

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

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



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480012351.9

[43] 公开日 2006年7月5日

[11] 公开号 CN 1798544A

[22] 申请日 2004.4.2

[21] 申请号 200480012351.9

[30] 优先权

[32] 2003.4.2 [33] US [31] 60/460,169

[86] 国际申请 PCT/CA2004/000507 2004.4.2

[87] 国际公布 WO2004/087115 英 2004.10.14

[85] 进入国家阶段日期 2005.11.7

[71] 申请人 塞拉特药物股份有限公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 L·迈耶 M·巴利 M·韦伯

P·塔蒂 S·约翰斯通

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 陈文青

权利要求书 3 页 说明书 33 页 附图 16 页

[54] 发明名称

喜树碱和氟嘧啶的组合物

[57] 摘要

包含具有稳定结合喜树碱和氟嘧啶的脂质体的组合物，当给予这些药物的组合时，该组合物用于增强疗效。

1.一种包含脂质体的组合物,所述脂质体以对相关细胞或肿瘤细胞匀浆具有所需的细胞毒性、细胞停滞或生物效应的喜树碱/氟嘧啶摩尔比,稳定
5 结合至少一种水溶性喜树碱和至少一种氟嘧啶。

2.如权利要求1所述的组合物,其特征在于,所述对相关细胞或肿瘤细胞匀浆的所需细胞毒性、细胞停滞或生物效应是非拮抗的。

3.如权利要求1所述的组合物,还包含足以稳定所述氟嘧啶的甲酰四氢叶酸。

10 4.如权利要求2所述的组合物,还包含足以稳定所述氟嘧啶的甲酰四氢叶酸。

5.如权利要求1所述的组合物,其特征在于,所述水溶性喜树碱是伊立替康(CPT-11)、托泊替康、9-氨基喜树碱或勒托替康。

15 6.如权利要求1所述的组合物,其特征在于,所述水溶性喜树碱是水不溶性喜树碱的亲水盐。

7.如权利要求2所述的组合物,其特征在于,所述水溶性喜树碱是伊立替康(CPT-11)或托泊替康。

8.如权利要求1所述的组合物,其特征在于,所述氟嘧啶是氟尿苷、氟尿嘧啶或UFT(替加氟/尿嘧啶)。

20 9.如权利要求1所述的组合物,其特征在于,所述脂质体包括含磷脂酰胆碱的脂质。

10.如权利要求9所述的组合物,其特征在于,所述含磷脂酰胆碱的脂质是DSPC或DAPC。

25 11.如权利要求1所述的组合物,其特征在于,所述脂质体含有磷脂酰甘油或磷脂酰肌醇。

12.如权利要求11所述的组合物,其特征在于,所述磷脂酰甘油是DSPG或DMPG。

13.如权利要求1所述的组合物,其特征在于,所述脂质体含有固醇。

14.如权利要求13所述的组合物,其特征在于,所述固醇是胆固醇。

- 15.如权利要求 14 所述的组合物,其特征在于,所述胆固醇存在的量小于 20 mol%。
- 16.如权利要求 1 所述的组合物,其特征在于,所述脂质体含有金属离子溶液。
- 5 17.如权利要求 16 所述的组合物,其特征在于,所述金属离子是铜。
- 18.如权利要求 17 所述的组合物,其特征在于,所述金属离子溶液是 Cu(葡糖酸)₂ 或 CuSO₄。
- 19.如权利要求 1 所述的组合物,其特征在于,所述水溶性喜树碱和氟嘧啶是共包封的。
- 10 20.如权利要求 1 所述的组合物,其特征在于,所述水溶性喜树碱是伊立替康或托泊替康,所述氟嘧啶是氟尿苷或 5-FU。
- 21.如权利要求 20 所述的组合物,其特征在于,所述脂质体含有 DSPC。
- 22.如权利要求 20 所述的组合物,其特征在于,所述脂质体含有 DSPG。
- 23.如权利要求 20 所述的组合物,其特征在于,所述脂质体含有胆固醇。
- 15 24.如权利要求 20 所述的组合物,其特征在于,所述脂质体含有 Cu(葡糖酸)₂ 或 CuSO₄。
- 25.如权利要求 20 所述的组合物,其特征在于,所述脂质体含有三乙醇胺(TEA)。
- 26.如权利要求 1 所述的组合物,其特征在于,与以相同的比例给予但不稳定结合脂质体的所述水溶性喜树碱和所述氟嘧啶得到的结果相比,给予受试者所述组合物后,可提供较大的治疗活性。
- 20 27.如权利要求 1 所述的组合物,其特征在于,所述组合物含有第三种药物。
- 28.一种制备含有脂质体的组合物的方法,所述脂质体以非拮抗的摩尔比稳定结合至少一种水溶性喜树碱和一种氟嘧啶,该方法包括:
- 25 a)在相关细胞培养试验、无细胞试验或肿瘤细胞匀浆中测定生物活性,所述水溶性喜树碱和氟嘧啶的摩尔比在至少 5%浓度范围内是非拮抗的,所述范围内大于 1%的细胞受所述比例药物的作用($f_a > 0.01$), 和
- b)将步骤 a)中测定的非拮抗摩尔比的水溶性喜树碱与氟嘧啶包封于所

述脂质体内。

29.一种在受试者中治疗疾病的方法，所述方法包括给予需要这种治疗的受试者以治疗有效量的如权利要求1所述的组合物。

30.如权利要求29所述的方法，还包括给予所述受试者甲酰四氢叶酸。

5 31.如权利要求29所述的方法，其特征在于，所述受试者是人。

32.如权利要求29所述的方法，其特征在于，所述受试者是人类以外的哺乳动物或禽类。

33.一种传递治疗有效量的氟嘧啶/水溶性喜树碱药物组合的方法，该方法包括给予稳定结合第一种传递载体的氟嘧啶和稳定结合第二种传递载体的水溶性喜树碱，其特征在于，给予的氟嘧啶和水溶性喜树碱的比例是非拮抗的。

10

喜树碱和氟嘧啶的组合物

5 相关申请的交叉引用

本申请根据 35 U. S. C. § 119 (e), 要求 2003 年 4 月 2 日提交的美国序列号 60/460,169 的权利, 其内容通过引用包括于此。

技术领域

10 本发明涉及改善治疗药物组合传递的组合物和方法。更具体的说, 本发明涉及提供嘧啶和喜树碱药剂及其衍生物组合的传递系统。

发明背景

许多威胁生命的疾病如癌症、艾滋病、感染性疾病、免疫病症和心血管
15 疾病的进程受多种分子机制的影响。由于这种复杂性, 用单一药剂治疗获得的成功是有限的。因此, 常常使用药剂组合来对抗疾病, 尤其是治疗癌症。似乎给予药剂的数量与癌症, 如急性淋巴细胞白血病与转移性结肠直肠癌之间具有强相关性(Frei, 等, Clin. Cancer Res. (1998) 4:2027-2037 ; Fisher, M. D., Clin Colorectal Cancer (2001) Aug; 1 (2):85-86)。尤其是, 已用嘧啶类似物
20 和喜树碱衍生物的组合成功治疗胃癌和结肠直肠癌, 并且, 研究其对食管癌的作用。临床试验利用嘧啶类似物、氟尿嘧啶(5-FU)与喜树碱 (伊立替康) 和甲酰四氢叶酸治疗晚期结肠直肠癌, 证明超过仅用 5-FU 的提高了存活率 (Fisher, M. D. (上述);和美国专利 6,403, 569)。Fisher 还指出, 在 5-FU 首次
25 治疗后发展的 5-FU 抗药性结肠直肠癌的患者, 用 5-FU、伊立替康(CPT-11) 和甲酰四氢叶酸联合治疗, 也显示存活率增加, 因而证明这些药物组合在治疗耐药癌症中的其它潜在用途。

喜树碱是在中国喜树和亚洲殷柴龙(*nothapodytes*)树的树皮中发现的基于喹啉的生物碱。喜树碱的许多衍生物, 包括半合成和合成衍生物如托泊替康和伊立替康, 具有抑制拓扑异构酶 I 的独特能力, 使它们称为高度活化

的细胞致死剂。拓扑异构酶 I 是负责 DNA 缠绕和解旋的细胞酶。当 DNA 不能解旋时，DNA 信使的转录不能发生，蛋白质不能合成，最终导致细胞死亡。高速分裂的细胞如癌细胞，对喜树碱衍生物尤其敏感，因其 DNA 不断解旋以复制子细胞。在开放状态，已显示 DNA 易受喜树碱药物的插入，

5 最终导致 DNA 断裂和细胞死亡。

嘧啶类似物，如 5-FU 和阿糖胞苷(阿糖胞苷或 araC)，是类似嘧啶核苷酸的抗代谢物。大多数抗代谢剂物具有不同的作用方式。例如，5-FU 起胸苷酸合酶的自杀失活剂作用，共价修饰酶的活性部位。胸苷酸合酶是 DNA 从头合成中限速的不可逆步骤，催化 dUMP 转化为 dTMP。该步骤的暂时阻

10 断导致细胞死亡。相反，阿糖胞苷被细胞酶生物活化为 araCMP，使其与 DNA 聚合酶的交替底物 CTP 竞争。araCMP 掺入 DNA 中，因而抑制增长的 DNA 链的进一步合成。这种抗增殖特性使抗代谢物能够有效地治疗结肠、乳房、头、颈、胃和胰的癌症，因为快速分裂细胞对这些药物的作用高度敏感。

15 虽然大约 40 年前临床试验中已引入 5-FU，但是直到二十世纪九十年代早期才研究了涉及喜树碱衍生物与嘧啶类似物的组合的试验(Furuta, T. 和 Yokokura, T., *Gan To Kagaku Ryoho* (1991) Mar; 18 (3):393-402)。多年来，研究者继续证明，通过给予多种嘧啶/喜树碱组合的游离药物混合物，有希望改善癌症的治疗。(参见 PCT 专利申请 WO 00/66125 和 WO 01/62235)。

20 尽管使用嘧啶/喜树碱药物混合物有优势，但是也存在各种缺点限制治疗应用。例如，给予游离药物混合物常常导致一种或所有药物在到达肿瘤部位前快速清除。由于这个原因，许多药物已掺入设计的传递载体中，以“保护”药物不受导致其从血流清除的机制的影响。

25 众所周知，脂质体具有提供“保护”作用的能力，它们能延长治疗药物的半衰期。包封于合理设计的传递载体中也能产生协调的包封药物的药物动力学。然而，已证明特殊药物或多于一种药物配制入传递载体中是困难的，因为载体的脂质组合物常常特异地影响个别药物的药物动力学。因此，适合于一种药物的保留和释放的组合物可能不适用于第二种药物的保留和释放。近来，虽然在临床试验中成功利用了许多活性嘧啶/喜树碱药物

组合，但是尚未描述设计了一种能够控制两种药物的药物动力学，因而肿瘤传递的药物制剂。例如，授权于 W. Achterrath，公开于 2002 年 6 月 11 日的美国专利 6,403, 569 声称假如有至少 200 mg/m² 甲酰四氢叶酸，通过给予喜树碱衍生物、5-FU 和甲酰四氢叶酸(与维生素叶酸有关的化合物，5-FU 5 治疗期间的标准治疗实践)的协同量治疗癌症的方法，但是没有提及保证传递和/或增加循环持续时间的药物制剂。

本发明研究人员已鉴定容纳嘧啶和喜树碱衍生物所需的具体传递载体制剂，得到每个药剂较高的载药量和持久的药物释放。他们还阐明，如果包封于脂质体，这些药物的协同比例在血流房室中可维持一段时间，与游离药物混合物相比，效果提高。 10

发明内容

本发明涉及使用稳定地结合至少一种氟嘧啶和一种水溶性喜树碱的脂质体载体，给予有效量的氟嘧啶/喜树碱药物组合的组合物和方法。组合物 15 以合适的方式，使两种或多种药物传递至病变部位，因而保证在病变部位存在所需比例的药物。无论药物是共包封于基于脂质的传递载体中，或是分别包封于单个基于脂质的传递载体中以在病变部位维持所需比例，都可得到此结果。通过基于脂质的传递载体本身控制组合物的药物动力学 (PK)，以达到合适的传递(假设传递系统的 PK 是可比较的)。

因此，一方面，本发明提供非肠道给药的脂质体组成，该组合物含有至少一种氟嘧啶和一种水溶性喜树碱，它们以治疗有效比例结合脂质体产生所需、优选是非拮抗效果。通过在浓度范围内，评价药物对相关细胞培养或无细胞体系，以及个体患者活组织检查的肿瘤细胞匀浆的生物活性或作用来确定药物的治疗有效比例。优选的组合物是伊立替康和氟尿嘧啶 20 (5-FU)或伊立替康和氟脱氧尿苷(FUDR)。可使用能够确定维持所需疗效的药物比例的任何方法。

组合物含有至少一种氟嘧啶和一种水溶性喜树碱，氟嘧啶与水溶性喜树碱的摩尔比能够对相关培养细胞或无细胞体系和肿瘤细胞匀浆显示所需，优选非拮抗的生物效应。“相关”细胞，申请者是指适用于测试所需 25

生物效应的至少一种细胞培养或细胞系。当这些药物用作抗肿瘤药时，“相关”细胞是由国立癌症研究所(NCI)/国立卫生研究院(NIH)的发展治疗规划(Developmental Therapeutics Program)(DTP)鉴定，作为适用于抗癌药物发现计划的细胞系。目前，DTP 筛选使用 60 中不同的人肿瘤细胞系。需要证明关于至少一种该细胞系的所需活性。“肿瘤细胞匀浆”，申请者是指患者活组织检查或形成全细胞样品的肿瘤的机械或化学破裂产生的细胞。合格医师可通过标准医学技术提取整体肿瘤或肿瘤活组织检查，在实验室中采用许多本领域公知的方法将组织匀浆成单一的全细胞。

另一方面，本发明涉及通过施用本发明组合物将治疗有效量的氟嘧啶/水溶性喜树碱组合传递至所需靶点的方法。

本发明还涉及通过给予稳定地结合第一传递载体的氟嘧啶和稳定地结合第二传递载体的水溶性喜树碱，传递治疗有效量的氟嘧啶/水溶性喜树碱药物组合方法。第一和第二传递载体可包含于独立小瓶中，同时或相继给予患者小瓶的内容物。在一个实施例中，施用氟嘧啶与水溶性喜树碱的比例是非拮抗的。

本发明另一方面，与本发明组合物一起给予甲酰四氢叶酸(与叶酸有关的化合物)，以稳定体内氟嘧啶。

另一方面，本发明涉及包含脂质体的治疗组合物，所述脂质体含有至少一种氟嘧啶和一种水溶性喜树碱的比例，以提供所需疗效的制备方法，该方法包括：提供一组至少一种氟嘧啶和一种水溶性喜树碱，其中，该组含有至少一种，但优选多种比例的所述药物；在一定浓度范围内，测定该组成员对相关培养细胞或无细胞体系和肿瘤细胞匀浆产生生物效应的能力；选择该组的一个成员，其中，在合适的浓度范围内，该比例提供对所述培养细胞或无细胞体系产生所需疗效；和该组的成功成员所代表的药物比例稳定结合进入基于脂质的药物传递载体。在优选的实施例中，上述所需疗效是非拮抗的。

如下文进一步描述，在优选的实施例中，在设计与上述方法一致的合适的组合中，选择具有组合指数(CI) ≤ 1.1 的非拮抗比例。在进一步的实施例中，设计合适的脂质体制剂，使其稳定包含有效量的氟嘧啶/水溶性喜树

碱组合，并且，体内两种药物持久释放。优选的制剂含有至少一种负电荷脂质如磷脂酰甘油，并含有至少一种固醇如胆固醇。

附图简要说明

5 图 1 是在 50℃，含 100mMCu(葡萄糖酸)₂，220 mM TEA, pH7.4 和被动包封 FUDR 的 DSPC/DSPG/Chol (70:20:10 摩尔比)脂质体中载入伊立替康 (CPT-11)一定时间的图。

图 2A 是在 50℃，比较含 100mM 葡萄糖酸铜，220 mM TEA, pH7.4 或 100 mM CuSO₄，265 mM TEA, pH7.4，和被动包封 FUDR 的 DSPC/DSPG/Chol
10 (70:20:10 摩尔比)脂质体中载入 CPT-11 一定时间的图。

图 2B 是在 50℃，比较使用含 100mM 葡萄糖酸铜，220 mM TEA, pH7.4 或 100 mM CuSO₄、265 mM TEA, pH7.4 和使用 pH 7.4 的 HBS 作为外部缓冲液被动包载 FUDR 的 DSPC/DSPG/Chol (70:20:10 摩尔比)脂质体中 FUDR 保留一定时间(CPT 载入后)的图。

15 图 3 是在比较含 100 mM 葡萄糖酸铜，220 mM TEA, pH 7.4 或 150 mM 葡萄糖酸铜，20 mM Hepes, pH 7.4 和使用 pH 7.4 的 HBS 作为外部缓冲液被动包载 FUDR 的 DSPC/DSPG/Chol (70:20:10 摩尔比)脂质体中载入 CPT-11 时间的图。

图 4A 是比较随着脂质体-胆固醇的量从 5 摩尔%增加到 20 摩尔%，
20 CPT-11 在载有 CPT-11 和 FUDR 的 DSPC/DSPG/Chol 脂质体中保留一定时间的图。FUDR 被动包封于含 250 mM CuSO₄ 的脂质体中，然后，在给予和测定 CPT-11 水平之前主动包载 CPT-11。

图 4B 是比较随着脂质体-胆固醇的量从 5 摩尔%增加到 20 摩尔%，
FUDR 在包载 CPT-11 和 FUDR 的 DSPC/DSPG/Chol 脂质体中保留一定时
25 间的图。FUDR 被动包封于含 250 mM CuSO₄ 的脂质体中，然后，在给予和测定 FUDR 水平之前主动包封 CPT-11。

图 5A 是受不同摩尔比的 FUDR:CPT-11 组合的作用:10:1(实心正方形)、5:1(实心圆形)、1:1(实心三角形)、1:5(实心反三角形)和 1:10(空心圆形)，组合指数(CI)作为 HT-29 人结肠直肠细胞分数的函数绘制的图。

图 5B 是受不同摩尔比的 FUDR:CPT-11 组合的作用:10:1(实心正方形)、5:1(实心圆形)、1:1(实心三角形)、1:5(实心反三角形)和 1:10(空心圆形), 组合指数(CI)对 H-460 人大细胞癌细胞分数的函数绘制的图。

图 5C 是受不同摩尔比的 FUDR:CPT-11 组合的作用:10:1(实心正方形)、5:1(实心圆形)、1:1(实心三角形)、1:5(实心反三角形)和 1:10(空心圆形), 组合指数(CI)对 HCT-116 人结肠直肠癌细胞分数的函数绘制的图。

图 5D 是 FUDR:CPT-11 的摩尔比为 1:5、1:1 和 1:10 时, 各种肿瘤型的编集数据与其相对协同值的函数绘制的图。

图 6A 是静脉给予 CD-1 鼠以 CPT-11 和 FUDR 的双载药脂质体和游离 10 药物混合物后, 血浆中 CPT-11/FUDR 比(摩尔/摩尔)作为时间函数的图。

图 6B 是静脉给予 SCID-Rag2M 鼠以 CPT-11/FUDR 双载药脂质体后, 血浆中 CPT-11/FUDR 比(摩尔/摩尔)作为时间函数的图。

图 7 是显示同时将 CPT-11(实心圆形)和 FUDR(空心圆形)包载入含糖酸铜的 DSPC/DSPG/Chol(7:2:1)脂质体的图。50℃, 脂质体存在下, 通过 15 加热药物混合物包载两种药物。2 小时时间过程内监测包载。

图 8A 是给予生理盐水(对照, 实心圆形)、1:1 协同比例的 CPT-11:FUDR 的游离药物混合物(空心方块和实心三角形)和 1:1 协同比例的 CPT-11:FUDR 的脂质体制剂(空心反三角形)后, 用人 HT-29 结肠腺癌细胞接种肿瘤细胞后, 瘤重对时间的图。

图 8B 是给予盐水(对照, 实心圆形)、1:1 协同比例的 CPT-11:FUDR 的游离药物混合物(实心三角形)和 1:1 协同比例的 CPT-11:FUDR 的脂质体制剂(空心方块)后, 用人 HCT116 结肠腺癌细胞接种肿瘤细胞后, 瘤重对时间的图。

图 8C 是给予盐水(对照, 实心圆形)、1:1 协同比例的 CPT-11/FUDR 的 25 游离药物混合物(空心方块和反实心三角形)和 1:1 协同比例的 CPT-11/FUDR 的脂质体制剂(空心反三角形)后, 用人 Capan-1 胰腺肿瘤细胞接种肿瘤细胞后, 瘤重对时间的图。

实施本发明的模式¹

本发明提供组合物，该组合物含有稳定结合至少一种氟嘧啶和一种水溶性喜树碱的脂质体，其中，存在氟嘧啶和水溶性喜树碱的氟嘧啶/喜树碱摩尔比，显示对相关细胞或肿瘤细胞匀浆所需的细胞毒性、细胞生长抑制

5 或生物效应。

优选地，本文提供的脂质体组成包括稳定结合至少一种氟嘧啶和一种水溶性喜树碱的脂质体，氟嘧啶/水溶性喜树碱的摩尔比显示对相关细胞或肿瘤细胞匀浆的非拮抗效应。

优选地，本发明脂质体组成包括稳定结合 5-FU 或 FUDR 和伊立替康的

10 脂质体。更优选地，5-FU 或 FUDR 和伊立替康将以 5-FU (或 FUDR):伊立替康的摩尔比在 100:1 和 1:100 之间，更优选 5-FU 或 FUDR 与伊立替康的摩尔比在 10:1 和 1:1 的范围内，存在于本发明组合物中。

在本发明再一个实施例中，上述基于脂质的传递载体包括第三或第四试剂。可包括任何治疗、诊断或化妆试剂。

15 本发明的另一方面，提供了含有固醇的脂质体。优选固醇是胆固醇。

本发明基于脂质的传递载体不仅可用于非肠道给药，而且可用于局部、鼻、皮下、腹膜内、肌内、气雾剂或口服传递、或在治疗目的或医疗显像等的靶部位或附近的天然或合成可植入装置上或内应用传递载体。优选地，

20 基于脂质的本发明传递载体用于非肠道给药，最优选静脉给药。在另一个本发明实施例中，与本发明组合物一起给予甲酰四氢叶酸，在体内稳定氟嘧啶。

¹ 缩写

25 DSPC:二硬脂酰卵磷脂; PG:磷脂酰甘油;
 DSPG:二硬脂酰磷脂酰甘油; PI:磷脂酰肌醇; Chol:胆固醇;
 CH 或 CHE:胆固醇基十六烷基醚;
 DAPC:二花生四烯酰基磷脂酰胆碱(diarachidonoylphosphatidylcholine)
 SUV:小单室脂质体; LUV:大单室脂质体; MLV:多室脂质体;
 MTT:3-(4, 5-二甲基噻唑-2-基)-2, 5-二苯基-2H 溴化四唑溴盐;
 30 EDTA:乙二胺四醋酸;
 HEPES:N-[2-羟乙基]-哌嗪-N-[2-乙磺酸];
 HBS:HEPES 缓冲盐水(20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4);
 SHE:300 mM 蔗糖, 20 mM HEPES, 30 mM EDTA;
 TEA:三乙醇胺; CI:组合系数; fa:作用分数

本文所描述的优选实施例不是为了无遗漏地或限制本发明范围至具体公开形式。选择和描述它们是为了更好地解释本发明的原理及其应用和实际使用，以使其它本领域技术人员理解本说明。

5 水溶性喜树碱

喜树碱是一类高活性抗癌药物。大部分药物是在中国喜树和亚洲殷柴龙树的树皮中发现的天然来源的“喜树碱”的半合成或合成衍生物。报道喜树碱是通过抑制拓扑异构酶 I，一种参与 DNA 的合成和复制的细胞中发现的酶的作用而起效的。发现与正常细胞相比，该酶在许多类型的癌细胞中具有显著较高量且降解更慢。由于尚未完全理解喜树碱的作用机理和微水溶性，喜树碱的临床应用受到限制。几乎所有的天然来源的喜树碱是微水溶性的；此性质使其制剂或给药困难，在许多情况下不可能。因此，许多市售或研发中的喜树碱已制备成水溶性的。本领域技术人员普遍接受的是，水溶性喜树碱包括在生理 pH 条件下带电的喜树碱衍生物。例如，通过在喜树碱 A 环的 9、10 或 11 位引入亲水性羟基或硝基，可有效增加水溶性。相似地，在 9 位引入正电荷的二甲基氨基甲基，证明水溶性增加。

喜树碱的水溶性衍生物具有抗人肿瘤的广谱活性。由于这个原因，美国食品与药品管理局(FDA)已批准水溶性喜树碱制剂伊立替康、托泊替康和勒托替康用于人临床应用。认为伊立替康(CPT-11)的抗肿瘤活性证明是通过其代谢物 SN-38 产生的。

本发明“水溶性喜树碱”是指在水中充分溶解的喜树碱衍生物或其制剂。水溶性喜树碱包括，但不限于伊立替康 (CPT-11)、SN-38、托泊替康、9-氨基喜树碱、勒托替康和这些药物的前药、前体、代谢产物；以及水不溶性喜树碱的亲水盐衍生物如母体混合物的钠盐，喜树碱(Camptothecin)。用于本发明优选的水溶性喜树碱是伊立替康、托泊替康、9-氨基喜树碱或勒托替康。最优选的水溶性喜树碱是伊立替康。

氟嘧啶

尿嘧啶、胞嘧啶或胸腺嘧啶，以及相应核苷的氟嘧啶类似物是众所周知

的抗癌药物。许多这种嘧啶类似物或衍生物作为抗代谢物接近类似必需代谢物，因此干扰有关的生理反应。嘧啶类似物的一般作用机制是抑制酶，即胸苷酸合酶。这种抑制作用防止 dUMP 的甲基化(脱氧尿苷单磷酸)，结果产生二氢叶酸和胸苷酸，其是 DNA 合成中的必需前体。这种干扰的结果是抑制 DNA 生物合成。在脱氧核苷酸的合成中，胸苷酸合酶的作用使其成为癌症化疗中的关键靶酶，最特别是结肠直肠癌和其它肿瘤。尤其感兴趣的是氟化嘧啶类似物或 "氟嘧啶"，如氟尿嘧啶(5-FU)和氟脱氧尿苷(氟尿苷或 FUDR)，已表明在人中具有明显的抗肿瘤活性。

"氟嘧啶"正如其名称所暗示的，是指氟原子衍生的嘧啶类似物。本领域认为本发明氟嘧啶是 5-FU 或 FUDR 的同等物，包括但不限于 UFT (尿嘧啶-替加氟)、卡培他滨、喃氟啶(FT-207)和 5-FU 或 FUDR 的前药、前体、代谢产物如 FdUMP (5 氟-脱氧尿苷单磷酸)和 FUTP (氟尿苷三磷酸)等。

在临床试验中使用尿嘧啶和替加氟(UFT)的组合治疗癌症已有 20 多年。替加氟体内代谢形成 5-FU 而尿嘧啶与替加氟相互作用，且防止 5-FU 的断裂。在一些情况下，口服给予 UFT 有希望替代 5-FU 的治疗，因其常常能增加活性和降低毒性。

卡培他滨是前药，被胸腺嘧啶磷酸化酶选择性地肿瘤激活至其细胞毒部分，氟尿嘧啶。在正常和肿瘤细胞内，氟尿嘧啶进一步代谢形成两个活性代谢物 5-氟-2-氟脱氧尿苷单磷酸(FdUMP)和 5-氟尿苷三磷酸(FUTP)。FdUMP 通过还原正常胸腺嘧啶产生抑制 DNA 合成，而 FUTP 通过与尿苷三磷酸竞争抑制 RNA 和蛋白质合成。

优选地，本发明使用的氟嘧啶是 5-FU、FUDR 或替加氟/尿嘧啶。更优选地，氟嘧啶是 FUDR 或 5-FU。最优选地，氟嘧啶是 FUDR。可结合本发明组合物给予甲酰四氢叶酸。此混合物没有抗肿瘤活性；但是，因为它导致 5-FU 的生存时间明显增加，所以是 FDA 批准的用 5-FU 治疗患者的标准护理实践。甲酰四氢叶酸通过使 5-FU (和 FUDR)稳定结合靶酶(胸苷酸合酶)而起作用，因而保护其免受从血液中清除的机制。氟嘧啶的清除降低使其显示较高的细胞毒作用。

在本发明脂质体中，结合喜树碱和嘧啶类似物的效果将至少抑制拓扑

异构酶 I 和胸苷酸合酶，因此，导致在治疗过度增生性疾病如癌症中关键的 DNA 合成抑制作用增加。

体外非拮抗的喜树碱/氟嘧啶比例的确定

5 本发明的又一方面，喜树碱和氟嘧啶将以协同或累加(即非拮抗)的比例包封于脂质体中。在以下所述实验数据类型的基础上，使用各种算法可确定显示协同或累加组合作用的药剂的比例。这些方法包括辐射热量法 (Loewe 等, *Arzneim-Forsch* (1953) 3:285-290; Steel 等, *Int. J. Radiol. Oncol. Biol. Phys.* (1979) 5:27-55), 分数产物法(Webb, 《酶和代谢抑制剂》(*Enzyme and Metabolic Inhibitors*) (1963) 卷 1,1-5 页. New York:Academic Press), 基
10 于 Chou, *J. Theor. Biol.* (1976) 39:253-276 所述方程的蒙特卡罗模拟法、CombiTool、ComboStat 和 Chou-Talalay 半数效应法; 和 Chou, *Mol. Pharmacol.* (1974) 10:235-247)。替代方法包括生存分数法(Zoli 等, *Int. J. Cancer*(1999) 80:413-416), 与对照相比, 粒细胞/巨噬细胞菌落形成单位的百分比反应
15 (Pannacciulli 等, *Anticancer Res.*(1999)19:409-412)及其它(Berenbaum, *Pharmacol. Rev.* (1989) 41:93-141; Greco 等, *Pharmacol Rev.*(1995) 47:331-385)。

优选 Chou-Talalay 半数效应法。利用方程分析，其中产生特殊效应的剂量， f_a 由以下方程给出：

$$20 \quad D=D_m[f_a/(1-f_a)]^{1/m}$$

其中，D 是所用药物的剂量， f_a 是该剂量作用的细胞分数， D_m 是半数效应的剂量表示效果，m 是表示剂量-效应曲线形状的系数(一级反应 m 是 1)。

如 Chou 和 Talalay, *Adv. Enzyme Reg.* (1984) 22:27-55; 和 Chou 等,《化疗中的协同作用和拮抗作用》(*Synergism and Antagonism in Chemotherapy*), Chou 和 Rideout 编, Academic Press:New York 1991:223-244 所述, 在多药物效应方程的基础上, 该方程还可用于计算组合指数(CI)。在 Chou 和 Chou(“用微型计算机进行剂量效应分析: 定量 ED₅₀、LD₅₀、协同作用、拮抗作用、低剂量风险、受体配基结合和酶动力学” "Dose-effect analysis with

microcomputers : quantitation of ED₅₀, LD₅₀, synergism, antagonism, low-dose risk, receptor ligand binding and enzyme kinetics":CalcuSyn 手册和软件; Cambridge:Biosoft 1987)中发现此计算的计算机程序(CalcuSyn)。

组合指数方程是基于来自酶动力学模型的 Chou-Talalay 的多药物-效应方程的。该方程只确定累加效应而不是协同作用和拮抗作用。然而, 根据 CalcuSyn 程序, 协同作用定义为大于预期的累加效应, 拮抗作用定义为小于预期的累加效应。Chou 和 Talalay 在 1983 年建议定义 CI=1 为累加效应, 因此, 从两种药物的多药物效应方程, 对于具有相同或近似的作用方式的相互排斥的药物, 我们得到:

$$10 \quad CI = (D)_1/(Dx)_1 + (D)_2/(Dx)_2 \text{ [方程 1]}$$

对于具有完全独立的作用方式的相互不排斥的药物, 还提出

$$CI = (D)_1/(Dx)_1 + (D)_2/(Dx)_2 + ((D)_1(D)_2)/(Dx)_1 (Dx)_2 \text{ [方程 2]}$$

CI <1, =1 和 >1 分别表示协调作用、累加效应和拮抗作用。方程 1 或方程 2 要求, 在实际实验中, 药物 1, (D)₁ 和药物 2, (D)₂, (在分子中)的组合抑制 x %。因此, 实验观察到的 x % 抑制作用可能不是整数, 最常见是小数。方程 1 和 2 的 (D_x)₁ 和 (D_x)₂ (在分母中) 分别是药物 1 和药物 2 的剂量, 抑制 x%。

为了简化, 当组合中涉及多于两种药物时, 通常假定是相互排斥的 (CalcuSyn 手册和软件; Cambridge:Biosoft 1987)。

还可使用两种药物组合作为单一药物单元, 以确定与第三种药物的协同或累加相互作用。此外, 可使用三种药物组合作为一个单元, 以确定与第四种药物的非拮抗相互作用, 等等。

通常使用细胞培养或无细胞体系确定基本实验数据。优选地, 如图 5A-5C 所示, 组合指数(CI)对作用细胞分数的函数(f_a)作图, 如上所述, 是浓度范围的替代参数。药物的优选组合是那些在 f_a 值实际范围内, 显示协同或累加效应的组合。选择至少 5% 浓度范围内显示协同作用的药物的组合, 其中, 大于 1% 的细胞受损, 即 f_a 范围大于 0.01。优选地, 大部分整体浓度显示有利的 CI; 例如, 5% 的 f_a 范围为 0.2-1.0。更优选地, 10% 的该范围显示有利的 CI。甚至更优选地, 20 % 的 f_a 范围, 优选 50%, 最优选至少超过 70 % 的 f_a 值 0.2-1.0 应用于组合物中。在多种药物比例下, 再次评价

在 f_a 值实际范围内显示协同性的组合，以确定最佳比例，增加非拮抗相互作用的强度并观察到在 f_a 值范围内协同作用增加。

虽然希望在受损细胞的整个浓度范围内具有协同作用，但已观察到，在许多情况下，更多可靠的结果是 f_a 范围 0.2-0.8。因此，虽然提及的本发明组合显示的协同作用在 0.01 或更大的广阔范围内存在，优选在 f_a 0.2-0.8 范围内建立协同作用。然而，可使用其它更灵敏的试验， f_a 值大于 0.8 时评价协同作用，例如生物发光或克隆发生试验。

最佳组合比例还可用作单一药物单元，以确定与第三种药物的协同或累加相互作用。此外，三种药物组合可用作一个单元，以确定与第四种药物的非拮抗相互作用，等等。

如上所述，用“相关”细胞进行的细胞培养的体外试验。细胞的选择取决于药物的预期治疗用途。只有一种相关细胞系或细胞培养类型需要显示所需非拮抗作用，以提供本发明范围内组合物的基础。

例如，在一个优选的本发明实施例中，药物组合用于抗癌治疗。然后适当选择试验细胞和试验的性质。尤其是，合适的受试对象是肿瘤细胞系，合适的终点是测定细胞死亡或细胞停滞。以下将进一步讨论，在发现其它适应症的合适的非拮抗组合的尝试中，可采用除了细胞毒性或细胞停滞以外的其它靶细胞和标准。

为了确定有关的抗肿瘤药物，细胞系可从标准细胞系储库(例如 NCI 或 ATCC)得到，可从科研机构或其它组织包括商业来源得到。优选的细胞系包括一种或多种选自 NCI/NIH 的发展治疗规划鉴定的细胞系。目前，该规划使用的肿瘤细胞系筛选鉴定了 60 种不同的肿瘤细胞系，代表白血病、黑色素瘤、肺癌、结肠癌、脑癌、卵巢癌、乳房癌、前列腺癌和肾癌。在所需浓度范围内，只有一种细胞类型显示所需的非拮抗效应；然而，优选的是至少两种细胞系显示该效应，更优选三种细胞系，更优选五种细胞系，更优选十种细胞系。细胞系可以是已建立的肿瘤细胞系或来自患者样本的原代培养细胞。细胞系可来自任何物种，但优选来自哺乳动物，特别是人。通过在各种实验条件下选择，和/或外源性遗传物质的加入或缺失，可遗传改变细胞系。细胞系可通过任何基因转染技术转染，包括但不限于基于病

毒或质粒的转染技术。修饰作用可包括编码特殊蛋白质或肽表达的 cDNA, 调节因子如启动子或增强子序列或反义 DNA 或 RNA 的转染。基因工程组织培养细胞系可包括含或不含肿瘤抑制基因的细胞系, 即基因如 p53、pTEN 和 p16; 以及通过使用显性阴性方法, 基因插入方法和其它选择方法产生的

5 细胞系。为了试验抗肿瘤药物, 可使用优选的组织培养细胞系定量细胞生存力, 包括但不限于, H460、MCF-7、SF-268、HT29、HCT-116、LS180、B16-F10、A549、Capan 胰腺、CAOV-3、IGROV1、PC-3、MX-1 和 MDA-MB-231。

10 在一个优选的实施例中, 给定的作用(f_a)是指细胞毒试剂应用于细胞培养后的细胞死亡或细胞停滞。例如, 使用以下方法可测定细胞死亡或生存力。

细胞毒性试验	参考文献
MTT 试验	Mosmann, J.Immunol.Methods (1983)65(1-2):55-63
台盼蓝排斥试验	Bhuyan 等,Experimental Cell Research(1976)97:275-280
放射性氚标记(³ H)-嘧啶掺入或 DNA 嵌入试验	Senik 等, Int.J.Cancer (1975)16(6):946-959
放射性铬-51 释放试验	Brunner 等, Immunology (1968)14:181-196
谷氨酸丙酮酸转氨酶、肌酸磷酸激酶 和乳酸脱氢酶泄漏试验	Mitchell 等, J. of Tissue Culture Methods (1980)6(3&4):113-116
中性红摄取试验	Borenfreund 和 Puerner, Toxicol.Lett. (1985)39:119-124
碱性磷酸酶活性试验	Kyle 等, Toxicol.Environ.Health (1983)12:99-117
碘化丙锭染色试验	Nieminen 等,J.Toxicol.Appl. Pharmacol. (1992)115:147-155
双羧乙基-羧基荧光素(BCECF)保留 试验	Kolber 等, J.Immunol.Methods (1988)108:255-264
线粒体膜电位试验	Johnson 等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1980)77:990-994
集落形成试验	Puck 等, J. of Experimental Medicine (1956)103:273-283
LIVE/DEAD 生存力/细胞毒性试验	Morris,Biotechniques (1990)8:296-308
罗丹明 B(SRB)试验	Rubinstein 等, J.Natl.Cancer Instit. (1990)82:1113-1118

优选“MTT”试验。

可确定两种或多种药物的非拮抗比例治疗除癌症外的疾病适应症，该信息可用于制备治疗这些疾病的两种或多种药物的治疗性制剂。对于体外试验，假设许多可测定的终点与具体疾病的治疗相关，可选择该终点以定义药物的协同作用。

如上所述，采用“相关”细胞进行细胞培养体外试验。细胞的选择取决于药物的预期治疗应用。由机械或化学破裂肿瘤样本为单一、全细胞产生的“肿瘤细胞匀浆”进行个体患者活组织检查或整体肿瘤的体外研究。

在一个优选的实施例中，给定作用(f_a)是指细胞毒试剂应用于“相关”细胞培养或“肿瘤细胞匀浆”后的细胞死亡或细胞停滞(见实施例 4)。可使用许多本领域已知方法测定细胞死亡或生存力。优选“MTT”试验(Mosmann, J. Immunol Methods (1983) 65 (1-2):55-63)，如实施例 4 所述。

基于脂质的传递载体的制备

用于本发明优选的脂质载体是脂质体。如《脂质体：合理的设计》(Liposomes:Rational Design) (A. S. Janoff编, Marcel Dekker, Inc., New York, NY)所述，或通过本领域技术人员已知的附加技术制备脂质体。适用于本发明的合适的脂质体包括大单室脂质体(LUVs)、多室脂质体(MLVs)、小单室脂质体(SUVs)和交指型融合脂质体。

本发明使用的脂质体可由“低胆固醇”制备。这种脂质体是“无胆固醇”，或“大体上不含胆固醇”，或“基本上没有胆固醇”的。本文所用关于脂质体的术语“无胆固醇”是指在没有胆固醇情况下制备的脂质体。术语“大体上不含胆固醇”可存在的胆固醇的量不足以明显改变脂质体的相转变性质(一般小于 20 摩尔%胆固醇)。脂质体中少于 20 摩尔%胆固醇的掺入，当用大于 20 摩尔%胆固醇制备脂质体时不能最佳保持药物的保留。优选地，本发明脂质体含有一些胆固醇。此外，用少于 20 摩尔%胆固醇制备的脂质体显示窄的相转变温度，可利用该性质制备由于应用热而释放包载药物的脂质体(热敏脂质体)。本发明脂质体还含有治疗脂质，例子包括醚脂质、磷脂酸、磷酸酯、神经酰胺和神经酰胺类似物、鞘氨醇和鞘氨醇类似

物和含丝氨酸脂质。

也可用表面稳定的亲水性聚合物-脂质缀合如聚乙二醇-DSPE 制备脂质体，以增加循环时间。也可在脂质体制剂中加入负电荷脂质如磷脂酰甘油(PG)和磷脂酰肌醇(PI)，以增加载体的循环时间。可采用这些脂质代替亲水性聚合物-脂质缀合作为表面稳定剂。本发明优选实施例使用含 PG 或 PI 的低胆固醇脂质体来防止聚集，因而增加了载体的血液保留时间。

在一个实施例中，本发明脂质体组成优选用于治疗癌症，包括多药抗性的癌症如 5-FU 抗性的结肠直肠癌。通过给予本发明脂质体使包载的药物传递至肿瘤部位。优选脂质体直径小于 300nm。最优选脂质体直径小于 200nm。由于开窗术或内皮中的缺口，肿瘤血管系统通常比正常血管系统渗漏。这就使 200nm 或更小直径的传递载体透过不连续的内皮细胞层和环绕供血血管的下层基底膜至肿瘤。渗过后传递载体在肿瘤部位中的选择性聚积可增加抗癌药物的传递和疗效。

可采用多种方法包封活性药物到脂质体中。“包封”包括药物与基于脂质的传递载体的共价或非共价结合。例如，这可通过药物与脂质体外层或脂质层或脂质体内包封的药物的相互作用，脂质体的不同部分之间达到平衡。因此，共价或非共价的相互作用，药物的包封可通过结合药物通过与脂质体的双层的相互作用，通过与脂质成分或脂质体内水相中包载或内部水相或双层之间的平衡。“载药”是指将一种或多种药物包封入传递载体的作用。

可通过包封于不同的传递载体或包封于相同的传递载体中，包封所需的组合物。当需要包封于不同的脂质体中时，每个脂质体的脂质组成可明显不同，以得到合适的药物动力学。通过改变载体组成，包封药物的释放速率可使所需比例的药物传递至肿瘤部位。改变释放速率的方法包括增加脂质载体的酰基链长度，以改善药物保留；控制表面移植的亲水性聚合物如脂质体膜外的 PEG 的交换；和掺入膜稳定剂如固醇或鞘磷脂到膜中。如果希望以具体的药物比例给予第一和第二种药物，如果第二种药物在第一种药物的脂质体组成(例如 DMPC/Chol)中保留较差，那么可通过将第二种药物包封于由增加的酰基链长度的脂质组成(例如 DSPC/Chol)的脂质体中，以改善药物

动力学，这对于本领域技术人员是显而易见的。当包封于不同的脂质体时，应该承认：对于个体患者，在给药前，通过结合每种脂质体包封药物合适的量，得到水溶性喜树碱与氟嘧啶的比例，该比例在患者特异性基础上以提供最佳治疗活性时已经确定。另一方面，两种或多种药物可包封于相同的脂质体内。

5 包封技术取决于传递载体的性质。例如，可使用被动和主动包载方法将治疗药物包载于脂质体中。包封活性药物进入脂质体的被动方法涉及在脂质体制备期间包封药物。这包括如 Bangham 等(J. Mol. Biol. (1965) 12:238) 所述的被动包载方法。该技术形成多室脂质体(MLVs)，多室脂质体挤压后可转化为大单室脂质体(ULVs)或小单室脂质体(SUVs)。被动包封其它合适的方法包括如 Deamer 和 Bangham (Biochim. Biophys. Acta (1976) 443:629) 10 所述的醚注射技术和如 Szoka 和 Paphadjopoulos (P. N. A. S. (1978) 75:4194) 所述的反相蒸发技术。

主动包封方法包括美国专利 5,616,341、5,736,155 和 5,785,987 所述的 pH 梯度包载技术和主动金属包载方法。pH 梯度载药优选的方法是基于柠檬酸的载药方法，利用柠檬酸作为 pH4.0 的内相缓冲液和一种中性外相缓冲液。建立和维持穿过脂质体的 pH 梯度所采用的其它方法涉及使用离子载体，离子载体可插入脂质体膜，转运离子穿过膜以交换质子(见美国专利 15 5,837,282)。也可使用最新技术，该技术在没有离子载体的情况下，通过络合利用过渡金属驱动药物吸收入脂质体中。该技术依赖于形成药物-金属络合物而不是建立 pH 梯度来驱动药物的吸收。 20

基于金属的主动载药一般使用具有被动包封金属离子的脂质体(有或没有主动包载治疗药物)。使用金属离子的各种盐，假定盐是药学上可接受的盐并且溶于水性溶液。选择主动包载的药物，该药物能够与金属离子形成络合物，因而在脂质体内络合时保留，但不与金属离子络合时也能载入 25 脂质体中。能与金属协同的药物一般包含配位点如胺、羰基、醚、酮、酰基、乙炔、链烯基、巯基、羟基、卤素基团或其它能够供给电子至金属离子而与金属离子形成络合物的合适的基团。结合金属的活性药物的例子包括但不限于：喹诺酮如氟喹诺酮；喹诺酮如萘啶酮酸；蒽环类抗生素如阿霉素、柔红霉素和伊达比星；氨基糖苷如卡那霉素；和其它抗生素如博来霉素、

丝裂霉素 C 和四环素；氮芥类如环磷酰胺、缩氨基硫脲、吲哚美辛、硝普盐；喜树碱如托泊替康、伊立替康、勒托替康、9-氨基喜树碱、9-硝基喜树碱和10-羟基喜树碱；鬼臼毒素如依托泊苷。外部介质中加入药物后，在合适的温度下孵育混合物，可建立药物的摄取。取决于脂质体的组成、外部介质的温度5 和 pH、药物的化学性质，药物的摄取可在几分钟或几小时内发生。确定在脂质体内药物和金属之间的协同是否发生的方法包括本领域技术人员已知的分光光度分析和其它常规技术。优选地，本发明脂质体含有金属离子溶液。优选金属离子是铜。

也可以结合被动和主动包封方法，以制备含有多于一种包封药物的脂质体制剂。10

体内给予本发明的组合物

如上所述，本发明传递载体组合物可给予温血动物，包括人和家禽类。对于治疗人体疾病，合格的医师将利用已建立的方案，确定如何施用本发明组合物的剂量、方案和给药途径。也可应用剂量按比例上升，使包封在本发明传递载体组合物中的药物对受试者健康组织的毒性降低。15

优选地，本发明药物组合物非肠道给药，即如动脉内、静脉内、腹膜内、皮下或肌内给药。更优选地，通过推注静脉内或腹膜内给药本发明药物组合物。例如，见 Rahman 等,美国专利 3,993,754；Sears,美国专利 4,145,20 410；Papahadjopoulos 等,美国专利 4,235, 871；Schneider,美国专利 4,224,179；Lenk, 等, 美国专利 4,522, 803；和 Fountain 等,美国专利 4,588,578，参考包括于此。

在其它方法中，本发明药物或化妆品制剂也可通过将制剂直接应用于组织使其接触靶组织。可通过局部“开放式”或“封闭式”方案进行应用。25 “局部”是指将多种药物制剂直接应用到暴露于环境的组织如皮肤、口咽、外听觉道等。“开放式”方案包括切开患者的皮肤，使施加药物制剂的下面的组织直接可见。这通常是通过外科手术实现的，例如胸廓切开术到达肺、腹部剖腹术到达腹部内脏或其它直接手术方法以到达靶组织。“封闭式”方案是侵入性方案，其内部的靶组织不直接可见，但通过皮肤上的小伤口插入装置

才能到达靶组织。例如，通过针灌洗将制剂施用到腹膜。另一方面，制剂可通过内窥镜装置施用。

根据标准技术制备含有本发明传递载体的药物组合物，可包括水、缓冲液、0.9%盐水、0.3%甘氨酸、5%葡萄糖等，包括糖蛋白如白蛋白、脂蛋白、球蛋白，以增加稳定性。可通过常规、众所周知的灭菌技术消毒这些组合物。得到的水性溶液包装后使用或在无菌状态下过滤并冻干，冻干制剂在施用前结合无菌水溶液。组合物可包含药学上可接受的附加物质，以接近生理状态，例如 pH 调节剂和缓冲剂、渗透性调节剂等，例如，醋酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙等。另外，传递载体混悬液可包含脂质保护剂，在储存中保护脂质免受自由基和脂质过氧化的损伤。亲脂性自由基淬灭剂如 α 生育酚和水溶性铁离子特异螯合剂如铁氧胺是合适的。还可以通过标准技术结合本发明组合物给予甲酰四氢叶酸，以增加给予的氟嘧啶的寿命。

在药物制剂中传递载体的浓度可广泛变化，例如从小于约 0.05 重量%，通常在或至少约 2-5 重量%到 10-30 重量%，并且，根据选择的给药的具体方式，主要根据液体体积、粘度等选择浓度范围。例如，可增加浓度以降低与治疗相关的液体负荷。另一方面，可稀释由刺激性脂质组成的传递载体至低浓度，以缓解给药部位的炎症。对于诊断而言，给予的传递载体的量取决于所用的具体标记、所诊断的疾病状态以及临床医师的判断。

优选地，本发明药物组合物静脉内给药。传递载体制剂的剂量将取决于药脂比以及基于患者的年龄、体重和状态的给药医师的观点。

除了药物组合物，还可以制备合适的兽医用制剂，以适合于受试动物的方式给药。优选的兽医受试动物包括哺乳动物类，例如除人外的灵长类动物，狗、猫、牛、马、羊和家禽。受试动物还包括实验室动物，例如，尤其是大鼠、兔子、小鼠和豚鼠。

25

试剂盒

可分别在治疗药物与合适的传递载体可稳定结合的各个组合物中配制本发明组合物中的治疗药物。可将这些组合物分别给予受试者，以协调传递载体的药物动力学，维持在治疗靶点给予的治疗药物的比例。因此，可

构建试剂盒，包括：在不同的容器中，含有与至少一种第一治疗剂稳定结合传递载体的第一种组合物，在第二个容器中，含有与至少一种第二治疗剂稳定结合传递载体的第二种组合物。然后容器可包装于试剂盒中。

试剂盒也可包括关于组合物对受试者的给药方式的使用说明，至少包括要给予的每种组合物的量的比例的说明。另外，或此外，预先测定每个容器中的组合物量，以使一个容器的内容物与另一个容器的内容物组合代表正确的比例，构建试剂盒。另外，或此外，用量尺标记容器，根据可见的刻度分配合适的用量。容器本身可用于给药；例如，试剂盒可包含注射器中的合适量的每个组合物。还可包装含有预先配制正确比例的治疗药物的制剂，从预包装于试剂盒中的注射器中直接施用制剂。

提供以下实施例是为了说明而非限制本发明。

实施例

大单室脂质体的制备方法

除非另有说明，脂质溶解于氯仿溶液中，接着在氮气下干燥并置于真空泵，以除去溶剂。加入痕量的放射性脂质 ^{14}C -CHE 以定量脂质。将得到的脂质膜置于高真空下最少 2 小时。在指定溶液中水解脂质膜，形成大单室脂质体(MLVs)。所得制剂使用挤压装置(Lipex Biomembranes, Vancouver, BC)挤压通过叠加的聚碳酸酯滤膜 10 次，得到平均脂质体粒径为 80-150nm。脂质体的所有组成脂质以摩尔%记录。

载药量的定量方法

在载药开始后的不同的时间点，移去等分部分并通过 Sephadex G-50 自旋柱，从包封药物中分离游离药物。对于特定体积的洗脱剂，加入 Triton X-100 或 N-ocyl β -D-葡糖吡喃糖苷(OGP)溶解脂质体。加入洗涤剂后，加热混合物至洗涤剂的浊点，室温下冷却后测定吸光度或荧光。与标准曲线比较，计算药物浓度。液相闪烁计数器测定脂质水平。

实施例 1A

CPT-11 和 FUDR 双包载脂质体中(脂质膜法)

为了确定是否能产生含有水溶性喜树碱和氟嘧啶的可使用的脂质体，含有被动包载的 FUDR 的 DSPC/DSPG/Chol (70:20:10 摩尔比)脂质体主动包
5 载 CPT-11。

在氯仿中溶解 DSPC 至 50 mg/ml，胆固醇至 50mg/ml，在氯仿/甲醇/水(50/10/1)中溶解 DSPG 至 25 mg/ml，制备脂质膜。混合脂质，除去溶剂后，得到的脂质膜用由 pH 7.4 的 100 mM 葡糖酸铜、220 mM 三乙醇胺(TEA)和 30 mg/mL(122 mM)的 FUDR (含痕量 ^3H -FUDR)组成的溶液在 70°C 下水
10 解。在 70°C 下挤压所得 MLVs，形成 LUVs。用 QELS (准弹性光散射)分析测定所得脂质体的平均粒径约为 100 nm +/-20 nm。接着，使用手提式切向流柱将脂质体缓冲交换入 pH 7.4 的 300 mM 蔗糖、20 mM HEPES、30 mM EDTA (SHE)，然后进入生理盐水，因而除去任何未包封的 FUDR 和 Cu(葡糖酸)₂。

15 这些脂质体中加入 CPT-11，以使 FUDR 与 CPT-11 的摩尔比为 1:1。以起始 CPT-11 与脂质比为 0.1:1，50°C 下样品孵育 10 分钟，促进 CPT-11 包载入脂质体。载药后，冷却至室温，样品交换入盐水(0.9% 氯化钠注射液，USP; pH 5.5, Baxter)，切向流透析除去 EDTA 和未包封药物。370nm 处测定吸收度，对照标准曲线得到 CPT-11 的载药程度。液相闪烁计数测定各个
20 时间点的药脂比，确定脂质浓度(^{14}C -CHE)和 FUDR 浓度(^3H -FUDR)。

图 1 显示 50°C，CPT-11 载药过程中，各个时间点的平均药/脂比(+/-标准差)。由图 1 可见，以起始 CPT-11 与脂质的比例为 0.1:1，CPT-11 可主动包载入 DSPC/DSPG/Chol (70:20:10 摩尔比)脂质体中，包含被动包载 FUDR，最终的 CPT-11 与脂质比约为 0.8:1。这些结果证明，包封有 FUDR 的
25 DSPC/DSPG/Chol (70:20:10 摩尔比) 脂质体可有效地双包载 CPT-11。

实施例 1B

有机乳化法制备 CPT-11 和 FUDR 包载入脂质体中

称量所需量的脂质 DSPC/DSPG/Chol(70:20:10), 溶解于二氯甲烷/甲醇/水混合液(93/5/2)中, 最终浓度为 125 mg/mL。溶解的脂质置于玻璃 Applikon 生物反应器中, 混合液中缓缓通入氮气。Applikon 生物反应器中泵入 100mM 葡糖酸铜/180mM TEA 缓冲液, 以使最终脂质浓度为 75 mg/mL。铜缓冲液
5 泵入生物反应器的同时, 连续通入氮气下, 用重型漩涡混合器搅拌整个混合液最少 90 分钟。整个过程中, 通过用钩钩住生物反应器的外部水浴使生物反应器的温度维持在 70°C。

然后, 通过温度, 肉眼观察混合物寻找脂质体形成, 按顺序是油包水乳剂、“半流体”相、半流体相的“破裂”和建立均质脂质体混悬液。70
10 °C 加压下, 粗脂质体挤压通过 0.1 μ m 孔径的滤膜, 直到平均脂质体粒径小于 150nm, 优选在 110 到 125nm 之间, 90% < 200 nm (动态光散射分析)。室温下, 使用切向流中空纤维柱, 用 10 体积的蔗糖磷酸盐 EDTA 缓冲液, 过滤除去外部的铜。

氟尿苷和伊立替康 HC1 三水合物的共包载要求在 pH7.0 将氟尿苷溶解
15 于蔗糖磷酸盐 EDTA 缓冲液中, 然后, 剧烈搅拌下, 在溶解的氟尿苷中加入伊立替康 HC1 三水合物, 如果需要可加热至 50°C 以溶解伊立替康 HC1 三水合物。在玻璃容器中, 在所需的浓度下, 将溶解于缓冲液中的药物加入到脂质体中。连续搅拌该系统, 50°C 下载药进行 1 小时。脂质体-药物混合物冷却至室温, 然后过滤。室温下, 使用切向流中空纤维柱, 用 10 体积
20 的蔗糖磷酸盐缓冲液过滤除去未包封的药物。

用蔗糖磷酸盐缓冲液稀释载药脂质体, 至 5 mg/mL 伊立替康 HC1 三水合物与氟尿苷的摩尔比为 1:1。然后, 稀释液无菌过滤通过 0.2 μ m 的膜。

实施例 2

25 使用不同组成的脂质体内相溶液制备双载药脂质体

为了检测脂质体内相溶液对双载药的影响, 制备了含有各种铜溶液的 DSPC/DSPG/Chol (70:20:10 摩尔比)脂质体。测定 FUDR 被动包载和 CPT-11 的载药程度。

如上所述制备脂质膜, 除了脂质膜的水化是用 1mL 的 100 mM 葡糖酸

铜,220 mM TEA, pH 7.4; 100 mM CuSO₄, 265 mM TEA, pH 7.4; 或含有大约 25 mg/ml FUDR (含痕量 ³H-FUDR)的 150 mM 酒石酸铜, 20 mM Hepes, pH 7.4。70°C 挤压得到的 MLVs。通过 QELS (准弹性光散射)分析测定每个样品的平均粒径约为 100 nm +/-20 nm。使用手提式切向流柱将脂质体缓冲交换 5 进入 SHE, pH 7.4, 然后交换入 HBS, pH 7.4。

如上所述进行 CPT-11 的摄取实验。以起始 CPT-11 与脂质摩尔比为 0.1:1, 加入 CPT-11。50°C 下预热样品 1 分钟促进载药。使用液相闪烁计数器测定脂质浓度(¹⁴C-CHE)和 FUDR 浓度(³H-FUDR), 产生各个时间点的药脂比。370nm 处测定吸光度, 由标准曲线以得到 CPT-11 的浓度。

10 图 2A 表明, 含有被动包载 FUDR 的 DSPC/DSPG/Chol (70:20:10 摩尔比)脂质体, 使用葡糖酸铜或硫酸铜作为脂质体内相溶液, 显示足够的 CPT-11 载药。然而, 葡糖酸铜似乎是主动包载 CPT-11 入这种脂质体的稍稍更有效的溶液。相似地, 从双载药脂质体中 FUDR 随时间的释放与用葡糖酸铜或硫酸铜制备的脂质体类似(图 2B), 两者都显示药物的梯度释放。

15 如图 3 所示, 仅有酒石酸铜不适合作为双包载 CPT-11 进入含 FUDR 的脂质体的脂质体内相溶液。由图 3 明显可见, CPT-11 不能包载入含有被动包封 FUDR 和 150mM 酒石酸铜的 DSPC/DSPG/Chol 脂质体。

实施例 3

20 胆固醇的存在对 CPT-11 和 FUDR 的血浆浓度的影响

本领域已知胆固醇和其它固醇常规用于传递载体的制剂, 如脂质体, 以扩大相转变温度的范围, 降低脂质聚集, 可能改变传递载体的循环时间。通常认为, 在脂质体制剂中, 需要大于 30 mol %的胆固醇以达到此固醇的益处。为了研究胆固醇含量对双载药脂质体的药物保留和药物动力学的影响, 使用各种胆固醇量制备了 DSPC/DSPG/Chol 脂质体。首先, 被动包载 25 氟嘧啶进入各个脂质体, 然后, 主动包载水溶性喜树碱。确定 Balb/c 小鼠血浆中每种药物的药脂比, 以测定体内每种制剂脂质体药物保留一定时间的程度。

DSPC 和胆固醇溶解于氯仿, DSPG 溶解于氯仿/甲醇/水(16/8/1), 制备

脂质膜。加入痕量 ^{14}C -CHE 作为脂质体脂质标记，以摩尔比 DSPC/Chol/DSPG (75:5:20), DSPC/Chol/DSPG (70:10:20), DSPC/Chol/DSPG (65:15:20)和 DSPC/Chol/DSPG (60:20:20), 混合脂质。除去溶剂后，在含有 25 mg/ml FUDR (含痕量 ^3H -FUDR)的 250 mM CuSO_4 中水化脂质膜。70℃下 5 挤压所得 MLVs。用 QELS (准弹性光散射) 分析测定每个样品的平均粒径约为 100 nm +/-20 nm。然后，使用手提式切向流柱使脂质体缓冲交换进入 SHE, pH 7.4。

类似于上述方法，50℃下，脂质体包载 CPT-11 5 分钟。如实施例 1 所示，测定 CPT-11、FUDR 和脂质水平。包载 CPT-11 后，冷却至室温，雌性 Balb/c 小鼠尾静脉注射 340 μmol 脂质/kg、34 μmol FUDR/kg 和 34 μmol CPT-11/kg 的等分样品。静脉内给药后 1、4 和 24 小时，心脏穿刺收集血液并置于涂有 EDTA 的微容器中。各个时间点用 3 只小鼠。样品离心分离血浆并小心将血浆转移至另一个试管中。由液相闪烁计数器测定血浆脂质和 FUDR 浓度，由高效液相色谱法(HPLC)测定血浆 CPT-11 的浓度。

15 图 4A 说明静脉内给予 Balb/c 小鼠以包封 CPT-11 和 FUDR 的脂质体后，CPT-11 与脂质的比例(+/-标准差)作为时间的函数。该图表明，随着脂质体胆固醇浓度的增加，体内 CPT-11 的脂质体保留相应增加，除了 20 摩尔%胆固醇例外，与 15 摩尔%相比，CPT-11 水平降低，释放较快。图 4B 结果显示在特定时间，相应的 FUDR 与脂质的比例(+/-标准差)作图，表明随着 20 胆固醇含量从 5 增加到 20 摩尔%，10 摩尔%胆固醇比 5 摩尔%保留更佳，体内 FUDR 保留显著降低。这些结果还表明，使用约 15 摩尔%胆固醇时，含有 FUDR 和 CPT-11 的 DSPC/DSPG/Chol 脂质体显示最佳的 CPT-11 血浆水平，使用约 15 摩尔%胆固醇时，FUDR 血浆浓度最佳。因此，为了共配制 DSPC/DSPG 脂质体以促进高浓度的 FUDR 和 CPT-11 传递至肿瘤部位，25 似乎需要约 10-15 摩尔%胆固醇以维持 FUDR 和 CPT-11 合适的药物保留和持久的药物释放。

实施例 4

显示非拮抗和拮抗效应的 CPT-11 和 FUDR 的组合

两种或多种药物的许多组合具有显示协同作用的能力。相似地，相同两种或多种药物的组合可显示累加或拮抗的相互作用，视所用的药物的浓度而定。为了确定产生协同作用的水溶性喜树碱与氟嘧啶的比例，体内试验了 FUDR 和 CPT-11 各种组合的细胞毒效应。更具体地说，在宽的药物浓度范围内，鉴定了显示协同作用的组合。

在 HT-29 人结肠直肠腺癌细胞、H460 人大细胞癌细胞和 HCT-116 人结肠直肠癌细胞中，以 10:1、5:1、1:1、1:5 和 1:10 摩尔比，用 FUDR/CPT-11 进行累加、协同和拮抗效应的测定。使用标准基于四氮唑盐的比色 MTT 存活率试验(Mosmann 等, *J. Immunol Methods* (1983) 65 (1-2):55-63)测定受损细胞的读数。简单地说，活细胞还原四氮唑盐，3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基-2H 四唑溴盐(MTT)形成蓝色甲臆，甲臆可用分光光度法读数。细胞，如本文所用 HT-29 细胞系，在 25 cm² 培养瓶中生长和传代(代数<20)，重悬于新鲜细胞培养基中，以 1000 细胞/孔，100 μ L/孔浓度加到 96-孔培养板中。37°C, 5% CO₂ 下培养细胞 24 小时。用已知技术匀浆组织，从患者肿瘤或活细胞检查也可制备所述单细胞悬液。第二天，在 12 孔细胞培养板中准备连续的药物稀释液。用新鲜细胞培养液稀释前准备的各种溶液。使用拉丁方设计或"棋盘"稀释方法，在双药物组合的特定固定比例下，将药物施加到每个药物(20 μ L)的合适或特定的孔中。总的孔体积用新鲜培养液加到 200 μ L。药物接触为 72 小时。

接触药物后，以 50 μ L/孔，每个孔中加入 MTT 试剂(1mg/mL 于 RPMI 中)，培养 3-4 小时。然后，吸出每孔中的内容物，每孔中加入 150 μ L 二甲基亚砷(DMSO)以破裂细胞并溶解细胞内的甲臆沉淀。在板振荡器上振荡 96 孔板，在波长 570nm 处微型板分光光度仪上读数。记录光密度(OD)读数，所有含细胞的孔减去空白孔(只含有培养液)的 OD 值。接触药物后的细胞存活率基于对照孔(未接触药物的细胞)的百分率。所有孔为三复孔进行并计算平均值。

使用 Calcosyn 测定每个 FUDR/CPT-11 剂量的组合指数。Calcosyn 是基于 Chou 和 Talalay 的剂量-效应分析理论，其中，使用“半数效应方程”

计算许多本领域中广泛使用的生物化学方程。该方程的衍生产生高阶方程如用于计算组合指数(CI)的方程。如上所述, CI 可用于确定多于一种药物的组合以及每种组合的不同比例是否是拮抗的($CI > 1.1$), 累加的($0.9 \leq CI \leq 1.1$)或协同的($CI < 0.9$)。典型的 CI 图以 CI 为 y 轴, 以受损细胞的比例或受影响的分数(f_a)为 x 轴。图 5 中的数据, 以 CI 对受损的 HT-29 细胞的分数作图, 清楚地表明 FUDR 和 CPT-11 的特定组合是拮抗的, 而另一些是协同或累加的。当 FUDR:CPT-11 比为 5:1 或 1:1 时, 在受作用分数值(0.2-0.8)的整个范围内观察到协同作用。这表明 5:1 或 1:1 比例是协同的, 与所用每个药物的浓度无关。然而, 在 f_a 值低于 0.76 时 10:1 的比例是非拮抗的, f_a 值小于 0.62 时, 1:5 摩尔比的 FUDR/CPT-11 是非拮抗的, 因而表明观察到这些比例的协同作用依赖于所用药物的浓度。在相当大的 f_a 值范围内(大于 50%), FUDR:CPT-11 1:10 的比例是拮抗的。

用于确定最佳药物比例的进一步表示, 制得相对协同作用图, 图 5D。该分析方法用于从许多细胞类型确定一般协同的药物:药物比例。图 5D 由多种细胞类型以 1:5、1:1 和 1:10 摩尔比汇制的数据集构成。横坐标显示的相对协同作用值以得自 CalcuSyn 的 CI 值计算, 通过从原始 CI 值减去 1 归一化为 0, 即 CI 值为 0、1 和 2 分别等于相对协同作用值-1、0 和 1。这种数据形式更清楚地表明, 在一些细胞类型中, 在所评价的比例下, 观察到协同作用(向左侧延伸的柱条), 而另一些则是拮抗的(向右侧延伸的柱条)。此外, 该分析方法有利于确定在 1:1 比例下, 显示相似协同反应的肿瘤类型, 即用结肠直肠细胞系, 结肠-26, HCT-116, HT-29 和 LS180 观察到相似水平的相对协同作用。基于这些结果, 在以下实施例中选择 1:1 摩尔比的 FUDR:CPT-11 进行药物动力学和效果研究, 因为此比例显示不依赖于浓度的协同作用。这是重要的, 因为体内给药后药物的浓度可能变化。

25

实施例 5

维持体内药物比例

双载药脂质体中, 为了确定体内是否能够维持水溶性喜树碱和氟嘧啶的协同作用比例, 小鼠静脉内给予含包封的 FUDR 和 CPT-11 的

DSPC/DSPG/Chol 脂质体，监测一定时间内血浆药物/药物比。

如上所述，在实施例 4 中鉴定了在 1:1 摩尔比下是协同的，所以，将 FUDR 和 CPT-11 配制入 DSPC/DSPG/Chol (70:20:10 摩尔比)脂质体中。在由 100mM Cu(葡糖酸)₂, 220 mM TEA, pH 7.4 和 30 mg/mL FUDR (含痕量 ³H-FUDR)组成的溶液中水化脂质膜。70℃下挤压得到的 MLVs。接着，将脂质体缓冲交换入 SHE, pH 7.4, 通过切向流透析，除去任何未包封的 FUDR 和 Cu(葡糖酸)₂。

以起始 CPT-11 与脂质的比例为 0.12:1，将 CPT-11 加到脂质体中。50℃孵育样品 10 分钟，促进 CPT-11 包载入脂质体中。载药后，样品交换入盐水(0.9% 氯化钠注射液, USP; pH 5.5, Baxter), 通过切向流透析除去 EDTA 和未包封的药物。370nm 处测定吸光度，由标准曲线得到 CPT-11 的载药量。用液相闪烁仪测定 FUDR 和脂质的水平。

CD-1 或 SCID-Rag2M 小鼠尾静脉注射上述制剂。脂质体制剂的剂量为 8.38 mg/kg 的 FUDR 和 20 mg/kg 的 CPT-11。对于 CD-1 小鼠，在 FUDR 和 CPT-11 1:1 下，还进行了双载药脂质体与游离药物混合物的比较。给予小鼠前，用盐水稀释游离药物混合物。在静脉内给药后的指定时间点，心穿刺收集血样(每个时间点 3 个小鼠)并装入涂有 EDTA 的微型容器中。离心样品以分离血浆，血浆转移至另一个试管中。用液相闪烁计数器定量血浆中放射性标记的脂质和 FUDR。用 HPLC 定量 CPT-11 的血浆水平。

图 6A 显示，静脉内给予 CD-1 小鼠上述脂质体后，不同时间点 FUDR 的血浆水平约等于 CPT-11 的血浆水平，FUDR 和 CPT-11 的血浆水平能有效维持在 1:1 摩尔比。相反，FUDR/CPT-11 的游离药物混合物给药后，从起始 1:1 摩尔比快速变化。图 6B 相似地表明，给予 SCID-Rag2M 小鼠后，FUDR 和 CPT-11 的血浆水平一定时间内维持在 1:1 摩尔比。数据点代表在特定时间点测定的血浆中 CPT-11/FUDR 的摩尔比(+/-标准差)。这些结果清楚地表明，FUDR 和 CPT-11 包载入本发明脂质体中，使血浆中这些药物的协同作用比有效地维持一定时间，而游离药物混合物则导致从协同杀死癌细胞所需的最佳比例快速和无控制地改变药物/药物比例。因此，为了体内充分传递所需比例的 FUDR 和 CPT-11，最好将这些药物配制入基于脂质的

传递载体中。

实施例 6

同时包封 CPT-11 和 FUDR

5 开发了共包封 CPT-11 和 FUDR 的可选方法，用于同时包载两种药物。DSPC 和胆固醇各自以 50 mg/ml 溶解于氯仿中，DSPG 以 25 mg/ml 溶解于氯仿/甲醇/水(50/10/1)中，制备脂质膜。然后，脂质以合适的量结合在一起，产生 DSPC/DSPG/Chol (70:20:10 摩尔比)混合物，用 ^{14}C -CHE 标记。N₂ 气流下除去溶剂，直到很少的溶剂残留。然后，将脂质膜置于真空泵在真空

10 下过夜，除去任何残留溶剂。70°C 下，在 4 mL 100 mM Cu(葡糖酸)₂, 220 mM TEA, pH 7.4 中再水化脂质膜，得到的 MLVs70°C 下挤压通过两层 100 nm 滤膜共 8 次。挤压前取等分试样，测定脂质制剂的比活。QELS (准弹性光散射)分析测定每个样品的平均粒径为 100 nm +/-20 nm。然后，使用切向流柱，将脂质体缓冲交换入 150 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7.4 (HBS)。

15 以下进行了 CPT-11/FUDR 的摄取实验: 25 μmol 脂质, 3 μmol CPT-11 和 60 μmol FUDR (含痕量 ^3H -FUDR) 各自在 50°C 下孵育，然后，混合至总体积 500 μL 。在混合后的各时间点，移去等分部分并用 1 mL Sephadex G-50 柱将外相脂质体溶液交换为盐水。使用双标记液相闪烁计数器测定洗脱液的药脂比，以确定脂质和 FUDR 浓度。370nm 处测定吸收度，由标准曲线

20 定量 CPT-11。CPT-11 的 UV 测定条件如下：每个脂质体样品的 100 μL 等分试样溶解于 100 μL 10% Triton X-100 + 800 μL 50 mM 柠檬酸三钠/柠檬酸, 15 mM EDTA, pH 5.5, 然后，沸水加热至 100°C 直到混浊。样品冷却至室温后，读取吸光度。CPT-11 和 FUDR 的同时载药如图 7 所示。

25 实施例 7

包封药物的脂质体显示超过协同药物混合物的增强效果

今天，许多疗法，尤其是组合化疗，依赖于给予游离药物混合物。本发明研究者希望确定，与相同组合游离药物混合物相比，在包封药物的脂质体组合中是否能观察到效果增加。还比较了双载药脂质体的效果与每种

药物分别包载于如脂质体中的疗效。

如实施例 1 所述,以 1:1 的协同摩尔比,制备了共包封 FUDR 和 CPT-11 的 DSPC/DSPG/Chol (70:20:10 摩尔比)脂质体。如实施例 1 所述,除了分别使用前述包载方法,每个脂质体只包载一种药物,制备了含有 FUDR 或
5 CPT-11 的 DSPC/DSPG/Chol (70:20:10 摩尔比)脂质体。100 mM Cu(葡萄糖酸)₂, 220 mM TEA, pH 7.4 中水化脂质膜。水化后,脂质体外相缓冲液交换为 SHE, pH 7.4; CPT-11 载药后,外相缓冲液再次交换为 0.9%生理盐水。

简单地说,为了进行小鼠的肿瘤研究,用肿瘤细胞接种动物,肿瘤长到足够大小。用 28g 针,第 0 天小鼠皮下接种 50 μ L 1-2 $\times 10^6$ 肿瘤细胞(一
10 次接种/小鼠)。

当肿瘤达到所定义的大小约 100 mm³ 到 200 mm³ 时,处理前一天或处理当天,测量所有肿瘤。选择合适的肿瘤大小,排除太小或太大的肿瘤之后,随机分配肿瘤 (n=6)并测定组的平均肿瘤体积。将小鼠编入由对照和治疗组构成的合适的处理组中,例如,盐水对照,脂质体对照,阳性对照和
15 受试样品的各种稀释液。

小鼠静脉内注射所需体积的样品,在个体小鼠重量的基础上给予动物处方剂量(如建议 10 μ L/g)。

从处理日开始,用游标卡尺监测肿瘤生长大小。肿瘤长度大小(mm)由最长轴和垂直于该轴的宽度大小(mm)构成。由长度和宽度测量,根据方程
20 $L \times W^2/2$ 计算肿瘤体积(cm³)。在肿瘤测量时间点采集动物重量和生命观察数据。

在发病率和死亡率的预处理和处理期间,观察所有动物至少每天一次,如果需要则更多次。尤其是,不健康的体征基于体重减轻、胃口改变、表皮粗糙、理毛行为丧失、行为改变如步态改变、嗜睡和应激的明显表现。
25 看到严重的毒性或肿瘤相关疾病的症状时,处死该动物(CO₂ 窒息)并进行尸体解剖评价其它毒性症状。出于人道的考虑处死濒死的动物,处死的决定是研究主管/管理人和动物护理技术人员的慎重考虑结果。记录任何或所有这些结果作为原始数据,死亡的时间将记为第二天。

在本研究中,如上所述进行,在侧边皮下接种 2×10^6 人 HT-29 或

HCT116 结肠腺癌, 2×10^6 人 Capan-1 胰腺肿瘤细胞或 1×10^6 鼠结肠-26 腺癌的雌性 SCID-Rag2M 小鼠中进行效果试验。使异种移植的肿瘤生长直至约为 150 mg (150 mm^3) 大小, 鼠肿瘤生长至约为 100 mg (100 mm^3), 这时注射指定的制剂。直接用游标卡尺测量确定肿瘤生长。用多剂量方案的盐水、

5 1:1 摩尔比的游离药物混合物、独立的游离药物、CPT-11:FUDR 1:1、1:10 和 10:1 摩尔比的脂质体制剂和也个别地施用 FUDR 和 CPT-11 脂质体制剂处理小鼠(图 8A、8B 和 8C 中箭头代表处理的天数), 以比较单载药脂质体("FUDR 脂质体"和"CPT-11 脂质体")与双载药脂质体("CPT-11:FUDR 脂质体")的效果。计算百分肿瘤生长延迟和 \log 细胞杀死, 定量抗肿瘤活性。定

10 义百分肿瘤生长延迟是处理肿瘤达到特定评价大小所需的时间天数作为对照的百分比($T-C/C \times 100$), 其中, T 是处理肿瘤的天数, C 是对照肿瘤的天数。Log 细胞杀死是处理结束时估计 \log_{10} 单位的细胞杀死的数量, 定义为 $[T-C / (3.32) (T_d)]$, 其中, T-C 是处理引起的肿瘤达到特定评价大小的延迟, T_d 是肿瘤倍增时间的天数。log 细胞杀死为 0, 表明处理结束时细胞数量与

15 处理开始时的数量相同。log 细胞杀死为 +6, 表明细胞数量降低 99.9999%。

图 8A 的结果表明, 与游离药物混合物剂量为 25:9.25 mg/kg 和最大耐受剂量(MTD) 100:37 mg/kg 或盐水处理动物相比, 给予包封于 DSPC/DSPG/Chol (70:20:10) 脂质体、剂量 25:9.25 mg/kg (相当于脂质剂量 278 mg/kg) 下 1:1 摩尔比的 CPT-11:FUDR 脂质体可提供显著更佳的治疗活

20 性(降低人结肠直肠 HT-29 肿瘤大小)。图 8B 表明, 与最大耐受剂量(MTD) 100:37 mg/kg 下的游离药物混合物或盐水处理动物相比, 给予包封于 DSPC/DSPG/Chol (70:20:10) 脂质体、剂量 25:9.25 mg/kg (相当于脂质剂量 278 mg/kg) 下 1:1 摩尔比的 CPT-11:FUDR 脂质体可提供显著更佳的治疗活

25 性(降低人结肠直肠 HCT116 肿瘤大小)。类似于图 8A 的结果, 图 8C 表明, 给予包封于 DSPC/DSPG/Chol (70:20:10) 脂质体中, 1:1 摩尔比的 CPT-11:FUDR 脂质体降低来自人 Capan-1 胰腺肿瘤细胞的小鼠肿瘤的肿瘤大小, 降低的程度大于 CPT-11:FUDR 游离药物混合物或盐水。数据点代表平均肿瘤大小 \pm 平均值的标准误(SEM)。并且, 这些结果强烈表明, 需要包封氟嘧啶和水溶性喜树碱进入合理设计的传递载体中, 以达到最佳治疗活性。

下表 1A 表示给予 1:1 摩尔比和 10:1 摩尔比的 CPT-11:FUDR 脂质体、FUDR 脂质体、CPT-11 脂质体、1:1 摩尔比的游离药物混合物 CPT-11:FUDR 和游离药物 CPT-11 和游离 FUDR 后，在人 HT-29 结肠直肠异种移植模型中，列表定量抗肿瘤效果的数据。

5

表 1A

治疗组 HT-29 抗肿瘤活性的定量分析

(Q7D×3 治疗方案)

治疗组	剂量(mg/kg)	肿瘤生长延迟(天)	百分肿瘤生长延迟 [(T-C÷C)×100]	Log 细胞杀死*
游离 Flox	205	2	8%	0.09
游离 Irino	100	2	8%	0.09
混合物	100:37	5	19%	0.23
L-Flox	18.5	3	12%	0.14
L-Irino	50	33	127%	1.51
拮抗的	50:1.85	32	123%	1.48
CPX-1	50:18.5	37	142%	1.71

*Log 细胞杀死 = $[T-C / (3.32)(T_d)]$ ，其中，T-C 是处理引起的肿瘤到达 400mg 的延迟(天数)， T_d 是肿瘤倍增时间的天数。对照肿瘤到达 400mg 的天数 = 26 天。

表 1A 表示的结果阐明定量分析给定治疗组的 HT-29 抗肿瘤活性。给予 18.5 mg/kg 剂量的 FUDR (L-Flox) 脂质体，肿瘤生长延迟仅 12%，log 细胞杀死为 0.14。剂量 50 mg/kg 的 CPT-11 (L-Irino) 脂质体具有高度活性，肿瘤生长延迟为 127%，log 细胞杀死为 1.51。给予剂量为 50:18.5 mg/kg (相当于脂质剂量 556 mg/kg)、1:1 摩尔比的包封于 DSPC/DSPG/Chol (70:20:10) 脂质体中的 CPT-11:FUDR 脂质体(CPX-1)最有效，肿瘤生长延迟为 142%，log 细胞杀死为 1.71。剂量为 50:1.85 mg/kg (拮抗的)、拮抗的 10:1 摩尔比的包封于 DSPC/DSPG/Chol (70:20:10) 脂质体中，CPT-11:FUDR 脂质体不如 1:1 摩尔比的有效，肿瘤生长延迟为 123%，log 细胞杀死为 1.48。最大耐受

剂量(MTD) 100:37 mg/kg 的游离药物混合物显示, 19%肿瘤生长延迟, log 细胞杀死为 0.23。剂量分别为 100 和 250 mg/kg 的游离 CPT-11 和游离 FUDR 具有 8%的肿瘤生长延迟, log 细胞杀死为 0.09。

表 1B

5 治疗组 Capan-1 抗肿瘤活性的定量分析
(Q7D×3 治疗方案)

治疗组	剂量(mg/kg)	肿瘤生长延迟(天)	百分肿瘤生长延迟 [(T-C÷C)×100]	Log 细胞杀死*
游离 Irino	100	15	35%	0.65
游离 Flox	250	10	23%	0.43
L-Irino	25	34	79%	1.46
L-Flox	9.25	7	16%	0.30
L-Flox	18.5	10	23%	0.43
拮抗的	5:18.5	10	23%	0.43
CPX-1	25:9.25	42	98%	1.98**

*Log 细胞杀死= $[T-C / (3.32)(T_d)]$, 其中, T-C 是处理引起的肿瘤到达 500mg 的延迟(天数), T_d 是肿瘤倍增时间的天数。对照肿瘤到达 500mg 的天数= 43 天。

10 **用 Student-Newman-Keuls 分析来自所有其它组的统计学差异
($p < 0.05$)

类似于表 1A 的结果, 表 1B 列出的结果表明, 剂量为 25:9.25 mg/kg(相当于脂质剂量 278 mg/kg)的 CPT-11:FUDR 脂质体(CPX-1)在人 Capan-1 胰腺异种移植模型中, 显示优异的抗肿瘤活性, 肿瘤生长延迟为 98%, log 细胞杀死为 1.98, 与分别显示肿瘤生长延迟为 79%和 16%, log 细胞杀死为 1.46 和 0.30 的 CPT-11 脂质体(25 mg/kg) (L-Irino)和 FUDR 脂质体(9.25 mg/kg) (L-Flox)相比, 具有统计学显著性。

表 C1 表示给予 1:1 摩尔比的 CPT-11:FUDR 脂质体、FUDR 脂质体和

CPT-11 脂质体后，在鼠 Colon-26 模型中，列表定量抗肿瘤效果的数据。

表 1C
治疗组 Colon-26 抗肿瘤活性的定量分析
(Q7D×3 治疗方案)

治疗	剂量(mg/kg)	肿瘤生长延迟(天)	百分肿瘤生长延迟 [(T-C÷C)×100]	Log 细胞杀死*
L-Irino	7.4	2.90	14.8%	0.69
L-Flox	20	2.73	13.9%	0.65
CPX-1	20:7.4	10.40	53.06%	2.47**

- 5 *Log 细胞杀死 = $[T-C / (3.32)(T_d)]$ ，其中，T-C 是处理引起的肿瘤到达 500mg 的延迟(天数)， T_d 是肿瘤倍增时间的天数。对照肿瘤到达 500mg 的天数 = 19 天。

**用 Student-Newman-Keuls 分析来自所有其它组的统计学差异 (p<0.05)

- 10 表 1C 表明，剂量为 20:7.4 mg/kg (相当于脂质剂量 160 mg/kg) 的 CPT-11:FUDR 脂质体(CPX-1)在鼠 Colon-26 结肠直肠模型中显示优异的抗肿瘤活性，肿瘤生长延迟 53%，log 细胞杀死为 2.47。CPT-11 脂质体(20 mg/kg) (L-Irino)和 FUDR 脂质体 (7.4 mg/kg) (L-Flox)的肿瘤生长延迟分别为 13.9%和 14.8%，log 细胞杀死分别为 0:65 和 0.69。如预期的，两种单载
- 15 药脂质体都比盐水对照具有更强的活性，CPT-11:FUDR 脂质体最有效，与 CPT-11 和 FUDR 脂质体相比，降低肿瘤大小具有统计学显著性。

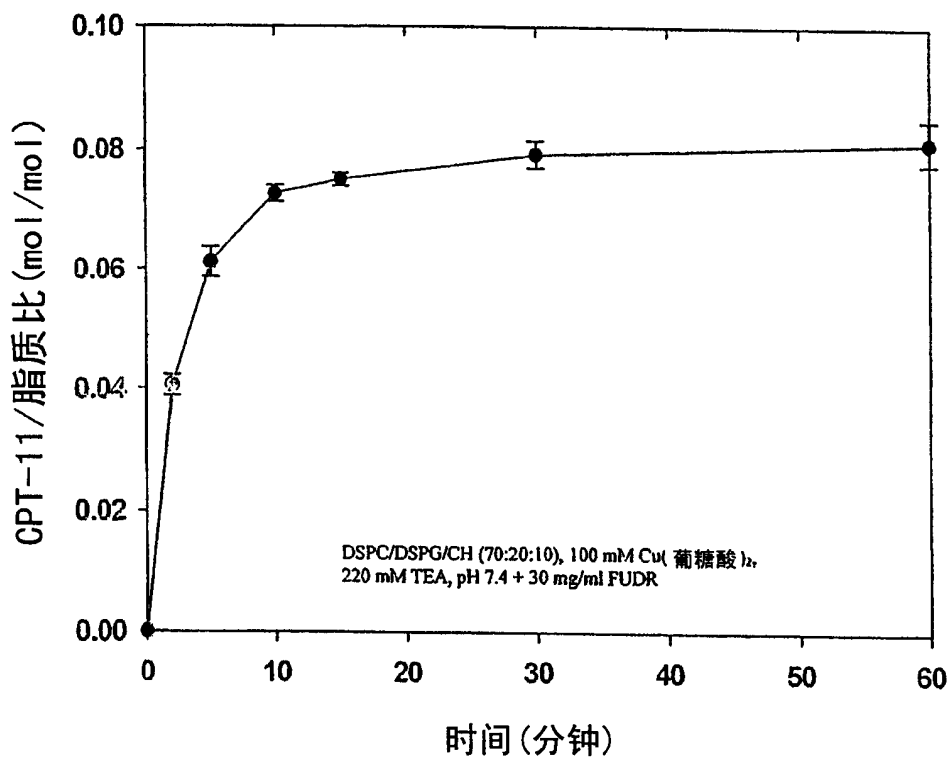


图 1

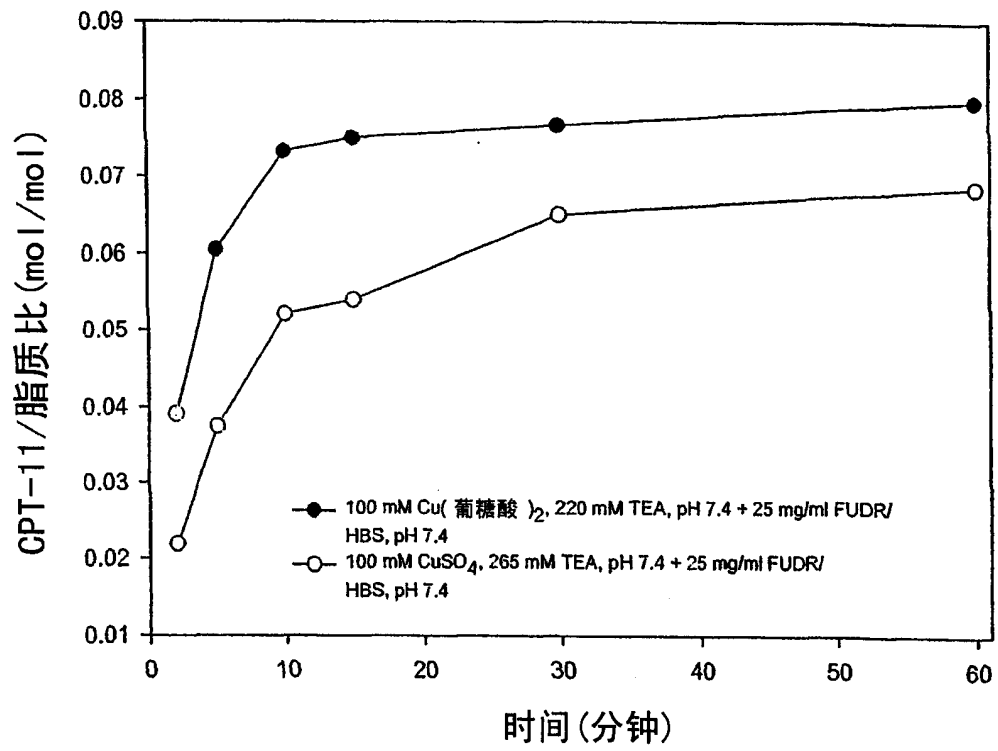


图 2A

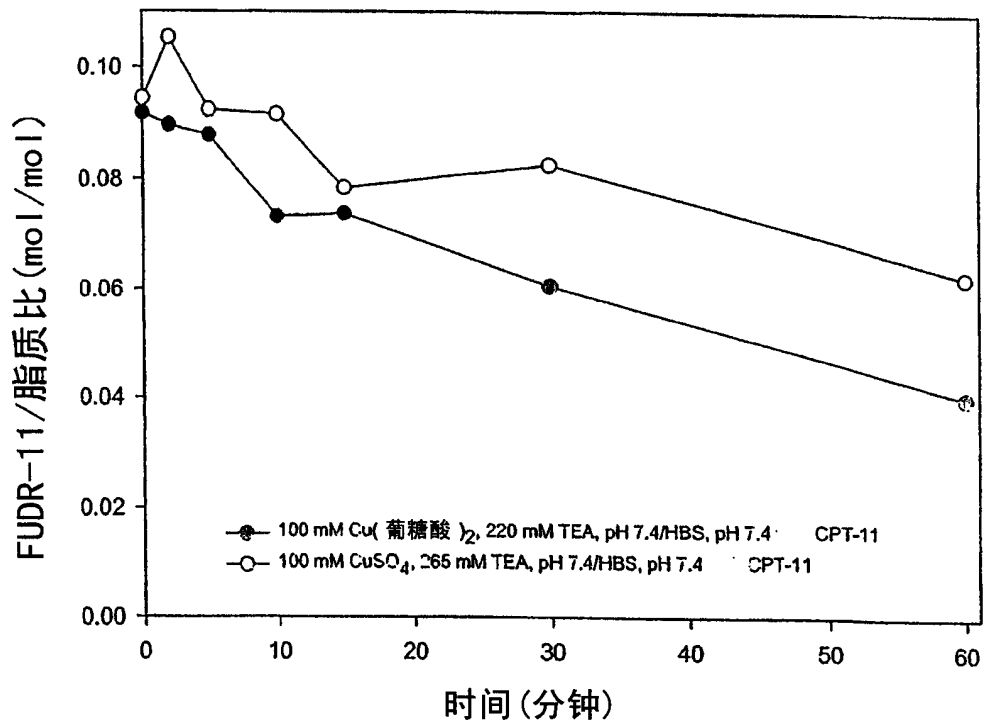


图 2B

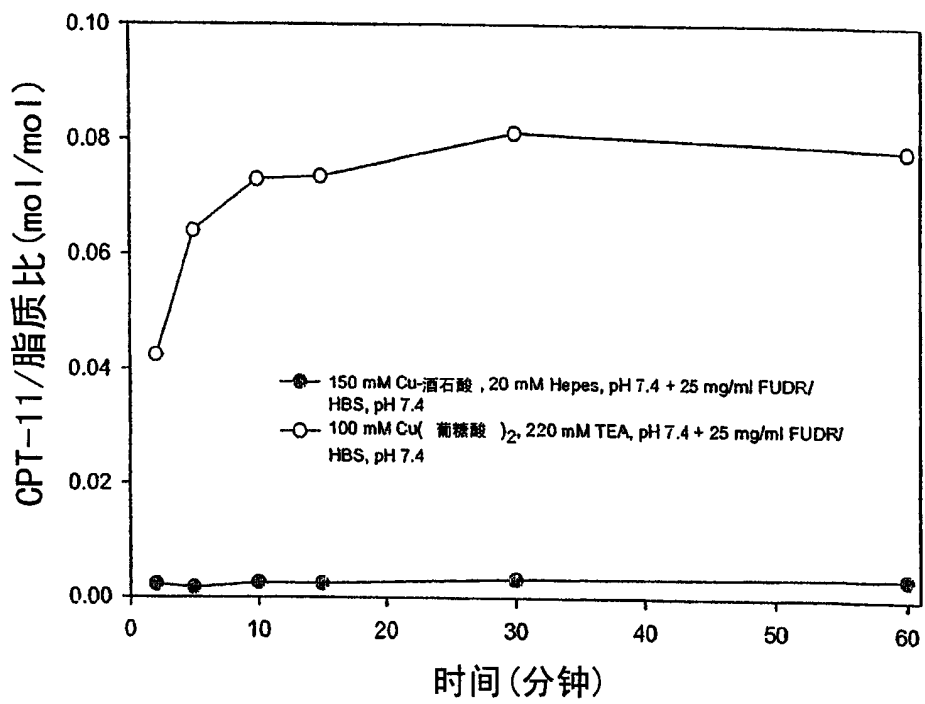


图 3

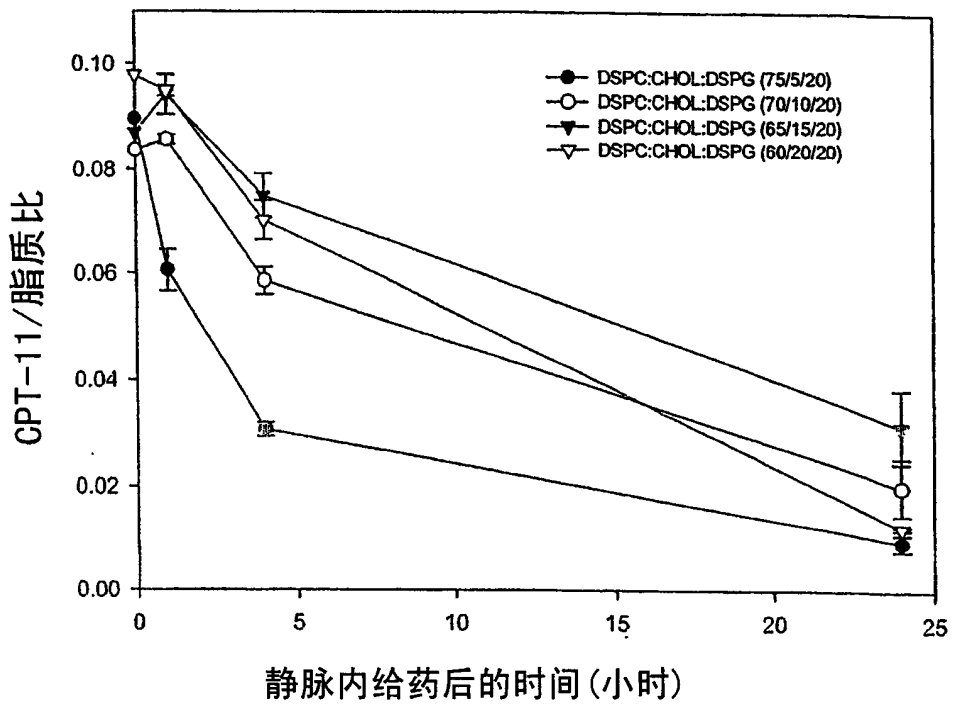


图 4A

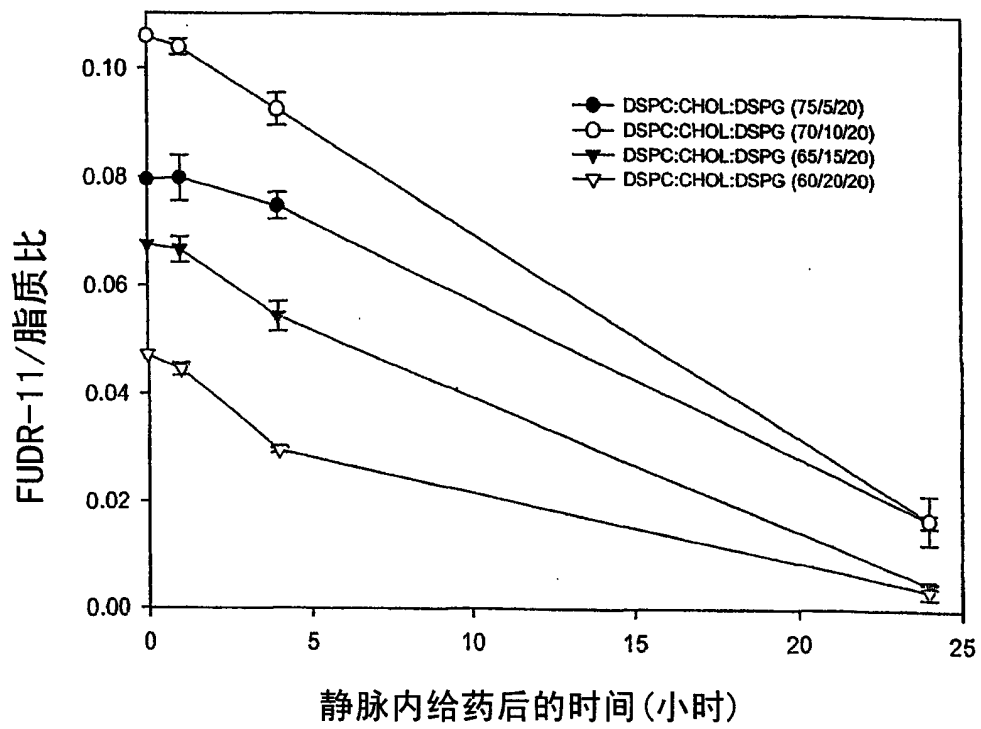


图 4B

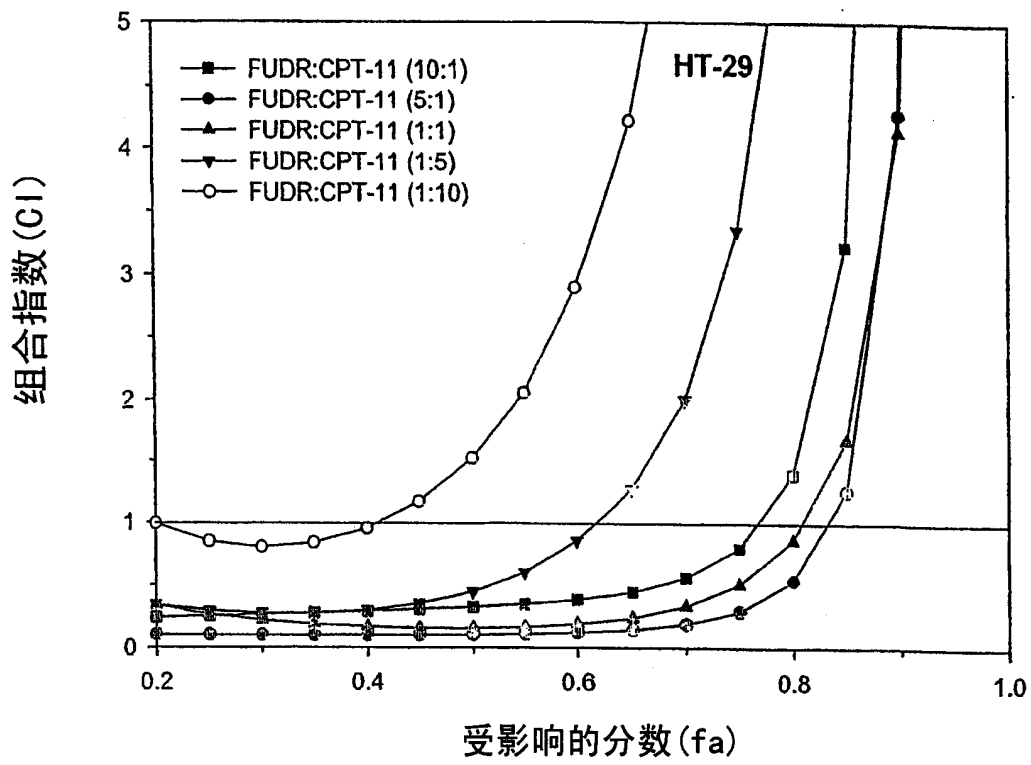


图 5A

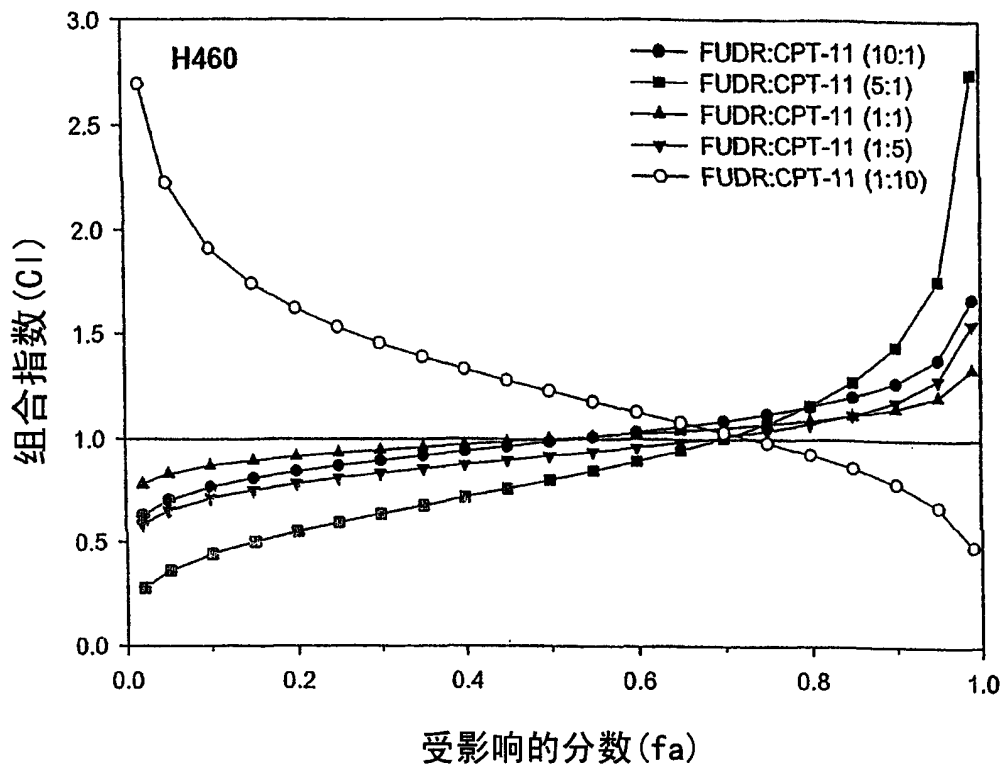


图 5B

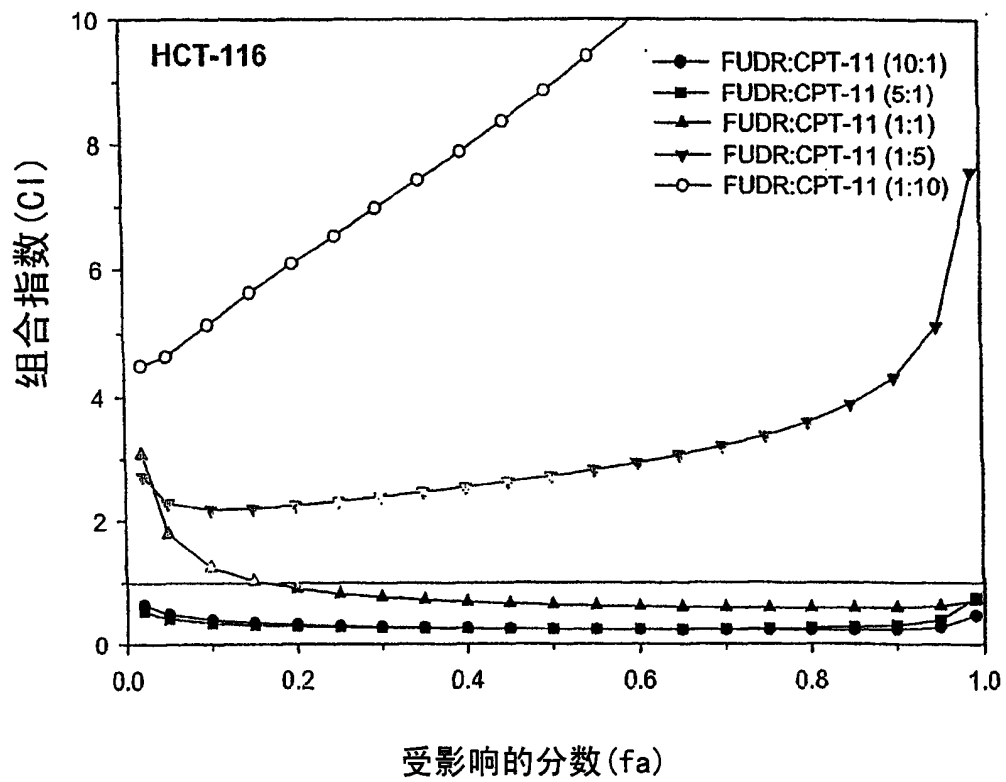


图 5C

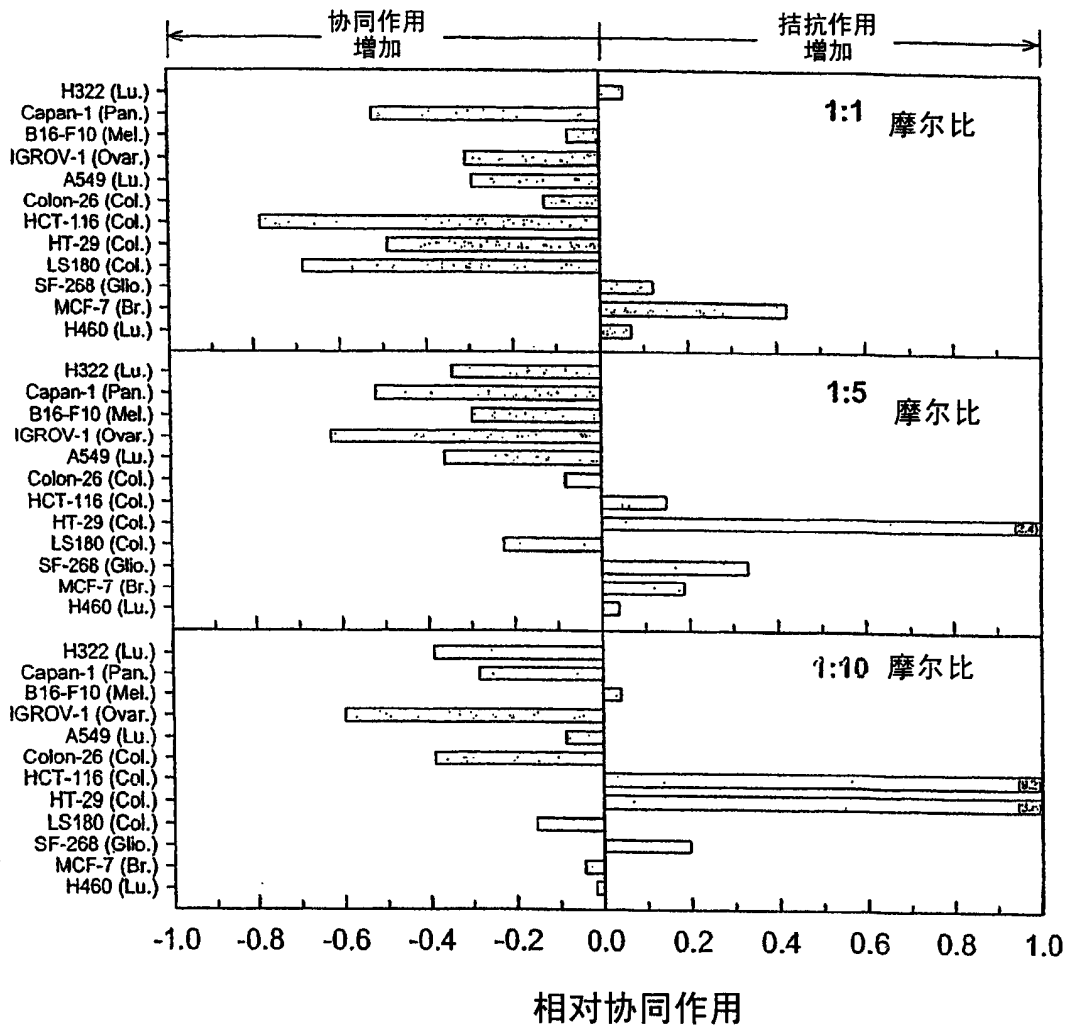


图 5D

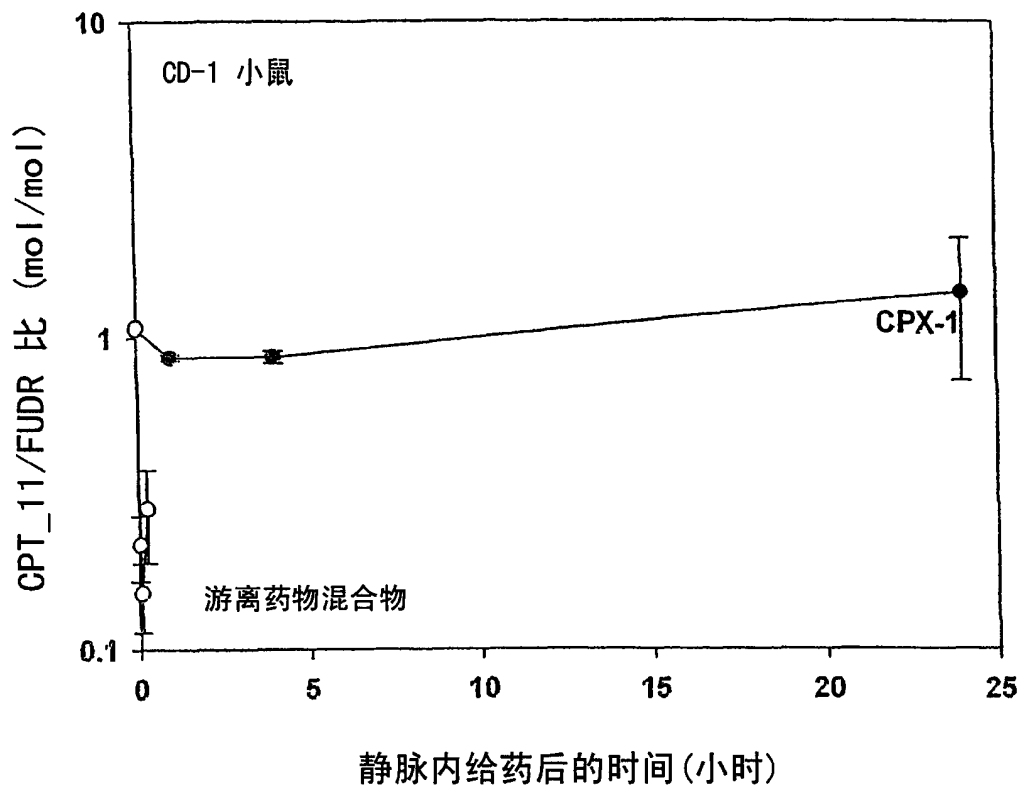


图 6A

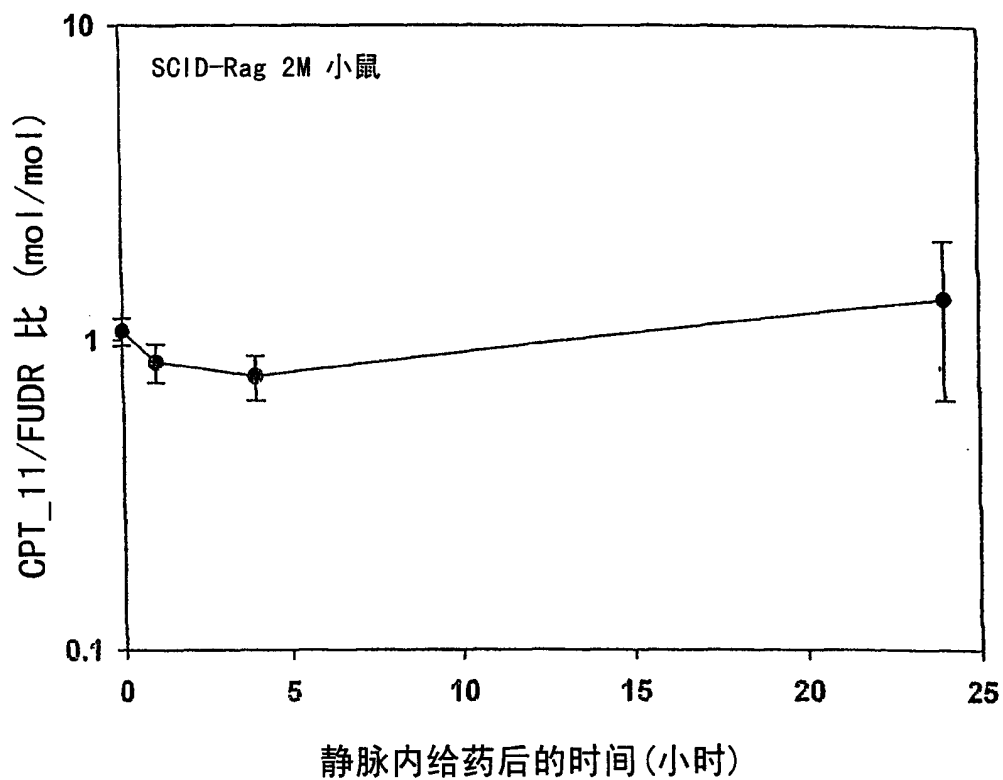


图 6B

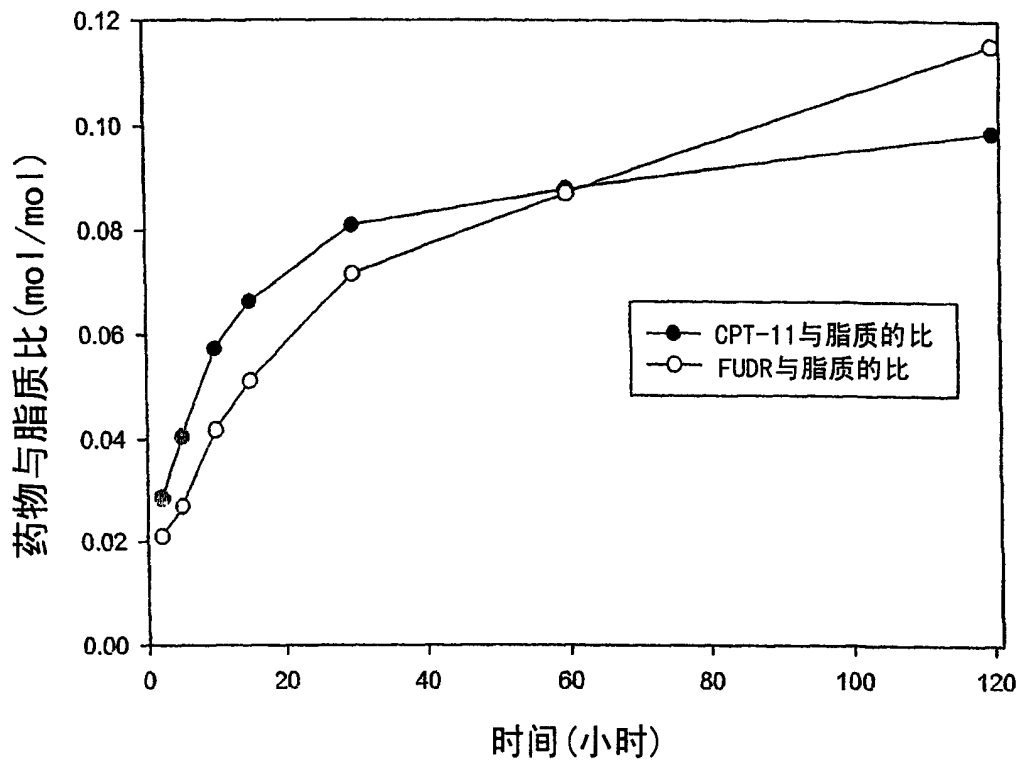


图 7

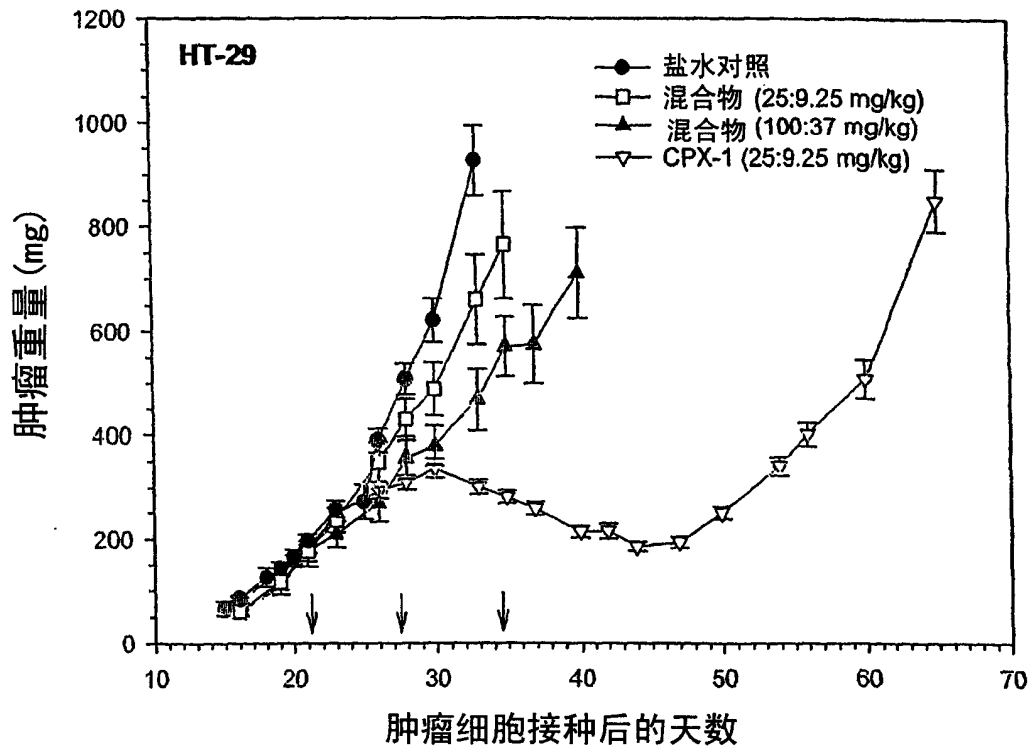


图 8A

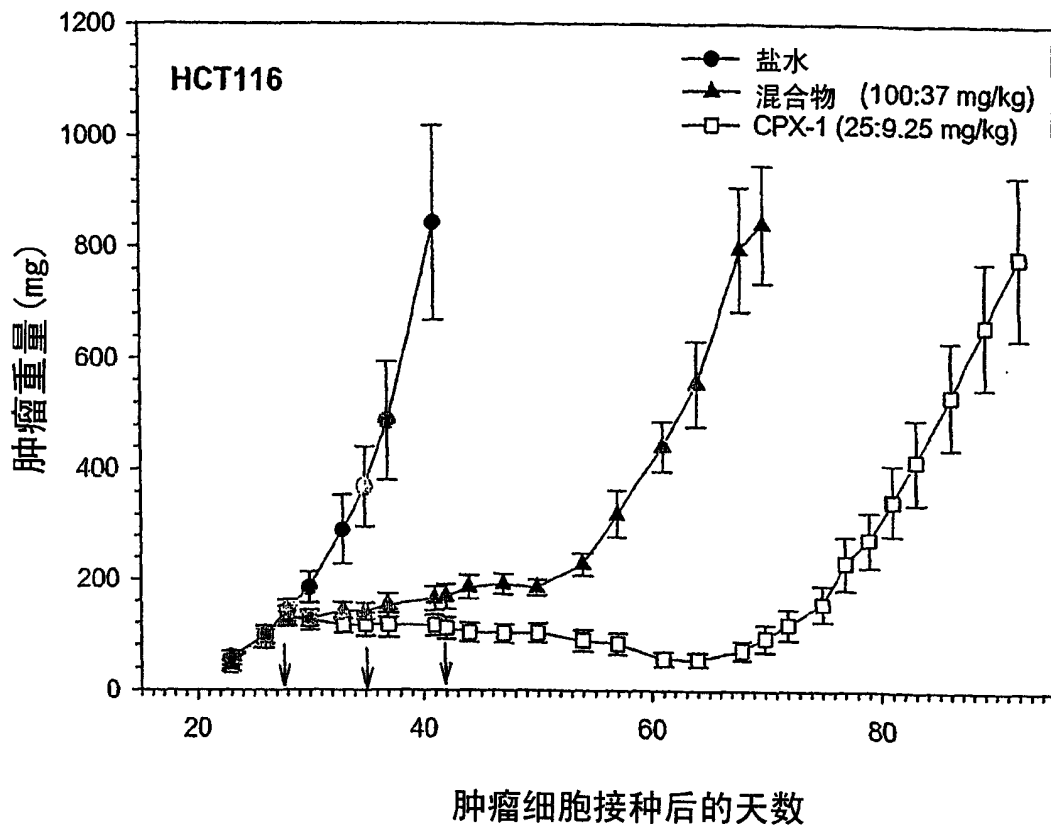


图 8B

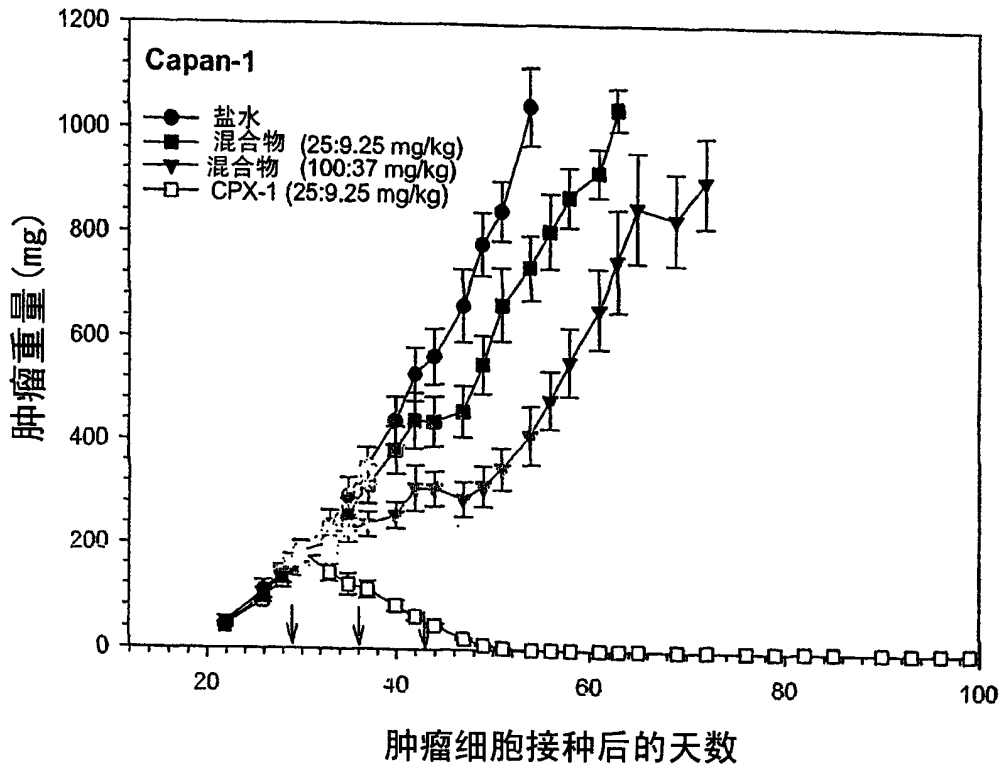


图 8C