

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
A61K 47/48 (2006.01)



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02810185.5

[45] 授权公告日 2007 年 1 月 17 日

[11] 授权公告号 CN 1294991C

[22] 申请日 2002.3.26 [21] 申请号 02810185.5

[30] 优先权

[32] 2001.3.26 [33] US [31] 60/278,869

[86] 国际申请 PCT/US2002/009330 2002.3.26

[87] 国际公布 WO2002/076428 英 2002.10.3

[85] 进入国家阶段日期 2003.11.18

[73] 专利权人 阿尔扎公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 S·扎利普斯基 T·M·阿伦  
S·K·黄

[56] 参考文献

WO0064483A2 2000.11.2 A61K47/48

US5643599A 1997.7.1 A61K9/127

US5891468A 1999.4.6 A61K9/127

US6143321A 2000.11.7 A61K9/127

审查员 张志聪

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
代理人 张元忠 孟凡宏

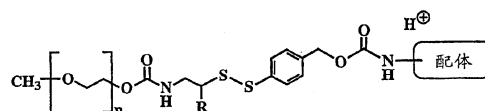
权利要求书 2 页 说明书 36 页 附图 9 页

[54] 发明名称

用于改善治疗物质的细胞内传递的脂质体组合物

[57] 摘要

描述了一种脂质体组合物和用该组合物完成脂质体所捕获物质的细胞内传递的方法。该脂质体包含 pH 敏感的脂质并包括一种将该脂质体直接靶向于靶细胞上的靶向配体。该脂质体还包含一种稳定化组分，如聚合物衍生的脂质，其中该聚合物通过一种可释放键被连接到该脂质上。该脂质体的给药导致了用于向细胞内传递所捕获物质的脂质体的细胞内在化和去稳定化。



1. 一种用于治疗物质的细胞内传递的脂质体组合物，其包含由如下物质所形成的脂质体：(i) pH-敏感的脂质；(ii) 1-20 mole% 的通过一种键与亲水性聚合物连接的脂质，所说的键在响应存在的或诱发的生理条件时可有效释放该亲水性聚合物链；(iii) 靶向配体；和 (iv) 所捕获的治疗物质；

其中所说的组合物能有效地结合于靶细胞并当与缺乏所说可释放键和/或所说靶向配体的类似脂质体所传递的细胞内物质浓度相比时，其可释放所说的捕获物质以使得该物质的细胞内浓度增加至少 2 倍。

2. 如权利要求 1 所述的组合物，其中所说的 pH-敏感的脂质是二油酰基磷脂酰乙醇胺。
3. 如权利要求 1 所述的组合物，其中所说的脂质体包含稳定化的组分。
4. 如权利要求 3 所述的组合物，其中所说的稳定化组分是半琥珀酸胆甾醇酯。
5. 如权利要求 1 所述的组合物，其中所说的与所述的聚合物连接的脂质是与聚乙二醇连接的磷脂酰乙醇胺。
6. 如权利要求 1 所述的组合物，其中所说的靶向配体是一种抗体或抗体片段。
7. 如权利要求 6 所述的组合物，其中所说的抗体片段选自抗-CD19、抗-CD20 和抗-CD22。
8. 如权利要求 1 所述的组合物，其中所说的可释放的键包含一种二硫化物键。
9. 如权利要求 8 所述的组合物，其中所说的二硫化物键是二硫代苜基键。
10. 一种用于增加脂质体所捕获物质的细胞内细胞毒性的组合物，其包含如权利要求 2-8 任一项所述的脂质体，当被给药时所说的脂质体可以完成 (i) 可释放键的裂解，从而释放所说的亲水性

聚合物链; (ii) 所说配体与靶细胞的结合, 其中所说的结合发生于所说的裂解之前或之后; 和 (iii) 所说脂质体被所说靶细胞的内在化, 从而使得所说物质的细胞内毒性比由缺乏所说可释放键和/或所说靶向配体的相似脂质体所传递物质的细胞内浓度至少高两倍。

11. 如权利要求 10 所述的组合物, 其中所说的可释放键的裂解是由血液中天然存在的组分来完成的。
12. 一种用于增加治疗物质在细胞核内的积聚的如权利要求 2-8 任一项所述的组合物, 当被给药时所说的脂质体可以完成 (i) 可释放键的裂解, 从而释放所说的亲水性聚合物链; (ii) 所说配体与靶细胞的结合, 其中所说的结合发生于所说的裂解之前或之后; 和 (iii) 所说脂质体被所说靶细胞的内在化从而当与由缺乏所说可释放键和/或所说靶向配体的相似脂质体所传递物质的细胞内浓度相比时, 可以获得所说物质在所说靶细胞核内至少高两倍的积聚。
13. 如权利要求 12 所述的组合物, 其中所说可释放键的裂解是由血液中天然存在的组分完成的。

## 用于改善治疗物质的细胞内传递的脂质体组合物

### 技术领域

[0001]本申请涉及用于改善被捕获物质的细胞内传递的脂质体组合物。更特定地,本发明涉及用于增加被脂质体所捕获物质的细胞内细胞毒性的组合物和方法。

### 背景技术

[0002]一直认为脂质体是向细胞内传递治疗物质的可能载体。但是,迄今为止,成功地获得脂质体所捕获物质的细胞内传递一直受到各种因素的限制。原因之一在于在将脂质体全身给药于血液后,脂质体被网状内皮系统迅速从循环中除去。另一个原因在于本来就难以将分子,特别是大分子或带电分子传递到细胞的细胞质和/或核中。

[0003]一种改善被脂质体所捕获物质的细胞内传递的方法是通过在脂质体双层膜中包含聚乙二醇(PEG)衍生的脂质而来延长脂质体的血液循环持续时间(见例如US 5,013,556)。通过延长脂质体在血液中的保留时间可以改善被细胞吸收的机会。

[0004]另一种改善被脂质体所捕获物质的细胞内传递的方法是在脂质体上提供一种靶向部分或配体(Klibanov 等人,*J. Liposome Res.*, 2(3):321(1992))。靶向部分与靶细胞上受体的结合改善了脂质体及其所捕获物质细胞内吸收的可能性。

[0005]在现有技术中还描述了脂质体能与靶细胞融合(US 5,891,468)。融合脂质体一般包括一种从脂质体的外表面延伸出来的用于渗透到靶细胞膜中的疏水片段。

[0006]已经对作为将所捕获物质传递到细胞内的方法的在微酸性条件下不稳定的脂质体(所谓的pH敏感的脂质体)进行了描述(Slepushkin 等人,*J. Biol. Chem.*, 272(4):2382(1997);Wang 等人,*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84:7851(1987),Liu 等人,*Biochim. Biophys. Acta*, 981:254(1989))。这些脂质体主要由在确定的pH范围内形成脂质双分子层的脂质如二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)所组成。在该pH范围之外,该脂质双分子层不稳定。在该类脂质体通过胞吞作用进入细胞后,在核内体内的酸性pH使得该pH-敏感

的脂质体不稳定并释放出所捕获的物质。

[0007]同“常规的”、“非 pH-敏感的脂质体”一样,因为 pH-敏感的脂质体具有短的循环持续时间,所以已经报道了通过加入 PEG-衍生化的脂质来延长其血液循环时间(Slepshkin 等人)。但是,PEG-衍生化脂质的加入降低了该脂质体的 pH-敏感性,使其丧失了所需的脂质体双分子层的去稳定和同时所需的所捕获药物迅速释放到细胞内的作用。

[0008]一种获得具有长血液循环持续时间并同时保留脂质体迅速去稳定能力的 pH-敏感脂质体的方法是使用其中 PEG 是通过可化学裂解的键如二硫化物而被连接到脂质上的 PEG-衍生化的脂质(Kirpotin 等人, *FEBS Letters*, 388:115 (1996))。但是,其希望该脱稳定化发生于细胞内以使得被脂质体所捕获的物质在细胞内可以达到高浓度水平。由 Kirpotin 等人(Id.)所描述的长循环的 pH 敏感脂质体被设计成通过释放 PEG 链而在细胞外脱稳定化。

[0009]因此,在现有技术中仍然需要能与靶细胞特定结合并同时能迅速在细胞内释放出所捕获物质的脂质体组合物。

### 本发明的概述

[00010]因此,本发明的目的是要提供一种能细胞内传递被脂质体所捕获物质的脂质体组合物。

本发明的另一个目的是要提供一种脂质体组合物和用其治疗各种病症的方法,特别是治疗血液恶性肿瘤的方法。

[00011]因此,本发明一方面包括一种用于细胞内传递治疗物质的脂质体组合物。该组合物由脂质体所组成,所说的脂质体由如下物质所形成:(i)一种 pH-敏感的脂质;(ii)1-20 摩尔百分比的用一种亲水性聚合物衍生化的脂质,该聚合物通过一种键而被连接到该脂质上,该键对于存在或诱导的生理学条件有响应从而可有效释放该亲水性聚合物链;(iii)一种靶向配体;和(iv)被捕获的治疗物质。该组合物可有效结合到靶细胞上并可有效释放所捕获的物质,从而使得当与由缺乏可释放键和/或靶向配体的相似脂质体所传递的细胞内药物浓度相比时,药物的细胞内浓度至少增加两倍。

[00012]在一个实施方案中,该 pH-敏感的脂质是二油酰基磷脂酰

乙醇胺(DOPE)。在另一个实施方案中,该脂质体进一步包含一种稳定组分,如半琥珀酸胆甾醇酯(CHEMS)。

[00013]在一个实施方案中,该聚合物衍生化的脂质是用聚乙二醇衍生化的磷脂酰乙醇胺。该靶向配体可以是抗体或抗体片段,并且对于某些病症的治疗而言,优选是得自抗-CD19、抗-DC20、抗-CD22的抗体或片段。

[00014]在一个实施方案中,将亲水性聚合物连接到脂质上的可释放键包含一种二硫化物键。在一个优选的实施方案中,该二硫化物键是二硫代苄基键的一部分。

[00015]在另一方面,本发明包括一种用于增加被脂质体所捕获物质的细胞内细胞毒性的方法。该方法包括提供具有如上所述组分的脂质体,并将该脂质体进行给药以完成(i)可释放键的裂解,从而释放出该亲水性的聚合物链;(ii)配体与靶细胞的结合,其中所说的结合发生在该裂解之前或之后;和(iii)脂质体被靶细胞的内在化。相对于由缺乏可释放键和/或靶向配体的相似脂质体所传递的细胞内药物浓度而言,该类给药可有效获得该物质至少高两倍的细胞内细胞毒性。

[00016]在一个实施方案中,在将该组合物进行给药后可释放键的裂解是通过一种或多种内源性物质来完成的,其中所说的内源性物质如在血液或细胞中天然存在的组分。

[00017]在另一方面,本发明涉及一种通过提供如上所述的脂质体并将该脂质体进行给药而来增加治疗物质在细胞核内的积聚的方法,通过提供如上所述的脂质体并将该脂质体进行给药从而完成(i)可释放键的裂解,从而释放出该亲水性聚合物链的一部分或全部;(ii)配体与靶细胞的结合,其中所说的结合发生在该裂解之前或之后;和(iii)脂质体被靶细胞的内在化。当与由缺乏可释放键和/或靶向配体的相似脂质体所传递的细胞内物质浓度进行比较时,该类给药可有效获得该物质至少高两倍的细胞核内物质积聚。

[00018]当结合附图阅读本发明如下的详细说明时,将可以更充分地理解本发明的这些和其它目的以及特征。

#### 附图简要说明

[00019]图 1A 表示了本发明的一个实施方案,其中二硫代苄基

(DTB)连接着一个甲氧基-聚乙二醇 (mPEG) 部分和包含胺的配体。

[00020] 图 1B 表示了图 1A 中的化合物硫解后的产物。

[00021] 图 2 说明了 mPEG-DTB-胺-脂质合成的合成反应流程图, 其中胺-脂质是脂质二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺 (DSPE)。

[00022] 图 3 说明了对-二硫代苄基尿烷 (DBT)-连接的 mPEG-DSPE 共轭物的硫解机理。

[00023] 图 4A-4B 说明了作为时间 (小时) 函数的被捕获的荧光染料的泄漏, 其是在 37°C 下在存在或不存在二硫苏糖醇 (DTT) 的情况下, 用相对于用 Triton X-100 (100% 释放) 进行处理的预培养样品的样品荧光增加百分比来进行测定的, 所说样品得自在 pH 为 7.4 或 5.5 的缓冲剂中的被各种 PEG-DSPE 共轭物 (可裂解或不可裂解的) 所稳定的二油酰基磷脂酰乙醇胺 (DOPE) 脂质体; 该结果得自有代表性的实验, 并且表示的是一式三份进行分析的结果的均值  $\pm$  S. D. (在许多情况中误差棒小于标志); 在 (A) 中, ●, DOPE, 没有 PEG-DSPE, pH 7.4; ○, DOPE, 没有 PEG-DSPE, pH 5.5; ▲, DOPE/mPEG-DSPE, pH 7.4; △, DOPE/mPEG-DSPE, pH 5.5, 在 (B) 中, ■, DOPE/mPEG-S-S-DSPE, pH 7.4; ▼, DOPE/mPEG-S-S-DSPE, pH 5.5; □, DOPE/mPEG-S-S-DSPE+DTT, pH 7.4; □, DOPE/mPEG-S-S-DSPE+DTT, pH 5.5。

[00024] 图 5A-5B 说明了作为时间 (小时) 函数的被捕获的荧光染料的泄漏, 其是在 37°C 下, 在存在或不存在二硫苏糖醇 (DTT) 的情况下, 用相对于 Triton X-100 (100% 释放) 进行处理的预培养样品的样品荧光增加百分比来进行测定的, 所说样品得自在 pH 为 7.4 或 5.5 的缓冲剂中的被 5 mol% mPEG-DSPE 或 5 mol% mPEG-S-S-DSPE 共轭物 (可裂解或不可裂解的) 所稳定的 DOPE/CHEMS 脂质体; 该结果得自有代表性的实验, 并且表示的是一式三份进行分析的结果的均值  $\pm$  S. D. (在许多情况中误差棒小于标志); 在 (A) 中, ●, 仅为 DOPE/CHEMS, pH 7.4; ○, 仅为 DOPE/CHEMS, pH 5.5; ▲, DOPE/CHEMS/mPEG-DSPE, pH 7.4; △, DOPE/CHEMS/mPEG-DSPE, pH 5.5; 在 (B) 中, ■, DOPE/CHEMS/mPEG-S-S-DSPE, pH 7.4; ▼, DOPE/CHEMS/mPEG-S-S-DSPE, pH 5.5; □, DOPE/CHEMS/mPEG-S-S-DSPE+DTT, pH 7.4; □, DOPE/CHEMS/mPEG-S-S-DSPE+DTT, pH 5.5。

[00025] 图 6A-6B 说明了作为时间 (小时) 函数的被捕获的荧光染

料的泄漏,其得自在 37℃下在 pH 被调至 5.5 的无细胞提取物中进行培养的未被稳定或被脂质混合物中不同比例的 mPEG-S-S-DSPE 所稳定的 DOPE 脂质体 (A) 或 DOPE/CHEMS 脂质体 (B); 泄漏是用相对于用 Triton X-100 (100% 释放) 进行处理的预培养样品的样品荧光增加百分比来进行测定的; 结果得自有代表性的实验, 并且表示的是一式三份进行分析的结果的均值  $\pm$  S. D.; 在 (A) 中, ●, 仅有 DOPE; ▲, DOPE/mPEG-S-S-DSPE (1: 0.03); ■, DOPE/mPEG-S-S-DSPE (1: 0.05); 在 (B) 中, ○, DOPE/CHEMS (6: 4); △, DOPE/CHEMS/mPEG-S-S-DSPE (6: 4: 0.18); □, DOPE/CHEMS/mPEG-S-S-DSPE (6: 4: 0.3)。

[00026] 图 7A-7B 说明了在 37℃下在人血浆 (pH 7.4) 中进行培养后, 作为时间 (小时) 函数的被包含作为靶向部分的抗-CD19 和 mPEG-DSPE 或 mPEG-S-S-DSPE 的 DOPE 或 DOPE/CHEMS 脂质体所捕获的阿霉素的泄漏; 所释放的 DXR 是根据用相对于用 Triton X-100 进行了处理的预培养样品的样品荧光增加百分比来进行测定的; 该结果得自有代表性的实验, 并且表示的是一式三份进行分析的结果的均值  $\pm$  S. D.; (A) ●, 抗-CD19 靶向的、负载有 DXR 的 DOPE/mPEG-DSPE/Ma1-PEG-DSPE (1: 0.04: 0.01); ▲, 抗-CD19-靶向的、负载有 DXR 的 DOPE/CHEMS/mPEG-DSPE/Ma1-PEG-DSPE (6: 4: 0.2: 0.1); (B) ■, 抗-CD19-靶向的、负载有 DXR 的 DOPE/mPEG-S-S-DSPE/Ma1-PEG-DSPE (1: 0.04: 0.01); ▼, 抗-CD19-靶向的、负载有 DXR 的 DOPE/CHEMS/mPEG-S-S-DSPE/Ma1-PEG-DSPE (6: 4: 0.2: 0.1)。

[00027] 图 8A-8C 说明在体外, 在用被捕获在脂质体中的阿霉素进行处理后, 随着时间的进行, 阿霉素在 Namalwa 细胞中的核积聚; 结果得自有代表性的实验, 并且表示的是一式三份进行分析的结果的均值  $\pm$  S. D.; 在 (A) 中, ●, 游离阿霉素; ■, 包含阿霉素的 HSPC/CHOL/mPEG-DSPE (2: 1: 0.1) 脂质体; ▲, 抗-CD19 靶向的包含阿霉素的 HSPC/CHOL/mPEG-DSPE/Ma1-PEG-DSPE (2: 1: 0.08: 0.02) 脂质体; 在 (B) 中, ●, 抗-CD19-靶向的包含阿霉素的 DOPE/mPEGDSPE/Ma1-PEG-DSPE (1: 0.04: 0.01) 脂质体; ▲, 抗-CD19 靶向的包含阿霉素的 DOPE/CHEMS/mPEG-DSPE/Ma1-PEG-DSPE (6: 4: 0.24: 0.06) 脂质体; ○, 包含阿霉素的 DOPE/mPEG-DSPE (1: 0.05); ○, DXR-DOPE/CHEMS/mPEG-DSPE (6: 4: 0.3) 脂质体; 在 (C) 中, ▼, 抗-CD19 靶向的包含阿霉素的



DOPE/CHEMS/mPEG-S-S-DSPE/Ma1-PEG-DSPE (6:4:0.12:0.06) 脂质体; ■, 抗-CD19 靶向的包含阿霉素的 DOPE/mPEG-S-S-DSPE/Ma1-PEG-DSPE (1:0.02:0.01) 脂质体; □, 非靶向的包含阿霉素的 DOPE/mPEG-S-S-DSPE (1:0.03) 脂质体; □, 非靶向的包含阿霉素的 DOPE/CHEMS/mPEG-S-S-DSPE (6:4:0.18) 脂质体。

[00028] 图 9A-9D 说明了 DOPE 或 DOPE/CHEMS 脂质体在 BALB/c 小鼠中的药动学, 其是通过测定被各种脂质体制剂所包封的 [ $^{126}\text{I}$ ]TI 的吸收来获得的 (0.5  $\mu\text{mol}$  PL/小鼠); 结果得自有代表性的实验, 并且表示的是一式三份进行分析的结果的均值 $\pm$ S. D.; 在 (A) 中  $\diamond$ , DOPE; ■, DOPE/mPEG-DSPE, 1.0:0.03; ▲, DOPE/mPEG-DSPE, 1.0:0.05; ●, DOPE/mPEG-DSPE, 1.0:0.1; 在 (B) 中  $\diamond$ , DOPE/CHEMS; □, DOPE/CHEMS/mPEG-DSPE, 6:4:0.18;  $\triangle$ , DOPE/CHEMS/mPEG-DSPE, 6:4:0.3;  $\circ$ , DOPE/CHEMS/mPEG-DSPE, 6:4:0.6; 在 (C) ■中, DOPE/mPEG-S-S-DSPE/mPEG-DSPE, 1.0:0.02:0.01; ▲, DOPE/mPEG-S-S-DSPE/mPEG-DSPE, 1.0:0.04:0.01; ●, DOPE/mPEG-S-S-DSPE/mPEG-DSPE, 1.0:0.09:0.01; (D) □, DOPE/CHEMS/mPEG-S-S-DSPE/mPEG-DSPE, 6:4:0.012:0.06;  $\triangle$ , DOPE/CHEMS/mPEG-S-S-DSPE/mPEG-DSPE, 6:4:0.024:0.06;  $\circ$ , DOPE/CHEMS/mPEG-S-S-DSPE/mPEG-DSPE, 6:4:0.054:0.06。

### 本发明的详细描述

[00029] 本发明提供了脂质体组合物和用其进行被脂质体所捕获物质的细胞内传递的方法。该脂质体在遇到靶部位低生理学 pH 环境时能迅速释放所捕获的物质, 其中所说靶部位的低生理学 pH 环境如细胞或细胞内细胞器的内部区域。在下面对该脂质体组合物进行了描述并表明了该脂质体内含物的细胞内传递。

#### I. 定义和缩写

[00030] “诱导的生理学情况”指的是一种给药于用这里所述的脂质体进行治疗的个体的外源性物质或情况, 如热、光、化学物质、或生物学物质, 其中所说的物质或情况可有效地造成不稳定键的裂解。

[00031] “存在的生理学情况”指的是一种可有效地使得不稳定键裂解的内源性物质或情况, 如化学物质、生物学物质、pH 水平或温度。

[00032] 短语“有效地释放亲水性聚合物链”指的是该聚合物链的全部或至少一部分被释放。

[00033] “pH-敏感的”脂质指的是其形成和/或维持形成脂质双分子层的能力至少部分取决于周围环境 pH 值的脂质。

DOPE 指的是二油酰基磷脂酰乙醇胺。

DSPE 指的是二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺。

mPEG-DSPE 指的是与 DSPE 共价偶合的甲氧基聚(乙二醇)。

mPEG-S-S-DSPE 指的是 N-[2- $\omega$ -甲氧基聚(乙二醇)- $\alpha$ -氨基羰基乙基-二硫代丙酰基]-DSPE。

Mal-PEG-DSPE 指的是与共价偶合于 DSPE 的马来酰亚胺-结尾的聚乙二醇。

CHEMS 指的是半琥珀酸胆甾醇酯。

CFE 指的是无细胞提取物。

mAb 指的是单克隆抗体。

DXR 指的是阿霉素。

HPTS 指的是 8-羟基芘三磺酸三钠。

HSCP 指的是氢化大豆磷脂酰胆碱。

TI 指的是 tyraminylinulin。

DPX 指的是对-二甲苯-二-吡啶鎓溴化物。

## II. 脂质体组合物

[00029] 用于本发明方法的脂质体包括 pH-敏感的脂质和用亲水性聚合物衍生化的脂质, 其中所说聚合物和脂质通过一种可裂解的键结合到一起。该脂质体还包括一种配体或可将该脂质体有效靶向于特定细胞的部分。被捕获在该脂质体中的是一种用于进行细胞内传递的治疗物质。现在将对这些组分中的各种组分进行描述。

### [00029] pH-敏感的脂质组分

该脂质体包括 pH-敏感的脂质, 即在不存在稳定化组分的情况下仅在特定的 pH 范围内就可形成双分子层载体的脂质。这些脂质一般是具有疏水性和极性头基团部分的两亲性脂质, 并且当排列成双分子层时, 其取向为疏水部分与该双层膜内部的疏水区域相接触, 极性头基

团部分的取向为朝向于该膜外部的极性表面。该 pH 敏感的两亲性脂质优选地具有双烃链，一般是长度为约 8-22 个碳原子的酰基链，并且具有各种不饱和度。

[00030] 一种优选的 pH 敏感的脂质是二油酰基磷脂酰乙醇胺 (DOPE) —— 一种具有二酰基链的磷脂。在生理学 pH 值和离子强度下, DOPE 存在于一种能形成双分子层的颠倒的六角形相 ( $H_{II}$ ) 中。DOPE 的双分子层脂质体可以在高于该氨基 pKa 的 pH 值 (即大约 pH 约为 8.5) 下来进行制备 (Allen T. M. 等人, *Biochemistry*, 23:2976 (1990))。但是, 在其中酸为负电荷的 pH 值时, DOPE 可以在存在具有电荷相对的亲水性部分的两亲物的条件下在双分子层情况中被稳定 (Litzinger, L. H. *Biochim. Biophys. Acta*, 1131:201 (1992); Kirpotin 等人, *FEBS Letters*, 388:115 (1996))。在两亲物的 pKa 下, 两亲物的质子化通过促进回复成六角形相 ( $H_{II}$ ) 而加速了 DOPE 囊的脱稳定化 (Lai, M. Z. 等人, *Biochemistry*, 24:1654 (1985); Ellens, H. 等人, *Biochemistry*, 23:1532 (1984))。因此, 可以通过选择稳定化的两亲物来控制脂质体将在其下释放其内含物的 pH。

[00031] 在本发明的一个实施方案中, DOPE 在双分子层情况中被庞大的半琥珀酸胆甾醇酯 (CHEMS) 所稳定。CHEMS 在 7.4 的 pH 下为净负电荷, 并且在中性 pH 下稳定了双分子层状态中的 DOPE。在约 6.0 以及更低的 pH 值下, CHEMS 质子化, 其将导致 DOPE 囊的脱稳定化。

[00032] 在双分子层状态, 在 5.5-7.4 的 pH 范围内, DOPE 还可以通过包含小摩尔百分比具有庞大的亲水性部分的两亲性脂质来被稳定化, 其中所说的两亲性脂质例如将在下面进行描述的 PEG-脂质衍生物。

### [00033] 聚合物衍生化的脂质组分

该脂质体还包括用亲水性聚合物进行了衍生化的脂质。该聚合物衍生化的脂质可用来稳定该 pH 敏感的脂质以有助于该双分子层和脂质体的形成并可以在该脂质体表面形成一种聚合物链的包衣以延长该脂质体的血液循环持续时间。即, 该亲水性的聚合物包衣提供了胶体稳定性并可保护该脂质体不被单核吞噬细胞系统所摄取, 从而使得该脂质体

具有较长的血液循环持续时间以在生物体中进行分布。该聚合物链通过一种可裂解的可释放的键被连接到该脂质上，并且正如将要进行描述的那样，为了恢复该脂质体的 pH 敏感性，该聚合物链可将被释放。

[00034] 优选地，该可进行衍生化的脂质是一种成囊的非 pH 敏感性的两亲性脂质，其在水中可自发地形成一种双分子层的囊。这种类型的成囊脂质优选地是具有双烃链的脂质，其中所说的双烃链一般为酰基链和一种顶头的基团，其中所说的顶头的基团可以是极性或非极性基团。有许多合成和天然存在的成囊的两亲性脂质，非限制性地包括磷脂，如磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酸、磷脂酰肌醇、以及鞘磷脂，其中两个烃链的长度上一般为约 14-22 个碳原子并且具有各种不饱和度。上述的其酰基链可具有各种不饱和度的脂质和磷脂可以通过商业途径获得或者可以根据已经被公开的方法来进行制备。优选的用于本发明的二酰基-链两亲性脂质包括二酰基甘油、磷脂酰乙醇胺 (PE) 和磷脂酰甘油 (PG)，并且最优选地是磷脂酰乙醇胺 (PE)。在本发明一个优选实施方案中使用的是二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺 (DSPE)。

[00035] 适于对该两亲性脂质进行衍生化的亲水性聚合物包括聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯甲基醚、聚甲基哌啶啉、聚乙基哌啶啉、聚羟丙基哌啶啉、聚羟丙基甲基丙烯酸酰胺、聚甲基丙烯酸酰胺、聚二甲基丙烯酸酰胺、聚羟丙基甲基丙烯酸酯、聚羟乙基丙烯酸酯、羟甲基纤维素、羟乙基纤维素、聚乙二醇、以及聚天冬酰胺 (polyaspartamide)。

[00036] 在一个优选的实施方案中，该亲水性聚合物是聚乙二醇 (PEG)，优选地是分子量为 500-10,000 道尔顿的 PEG 链，该 PEG 链的分子量更优选地为 2,000-10,000 道尔顿，并且最优选地为 1,000-5,000 道尔顿。

#### [00037] 可释放的键

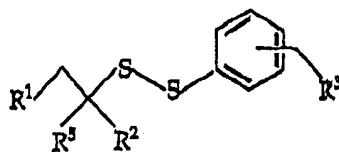
[00038] 如上所述，该亲水性聚合物通过一种可释放的键与该成囊的脂质相连，其中所说的可释放的键即在与特定刺激相接触时裂解的键，其中所说的特定刺激如热、pH 改变、或外源性给予的化学或生物学物质。在一个优选的实施方案中，该键是一种对内源性刺激（体内刺激）有响应的键，其中所说的内源性刺激非限制性地包括在细胞、血液（血浆）中或在靶细胞表面附近的化学或生物学物质。

[00039]适宜的可释放键包括，例如肽键、酯键或二硫化物键。酯键和肽键可以通过内源性或外源性的酯酶或肽酶而被裂解。二硫化物键可以通过使用还原剂如二硫苏糖醇 (DTT)、谷胱甘肽或抗坏血酸盐而被裂解，或可以被体内还原剂如胱氨酸或存在于血浆或细胞内的还原酶所裂解。

[00040]在一个优选的实施方案中，该可释放的键是一种二硫化物键，其广义地指的是包含硫的键。正如现有技术中所公知和例如在 US 6,043,094 中所描述的那样，可以对该包含硫的键进行合成以获得所选择的不稳定度。可变的不稳定度使之可以改变该亲水性聚合物包衣从脂质体表面上释放的速度。一般而言，当需要长循环的持续时间时，使用较不易变化的键。

[00041]一种二硫化物键的实例是如现有技术中所描述的二硫代丙酰基 (DTP) (Kirpotin 等人, *FEBS Letters*, 388: 115 (1996))。被 DTP 连接到脂质二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺 (DSPE) 上的聚乙二醇 (PEG) 的合成是通过将二硫代二(丙酸琥珀酰亚胺酯)的琥珀酰亚胺酯与过量的 mPEG-NH<sub>2</sub> 进行反应从而形成 N-琥珀酰亚胺基-[2-(甲氧基聚(氧乙烯基))- $\alpha$ -氨基羧基]乙基-二硫代丙酸酯, mPEG-DTP-Osu 来完成的。将其与 DSPE 进行反应从而形成所需的共轭物, mPEG-DTP-DSPE (*Id.*)。

[00042]正如在待审的申请序列号为 09/556,056 和 09/556,610 的美国申请中所描述的那样，另一种优选的可释放的键是一种二硫代苄基 (DTB) 键 (Zalipsky 等人, *Bioconjugate Chemistry*, 10(5): 703 (1999); WO 00/64483 和 WO 00/64484)，两篇专利文件在这里都被引入作为参考。该键可以由如下所示的一般结构来进行表示：



[00043]其中 R<sup>1</sup> 是一种包含用于连接到二硫代苄基部分上的键的亲水性聚合物；R<sup>2</sup> 选自 H、烷基和芳基；R<sup>3</sup> 选自 O(C=O)R<sup>4</sup>、S(C=O)R<sup>4</sup>、和 O(C=S)R<sup>4</sup>；R<sup>4</sup> 包含一种包含胺的脂质，例如如上所述的成囊脂质；和 R<sup>5</sup> 选自 H、烷基和芳基；并且其中 CH<sub>2</sub>-R<sup>3</sup> 的定位选自邻位和对位。

[00044]图 1A 表示了一种本发明实例性化合物的结构，其中 R<sup>1</sup> 是

亲水性聚合物——甲氧基-聚乙二醇,  $m\text{PEG}=\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ , 其中  $n$  为约 10 至约 2300, 其分子量相当于约 440 道尔顿至约 100,000 道尔顿。该聚合物的分子量在一定程度上取决于  $R^3$  的选择。在其中  $R^3$  是一种用于脂质体包含胺的脂质的实施方案中, PEG 分子量的优选范围为约 750 至约 10,000 道尔顿, 更优选地为约 2,000 至约 5,000 道尔顿。在该实施方案中的  $m\text{PEG}$  包括一种尿烷链接部分。将意识到  $R^1$  可选自各种亲水性聚合物, 并且该聚合物的实例如上所述。还将意识到该聚合物的分子量将取决于该脂质体组合物所包括的聚合物-DTB-脂质共轭物的数量, 其中当组合物中聚合物-DTB-脂质的量较小时通常选择较大分子量的聚合物, 从而产生较少数目的与脂质体相连的聚合物链。

[00045]继续参考图 1A, 在该示范性化合物中的  $R^2$  和  $R^3$  是氢(H), 但是  $R^2$  或  $R^3$  或  $R^2$  和  $R^3$  还可以是直链或支链的烷基或芳基。在一个优选的实施方案中,  $R^3$  是 H 并且  $R^2$  是烷基, 并且下面给出了一些实例。在图 1A 所示的化合物中,  $R^3$  的一般形式为  $\text{O}(\text{C}=\text{O})-(\text{NH}_2\text{-配体})$ , 其中  $\text{NH}_2\text{-配体}$  可以是任何包含胺的脂质。  $R^3$  还可以是  $\text{O}(\text{C}=\text{S})-(\text{NH}_2\text{-配体})$  或  $\text{S}(\text{C}=\text{O})-(\text{NH}_2\text{-配体})$  的形式。

[00046]图 1B 表示了图 1A 的  $m\text{PEGDTB}-(\text{NH}_2\text{-脂质})$  化合物的硫解机理。该对-或邻-二硫代苄基氨基甲酸酯部分在温和的硫解条件下裂解, 如在存在半胱氨酸或其它天然存在的还原剂的情况下进行裂解。一旦裂解, 则该包含胺的脂质就以其天然的未改性的形式再生。下面所述的本发明的研究表明体内的天然生理条件足以开始并完成该 DTB 键的裂解。应当意识到, 还可以使用还原剂以人为地诱发足以使该化合物裂解和分解的硫解条件。

[00047]适用于聚合物-DTB-脂质共轭物的脂质优选地是具有至少一条包含至少约 8 个碳原子的酰基链的水不溶性分子, 并且所说的酰基链更优选地包含约 8-24 个碳原子。一种优选的脂质是具有包含胺的极性头和酰基链的脂质。脂质的实例有具有单一酰基链的磷脂如硬脂酰基胺, 或具有两条酰基链的脂质。优选的具有包含胺的顶头基团的磷脂包括磷脂酰乙醇胺和磷脂酰丝氨酸。该磷脂的尾部(尾部们)具有约 12 至 24 个碳原子并且可以是完全饱和或不饱和的。一种优选的磷脂是二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(DSPE), 但是本领技术人员将想到许多属于本说明书范围的磷脂。还应当意识到该磷脂可自然地包括一种胺基团

或可以被进行衍生化从而包含一种胺基团。其它不包含酰基尾部的磷脂部分如胆固醇胺也是适用的。

[00048]已经在别处对聚合物-DTB-脂质化合物的合成进行了描述((Zalipsky 等人, *Bioconjugate Chemistry*, 10(5):703(1999); WO 00/64483 和 WO 00/64484)并且在图 2 中对示范性的合成路线进行了图解式描述。具有甲氧基羰基二硫代烷基末端基团的 mPEG 衍生物(MW 为 2000 和 5000 道尔顿)是通过将 2-(甲氧基羰基二硫代)乙烷胺与 mPEG-氯甲酸盐进行反应来进行制备的, mPEG-氯甲酸盐可以容易的通过干 mPEG-OH 溶液的光气化作用来进行制备(Zalipsky, S., 等人, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 15:100-114(1992))。前一种化合物可以根据所公开的方法(Brois, S. J., 等人, *J. Amer. Chem. Soc.* 92 :7629-7631(1970); Koneko, T., 等人, *Bioconjugate Chem.* 2:133-141(1991)), 通过将 2-氨基乙硫醇盐酸盐与等量甲氧基羰基烷基硫化氯进行反应来进行制备。将巯基苄醇的对位和邻位异构体(Grice, R., 等人, *J. Chem. Soc.* 1947-1954(1963))干净地与所得的联有 PEG 的酰基二硫化物进行偶合, 得到带有二硫代苄醇末端基团的 mPEG。用未进行衍生化的 mPEG-OH 来引入活性碳酸酯, 得到对-酰基苯基碳酸酯。加入在乙醇胺中的 DSPE 可形成所需的 mPEG-DTB-DSPE 产物。邻-和对-DTB-脂质化合物都是通过这种方法来进行制备的, 然后可以用硅胶色谱来对其进行纯化并用 NMR 和 MALDI-TOFMS 来对其进行定性。

[00049]图 3 表示了 mPEG-DTB-DSPE 共轭物的疏解机理。一旦裂解, 则该磷脂酰乙醇胺脂质(DSPE)就会以其天然未改性的形式再生。

#### [00050]末端官能团化的聚合物-脂质共轭物

[00051]本发明的脂质体组合物进一步包含一种靶向部分。在一个优选的实施方案中, 该靶向配体被共价连接于该锚定于脂质体的亲水性聚合物链的末端。例如, 在如上所述的该脂质体-DTB-聚合物中, 聚合物的游离末端可以被改性成包括一种适于与靶向部分分子内的官能团进行偶合的末端反应基团(末端官能团化)。该类聚合物末端的反应基团在现有技术中是公知的, 并且可以根据所要连接的靶向配体来对其进行选择。例如, 在靶向部分是抗体或抗体片段的情况中, 将该聚

合物链官能团化成包含适于与例如存在于该抗体中的巯基、氨基、以及醛或酮(一般得自该抗体碳水化合物部分的适度氧化)进行偶合的反应基团。该类 PEG-末端反应基团的实例包括马来酰亚胺(用于与巯基进行反应)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)或 NHS-碳酸酯(用于与伯胺进行反应)、酰肼或肼(用于与醛或酮进行反应)、碘乙酰基(优选地与巯基进行反应)和二硫代吡啶(硫醇反应)。

[00052]其它适宜的反应末端基团包括马来酰亚胺和肼。马来酰亚胺被广泛地用作蛋白质改性剂并且当该马来酰亚胺是杂双官能团交联剂中的两种官能团之一时尤其有用。马来酰亚胺与巯基的反应包括硫醇基向被活化的双键进行的迈克尔加成。通过相同的机理与氨基进行反应,但是反应速率更低。因为硫醇是最具反应性的类型,特别在中性 pH 下更是如此,所以可以用马来酰亚胺基团靶向于靶向部分中的巯基,其通常可以获得良好的选择性。

[00053]酰肼或肼与醛基进行反应。酰肼还可以被活性酯或被碳二亚胺活化的羧基所酰化。作为酰化物质的酰叠氨基反应物可以容易地由酰肼获得并可使之连接到包含氮的分子上。

[00054]制备末端官能团化聚合物-脂质共轭物的方法在现有技术中一般是公知的。例如,同时拥有的 US 5,620,689 公开了制备和用马来酰亚胺、酰肼、和 2-吡啶基二硫代丙酰胺末端基团来使抗体或抗体片段与聚合物链偶合的方法;该公开物在这里被引入作为参考。

[00055]应当意识到该靶向配体还通过一种没有连接脂质和聚合物的可释放键的脂质体-聚合物共聚物而被包含在该脂质体内。还应当意识到任何适于形成上述脂质体的亲水性聚合物包衣的脂质都可用来形成该改性的聚合物-脂质共轭物,并且任何上述亲水性聚合物都是适用的。优选地,在将一种靶向部分连接到 PEG-功能化的脂质时,该靶向部分的活性不会受到任何损害。

[00056]该靶向部分可以通过在脂质体中包括该末端官能团化的聚合物-脂质共轭物,然后在脂质体形成后,将所需的靶向配体与预先形成的脂质体中的反应性聚合物末端进行反应而被连接到脂质体表面。或者,该配体-聚合物-脂质可以在脂质体形成时被包括在该脂质组合物内部。还可通过插入而将该配体-聚合物-脂质共轭物混入到该预先形成的脂质体内,其中将该配体-聚合物-脂质共轭物在适于使得



该共轭物变成插入到该脂质体脂质双分子层的条件下用预先形成的脂质体进行培养。该插入技术在现有技术中已经进行了描述，例如在 US 6,056,973 中进行了描述。

#### [00057] 靶向部分

[00058] 考虑使用许多靶向部分，并且其实例包括这些例如在 US 5,891,468 中所描述的物质，该专利对配体进行描述的部分在这里被引入作为参考。一般而言，该靶向部分是一种可以有效与靶细胞表面的细胞表面受体特定结合的配体。

[00059] 在一个优选的实施方案中，该配体是一种抗体或抗体片段，其可将抗原特定地靶向于靶细胞的受体上。抗体可以是单克隆抗体或抗体片段，其具有靶向特异性。在一个优选的实施方案中，该被连接到脂质体上的抗体是可特定地结合到 B-细胞表位上的抗-CD19、抗-CD20、或抗-CD22。这些抗体或抗体片段一般得自对受影响的 B-细胞表现出阳性反应的杂交瘤。同样可以使用可靶向于体内任何其它细胞的其它抗体或抗体片段。

[00060] 在本发明的研究中，用抗-CD19 抗体来将包含所捕获物质的脂质体靶向于恶性 B-细胞。该抗体可识别 B-细胞上的唯一表位——CD19 表面抗原。如下所述，具有靶向部分的 pH-敏感的脂质体可以有有效的将所捕获的物质传递到细胞内。

#### [00061] 脂质体所捕获的治疗物质

被捕获在脂质体中的物质是要传递到靶细胞内的治疗物质。在脂质囊中可以捕获各种治疗物质，包括可被稳定包封在囊的水性隔室中水溶性物质、可被稳定分配在囊的脂相中的亲脂性化合物、或可被稳定的连接到外部囊表面（例如通过静电进行连接）的物质。水溶性化合物的实例包括小的水溶性有机化合物、肽、蛋白质、DNA 质粒、低聚核苷酸和基因片段。

[00062] 被脂质体捕获的化合物还可以是用于追踪疾病进展的显影剂。显影剂包括放射性核素的螯合物，如镓-99、铟-111、以及碘-125。

[00063] 被捕获的物质还可以是一种用于体外诊断试验的受体分

子，如酶或荧光团。该类具有所捕获的受体分子的脂质体可以通过与靶细胞或包含受体的脂质体进行融合来进行传递。

[00064] 在一个实施方案中，该化合物可用于治疗血浆细胞病症，如多发性骨髓瘤，其特征在于 B-淋巴细胞血统细胞瘤。用于治疗多发性骨髓瘤的治疗物质包括美法仑、环磷酰胺、泊尼松、苯丁酸氮芥、卡莫司汀、地塞米松、阿霉素、顺铂、紫杉醇、长春新碱、环己亚硝脲、以及干扰素。对于这些药物中的一些而言，其标准化疗所用的一般剂量如下：美法仑，每天  $8 \text{ mg/m}^2$  体表面积；环磷酰胺，每天  $200 \text{ mg/m}^2$ ；苯丁酸氮芥，每天  $8 \text{ mg/m}^2$ ；泊尼松，每天  $25\text{-}60 \text{ mg/m}^2$ ，长春新碱 ( $1.4 \text{ mg/m}^2$ ) 和阿霉素 ( $60\text{-}75 \text{ mg/m}^2$ )。

[00065] 还考虑通过质粒、反义低聚核苷酸以及合酶的胞质内传递来治疗癌症和和病毒感染。

[00066] 在本发明中，对于对个体进行的胃肠外给药而言，治疗物质通过下面所讨论的方法被捕获在脂质体内。脂质体给药的剂量最初以标准化疗剂量为基础，然后根据在治疗过程中对疾病进程进行的监测而对其进行调整。

### III. pH 敏感的靶向脂质体的制备

[00067] 包含所捕获物质的脂质体可以根据众所周知的方法如脂质膜的水合、反相蒸发、以及溶剂浸泡来进行制备。在亲脂性化合物的情况中，被传递的化合物被包含在该脂质膜内，或者在水溶性治疗物质的情况中被包含在水合介质中。或者，该治疗物质可以被装填在预先形成的囊中，例如逆着离子梯度来装填一种可离子化的化合物。

[00068] 一种形成多层囊 (MLVs) 的众所周知的方法是简单的脂质膜水合技术。在这种操作中，将形成脂质体的脂质混合物溶解于适宜的有机溶剂中，然后将该溶剂蒸发以形成一种薄脂质膜。然后将该脂质膜用水性介质进行水合从而形成 MLVs，其大小一般为约 0.1 至 10 微米。

[00069] 要被传递的治疗化合物可以通过在形成脂质体前将药物添加到形成囊的脂质中而被混入到脂质体中从而将药物捕获在形成的脂质体中。如果该药物是疏水性的，则其可以被直接加入到该疏水性混合物中，而亲水性药物可以被加入到覆盖着该干脂质薄膜的水性介质

中。或者，该药物可以通过主动转运机理如少量装填被混入到预成形的脂质体中，通过该机理，化合物作为一种梯度如硫酸铵梯度(US 5,192,549; Bolotin 等人, *J. Liposome Res.*, 4: 455 (1994))或钾或氢浓度的响应而被吸收到脂质体中。

[00070]在形成后，调整脂质体的大小。对于 MLVs 而言，一种有效调整大小的方法包括将该脂质体的水性混悬液挤压通过一系列聚碳酸酯膜，所说的聚碳酸酯膜具有所选择的范围为 0.03 至 0.2 微米的均匀孔尺寸，其孔尺寸一般为 0.05、0.08、0.1 或 0.2 微米。该膜的孔尺寸大概相当于通过由该膜挤出而制备的脂质体的最大尺度，特别是使其两次或多次通过相同的膜来进行挤压地进行制备时更是如此。还可用匀化法将脂质体的大小降低到 100 nm 或更小。在本发明一个优选的实施方案中，将脂质体挤压通过一系列孔尺寸为 0.2 至 0.08  $\mu\text{m}$  的膜，从而得到直径大约为  $120 \pm 10 \mu\text{m}$  的脂质体。

[00071]本发明的脂质体一般是用如下摩尔比的脂质组分来进行制备的：约 70-90% 的成囊脂质，1-20% 用于形成该可释放聚合物链的表面包衣的聚合物-脂质体共轭和 0.1-5% 用于与靶向部分偶合的末端官能团化的聚合物脂质共轭物。应当意识到可以将该具有可释放键的聚合物-脂质共轭物末端官能团化以与一种靶向配体相偶合，或者该脂质体可以包含两种不同类型的聚合物-脂质——一种是带有可释放键的聚合物-脂质共聚物，另一种是没有可释放键但是连接有靶向部分的聚合物-脂质共轭物。

[00072]在本发明进行的研究中，根据实施例 1 的描述制备了 pH-敏感性脂质体和非 pH-敏感性脂质体。靶向或非靶向并且具有可释放或不可释放的包衣 pH-敏感的脂质体——立体化学稳定的脂质体是由 DOPE 或 DOPE/CHEM(摩尔比为 6:4)所制备的，并且包含 mPEG-DSPE(不可释放)或 mPEG-S-S-DSPE(可释放包衣)，并且在一些情况中包含能连接靶向配体的偶合于 DSPE 的马来酰亚胺-结尾的聚乙二醇——Mal-PEG-DSPE。在图例和各实验的描述中表明了不同制剂的脂质摩尔比。

[00073]非 pH-敏感性脂质体是由氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)、胆固醇(CHOL)、mPEG-DSPE 所制备的并且可包含(靶向)或不包含(非靶向)马来酰亚胺-PEG-DSPE，其摩尔比分别为 2:1:0.08:0.02 的 HSPC/CHOL/mPEG-DSPE/马来酰亚胺-PEG-DSPE 或 2:1:0.08 的

HSPC/CHOL/mPEG-DSPE。该脂质体是用水合技术通过将脂质组分溶解于氯仿中而形成的。在将组分进行混合后，除去氯仿并用适宜的缓冲液对该干脂质膜进行水合，随后将其挤压通过一系列孔尺寸为 0.2 至 0.8  $\mu\text{m}$  的聚碳酸酯过滤器。

[00074]如实施例 1 中所描述的那样，按照硫酸铵梯度法通过少量装填而将治疗药物阿霉素 (DXR) 包封到预成型的脂质体中。在一些研究中，pH-敏感的脂质体还装填有 8-羟基芘三磺酸三钠对-二甲苯-二吡啶鎓 (pyridinium) (HPTS-DPX) (一种荧光染料) 或放射性标记的 tyramylinulin ( $^{125}\text{I}$ TI) 以对该脂质双分子层的稳定性进行评估。如实施例 1 所描述的那样，HPTS-DPX 或  $^{125}\text{I}$ TI 的包封是通过将该薄脂质膜用所需化合物的溶液 (pH 9.0) 进行水合来完成的。

[00075]在下面所述的一些研究中，具有偶合于 Ma1-PEG-DSPE 的马来酰亚胺终端的抗-CD19 抗体的靶向脂质体是根据实施例 2 所描述的方法来进行制备的。

#### IV. 脂质体组合物的体外稳定性

[00076]这里所描述的 pH-敏感的脂质体被一种可释放的聚合物包衣所稳定，从而使得即使在酸性 pH 下该脂质体仍然保有所包封的化合物。通过裂解所有的聚合物包衣或该聚合物包衣的一部分而回复了该脂质体的 pH 敏感性以及因此而产生的在酸性 pH 下的去稳定作用，从而造成了该脂质体的去稳定作用并同释放出脂质体内含物。如实施例 3-5 所述的，该脂质体组合物的这种特征通过体外裂解实验而得到了证明。在存在或不存在二硫苏糖醇 (DTT) 的情况下，在 pH 为 7.5 或 5.5 的缓冲液中对 pH-敏感性脂质体和非 pH-敏感性脂质体在无细胞提取物 (CFE)、人血浆、以及包含 10% 胎牛血清 (FBS) 的细胞培养介质中的稳定性进行了比较。所捕获溶质——8-羟基芘三磺酸三钠-对-二甲苯-二-吡啶鎓溴化物 (HPTS-DPX, 一种荧光染料) 或阿霉素 (DXR) 从该脂质体的释放或泄漏是用一种荧光-脱熄灭 (dequenching) 实验来进行测量的。

#### [00077] pH-敏感脂质体在缓冲液中的稳定性

用实施例 3 所述的方法对在 37 $^{\circ}\text{C}$  下，HPTS 从在 pH7.5 和 5.5 的缓

冲液进行培养的被 mPEG-DSPE (图 4A 和 5A) 或 mPEG-S-S-DSPE (图 4B 和 5B) 所稳定的 DOPE (图 4A-4B) 和 DOPE/CHEMS (图 5A-5B) 脂质体中的泄漏进行了评估。此外, 在存在二硫苏糖醇 (DTT) (100 nM) 的情况下, 对 HPTS 从在 pH 7.4 和 5.5 的缓冲液中进行培养的包含 mPEG-S-S-DSPE 的脂质体中的泄漏进行了评估 (图 5B)。DTT 诱导了二硫化物键的硫解并且引起了稳定化聚合物包衣的释放。

[00078] 如图 4A 和 4B 所示, pH 敏感的脂质体可以在双分子层状态被包含的小摩尔百分比的具有庞大的顶头基团的分子所稳定。即在 5.5-7.4 的 pH 范围内, PEG-脂质衍生物可以稳定双分子层状态中的 DOPE 或 DOPE/CHEMS, 并且当该包衣被释放时该脂质体的 pH 敏感性被恢复。当在 pH 为 7.4 (●) 或 5.5 (○) 的缓冲液中进行培养时, 仅由 DOPE 所形成的脂质体释放其内含物 (图 4A)。向该 DOPE 制剂中混入 5 mol % 的 mPEG-DSPE (图 4A) 或 mPEG-S-S-DSPE (图 4B) 可以形成当在 pH 为 7.4 (▲, 5 mol % mPEG-DSPE (图 4A), 和 ■, 5 mol % mPEG-S-S-DSPE (图 4B)) 或 5.5 (△, 5 mol % mPEG-DSPE (图 4A), 和 ▼, 5 mol % mPEG-S-S-DSPE (图 4B)) 的缓冲液中培养 24 小时不泄漏的脂质体。

[00079] 用二硫苏糖醇 (DTT) 对脂质体进行处理诱发了 mPEG-S-S-DSPE 从该脂质膜锚凹 (DSPE) 上的硫解。在存在 DTT 的情况下, 在 7.4 的 pH 下, 包含 5 mol % mPEG-S-S-DSPE 的 DOPE 脂质体在 24 小时内几乎没有内含物的释放 (■, 图 4B); 但是在 pH 为 5.5 时, 用 DTT 进行处理导致在约 10 h 内逐渐释放了约 50% 的 HPTS (▽, 图 4B)。在 pH 为 5.5 时, 一种包含 3 mol % mPEG-S-S-DSPE 的 DOPE 制剂具有更迅速的内含物释放 (在 2 h 内释放 100%, 数据未表示出)。

[00080] 如图 5A 和 5B 所阐明的, DOPE 脂质体还可以在双分子层状态被具有庞大的和/或电荷相斥的亲水性部分的两亲物所稳定。没有 mPEG-DSPE 的 DOPE/CHEMS 制剂在 7.4 的 pH 下几乎没有泄漏 (●, 图 5A), 但是其在 5.5 的 pH 下迅速释放出所包含的染料 (○, 图 5A)。在 5.5 或 7.4 的 pH 下, 当这些脂质体被 5 mol % mPEG-DSPE (图 5A: △, pH 5.5 和 ▲, pH 7.4) 或 5 mol % mPEG-S-S-DSPE (图 5B ▼, pH 5.5 和 ■, pH 7.4) 所稳定时, 在 24 小时所发生的泄漏小于 10%。在存在 DDT 的情况下, 包含 5 mol % mPEG-S-S-DSPE 的 DOPE/CHEMS 脂质体在 pH 为 5.5 时的释放半衰期约为 8 小时 (▽, 图 5B), 而在 7.4 的 pH 下几乎不发生泄漏

(□, 图 5B)。对用 3 mol % mPEG-S-S-DSPE 所稳定的 DOPE/CHEMS 脂质体进行 DTT 处理产生了中等的泄漏速率(数据未表示出)。

[00081]如图 4B 和 5B 所示, 虽然内含物的释放相对慢于不含 PEG 的相似脂质体(o, 图 4A 和 5A), 但包含 mPEG-S-S-DSPE(在图 4B 和 5B 中都是▼)的 pH-敏感的脂质体在 5.5 的 pH 下内含物的释放速率增加。这种较迅速的释放可能部分是由于 mPEG-S-S-DSPE 的不完全裂解(一种可有利地用来改变和制订所捕获物质的释放的特征)。例如, 可以用所选择的不能完全释放的可释放键来减缓内含物的释放速率, 而可以用所选择的在所选择刺激下易于裂解的键来获得被捕获物质的全部快速释放。

#### [00082] pH 敏感脂质体在无细胞提取物(CFE)中的稳定性

无细胞提取物(CFE)包含在裂解 mPEG-S-S-DSPE 时能模拟二硫苏糖醇(DTT)作用的细胞质和溶酶体的酶。从而亲水的不能渗透膜的染料 8-羟基芘三磺酸三钠(HPTS)从与 CFE 接触的制剂上的裂解表示了被 mPEG-DSPE 或 mPEG-S-S-DSPE 所稳定的 pH 敏感脂质体在细胞内环境中的去稳定作用过程。

[00083]图 6A-6B 表示了作为时间函数的被包封的 HPTS 染料从被脂质混合物中不同比例的 mPEG-S-S-DSPE 所稳定的 DOPE 或 DOPE/CHEMS 脂质体中的泄漏, 其中所说的脂质体在 37℃下被培养于 pH 为 5.5 的无细胞培养物(溶酶体 pH 大约为 5 至 6.5)中。该研究是按照实施例 4 所描述的方法来进行的。用相对于用 Triton X-100(100% 释放)进行处理的预培养样品的样品荧光增加百分比来对泄漏进行测定; 结果得自有代表性的实验, 并且表示的是一式三份进行分析的结果的均值 ± S. D.。

[00084]图 6A 表示了对于分别由 DOPE(●)、被 3 mol % mPEG-S-S-DSPE 所稳定的 DOPE(▲)和被 5 mol % mPEG-S-S-DSPE 所稳定的 DOPE(■)所组成的脂质体而言, 作为时间函数的 HPTS 染料的释放百分比。仅由 DOPE 所组成的脂质体或由被 3 mol % mPEG-S-S-DSPE 所稳定的 DOPE 所组成的脂质体出现了其内含物的迅速释放, 半衰期为 1.7 小时。被 5 mol % mPEG-S-S-DSPE 所稳定的 DOPE 制剂(■)在 CFE 中的释放速率较慢, 在 24 小时内释放出 40% 被包封的染料。

[00085]图 6B 表示了被截留在分别由 DOPE/CHEMS(o)、

DOPE/CHEMS/1.8 mol % mPEG-S-S-DSPE ( $\Delta$ ); 以及 DOPE/CHEMS/3 mol % mPEG-S-S-DSPE ( $\square$ ) 所组成的脂质体中的 HPTS 的释放百分比。在 CFE 中在 pH 为 5.5 时, 三种制剂迅速脂肪出其内含物, 8 小时时几乎释放完全。在 pH 被调至 7.4 的 CFE 中进行培养的 DOPE/CHEMS 和 DOPE/CHEMS/mPEG-S-S-DSPE 制剂以更缓慢的速率释放 HPTS (数据未被表示)。

#### [00086] pH-敏感的脂质体在人血浆中的稳定性

[00087] 在实施例 5 所详细描述的另一项研究中, 在 37°C 下, 在 90% 人血浆 (pH 7.4) 和包含 10% FBS 的细胞培养介质中对亲水性染料从各种脂质体制剂中泄漏的速率进行了评估。将 HPTS 以水溶性 (但荧光熄灭的) 复合体——HPTS-DPX 的形式被动地装填到脂质体中。当 HPTS-DPX 从脂质体中漏出时, 其分离成游离的 HPTS 和 DPX, 当在 413 nm 下被激发时, HPTS 荧光增加。发现在人血浆中, 在 24 小时内从 DOPE/mPEG-DSPE、DOPE/CHEMS/mPEG-DSPE、DOPE/mPEG-S-S-DSPE 或 DOPE/CHEMS/mPEG-S-S-DSPE 制剂中泄漏出的被包封的 HPTS 小于 20% (未表示出)。

[00088] 一般在约 5.5 的 pH 下通过用硫酸铵梯度在脂质体内形成沉淀 ((DXR-NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 来将阿霉素 (DXR) 主动装填到脂质体中 (Bolotin 等人, *J. Liposome Res.*, 4: 455 (1994))。这种脂质体阿霉素制剂非常稳定并具有低药物释放速率。但是, 在装配 DOPE 或 DOPE/CHEMS 所需的较高 pH 下, 迄今为止仍然不知道在该主动装填期间 DXR 是否会在该脂质体内形成一种沉淀以及 DXR 从 pH-敏感脂质体中的释放速率将是什么样子。正如在图 7A-7B 中所看到的那样, 检查了对于由 DOPE/4 mol % mPEG-DSPE ( $\bullet$ ); DOPE/CHEMS/2 mol % mPEG-DSPE ( $\blacktriangle$ ), DOPE/4 mol % mPEG-S-S-DSPE ( $\blacksquare$ ) 和 DOPE/CHEMS/2 mol % mPEG-S-S-DSPE ( $\blacktriangledown$ ) 所组成的抗-CD19-靶向的 pH-敏感脂质体而言在人血浆中的 DXR 泄漏。DXR 从除 DOPE/CHEMS/mPEG-DSPE ( $\blacktriangle$ , 图 7A) 外的所有制剂中都迅速泄漏, 从 DOPE/CHEMS/mPEG-DSPE 制剂中的泄漏相对缓慢, 但是仍然具有迅速的释放速率。在存在人血浆的情况下, 抗-CD19-靶向和相似的非靶向制剂 (包含 5 mol % mPEG) 之间在 DXR 的释放速率之间没有显著差异 (数据未表示出)。

[00089]还对各种 pH-敏感脂质体组合物在包含 10% FBS 的细胞培养物中的稳定性进行了评估。所有的试验脂质体都包含一种抗-CD19 靶向配体并包含被截留在隔室内的 DXR。该脂质体组合物包含 DOPE/4 mol % mPEG-DSPE、DOPE/CHEMS/2 mol % mPEG-DSPE、DOPE/4 mol % mPEG-S-S-DSPE 和 DOPE/CHEMS/2 mol % mPEG-S-S-DSPE。所有的脂质体组合物都是稳定的,其在 37℃ 下进行培养时在 24 小时内 DXR 的泄漏都小于 10% (数据未表示出)。

#### V. 脂质体组合物的药物传递功效

[00090]根据本发明的方法,当与非 pH-敏感的靶向脂质体或非-pH 敏感的非靶向脂质体进行比较时,上述脂质体能在较低的 pH 条件下在靶细胞内或就在靶细胞外部迅速释放其内含物从而使得药物的细胞内浓度增加。这种细胞内浓度的增加在下面部分 A 中所述的本发明所进行的研究中得到了证实。因为在该靶向脂质体内在化后脂质体包封的阿霉素从该溶酶体装置中释放到细胞核的速率是脂质体包封阿霉素细胞毒性的决定性因素,所以在这些研究中测定了阿霉素在细胞核中的积聚速率。在部分 B 中对阿霉素核积聚试验的结果进行了讨论。部分 C 用小鼠模型描述了脂质体的血液消除研究,并且部分 D 用体内研究说明了用本发明的方法进行治疗时所获得的疗效的改善。

#### [00091] 被稳定化的靶向 pH-敏感脂质体的体外细胞毒性

[00092]用 Namalwa 细胞用实施例 6 所述的体外增生试验对游离 DXR 和各种脂质体制剂的体外细胞毒性进行了评估。进行评估的脂质体制剂被列于表 1 中。除该靶向 pH-敏感的脂质体外,还对常规的非-pH 敏感的立体化学稳定的脂质体 (DXR-SL) 和游离形式的阿霉素进行了试验。在受控条件下将各试验制剂用 Namalwa 细胞培养 48 小时。在培养结束时,将细胞毒性表示为抑制浓度,即,将细胞生长抑制 50% 所需的浓度 (IC<sub>50</sub>)。结果被列于表 1 中。



表 1 游离阿霉素 (DXR) 和 DXR 的脂质体制剂 (含或不含抗-CD19) 对 CD19<sup>+</sup> Namalwa 细胞的细胞毒性

| 装填了DXR的脂质体制剂                                                            | IC <sub>50</sub> (μM DXR) <sup>1</sup> |
|-------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| DOPE/mPEG-DSPE (1:0.05)                                                 | 7.0 ± 2.2                              |
| DOPE/mPEG-DSPE/Mal-PEG-DSPE[anti-CD19] (1:0.04:0.01)                    | 0.2 ± 0.1                              |
| DOPE/mPEG-S-S-DSPE (1:0.03)                                             | 8.9 ± 4.7                              |
| DOPE/mPEG-S-S-DSPE/Mal-PEG-DSPE[anti-CD19] (1:0.02:0.01)                | 1.5 ± 0.7                              |
| DOPE/CHEMS/mPEG-DSPE (6:4:0.3)                                          | 4.2 ± 1.1                              |
| DOPE/CHEMS/mPEG-DSPE/Mal-PEG-DSPE[anti-CD19] (6:4:0.24:0.08)            | 0.4 ± 0.1                              |
| DOPE/CHEMS/mPEG-S-S-DSPE (6:4:0.18)                                     | 6.0 ± 0.8                              |
| DOPE/CHEMS/mPEG-S-S-DSPE/Mal-PEG-DSPE[anti-CD19] (6:4:0.12:0.06)        | 3.3 ± 1.0                              |
| HSPC/CHOL/mPEG-DSPE ("DXR-SL")                                          | >200                                   |
| HSPC/CHOL/mPEG-DSPE/Mal-PEG-DSPE[anti-CD19] (2:1:0.08:0.02) ("DXR-SIL") | 35.4 ± 12.7                            |
| 游离DXR                                                                   | 0.8 ± 0.7                              |

<sup>1</sup> 用 MTT 试验来测定细胞毒性并将细胞毒性表示为细胞生长被抑制 50% 时的平均药物浓度 (IC<sub>50</sub> ± S. D)。

[00093] 如表 1 所示, 靶向或非靶向的所有 DOPE 或 DOPE/CHEMS 制剂都有显著低于 DXR-SL (HSPC/CHOL/mPEG-DSPE) 或 DXR-SIL [抗-CD19] (HSPC/CHOL/mPEG-DSPE/Mal-PEG-DSPE [抗-CD19]) 制剂的 IC<sub>50</sub> (P < 0.001)。IC<sub>50</sub> 的显著降低可能是由于与阿霉素从 DXR-SL 或 DXR-SL [抗-CD19] 中具有相当慢药物释放速率的释放相比, 阿霉素从 DOPE 或 DOPE/CHEMS 制剂释放的速度迅速 (Lopes de Menezes 等人, *Cancer Res.*, 58 : 3320 (1998))。靶向 DOPE 和 DOPE/CHEMS 制剂在大多数情况中具有可以与游离阿霉素相比的 IC<sub>50</sub> (表 1)。装填有阿霉素的 DOPE 或 DOPE/CHEMS (被 mPEG-DSPE 或 mPEG-S-S-DSPE 所稳定) 靶向制剂的 IC<sub>50</sub> 显著低于非靶向制剂的 IC<sub>50</sub> (P < 0.05 至 P < 0.001)。值得注意的是, 对于包含 mPEG-DSPE 的制剂而言, 不管是靶向还是非靶向, 其细胞毒性都有略微高于包含 mPEG-SS-DSPE 的制剂的倾向。未包封阿霉素的靶向制剂在低于 0.06 μM DOPE 的浓度下没有毒性, 如果该制剂包含阿霉素的话, 则其将与 34.5 μM 的阿霉素浓度相对应 (未表示出)。

[00094] 从表 1 的数据中可以清楚地看出靶向或非靶向的 pH-敏感

的脂质体的  $IC_{50}$  显著低于非 pH-敏感的脂质体（例如，由 HSPC/CHOL/mPEG-DSPE 制备的脂质体）。非-pH 敏感脂质体的  $IC_{50}$  对于非靶向和靶向制剂而言分别为 200  $\mu$ M 阿霉素和 35  $\mu$ M 阿霉素。使用 pH-敏感脂质体 DOPE 或 DOPE/CHEMS 而不是 HPSC/CHOL 可以使  $IC_{50}$  增加 22-48 倍。这种细胞毒性的大大增加是出乎意料的，因此，本发明设计了一种通过将药物截留在 pH-敏感的脂质体中而将被脂质体所捕获药物的细胞毒性增加至少约 10 倍，更优选地增加约 20 倍，并且最优选地增加约 40 倍的方法。从表 1 的数据还可以看出，通过在该 pH-敏感的脂质体中包含一种靶向配体可以使得细胞毒性增加。因此，本发明还考虑通过在脂质体中包含一种靶向配体来增加被捕获在 pH-敏感脂质体中的药物的细胞毒性。正如所测定的相对于缺乏该靶向配体的 pH-敏感脂质体而言其  $IC_{50}$  那样，该靶向配体可有效地使细胞毒性增加至少 2 倍，优选地增加 4 倍，更优选地增加 6 倍，并且最优选地增加 10 倍。

#### [00095]核积聚试验

[00096]如实施例 7 所述的那样进行阿霉素的核积聚试验。简单地讲，将维持在对数生长条件下的 Namalwa 细胞用捕获了阿霉素的脂质体制剂在 8  $\mu$ M 的阿霉素浓度下进行处理。在各时间点（0、2、4、8、12 小时），将被处理细胞的等分试样破裂以回收核。将核中的 DNA 进行酶消化，然后测定阿霉素荧光。结果如图 8A-8C 所示。

[00097]以对阿霉素的荧光进行测定的方式，图 8A 比较了用游离阿霉素（●）；包封了阿霉素的非靶向非 pH 敏感的脂质体（■）（HSPC/CHOL/mPEG-DSPE，摩尔比为 2:1:0.1）；和包封了阿霉素的靶向非 pH 敏感的脂质体（▲）（HSPC/CHOL/mPEG-DSPE/Ma1-PEG-DSPE，摩尔比为 2:1:0.08:0.02）进行处理的 Namalwa 细胞内阿霉素的核积聚。正如可以看到的那样，在非 pH 敏感性脂质体给药后在核中几乎找不到可测量的阿霉素。

[00098]图 8B 比较了在用包封有阿霉素的抗-CD19 靶向的由 DOPE/mPEGDSPE/Ma1-PEG-DSPE（摩尔比为 1:0.04:0.01）组成的脂质体（●）；包封有阿霉素的抗-CD19 靶向的由 DOPE/CHEMS/mPEG-DSPE/Ma1-PEG-DSPE（摩尔比为 6:4:0.24:0.06）组成的脂质体（▲）；

包封有阿霉素的由 DOPE/mPEG-DSPE (摩尔比为 1:0.05) 组成的脂质体 (○); 包封有阿霉素的由 DOPE/CHEMS/mPEG-DSPE (摩尔比为 6:4:0.3) 组成的脂质体 (□) 进行处理的 Namalwa 细胞中阿霉素的核积聚。正如可以看到的那样, pH-敏感的脂质体在核中产生了药物的积聚(图 8A 表示了与非 pH 敏感脂质体的比较), 加入靶向配体有效地获得了更高水平的积聚。

[00099] 图 8C 表示了在用包封有阿霉素的抗-CD19-靶向的由 DOPE/CHEMS/mPEG-S-S-DSPE/Ma1-PEG-DSPE (摩尔比为 6:4:0.12:0.06) 组成的脂质体 (▼); 抗-CD19 靶向的由 DOPE/mPEG-S-SDSEP/Ma1-PEG-DSPE (摩尔比为 1:0.02:0.01) 组成的脂质体 (■); 非靶向的由 DOPE/mPEG-S-S-DSPE (摩尔比为 1:0.03) 组成的脂质体 (□); 由 DOPE/CHEMS/mPEG-S-S-DSPE (摩尔比为 6:4:0.18) 组成的非靶向脂质体 (▽) 进行处理的 Namalwa 细胞内的阿霉素核积聚。正如可以看到的那样, 具有可释放的 PEG 链和靶向配体的 pH-敏感脂质体在细胞核内获得了脂质体所捕获药物的积聚。

[000100] 图 8A-8C 所代表的的数据表明在核内游离阿霉素以最快的速率进行积聚(图 8A)。对于靶向的 mPEG-DSPE-稳定化(图 8B) 或 mPEG-S-S-DSPE 稳定化的(图 8C) DOPE 或 DOPE/CHEMS 制剂而言, 阿霉素的释放速率远远快于靶向非 pH 敏感脂质体的阿霉素释放速率(图 8A)。得自脂质体制剂的阿霉素的核积聚次序为: 游离药物>靶向的 pH-敏感的 mPEG-S-S-DSPE>靶向的 pH-敏感的 mPEG-DSPE>非靶向的 pH-敏感的 mPEG-S-S-DSPE>非靶向的 pH-敏感的 Mpeg-DSPE>靶向的非-pH 敏感的>非-pH 敏感的。有趣的是, 虽然细胞毒性不高于包含 mPEG 的制剂(表 1), 但是包含 mPEG-S-S-DSPE 的制剂在这些实验的时间过程中表现出更迅速的阿霉素核积聚。

[000101] 表 1 所报道的细胞毒性 (IC<sub>50</sub>) 值与核积聚数据平行, 表明脂质体药物的吸收总量以及被包封药物的释放速率控制着脂质体药物的细胞毒性。可以通过受体介导的内在化作用机理来增加脂质体药物的总细胞吸收, 可以通过诸如这里所描述的 pH-敏感的触发释放机理来增加细胞内的药物释放。因此, 该数据支持一种通过提供这里所描述的脂质体并将该脂质体进行给药来增加治疗物质进入到细胞核内的积聚的方法, 其中所说的脂质体包含 pH-敏感的脂质、可释放聚合物链的

包衣、以及靶向部分。该给药可以有效地获得(i)可释放键的裂解,以释放出所有的亲水性聚合物链或该链的一部分;(ii),脂质体所键合的配体与靶细胞之间的结合,其中该结合可以在聚合物链的裂解之前或之后发生;和(iii)脂质体进入到靶细胞中的内在化作用。脂质体的内在化作用将使得 pH-敏感的脂质与可有效造成脂质体去稳定作用的条件相接触,从而向细胞内释放出所捕获的内含物。该给药可以有效地获得比用不含 pH-敏感脂质、可释放键、和/或靶向配体的脂质体所获得的脂质体所捕获物质在细胞核内的积聚至少高两倍的积聚。

#### [000102] 血液药动学

[000103]用根据本发明进行制备并包含放射性标记 [ $^{125}\text{I}$ ]TI 的脂质体对脂质体制剂在小鼠体内的药动学进行了评估。如实施例 8 所述,用包封于各种脂质体制剂中的 0.2 ml [ $^{125}\text{I}$ ]TI 的单剂量通过尾静脉对小鼠进行静脉内给药 (0.5  $\mu\text{mol}$  PL/小鼠)。在注射后所选择的时间采集血样并对  $^{125}\text{I}$  标记进行分析。通过放射性的下降来测定脂质体从血液中的清除/消除。结果如图 9A-9D 所示。

[000104]图 9A 表示了 DOPE 脂质体的消除,其是以作为时间(小时)函数的每分钟体内计数百分比(cpm)来进行表示的,该脂质体是四种具有不同 mPEG-DSPE 含量的脂质体组合物。该脂质体组合物是:仅为 DOPE(◆);DOPE/mPEG-DSPE,摩尔比为 1.0:0.03(■);DOPE/mPEG-DSPE,摩尔比为 1.0:0.05(▲);DOPE/mPEG-DSPE,摩尔比为 1.0:0.1(●)。血液消除曲线随着脂质体中 mPEG-DSPE 含量的变化而变化,较高的 mPEG-DSPE 含量使得脂质体从血液中的消除变慢。

[000105]图 9B 是用 DOPE/CHEMS 所制备的并具有不同 mPEG-DSPE 含量的脂质体的类似绘图。该脂质体制剂是:DOPE/CHEMS,摩尔比为 6:4(□);DOPE/CHEMS/mPEG/DSPE,摩尔比为 6:4:0.18(◇);DOPE/CHEMS/mPEG-DSPE,摩尔比为 6:4:0.3(△);DOPE/CHEMS/mPEG-DSPE,摩尔比为 6:4:0.6(o)。血液消除曲线随着脂质体中 mPEG-DSPE 数量的变化而变化,较高的 mPEG-DSPE 含量可以减缓脂质体从血液中的消除。

[000106]图 9C 表示了作为时间函数的具有不同 mPEG-S-S-DSPE 含量的 DOPE 脂质体从血液中的消除曲线。脂质体的组成如下:

DOPE/mPEG-S-S-DSPE/mPEG-DSPE, 摩尔比为 1.0:0.02:0.01(■); DOPE/mPEG-S-S-DSPE/mPEG-DSPE, 摩尔比为 1.0:0.04:0.01(▲); DOPE/mPEG-S-S-DSPE/mPEG-DSPE, 摩尔比为 1.0:0.09:0.01(●), 将各脂质体如实施例 8 所述的那样给药于小鼠。在这里, 随着 mPEG-S-S-DSPE 数量的增加对循环持续时间的依赖性下降, 制剂具有基本相同的消除曲线。

[000107]在图 9D 中也看到了相似观察结果, 图 9D 表示了作为时间函数的具有各种不同 mPEG-S-S-DSPE 含量的 DOPE/CHEMS 脂质体的消除。这里, 该制剂分别由如下的物质所组成: DOPE/CHEMS/mPEG-S-S-DSPE/mPEG/DSPE, 摩尔比为 6:4:0.012:0.06(□); DOPE/CHEMS/mPEG-S-S-DSPE/mPEG-DSPE, 摩尔比为 6:4:0.024:0.06(Δ); DOPE/CHEMS/mPEG-S-S-DSPE/mPEG-DSPE, 摩尔比为 6:4:0.054:0.06(o)。所有的制剂又具有基本相同的消除曲线, 同时可裂解的 PEG (mPEG-S-S-DSPE) 数量增加对循环时间没有可察觉的影响。

[000108]总之, 循环时间随着 DOPE 或 DOPE/CHEMS 脂质体制剂中 mPEG-DSPE 含量的增加而增加(图 9A-9B)。在将包含 10 mol% mPEG-DSPE 的脂质体进行注射后 24 小时, 在血液中仍然保留有约 5-10% 所注射的脂质体。注射未被 mPEG-DSPE 所稳定的 DOPE 或 DOPE/CHEMS 脂质体使得脂质体被迅速清除。包含 2 至 9 mol% 的 mPEG-S-S-DSPE 不会增加 DOPE(图 9C)或 DOPE/CHEMS(图 9D)制剂的循环时间。在靶向实验中所有的 mPEG-S-S-DSPE 制剂都包含 1 mol% mPEG/DSPE 以模拟向该制剂中添加 1 mol% 偶合脂质的作用。增加制剂中 mPEG-S-S-DSPE 的数量并不能在任何程度上增加该制剂的循环半衰期(图 9A-9B)。

[000109]相对于包含不可裂解的 mPEG-DSPE 的脂质体而言, 由于在体内二硫化合物键被血液组分例如半胱氨酸迅速裂解, 所以包含 mPEG-S-S-DSPE 的脂质体具有缩短的血液循环半衰期。由于脂质体上 PEG 的损失而造成的空间位阻损失将降低其在血液中的稳定性并增加 MPS 对脂质体的吸收。抗体靶向的脂质体结合于靶细胞并被靶细胞迅速内在化(Lopes de Menezes 等人, *J. Liposome Res.*, 9:199(1999); Lopes de Menezes 等人, *Cancer Res.*, 58:3320(1998))。因此, 本发明考虑使用靶向 pH-敏感的包含可裂解聚合物链的脂质体来完成靶

向配体和靶细胞的结合、脂质体的内在化、聚合物链的裂解、以及随后向细胞内释放出脂质内含物的脂质双分子层的瓦解。

#### [000110] 体内治疗处理

[000111] 在本发明的另一项研究中，将小鼠用具有可释放 PEG 链的靶向 pH-敏感脂质体进行处理。脂质体中所捕获的物质是治疗物质阿霉素 (DXR)。如实施例 9 中所描述的那样，将小鼠用单剂量 3 mg DXR/kg 游离形式或被脂质体所捕获形式的药物进行处理。将脂质体制剂概括地列于表 2 中并在实施例 8 中进行了详细描述。

表 2. 荷有 CD19 ± 人 B-淋巴瘤 (Namalwa) 细胞的小鼠的存活时间

| 治疗号 <sup>1</sup>                        | 平均存活时间<br>(MST±S.D.(天)) | 增加的寿命 <sup>2</sup><br>(%ILS) |
|-----------------------------------------|-------------------------|------------------------------|
| (1) 盐水 (MST 对照)                         | 21.0±1.6                | -                            |
| (2) Free doxorubicin                    | 23.0±1.4                | 9.5                          |
| (3) DOPE/CHEM/mPEG-DSPE                 | 27.8±1.6                | 32.4                         |
| (4) DOPE/CHEM/mPEG-S-S-DSPE             | 25.8±4.0                | 22.9                         |
| (5) HSPC/CHOL/mPEG-DSPE                 | 24.2±1.3                | 15.2                         |
| (6) DOPE/CHEMS/mPEG-DSPE[anti-CD19]     | 42.2±4.1                | 101                          |
| (7) DOPE/CHEMS/mPEG-S-S-DSPE[anti-CD19] | 53.8±6.5                | 156.2                        |
| (8) HSPC/CHOL/mPEG-DSPE[anti-CD19]      | 43.2±5.7                | 105.7                        |

<sup>1</sup> 治疗组号 (3) - (8) 是包含所捕获的阿霉素的脂质体制剂。

<sup>2</sup> 相对于对照小鼠存活时间而言增加的寿命。

[000112] 表 2 表示了各治疗组的平均存活时间和增加的寿命，其是以对照动物的平均存活时间 (MST) 为基础来进行计算的。在任何试验动物中都没有显现出药物毒性的迹象。与对照组相比，用非靶向脂质体制剂进行处理的动物 ((3) - (5) 组) 在治疗功效方面几乎没有改善 ( $P > 0.05$ )。但是，用靶向脂质体制剂进行处理的动物 ((6) - (8) 组) 的寿命比对照组或用非靶向制剂进行处理的动物组的寿命显著增加 ( $>100\%$  ILS) ( $P > 0.001$ )。与其它靶向治疗组 (组 6 和组 8) 相比，用 DXR-DOPE/CHEMS/mPEG-S-S-DSPE/Ma1-PEG-DSPE [抗 CD19] 进行处理的组

(7) 具有显著增加的% ILS。

[000113]表 2 所列的和图所示的数据表明具有可裂解的 PEG 的靶向 pH-敏感脂质体的治疗功效高于非靶向或非-pH-敏感的脂质体。即, 相对于缺乏触动释放性的靶向制剂, 即 DXR-HSPC/CHOL/mPEG-DSPE [抗-CD19]而言, 被 mPEG-S-S-DSPE 所稳定的靶向 pH-敏感制剂可以有效地将所包封的阿霉素传递到靶细胞的细胞质内并且在体外可以改善所包封阿霉素的细胞毒性。该靶向 pH-敏感的可裂解聚合物链制剂可以增加脂质体所捕获物质的细胞内传递。

## V1. 实施例

[000114]用下面的实施例来对这里所描述的本发明进行进一步的说明, 这些实施例并不是要在任何方面对本发明的范围进行限制。

### 材料

[000115] 氢化大豆磷脂酰胆碱 (HSPC) 得自 Lipoid KG (Ludwigshafen, Germany), mPEG2000-二硬脂酰基磷脂酰基-乙醇胺 (mPEG2000-DSPE, 也被缩写为 mPEG-DSPE) 可以用标准方法来进行合成 (Zalipsky, S., 等人, 聚(乙二醇)化学: 生物技术和生物医学应用 (J. M. Harris, Ed.) Plenum Press, 347-370 页 (1992))。阿霉素 (DXR) 购自 Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo。马来酰亚胺-衍生化的 PEG<sub>2000</sub>-DSPE (Mal-PEG-DSPE) (Kirpotin, D. 等人, *Biochemistry*, 36: 66 (1997)) 是由 Shearwater Polymers (Huntsville, AL) 定制合成的。胆固醇 (CHOL) 和二油酰基磷脂酰乙醇胺 (DOPE) 购自 Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL)。N-[2-w-甲氧基聚(乙二醇)- $\alpha$ 氨基羧基-乙基-二硫代丙酰基]-DSPE (mPEG-S-S-DSPE, 二硫化物-衔接物) 是根据所描述的来进行合成的。Sephadex G-50 和 Sepharose CL-4B 购自 Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden)。Na<sup>125</sup>I 和胆甾醇基-[1, 2-[3H] (N)] 十六烷基醚 ([<sup>3</sup>H]CHE) 购自 Mandel Scientific (Guelph, ON)。半琥珀酸胆甾醇酯 (CHEMS)、3-(4, 5-二甲基噻唑-2-基)-2, 5-二苯基四唑鎓溴化物 (MTT) 和 iminothiolane 购自 Sigma Chemicals (Oakville, ON)。对-二甲苯-二-吡啶鎓溴化物 (DPX) 和-羟基苊三磺酸三钠 (HPTS) 购自 Molecular Probes (Eugene, OR)。

IgG 的碘化是根据别处所描述的方法来进行的 (Lopes de Menezes 等人, *Cancer Res.*, 58: 3320 (1998)). 以前已经对 Tyraminylinulin (TI) 的合成和 [<sup>125</sup>I]TI 的制备进行过描述 (Sommerman, E. F. 等人, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 122: 319 (1984)). 鼠科动物单克隆抗体 (mAb) 抗-CD19 是用得自 Dr. H. Zola (Children's Health Research Institute, Australia) 的 FMC-63 鼠科动物抗-CD19 杂交瘤细胞系来制备的。人 B-淋巴瘤细胞系 Namalwa (ATCC CRL 1432) 得自 American Type Culture Collection (MD, USA)。人血浆得自 the University of Alberta, Department of Pharmacology 中的健康志愿者。核微孔 (Nuclepore) 聚碳酸酯膜 (0.08、0.1 和 0.2 μm 孔大小) 购自 Northern Lipids (Vancouver, BC)。所有其它化学品都是分析等级。

### 实施例 1

#### pH-敏感和非 pH-敏感脂质体的制备

[000116] 立体化学稳定的 pH-敏感脂质体是用二油酰基磷脂酰乙醇胺 (DOPE) 或 DOPE/CHEMS (半琥珀酸胆甾醇酯) 和 mPEG-DSPE 或 mPEG-S-S-DSPE (如 Kirpotin 等人所述的那样来进行制备) 和 DSPE-PEG-马来酰亚胺 (Mal-PEG-DSPE; 如 US 6, 326, 353 中所述的那样来进行制备) 的混合物按照所需制剂的脂质摩尔比来进行制备的。将所需的脂质混合物溶解于氯仿中, 通过用旋转蒸发器在减压下进行旋转来将其干燥成一种薄膜。通过向其中加入一种水性缓冲剂来将该干燥的膜进行水化从而形成脂质体。通过用一种 Lipex Extruder (Lipex Biomembranes, Vancouver, BC) 将该脂质体挤压通过一系列孔大小为 0.2 至 0.08 μm 的核微孔聚碳酸酯过滤器来对脂质体的大小进行调整。用 Brookhaven BI-90 Particle Sizer (Brookhaven Instruments, Holtsville, NY) 通过动态光散射来对脂质体的平均直径进行测定。所挤出的脂质体的直径在 120 ± 10 nm 的范围内。

[000117] 对于加载有 HPTS-DPX 或 [<sup>125</sup>I]TI 的脂质体而言, 用 HPTS-DPX 溶液 (30 mM HPTS, 30 mM DPX, pH 9.0, 用 NaCl 调至 290 mosmol) 或 [<sup>125</sup>I]TI 溶液 (pH 9.0) 对该脂质膜进行水化。在挤出后, 通过用分别使用 Sephadex G-50 或 Sepharose CL-4B 柱的色谱法, 用 HEPES 缓冲剂, pH 7.4 (25 mM HEPES, 140 mM NaCl) 进行洗脱来除去所



捕获的染料或 [ $^{125}\text{I}$ ]TI。

[000118]如对 Bolotin 等人(*J. Liposome Res.*, 4 :455(1994))所述方法进行了微小改动的方法那样, 通过使用硫酸铵梯度的少量加载法来将治疗物质——阿霉素进行加载。简单地说, 将该脂质膜在 250 mM 硫酸铵中进行水合, 对于包含 DOPE/CHEMS 的制剂而言 pH 为 8.5, 对于包含 DOPE 的制剂而言, pH 为 9.0。在一些情况中向其中加入微量的 NaOH 以使得水合完全。在挤塑后, 通过使用用 10% 蔗糖、适宜的话 pH 为 8.5 或 9.0 的 25 mM Trizma 碱进行平衡的 Sephadex G-50 柱进行洗脱来对外部缓冲剂进行交换从而使双分子层形成。将 DXR 以 0.2:1 (w/w) 的 DXR/脂质比例添加到该预形成的脂质体中, 然后将该脂质体在 22℃ 下培养 15 分钟。通过用脱气的 HEPES 缓冲剂进行洗脱的使用 Sephadex G-50 柱的色谱法将脂质体包封的 DXR 与游离 DXR 分离开来。在用甲醇进行提取后, 通过分光光度法 ( $A=490\text{ nm}$ ) 测定脂质体所捕获的 DXR 浓度。用 Fiske-Subbarow 比色法试验来测定磷脂浓度 (Bartlett, G. R., *J. Biol. Chem.*, 234:466(1959))。

## 实施例 2

### 抗体与预成型脂质体的偶合

[000119]抗-CD19 mAb 与脂质体上马来酰亚胺 (Ma1)-PEG-DSPE 的偶合是根据以前所描述的方法 (Lopes de Menezes 等人, *J. Liposome Res.*, 9:199(1999)) 用  $^{125}\text{I}$ -标记的抗-CD19 mAb 作为示踪剂来进行的。

[000120]首先用 Traut's 试剂 (2-iminothiolane) 以 20:1 (Traut's:IgG) 的摩尔比在 10 mg IgG/ml 缓冲剂的浓度下在 25℃ 下在 pH 为 8.0 的 HEPES 缓冲剂 (25 mM HEPES, 140 mM NaCl) 中将抗体活化 1 小时。用 G-50 柱除去未进行反应的 Traut's 试剂。偶合反应是在 25℃ 下, 在氩气气氛下以 1:2000 的 IgG 与磷脂摩尔比进行 18 小时来进行的。通过使该偶合混合物通过在 pH 为 7.4 的 HEPES 缓冲液中的 Sepharose CL-4B 柱来从该脂质体中除去未偶合的 Ab。偶合效率平均为 80%。

[000121]所有的 mAb 密度对于体内实验一般为 30-60  $\mu\text{g}$  抗 CD19/ $\mu\text{mol}$  磷脂, 对于体外实验一般为 65-80  $\mu\text{g}$  抗-CD19/ $\mu\text{mol}$ 。

### 实施例 3

#### 在缓冲剂中脂质体捕获的荧光染料或脂质体捕获的阿霉素的泄漏

[000122] 通过用荧光-脱熄灭实验监测被捕获溶质的释放来对被各种 DOPE 或 DOPE/CHEMS 脂质体制剂所捕获的 HPTS-DPX 的泄漏进行评估。HPTS 以水溶性(但荧光熄灭的)复合体——HPTS-DPX 的形式被被动加载到脂质体中。当 HPTS-DPX 从脂质体泄漏时;其分离成游离 HPTS 和 DPX, 当在 413 nm 进行激发时 HPTS 荧光增加。进行试验的 DOPE 和 DOPE/CHEMS 制剂有:

| <u>脂质组分</u>              | <u>摩尔比</u> |
|--------------------------|------------|
| DOPE                     | 1          |
| DOPE/mPEG-DSPE           | 1: 0.05    |
| DOPE/mPEG-S-S-DSPE       | 1: 0.05    |
| DOPE/CHEMS               | 6: 4       |
| DOPE/CHEMS/mPEG-DSPE     | 6: 4: 0.3  |
| DOPE/CHEMS/mPEG-S-S-DSPE | 6: 4: 03   |

[000123] 在使用之前立即使包含所捕获的 HPTS-DPX 的脂质体通过一种 Sephadex G-50 柱以除去任何残余的游离染料或药物。将五十 (50)  $\mu$ l 包含所捕获的染料(HPTS-DPX)或阿霉素的脂质体以 0.5 mM 的最终 PL 浓度在 37 $^{\circ}$ C 下在 450  $\mu$ l pH 为 5.5 或 7.4 的缓冲剂中进行培养。包含 mPEG-S-S-DSPE 的 pH 敏感脂质体还用二硫苏糖醇(DTT) (100 nM) 在 pH 为 5.5 或 7.4 的缓冲液中进行培养。在各时间点, 通过在 512 nm 的发射波长和 413 nm 的激发波长下用 SLM-Aminco Model 8100 荧光计(Spectronic Instruments, Rochester, NY)测定相对于预培养样品(零释放)而言样品荧光的增加来测定培养混合物等分试样中所释放的 HPTS 百分比(Daleke, K. 等人, *Biochim. Biophys. Acta*, 1024: 352 (1990)); 将值标准化成在将预培养样品用 10% Triton X-100 样品水解后(100%释放)所得荧光增加的百分比(Kirpotin 等人, *FEBS Letters*, 388: 115 (1996))。

在图 4A-4B 和图 5A-5B 中, 将在 pH 为 5.5 或 7.4 的缓冲剂中被密封的 HPTS 从被 mPEG-S-S-DSPE 或 mPEG-DSPE 所稳定的 DOPE 和 DOPE/CHEMS 脂质体中的泄漏对时间作图。该结果得自有代表性的实验,

并且表示的是一式三份进行分析的结果的均值±S. D.

#### 实施例 4

### 脂质体捕获的荧光染料向无细胞提取物中的释放

#### A. 无细胞提取物的制备

[000124]在潮湿的包含 5% CO<sub>2</sub> 的气氛下, 将 Namalwa 细胞在 37 °C 下在另外添加了 10% FBS 的 RPMI 1640 中维持在对数生长条件下。通过离心法对细胞 ( $1.0 \times 10^8$ ) 进行收集, 然后将其用 20 ml TEA 缓冲液 (10 mM 三乙醇胺、0.25 M 蔗糖、10 mM 醋酸和 1 mM EDTA, pH 为 7.4) 进行洗涤。将进行了洗涤的细胞重新混悬于 4 ml TEA 缓冲液中, 以每克细胞 100  $\mu$ l 的量向其中加入所制备的用于哺乳动物细胞提取的蛋白酶抑制剂鸡尾酒 (4-(2-氨基-乙基)-苯磺酰氟化物、胃蛋白酶抑制剂 A、反式-环氧琥珀酰基-L-亮氨酸氨基(4-胍基)丁烷、苯丁抑制素、亮抑蛋白酶肽、以及抑肽酶; Sigma, MO, USA)。将该细胞用紧密装配的 Dounce 匀浆器在 4 °C 下用 40 次坚实冲击来进行破碎。通过在 4 °C 下以 1000 rpm 的速率离心 10 分钟来使未破裂的细胞成团。从该细胞团上小心地除去 CFE, 然后通过添加 TEA 缓冲液将其稀释成 6 ml。将 CFE 调至 pH 为 5.5, 该溶酶体的 pH 大约为 5 至 6.5 (Tycko, B. 等人, *Cell*, 28: 643 (1982); Tycko, B. 等人, *J. Cell Biol.*, 97: 1762 (1983))。

[000125]就在使用前立即使包含 HPTS-DPX 的脂质体通过 Sephadex G50 柱以除去任何残余染料。用荧光脱熄灭试验对所捕获溶质的释放进行研究。

[000126]在 37 °C 下, 在 450 mL 无细胞提取物中以 0.5 mM 的最终磷脂浓度对五十 (50) ml 包含所捕获染料 (HPTS-DPX) 的脂质体进行培养。该脂质体制剂由未被稳定或被 3% 或 5% mPEG-S-S-DSPE 所稳定的 DOPE 脂质体、和未被稳定或被在脂质混合物 1.8 mol% 或 3 mol% mPEG-S-S-DSPE 所稳定的 DOPE/CHEMS 脂质体所组成。通过测定样品荧光对相对于用 Triton X-100 进行处理的预培养样品荧光 (100% 释放) 的增加百分比来对泄漏进行测定。在图 6A-6B 中将得自有代表性实验的结果对时间作图。各数据点是一式三份分析的均值±S. D.

## 实施例 5

### 阿霉素从在人血浆中培养的 pH-敏感脂质体中的泄漏

[000127]检查了 DOPE/mPEG-DSPE/Ma1-PEG-DSPE (1: 0.04: 0.01)、DOPE/CHEMS/mPEG-DSPE/Ma1-PEG-DSPE (6: 4: 0.2: 0.1)、DOPE/mPEG-S-S-DSPE/Ma1-PEG-DSPE (1: 0.04: 0.01) 和 DOPE/CHEMS/mPEG-S-S-DSPE/Ma1-PEG-DSPE (6: 4: 0.2: 0.1) 的抗-CD19-靶向的脂质体在人血浆中的阿霉素 (DXR) 泄漏情况。

[000128]在 37℃ 下以 0.5 mM 的最终磷脂浓度在 450  $\mu$ l 人血浆中对五十 (50)  $\mu$ l 包含所捕获的 DXR 的脂质体进行培养。在各时间点, 采集培养混合物的等分试样并用 HEPES 缓冲液 (pH 7.4) 对其进行稀释。当用硫酸铵法进行加载时, 由于其自我缔合, 包含在脂质体中的阿霉素的荧光被熄灭。通过分别在 485 和 590 nm 的激发和发射波长下测定荧光脱熄灭来对阿霉素泄漏进行测定。通过测定样品荧光相对于用 10% Triton X-100 进行处理的预培养样品 (100% 释放) 荧光的增加百分比来测定所释放的 DXR。如图 7A-7B 所示, 将有代表性实验的结果对时间作图。各数据点是一式三份分析的均值。

## 实施例 6

### 靶向、PEG-DSPE 稳定的 pH-敏感脂质体的体外细胞毒性

[000129]游离阿霉素和各种脂质体制剂体外细胞毒性比较 (表 1) 是如 Lopes de Menezes 等人, *Cancer Res.*, 58: 3320 (1998) 所描述的那样用 Namalwa 细胞, 通过使用一种四唑啉染料 (MTT-3-(4, 5-二甲基噻唑-2-基)-2, 5-二苯基四唑啉溴化物; Mosmann, *J. J. Immunol Methods*, 65: 55 (1983)) 的体外增值试验来进行的。

[000130]简单地将, 将  $5 \times 10^5$  Namalwa 细胞镀在 96-孔板上并用游离 DXR 或包封于带有或不带有抗-CD19mAb 的脂质体中的各种阿霉素制剂进行培养。将单克隆抗体与马来酰亚胺-结尾的 PEG-DSPE 偶合从而形成具有 65-80  $\mu$ g mAb/ $\mu$ mol 磷脂的脂质体。在 140-160  $\mu$ g 阿霉素/ $\mu$ mol 磷脂 (0.24-0.28  $\mu$ mol 阿霉素/ $\mu$ mol 磷脂) 的加载水平下将脂质体极少量地体用阿霉素进行加载。将细胞在 37℃ 下在 95% 湿度和 5% CO<sub>2</sub> 的气氛下培养 1、24、48 小时。在 1 小时和 24 小时培养时间周期内, 在用新介质进行替换将前将细胞洗涤两次, 然后将其分别

再培养 47 小时和 24 小时。将所有的板一共都培养 48 小时。在培养结束时，向其中添加四唑鎓染料，然后将该板在 570 和 650 nm 的双波长下在 Titertek Multiskan Plus (Flow Laboratories, Inc. Mississauga, Ontario, Canada) 上进行读数。将各种脂质体制剂的细胞毒性表达为可有效将生长抑制 50% 的平均浓度 ( $IC_{50}$ ,  $\mu$  DXR)  $\pm$  S. D. (n=3-6) 并将其列于表 1 中。

### 实施例 7

#### 核积聚试验

[000131] 根据 Kirchmeier 等人的方法 (*J. Liposome Res.*, 11:15 (2001)) 对阿霉素的核积聚进行测定。简单地讲，将在另外添加了 10% FBS 的 RPMI 1640 中被维持在对数生长条件下的  $4.5 \times 10^8/500$  ml Namalwa 细胞用游离 DXR 或各种脂质体 DXR 制剂在  $8 \mu$ M 的 DXR 浓度下进行处理。

[000132] 在各时间点 (0, 2, 4, 8, 12 小时)，通过在 1000 rpm 下离心 10 分钟而使 100 ml 细胞成团，然后用 20 ml TEA 缓冲液对其进行洗涤。将进行了洗涤的细胞重新混悬于 3 ml TEA 缓冲液中并在 4℃ 下用紧密装配的 Dounce 匀浆器用 40 次坚实冲击使其破裂。使为破裂的细胞成团，然后小心地将包含核的 CFE 从该细胞团上取下。为了获得更完全的匀浆，将未破裂的细胞团混悬于 TEA 缓冲液 (3 ml) 中并进行第二次破裂，然后再除去未破裂的细胞。将所合并的上清液在 1000 rpm 下离心 10 分钟以除去仍然未破裂的细胞。将得自这一离心步骤的上清液在 4℃ 下在 2000 rpm 下旋转 2.5 分钟以使核成团。在除去上清液后，将该小团用 1 ml TEA 缓冲液进行稀释，然后涡旋并超声至通过目测该核均匀分散。

[000133] 对于各时间点而言，将三等分试样的核部分 (各份为 0.2 ml) 放置在 1.3 ml TEA 中。通过加入 10  $\mu$ l 洋地黄皂甙溶液 (在无菌 PBS 中, 25 mg/ml, Sigma, St. Louis, MO)、10  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> 溶液 (在无菌 PBS 中, 57 mg/ml) 和 50  $\mu$ l DNase 1 溶液 (在无菌 PBS 中, 3 mg/ml, Sigma) 将 DNA 进行酶消解。在将其在 22℃ 下消解 2 小时后，记录阿霉素的荧光 (在 480 nm 下激发并在 595 nm 下发射)。通过测定各种细胞器的酶标记水平来检查核片段的纯度 (Lopes de Menezes 等

人, J. Liposome Res., 9:199(1999))。

[000134]结果如图 8A-8C 所示。

### 实施例 8

#### 脂质体在 BALB/c(同系繁殖的)小鼠中的血液清除

[000135]体重为 17-22 g 的雌性 BALB/c Cr Alt B/M 小鼠得自 University of Alberta Health Sciences Laboratory Animal Services, 通过尾静脉注射将单剂量为 0.2 ml 包含所包封 [<sup>125</sup>I]TI 的各种脂质体制剂进行给药 (0.5 μmol PL/小鼠)。脂质体制剂仅包含 DOPE、包含 DOPE 与 3 mol%、5 mol% 或 10 mol% mPEG-DSPE、包含 DOPE/CHEMS 以及包含 DOPE/CHEMS 与 1.8 mol%、3 mol% 或 6 mol% mPEG-DSPE; DOPE/1 mol% PEG-DSPE 与 2 mol%、4 mol% 或 9 mol% mPEG-S-S-DSPE, 和 DOPE/CHEMS/mPEG-DSPE (6:4:0.06) 与 1 mol%、2 mol% 或 5 mol% mPEG-S-S-DSPE。

[000136]在注射后所选择的时间点, 将小鼠用氟烷进行麻醉, 然后通过颈部脱臼将其处死。通过心脏穿刺采集血样 (100 μl)。在 Beckman 8000 γ 计数器上对血样、各种器官和尸体进行 <sup>125</sup>I 标记计数。用 PKAnalyst (MicroMath Scientific Software) 对数据进行分析。

[000137]图 9A-9D 表示了得自有代表性试验的结果。数据点是一式三份分析的均值 ± S. D。

### 实施例 9

#### 体内给药

[000138]将 Namalwa 细胞 i. p. 给药于 CB-17/ICR Tac SCID 小鼠 (Charles River Laboratories, Quebec, 加拿大) 以形成一种具有可再生的肿瘤获得性的毒性更强的菌株 (Lopes de Menezes 等人, Cancer Res., 58: 3320(1998))。在无菌 PBS 中收获 Namalwa 细胞并将其植入到 SCID 小鼠体内。在移植过程之前和之后用台盼蓝染料通过染料排除来对细胞活力进行评估。

[000139]将 6-8 周大的 SCID 小鼠 (5 只小鼠/组) (Charles River Laboratories) i. v. 植入 Namalwa 细胞 ( $5 \times 10^6$ ) 并在移植后 24 小时通过静脉内注射单剂量——3 mg 的游离阿霉素、被 mPEG-DSPE 或

mPEG-S-S-DSPE 所稳定的阿霉素-SIL[抗-CD19]或负载有 DXR 的靶向 DOPE/CHEMS 制剂对其进行治疗。治疗方案如下:

| <u>治疗组</u> | <u>制剂<sup>1</sup></u>                                                                                                 |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (1)        | 盐水                                                                                                                    |
| (2)        | 游离阿霉素                                                                                                                 |
| (3)        | 由 DOPE/CHEMS/mPEG-DSPE/Ma1-PEG-DSPE (6:4:0.24:0.06) 所组成的脂质体                                                           |
| (4)        | 由 DOPE / CHEMS / mPEG-S-S-DSPE / Ma1-PEG-DSPE (6:4:0.24:0.06) 所组成的脂质体                                                 |
| (5)        | 由 HSPC/CHOL/mPEG-DSPE/Ma1-PEG-DSPE (2:1:0.08:0.02) 所组成的脂质体 ("DXR-SL")                                                 |
| (6)        | 由 HSPC/CHOL/mPEG-DSPE/Ma1-PEG-DSPE (2:1:0.08:0.02) 和 58.4 $\mu\text{g}$ 抗-CD19/ $\mu\text{mol}$ 磷脂所组成的脂质体 ("DXR-SIL") |
| (7)        | 由 DOPE/CHEMS/mPEG-DSPE/Ma1-PEG-DSPE (6:4:0.24:0.06) 和 33.3 $\mu\text{g}$ 抗-CD19/ $11\text{mol}$ 磷脂所组成的脂质体             |
| (8)        | 由 DOPE / CHEMS / mPEG-S-S-DSPE / Ma1-PEG-DSPE (6:4:0.24:0.06) 和 31.2 $\mu\text{g}$ 抗-CD19/ $\text{mol}$ 磷脂所组成的脂质体     |

<sup>1</sup>所有的脂质体制剂都包含阿霉素。

[000140]所有的治疗组都接受 3 mg 阿霉素/kg。常规地对小鼠的体重下降进行检测,并且在它们变得垂死时对其实施安乐死;记录存活时间。在任何实验组中都没有观测到药物毒性的迹象。所有的实验动物都得到了 Health Sciences Animal Policy and Welfare Committee of the University of Alberta (Edmonton, Alberta, Canada) 的批准。测定平均存活时间 (MST) 和相对于对照小鼠而言寿命增加 (ILS) 百分比并且其如表 2 所示。

[000141]虽然已经用特定实施方案对本发明进行了描述,但对于本领域技术人员而言可以进行各种变化和改变而不会脱离本发明是显而易见的。

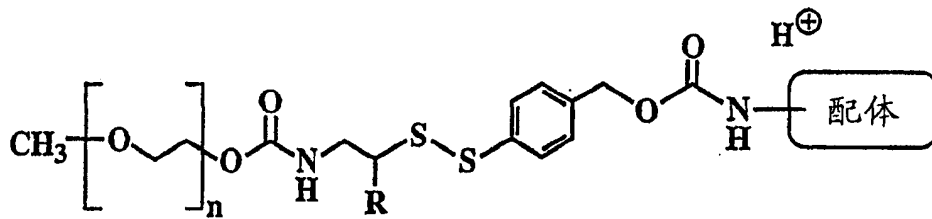


图 1A

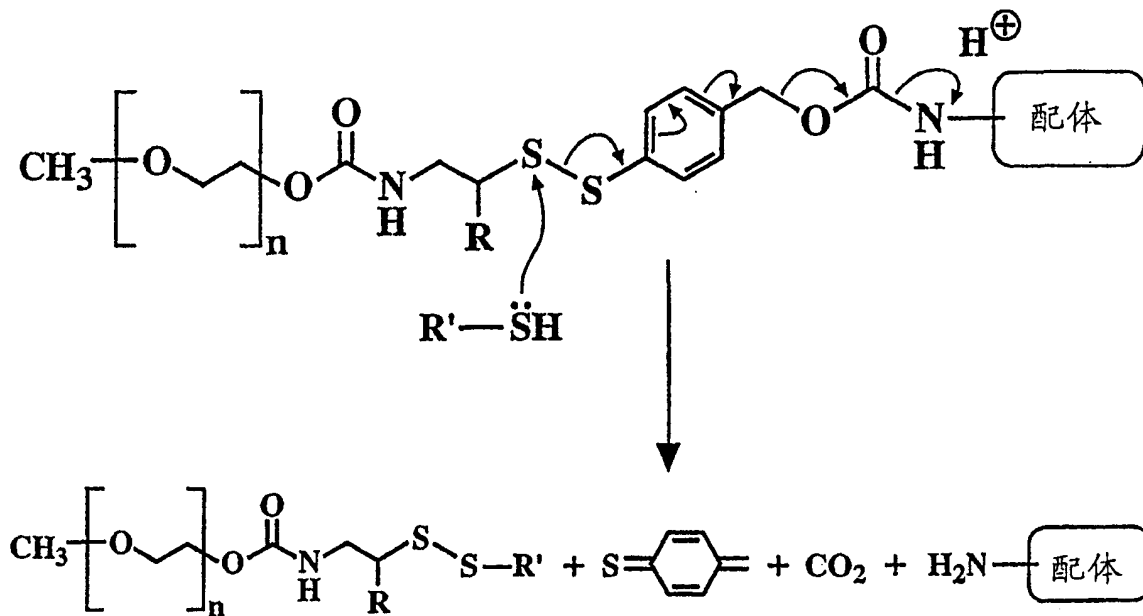


图 1B



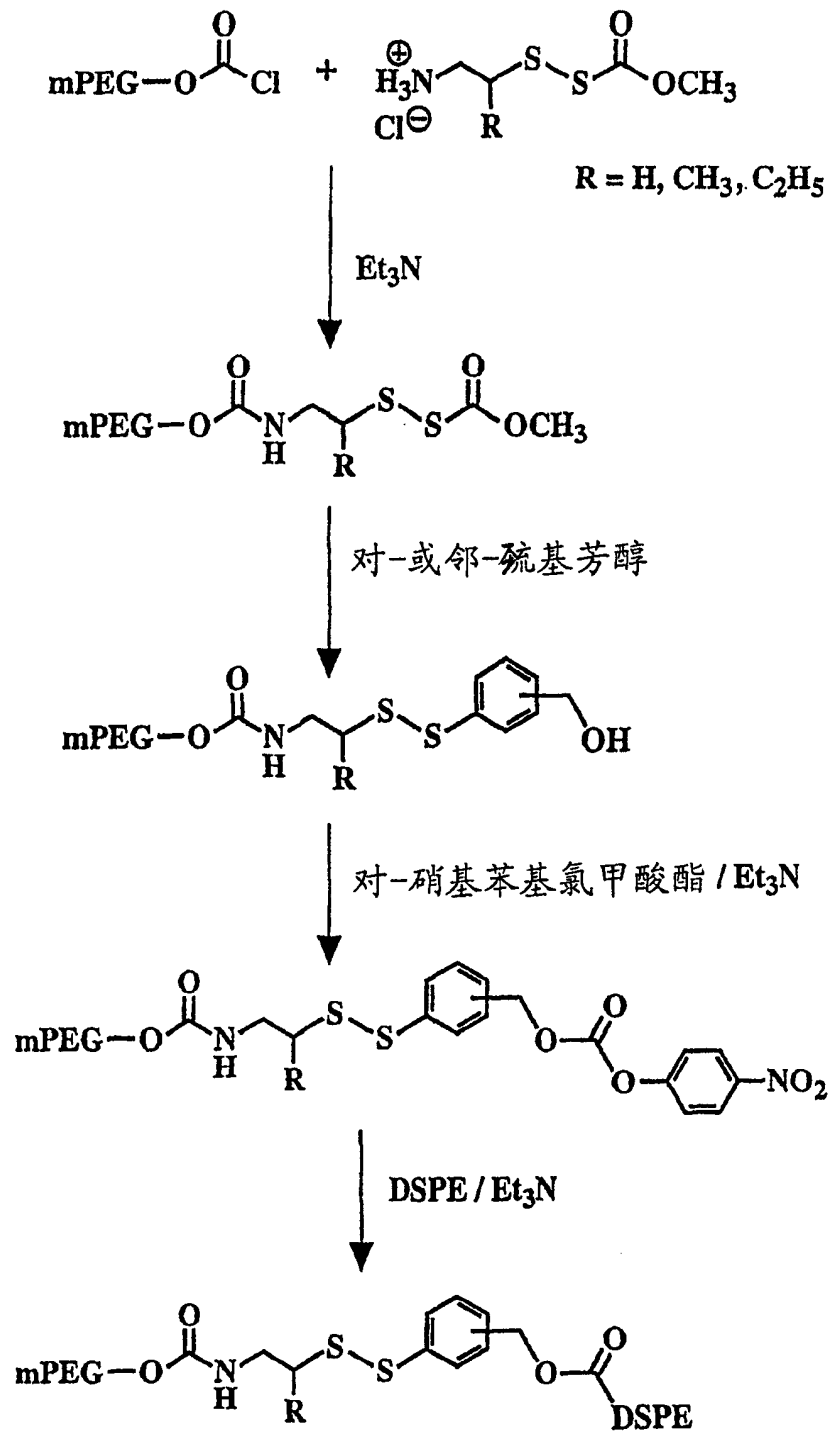


图 2

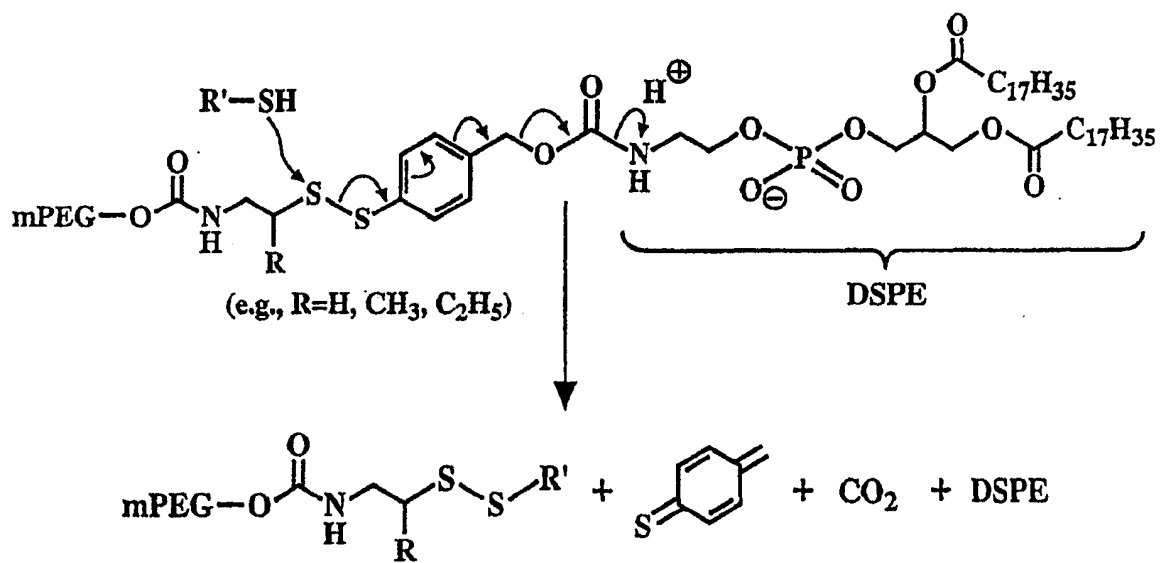


图 3

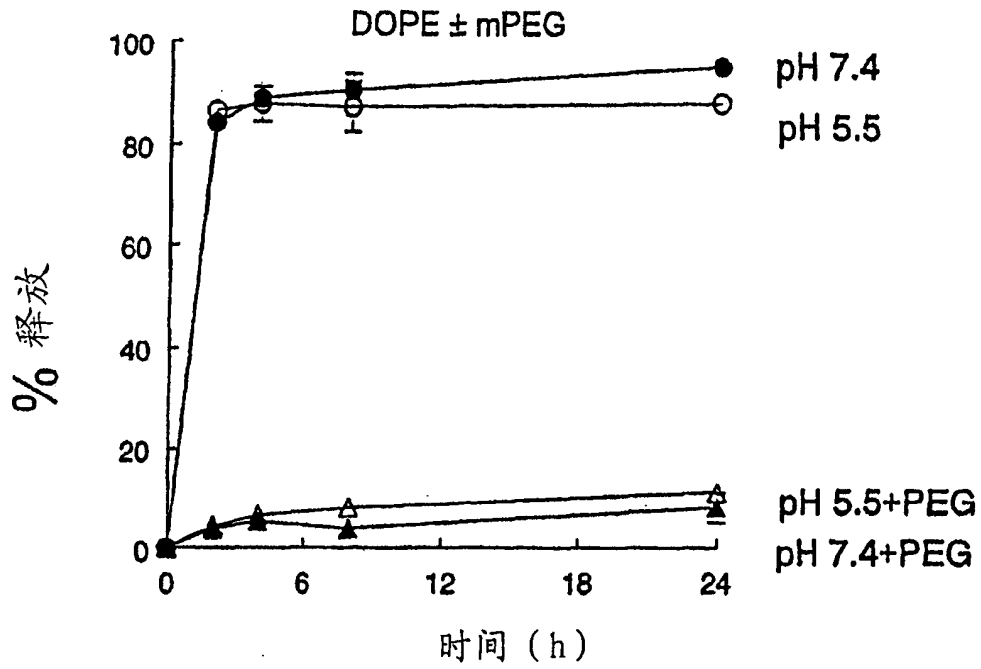


图 4A

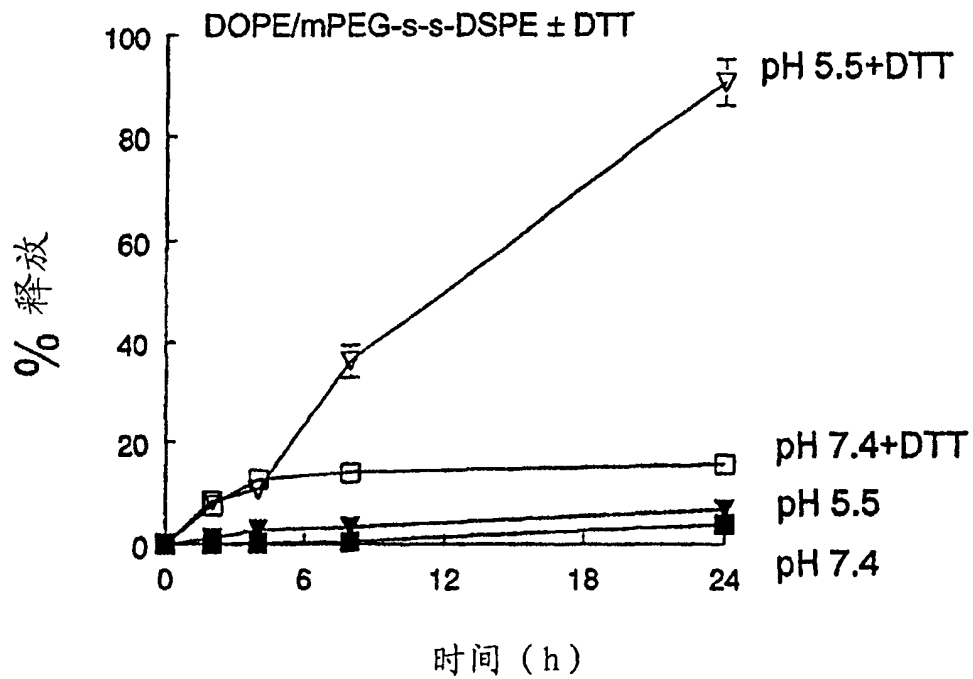


图 4B

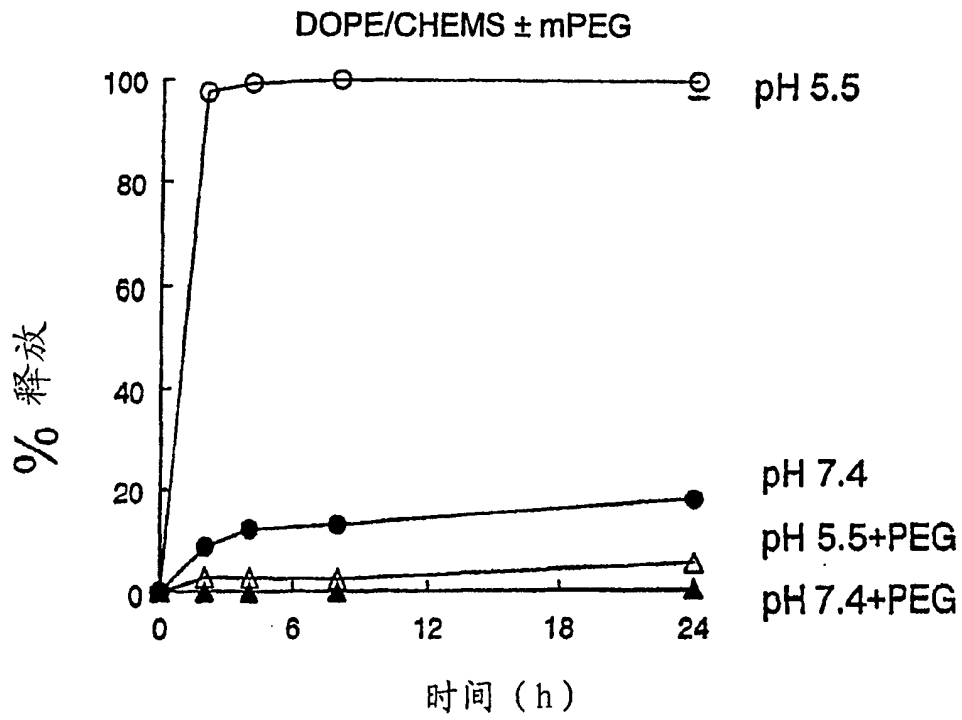


图 5A

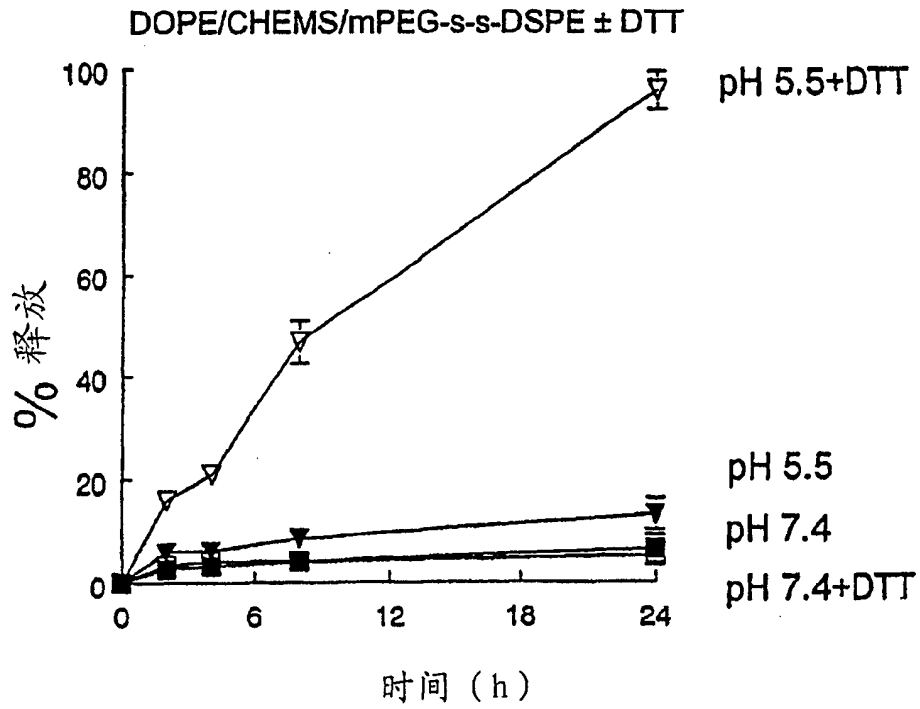


图 5B

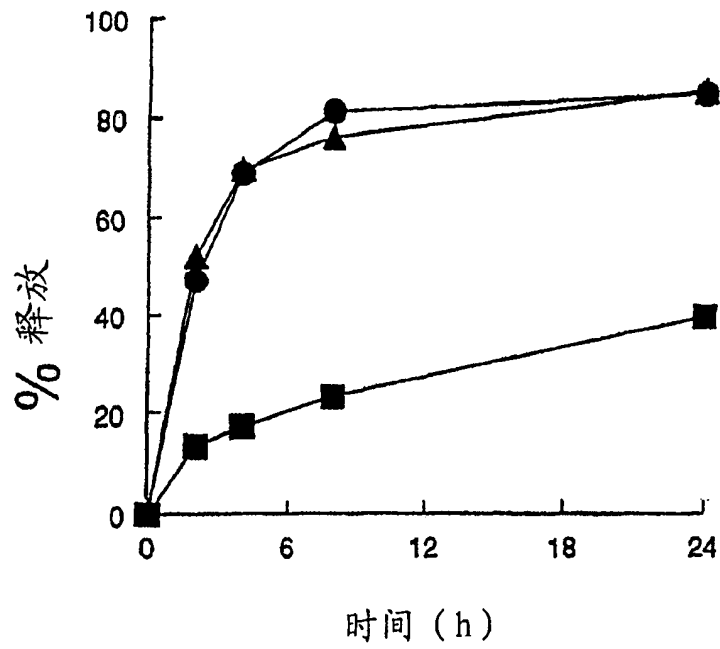


图 6A

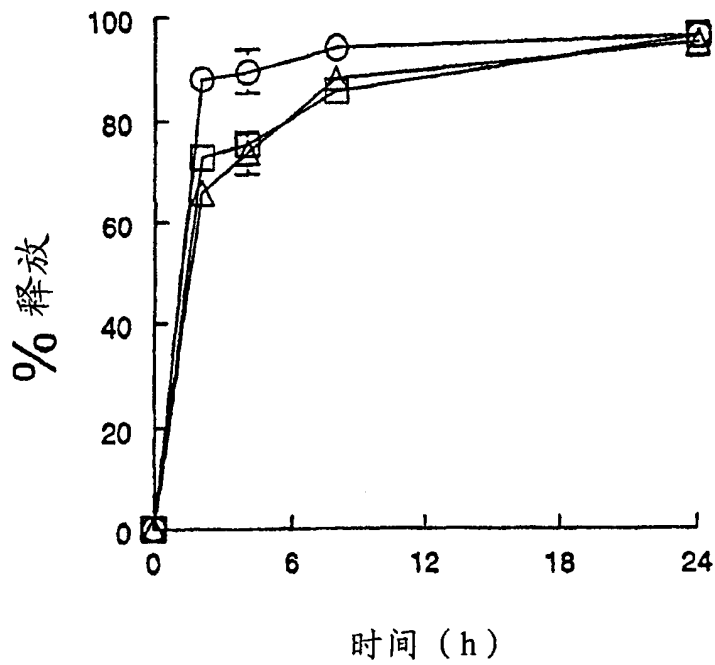


图 6B

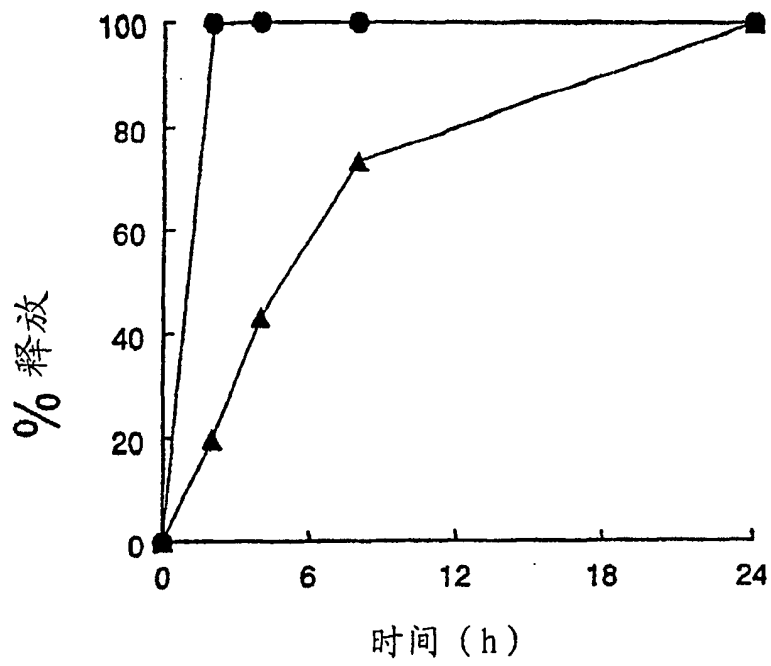


图 7A

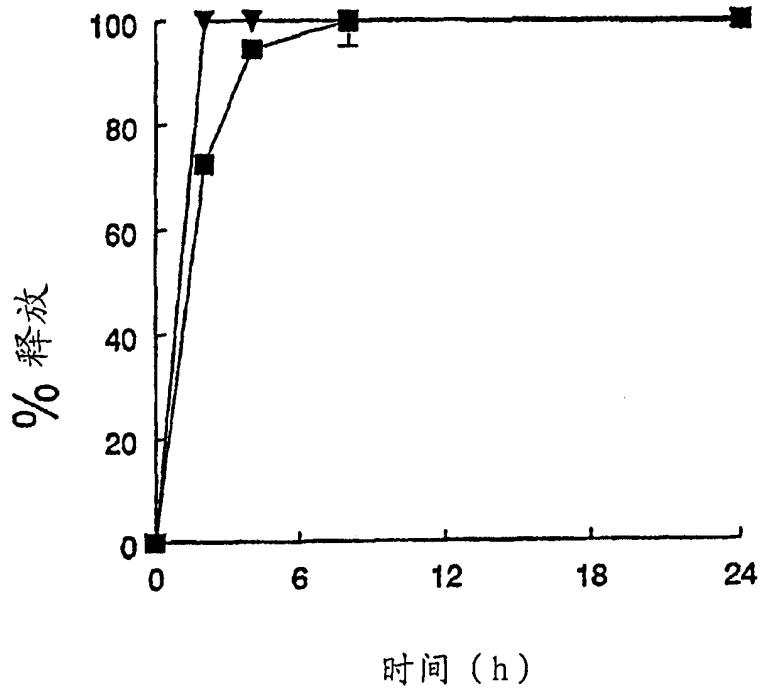
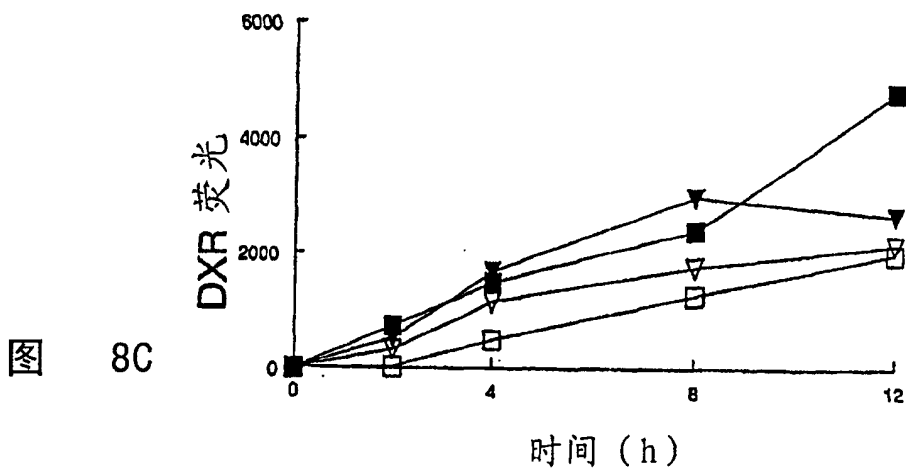
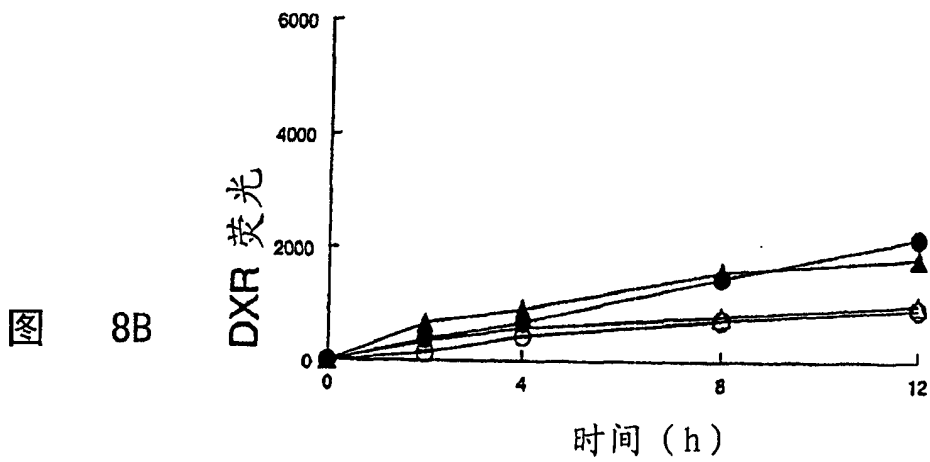
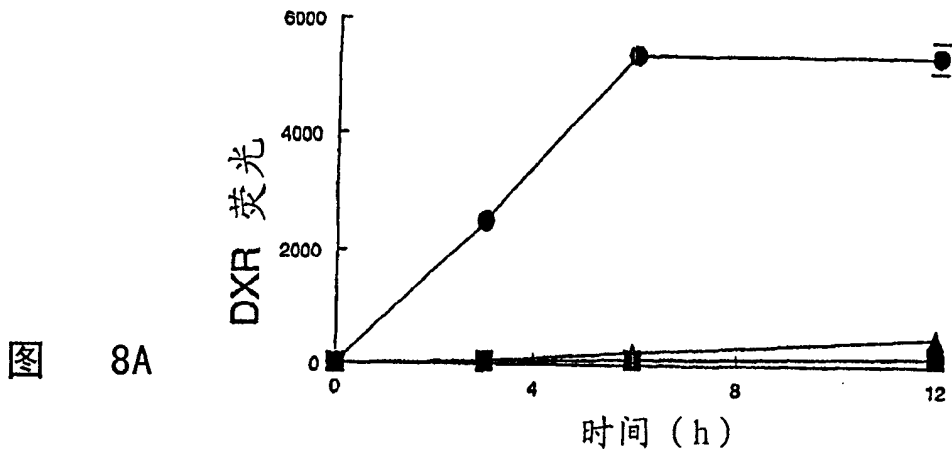


图 7B



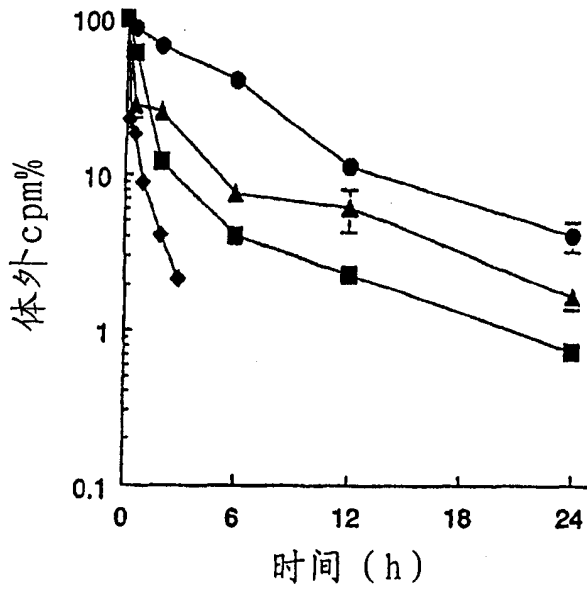


图 9A

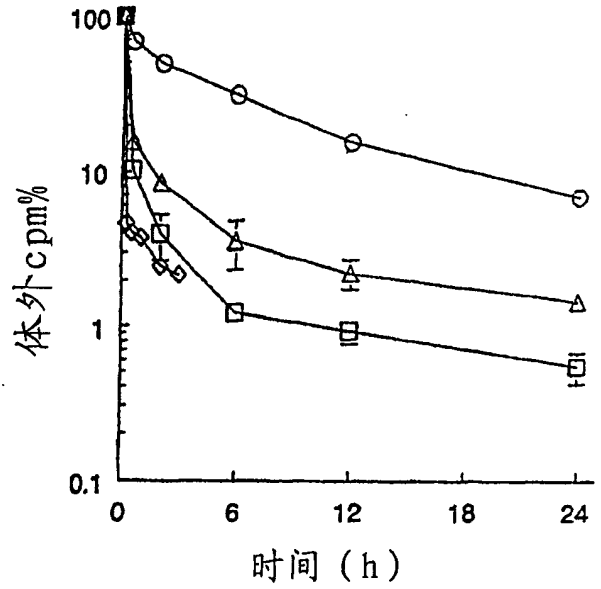


图 9B

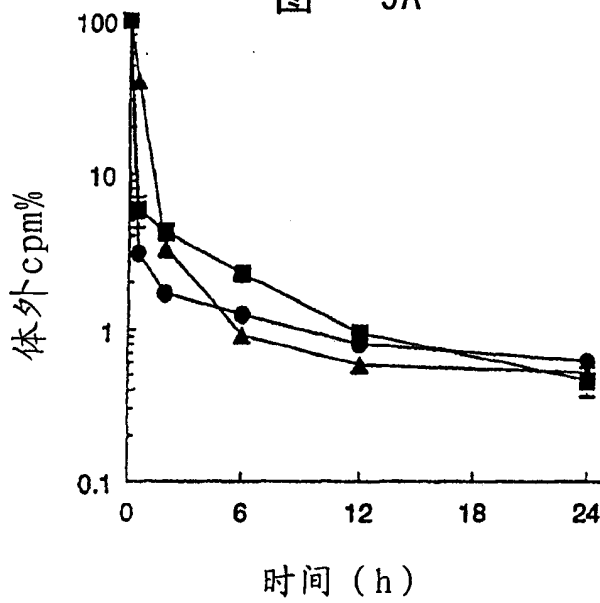


图 9C

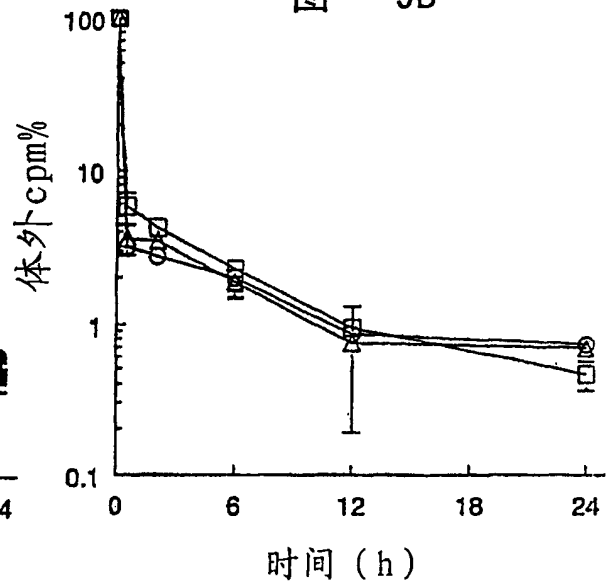


图 9D