



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108024962 A

(43)申请公布日 2018.05.11

(21)申请号 201580082921.X

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021

(22)申请日 2015.09.21

代理人 陈晓娜

(30)优先权数据

14/849,100 2015.09.09 US

(51)Int.Cl.

A61K 9/127(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.03.06

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/051206 2015.09.21

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/044135 EN 2017.03.16

(71)申请人 曼丽国际有限公司

地址 新加坡新加坡

(72)发明人 游廷彬 施志伟 苏矢宏

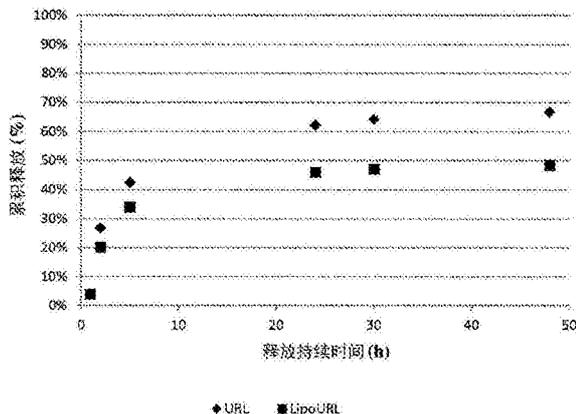
权利要求书2页 说明书9页 附图2页

(54)发明名称

用于治疗癌症的雷帕霉素和雷帕霉素衍生物的稳定的脂质体制剂

(57)摘要

用于治疗癌症的稳定的脂质体制剂。所述制剂包括脂质体,所述脂质体包含POPC、DMPC和DOPC中的一种或多种和包封在所述脂质体中的抗癌药西罗莫司、左他莫司和依维莫司中的一种或多种。还提供用于用所述抗癌药加载所述脂质体的有效的远程膜加载方法以及利用所述脂质体制剂治疗癌症的方法。



1. 用于治疗癌症的稳定的脂质体制剂,所述稳定的制剂包含脂质体,所述脂质体含有至少一个由选自棕榈酰油酰磷脂酰胆碱(POPC)、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)和二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)或它们的混合物组成的组的磷脂酰胆碱形成的脂双层;以及包封在所述脂质体中的药物,其中所述药物是西罗莫司、左他莫司或依维莫司,并且所述脂质体具有50nm至2 μ m的直径并且不含胆固醇。

2. 权利要求1的稳定的脂质体制剂,其中所述药物与所述磷脂酰胆碱的重量比为1:5至1:100。

3. 权利要求2的稳定的脂质体制剂,其中所述制剂含有0.01mg/mL至10mg/mL的所述药物。

4. 权利要求3的稳定的脂质体制剂,其中所述制剂的pH为6至8。

5. 权利要求1的稳定的脂质体制剂,其中所述至少一个脂双层还包括与聚乙二醇(PEG)部分缀合的磷脂。

6. 权利要求5的稳定的脂质体制剂,其中所述磷脂是二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE),并且所述PEG部分的分子量为150至3000g/mol。

7. 权利要求6的稳定的脂质体制剂,其中所述药物与所述磷脂酰胆碱的重量比为1:5至1:100。

8. 权利要求7的稳定的脂质体制剂,其中所述制剂含有0.01mg/mL至10mg/mL的所述药物。

9. 权利要求8的稳定的脂质体制剂,其中所述制剂的pH为6至8。

10. 权利要求9的稳定的脂质体制剂,其中所述磷脂酰胆碱是POPC,所述药物是左他莫司,所述左他莫司与所述磷脂酰胆碱的重量比为1:20,并且所述制剂含有1mg/mL的左他莫司。

11. 用于将疏水性药物加载到脂质体中的方法,所述方法包括:

获得具有至少一个脂双层的无胆固醇的脂质体,

将所述无胆固醇的脂质体添加至水溶液以形成混悬液,使得跨所述至少一个脂双层基本上没有跨膜电势,

在不存在增溶剂的情况下将疏水性药物添加至所述混悬液以形成混合物,并且

在室温将所述混合物搅拌4至48小时,

由此至少80%所添加的疏水性药物被加载到所述无胆固醇的脂质体中。

12. 权利要求11的方法,其中所述疏水性药物是西罗莫司、左他莫司或依维莫司。

13. 权利要求12的方法,其中所述无胆固醇的脂质体具有80nm至2 μ m的直径,并且是通过以下方式获得的:形成多层囊泡(MLV),所述多层囊泡含有棕榈酰油酰磷脂酰胆碱(POPC)、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)、二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)中的一种或多种;并且挤出所述MLV,由此获得直径为50nm至2 μ m的无胆固醇的脂质体。

14. 权利要求13的方法,其中所述MLV还含有与聚乙二醇缀合的二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE-PEG)。

15. 用于制备包封在无胆固醇的脂质体中的疏水性药物的方法,所述方法包括:

将棕榈酰油酰磷脂酰胆碱(POPC)、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)和二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)中的一种或多种悬浮在含水缓冲液中以形成脂质混悬液,

在室温将所述脂质混悬液搅拌至少30分钟以形成多层囊泡 (MLV)，
挤出所述MLV以形成直径为50nm至2 μ m的大单层囊泡 (LUV)，
将所述LUV添加至水溶液以形成混悬液，使得跨所述LUV基本上没有跨膜电势，
在不存在增溶剂的情况下将疏水性药物添加至所述混悬液以形成混合物，
在室温将所述混合物搅拌4至48小时以形成载有药物的脂质体混悬液，并且
过滤所述载有药物的脂质体混悬液以去除未包封的疏水性药物，
由此至少80%所添加的疏水性药物被包封在所述无胆固醇的脂质体中。

16. 权利要求15的方法，其中所述疏水性药物是西罗莫司、左他莫司或依维莫司。

17. 权利要求16的方法，其中在混悬步骤中将与聚乙二醇缀合的二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 (DSPE-PEG) 也悬浮在所述含水缓冲液中。

18. 权利要求1-10中任一项的稳定的脂质体制剂用于治疗癌症的用途。

19. 权利要求18的用途，其中所述稳定的脂质体制剂抑制癌细胞的生长。

用于治疗癌症的雷帕霉素和雷帕霉素衍生物的稳定的脂质体制剂

[0001] 背景

[0002] 领域

[0003] 本申请涉及抗癌药领域,特别是涉及用于将疏水性抗癌药加载到脂质体中的方法和利用所述脂质体治疗癌症的方法。

[0004] 背景

[0005] 雷帕霉素 (rapamycin), 也被称为西罗莫司 (sirolimus), 是最初被开发用作移植患者的免疫抑制剂的大环内酯抗生素。随后, 其被用作冠状动脉支架的药物涂层, 其中其起作用通过抑制平滑肌细胞增殖来减少血管成形术后的再狭窄。

[0006] 也已经发现西罗莫司及该药的衍生物可有效用于治疗某些癌症。例如, 西罗莫司具有抗肿瘤活性。参见美国专利4,885,171。依维莫司 (everolimus), 是西罗莫司的40-0-(2-羟乙基) 衍生物, 已被批准用于治疗晚期肾癌、晚期激素受体阳性/HER2阴性乳腺癌和胰神经内分泌肿瘤。

[0007] 已经证明, 唑他莫司 (umirolimus), 即40-烷氧基烷基-雷帕霉素, 以及载有唑他莫司的聚合物胶束都能够抑制体外癌细胞生长, 并且所述胶束可有效用于减缓体内实验性肿瘤的生长。参见美国专利申请公布2014/0154305。唑他莫司的聚合物胶束包封显著提高了该药物的溶解度和稳定性并且导致其持续的递送。

[0008] 作为聚合物胶束的备选, 脂质体已被用于改善西罗莫司及其衍生物的药物递送。例如, 已经使用两种被动加载方法, 即, 薄膜水合和乙醇注射, 将西罗莫司、依维莫司和他克莫司 (tacrolimus) 包封在脂质体中。然而, 由于这些药物的低溶解性和疏水性, 包封的药物量和药物包封效率特别低, 即, 分别 $<0.5\text{mg/mL}$ 和 $<90\%$ 。在被动加载技术的情况下还会发生药物从脂质体的渗漏。

[0009] 需要药物溶出和溶剂去除步骤的远程膜加载技术 (remote film loading technique) 已被用于将西罗莫司包裹在预成型的脂质体中。虽然该方法导致高的药物包封效率, 但在加载过程中存在对药物稳定性的潜在危害。

[0010] 因此, 需要开发新的用于疏水性药物的脂质体加载方法以提高药物含量、药物与脂质的比例以及药物包封效率。此种方法应当形成与现有脂质体相比具有更高的治疗指标的载有药物的脂质体, 特别用于唑他莫司及其他雷帕霉素衍生物。

[0011] 概述

[0012] 为了满足该需要, 提供一种用于治疗癌症的稳定的脂质体制剂。所述稳定的制剂包括脂质体, 所述脂质体含有至少一个由选自棕榈酰油酰磷脂酰胆碱 (POPC)、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱 (DMPC) 和二油酰磷脂酰胆碱 (DOPC) 的一种或多种磷脂酰胆碱形成的脂双层。所述脂质体具有50nm至2 μm 的直径并且不含胆固醇。包封在所述脂质体中的是选自西罗莫司、唑他莫司和依维莫司的抗癌药。

[0013] 还提供用于将疏水性药物加载到脂质体中的方法。所述方法包括以下步骤: (i) 获得具有至少一个脂双层的无胆固醇的脂质体, (ii) 将所述无胆固醇的脂质体添加至水溶液

以形成混悬液,使得跨所述脂双层基本上没有跨膜电势,(iii)在不存在增溶剂的情况下将疏水性药物添加至所述混悬液以形成混合物,并且(iv)在室温将所述混合物搅拌4至48小时。该方法导致至少80%的疏水性药物加载到脂质体中。在一个实施方案中,所述方法由本段所述的步骤组成。

[0014] 此外,公开了一种用于制备包封在无胆固醇的脂质体中的疏水性药物的方法。所述方法通过以下方式进行:(i)将POPC、DMPC和DOPC中的一种或多种悬浮在含水缓冲液中以形成脂质混悬液,(ii)在室温将所述脂质混悬液搅拌至少30分钟以形成多层囊泡(MLV),(iii)挤出所述MLV以形成直径为50nm至2 μ m的大单层囊泡(LUV),(iv)将所述LUV添加至水溶液以形成混悬液,使得跨所述LUV基本上没有跨膜电势,(v)在不存在增溶剂的情况下将疏水性药物添加至所述混悬液以形成混合物,(vi)在室温将所述混合物搅拌4至48小时以形成载有药物的脂质体混悬液,以及(vii)过滤载有药物的脂质体混悬液以去除未包封的疏水性药物。该方法允许包封至少80%所添加的疏水性药物。在另一个实施方案中,该方法由本段中所述的步骤组成。

[0015] 还公开了一种用于治疗癌症的方法。所述方法需要以下步骤:向有此需要的受试者施用有效量的上述稳定的脂质体制剂。所述有效量足以抑制受试者中的癌细胞生长。

[0016] 在以下说明书、附图和实施例中描述本发明的一个或多个实施方案的细节。本发明的其他特征、目的和优点将由详述、附图以及权利要求书而变得明显。本文中引用的所有出版物和专利文献都通过引用完整地结合。

[0017] 附图简述

[0018] 以下的发明描述参考附图,其中:

[0019] 图1是啞他莫司(URL)和脂质体啞他莫司(LipoURL)的体外药物释放特征曲线的图;

[0020] 图2是依维莫司(ERL)和脂质体依维莫司(LipoERL)的体外药物释放特征曲线的图;和

[0021] 图3是西罗莫司(SRL)和脂质体西罗莫司(LipoSRL)的体外药物释放特征曲线的图。

[0022] 详述

[0023] 如上所述,公开了一种用于治疗癌症的稳定的脂质体制剂。所述制剂中的脂质体包含至少一个由选自POPC、DMPC和DOPC的磷脂酰胆碱或这三种磷脂酰胆碱的混合物形成的脂双层,并且不含胆固醇。在特别的方面,所述脂质体含有一个脂双层。在另一个方面,所述脂质体仅包含POPC、DMPC或DOPC。在优选的实施方案中,所述脂质体仅包含POPC。

[0024] 备选地,所述脂质体的脂双层包括磷脂酰胆碱以及与聚乙二醇(PEG)部分缀合的磷脂。与PEG缀合的磷脂可以是1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[氨基(PEG)](DSPE-PEG);1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(PEG)](DOPE-PEG);1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(PEG)](DPPE-PEG);1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(PEG)](DMPE-PEG);或它们的混合物。在特别的实施方案中,所述与PEG缀合的磷脂是DSPE-PEG。

[0025] 当所述脂质体包括磷脂酰胆碱和与PEG缀合的磷脂两者时,它们之间的重量比可以是5:1至100:1,例如,5:1,7.5:1,10:1,15:1,20:1,30:1,40:1,50:1,60:1,70:1,80:1,90

:1,和100:1。优选的比率为10:1。

[0026] 与磷脂缀合的PEG部分的分子量可以为150至3000g/mol,例如,150,200,250,300,350,500,750,1000,1250,1500,1750,2000,2250,2500,2750,3000g/mol。在优选的实施方案中,所述PEG部分的分子量为2000g/mol。

[0027] 所述脂质体的直径可以为50nm至2 μ m(例如,50nm,100nm,150nm,200nm,250nm,500nm,1 μ m,1.5 μ m,和2 μ m)。在一个实施方案中,所述脂质体的直径为50nm至500nm。在优选的实施方案中,所述直径为100nm。

[0028] 所述稳定的脂质体制剂中的脂质体包封用于治疗癌症的疏水性药物。所述疏水性药物可以是抗增殖药物,例如,西罗莫司、左他莫司或依维莫司。在特别的制剂中,所述疏水性药物是左他莫司。

[0029] 疏水性药物与脂质体的磷脂酰胆碱组分的重量比可以为1:5至1:100(例如,1:5,1:10,1:15,1:20,1:25,1:30,1:35,1:40,1:45,1:50,1:75,和1:100)。在一个实施方案中,药物与磷脂酰胆碱的重量比为1:10。在另一个特别的实施方案中,所述重量比是1:20。

[0030] 疏水性药物在所述稳定的脂质体制剂中的浓度可以为0.01mg/mL至10mg/mL。例如,所述制剂中的药物浓度可以为0.01mg/mL,0.05mg/mL,0.5mg/mL,1.0mg/mL,2.5mg/mL,5.0mg/mL,和10mg/mL。在特别的实施方案中,所述药物浓度是1mg/mL。

[0031] 此外,所述稳定的脂质体制剂的pH可以为6.0至8.0。在优选的实施方案中,所述pH为7.4。

[0032] 在特别的方面,用于治疗癌症的稳定的脂质体制剂包括仅由POPC和DSPE-PEG 2000形成的脂质体,所述脂质体将左他莫司包封在其中。所述脂质体不含胆固醇,具有约100nm的直径,并且左他莫司与POPC的重量比为1:20。该具体制剂含1mg/mL的左他莫司并且具有7.4的pH。

[0033] 所述稳定的脂质体制剂还提高疏水性药物在溶液中的稳定性。例如,与在含水混悬液中的药物相比,当在5 $^{\circ}$ C储存时,所述制剂中的疏水性药物可以稳定7-14天。在该情形中,稳定性被定义为不超过制剂中药物起始量的5%的损失。

[0034] 有利地,疏水性药物可以在施用后在延长的一段时间内自所述制剂中的脂质体释放。也就是说,所述制剂是缓释制剂。例如,疏水性药物可以在所述制剂施用后在多至3个月的一段时间内(例如,7、14、21天以及1、2和3个月)从所述脂质体连续释放。

[0035] 同样如上所述,提供一种用于将疏水性药物加载到脂质体中的方法。所述方法是改进的远程膜加载技术,其中首先获得所述脂质体,然后将疏水性药物加载到所述脂质体中。

[0036] 用于所述加载方法中的脂质体是无胆固醇的,具有至少一个含POPC、DMPC和DOPC中的一种或多种的脂双层,并且具有50nm至2 μ m的直径。在一个实施方案中,所述脂质体仅含POPC。

[0037] 备选地,无胆固醇的脂质体具有至少一个脂双层,所述脂双层含有POPC、DMPC和DOPC中的一种或多种并且还含有选自DSPE-PEG、DOPE-PEG、DPPE-PEG和DMPE-PEG的与PEG缀合的磷脂。

[0038] 与磷脂缀合的PEG部分的分子量可以为150至3000g/mol,例如,150,200,250,300,350,500,750,1000,1250,1500,1750,2000,2250,2500,2750,3000g/mol。在优选的实施方案中,

案中,所述PEG部分的分子量为2000g/mol。

[0039] 在特别的方面,所述脂质体仅含POPC。在另一个实施方案中,所述脂质体仅含POPC和DSPE-PEG2000。

[0040] 所述脂质体可以通过以下方式获得:形成含有POPC、DMPC、DOPC中的一种或多种并且任选地含有DSPE-PEG2000的MLV,并且挤出所述MLV以获得直径为50nm至2 μ m的无胆固醇的脂质体。更具体地,将POPC、DMPC、DOPC中的一种或多种以及任选的DSPE-PEG2000悬浮在含水缓冲液中以形成脂质混悬液,在室温将所述混悬液搅拌至少30分钟以形成MLV。

[0041] 通过挤出工序将所述MLV转化为大的单层囊泡(LUV)。例如,可以将所述MLV通过3层的聚碳酸酯滤器挤出3至20次。在优选的挤出工序中,所述MLV被挤出10次。

[0042] 所述聚碳酸酯滤器的孔径可以为50nm至200nm。在特别的实施方案,所述孔径为100nm。同样,所得的LUV,即,脂质体,可以具有50nm至2 μ m的直径。

[0043] 然后将上述无胆固醇的脂质体添加至水溶液以形成混悬液。重要的是,所用的水溶液应当与用于制备无胆固醇的脂质体的溶液相同或相似,以使得跨所述脂质体的脂双层基本上没有跨膜电势。例如,离子强度,pH,和渗透性应当密切匹配以使得跨所述脂质体膜不存在离子梯度、pH梯度或渗透梯度。这可以例如通过使用PBS来形成无胆固醇的脂质体并且也将其稀释在PBS中以形成混悬液来保证。

[0044] 在该情形中,短语“基本上没有跨膜电势”表示这样的跨膜电势水平,在所述水平以下药物不会被主动地加载到脂质体中。例如,参见Akbarzadeh等,Nanoscale Research Letters 2013,8:102。

[0045] 将疏水性药物添加至脂质体在水溶液中的混悬液中以形成混合物。所述疏水性药物可以是西罗莫司、左他莫司或依维莫司。在特别的方法中,所述药物是左他莫司。该阶段的加载方法不需要使用增溶剂(例如环糊精)来使疏水性药物在水溶液中增溶。实际上,这不是必要或所需的。

[0046] 不受限于理论,据信所述疏水性药物在被添加至悬浮在水溶液中的脂质体中时由于所述药物的疏水性质而与所述脂质体的脂质尾部强烈相互作用,导致其被包封在所述脂质体的脂双层内。

[0047] 将脂质体和疏水性药物的混合物在室温搅拌4至48小时,导致至少80%(例如,80%,85%,90%,95%和100%)所添加的疏水性药物加载到所述无胆固醇的脂质体中。

[0048] 同样在本申请范围内的是使用上述稳定的脂质体制剂治疗癌症的方法。所述方法需要向癌症患者施用有效量的含有选自西罗莫司、左他莫司或依维莫司的抗癌药的稳定的脂质体制剂。所述有效量抑制患者中的癌细胞生长。

[0049] 本领域技术人员可以容易地确定应当被施用至癌症患者的所述稳定的脂质体制剂的有效量。例如,可以通过借助MRI或CT扫描测量肿瘤尺寸来跟踪随时间的对药物剂量的响应。

[0050] 所述稳定的脂质体制剂可以经由任何常规方法施用至癌症患者,所述方法包括但不限于,腹膜内注射,静脉内注射,直接注射到肿瘤中,注射到肿瘤上游的动脉循环中,以及鼻吸入。上述稳定的脂质体制剂也可以被制成用于口服施用的丸剂或胶囊。

[0051] 可通过施用上述稳定的脂质体制剂治疗的癌症的类型包括但不限于急性淋巴细胞性白血病,急性髓性白血病,肾上腺癌,成人软组织肉瘤,肛门癌,再生障碍性贫血,基底

和鳞状细胞皮肤癌,胆管癌,膀胱癌,骨癌,脑/CNS肿瘤,乳腺癌,男性乳腺癌,儿童癌症,未知的原发性癌症,卡斯尔曼病(Castleman's disease),宫颈癌,慢性淋巴细胞性白血病,慢性髓性白血病,慢性髓性单核细胞白血病,结直肠癌,子宫内膜癌,食道癌,尤因家族肿瘤(Ewing Family of tumors),眼癌,胆囊癌,胃癌,胃肠类癌,胃肠间质瘤,妊娠滋养细胞疾病,霍奇金病(Hodgkin's disease),卡波西肉瘤(Kaposi's sarcoma),肾癌,喉及咽下癌,儿童白血病,肝癌,非小细胞肺癌,小细胞肺癌,肺部类癌肿瘤,恶性间皮瘤,黑素瘤皮肤癌,多发性骨髓瘤,骨髓增生异常综合征,鼻腔及鼻旁窦癌,鼻咽癌,成神经细胞瘤,非霍奇金淋巴瘤,口腔及口咽癌,骨肉瘤,卵巢癌,胰腺癌,阴茎癌,垂体瘤,前列腺癌,肾细胞癌,成视网膜细胞瘤,横纹肌肉瘤,唾液腺癌,皮肤淋巴瘤,小肠癌,胃癌,睾丸癌,胸腺癌,甲状腺癌,子宫肉瘤,阴道癌,阴户癌,沃尔登斯特伦巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia)和肾母细胞瘤(Wilms' tumor)。

[0052] 在没有进一步详细说明的情况下,据信本领域技术人员基于本文中的公开内容能够将本发明应用至其最全面的程度。因此,以下具体实施例仅被认为是说明性的,并且绝不限制本公开的剩余部分。

实施例

[0053] 实施例1:制备载有左他莫司的脂质体

[0054] 制备四批200mL的脂质体,每批各自含有不同的磷脂酰胆碱,即,EggPC,POPC,DMPC,或DOPC。简言之,将6000mg的每种磷脂酰胆碱添加到在分别的500mL去热原的玻璃瓶中的200mL的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中。将混合物在室温搅拌至少30min以形成多层囊泡(MLV)。通过使用台式挤出机(Northern Lipids Inc.,Canada)通过3层的聚碳酸酯滤膜(孔径100nm)挤出来减小MLV的大小。在经过10次挤出后,获得平均尺寸为~100nm的大的单层囊泡(LUV)。

[0055] 为了将左他莫司加载到LUV中,将50mg的所述药物(与10mL的四种LUV制剂之一/瓶一起)添加至四个50mL去热原的玻璃瓶中的每个。给所述玻璃瓶加盖并置于温度为25℃的水浴中。将混合物搅拌24小时。将所得的载有左他莫司的脂质体的溶液通过孔径为0.2μm的聚偏氟乙烯(polyvinylidene difluoride,PVDF)注射器过滤器过滤以去除未包封的左他莫司。

[0056] 通过反相HPLC确定加载后脂质体溶液的左他莫司含量。通过将各脂质体溶液的50μl样品与1.0ml乙腈混合来使脂质体破裂。在甲醇中制备0.05mg/mL的左他莫司的标准溶液。通过HPLC分析样品并且与标准溶液相比以量化脂质体中左他莫司的量。

[0057] 使用Zetasizer Nano仪器(Malvern Instruments,Great Britain)通过动态光散射(DLS)来确定脂质体的强度平均直径和分布的多分散性指标(polydispersity index,PDI)。将测试的各样品1:25稀释在0.9%氯化钠溶液中。使用至少5min的扫描以及以下参数:粘度=1.0183cp,折射率=1.332,温度=23℃,进行在172°散射角的粒度测量。测量并记录左他莫司加载前后的脂质体尺寸。药物加载结果总结在下表1中。

[0058] 表1.左他莫司向脂质体中的加载

脂质类型	EggPC	POPC	DOPC	DMPC
药物加载前的囊泡尺寸 (nm)	98.0	96.6	97.6	88.6
药物加载前的PDI	0.070	0.039	0.059	0.072
[0059] 左他莫司含量(mg/mL)	1.71	2.76	2.72	2.98
药物加载结束时的囊泡 尺寸(nm)	102.0	99.0	99.0	91.8
药物加载结束时的PDI	0.031	0.049	0.038	0.048
药物:脂质比率(w/w)	1:17.5	1:10.9	1:11.0	1:10.1

[0060] 加载到由DMPC、POPC和DOPC形成的脂质体中的左他莫司的量大于2.7mg/mL。意想不到的是,加载到这三种脂质体中的左他莫司的量高于加载到由EggPC形成的脂质体中的量。

[0061] 实施例2:制备含有与聚乙二醇缀合的磷脂的载有左他莫司的脂质体

[0062] 通过将1800mg的POPC和200mg的DSPE PEG-2000合并于在500mL去热原的玻璃瓶中的200mL PBS中来制备含有与聚乙二醇缀合的(PEG化的)磷脂的脂质体。将混合物在室温搅拌至少30min以形成MLV。通过使用台式挤出机(Northern Lipids Inc., Canada)通过3层的聚碳酸酯滤膜(孔径100nm)挤出来减小MLV的大小。在经过10次挤出后,获得平均尺寸为大约100nm的PEG化的LUV。

[0063] 为了将左他莫司加载到PEG化的LUV中,将50mg的所述药物与50mL的LUV一起添加至500mL去热原的玻璃瓶。将所述玻璃瓶加盖并置于温度为25°C的水浴中。将混合物搅拌多达24小时。在开始搅拌后的1,2,3,4,5,6和24小时收集1mL样品以评估左他莫司向PEG化的脂质体中的加载。将各样品通过孔径为0.2μm的聚偏氟乙烯(PVDF)注射器过滤器过滤以去除未包封的左他莫司。如以上实施例1中所述,通过HPLC来评估各样品的左他莫司含量。

[0064] 结果显示,在搅拌1,2,3,4,5,6和24小时后结合到PEG化的脂质体中的左他莫司的百分比分别为59%,67%,77%,82%,87%,91%和102%(基于用于加载的左他莫司的初始量)。进行上述加载方法出人意料地导致在24小时内基本上所有的左他莫司都加载到PEG化的脂质体中。

[0065] 在储存期间在透明玻璃小瓶中在5°C±3°C评估载有左他莫司的PEG化的脂质体制剂的稳定性。连续监测并记录样品温度以保证恒定的温度条件。在储存2,3,4,6和8周后,如以上实施例1中所述,分析溶液的左他莫司含量、囊泡尺寸和PDI。稳定性结果显示在下表2中。

[0066] 表2. 载有左他莫司的PEG化的脂质体的制剂的稳定性

[0067]

时间点	0周 (药物加载结束)	2周	3周	4周	6周	8周
-----	----------------	----	----	----	----	----

[0068]

左他莫司含量 (mg/mL)	0.99	1.00	1.00	0.96	1.0	1.0
囊泡尺寸 (nm)	99.9	97.1	97.5	97.5	97.7	98.3
PDI	0.062	0.048	0.058	0.053	0.050	0.048

[0069] 结果显示,当在5℃储存时,载有左他莫司的PEG化的脂质体的溶液可稳定至少8周。

[0070] 实施例3:测量载有左他莫司的脂质体制剂的药物包封效率

[0071] 开发一种测定以使用凝胶过滤技术以从脂质体溶液中去掉游离药物来表征脂质体对左他莫司的包封效率。使用以下等式,在PD-10交联葡聚糖凝胶(SEPHADEX®G-25)脱盐柱上运行之前和之后,确定脂质体制剂的药物与脂质之比:

$$[0072] \quad \text{药物包封}\% = \frac{\text{最终药物:脂质之比} \\ \text{(通过 PD-10 柱的样品)}}{\text{初始药物:脂质之比} \\ \text{(PD-10 分离前的样品)}} \times 100\%$$

[0073] 分别如实施例1和实施例2中所述制备载有左他莫司的POPC脂质体和载有左他莫司的POPC PEG化的脂质体。药物包封效率显示在下表3中。

[0074] 表3.左他莫司药物包封效率

[0075]

制剂	柱分离前的药物:脂质比例	柱分离后的药物:脂质比例	药物包封效率 (%)
来自实施例1的载有药物的POPC脂质体(药物:脂质=1:10)	0.130	0.125	95.9
来自实施例2的载有药物的	0.052	0.050	97.5

[0076]

PEG化的DSPE/POPC脂质体(药物:脂质=1:20)			
-------------------------------	--	--	--

[0077] 令人惊奇的是,载有吡他莫司的POPC脂质体和载有吡他莫司的POPC PEG化的脂质体的包封效率都大于95%。

[0078] 实施例4:制备载有西罗莫司的脂质体和载有依维莫司的脂质体

[0079] 如以上实施例1所述制备POPC LUV。将50mg的西罗莫司或依维莫司与10mL的POPC LUV一起添加至50mL去热原的玻璃瓶。给所述玻璃瓶加盖并置于温度为25℃的水浴中。将混合物在室温搅拌24小时。将载有药物的脂质体溶液通过0.2μm PVDF注射器过滤器过滤以去除未包封的药物。

[0080] 对于两种脂质体制剂,如以上实施例1中所述确定包封后的药物含量、脂质体的强度平均直径以及PDI。结果显示在下表4中。

[0081] 表4. 西罗莫司和依维莫司向POPC脂质体中的药物-加载

药物	西罗莫司	依维莫司
药物加载前的囊泡尺寸(nm)	96.6	96.6
药物加载前的PDI	0.039	0.039
药物含量(mg/mL)	1.85	4.65
药物:脂质之比(w/w)	1:16	1:6.5
药物加载结束时的囊泡尺寸(nm)	96.1	99.5
药物加载结束时的PDI	0.048	0.087
药物包封效率(%)	95.7	98.7

[0082] 结果显示西罗莫司和依维莫司以高效率成功地被包封到POPC脂质体中。

[0083] 实施例5:体外药物释放研究

[0084] 利用体外药物释放测定来确定左他莫司、西罗莫司和依维莫司的释放特征曲线。如以上实施例1中所述制备载有左他莫司的脂质体,并且如以上实施例4中所述制备载有西罗莫司的脂质体和载有依维莫司的脂质体。

[0085] 对于每种药物,制备对照制剂,所述对照制剂在含15%乙腈和85%水的5mL溶液中含有1.0mg药物。将每种药物的5mL对照制剂和脂质体制剂上样到分开的具有50kDa的截留分子量的透析管中。

[0086] 将各上样的透析管置于单个的盛有40mL释放介质(15%乙腈和0.5%SDS)的50mL管中。在1,2,5,7,24,30和48小时后取样各管中的释放介质,并且如以上实施例1中所述通过HPLC确定释放介质中的药物浓度。对于所有样品,将累积的药物释放百分比相对释放时间作图。左他莫司、依维莫司和西罗莫司的结果分别显示在图1、2和3中。

[0087] 结果显示,在48小时内,分别有67%、100%和84%的起始量的左他莫司、依维莫司和西罗莫司扩散出透析管。

[0088] 相反,脂质体包封的药物以更慢的速率扩散出透析管。在48小时后,包封的左他莫司、依维莫司和西罗莫司的累积释放分别为药物起始量的67%、59%和54%。

[0089] 结果显示左他莫司、依维莫司和西罗莫司的脂质体制剂对于持续药物递送是有效的。

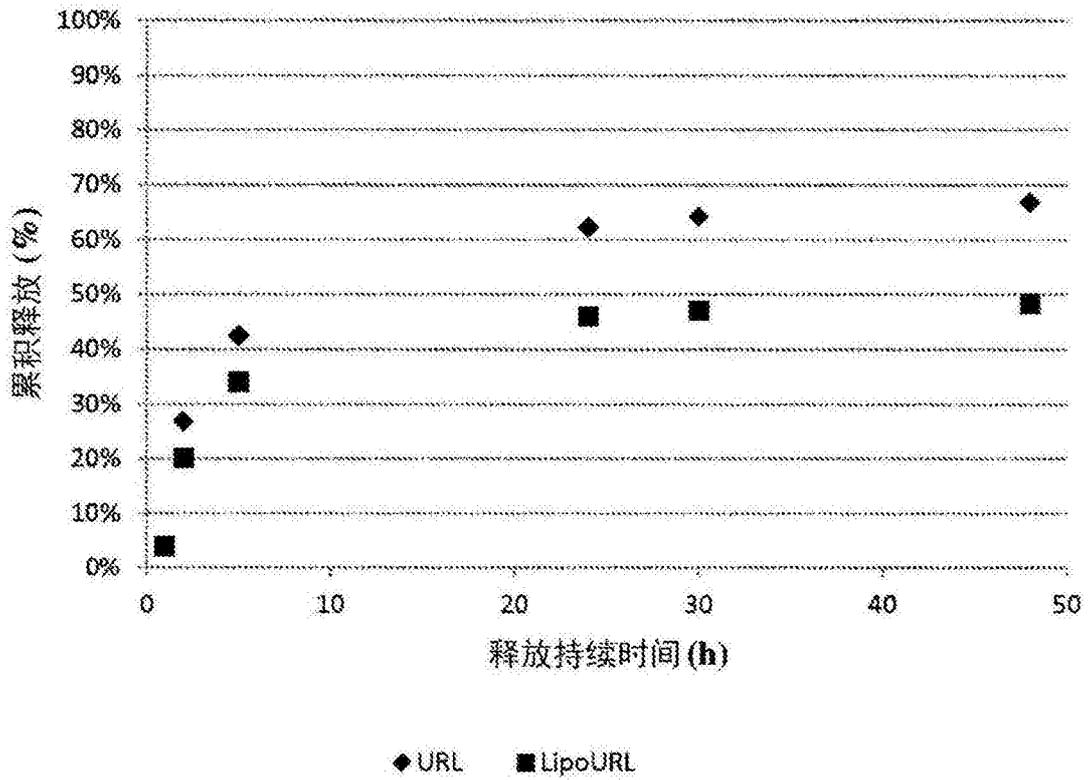


图1

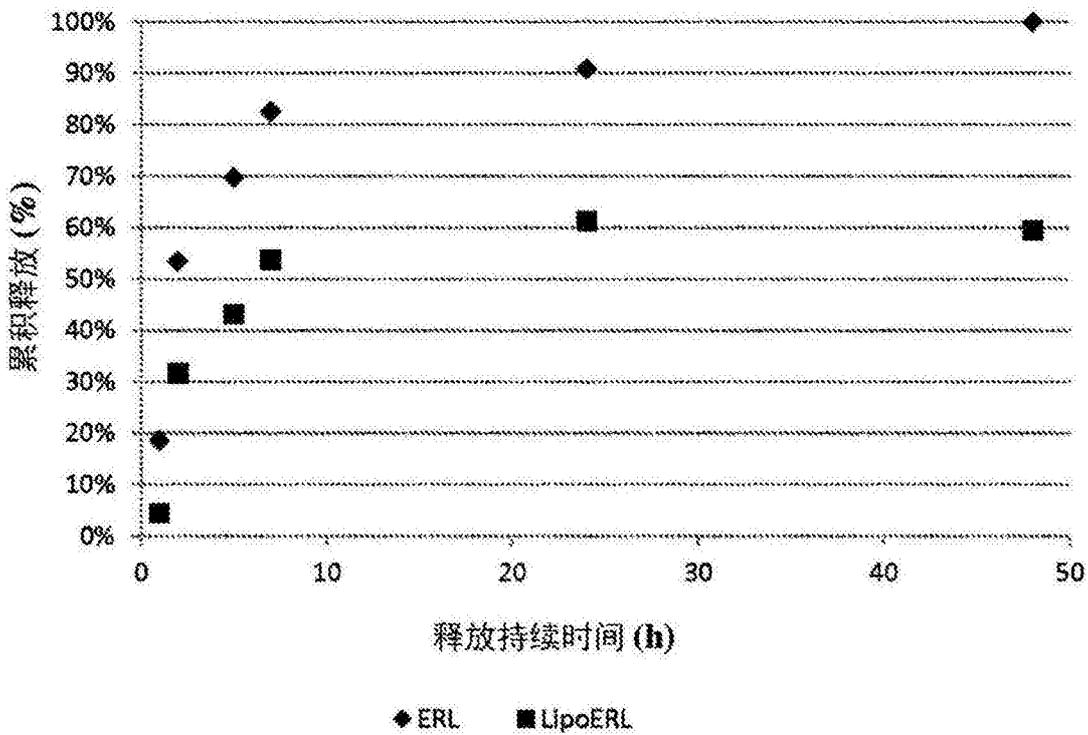


图2

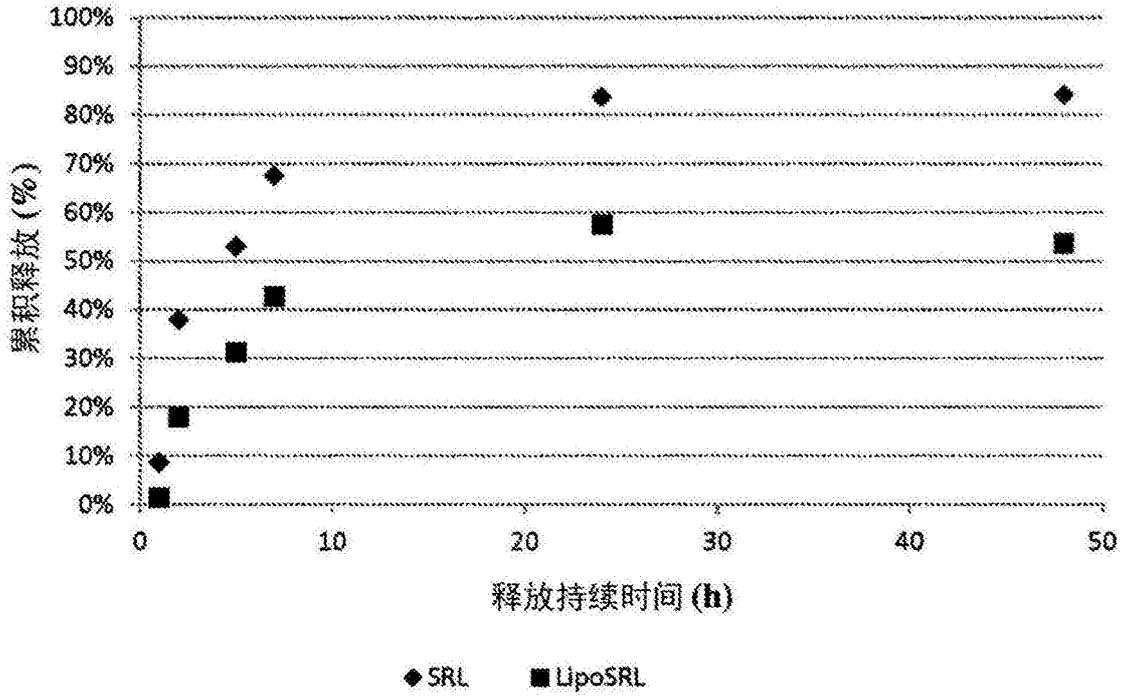


图3