



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107750156 B

(45)授权公告日 2020.08.21

(21)申请号 201680025547.4

(22)申请日 2016.05.03

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107750156 A

(43)申请公布日 2018.03.02

(30)优先权数据
15166247.5 2015.05.04 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2017.11.02

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2016/059912 2016.05.03

(87)PCT国际申请的公布数据
W02016/177741 EN 2016.11.10

(73)专利权人 沃桑缇斯股份公司
地址 瑞士苏黎世

(72)发明人 让-克里斯托弗·勒鲁
文森特·福斯特
瓦伦蒂娜·阿戈斯托尼

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 郑斌 尹玉峰

(51)Int.Cl.
A61K 9/127(2006.01)

(56)对比文件
Nicolas Bertrand等.Transmembrane pH-Gradient Liposomes To Treat Cardiovascular Drug Intoxication.《NANO》.2010,第4卷(第12期),第7552-7558页.

审查员 武波

权利要求书1页 说明书8页 附图2页

(54)发明名称

用于制备跨膜pH梯度囊泡的方法

(57)摘要

本发明涉及用于制备跨膜pH梯度囊泡的方法。该方法的特征在于以下步骤:a)在摩尔渗透压浓度不高于200mOsm/l的水性介质中制备由至少一种基质物质制成的囊泡,其中所述基质物质选自两亲性脂质和两亲性嵌段共聚物;b)将所述囊泡转移到摩尔渗透压浓度比步骤a)中水性介质的摩尔渗透压浓度高至少200mOsm/l的碱性或酸性缓冲液中,以向所述囊泡施加渗透冲击并获得缓冲液填充囊泡;以及c)通过添加中和溶液来稀释包含所述缓冲液填充囊泡的所述水性介质与所述碱性或酸性缓冲液的混合物,以获得悬浮在悬浮缓冲液中的跨膜pH梯度囊泡,其中所述悬浮缓冲液与所述碱性或酸性缓冲液的pH值不同。

1. 用于制备跨膜pH梯度囊泡的方法,其包括以下步骤:

a) 在摩尔渗透压浓度不高于200mOsm/l的水性介质中制备由至少一种基质物质制成的囊泡,其中所述基质物质选自两亲性脂质和两亲性嵌段共聚物,并且对所述囊泡进行灭菌;

b) 将经灭菌的囊泡与摩尔渗透压浓度比步骤a)中所述水性介质的摩尔渗透压浓度高至少200mOsm/l的经灭菌的碱性或酸性缓冲液混合,以向所述囊泡施加渗透冲击并获得缓冲液填充囊泡;以及

c) 通过添加中和溶液来稀释包含所述缓冲液填充囊泡的所述水性介质与所述碱性或酸性缓冲液的混合物,以获得悬浮在悬浮缓冲液中的跨膜pH梯度囊泡,其中所述悬浮缓冲液与所述碱性或酸性缓冲液的pH值不同。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于对步骤a)中制备的所述囊泡通过高压灭菌进行灭菌。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于在进行步骤b)之前将所述囊泡储存第一时间段。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于在低于所述基质物质相变温度的温度下进行步骤b)。

5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于在不高于35℃的温度下进行步骤b)。

6. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于所述碱性或酸性缓冲液的摩尔渗透压浓度为至少250mOsm/l。

7. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于步骤a)的所述水性介质的pH为6.0至7.5。

8. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于步骤a)的所述水性介质的摩尔渗透压浓度等于或小于50mOsm/l。

9. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于在步骤b)结束时其中悬浮有所述缓冲液填充囊泡的所述水性介质与所述碱性或酸性缓冲液的混合物的摩尔渗透压浓度为至少200mOsm/l。

10. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于所述中和溶液的摩尔渗透压浓度为250mOsm/l至550mOsm/l。

11. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于步骤c)的所述中和溶液还包含选自以下的至少一种物质:甘油、木糖醇、TRIS、葡萄糖、镁盐、氢氧化钠、钠盐和钙盐。

12. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于包含所述跨膜pH梯度囊泡的所述悬浮缓冲液的pH值为5.5至8.5。

13. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于所述水性介质选自水、有机盐的水溶液、无机盐的水溶液、有机物质的水溶液、及其组合。

14. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于所述基质物质选自二棕榈酰磷脂酰胆碱、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇-胺-N-[甲氧基(PEG)-2000]、胆固醇和1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱、及其组合。

用于制备跨膜pH梯度囊泡的方法

[0001] 本发明涉及用于制备跨膜pH梯度囊泡的方法,涉及跨膜pH梯度囊泡,以及涉及这样的跨膜pH梯度囊泡的用途。

[0002] 最近,具有远程负载能力(例如跨膜pH梯度脂质体)的囊泡(例如脂质体)的静脉内(Forster等,Biomaterials 2012;33:3578-3585)或腹膜内(Forster等,Sci Transl Med 2014;6:258ra141)施用已被描述为治疗药物过量和内源代谢物中毒(例如高血氨症)的有吸引力的方法。这些脂质体具有内部隔室,其包含酸性或碱性缓冲剂,并且允许通过在内部隔室与外部环境之间存在pH梯度来以其电离态隔离有毒化合物。

[0003] 根据现有技术,通常如下制备跨膜pH梯度脂质体:在酸性或碱性介质中水合,然后滴定(Nichols和Deamer Biochimica et Biophysica Acta 1976;455:269-271),通过凝胶过滤(Mayer等,Biochimica et Biophysica Acta 1985;816:294-302)或透析(Forster等,Biomaterials 2012; 33:3578-3585)进行介质交换,然后快速用于封装药物。

[0004] 根据现有技术,在包含封装的化合物的最终制剂上进行对这些囊泡的灭菌。然而,如果要长时间维持跨膜pH梯度(如在生物解毒剂的情况下)和/或如果在高温下对脂质体进行灭菌,则这种方法并不合适。实际上,由于化学物质跨脂质体膜扩散和/或脂双层的脂质组分(主要是磷脂)的降解,跨膜pH梯度随着时间降低。此外,在碱性或酸性介质中,可加速脂质体组分(主要是磷脂)的化学降解,如果灭菌过程涉及加热(如高压釜 autoclave)的话尤其如此。

[0005] Stevens和Lee(Stevens和Lee Anticancer Res.2003;23:439-442)所描述的对该问题的解决方案在于制备无菌冻干脂质体,然后将其悬浮在酸性或碱性介质中,然后中和以产生跨膜pH梯度。该方法涉及冻干步骤,这通常意味着在无菌条件下制备脂质体,该过程可能昂贵且难以控制,当待冻干大体积时尤其如此。因此从工业角度来看该方法并不理想。此外,如果使用大量的脂质,如在生物解毒应用(例如腹膜透析)的情况下,冻干脂质体以可再生的方式快速重悬是有问题的。

[0006] US 5,393,530A描述了远程负载脂质体囊泡的方法。因此,通过将低摩尔渗透压浓度(osmolarity)(渗透浓度)的脂质体溶液与待封装物质混合来实现跨膜负载。然后,将混合物加热到高于构成脂质体囊泡之脂质的膜脂转变温度(T_c)的温度,以实现膜去稳定化并将物质并入囊泡内部。

[0007] Bertrand等(ACS nano 2010;4:7552-7558)描述了用于形成跨膜pH梯度脂质体的方法,其中在第一步中将酸性缓冲液封装在脂质体中。在第二步中,交换脂质体周围的外部缓冲液以在所形成的脂质体的内部和外部之间建立跨膜pH梯度。

[0008] 本发明的一个目的是提供可以以简单的方式生产稳定的跨膜pH梯度囊泡而无现有技术的前述限制的制备方法。特别地,所述制备方法的工业应用是可能的。

[0009] 该目的通过具有权利要求1特征的用于制备跨膜pH梯度囊泡的方法实现。

[0010] 这样的方法包括下文解释的步骤。在第一步中,在摩尔渗透压浓度不高于200mOsm/l的水性介质中制备由至少一种基质物质制成的囊泡。在一个实施方案中,水性介质的摩尔渗透压浓度等于或小于150mOsm/l,特别地等于或小于100mOsm/l,特别地等于

或小于75mOsm/l,特别地 等于或小于50mOsm/l,特别地等于或小于25mOsm/l,特别地等于或小于10mOsm/l,特别地等于或小于5mOsm/l,特别地等于或小于1 mOsm/l。在一个实施方案中,摩尔渗透压浓度为1mOsm/l至200mOsm/l 或在由任意前述摩尔渗透压浓度所构成的范围内(例如10mOsm/l至150 mOsm/l等)。

[0011] 在第二步中,将所述囊泡与摩尔渗透压浓度比步骤a)中水性介质的 摩尔渗透压浓度高至少200mOsm/l的碱性或酸性缓冲液混合,以向所述 囊泡施加渗透冲击(osmotic shock)并且获得缓冲液填充囊泡。在一个实 施方案中,碱性或酸性缓冲液的摩尔渗透压浓度比步骤a)中水性介质的 摩尔渗透压浓度高至少220mOsm/l,特别地高至少250mOsm/l,特别地 高至少300mOsm/l,特别地高至少350mOsm/l,特别地高至少400 mOsm/l,特别地高至少450mOsm/l,特别地高至少500mOsm/l,特别地 高至少550mOsm/l。在一个实施方案中,碱性或酸性缓冲液的摩尔渗透 压浓度比步骤a)中水性介质的摩尔渗透压浓度高200mOsm/l 至550 mOsm/l,或在由任意前述摩尔渗透压浓度所构成的范围内(例如220 mOsm/l至 500mOsm/l等)。

[0012] 因此,相对于第一步中使用的水性介质,所述碱性或酸性缓冲液是高 渗缓冲液。这样做时,会向囊泡临时施加渗透冲击。该渗透冲击导致酸性 或碱性缓冲液并入到囊泡内。因此,渗透冲击用于使囊泡短期去稳定化, 以允许将缓冲液并入囊泡中。得到缓冲液填充囊泡。在一个实施方案中, 高渗缓冲液还可包含电解质,其用于调节摩尔渗透压浓度或具有生理学功 能。

[0013] 值得注意的是,向悬浮在水性介质中的囊泡添加足量的碱性或酸性缓 冲液,因为否则的话将无法实现渗透冲击。取决于水性介质的摩尔渗透压 浓度与酸性或碱性缓冲液的摩尔渗透压浓度之间的差异,足量可以是相当 于在第一步中使用的水性介质的体积的至少0.1倍的体积,特别地至少0.3 倍,特别地至少0.5倍,特别地至少0.8倍,特别地至少 1.5倍,特别地 至少2倍,特别地至少2.5倍,特别地至少3倍,以及特别地至少5倍。在一个 实施方案中,可以以与水性介质的体积相等的体积添加碱性或酸性 缓冲液。在一个实施方案中,待添加的碱性或酸性缓冲液的体积可以是水 性囊泡悬浮液体积的0.1倍至5倍或由 前述值构成的任意其他范围(例如 0.3倍至3倍等)。

[0014] 在一个实施方案中,高渗缓冲液的pH值为pH 1至pH 6.9,特别地 pH 1.5至pH 6.5,特别地pH 2.0至pH 6.0,特别地pH 2.5至pH 5.5,特 别地pH 3.0至pH 5.0,特别地pH 3.5至pH 4.5,特别地pH 3.0至pH 3.5。

[0015] 在一个实施方案中,高渗缓冲液的pH值为pH 7.1至pH 14,特别地 pH 7.5至pH 13.5,特别地pH 8.0至pH 13.0,特别地pH 8.5至pH 12.5, 特别地pH 9.0至pH 12.0,特别 地pH 9.5至pH 11.5,特别地pH 10.0至 pH 11.0,特别地pH 10.5至pH 11.0。

[0016] 在一个实施方案中,高渗缓冲液可以包含额外的化学试剂,如络合剂 或螯合剂。

[0017] 在第三步中,通过添加中和水溶液来稀释包含缓冲液填充囊泡的水性 介质与碱性或酸性缓冲液的混合物。碱性或酸性缓冲液与中和溶液的混合 物构成悬浮缓冲液。因此,稀释之后,得到悬浮在悬浮缓冲液中的跨膜 pH梯度囊泡。因此,悬浮缓冲液的pH与缓冲 液填充囊泡中包含的碱性 或酸性缓冲液不同。在一个实施方案中,pH的差异为至少1pH单 位,特别地至少1.5pH单位,特别地至少2pH单位,特别地至少2.5pH单 位,特别地至少3pH 单位,特别地至少3.5pH单位,特别地至少4pH 单位,特别地至少4.5pH单位,特别地至少5pH

单位,特别地至少5.5pH 单位,特别地至少6pH单位,特别地至少6.5pH单位,特别地至少7pH 单位。

[0018] 在一个实施方案中,中和溶液的pH值为pH 7.1至pH 14,特别地 pH 7.5至pH 13.5,特别地pH 8.0至pH13.0,特别地pH8.5至pH12.5, 特别地pH9.0至pH12.0,特别地 pH9.5至pH11.5,特别地pH10.0至 pH11.0,特别地pH10.5至pH11.0。

[0019] 在一个实施方案中,中和溶液的pH值为pH1至pH6.9,特别地pH 1.5至pH6.5,特别地pH2.0至pH 6.0,特别地pH 2.5至pH 5.5,特别地pH 3.0至pH 5.0,特别地pH 3.5至pH 4.5,特别地pH 3.0至pH 3.5。

[0020] 由于悬浮缓冲液与碱性或酸性缓冲液之间的差异,实现了囊泡内部与 周围悬浮缓冲液之间的跨膜pH梯度。

[0021] 在一个实施方案中,对第一步中制备的囊泡进行灭菌以获得无菌囊泡 或含无菌囊泡的液体溶液。然后,当进行上述制备方法的第二步时使用这 些无菌囊泡。在该第二步中,在一个实施方案中使用无菌碱性或酸性缓冲 液。这样做时,可以制备完全无菌的缓冲液填充囊泡或完全无菌的包含缓 冲液填充囊泡的溶液。可以通过例如无菌过滤或高压灭菌进行灭菌。

[0022] 在另一个实施方案中,在进行将囊泡(或含囊泡之溶液)与碱性或酸 性缓冲液混合的步骤之前将囊泡储存第一时间段。如果在第一制备步骤之 后对囊泡进行灭菌,则可以 以非常合适的方式实现储存,因为在无菌囊泡 悬液中不会或很少发生降解过程。第一时间段可以是一天、数天、一周、 数周、一个月或甚至数月。应注意包含在水性介质中的无菌囊 泡是稳定实 体。由于其尚未像后来使用囊泡时那样包含任何特定酸性或碱性缓冲液, 因此不必担心由于囊泡降解或囊泡泄漏而导致的缓冲液损失。在一个实施 方案中,如果囊泡 包含少量电解质分子,则也是这样的,因为囊泡内相应 摩尔渗透压浓度将为1mOsm/l至 200mOsm/l。此外,由于在储存期间囊 泡保持在水性介质中,因此不会发生像冻干囊泡的情 况下那样的缺点。

[0023] 由于通过强渗透冲击实现碱性或酸性缓冲液的并入,因此不必通过提 高温度使 囊泡去稳定化。特别地,不必将囊泡加热到高于用于制备囊泡之 基质物质的转变温度的温 度。相当意外的是发现,如果使用脂质作为基质 物质,则不必在高于膜脂相变温度的条件 下进行将缓冲液并入囊泡的步 骤。

[0024] 因此,在一个实施方案中,在低于基质物质相变温度的温度下进行所 述方法的第 二步。如果使用脂质作为基质物质,则这样的相变温度可以是 膜脂转变温度。

[0025] 在一个实施方案中,在35℃或更低,特别地30℃或更低,特别地25℃ 或更低,特别 地20℃或更低,特别地15℃或更低,特别地10℃或更低的 温度下进行所述方法的第二步。 例如,进行第二步的一个合适的温度范围 为15至35℃。此外,可以根据期望和需要来建立 使用前述温度的其他温 度范围(例如10至30℃等)。在另一个实施方案中,在前述温度或温 度 范围内进行整个制备方法(在一些实施方案中排除灭菌过程,即,特别是 如果以高压灭 菌进行灭菌过程的话)。

[0026] 在一个实施方案中,中和溶液的摩尔渗透压浓度为250mOsm/l至550 mOsm/l,特别 地270至520mOsm/l,特别地290至500mOsm/l,特别地 300至480mOsm/l,特别地320至 450mOsm/l,特别地330至420mOsm/l, 特别地350至400mOsm/l。

[0027] 在一个实施方案中,中和溶液的摩尔渗透压浓度比包含含有缓冲液之囊泡的混合物(即,含缓冲液之囊泡的溶液)的摩尔渗透压浓度高或低不到200mOsm/l,特别地高或低不到150mOsm/l,特别地高或低不到100 mOsm/l,特别地高或低不到50mOsm/l,特别地高或低不到20mOsm/l,特别地高或低不到10mOsm/l。在一个实施方案中,中和溶液和包含含有缓冲液之囊泡的混合物之间摩尔渗透压浓度的差异为1mOsm/l至200 mOsm/l,特别地10mOsm/l至150mOsm/l,特别地20mOsm/l至100 mOsm/l,特别地30mOsm/l至80mOsm/l,特别地40mOsm/l至60 mOsm/l。

[0028] 在一个实施方案中,高渗缓冲液的摩尔渗透压浓度等于或高于250 mOsm/l,特别地等于或高于300mOsm/l,特别地等于或高于350mOsm/l,特别地等于或高于400mOsm/l,特别地等于或高于450mOsm/l,特别地等于或高于500mOsm/l,特别地等于或高于550mOsm/l,特别地等于或高于600mOsm/l,特别地等于或高于700mOsm/l,特别地等于或高于800 mOsm/l,特别地等于或高于900mOsm/l,特别地等于或高于1000 mOsm/l,特别地等于或高于1100mOsm/l,特别地等于或高于1200 mOsm/l,特别地等于或高于1300mOsm/l,特别地等于或高于1400 mOsm/l,特别地等于或高于1500mOsm/l,特别地等于或高于1600 mOsm/l,特别地等于或高于1700mOsm/l,特别地等于或高于1800 mOsm/l,特别地等于或高于1900mOsm/l,特别地等于或高于2000 mOsm/l。在一个实施方案中,所述摩尔渗透压浓度为250mOsm/l至2000 mOsm/l或在由任意前述摩尔渗透压浓度所构成的范围内(例如300 mOsm/l至1400mOsm/l等)。

[0029] 在一个实施方案中,在步骤b)结束时其中悬浮有缓冲液填充囊泡的水性介质与碱性或酸性缓冲液的混合物的摩尔渗透压浓度为至少200 mOsm/l,特别地至少220mOsm/l,特别地至少250mOsm/l,特别地至少300mOsm/l,特别地至少350mOsm/l,特别地至少400mOsm/l,特别地至少450mOsm/l,特别地至少500mOsm/l,特别地至少550mOsm/l。在一个实施方案中,所述摩尔渗透压浓度为200mOsm/l至550mOsm/l或在由任意前述摩尔渗透压浓度所构成的范围内(例如220mOsm/l至500 mOsm/l等)。

[0030] 在一个实施方案中,中和溶液的组成用于不破坏缓冲液填充囊泡,以不使这些囊泡去稳定化。其可包含中和物质(碱性或酸性,例如弱碱或弱酸),但也可包含用于调节摩尔渗透压浓度和/或提供生理学功能的化学剂。发现向中和溶液添加甘油和三(羟甲基)氨基甲烷(TRIS)尤其令人感兴趣,因为这允许包含更高浓度的钙盐。可在制备过程中添加钙盐以抵消一些弱酸(例如柠檬酸)的抗凝作用。由于囊泡将用于体内应用,所以这是特别重要的。氢氧化钠、钠盐(如NaCl)、镁盐、乳酸盐、甘油、艾考糊精、葡萄糖、山梨醇、果糖、氨基酸或木糖醇也可以用作中和溶液的成分。

[0031] 在一个实施方案中,包含跨膜pH梯度囊泡的悬浮缓冲液的pH值为5.5至8.5,特别地6.0至8.0,特别地6.5至7.7,特别地6.8至7.5,特别地7.0至7.4。因此,悬浮缓冲液可具有生理pH值。

[0032] 在一个实施方案中,水性介质既不是酸也不是碱,并且pH值在7左右,如6.0至7.5,特别地6.1至7.4,特别地6.2至7.3,特别地6.3至7.2,特别地6.4至7.1,特别地6.5至7.3,特别地6.6至7.3,特别地6.7至7.3,特别地6.8至7.3,特别地6.9至7.1,特别地6.95至7.01,特别地pH值为7.0。因此,所述水性介质也可称为中性水性介质。

[0033] 在一个实施方案中,水性介质选自水、有机盐的水溶液、无机盐的水溶液、有机物

质的水溶液、及其组合。

[0034] 在一个实施方案中,水性介质选自pH值在7左右的有机盐的水溶液、pH值在7左右的无机盐的水溶液、pH值在7左右的有机物质的水溶液、水、及其组合。

[0035] 水可以是例如蒸馏水、去离子水、超纯水或任意其他类型的纯水。当使用有机或无机盐或其他有机化合物时,在一个实施方案中,这些盐或化合物以低浓度存在于水性介质中,以维持引起渗透冲击的水性介质和高渗缓冲液之间的摩尔渗透压浓度差异,所述差异足够大以诱导酸性或碱性高渗缓冲液扩散到囊泡内部隔室中。

[0036] 水性介质是类似水的介质(尤其在pH方面)但可包含低浓度的盐或化合物,例如用于在中性范围内缓冲pH值。在一个实施方案中,水性介质的摩尔渗透压浓度为0mOsm/l至49mOsm/l,特别地5mOsm/l至45 mOsm/l,特别地10mOsm/l至40mOsm/l,特别地15mOsm/l至35 mOsm/l,特别地20mOsm/l至30mOsm/l,特别地25mOsm/l至28 mOsm/l。

[0037] 在一个实施方案中,基质物质选自两亲性脂质和两亲性嵌段共聚物。如果使用两亲性脂质,则形成脂质体作为囊泡。合适的脂质体有多层囊泡(multilamellar vesicle, MLV),小单层囊泡(small unilamellar vesicle, SUV)和大单层囊泡(large unilamellar vesicle, LUV)。

[0038] 如果使用两亲性嵌段共聚物,则形成聚合物囊泡(polymersome)作为囊泡。合适的两亲性嵌段共聚物是线形二嵌段或三嵌段共聚物。嵌段共聚物可以具有一个疏水性嵌段和一个或两个其他亲水性嵌段。梳状共聚物也是可能的,其中这样的梳状共聚物的骨架嵌段可以是亲水的,并且梳状分支可以是疏水的。树枝化嵌段共聚物也是可能的,其中这些共聚物的树状聚体(dendrimer)部分可以是亲水的。在所有情况下,亲水性嵌段可以由聚(乙二醇)(PEG/PEO)或聚(2-乙基噁唑啉)构成。此外,在所有情况下,疏水性嵌段可以由聚(二甲基硅氧烷)(PDMS)、聚(己内酯)(PCL)、聚(丙交酯)(PLA)或聚(甲基丙烯酸甲酯)(PMMA)构成。

[0039] 在一个实施方案中,基质物质是选自以下的至少一种两亲性脂质:二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇-胺-N-[甲氧基(PEG)-2000](DSPE-PEG)、胆固醇、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(POPC)、及其组合。

[0040] 在一个方面,本发明还涉及可以通过根据以上解释的方法获得的跨膜pH梯度囊泡。这些跨膜pH梯度囊泡的稳定性不同于现有技术已知的囊泡。这是由上述特定制备方法导致的结构差异造成的。因此,根据上述方法制备的囊泡是现有技术尚未知晓的。

[0041] 在一个方面,要求保护这些跨膜pH梯度囊泡作为体外或体内(在人或动物中,特别是哺乳动物或啮齿类动物)的解毒剂的用途。其可用于提取并结合不需要的物质,例如过量的药物和毒物(或其代谢物)或可导致中毒的高含量内源代谢物。可以被所述跨膜pH梯度囊泡摄取的事物的实例是氨和丙酸。从溶液(体内或体外)中除去氨和丙酸导致从氨和/或丙酸的这样的溶液中解毒。

[0042] 本文公开的所有实施方案可以以任何期望的方式组合。所述方法的实施方案可以转移到所述囊泡和所述用途,反之亦然。

[0043] 本发明另外的方面和细节将参考附图和以下实施例进行解释。在附图中:

[0044] 图1示出了蒸汽灭菌前(上图)和蒸汽灭菌后(下图)脂质体水性悬浮液的一个实施方案的HPLC-电雾式检测器(charge aerosol detector, CAD)迹线;以及

[0045] 图2示出了蒸汽灭菌前和蒸汽灭菌后脂质体的一个实施方案的相对脂质浓度。

[0046] 实施例1

[0047] 脂质体制剂。通过膜水合方法制备由85:14:1摩尔%的二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC,Lipoid)、胆固醇(Sigma-Aldrich)和1,2-二硬脂酰基-Sn-甘油基-3-磷酸乙醇-胺-N-[甲氧基(PEG)-2000](DSPE-PEG,Lipoid)构成的脂质体。将1685mg DPPC、146mg胆固醇和75mg的DSPE-PEG共溶解在10mL二氯甲烷:甲醇95:5%v/v中。随后通过旋转蒸发除去有机溶剂,并且将脂质膜保持在真空下过夜。将干燥膜用27mL超纯水水合(脂质浓度=100mM),同时在56°C下加热且缓慢混合45分钟,最后通过在密封瓶中于121°C下高压灭菌20分钟来灭菌。

[0048] 稳定性。将脂质体在高压釜中进行蒸汽灭菌,以评估其通过所施加的热而降解。已知填充酸或碱的脂质体分别受到酸水解或碱水解。本发明形成的脂质体完全不会因蒸汽灭菌而降解。

[0049] 如图1所示,蒸汽灭菌前(图1中的上图)和蒸汽灭菌后(图1中的下图)的脂质体水性悬浮液的HPLC-电雾式检测器(CAD)迹线重叠。

[0050] 通过评估脂质体的相对脂质浓度来确认这些结果。从图2中可以看出,与蒸汽灭菌前的相对脂质浓度相比,蒸汽灭菌后的相对脂质浓度保持稳定。如果观察到水解,则脂质浓度已降低。

[0051] 渗透冲击。将如此获得的脂质体与包含290mM柠檬酸(柠檬酸一水合物)、55mM柠檬酸钙(柠檬酸三钙四水合物)和80mM HCl的27mL 400mM柠檬酸盐缓冲液(pH 2,700mOsm/l)一起孵育30分钟。在室温下轨道摇动下进行孵育。

[0052] 梯度的产生。通过用由280mM Tris(三(羟甲基)氨基甲烷,Panreac Applichem)和50mM氯化钙(脱水氯化钙,Merck Millipore)制成的106mL中和溶液(pH=10.6,410mOsm/l)中和和外部酸性介质来产生跨膜pH梯度。将所得16.9mM、pH 7.4、312mOsm/l的脂质体制剂用于体外氨摄取(uptake)研究。

[0053] 体外氨摄取。将保持在37°C下的并排扩散池(PermGear)用于监测HEPES缓冲盐水(20mM,300mOsm/l)中的氨摄取。通过聚碳酸酯膜(孔径=100nm,Steriltech)将脂质体物理地隔离在两室系统的一侧。扩散池内脂质体和氨的浓度分别为4.2和1.5mM。在指定时间点,从不含脂质体的隔室取50μL等分试样并通过酶促测定(氨酶促试剂盒,Sigma Aldrich)评估氨浓度。通过以下等式量化氨摄取(等式1和2):

$$[0054] \quad \text{摄取} = \frac{\text{mmol 封装的氨}}{\text{mmol 脂质}} = \frac{\text{mmol 总氨} - \text{mmol 游离氨}}{\text{mmol 脂质}} \quad \text{[等式 1]}$$

$$[0055] \quad \text{摄取(\%)} = \frac{\text{摄取}}{\text{最大摄取}} \times 100 = \frac{\text{摄取}}{\text{mmol 总氨/mmOsm 脂质}} \times 100 \quad \text{[等式 2]}$$

[0056] 孵育5小时后,根据等式2计算的氨摄取为82±5%。

[0057] 实施例2

[0058] 脂质体制剂。如上述(实施例1)制备由DPPC、胆固醇和DSPE-PEG构成的脂质体并灭菌。

[0059] 渗透冲击。将如此获得的脂质体与包含490mM柠檬酸、55mM柠檬酸钙、125mM氯化钠(Fischer Scientific)和135mM HCl的13.5mL 600mM柠檬酸盐缓冲液(pH2,1040mOsm/l)

一起孵育30分钟。在室温下轨道摇动下进行孵育。

[0060] 梯度的产生。通过用由160mM Tris、35mM氯化钙和100mM氯化钠制成的119.5mL中和溶液 (pH10.6, 440mOsm/l) 稀释脂质体来产生跨膜pH梯度。将最终的16.9mM、pH7.5的脂质体制剂用于体外氨摄取研究。

[0061] 体外氨摄取。通过上述并排扩散池方法 (实施例1) 研究体外氨摄取。孵育5小时后, 脂质体内的平均氨摄取为 $92 \pm 8\%$ 。

[0062] 实施例3

[0063] 脂质体制剂。如上述 (实施例1) 制备由DPPC、胆固醇和DSPE-PEG 构成的脂质体并灭菌。

[0064] 渗透冲击。通过如实施例2中所述孵育脂质体来进行渗透冲击。

[0065] 梯度的产生。通过用由155mM氢氧化钠、210mM甘油、20mM 氯化钙和20mM Tris制成的119.5mL中和溶液 (pH=12.7, 480mOsm/l) 稀释脂质体来产生跨膜pH梯度。所得16.9mM脂质体制剂为pH 6和341 mOsm/l。

[0066] 体外氨摄取。通过上述并排扩散池的方法 (实施例1) 研究体外氨摄取。孵育5小时后, 平均氨摄取为 $96 \pm 3\%$ 。

[0067] 实施例4

[0068] 脂质体制剂。通过膜水合方法制备由54:45:1摩尔%的1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱 (POPC, Lipoid)、胆固醇和DSPE-PEG 构成的脂质体。将1108mg POPC、469mg胆固醇和75mg DSPE-PEG 共溶解在10mL的二氯甲烷:甲醇95:5%v/v中。随后通过旋转蒸发除去有机溶剂, 并且将脂质膜保持在真空下过夜。将干燥膜用27mL超纯水水合 (脂质浓度=100mM), 同时在56°C下加热且缓慢混合30分钟, 最后通过在密封瓶于121°C下高压灭菌20分钟来灭菌。

[0069] 渗透冲击。通过如实施例2中所述孵育脂质体来进行渗透冲击。

[0070] 梯度的产生。通过用由150mM氢氧化钠、220mM甘油、10mM 氯化钙和20mM Tris制成的119.5mL中和溶液 (pH=12.7, 480mOsm/l) 稀释脂质体来产生跨膜pH梯度。所得16.9mM脂质体制剂为pH 7.4和 350mOsm/l。

[0071] 体外氨摄取。通过上述并排扩散池的方法 (实施例1) 研究体外氨摄取。孵育5小时后氨摄取为 $53.5 \pm 8.7\%$ 。

[0072] 实施例5

[0073] 脂质体制剂。如上述 (实施例1) 制备由DPPC、胆固醇和DSPE-PEG 构成的脂质体并灭菌。

[0074] 渗透冲击。在室温下轨道摇动下, 将脂质体与13.5ml乙酸钙缓冲液 (pH 10, 1050mOsm/l) 一起孵育30分钟。缓冲液含有350mM乙酸钙、0.75mM氢氧化钠。

[0075] 梯度的产生。用包含230mM甘油、50mM氯化钠、20mM Tris和 20mM乙酸的33mL溶液 (pH=6.7, 380mOsm/l) 稀释脂质体。将所得30mM、pH 7、335mOsm/l的脂质体制剂用于体外丙酸的摄取研究。

[0076] 体外丙酸的摄取。将保持在37°C下的并排扩散池用于监测标有1% [1-¹⁴C]丙酸的丙酸溶液 (50mCi/mmol, BIOTREND Chemikalien) 的体外摄取。通过聚碳酸酯膜 (孔径=100nm) 将脂质体物理地隔离在两室系统的一侧。在用HEPES缓冲盐水 (20mM, 300mOsm/l) 稀

释后,扩散池内脂质体和丙酸的浓度分别为4.2和1.5mM。在指定时间间隔(6-30分钟,1-2-3-4-5小时),从不含脂质体的隔室中取50 μ L等分试样,与3ml Ultima Gold混合物(Perking Elmer)混合并通过闪烁计数(LS 6500闪烁计数器,Beckman)评估每个样品中的放射性(β 衰变)。通过与校准曲线比较衰变来确定代谢物浓度,其线性度确定为31 μ M至2mM。通过以下等式量化丙酸(PA)摄取(等式3和4):

$$[0077] \quad \text{摄取} = \frac{\text{nmol 封装的 PA}}{\text{nmol 脂质}} = \frac{\text{nmol 总 PA} - \text{nmol 游离 PA}}{\text{nmol 脂质}} \quad \text{[等式 3]}$$

$$[0078] \quad \text{摄取(\%)} = \frac{\text{摄取}}{\text{最大摄取}} \times 100 = \frac{\text{摄取}}{\text{nmol 总 PA/nmol 脂质}} \times 100 \quad \text{[等式 4]}$$

[0079] 孵育5小时后,根据等式4计算的丙酸摄取为25 \pm 3%。

[0080] 实施例6

[0081] 脂质体制剂。如上述(实施例1)制备由DPPC、胆固醇和DSPE-PEG 构成的脂质体并灭菌。

[0082] 渗透冲击。将如此获得的脂质体与包含490mM柠檬酸、15mM柠檬酸钙、74mM柠檬酸钠(Sigma Aldrich)、6mM柠檬酸镁(Applichem Panreac)、35mM氯化钠和178mM HCl的13.5ml 600mM柠檬酸盐缓冲液(pH 2,1050mOsm/l)一起孵育30分钟。在室温下轨道摇动下进行孵育。

[0083] 梯度的产生。通过用由43mM氢氧化钠、260mM木糖醇(ABCR GmbH)、1mM氯化钙、20mM Tris、15mM氯化钠制成的279,5mL中和溶液(pH=12.6,360mOsm/l)稀释脂质体来产生跨膜pH梯度。所得8.4mM、pH 6.4、350mOsm/l的脂质体制剂用于体内氨摄取研究。

[0084] 体内氨摄取。使六个成年雄性Sprague-Dawley大鼠(重约300g; Charles River Laboratories)适应环境5天;允许其任意进食和饮水,并且其遵循12-小时光/暗周期。在实验当天,将新鲜制备的16.7mM透析溶液预热至37 $^{\circ}$ C并缓慢输注(60mL/kg)到保持在异氟烷麻醉(0.8mL/分钟的氧气流中2.5%)下的大鼠的腹膜腔中。使用20规格的皮下注射针进行滴注。在指定时间点,将大鼠短暂麻醉(在类似条件下使用异氟烷吸入),并且用22规格的穿刺硅酮导管(Venflon;Becton Dickinson)通过无菌腹部穿刺抽取约400 μ L的透析液。将等分试样立即在液氮中冷冻并保存在-80 $^{\circ}$ C以用于通过酶促测定(Enzymatic Ammonia Assay,Sigma Aldrich)的额外氨含量确定。在进行测定之前,将100 μ L的每个样品用50 μ L的Triton-X-100(3%)稀释并在超声浴中超声5分钟。动物实验依照州动物管理机构(Kantonales Veterinäramt Zürich)批准的程序和方案进行。实验结束时,将动物通过二氧化碳窒息安乐死,然后进行胸廓切开术。发现处理4小时后透析液样品中的平均氨浓度为1.25 \pm 0.2mM。

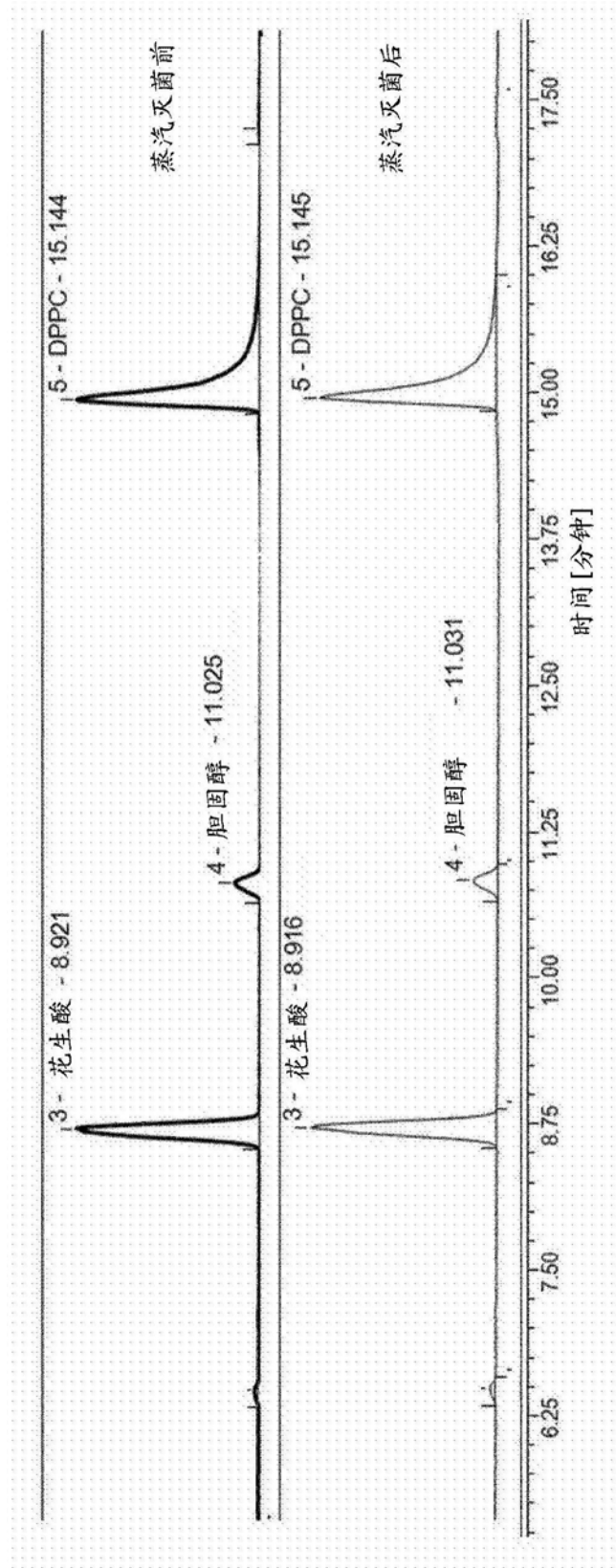


图1

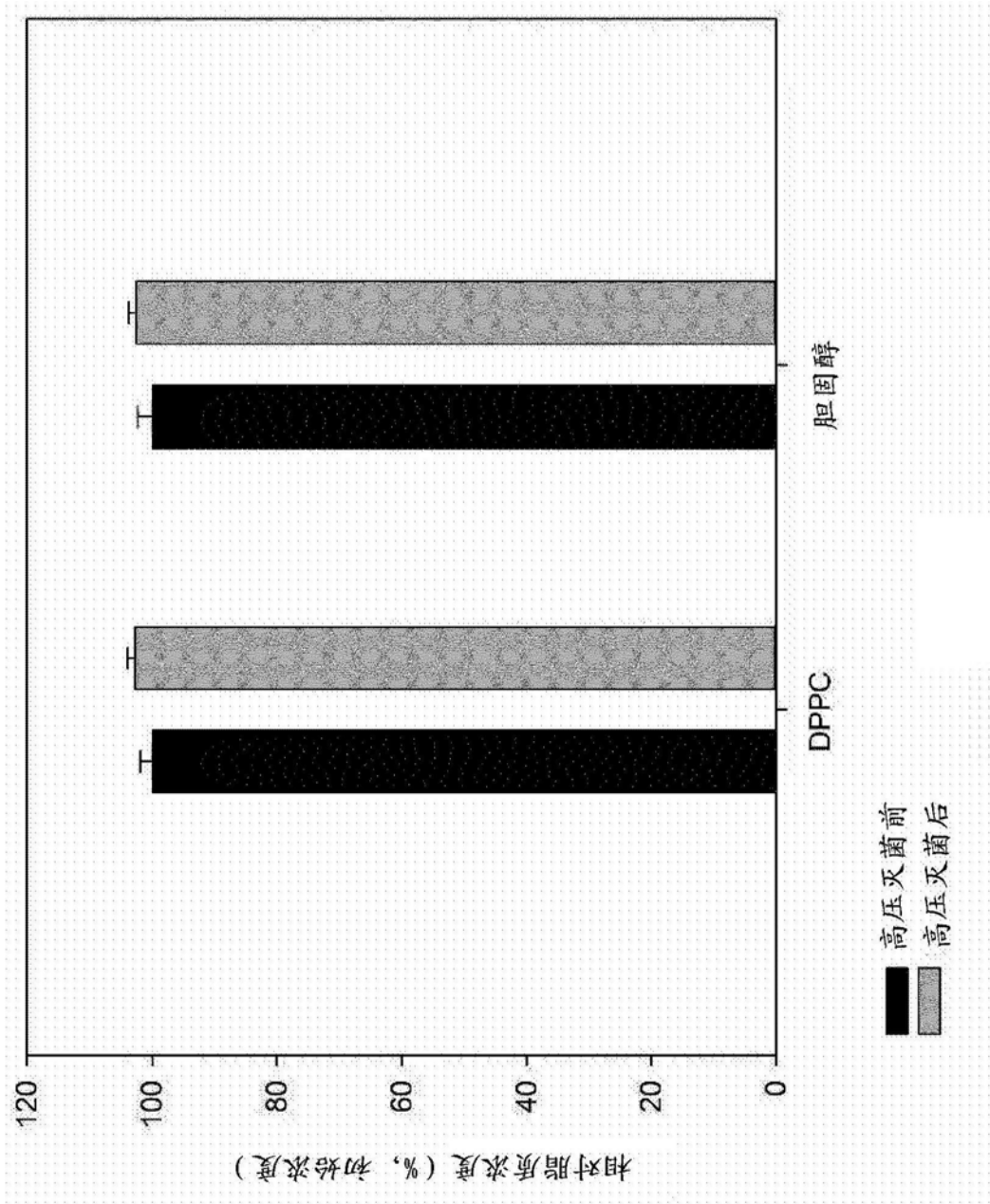


图2