞質內 (Pak 等人, 1999)。互補至 β -腦內啡 mRNA 之區域的 30 個鹼基之寡去氧核序列於包覆入含有融合基因性質之二(十八烷醯基)-DL- α -磷脂醯基-L-絲胺氨酸的小單層囊泡 (50nm) (Fresta 等人, 1998)。

有效於本發明方法的其他融合基因胜⑤ (SEQIDNOS:4至9) 述於下表一。

融合基因胜⑤	來源蛋白	性質	參考之獻
GLFEAIAGFIENGWEGMIDGGG YC	流行感冒病毒 紅血球凝集素 HA-2		Bongartz 等人, 1994
YGRKKRRQRRR	HIV 的 TAT		Green 及 Loewenstein, 1988
23 個殘基的融合基因 N-端胜⑤	HIV-1 穿膜醣	可當做 α -螺旋	Curtain 等人, 1999

序列表

<110> 泰尼 保利卡斯
<120> 利用包覆於脂質體之順氯氬鉑及其他藥物或基因治療人體癌症

<130> TB 2001.00
<140> TW 089123244
<141> 2000-11-03
<150> US 09/434,345
<151> 1999-11-05
<160> 10

<170> FastSEQ 版本 4.0

<210> 1
<211> 24
<212> PRT
<213> 流行性感冒病毒血球凝集素 HA-2

<400> 1
Gly Leu Phe Glu Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly
1 5 10 15
Met Ile Asp Gly Gly Tyr Cys
20

<210> 2
<211> 11
<212> PRT
<213> HIV

<400> 2
Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 3
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工合成序列

<220>
<223> 利用 DNA 質體調製之融合肽以生成以肽為基底之基因投遞系統

<400> 3
Gly Leu Phe Glu Ala Leu Leu Glu Leu Leu Glu Ser Leu Trp Glu Leu
1 5 10 15
Leu Leu Glu Ala
20

<210> 4
<211> 16
<212> PRT
<213> 野鴨 B 型肝炎病毒

<400> 4
Met Ser Gly Thr Phe Gly Gly Ile Leu Ala Gly Leu Ile Gly Leu Leu
1 5 10 15

煩請委員明示
本有無變更實質內容
9月10日所提之
是否准予修正

<210> 5
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 土撥鼠 B 型肝炎病毒

 <400> 5
 Met Ser Pro Ser Ser Leu Leu Gly Leu Leu Ala Gly Leu Gln Val Val
 1 5 10 15

<210> 6
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人工合成序列

<220>
 <223> 兩性肽

<400> 6
 Gly Leu Phe Gly Ala Leu Leu Glu Leu Leu Glu Ser Leu Trp Glu Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Glu Ala
 20

<210> 7
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工合成序列

<220>
 <223> 兩性融合生成肽

<400> 7
 Leu Lys Lys Leu Leu Lys Lys Leu Leu Lys Lys Leu Leu Lys Lys Leu
 1 5 10 15

<210> 8
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工合成序列

<220>
 <223> 鹼性兩性肽

<400> 8
 Leu Ala Arg Leu Leu Ala Arg Leu Leu Ala Arg Leu
 1 5 10

<210> 9
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> 人工合成序列

<220>
 <223> 30 個胺基酸之肽，其具有該序列之主要重覆序列，設計為模擬病毒融合蛋白質之融合生成序列的行為

I259770

<400> 9

Gly Ala Leu Ala Gly Ala Leu Ala Gly Ala Leu Ala Gly Ala Leu Ala

1

5

10

15

Gly Ala Leu Ala Gly Ala Leu Ala Gly Ala Leu Ala

20

25

<210> 10

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<220>

<223>融合生成肽

<400> 10

Ala Ala Pro Val

1

第 089123244 號專利申請案修正後無劃線之申請專利範圍替換本
民國 95 年 1 月 13 日呈

1. 一種生產順氣氬鉑微膠粒的方法，其包含：
 - a) 結合適宜之緩衝液、順氣氬鉑與負電荷之磷脂醯乙二醇脂衍生物(莫耳比範圍為 1:1 至 1:2)以形成順氣氬鉑混合物；及
 - b) 結合步驟 a) 的混合物與有效含量之至少 30% 乙醇之溶液，因而生成順氣氬鉑之水溶性混合物之微膠粒。

2. 一種生產順氣氬鉑微膠粒的方法，其包含：
 - a) 結合適宜之緩衝液、順氣氬鉑與有效含量之至少 30% 乙醇之溶液以形成順氣氬鉑/乙醇溶液；及
 - b) 結合該溶液與負電荷之磷脂醯乙二醇脂衍生物(莫耳比範圍為 1:1 至 1:2)，因而生成順氣氬鉑之水溶性混合物之微膠粒。

3. 如申請專利範圍第 1 或 2 項的方法，其中該磷脂醯乙二醇脂衍生物係選自二(十八烷醯基)磷脂醯乙二醇(DPPG)、二(十四烷醯基)磷脂醯乙二醇(DMPG)、二辛基磷脂醯乙二醇(DCPG)、二硬脂基磷脂醯乙二醇(DSPG)或二油基磷脂醯乙二醇(DOPG)。

4. 如申請專利範圍第 1 或 2 項的方法，其中該莫耳比係 1:1。

5. 如申請專利範圍第1或2項的方法，其更包含結合有效含量之自由融合基因胜⑤、融合基因胜⑤-脂偶合物或偶合至步驟a)之混合物的融合基因胜⑤-聚乙二醇(PEG)-氫化黃豆磷脂醯膽鹼(HSPC)，其中該融合基因胜⑤係在N或C-端延伸1-6個負電荷之胺基酸，因此能夠靜電結合至該順氣氬鉑之水溶性混合物。

6. 如申請專利範圍第5項的方法，其中該自由融合基因胜⑤或融合基因胜⑤脂偶合物包含二油基磷脂醯乙醇胺(DOPE)或二油基磷脂醯乙醇胺(DOPE)/陽離子脂。

7. 一種順氣氬鉑微膠粒，其係由申請專利範圍第1或2項的方法獲得。

8. 一種順氣氬鉑微膠粒，其係由申請專利範圍第5項的方法獲得。

9. 一種包覆順氣氬鉑微膠粒的方法，其包含混合有效含量之脂肪與申請專利範圍第1或2項的方法所獲得之順氣氬鉑微膠粒。

10. 一種順氣氬鉑包覆體，其係由申請專利範圍第9項的方法獲得。

11. 如申請專利範圍第9項的方法，其中該脂肪係選自可通透之中性脂質體，其包含10-60%的膽固醇、40-90%的氫化黃豆磷脂醯膽鹼(HSPC)、1-7%的聚乙二醇(PEG)-氫化黃豆磷脂醯膽鹼(HSPC)及聚乙二醇(PEG)-二硬脂醯基磷脂醯乙醇胺(DSPE)。

12. 如申請專利範圍第9項的方法，其中該脂肪包含10-60%的膽固醇。

13. 一種獲得順氣氬鉑/脂複合物的方法，該複合物當被投遞至患者時能夠欺騙免疫系統之巨噬細胞，該方法包含混合有效含量之申請專利範圍第10項的順氣氬鉑包覆體與有效含量之脂肪，該脂肪係選自聚乙二醇(PEG)-二硬脂醯基磷脂醯乙醇胺(DSPE)、聚乙二醇(PEG)-二硬脂醯基磷脂醯乙醇(DSPC)或玻尿酸-二硬脂醯基磷脂醯乙醇胺(DSPE)。

14. 如申請專利範圍第1或2項的方法，其更包含自順氣氬鉑微膠粒移除乙醇。

15. 如申請專利範圍第14項的方法，其中該移除乙醇係利用順氣氬鉑微膠粒經由可透膜的透析而移除乙醇。

16. 一種經包覆之順氣氬鉑脂質微膠粒，其係可由申

請專利範圍第13項的方法獲得。

17. 一種經包覆之順氯氮鉑脂質/複合物，其係可由申請專利範圍第13項的方法獲得。

18. 一種活體外投遞順氯氮鉑至細胞的方法，其包含使申請專利範圍第16項的經包覆之順氯氮鉑脂質微膠粒與細胞接觸。

19. 一種活體外投遞順氯氮鉑至細胞的方法，其包含使申請專利範圍第17項的經包覆之順氯氮鉑脂質/複合物與細胞接觸。

20. 一種用於抑制病患腫瘤生長的醫藥組成物，其包含有效含量之申請專利範圍第16項的經包覆之順氯氮鉑脂質微膠粒及醫藥上可接受之載體。

21. 一種用於抑制病患腫瘤生長的醫藥組成物，其包含有效含量之申請專利範圍第17項的經包覆之順氯氮鉑脂質/複合物及醫藥上可接受之載體。

22. 一種用於穿透病患之腫瘤細胞膜的醫藥組成物，其包含有效含量之申請專利範圍第16項的經包覆之順氯氮鉑脂質微膠粒或申請專利範圍第17項的經包覆之順氯

氣鉑脂質/複合物，及醫藥上可接受之載體。

23. 一種用於穿透病患之腫瘤細胞膜的醫藥組成物，其包含有效含量之申請專利範圍第7項的順氣鉑微膠粒及醫藥上可接受之載體。

24. 一種用於抑制病患腫瘤生長的醫藥組成物，其包含有效含量之申請專利範圍第10項的順氣鉑包覆體及選自p53(分子量為53,000道耳吞的細胞週期蛋白質)、pax5(paried box gene 5，配對盒基因5，為B細胞系列特異性啟動蛋白)或HSV-tk(疱疹單一病毒胸腺核(8)激^⑧)之基因。

25. 如申請專利範圍第24項的醫藥組成物，其中該醫藥組成物更包含有效含量之堅塞克羅維(ganciclovir)包覆體。

26. 如申請專利範圍第24項的醫藥組成物，其中將與順氣鉑結合之基因係為任一，或結合之包覆體IL-2(interleukin-2，介白素-2)、IL-4(interleukin-4，介白素-4)、IL-7(interleukin-7，介白素-7)、IL-12(interleukin-12，介白素-12)、GM-CSF(granulocyte-macrophage colony-Stimulating factor，顆粒球巨噬細胞群落刺激子)、IFN- γ (γ -干擾素(interferon))、TNF- α (tumor necrosis facor- α ， α -腫瘍

壞死子)、RB(retinoblastoma gene, 視網膜胚細胞瘤基因)、BRCA 1(breast cancer associated gene 1, 乳癌相關基因 1)、E1A(adenovirus 5 early 1A(E1A) gene, 腺病毒5早期1A基因)、與5-氟胞嘧啶包覆體組合之胞嘧啶去胺⑧、bcl-2 (B-cell lymphoma 2 gene, B細胞淋巴瘤2基因)、MDR-1(multidrug resistance gene, 多藥耐藥基因)、p21(分子量為21,000道耳吞的細胞週期蛋白質, 週期素依賴性激酶的抑制劑)、p16(分子量為16,000道耳吞的細胞週期蛋白質, 週期素依賴性激酶的抑制劑)、bax (bcl-2相關的某一(x)蛋白質)、bcl-xs(一種bcl-2及bcl-xL的顯性抑制子(dominant negative repressor), bcl-2及bcl-xL皆可抑制細胞凋亡, bcl-xL為bcl-2家族的抗細胞凋亡成員)、E2F(一種轉錄子家族, 控制涉及細胞週期調控的基因之抑制)、IGFI(胰島素相仿的生長激素I)、VEGF(血管內皮細胞生長子)、TGF- β (腫瘤生長子 β)及類似物者。

27. 一種治療人類癌症的組成物, 其包含申請專利範圍第10項的順氣氬鉑包覆體, 及寡核(8)酸、核⑧、三倍體或PNA(peptide nucleic acid, 肽鏈核甘酸)包覆體。

28. 一種治療人類癌症的組成物, 其包含申請專利範圍第10項的順氣氬鉑包覆體, 及選自阿黴素、氟去氧尿

氧尿嘧啶、博萊黴素、亞德里亞黴素、長春花鹼、潑尼松、長春花新鹼或紫衫醇之藥物。

29. 如申請專利範圍第9項的方法，其中該形成囊泡之脂肪係呈溶液或粉末之型式。