

公告本

A4  
C4

483759

申請日期	86.8.23
案 號	86112141
類 別	A 61k $\frac{33}{26}$

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

一、發明 名稱	中 文	含順氯氮鉑化合物之脂質體
	英 文	LIPOSOMES CONTAINING A CISPLATIN COMPOUND
二、發明 人	姓 名	1. 羅伯特 M. 艾伯拉 2. 凱倫 瑞斯
	國 籍	均美國
	住、居所	1. 美國加州舊金山萊迪森道143號 2. 美國加州聖喬斯市拉夫敦路5095號
三、申請人	姓 名 (名稱)	美商希昆斯製藥有限公司
	國 籍	美國
	住、居所 (事務所)	美國加州門羅公園市哈密爾敦街960號
	代 表 人 姓 名	莎莉 A. 達文波特

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

裝

訂

線

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
I P C 分類：

A6  
B6

本案已向：

美 國(地區) 申請專利，申請日期：1996.8.23 案號：60/024,350 ， 有 無主張優先權

有關微生物已寄存於： ， 寄存日期： ， 寄存號碼：

(請先閱讀封面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

## 五、發明說明(1)

發明領域

本發明係關於含經包藏之順氣氬鉑化合物之脂質體組合物。

參考

- Freise, J., *et al.*, *Arch. Int. Pharmacodyn.* 258:180-192 (1982).
- Gondal, J.A., *et al.*, *Eur. J. Cancer* 29A(11):1536-1542 (1993).
- Mabrey, S., *et al.*, *Biochem.* 17:2464-2468 (1978).
- Martin, F.J., SPECIALIZED DRUG DELIVERY SYSTEMS-MANUFACTURING AND PRODUCTION TECHNOLOGY, (P. Tyle, Ed.) Marcel Dekker, New York, pp. 267-316 (1990).
- PHYSICIAN'S DESK REFERENCE, 48TH EDITION, Medical Economics Data Production Co., Montvale, NJ (1994).
- Potkul, R.K., *et al.*, *Am. J. Obstet Gynecol.* 164(2):652-658 (1991).
- Prestayko, A.W., CANCER AND CHEMO. VOL III (Crooke, *et al.*, Eds.) Academic Press, NY, 133-154 (1981).
- Steenberg, P.A., *et al.*, *International Journal of Pharmaceutics* 40:51-62 (1987).
- Sur, B., *et al.*, *Oncology* 40:372-376 (1983).
- Szoka, F., Jr., *et al.*, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9:467 (1980).
- Tsong, T.Y., *Biochem.* 14:5409-5414, 5415-5417 (1975).
- Weiss, R.B., *et al.*, *Drugs* 46(3):360-377 (1993).

發明背景

順氣氬鉑--順式-二胺-二氬鉑(II)--為生殖細胞癌症之全身治療中所用較有效之抗腫瘤劑之一。此化學治療藥物對實驗用動物及人類腫瘤中之腫瘤模型之治療相當有效，如子宮內膜，膀胱，卵巢及睪丸贅瘤，以及頭及頸部之鱗狀細胞癌(Sur, 等人, 1983; Steerenberg, 等人, 1987)。

如同其他之化學治療劑，順氣氬鉑為高毒性之藥物。順

## 五、發明說明(2)

順氣鉑之主要缺點為極度之毒腎性(其為主要之劑量限制因子)，經由囊腎快速地排泄(只數分鐘即循環半身)，及對血漿蛋白之強的親和力(Freise, 等人, 1982)。

為了使藥物之毒性為最小，已包含結合化學治療，順氣鉑類似物之合成(Prestayko, 1991; Weiss等人, 1993)，脂質體中之免疫療法及包藏(Sur, 等人, 1983; Weiss等人, 1993)。包藏在脂質體中之包含順氣鉑之防止新生物劑相對於自由形式之劑類，具有減低之毒性，同時維持抗腫瘤之活性(Steerenberg, 等人, 1987; Weiss, 等人, 1993)。

然而，順氣鉑不易有效地包藏在脂質體中，因為藥物之低水溶性(室溫下約1.0毫克/毫升)，及低的親脂性，二者構成低的藥物/脂質比。

含順氣鉑之脂質體遭遇另一問題--組成物之安定性。特別是，儲存過程中脂質體中藥物之維持為已知之問題(Freise, 等人, 1982; Gondal, 等人, 1993; Potkul, 等人, 1991; Steerenberg, 等人, 1987; Weiss, 等人, 1993)，且曾提出在4°C下數週之含順氣鉑之脂質體之有限架上壽命(Gondal, 等人, 1993; Potkul, 等人, 1991)。

### 發明概要

其一目標中，本發明包含含包藏之順氣鉑化合物之脂質體組合物。此組合物包含具有界定外表面與內表面之水性脂質體間隔之脂質體。此脂質體係由成胞之脂質及約1-20莫耳百分比間之由親水性聚合物衍生成之成胞脂質組

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

### 五、發明說明(3)

成。此脂質體經形成，使得親水性聚合物在內及外表面上形成親水性聚合物鏈之塗層。順氣氬鉑化合物係以實質上比沒有內及外聚合物表面塗層之脂質體較大之滯留包藏在脂質體中。

其一具體例中，脂質體化合物為天然之順氣氬鉑，且依藥物對脂質比為約10至20微克／毫克總脂質，包藏於脂質體中。另一具體例中，順氣氬鉑化合物為順氣氬鉑類似物。

另一具體例中，親水性聚合物鏈係由選自包含聚乙烯吡咯烷酮，聚乙烯甲基醚，聚甲基哌啶，聚乙基哌啶，聚羥丙基哌啶，聚羥丙基甲基丙烯醯胺，聚甲基丙烯醯胺，聚二甲基丙烯醯胺，聚羥丙基甲基丙烯酸酯，聚羥乙基丙烯酸酯，羥甲基纖維素，羥乙基纖維素，聚乙二醇，及聚天門冬醯胺之親水性聚合物組成。較佳具體例中，親水性聚合物及聚乙二醇。

其一具體例中之脂質體之大小約80-160毫微米，較好為100 - 140毫微米，最好為100 - 120毫微米。

較佳具體例中，成胞脂質為經氬化之大豆磷脂膽素，且衍生之成胞脂質為聚乙二醇衍生之二硬脂醯磷脂乙醇胺。

另一目標中，本發明包含藉由將順氣氬鉑化合物之水溶液加熱至足以使其溶解度增至超過室溫下化合物之溶解度之溫度，使順氣氬鉑化合物包藏在脂質體中之方法。添加成胞脂質及約1-20莫耳百分比之由親水性聚合物衍生之成胞脂質於加熱之順氣氬鉑化合物溶液中。藉該添加，形成

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(4)

具有親水性聚合物鏈內表面塗層及外表面塗層之脂質體，且順氣氬鉑化合物係以實質上比沒有聚合物塗層之脂質體大之滯留包藏在脂質體中。

此方法之一具體例中，順氣氬鉑化合物為天然之順氣氬鉑，且水性順氣氬鉑溶液經加熱至足以使順氣氬鉑溶解度超過其室溫溶解度二倍之溫度。

另一具體例中，加熱至順氣氬鉑溶液之溫度約 $10^{\circ}\text{C}$ 中之成胞脂質溶液添加於順氣氬鉑化合物溶液中。

另一具體例中，添加於順氣氬鉑溶液中者為含有具相轉移溫度在順氣氬鉑溶液經加熱約 $10^{\circ}\text{C}$ 溫度中之成胞脂質之溶液。

另一具體例中，加於順氣氬鉑溶液之成胞脂質溶液含相轉移溫度為 $40-70^{\circ}\text{C}$ 之成胞脂質。

本發明之此等及其他目的及特點在研讀下列詳細，配合附圖，可更充份的了解。

### 附圖之簡要敘述

圖1為依本發明形成之脂質體之簡要說明；

圖2說明以聚烷醚衍生之成胞脂質之一般反應圖；

圖3為經由氬尿酸氣連結劑，製備以聚乙二醇衍生之磷脂乙醇胺之反應圖；

圖4說明藉二咪唑活化試劑製備以聚乙二醇衍生之磷脂乙醇胺之反應圖；

圖5為以立方毫米計之腫瘤體積圖，為以C26結腸瘤模式接種老鼠之接種後天數，且以鹽水(■)，自由順氣氬鉑

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(5)

(▲)，自由之碳布雷汀(●)或以經脂質體包藏之順氣氬鉑(▼)處理12，19及26天後之函數；

圖6為以立方毫米計之腫瘤體積圖，為以C26結腸瘤模式接種老鼠之接種後天數，且以鹽水(■)，自由順氣氬鉑(▲)，或以依三種計量攝生法之經脂質體包藏之順氣氬鉑(▼，◆，●)處理12，19及26天後之函數；及

圖7為以立方毫米計之腫瘤體積圖，為以C26結腸瘤模式接種老鼠之接種後天數，且以鹽水(■)，自由順氣氬鉑IV(◆)，自由之順氣氬鉑IP(●)或以經脂質體包藏之順氣氬鉑IV(▲)或IP(▼)處理7，14及21天後之函數。

### 發明之詳細敘述

#### I. 脂質體組成物

本發明之脂質體組合物包含具有安定包藏之順氣氬鉑化合物之脂質體。至於此處所用者，"安定經包藏之順氣氬鉑化合物"係指抓取在脂質體中，且主要為抓取在脂質體之水性空間中之天然順氣氬鉑或順氣氬鉑相似物，使得順氣氬鉑化合物在投藥前實質上滯留在脂質體中。

圖1說明依本發明製備之脂質體10，其包含內脂質雙層12及外脂質雙層14。內及外雙層均優先形成成胞脂質，如脂質16，其包含極性頭基16a及疏水性尾基16b。列舉之成胞脂質列於下。

脂質體10亦包含以親水聚合物衍生之成胞脂質，如圖1中之衍生脂質18。衍生之脂質18包含疏水之尾基18a，極性頭基18b，及藉下述附於極性頭基之親水聚合物18c。親

## 五、發明說明(6)

水聚合物在外脂質雙層14之外表面22及內脂質雙層12之內表面24上提供親水聚合物鏈之表面塗層20, 21。親水聚合物鏈之外表塗層對於提供具活體內長血液循環壽命之脂質體有效。至於如下說明者, 內及外表塗層對提供具長架上壽命之順氣氫鉑脂質體組合物, 例如, 順氣氫鉑化合物滯留在脂質體中之安定脂質體組合物更有效。

脂質體10亦包含順氣氫鉑化合物, 例如, 依包藏形式之天然順氣氫鉑或順氣氫鉑類似物。此藥劑係依溶解之形式或依沉澱之形式包藏在內部水性間隔26中。支持本發明所進行之研究中, 天然順氣氫鉑係包藏在具有脂質體之內及外表面上之親水性聚合物鏈之表面塗層製備之脂質體中。當與沒有親水性聚合物塗層之脂質體比較時, 此等脂質體具有改善之安定性, 如以使藥物較長期滯留在脂質體中之能力證明。

### A. 成胞之脂質成份

本發明之脂質體組合物主要係由成胞之脂質組成。此種成胞之脂質為(a)在水中可自動形成雙層胞, 如磷脂質所列舉者, 或(b)加於脂質雙層中係安定地, 疏水部份係與雙層膜之內部, 疏水區接觸, 且其極性頭基部份向膜之外部, 極性表面定向。

此類之成胞脂質較好為具有二烴鏈(一般為醯基鏈)及極性頭基者。有各種合成之成胞脂質及天然發生之成胞脂質, 包含磷脂質, 如磷脂膽素(PC), 磷脂乙醇胺(PE), 磷脂酸(PA), 磷脂肌醇(PI), 及抱合髓磷脂(SM), 其中此

(請先閱讀背面之注意事項再為本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(7)

二烴鏈長度一般約在14-22個碳原子間，且具有各種程度之不飽和。本發明中所用之較佳脂質為氫化之大豆磷脂膽素(HSPC)。

醯基鏈具有不同程度飽和之上述脂質及磷脂質均可商業上或依公開之方法製備得到。

成胞之脂質可經選擇，以達到特定程度之流體性或硬度，以控制血清中脂質體之安定性，且控制脂質體中經包藏藥劑之釋放速率。具有較硬脂質雙層，或液晶雙層之脂質體係藉由添加相對硬之脂質，例如，具有相對高的相轉移溫度，例如達80°C之脂質達成。硬的(即飽和)之脂質提供脂質雙層中較大之薄膜硬度。其他之脂質成份(如膽脂醇)亦已知可提供脂質雙層構造中之薄膜硬度。

脂質之流體性係藉由加入相對流體之脂質，一般為具有相對低之液體至液晶相轉於溫度(例如室溫或以下(20-25°C))之脂質相者。

適用於本發明之順氣氫鉑脂質體組合物之脂質包含相轉移溫度為室溫或以下，及具有高相轉移溫度之成胞脂質。較佳具體例中，係使用相轉移溫度在約40-70°C間之成胞脂質。另一具體例中，形成脂質體中所用之脂質為相轉移溫度在含順氣氫鉑化合物之溶液於脂質體製備之過程中(如下所述)加熱之溫度之約20°C，更好10°C，最好5°C之中者。脂質之相轉移溫度係依各種來源表列，如Avanti Polar Lipids目錄及Lipid Thermotropic Phase Transition Database (LIPIDAT, NIST Standard Reference Database 34)。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(8)

脂質體可包含可使主要由磷脂質組成之胞或脂質體安定之其他脂質。針對此目的常用之脂質為25至40莫耳百分比間之膽脂醇。雙層中0至20莫耳百分比之膽脂醇下，存在之分離範圍含有膽脂醇及磷脂質與純的磷脂質(Mabrey, 等人, 1978)。此等雙層顯示對水增加之浸透性(Tsong, 1975)。本發明之一具體例中，膽脂醇係包含於脂質體組合物之中，如下所述。

本發明之方法中，含順氣氬鉑化合物之脂質體係藉由添加含1-20莫耳百分比之由親水性聚合物衍生之成胞脂質之成胞脂質之混合物於順氣氬鉑化合物之加熱水溶液中製備。脂質係溶於適當之脂質溶劑中，如乙醇，甲醇，氯仿或其混合物。

添加脂質前，順氣氬鉑化合物之水溶液加熱至足以使其溶解度增至超過順氣氬鉑化合物之室溫溶解度之溫度。即，溶液經加熱至使溶解度增加超過順氣氬鉑化合物之水性室溫溶解度之至少約二倍，較好三倍，最好四倍之溫度。例如，在20-25°C下之水性溶解度為1毫克/毫升之順氣氬鉑可加熱至約63°C，使水性溶解度增加至約8.5毫克/毫升。順氣氬鉑及順氣氬鉑相似物之溶解性可依標準步驟，由熟習本技藝者輕易地測定。

本發明之一具體例中，含成胞脂質之溶液經加熱至順氣氬鉑溶液之溫度之約20°C，更好10°C，最好5°C之中。

下列詳述之實例中，成胞脂質HSPC，衍生之成胞脂質PEG-DSPE及膽脂醇均溶於加熱至約65°C(正好超過約52-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(9)

60°C間之HSPC之相轉移溫度)。天然順氣氬鉑之水溶液加熱至63-67°C間。溶液混合在一起，形成含依包藏形式之順氣氬鉑化合物之脂質體。

本發明之方法達成順氣氬鉑之高的包封，一般之包封在10-20微克藥物/毫克脂質間，且提供具有除外表塗層外之親水性聚合物鏈之內表面塗層，且順氣氬鉑化合物安定地包藏在脂質體中。

### B. 衍生之成胞脂質成份

如上述，本發明之脂質體在內及外脂質雙層表面上具有親水聚合物鏈之表面塗層。表面塗層係由包含於脂質體組合物中之約1-20莫耳百分比之由親水聚合物衍生之脂質提供。

適於由成胞脂質衍生之親水聚合物包含聚乙烯吡咯烷酮，聚乙烯甲基醚，聚甲基哌啶啉，聚乙基哌啶啉，聚羥丙基哌啶啉，聚羥丙基甲基丙烯醯胺，聚甲基丙烯醯胺，聚二甲基丙烯醯胺，聚羥丙基甲基丙烯酸酯，聚羥乙基丙烯酸酯，羥甲基纖維素，羥乙基纖維素，聚乙二醇及聚天門冬醯胺。聚合物可以以均聚物或嵌段或無規共聚物使用。

較佳之親水性聚合物鏈為聚乙二醇(PEG)，較好如分子量在500 - 10,000道爾吞間，更好在1,000 - 5,000道爾吞間之PEG鏈。PEG之甲氧基或乙氧基封端之相似物亦為較佳之親水性聚合物，且依各種聚合物尺寸銷售，例如120 - 20,000道爾吞。

## 五、發明說明(10)

適於以親水性聚合物衍生之成胞脂質包含上面所列脂質之任一種，且特別是磷脂質，如二硬脂醯磷脂乙醇胺(DSPE)。以PEG衍生之DSPE之製備敘述於下(實例1)。

衍生之脂質係在脂質胞形成過程中，藉由包含具有成胞脂質之以親水性聚合物衍生之兩親脂質。

一旦脂質體形成，親水性聚合物鏈在脂質雙層之內及外表面之上提供鏈之表面塗層，如圖1中所述。重要地是表面塗層對改善脂質體之安定性有效，如下所討論。表面塗層對延伸沒有此塗層之脂質體之血液循環時間亦有效。血液循環時間之提升較好超過沒有聚合物塗層所達成者數倍，如共擁有之美國專利第5,013,556號中所述。

### C. 其他之脂質體成份

本發明組合物中之脂質體可包含其他之成份，如鵲狀分子，包含抗體，抗體片，或細胞表面確認分子，其係藉由親水性聚合物鏈附於脂質體上。例如，成胞脂質係以親水性聚合物鏈衍生成，如上述般，親水性聚合物為使抗體偶合至官能基化端之經端部官能化者。經官能化之端基可為向醛基反應之醯肼或肼基，雖然可使用偶合於抗體用之許多PEG-封端反應基之任一種。醯肼亦可藉由活性酯或經碳化二亞胺活化之羧基醯基化。如醯基化類般之醯基疊氮化物基可由醯肼輕易製得，且使含胺基之分子附著。官能基化端基亦可為2-吡啶基二硫-丙醯胺，使其他分子之抗體經二硫化物連結偶合於脂質體中。

### D. 順氣氬鉑化合物

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 11 )

本發明之脂質體組合物將用於癌症之治療，更特別地是腫瘤之治療。順氣氬鉑化合物係包藏在脂質體之中，且脂質體組合物投藥於支配物中。至於此處所指，順氣氬鉑化合物係指天然之順氣氬鉑及其相似物。較佳之具體例中，順氣氬鉑化合物為天然之順氣氬鉑，且另一具體例中，順氣氬鉑化合物為順氣氬鉑類似物，且較好為親水性順氣氬鉑類似物。

天然之順氣氬鉑(此處亦稱為順氣氬鉑)為含有在順式位置上由二個氯原子及二個氬分子圍繞之鉑中心原子之重金屬錯合物。其係分子式為 $\text{PtCl}_2\text{H}_6\text{N}_2$ 之黃色粉末，且分子量為300.1。其於室溫下依1毫克/毫升溶於水中或鹽水中，熔點為 $207^\circ\text{C}$  (PHYSICIAN'S DESK REFERENCE, 1994)，且在 $270^\circ\text{C}$ 下分解。

順氣氬鉑分子中之氯原子係藉由親核試劑(如水或氬硫基)進行化學置換反應。0.1M NaCl存在中之生理pH下，主要分子類為近等濃度之順氣氬鉑及單氬單氯順式二胺鉑(II)。

藥劑係以每毫升水中含1毫克順氣氬鉑及9毫克NaCl之殺菌水溶液使用，且此形式一般係在約20-120毫克/平方米之劑量下，針對腫瘤治療靜脈投藥 (PHYSICIAN'S DESK REFERENCE, 1994)。此藥劑可單獨或與其他化學治療劑結合投藥，如丸劑注入或在數小時內緩慢注入。

至於單一劑類，順氣氬鉑可在例如100毫克/平方米之劑量下，每4週一次靜脈投藥 (PHYSICIAN'S DESK

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(12)

REFERENCE, 1994), 或在20毫克/平方米之劑量下, 順氣氬鉑每日快速靜脈注入, 且以4週之間隔重複注入5天 (Prestayko, 1991)。頭及頸部鱗片狀細胞癌之治療中, 順氣氬鉑在80毫克/平方米之劑量下, 24小時注入靜脈投藥, 可達到有利之反應(Prestayko, 1991)。

雖以單一劑活化, 但順氣氬鉑經常與其他劑類結合投藥, 包含長春花鹼, 博萊霉素, 放線菌素, 阿霉素, 發尼松, 長春新鹼, 及其他(Prestayko, 1991)。例如, 卵巢癌之治療包含24小時注射投藥之60毫克/平方米順氣氬鉑及60毫克/平方米之阿霉素。本發明中, 結合之治療可包含脂質體包藏之順氣氬鉑與另一自由形式或脂質體包藏之形式之化學治療劑投藥, 如美國專利第5,527,528號中敘述之脂質體包藏之阿霉素。

本發明中, 順氣氬鉑係包藏在脂質體中, 其大小約80-160毫微米, 更好約100-140毫微米, 最好約100-120毫微米, 以適於靜脈投藥。含順氣氬鉑之脂質體係在上面所定針對自由藥劑之劑量下投藥, 然而, 此種計量可依降低由脂質體之包藏所提供藥物之毒性調整。此經調整之劑量可由熟習本技藝者在實驗上輕易地測定。

順氣氬鉑之內脂質濃度係1-9毫克順氣氬鉑/毫升, 更好為4-9毫克/毫升, 最好為6-8.5毫克/毫升。含順氣氬鉑之脂質體懸浮液對於靜脈投藥之濃度為約1-2毫克順氣氬鉑/毫升之總懸浮液體積。

本發明之另一具體例中, 包藏在脂質體中之順氣氬鉑化

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(13)

合物為順氯氮鉑相似物。順氯氮鉑相似物之廣泛之譜已合成，且提供不同之抗腫瘤譜，較佳之治療指數及比天然順氯氮鉑提供者較低之毒性。此相似物包含碳布雷汀(carboplatin)，歐嗎布雷汀(ormaplatin)，歐沙利布雷汀(oxaliplatin)，DWA2114R((-)-(R)-2-胺甲基吡咯啉(1,1-環丁烷二羧酸)鉑)，傑里布雷汀(zeniplatin)，恩農布雷汀(enloplatin)，洛貝布雷汀(lobaplatin)，CI-973((SP-4-3(R)-1,1-環丁基-二羧酸(2-)-(2-甲基-1,4-丁二胺-N,N'))鉑)，254-S(納達布雷汀(nedaplatin))及JM-216(雙-乙酸-胺-二氯-環己胺-鉑(IV))(Weiss, 等人, 1993)。經發現某些順氯氮鉑相似物(如斯帕羅布雷汀(spiroplatin)之毒性比天然順氯氮鉑強。雖然更毒之相似物對於依自由形式之靜脈投藥為不期望，但此相似物可依脂質體包藏之形式使用，其可降低藥物之毒性。

針對本發明之目的，具有某種程度水溶性之相似物(如碳布雷汀，依伯布雷汀及其他者)較佳，因此藥物主要係包藏在脂質體之內水性間隔中。

較佳具體例中，順氯氮鉑相似物為碳布雷汀，(1,1-環丁烷二羧酸酯-二胺鉑)，其在鉑之4-配位平面錯合物中含有有機配位基。此順氯氮鉑相似物證明具有相等或大於順氯氮鉑之抗腫瘤活性，及在預臨床研究中較少之毒腎性(Weiss, 等人, 1993)。

含順氯氮鉑相似物之脂質體可以單獨與其他化學治療劑(自由形式或脂質體包藏之形式)結合投藥，如上面針對天然順氯氮鉑所討論者。

II. 脂質體組合物之製備

下列A段敘述由親水性聚合物衍生之成胞脂質之合成，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 14 )

以形成本發明之脂質體。B段敘述製備包含衍生之脂質及順氯氫鉑化合物之脂質體之方法。

### A. 衍生之成胞脂質之製備

圖2顯示製備由生物可相容，親水性聚合物(如聚乙二醇(PEG)，其可輕易溶於水中，可與成胞脂質偶合，且可為活體接受而沒有毒性)衍生之成胞脂質之反應圖。聚合物之一端較好以甲氧基，乙氧基或其他不反應基封端，或為一端比其他端更具反應性者。

聚合物係藉由與適當之活化劑，如氰尿酸，二咪唑，酸酐試劑，等等反應，於一端活化，如下述。活化之化合物再與成胞脂質(如磷脂乙醇(PE))反應，產生衍生之脂質。

相對地，成胞脂質中之極性基可對與聚合物之反應活化，或此二基可依已知之偶合方法，依相關之偶合反應結合。一端以甲氧基或乙氧基封端之PEG可依各種聚合物尺寸，例如500 - 20,000道爾吞分子量商業上購得。

成胞脂質較好為具有二個煙鏈(一般為醯基鏈)及極性頭基(如上面所列者)者。

圖3顯示PEG經由氰尿酸醯基衍生成PE之PE-PEG脂質之反應圖。反應之詳細於實例1中提供。簡言之，甲氧基封端之PEG係在製造圖中之活化PEG化合物之條件下，碳酸鈉之存在下以氰尿酸醯基活化。此物質經純化以移除未反應之氰尿酸。經活化之PEG係在三乙胺之存在下與PE反應，製成所需之PE-PEG化合物，亦示於圖中。相對於PEG之起初量，產率為8-10%。

## 五、發明說明 ( 15 )

上述之方法可用於各種脂質胺中，包含PE，膽甾醇胺及具有糖-胺基之二醇脂質。

使聚烷醚(如封端之PEG)偶合於脂質胺之第二種方法說明於圖4中。此處之封端PEG係以羧基二咪唑偶合劑活化，以形成圖4中所示之活化咪唑化合物。與脂質胺(如PE)反應導致PEG經由醯胺連結偶合於脂質上，如圖中所示之PEG-PE中說明。反應之詳細說明於實例2中。

### B. 脂質體之製備

脂質體可藉各種方法製備，如Szoka等人，1980中詳述者。製備含藥物之脂質體之一方法為逆相蒸發法，由Szoka及美國專利第4,235,871號中敘述。逆相蒸發胞(REVs)一般之平均大小為2-4微米，且主要為寡層狀，即含一或數個脂質雙層殼。

另一方法中，包層胞(MLVs)可藉由簡單之脂質-膜水合技術形成。此步驟中，溶於適當有機溶劑中之上述類型之成胞脂質之混合物係在槽中蒸發，形成薄膜，再以水性介質覆蓋。脂質膜水合形成一般大小約0.1至10微米之MLVs。

脂質體再分大小，且對於REVs及MLVs之有效分大小之方法包含使脂質體之水性懸浮液經過一系列0.03至0.2微米，一般為0.05，0.08或1.2微米之經選擇過之孔隙大小之聚碳酸酯薄膜擠出。薄膜之孔隙尺寸略相當於經薄膜擠出製成之脂質體之最大尺寸。特別是當此製備係經相同之薄膜擠出二或多次時。均質化法亦用於使脂質體降低大小至

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 16 )

100 毫微米或更小之尺寸 (Martin, 1990)。

本發明中，脂質體組合物一般係以 25-80 莫耳百分比之成脂質，10-40 莫耳百分比之膽脂醇，及 1-20 莫耳百分比之聚合物衍生之脂質製備。其一系列之脂質體配方包含添加氫化之大豆磷脂膽素 (HSPC) 及膽脂醇 (Chol)，(約為 1:1 莫耳比)，及約 1-5 莫耳 % 之 DSPE-PEG，以形成具有 PEG 之內及外雙層塗層之脂質體。

通常，順氣氫鉑化合物係藉由添加脂質之溶於於含藥物之溶液中，於脂質體形成過程中加於脂質體中，如下述。

依本發明之方法，及如實例 3 中所述，含 50-200 毫克 / 毫升由 mPEG - DSPE，HSPC 及膽脂醇 (莫耳比為 50.6 / 44.3 / 5.1) 組成之總脂質之脂質溶液係藉由將脂質溶於溫熱 (60-65°C) 乙醇中製備。順氣氫鉑之水溶液 (含 8.5 毫克 / 毫升之順氣氫鉑之 0.9% 氯化鈉) 係加溫至溫度足以使其溶解度明顯增加至超過室溫下之化合物溶解度，尤其是，順氣氫鉑溶液加熱至約 65°C，使順氣氫鉑之溶解度增加約 8 倍，由 1 毫克 / 毫升至 8.5 毫克 / 毫升。

順氣氫鉑溶液及脂質溶液係一起添加，形成脂質體，且混合物之溫度維持在 60-65°C。

脂質體 (過濾與分析後) 經 0.2 微米及 0.1 微米之聚碳酸酯過濾物擠出，使脂質體之大小約為 100 - 120 毫微米。脂質體懸浮液冷卻至室溫，且未包藏，沉澱之順氣氫鉑以過濾移除。

最終之脂質體含在濃度為 8.5 毫克 / 毫升之 0.9% 氯化鈉下

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 17 )

包封之順氣氬鉑之內部相，及蔗糖／氯化鈉溶液之外部相。安定性研究包裝前(如下述)及／或投藥前，脂質體懸浮液以蔗糖／氯化鈉／組織氨基酸溶液使順氣氬鉑濃度為1.05毫克／毫升，且pH調整為6.5。

### III. 脂質體組合物之安定性

如上述般製備之脂質體之安定性(實例3)係以(i)針對順氣氬鉑及鉑之濃度分析脂質體懸浮液，(ii)測定包封之鉑之百分比，(iii)，測量脂質體之大小，及(iv)測量脂質體懸浮液之pH，各種均為時間與溫度之函數。

如實例4中所述，順氣氬鉑濃度以高壓液體層析(HPLC)針對順氣氬鉑濃度分析順氣氬鉑懸浮液測量。此方法中，添加有機溶劑於脂質體樣品中，使脂質雙層瓦解，在分析順氣氬鉑濃度之前，釋出包藏之順氣氬鉑。脂質體懸浮液之鉑濃度係以原子吸收測定。包封之鉑之濃度係經由排除尺寸之層析，自未包封藥物分離脂質體，且藉由原子吸收，針對鉑含量分析脂質體及藥物之部份。脂質體大小係以動態光掃描測定。

結果列於表1中。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 18 )

表 1

含順氣氬鉑脂質體之安定性

溫度	時間 (月)	順氣氬鉑濃度 (mg/ml)	Pt濃度 (mg/ml)	包封之鉑 之%	脂質體大小 (nm)	pH
	0	0.92	0.71	100	109	6.50
-40°C	1	0.86	0.71	99	106	6.55
	3	0.86	-	-	114	6.49
-20°C	1	0.85	0.71	100	111	6.56
	3	0.86	-	-	117	6.49
	18	1.00	0.69	-	117	6.29
2-8°C	1	0.85	0.71	100	109	6.61
	3	0.87	0.68	100	109	6.48
	6	0.90	0.73	99	110	6.54
	18	0.86	0.71	99	109	6.30
30°C	1	0.70	0.71	98	107	6.43
	3	0.55	0.68	93	107	6.18
40°C	0.5	0.65	0.71	96	110	6.36
	1	0.53	0.65	91	106	6.25

在 -40°C 及 -20°C 下儲存之脂質體在儲存三個月後，在順氣氬鉑及鉑之濃度上顯示沒有可測量之損失。三個月儲存後，並未發現脂質體大小及懸浮液 pH 明顯地改變。在 -20°C 下儲存 18 個月後，順氣氬鉑仍留在脂質體中，如順氣氬鉑及鉑之濃度並無明顯喪失所證實者。當在 2-8°C 下儲存

## 五、發明說明 ( 19 )

18個月後，脂質體組合物亦安定。如表1中所見，發現順氣氬鉑或鉑之濃度並沒有可測量之損失。在18個月之時，包封之鉑之百分比為99%，顯示除1%外所有之包藏鉑均保留在脂質體中。包藏之鉑為順氣氬鉑之形式係由順氣氬鉑之濃度測量，其經過18個月之儲存後並沒有降低。

在30°C及40°C更不良之儲存條件下，發現順氣氬鉑及鉑之濃度稍降，且在30°C下3個月後之包封鉑之百分比為91%，且40°C下1個月後為91%。且發現脂質體之大小稍改變。

數據顯示本發明之脂質體組合物對於使順氣氬鉑保留在脂質體中有效，因此提供安定之脂質體組合物。此安定性係特別以在2-8°C下6個月時證明，此時順氣氬鉑之濃度維持一定，且99%之鉑包封於脂質體中。

本發明之脂質體(具有親水聚合物鏈之內及外表面塗層)與"一般"之脂質體(即缺乏親水性聚合物鏈之內及外表面塗層者)比較。

如實例5中所述，含順氣氬鉑之脂質體係依本發明，自HSPC/Chol/mPEG-DSPE，依50.6/44.3/5.1之莫耳比製備。製備比較用之脂質體組合物，其係與本發明之脂質體相同，但mPEG-DSPE係以相同莫耳量之二硬脂醯磷脂甘油(DSPG)取代，其具有與mPEG-DSPE相同之煙尾部及相同之極性頭基中之電荷。比較用之脂質體組合物(沒有親水性聚合物)在內或外脂質雙層上並沒有親水聚合物鏈之表面塗層。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(20)

第一個研究(實例5A)中，脂質體組合物係在60°C下培養6小時。培養後，測量脂質體懸浮液之順氯氬鉑濃度，包封之鉑之百分比，脂質體大小及懸浮液之pH(依上述之步驟)。表2中所列之結果顯示培養後，本發明之脂質體組合物之順氯氬鉑濃度降低24%(0.38毫克/毫升至0.29毫克/毫升)，但比較用脂質體懸浮液之順氯氬鉑濃度降低44%(0.25毫克/毫升至0.14毫克/毫升)。培養後，本發明脂質體之包封鉑之百分比為96%。比較用脂質體之鉑包封百分比為81%，顯示19%之含鉑物種自脂質體洩漏。本發明之具體例中，脂質體組合物之特性為包封鉑之百分比超過約85%，更好91%(當儲存在60°C 6小時時)。

表2

## PEG-塗覆之脂質體及比較用脂質體

## 在60°C下6小時後之安定性

配方	培養溫度及時間	順氯氬鉑濃度(mg/ml)	包封之鉑之%	大小(nm)	pH
HSPC/chol/mPEG-DSPE	0	0.38	100	116	-
	60°C ; 6小時	0.29	96	117	-
HSPC/chol/DSPG (比較用組合物)	0	0.25	100	149	6.62
	60°C ; 6小時	0.14	81	148	6.52

第二個研究(實例5B)中，具有表2中所列數據之上述組合物之脂質體係在40°C下培養2週，結果列於表3中。此研

## 五、發明說明(21)

究中，脂質體在實例3G中敘述之組胺酸／蔗糖／氯化鈉稀釋劑中稀釋至順氣氬鉑濃度為1.0毫克／毫升。培養後，發現含具有PEG塗層之脂質體之懸浮液之順氣氬鉑濃度降低29%(自0.75至0.53毫克／毫升)。包封之鉑之百分比為95%。此數據顯示一部份之順氣氬鉑已轉化成另一分子物種，如單氬單氣順-二胺鉑，如上述，且在40°C下培養2週後，僅約5%之含鉑物種自脂質體洩漏。

表3

## PEG-塗覆之脂質體及比較用之脂質體

## 在40°C下2週後之安定性

配方	培養溫度及時間	順氣氬鉑濃度(mg/ml)	包封之鉑之%	大小(nm)	pH
HSPC/chol/mPEG-DSPE	0	0.75	100	108	6.62
	40°C : 2週	0.53	95	114	6.09
HSPC/chol/DSPG (比較用組合物)	0	0.51	100	146	6.53
	40°C : 2週	0	81	137	5.84

比較用之脂質體在40°C下儲存二週後，留在脂質體中之順氣氬鉑無法測得，即幾乎所有之順氣氬鉑已轉化成另一分子物種。換言之，81%之含鉑物種包封於脂質體中，19%之含鉑物種自脂質體洩漏。明顯地，依本發明製備成具有親水性聚合物鏈內及外表面塗層之脂質體實質上比比較用脂質體具有較大之順氣氬鉑。

## 五、發明說明(22)

另一研究中，比較用脂質體如上述般製備，且在2-8°C下儲存兩個月。此研究之安定性數據列於表4中，且依本發明製備之脂質體在相同溫度下係列於表1中以資比較。

表4

## PEG-塗覆之脂質體及比較用脂質體

在2-8°C下兩個月之安定性

配方	2-8°C 下之 時間(月)	順氣氨鉑濃 度(mg/ml)	Pt濃度 (mg/ml)	包封之 鉑之%	大小 (nm)	pH
HSPC/chol/mPEG-DSPE	0	0.92	0.71	100	109	6.5
	1	0.85	0.71	100	109	6.61
	3	0.87	0.68	100	109	6.48
	6	0.90	0.73	99	110	6.54
	18	0.86	0.71	99	109	6.30
HSPC/chol/DSPG (比較用組合物)	0	0.51	0.44	100	146	6.53
	2	0.11	0.42	98	143	6.50

由表4中之數據可明顯看出，比較沒有親水性聚合物之內及外表面塗層之脂質體，具有表面塗層之本發明脂質體組合物對降低由脂質體損耗之順氣氨鉑有效。特別是，如比較二組合物之順氣氨鉑濃度及包封鉑之百分比證明，脂質體組合物對於降低順氣氨鉑轉化成其他分子物種有效。

概括而言，表2、3及4中之所列之安定性數據顯示依本發明製備之脂質體(具有親水性聚合物鏈之內及外表面塗層)

## 五、發明說明 ( 23 )

可藉由(1)使順氣氬鉑轉化成其他分子物種降低，及(2)降低順氣氬鉑(及其他含鉑物種)自脂質體洩漏，提供順氣氬鉑之安定包藏，脂質體組合物。

### IV. 活體投藥

依本發明製備之含順氣氬鉑脂質物係投藥於帶有腫瘤之老鼠中，且針對抗腫瘤效用與自由順氣氬鉑及碳布雷汀比較。如實例6中所述，帶有C26有色腫瘤模式之老鼠係以本發明之脂質體包藏之順氣氬鉑組合物，自由順氣氬鉑或自由碳布雷汀治療。自由順氣氬鉑係依順氣氬鉑之最大之忍受劑量(6毫克/公斤)，每週一次靜脈投藥3週。自由碳布雷汀係以100毫克/公斤之順氣氬鉑臨床相當之劑量投藥，而且，在相同頻次下投藥。脂質體包藏之順氣氬鉑係如自由順氣氬鉑之相同劑量及頻次(每週一次6毫克/公斤3週)靜脈投藥。

結果示於圖5中，其中之腫瘤體積(立方毫米)係以後培養天數之函數顯示。試驗群之治療係在約12天，證實腫瘤塊約為100立方毫米時開始。如沿著x-軸之實心三角形所示，試驗群係在12，19及26天時治療。接收鹽水(■)之動物中之腫瘤繼續成長。以自由順氣氬鉑(▲)或以自由碳布雷汀(●)治療之動物相對於未經處理之動物在腫瘤成長上具相似之減少。以包封於在脂質體之內及外表面上具有聚乙二醇塗層之脂質體(▼)中之順氣氬鉑處理之動物，相對於以自由藥物處理之動物在腫瘤大小上具明顯之減小。

另一研究係依實例6進行，其中脂質體包藏之順氣氬鉑係

## 五、發明說明(24)

依不同之劑量排程投藥。即，脂質體包藏之順氣氬鉑係以較大之負荷劑量投藥，接著在第二及第三週均以較小之劑量投藥。結果示於圖6中，其中接收鹽水(■)及自由順氣氬鉑(▲)(每週一次6毫克/公斤，三週)之試驗動物顯示腫瘤體繼續增加。以經脂質體包藏之順氣氬鉑治療之動物與以鹽水或自由順氣氬鉑治療之動物比較具有明顯減小之腫瘤塊體。以脂質體包藏之順氣氬鉑之抗腫瘤效力對於以一週一次6毫克/公斤連續三週(●)之劑量排程，起始之劑量為12毫克/公斤，接著在第19及26天(◆)之劑量為4毫克/公斤，及起始劑量為14毫克/公斤，接著於19及26天(▼)之劑量為4毫克/公斤均相似。

帶有Lewis肺癌模式之老鼠以順氣氬鉑(靜脈及腹膜內投藥)，或以脂質體包藏之順氣氬鉑(相同投藥)治療。如實例6中所示，當試驗動物中發現腫瘤塊約為100立方毫米時開始治療，且在培養後7，14及21天開始治療。帶腫瘤老鼠之對照群以鹽水治療。

結果示於圖7中，其中之腫瘤體積(立方毫米)係以後培養天數之函數作圖。治療係對7，14及21天，沿著X-軸之實心三角形顯示。以鹽水(■)治療之老鼠中之腫瘤在試驗中持續成長。腫瘤對靜脈(◆)或腹膜內(●)以6毫克/公斤之劑量投藥之自由順氣氬鉑之反應，在顯示之治療天數上均相似。以12毫克/公斤之脂質體包藏之順氣氬鉑靜脈(▲)或腹膜內(▼)投藥治療。在所示之治療天數內，相對於以自由順氣氬鉑治療之動物，具有改善之抗腫瘤效力。

## 五、發明說明 (25 )

由前述可明顯看出如何符合本發明之各種特點及目的。本發明之脂質體組合物包含具有親水性聚合物鏈之內表面及外表面塗層之脂質體，及經包藏之順氣氬鉑化合物。本發明中進行之研究證實順氣氬鉑係安定地包藏在脂質體中，如在許多溫度下培養各種時段後之順氣氬鉑及鉑之留存證明。安定包藏在脂質體中之順氣氬鉑相對於以自由形式投藥之藥物，可提供降低毒性及改善效力之優點，因為投藥後，藥物仍包藏在脂質體中，且只稍洩漏於血液流中。PEG鏈之外表面塗層提供長的血液循環生命期，且使脂質體到達目標位置，如腫瘤。

### V. 實例

下列之實例將說明(但非限制)本發明之範圍。

物質：W.C. Heraeus GmbH (Hanau, 德國)製造之順氣氬鉑。以 Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL) 銷售之 DSPE, 及甲氧基聚乙二醇(mPEG)(MW 2000道爾吞)係由 Fluka Chemie AG (Buchs, Switzerland) 製得。由 Croda, Inc., (NY, NY) 製得之膽脂醇。由 Lipoid K.G. (Ludwigshafen, 德國) 製造之 HSPC, 及由 Sygena, Inc., (Liestal, Switzerland) 製得之 mPEG-DSPE。

#### 實例 1

#### 以氰尿酸氬氣連接之 PEG-衍生之 DSPE 之製備

##### A. 活化 PEG 之製備

如 J. Biol. Chem. 252: 3582 (1977) 中所述，配合下列改良製備先前稱為活化 PEG 之 2-0-甲氧基聚乙二醇 1900-

## 五、發明說明 ( 26 )

4,6-二氯-1,3,5-三嗪。

氰尿酸(5.5克；0.03莫耳)溶於400毫升之含10克無水碳酸鈉之無水苯中，添加PEG-1900(19克；0.01莫耳)，且混合物在室溫下攪拌過夜。溶液經過濾，且攪拌下緩慢加入600毫升之石油醚(沸騰範圍，35-60°)。收集最後分開之沉澱物於過濾器上，且再溶於400毫升苯中。重複沉澱及過濾製程數次，直到以高壓液體層析，於5-m "LiChrosorb" (E. Merck)之管柱(250 x 3.2毫米)上，以己烷顯像，且以紫外線偵測器偵測時，石油醚中沒有殘留之氰尿酸為止。在pH為10.0，室溫下，於水性緩衝液中隔夜水解後，以硝酸銀滴定活化之PEG-1900，得到1.7莫耳之釋出之氯化物／莫耳之PEG。

產物之TLC分析係以Baker製造之TLC逆相板進行，使用甲醇：水為4：1(v/v)當作顯像劑，且曝曬於可見之碘蒸氣中。此等條件下，起始之甲氧基聚二醇1900在 $R_f=0.54$ 至 $0.60$ 處出現。活化之PEG在 $R_f=0.41$ 處出現。未反應之氰尿酸在 $R_f=0.88$ 處出現且移除。

活化之PEG係針對氮分析，且在選擇用於進一步之合成步驟中之反應物量時施與適當之校正。因此，當產物只含20%理論量之氮時，次一合成步驟中使用之物質係以100／20，或5倍增加。當產物含50%之理論量之氮時，只需增加100／50或2倍。

B. 製備N-(4-氯-聚乙二醇1900)-1,3,5-三嗪基蛋磷脂乙醇胺

## 五、發明說明(27)

在螺旋蓋住之試驗管中，0.74毫升之100毫克／毫升(0.100莫耳)含蛋磷脂乙醇胺之氯仿之原料溶液在氮氣流中蒸發至乾，且加於A段中所述活化PEG之殘留物中(依得到205毫克(0.100毫莫耳)之量)。將5毫升無水二甲基甲醯胺加於此混合物中。添加27微升(0.200毫莫耳)之三乙胺於混合物中，且以氮氣取代空氣。混合物在維持於110℃之砂浴中加熱過夜。

混合物於真空下蒸發至乾，得到結晶固體之糊料。此固體溶於5毫升之4體積丙酮與1體積乙酸之混合物中。所得之混合物置於21毫米x 240毫米之充填氧化矽凝膠(Merck Kieselgel 60, 70-230網目)之層析吸收管柱中(其已先以由丙酮乙酸，80／20；v/v組成之溶劑濕潤)。

管柱層析係以相同之溶劑混合物進行，由收集分離20至50毫升整份之溶離物。各部份之溶離物以TLC，在氧化矽凝膠塗覆板上分析，使用2-丁醇／乙酸／水；40／25／5；v/v/v當作顯像劑，且碘蒸氣曝露以便觀察。僅含 $R_f$ 約0.79之物質部份經結合，且在真空下蒸發至乾。在高度真空下乾燥至一定重量，得到86毫克(31.2微莫耳)之含磷近無色固體N-(4-氯-聚乙二醇1900)-1,3,5-三嗪基蛋磷脂乙二醇。

固體化合物溶於24毫升之乙醇／氯仿(50／50)中，且經離心以移除不溶之物質。透明溶液在真空下蒸發至乾，得到21毫克(7.62微莫耳)之無色固體。

## 實例2

## 五、發明說明 ( 28 )

製備以氨基甲酸酯連結之PEG-衍生之DSPEA. 聚乙二醇甲基醚1900之咪唑氨基甲酸酯之製備

9.5克(5毫莫耳)Aldrich化學股份有限公司製造之聚乙二醇甲基醚1900溶於已於分子篩上乾燥之45毫升苯中。添加0.89克(5.5毫莫耳)之純羰基二咪唑。以紅外線光譜檢測純度。反應槽中之空氣以氮氣取代。槽經密封，且在75°C之砂浴中加熱16小時。

反應混合物經冷卻，且在室溫下形成透明溶液。溶液以無水苯稀釋至50.0毫升，且儲存於冷凍櫃中，當作100微莫耳/毫升之PEG醚1900之咪唑氨基甲酸酯之原料溶液。

B. 聚乙二醇甲基醚1900之磷脂乙醇胺氨基甲酸酯之製備

10.0毫升(1毫莫耳)聚乙二醇甲基醚1900之咪唑氨基甲酸酯(化合物X)之100毫莫耳/毫升原料溶液吸量於10毫升梨形瓶中。溶劑於真空中移除。添加3.7毫升含蛋磷脂乙醇胺(V)之氯仿(0.5毫莫耳)之100毫克/毫升溶液。溶劑在真空下蒸發。添加2毫升之1,1,2,2-四氯乙烯及139微升(1.0毫莫耳)之三乙醇胺VI。槽經密封且於95°C之砂浴中加熱6小時。此時，以上述混合物之部份進行薄層層析，以測定SiO<sub>2</sub>塗覆之TLC板上共軛之程度，且使用丁酮/乙酸/水：40/5/5；v/v/v；當作顯像劑。碘蒸氣之呈現證明大部份R<sub>f</sub>=0.68之自由磷脂乙醇胺已反應，且在R<sub>f</sub>=0.78至0.80下以含磷之脂質取代。

殘留反應混合物之溶劑在真空下蒸發。殘留物溶於10毫升二氯甲烷中，且置於充填Merck Kieselgel 60 (70-230網目

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 29 )

之氧化矽凝膠)之21毫米x 270毫米之層析吸收管柱之頂端(其已先以二氯甲烷洗滌過)。混合物使用下列溶劑依序通過管柱。

毫升	二氯甲烷之體積%	具2%乙酸之甲醇之體積%
100	100	0
200	95	5
200	90	10
200	85	15
200	60	40

收集溶離物之50毫升部份，且各部份均以SiO<sub>2</sub>塗覆板上之TLC分析，在以氯仿／甲醇／水／濃氫氧化銨；130／70／8／0.5%；v/v/v/v，顯像後，使用呈現用之碘蒸氣。大部份之磷酸鹽均發現於分餾物11、12、13及14中。

結合此等分餾物，在真空下蒸發至乾，且在高度真空下乾燥至重量不變。產出669毫克聚乙二醇甲基醚之磷脂乙醇胺氨基甲酸酯之無色蠟。此代表263微莫耳，及以磷脂乙醇胺為主之52.6%之產率。

在deutero-氯仿中溶解之產物之NMR光譜顯示相當於蛋PE之光譜之峰值，由於在Delta=3.4 ppm處環氧乙烷鏈之亞甲基而伴隨強的singlet。環氧乙烷之亞甲基質子對PE醯基之封端甲基質子之比率大到足以確定所須產物聚乙二醇共軛之磷脂乙醇胺氨基甲酸酯分子之聚環氧乙烷部份約

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 30 )

2000 之分子量，M.W. 2,654。

### 實例 3

#### 脂質體之製備

##### A. 步驟 1：藥物溶液之製備

消毒水在 TEFLON 襯裡之加壓槽中加熱至 63-67°C，且添加氯化鈉 (0.9%)。順氣氬鉑在 8.5 毫克 / 毫升之濃度下加入，且混合直到溶解，約 15-25 分鐘。

##### B. 步驟 2：脂質之溶解

257.0 克 PEG-DSPE，719.4 克 HSPC 及 308.4 克膽脂醇 (莫耳比為 50.6 / 44.3 / 5.1) 在 60-65°C 下加於 900 毫升之脫水乙醇中，且混合直到溶解，約 2 小時。溶解之脂質加於 7670 克之藥物溶液中，得到之總脂質濃度約為 150 毫克 / 毫升。

##### C. 步驟 3：脂質水合 / 藥物負荷

溫熱之脂質溶液快速加於溫熱 (63-67°C) 藥物溶液中，經混合形成具均勻大小之脂質體懸浮液。懸浮液在 63-67°C 下混合一小時。水合混合物中之順氣氬鉑濃度為 7.2 毫克 / 毫升，且此階段時，約 30% 之藥物包封在脂質體中。10% 之總溶液體積為乙醇，且總脂質濃度為 150 毫克 / 毫升。

##### D. 步驟 4：擠出

脂質體藉由經過封在加鐵氟龍襯裡之不銹鋼槽中之聚碳酸酯過濾器之控制擠出，區分大小至所需之平均粒徑。脂質體懸浮液在全部擠出製程中均維持在 63-65°C 下 6-8 小

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 31 )

時。

### E. 步驟5：低層級之過濾

區分大小後，脂質體懸浮液冷卻至室溫(20-25°C)，且經1.2微米142-毫米Gelman Versapor過濾器(尼龍66支撐物上之丙烯酸系共聚物)過濾，移除沉澱之藥物。在此階段，包封約50%之藥物。

### F. 步驟6：完全過濾

將蔗糖(100毫克/毫升)及氯化鈉(0.058毫克/毫升)溶於消毒水製備蔗糖/氯化鈉溶液。溶液之pH值以2N HCl或NaOH調整至約5.5。溶液經0.22微米Durapore過濾器過濾。

脂質體懸浮液以約1:1(v/v)比率之蔗糖/氯化鈉溶液稀釋，且經聚砜中空纖維超過濾器全過濾。以蔗糖/氯化鈉溶液進行八次體積交換，以移除乙醇與未包封之藥物。製程流體溫度維持在約20-30°C。全部之全過濾時間約4.5小時。

脂質體懸浮液再經超過濾濃縮至約1.2毫克順氣氨鉑/毫升。後全過濾製程流體以HPLC，針對順氣氨鉑分析。脂質體具有含8.5毫克/毫升順氣氨鉑之0.9%氯化鈉之內部相，及蔗糖/氯化鈉溶液之外部相。

### G. 步驟7：稀釋

稀釋劑係藉由使組氨酸(10 mM)溶於蔗糖/氯化鈉(10%蔗糖/1 mM NaCl)溶液中，製備成最後混合物中之目標組氨酸濃度為1.55毫克/毫升。脂質體懸浮液以組氨酸稀釋

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 32 )

劑稀釋成 1.05 毫克 / 毫升之目標順氣氬鉑濃度。

### H. 步驟 8 : 消毒過濾

脂質體懸浮液加熱至 33-38°C，且經 0.2 微米之 Gelman Supor 聚醚砜過濾器過濾。總過濾時間約為 10 分鐘。

### 實例 4

#### 順氣氬鉑脂質體之安定性

含順氣氬鉑脂質體之懸浮液係如實例 3 中所述般製備。5 毫升整份之脂質體懸浮液置於 10 毫升玻璃安瓶中，在無菌條件下密封，且在下列溫度下置於培養器或冷凍器中：

-40°C，-20°C，2-8°C，30°C，40°C。此期間，來自在各溫度下儲存之各安瓶之樣品經取出，且針對下列三重試驗：

1. 順氣氬鉑濃度：順氣氬鉑之濃度係藉由以有機溶劑破壞脂質體雙層，以釋出包藏之順氣氬鉑，接著以高壓液體層析 (HPLC) 測定順氣氬鉑濃度；
2. 鉑濃度，以原子吸附測量；
3. 包封鉑之百分比：包封之鉑之百分比係藉由以尺寸排除層析分離脂質體與未包封之順氣氬鉑，且以原子吸附，針對鉑含量分析脂質體及藥物部份；
4. 脂質體大小，以動態光掃描測定；及
5. 脂質體懸浮液之 pH。

結果列於表 1 中。

### 實例 5

#### 比較安定性研究

## 五、發明說明 ( 33 )

含順氣氬鉑之脂質體經製備成沒有親水聚合物鏈之內及外表面塗層，以與本發明之脂質體比較。比較用之脂質體如實例3般製備，但二硬脂醯磷脂甘油(DSPG)取代PEG-DSPE衍生物，例如，脂質體組合物包含莫耳比為50.6/44.3/5.1之HSPC/Chol/DSPG。

### A. 在60°C下培養6小時

比較用脂質體組合物與本發明之脂質體組合物之安定性係藉由以鹽水稀釋脂質體樣品(1:1 v:v)，且在60°C下培養此懸浮液6小時。培養後，依實例4中所述之步驟，針對順氣氬鉑濃度，鉑包封之百分比，脂質體大小及pH測試樣品。結果列於表2中。

### B. 40°C下培養2週

脂質體組合物以實例3G中所述之組氨酸/蔗糖/氯化鈉稀釋劑稀釋至1毫克/毫升之順氣氬鉑濃度。脂質體懸浮液在40°C下培養2週，隨後測量順氣氬鉑濃度，包封鉑之%，脂質體大小及pH。

## 實例6

### 帶腫瘤老鼠之治療

含脂質體之包藏順氣氬鉑係如實例3中所述製備，且係由HSPC，膽脂醇及mPEG-DSPE依50.6/44.3/5/1之莫耳比組成。總脂質含量約71毫克/毫升，且順氣氬鉑濃度為1毫克/毫升。

### A. C26結腸腫瘤模式

C26結腸腫瘤模式係在Balb/c，雄鼠中成長(Simonson

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 34 )

Laboratories, Inc., Gilroy, CA)。腫瘤自寄生鼠獲得，且在具有10%胎兒腸血清(FCS)之RPMI介質中細分。腫瘤再於37°C下以酶混合物(10毫升之含0.25%蛋白質酵素類IX及0.25%膠原酵素類IV之Hank's均衡之鹽溶液(HBSS)，及0.2毫升之含0.02% DNase之HBSS)消化30-60分鐘。腫瘤細胞之單胞懸浮液在具FCS之RPMI介質中洗滌二次，以離心濃縮，且在具FCS之RPMI介質中再懸浮以利接腫。一百萬腫瘤細胞(0.1毫升)接腫於5-6週老老鼠之左橫腹中。

所有實驗中，動物均維持在12小時光亮：12小時黑暗循環中，且餵食自由啮齒動物之食物及水。

i. 自由藥物與脂質體包藏藥物之比較

帶腫瘤之老鼠分成n=9之群，以利以脂質體包藏之順氣氬鉑，自由順氣氬鉑(Platinol-AQ<sup>®</sup>, Bristol Laboratories, Princeton, NJ)或自由碳布雷汀(Paraplatin<sup>®</sup>, Bristol Laboratories)治療(依表5中所示之治療配量)。

表5

試驗化合物	IV Dose	累積劑量	頻率
鹽水	0.1 ml	-	一次/週×3
順氣氬鉑	6 mg/kg	18 mg	一次/週×3
碳布雷汀	100 mg/kg	300 mg	一次/週×3
脂質體順氣氬鉑	6 mg/kg	18 mg	一次/週×3

自由順氣氬鉑及脂質體包藏之順氣氬鉑係在每週6毫克/

## 五、發明說明 ( 35 )

公斤之劑量下靜脈投藥3週。碳布雷汀係在每週100毫克／公斤之劑量下靜脈投藥3週。老鼠之對照群(n=5)每週靜脈接收0.1毫升之鹽水3週。結果示於圖5中。

## ii. 改變之劑量排程

依上述之步驟，以C26結腸腫瘤細胞接種老鼠。當動物主體之可觸知之腫瘤塊約100立方毫米時，開始治療帶腫瘤之老鼠。老鼠以脂質體包藏之順氣氬鉑或以自由順氣氬鉑每週治療一次共3週(依圖6中所示之配量)。

表 6

試驗化合物	IV Dose	累積劑量	頻率
鹽水	0.1 ml	-	一次／週×3
順氣氬鉑	6 mg/kg	18 mg/kg	一次／週×3
脂質體順氣氬鉑	14/4/4 mg/kg <sup>1</sup>	22 mg/kg	一次／週×3
脂質體順氣氬鉑	12/4/4 mg/kg <sup>1</sup>	20 mg/kg	一次／週×3
脂質體順氣氬鉑	6 mg/kg	18 mg/kg	一次／週×3

起初之劑量後接著2次較小之劑量。

自由順氣氬鉑係在每週一次6毫克／公斤之劑量下靜脈投藥於帶腫瘤之老鼠(n=9)中3週。如上述般製備之包藏在脂質體中之順氣氬鉑依三種劑量排程靜脈投藥於帶腫瘤之老鼠中。其一群(n=9)每週接收一次6毫克／公斤之脂質體包藏之順氣氬鉑3週；另一群(n=9)接收14毫克／公斤之第一次劑量；接著在第2及3週接收4毫克／公斤之劑量；另一

## 五、發明說明 ( 36 )

群接收12毫克／公斤之第一次劑量，接著於2及3週4毫克／公斤之劑量，對照群(n=5)在各治療日接收鹽水。結果列於表6中。

B. 帶Lewis Lung腫瘤模式之老鼠

Lewis Lung 腫瘤(LL/2, CRL-1642, ATCC, Rockville, MD)模式在G6C3-F1, 雄鼠中成長(Simonson, Laboratories, Inc., Gilroy, CA)。自寄生鼠中取得腫瘤，且如上般進行實驗接種。一百萬之腫瘤細胞(0.1毫升)接種於5-6週老，雄，B6C3-F1鼠之左橫腹中。

帶腫瘤動物之治療於接種後7天開始，當動物之主體已具可觸知之腫瘤塊時。依表7中所示之配量治療動物。

表 7

試驗化合物	Dose(Route)	累積劑量	頻率
鹽水	0.1 ml(IV)	-	一次／週×3
順氣氬鉑	6 mg/kg(IV)	18 mg/kg	一次／週×3
順氣氬鉑	6 mg/kg(IP)	18 mg/kg	一次／週×3
脂質體順氣氬鉑	12 mg/kg(IV)	36 mg/kg	一次／週×3
脂質體順氣氬鉑	12 mg/kg(IP)	36 mg/kg	一次／週×3

對照群(n=9)在治療日(7, 14及21天)接收鹽水。二群之動物在每一治療日以6毫克／公斤接收自由順氣氬鉑；其一群中(n=9)，自由順氣氬鉑為靜脈投藥，其他群中(n=9)，藥物為腹膜內投藥。二群在各治療日以12毫克／

### 五、發明說明 ( 37 )

公斤接收脂質體包藏之順氣氬鉑；其一群(n=7)為靜脈接收劑量，其他群(n=9)為腹膜內接收劑量。結果列於表7中。

雖然本發明已以特殊具體例敘述，但熟習本技藝者應了解可進行各種改變及改變，且均不離本發明之範圍。

(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： 含順氯氨鉑化合物之脂質體 )

本發明係敘述含有經包藏之順氯氨鉑化合物之脂質體組合物。此脂質體具有在其內及外表面上之親水性聚合物鏈之表面塗層，及包藏之順氯氨鉑化合物。此化合物係以實質上較大之保留包藏在脂質體中(當與缺乏聚合物塗層之脂質體比較時)。本發明亦敘述製備此組合物之方法。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

英文發明摘要 (發明之名稱： LIPOSOMES CONTAINING A CISPLATIN COMPOUND )

A liposome composition containing an entrapped cisplatin compound is described. The liposomes have a surface coating of hydrophilic polymer chains on inner and outer surfaces and an entrapped cisplatin compound. The compound is entrapped with substantially greater retention in the liposomes, when compared to liposomes lacking the polymer coating. A method of preparing the composition is also described.

訂

線

## 六、申請專利範圍

1. 一種包含包藏之順氣氬鉑化合物之脂質體組合物，包括具有界定外表面與內表面之水性脂質體間隔之脂質體，且係由成胞之脂質及1-20莫耳百分比間之由親水性聚合物衍生成之成胞脂質組成，該脂質體經形成，使得親水性聚合物在該內及外表面上形成親水性聚合物鏈之塗層，且

該順氣氬鉑化合物包藏在該脂質體中，該化合物係以實質上比沒有內及外聚合物表面塗層之脂質體較大之滯留包藏在脂質體中。

2. 根據申請專利範圍第1項之組合物，其中該親水性聚合物鏈係由選自包含聚乙炔吡咯烷酮，聚乙炔甲基醚，聚甲基呋唑啉，聚乙基呋唑啉，聚羥丙基呋唑啉，聚羥丙基甲基丙烯醯胺，聚甲基丙烯醯胺，聚二甲基丙烯醯胺，聚羥丙基甲基丙烯酸酯，聚羥乙基丙烯酸酯，羥甲基纖維素，羥乙基纖維素，聚乙二醇，及聚天門冬醯胺之親水性聚合物組成。
3. 根據申請專利範圍第2項之組合物，其中該親水性聚合物鏈係由聚乙二醇組成。
4. 根據申請專利範圍第1項之組合物，其中該脂質體之大小在80-160毫微米間。
5. 根據申請專利範圍第1項之組合物，其中該成胞脂質為氬化之大豆磷脂膽素，且該衍生之成胞脂質為由聚乙二醇衍生之二硬脂醯磷脂乙醇胺。
6. 根據申請專利範圍第1項之組合物，其中該順氣氬鉑化

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

## 六、申請專利範圍

合物為順氯氮鉑或選自包含碳布雷汀，歐嗎布雷汀，歐沙利布雷汀，DWA2114R((-)-(R)-2-胺甲基吡咯啉(1,1-環丁烷二羧酸)鉑)，傑里布雷汀，恩農布雷汀，洛貝布雷汀，CI-973((SP-4-3(R)-1,1-環丁基-二羧酸(2-)-(2-甲基-1,4-丁二胺-N,N'))鉑)，254-S(納達布雷汀)及JM-216(雙-乙酸-胺-二氯-環己胺-鉑(IV))之順氯氮鉑相似物。

7. 根據申請專利範圍第6項之組合物，其中該順氯氮鉑化合物為順氯氮鉑。
8. 根據申請專利範圍第7項之組合物，其中該順氯氮鉑化合物係以10至20微克／毫克總脂質間之藥物-對-脂質比包藏。
9. 根據申請專利範圍第1項之組合物，其中該脂質體係在脂質體之脂質濃度為50-200毫克／毫升下懸浮以水性介質中，且組合物之特性為在60°C下儲存6小時後，包封鉑之百分比超過90%。
10. 一種使順氯氮鉑化合物包藏在脂質體中之方法，包括：

加熱順氯氮鉑化合物之水溶液至足以使其溶解度增至超過室溫下化合物之溶解度之溫度；

將成胞脂質及1-20莫耳百分比之由親水聚合物衍生之成胞脂質加於加熱溶液中；及

藉由該添加，形成具有該親水聚合物之內表面塗層及外表面塗層之脂質體，且該順氯氮鉑化合物係以比沒有該內及外表面塗層之脂質體實質上較大之駐留包藏於該

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

## 六、申請專利範圍

脂質體中。

11. 根據申請專利範圍第10項之方法，其中該加熱包含使天然順氣氬鉑加熱至足以使順氣氬鉑溶解度增加至超過其室溫溶解度二倍之溫度。
12. 根據申請專利範圍第11項之方法，其中該添加包含添加加熱之成胞脂質之溶液至順氣氬鉑溶液之溫度之 $10^{\circ}\text{C}$ 之中。
13. 根據申請專利範圍第11項之方法，其中該添加包含將含有相轉移溫度在 $10^{\circ}\text{C}$ 之溫度之間之成胞脂質之溶液加於含順氣氬鉑化合物已加熱過之溶液中。
14. 根據申請專利範圍第10項之方法，其中該添加包含添加含相轉移溫度為 $40-70^{\circ}\text{C}$ 之成胞脂質之溶液。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

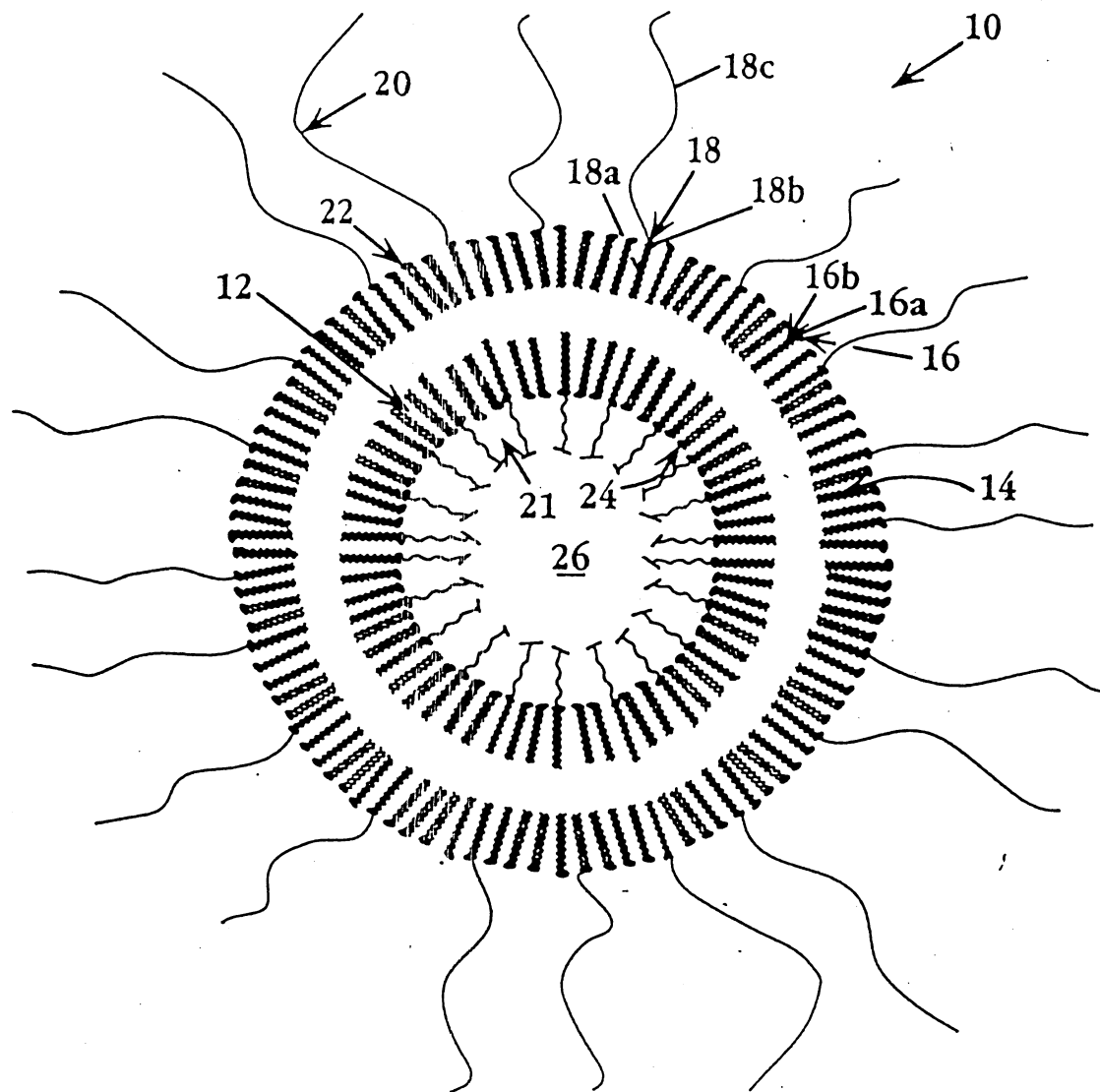


圖 1

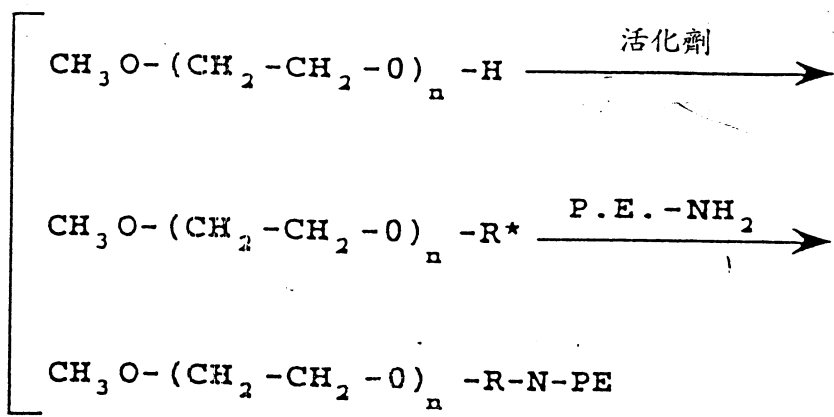


圖 2

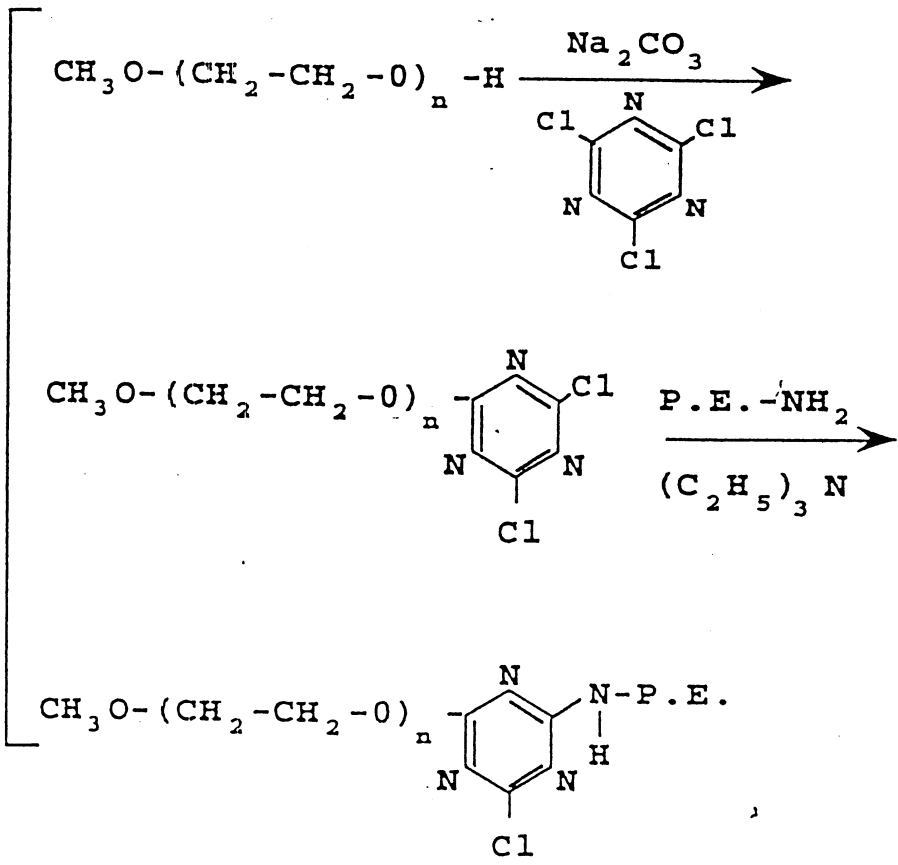


圖 3

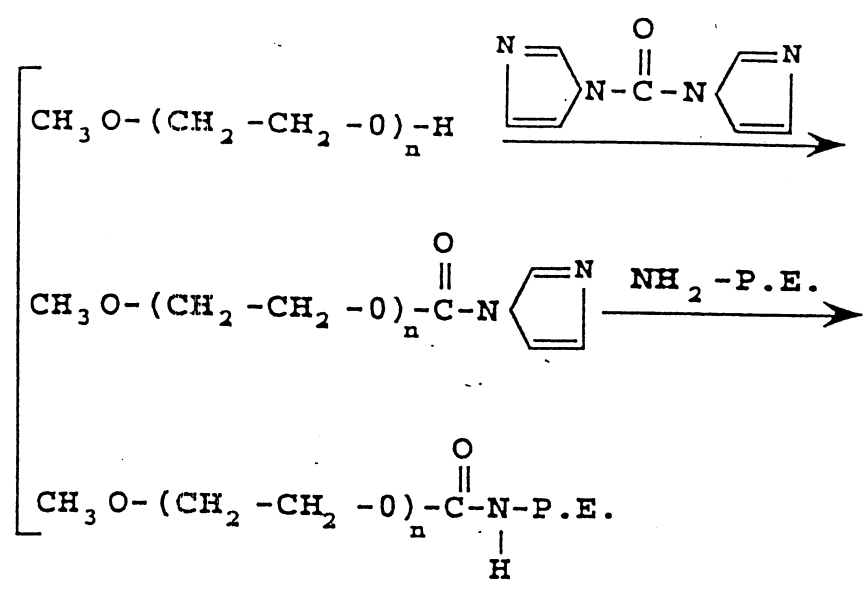


圖 4

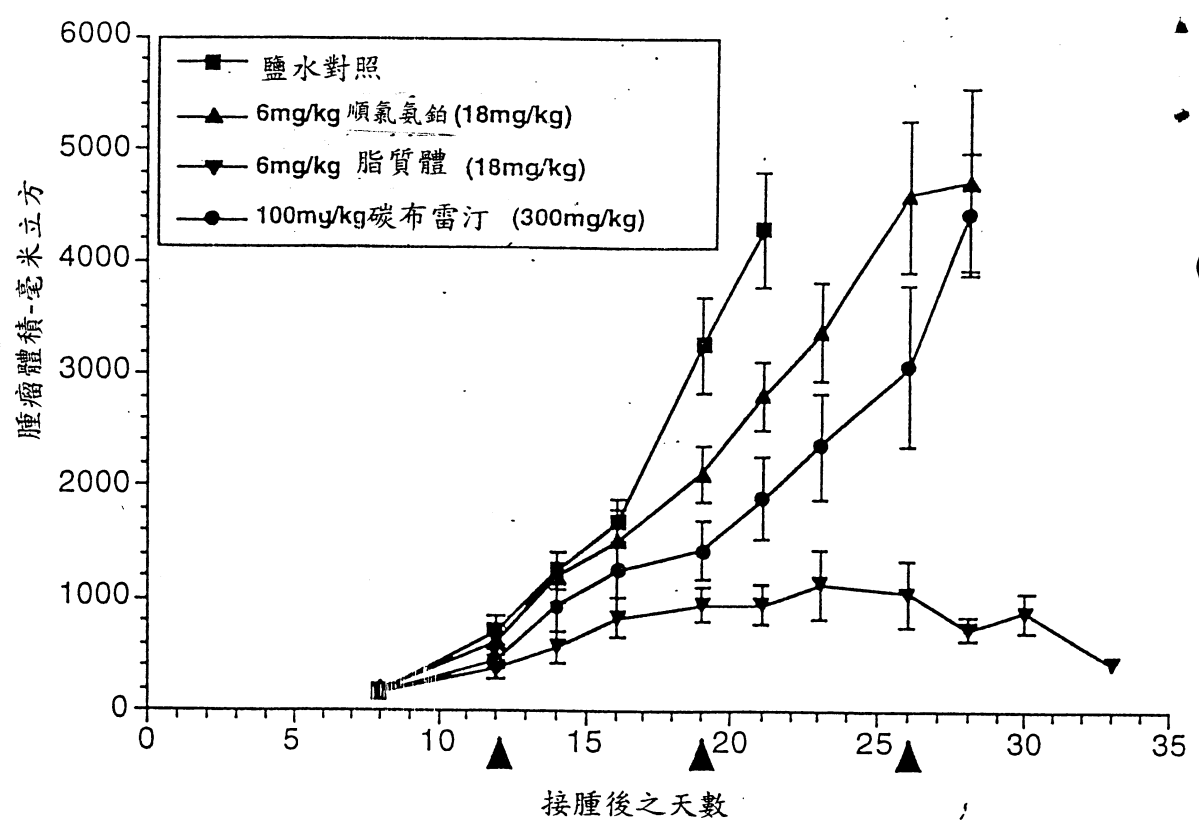


圖 5

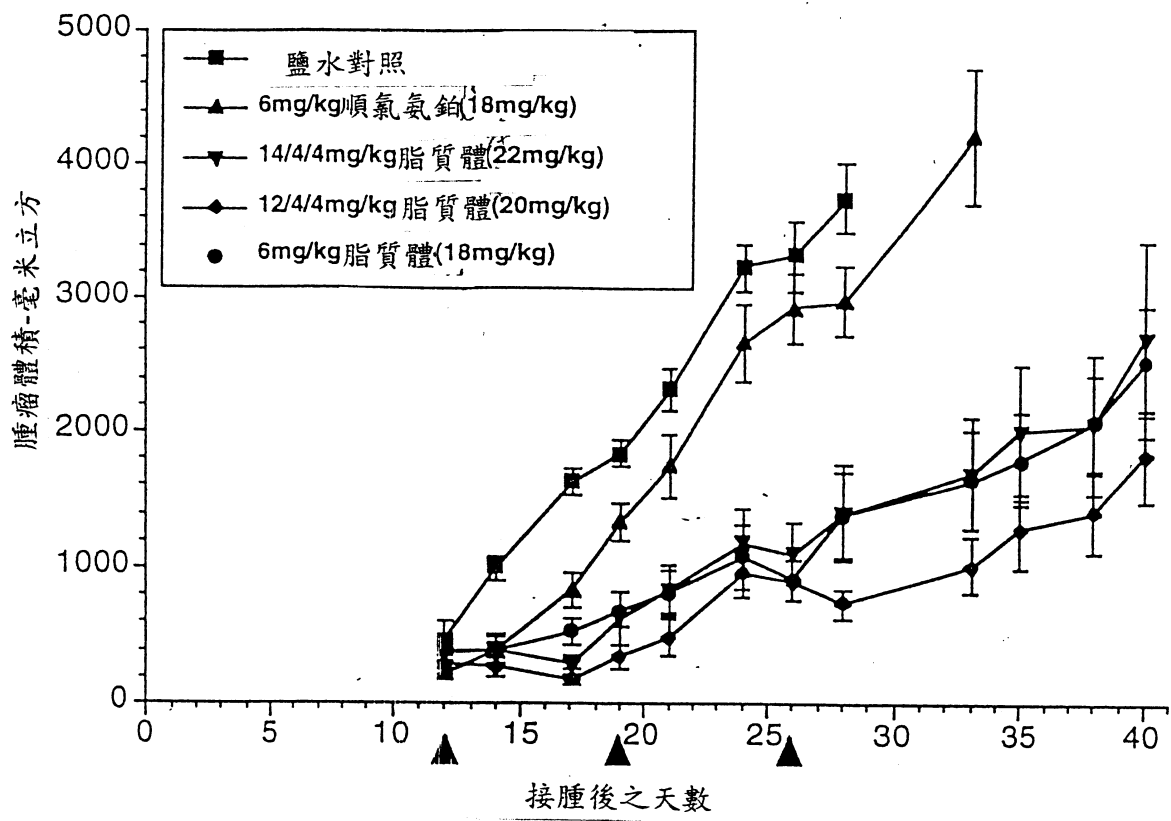


圖 6

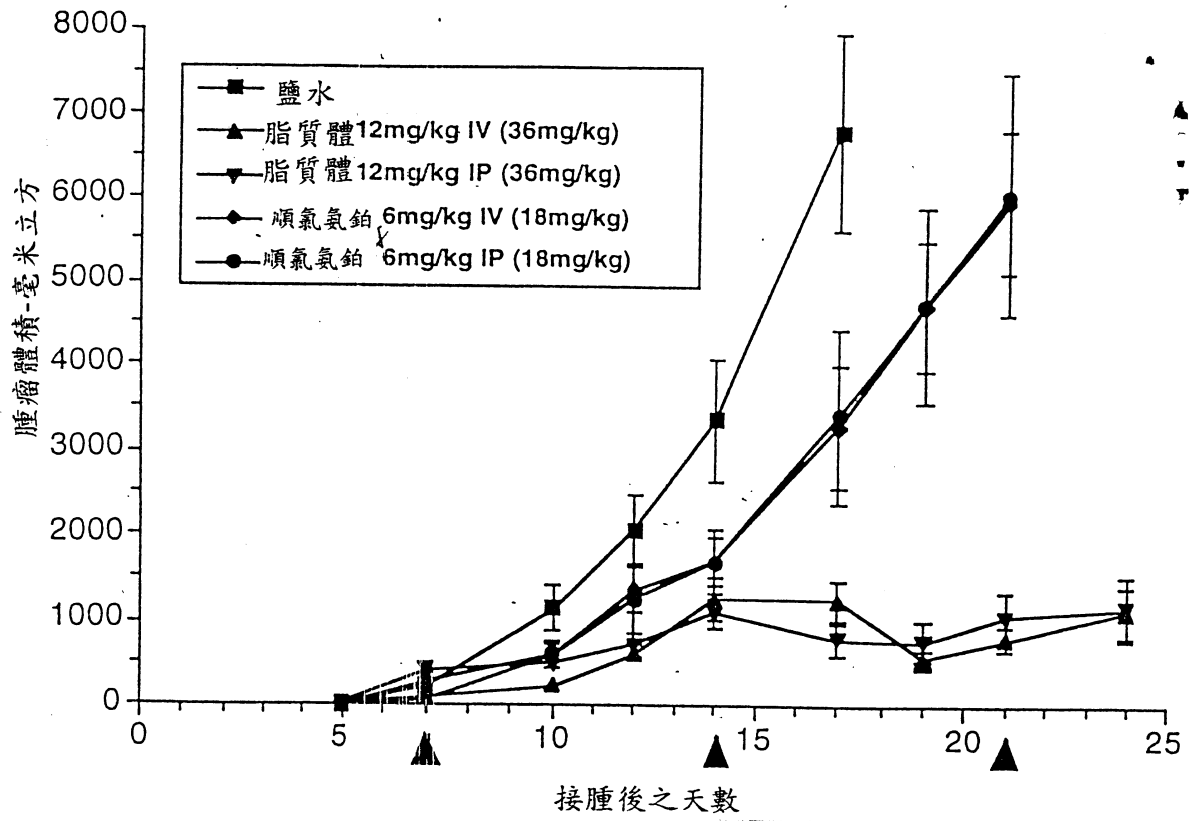


圖 7