



(10) 授权公告号 CN 112004527 B

(45) 授权公告日 2024.09.24

(21) 申请号 201980027748.1

(22) 申请日 2019.04.23

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 112004527 A

(43) 申请公布日 2020.11.27

(30) 优先权数据  
62/661,217 2018.04.23 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2020.10.23

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2019/028647 2019.04.23

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02019/209787 EN 2019.10.31

(73) 专利权人 盈肇生技股份有限公司  
地址 中国台湾台北市南港区园区街3号11  
楼之1

(72) 发明人 洪基隆 方元成 曾昱程 郑婷宇  
俞宛妮 唐若心

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司  
72002  
专利代理师 张晓威

(51) Int.Cl.  
A61K 9/00 (2006.01)  
A61K 9/127 (2006.01)  
A61K 31/496 (2006.01)  
A61P 11/00 (2006.01)

(56) 对比文件  
US 2018098945 A1, 2018.04.12

审查员 彭翠莲

权利要求书1页 说明书18页 附图3页

(54) 发明名称

用于治疗肺部疾病的可吸入脂质体缓释组合物

(57) 摘要

提供了一种用于治疗肺部疾病的脂质体缓释组合物。脂质体缓释组合物包含脂质体,脂质体包含经聚乙二醇(PEG)修饰的脂质并且包封酪氨酸激酶抑制剂。酪氨酸激酶抑制剂稳定地包埋在脂质体内,并且所得脂质体药物制剂可以气雾化或雾化,经由吸入给药。该气雾化的脂质体药物制剂产生一致的药代动力学和药效学特性,同时实现理想的药效和安全性。

1. 一种用于肺部疾病治疗的脂质体缓释组合物,其包含具有包埋的酪氨酸激酶抑制剂的脂质体,其中每个脂质体组成为:

脂质双层,其包含一种或多种磷脂、胆固醇和经聚乙二醇(PEG)修饰的脂质,其中总磷脂对胆固醇的摩尔比范围为1:1至3:2;以及

水性内部,其由所述脂质双层包覆并且包埋酪氨酸激酶抑制剂;

其中所述脂质体的平均粒径为50nm至400nm;

所述组合物的酪氨酸激酶抑制剂对磷脂的摩尔比为0.1mol/mol至2.5mol/mol;

其中所述酪氨酸激酶抑制剂为尼达尼布;

其中所述经聚乙二醇修饰的脂质是1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)](DSPE-PEG);以及

其中所述酪氨酸激酶抑制剂经由使用捕获剂的跨膜pH梯度驱动的远程装载方法包封在所述脂质体的水性内部。

2. 权利要求1的脂质体缓释组合物,其中所述酪氨酸激酶抑制剂的浓度范围为1mg/mL至15mg/mL。

3. 权利要求1的脂质体缓释组合物,其中所述经聚乙二醇修饰的脂质的存在量基于总磷脂和胆固醇低于6mol%。

4. 权利要求1至3中任一项的脂质体缓释组合物,其中所述肺部疾病选自肺纤维化、非小细胞肺癌和肺动脉高压。

5. 权利要求1至3中任一项的脂质体缓释组合物,其中所述经聚乙二醇修饰的脂质具有平均分子量范围为1,000g/mol至5,000g/mol的聚乙二醇部分。

6. 权利要求1至3中任一项的脂质体缓释组合物,其中所述一种或多种磷脂是中性磷脂,并且所述脂质体的所述DSPE-PEG的存在量基于总磷脂和胆固醇为0.001mol%至5mol%。

7. 权利要求1至3中任一项的脂质体缓释组合物,其中所述一种或多种磷脂选自氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)、1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DPPC)和磷脂酰乙醇胺脂质及其组合。

8. 权利要求1的脂质体缓释组合物,其中所述捕获剂是硫酸铵。

9. 一种用于肺部疾病治疗的气雾化颗粒组合物,其包含权利要求1至8中任一项的脂质体缓释组合物。

10. 权利要求9的气雾化颗粒组合物,其中所述颗粒的质量中值空气动力直径为0.5 $\mu$ m至5 $\mu$ m。

11. 权利要求9的气雾化颗粒组合物,其中所述具有包埋的酪氨酸激酶抑制剂的脂质体具有在肺中每小时0.5%至25%的总酪氨酸激酶抑制剂的释放速率,并且在最短12小时或最短24小时之后,所述包埋的酪氨酸激酶抑制剂完全释放。

12. 权利要求9的气雾化颗粒组合物,其以0.001mg/kg至50mg/kg的量给药。

## 用于治疗肺部疾病的可吸入脂质体缓释组合物

### [0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2018年4月23日提交的第62/661,217号美国临时申请的优先权,该美国临时申请以其整体援引加入。

### [0003] 背景

### 技术领域

[0004] 本公开涉及用于递送缓释脂质体组合物的可吸入药物递送系统。本公开涉及制备药物递送系统的方法。本公开也涉及适用于肺部递送系统的缓释药物组合物,其具有延长的药效持续时间。

### [0005] 相关领域描述

[0006] 不良的肺部疾病由各种外部效应物引发并成为老龄化社会的压倒性问题。特发性肺纤维化(Idiopathic Pulmonary Fibrosis, IPF)是一种典型的肺病,它困扰全世界约三百万人,其中大部分患者年龄超过50岁。此疾病的预后较差,特发性肺纤维化患者的中位存活时间为从诊断起2至3年。特发性肺纤维化几乎是孤儿肺部疾病,具有可怕的预后和治疗选择有限(有两种已批准的药物上市)的令人衰弱的症状。

[0007] 尼达尼布(Nintedanib),一种酪氨酸激酶抑制剂,批准用于特发性肺纤维化的治疗,以每天300毫克的高剂量给药,尼达尼布作为胶囊口服服用,建议剂量为每天两次150毫克。在临床试验中,与安慰剂相比,这种口服酪氨酸激酶抑制剂的给药方案使肺功能下降(增加的用力肺活量)的状况减少大约50%。

[0008] 然而,酪氨酸激酶抑制剂的口服给药导致非常低的生物利用度,例如,在人类中尼达尼布的生物利用度为4.7%。由目前治疗量的尼达尼布口服治疗引起的不良副作用包括腹泻(最常见的不良事件)、恶心、胃痛、肝脏问题、呕吐、食欲减退、头痛、体重减轻和高血压。

[0009] 脂质体是自组装的脂肪酸囊泡,其由磷脂双层组成,具有水性内部。这些囊泡已用作缓释药物递送的药物载体数十年。药物的脂质体包封改变游离药物的药代动力学特性,全身性或在疾病部位提供缓慢的药物释放,允许较高的给药剂量和较低频率的给药,并且可能降低副作用和毒性。在脂质体内的高药物包封可以藉由远程装载(remote loading)方法(也称为主动装载)而实现,远程装载方法依赖于跨膜pH和离子梯度,以允许游离的、不带电荷的药物分子扩散进入脂质体内。在脂质体内部,游离的药物分子可以与在水性内部的捕获剂(反离子)复合,以沉淀成为留在脂质体内部的药物-反离子盐。可以定制脂质体制剂以实现体内缓慢的药物释放,这会延长药物的治疗效果。这可以藉由调整脂质体制剂和优化某些脂质体性质来实现,例如所使用的磷脂(不同的链长、相变温度)、脂质对胆固醇比、脂质体上的聚乙二醇(PEG)的量(以避免被巨噬细胞清除)、用于药物包封的捕获剂,并且可能是脂质体的层状性(lamellarity)。

[0010] 已经稳定地包埋在脂质体内的药物可能被气雾化或雾化,以用于吸入递送。然而,并不显而易见的是,利用脂质体技术重新配制酪氨酸激酶抑制剂,可以产生用于以治疗剂

量吸入以治疗特发性肺纤维化或其他肺部疾病的制剂。研究显示,经由脂质体药物制剂的不同体内给药途径会获得不可预测的释放特性、血浆半衰期和生物分布。已经在用于治疗肺部疾病的多种活性药剂中观察到这种情况。因此,脂质体药物制剂应该以这样的方式定制,经由吸入的给药产生一致的药代动力学和药效动力学特性,同时实现理想的药效和安全性。

[0011] 目前有两种正在开发的吸入脂质体药物产品已达到进行临床试验:脂质体阿米卡星和脂质体环丙沙星。用于吸入的这两种脂质体抗生素均正在进行研究,以用于治疗多种呼吸系统疾病,例如囊性纤维化(cystic fibrosis,CF)、非囊性纤维化支气管扩张(non-CF bronchiectasis)、非结核分枝杆菌肺病(nontuberculous mycobacterial lung disease)和其他毒性感染。用于吸入治疗的这两种脂质体药物制剂都设计为经由将脂质成分修改为电中性(US 8,226,975),或经由调整粒径和游离环丙沙星的量以减弱对巨噬细胞的吸引力(US 8,071,127),使抗生素容易接近微生物或受感染的组织。

[0012] 不幸的是,现有的吸入脂质体制剂不能满足对于其他肺部疾病(例如特发性肺纤维化)的治疗的未满足需求,这可能需要进行具有不同目标产品特性的药物产品,产品特性包括但不限于肺部深处沉积、增强的黏液渗透、在肺部中延长的药物保留和增加的脂质体药物稳定性。迄今为止,还没有相关研究报导过基于脂质的缓释组合物形式的酪氨酸激酶抑制剂或类似者的吸入药物对于肺部疾病的治疗有效。因此,对于适用于治疗肺部疾病(例如特发性肺纤维化)的如下制剂存在未满足的需求,其可吸入、对于由局部肺表面活性物质造成的破坏具有改善的稳定性或抗性,并且还具剂量强度以确保有潜力在肺部环境中达到理想的药效。

#### [0013] 发明概述

[0014] 本公开提供了一种吸入脂质体药物制剂,其包含一种或多种磷脂、固醇、经聚乙二醇修饰的磷脂和包埋在脂质体的水性内部中的酪氨酸激酶抑制剂。在一些实施方案中,包埋的酪氨酸激酶抑制剂是取代的吡啶啉化合物。在一些实施方案中,取代的吡啶啉化合物是尼达尼布。

[0015] 为了改善现有的肺部疾病(例如肺纤维化)的治疗模式,以及利用缓慢、持续的药物释放的益处,我们开发了酪氨酸激酶抑制剂的脂质体缓释组合物,其在水性悬浮液中包含脂质体包封的酪氨酸激酶抑制剂和预定量的游离酪氨酸激酶抑制剂,其可以被雾化并且被吸入,以促进肺部疾病的治疗。特别地,存在对用于特发性肺纤维化治疗的吸入形式的尼达尼布的需求。

[0016] 本公开提供了酪氨酸激酶抑制剂的脂质体缓释组合物,其用于特发性肺纤维化的治疗,具有以下优点:1) 用更低的药物剂量达到治疗效果,2) 将药物直接递送到疾病部位,3) 作用起效得更快,4) 减少不良的药物反应和全身作用,5) 绕过在口服给药中观察到的首过代谢,从而提高药物的生物利用度(并且可能降低肝毒性),6) 藉由从脂质体药物制剂的缓释而增加药物在肺中的停留时间,7) 减少药物的给药频率,8) 非侵入性吸入递送,以及9) 改善患者结局和顺应性。雾化颗粒形式的用于治疗特发性肺纤维化的酪氨酸激酶抑制剂的脂质体缓释组合物的吸入药物剂量可以显著低于口服剂量,同时仍实现相似的治疗功效。

[0017] 根据本公开的具有包埋的酪氨酸激酶抑制剂的脂质体结合显著量的聚乙二醇部

分,以实现更长时间的持续药物释放,其会是安全、有效的并且适合于每日一次或甚至更低频率的给药。

[0018] 在一些实施方案中,具有包埋的酪氨酸激酶抑制剂的脂质体包含摩尔比为1:1至3:2的磷酸胆碱(phosphocholine,PC):胆固醇,其中磷酸胆碱可以是氢化大豆磷脂酰胆碱(hydrogenated soy phosphatidylcholine,HSPC)、1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine,DSPC)、1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine,DPPE)或其混合物,例如摩尔比为1:1的DSPC和1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine,DPPE)。

[0019] 在一些实施方案中,经聚乙二醇修饰的磷酸乙醇胺(phosphoethanolamine,PE)可以是DSPE-PEG2000,并且其范围为脂质体的总脂质含量的0.0001mol%至40mol%。

[0020] 在一些实施方案中,脂质体缓释组合物的脂质浓度范围为10mM至25mM,并且药物对脂质(D/L)比的范围为300g/mol至700g/mol。

[0021] 在一些实施方案中,具有包埋的酪氨酸激酶抑制剂的脂质体的平均粒径范围为100nm至300nm。

[0022] 在各个实施方案中,本公开提供了脂质体组合物的气雾化颗粒组合物,其包含具有包埋的酪氨酸激酶抑制剂的脂质体,用于特发性肺纤维化(IPF)的治疗,其中具有包埋的酪氨酸激酶抑制剂的脂质体具有至少200g/mol的药物对脂质比。

[0023] 在另一方面,本公开提供了用于治疗特发性肺纤维化(IPF)的脂质体缓释组合物的气雾化颗粒组合物,其中组合物包含具有包埋的酪氨酸激酶抑制剂的脂质体,脂质体具有预定量的经聚乙二醇修饰的脂质,预定量例如但不限于基于总磷脂和固醇低于6mol%。

[0024] 在又另一方面,本公开提供了用于治疗肺部疾病的方法,其包括将治疗有效量的脂质体缓释组合物的气雾化颗粒组合物的酪氨酸激酶抑制剂给药至有需要的个体,其中治疗有效量的酪氨酸激酶抑制剂的范围为每个体的体重0.001mg/kg至50mg/kg。

[0025] 本公开的其他目的、优点和新颖特征会藉由以下的详细描述及附图作明显的呈现。

[0026] 附图简要说明

[0027] 图1显示在4°C下300mM硫酸铵(A.S.)脂质体尼达尼布的储存稳定性;

[0028] 图2显示在4°C下储存的300mM硫酸铵(A.S.)脂质体尼达尼布的粒径;

[0029] 图3绘示脂质体酪氨酸激酶抑制剂制剂(liposomal TKI formulations)在模拟肺液(simulated lung fluid,SLF)中的体外释放曲线;AS=硫酸铵;空心圆形=脂质体酪氨酸激酶抑制剂制剂,其包含300mM硫酸铵、3.74mg/mL尼达尼布和0.45mol%经聚乙二醇修饰的脂质;实心方形=脂质体酪氨酸激酶抑制剂制剂,其包含300mM硫酸铵、3.74mg/mL尼达尼布和1.75mol%经聚乙二醇修饰的脂质;误差杠代表标准偏差;

[0030] 图4绘示在健康小鼠的肺组织中的尼达尼布(Nib)的保留;AS=硫酸铵;空心圆形=3.74mg/mL游离形式的尼达尼布(Nib);空心三角形=脂质体酪氨酸激酶抑制剂制剂,其包含300mM硫酸铵、3.74mg/mL尼达尼布和0.45mol%经聚乙二醇修饰的脂质;实心三角形=脂质体酪氨酸激酶抑制剂制剂,其包含300mM硫酸铵、3.74mg/mL尼达尼布和1.75mol%经聚

乙二醇修饰的脂质;误差杠代表标准偏差;

[0031] 图5绘示在特发性肺纤维化动物模型中小鼠肺组织中的尼达尼布(Nin)的保留;该图比较了包含300mM硫酸铵、3.74mg/mL尼达尼布和3mol%经聚乙二醇修饰的脂质的脂质体酪氨酸激酶抑制剂剂气管内(IT)给药的保留(实心圆形)和口服给药的尼达尼布(游离尼达尼布)的保留(空心三角形);AS=硫酸铵;误差杠代表标准偏差。

[0032] 优选实施方案的详细描述

[0033] 除非另有说明,如上文和整个公开中使用的以下术语应理解为具有以下含义。

[0034] 本文所用的单数形式“一”(a/an)和“该、所述”(the)包括复数的指代物,除非上下文另有明确说明。

[0035] 本文中的所有数字均可以理解为由“约”修饰,当提及诸如量、持续时间等的可测量值时,其意味着包括从指明的数值 $\pm 10\%$ ,优选 $\pm 5\%$ ,更优选 $\pm 1\%$ ,并且甚至更优选 $\pm 0.1\%$ 的变化,因为这些变化适当地获得脂质体药物的理想的量,除非另有说明。

[0036] 本文所用的术语“治疗”(treating、treated、treatment)包括预防性(例如,预防疾病的)、缓和性和治愈性的用途或结果。

[0037] 术语“个体”包括具有影响肺功能的癌症或其他疾病的脊椎动物。在一些实施方案中,个体是温血动物,例如哺乳动物,包括人类。

[0038] 本文所用的术语“药物对脂质比”(“D/L比”)是指酪氨酸激酶抑制剂对总磷脂含量比。经由紫外光-可见光(UV-Vis)吸收度测量来确定游离药物和脂质体药物的酪氨酸激酶抑制剂含量。藉由使用磷测定法(改编自G.Rouser等人,Lipids 1970,5,494-496)测定脂质体和脂质体药物样品的磷含量来确定脂质体和脂质体药物的磷脂含量或浓度。D/L比可以用g/mol或mol/mol表示。例如,经由将脂质体尼达尼布g/mol值除以539.62得到mol/mol值,可以将g/mol的脂质体尼达尼布转化为mol/mol的脂质体尼达尼布。

[0039] 本文所用的术语mol%是指混合物的一给定组分的摩尔数相对于该混合物的总摩尔数的百分比。

[0040] 脂质体

[0041] 本文所用的术语“脂质体”是指一种颗粒,其特征在于具有水性内部空间,由一个或多个双层膜形成囊泡将水性内部空间与外部介质隔离。脂质体的双层膜通常由脂质(亦即合成或天然来源的两亲分子,其包含空间上分离的疏水区和亲水区)形成。在本公开的某些实施方案中,术语“脂质体”是指小单层囊泡(small unilamellar vesicle,SUV)脂质体,其中一个脂质双层形成膜。

[0042] 一般而言,脂质体包含脂质混合物,其通常包含一种或多种选自以下的脂质:双脂肪链脂质,例如磷脂、二甘油酯、二脂肪糖脂,单脂质(single lipid),例如鞘磷脂和鞘糖脂,类固醇,例如胆固醇及其衍生物,及其组合。

[0043] 根据本公开的磷脂的实例包括但不限于1,2-二月桂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine,DLPC)、1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine,DMPC)、1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DPPC)、1-棕榈酰-2-硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(1-palmitoyl-2-stearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine,PSPC)、1-棕榈酰-2-油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine,POPC)、1,2-二硬脂酰-sn-甘

油-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine,DOPC)、氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)、1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸-(1'-外消旋-甘油)(钠盐)(1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)(sodium salt),DMPG)、1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸-(1'-外消旋-甘油)(钠盐)(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)(sodium salt),DPPG)、1-棕榈酰-2-硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸-(1'-外消旋-甘油)(钠盐)(1-palmitoyl-2-stearoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)(sodium salt),PSPG)、1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸-(1'-外消旋-甘油)(钠盐)(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)(sodium salt),DSPG)、1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸-(1'-外消旋-甘油)(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol),DOPG)、1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(钠盐)(1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine(sodium salt),DMPS)、1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(钠盐)(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine(sodium salt),DPPS)、1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(钠盐)(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine(sodium salt),DSPS)、1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine,DOPS)、1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸(钠盐)(1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphate(sodium salt),DMPA)、1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸(钠盐)(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphate(sodium salt),DPPA)、1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸(钠盐)(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphate(sodium salt),DSPA)、1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸(钠盐)(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphate(sodium salt),DOPA)、1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DPPE)、1-棕榈酰-2-油酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine,POPE)、1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine,DSPE)、1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine,DOPE)、1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸-(1'-肌醇)(铵盐)(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-myoinositol)(ammonium salt),DPPI)、1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸肌醇(铵盐)(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoinositol(ammonium salt),DSPI)、1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸-(1'-肌醇)(铵盐)(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-myoinositol)(ammonium salt),DOPI)、心磷脂、L- $\alpha$ -磷脂酰胆碱(L- $\alpha$ -phosphatidylcholine,EPC)和L- $\alpha$ -磷脂酰乙醇胺(L- $\alpha$ -phosphatidylethanolamine,EPE)。

[0044] 经聚乙二醇(PEG)修饰的脂质

[0045] 经聚乙二醇修饰的脂质包含与脂质缀合的聚乙二醇部分。在一些实施方案中,聚乙二醇部分具有约1,000至约20,000道尔顿的分子量。在一些实施方案中,经聚乙二醇修饰的脂质与磷脂混合,以形成具有一个或多个双层膜的脂质体。在一些实施方案中,经聚乙二醇修饰的脂质的量的范围基于总磷脂和固醇为0.0001mol%至40mol%,任选地为0.001mol%至30mol%,并且任选地为0.01mol%至20mol%。在一些实施方案中,经聚乙二醇修饰的脂质的量基于总磷脂和固醇不超过6mol%、不超过5mol%、不超过3mol%或不超过2mol%。在一些实施方案中,经聚乙二醇修饰的脂质具有平均分子量范围为1,000g/mol

至5,000g/mol的聚乙二醇部分。在一些实施方案中,经聚乙二醇修饰的脂质是与聚乙二醇基团连接的磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)。在一些实施方案中,经聚乙二醇修饰的磷脂酰乙醇胺是1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)](1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)]),DSPE-PEG)。

[0046] 脂质体缓释组合物

[0047] 术语“脂质体药物制剂”和“脂质体缓释组合物”在本公开中可互换使用。根据本公开的脂质体缓释组合物包括但不限于如下制备的具有包埋的酪氨酸激酶抑制剂的脂质体:经由跨膜pH梯度驱动远程装载方法将酪氨酸激酶抑制剂包埋在脂质体的水性内部中。在一些实施方案中,经由使用捕获剂来产生跨膜pH梯度,以将酪氨酸激酶抑制剂远程装载进脂质体中。在各种实施方案中,捕获剂选自硫酸铵、甲磺酸铵、甲苯磺酸铵、蔗糖八硫酸酯三乙基铵及其组合。

[0048] 在某些实施方案中,具有包埋的酪氨酸激酶抑制剂的脂质体包含(a)脂质双层,其包含一种或多种磷脂、固醇和经聚乙二醇(PEG)修饰的脂质,经聚乙二醇修饰的脂质包括但不限于经聚乙二醇修饰的磷脂酰乙醇胺;以及(b)由脂质双层包覆的水性内部,其包埋酪氨酸激酶抑制剂。

[0049] 在一些实施方案中,一种或多种磷脂是中性磷脂。在一些实施方案中,经聚乙二醇修饰的脂质是DSPE-PEG,并且在脂质体中的DSPE-PEG的量基于总磷脂和固醇为0.001mol%至5mol%。

[0050] 在一些实施方案中,具有包埋的酪氨酸激酶抑制剂的脂质体具有50nm至400nm的平均粒径。

[0051] 术语“酪氨酸激酶抑制剂”(TKI)是指一组或多组抑制酪氨酸激酶的物质,酪氨酸激酶是经由对蛋白质添加磷酸基团(磷酸化)而负责许多蛋白质的活化的酶。在一些实施方案中,术语“酪氨酸激酶抑制剂”包括但不限于吡啶啉化合物。在一些实施方式中,酪氨酸激酶抑制剂是经取代的吡啶啉化合物,例如尼达尼布或其药学上可接受的盐。

[0052] 在一些实施方案中,根据本公开的酪氨酸激酶抑制剂选自尼达尼布、塞卡替尼(saracatinib)、阿昔替尼(axitinib)、卡博替尼(cabozantinib)、帕唑帕尼(pazopanib)、凡德他尼(vandetanib)、瑞戈非尼(regorafenib)、索拉非尼(sorafenib)、舒尼替尼(sunitinib)、伊马替尼(imatinib)、博舒替尼(bosutinib)、达沙替尼(dasatinib)、尼罗替尼(nilotinib)、普纳替尼(ponatinib)、阿法替尼(afatinib)、厄洛替尼(erlotinib)、吉非替尼(gefitinib)、拉帕替尼(lapatinib)、克唑替尼(crizotinib)和鲁索利替尼(ruxolitinib)。

[0053] 在一些实施方案中,根据本公开的酪氨酸激酶抑制剂是尼达尼布,其中180.6mg的乙磺酸尼达尼布(nintedanib esylate)相当于150mg的尼达尼布碱。

[0054] 在一些实施方案中,根据本公开的酪氨酸激酶抑制剂是经取代的吡啶啉化合物,是指具有一个或多个取代基的吡啶啉化合物,其靶向血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor,VEGFR)、成纤维细胞生长因子受体(fibroblast growth factor receptor,FGFR)和血小板衍生生长因子受体(platelet derived growth factor receptor,PDGFR)。

[0055] 在一些实施方案中,经取代的吡啶啉化合物选自:



- [0056] (a) 3-Z-[1-(4-(哌啶-1-基-甲基)-苯胺基)-1-苯基-亚甲基]-6-乙氧基羰基-2-吡啶酮,
- [0057] (b) 3-Z-[(1-(4-(哌啶-1-基-甲基)-苯胺基)-1-苯基-亚甲基)-6-氨基甲酰基-2-吡啶酮],
- [0058] (c) 3-Z-[1-(4-(哌啶-1-基-甲基)-苯胺基)-1-苯基-亚甲基]-6-甲氧基羰基-2-吡啶酮,
- [0059] (d) 3-Z-[1-(4-(二甲基氨基甲基)-苯胺基)-1-苯基-亚甲基]-6-乙氧基羰基-2-吡啶酮,
- [0060] (e) 3-Z-[1-(4-((2,6-二甲基-哌啶-1-基)-甲基)-苯胺基)-1-苯基-亚甲基]-6-乙氧基羰基-2-吡啶酮,
- [0061] (f) 3-Z-[1-(4-(N-(2-二甲基氨基-乙基)-N-乙酰基-氨基)-苯胺基)-1-苯基-亚甲基]-6-乙氧基羰基-2-吡啶酮,
- [0062] (g) 3-Z-[1-(4-(N-(3-二甲基氨基-丙基)-N-乙酰基-氨基)-苯胺基)-1-苯基-亚甲基]-6-乙氧基羰基-2-吡啶酮,
- [0063] (h) 3-Z-[1-(4-(N-(2-二甲基氨基-乙基)-N-甲基磺酰基-氨基)-苯胺基)-1-苯基-亚甲基]-6-乙氧基羰基-2-吡啶酮,
- [0064] (i) 3-Z-[1-(4-(二甲基氨基甲基)-苯胺基)-1-苯基-亚甲基]-6-甲氧基羰基-2-吡啶酮,
- [0065] (j) 3-Z-[1-(4-(N-乙酰基-N-二甲基氨基羰基甲基-氨基)-苯胺基)-1-苯基-亚甲基]-6-甲氧基羰基-2-吡啶酮,
- [0066] (k) 3-Z-[1-(4-乙基氨基甲基-苯胺基)-1-苯基-亚甲基]-6-甲氧基羰基-2-吡啶酮,
- [0067] (l) 3-Z-[1-(4-(1-甲基-咪唑-2-基)-苯胺基)-1-苯基-亚甲基]-6-甲氧基羰基-2-吡啶酮,
- [0068] (m) 3-Z-[1-(4-(N-二甲基氨基甲基羰基-N-甲基-氨基)-苯胺基)-1-苯基-亚甲基]-6-甲氧基羰基-2-吡啶酮,
- [0069] (n) 3-Z-[1-(4-(N-(2-二甲基氨基-乙基)-N-甲基磺酰基-氨基)-苯胺基)-1-苯基-亚甲基]-6-甲氧基羰基-2-吡啶酮,
- [0070] (o) 3-Z-[1-(4-(N-(3-二甲基氨基-丙基)-N-甲基磺酰基-氨基)-苯胺基)-1-苯基-亚甲基]-6-甲氧基羰基-2-吡啶酮,
- [0071] (p) 3-Z-[1-(4-(N-二甲基氨基羰基甲基-N-甲基磺酰基-氨基)-苯胺基)-1-苯基-亚甲基]-6-甲氧基羰基-2-吡啶酮,
- [0072] (q) 3-Z-[1-(4-(N-((2-二甲基氨基-乙基)-羰基)-N-甲基-氨基)-苯胺基)-1-苯基-亚甲基]-6-甲氧基羰基-2-吡啶酮,
- [0073] (r) 3-Z-[1-(4-(N-(2-二甲基氨基-乙基)-N-乙酰基-氨基)-苯胺基)-1-苯基-亚甲基]-6-甲氧基羰基-2-吡啶酮,
- [0074] (s) 3-Z-[1-(4-甲基氨基甲基-苯胺基)-1-苯基-亚甲基]-6-甲氧基羰基-2-吡啶酮,
- [0075] (t) 3-Z-[1-(4-(N-((4-甲基-哌啶-1-基)-甲基羰基)-N-甲基-氨基)-苯胺基)-1-

苯基-亚甲基]-6-甲氧基羰基-2-吡啶酮,和

[0076] (u) (3Z)-3-[[4-[甲基-[2-(4-甲基哌嗪-1-基)乙酰基]氨基]苯胺基]-苯基亚甲基]-2-氧代-1H-吡啶-6-羧酸甲酯。

[0077] 脂质体缓释组合物的气雾化颗粒

[0078] 根据本公开的脂质体缓释组合物可以适用于制备气雾化颗粒组合物。在一些实施方案中,具有包埋的酪氨酸激酶抑制剂的脂质体包含(a)脂质双层,其包含磷脂、固醇和经聚乙二醇修饰的磷脂酰乙醇胺;以及(b)由脂质双层包覆并含有酪氨酸激酶抑制剂的水性内部,并且其中在气雾化后酪氨酸激酶抑制剂从脂质体中的药物泄露小于10%。

[0079] 在一些实施方案中,根据本公开使用的酪氨酸激酶抑制剂的脂质体缓释组合物具有范围为1mM至25mM的脂质浓度。在某些实施方案中,根据本公开使用的酪氨酸激酶抑制剂的脂质体缓释组合物具有范围为1mg/mL至15mg/mL的酪氨酸激酶抑制剂的浓度。在各个实施方案中,根据本公开使用的酪氨酸激酶抑制剂的脂质体缓释组合物具有范围为100g药物/mol磷脂至1,000g药物/mol磷脂的药物对磷脂比,任选地为500g药物/mol磷脂至1,000g药物/mol磷脂,并且任选地为0.01mol药物/mol磷脂至2.5mol药物/mol磷脂、0.05mol药物/mol磷脂至2mol药物/mol磷脂、0.1mol药物/mol磷脂至1.5mol药物/mol磷脂和0.5mol药物/mol磷脂至1.5mol药物/mol磷脂。

[0080] 在一些实施方案中,脂质体缓释组合物的游离酪氨酸激酶抑制剂的存在量小于脂质体缓释组合物的酪氨酸激酶抑制剂总量(亦即,游离的加上脂质体包封的)的50%,任选地范围为0.5%至40%,1%至30%,2%至20%,或3%至10%。

[0081] 在一些实施方案中,经由使用喷雾器,从脂质体缓释组合物产生气雾化颗粒组合物。在某些实施方案中,雾化器选自空气喷射雾化器、超声雾化器和振动网孔雾化器。

[0082] 在一些实施方案中,气雾化颗粒组合物的质量中值空气动力直径为0.5 $\mu$ m至5 $\mu$ m。

[0083] 在一些实施方案中,气雾化颗粒组合物的给药量为每个体的体重0.001mg/kg至50mg/kg,0.005mg/kg至40mg/kg,0.01mg/kg至30mg/kg,0.05mg/kg至20mg/kg,0.1mg/kg至10mg/kg或0.5mg/kg至5mg/kg,经由肺部递送至个体,以达到给药的酪氨酸激酶抑制剂剂量每小时约0.5%至25%的释放率,在最短约12小时之后完全释放酪氨酸激酶抑制剂。

[0084] 肺部疾病

[0085] 根据本公开的肺部疾病体现在非感染性肺部疾病中。非感染性肺部疾病是指除了革兰氏阴性细菌引起的肺部感染之外的肺部相关异常。在一些实施方案中,肺部疾病包括但不限于:肺纤维化(例如特发性肺纤维化或放射疗法诱导的纤维化)、肺癌(例如非小细胞肺癌)或全身性硬化症(也称为硬皮病)。术语“特发性肺纤维化”(Idiopathic Pulmonary Fibrosis, IPF)是指一种慢性肺病,其特征是肺功能逐渐和不可逆的下降。特发性肺纤维化属于称为间质性肺病(interstitial lung diseases, ILDs)或者更准确地说是弥漫性实质性肺病的肺部异常家族。在这类弥漫性肺病中,特发性肺纤维化属于称为特发性间质性肺炎(idiopathic interstitial pneumonia, IIP)的亚组。根据特定的临床特征和病理模式区分为七种不同的特发性间质性肺炎。特发性肺纤维化是最常见的特发性间质性肺炎的形式。特发性肺纤维化的症状通常包括逐渐发作的呼吸急促和干咳。特发性肺纤维化的其他症状可能包括感觉疲倦和杵状甲(nail clubbing)。运动引起的呼吸困难和慢性干咳也可能是特发性肺纤维化的主要症状。特发性肺纤维化的并发症包括肺动脉高压、心力衰竭、肺

炎和肺栓塞。

[0086] 以下参照具体的非限制性实施例进一步描述本公开。

### 实施例

[0087] 以下实施例说明本公开的某些实施方案的制备和性质。

[0088] 实施例1: 脂质体酪氨酸激酶抑制剂的制备

[0089] I. 空脂质体的制备

[0090] 经由薄膜水合方法或溶剂注射方法制备脂质体。用于经由薄膜水合方法制备空脂质体的方法包括以下步骤:

[0091] 1. 在DSPE-PEG2000存在或不存在下,以预定摩尔比称量出磷脂和胆固醇的脂质混合物,并将脂质混合物加入圆底烧瓶中的10mL氯仿中;

[0092] 2. 在60°C下将烧瓶置于旋转蒸发器中并旋转烧瓶以溶解脂质混合物,然后将烧瓶置于真空下同时旋转以蒸发氯仿,以获得干燥的脂质膜;

[0093] 3. 经由将捕获剂加入5mL的蒸馏水中并涡旋溶液以溶解粉末,制备捕获剂溶液(例如,硫酸铵(A.S));

[0094] 4. 将捕获剂溶液加入干燥的脂质膜中,并在60°C下搅拌30分钟,以形成前体脂质体溶液;

[0095] 5. 用液氮和60°C水浴将前体脂质体溶液冻融5次,以得到脂质体样品;

[0096] 6. 将脂质体样品在60°C下挤压通过0.2 $\mu$ m聚碳酸酯膜10次,然后在60°C下挤压通过0.1 $\mu$ m聚碳酸酯膜10次;

[0097] 7. 将经挤压的脂质体样品透析,以除去游离的捕获剂,然后将样品加入透析袋(MWCO:25kDa),将袋密封,并在100倍体积的9.4% (w/v) 蔗糖溶液中搅拌透析袋;并且在1小时后和4小时后进一步替换蔗糖溶液,并将透析袋搅拌过夜;以及

[0098] 8. 经由过滤经透析的脂质体样品通过0.45 $\mu$ m聚四氟乙烯(PTFE)膜而将其灭菌,以获得空脂质体。

[0099] 制备形成用于装载酪氨酸激酶抑制剂(例如尼达尼布)的空脂质体的各种脂质体制剂列于下表1中(所有脂质体制剂均在9.4% (w/v) 蔗糖溶液中制备)。对于包含DSPC和DPPE两种脂质的脂质体制剂,步骤#4至6在70°C而不是60°C下进行,因为DPPE具有63°C的相对高的 $T_m$ 。这些脂质体的平均粒径大约是120nm。

[0100] 表1脂质体制剂

制剂编号	摩尔比				胆固醇	捕获剂
	磷脂					
	HSPC	DSPC	DPPE	DSPE-PEG2000		
1	3	0	0	0	2	300 mM 硫酸铵
2	3	0	0	0.045	2	
3	3	0	0	0.1	2	
4	3	0	0	0.15	2	
5	3	0	0	0.26	2	
6	0	3	0	0.045	2	
7	0	3	0	0.26	2	
8	0	3	3	0.09	4	
9	0	3	3	0.526	4	

[0102] II. 将酪氨酸激酶抑制剂药物装载进脂质体内以获得脂质体酪氨酸激酶抑制剂

[0103] 以下方法是经由远程装载,酪氨酸激酶抑制剂(亦即尼达尼布)在脂质体内的包封的示例性方案,其包括以下步骤:

[0104] 1. 制备9.4% (w/v) 蔗糖溶液和9.4% (w/v) 蔗糖缓冲液溶液,蔗糖缓冲液溶液含有31mg/mL L-组氨酸(L-His), pH 6.5;

[0105] 2. 制备15mg/mL尼达尼布乙磺酸盐在9.4% (w/v) 蔗糖中的溶液,并在60°C下短暂加热溶液,以得到包含尼达尼布的储备溶液(以下称为Nin储备溶液);

[0106] 3. 在锥形管中混合:(a) 经由实施例1的部分I的方法制备的空脂质体(在一些实施方案中,具有如下条件:DSPC:胆固醇:DSPE-PEG2000为3:2:0.045的摩尔比,300mM硫酸铵(A.S),和58.27mM脂质浓度), (b) 9.4% (w/v) 蔗糖溶液, (c) 9.4% (w/v) 蔗糖缓冲液,其含有31mg/mL L-His, pH 6.5, 和(d) Nin储备溶液,以获得装载溶液。在一些实施方案中,装载溶液具有500g/mol的D/L比。在一个实施方案中,将空脂质体、蔗糖溶液、蔗糖缓冲液和Nin储备溶液混合在一起,如下表2中所提供;

[0107] 4. 在60°C水浴中剧烈摇动装载溶液,并在60°C下培育15分钟,以形成脂质体药物样品,然后将脂质体药物样品置于冰上几分钟;

[0108] 5. 如下进行透析:将冷脂质体药物样品加入透析袋(MWC0:25kDa),将袋密封,并在100倍体积的9.4% (w/v) 蔗糖溶液中搅拌透析袋;以及在1小时后和4小时后替换蔗糖溶液,并将透析袋搅拌过夜;和

[0109] 6. 使用尺寸排阻色谱法和HPLC分析来确定最终样品的药物包封(亦即,装载效率)(所有样品、脂质体形式或全部形式的药物浓度,经由在388nm处的吸收度测量来确定)。

[0110] 表2酪氨酸激酶抑制剂远程装载进脂质体内的示例性条件

最终目标脂质浓度(mM)	空脂质体体积(μL)	9.4% (w/v)蔗糖	9.4% (w/v)蔗糖缓冲液, 其具有 31 mg/mL L-组氨酸, pH 6.5	15 mg/mL Nin 储备溶液	装载溶液的最终 pH
15	772.2 μL	277.8 μL	150 μL	1,800 μL	6.0 至 6.5

[0112] 实施例2:在脂质体中酪氨酸激酶抑制剂的包埋

[0113] 将所实施的酪氨酸激酶抑制剂(尼达尼布)根据实施例1、部分II中描述的方法装

载到空脂质体中,空脂质体的平均粒径大约为120nm并且包含各种磷脂(例如:HSPC、DSPC、DSPC/DPPE或其组合),作为捕获剂的300mM硫酸铵,以及指示含量的经聚乙二醇修饰的磷脂(例如,0.9mol% DSPE-PEG2000)。

[0114] 表3总结了这些主动装载实验的尼达尼布包封结果。包含0.9mol%经聚乙二醇修饰的脂质的300mM硫酸铵空脂质体包封了至少0.9mol/mol的尼达尼布的D/L比,不论在空脂质体制剂中是PC脂质还是PC/PE脂质的组合。因此,对于包含相同捕获剂(硫酸铵)和聚乙二醇含量的脂质体,可灵活选择不同的磷脂用于可吸入脂质体尼达尼布制剂,其可以实现高药物包封、期望的缓释和在肺部环境中延长的药物保留。

[0115] 表3尼达尼布包封结果,脂质体为约120nm,包含各种磷脂和0.9mol%经聚乙二醇修饰的脂质

脂质体组合物 (摩尔比)	总药物浓度(mg/mL)	总 D/L 比 (mol/mol)	装载效率(%)	脂质体 D/L 比(mol/mol)	
[0116]	HSPC:胆固醇:DSPE-PEG2000 3:2:0.045	9.22	1.47	66.0	0.97
	DSPC:胆固醇:DSPE-PEG2000 3:2:0.045	7.35	0.92	106	0.98
	DSPC:胆固醇:DSPE-PEG2000 3:2:0.045	7.48	0.93	103	0.96
	DSPC:DPPE:胆固醇:DSPE-PEG2000 3:3:4:0.09	7.80	1.02	98.0	1.00

[0117] 实施例3:空脂质体大小对雾化的脂质体酪氨酸激酶抑制剂的稳定性的影响

[0118] 对具有低聚乙二醇含量和高尼达尼布包封、且具有不同粒径的脂质体药物在雾化之后进行脂质体酪氨酸激酶抑制剂的稳定性研究。经由将水合的脂质挤压通过不同孔径(0.1 $\mu$ m、0.2 $\mu$ m、0.4 $\mu$ m和1 $\mu$ m)的聚碳酸酯膜来制备不同大小的脂质体,然后将尼达尼布远程装载进所述脂质体内。用于雾化稳定性测试的脂质体制剂具有如下组成:摩尔比为3:2:0.045的HSPC:胆固醇:DSPE-PEG2000,具有300mM硫酸铵作为捕获剂。用于脂质体酪氨酸激酶抑制剂样品的雾化的方案如下:

[0119] 1. 将2mL的脂质体药物加入Vib-Mesh雾化器HL100(由Health and Life Corporation商业化)的药物腔室中;

[0120] 2. 将药物腔室滑入并连接到雾化器的其余部分;

[0121] 3. 打开雾化器以开始样品的气雾化,雾化整个2mL样品(总雾化时间将近6分钟);

[0122] 4. 将气雾颗粒收集在50毫升锥形管中,锥形管与雾化器出口牢固连接,并用封口蜡膜密封;和

[0123] 5. 使用尺寸排阻色谱法和HPLC分析来确定雾化之前和之后脂质体药物样品的药物装载效率。

[0124] 雾化稳定性测试的结果显示在下表4中。包含平均粒径低于300nm的脂质体的脂质体药物制剂非常稳定,几乎没有药物泄漏( $\leq 1\%$ )。平均粒径略大于300nm的药物的脂质体

制剂具有少量的药物泄漏(约5%)。总体上,其中脂质体具有在100nm至300nm范围内的平均粒径的脂质体药物制剂的气雾化颗粒是稳定的,因为药物泄漏最小并且在雾化之前和之后粒径没有显著变化。

[0125] 表4脂质体尼达尼布的雾化稳定性

用于挤压空脂质体的膜孔径( $\mu\text{m}$ )	脂质体酪氨酸激酶抑制剂平均粒径(nm)		雾化的脂质体酪氨酸激酶抑制剂药物对脂质(D/L)比(mol/mol)		酪氨酸激酶抑制剂泄露(%)
	雾化前	雾化后	游离的 + 脂质体的	脂质体的	
[0126] 0.1	128	128	0.92	0.92	0
0.2	191	189	0.91	0.90	1.1
0.4	244	244	0.93	0.93	0
1	322	311	1.03	0.98	4.9

[0127] 实施例4:脂质体药物制剂的储存稳定性

[0128] 监测储存在4°C下的脂质体酪氨酸激酶抑制剂的稳定性两年。将尼达尼布远程装载进脂质体内,脂质体包含摩尔比为3:2:0.045的HSPC:胆固醇:DSPE-PEG2000(0.9mol%经聚乙二醇修饰的脂质),具有300mM硫酸铵作为捕获剂。在将药物装载进脂质体中之后,搅拌脂质体药物样品并在100倍体积的9.4%(w/v)蔗糖溶液中透析。在1小时后和4小时后替换蔗糖溶液,并将样品在溶液中搅拌过夜。脂质体药物包封(D/L比)为约0.9mol/mol。将经透析的脂质体药物样品在4°C下储存两年之后,几乎没有包封的药物( $\leq 3\%$ )从脂质体中泄漏出(图1)。此外,在4°C下的两年储存期间内,脂质体酪氨酸激酶抑制剂悬浮液的粒径保持不变(直径在 $\pm 1\text{nm}$ 之内)(图2)。

[0129] 实施例5:在模拟肺液中的体外药物释放

[0130] 在模拟肺液(SLF)中评估两种脂质体酪氨酸激酶抑制剂制剂(具有0.45mol%的经聚乙二醇修饰的脂质,或1.75mol%的经聚乙二醇修饰的脂质)的药物释放特性,以证明它们的缓释性质。两种脂质体酪氨酸激酶抑制剂样品以约相同的尼达尼布浓度(3.85至3.95mg/mL药物)制备,在两种样品中几乎不存在游离药物(表5)。体外释放(in vitro release, IVR)实验的方案如下:

[0131] 1. 经由将0.5mL的每种样品与4.5mL的模拟肺液(在37°C下预热)混合,而将每种脂质体酪氨酸激酶抑制剂样品稀释10倍,并将经稀释的样品放入15mL离心管中;

[0132] 2. 将离心管与经稀释的样品放进Inteli-mixer旋转器(在37°C下培育并以20rpm旋转)的样品池中;

[0133] 3. 在预定的时间点(例如,0、4和24小时)取样1mL的经稀释的脂质体酪氨酸激酶抑制剂样品;

[0134] 4. 确定包封效率,其中用于确定每个1mL样品的包封效率的分析方法如下:

[0135] a. 用9.4%蔗糖溶液(少于5mL)填充并洗涤2mL的 Sepharose® CL-4B柱;

[0136] b. 将0.1mL样品加入柱中,然后加入0.15mL的9.4%蔗糖溶液,分别加入3次,并等

待溶液从柱中洗脱出来；

[0137] c. 加入1mL的9.4%蔗糖溶液至柱中,并将洗脱液(脂质体药物部分)收集在10mL容量瓶中;将甲醇加入容量瓶中使其达到体积并充分混合(这是脂质体药物形式);

[0138] d. 在另一个10mL容量瓶中,将0.1mL的未纯化的样品加入此容量瓶中,并加入甲醇至容量瓶以使其达到体积并充分混合(这是总药物形式);

[0139] e. 使用UV-Vis读板仪测量最终经稀释的样品在380nm处的吸收度,以确定每个样品的药物浓度。

[0140] 5. 包封效率(EE)定义为药物的脂质体形式(LF)除以药物的总形式(TF): $EE(\%) = LF/TF \times 100\%$ 。

[0141] 表5体外释放样品的包封结果

	样品名称	药物形式	药物浓度(mg/mL)	包封效率(%)
[0142]	AS 300 mM/Nin 3.74 mg/mL/PEG 0.45 mol%	LF	3.85	98.2
		TF	3.92	
	AS 300 mM/Nin 3.74 mg/mL/PEG 1.75 mol%	LF	3.88	98.2
		TF	3.95	

[0143] 两种脂质体酪氨酸激酶抑制剂制剂的体外释放曲线显示在图3中。脂质体制剂保留了总药物含量的显著百分比,并且在24小时的时间段内表现出缓慢的药物释放。具有聚乙二醇的脂质体非常稳定,因为在前四个小时内几乎没有尼达尼布释放到模拟肺液中,并且在24小时的时间段内仅有最高30%的它们的总药物含量被释放到模拟肺液中。这些体外释放结果表明我们的脂质体药物制剂可以在肺部环境中实现体内缓释。

[0144] 实施例6:在健康动物中脂质体酪氨酸激酶抑制剂的延长肺保留和减少药物毒性

[0145] 进行在健康小鼠中脂质体酪氨酸激酶抑制剂的肺保留研究,以比较在小鼠肺中游离形式相对于脂质体酪氨酸激酶抑制剂制剂的停留时间。在研究中使用了四种组合物:

[0146] 1) 空白(盐水);

[0147] 2) 游离尼达尼布(溶解在9.4%(w/v)蔗糖溶液中的药物);

[0148] 3) 300mM硫酸铵脂质体尼达尼布(0.45mol%聚乙二醇);和

[0149] 4) 300mM硫酸铵脂质体尼达尼布(1.75mol%聚乙二醇)。

[0150] 组合物#2至4的药物浓度相同:约3.74mg/mL尼达尼布。

[0151] 保留研究的方案如下:

[0152] 1. 用异氟醚麻醉7周龄C57BL/6小鼠;

[0153] 2. 使用微形喷雾器(HRH-MAG4),气管内(IT)给药50 $\mu$ L的组合物至经麻醉的小鼠;

[0154] 3. 在预定时间点(例如,2、6和24小时)麻醉并处死小鼠;

[0155] 4. 在相同的预定时间点(例如,2、6和24小时),收集肺组织样品用于药物测定;

[0156] 5. 如下分析在肺组织中的尼达尼布:

[0157] a) 用1mL的甲醇以6,000rpm将每个肺组织样品均质化两次(2次运行/循环);

[0158] b) 将每个样品在4 $^{\circ}$ C下以20,000g离心10分钟;

[0159] c) 将0.5mL的每个上清液转移到5mL容量瓶中,并用甲醇使其达到体积;

[0160] d) 使用UV-Vis读板仪测量最终经稀释的样品在380nm处的吸收度,以确定样品的

药物浓度。

[0161] 肺保留研究的结果如图4所示。对于气管内给药的游离尼达尼布(溶解在水溶液中的游离药物),在仅两小时之后几乎没有药物保留在肺中。因此,在该短时间内几乎所有药物都被吸收并从肺部清除。相对而言,给药脂质体尼达尼布(包含0.45mol%或1.75mol%经聚乙二醇修饰的脂质)的动物在气管内给药后六小时在肺中保留了总药物剂量的约一半。此外,24小时后仍在肺中观察到总剂量的16%至超过30%。因此,脂质体尼达尼布的停留时间远远长于游离药物的停留时间。此外,脂质体药物制剂似乎适合每日一次或甚至更少频率的给药。与游离药物相比,脂质体尼达尼布于24小时后在肺中多保留了高达约20倍的尼达尼布。

[0162] 在肺保留研究期间,没有观察到给药空白溶液或脂质体尼达尼布的小鼠死亡(表6)。然而,在与脂质体形式相同的3.74mg/mL的药物浓度给药游离尼达尼布(作为水溶液)的小鼠也没有好转。给药游离尼达尼布的九只小鼠中有两只死亡,七只存活的小鼠表现出明显的虚弱(表6)。这些结果证明,与尼达尼布的游离形式相比,尼达尼布的脂质体形式更安全且毒性更小。这些结果还表明,有可能将脂质体药物形式的尼达尼布剂量增加到3.74mg/mL以上,以增强药效并延长缓释,同时仍保持安全性。

[0163] 表6在肺保留研究期间小鼠的观察

测试物	在不同时间点(小时)采样的小鼠数目				死亡率
	0	2	6	24	
空白	3	0	0	0	0/3
3.74 mg/mL Nin (游离形式)	0	3	3	3	2/9, 7只存活的小鼠 非常虚弱
300 mM A.S. - 3.74 mg/mL Nin 0.45 mol%的聚乙二 醇 (脂质体形式)	0	3	3	3	0/9
300 mM A.S. - 3.74 mg/mL Nin 1.75 mol%的聚乙二 醇 (脂质体形式)	0	3	3	3	0/9

[0164] 实施例7:在特发性肺纤维化动物模型中酪氨酸激酶抑制剂的肺保留

[0165] 为了扩展实施例6的肺保留研究,也在特发性肺纤维化模型中研究了尼达尼布在小鼠肺组织中的保留。研究设计细节在表7中给出。简而言之,将21只小鼠分成两组(两种不同的尼达尼布组合物),其中在组#1中有9只小鼠,在组#2中有12只小鼠。

[0166] 每种尼达尼布组合物的描述如下:

[0167] 组#1:AS-Nin 3.74mg/mL-PEG 3%代表尼达尼布装载到300mM硫酸铵脂质体(其包含3mol%聚乙二醇)中;脂质浓度为15mM,尼达尼布浓度为3.74mg/mL;



[0169] 组#2:游离尼达尼布代表150mg尼达尼布软胶囊(经由将软胶囊内容物溶解在芝麻油中以产生用于给药的7.6mg/mL的尼达尼布浓度来每天制备游离尼达尼布溶液;口服给药的体积为200 $\mu$ L/小鼠)。

[0170] 首先,对每只小鼠经由气管内滴注2.5mg/kg博来霉素来诱导肺纤维化。七天之后,对纤维化小鼠气管内滴注(组#1) 25 $\mu$ L的脂质体尼达尼布,或是将口服尼达尼布(组#2)(用于特发性肺纤维化治疗的两种FDA批准的药物中的一种)口服给药于纤维化小鼠。给药方案如表7中所示。Q2Dx2表示每隔一天给药一次剂量,总共两次剂量。在预定的时间点收集血液和肺组织样品(表7)。

[0171] 表7在特发性肺纤维化动物模型中尼达尼布的肺保留的研究设计

组#	组合物	动物的数目	给药频率(数目)	血液/肺组织取样时间点(给药后)*
[0172] 1	AS-Nin 3.74 mg/mL-PEG 3% (4.68 mg/kg, 气管内)	9	一次(N=6)	24 和 48 小时
			Q2Dx2 (N=3)	48 小时
2	游离尼达尼布(60 mg/kg, 口服)	12	一次(N=6)	1 和 5 小时
			QD 5 天(N=6)	1 和 5 小时
*在所有组中每个时间点 3 只小鼠				

[0173] 特发性肺纤维化动物模型研究的肺保留结果如图5所示。测定在小鼠肺组织中的尼达尼布的量并监测长达五天。尽管每天一次口服给药60mg/kg的尼达尼布,但游离尼达尼布在小鼠肺中显示很少(如果有的话)的药物保留,因为在仅几小时后即未在肺组织中检测到尼达尼布。相对而言,每隔一天给药的4.68mg/kg脂质体尼达尼布的气管内给药在小鼠肺组织中缓释药物长达48小时。此外,在48小时之后仍然在肺组织中观察到超过12%的300mM硫酸铵脂质体尼达尼布制剂的滴注剂量(~0.06mg药物/g肺组织)。这些结果证明我们的脂质体药物制剂,在显著较低的剂量下,在患病小鼠的肺中的尼达尼布延长保留方面远远优于口服药物,并且低频率的吸入的脂质体尼达尼布的给药是可能的。

[0174] 实施例8:在特发性肺纤维化动物模型中吸入的脂质体尼达尼布的药效

[0175] 研究在治疗小鼠中博来霉素诱导的肺纤维化方面,脂质体尼达尼布和口服尼达尼布的药效。研究设计细节在表8中给出。简而言之,将八只小鼠分成三组(对于两种不同的尼达尼布组合物和给药途径,N=3;对于未治疗的对照,N=2)。

[0176] 每种尼达尼布组合物的描述如下:

[0177] 组#1:AS-Nin 3.74mg/mL-PEG 3%代表尼达尼布装载进300mM硫酸铵脂质体(其包含3mol%聚乙二醇);15mM的脂质浓度;3.74mg/mL的尼达尼布浓度;

[0178] 组#2:游离尼达尼布代表150mg尼达尼布软胶囊(经由将软胶囊内容物溶解在芝麻油中以产生用于给药的7.6mg/mL的尼达尼布浓度来每天制备游离的尼达尼布溶液;用于口服给药的体积为200 $\mu$ L/小鼠)。

[0179] 首先,在第0天经由气管内滴注2.5mg/kg的博来霉素来诱导肺纤维化。七天之后,对纤维化小鼠气管内滴注25 $\mu$ L的脂质体尼达尼布(组#1,N=3)或口服给药游离尼达尼布(组#2,N=3)于纤维化小鼠,以评估与未治疗对照(组#3,N=2)相比的治疗效果。尼达尼布

组合物的给药方案如表8所示。Q2Dx4表示在第7、9、15和17天每隔一天给药一剂。QDx10表示小鼠在第7、8、9、10、11、14、15、16、17和18天接受一天一次给药。在第21天收集血液和肺组织样品。

[0180] 表8在特发性肺纤维化动物模型中尼达尼布药效研究的研究设计

组#	组合物	动物编号	给药频率	血液/肺组织取样时间点
[0181] 1	AS-Nin 3.74 mg/mL-PEG 3% (4.68 mg/kg, 气管内)	1 至 3	Q2Dx4	第 21 天
2	游离尼达尼布 (60 mg/kg, 口服)	4 至 6	QDx10	第 21 天
3	未治疗对照	7 至 8	N/A	第 21 天

[0182] 经由小鼠肺组织的组织病理学评估来确定药效。表9显示组#1-3的纤维化小鼠的治疗之后的组织病理学结果。与组#3相比,在组#1和组#2中观察到肺纤维化的减少,因为在使用脂质体尼达尼布或游离尼达尼布任一种治疗之后,肺呈现出轻微的慢性、细支气管肺泡发炎和轻微的间质和胸膜下纤维化(~2的纤维化分数)。因为实施例7证明脂质体尼达尼布的气管内给药导致了较长时间在肺组织中较高的药物浓度,对于特发性肺纤维化的治疗,我们的数据显示脂质体尼达尼布的气管内滴注可以大大降低口服给药的尼达尼布的所需剂量和频率。

[0183] 表9在药效研究中小鼠肺组织的组织病理学结果(经由马森三色染色法(Masson's trichrome staining)评分)

组织病理学发现	组#1: 脂质体尼达尼布 (4.68 mg/kg, 气管内)			组#2: 游离尼达尼布 (60 mg/kg, 口服)			组#3: 未治疗对照	
	1	2	3	4	5	6	7	8
[0184] 动物编号	1	2	3	4	5	6	7	8
间质和胸膜下, 多灶性纤维化评分	2	3	2	2	2	2	5	4
	2	2	2	2	2	2	4	3
	2	2	2	2	1	2	4	3
	2	2	2	2	1	2	3	2
	2	2	1	2	1	2	3	2
平均分数	2.0	2.2	1.8	2.0	1.4	2.0	3.8	2.8

[0185] 根据严重程度将苏木精-伊红 (HE) 染色的病变程度分为1至5分: 1=最小 (<1%); 2=轻微 (1-25%); 3=中等 (26-50%); 4=中度/重度 (51-75%); 5=严重/高 (76-100%)。

[0186] 引用的参考文献

[0187] 美国专利文件

[0188] 8,071,127 B2 12/2011 Cipolla等人

[0189] 8,119,156 B2 2/2012 Cipolla等人

[0190] 8,226,975 B2 7/2012 Weers

- [0191] 8,652,512 B2 2/2014 Schmehl等人
- [0192] 8,802,137 B2 8/2014 Boni等人
- [0193] 9,078,897 B1 7/2015 Cipolla等人
- [0194] 9,333,214 B2 5/2016 Gupta等人
- [0195] 9,408,836 B2 8/2016 Armendariz Borunda等人
- [0196] 9,545,401 B2 1/2017 Cipolla等人
- [0197] 外国专利文件
- [0198] EP 0223831 7/1992
- [0199] EP 0267050 9/1994
- [0200] EP 1438955 6/2006
- [0201] EP 1530466 12/2014
- [0202] EP 1658851 5/2006
- [0203] FP 2079443 8/2014
- [0204] EP 2363114 5/2015
- [0205] EP 2384751 9/2015
- [0206] WO WO 2015/106150 11/2016
- [0207] WO WO 2016/178064 11/2016
- [0208] 其他公开文件
- [0209] K.D.Kistler,L.Nalysnyk,P.Rotella,D.Esser.Lung transplantation in idiopathic pulmonary fibrosis:a systematic review of the literature.BMC Pulmonary Medicine.14:139(2014) .
- [0210] L.Nalysnyk,J.Cid-Ruzafa,P.Rotella,D.Esser.Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis:review of the literature.Eur Respir Rev.21 (126):355-361(2012) .
- [0211] European Medicines Agency,Committee for Medicinal Products,Ofev:EPAR-Public assessment report,EMA/76777/2015,Procedure No.EMA/H/C/003821/0000,20 November 2014.
- [0212] L.Richeldi et al.Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis.N Engl J Med 370(22):2071-2082(2014) .
- [0213] T.Corte et al.Safety,tolerability and appropriate use of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis.Respiratory Research 16:116(2015) .
- [0214] Center for Drug Evaluation and Research,Clinical Pharmacology Review, NDA #205832,505(b) (1)priority review.
- [0215] <http://www.rxlist.com/ofev-side-effects-drug-center.htm>
- [0216] <https://www.rxlist.com/esbriet-drug.htm>
- [0217] [https://www.healthandlife.com.tw/index.php?action=products\\_data&id=142&width=1280](https://www.healthandlife.com.tw/index.php?action=products_data&id=142&width=1280)
- [0218] L.Wollin,E.Wex,A.Pautsch,G.Schnapp,K.E.Hostettler,S.Stowasser, M.Kolb.Mode of action of nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary

fibrosis. *Eur Respir J*.1-12(2015).

[0219] J.S.Patton,P.R.Byron.Inhaling medicines:delivering drugs to the body through the lungs.*Nature Reviews Drug Discovery*.6:67-74(2007).

[0220] D.Zucker,D.Marcus,Y.Barenholz,A.Goldblum.Liposome drugs' loading efficiency:A working model based on loading conditions and drug's physicochemical properties.*Journal of Controlled Release*.139:73-80(2009).

[0221] O.O.Okusanya et al.Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of liposomal amikacin for inhalation in cystic fibrosis patients with chronic pseudomonal infection.*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.53(9):3847-3854(2009).

[0222] J.P.Clancy et al.Phase II studies of nebulised Arikace in CF patients with *Pseudomonas aeruginosa* infection.*Thorax*.68:818-825(2013).

[0223] D.Cipolla,J.Blanchard,I.Gonda.Development of liposomal ciprofloxacin to treat lung infections.*Pharmaceutics*.8:6(2016).

[0224] C.S.Schneider et al.Nanoparticles that do not adhere to mucus provide uniform and long-lasting drug delivery to airways following inhalation.*Sci.Adv*.3,e1601556(2017).

[0225] S.Anabousi et al.Effect of PEGylation on the stability of liposomes during nebulization and in lung surfactant.*Journal of Nanoscience and Nanotechnology*.6:3010-3016(2006).

[0226] P.Muralidharan,E.Mallory,M.Malapit,D.Hayes Jr,H.M.Mansour.Inhalable PEGylated phospholipid nanocarriers and PEGylated therapeutics for respiratory delivery as aerosolized colloidal dispersions and dry powder inhalers.*Pharmaceutics*.6:333-353(2014).

[0227] F.J.Bayard,W.Thielemans,D.I.Pritchard,S.W.Paine,S.S.Young,P.Backman et al.Polyethylene glycol-drug ester conjugates for prolonged retention of small inhaled drugs in the lung.*J Control Release:Off J Control Release Soc*.171:234-240(2013).

[0228] T.W.Shen et al.Distribution and cellular uptake of PEGylated polymeric particles in the lung towards cell-specific targeted delivery.*Pharm Res*.32(10):3248-3260(2015).

[0229] Y.S.Youn,M.J.Kwon,D.H.Na,S.Y.Chae,S.Lee,K.C.Lee.Improved intrapulmonary delivery of site-specific PEGylated salmon calcitonin: optimization by PEG size selection.*J Control Release:Off J Control Release Soc*.125:68-75(2008).

[0230] G.Rouser,S.Fkeischer,A.Yamamoto.Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots.*Lipids* 5:494-496(1970).

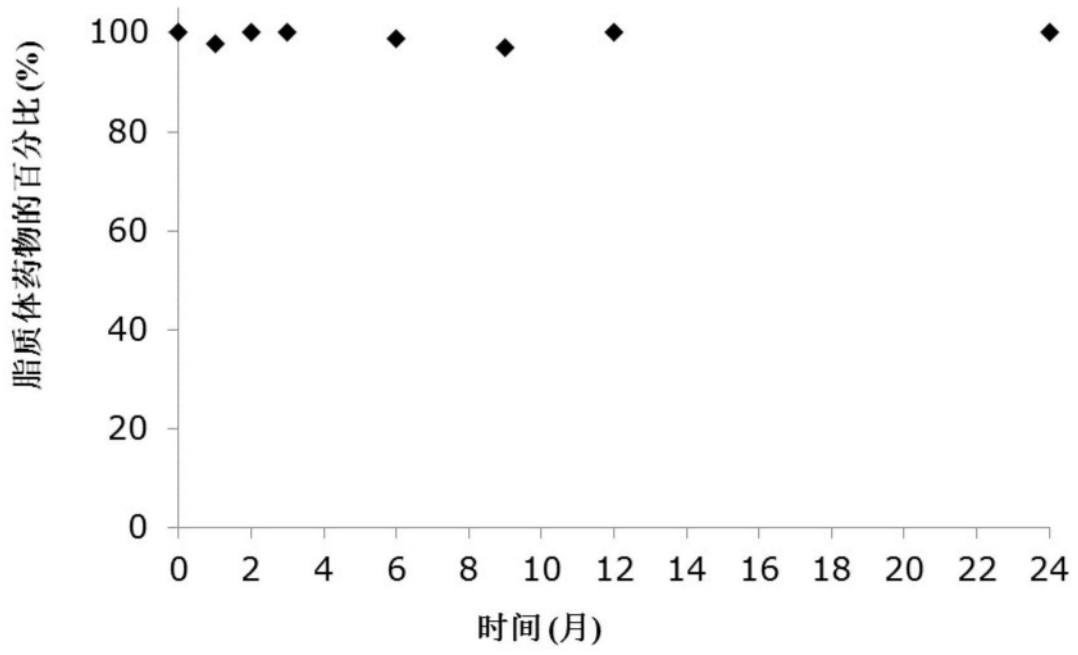


图1

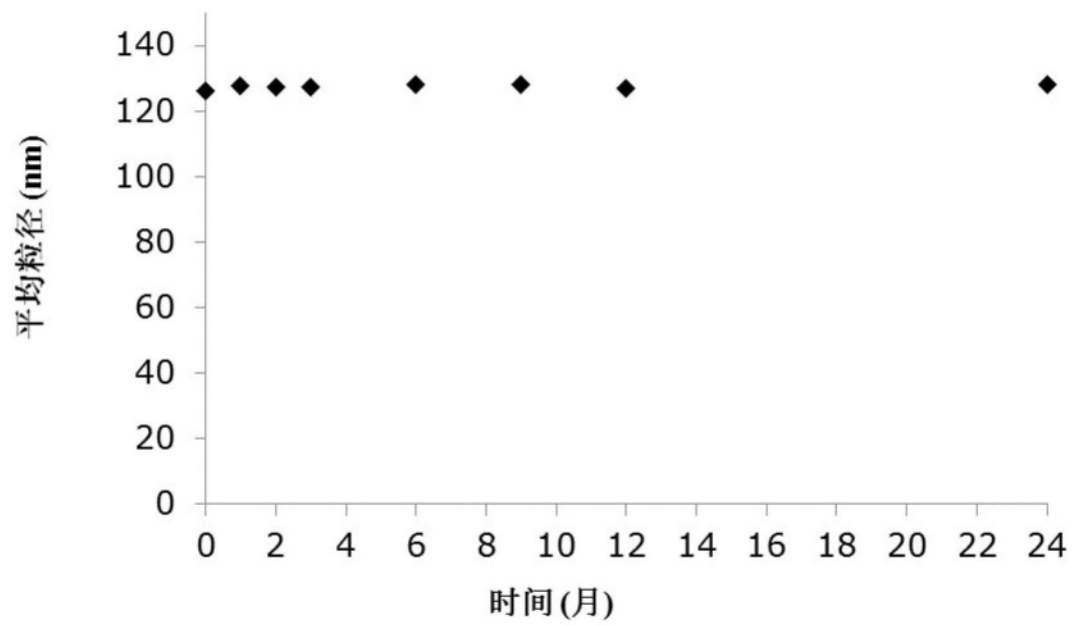


图2

在模拟肺液中的体外释放曲线

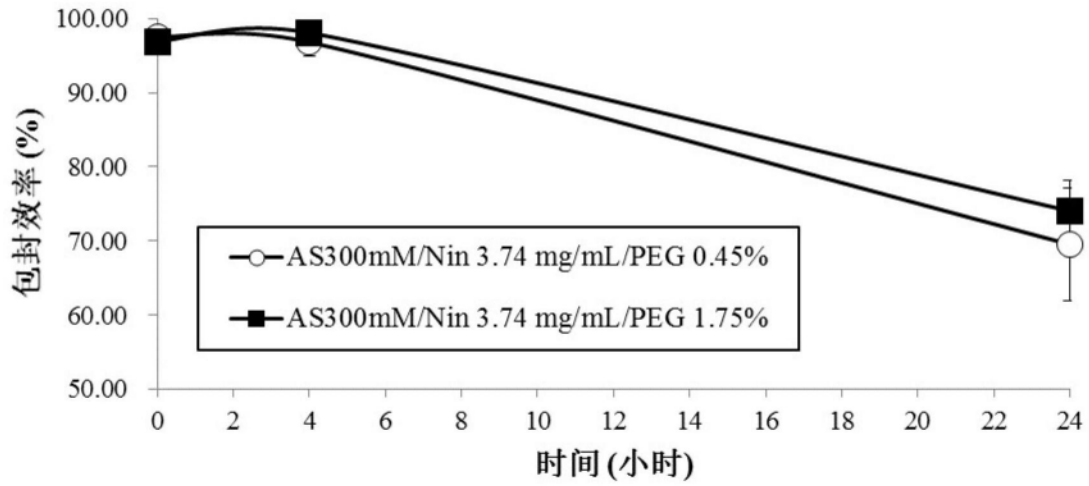


图3

在小鼠肺中的尼达尼布保留效率

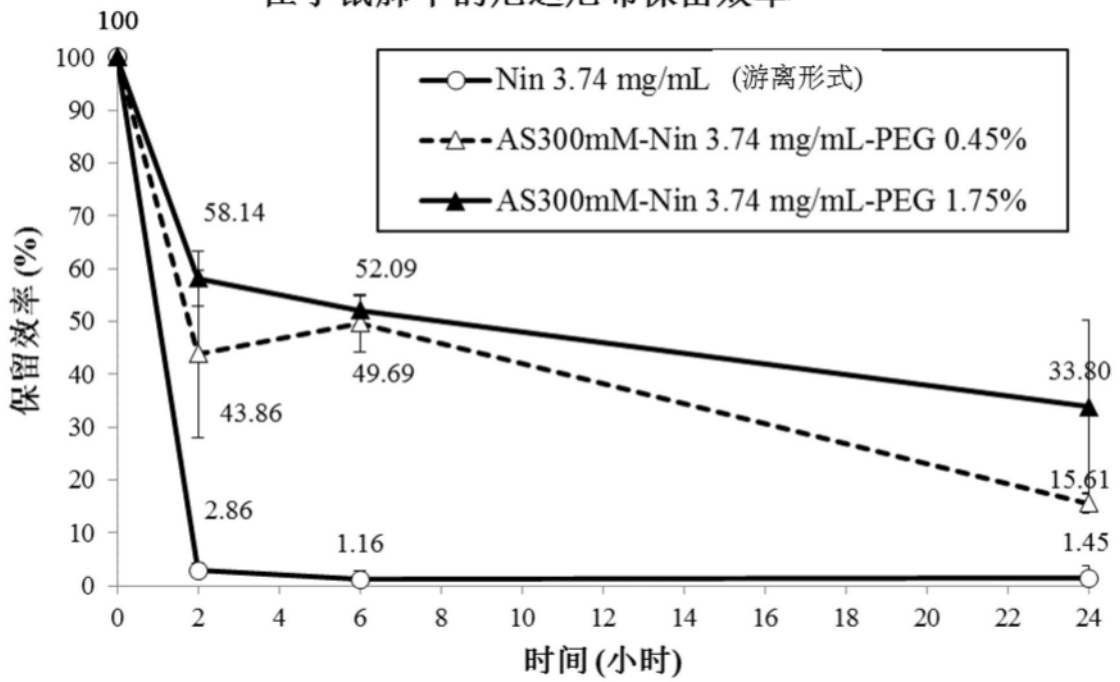


图4

在肺组织/特发性肺纤维化模型中的尼达尼布保留

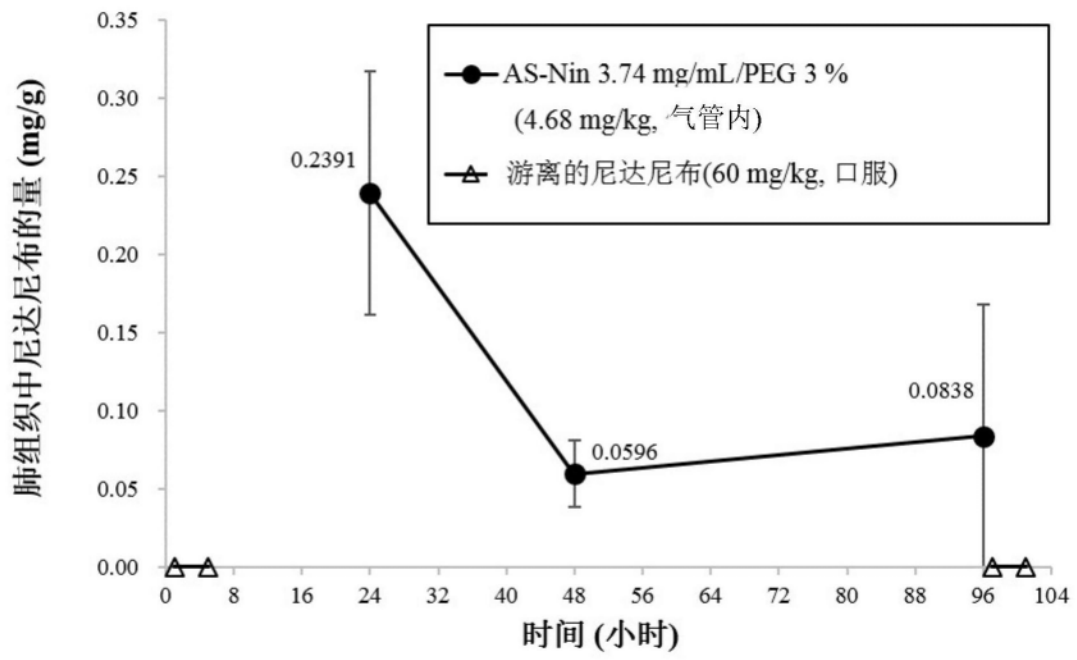


图5