



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 94194325.9

[43] 授权公告日 2003 年 5 月 21 日

[11] 授权公告号 CN 1108789C

[22] 申请日 1994.10.7 [21] 申请号 94194325.9
[30] 优先权
[32] 1993.10.7 [33] GB [31] 9320668.8
[86] 国际申请 PCT/GB94/02191 1994.10.7
[87] 国际公布 WO95/09610 英 1995.4.13
[85] 进入国家阶段日期 1996.5.29
[71] 专利权人 大不列颠及北爱尔兰联合王国国防大臣
地址 英国威尔特郡
[72] 发明人 G·格雷戈里埃蒂斯
S·G·安蒂米斯阿里斯
I·古尔塞尔
[56] 参考文献
US4396630 1983.04.02 A61K47/00
LIPOSME, A PRSCITICAL APPROACH, 1990 年第 1 版

1990-01-01 R,R,C, NEW 主编
审查员 张 伟
[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 罗 宏 谭明胜

权利要求书 4 页 说明书 19 页 附图 4 页

[54] 发明名称 包含颗粒性物质的脂质体

[57] 摘要

提供了一种用于形成直径 $0.1\ \mu\text{m}$ 至 $50\ \mu\text{m}$ 具有单层或多层结构并包含水不溶性或不溶解的颗粒性物质的脂质体的方法, 该方法包括 (a) 形成脂质体并基本上去除所有任何在其制备中使用的有机溶剂。(b) 冻干如此形成的该脂质体, 并随后 (c) 在与颗粒性物质紧密掺和中再水化它们。优选的被包被物质是颗粒性物质, 最优选具有对有机溶剂不稳定的生化或免疫活性的微生物, 植物或动物细胞或水不溶性结构物, 但使用本方法任何水不溶性颗粒均可被包被。例如微溶催化剂或药物也可被如此掺入, 从而提供向病人体内的缓慢释放, 而可避免包括在很多脂质体制备方案中的去垢剂的释放。

1. 一种用于形成直径为 $0.1-50\mu\text{m}$ 包含未溶的或不溶于水的具有生物学、化学或物理学活性物质颗粒的脂质体的方法，它包括 (a) 形成脂质体 (b) 冷冻干燥如此形成的脂质体和然后 (c) 将它们与将被包含在内的物质紧密掺合再水化。

2. 按照权利要求 1 的一种形成包含未溶解的或不溶于水的颗粒物质的单层脂质体的方法，包括 (a) 形成尺寸足够大以容纳将被包含在内的颗粒材料的单层脂质体，(b) 冻干如此形成的该脂质体并随后 (c) 在与颗粒物质紧密掺合再水化。

3. 按照权利要求 1 的一种形成包含未溶解的或不溶于水的颗粒物质的多层脂质体的方法，包括 (a) 形成直径小于将产生的多层脂质体的单层脂质体，(b) 在将要包含在内的物质存在时冻干如此形成的脂质体并随后 (c) 再水化该冻干的脂质体和物质。

4. 按照前面的权利要求的任何一项中要求的一种方法，其中基本所有任何在步骤 (a) 脂质体制备所用的有机溶剂在再水化前被去除。

5. 按照权利要求 1-3 的任何一项中所要求的方法，其中基本上所有任何的在步骤 (a) 脂质体制备中所用的有机溶剂在冻干步骤 (b) 前被去除。

6. 按照权利要求 1-3 的任何一项中所要求的方法，其中基本上不溶于水或未溶解的颗粒性物质包括具有对有机溶剂不稳定生物化学或免疫学活性的微生物、植物或动物细胞或不溶于水结构物。

7. 按照权利要求 1 或 2 中所要求的方法，其中脂质体是直径 $1\mu\text{m}$ 至 $30\mu\text{m}$ 的巨大脂质体。

8. 按照权利要求 1-3 的任何一项中所要求的方法，其中，将待包被的物质和脂质体早已紧密掺合来完成步骤 (b)。

9. 按照权利要求 1-3 的任何一项中所要求的方法，其中一种对抗水丢失效应的保护剂在再水化后被加至该脂质体产物中。

10. 按照权利要求 9 中所要求的方法，其中保护剂是海藻糖。

11. 按照权利要求 1-3 的任何一项中所要求的方法，其中步骤 (c) 的实施是通过控制所加水于小量以正好足以产生悬浮液，随后在几分钟的第一时期后加入相似数量的合适的缓冲液，此缓冲液与

被包被物质是生物学可接受的以保持该物质的期望活性，在几分钟的第二时期后如此获得的悬浮液与大量的缓冲液混合。

1 2. 按照权利要求 1 1 中所要求的方法，其中第一和第二时期分别是自 2 0 至 4 0 分钟。

5 1 3. 按照权利要求 1 1 中所要求的方法，其中所加的缓冲液是磷酸盐缓冲液，pH 大约 7. 4。

1 4. 按照权利要求 1 2 中所要求的方法，其中所加的缓冲液是磷酸盐缓冲液，pH 大约 7. 4。

10 1 5. 按照权利要求 1-3 中任何一项所要求的一种方法，其中该冻干步骤 (b) 的实施是通过冻干脂质体和将被包被物质的悬浮液，并且在再水化步骤 (c) 中加入的水和盐水的总体积是足以提供该悬浮液的体积的 1 至 1 0 倍。

1 6. 按照权利要求 1-3 中任何一项所要求的一种方法，其中步骤 (a) 中脂质体的形成包括一包括磷脂酰胆碱 (PC) 和 / 或二硬脂酰磷脂酰胆碱 (DSPC) 的脂质成分。

1 7. 按照权利要求 1 6 的方法，其中脂质成分进一步包括胆固醇、磷脂酰甘油 (PG) 和三油酸甘油酯 (TO) 的一个或多个。

20 1 8. 按照权利要求 1-3 中任何一项要求的一种方法，其中脂质体形成步骤 (a) 的实施的通过将一种脂质成份的氯仿溶液与蔗糖溶液混合以形成一种乳浊液，并将它与一种类似的醚水乳浊液混合以提供一种水包油包水的乳浊液，藉此可去除基本所有的有机溶剂，从而导致脂质体的形成。

25 1 9. 按照权利要求 1 至 3 中任何一项所要求的一种方法，其中被包含入脂质体内的物质包括一种活的微生物或植物或动物细胞，其特征在于在再水化步骤 (c) 后可通过脂质体壁向该微生物或细胞提供营养素以使它被培养并增殖。

2 0. 按照权利要求 1 9 中所要求的方法，其中该营养素用一种微生物或细胞代谢脂质体脂质能力的抑制剂来提供。

2 1. 按照权利要求 1 9 的一种方法，其中细胞是处于孢子形式。

30 2 2. 按照权利要求 2 0 的一种方法，其中细胞是处于孢子形式。

2 3. 一种用权利要求 1 至 2 2 中任一方法所获得的脂质体。

2 4. 一种根据权利要求 2 3 的脂质体，其特征在于它包含一个或

多个活或减毒具有有机溶剂不稳定生化或免疫活性的微生物、植物或动物细胞、或水不溶性结构物。

2 5. 一种根据权利要求 23 和 24 之一的脂质体, 其特征在于其含活或减毒的病毒、细胞和 / 或原虫。

5 2 6. 按照权利要求 23 或 24 之任一种脂质体, 其中活的或减毒的微生物选自麻疹、脊髓灰质炎病毒、百日咳杆菌、卡介菌和伤寒沙门氏菌。

2 7. 按照权利要求 25 的脂质体, 其中活的或减毒的微生物选自麻疹、脊髓灰质炎病毒、百日咳杆菌、卡介菌和伤寒沙门氏菌。

10 2 8. 一种权利要求 24 所要求的脂质体, 其中不溶于水的无生命的结构物包括携带支持物的细胞因子、酶、抗原或抗体。

2 9. 一种按照权利要求 23、24 任何一项中要求的脂质体, 其特征在于它进一步包括水溶性生化或免疫活性物质。

15 3 0. 一种按照权利要求 25 中要求的脂质体, 其特征在于它进一步包括水溶性生化或免疫活性物质。

3 1. 一种按照权利要求 26 中要求的脂质体, 其特征在于它进一步包括水溶性生化或免疫活性物质。

3 2. 一种按照权利要求 27 中要求的脂质体, 其特征在于它进一步包括水溶性生化或免疫活性物质。

20 3 3. 一种按照权利要求 28 中要求的脂质体, 其特征在于它进一步包括水溶性生化或免疫活性物质。

3 4. 一种脂质体制剂, 它包括按照权利要求 23-33 任何一项中要求的脂质体, 脂质体直径为 $0.1\mu\text{m}$ 至 $50\mu\text{m}$, 并且每 $6.3\mu\text{m}$ 平均脂质体直径范围每囊泡包含 3 个活的细菌孢子。

25 3 5. 一种脂质体制剂, 它包括按照权利要求 23-33 任何一项中要求的脂质体, 脂质体直径为 $0.1\mu\text{m}$ 至 $50\mu\text{m}$, 其中脂质体是多层的, 且存活的细胞孢子数是每 $3.2\mu\text{m}$ 平均脂质体直径范围有 6 个孢子。

30 3 6. 一种脂质体制剂, 它包括按照权利要求 23-33 任何一项中要求的脂质体, 脂质体直径为 $0.1\mu\text{m}$ 至 $50\mu\text{m}$, 其中脂质体是单层的且存活的细菌孢子数是每 $7.2\mu\text{m}$ 平均脂质体直径范围有 12 个孢子。

37. 一种组合物，它包括如权利要求 2 3 至 3 6 中任何一项所要求的一或多种脂质体或一种脂质体制剂和生理学上可接受载体。

包含颗粒性物质的脂质体

本发明涉及脂质体制剂，该制剂能用于向人或动物体施用对有机溶剂不稳定物质例如全活或减毒细胞。该制剂可通过提供以特定机体区域为目标的缓慢释放而用于运输不稳定生物活性物质。提供了生产该制剂的方法。

脂质体在疫苗制剂的施用中的用途已广为人知，且它们的佐剂活性已被对多种细菌、病毒、原虫、蛋白质和肽疫苗的免疫强化作用的大量研究所证实，参见综述：Gregoriadis G (1990) Immunol Today, 11, 89-97 和 Alving C R (1991) J Immunol Meth, 140, p 1-13。

所有这些研究均利用由产生具有亚微米平均直径囊泡的技术制作的脂质体完成（参见：Gregoriadis G (ed) (1993) Liposome Technology, 2nd Edition, Volumes I-III CRC Press, Boca Raton, 1993），此脂质体能容纳肽和蛋白质，但不能有效携带较大的疫苗。该较大的疫苗包括一些减毒的或死的病毒和细菌，如麻疹、脊髓灰质炎病毒、百日咳杆菌，卡介菌和伤寒沙门氏菌（参见 Minns C A et al (1993) Medical Microbiology, Chapter 36, Mosby）。

尽管其中多数疫苗具有高度的免疫原性，但在一些情况下将它们置于足够大的脂质体中施用为优选的选择。例如，就由可溶的和颗粒性（如：微生物的）抗原混合物组成的多价疫苗或而且含细胞因子的

疫苗配方而言，将所有物质通过共同的脂质体载体同时呈递给免疫活性细胞对抗原的免疫原性是有利于提高。而且，公知在水相中参入了抗原性物质的脂质体可防止抗原与它在已免疫动物体内抗体的反应及接着发生的变态反应或抗原中和反应（Gregoriadis and Allison (1974) FEBS lett. 45, 71-74）。由此可见，将脂质体用作疫苗施用载体，用于新生儿预防针对已存在母亲抗体的因子，例如麻疹，或用于疫苗杂质具超敏反应的个体均是有利的。

将颗粒性物质参入平均直径最多达 $9.2\mu\text{m}$ 的大脂质体中的方法是公知的，其中溶剂，如氯仿被制成含更小水滴的球状（参见Kim and Martin (1981) Biochimica et Biophysica Acta. 646, 1-9）。利用此技术一些物质被捕获，如：胶原蛋白、DNA 和细菌（唾液链球菌），但是注意到不稳定球状蛋白如血清白蛋白和血红蛋白不允许形成脂质体，推测可能是由于表面变性，以及发生了蛋白质变性。由于有机溶剂的损伤及细胞毒效应，此方法不适于对不稳定物质的包被，且当然不适于包被完整（活）或减毒的细菌、原虫、病毒或多细胞动物或植物细胞。

几年来已了解到在包被步骤中不利用有机溶剂将可溶性物质捕获入脂质体的方法（参见Kirby and Gregoriadis (1984) Liposome Technology, Vol I. Gregoriadis G (ed). CRC Press, Inc Boca Raton, FL. pp 19-28; Deamer and Uster (1983) Liposomes, Ostro M J (ed) Marcel Dekker, Inc, NY. pp 27-51; Deamer and Barchfield (1982) J Mol Evol 18, 203-206），且其基础是将预先形成的脂质体脱水脂质体，在可溶性物质存在下再水化的方法。在这些方法中随着脂质体的融合在一起可溶性物质和水进入导致材料被捕获入多层的脂质体中。所用脂质体在冻干前直径是40-80nm，且最

后多层产物囊泡的体积还要小些。这种体积和结构不适于包被微米尺寸和/或有生命物质，且由于进入囊泡的表面积相对较低，对可溶性药物的捕获水平不如单层脂质体高。同样的技术已被应用于小的旨在包被水溶液的单层脂质体。（见EP 0171710）。

上述方法是相对温和的且已被成功地用于包被不稳定溶质如Ⅷ因子（见Kirby and Gregoriadis (1984) *Biotechnology*. 2, 979-984）和破伤风类毒素（Gregoriadis et al (1987) *Vaccine*. Vol 5, p 145-151）。该方法依赖于当再水化时水进入形成脂质体时溶质进入脂质体。除此在溶质方面的工作之外，尚未提供一种方法包被完整的（活）或减毒的有机体，细胞或其它载有不稳定实体的不可溶结构，而不损伤它们；不管是细菌、原虫、病毒或其它。

此外，尚未提供方法将水不稳定可溶性物质包被入较大的脂质体中，不论单层或多层脂质体，从而可以以更大量的物质以特定组织为目标。

本发明者现已惊奇地发现脱水/再水化作用能够成功包装不可溶颗粒如完整的活或减毒的有机体、细胞、或具有有机溶剂不稳定活性的微观水不溶性结构，借此有机体将不被杀死，活性亦得以保持。本发明可生产微米尺寸的单层或多层的脂质体，（即 $0.1 \sim 50 \mu\text{m}$ 直径的脂质体），与先有技术的脂质体比较，能够捕获微米尺寸和/或有生命物质，且具有相对高的容纳能力的内囊泡，就单层巨大的脂质体而言此内在囊泡尺寸与它们外部直径相似。

特别令人惊奇的是（i）当微米尺寸的脂质体以此方式脱水然后再水化时，单层脂质体结构得到保持并可提供对可溶性物质更高的容纳能力以及保持以上描述的颗粒的能力。（ii）在形成包含不可溶或不溶解物质的多层脂质体所需的条件下，多层脂质体的直径是微米大

小而不是以前获得的40~80nm。

因此本发明第一方面是提供了制备直径大于0.1 μm 的脂质体的方法，优选直径大于1 μm ，且包含不溶解或不可溶颗粒性具生物学的、化学的或物理学活性的物质，包括（a）形成单层脂质体（b）冻干如此形成的脂质体然后（c）将它们同待包含在内的不溶解或不可溶物质在紧密掺合中再水化。

生产单层脂质体，步骤（a）中所制备的脂质体直径大于0.1 μm 用于步骤（b）。生产多层脂质体，脂质体的尺寸不必决定于步骤（a），而是由在步骤（b）中与脂质体优选冻干并在步骤（c）中预先再水化的不溶解或不可溶物质所决定。

就单层和多层脂质体两者而言，冻干步骤是优选在脂质体和被捕获物质的混合物中进行以及可以用已知的得到冻干脂质体的方法进行。再水化步骤优选被控制的，使被水进入囊泡产生的溶质浓度诱导的渗透压破坏的脂质体数目减至最小。

本发明的第二方面进一步提供了利用本发明第一方面中的方法生产脂质体。尤其提供了脂质体，其特征在于直径大于0.1 μm ，优选大于1 μm ，包含具生物学的、化学的和物理学活性的物质，此物质的活性在与有机溶剂接触时有可能被损害或破坏。

尤其优选的是在脂质体制备步骤（a）中所用的基本上所有的任何有机溶质在再水化步骤（c）之前被去除，而在冻干步骤（b）之前去除最为方便。

优选的颗粒性物质是具有有机溶剂不稳定生化或免疫活性的微生物，包括细菌、原虫和病毒，植物或动物细胞或水不溶性结构。然而必须提到利用此方法任何水不溶性颗粒都可能被包被。例如极少量可溶的催化剂或药物也可能被如此参入而得以缓慢释放入病人体内。然

而，由于预计有机溶剂不会对这些物质产生不利影响，此方法仅仅作作为可用于代替已知方法的一种选择；本方法的这一优选方面的主要优点在应用于对有机溶剂敏感微生物、细胞和物质，以及用多层脂质体产生增加的能力方面得以实现。

可用任何已知的方法形成脂质体的步骤（a），包括在其生产中牵涉溶剂使用的方法，因为它们除去了这些溶剂而留下了中空体；捕获后中空体形成溶液、微生物、细胞或不可溶结构将位于其中的囊泡。典型地，为生产单层脂质体，步骤（a）将包含一个制备适于包被在步骤（c）中所加物质的尺寸的所谓“巨大脂质体”；此方法与例如 Kim 和 Martin 上面所描述的那样是适宜的。最优选地这些脂质体是“微米”或“微米”大小的，即在本文中定义的直径从 $0.1\mu\text{m}$ 至 $50\mu\text{m}$ ，更优选 $1\mu\text{m}$ 至 $30\mu\text{m}$ 。为制备多层脂质体，将形成标准的脱水/再水化囊泡（DRVs）。

为达到最满意的包被率，冻干步骤（b）的步骤是用已与脂质体紧密掺合的待包被的物质进行的：以此方式可获得相对高的包被率，而当脂质体与待包被物质的混合不够紧密时，很可能不发生结合。当按照先有技术将溶液混合时情况不是如此。

步骤（c）可通过允许待包被物质进入脂质体的任何再水化方法完成。发现包括一步骤是便利的，即，将任何容易得到的形式的水，例如蒸馏或自来水或缓冲溶液形式，以被控制的方式加入脂质体和待包被物质的冻干混合物中。优选首先加蒸馏水以避免对脂质体结构的更进一步的渗透压。方便地加入足够小量的水制成一悬浮液，接着几分钟后，优选 20 至 40 分钟，例如 30 分钟后加入相似量的缓冲液，此缓冲液有利于允许被包被物质保持其期望的活性：一种此类合适的缓冲液是磷酸盐缓冲液（PBS）pH 7.4。再者，在此阶段优选缓冲液，

以在干燥步骤缓慢地再水化前平衡当物质存在时脂质体囊泡中形成的溶液的高渗透压。

再经一段时间，再次优选20至40分钟，优选大约30分钟后，优选将如此获得的悬浮液与较大体积缓冲液如PBS混合。脂质体被有代表性地从脂质体悬浮液冻干，且在再水化过程中所加水和盐水的总体积足以提供1至10倍于悬浮液的体积，尽管在此未提出特殊的限制。

再水化步骤可在适于被包被物质生存或保持其期望的活性的任何温度下进行。因此典型地可被选择0℃至60℃间高熔点脂质被用于脂质体且被包被物质具有抵抗力的任何温度。在应用有生命物质或蛋白质的地方，更通常选择0℃至40℃，优选10℃至30℃。然而应该认识到某些微生物和蛋白质可在更高的温度下处理。

为了最大限度地保持不稳定活性及贮存的脂质体的完整性，最好掺入冷冻保护剂以对抗冰冻及水份丢失的影响。优选在再水化步骤(c)被完成后将冷冻保持剂加入。此冷冻保护剂的典型是糖类及其衍生物，尤其是糖类例如海藻糖的(参见Grove and Grove in Liposome Technology (1993) V Vol I, pp 229-249, CRC Press Inc, Boca Raton)，关于利用它的技术为本领域工作人员所公知。

步骤(a)提供的预先形成的脂质体的组成也未被特别限定，但必须考虑到具有足够的保持待包被物质能力的脂质体的稳定形成。用于被称为“巨大脂质体”和DRVs形成的典型的脂质组分包括磷脂酰胆碱(PC)或二硬脂酰磷脂酰胆碱(distearoylphosphatidylcholine)(DSPC)，且这些可任意选择诸如胆固醇、磷脂酰甘油(PG)和/或三油酸甘油酯(TO)的成份补充。的其它本领域公知的提供脂质体稳定性或诱导囊泡形成成分或由此发展的成分也可被应用。

通过将这些成分的氯仿溶液与一蔗糖溶液相混合形成乳浊液，然后将此乳浊液与一类似的醚水乳浊液混合以得到水包油包水乳浊液，其中有机溶剂被去除以产生脂质体可方便地从此混合物形成巨大脂质体，通过将等克分子的PC 或DSPC和胆固醇溶解于氯仿中并旋转蒸发混合物直至在烧瓶壁上留下脂质薄层，可以方便地形成DRV。然后用2 ml 蒸馏水在4℃（对于PC）或60℃（对于DSPC）将此薄层破坏，接着用探头超声处理2分钟产生小单层囊泡（SUVs）。该悬浮液适于与待包被物质一起冻干，从而形成直径大于0.1 μm 的多层DRVs。

本发明的第3方面是提供了将本发明的脂质体从非捕获的微生物、细胞或水不溶性结构中分离的方法，其特征在于将二者的混合物置于密度梯度离心，移取梯度级分，收集含分离的脂质体的级分，通过常规方法将脂质体从此级分中分离出来；游离物质通常在较低的级分被收集而脂质体在上层级分。优选地梯度是0.4M至4 M的蔗糖梯度或包含相等密度范围或类似的糖的梯度。当需要从可溶性物质分离时，脂质体在缓冲液如PBS 中以大约600×g 离心，从而它们以沉淀颗粒形式被收集。

本发明的第4方面是，因而本发明的脂质体以这种形式提供，它们不含有非捕获形式的、它们所包含的不溶解的或不可溶的颗粒，此形式当然有利于应给剂量的确定。

如以上介绍段落所述，将一种以上的制剂同时呈递于病人的靶区域有时是有利的，而本发明提供了这样的有利条件，其中本发明的脂质体、制备它们的方法及将它们从非包被物质中分离出来的方法，都体现或迎合了水溶性制剂的处理的需要。因此利用本发明第2方面的方法生产的脂质体可包含活的或减毒的微生物、细胞和/或水不溶性结构，及水溶性因子、疫苗、抗体、抗原或酶。

因此当可溶性物质也被掺入时，本发明制备脂质体的方法将包括可溶性物质与不可溶性物质及与脂质体在再水化步骤，优选在冻干步骤，且自脂质体中分离非捕获物质的方法既利用密度梯度又利用缓冲液离心方法。

本发明的另一方面，依靠上述方面的独特优点，提供了新的脂质体其特征在于，它们含有具有有机溶剂不稳定生化或免疫活性的完整的活或减毒的微生物、植物或动物细胞，或水不溶性无生命结构物。后者包括死的生物体其保持对有机溶剂处理不稳定的期望的活性。本发明的脂质体可容易地被鉴定，因为其内容物能释放出来且能被证明具有被培养的能力及引出生化或免疫应答的活性。除细菌、原虫、细胞或病毒外，本发明的脂质体可包含无生命结构如细胞因子、酶、携带支持物如乳胶珠或其它聚合物支持体的抗原或抗体。

在该方面的一优选的形式，脂质体及因此它们囊泡的大约尺寸是直径从 $0.1\mu\text{m}$ 至 $50\mu\text{m}$ ，优选自 $1\mu\text{m}$ 至 $30\mu\text{m}$ ，方便地 $1\mu\text{m}$ 至 $14\mu\text{m}$ ，且方便地平均直径是 $5.5\mu\text{m}\pm 2.2$ ；而要求的囊泡尺寸必定由打算包被的溶液、微生物、细胞或水不溶性结构物的数量和尺寸决定。当提供一个方法将不稳定物质、尤其是微生物或不溶性结构物参入已形成的脂质体内而不杀死它们或使其失活或破坏脂质体的完整，就此而言脂质体最初形成所用的方法并不重要，而因此囊泡尺寸的变化是基本不受限制的。

本发明脂质体的用途允许特异性地以巨噬细胞、吞噬细胞和/或机体抗体产生细胞为目标，依靠以下事实，由于当优选的脂质体用胆固醇、PB或等价物质稳定时，基本上脂质体并不自发释放它们的颗粒内含物。因此颗粒性物质的结局趋向于被巨噬细胞或吞噬细胞处理，从而使免疫应答和相关的效应如细胞因子的效应增强。更进一步，颗

粒被脂质保护起来避免循环抗体、直至遇到巨噬细胞或吞噬细胞，这一事实保证了向免疫系统或抗体产生细胞的最大呈递。

现在将通过对下列图表、非限制性的实施例、和比较例的介绍来阐述本发明的脂质体及方法。根据这些本领域技术人员可容易地明白在本发明范围内的许多其它合适的脂质体及制备它们的方法。

巨大单层脂质体的形成

在这些实施例中，巨大脂质体预先形成，其平均直径为 $5.5 \pm 0.2 \mu\text{m}$ ，将它们与颗粒或可溶性物质混合并接着接受控制的再水化。

发现产生的脂质体保持它们的原有平均直径及直径范围并包含最多达所加材料的26.7%（平均值）。含颗粒的脂质体能够在海藻糖存在时被冻干。大多数（高达87%）的被捕获物质被回收至用盐水重构时形成的泡囊之内。

蛋磷脂酰胆碱（PC）、二硬脂酰磷脂酰胆碱（distearoyl phosphatidylcholine（DSPC））、胆固醇、经免疫纯化的破伤风类毒素及海藻糖的来源及等级已在别处被描述（Davis and Gregoriadis, 1987, Immunology, 61, 229-234）。磷脂酰甘油（PG）和三油酸甘油酯分别得自Lipid Product（Nuthill, Surrey）和Sigma Chemical Company（London）。死的枯草杆菌（*B. subtilis*）和卡介菌（BCG）分别由Dr. Bruce Jones（Public Health Laboratories Service, Porton Down, Salisbury, Wilts）和Dr J. L. Stanford（Dept of Medical Microbiology, UCL Medical School, London）馈赠，用 ^{125}I 的放射标记破伤风类毒素、枯草杆菌和BCG由以前所描述的方法完成（Kirby and Gregoriadis, 1984 同上）。将枯草杆菌用异硫氰酸荧光素（FITC）（Sigma）标记通过将枯草杆菌在含1 mg FITC的0.1M碳酸钠缓冲液（pH 9.0）中在4℃孵育24小时（Mann and

Fish. (1972) Meth. Enzymology. 26. 28-42)。所有其它试剂均是分析级的。

图

图 1：显示所加放射性或脂质对包含 ^{125}I 标记的枯草杆菌的巨大脂质体的蔗糖梯度离心梯度级分的%。通过如下描述的蔗糖梯度分离自未捕获的枯草杆菌中分离出脂质体捕获的枯草杆菌(A)及自加入的游离枯草杆菌中分离出空的脂质体(B)。对于下面比较例及实施例1所描述的两种技术制备的PS或DSCP脂质体，显示的 ^{125}I 放射性(○)和脂质(●)图例是典型的。值是用于分级分离的放射性或脂质的%。

图 2：显示本发明的脂质体中保留的枯草杆菌对在血浆中孵育时间的%。包含 ^{125}I 标记枯草杆菌的PC或DSPC脂质体与小鼠血浆(○)或PBS(●)在37℃孵育。在不同时间间隔样本在蔗糖梯度上被分级将游离的枯草杆菌自被捕获的中分离出来。且对于重复三次实验的值为用脂质体回收的放射性的%±SD。

图 3：显示在血浆存在下破伤风类毒素被本发明脂质体的保留。包含 ^{125}I 标记破伤风类毒素的PC或DSPC脂质体在血浆(○)或PBS(●)存在时于37℃孵育。在不同时间间隔样本在600×g离心将游离的类毒素自被捕获的中分离出来，来自重复三次实验的值为用脂质体回收的放射性的%±SD。

图 4：显示给小鼠肌内注射后破伤风类毒素和枯草杆菌的清除。于小鼠的后腿注射游离的(○)或脂质体捕获的(●) ^{125}I 标记的破伤风类毒素(A)或枯草杆菌(B)。动物在不同时间间隔被杀死并测定被截肢的腿中的放射性。每个值代表三只动物并由注射后立即回收的放射性的%±SD表达。

比较例：

在有机溶剂存在下包含疫苗的巨大脂质体的制备：

具有被捕获物质的巨大脂质体由改进的溶剂小球蒸发方法制备（Kim 和 Martin, 1981）。简言之，含 ^{125}I 标记的被包被物质（ $2 \times 10^3 - 10^4$ cpm，1 - 2 mg 破伤风类毒素和 1 ml 作为孢子的枯草杆菌）的 0.15M 蔗糖溶液 1 ml 通过涡旋 4 - 5 秒与 1 ml 含 PC 或 DSPC、Chol、PG 和 TO 的氯仿溶液（4 : 4 : 2 : 1 克分子比，9 μmols 总脂质）相混合。得到的氯仿包水乳浊液通过涡旋 15S 与由 0.5 ml 溶于二乙醚的如上脂质溶液及 2.5 ml 0.2M 蔗糖溶液制备的水包二乙醚乳浊液相混合。如此制成的水包油包水乳浊液被置于 250 ml 圆锥形烧瓶中且有有机溶剂通过氮气吹扫（flushing nitrogen）在 37°C 蒸发，而样本在一摇荡孵育器中温和振荡。产生的脂质体在 5 % 葡萄糖溶液上离心 $600 \times g$ ，5 分钟二次然后沉淀物于 0.1M 含 0.9% NaCl 的磷酸钠缓冲液，pH 7.4（PBS）中再悬浮。该最后步骤能将捕获的类毒素自未捕获的中分离出来。对于未捕获枯草杆菌（其与脂质体一起沉淀）的分离可用蔗糖梯度分级（见下面）。在某些实验中，FITC 标记的聚苯乙烯颗粒（直径 0.5 和 1 μm ，Polysciences）或 FITC 标记的枯草杆菌被如上捕获脂质体中，此脂质体用于荧光显微镜检查研究。

实施例 1：

用本发明的方法将活疫苗捕获入预先形成的巨大脂质体中：

在无有机溶剂时，为了将可能的不稳定颗粒物质捕获入巨大脂质体中，仅含有蔗糖的“空的”巨大脂质体依照上述比较例（具有 2 种制备，脂质总量是 36 μmols ）的描述来预先形成。并置于 5 % 葡萄糖溶液之上在台式离心机中以 $600 \times g$ 离心 5 分钟。沉淀的脂质体在含有 0.9% NaCl 的 1 ml，0.1M pH 7.4（PBS）磷酸钠缓冲液中再悬浮，

与 1 ml 被包被物质（芽孢的枯草杆菌、破伤风类毒素和芽孢的BCG）的溶液或悬浮液相混合，通过真空处理如前所描述（Gregoriadis et al, 1987, Kirby and Gregoriadis, 1984）那样被冻干。典型地，2 ml 于蒸馏水中的脂质体悬浮液与 2 ml 被捕获物质的悬浮液或溶液于一 50ml 园底烧瓶中或直径21mm 玻璃管中相混合，且该混合物通过在 cardice 和异丙醇的冻冰混合物中旋动而被急速冷冻成一薄层。冷冻后，制品被冻干。例如，在Hetosicc 冷冻干燥器中，于0.1 托真空 4 至 5 小时，或13Pa 过夜。

冻干物质通过于20℃添加0.1ml 蒸馏水开始再水化（包含“高熔解” DSPC 的脂质体于50° - 60℃的再水化在物质捕获百分数上无明显效果）。悬浮液被猛烈旋动并允许持续30 分钟。在连续添加0.1ml PBS 及 3 0 分钟后添加0.8ml PBS 后重复此过程。所有用以捕获的物质均为¹²⁵I 标记以估价吸收。在一项实验中，如上制备的含枯草杆菌的脂质体在0.25M（终浓度）海藻糖存在时被冻干并接着在PBS 中重建。

实施例 2：

含捕获物质的脂质体自未捕获物质中的分离。

自未捕获的物质中分离出捕获物质是通过蔗糖梯度离心（枯草杆菌和BCG：见下文）或600×g 离心 1 0 分钟接着二次PBC 洗涤的沉淀物于 1 ml PBS 中悬浮（破伤风类毒素）来完成。通过重形成囊泡保留的枯草杆菌由蔗糖梯度分级分离来评价。通过在甩平离心管中将 4 M 蔗糖溶液分层为 1 0 个稀释度（蔗糖含量0.4M至 4 M）来制备不连续的蔗糖梯度（Gregoriadis (1970) J. Biol chem 245, 5833-5837）。实施例 1 中有捕获的和未捕获的枯草杆菌或BCG 的制剂被放于梯度的顶部，然后于用一甩平的Dupont Combi Plus超速离心机中25,000rpm

离心1.5 小时。离心后，自梯度顶部移液出1 ml 级分并分析磷脂含量及在Wallac Minigamma 计数器中分析 ^{125}I 放射性。(Stewart, (1979) Anal. Biochem, 104, 10-14)。自蔗糖级分中分离脂质体通过将其用水或PBS 稀释来完成，例如：用足够的稀释剂补足离心桶的容量，然后，为移去未捕获的破伤风类毒素，于 $600\times g$ 离心10 分钟。

囊泡尺寸的测量 以巨大脂质体容积分布来描述，平均直径在Malvern Mastersizer 中测量。

光学显微镜学 包含FITC 标记枯草杆菌或聚苯乙烯颗粒的脂质体的光学显微镜研究用尼康显微镜和Leica 同焦点显微镜来完成，二种显微镜均以荧光光源装备。为了提高脂质体的显现，在脂质体制备时将油-红-O (oil-red-O) 加入脂质的氯仿溶液中将脂质体染色。

巨大脂质体在血浆中的稳定性 将包含放射标记的类毒素 (10^3 cpm; 0.1-0.2mg) 或枯草杆菌 ($3 \sim 5 \times 10^3$ cpm; 10^3 细菌) 并由本发明实施例1 和2 中的方法制备的PC 或DSPC 巨大脂质体 (3-5mg 总脂质) 与5 体积小鼠 (雄性, CDI 种) 血浆或PBC 混合，一式三份，于 37°C 温育。在不同时间间隔，移取样本。被脂质体捕获物质的保留通过蔗糖梯度分级分离 (枯草杆菌) 或 $600\times g$ 离心 (类毒素) 来确定。囊泡稳定性由被囊泡保留的最初捕获物质的百分数表达。

给小鼠肌肉注射后脂质体捕获的类毒素和枯草杆菌的清除 48只雄性CDI 小鼠 (体重20-25g) 被随机分为4 组，每组12 只动物并肌肉注射 (后腿) 0.1ml 的 (a) 游离放射标记的类毒素 (6×10^3 cpm; 0.01mg)，(b) 游离放射标记的枯草杆菌 (3×10^3 cpm, 10^3 从孢子形式的细菌)；(c) 如 (a) 中的类毒素被以实施例1 中的方

法捕获入DSPC 脂质体中 (1 mg 总脂质) : (d) 如 (b) 中的枯草杆菌被捕获入如 (c) 中的DSPC 脂质体中。的动物以 3 只为一组, 在注射后 (为测定零时的值) 及以后的不同时间间隔被处死并立即去除后腿, 测定分离的腿的 ^{125}I 且结果被要求作为在零时从组织中回收的放射性的百分数。

结果: 捕获研究 由于两种实体均在低速时沉淀, 枯草杆菌捕获入巨大脂质体的评价不能由离心来达到。完全的分离却是通过已描述的蔗糖梯度分离来获得。从离心后级分中测得的 ^{125}I 放射性 (枯草杆菌) 及磷脂 (脂质体) 值提示含细菌的PC 或DSPC 脂质体在梯度的上 10 个0.5ml 级分被回收, 而游离枯草杆菌沉淀至级分底部。

发现依照实施例的记录制备的 8 个不同的PC 和DSPC 制剂中囊泡的平均 (+SD) 直径为变异显著 ($5.5 \pm 2.2 \mu\text{m}$), 具1-14 μm 的低和高的直径范围 (所有制剂)。PC 和DSPC 脂质体平均直径间无统计学显著差异。细菌被吸附至空囊泡表面的可能性被忽略不计, 由于在梯度分级分离前此种脂质体与枯草杆菌孵育 22 小时导致了后者在级分底部的定量回收。在枯草杆菌存在于蔗糖梯度顶部 10 个级分的基础上 (与脂质体的磷脂同时出现于同一级分), 在利用Kim 和Martin 的方法的 12 个独立的实验中的枯草杆菌的捕获是可变的, 平均值为所用细菌的31.6%。然而尝试用同样的方法 (在有机溶剂存在时) 捕获破伤风类毒素是失败的, 可能因为在水-氯仿界面蛋白质变性及随后变性蛋白不能保持在水相。

本发现及关于对注定被捕获的其它蛋白质抗原、减毒或活微生物的类似损害或灭活的展望, 证明了本发明的方法及产品脂质体的进步。将预形成的脂质体与枯草杆菌、BCG 和破伤风类毒素冻干所得的粉末进行有控制的再水化, 导致形成平均直径 ($4.6 \pm 1.3 \mu\text{m}$ 和低和高范围

1-18 μm ，所有制备)与母体囊泡(见上面)相似的囊泡，该囊泡可变的但相当大的比率(所用物质的8.4至27.8%)包含枯草杆菌、BCG和类毒素。用本步骤或Kim和Martin的方法所获得的枯草杆菌捕获值无显著不同，与后者不同，当脂质体内容物被接种至培养板时，仍保留产生细菌生长的能力。

形态学研究 光学显微镜研究揭示几乎所有油-红-O(oil red-O)染色的巨大囊泡均包含不同数目的FITC(标记)的枯草杆菌，其在许多情况显示粘附于(或沉淀向)囊泡的内壁。用聚苯乙烯颗粒和乳脂颗粒(直径0.5 μm -1 μm)作为捕获于直径18 μm 脂质体中的颗粒性物质所做的实验得到相似的结果。那已完成的颗粒于脂质体中的定位已被同焦点显微镜进一步证明，该显微镜能使颗粒在囊泡之内的空间的不同“切面”上成像。

巨大脂质体在血浆中的稳定性 脂质体作为活或减毒微生物疫苗(单独或与可溶性抗原结合)的载体被成功地用于已免疫动物、具有母亲抗疫苗抗体的动物、或具抗疫苗杂质抗体的动物，的先决条件是在它们传递给抗原呈递细胞之前避免抗体和疫苗的相互反应。以前的工作(Gregoriadis and Allison 1974)证明当包含于多层脂质层中的蛋白质被静脉注射给已被该蛋白免疫的小鼠时，此类相互反应确实被避免了，然而被注射游离蛋白质的所有动物均死于过敏性休克，那些以被捕获蛋白质处理者存活下来，可能是由于抗原限制在双层中。同样地，将脂质体抗原(Gregoriadis and Allison, 1974)皮下注射给此类小鼠(足垫处)无Arthus反应发生。因此，值得注意的是由脱水-再水化制备的巨大脂质体在37℃小鼠血浆中是否仍保留被它捕获的细菌或破伤风类毒素内容物。

包含枯草杆菌的PC巨大脂质体保留其细菌内含物的80-90%于

小鼠血浆不至少 24 小时。因为大约 10% 的细菌在与血浆混合后很快游离，有可能这些细菌就相当于那些在捕获期被吸收至脂质体表面然后被血浆成份移开的细菌。这被暴露于 PBS 的脂质体保留其所有内含枯草杆菌的事实支持。枯草杆菌在血浆中至少 7 小时之内由 DSPC 脂质体的保留率更大 ($>95\%$)。进一步，保留值与在 PBS 中所见相比无显著差异，可能因为在其结构中含 DSPC 的脂质体双层将更为坚硬因此对颗粒吸附更为抵抗。与差不多数量的枯草杆菌的 (直径 $0.8\mu\text{m}$) 保留形成对照，于血浆中巨大脂质体显示逐渐丢失有效数量或其类毒素内容物，且在 PC (48%) 比 DSPC 脂质体 (38%，24 小时值) 丢失更为显著。

在肌肉注射后巨大脂质体在体内的稳定性 肌肉注射于小鼠后破伤风类毒素和枯草杆菌被巨大脂质体保留的程度不能被直接测定，例如通过测定肌肉组织中释放的和脂质体捕获的物质。然而，可推测游离的和脂质体捕获的破伤风类毒素和枯草杆菌自组织中清除率的比较能提供有关脂质体将其内含物保留于原位的程度的指标。与用同法给药的类毒素 (27%) 相比，更多的 (注射后在组织中立即测得的内容物的 67%) 通过脂质体给药的破伤风类毒素在注射 10 小时后在组织中被回收。该两类毒素配方 (捕获的和游离的) 清除率的显著不同提示多数的脂质体类毒素被保留在囊泡中原位。

从脂质体类毒素清除率缓慢中看来脂质体是逐渐地去稳定以释放类毒素，此类毒素然后自组织中以游离状态清除。然而一些囊泡，尤其尺寸较小者，也可能被动至淋巴管。另一方面游离的和脂质体的枯草杆菌的清除率最初是相似的，且假定包含枯草杆菌或类毒素的脂质体在局部环境以相同程度去稳定 (和释放其内容物)，在前 5 小时脂质体枯草杆菌的缓慢清除 (与脂质体类毒素相比) 可能由于对游离细

菌相似的缓慢清除。不过，注射后 2-4 小时两种枯草杆菌制剂在组织水平的显著不同表明脂质体在被注射组织中保持很大程度的稳定性。

已证明通过利用本发明可避免应用对活或减毒微生物有害的有机溶剂以及在配方中存在去污剂使配方在用于体内时产生的毒性。用本步骤制备的脂质体（在与外环境隔离状态）在血浆中保持其大部分的细菌或可溶性抗原内含物并在体内相当大得以保留。因此，脂质体不仅可作为微生物疫苗的免疫佐剂，在需要时与共同捕获的可溶性抗原或细胞因子连接，还可作为活或减毒微生物疫苗的载体，用于需要避免疫苗与母系抗体间或预先形成的对疫苗杂质的抗体的相互反应的情况。

更进一步，本发明允许微生物或细胞捕获入脂质体中，接着将这些处于捕获状态的微生物或细胞培养以提高活性物质的“剂量”，而不必完善捕获步骤。例如，仅需要少量的细胞在再水化步骤时被捕获，然后可通过脂质体壁向这些细胞提供营养物。优选使用脂质代谢的抑制剂，以便使它们增殖从而使脂质体囊泡装载更多的期望物质。一旦达到了合适的负荷，脂质体将被冻干以贮存，在用之前再水化。

本发明多层脂质体的形成

实施例 3

活的孢子和其它物质被捕获于多层 DRV 脂质体中

由 PC 或 DSPC 与等摩尔的胆固醇（ $18\ \mu\text{mols}$ 磷脂）组成的小单层囊泡依据 Kirby and Gregoriadis (1984) 中所描述的制备，磷脂和胆固醇被溶于氯仿中，然后将它们旋转蒸发直至在烧瓶壁上留下一薄脂质层。该层用 2 ml 蒸发水于 4°C (PC) 或 60°C (DSPC) 打破，并接着被探头超声处理 2 分钟以产生 SUVs 于悬浮液中。该悬浮液与 2 ml ^{125}I 标记活孢子 (10^7)、 $100-150\ \mu\text{g}$ ^{125}I 标记类毒素或放射性

标记的孢子与未标记类毒素的混合物相混合并冻干过夜。此冻干物质与0.1ml 水在适宜的温度（如实施例2）完全混合，并允许放置30分钟。以0.1ml PBS 重复该步骤并于30分钟后以0.8ml PBS补充该悬浮液。最终悬浮液进行蔗糖梯度分级分离将已捕获孢子从未捕获的中分离出来，或该最终悬浮液于90,000×g 离心20分钟2次将游离类毒素从已捕获的中分离出来。未标记类毒素用荧光胺方法测定。

（Anderson and Desnick (1979) J. Biol. Chem. 254, 6924）。

结果：尽管先前发现这种泡囊的尺寸相对较小，孢子捕获是意外地高（63.6~78%）。PC-DRVs 的平均尺寸是3.6 μm 而DSPC-DRVs 则为直径3.2 μm。

孢子存活性：

包含枯草杆菌孢子的巨大或DRV 脂质体通过以三硝基甲苯X-100 处理释出孢子来测定孢子存活性。孢子被连续地稀释于营养肉汤中然后铺于营养琼脂平板上来测定总菌落计数、存活性计数及每个囊泡生存孢子的平均数。结果显示于下面表1 其中克隆数已给出。

测定的经每种试剂处理后无产生的菌落数十分显著地大于用完整脂质体观察到的克隆数，于完整脂质体中的孢子应仅形成一个单菌落。该表表明，能在每个囊泡中发现至多20个孢子，而孢子数与所用磷脂间无明显联系。被捕获孢子数与囊泡大小间存在正相关。

在6种不同的巨大脂质体制剂中，应用最小直径的囊泡获得最低的孢子数而应用最大直径的囊泡获得最高的孢子数。然而，用DRV 脂质体它们的较小尺寸并不反映低的孢子数中。

表 1 . 每囊泡中活枯草杆菌孢子的测定平均数				
类型	菌落数		每囊泡的孢子	囊泡大小
方法	三硝基甲苯	对照组		μm
巨大 PC A	96	29	3	6.3
巨大 DSPC A	162	38	4	6.5
巨大 PC B	203	10	20	8.4
巨大 DSPC B	250	21	12	7.2
巨大 PC B	160	12	13	8.0
巨大 DSPC B	109	15	7	6.4
DRV PC	320	44	7	3.6
DRV DSPC	189	31	6	3.2

枯草杆菌孢子通过比较例 (A)、实施例 1 (B)、或 DRV 脂质体被捕获入巨大脂质体中, PC 和 DSPC 二种脂质均被用于制作各自的类型。每个囊泡孢子的测定通过三硝基甲苯处理过的菌落数除以对照组的数来完成。三硝基甲苯组数与自囊泡中释出的活孢子数相等。对照组数与囊泡数相等, 因为捕获的孢子仅产生一个克隆。已证明有机溶剂 (方法 A) 对孢子的毒性作用, 该作用在生长的细菌增强。

图.1A.

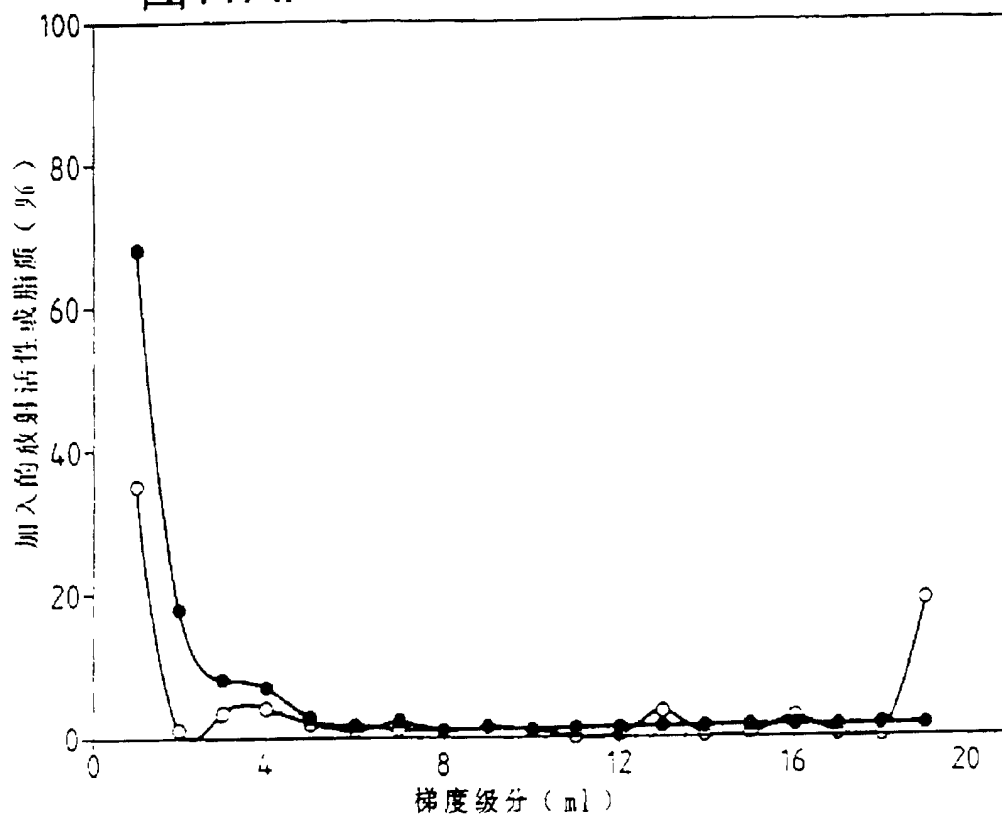


图.1B.

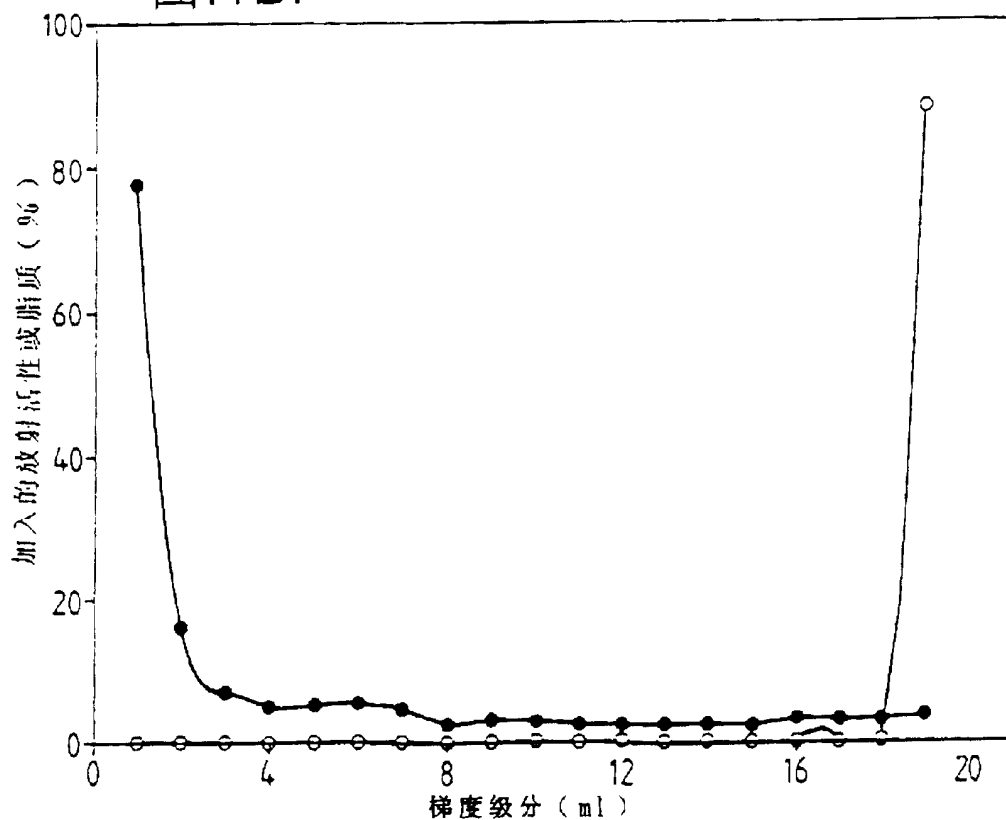


图 .2A.

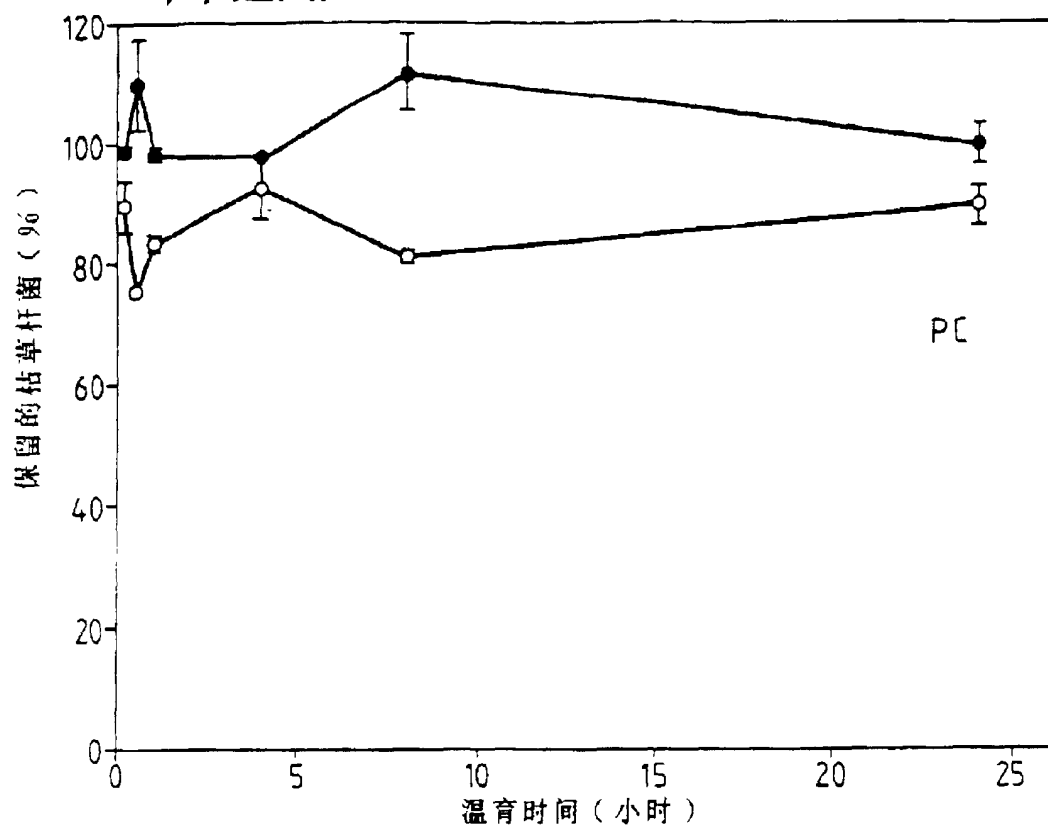


图 .2B.

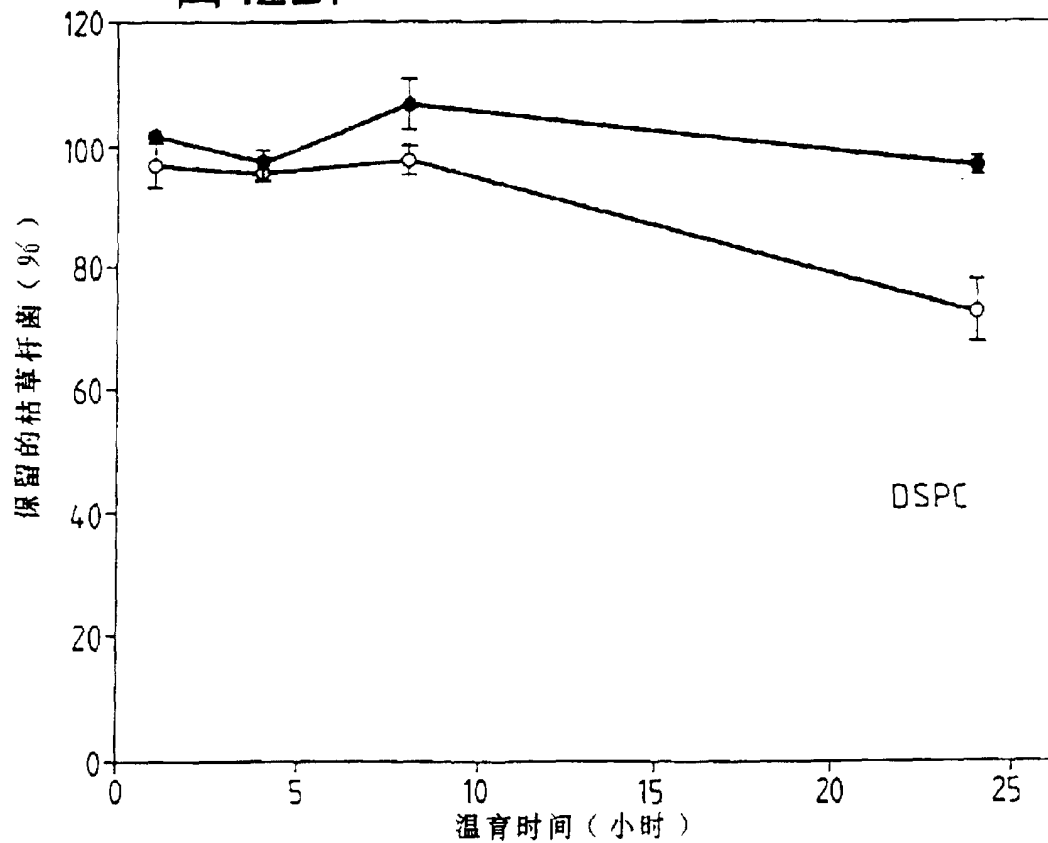


图.3A.

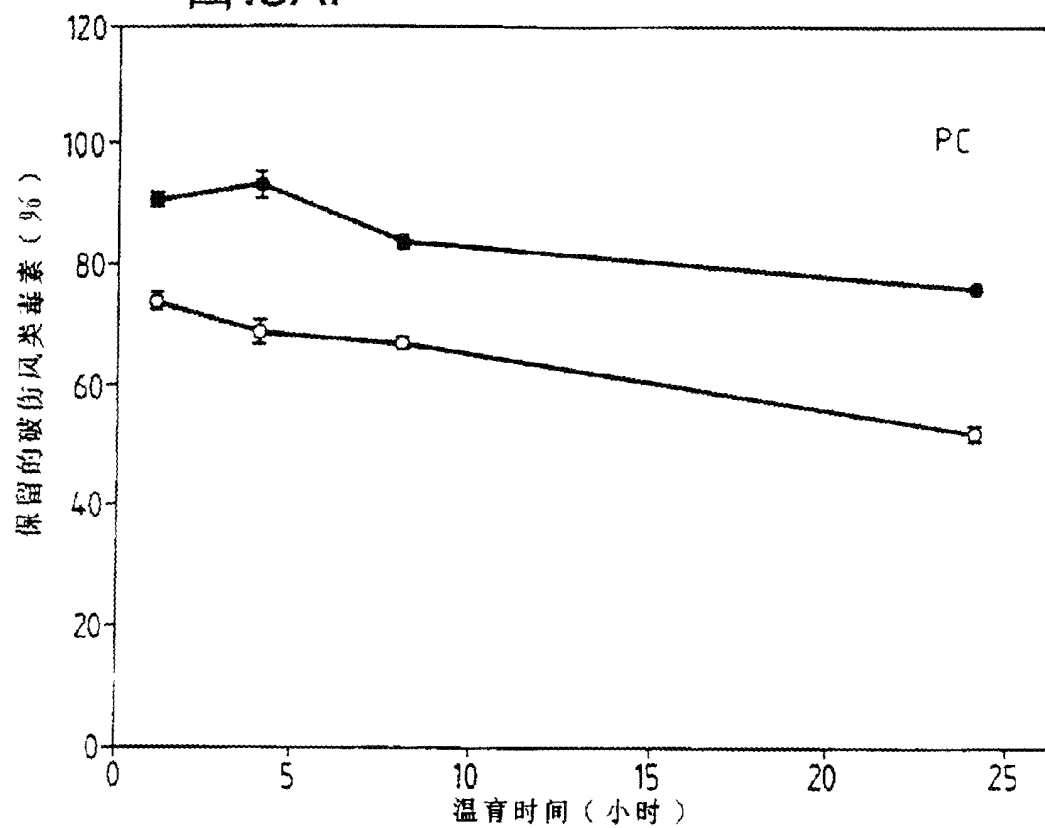


图.3B.

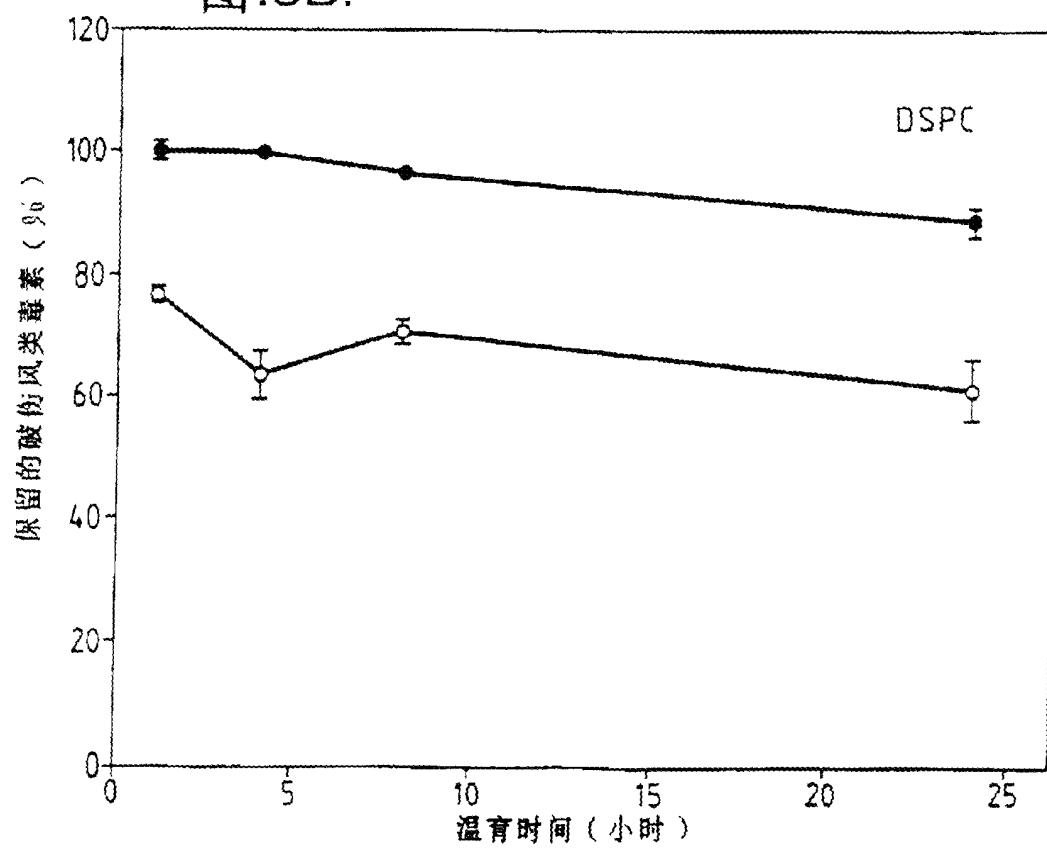


图.4A.

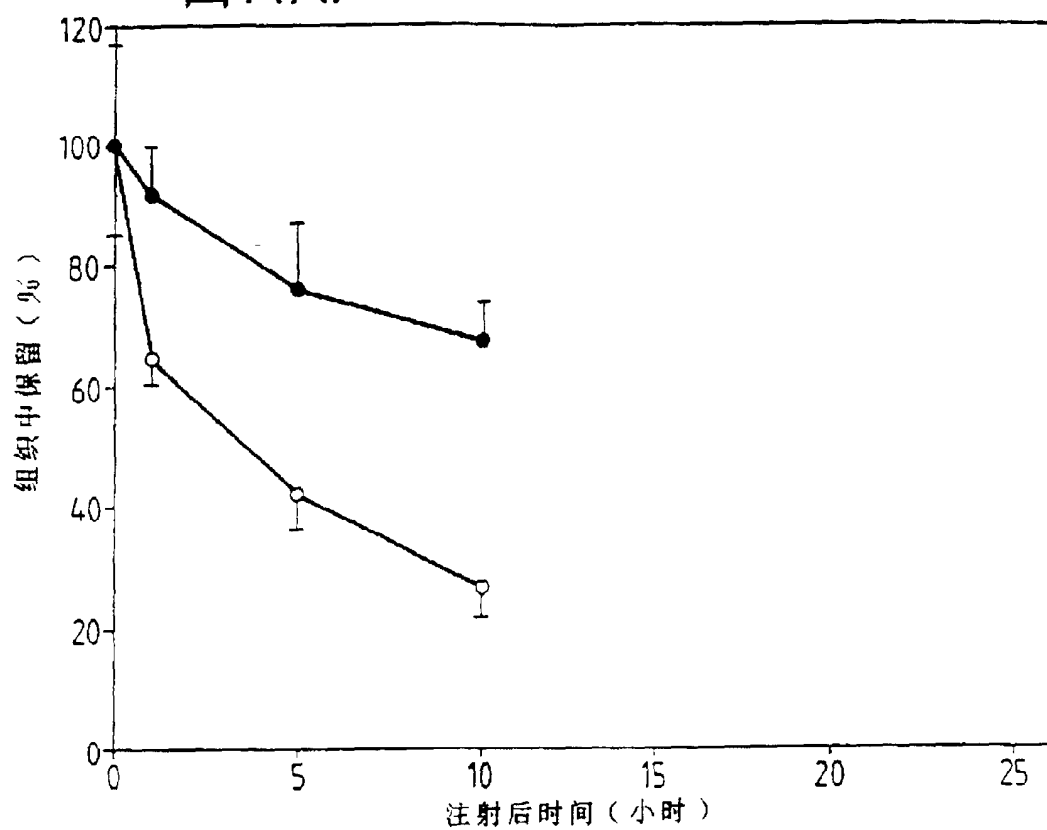


图.4B.

