



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119183454 A

(43) 申请公布日 2024.12.24

(21) 申请号 202380033760.X

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

(22) 申请日 2023.04.25

11256

(30) 优先权数据

2022-073640 2022.04.27 JP

专利代理人 牛蔚然

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.10.11

(51) Int.Cl.

C07F 9/572 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2023/016320 2023.04.25

A61K 9/127 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/210645 JA 2023.11.02

A61K 31/403 (2006.01)

(71) 申请人 卫材R&D管理有限公司

A61K 41/00 (2020.01)

地址 日本东京都

A61K 45/00 (2006.01)

申请人 国立大学法人浜松医科大学

A61K 47/14 (2017.01)

(72) 发明人 菊池宽 兵头健治 奥直人

A61K 47/28 (2006.01)

清水广介 成田雄大

A61K 50/00 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

C07D 209/60 (2006.01)

C09B 23/08 (2006.01)

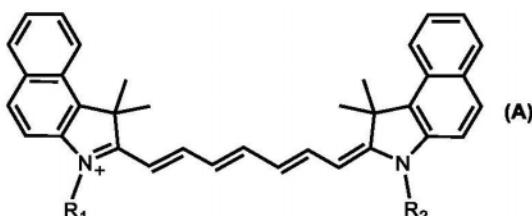
权利要求书4页 说明书55页 附图10页

(54) 发明名称

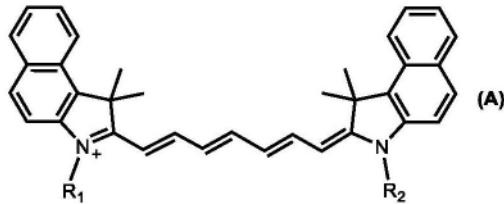
ICG脂质衍生物和包含其的基于脂质的颗粒

(57) 摘要

[问题]为了提供:可以形成具有优异稳定性和/或可以选择性地释放药物的基于脂质的颗粒的ICG脂质衍生物;和含有这种ICG脂质衍生物的基于脂质的颗粒。[解决方案]一种基于脂质的颗粒,其包含由下式(A)表示的化合物或其药学上可接受的盐,其中R₁和R₂各自独立地表示-(CH₂)_k-CONH-R₃;R₃表示选自由以下组成的组的基团:- (CH₂)_m-OP0₃⁻-CH₂-CH(CH₂OCOR₄)₂(OCOR₅)、支链C₁₄至C₄₀烷基、和支链C₁₄至C₄₀烯基;R₄和R₅各自独立地表示直链或支链C₁₃至C₂₁烷基或直链或支链C₁₃至C₂₁烯基;k表示从2至4的整数;并且m表示从2至4的整数。



1. 一种由下式(A)表示的化合物或其药学上可接受的盐：



其中

R₁和R₂各自独立地表示-(CH₂)_k-CONH-R₃；

R₃表示选自由以下组成的组的基团：-(CH₂)_m-OP(O₃⁻)-CH₂-CH(CH₂O-COR₄)(OCOR₅)、支链C₁₄至C₄₀烷基、和支链C₁₄至C₄₀烯基；

R₄和R₅各自独立地表示直链或支链C₁₃至C₂₁烷基或直链或支链C₁₃至C₂₁烯基；

k表示从2至4的整数；并且

m表示从2至4的整数。

2. 根据权利要求1所述的化合物，其中

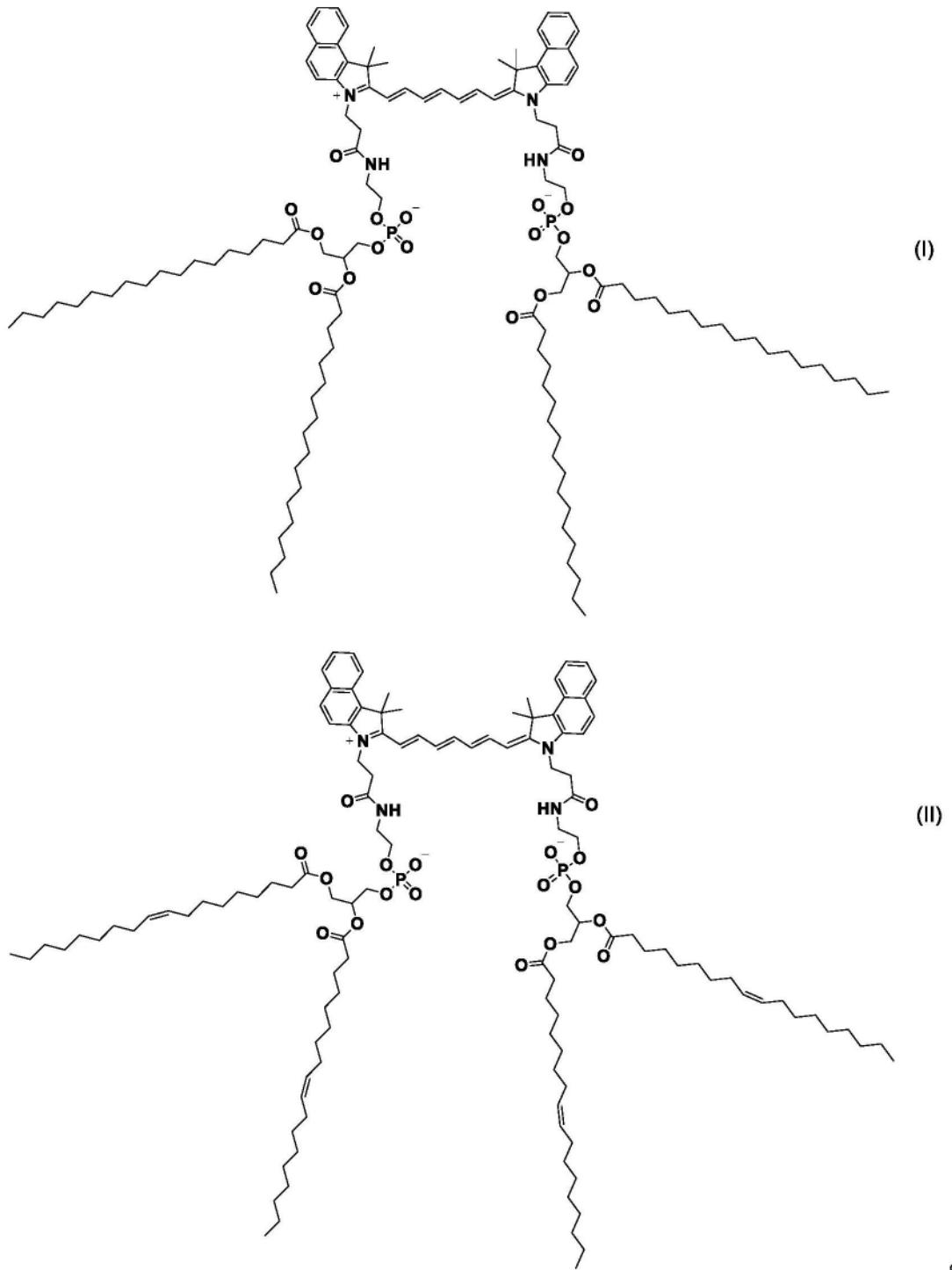
R₁和R₂各自独立地表示-(CH₂)₂-CONH-R₃；

R₃表示-(CH₂)_m-OP(O₃⁻)-CH₂-CH(CH₂O-COR₄)(OCOR₅)；

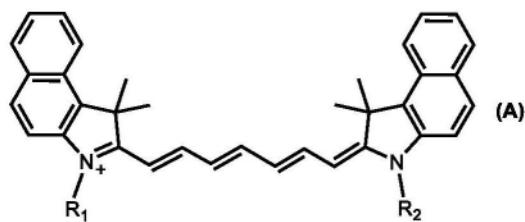
R₄和R₅各自独立地表示直链C₁₃至C₂₁烷基或直链C₁₃至C₂₁烯基；并且

m表示从2至4的整数。

3. 一种化合物，其选自由下式(I)或式(II)表示的化合物，或其药学上可接受的盐：



4. 一种基于脂质的颗粒，其包含由下式 (A) 表示的化合物或其药学上可接受的盐：



其中

R_1 和 R_2 各自独立地表示 $-(CH_2)_k-CONH-R_3$ ；

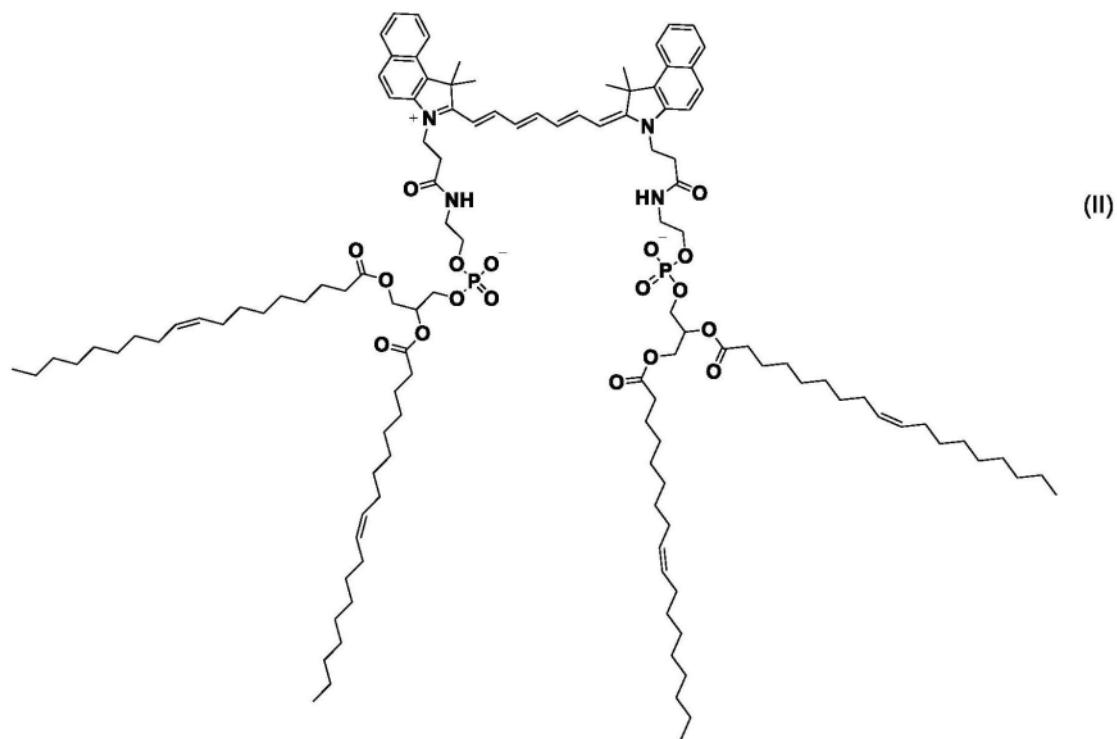
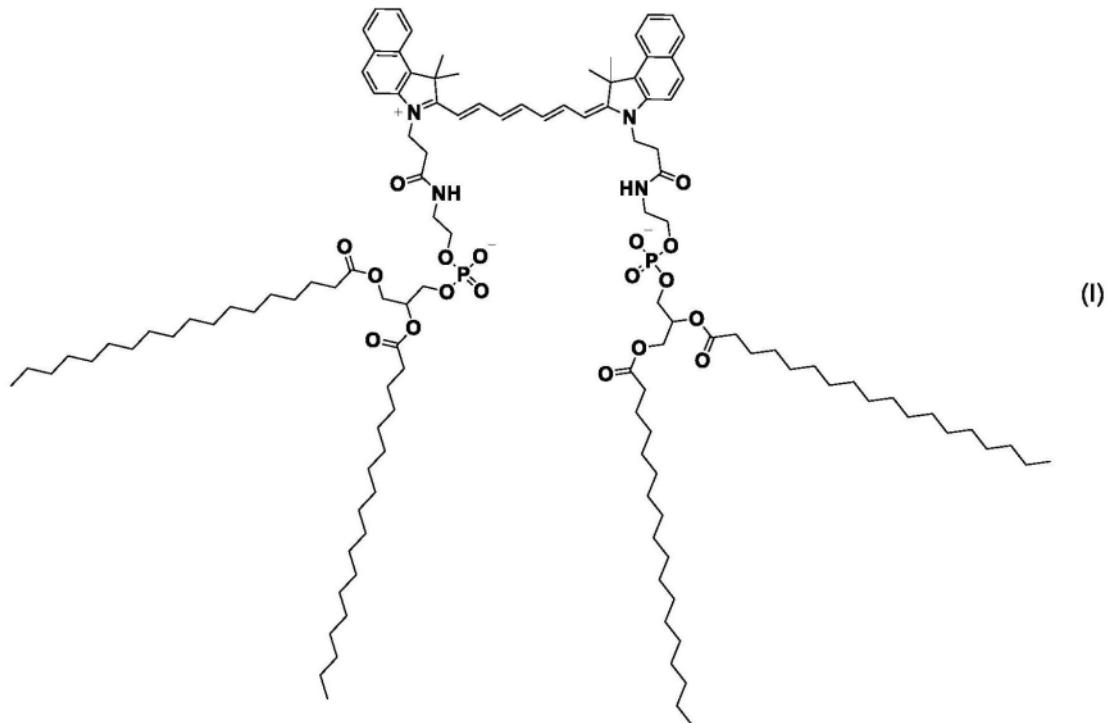
R_3 表示选自由以下组成的组的基团： $-\left(\text{CH}_2\right)_m-\text{OPO}_3^--\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_2\text{OCOR}_4)(\text{OCOR}_5)$ 、直链C₁₄至C₂₂烷基、直链C₁₄至C₂₂烯基、支链C₁₄至C₄₀烷基、和支链C₁₄至C₄₀烯基；

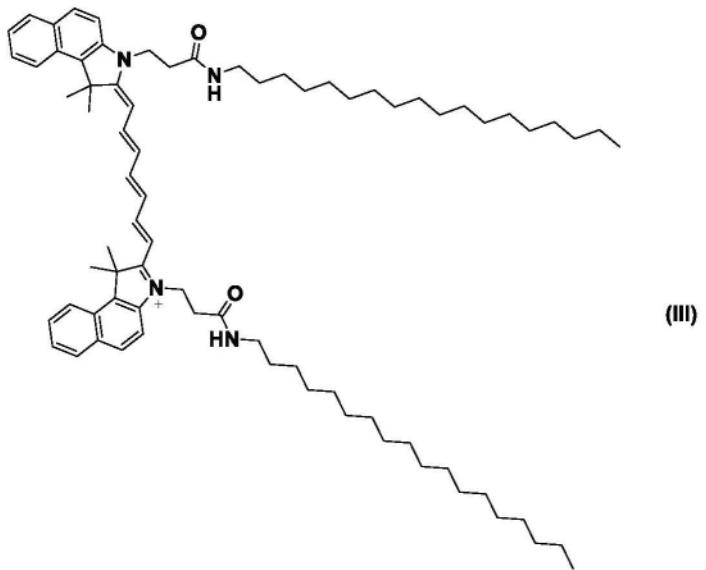
R_4 和 R_5 各自独立地表示直链或支链C₁₃至C₂₁烷基或直链或支链C₁₃至C₂₁烯基；

k表示从2至4的整数；并且

m表示从2至4的整数。

5. 根据权利要求4所述的基于脂质的颗粒，其包含选自由下式(I)至(III)表示的化合物组成的组的化合物或其药学上可接受的盐：





6. 根据权利要求4或5所述的基于脂质的颗粒,其另外固定或支持至少一种药物。
7. 根据权利要求4至6中任一项所述的基于脂质的颗粒,其中该药物包括抗癌剂。
8. 根据权利要求4至7中任一项所述的基于脂质的颗粒,其中该基于脂质的颗粒进一步包含选自由中性脂质、聚乙二醇修饰的脂质、和固醇组成的组的至少一种脂质。
9. 根据权利要求4至8中任一项所述的基于脂质的颗粒,其具有30至200nm的平均粒径。
10. 根据权利要求4至9中任一项所述的基于脂质的颗粒,其中该基于脂质的颗粒是聚合物胶束或脂质体。
11. 一种药物组合物或诊断组合物,其包含根据权利要求1至3中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,或根据权利要求4至10中任一项所述的基于脂质的颗粒。
12. 根据权利要求11所述的药物组合物或诊断组合物,其用于选自光动力学超高温疗法、光动力学疗法和荧光成像中的至少一种选择。

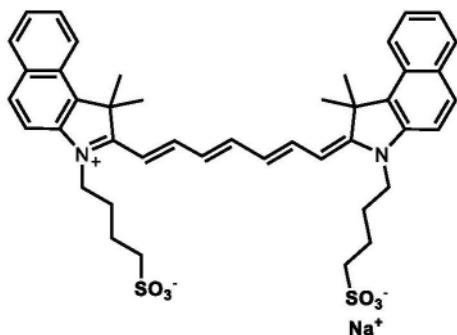
ICG脂质衍生物和包含其的基于脂质的颗粒

技术领域

[0001] 本发明涉及ICG脂质衍生物和包含其的基于脂质的颗粒，并且涉及前述物质的应用。

背景技术

[0002] 呋哚菁绿 (ICG)，作为一种近红外发射有机染料，是具有以下结构的化合物。



ICG在被近红外波长区域中的光激发时表现出荧光(近红外荧光能力)。另外，ICG在近红外区域中表现出吸收波长，并且在用近红外光照射时表现出发热作用(加热作用, HT作用)和活性氧生成作用(光动力学作用,PDT作用)。因为ICG是一种被批准用于施用到身体中的物质，并且因为ICG在近红外波长区域(活体对该近红外波长区域是高度可透过的)中表现出上述作用，所以已经针对ICG在各种医学领域中的应用而对其进行研究。具体而言，通过使用掺入ICG的颗粒或分子聚集体，已经在分子成像技术、分子探针技术、药物递送系统(DDS)等的应用中进行了研究和开发。

[0003] 例如，ICG被用于利用其近红外荧光能力的荧光成像(FI)中。受试者体内的ICG分布可以通过以下方式进行成像：向受试者施用ICG并在一定时间之后测量由受试者体内的ICG在用来自外部的光照射时生成的荧光信号；例如，这用于鉴定前哨淋巴结。例如，PTL 1(日本专利申请公开号2001-299676)披露了一种使用ICG的近红外荧光能力的前哨淋巴结检测方法。PTL 2(WO 2011/152046)披露了一种包含脂质体的荧光探针，该脂质体含有通过用烷基链或磷脂修饰基本ICG骨架产生的ICG脂质衍生物；这被用作可以长时间产生高荧光强度的荧光探针。PTL 3(日本专利申请公开号2010-266295)披露了一种具有通过乳化剂诱导形成和聚集多个胶囊生成的囊泡簇的荧光组织标志物，如通过由磷脂和近红外荧光染料(例如，ICG)的组合形成的囊泡在亲水溶剂中包封提供。

[0004] 还研究了使用ICG的光声成像(PAI)。PAI是一种成像方法，其检测由吸收了脉冲照射光的光吸收剂的热膨胀产生的超声波(光声或PA)。例如，光声成像和荧光成像在NPL 1(Akers WJ等人, ACS Nano.[ACS纳米]2011年1月25日;5(1):173-182,2011)中检查，并且使用通过修饰ICG提供的ICG衍生物作为近红外荧光染料，将支持这种ICG衍生物的全氟化碳(PFC)颗粒(负载ICG的PFC颗粒)用作探针。在该文献中，ICG衍生物作为用于成像的探针完全负载在一部分颗粒上，并且不考虑ICG衍生物本身用于携带药物的用途。另外，药物(例如，抗癌剂和抗生素)典型地是水溶性的，但是在该文献中使用负载ICG的PFC颗粒的超声造

影介质是颗粒的O/W乳液,其中全氟化碳是核心物质,并且因此从实际观点来看,难以将水溶性药物掺入这种乳液中。

[0005] 使用ICG的HT作用和PDT作用的光动力学超高温疗法(PHT)和将局部化疗与PHT组合的光动力学超高温化疗(PHCT)是已知的。例如,PTL 4(日本专利申请公开号2010-69001)披露了一种光动力学超高温化疗,其使用ICG作为光敏染料并且利用其发热作用和活性氧生成作用。另外,PTL 5(WO 2000/41726)披露了一种使用光敏剂(例如,ICG)的经皮光动力学疗法,并且披露了一种包含光敏剂的脂质体递送系统作为光敏剂递送系统。

[0006] 还已经寻求在DDS中使用含有ICG的化合物。PTL 6(WO 2013/051732)披露了一种包封药物的脂质体,其含有与ICG结合的脂质体膜组成材料;这可以用于例如DDS。

引用列表

专利文献

[0007] PTL 1:日本专利申请公开号2001-299676

PTL 2:WO 2011/152046

PTL 3:日本专利申请公开号2010-266295

PTL 4:日本专利申请公开号2010-69001

PTL 5:WO 2000/41726

PTL 6:WO 2013/051732

非专利文献

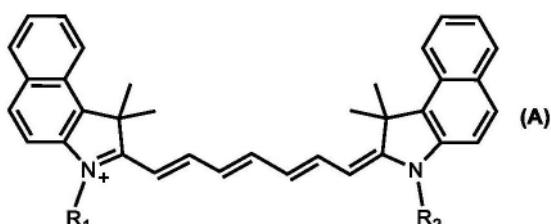
[0008] NPL 1:Akers WJ等人,ACS Nano.[ACS纳米]2011年1月25日;5(1):173-182,2011

发明内容

[0009] 虽然已经提出了大量的含有ICG的颗粒,但是仍然需要可以用于各种医学和诊断应用中的ICG脂质衍生物和含有其的颗粒。

[0010] 本发明例如如下。

[0011] [1]一种由下式(A)表示的化合物或其药学上可接受的盐:



其中

R₁和R₂各自独立地表示-(CH₂)_k-CONH-R₃;

R₃选自由以下组成的组:- (CH₂)_m-OP(O₃⁻)-CH₂-CH(CH₂OCOR₄) (OCOR₅)、支链C₁₄至C₄₀烷基、和支链C₁₄至C₄₀烯基;

R₄和R₅各自独立地表示直链或支链C₁₃至C₂₁烷基或直链或支链C₁₃至C₂₁烯基;

k表示从2至4的整数;并且

m表示从2至4的整数。

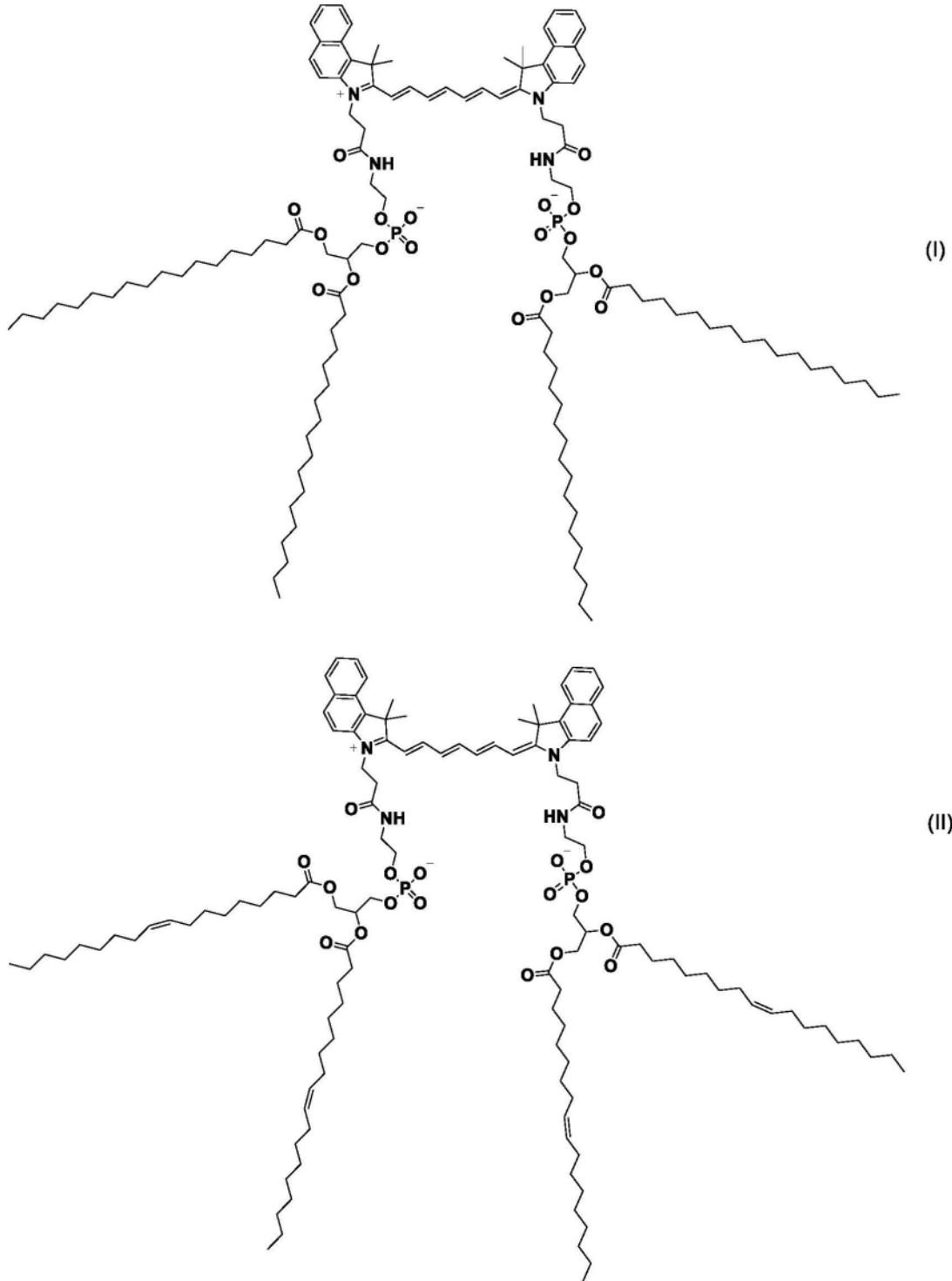
[2]根据[1]所述的化合物,其中

R₁和R₂各自独立地表示-(CH₂)₂-CONH-R₃;

R_3 表示 $-\left(\text{CH}_2\right)_m-\text{OPo}_3^--\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_2\text{OCOR}_4)(\text{OCOR}_5)$ ；

R_4 和 R_5 各自独立地表示直链 C_{13} 至 C_{21} 烷基或直链 C_{13} 至 C_{21} 烯基；并且
 m 表示从2至4的整数。

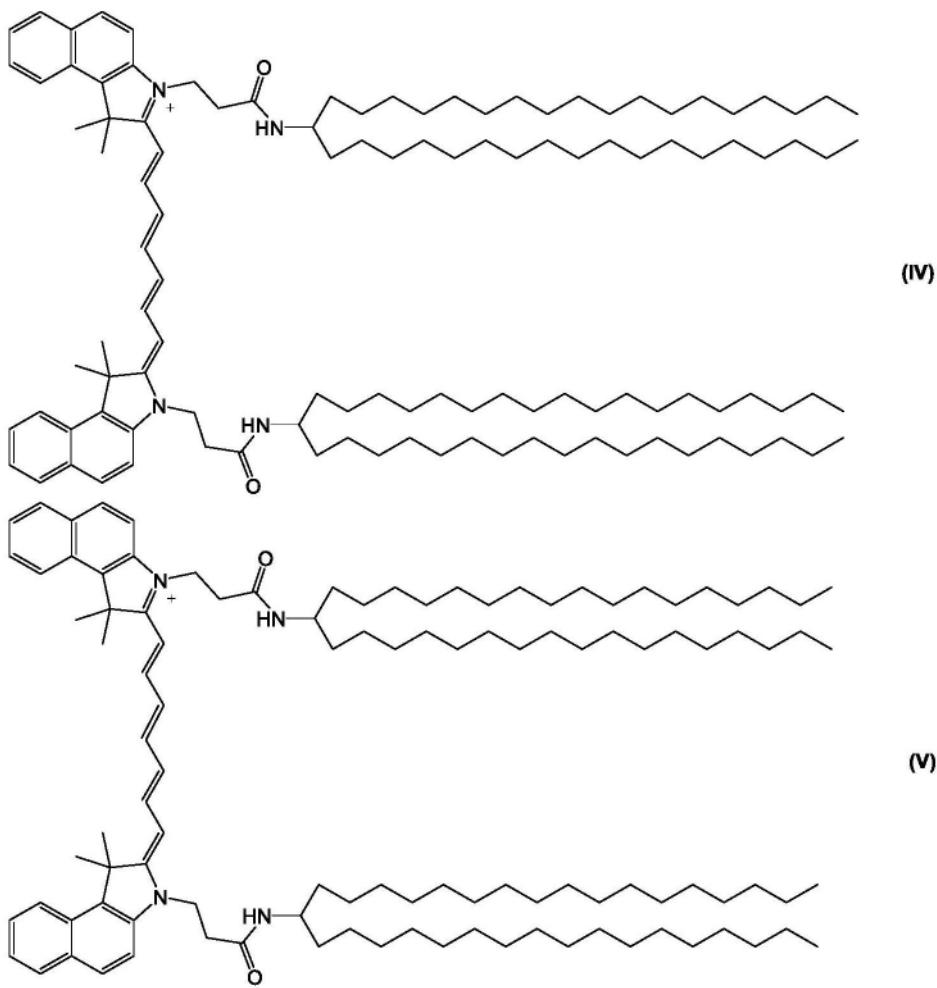
[3]一种化合物，其选自由以下组成的组：由下式(I)或式(II)表示的化合物，或其药学上可接受的盐：



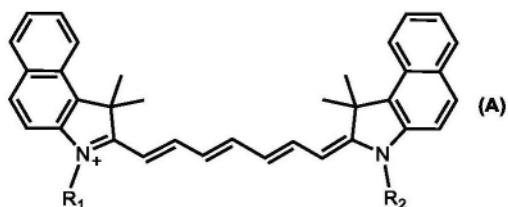
[0012] [3-1]根据[1]所述的化合物，其中
 R_1 和 R_2 各自独立地表示 $-\left(\text{CH}_2\right)_2-\text{CONH}-R_3$ ，并且

R_3 选自由以下组成的组:支链C₁₄至C₄₀烷基和支链C₁₄至C₄₀烯基。

[3-2]根据[3-1]所述的化合物,其选自由以下组成的组:由下式(IV)和式(V)表示的化合物,或其药学上可接受的盐:



[0013] [4]一种基于脂质的颗粒,其包含由下式(A)表示的化合物或其药学上可接受的盐:



其中

R_1 和 R_2 各自独立地表示 $-(CH_2)_k-CONH-R_3$;

R_3 选自由以下组成的组: $-(CH_2)_m-OPO_3^- - CH_2 - CH(CH_2OCOR_4)(OCOR_5)$ 、直链C₁₄至C₂₂烷基、直链C₁₄至C₂₂烯基、支链C₁₄至C₄₀烷基、和支链C₁₄至C₄₀烯基;

R_4 和 R_5 各自独立地表示直链或支链C₁₃至C₂₁烷基或直链或支链C₁₃至C₂₁烯基;

k 表示从2至4的整数;并且

m 表示从2至4的整数。

[4-1]根据[4]所述的基于脂质的颗粒,其中

R₁和R₂各自独立地表示-(CH₂)₂-CONH-R₃；

R₃表示-(CH₂)_m-OP(O₃⁻)-CH₂-CH(CH₂OCOR₄)(OCOR₅)；并且

R₄和R₅各自独立地表示直链C₁₃至C₂₁烷基或直链C₁₃至C₂₁烯基；并且

m表示从2至4的整数。

[4-2]根据[4]所述的基于脂质的颗粒，其中

R₁和R₂各自独立地表示-(CH₂)₂-CONH-R₃，并且

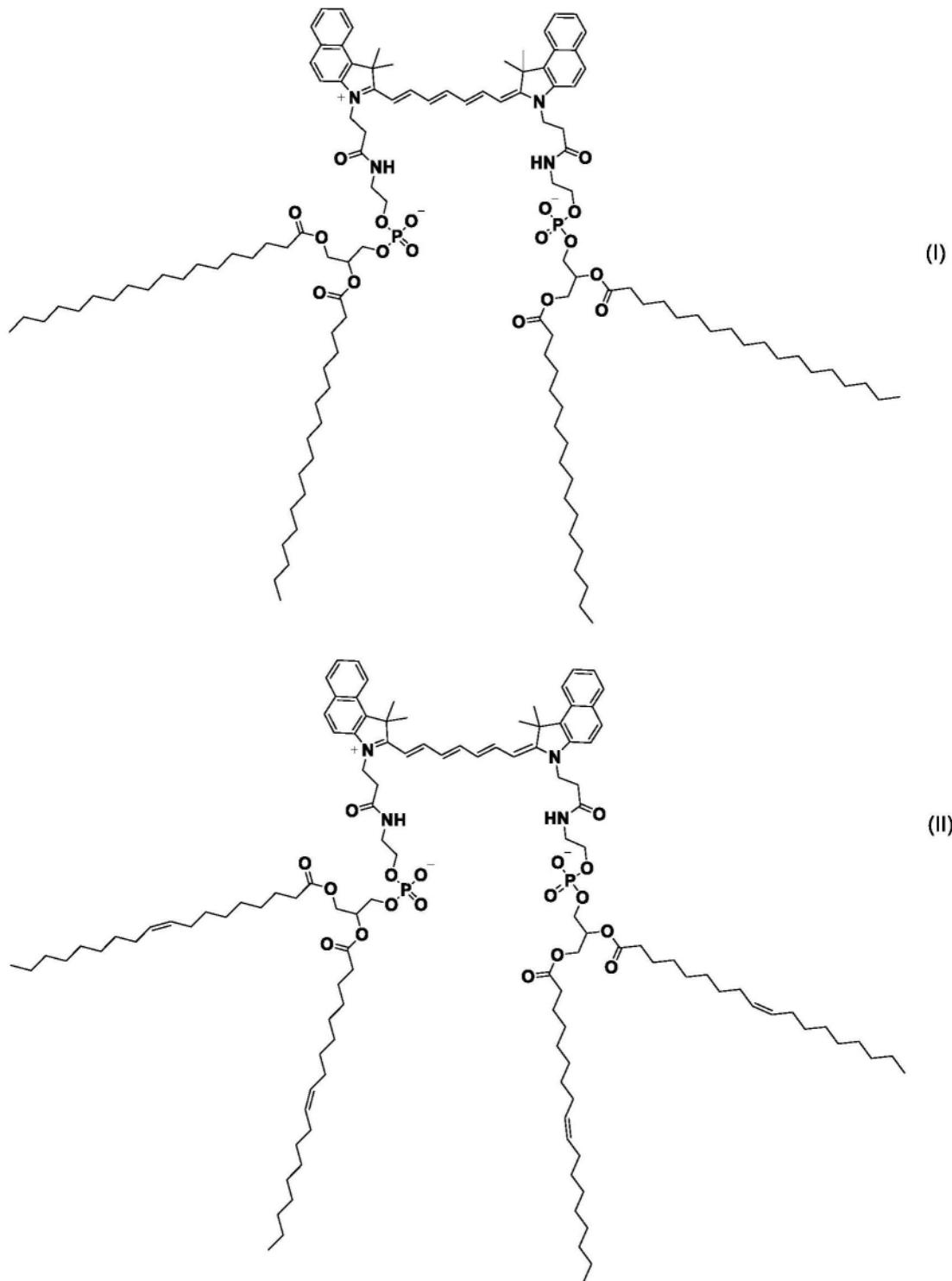
R₃选自由以下组成的组：直链C₁₄至C₂₂烷基、直链C₁₄至C₂₂烯基、支链C₁₄至C₄₀烷基、和支链C₁₄至C₄₀烯基。

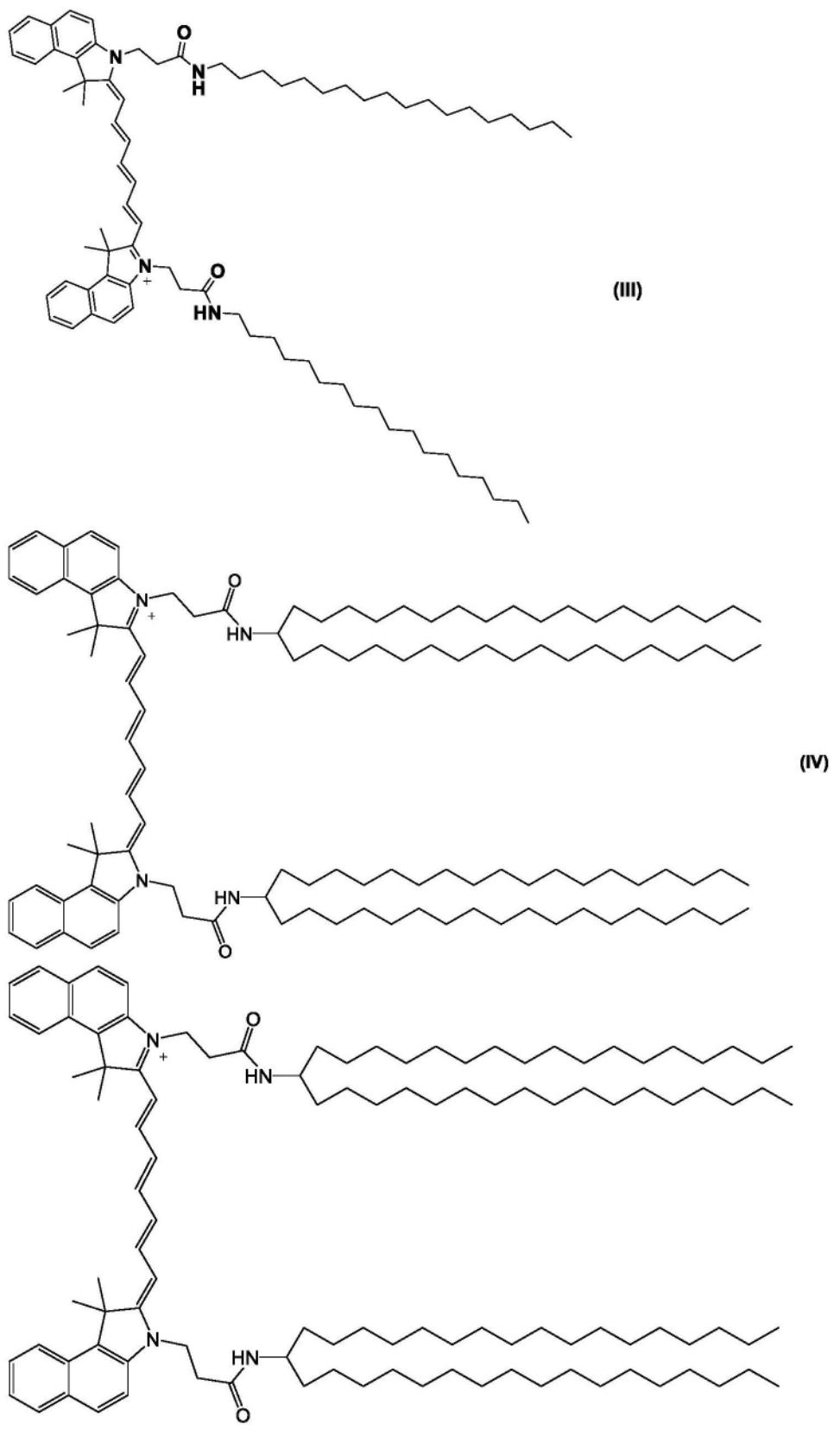
[4-3]根据[4]所述的基于脂质的颗粒，其中

R₁和R₂各自独立地表示-(CH₂)₂-CONH-R₃，并且

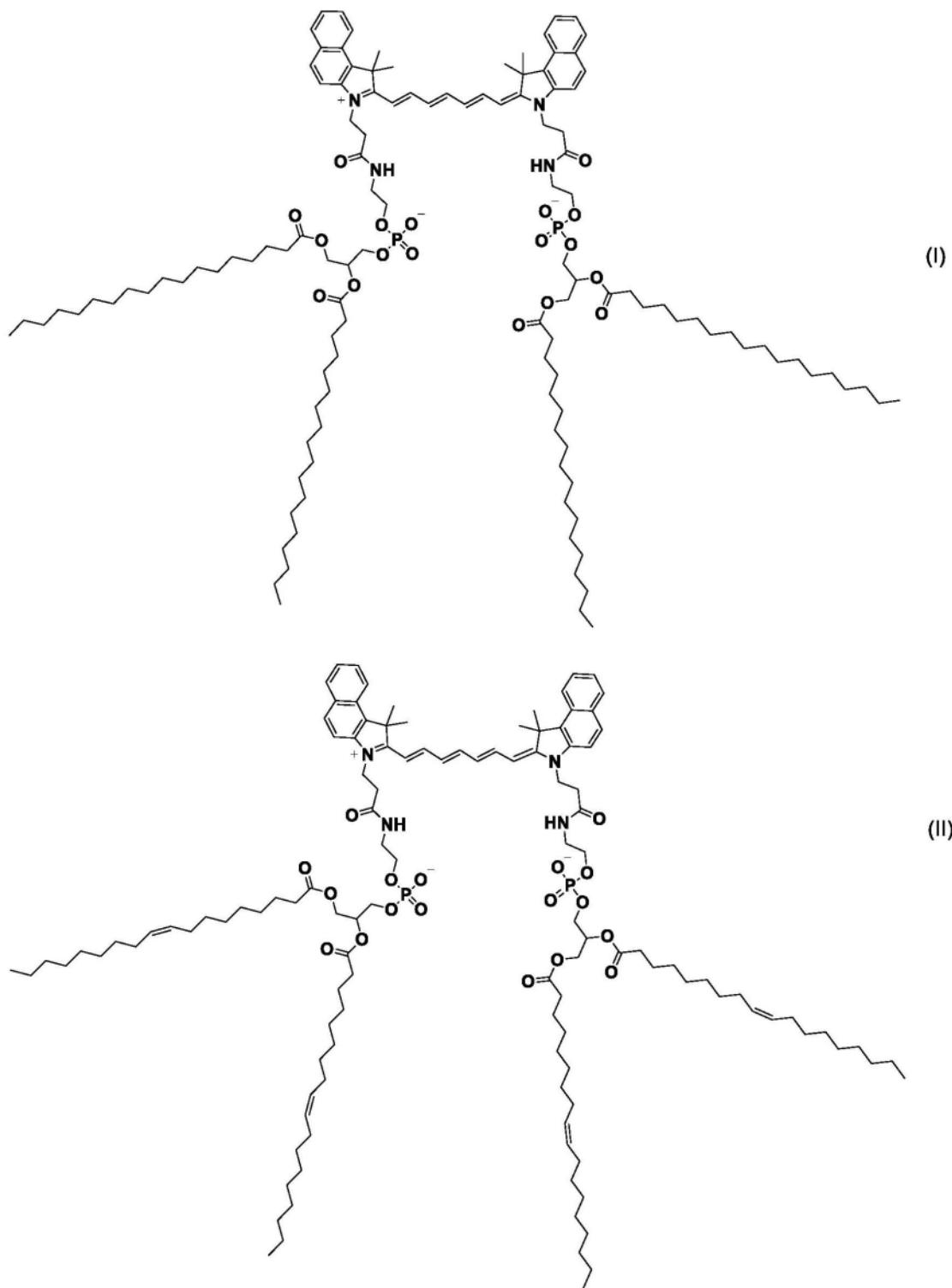
R₃选自由以下组成的组：支链C₁₄至C₄₀烷基和支链C₁₄至C₄₀烯基。

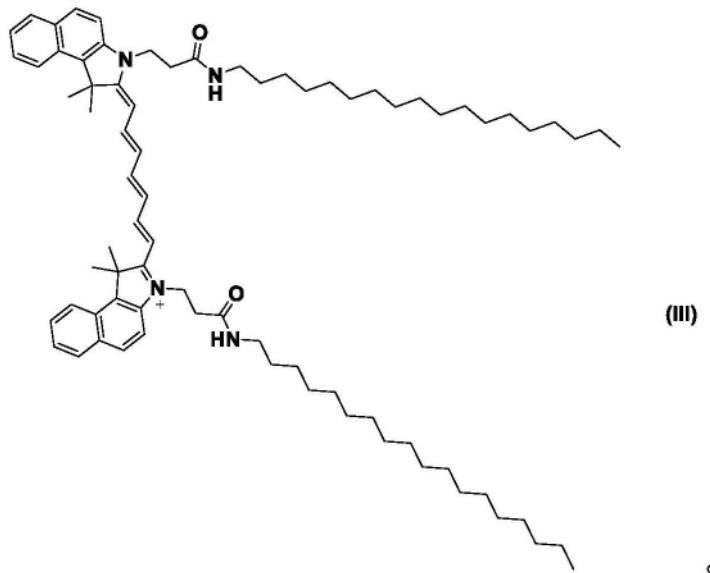
[4-4]根据[4]所述的基于脂质的颗粒，其包含选自由下式(I)至(V)表示的化合物组成的组的化合物或其药学上可接受的盐：





[5]根据[4]所述的基于脂质的颗粒,其包含选自由下式(I)至(III)表示的化合物组成的组的化合物或其药学上可接受的盐:





[0014] [6]根据[4]、[4-1]至[4-4]和[5]中任一项所述的基于脂质的颗粒,其另外固定或支持至少一种药物。

[7]根据[4]至[6]和[4-1]至[4-4]中任一项所述的基于脂质的颗粒,其中该药物包括抗癌剂。

[8]根据[4]至[7]和[4-1]至[4-4]中任一项所述的基于脂质的颗粒,其中该基于脂质的颗粒进一步包含选自由中性脂质、聚乙二醇修饰的脂质、和固醇组成的组的至少一种脂质。

[9]根据[4]至[8]和[4-1]至[4-4]中任一项所述的基于脂质的颗粒,其具有30至200nm的平均粒径。

[10]根据[4]至[9]和[4-1]至[4-4]中任一项所述的基于脂质的颗粒,其中该基于脂质的颗粒是聚合物胶束或脂质体。

[10-1]根据[10]所述的基于脂质的颗粒,其中该基于脂质的颗粒是脂质体。

[11]一种药物组合物或诊断组合物,其包含根据[1]至[3]、[3-1]和[3-2]中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,或根据[4]至[10]、[4-1]至[4-4]和[10-1]中任一项所述的基于脂质的颗粒。

[11-1]根据[11]所述的药物组合物,其用于治疗癌症。

[12]根据[11]所述的药物组合物或诊断组合物,其用于选自光动力学超高温疗法、光动力学疗法和荧光成像中的至少一种选择。

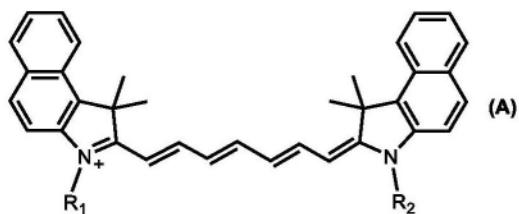
[0015] [13]一种用于产生包封药物的脂质体的方法,该方法包括:

由至少一种脂质产生脂质体的步骤;

替换该脂质体的外相以获得脂质体分散体的步骤,该脂质体分散体含有在内相与外相之间具有硫酸铵离子梯度和/或pH梯度的脂质体;以及

将药物与该脂质体分散体混合以将该药物包封在该脂质体分散体的脂质体中的步骤,

其中该至少一种脂质包含由下式(A)表示的化合物或其药学上可接受的盐:



其中

R₁和R₂各自独立地表示-(CH₂)_k-CONH-R₃；

R₃选自-(CH₂)_m-OPO₃²⁻-CH₂-CH(CH₂OCOR₄)₂(OCOR₅)、直链C₁₄至C₂₂烷基、直链C₁₄至C₂₂烯基、支链C₁₄至C₄₀烷基、和支链C₁₄至C₄₀烯基；

R₄和R₅各自独立地表示直链或支链C₁₃至C₂₁烷基或直链或支链C₁₃至C₂₁烯基；

k表示从2至4的整数；并且

m表示从2至4的整数。

[14]根据[4]至[10]、[4-1]至[4-4]和[10-1]中任一项所述的脂质复合物在产生药物组合物或诊断组合物中的用途。

[15]一种用于治疗癌症的方法，该方法包括向受试者施用根据[11]所述的药物组合物。

[16]光动力学超高温疗法、光动力学疗法或荧光成像，这些疗法或成像包括向受试者施用根据[11]所述的药物组合物或诊断组合物。

[17]根据[4]至[10]、[4-1]至[4-4]和[10-1]所述的脂质复合物或根据[11]所述的药物组合物用于在癌症治疗中使用的用途。

[18]根据[4]至[10]、[4-1]至[4-4]和[10-1]所述的脂质复合物或根据[11]所述的药物组合物用于在选自光动力学超高温疗法、光动力学疗法或荧光成像中的至少一种选择中使用的用途。

[0016] 根据本发明的ICG脂质衍生物具有以下作用中的一种或多种。

(1) 根据本发明的ICG脂质衍生物可以形成表现出优异稳定性(特别是在血液中的稳定性)的基于脂质的颗粒(特别是脂质体)。

(2) 根据本发明的ICG脂质衍生物可以形成表现出优异稳定性(特别是在血液中的稳定性)的包封药物的基于脂质的颗粒(特别是脂质体)。在一些方面，该包封药物的基于脂质的颗粒可以用作DDS中的药物载体。

(3) 用根据本发明的ICG脂质衍生物构建的基于脂质的颗粒(特别是脂质体)表现出优异的药物包封效率。

(4) 用根据本发明的ICG脂质衍生物构建的基于脂质的颗粒(特别是脂质体)容易进行药物包封。在一些方面，即使在使用其中在已经由ICG脂质衍生物产生空脂质体之后将药物从脂质体外部负载到脂质体中的方法的情况下，也可以获得具有优异稳定性的包封药物的脂质体。

(5) 在用根据本发明的ICG脂质衍生物构建的基于脂质的颗粒(特别是脂质体)的情况下，包封的药物可以通过近红外光照射来选择性地释放到该颗粒的外部。

(6) 在用根据本发明的ICG脂质衍生物构建的基于脂质的颗粒(特别是脂质体)的情况下，可以通过用近红外光照射来有效地产生加热和/或活性氧，并且可以增加相应分散

介质的温度。因此,含有根据本发明的ICG脂质衍生物的基于脂质的颗粒可以在光动力学超高温疗法和/或光动力学疗法中使用。在一些方面,含有根据本发明的ICG脂质衍生物的基于脂质的颗粒可以充当温度敏感性脂质体。

(7) 含有根据本发明的ICG脂质衍生物的基于脂质的颗粒(特别是脂质体)在用激光光照射时产生荧光。在一些方面,含有根据本发明的ICG脂质衍生物的基于脂质的颗粒因此用于荧光成像。例如,含有根据本发明的ICG脂质衍生物的基于脂质的颗粒可以充当用于荧光成像的探针。

(8) 在一些实施例中,提供了含有根据本发明的ICG脂质衍生物或基于脂质的颗粒的药物组合物或诊断组合物。

附图说明

[0017] [图1]图1提供了在实例A1中产生的ICG-diSA的¹H NMR图。

[图2]图2提供了在实例A2中产生的ICG-diDOPE的¹H NMR图。

[图3]图3提供了在实例A3中产生的ICG-diDSPE的¹H NMR图。

[图4]图4提供了在对比实例A1中产生的ICG-DOPE的¹H NMR图。

[图5]图5是示出在实例和对比实例中产生的ICG和ICG脂质衍生物的吸收光谱的图。

[图6]图6示出了阿霉素(DOX)由于暴露于LED光而从脂质体中的释放行为。左侧的图给出了由于暴露于LED光(近红外光)来自实例B7的ICGLip73-DOX和对比实例B3的Lip73-DOX的阿霉素释放比率(%) ;右侧的图给出了由于暴露于LED光(近红外光)来自实例B8的ICGLip82-DOX和对比实例B4的Lip82-DOX的阿霉素释放比率(%)。

[图7A]图7A示出了顺铂由于暴露于LED光而从脂质体中的释放行为。左侧的图给出了由于暴露于LED光(近红外光)来自实例C1的ICGLip73-Cis和对比实例C1的Lip73-Cis的顺铂释放比率(%) ;右侧的图给出了由于暴露于LED光(近红外光)来自实例C2的ICGLip82-Cis和对比实例C2的Lip82-Cis的顺铂释放比率(%)。

[图7B]图7B是示出在LED暴露(近红外光)下,实例C1和C2以及对比实例C1和C2的脂质体分散体(ICGLip73-Cis、Lip73-Cis、ICGLip82-Cis、Lip82-Cis)的温度的时间变化的图。

[图8]图8示出了在暴露于LED光之前和之后,使用热成像照相机(E5,菲力尔系统公司(Flir Systems))测量的接受生理盐水(盐水)或脂质体配制品(ICGLip、Lip-DOX、ICGLip-DOX)的小鼠的实体瘤部位的温度。

[图9]图9示出了由于施用生理盐水(盐水)或脂质体配制品(ICGLip、Lip-DOX、ICGLip-DOX)和/或暴露于LED光(+LED)引起的癌症治疗作用(实体瘤的癌症体积的变化(自药物施用当天的相对比率))。

[图10]图10示出了由于施用生理盐水(盐水)或脂质体配制品(ICGLip、Lip-DOX、ICGLip-DOX)和/或暴露于LED光(+LED)引起的小鼠体重变化。

[图11]图11示出了在暴露于LED光之前和之后,使用热成像照相机(E5,菲力尔系统公司)测量的接受生理盐水(盐水)或脂质体配制品(ICGLip、Lip-Cis、ICGLip-Cis)的小鼠的实体瘤部位的温度。

[图12]图12示出了由于施用生理盐水(盐水)或脂质体配制品(ICGLip、Lip-Cis、ICGLip-Cis)和/或暴露于LED光(+LED)引起的癌症治疗作用(实体瘤的癌症体积的变化(自药物施用当天的相对比率))。

[图13]图13示出了由于施用生理盐水(盐水)或脂质体配制品(ICGLip、Lip-Cis、ICGLip-Cis)和/或暴露于LED光(+LED)引起的小鼠体重变化。

具体实施方式

[0018] 在下文中通过提供实施例、实例等来详细描述本发明；然而，本发明不限于下文提供的实施例、实例等，并且可以在不背离本发明的基本特征的范围内自由地修改和执行。本说明书中描述的所有文件和出版物都通过援引以其全文并入在本说明书中，而不管其目的。

[0019] 在下文中描述了本说明书中使用的术语等的含义，并且下文提供了对本发明的详细描述。

“颗粒”，尤其被称为纳米球、微球、纳米胶囊和微胶囊，是具有从纳米尺寸到微米尺寸(1nm 至 $1\mu\text{m}$ 或 um)的平均粒径的颗粒。颗粒可以是分散在乳液中的相或在悬浮液中的内相。

“基于脂质的颗粒”代表含有通过分子间力彼此物理键合的多种脂质的颗粒。“基于脂质的颗粒”典型地是包含通过脂质缔合形成的膜样分子组件的颗粒。

“颗粒载体”或“基于脂质的颗粒载体”代表可以固定或支持化学物质(例如，药物)的颗粒或基于脂质的颗粒。在一个实施例中，“颗粒载体”或“基于脂质的颗粒载体”指示一种结构，该结构是生物相容的并且在足够的时间间隔内对化学和/或物理降解具有足够的抗性，以使得能够达到所需靶标。

“固定的”代表在外表面上和/或在内部不可移动的布置。

“支持”代表例如药物在颗粒的外表面上和/或内部可移动的布置。

“脂质体”代表通过双层分子膜形成的闭合囊泡。脂质体典型地由单个脂质双层或多个脂质双层构建。

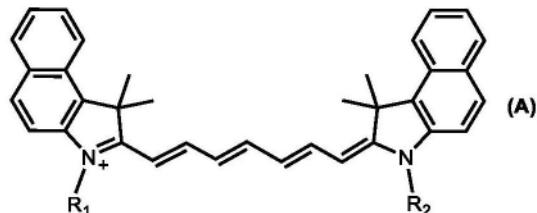
“聚合物胶束”代表通过单层分子膜形成的闭合囊泡。

“烷基”代表具有指定数目的碳原子的直链、环状或支链饱和脂族烃基团。

“烯基”意指具有预定数目的碳原子和至少一个碳-碳双键的直链或支链烃基团。此处的实例是单烯、二烯、三烯和四烯，但不限于这些。

[0020] 1. ICG脂质衍生物

本发明的一个实施例涉及一种由下式(A)表示的化合物或其药学上可接受的盐。



[0021] 通过式(A)给出的化合物具有一种结构，其中ICG骨架被携带R₁和R₂的烃链修饰，并且可以充当脂质。因为它具有ICG的基本骨架，所以通过式(A)给出的化合物可以表现出近

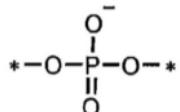
红外荧光能力，并且在用近红外光照射时可以表现出发热作用(HT作用)和活性氧生成作用(PDT作用)。具有式(A)的化合物或其盐在下文中也被称为“ICG衍生物脂质”。

例如，ICG脂质衍生物在700至1300nm并且特别是大约700至900nm的近红外区域中表现出吸收和荧光，并且在700至1300nm(优选地700至900nm)波长区域中任何地方的摩尔消光系数可以是至少 1.6×10^5 [L/mol/cm]。

[0022] 式(A)中的R₁和R₂各自独立地表示-(CH₂)_k-CONH-R₃。R₁和R₂可以是彼此相同的或者可以是彼此不同的。

式(A)中的R₃表示选自由以下组成的组的基团：-(CH₂)_m-OP₃⁻-CH₂-CH(CH₂OCOR₄)(OCOR₅)、直链C₁₄至C₂₂烷基、直链C₁₄至C₂₂烯基、支链C₁₄至C₄₀烷基、和支链C₁₄至C₄₀烯基。

在本说明书中，“-OP₃⁻”表示以下结构(*表示连接点)。



R₄和R₅各自独立地表示直链或支链C₁₃至C₂₁烷基或直链或支链C₁₃至C₂₁烯基。R₄和R₅可以是彼此相同的或者可以是彼此不同的。

式(A)中的k表示从2至4的整数。该k优选地是2或3，并且更优选地是2。

式(A)中的m表示从2至4的整数。该m优选地是2或3，并且更优选地是2。

[0023] 在一些实施例中，由式(A)表示的化合物或其药学上可接受的盐是一种化合物或其药学上可接受的盐，其中在式(A)中，

R₁和R₂各自独立地表示-(CH₂)_k-CONH-R₃；

R₃表示选自由以下组成的组的基团：-(CH₂)_m-OP₃⁻-CH₂-CH(CH₂OCOR₄)(OCOR₅)、支链C₁₄至C₄₀烷基、和支链C₁₄至C₄₀烯基；

R₄和R₅各自独立地表示直链或支链C₁₃至C₂₁烷基或直链或支链C₁₃至C₂₁烯基；

k表示从2至4的整数(优选地2或3，并且更优选地2)；并且

m表示从2至4的整数(优选地2或3，并且更优选地2)。

根据这些实施例的化合物对于以下优点中的至少一个是优选的：生物相容性，合成容易性，对于基于脂质的颗粒的亲和力，化学稳定性，基于脂质的颗粒的物理稳定性(聚集的抑制)，当药物包封在基于脂质的颗粒中时基于脂质的颗粒载体的稳定性和药物包封比率，基于脂质的颗粒在用近红外光照射时的反应性(发热和药物可释放性)等。

[0024] 在一些实施例中，由式(A)表示的化合物或其药学上可接受的盐是一种化合物或其药学上可接受的盐，其中在式(A)中，

R₁和R₂各自独立地表示-(CH₂)_k-CONH-R₃；

R₃表示选自由以下组成的组的基团：-(CH₂)_m-OP₃⁻-CH₂-CH(CH₂OCOR₄)(OCOR₅)、直链C₁₄至C₂₂烷基、和支链C₁₄至C₄₀烷基；

R₄和R₅各自独立地表示直链或支链C₁₃至C₂₁烷基或直链或支链C₁₃至C₂₁烯基；

k表示从2至4的整数(优选地2或3，并且更优选地2)；并且

m表示从2至4的整数(优选地2或3，并且更优选地2)。

根据这些实施例的化合物对于以下优点中的至少一个是优选的：生物相容性，合成容易性，对于基于脂质的颗粒的亲和力，化学稳定性，基于脂质的颗粒的物理稳定性(聚

集的抑制),当药物包封在基于脂质的颗粒中时基于脂质的颗粒载体的稳定性和药物包封比率,基于脂质的颗粒在用近红外光照射时的反应性(发热和药物可释放性)等。

[0025] 在一些实施例中,由式(A)表示的化合物或其药学上可接受的盐是一种化合物或其药学上可接受的盐,其中在式(A)中,

R_1 和 R_2 各自独立地表示- $(CH_2)_k\text{-CONH-}R_3$;

R_3 表示选自由以下组成的组的基团:- $(CH_2)_m\text{-OPO}_3^-$ - CH_2 - $CH(CH_2\text{OCOR}_4)$ (OCOR_5) 和支链C₁₄至C₄₀烷基;

R_4 和 R_5 各自独立地表示直链或支链C₁₃至C₂₁烷基或直链或支链C₁₃至C₂₁烯基;

k 表示从2至4的整数(优选地2或3,并且更优选地2);并且

m 表示从2至4的整数(优选地2或3,并且更优选地2)。

根据这些实施例的化合物对于以下优点中的至少一个是优选的:生物相容性,合成容易性,对于基于脂质的颗粒的亲和力,化学稳定性,基于脂质的颗粒的物理稳定性(聚集的抑制),当药物包封在基于脂质的颗粒中时基于脂质的颗粒载体的稳定性和药物包封比率,基于脂质的颗粒在用近红外光照射时的反应性(发热和药物可释放性)等。

[0026] 在一些实施例中,由式(A)表示的化合物或其药学上可接受的盐是一种化合物或其药学上可接受的盐,其中在式(A)中,

R_1 和 R_2 各自独立地表示- $(CH_2)_k\text{-CONH-}R_3$;

R_3 表示- $(CH_2)_m\text{-OPO}_3^-$ - CH_2 - $CH(CH_2\text{OCOR}_4)$ (OCOR_5) ;

R_4 和 R_5 各自独立地表示直链或支链C₁₃至C₂₁烷基或直链或支链C₁₂至C₂₂烯基(优选地直链C₁₃至C₂₁烷基或直链C₁₃至C₂₁烯基);

k 表示从2至4的整数(优选地2或3,并且更优选地2);并且

m 表示从2至4的整数(优选地2或3,并且更优选地2)。

根据这些实施例的化合物对于以下优点中的至少一个是优选的:生物相容性,合成容易性,对于基于脂质的颗粒的亲和力,化学稳定性,基于脂质的颗粒的物理稳定性(聚集的抑制),当药物包封在基于脂质的颗粒中时基于脂质的颗粒载体的稳定性和药物包封比率,基于脂质的颗粒在用近红外光照射时的反应性(发热和药物可释放性)等。

[0027] 在一些实施例中,由式(A)表示的化合物或其药学上可接受的盐是一种化合物或其药学上可接受的盐,其中在式(A)中,

R_1 和 R_2 各自独立地表示- $(CH_2)_2\text{-CONH-}R_3$;

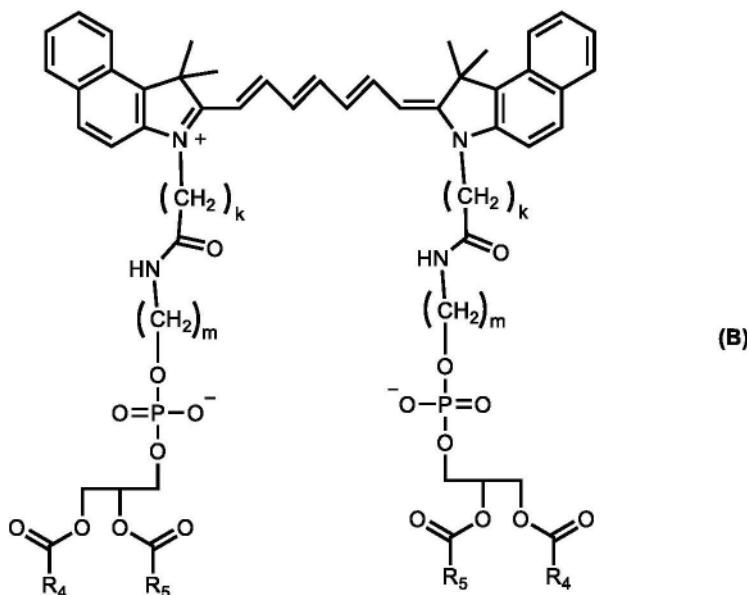
R_3 表示- $(CH_2)_m\text{-OPO}_3^-$ - CH_2 - $CH(CH_2\text{OCOR}_4)$ (OCOR_5) ;

R_4 和 R_5 各自独立地表示直链C₁₃至C₂₁烷基或直链C₁₃至C₂₁烯基;并且

m 表示从2至4的整数(优选地2或3,并且更优选地2)。

根据这些实施例的化合物对于以下优点中的至少一个是优选的:生物相容性,合成容易性,对于基于脂质的颗粒的亲和力,化学稳定性,基于脂质的颗粒的物理稳定性(聚集的抑制),当药物包封在基于脂质的颗粒中时基于脂质的颗粒载体的稳定性和药物包封比率,基于脂质的颗粒在用近红外光照射时的反应性(发热和药物可释放性)等。

[0028] 在一个实施例中,由式(A)表示的化合物或其药学上可接受的盐是由下式(B)表示的化合物或其药学上可接受的盐。



在式(B)中，

R_4 和 R_5 各自独立地表示直链或支链C₁₃至C₂₁烷基或直链或支链C₁₂至C₂₂烯基；

每个k独立地表示从2至4的整数(优选地2或3，并且更优选地2)；并且

每个m独立地表示从2至4的整数(优选地2或3，并且更优选地2)。

根据该实施例的化合物对于以下优点中的至少一个是优选的：生物相容性，合成容易性，对于基于脂质的颗粒的亲和力，化学稳定性，基于脂质的颗粒的物理稳定性(聚集的抑制)，当药物包封在基于脂质的颗粒中时的稳定性和药物包封比率，基于脂质的颗粒在用近红外光照射时的反应性(发热和药物可释放性)等。

[0029] 在一个实施例中，在式(B)中，

R_4 和 R_5 各自独立地表示直链C₁₃至C₂₁烷基或直链C₁₂至C₂₂烯基；

每个k独立地表示从2至4的整数(优选地2或3，并且更优选地2)；并且

每个m独立地表示从2至4的整数(优选地2或3，并且更优选地2)。

根据该实施例的化合物对于以下优点中的至少一个是优选的：生物相容性，合成容易性，对于基于脂质的颗粒的亲和力，化学稳定性，基于脂质的颗粒的物理稳定性(聚集的抑制)，当药物包封在基于脂质的颗粒中时基于脂质的颗粒载体的稳定性和药物包封比率，基于脂质的颗粒在用近红外光照射时的反应性(发热和药物可释放性)等。

[0030] 在一些实施例中，上述式(B)中的 R_4 和 R_5 是彼此相同的。

[0031] 在一些实施例中，由式(A)表示的化合物或其药学上可接受的盐是一种化合物或其药学上可接受的盐，其中在式(A)中，

R_1 和 R_2 各自独立地表示-(CH₂)_k-CONH-R₃；

R_3 表示选自由以下组成的组的基团：直链C₁₄至C₂₂烷基、直链C₁₄至C₂₂烯基、支链C₁₄至C₄₀烷基、和支链C₁₄至C₄₀烯基；

k表示从2至4的整数(优选地2或3，并且更优选地2)；并且

m表示从2至4的整数(优选地2或3，并且更优选地2)。

根据这些实施例的化合物对于以下优点中的至少一个是优选的：生物相容性，合成容易性，对于基于脂质的颗粒的亲和力，化学稳定性，基于脂质的颗粒的物理稳定性(聚

集的抑制),当药物包封在基于脂质的颗粒中时基于脂质的颗粒载体的稳定性和药物包封比率,基于脂质的颗粒在用近红外光照射时的反应性(发热和药物可释放性)等。

[0032] 在一些实施例中,由式(A)表示的化合物或其药学上可接受的盐是一种化合物或其药学上可接受的盐,其中在式(A)中,

R₁和R₂各自独立地表示-(CH₂)_k-CONH-R₃;

R₃表示选自由以下组成的组的基团:支链C₁₄至C₄₀烷基和支链C₁₄至C₄₀烯基;并且k表示从2至4的整数(优选地2或3,并且更优选地2)。

根据这些实施例的化合物对于以下优点中的至少一个是优选的:生物相容性,合成容易性,对于基于脂质的颗粒的亲和力,化学稳定性,基于脂质的颗粒的物理稳定性(聚集的抑制),当药物包封在基于脂质的颗粒中时基于脂质的颗粒载体的稳定性和药物包封比率,基于脂质的颗粒在用近红外光照射时的反应性(发热和药物可释放性)等。

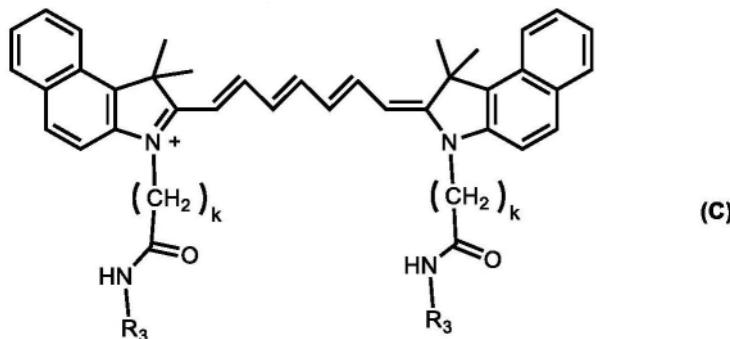
[0033] 在一些实施例中,由式(A)表示的化合物或其药学上可接受的盐是一种化合物或其药学上可接受的盐,其中在式(A)中,

R₁和R₂各自独立地表示-(CH₂)₂-CONH-R₃,并且

R₃表示选自由以下组成的组的基团:支链C₁₄至C₄₀烷基和支链C₁₄至C₄₀烯基。

根据这些实施例的化合物对于以下优点中的至少一个是优选的:生物相容性,合成容易性,对于基于脂质的颗粒的亲和力,化学稳定性,基于脂质的颗粒的物理稳定性(聚集的抑制),当药物包封在基于脂质的颗粒中时基于脂质的颗粒载体的稳定性和药物包封比率,基于脂质的颗粒在用近红外光照射时的反应性(发热和药物可释放性)等。

[0034] 在一些实施例中,由式(A)表示的化合物或其药学上可接受的盐是由下式(C)表示的化合物或其药学上可接受的盐。



在式(C)中,

每个R₃独立地表示选自由以下组成的组的基团:直链C₁₄至C₂₂烷基、直链C₁₄至C₂₂烯基、支链C₁₄至C₄₀烷基、和支链C₁₄至C₄₀烯基;并且

每个k独立地表示从2至4的整数(优选地2或3,并且更优选地2)。

[0035] 在一个实施例中,在式(C)中,

每个R₃独立地表示选自由以下组成的组的基团:支链C₁₄至C₄₀烷基和支链C₁₄至C₄₀烯基,并且

每个k独立地表示从2至4的整数(优选地2或3,并且更优选地2)。

[0036] 在一个实施例中,在式(C)中,

每个R₃独立地表示支链C₁₄至C₄₀烷基,并且

每个k独立地表示从2至4的整数(优选地2或3,并且更优选地2)。

[0037] 在以上所述的实施例中,针对式(A)或式(B)中的R₄或R₅引用的直链C₁₃至C₂₁烷基例如是直链C₁₃至C₁₉烷基,并且例如是直链C₁₅至C₁₇烷基。

在以上所述的实施例中,针对式(A)或式(B)中的R₄或R₅引用的支链C₁₃至C₂₁烷基例如是支链C₁₃至C₁₉烷基,并且例如是支链C₁₅至C₁₇烷基,例如1,3-二甲基十七烷基。

在以上所述的实施例中,针对式(A)或式(B)中的R₄或R₅引用的直链C₁₃至C₂₁烯基例如是直链C₁₃至C₁₉烯基,并且例如是直链C₁₅至C₁₇烯基,例如8-十七烯基。

在以上所述的实施例中,针对式(A)或式(B)中的R₄或R₅引用的支链C₁₃至C₂₁烯基例如是支链C₁₃至C₁₉烯基,并且例如是支链C₁₅至C₁₇烯基,例如1,3-二甲基-8-十七烯基。

[0038] 在以上所述的实施例中,针对式(A)或式(C)中的R₃引用的直链C₁₄至C₂₂烷基例如是直链C₁₄至C₂₀烷基,并且例如是直链C₁₆至C₁₈烷基。

在以上所述的实施例中,针对式(A)或式(C)中的R₃引用的直链C₁₄至C₂₂烯基例如是直链C₁₄至C₂₀烯基,并且例如是直链C₁₆至C₁₈烯基,例如8-十七烯基。

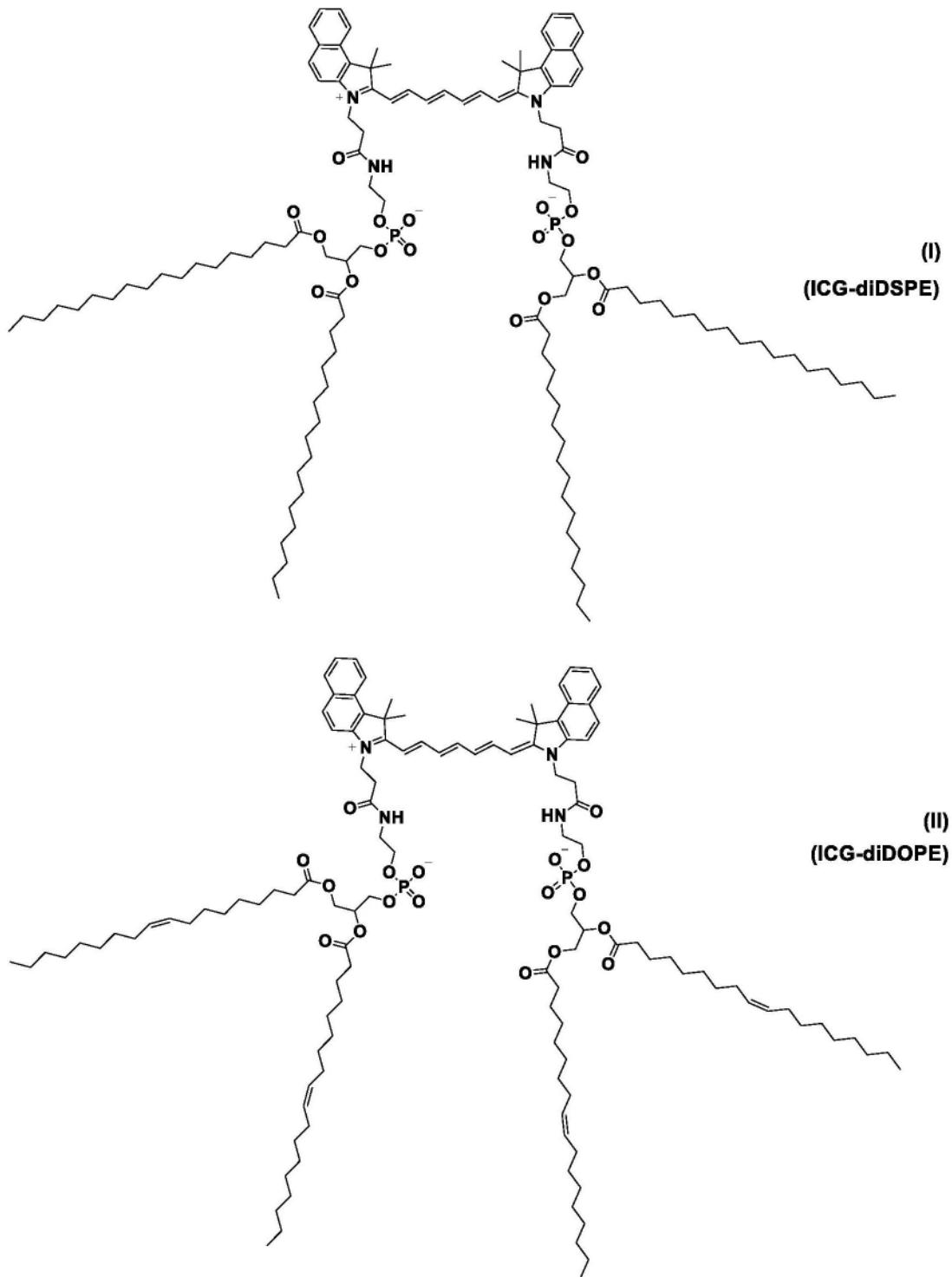
在以上所述的实施例中,针对式(A)或式(C)中的R₃引用的支链C₁₄至C₄₀烷基例如是支链C₂₀至C₄₀烷基,并且例如是支链C₂₈至C₄₀烷基,例如三十七烷-19-基。

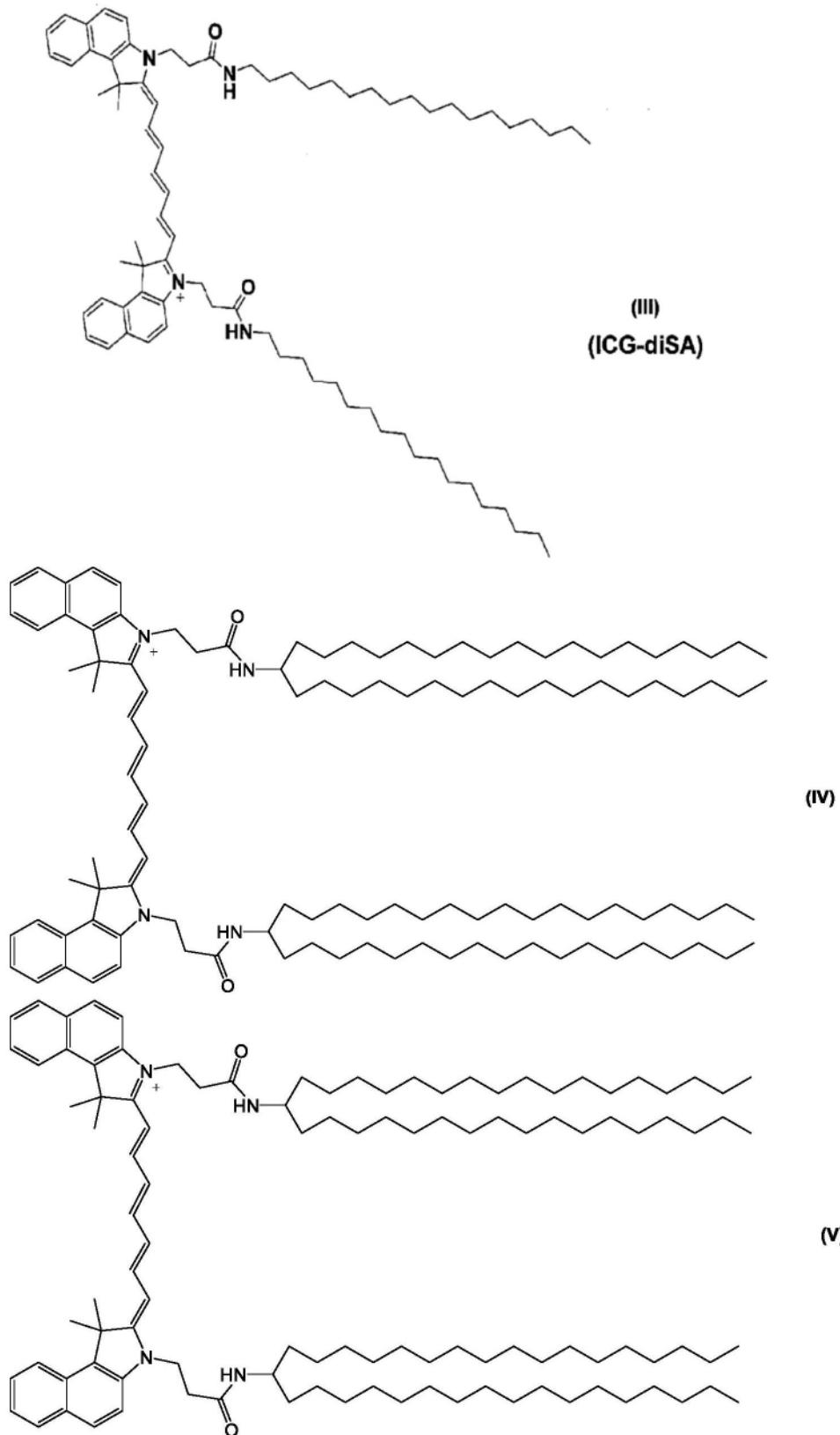
在以上所述的实施例中,针对式(A)或式(C)中的R₃引用的支链C₁₄至C₄₀烯基例如是支链C₂₀至C₄₀烯基,并且例如是支链C₂₈至C₄₀烯基。

在以上所述的实施例中,式(A)和式(C)中的R₃表示-CHR₃₁R₃₂,其中R₃₁和R₃₂各自独立地表示直链C₇至C₁₉(优选地C₁₀至C₁₉,并且更优选地C₁₄至C₁₉)烷基,并且

每个k独立地表示从2至4的整数(优选地2或3,并且更优选地2)。

[0039] 以下给出了根据实施例的化合物的实例。





[0040] 本发明的一个实施例是由前述式(I) (ICG-diDSPE)、前述式(II) (ICG-diDOPE)、前述式(III) (ICG-diSA)、或前述式(IV)中的任一个表示的化合物或其药学上可接受的盐。一个特别实施例是由前述式(I) (ICG-diDSPE)或前述式(II) (ICG-diDOPE)中的任一个表示的化合物或其药学上可接受的盐。一个特别实施例是由前述式(I) (ICG-diDSPE)、前述式(II)

(ICG-diDOPE)、和前述式(III) (ICG-diSA) 中的任一个表示的化合物或其药学上可接受的盐。

[0041] “药学上可接受的盐”是指在合理的医学判断的范围内适合与人和动物组织接触而不引起过度毒性或刺激或过敏反应的盐。药学上可接受的盐在本技术领域中是熟知的。例如,药学上可接受的盐在S.M.Berge等人J.Pharmaceutical Sciences[药学杂志]66:1-19,1977中描述。该盐可以通过使游离碱与适合的有机酸反应来产生,这在该化合物的最终分离和纯化过程中原位进行或者与之分开进行。

代表性的酸加成盐可以通过以下来例示:乙酸盐、己二酸盐、海藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、富马酸盐、葡萄糖酸盐、甘油磷酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、氢溴酸盐、盐酸盐、氢碘酸盐、2-羟基乙磺酸盐、乳糖酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、月桂基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、单马来酸、丙二酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、帕莫酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、特戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、甲苯磺酸盐、三氟乙酸盐、十一烷酸盐、和戊酸盐。

代表性的碱金属盐和碱土金属盐可以通过以下来例示:钠盐、锂盐、钾盐、钙盐和镁盐,以及无毒的铵、季铵和胺的阳离子。此处的实例如下,但不限于以下各项:铵、四甲基铵、四乙基铵,以及例如甲胺、二甲胺、三甲胺、三乙胺和乙胺的阳离子。

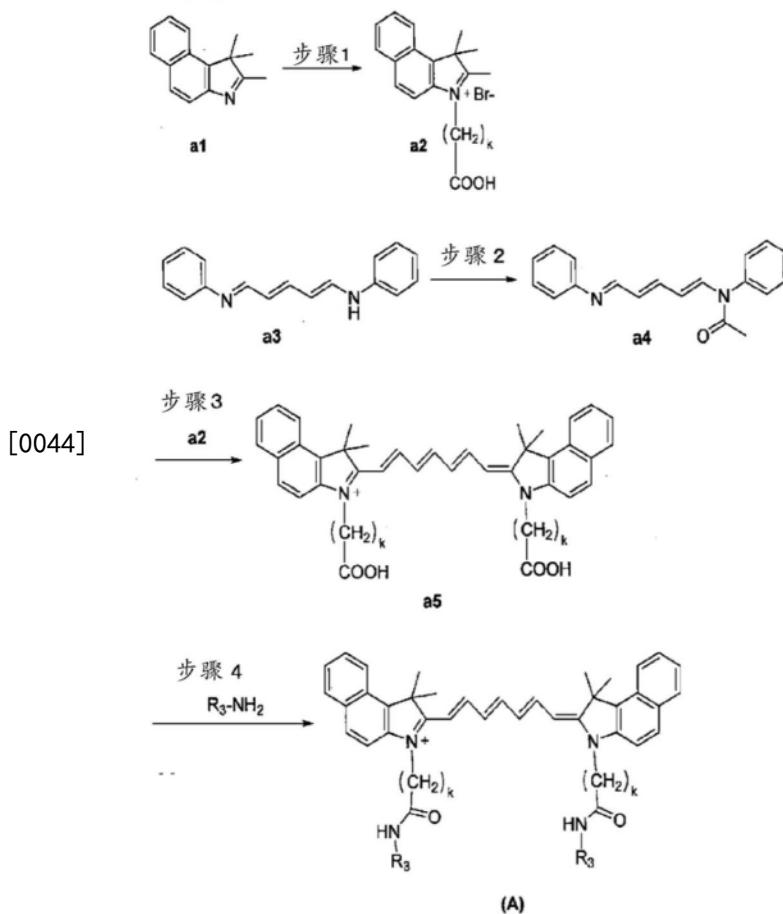
[0042] 立体异构体,例如几何异构体和光学异构体以及互变异构体等可以存在于本发明中由式(A)表示的化合物中,并且根据本发明的化合物涵盖所有可能的异构体及其混合物。另外,由式(A)表示的化合物或其盐可以呈水合物或溶剂化物的形式,并且根据本发明的化合物还涵盖水合物和溶剂化物。

[0043] (用于产生ICG衍生物脂质的方法)

现在将描述用于产生根据本发明的ICG衍生物脂质的方法。

式(A)化合物可以参考例如在J.Am.Chem.Soc.[美国化学会志]2003,125,7766、WO 2011/152046和WO 2013/051732中描述的方法合成。例如,合成可以根据前文中描述的方案1进行。

方案 1



(在式中, k 和 R , 各自如针对上式 (A) 所定义。)

[0045] (步骤1)

羧烷基取代的吲哚衍生物(a2)是通过使1,1,2-三甲基[1H]苯并[e]吲哚(a1)与卤素取代的羧酸X- $(\text{CH}_2)_k$ -COOH(X是卤素原子,优选地溴(Br))反应获得的。该溶剂例如是二氯苯、二氯甲烷、甲苯等。

(步骤2)

化合物(a4)是通过优选地在碱(例如,N,N-二异丙基乙胺(DIPEA))的存在下使乙酸酐与戊烯-1-醛-1-苯胺(a3)反应获得的。该溶剂例如是一氯甲烷等。

(步骤3·一羧酸合成)

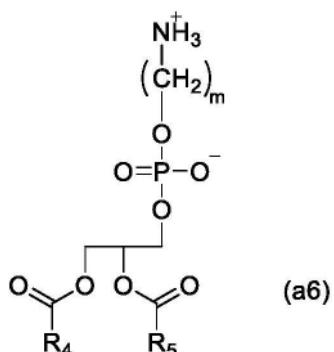
然后羧烷基取代的吲哚衍生物(a2)和化合物(a4)在碱存在下反应,以获得吲哚菁绿二羧酸化合物(a5),其中羧烷基取代的吲哚衍生物附接在己三烯链的两端。该碱通过乙酸钠、吡啶等来例示。该溶剂通过甲醇、四氢呋喃等来例示。

一种化合物(其中右侧呡哚环上取代的羧烷基基团的烷基链- $(\text{CH}_2)_k$ -不同于左侧的烷基链)可以通过以下方式获得:通过使一当量的羧烷基取代的呡哚衍生物(a2)与(a4)反应来将羧烷基取代的呡哚衍生物附接至己三烯链的一端,接着与在烷基链中具有不同数量的碳原子(k)的羧烷基取代的呡哚衍生物(a2)进行另一次加成反应。

[0046] (步骤4·酰胺化)

目标式(A)化合物是通过使胺 R_3-NH_2 与二羧酸化合物(a5)反应进行酰胺化来获得的。

更特别地,具有上述式(B)的化合物可以通过使用由以下(a6)给出的化合物作为R₃-NH₂来产生。



(在该式中,m、R₄和R₅如针对式(B)所定义。)

另外,具有先前指示的式(C)的化合物通过使用R₃-NH₂来获得,其中R₃是直链C₁₄至C₂₂烷基、直链C₁₄至C₂₂烯基、支链C₁₄至C₄₀烷基、或支链C₁₄至C₄₀烯基。

R₃-NH₂可以通过普通方法合成,或者可以使用可商购获得的R₃-NH₂。

酰胺化反应可以根据通常手段进行;例如,它优选地在缩合剂的存在下运行,例如像苯并三唑,例如1-羟基苯并三唑(HOBt)、N-羟基琥珀酰亚胺(HOSu)、1-羟基苯并三唑(HOAt)、1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-苯并三唑鎓3-氧化物六氟磷酸盐(HBTU)等,或1-[3-(二甲基氨基)丙基]-3-乙基碳二亚胺(EDC)盐酸盐、N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)等。根据需要,还可以将碱添加到反应中,并且该碱可以通过N-甲基吗啉(NMM)、三乙胺(TEA)、N,N-二异丙基乙胺(DIPEA)、4-(二甲基氨基)吡啶(DMAP)等来例示。该溶剂可以通过二甲基甲酰胺、四氢呋喃(THF)、二氯甲烷、乙腈等来例示。

为了获得其中式(A)中的两个R₃不同的化合物,可以使一当量的羧烷基取代的吲哚衍生物(a2)在(步骤3)中与(a4)反应,以将羧烷基取代的吲哚衍生物附接在己三烯链的一个末端,接着与R₃-NH₂反应以合成其中R₃-NH₂已经被添加到(a4)的仅一侧的化合物;携带不同R₃的R₃-NH₂可以通过在另一侧上进行相同的过程来反应。

[0047] 在根据本发明的化合物的合成中,当没有特别描述起始材料的产生时,这些化合物是已知的或可以通过所涉及的技术领域中已知的类似方法来产生,或者可以根据下文实例中提供的描述来产生。本领域技术人员将理解,以上提供的方案仅仅是用于产生根据本发明的化合物的代表性方法,并且可以类似地使用其他熟知的方法。

根据本发明的化合物可以具有一个或多个不对称中心,并且此类化合物可以作为单个的(R)-或(S)-立体异构体或作为其混合物产生。除非另外指定,否则本说明书中特定化合物的描述旨在涵盖单个对映异构体及其外消旋混合物两者。用于建立立体化学和分离立体异构体的方法是本领域技术人员所熟知的。

[0048] 2. 基于脂质的颗粒

本发明的一个实施例提供了一种基于脂质的颗粒,其含有根据上文描述的实施例的ICG衍生物脂质(在本说明书中也简称为“基于脂质的颗粒”)。

由于ICG衍生物脂质具有ICG结构作为其结构的一部分,因此它本身可以形成基于ICG支持脂质的颗粒。因此,在一些实施例中,基于脂质的颗粒由前文中描述的ICG衍生物脂质构建。

[0049] 脂质颗粒的构型不受特别限制，并且可以是例如聚合物胶束、脂质体、乳液、微球、纳米球等中的任一种。

在一些实施例中，基于脂质的颗粒是由包括上文描述的ICG衍生物脂质的单个或多个脂质形成的聚合物胶束或脂质体。在一些其他实施例中，基于脂质的颗粒例如是选自脂质体、脂质颗粒、使用脂质作为界面物质的O/W乳液等中的至少一种选择。在一个实施例中，基于脂质的颗粒是脂质体。

在一些实施例中，基于脂质的颗粒呈由包括上文描述的ICG衍生物脂质的单个或多个脂质形成的聚合物胶束或脂质体的形式存在于水性溶剂中。该水性溶剂可以通过以下来例示：灭菌水；生理盐水；含有辅助试剂（例如，葡萄糖、D-山梨糖醇、D-甘露糖、D-甘露醇、氯化钠等）的等渗溶液；以及缓冲液，诸如磷酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、乙酸盐缓冲液等。

[0050] 在一个特定实施例中，该基于脂质的颗粒例如是脂质体。根据一个实施例的脂质体由含有上文描述的ICG衍生物脂质的脂质双层构建，并且在脂质双层的内部（由脂质双层形成的闭合囊泡中的空间）具有水相（内相）。脂质体可以具有单个脂质双层或者可以具有多个脂质双层，但是从稳定性的角度来看，具有单层脂质双层结构的脂质体是优选的。

[0051] 相对于基于脂质的颗粒中所含的总脂质，本发明实施例的基于脂质的颗粒含有例如0.001至100mol%、例如0.01至20mol%、例如0.1至10mol%的根据上文描述的实施例的ICG衍生物脂质。可以单独使用单一种类的ICG衍生物脂质，或者可以使用两种或更多多种种类的混合物。

[0052] 根据一个代表性实施例的基于脂质的颗粒进一步含有至少一种脂质，该脂质选自由以下组成的组：中性脂质、聚乙二醇修饰的脂质、和固醇。根据本发明的ICG衍生物脂质表现出与这些脂质的高亲和力，并且可以形成非常稳定的颗粒结构。

根据一些实施例的基于脂质的颗粒含有(I)上文描述的ICG衍生物脂质和(II)至少一种选自由中性脂质、聚乙二醇修饰的脂质和固醇组成的组的脂质作为其脂质组分，并且含有相对于基于脂质的颗粒的总重量例如50至100重量%、例如70至100重量%、和例如90至100重量%的脂质组分。该基于脂质的颗粒例如是聚合物胶束或脂质体（优选地脂质体），其由上文描述的ICG衍生物脂质和至少一种选自由中性脂质、聚乙二醇修饰的脂质和固醇组成的组的脂质。

[0053] 根据本发明实施例的基于脂质的颗粒中的脂质组分组合不受特别限制，并且可以通过上文描述的ICG衍生物脂质与中性脂质和固醇的组合以及上文描述的ICG衍生物脂质与中性脂质、聚乙二醇修饰的脂质和固醇的组合来例示。

[0054] 中性脂质代表在生理pH下以不带电的形式或以中性两性离子的形式存在的脂质。中性脂质可以通过以下来例示：二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱(POPC)、蛋磷脂酰胆碱(EPC)、二肉豆蔻磷脂酰胆碱(DMPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、二花生酰基磷脂酰胆碱(DAPC)、二苯酰磷脂酰胆碱(DBPC)、二木质葡萄糖基磷脂酰胆碱(DLPC)、二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)、鞘磷脂、神经酰胺、二油酰磷脂酰甘油(DOPG)、二棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG)、磷脂酰乙醇胺(POPE)、二油酰磷脂酰乙醇胺4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-甲酸酯(DOPE-mal)等。可以单独使用单一种类的中性脂质，或者可以使用两种或更多多种种类的混合物。

相对于基于脂质的颗粒所含的总脂质,本发明实施例的基于脂质的颗粒可以含有例如0至99.99mol%、例如50至99.99mol%、例如60至99.9mol%的中性脂质。

[0055] 聚乙二醇修饰的脂质可以通过以下来例示:PEG2000-DMG (PEG2000-二肉豆蔻甘油)、PEG2000-DPG (PEG2000-二棕榈酰甘油)、PEG2000-DSG (PEG2000-二硬脂酰甘油)、PEG5000-DMG (PEG5000-二肉豆蔻甘油)、PEG5000-DPG (PEG5000-二棕榈酰甘油)、PEG5000-DSG (PEG5000-二硬脂酰甘油)、PEG-cDMA (N-[ω -甲氧基聚(乙二醇)2000]氨基甲酰基]-1,2-二肉豆蔻基丙基-3-胺)、PEG-C-DOMG (R-3-[ω -甲氧基聚(乙二醇)2000]氨基甲酰基]-1,2-二肉豆蔻基丙基-3-胺)、聚乙二醇(PEG)-二酰甘油(DAG)、PEG-二烷基氧基丙基(DAA)、PEG-磷脂、PEG-神经酰胺(Cer)等。

PEG-二烷基氧基丙基可以通过以下来例示:PEG-二月桂基氧基丙基、PEG-二肉豆蔻基氧基丙基、PEG-二棕榈基氧基丙基、PEG-二硬脂基氧基丙基等。

PEG-磷脂可以通过以下来例示:PEG2000-DSPE ((聚(乙二醇)2000)-1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺)、MPEG2000-DSPE ((甲氧基聚(乙二醇)2000)-1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺)等。

可以单独使用单一种类的聚乙二醇修饰的脂质,或者可以使用两种或更多多种种类的混合物。这些聚乙二醇修饰的脂质中的PEG(聚乙二醇)的末端可以被甲氧基化(MPEG,甲氧基(聚乙二醇))。

根据本发明实施例的基于脂质的颗粒可以含有相对于基于脂质的颗粒所含的总脂质例如0至30mol%、例如0至20mol%、例如0至10mol%的聚乙二醇修饰的脂质。

[0056] 固醇是具有类固醇骨架的醇。固醇可以通过以下来例示:胆固醇、二氢胆固醇、羊毛固醇、 β -谷固醇、菜油固醇、豆固醇、菜籽固醇、麦角固醇、岩藻固醇、 3β -[N-(N',N'-二甲基氨基乙基)氨基甲酰]胆固醇(DC-Chol)等。可以单独使用单一种类的固醇,或者可以使用两种或更多多种种类的混合物。

根据本发明实施例的基于脂质的颗粒可以含有相对于基于脂质的颗粒所含的总脂质例如0至90mol%、例如0至80mol%、例如0至50mol%或0至40mol%、例如0至30mol%、例如0至20mol%、例如0至10mol%、例如0至5mol%的固醇。血液中的稳定性可以通过固醇的存在来改善。另一方面,随着固醇的量增加,热敏感性表现出下降的趋势。在一个实施例中,基于脂质的颗粒不含固醇。

[0057] 在本发明实施例的基于脂质的颗粒中的脂质组分的共混物的实例中,含有0.01至20mol%的上文描述的ICG衍生物脂质,含有50至99.99mol%的中性脂质,并且含有0至49.99mol%的固醇,在每种情况下都是相对于基于脂质的颗粒所含的总脂质。

在另一个实例中,含有0.1至10mol%的上文描述的ICG衍生物脂质,含有60至99.9mol%的中性脂质,含有0至10mol%的聚乙二醇修饰的脂质,并且含有0至39.9mol%的固醇,在每种情况下都是相对于基于脂质的颗粒所含的总脂质。

在另一个实例中,含有0.1至10mol%的上文描述的ICG衍生物脂质,含有70至99.9mol%的中性脂质,含有0至10mol%的聚乙二醇修饰的脂质,并且含有0至10mol%的固醇,在每种情况下都是相对于基于脂质的颗粒所含的总脂质。

在另一个实例中,含有0.1至10mol%的上文描述的ICG衍生物脂质,含有80至99.9mol%的中性脂质,并且含有0至10mol%的聚乙二醇修饰的脂质,在每种情况下都是相

对于基于脂质的颗粒所含的总脂质。

[0058] 根据一些实施例的基于脂质的颗粒进一步包含至少一种药物。其中基于脂质的颗粒由药物和含有ICG衍生物脂质的脂质形成的实施例可以通过药物和由脂质单(单分子)层构成的膜(反胶束)的复合物、药物/脂质体复合物和药物/胶束(真胶束)复合物来例示。

在一些实施例中，药物被包封在由包含ICG衍生物脂质的脂质构建的基于脂质的颗粒内。这种“包封”代表假设药物被包含在脂质层本身中或包含在由脂质层形成的闭合空间内的条件或状态。

在一个实施例中，药物被包含在由基于脂质的颗粒的脂质层形成的闭合空间中。在另一个实施例中，药物存在于基于脂质的颗粒的一个脂质层或多个脂质层内。在另一个实施例中，药物被连接到基于脂质的颗粒的外脂质层的表面或基于脂质的颗粒的内脂质层的表面。

在一个特别实施例中，药物被包含在由含有ICG衍生物脂质的脂质构建的脂质体的内相和/或脂质层中。

[0059] 该药物可以是水溶性的或脂质可溶性的。另外，该药物可以是亲水性的或疏水性的。

在一些实施例中，该药物是水溶性的。在一个特别实施例中，基于脂质的颗粒存在于水性溶剂中并且将水溶性药物包封在由基于脂质的颗粒的脂质层形成的闭合空间内(例如，基于脂质的颗粒的内部水相，诸如脂质体的内相)，和/或包封在基于脂质的颗粒的一个脂质层或多个脂质层内(在单层或多层脂质层内)。该水性溶剂可以通过以下来例示：灭菌水；生理盐水；含有辅助试剂(例如，葡萄糖、D-山梨糖醇、D-甘露糖、D-甘露醇、氯化钠等)的等渗溶液；以及缓冲液，诸如磷酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、乙酸盐缓冲液等。

[0060] 该药物可以是例如以下中的任一种：合成化合物、发酵产物、肽、蛋白质、类固醇化合物、基因、病毒、糖类(多糖)、脂肪酸、维生素、或辅酶(或衍生物)。另外，它可以是如在任何领域中使用的药物，例如药品、农用化学品、肥料等，但是优选使用药品。药物可以是例如能够对细胞、组织、器官或受试者产生所所需作用的自由选择的分子或化合物(例如，活性药物)。此处提供的药物仅是实例，并且不旨在限于这些药物。这些药物可以是纯化的或部分纯化的，并且可以是天然存在的或衍生自自然界，或者可以是合成的，或者可以是遗传技术的产物，或者可以是化学修饰的。

[0061] 在一些实施例中，该药物是治疗性药物。

在一些实施例中，该药物是低分子量化合物。

在一些实施例中，该药物包括来自抗癌剂或抗微生物剂的至少一种选择。

在一个实施例中，该药物包括抗癌剂。

在一个特别实施例中，该抗癌剂可以通过以下来例示(尽管这不是一种特别限制)：喜树碱衍生物，诸如盐酸伊立替康、盐酸诺吉替康(nogitecan hydrochloride)和依喜替康；紫杉烷衍生物，诸如多西他赛水合物、多西他赛和紫杉醇；以及异环磷酰胺、盐酸尼莫司汀、卡波醌、环磷酰胺、达卡巴嗪、噻替哌、白消安、美法仑、雷莫司汀、雌莫司汀磷酸钠、6-巯基嘌呤核苷、依诺他滨(enocitabine)、吉西他滨盐酸盐、卡莫氟、阿糖胞苷、阿糖胞苷烷磷酯、替加氟、去氧氟尿苷、羟基脲、氟尿嘧啶、甲氨蝶呤、巯基嘌呤、磷酸氟达拉滨、放线菌素D、盐酸阿柔比星、盐酸伊达比星、盐酸吡柔比星、盐酸表柔比星、盐酸柔红霉素、盐酸阿霉

素、表柔比星、吡柔比星、柔红霉素、阿霉素、盐酸博来霉素、净司他丁苯马聚合物、新制癌菌素(neocarzinostatin)、丝裂霉素C、硫酸博来霉素、硫酸嘌呤霉素、依托泊苷、酒石酸长春瑞滨、硫酸长春新碱、硫酸长春地辛、硫酸长春碱、盐酸氨柔比星、吉非替尼、依西美坦、和卡培他滨。在一个实施例中，该抗癌剂含有阿霉素。该抗癌剂中的化合物可以是自由选择的盐。

在一个特别实施例中，该抗微生物剂可以通过以下来例示(尽管这不是一种特别限制)：抗真菌三唑衍生物(氟康唑、伊曲康唑、酮康唑、咪康唑)；抗细菌头孢菌素(头孢唑啉、头孢尼西(cefonicid)、头孢噻肟、ceftazimide、头孢克肟)；抗细菌 β -内酰胺衍生物(aztreopam、头孢美唑、头孢西丁)；红霉素组抗菌剂(红霉素、阿奇霉素、克拉霉素、竹桃霉素)；青霉素(苄青霉素、苯氧甲基青霉素、氯唑西林、甲氧西林、萘夫西林、苯唑西林、羧苄青霉素)；和四环素。这些抗微生物剂中的化合物可以是自由选择的盐。

[0062] 相对于基于脂质的颗粒载体的总重量，根据本发明实施例的基于脂质的颗粒载体含有例如0.01至50重量%、例如0.1至30重量%、例如1至10重量%的药物。

[0063] 根据本发明实施例的基于脂质的颗粒的“平均粒径”(下文也称为“平均粒径”或“粒径”)可以通过选自体积平均、数均和Z均的任何方法来计算，但是根据本发明的基于脂质的颗粒的“平均粒径”是指Z均粒径。本发明实施例的基于脂质的颗粒的平均粒径(Z均粒径)可以是例如30至200nm，例如70至150nm。

[0064] 根据实施例的基于脂质的颗粒通过颗粒结构表现出优异的稳定性(特别是在生物体中的稳定性)，表现出优异的药物包封能力，和/或优异的控制药物释放的能力。

根据上文描述的实施例的ICG衍生物脂质具有ICG骨架，该骨架被含有烃链的基团(R_1 和 R_2)修饰，并且可以形成稳定的颗粒结构。例如，根据实施例的基于脂质的颗粒形成脂质体，该脂质体在生物体内(特别是在血液中)表现出优异的稳定性。

根据上文描述的实施例的ICG衍生物脂质具有ICG骨架，该骨架被含有烃链的基团(R_1 和 R_2)修饰，并且可以以稳定的方式支持药物。因此，根据实施例的基于脂质的颗粒可以形成其中药物以稳定方式被包封的颗粒结构。根据实施例的基于脂质的颗粒形成例如药物包封脂质体，该脂质体在生物体(特别是在血液中)中表现出优异的稳定性和/或表现出优异的药物包封比率。另外，由根据本发明的ICG脂质衍生物构建的基于脂质的颗粒(特别是脂质体)可以在暴露于近红外光时选择性地将包封的药物释放到基于脂质的颗粒的外部。诸位发明人的研究显示，当修饰基团含有极性基团诸如磺基基团时，药物的稳定支持受到阻碍并且药物包封和释放的控制是有问题的。

根据本发明的基于脂质的颗粒提供了ICG衍生的近红外荧光能力，因为它含有根据上文描述的实施例的ICG衍生物脂质。根据实施例的基于脂质的颗粒在用激发光(例如，近红外光)照射时发射荧光。

因为根据本发明的基于脂质的颗粒含有根据上文描述的实施例的ICG衍生物脂质，所以它在用近红外光照射时提供发热作用(加热作用，HT作用)和/或活性氧生成作用(光动力学作用，PDT作用)。在一些方面，含有根据本发明的ICG脂质衍生物的基于脂质的颗粒充当温度敏感性脂质体。

[0065] (用于产生基于脂质的颗粒的方法)

根据实施例的基于脂质的颗粒载体可以使用相关技术领域中已知的任何方法来

产生。

使用基于脂质的颗粒的脂质体的实例在下文中描述了用于产生基于脂质的颗粒载体的方法。例如,根据一个实施例的产生方法包括(1)获得含有脂质体的脂质体分散体的步骤,和任选地(2)将药物与该脂质体分散体混合以将该药物包封在该脂质体分散体中的脂质体中的步骤。

[0066] (1) 获得含有脂质体的脂质体分散体的步骤

例如,获得含有脂质体的脂质体分散体的步骤优选地包括(i)由至少一种脂质种类产生脂质体的步骤,该脂质种类包括根据上文描述的实施例的ICG脂质衍生物,和(ii)替换或稀释脂质体外相的步骤。

[0067] 步骤(i)

脂质体制备方法不受特别限制,并且可以通过以下来例示:脂质膜法(涡旋法)、逆相蒸发法、超声法、预囊泡法、乙醇注射法、弗氏压碎法、胆酸盐消耗法、Triton X-100分批法、Ca²⁺融合法、乙醚注射法、退火法、和冻融融合法。脂质体制备中的各种条件可以根据例如脂质体制备方法、靶脂质体组合物、粒径等适当地建立。

[0068] 提供了通过以下程序制备的脂质体作为实例。

首先,将含有ICG脂质衍生物的一种或多种脂质溶解在合适的溶剂(例如,氯仿)中以制备脂质溶液。

然后将有机溶剂从脂质溶液中去除(优选地在减压下去除)以形成脂质薄膜。

随后将水性溶剂添加到脂质薄膜中以实现水合,并且通过使用例如涡旋混合器搅拌来进行脂质体形成。水溶液可以通过缓冲液(诸如HEPES缓冲液、磷酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲生理盐水等)以及生理盐水来例示。优选地在加热的同时进行水合,以使温度至少达到脂质体的脂质双层的相变温度。当要产生单层脂质体时,优选地在用例如涡旋混合器搅拌之后根据需要进行超声处理。

[0069] 步骤(ii)

脂质体分散体可以通过替换或稀释获得的脂质体的外相来获得。脂质体外相的替换或稀释可以进行一次或可以进行多次,并且可以组合各种类型的替换或稀释方法。用于替换脂质体制备溶液的脂质体外相的方法可以通过透析、离心分离、凝胶过滤等来例示。

用于替换和/或稀释脂质体外相的溶剂(分散介质)可以通过缓冲液(诸如HEPES缓冲液、磷酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲生理盐水等)以及生理盐水来例示。该溶剂的pH不受特别限制,但优选地为3至11,更优选地为4至10,并且还更优选地为5至10。

[0070] 脂质体粒径可以根据需要自由调节。例如,可以通过使用具有均匀孔径的膜过滤器在高压下进行挤出(挤出过滤)来调节粒径。粒径的调节可以在脂质体产生期间的任何时间进行;例如,它可以在替换或稀释脂质体外相之前,在替换或稀释脂质体外相之后,或在将药物引入脂质体内相中之后进行。粒径调节优选地在将药物引入脂质体内相中之前进行,并且更优选地在替换或稀释脂质体外相之前进行。

[0071] 在其中药物包封在脂质体中的实施例中,在步骤(ii)中,优选地在脂质体的内相与外相之间引入离子梯度和/或pH梯度(远程负载方法)。因此,在一些实施例中,步骤(ii)是其中替换脂质体外相以获得含有脂质体的脂质体分散体的步骤,该脂质体在内相与外相之间具有离子梯度和/或pH梯度。本发明实施例的产生方法产生表现出优异的药物包封比

率和优异的稳定性的包封药物的脂质体。

[0072] pH梯度方法是一种技术,其中利用pH介导的药物分子形式/离子形式解离平衡的偏移将化合物输入脂质体中。

当引入pH梯度时,脂质体分散体中脂质体内相和脂质体外相的pH差优选地为1至5,并且更优选地为2至3。根据药物的类型,脂质体内相或外相的pH也可以增加。另一方面,脂质体内相和脂质体外相的pH可以是基本上相同的。可以使用迄今已知用于在pH梯度方法中使用的化合物来调节pH梯度,例如氨基酸,诸如精氨酸、组氨酸和甘氨酸;酸,诸如抗坏血酸、苯甲酸、柠檬酸、谷氨酸、磷酸、乙酸、丙酸、酒石酸、碳酸、乳酸、硼酸、马来酸、富马酸、苹果酸、己二酸、盐酸、和硫酸;这些酸的盐,诸如钠盐,钾盐和铵盐;以及碱性化合物,诸如三羟甲基氨基甲烷、氨水、氢氧化钠、氢氧化钾和碳酸氢钠。

阿霉素(DOX,pKa:8.2)是可以使用pH梯度方法包封在脂质体中的化合物的实例。例如,可以使用pH大约为4的缓冲液(例如,柠檬酸盐缓冲液)制备脂质体分散体,并且然后可以用pH大约为7的缓冲液(例如,HEPES缓冲液)替换脂质体外相,以获得含有在内相与外相之间具有pH梯度的脂质体的脂质体分散体。当DOX在以下描述的步骤(2)中添加到该脂质体分散体中时,pH 7外相中的分子形式DOX由于其脂质可溶性而转移到脂质体膜中而不是水相中。另外,当转移到脂质体膜中的DOX与pH 4脂质体内相接触时,DOX呈现其离子形式并溶解到脂质体内相中。因此,DOX可以通过解离平衡的偏移而从脂质体外相转运到内相中。

[0073] 离子梯度方法是利用在脂质体的内相/外相之间形成的离子梯度将药物带入脂质体内相中的技术。

在离子梯度方法中使用的离子不受特别限制,并且可以通过硫酸铵、氯化铵、硼酸铵、甲酸铵、乙酸铵、柠檬酸铵、酒石酸铵、琥珀酸铵、和磷酸铵来例示。另外,离子梯度方法中脂质体内相的离子浓度可以根据药物种类来适当地选择;然而,越高越好,并且优选地为至少10mM、更优选地为至少20mM、并且还更优选地为至少50mM。脂质体内相或外相中的离子浓度也可以根据药物种类而增加。另一方面,脂质体内相和脂质体外相的离子浓度可能不存在实质性差异,即脂质体外相和脂质体内相的离子浓度可以是基本上相同的。还可以通过替换或稀释脂质体外相来调节离子梯度。

优选地使用具有硫酸铵的离子梯度,而不是pH梯度方法中的pH梯度。因此,在一些实施例中,步骤(ii)是其中替换脂质体外相以产生含有脂质体的脂质体分散体的步骤,该脂质体在内相与外相之间具有硫酸铵离子梯度和/或pH梯度。在一个特别实施例中,步骤(ii)是其中替换脂质体外相以获得含有脂质体的脂质体分散体的步骤,该脂质体在内相与外相之间具有硫酸铵离子梯度和pH梯度。使用该实施例,可以将药物有效地包封在脂质体内相中。

具体而言,当要引入硫酸铵的离子梯度时,可以使用硫酸铵水溶液作为前述步骤(i)中用于水合的水性介质,并且例如生理盐水或缓冲液诸如HEPES缓冲液、磷酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液或磷酸盐缓冲生理盐水可以在步骤(ii)中使用。

[0074] 脂质体分散体中的脂质浓度不受特别限制,但优选地为1至100mM,并且更优选地为1至50mM。在这些范围内,可以在不损害脂质体分散体的物理特性的情况下适当地形成更多数量的脂质体颗粒。

[0075] (2) 将药物与该脂质体分散体混合以将该药物包封在该脂质体分散体中的脂质体

中的步骤

通过将药物与获得的脂质体分散体混合,将药物包封在脂质体分散体中的脂质体(优选地脂质体内相)中。因此,可以获得包封药物的脂质体。

这优选地包括将药物与脂质体分散体混合并且随后提高药物+脂质体分散体混合物中脂质体的膜渗透性的步骤。这使得有可能在更短的时间段内将药物包封到脂质体中。用于增加混合物中脂质体的膜渗透性的方法可以通过以下来例示:其中加热混合物的方法、其中将膜流化剂添加到混合物中的方法等。

当要加热混合物时,通常可以通过将温度升高至更高的温度来更有效地将药物引入脂质体内相中。目标温度不受特别限制,并且目标温度优选地基于对药物和用于脂质体膜的组成组分的热稳定性的考虑来建立。例如,它优选地等于或大于室温并且更优选地等于或大于脂质体的脂质双层的相变温度。

[0076] 3.组合物

本发明的另一方面提供了一种组合物,其含有上文描述的基于脂质的颗粒。

根据一些实施例的组合物包含上文描述的基于脂质的颗粒以及药学上可接受的介质和其他添加剂,视情况而定。

[0077] 药学上可接受的介质可以通过以下来例示:灭菌水;生理盐水;含有辅助试剂(例如,葡萄糖、D-山梨糖醇、D-甘露糖、D-甘露醇、氯化钠等)的等渗溶液;以及缓冲液,诸如磷酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、乙酸盐缓冲液等。

在一些实施例中,药学上可接受的介质是水性溶剂。

其他添加剂可以包括例如增溶剂,例如醇,诸如乙醇、丙二醇、聚乙二醇等;稳定剂;抗氧化剂;抗菌剂;如通常用于药物生产的赋形剂;填料;填充剂;粘合剂;润湿剂;崩解剂;润滑剂;表面活性剂;分散剂;防腐剂;味道掩蔽剂和/或气味掩蔽剂;止痛剂;等。其他添加剂还可以包括例如糖,诸如蔗糖、葡萄糖、山梨糖醇、乳糖等;氨基酸,诸如谷氨酰胺、谷氨酸、谷氨酸钠和组氨酸等;以及酸,诸如柠檬酸、磷酸、乙酸、乳酸、碳酸、酒石酸等的盐。

[0078] 该组合物包括固体形式和液体形式。当该组合物采取固体形式时,可以通过溶解或悬浮在预定的药学上可接受的介质中而将其制成液体形式,如以下所述。另外,在通过冷冻该组合物提供的固体的情况下,可以通过熔融(例如,通过在室温下静置)将其制成液体形式。在一些实施例中,该组合物例如可以具有通过例如冷冻干燥去除溶剂而提供的粉末形式,或者可以具有液体形式。根据本发明的一个实施例的组合物是含有根据上文描述的实施例的基于脂质的颗粒的粉末组合物。该粉末组合物可以通过例如过滤、离心分离等从液体组合物(分散体)中去除溶剂来产生,或者可以通过冷冻干燥分散体来产生。

[0079] 根据本发明的组合物可以是例如药物组合物或诊断组合物。

可以将根据本发明的组合物配制为药物组合物。可注射剂是药物组合物配制品的实例。

另外,根据本发明的组合物可以用作诊断组合物。术语“诊断组合物”代表施用于受试者以便进行诊断(体内诊断或体外诊断,并且特别是体内诊断)的组合物。诊断组合物的配制品不受特别限制,其中可注射剂是一个实例。

根据本发明的一个实施例的药物组合物或诊断组合物是含有根据上文描述的实施例的基于脂质的颗粒以及药学上可接受的介质和其他添加剂的液体组合物。当该组合物

呈液体形式时,它可以按原样或悬浮或溶解在药学上可接受的介质中作为可注射剂使用。

根据本发明的一个实施例的药物组合物或诊断组合物是含有根据上文描述的实施例的基于脂质的颗粒以及其他添加剂的粉末组合物。当药物组合物呈粉末形式时,它可以通过在使用之前悬浮或溶解在药学上可接受的介质中作为可注射剂使用。

[0080] 将组合物、药物组合物或诊断组合物施用于受试者可以例如通过肠胃外方法进行,例如动脉内注射、静脉内注射、皮下注射等。剂量还将根据施用的靶标、靶器官、症状和施用方法而变化。施用的靶标不受限制,并且可以对各种动物进行应用,并且特别地可以对哺乳动物并且优选地对人以及临床测试、筛选和实验动物进行应用。

[0081] 4. 应用

根据上文描述的实施例的ICG脂质衍生物、基于脂质的颗粒、和含有基于脂质的颗粒的组合物可以在各种应用中使用。

例如,根据上文描述的实施例的ICG脂质衍生物、基于脂质的颗粒和含有基于脂质的颗粒的组合物(药物组合物,诊断组合物)可以在选自光动力学超高温疗法、光动力学疗法和荧光成像中的至少一种选择中使用。在一些实施例中,提供了一种光动力学超高温疗法方法、光动力学疗法方法或荧光成像方法,该方法包括向受试者施用根据上文描述的实施例的脂质复合物或含有基于脂质的颗粒的组合物(药物组合物或诊断组合物)。在一些实施例中,提供了根据上文描述的实施例的脂质复合物或含有基于脂质的颗粒的组合物(药物组合物或诊断组合物)用于在选自光动力学超高温疗法、光动力学疗法和荧光成像中的至少一种选择中使用的用途。

[0082] (荧光成像)

在一些实施例中,根据上文描述的实施例的含有基于脂质的颗粒的组合物用于荧光成像。因为根据上文描述的实施例的基于脂质的颗粒掺入了ICG脂质衍生物,它可以在吸收近红外光时发射荧光并且可以用作用于荧光成像的探针(造影剂)。根据一个实施例,基于脂质的颗粒是用于荧光成像的探针。根据一个实施例的荧光成像方法的特征在于使用根据上文描述的实施例的基于脂质的颗粒。本发明实施例的成像方法可用作非侵入性鉴定方法,该非侵入性鉴定方法可以产生可视化,同时减少或防止对生物体的组织的损害。

根据一个实施例的荧光成像方法典型地包括以下步骤:向受试者施用根据上文描述的实施例的含有基于脂质的颗粒(ICG脂质衍生物)的组合物(探针);并且将受试者暴露于来自激发光源的激发光(例如,近红外光),并且然后检测由于该激发光而从基于脂质的颗粒(ICG脂质衍生物)发射的荧光。激发波长将取决于基于脂质的颗粒中所含的ICG脂质衍生物而变化,并且不受限制,只要它在基于脂质的颗粒(ICG脂质衍生物)在近红外区域中有效地发射荧光的范围内即可。激发光例如是近红外光。基于已知方法进行荧光成像,并且单个参数(诸如激发波长和待检测的荧光波长)可以根据施用的靶标和基于脂质的颗粒中所含的ICG脂质衍生物的类型适当地建立。

用于这种荧光成像方法的受试者或靶标不受限制,并且它可以应用于各种动物,并且特别地可以应用于哺乳动物并且优选地应用于人,并且应用于实验中的临床测试、筛选和实验动物。这可以在体内或体外进行。

一个实施例是荧光成像方法,以便鉴定前哨淋巴结。

在一些实施例中,根据上文描述的实施例的含有基于脂质的颗粒的组合物在上述

荧光成像方法中用作诊断组合物。诊断组合物可以在动物中用于诊断或辅助诊断,或用于检测预定的细胞或组织。

[0083] (光动力学超高温疗法 • 光动力学疗法)

在一些实施例中,上文描述的实施例的含有基于脂质的颗粒的药物组合物在光动力学超高温疗法和/或光动力学疗法中使用。根据一个实施例的光动力学超高温疗法和/或光动力学疗法的特征在于使用根据上文描述的实施例的基于脂质的颗粒。光动力学超高温疗法和/或光动力学疗法典型地包括向受试者施用(例如,静脉内施用或肿瘤内施用)根据上文描述的实施例的含有基于脂质的颗粒的药物组合物,并且在一定时间段之后,用近红外光照射受试者(受试者的患病部分)。基于已知方法进行光动力学超高温疗法和/或光动力学疗法。根据基于脂质的颗粒中所含的ICG脂质衍生物的类型、用于施用的受试者或靶标和所需的治疗作用,适当地建立各种参数,诸如近红外光的波长区域、照射时间和基于脂质的颗粒浓度。

根据一个实施例的光动力学超高温疗法和/或光动力学疗法表现出针对各种肿瘤的治疗功效,例如脑肿瘤、胰岛素瘤、鼻腔癌、口腔癌、肾癌、肺癌、结直肠癌、软组织肉瘤、转移性癌症(胸膜转移、腹膜转移)等。

在一些实施例中,根据上文描述的实施例的含有基于脂质的颗粒的药物组合物用于治疗癌症。

[0084] (药物递送和相关用途)

上文描述的实施例的基于脂质的颗粒可以用作用于选择性地且有效地将所需包封药物引入靶位点的手段。例如,根据本发明的组合物可以在其中将所需药物转运至靶位点的疗法中使用。因此,本发明的一个实施例提供了一种用于使用药物组合物治疗各种疾病的方法,该药物组合物包含如前述内容中所述的含有基于脂质的颗粒的药物。另一个实施例提供了根据上文描述的实施例的基于脂质的颗粒在产生治疗各种疾病的药物中的用途。一些实施例提供了一种用于将药物转运至靶标的方法,该方法包括向受试者施用药物组合物,该药物组合物含有根据上文描述的实施例的含有基于脂质的颗粒的药物。

另一个实施例提供了一种用于在靶位点处释放由基于脂质的颗粒支持的所需药物的方法或用于控制该释放的方法。当基于脂质的颗粒中所含的ICG脂质衍生物由于暴露于近红外光而生成热时,伴随基于脂质的颗粒的温度升高,根据实施例的基于脂质的颗粒将包封的药物释放到基于脂质的颗粒(例如,脂质体)的外部。因此,通过将靶位点暴露于近红外光使得在靶位点处的选择性药物释放成为可能。在一个实施例中,脂质体是温度敏感性脂质体。温度敏感性脂质体可以在靶位点处有效且快速地释放药物。

[0085] (癌症治疗)

在一些实施例中,上文描述的实施例的含有基于脂质的颗粒的药物组合物用于治疗癌症。在一些实施例中,提供了一种用于治疗癌症的方法,该方法包括向受试者或靶标施用根据上文描述的实施例的脂质复合物或含有基于脂质的颗粒的药物组合物。一些实施例提供了根据上文描述的实施例的脂质复合物或含有基于脂质的颗粒的药物组合物用于治疗癌症的用途。在一个特别实施例中,基于脂质的颗粒含有抗癌剂作为药物。

在携带癌症的动物实验和人类患者中已经确认,脂质体(特别是粒径不超过200nm的脂质体)由于所谓的增强渗透性和滞留(EPR)作用而易于在实体瘤组织中积聚。根据上文

描述的实施例的含有ICG脂质衍生物的脂质体有利地用于癌症治疗,因为它在体内提供以下功能的组合:基于ICG脂质衍生物的红外荧光能力的癌症组织成像功能,基于ICG脂质衍生物的发热作用的热癌症治疗功能,以及由于抗癌药物的包封,掺入抗癌剂的温度敏感性脂质体(伴随温度升高而选择性释放抗癌剂的脂质体)的功能。

[0086] 5. 试剂盒

本发明的一个实施例是一种用于药物递送或成像的试剂盒,该试剂盒含有如前述内容中所述的基于脂质的颗粒。该试剂盒可以在各种治疗或诊断中使用。根据该实施例的试剂盒中的基于脂质的颗粒的储存条件不受特别限制,并且考虑到例如相应的稳定性(可储存性)和易用性等,可以采用任何条件,例如溶液形式或粉末形式。除了如前述内容中所述的基于脂质的颗粒之外,根据实施例的试剂盒可以含有例如各种介质(药学上可接受的介质、缓冲液)、各种药物和使用说明书(使用手册)。根据本发明实施例的试剂盒用于产生含有用于引入靶位点的所需基于脂质的颗粒的组合物。例如,可以根据一个实施例的基于脂质的颗粒和各种介质制成试剂盒,该试剂盒可以通过在施用于生物体中之前将颗粒分散在各种介质中来使用。

实例

[0087] 通过下文提供的实例、生产实例和测试实例进一步描述本发明,但是本发明不限于这些实例或不被这些实例限制。

在本说明书中,“室温”通常指示大约10°C至大约35°C。除非另外特别指示,否则“%”指示重量百分比。

在所有情况下用于合成本发明化合物的起始材料、试剂、酸、碱、脱水剂、溶剂和催化剂可以购买,或者可以通过本领域技术人员已知的有机合成方法来产生。另外,本发明的化合物可以通过本领域技术人员已知的有机合成方法产生,如以下实例中所示。

使用来自沃特世公司(Waters Corporation)的XevoTM G2-XS进行质谱法。

[0088] 将通过“ChemDraw Professional”15.1.0.144版(珀金埃尔默公司(PerkinElmer Inc.))生成的名称用作以下所示的化合物的名称,通常使用的那些试剂除外。

实例中使用的缩写是本领域技术人员熟知的常见缩写。以下给出了一些缩写。

Ac ₂ O	乙酸酐
AcONa	乙酸钠
Br	溴
DCM	二氯甲烷
DIPEA	N,N-二异丙基乙胺
DMF	二甲基甲酰胺
DOPE	二油酰磷脂酰乙醇胺
DPPC	二棕榈酰磷脂酰
DSPC	二硬脂酰磷脂酰胆碱
DSPE	1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺)
HBTU	1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-苯并三唑鎓3-氧化物六氟磷酸盐
MeOH	甲醇

MPEG	甲氧基聚乙二醇
MPEG2000-DSPE	(甲氧基聚(乙二醇)2000)-1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺
SA	硬脂胺
o-DCB	1,2-二氯苯
PEG	聚乙二醇
回流	回流

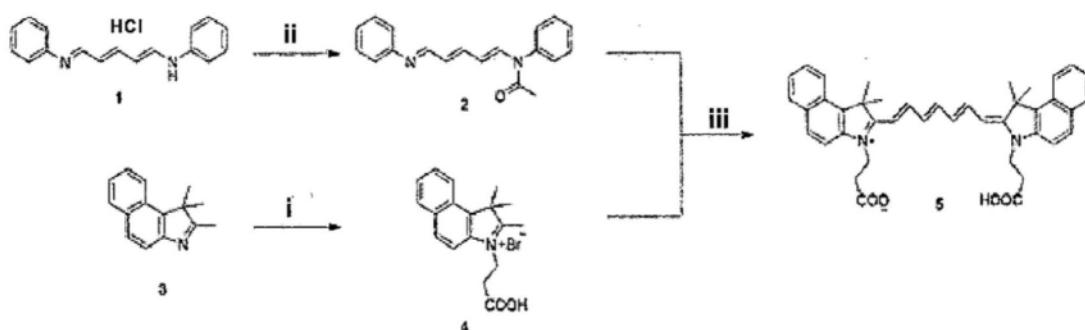
[0089] A. ICG脂质衍生物的合成

[生产实例1]

ICG二甲酸(化合物5)的合成

化合物5:3-(2-((1E,3E,5E,7E)-7-(3-(2-羧乙基)-1,1-二甲基-1,3-二氢-2H-苯并[e]吲哚-2-亚基)庚-1,3,5-三烯-1-基)-1,1-二甲基-1H-苯并[e]吲哚-3-鎓)丙酸酯

根据以下方案合成化合物5。



i. $\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}/\text{o-DCB}/110^\circ\text{C}$; ii. $\text{Ac}_2\text{O}/\text{DIPEA}/\text{DCM}$; iii. $\text{MeOH}/\text{AcONa}/\text{回流}$

[0090] (步骤i)

引入1,1,2-三甲基[1H]苯并[e]吲哚(10.0g,化合物3)和3-溴丙酸(7.3g)并且溶解在50ml的1,2-二氯苯中,并且在110℃下搅拌18小时。在冷却至室温之后,将沉淀的固体过滤出并用二氯甲烷洗涤。过滤,接着在减压下干燥,产生13.9g的3-(2-羧乙基)-1,1,2-三甲基-1H-苯并[e]吲哚-3-鎓溴化物(化合物4)。

[0091] (步骤ii)

引入戊烯二醛二苯胺盐酸盐(2.84g,化合物1)、N,N-二异丙基乙胺(2.60g)和20ml的二氯甲烷;在冰冷却下逐滴添加乙酸酐(1.20g)的二氯甲烷(5ml)溶液;并且搅拌3小时,蒸馏去除溶剂。

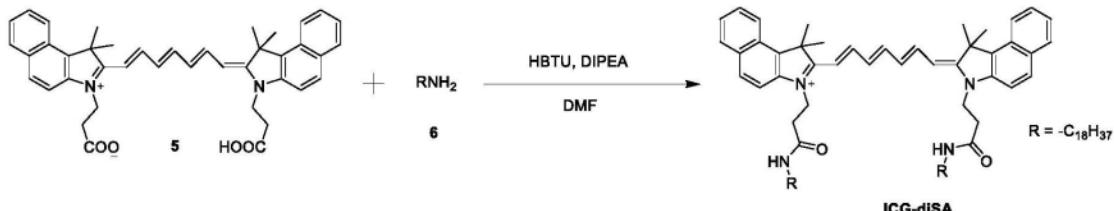
(步骤iii)

将来自步骤ii的残余物溶解在5ml的甲醇中,并且在回流下逐滴添加到化合物4(10.0g)和乙酸钠(3.9g,47.54mmol)的甲醇溶液(50ml)中。在逐滴添加之后,将反应在回流下运行16小时,然后蒸馏去除溶剂。将残余物用乙酸乙酯、5%盐酸和乙酸乙酯按指定顺序洗涤,并且将所得混合物用乙腈/水(3/7)结晶,获得4.3g的化合物5。

[0092] [实例A1]

ICG-diSA:2-((1E,3E,5E,7E)-7-(1,1-二甲基-3-(3-(十八烷基氨基)-3-氧化丙基)-1,3-二氢-2H-苯并[e]吲哚-2-亚基)庚-1,3,5-三烯-1-基)-1,1-二甲基-3-(3-(十八烷基氨基)-3-氧化丙基)-1H-苯并[e]吲哚-3-鎓

根据以下方案由生产实例1中获得的化合物5合成ICG脂质衍生物(ICG-diSA)。



将化合物5(502mg)、二甲基甲酰胺(85ml)、硬脂胺(1.01g,化合物6)、1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-苯并三唑鎓3-氧化物六氟-磷酸盐(2.71g)和N,N-二异丙基乙胺(413mg)的混合物在室温下搅拌3小时。蒸馏去除溶剂,接着溶解在乙酸乙酯(130ml)中;用50ml饱和碳酸氢钠水溶液洗涤两次,并且用50ml饱和氯化钠水溶液洗涤两次,将有机层经无水硫酸镁干燥。蒸馏去除溶剂,接着使用0.1%三氟乙酸/甲醇(100/0至0/100)用硅胶(Cosmosil 75C₁₈OPN(30g))纯化,并且另外用硅胶(Cosmosil 75C₁₈OPN(40g),使用甲醇/水(75/25至92/8))纯化,获得ICG-diSA(222mg)。ICG-diSA的¹H NMR图在图1中给出。

[0093] [实例A2和A3]

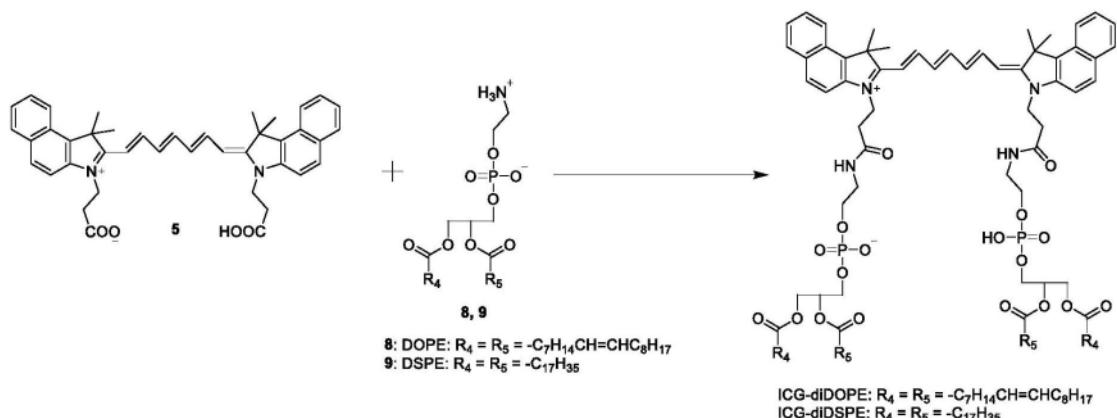
ICG-diDOPE:

2- (3- (2- ((1E,3E,5E,7E) -7- (3- (3- ((2- (((2,3-双(油酰基氧基)丙氧基) (羟基)磷酰基) 氧基) 乙基) 氨基)-3-氧代丙基)-1,1-二甲基-1,3-二氢-2H-苯并[e]吲哚-2-亚基) 庚-1,3,5-三烯-1-基)-1,1-二甲基-1H-苯并[e]吲哚-3-鎓-3-基) 丙酰胺) 乙基(2,3-双(油酰基氧基)丙基) 磷酸酯

ICG-diDSPE:

2- (3- (2- ((1E,3E,5E,7E) -7- (3- (3- ((2- (((2,3-双(硬脂酰基氧基)丙氧基) (羟基)磷酰基) 氧基) 乙基) 氨基)-3-氧代丙基)-1,1-二甲基-1,3-二氢-2H-苯并[e]吲哚-2-亚基) 庚-1,3,5-三烯-1-基)-1,1-二甲基-1H-苯并[e]吲哚-3-鎓-3-基) 丙酰胺) 乙基(2,3-双(硬脂酰基氧基)丙基) 磷酸酯

根据以下方案由生产实例1中获得的化合物5合成ICG脂质衍生物ICG-diDOPE和ICG-diDSPE。



[0094] (1) ICG-diDOPE

在室温下伴随搅拌将N,N'-二环己基碳二亚胺(511mg)的二氯甲烷(3ml)溶液逐滴添加到化合物5(501mg)、二氯甲烷(15ml)、N-羟基琥珀酰亚胺(278mg)和乙腈(3ml)的混合物中。进行过滤,然后蒸馏去除溶剂,并且用乙酸乙酯(20ml)进行重结晶。将所得固体溶解

在二氯甲烷(20ml)中,添加1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE, 738mg, 化合物8)和三乙胺(0.22g),并且在室温下搅拌过夜。蒸馏去除溶剂,接着用硅胶(Cosmosil 75C₁₈OPN(10g), 甲醇/水(50/50至100/0), 甲醇/氯仿(90/10至80/20))纯化,并且另外用硅胶(Cosmosil 75C₁₈OPN(40g), 氯仿/甲醇(100/0至75/25))纯化,获得ICG-diDOPE(97mg)。ICG-diDOPE的¹H NMR图在图2中给出。

[0095] (2) ICG-diDSPE

将化合物5(1.01g, 1.60mmol)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DSPE, 2.50g, 化合物9)、氯仿(170ml)、1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-苯并三唑鎓3-氧化物六氟磷酸盐(2.43g)和N,N-二异丙基乙胺(435mg)合并并且在室温下搅拌过夜。进行过滤,并且随后蒸馏去除溶剂,接着用硅胶(Cosmosil 75C₁₈OPN(120g), 氯仿/甲醇(100/0至90/10))纯化,获得ICG-diDSPE(299mg)。

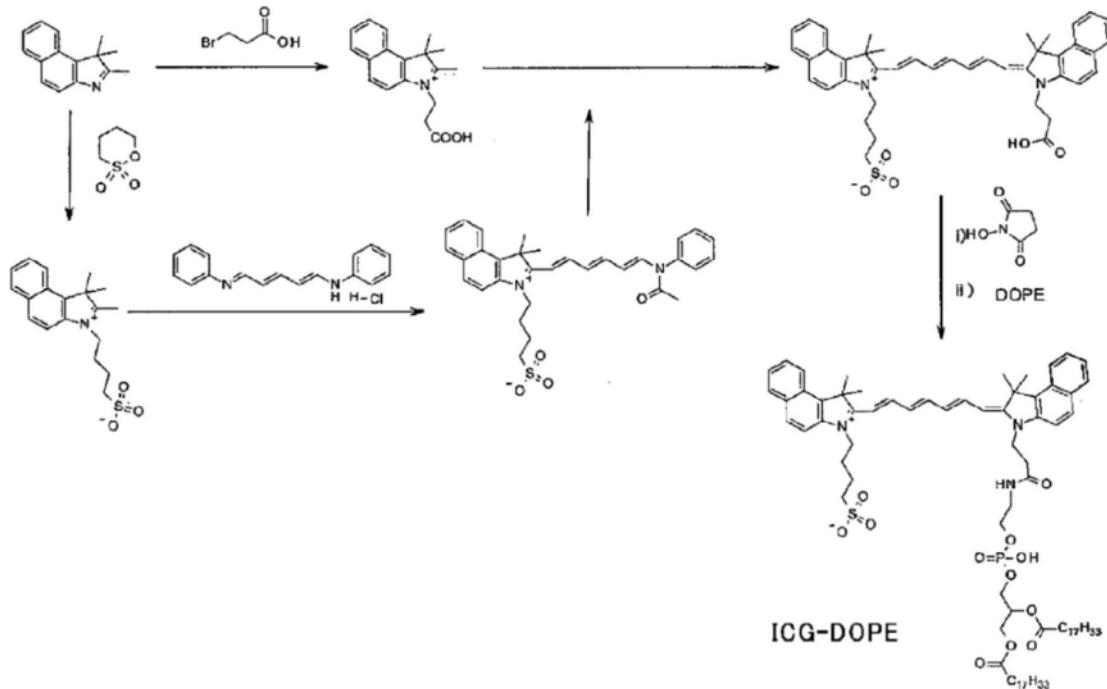
MS (ESI) m/z: 2082.4 [M-H]⁻

ICG-diDSPE的¹H NMR图在图3中给出。

[0096] [对比实例A1]

ICG-DOPE: 4-((2-((1E,3E,5E,7E)-7-(3-(3-(((2,3-双(油酰基氧基)丙氧基)氧化磷酰基)氧基)乙基)氨基)-3-氧代丙基)-1,1-二甲基-1,3-二氢-2H-苯并[e]吲哚-2-亚基)庚-1,3,5-三烯-1-基)-1,1-二甲基-1H-苯并[e]吲哚-3-鎓-3-基)丁烷-1-磺酸酯

基于以下方案参考在WO 2011/152046中[0050]至[0053]和[0068]中描述的方法合成ICG-DOPE。ICG-DOPE的¹H NMR图在图4中给出。



[0097] <摩尔消光系数的计算>

使用以下方法计算在实例A1至A3和对比实例A1中合成的ICG和ICG脂质衍生物的摩尔消光系数。

将通过将特定ICG脂质衍生物或ICG溶解在乙醇中以在每种情况下提供5μM制备的ICG脂质溶液引入光学长度为1cm的比色皿中,并且使用Infinite M200(帝肯公司(Tecan))

测量在230至1000nm处的吸收光谱。单个ICG脂质衍生物的吸收光谱在图5中给出。图5中的吸收光谱是通过从每个波长处的吸光度中减去乙醇的吸收光谱来提供的。

所有ICG脂质在其吸收光谱中具有790nm的最大吸收波长。由790nm(这是最大吸收波长)处的吸光度(减去乙醇的吸光度)计算摩尔消光系数 ϵ (L/mol/cm)。用于计算摩尔消光系数的摩尔浓度本身是使用ICG脂质衍生物的100%纯度和使用非盐形式计算的。单个ICG脂质衍生物的摩尔消光系数在表A中给出。

[表A]

表A. ICG脂质衍生物的摩尔消光系数 ϵ

	ICG	对比实例 A1	实例 A1	实例 A2	实例 A3
		ICG-DOPE	ICG-diSA	ICG-diDOPE	ICG-diDSPE
摩尔消光 系数 ϵ [L/mol/cm]	208980	165860	177760	161100	199840

如图5所示,所有ICG脂质衍生物在700至900nm的近红外区中表现出吸收。另外,所有ICG脂质衍生物也具有至少 1.6×10^5 [L/mol/cm]的摩尔消光系数。确认根据本发明的ICG脂质衍生物具有优异的近红外光吸收特征。

因为,如前述内容所示,根据本发明的ICG脂质衍生物表现出与ICG相同的近红外吸收特征,所以通过掺入这种ICG脂质衍生物构建的基于脂质的颗粒被认为适用于荧光成像和光声成像并且可用作诊断试剂和/或造影剂。也就是说,根据本发明的ICG脂质衍生物和含有其的基于脂质的颗粒也可以用于治疗诊断(疗法和诊断的融合)。

[0098] B. ICG脂质衍生物修饰的脂质体和包封阿霉素的ICG脂质衍生物修饰的脂质体的制备

1. ICG脂质衍生物修饰的脂质体(iLip-1)和包封阿霉素的ICG脂质衍生物修饰的脂质体(DOX-iLip-1)的制备

根据以下程序,使用硫酸铵梯度和pH梯度,并且使用实例A1至A3中合成的ICG脂质衍生物,并使用阿霉素作为药物,制备ICG脂质衍生物修饰的脂质体(iLip-1(ICG-diSA)、iLip-1(ICG-diDOPE)、iLip-1(ICG-diDSPE))和包封阿霉素的ICG脂质衍生物修饰的脂质体(DOX-iLip-1(ICG-diSA)、DOX-iLip-1(ICG-diDOPE)、DOX-iLip-1(ICG-diDSPE))。

另外,根据以下程序,使用硫酸铵梯度和pH梯度,并且使用对比实例A1中合成的ICG脂质衍生物,并使用阿霉素作为药物,制备ICG脂质衍生物修饰的脂质体(iLip-1(ICG-DOPE))和包封阿霉素的ICG脂质衍生物修饰的脂质体(DOX-iLip-1(ICG-DOPE))。

[0099] [实例B1]

(1) iLip-1(ICG-diSA)的制备

将实例A1中合成的ICG-diSA用作ICG脂质衍生物。

将200μl的0.1mol/1二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC,日本精化株式会社(Nippon Fine Chemical Co.,Ltd.))的氯仿溶液、100μl的0.1mol/1胆固醇(日本精化株式会社)的氯仿溶

液、 $100\mu\text{l}$ 的 0.01mol/l MPEG2000-DSPE(日本精化株式会社,PEG的平均分子量:2,000)的氯仿溶液、和 $200\mu\text{l}$ 的 0.001mol/l ICG脂质衍生物(ICG-diSA)的氯仿溶液合并并在氯仿中混合。接着进行减压蒸馏去除并且在真空中干燥至少一小时。将 2ml 的 0.3mol/l 硫酸铵水溶液($\text{pH } 5.5$)添加到回收烧瓶壁上的脂质薄膜上,并且将温度升高至 50°C 并使用涡旋混合器进行搅拌。将所得粗脂质体分散体在液氮中冷冻,将冷冻的材料在 50°C 下解冻,接着用涡旋混合器进行轻微搅拌。该冷冻和解冻过程进行三次,并且使用浴型超声处理装置(必能信公司(Branson))进行处理5分钟。使用加热至 50°C 的挤出机(Transferra Nanosciences公司),通过使所得脂质体分散体通过具有 100nm 孔径的聚碳酸酯核孔膜过滤器(GE医疗公司(GE Healthcare))五次来调节脂质体粒径。然后使用设定为 $453,000 \times g$ 和 4°C 的超离心分离器(CS120GXL,日立工机株式会社(Hitachi Koki Co.,Ltd.))使所得脂质体分散体经受分离过程15分钟。然后去除上清液,重悬浮于 $1\text{ml } 0.02\text{mol/l}$ HEPES缓冲液($\text{pH } 7.4$)中,产生ICG脂质衍生物修饰的脂质体(iLip-1(ICG-diSA))的分散体。

[0100] (2) DOX-iLip-1(ICG-diSA)

将 1ml 的阿霉素(协和发酵麒麟株式会社(Kyowa Hakko Kirin Co.,Ltd.))溶解在 0.02mol/l HEPES缓冲液($\text{pH } 7.4$)中以得到 $2\text{mg}/\text{ml}$ 的溶液添加到如上所述获得的脂质体(iLip-1(ICG-diSA))分散体中,并且在 50°C 下搅拌30分钟以将阿霉素包封在脂质体内。然后使用设定为 $453,000 \times g$ 和 4°C 的上述超离心分离器使脂质体分散体经受分离过程15分钟。去除上清液并且添加 2ml 超纯水,产生包封阿霉素的ICG脂质衍生物修饰的脂质体(DOX-iLip-1(ICG-diSA))的分散体。

[0101] [实例B2]

除了使用实例A2中获得的ICG-diDOPE作为ICG脂质衍生物而不是ICG-diSA之外,进行与实例B1中相同的程序以获得ICG脂质衍生物修饰的脂质体(iLip-1(ICG-diDOPE))的分散体和包封阿霉素的ICG脂质衍生物修饰的脂质体(DOX-iLip-1(ICG-diDOPE))的分散体。

[0102] [实例B3]

除了使用实例A3中获得的ICG-diDSPE作为ICG脂质衍生物而不是ICG-diSA之外,进行与实例B1中相同的程序以获得ICG脂质衍生物修饰的脂质体(iLip-1(ICG-diDSPE))的分散体和包封阿霉素的ICG脂质衍生物修饰的脂质体(DOX-iLip-1(ICG-diDSPE))的分散体。

[0103] [对比实例B1]

除了使用对比实例A1中获得的ICG-DOPE作为ICG脂质衍生物而不是ICG-diSA之外,进行与实例B1中相同的程序以获得ICG脂质衍生物修饰的脂质体(iLip-1(ICG-DOPE))的分散体和包封阿霉素的ICG脂质衍生物修饰的脂质体(DOX-iLip-1(ICG-DOPE))的分散体。

[0104] <脂质体分析1>

(1) 脂质体的粒径分布和zeta电位的测量

使用Zetasizer Nano ZS(由思百吉集团(Spectris plc company)的马尔文仪器公司(Malvern Instruments, Inc.)生产;溶剂:水),通过常用方法对实例B1至B3和对比实例B1中获得的阿霉素包封之前的脂质体(iLip-1)样品和对阿霉素包封之后的脂质体(DOX-

iLip-1) 样品测量脂质体的粒径分布(平均粒径(Z均)(d)和多分散性指数)和zeta电位。表1报告了在阿霉素包封之前脂质体(iLip-1)的粒径分布和zeta电位。表2报告了各种包封阿霉素的脂质体(DOX-iLip-1)的粒径分布和zeta电位。

[表1]

表1. 在阿霉素包封之前脂质体(iLip-1)的粒径分布和zeta电位

脂质体	根据本发明的 ICG 脂质衍生物修饰的 脂质体			常规 ICG 脂质 衍生物修饰的 脂质体
	iLip-1 (ICG- diSA)	iLip-1 (ICG-di DOPE)	iLip-1 (ICG-diDSPE)	iLip-1 (ICG-DOPE)
平均粒径 d (nm)	126.2	126.4	135.5	103.4
多分散性指数	0.071	0.039	0.070	0.085
zeta 电位 (mV)	-0.12	+1.52	-1.52	-1.66

[表2]

表2. 包封阿霉素的脂质体(DOX-iLip-1)的粒径分布和zeta电位

脂质体	根据本发明的 ICG 脂质衍生物修饰的脂质体			常规 ICG 脂质 衍生物修饰的 脂质体
	DOX-iLip-1 (ICG-diSA)	DOX-iLip-1 (ICG-diDO PE)	DOX-iLip-1 (ICG-diDS PE)	DOX-iLip-1 (ICG-DOPE)
平均粒径 d (nm)	129.3	143.0	140.9	367.1
多分散性 指数	0.035	0.099	0.051	1.0
zeta 电位 (mV)	-0.70	-0.59	-1.05	+0.92

[0105] (2) 包封在脂质体中的阿霉素的定量和包封比率的计算

通过将35μl的10%还原的Triton X-100(西格玛-奥德里奇公司(Sigma-

Aldrich))溶液和280 μ l超纯水添加到35 μ l的在实例B1至B3和对比实例B1中获得的特定阿霉素包封后脂质体(DOX-iLip-1)分散体中来获得对应的脂质体溶解溶液。为了构建阿霉素的校准曲线,还通过添加阿霉素水溶液(通过用超纯水稀释以提供0、3.125、6.25、12.5、25、50、100、200、400和800 μ g/ml的最终阿霉素浓度制备的溶液)代替脂质体分散体来制备样品。将100 μ l的每种特定混合物分配到96孔微孔板(康宁公司(Corning))的孔中,并且使用多板读数器(Infinite(注册商标)M200,帝肯公司)测量495nm波长处的吸光度。使用校准曲线法,由获得的吸光度确定包封在DOX-iLip-1中的阿霉素的量。计算包封在DOX-iLip-1中的阿霉素的量(阿霉素浓度,DOX浓度)相对于添加到脂质体(iLip-1)分散体中用于包封在脂质体中的阿霉素的量(阿霉素溶液的浓度)的百分比,并将其报告为阿霉素进入特定脂质体中的包封比率(DOX包封比率,%)。结果在表3中给出。

[表3]

表3. 单个DOX-iLip-1中阿霉素的包封比率

脂质体	根据本发明的ICG脂质衍生物修饰的脂质体			常规ICG脂质衍生物修饰的脂质体
	DOX-iLip -1 (ICG-di SA)	DOX-iLi p-1 (ICG-di DOPE)	DOX-iLi p-1 (ICG-di DSPE)	DOX-iLip-1 (ICG-DOPE)
DOX浓度 (μ g/ml) *	704.3	878.5	914.4	530.4
DOX包封比 率 (%)	70.4	87.9	91.4	53.0

*给出当脂质体浓度(对于DOX-iLip-1分散体中所含的DPPC、胆固醇、MPEG2000-DSPE和ICG脂质衍生物的总脂质浓度)为10mM时DOX-iLip-1分散体中的阿霉素浓度。

[0106] 如表1和图6所示,使用ICG脂质衍生物中的任一种可以产生均一的ICG脂质衍生物修饰的脂质体(iLip-1),其在阿霉素包封之前具有大约100至140nm的平均粒径和不大于0.1的多分散性指数。表1中的结果显示,根据本发明的ICG脂质衍生物可以用作基于脂质的颗粒的组成材料。

如表2和图7所示,对于使用根据本发明的对应ICG脂质衍生物(ICG-diSA、ICG-diDOPE、ICG-diDSPE)制备的iLip-1,阿霉素包封后DOX-iLip-1的粒径基本上不变,为130至140nm。另一方面,对于使用迄今已知的材料ICG-DOPE制备的DOX-iLip-1,在将阿霉素包封在脂质体中后确认了多分散性指数的较大增加和平均粒径的较大增加,推测这是由于聚集。基于这些结果,证明根据本发明的ICG脂质衍生物可用作包封药物(诸如阿霉素)的基于脂质的颗粒,并且能够形成表现出优异稳定性的包封药物的脂质体。虽然不旨在受以下理

论的限制,但假设使用迄今已知的材料ICG-DOPE不能形成稳定的包封药物的脂质体的原因如下:使用迄今为止已知的材料ICG-DOPE,当形成脂质体时,存在于结构的一部分中的磺基基团(-SO₃H)暴露于脂质体膜的表面,并且封装到脂质体内部中受到该磺基基团与药物(阿霉素)之间的相互作用的阻碍。

关于单个DOX-iLip-1的阿霉素包封比率,如表3所示,使用根据本发明的ICG脂质衍生物(ICG-diSA、ICG-diDOPE、ICG-diDSPE)制备的脂质体DOX-iLip-1(ICG-diSA)、DOX-iLip-1(ICG-diDOPE)和DOX-iLip-1(ICG-diDSPE)的阿霉素包封比率为70%至90%,高于使用迄今已知的材料ICG-DOPE制备的对比实例B1的DOX-iLip-1(ICG-DOPE)的大约50%。

因此,如前述内容所示,证明了与使用迄今已知的ICG脂质衍生物(ICG-DOPE)制备的脂质体相比,使用根据本发明的ICG脂质衍生物(ICG-diSA、ICG-diDOPE、ICG-diDSPE)制备的脂质体表现出以下各项:1)通过将药物从脂质体外部包封到脂质体内部而形成的包封药物的脂质体的更好且优异的稳定性;2)将药物包封到脂质体内部的更高效率。

[0107] 2. ICG脂质衍生物修饰的脂质体(iLip-2)和包封阿霉素的ICG脂质衍生物修饰的脂质体(DOX-iLip-2)的制备

通过使用柠檬酸的pH梯度法(这是另一种代表性包封方法),并且使用实例A1至A3中合成的ICG脂质衍生物,并使用阿霉素作为药物,制备ICG脂质衍生物修饰的脂质体(iLip-2(ICG-diSA)、iLip-2(ICG-diDOPE)、iLip-2(ICG-diDSPE))和包封阿霉素的ICG脂质衍生物修饰的脂质体(DOX-iLip-2(ICG-diSA)、DOX-iLip-2(ICG-diDOPE)、DOX-iLip-2(ICG-diDSPE))。

另外,根据以下程序,使用硫酸铵梯度和pH梯度,并且使用对比实例A1中合成的ICG脂质衍生物,并使用阿霉素作为药物,制备ICG脂质衍生物修饰的脂质体(iLip-2(ICG-DOPE))和包封阿霉素的ICG脂质衍生物修饰的脂质体(DOX-iLip-2(ICG-DOPE))。

[0108] [实例B4]

(1) iLip-2(ICG-diSA)的制备

将实例A1中合成的ICG-diSA用作ICG脂质衍生物。

将360μl的0.1mol/1二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC,日本精化株式会社)的氯仿溶液、200μl的0.01mol/1二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC,日本精化株式会社)的氯仿溶液、200μl的0.01mol/1 MPEG2000-DSPE(日本精化株式会社,PEG的平均分子量:2,000)的氯仿溶液、和400μl的0.001mol/1 ICG脂质衍生物(ICG-diSA)的氯仿溶液合并并在氯仿中混合。接着进行减压蒸馏去除,在真空中干燥至少一小时,并且添加2ml的0.3mol/1柠檬酸盐缓冲液(pH 4.0),并且将温度升高至50℃并使用涡旋混合器进行搅拌以获得粗脂质体分散体。使用加热至50℃的挤出机(Transferra Nanosciences公司),每个按顺序通过具有200nm、100nm和50nm孔径的聚碳酸酯核孔膜过滤器(GE医疗公司)五次,获得脂质体(iLip-2(ICG-diSA))分散体。

[0109] (2) DOX-iLip-2(ICG-diSA)

向2ml的获得的脂质体分散体中添加1.56ml的0.5mol/1碳酸氢钠水溶液和0.44ml的0.02mol/1 HEPES缓冲液(pH 7.4)。接着添加2ml的阿霉素(协和发酵麒麟株式会社)溶解在0.02mol/1 HEPES缓冲液(pH 7.4)中以得到2mg/ml的溶液,并且在50℃下搅拌2分钟以将阿霉素包封在脂质体内。然后使用设定为511,000×g和4℃的超离心分离器(CS120GXL,日

立工机株式会社)使脂质体分散体经受分离过程30分钟。去除上清液并且添加4ml的0.9%氯化钠水溶液,产生包封阿霉素的ICG脂质衍生物修饰的脂质体(DOX-iLip-2(ICG-diSA))的分散体。

[0110] [实例B5]

除了使用实例A2中获得的ICG-diDOPE作为ICG脂质衍生物而不是ICG-diSA之外,进行与实例B4中相同的程序以获得ICG脂质衍生物修饰的脂质体(iLip-2(ICG-diDOPE))的分散体和包封阿霉素的ICG脂质衍生物修饰的脂质体(DOX-iLip-2(ICG-diDOPE))的分散体。

[0111] [实例B6]

除了使用实例A3中获得的ICG-diDSPE作为ICG脂质衍生物而不是ICG-diSA之外,进行与实例B4中相同的程序以获得ICG脂质衍生物修饰的脂质体(iLip-2(ICG-diDSPE))的分散体和包封阿霉素的ICG脂质衍生物修饰的脂质体(DOX-iLip-2(ICG-diDSPE))的分散体。

[0112] [对比实例B2]

除了使用对比实例A1中获得的ICG-DOPE作为ICG脂质衍生物而不是ICG-diSA之外,进行与实例B4中相同的程序以获得ICG脂质衍生物修饰的脂质体(iLip-2(ICG-DOPE))的分散体和包封阿霉素的ICG脂质衍生物修饰的脂质体(DOX-iLip-2(ICG-DOPE))的分散体。

[0113] <脂质体分析2>

(1) 脂质体的粒径分布和zeta电位的测量

使用Zetasizer Nano ZS(由思百吉集团的马尔文仪器公司生产),如在<脂质体分析1>的前述内容(1)中对实例B4至B6和对比实例B2中获得的阿霉素包封之后的脂质体(DOX-iLip-2)样品测量脂质体的粒径分布(平均粒径(Z均)和多分散性指数)和zeta电位。表4报告了各种包封阿霉素的脂质体(DOX-iLip-2)的粒径分布和zeta电位。

[表4]

表4. 包封阿霉素的脂质体(DOX-iLip-2)的粒径分布和zeta电位

脂质体	根据本发明的 ICG 脂质衍生物修饰的脂质体				常规 ICG 脂质衍生物修饰的脂质体
	DOX-iLip-2 (ICG-diSA)	DOX-iLip-2 (ICG-diDOPE)	DOX-iLip-2 (ICG-diDS PE)	DOX-iLip-2 (ICG-DOP E)	
平均粒径 d (nm)	135.5	85.4	137.3	138.6	
多分散性 指数	0.072	0.17	0.073	0.155	
zeta 电位 (mV)	-1.52	-1.49	-1.70	-1.52	

[0114] (2) 包封在脂质体中的阿霉素的定量和包封比率的计算

对包封在脂质体中的阿霉素进行定量，并且使用与在<脂质体分析1>的前述内容(2)中相同的方法，对于实例B4至B6和对比实例B2中获得的阿霉素包封后的脂质体(DOX-iLip-2)分散体计算每种脂质体的阿霉素包封比率(DOX包封比率)。结果在表5中给出。

[表5]

表5. 单个DOX-iLip-2中阿霉素的包封比率

脂质体	根据本发明的 ICG 脂质衍生物修饰的脂质体				常规 ICG 脂质衍生物修饰的脂质体
	DOX-iLip-2 (ICG-diSA)	DOX-iLip-2 (ICG-diDO PE)	DOX-iLip-2 (ICG-diDSP E)	DOX-iLip-2 (ICG-DOP E)	
DOX 浓度 ($\mu\text{g/mL}$) *	882.6	803.0	842.1	522.5	
DOX 包封比 率 (%)	88.3	80.3	84.2	52.3	

*给出当脂质体浓度(对于DOX-iLip-2分散体中所含的DPPC、DSPC、MPEG2000-DSPE和ICG脂质衍生物的总脂质浓度)为10mM时DOX-iLip-2分散体中的阿霉素浓度。

[0115] 使用ICG脂质衍生物中的任一种，可以在实例B4至B6和对比实例B2中产生均一的

ICG脂质衍生物修饰的脂质体 (ICG-iLip-2) ,其在阿霉素包封之后具有大约85至140nm的平均粒径和不大于0.16的多分散性指数(参考表4和图8)。

另一方面,在产生的DOX-iLip-2的阿霉素包封比率方面,实例B4至C3与对比实例B2之间产生了显著差异。也就是说,使用迄今已知的材料ICG-DOPE产生的对比实例B2的DOX-iLip-2(ICG-DOPE)的阿霉素包封比率为约50%,相比之下根据本发明的ICG脂质衍生物(ICG-diSA、ICG-diDOPE、ICG-diDSPE)表现出的阿霉素包封比率更高,为80%至90%(参考表5),并且因此确认了使用根据本发明的ICG脂质衍生物产生的DOX-iLip-2(ICG-diSA)、DOX-iLip-2(ICG-diDOPE)和DOX-iLip-2(ICG-diDSPE)脂质体可以提供比使用迄今已知的材料ICG-DOPE产生的DOX-iLip-2(ICG-DOPE)更高的阿霉素包封。基于这些结果,证明了根据本发明的ICG脂质衍生物(ICG-diSA、ICG-diDOPE和ICG-diDSPE)可用作包封药物(诸如阿霉素)的基于脂质的颗粒,并且能够形成与迄今为止已知的材料ICG-DOPE相比在更高的包封比率下表现出优异稳定性的包封药物的脂质体。虽然不旨在受以下理论的限制,但假设在使用迄今已知的材料ICG-DOPE的情况下包封比率较小的原因如下:使用迄今为止已知的材料ICG-DOPE,当形成脂质体时,存在于结构的一部分中的磺基基团(-SO₃H)暴露于脂质体膜的表面,并且封装到脂质体内部中受到该磺基基团与药物(阿霉素)之间的相互作用的阻碍。

[0116] (3) 由于暴露于近红外LED光而引起的DOX-iLip-2的温度升高和阿霉素释放的研究

在将实例B4至B6和对比实例B2中获得的阿霉素包封后脂质体(DOX-Lip)分散体暴露于LED灯时,观察分散体溶剂的温度升高和伴随的阿霉素从特定脂质体中的释放行为。将500μl的用超纯水稀释以提供0.01mol/l的总脂质浓度(在DPPC、胆固醇、MPEG2000-DSPE和ICG脂质衍生物的分散体中的浓度)的特定DOX-iLip-2分散体引入24孔Falcon微孔板(康宁公司)的孔中,并在设定为37°C的恒温室(Taitec公司)中从板下方暴露于来自LED光源的近红外光(波长最大值=810nm,半值全宽=40nm)。在此期间,使用温度记录仪(SK-L400T,佐藤计量器制作所(Sato Keiryoki Mfg. Co., Ltd.))同时测量暴露于近红外光的DOX-iLip-2分散体的温度(每10秒进行一次数据采集)。在5、10和60分钟的近红外光暴露之后回收DOX-iLip-2分散体,并且添加0.9%氯化钠水溶液,同时混合。接着使用设定为511,000×g和4°C的超离心分离器(CS120GXL,日立工机株式会社)使DOX-iLip-2沉降,然后去除上清液,并且随后添加500μl的0.9%氯化钠水溶液。向35μl的获得的脂质体分散体中添加35μl的10% Triton X-100溶液和280μl超纯水,同时混合,得到特定脂质体的溶解溶液。如<脂质体分析1>的(2)中所述处理所得的混合物中的每一种,并且确定脂质体内剩余的阿霉素的量,并计算随时间消逝从脂质体中释放的阿霉素的量(%)。通过在设定为37°C的恒温室(Taitec公司)中将每种脂质体分散体引入微孔板孔中并且还确定未暴露于LED灯的保持的样品随时间消逝释放的阿霉素的量(%)来针对每种配制品进行对照实验。

[0117] 表6至9报告了由于暴露于近红外光而来自各种DOX-iLip-2的阿霉素释放比率(%)的时间变化。

[表6]

表6. 由于暴露于近红外光,来自根据本发明的ICG脂质衍生物修饰的脂质体DOX-iLip-2(ICG-diSA)的阿霉素释放比率(%)的时间变化

时间	0 min	5 min		10 min		60 min	
暴露于近红外光 (NIRL), 是(+) , 否(-)	NIRL-	NIR L-	NIRL +	NIRL-	NIRL +	NIRL -	NIR L+
DOX 释放比率 (%)	0	1.92	14.3	0	14.5	0	47.4

[表7]

表7. 由于暴露于近红外光, 来自根据本发明的ICG脂质衍生物修饰的脂质体DOX-iLip-2(ICG-diDOPE) 的阿霉素释放比率(%) 的时间变化

时间	0 min	5 min		10 min		60 min	
暴露于近红外光 (NIRL), 是(+) , 否(-)	NIRL-	NIR L-	NIRL +	NIRL-	NIRL +	NIRL -	NIR L+
DOX 释放比率 (%)	2.88	2.63	10.8	3.33	15.8	2.81	62.7

[表8]

表8. 由于暴露于近红外光, 来自根据本发明的ICG脂质衍生物修饰的脂质体DOX-iLip-2(ICG-diDSPE) 的阿霉素释放比率(%) 的时间变化

时间	0 min	5 min		10 min		60 min	
暴露于近红外光 (NIRL), 是(+) , 否(-)	NIRL-	NIR L-	NIRL +	NIRL-	NIRL +	NIRL -	NIR L+
DOX 释放比率 (%)	0.79	1.76	28.9	1.16	40.3	2.71	68.0

[表9]

表9. 由于暴露于近红外光, 来自迄今已知的ICG脂质衍生物修饰的脂质体DOX-iLip-2(ICG-DOPE) 的阿霉素释放比率(%) 的时间变化

时间	0 min	5 min		10 min		60 min	
暴露于近红外光 (NIRL), 是(+) , 否(-)	NIRL-	NIR L-	NIRL +	NIRL-	NIRL +	NIRL -	NIR L+
DOX 释放比率 (%)	13.4	24.4	96.6	78.2	98.2	100	94.8

[0118] 图9至12中所示的脂质体分散体温度随时间消逝的测量结果确认了对于实例B4至B6和对比实例B2的所有4种脂质体(DOX-iLip-2)观察到伴随暴露于近红外光的脂质体分散体温度升高,并且确认了所达到的温度是约50℃。这显示ICG脂质衍生物(ICG修饰的脂质体,其是一种脂质体修饰材料)通过暴露于近红外光而被加热,并且因此分散体溶剂的温度总体上升高。这表明根据本发明的ICG脂质衍生物可以应用于基于暴露于近红外光的热治疗性方法。通常已经报道,癌细胞在42℃及以上被杀死。在实际的体内条件下,脂质体颗粒以与当前使用的实验系统相比更稀的状态分布到癌组织中,并且预测溶剂的加热温度总体上较低;然而,当考虑添加到脂质体颗粒中的ICG脂质衍生物的量时,可以预期到癌细胞附近的脂质体颗粒本身将通过暴露于近红外光而被加热,从而导致附近癌细胞的死亡。

当测量由于暴露于近红外光而从脂质体中释放阿霉素时,可以确认对于实例B4至B6和对比实例B2中的所有4种脂质体(DOX-iLip-2),药物(阿霉素)在暴露于近红外光5分钟、10分钟和60分钟之后随时间消逝而被释放(参考表6至9和图9至12中的暴露于近红外光的“是”(NIRL+))。这表明了以下各项:暴露于近红外光导致ICG脂质衍生物的加热和脂质体颗粒本身的加热;脂质体膜的流动性因此增加;并且包封的药物被释放到脂质体颗粒的外部。这表明由根据本发明的ICG脂质衍生物构建的基于脂质的颗粒可以表现出所谓的温度敏感脂质体的功能。

在样品保持在37℃下而没有暴露于近红外光的情况下,实例B4至B6与对比实例B2之间产生了显著差异。也就是说,对于使用实例B4至B6的三种ICG脂质衍生物ICG-diSA、ICG-diDOPE和ICG-diDSPE的DOX-iLip-2,几乎没有观察到阿霉素泄漏(参考表6至8和图9至11中的暴露于近红外光的“否”(NIRL-))。然而,在使用迄今已知的ICG脂质衍生物ICG-DOPE的对比实例B2的DOX-iLip-2的情况下,在静置之后阿霉素立即开始泄漏,并且在静置60分钟之后几乎没有阿霉素保留在脂质体中(参考表9和图12中的没有暴露于近红外光的“否”(NIRL-))。

[0119] 3. ICG脂质衍生物修饰的脂质体(ICGLip73, ICGLip82)和包封阿霉素的ICG脂质衍生物修饰的脂质体(ICGLip73-DOX, ICGLip82-DOX)的制备

根据以下描述的程序,使用实例A3中合成的ICG脂质衍生物和作为药物的阿霉素并且使用硫酸铵梯度和pH梯度来制备ICG脂质衍生物修饰的脂质体(ICGLip73, ICGLip82)和包封阿霉素的ICG脂质衍生物修饰的脂质体(ICGLip73-DOX, ICGLip82-DOX)。

还根据以下描述的程序使用硫酸铵梯度和pH梯度制备不含ICG脂质衍生物的脂质体(Lip73, Lip82)和包封阿霉素的脂质体(Lip73-DOX, Lip82-DOX)。

[0120] [实例B7]

ICGLip73-DOX的制备

(1) ICGLip73

(i) 将 $280\mu\text{l}$ 的 $0.1\text{mol}/1$ 二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC,日本精化株式会社)的氯仿溶液、 $600\mu\text{l}$ 的 $0.01\text{mol}/1$ 二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC,日本精化株式会社)的氯仿溶液、 $200\mu\text{l}$ 的 $0.01\text{mol}/1$ MPEG2000-DSPE(日本精化株式会社,PEG的平均分子量:2,000)、和 $200\mu\text{l}$ 的 $0.01\text{mol}/1$ ICG-diDSPE(日本精化株式会社)的氯仿溶液在氯仿中混合。

(ii) 接着减压蒸馏去除氯仿,在真空中干燥至少一小时,添加 2ml 的 $0.3\text{mol}/1$ 硫酸铵水溶液(pH 5.5),将温度升高至 55°C ,并且使用涡旋混合器进行搅拌。使用加热至 55°C 的挤出机(北部脂质公司(Northern Lipids Inc.)),使所得粗脂质体分散体从最大孔径每个按顺序通过具有400nm、200nm和100nm孔径的聚碳酸酯核孔膜过滤器(GE医疗公司)五次。使用具有12-14kDa的分子量截留值的透析膜(Spectra/Por(注册商标)4透析膜,Spectrum公司)将所得脂质体分散体在超纯水中透析至少四小时。接着使用设定为 $543,200 \times g$ 和 4°C 的超离心分离器(Optima™ TLX,贝克曼库尔特公司(Beckman Coulter))进行分离过程,持续15分钟。然后去除上清液并悬浮在 2ml 的 $0.02\text{mol}/1$ HEPES缓冲液(pH 7.4)中,产生脂质体分散体(ICGLip73)。

(2) ICGLip73-DOX

添加 1ml 的阿霉素(协和发酵麒麟株式会社)溶解在 $0.02\text{mol}/1$ HEPES缓冲液(pH 7.4)中以得到 $2\text{mg}/\text{ml}$ 的溶液并将温度升高至 55°C ,并且搅拌(750rpm)5分钟以将阿霉素包封在脂质体内。在冰冷却之后,然后使用设定为 $543,200 \times g$ 和 4°C 的上述超离心分离器使所得脂质体分散体经受三个30分钟的分离过程。去除上清液,然后添加 2ml 的 $0.066\text{mol}/1$ 磷酸盐缓冲液(pH 7.4),产生包封阿霉素的ICG脂质衍生物修饰的脂质体(ICGLip73-DOX)的分散体。

[0121] [对比实例B3]

Lip73-DOX的制备

将 $280\mu\text{l}$ 的 $0.1\text{mol}/1$ 二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC,日本精化株式会社)的氯仿溶液、 $1000\mu\text{l}$ 的 $0.01\text{mol}/1$ 二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC,日本精化株式会社)的氯仿溶液、和 $200\mu\text{l}$ 的 $0.01\text{mol}/1$ MPEG2000-DSPE(日本精化株式会社,PEG的平均分子量:2,000)在氯仿中混合。

在此之后的程序中,获得脂质体(Lip73)分散体和包封阿霉素的脂质体(Lip73-DOX),如在实例B7中的ICGLip73-DOX的制备中的(1) (ii) 和(2) 中进行的。

[0122] [实例B8]

将 $320\mu\text{l}$ 的 $0.1\text{mol}/1$ 二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC,日本精化株式会社)的氯仿溶液、 $200\mu\text{l}$ 的 $0.01\text{mol}/1$ 二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC,日本精化株式会社)的氯仿溶液、 $200\mu\text{l}$ 的 $0.01\text{mol}/1$ MPEG2000-DSPE(日本精化株式会社,PEG的平均分子量:2,000)、和 $200\mu\text{l}$ 的 $0.01\text{mol}/1$ ICG-diDSPE(日本精化株式会社)的氯仿溶液在氯仿中混合。

在此之后的程序中,获得ICG脂质衍生物修饰的脂质体(ICGLip82)分散体和包封阿霉素的ICG脂质衍生物修饰的脂质体(ICGLip82-DOX),如在实例B7中的ICGLip73-DOX的制备中的1(ii) 和(2) 中进行的。

[0123] [对比实例B4]

Lip82-DOX的制备

将320 μ l的0.1mol/l二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC,日本精化株式会社)的氯仿溶液、600 μ l的0.01mol/l二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC,日本精化株式会社)的氯仿溶液、和200 μ l的0.01mol/l MPEG2000-DSPE(日本精化株式会社,PEG的平均分子量:2,000)在氯仿中混合。

在此之后的程序中,获得脂质体(Lip82)分散体和包封阿霉素的脂质体(Lip82-DOX),如在实例B7中的ICGLip73-DOX的制备中的1(ii)和(2)中进行的。

[0124] <脂质体分析3>

(1) 脂质体的粒径分布和zeta电位的测量

使用ELSZ-1000zeta电位粒径测量系统(大冢电子公司(Otsuka Electronics Co.,Ltd.)),通过常用方法对实例B7和B8以及对比实例B3和B4中获得的阿霉素包封后脂质体测量粒径(平均粒径(Z均)和多分散性指数)和zeta电位。结果在表10中报告。

[0125] (2) 包封在脂质体中的阿霉素的定量

通过在96孔微孔板(康宁公司)中将10 μ l的10%还原的Triton X-100(西格玛-奥德里奇公司)溶液和80 μ l超纯水添加到10 μ l的在实例B7和B8以及对比实例B3和B4中获得的特定阿霉素包封后脂质体分散体中并混合来获得脂质体溶解溶液。为了构建阿霉素的校准曲线,还通过添加阿霉素水溶液(通过用超纯水稀释以提供0、12.5、25、50、100、200、400和800 μ g/ml的最终阿霉素浓度制备的溶液)代替脂质体分散体来制备样品。使用多板读数器(Synergy H1,BIOTEC有限责任公司)测量495nm波长处的吸光度。使用校准曲线,由获得的吸光度确定包封在脂质体中的阿霉素的量(阿霉素(DOX)浓度)。结果在表10中给出。

[0126] (3) 脂质体中的吲哚菁绿(ICG)的定量

通过在96孔微孔板(康宁公司)中将10 μ l的10%还原的Triton X-100(西格玛-奥德里奇公司)溶液和80 μ l超纯水添加到10 μ l的在实例B7和B8以及对比实例B3和B4中获得的特定阿霉素包封后脂质体分散体的10倍稀释液中并混合来获得脂质体溶解溶液。为了构建ICG的校准曲线,还通过添加ICG水溶液(通过用生理盐水稀释以提供0、5、10、25、50和100 μ g/ml的最终ICG浓度的由Diagnogreen(第一三共株式会社(Daiichi Sankyo Co.,Ltd.))制备的溶液)代替脂质体分散体来制备样品。使用多板读数器(Synergy H1,BIOTEC有限责任公司)测量800nm波长处的吸光度。使用校准曲线,由获得的吸光度确定脂质体中的ICG的量。结果在表10中给出。

[0127] [表10]

表10. 各种包封阿霉素的脂质体的配制品特征

脂质体	粒径 (d, nm)	多分散 性指数	zeta 电位 (mV)	DOX 浓度 (mM)	ICG 浓度 (mM)
Lip73-DOX	108	0.068	-0.72	1.02	-
ICGLip73-DOX	112	0.073	-0.81	1.34	0.58
Lip82-DOX	104	0.119	-2.71	0.72	-
ICGLip82-DOX	110	0.087	-4.76	1.17	0.59

如表10所示,可以获得均一的包封阿霉素的ICG脂质衍生物修饰的脂质体(ICGLip73-DOX,ICGLip82-DOX)和包封阿霉素的脂质体(Lip73-DOX,Lip82-DOX),这些脂质

体具有大约100至120nm的粒径和不超过0.12的多分散性指数。

另外,根据阿霉素(DOX)和ICG的定量结果,这些脂质体以高浓度包封阿霉素。特别地,使用根据本发明的ICG脂质衍生物(ICG-diDSPE)制备的ICGLip73-DOX和ICGLip82-DOX以比不含ICG脂质衍生物的Lip73-DOX和Lip82-DOX更高的浓度包封阿霉素。根据HPLC分析,还确认了ICGLip73-DOX和ICGLip82-DOX含有ICG-diDSPE。

[0128] (4) 由于暴露于近红外LED光而引起的阿霉素从ICGLip-DOX释放的研究

然后,在将实例B7和B8以及对比实例B3和B4中获得的阿霉素包封后脂质体分散体(ICGLip73-DOX、Lip73-DOX、ICGLip82-DOX、Lip82-DOX)暴露于LED光时,观察分散体溶剂的温度升高和伴随的阿霉素从特定脂质体中的释放行为。也就是说,将200μl的用0.066mol/1磷酸盐缓冲液(pH 7.4)稀释以提供0.1mg/ml的ICG浓度的特定脂质体分散体(然而,对于Lip73-DOX和Lip82-DOX脂质体分散体,将脂质体分散体稀释,使得每种脂质体分散体的阿霉素浓度相同并将其添加)引入96孔微孔板(康宁公司)的孔中,并且在设定为37℃的恒温室(Taitec公司)中从板下方暴露于来自LED暴露装置的近红外光10分钟(该组含有L800辐照器(EL-SPI-800-01, LED: USHIO L800-66-60)和L800辐照器功率源(EL-DGI-10008-01)(Ebisudenshi有限责任公司);波长最大值=808nm,半值全宽=32nm,平均输出功率=767mW/cm²)。在暴露于近红外光之后,回收每种脂质体分散体,并且添加2.5ml的0.066mol/1磷酸盐缓冲液(pH 7.4),同时搅拌;接着使用设定为543,200×g和4℃的超离心分离器(OptimaTM TLX,贝克曼库尔特公司)使脂质体沉降30分钟,去除上清液,并且然后添加200μl的0.066mol/1磷酸盐缓冲液(pH 7.4)。如<脂质体分析3>的(2)中一样处理这些悬浮液中的每一种,并且确定脂质体内剩余的阿霉素的量,并计算从脂质体中释放的阿霉素的量(%)。通过在设定为37℃的恒温室(Taitec公司)中将每种脂质体分散体引入微孔板孔中并且还确定未暴露于LED光的保持10分钟的样品释放的阿霉素的量(%)来针对每种配制品进行对照实验。

[0129] 图6报告了ICGLip73-DOX、Lip73-DOX、ICGLip82-DOX和Lip82-DOX的结果。

由图6可以确认,由于ICGLip73-DOX暴露于LED光持续10分钟,封装在脂质体中的大约50%的阿霉素从脂质体中释放,但是阿霉素没有从未暴露于LED光的ICGLip73-DOX中释放。另一方面,确认了Lip73-DOX的LED暴露的释放与不暴露于LED光的情况大致相同(大约10%)。

对于ICGLip82-DOX也可以确认这一点:由于暴露于LED光,大约50%的阿霉素从脂质体中释放,而阿霉素没有从未暴露于LED光的ICGLip82-DOX中释放。对于Lip82-DOX,未确认暴露于LED光和不暴露于LED光的阿霉素释放。

实例B7和B8的阿霉素包封后脂质体分散体(ICGLip73-DOX, ICGLip82-DOX)具有比使用ICG-diDSPE的实例B6的DOX-iLip-2(ICG-diDSPE)好得多的阿霉素包封稳定性(在暴露于近红外光期间10分钟时的DOX释放比率为40.3%,图11A)。

[0130] 前述实例中的结果已经显示,由根据本发明的ICG脂质衍生物(ICG-diSA、ICG-diDOPE、ICG-diDSPE)制备的脂质体在生物体中以稳定的方式将阿霉素储存在脂质体内,在暴露于近红外光时本身具有发热作用,并且可以同时将包封的阿霉素释放到脂质体的外部。

[0131] C. 包封顺铂的ICG脂质衍生物修饰的脂质体的制备

使用以下程序并且使用在实例A3中合成的ICG脂质衍生物并且使用顺铂(Cis)作为药物来制备包封顺铂的ICG脂质衍生物修饰的脂质体(ICGLip73-Cis, ICGLip82-Cis)。

还使用以下程序制备了不含ICG脂质衍生物的脂质体(Lip73, Lip82)和包封顺铂的脂质体(Lip73-DOX, Lip82-DOX)。

[0132] [实例C1和C2以及对比实例C1和C2]

Lip73-Cis、ICGLip73-Cis、Lip82-Cis和ICGLip82-Cis的制备

根据下表将DPPC(日本油脂株式会社(NOF Corporation))、DSPC(日本精化株式会社)、MPEG2000-DSPE(健赞公司(Genzyme))、和ICG-diDSPE称重到玻璃小瓶中以分别提供以下摩尔比(DPPC:DSPC:MPEG2000-DSPE:ICG-diDSPE):7:2.5:0.5:0(Lip73-Cis)、7:1.5:0.5:0.5(ICGLip73-Cis)、8:1.5:0.5:0(Lip82-Cis)、和8:0.5:0.5:0.5(ICGLip82-Cis)。

[表11]

表11. 脂质混合物组成

		DPPC (mg)	DSPC (mg)	MPEG2000- DSPE (mg)	ICG-diDSPE (mg)
对比实例 C1	Lip73-Cis	128.6	49.5	34.9	0
实例 C1	ICGLip73-Cis	120.7	29.6	35.2	25.9
对比实例 C2	Lip82-Cis	146.8	29.5	35.0	0
实例 C2	ICGLip82-Cis	146.7	9.8	35.0	26.0

将1mL乙醇添加到每个玻璃小瓶中，并加热至80°C以制备脂质溶液。通过称出150mg顺铂、添加18mL生理盐水并加热至80°C来制备8.3mg/mL顺铂水溶液。将4mL顺铂水溶液添加到每种脂质溶液中以制备脂质体水溶液。在加热至80°C并且使用挤出机(LIPEX)的同时，使每种脂质体水溶液通过具有100nm孔径的过滤器(沃特曼公司(Whatman))五次。在4°C下冷却30分钟，离心10分钟(大约1600g, Kubota 7780II)，并且分离沉降的材料和脂质体水溶液。使用Float-A-Lyzer G2透析装置(100kD)，将上清液用生理盐水在4°C下透析12小时。用生理盐水稀释之后，使用大约370,000g的条件进行超离心分离(Optima XPN-80, 贝克曼公司)。去除上清液并且用生理盐水进行悬浮。将其通过具有0.45μm孔径的PES(聚醚砜)过滤器(沃特曼公司)，以获得包封顺铂的脂质体(ICGLip73-Cis, ICGLip82-Cis)水溶液和不含ICG脂质衍生物的包封顺铂的脂质体(Lip73-DOX, Lip82-DOX)水溶液。

[0133] <脂质体分析4>

对实例C1和C2以及对比实例C1和C2中获得的顺铂包封后脂质体水溶液运行以下分析。

[0134] (1) 脂质体的粒径和zeta电位的测量

使用ELSZ-1000zeta电位粒径测量系统(大冢电子公司)，通过常用方法对每种脂质体测量粒径(平均粒径(Z均)和多分散性指数)和zeta电位。结果在表12中报告。

[0135] (2) 包封在脂质体中的顺铂的定量

通过HPLC(岛津公司(Shimadzu Corporation))对每种脂质体水溶液测量脂质浓度和顺铂浓度。结果在表12中报告。

[0136] (3) 脂质体中的吲哚菁绿 (ICG) 的定量

通过在96孔微孔板(康宁公司)中将 $10\mu\text{l}$ 的10%还原的Triton X-100(西格玛-奥德里奇公司)溶液和 $80\mu\text{l}$ 超纯水添加到 $10\mu\text{l}$ 的每种所得脂质体分散体的50倍稀释液中并混合来获得脂质体溶解溶液。使用多板读数器(Synergy H1, BIOTEC有限责任公司)测量 800nm 波长处的吸光度。使用校准曲线,由获得的吸光度确定脂质体中的ICG的量。结果在表12中给出。

[0137] [表12]

表12. 包封顺铂的脂质体的配制品特征

脂质体	粒径 (d, nm)	多分散性 指数	zeta 电位 (mV)	顺铂浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	ICG 浓度 (mM)
Lip73-Cis	92	0.076	-4.18	800	-
ICGLip73-Cis	87	0.101	-0.46	800	4.68
Lip82-Cis	90	0.075	+1.33	800	-
ICGLip82-Cis	86	0.095	-5.37	800	4.44

如表12所示,可以获取均一的包封顺铂的ICG脂质衍生物修饰的脂质体(ICGLip73-Cis, ICGLip82-Cis)和包封顺铂的脂质体(Lip73-Cis, Lip82-Cis),这些脂质体具有不超过 100nm 的粒径和不超过0.12的多分散性指数。

另外,根据顺铂和ICG的定量结果,这些脂质体以高浓度包封顺铂。根据HPLC分析的结果,还可以确认ICGLip73-Cis和ICGLip82-Cis中掺入了ICG-diDSPE。

[0138] (4) 由于暴露于近红外LED光而引起的顺铂从ICGLip-Cis释放的研究

然后,在将实例C1和C2以及对比实例C1和C2的脂质体分散体(ICGLip73-Cis、Lip73-Cis、ICGLip82-Cis和Lip82-Cis)暴露于LED光时,观察分散体溶剂的温度升高和伴随的顺铂从特定脂质体中的释放行为。将 $200\mu\text{l}$ 的用 0.066mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)稀释以提供 0.1mg/mL 的ICG浓度的特定脂质体分散体(然而,对于Lip73-Cis和Lip82-Cis脂质体分散体,将脂质体分散体稀释,使得每种脂质体分散体的顺铂浓度相同并将其添加)引入96孔微孔板(康宁公司)的孔中,并且在设定为 37°C 的恒温室(Taitec公司)中从板下方暴露于来自LED暴露装置的近红外光10分钟(该组含有L800辐照器(EL-SPI-800-01, LED: USHIO L800-66-60)和L800辐照器功率源(EL-DGI-10008-01)(Ebisudenshi有限责任公司);波长最大值= 808nm ,半值全宽= 32nm ,平均输出功率= 767mW/cm^2)。在此期间,使用温度记录仪(SK-L400T,佐藤计量器制作所)每10秒测量暴露于近红外光的脂质体分散体的温度。在暴露于近红外光之后,回收每种脂质体分散体,并且添加 2.5mL 的 0.066mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.4),同时搅拌;接着使用设定为 $543,200\times g$ 和 4°C 的超离心分离器(OptimaTM TLX,贝克曼库尔特公司)使脂质体沉降30分钟,去除上清液,并且然后添加 $200\mu\text{l}$ 的 0.066mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)。如<脂质体分析4>的(2)中所述处理这些悬浮液中的每一种,并且确定脂质体内剩余的顺铂的量,并计算从脂质体中释放的顺铂的量(%)。通过在设定为 37°C 的恒温室(Taitec公司)中将每种脂质体分散体引入微孔板孔中并且还确定未暴露于LED光的保持10分钟的样品释放的顺铂的量(%)来针对每种配制品进行对照实验。

[0139] 图7A和图7B报告了ICGLip73-Cis、Lip73-Cis、ICGLip82-Cis和Lip82-Cis的结果。

由图7A可以确认,由于ICGLip73-Cis暴露于LED光持续10分钟,封装在脂质体中的至少80%的顺铂从脂质体中释放,但是顺铂没有从未暴露于LED光的ICGLip73-Cis中释放。另一方面,对于Lip73-Cis,针对暴露于LED光或未暴露于LED光均未确认顺铂释放。

对于ICGLip82-Cis,在未暴露于LED光的情况下观察到一些释放,但是可以确认由于暴露于LED而从脂质体中释放了至少90%的顺铂。对于Lip82-Cis暴露于LED光观察到的释放程度与对于未暴露于LED光的程度大致相同。

图7B示出了对于含有ICG脂质衍生物的脂质体(ICGLip73-Cis, ICGLip82-Cis),由于暴露于LED光,脂质体分散体的温度经历了显著升高。

[0140] 这些实例的结果证明了由根据本发明的ICG脂质衍生物(ICG-diDSPE)制备的脂质体以稳定的方式将顺铂保持在脂质体内,并且可以在用近红外光照射时将包封的顺铂释放到脂质体的外部。

[0141] D. 在携带HT1080癌症的小鼠中的治疗作用

1. 脂质体配制品(ICG-Lip、Lip-DOX、ICGLip-DOX)的制备

使用实例A3中合成的ICG脂质衍生物并使用阿霉素(DOX)作为药物,使用与前述实例中相同的程序制备以下物质:包封药物的ICG脂质衍生物修饰的脂质体(ICGLip-DOX)、不含ICG脂质衍生物的包封药物的脂质体(Lip-DOX)、和没有包封药物的ICG脂质衍生物修饰的脂质体(ICG-Lip)。

(制备程序)

将DPPC(日本油脂株式会社)、DSPC(日本精化株式会社)和MPEG2000-DSPE(健赞公司)用乙醇溶解以提供20mg/mL,并且将ICG-diDSPE用氯仿溶解以提供5mg/mL。进行混合以便给出下表中每种脂质的重量。脂质的摩尔比(DPPC:DSPC:MPEG2000-DSPE:ICG-diDSPE)分别为70:15:5:5(Rp.1)和70:25:5:0(Rp.2)。

[表13]

表13. 包封之前脂质体的脂质混合物组成

	DPPC (mg)	DSPC (mg)	MPEG2000-DSPE (mg)	ICG-diDSPE (mg)
Rp. 1	540.8	124.8	147.4	108.3
Rp. 2	513.8	197.6	140.0	0

减压蒸馏去除有机溶剂并且真空干燥12小时,以制备脂质混合物。通过溶解硫酸铵(日本富士胶片和光纯药株式会社(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation))以提供300mM来制备硫酸铵水溶液。将蔗糖(日本富士胶片和光纯药株式会社)和L-组氨酸(日本富士胶片和光纯药株式会社)溶解在水中以分别提供96mg/mL和10mM来制备96mg/mL蔗糖/10mM/L组氨酸水溶液。将加热至80°C的10mL硫酸铵水溶液添加到每种脂质混合物(Rp.1和Rp.2)中,并且通过反转混合来制备脂质体水溶液。在加热至80°C并且使用挤出机(LIPEX)的同时,使脂质体水溶液各自通过具有50nm孔径的过滤器(沃特曼公司)五次。用生理盐水稀释所得的经粒度调节的材料,接着使用大约370,000g的条件进行超离心分离(Optima

XPN-80, 贝克曼公司)。去除上清液并且用生理盐水进行悬浮, 接着使用大约370,000g的条件进行超离心分离。去除上清液, 并且使用96mg/mL蔗糖/10mM/mL组氨酸水溶液进行悬浮。通过HPLC(岛津公司)测量对应的脂质浓度。

通过用5%葡萄糖溶液(大冢制药株式会社(Otsuka Pharmaceutical Co.,Ltd.))溶解阿霉素(Dox)(西康公司(Sicor Inc.))以提供10mg/mL来获得阿霉素水溶液。通过将阿霉素水溶液与每种脂质体水溶液(Rp.1和Rp.2)混合并在50℃下加热5分钟来进行阿霉素包封; 在冷却之后, 将其通过具有0.45μm孔径的PES(聚醚砜)过滤器(沃特曼公司)以制备包封阿霉素的脂质体水溶液(ICG-Lip-Dox和LipDOX)。

通过HPLC(岛津公司)测量对应的脂质浓度。使用Zetasizer Nano ZS(马尔文仪器公司)测量粒径。通过用生理盐水将所获得的包封阿霉素的脂质体水溶液中的每一种稀释10倍, 使用大约600,000g的条件进行超离心分离(himac CS120FX, 日立公司(Hitachi))并且使用HPLC测量上清液中的阿霉素浓度和超离心分离之前的阿霉素浓度来测量包封比率。结果是包封比率分别为98.0%和98.6%。

另外, 通过在阿霉素包封之前用96mg/mL蔗糖/10mM/mL组氨酸水溶液稀释Rp.1脂质体水溶液来制备不含阿霉素的ICG-Lip。

阿霉素(DOX)浓度和相应的脂质(ICG、DPPC、DSPC)浓度如在下表中给出。

[表14]

表14. 脂质体的配制品特征

	粒径 (d, nm)	多分散 性指数	DOX 浓度 (mg/mL)	ICG 浓度 (mg/mL)	DPPC 浓度 (mg/mL)	DSPC 浓度 (mg/mL)
ICG-Lip	82.3	0.05	-	3.08	37.44	8.58
Lip-DOX	80.5	0.04	1.50	-	36.48	12.89
ICGLip-D OX	81.7	0.06	1.50	3.08	32.16	8.44

[0142] 2. 携带HT1080实体瘤的小鼠的实验治疗

(1) 携带HT1080实体瘤的小鼠的制备

通过用D-MEM(高葡萄糖)培养基(日本富士胶片和光纯药株式会社)悬浮来制备HT1080细胞(人纤维肉瘤细胞系)的细胞悬浮液, 以给出 5×10^7 个细胞/ml。然后将0.1ml的HT1080细胞悬浮液填充到配备有27G注射针(泰尔茂株式会社(Terumo Corporation))的1mL注射器(泰尔茂株式会社)中, 并且对6周龄BALB/c裸雄性小鼠(从日本SLC公司(Japan SLC, Inc.)获得)的右背部进行皮下施用(第0天), 以提供 5×10^6 个细胞/小鼠。然后通过常用方法进行育种, 直至形成合适大小的实体瘤。

[0143] (2) 药物施用和暴露于LED光

在癌细胞移植之后的第11天(第11天), 将小鼠保持在小鼠固定器中, 并且以10mg/kg(体重)的阿霉素剂量经由尾静脉施用ICGLip、Lip-DOX或ICGLip-DOX。将生理盐水(盐水)施用于非治疗组, 并且在ICGLip施用组中进行施用, 以便提供与ICGLip-DOX施用组相同的ICG-diDSPE剂量。在施用之后24小时, 使用小动物的小型麻醉机(MK-A110, Muromachi

Kikai有限责任公司),使用异氟烷(辉瑞公司(Pfizer))通过吸入麻醉小鼠,并将其置于设定在35℃下的加热垫(Heater Mat KN-475-35,Natsume Seisakusho有限责任公司)上。将LED暴露装置(该组含有L800辐照器(EL-SPI-800-01,LED:USHIO L800-66-60)和L800辐照器功率源(EL-DGI-10008-01)(Ebisudenshi有限责任公司);波长最大值=808nm,半值全宽=32nm,平均输出功率=767mW/cm²)的纤维头尽可能靠近实体瘤固定,并且在异氟烷吸入麻醉下照射LED光10分钟。还制备了非LED暴露组作为对照。

[0144] (3) 实体瘤部位处的温度测量

在暴露于LED光之前和暴露结束后立即使用热成像照相机(E5,菲力尔系统公司)测量实体瘤部位的温度。温度测量的结果在图8中给出。

[0145] (4) 治疗作用的评价和体重的测量

使用卡尺测量小鼠皮下形成的实体瘤的短直径和长直径。使用以下公式计算实体瘤的体积。

$$\text{癌症体积(cm}^3\text{)} = 0.4 \times (\text{短直径(cm)}) \times (\text{短直径(cm)}) \times (\text{长直径(cm)})$$

图9提供了使用计算的肿瘤体积显示相对于药物施用当天的变化的比例(相对肿瘤体积(RTV))的图。

小鼠体重测量的结果在图10中示出。

[0146] 如图8所示,对于已经接受ICGLip和ICGLip-DOX(它们是含有ICG脂质衍生物(ICG-diDSPE)的脂质体)的携带HT1080实体瘤的小鼠,确认了由于实体瘤暴露于LED光,实体瘤温度升高至约50℃。另一方面,在接受生理盐水(盐水)或Lip-DOX的小鼠中未确认由于暴露于LED光而导致的实体瘤温度升高。

如图9所示,在接受ICGLip-DOX并且随后接受用LED光照射实体瘤的携带HT1080实体瘤的小鼠(ICGLip-DOX+LED)的情况下,确认了非常大的肿瘤消退作用,并且还观察到癌症消失的小鼠。接受ICGLip和LED光照射的小鼠(ICGLip+LED)呈现短暂的肿瘤缩小,但这之后出现肿瘤增大。与施用盐水(非LED光暴露)的小鼠(盐水)、接受盐水,接着暴露于LED光的小鼠(盐水+LED)和施用ICGLip(非LED光暴露)的小鼠(ICGLip)相比,施用ICGLip-DOX(非LED光暴露)的小鼠(ICGLip-DOX)、施用Lip-DOX(非LED光暴露)小鼠(Lip-DOX)、和接受Lip-DOX,接着暴露于LED光的小鼠(Lip-DOX+LED)呈现出更大的癌症生长抑制作用,然而,这没有达到癌症缩小。

如图10所示,没有观察到由于药物施用或暴露于LED光而对小鼠体重变化产生影响,并且在接受ICGLip-DOX,接着将实体瘤暴露于LED光的小鼠(ICGLip-DOX+LED)中观察到从由于携带的癌症而导致的体重减轻中恢复的趋势。

[0147] E. 在携带BxPC3癌症的小鼠中的治疗作用

1. 脂质体配制品(ICG-Lip、Lip-Cis、ICGLip-Cis)的制备

使用实例A3中合成的ICG脂质衍生物并使用顺铂(Cis)作为药物,使用与前述实例中相同的程序制备以下物质:包封药物的ICG脂质衍生物修饰的脂质体(ICGLip-Cis)、不含ICG脂质衍生物的包封药物的脂质体(Lip-Cis)、和没有包封药物的ICG脂质衍生物修饰的脂质体(ICG-Lip)。

(制备程序)

根据下表将DPPC(日本油脂株式会社)、DSPC(日本精化株式会社)、MPEG2000-DSPE

(健赞公司)、和ICG-diDSPE称重到玻璃小瓶中。脂质的摩尔比(DPPC:DSPC:MPEG2000-DSPE:ICG-diDSPE)分别为70:15:5:5(ICG-Lip)、70:25:5:0(Lip-Cis)、和70:15:5:5(ICG-Lip-Cis)。

[表15]

表15. 包封之前脂质体的脂质混合物组成

	DPPC (mg)	DSPC (mg)	MPEG2000-DSPE (mg)	ICG-diDSPE (mg)
ICG-Lip	385.4	89.0	105.0	77.4
Lip-Cis	366.2	140.9	99.9	0
ICGLip-Cis	385.4	88.9	105.2	77.3

将3mL乙醇添加到每个玻璃小瓶中，并加热至80℃以制备脂质溶液。通过称出304mg顺铂、添加35mL生理盐水并加热至80℃来制备8.7mg/mL顺铂水溶液。将12mL顺铂水溶液添加到每种脂质溶液中以制备脂质体水溶液。在加热至80℃并且使用挤出机(LIPEX)的同时，使每种脂质体水溶液通过具有100nm孔径的过滤器(沃特曼公司(Whatman))五次。在4℃下冷却30分钟，离心10分钟(大约1600g,Kubota 7780II)，并且分离沉降的材料和脂质体水溶液。使用Float-A-Lyzer G2透析装置(100kD)，将上清液用生理盐水在4℃下透析12小时。用生理盐水稀释之后，使用大约370,000g的条件进行超离心分离(Optima XPN-80,贝克曼公司)。去除上清液并且用生理盐水进行悬浮。将其通过具有0.45μm孔径的PES(聚醚砜)过滤器(沃特曼公司)，以获得包封顺铂的脂质体(ICGLip-Cis,Lip-Cis)水溶液和不含顺铂的脂质体(ICGLip)水溶液。

通过HPLC(岛津公司)测量特定脂质的浓度和顺铂(cis)浓度。使用Zetasizer Nano ZS(马尔文仪器公司)测量粒径。结果在下表中报告。

[表16]

表16. 脂质体的配制品特征

	粒径 (d, nm)	多分散性 指数	Cis 浓度 (mg/mL)	ICG-diDSPE 浓度 (mg/mL)
ICG-Lip	83.9	0.05	—	9.22
Lip-Cis	79.7	0.02	0.94	—
ICGLip-Cis	81.8	0.03	0.94	9.22

[0148] 2. 携带BxPC3实体瘤的小鼠的实验治疗

(1) 携带BxPC3实体瘤的小鼠的制备

通过用RPMI1640培养基(日本富士胶片和光纯药株式会社)悬浮来制备BxPC3细胞(人胰腺癌细胞系)的细胞悬浮液，以给出 2.5×10^7 个细胞/mL。然后将0.2mL的BxPC3细胞悬浮液填充到配备有27G注射针(泰尔茂株式会社)的1mL注射器(泰尔茂株式会社)中，并且对5周龄BALB/c裸雄性小鼠(从日本SLC公司获得)的右背部进行皮下施用(第0天)，以提供 5×10^6 个细胞/小鼠。然后通过常用方法进行育种，直至形成合适大小的实体瘤。

[0149] (2) 药物施用和暴露于LED光

在癌细胞移植之后的第18天(第18天),将小鼠保持在小鼠固定器中,并且以10mg/kg(体重)的顺铂剂量经由尾静脉施用ICGLip、Lip-Cis或ICGLip-Cis。将生理盐水(盐水)施用于非治疗组,并且在ICGLip施用组中进行施用,以便提供与ICGLip-Cis施用组相同的ICG-diDSPE剂量。在施用之后24小时,使用小动物的小型麻醉机(MK-A110,Muromachi Kikai有限责任公司),使用异氟烷(辉瑞公司(Pfizer))通过吸入麻醉小鼠,并将其置于设定在35°C下的加热垫(Heater Mat KN-475-35,Natsume Seisakusho有限责任公司)上。将LED暴露装置(该组含有L800辐照器(EL-SPI-800-01,LED:USHIO L800-66-60)和L800辐照器功率源(EL-DGI-10008-01)(Ebisudensi有限责任公司);波长最大值=808nm,半值全宽=32nm,平均输出功率=767mW/cm²)的纤维头尽可能靠近实体瘤固定,并且在异氟烷吸入麻醉下照射LED光10分钟。还制备了非LED暴露组作为对照。

[0150] (3) 实体瘤部位处的温度测量

在暴露于LED光之前和暴露结束后立即使用热成像照相机(E5,菲力尔系统公司)测量实体瘤部位的温度。温度测量的结果在图11中给出。

[0151] (4) 治疗作用的评价和体重的测量

使用卡尺测量小鼠皮下形成的实体瘤的短直径和长直径。使用以下公式计算实体瘤的体积。

$$\text{癌症体积(cm}^3\text{)} = 0.4 \times (\text{短直径(cm)}) \times (\text{短直径(cm)}) \times (\text{长直径(cm)})$$

图12提供了使用计算的肿瘤体积显示相对于药物施用当天的变化的比例(相对肿瘤体积(RTV))的图。

小鼠体重测量的结果在图13中示出。

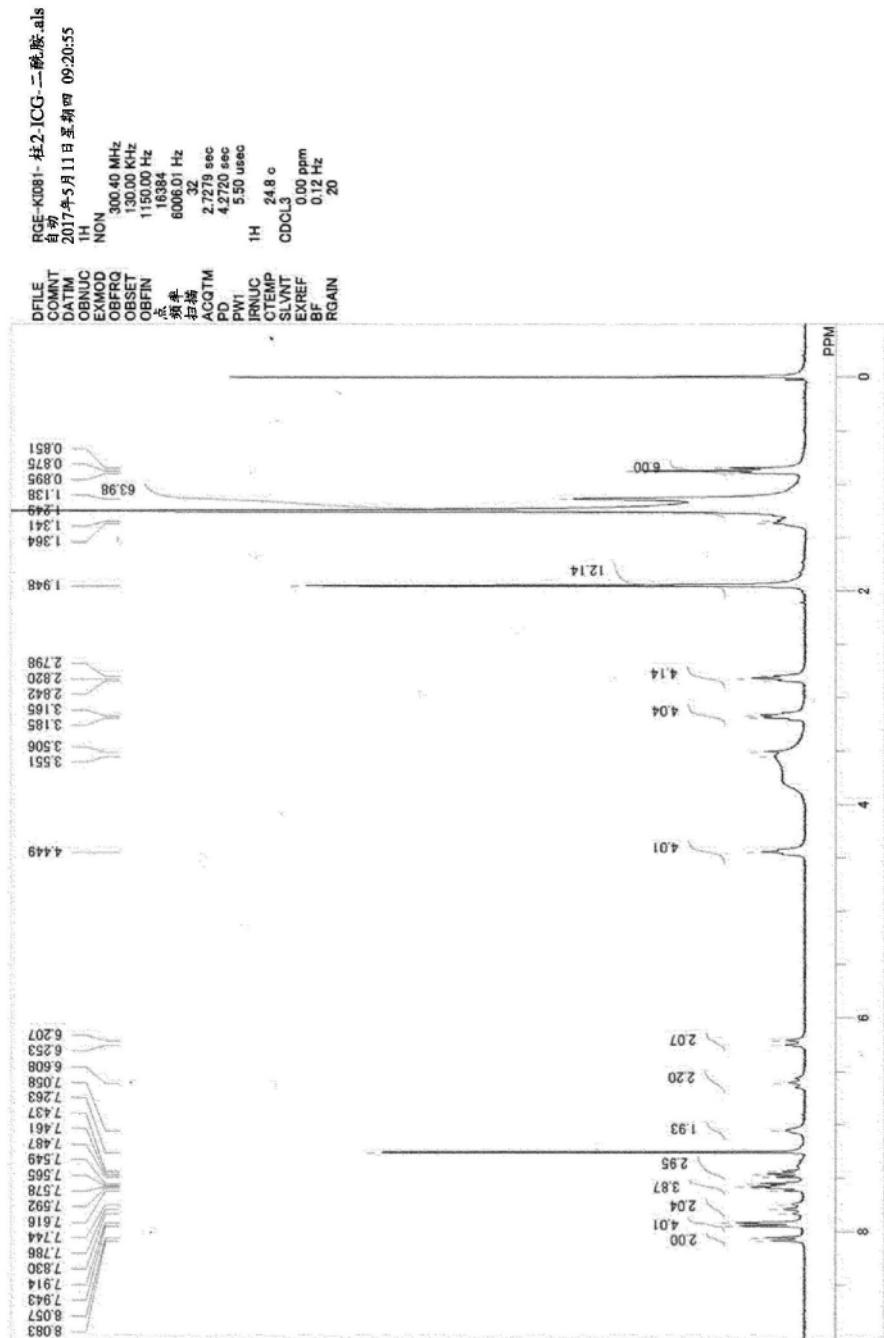
[0152] 如图11所示,对于已经接受ICGLip和ICGLip-Cis(它们是含有ICG-diDSPE的脂质体)的携带BxPC3实体瘤的小鼠,确认了由于实体瘤暴露于LED光,实体瘤温度升高至约43°C。另一方面,在接受生理盐水(盐水)或Lip-Cis的小鼠中未确认由于暴露于LED光而导致的实体瘤温度升高。

如图12所示,对于接受ICGLip-Cis并且随后接受用LED光照射实体瘤的携带BxPC3实体瘤的小鼠(ICGLip-Cis+LED),确认了肿瘤消退作用。接受ICGLip和LED光照射的小鼠(ICGLip+LED)呈现短暂的肿瘤消退,但这之后出现肿瘤增大。在施用ICGLip-Cis(非LED光暴露)的小鼠(ICGLip-Cis)、施用Lip-Cis(非LED光暴露)的小鼠(Lip-Cis)、和接受Lip-Cis,接着暴露于LED光的小鼠(Lip-Cis+LED)中观察到一些生长抑制作用,但这种作用很小。

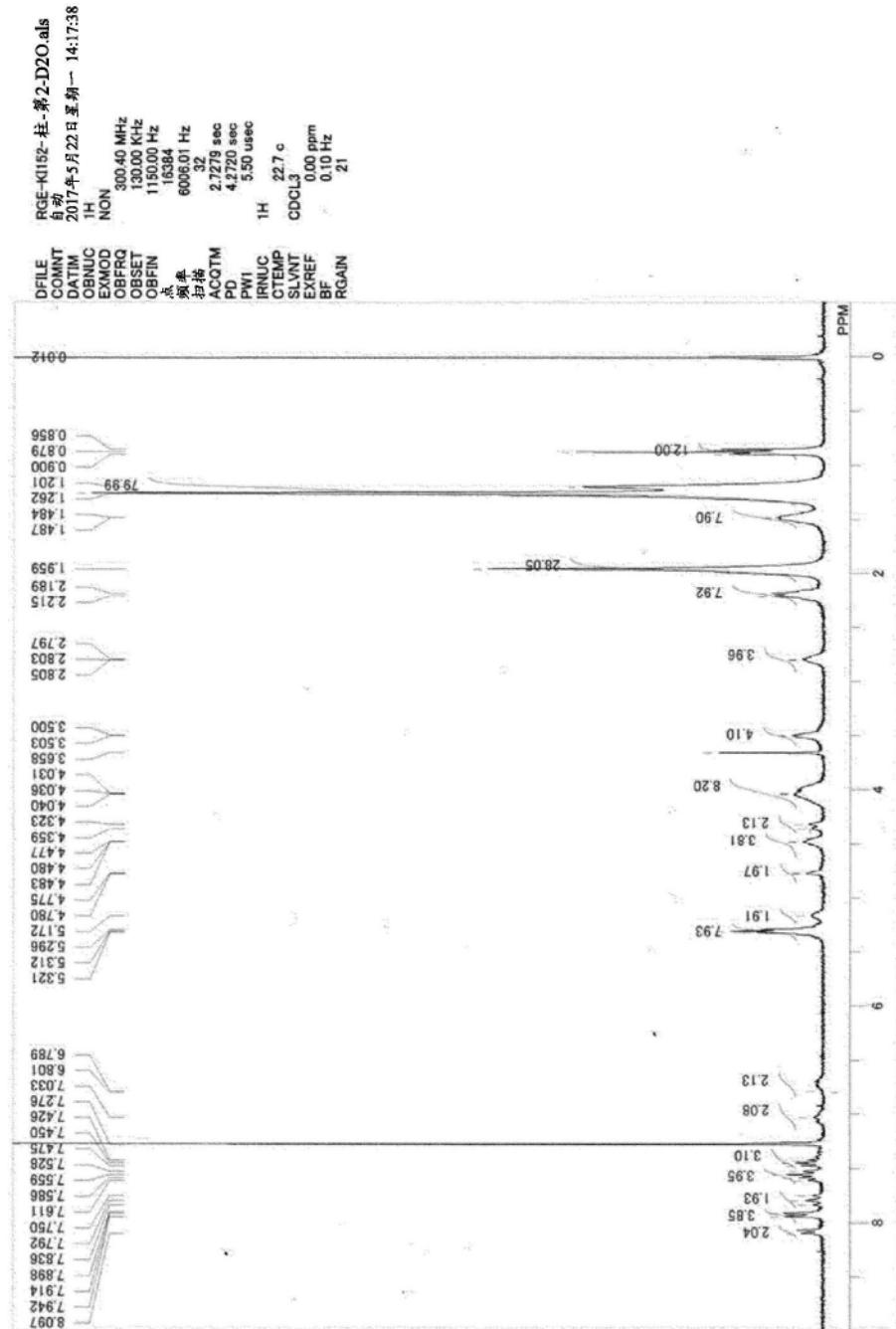
如图13所示,没有观察到由于药物施用或暴露于LED光而对小鼠体重变化产生影响。

[工业实用性]

[0153] 根据本发明的ICG脂质衍生物可以有利地应用于荧光成像、光动力学超高温疗法和/或光动力学疗法、或DDS的领域。



冬1



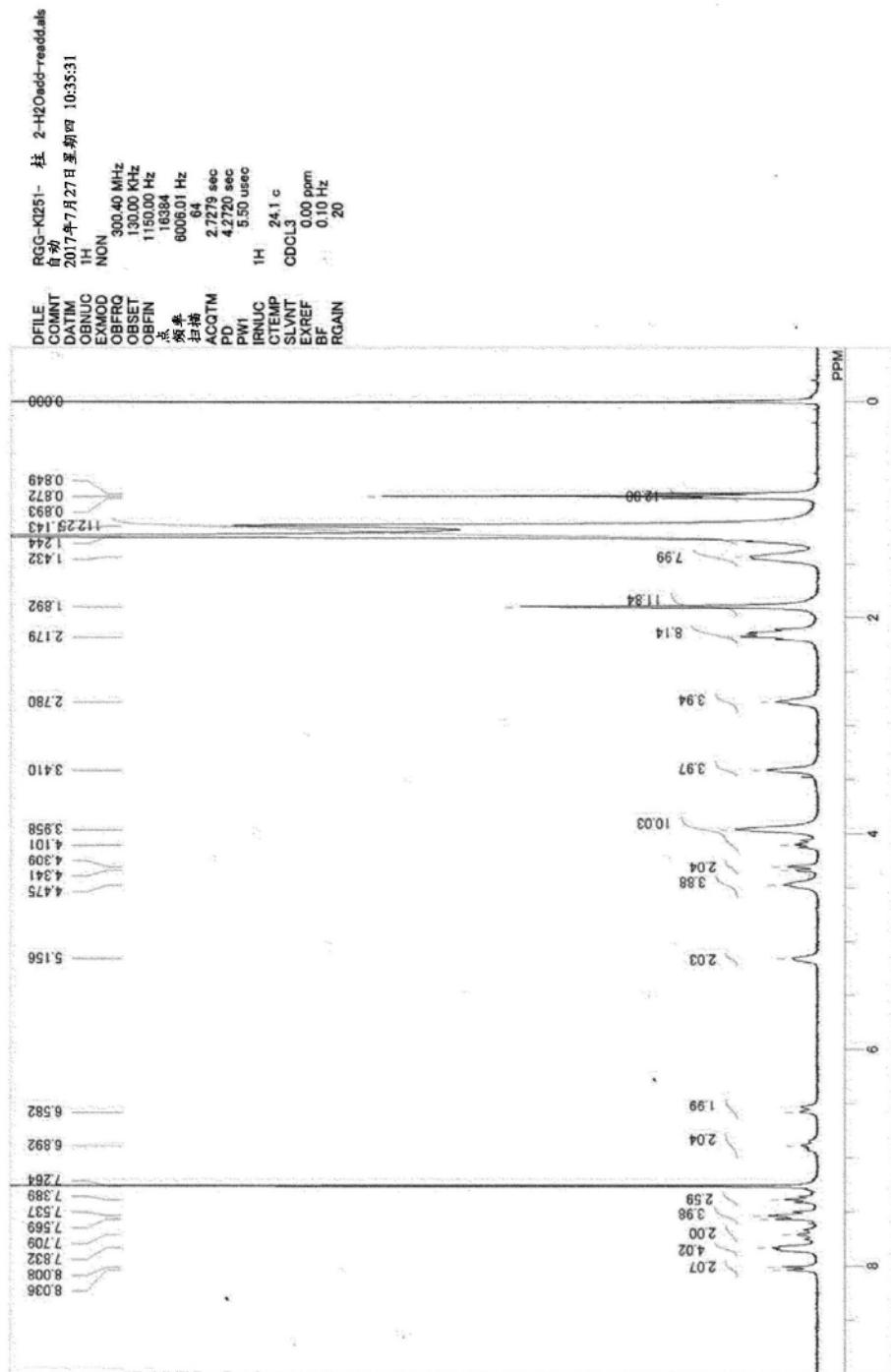


图3

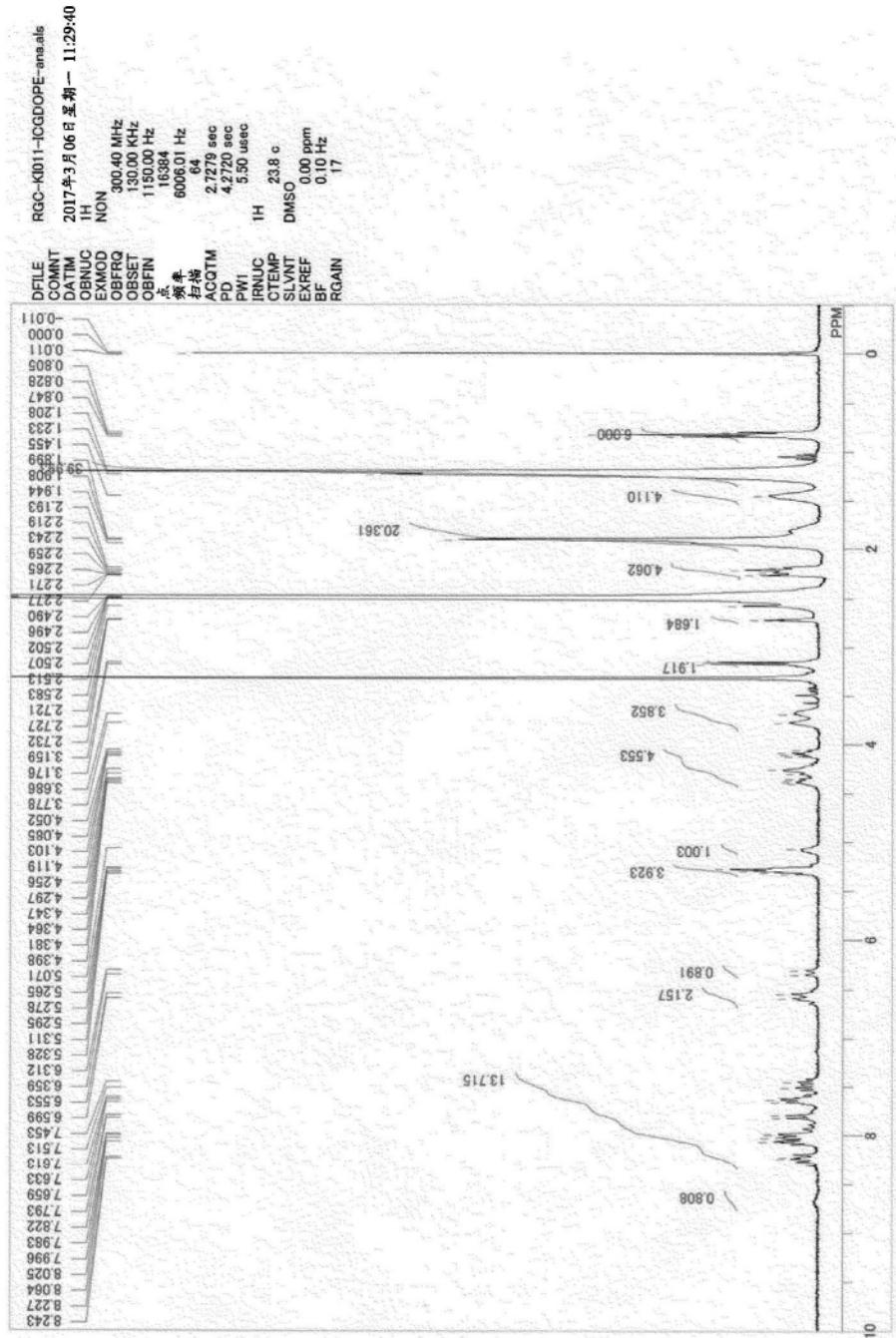


图4

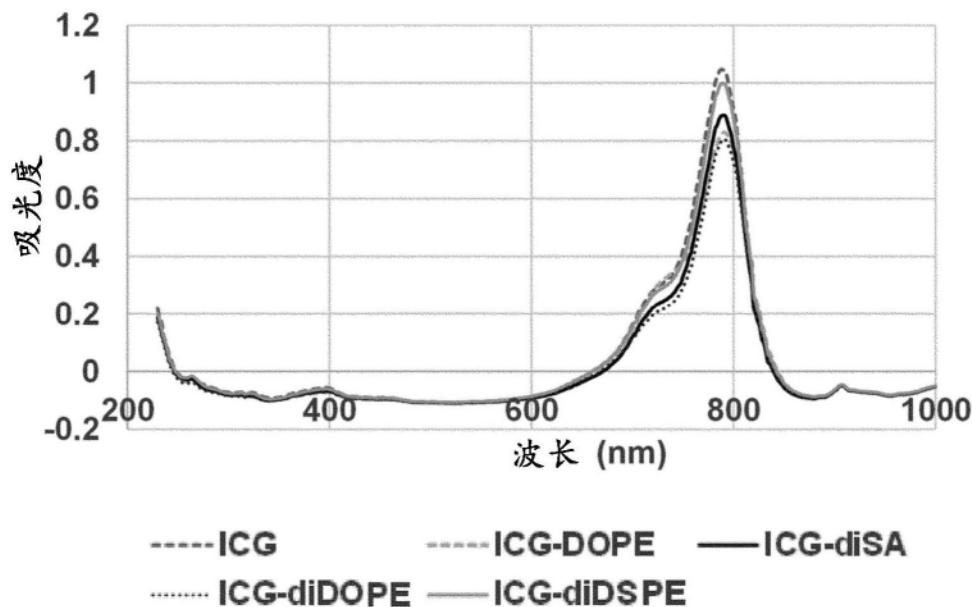


图5

由于暴露于LED光而导致的阿霉素 从脂质体中的释放

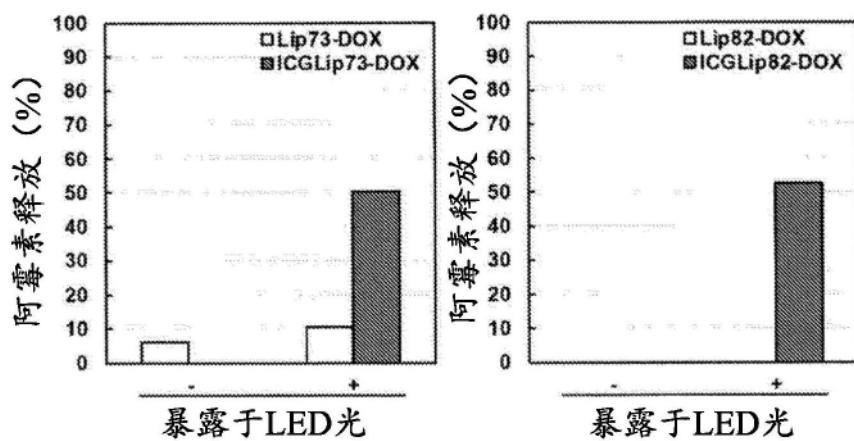


图6

由于暴露于LED光而导致的顺铂从
脂质体中的释放

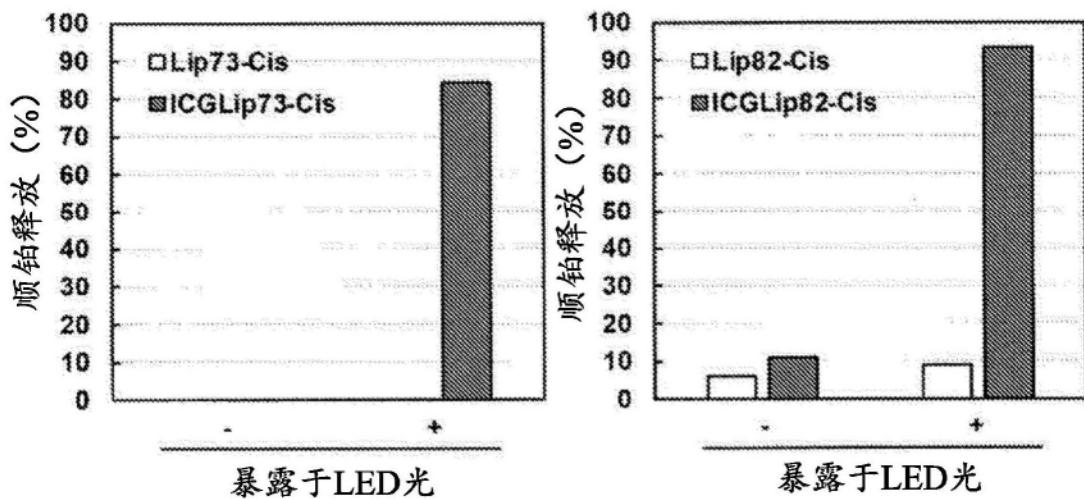


图7A

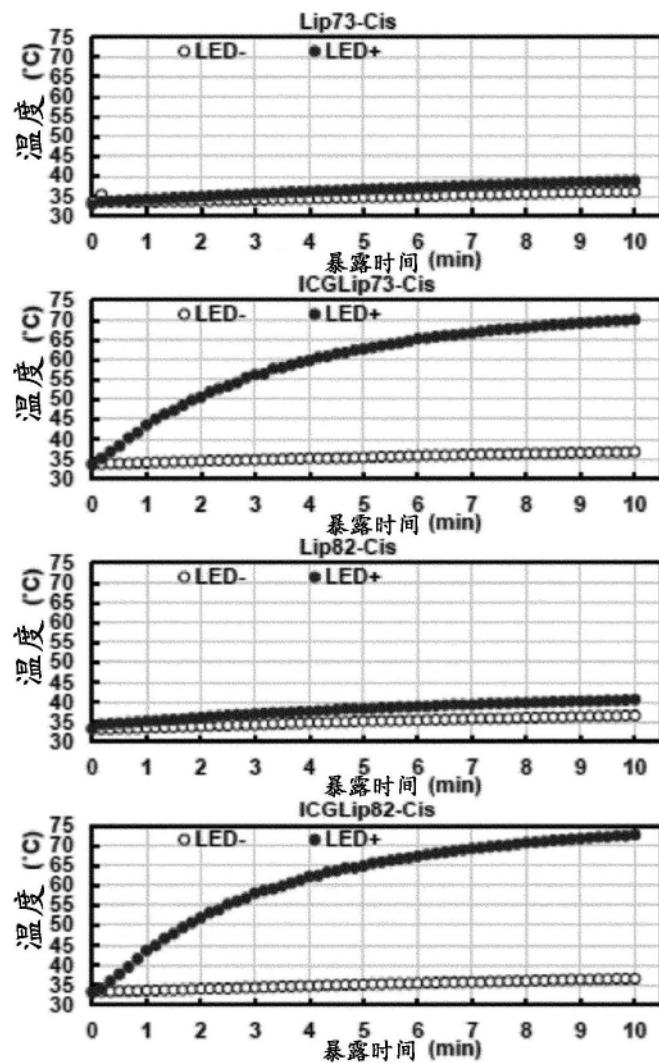


图7B

实体瘤温度在暴露于LED光之前
相对于之后的变化

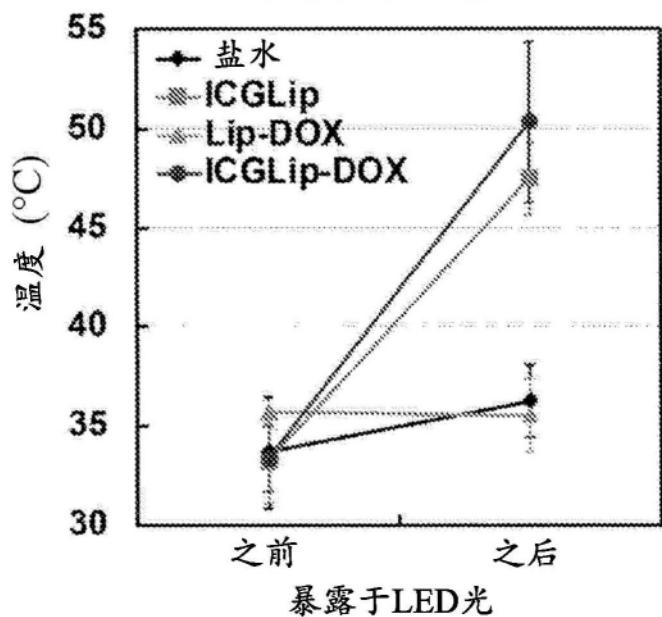


图8

由于药物施用和暴露于LED光而产生的
癌症治疗作用

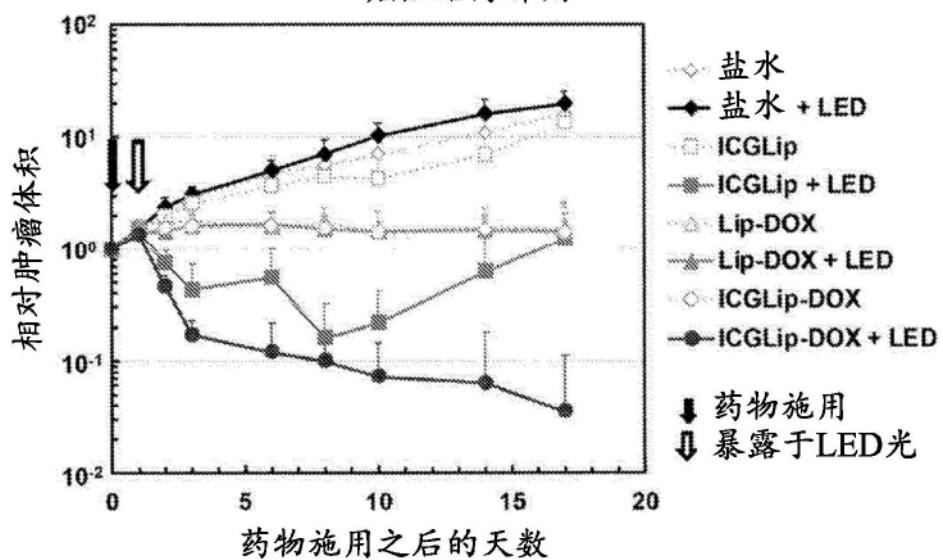


图9

小鼠在治疗之前相对于之后的体重变化

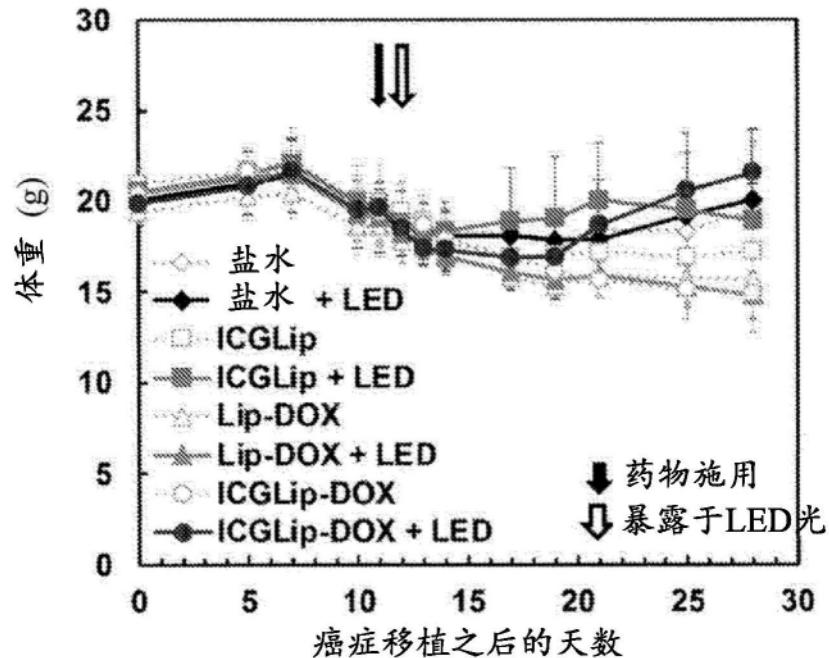


图10

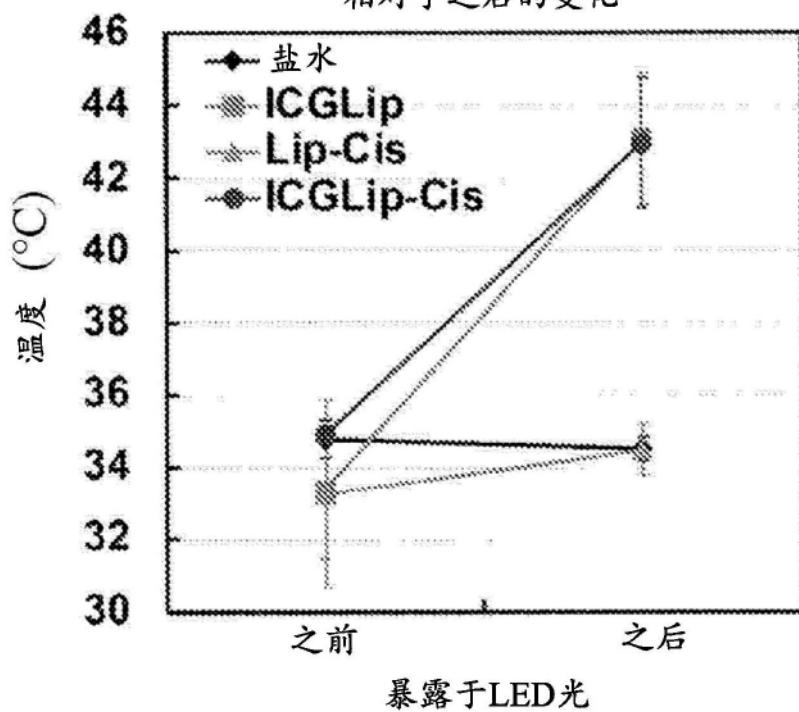
实体瘤温度在暴露于LED光之前
相对于之后的变化

图11

由于药物施用和暴露于LED光而产生的
癌症治疗作用

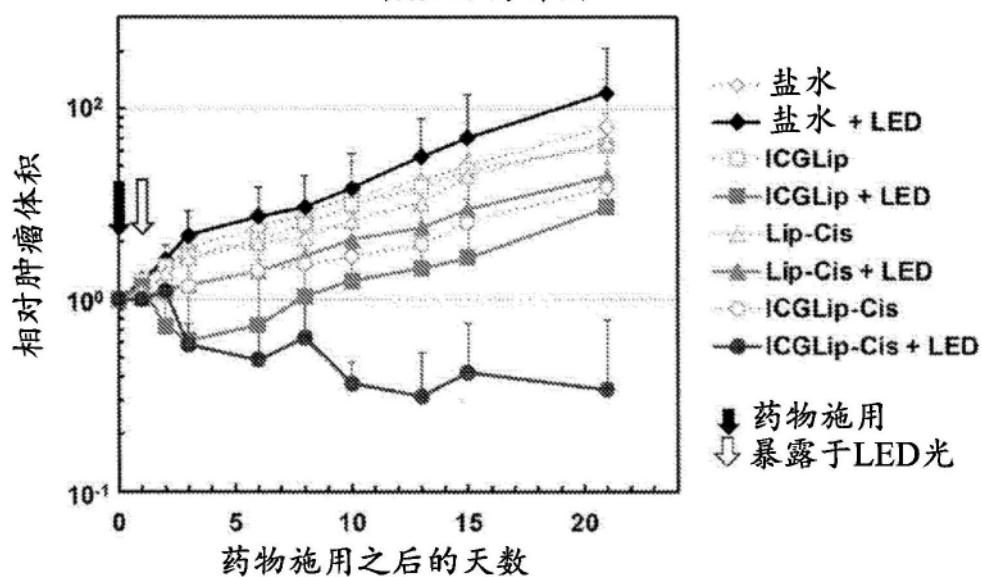


图12

小鼠在治疗之前相对于之后的体重变化

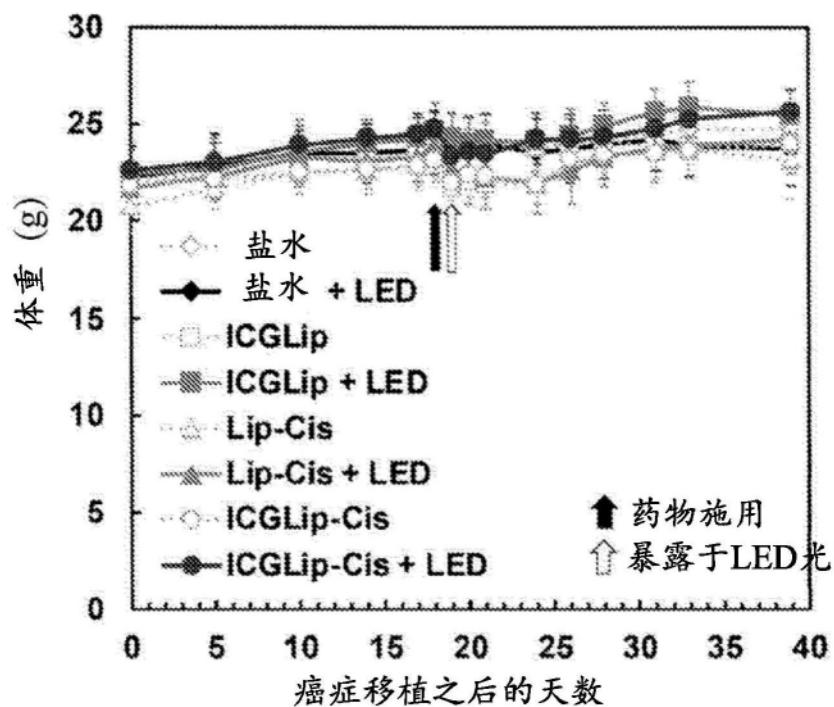


图13