[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C08G 69/10 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02812734.X

[45] 授权公告日 2006 年 8 月 23 日

[11] 授权公告号 CN 1271116C

[22] 申请日 2002.6.3 [21] 申请号 02812734.X
[30] 优先权
[32] 2001.6.1 [33] EP [31] 01202107.7
[86] 国际申请 PCT/EP2002/006432 2002.6.3
[87] 国际公布 WO2002/098951 英 2002.12.12
[85] 进入国家阶段日期 2003.12.25
[71] 专利权人 安斯泰来制药欧洲有限公司
地址 荷兰莱德多普
[72] 发明人 J·M·麦特瑟拉 W·E·翰尼克
T·德温格尔 L·W·T·德博尔
C·欧瑟伦 G·斯托姆
P·布鲁恩
审查员 唐少华

[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 郭建新

权利要求书 2 页 说明书 35 页 附图 6 页

[54] 发明名称

类脂－聚合物轭合物

[57] 摘要

本发明提供了聚(氨基酸)、聚(氨基酸衍生物)或聚(氨基酸类似物)如聚［N－(2－羟乙基)－谷氨酰胺］(PHEG)的类脂轭合物。

1. 一种类脂-聚合物轭合物，其可从由至少一种憎水非极性部分和一种亲水极性头基团组成的两亲性类脂和一种具有 N-和 C-末端基团的聚合物或其单体前体获得，其特征在于，所述聚合物是聚(氨基酸)、聚(氨基酸衍生物)或聚(氨基酸类似物)，且所述类脂连接到所述聚合物的 N 或 C 末端基团，所述聚合物具有如下通式：

$-[NHCHR(CH_2)_mCO]_n-$

其中：

-R 定义为：-H，$-CH_3$，$-CHCH_3OR_1$，$-(CH_2)_XOR_1$，$-(CH_2)_X-CO-NHR_1$，$-(CH_2)_X-NH-CO-R_1$，$-(CH_2)_X-SO_yCH_3$，或$-(CH_2)_XCOOH$；

$-R_1$ 为 H 或(C_1-C_4)烷基，由一个或多个羟基或一个二(C_1-C_4)烷基氨基取代；

x 为 0-4；

m=1 或 0，和

y=1 或 2。

2. 权利要求 1 的轭合物，其特征在于，所述两亲性类脂选自磷脂，糖脂，神经酰胺，胆固醇和衍生物，饱和或不饱和的、支链或直链 C_8-C_{100} 单-或二-烷基胺，芳基烷基胺，环烷基烷基胺，链烷醇，醛，碳卤或链烷酸和它们的酸酐，并且其特征在于 C 原子总数为 25 或更高。

3. 权利要求 2 的轭合物，其特征在于，所述两亲性类脂含有至少两个憎水非极性部分。

4. 权利要求 3 的轭合物，其特征在于，所述两亲性类脂选自 1-十七烷基十八烷基胺、N-琥珀酰-二-十八烷基胺和二硬脂基磷脂酰乙醇胺。

5. 前述任一项权利要求的轭合物，其特征在于，所述聚合物具有的在水中的 χ-参数 ≤ 0.65。

6. 权利要求 5 的轭合物，其特征在于，所述聚合物具有的在水中的 χ-参数 < 0.5。

7. 权利要求 1-4 中任一项的轭合物，其特征在于，所述聚合物由 α-氨基酸和其衍生物或类似物组成。

8. 权利要求 1-4 中任一项的轭合物，其特征在于，在 4-8 的生理 pH 范围内，所述聚合物不含有显著数量的荷电基团。

9. 权利要求 8 的轭合物，其特征在于，所述聚合物由中性或已中和的在 4-8 的生理 pH 的氨基酸单体、氨基酸类似物单体或氨基酸衍生物单体组成。

10. 权利要求 1-4 中任一项的轭合物，其特征在于，所述聚合物的分子量为 500 至 75000。

11. 权利要求 10 的轭合物，其特征在于，所述聚合物的分子量为 2000 至 15000。

12. 权利要求 1-4 中任一项的轭合物，其特征在于，所述聚合物是可生物降解的。

13. 权利要求 1 的轭合物，其特征在于，所述聚合物是聚[N-(2-羟乙基)]-L-谷氨酰胺。

14. 权利要求 1 的轭合物，其特征在于，所述聚合物是聚(2-羟乙基)-L-天冬酰胺。

15. 权利要求 1 的轭合物，其特征在于，所述聚合物是聚(D，L-蛋氨酸亚砜)。

类脂-聚合物轭合物

本发明涉及类脂-聚合物轭合物、它们的制备和用途。

发明背景

类脂-聚合物轭合物是公知的，并用于多种不同的用途。其中之一是包含在胶体载体组合物中，例如泡状双层体系，如脂质体、niosomes和反转泡囊(reversed vesicles)，胶束体系，纳米囊，纳米球(nanospheres)等。这种胶体载体组合物的一种公知的代表物是通过脂质体形成的。虽然本文此后特别提及的是脂质体，但读者应记住，所述讨论、公开内容和教导均还涉及其它胶体载体组合物。

属于胶体载体颗粒组的脂质体，是由包封有含水空间的一个或多个同心类脂双层组成的小泡囊(vesicles)。由于它们在大小、表面电荷、类脂组成、双层流动性方面的结构多变性，并由于它们能包封几乎各种药物的能力，它们的作为给药体系的重要性易于被人们所认识。然而，在静脉注射脂质体时，它们被单核吞噬细胞系统(MPS)认作是外来颗粒，并被快速地从循环清除到富含吞噬细胞的器官如肝、脾和骨髓中。人们已经确认了一些减少这种效应的可能性，如降低脂质体的颗粒尺寸和改变脂质体的表面电荷。另一进展涉及通过在脂质体表面上引入特殊的亲水聚合物组分而对脂质体进行表面改性，所述亲水聚合物组分的基团减少了蛋白质在颗粒表面上的吸附。因而这种脂质体可防止被 MPS 细胞辨认，并在体循环中具有延长的停留时间。脂质体表面改性的一种公知实例是在制备脂质体组合物的过程中引入亲水聚合物聚乙二醇(PEG)的类脂衍生物。通常这种聚合物是用憎水部分进行末端改性的，所述憎水部分是磷脂酰乙醇胺衍生物或长链脂肪酸的残基。聚乙二醇本身是相当稳定的聚合物，它是排斥蛋白质粘附的防护物，并且在生理条件下它不发生酶降解或水解降解。具有 PEG-接枝表面的脂质体对各种动物以及对人静脉给药后，已在延长血浆半衰期

(half life)和减少在富含噬细胞的器官中积累方面获得了良好结果(Storm G., Belliot S.O., Daemen T. And Lasic D.D.: Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system in Adv. Drug Delivery Rev. 17, 31-48, (1995); Moghimi S.M., Hunter A.C. and Murray J.C.: Long-circulating and target-specific nanoparticles; theory to practice in Pharmacol. Rev. 53, 283-318, (2001); Boerman O.C., Dams E.T., Oyen W.J.G., Corstens F.H.M. and Storm G.: Radiopharmaceuticals for scintigraphic imaging of infection and inflammation in Inflamm. Res. 50, 55-64, (2001))。含有阿霉素(doxorubicine)的这种脂质体制剂已获准上市。

同时，在长循环脂质体中使用聚合物聚乙二醇也有一些缺点。由于其非生物降解性，对 PEG-接枝的脂质体在巨噬细胞和皮肤中的积累有一些担心。第二次注射 PEG-脂质体时观察到失去长循环性(快速清除)(Dams E.T., Laverman P., Oijen W.J., Storm G., Scherphof G.L., Van der Meer J.W., Corstens F.H. and Boerman O.C.: Accelerated blood clearance and altered biodistribution of repeated injections of sterically stabilized liposomes in J. Pharmacol. Exp. Ther. 292, 1071-1079, (2000))。对应用 PEG-脂质体的病人的最近的研究表明，PEG-脂质体可引起急性的副作用(面部潮红，胸紧(tightness of the chest)，呼吸短促，血压改变)，当 PEG-脂质体制剂的给药(注入)结束时这些副作用立即消失。最近的数据指出了辅助活化在诱导副作用方面的影响(Szebeni J., Baranyi L., Savay S., Lutz H., Jelezarova E., Bunger R. and Alving C.R.: The role of complement activation in hypersensitivity to Pegylated liposomal doxorubicin (Doxil) in J. Liposome Res. 10, 467-481, (2000))。直到目前，市售的基于 PEG-脂质体的制剂是含水悬浮液制剂。众所周知，总体上脂质体含水悬浮液制剂以及 PEG-脂质体的保存期是相当有限的。已知有一些技术来除去这种制剂的载体或连续相，如喷雾干燥，透滤法，旋转蒸发等，以及优选的冻干。近来，提出了一种可改进含有锝-螯合剂肼基烟酰胺的 PEG-

脂质体的长期保存期的冻干方法(Laverman P., Van Bloois L., Boerman O.C., Oyen W.J.G., Corstens F.H.M. and Storm G.: Lyophilisation of Tc-99m-HYNIC labelled PEG-liposomes in J. Liposome Res. 10(2&3), page 117-129(2000)), 但仍需要对所述结果和这种技术在脂质体制剂中的应用进行深入研究。

使用聚乙二醇所固有的缺点促使研究者寻求替代的聚合物。作为合适的备选者，人们已建议了许多聚合物来将其用(形成泡囊(vesicle-forming)的)类脂进行衍生化(derivatising), 以结合到脂质体中(参见例如 EP-0688207)。亲水的水溶性聚合物聚(乙烯基吡咯烷酮)、聚(丙烯酰基吗啉)、聚(2-甲基或乙基-2-噁唑啉)、聚丙烯酰胺和聚甘油已表现出一定程度的延长脂质体静脉给药后循环时间的作用。然而，直到目前为止，这类类脂-聚合物轭合物还未应用于市售药物制剂中，主要是因为它们相对于已知的类脂-PEG 轭合物未表现出任何优点。因而，现在还需要寻找一种聚合物，其可用类脂衍生化以能够结合到胶体载体组合物如脂质体中，这种聚合物具有长循环性能，此外还具有相对于 PEG 的优点，如生物降解性。

发明简述

本发明提供了类脂-聚合物轭合物，其可从由至少一种憎水非极性部分和一种亲水极性头基团组成的两亲性类脂和一种具有 N-和 C-末端基团的聚合物或其单体前体获得，其中所述聚合物是聚(氨基酸)、聚(氨基酸衍生物)或聚(氨基酸类似物)，且其中所述类脂与所述聚合物的 N 或 C 末端基团共价连接，所述聚合物具有如下通式:

$-[NHCHR(CH_2)_mCO]_n-$,其中-R 定义为: -H, $-CH_3$, $-CHCH_3OR_1$, $-(CH_2)_XOR_1$, $-(CH_2)_X-CO-NHR_1$, $-(CH_2)_XNH-CO-R_1$, $-(CH_2)_X-SO_yCH_3$, $OR-(CH_2)_X$ COOH; $-R_1$ 为 H 或(C_1-C_4)烷基，由一或多个羟基或一个二(C_1-C_4)烷基氨基取代; x 为 0-4; m=1 或 0, y=1 或 2。本发明还提供了制备这种轭合物的方法和所述轭合物的用途。

附图说明

图 1 为具有不同总类脂数量的含 PEG-DSPE 脂质体制剂的血样中

注射剂量的计算百分比平均值随时间变化的示意图(实施例 22)。

图 2 为具有不同总类脂数量的含 PHEA-DODASuc 脂质体制剂的血样中注射剂量的计算百分比平均值随时间变化的示意图(实施例 22)。

图 3 为在分别含有 PEG-DSPE 和 PHEA-DODASuc 的脂质体制剂中包封的强的松龙磷酸盐的百分比随时间变化的示意图(实施例 23)。

图 4 为包封在含 PEG-DSPE 和 PHEA-DODASuc 的脂质体中的强的松龙磷酸盐在血液中的浓度相对于时间变化的示意图(实施例 24)。

图 5 为在静脉单次注射盐水和含强的松龙磷酸盐的脂质体(分别用 PEG-DSPE 和 PHEA-DODASuc 包覆)之前和之后，脚爪炎症分数随时间变化的示意图(实施例 24)。

图 6 为在分别含有作为类脂-聚合物轭合物的 PEG-DSPE、PHEG-二氨基丁烷 DODASuc，PHPG 二氨基丁烷 DODASuc，PHBG 二氨基丁烷 DODASuc，和 PHEA-DODASuc 的脂质体和常规脂质体(裸露)静脉给药后，在肝、脾和肝+脾中发现的脂质体的百分比注射剂量的示意图(实施例 21)。

发明详述

在本发明组合物中的两亲性类脂-聚合物轭合物可从两亲性类脂和聚合物或聚合物的单体前体获得。

在本发明的类脂-聚合物轭合物中使用的两亲性类脂可选自各种合成或天然存在的类脂，所述类脂由至少一个憎水非极性尾部基团和亲水极性头部基团组成，例如形成泡囊的类脂和膜类脂。

在类脂-聚合物轭合物中使用的两亲性类脂的一个重要特征是，所述类脂在其极性头部基团上含有适于与聚合物链共价连接的官能团。所述极性头部基团例如是伯或仲胺基团、羟基、醛基、卤素或羧基。所述类脂的憎水性部分使得所述类脂-聚合物轭合物能够结合到双层结构如脂质体中并用作锚定物(anchor)。

两亲性类脂的实例是磷脂、糖脂、神经酰胺、胆固醇和衍生物，饱和或部分不饱和的、支链或直链 C_8-C_{50} 单-或二-烷基胺，芳基烷基

胺，环烷基胺，链烷醇，醛，碳卤(carbohalides)或链烷酸和它们的酸酐，其中 C 原子总数优选为 25 或更高。

更具体地说，适用的两亲性类脂的实例是卵磷脂、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇、神经鞘磷脂，十八胺，十四烷醇，胆固醇和棕榈酸。

在类脂-聚合物轭合物中优选的两亲性类脂是具有两个憎水链（通常为烷基链）和上述的含有官能团的极性头部基团的类脂。磷脂酰乙醇胺衍生物，特别是二硬脂基磷脂酰乙醇胺是这种优选的磷脂，因为它们含有活性氨基基团。

另外的优选的两亲性类脂具有作为亲水极性头部基团的伯或仲胺和两个饱和或不饱和的 C_8-C_{50} 支链或直链憎水非极性部分。其实例是 1-十七烷基十八烷基胺和含二硬脂基胺的化合物，如二硬脂基胺和 N-丁二酰基-二（十八烷基）胺(DODASuc)。

本发明的类脂-聚合物轭合物的聚合物部分由聚(氨基酸)、聚(氨基酸衍生物)或聚(氨基酸类似物)形成。聚(氨基酸衍生物)是一种聚合物，其由连接有一种或多种取代基的氨基酸单体组成。其实例是聚(2-羟乙基)-L-谷氨酰胺。这里公开的聚(氨基酸类似物)是一种聚合物，其中氨基酸单体的碳原子链长度被减少或延长。其实例是聚(高丝氨酸)和聚(五碳高丝氨酸(pentahomoserine))。

所述聚合物是一种均聚物，其组成单体在整个聚合物链中是相同的。所述聚合物部分还可由嵌段共聚物组成，所述嵌段共聚物选自聚(氨基酸)、聚(氨基酸衍生物)和聚(氨基酸类似物)，或者所述聚合物部分可以由一系列交替变化的单体或控制次序的单体来形成，或通过合适的选自一种或多种氨基酸、氨基酸衍生物和氨基酸类似物的单体的无规聚合来形成。所述聚合物可以是直链或支链的，并包括接枝聚合物，但优选是直链的。

适用的氨基酸是天然存在的α-氨基酸。但β-氨基酸以及非蛋白质或非天然存在的氨基酸也是引人关注的。L-和 D-构型的氨基酸和衍生物均可使用。当在类脂-聚合物轭合物中的聚合物的氨基酸序列是通过 L-氨基酸的残基形成时，所得到的聚合物可进行酶降解。另一方面，

当在本发明的类脂-聚合物轭合物中的聚合物的氨基酸序列是通过 D-氨基酸形成时，所得到的聚合物对肽降解酶很可能是稳定的。也可使用 L-和 D-氨基酸的混合物。考虑所述聚合物的不同性能，其中结合了本发明的类脂-聚合物轭合物的胶体载体颗粒的表面改性，可通过选择使用 L-和/或 D-型的起始物质制备所述轭合物来进行调整。

适于结合到本发明的类脂-聚合物轭合物中的聚(氨基酸)、聚(氨基酸衍生物)和聚(氨基酸类似物)化合物的一个重要性能是，它们可溶解于水中(在 100 份水中至少 1 份，优选在 30 份水中 1 份，最优选在 10 份或更少的水中 1 份)。所述聚合物还可通过它们在水中的 χ-参数来表征。这种聚合物-溶剂相互作用参数可由例如膜渗透压测定法来确定。可有利地用于本发明的类脂-聚合物轭合物中的聚合物在水中的 χ-参数 $\leqslant 0.65$，优选 $\leqslant 0.5$。

所述聚合物的另一重要特征是，在 4-8 的(生理)pH 范围内它们不含有显著数量的荷电基团。优选地，在所述聚合物或氨基酸衍生物单体制备中使用中性氨基酸单体或氨基酸类似物单体，它们是中性的或已被中和。当存在荷电基团时，可允许其以不干扰本发明的胶体载体组合物的长循环性能的低百分比存在。对于 2-羟乙基-L-谷氨酰胺和荷电单体的共聚物已证实，带正电荷的基团被允许存在的百分比大于带负电荷的基团。

除其它外，制备所述聚合物的合适单体有丙氨酸、苏氨酸，缬氨酸，肌氨酸，α-氨基己二酸，α,γ-二氨基丁酸衍生物，鸟氨酸，谷氨酰胺和衍生物，包括谷氨酸，天冬酰胺和衍生物，包括天冬氨酸，赖氨酸衍生物，蛋氨酸和衍生物，丝氨酸，其衍生物和具有附加 CH_2 基团的类似物，例如高丝氨酸和五碳高丝氨酸。合适的侧基包括(C_1-C_4)-烷基，羟基烷基，二羟基烷基，酰胺(acid amides)和芳基或它们的组合，条件是所述聚合物保持水溶性。这些基团的实例是 2-羟基乙基，3-羟基丙基，4-羟基丁基和 2,3-二羟基丙基。可使用的聚合物是例如聚(D，L-丝氨酸)(PDLS)，聚(2-羟基乙基)-D，L-谷氨酰胺(PDLHEG)，聚(2-羟基丁基)-L-谷氨酰胺(PHBG)和共聚物聚(HEG-共

聚-谷氨酸)1%谷氨酸(PHEG1%GA)。优选的聚合物是聚(D，L-谷氨酰胺)(PDLG)，聚(D，L-天冬酰胺)(PDLA)，聚(羟基丙基)-L-谷氨酰胺(PHPG)，聚(2-羟基丙基)-L-谷氨酰胺(P2HPG)和β-丙氨酸与2-羟乙基-L-谷氨酰胺的共聚物(PbAHEG)，含有5和1%二甲基氨基乙基侧基的聚(HEG-共聚-二甲基氨基乙基-谷氨酰胺)(PHEG5%DG 和PHEG1%DG)。更优选的聚合物是均聚物聚-[N-(2-羟基乙基)-L-谷氨酰胺](PHEG)、聚(2-羟基乙基)-L-天冬酰胺(PHEA)和聚(D，L-蛋氨酸亚砜)(PDLMS)。

所述聚合物链含有5至500个单体子单元，优选20至100个。所述聚合物的平均分子量为500至75000，优选2000至15000。所述平均分子量可按本领域已知的不同方法来进行评估。在本申请的实施例中，分子量的评估基于NMR数据来进行。

为制备结合到本发明组合物中的类脂-聚合物轭合物，优选使用多种制备方法，其中在类脂聚合和偶合之前，对氨基酸单体的侧链中的活性基团进行保护。

可按照本领域已知的方法来制备类脂-聚合物轭合物。制备氨基酸聚合物的一种公知方法包括任选具有一个或多个保护基团的相应氨基酸N-羧基酸酐(NCA)的开环聚合，该开环聚合通过亲核试剂如(C_1-C_4)烷基伯胺引发。获得类脂-聚合物轭合物的另一方法包括使用具有保护官能团的胺如N-Boc-1,4-二氨基丁烷作为NCA开环聚合的引发剂。虽然在这一方法中需要两个额外的步骤，即官能团去保护和随后偶联到具有活性基团的类脂上，但通过这一方法制备的类脂-聚合物轭合物也适于结合到本发明的胶体载体组合物中。

如果所述两亲类脂是C_8-C_{50}支链或直链的单或二-烷基、-羟基烷基或-亚烷基胺、链烷醇或神经酰胺，这可有利地用作开环聚合过程中的引发剂。这意味着在聚合过程中，所述两亲性类脂会在一步中偶联到所述聚合物上。所述聚氨基酸的分子量很大程度上取决于溶剂或溶剂混合物、使用的化学品的纯度和单体/聚合引发剂的比值。一般来说，单体/聚合引发剂的比值越高，聚合物的分子量越高。

当制备预定组成的聚合物时，优选使用固相肽合成方法。

可通过使用氨基醇如 2-氨基乙醇、3-氨基丙醇或 2,3-二羟基丙基胺的氨解来除去所述聚合物的重复单元中存在的保护基团。

本发明的类脂-聚合物轭合物可有利地结合到本发明的胶体载体组合物中，例如泡囊状双层系统，如脂质体，niosomes 和反转泡囊，胶束系统，纳米囊，纳米球等。优选的胶体载体体系是泡囊状双层系统。

在制备脂质体时，将本发明的类脂-聚合物轭合物与制备脂质体通常使用的组分如形成泡囊的类脂、稳定剂等混合。包含的所述轭合物的摩尔浓度应足以使脂质体的血液循环时间相对于不含类脂-聚合物轭合物的相应脂质体延长数倍。所述聚合物轭合物通常的含量为 1-15%摩尔，优选 3-10%摩尔，最优选 5-7.5%摩尔。

通过动态光散射(Dynamic Light Scattering，DLS)技术测定的脂质体的平均尺寸低于 200nm，优选低于 150nm，最优选低于 100nm。对于这种类型的胶体载体颗粒来说的下限是 20nm。

当结合到荷电的脂质体中时，所述类脂-聚合物轭合物表现出减少 ζ 电位的能力，从而证实所述聚合物接枝屏蔽了表面电荷。

所述组合物可以以若干种途径来给药，但肠胃外给药是优选的。根据活性组分和所要治疗的医学适应症或病症，可通过静脉内、皮下、肌肉内、腹膜内、关节内等注射来进行给药。

在将本发明的脂质体制剂对小鼠静脉内给药后，已发现所述脂质体的血液循环时间可根据所需的目的改变。所述血液循环时间取决于所使用的类脂-聚合物轭合物，尤其是类脂/聚合物组合的选择、所述聚合物的分子量和接枝密度。对于例如其中两亲性类脂含有双憎水性尾部的类脂-PHEG 轭合物、类脂-PHEA 轭合物和类脂-PDLMS 轭合物(PHEG-二氨基丁烷 DODASuc，PHEA-DODASuc 和 PDLMS-DODASuc)，已观察到与用相应的 PEG-接枝的脂质体得到的结果相似的结果。

与通用的脂质体制剂相比，用本发明的类脂-聚合物轭合物制备的

脂质体制剂的稳定性一般有改进。此外，通过适当选择类脂-聚合物轭合物可进一步改进脂质体制剂的稳定性。可理解，这种选择还取决于活性剂的选择。例如，在脂质体制剂中用包封的皮质类固醇水溶性衍生物代替皮质类固醇本身，会导致脂质体制剂稳定性增加。将强的松龙磷酸盐包封在含有聚羟乙基天冬酰胺-DODASuc 轭合物的脂质体中，得到比结合到含有聚(2-羟乙基)-L-谷氨酰胺-二氨基丁烷-DODASuc 轭合物的脂质体中略好的结果。通过本领域已知的方法如喷雾干燥、冻干、旋转蒸发等从脂质体组合物中除去含水介质，可实现稳定性的进一步的改进。

结合到本发明胶体载体组合物中的类脂-聚合物轭合物给这些组合物提供了长循环性能。长循环性能应被理解为，与不含有类脂-聚合物轭合物的这种组合物相比，胶体载体组合物在血液中循环的时间有增加。所述长循环性能可按照本领域已知的方法来测定(Torchilin VP, Shtilman MI, Trubetskoy VS, Whiteman K, Milstein AM.: Amphiphilic vinyl polymers effectively prolong liposome circulation time in vivo. Biochimica et Biophysica Acta (1994) 1195: 181-184; Torchilin VP, Trubetskoy VS, Whiteman KR, Caliceti P, Ferruti P, Verones FM.: New synthetic amphiphilic polymers for steric protection of liposomes in vivo. Journal of pharmaceutical sciences (1995) 84(9): 1049-1053)。对脂质体，实施例中提供了一种方法。因而，这种组合物，尤其是泡囊组合物可用于许多种应用。除作为循环药物贮器外，它们例如通过与导向装置(homing devices)如单克隆抗体结合，可用于被动指向病理部位(肿瘤、感染、炎症)和主动指向在血流中的细胞、内皮(如血管生成相关的受体)。其它的应用可以是人造输氧系统，血池显象和生物材料如导尿管和血管假体的防污涂层。

此外，类脂-聚合物轭合物是可生物降解的，因而提供了许多优点，尤其是在人或动物体内的细胞中没有积累的危险。

另外，与 PEG-脂质体相比，类脂-聚合物轭合物表现出降低的类脂剂量依赖性。

另外一个但是很重要的优点是，在第二次注射本发明的组合物后不总是观察到增加的清除性，且血液循环时间的减少是适度的。这意味着与用 PEG 包覆的胶体载体组合物相比的显著的优点。

本发明的胶体载体组合物提供了用于治疗、诊断、预防等中的很多的可能性。由于类脂-聚合物轭合物，可根据目的来进行选择的组分，和各种可选择的胶态载体体系的多样性，显而易见，一般可为各种活性剂设计适宜的胶体载体组合物。如果在初次实验中，在本发明的组合物静脉给药后未观察到对血液循环时间的影响或仅观察到微弱的影响，本领域技术人员可改变在类脂-聚合物轭合物中的许多不同参数(如分子量、接枝密度、聚合物、类脂等) 和胶体载体组成参数，以按照标准设定增加循环时间。当本发明的组合物含有水溶性皮质类固醇作为活性剂时，观察到很令人感兴趣的效果。在一个体内关节炎模型实验中，这种组合物的一次静脉注射表现出与未包封或包封在常规脂质体中的皮质类固醇化合物重复注射同样有效的效果。感兴趣的水溶性皮质类固醇是布地奈德磷酸酯和 9-去氟肤轻松和氟替卡松丙酸酯的水溶性衍生物。有利的效果是与关节炎有关症状的完全的和长时间的缓解，而由于减少了要施用的皮质类固醇的数量并因为可使用通常自血液中被快速清除的皮质类固醇，降低了与基于皮质类固醇的疗法相关的副作用。此外在其中皮质类固醇是选择的药物或用作并用疗法(co-therapy) 的其它疾病中，可容易地确认本发明组合物的有益效果。但在本发明组合物中其它活性剂也表现出令人感兴趣的效果。

虽然为了清楚和便于理解的目的而以举例和实例的方式，一定程度地详细描述了本发明，但本领域普通技术人员很容易明白，在本发明的教导下，在不偏离所附权利要求书范围的条件下，可以对本发明进行一些变化和修改。

如下实施例对本发明进一步进行说明。

实施例

实施例 1

具有十七烷基十八烷基胺端基的聚(L-谷氨酸 γ-苄酯)(PBLG-十七

烷基十八烷基胺)

在氮气氛下，将0.94g(3.6mmol) L-谷氨酸γ-苄酯N-羧基酸酐(NCA)溶于5ml干燥DMF中。立即添加25mg(0.05mmol)1-十七烷基-十八烷基胺(Sigma Aldrich)在1ml干燥氯仿中的溶液。几乎即刻就形成气泡(CO_2)。所述溶液在室温下搅拌1天，然后沉淀在10-20倍过量的水中。收集白色沉淀物并在真空中干燥。产量0.75g。

表征:

在$CDCl_3$中的^{1}H-NMR(相对于溶剂峰的δ，单位ppm):

谷氨酸苄酯: 7.2(C_6H_5)，5.0(苄基的CH_2)，3.9(α-CH)，2.8 & 2.2(β & γ CH_2)，

烷基链: 1.2(CH_2烷基链)，0.85(CH_3)。

实施例2

具有十七烷基十八烷基胺端基的聚(N-(2-羟乙基)-L-谷氨酰胺)(PHEG-十七烷基十八烷基胺)

向0.60g PBLG-十七烷基-十八烷基胺(参见以上)在5ml干燥DMF中的溶液中，加入0.15g 2-羟基吡啶和0.8ml乙醇胺。将这一溶液在室温下氮气氛中搅拌3天。将该溶液沉淀在10-20倍过量的乙醚中。收集产物并在真空中干燥。将水溶性聚合物产物在纤维素酯渗析管(MWCO 500)中对水渗析2天。在冷冻干燥后获得纯化的具有十七烷基十八烷基端基的PHEG。产量0.30g。

表征:

在DMSO-d6中的^{1}H-NMR(相对于溶剂峰的δ，单位ppm):

羟乙基谷氨酰胺: 4.1(α-CH)，2.2 & 1.8-1.9(β & γ CH_2)，3.4(CH_2-OH)，3.1(CH_2-NH_2)，

烷基链: 1.2(CH_2烷基链)，0.8(CH_3)。

由硬脂基信号和α-CH信号的积分比值，估计出PHEG分子量为12000。

实施例3

具有通过 N-Boc-1,4-二氨基丁烷作为引发剂引入的二硬脂基胺端

基的聚[N-(2-羟乙基)-L-谷氨酰胺](PHEG-二氨基丁烷-DODASuc)

将 2.5g(9.5mmol) L-谷氨酸 γ-苄酯 N-羧基酸酐溶于 2.5ml 干燥乙酸乙酯和 12.5ml 干燥二氯甲烷的混合物中，并添加 N-Boc-1,4-二氨基丁烷在二氯甲烷中的 1M 溶液 0.95ml(0.95mmol)作为引发剂。所述混合物在氮气氛中室温下搅拌 3 天，然后沉淀在甲醇中。产量：1.48g PBLG-N-Boc-二氨基丁烷。

^{1}H-NMR($CDCl_3$)谱在 δ 1.4-1.3 处显示出 N-Boc-1,4-二氨基丁烷信号。

Maldi TOF ms:

重复的谷氨酸苄酯单元的质量：n ×219。

m/z 1417(n=5)，1636(n=6)，1855(n=7)，2074(n=8)，对应于具有 N-Boc-1,4-二氨基丁烷(187Da)基团和环肽端基(112Da)的钠加合物的质量。

m/z 1433(n=5)，1652(n=6)，1872(n=7)，对应于具有 N-Boc-1,4-二氨基丁烷(187Da)基团和环肽端基(112Da)的钾加合物的质量。

PBLG-N-Boc-二氨基丁烷的脱保护

将 738mg PBLG-N-Boc-二氨基丁烷在 5ml 在二噁烷中的 4N HCl 溶液中搅拌 3.5 小时。随后在 Rotavap 上蒸发所述反应混合物。将残余物溶解于 5ml 四氢呋喃中，并滴加到 80ml 的 $NaHCO_3$ 溶液(6.5g$NaHCO_3$ 溶解在水中)中。过滤出产物，用水洗涤并在真空中干燥。产量：677mg PBLG-二氨基丁烷。

^{1}H-NMR($CDCl_3$)显示成功地除去了保护基团。

Maldi TOF 质谱分析显示了所需的摩尔质量。

重复的谷氨酸苄酯单元的质量：n ×219。

m/z 1318(n=5)，1537(n=6)，1756(n=7)，1976(n=8)，对应于具有 1,4-二氨基丁烷(87Da)基团和环肽端基(112Da)的钠加合物的质量。

与 DODASuc 的偶联：

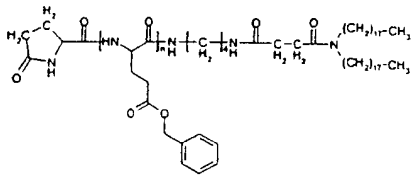
将 62mg(0.1mmol)的 N-丁二酰-二-十八烷基胺(DODASuc，Schmitt et al, J. Am. Chem. Soc. 1994, 116, 19, 8485-8491),

13.7mg(0.12mmol)的 N-羟基丁二酰亚胺和 0.66mg 的二甲基氨基吡啶(DMAP)溶解于 2ml 的二氯甲烷中。在冷却到 0°C 后，添加 24.6mg(0.12mmol)的 N，N'-二环己基碳二亚胺(DCC)。在 0°C 下将所述溶液搅拌 1 小时，并在室温下搅拌过夜。然后过滤出不溶解的二环己基脲，滤液添加到 200mg PBLG-二氨基丁烷在 3ml 二氯甲烷和 14μl 三乙胺中的溶液中。在室温下搅拌过夜后，将所述溶液滴加到甲醇中，过滤并干燥。产量: 135mg。^{1}H-NMR($CDCl_3$)谱表明存在二硬脂基，CH_2 信号在 δ 1.4-1.2 处，CH_3 信号在 δ 0.9-0.8 处。

Maldi TOF 质谱分析显示了所需的摩尔质量，表明 DODASuc 已与 PBLG-二氨基丁烷偶联。

m/z 1922(n=5)，2141(n=6)，2360(n=7)，2580(n=8)，2799(n=9)，3018(n=10)，对应于具有环肽端基(112Da)的 PBLG-二氨基丁烷-DODASuc 的钠加合物的质量。

结构:



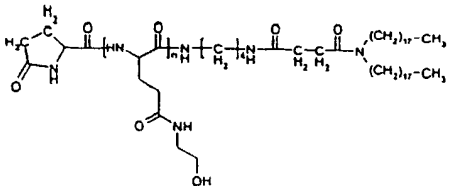
氨解。

将 120mg 的 PBLG-二氨基丁烷 DODASuc 和 10.8mg 的 2-HP 溶解于 1.3ml 的二甲基甲酰胺中，并加入 0.68ml 的 2-氨基乙醇。在 40°C 下氮气氛中搅拌 24 小时后，将所述溶液滴加到氯仿中。过滤出产物并在真空中干燥。产量: 83mg 的 PHEG-二氨基丁烷-DODASuc。

^{1}H-NMR(DMSO)在 δ 1.2-1.4 (CH_2)处和 δ 0.8-0.9(CH_3)处显示了二硬脂基信号。

由硬脂基信号和 α-CH 信号的积分的比值，估计出 PHEG 分子量为 4000。

结构:

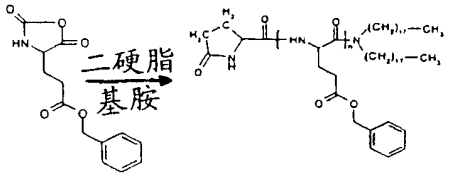


实施例 4

具有通过二硬脂基胺作为引发剂引入的胺端基的聚[N-(2-羟乙基)-L-谷氨酰胺]

将 1.0g(3.8mmol) L-谷氨酸 γ-苄酯 N-羧基酸酐溶解于 1ml 干燥乙酸乙酯和 5ml 干燥氯仿的混合物中。随后添加 2ml(0.19mmol)由 163mg 二硬脂基胺溶解在 3.26ml 氯仿中形成的溶液。烧瓶装有 $CaCl_2$ 管，并将所述混合物在氮气中室温下搅拌 4 天。将所述混合物滴加到甲醇中，通过过滤分离出聚合物并在真空中干燥。产量：757mg PBLG-二硬脂基胺。

反应：



^{1}H-NMR($CDCl_3$)分析显示了在产物中的二硬脂基的信号：CH_3 信号在 δ 0.9(t)处，CH_2 信号在 δ 1.3-1.2 处。

Maldi TOF ms:

重复的谷氨酸苄酯单元的质量：n ×219。

m/z 1971(n=6)，2190(n=7), 2410(n=8), 2629(n=9), 2848(n=10)，对应于具有二硬脂基胺(521Da)基团和环肽端基(112Da)的钠加合物的质量。

m/z 2206(n=7), 2427(n=8)，对应于具有二硬脂基胺(521Da)基团和环肽端基(112Da)的钾加合物的质量。

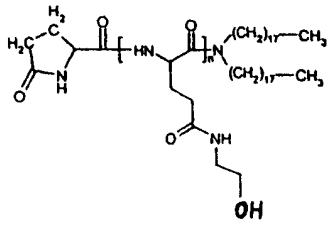
氨解

以上制备的 PBLG-二硬脂基胺(600mg)与氨基乙醇和作为催化剂

的 2-羟基吡啶在二甲基甲酰胺中进行氨解，得到 430mg 的 PHEG-二硬脂基胺。

^{1}H-NMR(DMSO-d6)显示了二硬脂基胺信号。

结构:



实施例 5

具有二氨基丁烷 DODASuc 端基的聚[N-(羟基烷基)-L-谷氨酰胺]

PBLG-二氨基丁烷 BOC:

向 3g L-谷氨酸 γ-苄酯 N-羧基酸酐(NCA)在 8ml 干燥 DMF 中的溶液中，添加 0.1g N-BOC-1,4-二氨基丁烷在 1ml 氯仿中的溶液。在第一小时内注意到有气体(二氧化碳)形成。将这一溶液在氮气氛中于室温下搅拌 1 天。在沉淀到约 100ml 甲醇中后，过滤出聚合物并进行干燥，得到 2g 含有 BOC 保护的氨基的 PBLG.

^{1}H-NMR($CDCl_3$)(相对于溶剂峰的 δ):

BOC: 1.4(CH_3)

PBLG: 2.2 & 2.6(β, γ -CH_2), 4.0(α -CH), 5.0(苄基的 CH_2), 7.3(苯基).

PBLG-二氨基丁烷(除去保护性的 BOC 基团):

将 1.1g PBLG-二氨基丁烷 BOC 在 5ml 的 4N HCl/二噁烷中的溶液搅拌 3-4 小时，然后滴加到约 80ml 的 $NaHCO_3$ 溶液(6.5g $NaHCO_3$ 溶解在水中)中。过滤出产物，用水洗涤，并在真空中干燥。产量: 1g PBLG-二氨基丁烷.

^{1}H-NMR($CDCl_3$)(相对于溶剂峰的 δ):

PBLG: 2.2 & 2.6(β, γ -CH_2), 4.0(α -CH), 5.0(苄基的 CH_2), 7.3(苯基).

BOC 信号不存在.

PBLG-二氨基丁烷 DODASuc(DCC 偶联):

将 170mg 的 N-丁二酰-二-十八烷基胺(DODASuc)、90mg 的 DCC 和 10mg 的 4-(二甲基氨基)吡啶鎓 4-甲苯磺酸盐(DPTS)溶解于 4ml 二氯甲烷中。在室温下将这一溶液搅拌 1 小时。添加 0.73g PBLG-二氨基丁烷和 40μl 三乙胺在 3ml 氯仿中的溶液。在室温下搅拌过夜后，将该溶液（含有二环已基脲沉淀）滴加到过量甲醇中(约 100ml)。过滤出聚合产物并干燥。产量: 0.5g。

^{1}H-NMR($CDCl_3$)(相对于溶剂峰的δ):

二硬脂基信号: 0.8-0.9(CH_3)和 1.2-1.4(CH_2)

PBLG: 2.2 & 2.6(β, γ-CH_2), 4.0(α-CH), 5.0(苄基的 CH_2), 7.3(苯基)

5.1 PHEG-二氨基丁烷 DODASuc

按下述方法，用乙醇胺氨解 PBLG-二氨基丁烷 DODASuc，获得 PHEG-二氨基丁烷 DODASuc:

将 0.5g PBLG-二氨基丁烷 DODASuc 和 15mg 2-羟基吡啶溶解于 4mlDMF 中。然后添加 2ml 乙醇胺。在氮气氛中 40℃下搅拌 24 小时后,将该溶液沉淀在约 100ml 乙醚中。将 PHEG-二氨基丁烷 DODASuc 溶解于水中，渗析(MWCO 500)并随后冷冻干燥，得到 0.35g 纯化的 PHEG 二氨基丁烷 DODASuc 轭合物。

^{1}H-NMR(DMSO-d6)(相对于溶剂峰的δ):

二硬脂基信号: 0.8-0.85(CH_3)和 1.2-1.5(亚甲基质子)

PHEG: 1.7-2.2(β, γ-CH_2), 3.1&3.3(羟乙基), 4.2(α-CH), 4.7(OH), 7.8&8.2(NH)

由二硬脂基信号和α-CH 信号的积分的比值计算出 PHEG 分子量为约 4000。

Maldi-TOF 确认了 PHEG 二氨基丁烷 DODASuc 轭合物的分子结构。

Na^+-加合物： m/z 3064.5(n=13), 3236.1(n=14), 3408.7(n=15), 3580.6(n=16), 3752.9(n=17), 3924.7(n=18), 4096.7(n=19), 4268.4(n=20), 4441.1(n=21), 4613.3(n=22), 4785.1(n=23)，等。

5.2 聚[(2-羟基丙基)-L-谷氨酰胺]二氨基丁烷 DODASuc

按下述程序，用 2-丙醇胺(异丙醇胺)氨解 PBLG-二氨基丁烷 DODASuc 来获得聚[(2-羟基丙基)-L-谷氨酰胺]二氨基丁烷 DODASuc:

将 0.15g PBLG-二氨基丁烷 DODASuc 和 0.05g 2-羟基吡啶溶解于 4mlDMF 中。然后添加 1ml 的 2-丙醇胺。在氮气氛中 40℃下搅拌 24 小时后，将该溶液沉淀在约 100ml 乙醚中。在干燥后得到 0.1g PHisoPG-二氨基丁烷 DODASuc。将聚合物溶解于水中，渗析(MWCO 500)并随后冷冻干燥，得到纯化的聚[(2-羟基丙基)-L-谷氨酰胺]二氨基丁烷 DODASuc。

^{1}H-NMR(DMSO-d6)(相对于溶剂峰的δ):

二硬脂基信号: 0.8-0.85(CH_3)和 1.2-1.5(亚甲基质子)

PHPG: 1.7-2.2(β，γ-CH_2), 1.0(CH_3) & 3.0 & 3.3 & 3.7(羟丙基), 4.2(α-CH), 4.7(OH), 7.8&8.2(NH)

计算出的分子量: 约 4000。

5.3 聚[(3-羟丙基)-L-谷氨酰胺]二氨基丁烷 DODASuc

用 3-丙醇胺对 PBLG-二氨基丁烷 DODASuc 进行氨解来获得聚[(3-羟丙基)-L-谷氨酰胺]二氨基丁烷 DODASuc:

将 0.3g PBLG-二氨基丁烷 DODASuc 和 0.1g 2-羟基吡啶溶解于 4mlDMF 中。然后添加 2ml 的 3-丙醇胺。在氮气氛中 40℃下搅拌 24 小时后，将该溶液沉淀在约 100ml 乙醚中。在干燥后得到 0.25g PHPG5000-二氨基丁烷 DODASuc。将聚合物溶解于水中，渗析(MWCO 500)并随后冷冻干燥，得到纯化的聚[(3-羟丙基)-L-谷氨酰胺]二氨基丁烷 DODASuc。

^{1}H-NMR(DMSO-d6)(相对于溶剂峰的δ):

二硬脂基信号: 0.8-0.85(CH_3)和 1.2-1.5(亚甲基质子)

PHPG: 1.7-2.2(β, γ-CH_2), 1.5&3.1&3.3 (羟丙基), 4.2(α-CH), 4.6(OH), 7.8&8.2(NH)

分子量: 约 5000。

Maldi-TOF:

Na^+-加合物: m/z 3623(n=15), 3810(n=16), 3996(n=17), 4182(n=18), 4368(n=19), 4555(n=20), 等。

5.4 聚[(4-羟基丁基)-L-谷氨酰胺]二氨基丁烷 DODASuc

用 4-丁醇胺对 PBLG-二氨基丁烷 DODASuc 进行氨解来获得聚[(4-羟基丁基)-L-谷氨酰胺]二氨基丁烷 DODASuc:

将 0.3g PBLG-二氨基丁烷 DODASuc 和 0.1g 2-羟基吡啶溶解于 4mlDMF 中。然后添加 2ml 的 4-丁醇胺。在氮气氛中 40℃下搅拌 48 小时后, 将该溶液沉淀在约 100ml 乙醚中。将聚合物溶解于水中, 渗析(MWCO 500)并随后冷冻干燥, 得到 0.2g 纯化的聚[(4-羟基丁基)-L-谷氨酰胺]二氨基丁烷 DODASuc。

^{1}H-NMR(DMSO-d6)(相对于溶剂峰的δ):

二硬脂基信号: 0.8-0.85(CH_3)和 1.2-1.5(亚甲基质子)

PHBG: 1.7-2.2(β, γ-CH_2), 1.4&3.1&3.3 (羟丁基), 4.2(α-CH), 4.5(OH), 7.8&8.2(NH)

分子量: 约 4000。

5.5 聚[(2,3-二羟基丙基)-L-谷氨酰胺]二氨基丁烷 DODASuc

用 2,3-二羟基丙基胺对 PBLG-二氨基丁烷 DODASuc 进行氨解来获得聚[(2,3-二羟基丙基)-L-谷氨酰胺]二氨基丁烷 DODASuc:

将 0.15g PBLG-二氨基丁烷 DODASuc 和 0.06g 2-羟基吡啶溶解于 3mlDMF 中。然后添加 1ml 的 2,3-二羟基丙基胺。在氮气氛中 40℃下搅拌 1 天后, 将该溶液沉淀在约 100ml 乙醚中。将聚合物溶解于水中, 渗析(MWCO 500)并随后冷冻干燥, 得到 0.1g 纯化的聚[(2,3-二羟基丙基)-L-谷氨酰胺]二氨基丁烷 DODASuc。

^{1}H-NMR(DMSO-d6)(相对于溶剂峰的δ):

二硬脂基信号: 0.8-0.85(CH_3)和 1.2-1.5(亚甲基质子)

聚(二羟基丙基)G: 1.7 - 2.2(β, γ-CH_2), 3.1&3.3-3.6 (二羟基丙基), 4.2(α-CH), 4.6&4.8(OH), 7.8&8.2(NH)

分子量: 约 4000。

实施例 6

胆甾醇基(cholesteryl)-PHEG

向 0.2g PBLG-NH_2 和 20μl 三乙胺在 2ml 氯仿中的溶液中, 添加 0.07g 氯甲酸胆甾醇酯在 1ml 氯仿中的溶液。将该溶液在室温下搅拌约 1 小时, 然后沉淀在乙醚中。在收集并干燥后, 得到 0.13g 聚合产物。

用乙醇胺在 40℃下氨解 1 天(2-羟基吡啶用作催化剂), 得到胆甾醇基 PHEG。通过渗析(MWCO 500)纯化所述聚合产物。

^{1}H-NMR(DMSO-d6)(相对于溶剂峰的δ):

PHEG: 1.7 - 2.2(β, γ-CH_2), 3.1&3.3 (羟基乙基), 4.2(α-CH), 4.7(OH), 7.8&8.2(NH)

胆甾醇基: 0.6-1.6

分子量: 约 4000。

Maldi-TOF 确认了胆甾醇基-PHEG 轭合物的分子结构。

Na^+-加合物: m/z 3046(n=14), 3218(n=15), 3390(n=16), 3562(n=17), 3735(n=18), 3907(n=19), 4080(n=20), 等。

实施例 7

聚(2-羟乙基)-DL-谷氨酰胺二氨基丁烷 DODASuc

该合成与聚(2-羟乙基)-L-谷氨酰胺二氨基丁烷 DODASuc 的合成(实施例 8)相似, 但一些细节不同:

由 L-谷氨酸 γ-苄酯和 D-谷氨酸 γ-苄酯的 1: 1 混合物来合成γ-苄基-DL-谷氨酰胺 NCA, 并从乙酸乙酯/己烷(约 1: 5)中结晶(参见实施例 1)。

将聚(苄基-DL-谷氨酰胺)二氨基丁烷BOC沉淀在水中而不是甲醇中。

将聚(苄基-DL-谷氨酰胺)二氨基丁烷 DODASuc 沉淀在甲醇中。

NMR 谱实质上与聚(2-羟乙基)-L-谷氨酰胺二氨基丁烷 DODASuc(实施例 8.1)的 NMR 谱相同。

分子量: 约 3000。

实施例 8

PHEG 共聚物: 聚(HEG-共聚-谷氨酸)二氨基丁烷 DODASuc; 5% 谷氨酸

将 0.14g PBLG 二氨基丁烷 DODASuc、0.05g 2-羟基吡啶、约 1ml 乙醇胺在 1.5ml DMF 中的溶液在氮气氛中在室温下搅拌一天。然后将该溶液沉淀在乙醚中。收集并干燥产物，即部分乙醇胺氨解的 PBLG 二氨基丁烷 DODASuc(具有 5%苄基酯侧基的 PHEG)。在 DMSO 中测定的 NMR 表明存在 5%的未反应的苄基基团。

将所述聚合物溶解于 8.5ml 的 1M NaOH 中并搅拌 4 小时。用 1N HCl 中和所述溶液，然后渗析(MWCO 500)数天。在将所述渗析过的溶液冷冻干燥后，得到带负电荷的(在生理 pH 下)的共聚物-类脂-轭合物(0.1g)。

在 DMSO 中的 NMR 表明苄基基团完全转化。

使用 Maldi TOF 来确认谷氨酸和羟乙基谷氨酰胺重复单元的存在。

分子量: 约 3500。

实施例 9

PHEG 共聚物: 聚(HEG-共聚-二甲基氨基乙基谷氨酰胺)二氨基丁烷 DODASuc; 5%二甲基氨基乙基侧基

将 0.25g PBLG 二氨基丁烷 DODASuc、0.08g 2-羟基吡啶和 1ml 乙醇胺在 2.5ml DMF 中的溶液在氮气氛中在室温下搅拌二天。将得到的溶液沉淀在乙醚中。收集并干燥所述部分乙醇胺氨解的 PBLG 二氨基丁烷 DODASuc(具有 5%苄基酯侧基的 PHEG)。在 $CDCl_3$ 中测定的 NMR 表明存在 5%的未反应的苄基基团。

将 0.16g 这种部分乙醇胺氨解的 PBLG 二氨基丁烷 DODASuc、

0.06g 2-羟基吡啶、1ml N，N-二甲基乙二胺在 2.5ml DMF 中的溶液在氮气氛中在 40℃下搅拌 1 天。沉淀在乙醚中得到一种粉末，收集所述粉末并在真空中干燥。在 DMSO 中的 NMR 表明残余苄基基团完全转化。将产物溶解在水中并渗析(MWCO 500)数天，随后冷冻干燥。得到：0.1g 带正电荷的 PHEG 共聚物-类脂轭合物。

分子量：约 4000。

实施例 10

分别具有硬脂胺和十七烷基十八烷基胺端基的聚(2-羟乙基)-L-天冬酰胺(PHEA)

L-天冬氨酸β-苄基酯 N-羧基酸酐(NCA)：

将 5g L-天冬氨酸β-苄基酯在含有约 16ml 20%光气甲苯溶液的 50ml 蒸馏过的 THF 中的悬浮液在 60-65℃下进行加热(在所述溶液上通氮气流)。在约 10 分钟后，得到澄清的溶液。在约 1.5 小时后，将该溶液缓慢倾倒到约 140ml 的正己烷中。几乎立即形成晶体。在-20℃下进一步结晶过夜后，分离出 NCA 结晶产物。从 THF/己烷和从热氯仿中进一步结晶得到 4.3g 微细针状物。(Biopolymers 1976, 15(9) 1869-71)。

^{1}H-NMR($CDCl_3$)(相对于溶剂峰的δ)：

苄基基团：7.3(苯基)，5.1(CH_2)

天冬氨酸酯 NCA：2.8&3.0(β-CH_2)，4.5(α-CH)，6.4(NH)

硬脂基-PBLA：

向 0.95g L-天冬氨酸β-苄基酯 NCA 在 2mlDMF 中的溶液中，添加 0.04g 硬脂胺在 0.5ml 氯仿中的溶液。在 60℃下搅拌数小时后，将浑浊溶液沉淀在甲醇中。在干燥后，得到 0.56g 的聚(L-天冬氨酸苄基酯)硬脂胺。

十七烷基十八烷基-PBLA：

向 0.5g L-天冬氨酸β-苄基酯 NCA 在 2ml DMF 中的溶液中，添加在约 1ml 氯仿中的 0.1g 1-十七烷基十八烷基胺。在室温下搅拌 3 天

后，将浑浊溶液沉淀在甲醇中。得到 0.2g 的聚合产物 PBLA-十七烷基十八烷基胺。

硬脂基-/十七烷基十八烷基-PHEA:

使用乙醇胺和作为催化剂的 2-羟基吡啶，对以上的 PBLA-轭合物在 40℃下氨解 1 天，随后沉淀在乙醚中，得到水溶性的聚(羟乙基)L-天冬酰胺(PHEA)，其分别含有硬脂基或十七烷基十八烷基尾部。通过渗析(MWCO 500)对所述类脂-聚合物轭合物进行纯化。

硬脂基-PHEA:

Maldi-TOF: Na^+-加合物 m/z 2823(n=16), 2981(n=17), 3139(n=18), 3297(n=19), 3455(n=20), 3613(n=21)等。

由 Maldi-TOF 确证，各 PHEA 链含有游离氨基端基。

十七烷基十八烷基-PHEA:

NMR(DMSO-d6)(相对于溶剂峰的δ):

十七烷基十八烷基: 0.8&1.2

PHEA: 2.2-2.6(β-CH_2), 3.1&3.4(羟乙基), 4.5(OH+α-CH), 7.8&8.3(NH)

分子量: 约 6000。

实施例 11

聚(2-羟乙基)-L-天冬酰胺 DODASuc

PBLA DODASuc:

向 1.7g L-天冬氨酸β-苄基酯 N-羧基酸酐(NCA)在 5ml DMF 中的溶液中，添加 0.2ml 的甲基胺在 THF 中的 2M 溶液。将所述澄清溶液搅拌一天，然后沉淀在甲醇(约 100ml)和水(250ml)的混合物中。得到 1.3g PBLA，含有甲基酰胺和氨基端基。

将 0.4g PBLA、30mgDCC、10mgDPTS 和 100mg N-丁二酰基-二硬脂基胺在 5ml DMSO 和 1ml 氯仿中的溶液搅拌一天，然后沉淀在水中。聚合产物用乙醚搅拌/洗涤并干燥。

PHEA DODASuc

将 PBLA DODASuc 用乙醇胺(使用 2-羟基吡啶作为催化剂)在 DMF 溶液中，在 40℃下氨解 1 天，得到 PHEA DODASuc (0.2g，在渗析和冷冻干燥后)。

^{1}H-NMR(DMSO-d6)(相对于溶剂峰的δ):

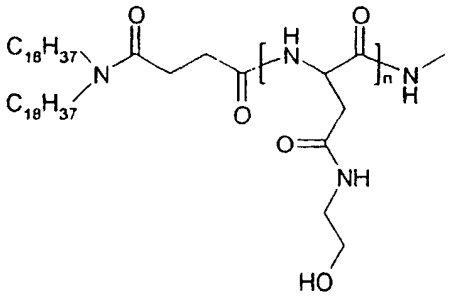
二硬脂基: 0.8(CH_3)，1.2(CH_2)，1.4(CH_2-N)

PHEA: 2.4-2.8(β-CH_2)，3.2&3.4(羟乙基)，4.6(α-CH + OH)，7.8-8.5(NH)

计算的分子量: 约 3000。

Maldi-TOF 确认了 PHEA DODASuc 轭合物的分子结构:

Na^+-加合物: m/z 2084(n=9), 2243(n=10), 2401(n=11), 2559(n=12), 2718(n=13), 2876(n=14),等。



实施例 12

聚(2-羟乙基)-L-天冬酰胺 DSPESuc 轭合物

PBLA(聚 L-天冬氨酸苄基酯)氨解后得到具有氨基末端的 PHEA，所述 PBLA 通过 L-天冬氨酸苄基酯 NCA 的甲基胺引发的聚合来得到。丁二酰化的 DSPE(其合成类似于在 JACS，116，8485(1994)中描述的 DPPE 的合成)首先使用 DCC(二环己基碳二亚胺)就地转化为其 NHS 酯: 将 70mg 丁二酰基化的 DSPE、20mgNHS(N-羟基丁二酰亚胺)、5mgDMAP 和 30mgDCC(二环己基碳二亚胺)在 2ml 二氯甲烷中的溶液搅拌约 3-4 小时。向该混合物中添加 0.13g 氨基终端的 PHEA(分子量约 4000)在 2mlDMSO 中的溶液。在搅拌过夜后，将该混合物沉淀在乙醚中。收集所述沉淀物并溶解在水中，渗析(MWCO500)数天。在冷冻干燥后，得到约 80mgPHEA-DSPE。

^{1}H-NMR(DMSO-d6)(相对于溶剂峰的δ):

DSPE: 0.8(CH_3), 1.2(CH_2), 1.4(CH_2-N)

PHEA: 2.4-2.8(β-CH_2), 3.2&3.4(羟乙基), 4.6(α-CH + OH), 7.8-8.4(NH)

计算的分子量: 约 4000。

实施例 13

聚(DL-丝氨酸)DODASuc

O-苄基-DL-丝氨酸 N-羧基酸酐(NCA):

将 2.5g O-苄基-DL-丝氨酸在含有约 10ml 20%光气甲苯溶液的 30ml 蒸馏过的(干燥)THF 中的悬浮液在 60-65℃下进行加热(氮气流经过所述溶液上面)。在约 5 分钟后, 得到澄清的溶液。在约 1.5 小时后, 将所述溶液缓慢倾倒在约 100ml 正己烷中。产物呈油状分离出来。将溶剂滗析, 并将所述油状物溶解在约 25ml 的乙酸乙酯中, 向其中缓慢添加 100ml 的己烷。在剧烈摇动烧瓶并在-20℃冷冻后, O-苄基-DL-丝氨酸 NCA 开始结晶。从乙酸乙酯/己烷和/或从氯仿/己烷中的类似重结晶给出 2g 的结晶物质。(Biopolymers 1976,15(9) 1869-71)

^{1}H-NMR($CDCl_3$)(相对于溶剂峰的δ):

苄基基团: 4.5(CH_2), 7.2(苯基)

丝氨酸 NCA: 3.7(β-CH_2), 4.4(α-CH), 5.8(NH)

聚(O-苄基-DL-丝氨酸):

向 0.9g O-苄基-DL-丝氨酸 NCA 在 2.5mlDMF 的溶液中, 添加 0.08ml 的 2M 的甲基胺在 THF 中的溶液。在室温下搅拌数小时后, 所述溶液变得浑浊和粘稠。在 1 天后, 将所述粘稠的、"结晶化"溶液与甲醇/水混合以完全沉淀聚合产物。得到 0.6g 的聚合产物聚(O-苄基-DL-丝氨酸)。

在 DMSO-d6 中测定的 ^{1}H-NMR (相对于溶剂峰的δ):

苄基基团: 4.4(CH_2), 7.2(苯基)

聚丝氨酸: 3.5(β-CH_2), 4.7(α-CH), 8.2(NH)

聚(O-苄基-DL-丝氨酸)DODASuc:

将 150mg N-丁二酰基-二-十八烷基胺(DODASuc)、80mgDCC 和 5mg DPTS 溶解于 4ml 氯仿中。所述溶液在室温下搅拌 1 小时。添加 0.6g 聚(O-苄基-DL-丝氨酸)和约 50μl 的三乙胺在约 5ml 氯仿中的溶液。在室温下搅拌过夜后，将该溶液(含有二环己基脲沉淀物)滴加到过量甲醇(约 100ml)中。过滤出聚合产物并干燥。得到 0.4g。

在 DMSO-d6 中的 ^{1}H-NMR (相对于溶剂峰的δ):

二硬脂基: 0.8(CH_3), 1.2(CH_2), 1.6(CH_2-N)

苄基基团: 4.4(CH_2), 7.2(苯基)

聚丝氨酸: 3.5(β-CH_2), 4.7(α-CH), 8.2(NH)

聚(DL-丝氨酸)DODASuc:

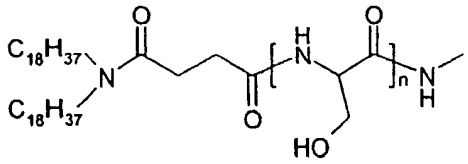
将 0.1g 聚(O-苄基-DL-丝氨酸)DODASuc 溶解在约 4ml 33%的 HBr/AcOH 溶液中并搅拌 1 小时。然后将所述溶液沉淀在水中。过滤出聚合产物，用水洗涤，收集并随后溶解 (1-2 小时) 于 4ml 1M NaOH 中。用 1N HCl 溶液中和所得到的溶液，然后渗析(MWCO 500)数天。将渗析过的溶液冷冻干燥。得到 20mg 聚(DL-丝氨酸)DODASuc。

在 DMSO-d6 中的 ^{1}H-NMR (相对于溶剂峰的δ):

二硬脂基: 0.8(CH_3), 1.2(CH_2), 1.6(CH_2-N)

聚丝氨酸: 3.6(β-CH_2), 4.3(OH), 5.0(α-CH), 8.0(NH)

从二硬脂基信号和α-CH 信号的积分的比值，计算出聚丝氨酸分子量为约 1500。



实施例 14

聚-L-苏氨酸 DODASuc

合成与聚(D,L-丝氨酸)DODASuc 的合成相似，并由 O-苄基-L-苏氨酸、HCl 和光气开始，经过 O-苄基-L-苏氨酸 N-羧基酸酐(NCA)进行。

聚-L-苏氨酸 DODASuc(M=约 2000):

在 DMSO-d6 中的 ^{1}H-NMR (相对于溶剂峰的δ):

二硬脂基: 0.8(CH_3)，1.2(CH_2)，1.6(CH_2-N)

聚苏氨酸: 1.0(CH_3)，4.0(β-CH)，4.3 (α-CH)，5.0(OH)，7.8(NH)

实施例 15

聚(D,L-蛋氨酸亚砜)DODASuc

DL-蛋氨酸 N-羧基酸酐(NCA):

将 2.5g DL-蛋氨酸在含有约 15ml 20%光气甲苯溶液的 40ml 蒸馏过的(干燥)THF 中的悬浮液在 60-65℃下加热(氮气流经过所述溶液)。几乎立即形成澄清溶液。在约 1 小时后，将所述溶液缓慢倾倒在约 140ml 正己烷中。DL-蛋氨酸 NCA 在-20℃下结晶(需数天)。从乙酸乙酯/己烷中重结晶得到约 0.7g 结晶物质。(Biopolymers 1976, 15(9) 1869-71)

^{1}H-NMR($CDCl_3$)(相对于溶剂峰的δ):

蛋氨酸 NCA: 2.0-2.4(β-CH_2+ CH_3)，4.5(α-CH)，6.8(NH)

聚(DL-蛋氨酸):

向 0.7g DL-蛋氨酸 NCA 在 2.5mlDMF 中的溶液中，添加 0.1ml 2M 的甲基胺 THF 溶液。在 1 天后，将浑浊溶液沉淀在约 100ml 甲醇中并随后干燥。得到 0.33g 聚合产物聚(DL-蛋氨酸)。

在 $CDCl_3$/TF-d 中的 ^{1}H-NMR (相对于溶剂峰的δ):

聚蛋氨酸: 2.0-2.3(CH_2& CH_3)，2.6(CH_2)，4.7(α-CH)

聚(DL-蛋氨酸)DODASuc:

将 80mg N-丁二酰基-二-十八烷基胺(DODASuc)、45mgDCC 和

5mg DPTS 溶解于 2ml 氯仿中。所述溶液在室温下搅拌 1 小时。添加 0.33g 聚(DL-蛋氨酸)和约 20μl 三乙胺在约 2.5mlDMSO 中的溶液。在室温下搅拌过夜后，将所述溶液(含有二环己基脲沉淀物)滴加到过量甲醇(约 100ml)中。过滤出聚合产物并干燥。得到 0.22g。

在 DMSO-d6 中的 ^{1}H-NMR (相对于溶剂峰的δ):

二硬脂基: 0.8(CH_3)，1.2(CH_2)，1.4(CH_2-N)

聚蛋氨酸: 1.8(β-CH_2)，2.0(CH_3)，2.4(γ-CH_2)，4.4 (α-CH)，8.1(NH)

聚(DL-蛋氨酸亚砜)DODASuc:

聚(DL-蛋氨酸)DODASuc 的单氧化:

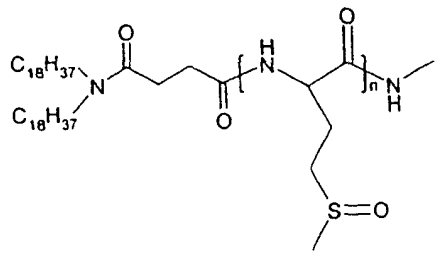
将 0.3g 高碘酸钠在 2ml 水中的溶液缓慢添加到 0.22g 聚(DL-蛋氨酸)二氨基丁烷 DODASuc 在约 6ml 乙酸中的悬浮液中。所得到的橙/红色溶液(其在数小时后形成)搅拌 1 夜。然后添加约 15ml 水，并将所得到的橙/红色溶液渗析(MWCO 500)数天。冷冻干燥后得到 0.25g 产物。

在 D_2O 中的 ^{1}H-NMR (相对于溶剂峰的δ):

二硬脂基: 0.7(CH_3)，1.2(CH_2)(宽峰)

聚蛋氨酸亚砜: 2.0(β-CH_2)，2.5(CH_3)，2.8(γ-CH_2)，4.3 (α-CH)，8.5(NH)

计算的分子量: 约 4000。



实施例 16

聚(DL-谷氨酰胺)DODASuc

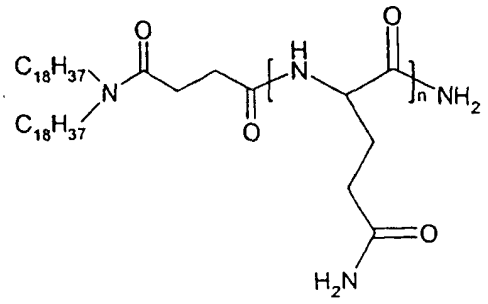
Ansynth Service B.V.使用固相肽合成方法(约 50mg 规模)合成了

聚(DL-谷氨酰胺)DODASuc 轭合物。结合到树脂上的聚(DL-谷氨酰胺)(n=20)使用 Fmoc 保护的氨基酸逐步构造。向 N-端上连接 N-丁二酰基-二硬脂基胺。将 C-端转变成酰胺。^{1}H-NMR 谱确认了该结构。

在 DMSO-d6 中的 ^{1}H-NMR (相对于溶剂峰的 δ):

二硬脂基: 0.8(CH_3), 1.2(CH_2), 1.4(CH_2-N)

聚谷氨酰胺: 1.7-2.2(β,γ-CH_2), 4.2(CH), 6.8&7.3(NH_2), 8.2(NH)



实施例 17

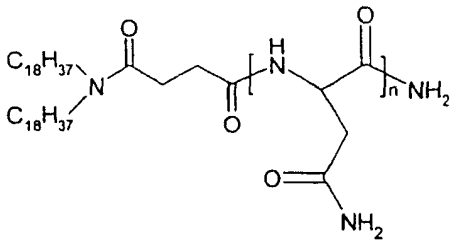
聚(DL-天冬酰胺)DODASuc

Ansynth Service B.V.使用固相肽合成方法，由 Fmoc 保护的氨基酸开始合成了聚(DL-天冬酰胺)DODASuc 轭合物(约 50mg 规模)。逐步构造结合到树脂上的聚(DL-天冬酰胺)(n=20)。向 N-端上连接 N-丁二酰基-二硬脂基胺。将 C-端转变成酰胺。在 DMSO 中测定的 ^{1}H-NMR 谱确认了所述结构。

在 DMSO-d6 中的 ^{1}H-NMR (相对于溶剂峰的 δ):

二硬脂基: 0.8(CH_3), 1.2(CH_2), 1.4(CH_2-N)

聚天冬酰胺: 2.5(CH_2), 4.5(CH), 7.0&7.4(NH_2), 8.1(NH)



实施例 18

聚(D,L-丙氨酸)DODASuc

将 95mg 聚-DL-丙氨酸(Sigma; MW:约 2000)溶解于 4ml DMSO 中。向该溶液中添加 40μl 三乙胺。随后，将该溶液添加到 0.1g DODASuc、70mgDCC 和 5mgDPTS 在 2ml 氯仿中的已搅拌 1 小时的溶液中。在搅拌 1 天后，将该混合物沉淀在甲醇/乙醚混合物中。过滤出沉淀物并干燥。

在 DMSO 中测定的 ^{1}H-NMR:

二硬脂基: 0.8(CH_3)，1.2(CH_2)，1.4(CH_2N)

聚丙氨酸: 1.2(CH_3)，4.2(CH)，8.0(NH)

实施例 19

β-丙氨酸和羟乙基 L-谷氨酰胺的共聚肽

DODASuc-(β-Ala)$_3$-Glu(OBzl)-(β-Ala)$_4$-Glu(OBzl)-(β-Ala)$_3$-Glu(OBzl)-(β-Ala)$_2$-NH_2:

Ansynth Service B.V.通过固相方法，由 Fmoc 保护的单体开始合成了β-丙氨酸和 L-谷氨酸苄基酯的共聚肽。

C-端: 酰胺; N-端: DODASuc。

DODASuc-(β-Ala)$_3$-HEG-(β-Ala)$_4$-HEG-(β-Ala)$_3$-HEG-(β-Ala)$_2$-NH_2

之后，通过在 DMF 中进行的氨解(乙醇胺)反应将谷氨酸苄基酯单元转化为羟乙基谷氨酰胺(HEG)单元。

在 DMSO 中测定的 ^{1}H-NMR 显示不存在苄基基团/苄基基团的转化。

实施例 20

制备含 PHEG-硬脂胺的脂质体

称量 33.8mg 的蛋卵磷脂(EPC)(Lipoid Ludwigshafen)、9.67mg 的胆固醇(Sigma Aldrich)和 30.0mg 的聚[N-(2-羟乙基)-L-谷氨酰胺]-硬脂胺(PHEG-硬脂胺)(合成的)并转移到一个 50ml 圆底烧瓶中。添加

500kBq 的氚标记的胆甾烯基油基醚作为类脂标记物。将所述类脂和标记物溶解于约 10ml 乙醇中。之后在 40℃下在旋转蒸发器(Rotavapor)中真空蒸发 1 小时，随后经氮气吹扫 1 小时蒸发至干。

将 PBS 添加到所述干类脂膜上，并在存在玻璃珠的条件下摇动一小时，以使类脂膜完全水合。

将脂质体悬浮液转移到挤出机(Avestin, 最大体积 15ml)中，并通过 2 个孔径分别为 200 和 100nm 的聚碳酸酯过滤器(一个放在另一个上面)，使用氮气加压挤出 6 次，并通过孔径分别为 100nm 和 50nm 的过滤器加压挤出 18 次。随后，将所述脂质体悬浮液在渗析室(Slide-A-Lyzer,10000MWCO)中，在 24 小时内对 1 升无菌 PBS 渗析 2 次。

通过光散射方法(Malvern Zeta-sizer)测定脂质体的平均颗粒尺寸，并发现其为 93.6 ±0.9nm，多分散性指数为 0.099 ±0.02。在脂质体制备过程中，通过将所述制剂的最终放射性与挤出步骤之前的放射性进行对比来确定的类脂的损失量为 25%。脂质体悬浮液在氮气氛中于 4℃下贮存。

实施例 21

含有其它类脂-聚合物轭合物的脂质体的制备

使用在实施例 20 中所述的膜方法制备脂质体。使用二棕榈酰卵磷脂代替蛋卵磷脂。向干类脂膜上添加 5mM HEPES 缓冲液，并在玻璃珠存在下摇动 5 分钟，以使类脂膜完全水合。通过经孔径为 100 和 200nm 的 2 个堆置的 PC 膜挤出 12 次来对脂质体进行尺寸分级。将所得到的脂质体分散体进行渗析(MWCO 10000)，并使用动态光散射技术来确定平均颗粒尺寸。脂质体制剂的性能见表 1。

实施例 22

在给小鼠单次静脉注射后结合到脂质体中的 ^{3}H-标记的类脂-聚合物轭合物的比较动力学

雄性小鼠(Wistar, Crl: (WI)BR (outbred, SPF-Quality) (Charles River, Sulzfeld, Germany))自由采食标准球粒实验动物饵料(Altromin,

code VRF 1, Lage, Germany)和自来水。在尾部静脉给予单剂量静脉注射脂质体制剂，各含有具有 40-50kBq 放射性的 ^{3}H-标记的胆甾烯基油基醚(Amersham)，(每 50μmol 类脂的组成示于表 1 中)。除非另外指明，施用的总类脂为 5μmol。在给药后的如下时间点从各小鼠的尾部静脉收集血样：5 分钟和 4、24 和 48 小时。收集的血样量为每次采样约 300μl。

将采集的血样转移到肝素化的管中并在-20℃下贮存。

按照如下方法将 100μl 的一个等分试样增溶:

•将 100μl 转移到闪烁管(20ml)中。

•添加 100μl 的 Solvable。将其保温至少 1 小时。

•添加 100μl 的 1mM EDTA 和 200μl 的 $H_2O_2$30%。该混合物在室温下保温 24 小时并之后在 50℃下保温过夜。

•添加 Ultima Gold(10ml)作为闪烁流体(scintillation fluid)。

•通过 LSC 测量放射性。

所有放射性测量使用 Packard 闪烁计数仪(1900TR)来进行。计数时间为达到 ±0.2%的统计精确度或最长 5 分钟，无论何者先达到。将 Packard 1900TR 编程以自动地减去背景并将每分钟计数(CPM) 转化每分钟的分解数(disintegration)。

对提到的一些制剂，在注射后 48 小时将小鼠的肝和脾解剖，按照如下方法评价脂质体的定位(localisation):

将器官匀浆并将匀浆物稀释至 25ml(肝)或 5ml(脾)。将 1ml 的均浆物转移到闪烁管，随后向其中添加:

•200ml Sovable(混合且将试样在 50℃下保温过夜)

•200ml 0.5M EDTA 溶液

•250ml H_2O_2(30%)溶液(在 50℃下保温过夜)

•10ml Ultima Gold 闪烁流体(涡旋且将试样保温 24 小时)。

之后将试样在β-闪烁计数仪计数 10 分钟。一些脂质体制剂的结果示于图 6 中。

按照实施例 21 制备的脂质体制剂的组成和这一实施例的体内试

验得到的结果示于表 1 中。评价了血液循环时间的增加，其中：

●良好意味着对循环时间的作用与含有 PEG-DSPE 的脂质体所显示的作用相当。

●适中意味着对循环时间的作用介于含有 PEG-DSPE 的脂质体和无聚合物涂层的裸露脂质体所显示的作用之间。

●轻微意味着对循环时间的作用在目前条件下几乎与裸露脂质体所显示的作用相似。

表 1

每 50μmol 类脂的脂质体组成和性能

DPPC (mg)	胆固醇 (mg)	类脂-聚合物轭合物 (mg)	平均粒径 (nm)	多分散性指数	血液循环时间的增加
23.1	6.4	Ex.3:10	153 ±0.5	0.056	良好
23.1	6.4	Ex.2:30	143 ±2	0.205	适中
23.1	6.4	Ex.5.1:11.2	140.3 ±2.2	0.090	良好
23.1	6.4	Ex.5.2:13.8	153.0 ±0.9	0.090	适中
23.1	6.4	Ex.5.4:11.2	148.2 ±1.7	0.071	轻微
23.1	5.5	Ex.6:11.0	138.7 ±1.8	0.116	轻微
23.1	6.4	Ex.11:8.9	146.0 ±2.1	0.092	良好
23.1	6.4	Ex.11:13.8	147.0 ±1.1	0.068	良好
23.1	6.4	Ex.11:8.9	141.7 ±2.3	0.044	良好
23.1	6.4	Ex.5.2:11.2	163.9 ±3.0	0.068	适中
23.1	6.4	Ex.20:2.2	171.6 ±2.5	0.167	轻微
23.1	6.4	Ex.8:10.1	180.7 ±6.1	0.113	轻微

DPPC (mg)	胆固醇 (mg)	类脂-聚合物轭合物 (mg)	平均粒径 (nm)	多分散性指数	血液循环时间的增加
23.1	6.4	Ex.5.1:11.2	159.0 ±3.8	0.073	良好§
23.1	6.4	Ex.11:8.9	152.9 ±3.4	0.050	良好§
23.1	6.4	Ex.9:11.2	170.3 ±2.5	0.039	适中
23.1	6.4	Ex.9:2.24 +Ex.5.1:8.96	166.0 ±0.9	0.056	适中
23.1	6.4	Ex.8:10.1	167.7 ±0.6	0.170	轻微
23.1	6.4	Ex.15:11.2	159.9 ±2.3	0.062	良好
23.1	6.4	Ex.13:5.0	162.7 ±1.6	0.159	轻微
23.1	6.4	Ex.16:8.8	156.3 ±3.2	0.059	适中
25.0	6.4	Ex.17:8.8	164.7 ±4.0	0.116	适中
23.1	6.4	Ex.7:8.8	159.0 ±3.8	0.073	轻微
23.1	6.4	Ex.19:8.8	152.9 ±3.4	0.050	适中
23.1*	6.4*	Ex.11:8.8*	167.7 ±0.6	0.170	良好
23.1**	6.4**	Ex. 11:8.8**	149.9 ±2.3	0.062	良好
23.1***	6.4***	Ex. 11:8.8***	162.7 ±.024	0.159	轻微
23.1	6.4	PEG-DSPE:6.9	156.3 3.2	0.059	良好
23.1*	6.4*	PEG-DSPE:8.8*	170.3 2.5	0.039	良好
23.1**	6.4**	PEG-DSPE:6.9**	166.0 0.9	0.056	良好
23.1***	6.4***	PEG-DSPE:6.9***	170.5 0.3	0.110	<轻微

*:施用 0.5μmol 总类脂(参见图 1 和 2)

**: 施用 0.05μmol 总类脂(参见图 1 和 2)

***: 施用 0.005μmol 总类脂(参见图 1 和 2)

§: 当在一周后进行第二次注射时(TL1μmol)，对于含有实施例 5.1 的类脂-聚合物轭合物的脂质体，观察到循环时间的减少。含有实施例 11 的轭合物的脂质体也表现出这种减少，但对 2 个动物，观察到这种效应适中。

实施例 23

制备含有类脂-聚合物轭合物和强的松龙磷酸盐的脂质体

分别称量 750mg 的二棕榈酰卵磷脂(DPPC)(Lipoid Ludwigshafen)、220.0mg 的胆固醇(Sigma Aldrich)和 270.0mg 的实施例 11 的类脂-聚合物轭合物，及 750mg 的二棕榈酰卵磷脂、250.8mg 的胆固醇和 267.6mg 的 PEG-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(PEG-DSPE)(Avanti Polar Lipids)，并在 100ml 圆底烧瓶中混合。将类脂溶解于约 30ml 的甲醇和氯仿的 1: 1 混合物(实施例 14 的类脂-聚合物轭合物)或乙醇(PEG-DSPE)中。之后，在 40℃下在旋转蒸发器(Rotavapor)中真空蒸发 1 小时，随后氮气吹扫 1 小时而蒸发至干。

称量 1200mg 的强的松龙磷酸二钠(PLP)(OPG Nieuwegein)并溶解于 12ml 的无菌 PBS 中。将该溶液添加到干类脂膜上并在存在玻璃珠的条件下摇动一小时，以使类脂膜完全水合。

将脂质体悬浮液转移到挤出机(Avestin，最大体积 15ml)中，并分别通过一个放在另一个上面的 2 个孔径分别为 200 和 100nm、分别为 100 和 50nm 及分别为 50 和 50nm 的多孔过滤器，使用氮气加压挤出 6 次。随后，将所述脂质体悬浮液在渗析室(Slide-A-Lyzer, 10000MWCO)中，在 24 小时内对 1 升无菌 PBS 渗析 2 次。

通过光散射方法(Malvern Zeta-sizer)测定脂质体的平均颗粒尺寸，并发现其分别为约 85 和 90nm，多分散性指数<0.1。强的松龙磷酸盐的包封效率通过 HPLC 方法来测定，发现其为 2.6%。脂质体悬浮液在氮气氛中于 4℃下贮存，发现其在至少 5 周内是稳定的，其中含有实施例 14 的类脂-聚合物轭合物的脂质体制剂略好于含有对比类脂-聚合物轭合物 PEG-DSPE 的脂质体制剂(参见图 3)。

实施例 24

含有强的松龙磷酸盐的脂质体制剂在小鼠佐剂关节炎模型中循环时间和疗效的评价

用在不完全 Freund's 佐剂(adjuvant)中加热灭活的结核杆菌在尾

底(tail base) 对 Lewis 鼠进行皮下免疫。在免疫后 9 至 12 天之间开始爪炎症，在约 20 天后达到最严重程度，然后逐渐消散。

从免疫后 10 天直到 35 天，通过对爪炎症严重度进行视觉打分来对所述疾病进行评价。当爪炎症分数约达到最大分数的一半数值时(14-15 天)，将所有小鼠分为具有相等的平均分数的 5 组，并用单一静脉注射如下物质来进行处置:

1. 在 PHEA-DODASuc 脂质体中的 10mg/kg PLP，如实施例 23 所制备，或

2. 在 PEG-DSPE 脂质体中的 10mg/kg PLP，如实施例 23 所制备(对比)，或

3. PBS(空白)。

在 t=0、24 和 48 小时，收集血样并分析脂质体 PLP 的血浆浓度。

PHEA-和 PEG-脂质体在血液中的循环行为通过 PLP 的血浆浓度曲线来表示，其绘于图 4 中。两种类型的脂质体就循环半衰期而言表现同样好。

图 5 显示了相对于作为空白实验的盐水处置的小鼠，10mg/kg PLP-PHEA-和 10 mg/kg PLP-PEG-脂质体在小鼠佐剂关节炎中的治疗活性。

图1

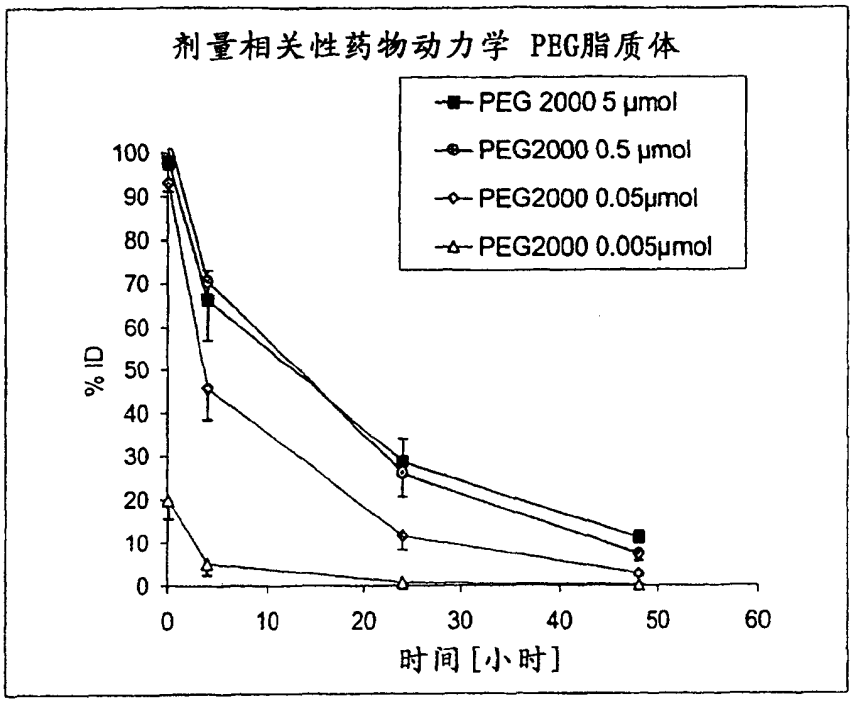

剂量相关性药物动力学 PEG脂质体
PEG 2000 5 µmol
PEG2000 0.5 µmol
PEG2000 0.05µmol
PEG2000 0.005µmol
% ID
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
10
20
30
40
50
60
时间[小时]

图2

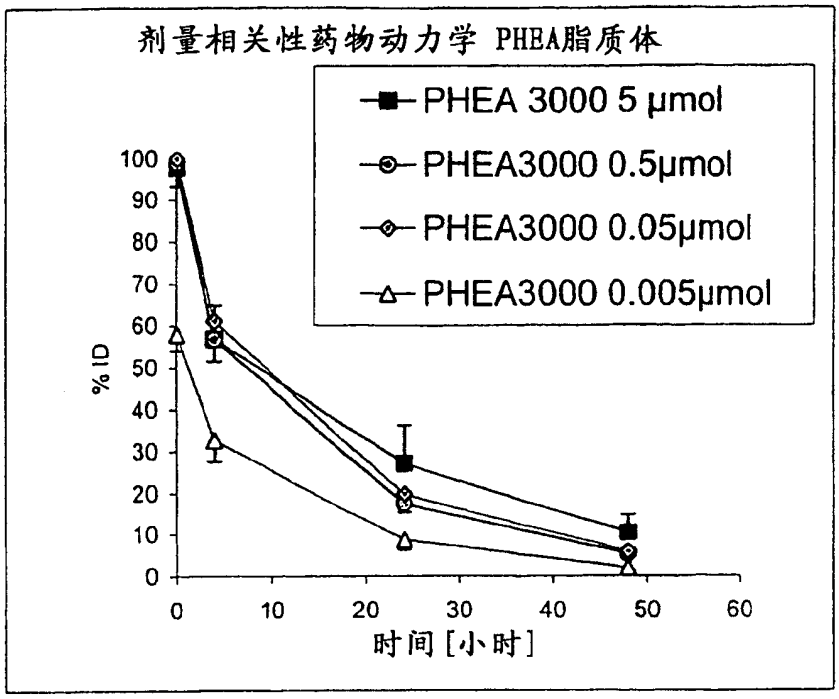

剂量相关性药物动力学 PHEA脂质体
PHEA 3000 5 µmol
PHEA3000 0.5µmol
PHEA3000 0.05µmol
PHEA3000 0.005µmol
% ID
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
10
20
30
40
50
60
时间[小时]

图 3

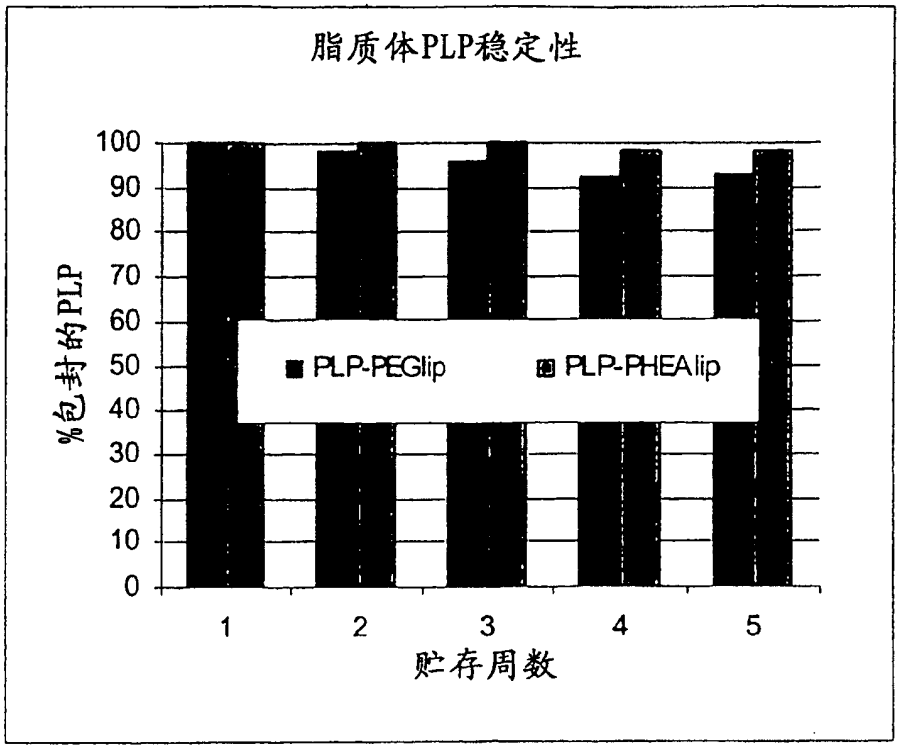

脂质体PLP稳定性
%包封的PLP
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
PLP-PEGlip
PLP-PHEAlip
1
2
3
4
5
贮存周数

图4

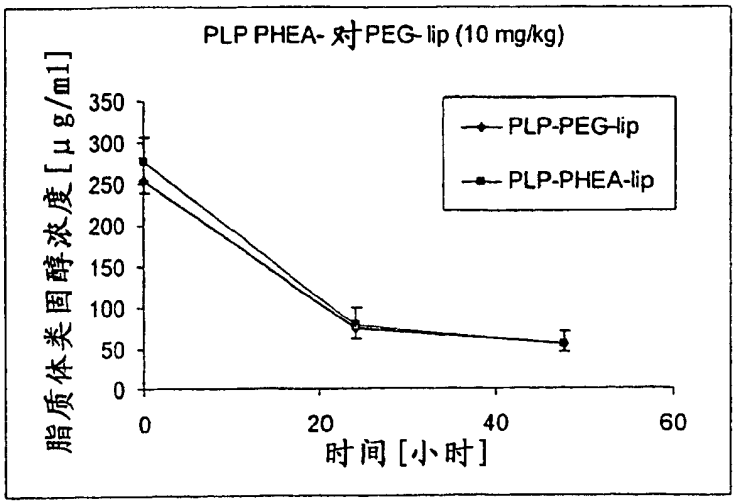

PLP PHEA- 对PEG- lip (10 mg/kg)
脂质体类固醇浓度[μg/ml]
350
300
250
200
150
100
50
0
0
20
40
60
时间[小时]
PLP-PEG-lip
PLP-PHEA-lip

图5

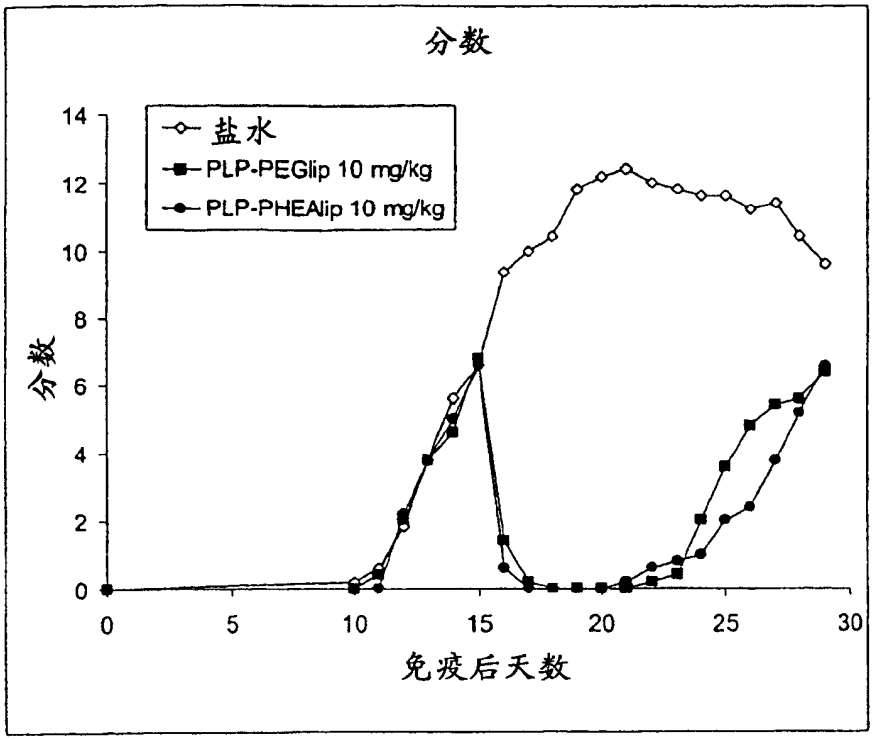
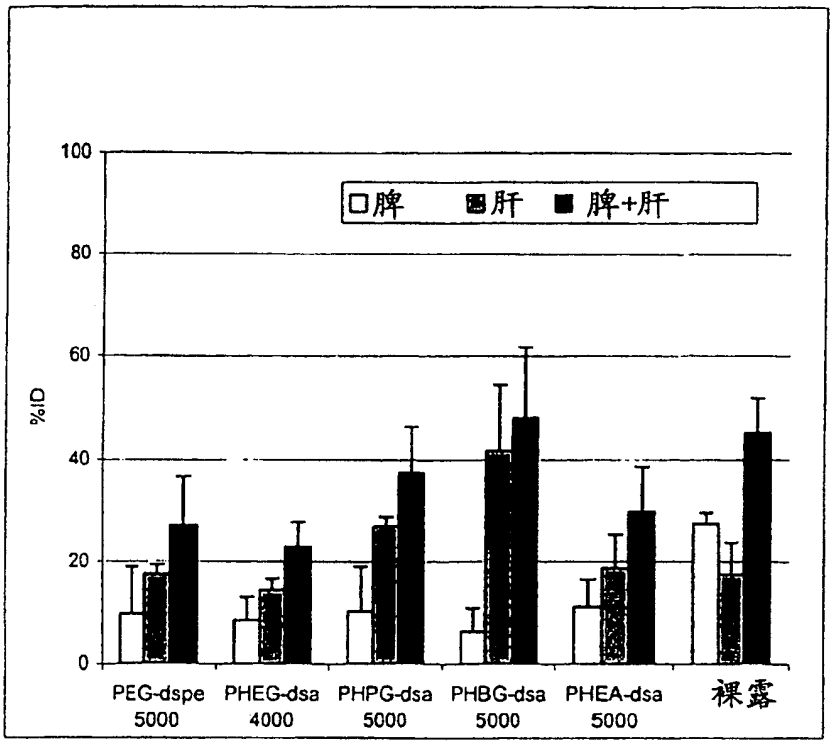

分数
盐水
PLP-PEGlip 10 mg/kg
PLP-PHEAlip 10 mg/kg
分数
0
2
4
6
8
10
12
14
0
5
10
15
20
25
30
免疫后天数

图6


100
80
60
40
20
0
%ID
脾
肝
脾+肝
PEG-dspe 5000
PHEG-dsa 4000
PHPG-dsa 5000
PHBG-dsa 5000
PHEA-dsa 5000
裸露