[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610106262.1

[51] Int. Cl.
C07C 271/28 (2006.01)
C07D 233/54 (2006.01)
C07H 5/06 (2006.01)
A61K 47/00 (2006.01)
A61K 47/16 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 2 月 21 日

[11] 公开号 CN 1915968A

[22] 申请日 2000.10.10
[21] 申请号 200610106262.1
分案原申请号 00813919.9
[30] 优先权
[32] 1999.10.8 [33] US [31] 60/158,693
[71] 申请人 阿尔萨公司
地址 美国加利福尼亚
[72] 发明人 黄士焜 S·扎里皮斯克 张伟明
金 蓓 Y·P·曲因

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所
代理人 唐晓峰

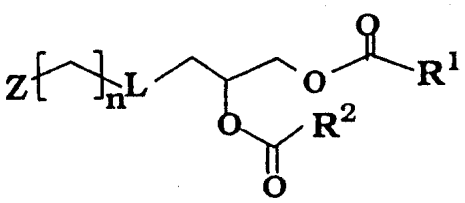
权利要求书 2 页 说明书 16 页 附图 7 页

[54] 发明名称

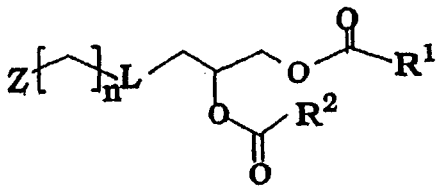
用于核酸及药物传递的中性－阳离子类脂

[57] 摘要

公开了式(I)代表的类脂，其中每一 R^1 和 R^2 为具有约 8－24 碳原子的烷基或链烯基链；n = 1－20；L 选自(i)－X－(C=O)－Y－CH2－，(ii)－X－(C=O)－，(iii)－X－CH_2－，其中 X 和 Y 独立选自氧、NH 和直接键；和 Z 为 pK 值约 4.0－7.4 的弱碱性基团。



1.一种具有下式结构的类脂



其中每一 R^1和 R^2为具有 8-24 碳原子的烷基或链烯基链并且 R^1和 R^2每一个独立地选择;

n=1-20;

L 选自 NH-(C=O)-O, (C=O), 和 NH-(C=O); 和

Z 为 pK4.0-7.4 的弱碱性基团,且选自咪唑基,芳香胺,或氨基糖。

2. 如权利要求 1 的类脂, 包括 1-80 摩尔%的类脂。

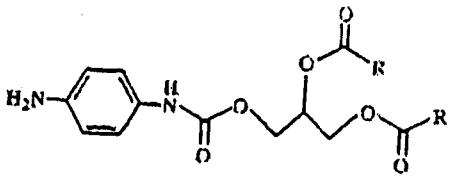
3. 如权利要求 1 的类脂, 其中每一 R^1和 R^2为具有 8-24 碳原子的无支链烷基或链烯基链。

4. 如权利要求 1 的类脂, 其中每一 R^1和 R^2为 $C_{17}H_{35}$。

5. 如前述任一权利要求的类脂, 其中 Z 为 pK 值从 5.0 到 6.5 的基团。

6. 如权利要求 1-4 中任一项的类脂, 其中 n 为 1-10。

7. 如权利要求 1 的类脂, 其具有下式结构:



。

8.一种脂质体组合物, 包括前述任一权利要求的类脂。

9. 如权利要求 8 的组合物, 包括 1-80 摩尔%的类脂。

10. 如权利要求 8 或 9 的组合物, 还包括包封于脂质体中的治疗剂。

11. 如权利要求 10 的组合物，其中治疗剂为核酸，和/或蛋白质或蛋白质片段。

12. 如权利要求 11 的组合物，其中核酸选自 DNA、RNA 和它们的补体。

13. 如权利要求 8-12 中任一项的组合物，还包括可使脂质体靶向靶点的配体。

14. 如权利要求 13 的组合物，其中所述配体是对肿瘤内皮细胞具有结合亲合力的配体并且被所述细胞内化。

15. 如权利要求 14 的组合物，其中配体选自 E-选择蛋白、Her-2、和 FGF。

16. 如权利要求 13 的组合物，其中脂质体还包括 5-20 摩尔％的经亲水性聚合物链衍生化的成囊类脂。

17. 如权利要求 16 的组合物，其中亲水性聚合物链为聚乙二醇。

18. 权利要求16的脂质体组合物用于生产将治疗剂转运给患者的药物中的用途。

用于核酸及药物传递的中性-阳离子类脂

发明领域

本发明涉及含有 pH 敏感基团(moiety)的类脂，所述类脂在生理 pH 下基本是中性的，而在低于生理 pH 的条件下主要带正电荷。本发明还涉及用上述类脂制备的脂质体组合物。

发明背景

许多治疗都要涉及生物活性物质向细胞内的传递。这类治疗包括：供给细胞具有必需生物活性的蛋白质，向细胞提供核酸(即 DNA、RNA、cDNA)分子(基因治疗)，使受治疗者对异质蛋白免疫(接种疫苗)，通过引入编码蛋白质的基因使受治疗者对异质蛋白免疫(基因疫苗接种)，和通过向细胞提供反义核酸分子即互补(complimentary)mRNA 编码蛋白、或者通过其他干涉 mRNA 编码蛋白的方式而抑制蛋白质的生成。

但是，向细胞内运送这类物质有许多障碍，这包括大多数细胞外膜所含的磷脂双分子层对物质进入细胞普遍具有阻碍作用。某些将活性物质引入细胞的方法包括如显微注射和电穿孔。其他方法包括病毒载体和化学介导引入。

已有技术中描述的向细胞内运送活性物质的方法包括以脂质体为基础的传递。特别是对采用脂质体向细胞内运送遗传性物进行了广泛的研究。脂质体载体一般通过胞饮作用被细胞摄取，并进入溶酶体降解途径。因此，某些研究朝着避免脂质体降解的方向努力。其中一种方法是采用含有 pH 敏感类脂例如棕榈酰高半胱氨酸的脂质体(Connor 等，*Proc. Natl. Acad. Sci.* (USA) 81: 1715 (1984)；Chu 和 Szoka，*J. Liposome Res.*，4(1): 361 (1994))。此类 pH 敏感类脂在中性 pH 下荷负电荷，并可稳定地结合到脂质体的类脂双分子层中。然而，该类脂在弱酸性 pH 条件下(pH 低于约 6.8)变成中性，并且足以改变结构

而使脂质体双分子层不稳定。这种结合于脂质体中的类脂，在进入 pH 约 5.0-6.0 的胞内体后，可使脂质体不稳定并促使脂质体释放内容物。

已有广泛报道采用以阳离子类脂为类脂双分子层组分的脂质体，来运送荷负电生物分子例如低聚核酸和基因片段，这类磷脂例如含有正电荷铵或锍离子头基的糖脂衍生物。类脂中的荷正电头基与荷负电细胞表面作用，可促进生物分子与细胞接触并进入细胞中。

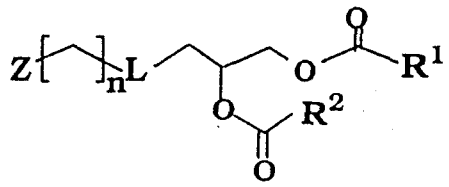
虽然针对生物分子例如低聚核酸和其他物质的传递进行了许多研究，但是本领域依然缺乏可有效地向细胞内运送生物分子的技术。本发明提供可改善向细胞内传递试剂例如核酸的组合物和方法。

发明概述

本发明提供用于向细胞内传递试剂的脂质体组合物。

本发明还提供用于制备向细胞内传递试剂的脂质体组合物的类脂。

一方面，本发明脂质体组合物含有下式所代表的类脂：



其中每一 R^1 和 R^2 为具有约 8-24 碳原子的烷基或链烯基链；n=1-20；L 选自 (i)-X-(C=O)-Y-CH_2-，(ii)-X-(C=O)-，(iii)-X-CH_2-，其中 X 和 Y 独立选自氧、NH 和直接键；和 Z 为 pK 约 4.0-7.4 的弱碱性基团。

在一个特定实施方案中，X 为 NH 和 Y 为氧。在其他实施方案中，L 为氨基甲酸酯键(NH-(C=O)-O-CH_2)、酯键或羧酸酯键。在一个优选实施方案中，Z 为咪唑。优选地，R^1 和 R^2 为具有约 8-24 碳原子的无支链烷基或链烯基链，和在一个优选实施方案中，每一 R^1 和 R^2 为硬脂酰基($C_{17}H_{35}$)。在另一优选实施方案中，n 为 1-10。

在一个实施方案中，脂质体包括约 1-80 摩尔 % 的上述通式所示类

脂。

在另一实施方案中，Z 为 pK 约 5.0-6.5 的基团。

在一个优选实施方案中，含有上述通式所示类脂的脂质体包括包封于脂质体中的治疗化合物。在一个实施方案中，所述治疗剂为核酸，例如 DNA、RNA 及其片段。所述脂质体还可包括靶向脂质体到靶点的配体，例如对内皮肿瘤细胞具有亲合力的配体，它可被该种细胞例如 E-选择蛋白、Her-2 和 FGF 内化。

在另一实施方案中，脂质体包括约 5-20 摩尔％用亲水性聚合物链衍生化的成囊类脂。在一个优选实施方案中，所述亲水性聚合物为聚乙二醇(PEG)。

附图简述

图 1 为制备含有氨基甲酸酯键和咪唑 Z 基团的类脂的合成路线图；

图 2A-2D 为制备 pH 敏感类脂的合成反应路线图；

图 3A-3D 为 pH 敏感类脂的各种结构；

图 4 为脂质体制备介质的 pH 值对 zeta 电位(mV)作图，其中本发明类脂(空心三角形)、阳离子类脂(实心菱形)和中性类脂(实心正方形)；

图 5 为对采用本发明 pH-敏感类脂制备的包封有 DNA 的脂质体进行凝胶电泳分析的显微照片。其中脂质体暴露于 DNase I 下 30 分钟(第 1 条)；采用本发明 pH-敏感类脂制备的包封有 DNA 的脂质体暴露于 DNase I 下(第 2 条)；DNA 暴露于 DNase I 下 30 分钟(第 3 条)；DNA(第 4 条)；和 1 kB DNA 梯标准 (第 5 条)；和

图 6A-6D 为采用本发明 pH-敏感类脂制备的带有靶向抗体的脂质体体外转染人肺癌细胞的显微图像照片。所述脂质体包有编码绿荧光蛋白的质粒，其中图 6A 为荧光显微镜下观察到的转染细胞，图 6B 为光学显微镜下观察到的转染细胞。图 6C-6D 为细胞经不含靶向抗体的相同脂质体转染后的显微照片，其中图 6C 和图 6D 分别为荧光显微镜下和光学显微镜下观察到的与脂质体温育后的细胞 。

发明详述

I. 在对本发明的描述中，将采用具有以下定义的术语。

在此所用的“核酸”，指任意长度线性聚合形式的核酸，包括核糖核酸或脱氧核酸，和包括双链和单链的 DNA 和 RNA。核酸中可包括来源于天然来源(例如微生物)、或者借助于重组或合成技术制备的编码和非编码区。核酸分子可相当于核酸片段，或者是除了一种或多种其他核酸、寡核酸或多核酸以外的核酸片段。例如，本发明核酸分子可以是载体或质粒，例如表达或克隆用的载体或质粒。

在此所用的“中性”指所述类脂不带电荷即不具备离子特性。

“荷电”指所述类脂带电荷即具备离子特性。

“成囊类脂”指具有疏水性和极性头基的两亲性类脂，它可在水中自发形成双分子层如磷脂囊泡，或者它可与类脂双分子层稳定结合，其疏水性部分与双层膜的内部疏水区接触，而其极性头基与双层膜的外部极性表面接触。这种成囊类脂的极性头基典型地包括一个或两个疏水性酰基烃链或甾体基团，并可含有化学反应基团例如胺、酸、酯、醛或醇。此类类脂包括磷脂，其中两个烃链典型地约长 14-22 碳原子，并且具有不同的饱和度，例如磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酸(PA)、磷脂酰肌醇(PI)和鞘磷脂(SM)。“成囊类脂”也包括糖脂，例如脑苷脂和神经节苷脂，和甾醇例如胆固醇。

“烷基”指含有碳和氢的完全饱和一价基团，可以是支链或直链。烷基的示例如甲基、乙基、正丁基、叔丁基、正庚基和异丙基。“低级烷基”指具有 1-6 个碳原子的烷基，其示例为甲基、乙基、正丁基、i-丁基、叔丁基、异戊基、正戊和异戊基。

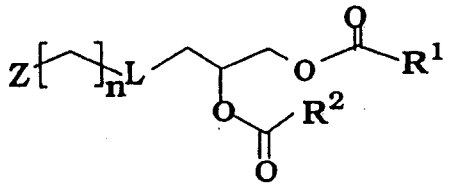
"链烯基”指含有碳和氢的一价基团，可以是支链或直链，含有一个或多个双键。

缩略语：PEG/聚乙二醇；mPEG/甲氧基封端的聚乙二醇；Chol/胆固醇；PC/磷脂酰胆碱；PHPC/部分氢化的磷脂酰胆碱；PHEPC/部分氢

化的蛋黄磷脂酰胆碱；HSPC/氢化大豆磷脂酰胆碱；DSPE/二硬脂酰磷脂酰乙醇；APD/1-氨基-2,3-丙二醇；DTPA/二亚乙基四胺五乙酸；Bn/苄基。

II. 阳离子-中性类脂

本发明一方面包括下式所示结构的类脂：



其中每一 R^1 和 R^2 为具有约 8-24 碳原子的烷基或链烯基链；n=1-20，在一个优选实施方案中 n=1-10；L 选自 (i)-X-(C=O)-Y-CH_2-，(ii)-X-(C=O)-，(iii)-X-CH_2-，其中 X 和 Y 独立选自氧、NH 和直接键；和 Z 为 pK 约 4.0-7.4 的弱碱性基团。

弱碱性基团 Z 使所述类脂在生理 pH7.4 条件下主要(例如至少 50%量)是中性的，但是在某些特定 pH 下，其 pH 低于生理 pH 并趋向于荷正电。例如，在一个实施方案中，Z 为 pK 约 6.0 的咪唑基。该基团在生理 pH7.4 下基本是中性的，而在 pH 低于 6.0 的条件下主要带正电荷。如下所述，将制备具有咪唑基的类脂，并将其用于脂质体的制备。

其他适宜的 Z 基团包括：例如芳胺、苯胺、氨基糖，示例类脂结构将在后面描述。

在另一实施方案中，Z 的 pK 约 4.5-7.0、更优选约 4.8-6.5 和最优选约 5.0-6.0。

本发明类脂的 Z 基团与尾部之间连接有中性键 L。L 键可以不同，但是在一个实施方案中，它选自氨基甲酸酯、酯、酰胺、羧酸酯、脲、胺和醚。在一个优选制备的类脂，采用了氨基甲酸酯键，其中 L 为 -X-(C=O)-Y-CH_2-，X 为 NH 和 Y 为氧。

在类脂的尾基部分，每一 R^1 和 R^2 可相同或不同。R^1 和 R^2 为具有约 8-24 碳原子的无支链烷基或链烯基链。优选地，R^1 和 R^2 的长度约为

12-22 个碳原子，例如 $R^1 = R^2 = C_{17}H_{35}$(即硬脂酰基团)，和 $R^1 = R^2 = C_{17}H_{33}$(即油酰基团)。

可采用标准合成方法制备本发明类脂。制备如上述结构的类脂，其中 Z 为咪唑，N=2，L 为氨基甲酸酯，和 $R^1 = R^2 = C_{17}H_{35}$。图 1 为制备该类脂的反应路线。实施例 1 中描述了合成的全部细节。简单地说，1,2-二硬脂酰基-sn-甘油(化合物 I)与氯甲酸对硝基苯酯(化合物 II)反应生成的 1,2-二硬脂酰基甘油的对硝基苯基碳酸酯(化合物 III)，与组胺(化合物 IV)反应，得到类脂(化合物 VI)，其中咪唑基团通过氨基甲酸酯键与二硬脂酰尾基连接。用甘油代替 1-氨基-2,3-丙二醇，也可用来制备碳酸酯连接的产物(L=-O-(C=O)-O-CH_2-或-O-(C=O)-CH_2-)。

按照在此所示的指导和实施例，本领域技术人员可容易地制备具有其他连接键的类脂。其他连接键包括：例如醚键(L= O-CH_2-)和酯键(L=-O-(C=O)-)、酰胺键、脲和胺键(即 L=-NH(C=O)-NH-、-NH-(C=O)-CH_2-、-NH-(C=O)-NH-CH_2-或-NH-CH_2-)。也可制备具有酮键的类脂，其中 L 为直接键。图 2A-2B 分别为醚连接类脂(图 2A)和酯连接类脂(图 2B)的示意图。在图 2A 中，组胺的端基胺与缩水甘油氯化物反应，水解得到的环氧化物并酰化所得二醇。

在图 2B 中，制备酯连接的类脂(L=-O-(C=O)-或-O-(C=O)-CH_2-)，例如，可采用组胺与甘油酸丙酮化合物(2,2-二甲基-1, 3-二氧戊环-4-羧酸)或其四碳同系物 2,2-二甲基-1,3-二氧戊环-4-乙酸的活化衍生物反应，然后对所得二醇进行脱保护和酰化处理。

图 2C 和 2D 为制备本发明 pH 敏感类脂的另一反应示意图。

图 3A-3D 为不同结构的 pH 敏感类脂，其中图 3A-3B 表示“Z”基团为芳胺的类脂。图 3C-3D 为连接有氨基糖的类脂。

III. 脂质体组合物

A. 脂质体成分

采用各种技术例如 Szoka 等在 Ann. Rev. Biophys. Bioena., 9:

467(1980)中所描述的技术，可制备含有上述类脂的脂质体，下面将详述脂质体的特定制备示例。典型地，所述脂质体为多层囊泡(MLVs)，它可采用简单的类脂膜水合技术制得。在该方法中，将脂质体形成类脂的混合物溶于适宜的有机溶剂中，所述溶剂可蒸发并在容器壁上形成薄膜。然后用水性介质覆盖形成的类脂膜，水合成典型粒径约为0.1-10μm的MLVs，。

本发明制备的脂质体包括例如含有约1-80摩尔%上述结构类脂的脂质体。在一个优选实施方案中，脂质体含有约5-50摩尔%的所述类脂。其他脂质体形成类脂还包括各种成囊类脂，即可在水中自发形成双分子层囊泡的类脂，例如磷脂。这类成囊类脂优选具有两个烃链、典型地为酰基链，和极性或非极性头基。许多合成的成囊类脂和天然成囊类脂具有烃链，它们典型的长度约12-22个碳原子并具有不同的不饱和度，其中包括磷脂，例如磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰甘油、 磷脂酰丝氨酸、磷脂酸、磷脂酰肌醇和鞘磷脂。

本发明脂质体还包括可稳定地掺入脂质体类脂双层的类脂，例如二酰甘油、溶血磷脂、脂肪酸、糖脂、 脑苷脂和甾醇例如胆固醇。

在一个实施方案中，本发明脂质体包括亲水性聚合物链包衣表面。在此所用的“包衣表面”指亲水性聚合物包被于脂质体的表面。亲水性聚合物链通过与一种或多种成囊类脂进行衍生化反应而掺入脂质体组合物中。这种包衣的脂质体在现有技术例如US5,013,556中已有描述。与未包衣脂质体相比，采用亲水性聚合物链进行表面包衣的脂质体可有效地延长其体内血液循环时间。

适于用亲水性聚合物衍生化的成囊类脂包括上述任何一种类脂，特别是磷脂，例如二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE)。

适于与成囊类脂进行衍生化的亲水性聚合物包括：聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯基甲醚、聚甲基 唑啉(oxazoline)、聚乙基oxazoline、聚羟丙基 oxazoline、聚羟丙基甲基丙烯酰胺、聚甲基丙烯酰胺、聚二甲基丙烯酰胺、聚甲基丙烯酸羟丙基酯、聚丙烯酸羟乙基酯、羟甲基纤维素、羟乙基纤维素、聚乙二醇、聚天冬酰胺(polyaspartamide)

和亲水性肽序列。这些聚合物可用作均聚物或嵌段或无规共聚物。

亲水性聚合物链优选为聚乙二醇(PEG)，其分子量优选约500-10,000道尔顿、更优选约1,000-5,000道尔顿。亲水性聚合物也优选为甲氧基或乙氧基-封端的PEG类似物。这些聚合物有不同大小如约120-20,000道尔顿的市售产品。

这类用亲水性聚合物衍生化制备的成囊类脂已有描述，例如US5,395,619和Zalipsky的隐形脂质体,(D. Lasic和F. Martin编辑，CRC出版社，第9章(1995))。

这种包衣脂质体优选含有约1-20摩尔%的衍生化类脂和其他脂质体形成组分，例如成囊类脂。制备衍生化类脂和形成包衣聚合物脂质体的示例方法，可参见共同拥有的US5,013,556、5,631,018和5,395,619中的描述。亲水性聚合物可稳定地连接到类脂上，或者通过不稳定键连接到类脂上，该键可使脂质体在血流中循环时或在应激刺激时脱落掉聚合物链包衣。

脂质体也可包括包封的试剂，其中的术语“包封”指将试剂包封于脂质体的水性内核和水性空间内，也包括将试剂包封于脂质体的类脂双分子层中。

许多试剂可用于本发明组合物，例如包括治疗或诊断用试剂。采用标准方法，可将这些选定的治疗或诊断用试剂掺入脂质体中，所述方法包括：(i)用含有试剂的水性溶液水合类脂膜，被动包封水溶性化合物；(ii)水合含有试剂的类脂膜，被动包封脂溶性化合物；和(iii)跨脂质体内/外的pH梯度而负载离子化药物。其他适宜的制备方法包括反相蒸发法。

在一个优选实施方案中，脂质体所包含的核酸选自各种含DNA和RNA的核酸，包括片段即截断(truncations)、突变及其类似物。现有技术中对用于不同病症治疗的许多基因作了描述，用于特定基因的编码序列和/或ORFs可很容易从DNA数据库如GenBank或EMBL中找到。例如，已有描述多核酸可用于病毒、恶性、和炎性疾病和病症，例如囊性纤维化、腺苷脱氨酶缺乏和AIDS的治疗。恶性肿瘤的治疗可考虑

给予肿瘤抑制基因例如 APC、DPC4、NF-1、NF-2、MTS1、RB、p53、WT1、BRCA1、BRCA2 和 VHL。

特定核酸及其所治疗的特定病症的示例包括：HLA-B7，用于肿瘤、结肠直肠癌、黑素瘤的治疗；IL-2，用于癌特别是乳房癌、肺癌和肿瘤的治疗；IL-4，用于癌的治疗；TNF，用于癌的治疗；反义 IGF-1，用于脑肿瘤的治疗；IFN，用于成神经细胞瘤的治疗；GM-CSF，用于肾细胞癌；MDR-1，用于癌特别是晚期癌、乳房癌和卵巢癌的治疗；和 HSV 胸腺嘧啶激酶，用于脑肿瘤、头和颈肿瘤、间皮瘤、卵巢癌的治疗。

本发明核酸可以是与其目标物互补序列组成的“反义核酸”， 所述靶典型地为信使 RNA(mRNA)或 mRNA 前信使。mRNA 典型地含有遗传信息功能，或有义定向(sense orientation)，与反义多核酸的结合可使目标 mRNA 灭活并阻止其翻译为蛋白质。采用特异 RNAs 翻译蛋白质的生化试验，即可确定这种反义核酸。一旦知道了 RNA 序列，就可构建(design)通过 Watson-Crick 互补碱基对与 RNA 结合的反义核酸。此类反义核酸典型地包括约 10-40 个碱基对、更优选地约 10-25 个碱基对和最优选地约 15-20 个碱基对。

反义核酸可经修饰而改善其抗核酸酶水解的能力。例如，这种类似物包括硫代磷酸酯、甲基膦酸酯、磷酸二酯-和对乙氧基-寡核酸(参见 WO97/07784)。所包封的试剂也可是核酶或催化 RNA。

核酸也可插入质粒或载体中，所述质粒或载体优选为环形或闭合的双链分子，优选大小为 5-40 kbp(千碱基对)。这种质粒或载体可按已知方法构建，它们包括治疗性核酸或基因，即在适宜促进剂和增强剂的调节下基因治疗中欲表达的基因或核酸，和宿主细胞内复制和/或整合到宿主细胞基因组内所必需的其他因子。制备用于基因治疗的质粒和载体的方法，在本领域是已知的并有参考。

通过水合脂质体类脂膜，可将核酸例如 DNA 质粒被动包封到脂质体中。其他包封核酸的方法包括：将核酸凝聚成单分子形式，即将核酸混悬于含有试剂的水性介质中，在适宜条件下将核酸凝聚成小颗粒，

所述试剂包括例如鱼精蛋白硫酸盐、精胺、精脒、组蛋白、赖氨酸及其混合物，或其他适宜的聚阳离子凝聚剂。用含有凝缩核酸分子的溶液再水合干燥类脂膜，得到包封有凝缩形式核酸的脂质体。

在另一实施方案中，脂质体可含有表面基团例如抗体或抗体片段、与细胞-表面受体作用的小效应器分子 、抗原和类似化合物，这可使脂质体获得与特异细胞 靶向结合的期望特性。用靶向分子衍生化脂质体形成类脂，或者用靶向分子衍生化具有极性化学头基的类脂，可将这种配体引入脂质体中。

通过共价结合，配体与亲水性聚合物链(其近端与成囊类脂连接)的游离末端连接，从而实现类脂的靶向配体衍生化。有许多技术，可实现选定亲水性聚合物与选定类脂的结合，并活化聚合物的游离未连接端与配体反应。其中对亲水性聚合物PEG已有广泛的研究(Allen, T. M.，等， *Biochemicia et Biophysica Acta* 1237:99-108(1995)；Zalipsky, S., *Bioconjugate Chem.*, 4(4): 296-299(1993)；Zalipsky, S.等, *FEBS Lett.* 353: 71-74(1994)；Zalipsky, S.，等, *Bioconjugate Chemistry*,705-108(1995)； Zalipsky, 隐形脂质体,(D. Lasic和F. Martin编辑)，第9章，CRC出版社，Boca Raton, FL(1995))。

靶向配体对于本领域技术人员而言是已知的，在一个优选实施方案中，这种靶向配体对内皮肿瘤细胞有亲和力，并优选可被这些细胞内化。这种配体一般可结合到生长因子受体的细胞外区域。示例性受体包括: HER2/neu致癌基因的c-erbB-2蛋白质产物、表皮生长因子(EGF)受体、碱性成纤维细胞生长因子(碱性FGF)受体、血管内皮生长因子受体、E-，L-和P-选择蛋白受体、叶酸盐受体、CD4受体、CD19受体、αβ整联蛋白受体和趋化因子受体。

按照本发明，可对制得的脂质体进一步整粒，使其粒径处于基本均匀的选定粒径范围内，典型地约 0.01-0.5μm、更优选约0.03-0.40μm。将脂质体水性溶液挤压通过一系列聚碳酸酯膜，可对REVs 和 MLVs 进行有效的整粒，其中的聚碳酸酯膜具有选定的约为

0.03-0.20μm、典型地约 0.05、0.08、0.10 或 0.20μm 的均匀孔径。膜的孔径与挤压过膜法、尤其是两次或多次过膜法制得的脂质体的最大粒径相当。也可采用均化方法将脂质体的粒径降低到 100 nm 或更低(Martin, F. J.,给药系统的专业制造和生产工艺学,(P. Tyle, 编辑)MarceLDekker, 纽约, 267-316 页(1990))。

B. 示例性组合物的制备和特性描述

采用实施例 1 描述的类脂,按实施例 2 方法制备脂质体,该类脂含有通过氨基甲酸酯键与二硬脂酰尾基连接的咪唑基团。所述脂质体 60 摩尔%的部分氢化大豆-黄豆磷脂酰胆碱(PHSPC)和 40 摩尔%的咪唑-氨基甲酸酯-二硬脂酰类脂组成。超声后组合物中脂质体的平均粒径为 80 nm。

将测得的脂质体 zeta 电位对 pH 值作图,结果见图 4(Δ)。制备两种不含本发明类脂的脂质体组合物,以供比较。一个组合物中含有阳离子类脂,而另一组合物中由单一中性类脂 PHSPC 组成。阳离子脂质体组合物中包括 55 摩尔%的二甲基双十烷基铵(DDAB)和 45 摩尔%的胆固醇。

zeta 电位值为脂质体外表面上的表观电荷测量值。更具体地说,液体边界层(和固体接触)与本体溶液中移动扩散层之间的界面例如滑动面产生的电势为 zeta 电位。下面将给出采用市售仪器测量 Zeta 电位值的方法。

在图 4 中,用咪唑-氨基甲酸酯-二硬脂酰类脂制备的脂质体(Δ)显示出 zeta 电位与环境介质 pH 间 的密切关系。当 pH 值低于 5.0 时,zeta 电位相对恒定在约 65 mV。随着介质 pH 的增加,zeta 电位会迅速下降。比较而言,阳离子脂质体(例如 DDAB-胆固醇脂质体,◆)和中性脂质体制剂(■)的 zeta 电位随着介质 pH 增加的变化较小。

咪唑-氨基甲酸酯-二硬脂酰类脂脂质体的 zeta 电位随着混悬介质 pH 的增加会迅速变化,这与咪唑基团的 pK 属性有关。咪唑的 pK 约为 pH 6.0。当 pH 低于 6.0 时,咪唑基团主要(例如超过 50%量的)荷正

电，因此咪唑-氨基甲酸酯-二硬脂酰类脂脂质体的 zeta 电位也趋向于荷正电。当 pH 高于 6.0 时，咪唑基团（例如超过 50%量的）转变为中性，因此咪唑-氨基甲酸酯-二硬脂酰类脂脂质体的 zeta 电位下降或趋向于中性。

在另一实验中，制备了含有咪唑-氨基甲酸酯-二硬脂酰类脂(按实施例 1 制备)和包封有 DNA 的脂质体。如实施例 3A 所描述的，凝聚的质粒 DNA 与含有 60/40 摩尔比的 PHSPC 和咪唑-氨基甲酸酯-二硬脂酰类脂的脂质体接触。与凝聚 DNA 接触前，先将脂质体溶液的 pH 调节到约 4.0。pH 约为 4.0 时，类脂的咪唑头基荷正电，这使荷负电的 DNA 通过静电与类脂结合。在连续搅拌下，包围着 DNA 的脂质体将 DNA 包封到类脂双分子层中。因此，本发明提供有效包封荷负电试剂的方法，即在用 pH-敏感类脂趋向于荷正电的环境中，将 pH-敏感类脂制备的脂质体与所述试剂接触。

将包封有 DNA 的脂质体与仅含有 DNA 的样品比较。两种样品用 DNase I 处理 30 分钟(参见实施例 3B)。处理后，分别取等分样品加到含有溴化乙锭的琼脂糖胶中，并进行电泳试验。将未用 DNase I 处理的同样脂质体和 DNA 也加到琼脂糖胶中。

图 5 为这些样品凝胶电泳分析的显微照片。第 1 条为 DNase 处理的脂质体；第 2 条为脂质体(未用 DNase I 处理)；第 3 条为 DNase I 处理的 DNA ；第 4 条为 DNA;和第 5 条为 1 kB DNA 梯标准。

图 5 显示经脂质体包封的 DNA 避免了 DNase I 的消化，(比较第 1 条和第 3 条，其中裸露的 DNA 被 DNase I 消化)。

在另一研究中，制备了含有 pH 敏感类脂和靶向抗体的脂质体。这些脂质体用于体外转染人肺部肿瘤细胞。

具体地说，按实施例 3A 方法，将含有绿荧光蛋白质基因的 DNA 报道质粒载体 pEGFP-C1(Clontech, Palo Alto CA)包封到脂质体中。脂质体中总类脂与 DNA 的比率约为 14 毫微摩尔类脂/1 微克 DNA。DNA 包封到脂质体中后，将脂质体与 1F11-Fab′-聚乙二醇-DSPE(PEG-DSPE)共轭物胶束共同温育，从而将抗-整联蛋白抗体 1F11 Fab′插入类脂双

分子层。采用常规技术，将抗体连接到 PEG-DSPE 的 N 端马来酰亚胺上，可制得 1F11-Fab′-PEG-DSPE 共轭物，例如 Zalipsky 在 隐形脂质体，(D. Lasic 和 F. Martin 编辑，CRC 出版社，第 9 章(1995))中的描述。将含有抗体的胶束与脂质体在室温下温育过夜。

体外将具有整联蛋白受体的人肺部肿瘤细胞系 2E9 与脂质体温育。37℃下，将含有 1F11-PEG-DSPE 共轭物的脂质体、不含抗体的对照脂质体(含 PDG-DSPE，而不含抗体)与细胞温育 4 小时，浓度为 5μg DNA/70 毫微摩尔类脂每毫升。温育后，改变培养基以除去脂质体。

转染 24 小时后，检测绿荧光，结果如图 6A-6D 所示。图 6A-6B 为 1F11-共轭脂质体转染细胞的显微照片。图 6A 为荧光显微镜下的细胞，图 6B 为光显微镜下的细胞。图 6A 为转染的细胞，其亮区（light regions）与发荧光细胞一致。图 6C-6D 为不含靶向抗体的对照制剂转染的细胞的图像。未转染的细胞在荧光显微镜下没有荧光（图 6C)。

本发明类脂含有 pH 敏感基团，这使类脂在 pH 约 7.4 条件下基本呈中性。当将脂质体给予受治疗者例如哺乳动物人时，脂质体是不带电荷的，这使其血液循环时间比荷电脂质体长。脂质体被胞饮或到达体内特定的低 pH 区域后，会随着类脂荷正电而带电荷。这是由于脂质体具有 pH 敏感基团的缘故。在肿瘤部位或溶菌酶(lysosyme)中会发生上述现象。这样，在 pH 值低于 6.0 的环境中，带有 pK 约 6.0 的咪唑基团的类脂会变为主要荷正电。因此，在 pH 约 5.0-6.0 的胞内体中，类脂 protenates，促进摄取和释放包封的 DNA 进入细胞的细胞质内(Xu 和 Szoka，*Biochemistry*，35：5616-5623(1996))。下面的实施例将对这一原理作进一步的本说明。

实施例

以下实施例将对本发明示例说明。

材料：以下材料来自指定来源：部分氢化大豆磷脂酰胆碱(Vernon

Walden 公司, Green Village, NJ); 胆固醇(Solvay 制药公司, 荷兰); 二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)和双十烷基铵(DDAB)(Avanti Polar Lipid公司, 伯明翰, AL)。

方法: 采用 Coulter N4-MD(Coulter 公司,迈阿密 FL)进行动态光散射分析。

Zeta-电位: 采用 Malver 仪器公司(Southborough MA)的 ZETASIZER 2000测量 Zeta 电位。操作方法: 测量数: 3; 测量间隔: 5秒; 温度: 25℃; 粘度: 0.89 cP; 介电常数: 79; 流室类型: 毛细管流; zeta 测量限: -150 mV~150 mV。

实施例 1

制备示例类脂

A.制备二硬脂酰甘油的对-硝基苯基碳酸酯

如图 1 所示, 用苯(旋转蒸发仪 3 次)共沸干燥 1,2-二硬脂酰基-sn-甘油(500 mg, 0.8 毫摩尔; 化合物 I)。氯甲酸对-硝基苯酯(242 mg, 1.2 毫摩尔, 1.5 当量; 化合物 II)、4-二甲氨基吡啶(10 mg, 0.08 毫摩尔, 0. 1 当量)和三乙胺 (334μl, 204 毫摩尔, 3 当量)加到 $CHCl_3$(5 ml)中的 1,2-二硬脂酰甘油中。

反应化合物于室温下搅拌 2 小时。TLC 分析表明反应进行完全。用 $CHCl_3$(50ml)稀释混合物, 并用 10%柠檬酸(3×15 mL)萃取。有机层干燥($MgSO_4$)并蒸发得一固体(淡橙色)。用乙腈(4×3 mL)洗涤所得固体(亮橙), 除去过量的氯甲酸对-硝基苯酯。真空下用 P_2O_5 干燥产物二硬脂酰甘油的对硝基苯基碳酸酯(化合物 III)。收率: 557 mg(88%)。

^1H NMR(360 MHz, DMSO-D6,): δ 0.88(t, CH_3, 6H); 1.26(s, CH_2 58H); 1.62(m, CH_2CH_2CO, 4H); 2.4(2xt, CH_2CO, 4H); 4.2(dd, 反式 CH_2OCO, 1 H); 4.35(m, CH_2OCOO, 2H); 4.5(dd, 顺式 CH_2OCO, 1 H); 5.38(m, CH_2CHCH_2, 1 H); 7.4(d, C_6H_5, 2H); 8.3(d, C_6H_5, 2H)。

B. 制备组胺和二硬脂酰基甘油的氨基甲酸酯

将 1,2-二硬脂酰甘油的对硝基苯基碳酸酯(350 mg, 0.44 毫摩尔, 化合物 III), 加到 $CHCl_3$(1 ml)和 DMSO(200μl)中的组胺 (46 mg, 0.40 毫摩尔, 0.9 当量; 化合物 IV)中。将吡啶 (300μl; 化合物 V)加到溶液中。反应混合物室温下过夜搅拌 20 小时。TLC($CHCl_3$: MeOH= 90: 10)显示反应进行完全。蒸发除去溶剂。产物(化合物 VI)用 $CHCl_3$溶解, 倾到硅胶(Aldrich, 230-400 目, 60 埃)柱中, 用下列溶剂洗脱: $CHCl_3$: CH_3COCH_3=90: 10, 40ml(upper spot eluted); $CHCl_3$: IPA= 80: 20, 40 ml(产物洗脱); $CHCl_3$: IPA=70: 30, 40 ml(更多产物洗脱)。合并含有纯产物的级分并蒸发。真空下用 P_2O_5干燥产物, 得到白色固体(236 mg, 收率 80%)。

^1H NMR(360 MHZ, $CDCl_3$/MeOH=1: 1 with TMS): δ 0.88(t, CH_3, 6H.); 1.28(s, CH_2, 56H; 1.62(m, CH_2CH_2CO, 4H); 2.34(2xt, CH_2CO, 4H); 2.77(t, CH_2CH_2NH, 2H); 3.18(t, CH_2CH_2CO, 2H); 4.05-4.2(dd, 顺式和反式 CH_2CHCH_2, 4H); 5.13(m, CH_2CHCH_2, 1 H); 608(s, 组胺, 1 H); 7.53(s,组胺, 1 H)。

实施例 2

制备对照脂质体

于圆底烧瓶中, 将按实施例 1 方法制备类脂(化合物 VI)和部分氢化大豆磷脂酰胆碱(PHSPC)(摩尔比为 40/60)溶于氯仿和/或甲醇中。旋转蒸发除去溶剂, 用去离子溶液水合干燥的类脂膜, 得到大多层囊泡。

采用同样方法, 制备含 100 摩尔 PHSPC、和摩尔比为 40/60 DDAB-胆固醇的对照脂质体制剂。

采用动态光散射法测得每种脂质体的大小。

实施例 3

制备含有核酸的脂质体

A. 制备包封 DNA 的脂质体

在室温下制备复合物。首先，加入 100g 组蛋白将 400μg 虫萤光素酶报道质粒 DNA 凝聚在 5%葡萄糖溶液中，并连续慢速搅拌 10 分钟。

取含有摩尔比为 40/60 的 PHSPC 和实施例 1 制备的 pH 敏感类脂(化合物 VI)的溶液，它在 5%葡萄糖中的总类脂量为 12,000 毫微摩尔，将溶液 pH 调节到 4。将凝聚 DNA 溶液加到酸性脂质体溶液中，并连续慢速搅拌 10 分钟。DNA 的终浓度为 0.25 mg/ml，总类脂浓度为 7.5 mM。DNA 与总类脂的比例为 1μg DNA/30 毫微摩尔类脂.

B. DNase I 分析

37℃下，在 10 mM 的 $MgSO_4$ 存在下，裸露 DNA 和脂质体包封的 DNA 用 DNase I 处理 30 分钟。处理后，用苯酚/氯仿萃取脂质体/DNase 混合物，并用氯仿将类脂和蛋白质从 DNA 中分离出来。

经 DNase 处理后的 DNA 和脂质体包封的 DNA 中的 DNA 片段，取等分样品加到溴乙啡啶的 1%琼脂糖凝胶中并进行电泳,检验 DNA 的完整性。将未用 DNase 处理的 DNA 和脂质体也加到凝胶中，和 1 Kb DNA 标准共同作为对照。结果如图 5 所示。

本说明书中提及的专利、专利文件或出版物等的全部公开内容均在此引用作为参考，所引用程度仍保持他们原有独立性。本领域技术人员清楚，针对本发明实施基础上的改进和变更并未偏离本发明的范畴。很容易理解，本发明并不限于在此所述的示例性实施例和实施方案，上述实施例和实施方案旨对以下权利要求书所限定的本发明范畴作示例性说明。

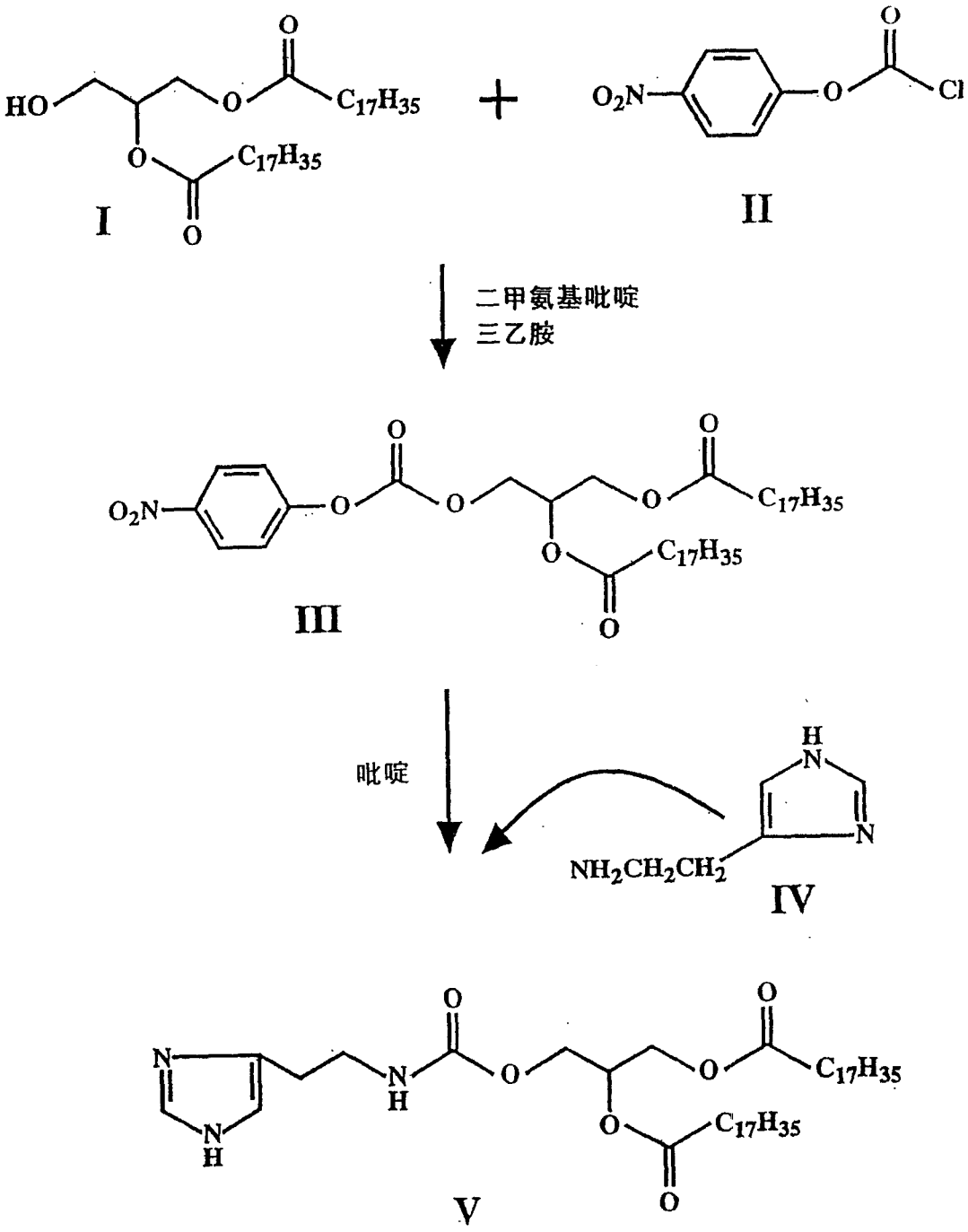

HO
O
$C_{17}H_{35}$
O
$C_{17}H_{35}$
O
I
+
O_2N
O
O
Cl
II
二甲氨基吡啶
三乙胺
O_2N
O
O
O
O
$C_{17}H_{35}$
O
$C_{17}H_{35}$
O
III
吡啶
H
N
N
$NH_2CH_2CH_2$
IV
N
H
N
N
H
O
O
O
O
$C_{17}H_{35}$
O
$C_{17}H_{35}$
O
V

图 1

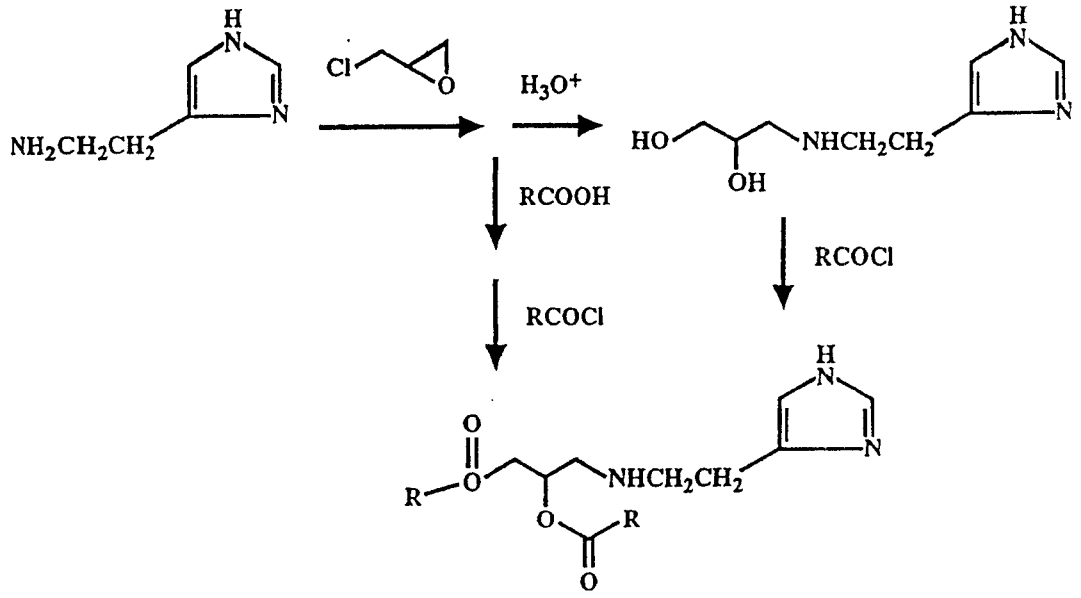

H
N
N
NH2CH2CH2
Cl
O
H3O+
HO
OH
NHCH2CH2
RCOOH
RCOCl
RCOCl
O
R
O
NHCH2CH2
O
R
O

图 2A

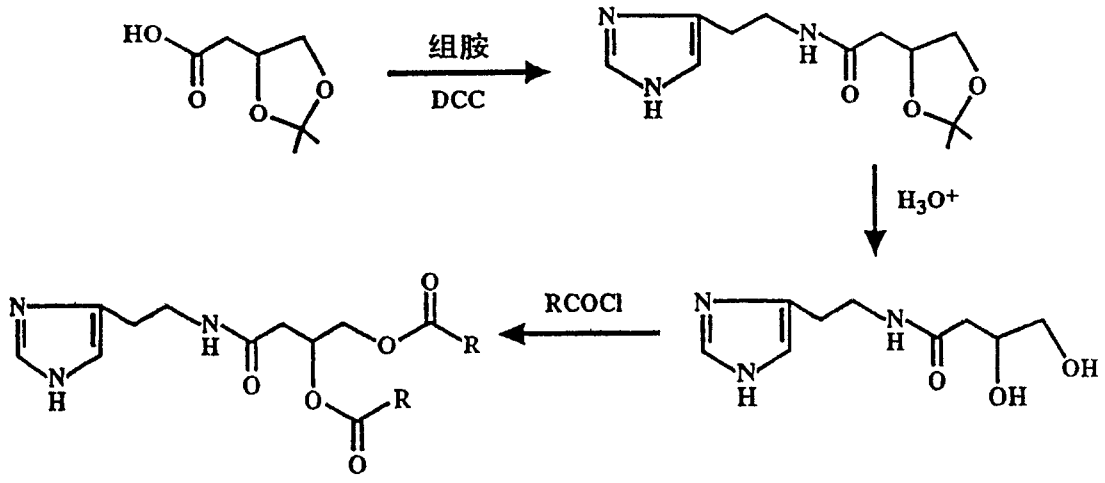

HO
O
O
O
组胺
DCC
N
N
H
N
H
O
O
O
H3O+
RCOCl
N
N
H
N
H
O
OH
OH
O
O
R
O
R
O

图 2B

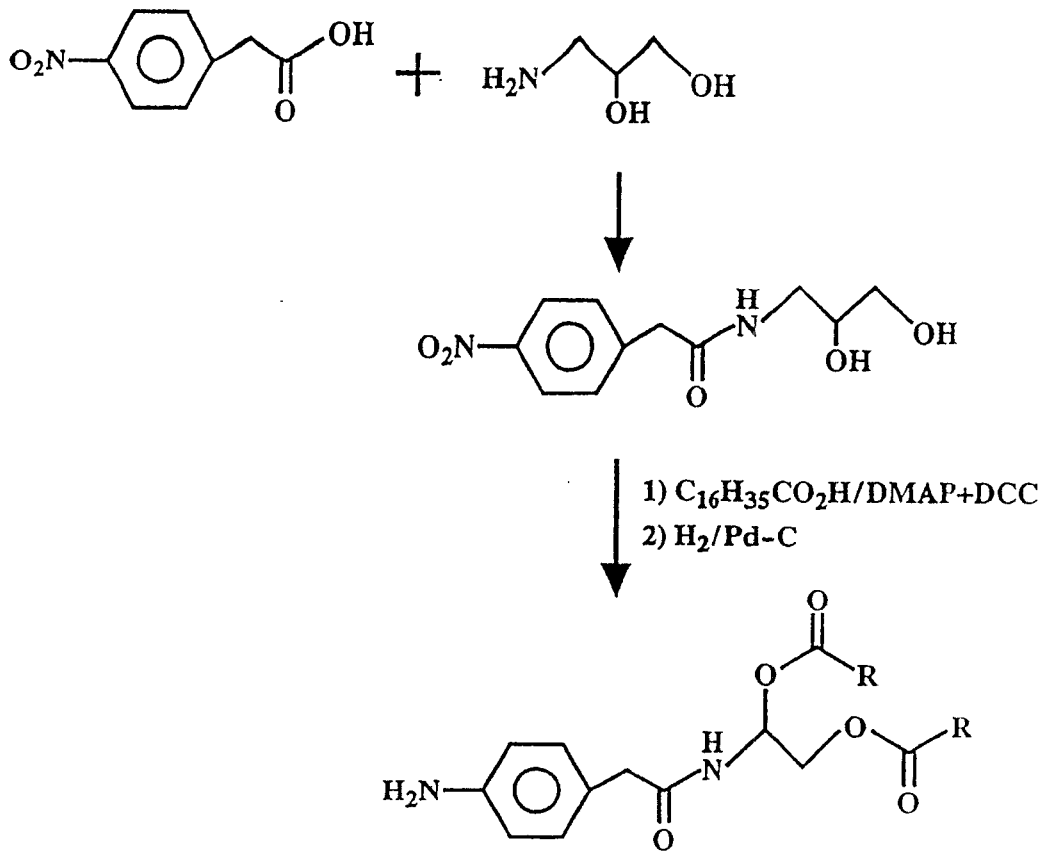


图 2C

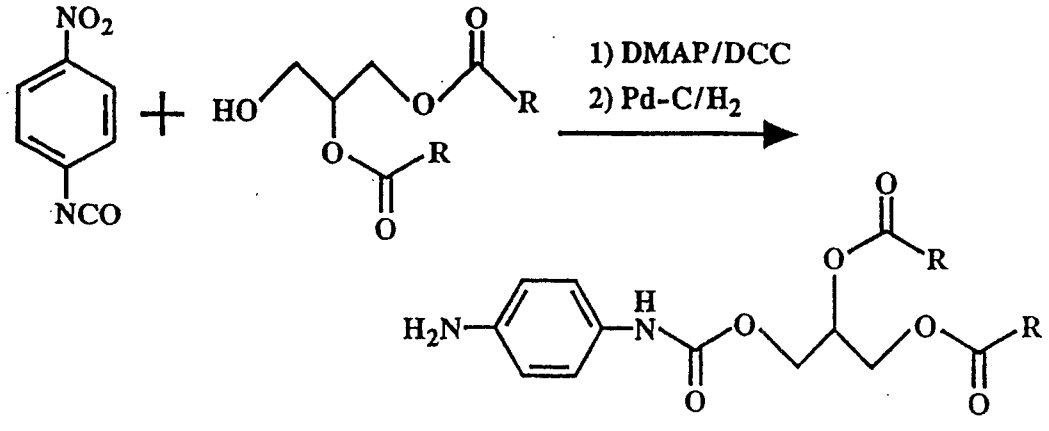


图 2D

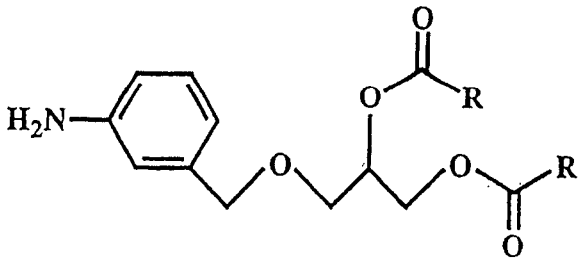


图 3A

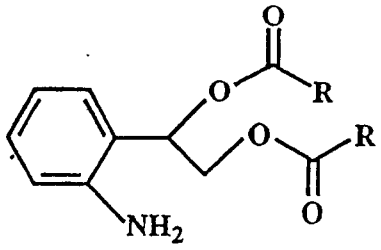


图 3B

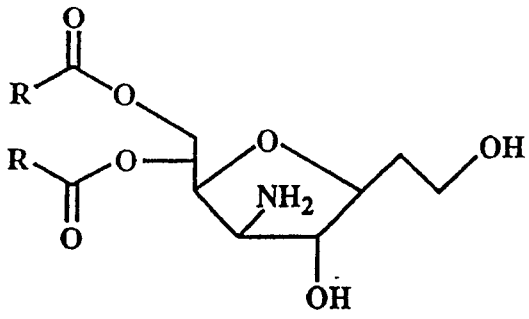


图 3C

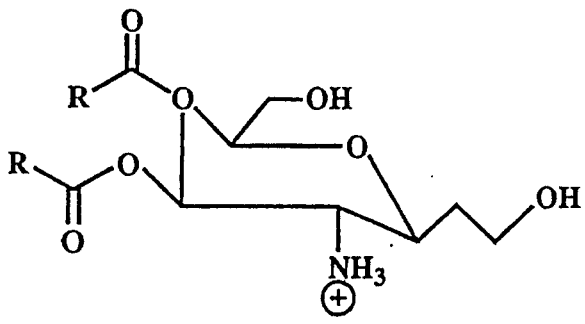


图 3D

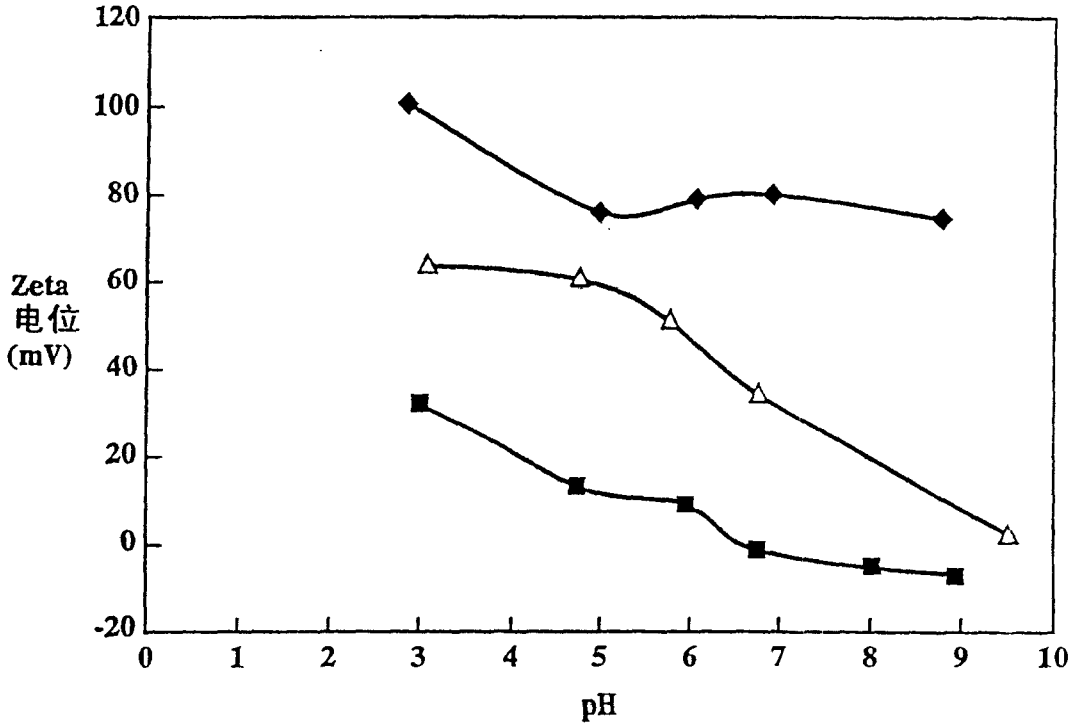


图 4

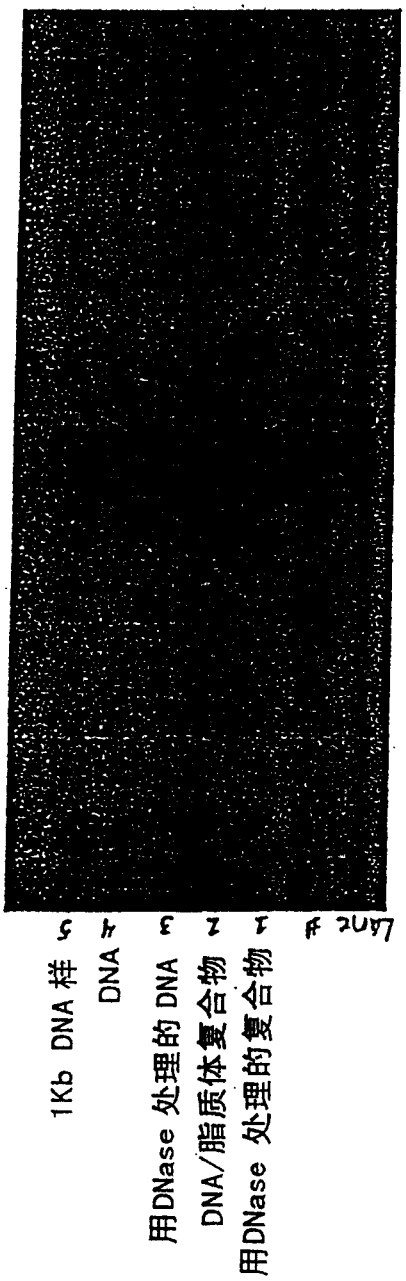


图 5

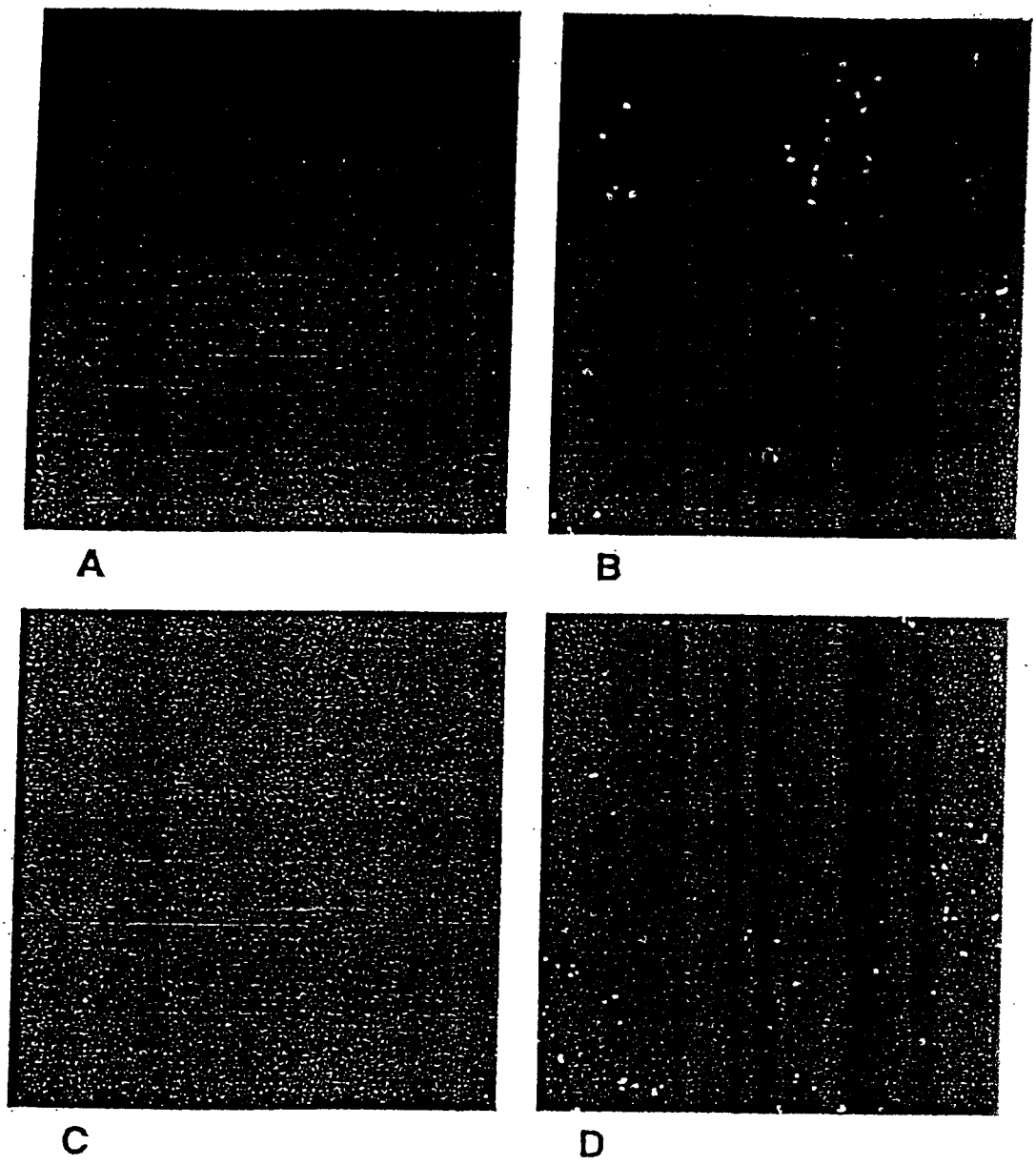


图 6