

(21)申請案號：102105593

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 02 月 18 日

(51)Int. Cl. : A61K9/127 (2006.01)

A61K47/44 (2006.01)

A61K31/704 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2012/02/17 美國

61/600,418

(71)申請人：賽爾森公司 (美國) CELSION CORPORATION (US)

美國

(72)發明人：理德 羅伯 REED, ROBERT A. (US) ; 蘇大水 SU, DAISHUI (CA)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：39 項 圖式數：13 共 54 頁

(54)名稱

熱塑性奈米粒子及其製法

THERMOSENSITIVE NANOPARTICLE FORMULATIONS AND METHOD OF MAKING THE SAME

(57)摘要

本發明係關於熱敏性脂質體之調和物，更具體地說係關於包含磷脂及表面活性劑之脂質體的調和物，其中該等脂質體協助在低於或等於約 8°C 之溫度下的長期貯存、控制降解物(degradate)形成以最大化產物效力，及在溫和體溫過高的溫度(hyperthermic temperature)下釋放其包含物。本發明亦描述製造調和物之方法。

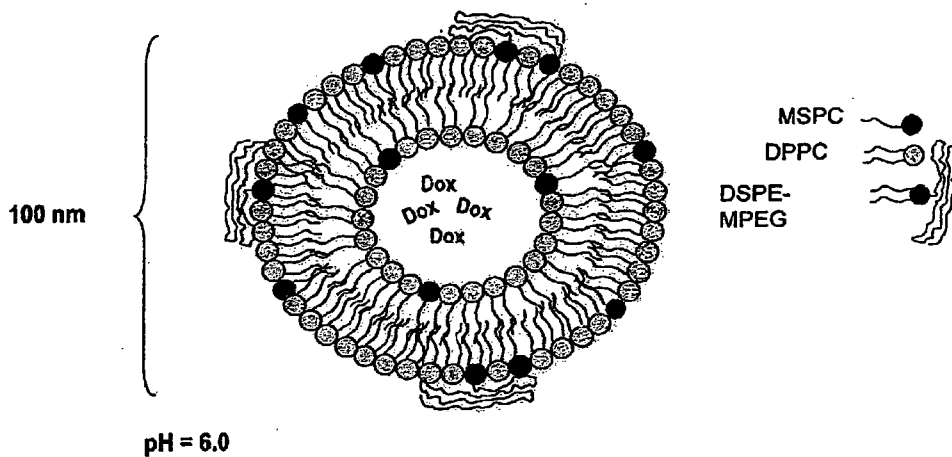


圖 1



(21)申請案號：102105593

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 02 月 18 日

(51)Int. Cl. : *A61K9/127 (2006.01)*

*A61K47/44 (2006.01)*

*A61K31/704 (2006.01)*

*A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2012/02/17 美國

61/600,418

(71)申請人：賽爾森公司 (美國) CELSION CORPORATION (US)

美國

(72)發明人：理德 羅伯 REED, ROBERT A. (US) ; 蘇大水 SU, DAISHUI (CA)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：39 項 圖式數：13 共 54 頁

(54)名稱

熱塑性奈米粒子及其製法

THERMOSENSITIVE NANOPARTICLE FORMULATIONS AND METHOD OF MAKING THE SAME

(57)摘要

本發明係關於熱敏性脂質體之調和物，更具體地說係關於包含磷脂及表面活性劑之脂質體的調和物，其中該等脂質體協助在低於或等於約 8°C 之溫度下的長期貯存、控制降解物(degradate)形成以最大化產物效力，及在溫和體溫過高的溫度(hyperthermic temperature)下釋放其包含物。本發明亦描述製造調和物之方法。

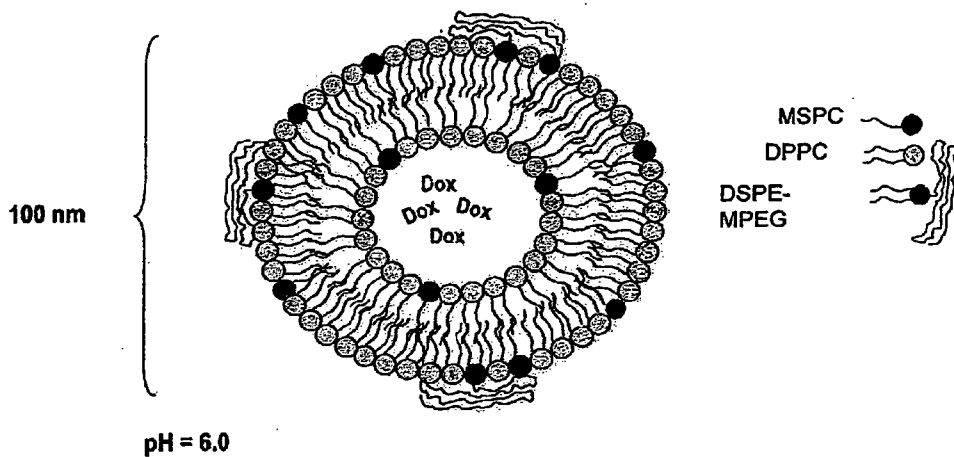


圖 1

## 發明摘要

※申請案號：102105593

※申請日：102年02月18日

※IPC分類：

A61K P<sub>127</sub> (2005.01)

47/4x (2005.01)

31/70x (2005.01)

A61P<sup>35</sup>/<sub>60</sub> (2005.01)

【發明名稱】(中文/英文)

熱塑性奈米粒子及其製法

Thermosensitive nanoparticle formulations and method of making the same

【中文】

本發明係關於熱敏性脂質體之調和物，更具體地說係關於包含磷脂及表面活性劑之脂質體的調和物，其中該等脂質體協助在低於或等於約 8°C 之溫度下的長期貯存、控制降解物(degradate)形成以最大化產物效力，及在溫和體溫過高的溫度(hyperthermic temperature)下釋放其包含物。本發明亦描述製造調和物之方法。

【英文】

The present invention relates to a formulation of thermosensitive liposomes, and more specifically to a formulation of liposomes comprising phospholipids and a surface active agent, wherein the liposomes support long term storage at temperatures less than or equal to about 8 °C, control degradate formation to maximize product potency and release their contents at mild hyperthermic temperatures. Methods of making formulations are also described.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第(1)圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：無

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

## 【發明名稱】(中文/英文)

熱塑性奈米粒子及其製法

Thermosensitive nanoparticle formulations and method of making the same

## 【技術領域】

[0001] 本發明係關於熱敏性脂質體之調和物，更具體地說係關於包含磷脂及表面活性劑之脂質體的調和物，其中該等脂質體協助在低於或等於約 8°C 之溫度下的長期貯存、控制降解物形成以最大化產物效力，及在溫和體溫過高的溫度下釋放其包含物。本發明亦描述製造調和物之方法。

## 【先前技術】

[0002] 脂質體係由至少一種包封水性內部隔室之脂質雙層膜所組成。脂質體可以膜類型及尺寸來表示特徵。小型單層囊泡 (small unilamellar vesicle, SUV) 具有單層膜且直徑通常在 0.02 與 0.25  $\mu\text{m}$  之間；大型單層囊泡 (large unilamellar vesicle, LUV) 通常大於 0.25  $\mu\text{m}$ 。寡層大型囊泡 (oligolamellar large vesicle) 及多層大型囊泡 (multilamellar large vesicle) 具有多層且經常為同心之膜層，並通常大於 0.25  $\mu\text{m}$ 。具有數層非同心膜之脂質體

(即，包含在較大囊泡中之數個小型囊泡)係稱為多囊囊泡。

[0003] 脂質體可調配成攜帶治療劑、藥物或其他活性劑，該等治療劑、藥物或其他活性劑係包含在水性內部空間(水溶性活性劑)或分布在脂質雙層內(非水溶性活性劑)。脂質體亦可與容許將活性劑傳遞至特定目標位置之抗體或定標分子結合。將藥物包封在脂質體中(1)降低該藥物之毒性，(2)避免開身體的防禦機制(通常辨識外來粒子並將彼等定為藉由肝臟及脾臟之網狀內皮系統(RES)移除的目標)，及(3)使該藥物載體定標至作用之治療位置，抵達該處後快速釋放藥物，從而可作用在目標組織上。此外，可藉由將聚乙二醇脂質併入脂質體膜而抑制脂質體被網狀內皮系統(RES)之細胞從血液清除掉；該等脂質抑制標示供 RES 吸收之脂質體的蛋白質吸收。

[0004] 脂質體可設計為不滲漏，但若該脂質體膜中產生孔，或若該膜變成流體(例如發生從固相或凝膠相成為液相之相變)，或若該膜降解或溶解時，則變成可滲漏。此種滲透性分解可藉由施加電場(電穿孔)或將脂質體曝露於酶或界面活性劑而引發。其他方法包括將膜之溫度提高至其由凝膠轉變成液態的相變溫度附近的溫度，於此條件下顯示出在部分液態與部分固態膜中之相邊界區的孔狀瑕疵能增加水、離子及小分子傳輸通過該膜。臨床升高體溫稱為體溫過高。該過程係用以使對象之目標位置的溫度升高，且若可將溫度敏感性脂質體傳遞至該目標位置，

則此溫度提高可觸發脂質體之包含物釋放，提高目標位置處之治療劑的選擇性傳遞及釋放，其係如 Yatvin 等人於 *Science* 204:188 (1979)所述。然而，該技術受限於脂質體之相變溫度比正常組織溫度高(大於 37°C)。

[0005] 體溫過高造成多種生理變化。評述可參考 Issels RD. *Hyperthermia adds to Chemotherapy*, *European J of Cancer* (2008) 44:2546-2554。溫和體溫過高的範圍(39-44°C)之溫度調停局部生理變化(諸如血流量、血管系統滲透性及組織氧合作用增加)。支持實體腫瘤的血管系統之結構紊亂且內襯微血管系統之內皮細胞不密封在一起，通常形成多孔品質。體溫過高造成異常腫瘤微血管系統中的孔徑增加，因此增強奈米尺寸分子(諸如直徑約 100 nm 之脂質體)外滲至腫瘤組織間隙(Bates DA, Mackillop WJ. *Hyperthermia, adriamycin transport, and cytotoxicity in drug-sensitive and-resistant Chinese hamster ovary cells*, *Cancer Res* (1986) 46:5477-5481; Nagaoka S, Kawasaki S, Sasaki K, Nakanishi T. *Intracellular uptake, retention and cytotoxic effect of adriamycin combined with hyperthermia in vitro*. *Jpn J Cancer Res* (1986) 77:205-211)。基於這些因素，溫和體溫過高選擇性令腫瘤細胞致死，其中抗腫瘤效果隨著溫度提高而增加。

[0006] 熱敏感性脂質體將高濃度化學治療劑攜至實體腫瘤及支持的血管系統，並於受熱時局部釋放藥物。體溫過高選擇性提高脂質體吸收、脂質體滲透性及刺激局部

藥物釋放，增加藥物進入腫瘤細胞之流入量，及增加藥物與腫瘤細胞 DNA 之結合(後者實質上為化學治療劑數之作用機制)。

[0007] 爲了開始使用體溫過高治療深處腫瘤(例如攝護腺、卵巢、大腸直腸及乳房腫瘤)，因此需要設計能回應於溫和體溫過高條件(即，39-45°C 之範圍內的臨床可達溫度)而傳遞治療量之活性劑的脂質體調和物。

[0008] 美國專利 6,726,925 號描述對於周圍環境溫度改變敏感的脂質體。該等脂質體尤其載有阿黴素(doxorubicin)，其係已經證實有效且已經常使用於治療廣泛範圍癌症的腫瘤藥物。含有阿黴素之脂質體調和物係靜脈注射投藥且結合體溫過高可提供局部腫瘤控制並改善生活品質。局部溫和體溫過高(39.5-45°C)將包封之阿黴素從脂質體釋放出來。該傳遞技術使得能將高濃度阿黴素優先沉積在目標腫瘤中。美國專利 7,901,709 號描述用於熱活化性阿黴素的脂質體之包封方法。

[0009] 早期公開國際申請案 WO 2007/024826 號描述貯存脂質體或奈米調和物之方法，其包括冷凍此種調和物。該調和物描述貯存具有增強安定性及貯存特徵之脂質體的方法。

[0010] 令體溫過高活化之脂質體藥物調和物有效所需之關鍵設計原理爲：1)幾近完全包封活性劑以使得該藥物在系統循環中該藥物與脂質體相結合，2)設計成在正常體溫(37°C)下保留藥物且在溫和體溫過高溫度(即，41-43

°C)下釋放藥物之膜，3)能使脂質體留在系統循環中的時間夠長到足以應用加熱模式觸發藥物釋放至其目標的膜組成物及粒度，及4)允許脂質體穿過滲漏性腫瘤微血管系統外滲至血流而使得能將化學治療藥物以腫瘤位置為目標的脂質體尺寸。

[0011] 由本發明人發現有關阿黴素之脂質體調和物(例如揭示於美國專利 7,901,709)的其他重要設計問題係阿黴素錯合物(共晶體或鹽)形成對於最終藥品之安定性的安定化影響。成功控制降解率將導致對於貯存溫度及藥品長期安定性的顯著影響。兩種重要的降解產物為 8-去乙酰基-8-羧基道諾黴素(daunorubicin)及雜質 A。

[0012] 本發明解決長期以來阿黴素脂質體調和物之藥物降解而形成檸檬酸鹽錯合物(共晶體或鹽)的問題。已發現檸檬酸鹽錯合物在阿黴素不安定性及降解物形成方面扮演重要角色。更明確地說，8-去乙酰基-8-羧基道諾黴素及雜質 A 之形成可藉由將檸檬酸鹽錯合物之形成改變成硫酸鹽錯合物(共晶體或鹽)而顯著減少。此外，本發明維持上述針對含有活性劑之有效之體溫過高活化的脂質體調和物的關鍵設計原理。

### 【發明內容】

[0013] 在一實施態樣中，本發明提供一種藥學組成物，其包含具有凝膠相脂質雙層之脂質體及包封於該等脂質體內之阿黴素的懸浮液；該脂質雙層包含：

(i) 一或多種磷脂，其係選自由以下所組成之群組：磷脂醯膽鹼、磷脂醯甘油、磷脂醯肌醇及磷脂醯乙醇胺；

(ii) 一或多種由親水性聚合物衍生之磷脂；及

(iii) 一或多種溶血性脂質 (lysolipid)，其係選自由以下所組成之群組：單醯基磷脂醯膽鹼、單醯基磷脂醯甘油、單醯基磷脂醯肌醇及單醯基磷脂醯乙醇胺；

其中該等脂質雙層成分係以約 80-90:2-8:2-18 之 (i):(ii):(iii) 莫耳比提供；其中該懸浮液中之該等脂質體的平均粒度介於約 50 與約 150 nm 之間；且

其中在約低於或等於 8°C 下貯存 6 個月之後的雜質 A 之相對濃度低於 0.5%，且其中雜質 A 係在當採用高效液相層析術 (HPLC) 中使用 C18 逆相管柱與乙酸/甲醇溶劑梯度沖提緩衝劑獲致分離時具有約 1.4 之相對停留時間的尖峰。

[0014] 在其他實施態樣中，本發明提供一種將阿黴素載於溫度敏感性脂質體之方法，其包括：

(a) 製備具有凝膠相脂質雙層之脂質體且銨離子在該等脂質體內部的濃度大於其在該脂質体外部的濃度之懸浮液，該脂質雙層包含：

(i) 一或多種磷脂，其係選自由以下所組成之群組：磷脂醯膽鹼、磷脂醯甘油、磷脂醯肌醇及磷脂醯乙醇胺；

(ii) 一或多種由親水性聚合物衍生之磷脂；及

(iii) 一或多種溶血性脂質(lysolipid)，其係選自由以下所組成之群組：單醯基磷脂醯膽鹼、單醯基磷脂醯甘油、單醯基磷脂醯肌醇及單醯基磷脂醯乙醇胺；

其中該脂質雙層成分係以約 80-90:2-8:2-18 之 (i):(ii):(iii)莫耳比提供；且

其中該製備包括將懸浮液中之脂質體的尺寸縮小至平均粒度介於約 50 與約 150 nm 之間；

(b) 將阿黴素溶液添加至該脂質體之懸浮液，其中該阿黴素被吸入該等脂質體。

[0015] 在其他實施態樣中，本發明包含由上述方法所製成的脂質體製劑。

[0016] 在其他實施態樣中，本發明包括包含阿黴素及成像劑之脂質體製劑。在又一實施態樣中，本發明包括包含阿黴素及其他藥物的脂質體製劑。

[0017] 本發明之該等及其他實施態樣及優點係於下文詳細描述。

### 【圖式簡單說明】

[0018] 圖 1 示意表示含有二棕櫚醯基磷脂醯膽鹼(DPPC)作為磷脂質、1,2-二硬脂醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[聚(乙二醇)2000]及單硬脂醯基磷脂醯膽鹼(MSPC)作為溶血性脂質(lysolipid)之雙層膜。表示出溶血性脂質(lysolipid)單體之定向及其存在該脂質雙層內外層。

[0019]圖 2 為載有銨之阿黴素脂質體製造方法的示意圖式。

[0020] 圖 3 為藉由擠出方法所形成之載有  $\text{NH}_4^+$  的阿黴素脂質體之粒度分布。

[0021] 圖 4 描述使用本技術中已知方法所製備之具有 pH 負荷的脂質體之微差掃描熱量測定法圖表(掃描速率為  $2^\circ\text{C}/\text{分鐘}$ )。

[0022] 圖 5 描述本發明載有  $\text{NH}_4^+$  之脂質體的微差掃描熱量測定法圖表(掃描速率為  $2^\circ\text{C}/\text{分鐘}$ )。

[0023] 圖 6 描述使用本技術中已知方法所製備之具有 pH 負荷的脂質體之穿隧電子顯微圖。

[0024] 圖 7 描述根據本發明所製備之載有  $\text{NH}_4^+$  之脂質體的穿隧電子顯微圖。

[0025] 圖 8 顯示受具有 pH 負荷及載有  $\text{NH}_4^+$  之脂質體的溶液溫度影響之阿黴素釋放曲線的比較。

[0026] 圖 9a 及 9b 顯示分別在具有 pH 負荷或載有  $\text{NH}_4^+$  之阿黴素脂質體中的 8-去乙酰基-8-羧基道諾黴素及雜質 A 之含量的比較。「A」及「B」條表示使用源自不同供應商之賦形劑所製備的調和物之雜質含量。圖 9a 及 9b 亦顯示根據本發明所製備之載有  $\text{NH}_4^+$  之阿黴素脂質體的三個重複操作程序之雜質 8-去乙酰基-8-羧基道諾黴素及雜質 A 含量。

[0027] 圖 10 顯示於  $2-8^\circ\text{C}$  下長時間貯存時在具有 pH 負荷及載有  $\text{NH}_4^+$  之阿黴素脂質體中之阿黴素的含量。

[0028] 圖 11 顯示於 2-8°C 下長時間貯存時在具有 pH 負荷及載有  $\text{NH}_4^+$  之阿黴素脂質體中之降解物生長量。

[0029] 圖 12 顯示在 -20°C 下長時間貯存時在具有 pH 負荷及載有  $\text{NH}_4^+$  之阿黴素脂質體中之阿黴素含量。

[0030] 圖 13 顯示在 -20°C 下長時間貯存時在具有 pH 負荷及載有  $\text{NH}_4^+$  之阿黴素脂質體中降解物生長量。

### 【實施方式】

[0031] 茲參考本文所示之具體實例及圖式來描述本發明。該等具體實例僅供說明目的並不應解釋為如申請專利範圍所定義般限制本發明。

[0032] 在一實施態樣中，本發明提供一種藥物組成物，其包含具有凝膠相脂質雙層之脂質體及包封於該等脂質體內之阿黴素的懸浮液；該脂質雙層包含：

- (i) 一或多種磷脂，其係選自由以下所組成之群組：磷脂醯膽鹼、磷脂醯甘油、磷脂醯肌醇及磷脂醯乙醇胺；
- (ii) 一或多種由親水性聚合物衍生之磷脂；及
- (iii) 一或多種溶血性脂質 (lysolipid)，其係選自由以下所組成之群組：單醯基磷脂醯膽鹼、單醯基磷脂醯甘油、單醯基磷脂醯肌醇及單醯基磷脂醯乙醇胺；

其中該等脂質雙層成分係以約 80-90:2-8:2-18 之 (i):(ii):(iii) 莫耳比提供；其中該懸浮液中之該等脂質體的平均粒度介於約 50 與約 150 nm 之間；且

其中在低於或等於 8°C 下貯存 6 個月之後的雜質 A 之相對濃度低於 0.5%，且其中雜質 A 係在當採用高效液相層析術(HPLC)中使用 C18 逆相管柱與乙酸/甲醇溶劑梯度沖提緩衝劑獲致分離時具有約 1.4 之相對停留時間的尖峰。

[0033] 在一具體實例中，於低於或等於 8°C 下貯存 6 個月後該雜質 A 之相對濃度低於約 0.5%，或低於 0.4%，或低於 0.3%，或低於 0.2%。在另一具體實例中，於低於或等於 8°C 下貯存約 1 年後該雜質 A 之相對濃度低於約 0.5%，或低於 0.4%，或低於 0.3%，或低於 0.2%。在另一具體實例中，於低於或等於 8°C 下貯存約 2 年後該雜質 A 之相對濃度低於約 1%、0.75%、0.5%，或低於 0.4%，或低於 0.3%，或低於 0.2%。

[0034] 在一具體實例中，於低於或等於 8°C 下貯存約 6 個月後 8-去乙醯基-8-羧基道諾黴素之相對濃度低於約 0.5%，或低於 0.4%，或低於 0.3%，或低於 0.2%。在另一具體實例中，於低於或等於 8°C 下貯存約 1 年後 8-去乙醯基-8-羧基道諾黴素之相對濃度低於約 0.5%，或低於 0.4%，或低於 0.3%，或低於 0.2%。在另一具體實例中，於低於或等於 8°C 下貯存約 2 年後 8-去乙醯基-8-羧基道諾黴素之相對濃度低於約 2.0%，或低於 1.6%，或低於 1.5%，或低於 1.0%，低於 0.5%，低於 0.4%，低於 0.3%，或低於 0.2%。

[0035] 在另外之具體實例中，於約低於或等於 8°C 之

溫度下貯存 150 天後阿黴素濃度為初始阿黴素濃度之大於 95%，大於 96%，大於 97%，大於 98%，大於 99%，或大於 99.5%，此係藉由 HPLC 使用 C18 逆相管柱並使用乙酸/甲醇溶劑梯度沖提條件測得。在另一具體實例中，於約低於或等於 8°C 之溫度下貯存約 6 個月後阿黴素濃度為初始阿黴素濃度之大於 95%，大於 96%，大於 97%，大於 98%，大於 99%，或大於 99.5%，此係藉由 HPLC 使用 C18 逆相管柱並使用乙酸/甲醇溶劑梯度沖提條件測得。在另一具體實例中，於約低於或等於 8°C 之溫度下貯存約一年後阿黴素濃度為初始阿黴素濃度之大於 95%，大於 96%，大於 97%，大於 98%，大於 99%，或大於 99.5%，此係藉由 HPLC 使用 C18 逆相管柱並使用乙酸/甲醇溶劑梯度沖提條件測得。在另一具體實例中，於約低於或等於 8°C 之溫度下貯存約兩年後阿黴素濃度為初始阿黴素濃度之大於 95%，大於 96%，大於 97%，大於 98%，大於 99%，或大於 99.5%，此係藉由 HPLC 使用 C18 逆相管柱並使用乙酸/甲醇溶劑梯度沖提條件測得。

[0036] 在另一具體實例中，本發明為一種藥物組成物，其中低於或等於 8°C 之溫度下貯存 150 天後形成之總降解產物為低於 1%，或低於 0.5%。在另外之具體實例中，本發明為一種藥物組成物，其中低於或等於 8°C 之溫度下貯存約六個月後形成之總降解產物為低於 1%，或低於 0.5%。在另外之具體實例中，本發明為一種藥物組成物，其中低於或等於 8°C 之溫度下貯存約一年後形成之總

降解產物為低於 1%，或低於 0.5%。在另外之具體實例中，本發明為一種藥物組成物，其中低於或等於 8°C 之溫度下貯存約兩年後形成之總降解產物為低於 2.5%，低於 1%，或低於 0.5%。

[0037] 在又一具體實例中，脂質體係懸浮於包含醣的緩衝劑中。該醣可為單醣，諸如乳糖，或雙醣，諸如蔗糖。在另一具體實例中，該緩衝劑另外包含組胺酸。

[0038] 在其他實施態樣中，本發明提供一種將阿黴素載於溫度敏感性脂質體之方法，其包括：

(a) 製備具有凝膠相脂質雙層之脂質體且鉍離子在該等脂質體內部的濃度大於其在該脂質体外部的濃度之懸浮液，該脂質雙層包含：

(i) 一或多種磷脂，其係選自由以下所組成之群組：磷脂醯膽鹼、磷脂醯甘油、磷脂醯肌醇及磷脂醯乙醇胺；

(ii) 一或多種由親水性聚合物衍生之磷脂；及

(iii) 一或多種溶血性脂質(lysolipid)，其係選自由以下所組成之群組：單醯基磷脂醯膽鹼、單醯基磷脂醯甘油、單醯基磷脂醯肌醇及單醯基磷脂醯乙醇胺；

其中該脂質雙層成分係以約 80-90:2-8:2-18 之 (i):(ii):(iii)莫耳比提供；且

其中該製備包括將懸浮液中之脂質體的尺寸縮小至平均粒度介於約 50 與約 150 nm 之間；

(b) 將阿黴素溶液添加至該脂質體之懸浮液，其中該阿黴素被吸入該等脂質體。

[0039] 在一具體實例中，至少 90%，至少 91%，至少 92%，至少 93%，至少 94%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，或至少 98%該溶液中之阿黴素被吸入該等脂質體。

[0040] 在另一具體實例中，被吸入該等脂質體之阿黴素的濃度為約 1 mM 至約 200 mM，較佳約 10 至約 65 mM，且最佳約 45 mM 至約 55 mM。在另外之具體實例中，被吸入該等脂質體之阿黴素的濃度為約 50 mM。在另一具體實例中，被吸入該等脂質體之阿黴素的濃度為約 75 mM。

[0041] 本發明之脂質體係由選自以下組成之群組的磷脂所組成：磷脂醯膽鹼、磷脂醯甘油、磷脂醯肌醇及磷脂醯乙醇胺。該等磷脂在達到體溫過高範圍(例如從約 38 °C 至約 45°C 之範圍)之較低端的液態轉變溫度前較佳具有固體或凝膠形式。更佳係醯基經飽和之磷脂。在一具體實例中，該一或多種磷脂具有兩個相同或不同 C<sub>14</sub>-C<sub>20</sub> 醯基，諸如例如二棕櫚醯基磷脂醯膽鹼(DPPC)、二硬脂醯基磷脂醯甘油(DSPG)或其組合。

[0042] 本發明之脂質體係由一或多種溶血性脂質(lysolipid)所組成。在一具體實例中，溶血性脂質(lysolipid)為單棕櫚醯基磷脂醯膽鹼(MPPC)、單月桂基磷脂醯膽鹼(MLPC)、單肉豆蔻醯基磷脂醯膽鹼(MMPC)、單

硬脂醯基磷脂醯膽鹼(MSPC)或其混合物。

[0043] 在本發明一具體實例中，最終脂質體調和物中之脂質的總濃度為約 10-50 mg/ml，約 20-50 mg/ml，約 30-40 mg/ml，約 20 mg/ml，約 30 mg/ml，或 40 mg/ml。在另一具體實例中，該脂質體調和物中之阿黴素濃度為約 0.2-40 mg/ml，約 0.5-30 mg/ml，約 1-20 mg/ml，約 2-10 mg/ml，約 1 mg/ml，約 2mg/ml，約 3 mg/ml，約 4 mg/ml 或約 5 mg/ml。在本發明一具體實例中，阿黴素對脂質的比為 0.02-10，約 0.05，約 1，約 2，約 3，約 4，約 5，約 6，約 7，約 8，約 9 或約 10。

[0044] 本發明之脂質體包括由聚合物衍生之脂質以減少被 RES 吸收之脂質體，從而增長脂質體的循環時間。適用之聚合物包括親水性聚合物，諸如聚乙二醇、聚乙烯吡咯啉、聚乳酸(olylactic acid)、聚羥乙酸、聚乳酸與聚羥乙酸之共聚物、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯啉酮、聚葡萄糖、寡醣以及上述之混合物。在一具體實例中，一或多種由親水性聚合物衍生之磷脂為聚乙二醇衍生之(PEG 化)脂質。較佳地，該 PEG 化脂質為 1,2-二硬脂醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[聚(乙二醇)2000]。

[0045] 在一具體實例中，本發明提供一種將活性劑裝載於脂質體之方法，該活性劑為博來黴素(bleomycin)、達卡巴仁(dacarbazine)、道諾黴素、放線菌素(dactinomycin)、福達樂(fludarabine)、健擇(gemcitabine)、艾達黴素(idarubicin)、滅殺除癌

(methotrexate)、絲裂黴素(mitomycin)、邁杜蔥(mitoxantrone)、長春鹼、溫諾平(vinorelbine)，或長春新鹼。

[0046] 在一具體實例中，該製法包括於鉍鹽存在下製備該等脂質體。較佳地，該鉍鹽係以硫酸鉍溶液形式提供。在一具體實例中，該溶液中之硫酸鉍濃度為約 100 mM 至約 300 mM，較佳約 200 mM。

[0047] 以單醣或雙醣溶液置換在該等脂質體外部之鉍離子。在另外之具體實例中，單醣或雙醣溶液之濃度為約 5-15%，較佳約 10%。該置換或交換可藉由諸如透析或滲濾之技術進行。

[0048] 在另外之具體實例中，在脂質體外部之鉍離子係由單醣溶液(例如乳糖溶液)置換。在另一之具體實例中，在脂質體外部之鉍離子係由雙醣溶液(例如蔗糖溶液)置換。

[0049] 在一具體實例中，於步驟(b)之後將組胺酸緩衝劑添加至脂質體製劑。在另外之具體實例中，該溶液中之組胺酸緩衝劑濃度為約 5 mM 至約 15 mM，較佳約 10 mM。

[0050] 一種製備本發明之脂質體調和物的方法包括在適用的有機溶劑中以適當比例混合雙層組分。適用的溶劑包括氯仿、丙酮、甲醇或二氯甲烷。然後蒸發該溶劑以形成經乾燥之脂質膜。該膜係使用含有均衡量之溶血性脂質(lysolipid)及所需活性劑(例如阿黴素)的水溶液再水合

(rehydrated)(在高於該脂質混合物之相變溫度下)。將再水合後所形成之脂質體擠出形成具有所希望尺寸之脂質體。例如，當製造由 80:20 DPPC:MSPC 所組成之脂質體時，再水合係在高於該特定脂質混合物之相變溫度的溫度(高於 39°C)下進行。用以將脂質膜再水合的水溶液包含均衡量之溶血性脂質(lysolipid)單體(例如等於 MSPC 之臨界微胞濃度的濃度，約 1 微莫耳)。

所提出之製造方法及控制的說明

[0051] 茲於下文描述載有鉍之調和物的大規模製造方法。該方法可用以製造各種批量大小之調和物，例如 2-2000 L 規模之批量。所提出之製造方法係示意圖示於圖 2。

[0052] 逐步製造方法：

1. 藉由將適當量之硫酸鉍溶解於注射用水(WFI)中，然後進行生物負荷減少過濾法(bioburden reduction filtration)來製備硫酸鉍緩衝劑。緩衝劑之莫耳濃度可為例如 200 mM。

2. 在高溫(45-70°C)下利用來自步驟 1 之硫酸鉍緩衝劑水合該等脂質一段適當時間。例如，該等脂質係在 60°C 下水合 1 小時。

3. 在高溫下經由具有特定孔徑之過濾膜擠出該經水合脂質混合物，以獲得具有所希望尺寸之脂質體。例如，該經水合脂質混合物係在 65°C 下經過 80 nm 聚碳酸酯過



濾膜擠出以形成~100 nm 之脂質體。

4. 由醣溶液(例如 10%蔗糖溶液)交換非脂質體包封之硫酸銨，然後經由預熱的過濾器(諸如 Sartobran P 過濾器)而滅菌過濾。

5. 藉由將適當量之組胺酸 HCl 溶解在 WFI 中然後滅菌過濾來製備組胺酸 HCl 緩衝劑，例如 pH 6 之 100 mM 組胺酸緩衝劑。

6. 藉由將適當量阿黴素 HCl 溶解於 WFI 中然後滅菌過濾來製備阿黴素 HCl 溶液，例如濃度為 5.0 mg/mL。

7. 混合 1.0 份滅菌脂質體與 0.8 份滅菌阿黴素 HCl 溶液，並在 35°C 下培養 4 小時。

8. 添加 0.2 份滅菌組胺酸緩衝劑並充分混合。

[0053] 在一具體實例中，本發明係有關藉由將阿黴素載於溫度敏感性脂質體之方法所製成之脂質體製劑，該方法包括

(a) 製備具有凝膠相脂質雙層之脂質體且銨離子在該等脂質體內部的濃度大於其在脂質体外部的濃度之懸浮液，該脂質雙層包含：

(i) 一或多種磷脂，其係選自由以下所組成之群組：磷脂醯膽鹼、磷脂醯甘油、磷脂醯肌醇及磷脂醯乙醇胺；

(ii) 一或多種由親水性聚合物衍生之磷脂；及

(iii) 一或多種溶血性脂質(lysolipid)，其係選自由以下所組成之群組：單醯基磷脂醯膽鹼、單醯

基磷脂醯甘油、單醯基磷脂醯肌醇及單醯基磷脂醯乙醇胺；

其中該脂質雙層成分係以約 80-90:2-8:2-18 之 (i):(ii):(iii)莫耳比提供；且

其中該製備包括將懸浮液中之脂質體的尺寸縮小至平均粒度介於約 50 與約 150 nm 之間；

(b) 將阿黴素溶液添加至該脂質體之懸浮液，其中該阿黴素被吸入該等脂質體。

[0054] 已有報告指出直徑介於 0.05 至 0.3 微米的脂質體適用於腫瘤投藥 (Allen 等人之美國專利 5,527,528 號)。本發明之脂質體的尺寸分級可根據先前技術中已知方法進行，且考慮其中所含之活性劑及所希望的效果 (詳見例如 Martin 等人之美國專利 5,225,212 號；Allen 等人之美國專利 5,527,528 號，該等揭示係以全文引用方式併入本文中)。在本發明較佳具體實例中，脂質體從直徑約 0.05 微米或約 0.1 微米至直徑約 0.3 微米或約 0.4 微米。脂質體製劑可含有不同尺寸之脂質體。有利地，該等脂質體包含本文所述之脂質混合物，且因此如上述地對溫度敏感，並具有釋放所包封藥物的能力。

[0055] 在本發明一實施態樣中，該等脂質體係製備成具有在選定尺寸範圍內之實質上均勻尺寸。一種有效尺寸分級方法包括將脂質體之水性懸浮液擠出通過一系列具有選定的均勻孔徑之聚碳酸酯膜；該膜之孔徑將大略對應於藉由擠出通過該膜所產生之脂質體的平均尺寸。詳見例

如美國專利 4,737,323 號。

[0056] 在本發明另一較佳具體實例中，脂質體之直徑為約 50 nm，100 nm，120 nm，130 nm，140 nm，或 150 nm，至高達約 175 nm，180 nm，200 nm，250 nm，300 nm，350 nm，400 nm，或 500 nm。

[0057] 在一具體實例中，本發明之脂質體製劑係貯存在低於或等於 8°C，約 2°C 至約 8°C，約 -80°C 至約 -15°C，約 -30°C 至約 -15°C，或約 -15°C 至約 2°C 之溫度下。

[0058] 在其他實施態樣中，脂質體製劑包含阿黴素及成像劑或診斷劑。基於許多因素，希望有將成像劑包封在脂質體內或將成像劑與治療劑一起包封在脂質體內的能力。首先，該活性劑之療效將隨著視覺化成像劑之釋放且因而推斷藥物釋放之能力而提高。此可提供判定藥物之組織滲透及濃度的工具。此外，將藥物與成像劑結合在脂質體中將容許監測及定量藥物之經時釋放、組織分布及藥物清除。其次，攜帶並釋放成像劑之脂質體使得有機會預篩選病患。例如，選擇病患族群可被視為可能從根據腫瘤血管系統之「滲漏性」的治療脂質體獲益。經由使用成像劑而視覺化之滲漏性係該活性劑外滲通過微血管系統及任何纖維變性組織以到達及治療腫瘤的能力之指示。可使用之成像劑或診斷劑的實例包括但不局限於用於 X 射線成像、磁共振成像(MRI)、超音波成像或核子醫學成像用之成像劑。

[0059] 在 X 射線成像(包括諸如電腦斷層掃描(CT)及

數位化去贅影血管攝影術(DSA)等應用)中，對比影像係以電子密度之差異為基礎。在本發明一實施態樣中，脂質體製劑包含阿黴素及 X 射線造影劑。X 射線造影劑通常係以重元素為底質，且包括可用以加強腸胃系統之顯影的鋇鹽(諸如硫酸鋇)及可用於腸胃系統之顯影及用於非經腸研究的碘化造影劑。碘化 X 射線造影劑包括但不局限於碘海醇(iohexol)、碘噴醇(iopentol)、碘帕醇(iopamidol)、碘克沙醇(iodixanol)、碘普羅胺(iopromide)、碘曲侖(iotrolan)、甲泛影醯胺(metrizamide)、甲基泛影酸(metrizoic acid)、泛影酸(diatrizoic acid)、碘灑拉酸(iothalamic acid)、碘克沙酸(ioxaglic acid)及該等酸之鹽。

在本發明另一實施態樣中，脂質體製劑包含阿黴素及 MRI 造影劑。MRI 造影劑包括順磁螯合劑，例如以錳(2+)、釷(3+)或鐵(3+)為底質者。親水性螯合劑(諸如 GdDTPA、GdDOTA、GdHPDO3A 及 GdDTPA-BMA)係分布於細胞外且由腎臟消除。此等化合物可用於例如顯影中樞神經系統中之病變。更多其他器官或組織之特定藥劑包括 MnDPDP、GdBOPA、GdEOB-DTPA、順磁卟啉、巨分子化合物、粒子及脂質體。

[0060] 在本發明又另一實施態樣中，脂質體製劑包含阿黴素及超音波成像劑。超音波成像以超音波(例如在 1-10 MHz 頻率範圍中)經由轉換器穿透入人或動物對象為基礎，該等超音波與身體組織及流體之界面互動。超音波影像中之對比影像係由在此等界面之音波的差異反射/吸

收所衍生；結果可利用都卜勒技術予以增強，包括使用彩色都卜勒以評估血流。超音波造影劑之實例包括以含氣體之半乳糖微晶體為底質的 Echovist®；包含塗覆有脂肪酸的含氣體之半乳糖微晶體為底質的 Levovist®；及包含藉由部分變性的人類血清蛋白包封之氣泡的 Infuson®。

[0061] 可用於本發明之其他成像劑或診斷劑包括但不局限於螢光劑(諸如 6-羧基螢光素)、放射性劑(諸如放射性同位素或含有放射性同位素之化合物，包括碘辛烷、鹵碳及泛影葡胺(renografin))等。

[0062] 在本發明其他實施態樣中，脂質體製劑另外包含額外活性劑，例如其他化學治療藥物。

## 實施例

### 實施例 1

藉由填載  $\text{NH}_4^+$  以製備載有阿黴素之溫度敏感性脂質體

[0063] 藉由以下技術製備含有 1,2-二棕櫚醯基-sn-甘油-3-磷脂醯膽鹼(DPPC)之脂質體(其包含 86%(莫耳%)該脂質體膜；約 4%(莫耳%)之 1,2-二硬脂醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-聚乙二醇 2000 (DSPE-mPEG)；及約 10%(莫耳%)之 1-硬脂醯基-2-羥基-sn-甘油磷脂醯膽鹼(MSPC))：先在 200 mM 硫酸銨緩衝劑中水合適當脂質組成物，形成多層脂質體。然後藉由擠出通過 80 nm 過濾器形成小型單層脂質體，以形成在 200 mM 硫酸銨緩衝劑中之約 100 nm 的球體。

[0064] 然後以 10%蔗糖溶液進行對於先前步驟中所製備之脂質體的透析或滲濾步驟以交換在脂質體外部之硫酸銨，形成通過該脂質體膜之銨濃度梯度(即內部 200 mM，外部低於 1 mM)。已知(Haran G、Cohen R、Bar LK 及 Barenholz Y 於 Transmembrane ammonium sulfate gradients in liposomes produce efficient and stable entrapment of amphipathic weak bases, Biochimica et Biophysica Acta, 1151 (1993) 201-215 201)銨濃度可有效且幾近定量地促進在高溫下將添加之阿黴素溶液載於該脂質體內部體積。阿黴素係藉由在 35-39°C 下培養而包封在脂質體之內部水性體積內。於填載完成之後，以組胺酸緩衝劑緩衝該脂質體溶液以安定貯存期間之產物 pH。

## 實施例 2

製備具有 pH 負荷之溫度敏感性阿黴素脂質體

[0065]根據 WO 2007/024826 所述之方法，製備使用 pH 梯度之載有阿黴素的脂質體。含有 1,2-二棕櫚醯基-sn-甘油-3-磷脂醯膽鹼(DPPC)之脂質體(其包含 86%(莫耳%)該脂質體膜；約 4%(莫耳%)之 1,2-二硬脂醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-聚乙二醇 2000 (DSPE-mPEG)；及約 10%(莫耳%)之 1-硬脂醯基-2-羥基-sn-甘油磷脂醯膽鹼(MSPC))係藉由下列技術製備：先在 300 mM 檸檬酸鹽(pH = 4)緩衝劑中水合適當脂質組成物，形成多層脂質體。然後藉由擠出通過 80 nm 過濾器形成小型單層脂質體，以在

300 mM 檸檬酸鹽緩衝劑中形成約 100 nm 之球體。

[0066] 然後將 500 mM 碳酸鈉溶液加入該先前步驟中所製備的脂質體，將外部溶液之 pH 提高至~7.5。已知(詳見例如 Mayer LB, Bally MB, Cullis PR., Uptake of adriamycin into large unilamellar liposomes in response to a pH gradient, *Biochimica et Biophysica Acta* 857 (1986) 123-126)通過該膜之 pH 梯度可有效且幾近定量地促進在高溫下將添加之阿黴素溶液載於該脂質體內部體積。阿黴素係藉由在 35-39°C 下培養而包封在脂質體之內部水性體積內。

調和物的組成/賦形劑/功能

[0067] 表 1 顯示根據實施例 1 之調和物與根據實施例 2 之習知具有 pH 負荷的脂質體之比較。從表 1 看出，二者調和物均含有 2.0 mg/mL 之阿黴素。根據本發明之調和物充分匹配於更習用之脂質體阿黴素調和物。所使用之所有原料均為藥學等級。

[0068]

表1. 2.0 mg/mL阿黴素HCl脂質體產品之組成

成分	數量 /mL (mg)		成分類別
	具有pH負荷	載有 NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	
阿黴素/脂質比	0.02-10	0.02 - 10	藥物物質
DPPC(1,2-二棕櫚醯基-sn-甘油-3-磷脂醯膽鹼)	10-50	10-50	脂質體組分
DSPE-PEG(1,2-二硬脂醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-聚乙二醇2000)			
MSPC(1-硬脂醯基-2-羥基-sn-甘油磷脂醯膽鹼)			
乳糖	24.5	0 - 150	等滲壓劑
蔗糖	-	0 - 150	等滲壓劑
檸檬酸三鈉	15.1	-	緩衝劑
檸檬酸	14.4	-	緩衝劑
碳酸鈉	13.6	-	緩衝劑
硫酸銨	-	15 - 40 <sup>a</sup>	緩衝劑
組胺酸	-	0 - 2.0	緩衝劑
水	添加至 所需體積	添加至 所需體積	溶劑

a.脂質體內之硫酸銨濃度(例如150-250 mM)

### 實施例 3

#### 最終產品之鑑定方法

[0069] 該最終產品係以總阿黴素含量、阿黴素降解產物、pH、滲透壓、粒度分布、MSPC 含量、DPPC 含量、DSPE-mPEG 含量、經包封之阿黴素%、於 37°C 下之藥物釋放量及於 41°C 下之藥物釋放量加以鑑定，以有效完整評估該產品。目標總阿黴素含量係介於約 1.8 至約 2.2 mg/mL。該藥物包封率通常大於 90%，且在正常體溫(即 37°C)下顯示有限釋放(例如 <10%)，並於 41.0°C 下展現提高之釋放(通常 >80%)。藉由動態光散射所測量之脂質體的體積平均粒度介於約 50 至約 150 nm 之間。

### 實施例 4

#### 物理化學性質

##### 脂質體之物理直徑

[0070] 上述實施例 1 中所形成之脂質體的物理化學性質與使用傳統緩衝劑所形成之脂質體製劑相當。如圖 3 所顯示，經硫酸銨水合之脂質體的粒度分布基本上與經檸檬酸鹽緩衝劑水合之脂質體相同。

##### 脂質組成物

[0071] 如上表 1 中所顯示，本發明之脂質體製劑的脂質組成物與本技術中已知之脂質體製劑的脂質組成物相同。脂質膜組成物之功能亦藉由在 37°C 及 41.0°C 下測試

藥物釋放的差異予以確認。

#### 阿黴素包封程度

[0072] 本發明提供設計成利用遠端填載製程之脂質體產品(詳見例如 Haran G, Cohen R、Bar LK 及 Barenholz Y., Transmembrane ammonium sulfate gradients in liposomes produce efficient and stable entrapment of amphipathic weak bases, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1151 (1993) 201-215 201), 以將大於 90%之阿黴素包封在該內部水性核心中。所包封之阿黴素的%係藉由測量由超過濾所分離的未包封之阿黴素(游離 Dox)及該產品中之總阿黴素而計算求出。目前的研究已顯示載有銨之調和物可獲致大於 95%之包封率。

[0073] 此外，各批次間之熱釋放性質(於 37°C 之釋放%及於 41°C 之釋放%)重現性非常高，且是相當的，如圖 8 所示。

#### 最終產品之鑑定方法

[0074] 除了上述最終產品鑑定測試之列表外，已評估新穎調和物之數種其他性質。首先，因脂質體膜在藥品之關鍵設計參數中的重要性之故，在具有 pH 負荷(圖 4 所示)及載有  $\text{NH}_4^+$ (圖 5 所示)調和物上進行微差掃描熱量測定法。各溫度記錄圖顯示一個主要放熱(於約 41°C)，且意指該膜對新穎調和物而言與對於具有 pH 負荷之脂質體而

言相當類似，正如所預期，此係因為緩衝劑溶液應對於該膜的排序之整體結構的影響微乎其微。

[0075] 亦使用穿隧電子顯微術(TEM)之高解析度技術比較兩種調和物的整體尺寸及形態。再次，比較在 GMP 製造設施中以目前製造規模所生產的具有 pH 負荷之產品(圖 6，其目前用於第三階段臨床研究)與在 Celsion 以實驗室規模使用載有  $\text{NH}_4^+$  的調和物所製成之產品(圖 7)。這兩種調和物之脂質體顯示相似的囊泡直徑，其主要為單層膜，且在每一脂質體內部展現典型的單晶體，此係歸因於在填載期間於該脂質體內部形成阿黴素藥物錯合物調和物。整體而言，TEM 顯示使用具有 pH 負荷或填載  $\text{NH}_4^+$  之系統所產生的脂質體相當類似。

[0076] 測量阿黴素釋放量隨著 35 至 45°C 之溫度變化的溫度釋放曲線係藉由在特定溫度下培養各樣本 10 分鐘來測定。測試結果示於圖 8。如先前測試，比較在 GMP 製造設施中以目前製造規模所生產的具有 pH 負荷之產品(其目前用於第三階段臨床研究)與在 Celsion 以實驗室規模使用載有  $\text{NH}_4^+$  的調和物所製成之產品(圖 8)。這兩種調和物之釋放曲線非常相似，二者均顯示出在低於 39°C 之溫度下有最小釋放，在 41.0°C 及更高之下接近 90% 之釋放。清楚地看出，二者調和物證實在正常體溫(即 37°C 下)具有有限阿黴素釋放且在溫和體溫過高或在 41-45°C 範圍之溫度下大部分該藥物係釋放之設計目標。

[0077] 該溫度釋放數據亦為脂質膜組成物之微觀均

勻度之最佳衡量標準。爲了使調和物在 41.0°C 下釋放超過 90% 該藥物，大部分脂質體(即 100 nm 囊泡)必須具有適當脂質組成物以證實半製品(bulk product)具有熱觸發釋放。已知不正確的 DSPE-MPEG 或 MSPC 用量將會負面影響阿黴素由脂質體釋放之程度及速率。此外，轉變溫度幾近相等，再加上比較的 DSC 掃描(圖 4 及 5)，得到緩衝劑系統的改變對脂質體膜之影響微乎其微的結論，因此對於其藥物釋放性質的影響微不足道。

#### 實施例 5

比較具有 pH 負荷及載有  $\text{NH}_4^+$  之調和物的 8-去乙醯基-8-羧基道諾黴素及雜質 A 含量

[0078] 進行實驗室實驗以檢驗在具有 pH 負荷及載有  $\text{NH}_4^+$  之調和物中所產生的 8-去乙醯基-8-羧基道諾黴素及雜質 A(圖 9)。對於具有 pH 負荷之調和物檢驗來自兩個提供者之賦形劑：賦形劑 A 及 B。亦檢驗載有  $\text{NH}_4^+$  之調和物的三個獨立製劑。在所有情況中，且均就 8-去乙醯基-8-羧基道諾黴素及雜質 A 二者而言，具有 pH 負荷之調和物所形成的量明顯高於載有  $\text{NH}_4^+$  之調和物。對於具有新來源之賦形劑的具有 pH 負荷及載有  $\text{NH}_4^+$  之調和物，觀察到 8-去乙醯基-8-羧基道諾黴素含量降低，而雜質 A 含量不變。

[0079] 此外，即使在 35°C 下培養四小時，載有  $\text{NH}_4^+$  之調和物的 8-去乙醯基-8-羧基道諾黴素及雜質 A 總含量

低於 0.2%。降解物形成量係以於圖 11 之安定性數據中的初始時點所表示，並與圖 10 中所顯示之阿黴素值極相關。

## 實施例 6

### 安定性曲線

[0080] 產生具有 pH 負荷及載有  $\text{NH}_4^+$  之調和物的對照安定性數據。雖然具有 pH 負荷之調和物需要在  $-15^\circ\text{C}$  至  $-30^\circ\text{C}$  下貯存，但安定性比較係在  $-20^\circ\text{C}$  及在加速安定性條件(即  $+5^\circ\text{C}$ ) 下貯存二者的情況下產生。於 739 天後之阿黴素試驗結果顯示載有銨之調和物的阿黴素損失為  $\sim 4\%$ 。反之，具有 pH 負荷之調和物在相同時間期間之後的阿黴素損失為  $\sim 60\%$ 。阿黴素損失試驗數據係彙總於圖 10 及表 2。總降解物生長證實相同趨勢，即具有 pH 負荷之調和物中觀察到降解物明顯增加，而載有  $\text{NH}_4^+$  之調和物的降解物生長量非常低(圖 11 及表 2)。

表2. 載有 $\text{NH}_4^+$ 且在2-8°C下貯存之安定性數據 - 阿黴素試驗

屬性	在2-8°C下的貯存天數						
	初始	21	35	77	175	362	739
阿黴素 (mg/mL)	1.99	1.99	1.99	1.98	1.98	1.94	1.91
pH	6.3	6.3	6.3	6.3	6.2	6.1	6.2
粒度 (nm)	NT	89	91	88	90	60	95
包封%	NT	NT	97	97	97	97	98
8-去乙酰基(%)	0.09	0.08	0.11	0.17	0.33	0.49	1.56
雜質 A (%)	< 0.05	0.12	0.14	0.18	0.19	0.42	0.66
總降解物(%)	0.09	0.20	0.25	0.35	0.52	0.91	2.22
於41.0°C之釋放%	NT	NT	90	88	87	89	NT

NT=未測試

[0081] 除了在 2-8°C 之安定性以外，圖 12 及圖 13 顯示於 -20°C 之阿黴素損失試驗數據。該數據證實，與具有 pH 負荷之調和物相較，該載有  $\text{NH}_4^+$  之調和物展現出非常低之降解物生長量及提高之阿黴素安定性。

[0082] 藉由 LC/MS 確認，亦觀察到由具有 pH 負荷及載有  $\text{NH}_4^+$  之調和物所形成的降解產物經識別為相同，該載有  $\text{NH}_4^+$  之調和物形成的程度較輕微。此外，經過至少兩年貯存之後，該載有  $\text{NH}_4^+$  之調和物除了降解產物生長量較低之外，亦展現經改良之阿黴素 HCl 安定性。該載有  $\text{NH}_4^+$  之調和物在低於或等於 8°C 溫度貯存至少兩年之後，仍維持其溶液 pH、脂質體粒度、包封%及於 41.0°C

之阿黴素釋放%。

[0083] 上述累積安定性數據證實載有  $\text{NH}_4^+$  之調和物可在商業上以貯存在低於或等於  $8^\circ\text{C}$  溫度下的經冷凍產物形式提供之結論。預期該新穎之最小化總降解物形成將獲得儲架壽命高達 2 年之商業用途可接受產品。降解量降低亦說明了產品效力維持得到改良。整體而言，該等藥品產品之改良的組合效果被視為加強調劑重現性、獲致更佳運輸及貯存順從性，從而形成較高品質之商業產品。

[0084] 應理解希望使用「詳細說明」部分而非「發明內容」與「摘要」部分闡述該等申請專利範圍。「發明內容」與「摘要」部分可說明本發明具體實例之一或更多個但非所有本發明人所企圖包括的範例具體實例，因此不希望以任何方式限制本發明與附錄之申請專利範圍。

[0085] 前文特定具體實例之描述充分揭露本發明之一般性質，使得其他人在不需要不當實驗且不違背本發明一般概念的情況下，可藉由應用本技術中之知識而容易修改及/或調整該等特定具體實例的各種應用。因此，根據本文所呈現之教示及導引，希望此等應用及修改在揭示具體實例之等效物的意義及範圍內。應瞭解本文之措辭及術語係供描述而非限制，因此本說明書之術語或措辭應由熟悉本技術之人士根據該等教示及導引予以闡述。

[0086] 本發明之廣度與範圍不應受到上述範例具體實例限制，而是僅根據下列申請專利範圍及其等效物界定。

## 申請專利範圍

1. 一種脂質體製劑，其包含具有凝膠相脂質雙層之脂質體及包封於該等脂質體內之活性劑的懸浮液；該脂質雙層包含：

(i) 一或多種磷脂，其係選自由以下所組成之群組：磷脂醯膽鹼、磷脂醯甘油、磷脂醯肌醇及磷脂醯乙醇胺；

(ii) 一或多種由親水性聚合物衍生之磷脂；及

(iii) 一或多種溶血性脂質(lysolipid)，其係選自由以下所組成之群組：單醯基磷脂醯膽鹼、單醯基磷脂醯甘油、單醯基磷脂醯肌醇及單醯基磷脂醯乙醇胺；

其中該等脂質雙層成分係以約 80-90:2-8:2-18 之莫耳比提供；且其中該懸浮液中之該等脂質體的大小介於約 50 與約 150 nm 之間；且

其中在低於或等於 8°C 下貯存 6 個月之後的雜質 A 之相對濃度低於 0.5%，且其中雜質 A 係在高效液相層析術(HPLC)中使用 C18 逆相管柱並使用乙酸/甲醇溶劑梯度沖提條件下具有約 1.4 之相對停留時間的尖峰。

2. 如申請專利範圍第 1 項之脂質體製劑，其中該活性劑為阿黴素(doxorubicin)。

3. 如申請專利範圍第 2 項之脂質體製劑，其中於低於或等於 8°C 下貯存 6 個月後該雜質 A 之相對濃度低於 0.2%。

4. 如申請專利範圍第 2 項之脂質體製劑，其中於低於或等於 8°C 下貯存約 1 年後該雜質 A 之相對濃度低於約

0.5%。

5. 如申請專利範圍第 2 項之脂質體製劑，其中於低於或等於 8°C 下貯存約 2 年後該雜質 A 之相對濃度低於約 0.75%。

6. 如申請專利範圍第 2 項之脂質體製劑，其中於低於或等於 8°C 下貯存 6 個月後 8-去乙酰基-8-羧基道諾黴素 (daunorubicin) 之相對濃度低於約 0.5%。

7. 如申請專利範圍第 2 項之脂質體製劑，其中於低於或等於 8°C 下貯存約 1 年後 8-去乙酰基-8-羧基道諾黴素之相對濃度低於約 0.5%。

8. 如申請專利範圍第 2 項之脂質體製劑，其中於低於或等於 8°C 下貯存約 2 年後 8-去乙酰基-8-羧基道諾黴素之相對濃度低於約 1.6%。

9. 如申請專利範圍第 2 項之脂質體製劑，其中在約低於或等於 8°C 之溫度下貯存約 6 個月後阿黴素的濃度為初始阿黴素濃度之大於約 99%，此係藉由 HPLC 使用 C18 尺寸排阻管柱 (size exclusion column) 並使用乙酸/甲醇溶劑梯度沖提條件測得。

10. 如申請專利範圍第 2 項之脂質體製劑，其中在約低於或等於 8°C 之溫度下貯存約 1 年後阿黴素的濃度為初始阿黴素濃度之大於約 97%，此係藉由 HPLC 使用 C18 逆相管柱並使用乙酸/甲醇溶劑梯度沖提條件測得。

11. 如申請專利範圍第 2 項之脂質體製劑，其中在約低於或等於 8°C 之溫度下貯存約 2 年後阿黴素的濃度為初

始阿黴素濃度之大於約 95%，此係藉由 HPLC 使用 C18 逆相管柱並使用乙酸/甲醇溶劑梯度沖提條件測得。

12. 如申請專利範圍第 2 項之脂質體製劑，其中在約低於或等於 8°C 之溫度下貯存約 6 個月後形成之總降解產物為低於 1%。

13. 如申請專利範圍第 2 項之脂質體製劑，其中在約低於或等於 8°C 之溫度下貯存約 1 年後形成之總降解產物為低於 1%。

14. 如申請專利範圍第 2 項之脂質體製劑，其中在約低於或等於 8°C 之溫度下貯存約 2 年後形成之總降解產物為低於 2.5%。

15. 如申請專利範圍第 2 項之脂質體製劑，其中該一或多種磷脂為二棕櫚醯基磷脂醯膽鹼(DPPC)、二硬脂醯基磷脂醯甘油(DSPG)或其組合；該溶血性脂質(lysolipid)為單棕櫚醯基磷脂醯膽鹼(MPPC)、單月桂基磷脂醯膽鹼(MLPC)、單肉豆蔻醯基磷脂醯膽鹼(MMPC)、單硬脂醯基磷脂醯膽鹼(MSPC)或其混合物；而該一或多種由親水性聚合物衍生之磷脂為 PEG 化脂質(PEGylated lipid)。

16. 如申請專利範圍第 2 項之脂質體製劑，其中該一或多種磷脂為二棕櫚醯基磷脂醯膽鹼，一或多種由親水性聚合物衍生之磷脂為 1,2-二硬脂醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[聚(乙二醇)2000]，而該一或多種溶血性脂質(lysolipid)為單硬脂醯基磷脂醯膽鹼。

17. 如申請專利範圍第 2 項之藥學組成物，其中該脂

質體另外包含成像劑或診斷劑。

18. 如申請專利範圍第 17 項之藥學組成物，其中該成像劑或診斷劑係包封在該脂質體中。

19. 如申請專利範圍第 18 項之藥學組成物，其中該成像劑或診斷劑是 X 射線造影劑、MRI 造影劑、超音波成像劑、螢光劑或放射性劑。

20. 一種將阿黴素載於溫度敏感性脂質體之方法，其包括：

(a) 製備具有凝膠相脂質雙層之脂質體且銨離子在該等脂質體內部的濃度大於其在脂質體外部的濃度之懸浮液，該脂質雙層包含：

(i) 一或多種磷脂，其係選自由以下所組成之群組：磷脂醯膽鹼、磷脂醯甘油、磷脂醯肌醇及磷脂醯乙醇胺；

(ii) 一或多種由親水性聚合物衍生之磷脂；及

(iii) 一或多種溶血性脂質(lysolipid)，其係選自由以下所組成之群組：單醯基磷脂醯膽鹼、單醯基磷脂醯甘油、單醯基磷脂醯肌醇及單醯基磷脂醯乙醇胺；

其中該脂質雙層成分係以約 80-90:2-8:2-18 之莫耳比提供；且

其中該製備包括將懸浮液中之脂質體的尺寸縮小至平均粒度介於約 50 與約 150 nm 之間；

(b) 將阿黴素溶液添加至該脂質體之懸浮液，其中該

阿黴素被吸入該等脂質體。

21. 如申請專利範圍第 20 項之方法，其中該溶液中  
之至少 95% 的阿黴素被吸入該等脂質體。

22. 如申請專利範圍第 20 項之方法，其中被吸入該  
等脂質體之阿黴素的濃度為約 50 mM。

23. 如申請專利範圍第 20 項之方法，其中被吸入該  
等脂質體之阿黴素的濃度為約 75 mM。

24. 如申請專利範圍第 20 項之方法，其中該製備包  
括於鉍鹽存在下製備該等脂質體。

25. 如申請專利範圍第 24 項之方法，其中該鉍鹽係  
以硫酸鉍溶液形式提供。

26. 如申請專利範圍第 25 項之方法，其中該硫酸鉍  
之濃度為約 100 mM 至約 300 mM。

27. 如申請專利範圍第 25 項之方法，其另外包括以  
單醣或雙醣溶液置換該等脂質體外之鉍離子。

28. 如申請專利範圍第 27 項之方法，其中該單醣或  
雙醣溶液之濃度為約 5-15%。

29. 如申請專利範圍第 28 項之方法，其中以單醣溶  
液置換該等脂質體外之鉍離子。

30. 如申請專利範圍第 29 項之方法，其中該單醣溶  
液為乳糖溶液。

31. 如申請專利範圍第 20 項之方法，其另外包括在  
步驟(b)之後添加組胺酸緩衝劑。

32. 如申請專利範圍第 31 項之方法，其中該組胺酸

緩衝劑之濃度為約 5 mM 至約 15 mM。

33. 如申請專利範圍第 20 項之方法，其中該一或多種磷脂具有兩個相同或不同之 C<sub>14</sub>-C<sub>20</sub> 醯基。

34. 如申請專利範圍第 33 項之方法，其中該一或多種磷脂為二棕櫚醯基磷脂醯膽鹼(DPPC)、二硬脂醯基磷脂醯甘油(DSPG)或其組合。

35. 如申請專利範圍第 20 項之方法，其中該溶血性脂質(lysolipid)為單棕櫚醯基磷脂醯膽鹼(MPPC)、單月桂基磷脂醯膽鹼(MLPC)、單肉豆蔻醯基磷脂醯膽鹼(MMPC)、單硬脂醯基磷脂醯膽鹼(MSPC)或其混合物。

36. 如申請專利範圍第 20 項之方法，其中該一或多種由親水性聚合物衍生之磷脂為 PEG 化脂質。

37. 如申請專利範圍第 36 項之方法，其中該 PEG 化脂質為 1,2-二硬脂醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[聚(乙二醇)2000]。

38. 如申請專利範圍第 20 項之方法，其中該一或多種磷脂為二棕櫚醯基磷脂醯膽鹼，一或多種由親水性聚合物衍生之磷脂為 1,2-二硬脂醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[聚(乙二醇)2000]，而該一或多種溶血性脂質(lysolipid)為單硬脂醯基磷脂醯膽鹼。

39. 一種由如申請專利範圍第 20 項之方法所製成之脂質體製劑。

圖式

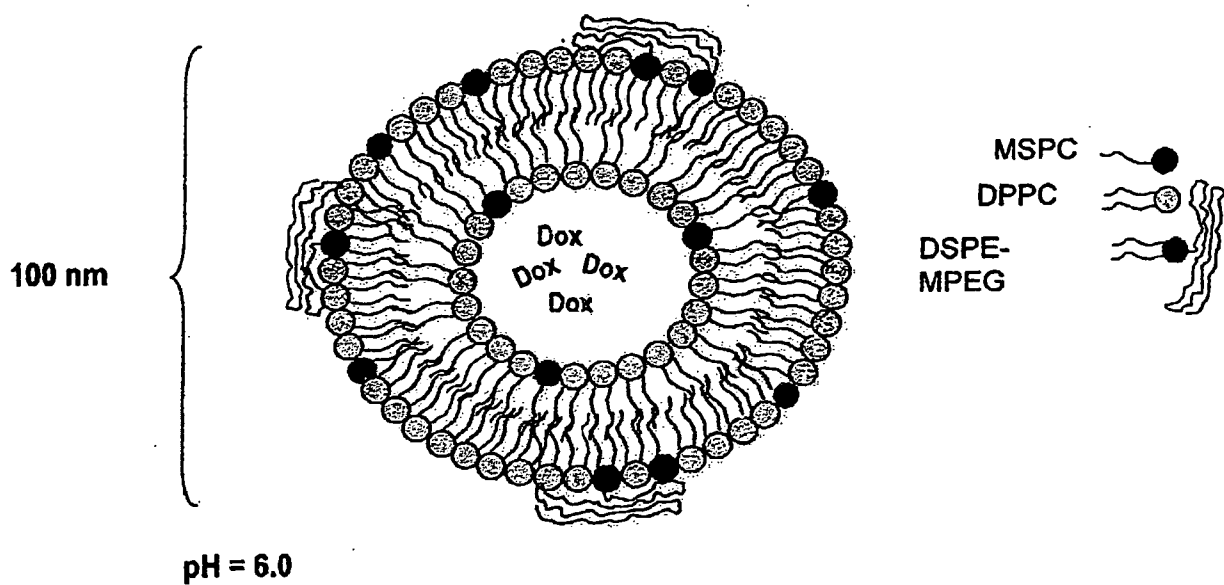


圖 1

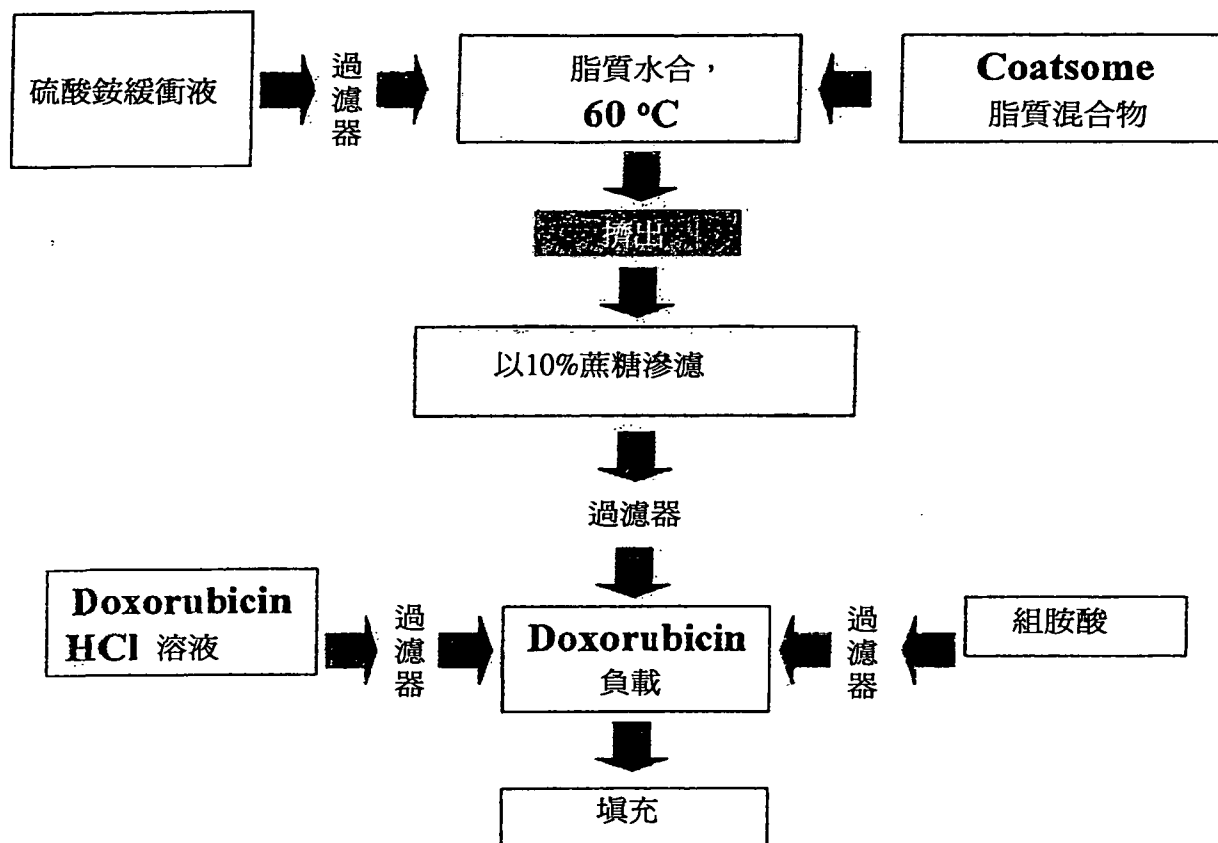
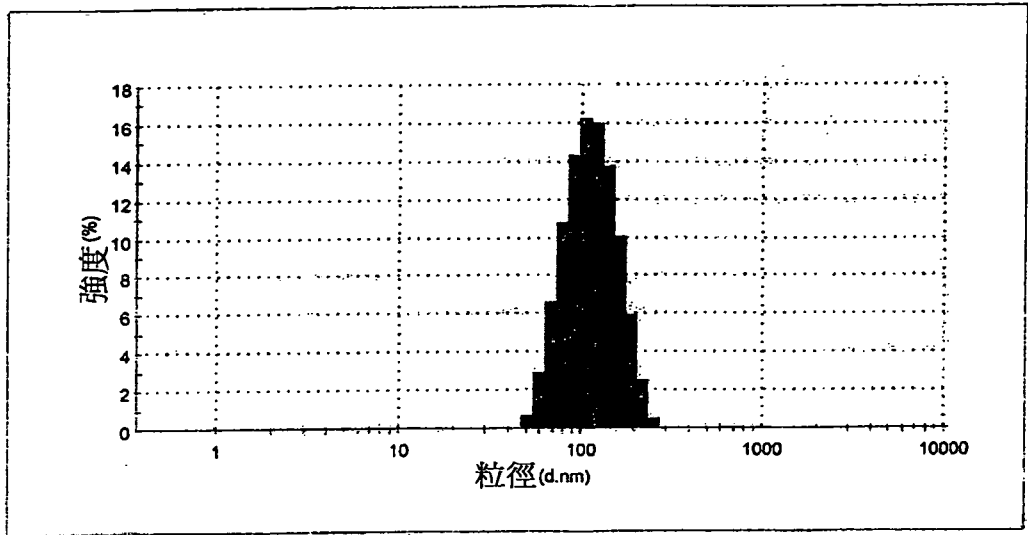


圖 2

pH負荷的調和物之粒度分布



載有  $\text{NH}_4^+$  的調和物之粒度分布

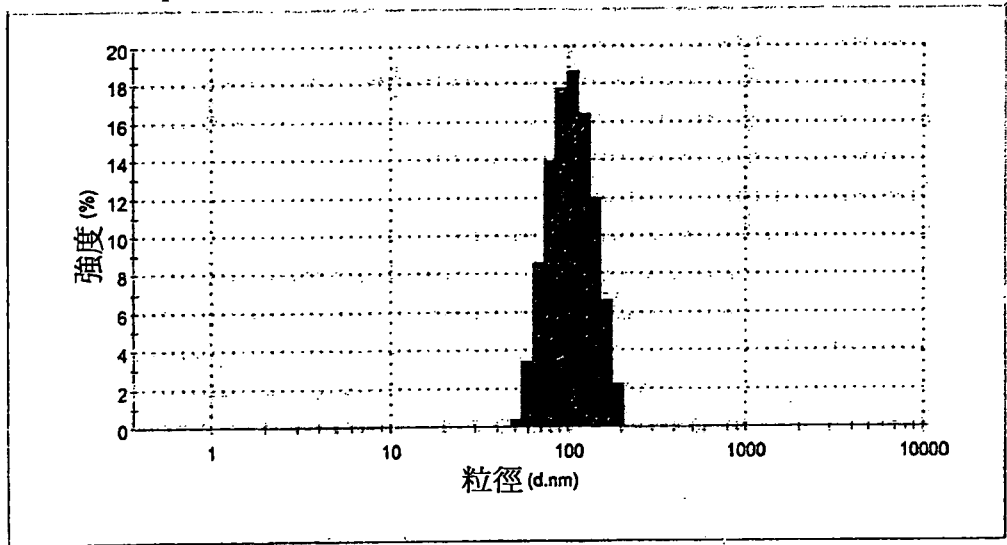


圖 3

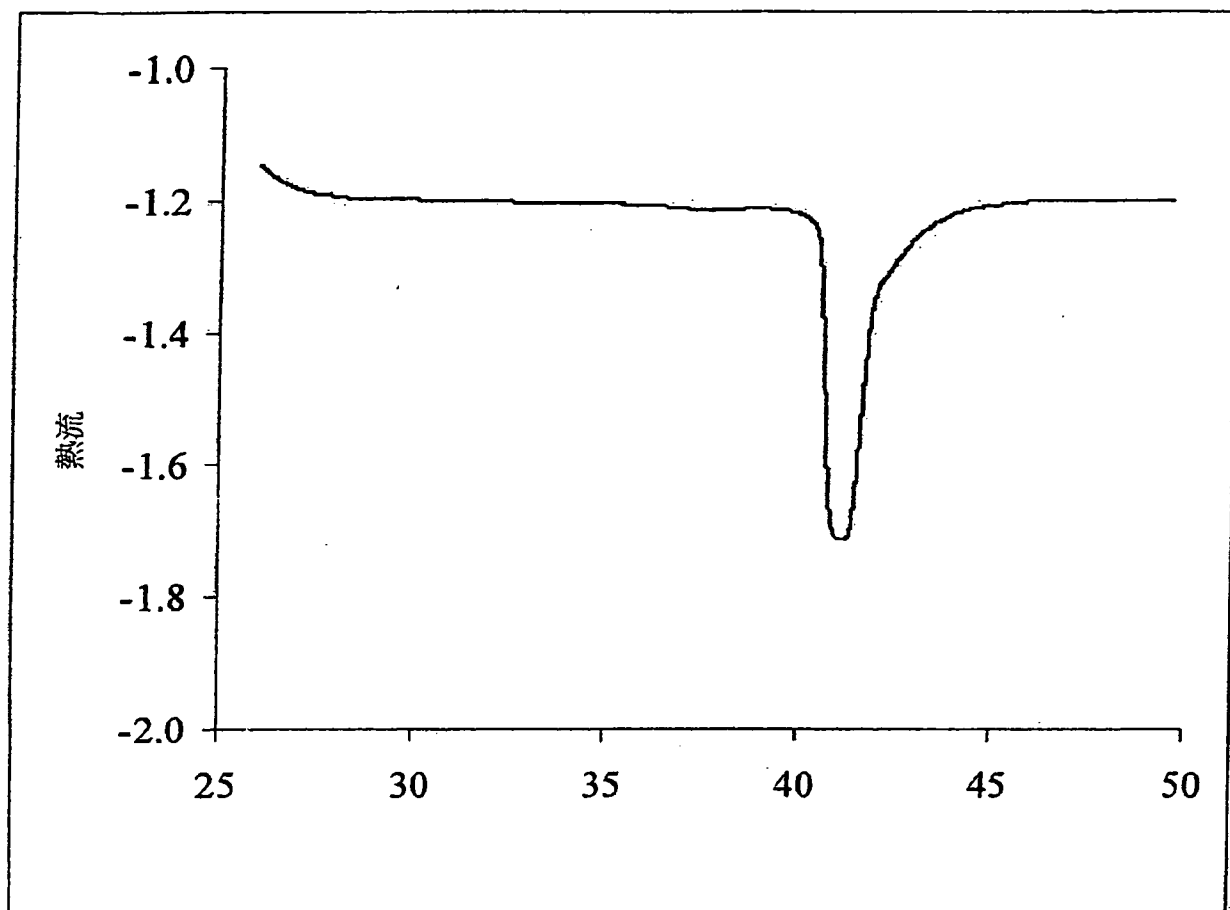


圖 4

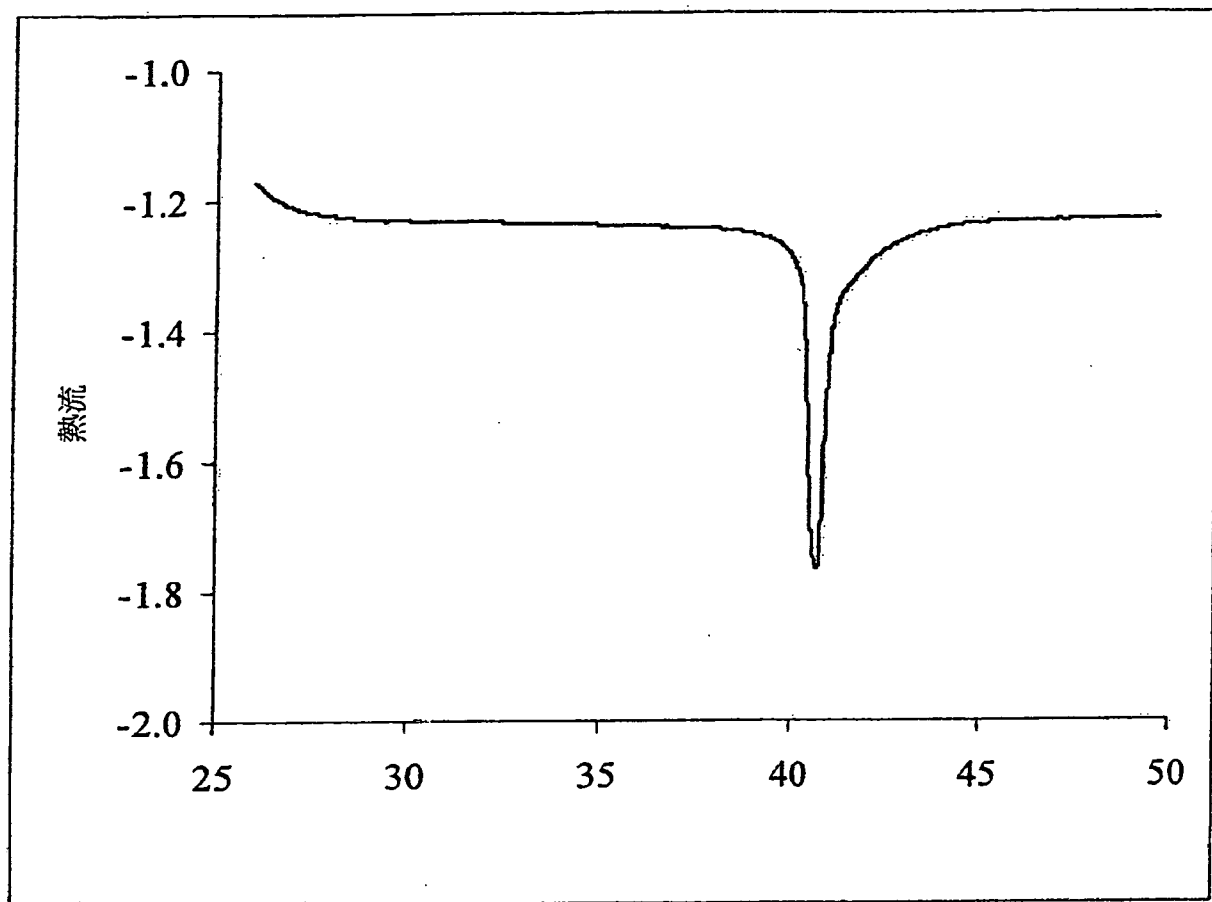


圖 5

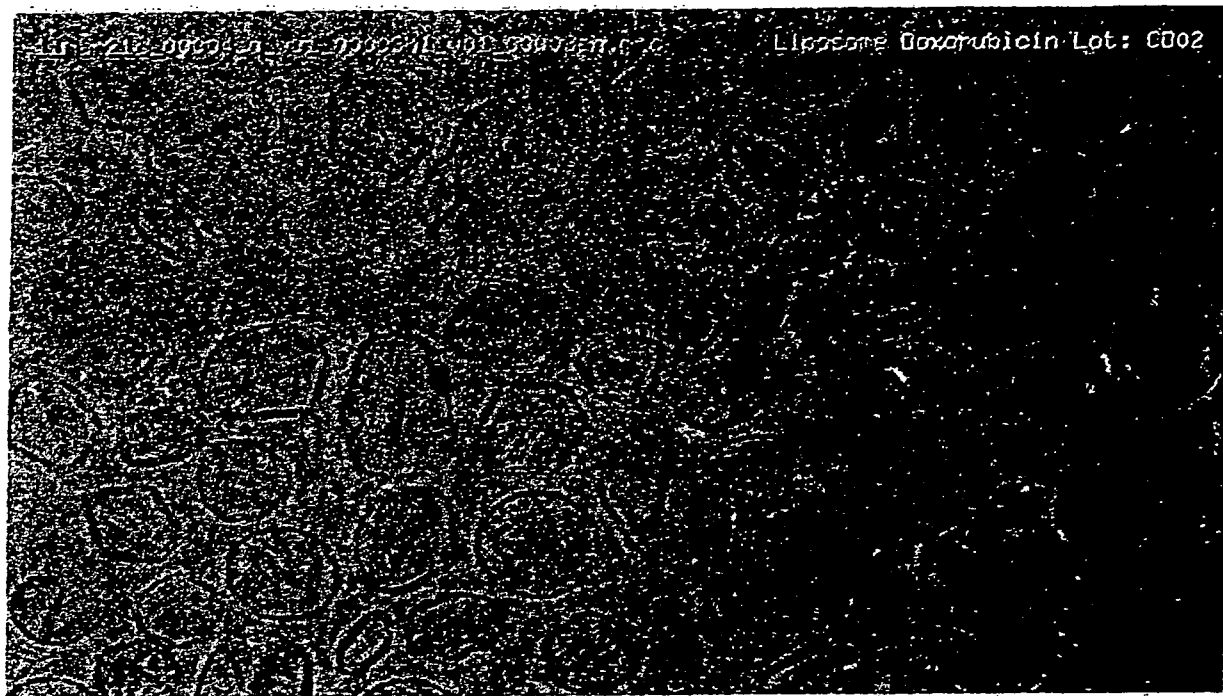


圖 6



圖 7

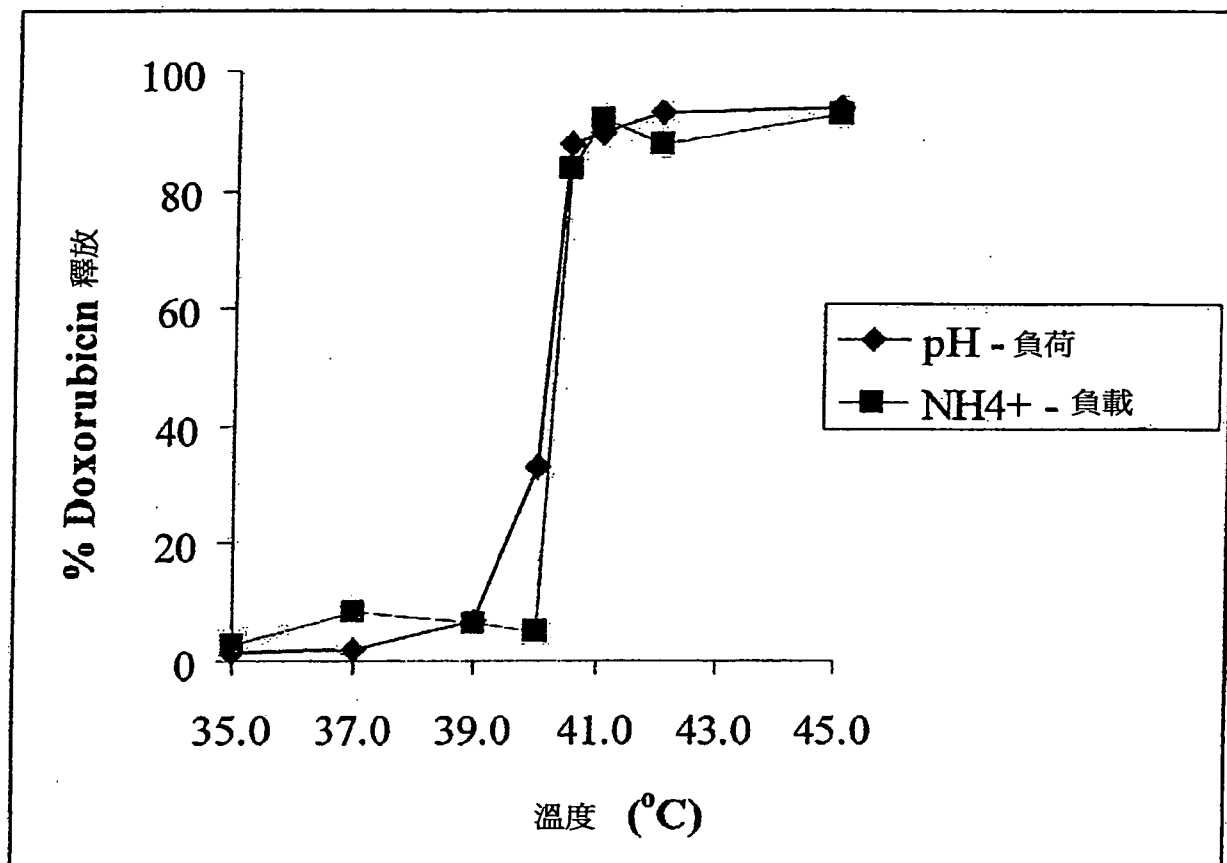
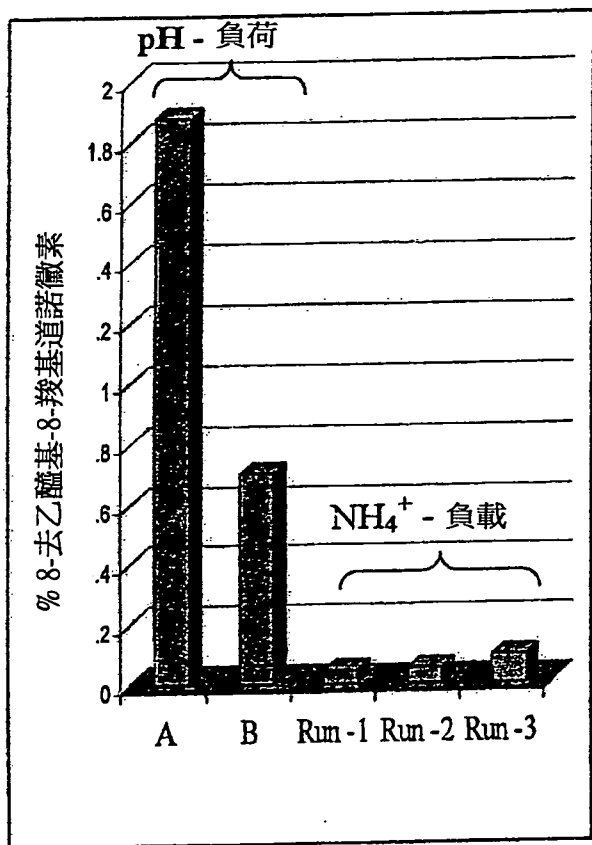
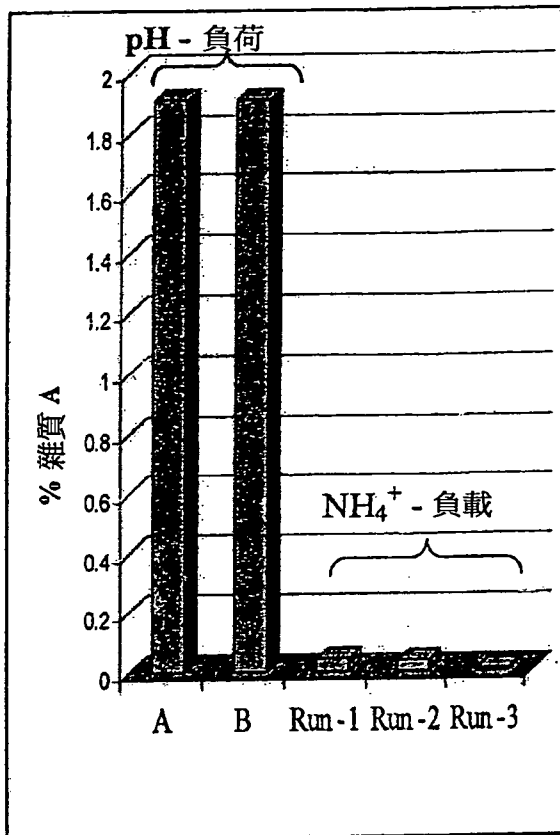


圖 8



9a



9b

圖 9

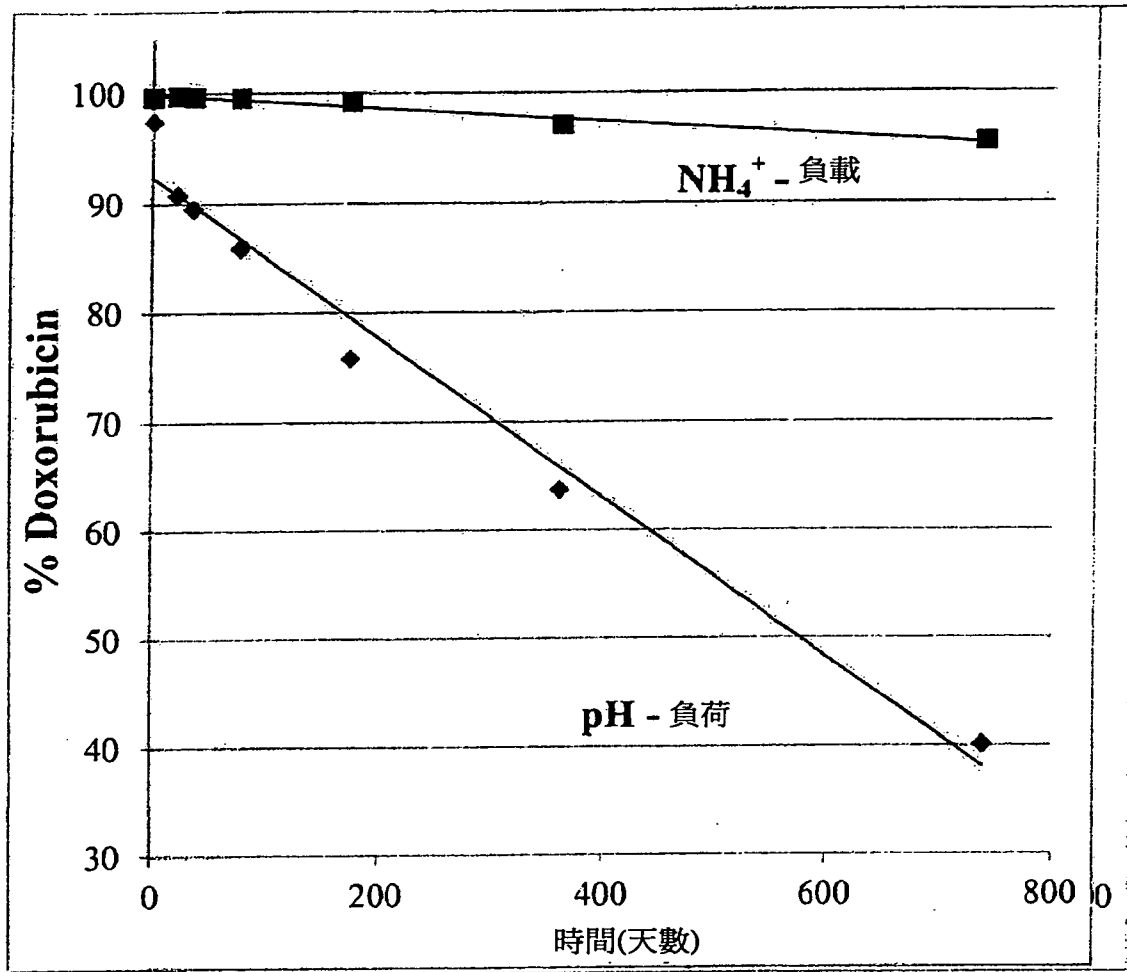


圖 10

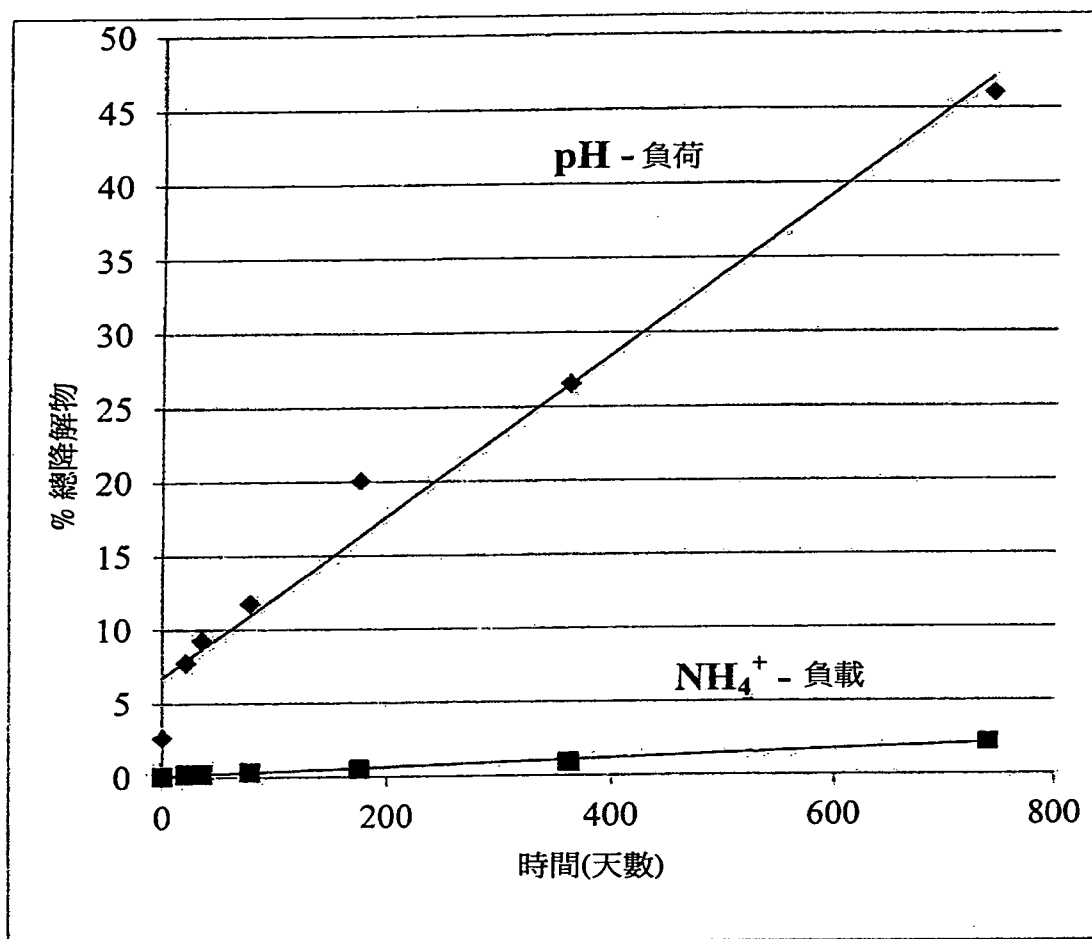


圖 11

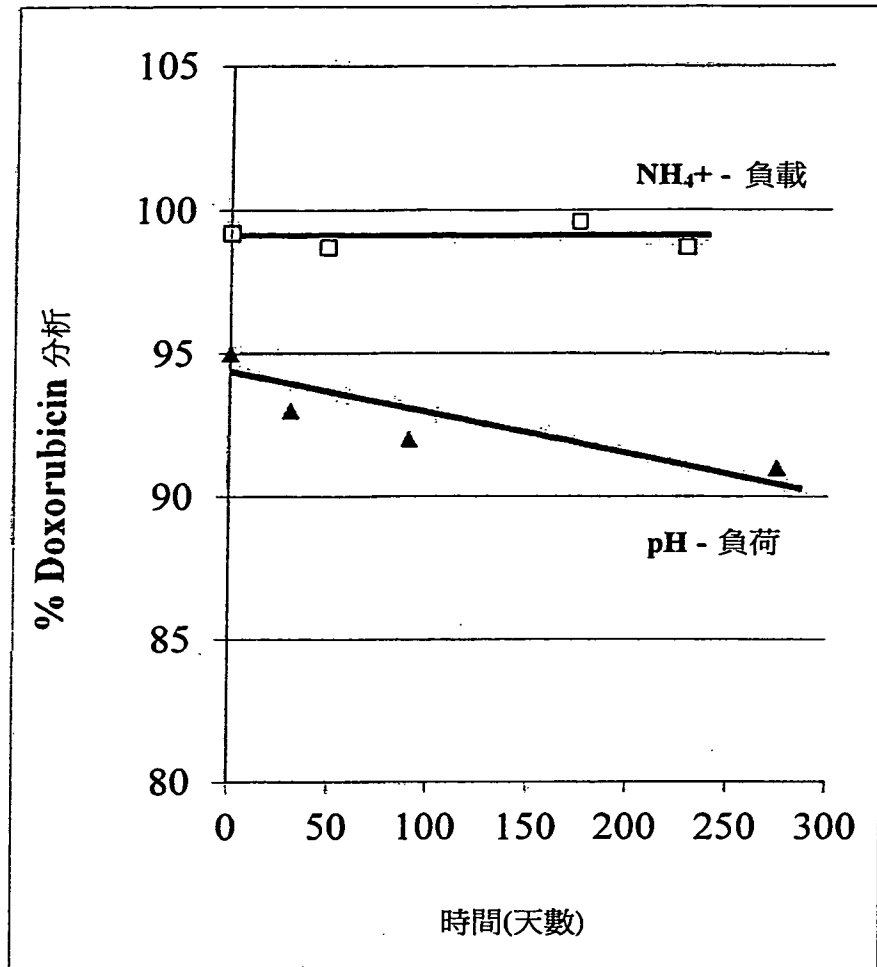


圖 12

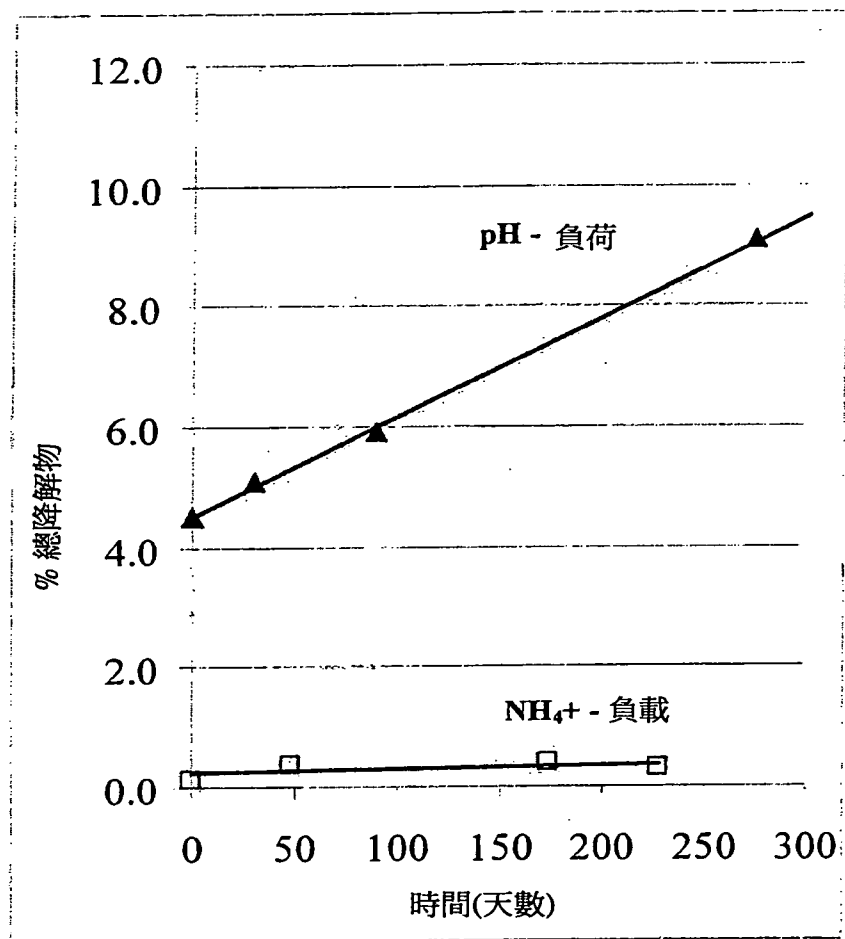


圖 13