



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104837483 B

(45)授权公告日 2017.09.01

(21)申请号 201380059204.6

T·P·韦伯

(22)申请日 2013.11.20

(74)专利代理机构 北京东方亿思知识产权代理
有限责任公司 11258

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104837483 A

代理人 肖善强

(43)申请公布日 2015.08.12

(51)Int.Cl.

(30)优先权数据

A61K 9/127(2006.01)

61/728,378 2012.11.20 US

A61K 31/475(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.05.13

(56)对比文件

WO 0059473 A1,2000.10.12,

CN 1795859 A,2006.07.05,

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2013/071096 2013.11.20

PUSCALAU GEORGETA ET AL.Reliability

of preparation procedure for sphingosomal

vincristine.《American Journal of health-

system pharmacy,American society of

health-system pharmacists,US》.2005,第62卷

(第15期),第1067页左栏第30行至1612页右栏最
后一段.

(87)PCT国际申请的公布数据
W02014/081887 EN 2014.05.30

(73)专利权人 光谱医药公司
地址 美国加利福尼亚州
专利权人 阿布图斯生物制药公司

审查员 陈卫星

(72)发明人 W·T·蒙特 C·J·巴尔博萨

权利要求书1页 说明书16页 附图1页

(54)发明名称

制备治疗用途的脂质体封装式长春新碱的
改进方法

(57)摘要

公开了有效配成用于静脉内注射液(VSLI)
的脂质体封装式长春新碱的改进方法,其操作失
误和污染的风险减少。

1. 制备包括脂质体封装式长春新碱的药学上可接受的液体组合物的方法,所述脂质体封装式长春新碱无显著降解产物,所述方法包括:

(a) 在单一瓶中配成 (i) 第一溶液,包括1mg/ml至5mg/ml浓度的硫酸长春新碱,其中所述第一溶液的pH为3.5至5.5;和(ii)第二溶液,包括低pH的鞘磷脂/胆固醇脂质体;

(b) 将所述单一瓶中的所述配成溶液的pH升高到7.0至7.5的pH;

(c) 在平衡在75℃的干热区块中加热包括所述配成溶液的所述单一瓶至少13至18分钟,其中所述加热区块包括大于所述单一瓶的平均长度或直径1-5%的一个或多个孔,以生成包括配成的脂质体封装式长春新碱的溶液;

(d) 平衡所述配成溶液至室温。

2. 权利要求1所述的方法,其中包括所述脂质体的所述第二溶液的pH为4.0。

3. 权利要求2所述的方法,其中所述第二溶液进一步包括柠檬酸盐缓冲液。

4. 权利要求1所述的方法,其中通过添加包括pH9.0的缓冲液的第三溶液,升高所述配成溶液的pH。

5. 权利要求4所述的方法,其中所述第三溶液包括磷酸钠缓冲液。

6. 权利要求1所述的方法,其中所述配成溶液包括0.1/1.0至0.2/2.0的硫酸长春新碱/脂质的浓度比。

7. 权利要求6所述的方法,其中所述配成溶液中的硫酸长春新碱的浓度为0.1mg/mL至0.5mg/mL。

8. 权利要求7所述的方法,其中所述配成溶液中的硫酸长春新碱的浓度为0.15mg/mL至0.2mg/mL。

9. 权利要求4所述的方法,其中所述第一溶液包括硫酸长春新碱USP (5mg/5mL),其等同于4.5mg/5mL长春新碱游离碱,和500mg/5mL甘露醇;所述第二溶液包括由73.5mg/mL鞘磷脂、29.5mg/mL胆固醇、33.6mg/mL柠檬酸、35.4mg/mL柠檬酸钠组成的鞘磷脂/胆固醇脂质体;和所述第三溶液包括355mg/25mL磷酸氢二钠和225mg/25mL氯化钠。

10. 权利要求1所述的方法,其中所述脂质体中鞘磷脂与胆固醇的比在75/25mol%/mol%鞘磷脂/胆固醇至30/50mol%/mol%鞘磷脂/胆固醇之间。

11. 权利要求1所述的方法,其中所述脂质体的尺寸范围为0.05-0.5微米。

12. 通过权利要求1所述的方法制成的脂质体封装式长春新碱在制造用于治疗癌症的药物中的应用,其中1.5至2.4mg/m²剂量的所述脂质体封装式长春新碱被给予患有癌症的患者。

13. 权利要求12所述的应用,其中所述癌症选自淋巴瘤、白血病、骨髓瘤、脑癌和神经母细胞瘤。

14. 权利要求12所述的应用,其中包括脂质体封装式长春新碱的药学上可接受的液体组合物,通过静脉内灌注,经30至60分钟时间被给予。

15. 权利要求12所述的应用,其中包括脂质体封装式长春新碱的药学上可接受的液体组合物,通过静脉内灌注,每7-28天被给予一次。

制备治疗用途的脂质体封装式长春新碱的改进方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2012年11月20日提交的名为“制备治疗用途的脂质体封装式长春新碱的改进方法(Improved Method for the Preparation of Liposome Encapsulated Vincristine for Therapeutic Use)”的美国临时申请号61/728378的优先权,其全部内容被并入本文作为参考。

[0003] 发明背景

[0004] 脂质体是确立的可通过相对于非封装形式提高药物的等离子体分布和药代动力学来增强治疗活性药物效力的纳米颗粒(例如,Weinstein, *Liposomes: From Biophysics to Therapeutics*, (Ostro, M. J., ed.), Marcel Dekker, Inc., N.Y., pp. 277-338, (1987))。例如,硫酸长春新碱脂质体注射液(VSLI)是封装在鞘磷脂-胆固醇脂质体中的抗癌治疗硫酸长春新碱的脂质体制剂,其提供的效力大于标准硫酸长春新碱注射液USP(VSI)。临床试验也已证明VSLI通过与非封装式长春新碱相比显著延长长春新碱的循环半衰期而促进剂量强化。脂质体提供延迟药物释放机制,并且脂质体尺寸能使药物通过外渗在癌组织中积累((Webb等, *Cancer Chemother. Pharmacol* 42:461-470, 1998; Shan等, *Cancer Chemother. Pharmacol* 58:245-255, 2006)。这些特征转化成相对于标准VSI提高的临床效益。

[0005] 硫酸长春新碱在鞘磷脂-胆固醇脂质体中的封装一般通过利用酸性脂质体内pH(例如,pH 4)和中性pH(例如,pH 7)的外部介质来实现。这种pH梯度使弱碱性长春新碱以高效率扩散到脂质体内部中(Cullis等, *Trends in Biotech* 9:268-272, 1991; Boman等, *Bioch Biophys Acta*, 1152:253-258, 1993)。为使长春新碱在跨膜pH梯度下在脂质体内部中积累,脂质体膜必须对于长春新碱的空间体积是暂时可渗透的。因此,不同于通常可被动地封装到脂质体中的中性或阴离子药物,必须增加鞘磷脂-胆固醇脂质体的温度以使跨膜pH梯度关于长春新碱起作用。脂质体双层,是联锁鞘磷脂和胆固醇分子的取向,需要特殊的瞬态热模式来产生向热性紊乱过渡态(thermotropic disorder transition states)。这些过渡态显著减轻膜脂质之间的弱分子间结合,在联锁脂质中产生间隙,并使脂质体生物层变得暂时可渗透。封装过程利用在冷却回到环境温度时发生的鞘磷脂-胆固醇脂质的自发性重新自组装,恢复了膜完整性。

[0006] 这种药物封装加热曲线必须与长春新碱对于热暴露的化学不稳定性平衡(Vendrig等, *Internatl. J. of Pharmaceutics* 50:189-196, 1989; Sethi等, *Cancer Res.* 45:5386-5389, 1985)。长春新碱是热不稳定的,并且容易在升高的温度下降解成N-脱甲酰基长春新碱。长春新碱的这种甲酰胺水解是公知的降解途径,并且影响硫酸长春新碱注射液(VLSI)的稳定保质期。例如,VLSI溶液由于这种热不稳定性不能被热灭菌,必须在冷藏温度下储存和运送以实现延长的稳定性。

[0007] 因此,当前硫酸长春新碱脂质体注射液(VSLI)根据FDA批准的标签(www.accessdata.fda.gov; 参考ID: 3172211, 2012)上提供的指导在药房由单独的组分制备。这些指导包括加热程序——需要使用水浴以实现长春新碱在鞘磷脂-胆固醇脂质体中

的有效封装和保持长春新碱的化学纯度。水的良好传热性质允许大于95%的长春新碱封装,而无可观的药物化学降解。

[0008] 由于VSLI是可注射药物,组分的生产和药房制备被严格控制以保持无菌。因此,VSLI制备过程中的开放水浴的使用需要另外的物力、规划和设备(例如,浮动环),包括保持无菌环境的无菌罩或“洁净”间。在一些药房中,VSLI的配成由于保持无菌环境的限制而无法完成。

[0009] 因此,仍需要可有效且可再现地进行而不需当前所需的另外的物力和设备的制备VSLI的改进方法。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明至少部分基于避免在封装过程中使用加热水浴的需求的制备VSLI的方法的建立。因此,本发明提供有效的、可再现的制备VSLI的方法,其可广泛应用,并具有预料不到的简便性和减少的污染危险。

[0012] 一方面,本发明描述了制备包括脂质体封装的无显著降解产物的长春新碱的药学上可接受的液体组合物的方法,该方法包括步骤:(a)在单一瓶中配成(i)第一溶液,包括硫酸长春新碱,浓度为约1mg/ml至约5mg/ml,其中第一溶液的pH为约3.5至约5.5;和(ii)第二溶液,包括低pH的鞘磷脂/胆固醇脂质体;(b)升高单一瓶中的配成溶液的pH至约7.0至7.5的pH;(c)在平衡在约75°C的干热区块中加热包括配成溶液的单一瓶至少约13至约18分钟,其中所述加热区块包括一个或多个孔——其大于单一瓶的平均长度或直径约1-5%,以产生包括配成的脂质体封装式长春新碱的溶液;(d)平衡配成的溶液至室温;(e)用适于静脉内给予的药物稀释剂稀释一定体积的、包括对于患者约1.5至约2.4mg/m²剂量的脂质体封装式长春新碱的配成溶液,以产生药学上可接受的液体组合物;和(f)给予药学上可接受的液体组合物至患者,其中配成的包括脂质体封装式长春新碱的溶液包括(i)小于约2.5%的游离长春新碱;和(ii)小于约1.5%的N-脱乙酰基长春新碱。

[0013] 在一些实施方式中,包括硫酸长春新碱的第一溶液的pH为约4.5至约4.7。在一个实施方式中,第一溶液进一步包括约100-200mg/ml浓度的甘露醇。

[0014] 在一些实施方式中,包括脂质体的第二溶液的pH为约4.0。在一个实施方式中,第二溶液进一步包括柠檬酸盐缓冲液。

[0015] 在一些实施方式中,通过添加第三溶液升高配成溶液的pH,该第三溶液包括pH约9.0的缓冲液。在一个实施方式中,第三溶液包括磷酸钠缓冲液。

[0016] 在一些实施方式中,配成溶液包括约0.1/1.0至约0.2/2.0的硫酸长春新碱与脂质的浓度比。

[0017] 在一些实施方式中,配成溶液中的硫酸长春新碱的浓度为约0.1mg/mL至约0.5mg/mL。在一些实施方式中,配成溶液中的硫酸长春新碱的浓度为约0.15mg/mL至约0.2mg/mL。在一个实施方式中,配成溶液中的硫酸长春新碱的浓度为约0.16mg/mL。

[0018] 在一个实施方式中,第一溶液包括硫酸长春新碱USP(5mg/5mL)——等同于4.5mg/5mL长春新碱游离碱、和500mg/5mL甘露醇,第二溶液包括鞘磷脂/胆固醇脂质体——由73.5mg/mL鞘磷脂、29.5mg/mL胆固醇、33.6mg/mL柠檬酸、35.4mg/mL柠檬酸钠组成,和第三溶液包括355mg/25mL磷酸氢二钠和225mg/25mL氯化钠。

[0019] 在一些实施方式中,脂质体中鞘磷脂与胆固醇的比在约75/25mol%/mol%鞘磷

脂/胆固醇至30/50mol%/mol%鞘磷脂/胆固醇之间。在一些实施方式中,脂质体包括约70/30mol%/mol%鞘磷脂/胆固醇至40/45mol%/mol%鞘磷脂/胆固醇。在一个实施方式中,脂质体包括大约55/45mol%/mol%鞘磷脂/胆固醇。在另一实施方式中,脂质体包括约60/40mol%/mol%鞘磷脂/胆固醇。

[0020] 在一些实施方式中,脂质体的尺寸范围为约0.05-0.5微米。在一些实施方式中,脂质体的平均直径为约50-200nm。在一个实施方式中,脂质体的平均直径为约90-125nm。

[0021] 在一些实施方式中,配成溶液的体积在约20-50mL之间。在一些实施方式中,配成溶液的体积在30-35mL之间。

[0022] 在一些实施方式中,在插入包含配成溶液的小瓶前,使加热区块平衡至 $75 \pm 2^\circ\text{C}$ 约15分钟。在一些实施方式中,将配成溶液在平衡在 $75 \pm 2^\circ\text{C}$ 的dri-block的口径孔内加热约13-15分钟。在一个实施方式中,将配成溶液在平衡在 $75 \pm 2^\circ\text{C}$ 的dri-block的口径孔内加热14分钟 \pm 30秒。

[0023] 在一些实施方式中,加热区块中的孔比包含配成溶液的单一瓶的平均长度或直径大小于(不到, less than)约3%。在一些实施方式中,包含配成溶液的单一瓶的直径在约35.8至约37.3mm之间,并且加热区块中的口径孔呈圆柱形,其直径为37.2至37.8mm之间的直径。

[0024] 在一些实施方式中,配成的溶液平衡至室温至少约30分钟。

[0025] 在一些实施方式中,将一定体积的、包括对于患者约1.5至约2.4mg/m²剂量的脂质体封装式长春新碱的配成溶液用适于静脉内给予的标准药物稀释剂稀释,以产生药学上可接受的液体组合物。在一些实施方式中,将患者计算剂量的体积从灌注容器移除,并用计算体积的配成的VSLI溶液代替。

[0026] 在一些实施方式中,将包括脂质体封装式长春新碱的药学上可接受的液体组合物在配成后不多于24小时之内给予患者。

[0027] 根据本发明的方法生成的VSLI一般给予患有癌症的患者。在一些实施方式中,癌症是淋巴瘤、白血病、骨髓瘤、脑癌或神经母细胞瘤。

[0028] 在一些实施方式中,包括脂质体封装式长春新碱的药学上可接受的液体组合物通过经约30至60分钟的时间静脉内灌注来给予。在一些实施方式中,包括脂质体封装式长春新碱的药学上可接受的液体组合物通过每7-28日一次静脉内灌注来给予。在一个实施方式中,包括脂质体封装式长春新碱的药学上可接受的液体组合物通过每7日一次静脉内灌注来给予。

[0029] 附图简述

[0030] 图1是显示配成的包含硫酸长春新碱和鞘磷脂/胆固醇脂质体的溶液的、利用干燥区块和水浴的内部加热曲线的图。

[0031] 发明详述

[0032] 本发明克服了与当前采用的制备VLSI的方法过程中的水浴使用相关的缺陷。惊奇地发现,加热区块联合适用于配成VSLI的容器而设计的定制设计插入物的应用提供了实现均匀封装长春新碱而无显著降解所需的热曲线。

[0033] 另外,本文描述的制备VSLI的方法证明参数释放的提高能力显著。由于VSLI的稳定性保证了“适时”制备,配成过程一定是高效的和药剂师可再现的。药剂师需要知道(即,

参数方面)封装已经通过热诱导过程实现,因为其提供“基于配成过程中收集的信息的复查和参数释放相关具体GMP要求的顺从性确认产物具有预期质量的释放系统”(Annex 17EU指南)。

[0034] 本发明的加热区块程序提供了便于和适于实现以大于95%的封装效率配成VSLI的工艺。由于其涉及较少的步骤,操作失误的可能性减少。该工艺总体上更直接,用时更少,耗用较少物力,并且便于常规制药操作。另外,制备VSLI的个体无需处理水浴中生长的微生物的潜在微生物污染或加热水浴的水蒸气。

[0035] 定义

[0036] 除非另外特别注明,本文使用的所有技术和科学术语均具有治疗和药物科学领域技术人员普遍理解的标准定义。

[0037] 单数形式“a(一)”、“an(一)”和“the(所述)”包括复数参考,除非上下文另外明确指示。

[0038] 术语“包括”和“包含”按包括式、开放式意义使用,表示可包括另外的成员。

[0039] 术语“约”,具体地引出给定数量或数目,意为覆盖加减5%的偏差。

[0040] “无菌”组合物或容器,如本文使用,是利用USP无菌测试确定不含活的微生物。(参见,“The United States Pharmacopeial Convention:2008)。

[0041] “脂质体”、“囊”和“脂质体囊”将被理解为表示具有封装水性内部的含脂质膜的结构。除非另外指明,该结构可具有一层或多层脂质膜,虽然一般脂质体仅具有一层膜。这种单层脂质体在本文中被称为“单层的”。多层脂质体在本文中被称为“多层的”。

[0042] “标准”治疗剂或“游离”治疗剂指代不是脂质体封装的治疗剂。通常,药物被认为是“标准的”或“游离的”,除非另外指定。但是,游离形式的标准长春花生物碱仍可与其他试剂如其他化疗化合物、药物载体、或复合剂组合存在,即,如本文所用,该术语仅具体地排除长春花生物碱的脂质制剂。

[0043] 短语“适时”指代在给予患者前不久(例如,24小时或更少之内)组合药物产物(例如,VSLI)的单独组分,以保持药物产物的质量(例如,最小化降解)。

[0044] “全身递送”,如本文所用,指代导致化合物在生物体内广泛生物分布的递送。全身递送意为有用量,优选地治疗量的化合物暴露于身体的大部分。为获得广泛生物分布,通常需要使得化合物在到达疾病位点前不被快速降解或清除(如通过先经过器官(肝,肺,等)或通过快速非特定细胞结合)的引入途径。优选通过静脉内递送实现脂质体封装式长春花生物碱的全身递送。

[0045] 短语“治疗有效量”指代有效治疗哺乳动物的疾病或紊乱(例如,癌症),例如,导致疾病稳定、癌状态部分缓解或完全缓解的药物(例如,VSLI)量。

[0046] “疾病稳定”,如本文所用,指代这样的状态:其中药物(例如,VSLI)的给予导致,通过标准临床、放射学和/或生物化学手段测定,肿瘤或癌症的生长或流行停止,虽然癌的尺寸或流行性没有消退或减少。

[0047] “部分响应”或“部分缓解”指代通过标准临床、放射学和/或生物化学手段测量的响应治疗的癌状态改善。一般,“部分响应”意为肿瘤尺寸或癌症指示血液标记物的水平自基线水平响应治疗减少(例如,20%、30%、40%或50%)。例如,基于国际工作组标准(国际工作组(International Working Group,IWS)标准;BD Cheson等,J Clin Oncol 15:4642-

4649) 评估血癌治疗的响应。

[0048] “完全响应”或“完全缓解”意为测量的癌状态，例如，肿瘤尺寸和/或癌症标记物水平，在治疗后检测不到。

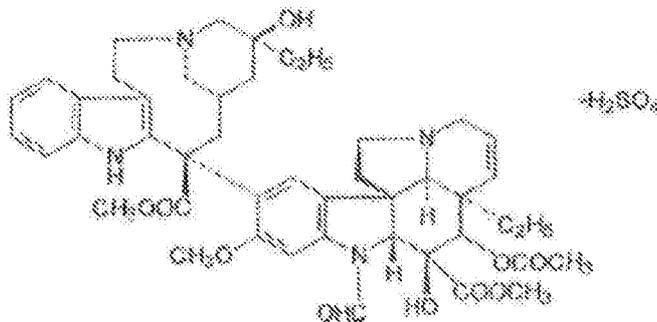
[0049] “神经毒性”包括治疗前和治疗期间的神经病的症状，如感觉减退、感觉过敏、感觉异常、反射减退、反射消失、神经痛、颌疼痛、振动感减少、颅神经病、肠梗阻、灼热感、关节痛、肌痛、肌肉痉挛、虚弱和/或直立性低血压。直立性低血压可能发生。神经毒性基于国家癌症研究所 (National Cancer Institute NCI) 不良事件常见术语标准 (Common Terminology Criteria for Adverse Events, CTCAE) 4.03版 (<http://ctep.cancer.gov/reporting/etc.html>) 被评估为1级至3级。

[0050] 硫酸长春新碱

[0051] 硫酸长春新碱是从长春花植物 (*Catharanthus roseus*) 原始分离的长春花生物碱家族成员。硫酸长春新碱具有细胞周期特异性抗癌活性。长春花生物碱结合于微管蛋白，改变微管蛋白聚合，导致中期停顿、细胞有丝分裂抑制和细胞死亡。作为细胞周期特异性试剂，其治疗响应被脂质体封装促进，脂质体封装保持了延长的药物水平。细胞至长春新碱 (以及其他细胞周期特异性药物) 的延长暴露已显示增强药物的体外细胞毒性 (Bfurriss等, JNCI 84:1816-1826, 1992; Georgiadis等, Clin Cancer Res 3:449-454, 1997; Jackson和Bender, Cancer Res 39:4346-4349, 1979)。

[0052] 硫酸长春新碱通常分离成1:1硫酸盐。其是可溶于水的吸湿性白色至淡黄色晶体粉末。其分子量为923.04 (盐形式) /824.98 (碱形式)，并且分子式为 $C_{46}H_{56}N_4O_{10} \cdot H_2SO_4$ 。硫酸长春新碱的化学名称为22-氧代长春碱 (vincal leukoblastine)，并且其具有下列化学结构：

[0053]



[0054] 硫酸长春新碱规定为硫酸长春新碱注射USP (例如，为1mg/mL溶液)，也被称为 leurocristine sulfate、Kyocristine、vincosid、vincrex、Oncovin、Vincasar PFS®，可购自很多来源中的任一个。

[0055] 脂质体

[0056] 本发明的脂质体载体组分由鞘磷脂和胆固醇脂质体注射液 (SCLI) 组成。脂质体中存在的鞘磷脂与胆固醇的比可不同，但通常在75/25mol%/mol% 鞘磷脂/胆固醇至30/50mol%/mol% 鞘磷脂/胆固醇的范围内。在一个实施方式中，脂质体组合物包括约70/30mol%/mol% 鞘磷脂/胆固醇至40/45mol%/mol% 鞘磷脂/胆固醇。在另一实施方式中，脂质体组合物包括大约55/45mol%/mol% 鞘磷脂/胆固醇。在再一实施方式中，脂质体组合物包括约60/40mol%/mol% 鞘磷脂/胆固醇。

[0057] 在某些实施方式中，制剂中可存在另外的脂质，例如，以防止脂质氧化或使配体附接到脂质体表面上。通常，包含其他脂质会导致鞘磷脂/胆固醇比减少。

[0058] 用于本发明的鞘磷脂/胆固醇脂质体可以是多层的或单层的。适于制备脂质体的方法包括但不限于,声处理、挤出、高压/同质化、微流化、洗涤剂透析、钙诱导的小脂质体囊融合、薄膜蒸发和醚灌注法,其全部在本领域公知。例如,多种方法可用于制备脂质体,如下列所述:例如,Szoka等,Ann.Rev.Biophys.Bioeng.,9:467(1980)、美国专利号4,186,183、4,217,344、4,235,871、4,261,975、4,485,054、4,501,728、4,774,085、4,837,028、4,946,787、5,543,152、6,723,338、WO 91/17424、Deamer and Bangham,Biochim.Biophys.Acta,443:629634(1976);Fraley等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,76:33483352(1979);Hope等,Biochim.Biophys.Acta,812:5565(1985);Mayer等,Biochim.Biophys.Acta,858:161168(1986);Williams等,Proc.Natl.Acad.Sci.,85:242246(1988),the text Liposomes,Marc J.Ostro,ed.,Marcel Dekker,Inc.,New York,1983,第1章,和Hope等,Chem.Phys.Lip.,40:89(1986),其全部被引入本文作为参考。

[0059] 在脂质体制备后,脂质体可利用本领域公知的标准方法(例如,参见US6,723,338)被设定尺寸以实现期望的颗粒尺寸范围。一般地,可用于本文描述的VSLI制备的脂质体的尺寸范围为约0.05-0.5微米(50-500nm)、0.2-0.4微米(200-400nm)、约0.1-0.4微米(100-400nm)、约0.05-0.2(50-200nm)或约0.5(500nm)至约0.15微米(150nm)。在某些实施方式中,脂质体的颗粒尺寸的平均颗粒直径为约50nm、约60nm、约70nm、约80nm、约90nm、约100nm、约105nm、约110nm、约115nm、约120nm、约130nm、约140nm、约150nm、约160nm、170nm、约180nm、约190nm、或约200nm。在一个实施方式中,平均颗粒尺寸在90和125nm之间,而优选平均颗粒尺寸为约107.5nm,其中25%的颗粒尺寸分布不小于70nm并且其中90%的分布的颗粒尺寸不大于170nm。

[0060] 鞘磷脂/胆固醇脂质体充当用于本文描述的VSLI制备物的脂质体组分,并且被制成脂质体内部具有低pH。在配成过程中,将具有低pH的VSI和具有低pH的SPLI在较高pH的缓冲液中稀释,从而外部VSLI溶液的最终pH为大约生理中性。结果是产生跨脂质膜的pH梯度,其中脂质体内核的pH低于外部周围溶液。这种梯度按照已知的方法(例如,US 6,723,338)来实现。例如,梯度可通过如下实现:在存在具有约2和约6之间的pH、约3和约5之间的pH的缓冲液的情况下配制脂质体,和随后将脂质体转移至较高pH,例如,约7.0至约7.5。在一个实施方式中,脂质体的内部pH为约4.0。可使用任何数量的稀释缓冲液,如磷酸钠。在一个实施方式中,缓冲液的pH为8-10,优选9.0,使得最终稀释的外部脂质体溶液在与VSI和SPLI混合时具有生理中性的pH。

[0061] 在根据本文描述的方法用于制备VSLI前,可将SPLI脂质体长期储存在冷藏条件下,然后进行药物封装和VSLI配成,以给予患者。可选地,可将脂质体脱水,储存,然后重新水化,然后再按照公知的方法使用(参见,例如,美国专利5,077,056或5,736,155)。

[0062] VSLI制备

[0063] 利用严格的无菌技术制备VSLI,例如,在生物安全柜中或通过已建立的制备无菌可注射制剂和危险药物的制药安全程序。必须严格遵守处理和处置抗癌药物的程序(NIOSH Alert:Preventing occupational exposure to antineoplastic and other hazardous drugs in healthcare settings.2004.U.S.Department of Health and Human Services,Public Health Service,Centers for Disease Control and Prevention,National Institute for Occupational Safety and Health,DHHS(NIOSH)公开号2004-

16; OSHA Technical Manual, TED 1-0.15A, 第VI节: 第2章. Controlling Occupational Exposure to Hazardous Drugs. OSHA, 1999; American Society of Health-System Pharmacists. ASHP guidelines on handling hazardous drugs. Am J Health-Syst Pharm. (2006) 63:1172-1193; Polovich M, White JM, Kelleher LO (eds.) 2005. Chemotherapy and biotherapy guidelines and recommendations for practice (第二版) Pittsburgh, PA: Oncology Nursing Society)。

[0064] 制备配成的VSLI的过程包括下列主要步骤:

[0065] • 通过如下制备配成溶液: 在无菌容器中混合硫酸长春新碱第一溶液, 该硫酸长春新碱在缓冲液中包含约1mg/mL、约2mg/mL或约5mg/mL之间, 该缓冲液包含约100至约200mg/mL甘露醇(也可使用硫酸长春新碱在其中保持稳定的其他药学上可接受的赋形剂), pH为约3.5至约5.5、或约4.5至约4.7, 与脂质体第二溶液, 该脂质体在低pH(例如, 约4.0)下悬浮于缓冲液中, 以适当浓度比, 例如, 0.1/1.0至0.2/1.0(硫酸长春新碱重量/脂质重量)。

[0066] • 然后将包含硫酸长春新碱和脂质体的配成溶液的pH升高至约7.0至约7.5, 以产生pH梯度。这可通过如下实现: 例如, 添加较高pH(例如, 约9.0)的缓冲液(例如, 磷酸钠)。

[0067] • 然后将配成溶液在平衡至约75°C的干热区块中加热至少约13至约18分钟, 该干热区块包含比包含配成溶液的容器的平均长度或直径大小于约5%的口径孔, 以产生配成的产物VSLI。

[0068] • 然后将加热后的、包括配成产物的配成溶液平衡至少约30分钟、至少约45分钟或至少约60分钟至室温(15°C至30°C)。

[0069] • 然后将对应于给予患者的配成的VSLI的剂量的一定体积的配成溶液与适于静脉内给予的溶液混合至最终体积约100mL。

[0070] 在一些实施方式中, 在三个单独的容器中提供硫酸长春新碱溶液、脂质体溶液和高pH缓冲溶液。在某些实施方式中, 将这三种溶液组合到一个无菌容器, 该无菌容器具有包容溶液组合体积的容量, 例如, 约20-50mL、约25-40mL、或约30-35mL。

[0071] 在一个实施方式中, 以试剂盒提供单独的组分, 该试剂盒包括3个或更多个小瓶。其中至少一个小瓶包含长春新碱溶液, 包含处于缓冲液中的例如1mg/mL、2mg/mL、或5mg/mL硫酸长春新碱, 该缓冲液包含例如, 100或200mg/mL甘露醇(也可使用药学上可接受并且其中长春新碱长期保持稳定的其他赋形剂); 并且被调节至pH 3.5至5.5、或优选pH 4.5至pH 4.7。其中一个小瓶包含包括鞘磷脂和胆固醇脂质体的溶液, 该鞘磷脂和胆固醇脂质体悬浮于例如pH 4.0的300mM柠檬酸盐缓冲液。另外的一个或多个小瓶包含碱性磷酸盐缓冲液(例如, pH 9.0), 如磷酸氢二钠, 14.2mg/ml (20ml/瓶)。

[0072] 在一个实施方式中, 用于配成VSLI的成分被分别提供在三个小瓶中, 该小瓶包含(i) 硫酸长春新碱USP (5mg/5mL), 等同于4.5mg/5mL长春新碱游离碱, 和500mg/5mL甘露醇; (ii) 鞘磷脂/胆固醇脂质体注射液(SPLI), 由73.5mg/mL鞘磷脂、29.5mg/mL胆固醇、33.6mg/mL柠檬酸、35.4mg/mL柠檬酸钠和不多于0.1%乙醇组成; 和(iii) 磷酸钠注射液(SPI), 包含355mg/25mL磷酸氢二钠和225mg/25mL氯化钠, 其全部用水制备, 用于注射。

[0073] 用于本发明方法的容器是无菌的, 并且由任何药学上可接受的物质(例如, 玻璃或塑料)组成。存在多种不同的小瓶类型, 并且其被设定尺寸, 由很多不同的生产商(例如, Wheaton Products, Thomas Scientific)销售。在一个实施方式中, 在无菌小瓶中配成组

分,其平均直径为约36.5mm,和平均范围为约35.8至约37.3mm。

[0074] 适当的干燥区块加热器,其提供安全、干燥的恒温来源,可购自很多来源(例如,Bibby Scientific Ltd、V&P Scientific, Inc.、Fisher Scientific Inc.、VWR Scientific, Thermolyne Inc.)。具有一个或多个适于接收配成溶液的容器的校准孔导热插入物可以是金属(例如,阳极化铝、铜)或其他适当的导热材料。包含适当尺寸的开口的孔的插入物可容易获得(例如,V&P Scientific, Inc.)、或利用标准方法制成。在某些实施方式中,加热区块包含比包含配成溶液的容器的平均长度或直径大约1-5%之间、或约4.5%、4.2%、4.0%、3.8%、3.5%、3.3%、3.0%、2.8%、2.5%、2.2%、2.0%、1.8%、1.5%、1.2%或1.0%的开口。在一些实施方式中,加热区块包含圆柱形开口。在一个实施方式中,开口直径在37.2至37.8mm之间、或在约37.4至37.6mm之间。

[0075] 在一些实施方式中,将配成溶液在约75°C下加热约13分钟、约14分钟、约15分钟、约16分钟、约17分钟。在一个实施方式中,将配成溶液在平衡在75°C的加热区块处加热约14分钟。

[0076] 可将配成的VSLI与药学上可接受的适于静脉内给予患者的稀释剂(例如,葡萄糖、氯化钠)混合,该稀释剂可被提供在例如预填充的无菌容器(玻璃瓶、塑料瓶或塑料袋)中。在一些实施方式中,将患者计算剂量的体积从灌注袋移除,并用计算体积的配成的VSLI溶液代替进入灌注袋,例如,其中灌注容器的最终体积为100mL。在一个实施方式中,药学上可接受的稀释剂为5%葡萄糖注射液或0.9%氯化钠注射液。

[0077] VSLI

[0078] 根据本文描述的方法生成的VSLI呈现为白色至米白色、半透明悬浮液,基本上不含可见异物和聚集物。一般,大于约95%、约96%、约97%、约98%或更多的硫酸长春新碱被封装在脂质体中。

[0079] 根据本文描述的方法生成的VSLI包含的杂质总量小于约4.0%、3.5%、3.4%、3.2%、3.1%或3.0%。在一些实施方式中,VSLI包含小于约2.0%、1.8%、1.7%、1.6%、1.5%、1.4%或1.3%的N-脱乙酰基长春新碱。

[0080] 根据本文描述的方法生成的VSLI的平均体外释放速率(IVR)或体内释放速率为在72小时内至少约75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%或约85%。

[0081] 确定长春新碱封装水平、杂质水平和长春新碱自脂质体的释放速率的试验在本领域已知。参见,例如,美国专利5543152和5837282; Zhigalstev等, J. Controlled Release 104:103-111, 2005); Pusalau等, Am. J. Health-Syst. Pharm. 62:1606-1612, 2005)。

[0082] 总体而言,根据本文描述的方法生成的VSLI包含约0.1mg/mL至约0.5mg/mL的硫酸长春新碱。在某些实施方式中,硫酸长春新碱以约0.15mg/mL至约0.2mg/mL存在。在一个实施方式中,硫酸长春新碱以约0.16mg/mL存在。在一个实施方式中,VSLI包含5mg硫酸长春新碱、500mg甘露醇、73.5mg鞘磷脂、29.5mg胆固醇、36mg柠檬酸钠、38mg柠檬酸、355mg磷酸钠、和225mg氯化钠。

[0083] 剂量和给药

[0084] 根据本文描述的方法制备的VSLI可用于治疗任何类型的癌症,包括原发性、复发性和顽固性癌症。用VLSI治疗的患者或对象可以是多种动物,包括人、非人灵长类、鸟类、马类、犬类、猫类、牛类、猪、兔类、啮齿类及类似物。在某些实施方式中,VSLI用于治疗血液和

淋巴系统的癌症,包括但不限于,淋巴瘤、白血病和骨髓瘤。在某些实施方式中,VSLI用于治疗肿瘤,包括但不限于,神经母细胞瘤和脑癌。

[0085] VSLI可作为单剂使用,或组合其他化疗剂使用,如环磷酰胺、阿霉素和/或泼尼松。在一个实施方式中,VSLI与环磷酰胺、阿霉素和泼尼松一起作为脂质体CHOP制剂(“lipo-CHOP”)给予。在另一实施方式中,VSLI与至少一种另外的抗肿瘤剂被共同给予。在另一实施方式中,另外的抗肿瘤剂是抗肿瘤单克隆抗体,如OncolyTM、RituxanTM、或BexxarTM。在另一实施方式中,另外的抗肿瘤剂是反义药物或抗肿瘤疫苗。在另一实施方式中,VSLI与神经毒性的预防性或治疗性治疗,如加巴喷丁(gabapentin) (NeurontinTM),被共同给予。

[0086] 一般,在给予患者约24小时之内制备VSLI,并储存在室温下(15°C至30°C)或冷藏(2-8°C)。

[0087] 将VSLI通过静脉内递送全身地给予患者。在一个实施方式中,经例如约30分钟、约45分钟、约60分钟、约90分钟或更长的时间通过静脉内灌注给予VSLI。

[0088] 一般周期性给予VSLI,例如,每7-28日一次。在某些实施方式中,VSLI每3、5、7、10、14、21或28日给予一次。在一个实施方式中,每14日通过静脉内灌注给予VSLI。在另一实施方式中,每7日通过静脉内灌注给予VSLI。如本文所用,每次给予VSLI都被认为是治疗的一个“疗程”。

[0089] 每剂量给予的VSLI量取决于多个因素,如患者医疗史、其他治疗手段的应用、和疾病性质(例如,原发性(first line)、复发性或顽固性癌症)。一般,根据本文描述的方法制备的VSLI以约1.4至约2.4mg/m²的剂量给予。在某些实施方式中,VSLI以约1.5mg/m²、约1.8mg/m²、约2.0mg/m²、2.1mg/m²、2.2mg/m²、2.3mg/m²或2.4mg/m²(即,mg长春新碱/m²身体表面积)的剂量给予。在一个实施方式中,VSLI每7日一次通过静脉内灌注经约60分钟以2.25mg/m²的剂量给予。

[0090] 在其他实施方式中,VSLI的剂量可在治疗过程中被暂时中断和/或减少。例如,在一个实施方式中,给予表现为3级外周神经病或持续性2级外周神经病的患者的VSLI剂量可中断上至约7日,然后在恢复至1级或2级后减少至约2mg/m²的剂量。在另一实施方式中,给予甚至在接受减少剂量后还表现为持续性2级外周神经病的患者的剂量可中断上至7日,然后减少至1.825mg/m²的剂量、或1.5mg/m²的剂量。

[0091] VSLI的剂量通过根据公知的方法计算对象的身体表面积(BSA)来确定。例如,根据Mosteller公式,其中BSA等于以kg表示的对象重量乘以以cm表示的身高的乘积除以3600的平方根。人的“标准”BSA通常取为1.7m²,但也取决于其他因素,包括个体年龄和性别。例如:

[0092] • 成年男性的平均BSA:1.9m²

[0093] • 成年女性的平均BSA:1.6m²

[0094] • 儿童(9岁)的平均BSA:1.07m²

[0095] • 儿童(10岁)的平均BSA:1.14m²

[0096] • 儿童(12-13岁)的平均BSA:1.33m²

[0097] (Mosteller RD.Simplified calculation of body-surface area.N Engl J Med 1987;317:1098)

实施例

[0098] 实施例1

[0099] 考察在干燥区块法加热的过程中的VSLI小瓶溶液的温度曲线,并与按照Marqibo®的获批标签指导(FDA/cder参考ID:3172211,2012年8月)水浴加热时观察到的温度曲线进行比较。

[0100] 设备和材料

[0101] • Marqibo® 试剂盒,配成的VSLI,lot NT 268035 (部分使用小瓶的内含物组合到一个小瓶中)

[0102] • Techne Dri-block® DB-3加热器,配备有1.480”直径孔和温度计套(Bibby Scientific Limited)。

[0103] • 数字温度计;在0°C-100°C的范围内精确到±1°C

[0104] • Isotemp 202#00947水浴(Fisher Scientific)

[0105] • Fluke 726#914002热电偶温度校准器(Fluke Corporation)

[0106] 程序

[0107] 通过记录置于加热设备(即,干燥区块或水浴)后小瓶内部的溶液温度生成温度曲线测量结果。零时是小瓶置于加热设备的时间点。采用下列程序:

[0108] 1.将组分VSI和SCLI组合到单个SPI小瓶(Swiss Precision Instruments,Inc.)中。将数字热电偶插入小瓶的隔垫,并保持在距小瓶底面大约5mm且定位在液体溶液中央。

[0109] 2.使用干燥区块加热器,其具有包含1.480英寸小瓶容器孔的区块。通过将温度计置于区块的温度计孔中来监测区块温度,该温度计孔的位置接近小瓶容器孔。将区块加热器设定至75°C温度,并允许其升温直到区块温度计读数为75±2°C。使加热区块在75±2°C平衡最少15分钟。然后将小瓶插入75±2°C平衡区块的孔中14分钟±15秒,然后取出。通过置于环境条件中约60分钟使配成的小瓶达到环境温度。利用同一小瓶,程序重复两次。

[0110] 3.以1分钟间隔(或按照说明)记录小瓶内部液体温度和区块温度,并列表于表1。

[0111] 4.作为比较,允许加热水浴直到水温为65±5°C。使水浴平衡最少15分钟。然后将包含配成的VSLI的小瓶插入水浴10分钟±1分钟,然后取出。使配成的小瓶达到环境温度。

[0112] 5.记录小瓶内部液体温度、时间和水温度,并列表于表1。

[0113] 结果和讨论

[0114] 用平衡在75°C±2°C的干燥区块加热配成的VSLI小瓶的液体内含物的温度曲线证明:加热速率均匀且渐进至65°C±5°C。表1和图1列出的结果显示,干燥区块以平均速率3.26°C/分钟加热液体小瓶内含物,与之相比,水浴以平均速率4.21°C/分钟加热小瓶内含物。65°C±5°C的期望温度在干燥区块中在14分钟内实现,与之相比水浴耗费10分钟。关于这两种加热设备,在将小瓶从加热源取出后,存在逐渐冷却。从干燥区块中取出后,温度保持在59-65°C内3-4分钟,而从水浴取出后,保持1-2分钟。关于这两种设备,利用干燥区块,小瓶暴露于50-65°C至少20分钟,而利用水浴,小瓶暴露15分钟。在任一设备中加热后,溶液保持视觉一致:白色至米白色、半透明悬浮液,基本上不含可见异物和聚集物。

[0115] 表1.配成温度曲线*

[0116]

时间	内部温度HB	区块温度	内部温度WB	区块温度2	内部温度WB	水浴
0	20.3	75.3	22.8	75.4	20.9	63.8

1	25.6	74.7	29.9	74.8	35.4	63.8
2	31.6	74.0	36.1	74.0	45.6	63.9
3	37.0	73.5	41.3	73.6	51.7	63.4
4	41.9	73.3	45.5	73.4	56.1	63.7
5	46.2	73.2	49.1	73.4	58.8	63.5
6	49.8	73.2	52.4	73.4	60.3	64.0
7	53.0	73.3	55.2	73.4	61.3	64.4
8	55.6	73.4	57.5	73.5	62.2	64.0
9	57.9	73.6	59.7	73.8	62.7	63.8
10	60.8	73.8	61.4	73.9	63.0	63.8
11	62.1	73.9	62.8	74.1	59.0	NR
12	63.3	74.1	64.4	74.2	56.6	NR
13	64.6	74.1	65.4	74.3	54.8	NR
14	65.8	74.3	66.4	74.4	53.1	NR
15	65.6	NR	66.1	NR	52.0	NR
16	64.1	NR	63.7	NR	51.2	NR
17	62.7	NR	NR	NR	50.3	NR
18	61.2	NR	60.6	NR	49.3	NR
19	59.8	NR	59.3	NR	48.7	NR
20	58.6	NR	58.0	NR	48.0	NR
21	57.4	NR	56.5	NR	NR	NR
22	56.1	NR	55.3	NR	NR	NR
23	55.0	NR	54.2	NR	NR	NR
24	53.9	NR	53.2	NR	NR	NR
25	52.8	NR	NR	NR	44.4	NR
26	51.7	NR	NR	NR	NR	NR
27	50.8	NR	NR	NR	NR	NR
28	49.8	NR	NR	NR	NR	NR
	NR	NR	NR	NR	NR	NR
33	45.6	NR	NR	NR	NR	NR
38	42.3	NR	NR	NR	NR	NR
43	39.4	NR	NR	NR	NR	NR
48	37.3	NR	NR	NR	NR	NR
53	35.3	NR	NR	NR	NR	NR
58	33.9	NR	NR	NR	NR	NR
60	33.3	NR	NR	NR	NR	NR

[0117] *内部温度HB= :在干燥区域中加热的小瓶内含物的内部温度

[0118] 内部温度WB= :在水浴中加热的小瓶内含物的内部温度

[0119] NR=未记录

[0120] 结论

[0121] 本研究证明,干燥区块验证了使VSLI小瓶内部液体温度在14分钟内实现 $65^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 的适当温度加热曲线,并提供了20分钟的 $50\text{--}65^{\circ}\text{C}$ 范围内的加热暴露。与之相比,在水浴中加热小瓶在10分钟内实现了 $65^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 的内部液体温度和15分钟的 $50\text{--}65^{\circ}\text{C}$ 范围内的总体加热暴露。两种方法的加热速率均是渐进的和均匀的。设定在 $75^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 的干燥区块产生 3.26°C 每分钟的加热速率,而设定在 $65^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 的水浴产生 4.21°C 每分钟的速率。利用水浴加热平稳,而干燥区块中的加热速率以稳定速率持续至 $75^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 设定点。在将小瓶从任一加热设备取出后,冷却至环境温度耗费约60分钟。这些加热曲线表明,长春新碱的接近的定量封装是个热力学过程,其取决于暴露于促进膜封装而非实现那些条件的动力学的温度的总体暴露。

[0122] 总之,干燥区块和水浴可提供允许将长春新碱封装到鞘磷脂胆固醇脂质体中以有效制备VSLI的热力学特征。

[0123] 实施例2

[0124] 考察利用干热区块配成的VSLI的长春新碱降解物产物水平。

[0125] 设备和材料:

[0126] • Techne DB-3Dri-Block[®], 配备有1.480”直径孔和温度计套。

[0127] • 直径不大于7mm并且在 $0\text{--}100^{\circ}\text{C}$ 范围内精确至 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 的温度计。

[0128] • 校准秒表或计时器

[0129] • 测微器(0-2”)或等同设备。

[0130] • 30Marqibo[®] Kits, Lot#TTX0611 (Talon Therapeutics, Inc.)

[0131] 程序

[0132] 来自30Marqibo[®]试剂盒(具有最大和最小外径的SPI小瓶)的小瓶用于本研究。测量SPI小瓶的直径并记录至最接近0.001”。结果显示在表2中。

[0133] 表2. 小瓶鉴定和SPI小瓶直径

[0134]

小瓶鉴定	SPI小瓶直径($\pm 0.0001\text{in.}$)	研究分配
1	1.4350	
2	1.4360	
3	1.4340	
4	1.4350	
5	1.4490	
6	1.4455	
7	1.4330	
8	1.4370	
9	1.4350	
10	1.4315	
11	1.4405	
12	1.4545	试剂盒2
13	1.4335	

14	1.4370	
15	1.4430	
16	1.4380	
17	1.4345	
18	1.4305	试剂盒1
19	1.4330	
20	1.4455	
21	1.4360	
22	1.4325	
23	1.4425	
24	1.4465	
25	1.4475	
26	1.4325	
27	1.4420	
28	1.4440	
29	1.4315	
30	1.4330	

[0135] 选择两个小瓶用于配成。直径最接近或等于1.41英寸的小瓶(“小瓶1”),允许的SPI小瓶直径的下端的测量直径为1.4305英寸。直径最接近或等于1.47英寸的小瓶(“小瓶2”),允许的SPI小瓶直径的上端经测量直径为1.4545英寸。

[0136] 如上所述配成选择的试剂盒,并按照适当的硫酸长春新碱注射液USP方法针对硫酸长春新碱、相关化合物和颗粒尺寸和分布进行测试。

[0137] 利用上述指导配成两个研究试剂盒,除了用具有包含1.480英寸小瓶容器孔的区块的Dri-Block加热器代替水浴之外。通过将温度计置于位于小瓶容器孔邻近的区块温度计孔中来监测区块温度。将区块加热器设定至75°C温度,并使其加热,直到区块温度计读数为75±2°C。然后使加热区块平衡最少15分钟(记录时间)。条件在表3中说明。然后将各小瓶插入75±2°C加热区块14分钟±15秒(记录时间),然后取出,并通过将小瓶置于环境条件约60分钟使其达到环境温度。

[0138] 记录配成期间的的时间和区块温度,如表4所示。分析结果记录在表5、6和7中。

[0139] 表3.干燥区块温度平衡

[0140]

	时间	相继读数之间的时间
设定至75°C的干燥区块	8:35AM	
第一例温度计读数75±2°C	8:46AM	73.0°C
15分钟平衡	9:01AM	75.2°C

[0141] 表4.干燥区块配成参数

[0142]

小瓶ID	SPI小瓶直径	温度 T=0分钟	温度 T=1分钟	温度 T=5分钟	温度 T=14分钟	取出时间
		75±1°C	供参考	供参考	75±1°C	
12	1.4545	75.2°C	74.5°C	73.2°C	74.2°C	9:24AM
18	1.4305	75.2°C	74.6°C	73.2°C	74.3°C	10:02AM

[0143] 表5. 总量&游离长春新碱结果

试剂盒ID	长春新碱总量
试剂盒1	102.10%
试剂盒2	102.14%

[0145] 表6. 相关化合物结果

[0146]

试剂盒ID	N-脱乙酰基长春新碱	任何其他化合物
试剂盒1	1.314	0.572
试剂盒2	1.345	0.574

[0147] 表7. 粒径分布

[0148]

试剂盒ID	平均直径	D ₂₅	D ₉₀
试剂盒1	108nm	90nm	139nm
试剂盒2	107nm	91nm	138nm

[0149] 结果和讨论

[0150] 利用Dri-Block加热器、利用直径为1.4305和1.4545英寸的配成小瓶来实现VSLI的配成。这些代表最接近小瓶直径容许的1.41英寸下限和1.47英寸上限的小瓶。在加热区块中14分钟温育VSLI小瓶的过程中，区块温度由于区块孔直径和小瓶任一直径之间的间隙之间的温度平衡造成的下降不大于1度。这种传热动力学不影响VSLI的制备。暴露于平衡在75°C的Dri-Block热14分钟后，从两个小瓶的所得的配成的VSLI均实现大于97%的长春新碱封装。利用Dri-Block的温育导致封装效率平均为2.175%游离长春新碱。通过Dri-Block加热曲线没有观察到新的或增加的杂质。观察到主要降解物，N-脱乙酰基长春新碱，平均为1.33%，无其他大于0.574%的杂质，并且杂质总量不大于3.10%。颗粒尺寸分布与VSLI规格一致，平均直径为直径107.5nm，平均D₂₅为90.5nm，和平均D₉₀为138.5nm，通过IVR分析，通过Dri-Block加热制备的VSLI通过72小时释放大约84%的长春新碱。

[0151] 总之，利用平衡在75±2°C的干燥区块加热器、以14分钟±15秒温育期配成的VSLI使大于99%的长春新碱封装在鞘磷脂-胆固醇脂质体中，并且此实验过程中无异常记录。数据建立了导致产物有效封装长春新碱并且证明干燥区块加热器在VSLI配成时可代替水浴的干燥区块配成温度曲线。

[0152] 实施例3

[0153] 在本研究中，测量长春新碱降解物产物水平，以提供利用干燥区块程序的配成时间范围。

[0154] 设备和材料

- [0155] • Dri-Block[®], 配备有1.476” (± 0.004) 直径孔和温度计套。
- [0156] • 温度计, 直径不大于7mm, 并且在0-100°C的范围内精确至 $\pm 1^\circ\text{C}$ 。
- [0157] • 校准秒表或计时器
- [0158] • Marqibo[®]试剂盒, Lot#TTX0611 (Talon Therapeutics, Inc.)

[0159] 程序

[0160] 随机选择三种Marqibo[®]试剂盒, 并通过在干燥区块中在75°C下以三个不同时间(分别为13、14和15分钟)加热来配成。利用适当的硫酸长春新碱注射液USP方法测试配成的小瓶的总量和游离硫酸长春新碱、相关化合物、颗粒尺寸和分布。

[0161] 利用上述指导配成本研究试剂盒, 除了用具有包含1.476英寸 (± 0.004 ”)小瓶容器孔的区块的Dri-Block[®]加热器代替水浴之外。通过将温度计置于位于小瓶容器孔邻近的区块温度计孔中来监测区块温度。将区块设定至75°C温度, 并使其加热, 直到区块中的温度计读数为 $75 \pm 2^\circ\text{C}$ 。然后使加热区块平衡最少15分钟。条件记录在表9中。然后将各小瓶插入 $75 \pm 2^\circ\text{C}$ 加热区块分别13分钟 ± 15 秒、14分钟 ± 15 秒、和15分钟 ± 15 秒。然后取出小瓶, 并置于环境温度。使配成后的小瓶在环境温度下冷却至少60分钟, 然后测试。

[0162] 记录配成期间的的时间和区块温度, 如表9和10所示。分析结果记录在表11、12和13中。

[0163] 表9a. 干燥区块温度平衡 (小瓶1)

[0164]

	时间	相继读数之间的时间
设定至75°C的干燥区块	8:20AM	
第一例温度计读数 $75 \pm 2^\circ\text{C}$	8:48AM	NA
15分钟平衡*	9:03AM	15mins.

[0165] *15分钟平衡期结束时的温度: 75.2°C

[0166] 表9b. 干燥区块温度平衡 (小瓶2)

[0167]

	时间	相继读数之间的时间
设定至75°C的干燥区块	9:17AM	
第一例温度计读数 $75 \pm 2^\circ\text{C}$	9:17AM	NA
15分钟平衡*	9:32AM	15mins.

[0168] *15分钟平衡期结束时的温度: 75.2°C

[0169] 表9c. 干燥区块温度平衡 (小瓶3)

[0170]

	时间	相继读数之间的时间
设定至75°C的干燥区块	9:47AM	
第一例温度计读数 $75 \pm 2^\circ\text{C}$	9:47AM	NA
15分钟平衡*	10:02AM	15mins.

[0171] *15分钟平衡期结束时的温度: 75.1°C

[0172] 表10. 干燥区块配成参数

小瓶	SPI小瓶直径	温度 T=0	温度 T=1分钟	温度 T=5分钟	温度 T=13分钟	温度 T=14分钟	温度 T=15分钟
		75±1°C	供参考	供参考	± 15 secs.	± 15 secs.	± 15 secs.
[0173]	1	1.4490	75.2°C	74.6°C	73.2°C	74.2°C	
	2	1.4360	75.2°C	74.5°C	73.2°C		74.1°C
	3	1.4355	75.2°C	74.6°C	73.3°C		74.2°C

[0174] 表11. 总量&游离长春新碱结果

[0175]

试剂盒ID	长春新碱总量
试剂盒1	100.91
试剂盒2	100.59
试剂盒3	100.43

[0176] 表12. 相关化合物结果

[0177]

试剂盒ID	N-脱甲酰基长春新碱	任何其他化合物
试剂盒1	1.498	0.590
试剂盒2	1.506	0.587
试剂盒3	1.464	0.593

[0178] 表13. 颗粒尺寸分布

[0179]

试剂盒ID	平均直径	D ₂₅	D ₉₀
试剂盒1	107nm	91nm	137nm
试剂盒2	106nm	90nm	137nm
试剂盒3	107nm	90nm	138nm

[0180] 结果和讨论

[0181] 各配成的试剂盒分别被置于平衡在75°C的加热区块13、14和15分钟。全部样本时间均产生封装的长春新碱,并且三个小瓶的测试结果之间不显示显著差异。利用Dri-Block的三个小瓶均观察到大于97%的长春新碱封装,导致封装效率最大为2.3%游离长春新碱。关于Dri-Block加热曲线未观察到新的或增加的杂质。观察到主要降解物N-脱甲酰基长春新碱的最大值为1.51%,无其他大于0.59%的杂质,杂质总量不大于3.3%。颗粒尺寸分布与VSLI规格一致,其平均直径为直径107nm,平均D₂₅为90nm,和平均D₉₀为137nm。

[0182] 总之,用平衡在75±2°C的Dri-Block代替水浴、以13至15分钟(±15秒)的温育期配成的VSLI有效封装长春新碱,并且实验进行期间无异常记录。数据建立了导致有效VSLI配成和显示Dri-Block加热器在VSLI配成中可代替水浴的Dri-Block配成温度曲线。

[0183] 应该理解,本文描述的实施例和实施方式仅以示例为目的,基于此各种改动和改变被暗示给本领域技术人员,并且将被包括在本申请的精神和范畴以及所附权利要求的范围内。本文引用的所有出版物、专利和专利申请其全部内容均被并入本文作为参考,用于所有目的。

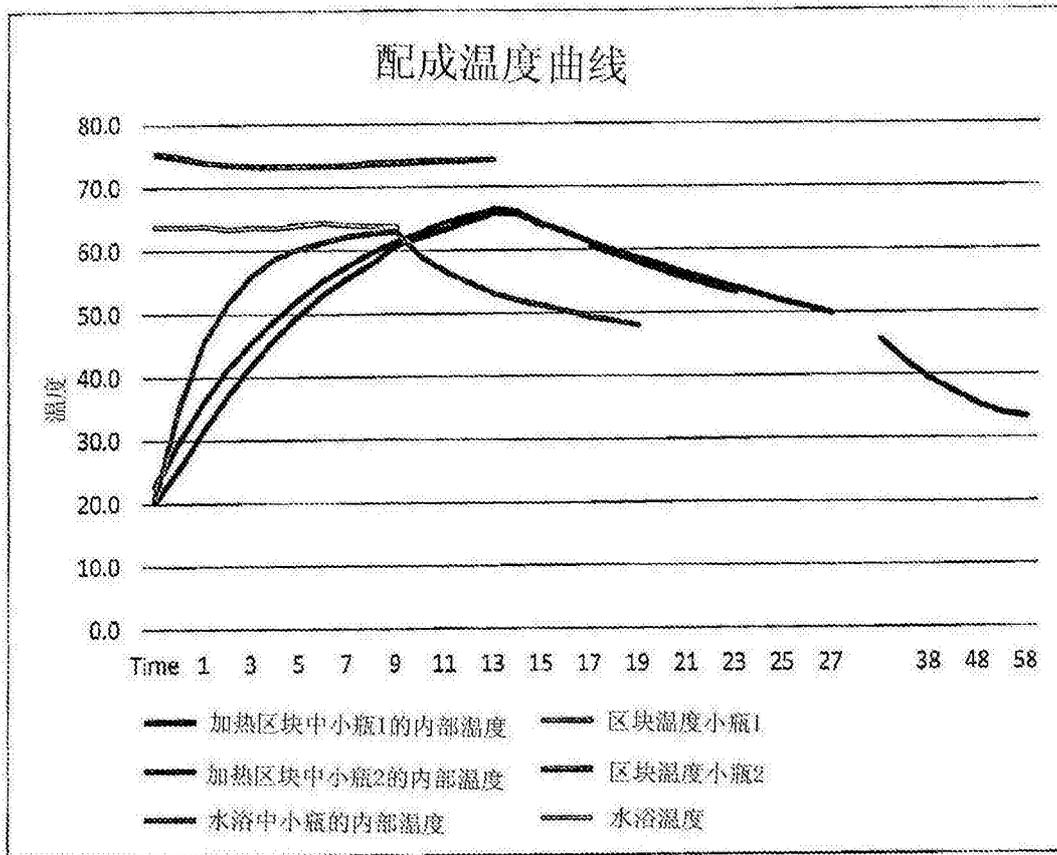


图1. 配成温度曲线