



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102920658 B

(45) 授权公告日 2015.01.21

(21) 申请号 201210430656.8

(22) 申请日 2012.11.02

(73) 专利权人 艾韦特(溧阳)医药科技有限公司
地址 213300 江苏省溧阳市城北工业园区芜
申路 168 号 A 座 3 楼

(72) 发明人 曹亮

(51) Int. Cl.

A61K 9/127(2006.01)

A61K 47/34(2006.01)

A61K 47/42(2006.01)

A61K 38/16(2006.01)

A61P 3/04(2006.01)

A61P 3/10(2006.01)

(56) 对比文件

WO 9816201 A1, 1998.04.23,

WO 9816202 A2, 1998.04.23,

WO 2004082626 A2, 2004.09.30,

US 5264221 A, 1993.11.23,

CN 102266288 A, 2011.12.07,

LEILA NOBS et. al. Current Methods
for Attaching Targeting Ligands to
Liposomes and Nanoparticles. 《JOURNAL OF
PHARMACEUTICAL SCIENCES》. 2004, 第 93 卷 (第
8 期),

徐缓等. 修饰脂质体的可断裂聚乙二醇脂质
衍生物的研究进展. 《药学学报》. 2008, 第 43 卷
(第 1 期),

审查员 耿锬锬

权利要求书1页 说明书6页

(54) 发明名称

与 GLP-1 类似物和聚乙二醇结合的脂质体及
其制备方法

(57) 摘要

本发明属于与 GLP-1 类似物和聚乙二醇结合的
脂质体及其制备方法。该发明是在脂质末端
的一部分被巯基化的脂质体上通过二硫键结合
了含聚乙二醇部分的化合物,并通过二硫键进
一步结合了 GLP-1 类似物而得到的脂质体,相对于
包含在脂质体中的 1 摩尔巯基化脂质,所述 PEG
的结合量和所述 GLP-1 类似物的结合量分别为
15-50mol% 和 0.5-10mol%。该脂质体在保留的
GLP-1 多肽生物活性的同时,增加了 GLP-1 类似物
在血液中的稳定性,延长了 GLP-1 类似物在体内
的半衰期。

1. 一种脂质体,其特征在于,所述脂质体是将含聚乙二醇部分的化合物,通过二硫键结合到脂质末端的一部分被巯基化的脂质体上而得到的脂质体,相对于包含在脂质体中的1mol 巯基化脂质,所述化合物的结合量为15-30mol%;该脂质体的表面通过二硫键进一步结合了GLP-1类似物;所述脂质体为使巯基化脂质的巯基与添加了硫巯基的含聚乙二醇部分的化合物氧化反应得到的脂质体的上述脂质体;其中所述GLP-1类似物选自HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKGRGC-NH₂、HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKGRGC-NH₂、HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKGCN-NH₂、HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKCRG-NH₂或HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVCGRG-NH₂。

2. 根据权利要求1的脂质体,所述脂质体可用于制备治疗糖尿病/肥胖的药物。

与 GLP-1 类似物和聚乙二醇结合的脂质体及其制备方法

技术领域：

[0001] 本发明涉及一种脂质体,具体涉及与 GLP-1 类似物和 / 或聚乙二醇结合的、具有优良的血浆稳定性和治疗效果的脂质体,及其制备技术。

背景技术：

[0002] 作为向特定部位输送大量药剂的手段,提出了将药剂封入脂质体,使抗体结合到脂质体表面的方法。特别是在癌的治疗领域,有许多关于其中封入了抗肿瘤药、与抗体结合的脂质体的有效性的报道 (Konno 等, Cancer Tes., 47, 4471, 1987, 特开昭 58-134032 号公报。进而,作为对脂质体存在的问题,即封入物的漏出、脂质体的凝集以及在网状内皮器官中的捕获等的改善方法,提出了向脂质体上结合聚乙二醇的方法 (特开平 1-249717 号公报、特开平 2-149512 号公报、Klibanovet, A. L, 等, FEBS Lett., 268, 235, 1990)。

[0003] 在特开平 4-346918 号公报中,公开了与蛋白质结合的含有药剂的脂质体,其特征在于具有蛋白质和包含聚乙二醇部分的化合物残基,所述蛋白质和化合物残基分别通过各自的巯基与内含药剂的脂质体表面的马来酰亚胺基结合。这种脂质体是使结合在抗体上的巯基和结合在含聚乙二醇部分的化合物上的巯基与脂质体表面的马来酰亚胺基反应来制备的,它的特征在于如通过历来的脂质体所观察到的那样,在肝脏、脾脏等网状内皮系统中的非特异性摄取得到抑制,实现了靶向性的化学疗法。

[0004] 多肽、蛋白类药物与传统药物相比,不仅具有用药剂量小、疗效好、毒副作用低等突出优点,而且还具有不同于传统药物的一些特性:1) 多肽、蛋白质分子的化学结构决定其活性,影响活性的结构因素主要为氨基酰及其排序、末端基团、肽链和二硫键位置等。此外,药物的空间结构即二维、三维结构也同样影响生物活性。2) 多肽、蛋白质药物体内外不稳定性。蛋白质药物在体内外环境可能经受多种复杂的化学降解和物理变化而失活,如凝聚、沉淀、消旋化、水解、脱酰氨基等。3) 蛋白质药物半衰期短、清除率高、分子量大、易受体内酶和细菌以及体液的破坏、非注射给药生物利用度低,一般都仅为百分之几。因此,如何设计出安全、有效和稳定的转运多肽、蛋白类药物的新型给药系统是当今制剂工作者和制药业面临的一个重大难题。

[0005] GLP-1 刺激胰岛素分泌而不出现低血糖,这种葡萄糖依赖性的促胰岛素分泌特性,避免了糖尿病治疗中常存在的产生低血糖症的危险;对受损胰岛 β 细胞的修复作用、刺激 β 细胞的增殖和分化、增加胰岛素的敏感性,能从根本上改善 2 型糖尿病患者的症状,使开发 GLP-1 作为一种 2 型糖尿病治疗药物具有广阔的前景。然而,天然的 GLP-1 生物半衰期短,在体内很快被二肽基肽酶 IV (dipeptidyl peptidase IV, DPP-IV) 降解,同时,在肾脏被肾小球滤过,被肾小管上的酶代谢。

[0006] 到目前为止,在糖尿病、肥胖领域,脂质体制剂应用于多肽药物 GLP-1 类似物,目的延长 GLP-1 类似物的血浆稳定性的研究鲜有报道。

[0007] 为了克服上述现有技术的缺点,本发明提供一种含有 GLP-1 类似物的聚乙二醇脂质体,在保留 GLP-1 类似物生物活性的同时,延长 GLP-1 类似物在血浆中的半衰期。

发明内容

[0008] 本发明提供一种新型脂质体,所述脂质体是将含聚乙二醇部分的化合物,通过二硫键结合到脂质末端的,相对于包含在脂质体中的 1mol 巯基化脂质,所述化合物的结合量为 15-50mol%;提供所述脂质体为使巯基化脂质的巯基与添加了硫巯基的含聚乙二醇部分的化合物氧化反应得到的脂质体的上述脂质体;提供所述化合物结合到脂质体表面的上述脂质体;提供所述聚乙二醇为聚乙二醇的上述脂质体;提供所述化合物为具有 2 个聚乙二醇基团的化合物的上述脂质体;提供所述聚乙二醇的分子量为 2,000-7,000 道尔顿的上述脂质体;提供所述聚乙二醇的分子量为约 5,000 道尔顿的上述脂质体;提供脂质体的表面进一步结合了 GLP-1 类似物的上述脂质体。

[0009] 而且,提供将 GLP-1 类似物通过二硫键结合到脂质末端的一部分被巯基化的脂质体上而得到的脂质体,相对于包含在脂质体中的 1mol 巯基化脂质,所述 GLP-1 类似物的结合量为 0.5-10mol%。

[0010] 因此,本发明提供一种新型脂质体,所述脂质体是将含聚乙二醇部分的化合物,通过二硫键结合到脂质末端的一部分被巯基化的脂质体上而得到的脂质体,相对于包含在脂质体中的 1mol 巯基化脂质,所述化合物的结合量为 15-50mol%。

[0011] 进一步,本发明提供一种新型脂质体,所述脂质体是将含聚乙二醇部分的化合物的结合量相对于 1 摩尔巯基化脂质为 15-30mol%。

[0012] 上述脂质体为使巯基化脂质的巯基与添加了硫巯基的含聚乙二醇部分的化合物氧化反应得到的脂质体的上述脂质体;所述化合物结合在所述脂质体的表面。

[0013] 上述脂质体为使巯基化脂质的巯基与添加了硫巯基的含聚乙二醇部分的化合物为具有 2 个聚乙二醇基的化合物,其中所述聚乙二醇的分子量为 2,000-7,000 道尔顿,所述聚乙二醇的分子量优选为约 5,000 道尔顿。

[0014] 上述脂质体中所述脂质体的表面进一步结合了抗体,所述脂质体是将抗体通过硫醚基结合到脂质末端的一部分被马来酰亚胺化的脂质体上而形成的,该抗体的结合量相对于脂质体中所含的 1 摩尔马来酰亚胺化脂质为 0.1-2mol%,其中所述抗体的结合量相对于 1 摩尔马来酰亚胺化脂质优选为 0.4-0.7mol%。

[0015] 上述脂质体,它是使具有马来酰亚胺基的脂质体与来自抗体的含硫基团反应,形成硫醚键而得到的脂质体。

[0016] 上述脂质体,其中所述抗体为 GAH 抗体,其中所述抗体为抗体片段 F(ab')₂,其中所述脂质体的表面进一步结合了含聚亚烷基二醇部分的化合物。

[0017] 此外,本发明提供了一种作为糖尿病 / 肥胖治疗药的上述脂质体;以及使用所述脂质体的糖尿病 / 肥胖治疗方法。

[0018] 本发明的脂质体的特征在于:具有优良的血浆稳定性,和较好的降糖活性。并且聚乙二醇的结合量少于历来的脂质体,因此,本发明的脂质体可以避免由聚乙二醇引起的副作用。而且从工业生产性的观点出发也是有利的。

[0019] 实施本发明优选方案

[0020] 构成本发明脂质体的脂质的例子包括但不限于下述物质:天然卵磷脂(例如蛋黄卵磷脂、大豆卵磷脂),二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC),二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC),二硬

脂酰磷脂酰胆碱 (DSPC)、二油酰磷脂酰胆碱 ((DOPC)、二肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺 (DMPE)、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺 (DPPE)、二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE)、二棕榈酰磷脂酸 (DPPA)、二棕榈酰磷脂酰甘油 (DPPG)、二肉豆蔻酰磷脂酸 (DMPA) 等磷脂,鞘糖脂、甘油糖脂等糖脂、脂肪酸、两亲性二烷基二甲铵、聚甘油烷基醚、聚氧乙烯烷基醚等。可以单独使用这些脂质,或是将两种或两种以上结合使用,也可以与胆固醇等非极性物质、胆甾醇衍生物结合使用。

[0021] 在本发明的脂质体中,为了结合含聚亚烷基二醇的化合物以及根据需要的多肽衍生物,使用例如巯基化磷脂酰乙醇胺等被巯基化的脂质(在本说明书中称为“巯基化脂质”)作为脂质体重要组成部分。巯基化脂质相对于全脂质的比例通常约为 0.5-10%。

[0022] 用巯基化磷脂酰乙醇胺的例子来进行说明,这种化合物是由具有与氨基的反应性的含巯基乙酸酯的化合物与磷脂酰乙醇胺 (PE) 的氨基反应得到的。所述含巯基乙酸酯的化合物可以含己酰基、苯甲酰基、苯基丁酰基等残基。可以使用的 PE 有二棕榈酰磷脂酰乙醇胺 (DPPE),二肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺 (DMPE)、二油酸磷脂酰乙醇胺 (DOPE) 等磷脂酰乙醇胺类,但优选 DPPE。

[0023] 作为典型的脂质体,例如可以使用含有相对于 1 摩尔磷脂酰胆碱为 0.3-1 摩尔,优选为 0.4-0.6 摩尔的胆固醇和 0.01-0.2 摩尔、优选为 0.02-0.1 摩尔、更优选为 0.02-0.05 摩尔的巯基化磷脂酰乙醇胺的脂质组合物,在加入磷脂酰的情况下,也可以使用其含量等于或小于 0.4 摩尔,优选等于或小于 0.15 摩尔的脂质组合物。

[0024] 本发明的脂质体的特征在于:脂质体被含聚亚烷基二醇部分的化合物改性。可以使用的聚亚烷基二醇的例子有聚乙二醇 (PEG),聚丙二醇等,但优选使用聚乙二醇。在使用聚乙二醇的情况下,可以使用分子量为 2,000-7,000 道尔顿的聚乙二醇,优选使用约 5,000 道尔顿的聚乙二醇。

[0025] 本发明的脂质体具有含上述聚亚烷基二醇部分的化合物通过硫醚键结合到脂质体表面的巯基化脂质上的结构,通常可以在向含聚亚烷基二醇的化合物中引入硫羟基后,使该化合物与脂质体的马来酰亚胺基反应来生产结合了聚亚烷基二醇的脂质体。含聚亚烷基二醇的化合物通常为具有聚乙二醇基,并且末端能巯基化的化合物或末端有硫醇基的化合物。具体例子有在三嗪上结合了聚亚烷基二醇基的化合物、所述三嗪进一步被氨基酸等所取代的化合物。在这种情况下,所述化合物也可以是具有 2 个聚亚烷基二醇基的化合物(双链)。

[0026] 对向本发明的脂质体中引入的含聚亚烷基二醇部分的化合物的量没有特别限制,可以使过量的该化合物与残余的巯基化脂质反应,优选聚亚烷基二醇的引入量相对于全脂质为约 0.28-0.90mol%,更优选为约 0.28-0.56mol%,相对于巯基化脂质为约 15-50mol%,更优选为约 15-30mol%,相对于 DPPC 为约 0.44-1.45mol%,更优选为约 0.44-0.89mol%。

具体实施方式:

[0027] 以下通过实施例对本发明进行进一步具体的说明,但本发明的范围不限于以下的实施例。

[0028] 实施例 1

[0029] (1) 脂质体的制备

[0030] 向由二棕榈酰磷脂酰胆碱 (DPPC)/胆甾醇/巯基己酰基二棕榈酰磷脂酰乙醇胺 (HS-DPPE) 摩尔比为 18/10/0.5 组成的脂质体混合物 (4.8g) 中加入 48mL 0.3M 的柠檬酰缓冲液 (pH4.0), 水合之后, 用液氮和 60℃ 的温浴冷冻和解冻 3 次, 制成多层脂质体。进一步用挤出法将其颗粒大小调整为 0.1 微米。

[0031] 脂质体混合物配比:

[0032] 二月桂酰磷脂酰胆碱 (DLPC)/胆甾醇/巯基己酰基二月桂酰磷脂酰乙醇胺 (HS-DLPE) 摩尔比为 18/10/0.5;

[0033] 二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱 (DMPC)/胆甾醇/巯基己酰基二肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺 (HS-DMPE) 摩尔比为 18/10/0.5;

[0034] 二硬脂酰磷脂酰胆碱 (DSPC)/胆甾醇/巯基己酰基二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 (HS-DSPE) 摩尔比为 18/10/0.5;

[0035] 二油酰磷脂酰胆碱 (DOPC)/胆甾醇/巯基己酰基二油酰磷脂酰乙醇胺 (HS-DOPE) 摩尔比为 18/10/0.5;

[0036] 二芥酰磷脂酰胆碱 (DEPC)/胆甾醇/巯基己酰基二芥酰磷脂酰乙醇胺 (HS-DEPE) 摩尔比为 18/10/0.5;

[0037] 天然蛋黄卵磷脂/胆甾醇/巯基己酰基二棕榈酰磷脂酰乙醇胺 (HS-DPPE) 18/10/0.5;

[0038] 天然大豆黄卵磷脂/胆甾醇/巯基己酰基二棕榈酰磷脂酰乙醇胺 (HS-DPPE) 18/10/0.5;

[0039] 二棕榈酰磷脂酸 (DPPA)/胆甾醇/巯基己酰基二棕榈酰磷脂酰乙醇胺 (HS-DPPE) 18/10/0.5;

[0040] 二棕榈酰磷脂酸甘油 (DPPG)/胆甾醇/巯基己酰基二棕榈酰磷脂酰乙醇胺 (HS-DPPE) 18/10/0.5。

[0041] (2) 含有半胱氨酰 (Cys) 残基的 GLP-1 类似物的合成及其与脂质体的结合

[0042] 使用微波辅助固相多肽合成仪合成末端和中间位置含有半胱氨酰的 GLP-1 类似物。

[0043] 用缓冲液 1mMEDTA 的 0.1M 磷酸缓冲液 (pH6.0) 后, 溶解 GLP-1 类似物。加入 (1) 中制备的脂质体, 使其在 25℃ 通入空气, 反应 12 小时, 使多肽通过二硫键结合到脂质体上。

[0044] GLP-1 类似物:

[0045] HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRGC-NH₂

[0046] HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG-NH₂

[0047] HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGCG-NH₂

[0048] HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKCRG-NH₂

[0049] HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVCGRG-NH₂

[0050] (3) 聚乙二醇的巯基化及与脂质体的结合 (结合了 PEG 的脂质体的制作)

[0051] 按照特开平 4-346918 号公报的方法, 使胱氨酰与 2,4-双(聚乙二醇)-6-氯-s-三嗪反应, 然后进行还原, 制成具有巯基的聚乙二醇 (双链型 PEG)。也就是说, 使用胱氨酰制备巯基化 PEG (30mg/mL, PEG 的分子量为 2000 的双链型 (PEG2000) 或 PEG 的分子量为 5000 的双链型 (PEG5000), 向每 1mL 上述反应液中加入 0.2mL 脂质体溶液, 使其在室温下,

通入空气,发生结合反应。反应开始后 12hr 后取样,将样品应用于琼脂糖凝胶过滤纯化,滤去未结合 PEG 的脂质体。

[0052] (4) 结合了 GLP-1 类似物和 PEG 的脂质体的制作

[0053] 使上述 (3) 中的巯基化 PEG 与上述 (2) 中制备的结合了 GLP-1 类似物的脂质体反应,制成结合了 GLP-1 类似物和 PEG 的脂质体。

[0054] (5) 结合 PEG 量的定量

[0055] 用 HPLC 法测定与脂质体结合的 PEG 量。将脂质体溶液作为最终浓度为 2% 的 SDS 溶液在 60℃ 加温 30 分钟,使脂质体可以完全溶解。使用 GPC 柱,用 pH7.5 的缓冲液 (25mM NaH₂PO₄, 0.1% SDS, 70% 甲醇) 进行洗脱,分离 PEG,用在 215nm 检出的面积值来对 PEG 进行定量。

[0056] (6) 结合 GLP-1 类似物量的定量

[0057] 与 PEG 量的定量相同,使用 GPC 柱 (3000SWXL),用 pH7.0 的缓冲液 (25mM NaH₂PO₄, 200mM Na₂SO₄, 0.1% SDS) 进行洗脱,分离 GLP-1 类似物,用在 214nm 检出的多肽 GLP-1 类似物峰的面积值来对多肽进行定量。

[0058] (7) 脂质体的定量

[0059] 用 HPLC 法对脂质 (DPPC 和胆固醇的总量) 进行定量。向 L- 柱 ODS 4.6mm X250mm 中装入脂质体,用四氢呋喃 (THF) / 乙腈 / 水 (2 : 1 : 1, v/v/v, 0.1% 三氟乙酸) 进行洗脱。由 DPPC 的峰面积和胆固醇的峰面积来进行定量。向 1 体积的脂质体试样中加入 9 体积的上述洗脱液来制备脂质体定量用试样。

[0060] 实施例 2

[0061] (1) 血浆稳定性试验

[0062] 所制备的化合物与人血浆在三乙醇胺 -HCl (pH7.8, 肽终浓度 2 ~ 20nM) 37℃ 条

[0063] 件下孵育 1-24 小时。最后加入 10% (V/V) 三氟醋酸 / 水终止酶促反应。酶解产物用 C-18 反相 HPLC 分析鉴定,214nm 下测定紫外吸收。

[0064] (2) 口服糖耐量实验

[0065] 针对 GLP-1 衍生物结合 PEG 脂质体,给予受试化合物 90min 后给予葡萄糖;取 10 周龄雄性昆明小鼠,随机分组,每组 10 只。只给饮水,禁食过夜。一组按照小鼠体重每千克腹腔注射生理盐水,其他组按照小鼠体重每千克腹腔注射 25nmol 的脂质体溶液;90min 后再按照小鼠体重每千克腹腔注射 18mmol 的葡萄糖溶液。给完葡萄糖后于 0, 15, 30, 60, 120min 用监测血糖水平。

[0066] 表 1, 受试化合物口服糖耐量实验结果

Group	0 min	15 min	30 min	60 min	120 min
GLP-1(7~36)-NH ₂	4.6±1.5	13.6±1.9***	8.3±1.7**	8.1±1.1*	8.2±1.7*
1	4.8±0.4	14.2±1.0***	10.4±1.2***	6.4±1.0***	6.2±0.4**
2	5.5±0.4	15.2±0.8***	10.8±0.8***	7.4±0.6***	7.4±0.1***
3	4.6±0.3	12.8±1.0***	10.3±0.8***	7.2±0.4***	6.7±0.5***
4	4.5±0.7	11.6±1.0***	9.6±1.3***	6.4±1.8***	5.1±0.8***
5	5.1±0.7	13.2±1.5***	10.2±0.9***	6.7±0.7***	7.8±0.7***

[0067]

[0068] 结果表明,小鼠口服糖耐量实验中,所制备的 GLP-1 类似物脂质体 1-5 在半小时后,降糖活性较均表现为不容程度增加,所有脂质体在试验 120min 后也都有较好的降糖效果, GLP-1 多肽活性基本丧失。总之,该实验表明, GLP-1 脂质体具有较好的降糖活性,且在体内具有较长的体内半衰期。