



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03813743.7

[43] 公开日 2005 年 8 月 24 日

[11] 公开号 CN 1658845A

[22] 申请日 2003.6.11 [21] 申请号 03813743.7

[30] 优先权

[32] 2002. 6. 11 [33] FR [31] 0207175

[32] 2002. 9. 9 [33] US [31] 60/421,112

[86] 国际申请 PCT/IB2003/003213 2003.6.11

[87] 国际公布 WO2003/103822 英 2003.12.18

[85] 进入国家阶段日期 2004.12.13

[71] 申请人 爱的发制药集团

地址 法国乌丹

[72] 发明人 D·瓦罗 P·戴尔马

J-C·勒鲁

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 程 伟

权利要求书 7 页 说明书 44 页 附图 5 页

[54] 发明名称 隐形脂质纳米胶囊,其制备方法,及其作为活性成分载体的应用

[57] 摘要

本发明涉及主要由脂质核和外脂质膜构成的隐形脂质纳米胶囊,其中所述脂质核在室温为液态或半液态,而所述脂质膜包括至少一种实质上为脂质的亲水性表面活性剂、至少一种实质上为脂质的亲脂性表面活性剂和至少一种聚乙二醇的两亲衍生物,其中聚乙二醇组分的摩尔质量大于或等于 100g/mol,优选为大于或等于 2000g/mol,本发明还涉及所述胶囊的制备方法,及其作为活性成分载体的应用。

1. 主要由脂质核和外脂质膜构成的隐形脂质纳米胶囊，其中脂质核在室温为液态或半液态，而且脂质膜包括至少一种实质上为脂质的亲水性表面活性剂、至少一种实质上为脂质的亲脂性表面活性剂和至少一种聚乙二醇的两亲衍生物，其中的聚乙二醇组分摩尔质量大于或等于 1000g/mol。
5
2. 根据权利要求 1 所述的隐形脂质纳米胶囊，其中的聚乙二醇组分摩尔质量大于或等于 2000g/mol。
10
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的隐形脂质纳米胶囊，其中所述的亲脂性表面活性剂是卵磷脂，其磷脂酰胆碱比例至少等于 95%，优选高于 99%。
15
4. 根据权利要求 1 至 3 任一所述的隐形脂质纳米胶囊，其中所述的亲脂性表面活性剂具有至少等于 25°C 的凝胶/液态转换温度，优选高于 37°C。
- 20 5. 根据权利要求 1 至 4 任一所述的隐形脂质纳米胶囊，其中所述的亲脂性表面活性剂为含有至少 16 个碳原子的酰基链的磷脂。
6. 根据权利要求 5 所述的隐形脂质纳米胶囊，其中所述的亲脂性表面活性剂选自 HSPC（氢化大豆磷脂酰胆碱）、DSPC（二硬脂酰磷脂酰胆碱）和 DPPC（二棕榈酰磷脂酰胆碱）、及其混合物。
25
7. 根据权利要求 1 至 6 任一所述的隐形脂质纳米胶囊，其中所述的亲脂性表面活性剂占构成所述外脂质膜的分子的 5-30mol% 之间。
- 30 8. 根据权利要求 1 至 7 任一所述的隐形脂质纳米胶囊，其中所述的亲水性表面活性剂选自聚乙二醇烷基酯和聚乙二醇烷基醚，及其混合

物。

9. 根据权利要求 8 所述的隐形脂质纳米胶囊，其中所述的亲水性表面活性剂是含有 15 个聚乙二醇单元链的聚乙二醇-660 12-羟基硬脂酸类非离子表面活性剂。

10. 根据权利要求 1 至 9 任一所述的隐形脂质纳米胶囊，其中所述的亲水性表面活性剂在所述外脂质膜中占分子的 60 至 90mol%之间，优选 80mol%。

11. 根据权利要求 1 至 10 任一所述的隐形脂质纳米胶囊，其中所述的聚乙二醇的两亲衍生物包括可以粘附在所述外脂质膜里的疏水性成分和朝向所述外脂质膜，且在其表面提供亲水性质的聚乙二醇类的亲水性成分。

12. 根据权利要求 1 至 11 任一所述的隐形脂质纳米胶囊，其中所述的聚乙二醇的两亲衍生物选自可生物降解的磷脂质。

13. 根据权利要求 12 所述的隐形脂质纳米胶囊，其中所述可生物降解的磷脂质选自：

DPPE-PEG_x(二棕榈酰磷脂酰乙醇胺)、
DSPE-PEG_x (二硬脂酰磷脂酰乙醇胺)、
DOPE-PEG_x(二油酰基磷脂酰乙醇胺)，和
POPE-PEG_x (棕榈酰磷脂酰乙醇胺)，

其中 x 大于或等于 1000 g/mol，及其混合物。

14. 根据权利要求 13 所述的隐形脂质纳米胶囊，其中所述可生物降解的磷脂质选自 DSPE-PEG₂₀₀₀、DSPE-PEG₃₀₀₀ 和 DSPE-PEG₅₀₀₀，及其混合物。

15. 根据权利要求 1 至 14 任一所述的隐形脂质纳米胶囊，其中所述的聚乙二醇的两亲衍生物占构成所述外脂质膜的分子的 0.5 至

12mol%之间，优选 1 至 10mol%之间。

16. 根据权利要求 1 至 15 任一所述的隐形脂质纳米胶囊，其中所述主要的脂质核占所述纳米胶囊总重量的 20 至 60 重量%之间，优选为
5 所述纳米胶囊总重量的 25 至 50 重量%之间。
17. 根据权利要求 1 至 16 任一所述的隐形脂质纳米胶囊，其中所述主要的脂质核由脂肪酸酯和/或甘油三酸酯和/或油类，和/或其混合物组成。
- 10 18. 根据权利要求 17 所述的隐形脂质纳米胶囊，其中构成所述主要的脂质核的甘油三酸酯选自带有 6 至 14 个碳原子的中链甘油三酸酯、辛酸/癸酸甘油三酯、及其混合物。
- 15 19. 根据权利要求 17 所述的隐形脂质纳米胶囊，其中构成所述主要的脂质核的脂肪酸酯选自具有 8 至 18 个碳原子的中链脂肪酸酯。
- 20 20. 根据权利要求 19 所述的隐形脂质纳米胶囊，其中构成所述主要的脂质核的脂肪酸酯选自乙基棕榈酸酯、乙基油酸酯、乙基肉豆蔻酸酯、异丙基肉豆蔻酸酯、辛基月桂酰肉豆蔻酸酯、及其混合物。
21. 根据权利要求 1 至 20 任一所述的隐形脂质纳米胶囊，其直径在 50 至 150nm 之间，优选在 80 至 120nm 之间。
- 25 22. 根据权利要求 1 至 21 任一所述的隐形脂质纳米胶囊，其中所述外脂质膜的外表面是实质上亲水性的，主要的脂质核是实质上亲脂性的。
- 30 23. 根据权利要求 1 至 22 任一所述的隐形脂质纳米胶囊，在其表面上带有特定配体，该配体为其提供主动靶向带有接收这些配体的受体的细胞，尤其是肿瘤细胞的能力。

24. 根据权利要求 23 所述的隐形脂质纳米胶囊，其中所述配体选自糖类、低聚糖、维生素、低聚肽、抗体片段和单克隆抗体类型。
25. 根据权利要求 1 至 24 中任一所述的隐形脂质纳米胶囊，在其投药
5 到的宿主的血液区室中有至少 2 个小时的半衰期。
26. 根据权利要求 1 至 25 中任一所述的隐形脂质纳米胶囊，能够通过生物降解，尤其是通过酶消化快速释放其大多数内含物。
- 10 27. 根据权利要求 1 至 26 中任一所述的隐形脂质纳米胶囊，包含一种或多个活性成分。
28. 根据权利要求 27 所述的隐形脂质纳米胶囊，包含一种或多种实质上主要是亲脂性的抗癌活性成分。
- 15 29. 根据权利要求 28 所述的隐形脂质纳米胶囊，其中所述抗癌活性成分选自紫杉醇及其例如多烯紫杉醇的衍生物、喜树碱及其例如羟基喜树碱、拓朴替康、鲁比替康、白消安的衍生物、苯丁酸氮芥、酞菁素、类胡萝卜素和红必霉素。
- 20 30. 根据权利要求 27 所述的隐形脂质纳米胶囊，包含一种或多种实质上是两亲的抗癌活性成分。
31. 根据权利要求 30 所述的隐形脂质纳米胶囊，其中所述抗癌活性成分
25 选自阿糖胞苷、环磷酰胺、氨甲叶酸、如 5-氟二氧嘧啶或 5-氟尿嘧啶核苷的氟代衍生物和阿霉素。
32. 根据权利要求 27 所述的隐形脂质纳米胶囊，包含一种或多种选自
30 抗炎药、肾上腺皮质类脂醇、抗生素、镇痛剂和抗感染剂的活性成分。
33. 根据权利要求 32 所述的隐形脂质纳米胶囊，包含氟美松、茚甲新、

布洛芬、酮丙酸、酮康唑、前列腺素 E1 或两性霉素 B。

34. 一种制备根据权利要求 1 至 33 任一所述的纳米胶囊的方法，包括：
预先形成缺少聚乙二醇的两亲衍生物的纳米胶囊，随后向这些纳米
5 胶囊的表面后插入所述聚乙二醇的两亲衍生物。
35. 根据权利要求 34 所述的方法，其中所述预先形成的步骤包括：根
据温度升降的几个周期使油/水乳液相转换发生，合成缺少聚乙二醇
的两亲性衍生物的纳米胶囊。
- 10 36. 根据权利要求 34 所述的方法，其中所述后插入步骤包括：第一步
是在有聚乙二醇的两亲衍生物存在的情况下，预先形成纳米胶囊的
培养，其后第二步是获得的聚乙二醇的两亲性衍生物/预先形成的纳
米胶囊混合物急冷直至温度达 0 至 5°C 之间的“骤冷”步骤。
- 15 37. 根据权利要求 36 所述的方法，其中所述聚乙二醇的两亲衍生物/预
先形成的纳米胶囊混合物的培养步骤是在高于实质上是脂质的所
述亲脂性表面活性剂的凝胶/液态相转换温度，但低于聚乙二醇的两
亲衍生物/预先形成的纳米胶囊混合物的相转换温度的温度下进行
20 的。
38. 根据权利要求 34 至 37 任一所述的方法，其中所述纳米胶囊的直径
通过调节引入到后插入步骤中两亲衍生物的亲水链比例和长度来
进行调节。
- 25 39. 一种制备根据权利要求 1 至 33 任一所述的纳米胶囊的方法，其中
纳米胶囊的直径通过调节常规合成方法中初始混合物的亲水性表
面活性剂和盐的比例，以及亲脂性表面活性剂的纯度来进行调节
的。
- 30 40. 根据权利要求 34 至 39 任一所述的方法，其无需使用任何有机溶液，
并且只能使用可生物降解的已被证明可用于肠道外应用的化合物。

41. 根据权利要求 34 至 40 任一所述的方法，其中所述纳米胶囊通过直径为 $0.45\ \mu\text{m}$ 至 $0.22\ \mu\text{m}$ 的过滤器的消除过滤过程进行消除。
- 5 42. 根据权利要求 34 至 41 任一所述的方法，其中所述纳米胶囊经过干燥，然后临时重组来形成胶质悬浮体。
43. 包含根据权利要求 1 至 33 任一所述的脂质纳米胶囊的药物组合物。
- 10 44. 根据权利要求 43 所述的药物组合物，是以包含所述脂质纳米胶囊的胶质水悬浮体形式存在的。
45. 根据权利要求 27 至 31 任一所述的脂质纳米胶囊的应用，其用于制备治疗癌症，尤其是通过静脉给药治疗实体或循环系统肿瘤的药物。
- 15 46. 根据权利要求 45 的应用，其用于制备通过主动靶向来治疗循环系统或实体肿瘤的药物。
- 20 47. 根据权利要求 45 的应用，其用于制备由经过肿瘤毛细管时，所述纳米胶囊外渗之后的被动靶向来治疗实体肿瘤的药物。
48. 根据权利要求 32 或 33 所述的脂质纳米胶囊的应用，其用于制备治疗组织炎症和/或传染的药物。
- 25 49. 根据权利要求 45 至 48 任一所述的应用，其中药品要通过肠道外给药，或通过血管内、尤其是静脉内或动脉中、腹膜内、肌内、皮下或关节内注射到患者的血液循环中。
- 30 50. 根据权利要求 1 至 26 任一的所述脂质纳米胶囊的应用，其用于制备在中毒之后，吸收血液循环中疏水性分子的药物。

51. 根据权利要求 45 至 50 任一所述的应用，其特征在于减小了活性成分对健康组织的毒性。

隐形脂质纳米胶囊，其制备方法，及其作为活性成分载体的应用

5 本发明的目的涉及如下的纳米胶囊，其作为活性成分的载体能够用于实体癌性肿瘤或循环系统癌性肿瘤的治疗，显示出与溶液中游离药物相比较减少的毒性，显示出对其施加的宿主的免疫系统的隐形性质，而且不仅有进行外渗进入肿瘤的能力，还有在其中释放内含物的能力。有利地，根据本发明的这个新颖载体是脂质纳米胶囊的可注射
10 胶质悬浮体形式，该胶囊的表面上带有结合了聚乙二醇分子的磷脂分子。

本发明还涉及合成这些隐形脂质纳米胶囊的方法，尤其是将载有聚乙二醇基团的所述分子插入到预先形成的纳米胶囊的脂质膜的方法。最后，本发明同时涉及由所述载体能够得到的应用，该载体是用
15 于通过血液传输活性成分，尤其是用于治疗人类实体或循环系统肿瘤，还用于炎症或其他任何观察到的血管渗透性增加的病理情况（炎症区域、传染区域）的治疗。

本发明还涉及多种含有根据本发明的纳米胶囊的药物组合物。

首先，术语“载体”用于表示，例如，在其投药的机体中，可以
20 使分子，尤其是如药品的活性成分运输和传送的任何化学实体。

此外，术语“胶质”用于表示液相中元素分子小于 1 微米的固体元素的任何稳定分散体。

术语“隐形”用来描述根据本发明的载体来表示纳米胶囊的能力，该能力为不会被其投药的宿主的免疫系统发觉及随后的螯合和/或降解，或几乎不被察觉及随后的螯合和/或降解，和/或被察觉及随后稍晚
25 的螯合和/或降解。

术语“外渗”用来表示物体从血液区室出来的出口。这个出口通过切向对向毛细血管轴的孔或“穿孔”出现的。这个现象只能从特定器官，例如肾或肝的有孔的毛细管，尤其是脑外的实体肿瘤和其血管
30 显示增长的渗透性的发炎或传染组织中观察出来。

术语“纳米胶囊”用于描述直径小于 300nm 的小球，其包括在室

温下在一定程度上刚性的环壁以及中心组分或核，在本发明中，所述核包含脂肪物质。

术语“两亲”用来描述带有对本质上为疏水性的物质有亲和力的基团且对本质上为亲水性的物质有亲和力的基团的分子。

5 最后“mol%”表示摩尔百分比，术语“活性成分”表示药物活性成分。

本发明目的的隐形脂质纳米胶囊主要由脂质核和外脂质膜组成，其中脂质核在室温为液态或半液态，脂质膜包括至少一种实质上为脂质的亲水性表面活性剂、至少一种实质上为脂质的亲脂性表面活性剂
10 和至少一种聚乙二醇的两亲衍生物，其中的聚乙二醇组分摩尔质量大于或等于 1000g/mol，优选为大于或等于 2000 g/mol。

“聚乙二醇化 (pegylated)”两亲衍生物有助于给纳米胶囊带来隐形性质。有利地，纳米胶囊的核可以使多数分子，尤为特别的是实质上为亲脂性的活性成分，如以溶解或分散状态传送的抗癌药物结合和
15 传输。从而，根据本发明的纳米胶囊具有在一段持续的时间周期，在血液系统，尤为特别的是在间质性介质缘的肿瘤中携带抗癌药物的能力。此外，根据本发明的纳米胶囊有足够长的血液循环时间，以使其与循环系统肿瘤细胞进行反应，以及在实体肿瘤中进行更多外渗。

“实体”肿瘤由被血液循环灌流的实体块或组织中组织起来的肿瘤细胞构成。带孔毛细管的网状结构灌流许多肿瘤。因而这些毛细管
20 有多种类型的孔，依据孔的大小，可以使实体元素通过血液区室。在肿瘤脉管基膜的皮下细胞之间的穿孔大小是从一个到另一个肿瘤变化的。但是，尺寸小于 300nm 的胶质粒子能够在许多肿瘤中进行外渗。此外，由于肿瘤的差的淋巴引流，胶体粒子到肿瘤的间质性介质的渗透渗透作用与增强的停滞效应结合。这个叫作 EPR (增强渗透性和停滞效应) 的双重现象可能实现以胶质载体系统为基础的抗肿瘤治疗的发展。尤其是，相对于从健康组织中观察到的，EPR 可以使肿瘤周围的胶质粒子和微分子有较长的持续累积。

因此，为了形成想要传输活性成分的胶质载体来开发了 EPR 现象。
30 然而，为了使其真实活性，这样的载体在被宿主免疫系统发现及摧毁前，必须在血液区室中循环足够长的时间。因此，免疫系统的特定效

应物，尤其是巨噬细胞会快速发现非隐形的胶质物体，使其不能以足够的活性量到达肿瘤。

事实上，巨噬细胞是构成免疫系统最重要成分之一，并且在从血液循环中去除包括脂质体和其他胶质粒子的外来粒子中起主导作用。

5 公认为用于表示此组循环和沉积的单核细胞，其构成涉及捕获纳米粒子的非特异性预防系统的表述为“单核-巨噬细胞系统”（MPS）是为了。

在分子层面，注射后粒子的清除分两步：在粒子表面，血清蛋白（或“调理素”）沉积的调理素作用，其后是由巨噬细胞识别和捕获调
10 理后的粒子。

带有亲水性和弹性聚合物，通常是聚乙二醇类的纳米粒子表面的修改使其得到空间保护来阻止调理素到达粒子表面，并且通过 MPS 细胞使其消除作用产生。依据链的长度及其密度给予隐形性质的高分子链的活性性。因此，莫里等人（FEBS Lett., 284:263,1991）进行了磷
15 脂的对比研究，该磷脂含有在 200nm 脂质体表面存在的 PEG750, 2000 和 5000g/mol 的链。在相同的摩尔百分比下，证明 PEG750 在体外在给予对抗调理素作用的空间保护方面完全无效。另一方面，最长的 PEG 链显示出对抗调理素作用的活性性，该性质与其链长有关。这个体外的行为是与在对大鼠进行静脉内注射之后的脂质体的半衰期有关联
20 的，其是：PEG750, PEG2000 和 PEG3000 分别为小于 30 分钟，大约 2 个小时和大于 3 个小时。

其他的研究（Allen 等人，BBA, 1066:29,1991）说明：在 1000g/mol 以下，即使在纳米粒子表面，聚乙二醇链是饱和浓度，也不可以使其具有足够的空间保护，及因此的隐形性质。

25 想要传输抗癌活性成分的隐形载体的设计不仅可能增加其治疗效果，从而还能确定在调理素作用现象和免疫系统方面的特定不可见性。此外，其血液半衰期的该增长（隐形效果的结果）还可以用来减少携带的活性成分的毒性，该活性成分将主要在肿瘤的间质组织中释放，在健康组织中的扩散非常有限。

30 事实上，通常抗癌活性成分是尺寸小且尤为明显的在分裂细胞上显示高细胞毒性的分子。此外，其活性治疗浓度有时与血浆浓度区别

不大，在该浓度下，变为对活性进行投药的机体有毒的。这种狭窄浓度界(narrow concentration window)需要使用载体以进行所述化合物的投药。隐形载体的使用可以使其在肿瘤间质组织里累积，并且在其中释放其活性物。由于累积作用，活性成分的肿瘤内浓度非常高，比使用常规载体和单独使用活性成分的浓度高很多（Allen, Trends, Pharm. Sci., 15:215, 1994）。因此，隐形胶质系统有可能使用更多剂量的抗癌药物，比起那些由于其高毒性而有可能单独使用活性成分投药的要好得多。

纳米粒子在肿瘤中的累积及其导致的治疗效果取决于其从血液循环消除的半衰期。因此，常规类型或显示持续循环的调理素的不同配方通过其血液消除图和其在大鼠内肿瘤的累积的主要成分来进行比较（Gabizon A. and Papahadjopoulos D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:6949, 1988）。从而 24 小时后，半衰期为大约 8 小时的隐形配方在肿瘤内显示高于注射剂量 10% 的累积物。半衰期为稍微小于 1 小时的对比配方在肿瘤内显示的累积物比从隐形配方中观察到的要低得多。具体来说，24 小时时，对比配方的肿瘤内浓度仅显示为隐形配方的肿瘤中测定的数量的 4-16%。这些结果说明半衰期为 1 小时或少于 1 小时的配方在肿瘤中的累积很差。

如脂质体或纳米粒子，即由在悬浮液中直径在 25nm 到 1 μ m 之间的粒子构成的胶质系统，导致各种胶质药物形式的发展和商品化。

因此，专利 US5,811,119 描述了脂质体用于从类胡萝卜素衍生出来的抗癌药物产品的使用。所述脂质体配方尤其可能减少活性成分的体内毒性。其中将要用于治疗肿瘤类胡萝卜素与脂质体中可以使其加载的夹层促进剂结合。由于如甘油三酸酯的两亲化合物的存在，亲脂性活性成分在其核实质上是疏水性的脂质体中的传输是可能的。这些“夹层促进剂”有可能在 10mol 甘油三酸酯:1mol 类胡萝卜素的比例下传输类胡萝卜素。

这样的载体有可能实现在减少其细胞毒性的同时传输抗癌药物，但是却有低的密封率，并且此外，其对肿瘤既没有精确的靶向性，在血液区室中又没有增长的载体半衰期。尤其地，特别由于循环系统酶会对其快速降解，脂质体系统的主要缺点是在血液循环中比较差的稳

定性。

文献 US5,527,528 描述了修改后的脂质体对携带和使用抗癌药品的使用。所述脂质体大小在 50 到 120nm 之间，包含如阿糖胞苷的抗肿瘤化合物和在其表面有足够浓度的聚乙二醇分子链，该链较大地增加其投药到的宿主的血液区室里的循环时间。此外，这些脂质体还可以在其表面携带对某一肿瘤抗原特定的抗体来促使对抗肿瘤的脂质体的活性靶向性。

这些文献公开了提供血液循环中活性成分的持续传输和抵抗指向其的肿瘤类型的特定靶向性的载体。

但是，这类载体有一个主要缺点。具体来说，其尤其有利于实质上是亲水性的抗癌药物，如阿糖胞苷或庆大霉素。而且，亲脂性活性成分，例如，尤其是如道诺霉素的抗癌药物的传输受到限制。这些化合物通过结合传送到脂质体的双磷脂层。因此，由于大量脂质体核不能用于传送，所以其保持低的结合量。由于水区室体积和亲脂性区室体积的差的比率，这个系统的主要缺点显示在对亲脂性药品有限的结合能力方面。

另外，活性成分的膜结合将取决于它们在磷脂双层的脂质环境里的溶解程度。在给定的双层内，其成分，在这里也就是磷脂的选择决定的亲脂性是很难调整的。因此，关于活性成分的溶脂性方面，这类载体不能调节传输介质的 HLB*（亲水亲脂平衡），其中活性成分易于和根据本发明的纳米胶囊核一起传输，以向核组分的选择提供更多易变性。所以结合量取决于活性成分在脂质体膜内的溶解程度。因而，对于所有由脂质双层组合物（Lasic, Trends Biotechnol. 16:307, 1998）制成的脂质，通常脂质体不能将大于 5mol%（绝大多数通常为 1-2%）的疏水性活性成分结合到其膜上。

*HLB 指数，或亲水/亲脂平衡如 C.Larpent 在出版物“Technique de l'ingenieur”的论文 K.342 中所定义。

以 Doxil[®]出售且希望传输阿霉素的脂质体还有在血液区室里显示出特定隐形性质的目的。在这些脂质体的表面，脂质体拥有插入到磷脂双层的 PEG 分子，因此提供了对肿瘤的被动靶向性。

通过来自当阿霉素分散到水质核心中产生的络合作用的“活性加

载”机理，活性成分“加载”到脂质体上。pH 梯度使得阿霉素进入到脂质体中，在其中活性成分将转换成胶质形式。这个填充机理可以获得高的活性成分加载量。

但是，这个机理只能用于特定的活性成分，该活性成分是实质上两亲和可电离的，能够易于穿过脂质双层（因而是小分子）分散，并且有沉淀或络合性能，例如阿霉素或米托蒽醌，以及该机理不适用于大多数的抗癌药物。不能受益于该机理的活性成分显示出低的加载量，并且需要随后的柱分离和活性成分循环的步骤。

另外，作为活性成分载体的脂质体的使用有其他的缺点。尤其是，因为可由该膜到达的曲率半径极限值，磷脂双层的存在物理上限制了获得的脂质体的大小，使其很难接近 50nm。

因此，脂质体载体的使用暗示了必然的主要缺点，尤其是，不仅是在其传输的几种抗癌药物物质的能力方面，还有关于其使用和储存的容易程度。

具体来说，当胶质溶液重新形成时，在不失去其结构性质和传输能力的情况下，这样的脂质体载体不可能易于进行冻干。结果是，脂质体悬浮液可能显示出非常不好的稳定性和相对短的保存时间。

为了想要克服这些限制这类载体有效性的缺点，开始研发非脂质体胶质载体。事实上，在亲脂性活性成分，尤其是抗癌药物的传输方面，以高分子为基础的微胶粒对于脂质体提供了一个很好的选择。

因此，文献 No.WO02/00194 描述了以高分子为基础的微胶粒形式的胶质载体。该载体尤其可以对如类胡萝卜素或甲氨喋呤的活性成分进行传送和运输。所述载体包含疏水性中心成分，和实质上为亲水性的外“壳”，其中的中心成分可以进入到能被插入的亲脂性抗癌药物。事实上，这些微胶粒对应于双嵌段聚合物的集合，该聚合物包含一半以聚乙烯吡咯烷三酮为基础的亲水部分和一半由聚乳酸构成的疏水性部分。疏水性中心成分对应于组成这些微胶粒的聚合物分子的疏水性中心成分的整合。除了传输疏水性分子的能力之外，这些载体还可能提供非常小尺寸的粒子，尤其是尺寸小于 100nm 的脂质体的情况下很难得到的粒子。

为了达到在持续时间里，在血液中运送活性成分（Stolnik 等人，

J. Drug Target., 9:361, 2001) 的目的, 其他类型的聚合物微胶粒还在研发中。这类载体也有双嵌段聚合物类的结构, 其疏水成分是由聚乳酸 (PLA) 构成以及其亲水成分是以 PEG 存在的。依赖于每段的长度, 获得的 PLA-PEG 微胶粒有不同的尺寸, 比较普遍的是 75nm 的。通过对大鼠进行这些微胶粒的静脉注射显示出消除半衰期在 1 到 2 小时之间的隐形性质; 在 3 小时之后仍有 25% 的注射剂留在血液中。

另一方面, 微胶粒基础的载体有在机体内不稳定, 以及一旦稀释就快速游离的缺点。事实上, 微胶粒的稳定性取决于临界微胶粒浓度 (CMC), 低于该浓度时, 形成的聚合物分子进行分解。这个相对稳定性使微胶粒用于抗癌物质的治疗传输方面的工业使用性不够好。

因此, 为了克服存在的胶质系统的稳定性和/或传输实质上为亲脂性的分子的差的有效性, 仍在研发除脂质体以外的以其他纳米粒子为基础的载体。

从而, 专利 WO01/64328 描述了含有刚性脂质表面和液态或半液态的核的脂质纳米胶囊, 其核是由脂肪酸或甘油三酸酯的酯组成的。这些纳米胶囊的刚性表面的一部分是由对应几种卵磷脂混合物的 Lipoid® S 75-3 和 Solutol® HS 15 组成的。这类载体有可能实现疏水活性成分, 尤其是抗癌药物的传输。在这样的纳米粒子中, 亲脂活性成分以溶解形式存在于核里, 作为选择的活性成分的脂溶性的函数, 其组合物可以通过修改来调节 HLB。根据专利 WO01/64328 的脂质纳米胶囊具有对体内血液中的性能评估的目的, 该评估是在通过静脉内注射到大鼠体内之后进行的 (Cahouet 等人., Int. J. Pharm. 242:367 2002)。构成这些纳米粒子表面的 Solutol® HS 15 为疏水组分和 660g/mol, 突出在外表的聚乙二醇短链组成的分子。如上所述, 甚至在高密度下仍然很短的 PEG 链不能足够有效的为纳米粒子提供抵抗调理素作用的空间保护, 以及由此产生的隐形性质。因此, 这些脂质纳米胶囊的半衰期很短, 只有大约 45 分钟。但是, 这些脂质纳米胶囊比起如单独的放射性标记的小分子能循环更长的时间。因而根据专利 WO01/64328 的脂质纳米胶囊的半衰期不足以使其循环所需的持续的时间段, 如先前所述的, 该时间段是为了能够在 (除肝和脾以外的机体内的) 肿瘤内累积。

这次，其他类型的脂质纳米胶囊在 Mosqueira 等人(Pharm. Res., 18:1411, 2001)中产生并描述，该类型能够在大鼠体内显示出特定的长循环时间且希望传输活性成分。这样的脂质纳米胶囊具有核和高分子的刚性外层，其核是由可以溶解并传输亲脂活性成分，尤其是抗癌药物的脂肪物质组成，其外层上接合 PEG 链且提供给他们一些对免疫系统的隐形性质。

这些直径大约为 200nm 的纳米胶囊显示出比缺少所述表面分子的同相纳米粒子长很多的血液循环时间。但是，这样的结果是从小鼠体内获得的，其免疫系统有调节素作用的能力，但该调节素作用小于如在大鼠或人体内观察到的。所以，在调节素作用能力方面，对大鼠或人类的免疫系统，不可能由逃避小鼠免疫系统的相对的有效性推断出更有力的结果(Liu D. 等人, BBA, 1240:277, 1995)。

另外，其相对大的直径不会使其在大多数的实体肿瘤中易于进行外渗。因此，即使在血液区室里的滞留时间增长，肿瘤的靶向性还是很低，其限制了所有更好的治疗活性性。

由制作 PLA-PEG 的双嵌段结构聚合物构成的，在大鼠体内显示出隐形性质，并且半衰期为 6 小时的纳米球还在进行发展(Verrecchia 等人, J. Control. Rel. 36:49, 1995)。高分子疏水成分是由 30000g/mol 的 PLA 构成，亲水链是由 2000g/mol 的 PEG 组成的。这些纳米粒子有相对不利于补体激活的表面，其结果是降低了调理素作用现象和由 MPS 细胞导致的噬菌作用。

但是，这类以 PLA 类型的实体聚合物为基础的纳米粒子的主要缺点是：一旦在肿瘤细胞的凝块的周围面积中，其快速释放活性成分的能力很差。特别地，这些纳米粒子的刚性外层是由 PLA 组成的，而且由于水解引起的降解相对很慢。弱的生物侵蚀暗示包含在这些纳米胶囊里的活性成分释放很慢。目前，这样的抗癌载体的治疗活性性首先来自其躲避免疫系统的能力，其次来自快速释放的能力，即 24 小时内，在肿瘤周围面积里的含量。此刻，由 Mosqueira 或 Verrecchia 描述的纳米粒子在生物体内滞留 24 小时之后，实际上不再降解，其不可能实现

实体肿瘤的最佳治疗。

因此，本发明提供一种用于活性成分的新颖载体，其可能避免从脂质体载体中观察出来的大多数缺点，并且与存在的非脂质体胶质载体相比较，能够改善将活性成分靶向性和释放的有效性。

5 本发明的目的还在于提供了一种用于活性成分的新颖类型隐形载体，通过增加其治疗指数，提供给癌症，尤其是实体或循环系统肿瘤更有效的治疗。

治疗指数是产生不希望效果的药物剂量与导致希望效果的剂量的比率。

10 鉴于由于药品是形成胶囊而不是在溶液中而减少的毒性、长的循环性质和肿瘤靶向能力，根据本发明的纳米胶囊提供了具有改善的治疗指数的药品。事实上，将活性成分封装在胶质药物载体里来减少其体内分布容积。这个药物动力学描述上的转变带来增长的效力和/或减少的毒性，并且提供比较多的药物使用量。

15 具体来说，由于根据本发明的纳米胶囊的大小和隐形性质使得这些纳米胶囊可以通过外渗现象接近和渗透这些肿瘤，作为用于活性成分载体的根据本发明的纳米胶囊可能用于实体肿瘤的治疗。本试验中，也就是肿瘤的被动靶向性。因此，对申请人有利的是，能够设计出由隐形脂质纳米粒子组成的载体，该粒子可以对要瞄准的肿瘤进行被动
20 靶向。

另外，作为用于活性成分载体的根据本发明的纳米胶囊可以通过主动靶向现象用于循环系统肿瘤的治疗。这种主动靶向是通过向所述纳米胶囊、分子或特定用于某种循环系统肿瘤表面分子的“配体”进行附着产生的。有利地，这种表面分子的附着是在通过其后描述的后
25 插入合成纳米胶囊方法中完成的。通常，作为用于活性成分载体的根据本发明的纳米胶囊可以通过有能够被配体识别的接受器的主动靶向或被动靶向（没有接受器的加入）用于实质上为实体或循环系统肿瘤的治疗。

30 作为用于活性成分载体的根据本发明的纳米胶囊还显示活性成分在肿瘤邻近环境中快速地，并且因而更有效地释放。所述纳米胶囊组分的快速生物吸收提供这样快速地释放，尤其是由于在机体内存在的

酶的作用。

尤其是通过酶消化的生物降解的特征是本发明的另一个优点，其可能改善通过这个方法投药的活性成分的治疗有效性。根据本发明的载体还显示有利的对免疫系统的隐形性质和结合了完全没有毒性的完整的生物降解能力。事实上，根据本发明的载体的所有组分为可生物降解且能够在机体内快速吸收，是用于肠道外使用的证明的目的，而且是在没有任何有机溶剂的情况下配制的。因此，纳米胶囊的这个“内在”毒性是非常低或根本不存在的。

另外，根据本发明的纳米胶囊能够携带相对高含量的潜在有毒的活性成分（例如抗癌药物）通过机体，该过程与溶液中游离的药物相比较，显示出减少的毒性。

本发明的这个方面在说明书的 F) 部分，实施例 10，和图 7（三次多烯紫杉醇静脉注射后，小鼠相对平均体重的发展）和图 8（给小鼠使用不同配方的多烯紫杉醇，体重下降 15% 的平均天数）中显示出来。

因此，与携带潜在有毒物质时其减少的毒性相结合，其非常低的内在毒性可以使根据本发明的纳米胶囊成为哺乳动物体内非常安全的抗癌药物的载体。

根据本发明的新颖隐形胶质载体还有的优点是：当其以悬浮液的形式重新合成时，在不会失去其性质的情况下，易于冻干和消除。

这个载体还有可能通过血管线路给药实现组织炎症的治疗。

有利地，根据本发明的脂质纳米胶囊的直径在 50 到 150nm 之间，优选在 80 到 120nm 之间。

所述纳米胶囊的大小对肿瘤抗癌药物的被动靶向性起作用。具体来说，在肿瘤中观察到的 EPR 效果可以使通道进入到并保持在血液中共存的实体肿瘤分子周围的间隙介质内，实体肿瘤分子的直径要足够小来实现这个外渗。根据本发明的纳米胶囊是通过使用有利地可能调节其分子大小的方法制备的。另外，纳米胶囊显示出长的循环性质，该循环能够提供给纳米胶囊在血液区室里长于 2 小时的半衰期。有利地，通过增加由肿瘤毛细血管孔的附近里的纳米胶囊产生的通道数量，这两个特征有可能促进外渗现象。

该外渗现象显示在 G 部分的实施例 11（还可以参看图 9 和 10），

其中在肿瘤里的纳米胶囊加载放射性同位素示踪的多烯紫杉醇的累积对于隐形纳米胶囊(S-LN)显示出比对于非聚乙二醇化纳米肿瘤(LN)更为重要。

根据本发明的纳米胶囊的隐形性质还有促进与血液循环中存在的恶性肿瘤细胞,尤其是循环系统肿瘤接触的能力。

外渗对应于切向过滤现象,其意思是孔直径为200nm的肿瘤将可以使相同直径的循环物通过,虽然很难。另外,根据本发明的纳米胶囊的大小可以使其避免由肝细胞层外渗引起的捕获。事实上,肝的窦状隙毛细血管孔可使大约50nm的粒子的外渗。最后,所述纳米胶囊的大小必须小于200nm以避免由于粒子大小超过这个尺寸而在脾里观察到的过滤现象。因此,限定尺寸的纳米胶囊既是造成由EPR促进的被动靶向性现象的原因,也是所述纳米胶囊存留在血液循环里以使其能够避免过滤和肝外渗现象的时间增长的原因。

纳米胶囊的直径可以作为要治疗的肿瘤类型的函数来进行调整,并且可以适当地稍微小于或大于上述范围。

事实上,纳米胶囊的大小必须调整到将要摧毁的肿瘤的孔的大小,这个大小有可能根据相同肿瘤空间里肿瘤的熟化度而随着时间变化。结果是,如果根据本发明的纳米胶囊的大小能够精确调整,那么根据本发明的载体的被动靶向性能最适合在治疗标准中实现。目前,有利地,申请人研发出精确合成可变化和可控制的隐形纳米胶囊的方法。因此,现有载体具有适于肿瘤环境的能力以使其更有效。

根据本发明的纳米胶囊的外脂质膜包括实质上为脂质的亲脂性表面活性剂。有利地,该表面活性剂是卵磷脂的形式,其磷脂酰胆碱的比例至少等于95%,优选高于99%。

申请人注意到在大鼠体内含有高于95%的磷脂酰胆碱含量的纳米胶囊的成分有可能较大地增长血液循环中的循环时间。因此,例如其他磷脂,如磷脂酰乙醇胺、溶血磷脂或游离脂肪酸的杂质可以促进增加这些纳米胶囊的调理素作用现象。另外,申请人还注意到:当亲脂性表面活性剂显示最初卵磷脂含量高于95%时,偶联PEG分子的脂质分子的插入量更好。

因此,观察到的根据本发明的纳米胶囊的长循环时间可能是因为

这些纳米胶囊的外表面含有以卵磷脂为基础的实际上纯的磷脂，其能够限制调理素作用。根据卵磷脂的纯度级对避免调理素作用的机理起作用。

有利地，实质上为脂质的亲脂性表面活性剂显示制作上述外脂质膜
5 膜的脂质分子的 5 到 30mol%的摩尔百分比。

优选地，这个表面活性剂有高于 25°C，优选高于 37°C 的从凝胶转化到液相的转化温度；意思是：在室温下，所述表面活性剂是凝胶形式，并且只能在高于 25°C，优选高于 37°C 的温度下转化为液体形式。凝胶/液体转化温度对所述纳米胶囊的外脂质膜的刚性起作用。无论纳
10 米胶囊是以悬浮液在水溶液中，还是投药到血液区室中，外膜的刚性在水性介质里提供给根据本发明的纳米胶囊相当重要的物理化学稳定性。事实上，所述外膜的刚性给予纳米胶囊内聚力使其可以抵抗如 pH 值变化或注射期间发生的渗透压的环境改变。

有利地，亲脂性表面活性剂是带有饱和碳基链的磷脂，优选双链，
15 每一个链包括至少 16 碳原子。作为其结果，磷脂优选自 C₁₆-C₁₈ DSPC（二硬脂酰磷脂酰胆碱）和 C₁₆-C₁₈ DPPC（二棕榈酰磷脂酰胆碱）。优选地，HSPC 可以作为高于 99%纯度级来使用以致于获得更好的刚性和更好的隐形性质。后一化合物是以 Doxil[®]来出售的可注射脂质体配方的组合物的一部分。

另外，所述外脂质膜含有优选证明用于肠道外注射的实质上为脂
20 质的亲水性表面活性剂。有利地，该亲水性表面活性剂选自聚乙二醇甲酯和聚乙二醇甲醚，及其混合物。

该亲水性表面活性剂优选为占构成外脂质膜的脂质分子的 60 到
25 90mol%之间。使用该表面活性剂的优选摩尔比例大约为构成外脂质膜的脂质分子的 80mol%。

和亲脂性表面活性剂一起的亲水性表面活性剂用于形成需要制备
根据本发明的纳米胶囊的油/水乳液。事实上，其保证了在合成所述纳
米胶囊的方法中由甘油三酸酯混合物形成的脂肪粒的稳定性。另外，
该表面活性剂还确保了所述外脂质膜的内聚力。在所述纳米胶囊膜中，
30 相对高比例的亲水性表面活性剂有可能得到低的界面间张力的情况下，有可能制备纳米胶囊，其中亲水性表面活性剂的比例越高，直径

越小。

优选地，将使用以下名称出售的非离子表面活性剂：Solutol[®] HS15(BASF), Brij[®] (Uniquema)或 Mapeg[®] (BASF)。优选使用 Solutol[®] HS15，其对应于聚乙二醇-660 12-羟基硬脂酸类，其包含对应于
5 660g/mol 分子重量的 15 个单元的乙二醇短链。该表面活性剂被证明有利地用于肠道外使用，并且更特别地用于静脉给药；另外，在内聚力方面也得到很好的结果。

最后，所述外脂质膜包含为所述纳米胶囊有效提供长的循环时间的 PEG 的两亲衍生物。特别地，PEG 的两亲衍生物有可能同时减少纳
10 米胶囊的调理素作用现象，改善胶质溶液的稳定性和延长这些纳米胶囊在血液循环中的滞留时间。

有利地，PEG 的两亲衍生物包含可以使其在所述外脂质膜中粘附的疏水性成分和朝向所述脂质纳米胶囊的外部并在其表面提供亲水性
能的 PEG 类型成分。

PEG 的两亲衍生物通过其疏水端插入到所述纳米胶囊的外膜中。
其后，PEG 成分朝向所述纳米胶囊的外部，并且在每一个纳米胶囊的
周围形成保护性的亲水壳。疏水端可以粘附在外膜表面。该粘附由较
低能量键能提供，该键是将聚乙二醇化脂质的疏水性成分连接到所述
脂质膜表面上存在的那些表面活性剂的键。具体来说，根据本发明的
20 纳米胶囊的外脂质膜的内聚力来自施加在疏水性基团之间，特别是构成该膜的链上甲基之间的范德华力。当纳米胶囊进入血液区室内，这些低能量键有可能同时在膜组分之间保持足够内聚力来避免根据本发明的纳米胶囊的快速降解，而是给予它们足够的脆性确保快速地生物降解，和因而的由传输的活性成分释放的治疗有效性。

事实上，不同于如 Mosqueira 描述的由 PLA（聚乳酸）或 PLAGA
（聚乳—共—乙二醇酸）类的高分子链组成纳米胶囊表面，且其中所
述高分子链在生理情况下的任何温度中为固体形式，构成根据本发明的
纳米胶囊膜的脂肪链不会以共价键彼此相连，因此，更容易分解。
具体地，生物侵蚀是其表面现象，该现象是结合了局部的 pH 情况和水的
30 的存在下的酶破坏或自然生物降解（或生物回吸）的结果。该侵蚀是造成磷脂损失的原因，该磷脂在纳米胶囊表面来促使活性成分的引出。

基于 PLA 或 PLAGA 的纳米胶囊的高分子链很长（由 Mosqueira 描述的纳米胶囊为 45000g/mol），且构成刚性且光滑的厚表面。所以其生物降解减慢。因此，对于完成基于 PLA 或 PLAGA 的纳米胶囊生物降解，多于 24 小时（或甚至几个星期）的时间是必要的。根据本发
5 明的纳米胶囊的表面上存在的磷脂是不同的实体，并且有利地可以进行表面萃取和快速生物降解，其对传输的活性成分的治疗有效性的释放也是必要的。

最后，纳米胶囊外膜的成分不仅可生物降解，且证明对于肠道外使用 and 静脉内注射，还能够被机体吸收。特别地，例如卵磷脂或磷脂
10 酰乙醇胺的成分通常存在于食品中，并且能自然地机体吸收。

因此，覆盖纳米胶囊表面的链的大小及其性质和保持其组合的化学键性质既提供给形成根据本发明的纳米胶囊在血液区室里多于 1 小时的稳定能力，又能够被循环酶或存在于间质液里的酶吸收。

有利地，用于根据本发明的纳米胶囊的根据本发明的纳米胶囊的
15 半衰期长于 2 小时。理想地，根据本发明地胶囊希望要获得 3 到 10 小时之间的血浆半衰期。有利地，这个特征可以使根据本发明的纳米胶囊在肿瘤中累积，并且在其中在适当的时间里释放含量的大多数。从而作为结果，抗癌药物的有效性增加。目前，抗肿瘤物的快速释放是作为考虑消除实体肿瘤，提供高增长率的基本因素。

20 本发明中使用的 PEG 的两亲衍生物优选具有作为疏水性基团的磷脂酰乙醇胺。因而其是聚乙二醇化磷脂。因此，使用可生物降解的磷脂，尤其是选自

DPPE-PEG_x(二棕榈酰磷脂酰乙醇胺)、
DSPE-PEG_x（二硬脂酰磷脂酰乙醇胺）、
25 DOPE-PEG_x(二油酰基磷脂酰乙醇胺)，和
POPE-PEG_x（棕榈酰磷脂酰乙醇胺），

其中 x 以 g/mol 表示 PEG 分子大小，以及它们的混合物构成。

优选地，作为偶联至 PEG 分子的磷脂，DSPE-PEG_x 将由于其稳定性而在根据本发明的纳米胶囊的外膜中使用。

30 有利地，将使用 DSPE-PEG₂₀₀₀、DSPE-PEG₃₀₀₀ 和 DSPE-PEG₅₀₀₀。另外，根据本发明的纳米胶囊的隐形性质还可以从甾醇核-PEG 的

聚乙二醇化脂质、神经酰胺-PEG 或 PEG₂₀₀₀ 四油酸失水山梨醇类、或更普遍地有至少一个烷基链的烷基-PEG 中获得，该烷基链粘附外膜中至少一个 PEG 分子来提供疏水性。

接合上述磷脂的 PEG 高分子的分子大小也是很重要的。具体地，
5 其将要决定在所述纳米胶囊表面上的空间障碍、从而对表面的可达性以及这些纳米胶囊躲避 MPS 的能力。

本发明中使用的 PEG 的两亲衍生物分子优选具有大于或等于 1000g/mol 的摩尔质量。如上所述，小于 1000g/mol 的 PEG 链的存在不能给予足够抵抗调理素作用的保护。所以，上述亲水性表面活性剂分子中存在的 660g/mol 的 PEG 短链不能给予足够抵抗调理素作用的表面
10 保护，也就是持续循环。能够用于本发明的 PEG 分子式 (O-CH₂-CH₂) 属于包括含有 113 PEG 单元的 PEG₅₀₀₀，含有 68 PEG 单元的 PEG₃₀₀₀，和含有 45 PEG 单元的 PEG₂₀₀₀ 的基团。这些长聚乙二醇链在脂质纳米胶囊表面投药亲水性。

15 使 PEG 的两亲衍生物并入所述纳米胶囊膜的摩尔比例优选为构成外脂质膜的脂质分子的 0.5 到 12mol% 之间，优选在 1 到 10mol% 之间。优选地，DSPE-PEG 分子的用量为膜的全部脂质的 1 到 10mol% 之间的摩尔比例。

在优选的具体实施方案中，将使用 DSPE-PEG₅₀₀₀ 的分子，由于其大小（大约两倍于 DSPE-PEG₂₀₀₀ 分子），对相同数量分子来说，有可能在体内通过空间影响和更显著的隐形性质获得更强的斥力。具体地，在脂质膜表面，PEG 链保持持续的移动，因此，其链越长，其在脂质纳米胶囊周围扫描的空间越大，以增加空间障碍和减少所有有可能到达这些纳米胶囊表面的蛋白质。因此，躲避调理素作用现象的能力也
25 由于 DSPE-PEG₅₀₀₀ 的存在而更强。

根据本发明的纳米胶囊的核是由脂肪酸酯和/或甘油三酸酯和/或作为脂肪物质的油和/或其混合物组成的基本上脂质的核。有利地，甘油三酸酯选自带有 6 到 14 碳原子的中链甘油三酸酯和/或辛酸或癸酸甘油三酸酯和其混合物。更优选地，作为构成根据本发明的纳米胶囊核的脂肪物质混合物将使用 Labrafac[®] cc, Miglyol[®] 812 N 或 Miglyol[®] 810
30 N，其与下列药品名称相对应：中链甘油三酸酯混合物，分馏的椰子油

或辛酸或癸酸甘油三酸酯。甘油三酸酯可以由纯的甘油基三辛酸酯（烷基链上有 8 个碳原子）构成，例如三辛酸甘油酯。为了最大化地将药物溶于核中，甘油三酸酯可以单独使用或作为结合其他的还被证明用于肠道外使用的药物油或脂肪酸酯的混合物来使用。

- 5 有利地，构成所述基本上脂质的核的脂肪酸酯选自带有 8 到 18 碳原子的中链脂肪酸，例如棕榈酸乙酯、油酸乙酯、肉豆蔻酸乙酯、豆蔻酸异丙酯或辛基月桂醇肉豆蔻酸酯及其混合物。

当然，作为混合物所需的亲脂亲水平衡（或 HLB）的函数，这些组分的每一种组成和比例能够进行调整和调节。事实上，由于膜的内
10 表面实质上是亲脂性的，所以在膜性质和核的含量之间是没有不相容性的。

根据由甘油三酸酯和油组成的所述核携带的碳基链饱和度的大小和程度，这些脂质在室温下是液态或半液态形式。根据本发明的纳米胶囊核里的存在的脂肪物质不仅用于作为传输抗癌药物的溶剂，还构成了为了在外部环境里保持纳米胶囊及其相对的稳定性的固体物质，
15 无论是在水质的溶液或在冻干步骤末端的干燥状态中。不像脂质体或其他有脂质膜和水质内部的胶质载体，脂肪物质含量的存在因而为根据本发明的纳米胶囊提供了一定的稳定性（在粒子强度或渗透压中变化）。

- 20 有利地，本发明目的的隐形脂质纳米胶囊的外脂质膜的外表面实质上是亲水性，且基本上为脂质的核实质上是亲脂性的。

因此，构成核和膜的可生物降解的能够消除的脂质有可能实现传输的活性成分快速释放，还提供给纳米胶囊物理稳定性，该稳定性可以使其冻干，甚至将其经过 0.45 到 0.22 μm 的过滤器消除。因此，
25 根据本发明的纳米胶囊可以消除，并且随意地以干燥形式储存较长时间。所以，根据本发明的新颖载体提供了确定的应用，该应用使其成为工厂易于开发的药品。

有利地，本发明目的的隐形脂质纳米胶囊的基本上为脂质的核占相对于所述纳米胶囊总重量的 20 到 60 重量%之间，优选为相对于所述
30 纳米胶囊总重量的 25 到 50 重量%之间。

有利地，可以在其中制备根据本发明的纳米胶囊（或分散相）的

水相或分散相最初含有一定浓度的盐，有利地为 NaCl。所述浓度在 4 到 8%之间，优选地在 4.4 到 5.2%之间。在合成方法的最后，向水相中加入渗透剂、冷冻防护剂或可溶防护剂和随意地防腐剂。

事实上，申请人注意到该浓度的盐有可能立刻获得比没有盐时更低的相转换温度（或 TIP），可以在常规制备方法中（如下所述）使更多磷脂分子的块状结合偶联到 PEG，并且最后较大地降低得到的纳米胶囊的大小。

组成所述脂质核的脂肪物质有可能实现携带从弱到强的亲脂性活性成分，尤为突出是抗癌物质。具体地，依据每一种活性成分的脂溶性，调节 HLB 来使活性成分完全溶解。本发明甚至可以使不同溶解度的活性成分的混合物传输，为此将要使用中间 HLB，来确保每一种抗癌药物至少部分的溶解度。

有利地，本发明目的的隐性脂质纳米胶囊含有一种或多种活性成分，特别是实质上为亲脂性的成分。

活性成分可以在纳米胶囊的脂质核里溶解或分散。

因此，可以单独或作为混合物使用下列实质上主要是亲脂性的抗癌活性成分：紫杉醇及其例如多烯紫杉醇的衍生物、喜树碱及其例如羟基喜树碱、拓朴替康、鲁比替康、白消安的衍生物、苯丁酸氮芥、酞菁素、类胡萝卜素、尤其是红必霉素。

另外，根据本发明的纳米胶囊还可以传输实质上是两亲的抗癌活性成分，例如阿糖胞苷、环磷酰胺、氨甲叶酸、如 5-氟二氧嘧啶或 5-氟尿嘧啶核苷的氟代衍生物、尤其是阿霉素。将活性成分预先溶解在脂肪酸酯或甘油三酸酯或药物油和可注射的脂肪物质中。为了溶解药物油中溶解性很差的活性成分，可以使用已被证明可用于肠道外应用的有机辅助溶剂；然后，获得的溶液可以混合到这些油中。由此制备的活性成分溶液可以直接在方法中使用或在甘油三酸酯混合物中在该混合物使用前作为继发稀释液。

最后，完全有可能实现任何类型活性成分，尤其是治疗组织中的炎症和感染部位的药物的传输。因此，根据本发明的纳米胶囊尤为适合为发炎组织携带和传送药物，该胶囊具有隐形性质的优点和能调整分子大小的事实。具体地，在发炎期间，例如，如观察到的关节炎的

形成，毛细管的穿孔不断灌流发炎部位使其变大，以致于使得血液
中存在的特定元素，尤其是蛋白质的传输增加。对组织里的传染部位也
是一样的。作为结果，即使在这些地方的累积的标识少于肿瘤里的，
也有可能实现在接近发炎或传染位置，通过根据本发明的纳米胶囊释
5 放的合适的活性成分减少这些病理状况的结果。因此，完全有可能通
过本发明的纳米胶囊实现抗发炎物质的传输，所述抗发炎物质例如
前列腺素 E1，如布洛芬的非类固醇抗发炎物、酮丙酸、茚甲新或如氟
美松的肾上腺皮质类脂醇和抗生素，镇痛剂和如两性霉素 B 或酮康唑
的抗传染药。

10 因此，根据本发明的纳米胶囊的核由脂肪相组成，其可变化的组
成有可能调节纳米胶囊溶解给定抗癌药物的能力。

有利地，本发明目的的隐形脂质纳米胶囊能够减少携带的活性成
分的毒性（和反作用的刚度），可以使用更多的药物剂量，并且从而改
善有效的但是高毒性的治疗指数。另外，与常规抗癌药物溶液相比较，
15 凭借其长的循环性质和大小，根据本发明的隐形脂质纳米胶囊能够累
积，并因此增加脂肪组织中的药物剂量。由于使用更多药量（得益于
对健康组织减少的毒性）和传输给脂肪组织更多药量（得益于在肿瘤
部位上特定的外渗），预计肿瘤治疗的功效有相当大地提高。

本发明的进一步目的是本发明的纳米胶囊在制备药品方面的使
20 用，其中活性成分对健康组织的毒性减少。

本发明的一个目的是含有根据本发明的纳米胶囊的药物组合物，
其中包括一种或多种活性成分。有利地，这些药物组合物是含有所述
纳米胶囊的胶质水性悬浮液形式。

这样的载体可能通过肠道外，尤其是静脉内或动脉中、腹膜内、
25 关节内和肌内使用，但是也有可能实现通过皮下注射。事实上，皮下
注射有可能到达淋巴腺内的淋巴管，其可能确保根据本发明的纳米胶
囊在淋巴结内的累积。因此，这个进入的路线对淋巴腺疾病，更特别
地淋巴腺肿瘤的治疗尤为重要。

30

1) 实体和循环系统肿瘤的治疗

首先，本发明能够用于通过血液的抗癌治疗。

根据本发明的纳米胶囊可以用于治疗人类的实体肿瘤。

另外，其可以用于治疗白血病或淋巴瘤类型的循环系统肿瘤。事实上，如上所述，在肝或循环 MPS 细胞的任何捕获之前，只有胶质系
5 统的粒子有足以促使与肿瘤细胞相遇的循环时间，从而能够获得循环系统肿瘤细胞的靶向性。

依据偶联的配体，这些纳米胶囊还可以具备主动靶向性的能力，其配体具有对位于癌细胞表面的受体类型分子的特定亲和力。

有利地，本发明目的的隐形脂质纳米胶囊在其表面带有特定配体，
10 该配体给予纳米胶囊主动靶向细胞，尤其是肿瘤细胞的能力，该细胞有对这些配体的受体。

优选地，将选择配体以致不会出现激发，或轻微激发粒子的清除现象。

有利地，所述配体是糖类或低聚糖类型或维生素类型，或作为另
15 一选择的寡肽，抗体片段或单克隆抗体类型。

有利地，糖类或低聚糖类型或维生素类型（叶酸盐，维生素 B2），以及甚至寡肽，抗体片段或单克隆抗体类型的配体可以应用。因此，所述配体将要预先偶联到激活的聚乙二醇磷脂类或任何其他脂类的分子反应端，该脂类可以包含能够在纳米胶囊表面粘附的疏水成分、PEG
20 类的亲水链以及在这个亲水链的基端有活性的化学官能团。这些配体一旦接触到这些链的基端，将优先利用如下所述的后插入技术被引入。事实上，后插入方法有可能引入特殊类型的配体或性质不同的配体，性质不同就是具有可以给予本发明的载体一系列特殊性质的各种特征。

因此，本发明进一步目的是本发明的脂质纳米胶囊在药物的制备
25 方面的使用，所述药物用于通过静脉给药对癌症，尤其是实体或循环系统肿瘤进行治疗，或用于通过主动靶向治疗循环系统或实体肿瘤，或用于通过被动靶向及其后所述经过肿瘤毛细管的纳米胶囊的外渗治疗肿瘤。

30

2) 发炎组织（尤其是关节炎）和感染组织的治疗

根据本发明的纳米胶囊的使用还可以看作治疗组织传染和/或炎症，尤其是人类的。具体地，如上所述，在组织发炎和传染期间，灌注区域的毛细管使发炎有增加的渗透性。与在治疗实体肿瘤时的方法相同，也能使用这个暂时的渗透性，利用外渗现象将生物活性物质，
5 例如抗炎症药物，镇痛剂或抗生素引入发炎组织，该生物活性物质具有降低或消除病源和/或炎症的后果能力的。因此，尤其有可能实现根据本发明的纳米胶囊活性成分的传输以削弱炎症，例如传输抗炎药、止痛剂或抗生素。例如关节炎的情况，也就是某一个关节发炎，优先使用根据本发明的纳米胶囊的内关节注射。这是因为载体对其位置的
10 靶向性由此得到促进，此外限制了纳米胶囊的稀释在整个血液循环里的损失。而且根据本发明的纳米胶囊的隐形性质应该可以使其不会被发炎位置上 MPS 的大量细胞和免疫系统识别和消除。

因此，本发明的进一步目的是根据本发明的脂质纳米胶囊在用于治疗炎症和/或传染组织的药物制备方面的使用。

15

3) 解毒作用

有利地，本发明目的的脂质纳米胶囊可以用来在中毒情况之后，吸收存在于血液循环中的疏水性分子。

在实质上为疏水性的活性成分的急性中毒情况之后，未加载活性
20 成分的隐形脂质纳米胶囊可以通过静脉内给药。因此，由于其长的循环时间和疏水性脂质核的优点，根据本发明的纳米胶囊可以吸收存在于血液循环中的活性成分，从而减少其游离浓度，并且因而减少其毒性。因此，这些活性成分在有毒的游离浓度之下的浓度中随着载体的降解逐步释放。

25 因此，本发明的进一步目的是本发明纳米胶囊的使用可用于在中毒情况之后，吸收存在于血液循环中的疏水性分子的药物的制备。

4) 消除过滤

最后，根据本发明的纳米胶囊的优点是其能够通过直径为 $0.45 \mu\text{m}$
30 m ，甚至是 $0.22 \mu\text{m}$ 的过滤器的消除过滤过程来进行消除，在以下描述的方法中的最后冷却步骤之后，可能发生这个步骤。事实上，申请人

注意到根据本发明的纳米胶囊在悬浮液中是足以使其通过这类过滤器的固体，而不需要进行任何主要的修改，尤其是不会失去其隐形性质和生物降解能力。这个特征可以使所述纳米胶囊易于并安全用于肠道外使用，来使其成为例如医院和工业大量使用的载体。

5

5) 在干燥/过滤形式里的使用

根据本发明的纳米胶囊可以有利地进行冻干，其后重新形成胶质悬浮液的形式。因此，其在可以在持续时间段里易于转化。事实上，根据本发明的纳米胶囊悬浮液可以在使用之前临时重新组建形成干燥形式。这样的冻干过程可以在上述的消除过滤步骤之后直接发生。

所述纳米胶囊的冻干过程包括通过升华现象从制备中除去水分。然后，可以在纳米胶囊悬浮液中加入例如冷冻防护剂或如甘露醇或海藻糖的溶解防护剂来进行冻干。在这些化合物完全溶解之后，选择的悬浮液进行快速冷冻到大约-50°C的第一步。然后这些悬浮液通过直接经过减压降低温度以水蒸气形式的水来进行冻干。而后，在使用前，干燥形式的纳米胶囊可以以无菌形式储存较长时间。

15

6) 其他应用

有可能实现使用根据本发明的纳米胶囊作为活性成分的载体来治疗除肿瘤或炎症以外类型的病症。具体地，这个胶质载体的性质之一是其躲避宿主免疫系统，和特别是如巨噬细胞的 MPS 细胞的能力。因此，有可能实现将本发明的隐形纳米胶囊用于不适合在常规载体内应用的机体区域内。这样的巨噬细胞丰富区域存在于例如肺泡和淋巴腺里。因此，有可能实现通过该途径使用所述载体，为此噬菌作用和/或调理素作用构成对药物形式的有效性的限制。

25

制备纳米胶囊的方法

构成根据本发明的隐形胶质载体的纳米胶囊可以有利地使用两种方法合成。第一种方法是“常规的”，由于其经常用于合成脂质纳米胶囊。第二种方法是申请人研发的，并且适合于根据本发明的纳米胶囊。尤其是有可能获得多于使用常规法得到的“聚乙二醇”磷脂的结合层，

30

并且还有可能为提供主动靶向性而引入偶联至配体的磷脂。这两个方法在以下成功说明。

5 1) 合成纳米胶囊的常规方法

有利的是，合成本发明的隐形胶质载体的方法无需任何有机溶剂。而且，该方法简单、快捷，无需任何特别的材料。另外，本方法只使用允许用于注射的可生物降解的化合物，该化合物通过特别是“生物吸收”的现象能被生物体自然吸收。最后，按照本发明的方法有可能合成
10 由使用者在 40-200 nm 直径范围内选择的确定直径的纳米胶囊。调节合成的纳米胶囊的尺寸使其能够适合用于不同类型的待处理肿瘤的载体。

首先，按照本发明，油/水乳液由水、盐、亲水性表面活性剂、亲脂性表面活性剂、组成所述纳米胶囊的核所需的脂肪物质、耦合到 PEG
15 分子的脂质分子和要被纳米胶囊传送的活性成分。按照本发明，活性成分预先溶解在组成纳米胶囊的核的油状脂肪态中。

因此第一步包括称重所有的组分，并将其在温和搅拌例如磁性搅拌下加热到比亲脂性表面活性剂的熔化温度更高的温度，直至获得均相的油/水乳液。因此当亲脂性表面活性剂为 HSPC 时，将该混合物首先
20 加热到 65°C。

将该油/水乳液进行相转化，使之转变成水/油乳液。为实现该转化，将混合物的温度提高到比所形成的混合物的相转化温度(TIP)更高的温度 T2。然后将该混合物的温度降到温度 T1。

当形成水/油乳液后，可选择的，相转化后配方的导电性可能会消
25 失，但如下所述一般肉眼可见。T1 为在其下所测导电率至少为 20°C 时所测量导电率的 90-95%的温度。T2 是导电率消失时的温度。

在相转化区附近进行至少一次介于 T1 和 T2 之间的温度校正来重复该操作直至出现半透明溶液。特别地，纳米胶囊形式的系统组织视觉反映为初始系统外观上的变化，从不透明白转变成半透明白。当温
30 度降低到相转化温度 (TIP) 以下时发生该转变。该温度一般比 TIP 低 6-15°C。

用于乳液的循环次数取决于形成纳米胶囊所需的能量。当温度升高时，在油/水乳液和水/油乳液之间的相转化导致导电率的降低，直至消失。相转化区的平均温度对应于相转化温度(TIP)。

然后将油/水乳液骤冷以获得稳定的纳米胶囊。该操作为在磁性搅拌下，将温度为 2°C+/-1°C 的去离子水快速投到精细乳液中将乳液稀释 3-10 倍。该骤冷步骤有可能将纳米胶囊从乳液态提取到悬浮态，在乳液态时，形成纳米胶囊的脂质是流体，而在悬浮态时，脂质处于更稳定的状态，因此结构上更稳定。将所获得的颗粒搅拌 5 分钟。在工业应用中，可以通过例如使其在热交换器系统上循环来进行急剧冷却。

10 在该特例中，避免了制备液的稀释。

有利的是，脂肪相为 Labrafac[®] cc，亲脂性表面活性剂为 HSPC(加氢的大豆卵磷脂)，亲水性表面活性剂为 Solutol[®] HS15。PEG 的两亲衍生物为聚乙二醇化的磷脂 DSPE PEG₂₀₀₀ 或-PEG₅₀₀₀。在该条件下，T1=60°C, T2=85°C，循环次数为 3。

15 按照纳米胶囊膜的组分，实质为脂质的亲脂性表面活性剂的摩尔百分比为 5-30mol%。实质为亲水性的表面活性剂的摩尔比为 60-90mol%，聚乙二醇化的磷脂的摩尔比为 0.5-5mol%。

所述纳米胶囊的外脂质膜的不同的组分的摩尔百分比的一个优选例如下所示：

- 20
- HSPC: 15.46mol%
 - Solutol[®] HS15: 81.2mol%
 - DSPE-PEG₂₀₀₀: 3.34mol%

在该例中，初始乳液的盐的浓度为 4.4% (m/m)，组成脂质纳米胶囊的核的 Labrafac[®] cc 的质量为制备液中存在的基本为脂质的或表面活性剂的所有组分的 44% (m/m)。该组组分随后称之为脂质总量（除了水和氯化钠以外的其他组分）；特别的，该术语包括聚乙二醇化的磷脂。外脂质表面（如上述）的组分对脂质总量的比因此为 56%。

通常，组成所述纳米胶囊外膜的脂质对组成纳米胶囊的脂质总量的质量比越高，纳米胶囊越小。因此，按照本发明，在其合成时可以很容易的通过选择合适的膜脂质对脂质总量的质量比来调整纳米胶囊的尺寸。

30

相反的，当组成核的脂质的比例提高时颗粒的尺寸增大。

而且，当亲水性表面活性剂的比例增大和当（亲水性和亲脂性）表面活性剂的比例增大时，颗粒的尺寸下降。表面活性剂降低了界面张力因此使系统稳定，促进了小颗粒的生长。特别的，界面张力越小，脂质纳米胶囊在水溶液中的悬浮液越稳定。对固定数量的亲水性和亲脂性表面活性剂和脂肪酸酯，增加加入的聚乙二醇化的脂质提高了颗粒的尺寸。可以通过选择给定数量的 Solutol[®] HS15 和 DSPE-PEG(参见实施例 4 的图 1)，来获得不同的尺寸范围和不同的聚乙二醇化的磷脂含量。

10 按照优选的实施例，脂肪相为 Labrafac[®] cc，实质为脂质的亲脂性表面活性剂为 HSPC (Northern Lipids)，非离子亲水性表面活性剂为 Solutol[®] HS15，耦合到 PEG 分子的脂质为 DSPE-PEG₂₀₀₀。上述化合物具有下列特点：

15 -Labrafac[®] cc (Gattefosse, Saint-Priest, France)。该化合物为由辛酸/癸酸中链甘油三酸酯 (C₈ 和 C₁₀) 组成的油。其密度在 20°C 时为 0.930-0.960。HLB 指数约为 1。其成分与 Miglyol[®] 812N(Sasol, Germany) 相同。Labrafac[®] cc 包含在用于制备注射营养品的成分中。

20 -Solutol[®] HS15(BASF, Ludwigshafen, Germany)。该化合物为聚(乙二醇)-660 12-羟基硬脂酸酯。因此其在配方中起亲水性表面活性剂的作用。可注射使用(对小鼠为 IV LD 50>3.16 g/kg, 对大鼠为 1.0<LD 50<1.47g/kg)。

25 -DSPE-PEG₂₀₀₀ (Northern Lipids Inc. Vancouver, Canada)。该化合物为正-(氨基甲酰甲氧基聚(乙二醇)2000)-1,2-二硬脂酰-*sn*-3-磷酸乙醇胺的钠盐。该物质赋予脂质纳米胶囊隐形性质。聚(乙二醇)的长链有可能通过其空间效应阻止血液循环中的蛋白质在纳米胶囊的表面沉积(调理素作用)从而保护了纳米胶囊的表面。其可以注射使用，并包含在脂质体制备 Doxil[®] (Alza, Mountain View, USA)中。

30 初始油/水乳液的水相还可能含有 4-8%的盐，例如氯化钠。修改盐浓度会导致相转化区的移动。盐浓度越高，相转化温度越低。该现象对封装疏水热敏性活性成分有利。该结合可在较低温度下发生。

纳米胶囊的直径可通过调节该合成方法中起始混合物中盐和亲水

性表面活性剂的比例、亲脂性表面活性剂的纯度来进行有利的调节。

2) 通过后插入合成隐形纳米胶囊的方法

有利的，作为本发明主题的隐形脂质纳米胶囊可用后插入的方法
5 制备。

该方法包括一个预先形成缺少聚乙二醇的两亲衍生物的纳米胶囊的步骤和随后的将所述聚乙二醇的两亲性衍生物后插入到该纳米胶囊表面的步骤。

根据本发明，有利的，所述预先形成步骤包括合成缺少 PEG 两亲
10 性衍生物的纳米胶囊，如上述的常规方法中按照数个温度升降循环形成的油/水乳液的相转化。

申请人开发的方法也无需使用任何有机溶剂，而且按照本发明，可以获得更好的在纳米胶囊表面结合“聚乙二醇化”的磷脂的产率。

例如，有可能获得 DSPE-PEG 对膜脂质的摩尔比大于 5mol%、优选大于 10mol% 的纳米胶囊。该比例赋予本发明的纳米胶囊良好的隐形
15 性质。现在，按照上述常规方法很难获得该比例。而且，通过预先形成不含 PEG 的纳米胶囊和随后的通过插入结合 DSPE-PEG 的合成方法可以很精确的调节纳米胶囊的尺寸，因此通过调节两亲性衍生物的亲水性链的比例和长度使其适合待治疗的肿瘤类型。除了插入较大比例的
20 的 DSPE-PEG 分子外，还可以设想利用该后插入技术来结合在其聚乙二醇化链末端含有配体的磷脂衍生物。该配体可以赋予本发明的纳米胶囊主动和特定的靶向感兴趣的细胞（实体肿瘤和循环系统肿瘤）的性质。因为在不超过 60°C 的温度下进行，该后插入方法特别适用于热敏性分子。

25 例如，基于 HSPC、但缺少 DSPE-PEG 的纳米胶囊，可以按照上述方法预先制备。

有利的，所述后插入步骤包括在聚乙二醇的两亲性衍生物存在下共培育预先形成的纳米胶囊的第一步，和“骤冷”的第二步，在该步中，将所获得的聚乙二醇的两亲性衍生物/预先形成的纳米胶囊混合物急剧
30 冷却，以达到介于 0-5°C 的温度。

例如，将水加入如上所述的含有缺少 DSPE-PEG 的纳米胶囊的制

备液中，以在容量瓶中具有精确的体积。因此，可以获知脂质以 mg/ml 计的精确浓度，基于该浓度可以计算按顺序加入的 DSPE-PEG₂₀₀₀ 或 -PEG₅₀₀₀ 的数量，使其相对于形成本发明的脂质纳米胶囊的外膜的所有脂质（包括 DSPE-PEG）的浓度达到例如 6mol%。有利的，随后将纳米胶囊的制备液和 DSPE-PEG 的胶束溶液分别置于并维持在 60°C 下 15 分钟。

为避免由于相转化现象造成的系统解体，聚乙二醇的两亲性衍生物/预先形成的纳米胶囊的混合物的共培育步骤在比所述实质为脂质的亲脂性表面活性剂的凝胶/液相转换温度略高、但比聚乙二醇的两亲性衍生物/预先形成的纳米胶囊的混合物的相转化温度低的温度下进行。参考上述例子，注意到 60°C 下脂质纳米胶囊的表面流动性更强，允许插入其他磷脂。将所需体积的 DSPE-PEG 的胶束溶液引入纳米胶囊的制备液中。在 60°C 下培育 1.5 小时，每隔一刻钟剧烈搅拌。在培育期结束时，将制备液浸入冰浴中 1 分钟，以突然形成纳米胶囊的膜并在该处俘获所插入的 DSPE-PEG 分子。

该后插入方法获得本发明的纳米胶囊成为可能，该纳米胶囊的 DSPE-PEG 含量高于按照常规方法有可能获得的含量。实际上，与按照常规方法制备的纳米胶囊有可能获得的隐形性质相比，所制备的纳米胶囊在体内显示出更强的隐形性质。

还可以在更低的温度（37-50°C）下进行 DSPE-PEG 的后插入，但需更长的培育时间。因此，低温插入方法适用于结合在其 PEG 链的末端含有例如寡肽和蛋白质的热敏性基团的聚乙二醇化的磷脂的衍生物。该后一化合物可以用作制备本发明的纳米胶囊的指向基团，但允许主动靶向肿瘤细胞。

另外，所述后插入方法还有可能引入除了 DSPE-PEG 分子外的 PDP-PEG₂₀₀₀-DSPE（吡啶二硫代丙酰胺-PEG₂₀₀₀-DSPE）或 MPB-PEG₂₀₀₀-DSPE（对马来酰亚胺苯基丁芳酰基胺-PEG₂₀₀₀-DSPE）类的活化磷脂（Northern Lipids, Inc., Vancouver, Canada），所述分子在其聚乙二醇化链末端含有反应性基团。一旦获得本发明的纳米胶囊，该反应性基团允许实质为肽的和含有硫醇基团的例如寡肽或抗体类蛋白质的化合物进行耦合，以赋予其主动靶向性质。

附图

在如下所述的实施例中，参照如下附图：

5 图 1：用 HSPC 制备的纳米胶囊尺寸的变化，是 DSPE-PEG₂₀₀₀ 的摩尔百分比的函数。

图 2：用 HSPC 制备的缺少 DSPE-PEG 的纳米胶囊尺寸的变化，是表面脂质/脂质总量的比率的函数。

图 3：用后插入方法获得的不同配方的纳米胶囊尺寸的变化。

10 图 4：用 DSPE-PEG₂₀₀₀ 或 DSPE-PEG₅₀₀₀ 制备的纳米胶囊的配方的隐形性质比较（血液中消失动力学）。

图 5：用 DSPE-PEG₂₀₀₀ 或 DSPE-PEG₅₀₀₀、或按照现有技术制备的纳米胶囊的不同配方的隐形性质比较（血液中消失动力学）。

图 6：用常规方法或后插入方法制备的纳米胶囊的不同配方的隐形性质比较（血液中消失动力学）。

15 图 7：静脉注射多烯紫杉醇（箭头）三次后小鼠的相对平均体重的变化。数值代表平均相对体重，每组 7 只小鼠。

图 8：投药给小鼠（n=7）使其体重减少 15% 的多烯紫杉醇的不同配方的平均天数。

20 图 9：小鼠（n=5）静脉注射多烯紫杉醇加载的脂质纳米胶囊（表示为%注射的³H），即载体）后在 C26 肿瘤中脂质纳米胶囊在不同时间的累积。

图 10：小鼠（n=5）静脉注射后在 C26 肿瘤中多烯紫杉醇（ng）在不同时间的累积。

25 A) 根据常规方法的隐形纳米胶囊的制备实施例

在下列实施例中：

质量%=相对于制备液的总重量的质量百分比

% w/w=相对于纳米胶囊的总重量的质量百分比

mol%=相对于纳米胶囊外膜的摩尔百分比

30 m%/env.=相对于纳米胶囊外膜的重量的质量百分比

实施例 1: 含有 DSPE-PEG₂₀₀₀ 的制备液

按照常规方法, 制备含有 2.86mol% 的 DSPE-PEG₂₀₀₀、脂质总量约为 1 克的制备液。

将合成本发明的纳米胶囊所需的成分加入 20ml 的闪烁管中, 加入量如表 1 所述。

表 1

	质量(mg)	质量(%)	摩尔数	摩尔%	m%/env.
HSPC	75	1.50%	9.843E-05	16.98%	13.25%
DSPE-PEG	46	0.92%	1.658E-05	2.86%	8.13%
Solutol HS15	445	8.90%	4.645E-04	80.15%	78.62%
Labrafac	504	10.08%			
NaCl	220	4.40%			
水	3710	74.20%			
全部	5000	100.00%			
				脂质总量	1070
				膜/总量	52.90%

通常, 称重时允许的最大变化范围 (相对于目标值) 为: 卵磷脂和 DSPE-PEG: $\pm 1.5\%$; 亲水性表面活性剂 (Solutol[®] HS15) 和甘油三酸酯: $\pm 0.2-0.5\%$; 盐: $\pm 3\%$ 。加入的水的量至少与给定值相同, 最多比给定值大 2%。实际上, 如上所述, 获得的纳米胶囊的尺寸主要取决于组成颗粒的膜的脂质的量对脂质总质量的比值 (膜/总量)。

称重后, 将温度逐渐升高到 60°C, 搅拌几分钟确保卵磷脂或 DSPE-PEG 的粒料已被分解。然后将温度升高到 80-85°C。随后, 将反应瓶转移到未加热的板上, 搅拌使温度下降到 60°C。可以进行 3 次将温度升高到 80°C 和降低到 60°C 的操作。在第二次升温中, 有可能观察到相转化现象 (低于相转化温度(PIT)时, 该溶液是半透明的, 高于 PIT 时, 该溶液不透明, 呈乳脂状)。

在第三个循环结束时, 当温度降到比在第二和第三次升温时所观察到的外观发生变化的温度低 10°C 时, 加入一定量的 1°C 的冷水 (12.5ml) 进行骤冷。冷却后, 搅拌 5 分钟。在所引用的实施例中, 外观发生变化的温度为 75°C, 制备液的最高温度为 82°C, 骤冷时的温度

为 62°C。

随后，用空隙率为 0.2 μm 的过滤器过滤制备液后可以用动态表面光散射来分析尺寸的分布情况。作为例子所引用的制备液有可能获得尺寸为 87.5 \pm 14nm 的本发明的纳米胶囊。相对于表面的所有组分，

5 DSPE-PEG₂₀₀₀ 的含量为 2.86mol%。其他比例在上述表 1 中列出。

用该常规制备方法获得的可能的 DSPE-PEG₂₀₀₀ 的最大比例为 3.34mol%。加入更多量的聚乙二醇化的磷脂会使得最后骤冷后获得的制备液不稳定。

10 实施例 2: 含有 DSPE-PEG₅₀₀₀ 的制备液

按照常规方法，制备含有 1.41mol% 的 DSPE-PEG₅₀₀₀、脂质总量约为 0.6 克的制备液。

除了表 2 中列出的使用量，其过程与上述实施例中描述的一致。

15

表 2

	质量 (mg)	质量(%)	摩尔数	摩尔%	m%/env.
HSPC	37.5	1.50%	4.921E-05	15.54%	11.89%
DSPE-PEG	25.8	1.03%	4.461E-06	1.41%	8.18%
Solutol HS15	252	10.08%	2.630E-04	83.05%	79.92%
Labrafac	252	10.08%			
NaCl	116	4.64%			
水	1816.7	72.67%			
全部	2500	100.00%			
				脂质总量	567.3
				膜/总量	55.58%

在该制备中，外观上不透明/半透明的变化在约 72°C 时发生，循环过程中达到的最高温度为 81°C，在低于 65°C 时用 6 ml 的冰水进行急剧冷却。

20 用空隙率为 0.2 μm 的过滤器过滤制备液后，用动态表面光散射分析，获得的纳米胶囊的平均尺寸为 63.2 \pm 9.83 nm。

用该常规制备方法获得的可能的 DSPE-PEG₅₀₀₀ 的最大比例为 1.49mol%。

因此，因为其分子含有较长的 PEG 链，用该常规方法结合的磷脂的量将更加受到限制。

B)用后插入法制备本发明的纳米胶囊的实施例

5

实施例 3：按照将 DSPE-PEG 插入预先形成的纳米胶囊的方法来制备纳米胶囊

表 3 给出了不同组分的含量的例子，使用将 DSPE-PEG 插入预先形成的纳米胶囊的技术，有可能获得直径约为 80nm 的脂质纳米胶囊的配方。

按照常规方法制备预先形成的没有 DSPE-PEG 的纳米胶囊的母液。所用的量列于表 3。骤冷后，将制备液转移到容量瓶中，用蒸馏水将体积加到 25ml。

15

表 3

	质量(mg)	质量(%)	摩尔数	摩尔%	m%/env.
HSPC	75	1.50%	9.843E-05	17.48%	14.42%
DSPE-PEG	0	0.00%	0.00	0.00%	0.00%
Solutol HS15	445	8.90%	4.645E-04	82.52%	85.58%
Labrafac	504	10.08%			
NaCl	220	4.40%			
水	3756	75.12%			
全部	5000	100.00%			

脂质总量	1024
膜/总量	50.78%

称量 75mg “聚乙二醇化”的磷脂，加入足量的蒸馏水形成溶液，全部溶解后，将体积精确的增加到 5ml，来制备 DSPE-PEG₂₀₀₀ 和 DSPE-PEG₅₀₀₀ 的胶束溶液。

20

然后将 2ml 的母液分散到置于 60°C 水浴中的带塞的溶血 (haemolysis) 试管中。将胶束溶液也置于水浴中。将脂质纳米胶囊的制备液和胶束溶液分别在 60°C 下预先培育 15 分钟。然后，加入所需的体积以获得理论百分比为 6mol%的磷脂，该磷脂与纳米胶囊的膜上的 PEG 分子相联。因此，在上述给定的胶束溶液的体积和浓度下，加

入 532 μ l 的 DSPE-PEG₂₀₀₀ 或 1108 μ l 的 DSPE-PEG₅₀₀₀。通过加入 800 μ l 的热水来制备对照组。

加入上述量后，将溶液留在 60°C 下 1.5 小时，每隔一刻钟使之涡旋。培育期后，将制备液投入冰浴中。

5 获得的脂质纳米胶囊的尺寸如表 4 所示。

表 4

制备液	纳米胶囊的尺寸 (nm)
未培育的母液	69 \pm 12.9
加热的对照组	69.9 \pm 14.2
DSPE-PEG ₂₀₀₀	77.9 \pm 14
DSPE-PEG ₅₀₀₀	78.4 \pm 13

10 在同样条件下培育的对照制备液的颗粒尺寸接近于没有在 60°C 下培育的母液中的尺寸。在 DSPE-PEG 存在下培育的制备液显著提高了颗粒的平均直径，表明已在纳米胶囊的表面插入了“聚乙二醇化”的磷脂。

C) 不同参数对本发明的纳米胶囊尺寸的影响

15

实施例 4: 按照常规方法制备的纳米胶囊尺寸的控制

20 按照实施例 1 中所述的常规方法制造该制备液。制造该制备液使之含有约 1 克脂质。图 1 为亲水性表面活性剂 Solutol[®] HS15 的量分别为 414mg (413.5 \pm 0.50)、446mg (445.85 \pm 0.01)或 504mg (504.4 \pm 0.27)时，作为加入的 DSPE-PEG₂₀₀₀ 的百分比的函数的纳米胶囊的尺寸的变化。HSPC, Labrafac[®] cc 和 NaCl 的量在所有的制备液中维持恒定，分别为 76mg、504.5mg 和 220mg。

25 通常，Solutol[®] HS15 的量降低时尺寸增大。在同一系列中，对于给定的 Solutol[®] HS15 的量，尺寸随着加入的 DSPE-PEG 百分比的提高而增加。

实施例 5: 按照后插入方法制备的纳米胶囊的尺寸的控制

当为了获得特别长的循环时间或要引入配体时，需要使用如实施例 3 所描述的后插入方法。因此，预先制备纳米胶囊，该纳米胶囊不含有 DSPE-PEG，并且可以通过改变组成颗粒表面的所有脂质和表面活性剂对组成制备液（表面和核）的所有的脂质和表面活性剂的质量比率来调节尺寸。表面脂质/脂质总量的比与适用于后插入方法获得的纳米胶囊尺寸的关系如图 2 所示。

制备图 2 所示的配方使之含有约 1 克脂质。HSPC, Labrafac[®] cc 和 NaCl 的量恒定，与实施例 4 中的一致。使用的 Solutol[®] HS15 的量和相应的表面脂质/脂质总量的比（S/T 比）如表 5 所示。

10

表 5

Solutol [®] HS15(mg)	S/T 比
400.6	48.6%
413.2	49.2%
445.9	50.9%
504.2	53.5%

随后，有可能将聚乙二醇化的磷脂 DSPE-PEG 用后插入的方法引入，以获得本发明的隐形纳米胶囊。后插入方法按照实施例 3 中进行，使得 DSPE-PEG 2000 或 5000 的最后的总的百分比为 6mol%。

15

分别含有 504、446 和 401mg Solutol[®] HS15、不含 DSPE-PEG 的母配方（SM 系列），和为用所述后插入方法引入 DSPE-PEG 2000 和 5000 的主体的本发明的子配方的尺寸如图 3 所示。

因此，插入 DSPE-PEG₂₀₀₀ 使直径平均提高 7.2nm。DSPE-PEG₅₀₀₀ 对尺寸的提高更明显，使粒子的直径平均提高了 9.1nm。

20

直径的提高反映了在脂质纳米胶囊的表面已有效地插入了聚乙二醇化的磷脂，在此基础上，并且已知不含 PEG 的纳米胶囊的尺寸的变化是表面/总的脂质的量比率的函数（图 2），按照本发明，有可能调节纳米胶囊的尺寸，以促进通过存在于特殊肿瘤毛细管的内皮上的穿孔的外渗。

25

D)在活体中用本发明的隐形纳米胶囊进行的清除实验的结果

实施例 6: 载体的消失动力学 (PEG₂₀₀₀/PEG₅₀₀₀ 的对比数据)

用在 3.34mol% 的 DSPE-PEG₂₀₀₀ (“2k-3.34”曲线)和 1.41mol% 的 DSPE-PEG₅₀₀₀ (“5k-1.41”)之间的对比研究来评价本发明的纳米胶囊的血液清除。该配方用实施例 1 和 2 中所述的常规方法制备。

5 为此, 将本发明的纳米胶囊的溶液静脉注射到雄性大鼠 (Sprague-Dawley, 325g) 中, 比例为每一配方物 4 只大鼠。选择脂质的注射剂量, 使之约小于可能会开始发生“饱和 MPS”现象的剂量的 10 倍 (由于清除超限的能力, 这可能会造成持续的循环时间)。因此, 将含有脂质总量为 2mg、体积为 400 μ l 的纳米胶囊的溶液注入每只大鼠
10 中。

用氘示踪的放射性示踪剂 [³H]-胆固醇十六碳烷基酯预先标记本发明的纳米胶囊, 该示踪剂为不可交换的标记物。放射性标记的剂量为每只大鼠 3 微居里 (μ Ci)。注射纳米胶囊后, 在 5、15 和 30 分钟、以及 1、2、4、8、12 和 24 小时取 9 个连续的血液样本。

15 将血液样本在 Soluene 350(Canberra Packard, Mississauga, Canada) 存在下在 50°C 消化 1 个小时。消化后, 血液样本用 30% 的过氧化氢水溶液去色。加入闪烁流体 Hionic Fluor(Canberra), 将样本留置过夜。用闪烁计数器计算的放射性来分析血液中存在的标记的纳米胶囊在不同时间的量。分析对照可以确定相对于 100%剂量的 dpm(每分钟的分解
20 量)。大鼠中的血液总量为 75ml/kg。因此, 可以将结果表示为全部注射的剂量的百分比。本实验中获得的血液图概括在图 4 中。

表 6 列出了用常规方法引入到所述脂质纳米胶囊的外膜的 DSPE-PEG 的名称、平均尺寸和摩尔百分比。

25 所使用的命名表达了 PEG 组分的摩尔质量 (对 ₂₀₀₀ 或 ₅₀₀₀ 为 2k, 5k) 和 DSPE-PEG 相对于所有表面脂质的摩尔百分比。

表 6: 使用的配方的描述

名称	尺寸 (nm)	DSPE-PEG
2k-3.34	77 \pm 15	3.34 摩尔%
5k-1.41	61 \pm 15	1.41 摩尔%

结果表明本发明的纳米胶囊的原生质半衰期对基于 3.34mol%的 DSPE-PEG₂₀₀₀和基于 1.41mol%的 DSPE-PEG₅₀₀₀的胶囊均在 2-3 小时之间。但重要的是，DSPE-PEG₅₀₀₀ 链提供了更强的隐形效果。特别的，由于纳米胶囊表面的比 DSPE-PEG₂₀₀₀ 的摩尔数小两倍多的摩尔数，与质量为 2000g/mol 的链所赋予的相比，较长的 PEG 链实际上提供了更好的保护效果。

实施例 7: 本发明的纳米胶囊与现有技术中的纳米胶囊的对比研究

进行了与实施例 6 类似、目的在于比较本发明的脂质纳米胶囊和现有技术中专利 No. WO 01/64328 中的脂质纳米胶囊在血液中的消失速度的研究。配方 1-4 获得的结果是在与图 4 所给出的相同的条件下获得的。下边简述该配方，所获得的数据如图 5 所示。该图为了对比，也包括了由 Stolnik 等（仅在血液动力学 3 小时获得）和 Cahouet 等获得的数据。

配方 1: 在专利 No. WO 01/64328 中描述的常规纳米胶囊：亲脂性表面活性剂为 Lipoid[®] S75-3，其不是纯的卵磷脂（70%的磷脂酰胆碱），颗粒中缺少 PEG；

配方 2: 基于 Lipoid[®] S75-3 的纳米胶囊，但含有按照常规方法引入的 DSPE-PEG₂₀₀₀(1.65mol%)；

配方 3: 基于 HSPC（>99% 的磷脂酰胆碱）和 DSPE-PEG₅₀₀₀(1.41mol%)的纳米胶囊，基于按照常规方法引入 PEG₅₀₀₀ 的本发明的纳米胶囊；

配方 4: 纳米胶囊-DSPE-PEG₂₀₀₀(3.34mol%)，基于 PEG₂₀₀₀ 的本发明的纳米胶囊，按照常规方法能引入的 HSPC 的最大量；

FS: Stolnik 配方: 比例为 13:5 (PEG 组分的摩尔质量为 2000g/mol) 的 PLA-PEG 胶束，其直径为 75nm。最佳配方的数值从已公开的文章中获得 (Stolnik 等人., J. Drug Target, 9:361, 2001)。该数据也可以通过将一定量的、不会饱和 MPS 的纳米胶囊静脉注射到大鼠中获得。

NL A.A.: 现有技术中的常规的纳米胶囊的配方。该数据从由 Cahouet 等人.(Int. J. Pharm. 242:367 2002)的研究中获得。该数据也可以通过将由上述作者制备的按照专利 No. WO 01/64328 记述的基于

Lipoid[®] S75-3 的配方的脂质纳米胶囊静脉注射（未知剂量）到大鼠中获得。

配方 1 和 2 分别代表了常规纳米胶囊的配方，该纳米胶囊的表面含有 Lipoid[®] S75-3(含有杂质的卵磷脂)，该纳米胶囊的表面还含有 1.65mol%的 DSPE-PEG₂₀₀₀。该水平接近能引入到按照常规方法制备的含有 Lipoid[®] S75-3 的纳米胶囊的最大含量。配方 4 的 DSPE-PEG₂₀₀₀ 的含量也为按照传统方法的最大值。没有杂质和均一的磷脂酰胆碱 HSPC 有可能将该含量的 DSPE-PEG 引入按照本发明的纳米胶囊中(实践上为 Lipoid[®] S75-3 的两倍)。

结果表明与现有技术中从血液区室中被快速清除的脂质纳米胶囊（配方 1，如专利 No. WO 01/64328 中所述）相比，本发明的纳米胶囊（配方 3 和 4）显示了明显较低的清除。因此，对配方 1，一小时后只有 10%的注入剂量仍存在于血液中。现有技术中的纳米胶囊因此显示出没有隐形性质。而且，将 DSPE-PEG₂₀₀₀ 引入现有技术中的纳米胶囊（配方 2）只是略微提高了其在血液循环中的存留：其半衰期时间也小于一小时。实际上，相对于配方 1 的 AUCs（在 5 分钟和 20 小时之间的曲线下面积）的提高（AUC 配方 X/AUC 配方 1）分别为：

配方 2：1.09

配方 3：2.31

配方 4：2.68

而且，如现有技术中所述，按照专利 No. WO 01/64328 的纳米胶囊曾经是由 Cahouet 等人.进行的大鼠体内研究的主体。从血液中清除该纳米胶囊的动力学显示的图(配方 NL A.A., 图 5)，稍好于配方 1 所获得的，与配方 2 的相类似，可能是由于注射剂量的不同（NL A.A.: 未知剂量）。Cahouet 等人. (NL A.A.)的纳米胶囊的半衰期小于一小时（准确的为 45 分钟）。申请人从配方 1 中获得的图因此与现有技术的研究中所给出的相对类似。该两组对照配方不含有大于 1000g/mol 的任何 PEG 链，显示短 PEG 链在赋予保护免于从血液循环中快速清除方面 Soluto[®] HS15（660g/摩尔）的无效性。因此，该两组配方没有显示出任何的隐形性质或持续的循环（第 2 小时时 10%的注入剂量），在评价载体的组成的修改时（使用具有高磷脂酰胆碱的卵磷脂），尤其是加入

长 PEG 碳，可以认为没有隐形性。

图 5 也为由 Stolnik 等人. (Legend FS)的出版物给出的现有技术中的数据。他们的 PLA-PEG 胶束的配方显示了隐形性质，两小时后血液中仍存在略小于 40%的注入剂量。但是，该胶质制备液的隐形性质小于本发明的纳米胶囊，后者的配方 3 (DSPE-PEG₅₀₀₀) 和配方 4 (DSPE-PEG₂₀₀₀)第 2 小时后有超过 50%和超过 60%的注入剂量。可以看出本发明(配方 3 和 4)的纳米胶囊在注射后前 4 个小时内在血液循环中存在的比例明显高于现有技术中的隐形纳米颗粒(配方 FS)，将会有利地提高容易到达实体和/或循环系统肿瘤细胞的载体数量，因此提高了治疗成功的机会。

实施例 8：后插入方法提供的隐形性质的增强

用 4 个不同的配方在与前述研究中相同的条件下进行体内研究。因此，为评价后插入方法的优点，申请人将按照所述后插入方法制备的三个配方的隐形性质与按照常规方法制备的最佳配方的隐形性质相比较。该体内研究的主题的 4 个配方如下：

配方 2k-3.34： 纳米胶囊-HSPC-PEG₂₀₀₀(3.34mol%)，基于 PEG₂₀₀₀ 的本发明的纳米胶囊，按照常规方法的能被引入到 HSPC 的最大量。该配方相当于实施例 7 中的配方 4，将其注入一组新的 4 只大鼠中；

配方 2k-6%： 基于 HSPC 的纳米胶囊，该纳米胶囊为按照后插入方法将相当于本发明的纳米胶囊表面脂质总量的 6mol%的 DSPE-PEG₂₀₀₀ 引入的主题，如实施例 3 中详述；

配方 5k-6%： 基于含有 HSPC 的同样的母配方的纳米胶囊，采用制备配方为 2k-6%的纳米胶囊的方法制备，但其目的为用后插入方法引入 DSPE-PEG₅₀₀₀；

配方 2k-10%： 基于含有 HSPC 的同样的母配方的纳米胶囊，采用制备配方为 2k-6%的纳米胶囊的方法制备根据本发明的纳米胶囊，但其目的为使用后插入方法引入 10mol%的 DSPE-PEG₅₀₀₀。

上述三个配方从血液中清除所获得的结果如图 6 所示。

图 6 中的数据显示出后插入方法的优点。具体来说，所述后插入方法有可能获得本发明的纳米胶囊，其隐形性质明显高于按照传统方

法制备的本发明的纳米胶囊。而且，该研究也显示出本发明的纳米胶囊的隐形性质随着时间变化的稳定性和守恒性。配方 2k-3.34 在 3 个月前制备，并于本研究中再次注入。获得的图是可比较的（在第 4 小时未发现略高于注入剂量的 22%，如图 4）。图 6 中的配方显示出显著的隐形性质。对照纳米胶囊（没有 DSPE-PEG）或（前述实施例中和现有技术研究中的配方 1）的配方在两小时后显示出小于 10% 的残留剂量。

后插入方法有可能引入的 DSPE-PEG 的量大于按照常规方法引入的量，如图 6 的血液图所示，这可以提高制备液的循环时间，并将其用于在注射后前 12 小时内需要血液中有较大纳米胶囊比例的应用中。因此，按照所述后插入方法制备的配方都显示出在第 4 小时末约为 60% 的注入剂量。8 小时后，配方 2k-6% 的纳米胶囊的残留剂量超过 18%。比例相同但含有较长 PEG 链（DSPE-PEG₅₀₀₀）的 6mol% DSPE-PEG 有可能在第 8 小时获得高于 40% 的注入剂量。当引入更多的 DSPE-PEG₂₀₀₀ 直至 10mol% 时，有可能获得略高于配方 5k-6% 的图，在第 8 小时时有 50% 的注入剂量。按照后插入方法制备的本发明的纳米胶囊的配方的隐形性质因此很明显的高于文献中记述的“隐形”固体纳米颗粒所观察到的隐形性质。

20 E) 加载了抗癌药物的隐形纳米胶囊的制备实施例

实施例 9：紫杉醇和多烯紫杉醇隐形脂质纳米胶囊的制备

可以将紫杉醇和多烯紫杉醇按照常规方法引入脂质纳米胶囊中，获得的药物加载的纳米胶囊可以通过后插入方法进行聚乙二醇化以提供隐形性质。

将药物在 75°C 下溶解在甘油三酸酯中以制备用于形成脂质纳米胶囊的内核的紫杉醇或多烯紫杉醇的甘油三酸酯溶液。调节药物的量，使得获得的溶液在冷却到室温时不会再结晶。对于紫杉醇和多烯紫杉醇，具有短烷基链的甘油三酸酯比具有长烷基链（C>8）的甘油三酸酯显示出更好的溶解性。其 C8 酯成分不同的紫杉醇和多烯紫杉醇的甘油三酸酯溶液列于表 7 中。

表 7: 紫杉醇和多烯紫杉醇的甘油三酸酯溶液

甘油三酸酯			溶解度 (%w/w) *	
名称/供应商	规格	C8 含量	紫杉醇	多烯紫杉醇
Labrafac® CC	C8:50-80% C10:20-50%	56.7%	1.6	2
Miglyol® 810N(Sasol)	C8:65-80% C10:20-50%	70.4%	2.7	3.9
Tricaprylin (Sigma)	C8:>99% C10:NR	>99%	6	7

*获得的甘油三酸酯溶液中药物的重量百分比

表 7 表明具有较高 C8 酯含量的甘油三酸酯(即甘油基三辛酸酯 = 三辛酸甘油酯)溶解了更多的紫杉醇或多烯紫杉醇。三辛酸甘油酯为纯粹 C8 化合物,是该两种药物的最佳溶剂。6%或更小的紫杉醇的三辛酸甘油酯溶液和 7%或更小的多烯紫杉醇的三辛酸甘油酯溶液在室温下可以保存很长时间。

例如,6%的多烯紫杉醇的三辛酸甘油酯溶液的组成如下:

- 10 -三辛酸甘油酯 552.0mg
- 多烯紫杉醇 35.3mg

6%的多烯紫杉醇的三辛酸甘油酯溶液在 25°C 下能稳定数月。

不含有 DSPE-PEG 的药物加载的脂质纳米胶囊,可以用常规方法从紫杉醇或多烯紫杉醇的三辛酸甘油酯溶液中制备。当用 6%的紫杉醇的三辛酸甘油酯溶液或 7%的多烯紫杉醇的三辛酸甘油酯溶液来制备脂质纳米胶囊时,分别在 10 天或 118 天出现药物晶体。这种不稳定的现象是由于该三辛酸甘油酯的溶液已接近饱和。降低三辛酸甘油酯中药物的量可以提高药物加载的脂质纳米胶囊制备液的稳定性。在 25°C 或 5°C 时用 5%的紫杉醇的三辛酸甘油酯溶液制备的脂质纳米胶囊能稳定 32 天,用 6%的多烯紫杉醇的三辛酸甘油酯溶液制备的脂质纳米胶囊能稳定至少 7 个月。

用 5%的紫杉醇或 6%的多烯紫杉醇的“三辛酸甘油酯溶液”制备的紫杉醇或多烯紫杉醇加载的脂质纳米胶囊可以具有下列组成:

- HSPC 75mg

- Solutol® HS 15400mg
- “三辛酸甘油酯溶液” 504mg
- NaCl 220mg
- 水 qs ad 5000mg

5 药物加载的纳米胶囊具有下列特点（表 8）。

表 8：药物加载的脂质纳米胶囊的特点

使用的三辛酸甘油酯溶液	药物加载（%w/w）	尺寸（nm）
无药物	0	72
紫杉醇 5%	2.58%	73
多烯紫杉醇 6%	3.09%	77

10 优选多烯紫杉醇，因为其比紫杉醇具有更好的药物加载性和增强的稳定性。但是，2% w/w 紫杉醇脂质纳米胶囊能稳定数月。3.09% w/w（“3%”）的多烯紫杉醇脂质纳米胶囊的稳定性在 25°C 时大于 7 个月。

15 然后，用原药加载的脂质纳米胶囊的制备液按照实施例 3 中所述的后插入方法制备药物加载的隐形脂质纳米胶囊。简要的说，获得的药物加载的脂质纳米胶囊的制备液最多为 25mL。其中的 2mL 用于与 DSPE-PEG 胶束溶液（见表 9）培育（预培育 15 分钟，然后在 60°C 下培育 90 分钟）；在后插入时间结束时将制备液在冰浴中冷却。作为本发明目的的在 DSPE-PEG 后插入后获得的药物加载的脂质纳米胶囊能稳定几个月（没有观察到引入的药物的再结晶或者尺寸的明显变化）。几个 DSPE-PEG 后插入的用 3.5%多烯紫杉醇加载的脂质纳米胶囊如表 20 9 所示。

表 9：3.5%多烯紫杉醇（w/w）隐形脂质纳米胶囊的特定

制备液	尺寸（nm）
对照 LN*	72
LN-DSPE-PEG2000-6 摩尔%	78
LN-DSPE-PEG5000-6 摩尔%	79
LN-DSPE-PEG2000-10 摩尔%	82
LN-DSPE-PEG5000-10 摩尔%	83

*含有 3.5%多烯紫杉醇的脂质纳米胶囊 (LN)，在没有后插入的同样的条件下培育

在任一制备中都没有发生多烯紫杉醇的再结晶。与对照制备液相比直径的显著提高反映了 DSPE-PEG 在多烯紫杉醇加载的脂质纳米胶囊表面的有效插入。

F) 加载抗癌药物的本发明的隐形纳米胶囊在体内进行的毒性实验结果

10

实施例 10: 多烯紫杉醇加载的纳米胶囊对 Taxotere[®]在健康小鼠中的毒性评价

用不同的配方来评价不同剂量的多烯紫杉醇在小鼠中的毒性。可以通过测量小鼠在静脉注射配方后体重的减轻来评价抗癌药物的毒性。多烯紫杉醇用商业可得的溶液 Taxotere[®] (Aventis)*、或配方的非聚乙二醇化的脂质纳米胶囊 (LN) 和隐形脂质纳米胶囊 (S-LN) 注射。

*Taxotere[®]为多烯紫杉醇在聚山梨醇酯 80、乙醇和水中的溶液。

按照实施例 9 中所述的方法制备脂质纳米胶囊和隐形脂质纳米胶囊，已获得 3% w/w 的多烯紫杉醇的加载量。该制备液在 25°C 下能稳定 7 个多月，具有下列特点 (表 10)。

表 10: 3% w/w 多烯紫杉醇加载的 LN 或 S-LN 的特点

名称	组成	聚乙二醇	尺寸
LN	HSPC 75mg	-	70nm
S-LN	Solutol [®] HS15 4000mg “三辛酸甘油酯溶液*” 504mg	DSPE-PEG ₂₀₀₀ 6 摩尔%	80nm

*使用 6% w/w 的多烯紫杉醇的三辛酸甘油酯溶液

将多烯紫杉醇的配方 (Taxotere[®], 非聚乙二醇化的 3% w/w 的多烯紫杉醇加载的纳米胶囊和 3% w/w 的多烯紫杉醇加载的 DSPE-PEG₂₀₀₀-6mol%的纳米胶囊) 用生理盐水稀释, 并以 20、40 和 60mg/kg 多烯紫杉醇注射。由于可注射的多烯紫杉醇溶液的高毒性,

Taxotere[®]没有研究 60mg/kg 的剂量。将该多烯紫杉醇的配方施于 8 组小鼠，加入另外一个注入生理盐水的对照组（表 11）。

表 11：用于毒性研究的配方和剂量

配方/剂量	20 mg/kg	40 mg/kg	60 mg/kg
3% w/w 多烯紫杉醇加载的脂质纳米胶囊 (LN)	LN-20	LN-40	LN-60
DSPE-PEG ₂₀₀₀ -6 摩尔% 3% w/w 多烯紫杉醇加载的隐形脂质纳米胶囊 (S-LN)	S-LN-20	S-LN-40	S-LN-60
Taxotere [®]	TXT-20	TXT-40	-

5

在体重为 17-20 克的健康雌性 BALB/c 小鼠上进行毒性研究（每配方 7 只小鼠，8 个配方和 1 个对照）。给小鼠施予 250 μ l 的给定配方（或对于对照组，为生理盐水的溶液）作为单个静脉剂量。首次注射（D0）之前的小鼠体重定义为参考体重。在 0 天（D0）、5 天（D5）和 10 天（D10）对小鼠投药 3 剂。每天称重和检查小鼠的明显的有害反应，达到 D28 和在 D30、D33 和 D40。

图 7 显示了 9 组小鼠的相对体重（D/D0）的变化（没有绘出误差线；所有的 RSD<2.4%）。所有的多烯紫杉醇配方都引起了体重减轻，并且体重减轻随着剂量的增加而增加。对照组（Ctrl）显示出体重的增加。TXT-40 组在 D10 第三次注射前中断，因为有 2 只动物的后腿出现萎缩和瘫痪。TXT-40 组的动物在第 10 天死亡，因为他们的体重已经减轻了 15%，因此不能再忍受第 3 次注射。

加载到 LN 或 S-LN 的 20mg/kg 的多烯紫杉醇比多烯紫杉醇的 Taxotere[®]溶液（P<0.05，学生测试）在最低点（D23）引起了更低的体重减轻（b.w.l.）。而且，40mg/kg 剂的多烯紫杉醇的 Taxotere[®]（TXT-40）显示出高毒性，在 9.7 天 b.w.l. 达到 15%；该 b.w.l. 高于 LN-40 和 S-LN-40 的相应剂量，甚至高于 60mg/kg 的剂量（LN-60 和 S-LN-60）。为比较配方的毒性效果，观察了 b.w.l. 为 10% 和 15% 的天数，分别在表 12 和图 8 中所示。

表 12: 小鼠 (n=7) 体重减轻 10%对应的平均天数
和接受的多烯紫杉醇的累积剂量

组	平均天数 \pm SD	累积剂量 (mg/kg)
TXT-40	6.4 \pm 1.13	80
LN-60	8.3 \pm 0.95	120
S-LN-60	9.4 \pm 0.79	120
LN-40	10.7 \pm 0.95	120
S-LN-40	11.1 \pm 2.41	120
TXT-20	13.0 \pm 1.53	60
LN-20	16.1 \pm 3.08	60
S-LN-20	17.3 \pm 3.33	60

5 表 12 和图 8 显示出在相同剂量时, Taxotere 配方比纳米胶囊配方能更快的引起体重减轻。TXT-40 组发生 15% b.w.l. 都明显快于任何 LN-40 和 S-LN-40 或 LN-60 和 S-LN-60 配方 (t 检验 $P < 0.05$)。

10 总之, 与同样剂量、静脉给药的商业溶液 Taxotere[®]相比, 在脂质纳米胶囊或隐形脂质纳米胶囊中封入多烯紫杉醇能有效地减小该抗癌剂的毒性。而且, 发现给药累积剂量为 80mg/kg 的 Taxotere[®] (2 \times 40) 具有高毒性和严重的副作用, 却有可能施加更高剂量的在 LN 或 S-LN 中的多烯紫杉醇, 即 180mg/kg (3 \times 60), 其在最低点时 b.w.l. 小于 20%, 而且在最后一剂的几个星期后体重增加。因此, 当将药物配制在脂质
15 纳米胶囊或隐形脂质纳米胶囊中, 有可能施予更高剂量的多烯紫杉醇, 或观察到较轻的毒性。

G) 用抗癌药物加载的本发明的隐形纳米胶囊在荷瘤小鼠进行的体内分解研究的结果

20 实施例 11: 在荷 C26 瘤的小鼠进行的多烯紫杉醇加载的纳米胶囊对 Taxotere[®]的肿瘤累积

使用由 3% w/w 多烯紫杉醇加载的 DSPE-PEG₂₀₀₀-6mol% 隐形脂质纳米胶囊 (S-LN) 的配方、非聚乙二醇化的 3% w/w 脂质纳米胶囊 (LN)

的配方和商业的多烯紫杉醇溶液 Taxotere[®] (TXT)之间的对比研究来评价抗癌药物加载的本发明的隐形脂质纳米胶囊的肿瘤累积。

配方的制备

用实施例 10 (表 10) 中所述的相同的组分和相同的相对比例根据
5 常规方法和后插入方法来制备多烯紫杉醇加载的 LN 和 S-LN。所有的
纳米胶囊配方都用 [³H]-胆固醇十六烷基醚(来跟踪纳米胶囊)和 [¹⁴C]-
多系紫杉醇(来跟踪药物) 放射性标记。三个配方 LN、S-LN 和 TXT 都
用生理盐水稀释, 以多烯紫杉醇为 1mg/kg 的剂量(150 μ l)注射。纳米胶
囊组接受了 0.7 μ Ci 的 [³H]和 0. μ uCi 的 [¹⁴C], Taxotere[®]小鼠被注入了
10 0.35uCi 的 [¹⁴C]。

荷 C26 瘤的小鼠

在荷大肠癌 26 (C26) 瘤的雌性 BALB/c (17-20 克) 小鼠上进行
实验。在移入肿瘤前, 将小鼠背部的毛刮掉并化学去毛。通过皮下注
射悬浮在 50 μ l 生长介质中的 2×10^6 细胞, 在每一个小鼠的背部移入三
15 个 C26 肿瘤。细胞接种后 10 天肿瘤直径平均达到 8mm (5-10mm) 时,
对小鼠进行测试。将荷瘤小鼠汇集成 3 组 (LN, S-LN 和 TXT), 并皮
下注射相当于 1mg/kg 多烯紫杉醇剂量的 150 μ l 的配方。注射后动物
(n=5) 在 2、6 和 12 小时后死亡。

治疗前称量肿瘤。在 Soluene350 存在下消化肿瘤, 用 30%过氧化
20 氢漂白, 如实施例 6 中所述将闪烁液体加入获得的溶液中。分别通过
用闪烁计数器计算 [³H]和 [¹⁴C]的放射性来评价肿瘤中纳米胶囊和多烯
紫杉醇的量。

评价不同时间的肿瘤累积

图 9 显示了肿瘤中脂质纳米胶囊(LN)和隐形脂质纳米胶囊(S-LN)
25 在不同时间时的累积。由于较长的循环时间和隐形性质, 3% w/w 多
烯紫杉醇加载的 DSPE-PEG₂₀₀₀-6mol%的本发明的脂质纳米胶囊, 与
3%w/w 多烯紫杉醇加载的常规脂质纳米胶囊相比, 随时都显示出较高
的肿瘤累积 (P<0.05, 学生测试)。给药后 12 小时肿瘤中 S-LN 的量比
常规 LN 中的高至少 3 倍。

30 图 10 表示脂质纳米胶囊 (LN)、隐形脂质纳米胶囊 (L-SN) 和参
考的商业配方 Taxotere[®] (TXT)在肿瘤中累积的多烯紫杉醇的量。用单

因子方差分析来计算统计学上的显著差异（给定时间的配方之间和给定配方的不同时间之间）。当认为 P 值较大时 ($P < 0.05$)，用事后 Scheffe 测试来比较多对的平均值。静脉给药 2 个小时后，三个配方的在肿瘤中累积的多烯紫杉醇的量没有明显差异 ($P = 0.954$)。给药 6 个小时后，

5 S-LN 配方的在肿瘤中累积的多烯紫杉醇的量明显高于 TXT 的。给药 12 个小时后，可以注意到更大的差别：尽管 TXT 和 LN 的多烯紫杉醇的量没有明显区别，S-LN 比 LN 或 TXT 使得更多的多烯紫杉醇释放到肿瘤中（但 TXT 和 LN 在肿瘤中的多烯紫杉醇的量并没有令人满意的区别）。每个配方的数据分析表明作为 TXT 配方给药的多烯紫杉醇的

10 量不随时间变化 ($P = 0.995$)。常规 LN 给药的多烯紫杉醇在肿瘤中的量随时间略有提高，但没有统计显著性 ($P = 0.069$)。但是，对于加载多烯紫杉醇的本发明的 S-LN，肿瘤中多烯紫杉醇的量随时间显著提高。

总之，当施予相同剂量时，加载多烯紫杉醇的本发明的脂质纳米胶囊比商业的多烯紫杉醇的溶液(Taxotere[®])在肿瘤中累积更多。而且，

15 申请人注意到药物加载的本发明的隐形脂质纳米胶囊，由于其长循环性质，在靶向肿瘤位置的抗癌剂的量的方面比常规的脂质纳米胶囊更有效。

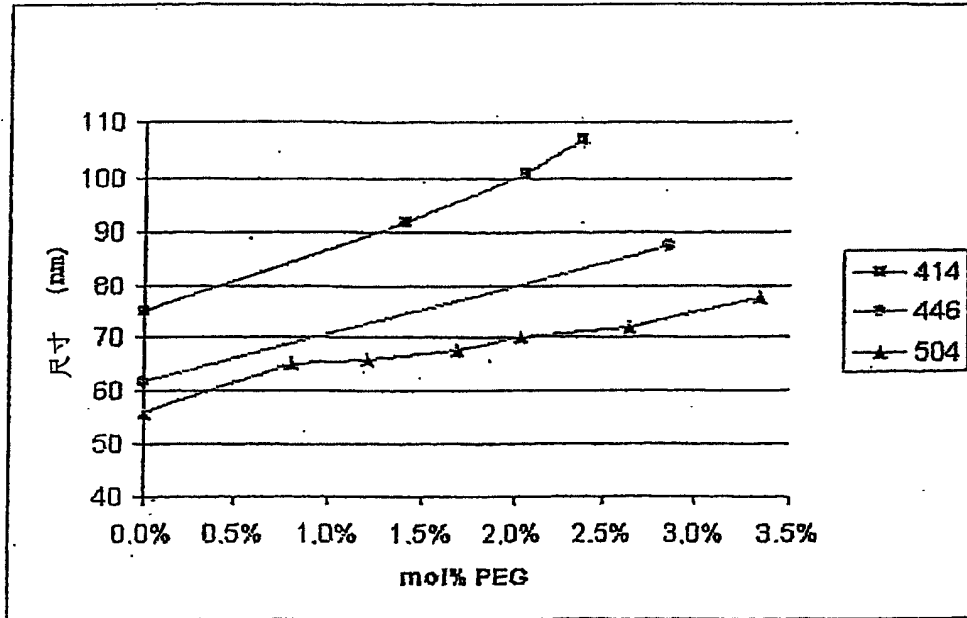


图 1

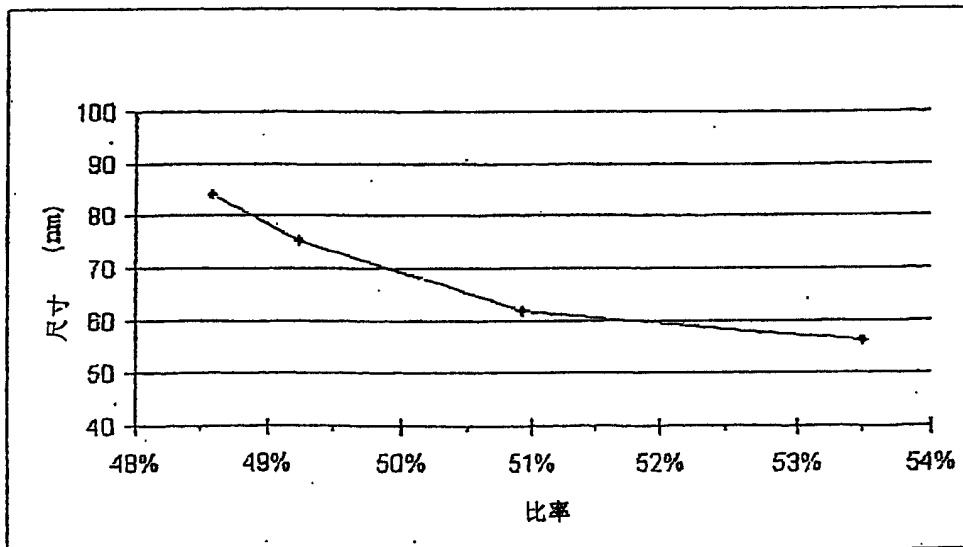


图 2

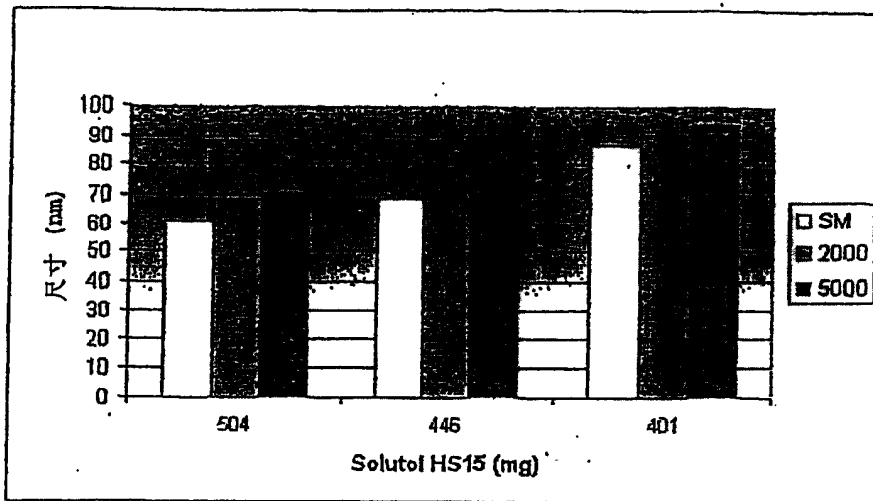


图 3

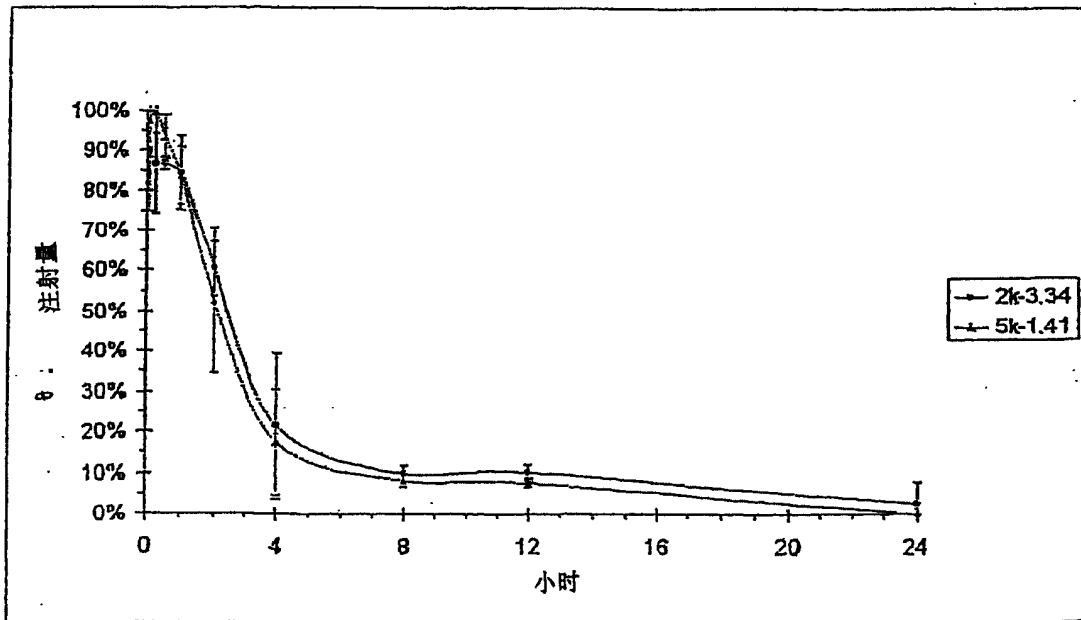


图 4

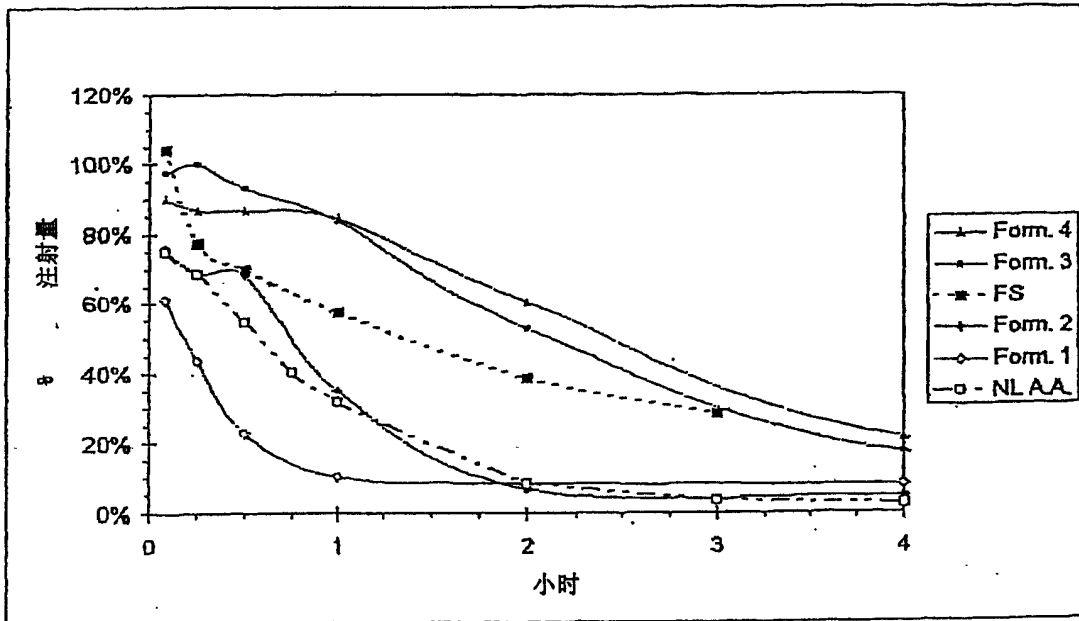


图 5

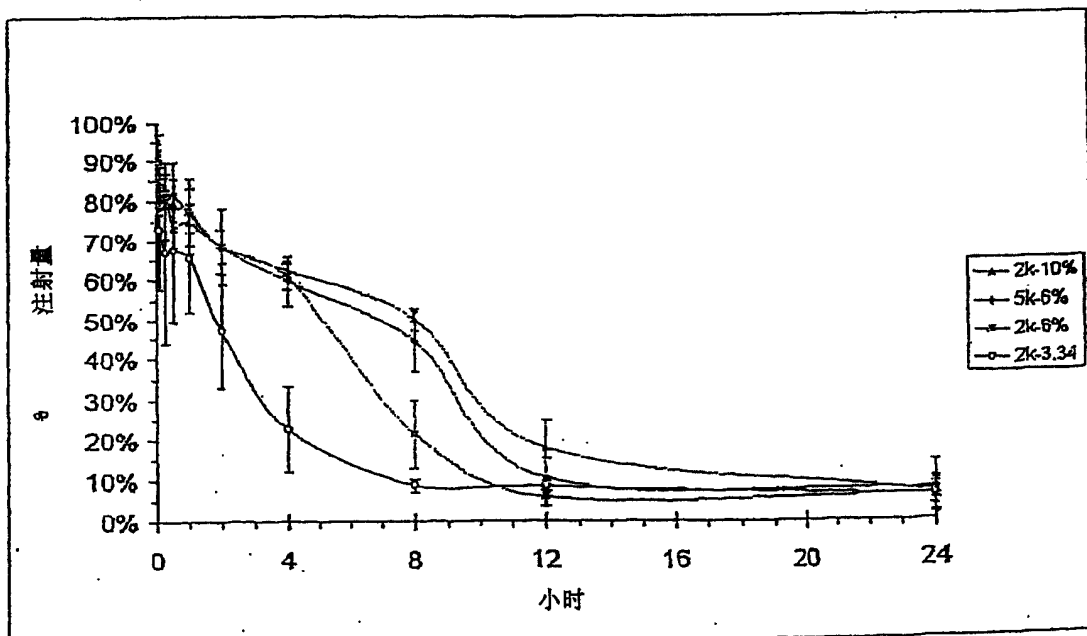


图 6

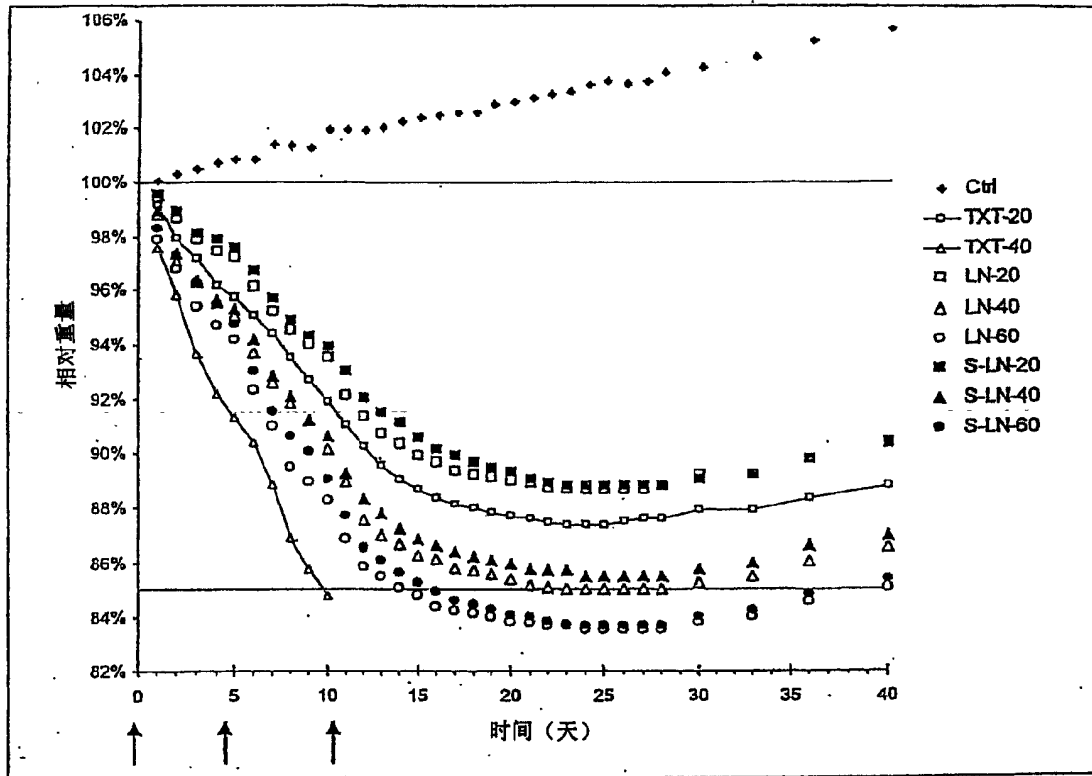


图 7

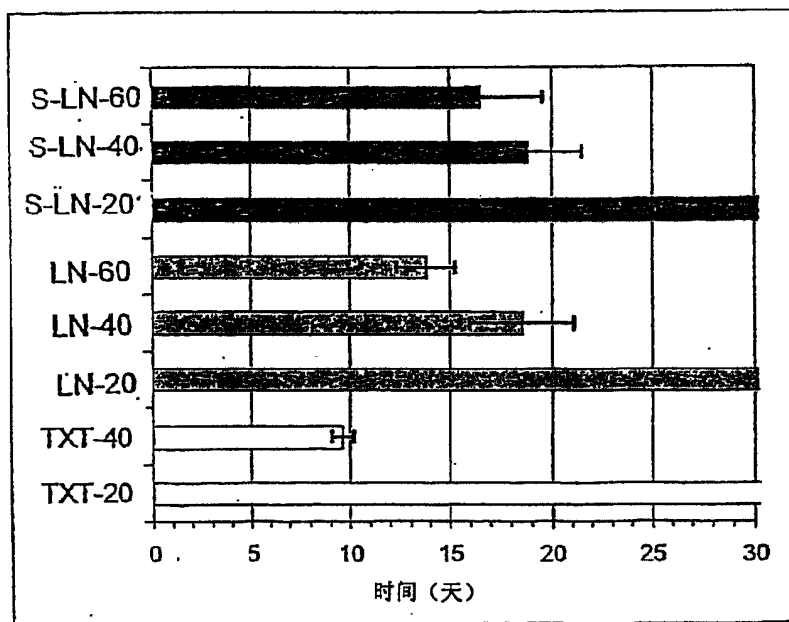


图 8

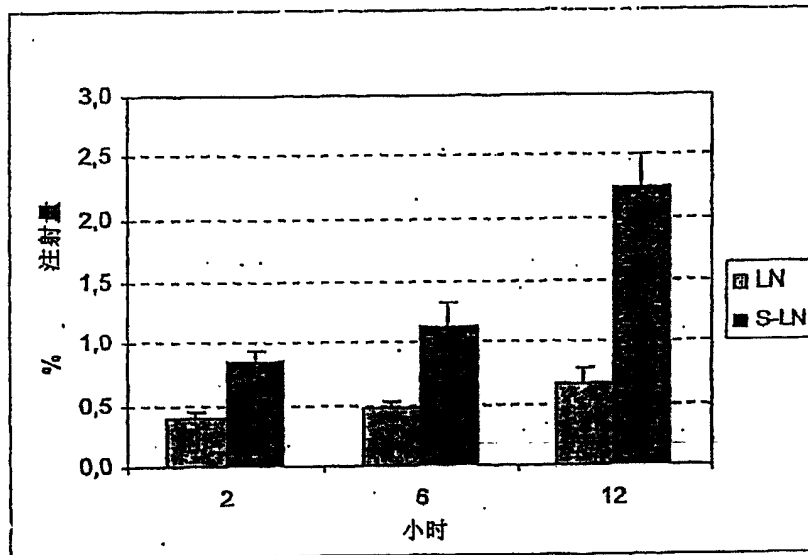


图 9

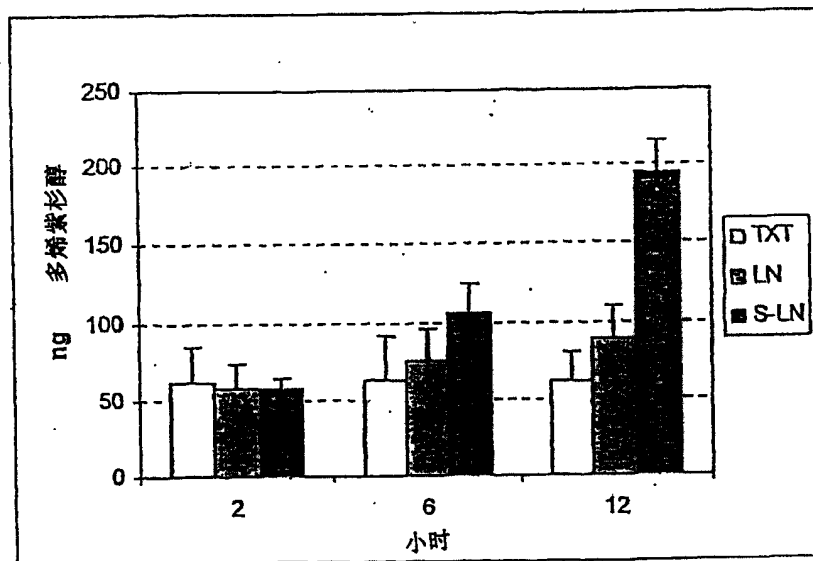


图 10