[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl[6]
A61K 31/00
A61K 9/127

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 95196052.0

[43]公开日 1997 年 11 月 19 日

[11] 公开号 CN 1165480A

[22]申请日 95.10.3

[30]优先权

[32]94.10.3 [33]US[31]08/316,735

[86]国际申请 PCT/CA95/00561 95.10.3

[87]国际公布 WO96/10399 英 96.4.11

[85]进入国家阶段日期 97.5.6

[71]申请人 M·G·伯杰龙

地址 加拿大魁北克

共同申请人 A·德索梅奥克斯

[72]发明人 M·G·伯杰龙

A·德索梅奥克斯

[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 张元忠

权利要求书 3 页 说明书 13 页 附图页数 11 页

[54]发明名称 治疗病毒性疾病的脂质体组合物

[57]摘要

公开了一种治疗病毒性疾病的方法，包括给予脂质体包裹的抗病毒药物。还提供了由于治疗病毒性疾病、尤其是治疗由病毒如人免疫缺损病毒（HIV）和细胞肥大病毒（CMV）引起的感染的脂质体组合物。该脂质体组合物由特定种类的类脂成分组成，并含有包封的、可有效抵抗病毒性疾病的药物。该抗病毒药物脂质体组合物可以在不同的细胞系中具有高的细胞穿透能力，在体外对 HIV 和 CMV 复制具有良好的抗病毒活性，在体内对 HIV 贮主具有有效的靶向能力，并且对药物的药代动力学具有显著的改善。

权 利 要 求 书

1、一种用于治疗病毒性疾病的脂质体组合物，含有： i)含有摩尔比在10:1和1:1之间的二酰基磷脂酰胆碱和二酰基磷脂酰甘油的混合物的类脂成分，其中的酰基链可以是饱和或不饱和的，并且链长在14和18个碳原子之间，和ii)治疗量的对所述病毒性疾病有效的包封药物。

2、根据权利要求1的脂质体组合物，其中所述类脂成分另外含有二酰基磷脂酰乙醇胺的聚乙二醇衍生物。

3、一种用于治疗病毒性疾病的脂质体组合物，所述制剂含有： i)含有摩尔比为4:1:5的二酰基磷脂酰胆碱：磷酸三十二烷酯；胆甾醇的混合物的类脂成分，其中的酰基链可以是饱和或不饱和的，并且链长在14和18个碳原子之间，和ii)治疗量的对所述病毒性疾病有效的包封药物。

4、根据权利要求3的脂质体组合物，其中所述类脂成分另外含有二酰基磷脂酰乙醇胺的聚乙二醇衍生物。

5、根据权利要求1的脂质体组合物，其中的包封药物选自3'-叠氮基-3'-脱氧胸苷(AZT)、 ddI 、 ddC 、膦甲酸、三氮唑核苷、更昔洛韦和saquinavir 。

6、根据权利要求5的脂质体组合物，其中的类脂成分是摩尔比为10:3的二酰基磷脂酰胆碱： 二酰基磷脂酰甘油。

7、根据权利要求2的脂质体组合物，其中的包封药物选自3'-叠氮基-3'-脱氧胸苷(AZT)、 ddI 、 ddC 、膦甲酸、三氮唑核苷、更昔洛韦和saquinavir .

8、根据权利要求7的脂质体组合物，其中的类脂成分是摩尔比为10:3:1.45的二酰基磷脂酰胆碱：二酰基磷脂酰甘油：二酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇。

9、根据权利要求3的脂质体组合物，其中的包封药物选自3'-叠氮基-3'-脱氧胸苷(AZT)、ddI、ddC、膦甲酸、三氮唑核苷、更昔洛韦和saquinavir。

10、根据权利要求4的脂质体组合物，其中的包封药物选自3'-叠氮基-3'-脱氧胸苷(AZT)、ddI、ddC、膦甲酸、三氮唑核苷、更昔洛韦和saquinavir。

11、根据权利要求2、4、8和10中的任意一项的脂质体组合物，其中聚乙二醇的分子量为大约500和大约5000道尔顿之间。

12、根据权利要求6的脂质体组合物，其中的类脂成分是摩尔比为10:3的二酰基磷脂酰胆碱：二酰基磷脂酰甘油，而包封药物是2',3'-二脱氧肌苷。

13、根据权利要求8的脂质体组合物，其中的类脂成分是摩尔比为10:3:1.45的二酰基磷脂酰胆碱：二酰基磷脂酰甘油：二酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇，而包封药物是2',3'-二脱氧肌苷。

14、根据权利要求6的脂质体组合物，其中的类脂成分是摩尔比为10:3的二酰基磷脂酰胆碱：二酰基磷脂酰甘油，而包封药物是膦甲酸。

15、根据权利要求9的脂质体组合物，其中的类脂成分是摩尔比为4:1:5的二棕榈酰基磷脂酰胆碱：磷酸三十二烷酯：胆甾醇，而包封药物是2',3'-二脱氧胞苷。

16、根据权利要求 1 至 10 和 12 至 15 中的任意一项的脂质体组合物，其平均颗粒直径在大约 0.05 和 0.5μm 之间。

17、根据权利要求 11 的脂质体组合物，其平均颗粒直径在大约 0.05 和 0.5μm 之间。

18、对病毒性疾病患者进行治疗的方法，包括向所述患者给予权利要求 1 至 10、 12 至 15、和 17 中任意一项的脂质体组合物。

19、对病毒性疾病患者进行治疗的方法，包括向所述患者给予权利要求 11 的脂质体组合物。

20、对病毒性疾病患者进行治疗的方法，包括向所述患者给予权利要求 16 的脂质体组合物。

说　　明　　书

治疗病毒性疾病的脂质体组合物

发明领域

本发明涉及用于治疗病毒性疾病、尤其是治疗由病毒（例如人免疫缺损病毒和细胞肥大病毒）引起的感染的脂质体组合物及其方法。

发明背景

目前已经开发出了多种用于对人免疫缺损病毒(HIV)感染的患者进行治疗的抗病毒药物。然而，在使用任何抗逆转录病毒药物或其联合形式治疗的 HIV 感染的患者中，仅能观察到短暂并且有限的治疗效果。由于这些药物减少病毒负荷的能力有限、耐药性的迅速产生以及大多数药物的毒副作用限制了它们的长期效果。对患者进行抗病毒药物给药的一个主要问题是这些药物对感染细胞的穿透及定向能力很差。药物的迅速清除以及母体化合物或其代谢产物的毒性也构成了一些主要的缺点，从而延缓了许多抗病毒药物的开发和使用。针对目前使用的治疗 AIDS 及其它病毒性疾病的抗病毒药物的严重毒性以及它们对感染细胞的有限的定向能力，应当研究旨在在感染细胞内达到药物的治疗浓度并降低毒性的策略。将药物包裹于脂质体中构成了一条改善活性药物向感染细胞的转运并减少与给药有关的毒副作用的引人注目的途径。脂质体是一种可以将多种药物掺入其中的微囊。由于脂质体的主要成分与天然的膜相似，所以脂质体一般无毒并可以被生物降解。我们相信，通过更好地理解脂质体作为抗病毒药物载体的角色，将导致改善治疗 AIDS 及其它病毒性疾病所用药物的效力和安全性的新策略。

目前，有许多证据表明巨噬细胞在 HIV 的发病机理中起重要作用，它可起到病毒在免疫系统中播散的病毒贮主的作用（ Gendelman 等，1989， AIDS 3:475-495; Meltzer 等， 1990，免疫学年评， 8:169-194 ）。最近报道，在感染早期以及整个临床潜伏期，尽管 HIV 在外周血中的活性很弱，但其在淋巴器官内的聚集和复制却很活跃（ Pantaleo 等， 1993，自

然，362:355-358；Embretson等，1993，自然，362:359-362；Fox等，1994，自然，370:256）。据报道，淋巴组织中观察到的高病毒负荷与生发中心的滤泡树状细胞捕集的HIV颗粒有关。在HIV感染过程中，滤泡树状细胞网逐渐紊乱并最终被破坏。由于淋巴组织的微环境对有效的免疫应答非常重要，从而必需减少或终止HIV在淋巴组织中的聚集以保持该微环境网的完整性。使用脂质体作为药物传送系统特别适用于控制HIV疾病的进展。由于脂质体必然被单核吞噬细胞系统(MPS)的细胞摄取，基于脂质体的治疗可以在易被HIV感染的细胞内富集抗病毒药物，并同时减少可能会产生药物潜在毒性的区域内的药物量。因此，脂质体包封的药物可以代表一种方便地策略，该策略可减少HIV向淋巴组织的播散并保持滤泡树状细胞微环境，从而有可能防止感染的宿主出现特征性的免疫缺损状态。

与母体药物相比，使用脂质体作为释药系统具有很多益处。例如，脂质体可以防止药物被酶降解、改善它们的药代动力学和组织分布并控制治疗药物向适当的细胞中释放。另外，脂质体的分布及其治疗利用度可以通过其体积、层数、类脂组成、电荷以及表面性质的改变进行调节。因此必需使脂质体的理化性质与所需的治疗目的相适应。本发明的一个目的是生产一种用于治疗AIDS及其它病毒性疾病的药物脂质体组合物。这种靶向释药系统有望在患有AIDS或其它病毒性疾病的患者中增强抗病毒药物的效果并减弱其毒性。另外，将药物包封于脂质体中所产生的改善的药物生物利用度可以缩短服药间隔，从而改善HIV及其它病毒感染的患者的生活质量。

发明概述

本发明涉及治疗病毒性疾病的方法，包括给予包封于脂质体内的抗病毒药物。本发明还涉及用于治疗病毒性疾病、尤其是治疗由病毒（例如HIV和CMV）引起的感染的脂质体组合物。该脂质体组合物由特定种类的类脂成分组成并含有包封的可有效抵抗病毒性疾病的药物。本发明的创造性是该药物脂质体组合物可以在不同的细胞系中具有高的细胞穿透能力，在体外对HIV和CMV具有良好的抗病毒活性，在体内对HIV贮主具有有效的靶向能力，并且对药物的药代动力学具有显著的改善（参见实施例）。

在优选的实施方案中，脂质体组合物由摩尔比为 10:3 的二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC):二硬脂酰基磷脂酰甘油(DSPG)组成，平均颗粒直径在大约 0.05 到 0.5μm 之间，含有 2',3'-二脱氧肌苷(ddI)作为抗病毒药物。在另一个优选实施方案中，脂质体组合物由摩尔比为 10:3:1.45 的 DSPC:DSPG:二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇(DSPE-PEG)组成，平均颗粒直径在大约 0.05 到 0.5μm 之间，含有 2',3'-二脱氧肌苷(ddI)作为抗病毒药物。在上述优选实施方案中，聚乙二醇的分子量在大约 500 至 5000 道尔顿之间。在另一个优选实施方案中，脂质体组合物由摩尔比为 4:1:5 的二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC):磷酸三十二烷酯(DP):胆甾醇(CHOL)组成，平均颗粒直径在大约 0.05 到 0.5μm 之间，含有 2',3'-二脱氧胞苷(ddC)作为抗病毒药物。在又一个优选实施方案中，脂质体组合物由摩尔比为 10:3 的 DPPC:二棕榈酰基磷脂酰甘油(DPPG)组成，平均颗粒直径在大约 0.05 到 0.5μm 之间，含有膦甲酸作为抗病毒药物。

附图概述

图 1a 和 1b 表明游离 ddI 和脂质体 ddI(20μM ddI)在 U937 细胞(图 1a)和 RAW 264.7 细胞(图 1b)中的聚集量关于时间的函数。图 1c 和 1d 表明游离 ddC 和脂质体 ddC(25μM ddC)在 U937 细胞(图 1c)和 RAW 264.7 细胞(图 1d)中的聚集量关于时间的函数。图 1e 和 1f 分别表明游离的和脂质体包裹的 ddC 和膦甲酸在 RAW 264.7 细胞中的药物浓度的函数。

图 2a 、 2b 和 2d 分别表示游离的和脂质体 ddI(40μM ddI)、ddC(0.01μM ddC)和膦甲酸(1μM 膦甲酸)在 HIV-1IIIB 感染的 U937 细胞中的抗病毒活性。图 2c 和 2e 分别表示游离的和脂质体 ddC(0.01μM ddC)和膦甲酸(1μM 膦甲酸)在 HIV-1IIIB 感染的 Molt-4 克隆 8 细胞中的抗病毒活性。图 2f 表示游离的和脂质体膦甲酸(1μM)在 HIV-1IIIB 感染的 Supt-1 细胞中的抗病毒活性。图 2g 表示游离的和脂质体膦甲酸(分别为 PFA 和 L-PFA)对人肺纤维细胞(MRC-5 细胞系)中 CMV p72 蛋白表达的抑制作用。

图 3a 、 3b 和 3c 表示将游离 ddI 或包裹于由摩尔比为 10:3 的 DSPC:DSPG 组成、平均颗粒直径为 0.175μm 的脂质体中的 ddI 对大鼠给

药后，游离 ddI(图 3a)、脂质体 ddI(图 3b)和脂质体类脂(图 3c)在血浆和组织中的分布。图 3d 和 3e 表示将包裹于由摩尔比为 10:3:1.45 的 DSPC:DSPG:DSPE-PEG 组成、平均颗粒直径为 0.150μm 的脂质体中的 ddI 对大鼠给药后，脂质体 ddI(图 3d)和脂质体类脂(图 3e)在血浆和组织中的分布。图 3f、3g、3h 和 3i 表示将游离 ddC 或包裹于由摩尔比为 4:1:5 的 DPPC:DS:CHOL 组成、平均颗粒直径为 0.300μm 的脂质体中的 ddC 对大鼠静脉内(图 3f 和 3g)或腹膜内(图 3h 和 3i)给药后 1 小时(图 3f 和 3h)和 3 小时(图 3g 和 3i)，游离的和脂质体 ddC(ddC 和 L-ddC)在血浆和组织中的分布。图 3j、3k 和 3l 表示将游离膦甲酸或包裹于由摩尔比为 10:3 的 DPPC:DPPG 组成、平均颗粒直径为 0.165μm 的脂质体中的膦甲酸对大鼠给药后，脂质体膦甲酸(图 3j)、游离膦甲酸(图 3k)和脂质体类脂(3l)在血浆和组织中的分布。在图 3a 至 3l 中，数值表示从每个时间点每组 4 至 6 只动物得到的平均值(±SEM)。

发明详述

类脂成分

在以脂质体为主的产品中，有必要利用脂质体双层特性，其可使药物包囊高效性以及包埋药物降低的渗漏利用脂质体将高量抗病毒药物释放到感染细胞中。在本发明范围药物中，通过使用以下组成的脂质体即可达到这些要求： i)二酰基磷脂酰胆碱和二酰基磷脂酰甘油混合物(摩尔比在 10:1 和 1:1 之间)，其中酰基链为饱和或不饱和的 14 至 18 碳链，或者 ii)摩尔比为 4:1:5 的二酰基磷脂酰胆碱:磷酸三十二烷酯:胆固醇，其中二酰基磷脂酰胆碱的酰基链为饱和或不饱和的 14 至 18 碳链。

本发明的脂质体包括立体稳定的脂质体，本文所定义的为由上述类脂组分组成的脂质体，其可通过混合聚合物（例如 poloxamers 和 poloxamines ）或混合由聚合物（如 DSPE-PEG 或二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE-PEG)）衍生出的两亲类脂而改良。DSPE-PEG 的合成细节如实施例 1 所示。本发明的脂质体包括免疫脂质体，本文所定义的为由上述类脂组成的脂质体或立体稳定的脂质体，其可通过偶联可增强定位特定细胞的抗体分子而改良。

并不是所有测试的脂质体组合物都显示出有效的药物包囊和药物潴

留。例如，ddI 在由摩尔比为 55:45 的蛋磷脂酰胆碱:胆固醇组成的脂质体中的包埋表现出有效的药物包囊，其比观察到的由摩尔比为 10:3 的 DSPC:DSPG 组成的脂质体低约 30 倍。另外，在人血清中仅培养 1 小时后，从由摩尔比 35:45:10 的蛋 PC:胆固醇:心脂质组成的多层囊中即释放出多于 90 % 的 ddI 。相反，在类似条件下于人血清中培养 5 小时后，从由摩尔比 10:3 的 DSPC:DSPG 组成的多层囊中仅释放出 10 % 的 ddI 。

尽管以下实施例描述了特定的脂质体组合物，但是显然易于从其得到许多脂质体组合物而不影响其有用的特性。因此，这些化合物包括已在实践中检测的磷脂组合物的其它酰基链。

脂质体的制备

在过去的几年中已发展了大量的脂质体制备技术以适应不断增长的用作药物转运体系的脂质体特殊应用。本发明脂质体的制备可通过许多技术完成，例如参考文献中描述的（ Szoka and Papahadjopoulos, 1980, Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467-508; Nasssander 等， 1990, liposomes in Biodegradable polymers as drug delivery systems. p. 261-338 ）。其中，薄类脂薄膜水合技术可迅速并简单地制备脂质体。由这种技术制备的脂质体多为多层囊，通常为 0.2 至 10 微米。薄类脂薄膜水合技术详细描述在实施例 2 中。制备脂质体的另外一种常用技术是由 Szoka 等在美国专利 4235871 中描述的反相蒸发技术。由这种技术制备的脂质体是单层或复层的，通常为 0.2 至 5 微米。反相蒸发技术详细描述在实施例 3 中。

抗病毒药物

本发明包括任何病毒 DNA 和/或 RNA 合成抑制剂和/或 HIV 蛋白酶抑制剂。这类物质包括抗病毒药物，例如 3'-叠氮-3'-脱氧胸苷（ AZT ）、ddI 、 ddC 、膦甲酸、三氮唑核苷、更昔洛韦和 saqiunavir 。通过文献中描述的一种或多种主动和/或被动装填方法（ Mayer 等， 1986, Chem. Phys. Lipids 40:333-345 ）可将这些药物掺入脂质体。

本发明的脂质体组合物包括任何粒度的普通颗粒，优选直径在约 0.05 和 0.5 微米之间。本发明的脂质体组合物也包括用任何药物/类脂摩尔比制

备的脂质体。如前所述，被 MPS 细胞摄取的脂质体应使包埋的抗病毒药物集中在易受 HIV 或其它病毒感染的细胞中，从而提高其抗病毒效果并降低其毒性。因此，下述实施例意欲说明抗病毒药物（其可非常有效地治疗 HIV 和 CMV 感染）的特定脂质体组合物的制备而不是以任何方式限定本发明范围。此外，尽管脂质体组合物的效果特定在两种病毒种类（ HIV 和 CMV ）上，但是本发明包括任何对病毒 DNA 和/或 RNA 合成抑制剂和/或 HIV 蛋白酶抑制剂效果敏感的病毒。

实施例 1

DSPE-PEG 的合成

如前所述制备二硬脂酰磷脂酰乙醇胺－聚乙二醇（ DSPE-PEG ）（ Gabizon and Papahadjopoulos, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6949-6953; Klibanov 等， 1990, FEBS Letters 268:235-237 ）。简而言之，将含有 0.01uCi[^{14}C]-二油酰磷脂酰乙醇胺 DOPE （[^{14}C]-DOPE ）/μmol 类脂的摩尔比为 3:1;3.5 的甲氧基聚乙二醇琥珀酰琥珀酸琥珀酰酯（ PEG-OSu； MW 5000 ）、 DSPE 和三乙胺在氯仿中于室温培养过夜。然后在氮气流下蒸发溶剂，所得干混合物用二次蒸馏水水合。用含有 Bio-Gel A-1.5M(50-100 目)的柱（ 32 × 2cm ）过滤胶束溶液以除去未结合的 PEG-OSu 。通过液闪计数（计数[^{14}C]-DOPE-PEG ）和 225nm 的吸收（游离 PEG-OSu ）测定含有 DSPE-PEG 的峰级分。合并含有 DSPE-PEG 的级分并用渗析膜（截至分子量(MWCO)为 300,000(Spectra-Por, Spectrum Medical, Los Angeles, CA)）在水中渗析 24 小时，然后冻干。市场上也可买到各种分子量的 DSPE-PEG 。

实施例 2

用薄类脂薄膜水合将 2'-3'-双去氧肌苷（ ddI ）包囊到由摩尔比 10:3 的 DSPC:DSPG 和摩尔比为 10:3:1.45 的 DSPC:DSPG:DSPG-PEG 组成的脂质体中。按照实施例 1 可合成 DSPE-PEG ，或者市售得到。简而言之，在少量[^{14}C]-DPPC （<0.002% mol/mol ）存在下将类脂混合物溶于氯仿:甲醇（ 2:1 v/v ），然后在圆底烧瓶中蒸发溶剂，于烧瓶壁上形成薄类脂薄

膜。然后用加入少量放射性标记的[^{3}H]ddI 且药物/类脂的摩尔比为 2 的 ddI 磷酸盐缓冲液（ PBS， 145mM， pH 7.4 ）水合类脂薄膜。室温放置约 30 分钟后，在高于类脂混合物的凝胶至液相转移的温度机械搅拌脂质体组合物而形成多层囊（ MLVs ）。用不锈钢挤压装置（ Lipex Biomembrane, Vancouver, BC ）从 0.2 微米的聚碳酸酯膜（ Nuclepore, Cambridge, MA ）挤出 MLV。通过准弹性光散射（ QELS ）用亚微粒分析仪（ Model N2SD Coulter Electronics, Hialeah, FL ）评价囊的粒度分布和均匀度。挤出的 DSPC:DSPG 和 DSPC:DSPG:DSPE-PEG 制剂的脂质体平均直径分别为 0.175±0.035 微米和 0.15±0.01 微米。将脂质体组合物（ 1 毫升）通过 10 毫升粗 Sephadex G-50 柱（ Pharmacia LKB, Montreal, QC ）离心（ 4 ℃，于 300 克离心 15 分钟）、超离心（ 4 ℃，于 160000g 离心 90 分钟）或通过在预定 PBS 中渗析而除去未包囊的药物。药物包埋的效率用液闪计数仪（ model LS 6000TA, Beckman Instruments Canada Inc.m Mississauga, ON ）测定。

实施例 3

用反相蒸发法（ Szoka and Papahadjopoulos, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:4194-4198 ）将 2'-3'-双去氧胞苷（ ddC ）包囊到由摩尔比为 4:1:5 的 DPPC:DP:CHOL 组成的脂质体中。简而言之，在少量[1-^{14}C]油酸胆甾醇酯存在下将类脂混合物溶于氯仿:甲醇（ 2:1 v/v ），然后在圆底烧瓶中蒸发溶剂，于烧瓶壁上形成薄类脂薄膜。然后将类脂包埋再溶于异丙醚:甲醇（ 3:0.8 v/v ）。在该有机相中加入含有少量放射性标记的[^{3}H]-ddC 且药物/类脂的摩尔比为 3.6 的 ddC 磷酸盐缓冲液（ PBS， 145mM， pH 7.4 ）。然后将两相混合物于室温的超声浴中超声 5 分钟而得均匀溶液。 50 ℃通过反相蒸发在控制条件于真空下除去有机溶剂。然后将脂质体悬浮液通过 0.4 微米的聚碳酸酯膜挤出。通过 QELS 评价囊粒度分别和均匀度。挤出的脂质体平均直径为 0.300±0.08 微米。如上除去未包囊药物， ddC 包囊效率通过放射性计数测定。

实施例 4

用如上所述的 ddC 脂质体组合物反相蒸发技术（实施例 3）将膦甲酸包囊到脂质体中，只是类脂组分是摩尔比为 10:3 的 DPPC:DPPG。本实施例中，药物/类脂的摩尔比是 5，[^{3}H]-DPPC 和[^{14}C]-膦甲酸分别用作类脂和药物标记物。通过 0.2 微米的聚碳酸酯膜挤出脂质体悬浮液而得平均直径为 0.165±0.030 微米的脂质体。如上除去未包囊药物，膦甲酸包囊效率通过放射性计数测定。

脂质体药物和游离药物的比较实施例

细胞摄取

发明人在体外实验中评价了游离及脂质体包囊的抗 HIV 药物在鼠单核细胞－巨噬细胞 RAW 264.7 中及人幼单核细胞 U937 中的累积。简而言之，通过将融合细胞在含有不同浓度的游离和脂质体包囊抗 HIV 药物的培养基（其中加有少量放射性标记的药物和类脂）中培养。在不同培养时间移去培养基，洗涤细胞并用 Triton X-100 溶液处理。用液闪计数仪通过测量放射性水平计算药物和类脂的摄取。用 Pierce 二辛可宁酸蛋白分析（Rockford, IL）在微滴定板中测定每个样品的蛋白质浓度。结果表明结合有 ddC 的脂质体可在 RAW 264.7 和 U937 细胞中大大增加药物的摄取（图 1c、1d 和 1e）。类似地，脂质体膦甲酸在 RAW 264.7 细胞中的累积大大高于游离药物（图 1f）。相反，尽管脂质体 ddI 在这些细胞中的摄取水平与 ddC 或膦甲酸脂质体组合物类似，但是，在两种细胞系中观察到游离 ddI 更多的累积（图 1a 和 1b），这表明与其它抗 HIV 药物相比，这些细胞系对 ddI 具有更大的膜渗透性。

体外抗病毒效应

抗病毒药物的脂质体组合物的抗病毒效应也已在不同细胞系中评价。简而言之，用不同株的 HIV 经 1（病毒/靶细胞）的重复感染感染细胞并用不同浓度的游离及脂质体包囊药物处理。在不同时间间隔通过测定不含细胞的上清液中逆转录酶的活性或者通过用酶分析测量病毒 p24 蛋白来监测病毒的复制。通过聚合物酶链反应（PCR）分析用 HIV 引物对（M661/M667）处理后 24 小时监测病毒转录。PCR 评价与人细胞β-珠蛋

白基因的含量相适应。用四唑比色（ MTT ）分析法评价细胞活性。结果表明，在脂质体中混合 ddC 得到与游离药物对抗 $HIV\text{-}1_{IIIB}$ 在 U937 和 Molt-4 clone-8 细胞中复制相比较的甚或更好的抗 HIV 效应（图 2b 和 2c ）。类似地，脂质体膦甲酸表明了与未包囊药物对抗 $HIV\text{-}1_{IIIB}$ 在 U937 、 Molt-4 clone-8 和 Supt-1 细胞中复制相比较的甚或更好的抗病毒效应（图 2d 、 2e 和 2f ）。尽管 ddI 脂质体组合物的抗病毒效应比游离药物对抗 $HIV\text{-}1_{IIIB}$ 在 U937 细胞中复制低（图 2a ），但是观察到脂质体 ddI 对 $HIV\text{-}1_{Ada\text{-}M}$ 在单核细胞衍生的巨噬细胞中的更大抗-HIV 效应（表 1 ）。应理解，由于脂质体优先被 MPS 细胞摄取，在体内环境下更容易观察到脂质体药物比游离药物更高的抗-HIV 效应。

表 1：游离和脂质体 ddI 在被 $HIV\text{-}1_{Ada\text{-}M}$[a] 感染的初期单核细胞衍生的巨噬细胞中的抗病毒效应

处理	浓度	p24(ng/ml)	感染后天数	
	(μ M)	7	13	17
未处理	0	161	1,263	7,700
脂质体 ddI	0.1	0	0	0
	1	0	0	0
	10	0	0	0
游离 ddI	0.1	0	0	280
	1	0	0	0
	10	0	0	0

[a] 将外周血液单核细胞悬浮在 48 孔板的接种培养基中，浓度为 3×10^6 细胞/毫升。开始培养 5 天后，用 PBS 漂洗培养基四次以除去未附着细胞。将附着细胞在用 10,000cpm/孔的 HIV-1 Ada-M 单核细胞株接种前，首先在有含有药物的培养基或没有含有药物的培养基存在下预培养 2 小时。然后，每 4 至 5 天更换培养基，并用补充有或没有 ddI 的培养基代替。通过用酶

分析测定 p24 的水平了监测病毒复制。

游离和脂质体包囊的膦甲酸的抗-CMV 活性也在胚胎肺成纤维细胞（ MRC-5 细胞系）中评价。简而言之，用人 CMV AD169 株感染细胞，用系列稀释的游离和脂质体膦甲酸处理。培养 96 小时后，将细胞固定，用单克隆抗体（抗 72-kDa 早期 CMV 蛋白）进行免疫过氧化酶染色。计数标记的血小板，结果用未处理的感染对照细胞与膦甲酸浓度的百分比表示。结果表明，游离和脂质体膦甲酸具有可比的对 CMV p72 在 MRC-5 细胞系中表达的抑制活性（图 2g ）。

体内研究

在大鼠中研究了游离和脂质体包囊的抗-HIV 药物的药代动力学特性和组织分布。简而言之，通过插入动物颈静脉的插管将游离和脂质体包囊的药物以单一静脉内药团剂量注射给雌性 Sprague-Dawley 大鼠。在特定的时间点处死动物，将血样收集到肝素化试管中，离心分离。在相同的时间，除去选择后的组织，洗涤，称重并匀化。然后根据商用组织增溶方法处理组织和血浆。用放射性示踪剂监测所有样品中的药物和类脂水平。

结果清楚地表明，将抗病毒药物包囊到脂质体中与未包囊药物相比，可在富含巨噬细胞组织中得到更高的药物累积（图 3a 至 3l ）。在这些易受 HIV 感染的组织中较大量抗病毒药物的释放以及药物在潜在毒性位点的降低的释放可得到具有增加效应且降低毒性的抗-HIV 药物。特别地，发明人表明，脂质体膦甲酸在淋巴结中的累积比游离药物高 8 倍（表 2；图 3j 、3k 和 3l 为相同制剂： 10mg 膦甲酸/kg ）。

表 2：对大鼠进行单一静脉内剂量(10mg 膦甲酸/kg)给药后，在不同组织中游离的和脂质体包裹的膦甲酸的曲线下面积。[a]

组织	脂质体包裹的膦甲酸	游离膦甲酸	L-膦甲酸/膦甲酸的比例
淋巴结	163.5	20.3	8.1
大脑	40.8	3.1	13.2
眼睛	86.9	22.9	3.8
脾	1151.4	0.8	1495.3
肝	62.5	1.2	52.1
肺	59.7	1.5	39.8

[a]数值用梯形（ trapezoidal ）规则从组织分布曲线的平均值计算得到，以 nmol 膦甲酸/g 组织/h 表示。

当用脂质体膦甲酸代替游离药物对动物注射时，在动物大脑中也观察到了药物聚集量的增加。由于 HIV 病理学涉及严重的中央神经系统疾病，所以该特征非常重要。另外，由于我们的数据表明在用脂质体膦甲酸代替游离药物进行注射后，眼内的药物聚集增加，所以给予脂质体膦甲酸可以在 HIV 感染的患者中改善药物对 CMV 的效力并可用于治疗 CMV 视网膜炎。将抗病毒药物包裹于脂质体中时，还观察到了药代动力学的改善（表 3 和 4；与图 3a 至 3e 和 3j 至 3l 中的制剂相同）。发现包裹药物的系统清除率比游离药物低得多，导致脂质体药物的清除半衰期大大增加。将抗病毒药物包裹于脂质体中所引起的药理学的改善有望降低常规治疗中所用的抗病毒药物的剂量以及抗 HIV 药物的给药频率，从而改善 AIDS 或其它病毒性疾病患者的生活质量。

表 3：对大鼠进行单一静脉内剂量(3mg ddI/kg)给药后，游离的和脂质体 ddI 的药代动力学参数。[a]

参数[1]	空间稳定的脂质体 DSPC:DSPG:PEG	常规脂质体 DSPC:DSPG	游离 ddI

	(10:3:1.45) [^{3}H]ddI [^{14}C]DPPC		(10:3) [^{3}H]ddI [^{14}C]DPPC		[^{3}H]ddI
$t_{1/2}$(h)	3.53	14.50	2.64	3.92	0.14
$AUC_{0-\infty}$ (nmol/ml/h)	950.3	17420	649.9	4971	5.31
K_{el}(h^{-1})	0.20	0.048	0.26	0.18	4.97
Vd_{ss}(1/kg)	0.071	0.077	0.074	0.070	0.48
Cl(1/h/kg)	0.013	0.004	0.020	0.013	2.39
MRT(h)	5.31	21.04	3.79	5.51	0.20

[a] 参数用零室模型从血浆浓度－时间曲线计算得到。[†] 缩写： $t_{1/2}$，清除半衰期； $AUC_{0-\infty}$，血浆浓度－时间曲线下从零到无穷的曲线下面积； K_{el}，清除速率常数； Vd_{ss}，稳态分布体积； Cl，系统清除率； MRT，平均保留时间。

表 4：对大鼠进行单一静脉内剂量(10mg/kg)给药后，游离的和脂质体 PFA 的药代动力学参数。[a]

药代动力学参数[†]	游离膦甲酸 [^{14}C]-PFA	脂质体包裹的膦甲酸 [^{14}C]-PFA	脂质体类脂 [^{3}H]-DPPC
$t_{1/2}$ (h)	0.71 ± 0.04	3.06 ± 0.34	5.44 ± 0.79
AUC0-→∞ (nmol/ml/h)	48.0 ± 9.6	3687.5 ± 374.2	24277.8 ± 2962.8
K_{el} (h-1)	0.96 ± 0.06	0.24 ± 0.03	0.12 ± 0.02
Vd_{ss} (l/kg)	0.80 ± 0.14	0.040 ± 0.004	0.050 ± 0.003
Cl (l/h/kg)	0.77 ± 0.15	0.010 ± 0.001	0.006 ± 0.001
MRT (h)	1.04 ± 0.07	4.52 ± 0.42	7.93 ± 1.12

[a]数值表示每个时间点从每组6只动物得到的平均值±SD。[b]缩写：$t_{1/2}$，清除半衰期；$AUC_{0-\infty}$，血浆浓度－时间曲线下从零到无穷的曲线下面积；K_{el}，清除速率常数；Vd_{ss}，稳态分布体积；Cl，系统清除率；MRT，平均保留时间。

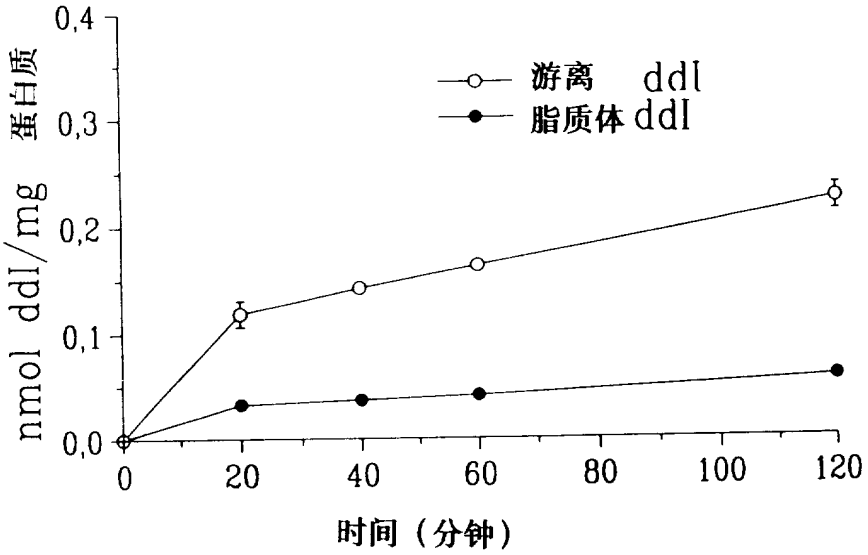

0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
nmol ddI/mg 蛋白质
游离 ddI
脂质体 ddI
0
20
40
60
80
100
120
时间（分钟）

图1A

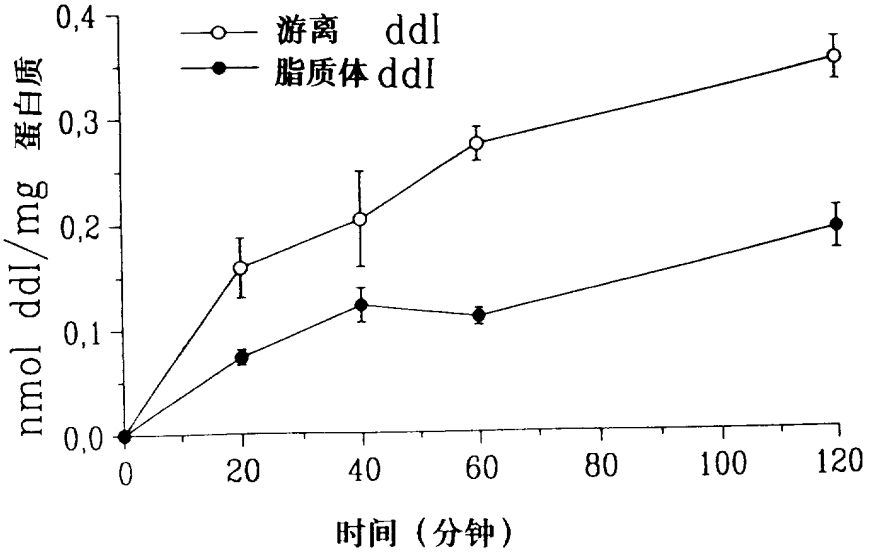

0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
nmol ddI/mg 蛋白质
游离 ddI
脂质体 ddI
0
20
40
60
80
100
120
时间（分钟）

图1B

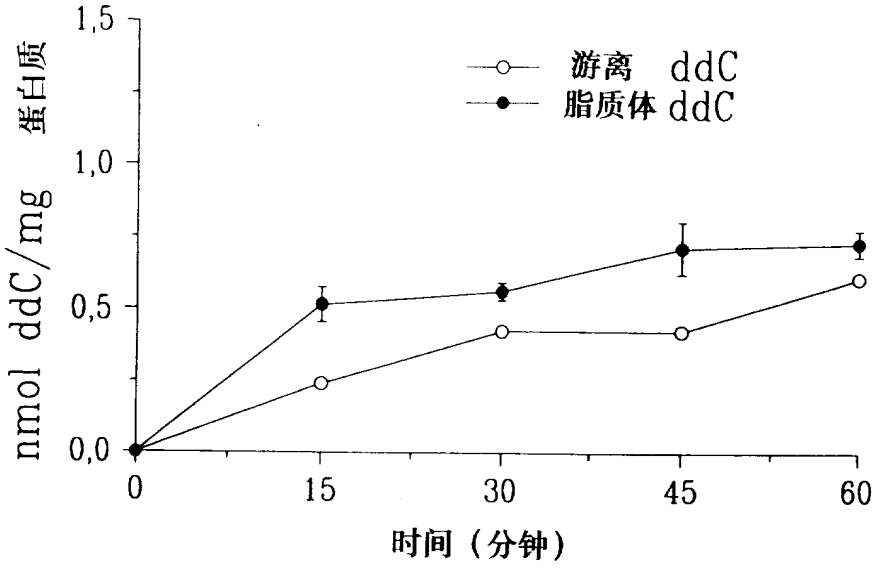

游离 ddC
脂质体 ddC
nmol ddC/mg 蛋白质
1,5
1,0
0,5
0,0
0
15
30
45
60
时间（分钟）

图1C

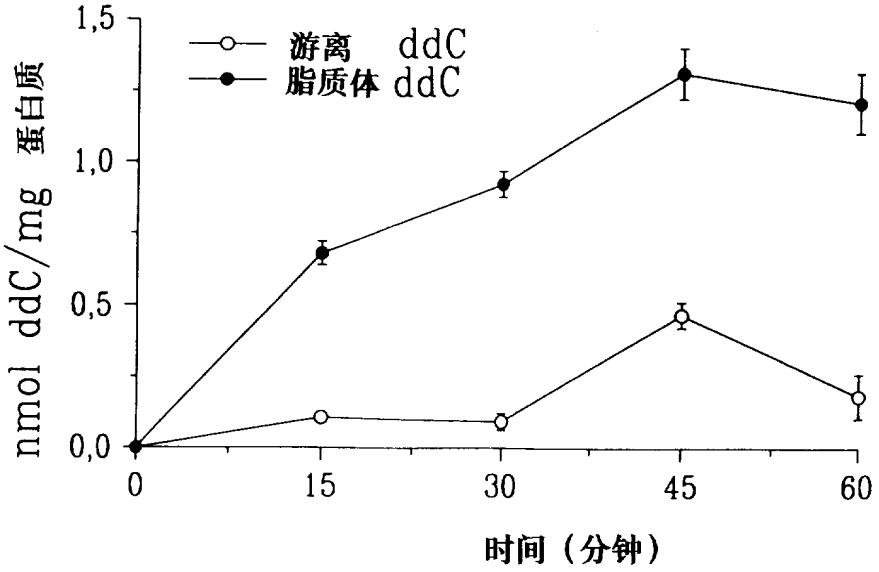

游离 ddC
脂质体 ddC
nmol ddC/mg 蛋白质
1,5
1,0
0,5
0,0
0
15
30
45
60
时间（分钟）

图1D

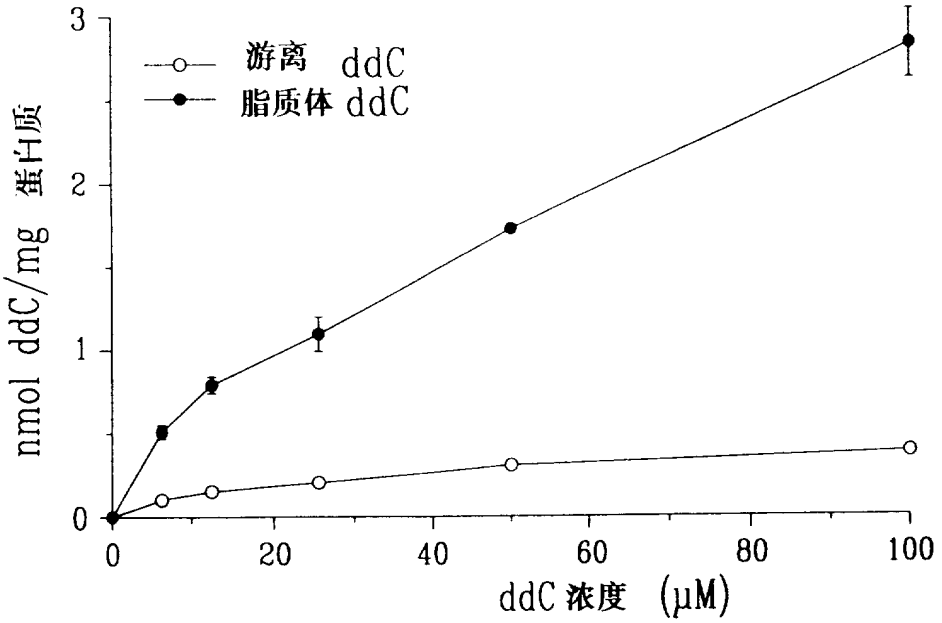

游离 ddC
脂质体 ddC
nmol ddC/mg 蛋白质
ddC 浓度 (μM)
0
1
2
3
0
20
40
60
80
100

图1E

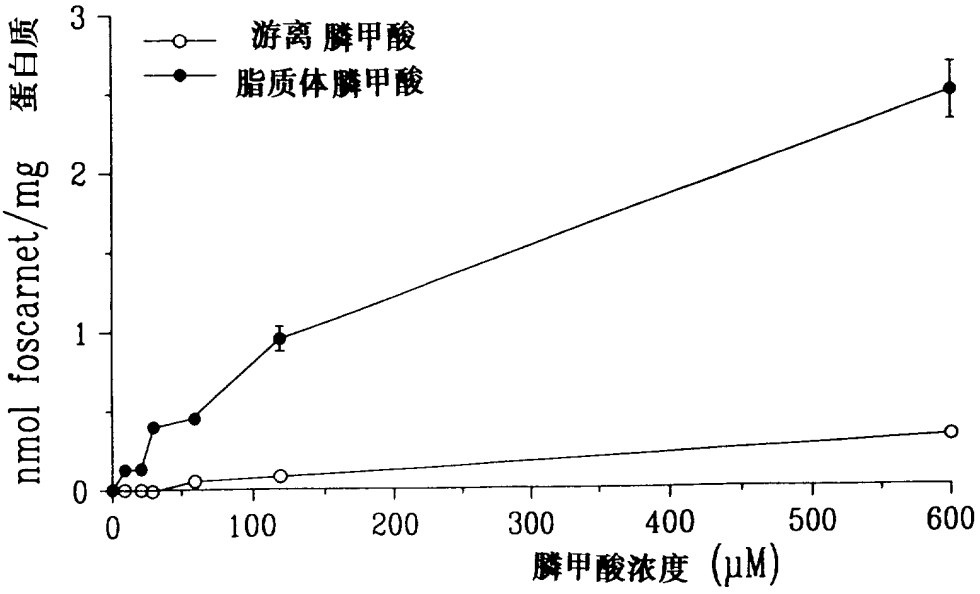

游离 膦甲酸
脂质体膦甲酸
nmol foscarnet/mg 蛋白质
膦甲酸浓度 (μM)
0
1
2
3
0
100
200
300
400
500
600

图1F

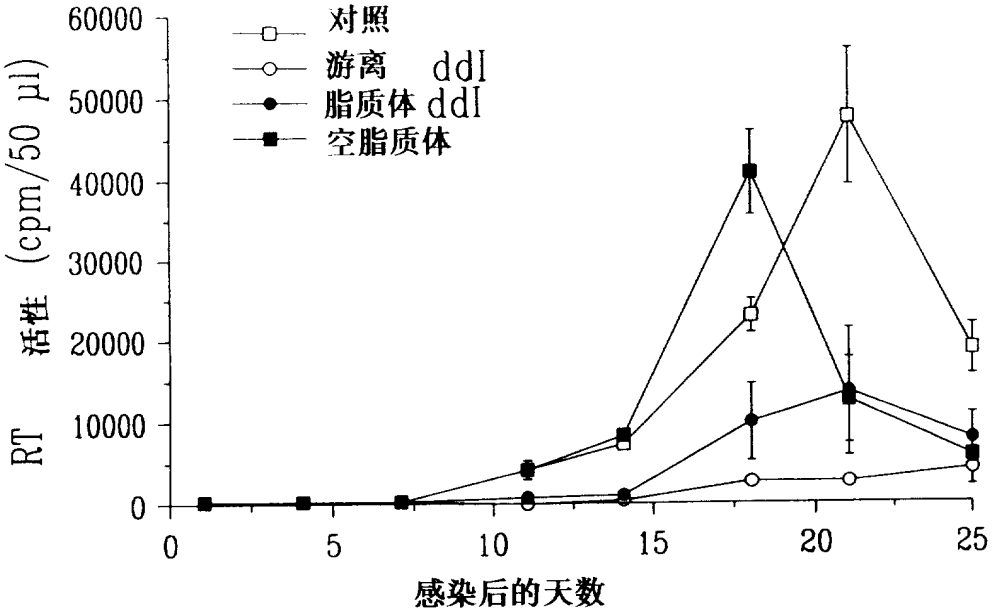

对照
游离 ddI
脂质体 ddI
空脂质体
RT 活性 (cpm/50 μl)
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
0
5
10
15
20
25
感染后的天数

图 2A

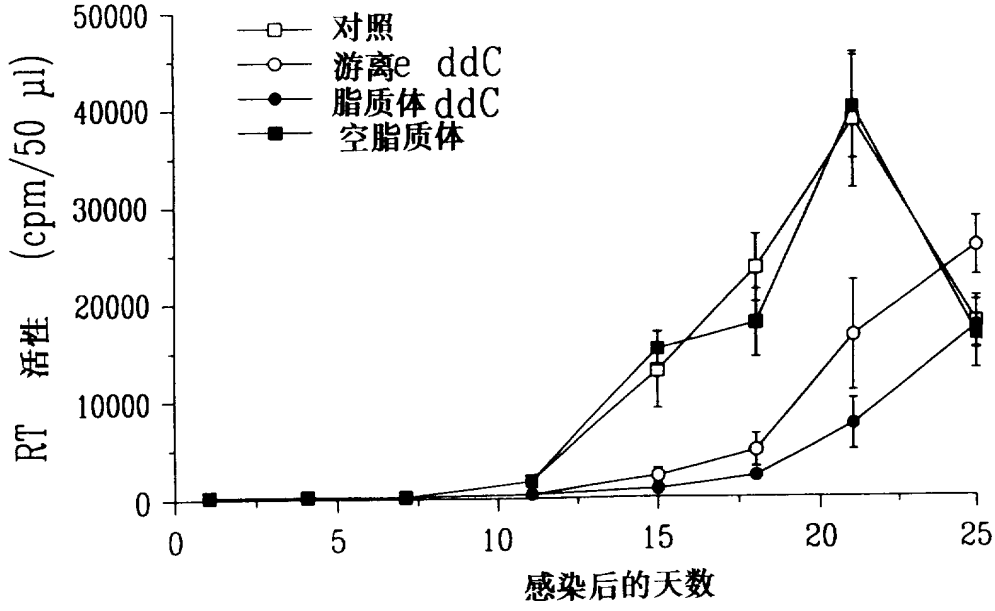

对照
游离e ddC
脂质体 ddC
空脂质体
RT 活性 (cpm/50 μl)
50000
40000
30000
20000
10000
0
0
5
10
15
20
25
感染后的天数

图 2B

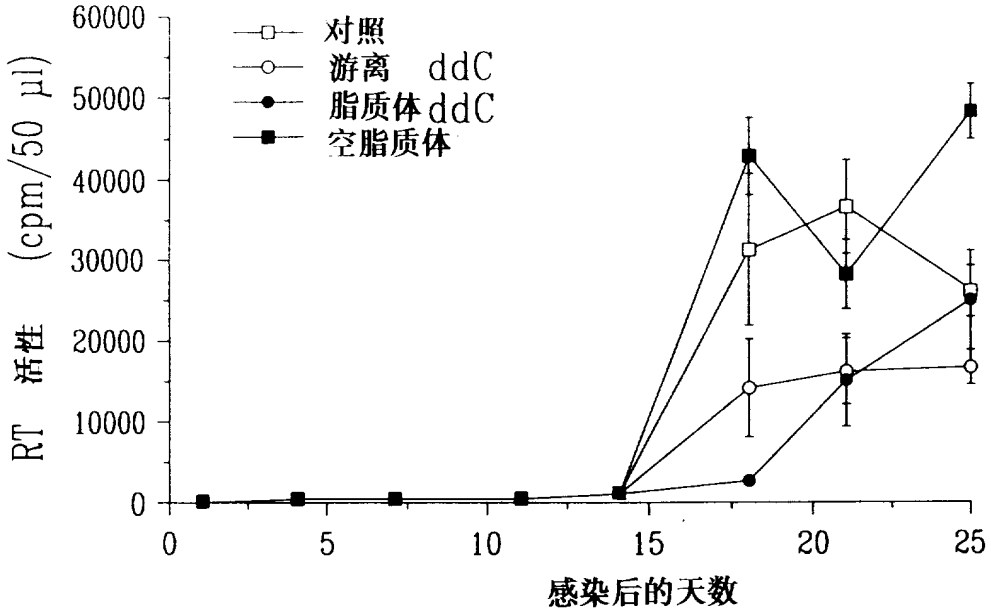

60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
RT 活性 (cpm/50 μl)
对照
游离 ddC
脂质体ddC
空脂质体
0
5
10
15
20
25
感染后的天数

图2C

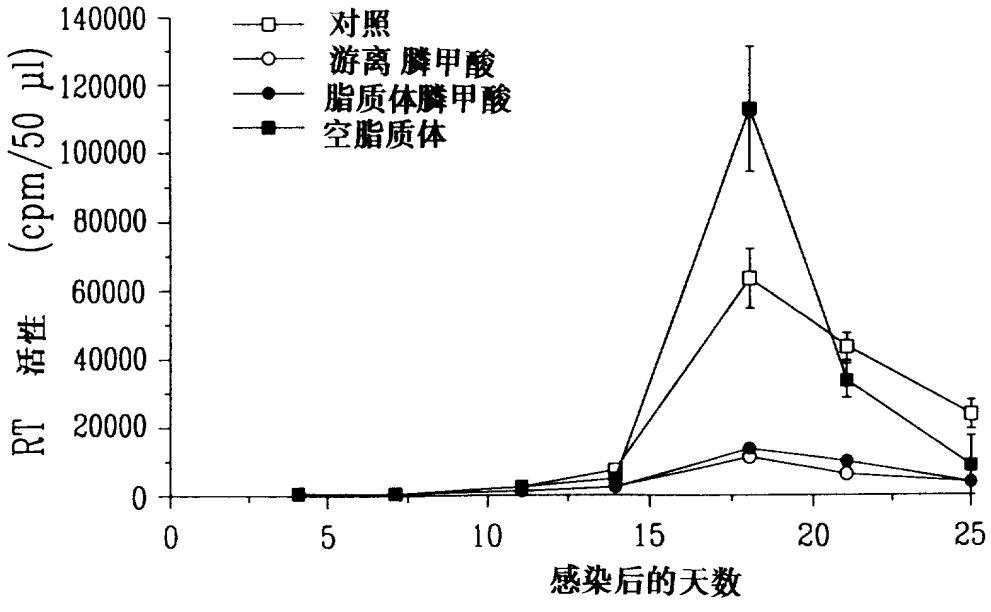

140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
RT 活性 (cpm/50 μl)
对照
游离 膦甲酸
脂质体膦甲酸
空脂质体
0
5
10
15
20
25
感染后的天数

图 2D

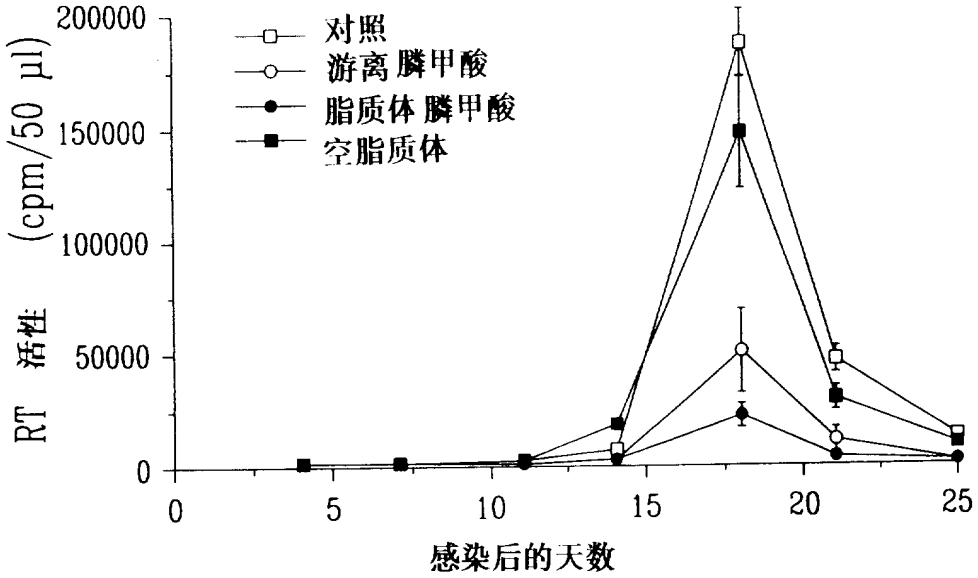

对照
游离膦甲酸
脂质体膦甲酸
空脂质体
RT 活性 (cpm/50 μl)
200000
150000
100000
50000
0
0
5
10
15
20
25
感染后的天数

图2E

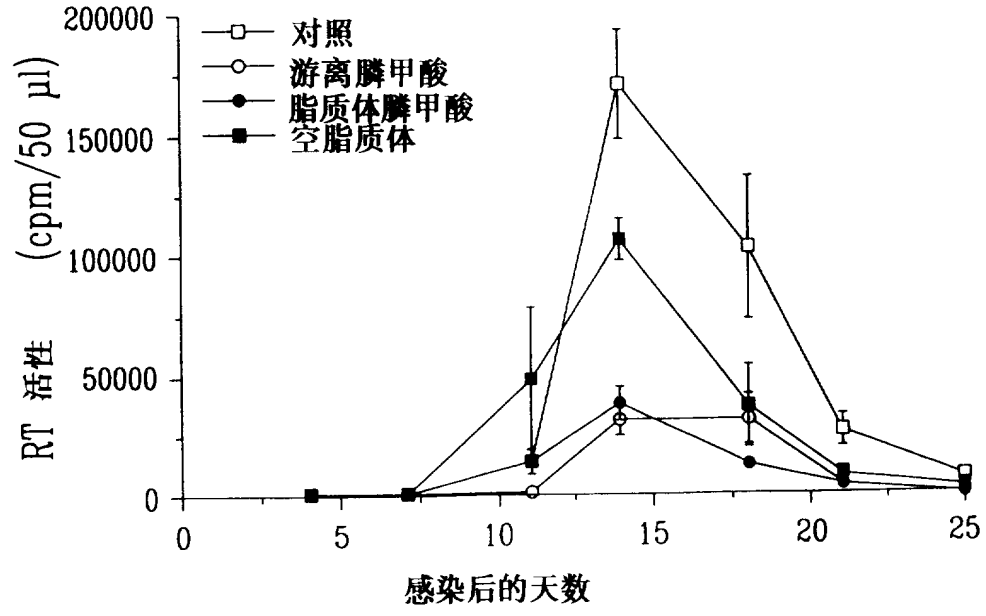

对照
游离膦甲酸
脂质体膦甲酸
空脂质体
RT 活性 (cpm/50 μl)
200000
150000
100000
50000
0
0
5
10
15
20
25
感染后的天数

图 2F

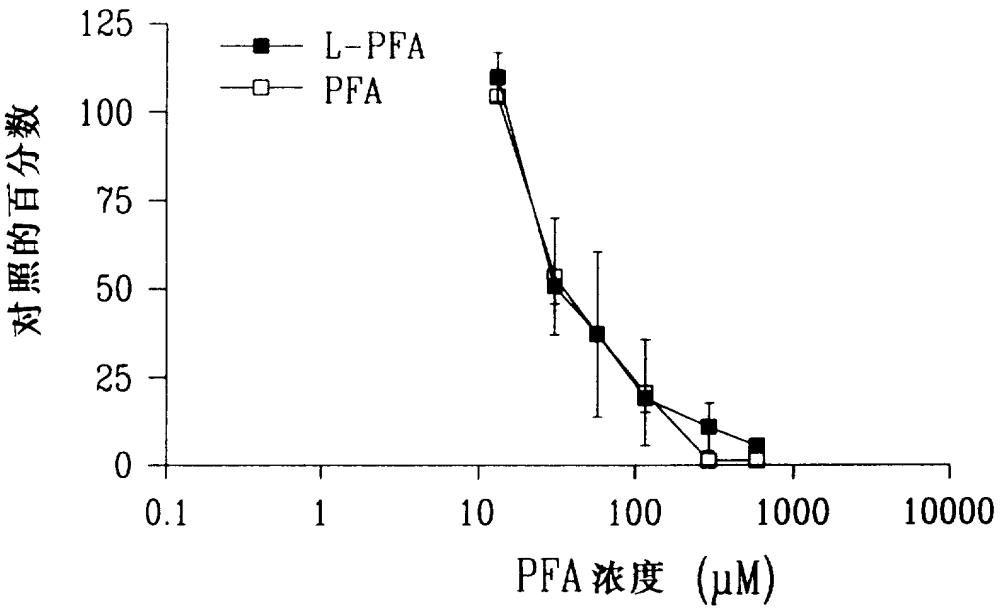

125
100
75
50
25
0
L-PFA
PFA
对照的百分数
0.1
1
10
100
1000
10000
PFA浓度 (μM)

图2G

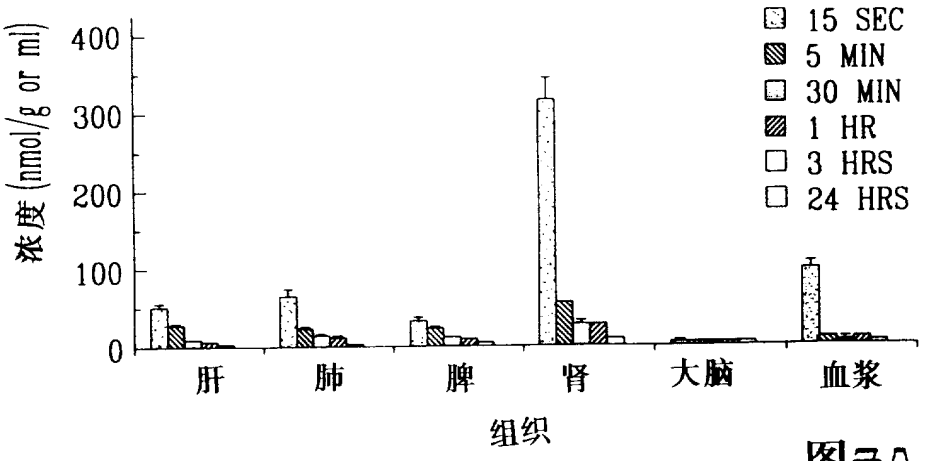

浓度 (nmol/g or ml)
400
300
200
100
0
15 SEC
5 MIN
30 MIN
1 HR
3 HRS
24 HRS
肝
肺
脾
肾
大脑
血浆
组织

图3A

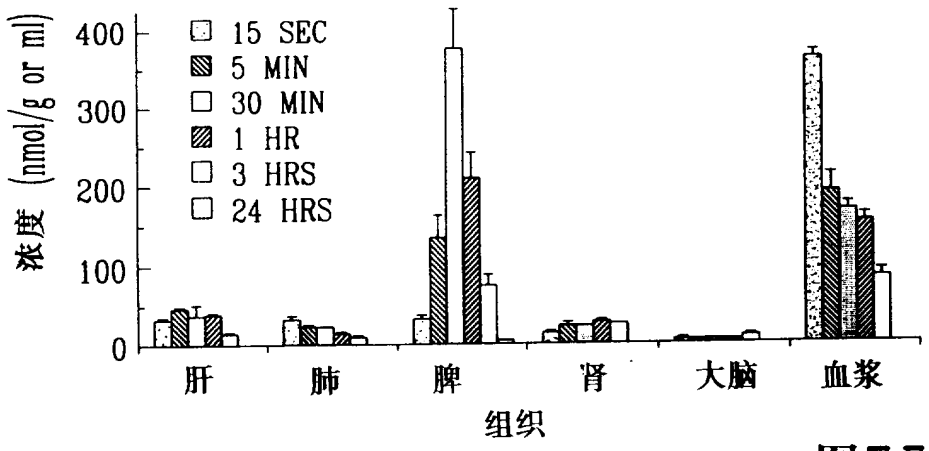

浓度 (nmol/g or ml)
400
300
200
100
0
15 SEC
5 MIN
30 MIN
1 HR
3 HRS
24 HRS
肝
肺
脾
肾
大脑
血浆
组织

图3B

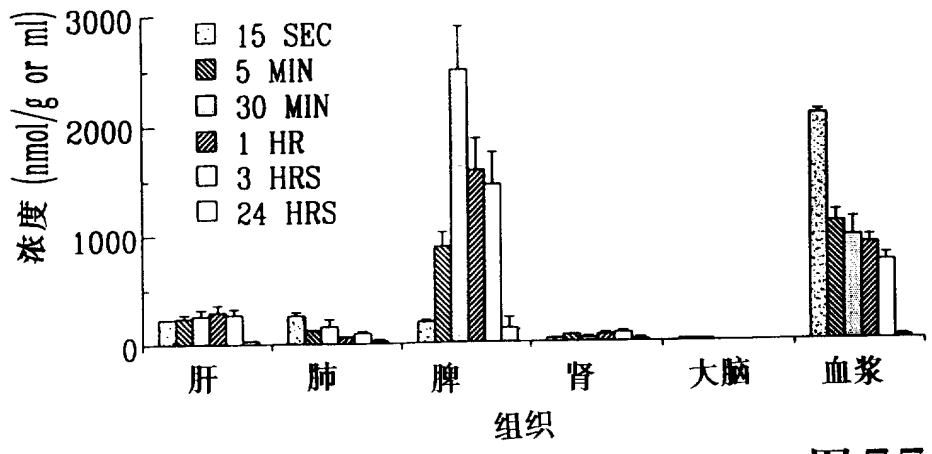

浓度 (nmol/g or ml)
3000
2000
1000
0
15 SEC
5 MIN
30 MIN
1 HR
3 HRS
24 HRS
肝
肺
脾
肾
大脑
血浆
组织

图3C

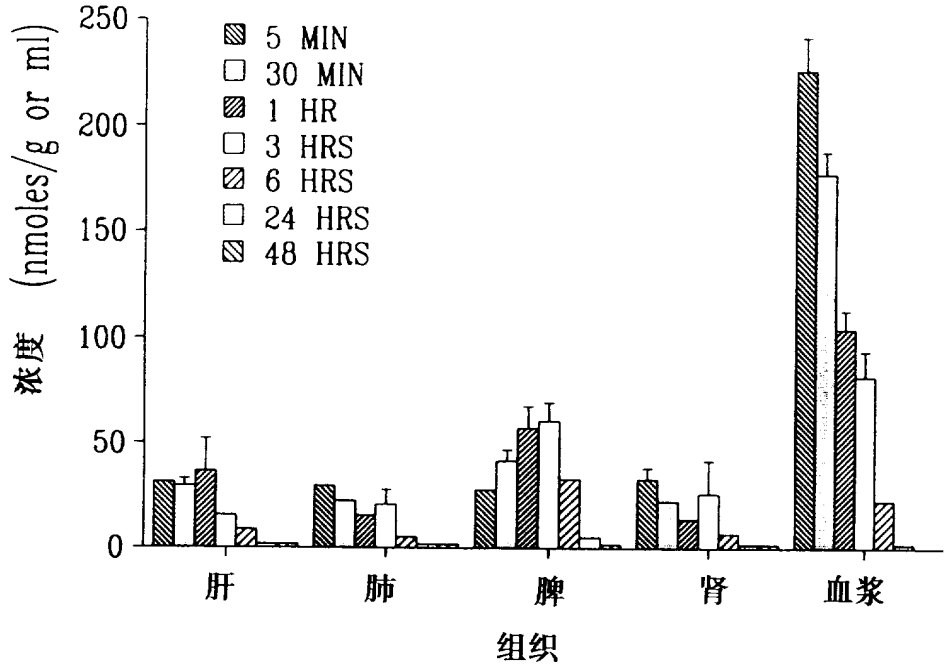

250
200
150
100
50
0
浓度 (nmoles/g or ml)
5 MIN
30 MIN
1 HR
3 HRS
6 HRS
24 HRS
48 HRS
肝
肺
脾
肾
血浆
组织

图3D

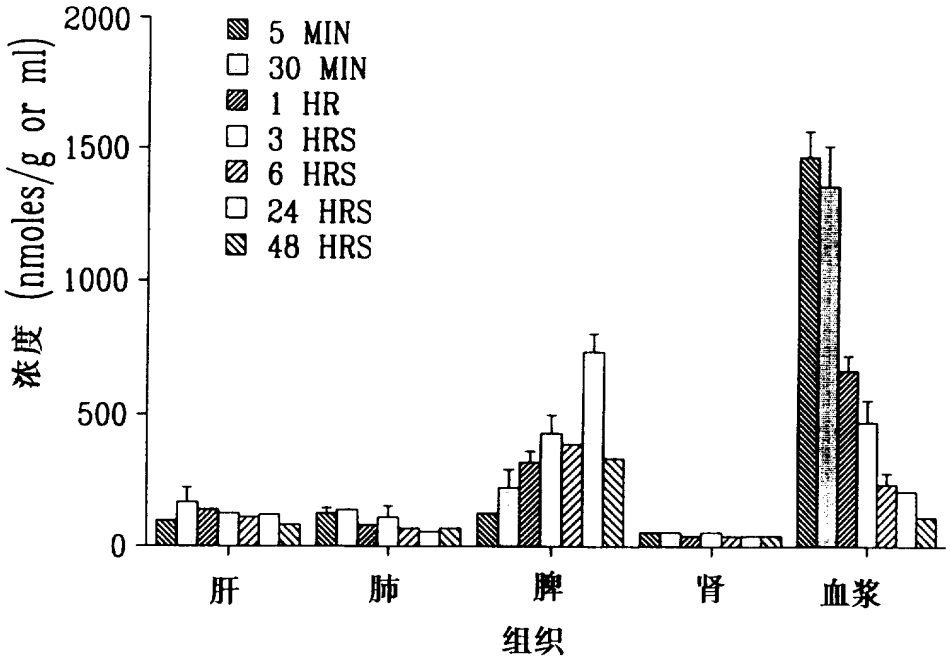

2000
1500
1000
500
0
浓度 (nmoles/g or ml)
5 MIN
30 MIN
1 HR
3 HRS
6 HRS
24 HRS
48 HRS
肝
肺
脾
肾
血浆
组织

图3E

图 3F

图 3G

图 3H

图 3I

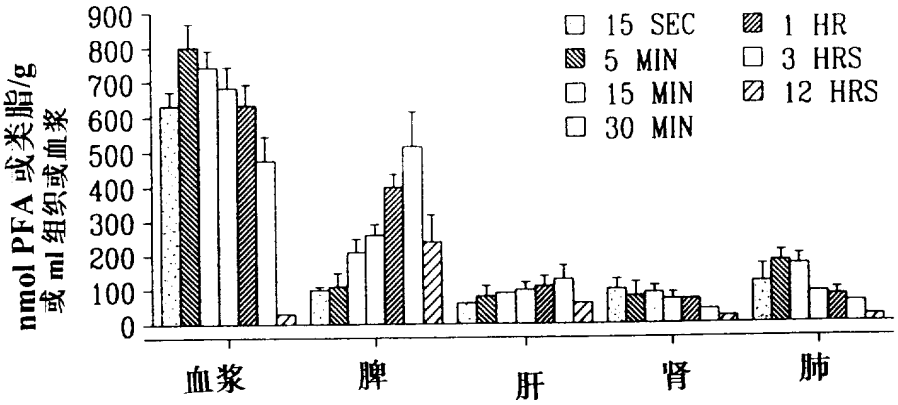

nmol PFA 或类脂/g
或 ml 组织或血浆
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
15 SEC
5 MIN
15 MIN
30 MIN
1 HR
3 HRS
12 HRS
血浆
脾
肝
肾
肺

图 3J

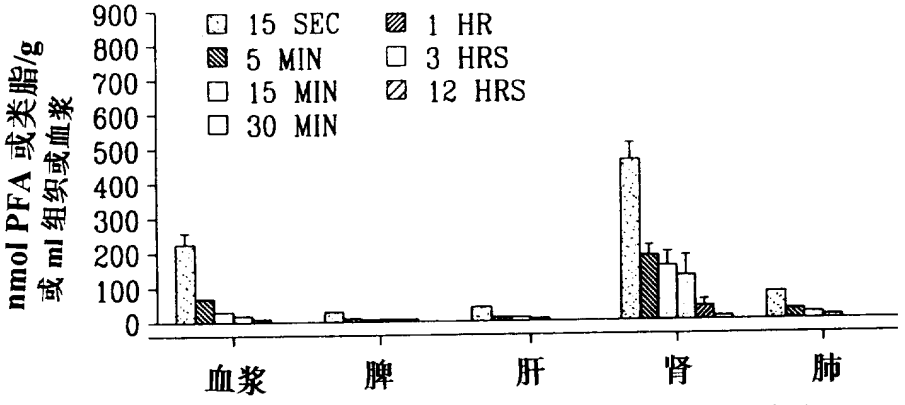

nmol PFA 或类脂/g
或 ml 组织或血浆
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
15 SEC
5 MIN
15 MIN
30 MIN
1 HR
3 HRS
12 HRS
血浆
脾
肝
肾
肺

图 3K

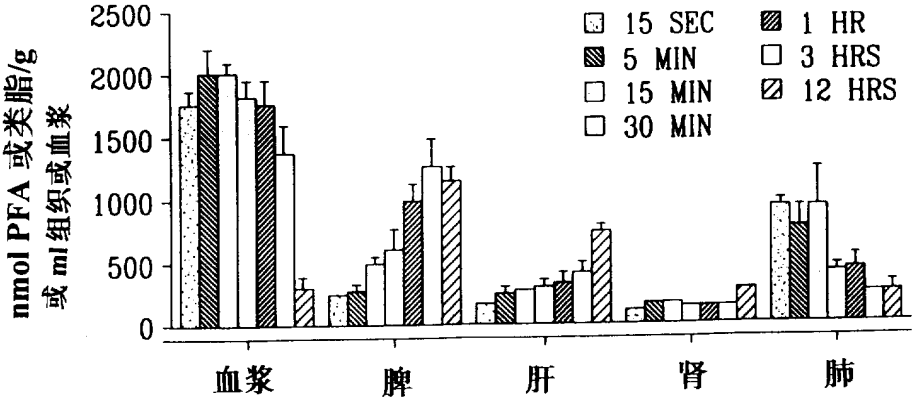

nmol PFA 或类脂/g
或 ml 组织或血浆
2500
2000
1500
1000
500
0
15 SEC
5 MIN
15 MIN
30 MIN
1 HR
3 HRS
12 HRS
血浆
脾
肝
肾
肺

图 3L