



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101170995 B

(45) 授权公告日 2013. 01. 16

(21) 申请号 200680015967. 0

(22) 申请日 2006. 03. 08

(30) 优先权数据

67469/2005 2005. 03. 10 JP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007. 11. 09

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2006/008650 2006. 03. 08

(87) PCT申请的公布数据

W02006/099169 EN 2006. 09. 21

(73) 专利权人 美生物药物株式会社

地址 日本东京

(72) 发明人 冈田一志 伊吹忠之 金东贤

藤泽忠司

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

公司 11245

代理人 赵蓉民 路小龙

(51) Int. Cl.

A61K 9/127(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

(56) 对比文件

EP 1209469 A1, 2002. 05. 29, 说明书第 [0007]-[0009]、[0049]、[0081] 和 [0083] 部分, 第 4 页第 25-26 行.

US 5891468 A, 1999. 04. 06, 实施例 6 和 9.

Liang Xu, et al. Transferrin-liposome-mediated systemic p53 gene therapy in combination with radiation results in regression of human head and neck cancer xenografts. Human Gene therapy 10. 1999, 10 摘要.

审查员 张玲玲

权利要求书 2 页 说明书 71 页 附图 22 页

(54) 发明名称

新颖的脂质体组合物

(57) 摘要

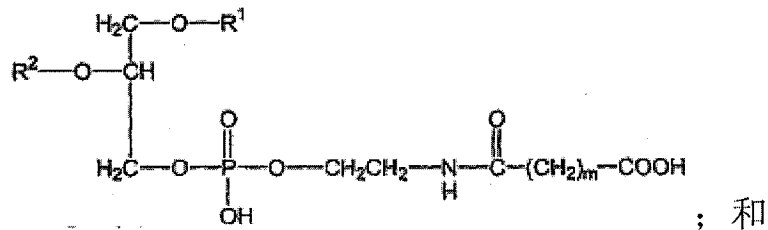
本公开内容提供了含有脂类的组合物, 包括包封药物的靶向脂质体及其药物制剂, 以及制备和应用所述含脂类组合物的方法, 包括所述靶向脂质体在癌症和其它疾病的治疗中的应用。

1. 靶向脂质体,包括一种或多种磷脂酰胆碱、N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺、靶向因子-修饰的N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺、包封药物和至少一种其它脂类,所述至少一种其它脂类是胆固醇、胆固醇普鲁兰多糖或带正电胆固醇,

其中所述靶向因子-修饰的N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺包括与第二N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺连接的靶向配体,所述靶向配体是转铁蛋白;和

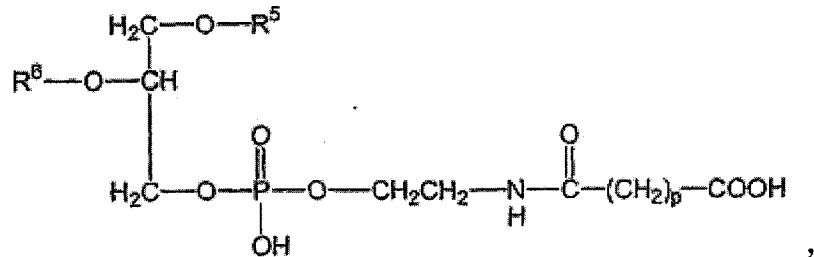
其中

所述N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺由式1表示,



式1

所述第二N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺由式3表示,



式3

其中 R^1 、 R^2 、 R^5 和 R^6 各自独立为酰基,

其中所述酰基独立衍生自具有18-22个碳原子的饱和或不饱和脂肪族羧酸,和其中 R^1 和 R^2 相同,并且 R^5 和 R^6 相同;并且

m 和 p 独立为1至10的整数;和

其中所述脂质体不包括除了式1和式3所示的磷脂酰乙醇胺之外的磷脂酰乙醇胺、卵磷脂酰胆碱和亲水聚合物,并且其中所述靶向配体不是完整抗体。

2. 权利要求1的靶向脂质体,其中所述至少一种其它脂类是胆固醇。

3. 权利要求1的靶向脂质体,其中所述除了卵磷脂酰胆碱之外的磷脂酰胆碱包含饱和脂肪酸部分。

4. 权利要求1的靶向脂质体,其中所述一种或多种磷脂酰胆碱是二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰胆碱、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱或二棕榈酰磷脂酰胆碱。

5. 权利要求1的靶向脂质体,其中所述脂质体包括二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱和胆固醇、二硬脂酰磷脂酰胆碱和胆固醇、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱和胆固醇、或二棕榈酰磷脂酰胆碱和胆固醇。

6. 权利要求1的靶向脂质体,其中所述脂质体包括二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱和胆固醇。

7. 权利要求1的靶向脂质体,其中所述靶向配体以 $10 \mu\text{g}$ 靶向配体 /mg 脂类至 $50 \mu\text{g}$ 靶向配体 /mg 脂类存在于所述靶向脂质体中。

8. 权利要求7的靶向脂质体,其中所述靶向配体以 $10 \mu\text{g}$ 靶向配体 /mg 脂类至 $25 \mu\text{g}$

靶向配体 /mg 脂类存在于所述靶向脂质体中。

9. 根据权利要求 1 的靶向脂质体,其中所述转铁蛋白是全蛋白形式而不是脱铁形式。
10. 根据权利要求 1 的靶向脂质体,其中所述脂质体的平均直径是 50nm 至 250nm。
11. 权利要求 1 的靶向脂质体,其中所述 R^1 、 R^2 、 R^5 和 R^6 是油酰基或硬脂酰基,并且 m 和 p 是 3。
12. 权利要求 11 的靶向脂质体,其中所述一种或多种磷脂酰胆碱是二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱或二硬脂酰磷脂酰胆碱,并且所述至少一种其它脂类是胆固醇。
13. 权利要求 1 的靶向脂质体,其中 m 和 p 各自独立为 2 至 4 的整数。
14. 权利要求 13 的靶向脂质体,其中 m 和 p 相等并且为 2 至 4 的整数。
15. 权利要求 14 的靶向脂质体,其中 m 和 p 相等并且为 3。
16. 权利要求 1 的靶向脂质体,其中所述 R^1 、 R^2 、 R^5 和 R^6 独立为油酰基或硬脂酰基。
17. 权利要求 11 的靶向脂质体,其中所述至少一种其它脂类是胆固醇,并且所述包封药物是抗癌药。
18. 权利要求 1 的靶向脂质体,其中所述 R^1 、 R^2 、 R^5 和 R^6 相同。
19. 权利要求 18 的靶向脂质体,其中所述包封药物是奥沙利铂。
20. 根据权利要求 1 的靶向脂质体,其中所述包封药物是抗癌药。
21. 根据权利要求 1 的靶向脂质体,其中所述包封药物选自细胞毒性药、拓扑异构酶 I 抑制剂、长春花生物碱、核酸、烷化剂、紫杉烷、抗代谢剂、抗肿瘤抗生素、激素治疗药和分子靶标药。
22. 根据权利要求 1 的靶向脂质体,其中所述包封药物是铂化合物。
23. 根据权利要求 22 的靶向脂质体,其中所述铂化合物是双铂、顺铂、卡铂、奥马铂、奥沙利铂、折尼铂、恩洛铂、洛铂或螺铂。
24. 根据权利要求 23 的靶向脂质体,其中所述铂化合物是奥沙利铂。
25. 根据权利要求 24 的靶向脂质体,其中所述 R^1 、 R^2 、 R^5 和 R^6 是油酰基,m 和 p 是 3,所述一种或多种磷脂酰胆碱是二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱,并且所述至少一种其它脂类是胆固醇。
26. 根据权利要求 24 的靶向脂质体,其中所述奥沙利铂溶解于糖的水溶液中,所述糖选自海藻糖、麦芽糖、蔗糖、甘露糖、乳糖、甘露醇、甘油和葡萄糖。
27. 权利要求 26 的靶向脂质体,其中所述糖的浓度是 300mM 的蔗糖。
28. 权利要求 24 的靶向脂质体,其中所述奥沙利铂的浓度是在脂质体中 0.1mg/ml 至 25mg/ml。
29. 权利要求 25 的靶向脂质体,其中所述转铁蛋白是全蛋白形式。
30. 权利要求 1 的靶向脂质体,其中所述脂质体不包含阳离子脂类。
31. 权利要求 1 的靶向脂质体,其中所述脂质体不包含阴离子脂类。
32. 权利要求 1 的靶向脂质体,其中所述带正电胆固醇是 DC-Chol。
33. 根据权利要求 1-32 任一项所述的靶向脂质体在制备治疗癌症的药物中的应用,其中所述包封药物是抗癌剂。
34. 药物制剂,其包括根据权利要求 1-32 任一项的靶向脂质体和一种或多种药学上可接受的载体、赋形剂、稀释剂、稳定剂或防腐剂。

新颖的脂质体组合物

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求 2005 年 3 月 10 日提交的日本专利申请 2005-67469 号的权益,其公开内容以整体并入本文作为参考。

[0003] 发明背景

[0004] 在过去数十年中,对包括癌症的许多疾病的治疗有效性已得到显著改进,但是,许多治疗方案需要应用具有有害副作用的药物,所述副作用包括,例如,脱发、恶心、呕吐、疲倦等。一些治疗方案也可能需要应用在生理条件下不稳定的药物,例如,在给药时容易降解或改变并且从而在实现所需治疗结果之前降低其效率的生物治疗剂(例如,基因或基因产物)和/或其它药物。这种不稳定性也使得药物贮存和制备进行施用更加困难和花费大。

[0005] 存在许多类型的抗癌剂,包括接近 100 种药物,以及许多药物联合治疗、输送方法和治疗方案。可以根据几种标准对抗癌剂进行分类,如化合物种类和被治疗的疾病状态。已经开发了利用癌细胞快速分裂和靶向于细胞周期中的特定时期的一些药剂,这提供了另一分类方法。也可以根据其副作用的类型和严重程度或输送方法对药剂进行分组。然而,基于非生物治疗的抗癌剂的最普通的分类是通过化学化合物分类,这广义地包括这些化合物的作用机制。

[0006] 根据所参考的参照来源,在抗癌剂的分类方面具有微小的差异。化合物的种类描述于 Physician's Desk Reference,如下:生物碱类、烷化剂、抗肿瘤抗生素、代谢拮抗剂、激素和激素类似物、免疫调节剂、光敏剂、和各种其它药剂。

[0007] 生物碱类化合物也称为有丝分裂抑制剂,因为它们是具有细胞周期特异性的,并且其作用是抑制有丝分裂或抑制有丝分裂所需的酶类。它们一般来自植物生物碱和其它天然产物并且在细胞周期的 M 期起作用。此类化合物通常用于治疗肿瘤如急性成淋巴细胞性白血病、何杰金淋巴瘤和非何杰金淋巴瘤;成神经细胞瘤和肺癌、乳腺癌和睾丸癌。

[0008] 烷化剂构成了化疗剂的一个大的种类,包括下列亚类,其各自表示许多单独的药物:烷基磺酸盐;氮丙啶;氮杂环丙烷和甲基蜜胺(methylmelamines);氮芥;亚硝基脲;和其它,包括铂化合物。烷化剂通过直接烷基化细胞 DNA 并且从而引起 DNA 复制无能而攻击增生性细胞。这类化合物通常用于治疗多种疾病,包括慢性白血病、非何杰金淋巴瘤、何杰金淋巴瘤、多发性骨髓瘤和一些肺癌、乳腺癌和卵巢癌。

[0009] 亚硝基脲通常被归类为烷化剂,并且具有类似的作用机制,但是它们不是直接烷基化 DNA,而是抑制 DNA 修复酶,使得修复失败。这些化合物具有能够穿过血脑屏障的优势,从而可以用于治疗脑肿瘤。

[0010] 抗肿瘤抗生素具有抗微生物活性和细胞毒性活性,并且也通过化学抑制酶和有丝分裂或者通过改变细胞膜而干扰 DNA。它们不是细胞周期特异性的,并且广泛用于治疗多种癌症。

[0011] 代谢拮抗剂类型的抗癌剂的干扰 DNA 和 RNA 的生长,并且特异于细胞周期的 S 期。通过下述类型的化合物,它们可以被进一步破坏,包括叶酸类似物、嘌呤类似物和嘧啶类似物。它们通常在慢性白血病、乳腺癌、卵巢癌和胃肠道肿瘤治疗中被应用。

[0012] 存在用作抗癌剂的两类激素或激素类似物,皮质类固醇激素和性激素。虽然一些皮质类固醇激素能够杀死癌细胞并且减慢肿瘤的生长,用于淋巴瘤、白血病等的治疗中,但性激素的主要作用是减慢乳腺癌、前列腺癌和子宫内膜癌的生长。存在许多激素和激素类似物的亚类,包括雄激素、抗肾上腺素物质 (antiadrenals)、抗雄激素物质、抗雌激素物质、芳香酶抑制剂、雌激素、促黄体激素释放激素 (LHRH) 类似物和孕酮。

[0013] 其它更小类的抗癌剂被分类为免疫治疗。这些是意图于刺激免疫系统以便更有效地攻击赘生性 (癌) 细胞的药剂。此治疗通常与其它治疗联合应用。

[0014] 也有许多化合物,如喜树碱,其通常被列举为“其它”抗癌剂并且可以用于治疗多种肿瘤。

[0015] 在治疗许多癌症中也应用抗癌剂的联合。例如, SanofiSyntholabo 出售 ELOXATIN™ (注射用奥沙利铂 (oxaliplatin)) - 其用于治疗结肠直肠癌,与 5- 氟尿嘧啶和 leuovorin 联合应用。此药物联合通常与手术辅助性应用,用于治疗结肠直肠癌。奥沙利铂是烷化剂,据认为它通过抑制 DNA 复制和转录起作用。与其它铂制剂不同,奥沙利铂已经证实了,耐受发生的可能性降低。奥沙利铂进一步描述于美国专利 4, 169, 846 ;5, 338, 874 ; 5, 298, 642 ;5, 959, 133 ;5, 420, 319 ;5, 716, 988 ;5, 290, 961 和 Wilkes GM. " New therapeutic options in colon cancer :focus on oxaliplatin" Clin J Oncol Nurs. (2002)6 :131-137 中。

[0016] 虽然存在过多的抗癌剂,但药剂产生的副作用的严重程度通常超过这些化合物的益处。这一比较通常称为治疗指数,其描述了实现癌细胞破坏所需的剂量与所述物质对于个体而言具有不可接受的毒性时的剂量之间的平衡。大多数抗癌剂的缺陷是相对小的治疗指数范围 (即,癌细胞被破坏而对个体没有不可接受的毒性的剂量的范围窄)。这一特征限制了药剂有用时的频率和剂量,并且通常地,在癌症被完全根除之前,副作用变得不可耐受。

[0017] 大多数癌症化疗所经历的严重副作用是这些药物的非特异性性质的结果,其没有将健康细胞和癌细胞区分开来,而是对两种细胞都进行破坏。一些细胞周期特异性药物试图减少这些作用,靶向于包含在细胞复制和分裂中的细胞周期的各个时期。然而,这些药物不区分癌细胞和进行正常细胞分裂的健康细胞。在这些类型的化疗中风险最高的细胞是常常进行细胞分裂的那些细胞,包括血细胞、毛囊细胞和生殖道及消化道的细胞。

[0018] 抗癌剂的最普通副作用是恶心和呕吐。大比例的个体也患有骨髓抑制 (myelosuppression) 或骨髓的抑制 (suppression of the bonemarrow),骨髓产生红细胞、白血病和血小板。这些副作用和其它副作用也由于对免疫系统的抑制而被加重,所述对免疫系统的抑制伴有白细胞破坏和产生缺乏,和相关的机会性感染的风险。

[0019] 宽范围抗癌剂的普遍的其它副作用包括:毛发丢失 (脱发)、食欲下降、体重减轻、味觉改变、口腔炎和食道炎 (炎症和疼痛)、便秘、腹泻、疲劳、心脏损伤、神经系统变化、肺脏损伤、生殖组织损伤、肝损伤、肾脏和泌尿系统损伤。

[0020] 在已经由于疾病和可能的免疫受损而疲劳过度的个体中与大多数抗癌剂有关的宽范围的副作用和它们的严重程度,使得研究者研究它们能够缓解一些副作用同时保持治疗效应的机制。针对这一问题采取了几种方法。它们包括联合化疗,其中多种抗癌药同时给予;辅助疗法,其中其它药剂连同抗癌药共同开处方,以便对抗抗癌剂的副作用;联合

形式的治疗,其中化疗与放射和 / 或手术联合 ;以及用于施用抗癌剂的可选的输送载体,如将抗癌剂包封在脂质体中。

[0021] 当磷脂及其衍生物分散在水中时,形成脂质体。当分散在水中后,磷脂形成闭合的囊泡称为“脂质体”,其特征是包封含水核心的脂双层。多种脂质体已经用于包封治疗剂的载体,所述治疗剂如医学科学、药物科学和生物化学中应用的药物、酶和遗传序列。

[0022] 脂质体组合物的例子包括美国专利 4,983,397 ;6,476,068 ;5,834,012 ;5,756,069 ;6,387,397 ;5,534,241 ;4,789,633 ;4,925,661 ;6,153,596 ;6,057,299 ;5,648,478 ;6,723,338 ;6,627,218 ;美国专利申请公布 :2003/0224037 ;2004/0022842 ;2001/0033860 ;2003/0072794 ;2003/0082228 ;2003/0212031 ;2003/0203865 ;2004/0142025 ;2004/0071768 ;国际专利申请 WO 00/74646 ;WO 96/13250 ;WO98/33481 ;Papahadjopolulos D, Allen TM, Gbizon A, et al. " Sterically stabilized liposomes : Improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy " Proc Natl Acad Sci U. S. A. (1991)88 :11460-11464 ;Allen TM, Martin FJ. " Advantages of liposomal delivery systems for anthracyclines " Semin Oncol (2004)31 :5-15 (suppl 13). Weissig et al. Pharm. Res. (1998)15 :1552-1556。

[0023] 在开发脂质体的早期,应用细胞膜中的天然发生的磷脂,如卵黄磷脂和大豆磷脂。然而,在静脉给药的情况下,应用这些磷脂的脂质体可能并入肝脏或脾脏的网状内皮系统中,引起血流停留时间短的问题,从而降低药物效率。此后,作为解决此问题的手段,其脂类部分仅含有饱和键的合成磷脂被用作脂质体膜的组分,目的是硬化脂质体膜。

[0024] 在延长脂质体的循环半衰期和避免被网状内皮系统摄取的努力中,研究者开发了通过加入聚乙二醇或其它亲水聚合物而被修饰的脂质体(例如,PEG 脂质体,其中组分脂类中的一个或多个通过附着 PEG 而被修饰)。PEG- 修饰脂质体也常常被称为“屏蔽了的”脂质体(" shielded" liposomes)。Doxil™(阿霉素 HCl 脂质体注射剂)是脂质体密闭的阿霉素,具有辅助聚乙二醇(PEG),其用于避免网状内皮系统(reticuloendothelial system, RES) 和延长药物循环时间。参见,Vail DM, Amantea MA, Colbern GT, et al, " Pegylated Liposomal Doxorubicin: Proof of Principle Using Preclinical Animal Models and Pharmacokinetic Studies. " Semin Oncol. (2004)31 (Suppl 13) :16-35。然而,副作用也由血液滞留延长引起(例如,手足综合症,它是 Doxil ® 对外周系统的一个副作用,等),这被认为是一个问题。

[0025] 脂质体的例子包括美国专利 4,983,397 ;5,013,556 ;6,316,024 ;6,056,973 ;5,945,122 ;5,891,468 ;6,126,966 ;5,593,622 ;5,676,971 ;6,586,559 ;和 5,846,458 ;美国专利申请公布 2003/0224037 ;2004/0022842 ;2003/0113262 ;2002/0136707 ;国际专利申请 WO99/30686 ;WO 02/41870 ;Aliminana et al, Prep. Biochem. Biotech. (2004)34(1) :77-96。脂质体也描述于美国专利 6,228,391 ;6,197,333 ;6,046,225 ;5,292,524 ;和美国专利申请公布 20050271588 ;20040213833 ;20040029210 ;20030175205 ;20030162748 ;20030130190 ;20030059461 ;和 20020034537。

[0026] 除了 PEG- 修饰的脂质体,研究者开发了多种其它衍生的脂类。这些衍生脂类也可以被并入脂质体中。参见,例如,国际专利申请 WO 93/01828 ;Park YS, Maruyama K, Huang L. " Some negatively charged phospholipids derivatives prolong the liposome

circulation in vivo." *Biochimica et Biophysica Acta*(1992)1108:257-260; Ahl et al, *Biochimica Biophys. Acta*(1997)1329:370-382。

[0027] 其它脂类组合物描述于美国专利 6,936,272;6,897,196;6,077,834;和美国专利申请公布 20050136064;20040234588;20030215490;20030166601;和 20010038851。

[0028] 除了用 PEG 和其它亲水聚合物修饰脂质体之外,研究者也开发出目标是特异靶向于特定细胞类型的脂质体,通过掺入针对特定细胞类型的靶向因子(也称为靶向配体)实施。靶向因子/配体的例子包括脱唾液酸糖蛋白、叶酸盐、转铁蛋白、抗体等。在一些情况下,组成脂类中的一种或多种能够通过附着靶向因子而被修饰。

[0029] 包含靶向因子的脂类组合物的例子包括美国专利 5,049,390;5,780,052;5,786,214;6,316,024;6,056,973;6,245,427;6,524,613;6,749,863;6,177,059;6,530,944;美国专利申请公开 2004/0022842;2003/0224037;2003/143742;2003/0228285;2002/0198164;2003/0220284;2003/0165934;2003/0027779;国际专利申请 W095/33841;W0 95/19434;W0 2001037807;W0 96/33698;W02001/49266;W0 9940789;W0 9925320;W0 9104014;W0 92/07959;EP 1369132;JP 2001002592;Iinuma H, Maruyama K, et al, " Intracellulartargeting therapy of cisplatin-encapsulated transferrin-polyethylene glycolliposome on peritoneal dissemination of gastric cancer " *Int J Cancer*(2002)99 130-137;Ishida O, Maruyama K, Tanahashi H, Iwatsuru M, Sasaki K, et al, " Liposomes bearing polyethylene glycol-coupled transferrin withintracellular targeting property to the solid tumors in vivo. " *Pharmaceutical Research*(2001)18:1042-1048;Holmberg et al, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (1989)165(3):1272-1278;Nam et al, *J. Biochem. Mol Biol*(1998)31(1):95-100;Nag et al, *J. Drug Target.* (1999)6(6):427-438。

[0030] 特别地, Iinuma et al. 开发了 Tf-PEG-脂质体,转铁蛋白(Tf)连接于所述脂质体表面。Iinuma et al 示出, Tf-PEG-脂质体与 PEG-脂质体相比,更多数的脂质体结合在肿瘤细胞的表面,肿瘤细胞对脂质体的摄取更多。(Iinuma et al,如上;Ishida et al,如上)。

[0031] 然而,虽然近来在药物和标记化合物输送领域中取得了进展,包括应用脂质体组合物,但仍然存在对将药物和标记化合物输送到获得治疗或诊断效应的特定细胞和/或组织的改进的脂质体组合物的需求。特别地,在癌症领域,对于被治疗的个体而言,需要具有改进的特异性和降低的毒性的药物制剂以确保治疗益处而不负面影响健康细胞并且也不引起有害副作用。类似地,可以用于检测疾病,特别是早期的威胁生命的疾病(例如,具有高特异性和/或高敏感性)并且也精确监测疾病的严重程度/范围(例如,治疗或未治疗时的进展和/或消退)的标记化合物,也会显著改进治疗的质量和成功率。

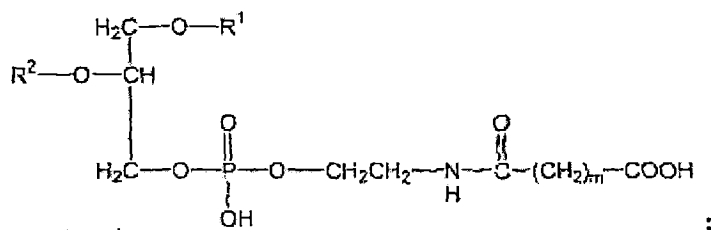
[0032] 发明简述

[0033] 本发明涉及新的含脂质体组合物(包括脂质体(例如,靶向脂质体、空白脂质体),脂类混合物和含脂质体组合物),它们可以任选地掺入药物或标记化合物,或者可以被用在掺入药物或标记化合物的制剂的制备中,其中所述含脂类组合物提供降低药物或标记化合物的副作用的益处和/或也防止药物或标记化合物的降解和/或效应丧失。本发明也包括制备和应用本文所述的含脂类组合物的方法。在本发明的一些方面,含脂质体组合物可以

用于治疗或诊断癌症（例如，乳腺癌、胃癌、结肠直肠癌、结肠癌、胰腺癌、非小细胞性肺癌、小细胞肺癌、脑癌、肝癌、肾癌、前列腺癌、膀胱癌、卵巢癌或血液恶性病（例如，白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤等）。

[0034] 在一些实施方式中，提供了靶向脂质体，其包括一种或多种磷脂、N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺、靶向因子-修饰的N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺、包封药物或标记化合物和任选地至少一种其它脂类，其中所述靶向因子-修饰的N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺包括靶向配体，其与第二N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺连接，并且其中所述N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺由式1表示，

[0035]

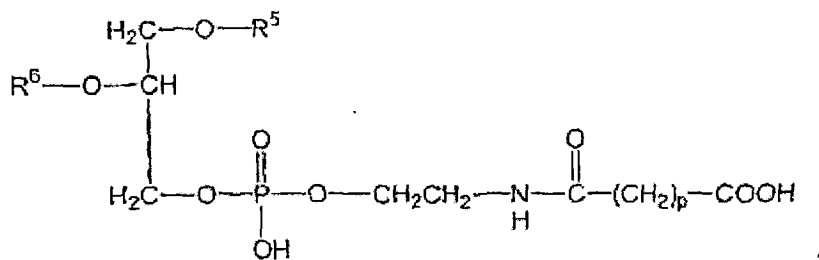


[0036]

式1

[0037] 以及所述第二N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺由式3表示，

[0038]



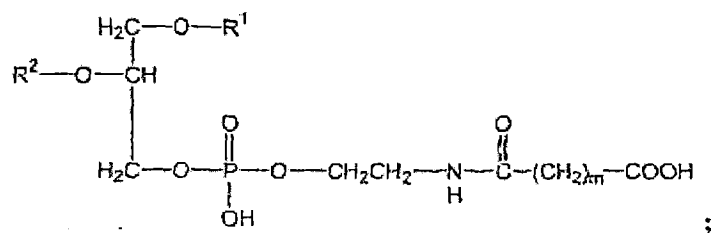
[0039]

式3

[0040] 其中 R^1 , R^2 , R^5 和 R^6 各自独立为酰基， m 和 p 独立为1至10的整数，并且其中所述脂质体不包括非衍生化磷脂酰乙醇胺或聚乙二醇，并且其中所述靶向配体不是完整抗体。

[0041] 在其它实施方式中，提供了空白脂质体，其包括一种或多种磷脂、N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺、靶向因子-修饰的N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺、和任选地至少一种其它脂类，其中所述靶向因子-修饰的N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺包括靶向配体，其与第二N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺连接，并且其中所述N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺由式1表示，

[0042]

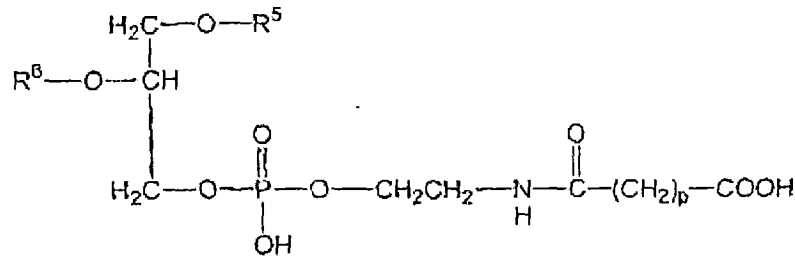


[0043]

式1

[0044] 以及如果存在第二N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺，则其由式3表示，

[0045]



[0046]

式 3

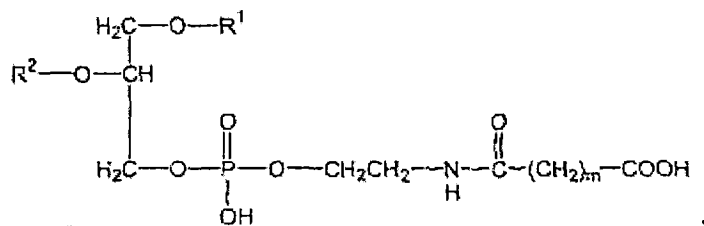
[0047] 其中 $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^5$ 和 R^6 各自独立为酰基, m 和 p 独立为 1 至 10 的整数, 并且其中所述脂质体不包括非衍生化磷脂酰乙醇胺、聚乙二醇、药物或标记化合物, 并且其中所述靶向配体不是完整抗体。

[0048] 在靶向脂质体和空白脂质体的一些实施方式中, $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^5$ 和 R^6 是油酰和硬脂酰, m 和 p 是 3。在一些实施方式中, 靶向配体是转铁蛋白。在特定实施方式中, 一种或多种磷脂是 DMPC 或 DSPC, 并且存在至少一种其它脂类, 其为胆固醇。在靶向脂质体和空白脂质体的一些实施方式中, $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^5$ 和 R^6 是油酰, m 和 p 是 3, 一种或多种磷脂是 DMPC, 并且其它脂类是胆固醇。

[0049] 在靶向脂质体和空白脂质体的一些实施方式中, m 和 p 各自独立为 2 至 4 的整数。在一些实施方式中, m 和 p 相等并且为 2 至 4 的整数。在特定实施方式中, m 和 p 相等并且为 3。在一些实施方式中, $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^5$ 和 R^6 各自独立为油酰、硬脂酰、棕榈酰或肉豆蔻酰。在一些实施方式中, R^1 和 R^2 相同, 并且 R^5 和 R^6 相同。在其它实施方式中, $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^5$ 和 R^6 相同。在特定实施方式中, $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^5$ 和 R^6 是油酰或硬脂酰。在一些实施方式中, $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^5$ 和 R^6 是油酰。

[0050] 在进步的实施方式中, 提供了脂类混合物, 其包括一种或多种磷脂、 $\text{N}-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺、 $\text{N}-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯、和任选地至少一种其它脂类的混合物, 其中所述 $\text{N}-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺由式 1 表示,

[0051]

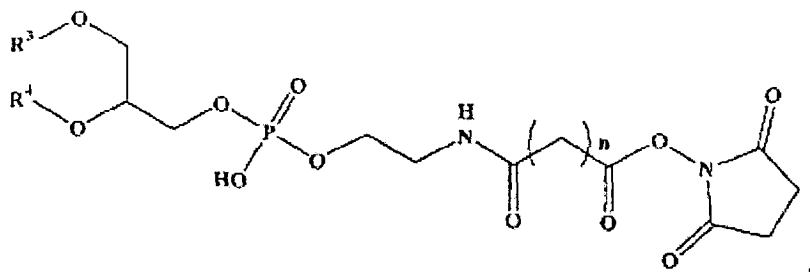


[0052]

式 1

[0053] 并且所述 $\text{N}-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯由式 2 表示,

[0054]



[0055]

式 2

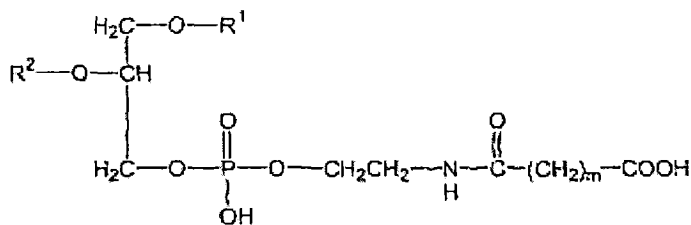
[0056] 其中, R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 各自独立为酰基, m 和 n 独立为 1 至 10 的整数, 并且其中所述混合物不包括非衍生化磷脂酰乙醇胺或聚乙二醇。

[0057] 在脂类混合物的一些实施方式中, m 和 n 各自独立为 2 至 4 的整数。在一些实施方式中, m 和 n 相等并且为 2 至 4 的整数。在特定实施方式中, m 和 n 相等并且为 3。

[0058] 在脂类混合物的一些实施方式中, R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 各自独立为油酰、硬脂酰、棕榈酰或肉豆蔻酰。在一些实施方式中, R^1 和 R^2 相同, 并且 R^3 和 R^4 相同。在特定实施方式中, R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 相同。在一些实施方式中, R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 是油酰或硬脂酰。在一些实施方式中, m 和 n 是 3, 其中一种或多种磷脂是 DMPC 或 DSPC, 并且存在至少一种其它脂类, 为胆固醇。在脂类混合物的一些实施方式中, R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 是油酰, m 和 n 是 3, 一种或多种磷脂是 DMPC 并且至少一种其它脂类是胆固醇。

[0059] 在进一步的实施方式中, 提供了脂类混合物, 其包括一种或多种磷脂、 $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺、靶向因子-修饰的 $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺、和任选地至少一种其它脂类的混合物, 其中所述 $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺由式 1 表示

[0060]

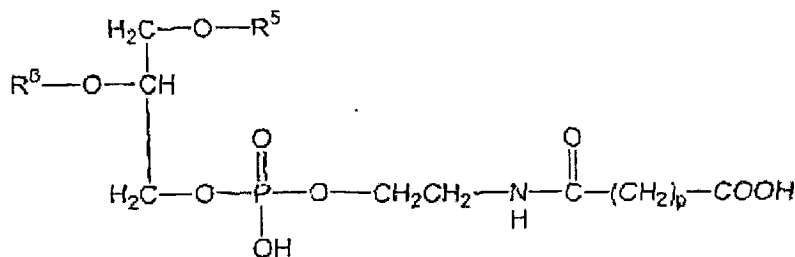


[0061]

式 1

[0062] 并且所述靶向因子-修饰的 $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺包括与第二 $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺连接的靶向配体; 并且其中所述第二 $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺由式 3 表示,

[0063]



[0064]

式 3

[0065] 其中 R^1 、 R^2 、 R^5 和 R^6 各自独立为酰基, m 和 p 独立为 1 至 10 的整数; 并且, 其中所述混合物不包括非衍生化磷脂酰乙醇胺或聚乙二醇, 并且其中所述靶向配体不是完整抗体。

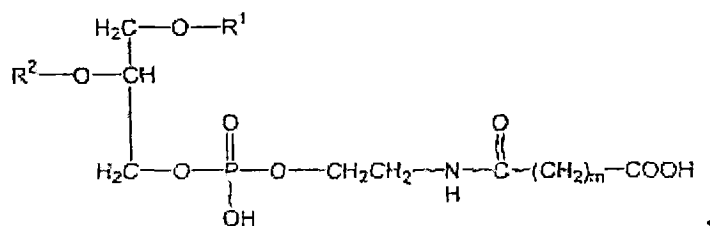
[0066] 在脂类混合物的特定实施方式中——其中存在靶向因子-修饰的 $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺, m 和 p 各自独立为 2 至 4 的整数。在一些实施方式中, m 和 p 相等并且为 2 至 4 的整数。在一些实施方式中, m 和 p 相等并且是 3。

[0067] 在脂类混合物的特定实施方式中——其中存在靶向因子-修饰的 $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺, R^1 、 R^2 、 R^5 和 R^6 各自独立为油酰、硬脂酰、棕榈酰或肉豆蔻酰。在一些实施方式中, 其中 R^1 和 R^2 相同, 并且 R^5 和 R^6 相同。在进一步的实施方式中, R^1 、 R^2 、 R^5 和 R^6 相同。在一些实施方式中, R^1 、 R^2 、 R^5 和 R^6 是油酰或硬脂酰。在一些实施方式中, R^1 、 R^2 、 R^5 和

R^6 是油酰或硬脂酰, m 和 p 是 3, 一种或多种磷脂是 DMPC 或 DSPC, 至少一种其它脂类是胆固醇, 靶向配体是转铁蛋白。在脂类混合物的一些实施方式中, R^1 、 R^2 、 R^5 和 R^6 是油酰, m 和 p 是 3, 一种或多种磷脂是 DMPC, 其它脂类是胆固醇, 靶向配体是转铁蛋白。

[0068] 在一些实施方式中, 提供了包含脂质体的含脂质体的组合物, 所述脂质体包括一种或多种磷脂、 $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺、 $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯、和任选地至少一种其它脂类, 其中所述 $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺由式 1 表示,

[0069]

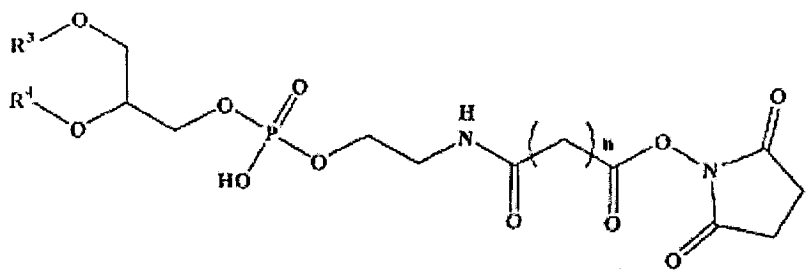


[0070]

式 1

[0071] 以及所述 $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯由式 2 表示,

[0072]



[0073]

式 2

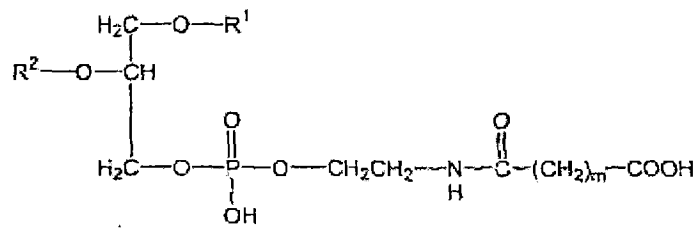
[0074] 其中, R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 各自独立为酰基, m 和 n 独立为 1 至 10 的整数; 并且其中所述组合物不包括非衍生化磷脂酰乙醇胺或聚乙二醇。

[0075] 在含脂质体组合物的一些实施方式中, m 和 n 各自独立为 2 至 4 的整数。在一些实施方式中, m 和 n 相等并且为 2 至 4 的整数。在特定实施方式中, m 和 n 相等并且为 3。

[0076] 在含脂质体组合物的一些实施方式中, R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 各自独立为油酰、硬脂酰、棕榈酰或肉豆蔻酰。在特定实施方式中, R^1 和 R^2 相同, 并且 R^3 和 R^4 相同。在一些实施方式中, R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 相同。在一些实施方式中, R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 是油酰或硬脂酰。在一些实施方式中, R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 是油酰或硬脂酰, m 和 n 是 3, 一种或多种磷脂是 DMPC、DSPC、POPC 或 DPPC。在一些实施方式中, R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 是油酰, m 和 n 是 3, 一种或多种磷脂是 DMPC 并且其它脂类是胆固醇。

[0077] 在含脂质体组合物的进一步实施方式中, 提供了包含脂质体的含脂质体组合物, 所述脂质体包括一种或多种磷脂、 $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺、靶向因子-修饰的 $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺、和任选地至少一种其它脂类, 其中所述 $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺由式 1 表示

[0078]

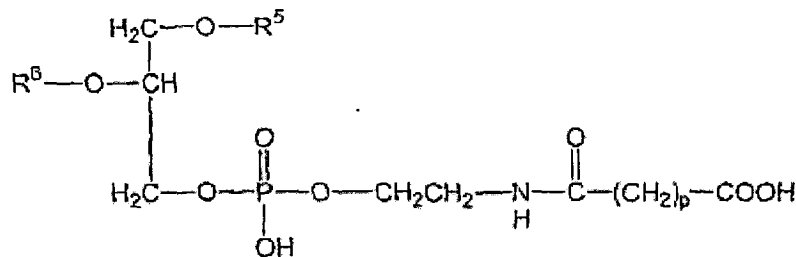


[0079]

式 1

[0080] 以及所述靶向因子-修饰的 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺包括与第二 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺连接的靶向配体;并且其中所述第二 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺由式 3 表示,

[0081]



[0082]

式 3

[0083] 其中 R^1 、 R^2 、 R^5 和 R^6 各自独立为酰基, m 和 p 独立为 1 至 10 的整数;并且,其中所述组合物不包括非衍生化磷脂酰乙醇胺或聚乙二醇,并且其中所述靶向配体不是完整抗体。

[0084] 在一些含脂质体组合物中——其中靶向因子-修饰的 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺存在, m 和 p 各自独立为 2 至 4 的整数。在特定实施方式中, m 和 p 相等并且为 2 至 4 的整数。在一些实施方式中, m 和 p 相等并且是 3。

[0085] 在一些含脂质体组合物中——其中靶向因子-修饰的 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺存在, R^1 、 R^2 、 R^5 和 R^6 各自独立为油酰、硬脂酰、棕榈酰或肉豆蔻酰。在特定实施方式中,其中 R^1 和 R^2 相同,并且 R^5 和 R^6 相同。在一些实施方式中,其中 R^1 、 R^2 、 R^5 和 R^6 相同。

[0086] 在一些实施方式中, R^1 、 R^2 、 R^5 和 R^6 是油酰或硬脂酰。在特定实施方式中, R^1 、 R^2 、 R^5 和 R^6 是油酰或硬脂酰,一种或多种磷脂是 DMPC 或 DSPC,至少一种其它脂类是胆固醇,靶向配体是转铁蛋白。在一些实施方式中, R^1 、 R^2 、 R^5 和 R^6 是油酰, m 和 p 是 3,一种或多种磷脂是 DMPC,其它脂类是胆固醇,靶向配体是转铁蛋白。

[0087] 在含脂质体组合物的进一步实施方式中,药物被包含在内。在一些实施方式中,一种或多种磷脂是 DMPC 或 DSPC, R^1 和 R^2 以及 R^5 和 R^6 ——如果 R^5 和 R^6 存在——是油酰或硬脂酰, m 和 p ——如果 p 存在——是 3,如果存在至少一种其它脂类,其为胆固醇,药物是奥沙利铂,如果存在靶向配体,其为转铁蛋白。在一些实施方式中,组合物还包括浓度约 1% 至约 20% 的糖百分含量 (v/v) 的糖。在一些实施方式中,一种或多种磷脂是 DMPC 或 DSPC, R^1 、 R^2 以及 R^5 和 R^6 ——如果 R^5 和 R^6 存在——是油酰, m 和 p ——如果 p 存在——是 3,如果存在至少一种其它脂类,其为胆固醇,药物是奥沙利铂,如果存在靶向配体,其为转铁蛋白。

[0088] 在含脂质体组合物的进一步实施方式中,标记化合物被包含在内。在一些实施方式中,标记化合物包括放射性同位素部分。

[0089] 在靶向脂质体、空白脂质体、脂类混合物和含脂质体组合物的一些实施方式中,存在至少一种其它脂类。在特定实施方式中,至少一种其它脂类是胆固醇或胆固醇衍生物。

[0090] 在靶向脂质体、空白脂质体、脂类混合物和含脂质体组合物的特定实施方式中，一种或多种磷脂是磷脂酰胆碱、磷脂酸、磷脂酰丝氨酸或磷脂酰甘油。在特定实施方式中，一种或多种磷脂是中性磷脂。在一些实施方式中，一种或多种磷脂是磷脂酰胆碱。在特定实施方式中，磷脂酰胆碱包括饱和脂肪酸部分。在一些实施方式中，一种或多种磷脂是 DMPC、DSPC、POPC 或 DPPC。在这些实施方式中，特别的是，存在至少一种其它脂类。在这些实施方式中的一些中，至少一种其它脂类是胆固醇或胆固醇衍生物。在特定实施方式中，DMPC 和胆固醇，DSPC 和胆固醇，POPC 和胆固醇，或 DPPC 和胆固醇被并入。在一些实施方式中，DMPC 和胆固醇。

[0091] 在靶向脂质体、空白脂质体、脂类混合物和含脂质体组合物的特定实施方式中，如果存在靶向配体，其指向靶细胞。在一些实施方式中，靶向配体指向靶细胞的细胞表面受体。在特定实施方式中，靶向配体是转铁蛋白、叶酸、透明质酸、糖链或单克隆抗体的片段。在一些实施方式中，靶向配体是转铁蛋白、叶酸、透明质酸或糖链。在其它实施方式中，靶向配体是转铁蛋白、叶酸、透明质酸或糖链。在一些实施方式中，靶向配体是转铁蛋白。在特定实施方式中，转铁蛋白是全蛋白形式 (holo-form) 而不是脱铁形式 (apo-form)。在一些实施方式中，转铁蛋白是全转铁蛋白形式。

[0092] 在靶向脂质体和空白脂质体的一些实施方式中，脂质体的平均直径是约 50nm 至约 250nm。在其它实施方式中，脂质体的平均直径是约 90nm 至约 200nm。

[0093] 在靶向脂质体和空白脂质体的特定实施方式中，脂质体的 ζ (zeta) 电位是负的。在一些实施方式中， ζ 电位是约 -75mV 至约 -90mV。在其它实施方式中， ζ 电位是约 -80mV 至约 -85mV。

[0094] 在含脂质体组合物、靶向脂质体和空白脂质体的一些实施方式中，制剂还包括溶液。

[0095] 在靶向脂质体和含脂质体组合物的特定实施方式中，存在药物。

[0096] 在靶向脂质体和含脂质体组合物的特定实施方式中，药物是奥沙利铂。在药物是奥沙利铂的一些实施方式中，靶向配体是转铁蛋白。在一些实施方式中，存在至少一种其它脂类，为胆固醇。

[0097] 在一些实施方式中，药物是抗癌剂。在特定实施方式中，药物是细胞毒性药物。在一些实施方式中，药物是拓扑异构酶 I 抑制剂。在特定实施方式中，拓扑异构酶 I 抑制剂是拓扑替康或依立替康。在其它实施方式中，药物是长春花生物碱。在特定实施方式中，长春花生物碱是长春新碱、长春花碱、长春罗新 (vinleurosine)、长春罗定 (vinrodisine)、脱水长春花碱 (vinorelbine) 或脱乙酰长春花碱 (vindesine)。在一些实施方式中，其中药物是核酸。在一些实施方式中，核酸是反义寡核苷酸或核酶。在一些实施方式中，药物是烷化剂。在特定实施方式中，药物是紫杉烷。在其它实施方式中，药物是抗代谢剂。在一些实施方式中，药物是抗肿瘤抗生素。在一些实施方式中，药物是激素治疗药。在一些实施方式中，药物是分子靶标药。

[0098] 在靶向脂质体和含脂质体组合物的一些实施方式中，药物是铂化合物。在特定实施方式中，铂化合物是双铂 (biplatin)、顺铂、卡铂、奥马铂 (ormaplatin)、奥沙利铂 (oxaliplatin)、折尼铂 (zeniplatin)、恩洛铂 (enloplatin)、洛铂 (lobaplatin) 或螺铂 (spiroplatin)。在一些实施方式中，铂化合物是奥沙利铂。

[0099] 在药物是奥沙利铂的一些实施方式中, R^1 、 R^2 、 R^5 和 R^6 是油酰或硬脂酰, m 和 p 是 3, 靶向配体是转铁蛋白, 一种或多种磷脂是 DMPC 或 DSPC, 至少一种其它脂类存在并且是胆固醇。在药物是奥沙利铂的一些实施方式中, R^1 、 R^2 、 R^5 和 R^6 是油酰, m 和 p 是 3, 靶向配体是转铁蛋白, 一种或多种磷脂是 DMPC, 至少一种其它脂类存在并且是胆固醇。在特定实施方式中, 靶向脂质体和含脂质体组合物不含其它脂类成分。

[0100] 在药物是奥沙利铂的一些实施方式中, 奥沙利铂溶解于糖的水溶液中, 所述糖选自: 海藻糖、麦芽糖、蔗糖、甘露糖、乳糖、甘露醇、甘油和葡萄糖。在一些实施方式中, 糖的浓度是约 1% 至约 20% 的糖百分数 (v/v)。在特定实施方式中, 奥沙利铂的浓度是在脂质体中约 0.1mg/ml 至约 25mg/ml。在其它实施方式中, 奥沙利铂的浓度是在脂质体中约 0.5mg/ml 至约 10mg/ml。在其它实施方式中, 奥沙利铂的浓度是约 0.5mg/ml 至约 3mg/ml。

[0101] 在靶向脂质体和含脂质体组合物的特定实施方式中, 存在标记化合物。在一些实施方式中, 标记化合物是放射性同位素部分。在特定实施方式中, 放射性同位素部分包含 ^{125}I 。

[0102] 在靶向脂质体和含脂质体组合物的特定实施方式中, 并入脂质体中的靶向配体的浓度是约 1.0mg/ml 至约 3.0mg/ml。在其它实施方式中, 并入脂质体中的靶向配体的浓度是约 1.0mg/ml 至约 2.5mg/ml。

[0103] 在靶向脂质体和含脂质体组合物的特定实施方式中——其中存在药物并且是奥沙利铂, 靶向配体是转铁蛋白。在特定实施方式中, 转铁蛋白是全转铁蛋白形式。在一些实施方式中, 铁 (ferric iron) 处于约 0.4 至约 3.0 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度下。在其它实施方式中, 铁处于约 0.4 至约 1.5 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度下。

[0104] 在靶向脂质体、空白脂质体、脂类混合物和含脂质体组合物的特定实施方式中, 脂质体、脂类混合物或含脂质体组合物不包括阳离子脂类。在特定实施方式中, 脂质体、脂类混合物或含脂质体组合物不包括阴离子脂类。在一些实施方式中, 脂质体、脂类混合物或含脂质体组合物不包括阴离子脂类或阳离子脂类。

[0105] 在靶向脂质体、空白脂质体、脂类混合物和含脂质体组合物的特定实施方式中, 制剂还包括溶液。在一些实施方式中, 脂类混合物不含溶液。在特定实施方式中, 溶液是水溶液或水溶液和易混合水的溶剂的混合物。

[0106] 在靶向脂质体、空白脂质体、脂类混合物和含脂质体组合物的特定实施方式中, 制剂还包括蔗糖。

[0107] 在本发明的又一方面, 提供了上述含脂类组合物的药物制剂。含脂质体组合物、靶向脂质体和空白脂质体的特定实施方式包括本文所述的含脂质体组合物、靶向脂质体和空白脂质体和一种或多种药学上可接受的载体、赋形剂、稀释剂、稳定剂或防腐剂。

[0108] 在本发明的又一方面, 提供了包含本文所述含脂类组合物的试剂盒。含脂质体组合物、靶向脂质体和空白脂质体一些实施方式包括本文所述的含脂质体组合物、靶向脂质体和空白脂质体, 包装和使用说明书。

[0109] 在试剂盒的一些实施方式中, 本文所述的含脂质体组合物、靶向脂质体或空白脂质体包含在第一容器中, 并且一种或多种药学上可接受的载体、赋形剂、稀释剂、稳定剂或防腐剂包含在第二容器中。

[0110] 在特定实施方式中, 提供了并入本文所述药物制剂、包装和使用说明书的试剂盒。

[0111] 在本发明的另一方面,提供了制备本文所述含脂类组合物的方法。

[0112] 在特定实施方式中,提供了制备本文所述靶向脂质体的方法,包括步骤:

[0113] a) 混合一种或多种磷脂、N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺、靶向因子修饰的N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺,和任选地,至少一种其它脂类,形成脂类混合物;

[0114] b) 将药物或标记化合物加入步骤 a) 中形成的脂类混合物中;

[0115] c) 形成脂质体。

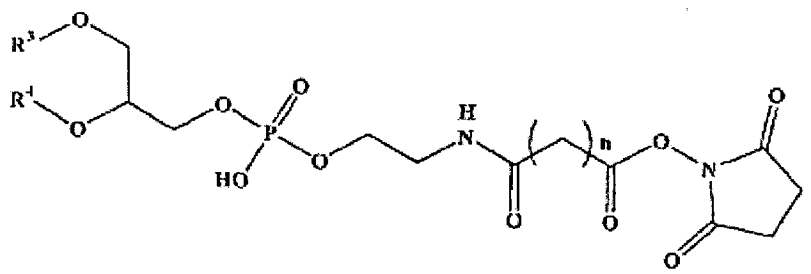
[0116] 在本方法的进一步实施方式中,提供了步骤 (d),纯化步骤 (c) 的脂质体。在特定实施方式中,步骤 (b) 中的药物在混合前在水溶液中。在一些实施方式中,步骤 (c) 包括超声波处理或搅拌。在一些实施方式中,步骤 (c) 包括挤出。

[0117] 在其它实施方式中,提供了制备本文所述的靶向脂质体的方法,包括步骤:

[0118] a) 混合一种或多种磷脂、N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺、N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯,和任选地,至少一种其它脂类,形成脂类混合物,

[0119] 其中 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯由式 2 表示,

[0120]



[0121]

式 2

[0122] 其中 R³ 和 R⁴ 各自独立为酰基, n 独立为 1 至 10 的整数;

[0123] b) 将药物或标记化合物加入步骤 a) 中形成的脂类混合物中;

[0124] c) 形成脂质体;和

[0125] d) 将靶向配体连接于 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯。

[0126] 在上述方法的一些实施方式中,方法也包括步骤 e),纯化步骤 (d) 的脂质体。

[0127] 在特定实施方式中,步骤 (b) 中的药物在混合前处于水溶液中。在一些实施方式中,步骤 c) 包括超声波处理或搅拌。在一些实施方式中,步骤 (c) 包括挤出。在特定实施方式中,步骤 (c) 包括搅拌。

[0128] 在特定实施方式中,提供了制备本文所述空白脂质体的方法,包括步骤:

[0129] a) 混合一种或多种磷脂、N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺、靶向因子修饰的N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺,和任选地,至少一种其它脂类,形成脂类混合物,和

[0130] b) 形成脂质体。

[0131] 在制备空白脂质体的方法的一些实施方式中,方法还包括步骤 (c),纯化步骤 (b) 的脂质体。

[0132] 在特定实施方式中,步骤 (b) 包括超声波处理或搅拌。在一些实施方式中,步骤 (b) 包括挤出。

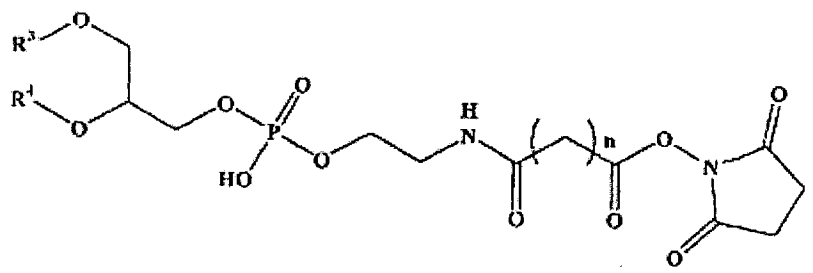
[0133] 在其它实施方式中,提供了制备本文所述的空白脂质体的方法,包括步骤:

[0134] a) 混合一种或多种磷脂、N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺、N-(ω)-二羧酸衍

生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯,和任选地,至少一种其它脂类,形成脂类混合物,

[0135] 其中 N-(ω)-二羧酸衍生生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯由式 2 表示,

[0136]



[0137]

式 2

[0138] 其中 R³ 和 R⁴ 各自独立为酰基, n 独立为 1 至 10 的整数;

[0139] b) 形成脂质体;和

[0140] c) 将靶向配体连接于 N-(ω)-二羧酸衍生生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯,形成靶向因子修饰的 N-(ω)-二羧酸衍生生化磷脂酰乙醇胺。

[0141] 在制备空白脂质体的一些方法中,方法还包括步骤 (d),纯化步骤 (c) 的脂质体。

[0142] 在特定实施方式中,步骤 (b) 包括超声波处理或搅拌。在一些实施方式中,步骤 (b) 包括挤出。

[0143] 在其它实施方式中,提供了制备本文所述的含脂类组合物的方法,包括混合一种或多种磷脂、N-(ω)-二羧酸衍生生化磷脂酰乙醇胺和 N-(ω)-二羧酸衍生生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯的步骤。

[0144] 在进一步实施方式中,提供了制备含脂类组合物的方法,其中存在至少一种其它脂类,如本文所述,包括步骤:混合一种或多种磷脂、至少一种其它脂类、N-(ω)-二羧酸衍生生化磷脂酰乙醇胺和 N-(ω)-二羧酸衍生生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯。

[0145] 在另一实施方式中,提供了制备本文所述的含脂类组合物的方法,包括步骤:混合一种或多种磷脂、N-(ω)-二羧酸衍生生化磷脂酰乙醇胺和靶向因子修饰的 N-(ω)-二羧酸衍生生化磷脂酰乙醇胺。

[0146] 在进一步的实施方式中,提供了制备含脂类组合物的方法,其中存在至少一种其它脂类,如本文所述,包括步骤:混合一种或多种磷脂、至少一种其它脂类、N-(ω)-二羧酸衍生生化磷脂酰乙醇胺和靶向因子修饰的 N-(ω)-二羧酸衍生生化磷脂酰乙醇胺。

[0147] 也提供了制备本文所述的含脂质体组合物的方法,包括步骤:

[0148] a) 混合一种或多种磷脂、N-(ω)-二羧酸衍生生化磷脂酰乙醇胺,以及, N-(ω)-二羧酸衍生生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯或靶向因子修饰的 N-(ω)-二羧酸衍生生化磷脂酰乙醇胺——如果它们存在,和任选地,至少一种其它脂类——如果其存在,以形成脂类混合物;和

[0149] b) 将药物加入步骤 (a) 中形成的脂类混合物;和

[0150] c) 形成脂质体。

[0151] 在制备各种含脂类组合物(靶向脂质体、空白脂质体、含脂质体组合物)的方法的一些实施方式中,其中存在药物,药物处于水溶液中。在一些实施方式中,步骤 a) 在有机溶剂存在的情况下进行。在一些实施方式中,水溶液还包括糖。在一些实施方式中,水溶液

也可以包括易混合水的有机溶剂。

[0152] 在其它实施方式中,提供了制备含脂质体组合物的方法,包括步骤:

[0153] a) 混合一种或多种磷脂和 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺和, N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯或靶向因子修饰的 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺——如果它们存在,和任选地,至少一种其它脂类——如果其存在,形成脂类混合物;和

[0154] b) 将标记化合物加入步骤 (a) 中形成的脂类混合物;

[0155] c) 形成脂质体。

[0156] 在制备各种含脂类组合物(靶向脂质体、空白脂质体、含脂质体组合物)的方法的一些实施方式中,其中存在标记化合物,标记化合物处于水溶液中。在一些实施方式中,步骤 a) 在有机溶剂存在的情况下进行。在一些实施方式中,水溶液也可以包括易混合水的有机溶剂。

[0157] 在一些实施方式中,也提供了制备本文所述的含脂质体组合物的方法,其中所述含脂质体组合物包括靶向因子修饰的 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺,包括步骤:

[0158] a) 混合一种或多种磷脂、N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺和靶向因子修饰的 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺,和任选地,至少一种其它脂类,形成脂类混合物;和

[0159] b) 将溶剂加入步骤 (a) 中形成的混合物中,形成含脂质体组合物。

[0160] 在特定实施方式中,混合步骤 a) 在有机溶剂存在的情况下进行。在特定实施方式中,步骤 (b) 中的溶剂是水溶液或水溶液和易混合水的溶剂的混合物。

[0161] 在一些实施方式中,步骤 (b) 包括超声处理或搅拌。在一些实施方式中,步骤 (b) 包括挤出。

[0162] 在制备含脂类组合物的方法的特定实施方式中,步骤 (a) 中存在至少一种其它脂类。

[0163] 在制备含脂类组合物的方法的一些实施方式中,步骤 (a) 中存在 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯。

[0164] 在制备含脂类组合物的方法的一些实施方式中,步骤 (a) 中存在靶向因子修饰的 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺。

[0165] 在本发明的其它方面,提供了应用本文所述含脂类组合物的治疗或诊断方法。

[0166] 在特定实施方式中,提供了治疗癌症的方法,包括 a) 将本文所述的靶向脂质体以有效治疗癌症的量施用于需要的个体,其中所述靶向脂质体包括药物,并且所述药物是抗癌剂。

[0167] 在治疗或诊断方法的一些实施方式中,个体是哺乳动物。在特定实施方式中,个体是人。

[0168] 在治疗的一些实施方式中,癌症是乳腺癌、胃癌、结肠癌、结肠直肠癌、胰腺癌、非小细胞性肺癌、小细胞肺癌、脑癌、肝癌、肾癌、前列腺癌、膀胱癌、卵巢癌或血液恶性病。

[0169] 在治疗的一些实施方式中,步骤 (a) 在联合形式的癌症治疗之前、同时或之后实施。在特定实施方式中,联合形式的癌症治疗包括化疗、放疗或手术。

[0170] 在治疗方法的特定实施方式中,步骤 (a) 在辅助癌症治疗之前、同时或之后实施。

在特定实施方式中,辅助癌症治疗包括给予一种或多种药剂以便减轻毛发丢失、呕吐、免疫抑制、恶心、腹泻、皮疹、感觉障碍、贫血、疲劳、口腔炎、或手足综合症。在一些实施方式中,步骤(a)在给予一种或多种其它抗癌剂之前、同时或之后实施。在一些实施方式中,一种或多种其它抗癌剂包括5-氟尿嘧啶、亚叶酸、卡培他滨(capecitabine)、UFT/LV(替加氟-尿嘧啶和亚叶酸)、依立替康、抗EGFR抗体、抗VEGF抗体、酪氨酸激酶抑制剂、或它们的联合。

[0171] 在治疗方法的一些实施方式中,靶向脂质体通过肠胃外投药施用。在特定实施方式中,肠胃外投药是通过注射或静脉输注。

[0172] 也提供了诊断方法,包括步骤:

[0173] a) 将本文所述的靶向脂质体以检测有效量给予需要的个体,其中所述靶向脂质体包括标记化合物;和

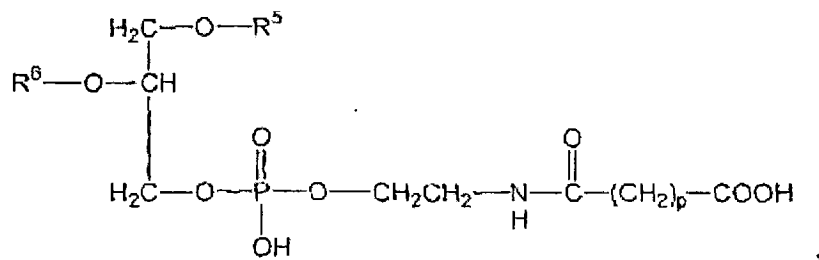
[0174] b) 检测标记化合物。

[0175] 在诊断方法的其它实施方式中,方法还包括步骤(c),比较检测到的标记化合物的水平和在前一时间点检测到的标记化合物的量。

[0176] 在诊断方法的进一步实施方式中,步骤(b)包括通过 γ 计数器检测。

[0177] 在本发明的又一方面,提供了转铁蛋白修饰的N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺,其中所述N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺由式3表示,

[0178]



[0179]

式 3

[0180] 其中 R^5 和 R^6 各自独立为酰基,并且 p 是1至10的整数,并且转铁蛋白连接于N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺。

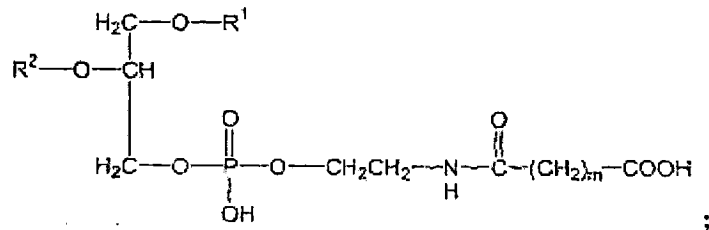
[0181] 在转铁蛋白修饰的N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的一些实施方式中, p 是2至4的整数。在特定实施方式中, p 是3。

[0182] 在转铁蛋白修饰的N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的一些实施方式中, R^5 和 R^6 各自独立为油酰、硬脂酰、棕榈酰或肉豆蔻酰。在特定实施方式中, R^5 和 R^6 相同。在一些实施方式中, R^5 和 R^6 是油酰或硬脂酰。在一些实施方式中, R^5 和 R^6 是油酰并且 p 是3。

[0183] 在其它方面,也提供了包括本文所述的转铁蛋白修饰的N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺和一种或多种药学上可接受的载体、赋形剂、稀释剂、稳定剂或防腐剂的药物制剂。

[0184] 在一些实施方式中,提供了脂类混合物,包括至少两种不同的中性脂类、N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺和N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯的混合物,其中N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺由式1表示,

[0185]

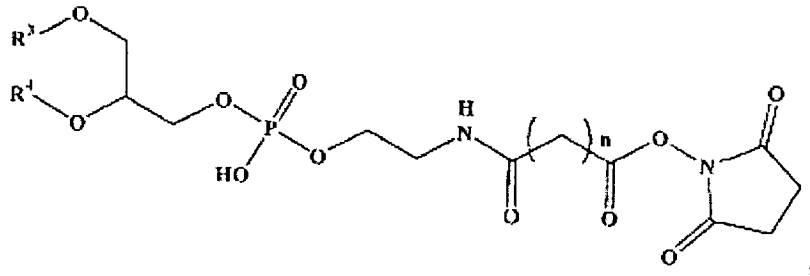


[0186]

式 1

[0187] 以及所述 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯由式 2 表示,

[0188]

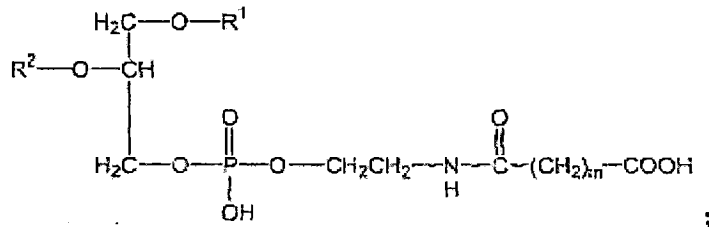


[0189]

式 2

[0190] 其中 R¹、R²、R³ 和 R⁴ 各自独立为酰基, m 和 n 独立为 1 至 10 的整数; 并且其中所述混合物不包括非衍生化磷脂酰乙醇胺或聚乙二醇。[0191] 在一些实施方式中, 提供了含脂质体组合物, 包括至少两种不同的中性脂类、N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺、N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯和包封的药物或标记化合物, 其中所述 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺由式 1 表示,

[0192]

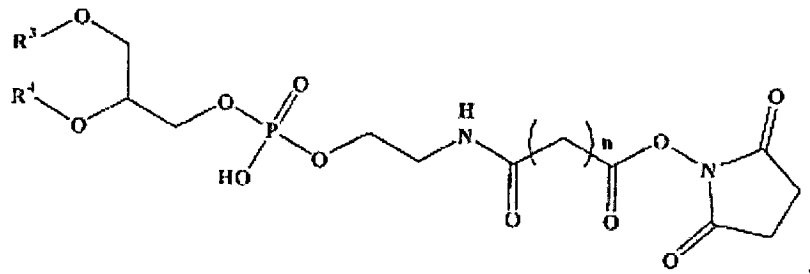


[0193]

式 1

[0194] 以及所述 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺琥珀酰亚胺酯由式 2 表示,

[0195]



[0196]

式 2

[0197] 其中 R¹、R²、R³ 和 R⁴ 各自独立为酰基, m 和 n 独立为 1 至 10 的整数; 并且其中所述混合物不包括非衍生化磷脂酰乙醇胺或聚乙二醇。

[0198] 在含脂质体组合物和脂类混合物的特定实施方式中, m 和 n 各自独立为 2 至 4 的整数。在一些实施方式中, m 和 n 相等并且是 2 至 4 的整数。在其它实施方式中, m 和 n 相

等并且是 3。

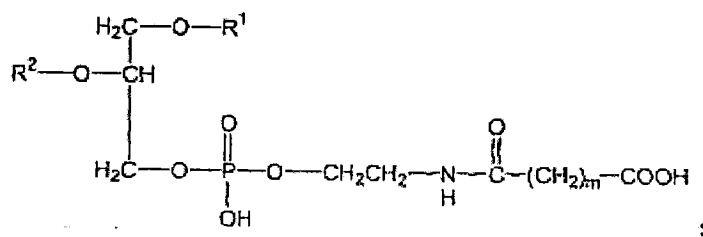
[0199] 在含脂质体组合物和脂类混合物的一些实施方式中, R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 各自独立为油酰、硬脂酰、棕榈酰或肉豆蔻酰。在一些实施方式中, R^1 和 R^2 相同, 并且 R^3 和 R^4 相同。在特定实施方式中, R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 相同。在一些实施方式中, R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 是油酰。

[0200] 在含脂质体组合物和脂类混合物的特定实施方式中, 中性脂类: $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺: $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯的摩尔比是约 95 : 4 : 1。

[0201] 在含脂质体组合物和脂类混合物的一些实施方式中, 其中中性脂类是 DMPC 和胆固醇, DMPC : 胆固醇 : ($N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺 + $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯) 的摩尔比是 50 : 45 : 5。在这些实施方式的一些中, $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺是 NG-DOPE, 而 $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯是 NHS-NG-DOPE。

[0202] 在一些实施方式中, 提供了靶向脂质体, 包括至少两种不同的中性脂类、 $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺、靶向因子修饰的 $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺和包封的药物或标记化合物, 其中靶向因子修饰的 $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺包括与第二 $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺连接的靶向配体, 并且其中 $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺由式 1 表示,

[0203]

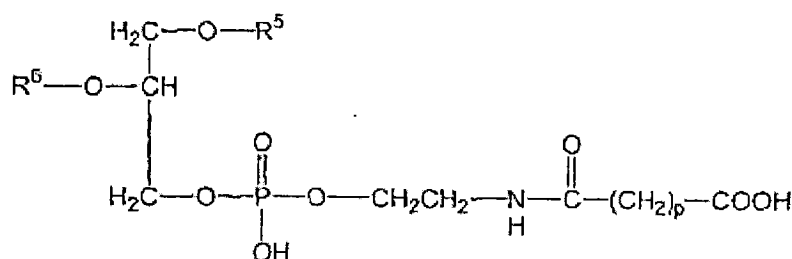


[0204]

式 1

[0205] 并且第二 $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺由式 3 表示,

[0206]



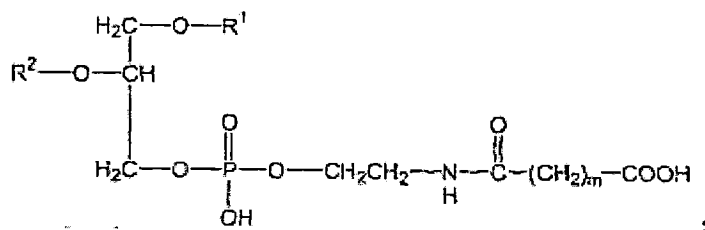
[0207]

式 3

[0208] 其中 R^1 、 R^2 、 R^5 和 R^6 各自独立为酰基, m 和 p 独立为 1 至 10 的整数; 并且其中所述脂质体不包括非衍生化磷脂酰乙醇胺或聚乙二醇, 并且其中所述靶向配体不是完整抗体。

[0209] 在特定实施方式中, 提供了靶向脂质体, 包括中性磷脂酰胆碱、胆固醇或胆固醇衍生物、 $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺、转铁蛋白修饰的 $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺和包封的奥沙利铂, 其中所述转铁蛋白修饰的 $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺包括通过羧酸酰胺键与第二 $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺连接的转铁蛋白; 并且其中 $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺由式 1 表示,

[0210]

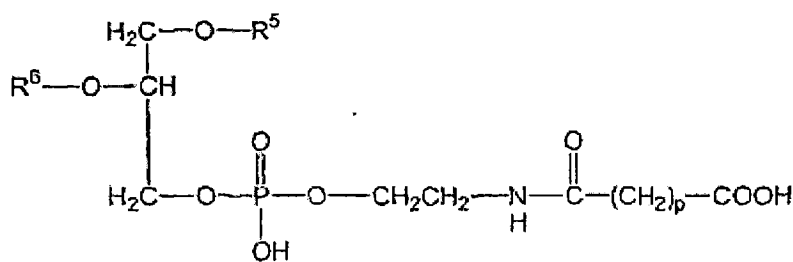


[0211]

式 1

[0212] 以及 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯由式 2 表示,其中第二 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺由式 3 表示,

[0213]



[0214]

式 3

[0215] 其中 R^1 、 R^2 、 R^5 和 R^6 各自独立为酰基, m 和 p 独立为 1 至 10 的整数;并且其中所述脂质体不包括非衍生化磷脂酰乙醇胺或聚乙二醇。在一些实施方式中,靶向脂质体基本上不含 EDC 和 / 或 DCC。

[0216] 在靶向脂质体的一些实施方式中, m 和 p 各自独立为 2 至 4 的整数。在一些实施方式中, m 和 p 相等并且是 2 至 4 的整数。在特定实施方式中, m 和 p 相等并且是 3。

[0217] 在靶向脂质体的一些实施方式中, R^1 、 R^2 、 R^5 和 R^6 各自独立为油酰、硬脂酰、棕榈酰或肉豆蔻酰。在一些实施方式中, R^1 和 R^2 相同, 并且 R^5 和 R^6 相同。在特定实施方式中, R^1 、 R^2 、 R^5 和 R^6 相同。在一些实施方式中, R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 是油酰或硬脂酰。在一些实施方式中, R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 是油酰。

[0218] 在靶向脂质体的一些实施方式中, 靶向配体指向靶细胞。在特定实施方式中, 靶向配体指向靶细胞的细胞表面受体。在一些实施方式中, 靶向配体是转铁蛋白、叶酸、透明质酸、糖链或单克隆抗体的片段。在一些实施方式中, 靶向配体是转铁蛋白、叶酸、透明质酸或糖链。在特定实施方式中, 靶向配体是转铁蛋白。在这些实施方式的一些中, 转铁蛋白是全蛋白形式而不是脱铁形式。在其它实施方式中, 转铁蛋白是脱铁形式。

[0219] 在脂类混合物、含脂质体组合物和靶向脂质体的一些实施方式中, 制剂不包括阴离子脂类。在一些实施方式中, 制剂不包括阳离子脂类。在一些实施方式中, 制剂不包括阳离子脂类或阴离子脂类。在一些实施方式中, 制剂不包括磷脂酰甘油或其衍生物。在特定实施方式中, 制剂不包括卵磷脂酰胆碱。

[0220] 在脂类混合物、含脂质体组合物和靶向脂质体的一些实施方式中, 至少两种不同的中性脂类是一种或多种磷脂和胆固醇或胆固醇衍生物。在一些实施方式中, 至少两种不同的中性脂类是磷脂。在脂类混合物、含脂质体组合物和靶向脂质体的一些实施方式中, 至少两种不同的中性脂类是磷脂酰胆碱和胆固醇。在特定实施方式中, 至少两种不同中性脂类之一是 DMPC、DSPC 或 DPPC。在一些实施方式中, 至少两种不同中性脂类之一是胆固醇或

胆固醇衍生物。在特定实施方式中,至少两种不同中性脂类是 DMPC 和胆固醇、DSPC 和胆固醇、或 DPPC 和胆固醇。在特定实施方式中,至少两种不同中性脂类是 DMPC 和胆固醇。

[0221] 在靶向脂质体的一些实施方式中,脂质体的平均直径是约 50nm 至约 250nm。在一些实施方式中,脂质体的平均直径是约 90nm 至约 200nm。在特定实施方式中,脂质体的平均直径是约 100nm 至约 140nm。

[0222] 在靶向脂质体的一些实施方式中,脂质体的 ζ 电位是负值。在特定实施方式中, ζ 电位是约 -75mV 至约 -90mV。在一些实施方式中, ζ 电位是约 -80mV 至约 -85mV。

[0223] 在脂类混合物、含脂质体组合物和靶向脂质体的一些实施方式中, N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺是 NG-DOPE (其中 NG-DOPE 等价于 :R¹ 和 R² 是油酰并且 m 是 3), 并且, 如果存在 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯, 其为 NHS-NG-DOPE (其中 NHS-NG-DOPE 等价于 :R³ 和 R⁴ 是油酰并且 n 是 3), 或者, 如果存在靶向因子修饰的 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺, 其为 TF-NG-DOPE (其中 TF-NG-DOPE 等价于 :R⁵ 和 R⁶ 是油酰并且 p 是 3)。

[0224] 在含脂质体组合物和靶向脂质体的一些实施方式中, 制剂还包括溶液。

[0225] 在靶向脂质体的一些实施方式中, 中性脂类 : N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺 : 靶向因子修饰的 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的摩尔比是约 95 : 4 : 1。

[0226] 在靶向脂质体的一些实施方式中, DMPC : 胆固醇 : (N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺 + 靶向因子修饰的 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺) 的摩尔比是 50 : 45 : 5。

[0227] 在含脂质体组合物和靶向脂质体的特定实施方式中, 存在标记化合物。在一些实施方式中, 标记化合物包括放射性同位素部分。在特定实施方式中, 标记化合物包括 ¹²⁵I。

[0228] 在含脂质体组合物和靶向脂质体的一些实施方式中, 存在药物。在特定实施方式中, 药物是抗癌剂。在一些实施方式中, 药物是细胞毒性药物。在一些实施方式中, 药物是拓扑异构酶 I 抑制剂。在特定实施方式中, 拓扑异构酶 I 抑制剂是拓扑替康或依立替康。在其它实施方式中, 药物是长春花生物碱。在一些实施方式中, 长春花生物碱是长春新碱、长春花碱、长春罗新 (vinleurosine)、长春罗定、脱水长春花碱或脱乙酰长春花碱。在其它实施方式中, 药物是核酸。在这些实施方式中的一些中, 核酸是反义寡核苷酸或核酶。在特定实施方式中, 药物是铂化合物。在一些实施方式中, 铂化合物是双铂、顺铂、卡铂、奥马铂、奥沙利铂、折尼铂、恩洛铂、洛铂或螺铂。在特定实施方式中, 铂化合物是奥沙利铂。在一些实施方式中, 药物是烷化剂。在特定实施方式中, 药物是紫杉烷。在其它实施方式中, 药物是代谢拮抗剂。在一些实施方式中, 药物是抗肿瘤抗生素。在一些实施方式中, 药物是激素治疗药物。在特定实施方式中, 药物是分子靶标药物。

[0229] 在其中存在奥沙利铂的特定实施方式中, 奥沙利铂溶解在糖的水溶液中, 所述糖选自 : 海藻糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖、甘露糖、甘露醇、甘油和葡萄糖。在一些实施方式中, 糖的浓度是约 1% 至约 20% 的糖百分数 (v/v)。在特定实施方式中, 奥沙利铂的浓度是在脂质体中约 0.1mg/ml 至约 25mg/ml。在其它实施方式中, 奥沙利铂的浓度是在脂质体中约 0.5mg/ml 至约 10mg/ml。在还有其它实施方式中, 奥沙利铂的浓度是约 0.5mg/ml 至约 3mg/ml。

[0230] 在特定实施方式中——其中存在靶向因子修饰的 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺, 掺入脂质体的靶向配体的浓度是约 1.0mg/ml 至约 3.0mg/ml。在一些实施方式中, 并

入脂质体的靶向配体的浓度是约 1.0mg/ml 至约 2.5mg/ml。

[0231] 在一些实施方式中——其中存在靶向因子修饰的 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺,靶向配体是转铁蛋白。在一些实施方式中,转铁蛋白是全蛋白形式而不是脱铁形式。在一些实施方式中,转铁蛋白是脱铁形式。在一些实施方式中,铁的浓度是约 0.4 至约 3.0 μ g/ml。在其它实施方式中,铁的浓度是约 0.4 至约 1.5 μ g/ml。

[0232] 在脂类混合物、含脂质体组合物和靶向脂质体的一些实施方式中,制剂不含有除了两种不同中性脂类、N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺和靶向因子修饰的 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺之外的脂类成分。在特定实施方式中,制剂不含有除了磷脂酰胆碱、胆固醇或胆固醇衍生物、N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺和转铁蛋白修饰的 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺之外的脂类成分。

[0233] 在另一方面,提供了药物制剂,其包括本文所述的靶向脂质体或含脂质体组合物以及一种或多种药学上可接受的载体、赋形剂、稀释剂、稳定剂或防腐剂。

[0234] 在又一方面,提供了试剂盒,其包括本文所述的脂类混合物、含脂质体组合物或靶向脂质体中的一种或多种、包装和使用说明书。

[0235] 在一些实施方式中,试剂盒包括靶向脂质体。在特定实施方式中,靶向脂质体包含在第一容器中,并且一种或多种药学上可接受的载体、赋形剂、稀释剂、稳定剂或防腐剂包含在第二容器中。

[0236] 如果没有另外指出,本文所述的含脂类组合物意图用于本文所述的治疗方法和诊断方法,并且可以并入本文所述的药物制剂和试剂盒中。如果没有另外指出,本文所述的含脂类组合物(包括脂类混合物、含脂质体组合物)、脂质体(包括靶向脂质体、空白脂质体等)可以通过本文所述的生产方法制备。

[0237] 在另一方面,提供了制备本文所述的含脂类组合物的方法,包括步骤:混合至少两种不同的中性脂类、N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺和 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯。

[0238] 在一些实施方式中,提供了制备本文所述的含脂质体组合物的方法,包括步骤:

[0239] a) 混合至少两种不同的中性脂类、N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺和 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯,形成脂类混合物;

[0240] b) 将药物加入步骤(a)中形成的脂类混合物;和

[0241] c) 形成脂质体。

[0242] 在一些实施方式中,混合步骤(a)是在有机溶剂存在的情况下进行的。

[0243] 在一些实施方式中,步骤(b)中的药物在混合前处于水溶液中。

[0244] 在一些实施方式中,步骤(c)包括超声波处理或搅拌。在特定实施方式中,步骤(c)包括挤出。

[0245] 在进一步实施方式中,提供了制备本文所述的靶向脂质体的方法,包括步骤:

[0246] a) 混合至少两种不同的中性脂类、N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺和 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯,形成脂类混合物;

[0247] b) 将药物或标记化合物加入步骤(a)中形成的脂类混合物;

[0248] c) 形成脂质体;和

[0249] d) 将靶向配体连接于 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯。

[0250] 在上述方法的一些实施方式中,所述方法还包括步骤(e),纯化步骤(d)的脂质体。在特定实施方式中,步骤(b)中的药物在混合之前处于水溶液中。在一些实施方式中,步骤(c)包括超声波处理或搅拌。在一些实施方式中,步骤(c)包括挤出。

[0251] 也提供了制备靶向脂质体的其它方法,包括步骤:

[0252] a) 混合磷脂酰胆碱、胆固醇或胆固醇衍生物、和 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺,形成脂类混合物;

[0253] b) 将奥沙利铂加入步骤(a)中形成的脂类混合物;

[0254] c) 形成脂质体;和

[0255] d) 官能化 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的一部分,形成 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯;和

[0256] e) 将转铁蛋白连接于 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯。

[0257] 在一些实施方式中,方法还包括纯化步骤(e)的脂质体的步骤(f)。

[0258] 在本方法的特定实施方式中,步骤(b)中的药物在混合之前处于水溶液中。

[0259] 在本方法的一些实施方式中,步骤(c)包括超声波处理或搅拌。

[0260] 在本发明的又一方面,提供了本文所述的含脂类组合物(包括靶向脂质体)及其制剂在制备药物中的应用。特别地,制备药物用于如本文所述的疾病诊断或治疗。进一步地,如果没有另外指出,本文各处所述的药物制剂也意图用于制备药物,所述药物用于治疗 and 诊断疾病,以及根据本文所述的方法制备药物。

[0261] 在本发明的又一方面,提供了治疗癌症的方法,包括步骤

[0262] a) 将本文所述的靶向脂质体以有效量施用给需要的个体,以便治疗癌症,其中所述药物是抗癌剂。

[0263] 在一些实施方式中,个体是哺乳动物。在特定实施方式中,个体是人。

[0264] 在一些实施方式中,癌症是乳腺癌、胃癌、结肠癌、结肠直肠癌、胰腺癌、非小细胞性肺癌、小细胞肺癌、脑癌、肝癌、肾癌、前列腺癌、膀胱癌、卵巢癌或血液恶性病。

[0265] 在治疗方法的一些实施方式中,步骤(a)在联合形式癌症治疗之前、同时或之后实施。在特定实施方式中,联合形式癌症治疗包括化疗、放疗或手术。

[0266] 在治疗方法的一些实施方式中,步骤(a)在辅助癌症治疗之前、同时或之后实施。在特定实施方式中,辅助癌症治疗包括给予一种或多种药剂以便减轻毛发丢失、呕吐、免疫抑制、恶心、腹泻、皮疹、感觉障碍、贫血、疲劳、口腔炎、或手足综合症。在一些实施方式中,步骤(a)在给予一种或多种其它抗癌剂之前、同时或之后实施。在特定实施方式中,一种或多种其它抗癌剂包括 5-氟尿嘧啶、亚叶酸、卡培他滨、UFT/LV(替加氟-尿嘧啶和亚叶酸)、依立替康、抗 EGFR 抗体、抗 VEGF 抗体、酪氨酸激酶抑制剂、或其联合。

[0267] 在治疗方法的一些实施方式中,靶向脂质体通过肠胃外投药施用。在特定实施方式中,肠胃外投药是通过注射或静脉输注。

[0268] 附图简述

[0269] 图 1 示出了靶向脂质体的示意性表示。

[0270] 图 2 示出了应用靶向脂质体进行肿瘤细胞的活性药物靶向的示意性表示。

[0271] 图 3 示出了含有奥沙利铂的靶向脂质体的建议作用方式的示意性表示。

[0272] 图 4 示出了靶向脂质体的生产方法 A 的示意性描述。

[0273] 图 5 示出了靶向脂质体的生产方法 B 的示意性描述。

[0274] 图 6 示出了在多种奥沙利铂浓度下,奥沙利铂对 AsPC-1 细胞的细胞毒性。

[0275] 图 7 示出了正常白细胞和肿瘤来源细胞系的细胞表面上存在的转铁蛋白受体的数目。

[0276] 图 8 示出了实施例 6 中制备的含脂质体混合物的大小分布的结果,通过 QELS 获得;A) 条目 1, B) 条目 2, C) 条目 3, D) 条目 4, E) 条目 5, F) 条目 6。

[0277] 图 9 示出了血液中脂质体的浓度,其中 (◆) 表示实施例 6 中制备的 Tf-PEG-脂质体, (■) 表示实施例 5 中制备的 Tf-NG-DSPE:NG-DSPE:DSPC:CH 脂质体,而 (▲) 表示实施例 6 中制备的 Tf/PEG-NG-DSPE 脂质体。

[0278] 图 10 示出了癌症组织中的脂质体的浓度;其中 (◆) 表示实施例 6 中制备的 Tf-PEG-脂质体, (■) 表示实施例 5 中制备的 Tf-NG-DSPE:NG-DSPE:DSPC:CH 脂质体,而 (▲) 表示实施例 6 中制备的 Tf/PEG-NG-DSPE 脂质体。

[0279] 图 11 示出了如实施例 13 所述而制备的 NG-PE 脂质体在静脉注射后,在肿瘤组织中的累积,其中将 NGPE 脂质体包封的标记有 ^{125}I 的酪胺菊粉 (tyraminyl inulin) 注射入带有 Colon 26 肿瘤的小鼠中。数据表示为平均值。数据表示为平均值 \pm SD ($n = 5$)。 (□) 0mol % (-); (■) 1mol % (+) Tf-NG-DOPE。* 与 0mol % (-) 的显著差 (significant difference)。

[0280] 图 12 示出了脂质体对肿瘤生长的抑制作用,通过对肿瘤生长比治疗起始后的时间进行绘图来表示,其中 (◆) 表示实施例 9 中制备的 Tf-PEG-脂质体;(■) 表示实施例 6 中制备的 PEG-脂质体,不带有 Tf;(▲) 表示实施例 8 中制备的 Tf-NG-DSPE:NG-DSPE:DSPC:CH 脂质体;(o) 表示实施例 8 中制备的 NG-DSPE:NG-DSPE:DSPC:CH 脂质体,不带有 Tf;(*) 表示实施例 9 中制备的 Tf/PEG-NG-DSPE 脂质体; (•) 表示实施例 9 中制备的 PEG-NG-DSPE 脂质体,不带有 Tf; (+) 表示 1-OHP 溶液; (-) 表示没有治疗。

[0281] 图 13 示出了多种浓度的 NG-PE (NG-DSPE) 对血液中检测的药物剂量百分数的作用,其中 NG-DSPE 的浓度 (总脂类含量的百分数) 如下:(◆) 0%, (■) 1%; (▲) 3%; (x) 6%; (o) 12%; 并且带有下列脂类:(•) MPB 6%; (+) PDP 6%。

[0282] 图 14 示出了应用多种二羧酸接头,带有和不带有 Tf,脂质体的血液滞留,其中 (◆) Tf-NGPE, (■) Tf-NSPE; (▲) TF-MPB; (x) NGPE (没有 Tf), (*) MPB (没有 Tf)。

[0283] 图 15 示出了通过电泳对脂质体进行的示范性分析:泳道 6 (转铁蛋白-N-戊二酰基-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-脂质体 (Tf-NG-DSPE 脂质体)); 泳道 5 (转铁蛋白-聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-脂质体 (Tf-PEG-DSPE 脂质体))。泳道 1-4, 分别包含 h-apo-Tf (240ng)、h-apo-Tf (120ng)、h-apo-Tf (60ng) 和 h-apo-Tf (30ng)。

[0284] 图 16 示出了与 Tf-NG-DSPE 脂质体结合的转铁蛋白的量,其中非-NG-DSPE 掺入 (泳道 5) 或不掺入 (泳道 4) 所述脂质体。泳道 1-3, 分别包含 h-apo-Tf (400ng)、h-apo-Tf (200ng) 和 h-apo-Tf (50ng)。

[0285] 图 17 示出了,以 5mg/kg 施用 (■) NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH 脂质体和以 5mg/kg 施用 (•) Tf-PEG 脂质体后,血液中的累积奥沙利铂。

[0286] 图 18 示出了在,以 5mg/kg 施用 (■) NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH 脂质体和以

5mg/kg 施用 (•)Tf-PEG 脂质体后,小鼠结肠 26 肿瘤中的累积奥沙利铂。

[0287] 图 19 示出了 NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH 脂质体在带有结肠 26 肿瘤的小鼠中的抗肿瘤作用,其中 (•) 表示赋形剂对照 (9%蔗糖);(▲) 表示 1-OHP 溶液,5mg/kg,(◆) 表示 NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH 脂质体,5mg/kg 和 (■) 表示 Tf-PEG 脂质体,5mg/kg。

[0288] 图 20 示出了 NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH 脂质体在带有 HCT-116 人结肠肿瘤异种移植物的鼠中的抗肿瘤作用,其中 (•) 表示赋形剂对照 (300mM(10.27%)蔗糖);(○) 表示空白 (无药物) 脂质体,(▲) 表示 1-OHP 溶液,15mg/kg,(◆) 表示 NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH 脂质体,10mg/kg 和 (■) 表示 NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH 脂质体,15mg/kg。所有脂质体都是通过精确体重、应用注射体积 0.103mL/10g 体重给予的。

[0289] 图 21 示出了 NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH 脂质体在带有 HT-29 人结肠肿瘤的异种移植物的鼠中的抗肿瘤作用,其中 (•) 表示赋形剂对照 (300mM(10.27%)蔗糖),(▲) 表示 NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH 脂质体,15mg/kg,(■) 表示 NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH 脂质体,10mg/kg,和 (◆) 表示 NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH 脂质体,6.7mg/kg。

[0290] 图 22 示出了 NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH 脂质体在带有 MKN45 人胃部肿瘤的异种移植物的鼠中的抗肿瘤作用,其中 (•) 表示赋形剂对照 (300mM(10.27%)蔗糖),(▲) 表示 NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH 脂质体,15mg/kg,(■) 表示 NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH 脂质体,10mg/kg,和 (◆) 表示 NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH 脂质体,6.7mg/kg。

[0291] 图 23 示出了 NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH 脂质体在带有 COLO 205 人肿瘤异种移植物的鼠中的抗肿瘤作用,其中 (•) 表示赋形剂对照 (300mM(9%)蔗糖),(▲) 表示 1-OHP 溶液,5mg/kg,q4d×3(第 16 天),10mg/kg,q2d×2(第 47 天),2mg/kg q2d×6(第 51 天);(◆) 表示 NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH 脂质体,5mg/kgq4d×3(第 16 天),10mg/kg,q2d×2(第 47 天),2mg/kg q2d×6(第 51 天);和 (■) 表示 NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH 脂质体,10mg/kg q4d×3(第 16 天),15mg/kg q2d×2(第 47 天),4mg/kg q2d×6(第 51 天)。

[0292] 图 24 示出了用 2-巯基乙醇还原后的 SDS-PAGE 样式,其中泳道 1 是分子量标记,泳道 2 是全转铁蛋白,泳道 3-5 是 NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH 脂质体,泳道 6 是 Tf-NG-DOPE。

[0293] 图 25 示出了具有系统适宜性的示范性 HPLC 色谱。

[0294] 发明详述

[0295] 本文提供了含脂类组合物 (包括靶向脂质体、空白脂质体、含脂质体组合物、脂类混合物等),和制备和应用本文所述的含脂类组合物的方法。含脂类组合物,和脂质体,特别是本文提供的,适于制备药物制剂和用于治疗或诊断多种疾病,包括癌症。组合物,包括药物制剂,提供了更有效的治疗和诊断方案,其中与输送到个体的药物或标记化合物有关的不利效应减少。增加的效率和减少的不利效应应当增加药物制剂的治疗指数,并且提供用于成功治疗多种疾病的机会,包括癌症,并且也应当增加功效和降低与诊断有关的不利效应。药物制剂的特异性增加同时伴有不利效应降低,应当保证对更多数和更大范围的被治

疗个体的治疗益处,因而挽救或延长生命以及改进需要治疗的个体的生活质量。标记化合物制剂的特异性增加同时伴有不利效应降低,应当增加被成功诊断的个体的数目,例如,能够耐受诊断制剂的个体,并且也增加诊断的准确性(例如,敏感性),包括使得对疾病进行更早期的诊断和更有效监测疾病的严重程度(例如,应用或不应用治疗时的进展或消退)。

[0296] 目前描述的组合物中包括含脂类组合物的药物制剂。本文所述的含脂类组合物包括但不限于脂质体,其包封药物和标记化合物并且可以用在疾病治疗或诊断中或需要治疗或诊断的其它病症的治疗或诊断中,包括,例如,癌症(例如,乳腺癌、胃癌、结肠直肠癌或结肠癌)。

[0297] 当传统的抗癌剂(包括细胞毒性剂)经静脉给予时,整个身体被非选择性地暴露于药物并且受到其影响。结果,可以发生许多不利效应,癌症未被靶向,和/或药物效应在循环过程中可能失去。在给予之前将药物包封在脂质体组合物中,可以产生一种或多种益处,包括降低药物对正常细胞的不利效应,在药物可能不稳定的情况下保护药物直至其达到靶向的病理细胞,延长药物在循环系统中的存在以便能够输送到病理细胞,和/或帮助输送药物到特定靶向病理细胞。药物更特异地靶向和降低通过在RES中吸收而导致的药物损失,也包括下列益处:降低需要施用的药物的量,从而也降低治疗成本,以及本文所述的其它益处。

[0298] 相似地,许多标记化合物有不利效应和/或可以在给药和诊断(例如,进行诊断技术的时间——例如,放射性同位素检测、磁性共振成像、超声等)之间的时间内降解。在本文所述的含脂类化合物中掺入标记化合物,应当增加标记化合物的功效,如,例如,检测阈值可以在较低剂量的标记化合物下获得,降低药剂的不利效应,和/或延长进行诊断的时窗。

[0299] 含脂类化合物也包含用靶向配体修饰的脂类(例如,靶向脂质体、空白脂质体、含脂质体组合物、脂类混合物)或其它衍生物。例如,掺入靶向因子(例如,转铁蛋白,叶酸盐)和衍生脂类(例如,N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺)的脂质体组合物被开发以改进抗癌剂(例如,奥沙利铂等)的安全性和功效,这通过延长药物在血浆中的循环时间(相比于单独在溶液中给予的药物)和通过肿瘤细胞上的靶向因子特异性受体进行。这种改进的生物利用度和肿瘤靶向,应当引起安全性改进和抗肿瘤活性改进,并且因而对需要的个体进行有效治疗的概率更大,同时也降低与许多药物有关的不利效应,特别是与大多数抗癌剂有关的严重不利效应。类似地,这种衍生化和靶向因子也可以用于有效地靶向特定位置(例如,肿瘤类型、器官、组织等)用于输送标记化合物。

[0300] 本发明也提供了转铁蛋白修饰的N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺,其可以用于本文所述的含脂类组合物及其制剂。

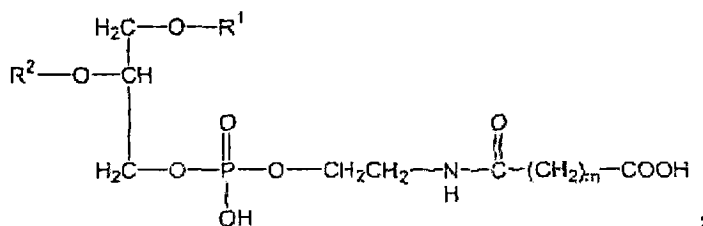
[0301] 含脂类组合物,包括脂质体,如本文所述,可以通过本文所述的方法制备,以及考虑到本说明书提供的教导,对技术人员已知和适当的脂质体制造方法制备。如果没有另外指出,本文所述的脂质体和含脂质体组合物可以没有限制地掺入药物制剂和/或试剂盒中,包括本文所述的药物制剂和/或试剂盒,以及另外包括考虑到本说明书提供的教导,对技术人员将是显而易见的制剂和/或试剂盒。类似地,如果没有另外指出,脂质体和含脂质体组合物和掺入了脂质体和含脂质体组合物的药物制剂可以被没有限制地用在治疗 and 诊断方法中,所述方法与贯穿本说明书提供的说明一致并且考虑到本文提供的教导、根据技术人员的实践进行。

[0302] 掺入药物（奥沙利铂）的示范性靶向脂质体在图 1 中示意性表示。建议的靶向脂质体的摄取机制和作用方式提供在图 2 和图 3 中。如本文所用，术语“靶向脂质体 (targeted liposome)”一般是指带有这样组分的脂质体：包含至少一种或多种磷脂、 $N\omega$ PE、TF- $N\omega$ PE，并且也包含本文所示的药物或标记化合物。如贯穿本说明书描述的这些组分中的每一种可以没有限制地掺入到本发明的靶向组合物中，这与本文提供的教导一致。指出，本文更详细描述的空白脂质体，也可以是“靶向的”，这在于它们能够掺入 TF- 修饰的 $N\omega$ PEs，但是一般不掺入药物或标记化合物。

[0303] $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺

[0304] 本文所述的含脂类组合物包含至少一种根据式 1 的 $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺，式 1 如下：

[0305]



[0306]

式 1

[0307] 其中 R^1 和 R^2 独立为酰基，并且 m 是 1 至 10 的整数。

[0308] 如本文所用，术语“ $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺”及其同源词，是指本文提供的式 1 包含的 $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺。类似地，缩写 $N\omega$ PE 用来指代式 1 包含的 $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺（例如， $N\omega$ -DOPE、 $N\omega$ -DSPE、NG-DOPE 等），例如，如果没有另外指明，NG-PE 是指式 1 的 N -戊二酰基磷脂酰乙醇胺（一种或多种）。

[0309] 意图在于，本文所述的含脂类组合物（包括靶向脂质体）中包含的唯一的磷脂酰乙醇胺（一种或多种）是式 1 的 $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺或式 2 的 $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯或式 3 的靶向因子修饰的 $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺，如下文更详细描述。如本文所用，术语“非衍生化磷脂酰乙醇胺”及其同源词，是指未被式 1、式 2 或式 3 包含的磷脂酰乙醇胺、半合成磷脂酰乙醇胺、合成磷脂酰乙醇胺和 / 或它们的衍生物。

[0310] 由 R^1 和 R^2 表示的宽范围的酰基，可以用在式 1 中，如本领域普通技术人员所理解。

[0311] 在一些实施方式中，酰基来自具有 12-22 个碳原子的饱和或不饱和脂肪族羧酸。示范性酰基包括但不限于，来自下列的酰基：月桂酸、十三烷酸、肉豆蔻酸、十五烷酸、棕榈酸、十七烷酸、硬脂酸、十九烷酸、花生酸、二十一烷酸、二十二烷酸、2-十二烯酸、5-十二烯酸、11-十二烯酸、5-肉豆蔻脑酸、肉豆蔻脑酸、2-棕榈油酸、7-棕榈油酸、顺-9-棕榈油酸、反-9-棕榈油酸、岩芹酸、异岩芹酸 (petroselinic acid)、油酸、反油酸、11-十八碳烯酸、二十碳-11-烯酸、反式-二十碳-11-烯酸、芥酸、亚油酸、反亚油酸、 α -桐酸、 β -桐酸、亚麻酸、假桐酸、花生四烯酸、二十碳五烯酸、或二十二碳六烯酸。

[0312] 在一些实施方式中，酰基来自 14-18 个碳原子的饱和或不饱和脂肪族羧酸。此类示范性酰基包括但不限于来自下列的酰基：油酸（18 碳）、棕榈酸（16 碳）、硬脂酸（18 碳）或肉豆蔻酸（14 碳）。如技术人员已知，相应的酰基分别是油酰基、棕榈酰基、硬脂酰基和肉

豆蔻酰基。

[0313] 在其它实施方式中,酰基来自具有 14-18、14-20、14-22、16-18、16-20、16-22、18-20、18-22、12、14、16、18、20 或 22 个碳的饱和或不饱和脂肪族羧酸。在一些实施方式中,酰基来自具有偶数碳原子数目的饱和或不饱和脂肪族羧酸。

[0314] 在一些实施方式中,酰基来自油酸(油酰基)、硬脂酸(硬脂酰基)、棕榈酸(棕榈酰基)、亚油酸(亚油酰基、18 碳)或肉豆蔻酸(肉豆蔻酰基)。在其它实施方式中,酰基来自油酸(油酰基)。在一些实施方式中,酰基来自硬脂酸(硬脂酰基)。在又一实施方式中,酰基来自棕榈酸(棕榈酰基)。在其它实施方式中,酰基来自肉豆蔻酸(肉豆蔻酰基)。

[0315] 在一些实施方式中,酰基来自饱和脂肪族羧酸,例如但不限于棕榈酸(16 碳)、硬脂酸(18 碳)或肉豆蔻酸(14 碳)。

[0316] 在其它实施方式中,酰基来自不饱和脂肪族羧酸,例如但不限于油酸(油酰基,18 碳)、亚油酸(亚油酰基、18 碳)或亚麻酸(亚麻酰基,18 碳)。在一些实施方式中,酰基来自亚麻酸。

[0317] 在一些实施方式中,m 是 1,2,3,4,5,6,7,8,9 或 10。在其它实施方式中,m 是 1-8,1-6,1-5,1-7,1-3,1-2,2-8,2-6,2-5,2-4,2-3,3-4,3-5,或 3-6 的整数。在一些实施方式中,m 是 2-4 的整数,在一些实施方式中,m 是 1,2 或 3。

[0318] 在一些实施方式中,m 是 1 至 4 的整数。如普通技术人员所知,m = 1 相应于磷脂酰乙醇胺(PE)的丙二酸衍生物,而 m = 2,3 或 4 分别表示 PE 的琥珀酸衍生物、戊二酸衍生物和己二酸衍生物。在一些实施方式中,m 是 3(戊二酸)。

[0319] 在一些实施方式中, R^1 和 R^2 是相同的酰基。在其它实施方式中, R^1 和 R^2 是不同的酰基。在一些实施方式中, R^1 和 R^2 是油酰基、硬脂酰基、棕榈酰基或肉豆蔻酰基。在一些实施方式中, R^1 和 R^2 是油酰基。在其它实施方式中, R^1 和 R^2 是硬脂酰基。在特定实施方式中, R^1 和 R^2 是棕榈酰基。在其它实施方式中, R^1 和 R^2 是肉豆蔻酰基。

[0320] 在一些实施方式中,式 1 的 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺是 N-戊二酰基-二油酰磷脂酰乙醇胺(NG-DOPE(即,当 R^1 和 R^2 是油酰基并且 m 是 3))。在其它实施方式中,其为 N-戊二酰基-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(NG-DSPE(即, R^1 和 R^2 是硬脂酰基并且 m 是 3))。在其它实施方式中,其为 N-戊二酰基-二肉豆蔻酰基磷脂酰乙醇胺(NG-DMPE(即,其中 R^1 和 R^2 是肉豆蔻酰基并且 m 是 3))。在其它实施方式中,其为 N-戊二酰基-二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(NG-DPPE(即,其中 R^1 和 R^2 是棕榈酰基并且 m 是 3))。在其它实施方式中,其为 N-琥珀酰基-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(NS-DSPE(即,其中 R^1 和 R^2 是硬脂酰基并且 m 是 2))。在其它实施方式中,其为 N-己二酰基-一硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(NA-DSPE(即,其中 R^1 和 R^2 是硬脂酰基并且 m 是 4))。在一些实施方式中,式 1 的 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺是 NG-DOPE 或 NG-DSPE。

[0321] N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的制备

[0322] 通过将二羧酸结合到磷脂酰乙醇胺的氨基,可以获得本文所述的 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺。

[0323] 磷脂,包括用于本文所述目的的磷脂酰乙醇胺及其衍生物,必须具有高的纯度并且在理想上应当是均一的。制备高纯度磷脂的已知方法包括从缓冲液提取脂类并且应用柱层析纯化。例如,N-琥珀酰二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺的生产方法描述于国际专利申请公

布 W093/01828 (JPAH7-501316) 和美国专利号 5,804,552 和 5,554,728 中,它们的内容以整体并入本文。这些生产方法包括从反应混合物纯化磷脂衍生物,其中应用硅胶 60 对反应混合物进行柱层析。在氮气氛下,在室温下,使二棕榈酰磷脂酰乙醇胺 (DPPE) 与琥珀酸酐反应 16 小时,应用三乙胺催化剂。

[0324] N-(ω -羧基)酰氨基-磷脂酰乙醇胺磷脂衍生物的其他生产方法描述于日本公开专利申请 JPA2001-261688 中,其包括在将 pH3.5-7.5 的缓冲液加入反应混合物之后通过分离液体层而进行纯化,其以整体并入本文作为参考。在这种情况下,应用三乙胺碱性催化剂,使 PE 与无水二羧酸在 4°C 下反应 1 小时。这种方法可能不是对所有磷脂酰乙醇胺衍生物都起良好的作用。

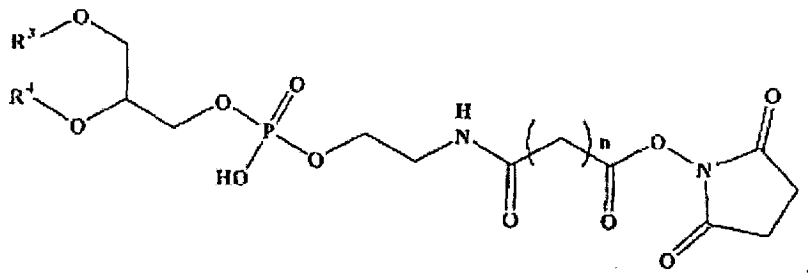
[0325] DOPE (二油酰基-磷脂酰乙醇胺) 也可以通过商业途径得到或通过本领域技术人员已知的方法制备。例如,简言之,卵磷脂 (API 起始物) 可以被化学水解,产生甘油-磷酸-胆碱,其通过沉淀得以分离。随后应用活化的油酸酰基化脂类,通过正相柱层析分离 DOPC (二油酰基-磷脂酰胆碱) 并且使其通过离子交换柱以便纯化。应用磷脂酶 D,通过与乙醇胺反应,可以从 DOPC 制得 DOPE。

[0326] 也可以以这样的方式制备 N-(ω -羧基)酰氨基-磷脂酰乙醇胺磷脂衍生物,如例如,描述于美国专利 4,534,899 中,其整体并入本文。简言之,使二羧酸酐与磷脂如磷脂酰乙醇胺反应,得到二羧酸-衍生化磷脂酰乙醇胺。

[0327] N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯

[0328] 本文所述的 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯由下列式 2 表示:

[0329]



[0330] 式 2

[0331] 其中 R^3 和 R^4 各自独立是酰基,并且 n 是 1 至 10 的整数。

[0332] 如本文所用,术语“N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯”及其同源词是指,本文提供的式 2 包含的 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯。类似地,缩写 SuccN ω PE 可以用于指代式 2 包含的 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯 (例如, SuccN ω -DOPE, SuccN ω -DSPE, SuccNG-DOPE 等),例如,如果没有另外指明, NHS-NG-PE 是指式 2 的 N-戊二酰磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯,通过与 NHS 反应形成。

[0333] 可以应用由 R^3 和 R^4 表示的宽范围的酰基,如本领域技术人员公知和上文对 R^1 和 R^2 所述。如果本文没有另外指明,明确地意图于,本文中所提供的针对式 1 的酰基 (例如, R^1 和 R^2) 描述等同地适用于针对式 2 的酰基 (例如, R^3 和 R^4)。特别地,包含上文中标题为“N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺”的部分中的描述。

[0334] 在一些实施方式中, R^3 和 R^4 是相同的酰基。在其它实施方式中, R^3 和 R^4 是不同的酰基。在一些实施方式中, R^3 和 R^4 是油酰基、硬脂酰基、棕榈酰基或肉豆蔻酰基。在一些实施方式中, R^3 和 R^4 是油酰基。在其它实施方式中, R^3 和 R^4 是硬脂酰基。在一些实施方式中, R^3 和 R^4 是棕榈酰基。在其它实施方式中, R^3 和 R^4 是肉豆蔻酰基。

[0335] 在一些实施方式中, n 是 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 或 10。在其它实施方式中, n 是 1-8, 1-6, 1-5, 1-7, 1-3, 1-2, 2-8, 2-6, 2-5, 2-4, 2-3, 3-4, 3-5, 或 3-6 的整数。在一些实施方式中, n 是 2-4 的整数, 在其它实施方式中, n 是 1, 2 或 3。

[0336] 在一些实施方式中, n 是 1 至 4 的整数。如普通技术人员所知, $n = 1$ 相应于磷脂酰乙醇胺 (PE) 的丙二酸衍生物, 而 $n = 2, 3$ 或 4 分别表示 PE 的琥珀酸衍生物、戊二酸衍生物和己二酸衍生物。在一些实施方式中, n 是 3 (戊二酸)。

[0337] 在一些实施方式中, 式 2 的 $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯是 N -戊二酰基-二油酰磷脂酰乙醇胺 (NG-DOPE) 的琥珀酰亚胺酯。在其它实施方式中, 其为 N -戊二酰基-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 (NG-DSPE) 的琥珀酰亚胺酯。在一些实施方式中, 式 2 的 $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯是 NG-DOPE 或 NG-DSPE 的琥珀酰亚胺酯。

[0338] 在一些实施方式中, 式 2 的 $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯是 N -戊二酰基-二油酰磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯 (SuccNG-DOPE (即, 其中 R^3 和 R^4 是油酰基并且 n 是 3))。在其它实施方式中, 其为 N -戊二酰基-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯 (SuccNG-DSPE (即, 其中 R^3 和 R^4 是硬脂酰基并且 n 是 3))。在其它实施方式中, 其为 N -戊二酰基-二肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯 (SuccNG-DMPE (即, 其中 R^3 和 R^4 是肉豆蔻酰基并且 n 是 3))。在其它实施方式中, 其为 N -戊二酰基-二棕榈酰磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯 (SuccNG-DPPE (即, 其中 R^3 和 R^4 是棕榈酰基并且 n 是 3))。在其它实施方式中, 其为 N -琥珀酰-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯 (SuccNS-DSPE (即, 其中 R^3 和 R^4 是硬脂酰基并且 n 是 2))。在其它实施方式中, 其为 N -己二酰-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯 (SuccNA-DSPE (即, 其中 R^3 和 R^4 是硬脂酰基并且 n 是 4))。在一些实施方式中, 式 2 的 $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯是 SuccNG-DOPE 或 SuccNG-DSPE。

[0339] 在一些实施方式中, $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺是 $N\omega$ -DOPE 并且 $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯是 Succ $N\omega$ -DOPE。在其它实施方式中, $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺是 $N\omega$ -DSPE 并且 $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯是 Succ $N\omega$ -DSPE。在其它实施方式中, $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺是 $N\omega$ -DOPE 并且 $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯是 Succ $N\omega$ -DSPE。在一些其它实施方式中, $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺是 $N\omega$ -DSPE 并且 $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯是 Succ $N\omega$ -DOPE。在这些实施方式中的一些中, 琥珀酰亚胺酯可以是 NHS (例如, NHS- $N\omega$ -DOPE, NHS- $N\omega$ -DSPE 等)。

[0340] 在一些实施方式中, $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺是 NG-DOPE 并且 $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯是 SuccNG-DOPE。在其它实施方式中, $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺是 NG-DSPE 并且 $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯是 SuccNG-DSPE。在其它实施方式中, $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺

是 NG-DOPE 并且 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯是 SuccNG-DSPE。在一些其它实施方式中, N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺是 NG-DSPE 并且 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯是 SuccNG-DOPE。在这些实施方式中的一些中, 琥珀酰亚胺酯可以是 NHS (例如, NHS-NG-DOPE, NHS-NG-DSPE 等)。N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯的制备

[0341] 通过衍生化本文所述的 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺, 可以获得本文所述的 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯, 如本领域已知和本文所述进行制备。N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯的制备也在下文更详细描述, 包括在实施例中更详细描述。考虑到本说明书中提供的教导, 技术人员也将能够修改本文所述的方法。

[0342] 本发明的 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯的生产方法如下:

[0343] 向 1 当量的本文所述式 2 表示的 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺加入约 0.7-1.3 当量 NHS, 其溶解在不含有活性氢的有机溶剂中。随后于 0-50°C 使混合物与约 0.7-1.3 当量的碳二亚胺化合物反应约 1-7 天。

[0344] 示范性地, 不含有活性氢的有机溶剂包括但不限于酯 (例如, 乙酸乙酯, 乙酸丁酯等), 脂肪烃 (例如, 己烷, 庚烷等), 芳香烃 (例如, 甲苯, 二甲苯等), 卤代烃 (例如, 氯仿, 二氯甲烷, 二氯乙烷等), 醚 (例如, THF, 二噁烷、二乙醚等), 环烃 (例如, 环己烷等), DMF 和 DMSO。有机溶剂也可以被脱氢。

[0345] 可以应用宽范围的碳二亚胺化合物, 只要所述化合物具有碳二亚胺基 ($-N=C=N-$) 即可。例如, 可以使用的碳二亚胺化合物包括但不限于, 碳二亚胺基如 N, N'-二环己基-碳二亚胺 (DCC)、N, N'-二异丙基-碳二亚胺、N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺氯化物 (EDC) 等。在一些实施方式中, 应用 DCC。在其它实施方式中, 应用 EDC。

[0346] 上述反应也可以在副产物产生最小或消除的条件下进行。不需要的副产物包括脲化合物 (例如, N, N'-二环己基脲、N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)脲等)、N-乙酰化脲化合物、羧酸酐化合物和 5-噁唑酮化合物。不利于副产物形成或最小化副产物形成的条件和物质包括, 1) 将碳二亚胺化合物缓慢溶解于有机溶剂中, 2) 在 0°C 以下进行反应以便防止反应带来的热的放出等。优化反应和最小化副产物产生的其它方式将被本领域技术人员理解, 特别是考虑到本文提供的教导。

[0347] 能够溶解碳二亚胺化合物的有机溶剂与上述不含有活性氢的有机溶剂相同。用于溶解碳二亚胺的溶剂和不含有活性氢的有机溶剂可以相同或不同。

[0348] 反应进程可以通过薄层层析 (TLC) 系统、高效液相色谱 (HPLC) 和 / 或蒸发光散射 (evaporated light scattering) 检测器监测。监测反应进程的其它方法将是本领域技术人员已知的。

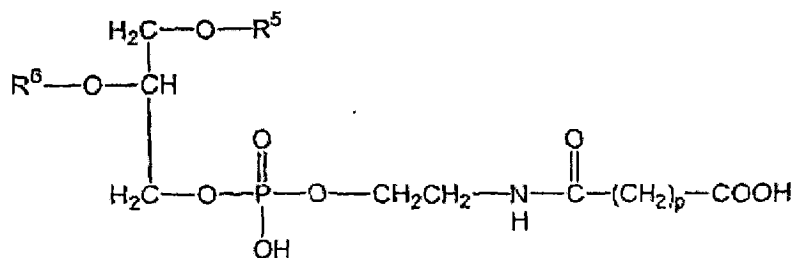
[0349] 应用氯仿和甲醇的混合物, 通过硅胶柱层析, 可以进行纯化。其它纯化方法将是本领域技术人员已知的。

[0350] 在完全脱氢的有机溶剂中和不存在强酸或强碱时, 本文所述的 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯通常是稳定的。靶向因子修饰的 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺

[0351] 靶向因子修饰的 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺包括与第二 N-(ω)-二羧酸

衍生化磷脂酰乙醇胺连接的靶向配体,其中第二 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺由式 3 表示,

[0352]



[0353]

式 3

[0354] 其中 R^5 和 R^6 独立为酰基,并且 p 是 1 至 10 的整数。

[0355] 如本文所用,术语“靶向因子修饰的 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺”及其同源词,是指式 3 包括的 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺,其应用本文提供的靶向因子进行修饰。类似地,缩写 TF-N ω PE 可以用于指代靶向因子修饰的 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺(例如,TF-N ω -DOPE,TF-N ω -DSPE,TF-NG-DOPE 等),例如,TF-NG-PE 是指连接于式 3 的 N-(ω)-戊二酰基磷脂酰乙醇胺的靶向配体。

[0356] 可以应用由 R^5 和 R^6 表示的宽范围的酰基,如本领域技术人员公知和上文对 R^1 和 R^2 所述。如果本文没有另外指明,明确地意图于,本文中所提供的针对式 1 的酰基(例如, R^1 和 R^2)的描述等同地适用于针对式 3 的酰基(例如, R^5 和 R^6)。特别地,包含上文中标题为“N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺”的部分中的描述。

[0357] 在一些实施方式中, R^5 和 R^6 是相同的酰基。在其它实施方式中, R^5 和 R^6 是不同的酰基。在一些实施方式中, R^5 和 R^6 是油酰基、硬脂酰基、棕榈酰基或肉豆蔻酰基。在一些实施方式中, R^5 和 R^6 是油酰基。在其它实施方式中, R^5 和 R^6 是硬脂酰基。在一些实施方式中, R^5 和 R^6 是棕榈酰基。在其它实施方式中, R^5 和 R^6 是肉豆蔻酰基。

[0358] 在一些实施方式中, p 是 1,2,3,4,5,6,7,8,9 或 10。在其它实施方式中, p 是 1-8,1-6,1-5,1-7,1-3,1-2,2-8,2-6,2-5,2-4,2-3,3-4,3-5 或 3-6 的整数。在一些实施方式中, p 是 2-4 的整数,在其它实施方式中, p 是 1,2 或 3。

[0359] 在一些实施方式中, p 是 1 至 4 的整数。如普通技术人员所知, $p = 1$ 相应于磷脂酰乙醇胺(PE)的丙二酸衍生物,而 $p = 2,3$ 或 4 分别表示 PE 的琥珀酸、戊二酸和己二酸衍生物。在一些实施方式中, p 是 3(戊二酸)。

[0360] 在一些实施方式中,靶向因子修饰的式 3 的 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺是靶向因子修饰的 N-戊二酰基-二油酰磷脂酰乙醇胺(TF-NG-DOPE)。在其它实施方式中,其为靶向因子修饰的 N-戊二酰基-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(TF-NG-DSPE)。在一些实施方式中,靶向因子修饰的式 3 的 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺是 TF-NG-DOPE 或 TF-NG-DSPE。

[0361] 在一些实施方式中,式 3 的 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺是 N-戊二酰基-二油酰磷脂酰乙醇胺(NG-DOPE(即,其中 R^5 和 R^6 是油酰基并且 p 是 3))。在其它实施方式中,其为 N-戊二酰基-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(NG-DSPE(即,其中 R^5 和 R^6 是硬脂酰基并且 p 是 3))。在其它实施方式中,其为 N-戊二酰基-二肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺(NG-DMPE(即,其中 R^5 和 R^6 是肉豆蔻酰基并且 p 是 3))。在其它实施方式中,其为 N-戊二酰基-二棕榈酰

磷脂酰乙醇胺 (NG-DPPE (即, 其中 R^5 和 R^6 是棕榈酰基并且 p 是 3))。在其它实施方式中, 其为 N -琥珀酰基-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 (NS-DSPE (即, 其中 R^5 和 R^6 是硬脂酰基并且 p 是 2))。在其它实施方式中, 其为 N -己二酰基-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 (NA-DSPE (即, 其中 R^5 和 R^6 是硬脂酰基并且 p 是 4))。在一些实施方式中, 式 3 的 N -(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺是 NG-DOPE 或 NG-DSPE。

[0362] 在一些实施方式中, 靶向配体是转铁蛋白 (Tf), 其在下文中更详细描述, 并且并入转铁蛋白修饰的 N -(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺中的 N -(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺是式 3 的 N -(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺, 如本文所述。

[0363] 在一些实施方式中, N -(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺是 $N\omega$ -DOPE 并且靶向配体是转铁蛋白 (Tf), 并且靶向因子修饰的 N -(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺是 Tf- $N\omega$ -DOPE。在其它实施方式中, N -(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺是 $N\omega$ -DSPE 并且靶向配体是转铁蛋白 (Tf), 并且靶向因子修饰的 N -(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺是 Tf- $N\omega$ -DSPE。在其它实施方式中, N -(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺是 $N\omega$ -DOPE 并且靶向配体是转铁蛋白 (Tf), 并且靶向因子修饰的 N -(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺是 Tf- $N\omega$ -DSPE。在一些其它实施方式中, N -(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺是 $N\omega$ -DSPE 并且靶向配体是转铁蛋白 (Tf), 并且靶向因子修饰的 N -(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺是 Tf- $N\omega$ -DOPE。在这些实施方式中的一些中, m 可以是 3 并且 N -(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺是根据式 1 的 NG-PE。

[0364] 在一些实施方式中, N -(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺是 NG-DOPE 并且靶向因子修饰的 N -(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺是 TF-NG-DOPE。在其它实施方式中, N -(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺是 NG-DSPE 并且靶向因子修饰的 N -(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺是 TF-NG-DSPE。在又一实施方式中, N -(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺是 NG-DOPE 并且靶向因子修饰的 N -(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺是 TF-NG-DSPE。在一些其它实施方式中, N -(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺是 NG-DSPE 并且靶向因子修饰的 N -(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺是 TF-NG-DOPE。

[0365] 通过与靶向配体和其它反应物进行反应, 可以从 Succ $N\omega$ PE 制得靶向因子修饰的 N -(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺, 如本文更详细描述。TF- $N\omega$ PE 可以在与本文所述的含脂类组合物的其它脂类组分混合之前被制备 (和任选地被纯化) 或者可以通过预先制备的已掺入含脂类组合物中的 Succ $N\omega$ PE 的反应被原位制备。

[0366] 其它脂类组分

[0367] 除了本文所述的 $N\omega$ PE、Succ $N\omega$ PE 和 / 或 TF- $N\omega$ PE 之外, 本文所述的含脂类组合物也包含一种或多种其它脂类组分。各种其它脂类组分都可以被应用, 然而, 术语“其它脂类组分 (additional lipid component(s))”不意图于包括非衍生化的磷脂酰乙醇胺 (PE) 或如式 1、2 或 3 中的 PE 的衍生物。在一些实施方式中, 一种或多种其它脂类组分可以是磷脂或一种或多种磷脂。在一些实施方式中, 一种或多种其它脂类组分可以包括至少两种中性脂类。在其它实施方式中, 一种或多种磷脂可以存在, 并且任选地, “其它脂类 (additional lipid)” (其不是磷脂) 可以存在。各种中性脂类都可以应用, 然而, 所述至少两种中性脂类不意图于包括非衍生化的磷脂酰乙醇胺 (PEs) 或如式 1、2 或 3 中的 PE 的衍生物。意图不在于, 如本文应用的术语“磷脂 (phospholipid)”应该包括 PE 或其衍生

物,如式 1、2 或 3 中的。类似地,术语“其它脂类”不包括 PEs 或其衍生物,如式 1、2 或 3 中的,也不包括其它磷脂。

[0368] 在特定实施方式中,磷脂(一种或多种)可以被用在本文所述的含脂类组合物和制剂中。例如,一种或多种、至少 2 种、至少 3 种、至少 4 种磷脂;或 2 种、3 种、或 4 种磷脂。在特定实施方式中,存在一种磷脂。在一些实施方式中,组合物中的脂类组分被限制为一种磷脂、 $N\omega$ PE 和 Succ $N\omega$ PE(或 TF 修饰的 $N\omega$ PE,其中进行了与靶向因子的反应)。

[0369] 在特定实施方式中,两种或多种中性脂类可以被用在本文所述的含脂类组合物和制剂中。例如,至少 2 种、至少 3 种、至少 4 种中性脂类;或 2 种、3 种、或 4 种脂类。在特定实施方式中,有 2 种中性脂类。在一些实施方式中,组合物中的脂类组分被限制为两种中性脂类、 $N\omega$ PE 和 Succ $N\omega$ PE(或 TF- 修饰的 $N\omega$ PE,其中进行了与靶向因子的反应)。

[0370] 在一些实施方式中,其中其它脂类组分包括磷脂,磷脂可以是磷脂酰胆碱,包括天然发生的、半合成的或合成的磷脂酰胆碱(例如, DSPC、DMPC 等)。在一些实施方式中,磷脂酰胆碱是非天然发生的磷脂酰胆碱(例如,不是卵磷脂酰胆碱)。在特定实施方式中,磷脂酰胆碱是酰基磷脂酰胆碱(例如, DMPC、DPPC、POPC、DSPC 等)。在一些实施方式中,磷脂是阳离子的。在其它实施方式中,磷脂是阴离子的。在其它实施方式中,磷脂是中性的。在特定实施方式中,一种或多种磷脂不是阴离子的。在其它实施方式中,一种或多种磷脂不是阳离子的。在一些实施方式中,其中存在多于一种的磷脂,阴离子的脂类和中性脂类可以包含在内。示范性磷脂包括但不限于磷脂酰胆碱(PCs)、磷脂酸、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰甘油等。在一些实施方式中,含脂类组合物不包括磷脂酰丝氨酸或磷脂酰甘油。

[0371] 在一些实施方式中,至少两种中性脂类中的至少一种脂类可以是磷脂。在一些实施方式中,磷脂可以是磷脂酰胆碱,包括天然发生的、半合成的或合成的磷脂酰胆碱(例如, DSPC、DMPC 等)。在一些实施方式中,磷脂酰胆碱是非天然发生的磷脂酰胆碱(例如,不是卵磷脂酰胆碱)。在特定实施方式中,磷脂酰胆碱是酰基磷脂酰胆碱(例如, DMPC、DPPC、POPC、DSPC 等)。

[0372] 在一些实施方式中,至少两种中性脂类中的至少一种脂类可以是胆固醇或胆固醇衍生物(例如,胆固醇普鲁兰多糖(cholesterolpullulan)、带正电胆固醇(例如, DC-Chol)),其掺入放射性同位素部分(例如, ^3H 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^{130}I 等),具有功能部分(例如,荧光部分等)。

[0373] 在一些实施方式中,其中含脂类组合物包括一种或多种磷脂,所述组合物可以另外包括其它中性、非磷脂作为其它脂类。例如,如上述的胆固醇或胆固醇衍生物。

[0374] 本文所述的含脂类组合物中应用的磷脂(非 PE)包括合成的、半合成的和天然发生的磷脂。示范性磷脂包括但不限于磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酸、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰甘油等。在其它实施方式中,一种或多种磷脂包括磷脂酰胆碱(PC)或磷脂酸并且不包括磷脂酰丝氨酸或磷脂酰甘油。

[0375] 在一些实施方式中,磷脂可以是磷脂酰胆碱。在一些实施方式中,磷脂酰胆碱可以是,例如,二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱(POPC)、卵磷脂酰胆碱(EPC)、氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)等。在特定实施方式中,至少一种磷脂是磷脂酰胆碱。在这些实施方式中的一些中,磷脂酰胆碱是 DMPC。在其它实施方式中,磷脂酰胆碱是 DSPC。在其它实施方式中,磷脂酰

胆碱是 DPPC。在其它实施方式中,磷脂酰胆碱是 POPC。在其它实施方式中,磷脂酰胆碱是 EPC。在其它实施方式中,磷脂酰胆碱是 HSPC。在一些实施方式中,包含一种磷脂,并且其为 DMPC、DSPC、DPPC、POPC、EPC 或 HSPC。在特定实施方式中——其中含脂类组合物包括单一磷脂(非 PE 磷脂),磷脂是 DMPC。在其它实施方式中——其中含脂类组合物包括单一磷脂(非 PE 磷脂),磷脂是 DSPC。在其它实施方式中——其中含脂类组合物包括单一磷脂(非 PE 磷脂),磷脂是 DPPC。在其它实施方式中——其中含脂类组合物包括单一磷脂(非 PE 磷脂),磷脂是 POPC。在其它实施方式中——其中含脂类组合物包括单一磷脂(非 PE 磷脂),磷脂是 EPC。在其它实施方式中——其中含脂类组合物包括单一磷脂(非 PE 磷脂),磷脂是 HSPC。

[0376] 在一些实施方式中,其它脂类组分可以包括至少一种磷脂,和任选的其它磷脂如胆固醇或胆固醇衍生物。在特定实施方式中,其它脂类组分是单一磷脂和胆固醇。在一些实施方式中,其它脂类组分包括至少一种磷脂酰胆碱和胆固醇。在特定实施方式中,其它脂类组分包括单一磷脂酰胆碱和胆固醇。在其中包含胆固醇的一些实施方式中,磷脂是 DSPC、DMPC、DPPC、POPC、EPC 或 HSPC。在一些实施方式中,其它脂类组分包括胆固醇和 DMPC。在其它实施方式中,其它脂类组分包括胆固醇和 DSPC。在一些实施方式中,其它脂类组分是胆固醇和 DMPC 或 DSPC 中的一个。在一些实施方式中,其它脂类组分是胆固醇和 DMPC。在其它实施方式中,其它脂类组分是胆固醇和 DSPC。在其它实施方式中,其它脂类组分包括胆固醇和 DPPC。在其它实施方式中,其它脂类组分包括胆固醇和 POPC。在其它实施方式中,其它脂类组分包括胆固醇和 EPC。在其它实施方式中,其它脂类组分包括胆固醇和 HSPC。在一些实施方式中,其它脂类组分是胆固醇和 DMPC、DSPC、DPPC、POPC、EPC 或 HSPC 之一。在一些实施方式中,其它脂类组分是胆固醇和 DMPC。在其它实施方式中,其它脂类组分是胆固醇和 DSPC。在其它实施方式中,其它脂类组分是胆固醇和 DPPC。在其它实施方式中,其它脂类组分是胆固醇和 POPC。在其它实施方式中,其它脂类组分是胆固醇和 EPC。在其它实施方式中,其它脂类组分是胆固醇和 HSPC。

[0377] 在特定实施方式中,存在一种磷脂,所述磷脂不是 HSPC 或 EPC。

[0378] 在特定实施方式中,存在一种或多种磷脂。在一些实施方式中,一种或多种磷脂包括磷脂酰胆碱。在特定实施方式中,包括一种或多种磷脂和胆固醇(或胆固醇衍生物)。在一些实施方式中,磷脂是磷脂酰胆碱并且组合物另外包括胆固醇(或胆固醇衍生物)。在特定实施方式中,磷脂酰胆碱是包含饱和和脂肪酸部分的磷脂酰胆碱(例如,DMPC、DSPC 或 DPPC)。在一些实施方式中,磷脂酰胆碱不是卵磷脂酰胆碱。在特定实施方式中,磷脂酰胆碱不是 HSPC。

[0379] 在特定实施方式中,有两种中性脂类。在一些实施方式中,这两种中性脂类是胆固醇(或胆固醇衍生物)和磷脂酰胆碱。在特定实施方式中,磷脂酰胆碱是包含饱和和脂肪酸部分的磷脂酰胆碱(例如,DMPC、DSPC 或 DPPC)。在一些实施方式中,磷脂酰胆碱不是卵磷脂酰胆碱。

[0380] 如本文所述的其它脂类组分,以及本领域技术人员已知的其它脂类组分,可以从许多供应商经商业途径得到,包括,例如,AvantiPolar Lipids, Inc. (Alabaster, AK)、NorthernLipid Inc. (Canada)、LipoidGmbH(Germany)、NOF Corporation (Japan)、Nippon Fine Chemical Co., Ltd(Japan)。

[0381] 药物

[0382] 多种药物可以包含在本发明的含脂类组合物中,例如,化合物或基因。在一些实施方式中,药物可以是抗癌剂,例如,适于包封在脂质体中的抗癌剂。考虑到本文提供的教导和根据所选的药物以及意图用于组合物或制剂的用途,考虑到特异于药物和待治疗个体的因素,如本文进一步描述,技术人员能够容易地确定欲包含在本文所述的含脂类组合物及其制剂中的药物的量。

[0383] 在一些实施方式中,药物可以是核酸,例如,编码具有抗癌性质的序列的核酸。例如但不限于,反义寡核苷酸、核酶等。

[0384] 在一些实施方式中,抗癌药可以是细胞毒性药物,包括本领域技术人员和医学实践者已知的那些药物。示范性抗癌剂包括拓扑异构酶 I 抑制剂、长春花生物碱、烷化剂(包含铂化合物)、紫杉烷和本领域技术人员已知的其它药剂。

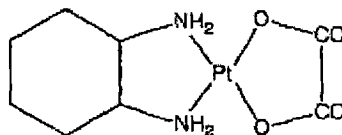
[0385] 在一些实施方式中,抗癌药可以是拓扑异构酶 I 抑制剂,例如,但不限于拓扑替康、依立替康等。

[0386] 抗癌药也可以是长春花生物碱,例如,长春新碱、长春花碱、长春罗新、长春罗定、脱水长春花碱、脱乙酰长春花碱等。

[0387] 进一步地,抗癌药也可以是铂化合物。铂化合物的非限制性例子包括双铂、顺铂、卡铂、奥马铂、奥沙利铂、折尼铂、恩洛铂、洛铂、螺铂等。

[0388] 奥沙利铂(反-1,2-二氨基环己烷的铂(II)顺-草酸基络合物)是具有下式子表示的结构铂络合物,更具体地是有机铂络合物。也已知奥沙利铂为下列:二氨基环己烷铂、DACH-铂、和顺-[(1R,2R)-1,2-环己烷二胺-N,N'] [草酸基(2)-O,O']铂($C_8H_{14}N_2O_4Pt$; MW 397.4g/mol)。如前所指出,奥沙利铂是 Eloxatin™ 中的活性药物组分。

[0389]



[0390] 奥沙利铂作为抗肿瘤剂是有用的,因为它具有类似于顺铂的治疗活性和相对低的肾毒性和化疗所致呕吐(呕吐)。奥沙利铂的生产方法是本领域公知的(例如,在 JP-A-9-40685;美国专利 4,169,846;5,338,874;5,959,133;5,298,642;和 5,290,961(其公开内容以整体并入本文)。奥沙利铂在 Chaney SG et al. "Recognition and processing of cisplatin and oxaliplatin-DNA adducts." Crit Rev Oncol Hematol. (2005) 53:3-11 中被进一步描述(整体并入本文作为参考)。

[0391] 在一些实施方式中,包封在脂质体中的奥沙利铂的浓度是约 1mg/ml,例如,约 0.8mg/ml。

[0392] 一般地,本发明的脂质体组合物包含约 1 至约 50 μ g 奥沙利铂/mg 脂类和约 1 至约 150 μ g TF/mg 脂类。例如,约 10 至约 50 μ g 奥沙利铂/mg 脂类和约 10 至约 150 μ g TF/mg 脂类。

[0393] 在一些实施方式中,组合物包含约 1 至约 45 μ g 奥沙利铂/mg 脂类,约 1 至约 40 μ g 奥沙利铂/mg 脂类,约 1 至约 35 μ g 奥沙利铂/mg 脂类,约 1 至约 30 μ g 奥沙利铂/mg 脂类,约 1 至约 25 μ g 奥沙利铂/mg 脂类,约 1 至约 20 μ g 奥沙利铂/mg 脂类,约 1 至约 15 μ g 奥

沙利铂/mg 脂类,约 1 至约 10 μ g 奥沙利铂/mg 脂类,约 1 至约 5 μ g 奥沙利铂/mg 脂类,约 5 至约 50 μ g 奥沙利铂/mg 脂类,约 5 至约 45 μ g 奥沙利铂/mg 脂类,约 5 至约 35 μ g 奥沙利铂/mg 脂类,约 5 至约 25 μ g 奥沙利铂/mg 脂类,约 5 至约 20 μ g 奥沙利铂/mg 脂类,约 5 至约 15 μ g 奥沙利铂/mg 脂类,约 5 至约 10 μ g 奥沙利铂/mg 脂类,约 1 μ g 奥沙利铂/mg 脂类,约 2 μ g 奥沙利铂/mg 脂类,约 4 μ g 奥沙利铂/mg 脂类,约 5 μ g 奥沙利铂/mg 脂类,约 10 μ g 奥沙利铂/mg 脂类,约 15 μ g 奥沙利铂/mg 脂类,约 20 μ g 奥沙利铂/mg 脂类,约 30 μ g 奥沙利铂/mg 脂类,约 40 μ g 奥沙利铂/mg 脂类,约 50 μ g 奥沙利铂/mg 脂类。

[0394] 在一些实施方式中,组合物包含约 1 至约 145 μ g TF/mg 脂类,约 1 至约 120 μ g TF/mg 脂类,约 1 至约 11.5 μ g TF/mg 脂类,约 1 至约 100 μ g TF/mg 脂类,约 1 至约 90 μ g TF/mg 脂类,约 1 至约 70 μ g TF/mg 脂类,约 1 至约 60 μ g TF/mg 脂类,约 1 至约 50 μ g TF/mg 脂类,约 1 至约 25 μ g TF/mg 脂类,约 10 至约 150 μ g TF/mg 脂类,约 10 至约 140 μ g TF/mg 脂类,约 10 至约 125 μ g TF/mg 脂类,约 10 至约 100 μ g TF/mg 脂类,约 10 至约 80 μ g TF/mg 脂类,约 10 至约 50 μ g TF/mg 脂类,约 10 至约 25 μ g TF/mg 脂类,约 1 μ g TF/mg 脂类,约 5 μ g TF/mg 脂类,约 10 μ g TF/mg 脂类,约 25 μ g TF/mg 脂类,约 40 μ g TF/mg 脂类,约 50 μ g TF/mg 脂类,约 70 μ g TF/mg 脂类,约 100 μ g TF/mg 脂类,约 120 μ g TF/mg 脂类,约 140 μ g TF/mg 脂类,或约 150 μ g TF/mg 脂类。

[0395] 在一些实施方式中,约 0.5 至约 50 μ g 奥沙利铂/mg 脂类和约 1 至约 150 μ g TF/mg 脂类。在一些实施方式中,约 5 至约 50 μ g 奥沙利铂/mg 脂类和约 10 至约 100 μ g TF/mg 脂类。在一些实施方式中,约 2 至约 50 μ g 奥沙利铂/mg 脂类和约 5 至约 150 μ g TF/mg 脂类;约 3 至约 50 μ g 奥沙利铂/mg 脂类和约 5 至约 150 μ g TF/mg 脂类;约 4 至约 50 μ g 奥沙利铂/mg 脂类和约 5 至约 150 μ g TF/mg 脂类;约 2 至约 40 μ g 奥沙利铂/mg 脂类和约 5 至约 150 μ g TF/mg 脂类;约 3 至约 40 μ g 奥沙利铂/mg 脂类和约 5 至约 150 μ g TF/mg 脂类;约 4 至约 40 μ g 奥沙利铂/mg 脂类和约 5 至约 150 μ g TF/mg 脂类;约 2 至约 50 μ g 奥沙利铂/mg 脂类和约 10 至约 150 μ g TF/mg 脂类;约 3 至约 50 μ g 奥沙利铂/mg 脂类和约 10 至约 150 μ g TF/mg 脂类;约 4 至约 50 μ g 奥沙利铂/mg 脂类和约 10 至约 150 μ g TF/mg 脂类;约 5 至约 50 μ g 奥沙利铂/mg 脂类和约 5 至约 100 μ g TF/mg 脂类;约 5 至约 50 μ g 奥沙利铂/mg 脂类和约 5 至约 100 μ g TF/mg 脂类;或约 0.5 至约 50 μ g 奥沙利铂/mg 脂类和约 5 至约 100 μ g TF/mg 脂类。

[0396] 在一些实施方式中,脂质体制剂中的奥沙利铂浓度是 0.8 \pm 10% mg/ml。

[0397] 在一些实施方式中,药物是奥沙利铂时,奥沙利铂可以溶解在溶液中(例如,水溶液)。在一些实施方式中,溶液包括糖(例如,海藻糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖、甘露糖、甘露醇、甘油、葡萄糖、果糖等)。糖的浓度可以是几个百分数。例如,糖浓度(v/v)是约 0.1-12%、0.5-12%、1%-12%、2%-8%、2%-6%、2%-5%、2%-4%、2%-5%、2%-6%、2%-8%、2%-9%、2%-10%、4%-10%、4%-9%、4%-8%、4%-6%、3%-4%、约 2%、约 3%、约 4%、约 5%、约 6%、约 7%、约 8%、约 9%或约 10%。在一些实施方式中,溶液包括糖并且是含水的。意图在于,奥沙利铂溶解于其中的溶液也可以包含其它成分,包括技术人员已知的那些成分。

[0398] 在一些实施方式中,糖浓度是约 5%、约 7%、约 8%、约 9%或约 10%。在其它实施方式中,糖浓度是约 5%至约 10%。在一些实施方式中,糖是葡萄糖并且奥沙利铂溶液中的

葡萄糖的浓度是约 5%。在一些实施方式中,糖是葡萄糖并且奥沙利铂溶液中的葡萄糖的浓度是约 9%。在一些实施方式中,糖是葡萄糖并且奥沙利铂溶液中的葡萄糖的浓度是约 9%。在一些实施方式中,糖是葡萄糖并且奥沙利铂溶液中的葡萄糖的浓度是约 10%。

[0399] 在一些实施方式中,溶液中的糖浓度可以是,例如,约 50mg/ml 至约 150mg/ml、约 50mg/ml 至约 130mg/ml、约 50mg/ml 至约 120mg/ml、约 50mg/ml 至约 100mg/ml、约 80mg/ml 至约 100mg/ml、约 90mg/ml 至约 150mg/ml、约 90mg/ml 至约 130mg/ml、约 60mg/ml、约 80mg/ml、约 90mg/ml、约 100mg/ml、约 110mg/ml、约 105mg/ml、约 120mg/ml 或约 140mg/ml。

[0400] 溶液也包含本领域技术人员已知的其它成分,如同但不限于盐、缓冲液、糖醇等。在一些实施方式中,奥沙利铂溶解于其中的溶液包含磷酸钠(例如,磷酸氢二钠和/或磷酸二氢钠)。

[0401] 在一些实施方式中,磷酸钠的浓度可以是约 5 至约 15mM。例如,约 5 至约 12mM、约 5 至约 10mM、约 5 至约 7mM、约 7 至约 12mM、约 7 至约 15mM、约 9 至约 12mM、约 5mM、约 7mM、约 10mM、约 12mM 或约 15mM。

[0402] 在一些实施方式中,糖溶液还可以包含约 1.0 至约 1.5mg/ml 磷酸钠。例如,约 1.2 至约 1.5mg/ml、1.0 至约 1.7mg/ml、1.0 至约 2 mg/ml、1.0 至约 2.5mg/ml、1.0 至约 3mg/ml、0.5 至约 3.5mg/ml 磷酸钠。

[0403] 在一些实施方式中,溶液 pH 值将是约 6.5 至约 7.5、约 6.7 至约 7.5、约 7 至约 7.5、约 7、约 7.5、约 6.8、或约 6.5。

[0404] 在一些实施方式中,药物是奥沙利铂,并且其包含在约 9%蔗糖溶液中。在一些实施方式中,药物是奥沙利铂,并且其包含在约 9%蔗糖溶液中,奥沙利铂浓度是约 1mg/ml。在一些实施方式中,药物是奥沙利铂,并且其包含在约 105mg/ml 蔗糖溶液中。在一些实施方式中,药物是奥沙利铂,并且其包含在约 105mg/ml 蔗糖溶液中,脂质体中的奥沙利铂浓度是约 1mg/ml。在这些实施方式中的一些中,溶液还包含磷酸钠。在一些实施方式中,奥沙利铂的浓度为脂质体溶液的约 0.8+/-10% mg/ml。

[0405] 标记化合物

[0406] 多种标记化合物也可以包含在本发明的含脂类组合物中。一般地,标记化合物可以是用于进行体内诊断方法的药剂。

[0407] 对于本文所述药物的掺入和应用,考虑到本文提供的教导和根据所选的标记化合物和组合物或制剂的意图应用,考虑到特异于标记化合物和待诊断个体的因素,如本文进一步所述,本领域技术人员可以容易地确定包含在如本文所述的含脂类组合物及其制剂中的标记化合物的量。

[0408] 示范性标记化合物包括,例如,包括放射性同位素(例如, ^3H 、 ^{14}C 、 ^{67}Ga 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{133}Xe 等)的物质,包括荧光部分(例如,荧光黄,荧光素异硫氰酸酯等)的物质,包括酶(例如,过氧化物酶、碱性磷酸酶等)的物质,以及本领域技术人员已知的其它标记化合物。

[0409] 如技术人员将理解,对诊断中应用的标记化合物和方法的选择将取决于待研究的器官(例如,肝脏、胰腺、前列腺等)、组织(例如,恶性或非恶性或组织类型(例如,乳腺等))。例如,掺入 ^{125}I 的含脂类组合物(例如,靶向脂质体、含脂质体组合物等)在利用 γ 计数器鉴定各种癌症(例如,乳腺癌、胃癌、结肠直肠癌、结肠癌等)的存在和确定其严重程度(例如,起初,在疗程期间,治疗后)中特别有用。

[0410] 靶向因子

[0411] 如果没有另外指出,术语“靶向因子”和“靶向配体”在本文中可以互换应用。

[0412] 通过掺入用针对特定靶细胞的靶向因子修饰的 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺(即,TF-N ω PE),本文所述的含脂类组合物得到表征。术语“靶向因子”是指能够结合于靶细胞表面上存在的受体或表面抗原的部分。在一些实施方式中,靶向因子针对特定靶细胞上的细胞表面受体。靶向因子常常是能够与含脂类组合物的脂类成分连接的蛋白质或肽。

[0413] 最有效地,选择靶向因子以至于靶向受体或抗原仅存在于被靶向以进行输送药物或标记化合物的细胞(例如,致病细胞)上并且不存在于健康细胞上。可选地,相比于非靶(例如,健康)细胞,数量更多的受体或抗原在靶细胞(例如,致病细胞或患病细胞)上表达。优选地,结合靶向因子的受体或抗原不存在于健康细胞上或以少数存在于健康细胞上,以至于与靶向因子的结合不频繁发生。换言之,靶向因子需要选择性输送本文所述的脂质体(包含包封药物)到达靶细胞(例如,致病的、不健康的细胞等)。包封药物向靶细胞的选择性输送从而降低了不利效应的发生,原因是包封药物或标记化合物对非靶向(例如,健康)细胞的作用降低,因而也降低给予组合物或其制剂的个体所经历的不利效应。

[0414] 示范性靶向因子包括但不限于,转铁蛋白、叶酸、叶酸盐、透明质酸、糖链(例如,半乳糖、甘露糖等)、单克隆抗体片段、脱唾液酸糖蛋白等、以及技术人员已知的其它靶向因子。

[0415] 在特定实施方式中,靶向因子是针对表面受体的蛋白质或肽(例如,转铁蛋白、叶酸盐、叶酸、无唾液酸糖蛋白等)。

[0416] 在其它实施方式中,靶向因子是针对抗原的(例如,单克隆抗体片段(例如 Fab, Fab', F(ab')₂, Fc 等))。靶向因子不意图于包括完整的或全单克隆抗体。如本文所使用,术语“全抗体(whole antibody)”或“完整抗体(intact antibody)”及其同源词,一般是指抗体免疫球蛋白 IgG。单克隆抗体片段一般是指单克隆抗体的分解产物,例如,应用蛋白酶如胃蛋白酶等的消化得到的片段。

[0417] 在一些实施方式中,靶向因子不针对抗原(例如,不是单克隆抗体片段,例如, Fab, Fab', F(ab')₂, Fc 等)。

[0418] 在一些实施方式中,靶向因子是转铁蛋白。

[0419] 转铁蛋白(Tf)是铁结合蛋白,分子量为 80,000,其在肝细胞中合成开且在血液中发现。转铁蛋白通过各个细胞表面的 Tf 受体将铁(Fe)供给细胞。相比于正常组织,转铁蛋白受体一般在肿瘤组织中的表达量更大,不论肿瘤类型如何。已知肿瘤细胞膜过表达转铁蛋白受体以便维持细胞增殖。参见 Shindelman JE, Ortmeyer AE, Sussman HH. " Demonstration of the transferrin receptor in human breast cancer tissue. Potential marker for identifying dividing cells." Int J Cancer. (1981)27(3) : 329-34 ;Lloyd JM, O' Dowd T, Driver M, Tee DE. " Demonstration of an epitope of the transferrin receptor in human cervical epithelium—a potentially useful cell marker." J Clin Pathol. (1984)37(2) :131-5 和 Habeshaw JA, Lister TA, Stansfeld AG, Greaves MF. " Correlation of transferrin receptor expression with histological class and outcome in non-Hodgkin lymphoma." Lancet. (1983)1(8323) :498-501. 治

疗剂和转铁蛋白结合从而将增强药物通过转铁蛋白受体摄入肿瘤细胞。虽然不意图限于作用机制,本文所述的转铁蛋白脂质体的可能的摄入途径在图 2 和 3 中示意性表示。转铁蛋白可以经商业途径得到,或者可以重组产生,如例如,美国专利 5,026,651 所述,其整体并入本文作为参考。

[0420] 虽然不局限于理论,认为转铁蛋白 (Tf) 与 N ω PE 的偶联通过伯胺与 N ω PE 的反应而发生,所述反应使得脂质锚和蛋白质之间形成羧酸酰胺。

[0421] 在一些实施方式中,靶向脂质体产物中存在的 Tf 与总脂类的摩尔比是约 0.00014 : 1mol/mol (Tf : 总脂类) (0.015, wt/wt)。在其它实施方式中, Tf : 总脂类的摩尔比是约 0.016 至约 0.029 : 约 126 至约 158mM/mM。

[0422] 含脂类组合物

[0423] 本文所述的含脂类组合物包括靶向脂质体,其掺入了衍生化脂类、其它脂类和包封药物或标记化合物,以及用于制备靶向脂质体的中间体,其包括脂类混合物和含脂类组合物,如本文所述,其中含脂类组合物(包含靶向脂质体)不含非衍生化磷脂酰乙醇胺和亲水聚合物,如同但不限于聚乙二醇。含脂类组合物也包括掺入 TF 但不包含药物或标记化合物的脂质体(例如,空白脂质体)。

[0424] 如本文所用,术语“亲水聚合物 (hydrophilic polymer)”及其同源词,是指聚合物如聚乙二醇 (PEG) 以及其它聚乙氧基化聚合物,所述聚合物用于脂质体领域以屏蔽脂质体,目的是增强脂质体的循环半衰期。该术语意图包括与脂质体非共价连接的游离亲水聚合物以及以某种方式与脂质体的特定组分偶联或共价连接的亲水聚合物(例如,PEG-修饰的脂类等)。在本领域中,这种亲水聚合物也可选地指“水溶性”聚合物。其它示范性亲水性聚合物包括但不限于聚乙烯醇、聚乳酸、聚羟基乙酸 (polyglycolic acid)、聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酰胺、聚甘油、polyaxozlines 等。

[0425] 如本文所用,术语“脂类混合物”及其同源词,是指本文所述脂类成分的混合物,其中脂类混合物不掺入溶液,例如,水溶液(例如,水、缓冲液或水和易混合水的溶剂(例如,糖(例如,海藻糖、蔗糖、乳糖、甘露糖、葡萄糖、果糖等)、糖醇(例如,山梨糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、甘油、甘露醇等)、醇(例如,乙醇、叔丁醇等)等))或有机溶剂的混合物。

[0426] 术语“含脂类组合物”及其同源词,是指脂类和任选地药物(一种或多种)或标记化合物(一种或多种)的混合物,其中已经通过混合(例如,搅拌、振荡等中的一种或多种)掺入了水溶液(例如,水、缓冲液(例如,乙酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液、酒石酸盐缓冲液等)或水和易混合水的溶剂的混合物)。水溶液也可以包含其它成分,如一种或多种糖(例如海藻糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖、甘露糖、葡萄糖、果糖等)、糖醇(例如,山梨糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、甘露醇、甘油等)、醇(例如,乙醇、叔丁醇等)等。水溶液也可以包含有机溶剂((例如,酯(例如,乙酸乙酯、乙酸丁酯)、脂肪烃(例如,己烷、庚烷等)、芳香烃(例如,甲苯、二甲苯等)、卤代烃(例如,氯仿、二氯甲烷、二氯乙烷等)、醚(例如,THF、二噁烷、二乙醚、异丙醚等)、环烃(例如,环己烷等)、DMF、DMSO 等)或它们的混合物)。含脂质体组合物一般会含有脂类、水溶液和在 100-10,000nm 间广泛分布并且平均直径为 500-2,000nm 的脂质体的非均一混合物。示范性含脂质体组合物的表征在实施例中进一步提供。

[0427] 在一些实施方式中,含脂类组合物不掺入亲水聚合物。在特定实施方式中,含脂类

组合物不掺入 PEG。

[0428] 在一些实施方式中,中间体脂类混合物包括至少两种不同的中性脂类或一种或多种磷脂,和 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺,其中所述脂类组分在本文中更详细描述并且其中所述混合物不含非衍生化磷脂酰乙醇胺和亲水聚合物如聚乙二醇。任选地,本文所述的水溶液可以与脂类成分混合,形成含脂质体组合物。在一些实施方式中,脂类混合物不包括药物或标记化合物。在特定实施方式中,脂类混合物可以被处理以形成含脂类组合物或脂质体制剂。

[0429] 在一些实施方式中,中间体脂类混合物包括至少两种不同的中性脂类或一种或多种磷脂、N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺和药物或标记化合物,其中所述脂类组分和药物 / 标记化合物在本文中更详细描述并且其中混合物不含非衍生化磷脂酰乙醇胺和亲水聚合物如聚乙二醇。任选地,本文所述的水溶液可以与脂类成分混合,形成含脂质体组合物,例如,当药物或标记化合物作为药物 / 标记化合物的水溶液加入时。在一些实施方式中,含脂质体组合物可以被处理(例如,通过挤出、大小排阻层析等或本领域中的方法中的一种或多种),形成脂质体。

[0430] 在一些实施方式中,脂类混合物包括一种或多种磷脂或至少两种不同的中性脂类、N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺和 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯,其中脂类组分在本文中更详细描述并且其中混合物不含非衍生化磷脂酰乙醇胺和亲水聚合物如聚乙二醇。混合物也可以基本上不含与 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯的合成有关的非-NHS 起始物质、副产物和 / 或分解产物(例如,碳二酰亚胺(例如,DCC,EDC 等)、酰基化脲化合物等)。任选地,本文所述的水溶液可以与脂类成分混合,形成含脂质体组合物。

[0431] 在一些实施方式中,中间体脂类混合物包括一种或多种磷脂或至少两种不同的中性脂类、N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺和靶向因子修饰的 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺,其中脂类组分在本文中更详细描述并且其中混合物不含非衍生化磷脂酰乙醇胺和亲水聚合物如聚乙二醇。混合物也可以基本上不含与 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯的合成有关的非-NHS 起始物质、副产物和 / 或分解产物(例如,碳二酰亚胺(例如,DCC,EDC 等)、酰基化脲化合物等)。任选地,本文所述的水溶液可以与脂类成分混合,形成含脂质体组合物。在一些实施方式中,脂类混合物不包含药物或标记化合物。脂类混合物可以被处理,形成含脂质体组合物或脂质体制剂。

[0432] 在一些实施方式中,中间体脂类混合物包括一种或多种磷脂或至少两种不同的中性脂类、N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺和 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯和药物或标记化合物,其中脂类和 / 或标记化合物组分在本文中更详细描述并且其中组合物不含非衍生化磷脂酰乙醇胺和亲水聚合物如聚乙二醇。混合物也可以基本上不含与 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯的合成有关的非-NHS 起始物质、副产物和 / 或分解产物(例如,碳二酰亚胺(例如,DCC,EDC 等)、酰基化脲化合物等)。任选地,本文所述的水溶液可以与脂类成分混合,形成含脂质体组合物。

[0433] 在一些实施方式中,含中间体脂类的组合物包括脂质体,其含有一种或多种磷脂或至少两种不同的中性脂类、N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺和 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯和包封药物,其中脂类和药物组分在本文中更详细描述并

且其中脂质体不含非衍生化磷脂酰乙醇胺和亲水聚合物如聚乙二醇。脂质体也可以基本上不含与 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯的合成有关的非-NHS 起始物质、副产物和 / 或分解产物 (例如, 碳二酰亚胺 (例如, DCC, EDC 等)、酰基化脲化合物等)。在一些实施方式中, 脂类混合物不包含药物或标记化合物。脂类混合物可以被处理, 形成含脂质体组合物或脂质体制剂。

[0434] 在一些实施方式中, 脂类混合物包括一种或多种磷脂或至少两种不同的中性脂类、N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺、靶向因子修饰的 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺和包封药物或标记化合物, 其中脂类、靶向因子和药物 / 标记化合物组分在本文中更详细描述并且其中脂质体不含非衍生化磷脂酰乙醇胺和亲水聚合物如聚乙二醇。在脂类混合物的一些实施方式中, 脂质体基本上不含与 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯的合成有关的非-NHS 起始物质、副产物和 / 或分解产物 (例如, 碳二酰亚胺 (例如, DCC, EDC 等)、酰基化脲化合物等)。在特定实施方式中, 脂类混合物是含脂质体组合物 (例如, 当药物或标记混合物作为水溶液加入时)。任选地, 本文所述的水溶液可以与脂类成分混合, 形成含脂质体组合物。

[0435] 在一些实施方式中, 靶向脂质体包括这样的脂质体, 其含有一种或多种磷脂或至少两种不同的中性脂类、N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺和靶向因子修饰的 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺和包封药物或标记化合物, 其中脂类、靶向因子和药物或标记化合物组分在本文中更详细描述并且其中脂质体不含非衍生化磷脂酰乙醇胺和亲水聚合物如聚乙二醇。在靶向脂质体的一些实施方式中, 脂质体基本上不含与 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯的合成有关的非-NHS 起始物质、副产物和 / 或分解产物 (例如, 碳二酰亚胺 (例如, DCC, EDC 等)、酰基化脲化合物等)。然而, 在一些实施方式中, N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯可以在靶向脂质体制备的起始阶段存在 (例如, NHS-NG-PEs (例如, NHS-NG-DOPE, NHS-NG-DSPE 等), 例如, 在琥珀酰亚胺酯水解前, 其在最终制剂中可以产生, 例如, NHS 和 NG-DOPE。在一些实施方式中, 当 SuccN ω PE 不掺入脂质体内部时, 脂质体或含脂质体组合物也可以不含或基本上不含 NHS, 如 TF-N ω PE 被预先形成和用作起始物质时。在特定实施方式中, 靶向脂质体基本上不含 DCC 和 EDC。在一些实施方式中, 靶向脂质体基本上不含 DCC。

[0436] 另外, 可以对本文所述的任一含脂质体组合物进行处理, 产生脂质体。脂质体的产生是本领域公知的, 并且可以根据本文所述的方法实现, 例如, 如下文更详细描述的生产方法 A 和 B 中。从含脂质体组合物产生脂质体的生产方法包括但不限于挤出、超声、反相囊泡、冻融、大小排阻层析、超滤等和它们的组合。从本文所述的含脂质体组合物形成的脂质体可以掺入药物或标记化合物或可以不含药物或标记化合物 (例如, 对于也在本文中称为“空白脂质体”的脂质体)。在特定实施方式中, 含脂质体组合物、脂质体 (包括空白脂质体) 和靶向脂质体可以制备为药物制剂, 此外, 可以用在本文所述的治疗或诊断方法和 / 或试剂盒中。

[0437] 术语“基本上不含”是指通过本领域中使用的常规分析方法, 物质的水平不可检测或最低程度地被检测。例如, HPLC (参见, 例如, European Pharmacopoeia 5thEd.)、TLC、气相色谱等, 以及其它本领域技术人员已知的其它分析方法。

[0438] 例如, 含脂类组合物可以包含按重量计约 0.1% 以下、约 0.5% 以下、约 1% 以下、

约 2% 以下、约 3% 以下、约 4% 以下、约 5% 以下或约 6% 以下的与 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯的合成有关的特定起始物质、副产物或分解产物比总脂类含量。在特定实施方式中,组合物含有约 10% 以下、约 7% 以下、约 5% 以下、约 3% 以下、约 2% 或约 1% 以下的总杂质(例如,与 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯的合成有关的特定起始物质、副产物和分解产物的总数百分数)。

[0439] 在一些实施方式中,靶向脂质体包括这样的脂质体,其含有磷脂酰胆碱(例如,中性、带负电荷或正电荷)、胆固醇或胆固醇衍生物、N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺、靶向因子修饰的 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺和包封药物或标记化合物,其中脂类、靶向因子和药物组分在本文中更详细描述并且其中脂质体不含非衍生化磷脂酰乙醇胺和亲水聚合物如聚乙二醇。在特定实施方式中,磷脂酰胆碱是中性磷脂酰胆碱。

[0440] 在一些实施方式中,靶向脂质体包括这样的脂质体,其含有磷脂酰胆碱(例如,中性、阴离子或阳离子)、胆固醇或胆固醇衍生物、N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺、转铁蛋白修饰的 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺和包封药物或标记化合物,其中脂类组分和药物或标记化合物组分在本文中更详细描述并且其中脂质体不含非衍生化磷脂酰乙醇胺和亲水聚合物如聚乙二醇。在特定实施方式中,磷脂酰胆碱是中性磷脂酰胆碱。

[0441] 在特定实施方式中,靶向脂质体包括这样的脂质体,其含有磷脂酰胆碱(例如,中性、阴离子或阳离子磷脂酰胆碱)、胆固醇或胆固醇衍生物、N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺、转铁蛋白修饰的 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺和包封的奥沙利铂,其中脂类组分在本文中更详细描述并且其中脂质体不含非衍生化磷脂酰乙醇胺和亲水聚合物如聚乙二醇。在特定实施方式中,磷脂酰胆碱是中性磷脂酰胆碱。

[0442] 在一些实施方式中,本文所述的含脂类组合物(包括靶向脂质体和空白脂质体)及其制剂还可以包含通过用二羧酸衍生化磷脂酰甘油、鞘氨醇、神经酰胺、胆固醇衍生物或类似物而得到的脂类。这些二羧酸衍生物可以如本文对 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺所述制备和根据技术人员已知的方法制备。

[0443] 在一些实施方式中,本文所述的含脂类组合物(包括靶向脂质体和空白脂质体)及其制剂不包含阴离子脂类(例如,磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇(phosphatidylinositols)、磷脂酰甘油等)或阳离子脂类(例如,鞘氨醇、DOTAP、DOTMA、DC-CHOL 等)。在特定实施方式中,组合物不包含阴离子脂类。在其它实施方式中,组合物不包含阳离子脂类。在一些实施方式中,组合物不包含阳离子和阴离子脂类。

[0444] 在一些实施方式中,含脂类组合物,组合物包括药物。在其它实施方式中,含脂类组合物包括标记化合物。

[0445] 在含脂类组合物的一些实施方式中,药物是奥沙利铂,靶向因子(TF)是转铁蛋白(Tf)并且脂类组分包含:DMPC 或 DSPC,和胆固醇或胆固醇衍生物,和 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺,和转铁蛋白修饰的 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺,其中转铁蛋白修饰的 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺包括通过羧酸酰胺键与 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺连接的转铁蛋白。

[0446] 在一些实施方式中,N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺和靶向因子修饰的 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺是 NG-DOPE 或 NG-DSPE。

[0447] 在特定实施方式中,含脂类组合物中的脂类组分是 DMPC、胆固醇、NG-DOPE 和

TF- 修饰的 NG-DOPE。在其它实施方式中,脂类组分是 DSPC、胆固醇、NG-DOPE 和 TF- 修饰的 NG-DOPE。在其它实施方式中,脂类组分是 DMPC、胆固醇、NG-DSPE 和 TF- 修饰的 NG-DSPE。在一些其它实施方式中,脂类组分是 DSPC、胆固醇、NG-DSPE 和 TF- 修饰的 NG-DSPE。在这些实施方式中的一些中,靶向因子 (TF) 是转铁蛋白,药物是奥沙利铂。

[0448] 在特定实施方式中,脂类组分是 DPPC、胆固醇、NG-DOPE 和 TF- 修饰的 NG-DOPE。在其它实施方式中,脂类组分是 POPC、胆固醇、NG-DOPE 和 TF- 修饰的 NG-DOPE。在其它实施方式中,脂类组分是 DPPC、胆固醇、NG-DSPE 和 TF- 修饰的 NG-DSPE。在一些其它实施方式中,脂类组分是 POPC、胆固醇、NG-DSPE 和 TF- 修饰的 NG-DSPE。在这些实施方式中的一些中,靶向因子 (TF) 是转铁蛋白,药物是奥沙利铂。

[0449] 在特定实施方式中,脂类组分是 HSPC、胆固醇、NG-DOPE 和 TF- 修饰的 NG-DOPE。在其它实施方式中,脂类组分是 EPC、胆固醇、NG-DOPE 和 TF- 修饰的 NG-DOPE。在其它实施方式中,脂类组分是 HSPC、胆固醇、NG-DSPE 和 TF- 修饰的 NG-DSPE。在一些其它实施方式中,脂类组分是 EPC、胆固醇、NG-DSPE 和 TF- 修饰的 NG-DSPE。在这些实施方式中的一些中,靶向因子 (TF) 是转铁蛋白,药物是奥沙利铂。

[0450] 脂类组分的比例

[0451] 一般地,起始物质 NG-DOPE 的摩尔百分数将是约 2.5 摩尔%至约 4.5 摩尔%,这是相比于总脂类含量而言的。另外,起始物质 NHS-NG-DOPE 的摩尔百分数将是约 0.5 摩尔%至约 2.5 摩尔%,这是相比于总脂类含量而言的。在一些实施方式中,NG-DOPE 与 NHS-NG-DOPE 的相对摩尔比将是约 3.4 : 1。在一些实施方式中,NG-DOPE 与 NHS-NG-DOPE 的相对摩尔比可以是约 4 : 1。在特定实施方式中,当中性磷脂和中性脂类存在时,摩尔比(例如,DMPC : Chol : NG-DOPE : NHS-NG-DOPE)可以是 43.0 : 38.5 : 3.42 : 1,也可以按摩尔百分数计表示为 50 : 45 : 4 : 1。

[0452] 在一些实施方式中,其它脂类比 $N\omega$ PE 比 Succ $N\omega$ PE 的相对摩尔百分数(例如,至少两种中性脂类 : $N\omega$ PE : Succ $N\omega$ PE 或一种或多种磷脂 : $N\omega$ PE : Succ $N\omega$ PE 或(一种或多种磷脂 + 中性脂类) : $N\omega$ PE : Succ $N\omega$ PE)可以是约 98mol%至约 87mol%的其它脂类:约 1mol%至约 12mol% $N\omega$ PE :约 0.5mol%至约 1% Succ $N\omega$ PE;其中所有组分的总摩尔百分数是 100mol%。例如,其它脂类 : $N\omega$ PE : Succ $N\omega$ PE 可以是约 95 : 4 : 1、90 : 9 : 1、92 : 7 : 1、93 : 6 : 1 等。

[0453] 在特定实施方式中,当其它脂类包括磷脂和另一脂类如胆固醇、胆固醇衍生物等时,每一脂类组分的摩尔百分数范围是约 30mol%至约 64%,其中其它脂类的总数是约 98mol%至约 87mol%。

[0454] 在一些实施方式中,当其它脂类是两种不同的中性脂类时,每一中性脂类的摩尔百分数范围是约 30mol%至约 64%,其中中性脂类的总数是约 98mol%至约 87mol%。

[0455] 在示范性实施方式中,当一种其它脂类是磷脂酰胆碱并且第二其它脂类是胆固醇或胆固醇衍生物时,磷脂酰胆碱的摩尔百分数范围是约 30 至约 70mol%,(例如,约 50 至约 64mol%,约 40 至约 65mol%,约 40 至约 60mol%,约 50 至约 62mol%,约 55 至约 60mol%,约 35 至约 55mol%,约 30mol%,约 40mol%,约 45mol%,约 50mol%,约 55mol%,约 60mol%,约 65mol%,约 70mol%),并且胆固醇或胆固醇衍生物的摩尔百分数是约 30 至约 60mol%(例如,约 32 至约 45mol%,约 32 至约 42mol%,约 32 至约 40mol%,约 40 至约 60mol%,约

35至约55mol%，约35至约60mol%，约45至约60mol%，约35至约45mol%，约30mol%，约35mol%，约40mol%，约45mol%，约50mol%，约55mol%或约60mol%）。在一些实施方式中，磷脂酰胆碱是约50mol%，约52mol%，约55mol%，约58mol%，约60mol%，约62mol%，并且胆固醇或胆固醇衍生物是约30mol%，约32mol%，约34mol%，约35mol%，约37mol%，约38mol%，约40mol%，约42mol%，约43mol%，约45mol%。

[0456] 在特定实施方式中， $N\omega$ PE 的摩尔百分数是约1至约11mol%，约1至约10mol%，约1至约8mol%，约1至约6mol%，约1至约5mol%，约1至约4mol%，约1至约3mol%，约1至约2mol%，约2至约10mol%，约2至约5mol%，约1mol%，约2mol%，约3mol%，约4mol%，约5mol%，约7mol%，约8mol%，约9mol%，约10mol%，约11mol%，或约12mol%。

[0457] 在一些实施方式中，第一其它脂类：第二其它脂类： $N\omega$ PE：Succ $N\omega$ PE 的相对摩尔百分数是，例如，50：45：4：1。在一些实施方式中，第一其它脂类是磷脂酰胆碱（例如，DMPC、DOPC、DPPC、DSPC等），第二其它脂类是胆固醇。在一些实施方式中， $N\omega$ PE 的PE是DOPE或DSPE。在特定实施方式中， $N\omega$ PE是NG-DOPE或NG-DSPE。在一些实施方式中，脂类是DMPC：Chol：NG-DOPE：NHS-NG-DOPE并且它们的相对摩尔百分数是50：45：4：1。在其它实施方式中，脂类是DSPC：Chol：NG-DSPE：NHS-NG-DSPE并且它们的相对摩尔百分数是50：45：4：1。在其它实施方式中，脂类是DSPC：Chol：NG-DSPE：NHS-NG-DSPE并且它们的相对摩尔百分数是62：33：4：1。

[0458] 在一些实施方式中， $N\omega$ PE 和 TF- $N\omega$ PE ($N\omega$ PE+TF- $N\omega$ PE) 的总摩尔百分数是总脂类含量的约2至约13mol%。例如，约2至约12mol%，约2至约10mol%，约2至约8mol%，约2至约6mol%，约2至约4mol%，约2mol%，约3mol%，约4mol%，约5mol%，约6mol%，约7mol%，约8mol%，约9mol%，约10mol%，约11mol%或约12mol%。

[0459] 一般地，TF- $N\omega$ PE 的总摩尔百分数是相对于总脂类含量的约0.002至约0.2mol%。例如，在一些实施方式中，TF- $N\omega$ PE 的总摩尔百分数是约0.002至约0.15mol%，TF- $N\omega$ PE 的总摩尔百分数是约0.002至约0.1mol%，0.002至约0.05mol%，约0.01至约0.03mol%，约0.005至约0.2mol%，约0.007至约0.2mol%，约0.007至约0.05mol%，约0.01至约0.025mol%，约0.015至约0.025mol%，约0.01至约0.2mol%，约0.02至约0.2mol%，约0.04至约0.2mol%，约0.06至约0.2mol%，约0.08至约0.2mol%，约0.002mol%，约0.008mol%，约0.01mol%，约0.02mol%，约0.03mol%，约0.025mol%，约0.015mol%，约0.06mol%，约0.08mol%，约0.1mol%，约0.15mol%，或约0.2mol%。

[0460] 脂质体和含脂质体组合物的表征

[0461] 除了应用组分比例表征含脂类组合物之外（例如，脂类比例、药物/标记化合物与脂类的比例等），也可以应用标准的分析方法表征本文所述的含脂质体组合物（例如，物理化学性质等），如技术人员所理解。这些分析方法包括但不限于，适当地，平均直径、包封体积、净电荷（ ζ 电位）、封入（即，包封）药物的量、颗粒大小、不同条件（例如，在保存中，当制备用于施用时，体外）下的稳定性、渗透性质、偶联的靶向因子的量等的确定方法。这些特性的示范性分析方法在下文中以及实施例加以阐述出，技术人员已知的其它方法也可以用于表征组合物。

[0462] 如技术人员所理解，如本领域常规实施的，应用已建立的 HPLC 分析方法，应用合适的对照，另外，如实施例中所述，可以确定脂质体的药物含量。应用合适的对照，通过

HPLC, 或者对于一些药物 (例如, 含铂药物) 通过分析方法如 ICP-MS (电感耦合等离子体质谱 Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry), 也可以鉴定包封药物, 如本领域技术人员所实践。

[0463] 在一些实施方式中, 脂质体或含脂质体组合中包封的药物 (例如, 奥沙利铂等) 或标记化合物的量可以是, 在脂质体中约 0.1mg/ml 至约 15mg/ml。例如, 药物浓度可以在脂质体中约 0.5mg/ml 至约 15mg/ml, 约 0.5mg/ml 至约 10mg/ml, 约 0.1mg/ml 至约 10mg/ml, 约 0.5mg/ml 至约 5mg/ml, 约 0.5mg/ml 至约 3mg/ml, 约 0.5mg/ml 至约 2mg/ml, 约 0.5mg/ml 至约 1.5mg/ml, 约 0.8mg/ml 至约 3mg/ml, 约 0.8mg/ml 至约 2mg/ml, 约 0.8mg/ml 至约 1.5mg/ml, 约 0.7mg/ml 至约 3mg/ml, 约 0.7mg/ml 至约 2mg/ml, 约 0.7mg/ml 至约 1.7mg/ml, 约 0.7mg/ml 至约 1.5mg/ml, 约 0.7mg/ml 至约 1.4mg/ml, 约 0.7mg/ml 至约 1.3mg/ml, 约 0.5mg/ml, 约 0.7mg/ml, 约 0.8mg/ml, 约 0.9mg/ml, 约 1mg/ml, 约 1.1mg/ml, 约 1.2mg/ml, 约 1.3mg/ml, 约 1.4mg/ml, 约 1.5mg/ml, 约 1.6mg/ml, 约 2mg/ml, 约 3mg/ml, 约 4mg/ml, 约 5mg/ml, 约 6mg/ml, 约 7mg/ml, 约 8mg/ml, 约 9mg/ml, 约 10mg/ml 或约 15mg/ml。

[0464] 剪切面 (shear plane) 处的电位被称为脂质体的 ζ 电位。如技术人员已知, 应用合适的仪器, 例如, 通过 ELS-6000 (Otsuka Electronics, Japan), 应用激光多普勒微量电泳方法或技术人员可得的其它仪器和方案, 可以通过试验确定脂质体的 zeta 电位。例如, J. Colloid and Interface Sci, 39, 670-675 (1972), nition.com/en/products/zeecom_s.htm 等等。

[0465] 在一些实施方式中, 本文所述的脂质体 (包括靶向脂质体和含脂质体组合物的脂质体) 将表现出总的净负 ζ 电位。在一些实施方式中, ζ 电位是约 -10mV 至约 -200mV。例如, 约 -50mV 至约 -150mV, 约 -50mV 至约 -130mV, 约 -60 至约 -120mV, 约 -50 至约 -100mV, 约 -75mV 至约 -90mV, 约 -80mV 至约 -90mV, 约 -80mV 至约 -85mV, 约 -85mV 至约 -90mV, 约 -75mV 至约 -85mV, 约 -70mV 至约 -90mV, 约 -75mV, 约 -80mV, 约 -85mV, 约 -83mV, 约 -90mV, 约 -100mV, 约 -120mV。

[0466] 静脉注射小脂质体之后, 它们被认为经过肝窦状隙的窗并且会迅速与肝细胞接触。据认为中等大小的脂质体保留在血液中并且可以循环相当长的时间。然而, 大的脂质体更缓慢地经过肝窦状隙, 并且被枯否氏细胞 (Kupffer cells) 迅速摄取。因此, 脂质体的大小对于确定体内行为是非常重要的。参见, 例如, Liu et al. Biochim. Biophys. Acta (1992) 1104 (1) :95-101; Harashima et al, J. Drug Target. (1995) 3 (4) :253-261; (整体并入本文作为参考) 等。

[0467] 应用光子相关光谱法 (PCS; 动态光散射或准弹性光散射 (QELS, Quasi-Elastic Light Scattering)), 通过应用各种算法, 可以从相关功能获得脂质体的颗粒大小。通过这些技术获得的颗粒大小比得上 PCS 确定的平均直径。PCS 应用标准偏差和 x^2 以描述大小分布。在 PCS 系统中, x^2 确定系统是否是单峰的 (高斯分布) 或是多峰的 (Nicomp 分布)。可以应用强度加权测定 (intensity weighted measurements) 来确定平均粒径, 如果 $x^2 \leq 5$, 则从高斯分布报告。如果 $x^2 > 5$, 则从 Nicomp 分布中的主要的峰的均值报告。这种分析将是技术人员熟悉的, 并且适于硬件, 例如, Nicomp QELS Particle Sizer, PSS Model 380ZLS, S/N0103301; pssnicomp.com/zetaspec.htm。

[0468] 在本文所述的脂质体, 特别是靶向脂质体的一些实施方式中, 脂质体平均直径将

是约 50 至约 275nm。例如,脂质体平均直径可以从约 50 至约 200nm,从约 50 至约 265nm,从约 50 至约 250nm,从约 50 至约 225nm,从约 50 至约 175nm,从约 50 至约 150nm,从约 50 至约 120nm,从约 50 至约 100nm,从约 75 至约 250nm,从约 75 至约 200nm,从约 75 至约 175nm,从约 75 至约 150nm,从约 75 至约 120nm,从约 75 至约 100nm,从约 90 至约 100nm,从约 90 至约 120nm,从约 90 至约 150nm,从约 90 至约 200nm,从约 95 至约 100nm,从约 95 至约 120nm,从约 95 至约 125nm,从约 95 至约 130nm,从约 95 至约 150nm,从约 95 至约 175nm,约 90nm,约 95nm,约 100nm,约 120nm,约 130nm 或约 150nm。对于特定的脂质体组合物,靶向脂质体的直径将比由相同成分形成但未掺入靶向因子的脂质体的直径大大约 15 至约 25nm。

[0469] 本文所述的脂质体(例如,靶向脂质体,空白脂质体,含脂质体组合物中的脂质体)也可以应用掺入脂质体的靶向配体的浓度加以表征。根据所选的靶向配体,对靶向配体的数量进行定量的各种方法对技术人员将是显而易见的。例如,如实施例所述,可以应用脂质体电泳迁移(例如,SDS-PAGE 所测定),与合适的对照相比较,确定脂质体的转铁蛋白(Tf)含量。

[0470] 简言之,可以应用针对偶联于脂质体的转铁蛋白的含量和/或身份的两种分析,对脂质体中的转铁蛋白含量的确认进行评价。首先,可以将通过 SDS-PAGE 分析的脂质体转铁蛋白的电泳迁移与纯化的偶联转铁蛋白例如 TF-N ω PE 的迁移方式相比较。此外,偶联转铁蛋白的电泳迁移也可以与游离转铁蛋白标准参照物相比较。对脂质体中转铁蛋白的身份的其它支持可以应用 ELISA——一种证明抗转铁蛋白抗体与靶向脂质体的特异结合的研究级形式——获得。转铁蛋白靶向脂质体的浓度可以用比色蛋白定量试验如 BCA 测定,所述测定是技术人员公知的。技术人员考虑到本文的教导,也会理解本领域已知的用于确定各种靶向因子的量的相似方法和其它方法。

[0471] 简言之,应用二辛可宁酸(BCA, bicinchoninic acid)分析试剂,可以分析脂质体中转铁蛋白的量。在碱性条件下,铜(II)被蛋白质还原为铜(I)。产生的铜(I)离子与 BCA 形成可溶性、颜色鲜明的络合物。通过已知量的微粒悬浮物与 BCA 试剂的反应,测定总的微粒结合蛋白。一旦颜色形成,通过过滤移去微粒并且荧光光度分析测定颜色。

[0472] 在一些实施方式中,脂质体中掺入的靶向配体的浓度将是约 0.5mg/ml 至约 5.0mg/ml,约 0.5mg/ml 至约 2.0mg/ml,约 1.0mg/ml 至约 2.0mg/ml,约 1.0mg/ml 至约 3.0mg/ml,约 1.0mg/ml 至约 2.5mg/ml,约 1.0mg/ml 至约 2.0mg/ml,或约 1.3mg/ml 至约 2.5mg/ml。

[0473] 在将转铁蛋白结合到肿瘤细胞表面中,铁离子的作用非常重要。因此,掺入 Tf 的靶向脂质体的铁离子含量是表征脂质体的又一有意义的途径。虽然本领域技术人员已知许多确定铁离子含量的方法,但一种方法是 ICP-MS。

[0474] 当脂质体含有转铁蛋白时,脂质体的铁离子含量可以是,例如,约 0.25 μ g/mL 至约 3 μ g/mL,0.4 μ g/mL 至约 3 μ g/mL,0.25 μ g/mL 至约 2 μ g/mL,0.25 μ g/mL 至约 1.5 μ g/mL,0.25 μ g/mL 至约 1 μ g/mL,0.4 μ g/mL 至约 2 μ g/mL,0.4 μ g/mL 至约 1.5 μ g/mL,0.5 μ g/mL 至约 2 μ g/mL,约 0.5 μ g/mL 至约 1.4 μ g/mL,或约 0.5 μ g/mL 至约 1.5 μ g/mL。

[0475] 脂质体,包括靶向脂质体和空白脂质体,也可以应用它们在指定温度下的渗透压来表征。指定温度下的渗透压取决于糖(蔗糖)溶液的摩尔浓度。它也取决于溶液中的总离子密度和分子的大小。通常,应用已知为渗透压计的仪器,可以测定渗透压,渗透压计以合适的压力单位测定渗透压,如技术人员所理解。

[0476] 在一些实施方式中,脂质体,特别是靶向脂质体和空白脂质体在室温下的渗透压,将是约 310 至约 410mOsm/kg。例如,渗透压可以是室温下约 310 至约 400mOsm/kg,约 310 至约 380mOsm/kg,约 320 至约 360mOsm/kg,约 315 至约 375mOsm/Kg,约 320 至约 375mOsm/Kg,约 315 至约 370mOsm/Kg,约 320 至约 370mOsm/Kg,约 360mOsm/Kg,约 350mOsm/Kg,约 340mOsm/Kg,约 370mOsm/Kg 或约 380mOsm/Kg。

[0477] 在本文所述的各种条件下(例如,贮存条件、制备用于施用和/或体内条件),当在与本文所述各种条件有关的特定时间段内监测时,渗透压可以变化约 25%以下,约 20%以下,约 15%以下。例如,360+/-50mOsm/kg。

[0478] 含脂类组合物的产生

[0479] 对意图于在治疗过程中施用于个体的药物和标记化合物有三个主要要求,即,效应、安全性和质量保证。虽然已证实了效应和安全性,但如果在制造和销售期间不能持续保证质量(例如,纯度、同质性、剂量再现性、经时稳定性等),则在治疗中应用药物的能力受到破坏。产生不持续确保高质量药物的药物或标记化合物的方法也增加了对其施用药物的个体中发生不利反应的概率。在药物或标记化合物的有效期内,重要的是,被制造和销售的产品满足与该产品最初获得规章批准时相同的标准。因此,持续产生高质量药物或标记化合物的能力对于生产安全的药物或标记化合物产品是必须的,并且能够被常规和容易地制造和纯化的药物或标记化合物在商业和安全性前景中具有优势。例如,标记化合物的效应是指,在批次与批次之间或贮存期间,标记化合物在与特定诊断方法联合诊断特定疾病或症状中有用的能力(例如,标记化合物的活性(例如, γ 计数器可视能力等))不受到不可接受的水平的损害。

[0480] 下文描述的是生产本文所述组合物的一般方法,所述组合物用于持续产生高质量(例如,高纯度、同质性等)靶向脂质体(及其中间体)和空白脂质体。这些方法在图 4(生产方法 A)和图 5(生产方法 B)中示意性表示。

[0481] 本文所述的 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯和 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺用作磷脂复合物如脂质体、聚合物胶束、微球和纳米球、乳剂和水溶性聚合物的组分。这些 PE 衍生物的制备描述在本文中并且它们的制备方法也是本领域已知的,如前文所述。

[0482] 特别地, N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯和 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺也用作本文所述的含脂类组合物的组分。含脂类组合物可以根据本文所述方法制备,虽然对这些方法的修改对技术人员也将是显而易见的。例如,在从脂类组分形成脂质体中,可以应用技术人员已知的各种方法(例如,超声、搅拌、挤出、脱氢等)。例如,如美国专利申请公开 2004/0142025 号所描述,其内容整体并入本文作为参考。

[0483] 本文——包括实施例——中所述的产生靶向脂质体的一般方法的应用,也包括用于产生其它含脂类组合物(例如,脂类混合物、含脂质体组合物、空白脂质体和中间体脂质体)的方法,如本文所述。

[0484] 生产方法 A

[0485] 生产方法 A 示意性描述于图 4 中。

[0486] A :N ω PE:SuccN ω PE: 其它脂类混合物(中间体 1)的产生

[0487] 将本文所述的 N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯(SuccN ω PE)

和N-(ω)-二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺(N ω PE)与其它脂类((例如,至少一种磷脂(例如,PC(例如,DMPC、DSPC等)、PI、鞘磷脂、磷脂酸等)和至少一种其它脂类(例如,胆固醇))混合,随后溶解于合适的溶剂中(例如,乙醇,t-BuOH,氯仿,异丙醚等)。溶剂的量一般是1至100v/w(相对于脂类总重量)。在一些实施方式中,这是2至20v/w。

[0488] 通过本文所述方法或技术人员已知的方法,可以制备和纯化如前段所描述采用的SuccN ω PE和N ω PE。SuccN ω PE和N ω PE以及本文所述的用于产生靶向脂质体及其中间体的其它组分,应该具有足够的纯度和同质性,以便最终产生具有足够纯度和同质性的靶向脂质体,以符合向个体施用靶向脂质体的规章指南中和根据实验室优化管理规则(good laboratory practice)(GLP)和良好操作规范(good manufacturing practice)(GMP)指南的规章指南中。

[0489] 当其它脂类(除了一种或多种磷脂外)与磷脂共同应用时,磷脂与另外的其它脂类的比例是约2:1。SuccN ω PE衍生物与磷脂的混合比例是总浓度约1至约12%(1:99至12:88)或约3-6%(3:97至6:94)/(NHS-NGPE+NGPE)与(CHOL+磷脂)的比例。例如,示范性比例包括50:45:4:1(例如,PC:Chol:NG-PE:NHS-NG-PE),其中,例如,在1g混合物中有17.5mg的NHS-NG-DOPE,63.1mg的NG-DOPE,312mg的Chol和607mg的磷脂。

[0490] B:药物:N ω PE:SuccN ω PE:其它脂类混合物(中间体2)的产生

[0491] 随后,将步骤A中制备的N ω PE:SuccN ω PE:其它脂类混合物与含有待包封的药物或标记化合物(例如,抗癌药(例如,奥沙利铂、拓扑异构酶I抑制剂、长春花碱等))的水溶液(例如,缓冲液等)混合,以便得到药物:N ω PE:SuccN ω PE:中性脂类混合物(中间体2)。

[0492] 当药物是奥沙利铂时(1-OHP),奥沙利铂的浓度是,在约9%的蔗糖溶液中约8mg/ml。例如,靶向脂质体中的奥沙利铂的浓度是约0.8mg/mL \pm 10%。

[0493] C:药物:N ω PE:SuccN ω PE:其它脂类脂质体(中间体3)的产生

[0494] 随后,对步骤B中获得的药物:N ω PE:SuccN ω PE:其它脂类混合物(中间体2)进行超声或搅拌,随后蒸发溶剂,形成药物:N ω PE:SuccN ω PE:其它脂类脂质体(中间体3)。进行超声、搅拌和蒸发的方法和条件,以及实现这些步骤的手段是技术人员公知的,也进一步描述于实施例。参见,例如,通过反相囊泡(REV)方法的生产方法,美国专利4,235,871(整体并入本文作为参考)。也可以应用技术人员已知的一般脂质体生产方法如简单的水合方法和乙醇注射方法。

[0495] 随后,将上述形成的药物:N ω PE:SuccN ω PE:其它脂类脂质体按照大小挤压出,并且分离该药物:N ω PE:SuccN ω PE:其它脂类脂质体。任选地,随后可以应用超滤,浓缩脂质体溶液。

[0496] 当脂质体含有1-OHP(药物)、DMPC(其它脂类/磷脂(中性))、胆固醇(CHOL、其它脂类/中性脂类)、N-戊二酰基-DOPE(NG-DOPE)和NHS-NG-DOPE时,平均直径是约0.2微米(200nm)的脂质体可以被分离。对于含有1-OHP(药物)、DSPC(其它脂类/磷脂(中性))、胆固醇、N-戊二酰基-DSPE(NG-DSPE)和NHS-NG-DSPE的脂质体,也可以获得类似大小的脂质体。脂类组分的示范性目标量是,例如,约40mg/mLDMPC(其它脂类/磷脂酰胆碱/磷脂/中性脂类),约20mg/mL CHOL(其它脂类/中性脂类)和约5mg/mL NG-DOPE(组合

量的 NG-PE 和 NHS-NG-PE)。脂类组分的示范性比例是 50 : 45 : 5 (其它脂类 1 (例如, 磷脂酰胆碱)) : 其它脂类 2 (例如, CHOL) : NG-PE (例如, NG-DOPE+NHS-NG-DOPE)。

[0497] D : 药物 : N ω PE : TF-N ω PE : 其它脂类脂质体 (靶向脂质体) 的产生

[0498] 随后, 可以应用选择的靶向因子对步骤 C 中描述形成的药物 : N ω PE : SuccN ω PE : 其它脂类脂质体进行官能化, 产生药物 : N ω PE : TF-N ω PE : 其它脂类脂质体 (也称为“靶向脂质体”)。

[0499] 靶向因子 (TF) 的连接 (例如, 用靶向因子进行中间体脂质体 (中间体 3) 的官能化) 是通过将靶向因子共价结合于 SuccN ω PE 实现的, 通过琥珀酰亚胺基部分与靶向因子的反应进行。通过合适的反应条件, 脂质体暴露表面的琥珀酰亚胺基 (在脂双层的外部, 其中药物或标记化合物包封在脂质体内部) 可以被共价修饰, 形成靶向因子修饰的 N-(ω)-二衍生化磷脂酰乙醇胺 (TF-N ω PE)。靶向因子与脂质体连接, 引起药物 : N ω PE : TF-N ω PE : 其它脂类脂质体 (靶向脂质体) 形成。

[0500] 更具体地, 在合适的条件下, 本文所述的 SuccN ω PE 的琥珀酰羧基部分 (succinyl carboxyl moiety) 被官能化。如果靶向因子具有氨基, 则靶向因子上的氨基与琥珀酰羧基部分反应, 形成羧酸酰胺键。本文进一步描述了适于此反应的条件, 包括在实施例中进行描述, 这也是技术人员充分理解的。根据本文的教导, 技术人员也将能够修改反应条件, 以便优化条件进行靶向因子和脂质体的特定组合, 而不需要过多的试验。

[0501] 本文所述和技术人员已知的各种靶向因子可以经商业途径得到或者通过普通技术人员已知的方法产生。

[0502] 例如, 当选择转铁蛋白作为靶向因子时, 转铁蛋白可以以纯化蛋白经商业途径得到, 例如, 从 Celliance Corp., GA, USA 得到。转铁蛋白也可以应用本领域公知的重组方法得到 (例如, 通过应用原核细胞 (大肠杆菌等)、通过应用真核细胞 (CHO, BHK 等) 等)。如充分理解, 转铁蛋白可以以脱铁形式或全蛋白形式得到和应用在靶向脂质体中。可选地, 可以用铁化合物如柠檬酸铁、氯化铁 (III) 等处理掺入脱铁转铁蛋白的靶向脂质体, 产生掺入全转铁蛋白衍生化脂质体的靶向脂质体。

[0503] 转铁蛋白作为靶向因子的示范性量是, 例如, 约 2mg/mL 转铁蛋白。这样的量对于含有约 40mg/mL DMPC、约 20mg/mL CHOL 和约 5mg/mL NG-DOPE (组合量的 NG-PE 和 NHS-NG-PE) 的示范性靶向脂质体是合适的。

[0504] 在脂质体 (中间体 3) 用上述靶向因子官能化获得靶向脂质体后, 可以应用本领域技术人员已知的方法对得到的脂质体任选地进一步纯化, 包括本文所述的那些纯化方法, 特别是与上述步骤 C 有关的方法。

[0505] 当脂质体包含 1-OHP (药物)、DMPC、胆固醇 (CHOL)、N-戊二酰基-DOPE (NG-DOPE) 和 Tf-NG-DOPE 时, 平均直径为约 0.05 微米至约 0.2 微米 (约 50nm 至约 200nm) 的脂质体可以被分离。对于含有 1-OHP (药物)、DSPC、胆固醇、N-戊二酰基-DSPE (NG-DSPE) 和 NHS-NG-DSPE 的脂质体, 也可以得到类似大小的脂质体。

[0506] 通过上述方法产生靶向脂质体 (为了方便称为生产方法 A) 可再现地产生具有高纯度和同质性的靶向脂质体。特别地, 靶向脂质体基本上不含与 SuccN ω PEs 的生成有关的非-NHS 起始物质 (本文所述) 和副产物 (例如, 酰基化脲化合物等)。特别地, 在脂质体形成之前制备和纯化 SuccN ω PEs, 产生了基本上不含用于官能化 N ω PEs 而形成 SuccN ω PEs

的碳二酰亚胺起始物（例如，DCC，EDC 等）的脂质体（中间体 3）和靶向脂质体。如前述，药物和标记化合物，包括掺入药物或标记化合物的靶向脂质体——意图于在治疗或诊断过程中将它们施用给个体，必须具有高质量。

[0507] 任选地，可以用靶向因子处理 A 中描述的脂类混合物（中间体 1），形成含有 TF-N ω PE 的脂类混合物。进一步地，这种脂类混合物可以和水溶液混合，形成含脂质体组合物。最后，含脂质体组合物可以被处理以便产生脂质体制剂。任选地，水溶液可以包括药物或标记化合物。

[0508] 可选的生产方法（方法 B）

[0509] 生产方法 B 在图 5 中示意性描述。

[0510] A. 药物 :N ω PE: 其它脂类脂质体的产生

[0511] 通过将其它脂类和 N ω PE 溶解在合适的溶剂中（例如，乙醇、t-BuOH、氯仿、异丙醚等），将得到的溶液分散在任选包含药物或标记化合物的水溶液中，和随后对得到的分散液进行超声处理或反相囊泡形成脂质体（药物 :N ω PE: 中性脂类），也可以产生本文所述的脂质体。脂质体溶液可以通过超滤而浓缩。

[0512] 作为非限制性例子，可以通过反相囊泡 (REV) 方法（美国专利 4, 235, 871，并入作为参考）产生脂质体。当然，一般的脂质体组合物方法如简单水合方法和乙醇注射方法也可以应用。

[0513] 为了使 N ω PE（一种或多种）稳定保持在脂双层中，根据技术人员已知的方法，可以制备和纯化 N ω PE（一种或多种），随后 N ω PE（一种或多种）与其它脂类（例如，磷脂、胆固醇等）共同用于制备脂质体。

[0514] 作为非限制性例子，其它脂类（例如，一种或多种磷脂（例如，DSPC、DMPC 等）和任选地，另一其它脂类（例如，胆固醇等）和至少一种 N ω PE 被混合在一起，溶解在合适的有机溶剂中。

[0515] 当其它脂类是磷脂和胆固醇时，磷脂和胆固醇的混合比是，例如，约 1 : 1，例如，约 1.1 : 1，约 1.2 : 1，约 0.9 : 1（例如，DMPC 和胆固醇，50 : 45(mol%)）。N ω PE（一种或多种）的含量占总脂类含量的比例是，例如，相对于磷脂为 6%。随后，将得到的溶液与奥沙利铂溶液在缓冲水溶液中混合。N ω PE 可以是相对于总脂类含量的约 0.8mol% 至约 12mol%。例如，约 1mol% 至约 10mol%，约 1mol% 至约 8mol%，约 1mol% 至约 6mol%，约 1mol% 至约 5mol%，约 1mol% 至约 4mol%，约 1mol% 至约 3mol%，约 1mol% 至约 2mol%，约 2mol% 至约 12mol%，约 2mol% 至约 10mol%，约 3mol% 至约 8mol%，约 1mol%，约 2mol%，约 3mol%，约 4mol%，约 5mol%，约 6mol%，约 8mol%，约 10mol%，或约 12mol%。

[0516] 药物或标记化合物在溶液中的浓度可以如本文所述，特别是如上述生产方法 A 所述。类似地，含有药物或标记化合物的溶液包括本文所述的溶液组分。

[0517] 本方法制备的掺入 1-OHP（药物）、胆固醇和 N-戊二酰基-DSPE (NG-DOPE) 的脂质体可以被分离，提供含平均直径约 0.2 μ m 的含奥沙利铂脂质体（例如，通过凝胶过滤、通过大小排阻层析、通过超滤、通过超速离心等）。

[0518] B. 药物 :SuccN ω PE:N ω PE: 其它脂类脂质体的产生

[0519] 步骤 A 之后，步骤 A 中制备的脂质体（药物 :N ω PE: 其它脂类脂质体）中存在的一部分 N ω PE 被官能化，产生掺入 SuccN ω PE 的脂质体（即，药物 :SuccN ω PE:N ω PE: 其它

脂类脂质体),其以后可以被修饰形成 TF-N ω PE。

[0520] 为了形成 SuccN ω PE,可以修饰 N ω PE 的末端羧基,形成琥珀酰亚胺基。这种官能化可以用描述用于产生 SuccN ω PE(一种或多种)的方法实现。

[0521] 例如,在脂质体存在的情况下,使碳二亚胺(例如,EDC,DCC等)和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)反应,产生药物:SuccN ω PE:N ω PE:其它脂类脂质体。

[0522] C. 药物:TF-N ω PE:N ω PE:其它脂类脂质体的产生

[0523] 步骤 B 之后,使 B 中制备的药物:SuccN ω PE:N ω PE:其它脂类脂质体与靶向因子反应,形成药物:TF-N ω PE:N ω PE:其它脂类脂质体。反应方法和条件如生产方法 A 步骤 D 所述。

[0524] 可以应用本文所述的方法和技术人员已知的方法纯化和浓缩由生产方法 B 获得的药物:TF-N ω PE:N ω PE:其它脂类脂质体。

[0525] 生产方法的比较

[0526] 生产方法 A 相对于生产方法 B 具有几个优势,虽然两者都可以用于获得药物:TF-N ω PE:N ω PE:其它脂类脂质体(靶向脂质体,任选地含有药物或标记化合物)。更显著地,方法 A 获得的脂质体将不含,或基本上不含与 SuccN ω PE 的产生有关的杂质(例如,非-NHS 起始物质和/或副产物)。特别地,如前所述,生产方法 A 制备的靶向脂质体将不含,或基本上不含,例如,碳二亚胺(例如,EDC、DCC 等)和酰化脲。在一些实施方式中,当 SuccN ω PE 不掺入脂质体内时,脂质体或含脂质体组合物也可以不含或基本上不含 NHS。此外,反应规模越大,制备时间越长。生产方法 A 的时间大大短于生产方法 B。

[0527] 虽然由生产方法 B 制备的药物:TF-N ω PE:N ω PE:其它脂类脂质体的纯化会降低这些杂质的量,但纯化脂质体(例如,生产方法 B 的步骤 B 中获得的药物:SuccN ω PE:N ω PE:其它脂类脂质体)比脂类(例如,在生产方法 A 的步骤 A 之前制备和纯化的 SuccN ω PEs)更难。由于一些 SuccN ω PE 可能被导向脂质体内部(例如,琥珀酰亚胺酯官能基位于脂双层内并且难于与靶向因子反应),可能的是,生产方法 A 的制备的靶向脂质体可能具有一些掺入其中的残余 SuccN ω PE。

[0528] 生产方法 A 的另一优势是,应用生产方法 A 时,最终的药物:TF-N ω PE:N ω PE:其它脂类脂质体中 TF-N ω PE 对 N ω PE 的相对含量可以得到更精确的控制。这些脂类的相对量直接与生产方法 A 的步骤 A 中用作起始物的 SuccN ω PE 和 N ω PE 的相对量相关。因此,TF-修饰的 SuccN ω PE 的量也可以得到更精确的控制。

[0529] 应用生产方法 B 时,N ω PE 对 SuccN ω PE 的相对量取决于方法 B 步骤 B 的反应效率。认为脂质体中存在约 10%的 N ω PE 时,此反应完成,但是随批次将预期到试验变化。反应效率低可能是部分由于预先形成的脂质体的空间位阻。当 SuccN ω PE 形成自分离的 N ω PE(仅脂类),空间位阻少得多并且反应更进一步地完成。同样,形成 SuccN ω PE 之后(以仅脂类的形式),可以从反应混合物纯化所得到的产物,从而去除未反应的 N ω PE、碳二亚胺和 NHS 以及可能在反应期间形成的其它副产物。

[0530] 任一方法形成的脂质体似乎比掺入 PEG 或其它亲水性聚合物的脂质体——如本说明书的背景部分描述的脂质体——更加均一(并且从而能够用于产生更加可再现的药物/诊断产品)。总之,当 PEG 或其它亲水性聚合物被用来增加脂质体的循环时间(例如,屏蔽 RES 对脂质体的摄取)时,由于 PEG 或亲水性聚合物本身的宽的分布,应用它们形成具有分

子大小分布的脂质体。所述分布增加与制造有关的困难（例如，可再现性和 / 或纯化）并且也可能增加临床效率的可变性。在这些方面，方法 A 或 B 制备的靶向脂质体应该较好。

[0531] 其它生产方法

[0532] 通过修改生产方法 A 和 B，也可以制备脂类混合物和含脂质体组合物（其可以用于制备脂质体）。例如，在一些实施方式中，通过下文描述的生产方法，以及考虑到本说明书的教导由技术人员预期的对方法的其它修改，可以制备掺入其它脂类组分： $N\omega PE:TF-N\omega PE$ 或其它脂类组分（一种或多种）： $N\omega PE:TF-N\omega PE$ ：药物 / 标记化合物（其中“其它脂类组分（一种或多种）”是指一种或多种磷脂（例如，一种或多种中性磷脂、一种或多种阴离子磷脂、一种或多种阳离子磷脂或前述两种或多种的组合）、任选地另外包括本文所述的一种或多种其它脂类（例如，胆固醇或其衍生物）；或至少两种本文所述的不同中性脂类（例如，至少一种磷脂（例如，PC（例如，DMPC，DSPC 等）、PI、鞘磷脂、磷脂酸等）和至少一种其它中性脂类（例如胆固醇））的脂类混合物和含脂质体组合物。其它脂类、 $N\omega PE$ 、 $TF-N\omega PE$ 和药物或标记化合物组分——如果存在该组分，可以是如贯穿本说明书所述的那些。类似地，组分的相对量也如贯穿本说明书所述。

[0533] 在一些实施方式中，在生产方法 B 的第一步产生的脂类混合物（通过将其它脂类和 $N\omega PE$ 溶解在合适的有机溶剂中而产生的脂类混合物）可以被修饰，以便掺入 NHS，随后应用 TF 修饰，产生其它脂类组分（一种或多种）： $N\omega PE:TF-N\omega PE$ 脂类混合物。随后，可以将此脂类混合物与水溶液（任选地含有药物或标记化合物）混合，形成含脂质体组合物。可选地，在制备含脂质体组合物之后可以掺入药物或标记化合物。在一些实施方式中，不含水溶液的药物或标记化合物可以被掺入应用 NHS 和 TF 修饰后形成的脂类混合物中，形成其它脂类组分（一种或多种）： $N\omega PE:TF-N\omega PE$ ：药物 / 标记化合物脂类混合物。随后可以将此脂类混合物与水溶液混合，形成含脂质体组合物。

[0534] 在一些实施方式中，生产方法 B 的第一步中产生的脂类混合物（通过将其它脂类组分（一种或多种）和 $N\omega PE$ 溶解在合适的溶剂中产生的脂类混合物）可以与水溶液混合，形成含脂质体组合物（其它脂类组分（一种或多种）： $N\omega PE$ ）。随后，可以用 NHS 和 TF 处理此含脂质体组合物，随后与药物或标记化合物混合，形成含其它脂类组分（一种或多种）： $N\omega PE:TF-N\omega PE$ ：药物 / 标记化合物脂质体的组合物。可选地，可以用药物或标记化合物处理含其它脂类组分（一种或多种）： $N\omega PE$ 脂质体的组合物，然后用 NHS 修饰，随后用 TF 修饰。

[0535] 在一些实施方式中，生产方法 B 的第一步中产生的脂类混合物（通过将其它脂类组分（一种或多种）和 $N\omega PE$ 溶解在合适的溶剂中产生的脂类混合物）可以随后与药物或标记化合物（任选地包含水溶液）混合，形成脂类混合物（其中药物或标记化合物不包含水溶液）或含脂质体组合物。当形成了脂类混合物，可以用 NHS 和 TF 随后处理脂类混合物，形成其它脂类组分（一种或多种）： $N\omega PE:TF-N\omega PE$ ：药物 / 标记化合物脂类混合物，随后其可以与水溶液混合，形成含脂质体组合物。可选地，当形成了含脂质体组合物（例如，当药物或标记化合物掺入水溶液时），可以随后用 NHS 和 TF 处理此含脂质体组合物，也产生其它含脂类组分（一种或多种）： $N\omega PE:TF-N\omega PE$ ：药物 / 标记化合物脂质体的组合物。

[0536] 在进一步可选的生产方法——方法 C 中，在有机溶剂中同时混合各个组分，形成脂类混合物 (C-1)（例如，组分：其它脂类组分（一种或多种）； $N\omega PE$ ； $TF-N\omega PE$ 或组分：

其它脂类组分（一种或多种）： $N\omega$ PE:TF- $N\omega$ PE: 药物或标记化合物），其中在混合前制备并且任选地纯化 TF- $N\omega$ PE。随后可以将脂类混合物 C-1 与水溶液混合，形成含脂质体组合 C-2（其它脂类组分（一种或多种）： $N\omega$ PE:TF- $N\omega$ PE（任选地含有药物或标记化合物））。当如此形成的含脂质体组合不包含药物或标记化合物时，可以在含脂质体组合（C2-A）形成后加入药物或标记化合物。可选地，当包含水溶液的药物或标记化合物被用作最初的起始成分时，在所有起始成分混合时可以同时形成含脂质体组合。

[0537] 随后，可以处理 C-2（任选地包含药物或标记化合物）或 C2-A，形成脂质体（C-3）。当 C-3 不包含药物或标记化合物时，脂质体将是空白脂质体，如前述（例如，其它脂类组分（一种或多种）： $N\omega$ PE:TF- $N\omega$ PE 脂质体）。当 C-3 包含药物或标记化合物时，脂质体将是靶向脂质体，如本文所述。当 C-3 是空白脂质体时，在随后的步骤中，可以将药物或标记化合物如前述地加入空白脂质体中，形成靶向脂质体，其可以在制备 C-3 之后即刻或在延迟之后预先形成，所述延迟可包括贮存 C-3 空白脂质体一段时间。

[0538] 在进一步可选的生产方法——方法 D 中，在有机溶剂中同时混合各个组分，形成脂类混合物（D-1）（例如，组分：其它脂类组分（一种或多种）： $N\omega$ PE；或组分：其它脂类组分（一种或多种）： $N\omega$ PE: 药物或标记化合物）。随后可以将脂类混合物 D-1 与水溶液混合，形成含脂质体组合 D-2（其它脂类组分（一种或多种）： $N\omega$ PE:（任选地含有药物或标记化合物））。随后可以将含脂质体组合 D-2 与 TF- $N\omega$ PE 混合，形成含脂质体组合 D-3（其它脂类组分（一种或多种）： $N\omega$ PE:TF- $N\omega$ PE（任选地含有药物或标记化合物）），其中在混合前制备和任选地纯化 TF- $N\omega$ PE。当如此形成的含脂质体组合不包含药物或标记化合物时，可以在含脂质体组合（D3-A）形成后加入药物或标记化合物。可选地，当包含水溶液的药物或标记化合物被用作最初的起始成分时，在所有起始成分混合时可以同时形成含脂质体组合。

[0539] 随后，可以处理 D-3（任选地包含药物或标记化合物）或 D3-A，形成脂质体（D-4）。当 D-4 不包含药物或标记化合物时，脂质体将是空白脂质体，如前述（例如，其它脂类组分（一种或多种）： $N\omega$ PE:TF- $N\omega$ PE 脂质体）。当 D-4 包含药物或标记化合物时，脂质体将是靶向脂质体，如本文所述。当 D-4 是空白脂质体时，在随后的步骤中，可以将药物或标记化合物如前述地加入空白脂质体中，形成靶向脂质体，其可以在制备 D-4 之后即刻或在延迟之后预先形成，所述延迟可包括贮存 D-4 空白脂质体一段时间。

[0540] 当应用生产方法 A 形成的脂类混合物、含脂质体组合和脂质体（包括靶向脂质体、空白脂质体等），生产方法 C 或 D 制备的含脂类组合将基本上不含与 $N-(\omega)$ -二羧酸衍生化磷脂酰乙醇胺的琥珀酰亚胺酯的合成有关的非-NHS 起始物质、副产物和 / 或分解产物（例如，碳二亚胺（例如，DCC, EDC 等）、酰基化脲化合物等），只要在生产方法 C 或 D 的起始步骤之前，起始物（例如，TF-NG-PE）基本上不含这些物质即可。当 Succ $N\omega$ PE 不作为起始物掺入（因而不掺入脂质体内部）时，脂质体或含脂质体组合也可以不含或基本上不含 NHS，如 TF- $N\omega$ PE 预先形成并用作起始物时。在特定实施方式中，生产方法 C 或 D 制备的含脂类组合基本上不含 DCC 和 EDC。在一些实施方式中，生产方法 C 或 D 制备的含脂类组合基本上不含 DCC。

[0541] 在一些实施方式中，其它脂类组分（一种或多种）包括一种或多种磷脂（例如，磷脂酰胆碱等）和胆固醇或胆固醇衍生物。在特定实施方式中，磷脂酰胆碱是 DMPC、POPC、

DSPC 等,如本文所述。在一些实施方式中,磷脂酰胆碱是 DMPC 或 DSPC。在特定实施方式中,其它脂类(一种或多种)是磷脂和胆固醇。在一些实施方式中,磷脂是中性磷脂。

[0542] 在一些实施方式中,其它脂类组分(一种或多种)包括至少两种不同的中性脂类,其包括磷脂(例如,磷脂酰胆碱等)和胆固醇或胆固醇衍生物。在特定实施方式中,磷脂酰胆碱是 DMPC、POPC、DSPC 等,如本文所述。在一些实施方式中,磷脂酰胆碱是 DMPC 或 DSPC。在特定实施方式中,至少两种不同的中性脂类是磷脂和胆固醇。

[0543] 在一些实施方式中, $N\omega$ PE 是 NG-PE。在特定实施方式中, $N\omega$ PE 是 $N\omega$ -DOPE 或 $N\omega$ -DSPE。在一些实施方式中, $N\omega$ PE 是 NG-DOPE 或 NG-DSPE。

[0544] 在特定实施方式中,TF 是,例如,脱唾液酸糖蛋白、叶酸盐、转铁蛋白等。在一些实施方式中,TF 是转铁蛋白(Tf)。在一些实施方式中,TF- $N\omega$ PE 是 Tf- $N\omega$ PE(例如, Tf-NG-DOPE 或 Tf-NG-DSPE)。

[0545] 在特定实施方式中,药物是,例如,抗癌药(例如,奥沙利铂、拓扑异构酶 I 抑制剂、长春花碱等)。在其它实施方式中,脂类混合物或含脂质体组合物包含标记化合物。在一些实施方式中,脂类混合物或含脂质体组合物不包含标记化合物或药物。

[0546] 如前述,每一脂类混合物都可以与水溶液混合,形成含脂质体组合物,并且每一含脂质体组合物都可以被处理,形成相应的脂质体(例如,靶向脂质体(例如,掺入药物或标记化合物)、中间体脂质体、空白脂质体等),如本文所详述。

[0547] 对于本文所述的生产方法的变化,意图在于,给出本说明书提供的教导,特别包括生产方法 A 和 B 中的详细描述和如实施例中出现的详细描述,技术人员可以如本文所述而实施:用 NHS 修饰 $N\omega$ PE,用 TF 修饰 NHS- $N\omega$ PE,从脂类混合物制备含脂质体组合物,和从含脂质体组合物制备脂质体,而无需过多的试验。

[0548] 药物制剂

[0549] 另一方面,本发明提供了用于治疗或诊断有需求的个体的药物制剂,包括本文所述的含脂类组合物和一种或多种药学上可接受的载体、赋形剂、稀释剂、稳定剂、防腐剂或其它无活性成分,包括前述的组合,这是技术人员已知的和本文进一步描述的。

[0550] 在药物制剂的一些实施方式中,含脂类组合物是本文所述的靶向脂质体。在其它实施方式中,含脂类组合物是含脂质体组合物。在一些实施方式中,含脂类组合物是空白脂质体。在一些实施方式中,组合物包括药物。在其它实施方式中,组合物包括标记化合物。

[0551] 在一些实施方式中,载体可以包括无菌水、缓冲液或盐水、稀释液以及它们的组合中的一种或多种。

[0552] 药物制剂还可以包括一种或多种不同的盐、糖、蛋白质、淀粉、明胶、植物油、聚乙二醇和类似物,包括前述两种或多种的组合。

[0553] 本发明的其它方面包括在药物制备中应用本文所述的组合物及其制剂。特别地,制造药物用于治疗或诊断本文所述的疾病。进一步地,如果没有另外指出,本文不同描述的活性组合物及其制剂,也意图用于制备药物,所述药物用于治疗或诊断疾病,并且根据本文所述的方法应用。

[0554] 组合物的应用

[0555] 施用

[0556] 如前述,一方面,提供了应用本文所述的含药物或标记化合物的含脂类组合物

(例如,靶向脂质体、含有含药物 / 标记化合物的脂质体的组合物) 和药物制剂治疗或诊断本文所述的疾病的方法。

[0557] 在一个实施方式中,所述方法可以作为针对本文所述疾病的治疗的治疗性途径而实施。因此,在特定实施方式中,含有含药物脂类的组合物或药物制剂可以用于在所需个体——包括人类——中治疗本文所述的疾病。所述方法一般包括给予所述个体一定量的本文所述组合物或制剂,所述量有效治疗所述疾病。

[0558] 在另一实施方式中,所述方法可以作为针对本文所述疾病的诊断的诊断性途径而实施。因此,在特定实施方式中,含有含标记化合物脂类的组合物或药物制剂可以用于在所需个体——包括人类——中诊断本文所述的疾病。所述方法一般包括给予所述个体一定量的本文所述组合物或制剂,所述量有效诊断所述疾病。这种施用一般与检测疾病的方法共同采取。

[0559] 在一些实施方式中,个体是哺乳动物,包括但不限于人、牛、马、猫、犬、啮齿动物或灵长类动物。在其它实施方式中,个体是人。

[0560] 术语“药学有效量”或“治疗有效量”是指组合物的量足以治疗特定紊乱、病症或疾病或其症状中的一种或多种和 / 或预防疾病或紊乱的发生。参照癌症,药学有效量或治疗有效量包括足以引起肿瘤收缩或降低肿瘤增长速度等等的量。

[0561] 术语“有效诊断的量”或“诊断有效量”或“有效用于诊断的量”及其同源词,是指组合物的量足以诊断特定紊乱、病症或疾病、和 / 或其表现中的一种或多种,其中诊断包括鉴定疾病的存在情况和 / 或检测疾病的程度或严重性。例如,参照癌症,“诊断有效量”包括足以检测,例如,恶性细胞、肿瘤或其它癌症表现中的一种或多种的存在和 / 或浓度的量。常常地,诊断将参照不患有疾病的个体中观察到的基线或背景检测水平而进行。检测水平高于背景或基线水平(检测水平增加)提示疾病存在,在一些情况下,提示疾病的严重性。

[0562] 当针对治疗方法和应用含有含药物脂类的组合物而应用时,“需要”的个体(individual in need thereof)可以是已经诊断为患有待治疗疾病或以前针对待治疗疾病治疗过的个体。对于诊断方法和应用含含标记化合物脂类的组合物而应用时,“需要”的个体可以是怀疑患有疾病,处于疾病风险中的个体(例如,有疾病家族史,表明疾病风险的生活方式因素(例如,吸烟作为肺癌的风险因素等))或者以前被诊断为患有疾病的个体(例如,诊断可以包括在一定时间段内和 / 或联合治疗监测疾病的严重性(例如,进展 / 退化))。

[0563] 在一些实施方式中,待治疗或诊断的疾病是癌症。在一些实施方式中,癌症可以是胃癌、结肠癌、结肠直肠癌或乳腺癌。在一些实施方式中,癌症是结肠癌。在其它实施方式中,癌症是乳腺癌。在其它实施方式中,癌症是胃癌。在一些实施方式中,癌症是胰腺癌、非小细胞性肺癌、小细胞肺癌、脑癌、肝癌、肾癌、前列腺癌、膀胱癌、卵巢癌或造血恶性病(例如,白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤等)。

[0564] 含药物组合物,包括本文所述的制剂,可以单独应用或与其它治疗方式(例如,辅助癌症治疗、组合方式治疗)联合应用(例如,在其之前、同时或之后)。例如,与其它治疗药(例如,本文所述和本领域技术人员已知的癌症化疗药(例如,烷化剂、紫杉烷、代谢拮抗剂、抗肿瘤抗生素、植物碱、激素治疗药、分子靶标药等))、手术和 / 或放疗联合。当待治疗

疾病是癌症时,本文所述的组合物可以与本文所述和本领域已知的其它抗癌药或细胞毒性化合物中的一种或多种、降低副反应和/或其临床表现的发生和/或严重性的一种或多种其它药剂、手术(例如,去除肿瘤或淋巴结等)或放射联合。当手术或放射中的一种或多种是治疗方案的一部分时,组合物可以在放疗或手术之前、同时或之后施用。类似地,本文所述的组合物及其制剂,可以在给予一种或多种抗癌药之前、同时或之后施用。本文所述的靶向脂质体及其制剂也可以与减轻疾病或治疗方案相关症状的药物(例如,降低呕吐、脱发、免疫抑制、腹泻、皮疹、感觉紊乱、贫血、疲劳、口腔炎、手足综合症等的药物)联合施用(例如,之前、同时或之后)。靶向脂质体也可以在治疗方案的一个阶段以上(包括贯穿整个治疗方案)施用(例如,手术后和与放疗同时或在放疗之后等)。

[0565] 含标记化合物组合物,包括本文所述的制剂,可以单独应用或与治疗方式(例如,辅助癌症治疗、组合方式治疗)联合应用(例如,在其之前、同时或之后)。例如,组合物可以用于监测治疗进展。例如,在治疗方案之前、之后或同时确定待治疗疾病是否可检测(如上关于治疗方法的描述)。

[0566] 在一些实施方式中,在手术(例如,去除肿瘤或淋巴结等)之前或之后施用组合物。在其它实施方式中,在手术后和放疗之前、同时或之后施用组合合物。手术和/或放疗中的一种或多种,与给予本文所述组合物和任选地其它一种或多种化疗药的最佳联合,可以由主治医师根据个体并考虑影响特定个体的各个因素而确定,包括本文所述的那些因素。

[0567] 在特定实施方式中,含药物组合物或药物制剂可以与5-氟尿嘧啶和/或亚叶酸中的一种或两种联合施用。在其它实施方式中,含药物组合物或药物制剂可以与一种或多种其它抗癌药联合施用,如卡培他滨、UFT/LV(替加氟-尿嘧啶(tegafur-uracil)和亚叶酸)、依立替康、抗EGFR抗体(例如,西妥昔单抗等)、抗VEGF抗体(例如,阿瓦斯丁等)、酪氨酸激酶抑制剂(例如,埃罗替尼)等。这种施用也可以与包含放疗和/或手术的治疗方案联合。在一些实施方式中,靶向脂质体中的包封药物是奥沙利铂。

[0568] 结合本文所述的方法和应用,可以肠胃外给予本发明的含脂类组合物或药物制剂。肠胃外给予可以通过弹丸注射(IV)、输注(IV)、腹膜内注射或通过局部注射(如颅内注射)实现。在一些实施方式中,施用是通过弹丸注射或持续输注进行的。

[0569] 持续静脉内输注可以在数分钟或数小时期间施用。例如,但不限于,约10分钟至约5小时,约15分钟至约4小时;约30分钟至约4小时;约45分钟至约4小时,约60分钟至约4小时,约45分钟至约3小时,约60分钟至约2小时,约90分钟至约3小时,约90分钟至约2小时,约10分钟,约15分钟,约20分钟,约30分钟,约45分钟,约50分钟,约60分钟,80分钟,约1.5小时,约2小时,约2.5小时,约3小时,约3.5小时,约4小时,约5小时,约12小时,约24小时,约36小时,或约48小时。

[0570] 制剂和剂量

[0571] 如前述,本文所述的含脂类组合物和药物制剂可以被施用给需要的个体,用于结合本文所述的应用方法治疗或诊断本文所述的疾病。

[0572] 本文所述的含脂类组合物,特别是本文所述的靶向脂质体,一般将以实现意图结果的有效量使用,例如,以治疗或预防所治疗的特定疾病的有效量使用。所述组合物(一种或多种)可以被治疗性给予,以便获得治疗益处。治疗益处是指所治疗的基础疾病的根治

或改善和 / 或与基础疾病有关的一种或多种症状的根治或改善,使得患者在感觉和状态方面报告有改进,虽然该患者可能仍然受到基础疾病的折磨。治疗益处也包括疾病进展的停止或减缓,不论是否实现改进。

[0573] 在一些实施方式中,当所治疗的疾病是癌症时,有效量是足以降低肿瘤生长(例如,由治疗前和 / 或后的平均肿瘤体积的增加速度所测定)的量。在一些实施方式中,有效量是足以降低平均肿瘤体积的量(例如,当治疗后的平均肿瘤体积相比于治疗前的平均肿瘤体积降低时)。

[0574] 为了给予有效量的包封药物(例如,奥沙利铂)而施用的组合物的量将取决于多种因素,包括,例如,所治疗的特定疾病、给药方式、所治疗疾病的严重性和患者的年龄和体重、组合物的生物利用度、所治疗个体经历的不利效应等。考虑到本文提供的教导,对有效剂量的确定完全在本领域技术人员的能力范围内。

[0575] 在一些实施方式中,在特定时间点施用的包封的奥沙利铂的剂量将是约 1 至约 400mg/m²/日的范围。例如,约 1 至约 350mg/m²/日、1 至约 300mg/m²/日、1 至约 250mg/m²/日、1 至约 200mg/m²/日、1 至约 150mg/m²/日、1 至约 100mg/m²/日、约 5 至约 80mg/m²/日、约 5 至约 70mg/m²/日、约 5 至约 60mg/m²/日、约 5 至约 50mg/m²/日、约 5 至约 40mg/m²/日、约 5 至约 20mg/m²/日、约 10 至约 80mg/m²/日、约 10 至约 70mg/m²/日、约 10 至约 60mg/m²/日、约 10 至约 50mg/m²/日、约 10 至约 40mg/m²/日、约 10 至约 20mg/m²/日、约 20 至约 40mg/m²/日、约 20 至约 50mg/m²/日、约 20 至约 90mg/m²/日、约 30 至约 80mg/m²/日、约 40 至约 90mg/m²/日、约 40 至约 100mg/m²/d 日、约 80 至约 150mg/m²/日、约 80 至约 140mg/m²/日、约 80 至约 135mg/m²/日、约 80 至约 130mg/m²/日、约 80 至约 120mg/m²/日、约 85 至约 140mg/m²/日、约 85 至约 135mg/m²/日、约 85 至约 135mg/m²/日、约 85 至约 130mg/m²/日或约 85 至约 120mg/m²/日的范围。特定时间点施用的剂量也可以是约 130mg/m²/日、约 120mg/m²/日、约 100mg/m²/日、约 90mg/m²/日、约 85mg/m²/日、约 80mg/m²/日、约 70mg/m²/日、约 60mg/m²/日、约 50mg/m²/日、约 40mg/m²/日、约 30mg/m²/日、约 20mg/m²/日、约 15mg/m²/日或约 10mg/m²/日。

[0576] 施用的剂量可以高于或低于本文所述的剂量范围,这取决于组合物的生物利用度、个体对不利副作用的耐受性、给药方式和上述各种因素等因素。根据处方医师的判断,可以对给药剂量和给药间隔单独调节,以便提供足以维持治疗作用的组合物血浆水平。考虑到本文提供的教导,技术人员将能够优化有效局部剂量而无需过多的试验。

[0577] 应用体内动物模型,也可以估计剂量,如本领域技术人员所理解。

[0578] 多剂量的(例如,持续或弹丸)本文所述组合物也可以被施用于需要的个体,持续数小时、数日、数周或数月。例如,但不限于,每日、每隔一日、每 10 日、每周、每月、每周两次、每周三次、每月两次、每月三次、每月四次、每月五次、每两个月、每三个月、每四个月等。

[0579] 试剂盒

[0580] 也提供了施用本文所述组合物的试剂盒,其包括含有组合物的药物制剂。

[0581] 在一些实施方式中,试剂盒可以包括给药剂量(例如,用于治疗或诊断的剂量)的至少一种含脂类组合物或其药物制剂,如本文所公开。试剂盒还可以包括合适的包装和 / 或组合物的使用说明书。试剂盒也可以包括输送组合物、或其药物制剂的工具,如用于注射的注射器或本文所述和本领域技术人员已知的其它工具。

[0582] 在一些实施方式中,试剂盒可以包括给药剂量(例如,用于治疗或诊断的剂量)的空白脂质体或其药物制剂,如本文所公开。试剂盒还可以包括合适的包装和/或组合物的使用说明书。试剂盒也可以包括输送组合物、或其药物制剂的工具,如用于注射的注射器或本文所述和本领域技术人员已知的其它工具。此外,在一些实施方式中,试剂盒可以含有待掺入空白脂质体的单独剂量的药物或标记化合物。

[0583] 此外,含脂类组合物或其药物制剂可以以试剂盒形式装配。试剂盒提供了含脂类组合物或其药物制剂和用于制备施用组合物的试剂。组合物可以是干燥或冻干形式,或者在溶液中,特别是无菌溶液中。当组合物为干燥形式时,试剂可以包括药学上可接受的稀释剂,用于制备液体制剂。这种稀释剂包括本领域技术人员已知的稀释剂,例如,糖溶液,诸如葡萄糖、蔗糖等。在一些实施方式中,试剂盒可以包括约1%至约20%、约1%至约18%、约1%至约15%、约1%至约10%、约3%至约10%、约3%至约6%、约1%、约2%、约3%、约4%、约5%、约6%、约7%、约8%、约9%、约10%、约12%、约15%、约18%或约20%糖的糖溶液。在一些实施方式中,溶液可以是葡萄糖溶液(例如,约1%、约2%、约5%的葡萄糖等)。在一些实施方式中,含脂类组合物可以是,例如,靶向脂质体、空白脂质体、脂类混合物或含脂质体组合物(任选地包含药物或标记化合物)。

[0584] 试剂盒也可以包括施用或分配组合物的工具,包括但不限于,注射器、吸液管或本领域技术人员已知的其它工具。当处于湿形式时,组合物可以贮存在安瓿或其它无菌密封容器中,包括本领域技术人员已知的那些。

[0585] 试剂盒可以包括其它治疗化合物,用于与本文所述化合物联合使用。在一个实施方式中,治疗药是其它抗癌药。这些药剂可以以单独形式提供,或者与本发明化合物混合,只要这种混合不降低本文所述组合物和制剂中的任一其它治疗药的效率即可。类似地,试剂盒可以包括其它药剂用于辅助治疗。例如,降低药物副作用的药剂(例如,抗恶心药、抗脱发药、免疫增强剂等)。

[0586] 试剂盒将包括制备和施用组合物、组合物的副作用和任何其它相关信息的合适的说明书。说明书可以是任何适当形式,包括但不限于印刷物、录像带、计算机可读盘、或光盘。

[0587] 在本发明的另一方面,提供了治疗遭受本文所述疾病或易受本文所述疾病影响的个体的试剂,其包括含有给药剂量的本文所述含脂类组合物或其制剂的第一容器,和使用说明书。容器可以是本领域技术人员已知并且适于贮存和输送静脉制剂的任何容器。在一些实施方式中,试剂盒还包括第二容器,其包含药学上可接受的载体、稀释剂、辅剂等,用于制备待施用于个体的组合物。

[0588] 也提供了含有足够量的本文公开的组合物或其制剂的试剂盒,以便为个体提供有效治疗延长的一段时期,如1周、2周、3周、4周、6周、8周、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月或更长。

[0589] 试剂盒也可以包括多剂量的含脂类组合物或其制剂,以及使用说明书,并且以足以在药房中贮存和使用的量包封,例如,医院药房和配药房。

[0590] 本文提及的所有专利、专利申请和公布以整体并入本文作为参考。

[0591] 实施例

[0592] 本发明将参照下列实施例进一步描述,然而,这些实施例不限制本发明的范围。

[0593] 实施例 1:奥沙利铂的细胞毒性试验

[0594] 通过以 8mg/ml 浓度将奥沙利铂溶解在 9%蔗糖溶液(蔗糖/蒸馏水)中,制备奥沙利铂(1-OHP)溶液。应用商业可得的细胞毒性分析试剂盒 WST-1 kit,Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan) 确定细胞存活。

[0595] 在 37℃,在 5% CO₂ 下,应用 1-OHP 溶液浓缩液 [$200 \times (1/2)^{(0-10)}$ nM] 处理在补充有 10% FCS(胎牛血清;SIGMA,USA)的 RPMI 1640 培养基中培养的 AsPC-1 细胞(由 Research Center for Advanced Science and Technology, the University of Tokyo, Japan 的 Hironobu Yanagie 博士提供)48 小时。然后,去除培养基并且向细胞加入底物(WST-1, CellCounting Kit, Dojindo Laboratories, Japan),所述细胞在 37℃,在 5% CO₂ 下温育 2 小时,产生着色产物。在 Immuno Mini NJ-2300(Cosmo Bio Co., Ltd., Japan) 上,以 450nm 下的吸光度测定生成的颜色(参考波长:620nm)。

[0596] 结果示于图 6 中。发现 1-OHP 的细胞毒性是 LD₅₀ > 8 μg/ml。

[0597] 实施例 2:细胞表面上转铁蛋白受体数目的确定

[0598] 在试验中应用人正常白细胞和人恶性肿瘤衍生细胞系(K562, MKN45P 和 HL60),所述如下获得:K562:TKG0210(CellResource Center for Biomedical Research, Institute of Department, Aging and Cancer, Tohoku University, Japan);MKN45P:Dr. Hisae Iinuma, Teikyo University School of Medicine, Japan;HL60:TKG0345(CellResource Center for Biomedical Research, Institute of Department, Aging and Cancer, Tohoku University, Japan)。

[0599] 每一细胞表面上 Tf(转铁蛋白)受体数目由 Scatchard 分析(Comp. Biochem. Physiol., 116B, 137-160(1949),应用 Microsoft Excel)测定。通过碘化(iodogen)方法混合 ¹²⁵I- 标记 Tf(Na-¹²⁵I(PerkinElmer Japan Co., Ltd., Japan)和 h-Tf(T-4132, SIGMA, USA)溶液(Biochem. Biophys. Res. Commun., 122, 319-325(1984)),以范围是 [$300 \times (1/2)^{(0-9)}$ nM] 的不同浓度将其在 4℃ 下加入到各个细胞培养物,并温育 1 小时。

[0600] 应用 Lowry 方法,通过蛋白质定量试验测定 ¹²⁵I- 标记的 Tf 的浓度(J. Biol. Chem., 193, 265-270(1951)),应用 γ 计数器测定放射性(Auto Well Gamma System ARC-300, Aloka Co., Ltd., Japan)。简言之,离心溶液以便沉淀细胞,应用冰冷的 PBS 洗涤细胞片段(180×g(重力),持续 3 分钟,重复 3 次,随后应用 γ 计数器测定放射性,以便确定与细胞表面结合的 Tf 的浓度。应用 Lowry 方法,通过蛋白质定量试验测定细胞数(J. Biol. Chem., 193, 265-270(1951))。

[0601] 对于每一数据点,从加入的 Tf 的已知浓度减去结合 Tf 的浓度,确定未结合的 Tf 的浓度。在横轴上绘制结合的 Tf 的浓度,在纵轴上绘制结合的 Tf 的浓度与未结合的 Tf 的浓度的比值,绘制 Scatchard 曲线。从曲线的 x 轴截距确定结合 Tf 的数目(即,受体数),如 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80 2263-2266(1983); J. Cell Physiol, 132, 492-500(1987); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92 3318-3322(1995); J. Pharm. Sci, 84, 216-220(1995); Eur. J. Biochem., 186, 367-373(1989); J. Biol. Chem., 258, 4715-4724(1983) 所述,其整体并入本文作为参考。

[0602] 与不同细胞类型的细胞表面结合的 ¹²⁵I-Tf 数目在图 7 中示出。经确定,来源于人恶性肿瘤的细胞系的细胞表面上的转铁蛋白(Tf)受体数目明显高于正常白细胞上的数

目。

[0603] 实施例 3 :NHS-NG-DOPE 的制备

[0604] 将质量 200mg 的 NG-DOPE (Avanti Polar Lipids, Inc., USA) (Cat. No. 870242, MW 880.13) 称入 2 腿锥形瓶中。向瓶中加入 39.2mg NHS (Sigma, USA, MW = 115.09)。随后,加入 5mL 氯仿 / 乙酸乙酯 (1 : 1(v/v), Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan) 并搅拌,开始溶解 NG-DOPE 和 NHS。观察到轻微浑浊。

[0605] 在初始搅拌之后,加入搅棒,并且所述瓶开始(充满氮气的气囊)逐渐吹入氮气到瓶的一个腿中,用橡胶塞封住。应用搅棒和搅板在氮气下进行搅拌。用管封住第二腿。室温(20-23℃)下进行反应。搅拌混合物 5-10 分钟。留出 20 μL 的脂 +NHS 反应混合物样品,用作 TLC 对照。

[0606] 在单独的瓶中,通过将 70mg 的 DCC 溶解在 5mL 乙酸乙酯中,制备 DCC(99%, Aldrich, USA, MW :206.33g/mol) 溶液。DCC 在溶剂中快速溶解,产生清澈的溶液。随后,在 10-15 分钟期间内,将如此制备的 DCC 溶液(约 5mL)逐滴加到脂 /NHS 反应混合物中。加入 DCC 后,反应混合物变得更加混浊。

[0607] 在时间为 0 时,在对照(脂 /NHS)上和脂 /NHS/DCC 等分试样上进行 TLC,用作参照,如下。在 TLC 板(铝片-硅胶 60F₂₅₄, 来自 EMScience (Gibbstown, NJ, USA) Cat No. SP05554M) 上点样 50 μg (2.5 μL, 20mg/mL), 干燥,随后放置在展开室(developing chamber)中,在那里允许溶剂(70%氯仿、28%甲醇、2%水)迁移。标记出溶剂前沿,随后将 TLC 板浸入钼酸铵(5%钼酸铵,在 10% H₂SO₄中),并用干燥剂脱水。

[0608] 氮气流下搅拌脂 /NHS/DCC 反应混合物,监测随时间的产物形成(Rf 0.3-0.4)。

[0609] 18 小时之后,向 NHS-NG-DOPE 的转化并非完全转化,加入更多 NHS(26mg, 在 2mL 乙酸乙酯中)和 DCC(47mg, 在 1mL 乙酸乙酯中)。于 T = 20hr,再次用 TLC 检测反应进程。

[0610] 室温下使反应在周末期间持续,其中应用氮气流并搅拌(防止光线)。纯化前保持一些起始物。

[0611] 纯化:在冰上冷冻反应混合物约 30 分钟。随后使冷冻的反应混合物滤过 Buckner 漏斗,随后用 2×5mL 氯仿洗涤三次。收集得到的所有液体并通过旋转蒸发干燥。蒸发后得到半固态糊状物。随后将糊状物重悬浮于 2-3mL 氯仿中。

[0612] 应用硅石(400 目)4g——在氯仿中水合——制备纯化悬浮糊状物的硅胶。将硅胶填充在 1cm×28cm 带活塞的柱上。床的大致大小是 1cm×14cm。用氯仿平衡柱子(重力填充)。

[0613] 将样品上样于平衡过(但未干燥)的硅胶柱上。向柱加入 10mL 氯仿(5×2mL)。收集 5×2mL 级分。流速是重力的函数,但是在 10-20 分钟内收集 5×10mL 级分并命名为级分 1-5。

[0614] 下一步,将 50mL 氯仿 / 甲醇(90/10, vol/vol) 加入柱子(5×10mL)。收集 5×10mL 级分并命名为级分 6-10。

[0615] 收集级分 6-10 之后,将体积为 100mL 的氯仿 / 甲醇(5/1(v/v)) 加入柱子(10×10mL)。收集另外的 10×10mL 级分并命名为级分 11-15。

[0616] 如上所述,通过 TLC 分析级分 6-15(5 μL 等分试样)。

[0617] 级分 6-15 进行 TLC 之后,汇合级分 7-11 并应用旋转蒸发将其干燥至薄膜层。

蒸发后得到的最终产物是 130mg(收率 65%),如针对未纯化反应产物的 TLC 并与得自 NOF(Japan) 的标准产物(NHS-NG-DOPE) 比较所测定。

[0618] 实施例 4 :NHS-NG-DOPE 的制备

[0619] 对预先制备并纯化的 NG-DOPE (200mg) (NOF Corporation Japan) 和 NHS(N-羟基琥珀酰亚胺 ;34mg) 进行称重,并置于带有 2 个开口的 5mL 锥形瓶中。用橡胶塞密闭一个开口,通过剩余的开口加入搅棒。

[0620] 随后将锥形瓶置于真空下,用氮气流逐渐填满(重复三次)。随后应用氮气囊将锥形瓶保持在氮气下。

[0621] 放置于氮气下之后,向锥形瓶加入 2.5mL 干燥氯仿,随后用搅棒和搅板搅拌。室温下进行反应约 30 分钟,漩涡溶解起始物。留出 20 μ L 的脂 +NHS 样品,用在反应的 TLC 对照 / 监测中。

[0622] 随后制备溶解在 2.5mL 干燥氯仿中的 61mg 的 DCC(1,3-二环己基碳二亚胺) 溶液(清澈,迅速溶解)。在 15 分钟期间将 DCC 溶液逐滴加到脂 /NHS 混合物中。加入 DCC 后,溶液变为混浊。

[0623] 在时间点 0 时,通过将 50mg 氯仿点到 TLC 板上,使其干燥,随后将其放置在反应室中(70%氯仿,30%甲醇,5%水) 以便迁移,对脂 /NHS 和脂 /NHS/DCC 进行 TLC(70%氯仿,30%甲醇,5%水),以便监测反应。

[0624] 氮气流下持续搅拌反应混合物,随时间的推移监测产物的形成(Rf0.3-0.4)。

[0625] 室温下使反应在 2-3 天期间进行,同时应用氮气流并搅拌。

[0626] 随后使反应混合物滤过 Bruchner 漏斗,应用 2 \times 5mL 氯仿洗涤两次。收集全部溶液并通过旋转蒸发干燥。得到半固态糊状物。

[0627] 将半固态糊状物重悬浮于 2-3mL 氯仿中,随后过滤和干燥。重复此过程三次。最后,三次后将产物重悬浮于 2 \times 3mL 氯仿中。

[0628] 通过在氯仿中混合硅石制备柱硅胶,随后填充于带有活塞的 1cm \times 28cm 柱子上。柱床的大致尺寸是 1cm \times 14cm。用氯仿平衡柱子(重力填充)。

[0629] 将样品上柱子平衡过(但未干燥)的硅胶柱上。随后向柱加入 100mL 氯仿,收集 100mL 级分等分试样。流速是重力的函数。(级分 1)

[0630] 级分 1. 向柱子加入 100mL 氯仿 / 甲醇(90/10, vol/vol)。收集 100mL 级分。(级分 2)

[0631] 将 200mL 氯仿 / 甲醇(50/10, v/v) 加入柱子(20 \times 10mL)。收集 20 \times 10mL 级分。(级分 3-23)

[0632] 通过 TLC 应用 5ml 等分试样分析级分 1 至 23。

[0633] 汇合级分 9 至 22,应用旋转蒸发和冻干,干燥至薄膜层。来自这些级分的 NHS-NG-DOPE 的最终重量是 61.9mg(收率 27.9%)。

[0634] 实施例 5 :脂类混合物(NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH) 的制备

[0635] 45-50 $^{\circ}$ C 下,混合 583mg DMPC(NO F 公司, Japan)、299mg 胆固醇(Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan) 和 75.7mg NG-DOPE(NO F 公司, Japan) 并溶解在 t-BuOH 中(10v/w, 相对于脂类(10mL))。

[0636] 将得到的溶液倒入瓶中并在 -40 $^{\circ}$ C 于架子上冷冻约 8 小时。使其减压至约 0.1mmHg

并于减压下保持 2 天,同时温度从 -40°C 逐步升高至 25°C ,从该过程得到冻干脂混合物。

[0637] 如上得到的冻干脂混合物粉末与 20mg 的粉末状 Tf-NG-DOPE (如实施例 29 制备)混合并击碎。从而得到脂混合物的均一粉末,脂类比是 50 : 45 : 5 (DMPC : Chol : NG-DOPE+Tf-NG-DOPE)。

[0638] 实施例 6 :含脂质体组合物的制备

[0639] 按照前面的实施例制备脂混合物,成分详述如下 :

[0640] 条目 1 :DMPC/Chol/NG-DOPE (155mg/79.4mg/16.1mg)

[0641] 条目 2 :DMPC/Chol/NG-DOPE (155mg/79.4mg/16.1mg)

[0642] 条目 3 :DMPC/Chol/NG-DOPE/NHS-NG-DOPE

[0643] (152mg/77.9mg/15.8mg/4.38mg)

[0644] 条目 4 :DMPC/Chol/NG-DOPE/NHS-NG-DOPE

[0645] (152mg/77.9mg/15.8mg/4.38mg)

[0646] 条目 5 :DMPC/Chol/NG-DOPE/Tf-NG-DOPE

[0647] (148mg/76.0mg/15.4mg/4.8mg)

[0648] 条目 6 :DMPC/Chol/NG-DOPE/Tf-NG-DOPE

[0649] (148mg/76.0mg/15.4mg/4.8mg)

[0650] $45-50^{\circ}\text{C}$ 下,各自水合条目 (Entries) 1、3 和 5,与 300mM 蔗糖水溶液 (20v/w,相对于脂类 (5mL) (将 5mL 蔗糖溶液 (20v/w) 加入干燥的脂类混合物并搅拌) 一起搅拌 30 分钟。 $45-50^{\circ}\text{C}$ 下,各自水合条目 2、4 和 6,并与 1-OHP 水溶液 (8mg 1-OHP/mL, 20v/w, 相对于液体 (5mL), 在 300mM 蔗糖溶液中) 一起搅拌 30 分钟。从而得到含脂质体混合物。

[0651] 通过 QELS 测定脂质体直径,结果示于图 8 中。含脂质体混合物中存在的脂质体具有平均直径 500-2,000nm 并且具有约 100-10,000nm 的宽的大小分布。

[0652] 实施例 7 :含奥沙利铂脂质体 (NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH) 的制备

[0653] 脂质体的组分如下 :

[0654] 二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱 (1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱 :DMPC) (NOF Corporation, Japan)

[0655] 胆固醇 (CH) (Solvay Pharmaceuticals B. V., Netherlands)

[0656] N-戊二酰基-二油酰基磷脂酰乙醇胺 (N-戊二酰基-1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺钠盐 :DOPE-CO-(CH₂)₃-COOH ;下文表示为 NG-DOPE) (NOF Corporation, Japan)

[0657] Succ-N-戊二酰基-二油酰基磷脂酰乙醇胺 (N-(琥珀酰亚胺基-戊二酰基)-1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺钠盐 :DOPE-CO-(CH₂)₃-CO-OSu ;下文表示为 NHS-NG-DOPE) (NOFCorporation, Japan)

[0658] DMPC : CH : NG-DOPE : NHS-NG-DOPE = 50 : 45 : 4 : 1 (m/m)。

[0659] 作为水相,应用 1-OHP 水溶液 (8mg/ml, 在 300mM 蔗糖溶液中)。

[0660] 将 DMPC、CH、NG-DOPE 和 NHS-NG-DOPE (摩尔比 50 : 45 : 4 : 1) 溶解在 4v/w (相对于脂总重量) 的温热乙醇 / 叔丁醇 / 水溶剂中。约 45°C 下,将脂溶液注射入含约 8mg/ml 1-OHP 的 300mM 蔗糖溶液中,因而溶剂浓度成为约 14% v/v。

[0661] 约 45°C 下,在压力约 200-800psi 下,使悬浮液通过重叠有 5 片 100nm 滤膜 (Cat.

No. 112105, Whatman pic, UK) (lapped over five pieces of 100nm filters) 的挤出机。从而得到脂质体, 其平均直径是大约 100nm。应用 QELS 测定脂质体直径。

[0662] 混合 6L 磷酸盐缓冲液 (pH7.9)、6L 转铁蛋白 (Cat. No. 4455, Selorogicals, GA, USA) 溶液 (20mg/ml) 和 18L 脂质体悬浮液并于 30℃ 搅拌 15-60 分钟。这得到了含有 4mg/ml 转铁蛋白和 20mg/ml 脂类的反应混合物。

[0663] 根据卖主提供的说明书, 应用二辛可宁酸 (BCA) 试验进行转铁蛋白定量分析。

[0664] 应用 SDS-PAGE (十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳) 研究掺入转铁蛋白后的分子量增加情况。对 NG-DOPE 的分析是通过具有蒸发光散射检测器 (ELSD2000, Alltech, MD, USA) 的高效液相色谱 (HPLC) 进行的, 其中应用硅胶柱 (YMC PVA Silica Column, 4.6×250mm, 5 μm)。

[0665] 实施例 8 : 含奥沙利铂脂质体 (NG-DSPE:TF-NG-DSPE:DSPC:CH) 的制备

[0666] 脂质体的组成如下:

[0667] 二硬脂酰基磷脂酰胆碱 (1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-胆碱磷酸:DSPC) 胆固醇 (CH)

[0668] N-戊二酰基-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺 (N-戊二酰基-1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺钠盐:DSPE-(CH₂)₃-COOH; 下文表示为 NG-DSPE)

[0669] DSPC : CH : NG-DSPE = 2 : 1 : 0.2 (mol/mol)

[0670] 作为水相, 应用 1-OHP 水溶液 (8mg/ml, 在 9% 蔗糖溶液中), 如实施例 1 所述。

[0671] 将 DSPC (MC8080, NOF, Japan)、胆固醇 (038-03005, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan) 和 NG-DSPE (Dr. Kazuo Maruyama, Teikyo University, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Japan) 以比例 2 : 1 : 0.2 (m/m) 溶解在氯仿和异丙醚中。

[0672] 向得到的溶液加入 1-OHP 溶液 (在 9% 蔗糖溶液中), 随后对得到的混合物超声波处理约 15-30 分钟。随后通过旋转蒸发于 60℃ 蒸发溶液, 以便去除溶剂并重复冻/融五次。冷冻悬浮液 (通过浸没在干冰/丙酮浴中) 和融化 (通过使其静止并浸没在温水中)。重复五次。

[0673] 随后, 于 60℃ 应用 EXTRUDER 滤膜对得到的产物进行大小筛分 (两次在 400nm, 随后五次在 100nm), (Lipex™ Extruder, Model No. T-001, Northern Lipids Inc., Canada) 并超速离心 (200,000×g, 60min, 于大约 4℃ 下)。将沉淀物重悬浮于 9% 蔗糖溶液或 MES 缓冲液中 (pH5.5) (MES 缓冲液 Cat. No. 345-01625, Dojindo Laboratories, Japan), 得到包封 1-OHP 的 NG-DSPE:DSPC:CH 脂质体。

[0674] 随后, 对包封 1-OHPNG-DSPE:DSPC:CH 脂质体应用转铁蛋白 (Tf) 衍生化。向因此得到的包封 1-OHP 的 NG-DSPE 脂质体加入 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺氢氯化物 (EDC; Cat. No. #22980, Pierce Biotechnology, Inc., USA) (其量相对于脂类重量是 2.7%) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (S-NHS; 038-0432, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan) (其量相对于脂类重量是 7.3%), 并使混合物在室温下放置 10 分钟。

[0675] 随后, 向得到的溶液加入转铁蛋白 (Tf) (其量相对于脂类重量是 20%; (Cat. No. T4132, SIGMA, USA)) 并于室温下搅拌 3 小时。加入 1mM 转铁蛋白 (Tf) (其量相对于反应混合物总体积是 20%) 的 PBS (磷酸盐缓冲液) 溶液和 1mM PBS (其量相对于反应混合物总体积是 20%), 室温下搅拌得到的溶液 1 小时。

[0676] 向如此得到的脱铁蛋白形式的 Tf-NG-DSPE 脂质体,将 10-40 当量(相对于转铁蛋白)的柠檬酸铁-柠檬酸钠(Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan)加入悬浮液并于室温下搅拌 15 分钟。如上超滤得到的溶液。随后将沉淀物重悬于 9%蔗糖溶液中,从而得到全蛋白形式的 Tf-NG-DSPE 脂质体。对溶液超速离心(200,000×g, 60min, 大约 4℃),随后将沉淀物重悬浮于 9%蔗糖溶液中。

[0677] 根据卖主提供的说明书,应用二辛可宁酸(BCA)试验进行转铁蛋白定量分析(Cat. No. 23227, BCA™ Protein Assay Kit, Pierce Biotechnology, Inc., USA)。

[0678] 应用 SDS-PAGE(十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳)研究衍生化后的分子量增加情况。对 NG-DSPE 的分析是通过具有蒸发光散射检测器(ELSD2000, Alltech, MD, USA)的高效液相色谱(HPLC)进行的,其中应用硅胶柱(YMC PVA Silica Column, 4.6×250mm, 5 μm)。

[0679] 实施例 9:PEG 化的含奥沙利铂脂质体的制备

[0680] 按照实施例 8 中的试验方案,制备 DSPC:胆固醇:DSPE-PEG(2K)-OMe:DSPE-PEG(3.4K)-COOH 脂质体(Tf-PEG-脂质体)。在这些脂质体中,组分比例如下: DSPC:胆固醇: DSPE-PEG(2K)-OMe: DSPE-PEG(3.4K)-COOH = 2:1:0.16:0.03。

[0681] 此脂质体含有以摩尔计 6%的 PEG-脂和以摩尔计 1%的 PEG-COOH-脂, Tf 通过 PEG-COOH 结合于脂质体。

[0682] 实施例 8 的方法也制备 Tf/PEG-DSPE 脂质体(Tf/PEG-NG-DSPE 脂质体)。

[0683] 在这些脂质体中,组分比例如下: DSPC:胆固醇: DSPE-PEG(2K)-OMe: NG-DSPE = 2:1:0.16:0.03。

[0684] 用 PEG 衍生化此脂质体,而 Tf 通过 NG-DSPE 与脂质体结合。PEG-衍生化脂质体也可以通过美国专利申请公开 2003/0224037 和 2004/0022842 中描述的方法产生,其公开内容整体并入本文。

[0685] 实施例 10:空白脂质体的制备

[0686] 将 DMPC、Chol(Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan)、NG-DOPE(NOF Corporation, Japan)和 NHS-NG-DOPE(NOFCorporation, Japan)的混合物(摩尔比是 50:45:4:1;分别为 410g DMPC, 211g Chol, 43g NG-DOPE 和 12g NHS-NG-DOPE)溶解在 4 v/w(相对于脂总重量)的温热乙醇/叔丁醇/水溶剂中。在 45℃下搅拌温育 20L 体积的所得到的悬液,并使之在压力约 200-800psi 下于约 45℃通过重叠有 5 层聚碳酸酯 100nm 滤膜(Cat. No. 112105, Whatman pic, UK)的挤出机(Stevested Machinery&Engineering Ltd., Canada)。因而得到脂质体,其平均直径是大约 100nm。脂质体直径通过 QELS 测定。

[0687] 混合脂质体悬浮液、PBS 缓冲液(pH7.9)和转铁蛋白(Cat. No. 4455, Selorogicals, GA, USA)的 PBS 溶液(pH7.0),比例是 3:1:1(v/v),随后于 30℃下搅拌 15-60 分钟。因而得到约 6L 空白脂质体。

[0688] 将 20g(约 19mL)脂质体溶液倒入瓶中并在架子上于 -40℃冷冻约 8 小时。对其减压至约 0.1mmHg 并保持在减压下约 2 天,同时在 2 天期间逐渐使温度从 -40℃升高到 25℃。此方法完成时,因而得到约 3.5g 的冻干空白脂质体。随后于 4℃贮存脂质体。

[0689] 实施例 11:奥沙利铂在预先制备的空白脂质体中的包封

[0690] 将 1-OHP 水溶液(8mg/mL, 在 300mM 蔗糖溶液中)加入约 3.5g 的冻干空白脂质体

中并通过 40℃ 下搅拌 2 小时再水合。搅拌之后,通过应用 Sephadex G-25(φ 1×45cm) 分离,从游离 1-OHP 分离脂质体 1-OHP。分别应用 VIS 600nm 和 UV 210nm 监测脂质体 1-OHP 和游离 1-OHP。

[0691] 测定 1-OHP 和胆固醇的量。对于将脂质体级分浓缩至原始胆固醇浓度的情况,计算 1-OHP 浓度,最终,通过比较脂质体的 1-OHP 浓度和 1-OHP 的给予浓度来测定 1-OHP 的收率。

[0692] 对于将脂质体级分浓缩至原始胆固醇浓度的情况,1-OHP 总浓度是 210 μg/mL。1-OHP 的收率是 2.6%。

[0693] 这表明 210 μg/mL 的 1-OHP 被包封在冻干空白脂质体中。

[0694] 实施例 12 :血液和器官中脂质体水平的比较

[0695] 在带有肿瘤的小鼠中,进行比较研究以评价包封 1-OHP 的 Tf-修饰脂质体组合物的血液滞留和在器官中的累积。用 5 周龄的雄性 BALB/c 小鼠作为动物模型,应用 Colon 26 细胞(衍生自小鼠结肠癌)作为肿瘤细胞。细胞得自 Laboratory of Biopharmaceutics, Teikyo University School of Pharmaceutical Sciences, Japan。

[0696] 将体外传代培养的 Colon 26 细胞(2×10^6 细胞)皮下植入小鼠的背区。使用带有直径约 8 至 10mm 的肿瘤(平均生长 8 至 10 天后)的小鼠作为带有结肠癌的小鼠。将实施例 5 和 6 中制备的每一脂质体的溶液或 1-OHP(8mg/ml,在 9%蔗糖溶液中)注射入尾静脉。在每一情况下,以 5mg 1-OHP/kg 体重调整奥沙利铂浓度。作为脂质体,应用 Tf-NG-DSPE 脂质体((■);实施例 5)、Tf/PEG-NG-DSPE 脂质体((▲);实施例 6)和 Tf-PEG-DSPE 脂质体((◆);实施例 6)。

[0697] 施用后 1、3、6、24、48 和 72 小时,对每一组在每一时间点,从 3 只小鼠收集血液、血浆、肝脏、脾脏、肾脏、心脏、肺脏和肿瘤组织。用原子吸附(AA)测定血液、每一器官和肿瘤组织中的 Pt 浓度,计算 1-OHP 浓度并报告为与剂量的比例(%)。血液中的浓度在图 9 中表示。

[0698] 相比于 Tf-PEG-DSPE 脂质体和 Tf/PEG-NG-DSPE 脂质体,在施用后 3 小时,Tf-NG-DSPE 脂质体表现出基本上相同的血液滞留。然而,6 小时后,Tf-NG-DSPE 脂质体表现出一些血液滞留,但是相比于 PEG 脂质体,其更迅速地 from 血液中消失。肿瘤组织中的浓度在图 10 中示出。Tf-NG-DSPE 脂质体表现出与 Tf-PEG-DSPE 脂质体和 Tf/PEG-DSPE 脂质体基本上相同的肿瘤组织累积,虽然随着时间的推移其以较低浓度保持在血液中。

[0699] 从上面的结果,发现施用后约 6 小时的血液滞留时间是必要的并且足以以显著水平或较高水平输送足够浓度的药物到达小鼠的肿瘤组织。认为血液中的滞留时间长于这一时间可以增加在正常组织中引起副作用的可能性。

[0700] 实施例 13 :诊断性脂质体的制备和 ^{125}I 在肿瘤组织中的累积

[0701] 以与实施例 7 中相同的方式制备脂质体,除了 [^{125}I]-酪胺菊粉(在 PBS 溶液中)替换 1-OHP,得到 DMPC/CH/NG-DOPE/Tf-NG-DOPE/[^{125}I]-酪胺菊粉脂质体。也如实施例 7 所述得到脂类组分。应用下示组分制备脂质体制剂。缺少 Tf-NG-DOPE 的脂质体作为脂质体的非靶向分布的对照。靶向脂质体:DMPC/CH/NG-DOPE/Tf-NG-DOPE(63.3/31.7/4/1(m/m)) 非靶向脂质体(对照):DMPC/CH/NG-DOPE(63.3/31.7/5(m/m))

[0702] 通过混合 $\text{Na-}^{125}\text{I}$ (PerkinElmer Japan Co., Ltd., Japan) 和酪胺菊粉(Dr. Kazuo

Maruyama, Teikyo University, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Japan), 应用碘化方法 (Biochem. Biophys. Res. Commun., 122, 319-325 (1984), 整体并入本文作为参考), 将¹²⁵I 结合于酪胺菊粉。从而得到¹²⁵I-酪胺菊粉。随后将浓度约 1mg/mL 的¹²⁵I-酪胺菊粉 / PBS(-) 溶液包封入实施例 7 所述的脂质体中。

[0703] 将 100 μl 每一脂质体溶液注射入如实施例 12 所述的带有鼠结肠癌的小鼠的尾静脉中。施用后 1、6、24 和 48 小时, 对于每一组, 在每一时间点, 从 5 只小鼠收集肿瘤组织和尾。测定肿瘤组织重量, 应用 γ 计数器, 测定肿瘤组织和尾中的放射活性 (单位: cpm) (Aloka AutoGamma System ARC-300, Japan)。结果被评价为肿瘤组织中的分布量 (剂量百分数 / g-肿瘤) = [(肿瘤组织中的计数值) - (b. g. 值)] × 100 / [(Std. 计数值) - (尾中的计数值)] / (肿瘤组织的重量 (g))。¹²⁵I 放射活性半衰期是约 60 天。

[0704] 100 μl 施用溶液 (标准物: Std.) 的放射活性被定义为 100%, 空试管的计数值被定义为背景 (b. g.) 值。结果在图 11 中表示。如从图 11 显而易见的, Tf-修饰脂质体表现出向肿瘤组织的高累积, 而非靶向脂质体不表现出高累积。这些结果证明, 包封放射性化合物的脂质体对于肿瘤组织的检测是有用的。

[0705] 实施例 14: 脂质体的抗肿瘤效应的比较

[0706] 对于包封 1-OHP 的 Tf-修饰脂质体组合物 (实施例 9 中制备的 Tf-PEG-脂质体, 实施例 8 中制备的 Tf-NG-DSPE:NG-DSPE:DSPC:CH 脂质体, 实施例 9 中制备的 Tf/PEG-NG-DSPE 脂质体; 每组 9 只小鼠) 和未结合转铁蛋白的每一脂质体组合物 ((-)TF; 每组 6 只小鼠), 进行比较试验, 以便评价它们对带有结肠癌 Colon 26 的小鼠的抗肿瘤效应。

[0707] 以与实施例 12 中相同的方式制备带有肿瘤的小鼠。作为对照, 应用 1-OHP 溶液 (8mg/ml, 在 9% 蔗糖溶液中)。以 5mg/kg 剂量给予 1-OHP 的日期定义为起始日期, 在第 4 天, 以剂量 5mg/kg 再次给予 1-OHP。第 0 天的肿瘤大小定义为 1, 大小显示为基于此起始大小的比例。在第 0、2、5、7、10、13、15、18 和 21 天测定肿瘤大小, 研究存活天数。

[0708] 结果在图 12 中示出。

[0709] 如图 12 所见, 结合有转铁蛋白的脂质体组合物表现出对肿瘤生长的抑制作用。另一方面, 相比于结合转铁蛋白的脂质体组合物, 未结合转铁蛋白的脂质体组合物对肿瘤生长有更弱的抑制作用。从图 9 和 10 中描述的结果来看, 发现施用后约 6 小时的滞留时间是必要的并且足以使结合转铁蛋白的脂质体对肿瘤生长有抑制作用和使得累积到肿瘤组织的药物浓度明显并且基本上为同一水平。认为血液中的滞留时间长于此时间可以增加对正常组织引起副作用的可能性。

[0710] 实施例 15: NG-DSPE 含量的优化

[0711] 为了确定脂质体中 NG-DSPE 的最佳混合比, 研究正常小鼠中未包封抗癌药的 NG-DSPE 的血液滞留。以如实施例 8 中相同的方式制备未包封抗癌药的脂质体组合物, 但是用水替代 1-OHP 溶液作为水相, 其具有不同量的 NG-DSPE。

[0712] 构成脂质体的全部脂类成分的总摩尔含量被确定为 100%, 并且 NG-DSPE 的含量显示为 NG-DSPE 与总脂类组分的比例 (摩尔百分数)。此外, 也制备含有按摩尔计 6% 的 MPB 脂类 (MPB-DSPE) 或 PDP 脂类 (PDP-DSPE) 作为组成脂类的脂质体。通过将马来酰亚胺基苯基丁酸盐 (MPB) (870013(16:0), Avanti Polar Lipids, Inc, USA) 结合到脂类的乙醇胺的氨基形成脂质体, 和通过 MPB 将 Tf 结合到所述脂质体, 得到 MPB 脂质体。通过将 2-吡

啖基硫代丙酸酯 (PDP) (870205(16:0, AvantiPolar Lipids, Inc, USA) 结合到脂类的乙醇胺的氨基形成脂质体,和通过 PDP 将 Tf 结合到所述脂质体,得到 PDP 脂质体。

[0713] 在本试验中,应用 105 只小鼠 (ICR, 雄性, 6 周龄) (TokyoLaboratory Animal Science Co., Ltd., Japan)。作为示踪剂,将 ^{125}I 结合于酪胺菊粉 (如实施例 13 所述而制备),将约 1mg/ml 浓度的此菊粉溶液包封进脂质体。测定每一情况下收集的血液和器官的重量,应用 γ 计数器 (Aloka Auto Gamma System ARC-300, Japan) 测定脂质体标记物的放射活性 (单位 :cpm)。此外,测定施用于尾静脉的每一溶液 (100 μl) 的放射活性。将 100 μl 施用溶液 (标准物 :Std.) 的放射活性定义为 100%,每一器官的值 (剂量百分数) 表示为百分数。估计血液总量是体重的 7.3%,血液中的脂质体量表示为全部血液中的量。空试管中的计数值定义为背景 (b. g.) 值,从每一样品的计数值减去该值。

[0714] 血液中的分布量 (%) = [(血液中的计数值)-(b. g. 值)] \times (小鼠的体重 (g)) \times 0.073 \times 100/[(Std. 计数值)-(尾部的计数值) \times (血液重量 (g))]

[0715] 结果在图 13 中示出。当脂类含量按摩尔计是 3%或更高时,对于 6 小时后血中的浓度,NG-DSPE 脂质体表现出高的血液滞留。对于马来酰亚胺-脂质体 (MPB 6%),血液滞留低。

[0716] 实施例 16 :Tf 和二羧酸对血液滞留的效应

[0717] 为了研究结合脂质体的转铁蛋白存在与否和二羧酸类型 (例如,戊二酰基、琥珀酰基等) 的效应,在正常小鼠中检测其中未包封抗癌药的结合转铁蛋白的脂质体的血液滞留情况。试验方法与实施例 15 中所述的方法相同。

[0718] 制备含有结合琥珀酸而不是戊二酸的磷脂的脂质体。

[0719] 如下制备 NG-DSPE(戊二酸)。在暗处,在氮气流下,将 DSPE (ME-8080, NOF Corporation, Japan) 悬浮于 10 倍于 DSPE 体积的脱水氯仿中。随后,加入 1.3 当量的三乙胺 (208-02643, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan),并在室温下逐滴加入无水戊二酸的脱水氯仿溶液 (G0071, Tokyo Chemical Industry, Japan) (溶解在与 DSPE 体积相同的脱水氯仿中)。完成之后,使溶液在 30 $^{\circ}\text{C}$ 反应 2 小时,同时搅拌。

[0720] 随后,用醋酸盐缓冲液 (pH4.5) 洗涤反应液 3 次,用硫酸镁对有机层脱水,并用水流吸气器 (water flow aspirator) 抽吸过滤而过滤。随后,减压下于 30 $^{\circ}\text{C}$ 浓缩滤液。当其变得油性时 (DSPE 体积的约 2 倍),加入甲醇形成晶体,随后过滤。再次将其溶解在氯仿中,此过程重复两次。随后,室温下减压下干燥晶体,从而得到目标产物,为白色晶体。通过与实施例 8 相同的方法制备 NG-DSPE 脂质体。

[0721] 结果在图 14 中示出。通过二羧酸结合转铁蛋白的脂质体 (NG-DSPE:N-戊二酰基-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺, NS-DSPE:N-琥珀酰基-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺) 表现出高的血液滞留。然而,在通过马来酰亚胺经 S-S 键结合转铁蛋白的脂质体 (MPB) 的情况下,甚至在结合相同配体转铁蛋白时,血液滞留低。

[0722] 实施例 17 :脂质体的电泳分析

[0723] 作为表征脂质体的分析方法的一个例子,示出了一个电泳例子。在含有 2.5% SDS 和 5% 的 2-巯基乙醇的样品缓冲液中,溶解脂质体并于 95 $^{\circ}\text{C}$ 下变性 5 分钟。通过应用约 7.5%至 10%的聚丙烯酰胺凝胶 (Funakoshi, Easy gel (II), 预制凝胶 (precast gel), Japan),将每一样品 5 μl 施用到凝胶上,在恒定电流 20mA 下进行电泳 1 至 2 小时。

[0724] 电泳之后,用银染试剂盒(Wako Pure Chemical Industries,Silver Staining II Kit Wako,Japan)对凝胶进行银染。对于下列脂质体,结果在图15中示出:示出了泳道6(转铁蛋白-N-戊二酰基-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-脂质体(Tf-NG-DSPE脂质体));泳道5(转铁蛋白-聚乙二醇-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-脂质体(Tf-PEG-DSPE脂质体))。泳道1-4,分别含有h-apo-Tf(240ng)、h-apo-Tf(120ng)、h-apo-Tf(60ng)和h-apo-Tf(30ng)。

[0725] 在比较实施例的情况下,Tf-PEG-DSPE脂质体,由于聚乙二醇具有一些分子量分布,显示出具有几条带的复杂的电泳图像。在Tf-NG-DSPE脂质体的情况下,出现单条带,对其更容易分析,并且增强了纯化脂质体的能力。这些结果表明,对于根据本发明的脂质体组合物,分析试验方法比对于PEG-衍生的脂质体组合物的分析试验方法简单。

[0726] 实施例18:游离PE对脂质体组合物的作用

[0727] 为了研究脂质体中游离磷脂酰乙醇胺(非-NG-PE)存在的作用,对Tf-NG-DSPE脂质体和通过加入二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(DSPE)制备的脂质体(无NG存在),测定Tf的结合能力。以与实施例8中相同的方式,从DSPC(64份)、CH(32份)和NG-DSPE(4份)制备Tf-NG-DSPE脂质体,从DSPC(64份)、CH(32份)、NG-DSPE(4份)和DSPE(10份)制备Tf-NG-DSPE+DSPE脂质体。

[0728] 随后,应用10当量的NHS和ECD/HCl和0.05当量的Tf将Tf结合到NG-DSPE。随后,用SDS-PAGE分离其量相当于1mg脂的脂质体样品,并且通过银染可见到条带,如实施例17所述。

[0729] 结果在图16中示出。发现相比于含有非-NG-DSPE的NG-DSPE脂质体而言,在加入按摩尔计10%DSPE的NG-DSPE+DSPE脂质体的情况下,Tf的结合量显著低。这可能是由于Tf的氨基和DSPE的氨基在Tf结合于NG-DSPE的羧基的反应中互相竞争。

[0730] 实施例19:血液和器官中脂质体水平的比较

[0731] 应用实施例12所述的方案,比较血液和肿瘤中NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH(Tf-NG-DOPE:NG-DOPE)脂质体(实施例7中制备)和Tf-PEG-DSPE脂质体(实施例9中制备)的水平。血液中滞留的脂质体量的结果在图17中描述,肿瘤中检测的脂质体量在图18中示出。

[0732] 图17和18中的结果表明,虽然Tf-NG-DOPE:NG-DOPE脂质体在血液中(图17)表现出的累积比Tf-PEG-DSPE脂质体低,但它们能够输送数量更多的奥沙利铂到达肿瘤(图18)。血液中较低的脂质体累积可能降低了奥沙利铂的全身副作用。

[0733] 实施例20:带有Colon 26肿瘤的小鼠中脂质体抗肿瘤效应的比较

[0734] 应用实施例14所述的方案,在小鼠中比较NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH脂质体(在实施例7中制备)和Tf-PEG-DSPE脂质体(在实施例9中制备)对colon 26肿瘤的效应。结果描述在图19中。

[0735] 如图19所示,相比于奥沙利铂溶液,两种脂质体都表现出对肿瘤生长的抑制,然而,如实施例19所示,血液(血浆)中NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH累积较少,可能意味着这些脂质体被给予它们的个体更好地耐受。

[0736] 实施例21:脂质体对异种移植HCT-116结肠肿瘤模型的抗肿瘤效应

[0737] 当针对皮下植入的HCT-116人结肠肿瘤异种移植植物给予NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH脂质体(在实施例7中制备)时,测试所述脂质体的抗肿瘤

功效。试验在 Southern Research Institute, AL, USA 进行, 研究无胸腺 NCr-nu 小鼠 (02/A/08F17T9, Frederick Cancer Research and Development Center, MD, USA ;50 只小鼠), 溶液中的奥沙利铂作为参照化合物。NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH 脂质体的抗肿瘤活性总结于图 20 中。

[0738] 每 4 天静脉给予 NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH 脂质体, 以每次注射 15 和 10mg/kg 的剂量进行四次注射 (q4d×4)。以相同时间表以每次注射 15mg/kg 的剂量给予奥沙利铂。以相同时间表注射赋形剂 (约 10.3% 蔗糖) 和空白脂质体对照组。

[0739] 对于 15mg/kg 组, 应用 NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH 脂质体每四周处理的 HCT-116 结肠肿瘤模型的平均肿瘤体积是对照肿瘤体积的 28.9%, 而对于 10mg/kg 组, 是对照肿瘤体积的 35.9%。也在 HCT-116 模型中比较 NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH 脂质体与非脂质体奥沙利铂的抗肿瘤活性, 其中当以 15mg/kg (对照肿瘤体积的 28.9%) 每四天 (4×) 给予时, 就相对肿瘤体积而言, NG-DOPE:f-NG-DOPE:DMPC:CH 脂质体表现出更强的效应。以 15mg/kg 每四天 (4×) 输送的非脂质体奥沙利铂得到对照肿瘤体积的 39.3%。

[0740] 实施例 22 : 脂质体对异种移植物 HT-29 结肠肿瘤模型的抗肿瘤效应

[0741] 当针对皮下植入的 HT-29 人结肠肿瘤异种移植物给予 NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH 脂质体 (在实施例 7 中制备) 时, 检测所述脂质体的抗肿瘤功效。试验在 Panapharm Laboratories Co., Ltd., Japan 对雌性无胸腺 BALB/cA Jcl-nu 小鼠 (CLEA Japan, Inc., Japan ;50 只小鼠) 进行, 结果总结在图 21 中。对 4 只小鼠的组施用 NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH 脂质体, 剂量是 6.7、10 或 15mg/kg, 或者施用赋形剂对照。在第 10、14 和 19 天注射赋形剂以及 6.7 和 10mg/kg 处理组, 而在第 10 和 14 天注射 15mg/kg 处理组。

[0742] 对于 6.7mg/kg 组, 应用 NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH 脂质体处理的 HT-29 结肠肿瘤模型的平均肿瘤体积是对照肿瘤体积的 66.3%, 而对于 10mg/kg 组, 是对照肿瘤体积的 39.5% (p 值 ≤ 0.01)。

[0743] 实施例 23 : 脂质体对异种移植物 MKN45 胃肿瘤模型的抗肿瘤效应

[0744] 当针对皮下植入的 MKN45 人胃肿瘤异种移植物给予 NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH 脂质体 (在实施例 7 中制备) 时, 检测所述脂质体的抗肿瘤功效。试验在 Panapharm Laboratories Co., Ltd., Japan 进行, 研究雄性无胸腺 BALB/cA Jcl-nu 小鼠 (CLEA Japan, Inc., Japan ;50 只小鼠), 并总结于图 22 中。

[0745] 对 4 只小鼠的组施用 6.7、10 或 15mg/kg 的 NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH 脂质体, 或赋形剂对照。在第 7、12 和 24 天注射赋形剂组以及 6.7 和 10mg/kg 处理组, 在第 7 和 24 天注射 15mg/kg 处理组。对于 6.7mg/kg 组, 应用 NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH 脂质体处理后 MKN45 胃肿瘤模型的平均肿瘤体积是对照肿瘤体积的 65.4% (p 值 ≤ 0.05), 对于 10mg/kg 组, 是对照肿瘤体积的 49.6% (p 值 ≤ 0.01), 对于 15mg/kg 组, 是对照肿瘤体积的 48.5% (p 值 ≤ 0.01 ; 每 17 天输送)。

[0746] 实施例 24 : 脂质体对异种移植物 COLO 205 结肠肿瘤模型的抗肿瘤效应

[0747] 当针对皮下植入的 COLO 205 结肠肿瘤异种移植物给予 NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH 脂质体 (在实施例 7 中制备) 时, 检测所述脂质体的抗肿瘤功效。试验在 Southern Research Institute, AL, USA 进行, 研究雄性无胸腺 NCr-nu 小鼠

(01/A/09F3T8, Federic Cancer Research and Development Center, MD, USA), 溶液中的奥沙利铂作为参照化合物并总结于图 23 中。

[0748] 对 40 只小鼠施用 NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH 脂质体, 每 4 天静脉注射, 进行三次注射 (q4d×3), 每次注射剂量是 10 和 5mg/kg。以相同时间表, 以每次注射 5mg/kg 的剂量施用奥沙利铂。以相同时间表注射对照组。对于所有的组, 从第 47 天开始, 晚期肿瘤退却。

[0749] 施用 NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH 脂质体, 隔日施用, 进行 2 次注射, 每次注射剂量是 15 和 10mg/kg, 随后隔日治疗, 进行 6 次注射, 每次注射剂量分别是 4 和 2mg/kg。以相同时间表, 以每次注射 10 和 2mg/kg 的剂量施用奥沙利铂。以相同时间表处理对照组。

[0750] 用起始剂量 10 和 5mg/kg 施用 NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH 脂质体, 随后以剂量 15 和 10mg/kg 用 NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH 脂质体治疗晚期的、预先治疗的肿瘤, 随后是剂量 4 和 2mg/kg 的 NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH 脂质体, 应用各种治疗方案治疗之后, COLO 205 结肠肿瘤模型的平均肿瘤体积是对照肿瘤体积的 53.2% 和 69.5% 之间 (p 值 ≤ 0.05 或 0.01)。

[0751] 实施例 25 : 奥沙利铂在靶向脂质体中的包封

[0752] 为了测定实施例 7 中制备的 NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH (Tf-NG-DOPE:NG-DOPE) 脂质体中包封的奥沙利铂的比例, 应用下列方法。

[0753] 通过使样品的等分试样通过 3,000 MWC0 (截留分子量) 离心柱 (30K MWC0 纤维素超滤膜柱, Cat. No. 42410, Millipore Corp., USA) 和应用 HPLC 测定洗脱液中的奥沙利铂浓度, 测定包封程度, 其中所述 HPLC 用稀磷酸水溶液中 (pH3.0) 的 1% 乙腈等度洗脱。

[0754] 使用 HPLC 分析来定量未包封 (游离) 药物的水平, 在膜滤过之后测定奥沙利铂的水平。如实施例 7 中所述制备的, 3 批的包入效率在 98% 以上 (参见表 1)。

[0755] 表 1 : 奥沙利铂在脂质体中的包封比例

[0756]

批次	I	II	III
包封百分比	98.8	99.6	99.1

[0757] 实施例 26 : 靶向脂质体的 pH 值

[0758] 通过将本发明脂质体放在蒸馏水中并应用标准 pH 计如下测定, 能够确定靶向脂质体的 pH 值。

[0759] 用带有凝胶填充的 Ag/AgCl 电极的 pH 计 (VWR Model 8000) 测定 NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH 脂质体 (实施例 7 中制备) 的 pH 值。4 批脂质体的 pH 值的范围是 pH7.17-7.23, 如下面的表 2 中所示。

[0760] 表 2 : 脂质体的 pH 值

[0761]

批次	1	2	3	4
pH	7.17	7.17	7.23	7.20

[0762] [0762] 不同 pH 下脂质体的外观总结于表 3 中。这些结果表明, 低 pH 值引起凝集、沉降和沉淀, 这可以是由于 NG-DOPE 和 Tf 质子化, 随后双层聚集和转铁蛋白变性引起。

[0763] 表 3 : 不同 pH 值下的脂质体情况

[0764]

pH	观察结果
7.19	液体,半透明,淡粉色
6.98	液体,半透明,相比于不加入没有改变,淡粉色
6.83	液体,半透明,相比于不加入没有改变,淡粉色
6.37	液体,加入后有小的白色沉淀,相比于不加入在一分钟内澄清,淡粉色
5.53	液体,加入后有白色沉淀,在一分钟内澄清但略微更加混浊,颜色略微白色
5.07	液体,小的白色沉淀,混浊,颜色为白色
4.33	粘度增加,显著量的白色沉淀量,非常混浊,颜色为白色
3.72	非常粘,旋转微量离心管时样品不移动,颠倒时为白色,不透明,白色

[0765] 实施例 27 :偶联转铁蛋白的鉴定和靶向脂质体中转铁蛋白的 SDS-PAGE 图

[0766] 进行本研究以确认实施例 7 中制备的 NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH 脂质体中与 NG-DOPE 偶联的转铁蛋白。在本方法中,当转铁蛋白被偶联到 NG-DOPE 时,复合物表现出比非偶联转铁蛋白高的分子量。

[0767] 在 95°C 下,在含有 2.5% SDS 和 5% 2-巯基乙醇的样品缓冲液中溶解脂质体并变性 5 分钟。随后将样品施加到 5-10% 梯度聚丙烯酰胺凝胶中,随后在 SDS 存在下对它们进行电泳。通过使用胶状亮兰 G (B2025, SIGMA₅ USA),使迁移的蛋白条带可见。

[0768] 脂质体中的转铁蛋白被检测为偶联于 NG-DOPE 的转铁蛋白,其表现出比完整转铁蛋白高的分子量(参见图 24)。具有较低分子量的小条带被检测为游离转铁蛋白。

[0769] 应用 Scion Image 软件(在 www.microsoft.com.DirectX 免费得到),以峰面积计算 SDS-PAGE 上游离转铁蛋白与偶联于 NG-DOPE 的转铁蛋白的比(图 24)。游离 Tf 在 NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH 脂质体的总 Tf 中的比值是约 4.7%。

[0770] 实施例 28 :渗透压分析

[0771] 给定温度下的渗透压取决于蔗糖和盐,如氯化钠和磷酸盐缓冲液。它不取决于溶质,而是取决于溶液中总离子密度和分子大小。正常地,应用已知为渗透压计的仪器,可以测定渗透压,其以合适的压力单位测量渗透压。

[0772] 应用渗透压计 (Vapro Vapor Pressure Osmometer Model 5520, Wescor, Inc., USA) 测定室温下如实施例 7 制备的 NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH 脂质体的渗透压。3 个脂质体制备物的渗透压值范围为 360-370 mOsm/kg,如表 4 所报告。

[0773] 表 4 :渗透压

[0774]

批次	A	B	C
渗透压 (mOsm/kg)	360	370	368

[0775] 实施例 29 :Tf-NG-DOPE 的分离

[0776] 将 900mL 的 EtOH 加入 100mL 空白脂质体中 (DMPC/Chol/NG-DOPE/Tf-NG-DOPE) (冻干前如实施例 10 制备) 并充分搅拌。随后对混合物进行离心 (9,000rpm, 10min, 20°C; CF16RX, Hitachi Koki Co., Ltd., Japan), 得到沉淀物。

[0777] 随后将 100mL 的 EtOH 加入到此沉淀物中并充分搅拌。对混合物再次离心 (9,000rpm, 10min, 20°C; CF16RX, Hitachi Koki Co., Ltd., Japan), 得到白色(浅橙色)沉淀。再次重复这一洗涤步骤。

[0778] 用 N₂ 气干燥上面得到的沉淀物 30 分钟。随后将干燥的物质溶解在 10mL 蒸馏水中并通过无菌滤器 (0.22 μm) (Millipore Corp., USA)。

[0779] 将滤液倒入瓶中,于 -40°C 在架子上冷冻约 8 小时。使样品减压至约 0.1mmHg

并保持在减压下 2 天,同时将温度从 -40°C 逐渐升高到 25°C 。从而得到约 444mg 的 Tf-NG-DOPE(空白脂质体的转铁蛋白含量约 45%)。

[0780] 实施例 30 :Tf-NG-DSPE 的制备

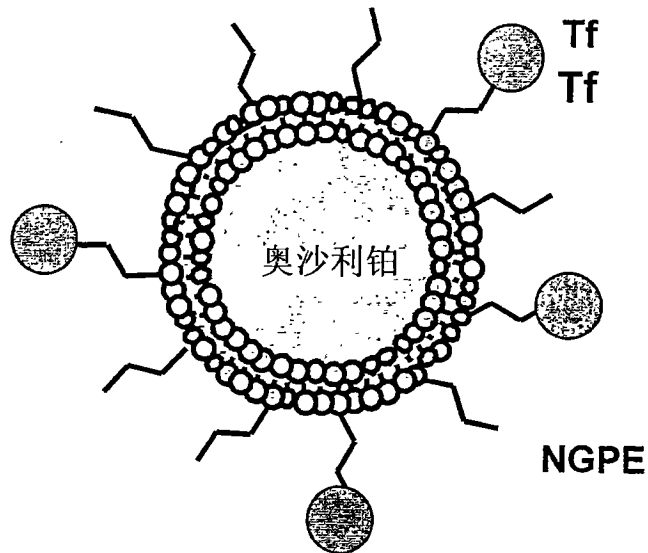
[0781] 在 50mmol/L MES 缓冲液中 (pH5.5) 混合 200 μL NHS(Wako Pure Chemical Industries,Ltd.,Japan) 水溶液 (0.1mol/L)、200 μL EDC(N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺氢氯化物)(TokyoChemical Industry Co.,Ltd.,Japan) 水溶液 (0.25mol/L) 和含有 2% (w/v) OG(正辛基-D-吡喃葡萄糖苷)(Wako Pure Chemical Industries,Ltd.,Japan) 的 1mL NG-DSPE 溶液 (2mmol/L),搅拌 10 分钟。

[0782] 通过 Sephadex G-15 柱 (1.5cm \times 20cm,0.1% (w/v) 的 OG 溶解在 50mmol/L HEPES 缓冲液 (pH8.0),GE Healthcare Bio-SciencesCorp.,USA) 去除过剩试剂,并分馏为约 1mL/管。

[0783] 将 5mL 的 1%转铁蛋白 (Sigma, USA) 水溶液逐滴加入含有 NG-DSPE 的级分中,并在 4°C 下轻轻搅拌 20 小时。通过 MS 确定每一级分而进行鉴定。

[0784] 随后用 TOYOPEARL HW-55S 柱 (1.5cm \times 45cm,0.9% NaCl,Tosoh Bioscience LLC, USA) 将反应产物分馏为约 1.7mL/管。通过质谱测定 (MALDI-TOF/MS) 和应用 CBB(考马斯亮兰,Wako PureChemical Industries,Ltd.,Japan) 染色的 SDS-PAGE,测定 Tf-NG-DSPE。

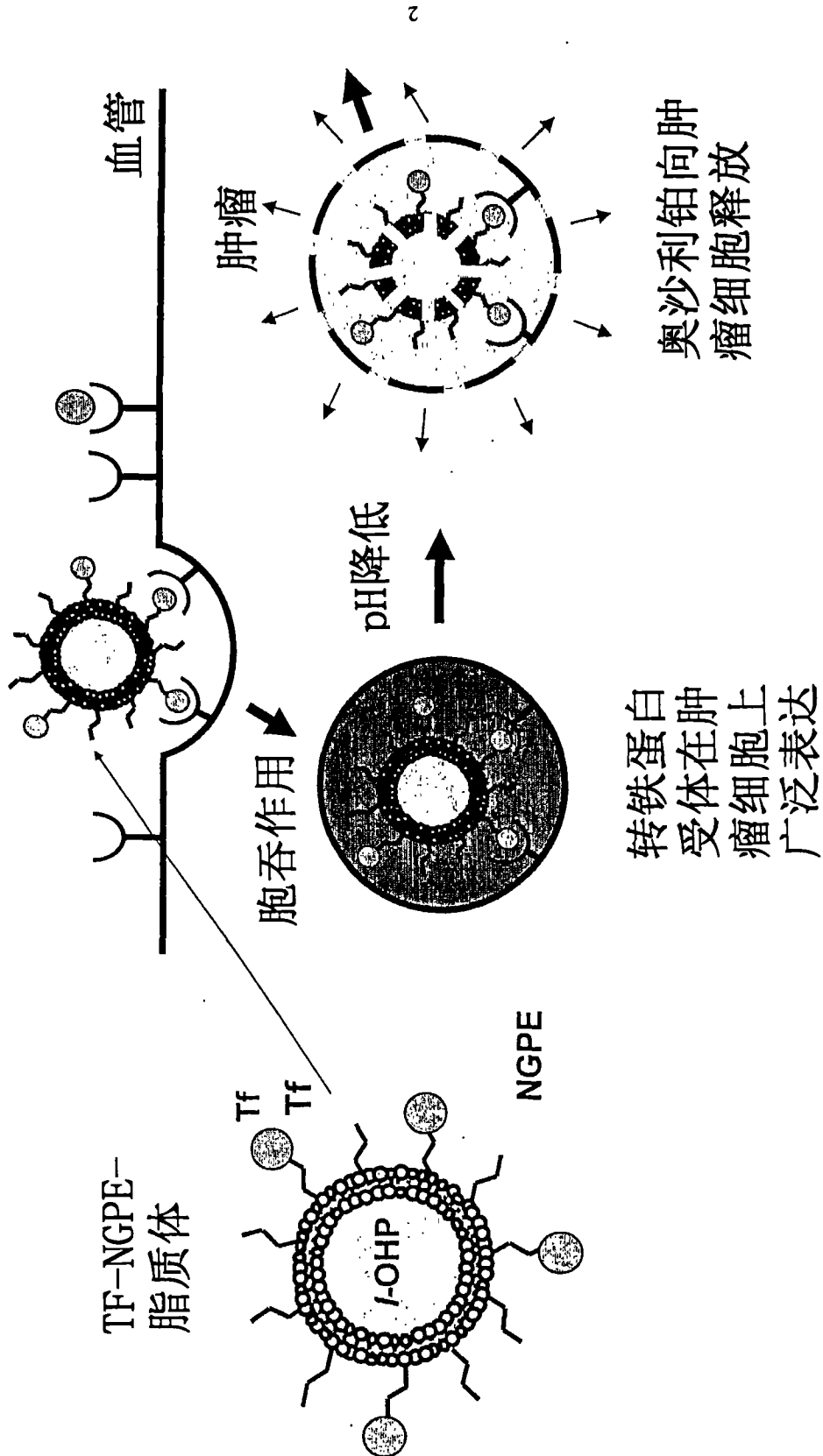
包封奥沙利铂的、 转铁蛋白偶联的 NGPE脂质体



PEG: 聚乙二醇

NGPE: N-戊二酰基磷脂酰乙醇胺

图1



2

图2

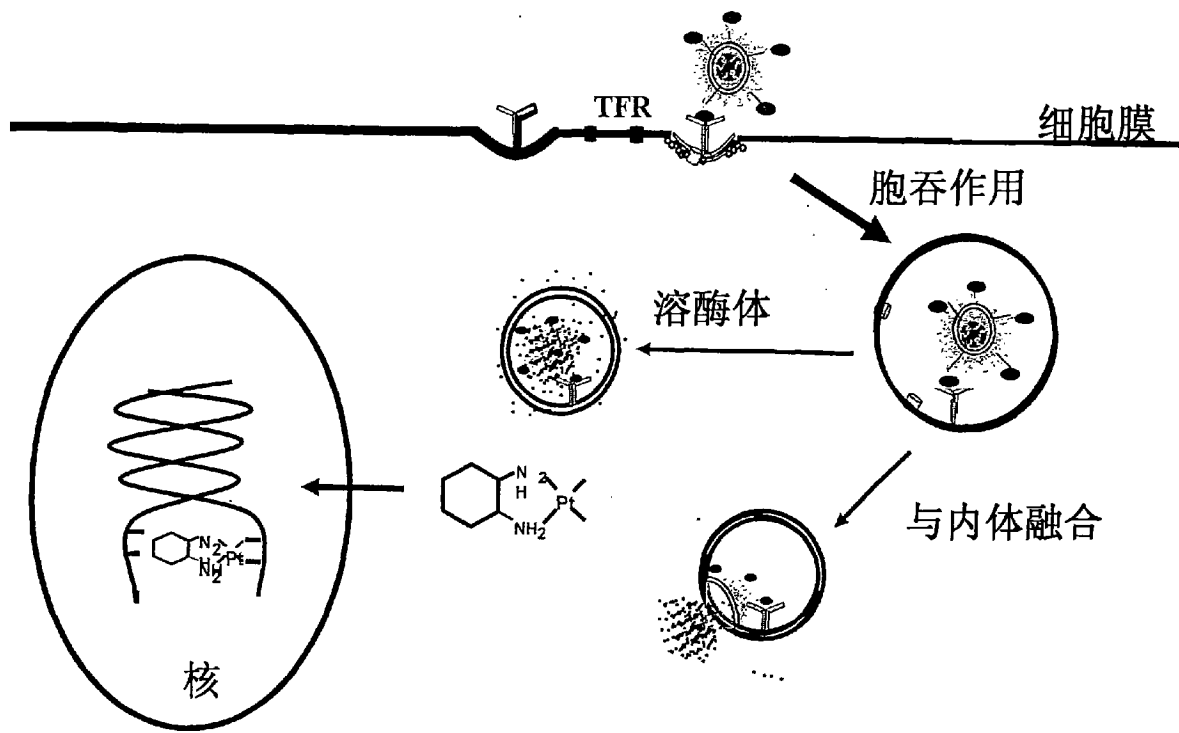


图3

磷脂: N₀PE : SuccN₀PE 混合物

含有药物或标记化合物的水溶液

磷脂: N₀PE : SuccN₀PE : 药物或标记化合物 混合物

超声波处理, 蒸发等

磷脂: N₀PE : SuccN₀PE : 药物或标记化合物 脂质体

转铁蛋白 (Tf)

磷脂: N₀PE : Tf-N₀PE : 药物或标记化合物 脂质体

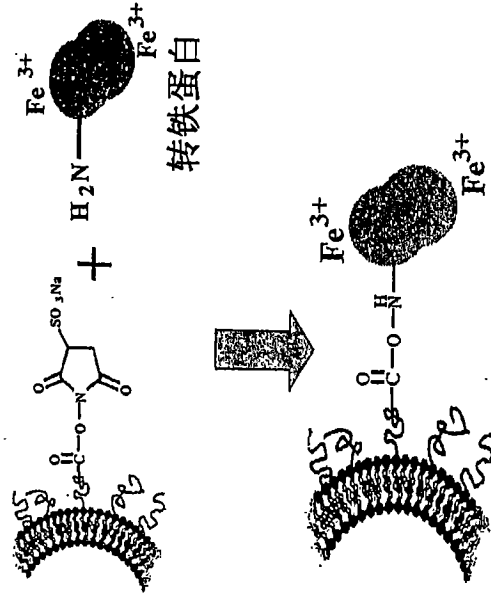


图4

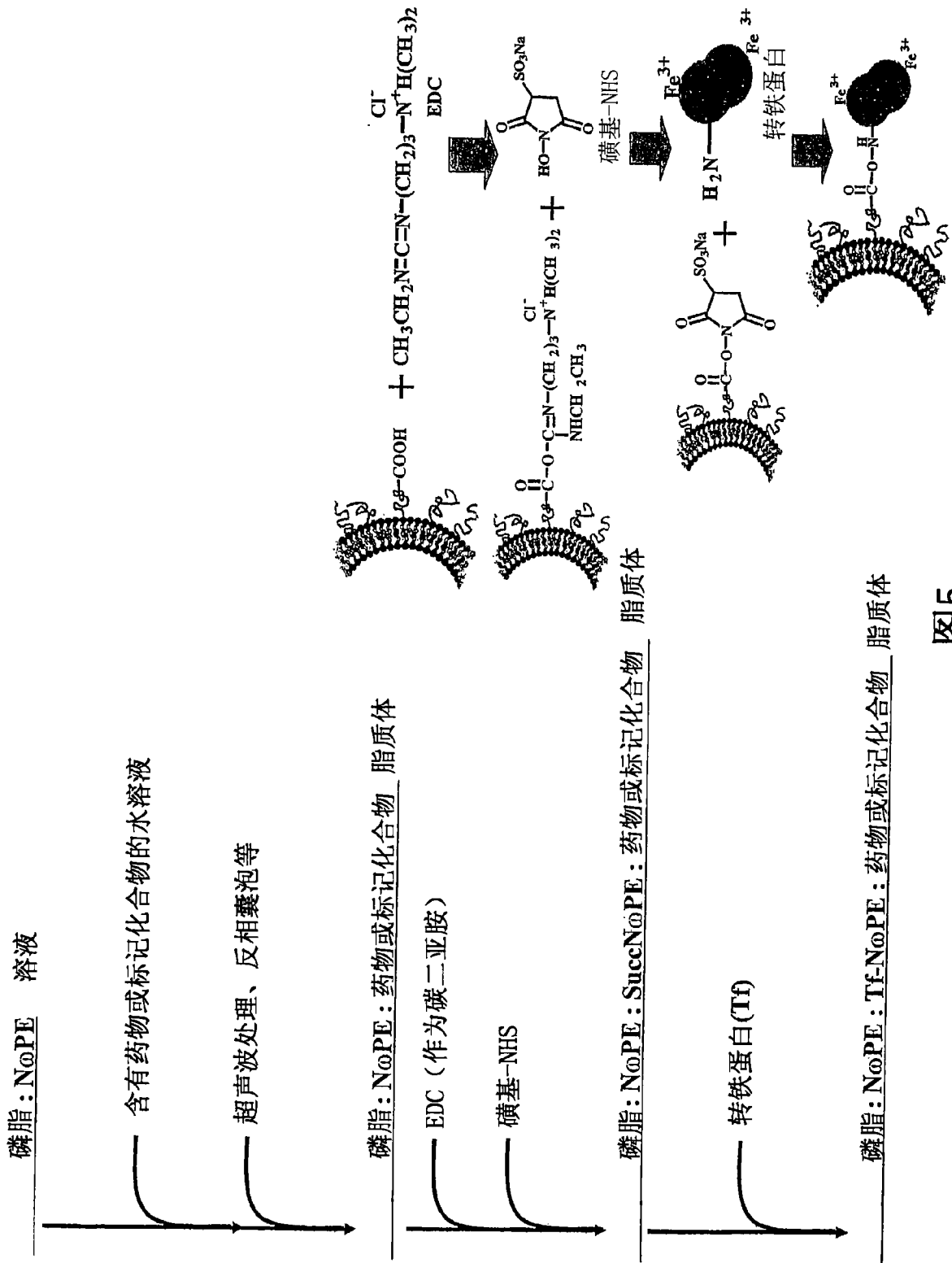


图5

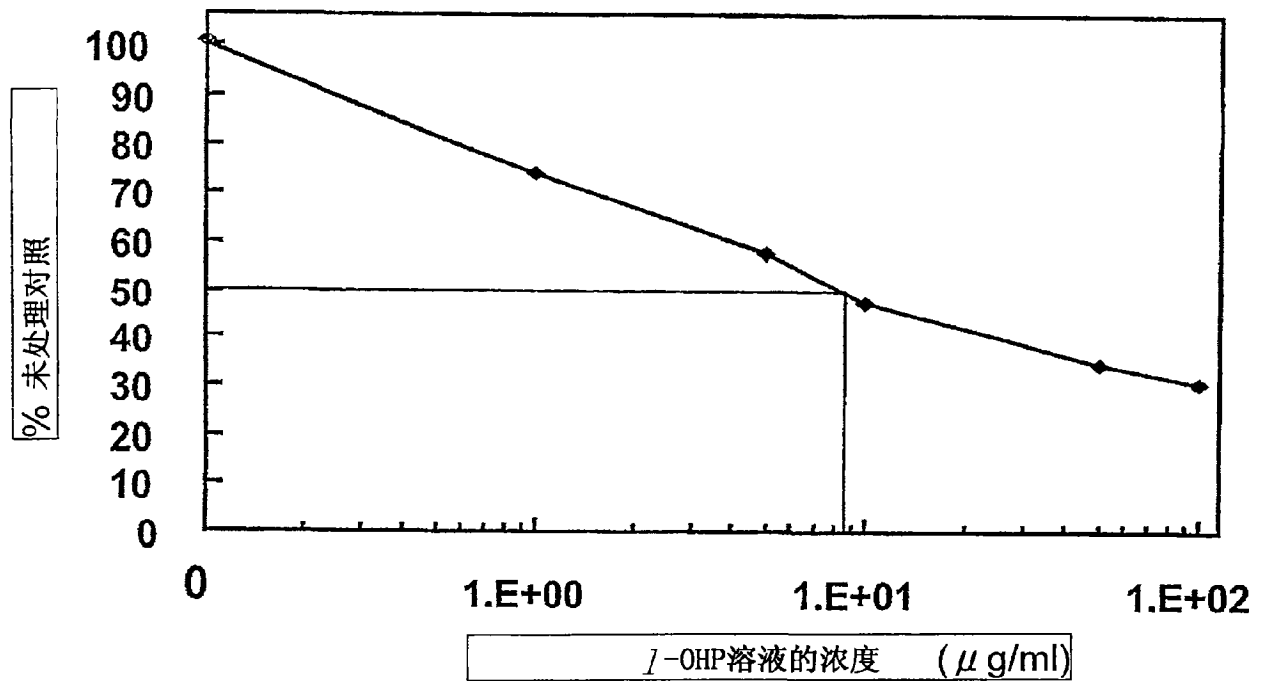


图6

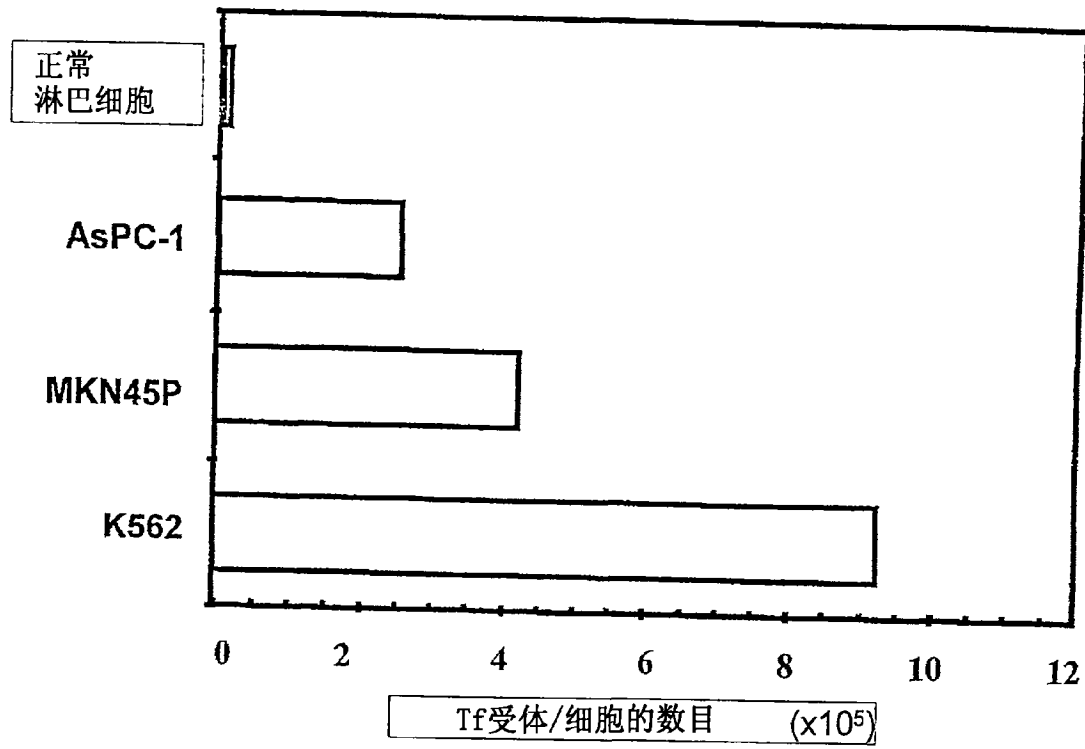


图7

随强度的大小分布

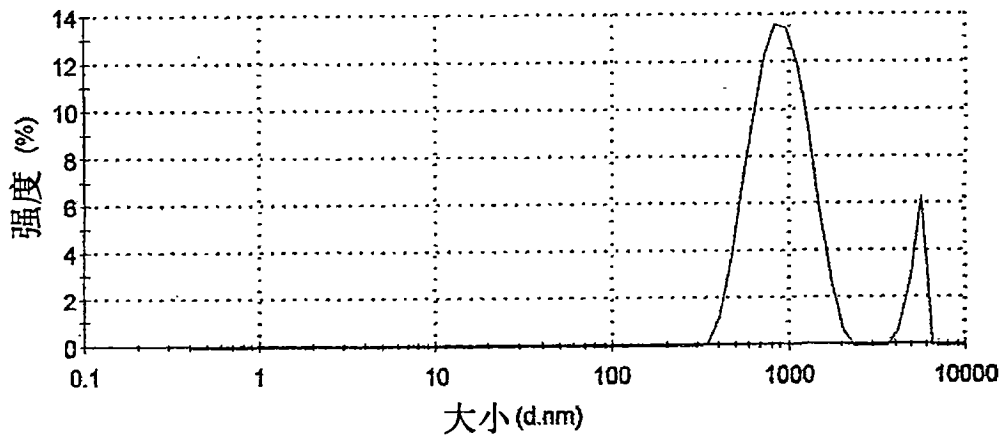


图8A

随强度的大小分布

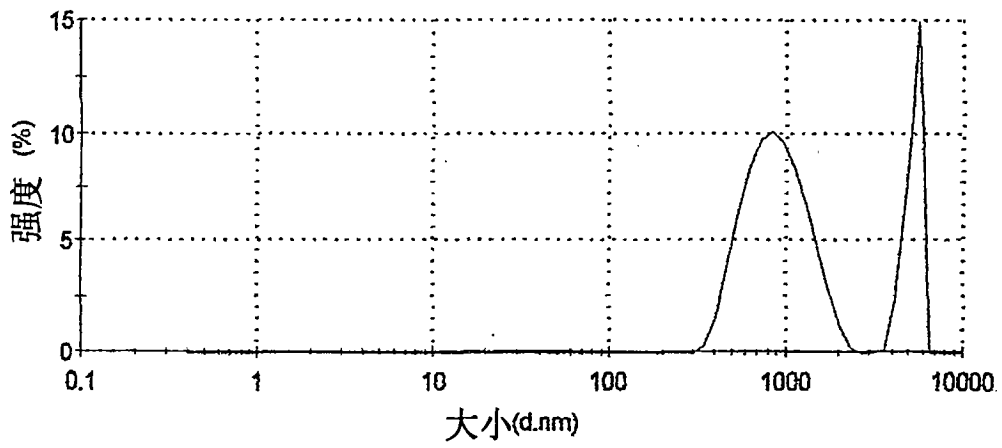


图8B

随强度的大小分布

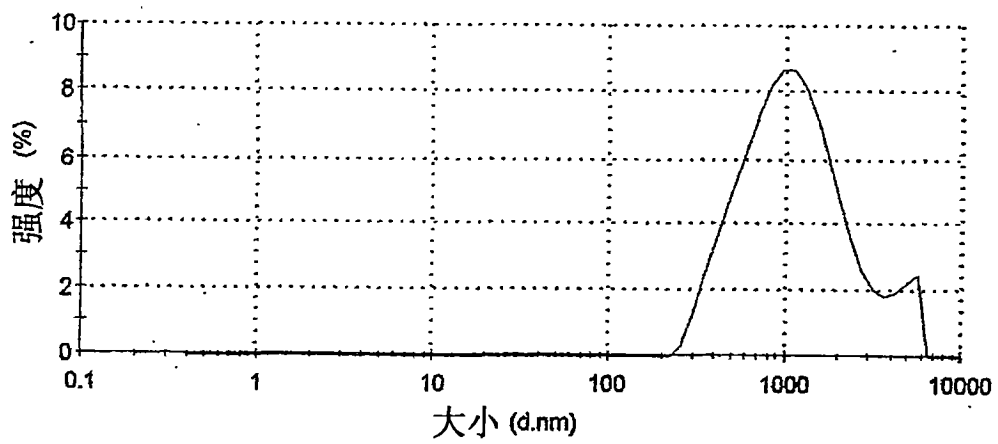


图8C

随强度的大小分布

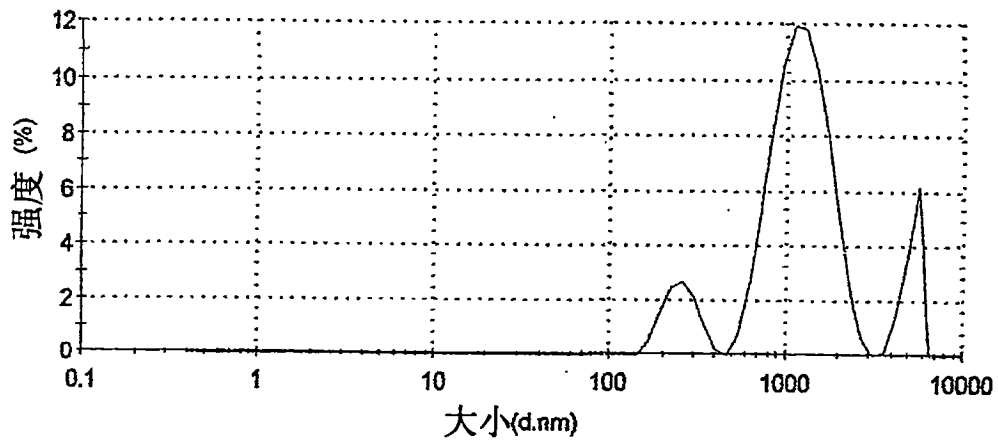


图8D

随强度的大小分布

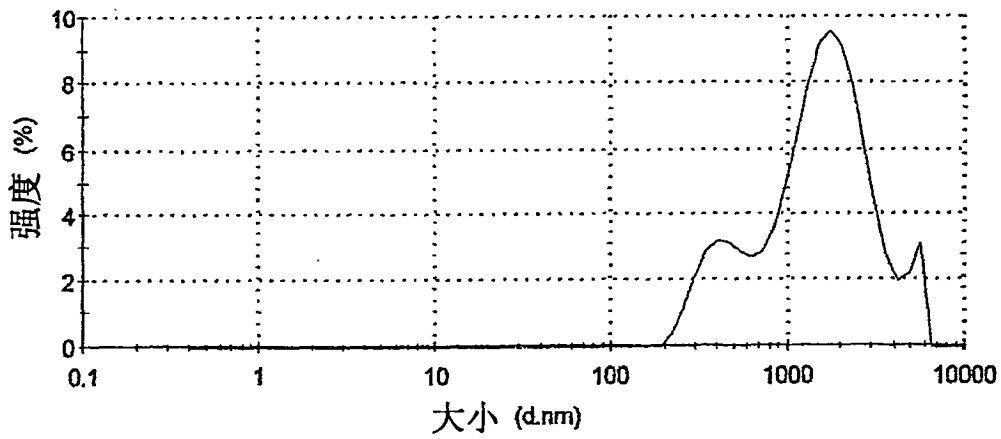


图8E

随强度的大小分布

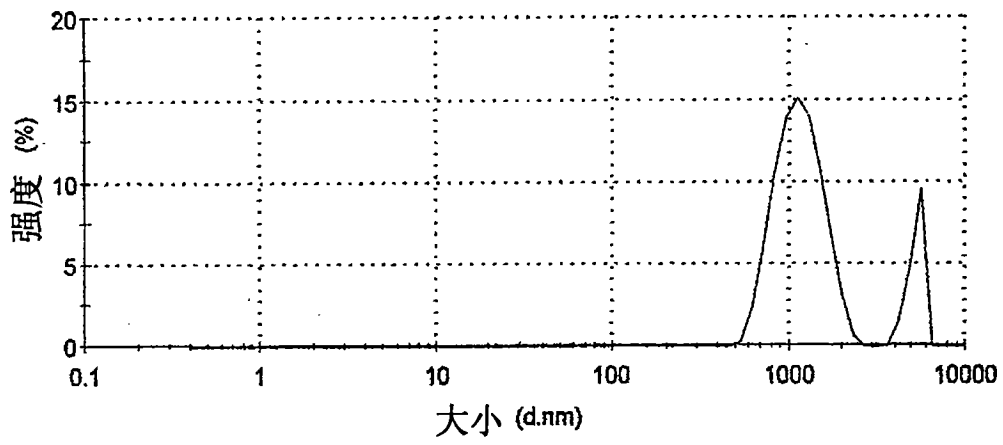


图8F

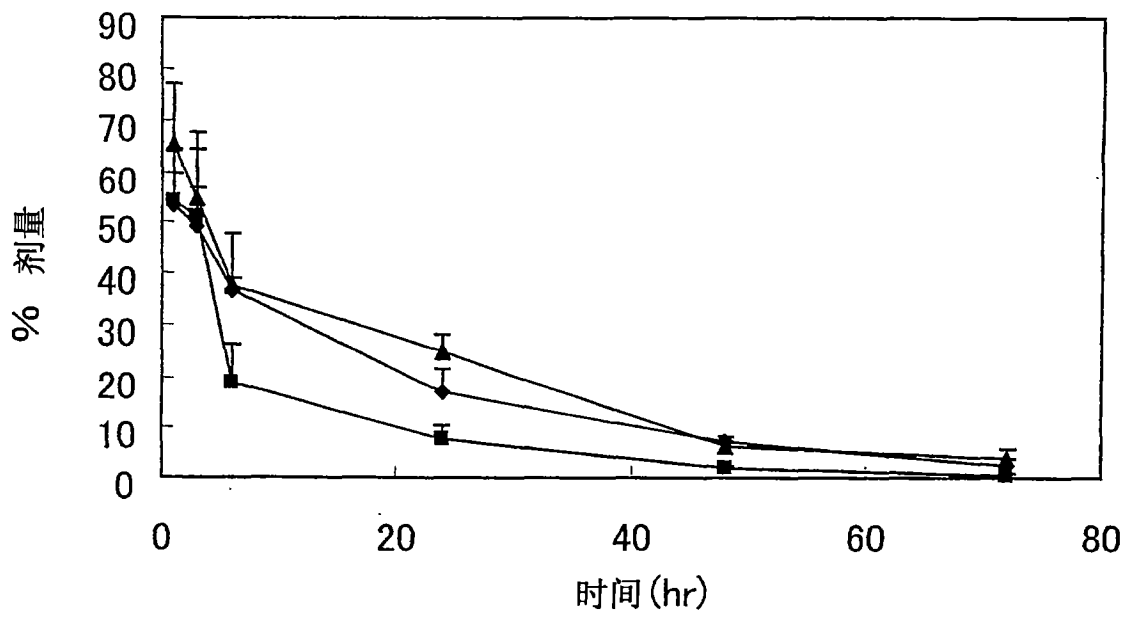


图9

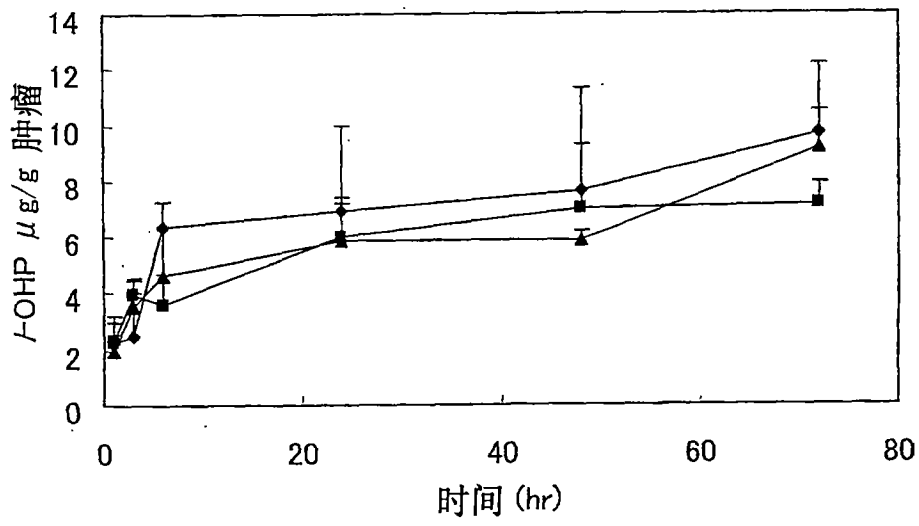


图10

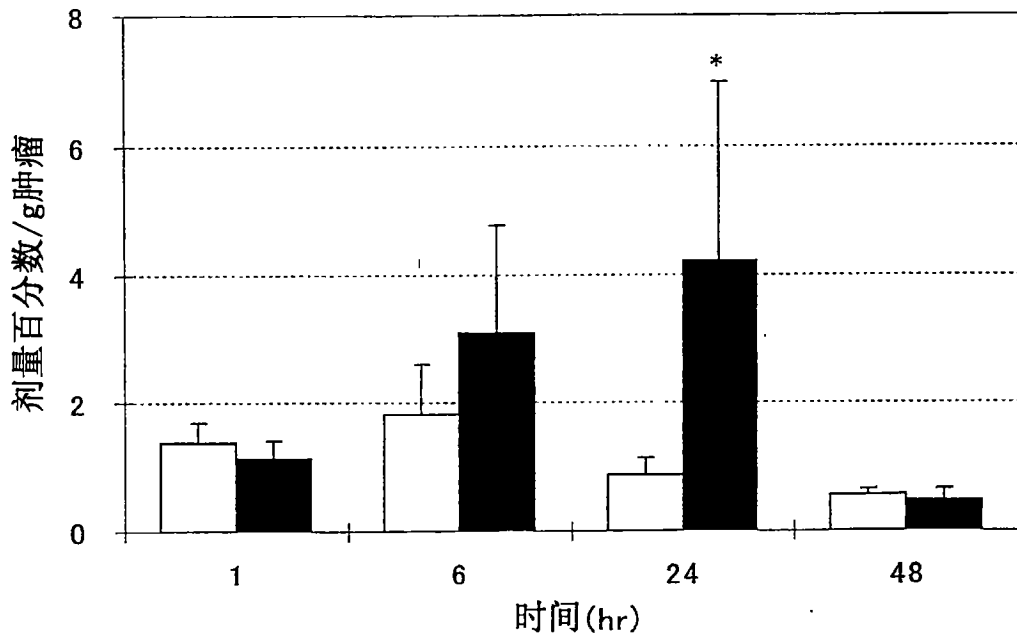


图11

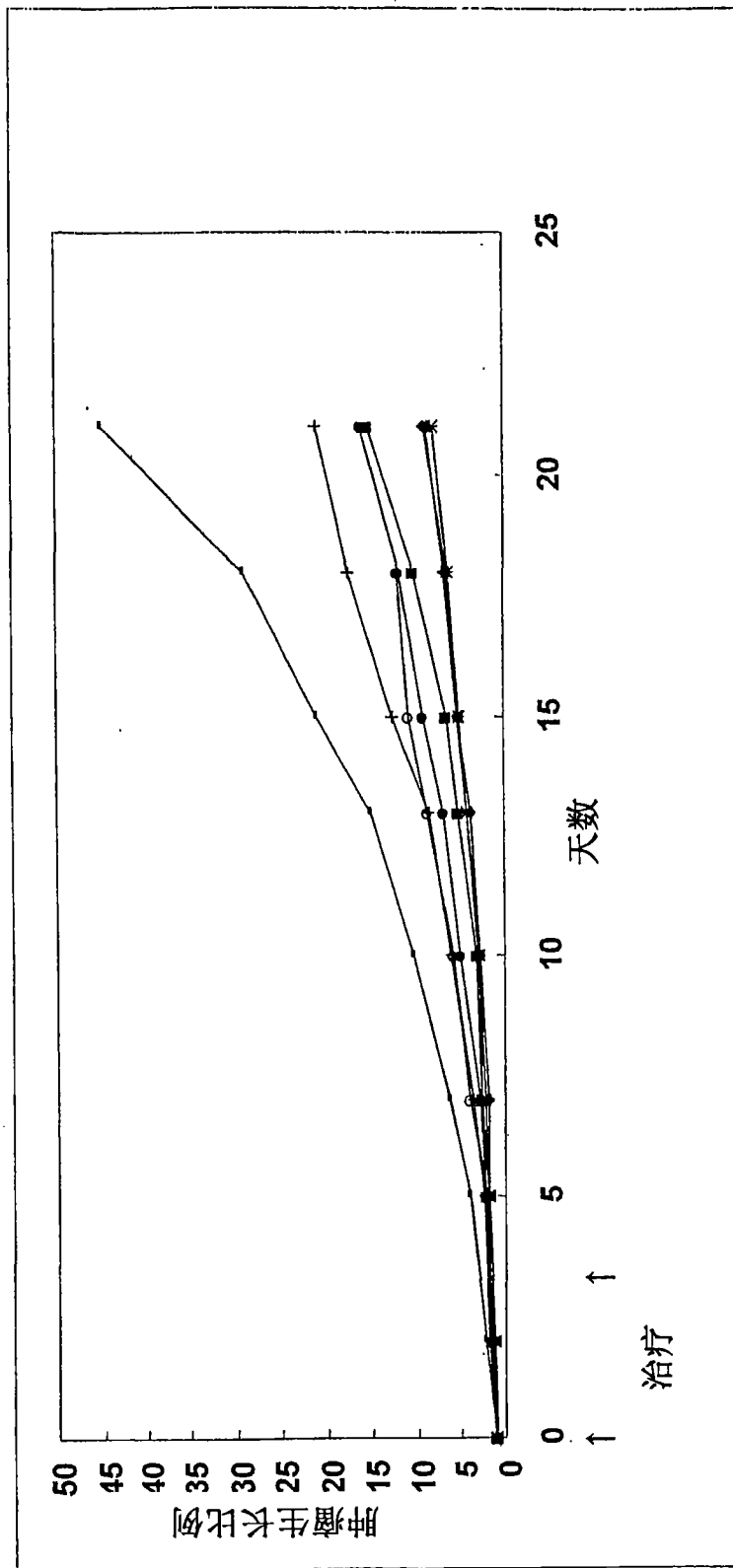


图12

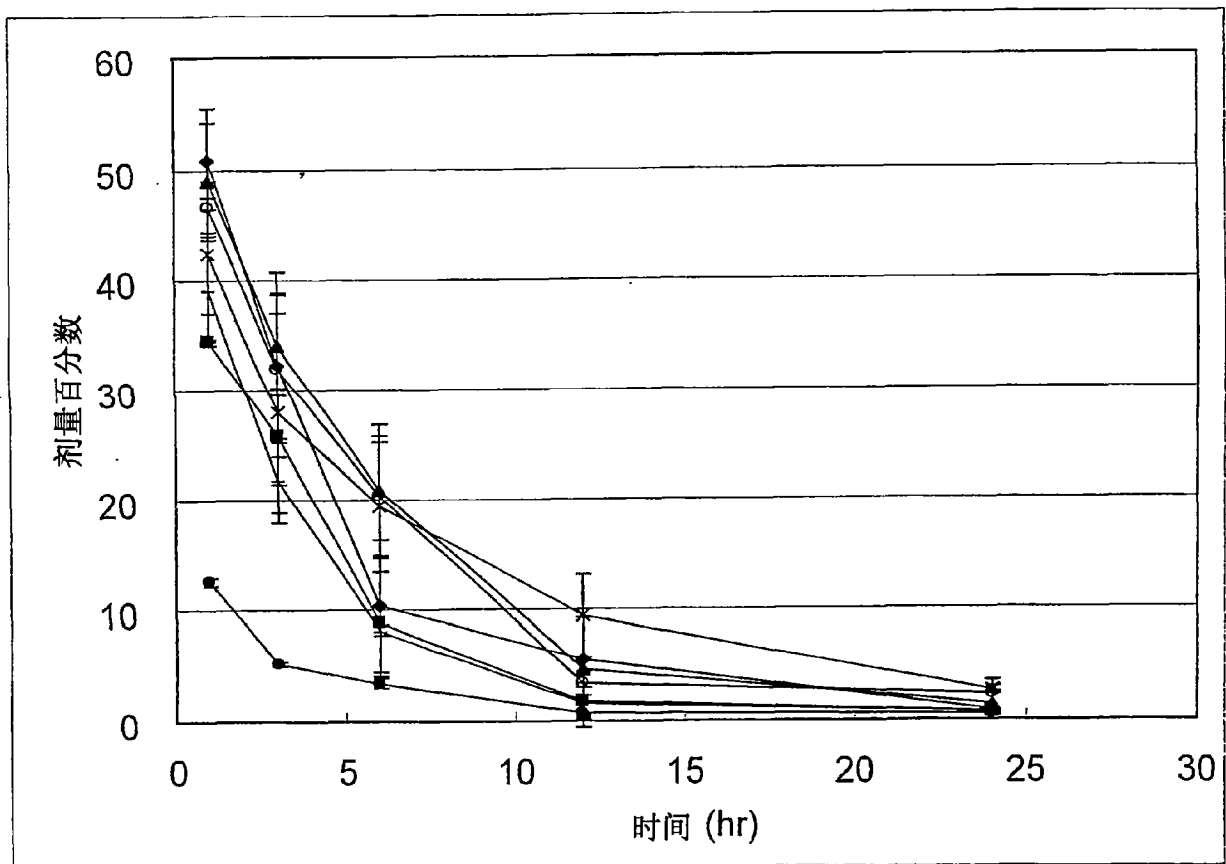


图13

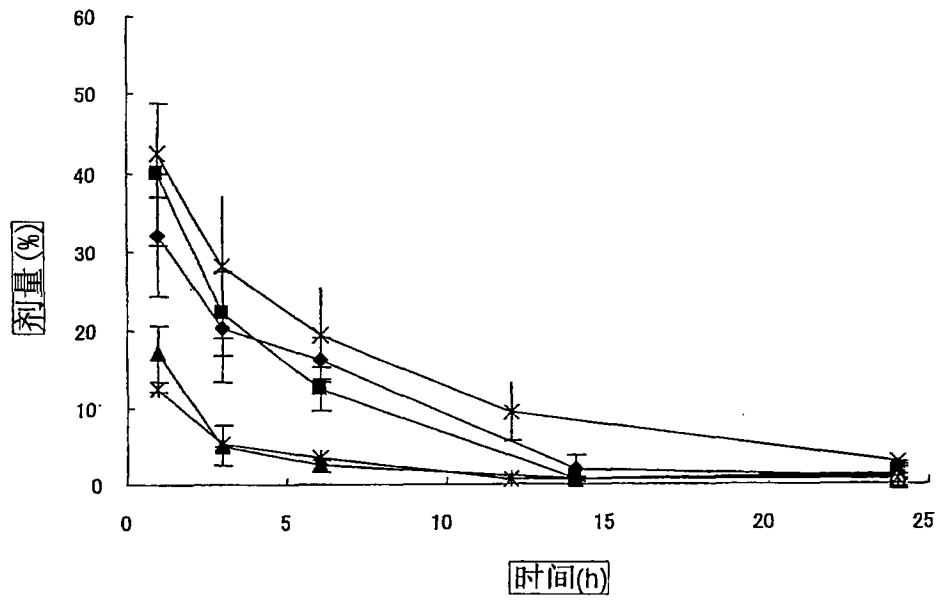


图14

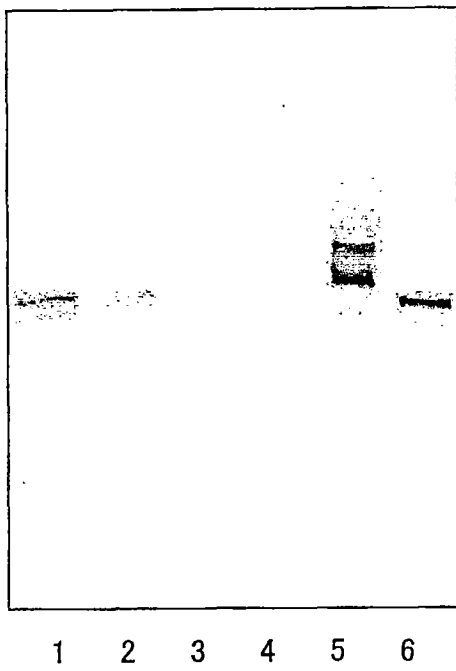


图15

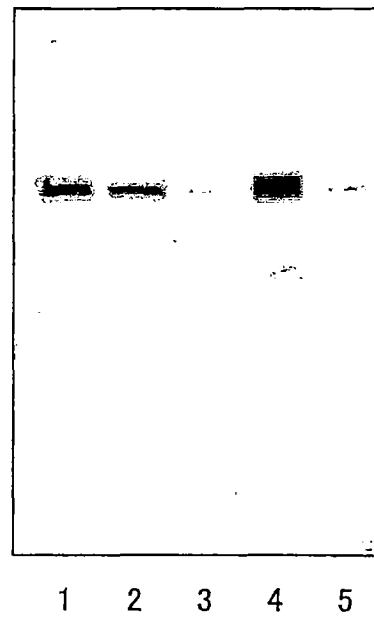


图16

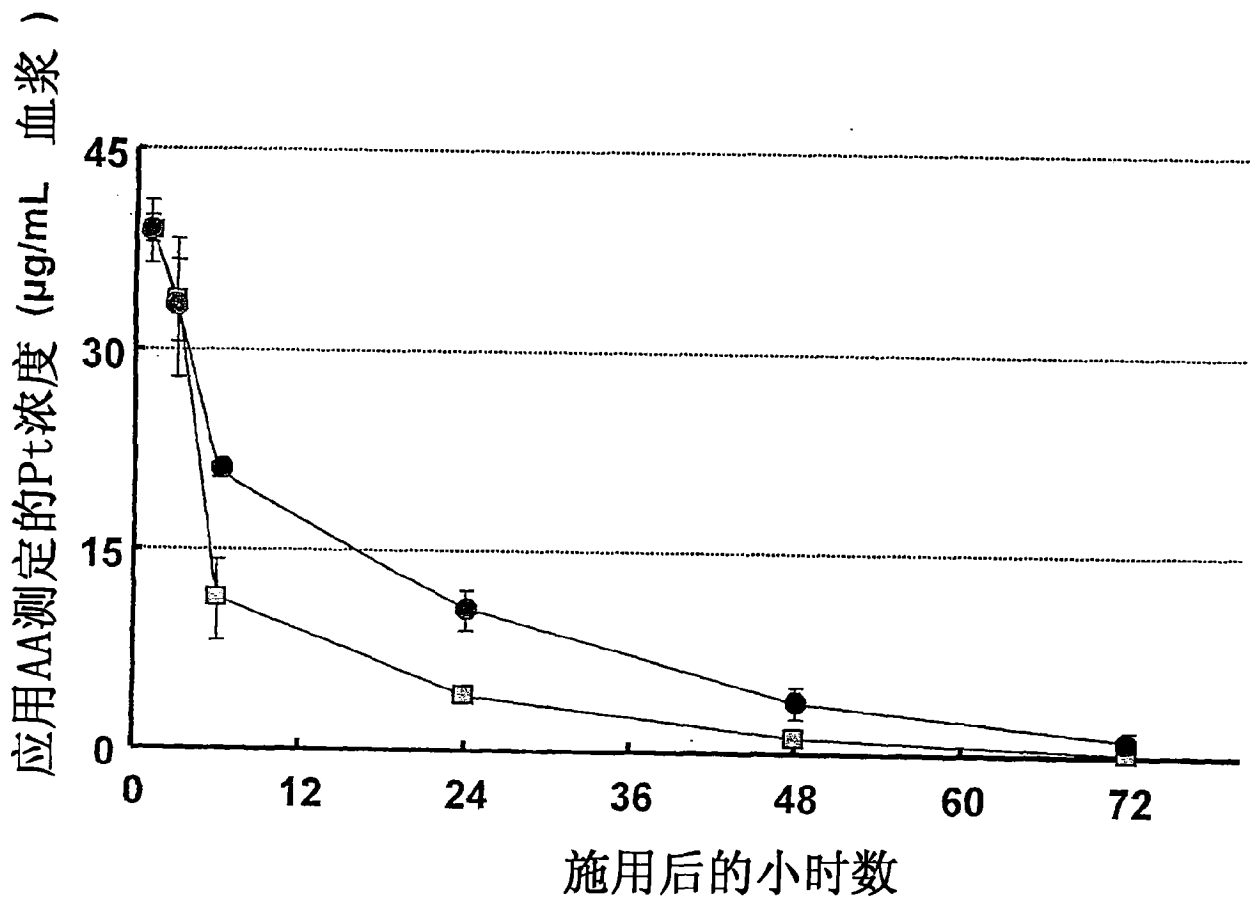


图17

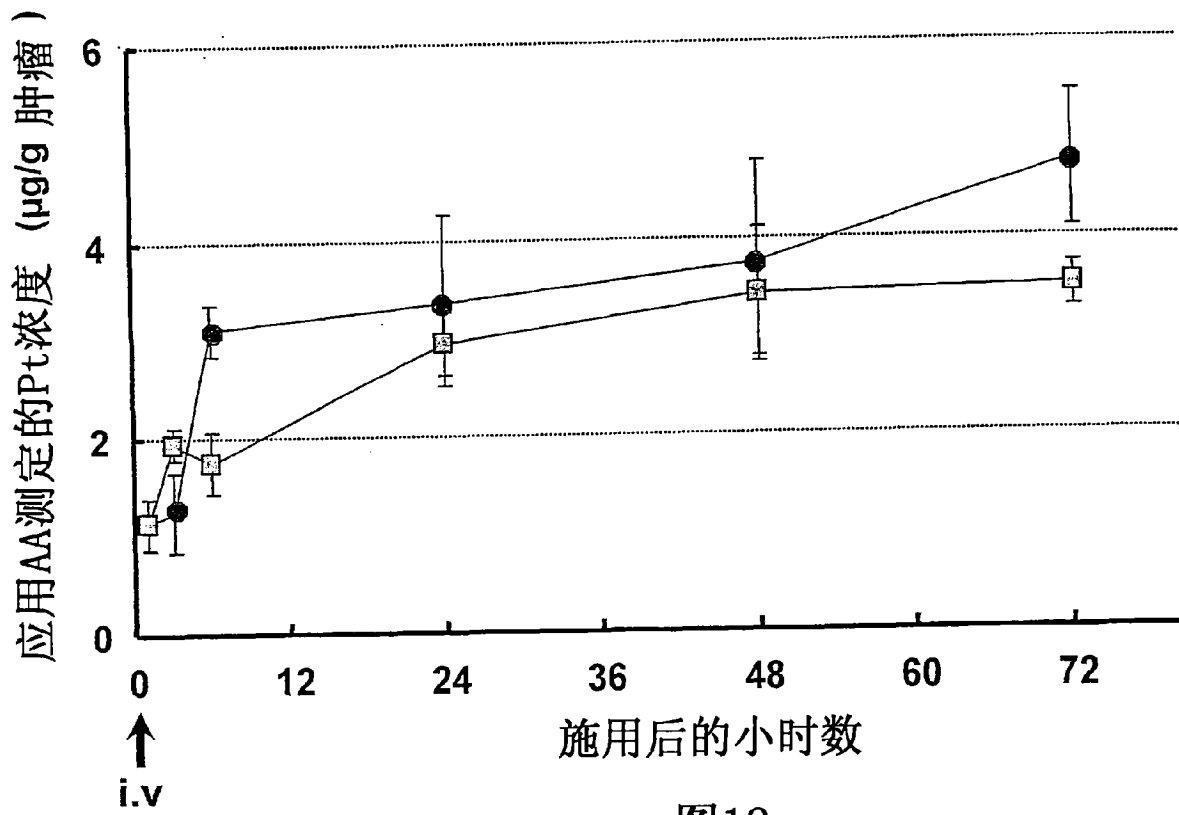


图18

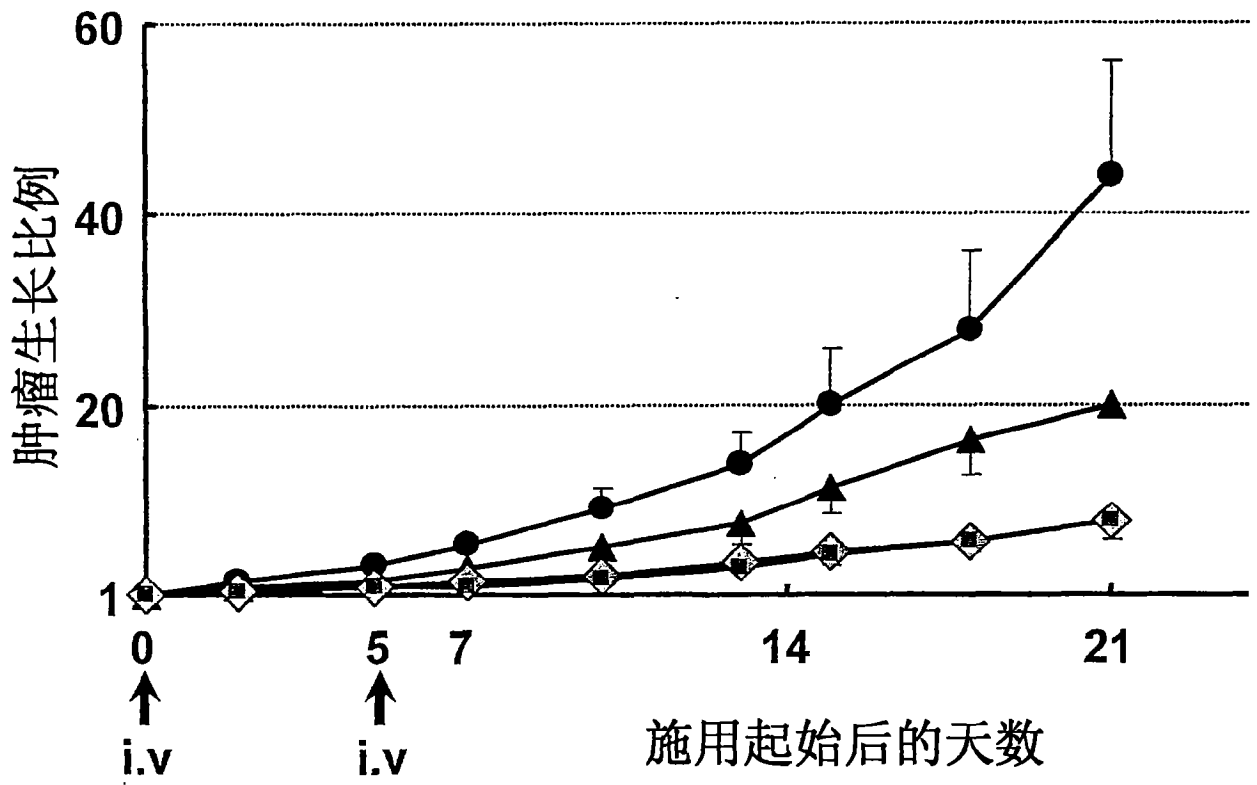


图19

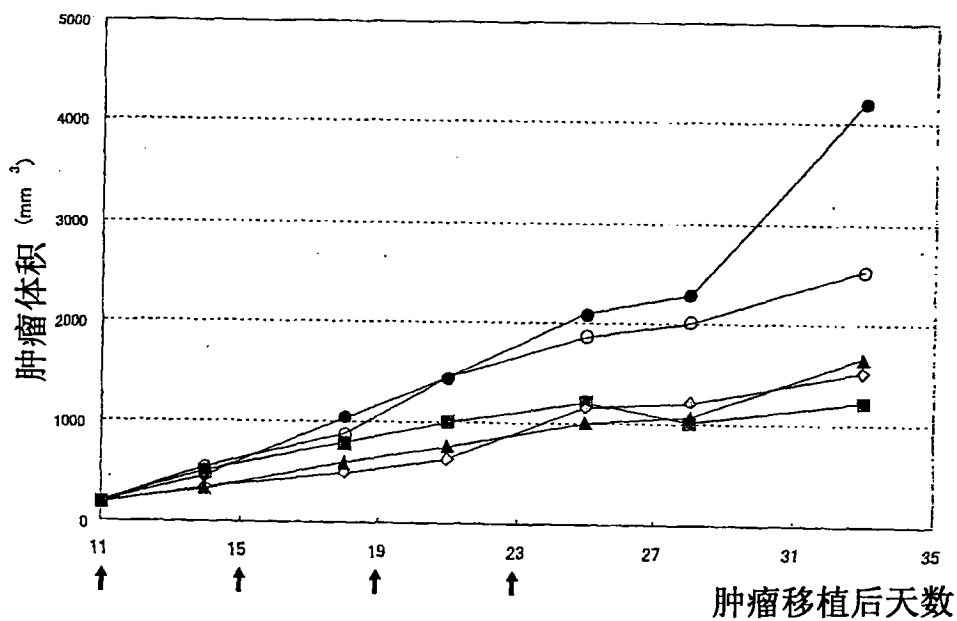


图20

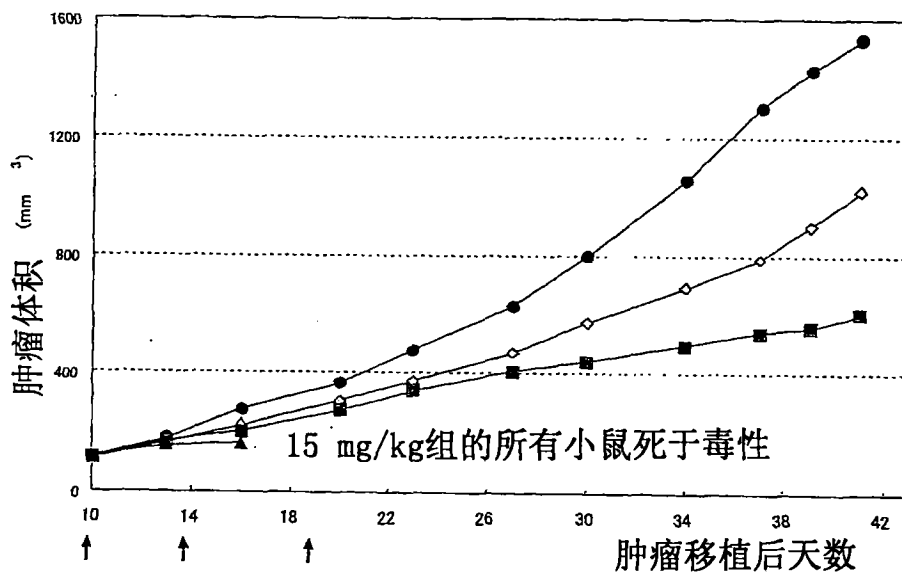


图21

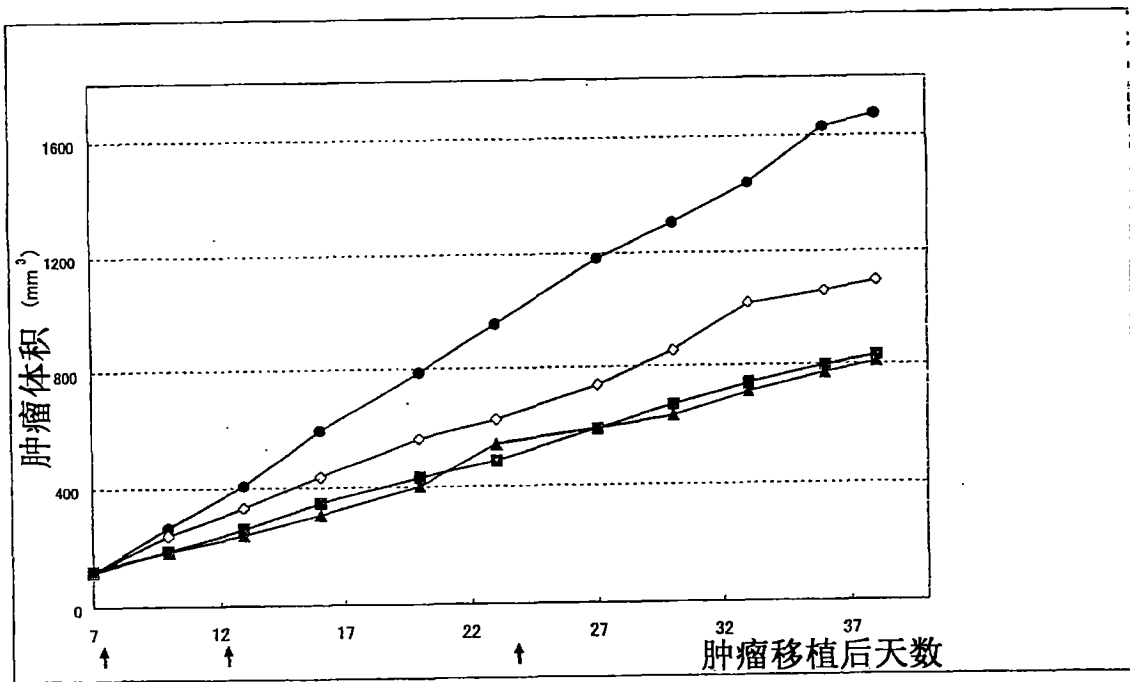


图22

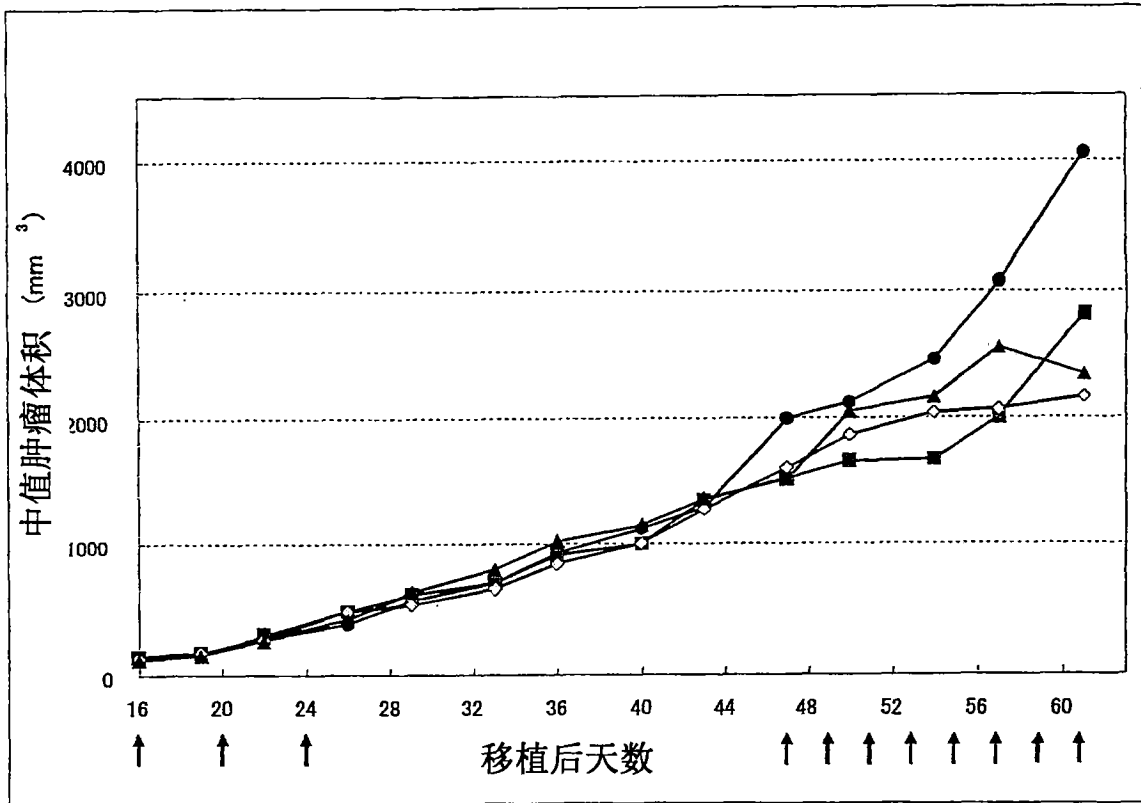


图23

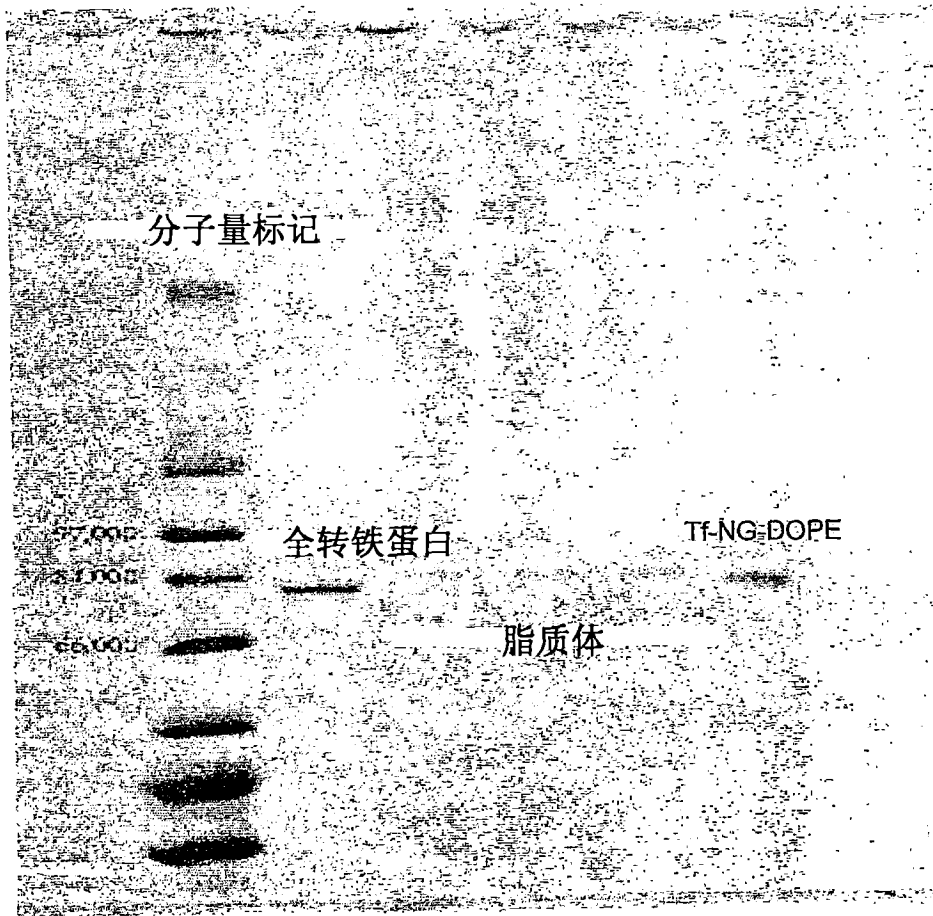


图24

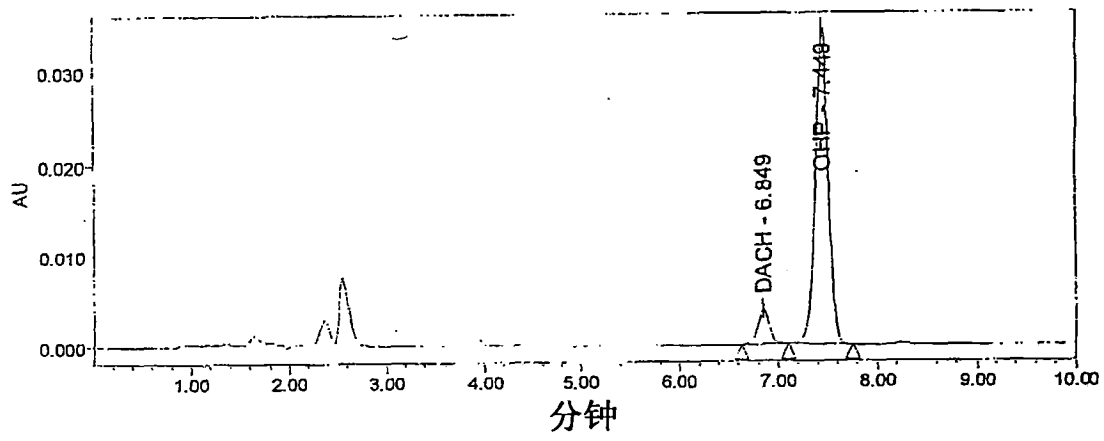


图25