

申請日期	91.10.3
案 號	91122851
類 別	A61K 9/00, 9/14, 9/127

A4
C4

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書

~~新 型~~

一、發明 新 名稱	中 文	負載金屬離子之微脂體
	英 文	LIPOSOME LOADING WITH METAL IONS
二、發明 創 作人	姓 名	1.保羅 塔狄 PAUL TARDI 2.雪倫 強史東 SHARON JOHNSTONE 3.莫瑞 威伯 MURRAY WEBB
	國 籍	1.2.3.均加拿大 CANADA
三、申請人	住、居所	1.加拿大雪瑞市桑戴爾廣場19081號 19081 SUNDALE COURT, SURREY, B.C. CANADA, V3S 7M6 2.加拿大溫哥華市第29街573號 573 EAST 29 TH AVENUE, VANCOUVER, B.C., CANADA V5V 2S1 3.加拿大北溫哥華市桑尼克瑞斯特街3640號 3640 SUNNYCREST DRIVE, NORTH VANCOUVER, B.C., CANADA V7R 3C6
	姓 名 (名稱)	加拿大商賽雷特科技公司 CELATOR TECHNOLOGIES, INC.
代 表 人 姓 名	國 籍	加拿大溫哥華市西百老匯604號200室 604 WEST BROADWAY, SUITE 200, VANCOUVER, B.C. V5Z 1G1, CANADA
	住、居所 (事務所)	瑪歇爾 貝里 MARCEL BALLY

裝
訂
線

申請日期	
案 號	
類 別	

A4
C4

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書		
一、發明 名稱	中 文	
	英 文	
二、發明 創作人	姓 名	4.瑪歇爾 貝里 MARCEL BALLY
	國 籍	5.席拉 亞伯拉漢 SHEELA ABRAHAM
三、申請人	住、居所	4.5.均加拿大 CANADA 4.加拿大波恩島市哈汀路1055號P-11室 P-11, 1055 HARDING ROAD, BOWEN ISLAND, B.C., CANADA V0N 1G0
	代 表 人 姓 名	5.加拿大溫哥華市西第10街1675號211室 #211-1675 WEST 10TH AVENUE, VANCOUVER, B.C., CANADA V6J 2A2
三、申請人	姓 名 (名稱)	
	國 籍	
	住、居所 (事務所)	

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：

國 (地區)	申請專利，申請日期：	案號：	， <input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無主張優先權
美國	2001年10月03日	60/326,671	<input checked="" type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無主張優先權
美國	2001年12月17日	60/341,529	<input checked="" type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無主張優先權
美國	2002年02月15日	60/356,759	<input checked="" type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無主張優先權
美國	2002年03月07日	60/362,074	<input checked="" type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無主張優先權
美國	2002年07月09日	60/394,273	<input checked="" type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無主張優先權

有關微生物已寄存於： 寄存日期： 寄存號碼：

裝
訂
線

五、發明說明 (5)

或錯合而增進。

本發明因此提供一種將藥劑負載入微脂體之方法，包括製備含包囊金屬之微脂體，該微脂體可存在於外部溶液中；及，於外部溶液中添加藥劑，使得該藥劑包囊於微脂體中，但假若包囊於該微脂體中之藥劑為多索魯濱，則該包囊之金屬非僅為錳。本發明此目的之一具體例中，該包囊金屬為過渡金屬。較好在微脂體內部及外部間僅有少許或無pH差異。更好，該pH將與生理體液之pH相當或約為中性pH。較好，該外部溶液將含較少，更好含實質上較少之金屬。較好，該外部溶液及微脂體表面在未錯合狀態中實質上不含金屬。此外，本發明提供一種組合物，係依據本發明方法所製備者，及提供適用於該方法之含包囊金屬之微脂體。

因此本發明亦提供一種將藥劑負載入微脂體之方法，包括下列步驟：

- i) 製備包括包囊之過渡金屬離子之微脂體，及
- ii) 於該微脂體之外部溶液中添加藥劑，使得該藥劑包囊於微脂體中。

該過渡金屬可選自Fe、Co、Ni、Cu、Zn、V、Ti、Cr、Rh、Ru、Mo及Pd之一或多種且可包囊於其中亦包囊有錳之微脂體中。

本發明提供一種依據此方法製備之組合物以及含有過渡金屬離子或一或兩種不同此離子而適用於此方法之微脂體。

五、發明說明 (6)

本發明亦提供一種負載微脂體之方法，係於本文所述之"金屬可相容"溶液中使用金屬離子而使金屬沉澱最少且使該離子維持於溶液中足以製備該微脂體之時間。本發明因此亦包含使藥劑負載入微脂體之方法，該方法包括下列步驟：

- i) 製備具有金屬離子及金屬可相容溶液之包囊介質之微脂體；
- ii) 於該微脂體之外部溶液中添加藥劑，使得該藥劑包囊於微脂體中。

此外，本發明提供一種依據此方法製備之組合物以及含有金屬離子及金屬相容溶液而適用於此方法之微脂體。

較好，藥物包囊後，本發明之微脂體或本發明方法中所用之微脂體具有實質上類似於微脂體內pH之微脂體外pH。更好該微脂體外及微脂體內pH約為pH 3.4至pH 9.0，更好約pH 6.0至pH 8.5，甚至更好約6.5至8.5之間，且最好在約pH 6.5至pH 7.5之間。

本發明亦基於發現製備成低膽固醇含量之微脂體在利用金屬為主之負載時展現意外之負載及保留性質。因此，本發明亦提供一種將藥劑包囊於微脂體中之方法，該微脂體可存在於外部溶液，該方法包括下列步驟：

- i) 製備微脂體，該微脂體包括：
 - (a) 一或多種泡囊形成脂質，但微脂體為低膽固醇者；
 - (b) 一種於金屬可相容溶液中之包囊金屬；
- ii) 於該外部溶液中添加活性劑，使得該藥劑包囊於微脂體

五、發明說明 (7)

中。

本發明此目的之一具體例中，該金屬可相容溶液包含過渡金屬。

本發明另一目的中，本發明提供一種將藥劑包囊入微脂體之方法，該方法包括下列步驟：

- i) 於外部溶液提供本發明之微脂體，其中該微脂體不具有轉膜pH梯度；
- ii) 於該外部溶液中添加藥劑，使得該藥劑包囊於微脂體中。

再者，本發明亦有關一種對哺乳類投與微脂體之方法及一種對罹患疾病或易罹患疾病(如癌症)之哺乳類治療之方法。尤其，本發明包括對個體投與微脂體之方法，包括投與包含本發明微脂體之醫藥組合物。治療或投與方法一般須了解為包括在足以舒緩該疾病或其病徵之劑量投與該醫藥組合物。一目的中，本發明基於發現使用包囊金屬負載有活性劑之微脂體展現不同於由錳所展現之負載及保留性質。

本發明提供一種微脂體組合物，包括含有內部溶液之微脂體，該內部溶液包括一或多種包囊過渡金屬離子及一或多種治療劑，但若該微脂體具有由神經磷脂及膽固醇所構成之脂質或若該一或多種治療劑僅為多索魯濱，則該一或多種包囊金屬非僅為錳。本發明又提供一種前述微脂體組合物，其中該微脂體在外部溶液中。

本發明又提供一種以藥劑負載微脂體之方法，其中該微

五、發明說明 (8)

脂體組合物為上述之微脂體，該方法包括：選擇一種藥劑，該藥劑當存在於組合物外部溶液中可使微脂體之膜交聯但當與內部溶液中一或多種金屬離子複合時無法使該膜交聯；將經選擇之藥劑添加至組合物之外部溶液中；及維持該藥劑在該外部溶液中足以負載該藥劑之時間。

本發明又有關一種製備、選擇或設計微脂體之方法，包括選擇在微脂體中供包囊之金屬離子以達到所需之包囊藥劑維持於該微脂體中。因此，提供、製備或選擇對本發明所選擇藥劑具有較佳負載或保留性質之微脂體組合物之方法可包括：

- a) 提供上述之第一微脂體組合物；
- b) 將所選擇之藥劑添加於(a)之組合物之外部溶液中足以提供藥劑負載入組合物之微脂體之時間；
- c) 提供上述之第二微脂體組合物；
- d) 將所選擇之藥劑添加於(c)之組合物之外部溶液中足以提供藥劑負載入組合物之微脂體之時間；
- e) 比較(b)所得之組合物微脂體與(d)所得組合物微脂體之負載藥劑量或保留藥劑量；及
- f) 選擇、提供或製備具有較佳負載或保留之(b)或(d)之微脂體組合物，

其中(a)及(c)之微脂體組合物之下列一或多個項目不同：

- (i) 存在於內部溶液之金屬離子；
- (ii) 微脂體組合物之微脂體中之脂質；
- (iii) 足以提供藥劑負載之時間及/或溫度條件；及
- (iv) 內部溶液中存在之金屬離子濃度。

五、發明說明 (9)

圖式簡單說明

圖 1A：顯示使用以三乙醇胺(TEA)緩衝至 pH 7.4 之 100 mM 葡糖酸銅(II)作為內部介質及以 300 mM 葡萄糖、20 mM HEPES、30 mM EDTA (SHE), pH 7.4 作為外部介質之艾諾汰肯(irinotecan)負載入 DSPC/DSPG (80 : 20 莫耳比)微脂體與時間函數之作圖。負載係在 50°C 以藥物對脂質莫耳比為 0.1 : 1 之下進行。

圖 1B：顯示使用以 TEA 調整至 pH 7.4 之 150 mM CuSO₄、20 mM 組胺酸作為內部介質及以 SHE, pH 7.4 作為外部介質之道諾魯濱(daunorubicin)負載入 DSPC/DSPG (90 : 10 莫耳比)微脂體與時間函數之作圖。負載係在 60°C 以藥物對脂質重量比為 0.1 : 1 之下進行。

圖 2：顯示使用以 TEA 調整至 pH 7.4 之 100 mM 葡糖酸銅(II)作為內部介質及以 SHE, pH 7.4 作為外部介質之艾諾汰肯(irinotecan)負載入 DPPC/Chol(55 : 45 莫耳比)微脂體與時間函數之作圖。負載係在 50°C 以藥物對脂質重量比為 0.1 : 1 之下進行。

圖 3：顯示使用 300 mM MnSO₄、20 mM 咪唑, pH 7.4 作為內部介質及以 SHE, pH 7.4 作為外部介質之艾比魯濱(epirubicin)負載入 DSPC/DSPE-PEG2000 (95 : 5 莫耳比)微脂體與時間函數之作圖。負載係在 60°C 以藥物對脂質重量比為約 0.2 : 1 之下進行。

圖 4A：顯示使用 100 mM 葡糖酸銅(II)、220 mM TEA, pH 7.4 作為內部介質及以 300 mM 蔗糖、20 mM HEPES, pH

五、發明說明 (13)

負載係在藥物對脂質重量比0.1：1之下進行。

圖13A：顯示使用150 mM $MnCl_2$ 作為內部介質及HBS, pH 7.4作為外部溶液之道諾魯濱負載入含順氣氬鉑之DSPC/DSPE-PEG2000 (95：5莫耳比)微脂體與時間函數之作圖。順氣氬鉑係被動地包囊及道諾魯濱負載係在60°C以藥物對脂質重量比0.1：1之下進行。

圖13B：顯示使用150 mM $CuCl_2$ 作為內部介質及HBS, pH 7.4作為外部溶液之道諾魯濱負載入含順氣氬鉑之DMPC/Chol (55：45莫耳比)微脂體與時間函數之作圖。順氣氬鉑係被動地包囊及道諾魯濱負載係在60°C以藥物對脂質重量比0.1：1之下進行。

圖13C：顯示使用300 mM $NiSO_4$ 作為內部介質及300 mM 蔗糖、20 mM HEPES, pH 7.4作為外部溶液之道諾魯濱負載入含碳氣氬鉑之DPPC/Chol (55：45莫耳比)微脂體與時間函數之作圖。碳氣氬鉑係被動地包囊及道諾魯濱負載係在37°C以藥物對脂質重量比0.1：1之下進行。

圖13D：顯示使用75 mM $CuCl_2$ +150 mM $CuSO_4$ 作為內部介質及SHE, pH 7.4作為外部溶液之艾諾汰肯負載入含順氣氬鉑之DPPC/Chol (55：45莫耳比)微脂體與時間函數之作圖。順氣氬鉑係被動地包囊及艾諾汰肯負載係在60°C以藥物對脂質重量比0.1：1之下進行。

圖14：顯示文克斯汀(vincristine)在50°C負載至預先負載有多索魯濱之DSPC/Chol(55：45莫耳比)微脂體期間，在各種時間點之文克斯汀/脂質及多索魯濱/脂質比例之作

五、發明說明 (15)

反應於包囊 CuSO_4 之作圖。微脂體之外部溶液負載前為交換至食鹽水且進一步交換至 300 mM 蔗糖、20 mM HEPES, pH 7.4(無外加 EDTA) 之緩衝液。

圖 19：顯示在外部溶液緩衝液交換至 300 mM 蔗糖，20 mM HEPES，30 mM EDTA, pH 7.4 後，艾諾汰肯負載入 DSPC : DSPG (80 : 20 莫耳%) 微脂體反應於包囊葡萄糖酸銅之作圖。負載係在 37°C (實心圓)、50°C (空心圓) 及 60°C (倒三角形) 保溫進行。

圖 20：顯示在微脂體製劑通過以 300 mM 蔗糖、20 mM HEPES, pH 7.4 平衡之 Chelex-100TM 管柱後，艾諾汰肯負載入 DSPC : DSPG (80 : 20 莫耳%) 微脂體反應於包囊葡萄糖酸銅之作圖。艾諾汰肯負載係在 37°C (實心圓)、50°C (空心圓) 及 60°C (倒三角形) 保溫進行。

圖 21：顯示以道諾魯濱及碳氣氬鉑共同負載之 DSPC : DSPG (80 : 20 莫耳%)、DSPC : SM : DSPG (75 : 5 : 20 莫耳%) 及 DSPC : SM : DSPG (70 : 10 : 20 莫耳%) 微脂體之血漿脂質量作圖，分別以實心圓、空心圓及倒三角形表示。碳氣氬鉑被動地被捕捉及道諾魯濱反應於包囊 CuSO_4 主動地負載。

圖 22：顯示以道諾魯濱及碳氣氬鉑共同負載之 DSPC : DSPG (80 : 20 莫耳%)、DSPC : SM : DSPG (75 : 5 : 20 莫耳%) 及 DSPC : SM : DSPG (70 : 10 : 20 莫耳%) 微脂體之血漿道諾魯濱量作圖，分別以實心圓、空心圓及倒三角形表示。碳氣氬鉑被動地被捕捉及道諾魯濱反應於包囊 CuSO_4

五、發明說明 (16)

主動地負載。

圖 23：顯示以道諾魯濱及碳氣氫鉑共同負載之 DSPC：DSPG(80：20 莫耳%)、DSPC：SM：DSPG(75：5：20 莫耳%)及 DSPC：SM：DSPG(70：10：20 莫耳%) 微脂體之血漿碳氣氫鉑量作圖，分別以實心圓、空心圓及倒三角形表示。碳氣氫鉑被動地被捕捉及道諾魯濱反應於包囊 CuSO_4 主動地負載。

發明詳細說明

微脂體製備

本文所用之"微脂體"代表由包囊含水相之一或多個同心排列之脂質雙層所構成之泡囊。此泡囊之形成需要存在有"形成泡囊之脂質"，其為可形成或併入雙層結構之兩性脂質。後者名詞包含可藉本身或當與其他脂質組合時可形成雙層之脂質。兩性脂質藉其疏水性基團與膜雙層之內部疏水性區域接觸及其極性端朝相膜之外部極性表面定向而併入脂質雙層。親水性因存在有如羥基、磷醯基、羧基、硫醯基、胺基或氫硫基等官能基而產生。疏水性因存在有長鏈脂族烴基而產生。

需了解本發明操作上由本技藝者判斷可使用任何適當形成泡囊之脂質。此包含磷脂質如磷脂醯基膽鹼(PC)、磷脂醯基甘油(PG)、磷脂醯基肌醇(PI)、磷脂酸(PA)、磷脂醯基乙醇胺(PE)及磷脂醯基絲胺酸(PS)；糖脂類；及神經鞘脂類如神經鞘氫醇、神經醯胺、神經磷脂及糖神經鞘脂類(如腦苷脂類及神經節苷脂)。較佳之磷脂質包括彼此獨立

裝
訂
線

五、發明說明 (17)

選擇且具有改變之不飽和度之兩個5至24個碳原子之醯基鏈。

依據本發明製備之微脂體可藉用以製備泡囊之習知技術產生。該等技術包括醚注射法(Deamer等人, Acad. Sci. (1978) 308 : 250)、界面活性劑法(Brunner等人, Biochim. Biophys. Acta(1976) 455 : 322)、冷凍-解凍法(Pick等人, Arch. Biochim. Biophys. (1981) 212 : 186)、逆相蒸發法(Szoka等人, Biochim. Biophys. Acta. (1980) 601 : 559-71)、超音波處理法(Huang等人, Biochemistry(1969) 8 : 344)、乙醇注射法(Kremer等人, Biochemistry(1977) 16 : 3932)、擠出法(Hope等人, Biochim. Biophys. Acta(1985) 812 : 55-65)及法式押入法(Barenholz等人., FEBS Lett. (1979) 99 : 210)。所有上述方法為形成微脂體泡囊之基本分類且該等方法可組合使用。較好, 小的單層泡囊(SUVs)藉超音波處理法、乙醇注射法及法式押入法製備。較好, 多層泡囊(MLVs)係藉逆相蒸發法或藉簡單添加水溶液至脂質膜中接著藉機械攪動分散(Bangham等人, 分子生物學期刊(1965) 13 : 238-252)而製備。

可用以操作本發明之特別適宜微脂體製劑為大的單層泡囊(LUVs)。LUVs可藉注射法、界面活性劑法、冷凍-解凍法、逆相蒸發法、法式押入法或擠出法製備。較好, LUVs係依據擠出法製備。擠出法包含先於氯仿中混合脂質獲得所需莫耳比。於脂質製劑中視情況添加脂質標記物。所得混合物在氮氣流中乾燥及置入真空泵中直至溶劑實質上移

五、發明說明 (18)

除。樣品接著於適當水溶液中水合，該水溶液可含有治療劑之混合物。該混合物接著通過擠出裝置(如加拿大 Vancouver 之北方脂質公司之裝置)獲得界定大小之微脂體。微脂體平均大小可藉各種方法測定，包含使用例如 NICOMPTM 370 次微米粒徑儀在 632.8 奈米之波長進行表面彈性光散射。

本發明有些目的中，微脂體製備為"低膽固醇"。此微脂體含有"實質上無膽固醇"或"本質上無膽固醇"。"實質上無膽固醇"使膽固醇存在量為不足以明顯改變微脂體之相轉移特徵(一般少於 20 莫耳%膽固醇)。20 莫耳%或以上之膽固醇可使發生相轉移之溫度範圍變寬，在較高膽固醇量時相轉移消失(如大於 30 莫耳%)。較好，實質上不含膽固醇之微脂體將含有約 15% 或以下且更好約 10 或以下莫耳%之膽固醇。"本質上無膽固醇"意指約 5 或以下莫耳%，較好約 2 或以下莫耳%且甚至更好約 1 或以下莫耳%之膽固醇。最好，當製備"低膽固醇"微脂體時不存在或不添加膽固醇。

本發明之微脂體可包括親水性聚合物-脂質共軛物如聚烷醚-脂質共軛物。使親水性聚合物如聚烷醚接枝至微脂體表面上已用以"立體安定"微脂體，因此增加微脂體之循環壽命。此導致增加之血液安定性及增加之循環時間、減少吸入於健康組織、及增加遞送至疾病位置如實心腫瘤(參見 US 專利 5013556 及 5593622；及 Patel 等人, Crit Rev Ther Drug Carrier Syst(1992) 9:39-90)。典型上，聚合物共軛至微脂體之脂質成分。"親水性聚合物-脂質共軛物"一詞代表在其

五、發明說明 (19)

極性端基團共價鍵結至親水性聚合物之形成泡囊之脂質，且典型上係由在極性端基團聚有反應性官能基之脂質所製成，以附接該聚合物。適當的反應性官能基為例如胺基、羥基、羧基或甲醯基。脂質可為本技藝中描述用於此共軛物之任何脂質。較好，脂質為具有兩個醯基鏈之磷脂質，該醯基鏈長度約6至約24個碳原子且具改變之不飽和度。最好，共軛物中之脂質為PE，較好成二硬脂醯態。該聚合物為生物可相容聚合物，其特徵為其水中溶解度可使聚合物鏈以可產生微脂體之均勻表面覆蓋之充分撓性而有效自微脂體表面延伸。較好，此聚合物為聚烷醚，包含聚乙二醇(PEG)、聚伸甲基二醇、聚羥基丙二醇、聚丙二醇、聚乳酸、聚乙醇酸、聚丙烯酸及其共聚物，以及述於US專利5,013,556及5,395,619者。較好，此聚合物具有分子量約350至5000道爾吞之間。該共軛物可製備成包含可釋出之脂質-聚合物鍵聯基如肽、酯或二硫醚鍵聯基。該共軛物亦可包含標的配位體。共軛物之混合物可併入微脂體中用於本發明。

下述之負電荷脂質可併入金屬包囊之微脂體調配物中以增加載體之循環壽命。該等脂質可用以替代親水性聚合物脂質共軛物作為表面安定劑。本發明具體例可使用含此負電荷脂質之無膽固醇微脂體以避免凝集，因而增加載體之血液停留時間。此具體例理想上經負載接著自微脂體表面及微脂體外部溶液激烈移除金屬離子。

"負電荷脂質"一詞代表在生理pH下具有一或多個負電荷

五、發明說明 (20)

之形成泡囊之脂質，包含磷脂質及神經鞘脂類。負電荷脂質可以5至95莫耳%，更好10至50莫耳%且最好15至30莫耳%併入本發明微脂體中。

較好，用於本發明之在生理pH為負電荷之脂質將包括"非兩性離子之基團"，其代表在生理pH下不具有相反電荷之基團。此脂質賦予微脂體在體內用途時所需之循環性質。脂質上之淨負電荷可僅源自脂質上負電荷之存在(如源自磷酸酯基)或脂質上不具有一個以上電荷時，額外之負電荷可能由於存在有負電荷之非兩性離子基團之故。但較好，在非兩性離子基團為中性基之例中，負電荷僅源自脂質成分。較好，該非兩性離子包括2至6個碳原子。

適當之非兩性離子基團含有可賦予端基親水性質之拉電子官能基。此官能基可選自由醇類、酸類、酮類、酯類、醚類、醯胺類及醛類所成之組群。可使用下式之非兩性離子基團：

醇類

P-R或POR或 $PO(CH_2)_2NHR$ 其中R為 $-(CH_2)_v(CH)_w(C)_x(OH)_y(CH_3)_z$ 其中碳數 $(v+w+x+z)$ 為2-6，最好3-5，其中OH基數為1-3 $(y=1-3)$ ，如DPPG

酮類

P-R或POR或 $PO(CH_2)_2NHR$ 其中R為 $-(CH_2)_v(C)_x(CO)_y(CH_3)_z$ 其中碳數 $(v+x+y+z)$ 為2-6，最好3-5，其中酮基數為1-2 $(y=1-2)$ ，如N-丁醯基-DPPE、N-戊醯基-DPPE

羧酸類

五、發明說明 (21)

P-R 或 POR 或 $PO(CH_2)_2NHR$ 其中 R 為 $-(CH_2)_u(CH)_v(C)_x(COOH)_y(CH_3)_z$ 其中碳數 $(u+v+x+y+z)$ 為 2-6，最好 3-5，其中羧酸基數為 $1-2(y=1-2)$

酯類

P-R 或 POR 或 $PO(CH_2)_2NHR$ 其中 R 為 $-(CH_2)_v(C)_x(COO)_y(CH_3)_z$ 其中碳數 $(v+x+y+z)$ 為 2-6，最好 3-5，其中酯基數為 $1-2(y=1-2)$

醚類

P-R 或 POR 或 $PO(CH_2)_2NHR$ 其中 R 為 $-(CH_2)_v(C)_x(O)_y(CH_3)_z$ 其中碳數 $(v+x+z)$ 為 2-6，最好 3-5，其中醚基數為 $1-2(y=1-2)$

胺類

一級胺：

P-R 或 POR 或 $PO(CH_2)_2NHR$ 其中 R 為 $-(CH_2)_v(C)_w(CH)_x(NH_3)_y(CH_3)_z$

- 其中碳數 $(v+w+x+z)$ 為 2-6，最好 3-5

- 其中胺基數為 $1-2(y=1-2)$

二級胺：

P-R 或 POR 或 $PO(CH_2)_2NHR$ 其中 R 為 $-(CH_2)_v(C)_w(CH)_x(NH_2)_y(CH_3)_z$

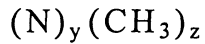
- 其中碳數 $(v+w+x+z)$ 為 2-6，最好 3-5

- 其中胺基數為 $1-2(y=1-2)$

三級胺：

P-R 或 POR 或 $PO(CH_2)_2NHR$ 其中 R 為 $-(CH_2)_v(CH)_w(C)_x$

五、發明說明 (22)

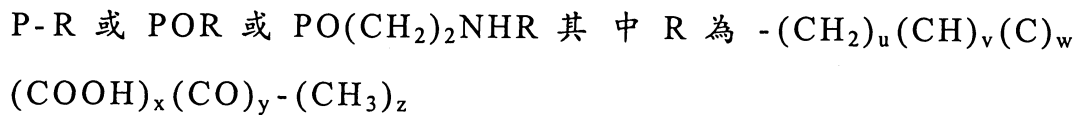


- 其中碳數 $(v+w+x+z)$ 為 2-6，最好 3-5

- 其中胺基數為 1 $(y=1)$

該非兩性離子基團亦可包括官能基之組合；例如下式化合物：

羧酸類及酮類

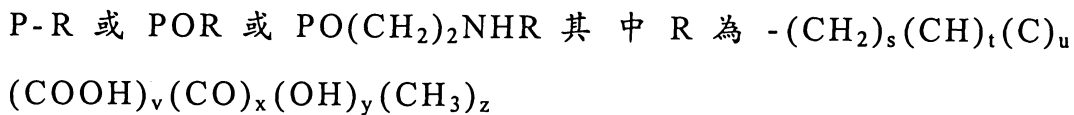


其中碳數 $(u+v+w+x+y+z)$ 為 2-6，最好 3-5

其中羧酸基數為 1-2 $(x=1-2)$

其中酮基數為 1-2 $(y=1-2)$

如 N-琥珀醯基-DPPE、N-戊二醯基-DPPE



羧酸類、酮類及醇類

其中碳數 $(s+t+u+v+x+z)$ 為 2-6，最好 3-5

其中羧酸基數為 1-2 $(v=1-2)$

其中酮基數為 1-2 $(x=1-2)$

其中羥基數為 1-2 $(y=1-2)$

如 N-酒石醯基-DPPE

環結構

P-R 或 POR 或 $PO(CH_2)_2NHR$ 其中 R 為分別含 1-5 或 1-6 個醇(環肌醇)之 5 或 6 員環(如磷脂醯基肌醇)。

碳水化物

五、發明說明 (23)

可用以操作本發明之單糖包含阿拉伯糖、果糖、半乳糖、葡萄糖、來蘇糖、核糖及木質糖。雙糖類包含蔗糖、乳糖、特里哈糖、纖維二糖、龍膽二糖及麥芽糖。就延長微脂體循環壽命目的而言，以不與細胞受體結合之單糖及雙糖較佳(如甘露糖)。

在非兩性離子基團為中性之例中，端基係由在生理pH下為中性之基所構成，包含醇類、酮類、酯類、醚類、醯胺類及醛類。

本發明較佳具體例中，非兩性離子基團為短鏈醇，較佳之醇含兩個或多個羥基。該醇可為直鏈多元醇，其實例為甘油。該由可經由羥基之一與脂質之磷酸酯基鍵聯而構成磷神經鞘磷脂類或磷脂質之端基。最好，甘油經由甘油分子之終端羥基附接至磷酸酯，所得分子稱為磷脂醯基甘油(PG)。較好磷脂醯基甘油之脂肪酸鏈係彼此獨立選自由下列所成之組群：己醯基(6:0)、辛醯基(8:0)、癸醯基(10:0)、肉桂醯基(12:0)、荳蔻醯基(14:0)、棕櫚醯基(16:0)、硬脂醯基(18:0)、花生醯基(20:0)、山榆醯基(22:0)、二十四碳醯基(24:0)及植烷醯基，包含順式或反式組態之該等脂肪酸鏈之不飽和變化體，如油醯基(18:1)、亞油醯基(18:2)、花生四烯醯基(20:4)及二十二碳六醯基(22:6)。以具有兩個含14至18碳原子之醯基之磷脂質較佳。

本發明另一較佳具體例中，該非兩性離子基團為環結構。最好該環結構為環肌醇，其為在各三或多個環原子上

五、發明說明 (24)

含有一個羥基之環烷。此化合物可以各種基衍生而賦予分子所需之水溶解性。較好該環肌醇為經由磷酸酯基附接至磷脂質之肌醇，所得化合物為磷脂醯基肌醇(PI)。較好，磷脂醯基肌醇之脂肪酸鏈係彼此獨立選自由下列組成之基：己醯基(6:0)、辛醯基(8:0)、癸醯基(10:0)、肉桂醯基(12:0)、荳蔻醯基(14:0)、棕櫚醯基(16:0)、硬脂醯基(18:0)、花生醯基(20:0)、山榆醯基(22:0)、二十四碳醯基(24:0)及植烷醯基，包含順式或反式組態之該等脂肪酸鏈之不飽和變化體，如油醯基(18:1)、亞油醯基(18:2)、花生四烯醯基(20:4)及二十二碳六醯基(22:6)。以具有兩個含14至18碳原子之醯基之磷脂醯基肌醇較佳。

負電荷脂質可得自天然來源或可經化學合成。使化合物共價附接至脂質端基之方法為本技藝已知，且一般包含使脂質端基之終端部分上之官能基與欲附接之基團上之官能基反應。化學附接親水性基團之適當脂質包含具有末端為反應性官能基如胺或羧酸之極性端基之脂質。特別適宜之脂質實例為磷脂醯基乙醇胺，因為其含有反應性胺基之故。製備磷脂醯基乙醇胺衍生物之方法述於Ahl, P., 等人(1997) *Biochimica et Biophysica Acta* 1329: 370-382，其併於本文供參考。天然來源所得之負電荷脂質實例包含分別得自蛋及植物來源之磷脂醯基甘油及磷脂醯基肌醇。

微脂體中活性劑及金屬之包囊作用

本發明提供一種將藥劑負載至包括有包囊過渡金屬之微

五、發明說明 (25)

脂體之方法。說明書中，"藥劑"代表可依據本發明包囊入微脂體之物質。較好，此藥劑為可於體外或體內對標的展現效果之"治療劑"。適宜活性劑包含例如前藥、診斷劑、治療劑、醫藥劑、藥物、合成有機分子、蛋白質、肽、維他命、固醇及固醇類似物。該藥劑至少當不與過渡金屬複合時需可滲透通過微脂體膜以達到負載。

用於本發明之過渡金屬包含1B、2B、3B、4B、5B、6B、7B及8B族元素(3-12族)。較佳金屬包含選自Fe、Co、Ni、Cu、Zn、V、Ti、Cr、Rh、Ru、Mo、Mn及Pd所成組群者。更好，該金屬為Fe、Co、Ni、Cu、Mn或Zn。甚至更好，該金屬為Zn、Mn、Co或Cu。甚至更佳，該金屬為Zn、Co或Cu。

本發明所用之過渡金屬離子可依據本技藝習知技術包囊入微脂體中。此包含本技藝已知及下述之被動包囊技術。

較好，於包括濃度約20 mM至約1M，較好約50 mM至約800 mM且更好約100至約350 mM之過渡金屬之溶液中形成微脂體。

金屬各種鹽可用於操作本發明。較好，該鹽為醫藥可接受性且可溶於含水溶劑中。較佳之鹽係選自由氯化物、硫酸鹽、酒石酸鹽、檸檬酸鹽、磷酸鹽、硝酸鹽、碳酸鹽、乙酸鹽、穀胺酸鹽、葡糖酸鹽、甘胺酸鹽、組胺酸鹽、離胺酸鹽等所成之組群。

較好，欲包囊入本發明微脂體之治療劑為可與包囊於微脂體之金屬配位者。可與過渡金屬配位之藥劑典型上包括

五、發明說明 (26)

配位位置如胺、羰基、醚、酮、醯基、乙炔、烯烴、硫醇、羧基、鹵化物、可對過渡金屬提供電子而與金屬形成複合物之基或其他適當基。結合過渡金屬且因此可用於操作本發明之藥劑實例包含喹啉酮如氟喹啉酮、喹啉酮如茶啞酸、蔥環素如多索魯濱、道諾魯濱、艾多魯濱及艾比魯濱、胺基糖苷如坎納黴素(kanamycin)及其他抗生素如博來黴素(bleomycin)、絲裂黴素(mitomycin)C及四環素及氮芥物如環磷醯胺、硫代半卡脞(thiosemicarbazones)、消炎痛(indomethacin)及硝基普塞(nitroprusside)、喜樹鹼如托普汰肯、艾諾汰肯、盧托汰肯、9-胺基喜樹鹼、9-硝基喜樹鹼及10-羧基喜樹鹼及鬼臼脂素如艾托普塞(etoposide)。本發明所用藥劑可自藥劑中不同原子及於複合物幾何結構不同位置給與電子。可給予一個以上非結合電子對之此藥劑亦稱為多配位體。較好本發明所用之治療劑為抗贅瘤劑。

與過渡金屬複合且因此可用以操作本發明之活性劑非限制實例列於表I。

五、發明說明 (27)

表 I

金屬為主之活性劑實例

金屬	藥劑	參考文獻
Cu	艾托普塞	Tawa 等人(1997)Biol. Pharm.-Bull. 20 : 1002-1005
Fe(III)	左旋唑脞(dexrazoxane) 蘭索催酮(losoxantone) 派洛催酮(piroxantone)	Hasinoff 等人,(1999)無機生化期刊 77 : 257-259
Zn, Cu(II), Fe(III),Co(III)	博來黴素	Wenbao 等人(2001)生物化學 40 : 7559-7568
Fe(III)	蔥環素	Fiallo 等人(1999)無機生化期刊 75 : 105-115
Bi(III)	喹啉酮	Turel 等人(1997)無機生化期刊 66 : 241-245
Cu(II)	L-離胺酸, L-精胺酸	Chikira 等人(1997)無機生化期刊 66 : 131-139
Cu(II),Ni(II) Zn(II),Mo(VI)	代鐵胺(desferrioxamine) B	Farkas 等人(1997)無機生化期刊 65 : 281-286
Cu(II)	希納滅(cynnaml) 拉法黴素(rafamycin)之衍生物	Bontchev 等人(1997)無機生化期刊 65 : 175-182
Fe(III)	阿黴素(adriamycin)	Capolongo 等人(1997)無機生化期刊 65 : 115-122
Cu(II),Ni(II)	新諾辛(cinoxacin)	Ruiz 等人(1997)無機生化期刊 65 : 87-96

決定藥劑與過渡金屬間是否發生配位之方法包含本技藝悉知之技術。較佳技術包含測定吸收光譜或如 Greenaway 及 Dabrowiak 所述(無機生化期刊(1982)16(2) : 91)使用 NMR。若需要，活性劑可在包囊前測試以決定是否發生配位及決

五、發明說明 (28)

定複合之最佳pH。

製備具包囊金屬之微脂體之較佳技術包含先於氣仿中混合脂質獲得所需莫耳比。於該脂質製劑中視情況添加脂質標記物。所得混合物在氮氣流中乾燥並置入真空泵中直至溶劑移除。隨後，樣品於包括過渡金屬(其可包括一種以上金屬如Cu及Mn，或一種金屬但不同金屬鹽)之溶液中水合。該混合物接著通過擠出裝置獲得所定大小之微脂體製劑。平均微脂體大小可藉表面彈性光散射使用NICOMP™ 370次微米粒徑一再632.8奈米測定。隨後擠出，隨後擠出，外部溶亦可經處理或置換因而自外部溶液及微脂體表面移除金屬離子。

本發明較好使用具有包囊或"內部"介質(其包括於"金屬可相容溶液中"之過渡金屬)之微脂體。使用金屬可相容溶亦可避免金屬沉澱或使沉澱減至足以使微脂體作為醫藥用途之最小程度。

金屬可相容溶液定義為由在溶液中至少調配微脂體所需時間內不引起無法接受之沉澱發生之金屬所構成。較好，金屬溶液需透明且可溶、至少約4小時無凝集、無沉澱或無凝絮。例如Cheung等人[同上文獻]所述之於pH 7.4 HEPES緩衝液中之300 mM $MnSO_4$ 溶液並非金屬可相容溶液，因其可產生包括約6-7莫耳%錳添加至溶液時之 $Mn(OH)_2$ 之顯見棕色沉澱。

各種方法為本技藝已知且可用以測定是否金屬溶液形成沉澱，如溶液離心及評估是否形成粒片或觀察溶液是否渾

五、發明說明 (29)

濁。溶液吸收度亦可藉分光鏡追蹤(如在690奈米之吸收度)，吸收度實質增加表示溶液不安定且沉澱。最簡單方法為過濾溶液及觀察濾紙上是否存在有沉澱。例如，50毫升樣品可通過Whatman(tm)2號濾紙及觀察濾液之可見沉降。

測定溶液是否為金屬可相容之較佳方法為在690奈米追蹤吸收度。其他金屬需不導致增加約0.1吸收單位以上且較好不超過約0.05單位。

測定金屬溶液是否為金屬可相容之另一較佳方法為離心(如100毫升樣品在1000 rpm離心10分鐘)以收集任何沉澱，測定所收集之沉澱量並決定添加至最初溶液之金屬對存在於沉澱中之金屬比例。沉澱中金屬量需不超過添加至最初溶液之金屬量之約1莫耳當量%。

較佳之金屬可相容溶液為亦為醫藥可接受者如包括三乙醇胺(TEA)、氯化鈉、乙酸鈉/乙酸、檸檬酸鈉/檸檬酸或糖溶蔗糖、右旋糖及乳糖者。磷酸酯及碳酸酯為主之溶液(但仍為醫藥可接受者)將具有受限之用途但在正常生理範圍以外之pH除外，係由於該類似之金屬沉澱之故。較好，金屬可相容溶液經緩衝且具有生理範圍內之pH。

操作本發明中，較好微脂體製劑之外部溶液經置換或處理使得所得外部溶液在負載藥劑之前實質上不含未複合之金屬離子。就此說明書目的，"未複合金屬離子"包含在外部溶液中游離之金屬離子及結合至微脂體外部表面(或與其配位)之金屬離子。相反地，複合金屬離子為不再自由與治療劑或微脂體表面相互作用者，但以與如螯合劑之基團存

五、發明說明 (30)

在於外部溶液中。因此，較好微脂體表面及外部溶液實質上不含金屬離子或若存在金屬離子，則可與螯合劑複合。可使用之陽離子螯合劑實例包含：EDTA及衍生物；EGTA及衍生物；組胺酸；Chelex(tm)；TPEN及衍生物；BAPTA及衍生物；雙磷酸酯；鄰-菲繞啉(菲繞啉)；檸檬酸鹽；InsP6；Diazo-2；及DTPA(二乙烯-三胺基五乙酸)異硫代氰酸酯。

外部溶液置換移除金屬離子可藉各種其他技術完成，如微脂體製劑經由以第二種緩衝水溶液平衡之外延凝膠過濾管柱層析、離心、重複滲析、重複交換或以外部介質稀釋、以螯合劑處理外部溶液或相關技術。不使用螯合劑之單一溶液交換或滲析典型上不足以自微脂體表面移除金屬離子。

外部溶液亦較好為緩衝溶液。然而，需了解任何適當溶劑可用以操作本發明。較加之外部溶液pH約為生理pH且包括具有包含生理pH之緩衝範圍之緩衝液。外部溶液之適當緩衝液之非限制實例為HBS, pH 7.4(150 mM NaCl、20 mM HEPES)及SHE, pH7.4(300 mM蔗糖、20 mM HEPES、30 mM EDTA)。

藥劑吸入可在添加藥劑至外部溶液後，藉在適當溫度保溫混合物而建立。視微脂體組成、內部介質之溫度及pH及藥劑之化學性質而定，藥劑之吸入可在數分鐘至數小時之時間內發生。負載可在溫度例如20°C至約75°C，較好約30°C至約60°C進行。

五、發明說明 (31)

未包囊藥劑之移除之進行，可藉使微脂體製劑通過以第二種緩衝之溶液平衡之凝膠過濾管柱、離心、滲析或相關技術。較好該第二溶液為生理可相容但不需"金屬可相容"者。移除未包囊活性劑之後，樣劑負載程度可依據習知技術藉測量藥物及脂質量而決定。脂質及藥物濃度可利用例如閃蒸計數、光譜計分析、螢光分析及高效能液體層析測定。分析之選擇視藥物性質及微脂體是否含放射標記之脂質標記物而定。利用放射標記物之定量實例述於本文實例，但需了解可使用測定負載程度之任何適當方法。

使用包囊過渡金屬使藥劑負載至微脂體之前，微脂體可被動地以藥劑及金屬共包囊。使用此方式，藉組合被動及主動負載方法可於微脂體中併入兩種或多種藥劑。

藥劑負載入微脂體後，可與混合物保溫離子載體使得離子載體插入雙層分子中。"離子載體"一詞代表與金屬離子形成複合物且幫助離子通過脂質雙分子層同時進一步協助 H^+ 以相反方向傳遞之化合物。本發明之適當離子載體實例包含尼日利亞菌素、monensin、獵神黴素、A23187、4-BrA23187、離子黴素及X-537A。該離子載體可對單價或二價金屬離子具專一性。對單價金屬離子具專一性之離子載體實例包含尼日利亞菌素、monensin及獵神黴素。離子載體之吸入係藉添加離子載體至混合物中及在適於將離子載體併入微脂體雙分子層之溫度下保溫而建立。所用離子載體量典型上視微脂體調配物性質而定。藥劑負載後可添加離子載體至微脂體中以及在隨後強制使微脂體雙分子層間有

五、發明說明 (32)

pH梯度而改變藥劑於微脂體中之保留性質或保護可受中性或鹼性環境影響之藥劑如托普汰肯及艾諾汰肯。

較佳之金屬可相容溶液可包含如可在pH 6.0至8.5之間使用之緩衝液之成分。較好，該緩衝液實質上在4°C超過兩天時間內在pH 6.0至8.0間且更好在pH 6.5至7.5間不與包囊之金屬離子產生沉澱。緩衝液可藉視覺檢視溶液渾濁外觀(其表示形成沉澱)而測試其避免沉澱之能力。測定緩衝劑是否與特定過渡金屬相容之方法實例概述於實例3。過渡金屬包囊於金屬可相容溶液後，藥劑可添加至外部介質中使得該藥劑包囊入微脂體中。包囊過渡金屬及金屬可相容溶液之微脂體可依據本技藝習知技術製備，包含上述技術。然而需了解，本發明目的中可使用任何適當之金屬。較好，含包囊藥劑之微脂體具有實質上類似於微脂體內pH之微脂體外pH。最好，微脂體外及微脂體內pH約為pH 6.0至pH 8.0，最好約pH 6.5至pH 7.5。

本發明又提供一種設計微脂體之方法，該方法包括選擇微脂體中供包囊之金屬離子以達到包囊藥劑之所需保留。需了解任何適當微脂體及藥劑可用以操作本發明目的。本發明此目的之其他較佳特徵及條件如上述。

為了決定藥劑自微脂體釋出之速率，微脂體可經靜脈內投藥並在投藥後測量藥劑血漿及脂質量。例如，脂質成分可經放射活性地標記及血漿進行液體閃蒸計數。藥物量可藉光譜計、HPLC或其他分析測定。類似地，藥劑保留於微脂體中之測試可在體外於血漿或適當緩衝液中進行。例

五、發明說明 (33)

如，包括包囊藥劑及過渡金屬之微脂體可於體外或體內測試藥劑之保留性。若未達到藥劑之所需保留性，則可選擇不同金屬或測試其保留所關心藥劑之能力。

投與微脂體

本發明又有關一種對哺乳類投與微脂體之方法及治療罹患或易罹患或預期將罹患疾病(如癌症)之哺乳類之方法。治療或投藥方法一般需了解係包括在足以舒緩該疾病或病徵之劑量下投與該醫藥組合物。

就治療人類而言，合格之醫師可使用以建立之方式，預期如何決定本發明組合物之使用劑量、療程及投藥路徑。此應用亦可利用劑量階梯式修正使包囊於本發明輸送載劑組合物之活性劑對個體健康組織展現降低之毒性。

較好，該醫藥組合物以非經腸道、動脈內、靜脈內、腹膜內、皮下或肌肉內投藥或經氣溶膠投藥。氣溶膠投藥方法包含經鼻及肺投藥。更好，該醫藥組合物藉丸劑注射或灌注經靜脈內或腹膜內投藥。例如，參見Rahman等人US專利號3,993,754；Sears之US專利號4,145,410；Papahadjopoulos等人之US專利號4,235,871；Schneider之US專利號4,224,179；Lenk等人之US專利號4,522,803；及Fountain等人之US專利號4,588,578。適於此用途之特定調配物見於雷明頓醫藥科學，Mack出版公司，賓州，PA，第17版(1985)。

實例

下列實例供說明目的而非用以限制本發明範圍。除非另有說明，否則pH使用三乙醇胺(TEA)調整且適於圖式之結

五、發明說明 (34)

果係得自單一代表實例。

製備大的單層微脂體之方法

脂質溶於氯仿溶液中及隨後在氮氣流中乾燥及置於真空泵中以移除溶劑。除非另有說明，否則在調配製程期間，添加微量之放射活性之脂質³H-CHE以定量脂質。所得脂質膜放置在高真空下最少2小時。脂質膜於溶液中水合顯示形成多層泡囊(MLVs)。所得製劑經由堆疊之聚碳酸酯濾紙以擠出裝置(Lipex生物膜公司，Vancouver, BC)擠出10次，達到平均微脂體大小介於80至150奈米之間。所有微脂體之構成脂質以莫耳%表示。

藥物負載定量方法

藥物開始負載之各種時間點，移除整數份及通過Sephadex G-50旋轉管柱以自由分離包囊藥物。於評估物之特定體積中，添加Triton X-100或N-辛醯基β-D-哌喃葡萄糖苷(OGP)以溶解微脂體。添加清潔劑後，混合物加熱至清潔劑之濁點並冷卻至室溫後，測量吸收度或螢光。藉與標準曲線比較計算藥物濃度。藉液體閃蒸計數測量脂質量。

實例1金屬負載可在無pH梯度之下發生

具有緩衝至pH 7.4之內部及外部溶液之含金屬微脂體檢視其負載藥物之能力。進行該等研究以測定藥物之金屬為主負載是否可與pH梯度無關地發生。主動負載藥物至微脂體之習知技術經常需要轉膜pH梯度。

為了測定艾諾吡肯是否在無pH梯度下使用不含膽固醇之

五、發明說明 (36)

pH梯度下之吸收入DSPC/DSPG(90:10莫耳比)為100%。

利用DPPC/Chol(55:45莫耳比)微脂體檢視展現無pH梯度時之艾諾汰肯之銅負載入含膽固醇之微脂體。該微脂體如該方法所述般藉由使脂質膜於以TEA調整至pH 7.4之100 mM葡糖酸銅(II)溶液中水合而製備。微脂體在65°C擠出及微脂體之外部緩衝液藉相切流動滲析交換至SHE,pH 7.4。微脂體與艾諾汰肯以0.1:1之藥物對脂質重量比在50°C保溫及如所述般在藉清潔劑溶解後測量370奈米之吸收度而測定藥物負載程度。

在無pH梯度下艾諾汰肯負載入DPPC/Chol(55:45莫耳比)顯示保溫約60分鐘後觀察到幾乎完全負載(圖2)。

除了銅負載以外，亦檢視無pH梯度下使用含MnSO₄之微脂體之藥物負載。以緩衝至pH 7.4之內部MnSO₄溶液及以SHE緩衝至pH 7.4之外部溶液製備DSPC/DSPE-PEG2000(95:5莫耳比)微脂體。如所述般製備脂質膜且於以20 mM咪唑緩衝至pH 7.4(最初以濃HCl調整pH至7.4)之300 mM MnSO₄中水合及在70°C進行擠出。樣品向下流入Sephadex G-50管柱而以SHE,pH 7.4交換該外部緩衝液。艾比魯濱在藥物對脂質重量比0.2:1之下負載及在60°C進行負載。如方法中所述般測量480奈米之藥物吸收度測量藥物負載程度。

圖3之結果顯示在60°C艾比魯濱之錳負載至DSPC/DSPG-PEG 2000(95:5莫耳比)微脂體不需要存在有pH梯度，因為在所測量之各時間點發生藥物之有效包囊。

五、發明說明 (37)

實例2第二藥物之金屬複載入含被動包囊第一藥物之緩衝微脂體

雖然上述實例描述一種藥物之金屬誘發負載入微脂體中，但該技術可用以負載兩種或多種藥物至單一微脂體中。一技術包含在製備微脂體期間，首先被動捕捉至少一種藥物與金屬，接著進行另一藥物之主動金屬負載。此實例中，製備微脂體因而在通過膜中無pH梯度因而確使第二藥物藉本發明方法負載。

使用各種條件及將艾諾汰肯負載入含碳氣氬鉑之微脂體及道諾魯濱負載入含順氣氬鉑之微脂體而檢視艾諾汰肯負載入含被動包囊之氟利啶(FUDR)之DSPC/DSPG及DSPC/Chol/DSPG微脂體。

使DSPC溶於氯仿及DSPG溶於氯仿/甲醇/水(50:10:1 v/v)而製備含FUDR之DSPC/DSPG(85:15莫耳比)微脂體。該脂質接著以85:15之莫耳比混合及以微量14C-CHE負載。樣品於100 mM葡糖酸銅(II)、220 mM TEA,pH 7.4(含具微量3H-FUDR之24.62毫克/毫升(100 mM) FUDR)中在70°C水合。所得MLVs在70°C擠出，接著使用手固定之相切流動滲析管柱，先緩衝交換入食鹽水中接著交換入SHE,pH 7.4中。此樣品接著交換入300 mM蔗糖、20 mM HEPES,pH 7.4中以移除外部緩衝液中之任何EDTA。

艾諾汰肯以藥物對脂質莫耳比0.1:1在50°C負載入所得微脂體製劑中。使用液體閃蒸計數產生旋轉管柱溶離物之藥物對脂質比例以決定脂質及FUDR濃度，及測定370奈米之

五、發明說明 (38)

吸收度以決定艾諾汰肯濃度。測量吸收度之前，微脂體溶解於含 Triton X-100 之溶液中。最初之 FUDR 藥物對脂質莫耳比為 0.09 : 1，及發生艾諾汰肯負載後為 0.06 : 1。

圖 4A 顯示將艾諾汰肯負載入含包囊 FUDR 及金屬之無膽固醇之 DSPC/DSPG (85 : 15 莫耳比) 微脂體不需要存在有 pH 梯度，因為整個實驗過程中發生藥物有效負載。

如上述製備含 FUDR 及葡糖酸銅 (II) 之 DSPC/Chol/DSPG (70 : 10 : 20 莫耳比) 微脂體。為了測量外部緩衝液對負載之影響，所得 LUVs 之一半緩衝交換入 SHE, pH 7.4 中接著緩衝入 20 mM HEPES、150 mM NaCl (HBS), pH 7.4 中，而另一半使用手固定之相切流動滲析管柱進一步交換入 300 mM 蔗糖、20 mM HEPES, pH 7.4 中。艾諾汰肯添加至含 FUDR 之微脂體中，及隨後如上述測量。含 HBS (實心圓) 或 300 mM 蔗糖、20 mM HEPES (空心圓) 作為外部緩衝液之樣品之最初 FUDR 藥物對脂質莫耳比分別為 0.1 : 1 及 0.09 : 1。艾諾汰肯負載後，相同樣品之 FUDR 藥物 / 脂質比例分別為 0.09 : 1 及 0.08 : 1。

圖 4B 概述之結果顯示艾諾汰肯有效地負載入含低膽固醇且含包囊 FUDR 之微脂體中，無關是否使用外部緩衝液。無 pH 梯度下之負載進一步支持在本發明之金屬負載技術期間發生此程度之艾諾汰肯吸入。

亦顯示可在無 pH 梯度下使金屬負載入含被動包囊藥物之微脂體中之各種其他藥物；實例詳述如下：

使用上述製備之微之體測量艾諾汰肯負載入含被動包囊

五、發明說明 (39)

碳氣氣鉑之DSPC/DSPG(80:20莫耳比)微脂體，但脂質膜於含25毫克/毫升碳氣氣鉑之150 mM CuSO₄(使用TEA調整至pH 7.4)中水合。樣品擠出及外部緩衝液使用手固定之相切流動滲析管柱交換入SHE,pH 7.4。艾諾汰肯以藥物對脂質重量比0.1:1在60°C添加及如前述測量吸入。使用原子吸收光譜計(AA)測定碳氣氣鉑濃度及測量370奈米之吸收度以決定艾諾汰肯濃度。最初碳氣氣鉑藥物對脂質重量比例為0.030，及發生艾諾汰肯負載後為0.025。

如圖5之作圖所示，在無Ph梯度存在下艾諾汰肯負載入含高度碳氣氣鉑及含高濃金屬之DSPC/DSPG(80:20莫耳比)微脂體中。

為了測量道諾魯濱負載入含包囊順氣氣鉑之微脂體中，如上述圖4B般製備DSPC/Chol(55:45莫耳比)微脂體，但脂質膜以順氣氣鉑溶液水合。固體順氣氣鉑(40毫克/毫升)藉由在80°C添加4% DMSO而溶於150 mM CuCl₂,p H7.4(以NaOH調整pH)接著添加至脂質膜中及在80°C經常造成漩渦而水合。冷卻後，樣品在實驗台離心機上離心使任何未包囊之順氣氣鉑成粒片及收集上澄液。微脂體接著施加至以HBS, pH 7.4預先平衡之Sephadex G-50管柱上以自微脂體外部移除過量金屬離子。

道諾魯濱以0.1:1重量比添加至微脂體中及在60°C進行負載。在各種時間點移除整數份及施加至Sephadex G-50旋轉管柱上。在480奈米測量之吸收度用以決定道諾魯濱濃度及使用AA測量順氣氣鉑量。最初順氣氣鉑藥物對脂質比例為

五、發明說明 (40)

0.044 : 1。

圖 6 顯示無 pH 梯度存在下之含被動包囊順氯氬鉑之 DSPC/Chol 微脂體有效地負載道諾魯濱。此進一步支持在金屬負載複合期間第二種藥物負載入微脂體中。

實例 3

緩衝液組成對金屬離子沉澱之影響

以 150 及 300 mM 濃度於 20 mM 組胺酸中製備鈷、鎳、錳、鎘、鋅及銅溶液。滴加三乙醇胺 (1.13 克/毫升) 直至所得溶液為 pH 7.4 或直至溶液外觀變渾濁 (10 分鐘觀察期)。典型上，添加 500 升以下之 1.13 克/毫升三乙醇胺。添加三乙醇胺後，溶液以視覺檢視決定是否發生金屬沉澱。溶液渾濁外觀顯示存在有沉澱及溶液透明顯示無沉澱。結果示於表 2。

表 2

金屬	濃度 (mM)	硫酸鹽	氯化物	硝酸鹽
鈷	300	無沉澱	無沉澱	---
	150	無沉澱	無沉澱	----
鎳	300	無沉澱	無沉澱	---
	150	無沉澱	無沉澱	----
錳	300	無沉澱	沉澱	---
	150	無沉澱	沉澱	----
鎘	300	無沉澱	沉澱	---
	150	無沉澱	沉澱	----

五、發明說明 (41)

鋅	300	沉澱	沉澱	---
	150	沉澱	沉澱	----
銅	300	無沉澱	無沉澱	無沉澱
	150	無沉澱	無沉澱	----

沉澱：代表添加三乙醇胺後10分鐘內發生沉澱形成

無沉澱：代表添加三乙醇胺達pH 7.4及10分鐘期間內未發生沉澱形成

虛線：未測量

所示金屬濃度為添加三乙胺前之濃度。

實例4

金屬負載不同於檸檬酸鹽為主之負載

比較依據MnSO₄及檸檬酸鹽為主之負載程序中道諾魯濱累積於DPPC/DSPE-PEG2000(95:5莫耳比)微脂體之能力。脂質膜以300 mM MnSO₄溶液或300 mM檸檬酸鹽,pH 3.5水合及在55°C通過擠出裝置。所得微脂體向下流入Sephadex G-50管柱,對含MnSO₄之微脂體而言該管柱以SHE,pH 7.5預平衡及對含檸檬酸鹽微脂體以HBS,pH 7.5預平衡。緩衝液交換後,微脂體與道諾汰肯混合獲得最終藥物:脂質重量比約0.1:1、0.2:1或0.3:1。所得混合物在37°C保溫80分鐘。藉測量480奈米之吸收度如上述方法決定藥物負載程度以定量藥物;脂質量以液體閃蒸計數測量。

圖7概述之結果顯示當最初藥物/脂質重量比分別為0.1:1(條桿A)、0.2:1(條桿B)及0.3:1(條桿C)時,於含MnSO₄(300 mM)之無膽固醇微脂體中達到>95%、>90%及

五、發明說明 (42)

>80%之道諾魯濱有效負載。相反地，依據pH梯度檸檬酸鹽(300 mM檸檬酸鹽,pH 4.0)在相同條件下之負載程序以道諾魯濱負載之無膽固醇微脂體顯示包囊效率實質上降低，因為道諾魯濱/脂質重量比自0.1增加至0.3。後者方法可達到<0.075之最大藥物對脂質重量比。該等結果證明使用金屬負載，無膽固醇之微脂體可以道諾魯濱有效負載至藥物對脂質比高如0.3：1(w/w)，而檸檬酸鹽為主之負載程序僅達到0.1：1(w/w)之最大藥物對脂質比例。該等數據顯示金屬為主之負載機制不同於仰賴維持穩定pH梯度者。述據點代表平均藥物對脂質比及誤差桿代表標準偏差。

實例5未緩衝之金屬負載引起轉膜pH梯度坍塌

使用檸檬酸鹽及錳負載技術藉測量藥物負載前及負載後脂pH梯度而比較道諾魯濱負載對DMPC/Chol微脂體之影響。DMPC/Chol (55：45莫耳比)脂質膜於300 mM檸檬酸鹽緩衝液,pH 3.5、300 mM MnSO₄或300 mM MnCl₂中水合。所得MLVs接受5次冷凍-及解凍循環(於液態氮中冷卻及在40°C解凍，接著在40°C擠出)。為了交換微脂體之外部溶液，樣品於Sephadex G-50管柱上溶離。對含包囊檸檬酸鹽之微脂體而言，外部緩衝液交換至HBS及對含包囊MnSO₄及MnCl₂而言，外部溶液交換至SHE,pH 7.5。緩衝液交換後，多索魯濱以0.2：1重量比在60°C添加。評估480奈米之吸收度及清潔劑溶解作用以定量藥物及藉液體閃蒸計數決定脂質量。

五、發明說明 (43)

圖8A所示結果顯示多索魯濱負載入含包囊檸檬酸鹽(方塊)及 $MnSO_4$ (圓圈)之微脂體在保溫5分鐘內實質上已完成。利用 $MnCl_2$ (三角形)之多索魯濱累積相對於 $MnSO_4$ 及檸檬酸鹽較不完全。數據點顯示至少三次重複實驗之平均藥物對脂質比例及誤差桿代表標準偏差。

使用 $[14C]$ -甲胺測量多索魯濱負載前後之調配物轉膜pH梯度。簡言之， $[14C]$ -甲胺(0.5Ci/毫升)添加至上述製備之微脂體溶液中。15分鐘後，150毫升份數向下通過以HBS平衡之1毫升Sephadex G-50管柱以移除未包囊之甲胺。藉閃蒸計數測定管柱層析前後脂質及甲胺濃度。依據下列相關性計算轉膜pH梯度：

$$pH = \log \{ [H^+]_{\text{內部}} / [H^+]_{\text{外側}} \} = \log \{ [甲胺]_{\text{內部}} / [甲胺]_{\text{外側}} \}$$

如圖8B所示，建立pH梯度後，但在道諾魯濱負載前，含包囊檸檬酸鹽(條桿1)、 $MnSO_4$ (條桿3)、 $MnCl_2$ (條桿5)之調配物分別展現3.4、1.6及小於0.18之所測量pH梯度。該等結果顯示轉膜pH在利用錳溶液時比檸檬酸鹽小。添加多索魯濱於含包囊檸檬酸鹽之微脂體後，pH梯度自3.4(條桿1)降至2.3(條桿2)。此結果與前述報導相符，證明該等調配物中pH梯度因多索魯濱調節而坍塌。多索魯濱負載後，含錳之微脂體未展現可測量之pH梯度(條桿4及6)因此證明該等調配物在藥物負載期間喪失其pH梯度。數據點代表三次分開實驗之平均pH梯度及誤差桿顯示標準偏差。

實例6

五、發明說明 (44)

負載效率與所用金屬離子有關

進行艾諾汰肯負載入包囊硫酸錳或硫酸銅溶液之DSPC/DSPE-PEG2000(95:5莫耳比)微脂體中以比較兩種不同金屬之負載效率。

脂質膜於300 mM MnSO₄或300 mM CuSO₄溶物中水合。所得多層泡囊(MLVs)在60°C擠出及LUVs緩衝交換至SHE,pH 7.4。以0.1:1之藥物對脂質重量比在60°C添加艾諾汰肯至所得溶液中而起始藥物負載。如上述測量藥物負載程度及在370奈米測量吸收度。

圖9所示結果證明艾諾汰肯之錳負載在30分鐘時間點僅10%完成，而艾諾汰肯負載入含銅之微脂體則在5分鐘內大於95%負載。該等結果說明微脂體之負載性質與金屬離子之種類高度相關。

實例7使用包囊之錳、鈷及鎳之不含膽固醇之微脂體之藥物負載

使用內部MnSO₄、CoCl₂及NiSO₄溶液在各種負載溫度檢視道諾魯濱吸收入無膽固醇之微脂體(DSPC/DSPE-PEG 2000)。

使脂質膜於300 mM MnSO₄中水合製備包囊錳之無膽固醇(DSPC/DSPE-PEG2000, 95:5莫耳比)微脂體並在75°C擠出。樣品使用手固定相切流動滲析管柱交換至HBS。外部緩衝液含1.67 mM EDTA而移除任何二價陽離子。道諾魯濱以藥物對脂質重量比0.1:1負載及在23°C、37°C或60°C進行負載。使微脂體溶於清潔劑中接著測量480奈米之吸收度

五、發明說明 (45)

而測量藥物負載程度。

圖 10A 結果顯示道諾魯濱負載入含 $MnSO_4$ 之 DSPC/ESPE-PEG 2000(95 : 5 莫耳比)微脂體在 $60^\circ C$ 最有效，而在 $23^\circ C$ 及 $37^\circ C$ 之負載程度較小。當負載溫度達 $60^\circ C$ 可達到 0.07 之道諾魯濱對脂質比例(莫耳：莫耳)。

使脂質膜於 150 mM $CoCl_2$ 中水合製備含鈷之 DSPC/DSPE-PEG 2000(95 : 5 莫耳比)微脂體。MLVs 在 $75^\circ C$ 擠出接著外部緩衝液藉對 HBS 滲析隔夜而交換。微脂體接著使用手固定之相切流動滲析管柱進一步交換至 HBS 以移除任何殘留 $CoCl_2$ 。道諾魯濱以藥物/脂質重量比 0.1 : 1 在 23、37 及 $60^\circ C$ 負載。藉測量微脂體溶解後之 480 奈米吸收度而決定道諾魯濱負載程度。藉液體閃蒸計數測定脂質量。

道諾魯濱在 $60^\circ C$ 有效地負載入含 $CoCl_2$ 之 DSPC/DSPE-PEG2000 (95 : 5 莫耳比)微脂體中(參見圖 10B)。在 $60^\circ C$ ，在 5 分鐘內負載產生 >95% 之道諾魯濱包囊作用。在 $23^\circ C$ 及 $37^\circ C$ 之負載較無效率及在 $37^\circ C$ 需要保溫 60 分鐘才達到 80% 藥物包囊。

如前述實例製備含 DSPC/DSPE-PEG2000(95 : 5 莫耳比)及包囊 $NiSO_4$ 之微脂體。脂質膜於 300 mM $NiSO_4$ 中水合及微脂體之外部緩衝液藉通過以 SHE, pH 7.4 平衡之 Sephadex G-50 管柱而交換。添加道諾魯濱使得最初(負載前)藥物對脂質重量比為 0.2 比 1 及在 $60^\circ C$ 進行負載。如前述藉 UV 吸收測量道諾魯濱之負載效率。

圖 10C 結果證明在 $60^\circ C$ 道諾魯濱與含 $NiSO_4$ 之 DSPC/

五、發明說明 (46)

DSPE-PEG 2000微脂體保溫在5分鐘內產生大於75%藥物包囊。

實例8利用包囊之銅使藥物負載入無膽固醇之微脂體

亦檢視艾比魯濱之銅負載入DSPC/DSPE-PEG2000(95:5莫耳比)微脂體。

如前述實例製備含銅之DSPC/DSPE-PEG2000(95:5莫耳比)微脂體。脂質膜在300 mM CuSO₄中水合及在70°C進行擠出。負載前，外部緩衝液藉使微之體通過以SHE緩衝液平衡之Sephadex G-50管柱而以SHE,pH 7.4置換。艾比魯濱以藥物對脂質重量比約0.2:1添加至含銅之微脂體中且在60°C進行負載。分別藉分光計及閃蒸計數分析艾比魯濱及脂質量。為了定量艾比魯濱，以清潔劑溶解微脂體製劑後在480奈米測量吸收度。

圖11顯示在60°C發生吸入時，在5分鐘內艾比魯濱負載入DSPC/DSPE-PEG2000(95:5莫耳比)微脂體產生>95%累積。

實例9含膽固醇之微脂體之金屬負載

使用製備成包囊銅及鎳之微脂體檢視多索魯濱、道諾魯濱及托普汰肯吸收入DSPC/Chol(55:45莫耳比)微脂體中。

如上述使脂質膜於300 mM CoCl₂溶液中水合製備包囊鎳之DSPC/Chol(55:45莫耳比)微脂體。外部緩衝液藉管柱層析而交換至SHE,pH 7.5。以藥物對脂質重量比約0.1:1添加

五、發明說明 (47)

多索魯濱而開始負載。接著微脂體在60°C保溫以加速藥物負載。如前述以清潔劑溶解樣品接著測量480奈米吸收度而測量藥物負載程度。

圖12A結果顯示10分鐘內包囊有>90%之添加藥物。

使脂質膜於300 mM CuSO₄中水合而製備含硫酸銅之DSPC/Chol(55:45莫耳比)微脂體。所得MLVs在70°C擠出及外部緩衝液藉通過Sephadex G-50旋轉管柱而交換至HBS。緩衝液交換之微脂體在60°C以0.1:1、0.2:1或0.4:1之藥物對脂質重量比以道諾魯濱負載。微脂體溶解於清潔劑後藉測量480奈米之吸收度而決定藥物量。

圖12B結果顯示在60°C5分鐘內藥物負載入使用包囊CuSO₄負載之DSPC/Chol(55:45莫耳比)微脂體包囊有>90%之添加藥物。

如圖12B所述般製備包囊300 mM CuSO₄之DSPC/Chol(55:45莫耳比)微脂體，但外部緩衝液交換至SHE, pH 7.4。微脂體接著在37°C以0.1:1藥物/脂質重量比與托普汰肯保溫。在所示時間點藉定量380奈米之藥物吸收度及藉液體閃蒸計數定量脂質追蹤負載程度2小時。

圖12C顯示托普汰肯負載入DSPC/Chol(55:45莫耳比)微脂體在30分鐘內實質上達100%(>95%)完全。

實例10

數種不同藥物之金屬負載入含被動包囊藥物之未緩衝微脂體

在數種條件下檢視道諾魯濱或艾諾汰肯負載入含有被動

五、發明說明 (48)

包囊藥物之各種微脂體。

依據下列程序測量道諾魯濱吸收入含順氣氬鉑之微脂體中。依據前述實例之材料及方法製備 DSPC/DSPE-PEG2000(95 : 5 莫耳比)或 DSPC/Chol(55 : 45 莫耳比)微脂體。脂質膜分別於 150 mM $MnCl_2$ 或 150 mM $CuCl_2$ 中與 8.5 毫克/毫升在 80°C 水合。MLVs 在 75°C 擠出。離心移除沉澱之順氣氬鉑及接著樣品對 HBS 滲析隔夜。含 $CuCl_2$ 之樣品使用手固定之相切流動滲析管柱進一步交換至 HBS 中以移除任何殘留 $CuCl_2$ 或順氣氬鉑。道諾魯濱在 0.1 : 1 之藥物/脂質重量比在 60°C 之保溫溫度負載入含順氣氬鉑/ $MnCl_2$ 及順氣氬鉑/ $CuCl_2$ 之微脂體中。兩微脂體組成之最初順氣氬鉑藥物/脂質重量比為 0.1 : 1。如前述使樣品溶於清潔劑接著在 480 奈米測量吸收度而測量藥物負載程度。

圖 13A 及 13B 顯示以順氣氬鉑預先負載之 DSPC/DSPE-PEG 2000(95 : 5 莫耳比)或 DSPC/Chol(55 : 45 莫耳比)微脂體，當分別使用錳-或銅-為主之活性負載時，可以第二種藥物負載。再者，道諾魯濱包囊則不若比較 $MnCl_2$ 與 $CuCl_2$ 般有效率。

使用鎳或銅負載分析道諾魯濱或艾諾汰肯負載入分別含被動捕捉之碳氣氬鉑或順氣氬鉑之 DPPC/Chol(55 : 45 莫耳比)微脂體。脂質膜於 300 mM $NiSO_4$ 或 75 mM $CuCl_2$ + 150 mM $CuSO_4$ 中分別與 40 毫克/毫升碳氣氬鉑或 8.5 毫克/毫升順氣氬鉑水合。MLVs 在 70°C 擠出。含鎳之樣品對 1 升 300 mM 蔗糖、20 mM HEPES, pH 7.4 滲析隔夜，而含銅之樣品藉含

五、發明說明 (50)

克斯汀對脂質重量比進行藥物吸入。藉閃蒸計數接著以清潔劑溶解微脂體而定量文克斯汀及脂質。使用480奈米之吸收度定量多索魯濱量。

圖14顯示經由金屬負載以多索魯濱(圓形)預先負載之微脂體在50°C保溫40分鐘後，展現幾近最大之文克斯汀之離子載體調節負載之包囊作用(方塊)，而在文克斯汀包囊期間多索魯濱無明顯滲漏。該數據點代表三次分別實驗之平均藥物對脂質比及誤差桿代表標準偏差。

實例12無離子載體下兩種藥物之金屬負載導致兩種藥物之有效包囊

前述實例使用被動或離子載體調節之負載程序組合以主動金屬負載而產生兩種藥物包囊於各種組成之微脂體中。下列實例證明單獨金屬負載可用以主動負載兩種藥物至單一微脂體中。如下述於DSPC/膽固醇微脂體中負載多索魯濱及艾諾汰肯。

如前述般以包囊之300 mM CuSO₄製備DSPC/Chol微脂體(55:45莫耳比)。擠出之微脂體通過以SHE, pH 7.5預平衡之Sephadex G-50管柱。艾諾汰肯先在60°C以藥物對脂質莫耳比0.2:1負載至約100%包囊。隨後，多索魯濱在60°C以藥物對脂質莫耳比0.15:1與含艾諾汰肯之微脂體調配物保溫而充分負載多索魯濱。藉測量370奈米之吸收度使用在多索魯濱存在下製備之標準曲線以計算其在370奈米之吸收度而測量艾諾汰肯量。類似地，使用艾諾汰肯存在下製備之標

五、發明說明 (51)

準曲線測量480奈米之吸收度以計算其在480奈米之吸收度而測定多索魯濱濃度。至於對照組，分別測量各藥物吸收入相同組成之微脂體內之量。

圖15概述之結果說明使用本發明之主動金屬負載程序，多索魯濱及艾諾汰肯可有效地負載入單一微脂體中。該結果代表三次分別實驗之平均藥物對脂質比及誤差桿顯示標準偏差。

實例13體內之藥物釋出率與金屬離子性質有關

不銅內部負載藉質控制道諾魯濱自DSPC/DSPE-PEG 2000(95:5莫耳比)微脂體於體內釋出之能力使用150 mM檸檬酸鹽,pH 4.0、300 mM CuSO₄及300 mM MnSO₄檢視。如所述製備DSPC/DSPE-PEG2000微脂體及在75°C擠出。外部溶液藉對HBS滲析而交換至HBS中。道諾魯濱以藥物對脂質重量比約0.1:1負載及在60°C進行負載。如前述實例所述於溶解緩衝液中使用EDTA測量道諾魯濱負載。接著藥物負載之微脂體以100毫克/公斤之脂質劑量及10毫克/公斤之道諾魯濱劑量對Balb/c小鼠靜脈內投藥。投藥後24小時藉心臟穿刺(每時間點3隻小鼠)回收血液及收集至含EDTA之試管中。藉液體閃蒸計數測定血漿脂質濃度。如下自血漿萃出道諾魯濱：

界定體積之血漿以蒸餾水調整至200毫升接著添加600毫升蒸餾水、100毫升10% SDS及100毫升10 mM H₂SO₄。所得混合物予以混合及添加2毫升1:1之異丙醇/氯仿接著作

五、發明說明 (52)

成漩渦。樣品在 -20°C 冷凍隔夜或 -80°C 冷凍1小時以促進蛋白質凝集，回至室溫成漩渦及在3000 rpm離心10分鐘。移除底下之有機層及在500奈米作為激發波長(2.5奈米波帶)及550奈米作為發射波長(10奈米波帶)並使用480奈米之吸收波長分析螢光強度。

圖16證明使用包囊檸檬酸鹽，pH 4.0、 CuSO_4 及 MnSO_4 以道諾魯濱負載之DSPC/DSPE-PEG2000(95:5莫耳比)微脂體在靜脈內投藥後24小時展現不同血漿藥物對脂質比例。該等結果因此顯示經由選擇適當金屬離子可控制藥物釋出。該結果代表三次個別實驗之平均藥物對脂質比例及誤差桿代表標準偏差。

實例14未複合金屬離子存在及不存在下之負載微脂體比較

檢視在含磷脂醯基甘油之微脂體外表面上存在及不存在金屬離子之藥物金屬為主負載且結果示於圖17及18。

依實例1所述程序製備由DSPC: DSPG(80:20莫耳%)所構成之微脂體。DSPC及DSPG分別溶於氯仿及氯仿: 甲醇: 水(50:10:1 v/v)中。接著對各調配物而言，脂質以適當量與微量3H-CHE混合。穩定 N_2 氣流下移除溶劑同時溫度維持在 70°C 及於真空中放置5分鐘。所得脂質膜再溶於氯仿以進一步移除任何甲醇或水，接著如前述移除溶劑及真空乾燥以移除任何殘留溶劑。樣品隨後於150 mM CuSO_4 , pH 7.4(以TEA調整pH)終再水合及整數份測定製劑之特異活性。所得MLVs在 70°C 經過兩個堆疊之100奈米濾

五、發明說明 (53)

紙擠出共通過10次。微脂體樣品以0.5毫升/分鐘向下流經以150Mm NaCl平衡之15毫升Chelex-100TM(BioRad)管柱或緩衝液交換至食鹽水中及使用相切流動進一步交換至300 mM蔗糖、20 mM HEPES, pH 7.4中。通過Chelex-100TM管柱之微脂體隨後使用相切流動進一步交換至300 mM蔗糖、20 mM HEPES, pH 7.4中。

接著兩種微脂體製劑在37、50及60°C以藥物對脂質比0.1 w/w如上述以艾諾汰肯負載。開始負載後在各種時間點移除整數份(100毫升)及施用至Sephadex G-50管柱上以移除未包囊藥物。樣品接著以100毫升10% Triton X-100+800毫升25 mM檸檬酸鹽/檸檬酸三鈉、15 mM EDTA, pH 5.5溶解。樣品於水浴中加熱至100°C以加速溶解。使用液體閃蒸計數產生旋轉管柱流出物之藥物對脂質比例，以測定脂質濃度及在370奈米之吸收度以測定艾諾汰肯濃度。

圖17之結果顯示在微脂體製劑通過Chelex-100TM管柱以移除外部金屬離子時，艾諾汰肯負載入DSPC：DSPG(80：20莫耳%)微脂體增加。相反地，圖18之結果證明艾諾汰肯以低速率負載至交換至不含螯合劑之溶液之微脂體中。雖然未受任何理論限制，但藉螯合劑複合移除金屬離子可減少膜外表面上之金屬-藥物相互作用，因而增加可通過膜而被捕捉於微脂體內部分室內之游離藥物量。

實例 15自微脂體外部溶液移除金屬離子之方法

使用兩種不同技術(兩者均倚賴外部金屬之螯合劑)自外部

五、發明說明 (54)

溶液移除 Cu^{2+} 後檢視艾諾汰肯之銅為主負載入 DSPC : DSPG(80 : 20 莫耳%) 微脂體。第一種技術包含藉由通過 ChelexTM 管柱移除銅及第二種技術包含使微脂體交換至含 EDTA 之緩衝液中。

如實例 14 般製備 DSPC : DSPG(80 : 20 莫耳%)，但樣品於 150 mM 葡糖酸銅, pH 7.4 (以 TEA 調整 pH) 中再水合。藉 i) 通過於 300 mM 蔗糖、20 mM HEPES, pH 7.4 平衡之 15 毫升 Chelex-100 管柱；或 ii) 藉緩衝液交換至食鹽水中接著使用相切流動交換至 300 mM 蔗糖、20 mM HEPES、30 mM EDTA, pH 7.4 (SHE) 中而移除外部銅。

兩種微脂體製劑如實例 14 般以藥物對脂質比例 0.1 w/w 在 37、50 及 60°C 以艾諾汰肯負載。開始負載後在各時間點移除整數份 (100 毫升) 及施加至 Sephadex G-50 旋轉管柱上。樣品接著溶於 100 毫升 10% Triton X-100 + 800 毫升 25 mM 檸檬酸鹽 / 檸檬酸三鈉、15 mM EDTA, pH 5.5 接著加熱至 100°C。如實例 14 所述進行藥物及脂質定量。

藉通過螯合管柱移除外部金屬後之艾諾汰肯金屬為主之負載 (圖 20) 與微脂體交換於含 EDTA 管柱後之負載 (圖 19) 相當。該等結果因此證明各種方式可用以自負電荷之膜移除外部金屬而認為不影響負載效率。

實例 16與道諾魯濱及碳氣氬鉑共同負載之含磷脂醯基甘油微脂體之藥效學

道諾魯濱及碳氣氬鉑共同包囊於含 PG 之微脂體中之保留

五、發明說明 (55)

性藉被動負載碳氣氫鉑接著金屬負載道諾汰肯而檢視。

道諾汰肯及碳氣氫鉑包囊於 DSPC : DSPG(80 : 20 莫耳%)、DSPC : SM : DSPG(75 : 5 : 20 莫耳%)及 DSPC : SM : DSPG(70 : 10 : 20 莫耳%)微脂體中。依前述實例所述程序製備微脂體。DSPG 溶於 50 : 10 : 1 氣仿 : 甲醇 : 水 v/v 溶液中及於製劑中添加放射活性標記物 ^{14}C -CHE 以定量脂質。脂質膜於含 80 毫克/毫升碳氣氫鉑之 150 mM CuSO_4 、20 mM 組胺酸, pH 7.4(含 4% DMSO 以改善碳氣氫鉑溶解度)中再水合。擠出後, 樣品離心移除未包囊之碳氣氫鉑。交換至 SHE 緩衝液之微脂體以 3H-道諾魯濱負載。以 100 毫克/公斤脂質之劑量對小鼠投與微脂體。使用液體閃蒸計數定量道諾魯濱及脂質。藉原子吸收測定血漿碳氣氫鉑量。

圖 21 之結果顯示雙重負載之 DSPC : DSPG(80 : 20 莫耳%)、DSPC : SM : DSPG(75 : 5 : 20 莫耳%)及 DSPC : SM : DSPG(70 : 10 : 20 莫耳%)微脂體靜脈內投藥後, 在各時間點展現增進之血漿脂質量, 但以 10 莫耳%神經鞘脂類製備之微脂體相對於以 5 莫耳%神經鞘脂類製備之微脂體展現較低之脂質量。該微脂體有效地改變藥物藥效學, 可由投藥後留在血液分室中高量之道諾魯濱及碳氣氫鉑加以證明(參見圖 22 及 23)。以 DSPC : DSPG(80 : 20 莫耳%)及 DSPC : SM : DSPG(75 : 5 : 20 莫耳%)製備之微脂體相對於 DSPC : SM : DSPG(70 : 10 : 20 莫耳%)微脂體展現最高量之道諾魯濱及碳氣氫鉑。

雖然前述發明已藉說明及實例方式為闡述目的而更詳細

五、發明說明 (56)

描述，但需了解熟知本技藝者由本發明之教示可在不違離本發明申請專利範圍之精神下作各種改變及修飾。所有專利、專利申請案及公報均併於本文供參考。

四、中文發明摘要(發明之名稱: 負載金屬離子之微脂體)

本發明有關一種藥物及其他藥劑包囊入微脂體之方法。

英文發明摘要(發明之名稱: LIPOSOME LOADING WITH METAL IONS)

This invention relates to encapsulation of drugs and other agents into liposomes.

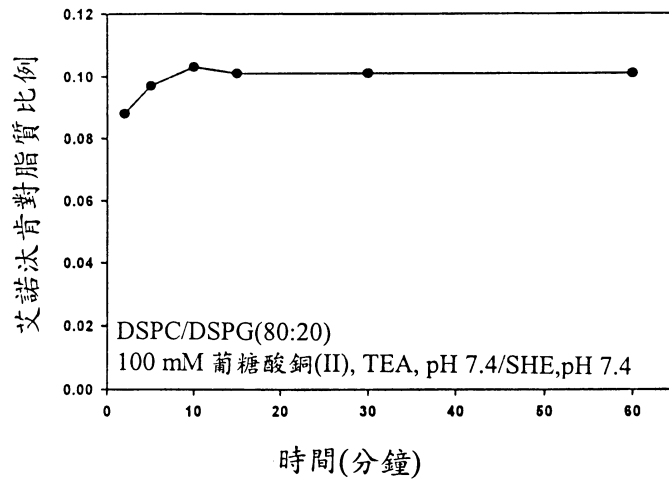


圖 1A

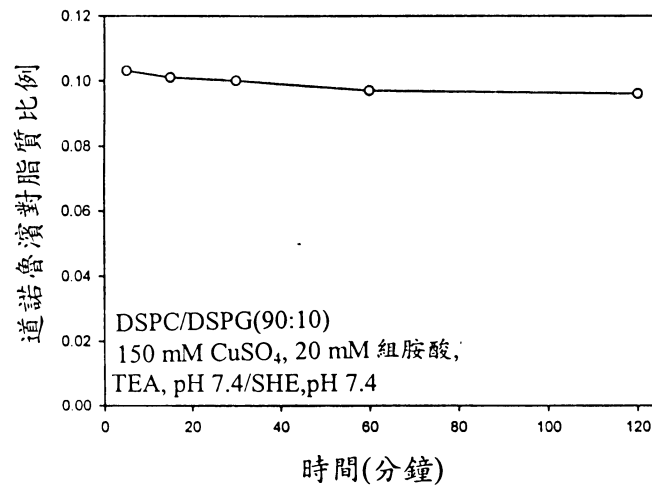


圖 1B

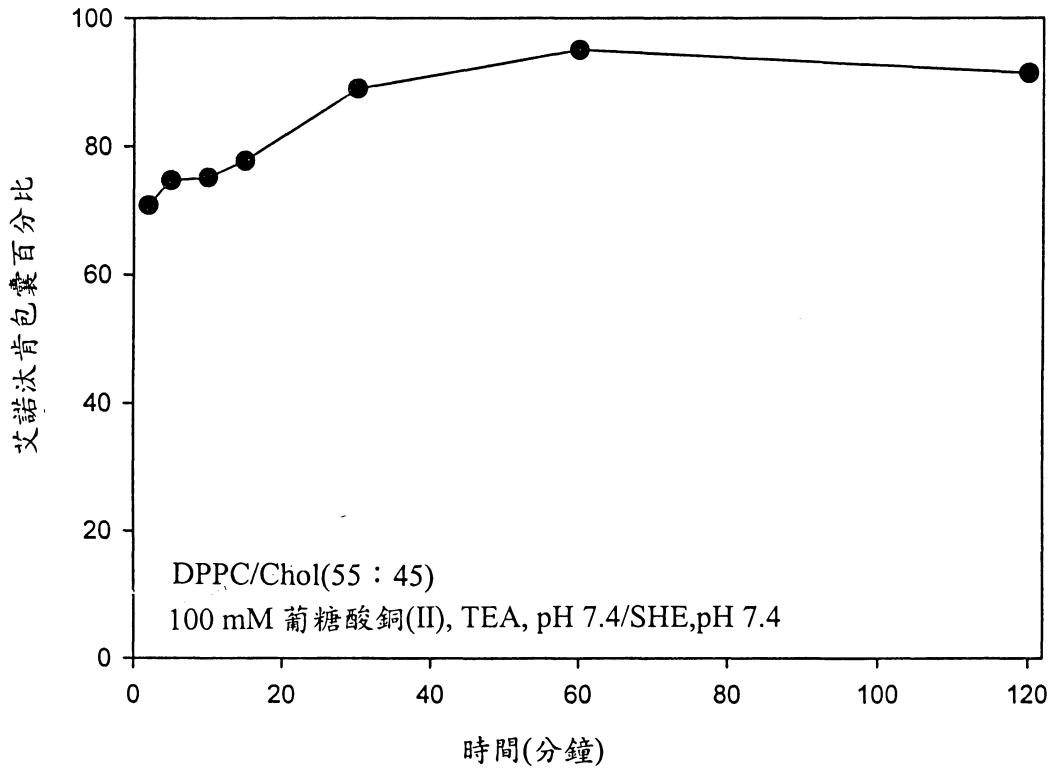


圖 2

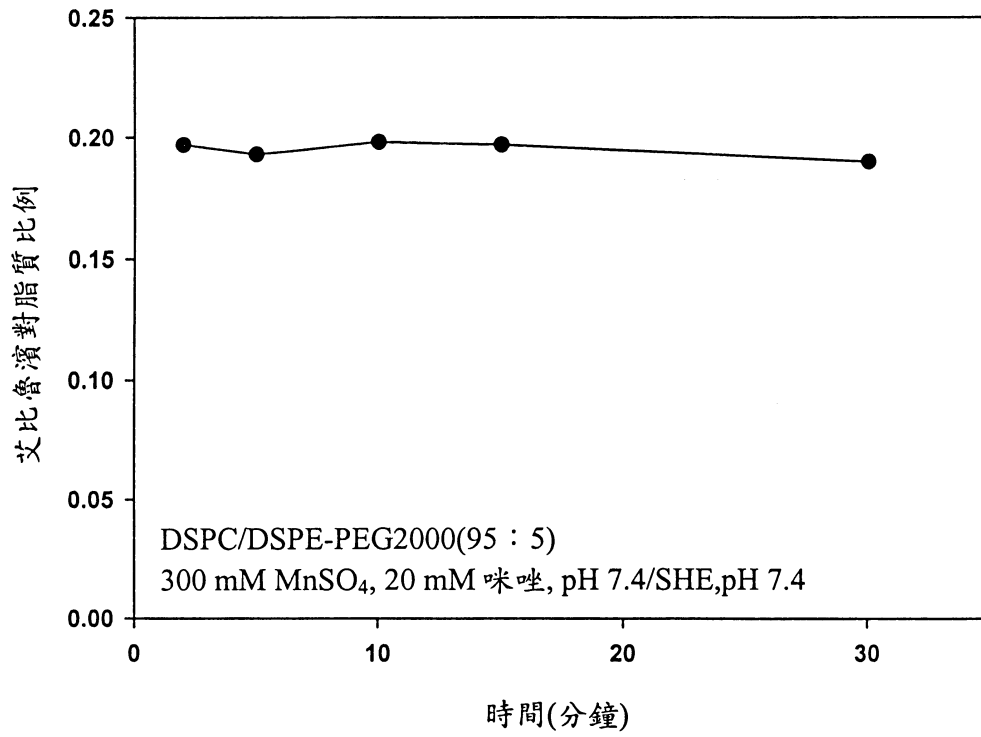


圖 3

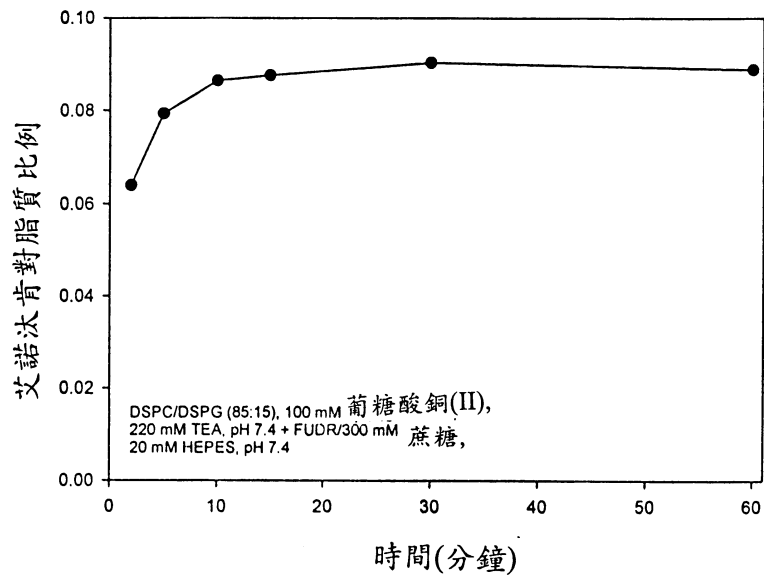


圖 4A

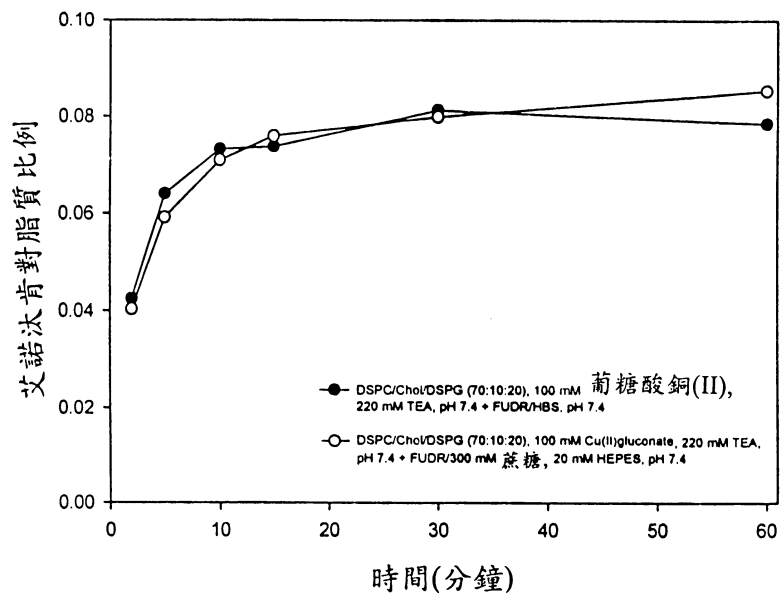


圖 4B

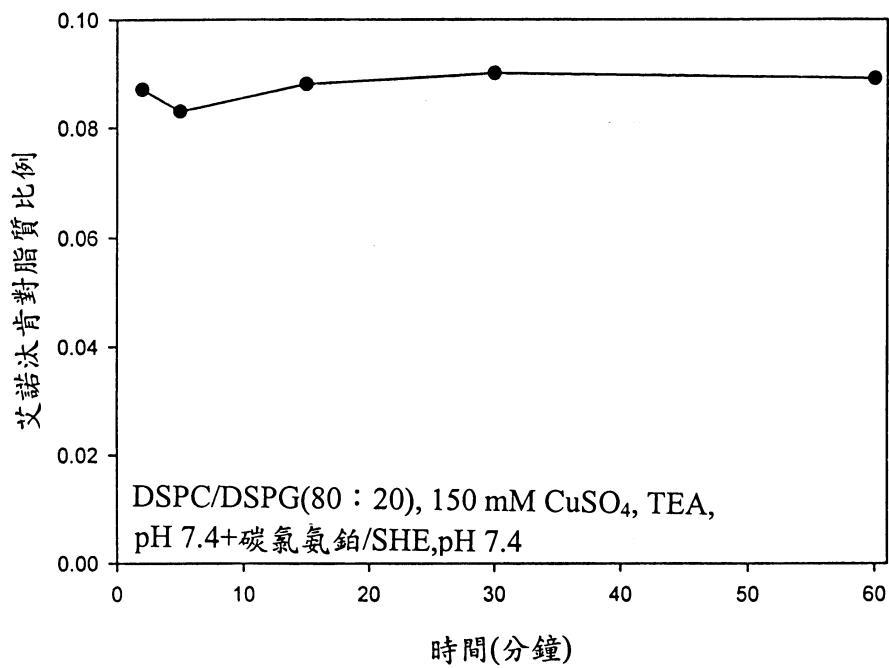


圖 5

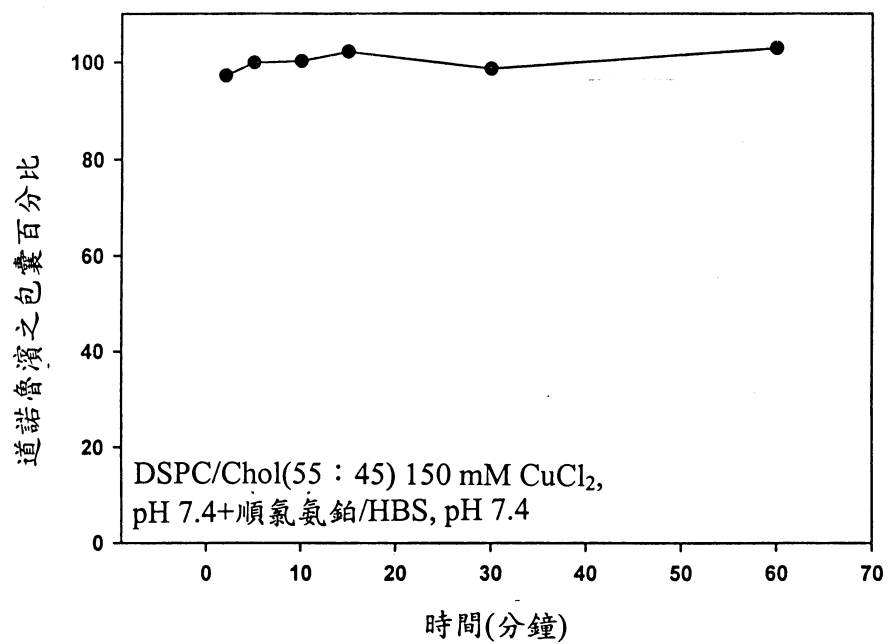


圖 6

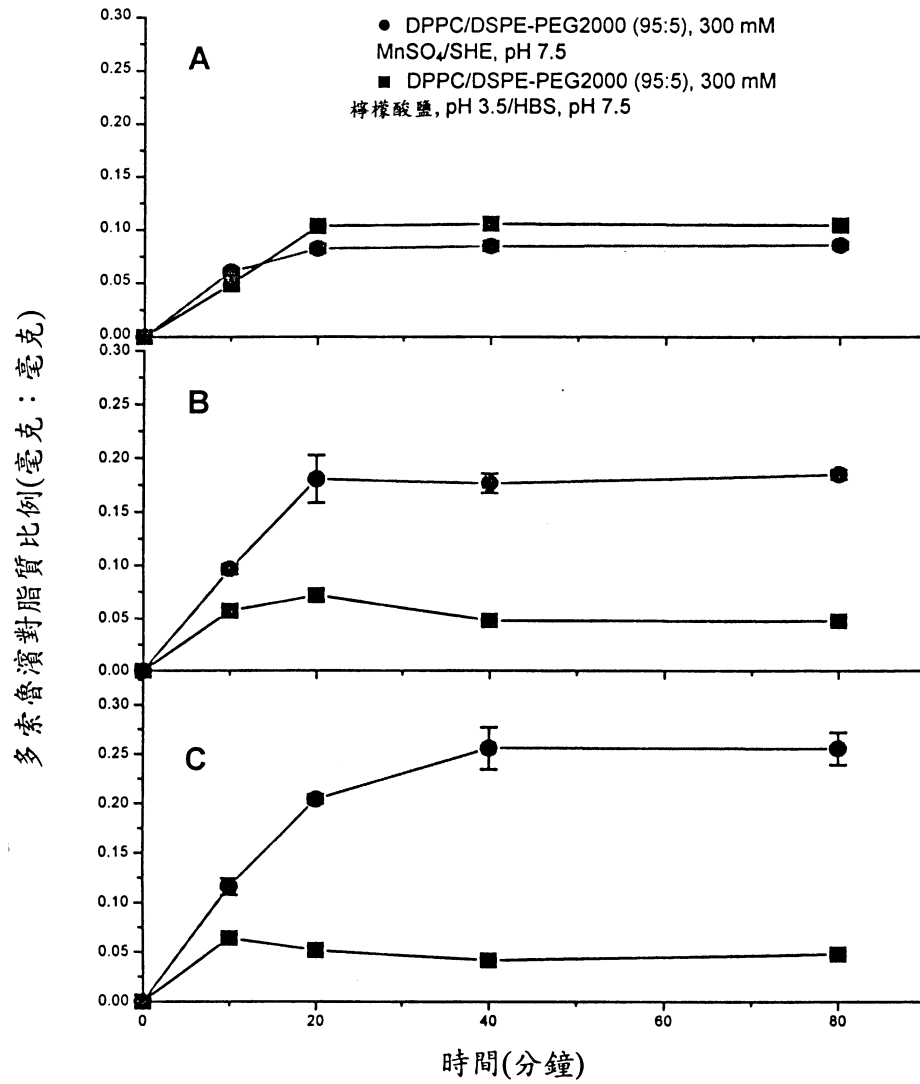


圖 7

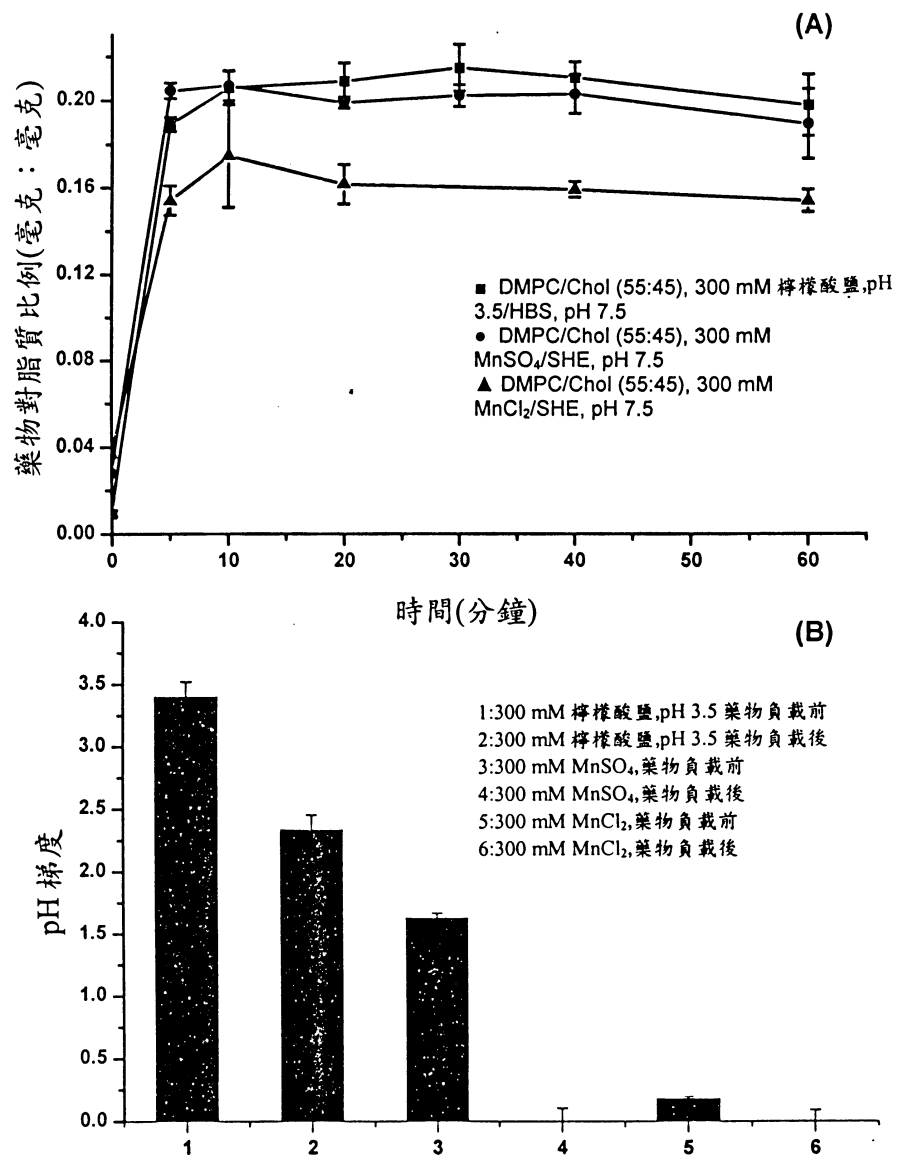


圖 8

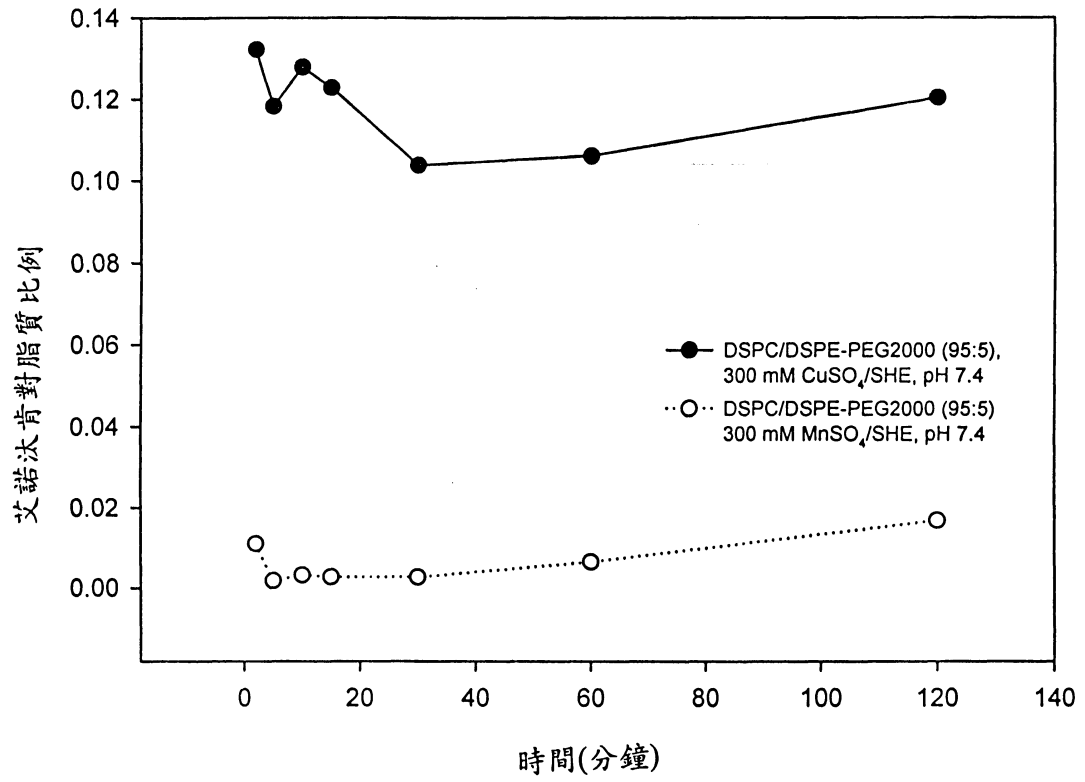


圖 9

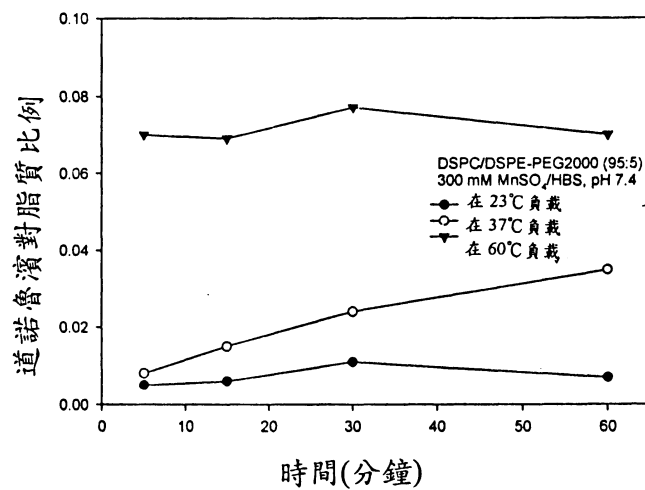


圖 10A

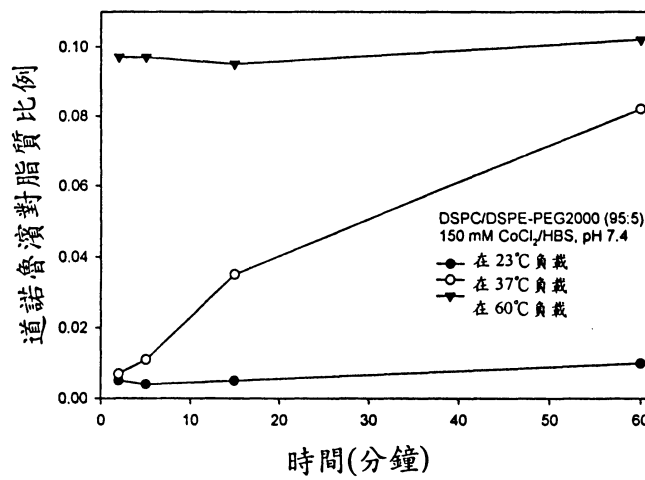


圖 10B

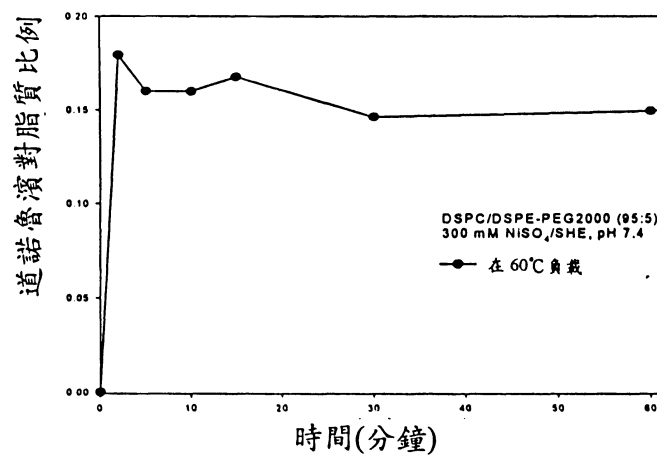


圖 10C

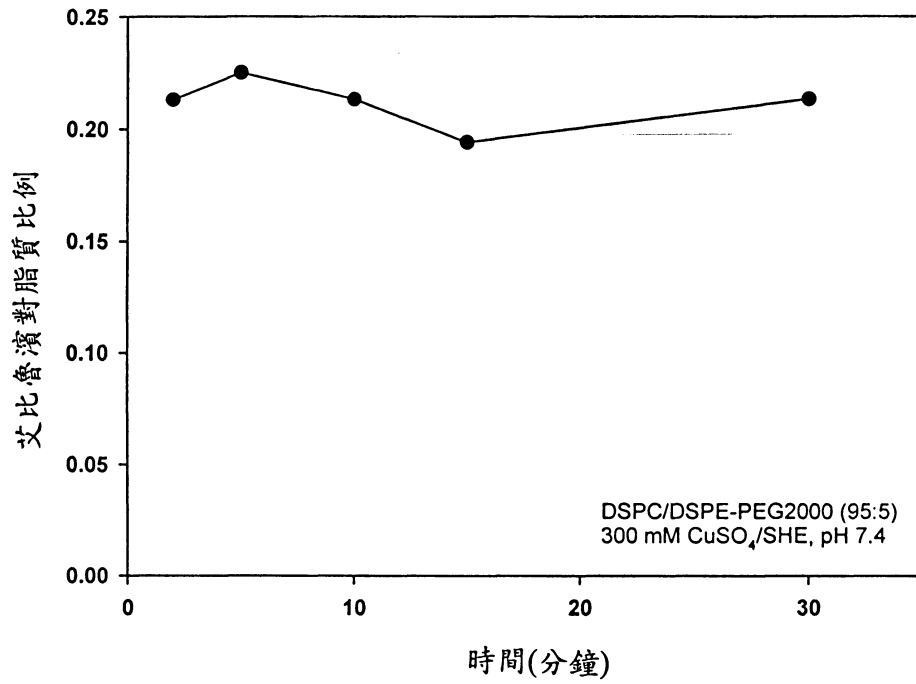


圖 11

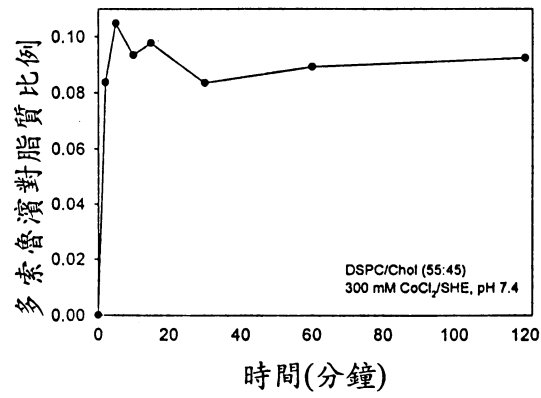


圖 12A

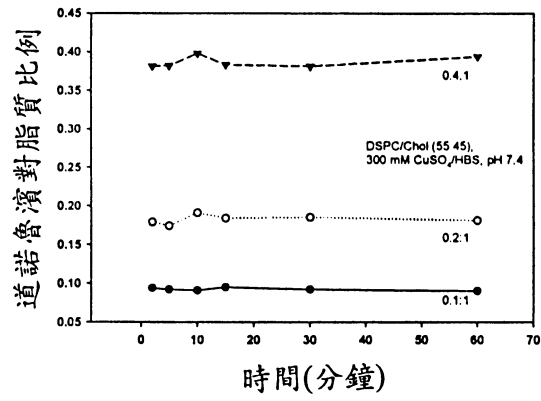


圖 12B

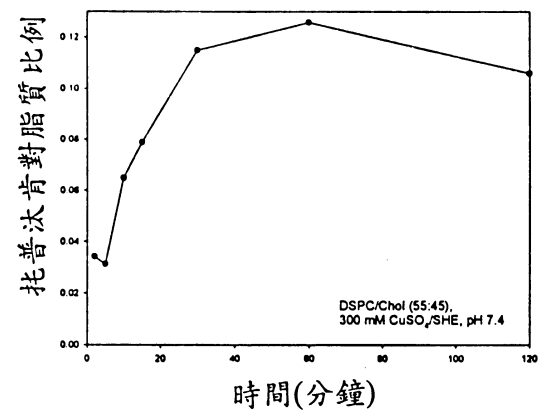


圖 12C

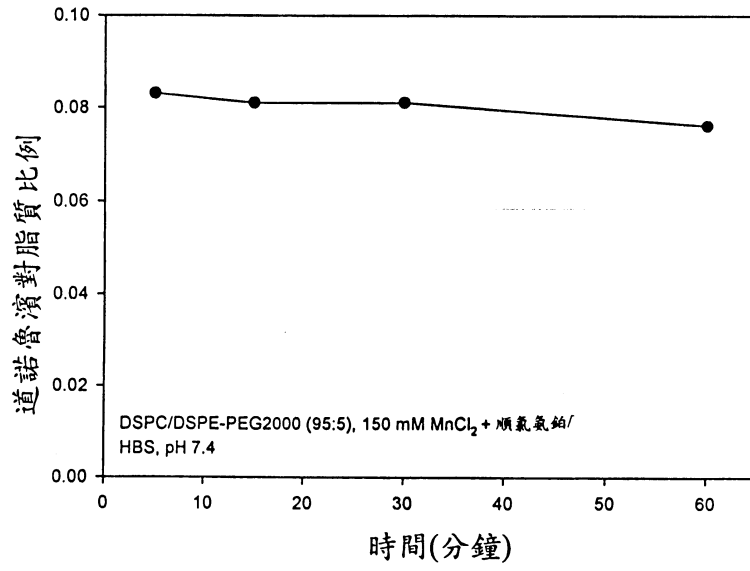


圖 13A

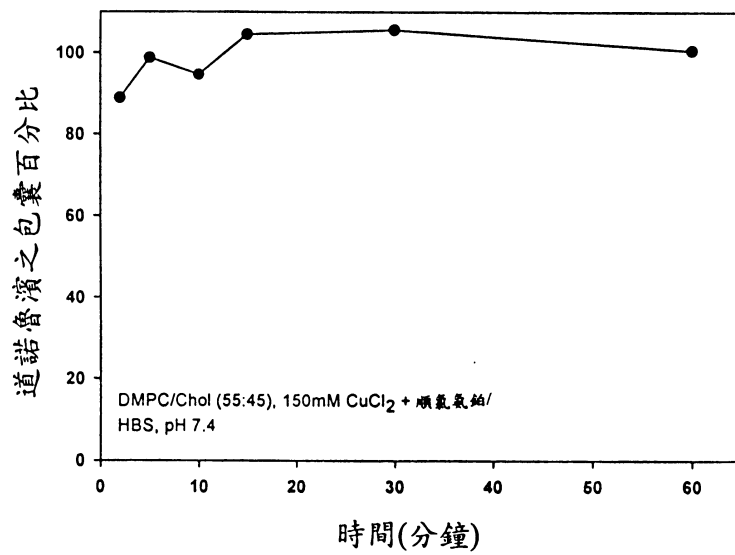


圖 13B

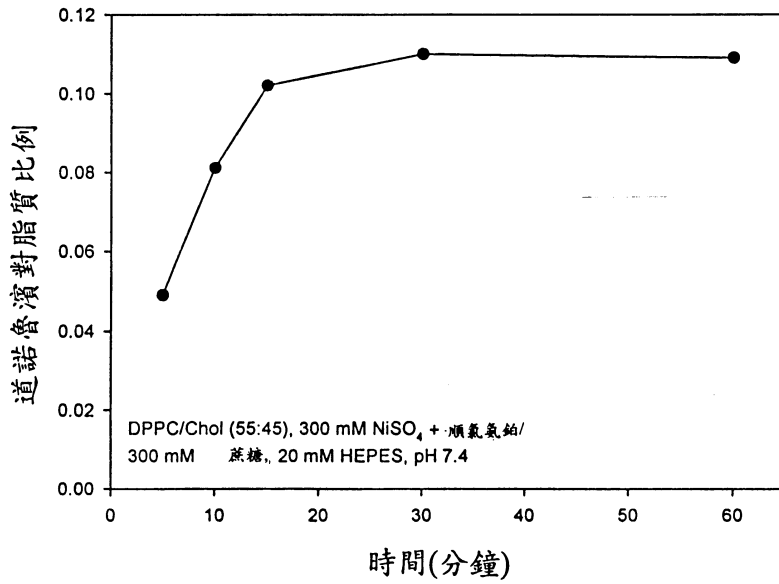


圖 13C

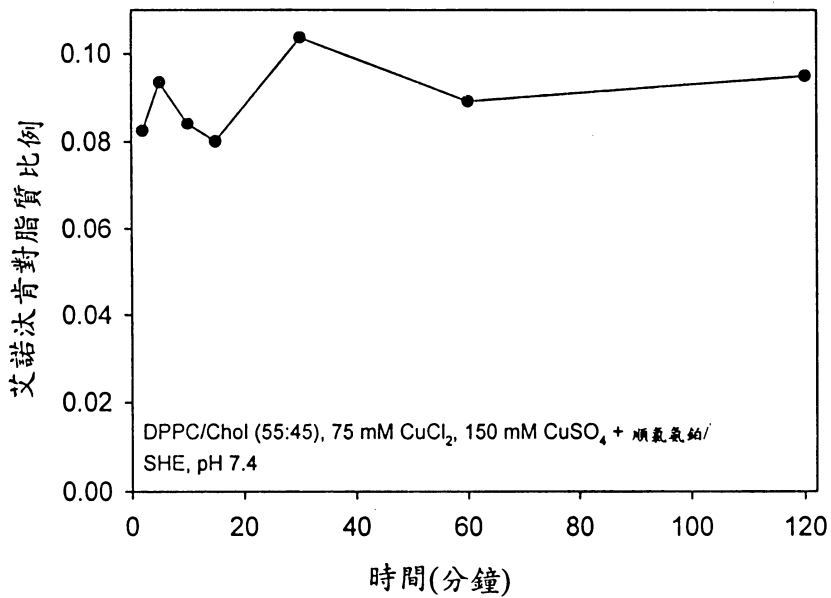


圖 13D

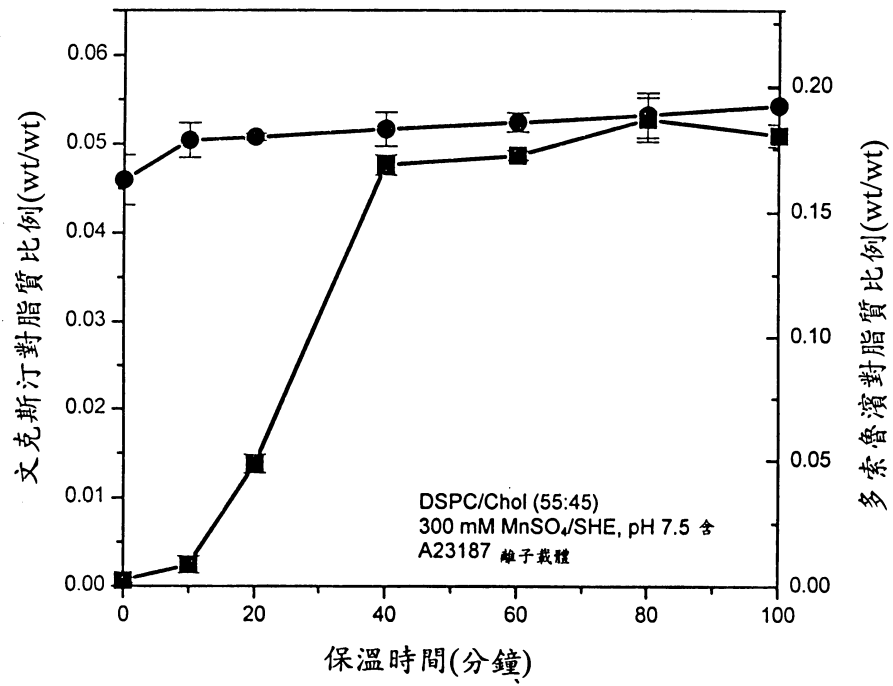


圖 14

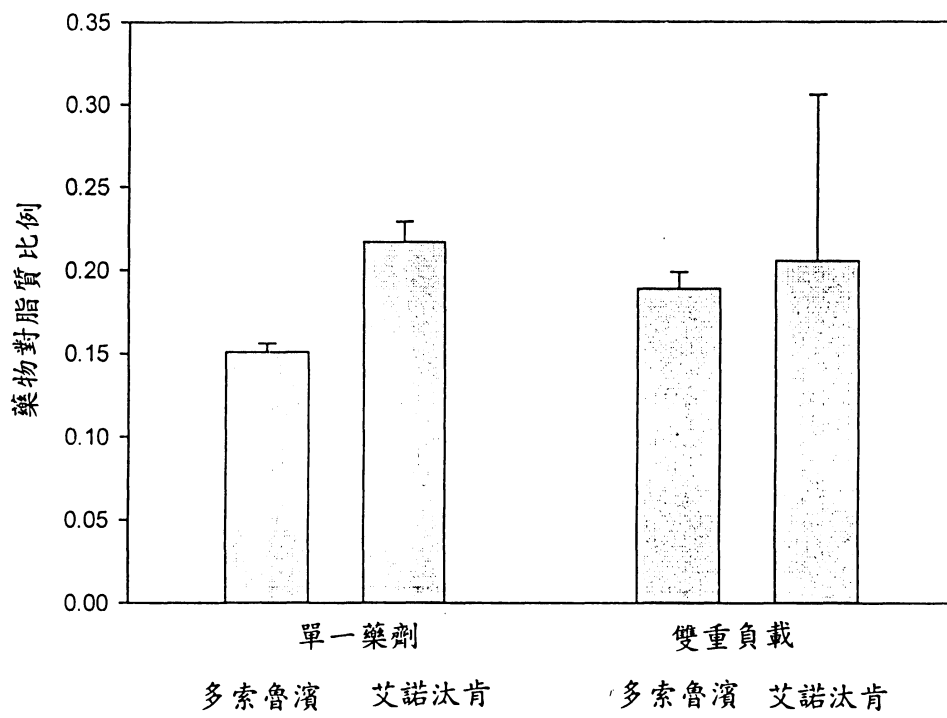


圖 15

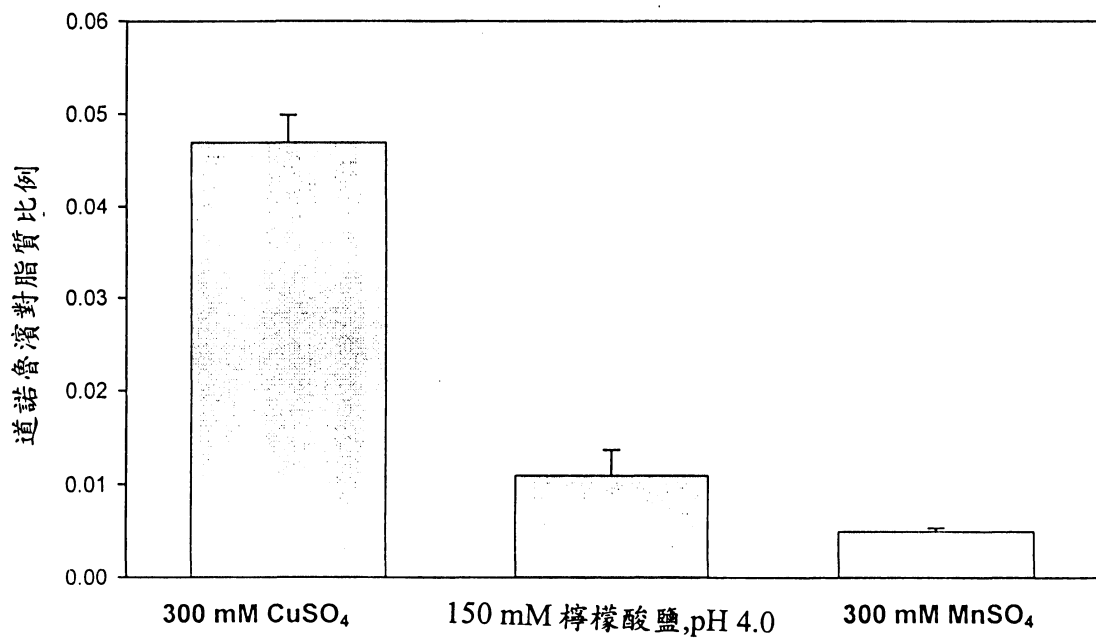


圖 16

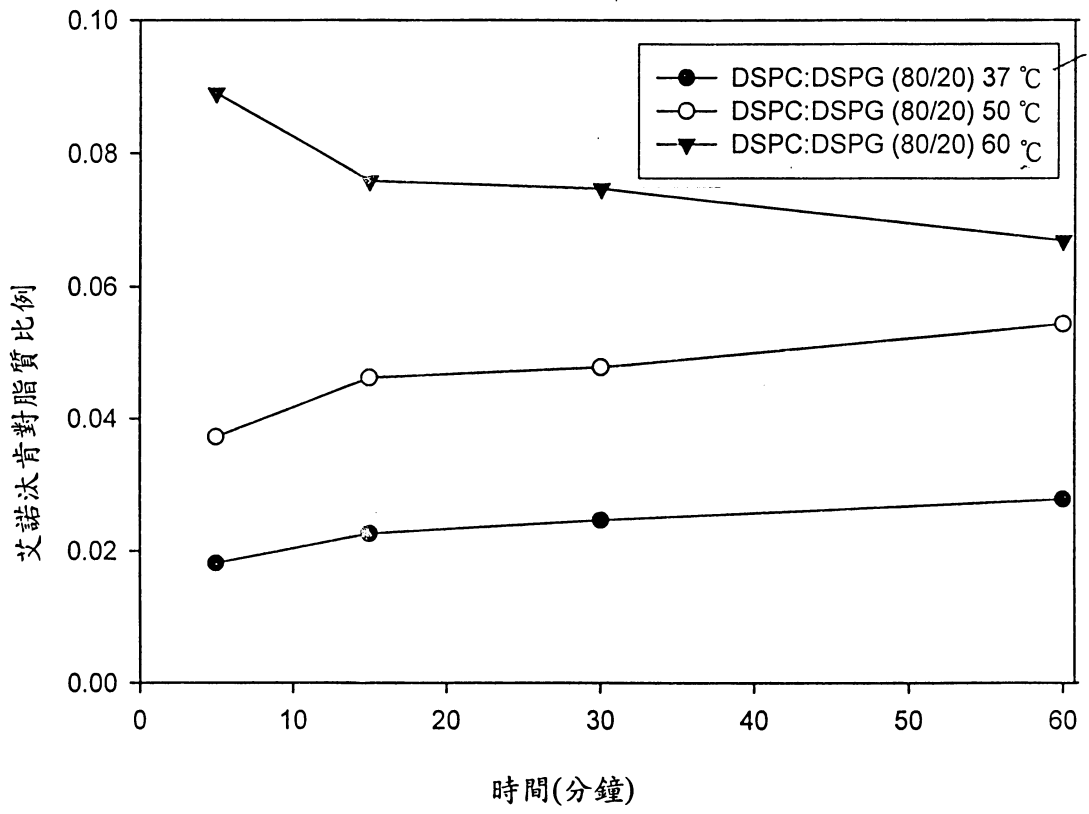


圖 17

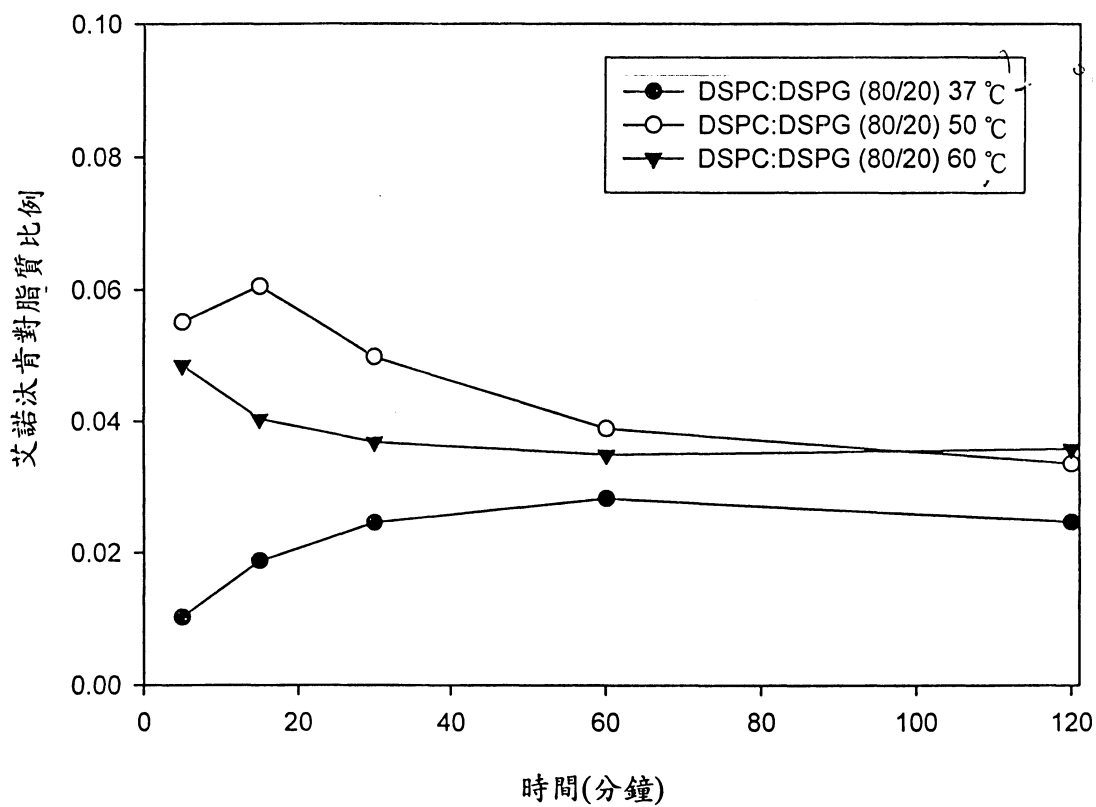


圖 18

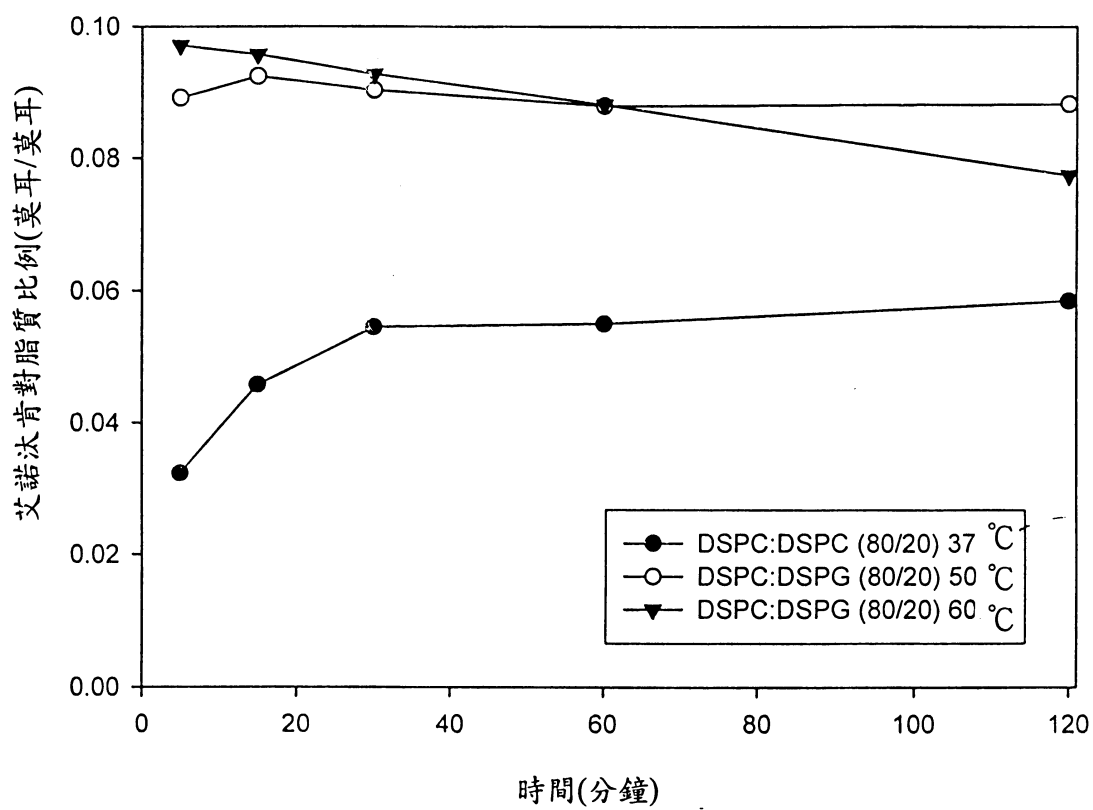


圖 19

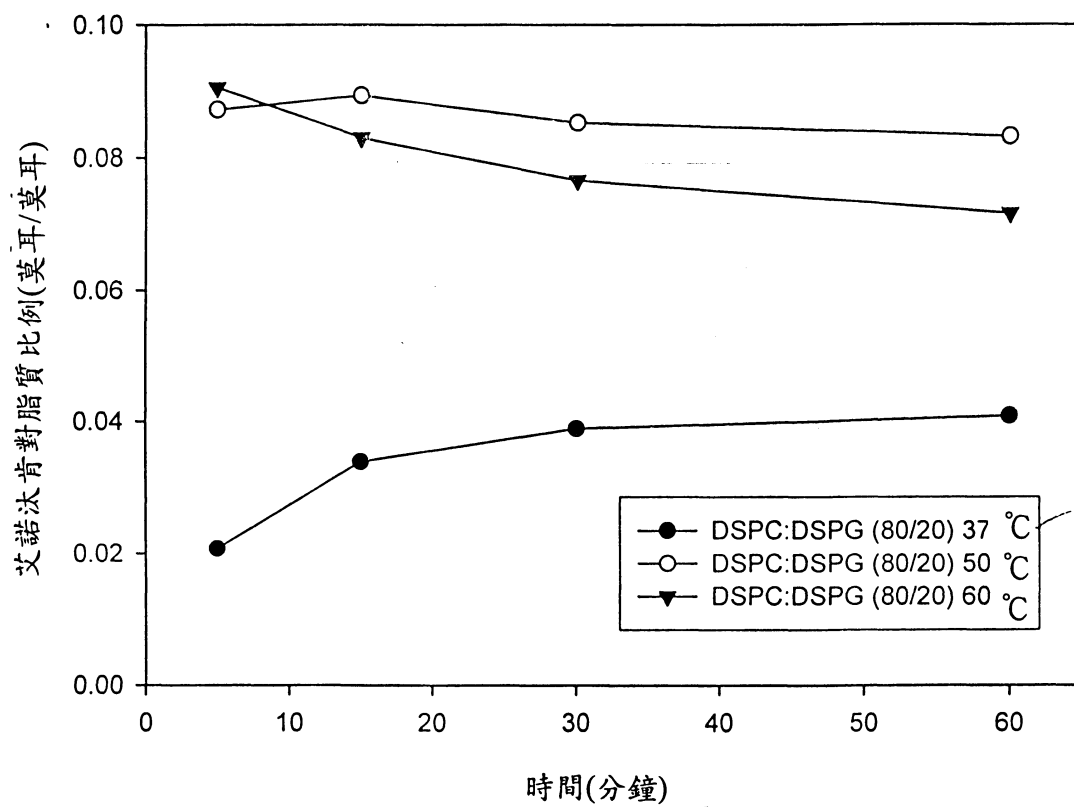


圖 20

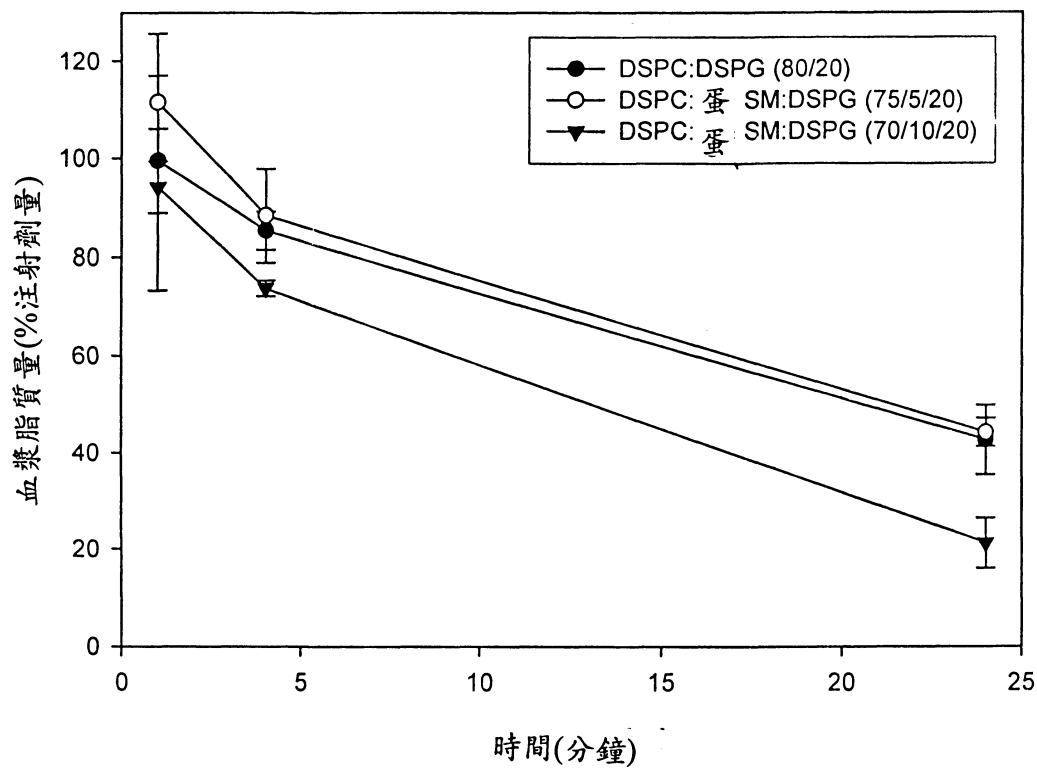


圖 21

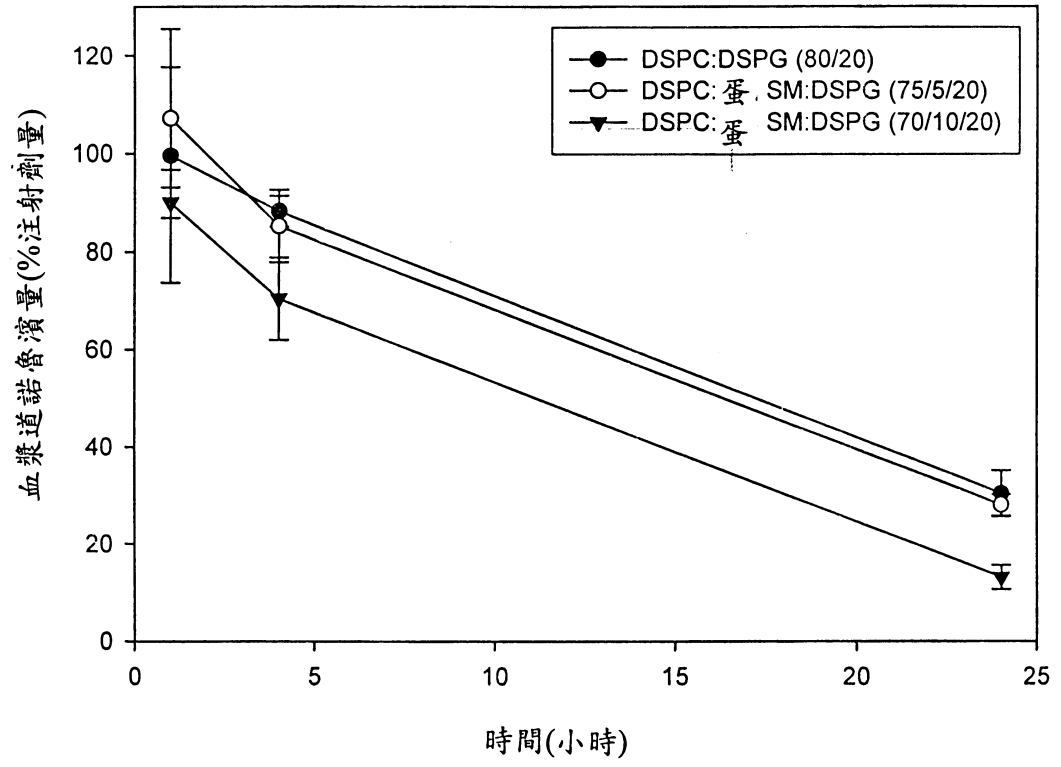


圖 22

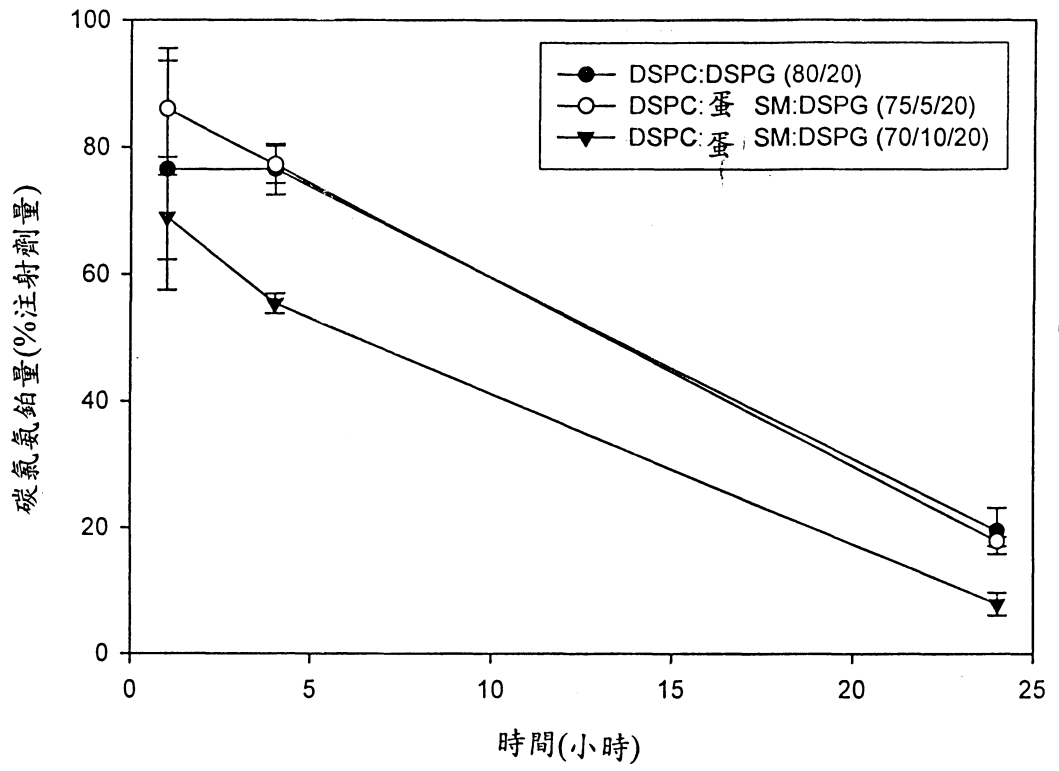


圖 23

五、發明說明 (1)

發明領域

本發明有關一種藥物及其他藥劑包囊入微脂體之方法。

發明背景

微脂體為由一或多個包圍內部分室之脂質雙分子層所構成之微觀顆粒。微脂體可歸類為多層泡囊、多泡囊微脂體、單層泡囊及巨大微脂體。多層微脂體(亦稱為多層泡囊或"MLV")在各微質體顆粒內含有數個同心雙分子層，裝配該"洋蔥層"。多泡囊微脂體係由包圍數個非同心水性隔室之脂質膜所構成。包圍單一內部含水分室之微脂體包含小的單層泡囊(SUVs)及大的單層泡囊(LUVs)。LUVs及SUVs大小範圍分別為約50至500奈米及20至50奈米。巨大微脂體典型上大小範圍自5000奈米至50,000奈米且主要用以研究體外脂體雙分子泡囊之機械化學及相互作用特徵(Needham等人, 膠體及表面B: 生物介面(2000)18: 183-195)。

微脂體已廣泛研究及作為各種藥劑(如藥物、化妝品、診斷藥劑及基因材料)之載體。由於微脂體由非毒性脂質所構成, 其一般具有低毒性且因此可用於各種醫藥用途。尤其, 微脂體可用以增加於血流中具短半衰期之藥劑之循環生命期。微脂體包囊之藥物經常具有生物分布性及毒性, 其與游離藥物大為不同。對特定體內輸送而言, 該等載體之大小、改變及表面性質可藉改變製備方法及藉修整由載體構成之脂質而改變。例如, 微脂體可藉減少構成該載體之脂質醯基鏈長而作成更快速釋出藥物。

包囊於泡囊內部之含金屬離子之微脂體已用於診斷用

五、發明說明 (2)

途。例如，微脂體已用於顯影劑之傳遞，其目標為在個體內之所需部位累積顯影劑。後者用途中，微脂體主要分別用於傳遞診斷放射核苷酸及 γ 之超磁金屬離子及用於核磁顯影。此包含放射核苷酸如 ^{111}In 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 及 ^{67}Ga 及超磁離子如 Gd 、 Mn 及氧化錳之微脂體包囊作用。兩方法典型上用以製備顯影目的之微脂體。第一方法中，金屬轉化成可溶螯合劑且接著導入微脂體之含水內部。第二方法中，以親脂基衍化之螯合劑在微脂體製備期間或之後定位至微脂體表面。

錳及非過渡金屬離子亦已包含於將可離子化劑包囊入含有插入微脂體膜中之離子載體之微脂體之方法中(參見US專利5837282及Fenske等人, *Biochim. Biophys. Acta*(1998) 1413:188-204)。此方法中，該離子載體使該離子金屬轉位通過微脂體膜與質子交換，因而建立pH梯度。通過微脂體雙分子層之適當pH梯度建立使可離子劑被包囊，由於該劑易通過中性態之微脂體雙分子層且隨後由於轉變成帶電態變成被包囊且捕捉於微脂體之含水內部中(參見Mayer等人, US專利6083530, 5616341, 5795589及5744158; Mayer等人, *Biochimica et Biophysica Acta*(1986) 857:123)。此工作產生自Deamer等人所完成之機械論研究(*Biochimica et Biophysica Acta*(1976) 455:269-271)，其證明此微脂體反應於穿膜pH梯度而有效地濃縮數種兒茶酚胺(多巴胺、副腎腺素及腎上腺素)。

存在有酸性微脂體內部及對中性外部環境為鹼性可使在

五、發明說明 (3)

中性至鹼性pH 主要呈中性態且在酸性pH 主要成帶電荷態之藥劑易被捕捉入微脂體中。含可離子化基團如胺基之藥物易被包囊且保留於含酸性內部之微脂體中。此方法當使用離子載體(A23187)在通過含錳微脂體中產生pH梯度時，已被用以將托普汰肯(topotecan)負載入包括有插入膜中之PEG-脂質共軛物之不含膽固醇之微脂體中(參見WO/0185131)。然而，使用穿膜pH梯度成功地負載及保留可實現，同時維持微脂體之內部pH。由於pH梯度僅可維持短暫時間，因此臨床上調配藥物於微脂體中須洽在藥物負載之前產生微脂體之pH梯度。此方法之缺點源自脂質在可避免須長期儲存藥物負載之微脂體之酸性pH下之不安定性。微脂體調配物之冷凍可減緩水解速率，但習知之微脂體調配物經常凝集且解凍後滲透內容物，除非使用適當地選擇之凍結保護劑。

藥物如多索魯濱(doxorubicin)或希普氟辛(ciprofloxacin)與二價金屬離子如Mn²⁺間之錯合已被報導(Bouma, J., 等人(1986) Pharm. Weekbl. Sci. Edn. 16: 109-133; Riley, C.M., 等人(1993) J. Pharm. Biomed. Anal. 11: 49-59; 及Fenske, D.B.(1998) Biochim. Biophys. Acta. 1414: 188-204)。近來，已報導多索魯濱(但非希普氟辛)吸收入神經磷脂/膽固醇LUVs可以內部負載介質中之錳進行而不存在離子載體(Cheung 等人., Biochimica et Biophysica Acta(1998) 1414: 205)。已教示同時包含在多索魯濱及錳離子間形成錯合及使微脂體內部之多索魯濱之質子化導致在錳離子存在下之

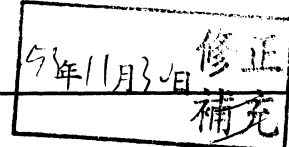
五、發明說明 (4)

此特定藥物吸入。已報導多索魯濱之穩定捕捉但此工作倚賴於使用神經磷脂/膽固醇微脂體(適當藥物保留之調配物)。Cheung等人所報導之包含於pH 7.4之HEPES緩衝液中使用 $MnSO_4$ 之方法由於金屬自此緩衝液中沉澱出而無再現性。

各種基已被研究金屬離子與微脂體之相互作用目的為評估金屬陽離子對泡囊膜之影響(Steffan等人(1994) Chem. Phys. Lipids 74(2) : 141-150)。由於微脂體之表面負電荷，二價金屬離子如 Ca^{2+} 與含微脂體之磷脂醯基甘油(PG)之金屬誘發交聯之不利形成有關聯。金屬離子亦與負電模型膜系統之相轉移溫度增加有關(Borle,等人., (1985) 脂質之化學及物理性 36 : 263-283 ; Jacobson, 等人., (1975) Biochemistry 14(1) : 152-161)。該等研究顯示鈣加入二棕櫚醯基磷脂醯甘油(DPPG)膜導致相轉移溫度增加約 $50^{\circ}C$ 。該等結果顯示使用負電荷質質聯同金屬離子將導致微脂體展現體內應用之優異特性。

發明概述

本發明基於發現在微脂體中無離子載體進行使用金屬為主之程序之微脂體負載效率及保留性質意外地與所用金屬及構成微脂體之脂質有關。藉選擇脂質構成及金屬組成，可修整負載或保留性質而達所選擇之藥劑之所需負載或自微脂體中釋出。再者，藉由使用金屬可相容溶液可避免金屬自用以調配金屬離子包囊微脂體之溶液中不利沉澱，且負載亦可藉嚴厲地自含此微脂體之外部溶液移除金屬離子



五、發明說明 (10)

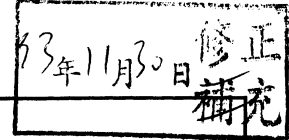
7.4作為外部溶液之艾諾汰肯(irinotecan)以85:15莫耳比負載入含氟利啉(floxuridine)(FUDR)之DSPC/DSPG微脂體與時間函數之作圖。FUDR經被動包囊且艾諾汰肯負載係在50°C以藥物對脂質莫耳比為0.1:1之下進行。

圖4B:顯示使用100 mM葡糖酸銅(II)、220 mM TEA, pH 7.4作為內部介質及以20 mM HEPES、150 mM NaCl (HBS), pH 7.4或以300 mM蔗糖、20 mM HEPES, pH 7.4作為外部緩衝液之艾諾汰肯(irinotecan)負載入含FUDR之DSPC/DSPG (70:10:20莫耳比)微脂體與時間函數之作圖。FUDR經被動包囊且艾諾汰肯負載係在50°C以藥物對脂質莫耳比為0.1:1之下進行。

圖5:顯示使用以TEA調整至pH 7.4之150 mM CuSO₄作為內部介質及以SHE, pH 7.4作為外部緩衝液之艾諾汰肯(irinotecan)負載入含碳氯鉍鉑(carboplatin)之DSPC/DSPG (80:20莫耳比)微脂體與時間函數之作圖。碳氯鉍鉑經被動包囊且艾諾汰肯負載係在60°C以藥物對脂質重量比為0.1:1之下進行。

圖6:顯示使用以NaOH調整至pH 7.4之150 mM CuCl₂作為內部介質及以HBS, pH 7.4作為外部介質之道諾魯濱(daunorubicin)負載入含順氯鉍鉑(cisplatin)之DSPC/Chol (55:45莫耳比)微脂體與時間函數之作圖。順氯鉍鉑經被動包囊且道諾魯濱負載係在60°C以藥物對脂質重量比為0.1:1之下進行。

圖7:顯示使用300 mM MnSO₄或300 mM檸檬酸鹽, pH



五、發明說明(11)

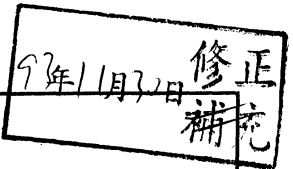
3.5作為內部介質之多索魯濱負載入DPPC/DSPE-PEG 2000 (95:5莫耳比)微脂體與時間函數之作圖。多索魯濱負載係在37°C以藥物對脂質重量比為0.1:1(A條桿)、0.2:1(B條桿)或0.3:1(條桿C)之下進行。數據點代表三次重複實驗之平均且誤差桿代表標準偏差。

圖8A:顯示使用300 mM MnSO₄或300 mM檸檬酸鹽, pH 3.5或300 mM MnCl₂之多索魯濱負載入DMPC/Chol(55:45莫耳比)微脂體與時間函數之作圖。多索魯濱負載係在60°C以藥物對脂質重量比為0.2:1之下進行。數據點代表三次重複實驗之平均且誤差桿代表標準偏差。

圖8B:顯示多索魯濱在各種條件下負載前及負載後所測得之轉膜pH梯度之柱狀圖。該樣品包含以多索魯濱負載前(柱條1)及負載後(柱條2)之檸檬酸負載方法為主者;多索魯濱負載前(柱條3)及負載後(柱條4)之MnSO₄負載方法;及多索魯濱負載前(柱條5)及負載後(柱條6)之MnCl₂負載方法。該結果代表三次個別實驗之平均pH梯度及誤差桿表示標準偏差。

圖9:顯示利用300 mM MnSO₄或300 mM CuSO₄作為內部負載介質而將艾諾汰肯(irinotecan)負載入DSPC/DSPE-PEG2000(95:5莫耳比)之作圖。艾諾汰肯負載係在60°C以藥物對脂質重量比為0.1:1之下進行。

圖10A:顯示利用300 mM MnSO₄作為內部介質之道諾魯濱(daunorubicin)負載入DSPC/DSPE-PEG2000(95:5莫耳比)之作圖。負載係在23°C、37°C及60°C以最初藥物對脂質



五、發明說明 (12)

重量比為0.1 : 1之下進行。

圖 10B : 顯示利用 150 mM CoCl_2 作為內部介質之道諾魯濱 (daunorubicin) 負載入 DSPC/DSPE-PEG2000(95 : 5 莫耳比) 之作圖。負載係在 23°C、37°C 及 60°C 以藥物對脂質重量比為 0.1 : 1 之下進行。

圖 10C : 顯示利用 300 mM NiSO_4 作為內部介質之道諾魯濱 (daunorubicin) 負載入 DSPC/DSPE-PEG2000(95 : 5 莫耳比) 之作圖。負載係在 60°C 以藥物對脂質重量比為 0.2 : 1 之下進行。

圖 11 : 顯示在 60°C 使用 300m M CuSO_4 之艾比魯濱 (epirubicin) 負載入 DSPC/ DSPE-PEG2000 (95 : 5 莫耳比) 微脂體與時間函數之作圖。艾比魯濱係負載達成藥物對脂質重量比為 0.2 : 1。

圖 12A : 顯示使用 300 mM CoCl_2 作為內部介質及 SHE, pH 7.5 作為外部緩衝液之多索魯濱負載入 DSPC/Chol(55 : 45 莫耳比) 微脂體與時間函數之作圖。負載係在 60°C 以藥物對脂質重量比 0.1 : 1 之下進行。

圖 12B : 顯示使用 300 mM CuSO_4 作為內部介質及 HBS, pH 7.4 作為外部緩衝液之道諾魯濱負載入 DSPC/Chol(55 : 45 莫耳比) 微脂體與時間函數之作圖。負載係在 60°C 以藥物對脂質重量比 0.1 : 1、0.2 : 1 及 0.4 : 1 之下進行。

圖 12C : 顯示在 37°C 之托普汰肯 (topotecan) 負載入 DSPC/DSPE-PEG (95 : 5 莫耳比) 微脂體與時間函數之作圖。使用 300 mM CuSO_4 溶液作為內部負載介質。托普汰肯

五、發明說明 (14)

圖。含300 mM $MnSO_4$ 之微脂體在50°C以多索魯濱以藥物對至脂質比例0.2 : 1 wt/wt預先負載。文克斯汀負載以A23187離子載體之助在藥物對脂質比例0.05 : 1 wt/wt進行。誤差桿表示三次重複實驗間之標準偏差。

圖15：顯示含300 mM $CuSO_4$ 作為內部介質依序將艾諾汰肯(irinotecan)及多索魯濱負載至DSPC/Chol(55 : 45莫耳比)微脂體之柱狀圖。微脂體在60°C以藥物對脂質莫耳比0.2 : 1預先負載至約100%接著使多索魯濱包囊，在0.15 : 1藥物/脂質莫耳比負載。至於對照組，分別測量各藥物吸入單獨負載之微脂體中之微脂體。誤差桿表示三次重複實驗間之標準偏差。

圖16：顯示對Balb/c小鼠靜脈內投與24小時後，含道諾魯濱之DSPC/DSPE-PEG2000(95 : 5莫耳比)微脂體之血漿藥物對脂質比例柱狀圖。道諾魯濱以藥物對脂質重量比例0.1 : 1在60°C負載入包括有300 mM $CuSO_4$; 150 mM檸檬酸鹽，pH 4 ; 或包括有300 mM $MnSO_4$ 作為內部介質之微脂體中。誤差桿表示三次重複實驗間之標準偏差。

圖17：顯示艾諾汰肯負載入DSPC : DSPG(80 : 20莫耳%)微脂體反應於包囊 $CuSO_4$ 接著通過以150 mM NaCl平衡之Chelex-100TM管柱之微脂體之作圖。該微脂體隨後交換至300 mM蔗糖、20 mM HEPES, pH 7.4。負載係在37°C(實心圓)、50°C(空心圓)及60°C(倒三角形)保溫進行。

圖18：顯示艾諾汰肯負載入DSPC : DSPG(80 : 20莫耳%)微脂體在37°C(實心圓)、50°C(空心圓)及60°C(倒三角形)

五、發明說明 (35)

調配物發生銅負載，以7.4之內部及外部pH製備含葡糖酸銅(II)之二硬脂醯磷脂醯基膽鹼(DSPC)/二硬脂醯磷脂醯基甘油(DSPG)(80：20莫耳比)微脂體。如上述方法段落般製備80：20莫耳比脂DSPC/DSPG脂質膜。該脂質膜在以三乙醇胺(TEA)調整至pH 7.4之100 mM葡糖銅(II)中水合及在70°C擠出。該微脂體藉相切流動滲析經緩衝交換至300 mM蔗糖、20 mM HEPES、30 mM EDTA(SHE緩衝液),pH 7.4及隨後於6毫升SHE,pH 7.4中洗滌3次以自微脂體外溶液移除任何葡糖酸銅(II)。以0.1：1之藥物對脂質莫耳比添加艾諾吡肯至該微脂體製劑中並在50°C保溫。如方法段落所述般在370奈米測量吸收度而測定藥物負載程度及藉液體閃蒸計數測定脂質量。

圖1A所示結果顯示在負載起始約5分鐘後，在50°C無pH梯度下實質上完成艾諾吡肯負載入DSPC/DSPG(80：20莫耳比)微脂體中。

亦研究道諾魯濱負載入含有緩衝至pH 7.4之包囊CuSO₄-DSPC/DSPG(90：10莫耳比)微脂體。依據該方法製備脂質膜，但DSPG溶於氯仿/甲醇/水(50：10：1 v/v)。使用150 mM CuSO₄、20 mM組胺酸(使用TEA調整至pH 7.4)作為水合介質及MLVs在70°C擠出。使用手固定之相切流動滲析管柱使微脂體交換至SHE,pH 7.4。道諾魯濱以0.1：1之藥物/脂質重量比負載。如上述於清潔劑中溶解以定量道諾魯濱後藉測量480奈米之吸收度而測定負載期間各時間點脂藥物對脂質比例；藉液體閃蒸計數測定脂質量。

如圖1B所概述，所測量之所有時間點中，道諾魯濱在無

五、發明說明 (49)

CL4B樹脂之 Sepharose 管柱上層析而交換至 SHE, pH 7.4 中。道諾魯濱以藥物對脂質重量比 0.1 : 1 在 37°C 負載。艾諾汰肯如前述在 60°C 以藥物對脂質重量比 0.1 負載入微脂體中。使用前述程序測量藥物及脂質量。

概述於圖 13C 及 13D 之結果說明以含鉑藥物之鎳或銅離子溶液有效地負載第二種藥物所製備之 DPPC/Chol(55 : 45 莫耳比)微脂體。

實例 11

金屬負載與離子載體調節之負載技術組合獲得多重藥劑之包囊

以額外活性負載機制負載之組合金屬產生多索魯濱及文克斯汀兩者有效包囊入單一微脂體中。多索魯濱之金屬負載接著文克斯汀之離子載體調節負載詳述如下。

如前述實例般製備 DSPC/膽固醇微脂體(55 : 45 莫耳比)，但脂質膜在 300 mM MnSO₄ 中水合及使用脂質標記物 14C-CHE。所得 MLVs 在 65°C 擠出接著通過以 300 mM 蔗糖、20 mM HEPES 及 15 mM EDTA (pH 7.5) 預平衡之 Sephadex G-50 管柱。接著以 0.2 : 1 之藥物對脂質重量比添加多索魯濱及在 60°C 進一步保溫 60 分鐘。

負載多索魯濱後，二價陽離子之離子載體 A23187 離子載體/(莫耳脂質)添加至該微脂體中及混合物在室溫保溫 3 分鐘以加速 A23187 併入雙分子層中。隨後，文克斯汀添加至該混合物中及在 50°C 保溫 100 分鐘。於藥物製劑中添加小量放射標記之文克斯汀以加速藥物定量。在 0.05 : 1 之文

六、申請專利範圍

1. 一種微脂體組合物，其包括含內部溶液之微脂體，該內部溶液包括一或多種包囊之過渡金屬離子及一或多種治療劑，但若該一或多種治療劑僅為多索魯濱(doxorubicin)，則該一或多種包囊金屬離子不僅為錳；且其中
 - (a) 該微脂體不包括離子載體；且
 - (b) 該治療劑係負載於在該內部溶液中含有該金屬離子之預形成微脂體。
2. 如申請專利範圍第1項之組合物，其係為一醫藥組合物。
3. 如申請專利範圍第1項之組合物，其中該治療劑係為喹啉酮、蔥環素、抗生素、氮芥物、喜樹鹼或鬼臼脂素。
4. 如申請專利範圍第1至3項中任一項之組合物，其中該微脂體包括二硬脂醯磷脂醯基膽鹼(DSPC)/二硬脂醯磷脂醯基甘油(DSPG)。
5. 如申請專利範圍第1至3項中任一項之組合物，其包括於外部溶液中之該微脂體。
6. 如申請專利範圍第5項之組合物，其中該外部溶液及微脂體之外部表面實質上不含未複合之金屬離子。
7. 如申請專利範圍第6項之組合物，其中該外部溶液包括金屬螯合劑。
8. 如申請專利範圍第5項之組合物，其中該外部溶液及該內部溶液實質上具相同pH。
9. 如申請專利範圍第1至3項中任一項之組合物，其中該微脂體為低膽固醇。

六、申請專利範圍

10. 如申請專利範圍第1至3項中任一項之組合物，其中該一或多種金屬離子為第一列過渡金屬。
11. 如申請專利範圍第1至3項中任一項之組合物，其中該一或多種金屬離子係選自Fe、Co、Ni、Cu、Zn、V、Ti、Cr、Rh、Ru、Mo及Pd所成之組群。
12. 如申請專利範圍第11項之組合物，其中該一或多種金屬離子係選自Zn、Co及Cu所成之組群。
13. 如申請專利範圍第12項之組合物，其中該金屬離子包括Cu。
14. 如申請專利範圍第10項之組合物，其中該微脂體又包括包囊之Mn。
15. 如申請專利範圍第1至3項中任一項之組合物，其中該內部溶液之pH在約6.0至約8.5之範圍內。
16. 如申請專利範圍第1至3項中任一項之組合物，其中該微脂體包括一或多種在生理pH下為負電荷之脂質。
17. 如申請專利範圍第16項之組合物，其中該一或多種負電荷脂質係選自磷脂醯基甘油(PG)及磷脂醯基肌醇(PI)。
18. 一種將治療劑負載入微脂體組合物之微脂體中之方法，該方法包括下列步驟：
 - i) 提供於外部溶液中包括微脂體之微脂體組合物，該微脂體含有包括一或多種包囊之過渡金屬離子之內部溶液；
 - ii) 於該外部溶液中添加一或多種治療劑；及
 - iii) 維持該治療劑於該外部溶液中足夠時間而使該治療

六、申請專利範圍

劑負載於微脂體中

但若該一或多種治療劑僅為多索魯濱(doxorubicin)，
則該一或多種金屬離子不僅為錳；且

該微脂體不包括離子載體。

19. 如申請專利範圍第18項之方法，其中該內部溶液包括金屬可相容溶液；及/或

其中該外部溶液及該微脂體之外部表面實質上不含未複合之金屬離子；及/或

其中該未複合金屬離子係在步驟(ii)之前藉層析或藉示量溶液交換或滲析而自外部溶液移除；及/或

其中該內部溶液及該外部溶液實質上具相同pH；及/或

其中該微脂體為低膽固醇；及/或

其中該一或多種金屬離子係選自Fe、Co、Ni、Cu、Zn、V、Ti、Cr、Rh、Ru、Mo及Pd所成之組群；及/或

其中該內部溶液之pH在約6.0至約8.5之範圍內；及/或

其中該微脂體包括一或多種在生理pH下為負電荷之脂質。

20. 如申請專利範圍第19項之方法，其中該微脂體包括二硬脂醯磷脂醯基膽鹼(DSPC)/二硬脂醯磷脂醯基甘油(DSPG)。

21. 如申請專利範圍第19項之方法，其中該外部溶液包括金屬螯合劑；及/或

其中該一或多種負電荷脂質係選自磷脂醯基甘油(PG)及磷脂醯基肌醇(PI)。

六、申請專利範圍

22. 如申請專利範圍第18至20項中任一項之方法，其中在步驟(iii)之後藉所形成之轉膜pH梯度負載第二治療劑。
23. 如申請專利範圍第18至20項任一項之方法，其中第二治療劑係藉微脂體中存在之離子載體所建立之轉膜梯度負載，其中該轉膜梯度係建立在步驟(iii)之後。
24. 一種微脂體組合物，其包括由如申請專利範圍第18至22項中任一項之方法所製得之含有一或多種治療劑之微脂體。
25. 一種選擇對藥劑具有較佳負載或保留性質之微脂體組合物之方法，其包括：
 - (a) 提供於外部溶液中包括微脂體之微脂體組合物，該微脂體含有包括一或多種過渡金屬離子之內部溶液；
 - (b) 於(a)之組合物之該外部溶液中添加藥劑一段時間而使該藥劑負載入第一組合物之微脂體中；
 - (c) 提供一種於外部溶液中包括微脂體之第二微脂體，該微脂體含有包括一或多種過渡金屬離子之內部溶液；
 - (d) 於(c)之組合物之該外部溶液中添加藥劑一段時間而使該藥劑負載入第二組合物之微脂體中；
 - (e) 比較經時之負載藥劑量或保留藥劑量，用以比較(b)所得之組合物微脂體對(d)所得組合物之微脂體；及
 - (f) 選擇(b)或(d)之具有較大負載或保留藥劑量之微脂體組合物；其中：
 - (I) (a)及(c)之微脂體組合物之下列一或多個項目不

六、申請專利範圍

同：(i)存在於內部溶液之金屬離子；(ii)微脂體組合物之微脂體中之脂質；及(iii)內部溶液中存在之金屬離子濃度；

(II) 在(b)之時間期不同於在(d)之時間期；或

(III) (b)之負載係在不同於(d)之溫度下進行。

26. 如申請專利範圍第25項之方法，其中第一及第二組合物之一包括含膽固醇之微脂體及另一個該組合物包括低膽固醇之微脂體。
27. 如申請專利範圍第25或26項之方法，其中該第一及第二組合物之至少一個包括一或多種選自Cu、Co及Zn所成組群之金屬離子。
28. 如申請專利範圍第26或26項之方法，其包括進一步提供具有較大負載或保留藥劑量之組合物之額外步驟。