

## LIPOSOMAL ANTINEOPLASTIC DRUGS AND USES THEREOF

### CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

[01] This application is related to U.S. Provisional Application No. 60/215,556, filed June 30, 2000, entitled "Liposomal Camptothecins and Uses Thereof," and U.S. Provisional Application No. 60/264,616, filed January 26, 2001, entitled "Liposomal Antineoplastic Drugs and Uses Thereof," both of which are incorporated herein by reference in their entireties for all purposes. U.S. Patent Application No. \_\_\_, bearing Attorney Document No. 016303-008020, filed June 29, 2001, entitled "Liposomal Camptothecins and Uses Thereof," is hereby incorporated by reference for all purposes.

### BACKGROUND OF THE INVENTION

[02] This invention relates to liposomal compositions and methods of using such compositions for treating neoplasia and for inhibiting angiogenesis.

[03] Many anticancer or antineoplastic drugs have been encapsulated in liposomes. These include alkylating agents, nitrosoureas, cisplatin, antimetabolites, and anthracyclines. Studies with liposomes containing anthracycline antibiotics have clearly shown reduction of cardiotoxicity and dermal toxicity and prolonged survival of tumor bearing animals compared to controls receiving free drug.

[04] Liposomal anticancer drugs modify drug pharmacokinetics as compared to their free drug counterpart. For a liposomal drug formulation, drug pharmacokinetics will be largely determined by the rate at which the carrier is cleared from the blood and the rate at which the drug is released from the carrier. Considerable efforts have been made to identify liposomal carrier compositions that show slow clearance from the blood and long-circulating carriers have been described in numerous scientific publications and patents. Efforts have also been made to control drug leakage rates from liposomal carriers, using for example, transmembrane potential to control release.

[05] Therapeutic camptothecins, such as Topotecan (9--dimethylaminomethyl--10--hydroxy--camptothecin; Hycamtin<sup>TM</sup>), and Irinotecan, are a semi-synthetic, water soluble derivative of camptothecin, an alkaloid extracted from the stem wood of the Chinese tree *Camptotheca acuminata* (Wall, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 88:3888-3890

(1966)). Camptothecins belong to the topoisomerase inhibitor class of antineoplastic agents, specifically inhibiting the action of the nuclear enzyme topoisomerase I which is involved in DNA replication (Hsiang, *et al.*, *Cancer Res.* **48**:1722-1726 (1988)). As such, topotecan exhibits a cell cycle-specific mechanism of action, acting during S-phase (DNA replication) to cause irreversible double strand breaks in DNA that ultimately lead to G2 cell cycle arrest and apoptosis. In the free form, the drug has a broad spectrum of activity against a range of tumor cell lines and murine allograft and human xenograft tumor models (McCabe, F. L. *et al.*, *Cancer Invest* **12**:308-313 (1994); Emerson, *et al.*, *Cancer Res.* **55**:603-609 (1995); Thompson, *Biochim. Biophys. Acta* **1400**:301-319 (1998); Ormrod, *et al.*, *Drugs* **58**:533-551 (1999); Hardman, *et al.*, *Anticancer Res.* **19**:2269-2274 (1999)). More recently, evidence has emerged that topotecan has strong anti-angiogenic properties that may contribute to its anti-tumor mechanism of action (O'Leary, *et al.*, *Clin. Cancer Res.* **5**:181-187 (1999); Clements, *et al.*, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **44**:411-416 (1999)). All these treatments are associated with dose-limiting toxicity such as non-cumulative myelosuppression leading to anaemia, neutropenia and thrombocytopenia, and gastrointestinal-related toxicity, including mucositis and diarrhea. Clinically, topotecan has been approved for second-line therapy in ovarian and small cell lung cancer (SCLC) and is currently the focus of extensive clinical evaluation.

[06] Lipid formulations of camptothecins have been proposed as therapeutic agents (*see*, U.S. Patent No. 5,552,156 and PCT Publication No. WO 95/08986. However, not all lipid formulations are equal for drug delivery purposes and extensive research continues into formulations which demonstrate preferred characteristics for drug loading and storage, drug administration, pharmacokinetics, biodistribution, leakage rates, tumor accumulation, toxicity profile, and the like. With camptothecins, the field is further complicated because dose limiting toxicities in humans may be 10-fold lower than in mice (Erickson-Miller, *et al.*, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **39**:467-472 (1997)).

[07] Improved liposomal formulations of antineoplastic agents could prove very useful. It is an object of the instant invention to provide lipid formulated antineoplastic agents having novel clinical utility.

30

### SUMMARY OF THE INVENTION

[08] The present invention provides compositions and methods useful for modulating the plasma circulation half-life of an active agent (*e.g.*, topotecan). The

liposomal formulations have increased clinical efficacy and decreased collateral toxicity. In addition, the present invention provides methods and liposomal compositions for treating neoplasia and inhibiting angiogenesis.

[09] As such, in one embodiment, the present invention provides a method  
5 for modulating the plasma circulation half-life of an active agent, comprising: (a) providing a liposome having free active agent and precipitated active agent encapsulated therein; and (b) varying the amount of the active agent that is precipitated in the liposome. Surprisingly, by varying the amount of active agent that is precipitated in the liposome, it is possible to modulate the release kinetics of the active agent into the plasma. Preferred active agents are  
10 antineoplastic drugs, such as a camptothecin (*e.g.*, topotecan).

[10] In another embodiment, the present invention provides a liposomal formulation, comprising: a) an antineoplastic drug; and b) a liposome having free antineoplastic drug and precipitated antineoplastic drug, wherein the precipitated antineoplastic drug in the liposome is at least 50% of the total antineoplastic drug. By  
15 tailoring the amount of precipitated antineoplastic drug in the liposome, it is possible to control the release of the drug, both *in vitro* and *in vivo*. In certain preferred embodiments, high intraliposomal concentrations of the active agent (*e.g.*, topotecan) results in a high amount of precipitated form. In this aspect, subsequent release rates of the drug *in vivo* are slow. In certain aspects, a slow release rate is preferable and more efficacious compared to a  
20 fast release rate.

[11] In yet another embodiment, the present invention provides a liposomal formulation, comprising: a) an active agent; b) a liposome having free active agent and precipitated active agent encapsulated therein; and c) an empty liposome.

[12] In this aspect, the serum half-life of the liposome is prolonged by  
25 including empty liposomes in the formulation. It will be readily apparent to those of skill in the art that any of a variety of lipids can be used to form the liposomal compositions of the present invention. In a presently preferred embodiment, the lipid comprises a mixture of sphingomyelin and cholesterol, preferably at a sphingomyelin:cholesterol ratio (molar ratio) of about 30:70 to about 60:40. In one preferred embodiment, the liposome comprises  
30 sphingomyelin and cholesterol in a 55:45 ratio.

[13] In still another aspect, the present invention provides a method of treating a solid tumor in a human afflicted therewith, the method comprising administering to the human an effective amount of a liposomal formulation of the present invention in a

pharmaceutically acceptable carrier. A variety of solid tumors can be treated using the compositions of the present invention. In a preferred embodiment, the solid tumor to be treated is selected from the group consisting of solid tumors of the lung, mammary, colon and prostate. In another preferred embodiment, the method further comprises co-administration  
5 of a treatment or active agent suitable for treating neutropenia or platelet deficiency.

[14] In a preferred embodiment, a liposomal topotecan is used to treat the solid tumors. In addition, it will be readily apparent to those of skill in the art that any of a variety of lipids can be used to form the liposomal compositions of the present invention.

[15] Other features, objects and advantages of the invention and its  
10 preferred embodiments will become apparent from the detailed description which follows.

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[16] Figure 1 A-C shows the pharmacokinetic behavior of a liposomal formulation of vinorelbine. Panel A shows the rates of drug leakage from circulating carriers for three formulations of differing drug:lipid ratio (0.1:1, 0.2:1, 0.3:1). Drug release is  
15 dependent upon drug:lipid ratio with the slowest rate of release seen for the highest ratio (0.3:1). Panel B shows lipid recovery in the blood. Panel C shows that modulation in drug release rates from the carrier results in changes to the blood clearance half-life for vinorelbine.

[17] Figure 2 A-C shows a corresponding behavior when plasma drug  
20 levels are used to follow pharmacokinetics. Panel A shows drug retention versus time. Panel B shows lipid recovery versus time. Panel C shows drug recovery versus time.

[18] Figure 3 A-C shows the pharmacokinetic behavior of formulations of liposomal vinblastine as a function of drug:lipid ratio (blood PK). Drug leakage from the liposomal carrier is determined by the initial drug:lipid ratio with slower release for  
25 formulations of higher drug ratio. Panel A shows drug retention versus time. Panel B shows lipid recovery versus time. Panel C shows drug release rates correlate with changes to drug clearance half-life from the blood.

[19] Figure 4 A-C shows the pharmacokinetic behavior of formulations of liposomal vinblastine as a function of drug:lipid ratio (plasma PK). Panel A shows drug  
30 retention versus time. Panel B shows lipid recovery versus time. Panel C shows drug release rates correlate with changes to drug clearance half-life from the plasma.

[20] Figure 5 A-C shows the influence of lipid dose on PK behavior (blood PK). As illustrated therein, similar rates of drug release (A), lipid clearance (B) and drug clearance (C) are seen for a liposomal vinblastine formulation of drug:lipid ratio 0.3:1 over a lipid dose range of 16.6 mg/kg to 50 mg/kg.

5 [21] Figure 6 A-C shows the influence of lipid dose on PK behavior (plasma PK). As illustrated therein, similar rates of drug release (A), lipid clearance (B) and drug clearance (C) are seen for a liposomal vinblastine formulation of drug:lipid ratio 0.3:1 over a lipid dose range of 16.6 mg/kg to 50 mg/kg.

[22] Figure 7 A-B shows the pharmacokinetic behavior of two  
10 formulations of liposomal topotecan of differing drug:lipid ratios. Panel A shows that when topotecan is loaded to a drug:lipid ratio of 0.11:1, a much slower drug release rate is seen resulting in a much longer plasma clearance rate compared to Panel B having a formulation of lower drug:lipid ratio of 0.02:1.

## DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION AND PREFERRED EMBODIMENTS

15 [23] The activity of many anticancer drugs is dependent on their pharmacokinetic behavior. This pharmacokinetic behavior defines the drug concentrations and period of time over which cancer cells are exposed to the drug. In the case of most anticancer drugs, longer exposure times are preferred as this results in increased killing of the  
20 cancer cells. In general, several parameters are used to describe drug pharmacokinetics. Plasma clearance half-time and area under the curve (AUC) are examples. The plasma clearance half-time is the time required for half of the administered drug to be removed from the plasma. The AUC is a measure of plasma drug levels over time and provides an indication of the total drug exposure. Generally, increased plasma clearance half-life and  
25 plasma AUC for an anticancer drug correlate with increased therapeutic efficacy.

### I. MODULATING ACTIVE AGENT RELEASE

[24] The present invention describes methods and formulations for modulating drug release from liposomes. In one embodiment, the present invention provides a method for modulating the plasma circulation half-life of an active agent, comprising: (a)  
30 providing a liposome having free active agent and precipitated active agent encapsulated therein; and (b) varying the amount of the active agent that is precipitated in the liposome.

Preferably, the "free active agent" and the "precipitate active agent" are the same active agent, however the present invention is not so limited. As used herein, the term "modulating" can mean either increasing or decreasing the release rate of the active agent from the liposomal carrier. For antineoplastic active agents, modulating is preferably decreasing or slowing the release rate of the active agent.

[25] In preferred aspects, the liposomes of the present invention contain both encapsulated free active agent and precipitated active agent. The amount of active agent that is precipitated within the liposome can be varied using a variety of mechanisms. For example, by varying the active agent to lipid ratio the amount of active agent that is precipitated can be increased or decreased. Drug loading at low drug:lipid ratios, results in low concentrations of active agent (*e.g.*, topotecan) in the liposome interior and hence most, if not all of the entire drug is in solution *i.e.*, not precipitated or free. Low precipitation amounts result in a fast release rate of the drug from the liposome. Conversely, a high drug:lipid ratio results in high intraliposomal concentrations and high precipitation amounts. When the drug is in a precipitated form, subsequent release rates *in vivo* or *in vitro* are slow. For antineoplastic drugs (*e.g.*, topotecan), slow release rates are preferable.

[26] Without being bound by any particular theory, it is believed that the liposomes of the present invention undergo a "precipitation-dissolution mechanism" (PDM), which dictates drug release. In the PDM mechanism of the present invention, the dissolution rate of precipitated active agent (*e.g.*, topotecan) within the liposome's interior into the internal solution of the liposome is slow, compared to the rate of release of active agent out of the liposome to the exterior and is thus rate determining. That is, the rate of dissolution of the precipitated drug to free drug in the liposome's interior determines how fast the drug will be released into the plasma.

[27] In certain embodiments, the active agent to lipid ratio can be varied by the addition of empty liposomes. In general, liposomes whether empty or those having active agents contained therein are cleared by cells of the reticuloendothelial system (RES). Typically, the RES will remove 80-95% of a dose of injected liposomes within one hour, effectively out-competing the selected target site for uptake of the liposomes. A variety of factors which influence the rate of RES uptake of liposomes have been reported including, liposome size, charge, degree of lipid saturation, and surface moieties. By including empty liposome vesicles, it is possible to shield the liposomes containing active agent from the RES. Thus, empty liposome vesicles actually extend the blood circulation lifetime of the liposomes

by acting as "decoys". An extended circulation time is often needed for liposomes to reach the target region, cell or site from the site of injection. The empty liposomal vesicles keep the RES busy and as a result, the serum half-life of the liposomes having active agent contained therein is increased.

5 [28] In certain other aspects, a component(s) is added to the liposome that will enhance the precipitation of the active agent. In this aspect, a variety of charged ions can be used to increase the amount of precipitated active agent in the vesicle's interior. In preferred aspects, divalent, trivalent or polyvalent anions are used. Suitable anions include, but are not limited to, carboxylate ( $-\text{CO}_2^-$ ), sulfonate ( $\text{SO}_3^-$ ), sulfate ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), hydroxide ( $-\text{OH}$ ),  
10 alkoxides, phosphate ( $-\text{PO}_4^{2-}$ ), and phosphonate ( $-\text{PO}_3^{2-}$ ). Those of skill in the art will know of other components, which will enhance the amount of precipitated active agent in the liposome's interior.

[29] Moreover, the drug:lipid ratios can be varied using the size of the liposome. The larger the liposome vesicle used, the smaller the drug:lipid ratio. In certain  
15 aspects, both the active agent to lipid ratio and the size of the liposome are varied to optimize the efficacy of the active agent.

[30] The amount of encapsulated active agent that is precipitated in vesicle will vary and is somewhat dependent on the active agent itself. In certain embodiments, the amount of precipitated active agent is at least about 25% to about 95% (such as about 25%,  
20 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% and 95%) of total active agent. For topotecan, the amount of the precipitated active agent encapsulated in the liposome is at least 50% of the total active agent.

[31] In preferred aspects, when the active agent is an antineoplastic drug, using higher drug:lipid ratios results in higher amounts of encapsulated precipitated drug. As  
25 a result, drug release from the liposomes *in vivo* is slower than for similar compositions prepared at lower drug:lipid ratio. These higher drug:lipid ratio liposomes exhibit extended plasma half-life and increased plasma AUC values. Advantageously, these formulations exhibit improved antitumor efficacy.

[32] In certain embodiments, the ratio of active agent: lipid is about 0.005-  
30 1:1 (w/w).

[33] Preferably, the ratio of active agent: lipid is about 0.05-0.9:1 (w/w) and more preferably, the ratio of active agent:lipid is about 0.1-0.5:1 (w/w). By modulating the

plasma circulation half-life of the active agent, it is thus possible to maximize or optimize efficacy of the active agent.

## II. COMPOSITIONS AND METHODS OF MAKING LIPOSOMAL FORMULATIONS

5 [34] Liposome, vesicle and liposome vesicle will be understood to indicate structures having lipid-containing membranes enclosing an aqueous interior. The structures can have one or more lipid membranes unless otherwise indicated, although generally the liposomes will have only one membrane. Such single-layered liposomes are referred to herein as "unilamellar." Multilayer liposomes are referred to herein as "multilamellar."

10 [35] The liposomes that are used in the present invention are preferably formed from lipids which when combined form relatively stable vesicles. An enormous variety of lipids are known in the art, which can be used to generate such liposomes. Preferred lipids include, but are not limited to, neutral and negatively charged phospholipids or sphingolipids and sterols, such as cholesterol. The selection of lipids is generally guided  
15 by consideration of, e.g., liposome size and stability of the liposomes in the bloodstream.

[36] Preferred liposome compositions for use in the present invention include those comprising sphingomyelin and cholesterol. The ratio of sphingomyelin to cholesterol in the liposome composition can vary, but generally is in the range of from about 75/25 mol %/mol % sphingomyelin/cholesterol to about 30/50 mol %/mol %  
20 sphingomyelin/cholesterol, more preferably about 70/30 mol %/mol % sphingomyelin/cholesterol to about 40/45 mol %/mol % sphingomyelin/cholesterol, and even more preferably about 55/45 mol %/mol % sphingomyelin/cholesterol. Other lipids can be included in the liposome compositions of the present invention as may be necessary, such as to prevent lipid oxidation or to attach ligands onto the liposome surface. Generally, if lipids  
25 are included, the other inclusion of such lipids will result in a decrease in the sphingomyelin/cholesterol ratio. Liposomes of this type are known as sphingosomes and are more fully described in U.S. Patent No. 5,814,335, the teachings of which are incorporated herein by reference.

[37] A variety of methods are available for preparing liposomes as  
30 described in, e.g., Szoka, *et al.*, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9:467 (1980); U.S. Patent Nos. 4,235,871; 4,501,728; 4,837,028, the text *Liposomes*, Marc J. Ostro, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1983, Chapter 1; and Hope, *et al.*, *Chem. Phys. Lip.* 40:89 (1986), all of



which are incorporated herein by reference. The protocol for generating liposomes generally includes: mixing of lipid components in an organic solvent; drying and reconstituting liposomes in aqueous solvent; and sizing of liposomes (such as by extrusion), all of which are well known in the art.

5                   [38]   Alternative methods of preparing liposomes are also available. For instance, a method involving detergent dialysis based self-assembly of lipid particles is disclosed and claimed in U.S. Patent No. 5,976,567 issued to Wheeler, *et al.*, which avoids the time-consuming and difficult to-scale drying and reconstitution steps. Further methods of preparing liposomes using continuous flow hydration are under development and can often  
10 provide the most effective large scale manufacturing process.

                  [39]   Preparation of liposomal formulations having active agents (*e.g.*, camptothecins) requires loading of the drug into the liposomes. Loading can be either passive or active. Passive loading generally requires addition of the drug to the buffer at the time of the reconstitution step. This allows the drug to be trapped within the liposome  
15 interior, where it will remain if it is not lipid soluble, and if the vesicle remains intact (such methods are employed, for example, in PCT Publication No. WO 95/08986, the teachings of which are incorporated herein by reference).

                  [40]   Active loading is in many ways preferable, and a wide variety of therapeutic agents can be loaded into liposomes with encapsulation efficiencies approaching  
20 100% by using a transmembrane pH or ion gradient (*see*, Mayer, *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **1025**:143-151 (1990) and Madden, *et al.*, *Chem. Phys. Lipids* **53**:37-46 (1990)). Numerous ways of active loading are known to those of skill in the art. All such methods involve the establishment of some form of gradient that draws lipophilic compounds into the interior of liposomes where they can reside for as long as the gradient is maintained. Very  
25 high quantities of the desired drug can be obtained in the interior, so much that the drug may precipitate out on the interior and generate a continuing uptake gradient.

                  [41]   Particularly preferred for use with the instant invention is ionophore-mediated loading as disclosed and claimed in U.S. Patent No. 5,837,282, the teachings of which are incorporated by reference herein. The ionophore-mediated loading is an  
30 electroneutral process and does not result in formation of a transmembrane potential. With hydrogen ion transport into the vesicle there is concomitant magnesium ion transport out of the vesicle in a 2:1 ratio (*i.e.* no net charge transfer). In the case of topotecan, it is thought that the agent crosses the membrane in a neutral state (no charge). Upon entry into the

vesicle, topotecan becomes positively charged. As ionophore-mediated loading is an electroneutral process, there is no transmembrane potential generated.

[42] An important characteristic of liposomal camptothecins for pharmaceutical purposes is the drug to lipid ratio of the final formulation. As discussed earlier, drug:lipid ratios can be established in two ways: 1) using homogenous liposomes each containing the same drug:lipid ratio; or 2) by mixing empty liposomes with liposomes having a high drug:lipid ratio to provide a suitable average drug:lipid ratio. For different applications, different drug:lipid ratios may be desired. Techniques for generating specific drug:lipid ratios are well known in the art. Drug:lipid ratios can be measured on a weight to weight basis, a mole to mole basis or any other designated basis. Preferred drug:lipid ratios range from about .005:1 drug:lipid (by weight) to about 0.2:1 drug:lipid (by weight) and, more preferably, from about 0.1:1 drug:lipid (by weight) to about 0.3:1 drug:lipid (by weight).

[43] A further important characteristic is the size of the liposome particles. For use in the present inventions, liposomes having a size of from about 0.05 microns to about 0.15 microns are preferred.

[44] The present invention also provides liposomal compositions (*e.g.*, camptothecin) in kit form. The kit can comprise a ready-made formulation, or a formulation, which requires mixing of the medicament before administration. The kit will typically comprise a container that is compartmentalized for holding the various elements of the kit. The kit will contain the liposomal compositions of the present invention or the components thereof, possibly in dehydrated form, with instructions for their rehydration and administration

[45] The liposome compositions prepared, for example, by the methods described herein can be administered either alone or in a mixture with a physiologically acceptable carrier (such as physiological saline or phosphate buffer) selected in accordance with the route of administration and standard pharmaceutical practice. Generally, normal saline will be employed as the pharmaceutically acceptable carrier. Other suitable carriers include, *e.g.*, water, buffered water, 0.4% saline, 0.3% glycine, and the like, including glycoproteins for enhanced stability, such as albumin, lipoprotein, globulin, *etc.* These compositions may be sterilized by conventional, well-known sterilization techniques. The resulting aqueous solutions may be packaged for use or filtered under aseptic conditions and lyophilized, the lyophilized preparation being combined with a sterile aqueous solution prior

to administration. The compositions may also contain pharmaceutically acceptable auxiliary substances as required to approximate physiological conditions, such as pH adjusting and buffering agents, tonicity adjusting agents and the like, for example, sodium acetate, sodium lactate, sodium chloride, potassium chloride, calcium chloride, *etc.* Additionally, the composition may include lipid-protective agents, which protect lipids against free-radical and lipid-peroxidative damages on storage. Lipophilic free-radical quenchers, such as  $\alpha$ -tocopherol and water-soluble iron-specific chelators, such as ferrioxamine, are suitable.

[46] A wide variety of active agents are suitable for the liposomal compositions and methods of the present invention. In a preferred aspect, the active agents are antineoplastic drugs. Currently, there are approximately twenty recognized classes of approved antineoplastic drugs. The classifications are generalizations based on either a common structure shared by particular drugs, or are based on a common mechanism of action by the drugs. A partial listing of some of the commonly known commercially approved (or in active development) antineoplastic agents by classification is as follows:

[47] Structure-Based Classes:

1. Fluoropyrimidines--5-FU, Fluorodeoxyuridine, Ptorafur, 5'-deoxyfluorouridine, UFT, S-1 Capecitabine;
2. Pyrimidine Nucleosides--Deoxycytidine, Cytosine Arabinoside, 5-Azacytosine, Gemcitabine, 5-Azacytosine-Arabinoside;
3. Purines--6-Mercaptopurine, Thioguanine, Azathioprine, Allopurinol, Cladribine, Fludarabine, Pentostatin, 2-Chloro Adenosine;
4. Platinum Analogues--Cisplatin, Carboplatin, Oxaliplatin, Tetraplatin, Platinum-DACH, Ormaplatin, CI-973, JM-216;
5. Anthracyclines/Anthracenediones--Doxorubicin, Daunorubicin, Epirubicin, Idarubicin, Mitoxantrone;
6. Epipodophyllotoxins--Etoposide, Teniposide;
7. Camptothecins--Irinotecan, Topotecan, 9-Amino Camptothecin, 10,11-Methylenedioxy Camptothecin, 9-Nitro Camptothecin, TAS 103, 7-(4-methyl-piperazino-methylene)-10, 11-ethylenedioxy-20(S)-camptothecin, 7-(2-N-isopropylamino)ethyl)-20(S)-camptothecin;
8. Hormones and Hormonal Analogues--Diethylstilbestrol, Tamoxifen, Toremefine, Tolmudex, Thymitaq, Flutamide, Bicalutamide, Finasteride, Estradiol,

Trioxifene, Droloxifene, Medroxyprogesterone Acetate, Megesterol Acetate, Aminoglutethimide, Testolactone and others;

9. Enzymes, Proteins and Antibodies--Asparaginase, Interleukins, Interferons, Leuprolide, Pegaspargase, and others;
- 5 10. Vinca Alkaloids--Vincristine, Vinblastine, Vinorelbine, Vindesine;
11. Taxanes--Paclitaxel, Docetaxel.
- [48] Mechanism-Based Classes:
1. Antihormonals--See classification for Hormones and Hormonal Analogues, Anastrozole;
- 10 2. Antifolates--Methotrexate, Aminopterin, Trimetrexate, Trimethoprim, Pyritrexim, Pyrimethamine, Edatrexate, MDAM;
3. Antimicrotubule Agents--Taxanes and Vinca Alkaloids;
4. Alkylating Agents (Classical and Non-Classical)--Nitrogen Mustards (Methlorethamine, Chlorambucil, Melphalan, Uracil Mustard), Oxazaphosphorines (Ifosfamide, Cyclophosphamide, Perfosfamide, Trophosphamide), Alkylsulfonates (Busulfan), Nitrosoureas (Carmustine, Lomustine, Streptozocin), Thiotepe, Dacarbazine and others;
- 15 5. Antimetabolites--Purines, pyrimidines and nucleosides, listed above;
6. Antibiotics--Anthracyclines/Anthracenediones, Bleomycin, Dactinomycin, Mitomycin, Plicamycin, Pentostatin, Streptozocin;
7. Topoisomerase Inhibitors--Camptothecins (Topo I), Etoposide, Irinotecan, m-AMSA, Ellipticines (Topo II);
8. Antivirals--AZT, Zalcitabine, Gemcitabine, Didanosine, and others;
9. Miscellaneous Cytotoxic Agents--Hydroxyurea, Mitotane, Fusion Toxins, PZA, Bryostatins, Retinoids, Butyric Acid and derivatives, Pentosan, Fumagillin, and others.
- 25

[49] The objective of all antineoplastic drugs is to eliminate (cure) or to retard the growth and spread (remission) of the cancer cells. The majority of the above listed antineoplastic agents pursue this objective by possessing primary cytotoxic activity, effecting a direct kill on the cancer cells. Other antineoplastic drugs stimulate the body's natural immunity to effect cancer cell kill. The literature is replete with discussions on the activity and mechanisms of all of the above drugs, and many others.

30

[50] Exemplary methods of making specific formulations of liposomal camptothecins and, in particular, liposomal topotecan are set out in the examples below.

### III. METHODS OF USING LIPOSOMAL CAMPTOTHECINS

[51] The liposomal compositions (*e.g.*, camptothecins) of the present invention are used, in the treatment of solid tumors in an animal, such as a human. The examples below set out key parameters of the drug:lipid ratios, dosages of active agent and lipid to be administered, and preferred dose scheduling to treat different tumor types.

[52] Preferably, the pharmaceutical compositions are administered parenterally, *i.e.*, intraarticularly, intravenously, intraperitoneally, subcutaneously or intramuscularly. More preferably, the pharmaceutical compositions are administered by intravenous drip or intraperitoneally by a bolus injection. The concentration of liposomes in the pharmaceutical formulations can vary widely, *i.e.*, from less than about 0.05%, usually at or at least about 2-5% to as much as 10 to 30% by weight and will be selected primarily by fluid volumes, viscosities, *etc.*, in accordance with the particular mode of administration selected. For example, the concentration can be increased to lower the fluid load associated with treatment. Alternatively, liposomes composed of irritating lipids can be diluted to low concentrations to lessen inflammation at the site of administration. The amount of liposomes administered will depend upon the particular camptothecin used, the disease state being treated and the judgement of the clinician, but will generally, in a human, be between about 0.01 and about 50 mg per kilogram of body weight, preferably between about 5 and about 40 mg/kg of body weight. Higher lipid doses are suitable for mice, for example, 50 – 120 mg/kg.

[53] Dosage for the active agent (*e.g.*, camptothecin) will depend on the administering physician's opinion based on age, weight, and condition of the patient, and the treatment schedule. A recommended dose for free topotecan in Small Cell Lung Cancer is 1.5 mg/M<sup>2</sup> per dose, every day for 5 days, repeated every three weeks. Because of the improvements in treatment now demonstrated in the examples, below, doses of active agent (*e.g.*, topotecan) in humans will be effective at ranges as low as from 0.015 mg/M<sup>2</sup>/dose and will still be tolerable at doses as high as 15 to 75 mg/M<sup>2</sup>/dose, depending on dose scheduling. Doses may be single doses or they may be administered repeatedly every 4h, 6h, or 12h or every 1d, 2d, 3d, 4d, 5d, 6d, 7d, 8d, 9d, 10d or combination thereof. Preferred scheduling may employ a cycle of treatment that is repeated every week, 2 weeks, three weeks, four weeks, five weeks or six weeks or combination thereof. In a presently preferred embodiment, treatment is given once a week, with the dose typically being less than 1.5 mg/M<sup>2</sup>.

[54] Particularly preferred topotecan dosages and scheduling are as follows:

Dosage (mg/M <sup>2</sup> /dose)	Period	Repeat Cycle every:
0.15	1dx5d	3 weeks
0.5	1d	1 week
1.5	1d	1 week
15	1d	3 weeks
50	1d	3 weeks

[55] The invention will be described in greater detail by way of specific examples. The following examples are offered for illustrative purposes, and are not intended to limit the invention in any manner. Those of skill in the art will readily recognize a variety of non-critical parameters, which can be changed or modified to yield essentially the same results.

#### IV. EXAMPLES

##### A. **Materials and Methods**

[56] 1. **Materials.** Topotecan (Hycantin™, SmithKline Beecham) was purchased from the pharmacy at the British Columbia Cancer Agency. Sphingomyelin (SM) was purchased from Avanti Polar Lipids. Sphingomyelin from Northern Lipids was used in an early study, but was less soluble in ethanol than the Avanti version. Cholesterol (CH) and the divalent cation ionophore A23187 were purchased from Sigma. [<sup>3</sup>H]-cholesterylhexadecylether (Dupont) was used as a lipid marker.

[57] 2. **Mice.** Female, ICR, BDF-1 or athymic *nu/nu* (6 - 8 weeks) were purchased from Harlan-Sprague Dawley (Indianapolis, IN). All animals were quarantined for one week prior to use. All studies were conducted in accordance with the guidelines established by the Canadian Council on Animal Care (CCAC) and the Institutional Animal Care and User Committee (IACUC).

[58] 3. **Formulation of topotecan by the Mg-A23187 method.** Topotecan was encapsulated in SM:CH (55:45, mol/mol) liposomes using the Mg-A23187 ionophore method according to U.S. Patent No. 5,837,282. The initial drug-to-lipid ratio was 0.10 (w/w) and drug loading was typically 95-100%. The external buffer consisted of 10 mM PBS, pH 7.5 and 300 mM sucrose. All formulations were analyzed with respect to particle size, drug loading efficiency, pH, and drug and lipid concentration.

[59] 4. **Drug preparation and dosing.** Each vial of topotecan (Hycamtin™) was hydrated in 1.0 ml of sterile water, giving a topotecan concentration of 4.0 mg/ml. Subsequent dilutions were made in 0.9% sterile saline to maintain the low pH required for the lactone species of the drug. Unused drug in the water stock solution (4.0 mg/ml) was stored at 4°C in the absence of light. Liposome encapsulated topotecan was diluted in 0.9% saline to the required concentration for administration. All drug administrations were at 10 ml/kg (200 µl/20 g mouse) via the lateral tail vein.

[60] 5. **Pharmacokinetic and in vivo leakage studies.** The pharmacokinetics and drug leakage of free and liposome encapsulated topotecan were evaluated in ICR mice over 24 h following i.v. administration via the lateral tail vein. Two different drug-to-lipid ratios, *i.e.*, 0.10 (w/w) and 0.02 (w/w), were used to examine the influence of drug-to-lipid ratio and lipid dose on drug leakage and PK behavior. Encapsulated topotecan was administered at 1 mg/kg (10 or 50 mg/kg lipid) and 5 mg/kg topotecan (50 mg/kg lipid). Correspondingly, the PK behavior of free topotecan was evaluated at 1 and 5 mg/kg. Total topotecan in blood was determined by a fluorescence assay preceded by precipitation of plasma proteins. Topotecan was quantified by spectrofluorimetry at an excitation (2.5 nm slit width) and emission wavelength (2.5 nm slit width) of 380 and 518 nm, respectively. Lipid levels in plasma were determined by liquid scintillation counting of the [<sup>3</sup>H]-CHE label.

[61] 6. **MTD studies.** MTD studies were performed in the host mouse strain corresponding to each tumor model. Single dose and multidose MTD were determined by monitoring weight loss over time. The MTD was defined as the dose that resulted in 20% weight loss.

[62] 7. **Myelosuppression and neutropenia studies.** Alteration in peripheral blood cell levels as a consequence of topotecan administration was assessed over 4-6 weeks in ICR mice. Blood was collected into EDTA microtainer tubes at Day 1, 3, 5, 7, 14, and 21 following i.v. administration of free or liposome encapsulated topotecan at 10 mg/kg. Empty vesicles were administered as a control. CBC and differential analysis was performed at Central Labs for Veterinarians (Langley, BC) to quantify cellular levels, ratios and morphology.

[63] 8. **Tumor Models.** The L1210 murine leukemia model and the CT-26 murine colon metastases model were employed as in standard protocols. Human MX-

1 and LX-1 cell lines were obtained from the DCTD Tumor Repository in Frederick, MD. These cell lines were received as tumor fragments and were propagated in NCr nude mice by serial transplantation of 3 x 3 mm fragments. Experiments were not initiated until the cell lines had been through 3 passages in nude mice and the tumor lines were restarted when the  
5 passage number reached 10.

[64] 9. **Efficacy Studies.** All dosing of free and liposomal topotecan was administered by the intravenous route at 10 ml/kg via the lateral tail vein. In the LI210 and CT-26 models, dosing occurred on day 1 (tumor cell injection = day 0). For the MX-1 and LX-1 tumor models, tumor volume was determined by repeated perpendicular  
10 measurements of tumor dimensions and using the formula:

$$\text{Volume (mm}^3\text{)} = (L \times W^2)/2$$

[65] Dosing was initiated in the MX-1 and LX-1 models when tumors had clearly demonstrated growth and were in the range 100-300 mm<sup>3</sup>.

[66] Since most drugs exhibit a balance between a biological effect and  
15 toxicity, it is useful to examine a parameter that incorporates both of these attributes. The most commonly employed parameter is therapeutic index (TI). Traditionally, therapeutic index is defined as:

$$\text{TI} = \text{LD}_{50}/\text{ED}_{50}$$

[67] However, since it is no longer permissible to perform LD50 studies,  
20 therapeutic index for these studies has been defined as follows:

$$\text{TI} = \text{MTD}/\text{MED}.$$

[68] In the above formula, MTD is the maximum tolerated dose, defined as that dose that causes a mean weight loss of 20% in a group of animals; and MED is the minimal effective dose, defined as the dose that produces an optimal %T/C value of  $\leq 40$  in  
25 the solid tumor models or an %I.L.S of  $50 \pm 10\%$  in the survival models.

## B. Results

[69] 1. **Pharmacokinetics and drug leakage.** The influence of liposome encapsulation and drug-to-lipid ratio on plasma pharmacokinetics and drug leakage of topotecan was examined over 24 h in ICR mice. Liposome encapsulation of topotecan  
30 (drug-to-lipid ratio, 0.11, w/wt) had a dramatic influence on the pharmacokinetics parameters of the drug (see, Figure 1, top; and Table 1). At a 5 mg/kg dose of topotecan, a 164-fold increase in plasma AUC, a 24-fold increase in C<sub>max</sub> and a 24-fold increase in the



plasma  $\alpha$  half-life were observed for the liposomal drug relative to the free drug (*see*, Table 1). Historically, large improvements in AUC and plasma half-lives of liposomal drugs have resulted in enhanced delivery of the drug to disease-sites (such as tumors), a process known as “disease-site targeting”.

5                    [70]    The formulations used in this study were prepared by the Mg-A23187 ionophore method. There was an initial rapid release of drug in the first 10-30 minutes after iv administration (*see*, Figure 1, bottom), followed by a more gradual release phase. The  $t_{1/2\text{release}}$  for the Mn-A23187 and Mg-A23187 formulations were ~ 3 h and ~ 5-7 h, respectively; however, very little drug was present in either formulation at 24 h.

10                   [71]    For most liposomal drug formulations, the pharmacokinetic properties of the encapsulated drug are controlled by the lipid composition and dose. Liposomal topotecan has been shown to exhibit exceptional anti-tumor activity, even at very low drug doses (0.5 mg/kg; drug-to-lipid ratio, 0.10, wt/wt). At these drug doses and drug-to-lipid ratio, liposome elimination from the plasma is expected to be rapid. Therefore, to determine  
15 whether the pharmacokinetics of topotecan at low doses could be improved, a low drug-to-lipid ratio (0.02, wt/wt) formulation of topotecan was investigated. Interestingly, in this study, the low drug-to-lipid ratio formulation released the drug much faster than the higher drug-to-lipid ratio (0.11, wt/wt) formulation. This result was unexpected.

**Table 1. Pharmacokinetic parameters of free and liposomal topotecan.**

Formulation	Dose (mg/kg)	AUC (h•µg/ml)	Cmax (µg/ml)	Cl (ml/h)	$\alpha_{1/2}$ (h)	$\beta_{1/2}$ (h)
Free	1	1.97	0.75	13.9	0.14	11.8
	5	2.77	2.17	49.6	0.26	11.4
TCS	1	65.7	16.3	0.417	2.79	
	5	453	51.0	0.302	6.16	

All parameters were derived from one or two-compartment models using WINNONLIN PK modeling software.

[72] 2. **Maximum tolerated doses.** Single and multidose MTD studies were performed in tumor bearing Balb/c, BDF-1 and NCr *mu/mu* mice. Body weights of individual mice were monitored throughout each study to evaluate the general tolerability of free and liposomal topotecan and, where possible, to establish an MTD (*see*, Figure 2). The maximum tolerated dose of liposomal topotecan was 10 mg/kg on a single administration, 7.5 mg/kg on a q7dx3 schedule and 5 mg/kg on a q3dx4 schedule. The reported LD<sub>10</sub> of free topotecan following a single intravenous infusion in mice is 75 mg/M<sup>2</sup> (~ 25 mg/kg) [Hycamtin™ product monograph]; however, very little weight loss was observed at doses up to 40 mg/kg, although this was considered the MTD due to acute responses. Drug quantities were limited so doses higher than 40 mg/kg (administered over 5-10 minutes) were not pursued. It has previously been indicated that the LD<sub>10</sub> of free topotecan on a qdx5 schedule is 14 mg/M<sup>2</sup>/dose (~ 4.7 mg/kg/dose) (Grochow, *et al.*, *Drug Metab. Dispos.*, **20**:706-713 (1992)).

[73] 3. **Toxicity.** The major dose-limiting toxicity of free topotecan administered daily in humans for 5 consecutive days (dx5) at 1.5 mg/M<sup>2</sup>/dose, the MTD, is non-cumulative myelosuppression. As mentioned earlier, humans are more sensitive than mice to myelosuppression and can only tolerate 11% of the MTD in mice (1.5 vs 14 mg/M<sup>2</sup>). In this regard, dogs have been shown to be a much better predictor of topotecan myelosuppression in humans (Borris, *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.* **84**:1816-1820 (1992)). However, mice should be suitable for comparing the relative myelosuppressive effects of free and liposome encapsulated topotecan.

[74] In a study, the maximal reduction in peripheral WBC counts occurred at day 3 post-injection following administration of liposomal topotecan. A comparison of peripheral blood cell levels and morphology was then made at day 3 following administration of free or liposome encapsulated topotecan or empty vesicles (*see*, Table 2). The dose used for this comparison was the MTD of liposome-encapsulated topotecan (10 mg/kg). A significant reduction in circulating neutrophils was observed for liposomal topotecan relative to free topotecan (~10-fold), empty vesicles (~10-fold) or control animals (~20-fold). Total WBC levels and the lymphocyte sub-population were reduced approximately 2-fold for liposomal topotecan relative to control animals. No significant differences were observed in these parameters for free topotecan at the same dose. At day 21 post-injection total, WBC levels for liposomal topotecan remained approximately 2.5-fold lower than normal animals; however, neutrophils levels had recovered from a 20-fold decrease to a 3-fold decrease relative to normal mice. Lymphocyte levels remained ~ 2-fold lower than normal mice. No other significant differences were observed.

[75] Analysis of serum chemistry parameters at day 3 post-injection revealed very few changes relative to untreated animals (*see*, Table 3). The only change of note was a statistically significant increase (~ 2-fold) in globulin levels and a concomitant decrease in the albumin/globulin ratio for animals treated with liposomal topotecan. No other significant changes were observed.

Table 2. Blood CBC and differential of ICR mice treated with a 10 mg/kg i.v. dose of free or liposome encapsulated topotecan.

Treatment	Day Post-Injection	WBC Differential										
		WBC (x10 <sup>9</sup> /L)	Neutro (x10 <sup>9</sup> /L)	Lympho (x10 <sup>9</sup> /L)	Mono (x10 <sup>9</sup> /L)	Eosino (x10 <sup>9</sup> /L)	Baso (x10 <sup>9</sup> /L)	RBC (x10 <sup>12</sup> /L)	Hb (g/L)	Hc (L/L)	PLT (x10 <sup>9</sup> /L)	
Control		6.47 ± 1.62	0.937 ± 0.201	5.23 ± 1.45	0.180 ± 0.042	0.059 ± 0.059	0.056 ± 0.053	8.67 ± 0.93	142 ± 12	0.438 ± 0.045	717 ± 317	
Free	3	6.70 ± 1.95	0.520 ± 0.209	5.90 ± 1.70	0.177 ± 0.072	0.031 ± 0.021	0.057 ± 0.040	8.47 ± 0.39	136 ± 05	0.444 ± 0.012	879 ± 145	
	21	5.16 ± 1.18	0.480 ± 0.122	4.33 ± 0.93	0.247 ± 0.180	0.034 ± 0.016	0.088 ± 0.071	9.81 ± 0.37	154 ± 04	0.493 ± 0.014	907 ± 059	
TCS	3	2.82 ± 1.05	0.048 ± 0.018	2.63 ± 0.87	0.109 ± 0.126	0.001 ± 0.001	0.034 ± 0.029	8.93 ± 0.76	141 ± 10	0.463 ± 0.033	564 ± 098	
	21	2.54 ± 1.43	0.282 ± 0.167	2.06 ± 1.36	0.133 ± 0.142	0.019 ± 0.011	0.064 ± 0.060	9.41 ± 0.83	154 ± 12	0.486 ± 0.025	1009 ± 161	
Empty	3	4.68 ± 1.13	0.598 ± 0.238	3.66 ± 0.93	0.248 ± 0.168	0.081 ± 0.044	0.064 ± 0.055	7.77 ± 0.30	130 ± 05	0.416 ± 0.014	863 ± 143	
	21	5.05 ± 0.64	0.898 ± 0.575	3.78 ± 0.88	0.263 ± 0.163	0.038 ± 0.056	0.072 ± 0.057	9.35 ± 0.67	152 ± 08	0.483 ± 0.053	1366 ± 144	

Table 3. Serum chemistry panel of ICR mice treated with a 10 mg/kg i.v. dose of free or liposome encapsulated topotecan - day 3 post-injection.

Treatment	BUN (µmol/L)	Creatinine (µmol/L)	TP (g/L)	Albumin (g/L)	Globulin (g/L)	Alb/Glob Ratio	Bilirubin (µmol/L)	Alk Phos (IU/L)	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	CPK (IU/L)
Control	11.3 ± 3.0	83 ± 6	46.7 ± 2.1	31.3 ± 1.5	15.3 ± 1.3	2.07 ± 0.15	4.7 ± 0.6	86 ± 12	27 ± 31	59 ± 22	87 ± 107
Free	9.4 ± 3.2	82 ± 18	48.0 ± 2.1	32.8 ± 1.5	15.2 ± 1.1	2.16 ± 0.15	3.8 ± 0.8	67 ± 35	13 ± 23	55 ± 10	56 ± 38
TCS	10.0 ± 3.9	96 ± 28	55.8 ± 11.8	28.8 ± 2.5	27.0 ± 10.1	1.18 ± 0.33	2.5 ± 0.6	73 ± 21	23 ± 17	77 ± 29	155 ± 54
Empty	ND	68 ± 13	49.3 ± 1.2	33.0 ± 1.7	16.3 ± 0.6	2.00 ± 0.17	4.5 ± 0.6	70 ± 10	17 ± 15	53 ± 6	56 ± 26

C. **Efficacy Studies in Murine and Human Tumor Models: Single Dose Studies**

[76] 1. **L1210 Murine Leukemia.** The intravenous L1210 murine leukemia model has been used extensively to evaluate differential activity between free and liposome encapsulated chemotherapeutic agents and was one of the original (1955-1975) models in the *in vivo* NCI screen of novel chemotherapeutic agents (Plowman, *et al.*, *Human tumor xenograft models in NCI drug development. In "Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval"* (B. Teicher, Ed.), Humana Press Inc., Totowa (1997); Waad, *Murine L1210 and P388 leukemias. In "Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval"* (B. Teicher, Ed.), Humana Press Inc., Totowa (1997)). The model is rapid -- the mean survival of untreated animals is typically ~ 7-8 days -- and the administered tumor cells seed in the liver and bone marrow.

[77] Administration of free topotecan as a single intravenous dose had minimal effect on survival in the L1210 model (*see*, Figure 3A). At the highest dose of free topotecan, a median survival of 13 days (44% ILS) was observed. There was one long-term survivor (day 60) in this group. In contrast, a single i.v. administration of liposomal topotecan at either 5 or 10 mg/kg resulted in 100% survival at day 60 (*see*, Figure 3B). Median survival for a 1 mg/kg dose was 13 days (44% ILS) and the survival curve was nearly identical to that of the free topotecan administered at 30 mg/kg -- a 30-fold improvement in potency. At higher doses (30 mg/kg) of the liposomal topotecan, toxic deaths were observed. The MTD for liposomal topotecan was 20 mg/kg in BDF-1 mice after a single i.v. administration.

[78] 2. **CT-26 Murine Colon Carcinoma.** The murine CT-26 colon cell line is useful for drug screening since it readily grows as subcutaneous solid tumors or can be administered intravenously and used as a survival model. In addition, when the tumor cells are administered by intrasplenic injection, followed by splenectomy, the cells seed to the liver and give rise to an experimental metastases model that more closely resembles the clinical progression of colorectal cancer. The model has been used extensively and is described, for example, in detail elsewhere.

[79] In the CT-26 model, administration of a single dose of topotecan had a modest impact on survival resulting in %ILS of 23-60% over the dose range 5-40 mg/kg (see, Figure 4). Liposome encapsulated topotecan, however, was highly active at doses greater than 5 mg/kg, resulting in 100% survival (8/8) at day 90. At 10 mg/kg, 87.5% survival (7/8) was observed at day 90; however, the tumor burden in dead animal was very low suggesting that this animal may have died due to other factors, such as infection related to myelosuppression. A dose response was observed for liposomal topotecan, with the 2 mg/kg dose giving an %ILS of 54%. This was determined to be the MED and was comparable to the %ILS (58%) achieved using free topotecan at 40 mg/kg – a 20-fold increase in potency.

[80] 3. **MX-1 Human Breast Carcinoma.** MX-1 is an experimental model of human breast cancer and has a reported doubling time of 3.9 days (NCI); in this study, the median doubling time was consistently 3.6-3.7 days. The tumor cell line was derived from the primary tumor of a 29-year-old female with no previous history of chemotherapy and is provided by the DCTD (NCI) tumor repository as a tumor fragment that is serially passaged in nude mice. Histologically, MX-1 is a poorly differentiated mammary carcinoma with no evidence of gland formation or mucin production. MX-1 was one of 3 xenograft models (MX-1, LX-1, CX-1) that comprised the NCI *in vivo* tumor panel and prescreen (1976-1986) for evaluating novel chemotherapeutic agents (Plowman, *et al.*, *Human tumor xenograft models in NCI drug development. In "Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval"* (B. Teicher, Ed.), Humana Press Inc., Totowa (1997)). Since then, MX-1 has been incorporated into a larger panel of breast tumor models (12 in total) to reflect a shift in NCI strategy from "compound-oriented" discovery to "disease-oriented" discovery.

[81] In staged (100-300 mm<sup>3</sup>) MX-1 tumors, free topotecan exhibited dose-dependent inhibition of tumor growth (see, Figure 5; Table I). At the highest dose (40 mg/kg), an optimal % T/C of 24% was obtained; while optimal % T/C values for 10 and 5 mg/kg were 66% and 78%, respectively. No drug-related deaths were observed and all animals gained weight throughout the study. Liposome encapsulation of topotecan had a marked impact on %T/C, with optimal %T/C values of 8%, -49% and -62% following a single administration of the drug at 2, 5 or 10 mg/kg, respectively. A negative % T/C value is indicative of tumor volume regression from the original staged tumor size (100-300 mm<sup>3</sup>).

According to NCI guidelines, an optimal % T/C < 10% is considered significant activity, while values < 42% are the minimum acceptable limits for advancing a drug further in development (Corbett, T. *et al.*, *In vivo methods for screening and preclinical testing*. In "Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval" (B. Teicher, Ed.), Humana Press Inc., Totowa (1997)). Liposome encapsulation increased the toxicity of topotecan, reducing the MTD to 10 mg/kg from > 40 mg/kg for free topotecan.

[82] 4. **LX-1 Human Lung Carcinoma.** LX-1 is an experimental model of human small cell lung cancer (SCLC). The tumor cell line was derived from the surgical explant of a metastatic lesion found in a 48 year old male and is provided by the DCTD (NCI) tumor repository as a tumor fragment that is serially passaged in nude mice. The LX-1 model was part of the NCI *in vivo* tumor panel from 1976-1986 (Plowman, J. *et al.*, *Human tumor xenograft models in NCI drug development*. In "Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval" (B. Teicher, Ed.), Humana Press Inc., Totowa (1997)) and, although used less frequently now, remains a useful xenograft model for comparative activity studies between free and liposomal drugs because of its rapid growth rate.

[83] In general, the LX-1 model was less sensitive to the effects of topotecan than the MX-1 model, for both free and liposome-encapsulated drug (*see*, Figure 6; Table D). Optimal % T/C values for free topotecan were 43%, 55% and 67% for doses of 30, 10 or 5 mg/kg, respectively. Anti-tumor activity was improved through encapsulation, resulting in %T/C values of 8%, 11% and 13% for doses of 30, 10, or 5 mg/kg, respectively. Interestingly, all of the liposomal topotecan doses exhibited similar activity. This was an early study and subsequent studies in other models (*see*, Figures 4-6) indicate dose response beginning at doses < 5 mg/kg. This is consistent with the observation that camptothecin-class compounds (and presumably other antineoplastic agents) can exhibit "self-limiting" efficacy whereby, at doses above a critical threshold dose, no further activity benefits are observed (Thompson, *Biochim. Biophys. Acta* 1400:301-319 (1998)). This situation could conceivably occur if the drug has limited tumor cell access or if the drug is acting on, and destroying, the tumor vasculature (*i.e.*, has anti-angiogenic activity). In both instances, a higher dose of drug would be expected to have negligible benefit.

[84] As observed in the L1210 study, encapsulation of topotecan enhanced the toxicity of the drug and reduced the MTD. The MTD in tumor-bearing nude mice was 10



mg/kg (~ 16% weight loss). At 30 mg/kg, 4/6 drug-related toxic deaths were observed and maximum weight loss reached ~ 29% (27-34% range).

**D. Efficacy Studies in Murine and Human Tumor Models: Multiple Dose Studies**

5 [85] 1. **MX-1 Human Breast Carcinoma.** To address the effectiveness of multiple administration and prolonged exposure of the tumors to drug, two multiple dose protocols were examined in MX-1 xenografts -- q3dx4 and q7dx3 schedules. On the q4dx3 schedule, free topotecan exhibited moderate activity at 2.5 and 10 mg/kg/dose and minimal activity at 1.25 mg/kg/dose (*see*, Figure 7; Table II). Optimal % T/C values for  
10 free topotecan on this dosing schedule were 55%, 30% and 27% for 1.25, 2.5 and 10 mg/kg/dose, respectively. For the encapsulated topotecan administered on the same dosing schedule, optimal % T/C values were - 15%, - 100%, - 100%, and - 100% for 0.5, 1.25, 2.5 and 5 mg/kg/dose, respectively. All regressed tumors were monitored for 60 days. At the end of this period, all animals treated with  $\geq$  1.25 mg/kg/dose of liposomal topotecan were  
15 considered tumor free.

[86] On a q7dx3 dosing schedule, little activity was observed with the free topotecan, either a 5 or 10 mg/kg/dose (*see*, Figure 8; Table II). At the same doses, liposomal topotecan induced complete regression of the staged tumors. However, on this dosing schedule, 10 mg/kg/dose was too toxic and this portion of the study was halted as 6/6 toxic  
20 deaths (or euthanasia's) were observed by day 24.

[87] 2. **LX-1 Human Lung Carcinoma.** Initial studies (single dose) in the LX-1 model indicated that free topotecan was inactive at evaluated doses < 30 mg/kg and liposomal topotecan inhibited tumor growth, but did not induce regression. To improve this activity, a multiple (q7dx3) schedule was examined for both free and liposomal  
25 topotecan. In this instance, considerably greater activity was observed for free topotecan compared to the single dose study and optimal %T/C values of 5 and 40 were obtained for 30 and 10 mg/kg/dose, respectively. Liposomal topotecan also exhibited significantly improved activity, resulting in complete regression (with subsequent re-growth) at 5 mg/kg/dose. Optimal % T/C values for liposomal topotecan in this model and dosing schedule were - 55,  
30 3 and 16 for 5, 2.5, 1.25 mg/kg/day, respectively.

[88] 3. **Therapeutic Index (TI) Comparisons.** The therapeutic index of free and liposomal topotecan was assessed in 4 different tumor models on several different

dosing schedules (*see*, Table 4). The assumptions and definitions used to generate these numbers are found in Table III. In some instances, a true MED or MTD was not observed and was therefore estimated mathematically based on dose response trends. For instance, an acute MTD of 40 mg/kg was observed for free topotecan administered as a single bolus injection, but the true MTD (based on weight loss) would likely be closer to 60 mg/kg if the drug was infused over 5–10 minutes. Also, complicating the analysis somewhat was the level of potency of the liposomal formulation. Significant anti-tumor activity was achieved at low drug doses and the MED had to be estimated in certain studies. In these instances, a notation was made in Table 4.

10 [89] In general, the increase in therapeutic index for liposomal topotecan was relatively large for single dose administration (5, 10, 15 and 18-fold, depending on the model) and decreased with increasing dosing frequency. This is illustrated in Table 4, where the  $TI_{TCS} / TI_{Free}$  ratio was 4.7–7.5 and 3.3 for q7dx3 and q3dx4 schedules, respectively. The decrease in the  $TI_{TCS} / TI_{Free}$  ratio with more frequent dosing is consistent with preclinical and clinical studies indicating that the efficacy and toxicity of free topotecan is schedule-  
15 dependent.

**Table 4. Relative Therapeutic Indices of Free and Liposomal Topotecan in Murine and Human Tumor Models.<sup>a</sup>**

Tumor Model	Route of Inoculation	Dosing Schedule	$TI_{Free}$	$TI_{TCS}$	$TI_{TCS} / TI_{Free}$
LI210 (murine leukemia)	i.v.	single	1.3 (2.0) <sup>b</sup>	20	15.4 (10) <sup>b</sup>
CT-26 (murine colon)	i.s.	single	1.0 (1.5) <sup>b</sup>	5.0	5 (3.3) <sup>b</sup>
MX-1 (human breast)	s.c.	single	1.4 (2.1) <sup>b</sup>	25	17.9 (11.9) <sup>b</sup>
		q3dx4	15	50 <sup>c</sup>	3.3
		q7dx3	2.0	15.0 <sup>c</sup>	7.5
LX-1 (human lung)	s.c.	single	1.3 (2.0) <sup>b</sup>	13.3	10.2 (6.7) <sup>b</sup>
		q7dx3	4.0	18.8	4.7

<sup>a</sup> based on data in Table II and III; formulas and definitions in Table IV.

20 <sup>b</sup> obtained using an acute MTD of 40 mg/kg; second value is based on an estimated MTD (body weight)

<sup>c</sup> a conservative estimate that may be ~ 2-fold greater; difficult to assess the MED due to high activity at low doses.

## E. Discussion

[90] Topotecan is an excellent candidate for liposome encapsulation. Briefly, topotecan is cell-cycle specific (S-phase) and activity is greatly enhanced with prolonged exposure, topotecan exhibits rapid plasma pharmacokinetics and the drug needs to be maintained below pH 6.0 to retain biological activity. This is an ideal scenario for using a relatively non-leaky liposome formulation (such as SM:CH, 55:45) that has an acidic aqueous core. The required acidic interior can be produced, for example, by pH-loading or ionophore loading methodology. Here, it has been demonstrated that encapsulation of topotecan in SM/CH liposomes by the Mg-A23187 method results in dramatic enhancements in anti-tumor efficacy. Modest enhancement of toxicity was also observed for liposomal topotecan, but this was largely offset by substantial dose reductions that achieved comparable and, in most instances, superior efficacy relative to the free drug.

[91] Therapeutic index (TI) is a useful parameter of drug activity, as it is measure of the ratio of toxicity (MTD) to biological activity (user defined endpoint, *i.e.*, MED, ED<sub>50</sub>, or ED<sub>90</sub>). In general, the lower the TI, the greater the risk of toxicity since the dose of drug required to elicit a biological effect approaches the MTD. Therapeutic index is particularly useful for the evaluation of liposomal drugs since the relative change in TI can be used to define the benefit (or lack thereof) of encapsulation. As demonstrated herein, the TI improved from 3-18 fold depending on the model and dose schedule used. Therefore, the improvement in biological activity observed following liposome encapsulation of topotecan more than compensates for any increases in toxicity.

[92] Without intending to be bound by any theory, it is thought that the significant improvements in anti-tumor activity and the increased toxicity of the liposomal form of the drug result from improved pharmacokinetics and the maintenance of the drug in the active lactone form. In these studies, 84% of topotecan was present in plasma as the lactone species after 24 h compared to 48% lactone for free topotecan after only 5 minutes. Moreover, when the same dose (10 mg/kg) of free and liposomal topotecan was administered intravenously in mice, the concentration of lactone was ~40-fold higher at times < 1 h. At 24 h, the lactone plasma concentration for liposomal drug was 5.4 µg/ml compared to 1.5 µg/ml at 5 minutes for free drug - still 3.5-fold greater than the peak lactone concentration for free topotecan.

**Table I**  
Summary of Single Dose Anti-Tumor Activity and Toxicity Parameters

Model	Dose	Anti-Tumor Activity					Toxicity		
		%T/C <sup>a</sup>	T-C <sup>b</sup>	%ILS <sup>c</sup>	LCK <sup>d</sup>	TF <sup>e</sup>	DRD <sup>f</sup>	MWL <sup>g</sup>	
L1210	Free	5		11		0/8	0/8	+	
(i.v.)	Free	10		22		0/8	0/8	+	
NCTEF-005	Free	20		33		0/8	0/8	+	
	Free	30		44		0/8	0/8	+	
	Free	40		55		0/8	0/8	+	
	TCS	1		44		0/8	0/8	+	
	TCS	5		**		8/8	0/8	+	
	TCS	10		**		8/8	0/8	-9.7	
	TCS	20		**		7/7	1/8	-14.8	
	TCS	30		**		3/3	5/8	-23.4	
	CT-26	Free	5		31		0/8	0/8	+
(i.s.)	Free	10		23		0/8	0/8	+	
NCTEF-005	Free	40		58		1/8	0/8	-0.4	
	TCS	2		54		0/8	0/8	+	
	TCS	5		**		8/8	0/8	-6.8	
	TCS	10		**		7/8	0/8	-19.1	
MX-1	Free	5	78	0.2	0	0.02	0/6	0/6	+
	(s.c.)	Free	10	66	1.4	13	0.12	0/6	0/6
NCTEF-004	Free	40	24	4.2	35	0.35	0/6	0/6	+
	TCS	2	8	7.4	65	0.62	0/6	0/6	+
	TCS	5	-49	10.2	74	0.85	0/6	0/6	-0.4
	TCS	10	-62	14.2	83	1.19	1/6	0/6	-18.3
LX-1	Free	5	67	1.4	0	0.13	0/6	0/6	+
	(s.c.)	Free	10	55	1.9	0	0.18	0/6	0/6
NCTEF-003	Free	30	43	2.9	7	0.27	0/6	0/6	-1.3
	TCS	5	13	7.9	30	0.74	0/6	0/6	-1.7
	TCS	10	11	8.7	32	0.82	0/6	0/6	-15.6
	TCS	30	8	9.9	22	0.93	0/6	4/6	-29.0

<sup>a</sup> optimal % T/C following final treatment. Negative value indicates tumor regression.

<sup>b</sup> tumor growth delay (difference in time for treated and control tumors to reach 500 mm<sup>3</sup>).

<sup>c</sup> increase in lifespan relative to untreated animals (expressed as %).

<sup>d</sup> log cell kill (gross).

<sup>e</sup> tumor free animals at the end of study (i.e. no visible tumors or long term survivors).

<sup>f</sup> drug related deaths.

<sup>g</sup> maximum mean weight loss per treatment group.

<sup>h</sup> positive weight change (i.e. at no time did weight decrease below pre-treatment weight).

\*\* long term survivors

5

10

**Table II**

Summary of Multiple Dose Anti-Tumor Activity and Toxicity Parameters

Model	Dose	Anti-Tumor Activity					Toxicity		
		%T/C <sup>a</sup>	T-C <sup>b</sup>	%ILS <sup>c</sup>	LCK <sup>d</sup>	TF <sup>e</sup>	DRD <sup>f</sup>	MWL <sup>g</sup>	
MX-1	Free	1.25	55	2.0	20	0.17	0/6	0/6	+ <sup>h</sup>
(q3dx4)	Free	2.5	30	5.0	55	0.42	0/6	0/6	+
NCTEF-006	Free	10	27	2.5	52	0.21	1/6	0/6	+
	TCS	0.5	-15	23.5	157	1.96	1/6	0/6	-0.3
	TCS	1.25	-100	**	**	1	6/6	0/6	-1.0
	TCS	2.5	-100	**	**	1	6/6	0/6	-11.5
	TCS	5	-100	**	**	1	6/6	0/6	-20.0
MX-1	Free	5	58	1.8	27	0.15	0/6	0/6	+
(q7dx3)	Free	10	61	2.0	ND <sup>i</sup>	1	0/6	0/6	-0.8
NCTEF-009	TCS	5	-100	**	**	1	6/6	0/6	-7.6
	TCS	10	-100	ND <sup>i</sup>	ND <sup>i</sup>	1	6/6	6/6	-29.0
LX-1	Free	10	40	2.0	21	0.14	0/6	0/6	-6.2
(q7dx3)	Free	30	5	20.9	58	1.53	0/6	0/6	-8.8
NCTEF-007	TCS	1.25	16	10.8	54	0.79	0/6	0/6	-7.7
	TCS	2.5	3	23.2	79	1.70	0/6	0/6	-7.3
	TCS	5	-55	30.2	100	2.22	0/6	0/6	-10.5
LX-1	Free	10	28	4.4	41		0/6	0/6	-3.6
(q7dx3)	Free	30	9	25	72		0/6	2/6	-16.4
NCTEF-011	TCS	7.5	ND <sup>i</sup>	ND <sup>i</sup>	ND <sup>i</sup>		0/6	6/6	> -30
	TCS	0.75	27	11.2	50		0/6	0/6	-1.3

a optimal % T/C following final treatment. Negative value indicates tumor regression.

b tumor growth delay (difference in time for treated and control tumors to reach 500 mm<sup>3</sup>).

5 c increase in lifespan relative to untreated animals (expressed as %).

<sup>d</sup> log cell kill (gross).

e tumor free animals at the end of study (*i.e.* no visible tumors or long term survivors).

f drug related deaths.

g maximum mean weight loss per treatment group.

10 h positive weight change (*i.e.* at no time did weight decrease below pre-treatment weight).

i not determined; toxic deaths in the liposome-encapsulated group.

\*\* "cures"; no visible tumors by day 60.

**Table III**

## Definitions and Formulas for Toxicity and Anti-Tumor Activity Parameters

5	<b>DRD</b>	Drug-related death. A death was considered drug-related if the animal died or was euthanized within 15 days following the final treatment with drug AND its tumor weight was less than the lethal burden on control mice, or its weight loss was greater than 20% that of the control animals.
10	<b>GI<sub>50</sub></b>	<p>The concentration of drug that causes 50% growth inhibition in a population of cells in vitro. The NCI renamed the IC<sub>50</sub> parameter to emphasize the correction for cell count at time zero. Therefore, the formula is:</p> $GI_{50} = (T - T_0) / (C - T_0) \times 100 = 50$ <p>T and T<sub>0</sub> are the optical densities at 48 and 0 h, respectively; C is the control (cell count) optical density at 0 h.</p>
15	<b>% ILS</b>	<p>Increase in lifespan (in percent). For survival models this is calculated using the median survival times for the treated (T<sub>treat</sub>) and control (T<sub>cont</sub>) animals, according to:</p> $(T_{treat} - T_{cont}) / T_{cont} \times 100$ <p>For the solid tumor models, the time for tumors to reach 2000 mm<sup>3</sup> (~ 10% of body weight) was used as an ethical cutoff instead of median survival.</p>
20	<b>LCK</b>	<p>Log cell kill (gross). This parameter estimates the number of log<sub>10</sub> units of cells killed at the end of treatment, according to the formula:</p> $(T - C) \times 0.301 / \text{median doubling time}$ <p>Net log cell kill can be calculated by subtracting the duration of treatment from the tumor growth delay (T - C) parameter as follows:</p> $[(T - C) - \text{duration of treatment}] \times 0.301 / \text{median doubling time}$
25		A log cell kill of 0 indicates that the cell population at the end of treatment is the same as it was at the onset of treatment. However, a log cell kill of 4, for example, indicates a 99.99% reduction in the initial cell population.
30	<b>MBWL</b>	<p>Maximum body weight loss (in percent). The animals are weighed prior to the first administration of the drug (W<sub>i</sub>) and on various days during the study (W<sub>d</sub>). The percent change in body weight is calculated by:</p> $MBWL = (W_d - W_i) / W_i \times 100$
	<b>MED</b>	Minimum effective dose. This is a somewhat arbitrary parameter. For these studies we have defined the MED as the lowest dose achieving an optimal % T/C ≤ 40 (for solid tumor models) or a % ILS of 40 - 60 % (for survival models).
35	<b>MTD</b>	Maximum tolerated dose. Dose of drug that results in a MBWL of ≤ 20%.

**% T/C** Optimal ratio of treated vs control tumors obtained following the first course of treatment. These values are obtained by subtracting the median tumor weight on the first day of treatments ( $T_1$  or  $C_1$ ) from the tumor weights on each observation day according to the following formula:

$$5 \quad \begin{aligned} \% T/C &= (\Delta T / \Delta C) \times 100, \text{ where } \Delta T > 0, \text{ or} \\ \% T/C &= (\Delta T / T_1) \times 100, \text{ where } \Delta T < 0 \end{aligned}$$

According to NCI activity criteria, the following scoring system applies (Plowman, *et al.*, *Human tumor xenograft models in NCI drug development. In "Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval"* (B. Teicher, Ed.), Humana Press Inc., Totowa (1997)[22]:

- 10
- 0 = inactive, % T/C > 40
  - 1 = tumor inhibition, % T/C range 1 – 40
  - 2 = tumor stasis, % T/C range 0 to -40
  - 3 = tumor regression, % T/C range -50 to -100
  - 15 4 = % T/C range -50 to -100 and > 30% tumor-free mice

**TGD** Tumor growth delay (also represented as  $T - C$ ). This parameter expresses the difference in time (in days) for treated and control tumors to attain an arbitrary size (typically 500 or 1000 mm<sup>3</sup>).

20 **TI** Therapeutic index. Therapeutic index is the ratio of a toxicity parameter (*i.e.* LD<sub>50</sub>, LD<sub>10</sub>, MTD) and a biological activity parameter (*i.e.* ED<sub>50</sub> – the dose that causes a defined biological response in 50% of the treatment group). In general, TI describes the margin of safety for a drug. For animal model studies this is traditionally described by the formula:

$$TI = LD_{50} / ED_{50}$$

25 However, since it is no longer ethically permissible to perform LD<sub>50</sub> studies, we have defined therapeutic index for these studies as:

$$TI = MTD / MED$$

[93] It is to be understood that the above description is intended to be illustrative and not restrictive. Many embodiments will be apparent to those of skill in the art upon reading the above description. The scope of the invention should, therefore, be 30 determined not with reference to the above description, but should instead be determined with reference to the appended claims, along with the full scope of equivalents to which such

claims are entitled. The disclosures of all articles and references, including patent applications and publications, are incorporated herein by reference for all purposes.



**WHAT IS CLAIMED IS:**

- 1           1.     A method for modulating the plasma circulation half-life of an active  
2 agent, said method comprising:  
3           (a) providing a liposome having free active agent and precipitated active agent  
4 encapsulated therein; and  
5           (b) varying the amount of said active agent that is precipitated in said  
6 liposome.
- 1           2.     The method of claim 1, wherein step (b) comprises varying said active  
2 agent to lipid ratio.
3.     The method of claim 2, wherein said active agent to lipid ratio is varied  
by the addition of an empty liposome.
- 1           4.     The method of claim 1, wherein step (b) comprises varying the size of  
2 said liposome.
- 1           5.     The method of claim 1, wherein step (b) comprises adding a  
2 component that enhances precipitation of said active agent.
- 1           6.     The method of claim 5, wherein said component is a mono-, di-, tri-, or  
2 polyvalent anion.
- 1           7.     The method of claim 1, wherein step (b) comprises varying both said  
2 active agent to lipid ratio and the size of the liposome.
- 1           8.     The method of claim 1, wherein said active agent is an antineoplastic  
2 drug.
- 1           9.     The method of claim 8, wherein said antineoplastic drug is a  
2 camptothecin.
- 1           10.    The method of claim 9, wherein said camptothecin is a member  
2 selected from the group consisting of irinotecan, topotecan, 9-amino camptothecin, 10,11-  
3 methylenedioxy camptothecin, 9-nitro camptothecin, TAS 103, 7-(4-methyl-piperazino-

4 methylene)-10, 11-ethylenedioxy-20(S)-camptothecin and 7-(2-N-isopropylamino)ethyl)-  
5 20(S)-camptothecin.

1 11. The method of claim 10, wherein said camptothecin is topotecan.

1 12. The method of claim 1, wherein said active antineoplastic drug is a  
2 vinca alkaloid.

1 13. The method of claim 12, wherein said vinca alkaloid is a member  
2 selected from the group consisting of vincristine, vinblastine, vinorelbine and vindesine.

1 14. The method of claim 1, wherein the precipitated active agent  
2 encapsulated in said liposome is at least 50% of said total active agent.

1 15. The method of claim 14, wherein the precipitated active agent  
2 encapsulated in said liposome is at least 60% of said total active agent.

1 16. The method of claim 15, wherein the precipitated active agent  
2 encapsulated in said liposome is at least 70% of said total active agent.

1 17. The method of claim 1, wherein said liposome comprises  
2 sphingomyelin and cholesterol.

1 18. The method of claim 17, wherein said liposome comprises  
2 sphingomyelin and cholesterol in a 55:45 ratio.

1 19. The method of claim 1, wherein the plasma circulation half-life of said  
2 active agent is modulated for optimum efficacy.

1 20. The method of claim 1, wherein the ratio of said active agent to lipid is  
2 about 0.005-1:1 (w/w).

1 21. The method of claim 20, wherein the ratio of said active agent to lipid  
2 is about 0.05-0.9:1 (w/w).

1 22. The method of claim 21, wherein the ratio of said active agent to lipid  
2 is about 0.1-0.5:1 (w/w).

- 1           23.    A method for modulating the plasma circulation half-life of an active  
2 agent, said method comprising:  
3           (a) providing a liposome having free active agent and precipitated active agent  
4 encapsulated therein; and  
5           (b) adding a liposome with no encapsulated active agent.
- 1           24.    The method of claim 23, wherein the ratio of liposomes containing  
2 active agent to liposomes with no encapsulated agent is from about 1:0.5 to 1:1000.
- 1           25.    The method of claim 24, wherein the ratio of liposomes containing  
2 active agent to liposomes with no encapsulated agent is from about 1:1 to 1:100.
- 1           26.    The method of claim 25, wherein the ratio of liposomes containing  
2 active agent to liposomes with no encapsulated agent is from about 1:2 to 1:10.
- 1           27.    The method of claim 26, wherein the ratio of liposomes containing  
2 active agent to liposomes with no encapsulated agent is from about 1:3 to 1:5.
- 1           28.    The method of claim 23, wherein said active agent is an antineoplastic  
2 drug.
- 1           29.    The method of claim 28, wherein said antineoplastic drug is a  
2 camptothecin.
- 1           30.    The method of claim 29, wherein said camptothecin is a member  
2 selected from the group consisting of irinotecan, topotecan, 9-amino camptothecin, 10,11-  
3 methylenedioxy camptothecin, 9-nitro camptothecin, TAS 103, 7-(4-methyl-piperazino-  
4 methylene)-10, 11-ethylenedioxy-20(S)-camptothecin and 7-(2-N-isopropylamino)ethyl)-  
5 20(S)-camptothecin.
- 1           31.    The method of claim 30, wherein said camptothecin is topotecan.
- 1           32.    A liposomal formulation, said liposomal formulation comprising:  
2 a) an antineoplastic drug; and

3           b)     a liposome having free antineoplastic drug and precipitated  
4 antineoplastic drug, wherein the precipitated antineoplastic drug in said liposome is at least  
5 50% of the total antineoplastic drug.

1           33.    The liposomal formulation of claim 32, wherein said antineoplastic  
2 drug is a camptothecin.

1           34.    The liposomal formulation of claim 33, wherein said camptothecin is a  
2 member selected from the group consisting of irinotecan, topotecan, 9-amino camptothecin,  
3 10,11-methylenedioxy camptothecin, 9-nitro camptothecin, TAS 103, 7-(4-methyl-  
4 piperazino-methylene)-10, 11-ethylenedioxy-20(S)-camptothecin and 7-(2-N-  
5 isopropylamino)ethyl)-20(S)-camptothecin.

1           35.    The liposomal formulation of claim 34, wherein said camptothecin is  
2 topotecan.

1           36.    The liposomal formulation of claim 33, wherein said antineoplastic  
2 drug is a vinca alkaloid.

1           37.    The liposomal formulation of claim 32, wherein the free antineoplastic  
2 drug and the precipitated antineoplastic drug are different.

1           38.    The liposomal formulation of claim 36, wherein said vinca alkaloid is a  
2 member selected from the group consisting of vincristine, vinblastine, vinorelbine and  
3 vindesine.

1           39.    The liposomal formulation of claim 32, wherein the ratio of said  
2 antineoplastic drug to lipid is about 0.005-1:1 (w/w).

1           40.    The liposomal formulation of claim 39, wherein the ratio of said  
2 antineoplastic drug: said lipid is about 0.05-0.9:1 (w/w).

1           41.    The liposomal formulation of claim 40, wherein the  
2 ratio of said antineoplastic drug: said lipid is about 0.1-0.5:1 (w/w).

1           **42.**    The liposomal formulation of claim **32**, wherein said liposome  
2 comprises sphingomyelin and cholesterol.

1           **43.**    The liposomal formulation of claim **42**, wherein said liposome  
2 comprises sphingomyelin and cholesterol in a 55:45 ratio.

1           **44.**    The liposomal formulation of claim **32**, further comprising a liposome  
2 with no encapsulated active agent.

1           **45.**    The liposomal formulation of claim **44**, wherein the ratio of liposomes  
2 containing active agent to liposomes with no encapsulated agent is from about 1:0.5 to  
3 1:1000.

1           **46.**    The liposomal formulation of claim **45**, wherein the ratio of liposomes  
2 containing active agent to liposomes with no encapsulated agent is from about 1:1 to 1:100.

1           **47.**    The liposomal formulation of claim **46**, wherein the ratio of liposomes  
2 containing active agent to liposomes with no encapsulated agent is from about 1:2 to 1:10.

1           **48.**    The liposomal formulation of claim **47**, wherein the ratio of liposomes  
2 containing active agent to liposomes with no encapsulated agent is from about 1:3 to 1:5.

1           **49.**    A liposomal formulation, said liposomal formulation comprising:  
2           a)    an active agent;  
3           b)    a liposome having free active agent and precipitated active agent  
4 encapsulated therein; and  
5           c)    an empty liposome.

1           **50.**    The liposomal formulation of claim **49**, wherein the ratio of liposomes  
2 containing said active agent to said empty liposomes is from about 1:0.5 to 1:1000.

1           **51.**    The liposomal formulation of claim **50**, wherein the ratio of liposomes  
2 containing said active agent to said empty liposomes is from about 1:1 to 1:100.

1           **52.**    The liposomal formulation of claim **51**, wherein the ratio of liposomes  
2 containing said active agent to said empty liposomes is from about 1:2 to 1:10.

1           53.     The liposomal formulation of claim 52, wherein the ratio of liposomes  
2 containing said active agent to said empty liposomes is from about 1:3 to 1:5.

1           54.     The liposomal formulation of claim 49, wherein said active agent is an  
2 antineoplastic drug.

1           55.     The liposomal formulation of claim 54, wherein said antineoplastic  
2 drug is a camptothecin.

1           56.     The liposomal formulation of claim 55, wherein said camptothecin is a  
2 member selected from the group consisting of irinotecan, topotecan, 9-amino camptothecin,  
3 10,11-methylenedioxy camptothecin, 9-nitro camptothecin, TAS 103, 7-(4-methyl-  
4 piperazino-methylene)-10, 11-ethylenedioxy-20(S)-camptothecin and 7-(2-N-  
5 isopropylamino)ethyl)-20(S)-camptothecin.

1           57.     The liposomal formulation of claim 56, wherein said camptothecin is  
2 topotecan.

1           58.     The liposomal formulation of claim 57, wherein said antineoplastic  
2 drug is a vinca alkaloid.

1           59.     The liposomal formulation of claim 58, wherein said vinca alkaloid is a  
2 member selected from the group consisting of vincristine, vinblastine, vinorelbine and  
3 vindesine.

1           60.     The liposomal formulation of claim 49, wherein the ratio of said active  
2 agent to lipid is about 0.005-1:1 (w/w).

1           61.     The liposomal formulation of claim 60, wherein the ratio of said active  
2 agent to lipid is about 0.05-0.9:1 (w/w).

1           62.     The liposomal formulation of claim 61, wherein the ratio of said active  
2 agent to lipid is about 0.1-0.5:1 (w/w).

1           63.     The liposomal formulation of claim 49, wherein said liposome  
2 comprises sphingomyelin and cholesterol.

PK/Payout of Ionophore loaded Vinorelbine [Vinca 03]

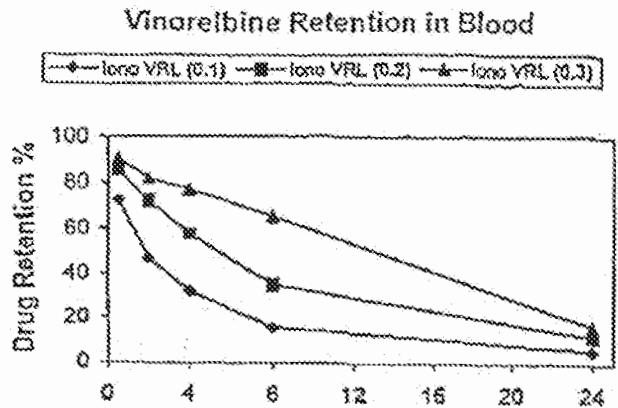


Fig. 1A

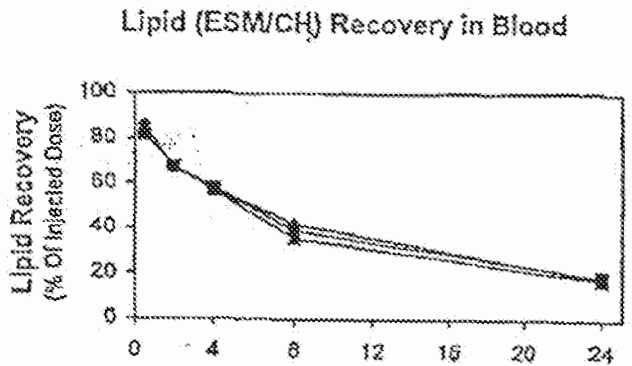


Fig. 1B

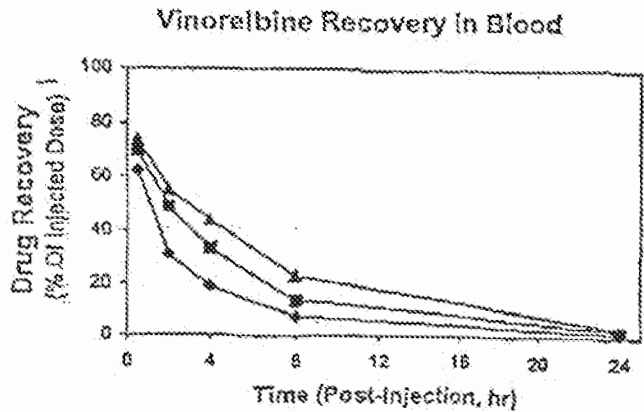


Fig. 1C

PK/Payout of Ionophore loaded Vinorelbine [Vinca 03]

Vinorelbine Retention in Plasma

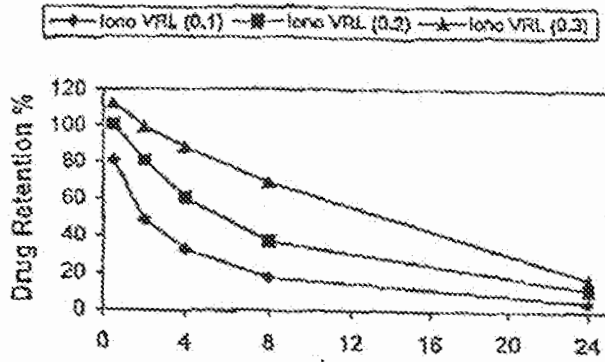


Fig. 2A

Lipid (ESM/CH) Recovery in Plasma

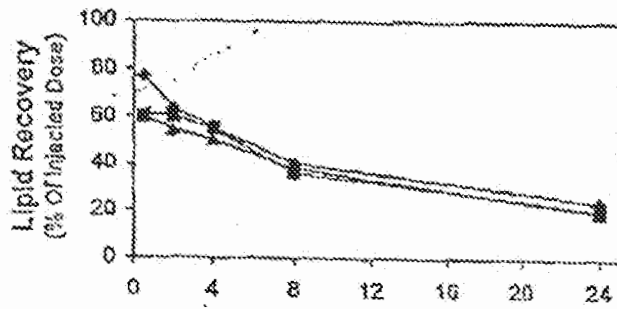


Fig. 2B

Vinorelbine Recovery in Plasma

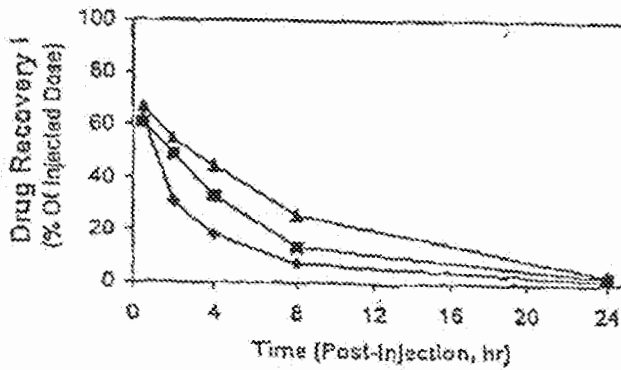


Fig. 2C



PK/Payout of Ionophore loaded Vinblastine [Vinca 04]

Vinblastine Retention in Blood

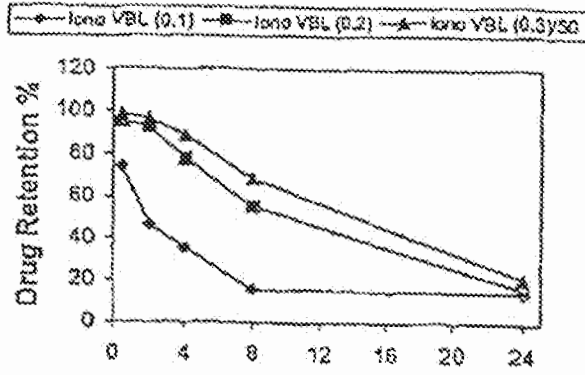


Fig. 3A

Lipid (ESM/CH) Recovery in Blood

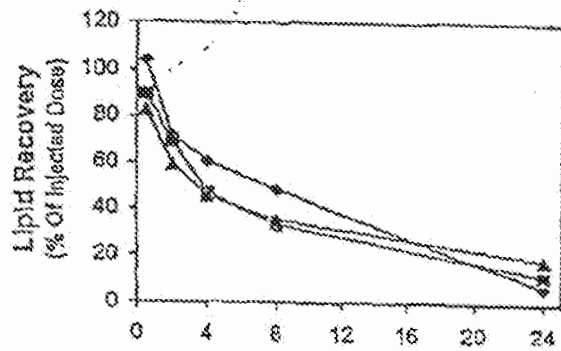


Fig. 3B

Vinblastine Recovery in Blood

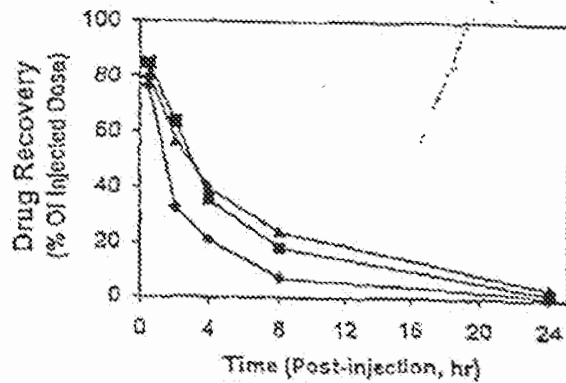


Fig. 3C

PK/Payout of Ionophore loaded Vinblastine [Vinca 04]

Vinblastine Retention in Plasma

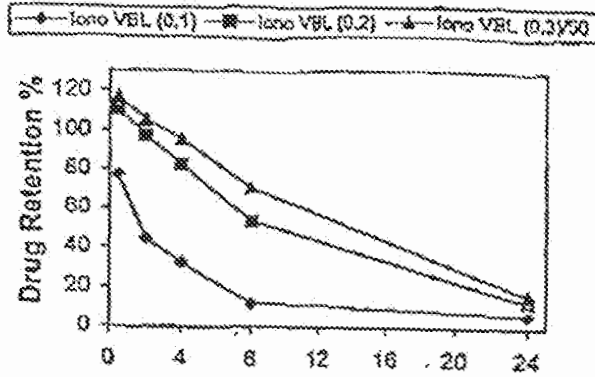


Fig. 4A

Lipid (ESM/CH) Recovery in Plasma

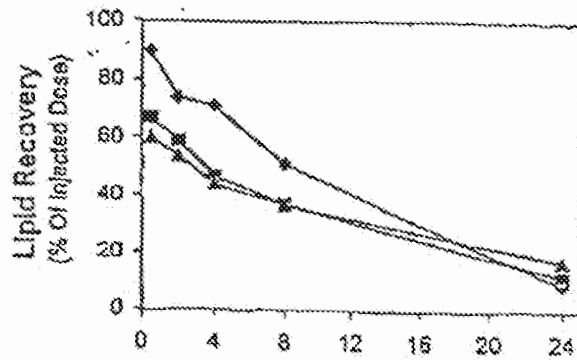


Fig. 4B

Vinblastine Recovery in Plasma

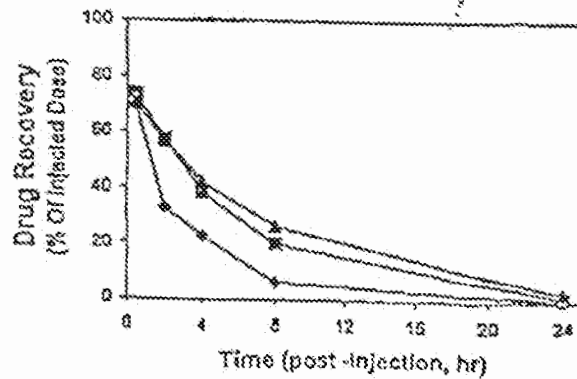


Fig. 4C

PK/Payout of longphore loaded Vinblastine [Vinca 04]

Vinblastine Retention In Blood

◆ long VBL (0.3)50    ■ long VBL (0.3)33.3    ▲ long VBL (0.3)16.6

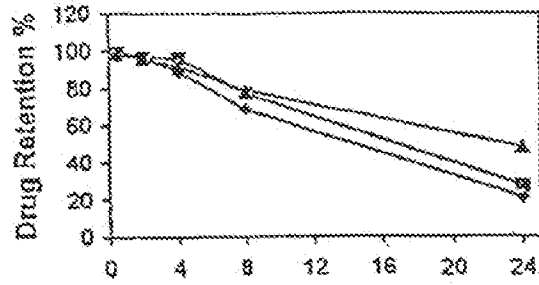


Fig. 5A

Lipid (ESM/CH) Recovery in Blood

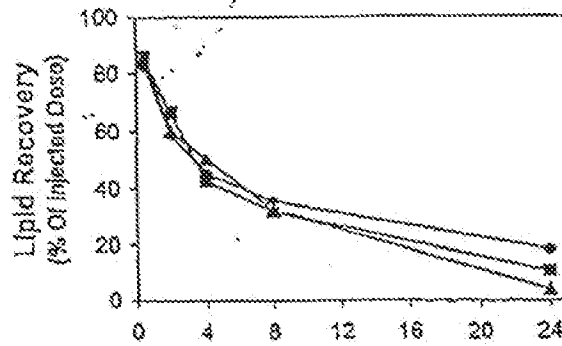


Fig. 5B

Vinblastine Recovery in Blood

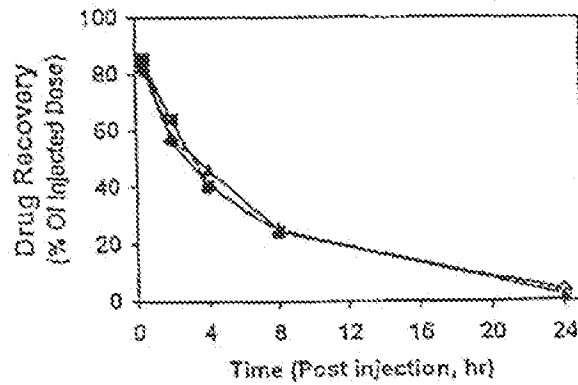


Fig. 5C

PK/Payout of Ionophore loaded Vinblastine [Vinca 04]

Vinblastine Retention in Plasma

—▲— Iono VBL (0.3)/50 —■— Iono VBL (0.3)/33.3 —▲— Iono VBL (0.3)/16.6

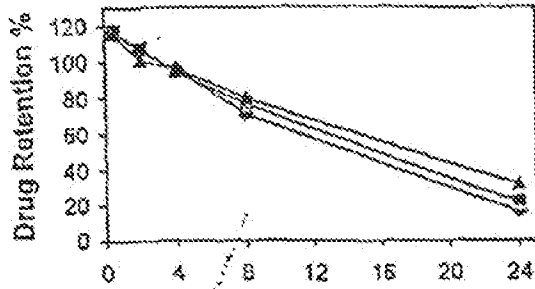


Fig. 6A

Lipid (ESM/CH) Recovery in Plasma

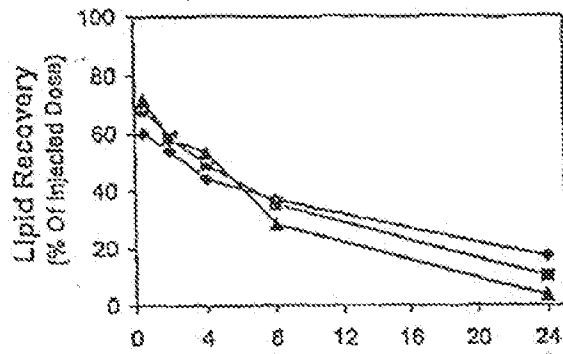


Fig. 6B

Vinblastine Recovery in Plasma

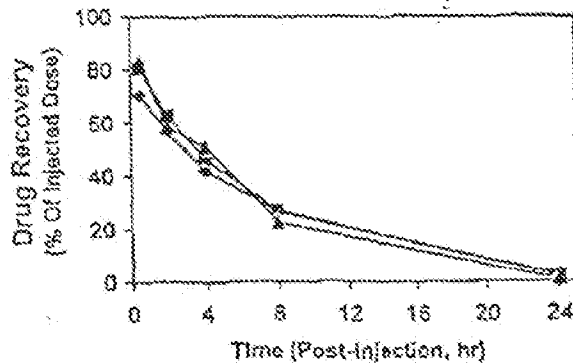


Fig. 6C

PK/Payout of Ionophore loaded Topotecan

Topotecan Retention in Plasma

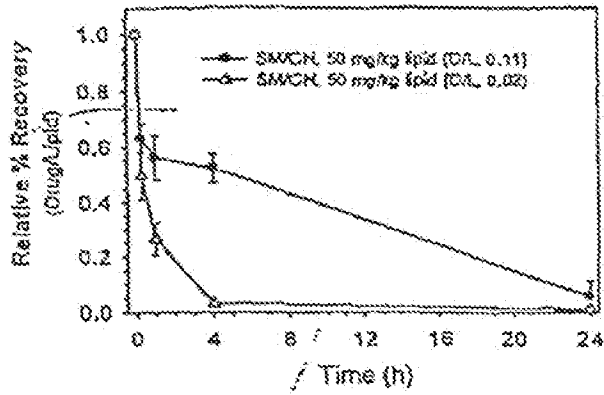


Fig. 7A

Topotecan Recovery in Plasma

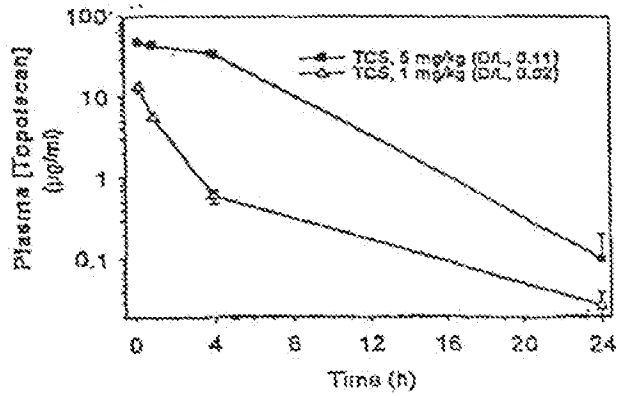


Fig. 7B



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101878229 A

(43) 申请公布日 2010. 11. 03

(21) 申请号 200880118058. 9

*A61P 35/00* (2006. 01)

(22) 申请日 2008. 09. 26

*A61K 31/704* (2006. 01)

(30) 优先权数据

07019161. 4 2007. 09. 28 EP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 05. 27

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2008/062958 2008. 09. 26

(87) PCT申请的公布数据

W02009/040426 EN 2009. 04. 02

(71) 申请人 巴塞尔大学医院

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 C·罗赫利茨 C·马莫特

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 胡志君

(51) Int. Cl.

*C07K 16/28* (2006. 01)

*A61K 39/395* (2006. 01)

权利要求书 4 页 说明书 42 页

(54) 发明名称

用于治疗癌症的免疫脂质体

(57) 摘要

本发明涉及用于多重治疗罹患癌症、特别地由局部推进的或转移性肿瘤所代表癌症的人患者的免疫脂质体,并涉及在所述方法中使用的组合物。本发明还涉及免疫脂质体用于在癌症疗法中治疗多药抗性的用途。

1. 免疫脂质体,其包含识别并结合至实体瘤表面上的 EGF 受体抗原的抗体或抗体片段并且还在脂质体中封装了抗肿瘤化合物,用于多线治疗临床设立的人患者中的癌症,特别地由局部推进的或转移性肿瘤所代表的癌症。

2. 根据权利要求 1 的免疫脂质体,其中所述肿瘤是 EGFR 阳性肿瘤。

3. 根据权利要求 1 或 2 的免疫脂质体,其中脂质体封装了抑制细胞性化合物。

4. 根据前述权利要求任一项所述的免疫脂质体,其中抗肿瘤化合物是选自以下的化合物:道诺霉素、伊达比星、米托蒽醌、丝裂霉素、顺铂和其他铂类似物、长春新碱、表柔比星、阿克拉霉素、氨甲蝶呤、依托泊苷、多柔比星、阿糖胞苷、氟尿嘧啶和其他氟化嘧啶、嘌呤或核苷、尤其地吉西他滨、博来霉素、丝裂霉素、普卡霉素、放线菌素 D、环磷酰胺和其衍生物、噻替派、BCNU、紫杉醇、多西他赛和其他紫杉烷衍生物和分离物、喜树碱、多肽、核酸、具有硫代磷酸酯核苷酸间键的核酸、和具有聚酰胺核苷酸间键的核酸。

5. 根据权利要求 4 的免疫脂质体,其中细胞毒化合物是选自多柔比星、表柔比星和长春瑞滨的化合物。

6. 根据前述权利要求任一项所述的免疫脂质体,用于二线治疗人患者。

7. 根据前述权利要求任一项所述的免疫脂质体,用于三线治疗人患者。

8. 根据前述权利要求任一项所述的免疫脂质体,用于四线治疗人患者。

9. 根据前述权利要求任一项所述的免疫脂质体,用于五线治疗人患者。

10. 根据前述权利要求任一项所述的免疫脂质体,用于六线治疗人患者。

11. 根据前述权利要求任一项所述的免疫脂质体,用于七线治疗人患者。

12. 根据前述权利要求任一项所述的免疫脂质体,用于多线治疗已经接受、但不应答所有可使用的标准疗法的患者群体。

13. 根据前述权利要求任一项所述的免疫脂质体,其中肿瘤仍然正在进展。

14. 根据前述权利要求任一项所述的免疫脂质体,其中患者已经发展了多药抗性。

15. 根据前述权利要求任一项所述的免疫脂质体,其中治疗导致疾病的稳定化。

16. 根据前述权利要求任一项所述的免疫脂质体,其中治疗导致部分应答。

17. 根据前述权利要求任一项所述的免疫脂质体,其中治疗导致完全应答。

18. 根据前述权利要求任一项所述的免疫脂质体,其中治疗显示没有或基本上没有毒性副作用。

19. 根据前述权利要求任一项所述的免疫脂质体,其中治疗不显示皮肤毒性。

20. 根据前述权利要求任一项所述的免疫脂质体,其中治疗不显示掌跖红斑 (PPE = 手足综合征)。

21. 根据前述权利要求任一项所述的免疫脂质体,其中治疗在  $5\text{mg}/\text{m}^2$  和  $80\text{mg}/\text{m}^2$  之间的浓度显示没有或基本上没有毒性副作用。

22. 根据前述权利要求任一项所述的免疫脂质体,其中治疗在直到  $40\text{mg}/\text{m}^2$  的浓度显示没有或基本上没有毒性副作用。

23. 根据前述权利要求任一项所述的免疫脂质体,其中抗体或抗体片段共价地结合至脂质体膜。

24. 根据前述权利要求任一项所述的免疫脂质体,其中抗体共价地缀合至与脂质体锚接的接头分子的末端。

25. 根据前述权利要求任一项所述的免疫脂质体,其中接头分子是聚乙二醇。

26. 根据前述权利要求任一项所述的免疫脂质体,其中抗体是针对 EGF 受体的结合配体的胞外结构域的单克隆抗体。

27. 根据前述权利要求任一项所述的免疫脂质体,用于治疗临床设立的人患者中选自由卡波奇氏肉瘤、复发性卵巢癌、软组织肉瘤、神经胶质瘤、黑素瘤、间皮瘤、泌尿道移行细胞癌、子宫内膜癌、胰腺癌、小细胞和非小细胞肺癌、肝细胞癌、肾细胞癌、食管癌、结肠直肠癌、肛门癌、阴道癌、外阴癌、前列腺癌、皮肤的基底细胞癌、头颈癌和胆管癌组成的组中的癌症,所述癌症特别地由局部推进的或转移性肿瘤、特别地 EGFR 阳性肿瘤代表。

28. 根据前述权利要求任一项所述的免疫脂质体,用于治疗临床设立的人患者中选自由前列腺癌、胰腺癌、肾癌、膀胱上皮癌、食管癌、头颈癌、结肠直肠癌、肝细胞癌和间皮瘤组成的组中的癌症,所述癌症特别地由局部推进的或转移性肿瘤、特别地 EGFR 阳性肿瘤代表。

29. 根据前述权利要求任一项所述的免疫脂质体,用于多线治疗临床设立的人患者中的癌症,其中所述患者罹患前列腺癌,具有在激素和 / 或多西他赛和 / 或米托蒽醌治疗下已经进展的肿瘤。

30. 根据前述权利要求任一项所述的免疫脂质体,用于多线治疗临床设立的人患者中的癌症,其中所述患者罹患胰腺癌,具有在吉西他滨和 / 或卡培他滨和 / 或奥沙利铂治疗下已经进展的肿瘤。

31. 根据前述权利要求任一项所述的免疫脂质体,用于多线治疗临床设立的人患者中的癌症,其中所述患者罹患肾癌,具有在干扰素和 / 或卡培他滨和 / 或舒尼替尼和 / 或索拉菲尼治疗下已经进展的肿瘤。

32. 根据前述权利要求任一项所述的免疫脂质体,用于多线治疗临床设立的人患者中的癌症,其中所述患者罹患食管癌,具有在顺铂和 / 或 5-FU 和 / 或多西他赛和 / 或西妥昔单抗治疗下已经进展的肿瘤。

33. 根据前述权利要求任一项所述的免疫脂质体,用于多线治疗临床设立的人患者中的癌症,其中所述患者罹患结肠癌和 / 或直肠癌,具有在西妥昔单抗和 / 或贝伐单抗和 / 或奥沙利铂和 / 或伊立替康和 / 或卡培他滨和 / 或 5-FU 治疗下已经进展的肿瘤。

34. 根据前述权利要求任一项所述的免疫脂质体,用于多线治疗临床设立的人患者中的癌症,其中所述患者罹患膀胱上皮癌,具有在顺铂或卡铂和 / 或吉西他滨和 / 或多柔比星和 / 或氨甲蝶呤和 / 或长春新碱治疗下已经进展的肿瘤。

35. 根据前述权利要求任一项所述的免疫脂质体,用于多线治疗临床设立的人患者中的癌症,其中所述患者罹患间皮瘤,具有在顺铂或卡铂和 / 或吉西他滨和 / 或培美曲塞治疗下已经进展的肿瘤。

36. 根据前述权利要求任一项所述的免疫脂质体,用于多线治疗临床设立的人患者中的癌症,其中所述患者罹患肝细胞癌,具有在舒尼替尼和 / 或索拉非尼治疗下已经进展的肿瘤。

37. 根据前述权利要求任一项所述的免疫脂质体,用于治疗临床设立的患有癌症、特别地患有由局部推进的或转移性肿瘤所代表的癌症的人患者,其中实现 5% 和 95% 之间的应答率。



38. 药物组合物,其包含根据前述权利要求任一项所述的免疫脂质体和可药用载体或赋形剂或稀释剂,用于一线至多线治疗、特别地用于二线、特别地三线、特别地四线、特别地五线、特别地六线、特别地七线和更高线治疗临床设立的人患者中的癌症、特别地由局部推进的或转移性肿瘤、特别地 EGFR 阳性肿瘤所代表的癌症。

39. 一线至多线治疗、特别地二线、特别地三线、特别地四线、特别地五线、特别地六线、特别地七线和更高线治疗临床设立的人患者中的癌症、特别地由局部推进的或转移性肿瘤、特别地 EGFR 阳性肿瘤所代表的癌症的方法,所述方法通过施用根据前述权利要求任一项所述的免疫脂质体或药物组合物至所述人患者而实施。

40. 治疗患有癌症、特别地由局部推进的或转移性肿瘤、特别地 EGFR 阳性肿瘤所代表的癌症并且未经历过化学疗法的人患者、特别地治疗已经接受过、但不应答至少一种标准疗法、特别地至少二种标准疗法、特别地至少三种标准疗法,但是尤其地不应答所有可使用的标准疗法的患者的方法,所述方法通过施用根据前述权利要求任一项所述的免疫脂质体或药物组合物至所述人患者而实施。

41. 使用根据前述权利要求任一项所述的免疫脂质体或药物组合物用来制备药物的方法,所述药物用于一线至多线治疗,特别地二线、特别地三线、特别地四线、特别地五线、特别地六线、特别地七线和更高线治疗临床设立的人患者中的癌症、特别地由局部推进的或转移性肿瘤、特别地 EGFR 阳性肿瘤所代表的癌症。

42. 使用根据前述权利要求任一项所述的免疫脂质体或药物组合物用来制备药物的方法,所述药物用于治疗患有癌症、特别地由局部推进的或转移性肿瘤、特别地 EGFR 阳性肿瘤所代表的癌症并且未经历过化学疗法的人患者、特别地治疗已经接受过、但不应答至少一种标准疗法、特别地至少二种标准疗法、特别地至少三种标准疗法,但是尤其地不应答所有可使用的标准疗法的患者。

43. 免疫脂质体,其包含识别并结合至实体瘤表面上的 EGF 受体抗原的抗体或抗体片段并且还在脂质体中封装了抗肿瘤化合物,用于治疗已经显现多药抗性的患者或患者群体中的多药抗性。

44. 药物组合物,其包含根据前述权利要求任一项所述的免疫脂质体和可药用载体或赋形剂或稀释剂,用于治疗已经显现多药抗性的患者或患者群体中的癌症。

45. 根据权利要求 44 的药物组合物,用于治疗乳腺癌。

46. 根据权利要求 44 的药物组合物,用于治疗结肠直肠癌。

47. 根据权利要求 44 的药物组合物,其中所述的多药抗性包含选自以下药物组成的组中的一种或多种抗癌药物:多西他赛、米托蒽醌、吉西他滨、卡培他滨、奥沙利铂、干扰素、舒尼替尼、索拉菲尼、顺铂或卡铂、多柔比星、氨甲蝶呤、长春新碱、长春瑞滨、培美曲塞、吉非替尼、依托泊苷、伊立替康、环磷酰胺、托泊替康、环磷酰胺、紫杉醇、丝裂霉素、贝伐单抗、曲妥珠单抗、5-FU、西妥昔单抗、替莫唑胺、贝伐单抗、丙卡巴肼、CCNU 和 BCNU。

48. 根据权利要求 47 的药物组合物,其中所述的多药抗性包含选自以下药物组成的组中的一种或多种抗癌药物:多西他赛、米托蒽醌、吉西他滨、卡培他滨、奥沙利铂、舒尼替尼、索拉菲尼、顺铂、5-FU、西妥昔单抗、贝伐单抗、奥沙利铂和伊立替康。

49. 药物组合物,其包含根据前述权利要求任一项所述的免疫脂质体,其中所述的免疫脂质体封装了多柔比星并且还包含抗体 MAb C225 或抗体 EMD72000 或其片段,其仍显示所

述抗体之一者或两者的特异结合特性。

## 用于治疗癌症的免疫脂质体

[0001] 本发明属于癌症治疗领域。特别地,本发明涉及用于一线和更高线治疗罹患癌症、特别地由局部推进的或转移性肿瘤所代表的癌症的人患者并涉及在所述方法中使用的组合物。

[0002] 表皮生长因子受体 (EGFR) 是 ErbB 家族的酪氨酸激酶受体,所述酪氨酸激酶受体在许多上皮肿瘤中被异常激活。受体激活导致几种下游胞内底物的召集和磷酸化,这导致促有丝分裂信号传导和其他促进肿瘤的细胞活性。在人肿瘤中,受体过量表达与更侵入性的临床过程相关 (1,2)。针对结合配体的胞外结构域的单克隆抗体和受体酪氨酸激酶的低分子量抑制剂目前处于临床开发的高级阶段。

[0003] 在可获得的抗 EGFR 单抗当中,最充分表征的一种单抗是嵌合的人:小鼠 MAbs 西妥昔单抗。西妥昔单抗是具有活跃的自分泌 EGFR 回路的培养癌细胞的生长的强力抑制剂。现在已经完成单独或者与化学疗法或放射疗法联合给予的一系列西妥昔单抗 I 期、II 期和 III 期研究。发现西妥昔单抗是安全的,但是它显示一些副作用,包括在多达 40-70% 全部治疗患者中的痤疮样皮疹和 2% 患者中发生的过敏样或过敏反应。在 4% 患者中检测到针对嵌合抗体的非中和性人抗体。发现如通过抗体清除率的饱和和作用所确定的最佳生物学剂量是在每周 200 至 400mg/m<sup>2</sup> 的范围内 (3)。西妥昔单抗目前在许多国家被视为患有结肠直肠癌的患者和头颈肿瘤中的标准疗法的部分。

[0004] 多柔比星是最广泛使用的用于治疗实体瘤和血液恶性病的抗癌药之一。它有效对抗多种癌症类型,并广泛用作单一药物或用于联合化疗方案中。除在治疗乳腺癌中的重要地位之外,多柔比星还在卵巢癌、子宫颈癌、子宫内膜癌、胃癌、膀胱癌和小细胞肺癌、子宫肉瘤、急性成淋巴细胞白血病、霍奇金和非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤和软组织及骨肉瘤中显示抗肿瘤活性。尽管多柔比星展示了优异的抗肿瘤活性谱,然而它在临床实践中的使用受到药物相关毒性、特别地骨髓抑制和心脏毒性限制 (援引: "Principals and Practice of Oncology, DeVita, 第 6 版")。

[0005] 利用多柔比星的脂质体封装来改变该药物的组织分布和药物代谢动力学并提高其治疗指数。聚乙二醇化的脂质体多柔比星 (DOXYL, OrthoBiotech Products LP, Bridgewater, NJ; CAELYX, Schering Plough, Kenilworth, NJ) 是多柔比星的一种新制剂。聚乙二醇化保护脂质体免遭单核吞噬细胞系统探测并增加循环时间,从而允许更多地定向递送多柔比星至肿瘤细胞。

[0006] 聚乙二醇化的脂质体多柔比星已经作为单一药物在患有转移性或复发性乳腺癌的患者中显示效力,客观应答率范围是 9% 至 33% (4,5)。与常规多柔比星相比,聚乙二醇化的脂质体多柔比星具有相似的效力谱和改善的安全性谱,伴以明显降低的心脏毒性发生率和明显更少的心脏事件,以及降低的骨髓抑制、粘膜炎、恶心、呕吐和脱发的发生率。

[0007] 另一方面,聚乙二醇化的脂质体多柔比星与掌跖红斑 (PPE = 手足综合征) 相关,其中所述掌跖红斑是用游离多柔比星时很少或从未见到的一种毒性。

[0008] 除在乳腺癌中使用外,脂质体多柔比星在治疗卡波奇氏肉瘤 (6,7) 和复发性卵巢癌 (8) 中发挥充分确立的作用,并且还成功地用于患有不同类型的淋巴瘤、多发性骨髓瘤、

软组织肉瘤、神经胶质瘤、黑素瘤、间皮瘤、泌尿道移行细胞癌和用在子宫内膜癌、胰腺癌、胃癌、小细胞及非小细胞肺癌、肝细胞癌、子宫内膜癌、肾细胞癌、头颈癌和胆管癌的患者中（在（9）中综述）。

[0009] 对于临床前研究，通过使用与脂质体膜共价缀合的嵌合 MAb 西妥昔单抗（C225，西妥昔单抗，爱必妥，ImClone Systems 公司，纽约，美国；Merck KGaA，达姆施塔特，德国）Fab' 片段构建了抗 EGFR 免疫脂质体。设计该方法旨在通过导向受体和内化性药物载体提供最大药物递送至癌细胞，其中所述的导向受体和内化性药物载体稳定、无免疫原性、长寿命、具有延长的血液及组织驻留时间并且能够递送大的有效荷载的多样类型药物。在优化 MAb 片段的同时，也优化了缀合方法学。开发了一种新的胶束掺入方法，包括 2 步骤缀合 MAb 片段至预制的载药脂质体（10）。首先，将 MAb 片段（Fab'）共价地缀合至溶液中的衍生化 PEG-磷脂酰乙醇胺（MAL-PEG-DSPE）接头，产生易于自发形成胶束的免疫缀合物。接下来，所述缀合物通过受控加热法掺入预载药物的脂质体，从而产生与 PEG 链的末端共价缀合并与脂质体锚接的 MAb 片段。

[0010] 当 C225 的 Fab' 仅以中等密度（每个脂质体 30 个 Fab'）在免疫脂质体上存在时，这些免疫脂质体在一系列过量表达 EGFR 或 EGFRvIII 的癌细胞系中显示极有效的结合和内化，如荧光显微镜法和 FACS 所示（11）。这些癌细胞系包括表皮样癌细胞（A431）、乳腺癌细胞（MDA-MB-468）、恶性神经胶质瘤细胞（U87）和 EGFRvIII 稳定转化体 NR6-M 细胞。相反，无关的免疫脂质体（抗-HER2）和对照脂质体（无 MAb）不结合或聚积于 A431、MDA-MB468、U87 或 NR6-M 细胞中。另外，抗 EGFR 免疫脂质体不可检测地结合至非过量表达 EGFR 的细胞（乳腺癌细胞系 SKBR-3 或 MCF-7）或聚积于其中。

[0011] 在体外条件下，使用载有 pH 敏感探针（HPTS）的抗 EGFR 免疫脂质体进行免疫脂质体摄取、内化和胞内药物递送的定量研究。这种方法允许定量分析在中性 pH（表面结合）与酸性 pH（内吞相关）下的免疫脂质体摄取的动力学（12）。在 MDA-MB-468 细胞中，抗 EGFR 免疫脂质体在 5 分钟内结合，随后在 15 分钟处开始胞内聚积并升高直至 240 分钟。以饱和浓度存在时，靶向 EGFR 的免疫脂质体在 MDA-MB-468 细胞中的总摄取量是 1.70 fmol 磷脂 / 细胞，这对应于 13,000 个脂质体 / 细胞的摄取量。非靶向的脂质体在 MDA-MB-468 细胞中的摄取量是小于 300 个脂质体 / 细胞，显示因定向递送所致的大于 43 倍增加。抗 EGFR 免疫脂质体在非过量表达 EGFR 的 MCF-7 细胞中的摄取量是 450 个 ILs / 细胞，显示过量表达 EGFR 的 MDA-MB468 细胞中 28 倍更多的积累。

[0012] 在体内，抗 EGFR 免疫脂质体（ILs）在单次静脉内给药后显示作为稳定构建体在正常成年大鼠中的极长循环，同时具有与那些立体稳定的（“隐形（stealth）”）的脂质体不可区分的药物代谢动力学（13）。另外，重复施用显示清除率不升高，这进一步证实免疫脂质体保留作为隐形脂质体特征的长循环作用和非免疫原性。在一系列肿瘤异种移植模型（MDA-MB-468、U-87 和 U-87vIII）中评价了载有多种抗癌药的抗 EGFR 免疫脂质体（C225-ILs-dox）的潜在治疗效力（13）。

[0013] 仍未显示抗 EGFR 免疫脂质体系统（ILs）用于临床环境中治疗人的可行性。在这方面的一个主要顾虑涉及抗 EGFR 免疫脂质体（例如以脂质体方式封装的多柔比星（Doxil，Caelyx））的已知毒性。这里，最明显的毒性副作用是掌跖红斑（PPE = 手足综合征），其中可以在作为例行肿瘤学实践中标准的每隔 4 周短时输注形式的 40-50mg/m<sup>2</sup> 剂量观察到所

述的掌跖红斑。类似地,抗 EGFR 抗体如西妥昔单抗的重大副作用是皮肤毒性,通常表现为面部和躯干的痤疮样疹。此种副作用可能是表皮以相对高的水平表达 EGFR 这一事实的后果。因而,临床环境中使用抗 EGFR 免疫脂质体的一个主要安全顾虑是借助抗 EGFR 抗体例如西妥昔单抗引导所述脂质体至过量表达 EGFR 的细胞也可能增加该药物的皮肤毒性。

[0014] 另外,仍然未显示并且极其不可预测的是封装化疗药物例如多柔比星、长春瑞滨(vinorelbine)或氨甲蝶呤(methotrexate)的抗 EGFR 免疫脂质体(ILS)是否可以治疗性地用于已经接受、但不应答一种或多种标准疗法(一线、二线、三线等)患者群体即非应答者群体中。

[0015] 多线治疗中所观察到应答缺乏的可能原因之一是癌细胞多药抗性的发展。

[0016] 抗药性仍然是癌症治疗中的主要挑战。内因性或获得性抗药性在大部分癌症中频繁出现并且经常同时涉及对多种药物抵抗(多药抗性,MDR)。已经对抗药性描述了许多机制。这些机制包括:药物输出泵(如P-糖蛋白(PGP)和多药抗性蛋白(MRP))过量表达;药物摄取减少,如叶酸载体改变;药物失活,如借助谷胱甘肽介导的还原作用;靶酶过量表达,如胸苷酸合酶上调;药物靶(如拓扑异构酶II)的改变;DNA修复能力提高;发生凋亡的能力降低和其他机制(在(30)和(31)中综述)。在这些机制当中,PGP在多药抗性中的作用已经成为最深入研究的对象之一。由MDR1基因编码的PGP是ABC(ATP结合盒)转运蛋白家族的成员并且频繁地在MDR表型中过量表达。能够介导药物排出的其他膜结合型转运蛋白包括多药抗性蛋白MRP和其他相关蛋白((32)、(33)和(34))。这些蛋白质主动地转运多种杂环底物(包括细胞毒药物如蒽环类药、长春碱类、米托蒽醌、紫杉醇和其他药物)离开细胞或进入其他细胞区室((32)、(33)和(34))。

[0017] 这些抗药性机制的特异性抑制剂已经广泛地用作恢复药物敏感性的手段(综述,见(35))。尽管仍在积极研究中,但抗药性特异抑制剂仍没有获得临床用途的注册。治疗成功的进展受阻于此类事项,如特异性不充分、可预测的和不可预见的毒性、不确定已知抗药性机制的真实普遍性和贡献、缺乏鉴定依赖特定机制的肿瘤的预测性测定法和抗药性机制的多样性和冗余性((35))。

[0018] 因而需要提供备选策略以安全地治疗性治疗已经显现癌症的患者、特别地属于非应答者群体的患者,即不应答或不再应答常规癌症化学疗法的患者。特别地,需要提供备选策略以克服癌疗法中的内在性或获得性抗药性。

[0019] 能够在本发明的范围内通过提供基于药物递送系统的治疗方法满足这种提供备选策略的需要,其中所述的药物递送系统包含靶向EGFR的免疫脂质体,所述免疫脂质体在过量表达EGFR的细胞的细胞浆中显示广泛内化(多达30,000个ILs/细胞),但在非过量表达的细胞中不显示内化,并且当封装几种化疗药物(多柔比星、长春瑞滨和氨甲蝶呤)之任一种药物时还显示突出的细胞毒性。

[0020] 现在已经在本发明的范围内惊讶地发现在临床设立的施用抗EGFR免疫脂质体、特别地包含几种化疗药物例如多柔比星、长春瑞滨或氨甲蝶呤之任一种药物的免疫脂质体至罹患癌症、特别地由局部推进的或转移性肿瘤、特别地EGFR阳性肿瘤所代表的癌症并且未经历过化学疗法的人患者,并且特别地施用至已经接受过,但不应答或停止应答至少一种标准疗法(一线)、特别地至少二种标准疗法(二线)、特别地至少三种标准疗法(三线),不过尤其地不应答或停止应答全部可用的标准疗法(多线)的患者,不仅引起该疾病稳定

化、特别地引起部分应答、但是尤其地引起完全应答，而且显示没有或基本上没有副作用、特别地显示没有或基本上没有掌跖红斑（PPE = 手足综合征）和 / 或皮肤毒性。

[0021] 在一个实施方案中，提供了根据本发明和如本文中先前所述的包含识别并与实体瘤表面上的 EGF 受体抗原结合的抗体或抗体片段的免疫脂质体，用于一线至多线治疗临床设立的人患者中的癌症、特别地由局部推进的或转移性肿瘤、特别地 EGFR 阳性肿瘤所代表的癌症。

[0022] 在一个实施方案中，本发明涉及根据本发明和如本文中先前所述的包含识别并与实体瘤表面上的 EGF 受体抗原结合的抗体或抗体片段的免疫脂质体，其用于二线治疗临床设立的人患者中的癌症、特别地由局部推进的或转移性肿瘤、特别地 EGFR 阳性肿瘤所代表的癌症。

[0023] 在一个实施方案中，本发明涉及根据本发明和如本文中先前所述的包含识别并与实体瘤表面上的 EGF 受体抗原结合的抗体或抗体片段的免疫脂质体，其用于三线治疗临床设立的人患者中的癌症、特别地由局部推进的或转移性肿瘤、特别地 EGFR 阳性肿瘤所代表的癌症。

[0024] 在一个实施方案中，本发明涉及根据本发明和如本文中先前所述的包含识别并与实体瘤表面上的 EGF 受体抗原结合的抗体或抗体片段的免疫脂质体，其用于四线治疗临床设立的人患者中的癌症、特别地由局部推进的或转移性肿瘤、特别地 EGFR 阳性肿瘤所代表的癌症。

[0025] 在一个实施方案中，本发明涉及根据本发明和如本文中先前所述的包含识别并与实体瘤表面上的 EGF 受体抗原结合的抗体或抗体片段的免疫脂质体，其用于五线治疗临床设立的人患者中的癌症、特别地由局部推进的或转移性肿瘤、特别地 EGFR 阳性肿瘤所代表的癌症。

[0026] 在一个实施方案中，本发明涉及根据本发明和如本文中先前所述的包含识别并与实体瘤表面上的 EGF 受体抗原结合的抗体或抗体片段的免疫脂质体，其用于六线治疗临床设立的人患者中的癌症、特别地由局部推进的或转移性肿瘤、特别地 EGFR 阳性肿瘤所代表的癌症。

[0027] 在一个实施方案中，本发明涉及根据本发明和如本文中先前所述的包含识别并与实体瘤表面上的 EGF 受体抗原结合的抗体或抗体片段的免疫脂质体，其用于七线和更高线治疗临床设立的人患者中的癌症、特别地由局部推进的或转移性肿瘤、特别地 EGFR 阳性肿瘤所代表的癌症。

[0028] 在一个实施方案中，本发明涉及根据本发明和如本文中先前所述的包含识别并与实体瘤表面上的 EGF 受体抗原结合的抗体或抗体片段的免疫脂质体，其用于治疗、特别地用于多线治疗罹患癌症、特别地由局部推进的或转移性肿瘤、特别地 EGFR 阳性肿瘤所代表的癌症并且未经历过化学疗法的人患者、特别地是已经接受过、但不应答至少一种标准疗法、特别地至少二种标准疗法、特别地至少三种标准疗法，但是尤其地不应答所有可使用的标准疗法的患者。

[0029] 在一个实施方案中，本发明涉及根据本发明和如本文中先前所述的免疫脂质体，其用于治疗、特别地用于多线治疗具有如本文中先前所述的局部推进的或转移性肿瘤的人患者，其中所述的肿瘤仍然正在进展。

[0030] 在一个实施方案中,提供了根据本发明和如本文中先前所述的免疫脂质体用于治疗、特别地用于多线治疗患有癌症、特别地由如本文中先前所述的局部推进的或转移性肿瘤所代表癌症的人患者,其中脂质体封装了抗癌化合物,特别地抑制细胞性化合物,特别地封装选自以下的化合物:道诺霉素、伊达比星、米托蒽醌、丝裂霉素、顺铂和其他铂类似物、长春新碱、表柔比星、阿克拉霉素、氨甲蝶呤、依托泊苷、多柔比星、表柔比星、长春瑞滨、阿糖胞苷、氟尿嘧啶和其他氟化嘧啶、嘌呤或核苷、尤其地吉西他滨、博来霉素、丝裂霉素、普卡霉素、放线菌素 D、环磷酰胺和其衍生物、噻替派、卡芥氮、紫杉醇、多西他赛和其他紫杉烷衍生物和分离物、喜树碱、多肽、核酸、具有硫代磷酸酯核苷酸间键的核酸和具有聚酰胺核苷酸间键的核酸,但是尤其地封装选自多柔比星、表柔比星和长春瑞滨的化合物,特别地封装多柔比星。

[0031] 在一个实施方案中,本发明涉及根据本发明和如本文中先前所述的免疫脂质体,其用于治疗、特别地用于多线治疗患有癌症、特别地由如本文中先前所述的局部推进的或转移性肿瘤所代表癌症的人患者,其中该患者的非应答性由多药抗性机制引起。

[0032] 在一个实施方案中,本发明涉及根据本发明和如本文中先前所述的免疫脂质体,其用于治疗、特别地用于多线治疗人患者,所述的人患者患有癌症、特别地由如本文中先前所述的局部推进的或转移性肿瘤所代表的癌症并且已经显现多药抗性。

[0033] 在一个实施方案中,提供了根据本发明和如本文中先前所述的用于治疗、特别地用于多线治疗人患者的免疫脂质体,所述人患者属于患有癌症、特别地由如本文中先前所述的局部推进的或转移性肿瘤所代表癌症的非应答者群体,特别地属于已经显现多药抗性的患者,其中所述免疫脂质体具有标准 MTT 测定法中所确定的在  $1.0 \mu\text{g/ml}$  与  $5.0 \mu\text{g/ml}$  之间、特别地  $0.8 \mu\text{g/ml}$  与  $3.5 \mu\text{g/ml}$  之间、特别地  $0.7 \mu\text{g/ml}$  与  $2.5 \mu\text{g/ml}$  之间、特别地  $0.6 \mu\text{g/ml}$  与  $2.0 \mu\text{g/ml}$  之间、特别地  $0.5 \mu\text{g/ml}$  与  $1.5 \mu\text{g/ml}$  之间、特别地  $0.4 \mu\text{g/ml}$  与  $1.0 \mu\text{g/ml}$  之间、特别地  $0.3 \mu\text{g/ml}$  与  $0.5 \mu\text{g/ml}$  之间、特别地  $0.2 \mu\text{g/ml}$  与  $0.4 \mu\text{g/ml}$  之间的  $\text{IC}_{50}$ 。该免疫脂质体特别地是包含多柔比星的免疫脂质体。

[0034] 在本发明的一个实施方案中,提供了根据本发明和如本文中先前所述的用于治疗、特别地用于多线治疗人患者的免疫脂质体,所述人患者属于患有癌症、特别地由如本文中先前所述的局部推进的或转移性肿瘤所代表癌症的非应答者群体,特别地属于已经显现多药抗性的患者,其中所述免疫脂质体具有比游离抗癌药的细胞毒性在 3 倍至 5 倍之间、在 5 倍至 20 倍之间、在 10 倍至 30 倍之间、在 15 倍至 40 倍之间、在 20 倍至 50 倍之间、在 25 倍至 60 倍之间、在 30 倍至 70 倍之间、在 35 倍至 80 倍之间、在 40 倍至 90 倍之间、在 50 倍至 100 倍之间更高、在 80 倍至 150 倍之间、在 120 倍至 250 倍之间更高的细胞毒性。

[0035] 在本发明的一个实施方案中,提供了用于治疗、特别地用于多线治疗人患者的免疫脂质体,所述人患者患有癌症、特别地由如本文中先前所述的局部推进的或转移性肿瘤、特别地 EGFR 阳性肿瘤所代表的癌症,其中所述的治疗引起疾病稳定化,特别地引起部分应答,但是尤其地特别引起完全应答。

[0036] 在本发明的一个实施方案中,抗 EGFR 免疫脂质体以  $10\text{mg/m}^2$  和  $40\text{mg/m}^2$  身体表面、特别地  $30\text{mg/m}^2$  与  $50\text{mg/m}^2$  之间、特别地  $40\text{mg/m}^2$  与  $60\text{mg/m}^2$  之间、特别地  $50\text{mg/m}^2$  与  $70\text{mg/m}^2$  之间、特别地  $60\text{mg/m}^2$  与  $80\text{mg/m}^2$  之间、特别地  $70\text{mg/m}^2$  与  $90\text{mg/m}^2$  之间、特别地  $75\text{mg/m}^2$  与  $100\text{mg/m}^2$  的剂量水平给予,作为短时输注每隔 2 至 6 周,特别地每隔 3 至 5 周,但是特别

地每隔 4 周给予。短时输注为至少 10 分钟、特别地至少 20 分钟、特别地至少 30 分钟、特别地至少 40 分钟、特别地至少 60 分钟、特别地至少 90 分钟、特别地至少 120 分钟、特别地至少 240 分钟的输注时间。

[0037] 在一个实施方案中,本发明涉及如本文中先前所述的用于治疗、特别地用于多线治疗人患者的免疫脂质体,所述人患者罹患癌症、特别地由局部推进的或转移性肿瘤、特别地 EGFR 阳性肿瘤所代表的癌症,其中所述的治疗显示没有或基本上没有毒性副作用,特别地显示没有或基本上没有掌跖红斑 (PPE = 手足综合征) 和 / 或皮肤毒性。

[0038] 在一个实施方案中,本发明涉及如本文中先前所述的用于治疗、特别地用于多线治疗人患者的免疫脂质体,特别地包含多柔比星化合物的免疫脂质体,所述人患者罹患癌症、特别地由局部推进的或转移性肿瘤、特别地 EGFR 阳性肿瘤所代表的癌症,其中所述的治疗在  $5\text{mg}/\text{m}^2$  与  $20\text{mg}/\text{m}^2$  身体表面之间、特别地  $10\text{mg}/\text{m}^2$  与  $40\text{mg}/\text{m}^2$  之间、特别地  $30\text{mg}/\text{m}^2$  与  $50\text{mg}/\text{m}^2$  之间、特别地  $40\text{mg}/\text{m}^2$  与  $60\text{mg}/\text{m}^2$  之间、特别地  $50\text{mg}/\text{m}^2$  与  $70\text{mg}/\text{m}^2$  之间、特别地  $60\text{mg}/\text{m}^2$  与  $80\text{mg}/\text{m}^2$  之间、特别地  $70\text{mg}/\text{m}^2$  与  $90\text{mg}/\text{m}^2$  之间、特别地  $75\text{mg}/\text{m}^2$  与  $100\text{mg}/\text{m}^2$  之间的免疫脂质体浓度上显示没有或基本上没有毒性副作用,特别地显示没有或基本上没有掌跖红斑 (PPE = 手足综合征) 和 / 或皮肤毒性。

[0039] 在本发明的一个实施方案中,提供了用于治疗、特别地用于多线治疗人患者的免疫脂质体,所述人患者患有癌症、特别地由如本文中先前所述的局部推进的或转移性肿瘤所代表的癌症,其中抗体或抗体片段共价地结合至脂质体膜,特别地共价地缀合至与脂质体锚接的接头分子的末端。接头分子特别地是亲水聚合物,但尤其地是聚乙二醇。

[0040] 在本发明的一个实施方案中,根据本发明和如本文中所述的免疫脂质体包含针对 EGF 受体的结合配体的胞外结构域的单克隆抗体、特别地嵌合抗体例如嵌合 MAbs C225 或人源化抗体例如人源化 MAbs EMD72000,其中提供所述的免疫脂质体用于治疗、特别地用于多线治疗患有癌症、特别地由如本文中先前所述的局部推进的或转移性肿瘤所代表癌症的人患者。

[0041] 在一个实施方案中,提供了根据本发明和如本文中先前所述的免疫脂质体或包含所述免疫脂质体的药物组合物,其中待治疗的癌症是乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫内膜癌、胃癌、膀胱癌、子宫肉瘤、多发性骨髓瘤和软组织及骨肉瘤。

[0042] 在一个实施方案中,提供了根据本发明和如本文中先前所述的用于治疗,特别地用于多线治疗临床设立的人患者的免疫脂质体,其中所述患者罹患选自卡波奇氏肉瘤、复发性卵巢癌、软组织肉瘤、神经胶质瘤、黑素瘤、间皮瘤、泌尿道移行细胞癌、子宫内膜癌、胰腺癌、小细胞及非小细胞肺癌、肝细胞癌、肾细胞癌、食管癌、结肠直肠癌、肛门癌、阴道癌、外阴癌、前列腺癌、皮肤的基底细胞癌、头颈癌和胆管癌的癌症,所述癌症特别地由局部推进的或转移性肿瘤、特别地 EGFR 阳性肿瘤代表。

[0043] 在一个实施方案中,提供了根据本发明和如本文中先前所述的免疫脂质体或包含所述免疫脂质体的药物组合物用于治疗,特别地用于多线治疗临床设立的的人患者,其中所述的患者罹患选自前列腺癌、胰腺癌、肾癌、食管癌、结肠癌和直肠癌的癌症,所述癌症特别地由局部推进的或转移性肿瘤、特别地 EGFR 阳性肿瘤代表。

[0044] 在一个实施方案中,提供了根据本发明和如本文中先前所述的免疫脂质体或包含所述免疫脂质体的药物组合用于多线治疗、特别地二线、特别地三线、特别地四线治疗临床



设立的的人患者,其中所述的患者罹患前列腺癌,具有在激素和 / 或多西他赛和 / 或米托蒽醌治疗下已经进展的肿瘤。

[0045] 在一个实施方案中,提供了根据本发明和如本文中先前所述的免疫脂质体或包含所述免疫脂质体的药物组合物用于多线治疗、特别地用于二线、特别地三线、特别地四线治疗临床设立的的人患者,其中所述的患者罹患胰腺癌或胆囊癌,具有在吉西他滨和 / 或卡培他滨和 / 或奥沙利铂治疗下已经进展的肿瘤。

[0046] 在一个实施方案中,提供了根据本发明和如本文中先前所述的免疫脂质体或包含所述免疫脂质体的药物组合物用于多线治疗、特别地用于二线、特别地三线、特别地四线、特别地五线治疗临床设立的的人患者,其中所述的患者罹患肾癌,具有在干扰素和 / 或卡培他滨和 / 或舒尼替尼和 / 或索拉菲尼治疗下已经进展的肿瘤。

[0047] 在一个实施方案中,提供了根据本发明和如本文中先前所述的免疫脂质体或包含所述免疫脂质体的药物组合物用于多线治疗、特别地用于二线、特别地三线、特别地四线、特别地五线治疗临床设立的的人患者,其中所述的患者罹患膀胱上皮癌,具有在顺铂或卡铂和 / 或吉西他滨和 / 或多柔比星和 / 或氨甲蝶呤和 / 或长春新碱治疗下已经进展的肿瘤。

[0048] 在一个实施方案中,提供了根据本发明和如本文中先前所述的免疫脂质体或包含所述免疫脂质体的药物组合物用于多线治疗、特别地用于二线、特别地三线、特别地四线、特别地五线治疗临床设立的的人患者,其中所述的患者罹患非小细胞肺癌,具有在顺铂或卡铂和 / 或吉西他滨和 / 或长春瑞滨和 / 或培美曲塞和 / 或多西他赛和 / 或吉非替尼治疗下已经进展的肿瘤。

[0049] 在一个实施方案中,提供了根据本发明和如本文中先前所述的免疫脂质体或包含所述免疫脂质体的药物组合物用于多线治疗、特别地用于二线、特别地三线、特别地四线、特别地五线治疗临床设立的的人患者,其中所述的患者罹患小细胞肺癌,具有在顺铂或卡铂和 / 或依托泊苷和 / 或伊立替康和 / 或多柔比星和 / 或长春新碱和 / 或环磷酰胺和 / 或托泊替康治疗下已经进展的肿瘤。

[0050] 在一个实施方案中,提供了根据本发明和如本文中先前所述的免疫脂质体或包含所述免疫脂质体的药物组合物用于多线治疗、特别地用于二线、特别地三线、特别地四线、特别地五线治疗临床设立的的人患者,其中所述的患者罹患间皮瘤,具有在顺铂或卡铂和 / 或吉西他滨和 / 或培美曲塞治疗下已经进展的肿瘤。

[0051] 在一个实施方案中,提供了根据本发明和如本文中先前所述的免疫脂质体或包含所述免疫脂质体的药物组合物用于多线治疗、特别地用于二线、特别地三线、特别地四线、特别地五线治疗临床设立的的人患者,其中所述的患者罹患乳腺癌,具有在顺铂或卡铂和 / 或多柔比星和 / 或长春新碱和 / 或环磷酰胺和 / 或紫杉醇和 / 或多西他赛和 / 或吉西他滨和 / 或长春瑞滨和 / 或卡培他滨和 / 或丝裂霉素和 / 或氨甲蝶呤和 / 或米托蒽醌和 / 或贝伐单抗和 / 或曲妥珠单抗下已经进展的肿瘤。

[0052] 在一个实施方案中,提供了根据本发明和如本文中先前所述的免疫脂质体或包含所述免疫脂质体的药物组合物用于多线治疗、特别地用于二线、特别地三线、特别地四线治疗临床设立的的人患者,其中所述的患者罹患食管癌,具有在顺铂和 / 或 5-FU 和 / 或多西他赛和 / 或西妥昔单抗治疗下已经进展的肿瘤。

[0053] 在一个实施方案中,提供了根据本发明和如本文中先前所述的免疫脂质体或包含

所述免疫脂质体的药物组合物用于多线治疗、特别地用于二线、特别地三线、特别地四线、特别地五线治疗临床设立的的人患者,其中所述的患者罹患在替莫唑胺和 / 或贝伐单抗和 / 或伊立替康和 / 或长春新碱和 / 或丙卡巴肼和 / 或 CCNU 和 / 或 BCNU 治疗下已经进展的脑肿瘤。

[0054] 在一个实施方案中,提供了根据本发明和如本文中先前所述的免疫脂质体或包含所述免疫脂质体的药物组合物用于多线治疗、特别地用于二线、特别地三线治疗临床设立的的人患者,其中所述的患者罹患肝细胞癌,具有在舒尼替尼和 / 或索拉非尼治疗下已经进展的肿瘤。

[0055] 在一个实施方案中,提供了根据本发明和如本文中先前所述的免疫脂质体或包含所述免疫脂质体的药物组合物用于多线治疗、特别地用于二线、特别地三线、特别地四线、特别地五线、特别地六线、特别地七线治疗临床设立的的人患者,其中所述的患者罹患结肠癌和 / 或直肠癌,具有在西妥昔单抗和 / 或贝伐单抗和 / 或奥沙利铂和 / 或伊立替康和 / 或卡培他滨和 / 或 5-FU 治疗下已经进展的肿瘤。

[0056] 在本发明的一个实施方案中,提供了用于治疗、特别地用于多线治疗患有癌症、特别地由如本文中先前所述的局部推进的或转移性肿瘤所代表癌症的人患者的免疫脂质体,其中实现在 5% 与 10% 之间、特别地 7% 与 15% 之间、特别地 9% 与 20% 之间、特别地 12% 与 25% 之间、特别地 18% 与 30% 之间、特别地 22% 与 35% 之间、特别地 28% 与 40% 之间、特别地 32% 与 45% 之间、特别地 38% 与 50% 之间、特别地 42% 与 55% 之间、特别地 48% 与 60% 之间、特别地 52% 与 60% 之间、特别地 52% 与 70% 之间、特别地 52% 与 75% 之间、特别地 58% 与 80% 之间、特别地 62% 与 85% 之间、特别地 68% 与 90% 之间、特别地 72% 与 95% 之间并且直至 100% 的应答率。

[0057] 在一个实施方案中,本发明涉及包含根据本发明和如本文中先前公开的免疫脂质体和可药用载体或赋形剂或稀释剂的药物组合物,其用于一线至多线治疗、特别地用于二线、特别地三线、特别地四线、特别地五线、特别地六线、特别地七线和更高线治疗临床设立的人患者、特别地属于非应答者群体的人患者、特别地属于非应答者群体的已经显现多药抗性的人患者中癌症、特别地由局部推进的或转移性肿瘤、特别地 EGFR 阳性肿瘤所代表的癌症。

[0058] 在一个实施方案中,本发明涉及一线至多线治疗、特别地二线、特别地三线、特别地四线、特别地五线、特别地六线、特别地七线和更高线治疗临床设立的人患者、特别地属于非应答者群体的人患者、特别地属于非应答者群体的已经显现多药抗性的人患者中癌症、特别地由局部推进的或转移性肿瘤、特别地 EGFR 阳性肿瘤所代表癌症的方法,所述方法为通过施用根据本发明和如本文中先前公开的免疫脂质体或药物组合物至所述的人患者。

[0059] 在一个实施方案中,本发明涉及用根据本发明和如本文中先前公开的免疫脂质体或药物组合物治疗患有癌症、特别地患有由局部推进的或转移性肿瘤、特别地 EGFR 阳性肿瘤所代表的癌症并且未经历过化学疗法的人患者、特别地治疗已经接受过、但不应答至少一种标准疗法、特别地至少二种标准疗法、特别地至少三种标准疗法,但是尤其地不应答所有可使用的标准疗法的患者的方法。

[0060] 特别地,本发明涉及治疗已经显现多药抗性人患者的方法。

[0061] 在一个实施方案中,本发明涉及使用根据本发明和如本文中先前公开的免疫脂质体或药物组合物以制备药物的方法,所述的药物用于一线至多线治疗、特别地二线、特别地三线、特别地四线、特别地五线、特别地六线、特别地七线和更高线治疗临床设立的人患者中、特别地属于非应答者群体的人患者中、特别地属于非应答者群体的已经显现多药抗性的人患者中癌症、特别地由局部推进的或转移性肿瘤、特别地 EGFR 阳性肿瘤所代表的癌症。

[0062] 在一个实施方案中,本发明涉及使用根据本发明和如本文中先前公开的免疫脂质体或药物组合物以制备药物的方法,其中所述药物用以治疗患有癌症、特别地由局部推进的或转移性肿瘤、特别地 EGFR 阳性肿瘤所代表的癌症并且未经历过化学疗法的人患者、特别地治疗已经接受过、但不应答至少一种标准疗法、特别地至少二种标准疗法、特别地至少三种标准疗法,但是特别地不应答所有可使用的标准疗法的患者。

[0063] 特别地,本发明涉及使用根据本发明和如本文中先前公开的免疫脂质体或药物组合物以制备药物的方法,其中所述药物用以治疗已经显现多药抗性的人患者。

[0064] 在一个实施方案中,提供了根据本发明和如本文中所述的包含识别并与实体瘤表面上的 EGF 受体抗原结合的抗体或抗体片段并且还在脂质体中封装抗肿瘤化合物的免疫脂质体或包含这种免疫脂质体的药物组合物,用于治疗已经显现多药抗性的患者或患者群体中的这种多药抗性。

[0065] 在一个实施方案中,本发明涉及包含根据本发明和如本文中所述的免疫脂质体和可药用载体或赋形剂或稀释剂的用于治疗患者或患者群体中癌症、特别地用于治疗乳腺癌或结肠直肠癌或这两种癌症的药物组合物,其中所述的患者或患者群体已经显现多药抗性、特别地显现针对用一种或多种抗癌药治疗的多药抗性,其中所述抗癌药选自多西他赛、米托蒽醌、吉西他滨、卡培他滨、奥沙利铂、干扰素、舒尼替尼、索拉菲尼、顺铂或卡铂、多柔比星、氨甲蝶呤、长春新碱、长春瑞滨、培美曲塞、吉非替尼、依托泊苷、伊立替康、环磷酰胺、托泊替康、环磷酰胺、紫杉醇、丝裂霉素、贝伐单抗、曲妥珠单抗、5-FU、西妥昔单抗、替莫唑胺、贝伐单抗、丙卡巴肼、CCNU 和 BCNU。

[0066] 在一个实施方案中,所述的多药抗性包含选自以下药物中的一种或多种抗癌药物:多西他赛、米托蒽醌、吉西他滨、卡培他滨、奥沙利铂、舒尼替尼、索拉菲尼、顺铂、5-FU、西妥昔单抗、贝伐单抗、奥沙利铂和伊立替康。

[0067] 在一个实施方案中,提供了包含根据本发明和如本文中所述的免疫脂质体和可药用载体或赋形剂或稀释剂的药物组合物用于治疗、特别地用于多线治疗癌症、特别地用于治疗乳腺癌或结肠直肠癌或这两种癌症,其中所述的免疫脂质体封装了多柔比星并且还包含抗体 MA b C225 或抗体 EMD72000 或其片段,其仍显示所述抗体之一者或两者的特异结合特性。

[0068] 在一个实施方案中,提供了包含根据本发明和如本文中所述的免疫脂质体和可药用载体或赋形剂或稀释剂的药物组合物用于治疗患者或患者群体中癌症、特别地用于治疗乳腺癌或结肠直肠癌或这两种癌症,其中所述的患者或患者群体已经显现多药抗性、特别地显现针对用一种或多种抗癌药治疗的多药抗性,其中所述抗癌药选自多西他赛、米托蒽醌、吉西他滨、卡培他滨、奥沙利铂、干扰素、舒尼替尼、索拉菲尼、顺铂或卡铂、多柔比星、氨甲蝶呤、长春新碱、长春瑞滨、培美曲塞、吉非替尼、依托泊苷、伊立替康、环磷酰胺、托泊替

康、环磷酰胺、紫杉醇、丝裂霉素、贝伐单抗、曲妥珠单抗、5-FU、西妥昔单抗、替莫唑胺、贝伐单抗、丙卡巴肼、CCNU 和 BCNU, 其中所述的免疫脂质体封装了多柔比星并且还包含抗体 MAb C225 或抗体 EMD72000 或其片段, 其仍显示所述抗体之一者或两者的特异结合特性。

[0069] 定义

[0070] 术语“包含”通常以包括的意思使用, 也就是说允许一种或多种特征或组分存在。

[0071] 如本说明书和权利要求书中所用, 单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数称谓, 除非上下文另外清楚地说明。例如, 术语“一位患者”包括多位患者。术语“一种免疫脂质体”包括多种免疫脂质体, 包括其混合物。

[0072] 术语“EGF 受体”或“EGFR”、“ErbB1”、“HER1”是本领域认可的术语并且在本文中同义地使用并理解为指作为受体酪氨酸激酶 (RTK) I 类家族成员的受体蛋白, 其包括 EGFR (ErbB1、HER1)、HER2 (ErbB2)、HER3 (ErbB3) 和 HER4 (ErbB4)。作为靶抗原, EGFR 是在多种人实体瘤中过量表达的轻易可及的细胞表面受体。在这个定义中也包括 EGFR 的突变体, 特别地 III 类突变体, 例如 EGFRvIII, 其在 ECD 内部的第 2-7 外显子中含有缺失, 导致符合可读框地缺失编码序列的 801bp 和在融合接头处生成新的甘氨酸残基。

[0073] 如本文中所述的术语“一线治疗”或“一线疗法”是本领域认可的术语并理解为指首次化学疗法治疗癌症, 它可以与手术和 / 或放射疗法联合, 也称初级治疗或初级疗法。

[0074] 如本文中所述的术语“二线治疗”或“二线疗法”是本领域认可的术语并理解为指当初始或初级治疗 (一线或初级疗法) 不奏效或停止奏效时给予的化学疗法治疗。

[0075] 如本文中所述的术语“三线、四线、五线等治疗”或“三线、四线、五线等疗法”是本领域认可的术语并理解为指当初始治疗和任意的后续治疗 (一线、二线、三线等疗法) 不奏效或停止奏效时给予的化学疗法治疗。

[0076] 术语“多线”治疗是通用术语并在本文中理解为指在不奏效或已经停止奏效的初始或初级治疗 (一线或初级疗法) 之后的任意的更高线治疗。

[0077] 如本文中所述的术语“基本上无副作用”或“基本上无不利副作用”是本领域认可的术语并理解为指的轻微至中等药物相关作用或毒性, 它不是剂量限制的。

[0078] 如本文中所述的术语“EGFR 阳性肿瘤”理解为指含有例如通过免疫组织化学试验 (例如 FDA 批准的 EGFR pharmaDx 试剂盒 (“DAKO”试验; DAKO North America, Inc)、Zymed EGFR 试剂盒或 Ventana EGFR 3C6 抗体) 检测到的至少 1%、特别地至少 2%、3%、4% 或 5%、特别地至少 10% EGFR 阳性细胞的肿瘤, 特别地, 所述的 EGFR 阳性细胞过量表达 EGFR 抗原和 / 或 EGFR 的突变体, 特别地 III 类突变体, 例如 EGFRvIII。

[0079] “药学有效量”是指施用至人或动物生物时诱导可检测的药理学和 / 或生理学作用的化学物质或化合物。

[0080] 相应的药学有效量可以取决于待治疗的特定患者、待治疗的疾病和施用的方法。另外, 药学有效量取决于所用的具体蛋白质, 特别地该蛋白质是否额外地含有或不含有如所述的药物。治疗通常包括药物组合物的多次施用, 通常间隔几小时、几日或几周。本发明免疫脂质体的剂量单位的药学有效量通常在  $5\text{mg}/\text{m}^2$  与  $100\text{mg}/\text{m}^2$  待治疗患者的身体表面之间的范围内。

[0081] “可药用”指生理上可耐受并且在施用至人时一般不产生变态反应或类似异常反应如胃不适、眩晕等的分子实体和组合物。

[0082] 如本文中所述的术语“抗体”或“诸抗体”是本领域认可的术语并且理解为指与已知抗原结合的分子或分子活性片段,特别地术语“抗体”或“诸抗体”指免疫球蛋白分子并指免疫球蛋白分子的免疫活性部分,即含有免疫特异地结合抗原的结合位点的分子。本发明的免疫球蛋白可以是任意型(IgG、IgM、IgD、IgE、IgA 和 IgY) 或类(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2) 或亚类的免疫球蛋白分子。

[0083] “抗体”在本发明的范围内意图包括单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、单链抗体、双特异性抗体、猿猴源化抗体、人抗体和人源化抗体以及其活性片段。术语“片段”指抗体或抗体链的一部分或区段,其比完整或完全抗体或抗体链包含更少的氨基酸残基。与已知抗原结合的分子活性片段的例子包括分开的轻链和重链、Fab、Fab/c、Fv、Fab' 和 F(ab')<sub>2</sub> 片段,包括 Fab 免疫球蛋白表达文库的产物和上文所提及任意抗体和片段的表位结合片段。片段可以通过化学处理或酶处理完整或完全抗体或抗体链获得。片段也可以通过重组手段获得。示例性片段包括 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fabc 和 / 或 Fv 片段。术语“抗原结合片段”指免疫球蛋白或抗体的多肽片段,其结合抗原或与完整抗体竞争(即与衍生这些片段的完整抗体竞争) 抗原结合(即特异结合)。

[0084] 抗体结合片段通过重组 DNA 技术产生或通过酶切割或化学切割完整免疫球蛋白产生。结合片段包括 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fabc、Fv、单链和单链抗体。

[0085] 这些活性片段可以借助许多技术从给定抗体衍生。例如,纯化的单克隆抗体可以用酶如胃蛋白酶切割,并经过 HPLC 凝胶过滤处理。随后可以通过膜过滤法和其他方法收集并浓缩含有 Fab 片段的适宜级分。关于进一步描述用于分离抗体活性片段的一般技术,见例如 (14); (15)。

[0086] “嵌合抗体”是这样的抗体,其中该抗体的一个或多个区域来自一个动物物种并且该抗体的一个或多个区域来自一个不同的动物物种。优选的嵌合抗体是包括来自灵长动物免疫球蛋白的区域的嵌合抗体。用于人临床用途的嵌合抗体一般理解为具有来自非人动物例如啮齿动物的可变区,同时恒定区来自人,相反,人源化抗体使用来自非人抗体的 CDR,同时大部分或全部可变构架区来自人免疫球蛋白并且全部恒定区来自人免疫球蛋白。人嵌合抗体一般理解为具有来自啮齿动物的可变区。常见的人嵌合抗体具有人重链恒定区和人轻链恒定区,同时重链和轻链的可变区均来自啮齿动物抗体。嵌合抗体可以包括相对于人恒定区天然氨基酸序列和天然啮齿动物可变区序列的一些变化。嵌合和人源化抗体可以通过本领域熟知的方法制备,所述方法包括 CDR 移植方法(见,例如美国专利号 5,843,708 ;6,180,370 ;5,693,762 ;5,585,089 ;5,530,101)、链改组策略(见例如美国专利号 5,565,332) (16)、分子模建策略(美国专利号 5,639,641) 等。

[0087] “人源化抗体”指掺入至少一种人源化免疫球蛋白或抗体链或其片段、特别地至少一条人源化轻或重链的一类工程化抗体。所述人源化免疫球蛋白或抗体链或其片段,但是特别地至少一条人源化轻或重链衍生自非人来源,特别地衍生自非人抗体,一般是啮齿动物起源。一般以至少一个 CDR 区的形式提供对人源化抗体的所述非人贡献,所述的 CDR 区分散在衍生自一种(或多种)人免疫球蛋白的构架区当中。此外,可以改变构架支持残基以保留结合亲和性。

[0088] 人源化抗体可以进一步包含恒定区(例如在轻链的情况下,至少一个恒定区或其部分,并且在重链的情况下,优选 3 个恒定区)。

[0089] 获得“人源化抗体”的方法是本领域技术人员熟知的。

[0090] “人源化抗体”也可以通过能够在在大动物例如兔中产生亲和力成熟的人样多克隆抗体的新基因工程方法获得 (<http://www.rcotech.com/bioventures/-therapeutic.php>)。

[0091] 术语“免疫脂质体剂量”或“免疫脂质体浓度”通常指截留于脂质体中的抗癌药的浓度。

[0092] “脂质体”指由脂质、特别地形成小泡的脂质组成的球状小泡,其能够在水中自发排列成脂质双层结构,其中该脂质的疏水部分与双层膜的内部疏水区接触并且其首基部分指向该膜的外部极性表面。形成小泡的脂质一般具有两条烃链,特别地酰基链,和极性或非极性的首基。形成小泡的脂质由天然存在或合成来源的脂质(包括磷脂如磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酸、磷脂酰肌醇和鞘磷脂)组成,其中所述两条烃链一般长约 14-22 个碳原子并且具有可变的不饱和度。其酰基链具有可变饱和度的上述脂质和磷脂可以商业地获得或根据公开的方法制备。用于本发明组合物中的其它合适脂质包括糖脂和固醇,如胆固醇及其也可以用于脂质体中的各种类似物。

[0093] 也可以在脂质体中适宜地使用一般具有亲脂部分如固醇、酰基或二酰基链并且其中脂质具有总体净正电荷的阳离子脂质。该脂质的首基一般携带正电荷。示例性阳离子脂质包括 1,2-二油基氧基-3-(三甲基氨基)丙烷(DOTAP);N-[1-(2,3-双十四烷氧基)丙基]-N,N-二甲基-N-羟乙基溴化铵(DMRIE);N-[1-(2,3-二油基氧基)丙基]-N,N-二甲基-N-羟乙基溴化铵(DORIE);N-[1-(2,3-二油基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA);3[N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)氨基甲酰基]胆固醇(DC-Chol)和二甲基双十八烷基铵(DDAB)。形成小泡的阳离子脂质也可以是中性脂质如二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE),或两亲性脂质如以阳离子脂质衍生化的磷脂,如聚赖氨酸或其他聚胺脂质。

[0094] 脂质体可以包括用亲水聚合物衍生化的形成小泡的脂质以形成脂质体表面上的亲水聚合物链表面层。形成小泡的脂质、特别地磷脂,如二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE)可以共价地接合至亲水聚合物,其在脂质体周围形成亲水聚合物链表面层。适合与形成小泡的脂质衍生化的亲水聚合物包括聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯甲醚、聚甲基噁唑啉、聚乙基噁唑啉、聚羟丙基噁唑啉、聚羟丙基甲基丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯、聚二甲基丙烯酸酯、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、聚天冬酰胺(polyaspartamide)和亲水肽序列。所述聚合物可以作为均聚物或作为嵌段或随机共聚物使用。

[0095] 优选的亲水聚合物链是聚乙二醇(PEG),优选地作为具有在 200-20,000 道尔顿之间、更优选地在 500-10,000 道尔顿之间、仍更优选地在 750-5000 道尔顿之间分子量的 PEG 链。甲氧基或乙氧基封端的 PEG 类似物也是以多种聚合物大小例如 120-20,000 道尔顿商业可获得的优选亲水聚合物。

[0096] 在脂质体形成时添加至脂质混合物并处于脂质聚合物缀合物形式的额外聚合物链产生从脂质体脂质双层的内表面和外表面均伸出的聚合物链。一般通过包括 0.5-20 摩尔百分数之间的聚合物衍生化脂质与剩余的脂质体形成组分(例如形成小泡的脂质)实现在脂质体形成时添加脂质聚合物缀合物。

[0097] 已经在例如美国专利号 5,395,619、在美国专利号 5,013,556、在美国专利号 5,631,018 和在 WO 98/07409 中描述了制备用亲水聚合物衍生化的形成小泡的脂质。将理

解的是亲水聚合物可以稳定偶联至脂质或借助不稳定键偶联,这允许包衣的脂质体在血流中循环时或应答于刺激物时脱去聚合物链表层。

[0098] “内化抗体”是与细胞表面上的受体或其他配体结合后被转运至细胞内例如转运至溶酶体或其他细胞器或转运至细胞浆内的抗体。

[0099] 本发明涉及用于一线至多线治疗、特别地至二线、特别地至三线、特别地至四线、特别地至五线、特别地至六线、特别地至七线和更高线治疗临床设立的人患者中癌症、特别地由局部推进的或转移性肿瘤、特别地 EGFR 阳性肿瘤所代表癌症的免疫脂质体,其中所述的免疫脂质体包含识别并与实体瘤表面上的 EGF 受体抗原结合的抗体或抗体片段并且包含至少一种抗肿瘤药。

[0100] 本发明的免疫脂质体组合物因而也包括特异性识别并与肿瘤衍生细胞的表面上 EGF 受体结合的抗体或抗体片段,包括 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fabc、Fv、单链和单链抗体。在另一个实施方案中,该抗体包含与肿瘤衍生细胞的表面上 EGF 受体特异性结合的至少一个结合结构域。在另一个实施方案中,该抗体是包含与肿瘤衍生细胞的表面上 EGF 受体特异性结合的至少一个结合结构域的单链抗体。

[0101] 抗体可以通过本领域已知的共价方法接合至脂质体。为了共价地接合抗体至脂质体,将含有末端官能化聚乙二醇链的衍生化脂质掺入脂质体。在脂质体形成后,末端官能化基团可以与抗体反应用于偶联抗体至脂质体。

[0102] 存在广泛类型的用于接合所选亲水性聚合物至所选脂质并活化聚合物的游离未接合末端以与所选配体反应的技术,并且特别地已经广泛研究了亲水性聚合物聚乙二醇(PEG)(18 ;19 ;20 ;21 ;22)。

[0103] 通常,将 PEG 链官能化以含有适于例如与多种类型配体中存在的巯基、氨基和醛或酮(一般衍生自温和氧化抗体的糖部分)偶联的反应基。此类 PEG 末端反应基的例子包括马来酰亚胺(用于与巯基反应)、N-羟琥珀酰亚胺(NHS)或 NHS 碳酸酯(用于与伯胺反应)、酰肼或肼(用于与醛或酮反应)、碘乙酰基(偏好地与巯基反应)和二硫代吡啶(硫羟反应性)。通过这些方法中任意方法制备携带所截留物并承载表面结合的靶向性配体的脂质体,即靶向的治疗性脂质体。优选的制备方法是插入法,其中预制的脂质体与靶向性缀合物孵育以实现靶向性缀合物插入脂质体双层。在这种方法中,通过多种技术(如(23)中详述的那些技术)制备脂质体,并且下文将描述为支持本发明所制备的脂质体的具体例子。一般而言,脂质体是可以由简单的脂质膜水化技术形成的多层小泡(MLV)。在这种方法中,在容器中蒸发溶解于适宜有机溶剂中的上文详述类型的脂质体形成脂质的混合物以形成薄膜,该薄膜随后被含水介质覆盖。该脂质膜水化以形成 MLV,通常大小在约 0.1 至 10 微米之间。脂质体可以包括用亲水聚合物衍生化的形成小泡的脂质以形成脂质体表面上的亲水聚合物链表面层。脂质-聚合物缀合物的添加是任选的,因为在插入步骤后,如下文所述,脂质体将包括脂质-聚合物-靶向性配体。在脂质体形成时添加至脂质混合物并处于脂质聚合物缀合物形式的额外聚合物链产生从脂质体脂质双层的内表面和外表面均伸出的聚合物链。一般通过包括 0.5-20 摩尔百分数之间的聚合物衍生化脂质与剩余的脂质体形成组分(例如形成小泡的脂质)实现在脂质体形成时添加脂质聚合物缀合物。制备聚合物衍生化脂质的示例性方法和形成聚合物包衣的脂质体的示例性方法已经在美国专利号 5,013,556、5,631,018 和 5,395,619 中描述,所述专利通过引用的方式并入本文。将理解的

是亲水聚合物可以稳定偶联至脂质或借助不稳定键偶联,这允许包衣的脂质体在血流中循环时或应答于刺激物时脱去聚合物链表层。

[0104] 备选地,抗体-脂质衍生物可以首先形成并随后掺入脂质体。作为例子,将抗体偶联至游离 DSPE-PEG 分子的马来酰亚胺基团。抗体偶联的 DSPE-PEG 分子随后用来形成小泡。

[0105] 在形成脂质体后,掺入靶向性配体以获得靶向细胞的治疗性脂质体。通过孵育预制的脂质体与如上文所述制备的脂质-聚合物-配体缀合物来掺入靶向性配体。将预制的脂质体和缀合物在实现缀合物与脂质体缔合的条件下孵育,所述的缔合可以包括该缀合物与外部脂质体双层相互作用或缀合物插入脂质体双层。更具体地,将这两种组分在实现缀合物与脂质体以如下方式缔合的条件下孵育,使得靶向性配体从脂质体表面指向外部并因而可用于与其相关受体相互作用,将理解的是基于几种变量确定有效实现此种缔合或插入的条件,所述变量包括想要的插入速率(其中较高的孵育温度可以实现较快的插入速率)、可以安全加热配体而不影响其活性的温度和较小程度地包括脂质及脂质组合物的相变温度。还将理解的是插入过程可以因存在溶剂如两亲性溶剂(包括聚乙二醇和乙醇)或去污剂而变化。

[0106] 当脂质-聚合物-配体缀合物形式的靶向性缀合物与含水溶剂混合时,该缀合物一般将形成胶束溶液。缀合物的胶束溶液与预制脂质体的悬液混合以将缀合物与脂质体孵育和缔合或将缀合物插入脂质体的脂质双层。孵育过程有效实现脂质-聚合物-抗体缀合物与脂质体的外部双层小叶缔合或插入其中以形成免疫脂质体。

[0107] 在制备后,免疫脂质体优选地具有如通过例如动态光散射法在 30[度]或 90[度]所测量的小于约 200nm、优选在约 85-120nm 之间并更优选在 90-110nm 之间的尺寸。

[0108] 脂质体组合物一般用以下述摩尔比存在的脂质组分制备:约 30-75 百分数形成小泡的脂质、25-40 百分数胆固醇、0.5-20 百分数聚合物衍生脂质和 0.0001-10 摩尔百分数用于抗体偶联的脂质衍生物。

[0109] 一般而言,如下文所述,通过在脂质体形成之前添加治疗药物至形成小泡的脂质而将该药物掺入脂质体以截留该药物于形成的脂质体中。如果该药物是疏水的,则直接添加药物至疏水混合物。如果该药物是亲水的,则可以添加该药物至含水介质,其中所述含水介质覆盖蒸发的脂质的薄膜。

[0110] 在本发明中待使用的脂质体包含抗肿瘤药。构思了用于本发明中的抗肿瘤化合物,包括但不限于植物生物碱,如长春新碱、长春碱和依托泊苷;萘环类药抗生素包括多柔比星、表柔比星、柔红霉素;氟尿嘧啶;抗生素,包括博来霉素、丝裂霉素、光神霉素、放线菌素 D;拓扑异构酶抑制剂,如喜树碱及其类似物;和铂化合物,包括顺铂及其类似物如卡铂。适合使用的其他常规化疗药是本领域技术人员已知的并且包括天冬酰胺酶、白消安、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、阿糖胞苷、达卡巴嗪、雌莫司汀磷酸钠、氟尿苷、氟尿嘧啶(5-FU)、羟基脲(羟脲)、异环磷酰胺、洛莫司汀(CCNU)、盐酸氮芥(氮芥)、美法仑、巯基嘌呤、氨甲蝶呤(MIX)、丝裂霉素、米托坦、米托蒽醌、丙卡巴肼、链脲佐菌素、硫鸟嘌呤、噻替派、安吡啶(m-AMSA)、阿扎胞苷、六甲嘧啶(HMM)、米托胍脲(甲基 GAG;甲基乙二醛双脒基脲;MGBG)、司莫司汀(甲基 CCNU)、替尼泊苷(TM-26)和硫酸长春地辛。

[0111] 在本发明的一个实施方案中,脂质体具有适于外渗入实体瘤的尺寸。在脂质体也包含亲水聚合物链表面层以延长脂质体的血液循环寿命时,这是特别有用的。保持循环持



续较长时间段例如大于约 2-5 小时的脂质体能够渗入显示受损泄露性脉管系统或内皮屏障的肿瘤和感染部位。此类脂质体一般是在约 40-200nm 之间,更优选是在 50-150nm 之间,最优选是在 70-120nm 之间。

[0112] 将所选药剂通过标准方法掺入脂质体,所述标准方法包括 (i) 通过用该药物的水溶液水化脂质薄膜被动截留水溶性化合物,(ii) 通过水化含有该药物的脂质薄膜被动截留亲脂化合物,和 (iii) 加载对抗内部 / 外部脂质体 pH 梯度的可离子化药物。其他方法如反向蒸发法也是合适的。

[0113] 备选地,药物可以通过主动运输机制掺入预制的脂质体。一般而言,在这种情况下,药物应答于差异性钾离子或氢离子浓度而摄入脂质体中 (Mayer, 1986 ;Mayer 1989)。

[0114] 在脂质体形成后,可以筛分脂质体以获得具有基本上均一大小范围的、一般在约 0.01 至 0.5 微米之间、更优选在 0.03-0.40 微米之间的脂质体群体。用于 REV 和 MLV 的一种有效筛分方法包括经过一系列聚碳酸酯膜挤出脂质体的含水悬液,所述的聚碳酸酯膜具有所选的范围 0.03 至 0.2 微米、一般 0.05、0.08、0.1 或 0.2 微米的统一孔径。膜的孔径大体对应于经该膜挤出所产生的脂质体的最大尺寸,特别地在经相同的膜挤出该制备物两次或多次的情况下。均化方法也用于减小脂质体大小至 100nm 或更小的尺寸 (24)。

[0115] 可以通过这些方法中的任意方法制备携带所截留物并承载表面结合的靶向性配体的脂质体,即靶向的治疗性脂质体。优选的制备方法是插入法,其中预制的脂质体与靶向性缀合物孵育以实现靶向性缀合物插入脂质体双层。在这种方法中,通过多种技术(如 (23) 中详述的那些技术)制备脂质体,并且下文描述为支持本发明所制备的脂质体的具体例子。一般而言,脂质体是多层小泡 (MLV) 或单层小泡 (ULV)。

[0116] MLV 可以通过简单的脂质膜水化技术形成。在这种方法中,在容器中蒸发溶解于适宜有机溶剂中的上文详述类型的脂质体形成脂质的混合物以形成薄膜,该薄膜随后由含水介质覆盖。该脂质膜水化以形成 MLV,通常大小在约 0.1 至 10 微米之间。

[0117] ULV 可以通过反复冻融法形成。在这种方法中,1-2- 油酰基 -3-sn- 甘油磷酸胆碱和 Chol 或者 DSPC 和 Chol (摩尔比 3 : 2) 与 mPEGDSPE (0.5-5mol% 磷脂) 混合。随后将脂质体通过具有 0.1、0.08 和 0.05  $\mu\text{m}$  定义孔径的聚碳酸酯过滤器挤出几次。这产生一般具有直径 70-120nm 大小的脂质体。脂质体的尺寸可以由动态光散射法确定。可以使用标准磷酸盐测定法测量脂质体浓度。

[0118] 通过上述任意方法能够获得的抗 EGFR 免疫脂质体具有临床相关性并且可以用于二线和更高线治疗罹患癌症、特别地由局部推进的或转移性肿瘤所代表癌症的人患者中。构思的用于本发明中的免疫脂质体包含识别并与实体瘤表面上的 EGF 受体抗原结合的抗体或抗体片段。特别地,该免疫脂质体包含 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fabc、Fv 片段或者是单链抗体。

[0119] 构思的用于本发明中的免疫脂质体还包含抗肿瘤药,特别地还包含选自多柔比星、表柔比星和长春瑞滨中的抗肿瘤药、特别地还包含多柔比星。

[0120] 本发明的免疫脂质体可以以包含所述免疫脂质体和可药用载体和 / 或稀释剂和 / 或赋形剂的药物组合物的形式施用至人患者。

[0121] 本发明药物组合物的配制可以根据本领域技术人员已知的标准方法学完成。

[0122] 本发明的免疫脂质体或包含所述免疫脂质体的药物组合物可以在固体剂、液体

剂、气雾剂的形式以合适的药理学有效剂量施用至受试者。固体组合物的例子包括丸剂、膏剂和可植入的剂量单元。丸剂可以经口施用。治疗性膏剂可以局部施用。可植入的剂量单元可以局部地施用,例如在肿瘤部位,或可以植入以全身性释放治疗性组合物,例如皮下植入。液体组合物的例子包括适用于输注的制剂、适用于肌内、皮下、静脉内、动脉内注射的制剂和用于局部和眼内施用的制剂。气雾制剂的例子包括用于施用至肺部的吸入制剂。

[0123] 本发明的免疫脂质体或包含所述免疫脂质体的药物组合物可以通过标准施用途径施用。一般而言,所述组合物可以通过局部、经口、直肠、鼻、皮内、腹膜内或肠胃外(例如静脉内、皮下或肌内)途径施用。此外,该组合物可以掺入持续释放基质如生物降解性聚合物,所述聚合物植入想要递送至的位置附近,如在肿瘤部位处。施用方法包括施用单次剂量、以预定时间间隔施用重复剂量和持续施用预定的时间段。

[0124] 所属领域的技术人员熟知药物组合物的剂量将取决于多种因素,例如待治疗的病症,所用的具体组合物和其他临床因素,如患者的重量、尺寸、性别和总体健康状况、身体表面积、待施用的化合物或组合物、同时施用的其他药物、和施用途径。

[0125] 本发明的免疫脂质体或包含所述免疫脂质体的药物组合物可以与生物活性物质或化合物或其他组合物组合施用,所述的组合物包含所述生物活性物质或化合物,特别地抗肿瘤化合物,特别地至少一种抑制细胞性化合物,特别地选自以下的化合物:道诺霉素、伊达比星、米托蒽醌、丝裂霉素、顺铂和其他铂类似物、长春新碱、表柔比星、阿克拉霉素、氨甲蝶呤、依托泊苷、多柔比星、阿糖胞苷、氟尿嘧啶和其他氟化嘧啶、嘌呤或核苷、特别地吉西他滨、博来霉素、丝裂霉素、普卡霉素、放线菌素 D、环磷酰胺和其衍生物、噻替派、BCNU、紫杉醇、多西他赛和其他紫杉烷衍生物和分离物、喜树碱、多肽、核酸、具有硫代磷酸酯核苷酸间键的核酸和具有聚酰胺核苷酸间键的核酸,但尤其地多柔比星、表柔比星和长春瑞滨,以及本发明的抗体和任选地可药用载体和/或稀释剂和/或赋形剂。

[0126] 药理学活性物质,特别地免疫脂质体中截留的抗肿瘤化合物,可以以  $0.1\text{mg}/\text{m}^2$  和  $2.5\text{g}/\text{m}^2$  身体表面和每次给药之间的量存在。一般而言,施用方案应当在本发明抗肿瘤化合物的  $0.5\text{mg}/\text{m}^2$  与  $1000\text{mg}/\text{m}^2$  之间的范围内,特别地在  $1.0\text{mg}/\text{m}^2$  至  $500\text{mg}/\text{m}^2$  之间的范围内并且特别地在  $5.0\text{mg}/\text{m}^2$  与  $250\text{mg}/\text{m}^2$  之间的范围内、特别地在  $10.0\text{mg}/\text{m}^2$  与  $150\text{mg}/\text{m}^2$  之间的范围内,同时处于这些范围内的全部各个数字也是本发明的部分。如果施用通过连续输注进行,更适宜的剂量可以是每小时在每公斤体重单位  $0.01\ \mu\text{g}$  和  $10\text{mg}$  之间的范围,同时处于这些范围内的全部各个数字也是本发明的部分。

[0127] 免疫脂质体的抗体浓度在每微摩尔磷脂  $1\ \mu\text{g}$  至  $150\ \mu\text{g}$  抗体或抗体片段之间的范围内,特别地在每微摩尔磷脂  $5\ \mu\text{g}$  至  $100\ \mu\text{g}$  抗体或抗体片段之间的范围内,特别地在每微摩尔磷脂  $10\ \mu\text{g}$  至  $100\ \mu\text{g}$  抗体或抗体片段之间的范围内,特别地在每微摩尔磷脂  $20\ \mu\text{g}$  至  $50\ \mu\text{g}$  抗体或抗体片段之间的范围内,特别地在每微摩尔磷脂  $30\ \mu\text{g}$  至  $40\ \mu\text{g}$  抗体或抗体片段之间的范围内。

[0128] 本发明的免疫脂质体制备物可以制备为药物组合物的形式,用于例如通过静脉内、皮下或肌内注射或通过静脉内滴注进行肠胃外施用,其中所述的药物组合物含有溶解于或分散在本领域技术人员熟知的可药用载体中的分离和纯化的免疫脂质体。

[0129] 就肠胃外施用的药物组合物而言,可以使用任意的常规添加剂,如赋形剂、佐剂、黏合剂、崩解剂、分散剂、润滑剂、稀释剂、吸收增强剂、缓冲剂、表面活性剂、增溶剂、防腐

剂、乳化剂、等渗剂、稳定剂、注射用增溶剂、pH 调节剂等。

[0130] 促进活性化合物加工成可以药学方式使用的制备物的可接受载体、稀释剂和佐剂在所用的剂量和浓度对接受者无毒并且包括缓冲剂如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸；抗氧化剂（包括抗坏血酸和甲硫氨酸）；防腐剂（如十八烷基二甲基苄基氯化铵；六甲氯铵；苯扎氯铵、苯扎溴铵；苯酚、丁醇或苄醇；对羟基苯甲酸烷基酯如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯；儿茶酚；雷琐辛；环己醇；3-戊醇和间甲酚）；低分子量（少于约 10 个残基）多肽；蛋白质，如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水聚合物如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸；单糖、二糖和其他碳水化合物包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合剂如 EDTA；糖如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇；形成盐的反离子如钠；金属复合物（例如 Zn-蛋白质复合物）和 / 或非离子表面活性剂如 TWEEN®、PLURONICS® 或聚乙二醇 (PEG)。

[0131] 施用药物组合物的形式可以是全身或局部的。例如，此类组合物的施用可以是各种肠胃外途径，如皮下、静脉内、皮内、肌内、腹膜内、鼻内、经皮、颊途径或借助植入装置，并且也可以通过蠕动手段递送。

[0132] 施用通常以肠胃外例如静脉内，特别地以输注形式进行。用于肠胃外施用的制品包括无菌的水溶液或非水溶液、混悬剂和乳剂。非水溶剂包括但不限于丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油和可注射的有机酯如油酸乙酯。含水溶剂可以选自由水、醇 / 水溶液、乳浊液或悬液组成的组，包括盐水和缓冲的介质。肠胃外载体包括氯化钠溶液、林格右旋糖、右旋糖和氯化钠、乳酸化林格液或固定油，静脉内载体包括液体和养分补充物、电解质补充物（如基于林格右旋糖的那些电解质补充物）和其他载体。也可以存在防腐剂（例如抗微生物剂）、抗氧化剂、螯合剂、惰性气体等。

[0133] 药物组合物还可以包含蛋白质载体例如血清白蛋白或免疫球蛋白，特别地人来源的蛋白质载体。根据药物组合物的预期用途，其他生物活性物质可以在本发明的药物组合物中存在。

[0134] 在本发明的一个方面，产生了如本文中所述的免疫脂质体 (ILs)，其结合 EGFR 以提供抗体指导的抗癌药有效胞内递送入靶细胞，旨在研究通过这种方法是否可能克服抗药性机制，所述抗药性机制仍是癌症疗法中更好结果的重大障碍。

[0135] ILs 可以按模块方式用共连接至含有多种药物或探针的稳定化脂质体的多种 MAb 或 MAb 片段构建，所述的 MAb 或 MAb 片段包括嵌合抗体例如来自 C225 (西妥昔单抗、爱必妥®) 的 Fab' 或人源化抗体例如 EMD72000。

[0136] 随后可以用如此产生的 ILs 治疗也以 mdr 介导多药抗性为特征的过量表达 EGFR 的细胞，例如人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231/mdr 或结肠直肠癌细胞系 HT-29/mdr。在多药抗性细胞系中，载有多柔比星 (dox) 的 ILs 能显示产生比游离多柔比星大 15-86 倍的细胞毒性（例如 HT-29/mdr 细胞中 ILs-dox 的  $IC_{50} = 0.37$  而游离多柔比星的  $IC_{50} = 6.0$  ( $\mu g$  dox/ml)。在非耐受性 HT-29 细胞中，多柔比星的免疫脂质体细胞毒性是与游离药物的免疫脂质体细胞毒性可比较的 ( $IC_{50} = 0.23 \mu g$  dox/ml 对  $0.36 \mu g$  dox/ml)，而比非靶向的脂质体多柔比星具有显著更多的细胞毒性 ( $IC_{50} > 27 \mu g$  dox/ml)。令人感兴趣的是，MDA-MB-231/mdr 细胞中的胞内分布研究揭示了游离多柔比星与免疫脂质体 dox 递送之间的明显差异。虽然游离多柔比星被有效泵出这种多药抗性肿瘤细胞之外，但在相同浓度上的免疫脂质体

dox 在胞浆中实现 3.5-8 倍更高的 dox 累积并且在胞核中实现 3.5-4.9 倍更高的 dox 累积。

[0137] 最后,在 MDA-MB-231/mdr 异种移植物模型中的体内疗法研究证实抗 EGFR ILs-dox 有效靶向多药抗性细胞的能力。尽管游离多柔比星在这种高度多药抗性肿瘤模型中在其 MTD 上没有显示任何活性,然而抗 EGFRILs-dox 显示令人印象深刻的明显优于全部其他疗法的抗肿瘤作用。

[0138] 根据本发明和如本文中披露的免疫脂质体因而对过量表达 EGFR 的肿瘤细胞提供有效和靶向的药物递送并且甚至对多药抗性细胞显示强烈活性。

[0139] 本领域技术人员会理解除了具体描述的那些内容之外,本文中所述的本发明易受变化和改变。将理解的是本发明包括全部此类变化和改变,而不脱离本发明的精神和基本特征。本发明也分别或总体地包括在本发明中提及或显示的全部步骤、特征、组合物和化合物,以及任意和全部组合或任意两个或多个所述步骤或特征。本公开因而以全部所述方面加以考虑并且不限于此,从而本发明的范围由所附权利要求书指示,并且属于等同性意思和范围内的全部变化意图包含于本发明范围内。

[0140] 在本说明书通篇范围内援引多篇参考文献,每份参考文献通过全部引用的方式并入本文。

[0141] 将参考以下实施例更充分地理解前面的描述。然而,此类实施例举例说明实施本发明的方法并且不意图限制本发明的范围。

## 实施例

[0142] 目标群体是已经接受过所有可使用的标准疗法的具有过量表达 EGFR 的实体瘤的患者。

[0143] 特别地,所述患者罹患以下癌症并且肿瘤在以下治疗下已经进展:

[0144] 前列腺癌,具有在激素、多西他赛、米托蒽醌治疗时进展的肿瘤。

[0145] 胰腺癌和胆囊癌,具有在吉西他滨、卡培他滨、奥沙利铂治疗时进展的肿瘤。

[0146] 肾癌,具有在干扰素、卡培他滨、舒尼替尼、索拉菲尼治疗时进展的肿瘤。

[0147] 膀胱上皮癌,具有在顺铂或卡铂、吉西他滨、多柔比星、氨甲蝶呤、长春新碱治疗时进展的肿瘤。

[0148] 非小细胞肺癌,具有在顺铂或卡铂、吉西他滨、长春瑞滨、培美曲塞、多西他赛、吉非替尼治疗时进展的肿瘤。

[0149] 小细胞肺癌,具有在顺铂或卡铂、依托泊苷、伊立替康、多柔比星、长春新碱、环磷酰胺、托泊替康治疗时进展的肿瘤。

[0150] 间皮瘤,具有在顺铂或卡铂、吉西他滨、培美曲塞治疗时进展的肿瘤。

[0151] 乳腺癌,具有在顺铂或卡铂、多柔比星、长春新碱、环磷酰胺、紫杉醇、多西他赛、吉西他滨、长春瑞滨、卡培他滨、丝裂霉素、氨甲蝶呤、米托蒽醌、贝伐单抗、曲妥珠单抗治疗时进展的肿瘤。

[0152] 食管癌,具有在顺铂或卡铂、5-FU、多西他赛治疗时进展的肿瘤。

[0153] 头颈癌,具有在顺铂或卡铂、5-FU、多西他赛、西妥昔单抗治疗时进展的肿瘤。

[0154] 脑肿瘤,具有在替莫唑胺、贝伐单抗、伊立替康、长春新碱、丙卡巴肼、CCNU、BCNU 治疗时进展的肿瘤。

- [0155] 肝细胞癌,具有在舒尼替尼、索拉非尼治疗时进展的肿瘤。
- [0156] 结肠和直肠癌,具有在西妥昔单抗、贝伐单抗、奥沙利铂、伊立替康、卡培他滨、5-FU 治疗时进展的肿瘤。
- [0157] 在试验中测试的治疗性化合物是 C225-ILs-dox,是一种其中 EGFR 特异性抗体 C225 与含有多柔比星的脂质体的脂质膜共价结合的构建体。使用这种化合物的基本理由是这样的事实:多柔比星是许多种人肿瘤中最有效的药物之一并且高百分数的这些恶性病确实表达 EGFR。
- [0158] A:I 期研究 CC1 的方案
- [0159] 1. 选择标准
- [0160] 1.1. 患者总数
- [0161] 大约 30 位患者。
- [0162] 1.2. 纳入标准
- [0163] 在登记参与本研究前,候选人必须达到全部以下标准:
- [0164] 1. 组织学证明的局部推进的或转移性实体瘤。
- [0165] 2. ECOG 表现 $\leq 2$ 。
- [0166] 3. 没有额外的标准疗法可用于该患者。
- [0167] 4. 在最新近可评价的肿瘤组织中确定的 EGFR 过量表达(根据 DAKOEGFR pharmDx- 试验)。
- [0168] 5. 无伴行的抗肿瘤疗法(类固醇是允许的-在乳腺癌和前列腺癌中,需要类固醇剂量在研究期间保持稳定)。
- [0169] 6. 自停止任何先前抗肿瘤治疗以来至少 4 周(在亚硝基脲或丝裂霉素 C 的情况下 6 周)。
- [0170] 7. 在具有先前蒽环类药暴露史的患者中,要求正常的超声心动图(LVEF  $> 50\%$ )。
- [0171] 8. 年龄 $\geq 18$ 岁。
- [0172] 9. 男性或女性。
- [0173] 10. 育龄女性和男性患者必须使用有效避孕措施。
- [0174] 11. 在参与本研究前,愿意并且能够签署知情同意书并且在本研究持续期间服从本方案。
- [0175] 1-3. 排除标准:
- [0176] 如果符合以下任意标准,则必须从本研究排除候选人:
- [0177] 1. 妊娠和/或哺乳。
- [0178] 2. 具有以下实验室值的患者
- [0179] 嗜中性粒细胞  $< 1.5 \times 10^9$  个/L
- [0180] 血小板  $< 100 \times 10^9$  个/L
- [0181] 血清肌酸  $> 3.0 \times$  正常上限
- [0182] ALAT、ASAT  $> 3.0 \times$  正常上限(在肝脏转移作为酶改变的唯一可能原因的患者中  $5.0 \times$ )
- [0183] 碱性磷酸酶  $> 3.0 \times$  正常上限(在肝脏转移或骨转移作为酶改变的唯一可能原因的患者中  $5.0 \times$ )

- [0184] 胆红素 > 3.0x 正常上限
- [0185] 3. 在治疗开始前 4 周内参与任何调查性药物研究。
- [0186] 4. 具有临床明显和失控的肾病或肝病的患者。
- [0187] 5. 临床明显的心脏病：充血性心力衰竭（纽约心脏协会 III 或 IV 类）；有症状的冠状动脉病；用药物治疗没有充分控制的心律不齐；在最近 12 个月内的心肌梗死。
- [0188] 6. 可能有损患者参与本试验的能力的（由研究人员判定的）任何严重的基础性医学病症（例如活跃的自身免疫病、失控的糖尿病等）。
- [0189] 7. 根据瑞士治疗产品署批准的产品信息施用爱必妥™ 或 Caelyx™ 时禁忌的任何伴行药物。
- [0190] 8. 累积的多柔比星剂量 > 300mg/m<sup>2</sup>BSA（或心脏毒性蒽环类药等同物）。
- [0191] 9. 具有由研究人员判定为临床明显并妨碍知情同意或干扰顺应性的失控性发作、中枢神经系统疾病或精神病学失能的患者。
- [0192] 10. 脑转移。
- [0193] 2. 安全性参数
- [0194] 2.1. 不利事件（主要对象）
- [0195] 临床研究期间遭遇的全部不利事件将记录于患者的历史 / 文件中。
- [0196] 临床不利事件的强度将根据 NCI CTC 评级系统 3.0 版 (<http://ctep.info.nih.gov/reporting/ctc.html>) 评级。
- [0197] 2-2. 实验室参数
- [0198] 在研究启动之前，必须记录参与实验室的正常值。本研究期间必须实施以下实验室操作：
- [0199] 每周（根据需要在新的施用研究药物之前）：
- [0200] 血红蛋白 - 白细胞计数，包括白细胞分类计数
- [0201] 血小板计数
- [0202] 每 4 周（在新的施用研究药物之前）：
- [0203] ASAT-ALAT
- [0204] 胆红素
- [0205] 碱性磷酸酶
- [0206] 血清肌酸
- [0207] LDH
- [0208] 钙
- [0209] 尿分析（“U- 状况”：检测红细胞尿、白细胞尿和蛋白尿）
- [0210] 仅在周期 1 期间的药物代谢动力学研究：
- [0211] 在 0、24、48、96 小时和在第 8 日的血样（2x7.5ml 血清管）
- [0212] 2.3. 生命体征和体格检查
- [0213] 在研究开始之前应当记录以下生命体征和体格检查结果：
- [0214] 体温
- [0215] 血压
- [0216] 心率

[0217] 高度（一旦开始筛查）

[0218] 重量

[0219] 体力状况 (ECOG)

[0220] 2.4. 专门研究

[0221] 对于药物代谢动力学研究,将在0、24、48、96小时以及在第8日抽取血样(2x7.5ml血清管)。血浆将通过离心从全血分开并冷冻在-80°C以进一步分析。多柔比星浓度将由荧光确定。由于游离多柔比星的快速清除率,这种简单分析提供对循环性完整C225-ILs-dox的优异测量。将使用PK Solution 2.0软件(Summit Research Serviced, Montrose, CO, 美国),通过非区室药物代谢动力学数据分析确定药物代谢动力学参数。

[0222] 2.5. 针对毒性的剂量调整

[0223] 这是一个剂量逐步升高研究(I期)。对于细节,还参见10.3.2部分。

[0224] 在感受到毒性(DLT)但受益于疗法的个体患者中,根据主要研究人员的临床判断所确定,以降低的剂量继续治疗是可选项(撤出研究)。

[0225] 如果可能,应当对症治疗毒性。如果毒性出现,将使用适宜的治疗来改善体征和症状,包括针对恶心和呕吐的止吐药、针对腹泻的止泻药、针对药物发热的退热药和抗组胺药和针对皮肤毒性的50% DMSO软膏剂。

[0226] 2.6. 支持措施

[0227] 2.6.1 恶心/呕吐

[0228] 应当从第一周期开始给予患者预防性止吐治疗。推荐使用5-HT<sub>3</sub>-受体拮抗剂。应当给予在前面周期中感受等级≥3恶心/呕吐的任何患者更有侵入性的止吐预防措施。

[0229] 尽管给予适宜药物,如果等级≥3恶心/呕吐持续,则该患者必须从本研究退出。

[0230] 2.6.2 腹泻

[0231] 对第一周期不推荐预防性抗腹泻疗法。然而,在腹泻首次发生后,该患者应当在首次发作后接受用洛哌丁胺:4mg对症治疗,随后在每次新发作用2mg洛哌丁胺对症治疗直至腹泻康复(每日不超过16mg)。

[0232] 尽管给予适宜药物,如果等级≥3腹泻持续,则该患者必须从本研究退出。

[0233] 2.6.3. 掌跖红斑(PPE=手足综合征)

[0234] 应当从第一周期开始给予患者预防性治疗。患者应当在第-1至4日经口接受8mg地塞米松BID、在第5日接受4mg地塞米松BID并且在第6日接受4mg地塞米松。额外地,患者应当在治疗时间期间每日(经口)接受150mg吡哆醇(维生素B6)(20)。尽管给予适宜药物,如果2或3级PPE出现,则C225-ILs-dox的施用应当中断最长14日。一旦PPE的严重性降低至CTC等级1,则患者可以继续治疗(如果不因DLT放弃)。

[0235] 尽管给予预防性或对症治疗,如果等级2或3毒性持续,则该患者必须从本研究退出。

[0236] 3. 疾病评价(功效标准)

[0237] 3.1. 总体应答率(次要目标)

[0238] 虽然应答率不是本试验的主要目的,但是将通过标准指标评价具有可测量疾病的患者。肿瘤评估将在筛查期间和在2、4和6个治疗周期后进行。在治疗结束后,第一年每隔3个月并随后根据临床需要开展评估。如果记录到进展,则在本研究范围内将不必开展

进一步评估。在应答性患者中,应答必须在首次记录该应答后最少 4 周进行证实。

[0239] 主要功效标准是根据附录 1 中给出的用于报告癌症治疗结果的 RECIST 标准评估的总体应答率。

[0240] 必须在全部评价期间对每位患者确保连续 CT 扫描与 X 射线(例如利用反差等)的一致性,同时相同技术在整个治疗期间自始至终用于评价损害。

[0241] 3. 2. 进展时间

[0242] 将从患者开始治疗的时间至患者首次记录为具有疾病进展的时间来测量进展时间。

[0243] 必须充分记录并根据 RECIST 标准评估疾病进展。

[0244] 4. 研究流程

[0245] 4. 1. 筛查

[0246] 在进行任何研究特定筛查流程前必须提交知情同意书。

[0247] 筛查流程可以在两个阶段进行。第一组评估可以在第 1 日治疗开始之前 4 周内的任意时间进行。第二组评估必须在治疗开始之前 7 日内进行。如果评估在第 1 日进行,它们必须在研究药物施用之前结束。

[0248] 第 -28 日至第 1 日(首日 C225-ILs-dox,在药物施用之前)评估

[0249]



评估	包括
患者的知情同意	书面同意书
人口统计数据	出生日期
	种族
	性别
恶性疾病史	原发性诊断结果
	组织学
	转移的定位
医疗史	伴发非恶性疾病 非恶性伴发疾病的治疗(=伴行药物)
一般体格检查	总体体检
专项检查	ECG, 超声波心动描记法
	根据需要, 妊娠试验
肿瘤测量/评估	CT扫描、MRI扫描、超声波法或X射线法; 在皮肤或可触及淋巴结转移的情况下临床测量
专项检查	EGFR 过量表达免疫组织化学(DAKO)
生命体征和体格检查	体温 血压 心率 高度 重量 体力状况(ECOG) 体格检查
常见实验室检查	血液学
	血液化学

[0250] 4.2. 在治疗期间

[0251] 肿瘤评估将在筛查期间和在 2、4 和 6 个治疗周期后进行。在治疗结束后, 第一年每隔 3 个月并此后根据临床需要开展评估。如果记录到进展, 则在本研究范围内将不必开展进一步评估。在应答性患者中, 应答必须在首次记录该应答后最少 4 周进行证实。

[0252] 实验室安全性评估:

[0253] 血红蛋白、白细胞和血小板将在第一周期期间每周进行分析, 并且如果没有相反的临床指示, 在后续周期期间每隔 2 周进行分析。

[0254] 转氨酶、胆红素、碱性磷酸酶、肌酸酐、钙、LDH 和尿状况将每隔 4 周进行分析。

[0255] 将在每次访问时记录不利事件。

[0256] 将在全部患者中在治疗前和治疗 2 和 6 个周期后（或在研究结束时）并且如果临床提示时开展超声波心动描记法。

[0257] 5. 研究设计

[0258] 这是一个单中心、开放研究。

[0259] 将以两个阶段进行患者招募。首先，患者根据 10.3.2 部分（剂量方案和剂量调节）登记。第二阶段允许根据如 MTD 所确定的剂量水平额外地招募至多 6 位额外患者。

[0260] 已经完成治疗期（24 周）并显示完全或部分应答以及稳定疾病的患者将进入本研究的观察期。该期将在纳入最后患者后 12 个月结束。

[0261] 在治疗期或观察期期间的任何时间，下述患者将离开研究并任由研究人员治疗，所述患者根据附录 1 中给出的用于报告癌症治疗结果的 RECIST 标准具有疾病进展的体征或因不可接受的毒性而中断治疗。

[0262] 6. 研究药物治疗

[0263] 6.1. 药物名称、制剂、贮存

[0264] 将供应 C225-IL-dox 作为肠胃外施用的每 20ml 小药瓶 10mg 多柔比星溶液剂（0.5mg 多柔比星 /ml）使用。C225-ILs-dox 应当贮存在 2-8°C。

[0265] 6.1.1. 脂质体制备

[0266] 通过使用反复冻融以水化脂质膜的脂质膜水化-挤出法 (23) 制备脂质体。脂质体包含 1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DSPC) 和胆固醇（摩尔比 3 : 2），具有甲氧基聚乙二醇 (mPEG)-1,2-二硬脂酰-3-sn-甘油磷酸乙醇胺 (DSPE ; 0.5-5mol% 磷脂 ; Avanti Polar Lipids ; Alabaster, AL)。水化后，将脂质体通过聚碳酸酯滤器（0.1 μm 孔径）挤出 10 次。脂质体大小由动态光散射法确定（一般 80-100nm）。磷脂浓度由磷酸盐测定法测量 (25)。

[0267] 对于载有 ADS645WS (American Dye Source, 魁北克, 加拿大) 的脂质体，将荧光染料 (5mmol/L) 溶解于缓冲液中以再水化干燥的脂质。在被动加载后，使用 Sephadex G-75 层析法除去未封装的染料。

[0268] 为封装化疗药物多柔比星 (Bedford 实验室, Bedford, OH) 和表柔比星 (Pharmacia, Kalamazoo, MI)，使用硫酸铵进行标准的远程加载方法 (26, 27)。为封装长春瑞滨，在蔗糖八硫酸酯三乙基铵的溶液 (TEA<sub>8</sub>SOS ; 0.65mol/L TEA, pH 5.2-5.5) 中水化后如所述制备脂质体。在 Sepharose CL-4B 大小排阻柱上除去未截留的 TEA<sub>8</sub>SOS。以 350g 药物 /mol 磷脂的药物对磷脂比添加长春瑞滨并且用 1N HCl 调节 pH 至 6.5，随后在 60°C 启动加载过程持续 30 分钟。所得脂质体长春瑞滨在 Sephadex G-75 柱上纯化以除去未封装的药物。

[0269] 6.1.2 单克隆抗体片段和免疫脂质体的制备

[0270] 如之前所述切割并还原完整 C225mAb (西妥昔单抗, 爱必妥 ; ImClone Systems, 在 New York, NY) (11)。Fab' 片段共价地缀合至 PEG-DSPE 链末端处的马来酰亚胺基团 (Mal-PEG-DSPE ; Nektar, Huntsville, AL ; 参考文献 8)。对于 C225-Fab'，缀合效率一般是 30% 至 50%。为掺入进预制的脂质体或商品 PLD (Doxil, Alza Pharmaceuticals, Palo

Alto, CA), 通过在 55°C 以 30  $\mu\text{g Fab}' / \mu\text{mol}$  磷脂的蛋白质 / 脂质体比共孵育 30 分钟, 将 mAb 缀合物掺入脂质体, 产生 70% 至 80% 的掺入效率 (11)。

#### [0271] 6.1.3 制剂

[0272] C225-ILs-dox 将在 University Hospital of Basel 的药房 (Prof. C. Surber) 制备。C225-ILs-dox 将贮存在 pH 6-7 的 HEPES 缓冲盐水 (0.9% NaCl ; HEPES 2mM), 以浓度 0.5mg 多柔比星 /ml。将 C225-ILs-dox 添加至 250ml 5% 葡萄糖中用于注射 (500ml, 对剂量水平 50mg/m<sup>2</sup> 和以上)。

[0273] 这种制剂必须在葡萄糖中稀释后 24 小时内使用。稀释的 C225-ILs-dox 应当是清亮和浅红色的溶液, 没有任何聚集迹象。

#### [0274] 6.1.4 贮存要求

[0275] 小瓶的 C225-ILs-dox 必须在冰箱内在 2° -8°C 范围的温度贮存以确保最佳保留物理和生物化学完整性。重要的是不冻结该研究药物, 因为脂质体将被破坏。C225-ILs-dox 可能对剪切有诱导的应力 (例如搅拌或从注射器快速推出) 敏感。剧烈操作 (如振摇) C225-ILs-dox 溶液可能导致蛋白质聚集并可以产生云雾状溶液。小瓶仅设计为单次使用。

#### [0276] 6.2 包装和标注

[0277] 本研究药物 C225-ILs-dox 的小瓶如下标注:

[0278] 仅用于临床试验使用

[0279] 研究 CC1

[0280] C225-ILs-dox

[0281] 总含量: 20ml, 0.5mg 多柔比星 /ml = 10mg/ 小瓶

[0282] 贮存在 2-8°C 之间 (勿冻结)

[0283] 失效日期:

[0284] 批号:

[0285] 研究员姓名:

[0286] 患者标识:

#### [0287] 6.3 研究治疗

##### [0288] 6.3.1. 剂量选择的原理

[0289] 在众多 II 期和 III 期试验中并还在例行肿瘤学实践中使用的 Caelyx 标准剂量是 40-50mg/m<sup>2</sup>, 作为短时输注每 4 周给予。以这个剂量给予的该药物的主要毒性之一是掌跖红斑 (PPE = 手足综合征)。类似地, 西妥昔单抗的重要可能的副作用是皮肤毒性, 通常本身表现为面部和躯干的痤疮样疹。此种副作用可能是表皮以相对高的水平表达 EGFR 这一事实的后果。因而, 这项研究的主要安全性顾虑是借助抗 EGFR 抗体西妥昔单抗引导 Caelyx 至过量表达 EGFR 的细胞也可能增加该药物的皮肤毒性。

[0290] 在这项 I 期研究范围内的治疗以非常低剂量的 Caelyx 即十分之一标准剂量的药物 (与建立的临床方案中 250mg/m<sup>2</sup> (加载剂量 400mg/m<sup>2</sup>) 相比, 对应于大约 0.9mg/m<sup>2</sup> 的抗体 (西妥昔单抗) 剂量) 进行并且计划以小的增量提高剂量。

##### [0291] 6.3.2 剂量方案和剂量调节

[0292] 患者将三位患者成组分别以下述剂量水平治疗 (C225-ILs-dox 的定量和剂量水平以 mg 多柔比星定义):

[0293] 水平 1 = 5mg/m<sup>2</sup>

[0294] 水平 2 = 10mg/m<sup>2</sup>

[0295] 水平 3 = 20mg/m<sup>2</sup>

[0296] 水平 4 = 30mg/m<sup>2</sup>

[0297] 水平 5 = 40mg/m<sup>2</sup>

[0298] 水平 6 = 50mg/m<sup>2</sup>

[0299] 水平 7 = 60mg/m<sup>2</sup>

[0300] 水平 8 = 70mg/m<sup>2</sup>

[0301] 水平 9 = 80mg/m<sup>2</sup>

[0302] 在每个剂量水平上, 3 位患者可以同时登记参与。在给定剂量水平的 3 位患者已经接受至少一个完整治疗周期后, 如果在给定剂量水平没有剂量限制性毒性 (DLT) 出现, 将允许升高至下一个较高的剂量。将由团队在审阅前面组的全部可用毒性数据后作出进入下一个剂量水平的决定。DLT 定义为任意的 4 级毒性、持续超过 1 周的任意 3 级毒性或 / 和 3 级热性嗜中性白细胞减少症 (定义为嗜中性粒细胞 < 1.0x10<sup>9</sup>/l 和发热 > 38.5°C)。排除恶心、呕吐、厌食和脱发 (2 级) 是剂量限制性毒性。类似地, 与原发性肿瘤显然相关的不利事件如疾病进展将不视为 DLT。此外, 当定义并分析 DLT 时, 必须考虑预先存在的毒性。

[0303] 视为 DLT 的 3 级毒性的例子:

[0304] • 在 PPD (手足综合征) 的情况下, 3 级毒性定义为溃疡性皮炎或皮肤改变, 伴有干扰功能的疼痛, 并因而视为 DLT。

[0305] • 在腹泻的情况下, 3 级毒性定义为超过基线的每日大于 7 次排便; 失禁; 静脉内补液大于 24 小时和 / 或住院, 并因而视为 DLT。

[0306] • 在左心室功能的情况下, 3 级毒性定义为应答于介入治疗的有症状心机能障碍和 / 或射血分数降低于 40%, 并因而视为 DLT。

[0307] 如果 DLT 在任何剂量水平上出现, 则以下原则将适用:

[0308]

在给定剂量水平上具有的 DLT 的患者数	逐步升高决定规则
3 位患者中 0 位患者	3 位患者进入下一个剂量水平
≥ 2	将停止剂量逐步升高。将宣布该剂量水平是最大施用的剂量 (施用的最高剂量)。如果先前仅以该剂量治疗 3 位患者, 则三位 (3) 额外患者将进入下一个较低的剂量水平。

在给定剂量水平上具有的 DLT 的患者数	逐步升高决定规则
3 位患者中 1 位患者	至少 3 位更多的患者进入这个剂量水平。如果这 3 位患者中 0/3 或 1/3 经历 DLT, 继续至下一个剂量水平。如果这个组的 2/3 或更多患者遭受 DLT, 则停止剂量逐步升高, 并宣布该剂量是最大施用的剂量。如果先前仅以该剂量治疗 3 位患者, 则三位 (3) 额外患者将进入下一个较低的剂量水平。
在低于最大施用剂量的最高剂量水平上 6 位患者中有 2 位或以下的患者	这一般是推荐的 2 期剂量。至少 6 位患者必须进入推荐的 2 期剂量。

[0309] 将允许依次剂量逐步升高直至在同一剂量水平上治疗的 3-6 位患者中对 3 位患者观察到 DLT。在此刻, 将不允许进一步剂量逐步升高。未来可能研究的最大耐受剂量 (MTD) 随后将定义为比不得不停止剂量逐步升高的剂量水平低的剂量水平。

[0310] 在经历了毒性的个体患者中, 根据主要研究人员的临床判断所确定并且按照第 6.5 章中详述的规则, 以降低的剂量继续治疗是可选项。

[0311] 6.3.3. 治疗持续期

[0312] 患者将进行治疗直至疾病进展, 但持续最多 6 个周期。

[0313] 6.4. 伴行治疗

[0314] 必须以病例报告形式汇报全部并行药物。

[0315] 7. 过早退出

[0316] 患者可以在任何时间并因任何原因退出本研究, 而不影响他们的恰当治疗权利。研究人员有权利因最有利于患者的任何原因请患者退出, 所述原因包括间发疾病、不利事件、治疗失败或违反方案。

[0317] 在本研究期间怀孕的患者将退出。退出的原因应当标记为违反方案并且应当将妊娠报告为严重不利事件。

[0318] 尽管应当尽可能避免退出, 然而应理解退出可以在研究期间出现。无论何时患者出于任何原因退出研究, 必须对该患者完成最终研究评价, 无论退出原因是什么。关于该患者的全部文件记录必须尽可能完整。

[0319] 8. 警告和注意事项

[0320] 视为严重的任何不利事件必须立即 (在一个工作日内) 报告给 Christoph Mamot 博士或 Christoph Rochlitz 教授 (二者均来自巴塞尔大学医院肿瘤学系; 联系方式见本方案的标题页)。

[0321] C225-ILs-dox 疗法仅应当在治疗癌症患者方面有经验的医师监督下启动。由于这是在瑞士巴塞尔大学肿瘤学系实施的一个单中心研究, 仅该系的医师与研究人員密切合作实施该治疗。

[0322] 关于皮肤毒性, 请参考 10.3.1 (剂量选择的原理)

## [0323] 9. 统计方法和考虑事项

## [0324] 9.1 总体考虑事项

[0325] 这是评价 C225-ILs-dox 在患有晚期实体瘤的患者中安全性的 I 期研究。功效是该项研究的次要目的，因而在治疗之前、期间和之后的肿瘤量值会提供关于针对 C225-ILs-dox 的肿瘤应答的一些初步数据。然而，功效分析将是纯粹描述性的并且没有开展正式的统计学检验。

## [0326] 9.2 样本量

[0327] 本试验的样本量基于这样的研究设计，其中使用所述研究设计来提供试验期间遭遇剂量限制性毒性 (DLT) 时的安全性终止规则。研究计划是在每个剂量水平上招募 3 位患者，同时取决于毒性，在这些剂量水平的每一剂量水平上随后纳入最多另外的 3 位额外患者。当 3 至 6 位患者中 3 位患者在特定剂量水平 (DLT 剂量) 感受到 DLT 时，将终止试验。

[0328] 如果在某一剂量水平的真实毒性率是“P”，则宣布该剂量为毒性 (DLT 剂量) 的概率如下：

## [0329]

毒性率 (P)	检测 DLT 剂量的概率
0.2	0.099
0.3	0.256
0.4	0.456
0.5	0.656
0.6	0.821
0.7	0.930
0.8	0.983

## [0330] 9.3. 主要和次要分析

## [0331] 9.3.1. 主要变量

[0332] 患者针对每一剂量水平的不利事件谱将就事件的频率和数目进行概括。类似地，也概括了感受到 DLT 的患者的数目和比例。将提供全部不利事件和实验室数据的清单。

## [0333] 9.3.2. 次要变量

[0334] 将列表说明属于每种应答类别 (见 7.2.1.) 的患者的比例。

## [0335] 10. 伦理学考虑事项

[0336] 本方案已经书写成文，并且试验将根据赫尔辛基宣言、ICH 颁布良好临床实践指南 (Guidelines of Good Clinical Practice) 和瑞士管理机关要求进行。

[0337] 在将任何患者纳入本试验之前，研究人员必须确保该试验已经由当地伦理委员会批准并且瑞士治疗产品署已经开放该中心。

## [0338] 10.1 知情同意书和患者信息

[0339] 知情同意书应当以地伦理委员会批准的书面形式获得并且由患者签名。两份知情同意书应当签名,其中一份递交给该患者。

[0340] 在寻求知情同意书时,应当使用附件中提供的患者信息(根据当地伦理委员会的要求修订)并且应当递交一份副本给该患者。

[0341] 知情同意流程必须遵守 ICH 和瑞士治疗产品署颁布的良好临床实践指南。

[0342] 全部患者将被告知试验目的、可能的不利感受、在不利事件出现时如何反应和他/她可能遭遇的流程及可能危害。他们将被告知对患者数据严格保密,但是他们需要知道他们的医学纪录可以由除治疗医师之外的授权个人审阅。

[0343] 研究人员必须向患者提供考虑是否参与的足够机会并且使被迫或过度影响的概率最小化。提供的信息应当以患者可理解的语言书写并且不可以包括可能放弃患者任何合法权利或可能豁免研究人员、赞助商或研究机构过失责任的任何内容。

[0344] 将强调的是参与是自愿的并且允许患者在他或她愿意的任何时候拒绝进一步参与该方案。这不损害患者的后续护理。

[0345] 在转变损益比的新数据可获得的情况下,患者应当再次同意。

[0346] 11. 附件

[0347] 11.1. Recist 标准

[0348] 实体肿瘤应答评价标准 (RECIST) (29)

[0349] 对具有可测量疾病的全部患者评价应答。

[0350] 可测量的疾病 - 存在至少一种可测量的损害。如果这种可测量疾病限于孤立损害,其肿瘤特征应当由细胞学 / 组织学证实。

[0351] • 可测量的损害 :可以在至少一个维度上精确测量的损害,所述损害具有使用常规技术时 20mm 的最长直径<sup>3</sup>或用螺旋 CT 扫描时 10mm 的最长直径<sup>3</sup>。

[0352] • 不可测量的损害 :全部其他损害,包括小损害(用常规技术时最长直径 < 20mm 或用螺旋 CT 扫描时最长直径 < 10mm),即,骨损害、柔脑脊膜疾病、腹水、胸膜 / 心包膜渗出、炎性乳腺疾病、皮肤 / 肺淋巴管炎、囊性损害并且还包含未证实并随后由成像技术证实的腹部包块。

[0353] 损害的评价

[0354] 靶损害的评价<sup>A</sup>

[0355] • 完全应答 (CR) :全部靶损害消失

[0356] • 部分应答 (PR) :以基线总和 LD 为参考,靶损害的最长直径 (LD) 的总和下降至少 30%。

[0357] • 进展 (PD) :参考自开始治疗或出现一种或多种新损害以来所记录的最小总和 LD,靶损害的 LD 总和增加至少 20%。

[0358] • 稳定的疾病 (SD) :参考自开始治疗以来的最小总和 LD,既没有足够地缩小至定性 PR,也没有足够地增加至定性 PD。

[0359] 非靶损害的评价<sup>B</sup>

[0360] • 完全应答 (CR) :全部非靶损害消失和肿瘤标记水平正常化。

[0361] • 不完全应答 :一种或多种非靶损害持续(非 CR)或 / 和肿瘤标记水平维持高于正常限。

[0362] • 进展 (PD) :一种或多种新损害出现和 / 或现有非靶损害毫无疑问地进展。<sup>c</sup>

[0363] 注 :

[0364] • 肿瘤标记单独不能用来评估应答。如果肿瘤标记初始高于正常上限,它们必须对全部损害已消失时视为处于完全临床应答的患者归一化。

[0365] • 细胞学和组织学 :如果这种可测量疾病限于孤立损害,则其肿瘤特征应当由细胞学 / 组织学证实。

[0366] 这些技术可以用来区分罕有病例 (例如,其中已知的残余良性肿瘤可能仍保留的肿瘤类型如生殖细胞肿瘤中的残余损害) 中的 PR 和 CR。

[0367] 当可测量的肿瘤已经符合应答或稳定性疾病的标准时,细胞学证实治疗期间出现或恶化的任何渗出物的肿瘤来源对于区分应答或稳定性疾病与进展性疾病是必须遵循的 (渗出可以是该治疗的副作用)。

[0368] 最好总体应答的评价

[0369] 最好总体应答是从治疗开始直至疾病进展 / 复发所记录的最好应答 (以开始治疗以来所记录的最小量值作为进展性疾病的参考)。患者的最好应答指定将取决于量值和证实标准的实现。

[0370] <sup>A</sup> 代表全部所涉及器官的全部可测量损害直至最多 10 处损害应当被鉴定为靶损害并且在基线处记录和测量。应当基于靶损害的大小 (具有最长直径的损害) 及它们对精确反复测量 (通过成像技术或临床测量) 的适用性选择靶损害。将计算全部靶损害的长直径 (LD) 的总和并且报道为基线总和 LD。该基线总和 LD 将作为参考用来进一步表征疾病的可测量维度的客观肿瘤应答。

[0371] <sup>B</sup> 全部其他损害 (或疾病部位) 应当被鉴定为非靶损害并也应当在基线处记录。不要求量值,不过在随访期间应当指出这些损害中每一种损害的存在或不存在。

[0372] <sup>C</sup> 尽管“非靶”损害的清晰进展仅是例外,然而在这种环境下,治疗医师的选择应当为主导并且进展状况应当在稍后时间由评审专家组 (或试验主持人) 证实。

[0373]

靶损害	非靶损害	新损害应答	总体
CR	CR	无	CR
CR	非 CR/ 非 PD	无	PR
PR	非 PD	无	PR
SD	非 PD	无	SD
PD	任意	有或无	PD
任意	PD	有或无	PD
任意	任意	有	PD

[0374] 注 :



[0375] • 应当将健康状况全面恶化的要求中断治疗而当时没有疾病进展客观证据的患者报道为“有症状的恶化”。应当全力记录客观进展,即便在中断治疗后。

[0376] • 在一些情况下,可能难以区分残留疾病与正常组织。当完全应答的评价取决于这种决定因素时,推荐应当在证实完全应答状况之前研究残余损害(细针头抽吸/活组织检查)。

[0377] 评价可测量疾病的指南

[0378] 全部量值应当使用尺子或卡尺记录以米制符号记录。全部基线评价应当在根据评估计划注册之前 14 日内进行。

[0379] 注:在以往辐射过的区域内的肿瘤损害最佳地不视为可测量的疾病。

[0380] 应当在基线处和随访期间使用相同的评估方法和相同技术来表征每种所鉴定和报告的损害。CT 和 MRI 是测量为应答评估所选择的靶损害的目前可用性和重复性最好的方法。当使用两种方法来评估疗法的抗肿瘤作用时,优选基于成像的评价法来通过临床检查评价。

[0381] • 仅当临床损害为浅表时(例如,皮肤小结,可触及性淋巴结),才会认为它们是可测量的。在皮肤损害的情况下,推荐通过彩色照相记录,包括尺子以估计损害的尺寸。

[0382] • 可接受胸部 X 射线片上的损害为可测量的损害,当这些损伤是清晰限定的并被充气肺包围时。然而,优选 CT。

[0383] • 常规 CT 和 MRI 应当以 10mm 或更小截距切片厚度连续地进行。螺旋 CT 应当使用 5mm 连续的重构算法进行。这适用于胸部、腹部和骨盆。头和颈部端部通常需要特殊的方法。

[0384] • 当本试验的主要目的是客观性应答评价时,超声术(US)不应当用来测量临床上不容易接近的肿瘤损害。它是临床测量浅表可触及性小结、皮下损害和胸腺小结的可能替代。超声术也可能用来证实通常由临床检查评估的浅表性损伤的彻底消失。

[0385] 证实性量值/应答持续期

[0386] 证实

[0387] 为了向一种状况指定 PR 或 CR,必须通过重复研究证实肿瘤量值的改变,其中所述的重复研究应当在首次满足应答标准 4 周后进行。在 SD 的情况下,随访量值必须在试验 7 周后符合 SD 标准至少一次(见评估安排,附件 23.18)。

[0388] 总体应答的持续期

[0389] 从对 CR/PR(无论先记录到哪种)符合测量标准的时间直至客观记录到复发性或进展性疾病的首个日期,测量总体应答的持续期(以开始治疗以来所记录的最小量值作为进展性疾病的参考)。

[0390] 从 CR 首先符合测量标准的时间直至客观记录到复发性疾病的首个日期,测量总体完全应答的持续期。

[0391] 稳定疾病的持续期

[0392] 以开始治疗以来所记录的最小量值作为参考,从开始治疗直至符合进展标准,测量稳定性疾病。

[0393] 11.2. 合格形式

[0394] 纳入标准

- [0395] 在登记参与本研究前,候选人必须达到全部以下标准(如果是的话,勾选每个空格):
- [0396] 1. 组织学证明的局部推进的或转移性实体瘤。
- [0397] 2. ECOG 表现 $\leq 2$ 。
- [0398] 3. 没有额外的标准疗法可用于该患者。
- [0399] 4. 在最新近可评价的肿瘤组织中确定的 EGFR 过量表达(根据 DAKOEGFR pharmDx- 试验)。
- [0400] 5. 无伴行的抗肿瘤疗法(类固醇是允许的 - 在乳腺癌和前列腺癌中,需要类固醇在研究期间保持稳定)。
- [0401] 6. 自停止任何先前抗肿瘤治疗以来至少 4 周(在亚硝基脲或丝裂霉素 C 的情况下 6 周)。
- [0402] 7. 在具有先前蒽环类药暴露史的患者中,要求正常的超声心动图(LVEF  $> 50\%$ )。
- [0403] 8. 年龄 $\geq 18$  岁。
- [0404] 9. 男性或女性。
- [0405] 10. 育龄女性和男性患者必须使用有效避孕措施。
- [0406] 11. 在参与本研究前,愿意并且能够签署知情同意书并且在本研究持续期间服从本方案。
- [0407] 排除标准:
- [0408] 如果符合以下任意标准,则必须从本研究排除候选人(如果是的话,勾选每个空格):
- [0409] 1. 妊娠和 / 或哺乳。
- [0410] 2. 具有以下实验室值的患者
- [0411] 嗜中性粒细胞  $< 1.5 \times 10^9$  个 /L
- [0412] 血小板  $< 100 \times 10^9$  个 /L
- [0413] 血清肌酸  $> 3.0 \times$  正常上限
- [0414] ALAT、ASAT  $> 3.0 \times$  正常上限(在肝脏转移作为酶改变的唯一可能原因的患者中  $5.0 \times$ )
- [0415] 碱性磷酸酶  $> 3.0 \times$  正常上限(在肝脏转移或骨转移作为酶改变的唯一可能原因的患者中  $5.0 \times$ )
- [0416] 胆红素  $> 3.0 \times$  正常上限
- [0417] 3. 在治疗开始前 4 周内参与任何调查性药物研究。
- [0418] 4. 具有临床明显和失控的肾病或肝病的患者。
- [0419] 5. 临床明显的心脏病:充血性心力衰竭(纽约心脏协会 III 或 IV 类);有症状冠状动脉病;用药物治疗没有充分控制的心律不齐;在最近 12 个月内的心肌梗死。
- [0420] 6. 可能有损患者参与本试验的能力的(由研究人员判定的)任何严重的基础性医学病症(例如活跃自身免疫病、失控的糖尿病等)。
- [0421] 7. 根据瑞士治疗产品署批准的产品信息施用爱必妥™ 或 Caelyx™ 时禁忌的任何伴行药物。
- [0422] 8. 累积的多柔比星剂量  $> 300 \text{mg}/\text{m}^2 \text{BSA}$ (或心脏毒性蒽环类药等同物)。

[0423] 9. 具有由研究人员判定为临床明显并妨碍知情同意或干扰顺应性的失控性发作、中枢神经系统疾病或精神病学失能的患者。

[0424] 10. 脑转移。

[0425] 12. 结果

[0426] 在下表中包括 I 期试验的初步结果。这些结果显示直至 50mg/m<sup>2</sup> 浓度不能或很少能够观察到药物相关的毒性作用。特别地,在甚至更高的剂量上没有发现皮肤毒性、特别地没有掌跖红斑,而与此同时,观察到清晰的功效信号,甚至在所用的最低剂量上也是如此。

[0427] 表 1 :I 期试验的初步结果

[0428]

患者编号	剂量 (每 m <sup>2</sup> )	肿瘤	周期	3/4 级毒性	功效 (最好的应答)
1	5mg	前列腺	2	无	PD*
2	5mg	胰腺	2	无	PD
3	5mg	肾细胞	2	无	PD
4	10mg	胰腺	1	无	n. e.
5	10mg	食管	3	无	SD
6	10mg	结直肠	6	无	SD
7	20mg	结直肠	2	无	PD
8	20mg	胰腺	1	无	PD
9	20mg	头颈	4	无	SD
10	30mg	间皮	6	无	PR
11	30mg	前列腺	2	无	PD
12	30mg	胰腺	2	无	PD
13	40mg	膀胱	2	无	PD
14	40mg	膀胱	6	无	SD (MR)
15	40mg	肾细胞	1	无	n. e.

患者编号	剂量 (每 m <sup>2</sup> )	肿瘤	周期	3/4 级毒性	功效 (最好的应答)
16	50mg	肝细胞	2	3 级嗜中性白细胞减少症	n. e.

[0429] (\*2 周期后最小肿瘤进展。回溯地, PSA 下降和肺转移缓和持续 18 个月)。

[0430] (在迄今治疗的所有 16 位患者中根本没有皮肤毒性)

[0431] PD 进展

[0432] SD 稳定性疾病

[0433] SD (MR) 稳定性疾病 (最小应答)

[0434] PR 部分应答

[0435] n. e 未评价

[0436] B 多药抗性研究

[0437] 1. 材料

[0438] 1.1 试剂

[0439] 用于脂质体制备的试剂包括: DiI<sub>C<sub>18</sub></sub>(3)-DS (Molecular Probes ;Leiden, Netherlands) ;DSPC, 胆固醇, 和 mPEG-DSPE (Avanfi Polar Lipids ;Alabaster, AL, USA) ; Mal-PEG (2000/3400)-DSPE (Nektar ;Huntsville, AL, 美国) ;有机溶剂和其他试剂纯化学品 (Sigma-Aldrich AG ;Buchs, 瑞士)。

[0440] 多柔比星 (Adriblastin RD<sup>®</sup> ;Pfizer AG, Zürich, 瑞士) 和聚乙二醇化的脂质体多柔比星 (Caelyx<sup>®</sup>, Essex Chemie AG, Luzern, 瑞士) 商业地从药房获得。

[0441] 免疫脂质体含有衍生自 C225 (西妥昔单抗, 爱必妥) 或 EMD72000 (马妥珠单抗) (均为 Merck KGaA, 达姆施塔特, 德国) 的 Fab'。两种单克隆抗体均是与 EGFR 胞外结构域 (ECD) 结合并因而阻断 EGFR 配体如 EGF 和 TGF- $\alpha$  (36) 激活作用的重组 IgG<sub>1</sub>。MAb C225 是嵌合 MAb, 而 EMD72000 是从转基因小鼠衍生的人源化 MAb (37)。

[0442] MAb EMD72000 由德国达姆施塔特 Merck KGaA 友好提供。

[0443] 1.2. 细胞系

[0444] MDA-MB-231 人乳腺癌和结肠直肠癌细胞系 HT-29 癌细胞系从巴塞尔大学研究系或美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 获得。这些细胞系的抗性形式由 Susan Bates (MDA-MB-231 Vb100 ;NIH, Bethesda, 美国) 和由 **Schäfer** 博士 (HT-29RDB ;Charité, 柏林, 德国) 提供。在加湿气氛 95 % 空气和 5 % CO<sub>2</sub> 在 37 °C 将 MDA-MB-231 细胞维持于“改良 MEM 锌选项”培养基 (Invitrogen AG, 巴塞尔, 瑞士) 中和将 HT-29 维持在 RPMI-1640 (Sigma-Aldrich AG, 布克斯, 瑞士), 所述培养基补充有 10 % 胎牛血清, 100 IU/ml 青霉素和 100  $\mu$ g/ml 链霉素。

[0445] 2. 脂质体制备、加载和抗体掺入

[0446] 2.1 脂质体制备

[0447] 根据反复冻融法 (23), 使用 DSPC 和胆固醇 (摩尔比 3 : 2) 与

mPEG-DSPE (0.5–5mol% 磷脂) 制备单层脂质体。简而言之, 随后将脂质体通过具有 0.1 μm 定义孔径的聚碳酸酯滤器挤出 10 次, 产生如动态光散射法所确定的 90–120nm 直径的脂质体。使用标准磷酸盐测定法测量脂质体浓度。

[0448] 对于摄取和内化研究, 用 0.1–0.3mol% DiI<sub>C18</sub>(3)-DS (一种可以稳定掺入脂质体膜的荧光脂质) ((38) (39)) 标记脂质体。

[0449] 为封装多柔比星, 利用硫酸铵进行远程加载法 (remote-loading method) ((27) (26))。首先, 将干燥脂质在 250mM 硫酸铵中于 pH 5.5 再水化, 随后如上文所述挤出。使用 Sephadex G-75 柱 / HEPES 缓冲盐水 (pH 7.0), 通过大小排阻层析法除去游离硫酸铵。脂质体随后在 60°C 与多柔比星孵育 30 分钟。在这些条件下, 当使用每微摩尔磷脂 150 μg 药物时, 加载效率一般在 95–100% 范围内。使用 Sephadex G-75 柱, 通过大小排阻层析法除去所有未封装的多柔比星。此外, 商业地获得聚乙二醇化的脂质体多柔比星 (PLD/Caelyx<sup>®</sup> / Doxil<sup>®</sup>)。

#### [0450] 2.2 MAb 片段制备、缀合和脂质体掺入

[0451] 对于 C225- 和 EMD72000-Fab', 将完整 MAb 与 0.1M 乙酸钠 (pH 3.7) 中的胃蛋白酶 (重量比 1 : 20) 在 37°C 孵育 3 小时, 随后对 HEPES 缓冲盐水 (pH 6.0) 透析。所得 F(ab)<sub>2</sub> 用 2-巯基乙醇或 2-巯基乙醇在 37°C 于氩气下还原 15 分钟, 然后通过使用 Sephadex G-25 的凝胶过滤法回收。还原效率一般是 70–90%。

[0452] Fab' 如以往所述缀合至 Mal-PEG-DSPE ((11) (12))。通过 SDS-PAGE 评价缀合效率, 从而允许比较游离 MAb 片段与缀合物; 缀合效率一般对于 C225 是 30–50% 并且对于 EMD72000 是 40–60%。为掺入包含制备的脂质体药物和探针或商品聚乙二醇化的脂质体多柔比星的预制脂质体, 通过在 55°C 共孵育 30 分钟将形成胶束溶液的 MAb 片段缀合物 (Fab' -Mal-PEG-DSPE) 掺入脂质体。作为结果, 缀合物通过疏水 DSPE 结构域与脂质体的脂质外层接合。通过 Sepharose CL-4B 凝胶过滤法将未掺入的缀合物和游离药物与免疫脂质体分开。当使用 DiI<sub>C18</sub>(3)-DS 标记的脂质体时, 小于 5% 的荧光与胶束级分共缔合, 这显示该标记的最小转移。如所述地使用一系列蛋白质标准品和凝胶扫描与定量法, 通过 SDS-PAGE 评估缀合 MAb 片段的掺入效率。对于 C225 和 EMD72000, 一般而言, 75–85% 添加的 MAb 缀合物掺入免疫脂质体, 这对应于每个脂质体 30–40 个 Fab' 片段。

### [0453] 3. 研究设计

#### [0454] 3.1 结合和内化研究

[0455] 对于流式细胞术研究, 将 250,000 个细胞在 37°C 与 12 孔板中的盐水 (对照)、脂质体或以 DiI<sub>C18</sub>(3)-DS 标记的靶向 EGFR 的免疫脂质体共孵育 2 小时, 用 PBS 充分洗涤, 随后分开并贮存在冰上直至进行流式细胞术。因而进行荧光显微镜术研究, 除了从 12 孔平板移出细胞之外。

[0456] 含有 C225-Fab' 的免疫脂质体比对照脂质体在人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 中显示高大约 2 个数量级的累积, 所述对照脂质体在这些细胞中仅产生背景荧光水平。在多药抗性次级细胞系 MDA-MB-231 Vb100 中存在相似的模式。

[0457] 也在过量表达 EGFR 的结肠癌 HT-29 细胞及其多药抗性次级细胞系 HT-29 RDB 中评价了含有 C225-Fab' 的免疫脂质体的结合和摄取。这里, 免疫脂质体在过量表达 EGFR 的 HT-29 细胞中显示超过 1 个数量级的更多摄取并且在 mdr 细胞系 HT-29 RDB 中显示可比较

的研究结果。在无 EGFR 过量表达的对照细胞系 MCF-7 中,非靶向的脂质体与抗 EGFR 免疫脂质体之间不存在摄取 / 结合的差异 (数据未显示)。这些结果表明两个同基因细胞系中对免疫脂质体摄取的高度选择性,与这两个细胞系的 *mdr* 特征无关。

[0458] 与对照脂质体孵育后靶细胞中最小荧光摄取的观察结果与聚乙二醇化脂质体的非反应特性一致 ((12) (40)),并且还证实 Di1C<sub>18</sub>(3)-DS 可以用作基于脂质体的稳定标记,而没有明显交换至细胞膜中。

### [0459] 3.2 细胞毒性研究

[0460] 在靶细胞中评价含有多柔比星的 EGFR- 靶向的免疫脂质体的特异性细胞毒性,其中所述的靶细胞以密度每孔 8,000 个细胞接种于 96 孔平板内并且使其生长过夜。在 37°C 应用免疫脂质体或对照治疗 2 小时,随后用 PBS 洗涤并重新添加生长培养基。细胞进一步在 37°C 孵育 3 日并使用 3-(4,5- 二甲基噻唑 -2- 基)-2,5- 二苯基溴化四唑鎓 (MTT) 染色法 (41) 分析细胞成活力。对于使用排出泵抑制剂维拉帕米的细胞毒性研究,在整个实验期间这种化合物以 100  $\mu$  M 浓度添加至培养基。

[0461] 在过量表达 EGFR 的 HT-29 野生型结肠癌细胞,处理 2 小时后,靶向 EGFR 的免疫脂质体多柔比星显示实质的体外细胞毒性 ( $IC_{50} = 0.25 \mu$  g/ml),这接近于游离多柔比星的体外细胞毒性 ( $IC_{50} = 0.3 \mu$  g/ml) (表 2)。因而,多柔比星的 EGFR 靶向免疫脂质体递送如游离多柔比星 (一种在体外轻易横穿细胞膜的两亲性小分子) 的快速扩散一样有效。另一方面,通过将 C225-Fab' 缀合至 PLD 所衍生的靶向 EGFR 的免疫脂质体多柔比星在 HT-29 细胞中比非靶向的 PLD 本身 (未达到  $IC_{50}$ ) 显示大得多的细胞毒性,表明递送过程是抗体依赖的 (表 2)。值得注意地,仅用抗体 C225 持续 2 小时的相似处理在这种测定法中不显示细胞毒性,这证实免疫脂质体活性归因于定向药物递送并且与 C225 在这个短暂孵育时间期间的潜在抗增殖作用不相关。另外,含有 C225-Fab' 但缺少所封装药物的免疫脂质体 (“空的免疫脂质体”) 在这些测试条件下类似地不显示细胞毒性。在缺少 EGF 受体的 MCF-7 细胞中也未见到 C225- 免疫脂质体 -dox 的作用 (阴性对照 ;数据未显示)。

[0462] 在多药抗性次级细胞系 HT-29RDB 中进行相同实验。值得注意地,在这种细胞系中,多柔比星的免疫脂质体递送 ( $IC_{50} = 0.5 \mu$  g/ml) 优于游离药物 ( $IC_{50} = 9.5 \mu$  g/ml ;= 19 倍) 并且还优于脂质体药物 (未达到  $IC_{50}$ )。汇总我们的这部分研究,尽管游离多柔比星在 HT-29 细胞系的多药抗性变体中与野生型细胞系相比具有低得多的细胞毒性,然而对于免疫脂质体化合物而言几乎不存在差异,与这种细胞系中的不同 *mdr* 特征无关,这表明免疫脂质体能够在这种环境下回避多药抗性机制。

[0463] 也在以多药抗性为特征的过量表达 EGFR 的人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 Vb100 中评价了使用多柔比星的免疫脂质体介导的细胞毒性并且与使用缺少 *mdr* 的其亲本细胞系 MDA-MB-231 的结果比较。在亲本野生型 MDA-MB-231 中,含有 C225-Fab' 的 ILs 与游离多柔比星本身一样有效地递送多柔比星,其也可以轻易穿透细胞膜并且比非靶向的脂质体多柔比星 /PLD 明显具有更强细胞毒性 ( $IC_{50} = 0.3 \mu$  g/ml,相对于  $0.6 \mu$  g/ml,相对于  $120 \mu$  g/ml)。

[0464] 令人感兴趣地,在高度药物抗性 MDA-MB-231 Vb100 细胞系中,载有多柔比星 (dox) 的 ILs 产生比游离多柔比星高 216 倍的细胞毒性,并且也比非靶向的脂质体多柔比星具有明显更高的细胞毒性 ( $IC_{50} = 0.6 \mu$  g/ml,相对于  $130 \mu$  g/ml,相对于大于  $900 \mu$  g/m)。

[0465] 在维拉帕米的存在下重复抗性 MDA-MB-231 Vb100 细胞中的相同实验。维拉帕米能够抑制排出泵并因而逆转多药抗性的特定机制。实际上,通过添加维拉帕米至这个实验,能有效地转变多药抗性机制,并且因而游离多柔比星如在野生型 MDA-MB-231 细胞系中那样有效 ( $IC_{50} = 0.9 \mu g/ml$ )。相反,维拉帕米的添加没有进一步提高由抗 EGFR 免疫脂质体递送的多柔比星的效力 ( $IC_{50} = 0.5 \mu g/ml$ ),因而证实了我们的研究结果:ILs 能够克服多药抗性机制并且该递送系统不受排出泵存在的影响。

[0466] 表 2:细胞毒性研究的汇总结果

[0467]

	HT-29 野生型 ( $IC_{50}$ )	C225-ILs-dox 相对于游离 多柔比星	HT-29 RDB( $IC_{50}$ )	C225-ILs-dox 相对于游离 多柔比星
游离多柔比星	0.3	1.2 倍	9.5	19 倍
C225-ILs-dox	0.25		0.5	
PLD	>31		>31	

[0468] PLD 非靶向的脂质体多柔比星

[0469] C225-ILs-dox C225 抗体靶向的脂质体多柔比星

[0470] 3.3 多柔比星在细胞浆和胞核中的累积

[0471] 对于比较性累积研究,肿瘤细胞 (HT-29、HT-29 RDB、MDA-MB-231 或 MDA-MB-231 Vb100) 以每孔 200,000 个细胞的密度接种在 12 孔板中。游离多柔比星、非靶向的脂质体多柔比星 (PLD) 和免疫脂质体多柔比星已经以  $3 \mu g/ml$  多柔比星浓度在  $37^{\circ}C$  应用了 2 小时,随后用培养基进行 2 轮洗涤。维拉帕米以 0、10 或  $100 \mu M$  浓度添加至实验。在无任何处理下孵育另外 2 小时后,如下分析细胞:

[0472] 在移去培养基后,细胞用 1ml 含有 FCS 的培养基洗涤一次,随后用 1ml 含钙和镁的 PBS 在室温 (RT) 3 分钟。将 PBS 用  $400 \mu l$  C100T 溶液 (100ml 含有 2.1g 柠檬酸和 0.5ml Tween 20) 替换。以 300 转 / 分钟振摇 10-15 分钟引起细胞膜溶解和释放细胞核,如显微镜术所证实。将每孔的全部内容物转移至 0.5ml 透明 PCR 管并在室温和 1200rcf 离心 5 分钟。以这种方式,胞核将沉积在管底尖处,这对后续加工是重要的。为确定细胞浆中的多柔比星,取出  $350 \mu l$  上清液并与  $350 \mu l$  酸性甲醇 (含有 1M 正磷酸的甲醇) 混合。对于多柔比星的胞核累积,含有胞核的沉淀物用  $500 \mu l$  含有 1% C100T 的 PBS 洗涤两次并且利用如前所述的后续离心法离心。在仔细移去最终上清液后,来自沉淀物的多柔比星由  $400 \mu l$  50%酸性甲醇过夜提取。

[0473] 从细胞浆提取物和胞核提取物转移  $300 \mu l$  至 96 孔平板并通过“SpertraMax Gemini Fluorimeter” (Molecular Devices) 测量。

[0474] 3.4 肿瘤异种移植模型

[0475] 在 MDA-MB-231 野生型和抗性乳腺癌异种移植肿瘤模型中研究非靶向的脂质体相对于抗 EGFR 免疫脂质体的效力。Swiss nu/nu 小鼠 (5-6 周; Charles River, 法国) 以过量表达 EGFR 的 MDA-MB-231 肿瘤细胞 ( $1 \times 10^7$  个细胞,野生型或抗性) 皮下 (s. c.) 注射

至动物背部。一旦肿瘤异种移植物已经建立并且和肿瘤测量为 150-250mm<sup>3</sup>,将小鼠随机分配至不同处理组(根据研究,8-10 只动物/组)。全部静脉内治疗通过尾静脉注射,一般以 100-200 μl 体积进行。脂质体和抗 EGFR 免疫脂质体(C225-和 EMD72000-)以剂量 10mg 多柔比星/kg/剂静脉内施用 3 周,每周 1 次,总剂量 30mg dox/kg。游离药物按照与脂质体或免疫脂质体相同的时间进度表以 30mg dox/kg 多柔比星 MTD 进行静脉内注射。在对照组中,盐水以相同注射体积和时间进度表静脉内施与。

[0476] 肿瘤植入后监测肿瘤生长 55-100 日。小鼠一周三次称重并就毒性进行检查。使用卡尺每周 2-3 次进行肿瘤测量,并且使用等式:(长度 X 宽度<sup>2</sup>)/2 计算肿瘤体积。

[0477] 在缺少 mdrl 特征的野生型 MDA-MB-231 异种移植物模型中,以分成 10mg/kg 的周剂量三次的 30mg dox/kg 总剂量静脉内施用抗 EGFR 免疫脂质体-dox。从抗 EGFR MAb C225 或从 EMD 72000 制备抗 EGFR 免疫脂质体。对照治疗包括:剂量和时间进度表与免疫脂质体相同的盐水;游离多柔比星和非靶向的脂质体多柔比星(商业聚乙二醇化的脂质体多柔比星;PLD)。

[0478] 与盐水治疗相比时,游离多柔比星产生一些肿瘤生长抑制。通过 PLD 实施的多柔比星非靶向脂质体递送在这个高剂量上诱导肿瘤消退和胜过游离药物的明显提高的效力。用抗 EGFR 免疫脂质体-dox 的治疗,无论使用 C225 或 EMD72000,引起实质的肿瘤消退并且总体上是最有效的治疗。直到第 77 日,对于 PLD 组、C225-ILs-dox 组和 EMD72000-ILs-dox 组而言肿瘤消退是相似的。然而,在追踪期间,用非靶向 PLD 治疗的肿瘤均开始重新生长而用免疫脂质体多柔比星即 C225-ILs-dox 和 EMD72000-ILs-dox 治疗的肿瘤不显示生长活动直至观察结束(第 100 日),表明了如以往在其他异种移植物肿瘤模型中报道的抗 EGFR 免疫脂质体的治愈性潜力。

[0479] 在以非常相似的 EGFR 过量表达(数据未显示)、但额外地以多药抗性为特征的 MDA-MB-231 Vb100 异种移植物模型中重复相同实验。再次,以分成 10mg/kg 三次周剂量的 30mg dox/kg 总剂量静脉内施用从 C225 或 EMD72000 衍生的抗 EGFR 免疫脂质体-dox。比较物包括:剂量和时间进度表与免疫脂质体相同的盐水;游离多柔比星和非靶向的脂质体多柔比星(商业聚乙二醇化的脂质体多柔比星;PLD)。

[0480] 在这个高度多药抗性模型中,与盐水治疗相比,游离多柔比星不显示任何肿瘤生长抑制作用。通过 PLD 实施的多柔比星的非靶向脂质体递送在这个高剂量上显示一些肿瘤生长抑制作用。有趣并且重要地,用抗 EGFR 免疫脂质体-dox 的治疗,无论使用 C225 或 EMD72000,引起实质的肿瘤消退并且总体上是最有效的治疗。与 EMD72000-ILs-dox 相比,C225-ILs-dox 似乎是适度地更有效。然而,这仅是一种趋势并且不是统计显著的。总之,本试验的结果说明抗 EGFR 免疫脂质体甚至对多药抗性肿瘤是有效的并且可以克服 mdrl 机制(见表 3)。

[0481] 在两种模型中,抗 EGFR 免疫脂质体-dox 被小鼠充分耐受。用抗 EGFR 免疫脂质体-dox 的治疗与没有大的体重损失相关:

[0482] 表 3:肿瘤异种移植物研究的结果

[0483]



IC <sub>50</sub> (μg/ml)	MDA-231 WT	MDA-231 Vb100	MDA-231 Vb100 维拉帕米
PLD	120	> 900	740
游离多柔比星	0.6	130	0.9
C225-ILs-dox	0.3	0.6	0.5

[0484] 3.5 统计分析

[0485] 为评价结果的统计显著性,分析了肿瘤体积并对每个时间点使用 Student t 检验 (2 样本单独的 t 检验) 比较不同治疗组。此外,基于每只小鼠的秩总数进行多变量 (秩) 检验。在最后的治疗后的每个时间点上的肿瘤尺寸在该日的全部小鼠内进行秩评定并将秩加总。在每种情况下对两个治疗组通过 2 样本 t 检验比较秩总数 (42)。

[0486] 参考文献:

[0487] (1)Sridhar SS, Seymour L, Shepherd FA. 表皮生长因子受体抑制剂:以非小细胞肺癌为焦点的临床研究综述 (Inhibitors of epidermal-growth-factor receptors: a review of clinical research with a focus on non-small-cell lung cancer). *Lancet Oncol* 2003 ;4 :397-406.

[0488] (2)Longley DB, McDermott U, Johnston PG. 结肠直肠癌的预测标记:现状与未来展望 (Predictive markers for colorectal cancer: current status and future prospects). *Clin Colorectal Cancer* 2003 ;2 :223-30.

[0489] (3)Baselga J, Pffster D, Cooper MR, Cohen R, Burtness B, Bos M 等人, 单独或与顺铂联合的抗表皮生长因子受体嵌合抗体 C225 的 I 期研究 (Phase I studies of anti-epidermal growth factor receptor chimeric antibody C225 alone and in combination with cisplatin). *J Clin Oncol* 2000 ;18 :904-14.

[0490] (4)O' Brien ME, Wigler N, Inbar M, Rosso R, Grischke E, Santoro A 等人, III 期试验中用于一线治疗转移性乳腺癌的 PEG 化脂质体多柔比星 HCl (CAELYX/Doxil) 相对于常规多柔比星的降低心脏毒性和可比较效力 (Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX/Doxil) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer). *Ann Oncol* 2004 ;15 :440-9.

[0491] (5)Keller AM, Mennel RG, Georgoulias VA, Nabholz JM, Erazo A, Uch A 等人, 聚乙二醇化的脂质体多柔比星与长春瑞滨或丝裂霉素 C 加长春花碱在患有紫杉烷类难治性晚期乳腺癌的妇女中的随机化 III 期试验 (Randomized phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin versus vinorelbine or mitomycin C plus vinblastine in women with taxane-refractory advanced breast cancer). *J Clin Oncol* 2004 ;22 :3893-901.

[0492] (6)Northfelt DW, Dezube BJ, Thommes JA, Levine R, Von Roenn JH, Dosik GM

等人, 标准化学疗法失败后聚乙二醇化的脂质体多柔比星在治疗 AIDS 相关的卡波奇氏肉瘤中的效力 (Efficacy of pegylated-liposomal doxorubicin in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma after failure of standard chemotherapy). *J Clin Oncol* 1997 ;15 :653-9.

[0493] (7) Stewart S, Jablonowski H, Goebeil FD, Arasteh K, Spittle M, Rios A 等人, 治疗 AIDS 相关性卡波奇氏肉瘤中聚乙二醇化的脂质体多柔比星对博来霉素和长春新碱的随机化比较试验, 国际聚乙二醇化的脂质体多柔比星研究组 (Randomized comparative trial of pegylated liposomal doxorubicin versus bleomycin and vincristine in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma. International Pegylated Liposomal Doxorubicin Study Group). *J Clin Oncol* 1998 ;16 :683-91.

[0494] (8) Gordon AN, Fleagle JT, Guthrie D, Parkin DE, Gore ME, Lacave AJ. 复发性上皮卵巢癌: 聚乙二醇化的脂质体多柔比星对托泊替康的随机化 III 期研究 (Recurrent epithelial ovarian carcinoma: a randomized phase III study of pegylated liposomal doxorubicin versus). *J Clin Oncol* 2001 ;19 :3312-22.

[0495] (9) Orditura M, Quaglia F, Morgillo F, Martinelli E, Lieto E, De Rosa G 等人, 聚乙二醇化的脂质体多柔比星: 强力抗肿瘤活性伴有蒽环类药物诱导性心脏毒性降低的药理学证据和临床证据 (综述) (Pegylated liposomal doxorubicin: pharmacologic and clinical evidence of potent antitumor activity with reduced anthracycline-induced cardiotoxicity (review)). *Oncol Rep* 2004 ;12 :549-56.

[0496] (10) Kirpotin DB, Hong K, Park JW, Shalaby R, Shao Y, Zheng W 等人, 通过两亲性聚(乙二醇)-抗 HER2 抗体缀合物自发捕获至脂质体膜中所产生的抗 HER2 免疫脂质体 (Anti-HER2 immunoliposomes produced by spontaneous capture of an amphipathic poly(ethylene glycol)-anti-HER2 antibody conjugate into the liposome membrane). *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.* 2000 ;41 :325.

[0497] (11) Mamot C, Drummond DC, Greiser U, Hong K, Kirpotin DB, Marks JD 等人, 表皮生长因子受体 (EGFR) 靶向的免疫脂质体介导特异性及有效递送药物至过量表达 EGFR 和 EGFRvIII 的肿瘤细胞 (Epidermal growth factor receptor (EGFR)-targeted immunoliposomes mediate specific and efficient drug delivery to EGFR- and EGFRvIII-overexpressing tumor cells). *Cancer Res* 2003b ;63 :3154-61.

[0498] (12) Kirpotin D, Park JW, Hong K, Zalipsky S, Li WL, Carter P. 等人, 立体稳定化的抗 HER2 免疫脂质体: 设计和体外靶向人乳腺癌细胞 (Sterically stabilized anti-HER2 immunoliposomes: design and targeting to human breast cancer cells in vitro). *Biochemistry* 1997 ;36 :66-75.

[0499] (13) Mamot C, Drummond DC, Noble C, Kirpotin DB, Hong K, Park JW. EGFR/EGFRvIII 靶向的免疫脂质体在体内显著增强多种抗癌药的效力 (EGFR/EGFRvIII targeted immunoliposomes significantly enhance the efficacy of multiple anticancer drugs in vivo). *Cancer Res* 2005 ;.

[0500] (14) Khaw, B. A 等人, *J. Nucl. Med.* 23 :1011-1019 (1982)

[0501] (15) Rousseaux 等人, *Methods Enzymology*, 121 :663-69, Academic Press, 1986.

- [0502] (16) Rader 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1998) 95 :8910-8915.
- [0503] (17) Queen 等人, Proc. Natl Acad Sci USA, 86 :10029-10032 (1989), Hodgson 等人, Bio/Technology, 9 :421 (1991)).
- [0504] (18) Allen, T. M. 等人, Biochimica et Biophysica Acta, 1237 :99-108 (1995).
- [0505] (19) Zalipsky, S., Bioconjugate Chem., 4(4) :296-299 (1993).
- [0506] (20) Zalipsky, S. 等人, FEBS Lett., 353 :71-74 (1994).
- [0507] (21) Zalipsky, S. 等人, Bioconjugate Chemistry, 6(6) :705-708 (1995).
- [0508] (22) Zalipsky, S. 在《隐形脂质体》(D. Lasic 和 F. Martin 编著) 第 9 章, CRC Press, Boca Raton, Fla, (1995).
- [0509] (23) Szoka, F., Jr. 等人, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 9 :467 (1980).
- [0510] (24) Martin, F. X, 在《专门药物递送系统 - 制造与生产技术》(SPECIALIZED DRUG DELIVERY SYSTEMS-MANUFACTURING AND PRODUCTION TECHNOLOGY), P. Tyle 编著, Marcel Dekker, New York, 第 267-316 页 (1990).
- [0511] (25) Bartlett GK, J Bio Chem 1959, 234 :466-8.
- [0512] (26) Lasic DD 等人, FEBS Lett 1992, 312 :255-8.
- [0513] (27) Haran G 等人, Biochim Biophys Acta 1993, 1151 :201-15.
- [0514] (28) Nellis DF 等人, Biotech Prog 2005, 21 :221-32.
- [0515] (29) Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L 等人, 评价实体瘤中治疗应答的新指南. 欧洲癌症研究与治疗组织, 美国国家癌症研究所, 加拿大国家癌症研究所 (New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada). J Natl Cancer Inst 2000 ;92 :205-16.
- [0516] (30) Keilen, J. A. (1994). 多药抗性现象, 在 :Keilen JA (编著) 《逆转癌症中的多药抗性》(The Phenomenon of multi drug resistance, in :Keilen JA (ed) Reversal of MultiDrug Resistance in Cancer), CRC Press, Boca Raton, 第 1-21 页.
- [0517] (31) Mickley, L. & Fojo, AT. (1998). MDR 基因. 在 :Pinedo HM, Giaccone G (编著) 癌症治疗中的抗性 (The MDR genes. In :Pinedo HM, Giaccone G (eds.) Drug Resistance in the Treatment of Cancer), Cambridge University Press, Cambridge, 第 101-131 页.
- [0518] (32) Cole, S. P. 和 Deeley, R. G. (1998). 由 ATP 结合盒转运蛋白 MRP 介导的多药抗性 (Multidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter protein MRP). Bioessays, 20, 931-40.
- [0519] (33) Juranka, P. F., Zastawny, R. L. 和 Ling, V. (1989). P-糖蛋白 :多药抗性和膜相关转运蛋白超家族 (P-glycoprotein : multidrug-resistance and a superfamily of membrane-associated transport proteins). Faseb J, 3, 2583-92.
- [0520] (34) Renes, J., de Vries, E. G., Jansen, P. L. 和 Muiller, M. (2000). MRP 家族的 (病理) 生理学功能 (The (patho)physiological functions of the MRP family). Drug Resist Updat, 3, 289-302.
- [0521] (35) Leonard, G. D., PoIgar, O. 和 Bates, S. E. (2002). ABC 转运蛋白和抑制剂 :

新靶,新药物 (ABC transporters and inhibitors:new targets, newagents).Curr Opin Investig Drugs,3,1652-9.

[0522] (36)Fan, Z. , Masui, H. , Altas, I. 和 Mendelsohn, J. (1993). 通过 225 抗表皮生长因子受体单克隆抗体的双价和单价片段阻断表皮生长因子受体功能 (Blockade of epidermal growth factor receptor function by bivalent andmonovalent fragments of 225 anti-epidermal growth factor receptormonoclonal antibodies).Cancer Res, 53,4322-8.

[0523] (37)Bier, H. , Hoffmann, T. , Hauser, U, Wink, M. , Ochler, M. , Kovar, A. , Muser, M. 和 Knecht, R. (2001). 采用升高剂量抗表皮生长因子受体人源化单克隆抗体 EMD72000 在患有晚期喉和下咽鳞状细胞癌的患者中的临床试验 (Clinical trial with escalating doses of the antfepidermal growthfactor receptor humanized monoclonal antibody EMD 72 000 in patientswith advanced squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx).Cancer Chemother Pharmacol,47,519-24.

[0524] (38)Claassen, E. (1992). 脂质体膜的形成后荧光标记 :体内检测、定位和动力学 (Post-formation fluorescent labelling of liposomal membranes. Invivo detection, localisation and kinetics), J Immunol Methods,147,231-40.

[0525] (39)Litzinger, D. C. ,Butting, A. M. , van Rooijen, N. 和 Huang, L. (1994). 脂质体大小对含有两亲性聚 ( 乙二醇 ) 的脂质体的循环时间和器官内分布的影响 (Effect of liposome size on the circulation time and intraorgandistribution of amphipathic poly(ethylene glycoi)-containing liposomes).Biochim Biophys Acta,1190,99-107.

[0526] (40)Park, J. W. ,Hong, K. , ,Garter, P. , Asgari, H. , Guo, L. Y. , Keller, G. A. , Wirth, C, Shalaby, R. , Kotts, C, Wood, W. I 等人, (1995). 用于癌治疗法的抗 p185HER2 免疫脂质体的开发 (Development of anti-pi 85HER2immunoliposomes for cancer therapy).Proc Natl Acad Sci USA,92,1327-31.

[0527] (41)Scudiero, DA, Shoemaker, R. H. , Paull, K. D. , Monks, A. , Tierney, S. , Nofziger, T. H. , Currens, M. J. , Seniff, D. 和 Boyd, M. R. (1988). 在使用人和其他肿瘤细胞系的培养中评价细胞生长和药物敏感性的可溶性四唑鎓 / 甲 吩 测定法 (Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cellgrowth and drug sensitivity in culture using human and other tumor celllines).Cancer Res,48,4827-33.

[0528] (42)O' Brien, P. C. (1984). 用于以多个终点比较样品的方法 (Procedures for comparing samples with multiple endpoints).Biometrics,40,1079-87.

[0529] 美 国 专 利 号 5, 843, 708 ;6, 180, 370 ;5, 693, 762 ;5, 585, 089 ;5, 530, 101、5, 565, 332 ;5, 639, 641、5, 395, 619、5, 013, 556、5, 631, 018 ;

[0530] 和 WO 98/07409。

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480021966.8

[51] Int. Cl.

*C07K 16/24 (2006.01)*  
*A61K 39/395 (2006.01)*  
*A61P 35/00 (2006.01)*  
*A61P 35/04 (2006.01)*

[43] 公开日 2006年9月6日

[11] 公开号 CN 1829741A

[22] 申请日 2004.5.28

[21] 申请号 200480021966.8

[30] 优先权

[32] 2003.5.30 [33] US [31] 60/474,480

[86] 国际申请 PCT/US2004/017078 2004.5.28

[87] 国际公布 WO2005/000900 英 2005.1.6

[85] 进入国家阶段日期 2006.1.27

[71] 申请人 健泰科生物技术公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 格温德林·法伊夫

埃里克·霍姆格伦

罗伯特·D·马斯 威廉·诺沃特尼

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书 4 页 说明书 64 页 附图 7 页

[54] 发明名称

利用抗-VEGF 抗体的治疗

[57] 摘要

本发明总体涉及利用抗-VEGF 抗体治疗疾病以及病理状况。更具体地,本发明涉及治疗利用抗-VEGF 抗体易患或诊断为患有癌症的患者,优选与一或多种其它抗肿瘤治疗剂联用。

1. 治疗人患者中的癌症的方法，包括将有效量的抗-VEGF 抗体以及抗肿瘤组合物给予患者，所述抗肿瘤组合物包含至少一种化疗剂。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述癌症选自乳腺癌，结肠直肠癌，直肠癌，非小细胞肺癌，非何杰金淋巴瘤(NHL)，肾细胞癌，前列腺癌，肝癌，胰腺癌，软组织肉瘤，卡波奇肉瘤，类癌样癌，头和颈部癌症，黑色素瘤，卵巢癌，间皮瘤以及多发性骨髓瘤组成的组。

3. 权利要求 1 的方法，其中所述癌症是转移的。

4. 权利要求 1 的方法，其中所述患者以前未接受治疗。

5. 权利要求 1 的方法，其中所述化疗剂选自以下物质组成的组：烷化剂，抗代谢物，叶酸类似物，嘧啶类似物，嘌呤类似物以及相关抑制剂，长春花碱类，epipodopyllotoxins，抗生素，L-天冬酰胺酶，拓扑异构酶抑制剂，干扰素，铂配位复合物，大黄素取代的脲，甲基胍衍生物，肾上腺皮质抑制剂，肾上腺皮质类固醇，孕激素，雌激素，抗雌激素，雄激素，抗雄激素，以及促性腺激素-释放激素类似物。

6. 权利要求 5 的方法，其中所述化疗剂选自以下物质组成的组；5-氟尿嘧啶 (5-FU)，甲酰四氢叶酸，伊立替康，奥沙利铂，卡培他滨，紫杉醇和多西紫杉醇。

7. 权利要求 1 的方法，其中所述抗肿瘤组合物包含至少两种化疗剂的组合。

8. 权利要求 7 的方法，其中所述抗肿瘤组合物包含 5-FU 和甲酰四氢叶酸。

9. 权利要求 7 的方法，其中所述抗肿瘤组合物包含 5-FU，甲酰四氢叶酸和伊立替康。

10. 权利要求 1 的方法，其中一旦完成利用抗-VEGF 抗体和所述抗肿瘤组合物的治疗，所述患者接受利用至少一种化疗剂的进一步化疗。

11. 权利要求 10 的方法，其中用于进一步化疗的化疗剂选自 5-FU，甲酰四氢叶酸，伊立替康，奥沙利铂，卡培他滨，紫杉醇和多西紫杉醇组成的组。

12. 权利要求 11 的方法，其中所述化疗剂是奥沙利铂。

13. 权利要求 1 的方法, 其中所述抗-VEGF 抗体与单克隆抗-VEGF 抗体 A4.6.1 结合同一表位, 所述 A4.6.1 由杂交瘤 ATCC HB 10709 产生。

14. 权利要求 1 的方法, 其中所述抗-VEGF 抗体是人抗体。

15. 权利要求 1 的方法, 其中所述抗-VEGF 抗体是人源化抗体。

16. 权利要求 15 的方法, 其中所述抗-VEGF 抗体是人源化 A4.6.1 抗体或其片段。

17. 权利要求 1 的方法, 其中所述抗-VEGF 抗体经静脉输注给药。

18. 权利要求 1 的方法, 其中所述抗-VEGF 抗体以大约 5mg/kg 每 2-3 周给药患者。

19. 权利要求 1 的方法, 由此所述抗-VEGF 抗体和所述抗肿瘤组合物的联合给药有效延长人类患者的生存期。

20. 权利要求 19 的方法, 其中与单用所述抗肿瘤组合物治疗的患者相比, 所述人类患者的生存期增加至少约 2 个月。

21. 权利要求 1 的方法, 由此所述抗-VEGF 抗体和所述抗肿瘤组合物的联合给药有效延长人类患者的无进展生存期。

22. 权利要求 21 的方法, 其中与单用所述抗肿瘤组合物治疗的患者相比, 所述患者的无进展生存期增加至少约 2 个月。

23. 权利要求 1 的方法, 由此所述抗-VEGF 抗体和所述抗肿瘤组合物的联合给药有效提高人类患者组中的反应率。

24. 权利要求 23 的方法, 其中与单用所述抗肿瘤组合物治疗的患者相比, 所述人类患者组中的反应率明显增加, 其 Chi-square p-值小于 0.005。

25. 权利要求 1 的方法, 由此所述抗-VEGF 抗体和所述抗肿瘤组合物的联合给药有效延长所述人类患者的反应时间。

26. 权利要求 25 的方法, 其中与单用所述抗肿瘤组合物治疗的患者相比, 所述患者的反应时间增加至少约 2 个月。

27. 治疗易患或诊断为患有结肠直肠癌的人类患者的方法, 包括给药所述患者治疗有效量的抗-VEGF 抗体。

28. 权利要求 27 的方法, 其中所述结肠直肠癌是转移癌。

29. 权利要求 27 的方法, 其中所述抗-VEGF 抗体与单克隆抗-VEGF 抗体 A4.6.1 结合同一表位, 所述 A4.6.1 由杂交瘤 ATCC HB 10709 产生。

30. 权利要求 27 的方法, 其中所述抗-VEGF 抗体是人抗体。

31. 权利要求 27 的方法，其中所述抗-VEGF 抗体是人源化抗体。

32. 权利要求 31 的方法，其中所述抗-VEGF 抗体是人源化 A4.6.1 抗体或其片段。

33. 权利要求 27 的方法，其中所述抗-VEGF 抗体经静脉输注给药。

34. 权利要求 27 的方法，其中所述抗-VEGF 抗体以大约 5mg/kg 每 2-3 周给药患者。

35. 权利要求 27 的方法，还包括给药所述患者一或多种化疗剂。

36. 权利要求 35 的方法，其中所述化疗剂选自以下物质组成的组：烷化剂，抗代谢物，叶酸类似物，嘧啶类似物，嘌呤类似物以及相关抑制剂，长春花碱类，epipodopyllotoxins，抗生素，L-天冬酰胺酶，拓扑异构酶抑制剂，干扰素，铂配位复合体，大黄素取代的脲，甲基胍衍生物，肾上腺皮质抑制剂，肾上腺皮质类固醇，孕激素，雌激素，抗雌激素，雄激素，抗雄激素，和促性腺激素-释放激素类似物。

37. 权利要求 35 的方法，其中所述化疗剂选自以下物质组成的组：5-氟尿嘧啶，甲酰四氢叶酸，伊立替康，奥沙利铂，卡培他滨，紫杉醇和多西紫杉醇。

38. 治疗患有转移性结肠直肠癌的人类患者或人类患者的组的方法，包括给药所述患者有效量的抗-VEGF 抗体组合物和抗肿瘤组合物，其中所述抗肿瘤组合物包含基于氟尿嘧啶的化疗剂组合，由此联合给药所述抗-VEGF 抗体和所述抗肿瘤组合物导致被治疗患者中统计学显著性以及临床有意义的改善，所述改善通过存活时间，无进展存活，反应率以及反应时间测定。

39. 权利要求 38 的方法，其中所述抗肿瘤组合物包含 5-FU，甲酰四氢叶酸和伊立替康。

40. 权利要求 39 的方法，其中所述抗肿瘤组合物包含具有 500 mg/m<sup>2</sup> 5-FU，20mg/m<sup>2</sup> 甲酰四氢叶酸和 125 mg/m<sup>2</sup> 伊立替康的方案，并以每周给药持续 4 周然后停止给药 2 周的为期 6 周的反复性循环来给药患者，并且其中所述抗-VEGF 抗体以 5 mg/kg 每隔一周给药患者。

41. 权利要求 38 的方法，其中所述抗肿瘤组合物包含 5-FU 和甲酰四氢叶酸。

42. 权利要求 41 的方法，其中 5-FU 和甲酰四氢叶酸以为期 8 周的反复循环、每个循环 500 mg/m<sup>2</sup> 给药患者，所述循环包括每周给药持续 4 周然后



停止给药 2 周，并且其中所述抗-VEGF 抗体以 5 mg/kg 每隔一周给药患者。

43. 权利要求 41 的方法，其用于被认为不是一线伊立替康治疗的最佳候选患者的人类患者。

44. 权利要求 38 的方法，其中所述抗肿瘤组合物包含 5-FU，甲酰四氢叶酸和奥沙利铂。

45. 制品，其包含容器，所述容器内包含含有抗-VEGF 抗体的组合物以及包装插页，所述包装插页指示该组合物的使用者将所述抗-VEGF 抗体组合物和包含至少一种化疗剂的抗肿瘤组合物给药癌症患者。

46. 治疗人类患者中的癌症的试剂盒，其包含含有抗-VEGF 抗体组合物的药物包，以及利用所述抗-VEGF 抗体组合物和包含至少一种化疗剂的抗肿瘤组合物治疗患者中的癌症的说明。

## 利用抗-VEGF 抗体的治疗

本申请要求 2003 年 3 月 30 日提交的美国临时申请 60/474,480 的优先权，其内容包含在此作为参考。

### 技术领域

本发明涉及人疾病以及病理状态的治疗。更具体地，本发明涉及癌症的抗血管生成疗法，其单独使用或与其它抗癌疗法联用。

### 背景技术

癌症仍然是导致人类死亡的头号威胁之一。在美国，癌症的每年新发患者为近 1,300,000，并且是仅次于心脏病的第二号致死原因，在所有死亡中约占 1/4。还预测，癌症会在 5 年内超过心血管疾病称为头号致死原因。实体瘤导致大部分死亡。尽管在具体癌症的医学治疗中有明显的进展，所有癌症的总体 5 年生存率在过去的 20 年中仅仅提高了约 10%。癌症，或恶性肿瘤，以不受控制的方式转移并快速生长，导致及时检出和治疗非常困难。此外，癌症可通过自体内的几乎任何组织中一个或一些正常细胞的恶性转化而在体内的任何组织中形成，每种具有特定组织来源的癌症都彼此不同。

目前治疗癌症的方法的选择性相对较低。手术取出疾病组织；放疗导致实体瘤体积减小；化疗杀死快速分裂的细胞。具体地，化疗导致多种副作用，一些情况下非常严重以至于限制了给予的剂量，并因此使得可能有效的药物不能得以应用。此外，癌症通常对化疗药物产生抵抗。

因此，非常需要特异性且更为有效的癌症疗法。

血管生成是重要的细胞事件，其中血管内皮细胞增殖，去除多余细胞，并重组而从现存血管网络形成新血管。存在有力的证据表明血供的发展对于正常和病理增生过程是必不可少的(Folkman and Klagsbrun(1987) Science 235: 442-447)。氧气和养料的递送，以及分解产物的去除，代表多细胞有机体中出现的大多数生长过程中的限速步骤。因此，通常推定血管间隔 (vascular

compartment) 是必须的, 其不仅对于胚胎形成中的器官发育和分化如此, 对于成人伤口愈合以及生殖功能而言也是。

血管生成也见于多种疾病的发病机理, 包括但不限于, 肿瘤, 增生性视网膜疾病, 老年性黄斑退变, 类风湿性关节炎(RA), 和银屑病。血管生成对于大多数原发肿瘤以及其随后的转移而言是必不可少的。肿瘤可通过简单扩散到 1-2mm 的大小而吸收足够的养分和氧气, 在这样的情况下, 它们的进一步生长需要血供的建立。该过程被认为涉及邻近宿主成熟脉管系统的募集以启动新生血管毛细管的出芽, 其向肿瘤基质生长并随后穿透到其中。此外, 肿瘤血管生成涉及循环内皮细胞前体细胞从骨髓的募集以促进新生血管化 Kerbel (2000) *Carcinogenesis* 21: 505-515; Lynden et al. (2001) *Nat. Med.* 7: 1194-1201。

尽管新生血管的诱导被认为是肿瘤血管生成的主要方式, 最近的数据表明一些肿瘤可通过共选择(co-opt)现存宿主血管而生长。共选择的脉管系统随后退化, 导致肿瘤退化, 其最终可被低氧诱导的肿瘤边缘血管生成逆转。Holash et al. (1999) *Science* 284: 1994-1998。

考虑到血管生成的明显生理和病理重要性, 进行了许多工作以说明能调节该过程的因素。据提示血管生成过程由促血管生成分子和抗血管生成分子之间的平衡调节, 并在多种疾病具体是癌症中所述平衡可移动。Carmeliet and Jain (2000) *Nature* 407: 249-257。

血管内皮细胞生长因子(VEGF)(也称为 VEGF-A 或血管通透性因子 (vascular permeability factor) (VPF), 已经被报道为正常和异常血管生成中的关键调节物。Ferrara and Davis-Smyth (1997) *Endocrine Rev.* 18: 4-25; Ferrara (1999) *J. Mol. Med.* 77: 527-543。与其它导致血管形成过程的生长因子相比, VEGF 的独特性在于其对血管系统中内皮细胞的高特异性。Carmeliet et al. (1996) *Nature* 380: 435-439; Ferrara et al. (1996) *Nature* 380: 439-442。此外, VEGF 是雌性生殖道中周期性(cyclical)血管增殖以及骨生长和软骨形成中所需的。Ferrara et al. (1998) *Nature Med.* 4: 336-340; Gerber et al. (1999) *Nature Med.* 5: 623-628。

除了是血管生成和脉管形成中的血管生成因子, VEGF 作为多效生长因子, 显示在其它生理过程中的多种生物效应, 诸如内皮细胞存活, 血管通透性和血管舒张, 单核细胞趋化以及钙内流。Ferrara and Davis-Smyth (1997),

supra。此外，最近的研究报道 VEGF 对一些非内皮细胞类型具有促有丝分裂效应，诸如对视网膜色素细胞，胰腺导管细胞以及雪旺细胞 (Schwann cell)。Guerrin et al. (1995) *J. Cell Physiol.* 164: 385-394; Oberg-Welsh et al. (1997) *Mol. Cell.Endocrinol.* 126: 125-132; Sondell et al. (1999) *J. Neurosci.* 19: 5731-5740。

实质性证据还表明 VEGF 在涉及病理性血管增生的疾病或病症的进展中的重要作用。VEGF mRNA 由所检测的大多数人肿瘤细胞过表达(Berkman et al. *J Clin Invest* 91: 153-159 (1993); Brown et al. *Human Pathol.* 26:86-91 (1995); Brown et al. *Cancer Res.* 53: 4727-4735 (1993); Mattern et al. *Brit. J. Cancer.* 73: 931-934 (1996);和 Dvorak et al. *Am J.Pat101.* 146: 1029-1039 (1995))。此外，眼液体中 VEGF 的浓度与糖尿病以及其它缺血相关性视网膜病患者中血管的活跃增殖的存在高度相关(Aiello et al. *N. Engl. J. Med.* 331:1480-1487 (1994) )。此外，最近的研究证实了 AMD 患者中脉络膜新生血管膜中 VEGF 的定位(Lopez et al. *Invest.Ophthalmol. Vis. Sci.* 37: 855-868 (1996))。

由于其在促进肿瘤生长中的重要作用，VEGF 提供了治疗介入的有吸引力的靶。实际上，多种治疗靶的目的在于阻断 VEGF 或其受体信号系统，所述治疗靶目前正被开发用于治疗肿瘤疾病。Rosen (2000) *Oncologist* 5: 20-27; Ellis et al. (2000) *Oncologist* 5: 11-15; Kerbel (2001) *J. Clin. Oncol.* 19: 45S-51S。目前，单克隆抗体的 VEGF/VEGF 受体阻断作用以及酪氨酸激酶抑制剂对受体信号的抑制作用是最好的研究方法。VEGFR-1 核酶，VEGF 毒素偶联物以及可溶性 VEGF 受体也正被研究。

抗-VEGF 抗体 "Bevacizumab (BV) "，也称为 "rhuMAb VEGF" 或 "Avastin™"，是重组人源化抗-VEGF 单克隆抗体，其根据 Presta et al. (1997) *Cancer Res.* 57: 4593-4599 所述制备。其包含突变的人 IgG1 框架区以及鼠抗-hVEGF 单克隆抗体 A. 4.6. 1 的抗原结合互补决定区，后者可阻断人 VEGF 与其受体的结合。Bevacizumab 的大约 93% 的氨基酸序列，包括大部分框架区，源自人 IgG1，该序列的大约 7% 源自鼠抗体 A4.6.1。Bevacizumab 的分子量约 149,000 道尔顿并且是糖基化的。Bevacizumab 正在临床研究用于治疗各种癌症，一些早期试验已经显示有希望的结果。Kerbel (2001) *J. Clin. Oncol.* 19: 45S-51S; De Vore et al. (2000) *Proc.Am. Soc. Clin. Oncol.* 19: 485a;

Johnson et al. (2001) Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 20: 315a; Kabbinavar et al. (2003) J. Clin. Oncol. 21: 60-65.

### 发明内容

本发明涉及利用抗-VEGF 抗体治疗疾病和病理状态的方法。具体地，本发明提供了治疗癌症的有效方法，其部分基于将抗 VEGF 抗体加入标准化疗导致癌症患者的统计学显著性以及临床有意义的改善这一出人意料的结果。

因此，一方面，本发明提供治疗人类患者中的癌症的方法，包括给药患者有效量的抗 VEGF 抗体以及抗肿瘤组合物，其中所述抗肿瘤组合物包含至少一种化疗剂。

可通过本发明治疗的癌症包括，但不限于，癌症，淋巴瘤，母细胞瘤，肉瘤，白血病或淋巴组织恶性疾病。癌症的更具体的例子包括鳞状细胞癌(例如上皮鳞状细胞癌)，肺癌(包括小细胞肺癌，非小细胞肺癌，肺腺癌以及肺鳞癌)，腹膜癌，肝细胞癌，胃的或胃癌(包括胃肠癌)，胰腺癌，神经母细胞瘤，宫颈癌，卵巢癌，肝癌，膀胱癌，肝细胞瘤，乳腺癌，结肠癌，结肠直肠癌，子宫内膜癌或子宫癌，唾液腺癌，肾或肾的癌，肝癌，前列腺癌，外阴癌，甲状腺癌，肝的癌以及各种头和颈的癌症，以及 B 淋巴细胞瘤(包括低级/滤泡样非何杰金氏淋巴瘤(low grade/follicular non-Hodgkin's lymphoma)(NHL); 小淋巴细胞性(SL) NHL; 中级/滤泡样 NHL; 中级弥漫性 NHL; 高级免疫母细胞 NHL (high grade immunoblastic NHL); 高级淋巴母细胞 NHL; 高级小无裂细胞 NHL (high grade small non-cleaved cell NHL); bulky disease NHL; 外套细胞淋巴瘤(mantle cell lymphoma); AIDS-相关的淋巴瘤; 和 Waldenstrom's 巨球蛋白血症); 慢性淋巴细胞白血病(CLL); 急性淋巴母细胞白血病(ALL); 毛细胞白血病(Hairy cell leukemia); 慢性骨髓细胞白血病(chronic myeloblastic leukemia); 和移植后淋巴组织增生疾病(PTLD)，以及母斑细胞病相关性异常血管增生(abnormal vascular proliferation associated with phakomatoses)，水肿(诸如与脑肿瘤相关的)，和 Meigs 综合症 (Meigs' syndrome)。优选，所述癌症选自以下疾病：乳腺癌，结肠直肠癌，直肠癌，非小细胞肺癌，非何杰金氏淋巴瘤(NHL)，肾细胞癌，前列腺癌，肝癌，胰腺癌，软组织肉瘤，卡波奇肉瘤 (kaposi's sarcoma)，类癌样癌 (carcinoid carcinoma)，头和颈部癌，黑素瘤，卵巢癌，间皮瘤 (mesothelioma) 以及多

发性骨髓瘤。更优选，所述癌症为结肠直肠癌。可由本发明治疗的癌性疾病包括转移癌。本发明的方法具体适于治疗血管化的肿瘤。

任何具有抗癌活性的化疗剂可根据本发明使用。优选，所述化疗剂选自以下物质组成的组：烷化剂，抗代谢物，叶酸类似物，嘧啶类似物，嘌呤类似物以及相关抑制剂，长春花碱类，epipodopyllotoxins，抗生素，L-天冬酰胺酶，拓扑异构酶抑制剂，干扰素，铂配位复合物(platinum coordination complexes)，大黄素(anthracenedione)取代的脲，甲基胍衍生物，肾上腺皮质抑制剂，肾上腺皮质类固醇，孕激素，雌激素，抗雌激素，雄激素，抗雄激素，和促性腺激素-释放激素类似物。更优选，所述化疗剂选自以下物质组成的组：5-氟尿嘧啶(5-FU)，甲酰四氢叶酸(leucovorin)(LV)，伊立替康(irinotecan)，奥沙利铂(oxaliplatin)，卡培他滨(capecitabine)，紫杉醇(paclitaxel)和多西紫杉醇(doxetaxel)。两种或更多抗癌剂可以以鸡尾酒方式同抗-VEGF抗体联用给药。一种优选的联合化疗是基于5-氟尿嘧啶，包含5-FU和一或多种其它化疗剂。适宜的联用化疗剂量方案是本领域已知的并在例如 Saltz et al. (1999) Proc ASCO 18: 233a and Douillard et al. (2000) Lancet 355: 1041-7 中描述。

一方面，本发明提供了延长患有癌症的人类患者的生存期的方法，包括给药所述患者有效量的抗-VEGF抗体组合物和抗肿瘤组合物，其中所述抗肿瘤组合物包含至少一种化疗剂，由此所述抗-VEGF抗体和所述抗肿瘤组合物的联合给药有效延长所述生存期。

另一方面，本发明提供延长人类癌症患者的无进展生存期(progression free survival)的方法，包括给药所述患者有效量的抗-VEGF抗体组合物和抗肿瘤组合物，其中所述抗肿瘤组合物包含至少一种化疗剂，由此所述抗-VEGF抗体和所述抗肿瘤组合物的联合给药有效延长人类患者的无进展生存期。

此外，本发明提供治疗一组人类癌症患者的方法，包括给药所述患者有效量的抗-VEGF抗体组合物和抗肿瘤组合物，其中所述抗肿瘤组合物包含至少一种化疗剂，由此所述抗-VEGF抗体和所述抗肿瘤组合物的联合给药有效增加所述患者组中的反应率。

另一方面，本发明提供延长人类癌症患者的反应时间(duration of response)的方法，包括给药所述患者有效量的抗-VEGF抗体组合物和抗肿瘤

组合物,其中所述抗肿瘤组合物包含至少一种化疗剂,由此所述抗-VEGF 抗体和所述抗肿瘤组合物的联合给药有效延长反应时间。

本发明还提供治疗易患或诊断为患有结肠直肠癌的人类患者的方法,包括给药所述患者有效量的抗-VEGF 抗体。所述结肠直肠癌是转移癌。所述抗-VEGF 抗体可进一步与标准结肠直肠癌化疗诸如 Saltz et al. (1999)所述的 Saltz(5-FU/LV/伊立替康(irinotecan))方案联合。

一个优选实施方案中,本发明提供治疗患有转移性结肠直肠癌的人类患者或人类患者的组的方法,包括给药所述患者有效量的抗-VEGF 抗体组合物和抗肿瘤组合物,其中所述抗肿瘤组合物包含至少一种化疗剂,由此所述抗-VEGF 抗体和所述抗肿瘤组合物的联合给药导致被治疗患者的统计学显著且临床有意义的改善,所述改善通过生存期,无进展生存期,反应率(response rate)以及反应时间来测定。优选,所述抗肿瘤组合物是基于 5-氟尿嘧啶的组合方案。更优选,所述组合方案包含 5-FU+甲酰四氢叶酸,5-FU+甲酰四氢叶酸+伊立替康(IFL),或 5-FU+甲酰四氢叶酸+奥沙利铂 (FOLFOX)。

本发明提供制品,其包含容器、组合物以及包装插页,所述组合物包含在容器内,该组合物含有抗-VEGF 抗体,所述包装插页指示该组合物的使用者将所述抗-VEGF 抗体组合物和包含至少一种化疗剂的抗肿瘤组合物给药癌症患者。

本发明还提供用于治疗人类患者中的癌症的试剂盒,其包含含有抗-VEGF 抗体组合物的药物包,以及利用所述抗-VEGF 抗体组合物和包含至少一种化疗剂的抗肿瘤组合物治疗患者中的癌症的说明。

#### 附图简述

图 1 显示生存的 Kaplan-Meier 评估。存活时间中值(median duration of survival)(由点状虚线表示)在给予伊立替康,氟尿嘧啶,和甲酰四氢叶酸(IFL)加上 bevacizumab 的组中为 20.3 月,而给予 IFL + 安慰剂的组中为 15.6 月,相应的死亡危险率为 0.66 ( $P < 0.001$ )。

图 2 显示无进展生存的 Kaplan-Meier 评估。无进展存活时间中值(由点状虚线表示)在给予伊立替康,氟尿嘧啶,和甲酰四氢叶酸(IFL)加上 bevacizumab 的组中为 10.6 月,而给予 IFL + 安慰剂的组中为 6.2 月,相应的死亡危险率为 0.54 ( $P < 0.001$ )。

图 3A-3C 提供了利用基线特征对不同患者亚组存活时间的分析。

图 4 显示生存的 Kaplan-Meier 评估, 其比较了给药 5-FU/LV + 安慰剂的组相对于给药 5-FU/LV + bevacizumab (BV) 的组。

图 5 显示无进展生存的 Kaplan-Meier 评估, 其比较了给药 5-FU/LV + 安慰剂的组相对于给药 5-FU/LV + bevacizumab (BV) 的组。

## 具体实施方案

### 1. 定义

术语"VEGF"和"VEGF-A"可互换使用, 指 165 个氨基酸的血管内皮生长因子, 以及相关的 121-, 189-, 和 206-氨基酸的血管内皮细胞生长因子(其由 Leung et al. *Science*, 246: 1306 (1989), 和 Houck et al. *Mol. Endocrin.*, 5: 1806 (1991)描述), 以及其天然等位基因变体和加工的形式。术语"VEGF"也用于指含有 165 氨基酸的人血管内皮细胞生长因子的氨基酸 8 - 109 或 1 - 109 的多肽的截短形式。对任何这样形式的 VEGF 可在本文中鉴定, 例如通过"VEGF (8-109)", "VEGF(1-109)"或"VEGF<sub>165</sub>"。"截短的"天然 VEGF 的氨基酸位置根据天然 VEGF 序列中所示编号。例如, 截短的天然 VEGF 中的氨基酸位置 17 也是天然 VEGF 中的位置 17(蛋氨酸)。截短的天然 VEGF 与天然 VEGF 相比具有对 KDR 以及 Flt-1 受体的结合亲和力。

"抗-VEGF 抗体"是与 VEGF 以足够的亲和力以及特异性结合的抗体。优选, 本发明的抗-VEGF 抗体可用作治疗剂靶向并干扰其中涉及 VEGF 活性的疾病或病症。抗-VEGF 抗体通常不与其它 VEGF 同系物诸如 VEGF-B 或 VEGF-C 结合, 也不与其它生长因子诸如 PlGF, PDGF 或 bFGF 结合。优选的抗-VEGF 抗体是单克隆抗体, 其与杂交瘤 ATCC HB 10709 产生的单克隆抗-VEGF 抗体 A4.6.1 结合相同的表位。更优选, 所述抗-VEGF 抗体是重组人源化抗-VEGF 单克隆抗体, 其根据 Presta et al. (1997) *Cancer Res.* 57: 4593-4599 制备, 包括但不限于已知为 bevacizumab (BV; Avastin™) 的抗体。

术语"VEGF 拮抗剂"是指任何能中和、阻断、抑制、消除、降低或干扰 VEGF 活性包括其与一或多种 VEGF 受体的结合的分子。VEGF 拮抗剂包括抗-VEGF 抗体和其抗原结合片段, 受体分子以及衍生物, 该 VEGF 拮抗剂与 VEGF 特异性结合, 由此隔离了(sequestering)其与一或多种受体、抗-VEGF 受体抗体和 VEGF 受体拮抗剂诸如 VEGFR 酪氨酸激酶的小分子抑制剂的结



合。

在本说明书以及权利要求中，免疫球蛋白重链中残基的编号根据 Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)所述的 EU index 进行，所述文献包含在本文作为参考。“Kabat 中的 EU index”指人 IgG1 EU 抗体的残基编号。

“天然序列”包括具有与自然界衍生的多肽相同的氨基酸序列的多肽。所述天然序列多肽可以从自然界分离或者通过重组和/或合成手段制备。术语“天然序列”多肽具体包括所述多肽的天然截短形式或分泌形式(如，胞外区序列)，天然变体形式(如，旁路剪接形式)以及天然存在的等位变体。

多肽“变体”指生物活性分子，其与天然序列多肽具有至少约 80%的氨基酸序列同一性。所述变体包括，例如在所述多肽 N 或 C 末端加入、缺失了一或多个氨基酸残基的多肽。通常，变体与天然序列多肽具有至少约 80%氨基酸序列同一性，更优选至少约 90%氨基酸序列同一性，更优选至少约 95%氨基酸序列同一性。

术语“抗体”是指最广义上的抗体，具体包括人、非-人(例如鼠)和人源化的单克隆抗体(包括全长或完整单克隆抗体)、多克隆抗体、多价抗体 (multivalent antibody) 多特异性抗体(如双特异性抗体)和抗体片段(参照以下说明)，只要它们显示所需的生物学活性。

除非另有说明，本文术语“多价抗体”表示含有三个或更多抗原结合位点的抗体。所述多价抗体优选被改造成包含三个或更多抗原结合位点并通常不是天然序列 IgM 或 IgA 抗体。

“抗体片段”包括完整抗体的仅仅一部分，通常包括完整抗体的抗原结合位点并由此保持与抗原结合的能力。本发明抗体片段的实例包括：(i) Fab 片段，其具有  $V_L$ ， $C_L$ ， $V_H$  和  $CH1$  区；(ii) Fab' 片段，其为在  $CH1$  区 C 末端具有一或多个半胱氨酸残基的 Fab 片段；(iii) Fd 片段，其具有  $V_H$  和  $CH1$  区；(iv) Fd' 片段，其具有  $V_H$  和  $CH1$  区以及位于  $CH1$  区 C 末端的一或多个半胱氨酸残基；(v) Fv 片段，其具有抗体单个臂的  $V_L$  和  $V_H$  区；(vi) dAb 片段 (Ward et al., Nature 341,544-546 (1989))，其由  $V_H$  区组成；(vii) 分离的 CDR 区；(viii)  $F(ab')_2$  片段，其为包含两个由铰链区二硫桥连接的两个 Fab' 片段的二价片段(例如单链 Fv; scFv) (Bird et al., Science 242: 423-426 (1988); 和 Huston et al.,

PNAS(USA) 85: 5879-5883(1988)); (x) 具有两个抗原结合位点的"二价抗体 (diabodies)", 包括在相同多肽链中与轻链可变区( $V_L$ )连接的重链可变区( $V_H$ ) (见, 例如, EP 404,097; WO 93/11161; 和 Hollinger et al., PYOC. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)); (xi)"线性抗体", 其包含一对串联的 Fd 片段 ( $V_H$ -CH1- $V_H$ -CH1), 其与互补轻链多肽一起形成一对抗原结合区(Zapata et al. *Protein Eng.* 8(10):1057-1062 (1995);和 US Patent No. 5,641,870)。

本文术语“单克隆抗体”是指自一群基本同质的(homogeneous)抗体群获得的抗体, 即除了少量可能天然存在的突变以外, 包含在该群中的各个抗体完全相同。单克隆抗体针对单个抗原高度特异。而且, 与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相反, 每种单克隆抗体针对抗原的单个决定簇。修饰词“单克隆”不解释为需通过任何特殊方法产生抗体。例如, 根据本发明应用的单克隆抗体可通过 Kohler 等(Nature, 256: 495(1975))首先描述的杂交瘤法, 或者重组 DNA 法制备(例如见美国专利 4816567)。还可用例如 Clackson 等(Nature, 352: 624-628(1991))和 Marks 等(J. Mol. Biol., 222: 581-597(1991))所述的技术从噬菌体抗体文库中分离“单克隆抗体”。

本文中单克隆抗体具体包括“嵌合”抗体(免疫球蛋白), 其重链和/或轻链的一部分与源自具体物种或属于具体抗体种类或亚类的抗体的相应序列相同或同源, 但所述链的剩余部分的序列与源自另一个物种或属于另一个抗体种类或亚类的抗体(以及此抗体的片段, 只要它们显示所需的生物学活性)的相应序列相同或同源 (美国专利 4,816,567; Morrison 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984))。

“人源化”非人(例如鼠)抗体是包含非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合抗体。大多数场合, 人源化抗体是人免疫球蛋白(受体抗体), 但其中受体的超变区残基被具有所需特异性、亲和力和能力的小鼠、大鼠、家兔或非人灵长类等非人源物种抗体(供体抗体)的超变区残基所取代。在一些实例中, 人免疫球蛋白的框架区(FR)残基由相应的非人类残基所取代。而且, 人源化抗体可包括在受体抗体或供体抗体中未发现的残基。这些修饰旨在进一步改善抗体的性能。通常, 人源化抗体基本上包括至少一个(通常包括两个)可变区的全部, 其中超变环的全部或基本上全部对应于非人免疫球蛋白的相应部分, 而 FR 的全部或基本上全部是人免疫球蛋白的序列。人源化抗体还任选包括至少一部分免疫球蛋白恒定区(Fc), 通常为人的免疫球蛋白恒定区。详见

Jones 等, *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann 等, *Nature* 332: 323-329 (1988); 和 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992)。

“人抗体”是具有相应于人产生的抗体的氨基酸序列的抗体和/或使用本文公开的任何一种制备人抗体的技术制备的抗体。人抗体的定义明确排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。使用各种本领域已知的技术可产生人抗体。在一个实施方案中,人抗体选自噬菌体文库,该噬菌体文库表达人抗体(Vaughan 等 *Nature Biotechnology* 14:309-314(1996); Sheets 等 *PNAS(USA)* 95:6157-6162(1998)); Hoogenboom 和 Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381(1991); Marks 等, *J. Mol. Biol.*, 222:581(1991))。也可通过将人免疫球蛋白基因座引入转基因动物制造人抗体,该转基因动物可以是例如内源性免疫球蛋白基因被部分或完全灭活的小鼠。攻击后观察人抗体的产生,其与在人中所见的情形在各方面均十分相似,包括基因重排,组装,和抗体库。该方法在例如美国专利 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016 和以下科学出版物中描述: Marks 等, *Bio/Technology* 10: 779-783(1992); Lonberg 等, *Nature* 368: 856-859(1994); Morrison, *Nature* 368:812-13(1994); Fishwild 等, *Nature Biotechnology* 14: 845-51(1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14: 826(1996); Lonberg 和 Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93(1995)。可选地,可通过将产生针对目的抗原的抗体的人 B 淋巴细胞(此种 B 淋巴细胞可自个体回收或在体外被免疫)永生生化制备人抗体。见例如, Cole 等, 单克隆抗体和癌症治疗, Alan R. Liss, p. 77(1985); Boerner 等, *J. Immunol.*, 147(1):86-95(1991); 和美国专利 5,750,373。

“亲和力成熟”的抗体是其中的一个或多个 CDRs 发生一种或多种改变并导致较不具有这些改变的亲本抗体该抗体对抗原的亲和力提高。优选亲和性成熟的抗体对目的抗原具有纳摩尔甚至皮摩尔的亲和力。亲和力成熟抗体可由已知的方法产生。Marks 等, *Bio/Technology*, 10: 779-783(1992)通过  $V_H$  和  $V_L$  区域改组描述了亲和力成熟。CDR 和/或框架残基的随机突变的描述见: Barbas 等, *Proc Nat.Acad.Sci, 美国*, 91:3809-3813(1994); Schier 等, *Gene*, 169:147-155 (1995); Jackson 等, *J.Immunol.*, 154(7):3310-9(1995); 和 Hawkins 等, *J. Mol. Biol.*, 226:889-896 (1992)。

“分离的”抗体是指从其天然环境成份中鉴定和分离和/或回收的抗体。其天然环境的污染成份是可能干扰该抗体的诊断或治疗用途的物质,且可能包

括酶，激素，和其它蛋白类或非蛋白类溶质。在优选的实施方案中，该多肽可纯化成(1)按劳里(Lowry)方法测定的抗体重量超过 95%，且最优选重量超过 99%，(2)其纯化程度足以通过使用转杯式测序仪获得至少 15 个残基的 N-末端或内部氨基酸序列，或(3)在还原型或非还原型条件下进行 SDS-PAGE 并使用考马斯蓝或者，优选银染测定具有同质性。分离的抗体包括在重组细胞内的原位多肽，因为该抗体天然环境中的至少一种成份不存在。然而，一般来说，分离的抗体由至少一个纯化步骤制备。

抗体的"功能性抗原结合位点"是能够结合靶抗原的位点。所述抗原结合位点的抗原结合亲和力不必与所述抗原结合位点所来源的亲代抗体一样强，但结合抗原的能力必须可利用多种已知评价抗体与抗原的结合的方法中的任意一种来测定。此外，本文所述多价抗体的每个抗原结合位点的抗原结合亲和力在量上不必相同。对于本文的多聚体抗体，功能性抗原结合位点的数目可利用以下实施例 2 所述的超速离心分析来评估。根据该分析法，靶抗原与多聚体抗体的以不同比例组合，并且所述复合体的平均分子量在推定存在不同数目的功能性结合位点存在的条件下测定。这些理论值与所得实际试验值相比以评估功能性结合位点的数目。

具有指定抗体的"生物性质"的抗体是具有使得所指定的抗体与结合相同抗原的其它抗体区别开来的一或多种生物性质的抗体。

为筛选结合与位于目的抗体结合的抗原上的表位的抗体，可进行常规交叉-阻断(cross-blocking)试验，诸如 *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow 和 David Lane(1988)中所述。

"激动剂抗体"是结合并活化受体的抗体。通常拮抗剂抗体的受体活化能力在质上至少与所述受体的天然激动剂配体相似(并且可以在量上基本相似)。激动剂抗体的实例是与 TNF 受体超家族中的受体结合并诱导表达 TNF 受体的细胞的凋亡的激动剂抗体。测定凋亡的诱导的试验的描述见 W098/51793 和 W099/37684，均包含在此作为参考。

"疾病"是可从利用所述抗体的治疗中受益的任何疾病。这包括慢性和急性疾病和病症，包括使得哺乳动物易患所述疾病的病理性状态。本发明治疗的疾病的非限制性实例包括良性和恶性肿瘤；白血病和淋巴组织恶性疾病；神经元，神经胶质，星形细胞，下丘脑以及其它腺体，巨噬细胞，上皮细胞，基质以及囊胚腔(blastocoelic)的疾病；以及炎性，血管生成性以及免疫性疾

病。

术语“治疗有效量”指可有效治疗哺乳动物中的疾病或病症的药物量。对于癌症，药物有效量可减少癌细胞数量；减小肿瘤体积；抑制(即减慢到一定程度并优选停止)癌细胞浸润到周围器官中；抑制(即减慢到一定程度并优选停止)肿瘤转移；在一定程度上抑制肿瘤生长；和/或在一定程度上缓解一或多种与癌症相关的症状。药物可以阻止已存在的肿瘤细胞的生长或杀死这些肿瘤细胞，所述药物可以是细胞抑制剂或细胞毒性剂。对于癌症治疗，体内效力可例如通过评估存活期，疾病进展时间(TTP)，反应率(RR)，反应时间，和/或生活质量来测定。

“治疗”指治疗性疗法和防病或预防措施。需要治疗的包括那些已患该病或那些需预防该病的人。

术语“癌症”和“癌性”是指或者描述哺乳动物中一般特征在于细胞生长不受调控的生理学状态。癌症的例子包括，但不限于，癌，淋巴瘤，母细胞瘤，肉瘤，白血病或淋巴组织恶性疾病。癌症的更具体的例子包括鳞状细胞癌(例如上皮鳞状细胞癌)，肺癌(包括小细胞肺癌，非小细胞肺癌，肺腺癌以及肺鳞癌)，腹膜癌，肝细胞癌，胃的或胃癌(包括胃肠癌)，胰腺癌，神经母细胞瘤，宫颈癌，卵巢癌，肝癌，膀胱癌，肝细胞瘤，乳腺癌，结肠癌，结肠直肠癌，子宫内膜或子宫癌，唾液腺癌，肾或肾的癌，肝癌，前列腺癌，外阴癌，甲状腺癌，肝的癌，各种类型的头和颈癌，以及 B-细胞淋巴瘤(包括低级/滤泡样非霍奇金淋巴瘤(NHL)；小淋巴细胞性(SL) NHL；中级/滤泡样 NHL；中级弥漫性 NHL；高级免疫母细胞 NHL；高级淋巴母细胞 NHL；高级小无裂细胞 NHL；bulky disease NHL；外套细胞淋巴瘤；AIDS-相关的淋巴瘤；和 Waldenstrom's 巨球蛋白血症)；慢性淋巴细胞白血病(CLL)；急性淋巴母细胞白血病(ALL)；毛细胞白血病；慢性骨髓细胞白血病；移植后淋巴组织增生疾病(PTLD)，母斑细胞病相关性异常血管增生，水肿(诸如与脑肿瘤相关的)，以及 Meigs 综合征。

本文术语“哺乳动物宿主”指任何相容的移植物的受体。“相容”是指将接受供出的移植物的哺乳动物宿主。优选，所述宿主是人。如果移植物供体和所述受体都是人，优选他们的 II 型 HLA 抗原匹配以改善组织相容性。

本文所用术语“细胞毒作用制剂”是指抑制或阻止细胞功能和/或引起细胞破坏的物质。该术语意在包括放射性同位素(例如 At<sup>211</sup>、I<sup>131</sup>、I<sup>125</sup>、Y<sup>90</sup>、

Re<sup>186</sup>、Re<sup>188</sup>、Sm<sup>153</sup>、Bi<sup>212</sup>、P<sup>32</sup>和Lu的放射性同位素), 化疗剂和毒素例如小分子毒素或细菌, 真菌, 植物或动物来源的酶活性毒素, 包括其片段和/或变体。

术语"抗肿瘤组合物"指用于治疗癌症的组合物, 其包含至少一种能够抑制或预防肿瘤生长或功能, 和/或导致肿瘤细胞破坏的活性治疗剂。适合包含在用来治疗癌症的抗肿瘤组合物中的治疗剂包括, 但不限于, 化疗剂、放射性同位素, 毒素, 细胞因子诸如干扰素, 以及靶向细胞因子的拮抗剂, 与肿瘤细胞相关的细胞因子受体或抗原。例如, 用于本发明的治疗剂可以是诸如抗-HER2抗体和抗-CD20抗体, 或小分子酪氨酸激酶抑制剂诸如VEGF受体抑制剂和EGF受体抑制剂。优选所述治疗剂是化疗剂。

“化疗剂”是在癌的治疗中使用的化学化合物。化疗制剂实例包括烷化剂, 如噻替哌(thiotepa)和CYTOXAN<sup>TM</sup>环磷酰胺(cyclophosphamide); 烷基磺酸酯如白消安(busulfan), 英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan); 氮丙啶如benaodopa, 卡波醌(carboquone), 美妥替哌(meturedopa)和尿烷亚胺(uredopa); 氮丙啶(ethylenimine)和methylamelamine包括六甲蜜胺(altretamine), 三亚乙基蜜胺(triethylenemelamine), 三亚乙基磷酰胺, 三亚乙基硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramidate)和三羟甲基蜜胺(trimethylolomelamine); 多聚乙酰(acetogenins)(具体是bullatacin和bullatacinone); 喜树碱(camptothecin)(包括合成类似物托泊替康(topotecan)); 苔藓抑素(bryostatin); callystatin; CC-1065(包括其阿多来新(adozelesin), 卡折来新(carzelesin)和比折来新(bizelesin)合成类似物); cryptophycins(具体是cryptophycin 1和cryptophycin 8); 多拉司他汀(dolastatin); duocarmycin(包括合成类似物, KW-2189和CB1-TM1); eleutherobin; pancratistatin; sarcodictyin; spongistatin; 氮芥(nitrogen mustards)如苯丁酸氮芥, 萘氮芥, 胆磷酰胺(cholophosphamide), 雌氮芥(estramustine), 异环磷酰胺(ifosfamide), 氮芥(mechlorethamine), 盐酸氧氮芥; 美法仑(melphalan), 新氮芥(novembichin), 胆甾醇苯乙酸氮芥(phenesterine), 松龙苯芥(prednimustine), 曲磷胺(trofosfamide), 尿嘧啶氮芥; 亚硝基脲(nitrosoureas)如亚硝基脲氮芥(carmustine), 氯脲菌素(chlorozotocin), 福莫司汀(fotemustine), 洛莫司汀(lomustine), 尼莫司汀(nimustine), 雷莫司汀(ranimustine); 抗生素诸如enediynes 抗生素(例如calicheamicin, 具体是calicheamicin gammaII和

calicheamicin omegaII (见, 例如, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); dynemicin, 包括 dynemicin A; 二膦酸盐(bisphosphonates), 诸如氯膦酸盐(clodronate); esperamicin; 以及新制癌菌素(neocarzinostatin)生色团和相关色素蛋白 enediyne 抗生素生色团), aclacinomysins, 放射菌素(actinomycin), aauthramycin, 氮丝氨酸(azaserine), 博莱霉素(bleomycin), 放线菌素 C (cactinomycin), carabycin, 去甲柔红霉素(carminomycin), 嗜癌霉素(carzinophilin), chromomycins, 更生霉素(dactinomycin), 柔红霉素, 地托比星(detorubicin), 6-重氮-5-氧-L-正亮氨酸, ADRIAMYCIN®多柔比星(doxorubicin) (包括吗啉代-多柔比星, 氰基吗啉代-多柔比星, 2-pyrrolino-多柔比星和去氧多柔比星), 表阿霉素(epirubicin), 依索比星(esorubicin), 伊达比星(idarubicin), 发波霉素(marcellomycin), 丝裂霉素诸如丝裂霉素 C, 霉酚酸, 诺加霉素(nogalamycin), 橄榄霉素(olivomycin), 培洛霉素(peplomycin), potfiromycin, 嘌呤霉素, 三铁阿霉素(quelamycin), 罗多比星(rodorubicin), 链黑菌素(streptonigrin); 链脲霉素(streptozocin), 杀结核菌素(tubercidin), 乌苯美司(ubenimex), 净司他丁(zinostatin), 佐柔比星(zorubicin); 抗代谢药如氨甲蝶呤, 5-氟尿嘧啶(5-FU); 叶酸类似物如二甲叶酸(denopterin), 氨甲蝶呤, 丁蝶翼素(pteropterin), 三甲曲沙(trimetrexate); 嘌呤类似物氟达拉滨(fludarabine), 6-巯基嘌呤, 硫咪嘌呤, 硫鸟嘌呤; 嘧啶类似物如安西他滨(ancitabine), 阿扎胞苷(azacitidine), 6-氮尿苷, 卡莫氟(carmofur), 阿糖胞苷, 双脱氧尿苷, doxifluridine, 依诺他滨(enocitabine), 氟尿苷; 雄激素类如卡普睾酮(calusterone), 丙酸甲雄烷酮(dromostanolong propionate), 环硫雄醇(epitiostanol), 美雄氨(mepitiostane), 睾内酯(testolactone); 抗肾上腺类如氨基鲁米特(aminoglutethimide), 邻氯苯对氯苯二氯乙烷(mitotane), 曲洛司坦(trilostane); 叶酸补充剂如 frolinic acid; 醋葡内酯(aceglatone); 醛磷酰胺糖苷(aldophosphamide glycoside); 氨基乙酰丙酸(aminolevulinic acid); 恩尿嘧啶(eniluracil); 安吡啶(amsacrine); bestrabucil; 比生群(biasntrene); 依达曲沙(edatraxate); defofamine; 秋水仙胺; 地吡醌(diaziquone); elfornithine; elliptinium acetate; epothilone; 依托格鲁(etoglucid); 硝酸镓; 羟基脲; 香菇多糖(lentinan); 氯尼达明(lonidamine); 美登素类(maytansinoids)诸如美登素(maytansine)和柄型菌素(ansamitocins); 米托胍脲(mitoguazone); 米托蒽醌(mitoxantrone); 莫哌达醇(mopidamol); nitracrine; 喷司他丁(pintostatin);

phenamet; 吡柔比星(pirarubicin); 洛索萸醌(losoxantrone); 鬼臼树酸(podophyllinic acid); 2-乙基酰肼; 丙卡巴肼(procarbazine); PSK®; 多糖复合物(JHS Natural Products, Eugene, OR); 雷佐生(razoxane); 根霉素(rhizoxin); 西索菲兰(sizofiran); 锗螺胺(spirogermanium); 细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid); 三亚胺醌; 2,2',2''-三氯三乙胺(trichlorotriethylamine); 单端孢霉烯(trichothecene)(具体是 T-2 毒素, verracurin A, 杆孢菌素(roridin)A 和 anguidine); 乌拉坦(urethan); 长春碱酰胺; 达卡巴嗪(dacarbazine); 甘露醇氮芥; 二溴甘露醇(mitobronitol); 二溴卫矛醇(mitolactol); 溴丙哌嗪(pipobroman); gacytosine; 阿拉伯糖苷("Ara-C"); 环磷酰胺; 三胺硫磷(thiotepa); 紫杉烷(taxoid), 如 TAXOL®紫杉醇(Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ), ABRAXANE™ 无克列莫佛(Cremophor-free), 紫杉醇的白蛋白改造的纳米颗粒配制剂(albumin-engineered nanoparticle formulation of paclitaxel)(American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), 和 TAXOTERE® 多西紫杉醇(Rhône- Poulenc Rorer, Antony, France); chloranbucil; GEMZAR®吉西他滨(gemcitabine); 6-硫代鸟嘌呤; 巯基嘌呤; 氮甲蝶呤; 铂配位复合物(platinum coordination complexes)如顺铂、奥沙利铂(oxaliplatin)和卡铂(carboplatin); 长春花碱; 铂; 鬼臼乙叉甙(etoposide) (VP-16); 异环磷酰胺; 米托萸醌(mitoxantrone); 长春新碱; NAVELBINE®长春瑞宾(vinorelbine); novantrone; 替尼泊甙(teniposide); 依达曲沙(edatrexate); 柔红霉素(daunomycin); 氨基蝶呤; xeloda; 伊拜膦酸盐(ibandronate); irinotecan (例如 CPT-11); 拓扑异构酶抑制剂 RFS 2000; 二氟甲基鸟氨酸(DMFO); 维甲酸类(retinoids)诸如维甲酸; capecitabine; 以及上述任何物质的可药用盐, 酸或衍生物。

此定义还包括能调节或抑制激素对肿瘤的作用的抗激素制剂, 如抗雌激素制剂和选择性雌激素受体调节物(SERM), 包括, 例如他莫昔芬(tamoxifen) (包括 NOLVADEX®他莫昔芬), 雷洛昔芬(raloxifene), 屈洛昔芬(droloxifene), 4-羟基他莫昔芬, 曲沃昔芬(trioxifene), keoxifene, LY117018, 奥那司酮(onapristone), 和 FARESTON·托瑞米芬(FARESTON· toremifene); 芳香酶抑制剂(aromatase inhibitor), 其抑制芳香酶, 该酶调节肾上腺中的雌激素生成, 诸如, 例如 4(5)-咪唑, 氮鲁米特(aminoglutethimide), MEGASE®醋酸甲地孕酮(megestrol acetate), AROMASIN®依西美坦(exemestane), formestanie,



法偻唑 (fadrozole), RIVISOR® 伏氯唑 (vorozole), FEMARA® 来曲唑 (letrozole), 和 ARIMIDEX® 阿那曲唑 (anastrozole); 和抗雄激素制剂如氟他氨 (flutamide), 尼鲁米特 (nilutamide), 比卡鲁胺 (bicalutamide), 亮丙瑞林 (leuprolide) 和戈舍瑞林 (goserelin); 以及曲沙他滨 (troxacitabine) (1,3-二氧戊烷核苷胞嘧啶类似物); 反义寡核苷酸, 具体是抑制异常细胞增生所涉及的信号途径中的基因表达的那些反义寡核苷酸, 诸如, 例如, PKC- $\alpha$ , Ralf 和 H-Ras; 核糖酶诸如 VEGF 表达抑制剂 (例如, ANGIOZYME® 核糖酶) 和 HER2 表达抑制剂; 疫苗诸如基因治疗疫苗, 例如, ALLOVECTIN® 疫苗, LEUVECTIN® 疫苗, 和 VAXID® 疫苗; PROLEUKIN® rIL-2; LURTOTECAN® 拓扑异构酶 1 抑制物; ABARELIX® rmRH; 和上述任何物质的可药用盐, 酸或衍生物。

本文中“生长抑制剂”是指在体内或体外抑制细胞 (例如癌症细胞) 生长的化合物或组合物。因此, 生长抑制剂可以是显著降低 S 期恶性细胞百分比的药物。生长抑制剂的实例包括阻断细胞周期 (在除 S 期以外的阶段) 进展的药物, 例如诱导 G1 停滞和 M 期停滞的药物。经典的 M 期阻断剂包括长春花类 (长春新碱和长春花碱), TAXOL®, 美登木素生物碱和 topo II 抑制剂如阿霉素、柔红菌素、依托泊甙和博来霉素等。那些使 G1 期停滞的药物还连带使 S 期停滞, 例如 DNA 烷化剂象他莫昔芬、强的松、达卡巴嗪、氮芥 (mechlorethamine)、顺铂、氮甲蝶呤、5-氟尿嘧啶和阿糖胞苷等。详见“癌症的分子基础”Mendelsohn 和 Israel 编, 第一章, Murakami 等的题为“细胞周期调节, 肿瘤和抗肿瘤药物”的文章 (WB Saunders: Philadelphia, 1995), 尤其见第 13 页。

术语“细胞因子”是一般性术语, 指由一个细胞群释放的对另一个细胞群起细胞间介质作用的蛋白。此种细胞因子的实例是淋巴细胞因子, 单核细胞因子和传统的多肽激素。这些细胞因子包括生长激素, 如人生长激素, N-甲二磺酰人生长激素, 和牛生长激素; 甲状旁腺素; 甲状腺素; 胰岛素; 前胰岛素; 松驰素; 前松驰素; 糖蛋白激素如卵泡刺激素 (FSH), 甲状腺刺激素 (TSH), 促黄体 (生成) 激素 (LH); 上皮生长因子, 肝细胞生长因子; 成纤维细胞生长因子; 催乳激素; 胎盘催乳素; 肿瘤坏死因子- $\alpha$  和  $\beta$ ; 苗勒氏管抑制物质 (mullerian-inhibiting substance); 小鼠促性腺激素相关肽; 抑制素; 苯丙酸诺龙; 血管内皮细胞生长因子; 整合素; 血小板生成素 (TPO); 神经生

长因子如 NGF- $\beta$ ; 血小板生长因子; 转化生长因子(TGF)如 TGF- $\alpha$ 和 TGF- $\beta$ ; 胰岛素样生长因子-I 和-II; 促红细胞生成素(EPO); 骨诱导因子(osteoinductive factors); 干扰素如干扰素- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ ; 集落刺激因子(CSF)如巨噬细胞-CSF(M-CSF); 粒细胞-巨噬细胞-CSF(GM-CSF); 粒细胞-CSF(G-CSF); 白细胞介素(IL)如 IL-1, IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; 肿瘤坏死因子如 TNF- $\alpha$ 或 TNF- $\beta$ ; 和其它多肽因子包括 LIF 和 kit 配体(KL)。本文中术语细胞因子包括天然蛋白或来自重组细胞培养物的蛋白以及天然序列细胞因子的生物活性等效物。

本文所用术语“前体药物”指药理学活性物质的前体或衍生物形式, 其较亲本药物对癌细胞的细胞毒作用小并能被酶活化或转化成更具活性的亲本形式。见例如 Wilman“Prodrugs in Cancer Chemotherapy”Biochemical Society Transactions, 14, pp.357-382, 615<sup>th</sup> Meeting Belfast(1986)和 Stella 等, “Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery, ”Directed Drug Delivery, Borchardt 等, (ed.), pp.247-267, 人 a Press(1985)。本发明的前体药物包括但不限于, 含磷酸盐前体药物, 含硫代磷酸脂前体药物, 含硫酸盐前体药物, 含肽前体药物, D 氨基酸修饰的前体药物, 糖基化前体药物, 含 $\beta$ 内酰胺的前体药物, 任选取代的含苯氧基乙酰胺的前体药物或任选取代的含苯基乙酰胺的前体药物, 可被转化成更具活性的细胞毒性游离药物的 5-氟胞嘧啶和其它 5-氟尿嘧啶前体药物。可被衍生为本发明所用前提药物形式的细胞毒作用药物的实例包括, 但不限于, 上述那些化疗剂。

术语“静脉内输注”指将在长于大约 5 分钟的时间, 优选大约 30-90 分钟内将药物导入动物或人类患者的静脉, 但根据本发明, 静脉内输注给药可选持续 10 小时或 10 小时以下。

“静脉内药团 (intravenous bolus)”或“静脉内推注(intravenous push)”指给药到动物或人类的静脉, 使得机体在大约 15 分钟或以下, 优选 5 分钟或以下的时间内接受到所述药物。

“皮下给药”指通过自药物容器的相对缓慢、持续的释放, 将药物导入动物或人类患者的皮肤下, 优选在皮肤和皮下组织之间的囊袋(pocket)中。所述囊袋可通过将皮肤捏起或拉开使其离开皮下组织而产生。

术语“皮下输注”指通过自药物容器的相对缓慢、持续的释放, 将药物导入动物或人类患者的皮肤下, 优选在皮肤和皮下组织之间的囊袋(pocket)中,

所述释放持续一段时间，包括但不限于 30 分钟或以下，或 90 分钟或以下。可选，所述输注可通过将药物递送泵植入所述动物或人类患者的皮下来进行，其中所述泵递送预定量的药物一段预定的时间，诸如 30 分钟，90 分钟，或治疗方案长度所跨越的时间。

术语“皮下药团 (subcutaneous bolus)”指在动物或人类患者的皮肤下给药，其中所述药团递送优选小于约 15 分钟，更优选小于 5 分钟，最优选小于 60 秒。给药优选在皮肤和皮下组织之间的囊袋中，所述囊袋可通过将皮肤捏起或拉开使其离开皮下组织而产生。

“血管生成因子”是刺激血管发育的生长因子。本文优选的血管生成因子是血管内皮生长因子(VEGF)。

本文术语“标记”指可检测的化合物或组合物，其与所述多肽直接或间接偶联。所述标记自身是可检测的(例如放射同位素标记或荧光标记)或，对于酶标记，可催化可检测底物化合物或组合物的化学改变。

“分离的”核酸分子是一种从通常与该多肽核酸天然来源相关的至少一种混合核酸分子中鉴定并分离的核酸分子。分离的核酸分子不同于其天然发现的形式。因此分离的核酸分子可从天然细胞中的该核酸分子区别出来。然而，分离的核酸分子包括包含于通常表达该多肽的细胞中的核酸分子，在该细胞中核酸分子位于与天然细胞不同的染色体位置。

术语“调控序列”指特定宿主有机体中可操作地连接的编码序列的表达所需的 DNA 序列。适合原核生物的调控序列，例如，包括启动子，可选地包括操纵子序列，和核糖体结合位点。已知真核细胞利用启动子，多腺苷化信号和增强子。

当与另一核酸序列发生功能关联时，核酸是“可操作地连接的”。例如，前序列或分泌性前导序列如果被表达为参与多肽分泌的前蛋白，其可操作地连接该多肽的 DNA；如果启动子或增强子影响编码序列的转录，其可操作地连接于该序列；或如果核糖体结合位点位于可促进翻译的位置，其可操作地连接编码序列。通常，“可操作地连接于”的意思是被连接的 DNA 序列是相邻的，并且如果是分泌性前导序列，应是相邻的并且处于阅读框中。然而，增强子则不一定是相邻的。通过在方便的限制位点接合而实现连接。如果此种位点不存在，合成的寡核苷酸连接物或连头的使用符合常规的作法。

本文术语“细胞”，“细胞系”，和“细胞培养”可互换使用并且所有此种名

称包括其子代。因此，术语“转化体”和“转化后细胞”包括原代处理细胞及其衍生的培养物，而不考虑传代的次数。由于有意和无意的突变，也可理解所有子代的 DNA 含量均不是恰好相同的。具有与原始转化后细胞中筛选到的功能或生物活性相同的功能或生物活性的突变体子代也包括在内。尽管命名截然不同，从上下文来看这一点是清楚的。

## II. 抗-VEGF 抗体的制备

### 抗体制备

#### (i) VEGF 抗原

制备并鉴定抗体的方法是本领域已知的。下文描述了制备本发明所用抗-VEGF 抗体的示例性技术。用于制备抗体的 VEGF 抗原可以是，例如 VEGF<sub>165</sub> 分子以及 VEGF 的其它同种型或者其含有所需表位的片段。用于生成本发明抗-VEGF 抗体的其它 VEGF 的形式对于本领域技术人员而言是显而易见的。

人 VEGF 通过首先利用牛 VEGF cDNA 作为杂交探针筛选自人细胞制备的 cDNA 文库来获得。Leung et al.(1989) Science, 246: 1306。由此鉴定的一种 cDNA 编码与牛 VEGF 具有超过 95%同源性的 165 个氨基酸的蛋白质；该 165 个氨基酸的蛋白质通常称为人 VEGF (hVEGF)或 VEGF<sub>165</sub>。人 VEGF 的有丝分裂原活性通过在哺乳动物宿主细胞中表达人 VEGF cDNA 得以证实。通过由人 VEGF cDNA 转染的细胞调节的培养基促进毛细血管内皮细胞的增殖，而对照细胞不能。Leung et al. (1989) Science, supra。

尽管血管内皮细胞生长因子可以从自然界分离并纯化用于进一步的治疗用途，滤泡细胞中相对低的蛋白浓度以及回收 VEGF 的高成本(就人力以及花费而言)在商业上没有应用价值。因此，需要进行其它努力以通过重组 DNA 技术克隆并表达 VEGF。(见例如，Ferrara (1995) Laboratory Investigation 72: 615-618, 所述参考文献包含在此作为参考)。

VEGF 在多种组织中作为多元同二聚体形式表达 (每单体 121, 145, 165, 189, 和 206 个氨基酸)，其是可选 RNA 剪接的结果。VEGF<sub>121</sub> 是可溶有丝分裂原，并不结合肝素；较长形式的 VEGF 而渐离的亲合力结合肝素。较长形式的 VEGF 可通过纤溶酶裂解其羧基末端以释放 VEGF 的可扩散形式。纤溶酶裂解后鉴定的羧基末端肽的氨基酸序列是 Arg<sub>110</sub>-Ala<sub>111</sub>。氨基末端“核心”蛋白 VEGF<sub>(1-110)</sub>作为同源二聚体分离，与完整 VEGF<sub>165</sub> 同源二聚体相比，其

与中和型单克隆抗体(诸如称为 4.6.1 和 3.2E3. 1.1 的抗体)以及 VEGF 受体的可溶形式以相似的亲和力结合。

数种在结构上与 VEGF 相关的分子最近已经被鉴定, 包括胎盘生长因子(PlGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D 和 VEGF-E。Ferrara and Davis-Smyth (1987) *Endocr. Rev.*, supra; Ogawa et al. (1998) *J. Biological Chem.* 273:31273-31281; Meyer et al. (1999) *EMBO J.*, 18: 363-374。受体酪氨酸激酶, Flt-4 (VEGFR-3), 已经被鉴定为 VEGF-C 和 VEGF-D 的受体。Joukov et al. (1996) *EMBO J.* 15: 1751; Lee et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:1988-1992; Achen et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 548-553。最近显示 VEGF-C 参与淋巴血管生成的调节。Jeltsch et al. (1997) *Science* 276: 1423- 1425。

已经鉴定了两种 VEGF 受体, Flt-1 (也称为 VEGFR-1)和 KDR (也称为 VEGFR-2)。Shibuya et al. (1990) *Oncogene* 8: 519-527; de Vries et al. (1992) *Science* 255: 989-991; Terman et al. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187: 1579-1586。Neuropilin-1 为选择性 VEGF 受体, 其能够结合肝素结合型 VEGF 同种型(Soker et al. (1998) *Cell* 92: 735-45)。Flt-1 和 KDR 都属于受体酪氨酸激酶(RTK)家族。RTK 包括跨膜受体大家族, 具有多种生物活性。目前, 至少 19 种不同的 PTK 亚家族已经得以鉴定。酪氨酸激酶(RTK)家族包括对于多种细胞类型的生长以及分化而言重要的受体(Yarden and Ullrich (1988) *Ann. Rev. Biochem.* 57: 433-478; Ullrich and Schlessinger (1990) *Cell* 61: 243-254)。RTK 的内在功能在与配体结合时被活化, 其导致受体以及多种细胞基质的磷酸化, 由此产生多种细胞反应 (Ullrich & Schlessinger (1990) *Cell* 61: 203-212)。因此, 受体酪氨酸激酶介导的信号转导由与特定生长因子(配体)的细胞外相互作用而启动, 通常随后导致受体二聚体化, 刺激内在蛋白酪氨酸激酶活性以及受体的反式磷酸化。细胞内信号转导分子的结合位点由此产生, 并导致形成具有胞浆信号分子谱的复合体, 其可促进适当的细胞反应(例如细胞分裂, 分化, 代谢效应, 细胞外微环境中的改变)。见 Schlessinger and Ullrich (1992) *Neuron* 9: 1-20。结构上, Flt-1 和 KDR 在细胞外结构域中有 7 个免疫球蛋白样结构域, 一个跨膜结构域, 被激酶插入区中断的共有酪氨酸激酶序列。Matthews et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 : 9026-9030; Terman et al. (1991) *Oncogene* 6: 1677-1683。

## (ii) 多克隆抗体

多克隆抗体优选通过多次给动物皮下(sc)或腹膜内(ip)注射相关抗原和佐剂而产生。将所述相关抗原与针对所免疫的物种具有免疫原性的蛋白(如匙孔血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin)、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂)用双功能试剂或衍生试剂,如马来酰亚胺苯甲酰基琥珀酰亚胺酯(通过半胱氨酸残基结合)、N-羧基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酸酐、SOCl<sub>2</sub>或R<sub>1</sub>N=C=NR(R和R<sub>1</sub>是不同烷基),进行偶联是有效的。

用所述抗原、免疫原性偶联物或衍生物免疫动物,方法是,将100μg或5μg蛋白或偶联物(分别针对兔或鼠)与3倍体积的弗氏完全佐剂混合,在多位点皮内注射该溶液。1个月后,多位点皮内注射起始量的1/5-1/10的肽或偶联物与弗氏完全佐剂来加强免疫。7-14天后,对动物采血,测定血清中的抗体效价。对动物的加强免疫直到效价达到平台期为止。优选给动物加强注射相同抗原的偶联物,但也可以是偶联至不同蛋白和/或通过不同的交联剂偶联的偶联物。偶联物还可以是重组细胞培养物产生的融合蛋白。此外,可用明矾等聚集剂(aggregating agent)增强免疫反应。

## (iii) 单克隆抗体

单克隆抗体可用Kohler和Milstein, Nature, 256: 495(1975)首先描述的杂交瘤法制备或通过重组DNA法(美国专利4,816,567)制备。

在杂交瘤方法中,如上述免疫小鼠或其它适宜的宿主动物,例如仓鼠,来激发产生或能产生特异结合免疫所用蛋白的抗体的淋巴细胞。可选地,所述淋巴细胞可被体外免疫。免疫后,淋巴细胞可被分离并随后使用适宜的融合剂例如聚乙二醇与骨髓瘤细胞系融合,以形成杂交瘤细胞(Goding, *单克隆抗体: Principles and Practice*, 59-103页(Academic Press, 1986))。

由此制备的杂交瘤细胞被接种于适宜的培养基并在其中生长,该培养基优选包含一种或多种抑制未融合亲代骨髓瘤细胞的生长或存活物质。例如,如果亲代骨髓瘤细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT或HPRT),杂交瘤的选择培养基通常包括次黄嘌呤,氨基蝶呤,和胸腺嘧啶(HAT培养基)这些抑制HGPRT-缺陷细胞生长的物质。

优选骨髓瘤细胞为那些能有效融合、支持所选抗体生成细胞以稳定的高水平产生抗体、并对如HAT培养基敏感的骨髓瘤细胞系。在众多这样的细

胞系中，优选的骨髓瘤细胞系是小鼠骨髓瘤系，如由 Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA 提供的 MOPC-21 和 MPC-11 小鼠肿瘤，和由美国典型培养物保藏中心，Rockville, Maryland USA 提供的 SP-2 或其衍生物，如 X63-Ag8-653 细胞。也描述了人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系可用于产生人单克隆抗体[Kozbor, J. Immunol., 133: 3001(1984); 和 Brodeur 等，单克隆抗体的制备技术和应用(Marcel Dekker, Inc., New York 纽约, (1987)) 51-63 页]。

可在含有生长的杂交瘤细胞的培养基中分析抗所述抗原的单克隆抗体的产生。优选地，杂交瘤细胞所产生的单克隆抗体的结合特异性通过免疫沉淀或通过体外结合试验，如放射免疫分析(RIA)或酶联免疫吸附试验(ELISA)来分析。

一旦鉴定出产生具有所需特异性、亲合力和/或活性的抗体的杂交瘤细胞，这些细胞克隆可通过有限稀释进行亚克隆，并通过标准方法(Goding, *单克隆抗体: Principles and Practice*, 59-103 页(Academic Press, 1986))使其生长。适合此目的的培养基包括例如 D-MEM 或 RPMI-1640 培养基。此外，通过例如将细胞注射入小鼠中，可以使杂交瘤细胞以动物腹水肿瘤的形式在体内生长。

上述亚克隆所分泌的单克隆抗体可用经典抗体纯化方法如，例如蛋白 A-Sepharose，羟基磷灰石层析，凝胶电泳，透析或亲和层析等从培养基，腹水或血清中分离。

使用传统方法(例如通过使用能与编码小鼠抗体重链和轻链的基因特异结合的寡核苷酸探针)可轻易分离并测序编码单克隆抗体的 DNA。杂交瘤细胞是此 DNA 的优选来源。一旦分离出该 DNA，可以将它置入表达载体中，该载体随后被转染至宿主细胞中例如大肠杆菌细胞，猴 COS 细胞，中国仓鼠卵巢(CHO)细胞，或不另外生成抗体蛋白的骨髓瘤细胞，从而在重组宿主细胞中合成单克隆抗体。抗体的重组生产将在下文详述。

在进一步的实施方案中，可从使用 McCafferty 等，*Nature*, 348:552-554(1990)描述的技术产生的抗体噬菌体文库中分离单克隆抗体或抗体片段。Clackson 等，*Nature*, 352:624-628(1991)和 Marks 等，*J. Mol. Biol.*, 222:581-597(1991)分别描述了使用噬菌体文库分离小鼠和人抗体。随后的文章描述了通过链改组产生高亲和性(纳米级)人抗体(Marks 等，*Bio/Technology*,

10:779-783(1992)), 以及将组合感染 (combinational infection) 和体内重组作为策略构建非常大的噬菌体文库 (Waterhouse 等, *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266(1993))。因此, 这些技术是用于分离单克隆抗体的传统单克隆抗体杂交瘤技术的可行选择。

也可采用以下方法对 DNA 进行修饰: 例如, 以人重链和轻链恒定区的编码序列代替同源小鼠序列(美国专利 4,816,567; Morrison 等, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851(1984)), 或将免疫球蛋白编码序列与非免疫球蛋白多肽(异源多肽)的完整或部分编码序列共价结合。

通常, 上述非免疫球蛋白多肽序列可取代抗体的恒定区, 或它们可取代抗体的一个抗原结合位点的可变区以产生嵌合二价抗体, 该抗体包含两个特异于不同抗原的抗原结合位点。

#### (iv) 人源化抗体和人抗体

人源化抗体具有一个或多个从非人来源引入它的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基常称为“引进的”残基, 它们通常来自“引进的”可变区。人源化过程基本是按照 Winter 及其同事 (Jones 等, *Nature*, 321: 522-525(1986); Riechmann 等, *Nature*, 332:323-327(1988); Verhoeyen 等, *Science*, 239:1534-1536(1988)) 的方法, 通过用啮齿类 CDRs 或 CDR 序列替换人抗体的对应序列来进行。因此, 这样的“人源化”抗体是嵌合抗体(美国专利 4,816,567), 其中完整人类可变区的很少一部分被非人物种的相应序列取代。实践中, 人源化抗体通常是人的抗体, 其中一些 CDR 残基且可能有部分 FR 残基被啮齿动物抗体中类似位点的残基取代。

选择人源化抗体制备所用的人轻链和重链可变区, 对于降低抗原性非常重要。根据所谓的“最适”方法, 针对已知人可变区序列的整个文库筛选啮齿类抗体的可变区序列。随后将与啮齿类最接近的人序列作为人框架区 (FR) 用于人源化抗体 (Sims 等, *J. Immunol.*, 151:2296(1993); Chothia 等, *J. Mol. Biol.*, 196:901(1987))。另一种方法是使用从轻链或重链特定亚群的所有人抗体的共有序列衍生的特定框架区。同样的框架区可被用于几种不同的人源化抗体 (Carter 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285(1992); Presta 等, *J. Immunol.*, 151:2623(1993))。

更重要的是, 将抗体人源化后保留了对抗原的高亲合力和其它有利的生物特性。为达到此目的, 根据优选方法, 通过用亲本序列和人源化序列的三



维模型分析亲本序列和各种概念性(conceptual)人源化产物来制备人源化抗体。免疫球蛋白三维模型已有商品,是本领域技术人员所熟悉的。还有用于描述和展示所选免疫球蛋白序列可能的三维构象结构的计算机程序。通过观察这些展示结果可分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能中可能发挥的作用,即分析能影响候选免疫球蛋白与其抗原结合的能力的残基。通过这种方法,可从受体序列和引进序列中选出FR残基并组合,从而得到所需抗体性质,如对靶抗原的亲合力增加。总之,超变区残基直接并且最主要涉及对抗原结合的影响。

可选的,可以制备转基因动物(如小鼠),它经过免疫能在缺乏内源性免疫球蛋白生成的情况下产生全套人抗体。例如,已指出在嵌合和胚系(germ-line)突变小鼠中,抗体重链连接区( $J_H$ )基因的纯合缺失导致内源性抗体生成的完全抑制。将人胚系免疫球蛋白基因阵列(array)转移到此胚系突变小鼠中,将导致在抗原攻击的情况下产生人抗体。见例如, Jakobovits 等 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551(1993); Jakobovits 等, *Nature*, 362:255-258(1993); Bruggemann 等, *Year in Immuno.*, 7:33(1993); 和 Duchosal 等, *Nature* 355:258(1992)。人抗体也可来自噬菌体展示文库(Hoogenboom 等, *J. Mol. Biol.*, 227:381(1991); Marks 等, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597(1991); Vaughan 等, *Nature Biotech* 14:309(1996))。

#### (v) 抗体片段

已开发了生成抗体片段的多种技术。传统上,这些片段通过对完整抗体的蛋白水解性消化获得(见 Morimoto 等, *生物化学和生物物理学方法杂志 (Journal of Biochemical and Biophysical Methods)* 24: 107-117(1992))和 Brennan 等, *科学*, 229: 81(1985))。但现在可直接通过重组宿主细胞产生这些片段。例如,可从上述抗体噬菌体库分离抗体片段。另外,可从大肠杆菌直接回收 Fab'-SH 片段,并经化学连接形成  $F(ab')_2$  片段(Carter 等, *生物/技术* 10: 163-167(1992))。依据另一种方法,可直接从重组宿主细胞培养中分离  $F(ab')_2$  片段。其它产生抗体片段的技术对本领域技术人员是显而易见的。在其它实施方案中,所选抗体是单链 Fv 片段(scFv)。见 WO 93/ 16185。

#### (v) 多特异抗体

多特异抗体对至少两种不同的抗原具有结合特异性。尽管此种分子通常只结合两种抗原(即双特异抗体, BsAbs), 具有附加特异性的抗体例如三特

异抗体也包含在文中所用的术语中。BsAbs 的实例包括具有针对肿瘤抗原的一条臂和针对细胞毒作用触发分子(cytotoxic trigger molecule)的另一条臂的那些抗体,例如抗-FcγRI/抗-CD15, 抗-p185<sup>HER2</sup>/FcγRIII(CD16), 抗-CD3/抗-恶性 B-细胞(1D10), 抗-CD3/抗-p185<sup>HER2</sup>, 抗-CD3/抗-p97, 抗-CD3/抗-肾细胞癌, 抗-CD3/抗-OVCAR-3, 抗-CD3/L-D1(抗-结肠癌), 抗-CD3/抗-黑色素细胞刺激激素类似物, 抗-EGF 受体/抗-CD3, 抗-CD3/抗-CAMA1, 抗-CD3/抗-CD19, 抗-CD3/MoV18, 抗-神经细胞粘附分子(NCAM)/抗-CD3, 抗-叶酸结合蛋白(FBP)/抗-CD3, 抗-泛癌相关抗原(AMOC-31)/抗-CD3; 一条臂特异地结合肿瘤抗原而另一条臂结合毒素的 BsAbs 例如抗-皂草素(saporin)/抗-Id-1, 抗-CD22/抗-皂草素, 抗-CD7/抗-皂草素, 抗-CD38/抗-皂草素, 抗-CEA/抗-蓖麻毒素 A 链, 抗-干扰素-α(IFN-α)/抗-杂交瘤独特型, 抗-CEA/抗-长春花碱; 转化酶活化的前体药物的 BsAbs 例如抗-CD30/抗-碱性磷酸酶(催化磷酸丝裂霉素前药物向丝裂霉素醇的转化); 可用作纤维蛋白溶解剂的例如抗-纤维蛋白/抗-组织纤溶酶原激活物(tPA), 抗-纤维蛋白/抗-尿激酶型纤溶酶原激活物(uPA); 将免疫复合物靶向细胞表面受体的 BsAbs 例如抗-低密度脂蛋白(LDL)/抗-Fc 受体(例如 FcγRI, FcγRII 或 FcγRIII); 用于治疗感染性疾病的 BsAbs 例如抗-CD3/抗-单纯疱疹病毒(HSV), 抗-T-cell 受体:CD3 复合物/抗-流感病毒, 抗-FcγR/抗-HIV; 体外或体内检测肿瘤的 BsAbs 例如抗-CEA/抗-EOTUBE, 抗-CEA/抗-DPTA, 抗-p185<sup>HER2</sup>/抗-hapten; 作为疫苗佐剂的 BsAbs; 和作为诊断工具的 BsAbs 例如抗-兔 IgG/抗-铁蛋白, 抗-辣根过氧化物酶(HRP)/抗-激素, 抗-生长抑素/抗-物质 P, 抗-HRP/抗-FITC, 抗-CEA/抗-β-半乳糖苷酶。三特异抗体的实例包括抗-CD3/抗-CD4/抗-CD37, 抗-CD3/抗-CD5/抗-CD37 和抗-CD3/抗-CD8/抗-CD37。双特异抗体可被制备为全长抗体或抗体片段(例如 F(ab')<sub>2</sub> 双特异性抗体)。双特异性抗体的综述见 Segal 等 *J. Immunol. Methods* 248:1-6(2001)。

制备双特异性抗体的方法是本领域已知的。传统上, 全长双特异性抗体的重组制备是基于两个免疫球蛋白重链-轻链对的共表达, 其中这两条链具有不同特异性(Millstein and Cuello, *Nature*, 305: 537-539(1983))。由于免疫球蛋白重链轻链随机搭配, 这些杂交瘤(quadroma)产生 10 种不同抗体分子的潜在的混合物, 其中只有一种具有正确的双特异性结构。对正确分子的纯化(通常通过亲和层析步骤来进行)非常复杂, 且产量很低。类似的方法见

WO93/08829(1993年5月13日公开)和 Traunecker 等, EMBO J, 10: 3655-3659(1991)。

依据不同的方法,可将具有所需结合特异性(抗体-抗原结合位点)的抗体可变区与免疫球蛋白恒定区序列融合。该融合优选与至少包含铰链区、CH2及 CH3 区部分的免疫球蛋白重链恒定区融合。优选使含有轻链结合所需位点的第一重链恒定区(CH1)出现在至少在一种融合中。可将编码免疫球蛋白重链融合体,以及必要时,编码免疫球蛋白轻链的 DNA 插入不同表达载体,共转染至适当宿主生物。这使得在使用非等比的三种多肽链进行构建的实施方案中,能够较灵活地调整三种多肽片段的相互比例,以获得最佳产量。但也可在至少两种多肽链以等比例表达而获得高产时或所述比例无特别意义时,将两种或所有三种多肽链的编码序列插入同一表达载体。

在该方法的一个优选实施方案中,所述双特异性抗体由一条臂上的具有第一结合特异性的杂合免疫球蛋白重链和另一条臂上的杂合免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)构成。已发现这种不对称结构有利于从非必要免疫球蛋白链的组合中分离出所需双特异性化合物,因为只在该双特异性分子的一半中存在免疫球蛋白轻链,这使得分离更加容易。此方法公开于1994年3月3日公开的 WO94/04690 中。制备双特异性抗体的进一步细节可以参见,例如 Suresh 等, *Methods in Enzymology*, 121: 210(1986)。根据 W096/27011 所述的另一种方法,可改造一对抗体分子之间的界面,使得从重组细胞培养中获得的异二聚体的百分比最大。优选的界面包括抗体恒定区 CH3 结构域的至少一部分。在该方法中,源于第一抗体分子界面上的一条或多条小的氨基酸侧链被较大侧链(如酪氨酸或色氨酸)取代。与所述大侧链大小相同或相近的互补“沟”可通过将氨基酸大侧链用小侧链(如丙氨酸或苏氨酸)取代而在第二抗体分子的界面上形成。这提供了一种机制,其使异二聚体的产量比不想要的终产物如同二聚体高。

双特异性抗体包括交联抗体或“异源偶联的”抗体。例如,可使异源偶联物中的抗体之一与抗生物素蛋白偶联,使另一抗体与生物素偶联。有观点认为,这类抗体可用于将免疫细胞导向不想要的细胞(美国专利 4676980),也可用于治疗 HIV 感染(WO91/00360, WO92/200373 和 EP03089)。异源偶联抗体可通过任何适当的交联方法制备。适当的交联制剂和多种交联技术为本领域已知,可在美国专利 4676980 号中获得。

从抗体片段制备双特异性抗体的技术已有文献。例如，双特异性抗体可利用化学连接制备。Brennan 等，科学 229: 81(1985)中描述了将完整抗体经蛋白水解制备  $F(ab')_2$  片段的方法。这些片段在二巯基复合剂亚砷酸钠存在时被还原，从而稳定相邻的巯基，并阻止分子间二硫键的形成。生成的  $Fab'$  片段被转化为硫硝基苯甲酸盐(TNB)衍生物。其中一种  $Fab'$ - TNB 衍生物经巯基乙胺还原成  $Fab'$ -硫醇，再与等分子量的其它  $Fab'$ - TNB 衍生物混合形成双特异性抗体。如此产生的双特异性抗体可作为酶的选择性固相化中所用的试剂。

近期的进展促进了  $Fab'$ - SH 片段从大肠杆菌的直接回收，该片段可经化学偶联形成双特异性抗体。Shalaby 等，实验医学杂志，175:217-225(1992)中描述了完全人源化双特异性抗体  $F(ab')_2$  分子的产生。每一  $Fab'$  片段分别从大肠杆菌中分泌出来，体外直接化学偶联形成双特异性抗体。如此制备的双特异性抗体能与过表达 VEGF 受体的细胞和正常人 T 细胞结合，还能引发人类细胞毒淋巴细胞对人乳腺肿瘤细胞的裂解活性。

直接从重组细胞培养中制备并分离双特异性抗体片段的多种技术也已有描述。例如，可用亮氨酸拉链制备双特异性抗体。Kostelny 等，免疫学杂志，148(5):1547-1553(1992)。将来自 Fos 和 Jun 蛋白的亮氨酸拉链肽与两种不同抗体的  $Fab'$  部分通过基因融合而连接。使抗体的同型二聚体在铰链区被还原成单体，然后被再氧化形成抗体的异二聚体。该方法也可用于制备抗体同型二聚体。由 Hollinger 等，美国国家科学院学报，90:6444-6448 (1993)) 描述的“二价抗体”技术提供了另一种制备双特异性抗体片段的方法。所述片段中含有重链可变区 ( $V_H$ )，其通过接头与轻链可变区( $V_L$ )相连，该接头非常短，使得同一链的两个结构域之间无法配对。因此，同一片段上的  $V_H$  和  $V_L$  结构域被迫与另一片段上的互补  $V_L$  和  $V_H$  结构域配对，从而形成两个抗原结合位点。此外还报道了另一种用单链 Fv(sFv)二聚体来制备双特异性抗体的策略。见 Gruber 等，免疫学杂志，152: 5368(1994)。

还考虑了二价以上的抗体。如可制备三特异性抗体。Tutt 等，免疫学杂志，147: 60(1991)。

#### (vii) 效应物功能改造

也可预期修饰拮抗剂的效应物功能 (effector function)，如以此增强拮抗剂的抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用(ADCC)和/或补体依赖的细胞毒作

用(CDC)。这可以通过在抗体拮抗剂 F<sub>C</sub> 区引入一或多个氨基酸取代而获得。此外,可在 F<sub>C</sub> 区引入半胱氨酸残基,使得在此区形成链间二硫键。由此产生的同型二聚体抗体可提高内在化能力和/或增强补体介导的细胞杀伤作用和 ADCC。见 Caron 等,实验医学杂志 176:1191-1195(1992)和 Shopes, B. 免疫学杂志 148: 2918-2922 (1992)。具有增强的抗肿瘤活性的同型二聚体抗体也可用 Wolffe 等,癌症研究 53:2560-2565 (1993)所述异源双功能交联剂制备。或者,可通过工程改造产生具有双 F<sub>C</sub> 区并因此具有增强的补体裂解效应及 ADCC 能力的抗体。见 Stevenson 等,抗癌药物的设计(抗-Cancer drug design) 3:219-230 (1989)。

#### (viii) 免疫偶联物

本发明还涉及包含偶联于细胞毒药剂的本文所述抗体的免疫偶联物,所述细胞毒药剂诸如化疗剂,毒素(例如细菌,真菌,植物或动物来源的酶活性毒素或其片段)或放射性同位素(即,放射偶联物)。

可用于产生所述免疫偶联物的化疗剂已经在上文描述。可以应用的酶活性毒素及其片段包括:白喉毒素 A 链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素 A 链(来自铜绿假单胞菌)、蓖麻毒蛋白 A 链、相思豆毒蛋白 A 链、蒴莲根毒素 A 链、 $\alpha$ -帚曲毒素、油桐(*Aleutites fordii*)蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆(*Phytolaca Americana*)蛋白(PAPI, PAPII, PAP-S)、苦瓜(*Momordica charantia*)抑制因子、麻疯树毒蛋白、巴豆毒蛋白、肥皂草(*Saponaire officinalis*)抑制剂,白树毒素,米托菌素(mitogellin)、局限曲菌素、酚霉素、依诺霉素和单端孢菌毒素(tricothecenes)。多种放射性核素可用于制备放射偶联物抗体。实例包括 <sup>212</sup>Bi, <sup>131</sup>I, <sup>131</sup>In, <sup>90</sup>Y 和 <sup>186</sup>Re。

抗体和细胞毒作用制剂的偶联物可通过多种双功能蛋白偶联剂来连接,所述双功能蛋白偶联剂如: N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP),琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯,亚胺基硫烷(IT),亚胺酸酯的双功能衍生物(如盐酸二甲基己二酸亚氨酯),活性酯类(如二琥珀酰亚胺基辛二酸酯),醛类(如戊二醛),双-叠氮化合物(如双(对-叠氮基苯甲酰基)己二胺),双-重氮衍生物(如双-(对-重氮苯甲酰基)-乙二胺),二异氰酸酯(如亚甲代苯基 2,6-二异氰酸酯),和双-活性氟化合物(如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如,蓖麻毒蛋白免疫毒素可如 Vitetta 等, Science 238: 1098(1987)所述制备。C14 标记的 1-异硫氰酸苯甲基-3-甲基二乙烯三氮五乙

酸(MX-DTPA)是将放射性核苷酸偶联至抗体的偶联剂之一。见 WO94/11026。

在另一实施方案中,抗体可与肿瘤预靶向中应用的“受体”(如链霉亲和素)偶联,将该抗体-受体偶联物给予患者,之后用清除剂(clearing agent)除去循环中未结合的偶联物,再给予已偶联了细胞毒作用制剂(如放射性核苷酸)的“配体”(如抗生物素蛋白)。

#### (ix)免疫脂质体

本发明公开的抗体也被配制成免疫脂质体。含有所述抗体的脂质体通过本领域已知方法制备,诸如 Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82 : 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); 以及美国专利 4,485,045 和 4,544,545 中所述。具有延长的循环时间的脂质体在美国专利 5,013,556 中公开。

特别有用的脂质体可利用包含磷脂酰胆碱、胆固醇和 PEG 衍生的磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)的脂质组合物经反相蒸发法产生。通过使脂质体在挤压之下穿过指定孔径大小的滤膜,可获得具有所需直径的脂质体。本发明抗体的 Fab' 片段可如 Martin 等, J. Biol. Chem., 257: 286-288(1982)所述,经二硫键交换反应与脂质体偶联。可任选在所述脂质体中包含一种化疗药物。见 Gabizon 等, J. National Cancer Inst, 81(19)1484(1989)。

#### (x)抗体依赖酶介导的前体药物的治疗(ADEPT)

通过将抗体偶联于前体药物活化酶,本发明的抗体也可用于 ADEPT,该酶将前体药物(例如肽基化疗剂,见 WO81/01145)转化成活性抗癌药物。参见,例如,WO 88/和美国专利 4,975,278。

用于 ADEPT 的免疫结合物的酶组分包括任何能够对前体药物起作用,将它转化成更加有活性的细胞毒作用形式的酶。

可用于本发明的方法的酶包括,但不限于,碱性磷酸酶,用于将含有磷酸盐的前体药物转化成游离药物;芳香硫酸酯酶,用于将含有硫酸盐的前体药物转化成游离药物;胞嘧啶脱氨酶,用于将含有无毒的 5-氟胞嘧啶转化成抗癌药物 5-氟尿嘧啶;蛋白酶,例如沙雷氏菌属蛋白酶,嗜热菌蛋白酶,枯草杆菌蛋白酶,羧肽酶和组织蛋白酶(例如组织蛋白酶 B 和 L),用于将含肽的前体药物转化成游离药物;D-丙酰胺羧肽酶,用于转化含有 D-氨基酸取代物的前体药物;碳水化合物-切割酶,例如 $\beta$ -半乳糖苷酶和神经酰胺酶,用于将糖基化的前体药物转化成游离药物; $\beta$ -内酰胺酶,用于将 $\beta$ -内酰胺衍生

的药物转化为游离药物；和青霉素酰胺酶，例如青霉素 V 酰胺酶或青霉素 G 酰胺酶，用于将由苯氧乙酰基或苯乙酰基自其氮氮衍生的药物分别转化成游离药物。可选地，具有酶活性的抗体(本领域也称“抗体酶 (abzyme)”)可用将本发明的前体药物转化成游离活性药物(参见，例如，Massey, Nature 328: 457-458(1987))。可如本文所述方法制备抗体-抗体酶偶联物，从而将抗体酶递送到肿瘤细胞群。

通过本领域已知的技术，本发明的酶可与抗体共价偶联，例如使用上述的异双功能交联剂。可选地，使用本领域技术人员熟悉的重组 DNA 技术构建融合蛋白，该融合蛋白至少包含本文抗体的抗原结合区，并连接于本发明的酶的至少一个功能活化部分。(见，例如，Neuberger 等，Nature, 312:604-608(1984))。

#### (xi) 抗体-拯救受体结合表位融合物

在本发明具体实施方案中，例如需要利用抗体片段而不是完整抗体来促进肿瘤穿透。在这种情况下，需要修饰所述抗体片段以增加其血清半寿期。这可通过例如将拯救受体结合表位掺入所述抗体片段(例如通过突变抗体片段中的适宜区域或将所述表位掺入将融合于所述抗体任意末端或中间的肽标记中，例如通过 DNA 或肽合成)来实现

拯救受体结合表位优选构成这样的区域，其中任何来自 Fc 区的一或两个环的一个或多个残基被转移到抗体片段的类似的位置。甚至更优选，来自 Fc 区的一或两个环的 3 个或多个残基被转移。更优选，所述表位从 Fc 区(例如 IgG 的 Fc 区)的 CH<sub>2</sub> 区取出，并转移到 CH<sub>1</sub>, CH<sub>3</sub>, 或 V<sub>H</sub> 区，或超过一个所述的抗体的所述区。可选，所述表位从 Fc 区的 CH<sub>2</sub> 区取出，并转移到所述抗体片段的 C<sub>L</sub> 区和/或 V<sub>L</sub> 区。

#### (xii) 抗体的其它共价修饰

抗体的共价修饰包含在本发明范围内。如果可能，它们可通过化学合成或对所述抗体的酶促或化学裂解来制备。对所述抗体的其它类型的共价修饰通过使被靶向的抗体氨基酸残基与有机衍生反应剂反应来导入分子，所述有机衍生化剂可与选定的侧链或 N 或 C 末端残基反应。

半胱氨酰残基最经常与  $\alpha$ -卤代乙酸盐(酯)(以及相应的胺)诸如氯代乙酸或氯代乙酰胺反应，以产生羧甲基或羧基氨基甲基衍生物。半胱氨酰残基也通过与溴三氟丙酮， $\alpha$ -溴- $\beta$ -(5-咪唑基)丙酸，氯乙酰基磷酸酯，N-烷基马来

酰亚胺, 3-硝基-2-吡啶基二硫化物, 甲基 2-吡啶基二硫化物, 对氯汞基苯甲酸, 2-氯汞基-4-硝基酚, 或氯-7-硝基苯并-2-氧杂-1, 3-二唑反应衍生化。

组氨酰残基经过与焦碳酸二乙酯在 pH 5.5-7.0 下反应衍生化, 因为该试剂对组氨酸侧链具有相对特异性。对溴苯甲酰甲基溴化物也是有用的; 反应优选在 0.1 M 二甲胍酸钠中在 pH 6.0 进行。

赖氨酰和氨基末端残基与琥珀酸或其他羧酸酐反应。与这些试剂的衍生化具有使赖氨酰残基的电荷逆转的效应。衍生含 $\alpha$ -氨基的残基的其他合适试剂包括亚氨酸酯(imidoesters), 例如甲基吡啶亚酰胺(methyl picolinimide); 磷酸吡哆醛; 吡哆醛; 氯代硼氢化物(chloroborohydride); 三硝基苯磺酸; O-甲基异脲; 2, 4-戊二酮; 和转氨酶催化的与乙醛酸的反应。

精氨酰残基通过与苯基乙二醛, 2, 3-丁二酮, 1, 2-环己二酮和茚三酮的一种或几种常规试剂反应进行修饰。精氨酸残基的衍生化需要在碱性条件下进行反应, 因为胍官能团具有高 pKa。另外, 这些试剂可与赖氨酸以及精氨酸 $\epsilon$ -氨基反应。

酪氨酰残基的具体修饰可通过通过与芳香重氮基化合物或四硝基甲烷反应而将光谱标记导入酪氨酰残基来进行。最常见, N-乙酰基咪唑和四硝基甲烷分别用于形成 O-乙酰基酪氨酰种类以及 3-硝基衍生物。酪氨酰残基利用  $^{125}\text{I}$  或  $^{131}\text{I}$  来碘化, 从而制备标记的蛋白质用于放射免疫分析。

通过与碳二亚胺(R-N=C=N-R')反应可选择性修饰羧基侧链基团(天冬氨酰或谷氨酰), 其中 R 和 R'是不同的烷基基团, 例如 1-环己基-3-(2-吗啉基-4-乙基)碳二亚胺或 1-乙基-3-(4-氯-4, 4-二甲基戊基)碳二亚胺。另外, 天冬氨酰和谷氨酰残基通过与铵离子反应转变成天冬酰胺酰基和谷氨酰胺酰基。

谷氨酰胺酰基以及天冬酰胺酰基通常被脱去酰胺基分别形成相应的谷氨酰残基以及天冬酰胺残基。这些残基在中性或碱性条件下脱去酰胺基。这些残基脱去酰胺基后的形式在本发明的范围内。

其它修饰包括脯氨酸以及赖氨酸的羟化, 丝氨酰或苏氨酰残基的羟基的磷酸化, 赖氨酸、精氨酸以及组氨酸侧链的 $\alpha$ -氨基的甲基化(T. E. Creighton, *Proteins : Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983) ), N 末端胺的酰化, 以及任何 C 末端羧基的酰胺化。

其它共价修饰类型包括将配糖以化学或酶促方式偶联于抗体。这些方法



的优势在于它们不需要在宿主细胞中产生抗体，所述宿主细胞具有对 N-或 O-连接的糖基化的糖基化能力。根据所用的偶联模式，所述糖可连接于(a) 精氨酸和组氨酸，(b) 游离羧基，(c) 游离巯基诸如半胱氨酸的游离巯基，(d) 游离羟基，诸如丝氨酸、苏氨酸和羟脯氨酸的游离羟基，(e) 芳香残基，诸如苯丙氨酸，酪氨酸和色氨酸的芳香残基，和 (f) 谷氨酰胺的酰胺基。这些方法在 1987 年 9 月 11 日公开的 WO 87/05330, 以及 Aplin and Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306(1981)中描述。

去除任何存在于抗体上的碳水化合物部分可通过化学和酶方法实现。化学去糖基化需要将所述抗体暴露于化合物三氟甲磺酸或等价化合物。该处理导致除连接糖(N-乙酰葡萄糖胺和 N-乙酰半乳糖胺)之外的大多数或所有糖的裂解，而保持所述抗体完整。化学去糖化由 Hakimuddin, et al. Arch. Biochem. Biophys. 259: 52 (1987)和 Edge et al. Anal.Biochem., 118: 131(1981)描述。抗体上碳水化合物部分的酶促裂解可通过利用多种内糖苷酶以及外糖苷酶进行，如 Thotakura et al. Metla. Enzymol. 138 : 350 (1987)所述。

另一种抗体共价修饰类型包括将所述抗体连接于多种非蛋白质聚合物之一，例如聚乙二醇，聚丙二醇或聚氧化烯，如美国专利 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 或 4,179,337 所述。

## B. 载体，宿主细胞和重组方法

本发明所述抗-VEGF 抗体可利用轻易可得的技术和材料重组制备。

为进行糖蛋白的重组生产，分离编码它的核酸并把核酸插入可复制的载体中进一步克隆(DNA 扩增)或表达。编码糖蛋白的 DNA 易于利用传统方法分离和测序(例如，通过使用能够与编码糖蛋白的基因特异结合的寡核苷酸探针)。可利用许多载体。载体的组分通常包括，但不限于，以下物质中的一种或多种：信号序列，复制起点，一个或多个标记基因，增强子，启动子，和转录终止序列。

### (i) 信号序列成分

本发明的糖蛋白不仅可直接被重组生产，也可以作为与异源多肽的融合蛋白被生产，该异源多肽优选是信号序列或在成熟蛋白或多肽的 N 末端具有特定切割位点的其它多肽。选定的异源信号序列优选是可由宿主细胞识别和加工(即，由信号肽酶切割)的序列。对于不识别和加工天然多肽信号序列的

原核细胞，信号序列由以下原核信号序列取代，例如选自碱性磷酸酶，青霉素酶，lpp，或热稳定肠毒素 II 前导序列。对于酵母分泌物，天然信号序列可由例如酵母转化酶前导序列， $\alpha$ 因子前导序列(包括糖酵母(*Saccharomyces*)和克鲁维酵母(*Kluyveromyces*) $\alpha$ -因子前导序列)，或酸性磷酸酶前导序列，白色念珠菌(*C. albicans*)葡糖淀粉酶前导序列，或 WO 90/13646 中所述的信号序列。在哺乳动物细胞表达中，可利用哺乳动物信号序列以及病毒分泌性前导序列，例如，单纯疱疹 gD 信号。

在阅读框架中，此种前体区的 DNA 连接于编码所述抗体的 DNA。

### (ii)复制成分的起点

表达载体和克隆载体都包含能使该载体在一或多种选定的宿主细胞中复制的核酸序列。一般情况下，在克隆载体中，这种序列是能使该载体独立于宿主染色体 DNA 而复制的序列，包括复制起点或自我复制序列。这样的序列在各种细菌、酵母和病毒中都是众所周知的。质粒 pBR322 的复制起点适合大多数革兰氏阴性细菌，2 $\mu$ 质粒起点适合酵母菌，多种病毒起点(SV40，多瘤病毒(Polyoma)，腺病毒，VSV 或 BPV)可用于哺乳动物细胞中的克隆载体。复制组分的起点一般不是哺乳动物表达载体所必需的(SV40 起点的使用通常仅仅是由于其包含早期启动子)。

### (iii)选择基因成分

表达载体和克隆载体应该包含选择基因，也称选择标记。该基因编码使经过转化的宿主细胞在选择性培养基中存活或生长所必需的蛋白。没有被包含该选择基因的载体转化的宿主细胞在所述选择性培养基中不能存活。典型的选择基因编码具有以下性质的蛋白：(a)赋予对抗生素或其它毒素(如氨基青霉素，新霉素，氨基蝶呤或四环素)的抗性，(b)弥补营养缺陷，或(c)提供复合培养基不能供给的关键营养物，例如编码芽孢杆菌 D-丙氨酸消旋酶基因。

选择方案的一个实例是利用药物限制宿主细胞的生长。那些被异源基因成功转化的细胞产生一种赋予药物抗性的蛋白，从而在该选择环境中存活。这种显性选择可以采用的药物有新霉素，霉酚酸和潮霉素。

适合于哺乳动物细胞的另一例选择标记是允许鉴定能摄取多肽核酸的细胞的那些标记，如 DHFR 或胸苷激酶，金属硫蛋白-I 和-II，优选灵长类金属硫蛋白基因，腺苷脱氨酶，鸟氨酸脱羧酶等。

例如,用 DHFR 选择基因转化的细胞首先通过将所有转化体培养在包含氨甲蝶呤(Mtx, 为 DHFR 的一种竞争型拮抗剂)的培养基中来进行鉴定。当采用野生型 DHFR 时,合适的宿主细胞包括 DHFR 活性有缺陷的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系。

或者,宿主细胞(尤其包含内源 DHFR 的野生型宿主)被编码 Bv8 的 DNA 序列,野生型 DHFR 蛋白,以及另一种选择标记如氨基糖苷 3'-磷酸转移酶 (APH)转化或共转化以后,可以通过在含有针对该选择标记的选择试剂如氨基糖苷类抗生素(如卡那霉素,新霉素或 G418)的培养基中培养细胞来进行选择。参见美国专利 4,965,199。

适用于酵母的合适选择基因是存在于酵母质粒 YRp7 中的 *trp1* 基因 (Stinchcomb 等, *Nature*, 282: 39(1979))。 *Trp1* 基因为不能在色氨酸中生长的酵母突变株(例如 ATCC 44076 或 PEP4-1)提供了选择标记(Jones, *Genetics*, 85: 12(1977))。此后,酵母宿主细胞基因组中 *trp1* 损伤的存在提供了通过在缺乏色氨酸的条件中生长而检测转化的有效环境。类似地, *Leu2*-缺陷型酵母菌株(ATCC 20,622 或 38,626)可以由携带 *Leu2* 基因的已知质粒来补充。

此外,源自 1.6 $\mu$ m 环状质粒 pKDI 的载体可以用于转化克鲁维酵母 (*Kluyveromyces*)。 Bianchi 等, *Curr. Genet.*, 12:185(1987)。可选地, Van den Berg, *Bio/Technology*, 8:135(1990)报道了一种用于在乳克鲁维酵母(*K. lactis*)中大规模制备重组小牛凝乳酶的表达系统。已公开由克鲁维酵母的工业生产菌株产生分泌重组人血清白蛋白的稳定的多拷贝表达载体。Fleer 等, *Bio/Technology*, 9:968-975(1991)。

#### (iv) 启动子成分

表达载体和克隆载体通常包含能被宿主生物识别的启动子,它与多肽核酸可操作相连。适用于原核宿主的启动子,包括 *phoA* 启动子,  $\beta$ -内酰胺酶和乳糖启动子系统,碱性磷酸酶,色氨酸(*trp*)启动子系统,和杂化启动子如 *tac* 启动子。然而,也可以使用其它已知的细菌启动子。适用于细菌系统的启动子还包含与编码多肽的 DNA 可操作相连的 Shine-Dalgarno(S. D.) 序列。

真核生物的启动子序列也是已知的。几乎所有的真核基因在转录起始点上游约 25-30 个碱基处具有 AT-富集区。很多基因在其转录起始点上游 70-80 个碱基处有另一种序列: CNCAAT, 其中 X 可以是任何核苷酸。大多数真核

基因的3'端是AATAAA序列,它可以作为一种信号用于将poly-A尾添加到编码序列3'端。所有这些序列都适合于插入真核表达载体中。

适用于酵母宿主的启动序列的实例包括:3-磷酸甘油酸激酶(Hitzeman等, *J. Biol. Chem.*, 255: 2073(1980))或其它糖酵解酶(Hess等, *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7: 149(1968); Holland, *Biochemistry*, 17: 4900(1978))的启动子,所述其它糖酵解酶如烯醇化酶,甘油醛-3-磷酸脱氢酶,己糖激酶,丙酮酸脱羧酶,磷酸果糖激酶,葡萄糖-6磷酸异构酶,3-磷酸甘油变位酶,丙酮酸激酶,磷酸丙糖异构酶,磷酸葡萄糖异构酶和葡萄糖激酶。

其它的酵母启动子,即那些还具有由生长条件控制转录的优点的诱导型启动子,是下述基因的启动子区:醇脱氢酶2、异细胞色素C、酸性磷酸酶、与氮代谢相关的降解酶、金属硫蛋白、甘油醛-3-磷酸脱氢酶和负责麦芽糖和半乳糖利用的酶。在EP 73,657中进一步描述了适用于酵母表达系统的载体和启动子。酵母增强子与酵母启动子联合使用也是有利的。

在哺乳动物宿主细胞中,从载体转录抗体可以受启动子调控,所述启动子例如来自病毒基因组,如多形瘤病毒、鸡痘病毒(1989年7月5日公布的UK 2211504)、腺病毒(如腺病毒2)、牛乳头瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙型肝炎病毒和猴病毒40(SV40)的启动子,或者来自异源哺乳动物的启动子,如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子等,来自热休克蛋白的启动子,前提是这些启动子与宿主细胞系统相容。

SV40病毒的早期和晚期启动子可以作为还包含SV40病毒复制起点的SV40限制性片段而方便地获得。人巨细胞病毒的立即早期启动子可以作为Hind III E限制性片段方便地获得。美国专利4,419,446中公开了在哺乳动物宿主中用牛乳头瘤病毒作为载体来表达DNA的系统。美国专利4,601,978中叙述了对这个系统的改进。另见Reyes等, *Nature*, 297: 598-601(1982)中关于在单纯疱疹病毒胸苷激酶启动子控制下在小鼠细胞中表达人 $\beta$ 干扰素cDNA。可选地,可将劳氏肉瘤病毒长末端重复序列作为启动子。

#### (v)增强子成分

编码本发明多肽的DNA在高等真核生物中的转录常常通过将增强子序列插入载体中来增加。目前已知很多哺乳动物基因(球蛋白、弹性蛋白酶、白蛋白、甲胎蛋白和胰岛素)的增强子序列。但通常使用真核细胞病毒的增强子。实例包括在其复制起始点晚期侧(late side)的SV40增强子(bp

100-270), 巨细胞病毒早期启动子增强子, 在其复制起始点晚期侧的多形瘤增强子, 和腺病毒增强子。也可参见 Yaniv, *Nature*, 297:17-18(1982)所述用于活化真核启动子的增强元件。所述增强子可以剪接插入载体中抗体编码序列的 5'或 3'位置, 但优选位于启动子的 5'位置。

#### (vi) 转录终止成分

用于真核宿主细胞(酵母、真菌、昆虫、植物、动物、人或来自其它多细胞生物的有核细胞)的表达载体, 还包括对转录终止和稳定 mRNA 所必需的序列。这些序列通常来自真核或病毒 DNA 或 cDNA 的 5'(偶尔为 3')非翻译区。这些区域包含转录为编码抗体的 mRNA 的非翻译区中聚腺苷酸化片段的核苷酸片段。一种有用的转录终止元件是牛生长激素多腺苷化区。见 WO94/11026 和其中公开的表达载体。

#### (vii) 宿主细胞的选择和转化

克隆或表达本文所述载体中 DNA 的适宜宿主细胞, 包括原核生物、酵母或高等真核细胞。适于此目的的原核生物包括真细菌, 如革兰氏阴性或革兰氏阳性细菌, 例如肠杆菌科(Enterobacteriaceae), 如埃希氏菌属(*Escherichia*), 例如, 大肠杆菌(*E.coli*), 肠杆菌属(*Enterobacter*), 欧文菌属(*Erwinia*), 克雷白菌属(*Klebsiella*), 变形菌杆属(*Proteus*), 沙门菌属(*Salmonella*)(如鼠伤寒沙门菌(*Salmonella typhimurium*)), 沙雷菌属(*Serratia*)(如粘质沙雷菌(*Serratia marcescans*))和志贺菌属(*Shigella*)等, 以及芽孢杆菌属(*Bacilli*)如枯草芽孢杆菌(*B.subtilis*)和地衣芽孢杆菌(*B.licheniformis*)(例如 1989 年 4 月 12 日出版的 DD 266,710 中所述地衣芽孢杆菌 41P)等, 假单胞菌属(*Pseudomonas*)如铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*), 及链霉菌(*Streptomyces*)。优选的大肠杆菌克隆宿主是大肠杆菌 294(ATCC 31,446), 但其它菌株, 如大肠杆菌 B, 大肠杆菌 X1776(ATCC 31,537)和大肠杆菌 W3110(ATCC 27,325)也是合适的。这些实例是用于说明, 并非限制。

除了原核生物, 真核微生物如丝状真菌或酵母也是适合于抗体编码载体的克隆或表达的宿主。酿酒酵母或常见的面包酵母是最常用的低等真核宿主微生物。还有多个其它属、种和株已有商品供应, 并且可以用于本发明, 例如粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*); 克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)宿主, 例如乳克鲁维酵母(*K. lactis*)、脆壁克鲁维酵母(*K. fragilis*)(ATCC 12,424)、保加利亚克鲁维酵母(*K. bulgaricus*)(ATCC 16,045)、威克曼氏克鲁

维酵母(*K. wickeramii*)(ATCC 24,178)、*K. waltii*(ATCC 56,500)、果蝇克鲁维酵母(*K. drosophilarum*)(ATCC 36,906)、耐热克鲁维酵母(*K. thermotolerans*)和马克斯克鲁维氏酵母(*K. marxianus*)等; yarrowia(EP 402,226); 巴斯德毕赤酵母(*pichia pastoris*)(EP 183,070; Sreekrishna 等, *J. Basic Microbiol.*, 28: 265-278(1988)); 念珠菌属; *Trichoderma reesia*(EP 244,234); 粗糙链孢霉; 许旺氏酵母属(*schwanniomyces*)如西方许旺氏酵母(*schwanniomyces occidentalis*)等; 和丝状真菌, 例如链孢霉属、青霉属、*Tolyocladium* 以及曲霉属宿主如构巢曲霉和黑曲霉。

适合于表达糖基化多肽的宿主细胞来自多细胞生物。无脊椎动物细胞的实例包括植物和昆虫细胞。目前已经从下述宿主中鉴定了大量的杆状病毒株和变体以及相应的许可型昆虫宿主细胞: 草地夜蛾(*Spodoptera Frugiperda*, 毛虫)、埃及伊蚊(*Aedes aegypti*, 蚊子)、白纹伊蚊(*Aedes albopictus*, 蚊子)、*Drosophila melanogaster*(果蝇)和家蚕蛾(*Bombyx mori*)等。用于转染的各种病毒株公众可以获得, 例如加利福尼亚 Y 级夜蛾(*Autographa californica*) NPV 的 L-1 变体和家蚕蛾 NPV 的 Bm-5 株, 并且这些病毒可以在此用作本发明的病毒, 尤其是用于转染草地夜蛾细胞。棉花、玉米、土豆、大豆、矮牵牛、西红柿和烟草等的植物细胞培养物也可以用作宿主。

然而, 关注最多的是脊椎动物细胞, 而且在培养(组织培养)中繁殖脊椎动物细胞已经成为常规方法。有效哺乳动物宿主细胞系的实例是用 SV40 转化的猴肾 CV1 细胞系(COS-7, ATCC CRL 1651); 人胚肾细胞系(293 细胞或经过再克隆以便能在悬浮培养物中生长的 293 细胞, Graham 等, *J. Gen Virol.* 36:59(1977)); 幼仓鼠肾细胞(BHK, ATCC CCL 10); 中国仓鼠卵巢细胞 /-DHFR(CHO, Urlaub 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77:4216(1980)); 小鼠足细胞(TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251(1980)); 猴肾细胞(CV1 ATCC CCL 70); 非洲绿猴肾细胞(VERO-76, ATCC CRL-1587); 人宫颈癌细胞(HELA, ATCC CCL 2); 犬肾细胞(MDCK ATCC CCL 34); 布法罗(buffalo)大鼠肝细胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442); 人肺细胞(W138, ATCC CCL 75); 人肝细胞(Hep G2, HB 8065); 小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562, ATCC CCL 51); TRI 细胞(Mather 等, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383: 44-68(1982)); MRC 5 细胞; FS4 细胞; 小鼠骨髓瘤细胞, 例如 NSO(如 RCB0213, Bebbington 等, *Bio/Technology* 10:169(1992))和 SP2/0 细胞(例如 SP2/0-Ag14 细胞, ATCC

CRL 1581); 大鼠骨髓瘤细胞, 例如 YB2/0 细胞(例如 YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 细胞, ATCC CRL 1662); 和人肝癌细胞系(Hep G2)。

利用上述表达或克隆载体转化宿主细胞以进行抗体制备并培养在经改进的常规营养培养基中, 所述培养基适于诱导启动子, 选择转化体, 或扩增编码所需序列的基因。

#### (viii) 培养宿主细胞

可在多种培养基中培养用于生产本发明多肽的宿主细胞。作为商品提供的培养基例如 Ham's F10(Sigma), Minimal Essential Medium((MEM),(Sigma), RPMI-1640(Sigma), 和 Dulbecco's Modified Eagle's Medium((DMEM), Sigma) 适宜培养宿主细胞。此外, Ham 等, *Meth. Enzym.* 58:44(1979), Barnes 等, *Anal. Biochem.*102:255(1980), 美国专利 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; 或 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; 或美国专利 Re. 30,985 中所述的任何培养基可用作宿主细胞的培养基。在需要时均可向这些培养基的任何一种补充激素和/或其它生长因子(例如胰岛素, 转铁蛋白, 或表皮生长因子), 盐(例如氯化钠, 钙, 镁, 和磷酸盐), 缓冲液(例如 HEPES), 核苷酸(例如腺苷酸和胸腺嘧啶), 抗生素(例如 GENTAMYCIN™ 药物), 微量元素(定义为无机化合物, 通常终浓度在微摩尔范围内), 和葡萄糖或对等的能源。也可包括本领域熟练技术人员所知的适当浓度的任何其它必需添加剂。培养条件, 例如温度, pH, 等是此前选择用于表达的宿主细胞的条件, 并且是本领域普通熟练技术人员显而易见的。培养条件诸如温度, pH 等, 是被选用于表达的宿主细胞的那些条件, 并且是本领域技术人员所已知的。

#### (ix) 抗体的纯化

使用重组技术时, 抗体可在细胞内, 壁膜间隙产生, 或直接分泌到培养基中。如果抗体在细胞内产生, 第一步需要去除宿主细胞或裂解片段的粒状残骸, 例如, 通过离心或超滤作用。Carter 等, *Bio/Technology* 10:163-167(1992) 描述了分离抗体的方法, 该抗体被分泌到大肠杆菌的壁膜间隙。简言之, 细胞悬浊液(paste)在乙酸钠(pH 3.5), EDTA, 和苯基甲基磺酰氟化物(phenylmethylsulfonyl fluoride)(PMSF)存在下, 经过约 30 分钟解冻。通过离心可去除细胞碎片。如果抗体被分泌到培养基中, 通常首先使用作为商品提供的蛋白浓缩滤纸(例如, Amicon 或 Millipore Pellicon ultrafiltration unit)浓缩

来自该表达系统的上清液。在此前的任何步骤中，可使用蛋白酶抑制物例如 PMSF 抑制蛋白溶解，以及使用抗生素防止外来污染物的生长。

由细胞制备的糖蛋白组合物可使用如下方法纯化：例如，羟磷灰石层析，凝胶电泳，透析和亲和层析，优选亲和层析。蛋白 A 作为亲和配体的适宜性有赖于存在于糖蛋白中的任何免疫球蛋白 Fc 区的种类和同种型。蛋白 A 可用于纯化基于人( $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ , 或  $\gamma 4$  重链的糖蛋白(Lindmark 等, *J. Immunol. Meth.* 62:1-13(1983))。蛋白 G 用于所有小鼠同种型和人  $\gamma 3$ (Guss 等, *EMBO J.* 5:15671575(1986))。亲和配体附着的基质通常是琼脂糖,但也可用其它基质。物理稳定的基质例如孔径被控制的玻璃或聚(苯乙烯二乙烯)苯(poly(styrenediviny)benzene)比使用琼脂糖获得更快的流率而且加工时间更短。对于含有  $C_{H3}$  区的抗体, Bakerbond ABX™树脂(J. T. Baker, Phillipsburg, NJ)可用于纯化。根据待回收的抗体,也可利用其它蛋白纯化技术例如;在离子-交换柱上分级分离;乙醇沉淀;反相 HPLC;在硅石(silica)上层析,在肝素 SEPHAROSE™上层析,在阳离子或阴离子-交换树脂(例如聚天冬氨酸柱)上层析;聚焦层析;SDS-PAGE;硫酸铵沉淀。

任何初步纯化步骤后,包含抗-VEGF 抗体以及污染物的混合物可接受利用洗脱缓冲液在 pH 约 2.5-4.5 的条件下的低 pH 疏水反应层析,其优选在低盐浓度(例如约 0-0.25M 盐)条件下进行。

### III. 药物配制剂

可以通过将具有所需纯度的抗体与可选的药用载体,赋形剂,或稳定剂(Remington's Pharmaceutical Sciences, 16 版, Osol, A. ed.(1980))混合形成冻干制剂或水溶液制备治疗配制剂。可接受的载体、赋形剂、稳定剂在所用剂量及浓度下对受者无毒性,并包括缓冲剂例如磷酸盐,柠檬酸盐及其它有机酸;抗氧化剂包括抗坏血酸和蛋氨酸;防腐剂(例如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化己烷双胺;氯化苄烷铵(benzalkonium chloride), 苯索氯铵;酚、丁醇或苯甲醇;烷基对羟基苯甲酸酯如甲基或丙基对羟基苯甲酸酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;间甲酚);低分子量多肽(少于约 10 个残基);蛋白质如血清白蛋白,明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸如甘氨酸,谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖,二糖及其它碳水化合物包括葡萄糖、甘露糖、或糊精;螯合剂如 EDTA;糖类如蔗糖、甘露醇、岩藻糖或山梨醇;成盐反离子如钠;金属复合物(例如锌-



蛋白复合物); 和/或非离子表面活性剂, 例如 TWEEN<sup>TM</sup>, PLURONICS<sup>TM</sup> 或聚乙二醇(PEG)。优选冻干的抗-VEGF 抗体配制剂在 WO 97/04801 中描述, 其包含在本文中作为参考。

本发明的配制剂也可含有被治疗具体指征所需的一种以上的活性化合物, 优选活性互补并且相互之间没有副作用的那些。例如, 合意地进一步在一种配制剂中包含与 EGFR, VEGF(例如, 与 VEGF 上不同表位结合的抗体), BEGFR 或 ErbB2 结合的抗体(例如 Herceptin®)。可选或此外, 所述组合物包含细胞毒剂, 细胞因子, 生长抑制剂和/或小分子 VEGFR 拮抗剂。所述分子是与以有效用于目的意图的量组合存在。

该活性成分也可包裹在通过诸如凝聚技术或界面聚合而制备的微胶囊中, 例如, 分别在胶质药物传送系统(例如, 脂质体, 白蛋白微球, 微乳剂, 纳米颗粒和纳米胶囊)中或在粗滴乳状液中的羟甲基纤维素或凝胶-微胶囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊。这些技术公开于 Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed.(1980)。

用于体内给药的本发明化合物必需是无菌的。这可以通过在冷冻干燥和重新配制之前或之后通过除菌滤膜过滤而轻易实现。

可制备缓释制剂。缓释制剂的适当实例包括具有一定形状且含有糖蛋白的固体疏水聚合物半通透基质, 例如膜或微胶囊。缓释基质实例包括聚酯、水凝胶(如聚(2-羟基乙基-异丁烯酸酯)(Langer 等, *J. Biomed. Mater. Res.*, 15: 167-277(1981); Langer, *Chem. Tech.*, 12:98-105(1982))或聚(乙烯醇), 聚交酯(美国专利 3773919, EP 58,481), L-谷氨酸与 $\gamma$ 乙基-L-谷氨酸的共聚物(Sidman, 等, *Biopolymers* 22:547(1983)), 不可降解的乙烯-乙酸酯(ethylene-vinyl acetate)(Langer, 等, 出处同上), 或可降解的乳酸-羟基乙酸共聚物如 Lupron Depot<sup>TM</sup>(由乳酸-羟基乙酸共聚物和亮氨酸脯氨酸(leuprolide)乙酸酯组成的可注射的微球体), 以及聚 D-(-)-3-羟丁酸。聚合物如乙烯-乙酸酯和乳酸-羟基乙酸能持续释放分子 100 天以上, 而一些水凝胶释放蛋白的时间却较短。当胶囊化抗体长时间停留在体内时, 它们可能由于暴露在 37°C 潮湿环境中而变性或凝聚, 导致损失生物活性, 且免疫原性可能会改变。可以根据相关机理来设计使蛋白稳定的合理策略。例如, 如果发现凝聚的机理是通过硫代二硫键互换而形成分子间 S-S 键, 则可通过修饰巯基残基、从酸性溶液中冻干、控制湿度、采用合适的添加剂、和开发特定的聚合物基质

组合物来实现稳定。

#### IV. 抗-VEGF 抗体的治疗用途

根据本发明, 抗-VEGF 抗体可用于治疗各种以病理性血管生成为特征的肿瘤和非肿瘤疾病。可接受治疗的非肿瘤疾病包括类风湿性关节炎, 银屑病, 动脉粥样硬化, 糖尿病以及其它增生性视网膜病, 包括早产儿视网膜病, 晶状体后纤维组织形成, 新生血管性青光眼, 与年龄相关的黄斑退行性改变, 甲状腺增生(包括 Grave 病), 角膜以及其它组织移植, 慢性炎症, 肺炎症, 肾病综合征, 先兆子痫, 腹水, 心包积液(诸如与心包炎相关的心包积液), 以及胸膜积液。

本发明的抗体优选用于治疗其中血管生成在肿瘤生长中起重要作用的肿瘤, 包括癌症和良性肿瘤。将被治疗的癌症的实例包括, 但不限于, 癌, 淋巴瘤, 母细胞瘤, 肉瘤和白血病。癌症的更具体的例子包括鳞状细胞癌, 肺癌(包括小细胞肺癌, 非小细胞肺癌, 肺腺癌以及肺鳞癌), 腹膜癌, 肝细胞癌, 胃的或胃癌(包括胃肠癌), 胰腺癌, 神经母细胞瘤, 宫颈癌, 卵巢癌, 肝癌, 膀胱癌, 肝细胞瘤, 乳腺癌, 结肠癌, 结肠直肠癌, 子宫内膜癌或子宫癌, 唾液腺癌, 肾或肾的癌, 肝癌, 前列腺癌, 外阴癌, 甲状腺癌, 肝的癌以及各种头和颈的癌症, 以及 B 淋巴细胞瘤(包括低级/滤泡样非何杰金氏淋巴瘤(NHL); 小淋巴细胞性(SL) NHL; 中级/滤泡样 NHL; 中级弥漫性 NHL; 高级免疫母细胞 NHL; 高级淋巴母细胞 NHL; 高级小无裂细胞 NHL; bulky disease NHL; 外套细胞淋巴瘤; AIDS-相关的淋巴瘤; 和 Waldenstrom's 巨球蛋白血症); 慢性淋巴细胞白血病(CLL); 急性淋巴母细胞白血病(ALL); 毛细胞白血病; 慢性骨髓细胞白血病; 和移植后淋巴组织增生疾病(PTLD)以及母斑细胞病相关性异常血管增生, 水肿(诸如与脑肿瘤相关的水肿), 和 Meigs 综合症。优选, 可用本发明抗体治疗的癌症选自以下疾病组成的组: 乳腺癌, 结肠直肠癌, 直肠癌, 非小细胞肺癌, 非何杰金氏淋巴瘤(NHL), 肾细胞癌, 前列腺癌, 肝癌, 胰腺癌, 软组织肉瘤, 卡波奇肉瘤, 类癌样癌, 头和颈部癌, 黑素瘤, 卵巢癌, 间皮瘤以及多发性骨髓瘤。更优选, 本发明的方法用于治疗人类患者的结肠直肠癌。

本发明包括抗血管生成治疗, 新癌症治疗策略, 其目标在于抑制提供养料支持肿瘤生长的肿瘤血管的发育。因为血管生成参与原发性肿瘤生长以及转移, 本发明提供的抗血管生成疗法能够抑制原发位点的肿瘤生长以及防止

肿瘤向继发位点的转移，由此允许通过其它疗法攻击肿瘤。

### 联合疗法

当用于治疗诸如肿瘤的各种疾病时，本发明的抗体可与其它适于相同或类似疾病的治疗剂联用。当用于治疗癌症时，本发明的抗体可与常规癌症疗法诸如手术、放疗、化疗或其组合联用。

在一些方面中，用于与本发明抗体联用的癌症治疗的其它治疗剂包括其它抗血管生成药剂。许多抗血管生成药剂已经被鉴定并且是本领域已知的，包括 Carmeliet 和 Jain (2000)所述的。优选，本发明的抗-VEGF 抗体与其它 VEGF 拮抗剂或 VEGF 受体拮抗剂联用，诸如 VEGF 变体，可溶性 VEGF 受体片段，能够阻断 VEGF 或 VEGFR 的适体 (aptamer)，中和型抗-VEGFR 抗体，VEGFR 酪氨酸激酶的低分子量抑制剂以及其任意组合。可选或此外，两或多种抗-VEGF 抗体可共同给药患者。

一些其它方面中，用于与本发明抗体联用的肿瘤疗法的其它治疗剂包括其它参与肿瘤生长的因子的拮抗剂，所述因子诸如 EGFR, ErbB2 (也已知为 Her2) ErbB3, ErbB4, 或 TNF。有时，将一或多种细胞因子给药所述患者也是有益的。在优选实施方案中，VEGF 抗体与生长抑制剂联合给药。例如，所述生长抑制剂可先给药，然后给药 VEGF 抗体。然而，也考虑同时给药或首先给药 VEGF 抗体。生长抑制剂的适宜剂量是目前所用的那些，并且可由于生长抑制剂与抗 VEGF 抗体的联合作用(协同作用)而用量减少。

### 化疗剂

在具体的方面，本发明提供通过将有效量的抗 VEGF 抗体以及一或多种化疗剂给药易患或被诊断患有癌症的患者来治疗癌症的方法。多种化疗剂可与本发明的方法联用。所涉及化疗剂的示例性以及非限制性列表在本发明的“定义”这一标题下提供。

本领域技术人员应理解，化疗剂的适宜剂量通常大致为临床治疗中所用的剂量，其中所述化疗剂单独给药或其它化疗剂联用给药。剂量的变化很可能根据被治疗的疾病而出现。给予所述治疗的医师将能够确定个体患者的适宜剂量。

仅作为举例，本发明给出了用于转移性结肠直肠癌的标准化疗。

一个优选实施方案中，本发明的方法用于治疗结肠直肠癌包括转移性结肠直肠癌。结肠直肠癌是美国癌症死亡率中的第三位的常见原因。估计在美国，1999年诊断大约129,000的新发结肠直肠癌病例，并且结肠直肠癌导致56,000人死亡，Landis et al., *Cancer J Clin.* 49:8-31 (1999)。大约70%的结肠直肠癌患者显示可通过手术切除治愈的疾病，August et al., *Cancer Metastasis Rev* 3:303-24 (1984)。然而，占30%的进展期或转移癌症的患者以及占20%的切除后复发患者的预后较差。转移疾病患者的中值存活期为12-14个月，Advanced Colorectal Cancer Meta-Analysis Project, *J Clin Oncol* 10:896-903 (1992)。

美国的转移性结肠直肠癌标准疗法目前是利用5-氟尿嘧啶(5-FU)加5-FU的生化调节物甲酰四氢叶酸，Advanced Colorectal Cancer Meta-Analysis Project, *J Clin Oncol* 10:896-903 (1992); Moertel *N Engl J Med* 330:1136-42 (1994)。5-FU/甲酰四氢叶酸的组合使得结肠直肠肿瘤偶然的暂时缩小，但与单独的5-FU相比没有显示延长生存期(Advanced Colorectal Cancer Meta-Analysis Project, *J Clin Oncol* 10:896-903 (1992))，而且5-FU与无效治疗加上最佳的支持性看护相比没有显示延长生存期，Ansfield et al. *Cancer* 39:34-40 (1977)。5-FU/甲酰四氢叶酸对于生存期益处的缺乏可能部分由于不适当的临床试验范围。在大型随机化试验中，患者接受辅助化疗来治疗可切除的结肠直肠癌，5-FU/甲酰四氢叶酸与lomustine (MeCCNU)，长春新碱，和5-FU相比显示可延长生存期(MOF; Wolmark et al. *J Clin Oncol* 11:1879-87 (1993))。

在美国，5-FU/甲酰四氢叶酸化疗通常根据两种方案之一给药：Mayo Clinic和Roswell Park方案。Mayo Clinic方案由长期(intensive course)5-FU加低剂量甲酰四氢叶酸(425 mg/m<sup>2</sup> 5-FU加20 mg/m<sup>2</sup> 甲酰四氢叶酸，每天经静脉[IV]推注给药持续5天，每隔4到5周重复所述治疗)组成，Buroker et al. *J Clin Oncol* 12:14-20 (1994)。Roswell Park方案每周5-FU加高剂量甲酰四氢叶酸(500-600 mg/m<sup>2</sup> 5-FU通过IV推注给药加上500 mg/m<sup>2</sup> 甲酰四氢叶酸，后者每周一次输液2小时给药并持续6周，上述治疗每8周重复一次)，Petrelli et al., *J Clin Oncol* 7:1419-26 (1989)。临床试验比较了Mayo Clinic和Roswell Park方案，没有显示其效力有差异，但是效力不足，Buroker et al., *J Clin Oncol* 12:14-20 (1994); Poon et al., *J Clin Oncol* 7:1407-18 (1989)。两种方

案的毒性图谱不同, Mayo Clinic 方案导致更多的白细胞减少而 Roswell Park 方案导致更频繁的腹泻。接受任意方案的新近被诊断为转移性结肠直肠癌的患者可预期 4-5 个月的疾病进展中值时间以及 12-14 个月的中值生存期, Petrelli et al., J Clin Oncol 7:1419-26 (1989); Advanced Colorectal Cancer Meta-Analysis Project, J Clin Oncol 10:896-903 (1992); Buroker et al., J Clin Oncol 12:14-20 (1994); Cocconi et al., J Clin Oncol 16:2943-52 (1998)。

最近, 转移性结肠直肠癌的新第一线疗法出现。两个随机化临床疗法, 每个均使用近 400 名患者, 评估了伊立替康与 5-FU/甲酰四氢叶酸的联用, Saltz et al., Proc ASCO 18:233a (1999); Douillard et al., Lancet 355:1041-7 (2000)。在两项研究中都显示, 与单独的 5-FU 或甲酰四氢叶酸相比, 伊立替康/5-FU/甲酰四氢叶酸的联用导致统计学显著的生存期延长(分别为 2.2 和 3.3 月), 疾病进展时间延长以及反应率增加。伊立替康的益处的代价在于毒性增加: 将伊立替康加入 5-FU/甲酰四氢叶酸与单独的 5-FU 或甲酰四氢叶酸相比, National Cancer Institute Common Toxicity Criteria (NCI-CTC) 3 级/4 级腹泻, 3 级/4 级呕吐, 4 级白细胞减少, 以及无力的发病率增加。还有证据显示单剂伊立替康在二线背景中延长存活期, Cunningham et al., Lancet 352:1413-18 (1998); Rougier et al., Lancet 352:1407-12 (1998)。两项随机研究证实伊立替康延长在 5-FU 治疗后进展的患者的生存期。一项研究将伊立替康与最佳支持性护理比较, 并显示存活期延长 2.8-月; 另一项研究将伊立替康与输注的 5-FU 比较, 并显示生存期延长 2.2-月。伊立替康在一线和二线背景中对生存期是否有更多影响没有以良好控制的方式研究。

### 剂量和给药

本发明的抗体和化疗剂可根据已知方法给药人类患者, 诸如作为药团 (bolus) 经静脉内给药, 或通过一段时间内的连续输注给药, 经肌内、腹膜内、脑脊液内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、口服、局部或吸入途径。静脉内或皮下给药所述抗体是优选的。

一个实施方案中, 本发明的治疗涉及联合给药抗 VEGF 抗体以及一或多种化疗剂。本发明涉及给药不同化疗剂的组合。联合给药包括利用不同配制剂或单一药物配制剂的联合给药, 以及以任何顺序的连续给药, 其中优选存在两种(或所有)活性药剂同时显示它们的生物活性的一段时间。所述化疗剂

的制备和配制方案可根据生产商说明进行或由有经验的医师根据经验确定。化疗的制备和剂量方案也在 Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)中描述。所述化疗剂可在所述抗体给药之前或以后, 或可同时给药。

为预防或治疗疾病, 抗体的适宜剂量将有赖于将要治疗的疾病类型, 如上所述, 疾病的严重度以及病程, 所述抗体是否为预防或治疗目的给药, 以前的治疗, 患者的临床病史以及对抗体的反应, 以及主治医师的判断。所述抗体一次性或在一系列治疗中适宜地给药患者。在联合治疗方案中, 本发明的组合物以治疗有效量或协同作用量给药。如本文所用, 治疗有效量使得抗 VEGF 抗体以及一或多种其它治疗剂的联合给药或本发明的组合物的给药导致靶疾病或病症的缓解或抑制。治疗协同作用量为抗 VEGF 抗体与一或多种其它治疗剂协同作用或显著降低或消除与具体疾病相关的病症或症状所必须的量。

根据疾病的类型以及严重度, 约 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  到 50  $\text{mg}/\text{kg}$  (例如 0.1-20 $\text{mg}/\text{kg}$ ) 抗体是给药患者的初始候选剂量, 其可例如通过一或多次分开的给药或连续输注来给予。常规日剂量范围为约 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  到约 100  $\text{mg}/\text{kg}$  或更高, 依上述因素而不同。对于在数天或更长时间内的重复给药, 根据病情, 所述治疗持续直到出现对疾病症状的所需的抑制。然而, 其它剂量方案也可使用。在一个优选方面, 本发明的抗体每 2-3 周给药, 剂量范围为约 5 $\text{mg}/\text{kg}$  到约 15  $\text{mg}/\text{kg}$ 。更优选, 所述剂量方案与化疗方案联用作为转移的结肠直肠癌的一线疗法。在一些方面, 所述化疗方案涉及常规高剂量间歇给药。在一些其它方面, 所述化疗剂以较小且更为频繁的剂量而没有预定的间隔来给药(“节拍化疗(metronomic chemotherapy)”)。本发明治疗的进展容易通过常规技术和实验来监测。

适宜剂量的其它信息在以下实施例中提供。

### 治疗效力

本发明治疗的主要优势是在人患者中产生明显的抗癌效果但不导致明显的毒性或副作用的能力, 使得所述患者从整体治疗获益。本发明治疗的效力可通过通常用于评估癌症治疗的各个终点(endpoint)来测定, 包括但不限于, 肿瘤退化, 肿瘤重量或大小减小, 进展时间, 生存期, 无进展生存期,

总体反应率，反应时间以及生活质量。由于本发明的抗血管生成剂靶向肿瘤血管系统而不必要是肿瘤细胞本身，它们代表抗癌药物的独特类型，并因此可需要独特的方法以及对药物的临床反应的定义。例如，2 维分析中超过 50 % 的肿瘤缩小是宣布反应的标准分离点(cut-off)。然而，测定抗血管生成疗法的效力的新方法应采用，包括例如，测定血管生成的血浆或尿标志物以及通过放射显像测定反应。

一个实施方案中，本发明可用于延长易患或被诊断患有癌症的人类患者的生存期。生存期定义为首次给予药物到死亡的时间。一个优选方面，本发明的抗 VEGF 抗体与一或多种化疗剂联合给药人类患者，由此该患者的生存期与单独给药化疗相比得以有效延长。例如，用抗 VEGF 抗体联合至少两种，优选三种化疗剂的化疗剂组合治疗的患者组的中值生存期为至少约 2 个月，优选约 2 - 5 个月，超过单独用相同的化疗剂组合治疗的患者组，所述延长在统计学上具有显著性。生存期可通过治疗组相对于对照组的分层危险率 (stratified hazard ratio)(HR)来测定，其代表治疗过程中患者死亡的危险性。优选，当与单独的化疗剂相比时，抗 VEGF 抗体与一或多种化疗剂的联用治疗明显降低死亡率至少约 30% (即分层 HR (stratified HR) 约 0.70)，优选至少约 35% (即分层 HR 约 0.65)。

一个实施方案中，本发明提供增加易患或被诊断患有癌症的人类患者的无进展生存期的方法。疾病进展的时间定义为给予药物到疾病进展的时间。一个优选实施方案中，与单独的化疗治疗相比，本发明利用抗 VEGF 抗体以及一或多种化疗剂的联合治疗明显增加无进展存活期至少约 2 个月，优选至少约 2 - 约 5 个月。

另一实施方案中，本发明的治疗显著增加易患或被诊断患有癌症的人类患者组中的反应率，所述患者用多种疗法治疗。反应率定义为对所述治疗有反应的被治疗患者的百分比。一方面，与单独的化疗治疗相比，本发明利用抗 VEGF 抗体以及一或多种化疗剂的联合治疗显著增加被治疗患者组中的反应率，所述增加具有低于 0.005 的 Chi-square p-值。

一方面，本发明提供增加易患或被诊断患有癌症的人类患者或人类患者组中的反应时间(duration of response)。反应时间定义为初次反应到疾病进展的时间。在本发明利用抗 VEGF 抗体以及一或多种化疗剂的联合治疗中，获得并优选反应时间增加至少 2 个月，所述增加具有统计学显著性。

### 治疗安全性

本发明提供有效治疗癌症而对被治疗人类受试者没有明显副作用的方法。本发明治疗的临床效果在一定程度上是出人意料的，被认为与抗血管生成疗法相关的数个不利事件在根据本发明的治疗过程中没有观察到。例如，以前的临床研究提示利用抗 VEGF 抗体的治疗可导致血栓(一些情况中会致死)，高血压，蛋白尿和鼻衄(出血)。然而，与单独的化疗相比，本发明利用抗 VEGF 抗体以及包含至少两种优选三种化疗剂的化疗剂组合的联合治疗不显著增加这些不利事件的发生率。因此，本发明的治疗出人意料地包含可接受水平的副反应，同时具有明显提高的抗癌效力。

### V. 制品

本发明另一实施方案涉及一种制品，其包含可用于治疗上述疾病的材料。所述制品优选包括一个容器，标签或包装插页。适当的容器有瓶子，小瓶，注射器等。容器可由各种材料如玻璃或塑料制成。所述容器含有组合物，所述组合物可有效治疗所述疾病并具有无菌入口(例如所述容器可为静脉内溶液包或小瓶，其含有可被皮下注射针穿透的塞子的)。所述组合物中至少一种活性剂是抗 VEGF 抗体。所述容器上或所附的标签说明所述组合物用于治疗所选的疾病。所述制品可进一步包含含有可药用缓冲液的第二容器，诸如磷酸盐缓冲的盐水，林格氏溶液以及葡萄糖溶液。其可进一步包含从商业和使用者角度来看所需的其它物质，包括其它缓冲液，稀释剂，过滤物，针和注射器。此外，所述制品包含带有使用说明的包装插页，包括例如警告所述组合物不与萘环类抗生素类型的化疗剂例如阿霉素，或表柔比星联用，或指示所述组合物的使用者将抗 VEGF 抗体组合物以及抗肿瘤组合物给药患者。

### 保藏材料

以下杂交瘤细胞系已经根据布达佩斯条约保藏在美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection) (ATCC), Manassas, VA, USA:

抗体名称	ATCC No.	保藏日期
A4.6.1	ATCC HB-10709	1991-3-29



以下实施例仅仅意在举例说明本发明的实践而不是限制。本发明所引用的所有专利以及科学文献的全文都包含在本文作为参考。

## VI. 实施例

实施例 1. 在一线转移性结肠直肠癌中将抗-VEGF 抗体加入药团伊立替康/氟尿嘧啶/甲酰四氢叶酸(IFL)

进行多中心、III期、随机化、主动控制的试验(multicenter, Phase III, randomized, active-controlled trial)以评估将 bevacizumab 加入转移性结肠直肠癌的标准一线化学疗法的情况下, bevacizumab 的有效性和安全性。该试验收入 900 多名组织学确定的、之前没有进行治疗的、二维可检测的转移结肠直肠癌患者。

### 方法和材料

#### 抗-VEGF 抗体 bevacizumab

抗-VEGF 抗体“Bevacizumab (BV)”也已知为“rhuMAb VEGF”或“Avastin<sup>TM</sup>”, 是重组人源化抗-VEGF 单克隆抗体, 其根据 Presta et al. (1997) Cancer Res. 57:4593-4599 制备。它包含突变的人 IgG1 框架区以及小鼠抗-hVEGF 单克隆抗体 A.4.6.1 的抗原结合性互补决定区, 所述抗体阻断人 VEGF 与其受体的结合。美国专利 6,582,959; WO 98/45331。bevacizumab 大约 93%的氨基酸序列(包括大部分框架区)来自人 IgG1, 并且该序列的约 7%来自鼠抗体 A4.6.1。Bevacizumab 的分子量约为 149,000 道尔顿并且是糖基化的。

多肽的特性以及糖基化位点可从氨基酸组成以及肽图谱推定。所述分子的大小以及电荷特性和临床所用批次(lot)的纯度通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳或毛细管电泳非凝胶筛选(capillary electrophoresis non-gel sieving), 等电聚焦, 以及离子交换和大小排阻层析证明。bevacizumab 的活性通过结合酶联免疫吸附测定或重组人 VEGF 的激酶受体实验来定量。

Bevacizumab 利用遗传改造的中国仓鼠卵巢细胞系通过重组 DNA 技术制备。所述蛋白通过常规柱层析和过滤方法从细胞培养基纯化。根据美国药品和食品监督条例, 检测最终产物的质量, 特性, 安全性, 纯度, 效力, 强度以及赋形剂/化学组成。Bevacizumab 的纯度>95%。Bevacizumab 呈清至轻度乳白色, 无菌液体, 可用于胃肠外给药。

### 患者选择

符合条件的患者患有组织学上证实的转移性结肠直肠癌，以及二维可测定的疾病。其它包含标准包括至少 18 岁，美国东部肿瘤协作组 Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 体力状态 (performance status) 为 0 或 1 (Oken et al. (1982) Am. J. Clin. Oncol. 5:649-55)，预期寿命超过 3 个月，以及书面告知的同意。适当的血液、肝以及肾功能(包括不超过 500mg 蛋白每天的尿排除率)也是所需的。

排除标准包括以前对转移疾病的化疗或生物治疗(在进入研究前辅助使用或使对放射敏感而使用氟代嘧啶(fluoropyrimidine)加或不加甲酰四氢叶酸或左旋咪唑(levamisole)12 个月以上是允许的)，研究治疗开始前 14 天内接受放疗，研究治疗开始前 28 天内的进行大手术，临床明显的心血管疾病，临床可检测的腹水，妊娠或泌乳，阿司匹林的规律使用(超过每天 325mg)或其它非类固醇抗炎药的规律使用，先前存在的出血因素或凝血病 (coagulopathy) 或需要全剂抗凝，以及已知的中枢神经系统转移。

### 研究设计

符合条件的患者接受治疗，所述治疗利用被涉及用于实现组间总体平衡的动态随机化算法；随机化根据研究中心、基线 ECOG 体力状态(0 vs.1)，原发疾病位点(结肠 vs.直肠)，以及转移病灶数目(一个 vs.一个以上)进行分层 (stratify)。开始，患者以 1:1:1 的比例随机分配来接受 IFL 加安慰剂，IFL 加 bevacizumab，或氟尿嘧啶和甲酰四氢叶酸加 bevacizumab (表 1)，每种治疗持续直到疾病进展或不可接受的副作用出现或持续最长 96 周。

表 1. 一线治疗方案\*

治疗	起始剂量	方案
伊立替康 氟尿嘧啶 甲酰四氢叶酸 安慰剂	125 mg/m <sup>2</sup> 体表面积 500 mg/m <sup>2</sup> 20 mg/m <sup>2</sup>	每周一次持续 4 周； 每 6 周重复循环  每 2 周
伊立替康 氟尿嘧啶 甲酰四氢叶酸	125 mg/m <sup>2</sup> 500 mg/m <sup>2</sup> 20 mg/m <sup>2</sup>	每周一次持续 4 周； 每 6 周重复循环

Bevacizumab	5 mg/kg 体重	每 2 周
氟尿嘧啶	500 mg/m <sup>2</sup>	每周一次持续 4 周;
甲酰四氢叶酸	500 mg/m <sup>2</sup>	每 8 周重复循环
Bevacizumab	5 mg/kg	每 2 周

\*在 bevacizumab 加入伊立替康, 氟尿嘧啶和甲酰四氢叶酸的方案的安全性得到证实后, 利用氟尿嘧啶, 甲酰四氢叶酸和 bevacizumab 的治疗停止。313 名患者随机化之后进行证实。所有药物经静脉内给药。

300 名患者随机化后, 进行中期分析(interim analysis), 此时非盲性、独立数据监测委员会来评价 IFL 加 bevacizumab 的安全性, 所述评价基于所有可得的安全性信息, 包括每组的死亡数, 但缺乏与肿瘤反应相关的信息。如果数据监测委员会发现没有由于将 bevacizumab 加入 IFL 导致的不适当的不利事件, 停止将患者加入将接受氟尿嘧啶以及甲酰四氢叶酸加 bevacizumab 的组, 其它患者以 1:1 随机分组以接受 IFL 加安慰剂或 IFL 加 bevacizumab。然而, 如果数据监测委员会的结论是 IFL 加 bevacizumab 的安全性状况不能被接受, 该治疗停止, 患者以 1:1 随机分组来接受氟尿嘧啶和甲酰四氢叶酸加 bevacizumab 的组合或 IFL 加安慰剂。

肿瘤反应和进展利用 Response Evaluation Criteria in Solid Tumors. Therasse et al. (2000) J. Natl. Cancer Inst. 92:205-16 确定。在疾病进展时间, 所述治疗分组公开并对患者提供二线治疗。接受含 bevacizumab 的治疗的组中的患者可选择在该二线治疗中继续接受 bevacizumab。在给予 IFL 加安慰剂的组中不允许交叉。接受含 bevacizumab 治疗并且在 96 周的研究期末没有进展性疾病的征兆的患者可继续在分开的延期研究中接受 bevacizumab。接受 bevacizumab 的组中, 具有证实的完全反应或不可接受的化疗副作用的患者将停止化疗并接受单独的 bevacizumab。

Bevacizumab(或安慰剂)与化疗同时给药。如果患者体重在研究过程中改变至少 10%, Bevacizumab 以及化疗的剂量可重新计算。伊立替康和氟尿嘧啶(根据包装插页)<sup>o</sup>的标准循环内和循环间剂量改变在具有治疗相关不利事件的患者中是允许的。甲酰四氢叶酸和 bevacizumab 的剂量没有改变。

在生存和随后的治疗的分析中, 所有患者均被随诊直至死亡, 失去随诊或研究终止。

## 评估

在基线评估以后，肿瘤状况在研究的前 24 周每 6 周评估一次，然后在治疗余下的时间内每 12 周评估一次。所有完全和部分反应(complete and partial responses)需要在它们首次被注意后的至少 4 周得到证实。

安全性基于不利事件的报告、实验室检测结果，以及生命体征测定来评估。不利事件根据 Common Toxicity Criteria of the National Cancer Institute, version 2 分类，其中 1 级表示轻微不利事件，2 级为中度不利事件，3 级为严重不利事件，4 级为威胁生命的不利事件。预先规定的安全性衡量标准包括以下事件的发生率：所有不利事件，所有严重不利事件，以及与 bevacizumab 相关的不利事件- 高血压，血栓形成，3 级或 4 级的出血，以及蛋白尿-以及 3 级或 4 级的腹泻，以及不同实验值与生命体征自基线的改变。

为监测 IFL 加安慰剂以及 IFL 加 bevacizumab 方案的安全性，监测研究过程中的死亡、严重副反应、3 级或 4 级的腹泻、自任何来源的 3 级或 4 级的出血，以及血栓形成的发生率，所述监测通过非盲性方式由数据安全性监测委员会进行，持续到募集完成或效力的中期分析时间 (time of the interim analysis of efficacy)，以先到的那个为准。

## 统计学分析

主要结果检测指标 (primary outcome measure) 是总体生存期；生存的测定不涉及随后的治疗。然而，组间没有交叉。采用生存分析技术诸如 Kaplan-Meier 方法，对数-秩检验，以及 Cox 正比危害模型(Cox proportional hazards model)。次要结果检测指标 (secondary outcome measure) 是无进展生存期，目标反应率 (objective response rate) (完全和部分反应)，反应时间以及生活质量。

对于在分析时存活的患者，生存时的数据在最后的接触时间得以检查。无进展生存期 (progression-free survival) 定义为在研究过程中，从随机化到进展或死亡的时间，在研究中死亡定义为最后剂量的 bevacizumab 或化疗之后 30 天之内出现的任何死亡。对于在最后分析时没有疾病进展的患者，无进展生存的数据在肿瘤状况的最后评估或如果在基线以后没有进行其它评估的情况下于第 0 天接受审查。没有适当随诊数据的患者被分类为没有反应。

为检测到与对照相比，给予 IFL 加 bevacizumab 的组中的死亡危险率为 0.75，需要大约 385 例死亡。所有计算利用对数秩检验进行并涉及对效力的双侧 P 值， $\alpha$  值 0.05，统计强度(statistical power)为 80%，以及一次效力中期分析 (interim analysis of efficacy)。

中期分析可以以非盲性方式进行。安全性的中期分析在将大约 100 名患者随机分配到各组之后进行。安全性和效力的第二中期分析在出现 193 例死亡(所需事件一半的数目)之后进行。

效力分析根据意图 - 治疗(intention-to-treat)原则进行。安全性分析包括所有接受至少一个剂量的研究药物的患者。

### 结果

#### 患者的特征

在约 20 个月的时间中，923 名患者在美国、澳大利亚和新西兰的 164 个位置接受随机化。在 313 名患者被随机分配到三个组之一中(100 名分配到 IFL 加安慰剂组，103 名分配到 IFL 加 bevacizumab 组，110 名分配到氟尿嘧啶，甲酰四氢叶酸，和 bevacizumab)之后，停止向给予氟尿嘧啶，甲酰四氢叶酸和 bevacizumab 的组的分配(该组中的结果没有报道)。该步骤是对安全性的首次正式中期分析之后，所述方案所需的，所述分析的结果是 IFL 加 bevacizumab 的方案具有可接受的安全性以及向该组的分配可以继续。

总体生存的主要终点的意图 - 治疗分析在给予 IFL 加安慰剂的组中包括 411 名患者，在 IFL 加 bevacizumab 的组中包括 402 名患者。表 2 显示所选的人口统计学以及基线特征，其在组间很好地平衡。每个组中相似数目的患者以前经过结肠直肠癌的手术或接受放疗或辅助化疗。

#### 治疗

治疗的中值时程 (median duration) 在 IFL 加安慰剂的组中为 27.6 周，在给予 IFL 加 bevacizumab 的组中为 40.4 周。计划的给予伊立替康剂量的百分比在两组中类似(在给予 IFL 加安慰剂的组中为 78%，在给予 IFL 加 bevacizumab 的组中为 73%)。

在数据停止的当天，IFL 加安慰剂组中的 33 名患者以及 IFL 加 bevacizumab 组中的 71 名患者仍然接受分配给他们的初始治疗。可影响生存的二线疗法诸如奥沙利铂或转移切除术的利用率在两个组之间很好地平

衡。在两个组中，大约 50% 的患者接受一些二线疗法形式；所有患者的 25% 接受奥沙利铂以及少于 2% 的患者接受转移切除术。

表 2. 所选人口统计学以及基线特征\*

特征	IFL加安慰剂 (N=411)	IFL加Bevacizumab (N=402)
性别(%)		
男性	60	59
女性	40	41
平均年龄 (YR)	59.2	59.5
种族(%)		
白人	80	79
黑人	11	12
其它	9	9
中心位置(%)		
美国	99	99
澳大利亚或新西兰	<1	<1
ECOG 体力状态 (%)		
0	55	58
1	44	41
2	<1	<1
中心类型 (%)		
结肠	81	77
直肠	19	23
转移位点数目(%)		
1	39	37
>1	61	63

以前的癌症治疗(%)		
辅助化疗	28	24
放疗	14	15
转移性疾病的		
中值持续时间(mo)	4	4

\*组间没有明显差异。IFL 表示伊立替康，氟尿嘧啶，和甲酰四氢叶酸，ECOG 表示美国东部肿瘤协作组。

### 效力

给予 IFL 加 bevacizumab 的组的总体生存持续时间中值 (median duration of overall duration) 以及主要终点(primary endpoint) 明显长于 IFL 加安慰剂组 (20.3 月 vs. 15.6 月)，其对应死亡风险率为 0.66 ( $P < 0.001$ ) (表 3 和图 1)，或在 bevacizumab 组死亡风险降低 34%。IFL 加 bevacizumab 组的一年生存率为 74.3%，IFL 加安慰剂组中为 63.4% ( $P < 0.001$ )。接受奥沙利铂二线治疗的患者亚组中，IFL 加 bevacizumab 组的总体生存中值持续时间为 25.1 个月而 IFL 加安慰剂组的为 22.2 个月。

将 bevacizumab 加入 IFL 与无进展生存持续时间中值的增加相关 (10.6 月 vs. 6.2 月；与 IFL 加安慰剂组相比，进展危险率 0.54;  $P < 0.001$ )；反应率 (44.8% vs. 34.8%； $P = 0.004$ )；反应持续时间中值 (10.4 月 vs. 7.1 月；进展危险率，0.62;  $P = 0.001$ ) (表 3)。图 2 显示无进展生存的 Kaplan-Meier 估计值。治疗效应在预先规定的亚组之间是一致的，包括根据以下因素定义的那些：年龄，性别，种族，ECOG 体力状态，原发性肿瘤位置，以前有或无的辅助治疗，转移性疾病持续时间，转移病灶数目，自诊断结肠直肠癌起的年数，以前有或无放疗，基线肿瘤负荷，血清白蛋白浓度，碱性磷酸酶以及乳酸脱氢酶。

表 3. 效力分析\*

终点	IFL 加安慰剂	IFL 加 Bevacizumab	P 值
生存时间中值(mo)	15.6	20.3	<0.001
死亡危险率		0.66	
一年生存率(%)	63.4	74.3	<0.001
无进展生存(mo)	6.2	10.6	<0.001
进展危险率		0.54	
总体反应率(%)	34.8	44.8	0.004
完全反应	2.2	3.7	
部分反应	32.6	41.0	
反应持续时间中值 (mo)	7.1	10.4	0.001
复发危险率		0.62	

\* IFL 表示伊立替康，氟尿嘧啶和甲酰四氢叶酸。

#### 安全性

表 4 表示所规定治疗过程中所选 3 或 4 级的不利事件的发生率，而没有对中值治疗持续时间的调整(IFL 加安慰剂组中为 27.6 周, IFL 加 bevacizumab 组中为 40.4 周)。任何 3 或 4 级不利事件的发生率在接受 IFL 加 bevacizumab 的患者中比接受 IFL 加安慰剂的患者中高大约 10 个百分点，主要是由于 3 级高血压(需要治疗) 的发生率增加, 以及 4 级腹泻和白细胞减少的发生率少量增加。然而，导致住院或研究治疗停止或 60 天中任何原因导致的死亡率的不利事件的发生率没有明显变化。



表 4. 所选不利事件 \*

不利事件	IFL 加安慰剂	IFL 加 Bevacizumab
	(N=397)	(N=393)
		百分比
任何 3 或 4 级不利事件	74.0	84.9**
导致住院的不利事件	39.6	44.9
导致治疗停止的不利事件	7.1	8.4
导致死亡的不利事件	2.8	2.6
60 内的死亡	4.9	3.0
3 级或 4 级白细胞减少	31.1	37.0
高血压		
任何级别	8.3	22.4**
3 级	2.3	11.0**
任何血栓形成事件	16.2	19.4
深血栓静脉炎	6.3	8.9
肺栓塞	5.1	3.6
3 级或 4 级出血	2.5	3.1
蛋白尿		
任何级别	21.7	26.5
2 级	5.8	3.1
3 级	0.8	0.8
胃肠穿孔	0.0	1.5

\* 没有为伊立替康, 氟尿嘧啶, 和甲酰四氢叶酸 (IFL)加安慰剂组与 IFL 加 bevacizumab 组的治疗中值持续时间的差异(27.6 周 vs. 40.4 周)而校准数据。

\*\* P<0.01。仅仅接受至少一次研究-药物治疗的患者包含在内。

阶段 1 和 2 的试验鉴定了出血, 血栓栓塞, 蛋白尿以及高血压作为可能的 bevacizumab 相关的副作用。然而, 在本研究中, 与 IFL 加安慰剂组相比, IFL 加 bevacizumab 组中仅有高血压的发病率明确增加。所有高血压发作都

可利用标准口服抗高血压药剂(例如钙通道阻断剂, 血管紧张素转化酶抑制剂以及利尿剂)控制。在 bevacizumab 组中, 没有与高血压相关的 bevacizumab 疗法中止、高血压危象或死亡。

在两组中, 2 级或 3 级蛋白尿(没有 4 级蛋白尿的发作或肾炎综合征)以及任何原因导致的 3 级或 4 级出血发生率是相似的, 尽管所有 3 例 4 级出血都在 IFL 加 bevacizumab 组中。所有静脉以及动脉血栓形成事件的发生率在 IFL 加 bevacizumab 组中为 19.4%, 在 IFL 加安慰剂中为 16.2% (P=0.26)。

胃肠穿孔出现在 6 例接受 IFL 加 bevacizumab 的患者中(1.5%)。一名患者直接死于该事件, 而其它 5 名恢复(其中 3 名能够重新开始治疗而没有随后的并发症)。患有穿孔的 6 名患者中, 3 名被证实对 IFL 加 bevacizumab 有完全或部分反应。除外研究治疗以外可能与胃肠穿孔相关的因素是在两名患者中前两个月当中的结肠手术以及一名患者中的消化性溃疡疾病。

该阶段 III 研究的结果直接支持抗血管生成药可广泛适用于癌症治疗的结论。将 bevacizumab 这种抗-VEGF 抗体加入 IFL 化疗显示有临床意义以及统计学显著的癌症患者中的改善, 所述改善通过例如总体生存率, 无进展生存, 反应率以及反应持续时间来测定。bevacizumab 导致的生存中值持续时间 4.7 月的延长与在结肠直肠癌治疗的其它任何 3 阶段试验中观察到的一样多或更多。Goldberg et al. (2004) J. Clin. Oncol. 22:23-30。尽管该试验过程中, 奥沙利铂二线疗法的可用性(availability)有限, Bevacizumab 治疗的人群中 20.3 月的中值生存期还是出现了。

与单独的 IFL 相比, IFL 加 bevacizumab 的方案使得无进展生存时间从中值 6.2 月增加到 10.6 月, 总体反应率从 34.8% 增加到 44.8%, 反应中值持续时间从 7.1 月增加到 10.4 月。这些改善在临床上有意义。不能预测利用 IFL 加 bevacizumab 导致的反应率绝对增加 10% 与该数量级的存活的增长相关。该观察提示, bevacizumab 的主要机制是抑制肿瘤生长, 而不是细胞减少。

该临床益处伴随治疗副反应的相对适度的增加, 其可轻易控制。在 3 级和 4 级不利效应的总体发生率中大约 10% 的绝对增加, 主要由于需要治疗的高血压, 腹泻以及白细胞减少所致。将 bevacizumab 加入 IFL 没有明显增加任何原因所致的 60 天死亡率, 住院以及治疗的中止。

以前的阶段 1 和 2 临床实验提示, 利用单独的 bevacizumab 或联用化疗导致血栓形成、出血、蛋白尿以及高血压发病率增加。Kabbinavar et al. (2003)

J. Clin. Oncol. 21:60-65; Yang et al. (2003) New Engl. J. Med. 349:427-34。除了高血压以外，与 IFL 加安慰剂组中这些副反应的发生率相比，没有发现所述副反应的增加，因此，显示了随机化的、安慰剂对照研究对安全性以及效力评估的重要性。一种新出现的潜在副反应是胃肠穿孔。该并发症并不常见并且有各种临床表现。严重肠道并发症，具体是在患有中性粒细胞减少的患者中的严重肠道并发症，在 IFL 以及其它结肠直肠癌化疗方案中有报道，并且在一系列中，在超过 2% 用基于氟尿嘧啶的方案治疗的患者中有瘘的报道。Saltz et al. (2000) New Engl. J. Med. 343:905-914; Rothenberg et al. (2001) J. Clin. Oncol. 19:3801-7; Tebbutt et al. (2003) Gut 52:568-73。在给予 IFL 加安慰剂的组中没有所述事件出现，而在 IFL 加 bevacizumab 组中观察到 6 个病例 (1.5%)，有时在整体肿瘤反应的背景中。尽管这 6 名患者中有 3 名能够重新开始治疗而没有随后的并发症，一名患者死亡，两名由于该并发症而永远停止所述治疗。

虽然以前的动物研究和早期阶段的临床试验提示利用抗血管生成治疗来治疗癌症，本研究首次显示利用抗血管生成抑制剂，诸如抗-VEGF 抗体，确实能产生对癌症患者统计学显著且临床有意义的益处。

实施例 2. 在一线转移结肠直肠癌中将 Bevacizumab 加入药团 5-FU/甲酰四氢叶酸

该随机的，阶段 II 试验比较了 bevacizumab 加 5-氟尿嘧啶与甲酰四氢叶酸 (5-FU/LV) 相对于安慰剂加 5-FU/LV 在患者中作为一线治疗的情况，所述患者被认为是一线伊立替康的非最佳候选者。

#### 患者和方法

##### 患者合格条件

组织学上被确认的、以前未被治疗的、可测定转移结肠直肠癌患者是合格的，条件是，如果研究人员判断他们不是一线含伊立替康疗法的最佳候选人并具有以下特征中至少一个：年龄超过 65，ECOG PS 1 或 2，血清白蛋白等于或低于 3.5 g/dL，或之前对腹部或骨盆的放疗。如果患者经过大手术 (major surgical procedures) 或开放性活检，或在研究开始前 28 天之内经历过明显的外伤性损伤；研究过程中预期需要大手术；目前正在使用或最近使用

过治疗性抗凝剂(除非导管开放所需), 溶栓治疗或利用阿司匹林的长期每日治疗( $\geq 325$  mg/天)或非类固醇抗-炎药物治疗; 具有严重的, 非愈合伤口, 溃疡, 或骨折; 具有 CNS 转移病史或证据; 怀孕或哺乳; 或在基线时具有蛋白尿或临床明显的肾功能障碍, 则该患者被排除。所有患者提供其参与的书面同意书。

### 研究设计和治疗

相互作用性声音反应系统用于随机将合格的患者分配到 2 个治疗组中 1 个中: 5-FU/LV 加安慰剂或 5-FU/LV 加 bevacizumab。利用动态随机算法实现总体以及以下类别中每个组内的平衡: 研究中心, 基线 ECOG 体力状态 (baseline ECOG performance status) (0 vs.  $\geq 1$ ), 原发疾病位点(结肠 vs. 直肠), 以及转移病灶数目(1 vs.  $> 1$ )。5-FU/LV 疗法, 包括 LV  $500\text{mg}/\text{m}^2$ 、超过 2 小时以及 5-FU  $500\text{mg}/\text{m}^2$  作为药团 (bolus) 中途通过 LV 输注(Roswell Park regimen; Petrelli et al. (1989) J. Clin. Oncol. 7:1419-1426), 在每个 8 周的循环中在前 6 周每周给药一次。化疗持续到研究结束(96 周)或疾病进展。Bevacizumab  $5\text{mg}/\text{kg}$  或安慰剂每 2 周给药。Bevacizumab 组中被证实完全反应或经历不可接受的化疗毒性的患者被允许停止 5-FU/LV 并持续接受单独的 bevacizumab 作为一线疗法。疾病进展时, 患者对其接受的治疗并非盲性, 并可接受研究人员慎重决定的任何二线治疗。只有被随机分配到 bevacizumab 组的患者可接受 bevacizumab 作为二线治疗的成分。结束该研究后, 每 4 个月随诊患者任何随后的治疗以及存活情况, 直到死亡, 失随诊, 或研究终止。

### 研究评估

在基线以及每个 8 周的循环完成时, 利用适宜的放射显像技术(通常为螺旋 CT 扫描)评估患者的肿瘤状态。肿瘤反应或进展通过研究人员以及独立放射设备 (independent radiology facility) (IRF) 测定, 利用实体瘤反应评估标准 (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors)。Therasse et al. (2000)。IRF 评估在不了解治疗方案或研究人员的评估的情况下进行。此外, 患者完成结肠直肠癌患者中的结肠直肠癌治疗的功能评估 (Functional Assessment of Cancer Therapy—Colorectal) (FACT-C), 4 版, 一种评估生活质量 (quality of

life) (QOL)的可信方案,在基线以及每次治疗循环以前直到疾病进展。Ward et al. (1999) Qual. Life Res. 8:181-195。

安全性从不利事件,实验室检验结果,以及生命体征测定的报告评估。不利事件以及异常实验室结果利用 National Cancer Institute Common Toxicity Criteria (NCI-CTC), Version 2 分类。预先规定的安全性测定包括四项特别感兴趣的不利事件(高血压,蛋白尿,血栓形成以及出血),其基于对 bevacizumab 的以前的临床试验的发现。

### 统计学分析

主要结果指标(primary outcome measure)是总体生存期。次要结果指标包括无进展生存,目标反应率(完全和部分),反应持续时间,以及 FACT-C QOL 评分的变化。生存期定义为从随机化开始到死亡的时间。对于在分析时存活的患者,生存期在最后接触那一天接受审查。无进展生存定义为从随机化到疾病进展较早期或在研究中死亡的时间,所谓研究中的死亡定义为在最后剂量的研究药物或化疗的 30 天内任何原因所致的死亡。对于在分析时没有疾病进展的存活患者,无进展生存在其最后的肿瘤评估中检查,或如果没有进行基线后评估(postbaseline assessment),在第 1 天(研究治疗的第一天)接受检查。在目的反应分析中,没有肿瘤评估的患者分类为无反应者。疾病进展和反应分析基于 IRF 评估。生活质量改变作为 QOL 达到恶化的时间(TDQ)来分析,定义为从随机(randomization)化到结肠癌特异性 FACT-C 辅助(subscale)得分(colon-cancer specific FACT-C subscale score)(CCS)最早出现自基线降低 $\geq 3$ 个点,疾病进展或研究中的死亡的时间。也测定 TOI-C (CCS 总和,身体和功能健康)以及总 FACT-C 的 TDQ,其分别为相对于基线下降 7 和 9 个点。

为检测到 5-FU/LV/bevacizumab 组相对于 5-FU/LV/安慰剂组的死亡危险率为 0.61,需要大约 133 例死亡。双尾对数秩和检验的 0.05 显著性水平 80%置信区间以及两次中期分析(interim analyses)在计算中推定。中期分析通过非盲性独立 Data Monitoring Committee (DMC)进行。安全性中期分析在 44 例死亡之后进行,并在 89 例死亡之后进行第二次安全和效力中期分析。所述中间效力分析由正式组顺序停止规则(formal group sequential stopping rule)基于 O'Brien-Fleming 耗费函数(spending function)来控制。Kaplan-Meier

法用于估计每个治疗组的中值生存，无进展生存，以及反应持续时间。Bevacizumab 组相对于安慰剂组的危险率利用分层 Cox 成比例危险模型 (stratified Cox proportional hazards model) 测定。双侧分层对数秩和检验 (stratified log rank test) 用于比较这两组。分层分析 (Stratified analyses) 包括基线 ECOG 体力状态 (base line ECOG performance status)，原发疾病位点，以及转移位点数目。目的反应率通过 Chi-squared 检验来检验。作为解释性分析，Cox 正比危险模型用于估计危险因素对治疗效果在生存与无进展生存期的影响。效力分析对于意欲-治疗人群 (intent-to-treat population) 进行，该人群定义为所有被随机化的患者。安全性分析包括所有接受至少一剂研究药物的患者。

## 结果

### 患者特征

在 23 月中，209 名患者在美国和澳大利亚/新西兰的 60 个位置随机化。为对主要终点 (primary endpoint) (总体生存) 的意图-治疗分析，在 5-FU/LV/安慰剂组有 105 名患者，在 5-FU/LV/bevacizumab 组有 104 名患者。所选人口统计学以及基线特征类似于实施例 1 中所述，并在治疗组间合理平衡。基线低血清白蛋白 ( $\leq 3.5$  g/dL) 在 bevacizumab 组中比在安慰剂组中少见。

### 治疗

治疗的中值持续时间在 5-FU/LV/安慰剂组为 23 周，在 5-FU/LV/bevacizumab 组为 31 周，在治疗过程中 5-FU 剂量强度 (计划 5-FU 剂量与实际接受量的百分比) 在两组中相似 (92% vs. 84%)。至截止日 (the date of date cut-off)，5-FU/LV/安慰剂组中的 1 名患者以及 5-FU/LV/bevacizumab 组中的 7 名患者保持所给予的初始治疗。随后的治疗 (其影响生存) 用于两组中大约 50% 的患者，但 5-FU/LV/安慰剂组中更多患者用活性剂伊立替康和奥沙利铂。

### 效力

总体生存，主要终点，在 5-FU/LV/bevacizumab 组 (中值，16.6 月) 中优于 5-FU/LV/安慰剂组 (中值，12.9 月)，表明显著性的趋势。死亡危险率估计

为 0.79 (95% CI, 0.56 至 1.10; P = 0.16; 表 5 和图 4)。将 bevacizumab 加入 5-FU/LV 与中值无进展生存 (9.2 vs. 5.5 月; 危险率= 0.50; 95% CI, 0.34 至 0.73; P = 0.0002, 表 5 和图 4), 反应率(26.0% vs. 15.2%, P = 0.055), 和反应期中值(9.2 月 vs. 6.8 月; 危险率= 0.42; 95% CI, 0.15 至 1.17; P = 0.088) 的增加相关。对于对治疗的总体生存效果的进一步分析通过基线特征显示具有低基线血清白蛋白( $\leq 3.5$  g/dL)的患者显示产生明显的生存益处(危险率= 0.46; 95% CI, 0.29 至 0.74; P = 0.001)。

表 5. 效力分析总结

效力参数	5-FU/LV/ 安慰剂 (N = 105)	5-FU/LV/ Bevacizumab (N = 104)	P-值
中值生存(月)	12.9	16.6	
危险率		0.79	0.160
95% CI		0.56 至 1.10	
无进展生存 (月)	5.5	9.2	
危险率		0.50	0.0002
95% CI		0.34 至 0.73	
总反应率 (%)	15.2	26.0	0.055
完全反应	0	0	
部分反应	15.2	26.0	
反应持续时间 (月)	6.8	9.2	
危险率		0.42	0.088
95% CI		0.15 至 1.17	

5-FU/LV = 5-氟尿嘧啶/甲酰四氢叶酸

Bevacizumab 治疗对生活质量没有有害影响, TDQ 结果提示可能的有益效果。CCS 得分测定的中值 TDQ 在 5-FU/LV/安慰剂组中为 3.0 月, 在 5-FU/LV/bevacizumab 组中为 3.1 月(危险率 = 0.79, P = 0.188)。安慰剂治疗和 bevacizumab 治疗的患者的中值 TDQ 如第二(secondary)TDQ 所测定的为 2.3

和3.2个月(TOI-C; 危险率 = 0.71, P = 0.048) 以及2.6和3.6个月(总FACT-C; 危险率 = 0.66, P = 0.016)。

### 安全性

共204名接受至少一种研究药物剂量的患者(104名患者5-FU/LV/安慰剂和100名患者5-FU/LV/bevacizumab)包含安全性人群。观察到接受bevacizumab的患者的总体3级和4级毒性的16%增加(71%相对于87%)。导致死亡或研究中止的不利事件在两组中相似,所述不利事件已知与5-FU/LV相关(具体地,腹泻和白细胞减少)。两名患者,都在5-FU/LV/bevacizumab组,经历的肠穿孔事件。这些事件在治疗110天以及338天出现,均被认为与手术探查的结肠憩室相关。一名患者死于该并发症。以前的临床试验提示出血,血栓性栓塞,蛋白尿,以及高血压作为可能的bevacizumab相关的毒性;然而,在该研究中,在静脉血栓形成,大于或等于3级的出血,或临床显著的(大于或等于3级)的蛋白尿没有增加。动脉血栓形成事件(心肌梗塞,卒中,或外周动脉血栓形成事件)在5-FU/LV/bevacizumab组中出现在10名患者中,而在5-FU/LV/安慰剂组中出现在5名患者中。

5-FU/LV/安慰剂组的60天所有原因导致的死亡率比5-FU/LV/bevacizumab组高(13.5% vs. 5.0%)。两组中由于疾病进展导致的死亡在第一个60天之内是相似的(5.8% vs. 4.0%)。在5-FU/LV/安慰剂组,第一个60天内不是由于疾病进展导致的死亡是由于以下原因:心力衰竭(1),脓毒症(3),腹泻(2),呼吸衰竭(1),以及肺栓塞(1)。在5-FU/LV/bevacizumab组,不归因于疾病进展的单个早期死亡归因于心肌梗塞。

该临床研究的结果进一步证实,人源化抗VEGF单克隆抗体bevacizumab,在加入转移性结肠直肠癌的一线化疗时提供重要的临床益处。当于单独的5-FU/LV比较时,加入bevacizumab延长中值生存期3.7个月,延长无进展生存3.7个月,延长反应持续时间2.4个月,增加反应率11%。

这些结果应当在研究人群的背景下来看。具体选出的是对一线含伊立替康疗法反应不良的候选患者,其反应不良可能是低获益或高治疗相关毒性可能性的结果。对关键性(pivotal)伊立替康试验的仔细分析显示,该试剂的临床益处限于这样的患者,其具有正常ECOG体力状态(PS = 0).21, 22。高龄,以前接受过骨盆放疗,体力状态受损,以及低血清白蛋白均被报道增加伊立



替康相关毒性。23-27名具有这些特征的患者需要其它治疗选择。以前进行了对较小的随机化II期试验的回顾性子集分析，在CRC中评估 bevacizumab 和 5-FU/LV，并发现 bevacizumab 对具有基线 PS 1 或 2 (中值生存，6.3 个月 vs. 15.2 个月)的患者亚组，年龄 $\geq 65$  的亚组(11.2 个月 vs. 17.7 个月)，以及血清白蛋白 $< 3.5$  的亚组 (8.1 个月对 14.1 个月)提供了实质上的治疗效果。这些结果鼓励我们设计目前的试验，具体包括预后不良研究人群以及利用所述试验来检测对生存的显著治疗效果。我们非常成功地录入了与同时进行的关键性 IFL/安慰剂相对于 IFL/bevacizumab 试验的人群不同的人群。与该关键性试验相比，目前的试验中的患者具有更高的中值年龄(72 vs. 61 岁)并且基本上更多的患者具有 $> 0$  的体力状态(72% vs. 43%)和 $\leq 3.5$  mg/dL 的白蛋白(46% vs. 33%)。

尽管是这样的高危险研究人群，却显示对 5-FU/LV/bevacizumab 方案的很好的耐受。所述 bevacizumab 相关的不利事件 3 级高血压在 5-FU/LV/bevacizumab 组占 16%，在 5-FU/LV/安慰剂组中占 3%。没有出现 4 级高血压。任何级的蛋白尿在 5-FU/LV/bevacizumab 组 38%相对于 5-FU/LV/安慰剂组的 19%；然而，bevacizumab 组中仅有一名患者出现 3 级蛋白尿，而没有 4 级蛋白尿的病例。在 bevacizumab 治疗的患者中，没有 3 和 4 级出血或静脉血栓事件增加。动脉血栓事件发病率不平衡：10%见于 5-FU/LV/bevacizumab 组，而 4.8%见于 5-FU-/LV 安慰剂组。类似的不平衡见于关键性 (pivotal) bevacizumab 试验中(1.0%见于 IFL/安慰剂组，3.3%见于 IFL/bevacizumab 组)。本研究中所包含人群的年龄越大，导致该不利事件总体发生率越高，然而两项研究中的不平衡值得注意。需要大的、观察性安全试验进一步确定这些以及与 bevacizumab 治疗相关的其它不常出现的不利事件的发生率以及潜在危险因素。

总之，这些数据证实，bevacizumab 与药团 5-FU/LV 联用为患有以前未经治疗的转移性结肠直肠癌的患者提供了实质性临床益处，所述患者是含伊立替康疗法的不佳候选者。与关键性试验 (pivotal trial) 结果相结合，这些数据加强了基于 bevacizumab 的，含 5-FU/LV-疗法应当被认为是转移性结肠直肠癌初始治疗的标准选择的证据。

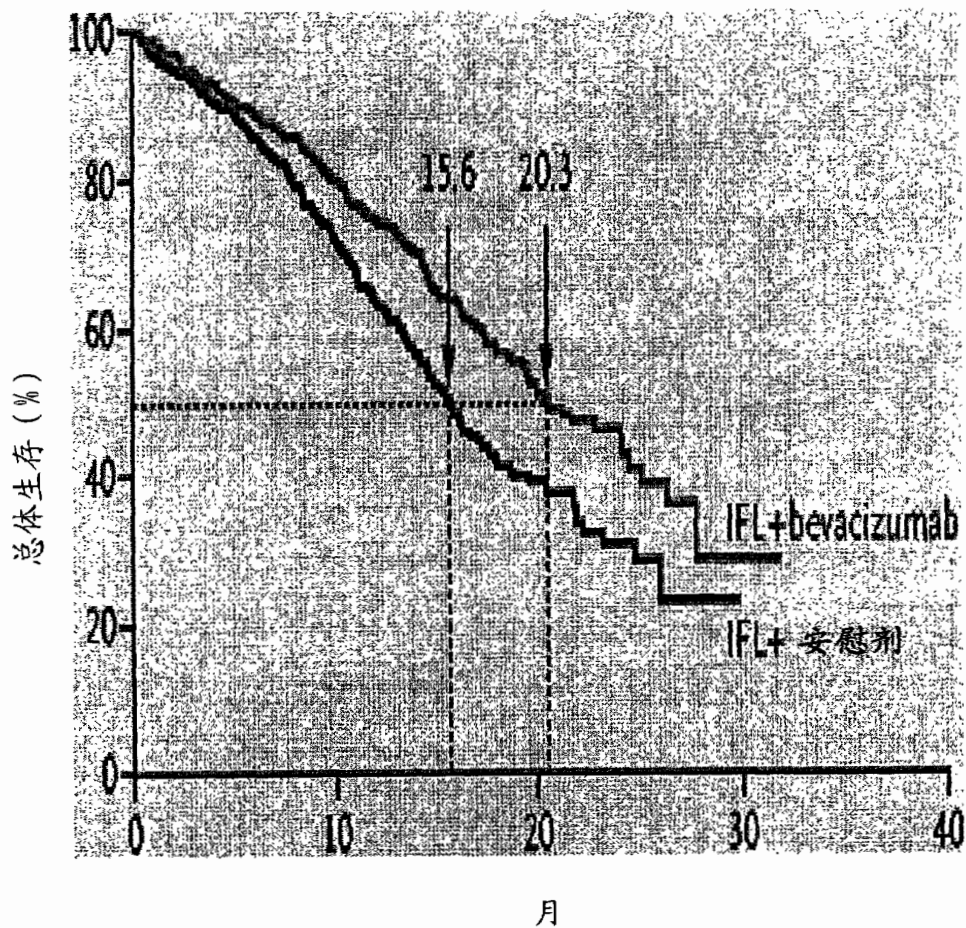


图 1

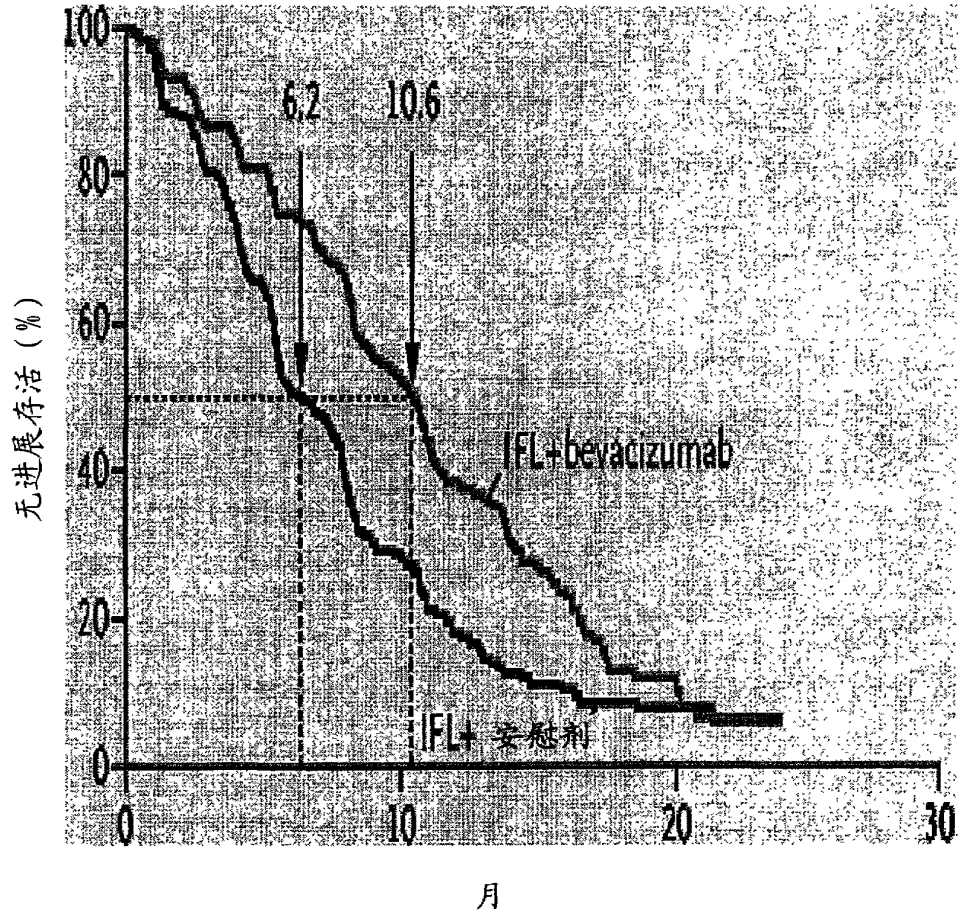


图 2

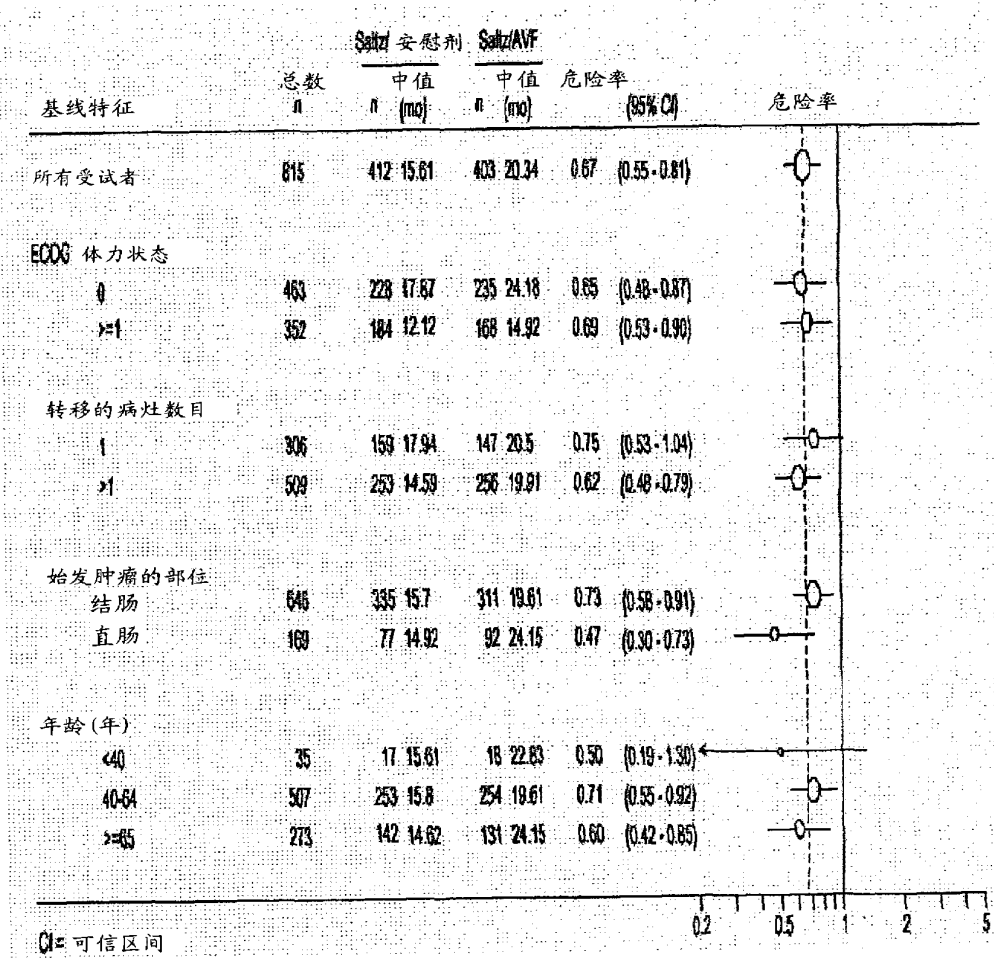


图 3A

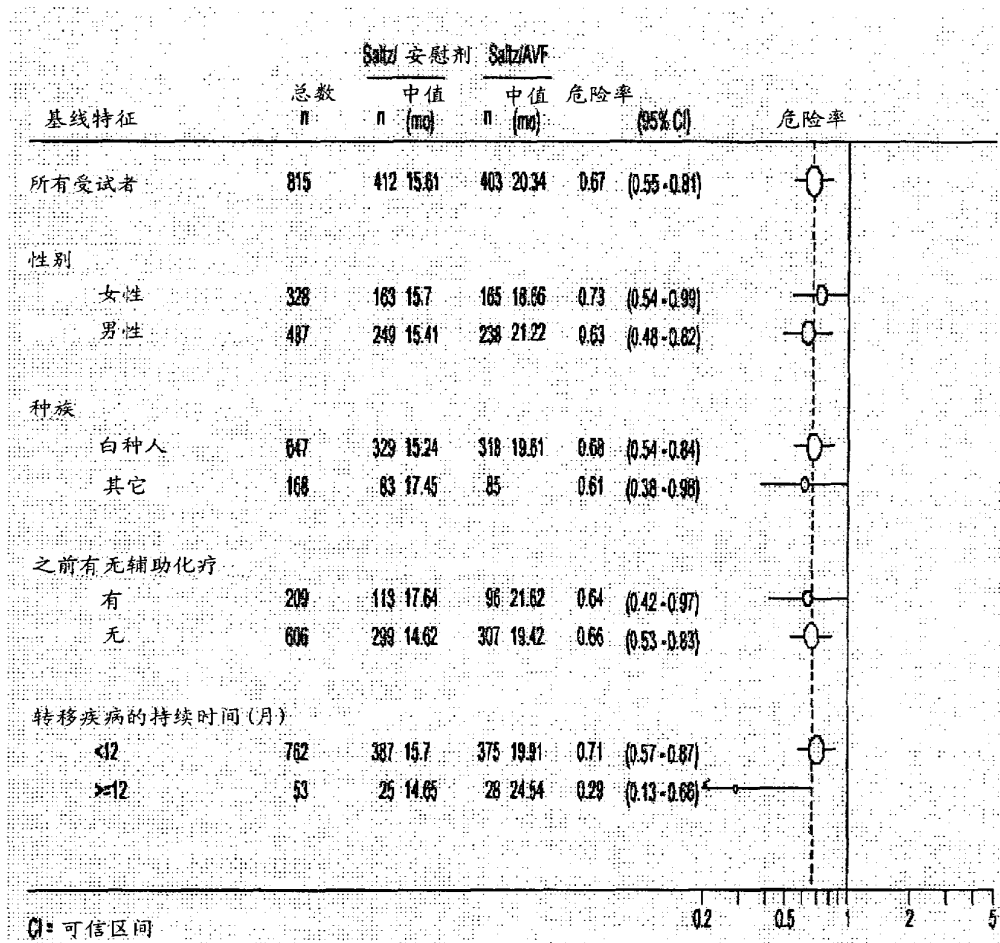


图 3B

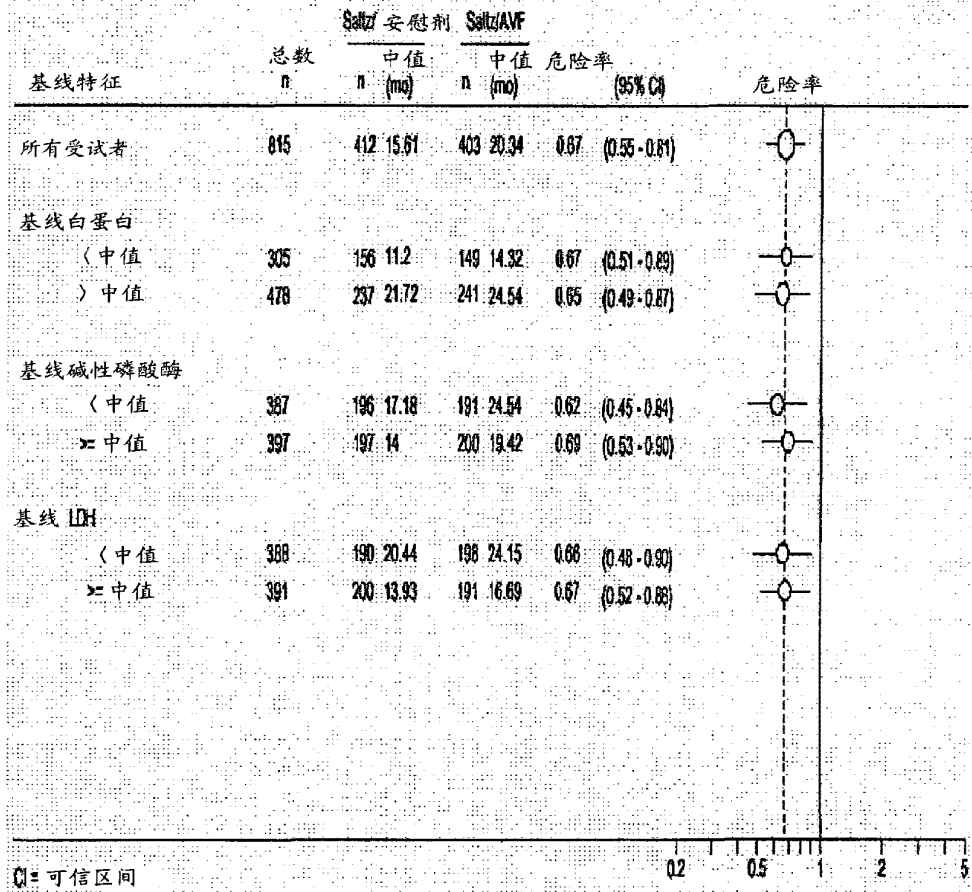


图 3C

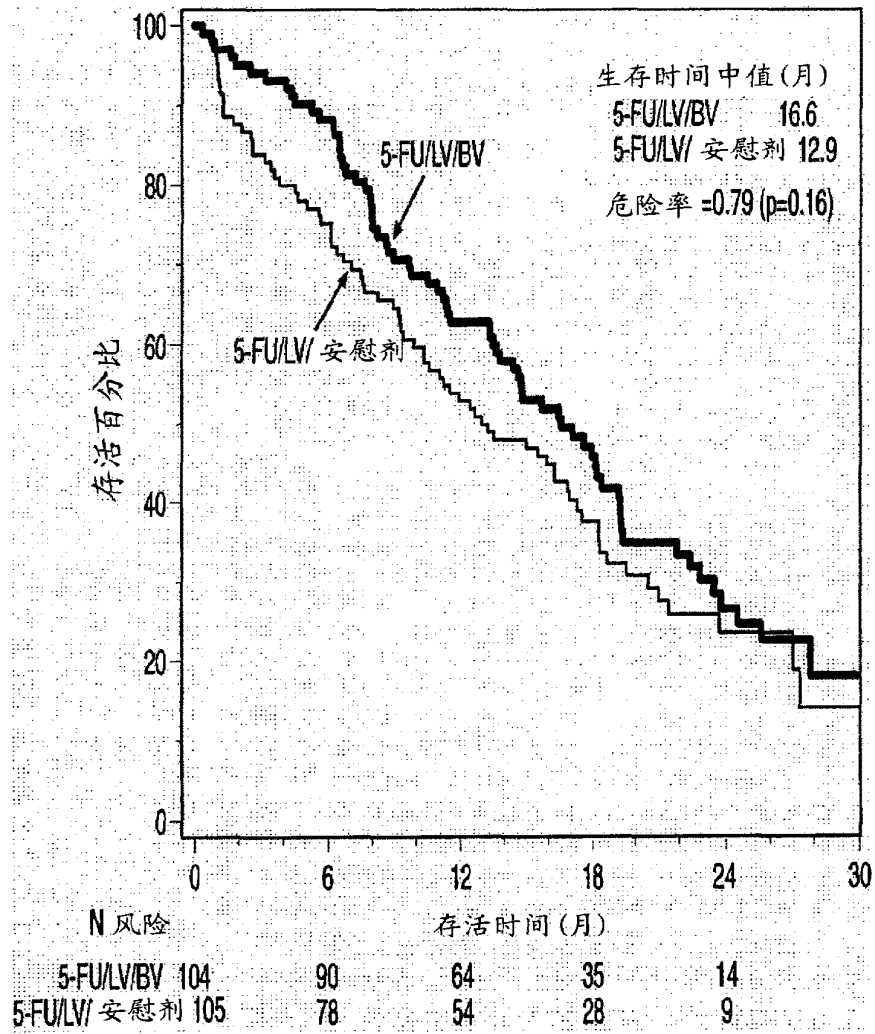


图 4

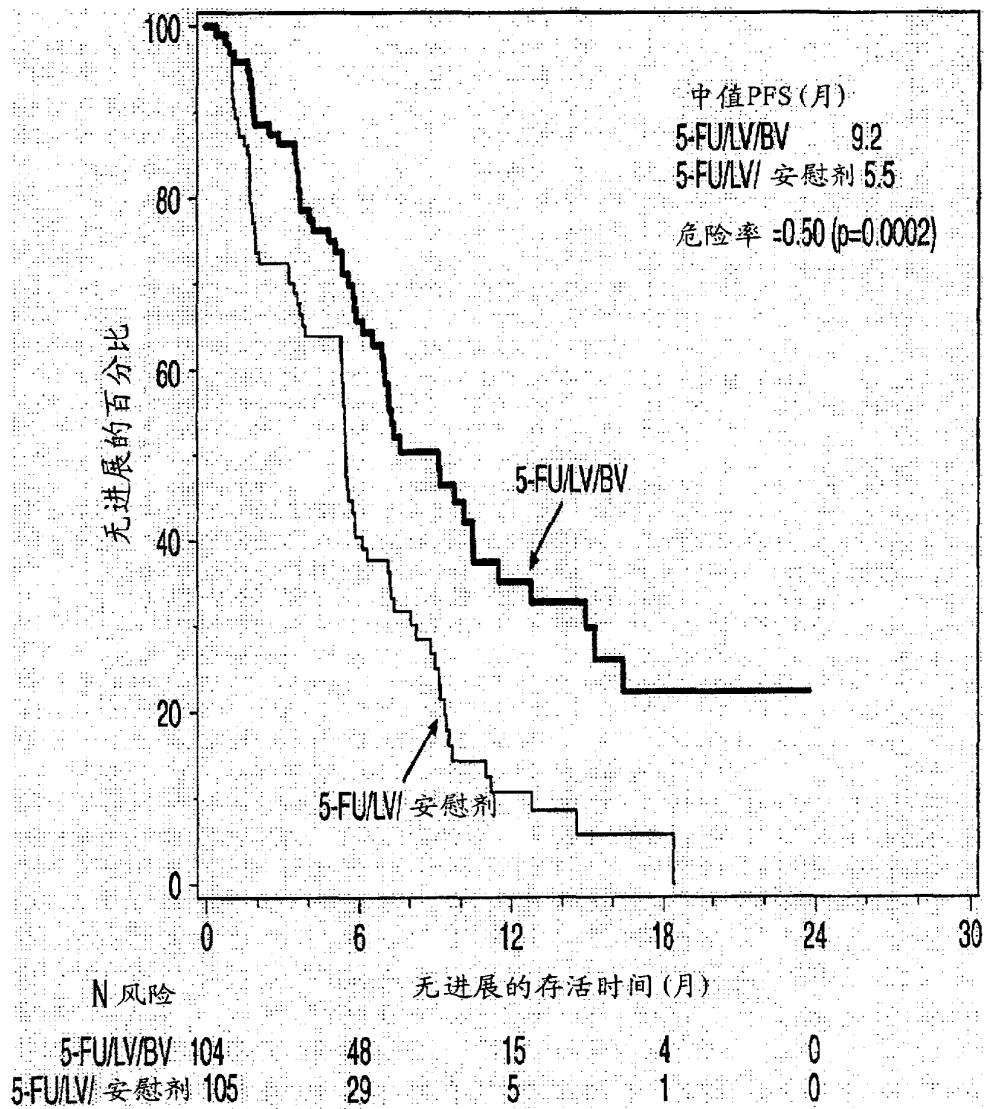


图 5





(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1980637 B

(45) 授权公告日 2014.02.19

---

(21) 申请号 200580022391.6	A61K 47/24(2006.01)
(22) 申请日 2005.05.02	A61K 47/34(2006.01)
(30) 优先权数据	A61K 31/337(2006.01)
60/567,921 2004.05.03 US	A61K 31/475(2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日	A61K 31/704(2006.01)
2006.12.31	A61K 31/4745(2006.01)
(86) PCT国际申请的申请数据	A61K 31/47(2006.01)
PCT/US2005/015349 2005.05.02	A61K 9/127(2006.01)
(87) PCT国际申请的公布数据	A61P 31/04(2006.01)
W02005/107712 EN 2005.11.17	A61P 31/12(2006.01)
(73) 专利权人 赫尔姆生物科学公司	A61P 35/00(2006.01)
地址 美国加利福尼亚州	A61P 43/00(2006.01)
(72) 发明人 K·洪 D·C·德拉蒙德	(56) 对比文件
D·B·基尔波京	CN 1351495 A, 2002.05.29, 实施例2, 表3A.
(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245	US 5785987 A, 1998.07.28, 全文.
代理人 赵蓉民 路小龙	US 6110481 A, 2000.08.29, 实施例3.
(51) Int. Cl.	审查员 李晓林
A61K 47/18(2006.01)	
A61K 47/10(2006.01)	
A61K 47/26(2006.01)	
A61K 47/02(2006.01)	
A61K 47/20(2006.01)	
A61K 47/22(2006.01)	

---

权利要求书1页 说明书72页 附图28页

(54) 发明名称

用于药物输送的脂质体

(57) 摘要

本发明提供了含有取代的铵和 / 或聚阴离子、和任选地带有期望的治疗实体或成像实体的脂质体组合物。本发明也提供了制备本发明提供的脂质体组合物的方法。

CN 1980637 B

1. 用于施用抗肿瘤治疗性喜树碱实体的组合物,其包含脂质体,所述脂质体包含一种或多种脂类和包囊在所述脂质体中的抗肿瘤治疗性喜树碱实体,和脂质体包囊的阴离子,所述阴离子选自八硫酸蔗糖和六磷酸肌醇,

其中所述脂质体是在介质中并且具有所述喜树碱实体包囊在其中的内部空间,所述喜树碱实体是伊立替康或托泊特坎,并且脂质体组合物的体内抗肿瘤活性比游离非脂质体形式的实体的抗肿瘤活性高至少四倍,

其中所述脂质体含有铵化合物,

所述铵化合物选自二甲铵、二甲基乙醇铵、二乙铵、三甲铵和三乙铵。

2. 权利要求 1 所述的组合物,其中施用于哺乳动物的所述脂质体组合物的毒性比以游离非脂质体形式施用于所述哺乳动物的所述实体的毒性低至少两倍。

3. 权利要求 1 所述的组合物,其中施用于哺乳动物的所述脂质体组合物的毒性比以游离非脂质体形式施用于所述哺乳动物的所述实体的毒性低至少四倍。

4. 权利要求 1 所述的组合物,其中所述阴离子是八硫酸蔗糖和所述喜树碱实体是作为盐酸伊立替康的阳离子。

5. 权利要求 4 所述的组合物,其中所述八硫酸蔗糖阴离子和所述盐酸伊立替康阳离子以酸或盐的形式被包含。

6. 权利要求 5 所述的组合物,其中所述盐酸伊立替康以超过所述介质中的所述盐酸伊立替康的浓度存在于所述内部空间中。

7. 权利要求 5 所述的组合物,其中以所述组合物施用到哺乳动物血流中的所述实体从所述脂质体释放的半释放期是至少 10 小时。

8. 权利要求 5 所述的组合物,其中以所述组合物施用到哺乳动物血流中的所述实体从所述脂质体释放的半释放期是至少 24 小时。

9. 权利要求 1-8 中任一项所述的组合物,其中所述喜树碱实体以每摩尔脂类至少约 0.30 摩尔药物的浓度被包载。

10. 权利要求 1-8 中任一项所述的组合物,其中所述喜树碱实体以每摩尔脂类约 0.40 摩尔药物至每摩尔脂类约 1.7 摩尔药物之间的浓度被包载。

11. 权利要求 1-8 中任一项所述的组合物,其中所述哺乳动物是小鼠。

12. 权利要求 1-8 中任一项所述的组合物,其中所述抗肿瘤活性在 HT-29 肿瘤模型或 BT-474 肿瘤模型中在体内被测定。

13. 权利要求 7-8 任一项所述的组合物,其中所述哺乳动物是大鼠。

## 用于药物输送的脂质体

[0001] 优先权声明

[0002] 本申请要求 2004 年 5 月 3 日提交的美国临时专利申请第 60/567, 921 号的优先权, 该临时申请以参考方式整体并入本文, 用于所有目的。

### 发明领域

[0003] 本发明总体上涉及脂质体领域, 更具体地涉及用于输送治疗实体或诊断实体的脂质体组合物。

[0004] 发明背景

[0005] 脂质体或脂双层小泡已经用于或被提议用于各种研究、工业和医疗的应用中, 特别是体内用作诊断化合物或治疗化合物的载体。参见例如: Lasic, D. *Liposomes: from physics to applications*. Elsevier, Amsterdam, 1993; Lasic, D 和 Papahadjopoulos, D., eds. *Medical Applications of Liposomes*. Elsevier, Amsterdam, 1998。脂质体的通常特征是具有通过一个或多个双层组成的膜与外部介质隔开的内部空间, 形成显微囊或小泡。脂质体的双层膜典型地由包含空间上隔开的亲水性区域和疏性区域的脂质, 即合成的或天然来源的两亲性分子形成, 参见 Lasic D., 1993, 见上文。脂质体的双层膜也可以由两亲性聚合物和表面活性剂 (polymerosomes、niosomes (非离子表面活性剂囊泡)) 形成。脂质体通常充当能够拥有有用特性或发挥有用活性的各种实体的载体, 这些实体不受限制地, 例如是化学化合物、化合物的组合、合成或天然来源的超分子复合体、遗传物质、活生物体、其部分、或其衍生物。为了实现这一目的, 制备脂质体, 以便以掺入脂质体的形式 (liposome-incorporated form) 包含期望的实体。将期望的实体掺入脂质体的过程常常称为“装载”。掺入脂质体的实体可以完全或部分地位于脂质体的内部空间, 在脂质体的双层膜内, 或与脂质体膜的外表面结合。实体掺入脂质体的过程也称为包囊或包载。

[0006] 这三个术语在本文中可替换使用, 具有相同的意思。用脂质体包囊实体的目的常常是为了保护实体免遭环境破坏, 同时使包囊的实体主要在实体活性有利的位置或环境中发挥其活性, 而在这种活性可能无用或不利的其他位置不大发挥其活性。该现象称为输送 (delivery)。例如, 脂质体内的药物物质可免遭体内酶的破坏, 但在疾病位置由脂质体释放出来并进行治疗。

[0007] 理想地, 这样的脂质体可以被制备用于包含期望的化合物, 具有下述特性: (i) 高装载效率, 即与被带入包囊过程的量相比, 具有高百分比的包囊的实体; (ii) 每单位脂质体双层物质具有大量包囊的实体; (iii) 高浓度的包囊实体, 和 (iv) 稳定的形式, 即当储存或通常在脂质体出现在期盼脂质体包埋的实体发挥其预期活性的位置或环境之前仅仅少量的包囊实体释放 (渗漏)。

[0008] 因此, 本领域要求提供可用于输送各种化合物, 尤其是治疗实体、诊断实体或成像实体的各种脂质体组合物。

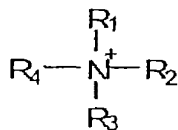
[0009] 发明概述

[0010] 本发明基于这样的发现, 取代的铵和聚阴离子可用于将实体装入并保持在脂质体

中。因此,本发明提供了用于输送各种实体的方法和脂质体组合物,尤其是治疗实体,即在活生物体如人、植物或动物中诊断、预后、测试、筛选、治疗或预防不利状态如疾病中有用的实体。

[0011] 在一种实施方案中,本发明提供了含有处于介质中的脂质体的组合物,其中脂质体里面含有取代的铵,

[0012]



(I)

[0013] 其中  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  和  $R_4$  中的每一个独立地是氢或有机基团,具有总计达 18 个的碳原子,包括 18 个在内,其中  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  和  $R_4$  中的至少一个是有机基团,其中该有机基团独立地是具有可达 8 个碳原子的烃基,并且是烷基、亚烷基、杂环烷基、环烷基、芳基、烯基或环烯基基团或其羟基-取代的衍生物,任选地,在它的烃链中包括 S、O 或 N 原子,形成醚、酯、硫醚、胺或酰胺键,其中  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  和  $R_4$  中的至少三个是有机基团,或取代的铵是位阻铵 (sterically hindered ammonium),如,例如,其中有机基团中的至少一个具有直接连接到铵氮原子的仲碳原子或叔碳原子。优选地,包囊入脂质体的取代的铵化合物的酸性(去质子化)解离常数的负对数(pKa),至少约 8.0、至少约 8.5、至少约 9.0、至少约 9.5 或至少约 10.0,这是在环境温度下于含水溶液中测定的。

[0014] 在另一实施方案中,本发明提供了含有处于介质中的脂质体的组合物,其中脂质体的内部空间含有聚阴离子,其中聚阴离子是聚阴离子化的多元醇或聚阴离子化的糖。脂质体优选地含有能够将实体装载入脂质体的跨膜梯度。在一种实施方案中,跨膜梯度是由铵、季铵、或取代的伯铵、仲铵或叔铵化合物构成的梯度,所述取代的伯铵、仲铵或叔铵化合物在环境温度下在稀释的含水溶液中的酸性(去质子化)解离常数(pKa)的负对数至少约 8.0、至少约 8.5、至少约 9.0、至少约 9.5 或至少约 10.0。脂质体任选地含有包埋的实体,例如治疗剂、可检测标记、或球形阳离子有机分子。

[0015] 在还有另一实施方案中,本发明提供的组合物还包含包囊入本发明脂质体的实体。优选地,实体包囊入脂质体的内部空间内。例如,脂质体的内部空间还包含抗肿瘤治疗剂,其中组合物对对象的毒性水平至少等于或小于在不用组合物的情况下给予对象的抗肿瘤治疗剂的毒性水平。

[0016] 在还有另一实施方案中,本发明提供的组合物是包含喜树碱化合物的脂质体组合物。该组合物的抗癌活性比在组合物不存在下同样给药的喜树碱化合物的抗癌活性高至少 2 倍、4 倍、或 10 倍,同时组合物的毒性不超过在组合物不存在下同样给药的喜树碱化合物的毒性,要低至少 2 倍、或低至少 4 倍。在一种实施方案中,喜树碱化合物是药物前体,并以每 1mg 脂质体膜物质例如脂类,至少 0.1mg、至少 0.2mg、至少 0.3mg、0.5mg 或至少 1mg 的量包含在脂质体中。喜树碱化合物优选包囊在脂质体中,实质上包囊在脂质体的内部空间。在一个例子中,喜树碱化合物是伊立替康(irinotecan(CPT-11))。

[0017] 在还有另一实施方案中,本发明提供的组合物是长春花碱(vinca alkaliod)或其衍生物的脂质体组合物。在体内暴露于哺乳动物血液 24 小时后,该组合物在脂质体内

24-小时时的药物保持量为原始药物装载量的至少 50%、至少 60%或至少 70%。长春花碱或其衍生物优选包囊在脂质体中,实质上包囊在脂质体的内部空间。哺乳动物的例子是大鼠。示例性长春花碱及其衍生物是长春新碱 (vincristine)、长春碱 (vinblastine)、长春瑞滨 (vinorelbine)。

[0018] 在还有另一实施方案中,本发明提供了将实体包囊入脂质体的方法。该方法包括将本发明的脂质体与实体,例如治疗实体或可检测实体接触。优选地,在本发明取代的铵或聚阴离子在介质中的浓度低于在脂质体内部空间中的浓度的条件下进行接触。在一种实施方案中,脂质体组合物与实体在含水介质中接触。

[0019] 在还有另一实施方案中,本发明提供了将实体包囊入脂质体的方法。该方法包括将本发明含脂质体的组合物与实体前体 (pre-entity) 接触,其中实体前体能够在一定条件下转化为实体,并在脂质体内部提供将实体前体在脂质体内转化为实体的条件。在一种情况下,实体是有机化合物,实体前体是其碱性衍生物。

[0020] 在还有另一实施方案中,本发明提供了用于制备脂质体包囊的实体的试剂盒。该试剂盒包含携带本发明脂质体的容器,以及任选地包含含有实体的容器,和/或例如用于包囊实体的用户说明书。

[0021] 附图简述

[0022] 图 1 显示了在将装载 CPT-11 的脂质体经静脉丸剂注射 (i. v. bolus) 给药大鼠之后,脂质体脂类 (圆圈) 和药物 (三角形) 的血液药物动力学。脂质体使用 TEA-Pn 方法装载 (参见实施例 9)。

[0023] 图 2 显示了经静脉丸剂注射施用用 TEA-Pn 方法装载 CPT-11 的脂质体后,在大鼠血液内的体内药物 - 脂质体脂类比率的动态学 (参见实施例 9)。

[0024] 图 3 显示了在裸鼠内游离 CPT-11 和脂质体 CPT-11 对 BT-474 人乳腺癌异种移植物的抗肿瘤功效。“对照”指仅用无药物和无脂质体的载体治疗的小鼠 (参见实施例 10)。

[0025] 图 4 显示了在用游离 CPT-11 或脂质体 CPT-11 对携带 BT-474 肿瘤的裸鼠进行治疗期间的动物体重动态学。“对照”指仅用无药物和无脂质体的载体治疗的小鼠 (参见实施例 10)。

[0026] 图 5 显示了经静脉丸剂注射施用用 TEA-SOS 方法装载 CPT-11 的脂质体后,在大鼠血液内的体内药物 - 脂质体脂类比率的动态学 (参见实施例 14)。

[0027] 图 6 显示了在裸鼠中游离 CPT-11 和脂质体 CPT-11 对 HT-29 人结肠癌异种移植物的抗肿瘤功效。图上的文字说明表示药物装载方法和每次注射的给药剂量。“盐水对照”指仅用无药物和无脂质体的载体治疗的小鼠 (参见实施例 15)。

[0028] 图 7 显示了在用游离 CPT-11 或脂质体 CPT-11 制剂对携带 HT-29 肿瘤的裸鼠进行治疗期间的动物体重动态学。误差条 (error bars) 代表了数据的标准偏差。“盐水对照”指仅用无药物和无脂质体的载体治疗的小鼠 (参见实施例 15)。

[0029] 图 8A 显示了经静脉丸剂注射对大鼠施用装载托泊特坎的脂质体后,脂质体脂类的血液药物动力学。图上说明文字表示药物装载方法和脂质体的药物含量 (参见实施例 24)。

[0030] 图 8B 显示了经静脉丸剂注射施用装载托泊特坎的脂质体后,在大鼠血液内的体内药物 - 脂质体脂类比率的动态学。图上说明文字表示药物装载方法和脂质体的药物含量

(参见实施例 24)。

[0031] 图 9 显示了游离托泊特坎、脂质体托泊特坎或 HER2- 定向免疫脂质体托泊特坎 (TEA-Pn 方法) 对 SKBr-3 乳腺癌细胞的体外细胞毒性 (参见实施例 27)。

[0032] 图 10 显示了游离托泊特坎、脂质体托泊特坎或 HER2- 定向免疫脂质体托泊特坎 (TEA-SOS 方法) 对 SKBr-3 乳腺癌细胞的体外细胞毒性 (参见实施例 32)。

[0033] 图 11 显示了不同托泊特坎 (TPT) 制剂在裸鼠中对 BT-474 人乳腺癌异种移植物的抗肿瘤功效。“盐水对照”指仅用无药物和无脂质体的载体治疗的小鼠 (参见实施例 29)。

[0034] 图 12 显示了用游离托泊特坎 (TPT)、脂质体托泊特坎 (Ls-TPT) 或抗 -HER2 免疫脂质体托泊特坎 (F5 ILs-TPT) 对含 BT-474 肿瘤的裸鼠进行治疗期间动物体重的动态学。“对照”指仅用无药物和无脂质体的载体治疗的小鼠 (参见实施例 29)。

[0035] 图 13A 显示了在裸鼠中托泊特坎制剂对 BT-474 人乳腺癌异种移植物的抗肿瘤功效。游离托泊特坎 (游离 TPT) 或脂质体托泊特坎 (Ls-TPT) 以它们最大耐受剂量的八分之一给药。误差棒代表数据的标准偏差。“对照”指仅用无药物和无脂质体的载体治疗的小鼠 (参见实施例 31)。

[0036] 图 13B 显示了在裸鼠中托泊特坎制剂对 BT-474 人乳腺癌异种移植物的抗肿瘤功效。游离托泊特坎 (游离 TPT) 或脂质体托泊特坎 (Ls-TPT) 以它们最大耐受剂量的四分之一给药。误差棒代表数据的标准偏差。“对照”指仅用无药物和无脂质体的载体治疗的小鼠 (参见实施例 31)。

[0037] 图 13C 显示了在裸鼠中托泊特坎制剂对 BT-474 人乳腺癌异种移植物的抗肿瘤功效。游离托泊特坎 (游离 TPT) 或脂质体托泊特坎 (Ls-TPT) 以它们最大耐受剂量的二分之一给予。误差棒代表数据的标准偏差。“对照”指仅用无药物和脂质体的载体治疗的小鼠 (参见实施例 31)。

[0038] 图 13D 显示了在裸鼠中托泊特坎制剂对 BT-474 人乳腺癌异种移植物的抗肿瘤功效。游离托泊特坎 (游离 TPT) 或脂质体托泊特坎 (Ls-TPT) 以它们的最大耐受剂量给药。误差棒代表数据的标准偏差。“对照”指仅用无药物和无脂质体的载体治疗的小鼠 (参见实施例 31)。

[0039] 图 14 显示了用以它们的最大耐受剂量给药的游离托泊特坎 (游离 TPT) 或脂质体托泊特坎 (Ls-TPT) 对携带 BT-474 肿瘤的裸鼠治疗期间的平均体重动力学。“对照”指仅用无药物和无脂质体的载体治疗的小鼠 (参见实施例 31)。

[0040] 图 15 显示了游离 6-(3-氨基基)-玫瑰树碱 (游离 APE)、脂质体 6-(3-氨基基)-玫瑰树碱 HER2- 定向免疫脂质体 6-(3-氨基基)-玫瑰树碱 (F5 ILs-AE)) 对 BT-474 乳腺癌细胞的体内细胞毒性 (参见实施例 35)。

[0041] 图 16 显示了游离 6-(3-氨基基)-玫瑰树碱 (游离 APE)、脂质体 6-(3-氨基基)-玫瑰树碱或 EGFR- 定向免疫脂质体 6-(3-氨基基)-玫瑰树碱 (C225-ILs-APE) 对具有低 (MCF-7) 或高 (MDA-MB468) EGF 受体表达水平的乳腺癌细胞的体外细胞毒性 (参见实施例 36)。

[0042] 图 17 显示了在经静脉丸剂注射将 APE 脂质体给予大鼠后, 脂质体制剂的 6-(3-氨基基) 玫瑰树碱 (APE) 的血液药物动力学特性: 脂质体脂类 (图 A, 空圆圈)、药物 (图 A, 实心圆圈) 的血液药物动力学, 和药物 - 脂质体比率的动态学 (图 B) (参见实施例 37)。

[0043] 图 18 显示了在经静脉丸剂注射将长春瑞滨脂质体给予大鼠后,长春瑞滨配制的脂质体 (Ls-VRB) 和抗-HER2 脂质体 (F5-ILs-VRB) 的血液药物动力学特性:脂质体脂类(图 A)、药物(图 B)的血液药物动力学,和药物-脂质体比率的动态学(图 C)(参见实施例 43)。

[0044] 图 19 显示了在经静脉丸剂注射将装载长春瑞滨的脂质体给予大鼠后的脂质体脂类的血液药物动力学特性。脂质体使用预先包载的糖酐酯三乙铵 (DS-TEA)、糖酐酯铵 (DS-A) 或硫酸铵 (S-A) 装载(参见实施例 44)。

[0045] 图 20 显示了在经静脉丸剂注射施用使用预先包载的糖酐酯三乙铵 (DS-TEA)、糖酐酯铵 (DS-A) 或硫酸铵 (S-A) 装载长春瑞滨的脂质体后,在体内大鼠血液中的药物-脂质体脂类比率的动态学(参见实施例 44)。

[0046] 图 21 显示了在经静脉丸剂注射将装载长春瑞滨的脂质体给予大鼠之后脂质体脂类的血液药物动力学。脂质体使用预先包载的蔗糖八硫酸铵(蔗糖八硫酸三乙铵(triethylammonium sucroseoctasulfate))(TEA-SOS) 装载,并具有如在图上说明文字中所表示的平均大小(参见实施例 45)。

[0047] 图 22 显示了在经静脉丸剂注射施用装载长春瑞滨的脂质体之后,大鼠血液内的体内药物-脂质体脂类比率动态学。脂质体使用预先包载的蔗糖八硫酸铵(TEA-SOS) 装载,并具有在如图上说明文字中所表示的平均大小(参见实施例 45)。

[0048] 图 23 显示了在经静脉丸剂注射施用使用 TEA-SOS 方法配制入脂质体 (Ls-VRB) 或抗-HER2 免疫脂质体 (F5-ILs-VRB) 的长春瑞滨后,大鼠内脂质体脂类的血液药物动力学(参见实施例 46)。

[0049] 图 24 显示了在经静脉丸剂注射施用使用 TEA-SOS 方法配制入脂质体 (Ls-VRB) 或抗-HER2 免疫脂质体 (F5-ILs-VRB) 的长春瑞滨后,大鼠血液内的体内药物-脂质体脂类比率的动力学(参见实施例 46)。

[0050] 图 25 显示了游离长春瑞滨(游离 VRB)、脂质体长春瑞滨 (Ls-VRB) 或 HER2-定向免疫脂质体长春瑞滨 (F5-ILs-VRB) 对 HER2-过量表达的人乳腺癌细胞 MDA-MB-453 的体外细胞毒性(参见实施例 48)。

[0051] 图 26 显示了游离长春瑞滨(游离 VRB)、脂质体长春瑞滨 (Ls-VRB) 或 HER2-定向免疫脂质体长春瑞滨 (F5-ILs-VRB) 对 HER2-过量表达的 CaLu-3 人非小细胞性肺癌细胞的体外细胞毒性(参见实施例 49)。

[0052] 图 27 显示了游离长春瑞滨(游离 VRB)、脂质体长春瑞滨 (Ls VRB/SOS-TEA) 或 HER2-定向免疫脂质体长春瑞滨 (F5-ILs VRB/SOS-TEA) 对 HER2-过量表达的人乳腺癌细胞 SKBr-3 的体外细胞毒性(参见实施例 50)。

[0053] 图 28 显示了在裸鼠中游离长春瑞滨(游离 VRB) 或脂质体长春瑞滨 (LsVRB) 对 HT-29 人结肠癌异种移植物的抗肿瘤功效。“盐水对照”指仅用无药物和无脂质体的载体治疗的小鼠。误差棒代表数据的标准偏差(参见实施例 51)。

[0054] 图 29 显示了在用游离长春瑞滨(游离 VRB)、脂质体长春瑞滨 (Ls VRB) 或用载体(盐水)对携带 HT-29 肿瘤的裸鼠治疗期间的平均体重动力学。误差棒代表数据的标准偏差(参见实施例 51)。

[0055] 图 30 显示了游离长春瑞滨(游离 VRB) 或脂质体长春瑞滨 (Ls VRB) 在同源 C-26 鼠结肠癌模型中的抗肿瘤功效。每次注射的药物的剂量在图上说明文字上示出。误差棒代

表数据的标准偏差。“盐水对照”指仅用无药物和无脂质体的载体治疗的小鼠（参见实施例 52）。

[0056] 图 31 显示了在用不同剂量的游离长春瑞滨（游离 VRB）、脂质体长春瑞滨（Ls VRB）或仅用载体（盐水）对携带同源 C-26 鼠结肠癌肿瘤的小鼠进行治疗期间的平均体重的动态学。每次注射的药物的剂量在图上说明文字上示出（参见实施例 52）。

[0057] 图 32 显示了在裸鼠中，游离长春瑞滨（游离药物）或利用 TEA-SOS 方法制备的 scFv F5- 连接的抗 -HER2 免疫脂质体长春瑞滨（F5-ILs-VRB TEA-SOS）、通过 TEA-Pn 方法制备的抗 -HER2 免疫脂质体长春瑞滨（F5-ILs-VRB TEA-Pn）对 HER2- 过量表达的人乳腺癌（BT-474）异种移植物的抗肿瘤功效。“盐水对照”指仅用无药物和无脂质体的载体治疗的小鼠（参见实施例 53）。

[0058] 图 33 显示了在用游离长春瑞滨、使用 TEA-SOS 方法制备的 scFv F5- 连接的抗 -HER2 免疫脂质体长春瑞滨、通过 TEA-Pn 方法制备的抗 -HER2 免疫脂质体长春瑞滨或仅用载体对携带 HER2- 过量表达的人乳腺癌（BT-474）异种移植物的鼠进行治疗期间的平均体重的动力学。对符号的解释，参见图 32 的文字说明（也请参见实施例 53）。

[0059] 图 34 显示了在裸鼠中，游离长春瑞滨（游离药物）或使用不同数量的 PEG- 脂类制备的 scFvF5- 连接的抗 -HER2 免疫脂质体长春瑞滨对过量表达 HER2 的人乳腺癌（BT-474）异种移植物的抗肿瘤功效。误差棒代表数据的标准偏差。“载体对照”指仅用无药物和无脂质体的载体治疗的小鼠（参见实施例 54）。

[0060] 图 35 显示了在裸鼠中，游离长春瑞滨（游离 NAV）、脂质体长春瑞滨（NAV Lip）或 FC225Fab' - 连接的抗 -EGFR- 免疫脂质体长春瑞滨（C225-NAV Lip）对过量表达 EGFR 的人成胶质细胞瘤（U87）异种移植物的抗肿瘤功效。“盐水”指仅用无药物和无脂质体的载体治疗的小鼠（参见实施例 55）。

[0061] 图 36 显示了在经静脉丸剂注射施用使用硫酸三乙铵方法配制入脂质体的阿霉素后，在大鼠血液内的脂质体脂类的血液药物动力学和药物 / 脂质体脂类比率的动态学（参见实施例 56）。

[0062] 图 37 显示了在裸鼠中，脂质体阿霉素（Ls-Dox）或使用不同数量的 PEG- 脂类制备的 scFv F5- 连接的抗 -HER2 免疫脂质体阿霉素（F5 ILs-Dox）对 HER2- 过量表达的人乳腺癌（BT-474）异种移植物的抗肿瘤功效。图上面的文字说明显示了用摩尔 % 的脂质体磷脂表达的 PEG- 脂类的数量。“盐水对照”指仅用无药物和无脂质体的载体治疗的小鼠（参见实施例 57）。

[0063] 图 38 显示了脂质体长春碱在大鼠中的血液药物动力学（参见实施例 58）。

[0064] 图 39 显示了经静脉丸剂注射施用脂质体长春碱后，大鼠血液内药物 / 脂质体脂类比率的变化（参见实施例 58）。

[0065] 图 40 显示了游离长春新碱（游离 VCR）、脂质体长春新碱（Ls-VCR）或 HER2- 定向免疫脂质体长春新碱（F5-ILs-VCR）对 HER2- 过量表达的人乳腺癌细胞 SKBr-3 的体外细胞毒性（参见实施例 61）。

[0066] 图 41 显示了经静脉丸剂注射施用配制入不同平均大小（在图上面的文字说明中示出）的脂质体的长春新碱后，大鼠中脂质体脂类的血液药物动力学（参见实施例 62）。

[0067] 图 42 显示了经静脉丸剂注射施用配制入不同平均大小（在图上面的文字说明中



示出)的脂质体的长春新碱后,大鼠血液中药物/脂质体脂类比率的动态学(参见实施例62)。

[0068] 图43显示了在裸鼠中,游离长春新碱(游离VCR)、通过柠檬酸三乙铵方法制备的脂质体长春新碱(Ls-VCR柠檬酸)、通过蔗糖八硫酸三乙铵(三乙铵sucrooctasulfate)方法制备的脂质体长春新碱(Ls-VCR SOS)、或通过蔗糖八硫酸三乙铵方法制备的scFv F5-连接的抗-HER2免疫脂质体长春新碱(F5ILs-VCR SOS)对HER2-过量表达的人乳腺癌(BT-474)异种移植物的抗肿瘤功效。“盐水对照”指仅用无药物和无脂质体的载体治疗的小鼠(参见实施例64)。

[0069] 图44显示了在用游离长春新碱(游离VCR)、通过柠檬酸三乙铵方法制备的脂质体长春新碱(Ls-VCR柠檬酸)、通过蔗糖八硫酸三乙铵方法制备的脂质体长春新碱(Ls-VCR SOS)、通过蔗糖八硫酸三乙铵方法制备的scFv F5-连接的抗-HER2免疫脂质体长春新碱(F5ILs-VCR SOS)或仅用载体(盐水对照)对携带HER2-过量表达的人乳腺癌(BT-474)异种移植物的鼠进行治疗期间的平均体重动态学(参见实施例64)。

[0070] 图45显示了游离长春新碱(长春新碱)、脂质体长春新碱(nt-vcr)或C225 Fab'-连接的抗-EGFR免疫脂质体长春新碱(C225-vcr)对裸鼠中的EGFRvIII-过量表达的人脑癌(U87)异种移植物的抗肿瘤功效。“盐水”指仅用无药物和无脂质体的载体治疗的小鼠(参见实施例65)。

[0071] 图46显示了在经静脉丸剂注射施用脂质体CPT-11后,大鼠血液中CPT-11的血液药物动力学和以活性(内酯)形式存在的CPT-11的百分比的动态学(参见实施例69)。

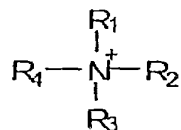
[0072] 图47显示了在经静脉丸剂注射施用CPT-11溶液(游离CPT-11)后,大鼠血液中CPT-11的血液药物动力学和以活性(内酯)形式存在的CPT-11的百分比的动态学(参见实施例69)。

[0073] 优选实施方案详述

[0074] 本发明总体上涉及用于输送各种实体,特别是治疗剂和成像剂的方法和脂质体组合物。本发明发现取代的铵和聚阴离子可用于将实体例如化合物装载并保留在脂质体内。因此,本发明提供了含有取代的铵和/或聚阴离子的脂质体组合物和试剂盒以及制备这些脂质体组合物的方法。

[0075] 根据本发明的一个特征,提供了在内部空间含有至少一个或多个取代的铵化合物的脂质体组合物,该取代的铵化合物具有下式:

[0076]



(I)

[0077] 其中,  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  和  $R_4$  中每一个独立地是氢或有机基团,其中,  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  和  $R_4$  中至少一个是有机基团,例如烷基、亚烷基、杂环烷基、环烷基、芳基、链烯基或环烯基基团,其羰基-取代的衍生物,任选地在它的烃链中包括S、O或N原子,例如在其上形成醚(包括乙缩醛或酮缩醛)、酯、硫化物(硫醚)、胺或酰胺键。如果  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  和  $R_4$  中三个以下是有机基团,那么根据本发明,至少一个,优选两个有机基团具有直接连接到铵的氮上的仲碳或叔碳

原子（即碳原子分别具有 2 或 3 个碳碳键），即取代的铵是位阻铵。一般而言，已经知道，在本发明脂质体内部空间中存在的可滴定铵如未取代的铵离子（ $\text{NH}_4^+$ ）、以及伯和仲直链烷基铵离子，例如通过“活性”、“远距离”或“跨膜梯度驱动”装载的机理，赋予其对弱的两亲性碱增强的包裹能力。（Haran, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1993, v. 1152, p. 253-258; Maurer-Spurei, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, v. 1416, p. 1-10）。然而，这些氮化合物具有氢原子，氢原子容易发生亲核取代反应，此外还与脂质体 - 包载的实体发生化学反应，并因此能够在脂质体装载（包载）期间或之后削弱实体的化学完整性。因此，所包载的取代的铵化合物在化学上更具惰性，缺少不稳定的或容易与脂质体成分发生反应的化学功能是期望的，其中所述脂质体成分可以包括包裹的实体。意想不到地是，我们发现了这样的脂质体组合物不但显示出突出的实体 - 装载容量，也提高了脂质体 - 包载的实体的稳定性，例如在活体中药物不会过早从脂质体释放，该脂质体组合物在它们的内部空间包含没有取代氢的取代的叔铵和季铵，或位阻伯铵或仲铵，其中，通往铵氢原子的通道在空间上受阻于附近大的有机基团，如具有连接到铵氮的一个或两个仲碳原子或叔碳原子的有机基团。

[0078] 在一个实施方案中，脂质体 - 包载的取代的铵化合物在药学上是惰性的，也就是说，当给予活对象如人或动物时，并不带来不利的生理应答，其量在脂质体膜物质足以输送有效剂量的脂质体包载的实体的量的范围内。在另一实施方案中，本发明取代的铵对于对象具有可接受的毒性水平。通常可接受的毒性水平指本发明取代的铵的毒性剂量，例如最大耐受剂量（MTD），或导致 50% 死亡的剂量（LD50）比装载在本发明脂质体内的脂质体 - 包载的实体如药物的毒性剂量高至少两倍、至少四倍、至少八倍或至少十倍。例如，硫酸三乙铵具有根据本发明可接受的毒性水平，因为它的 LD50 比阿霉素——一种抗癌药物的 LD50 高约 40 倍。如果还不清楚的话，取代的铵以及感兴趣的化学实体的毒性水平或生理应答可容易地用生物学领域技术人员熟知的常规技术确定。参见例如 S. C. *Drug Safety Evaluation*. Wiley, New York, 2002。本文实施例 16 描述了对游离的药物和 / 或脂质体化配制药物的毒性进行定量的一种方法。

[0079] 在一个优选的实施方案中， $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  或  $R_4$  中取代的有机基团的大小和物化特性足以确保取代的铵在含水环境中基本上形成真（分子）溶液，而不是胶束、双层或类似的自组装结构。因此，本发明取代的铵优选很少或基本上不分布入脂质体的双层部分中，因而使包载取代铵的脂质体不稳定、溶解或渗透的风险最小。

[0080] 取代的铵的有机基团一般是烃，含有高达 8 个碳原子（包括 8 个碳原子）、高达 6 个碳原子（包括 6 个碳原子）或高达 4 个碳原子（包括 4 个碳原子），并且取代基团总共包含性地含有高达 18、高达 16、高达 12、或高达 9 个碳原子。这些取代性烃基团包括相互连接的伯碳、仲碳或叔碳原子的任何组合，以及末端直接连接到铵氮形成杂环的环烷基基团，或末端直接连接到铵氢 - 取代基团的碳原子上的环烷基基团。这些取代的烷基基团在它们的碳链中也可以包括杂原子，例如氧、氮或硫，形成功能基团，例如醚、乙缩醛、胺或硫化物基团，以及形成官能团，例如连接到烷基碳链的羟基。本发明有机基团的例子包括但是不限于烷基、亚烷基、杂环烷基、环烷基、芳基、链烯基、环烯基或其羟基 - 取代的衍生物，例如羟基 - 取代的亚烷基，形成包括取代的铵中的 N 的环。

[0081] 在另一实施方案中，取代的铵是：杂环铵，即其中  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  或  $R_4$  中的至少两个形成环的铵；位阻伯铵；或位阻仲铵。一般而言，位阻伯铵或位阻仲铵包括  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  和  $R_4$  中的一

一个或两个被空间上使分子拥挤的烷基基团取代的任何取代的铵,例如  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  和  $R_4$  中的一个或两个被一个或两个环烷基基团或烷基基团取代的任何取代的铵,其中环烷基基团或烷基基团具有至少一个连接到取代的铵的氮的仲烷基碳原子或叔烷基碳原子。这种杂环的位阻伯铵和位阻仲铵不受限制地包括异丙基乙基铵、异丙基甲基铵、二异丙基铵、叔丁基乙基铵、二环己基铵、质子化形式的吗啉、嘧啶、哌啶、吡咯烷、哌嗪、叔丁胺、2-氨基-2-甲基丙醇-1,2-氨基-2-甲基-丙二醇-1,3 和三-(羟乙基)-氨基甲烷。这些取代的铵化合物通常在商业上可以以各种盐的形式获得,或通过用酸中和由它们相应的胺制备而得。

[0082] 在还有另一实施方案中,取代的铵是叔铵或季铵,包括但是不限于三甲铵、三乙铵、三丁铵、二乙基甲基铵、二异丙基乙基铵、三异丙基铵、N-甲基吗啉鎓 (N-methylmorpholinium)、N-羟乙基哌啶鎓 (N-hydroxyethylpiperidinium)、N-甲基吡咯烷鎓 (N-methylpyrrolidinium) 和 N, N' -二甲基哌嗪鎓 (N, N' -dimethylpiperazinium)、四甲基铵、四乙基铵和四丁基铵。这些取代的铵化合物通常在商业上可以以各种盐的形式获得,或通过用酸中和由它们相应的胺制备而得。

[0083] 在还有另一实施方案中,本发明取代的铵化合物是球形阳离子化合物,也就是说,在实体包囊条件下,一般是在 pH 为约 pH2 和约 pH8 之间的含水溶液中,带有净正电荷,例如这是对氮原子离子化(质子化)的结果。

[0084] 在还有另一实施方案中,包囊入脂质体的取代的伯铵、仲铵或叔铵化合物的酸性(去质子化)解离常数的负对数(pKa)至少约 8.0、至少约 8.5、至少约 9.0、至少约 9.5、至少约 10.0,这是在环境温度中(典型地 25°C)稀释的水溶液中测定的。参数 pKa 是铵化合物众所周知的特征,通常表征它们的碱性强度,并且测定 pKa 的方法是本领域传统的且常规的方法。许多胺和它们质子化形式(铵)的 pKa 值在化学和药理学参考书中以表格的形式列出。参见例如 IUPAC Handbook of Pharmaceutical Salts, ed. by P. H. Stahl 和 C. G. Wermuth, Wiley-VCH, 2002; CRCHandbook of Chemistry and Physics, 82nd Edition, ed. by D. R. Lide, CRC Press, Florida, 2001, p. 8-44 至 8-56。一般而言,较高的 pKa 表征较强的碱。示范性取代的铵化合物以及未取代的铵(作为它们共轭的胺碱列出)具有如下 pKa 值:吡咯烷, 11.31;哌啶, 11.12;二异丙胺, 11.05;二乙胺, 10.93;三乙胺, 10.75;三甲胺, 10.73;叔丁胺, 10.68;环己胺, 10.66;甲胺, 10.66;乙胺, 10.65;丙胺, 10.54;异丙胺, 10.53;N-乙基哌啶, 10.45;二环己胺, 10.4;N-甲基哌啶, 10.38;二乙基甲胺, 10.35;二甲基丙胺, 10.15;三甲胺, 9.8;哌嗪, 9.73(I), 5.33(II);2-氨基-2-甲基丙醇, 9.69;N, N' -二甲基哌嗪, 9.66(I), 5.2(II);二乙基-(2-羟乙基)胺, 9.58;乙醇胺, 9.5;N-羟乙基吡咯烷, 9.44;二乙醇胺, 9.28;氨(ammonia), 9.27;二甲基-(2-羟乙基)胺, 8.83;2-氨基-2-甲基丙二醇-1,3, 8.8;吗啉, 8.5;三-(羟甲基)-氨基甲烷, 8.3;N-甲基葡糖胺, 8.03;三乙醇胺, 7.76;N-乙基吗啉, 7.67;N-羟乙基吗啉, 7.39;咪唑, 7.03;嘧啶, 5.23。通常,烷基或环烷基基团取代铵化合物中的氢会增加 pKa 值。明显地,与不含羟基或醚官能的类似的取代的氨相比,取代的烷基基团中的多羟基或醚官能,或在含氮杂环基团中存在的芳香性会减少 pKa 值。具有一个以上铵基团的化合物通常第二个或随后的铵基团的 pKa 比第一个铵基团的 pKa 低得多。我们意想不到地发现,具有较高 pKa 值——即由较强的碱性胺形成的取代的铵在稳定脂质体中的药物上比那些由弱胺形成的取代的铵更有效。例如,三乙铵(pKa = 10.75)的 IHP 和 SOS 盐在体内稳定脂质体中的伊立替康上比起三乙醇胺(pKa

= 7.76) 相应的盐明显更为有效 (实施例 73)。

[0085] 包含在本发明的脂质体组合物中的取代的铵可以是任何合适的形式,例如盐。合适的盐包括药学上可接受的盐。参见例如, P. H. Stahl, C. G. Wermuth (eds), Handbook of Pharmaceutical Salts, Wiley-VCH, Weinheim, 2002。在一个实施方案中,取代的铵是含有一个或多个本发明的聚阴离子的盐。理想地,本发明取代的铵盐中的相反离子(阴离子)赋予盐以水溶性,在药学上是惰性的,当与治疗剂或可检测实体接触时能够形成沉淀或凝胶,和/或渗透通过脂质体膜的能力小于取代的铵或它的非解离的胺形式。一般而言,本发明取代的铵盐在脂质体内,例如在含水空间中形成真溶液,并不形成显著量的凝聚相,如胶束、双层、凝胶或晶体相。取代的铵和盐 - 形成阴离子例如聚阴离子的相对量在化学当量点 (point of stoichiometric equivalency) 或附近,通常 pH 在 3-9 范围内,更通常在 pH4-8 范围,这例如取决于取代的铵离子的共轭碱的解离常数。

[0086] 一般而言,取代的铵包含在内部,也就是本发明脂质体的内部 (inner) (内部 (interior)) 空间。在一个实施方案中,取代的铵部分地或基本上完全从脂质体周围的外部介质中去除。用本领域技术人员熟知的任何合适的方法可以去除取代的铵,例如稀释、离子交换层析、尺寸排阻层析、透析、超滤、沉淀等。

[0087] 根据本发明的另一特征,提供了包含聚阴离子的脂质体组合物。本发明的聚阴离子可以是任何适宜的化学实体,该化学实体具有一个以上带负电荷的基团,从而导致在脂质体内部例如含水空间中产生两个以上单位的净负离子电荷。本发明的聚阴离子可以是二价阴离子、三价阴离子、多价阴离子、聚合的多价阴离子、聚阴离子化的多元醇或聚阴离子化的糖。毫无限制地,硫酸盐、磷酸盐、焦磷酸盐、酒石酸盐、琥珀酸盐、马来酸盐、硼酸盐和柠檬酸盐是这种二价和三价阴离子的例子。在一个优选实施方案中,本发明的聚阴离子是聚阴离子聚合物,具有有机(碳)或无机骨架,和许多阴离子官能团,即在中性含水溶液中可离子化成负电荷,并整合或附着到骨架的官能团。聚合物是天然或合成的化合物,通常具有高分子量,由重复的连接单元组成,每一个重复的连接单元是相对轻和简单的分子。示范性的聚阴离子化的聚合物是聚磷酸盐、聚乙烯基硫酸盐、聚乙烯基磺酸盐、阴离子化的聚丙烯酸聚合物、阴离子化的,例如多磺化聚胺 (polysulfonated polyamines), 例如多磺化聚(乙烯亚胺);多硫酸化、多羧化或多磷酸化多糖;酸性多氨基酸;多核苷酸;其他多磷酸化、多硫酸化、多磺化、多硼酸化、多羧化聚合物。这种多价阴离子和聚合物是本领域熟知的,许多可以通过商业渠道获得。本发明的聚合物阴离子优选是生物可降解的,也就是说,能够在活的生物体内降解成无毒的单位。示范性的生物可降解聚合物阴离子是聚磷酸盐。

[0088] 在另一优选的实施方案,聚阴离子是聚阴离子化的多元醇或聚阴离子化的糖。多元醇是具有许多连接到例如线性、支链或环状碳骨架上的羟基基团的有机分子。因此,多元醇可以用其他术语表征为多羟基化合物。优选地,多元醇上的多数碳原子是羟基化的。多元醇(多原子醇)是本领域熟知的分子。直链(线性或支链)和环状多元醇都可以被使用。不受限制地,本发明示范性的多元醇是:乙二醇;丙三醇、treitol、赤藓醇、季戊四醇、甘露醇、葡萄糖醇、山梨醇、山梨聚糖、木糖醇、乳糖醇、麦芽糖醇、果糖醇(fructitol)和肌醇。在一组互连的多数羟基化的碳原子内,糖通常包括环乙缩醛、环酮缩醛、酮或醛基团,或其加合物。糖常常是天然存在的化合物。糖在水介质中水解产生称为单糖的单元。典型地,在含水溶液中,五个或六个碳原子的单糖分子形成环状半缩醛——环状结构。优选地,本发

明的糖是单糖或二糖,也就是由一个或两个单糖单元组成,每一个单糖具有三到七个,优选三到六个碳原子。不受限制地,本发明示例性的糖是单糖己糖,如葡萄糖(右旋糖)、半乳糖、甘露糖、果糖;单糖戊糖,如木糖、核糖、阿拉伯糖和二糖,如乳糖、海藻糖、蔗糖、麦芽糖和纤维二糖。由若干个互连的糖单元构成而形成环(环糊精)的化合物和它们的衍生物也可以使用。使糖还原是获得多元醇的一种方法。优选使用更稳定的“非还原”和非可代谢二糖如蔗糖或海藻糖。各种多元醇、单糖和二糖可以通过商业渠道获得。

[0089] 聚阴离子化的多元醇或糖是羟基基团被完全或部分修饰或被阴离子基团取代(阴离子化的)的多元醇或糖。因此,聚阴离子化的多元醇或聚阴离子化的糖包含多元醇部分或糖部分以及连接到其上的阴离子基团。不受限制地,示例性阴离子基团包括羧酸盐、碳酸盐、硫代碳酸盐、二硫代碳酸盐、磷酸盐、膦酸盐、硫酸盐、磺酸盐、硝酸盐和硼酸盐。优选地,聚阴离子化的糖或多元醇的至少一个阴离子基团是强阴离子基团,也就是说,当在含水介质中,在宽 pH 范围内,例如 pH3-12,优选 pH2-12,50%以上被离子化,或作为选择,解离常数的对数(pKa)为 3 或更小,优选 2 或更小。可以用本领域已知的各种化学方法对多元醇或糖进行聚阴离子化。例如,多元醇和/或糖与三氧化硫或氯磺酸在嘧啶或 2-甲基吡啶中的反应导致一些或所有羟基基团被硫酸残基酯化(硫酸化),得到多硫酸化糖或多元醇。本发明示例性的硫酸化糖是硫酸化的蔗糖,不受限制地包括六硫酸蔗糖、五硫酸蔗糖和八硫酸蔗糖(参见 Ochi. K., et al., 1980, Chem. Pharm. Bull., v. 28, p. 638-641)。类似地,在碱性催化剂存在下,与氯化氧磷或二乙基磷酰氯的反应产生多磷酸化多元醇或糖。多磷酸化多元醇也可分离自天然来源。例如,肌醇多磷酸盐如六磷酸肌醇(植酸)分离自玉米。适于实践本发明的各种硫酸化、磺酸化和磷酸化的糖和多元醇公开于例如美国专利 5,783,568 和美国专利 5,281,237 中,这些专利并入本文作为参考。意想不到地发现,仅具有强酸解离步骤——例如 pKa 小于约 3.0 优选小于约 2.0 的基团如硫酸盐单酯(pKa 1.0 或更小)的聚阴离子化的多羟基化合物,比起还具有弱酸解离步骤如磷酸盐单酯(步骤 1, pKa 约 1.5;步骤 2, pKa 约 6.7;参见 Stahl and Wermuth, Op. cit., 2002)的聚阴离子化的多羟基化的化合物,提供了具有更好的药物保留性的脂质体包裹效果。下面的实施例 73 举例说明了该发现。多元醇和/或糖与一个以上的硼酸分子的配位作用也产生聚阴离子化(多硼酸化)产物。多元醇和/或糖与二硫化碳在碱存在下的反应产生聚阴离子化的(多二硫代碳酸化、多黄原酸盐)衍生物。聚阴离子化的多元醇或糖衍生物可以以游离酸的形式分离,或用合适的碱,例如用碱金属氢氧化物、氢氧化铵、或优选取代的胺中和,取代的胺例如是对应于本发明取代的铵的胺,以纯的形式或以取代的氢氧化铵的形式,从而提供本发明取代的铵的聚阴离子化盐。作为选择,用任何已知的方法,例如用离子交换方法,聚阴离子化的多元醇/糖的钠盐、钾盐、钙盐、钡盐或锰盐可以分离并转化为适宜的形式,例如取代的铵盐形式。

[0090] 本发明的聚阴离子的电荷密度通常为每单元例如在碳链中每碳原子或环、或在糖中每单糖单元具有至少两、三或四个带负电荷的基团。本发明聚阴离子化的糖或环状多元醇优选至少 75%可获得的羟基基团被聚阴离子化的,更优选 100%可获得的羟基基团被聚阴离子化。此外,在本发明脂质体内部的聚阴离子化作用通常在这样的水平,与在目的作用位置输送并释放包载在脂质体内的实体相容或者帮助在目的作用位置输送并释放包载在脂质体内的实体,但是减少在脂质体到达它的目的作用位置之前过早释放包载的实体。

[0091] 根据本发明,脂质体内的聚阴离子化程度可以用于调控释放特征,例如包载在脂质体内的实体的释放速度和动力学。一般地,聚阴离子化程度可以基于阴离子化的糖或多元醇相对于阴离子总量量评估,或在聚阴离子是单一种类的阴离子的情况下,基于相对于本发明脂质体内的聚阴离子如聚阴离子化的糖或多元醇或其混合物的总聚阴离子化容量的聚阴离子化百分比进行评估。在一种实施方案中,聚阴离子化的糖或多元醇与一种或多种其他阴离子混合,并且聚阴离子化的糖或多元醇相对于其他阴离子的数量越少,实体从脂质体释放的速度越快。

[0092] 通常如果包载的实体在目的活性位置从脂质体释放的速度太慢,通过使用聚阴离子化的糖或多元醇与一种或多种其他单价或多价阴离子,例如氯化物、硫酸盐、磷酸盐等的混合物,可以取得理想的实体释放速度。作为选择,可以使用具有各种聚阴离子化程度的聚阴离子化的糖或多元醇的混合物。在一个实施方案中,本发明脂质体内的聚阴离子化程度,在脂质体内例如具有包载的实体的脂质体内,为总阴离子的 0.1% 至 99%、10% 至 90% 或 20% 至 80% 之间。

[0093] 一般而言,本发明的脂质体组合物可以含有任何适宜形式的一种或多种本发明的聚阴离子,例如包含聚阴离子和阳离子的酸或盐形式。聚阴离子,例如聚阴离子化的糖或多元醇的数量可以在化学计量学上与阳离子的数量相同或不同。在一种实施方案中,本发明的脂质体组合物含有一种或多种阳离子的聚阴离子盐,其中横跨脂质体膜具有阳离子浓度梯度或 pH 梯度。在另一实施方案中,本发明的脂质体组合物含有一种或多种本发明的取代的铵聚阴离子盐。在还有另一实施方案中,本发明的脂质体组合物在脂质体中含有聚阴离子,而在含有脂质体的介质中的聚阴离子通过本领域技术人员已知的任何适宜的方法部分去除或基本上去除,例如稀释、离子交换层析、尺寸排阻层析、透析、超滤、吸附、沉淀等方法。在还有另一实施方案中,具有包载的聚阴离子例如聚阴离子化的多元醇或聚阴离子化的糖的脂质体也具有有效地将物质保留在脂质体中的跨膜梯度。这种跨膜梯度的例子是 pH 梯度、电势梯度、铵离子梯度、取代的铵离子梯度或溶解性梯度。取代的铵梯度通常包括含有至少一个 C-N 键的取代形式的铵离子,如伯铵、仲铵、叔铵、季铵。产生跨膜梯度的方法是脂质体领域常规的方法。

[0094] 根据本发明的还有另一特征,本发明的脂质体组合物含有一种或多种本发明取代的铵和 / 或聚阴离子和化学实体或生物实体,例如治疗剂或可检测实体。例如,包含在本发明的脂质体组合物中的实体可以是治疗剂、墨、染料、磁性化合物、肥料、诱饵、生物催化剂、风味剂或气味改性物质、漂白剂、或用本领域已知的任何适宜的方法可以检测的任何实体,适宜的方法例如磁共振成像 (MRI)、光成像、荧光 / 发光成像或核成像技术。便利地,包含在或可装载在本发明的脂质体组合物中的实体是弱碱性的并可以渗透膜的 (亲脂性的) 实体,例如含胺实体或氮碱实体。

[0095] 在另一实施方案中,包含在本发明脂质体组合物中的实体是治疗剂。

[0096] 在另一实施方案中,包含在本发明脂质体组合物中的实体是抗癌实体。一些公知的商业上批准的 (或在积极开发中的) 抗肿瘤剂的部分清单分类如下。

[0097] 根据结构进行分类: 嘧啶类——5-FU、氟脱氧尿苷、喷噻溴铵、5'-脱氧氟尿苷、UFT、S-1 Capecitabine; 嘧啶核苷类——脱氧胞苷、阿糖胞苷、5-氮杂胞嘧啶、吉西他汀、5-氮杂胞嘧啶-阿拉伯糖苷; 嘌呤类——6-巯基嘌呤、硫鸟嘌呤、硫唑嘌呤、别嘌呤

醇、克拉屈滨、氟达拉滨、喷司他丁、2- 氯腺苷；铂类似物——顺铂、卡铂、奥沙利铂、依络铂 (Tetraplatin)、铂 -DACH、奥马铂、CI-973、JM-216；蒽环类抗生素 / 蒽醌——阿霉素、道诺霉素、表阿霉素、伊达比星、米托蒽醌；表鬼臼毒素——依托泊苷、替尼泊苷；喜树碱——依立替康、托泊特坎、勒托替康 (Lurtotecan)、Silatecan、9- 氨基喜树碱、10, 11- 亚甲二氧喜树碱、9- 硝基喜树碱、TAS 103、7-(4- 甲基- 哌嗪- 亚甲基)-10, 11- 亚乙二氧基-20(S)- 喜树碱、7-(2-N- 异丙基氨基) 乙基)-20(S)- 喜树碱；激素和激素类似物——己烯雌酚、它莫西芬、托瑞米芬、Tolmudex、Thymitaq、氟他胺、比卡鲁胺、非那雄胺、雌二醇、曲西立滨、多洛昔芬、醋酸甲羟孕酮、甲地孕酮醋酸酯、氨鲁米特、睾内酯和其他物质；酶、蛋白质和抗生素——天冬酰胺酶、白细胞介素、干扰素、亮丙瑞林、培门冬酶和其他物质；长春花碱——长春新碱、长春碱、长春瑞滨、长春酰胺；紫杉醇类——帕利它西、多烯紫杉醇 (Docetaxel)。

[0098] 根据机制进行分类：抗激素——参见 classification for Hormones and Hormonal Analogues, Anastrozole；抗叶酸类——甲氨喋呤、氨基喋呤、三甲曲沙、甲氧苄啶、Pyritrexim、乙胺嘧啶、依达曲沙、MDAM；抗微管剂——紫杉醇和长春花碱；烷化剂（经典和非经典）——氮芥类（双氯乙基甲胺、苯丁酸氮芥、美法仑、尿嘧啶氮芥）、氧氮磷环类 (Oxazaphosphorines)（异磷酰胺 (Ifosfamide)、环磷酰胺、过磷酰胺、氯乙环磷酰胺 (Trophosphamide)、烷基磺酸酯类（马利兰）、亚硝基脲类（卡莫司汀、洛莫司汀、链脲菌素）、塞替派、达卡巴嗪和其他物质；抗代谢物类——嘌呤、嘧啶和核苷，如上所列；抗生素类——蒽环类抗生素 / 蒽醌、博来霉素、放线菌素、丝裂霉素、普卡霉素、喷司他丁、链脲菌素；拓扑异构酶抑制剂——喜树碱 (Topo I)、表鬼臼毒素、m-AMSA、玫瑰树碱 (Topo II)；抗病毒类——AZT、扎西他滨、吉西他汀、地丹诺幸和其他物质；各种细胞毒性剂——羟基脲、米托坦、融合毒素、PZA、草苔毒素、视黄素、丁酸和衍生物、戊聚糖、烟曲霉素和其他物质。

[0099] 除了上述物质之外，抗癌实体不受限制地包括任何拓扑异构酶抑制剂；长春花碱，例如长春新碱、长春碱、长春瑞滨、长春氟宁和长春西汀；微管解聚剂或微管去稳定剂；微管稳定剂，例如紫杉醇；帕利它西或多烯紫杉醇的氮烷基或氨酰基类似物，例如 2'-[3-(N, N- 二乙基氨基) 丙酰基] 帕利它西、7-(N, N- 二甲基甘氨酸) 帕利它西和 7-L- 丙氨酰帕利它西；烷化剂；受体结合剂；酪氨酸激酶抑制剂；磷酸酶抑制剂；细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂；酶抑制剂；极光蛋白激酶抑制剂；核苷酸、多核苷酸和法兰基转移酶抑制剂。

[0100] 在另一实施方案中，包含在本发明脂质体组合物中的实体是下述物质治疗剂：蒽环类抗生素化合物或衍生物、喜树碱化合物或衍生物、玫瑰树碱化合物或衍生物、长春花碱或衍生物、渥曼青霉素及其类似物和衍生物、或具有极光蛋白激酶抑制特性的吡唑并嘧啶。

[0101] 在还有另一实施方案中，包含在本发明脂质体组合物中的实体是蒽环类抗生素药物，阿霉素、道诺霉素、丝裂霉素 C、表阿霉素、吡柔比星、柔红霉素、癌霉素、N- 乙酰阿霉素、佐柔比星、5- 亚氨基道诺霉素、N- 乙酰道诺霉素、daunoryline、米托蒽醌；喜树碱化合物，喜树碱、9- 氨基喜树碱、7- 乙基喜树碱、10- 羟基喜树碱、9- 硝基喜树碱、10, 11- 亚甲二氧喜树碱、9- 氨基-10, 11- 亚甲二氧喜树碱、9- 氯-10, 11- 亚甲二氧喜树碱、伊立替康、托泊特坎、勒托替康、silatecan、(7-(4- 甲基哌嗪亚甲基) (methylpiperazinomethylene)-10, 11- 亚乙二氧-20(S)- 喜树碱、7-(4- 甲基哌嗪亚甲基)-10, 11- 亚甲二氧-20(S)- 喜树碱、7-(2-N- 异丙基氨基) 乙基)-(20S)- 喜树碱；玫瑰树碱化合物，玫瑰树碱、6-3- 氨

丙基-玫瑰树碱、2-二乙基氨基乙基-玫瑰树碱鎓 (ellipticinium) 及其盐、达替铵 (datelliptium)、retelliptine。

[0102] 在还有另一实施方案中,包含在本发明脂质体组合物中的实体是药物实体,不受限制地包括下述任何物质:抗组胺乙二胺衍生物 (bromphenifamine、苯海拉明);抗原生动物剂:喹诺酮(双碘喹啉);脘(戊烷脘);抗蠕虫剂(噻嘧啶);抗吸血虫药物(奥沙尼喹);抗真菌三唑衍生物(fliconazole、埃他康唑、酮康唑、咪康唑);抗菌头孢菌素(头孢唑啉、头孢尼西、头孢噻肟、头孢酰亚胺、头孢呋辛);抗菌 $\beta$ -内酰胺衍生物(氨曲南、头孢美唑、头孢西丁);红霉素组抗菌剂(红霉素、阿奇霉素、克拉霉素、竹桃霉素);青霉菌类(苜青霉素、苯氧甲基青霉素、氯唑西林、甲氧西林、萘夫西林、苯唑西林、羧苄西林);四环素类;其他抗菌抗生素、新生霉素、壮观霉素、万古霉素;抗分枝杆菌药物:氨基水杨酸(aminosalicylic acid)、卷曲霉素、乙胺丁醇、异烟肼、吡嗪酰胺、利福布汀、利福平、氯法齐明;抗病毒金刚烷胺类:金刚烷胺、金刚乙胺;奎尼丁衍生物类:氯喹、羟氯喹、伯胺喹、qionone;抗菌 qionolones:环丙沙星、依诺沙星、洛美沙星、萘啶酸、诺氟沙星、氧氟沙星;磺胺类药物类;尿道抗菌剂:六亚甲基四胺、呋喃妥因、trimetoprim;硝基咪唑类:甲硝唑;胆碱季铵化合物(ambethinium、新斯的明、毒扁豆碱);抗-阿尔茨海默病氨基吡啶类(他克林);抗帕金森药物(苯扎托品、比哌立登、普环啶、苯海索);抗毒蕈碱剂(阿托品、莨菪碱、东莨菪碱、丙胺太林);肾上腺素多巴胺(沙丁胺醇、多巴酚丁胺、麻黄碱、肾上腺素、去甲肾上腺素、异丙肾上腺素、metaproterenol、氟替卡松、特布他林);麦角胺衍生物类;肌肉松弛素(myorelaxant)或curane系列;中枢作用肌肉松弛素;巴氯酚、环苯并环庚三烯、苯芙海因;烟碱; $\beta$ -肾上腺素阻断剂(beta-adrenoblocker)(acebutil、胺碘酮);地尔硫草(diltiazem);抗心律失常药(diisopyramide、恩卡尼)、局部麻醉剂序列——普鲁卡因、普鲁卡因酰胺、利多卡因、flecainide)、奎尼丁;ACE抑制剂:卡托普利、enalaprilat、福辛普利、喹那普利、雷米普利;抗脂类药物(antilipidemics):氟伐他汀、吉非贝齐(gemfibrosil)、HMG-coA抑制剂(普伐他汀);降压药剂:可乐定、胍那苄、哌唑嗪(prazosin)、胍乙啶、granadril、胍苯哒嗪;和非冠状血管扩张剂:双嘧达莫。

[0103] 根据本发明,包含在本发明脂质体组合物中的实体可以是实体前体(pre-entity),例如前药或能够在如pH变化或酶切割不稳定的键的条件下经一步或多步转化步骤转化为期望的实体的药剂。这种转化可以在前药从脂质体内部释放在药物/脂质体作用的目的位置处后发生。然而,前药可以在应用脂质体作为输送载体,例如给予患者之前,在本发明脂质体内部被转化成期望的活性实体。例如,实体可以被修饰成前药,以便于它更容易地被装载入脂质体中,然后一旦到达本发明的脂质体内时它可以被转化回到期望的实体。用这种方式,根据本发明,通常不适于“活性”、“远距离”或其他基于梯度的装载方法的实体,可以以它们天然地、未修饰的形式,有效地被装载入脂质体,例如装载入脂质体内部空间。

[0104] 已知,球形阳离子化合物,即能够在脂质体装载条件下获得净正离子电荷的化合物,特别是含有可滴定胺的化合物,有效地装载入展示出跨膜离子梯度的脂质体中。如果感兴趣的实体是有机化合物,并且不是具有可滴定胺的球形阳离子化合物,那么其具有必要的离子特性的衍生物可以用合适的修饰方法制备而得,例如根据Woodle等在W096/25147中描述的方法。例如,通过用氨基酸酯化实体的羟基基团可以引入胺基团。作为选择,疏水



基团可以被引入水溶性化合物以帮助它分配入脂质体膜以及随后横穿脂质体膜进入脂质体内室,即进入脂质体里面。产生脂质体-可装载的实体前体的另一有用的修饰是形成羰基加合物,例如脎、脞、乙缩醛或酮缩醛。在将修饰的化合物装载入本发明的脂质体后,修饰的含氨基基团可以从修饰的化合物水解或者用其他化学方法分裂出来。在脂质体内由实体前体重新产生实体的典型方法是水解、光分解、辐解、硫解、氨解、还原、取代、氧化或消除。这些方法可以不受限制地通过 pH 变化或酶作用实现。例如,非离子实体——帕利它西或多烯紫杉醇被转化成它们的 2'-(二乙基氨基丙酰基)-7'-(二乙基氨基丙酰基)酯,其是弱碱(实体前体)。在用任何已知的方法装载入脂质体后,通过将 pH 增加至 pH7.0 以上来刺激它的水解,使脂质体内的 2'-(二乙基氨基丙酰基)-帕利它西转化成原始的帕利它西,所述装载方法不受限制地包括“活性”、“远距离”、“基于跨膜-梯度的”或“基于溶解性梯度的”方法,和/或本发明的方法。因此,将中性紫杉醇分子包囊在它内部空间的脂质体以每摩尔脂质体脂类超过 0.05 摩尔的药物/脂类比率获得,无需紫杉醇分子的亲水性共价修饰(例如通过附着 PEG)、环糊精紫杉醇复合体或紫杉醇-增溶、胶束-形成表面活性剂的帮助。

[0105] 根据本发明,包含在脂质体组合物中的脂质体可以是任何本领域已知或以后发现的脂质体。一般而言,本发明的脂质体可以具有任何脂质体结构,例如具有通过一个或多个脂双层与外部介质隔开的内部空间的结构,或具有携带亲脂性中心部分的半透性膜的任何微胶囊,在亲脂性中心部分中膜将内部隔离开来。脂双层可以是具有亲水部分(part)(亲水部分(moiety))和疏水部分(疏水部分)的两亲性分子的任何排列。通常,双层中的两亲性分子被排列成二维的片,其中疏水部分朝向片的里面,而亲水部分朝向片的外面。形成本发明脂质体的两亲性分子可以是本领域已知的或以后发现的任何两亲性分子,例如合成的或天然来源的脂类或生物相容性脂类。本发明的脂质体也可以由两亲性聚合物和表面活性剂,例如 polymerosomes 和 niosomes 形成。对于本公开的目的而言,不受限制地,这些形成脂质体的物质也称为“脂类”。

[0106] 根据本发明,包含在本发明脂质体组合物中的脂质体也可以是导向脂质体(targeting liposomes),例如在脂质体的表面上含有一个或多个导向部分或生物分布修饰剂的脂质体。导向部分可以是能够与期望的靶标特异性结合或相互作用的任何介质。在一种实施方案中,导向部分是配体。根据本发明,配体优选与细胞结合和/或内化入细胞,在细胞中脂质体包载的实体发挥其期望的效应(靶细胞)。配体通常是结合对的成员,其中第二成员存在于靶细胞上或靶细胞中,或存在于包含靶细胞的组织中。适宜用于本发明的配体的例子是:叶酸、蛋白质例如转铁蛋白、生长因子、酶、肽、受体、抗体或抗体片段如 Fab'、Fv、单链 Fv、单结构域抗体,或包含抗体分子的抗原结合序列(CDRs)的任何其他多肽。其中导向部分是抗体或其靶抗原结合片段的配体定向脂质体称为免疫脂质体。在优选的实施方案中,携带导向部分例如配体的脂质体被内化入靶细胞。在还有另一实施方案中,导向部分是酪氨酸激酶受体特异性相互作用的配体,例如,如 EGFR、HER2、HER3、HER4、PD-GFR、VEGFR、bFGFR 或 IGF1R 受体。在还有另一实施方案中,导向部分与生长因子受体、血管生成因子受体、转铁蛋白受体、细胞粘附分子或维生素受体特异性相互作用。

[0107] 根据本发明的另一实施方案,包含在本发明脂质体组合物内的脂质体具有本发明取代的铵和/或聚阴离子的跨膜浓度梯度。优选地,脂质体内部(内部)空间中的浓度较

高。此外,除了本发明取代的铵和 / 或聚阴离子产生的梯度之外,本发明的脂质体组合物可以包括一个或多个跨膜梯度。例如,包含在本发明脂质体组合物中的脂质体可以额外地包括跨膜 pH 梯度、离子梯度、电化学势梯度和 / 或溶解性梯度。

[0108] 根据本发明的还有另一实施方案,本发明的脂质体组合物可以以试剂盒提供,该试剂盒包含具有脂质体的容器,任选地,具有实体和说明书的容器,例如关于在一种或多种应用中使用脂质体组合物的程序或信息的说明书。这种说明书可以通过任何介质提供,例如纸件复印件、电子介质或含有说明书的数据库或网址端口。

[0109] 本发明的脂质体膜组合物可以通过本领域技术人员已知的或以后发现的任何适宜的方法制备。一般而言,各种脂类组分可以被用于制备本发明的脂质体。脂质体组分通常包括,但是不限于:(1) 不带电荷的脂组分,例如胆固醇、神经酰胺、二酰基丙三醇、酰基(聚醚)或烷基聚(醚);(2) 中性磷脂,例如二酰基磷脂酰胆碱、鞘磷脂和二酰基磷脂酰乙醇胺,(3) 阴离子脂类,例如二酰基磷脂酰丝氨酸、二酰基磷脂酰丙三醇、二酰基磷酸酯、心磷脂、二酰基磷脂酰肌醇、二酰基丙三醇半琥珀酸酯、二酰基丙三醇半戊二酸酯、胆甾醇半琥珀酸酯、胆甾醇半戊二酸酯和类似物;(4) 聚合物-共轭脂类,例如 N-[甲氧基-(聚(乙二醇)二酰基磷脂酰乙醇胺)-聚(乙二醇)-二酰基丙三醇、聚(乙二醇)-神经酰胺;和(5) 阳离子脂类,例如 1,2,-二酰基-3-三甲铵-丙烷(DOTAP)、二甲基二十八烷基溴化铵(DDAB)和 1,2-二酰基-sn-丙三醇-3-乙基磷酸胆碱。也可以利用这些脂类的单酰基-取代的衍生物,以及二-和单烷基-类似物。

[0110] 可以选择各种脂类成分以满足、修改或赋予一种或多种期望的功能。例如,磷脂可以被用作主要的小泡-形成脂类。包含胆固醇以用于维持膜的刚性并减少药物渗漏。聚合物-共轭的脂类可用于脂质体配方中,以通过减少脂质体被肝脏和脾脏清除来增加循环寿命,或在缺少循环扩展效应的情况下提高存储期间脂质体针对聚集作用的稳定性。尽管以脂质体脂类的 1 摩尔%或更高的量包含 PEG-脂类被认为具有延长若干倍的脂质体血液循环时间(参见例如美国专利 5,013,556),但是我们惊奇地发现本发明的脂质体具有相当长的循环时间,而将 PEG-脂类加入到脂质体组合物仅仅将循环寿命延长不到两倍,如果有的话。此外,电荷-调控(可滴定)脂类可以被用于通过帮助一些类型的实体规避内体途经的包围,来帮助输送脂质体包裹的实体至细胞靶标或核靶标。

[0111] 在一种实施方案中,本发明的脂质体包括卵磷脂、胆固醇和两亲性聚合物。包含在本发明的脂质体中的卵磷脂可以是天然卵磷脂、氢化的天然卵磷脂、合成的卵磷脂、1,2-二硬脂酰-卵磷脂、二棕榈酰卵磷脂、二豆蔻酰卵磷脂、二油酰卵磷脂、1-硬脂酰-2-油酰卵磷脂或 1-棕榈酰-2-油酰卵磷脂,而两亲性聚合物可以是聚乙二醇-脂类衍生物例如聚乙二醇磷脂酰乙醇胺、聚乙二醇-二酰基丙三醇、或聚乙二醇-神经酰胺衍生物,其中聚(乙二醇)部分的分子量约 250 至约 20,000,最常见的约 500 至约 5,000。在另一实施方案中,在本发明脂质体中的卵磷脂和胆固醇的摩尔比约 3:2。在还有另一实施方案中,两亲性聚合物占本发明脂质体中的脂质体形成脂类的至少 0.1 摩尔%。在还有另一实施方案中,两亲性聚合物的量在本发明脂质体中的脂质体形成脂类的 0.1 摩尔%至 1 摩尔%之间。优选地,两亲性聚合物是中性聚合物,即在药物装载条件下具有零净离子电荷,例如 PEG-二酰基丙三醇、PEG-二烷基丙三醇或 PEG-神经酰胺。出人意料地发现,包含 PEG-脂类含量可达总脂的约 5.7 摩尔%(摩尔百分比)的离子中性两亲性脂类使脂质体高效率装载例如长春花

碱如长春瑞滨,而在阴离子带电荷 PEG-DSPE 的情况下,在 PEG-脂类含量为 1.6 摩尔% (摩尔百分比) 或更高时,装载效率显著下降 (实施例 72)。

[0112] 在还有另一实施方案中,本发明的脂质体含有喜树碱衍生物,例如喜树碱前药如伊立替康,并且该脂质体以例如约 3 : 2 的摩尔比包含卵磷脂和胆固醇,和例如以脂质体形成脂类的至少 0.1 摩尔%或 1%以下的量包含两亲性聚合物。

[0113] 本发明的脂质体可以通过本领域已知或将会知道的任何方法制备。参见例如 G. Gregoriadis (编者), *Liposome Technology*, vol. 1-3, 第 1 版, 1983 ; 第 2 版, 1993, CRC Press. Boca Raton, FL. 适宜制备本发明脂质体组合物的方法的例子包括挤出、反相蒸发、超声波、溶剂 (例如乙醇) 注射、微流化作用、洗涤剂透析、醚注射和脱水 / 再水合。通过控制用于低压挤出的膜孔大小或用于微流化作用的压力或通过次数或任何其他适宜的方法可以控制脂质体的大小。在一种实施方案中,期望的脂类首先通过薄膜水合作用或通过乙醇注射进行水合,随后利用通过确定孔大小的膜进行挤出形成一定的尺寸,最常见的为 0.05  $\mu\text{m}$ 、0.08  $\mu\text{m}$  或 0.1  $\mu\text{m}$ 。

[0114] 在脂质体内部含有本发明取代的铵和 / 或聚阴离子的脂质体组合物可以用任何适宜的方法制备,例如,在例如以盐形式的本发明取代的铵和 / 或聚阴离子存在下形成脂质体。或者在脂质体形成之后,或者在装载或包载期望的实体之前,可以将脂质体外的取代的铵和 / 或聚阴离子去除或稀释。可选择地,含有本发明取代的铵和 / 或聚阴离子的脂质体组合物可以直接通过离子交换方法制备,或通过中间游离酸步骤制备,该中间游离酸步骤具有本发明取代的铵的梯度,例如取代的聚阴离子化的糖或多元醇的铵盐。这种脂质体可以用具有挥发酸的胺或它的盐,例如碳酸盐中和。所得的脂质体溶液可以直接使用,或者作为选择,如果需要,包含在其中的盐可以被去除,例如通过蒸发和结晶去除,然后溶解在含水介质中。

[0115] 优选地,本发明的脂质体组合物具有取代的铵和 / 或聚阴离子跨膜浓度梯度,例如脂质体内的取代的铵和 / 或聚阴离子盐的浓度通常比脂质体外介质中的取代的铵和 / 或聚阴离子的浓度高至少 100 倍。

[0116] 在一种实施方案中,脂质体内的取代的铵和 / 或聚阴离子盐的浓度比脂质体外介质中的取代的铵和 / 或聚阴离子盐的浓度高至少 100 倍,并且浓度至少约 10mM、50mM、0.1M、0.2M、0.5M、0.6M、0.7M 或 1.0M,其中摩尔浓度根据取代的胺进行计算。在另一实施方案中,脂质体内的取代的铵和 / 或聚阴离子盐的浓度比脂质体外介质中的取代的铵和 / 或聚阴离子盐的浓度高至少 100 倍,并且浓度约 0.65M 或约 1.0M。

[0117] 此外,本发明的脂质体组合物外部通常具有这样的 pH,该 pH 适宜于或有助于在装载过程中维持期望实体的稳定性,以及高装载效率,例如 90% 以上的包载水平。例如,优选 pH 在 pH4-7 或 pH4.5-6.5 范围内。特别地,根据本发明,对喜树碱化合物例如托泊特坎或伊立替康的装载,最好在外部介质的 pH 在约 4.0 至约 7.0 范围内,更优选地在约 pH5.0 至 pH6.5 范围内完成。装载长春花碱衍生物,例如长春新碱、长春瑞滨或长春碱,最好在 pH 约 5.0-7.0,更优选在 pH 约 6.5 下完成。

[0118] 根据本发明,通过将期望的实体与本发明的脂质体在含水介质中于合适的温度温育,可以将期望的实体装载或包载入脂质体中,温度例如在装载期间高于脂类成分的相转变温度,在装载实体之后低于相转变温度。温育时间通常基于脂类成分的特性、装载入脂质

体的实体和温育温度。典型地,温育时间从几分钟至几小时足够。因为获得 85%以上的高包载效率,通常为 90%以上,通常没有必要去除未包载的实体。然而,如果有必要去除未包载的实体,未包载的实体可以用各种方法从组合物去除,方法如尺寸排阻层析、透析、超滤、吸附或沉淀。出人意料地发现,在将实体如特别是喜树碱衍生物或长春花碱衍生物与本发明的脂质体温育期间,维持低离子强度,然后在温育结束时增加离子强度,产生较高的装载效率、更好地去除未包载的药物以及脂质体对聚集具有更好的稳定性。典型地,在例如含水溶液中,在离子强度小于相当于 50mM NaCl 的离子强度,或更优选地小于相当于 30mM NaCl 的离子强度下,进行温育。温育之后,可以加入浓盐溶液,例如浓 NaCl 溶液,将离子强度提高到高于相当于 50mM NaCl 的离子强度,或更优选地,高于 100mM NaCl 的离子强度。不受理论限制地,我们假设,离子强度的增加有助于实体从脂质体膜的解离,使得基本上所有实体包囊在脂质体内部空间中。

[0119] 一般而言,实体-脂类比率,例如在装载实体时获得的药物装载比率,取决于包载在脂质体内的实体量、包载的取代的铵和/或聚阴离子例如盐的浓度、包载的实体的物化特性以及使用的相反离子(阴离子)例如聚阴离子的类型。因为在组合物中和/或通过本发明的方法获得了高装载效率,对于包载在脂质体中的实体而言,实体-脂类比率为基于装载过程中所用的实体和脂质体脂类的量而计算出的实体-脂类比率的 80%以上、90%以上,以及通常为 95%以上(输入比率)。事实上,实践上 100%(定量)的包囊水平是常见的。脂质体中实体-脂类比率可以根据重量比(每重量或摩尔单位的脂质体脂类的实体重量)或摩尔比(每重量或摩尔单位的脂质体脂类的实体摩尔数)表征。通过常规的计算方法,例如示例于下的常规的计算方法,一个单位的实体-脂类比率可以被转化成其他单位。在本发明脂质体中的实体的重量比典型为每 mg 脂类至少 0.05、0.1、0.2、0.35、0.5 或至少 0.65 mg 实体。根据摩尔比,本发明的实体-脂类比率为每摩尔脂质体脂类至少约 0.02 至约 5、优选至少 0.1 至约 2、更优选地约 0.15 至约 1.5 摩尔药物。在一种实施方案中,实体-脂类比率,例如喜树碱衍生物的药物装载比率为每一摩尔脂质体脂类至少 0.1 摩尔例如 0.1 摩尔喜树碱衍生物,优选至少 0.2 摩尔。在另一实施方案中,实体-脂类比率,例如药物装载量,为每 mg 脂质体形成脂类至少约 300mg 实体(例如长春花碱其衍生物)。在还有另一实施方案中,实体-脂类比率,例如药物装载量,为每 mg 脂质体形成脂类至少约 500mg 实体(例如喜树碱衍生物或喜树碱前药)。令人惊奇地,本发明提供稳定和接近于定量的喜树碱衍生药物例如伊立替康的脂质体包囊,其中药物-脂类比率为每 1 克脂质体脂类超过 0.8mmol 实体,每 1 克脂质体脂类超过 1.3mmol 实体,甚至为每 1 克脂质体脂类超过 1.7mmol 实体(参见实施例 74)。

[0120] 如果脂质体包含磷脂,方便地用每摩尔单位的脂质体磷脂所具有的药物重量(质量)单位数来表示实体含量,例如 mg 药物 /mmol 磷脂。然而,本领域技术人员将认识到药物含量同样可以以不依赖于脂质体中磷脂的存在的方式来表示,此外,同样可以根据每单位(质量或摩尔)脂质体脂类含量所具有的药物摩尔数来表示。例如,含有 3 摩尔份二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC,分子量 790)、2 摩尔份胆固醇(分子量 387)和 0.015 摩尔份聚(乙二醇)-衍生二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(PEG-DSPE,分子量 2750),和含有药物/脂类比率为 150mg/mmol 磷脂的药物阿霉素(分子量 543.5)的脂质体,相同的药物含量可以等同地用 mg 药物 /mg 总脂类表示如下:

[0121] (a) 通过组分的摩尔数量除以脂质体磷脂总的摩尔数量, 计算脂质体脂类组分的摩尔数量, 其被标准化为脂质体磷脂 (在该例子中是 DSPC 和 PEG-DSPE) 的摩尔单位:

$$[0122] \quad \text{DSPC}3/(3+0.015) = 0.99502$$

$$[0123] \quad \text{胆固醇} 2/(3+0.015) = 0.66335$$

$$[0124] \quad \text{PG-DSPE}0.015/(3+0.015) = 0.00498$$

[0125] (b) 计算与脂质体磷脂的单位摩尔数量和组分分子量相对应的总脂类的质量数量  
总脂类, mg/mmol 磷脂 =  $0.99502 \times 790 + 0.66335 \times 387 + 0.00498 \times 2750 = 1056.48$

[0126] (c) 通过以每摩尔单位磷脂的质量单位表示的药物含量除以步骤 (b) 中获得的数, 计算每质量单位总脂类的药物质量数量:

$$[0127] \quad \text{阿霉素, mg/mg 总脂类} = 150/1056.48 = 0.14198。$$

[0128] (d) 通过步骤 (c) 中获得的数除以药物分子量 (在该例子中为 543.5), 计算每单位总脂类质量所具有的药物摩尔数。

$$[0129] \quad \text{阿霉素, mmol/g 总脂类} = 0.14198/543.5 \times 1000 = 0.261。$$

[0130] (e) 计算磷脂在脂质体脂类基质中所占的摩尔份数:

$$[0131] \quad \text{磷脂摩尔份数} = (\text{磷脂总摩尔数}) / (\text{脂类总摩尔数}) = (3+0.015) / (3+2+0.015) = 0.6012。$$

[0132] (f) 计算阿霉素与总脂类的摩尔比。

$$[0133] \quad \text{阿霉素, mol/mol 总脂类} = (\text{磷脂摩尔份数}) \times (\text{阿霉素, g/mole 磷脂}) / (\text{阿霉素分子量}) = 0.6012 \times 150/543.5 = 0.166$$

[0134] 因此, 用各种单位表示的药物-脂类和药物-磷脂比率之间的关系容易建立。本文所使用的“脂类”不受限制地包括脂质体膜中的任何膜形成成分, 如聚合物和 / 或洗涤剂。

[0135] 本发明脂质体包载的取代的铵和 / 或聚阴离子盐溶液通常具有这样的渗透强度 (同渗重摩), 该渗透强度帮助脂质体对渗透破坏 (膨胀和 / 或破裂) 保持稳定, 而不牺牲脂质体的装载容量。在一种实施方案中, 本发明脂质体组合物的同渗重摩在 0.1 至 1.5 mol/kg 范围内, 优选在 0.2 至 1.0 mol/kg 范围内。令人惊奇地, 我们发现本发明的脂质体对于高脂质体内渗透强度对药物装载的不利影响是稳定的。高达 0.727 mol/kg 的脂质体内同渗重摩被充分耐受, 这导致药物的实际定量装载达到脂质体内取代的铵离子交换药物分子的化学计量的最大理论值 (在伊立替康的情况下, 每一取代的铵离子为一个药物单位), 即使对于药物和脂质体共温育期间脂质体外含水介质的同渗重摩接近约 0.3 mol/kg 的生理值也如此 (实施例 74)。

[0136] 一般而言, 本发明的脂质体组合物在保藏期间相当稳定, 这是例如从本发明脂质体中的实体的初始装载起的一段时间阶段之后, 由释放在脂质体外的包载的实体或依然保持在脂质体内的实体的百分比所测定的。例如, 本发明的脂质体组合物在 4°C 中稳定至少 6 个月, 例如在最初装载实体之后 6 个月, 10% 以下包载的实体释放出来。在一种实施方案中, 本发明的脂质体组合物在 4°C 中稳定至少 2 年, 例如在最初装载实体之后 2 年, 20% 以下包载的实体释放出来。

[0137] 直到脂质体到达它的目的作用位置之前, 例如在对病人施用脂质体抗肿瘤药物情况下, 脂质体到达肿瘤之前, 脂质体包载的实体一直保持包囊在脂质体中是有利的。在体内条件下, 例如在哺乳动物血液中, 本发明的脂质体对于包载的实体的释放 (渗漏) 显示出惊

人的稳定性。在大鼠体内血液中,50%包载的实体例如药物从脂质体释放出来所需要的暴露时间(半释放期)超过24小时。特别地,装载有长春花碱药物例如长春碱、长春新碱和长春瑞滨的脂质体对体内药物渗漏显示显著的稳定性,半释放期至少24小时,或体内血液中24小时之后保持包囊在脂质体内的实体的数量为给药前值的至少约50%。典型地,观察到半释放期超过33小时,或体内血液中24小时之后保持包囊在脂质体内的包囊的实体的数量至少约60%;甚至半释放期超过46小时,或体内血液中24小时之后保持包囊在脂质体内的包囊的实体的数量为给药前值的至少约70%也是常见的。有时,包囊的药物在体内血液中的半释放期超过93小时,甚至超过120小时。装载喜树碱衍生物如托泊特坎和伊立替康的脂质体在体内血液中也显示出优越的稳定性,24小时之后79-85%的原始药物装载保持包囊在脂质体中。引人注目地,尽管在血液循环中具有如此低的体内药物释放速度,本发明的脂质体显示出超过游离药物(即作为溶液施用的药物)的重大的体内抗肿瘤活性。

[0138] 本发明的脂质体意想不到地既提供了的包载治疗剂的高功效,也提供了低毒性。一般而言,本发明包囊入脂质体的治疗剂实体在哺乳动物中的活性,例如喜树碱衍生物的抗肿瘤活性,与以相同的数量通过其常规非脂质体制剂,例如不使用本发明的脂质体组合物的方式给药的治疗剂的活性相比,至少相等、高至少两倍和高至少四倍,而包囊在脂质体中的实体的毒性不超过以相同剂量和时间安排但是以游离的非包囊的形式给药的相同的治疗剂实体的毒性、低至少两倍、至少三倍或低至少四倍。例如,一般地已知,通过其他公开的方法用脂质体包囊抗癌症喜树碱衍生物导致毒性相比起未包囊的药物有所增加(较低的最大耐受剂量,较低的50%致死剂量)。参见美国专利6,355,268;美国专利6,465,008;Colbern, et al. *Clinical Cancer Res.* 1998, v. 4, p. 3077-3082;Tardi, et al. *Cancer Res.*, 2000, v. 60, p. 3389-3393;Emerson, et al. *Clinical Cancer Res.* 2000, v. 6, p. 2903-2912。经体内肿瘤模型评价,脂质体包囊的喜树碱前药,如水溶性的伊立替康(CPT-11)、阳离子喜树碱前药衍生物,比缺少脂质体制剂时的药物例如游离(溶液)形式的药物,具有高得多的抗肿瘤活性,例如高至少4倍、甚至10倍。因为治疗剂化合物例如喜树碱前药需要酶作用,例如需要内源性非特异性羧酸酯酶作用,但是根据本发明该酶被基本上包囊在脂质体内部空间内,所以这甚至更为显著。另一方面,令人惊奇地,本发明脂质体形式的喜树碱前药如CPT-11(药物/脂类质量比率超过0.1,例如0.2-0.6或更多)的毒性,比游离的(未包囊的)前药CPT-11的毒性低2倍以上、3倍以上和甚至4倍以上。此外,药物体内从CPT-11脂质体释放出的时间延长,在投入血流之后24小时,50%以上、甚至70%以上(79-86%)的原始药物含量依然保留在脂质体中,半释放期超过24小时,典型地超过48小时。在体内药物保留在脂质体内的时间延长与较高的抗肿瘤效应相关。令人惊奇地,在含有低分子量的聚阴离子化的糖衍生物(八硫酸蔗糖)而不是聚合物阴离子(聚磷酸盐)的脂质体中观察到最低的体内CPT-11释放和最高的抗肿瘤活性(实施例15)。

[0139] 根据本发明的另一实施方案,本发明的脂质体组合物可以作为药物组合物提供,该药物组合物含有本发明的脂质体组合物,和载体例如药学上可接受的载体。药学上可接受的载体的例子是生理盐水、等渗葡萄糖、等渗蔗糖、林格氏溶液和Hanks' 溶液。可以加入缓冲物质以提供获得保藏稳定性的最优pH。例如,约6.0至约7.5之间的pH,更优选地约6.5的pH对于脂质体膜脂类的稳定性是最佳的,并提供对包载的实体优异的保持力。典型地,2-20 mM浓度的组氨酸、羟乙基哌嗪-乙基磺酸盐(HEPES)、吗啉代(morpholino)-乙基

磺酸盐 (MES)、琥珀酸盐、酒石酸盐和柠檬酸盐是示范性缓冲物质。其他适宜的载体包括例如水、缓冲水溶液、0.4% NaCl、0.3% 甘氨酸和类似物。可以加入蛋白质、碳水化合物或聚合物稳定剂和张力调节剂,例如凝胶、清蛋白、葡聚糖或聚乙烯吡咯烷酮。组合物的张力可以用葡萄糖或更惰性的化合物如乳糖、蔗糖、甘露醇或糊精调节至 0.25-0.35mol/kg 的生理水平。这些组合物可以通过传统的、熟知的灭菌技术如通过过滤灭菌。所得的含水溶液可以包装起来以便使用,或在无菌条件下过滤并冻干,冻干的制剂在给药之前与无菌含水介质混合。

[0140] 如需要,药物脂质体组合物也可以含有其他药学上可接受的辅助物质,以接近生理条件,如 pH 调节剂和缓冲剂、张力调节剂和类似物,例如醋酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙等。此外,脂质体悬浮液可以包括脂类保护剂,其保护脂类在保存时免遭自由基和脂类过氧化物破坏。亲脂性自由基淬灭剂,如  $\alpha$ -生育酚和水溶性离子特异性如醌胺铁 (ferrioxamine) 是适宜的。

[0141] 在流体药物制剂中本发明脂质体的浓度可以在宽范围内变化,即按重量计算从通常约 0.05% 以下或至少约 2-10% 到多达 30 至 50%,并主要通过流体体积、粘度等根据所选择的特定的给药方式进行选择。例如,可以增加浓度以减少与治疗相关的流体装载。这在患有动脉粥样硬化相关的充血性心力衰竭或严重高血压的患者中可能特别有利。可选择地,由刺激性脂类组成的脂质体药物组合物可以被稀释到低浓度,以减少在给药位置出现炎症。

[0142] 投药的脂质体药物组合物的数量将取决于包载在脂质体中的特定治疗剂实体的数量、正被治疗的疾病状态、正被使用的脂质体的类型以及医师的判断。一般而言,投药的脂质体药物组合物的数量将足以输送治疗上有效剂量的特定的治疗剂实体。

[0143] 输送治疗上有效的剂量所必需的脂质体药物组合物的量可以通过药物测试领域常见的常规的体外和体内方法测定。参见例如 D. B. Budman, A. H. Calvert, E. K. Rowinsky (编者). Handbook of Anticancer Drug Development, LWW, 2003。各种治疗剂实体的治疗上有效的剂量是本领域熟知的;根据本发明,通过本发明的药物脂质体组合物输送的治疗剂实体给出了与用其常规非脂质体制剂给予相同数量的治疗剂实体所获得的活性至少相同或高 2 倍、4 倍或 10 倍的活性。典型地,本发明脂质体药物组合物的剂量在每千克体重约 0.005 至约 500mg 治疗剂实体之间的范围内,最经常地,在每千克体重约 0.1 至约 100mg 治疗剂实体之间的范围内。

[0144] 典型地,本发明的脂质体药物组合作为局部物质或可注射物质制备,或者是液体溶液或者悬浮液。然而,也可以制备适于在注射之前溶于或悬浮于液体载体中的固体形式。组合物也可以根据本领域已知的方法配制成肠包覆的片剂或凝胶胶囊。

[0145] 本发明的脂质体组合物可以用医学上可接收的任何方式给药,这取决于所治疗的病症和损伤。可能的给药途经包括注射,通过肠胃外途经,如肌内、皮下、静脉内、动脉内、腹膜内、关节内、脑膜内、鞘内,或其他途经;以及经口、鼻、眼、直肠、阴道、局部或肺部,例如通过吸入的方法。对于将根据本发明配制的脂质体药物输送至中央神经系统的肿瘤,缓慢而持续地将脂质体直接颅内输入肿瘤(对流加强传送 (convection enhanced delivery) 或 CED) 是特别有利的。参见 Saito, et al., Cancer Research, vol. 64, p. 2572-2579, 2004; Mamot, et al., J. Neuro-Oncology, vol. 68, p. 1-9, 2004。组合物也可以直接施用于

组织的表面。持续释放给药、pH 依赖性释放给药或其他特异性化学或环境条件介导的释放给药也明确包含在本发明中,例如通过诸如缓释注射 (depot injection) 或可蚀性移植 (erodible implant) 这样方法给药。

[0146] 实施例

[0147] 下面的实施例旨在举例说明本发明但不是以任何方式、形状或形式或者明确地或者含蓄地限制本发明。尽管这些实施例是可能使用的实施例中的典型,本领域技术人员知道的其他步骤、方法或技术也可以选择使用。

[0148] 实施例 1. 取代的铵盐溶液的制备

[0149] 通过用水将硫酸稀释至 0.25M 浓度,然后用众多胺中的其中一种胺滴定硫酸溶液,制备用于将药物(例如阿霉素)装载入脂质体的三烷基铵和二烷基铵硫酸盐溶液。用于该实施例的取代的胺是三乙胺、三甲胺、二甲胺、二乙胺或二乙醇胺。加入胺之后,将所得溶液稀释至 0.2M 的取代的铵盐终浓度。使用露点渗透压机 (dew point osmometer) 测定同渗重摩。所得的取代的烷基铵硫酸盐溶液的特性在下表 1 中示出。

[0150] 表 1. 各种二烷基铵和三烷基铵硫酸盐溶液的特性

[0151]

盐	同渗重摩, mmol/kg	pH
硫酸二甲铵	472	5.65
硫酸二甲乙醇铵	509	5.72
硫酸二乙铵	519	5.85
硫酸三甲铵	497	5.81
硫酸三乙铵	559	5.33

[0152] 实施例 2. 含有包载的二烷基铵盐和三烷基铵盐的脂质体的制备,和将物质装载入这些脂质体

[0153] 将二硬脂酰磷脂酰胆碱 (DSPC)、胆固醇 (Chol) 和 N-(甲氧基-聚(乙二醇)-氧羰基)-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 (PEG-DSPE) (由聚(乙二醇)制备,分子量 2,000) 以 3 : 2 : 0.015 摩尔比共溶于氯仿,并在 55-60°C 通过旋转蒸发去除氯仿。干燥的脂膜然后在 60°C 于实施例 1 中列出的二烷基铵硫酸盐或三烷基铵硫酸盐的其中一种的溶液中水合 30 分钟。脂悬浮液在压力下被挤出通过孔径为 0.1 μm 的二叠层聚碳酸酯径迹蚀刻膜过滤器 (two stacked polycarbonate track-etched membrane filter) (Corning Nuclepore)。通过准弹性光散射方法 (quasielastic light scattering method) 测定的脂质体大小近似为 110-120nm。通过凝胶过滤,使用交联葡聚糖凝胶 (Sephadex G-75, Amersham Pharmacia Biotechnology) 柱,用 pH7.2-7.4 的 HEPES-缓冲盐水洗脱该柱,将未包囊的三烷基铵或二烷基铵盐从脂质体的外部介质中去除,脂质体收集在柱的孔隙体积部分。以 150 μg 药物 / μmol 脂质体磷脂的浓度,将盐酸阿霉素 USP (冻干粉末,每 1 份阿霉素含有 2 重量份乳糖) 加入到脂质体中。混合物在 55°C 温育 45 分钟,冰上冷冻 10 分钟,通过凝胶过滤层析,使用 Sephadex G-75 柱,用 pH7.4 的 HEPES-缓冲盐水洗脱,去除未包囊的药物。游离阿霉素的存在 (特征为出现较慢移动的红色带) 无法通过视觉观察到。分别根据实施例 70 和 71 (分光光度法),分析纯化的装载阿霉素的脂质体的磷脂和阿霉素。所得的药物装



载效率在表 2 中示出。

[0154] 表 2. 阿霉素装载入含有包载的二烷基铵盐溶液和三烷基铵盐溶液的脂质体。输入药物 / 磷脂比率 150  $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ 。

[0155]

脂质体-包载的盐	脂质体中的药物/磷脂比率 ( $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ )	包载效率(%)
硫酸三甲铵	140.74 $\pm$ 10.35	93.8 $\pm$ 5.7
硫酸三乙铵	163.81 $\pm$ 16.41	109.2 $\pm$ 11.6
硫酸二乙铵	158.16 $\pm$ 18.34	105.4 $\pm$ 7.8
硫酸二甲基乙醇铵	155.08 $\pm$ 8.51	103.4 $\pm$ 11.6

[0156] 实施例 3. 含有各种二烷基-、三烷基-和杂环-取代铵硫酸盐的脂质体的制备, 和阿霉素装载入这些脂质体。

[0157] 如实施例 1, 使用商业上可获得的烷基-取代的、羟烷基-取代的和杂环胺制备取代的铵的硫酸盐溶液。如实施例 1, 形成脂质体, 除了替换脂膜水合步骤, 将纯脂类溶解在乙醇中 (每 50  $\mu\text{mol}$  磷脂, 近似 100  $\mu\text{l}$  乙醇), 并在 60-65 $^{\circ}\text{C}$  与取代的铵盐溶液混合, 以便得到的脂类分散液含有约 10vol. % 的乙醇。

[0158] 通过将阿霉素溶液 (2mg/ml, 于 pH6.5 的 HEPES- 缓冲盐水中) 以 155  $\mu\text{g}$  药物 /  $\mu\text{mol}$  脂质体磷脂 (PL) 的比率加入到脂质体, 并在热水浴中 58 $^{\circ}\text{C}$  加热 45 分钟, 以装载阿霉素。将所得的脂质体与任何残留的未包囊的阿霉素分离开来, 并分析药物和脂类含量, 如实施例 1 所述。结果在表 3 中示出。

[0159] 表 3. 阿霉素装载入含有包载的空间受阻的取代的烷基、二烷基-、三烷基-和杂环铵盐溶液的脂质体中。

	用于制备取代的 铵盐的胺	同 渗 重 摩 , mmol/kg	药 物 装 载 , mg/mmol 磷脂	装 载 效 率 , %
	三甲胺	497	149.4 $\pm$ 7.9	96.4 $\pm$ 4.9
	三乙胺	559	149.6 $\pm$ 6.9	96.5 $\pm$ 4.3
	二甲基乙醇胺	509	163.1 $\pm$ 6.6	105.3 $\pm$ 4.5
	二甲胺	472	158.6 $\pm$ 7.4	102.3 $\pm$ 4.9
[0160]	二乙胺	519	156.7 $\pm$ 13.0	101.1 $\pm$ 8.5
	二异丙胺	533	159.9 $\pm$ 6.2	103.2 $\pm$ 4.1
	三(羟甲基)-氨基 甲烷	423	179.9 $\pm$ 15.3	116.1 $\pm$ 11.5
	1-哌啶乙醇	506	153.5 $\pm$ 7.1	99.9 $\pm$ 4.5
	4-甲基吗啉	465	152.4 $\pm$ 9.8	98.3 $\pm$ 6.2
	哌啶	479	158.5 $\pm$ 12.5	102.3 $\pm$ 8.2

	1-甲基吡咯烷	492	153.6±12.3	99.1±7.8
[0161]	二甲基哌嗪	378	158.0±6.5	101.9±4.3

[0162] 实施例 4. 三乙铵多磷酸盐 (TEA-Pn) 溶液的制备

[0163] 将每分子含有 13-18 磷酸盐单元的线性多(磷酸)钠 (Phosphate glass; CALGON®, 得自 Sigma Chemical Company) 溶解入水中, 获得约 1.3M 磷酸盐的浓度。将溶液通过填充有 120mL 氢形式的磺酸化聚苯乙烯-二乙烯基苯共聚物阳离子交换树脂珠 (Dowex 50W×8.200, Dow Chemical Co.) 的柱。该柱用含水的 3-3.6M HCl 预先平衡使得树脂为氢形式, 并用去离子水洗涤至中性 pH。将 15ml 多磷酸钠溶液应用到柱上, 并用去离子水洗脱。使用传导率检测仪监测柱洗脱剂。传导率在峰值时的柱流出物用纯三乙胺滴定至 pH5.5-6.0。使用钠-敏感性玻璃电极通过电势分析法分析溶液中残留的钠, 使用无机磷酸盐分析法分析磷酸盐含量, 如实施例 1 所述。将残留钠含量在 1% 以下的溶液稀释至最终磷酸盐浓度为 0.55M。典型地, 溶液的 TEA 浓度为 0.52-0.55M、pH 为 5.5-6.0 和同渗重摩为 430-480mmol/kg。

[0164] 实施例 5. 从脂质体制剂去除未包裹的聚磷酸盐

[0165] 根据 Kirpotin, et al., Biochemistry 36:66-75, 1997, 制备含有包载的荧光标记 8-羟基苊三磺酸盐的脂质体 (大小为 120nm), 并与多磷酸钠溶液混合。将混合物装载在含有全部获自 Amersham Pharmacia 的交联葡聚糖珠 (Sephadex G-75)、6% 琼脂糖珠 (Sephacrose 6B-CL) 或 4% 琼脂糖珠 (Sephacrose 4B-CL) 的尺寸排阻柱上, 并用 MES-葡萄糖缓冲液 (pH5.5) 洗脱。使用 Bartlett (1959) 的磷酸盐测定法分析流出物的磷酸盐含量, 通过荧光光谱法测定脂质体含量。在研究的凝胶-层析载体中, Sepharose CL-6B 能在样品/柱床体积比为 13 时将聚磷酸盐与脂质体完全分开。

[0166] 实施例 6. 制备三乙铵蔗糖八硫酸盐 (TEA-SOS) 溶液

[0167] 蔗糖八硫酸钠 (当量, 144.8) 是蔗糖衍生物的钠盐, 其中所有羟基基团已经形成硫酸酯。蔗糖八硫酸 (SOS) 钠盐购自 Toronto Research Chemicals, Toronto, Canada, p/n S699020。将 6 克蔗糖八硫酸钠溶解在 16.57ml 的去离子水中, 得到约 2.5N 的硫酸盐基团终浓度。溶液通过离子交换处理, 如实施例 4 所述。然后用纯三乙胺滴定作为离子交换柱流出物获得的蔗糖八硫酸溶液, 至 pH5.7 (中和点), 并测定溶液的 pH 和同渗重摩。所得溶液计算得到的三乙胺浓度为 0.643M, pH5.7, 同渗重摩为 530mmol/kg。残留钠的存在用电势分析法无法检测到 (0.1% 以下)。

[0168] 实施例 7. 用取代的铵盐装载有伊立替康 (CPT-11) 的脂质体: 制备和在血浆存在下体外药物释放。

[0169] 在本实施例中, 硫酸盐、柠檬酸盐、焦磷酸盐、三磷酸盐和线性聚磷酸盐 (13-18mer) 作为阴离子在脂质体-包载的取代的铵盐溶液中被研究。因为磷酸盐聚合物具有生物可降解性和因为聚磷酸盐在细胞中天然发现的缘故, 选择磷酸盐聚合物, 作为其他合成的聚合物阴离子 (聚丙烯酸盐、葡聚糖硫酸盐和类似物) 的对照。还有, 低分子量的聚磷酸盐溶液的粘性比其他聚合物的粘性低, 这使得聚磷酸盐更容易处理。

[0170] 下面的物质被用于制备盐溶液:

[0171] 1. 多磷酸钠,  $\text{NaO}[\text{PO}_3\text{Na}]_n\text{-Na}$ ,  $n = 13-18$ , 购自 Sigma (产品编号 P-8510, “磷

酸盐级 (phosphate Glass), 实践级 (practical grade)”, 也称为六偏磷酸钠或商标名 CALGON) ;

[0172] 2. 三多磷酸五钠,  $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ , 购自 Sigma (产品编号 T-5883) ;

[0173] 3. 十水焦磷酸四钠,  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , 购自 Sigma (产品编号 P-9146)。

[0174] 4. 购自 Sigma 的离子交换树脂 Dowex 50Wx4 (4% 交联的磺酸化聚苯乙烯树脂, 100-200 网孔) (产品编号 50×4-200), 或购自 Sigma 的 Dowex HCR-W2 (8% 交联的磺酸化聚苯乙烯树脂 50-100 网孔) (产品编号 1-8880) 可交换使用。按下面的倾析顺序来洗涤树脂: 用去离子水倾析三次, 用 1N HCl (体积超过树脂 3 倍) 倾析两次, 用水倾析三次, 用 1N NaOH 倾析两次, 用水倾析三次, 用 1N HCl 倾析三次, 用水倾析三次。倾析之后, 树脂是  $\text{H}^+$  形式。

[0175] 5. 三甲胺 (TMA), 水溶液 40%, 购自 Aldrich Chemical Co. (产品编号 43, 326-8)。通过酸滴定建立约 5.9N 的浓度。

[0176] 6. 三乙胺 (TEA), 99%, HPLC 级, 来自 Fisher (产品编号 04884)。酸滴定浓度是 6.9-7.1N。

[0177] 通过反渗透、离子交换和有机去除法来纯化水, 获得无有机 “16-18 MΩm” 质量 (organic free “16-18 MΩm” quality)。

[0178] 通过离子交换方法制备焦磷酸盐、三磷酸盐和聚磷酸盐的含水溶液。将多磷酸钠 (3g, 于 25mL 水中)、焦磷酸盐 (4g, 于 27mL 水中) 或聚磷酸盐 (6.7g, 30mL 水中) 装载到含有 100mL (床体积) 如上制备的离子交换树脂的柱上。用水洗脱柱, 并收集级分。收集显示酸性 pH (pH<3) 的级分。用 20mL 水稀释三份 0.5mL 等分含有磷酸的收集级分, 并用 0.100N NaOH 滴定至 pH4.5-5.0 的终点 (Fisher 分析溶液), 来测定当量浓度。离子交换之后富集的级分用三甲胺滴定 (以便获得三甲铵盐) 至 pH5.4-5.5。滴定之后, 如果必要, 稀释溶液以便三甲铵的最终浓度接近 0.5N。

[0179] 通过用 80mL 水稀释 1.39mL 浓硫酸 (17.9M), 并用纯三乙胺或含水三甲胺在 pH 计控制下将稀释的溶液滴定至等当点 (pH5.1-5.5), 制备三甲铵和三乙铵硫酸盐。用水将体积调整到 100mL。

[0180] 通过将获自 Sigma 的 1.572g 一水柠檬酸 ACS (产品编号 C-1909) 溶解在 20mL 水中, 并用含水三甲胺将溶液滴定至等当点, 制备三甲铵柠檬酸盐溶液。用水将体积调整到 25mL。

[0181] 利用正压, 通过 0.2- $\mu\text{m}$  醋酸纤维素过滤器过滤该溶液。使用蒸汽压渗透压计和玻璃-甘汞电极 pH 计分别测量溶液的同渗重摩和 pH。酸水解 (5min, 100°C, 3N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 之后, 通过磷钼酸盐分光光度分析法 (参见实施例 70) 测定磷酸盐溶液中阴离子的当量浓度。阴离子当量浓度仅仅考虑在 pH5.5 充分离子化的酸性官能团。

[0182] 根据加入的三烷基铵基本组分 (base) 测定阳离子当量浓度。获得的溶液具有下述特性 (表 4) :

[0183] 表 4. 用于将 CPT-11 装载入脂质体的取代的铵盐溶液的特性

盐	阳离子当量 浓度	阴离子当量 浓度	pH	同渗重摩(mmol/kg)
TMA 柠檬酸 盐	0.58	0.60	5.1	791
TMA 硫酸盐	0.50	0.50	5.4	625
TMA 焦磷酸 盐	0.44	0.54	5.4	651
TMA 三磷酸 盐	0.57	0.68	5.4	695
TMA 多磷酸 盐	0.49	0.58	5.5	336
TEA 硫酸盐	0.54	0.50	5.35	719

[0184] 胆 固 醇 和 DSPC 购 自 Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, USA. PEG-DSPE (PEG 分子量 2,000) 购自 Shearwater Polymers, Huntsville, AL, USA. 将重量比为 3 : 1 : 0.1 (摩尔比约 3 : 2 : 0.03) 的 DSPC、胆固醇和 PEG-DSPE 溶解在氯仿 (Fisher ; Optima grade, 用戊烯稳定) 中, DSPC 的浓度为 60mg/mL. 以每管 30mg DSPC (0.5mL) 将溶液分配到 Pyrex 管中, 并使用旋转蒸发器在 60°C 在减压下缓慢蒸发. 室温下, 真空中 (100 微米水银, 油泵) 将脂膜干燥 30-60 分钟.

[0185] 通过在 60°C 在上面的含水盐溶液中温和摇动, 将干燥的脂膜水合 15-20 分钟. 脂类形成乳白色的悬浮液 (多层小泡). 该乳白色悬浮液进行下述 5 次循环: 在干冰和异丙醇 (-80°C, 3 分钟) 的混合物中冷冻, 在 60°C 水浴中解冻 3 分钟. 然后, 使用在 60°C 加热的手工操作的往复式挤出机 (Avanti Polar Lipids), 将脂类悬浮液挤压通过二叠层聚碳酸酯膜过滤器 (Nucleopore, Whatman, 孔径 0.1  $\mu$ m) 10 次 (双程).

[0186] 挤出的脂质体保持在 60°C 中 5 分钟, 并在冰水 (0-4°C) 中淬火 5 分钟. 然后通过 Sephadex G-75 上进行凝胶层析, 将脂质体从形成梯度的盐溶液分离入装载缓冲 MES- 葡萄糖 (50g/L 葡萄糖 ACS、0.975g/L 2-(N-吗啉代)-乙烷磺酸 (MES) 和足够数量的 5M NaOH, 使 pH 至 6.4). 脂质体出现在孔隙体积部分 (柱床体积的 30%).

[0187] 将每 1mg 固体含有 0.860mg CPT-11 基本成分 (base) 的 CPT-11 (盐酸伊立替康) 制剂溶解于 0.001N HCl, 制备 16.5mg/mL CPT-11 基本成分的贮存液. 将该溶液与 MES- 葡萄糖缓冲液中的脂质体混合, 获得每 1  $\mu$ mol 脂质体磷脂含 150  $\mu$ g CPT-11 的比率. 混合物在 55°C 水浴中温育 30 分钟, 偶尔温和摇动一下 (大约每分钟一次), 然后在冰水 (0-4°C) 中迅速冷冻. 使用 MES- 葡萄糖作为洗脱剂, 通过在 Sephadex G-75 上进行凝胶层析, 将脂质体与未包囊的药物分离开. 包囊的药物通过分光光度分析法测定 (实施例 71), 磷脂用抽取分析法 (extraction assay) 测定 (实施例 70).

[0188] 在 50% 人血浆存在下, 在体外按照如下方法研究药物从如此获得的装载 CPT-11 的脂质体的释放. 冷冻的人供体血浆在 37°C 解冻, 14,500g 下离心 10 分钟, 并过滤通过 0.45- $\mu$ m 醋酸纤维素注射过滤器. 使装载有 CPT-11 的脂质体制剂通过 0.2- $\mu$ m 无表面活性剂的醋酸纤维素 (SFCA) 无菌注射过滤器进行过滤. 将 0.5-mL 的脂质体与 0.5mL 血浆在

无菌 1.5-mL 共聚物 Eppendorf 管中混合,密封,并在摇摆平台上 37°C 中温育 24 小时。空白样品含有 0.5mL 无菌 MES-葡萄糖以替代脂质体。使用 144mM NaCl,5mM HEPES-Na, pH7.4 缓冲液 (HBS-5),在珠状交联的 2% 琼脂糖凝胶 (Sephacrose CL-2B, Pharmacia;10mL 床体积)上,通过凝胶层析分离脂质体。脂质体出现在孔隙体积部分中,而血浆蛋白和释放的药物(如果有)则保留在凝胶中。分析脂质体馏分中的 CPT-11 和磷脂,并测定药物/磷脂比率(输出比)。含脂质体样品的读数减去空白样品(仅血浆)的读数。通过输出药物/脂类比率除以输入药物/脂类比率(与血浆温育之前的药物/脂类比率),测定温育之后保留在脂质体中的药物百分比。表 5 概括了装载和释放的数据。

[0190] 表 5. CPT-11 装载入含有叔烷基铵盐的脂质体中,并在人血浆存在下的药物体外释放情况

	包载的盐溶液	与血浆温育之前		与血浆温育之后	
		药物/脂类比率	包囊效率(%)	药物/脂类比率	保持包囊的药物(%)
[0191]	TMA 硫酸盐	127.2±5.6	84.8±3.8	132.1±6.9	103.8±10.0
	TMA 焦磷酸盐	136.2±9.0	90.8±6.0	132.3±5.0	97.1±10.1
	TMA 三磷酸盐	132.9	88.6	129.2	97.3
	TMA-Pn	134.4±9.3	89.6±6.2	135.0±7.4	100.4±12.4
[0192]	TEA 硫酸盐	131.1±6.5	87.4±4.4	125±5.0	95.5±8.6

[0193] 实施例 8. 使用焦磷酸盐、三磷酸盐、聚磷酸盐、柠檬酸盐和硫酸盐三烷基铵盐装载 CPT-11 的脂质体的体内稳定性

[0194] 尽管喜树碱脂质体可以在体外血浆中显示出可接收的药物渗漏现象,在体内血液循环中药物可能更快地渗漏出来。因此,在小鼠中使用单时间点分析方法,筛选一组 CPT-11 脂质体制剂,分析体内血液循环中的药物稳定性。

[0195] 如实施例 6 所描述地,制备脂质体并装载 CPT-11,有如下改动。代替使用 Shearwater Polymers 的 PEG-DSPE,我们使用 Avanti Polar Lipids 的相似的 PEG-DSPE。为了能对血液/组织样品中的脂质体脂类基质进行定量,以 0.25mCi/mmol 磷脂的数量,将非可交换的放射性标记 [3H]-胆甾醇十六烷基醚 ([<sup>3</sup>H]-CHE ;(Amersham,USA)) 加入到脂类的氯仿溶液中。以 12mg DSPE/管将脂溶液分配入 Pyrex 管,通过旋转蒸发/真空干燥形成脂膜。脂膜在 0.7mL 形成梯度的取代的铵盐溶液中水合。含有包载的含磷酸盐的盐的脂质体中脂浓度通过放射性闪烁计数法测定。也测定无包载的含磷酸盐的盐的制剂中的磷脂,不进行萃取,如实施例 70 所述,并用作脂放射性标准。将制备用于装载的脂质体-药物混合物部分收集起来并进行分析,以在装载之前确定加入的 CPT-11 与脂质体脂类的装载前比率(“输入比率”)。使用高斯模型,通过准弹性光散射法 (QELS) 测定体积平均值和脂质体大小分布的标准偏差。表 6 概括了这些脂质体的特性。

[0196] 表 6. 用于体内稳定性研究的装载 CPT-11 的 [<sup>3</sup>H]-CHE 标记的脂质体的特征

	包载的盐溶液	装载之前的药物/脂类比率	装载之后的药物/脂类比率	装载效率(%)	脂质体大小 (平均值±SD) nm
	TMA 柠檬酸盐	159.2 ±3.5	156.7 ±3.6	98.5 ±4.4	122.1 ±25.3
	TMA 硫酸盐	156.1±2.5	156. ±3.1	100.0±3.6	122.2±28.4
[0197]	TMA 焦磷酸盐	164.6±5.8	156.6±4.3	95.2±6.0	121.1±19.9
	TMA 三磷酸盐	163.6±5.7	156.0±3.2	95.3±5.3	122.4±12.9
	TMA 多磷酸盐	170.5±8.0	162.4±4.0	95.3±6.8	123.0±12.7
	TEA 硫酸盐	153.±3.3	154.9±4.9	101.0 ±5.3	121.1 ±18.0

[0198] 六周龄的雌性 CD-1 小鼠 (Charles River) 以 10mg/kg (0.2mg CPT-11/ 小鼠) 的剂量通过尾静脉注射这些脂质体 CPT-11 制剂两次。八小时之后, 麻醉小鼠并通过开放性心脏穿刺放血。将血液收集到肝素化的注射器中 (10-20  $\mu$ l, 1000U/ml 肝素 USP), 并转移入称重的管中, 并放置在冰中, 其中该管含有 0.4ml 磷酸盐缓冲液生理盐水溶液 (PBS), 该溶液中含有 0.04% EDTA (Gibco BRL)。对管称重以测定血液样品的重量, 通过在 9,000g 离心 5 分钟分离血细胞, 收集含有 PBS- 稀释的血浆的上清液, 用于药物和脂质体脂类分析。通过荧光分析法对 CPT-11 定量 (实施例 71)。通过淬灭-校正放射性闪烁计数法对脂质体脂类定量。与血浆样品平行, 对脂质体和磷脂-放射性标准进行计数。通过血浆样品中药物/放射性比率除以注射的脂质体的药物/放射性比率, 来计算保持包囊的药物的百分比。由于游离 CPT-11 快速从血液中消除 (参见实施例 69) 以及已知的 [<sup>3</sup>H]-CHE 对脂交换的稳定性, 试验的读数被认为指示了脂质体 CPT-11 和脂类的血液含量。假设 100% 注射的药丸进入循环; 血液体积为小鼠体重的 6.3%; 血细胞比容 45%, 计算保持在循环中的注射的脂类剂量的百分比 (% I.D.)。表 7 概述了这些结果。

[0199] 表 7. 注射后单点时刻 (8 小时) 小鼠中 CPT-11 包囊的体内稳定性和装载 CPT-11 的脂质体的循环寿命。% I.D., 注射剂量的%。

	脂质体-包载的盐	药物/脂类比, 注射前值的%	脂质体脂类, % I.D., 于血液中
	TMA 柠檬酸盐	80.2±7.8	18.8±3.4
[0200]	TMA 硫酸盐	70.1±4.8	23.6±1.8
	TMA 焦磷酸盐	67.3±9.2	23.2±3.1
	TMA 三磷酸盐	70.6±6.0	24.9±8.2
	TMA 多磷酸盐	107.5±8.9	24.3±3.4
	TEA 硫酸盐	76.6±13.1	23.6±0.1

[0201] 所有制剂显示 8 小时后体内血液中药物包囊水平为注射前水平的 70-80%，而含有聚磷酸盐的脂质体最稳定（药物包囊保持在约 100%）。

[0202] 实施例 9. 用三乙铵多磷酸盐制备的 CPT-11 脂质体的血液药物动力学。

[0203] 按照实施例 3 描述的方法制备使用三乙铵多磷酸盐的脂质体 CPT-11 制剂。脂类——DSPC、胆固醇和 N-(甲氧基-聚(乙二醇)(分子量 2000)-氧羰基)-DSPE (PEG-DSPE) (都来自 Avanti Polar Lipids, Inc.)——作为干粉末以 3 : 2 : 0.015 摩尔比混合,并于 62-65°C 溶解在 100% 乙醇 (USP 级, 大约 0.15mL/100mg 脂类) 中。为了进行药物动力学研究,以 0.5mCi/mmol 磷脂的数量,将 <sup>3</sup>H-胆甾醇十六烷基醚 ([<sup>3</sup>H]-CHE, 获自 Amersham Pharmacia) 作为非可交换的放射性标记加入到脂类中。按照实施例 4 中的方法制备 TEA-Pn (0.5M 三乙铵, pH5.7-6.2) 的含水溶液。

[0204] 将 TEA-Pn 溶液 (10 倍于加入的乙醇的体积) 与脂类溶液在 60-65°C 混合,并在该温度进行搅拌,直到形成均质的乳白色多层囊。使用氩压力挤出机 (LipexBiomembranes) 在 60-65°C 下,使悬浮液挤压通过 100nm 孔径的 2 叠层聚碳酸酯径迹蚀刻过滤器 (Coming Nuclepore) 15 次,所得的单层脂质体迅速在冰上冷冻,然后放置在环境温度下。通过在 Sepharose CL-4B 柱上进行凝胶层析,用 MES-葡萄糖缓冲液 (5mM MES、50g/L 葡萄糖, pH 用 NaOH 调节到 6.5) 洗脱,去除乙醇和未掺入的聚磷酸盐。

[0205] 将含有于水中的 20mg/mL 伊立替康基本成分的 CPT-11 (盐酸伊立替康) 贮存液以 150-200mg/mmol 磷脂的药物 / 脂类比加入到脂质体,混合物在 60-62°C 温育 45-60 分钟,偶尔搅拌一下。迅速冷却温育混合物,并在 0°C 温育 10 分钟,然后可以达到环境温度。加入 1/20 体积的 2.88M NaCl 以调整生理离子强度,并提高膜-结合的 CPT-11 (相对于包囊在脂质体内部的药物) 的去除结果。通过在 SephadexG-25 或 G-75 柱 (Amersham Pharmacia) 进行凝胶层析,用 HBS-6.5 缓冲液 (5mM 2-(4-(2-羟乙基)-哌嗪)-乙基磺酸 (HEPES), 144mM NaCl, pH6.5) 洗脱,去除未包囊的药物。合并孔隙体积中洗脱的脂质体级分,通过 0.2 微米过滤进行灭菌,并保存在 4-6°C,直到使用。用脂类浓度、药物浓度和颗粒大小对脂质体表征,如实施例 7 所述。脂质体的平均大小为 108nm, CPT-11 含量为每 mmol 磷脂 139 ± 18mg CPT-11 基本成分。

[0206] 体内脂质体脂类和脂质体药物在血液中的寿命以及药物从脂质体释放的特征,在具有留置的中心静脉插管的雌性 Sprague-Dawley 大鼠 (190-210g) 中进行研究。大鼠注射以 0.2-0.3mL <sup>3</sup>H-CHE-标记的伊立替康脂质体 (0.05mmol 磷脂,或每 kg 体重为 7-8mg CPT-11) 丸剂。注射后使用经肝素处理的注射器在各时间点获取血样 (0.2-0.3mL)。提取的血液体积补充以磷酸盐缓冲生理盐水。血液样品用 0.3ml 含有 0.04% EDTA 的冰冷 PBS 稀释,称重,通过离心分离血细胞。收集上清流体,用实施例 71 的荧光测定程序分析 CPT-11,用常规方法通过闪烁放射性计数法分析脂质体脂类标记。具有已知的药物和 <sup>3</sup>H-CHE-脂类浓度的脂质体制剂用作标准。放射性标准含有相等数量的稀释的大鼠血浆,以说明淬灭效果。假设以 ml 计的血液体积是以克计的体重的 6.5%,血细胞比容为 40%,计算血液中 CPT-11 和脂质体脂类的数量。血液中脂类和药物的总数用注射剂量的 % (% I.D., % ID) 表示,并针对注射后时间作图。通过血液样品中的药物 / 脂类比率除以注射脂质体的药物 / 脂类比率 (取 100%),计算保留在脂质体中药物的百分比。因为这些图总体上显示与单指数动力学 (在半对数比例尺上是线性的) 具有良好的一致性,使用 Microsoft EXCEL 计算机

程序 (Microsoft Corp., USA) 的 TREND 选项, 药物、脂类的血液半衰期和药物从脂质体释放的半衰期由数据与单指数衰变方程最佳拟合计算而得。结果显示在图 1 中。由最拟合参数得知, 脂类和药物的血液半衰期分别是 16.4 小时和 6.61 小时。这些条件下, 游离的 CPT-11 迅速从循环中清除掉 (参见实施例 69)。

[0207] 血液药物 / 脂类比率显示了 CPT-11 从脂质体释放的两阶段特征 (图 2)。在第一个 24 小时, 药物释放与时间是线性关系 ( $R = 0.992$ ), 这证明是零阶释放动力学。在 24 小时的时间点, 约 75% 的药物被释放出来, 进一步的释放变为非线性的。在 24 小时里, 脂质体以每小时约起始载量的 3.6% 的恒定速率释放药物。因此, 在近似 14 个小时的阶段里, 50% 的药物被释放出来。在缓释制剂中, 药物的零阶释放是吸引人的特性, 这是因为药物释放速度随时间保持恒定。

[0208] 实施例 10. 在裸鼠中, 用三乙铵多磷酸盐制备的 CPT-11 脂质体对乳腺癌异种移植物的抗肿瘤功效

[0209] CPT-11 脂质体的抗肿瘤功效在人乳腺癌 BT-474 模型中进行研究, 人乳腺癌 BT-474 是过量表达 C-ErbB2 (HER2) 受体的雌激素 - 依赖性导管腺癌。BT-474 细胞获自 American Type Culture Collection (Rockville, MD)。具有较高肿瘤生长速度的 BT-474 亚系由按下面描述的方法培养的快速生长异种移植肿瘤节构建而得。在 T-150 瓶中, 细胞在含有 10% 胎牛血清、0.1mg/mL 硫酸链霉素和 100 U/ml 青霉素 G 的 RPMI-1460 培养基中体外增殖, 每周以 1 : 3 分裂。NCRnu/nu 雌性小鼠 (4-6 周龄, Taconic Farms) 皮下植入 60 天持续释放的 0.72-mg  $17\beta$ -雌二醇小药丸 (Innovative Research of America, Inc.), 两天后在上背区域皮下接种 0.1mL 含有于细胞生长培养基中的  $2 \times 10^7$  BT-474 细胞的悬浮液。每周 2 次, 通过触诊和测径器测量肿瘤的最大 (长度) 和最小 (宽度) 轴来监控肿瘤进展。使用下面的公式, 通过测径器测量数据, 每周确定肿瘤大小两次 (Geran, R. I., et al., 1972 Cancer Chemother. Rep. 3 : 1-88) :

[0210] 肿瘤体积 =  $[(长) \times (宽)^2] / 2$

[0211] 在接种后第 13 天, 肿瘤达到  $200\text{mm}^3$  的平均大小, 并将动物随机分配入三个组, 每组 13-15 只动物。

[0212] 如实施例 8 制备脂质体 CPT-11 (药物 / 磷脂比率 192mg/mmol ; 平均脂质体大小 86.8nm)。用 MES- 葡萄糖载体将游离 CPT-11 和脂质体 CPT-11 稀释至 5mg/ml 的 CPT-11 基本成分。在肿瘤接种后第 14、18、21 和 25 天, 动物通过尾静脉注射游离 CPT-11、脂质体 CPT-11 或仅仅注射载体。含药物的制剂以每次注射 50mgCPT-11/kg 的剂量给予, 这是有关啮齿动物肿瘤模型中进行 CPT-11 研究的文献中报道的剂量的平均值。

[0213] 为了评价与治疗相关的毒性, 也对动物每周两次称重。进行观察直到接种后 60 天结束, 在这时雌激素补充小药丸被耗尽。将各个组的平均肿瘤体积对时间一起作图并进行比较。如图 3 所示, 尽管游离 CPT-11 减慢肿瘤生长速度, 但在接受脂质体治疗的组中肿瘤显著消退。当在第 36 天对照组中肿瘤达到所允许的最大尺寸——平均  $3,500\text{mm}^3$ , 以及在第 46 天, 在用游离药物治疗的组中, 肿瘤平均约  $1,000\text{mm}^3$ , 而在同一时刻, 在脂质体治疗的组中没有动物具有可触诊的肿瘤。

[0214] 用动物体重动力学来评价与治疗相关的毒性 (图 4)。没有哪个组显示出任何明显的毒性。对照组动物的重量始终在增加。在最后治疗日, 接受脂质体 CPT-11 的动物的平



均体重微微减少约 3.3%。然而该肿瘤减轻得到逆转,并且所述动物达到它们期望的重量。与治疗前重量相比,通过 Student' t- 试验,该平均体重的减少在统计学上并不显著 ( $p = 0.274$ )。因此,所有治疗是可以忍受的,没有显著毒性。

[0215] 因此,通过预先包载聚阴离子的生物可降解聚合物(聚磷酸盐)的位阻取代铵盐(三乙铵)的药物装载而获得的 CPT-11 脂质体制剂,在研究的肿瘤模型中显示出延长的血液寿命期、缓释特征和增加的抗肿瘤活性,而毒性上并无可测量的增加。

[0216] 实施例 11. 对用预先包载的三乙铵盐制备的装载 CPT-11 的脂质体的比较性评价:脂质体大小的影响、药物/脂类比率、预先包载的阴离子的特性。

[0217] 制备两种装载 CPT-11 的脂质体的原型制剂,一种用具有预先包载的 TEA-Pn 的脂质体,另一种用具有预先包载的 TEA-SOS 的脂质体。这些脂质体的制备包括下述生产步骤:

[0218] 1) 通过在乙醇中共溶混合脂类。脂类基质组合物由下述物质组成:1,2-二硬脂酰-SN-磷脂酰胆碱(DSPC)(分子量 790),3 摩尔份(59.8 摩尔%);胆固醇(Chol)(分子量 387),2 摩尔份(39.9 摩尔%);和 N-( $\omega$ -甲氧基-聚(乙二醇)-氧羰基)-1,2-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(分子量 2787)(PEG-DSPE),0.015 摩尔份(约 0.3 摩尔%)。DSPC 和 PEG-DSPE 购自 Avanti Polar Lipids, Birmingham, Alabama。胆固醇(最高纯度级)购自 Calbiochem。在硼硅酸盐玻璃容器中以  $\pm 0.1\text{mg}$  的精度称量干脂类,并以适合于下面的脂类分散步骤的比率与无水乙醇混合。因为 DSPC 具有高转变稳定( $55^\circ\text{C}$ ),通常在  $55\text{--}60^\circ\text{C}$  下进行溶解,直到获得澄清溶液。

[0219] 2) 制备 TEA-Pn 和 TEA-SOS 溶液。多磷酸钠( $n = 13\text{--}18$ )来自 Sigma Chemical Co., p/n P 8510。蔗糖八硫酸钠购自 Toronto Research Chemicals, Toronto, Canada, p/n S699020。称取盐,并溶解在水中,得到 1.2-2.5N 溶液。使用  $\text{H}^+$  形式的阴离子交换剂 Dowex 50Wx8-200 或 Dowex HCR-W2(获自 Sigma),将钠盐转化为游离酸。在首次使用之前,树脂如下洗涤:用 3 体积的下述溶液搅拌,然后进行倾析:(1) 1.0-1.2M 含水  $\text{HCl}$  2 次;(2) 水 2 次;(3) 1.0-1.2M 含水  $\text{NaOH}$  2 次;(4) 水 2 次;(5) 1.0-1.2M 含水  $\text{HCl}$  2 次。将于水中的洗涤过的树脂的悬浮液在重力流的作用下填充在合适的尺寸层析柱中,使每 mL 钠盐溶液至少具有 8mL 填充的树脂。通过 2 柱体积的 3.0-3.6M 含水  $\text{HCl}$ ,之后 5 柱体积的水或直到洗出液的传导率低于  $1\ \mu\text{S}$ ,进一步平衡树脂。使用之后,通过顺序通过下述物质使柱再生,1. -1.2M  $\text{HCl}$ ——3 柱体积;3.0-3.6M  $\text{HCl}$ ——2 柱体积;水——至少 5 柱体积,或直到洗出液的传导率低于  $1\ \mu\text{S}$ ,并于室温中保存在  $0.2\ \mu\text{m}$  过滤的水中。将 Pn 和 SOS 钠盐溶液施用于柱沥干的表面上(每 4ml 填充的树脂体积约 1ml),并在重力作用下以约 1-2ml/min 的速度流动,这是对于 75-150mL 的树脂床尺寸而言。柱用水洗脱。测试洗出液的传导率。收集具有 10mS 或更高传导率的级分。如果需要更高浓度的多酸溶液,可以在 20-50mS 时开始收集,其代价是形成梯度的盐丧失稍微较多。在多磷酸的情况下,收集的溶液保持冷冻( $0\text{--}4^\circ\text{C}$ )直到胺滴定步骤,这是因为在低 pH 时磷酸二酯键具有水解不稳定性。收集的洗出液的 pH 将小于 0.7(典型地约 0.4),传导率约 120-200mS。任选地,因为在低 pH 下聚磷酸盐稳定性的缘故,无延迟地进行胺滴定步骤。将来自 Fisher, p/n 04884 的 HPLC-级三乙胺(99.5+% 的纯度)用于滴定由离子交换获得的酸溶液。通过电位滴定分析测定纯 TEA 的当量浓度。将 0.100-mL 等分 TEA(0.100ml)加入 20ml 水中,三次。用 0.1N  $\text{HCl}$  标准溶液滴定这些等分试样,至 5.5-6.0 的 pH 终点(玻璃电极)。计算得到的当量浓度(7.07N)接近于理论值

7. 17N。测量的多磷酸 (Pn) 或蔗糖八硫酸 (SOS) 溶液的体积用纯 TEA 在 pH (玻璃) 电极的控制下滴定。需要充分搅拌来分散胺。滴定终点是 pH5.6-6.2。准确记录加入的 TEA 的体积。测量滴定的溶液的体积, 根据加入的 TEA 的体积和当量浓度计算 TEA 的浓度。如果必要, 加入水来调节 TEA 浓度至所需的  $0.55 \pm 0.05N$  或  $0.65 \pm 0.03N$ , 如下所示。使用钠选择性玻璃电极 (Corning), 通过电势分析法测定在所得到的 TEA-Pn 或 TEA-SOS 溶液中残留钠的量。用 19mL 水稀释 1mL 溶液, 并根据电极制造商的使用手册, 使用增量法测定钠浓度。残留钠的量为 1mM 以下, 典型地在 0.5mM 以下。使用正压进料, 使获得的 TEA-Pn 或 TEA-SOS 溶液通过 0.2  $\mu$ m 醋酸纤维素无菌过滤器。测量并记录溶液的最终 pH 和同渗重摩。我们使用 pH 甘汞微组合全玻璃电极测量 pH, 使用蒸汽压 / 露点渗压机测量同渗重摩。溶液被冷冻保存直到使用。

[0220] 3). 通过将脂类的乙醇溶液与梯度形成缓冲液混合, 在梯度形成缓冲液中制备脂类分散液。用乙醇混合方法将脂类分散在形成梯度的盐溶液中。所有步骤在 60-65°C 中进行。在耐化学性玻璃梨形瓶或管中, 在约 0.5-0.6M DSPC 的浓度下, 将脂类溶解在 100% 乙醇 USP 中。将形成梯度的盐溶液 (TEA-Pn 或 TEA-SOS) 预加温到 60-65°C, 并立即加入到乙醇脂溶液中, 并通过旋转和 / 或漩涡充分混合各成分。乙醇的最终量为约 10 体积%。对于磷脂超过 0.1mmol 级别的制剂, 将所得的悬浮液于 60-65°C 置于旋转蒸发器中, 通过旋转抽真空, 直到乙醇停止产生, 这以泡沫形成终止而示出。对于磷脂为 0.1mmol 或 0.1mmol 以下级别的制剂, 在该步骤乙醇不从脂类分散液去除。所得脂类分散液保持在 60-65°C, 并立即用于挤出步骤。[0162]4). 脂类分散液连续挤压通过孔径确定的膜。对于体积达 1mL 的脂类悬浮液, 我们使用手工操作的反复式挤出机, 其由 Avanti Polar Lipids 提供。该挤出机安装 19mm 径迹蚀刻过滤膜, 并根据金属加热模块恒温调节温度。对于 1 至 10mL 的体积, 我们使用恒温的、气压操作的、单向流动挤出机, 该挤出机来自 LipexBiomembranes。该挤出机安装 25mm 过滤膜。如果合适, 使用手工进料或氩气压力, 在 60-65°C 反复挤压脂类悬浮液通过一系列 2 叠层聚碳酸酯膜过滤器 (来自 Corning-Nuclepore and Osmonics Corp. 的过滤器同样适合), 该膜过滤器具有 100nm、80nm 或 50nm 的公称孔径。当对脂质体大小的效应感兴趣时, 挤压在 100nm、80nm 或 50nm 步骤停止。对于每次试验, 所使用的过滤器的准确类型和挤压次数表示如下。所挤出的脂质体保持在 60-65°C 约 15 分钟, 并在冰浴中迅速冷却到 2-4°C。冰浴中约 15 分钟之后, 脂质体允许达到室温。

[0221] 5). 脂质体外的梯度形成缓冲液的去除了以及脂质体向药物装载缓冲液的转移。去除未包裹的梯度形成盐, 并使用尺寸排阻层析 (SEC) 将脂质体转移入药物装载缓冲液。其他可放大步骤的切线流过滤 (Tangential flow filtration)、中空纤维透析 (hollow fiber dialysis) 可以用于放大生产 (scale-up manufacture)。通过用阴离子交换树脂 (例如 Dowex-1 或 Dowex-2 季铵交联聚苯乙烯珠) 处理脂质体以确保完全去除脂质体外的聚阴离子是有利的。药物装载缓冲液含有 50g/L 无水葡萄糖 USP 和 5mM 水中的组织培养级 (tissue culture certified) HEPES, 并用 NaOH 将该缓冲液调节至 pH6.5。该缓冲液被真空过滤通过 0.2 微米尼龙过滤器 (Whatman)。挤出的脂质体在 Sepharose CL-4B (Pharmacia) 柱上层析, 并用该药物装载缓冲液洗脱。脂质体出现在孔隙体积部分, 并根据洗出液浊度以约 2 倍的所施用体积收集。根据实施例 70, 测定洗脱的脂质体的磷脂浓度, 通过 QELS 测定颗粒大小, 并保存在 4-6°C。

[0222] 6) 脂质体与药物温育。在与脂质体混合之前一刻,通过将盐酸伊立替康溶解在水中以获得 20mg/mL 药物基本成分的浓度而制备 CPT-11 (盐酸伊立替康) 贮存液。溶液的 pH 在 4.0 至 5.0 之间。使用正压使药物溶液过滤通过 0.2 微米聚醚砜 (PES) 无菌过滤器。将上面步骤 5 中产生的药物装载缓冲液中的等分脂质体在室温中与贮存的伊立替康溶液混合,获得每摩尔脂质体磷脂 0.15-0.55g 药物范围内的药物 / 脂类输入比。如果合适,将特定的输入药物 / 脂类比率表示于下。用 1M NaOH 将混合物的 pH 调节到 6.5,玻璃瓶中的混合物在 58-62°C 恒温水浴中温育 30-45min,同时缓慢搅拌,在冰浴 (0-2°C) 中迅速冷却,并在该温度放置 15 分钟。然后将脂质体加温到室温,用于下一步骤 (去除未包囊的药物并转移入保存缓冲液)。在所研究的药物 / 脂类比率的全部范围内,该步骤产生 95% 以上、典型地 98-100% 的包囊效率。

[0223] 7). 去除未包囊的 CPT-11,将脂质体转移到保存缓冲液,最终过滤并保存。去除未包囊的药物,利用尺寸排阻层析将脂质体转移入保存缓冲液。保存缓冲液含有于水中的 20mM HEPES、135mM NaCl, pH6.5 (用 NaOH 调节),在使用之前 0.2-微米真空过滤。基本上按照上面步骤 2 中描述的方法在 Sephadex G-75 (Amersham Pharmacia Biotech) 上进行凝胶层析。测定从柱 (孔隙体积部分) 洗脱得到的 CPT-11 脂质体的脂质体磷脂和 CPT-11 (通过分光光度法,参见实施例 70 和 71),并通过 QELS 测定体积加权平均颗粒尺寸。如果必要,将药物浓度调整到 2.0-4.0mg/mL 范围内。将脂质体过滤通过 0.2 微米聚醚砜无菌过滤器,并在无菌条件下分配入无菌聚苯乙烯瓶 (Corning Cryo-Vials) 或 PTFE 衬里的螺纹帽 (PTFE-lined screw-cap) 硼硅酸盐 4-mL 玻璃瓶中,至瓶体积的大约 70-80%。无菌条件下封闭瓶 (空气中),作标记,并保存在 4-6°C。

[0224] 实施例 12. 药物 / 脂类比率对药物装载效率和含 TEA-Pn 的脂质体的体外药物保持效果的影响。

[0225] 根据实施例 11 的程序,制备含有包载的 0.65N 含水 TEA-Pn 溶液, pH6.1,同渗重摩 531mmol/kg 的脂质体。脂质体分散液被 10 次挤压通过二叠层 100nm 孔径聚碳酸酯过滤器。脂质体脂类基质液还包含 0.5 mCi/mmol 磷脂的 [<sup>3</sup>H]-CHE。装载药物之前的脂质体大小为 98.5±34.3nm。脂质体以 200、300、400 和 500mgCPT-11/mmol 磷脂的初始药物 - 磷脂比率装载。分别根据实施例 71 的分光光度法和根据实施例 72 的磷脂挤压 - 消化 - 蓝色 (extraction-digestion-blue) 磷钼酸盐分析方法测定脂质体中药物和磷脂的量。

[0226] 为了评体内药物释放速度,进行实施例 8 的方法。以 5mg CPT-11/kg 的剂量,将脂质体通过尾静脉注射入 6 周龄雌性 Swiss Webster 小鼠 (体重 18-22g)。在注射后 8 小时和 24 小时,麻醉 3 组小鼠,并通过开口心脏穿刺放血。将血液与 0.4mL 于 PBS 中的冰冷的 0.04% EDTA 混合,通过离心分离血细胞,通过实施例 71 中描述的荧光光度法测量 CPT-11 的血浆浓度。通过使用淬灭 - 校正液体闪烁计数法测量 [<sup>3</sup>H]-CHE 的数量来测定脂类,并通过将测定的药物 / 脂类比率除以注射的脂质体中的药物 / 脂类比率,计算保留在脂质体中的药物的量。因为游离 CPT-11 具有快速的血液清除特性,导致低血液水平,我们假设所有被测定的药物是脂质体形式的药物。

[0227] 结果呈现在表 8 中。各组药物保留之间的差异在统计学上并不显著。作为这些研究的结果,我们得出的结论是,将药物装载增加至 500mg/mmol 将不会不利地影响药物装载或体内稳定性。该比率被用于进一步的研究。

[0228] 表 8. 药物 / 脂类比率对伊立替康 TEA-Pn 脂质体中药物装载和体内药物保留的影响 (平均值 ± 标准偏差)。

药物/脂类比率, mg/mmol 磷脂			保留在脂质体中的药物, 注射前值的%	
输入	输出	%装载	8 小时后	24 小时后
[0229] 200	208.4	104.2	54.6±9.9	9.72±2.23
300	286.3	95.4	85.2±14.3	14.52±2.51
400	348.8	87.2	81.5±18.3	17.31±6.14
500	518.9	103.8	66.8±19.6	13.47±1.44

[0230] 实施例 13. CPT-11 装载入含 TEA-SOS 的脂质体的药物装载效率; 脂质体大小的影响和小鼠体内药物保留

[0231] 如实施例 11 所述, 使用具有 0.643N TEA-SOS、pH5.7 和 530mmol/kg 的同渗重摩的梯度形成溶液制备含有包载的溶液的脂质体。使脂类分散液 10 次挤压通过孔径为 50nm、80nm 或 100nm 的二叠层聚碳酸酯过滤器。脂质体脂类基质液以 1.5mCi/mmol 脂质体磷脂的浓度包括 [<sup>3</sup>H]-CHE。通过动态光分散 (dynamic light scattering) 测定脂质体大小。脂质体以大约 550mg 伊立替康 /mmol 磷脂的初始药物 - 磷脂比率装载 CPT-11。通过 QELS 测定装载药物的脂质体的大小, 并如实施例 70 和 71 中描述地进行测定。

[0232] 雌性 Swiss Webster 小鼠 (8-10 周, 平均 27-30 克) 通过尾静脉以 10mg/kg 的药物剂量注射这些 CPT-11 脂质体制剂。24 小时之后处死小鼠, 收集血液, 并分析 CPT-11 和脂质体脂类, 如实施例 11 所述。这些结果概述于表 9 中。

[0233] 表 9. TEA-SOS 脂质体中的伊立替康装载和体内药物保留

[0234]

挤出膜孔径, nm	脂质体大小, nm, 平均值 SD	药物装载, mg 伊立替康 /mmol 磷脂	小鼠中 24 小时后保留在脂质体中的药物, 注射前值的%
50	87.6±28.1	57.9±24.2	79.2±3.8
80	98.5±15.1	571.1±69.7	82.6±2.1
100	110.8±25.2	567.7±37.7	86.2±2.7

[0235] 令人惊奇地, 与具有聚阴离子聚合物 (聚磷酸盐) 的相似的脂质体相比, 具有八硫酸蔗糖的三乙铵盐——非聚合的聚阴离子化的有机羟基化的有机化合物 (糖)——的脂质体, 提供了明显更好的 (4-5 倍) 药物在脂质体中的体内药物保留效果。

[0236] 实施例 14. 装载 CPT-11 的 SOS-TEA 脂质体在大鼠内的血液药物动力学

[0237] 如实施例 12 中所述的方法制备脂质体 (100nm 挤出膜孔径)。以 10mgCPT-11/kg (17.6 μmol 磷脂/kg) 的剂量, 将脂质体经静脉内给予两只 9 周龄的具有留置的中心静脉插管的雌性 Sprague Dawley 大鼠 (Harlan) (体重约 200g)。在规定的的时间点获取血液样

品,并分析药物和脂质体脂类的含量,如实施例 9 所述。数据用%注射的脂类剂量/ml 血浆以及在每一时间点时保留在脂质体中的药物的%来表示,对注射后的时间作图,并通过与单指数动态模型的最佳拟合计算脂质体的半衰期以及药物从脂质体释放的药物释放半衰期(图 5)。由装载 CPT-11 的 TEA-SOS 脂质体释放的药物释放半衰期是 56.8 小时,大大长于相似的 TEA-Pn 脂质体的半衰期。

[0238] 实施例 15. 游离 CPT-11、包裹入含 TEA-Pn 和 TEA-SOS 的脂质体的 CPT-11 在具有人结肠癌 (HT-29) 皮下异种移植物的无胸腺裸鼠中的抗肿瘤活性。

[0239] 如实施例 11 所述,使用 TEA-Pn 溶液或 TEA-SOS 溶液制备脂质体,其中 TEA-Pn 溶液含有 0.65M TEA, pH6.1 和同渗重摩 531mmol/kg, TEA-SOS 溶液含有 0.643M TEA, pH5.7 和同渗重摩 530mmol/kg。挤出步骤包括 10 次通过孔径为 100nm 的二叠层聚碳酸酯膜。所得的 TEA-Pn 和 TEA-SOS1 脂质体的大小分别为  $112.3 \pm 15.5$  nm 和  $120.5 + 42.5$  (平均值  $\pm$  大小分布的 SD)。脂质体以 500mg/mmol 的输入药物/磷脂比率装载 CPT-11。对于 TEA-Pn 和 TEA-SOS 制剂,所得的脂质体的药物含量分别为  $465.6 \pm 26.5$  (93% 装载效率) CPT-11/mmol 磷脂和  $499.9 \pm 22.5$ mg (100% 装载效率) CPT-11/mmol 磷脂。

[0240] HT-29 细胞获自 American Type Culture Collection, Rockville, MD, 并根据供应者的建议,在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 中,在补充有 10% 胎牛血清、50U/ml 青霉素 G 和 50  $\mu$ g/ml 硫酸链霉素的 DMEM 培养基中增殖。NCR nu/nu 同型无胸腺雄性裸鼠 (6 周龄,体重至少 16g) 获自 Charles River。小鼠右腹皮下接种 0.1mL 含有悬浮于无抗生素生长培养基中的  $5 \times 10^6$  细胞的悬浮液。11 天后,根据下述方法将肿瘤大小在 150mm<sup>3</sup> 至 350mm<sup>3</sup> 之间的动物分配入治疗组中。根据肿瘤大小对动物进行排列,并依据递减的肿瘤大小分成 6 类别。通过从每一大小类别中随机选择一只动物,组成每组 11 只动物的 6 个治疗组,这样在每一治疗组中相同地代表了所有的肿瘤大小。从第 13 天开始,每隔 4 天动物 4 次通过尾静脉注射下述制剂:1) 对照 (HEPES- 缓冲盐水 pH6.5); 2) 游离 CPT-11 50mg/kg, 以非缓冲生理盐水中的新鲜制备的 5mg/mL 溶液给药; 3) TEA-Pn 脂质体 CPT-11, 每次注射 25mg/kg; 4) TEA-Pn 脂质体 CPT-11, 每次注射 50mg/kg; 5) TEA-SOS 脂质体 CPT-11, 每次注射 25mg/kg; 6) TEA-SOS 脂质体 CPT-11, 每次注射 50mg/kg。如实施例 10 所述,每周两次监控动物体重和肿瘤大小。动物称得的重量减去肿瘤重量得到动物体重。肿瘤接种之后对动物观察 60 天。当某组中肿瘤达到小鼠体重的 20% 时,对该组中的动物实施安乐死。在一些组中,肿瘤完全消退,并在研究结束时并无肿瘤再生长的迹象。收集这些动物中肿瘤接种位置处的组织,并进行保存以用于对残留的肿瘤细胞进行病理学分析。

[0241] 该研究的结果显示在图 6 和 7 中。游离 CPT-11 对肿瘤生长仅具有微小的效应。所有脂质体都具有导致肿瘤消退的显著的效应,之后在大部分动物中重新生长。在 TEA-Pn 和 TEA-SOS CPT-11 脂质体中,50mg/kg 的剂量都比 25mg/kg 剂量更有效。由肿瘤大小数据(图 7) 计算得到的平均肿瘤大小加倍时间是:对照——4.2 天;游离药物,50mg/kg——4.8 天; TEA-Pn 脂质体药物,25mg/g——43.6 天; TEA-Pn 脂质体药物,50mg/kg 47.5 天; TEA-SOS 脂质体药物,25mg/kg——48.2 天;和 TEA-SOS 脂质体药物,50mg/kg——超过 56 天(在第 56 天时肿瘤大小未加倍时间)。因此,在相同剂量和时间表下,根据本发明制备的脂质体 CPT-11 比游离药物的活性高至少 10 倍。出乎意料地,以相同剂量给药时,TEA-SOS CPT-11 脂质体在减少肿瘤生长上比 TEA-Pn CPT-11 脂质体明显更为有效。而在用游离药物和 TES-Pn 脂质

体药物以每注射 50mg/kg 治疗的组中,所有动物都出现肿瘤再生长现象;在接受 25mg/kg 每一脂质体的组中,在研究结束时有一只动物(9.1%)无肿瘤;以及在接受 50mg/kg TEA-SOS 脂质体 CPT-11 制剂的组中,在研究结束时有 4 只动物(36.4%)无肿瘤,也无再生长的迹象。

[0242] 药物出现某些毒性。接受游离 CPT-11,但不接受脂质体 CPT-11 的动物在药物注射之后经历短暂的病态约 1 小时(丧失机敏性、驼背、皮肤起皱、活动能力减弱)。接受游离 CPT-11 的动物在治疗期间经受永久性的体重减轻,减轻约 6%,并且没有恢复。接受两种脂质体 CPT-11 制剂的动物在第二和第三次注射之间的期间经历短暂的重量减轻,平均重量减轻为治疗前值的约 5%(25mg/kg 下)或约 9%(50mg/kg 下),并最终获得正常的重量。因此,脂质体药物的毒性不超过游离(非脂质体)药物的毒性,而脂质体药物的功效则高许多。当药物治疗结束时,重量减轻得到逆转,并且所有动物恢复了它们的重量,未出现最终病态或毒性死亡现象。之后,随同肿瘤消退,动物重量增加。在盐水对照组中,发展有较大肿瘤的动物由于肿瘤-相关病态的缘故重量明显减轻。总的来说,药物被装载入具有预先包载的聚阴离子化糖(八硫酸蔗糖)的脂质体的脂质体药物组合物,证明是最有效的,而毒性低于非脂质体药物。

[0243] 实施例 16. 小鼠中游离和脂质体 CPT-11 的毒性

[0244] 通过对正常(具免疫活性)小鼠单次静脉注射后测定最大耐受剂量(MTD),比较游离 CPT-11 和根据本发明制备的脂质体包囊的 CPT-11 的急性毒性。

[0245] 使用下述物质:

[0246] 1) CPT-11(盐酸伊立替康)制剂,经 HPLC 分析具有 98.9% 盐酸伊立替康,水分为 7.6%。在该研究中,根据“原态”基础(“as is”basis),制备药物制剂,不修正水分含量或伊立替康基本成分的含量。

[0247] 2) 根据实施例 11 制备脂质体 CPT-11(Ls-CPT-11),使用如下物质:由 DSPC200 摩尔份、胆固醇 133 摩尔份、PEG-DSPE1 摩尔份组成的脂类基质;含有 0.65M TEA, pH6.4 的包载的溶液 TEA-SOS;装载入脂质体中的药物,于 5mM HEPES 缓冲液,5%葡萄糖, pH6.5 中,药物以 500mg 药物/mmol 磷脂的输入药物/脂类比率,在 60°C 装载 30 分钟。装载效率 >99%。脂质体大小(体积平均值 ± 标准偏差,由 QELS 测量):101 ± 37nm。脂质体在载体中配制, 20mM HEPES-Na, 135mM NaCl; pH6.5。注射的制剂中的药物浓度在下表中描述。

[0248] 3) 游离 CPT-11 溶液。通过以 22mg/mL 的浓度将盐酸伊立替康溶解在 5% 含水葡萄糖中,制备游离的药物贮存液,并经 0.2 μm 过滤除菌。在注射之前该贮存液用无菌 5% 葡萄糖稀释。

[0249] 4) 动物。雌性 Swiss Webster 小鼠,6-8 周龄,来自 Harlan, USA。

[0250] MTD 测定一般遵照 United States National Cancer Institute Developmental Therapeutics Program 采用的方案。该方案包括下述三个步骤:

[0251] 步骤 1): 范围探索(Range-seeking)步骤,剂量递增因子为 1.8。由两只动物组成的组在尾静脉注射入剂量递增的游离或脂质体伊立替康,以剂量 60mg/kg 起始,以 1.8 的递增因子持续进行,直到在所有动物中观察到急性死亡或最终发病(terminal morbidity)(注射后 >1 天内)。记录死亡/最终发病剂量之下的一步的剂量。

[0252] 步骤 2): 范围探索(Range-seeking)步骤,剂量递增因子为 1.15。由两只动物组

成的组在尾静脉注射入剂量递增的游离或脂质体伊立替康,以步骤 1 记录的剂量起始,以 1.15 的递增因子持续进行,直到在所有动物中观察到急性死亡或最终发病(注射后 >1 天内)。在试验性 MTD,记录死亡/最终发病剂量之下的一步的剂量。

[0253] 步骤 3):确认步骤。由 5 只动物组成的组以步骤 2 中测定的试验性 MTD 静脉(尾静脉)注射游离或脂质体伊立替康。对动物追踪 7 天,每周两次记录动物的体重,并与注射前重量比较。观察一般健康状况(机敏性、外表、喂食、排泄物、皮肤、毛发和粘膜状况、移动、呼吸、体态)。如果在观察期间,没有死亡、进行性发病或重量减轻超过注射前体重的 15% 这样的现象,则该剂量被认为作为急性单次注射 MTD 得到确认。如果出现这些结果中的任何结果,那么以 1.15 的因子的下一较低剂量重复试验。

[0254] 为了获得用于确认步骤的额外的统计学数据,追踪存活动物的体重动态学至注射后 11 天。因为浓度和注射体积的限制,324mg/kg 以上的脂质体伊立替康这样的剂量不可能给予。结果呈现在表 10 中。

[0255] 表 10. 小鼠中对 CPT-11 制剂的 MTD 探索研究。

[0256] 结果

[0257] 步骤 1 :以因子 1.8 增加剂量

[0258]

药物	注射剂 量 (mg/kg)	药物浓度 (mg/ml)	注射 体积 ( $\mu$ l)	小 鼠 编 号	动物体重, 注射后的天数							
					0 (g)	1 (g)	2 (g)	4 (g)	5 (g)	6 (g)	7 (g)	11 (g)
Ls- CPT -11	60	8	150	1	19.2	18.0	nd	20.3	20.6	20.6	20.2	19.7
				2	19.7	19.3	nd	20.6	20.4	19.6	19.7	20.7
	100	12	165	1	19.5	18.6	nd	19.6	20.0	20.1	19.4	19.9
				2	20.1	18.9	nd	20.2	21.5	22.2	21.8	22.5
	180	22	165	1	19.4	18.4	nd	18.9	19.7	20.5	19.5	20.5
				2	20.0	19.3	nd	19.6	20.6	21.4	21.6	21.7

[0259]

	324	30.6	210	1	21.8	21.2	21.2	nd	20.2	nd	20.2	nd
				2	21.6	20.4	21.3	nd	20.8	nd	21.4	Nd
游离 CPT -11	60	8	150	1	20.6	20.4	nd	22.1	22.1	22.2	22.0	22.5
				2	19.5	19.1	nd	20.2	20.3	20.4	20.5	21.1
	100	12	165	1	19.3	注射后 1-2 分钟死亡						
				2	20.1	注射后 1-2 分钟死亡						
				3	19.9	注射后 1-2 分钟死亡						

[0260] 注射之后,所有用游离 CPT-11 治疗的小鼠患病,呼气不足约 1 小时,然后恢复;

[0261] 注射之后,所有用 Ls-CPT-11 治疗的小鼠正常。

[0262] nd:未测定

[0263] 步骤 2 :以因子 1.15 增加剂量

	药物	注射 剂量 (mg/kg)	药物 浓 度 (mg/ml)	注 射 体 积 ( $\mu$ l)	小 鼠 编 号	动物体重, 注射后的天数				
						0 (g)	1 (g)	2 (g)	5 (g)	7 (g)
[0264]	游离 CPT-11	60	8	150	3	19.9	20.0	20.9	19.9	21.3
					4	19.5	18.7	19.4	18.8	18.9
		70	8	175	5	20.9	20.0	20.6	19.3	20.4
					6	22.3	21.8	22.4	22.4	22.8
		80	8	200	7	20.6	19.9	20.1	19.9	20.9
					8	20.6	20.8	21.1	20.7	21.4
90	12	150	9	22.3	注射后 1-2 分钟死亡					
			10	22.4	注射后 1-2 分钟死亡					
		8	225	11	20.6	注射后 1-2 分钟死亡				
[0265]	步骤 3: 确认									
	药物	注射 剂量 (mg/kg)	药物 浓 度 (mg/ml)	注 射 体 积 ( $\mu$ l)	小 鼠 编 号	动物体重, 注射后的天数				
						0 (g)	3 (g)	5 (g)	7 (g)	
[0266]	游离 CPT-11	80	8	200	1	20.2	19.3	20.0	21.7	
					2	20.5	20.6	20.5	21.2	
					3	20.7	20.6	20.8	21.9	
					4	20.8	21.4	22.1	23.0	
					5	21.9	21.9	21.6	21.5	
[0267]	Ls- CPT-11	324	365	180	6	21.0	20.0	20.1	20.2	
					7	20.4	20.4	20.2	19.2	
					8	20.4	19.8	20.3	20.7	
					9	29.9	19.9	20.5	21.5	
					10	20.7	19.5	19.8	20.2	

[0268] 因此, 当游离 CPT-11 的 MTD 为 80mg/kg, 脂质体 CPT-11 的 MTD 令人惊奇地甚至最高给药剂量 324mg/kg 时也未获得。因此, 根据本发明对 CPT-11 进行脂质体包囊药物毒性减少至少 4 倍。

[0269] 实施例 17. 装载 CPT-11 的 TEA-SOS 脂质体药物对渗漏的保存稳定性

[0270] 使用 TEA-SOS 方法 (实施例 11), 以 500-550mg/mmol 磷脂的药物 / 脂类输入比率制备 5 批脂质体 CPT-11。利用膜挤压通过孔径为 80nm 或 100nm 的聚碳酸酯膜, 制备脂质体, 如下表所示。脂质体经 0.2- $\mu$ m 过滤器除菌, 并在 4-8°C, 以 3.4-14.5mg/mL CPT-11 的浓度保存在 135mM NaCl, 20mM HEPES-Na, pH6.5 (保存缓冲液) 中。指定的保存时间之后, 通过使用保存缓冲液作为洗脱剂, 在 Sephadex G-75 上进行凝胶层析, 去除渗漏的药物。如实施例 70 和 71 所述, 分别使用分光光度法和酸消化蓝磷钼酸盐方法, 分析凝胶层析之前和



之后脂质体中药物和磷脂的浓度。根据本发明制备的 CPT-11 脂质体非常稳定。在保存期间,在 6 个月时间中,CPT-11 从这些脂质体的渗漏低于 5% (表 10)。

[0271] 表 11. CPT-11 脂质体在保存期间的包囊稳定性 (数据为平均值  $\pm$  SE)

	脂质体批号	挤压孔径, nm	CPT-11 浓度, mg/ml	保存时间, 月	保持包囊的药物的 %
	1	80	3.44 $\pm$ 0.06	6	99.02 $\pm$ 3.77
[0272]	2	80	7.88 $\pm$ 0.19	6	102.38 $\pm$ 4.78
	3	100	4.57 $\pm$ 0.06	6	96.38 $\pm$ 4.69
	4	100	4.62 $\pm$ 0.11	6	95.72 $\pm$ 4.36
	5	80	14.52 $\pm$ 0.42	3	103.4 $\pm$ 5.92

[0273] 实施例 18. 装载托泊特坎的脂质体

[0274] 如实施例 11 制备含有包载的 TEA-Pn 溶液和 TEA-SOS 溶液的脂质体。在与脂质体混合之前一刻,通过将盐酸托泊特坎以 15-20mg/ml 溶解在水中,制备盐酸托泊特坎 (GlaxoSmithKline, PA, USA) 贮存液,并计算实际盐酸托泊特坎含量。用 1N HCl 将 pH 调节到 3.0。利用正压,使药物溶液过滤通过 0.2 微米聚醚砜 (PES) 无菌过滤器。将药物装载缓冲液中的含 TEA-Pn 或 TEA-SOS 脂质体的等分试样在室温中与托泊特坎 HCl 贮存液混合,获得 0.15-0.45g/mmol 脂质体磷脂范围内的药物 / 脂类输入比。优选比率是每 mmol 脂质体磷脂含 0.35g 托泊特坎 HCl。玻璃容器中的混合物在 55-62°C 恒温水浴中温育,并伴随缓慢的搅拌,进行 30-60min,在冰浴 (0-2°C) 中迅速冷却,并放置在该温度 5-15min。这步骤产生 89-90% (TEA-Pn 梯度) 或 97-100% (TEA-SOS 梯度) 的包囊效率。使用尺寸排阻柱层析,去除未包囊的托泊特坎,并将脂质体转移入保存缓冲液。在施用到柱上之前,通过与 1/20 体积的 2.88M 含水氯化钠混合,增加脂质体制剂的离子强度,并将混合物温育 15 分钟。出乎意料地我们发现将脂质体介质的离子强度由装载期间的低值 (通常相当于 20mM NaCl 以下) 调整到高于 20mM NaCl 的值,优选地调整到 50mM NaCl 和更高值,提高未包囊药物的去除效果,增加装载托泊特坎的脂质体对聚集的稳定性,这可能通过帮助去除膜结合的托泊特坎而实现,其相对于包囊在脂质体内部的药物而言。剩余的步骤遵照实施例 11 的步骤 7 进行。对于结果,参见下表 12。实施例 19. 托泊特坎的抗 -HER2- 免疫脂质体制剂的制备

[0275] 通过将托泊特坎脂质体连接到选自嗜菌体展示文库的抗 -HER2 单链人 Fv 抗体片段 F5 以用于将其高水平地内化入表达 HER2 的细胞,制备可特异性地内化入过量表达 HER2 (C-ErbB-2) 表面受体酪氨酸激酶癌蛋白的癌细胞的托泊特坎免疫脂质体 (Poul, et al., 2000, J. Molecular Biology, v. 301, p. 1149-1161)。F5 是以约 150nM 的亲合力与 HER2 受体的胞外结构域结合,引起快速内化作用的 27-KDa 蛋白质 (Neve, et al., 2001, Biophys. Biochim. Res. Commun. v. 280, p. 274-279)。对于脂质体连接,一般遵照美国专利 6,210,707 方法和 Nielsen, et al. (2002), Biochim. Biophys. Acta, v. 1591, p. 109-118 的方法。首先制备 F5 亲水性脂聚合物连接物。F5 氨基酸链的 C-末端具有加入的末端半胱氨酸基团 (F5Cys)。F5Cys 构建物表达在大肠杆菌 (E. coli) 中,并通过蛋白质 A 柱层析从细菌裂解物分离出来。将蛋白 A 洗脱的级分吸附到阴离子交换树脂上去去除热原质和宿主 DNA,并用硫醇还原剂处理以释放末端半胱氨酸的硫醇基团。还原的 F5Cys 用 SP Sepharose Fast Flow (Amersham Phannacia) 通过离子交换层析进一步纯化。将纯化的蛋白连接到硫醇-反

应性脂类-聚(乙二醇)接头, N-(3-(N-酰亚胺)propionylamido)-聚(氧乙烯)-氧羰基)-1,2-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 (Mal-PEG-DSPE), 其是分子量 2,000 的 PEG 的衍生物(图 4.1), 商业上由 Avanti Polar Lipids, Inc., Alabama, USA 生产。将蛋白与接头在含水缓冲液中以 1 : 4 摩尔比温育, 用 1mM 半胱氨酸淬灭未反应的接头。在反应期间, F5Cys 的末端半胱氨酸与接头的酰亚胺基团共价连接。所得的 F5-PEG-DSPE 偶联物是水溶性的胶束形式, 具有高表观分子量 (500-850KDa), 并通过尺寸排阻层析与未反应的蛋白 (约 25%) 分离开来。纯化的偶联物中蛋白的数量通过 UV 分光光度法在 280nm 处测定, 接头的数量利用与用于磷脂定量的方法 (参见实施例 70) 相同的分光光度方法分析。纯化的 F5-PEG-DSPE 偶联物在水中是稳定的, 具有完全的免疫反应性, 并在 65°C 至少 1 小时和 37°C 至少 3 月的时间里对变性和反应性丧失具有稳定性。

[0276] 为了制备抗-HER2 免疫脂质体托泊特坎, 将实施例 18 中的装载托泊特坎的脂质体与 F5-PEG-DSPE 在含水盐水缓冲液中以每 1 微摩尔磷脂为 15 微克蛋白的比率 (每一脂质体约 45 个 F5 拷贝) 混合。在 60°C 将混合物温育 40 分钟, 在冰上冷冻, 在具有 Sepharose CL-4B (交联的 4% 琼脂糖珠, Amersham Phannacia) 的柱上层析, 以去除残留的胶束偶联物、未偶联的蛋白和在温育期间可能释放的任何微量的脂质体外的药物。具有膜-整合的 F5-PEG-DSPE 的脂质体用 5mM HEPES-144mM NaCl 缓冲液 pH7.4 洗脱, 收集在柱的孔隙体积中, 过滤除菌, 并进行分配以用于储存 (4-6°C)。脂质体-整合的 F5 的数量通常大于加入的偶联物的 80%。通过 SDS-PAGE 测定脂质体, 通过密度测定法对 Coomassie-染色的 F5 带进行定量。经测定, 免疫脂质体中的药物和脂类浓度与非-靶向脂质体相似。托泊特坎脂质体和 F5-免疫脂质体 (实施例 18-19) 的特性概述于表 12 中。

[0277] 表 12. 托泊特坎脂质体和免疫脂质体的特征

[0278]

脂质体-包 载的盐	F5 scfv 附着	药物/脂类比率, g/mol 磷		%包囊	脂质体大小, 平均 值±SD, nm
		输入	输出		
TEA-Pn	否	173.6	155.2±5.9	89.4±3.4%	96.4±38.7
TEA-Pn	是	173.6	156.2±5.2	90.0±3.0%	96.2±33.8
TEA-SOS	否	347.2	340.8±14.7	98.2±4.2%	99.1±32.6

[0279] 实施例 20. 装载缓冲液的 pH 和药物 / 脂类比率对托泊特坎装载入脂质体的影响

[0280] 使用乙醇注射方法 (实施例 18) 制备含有包载的 0.5N TEA-Pn (pH6.2, 同渗重摩 413mmol/kg) 的脂质体 (DSPC/Chol/PEG-DSPE, 3 : 2 : 0.015 摩尔比), 5 次挤压通过孔径 100nm 的二叠层聚碳酸酯过滤器和 10 次挤压通过孔径 50nm 的二叠层聚碳酸酯过滤器。装载缓冲液是 5mM MES, 50g/L 葡萄糖, 将各 pH 值调节到 5.0-6.5 的范围内。经 QELS 测定脂质体大小为 73.1±21.3nm。通过下述方法装载脂质体: 将托泊特坎贮存液 (20mg/ml) 与脂质体在装载缓冲液中以 100mg/mmol 的输入药物-磷脂比率混合, 在 60°C 温育混合物 45 分钟, 冰上淬灭 15 分钟, 并使用 Sephadex G-75 柱用 20mM HEPES, 135mM NaCl, pH6.5 洗脱, 去除未包囊的药物。通过分光光度法 (实施例 70 和 71) 对托泊特坎和磷脂进行定量。结果 (表 13) 表明, 在 pH5.5-6.5 范围内, 托泊特坎装载几乎是定量的。

[0281] 表 13. 装载缓冲液的 pH 对托泊特坎包囊入含有包载的 TEA-Pn 的脂质体的百分比的影响

	装载缓冲液 pH	%包囊
[0282]	5.0	50.1±2.1
	5.5	97.2±8.1
	6.0	115.5±15.0
[0283]	6.5	102.1±8.1

[0284] 也研究了药物与脂类的比率 (0.15-0.45mg/mmol 磷脂) 对装载效率的影响。按照上述方法, 制备含有包载的 TEA-Pn (0.5M TEA, pH5.8, 同渗重摩 480 mmol/kg) 的脂质体, 除了最终挤压步骤是 10 次通过二叠层 0.08 μm 聚碳酸酯过滤器外。装载在 pH6.5 进行。经 QELS 测定脂质体大小为 93.1±15.1nm。结果 (表 14) 表明对于整个研究的药物 / 脂类比率范围, 装载效率 85%。

[0285] 表 14. 药物 / 脂类比率对托泊特坎包囊入含 TEA-Pn 的脂质体的包囊效率的影响

	托泊特坎/磷脂比率, mg/mmol		%包囊(平均值±SE)
	输入比率	输出比率 (装载后)	
[0286]	168.2	166.9±11.1	99.2±6.6
	224.4	232.5±47.6	103.7±21.2
	280.3	253.5±19.8	90.4±7.0
	336.4	298.3±18.0	88.7±5.3
	392.5	361.2±36.8	92.0±9.4
	448.5	394.9±29.5	88.0±6.6

[0287] 实施例 21. 在体外, 在血浆存在下托泊特坎脂质体的稳定性

[0288] 如实施例 18 所述, 制备脂质体 (DSPC/Chol/PEG-DSPE, 摩尔比 3 : 2 : 0.015), 该脂质体含有包载的 0.5N TEA-Pn, pH6.2, 同渗重摩 413mmol/kg。通过 10 次挤压通过二叠层 100nm 孔径聚碳酸酯过滤器, 产生大小为 96.4±29.3nm 的脂质体。为了定量血浆中的脂质体脂类, 将 [<sup>3</sup>H]-CHE 以 0.5Ci/mol DSPC 包含在脂类溶液中。托泊特坎在 pH6.0, 于 58°C, 以 150mg/mmol 的药物 / 磷脂比率装载 45 分钟。装载效率为 148.48±10.26g 托泊特坎 / mol 磷脂 (99.0±6.8%)。

[0289] 脂质体用 50% 人血浆在多孔微透析装置 (Spectra-Por Micro 透析器 10-孔, Spectrum, USA) 中温育。人供体血浆用等体积的含有 0.02% 叠氮钠的 HEPES- 缓冲盐水 (20mM HEPES, 135mMNaCl), pH6.5 稀释, 并装载入透析器 (32mL) 的下部容器 (lower reservoir) 中。通过孔径为 30nm 的聚碳酸酯膜, 将孔 (0.4mL) 与容器分开, 使得血浆蛋白和小分子能自由通过, 但脂质体不能通过。将脂质体与计算出来的量的血浆和 HEPES- 缓冲盐水混合, 获得的浓度为 2.5mM 磷脂和血浆的 50vol. %。将装置在 37°C 温育, 缓慢搅拌容器中的内含物。温育 8 小时之后, 下部容器中的内含物更换新鲜的 50% 血浆。在给定时间点后 (参见下文), 从孔中获取 50-μL 等分样品, 在含有 2.2-2.4mL Sepharose CL-2B, 洗脱剂 HEPES- 缓冲盐水的柱上层析, 以将脂质体与血浆蛋白和游离药物分离开。将脂质体收集在孔隙体积部分中。在将血浆样品溶解在 90% 含水异丙醇 -0.1N HCl 中后, 利用 384nm

激发光和 524nm 发射光通过荧光测定法对托泊特坎定量,通过对 [ $^3\text{H}$ ]-CHE (淬火校正) 进行闪烁计数来定量脂类。将在每一时间点测得的药物 - 与 - 脂类比率与温育之前的起始比率进行比较,获得在每一时间点保持包囊的托泊特坎的百分比。温育 8 小时之后,保留在脂质体中的药物的数量是它起始值的大约 55% (表 15)。

[0290] 表 15. 于 37°C, 在 50% 人血浆中, 托泊特坎由装载有 TEA-Pn 梯度的脂质体的体外释放

	温育时间, 小时	% 保持包囊的药物
	1	95.5±5.4
[0291]	4	76.8±7.3
	8	55.9±4.1
	24	55.4±16.8

[0292] 实施例 22. 在各种药物 / 脂类比率, 具有包囊的 TEA-Pn 梯度的托泊特坎脂质体: 在小鼠中的体内药物保留和循环寿命

[0293] 如实施例 18 所述, 使利挤压通过二叠层 100nm 孔径聚碳酸酯过滤器 12 次, 制备含有包囊的形成梯度的盐溶液 (0.5N TEA-Pn, pH6.2, 同渗重摩 413mmol/kg) 的脂质体 (DSPC/Chol/PEG-DSPE, 3 : 2 : 0.015 摩尔比, 以 0.5mCi/mmol DSPC 含有 [ $^3\text{H}$ ]-CHE)。经 QELS 测量, 脂质体的大小为 107.7±19.1。在 5mM HEPES, 50g/L 葡萄糖, pH6.5 中, 将脂质体与托泊特坎的含水贮存液 (20mg/ml), 以 130-360g/mol 范围内的药物 / 磷脂比率混合, 然后在 58°C 温育混合物 45min, 放置在冰上 15min, 通过 Sephadex G-75 层析去除未包囊的药物。12 周龄的雌性 FvB 小鼠以每 kg 体重 5mg 托泊特坎的剂量 (大约 0.2mg 托泊特坎 / 动物), 通过尾静脉注射以脂质体, 注射三次。在指定时间, 典型地在注射后 8 小时或 24 小时, 将小鼠麻醉, 放血, 并分析血液样品中的药物和脂类, 如实施例 8 所述。结果在表 16 中示出。24 小时之后, 初始药物载量的大约 6-32% 保持包囊状态。较高的药物载量 (>200mg/mmol 磷脂) 导致较长的药物保留时间。

[0294] 表 16. 使用 TEA-Pn 梯度方法装载不同药物 / 脂类比率的原型托泊特坎脂质体的体内药物保留和循环寿命

	包囊的药物 / 磷脂比率, mg/mmol	保留在循环中的脂类, % 注射的剂量		保持包囊状态的托泊特坎, % 初始载量	
		8 小时后	24 小时后	8 小时后	24 小时后
[0295]	127.2±10.9	36.1±2.0	18.7±8.1	51.7±7.1	6.72±2.5
	207.2±21.6	32.1±5.2	9.84±1.88	75.6±13.0	13.8±3.5
	301.3±24.5	34.4±3.2	8.04±4.25	79.2±4.2	25.6±4.4
	360.3±35.6	33.6±2.4	8.68±4.96	73.5±7.0	32.3±9.8

[0296] 实施例 23. 使用不同的包囊的铵盐和三乙铵盐装载的托泊特坎脂质体的体内药物保留和循环寿命

[0297] 如实施例 18 所述, 制备由 DSPE、胆固醇和 PEG-DSPE (按重量比 3 : 1 : 0.1) 组成的脂质体, 该脂质体也含有 0.22mCi/mmol DSPE 的 [ $^3\text{H}$ ]-CHE, 与实施例 18 不同的是, 挤压步骤包括: 10 次通过 2 叠层 200-nm 孔过滤器, 10 次通过 2 叠层 100-nm 孔过滤器和 20 次通过

2 叠层 50-nm 孔过滤器。脂质体包含下述盐溶液：

[0298] 由购自 Sigma 的葡萄糖硫酸钠（分子量 5000）制备 0.5N 葡萄糖硫酸铵（ammonium dextran sulfate）溶液（A-DS），并通过与实施例 4 的程序相似的离子交换程序转化为铵盐。葡萄糖硫酸溶液立即用 12.4M 含水氨水滴定。A-DS 溶液的 pH 为 5.66，同渗重摩为 208mmol/kg。

[0299] 类似于实施例 6，制备 0.48N 蔗糖八硫酸铵（A-SOS），但是用氢氧化铵滴定。溶液的 pH 为 6.27，同渗重摩为 58mmol/kg。

[0300] 如实施例 6 所述制备 0.47M 蔗糖八硫酸三乙铵（TEA-SOS）。溶液 pH 为 6.6，同渗重摩为 297mmol/kg。

[0301] 通过在 61-62°C、以 346±1mg/mmol 的药物 / 磷脂比率用药物温育脂质体 40min，然后在冰上温育 10min，在 10mM MES-Na, 50g/L 葡萄糖，pH6.5 含水溶液中将托泊特坎装载入脂质体。通过在 Sephadex G-25 上进行层析，将脂质体从未包囊的药物纯化出来，洗脱剂为含水 2mM 组胺，144mM NaCl，pH6.6 (HCl)。

[0302] 7 到 9 周龄的雌性 Swiss Webster 小鼠经尾静脉注射这些脂质体托泊特坎制剂，剂量为每 kg 体重为 5mg 托泊特坎（大约 0.2mg 托泊特坎 / 动物），注射 3 次。在注射后 8 小时或 24 小时，收集血液，并分析托泊特坎和脂类，如实施例 22 所述。

[0303] 结果呈现在下表 17 中。尽管所有三种脂质体制剂表现出非常接近的脂质体循环寿命，在注射后 24 天，大约 23-28% 的注射剂量保留在血液中，但是出乎意料地是，无论在数量（药物保留提高大约 2 倍）还是在统计学显著性上（在 95% 置信度水平由 2-尾非配对 Student' s t- 试验获得的统计学显著性分别是  $p = 0.0257$  和  $p = 0.00995$ ；由 Mann' s U- 试验获得的结果差异明显 [ $\alpha$ ] = 0.01)，TEA-SOS 脂质体和 A-SOS 脂质体中的药物保留效果都好于 A-DS 脂质体。含有托泊特坎脂质体的 TEA-SOS 的药物保留效果优于含有托泊特坎脂质体的 A-SOS 的药物保留效果。

[0304]

表 17. 使用 TEA-SOS、铵-SOS(A-SOS)和葡萄糖硫酸铵(A-DS)制备的托泊特坎脂质体的体内药物保留和循环持续时间

梯度	药物/磷脂比率, mg/mmol	装载效率, %	脂质体大小, nm	剂量			保持包裹的托泊特坎, %起始
				保留在循环中的脂类, %注射	8 小时后	24 小时后	
A-DS	288.1±20.6	83.3±6.0	76.9±22.7	43.7±1.2	27.7±1.5	43.6±6.8	18.7±1.5
A-SOS	346.2±14.3	100.0±4.1	99.7±28.9	42.3±2.2	23.4±2.0	53.3±0.8	31.3±3.2
TEA-SOS	340.8±14.7	98.5±4.2	99.1±32.6	42.1±2.3	23.0±2.9	57.0±5.6	38.1±6.1

[0305] 实施例 24. 大鼠中托泊特坎脂质体的药物和脂类血浆动力学

[0306] 在大鼠中评价循环寿命和托泊特坎释放参数。如实施例 18 所述, 通过乙醇混合

/ 挤压方法制备脂质体 (DSPC/ 胆固醇 /PEG-DSPE, 摩尔比 3 : 2 : 0.015), 并使用 TEA-Pn 梯度或 TEA- 八硫酸蔗糖 (TEA-SOS) 梯度以不同的药物 / 脂类比率 (15-450mg/mmol 磷脂) 装载托泊特坎。为了定量脂类基质, 脂质体包含 0.5-1.5mCi/mmol DSPC 的 [<sup>3</sup>H]-CHE。以 4-5mg/kg 体重的剂量, 具有留置的中心静脉插管的雌性 Sprague Dawley 大鼠 (6-8 周龄, 体重 200g) 通过静脉注射 (通过导管) 托泊特坎脂质体。导管用盐水冲洗。在选定的时间 (最高达注射后 48 小时) 通过导管将血液样品 (0.2-0.3mL) 收集入肝素化的注射器中, 与 0.4mL 含有 0.04% EDTA 的冷硫酸盐缓冲盐水混合, 通过离心分离血细胞, 通过 H-CHE 放射性计数 (淬灭校正) 评价上清液 (PBS- 稀释的血浆) 中的脂类, 通过荧光测定法评价托泊特坎 (实施例 71)。对于血浆稀释液校正分析结果, 由获得的血液样品的重量计算, 并假设血细胞 (hematocryt) 为 40%。由经计算为体重的 6.5% 的血液体积估计药物和脂类的总血液剂量。将给定时间点的药物 / 脂类比率与注射的脂质体的药物 / 脂类比率比较, 计算保留在脂质体中托泊特坎的百分比。下表 18 概括了脂类、药物的血液半衰期, 药物释放半衰期以及脂质体的其他特性。药物动力学 (PK) 曲线显示在图 8A (脂类) 和 8B (药物 / 脂类比率) 中。总体上说, 药物和脂类的血液 PK 曲线与单指数模型 ( $R^2$  0.984-0.999) 充分拟合。尽管它们大小为 90-100nm 以及非常少量的 PEG 化的脂类 (0.3mol. %), 脂质体令人意想不到地显示出良好的循环寿命 (脂类组分的血浆半衰期在 11-16 小时范围内)。对于使用 TEA-SOS 装载的脂质体观察到最小水平的托泊特坎释放 (半衰期 22.9 小时)。

[0307] 表 18. 大鼠中脂类和药物的循环半衰期 ( $t_{1/2}$ ), 药物从原型托泊特坎脂质体释放出来的半衰期

	包载的盐和浓度	托泊特坎载量, mg/mmol 磷脂	脂质体大小, nm(平均值±SD)	注射的剂量, mg/kg	$t_{1/2}$ 脂类, 小时	$t_{1/2}$ 药物, 小时	药物释放的 $t_{1/2}$ , 小时	每组动物数量
[0308]	TEA-Pn 0.5N	124.3±9.7	92.3±23.3	4	15.8	4.13	5.34	3
	TEA-Pn 0.5N	360.3±35.6	107.7±19.1	5	12.8	6.06	9.97	2
	TEA-SOS 0.643N	439.2±15.9	108.8±13.4	5	10.8	7.36	22.87	2

[0309] 实施例 25. 在托泊特坎脂质体储存期间药物对渗漏的稳定性

[0310] 将制备用于上述研究的几种原型制剂的样品, 在 4-6°C 储存不同的时间, 以评价包囊的托泊特坎对药物从脂质体渗漏的保存稳定性。使脂质体样品通过 Sephadex G-75 柱, 用 20mM HEPES, 135mM NaCl, pH6.5 洗脱, 除去脂质体外的药物, 并通过分光光度法分析药物含量, 通过 [<sup>3</sup>H]-CHE 放射性计数法分析脂类。结果 (表 19) 表明在储存期间脂质体中的托泊特坎具有良好的保留性。

[0311] 表 19. 储存期间原型托泊特坎脂质体中的药物保留

	形成脂质体梯度的盐	脂质体大小, 平均值±SD, nm	初始药物载量, mg 药物/ mmol 磷脂	保存时间, 月	储存后的药物载量, %初始载量
	TEA-Pn 0.500 N pH6.2	96.4±29.3	148.5±10.3	8	101.6±5.5
	TEA-Pn 0.500 N pH 6.2	107.7±19.1	127.2±10.9	6	94.6±6.2
[0312]	TEA-Pn 0.500 N pH 6.2	107.7±19.1	207.2±21.6	6	113.9±9.4
	TEA-Pn 0.500 N pH 6.2	107.7±19.1	301.3±24.5	6	112.9±9.3
	TEA-SOS 0.643 N pH 5.6	108.8±13.4	439.2±15.9	2	97.8±9.4

[0313] 实施例 26. HER2- 过量表达的癌细胞对脂质体和免疫脂质体托泊特坎的体外吸收

[0314] 该研究揭示了在细胞培养物中根据本发明制备的装载托泊特坎的抗-HER2- 免疫脂质体将托泊特坎特异性地输送到 HER2- 过量表达的细胞的能力。制备（免疫）脂质体并使用实施例 19 的 TEA-Pn 方法装载托泊特坎。在 T-75 瓶中, 于 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 中, 将 HER-2 过量表达的人乳腺癌细胞 (SKBr-3, ATCC) 培养在改良的 McCoy 5A 培养基（无曲辛）中, 培养直至汇合, 该培养基补充以 10% 胎牛血清、50g/mL 硫酸链霉素和 50 U/ml 青霉素 G（完全生长培养基）。通过胰蛋白酶消化收获细胞, 以 150,000 细胞 / 孔, 于 0.5mL 完全生长培养基中, 将收获的细胞温育在 24- 孔细胞培养板上, 并允许驯化过夜。培养基用 0.5mL 完全生长培养基替换, 该完全生长培养基含有在 0.01-0.1mM 磷脂范围内选定浓度的托泊特坎制剂。孔一式三份用于每一条件。对照孔在缺少药物和 / 或脂质体的情况下温育（以获得用于药物分析的背景读数）。板在 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 中, 伴随缓慢搅拌温育 4-8 小时。对培养基吸气, 细胞用 1mL 份含有 Ca 和 Mg 盐的冷 Hanks' 平衡盐溶液冲洗 4 次。通过加入 0.1mL 于水中的 1% Triton X-100 溶解细胞, 细胞裂解物中药物数量经荧光测定法测定（实施例 71）。在 10-2500ng 托泊特坎 / 孔范围内获得标准曲线, 并在减去细胞自身荧光背景后与二价多项（说明了在较高药物浓度自淬灭）相符。当使用微量板荧光计时, 过滤器选择为激光光 400/30nm, 发射光 530/25nm。无论比色皿还是微量板荧光计都给出的相同的结果。

[0315] 两个试验的结果概述在下表 20 中。对 HER2 定向脂质体药物具有显著的细胞吸收水平（比非-定向脂质体托泊特坎高 50-300 倍）。令人感兴趣的是, 对游离托泊特坎的吸收也明显低于 HER2- 定向免疫脂质体托泊特坎。这可以这样解释, 在存在血清的细胞生长培养基中, 托泊特坎分子中的喜树碱内酯环快速水解, 产生具有较低细胞渗透性和较低细胞毒性的羧基形式的药物。总之, 定向细胞的、可内化的、连接配体的免疫脂质体在胞内输送托泊特坎的能力得到确认。

[0316] 表 20. 含有 TEA-Pn 的托泊特坎脂质体和抗-HER2 免疫脂质体的体外细胞吸收 (nd, 未测定)。脂质体特征请参见表 12。



[0317]	脂质体浓度, mM, 磷脂	托泊特坎浓度, $\mu\text{g/mL}$	暴露时间, 小时	SK-Br-3 细胞对托泊特坎的吸收, ng/100,000 细胞		
				非-定向脂质体	F5-免疫脂质体	游离药物
	0.1	15.5	4	1.45±0.09	163±5.7	nd
	0.01	1.55	4	0.185±0.03	60.2±2.0	nd
	0.033	5.0	8	3.62±2.03	169.6±13.7	5.56±0.91

[0318] 实施例 27. 在体外脂质体和免疫脂质体托泊特坎对 HER2- 过量表达的癌细胞的细胞毒性

[0319] 一旦抗-HER2 托泊特坎免疫脂质体将药物胞内输送入 HER2- 过量表达的癌细胞的能力被确立 (实施例 26), 对于确保内化的脂质体能够以其活性形式释放药物是重要的。为了这个目的, 对游离托泊特坎 (即托泊特坎被配制成溶液)、脂质体托泊特坎和抗-HER2- 免疫脂质体托泊特坎的体外细胞毒性进行了研究。制备脂质体托泊特坎制剂, 培养并收获 SKBr-3 细胞, 如实施例 26 所述。以含 5,000 个细胞的 0.1mL 完全生长培养基, 将细胞接种到 96 孔细胞培养板, 一式三份, 并驯化。培养板最边上的排和列空着。将托泊特坎脂质体、免疫脂质体或游离药物 (通过将托泊特坎 20mg/mL 贮存液, pH3 稀释入未缓冲的盐水至 2mg/mL 新鲜制备游离药物) 的无菌制剂用完全药物培养基稀释, 获得起始浓度 90、30 或 10g/mL, 并以因子 3 用培养基连续稀释。孔中的培养基用 0.2mL 药物 / 脂质体稀释液替换, 并在 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 中温育规定的时间 (4-6 小时)。每排一个孔用无药物的培养基温育以充当未处理的对照。从孔中吸取含药物的培养基, 用 0.2mL 无药物培养基冲洗细胞, 将 0.2mL 新鲜的无药物培养基加入到所有孔中。将板在 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 中温育 4 天。不改变培养基, 将在无血清培养基中的 0.03mL 的 2mg/mL 四唑染料 (噻唑蓝, MTT) (Sigma Chemical Co.) 溶液加入到每一孔中。在 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 将板再温育 2-3 小时。吸取培养基, 使孔充满 0.2mL 70vol. % 的含水异丙醇, 0.075N HCl, 并温和搅拌直到 formazan 染料溶解 (15-30min)。在 540nm 处使用微量板光度计测定 formazan 溶液的光密度。以试验孔中的光密度与含未处理细胞的孔中的光密度的比率, 计算细胞存活, 用 % 未处理对照表示, 用背景校正。将数据对药物浓度作图, 通过图中由存活 - 浓度曲线与 50% 存活线的交点估计 IC<sub>50</sub> 剂量。

[0320] 结果示出在图 9 中。导致 50% 生长抑制 (IC<sub>50</sub>) 的药物剂量对于游离托泊特坎或非定向脂质体托泊特坎超过 30  $\mu\text{g/mL}$ ; 对于 F5- 免疫脂质体托泊特坎为 15  $\mu\text{g/mL}$ 。这些结果与定向药物吸收数据一致。

[0321] 实施例 28. 小鼠中脂质体和 F5- 免疫脂质体托泊特坎的比较稳定性和血浆药动力学

[0322] 根据实施例 11 和 19, 使用乙醇脂类溶液混合 - 挤压程序下述条件下, 制备以 1.5mCi/mmol 磷脂含有放射性脂类标记 [<sup>3</sup>H]-CHE 的托泊特坎脂质体: 形成梯度的盐溶液: 0.643N 八硫酸蔗糖三乙铵; 聚碳酸酯膜挤压; 15 次通过 2 叠层 PCTE 过滤器, 80nm 孔径; 托泊特坎装载: 药物 / 磷脂输入比率 350mg/mmol (对托泊特坎游离基本成分计算); F5-scFv 连接如实施例 19 所描述地进行。脂质体具有下述特征:

[0323] 经 QELS 测定大小为: 加权平均值 101.2nm; 标准偏差, 20.1nm。

[0324] 药物包囊:托泊特坎脂质体 (Topo-Ls)  $359.3 \pm 27.4 \text{ mg/mmole}$  磷脂;托泊特坎 F5scFv- 免疫脂质体 (Topo-F5-ILs)  $326.3 \pm 15.9 \text{ mg/mmole}$  磷脂。

[0325] 该研究总体上按照实施例 22 进行。由 9 只雄性 Swiss Webster 小鼠 (8-10 周龄, 24-27g) 组成的组经尾静脉注射 Topo-Ls、Topo-F5ILs 或新鲜制备的托泊特坎  $1 \text{ mg/mL}$ , 于无缓冲盐水中, 剂量为每 kg 体重  $5 \text{ mg}$  托泊特坎基本成分 (相当于脂类剂量:  $14-16 \text{ mole}$  磷脂 / kg 体重)。在注射后 1 小时、8 小时或 24 小时, 在每一时间点对 3 只动物在氯胺酮 / 甲苯噻嗪麻醉下经开口心脏穿刺放血, 将血液收集入含有 PBS-EDTA 的管中, 并分析托泊特坎 (荧光测定法) 和脂质体 (通过放射性闪烁计数法)。投入的剂量取 100%, 计算在给定时间点保留在血液中的药物和脂类剂量的数量, 假设每只动物的血量为体重的 6.3%, 充满血细胞的部分 45%。单独将血浆样品的药物 / 脂类放射性比率与注射脂质体的药物 / 脂类放射性比率比较, 对每一动物计算每一时间点保持包囊在脂质体中的药物的数量。在注射后 1 小时收集的血浆样品中游离托泊特坎的数量低于注射剂量的 1% (事实上, 它们在我们分析方法的检测极限之下); 因此, 没有对游离托泊特坎组在进一步的时间点进行的研究。因为游离托泊特坎具有快速血液清除和低血液水平, 我们认为在所有时间点血液中发现的基本上所有托泊特坎都是脂质体包囊的托泊特坎。

[0326] 结果概述在下表 21 中。引人注目地, 根据本发明制备的脂质体甚至在注射入动物血流 24 小时后仍然保持原始药物载量的 79-85%。脂质体和免疫脂质体组的脂类或药物的平均血浆值之间的差异在 1.8-13.6% 范围内, 这接近于分析误差或在分析误差的范围内。使用 Student' t- 试验计算的与每一时间点的药物或脂类值相关的脂质体和免疫脂质体之间的零假设 (null hypothesis) 的概率, 在 0.543-0.938 范围内。我们的结论是两种制剂之间的药物或脂类的残留血液水平可以忽略不计且在统计学上是不可区分的。

[0327] 表 21. 在注射后各时间点, 脂质体脂类、托泊特坎和保持包囊在脂质体中的托泊特坎在小鼠血浆中的数量

注射后时间	脂类, %注射剂量	药物, %注射剂量	药物/脂类, %注射前值
F5-连接的脂质体托泊特坎 (Topo-F5ILs)			
1 小时	$57.58 \pm 4.95$	$55.45 \pm 7.23$	$96.14 \pm 7.32$
8 小时	$35.37 \pm 3.84$	$34.18 \pm 5.87$	$96.31 \pm 11.92$
24 小时	$15.51 \pm 11.84$	$12.30 \pm 9.02$	$79.36 \pm 8.03$
脂质体托泊特坎 (未连接的) (Topo-Ls)			
1 小时	$58.88 \pm 9.51$	$57.63 \pm 9.45$	$97.90 \pm 5.29$
8 小时	$39.61 \pm 1.99$	$38.82 \pm 1.49$	$98.06 \pm 4.44$
24 小时	$15.84 \pm 3.85$	$13.45 \pm 2.64$	$85.25 \pm 7.03$

[0329] 实施例 29. 脂质体的和抗-HER2-免疫脂质体的托泊特坎在 BT-474 异种移植物模型中的抗肿瘤功效

[0330] 在该研究中, 我们使用了利用三乙胺-聚磷酸盐梯度包载药物的第一原型托泊特坎免疫脂质体。基本上按照实施例 11 和 19 的方法制备脂质体。在  $60^\circ\text{C}$ , 将脂类基质组分——DSPC (Avanti Polar Lipids; 3 摩尔份)、胆固醇 (Calbiochem, 98.3%; 2 摩尔份)

和甲氧基-PEG(2000)-DSPE(Avanti Polar Lipids,0.015 摩尔份)——与 100%乙醇 USP 混合,得到含有 0.5mM 磷脂的溶液。在 60°C,用含水三乙铵磷酸盐溶液(0.608M 三乙胺,0.65N 磷酸盐,pH6.1,重量克摩尔渗透浓度为 531mmol/kg)稀释乙醇脂溶液,充分混合,并在 60°C 使用热稳定的气压挤压机(Lipex Biomembranes)10 次挤压通过孔径为 100nm 的 2 叠层聚碳酸酯膜(Nuclepore, Corning)。挤出的脂质体在冰上冷却,通过在 Sepharose CL-4B 上,使用 5%葡萄糖-5mM HEPES-Na 缓冲液,pH6.5 作为洗脱剂进行凝胶层析,去除未包裹的三乙铵多磷酸盐。经 QELS 测定,脂质体大小为  $103.8 \pm 35.1$ nm。以每  $\mu$ mol 磷脂 0.35mg 托泊特坎基本成分的比率,将该缓冲液中的脂质体与盐酸托泊特坎在 60°C 温育 30min。温育结束时,将脂质体在冰上冷却,在 Sephadex G-75 上以 20mMHEPES-Na,135mM NaCl, pH6.5 作为洗脱剂进行层析,去除任何未包裹的药物。如前面所报告地,通过荧光测定法测定药物含量,通过磷酸盐分析方法测定脂类含量。如此获得的脂质体托泊特坎每 mmol 磷脂具有  $365.4 \pm 23.1$ mg 托泊特坎基本成分。为了制备 HER2-定向托泊特坎免疫脂质体,将该脂质体托泊特坎制剂的一部分与如实施例所述的纯化的抗-HER2 scFv F5 和酰亚胺-PEG-DSPE 接头的偶联物温育。简而言之,将于含水 10%蔗糖-10mM 柠檬酸钠溶液,pH6.5 中的 F5-PEG-DSPE 偶联物与托泊特坎脂质体以每 mmol 脂质体磷脂 15mg 蛋白的比率混合,并 60°C 温育 30min。在冰上冷却温育混合物,并在 Sepharose CL-4B 上,以 20mM HEPES-Na,135mM NaCl, pH6.5 作为洗脱剂进行层析,去除任何未包裹的 scFv 偶联物。在该附加的温育之后,药物与脂类的比率降低 14%。

[0331] 将含有 1-2mg/mL 托泊特坎的托泊特坎脂质体和免疫脂质体制剂通过 0.2 微米无菌注射过滤器,并在无菌条件下分配入聚丙烯瓶中,4-6°C 储存达 1 个月直至使用。

[0332] 通过将盐酸托泊特坎粉末以 2mg/mL 溶解于 5%葡萄糖中制备新鲜的游离托泊特坎,通过 0.2 微米注射过滤器除菌。

[0333] 如实施例 10 描述,建立 HER2-过量表达的 BT-474 人乳腺癌异种移植物模型。在肿瘤注射之后第 13 天,选择具有 120-350 立方毫米范围内的肿瘤的动物,并随机分配入 3 个治疗组和 1 个对照组,每组有 12 只动物。在肿瘤接种之后第 14、18 和 21 天,小鼠经静脉(尾静脉)注射托泊特坎制剂进行治疗,每次注射剂量为 5mg/kg 体重,或注射相等体积的生理盐水。每日监控动物的总体健康状况。每周两次监控肿瘤大小和体重,时间最长至肿瘤接种后第 53 天。对肿瘤达到体重的 20%的动物,或进行性重量减少达 20%或更多的动物实施安乐死。

[0334] 图 11 和 12 分别显示了肿瘤生长和动物体重数据。脂质体托泊特坎(拓扑替康(topotecan))制剂在肿瘤生长抑制中的活性要高于游离药物,F5-靶向脂质体制剂(F5-定向脂质体制剂(F5-targeted liposomal formulation))的活性高于非靶向脂质体制剂(非定向脂质体制剂(non-targeted one))。在观察阶段结束时,各治疗组中平均肿瘤大小差异明显(经非配对 2-尾 Student' s t- 试验获得的 p 值(p values)对于游离 v. 免疫脂质体药物为  $1.2 \times 10^{-6}$ ;游离 v. 脂质体药为 0.000114;脂质体 v. 免疫脂质体药物为 0.00718)。因此,脂质体包裹的托泊特坎比游离药物更具活性,抗-HER2 免疫脂质体托泊特坎比非定向脂质体药物更具活性。在脂质体和免疫脂质体组中,在最初的肿瘤消退之后,在最后一次治疗的 10 天内出现肿瘤再生长的现象。在游离药物组中并无肿瘤消退现象。被注意到,给定剂量的托泊特坎的脂质体制剂比游离药物毒性更大。具有肠胃毒性。接受脂质体

托泊特坎的动物出现腹泻,经受体重减轻;在体重减轻的最高峰时,体重减轻平均约 14%。在非定向脂质体组中,动物体重恢复,除了一只动物(12.5%)在研究结束时体重减轻始终为 15%;在 F5-定向组中,5 只动物(41.6%)发展为晚期病态并断气,还有两只(16.7%)体重减轻始终为约 15%。在对照组和游离药物组中,无体重减轻或治疗相关的病态。

[0335] 实施例 30. 在一周 3 次给予静脉注射的小鼠中,游离托泊特坎和脂质体托泊特坎的最大耐受剂量(Maximum tolerated dose(MTD))

[0336] 除了三乙铵多磷酸盐溶液用具有 0.65M 三乙铵, pH6.2 的三乙铵蔗糖八硫酸盐溶液替换;并使用 80-nm 聚碳酸酯膜过滤器替换 100-nm 聚碳酸酯膜过滤器进行挤压外,该研究使用如实施例 29 制备的脂质体托泊特坎制剂。通过准弹性光散射法以高斯近似(Gaussian approximation)(QELS)测定的体积加权脂质体大小为  $95.1 \pm 19.6\text{nm}$ (平均值  $\pm$ SD);药物/脂类比率为  $369.1 \pm 18.3\text{mg}/\text{mmol}$  磷脂。在 2 组中的 5 只六周龄雌性 Swiss-Webster 小鼠(18-20g)经三次静脉(尾静脉)注射游离托泊特坎或脂质体托泊特坎,一周一次,以每次注射 2mg/kg 托泊特坎基本成分的剂量起始,并对每一随后的组以 1.8 的因子增加,直至剂量为 37.8mg/kg。免疫脂质体托泊特坎不包括在该研究中。每日监控动物的体重和总体健康。在从治疗开始起 10 天的时间里,组中两只动物中任何一只在任何时间点进行性体重减轻超过 20%或自然死亡时,被认为指示出了毒性剂量。根据动物死亡率和重量数据,经测定对于游离托泊特坎,MTD 落入 11.7-21mg/kg 范围,对于脂质体(原型 2)托泊特坎落入 2.0-3.6mg/kg 范围。在第二个研究中,用游离托泊特坎、脂质体托泊特坎或 F5-免疫脂质体托泊特坎(由该实施例的脂质体托泊特坎制备,如实施例 29 所述)注射小鼠,剂量由 2.0mg/kg(脂质体/免疫脂质体托泊特坎)或 12mg/kg(游离托泊特坎)起始,并对每一随后的组以 1.15 的因子增加,直至获得接近建立的 MTD 间隔的上限范围的剂量。在所有动物中并不导致死亡或最终发病的最高剂量被认作 MTD,并发现对于游离托泊特坎为 18.4mg/kg,对照脂质体托泊特坎为 3.0mg/kg,对于免疫脂质体托泊特坎为 3.0mg/kg。因此,脂质体托泊特坎比起游离药物显示出更大的毒性。

[0337] 实施例 31. BT-474 异种移植物模型中,在  $0.125-1.0 \times \text{MTD}$  范围内,脂质体托泊特坎的抗肿瘤功效

[0338] 实施例 30 中的托泊特坎脂质体和 F5-免疫脂质体被用于该研究。如实施例 29 所述,在裸鼠中培养 BT-474 皮下异种移植物。在肿瘤细胞接种 18 天后,将具有肿瘤(105-345 立方毫米,平均约 200 立方毫米)的动物随机分入每组 6 只动物组成的治疗组和每组 8 只动物组成的对照组。在肿瘤接种后第 19、23 和 27 天,通过三次静脉(尾静脉)注射,动物接受  $1 \times \text{MTD}$ 、 $0.5 \times \text{MTD}$ 、 $0.25 \times \text{MTD}$  或  $0.125 \times \text{MTD}$  的游离或脂质体托泊特坎。对照组接受生理盐水。如实施例 29 所述,监控肿瘤大小和动物体重。为了获得动物体重测量值,由动物体重总测量值减去肿瘤重量(假设肿瘤密度为 1.0,由肿瘤大小计算肿瘤重量)获得该值。在 MTD 时所有药物显示出抗肿瘤活性(图 13A-13D)。以它们各自的 MTD 或以其相等分数(1/2、1/4 或 1/8)给予的游离药物和脂质体药物之间的效率没有明显的差异。因此,使用 TEA-SOS 梯度对药物进行脂质体包囊导致抗肿瘤活性增加大约 6 倍,而且药物毒性也有类似的增加。动物体重动态学表明,除了用游离托泊特坎以 MTD 进行的治疗外,所有的治疗都是无毒性的,用游离托泊特坎以 MTD 进行的治疗显示出短暂的体重减轻(体重减轻约为治疗前值的 15%),之后体重减轻症状消退(图 14)。

[0339] 实施例 32. 使用八硫酸蔗糖三乙铵包载方法制备的托泊特坎脂质体的制备和定向的体外细胞毒性

[0340] 遵照实施例 18 的程序, 使用含有 643mM TEA, pH5.7, 同渗重摩 530mmol/kg 的包载的 TEA-SOS 溶液, 以 170mg/mmol 的药物 / 磷脂比率制备脂质体托泊特坎。脂质体具有 55mg 药物 / mmol 磷脂; 90% 的装载效率和 105nm 的颗粒大小。总体上如实施例 19 所述, 这些脂质体与 F5-PEG-DSPE 偶联物的胶束溶液, 以每脂质体大约 30scFv (15mg 抗体 / mmol 磷脂) 在 60°C 温育大约 1 小时。使用 Sepharose CL-4B 通过 SEC 分离连接抗体的脂质体, 并配制成 HBS-6.5HEPES- 缓冲盐水中。在连接抗-HER2 scfv (F5) 期间, 药物 / 脂类比率没有可检测的变化。

[0341] 如下测定癌细胞对托泊特坎制剂的吸收。将 HER2- 过量表达的人乳腺癌细胞 (SK-Br-3, ATCC HTB-30) 以 150,000 细胞 / 孔铺到 24 孔细胞培养板, 并驯化过夜。在 37°C, 以 0.1mM 和 0.01mM 的脂质体浓度, 将细胞与 F5- 定向脂质体托泊特坎和非定向脂质体托泊特坎在完全生长培养基中温育 4 小时 (一式三份)。用 Hanks' 平衡盐溶液冲洗细胞 4 次, 溶解在 0.1% TritonX-100-70% 酸化的异丙醇混合物 1:10 中, 通过荧光测定法测定每孔中与细胞连接的托泊特坎的数量。将结果 (平均值 ± 标准误差) 概述于表 22 中。定向脂质体输送比非定向脂质体多 100-300 倍的药物进入定向的细胞。

[0342] 表 22. SK-Br-3 乳腺癌细胞对脂质体托泊特坎的吸收

制剂	在 0.1 mM 磷脂时的托泊特坎吸收, ng/孔	在 0.01 mM 磷脂时的托泊特坎吸收, ng/孔
[0343] 非定向脂质体	4.76±0.24	0.607±0.088
HER2-定向脂质体	533.8±13.7	197.0±4.6
比率: 定向的/非定向的	112.1±8.6	324±55

[0344] 如实施例 27 所述描述地, 测定这些托泊特坎制剂对 SKBr-3 乳腺癌细胞的细胞毒性。将 SKBr-3 细胞以 5,000 细胞 / 孔接种入 96- 孔板, 驯化过夜, 用于细胞生长培养基中的增加浓度的 (0.004-30g/mL) 游离托泊特坎、脂质体托泊特坎或 F5- 免疫脂质体托泊特坎 37°C 温育 4 小时。去除含药物的培养基, 将细胞生长在无药物培养基中 72 小时。利用噻唑蓝 (MTT) 分析方法测定每孔中存活细胞的数量, 用与对照 (未处理) 细胞的百分比表示。结果呈现在图 10 中。托泊特坎免疫脂质体的毒性 ( $IC_{50} > \geq 0.15-0.5 \mu g/mL$ ) 大于非定向托泊特坎脂质体

[0345] 特坎 ( $IC_{50} > 2.3 \mu g/mL$ )。

[0346] 实施例 33. 不同大小的托泊特坎脂质体的体内稳定性

[0347] 如实施例 22 所述, 通过 12 次挤压通过 100nm 孔径聚碳酸酯膜或另外再 12 次通过 50nm 孔径聚碳酸酯膜制备含有 TEA-Pn 的脂质体。以 150g/mol 磷脂的比率加入托泊特坎 (TPT)。装载在 58°C 热水浴中 45min 完成, 然后在冰上淬灭。50-nm- 和 100-nm- 挤出的脂质体的装载效率分别为  $126.80 \pm 19.24 \mu g TPT / \mu mol PL$  ( $84.5 \pm 12.8\%$ ) 和  $148.48 \pm 10.26 \mu g TPT / \mu mol PL$  ( $99.0 \pm 6.8\%$ )。三组中的雌性 Swiss Webster 小鼠以 5mg TPT/kg 的剂量静脉内注射两种 Ls-TPT 制剂中的其中一种。6 小时后杀死小鼠, 并收集血液。如实施例 22 所述, 分析血浆中的 TPT 和脂质体脂类。结果呈现在表 23 中。

[0348] 表 23. 使用 TEA-Pn 包载方法装载的不同大小的 Ls-TPT 的体内稳定性

	脂质体大小, nm	血浆中的药物, % 注射剂量	血浆中的脂质体 脂类, %注射剂量	药物/脂类比率, % 注射前值
[0349]	74.2±21.6	32.93±1.97	45.7±2.2	72.06 ± 5.51
	96.4±29.3	33.26±3.56	37.6±5.3	88.41±15.68

[0350] 实施例 34. 6-(3-氨基)玫瑰树碱 (6-APE) 的合成和脂质体包囊

[0351] 根据 Werbel et al., J. Med. Chem. 1986, v. 29, p. 1321-1322 的程序, 在两步法中由玫瑰树碱制备 6-(3-氨基)玫瑰树碱。室温中, 将 501.4mg 玫瑰树碱基本成分 (NSC71795) (Aldrich Chemical Co.) 与大约 100mg 氢氧化钠 (Sigma ;用无水石油醚洗涤) 在 5ml 干二甲基甲酰胺 (DMF) 中搅拌 30min。在 2mL 干 DMF 中, 向该混合物逐滴加入 678mg 的 N-溴丙基酞酰亚胺 (bromopropylphthalimide) (Aldrich) 溶液。氩中搅拌紫色的反应混合物过夜, 用 1mL 水处理, 并倾倒入 60ml 水中。混合物用 25mL 二氯甲烷提取两次, 提取液经无水硫酸钠干燥, 并通过中性氧化铝层。氧化铝层用 10mL 二氯甲烷冲洗两次, 合并的过滤物和冲洗物在真空中干燥。产物用 20ml 无水乙醇和 2ml 无水肼在室温中搅拌过夜。将获得的浆在真空下过滤, 黄色的过滤物用 50mL 0.2N NaOH 稀释, 并用两份 (75ml 和 50ml) 氯仿提取。氯仿提取物经 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥, 并在真空中干燥。粗产物 (产量 408mg) 在硅 60 柱上层析, 用氯仿-甲醇混合物 (体积比 7 : 3) 等度洗脱, 用干三甲胺饱和。在未反应的玫瑰树碱之后, 洗脱在第二黄色带中的馏分, 显示出含有大约 30% 产量的期望的化合物。结果由 <sup>1</sup>H-NMR. TLC 确定: R<sub>f</sub> 0.29-0.31 (硅 60 ;CHCl<sub>3</sub>-MeOH 体积比 7 : 3, 用三甲胺饱和)。玫瑰树碱, R<sub>f</sub> 0.81-0.83。通过溶解在无水乙醇中并在干异丙醇中用 6NHCl 溶液滴定, 将获得的化合物转化为二盐酸盐。过滤出橙色晶体 6-APE 二盐酸盐 (NSC176328), 用醚冲洗, 真空中干燥。二盐酸盐的产量为 86%。

[0352] 如下制备脂质体: 在 0.5M TMA 的三甲铵多磷酸盐 (TMA-Pn) 溶液, pH5.6 中, 60°C 对 DSPC、胆固醇和 PEG (分子量 2000)-DSPC (3 : 2 : 0.015 摩尔比) 组成的纯脂膜进行水合, 然后经六个循环的快速冷冻 (-78°C) 和解冻 (60°C), 并 10 次挤压通过二叠层 50-nm 孔径聚碳酸酯过滤器。使用 Sepharose CL-4B 柱, 用 HEPES-葡萄糖 (5mM HEPES, 5% 葡萄糖, pH5.5) 洗脱, 去除未包囊的 TMA-Pn。脂质体大小为 85.7±32.1nm。

[0353] 以 100g APE/mol 磷脂的药物与磷脂比率, 将浓的 6-APE 溶液 (10mg/ml) 加入到含 TMA-Pn 的脂质体, 将混合物在 58°C 温育 45 分钟, 并在冰上快速冷却 15 分钟。通过用 HEPES-葡萄糖缓冲液 (5mM HEPES-Na, 5% 葡萄糖, pH6.5) 洗脱, 在 Sephadex G-75 柱上凝胶层析去除未包囊的药物。然后如实施例 71 所述地, 通过分光光度法对脂质体包囊的 APE 进行定量, 使用实施例 70 的提取分析法测定脂质体磷脂。药物包囊定量实施。

[0354] 实施例 35. HER2-定向免疫脂质体 6-APE 的制备, 以及体外 6-APE 制剂对 HER2-过量表达的 BT-474 乳腺癌细胞的细胞毒性

[0355] 如上面实施例 34 所述, 制备含有包囊的 6-APE 的脂质体 (Ls-APE)。遵照实施例 19 的方法, 由 Ls-APE 制备含有包囊的 6-APE 的抗-HER2 免疫脂质体 (F5-ILs-APE)。实施例 27 的 MTT-基细胞存活分析方法被用于测定作为溶液、作为 Ls-APE 和作为 HER2-定向 F5-ILs-APE 输送的 6-APE 对 HER2-过量表达的人乳腺癌细胞 (BT-474) 的细胞毒性。将细

胞暴露于含药物的培养基 6 小时,之后在无药物培养基中温育 3 小时。结果显示在图 15 中。游离 APE 的  $IC_{50}$  是  $0.26 \mu\text{gAPE/ml}$ , F5-ILs-APE 的  $IC_{50}$  是  $0.756 \mu\text{gAPE/ml}$ ,而非定向 Ls-APE 的  $IC_{50}$  是  $51.0 \mu\text{gAPE/ml}$ 。定向和非定向脂质体之间的活性差异有 67.5 倍,这表明具有相当大的定向输送效应。

[0356] 实施例 36. 6-APE 的 EGFR-定向免疫脂质体制剂和体外对癌细胞的细胞毒性

[0357] 如实施例 34 所述,制备装载 6-APE 的脂质体。通过与 EGFR-特异性 Fab' 抗体片段连接,制备 EGFR-定向免疫脂质体,如下描述。EGFR-特异性 IgG MAbC225(cetuximab, ERBITUX™, Imclone Systems) 用胃蛋白酶消化产生 (Fab')<sub>2</sub> 片段。通过在 37 °C 用 10-20mM 2-巯基乙胺处理 15min,还原纯化的 (Fab')<sub>2</sub> 片段,通过使用 Sephadex G-25 进行凝胶过滤来纯化 Fab' 片段。反应性硫醇基团典型地以每蛋白分子约 0.9 硫醇基团存在(使用 Ellmann's 试剂定量)。在 pH6.2-6.5 的含水溶液中,以蛋白-接头摩尔比 1 : 4,将 C225Fab' 共价连接到两亲性接头 Mal-PEG-DSPE (AvantiPolar Lipids, AL),在室温中进行 2-4 小时,或在 4-6 °C 中过夜,产生 C225Fab'-PEG-DSPE 偶联物,产量为蛋白质的 30-50%。在 3% 琼脂糖-4% 聚丙烯酰胺珠状凝胶 (Ultrogel AcA34, 获自 Sigma Chemical Co.) 进行尺寸排阻柱层析,用 HBS-6.5 缓冲液洗脱,将形成胶束的偶联物与未反应的蛋白分离开来。在孔隙体积部分中回收偶联物。按照如下方法形成免疫脂质体 6-APE:将 C225 Fab'-PEG-DSPE 与装载药物的脂质体一起以 30mg C225 蛋白 /mmol 脂质体的比率在 60 °C 温育 30min,在冰上淬灭 15min, Sepharose CL-4B 柱上层析,用 HBS-6.5 缓冲液洗涤纯化免疫脂质体(脂质体出现在柱的孔隙体积中或附近)。

[0358] 将 MDA-MB-468 EGFR-过量表达的人乳腺癌细胞和 EGFR 表达水平低的 MCF-7 人乳腺癌细胞 (ATCC, Rockville, MD) 培养在供应方建议的生长培养基中,并根据实施例 27 的方法研究游离 6-APE、脂质体 6-APE 和抗-EGFR-免疫脂质体 6-APE 对这些细胞的细胞毒性。将这些与含药物的培养基培养 6 小时,然后温育后置于无药物培养基中 3 天。结果显示在图 16 中。在 MDA-MB-468 细胞中,对于游离 6-APE,  $IC_{50}$  为约  $0.1 \mu\text{g/ml}$ ,对于 C225-ILs-APE,  $IC_{50}$  为约  $0.9 \mu\text{g/ml}$ 。在 MCF-7 细胞中,对于游离 6-APE,  $IC_{50}$  为约  $0.5 \mu\text{g/ml}$ ,对于 C225-ILs-APE,  $IC_{50}$  为约  $14 \mu\text{g/ml}$ 。在两种细胞系中, Ls-APE 的  $IC_{50}$  大于  $>30 \mu\text{g/ml}$ 。因此,装载 EGFR-定向 6-APE 的免疫脂质体在 EGFR-过量表达的 MDA-MB-468 乳腺癌细胞中表现出抗原-特异性细胞毒性活性,但是在不过量表达 EGFR 的 MCF-7 乳腺癌细胞中并没有表现出这种细胞毒性活性。在 MCF-7 细胞中,定向和非定向 6-APE 脂质体活性相等。

[0359] 实施例 37. 脂质体 6-APE 在大鼠中的药物动力学

[0360] 如上面实施例 11 所述,制备含有包载的 TEA-Pn 溶液 (557mM 磷酸盐基团, 500mM TEA, pH5.8, 同渗重摩 480mmol/kg) 的脂质体以及 DSPC、胆固醇和 PEG-DSPE (摩尔比 3 : 2 : 0.015) 的脂类组合物。将脂类的乙醇溶液在 60 °C 与 10 体积的含水 TEA-Pn 溶液混合,并 10 次挤压通过二叠层 80nm 孔径聚碳酸酯膜。使用 Sepharose CL-4B 柱,用 MES-葡萄糖 (5mM MES-Na, 5% 葡萄糖, pH5.5) 洗脱,去除未包囊的 TEA-Pn。经 QELS 测定脂质体大小为  $92.3 \pm 23.3\text{nm}$ 。以  $0.5\text{mCi/mmol}$  磷脂,将非-可交换的放射性脂类标记 [<sup>3</sup>H]-CHE 包括在脂类基质中。如实施例 34 所述,脂质体用 6-APE 装载。

[0361] 遵照实施 9 的方案研究药物动力学。雌性 Sim Albino 大鼠 (9 周龄, 200g) 经静脉注射 10mg 6-APE/kg。在规定的时间点获取血液,通过荧光测定法分析血浆中的 6-APE。将

血浆等分试样 (0.05-0.2ml) 与 1-2ml 90% 含水异丙醇 -0.1N HCl 混合, 利用荧光对 6-APE 定量, 如实施例 71。脂类通过 [<sup>3</sup>H]-CHE 放射性闪烁计数法定量。

[0362] 结果显示在图 17 中。药物的血液半衰期 ( $t_{1/2}$ ) 为 13.7 小时, 脂质体脂类为 16.6 小时 (图 17A)。药物由脂质体释放的半衰期是 77.9, 证明具有非凡的包囊稳定性 (图 17B)。

[0363] 实施例 38. 2-(2-(N,N-二乙基氨基)乙基)玫瑰树碱鎊 (2-DAE) 的合成和脂质体包囊

[0364] 2-(2-(N,N-二乙基氨基)乙基)-玫瑰树碱鎊氯化物 (NSC359449) 是抗肿瘤玫瑰树碱衍生物, 其通过在甲醇中, 在三乙胺存在下用 2-(N,N-二乙基氨基)乙基氯对玫瑰树碱进行烷基化作用制备而得 (参见 Werbel, L. M., Angelo, M., Fry, D. M., 和 Worth, D. F. J. Med. Chem. 1986, 29 : 1321-1322)。如实施例 37 所述的方法制备含有包载的 TEA-Pn 的脂质体。在 5mM HEPES-Na, 5% 葡萄糖, pH7.4 中, 以 2-DAE- 与 - 磷脂比率为 100  $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ , 将 2-DAE $\cdot$ 2HCl 与 TEA-Pn 脂质体温育。装载的药物的数量是 88.2  $\mu\text{gAPE}/\mu\text{mol PL}$  (效率 88.2%)。

[0365] 实施例 39. 脂质体 2-DAE 在大鼠中的药物动力学

[0366] 如实施例 37 所述研究脂质体 2-DAE (实施例 38) 在大鼠中的血液药物动力学。2-DAE 的  $t_{1/2}$  是 17.8h, 脂质体脂类基质的  $t_{1/2}$  是 18.2h (A)。在血液中药物从脂质体释放出来的半衰期是  $t_{1/2} = 677\text{h}$  (B)。因此, 那些脂质体在血流中对药物渗漏特别稳定。

[0367] 实施例 40. 使用 TEA-Pn 方法将长春瑞滨装载入脂质体。pH 的影响

[0368] 利用实施例 11 的乙醇注射方法制备脂质体, 该方法使用 0.608M TEA, 0.65M 磷酸盐基团的 TEA-Pn 溶液, pH6.1, 同渗重摩为 531mmol/kg; 将脂类悬浮液 15 次挤压通过二叠层 100nm 孔径聚碳酸酯膜。经 QELS 测定, 所得的脂质体大小为  $108.3 \pm 17.1\text{nm}$ 。以药物 - 与 - 磷脂比率为 350  $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ , 将长春瑞滨酒石酸盐贮存液 10mg/mL USP 形式的长春瑞滨 (VRB) 加入到于含水 5mM HEPES-Na, 5% 葡萄糖, pH6.5 中的脂质体, 用 1-5N NaOH 将 pH 调整到理想值, 将混合物在  $58 \pm 2^\circ\text{C}$  温育 30min。然后将混合物在冰上冷却 15min, 通过 Sephadex G-75 凝胶过滤层析, 用 HBS-6.5 缓冲液 (20mM HEPES-Na, 135mM NaCl, pH6.5) 洗脱去除未包囊的药物。然后将纯化的脂质体的等分试样溶解在酸性异丙醇中, 使用分光光度法在 270nm 处分析长春瑞滨。在甲醇-氯仿提取之后, 利用 Bartlett 的磷酸盐分析方法 (1959) 定量脂质体磷脂。[0239] 计算的装载后药物 - 对 - 脂类比率是如同表 24 中显示。长春瑞滨装载是定量的 (即几乎 100%), 并在研究范围内独立于 pH。

[0369] 表 24. 在各种 pH 值的外部缓冲液中, 长春瑞滨装载入含包载的 TEA-Pn 的脂质体中

[0370]

pH	药物-与-磷脂比率 ( $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ )	装载效率 (%)
4.5	351.2 $\pm$ 52.88	100.4 $\pm$ 15.2
5.0	347.6 $\pm$ 6.35	99.3 $\pm$ 1.8
5.75	355.2 $\pm$ 11.2	101.5 $\pm$ 3.2
6.25	377.0 $\pm$ 21.5	107.7 $\pm$ 6.6
7.0	374.3 $\pm$ 29.58	106.9 $\pm$ 9.0

[0371] 实施例 41. 以各种不同的药物 / 脂类比率 : 包封率、利用 TEA-Pn 方法制备的脂质



体长春瑞滨和小鼠体内稳定性

[0372] 根据实施例 40 制备带有截留的 TEA-Pn 溶液的脂质体；除了以 1.5mCi/mmol 磷脂，将 [<sup>3</sup>H]-CHE 引入到脂类基质中。经 QELS 测定，脂质体大小为 98.5±34.3nm。以药物-与-磷脂比率 150-450mg VRB/mmol，将脂质体与处于 5mMHEPES-Na, 5% 葡萄糖, pH6.5 的含水缓冲液中的酒石酸长春瑞滨 USP (美国药典) 混合，在 58±2°C 下温育 30 分钟 (min)。加入药物之后，不调节 pH。分离装载了长春瑞滨的脂质体 (vinorelbine-loaded liposomes (Ls-VRB))，并如实施例 40 所述分析药物和磷脂。

[0373] 以 5mg VRB/kg 的剂量，给处于三个组中的雌性 5-6 周龄的 Swiss Webster 小鼠 (Harlan Bioresearch)，静脉注射 Ls-VRB-Pn。脂类剂量根据装载程度变化，并可以由上面计算出的药物-与-脂类比率确定。在注射后 8 小时或 24 小时，麻醉动物，放血，并在冰上将血液收集入称重过的管中，管中含有已知量的含 0.04% EDTA 的 PBS。离心收集血细胞；并如下所述，通过 [<sup>3</sup>H]-CHE 放射性闪烁计数法分析上清液中的脂质体脂类，利用 HPLC 分析长春瑞滨。样品掺有长春碱 (内标)，用乙醚提取，蒸发，将残留物溶解在移动相中，移动相由含水的 50mM 三乙胺醋酸盐 (pH5.5) 和乙腈 (体积比 58 : 42) 组成。在 C-18 保护柱之前，将样品加载在 C<sub>18</sub> 反相硅柱 (Supelco C-18 柱, 250mm×4mm i.d. (内径)，颗粒大小 5 μm) 上。用上面的移动相，以 1.0ml/min 的流速，等度洗脱该柱。吸光率检测仪在 280nm 处检测 VRB。VRB 和长春碱 (内标) 的典型保留时间，分别为 9.1min 和 7.8min。

[0374] 结果显示在表 25 中。装载效率随着药物 / 脂类比率的增加而减小，从 150mg/mmol 下的几乎 100% 减小至 450mg/mmol 下的约 66%。注意到，以每 mmol 磷脂超过 250mg 长春瑞滨的比率加入酒石酸长春瑞滨，引起脂质体悬浮液发生实质上的酸化 (pH<4.0)，从而导致装载效率降低。因此，确立了：在药物装载步骤期间，需要控制 pH。8 小时之后，在血液中检测到的脂质体基质的数量是在被注射剂量 (injected dosed (% id)) 的 30.4±6.6% 至 38.6±5.2% id 的范围内，与被注射脂类的绝对数量无明显的关系。在 24 小时之后，血液中依然可以检测到脂类基质的 6.4% ID 至 14.8% ID。8 小时后，保持被包裹态的药物的数量在 37% 至 63% 之间变化。然而，在注射后 24 小时，药物水平下降到所应用的分析方法的检测极限之下。表 25. 使用 TEA-Pn 方法 (不调节装载缓冲液 pH)、在不同药物 / 脂类比率下所制备的脂质体长春瑞滨的包封率和体内药物保留。药物保留数据是平均值 ±SD (N = 3)。

[0375]

输入, mg/mmol, 计算的	长春瑞滨/磷脂比率		注射后 8 小时保持 在包封态的药物的 百分比
	输出, mg/mmol, 测量的	包封率, %	
150	156	104.0	36.6±4.2
[0376]			
250	238	95.2	56.3±1.3
350	260	74.3	65.9±2.3
450	299	66.4	63.0±4.1

[0377] 实施例 42. 以不同药物 / 脂类比率，使用 TEA-SOS 方法，将长春瑞滨装载入脂质体

[0378] 除了用 TEA-SOS 溶液 (0.65M TEA, pH5.4, 同渗透摩 521mmol/kg) 替换 TEA-Pn 溶

液外,如实施例 40 所述制备用于药物装载的 TEA-SOS 脂质体,并使脂质体挤压通过 80nm 孔径的聚碳酸酯膜。经 QELS 测定,脂质体大小为  $86.6 \pm 12.9\text{nm}$ 。以不同的药物-与-磷脂比率,将 VRB 加入到处于含水 5mM HEPES-Na、5%葡萄糖、pH6.5 中的脂质体,随后将混合物在  $60^\circ\text{C}$  下温育 30 分钟。然后分离装载了 VRB 的脂质体,并如实施例 40 中所述进行分析。

[0379] 在 VRB 脂质体中,计算的药物-与-脂类比率示出于表 26 中。令人注目地,与聚合阴离子辅助的装载不同,在使用聚阴离子化的糖(蔗糖八硫酸酯(sucroseoctasulfate))的脂质体中的长春瑞滨装载几乎是定量的,独立于药物/脂类比率,最高可达 450mg VRB/mmol 磷脂的;仅仅在 550mg VRB/mmol 磷脂时,稍微低些(88%)。

[0380] 表 26. 长春瑞滨装载入脂质体对药物-与-脂类比率的依赖性

长春瑞滨/磷脂比率, mg/mmol		装载效率(%)
总数	封装入脂质体	
150	$159.9 \pm 11.5$	$106.6 \pm 8.1$
[0381] 250	$255. \pm 12.4$	$102.2 \pm 5.1$
350	$381.8 \pm 16.3$	$109.1 \pm 5.1$
450	$456.1 \pm 29.5$	$101.4 \pm 6.6$
550	$486.2 \pm 26.0$	$88.4 \pm 4.2$

[0382] 实施例 43. 通过 TEA-Pn 方法装载有长春瑞滨的 HER2-定向免疫脂质体的制备, HER2-定向和非定向长春瑞滨脂质体在大鼠中的比较血液药物动力学

[0383] 如实施例 19 制备抗-HER2 scFv F5-PEG-DSPE 偶联物。将非定向长春瑞滨脂质体(实施例 41,以 350mg/mmol 的药物/磷脂比率装载)与 F5-PEG-DSPE 偶联物(实施例 19),在含水 20mM HEPES-Na、135mM NaCl、pH6.5 缓冲液中,以 15mg/mmol 蛋白质/磷脂比率、在  $60^\circ\text{C}$  下温育 30 分钟,制备 HER2-定向长春瑞滨免疫脂质体。通过在 Sepharose 4B 柱上、用相同的缓冲液洗脱而进行凝胶层析,去除未掺入的 F5 偶联物。将非定向的脂质体(Ls-Pn-VRB)和 HER2-靶向脂质体(F5-ILs-Pn-VRB),以 5mg VRB/kg 剂量,静脉内给予雌性 Albino 大鼠(8-9 周龄;200g)。在不同时间点,如实施例 9 所述收集血液,并如实施例 41 中那样地分析 VRB 和脂质体脂类。通过使用 MICROSOFT EXCEL(Microsoft Corp.) 电子数据表格动向功能(spreadsheetTREND function),以便找到单指数动力学的最佳拟合;从而分别由脂类浓度-时间图或由药物/脂类比率-时间图,计算出脂质体脂类的血液半衰期和 50%药物释放时间。结果(图 18)表明:定向的和非定向的长春瑞滨脂质体具有相同的药物和脂类的药物动力学,其中脂类半衰期为约 12.1 小时,并且 50%药物释放时间是约 4.3 小时。

[0384] 实施例 44. 使用铵和取代的铵盐制备的长春瑞滨脂质体的制剂和比较体内稳定性

[0385] 葡聚糖硫酸酯铵(ammonium dextran sulfate(DS-A))溶液(pH5.8,0.65MNH<sup>+</sup>,同渗重摩 390mmol/kg)和葡聚糖硫酸酯三乙基铵溶液(triethylammoniumdextran sulfate(DS-TEA))(pH6.0,0.65M NH<sup>+</sup>,同渗重摩 465mmol/kg),是根据实施例 4 的方法,由分子量为 10,000 的葡聚糖硫酸酯(dextran sulfate)(SigmaChemical Co.),分别采用 12.4M 含水的铵或纯三乙胺进行滴定制备而来。由分析级硫酸铵制备硫酸铵(ammonium sulfate(S-A))含水溶液,325mM, pH5.1,同渗重摩 703mmol/kg。所有三种溶液含有的

$\text{Na}^+$  是总阳离子含量的 1% 以下。使用实施例 41 的乙醇混合 - 挤出方法 (DSPC/ 胆固醇 / PEG-DSPE3 : 2 : 0.015 摩尔比), 制备包载有这些溶液的脂质体。以 1.5mCi/mmol 磷脂, 将放射性脂类标记  $[^3\text{H}]\text{-CHE}$  引入到脂类基质中。挤压步骤由 10 次通过二叠层的 0.1 $\mu\text{m}$  聚碳酸酯膜组成。以 350mg/mmol 的药物 - 与 - 磷脂比率, 将 VRB 加入到处于 5mM HEPES- $\text{Na}$ 、5% 葡萄糖、pH6.5 中的脂质体中, 用 1N  $\text{NaOH}$  将 pH 调节到 6.5; 并且将混合物在 58-60 $^{\circ}\text{C}$  下温育 30 分钟。然后, 反应物质在冰上被冷却 15min; 并使用 Sephadex G-75 凝胶过滤层析去除未包封的药物, 采用含水的 20mM HEPES- $\text{Na}$ 、135mM  $\text{NaCl}$ 、pH6.5 进行洗脱。通过分光光度技术, 分析纯化的、装载长春瑞滨的脂质体中的 VRB; 并使用 Bartlett (1959) 的磷酸盐分析方法分析磷脂 (参见实施例 70、71)。如实施例 43 所述, 在大鼠中研究脂质体的脂类和药物的血液药物动力学。

[0386] 结果显示于图 19-20 以及表 27 中。将用葡聚糖硫酸酯三乙基铵装载的脂质体与那些用葡聚糖硫酸酯的铵盐装载的脂质体进行比较。出乎意料地, 相当程度上, 那些用三乙基铵盐装载的脂质体比那些用铵盐装载的脂质体稳定更多。对于三种不同的制剂, 脂质体载体本身的药物动力学相似; 因此, 主要取决于所利用的脂类组成成分。从用葡聚糖硫酸酯三乙基铵装载的 Ls-VRB 渗漏长春瑞滨, 比起那些用葡聚糖硫酸酯铵装载的脂质体, 慢大约三倍。使用硫酸铵装载的脂质体具有最快的药物渗漏速度。

[0387] 表 27. 药物包封进使用包载有铵和取代的铵盐的脂质体中的比较体内稳定性

	制剂, 脂质体-包载 的盐	脂质体大小, nm, 平均值 $\pm$ SD (经 QELS)	脂类基质的血液 半衰期, 小时	达到血液内 50% 药 物释放的时间, 小 时
	DS-TEA	120.8 $\pm$ 28.5	9.5 $\pm$ 3.3	66.3 $\pm$ 13.4
[0389]	DS-A	107.8 $\pm$ 15.4	11.2 $\pm$ 0.6	22.9 $\pm$ 1.7
	S-A	114.5 $\pm$ 15.6	10.7 $\pm$ 0.2	1.77 $\pm$ 0.16

[0390] 实施例 45. 不同大小的装载长春瑞滨的脂质体的制备和体内稳定性

[0391] 利用实施例 11 的乙醇混合 - 挤压方法, 制备带有包载的蔗糖八硫酸酯三乙基铵 (triethylammonium sucrose octasulfate) 溶液 (0.65M TEA, pH6.4, 同渗重摩 502mmol/kg) 的  $[^3\text{H}]\text{-CHE}$  标记脂质体 (1.5mCi/mmol 磷脂)。挤出步骤包含: 15 次通过孔径为 0.05 $\mu\text{m}$ 、0.08 $\mu\text{m}$  或 0.1 $\mu\text{m}$  的二叠层聚碳酸酯膜。遵照实施例 40 的方法, 进行长春瑞滨装载、长春瑞滨脂质体分离、以及脂质体表征。雌性 Albino 大鼠 (8-9 周龄; 200g) 被用于研究脂质体体内稳定性。如实施例 43 所述, 在大鼠中研究脂质体脂类和药物的药物动力学。

[0392] 结果显示在图 21、22 以及下面的表 28 中。将挤压通过 0.05、0.08 和 0.1 $\mu\text{m}$  聚碳酸酯过滤器的脂质体进行比较, 并显示出具有相似的药物和脂质体载体药物动力学, 以及相似程度的内含物渗漏。药物在血液中从脂质体的释放是用 50% 释放时间表征, 是在大约 40-80 小时的范围内; 令人满意地, 高于 24 小时。

[0393] 表 28. 长春瑞滨脂质体的表征

	脂质体大小, nm, 平均值 ±SD ( 经	药物载量, mg/mmol 磷脂	装载效率, %	脂类基质的血 液半衰期, 小 时	达到血液内 50%药物释放 的时间, 小时
[0394]	QELS)				
	87.6 ±28.1	352.4 ± 13.9	100.7 ±4.0	14.6 ±0.7	39.7 ± 3.1
	98.5±15.1	322.6 ±22.7	92.2 ± 6.5	13.0±0.2	47.9±3.8
	109.6±24.6	357.0± 10.5	102.0±3.0	14.3±0.3	78.0 ±1.4

[0395] 实施例 46. 使用 TEA-SOS 包载方法制备 HER2-定向长春瑞滨脂质体, 以及大鼠中 HER2 scFv-定向和非定向免疫脂质体长春瑞滨的药物动力学

[0396] 如实施例 30 所述, 制备脂质体, 以 350mg/mmol 的药物-磷脂比率装载长春瑞滨, 并进行分析; 除了实施例 45 的 TEA-SOS (蔗糖八硫酸酯三乙基铵) 溶液被替换为 TEA-Pn 溶液。挤出步骤包括 15 次通过 0.08 μm 孔径的聚碳酸酯过滤器。经 QELS 测定, 脂质体大小为 95.0 ± 26.0nm。由这些长春瑞滨脂质体制备 F5scFv-连接的抗-HER2 长春瑞滨免疫脂质体, 并且在大鼠中研究 HER2-定向和非定向脂质体长春瑞滨的脂质体脂类和药物的血液药物动力学, 如实施例 43 中所述。对于 F5-ILs-VRB 和 Ls-VRB, 脂质体脂类的循环半衰期分别是 11.4 小时和 10.3 小时; 50% 药物释放时间分别是 30.9 小时和 30.3 小时。因此, Ls-VRB 和 F5-ILs-VRB 的脂类和药物的药物动力学是非常接近的, 这表明 scFv-PEG-DSPE 偶联物的引入在循环时既不影响对载体本身的清除, 也不导致药物从载体渗漏的增加 (图 23、24)。

[0397] 实施例 47. 包含聚(乙二醇)的非离子型脂类衍生物的长春瑞滨脂质体之制备和药物动力学特性

[0398] 合成的 C<sub>20</sub>-神经酰胺-甲氧基-PEG (分子量 2,000)-衍生物 (PEG-神经酰胺), 是得自 Northern Lipids, Inc., Canada。甲氧基-PEG (分子量 2,000)-二硬脂酰丙三醇 (PEG-DSG) (SUNBRIGHT GS20) 是获自 NOF Corp., Japan。

[0399] 具有摩尔比为 3 : 2 : 0.3 的 DSPC、胆固醇和 PEG-脂类 (PEG-神经酰胺或 PEG-DSG) 的脂类组成的并且包载有 TEA-SOS 溶液 (0.65M TEA, pH6.4, 同渗重摩 502mmol/kg) 的脂质体, 是通过实施例 11 的乙醇混合/挤压方法制备的。挤压步骤包括两次通过两个层叠式聚碳酸酯膜过滤器, 其中层叠式聚碳酸酯膜过滤器使用孔径为 0.2 μm 的两次以及使用孔径为 0.08 μm 的 10 次。脂质体以 350mg/mmol 的药物/磷脂比率装载长春瑞滨, 用大小、药物和脂类浓度表征; 并且, 如实施例 46 所述, 在大鼠中研究它们的药物动力学。两种制剂显示出延长的脂类基质循环时间, 以及缓慢的药物体内释放; 其中, 在 24 小时后, 体内血液中至少 50% 的药物保持在包封状态, 如下面的表 29 中所示。

[0400] 表 29 含有不同 PEG-脂类的长春瑞滨脂质体的表征

	PEG-脂类 脂质体大 小, nm, 平 均值 $\pm$ SD (经 QELS)	药物装载, mg/mmol 磷脂	装载效率, %	脂类基质的 血液半衰 期, 小时	血液内达到 50%药物释 放的时间, 小时	
[0401]	PEG-神经 酰胺	103.3 $\pm$ 30.9	291.4 $\pm$ 18.0	83.26 $\pm$ 5.14	14.0	102.7
	PEG-DSG	101.3 $\pm$ 20.1	359.3 $\pm$ 7.2	102.7 $\pm$ 2.1	15.1	24.6

[0402] 引人注目地,与具有低 PEG 化(总脂类的约 0.3mol.%)之相似的、大小相配的脂质体(实施例 45, 109.6nm,  $t_{1/2}$  = 14.3 小时; 98.5nm,  $t_{1/2}$  = 13.0 小时)相比,增加这些脂质体的 PEG 化(PEG 脂类含量为总脂类的约 5.7mol.%)几乎没有影响脂质体血液循环寿命。

[0403] 实施例 48. HER2-定向脂质体长春瑞滨的制备;以及游离、HER2-定向、和非定向脂质体长春瑞滨对体外 MDA-MB-453 细胞的细胞毒性

[0404] 如实施例 42 那样(无 [ $^3$ H]-CHE),在 pH6.0 和 350  $\mu$ g 长春瑞滨/ $\mu$ mol 磷脂下,通过药物装载,制备装载有长春瑞滨的脂质体(Ls-VRB)。通过将脂质体与 F5-PEG-DSPE 偶联物温育,形成抗-HER2 免疫脂质体长春瑞滨(F5-ILs-VRB),如上面实施例 19 和 42 中所述;除了不加入 [ $^3$ H]-CHE 之外。通过将酒石酸长春瑞滨的 10mg/ml 溶液 USP(美国药典)稀释入细胞培养基,制备“游离型”长春瑞滨。个

[0405] MDA-MB-453 是适度过量表达 HER2 受体(约  $3 \times 10^4$  个至  $1 \times 10^5$  个拷贝/细胞)的人乳腺癌细胞(American Type Culture Collection, Rockville, MD)。作为游离药物、作为非定向脂质体长春瑞滨或作为 HER2-定向(F5)-免疫脂质体长春瑞滨所递送的 VRB 对 MDA-MB-453 细胞的细胞毒性,是如实施例 27 所述那样而确定的。不同之处在于:在供应方所推荐的生长条件下(Leibowitz L-15,含有 10%的胎牛血清,不补充 CO<sub>2</sub>),将细胞以 10,000 个细胞/孔的密度铺在 96 孔微量滴定板上;并且以 0.03-0.1mg/ml 起始,将药物制剂以 1:3 逐步稀释的系列加入。将细胞存活力数据对药物浓度作图(图 25),并将细胞存活力减少到 50%(IC<sub>50</sub>)所需的药物浓度从图上估计得到。F5-定向长春瑞滨脂质体的 IC<sub>50</sub>(0.06  $\mu$ g/ml)与游离药物的 IC<sub>50</sub>(0.07  $\mu$ g/ml)接近,大大低于非定向脂质体的 IC<sub>50</sub>(2.2  $\mu$ g/ml)。这体现出活性增加 37 倍,是药物的癌细胞特异性定向递送的一个结果。

[0406] 实施例 49. 游离的、HER2-定向的和非定向的脂质体长春瑞滨对体外 CaLu-3 细胞的细胞毒性

[0407] 前面实施例(实施例 48)的脂质体和方法,被用于研究:游离长春瑞滨、Ls-VRB 和 F5-ILs-VRB 在 HER2-过量表达的人非小细胞肺癌细胞 CaLu-3(American Type Culture Collection, Rockville, MD)中的细胞毒性。在 5% CO<sub>2</sub> 存在下,将细胞培养在含 10%胎牛血清的 RPMI-1460 培养基中。结果显示在图 26 中。游离 VRB 的 IC<sub>50</sub> 为 1.2  $\mu$ g/ml, F5-ILs-VRB 的 IC<sub>50</sub> 为 10  $\mu$ g/ml, 非定向 Ls-VRB 的 IC<sub>50</sub> 为 50  $\mu$ g/ml。这表明:作为定向输送到细胞的效用,在脂质体包囊的药物的活性上,存在 5 倍的增加。

[0408] 实施例 50. 游离长春瑞滨、HER2-定向和非定向脂质体长春瑞滨对体外 SKBr-3 细胞的细胞毒性

[0409] 实施例 48 的脂质体和方法,被用于研究:游离长春瑞滨、Ls-VRB 和 F5-ILs-VRB 在 HER2-过量表达的乳腺癌细胞 SKBr-3 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) 中的细胞毒性;除了,在 5% CO<sub>2</sub> 存在下,将细胞培养在含有 10% 胎牛血清的改良型 McCoy 5A 培养基中,以 5,000 个细胞/孔的密度铺板,并且将药物与细胞温育 6 小时。

[0410] 结果显示在图 27 中。游离 VRB 的 IC<sub>50</sub> 为 0.28 μg/ml, F5-ILs-VRB 的 IC<sub>50</sub> 为 0.17 μg/ml, 且非定向 Ls-VRB 的 IC<sub>50</sub> 为 0.8 μg/ml。这表明:作为定向输送到细胞的一个作用,药物活性增加 4.7 倍。

[0411] 实施例 51. 在小鼠的 HT29 人结肠癌异种移植物中,脂质体长春瑞滨的体内抗肿瘤功效

[0412] 小的单层囊脂质体(经 QELS 测定为 93.2±26.4nm)是从二硬脂酰磷脂酰胆碱、胆固醇和 PEG-DSPE(3:2:0.045 摩尔比)制备的,是通过在蔗糖八硫酸酯三乙基铵的含水溶液(0.6M 三乙铵, pH5.7-6.2)中,由浓乙醇溶液水合;然后反复挤压通过聚碳酸酯膜(100nm 孔尺寸);去除脂质体外的聚阴离子盐;并且在等渗缓冲液中, pH6.5, 以 325mg VRB/mmol 磷脂的药物/脂类比率,在 60°C 下,通过与脂质体进行温育,从而装载长春瑞滨,如实施例 42 中所述。

[0413] 在雌性 BALB/c 纯合体裸鼠(6-8 周, 称重为 17-20g)的胁区皮下注射 1×10<sup>6</sup> 个 HT-29 人结肠癌细胞 (American Type Culture Collection, Rockville, MD)。从肿瘤接种后的第 16 天起,当平均肿瘤直径达到 5-8mm, 将小鼠随机分成三个组, 每组 6 只动物;并且,以 5mg/kg 的剂量, 每三天一次, 通过尾静脉用游离型或脂质体型长春瑞滨进行治疗, 总共注射 4 次。对于对照组, 小鼠用等体积盐水治疗。使用游标卡尺测量每只小鼠的肿瘤大小, 并且使用下述公式计算肿瘤体积:(肿瘤长度)×(肿瘤宽度)<sup>2</sup>/2。为了评价与治疗相关的毒性, 对动物也每周两次进行称重。脂质体型长春瑞滨在抑制 HT-29 肿瘤生长上显示出比游离型长春瑞滨切实更大的有效性, 导致肿瘤消退;而在游离药物组中, 肿瘤不断持续生长(图 28)。在治疗过程中动物体重鲜有变化, 这表明治疗是充分耐受的, 也表明脂质体化(liposomalization)并不增加药物毒性(图 29)。

[0414] 实施例 52. 脂质体型长春瑞滨对抗 C-26 同系鼠结肠癌肿瘤的体内抗肿瘤功效

[0415] 如实施例 48 制备脂质体型长春瑞滨和游离型长春瑞滨。雄性 BALB/c 小鼠(6-8 周, 称重 17-20g) 皮下接种 2×10<sup>5</sup> 个 C-26 鼠结肠癌细胞。接种后第 17 天, 当平均肿瘤直径达到 5-8mm 时, 将小鼠随机分成六个处理组, 每组 5 只动物。对荷瘤小鼠, 通过尾静脉, 以 6mg/kg、8mg/kg 或 12mg/kg 注射游离长春瑞滨, 以及以 4mg/kg 或 6mg/kg 的剂量注射脂质体型长春瑞滨, 每三天一次, 总共注射 4 次。对于对照组, 小鼠注射等体积的生理盐水。肿瘤体积和动物体重遵照实施例 51 测定。甚至 4mg/kg 的脂质体型长春瑞滨, 在减少肿瘤生长上也比 12mg/kg 的游离药物效率更加相当有效(图 30)。在治疗过程中动物体重几无变化(<10%减轻), 这表明:与游离药物的毒性相比, 脂质体型长春瑞滨的毒性并不增加(图 31)。

[0416] 实施例 53. HER2-定向脂质体长春瑞滨对小鼠的 BT-474 人乳腺癌异种移植物肿瘤的体内抗肿瘤功效: 装载反离子的影响

[0417] 除了不加入 [<sup>3</sup>H]-CHE 之外, 分别通过实施例 41 的 TEA-Pn 方法和实施例 42 的 TEA-SOS 方法, 制备大小为 99.5±10.2nm 的装载有 VRB 的脂质体。以 350mg/mmol 的药物/

磷脂比率装载 VRB。通过将脂质体与 F5-PEG-DSPE 偶联物（参见实施例 19）温育，形成 HER2- 定向脂质体型长春瑞滨，如实施例 43 所述。BT-474 HER2- 过量表达的人乳腺癌异种移植物，是在纯合型裸鼠中培育，如实施例 10 中那样进行。肿瘤细胞接种后第 25 天，当肿瘤大小达到约 200mm（范围 144-309mm）时，将小鼠随机分入四个组，每组 8 只动物，通过静脉注射接受如下治疗：5mg/kg 的游离 VRB；F5-ILs-VRB，以 Pn 作为反离子；或 F5-ILs-VRB，以 SOS 作为反离子，剂量为 5mg/kg，每周一次，总共三次注射。对照组接受等体积的生理盐水。如实施例 10 中那样，监控肿瘤和动物体重。当以 5mg VRB/kg 的剂量给予时，使用蔗糖八硫酸酯装载的 HER2- 定向脂质体型长春瑞滨，在减小肿瘤生长上，效率明显高于使用多（磷酸盐）装载的同样的定向构建物；而这两种免疫脂质体制剂的效率比游离长春瑞滨高许多（图 32）。经药物治疗的小鼠表现出很小的重量变化，这表明治疗是充分耐受的（图 33）。

[0418] 实施例 54. HER2- 定向脂质体型长春瑞滨对小鼠的 BT-474 人乳腺癌异种移植物肿瘤的体内抗肿瘤功效：PEG 化的影响。

[0419] 在含水蔗糖八硫酸酯三乙基铵中，经乙醇溶液方法，通过水合摩尔比为 3：2：0.015（“0.5% PEG”）或 3：2：0.3（“10% PEG”）的 DSPC、胆固醇和 PEG 分子量 2,000 的 PEG-二硬脂酰丙三醇（GS-20, NOF Corp., Japan）组成的脂类基质，根据实施例 48 制备摩尔比为 3：2 的 DSPC 和胆固醇的脂质体，然后根据实施例 48 进行膜挤出。以 350mg/mmol 的药物 / 磷脂比率，将 VRB 装载入脂质体。如实施例 43 中所述，通过这些脂质体与 F5-PEG-DSPE 偶联物（实施例 19）温育，形成 F5 免疫脂质体型长春瑞滨。培养具有 BT-474 异种移植物的裸鼠，如实施例 53 那样，经静脉，以 5mg/kg，用游离 VRB、F5-ILs-VRB-“0.5% PEG”或 F5-ILs-VRB-“10% PEG”治疗。如图 34 所示，采用非离子型 PEG 脂类衍生物 PEG-DSG 提供的具有较高 PEG 化作用的 F5-ILs-VRB，在减少肿瘤生长上，比具有较低数量 PEG-DSG 的 F5-ILs-VRB 效率明显更高；而两种制剂都比游离药物更具活性。

[0420] 实施例 55. 在鼠中，EGFR- 定向脂质体型长春瑞滨对 U87 人脑癌异种移植物肿瘤的体内抗肿瘤功效

[0421] 根据实施例 42，制备带有包封的 0.65M TEA-SOS 溶液的脂质体（经 QELS 大小为  $86.6 \pm 12.9$ nm），并装载上 VRB。如实施例 36 中所述，通过将 VRB 脂质体与抗-EGFR 抗体 Fab' 片段的 PEG-DSPE 偶联物温育，制备抗-EGFR- 免疫脂质体型 VRB (C225Fab' -ILs-VRB)。

[0422] 对雄性 NCRnu/nu 小鼠（5-6 周，称重 17-20g），在肋区皮下注射悬浮在生长培养基中的  $1 \times 10^7$  个 U87 人成胶质细胞瘤细胞（ATCC），总体积 150  $\mu$ l。当肿瘤平均大小达到 250mm 时，将小鼠随机分入具有 10-12 只动物的四个组中。小鼠，每周三次、以 5mg VRB/kg 的剂量，被静脉注射“游离”VRB、非定向 Ls-VRB 或 C225Fab' -ILs-VRB 进行治疗。对照组接受等体积的盐水。如实施例 10 监控肿瘤大小和动物体重。在相等剂量下，C225-Fab' -ILs-VRB，在抑制 EGFR- 过量表达的人脑癌异种移植物肿瘤的生长上，明显比非定向脂质体型长春瑞滨或游离型长春瑞滨更有效（图 35）。

[0423] 实施例 56. 使用硫酸三乙铵方法包封在脂质体中的阿霉素的制备和药物动力学

[0424] 如实施例 2 所述，形成含有不同的脂类基质组成成分（如下面的表所示）的脂质体。N-戊二酰-DSPE (Glu-DSPE) 获自 Avanti Polar Lipids, AL, USA。利用旋转蒸发，在氯仿中由脂溶液形成纯脂膜；真空下（90  $\mu$  mHg, 2 小时）去除痕迹挥发物；脂膜在硫酸三乙铵 (TEA-SO<sub>4</sub>) 溶液（0.65N TEA）中水合，经历六个循环的快速冷冻和融化；并挤压通过二叠

层 0.1  $\mu\text{m}$  孔径聚碳酸酯过滤器 10 次,和挤压通过二叠层 0.05  $\mu\text{m}$  孔径聚碳酸酯过滤器 10 次。为了在血液样品中对脂类基质定量,将 [ $^3\text{H}$ ]-CHE 以 0.5-1.5mCi/mmol 磷脂引入到脂类基质中。根据实施例 2,使含有包载的 TEA- $\text{SO}_4$  溶液的脂质体装载上阿霉素。在 60 $^\circ\text{C}$ 下,将 HEPES-缓冲盐水 (20mMHEPES-Na, 135mM NaCl, pH6.5) 中的脂质体与盐酸阿霉素 (药物/磷脂比率为 140-170mg/mmol) 温育 45min,然后在冰上中止,通过凝胶层析去除未包封的阿霉素。通过分光光度法 (实施例 71) 分析阿霉素,并且通过 Bartlett 方法 (实施例 70) 分析磷脂。所得的脂质体的特性,概述在下表 30 中。

[0425] 表 30. 不同脂类组成时的脂质体型阿霉素的特性

[0426]

脂类组成 (摩尔比)	脂质体大小, nm (平均值 $\pm$ SD, 由 QELS)	药物/磷脂 (mg/mmol)
DSPC/Chol/PEG-DSPE (3: 2: 0.015)	81.8 $\pm$ 27.3	163.6 $\pm$ 4.4
DSPC/Chol(3: 2)	79.1 $\pm$ 27.9	137.0 $\pm$ 17.5
DSPC/Chol/Glu-DSPE (2.85: 2: 0.15)	83.6 $\pm$ 27.2	141.7 $\pm$ 10.4
DSPC/Chol/PEG-DSPE (2.7: 2: 0.3)	83.7 $\pm$ 23.1	175.0 $\pm$ 6.8

[0427] 如实施例 9 中所述,在大鼠中,以 5mg 阿霉素 /kg 的单次静脉剂量,研究这些具有 DSPC/Chol/PEG-DSPE 2.7 : 2 : 0.3 的脂类组成的含阿霉素脂质体的血液药物动力学。脂质体具有长的循环时间 (半衰期约 28 小时) (图 36)。稳定的阿霉素-与-类脂比率表明:该制剂在循环中对药物渗漏而言是非常稳定的,在 48 小时的时间期间里损失为 25% 以下的药物。

[0428] 实施例 57. 通过 TEA-硫酸盐方法而制备的装载阿霉素的脂质体和抗-HER2 免疫脂质体:制备和对抗 HER2-过量表达的人乳腺癌异种移植物的体内抗肿瘤功效。

[0429] 具有不同脂类组成和特性 (在下表中列出) 的装载阿霉素的脂质体,如实施例 56 所述进行制备。通过与抗-HER2 scFv F5-PEG-DSPE 偶联物 (大约 30scFv/脂质体) 共温育,由装载阿霉素的脂质体制备装载阿霉素的抗-HER2 免疫脂质体,如实施例 19 中所述。培养携带皮下人乳腺癌异种移植物 (BT-474) 的 NCR nu/nu 小鼠;一旦肿瘤平均大小达到 200mm<sup>3</sup>,以 5mg/kg 剂量用脂质体型阿霉素或抗-HER2 免疫脂质体型阿霉素治疗 (在 10-12 只动物组成的组别中),每周一次,总共三周;并且如实施例 29 中描述地那样,监控肿瘤进展和动物体重。对于非定向阿霉素脂质体制剂,研究不含 PEG-DSPE、含 0.5mol. % PEG-DSPE 或含 10mol. % PEG-DSPE 的脂类组成情况;对于 F5-免疫脂质体型阿霉素,研究携带有 0.5mol. % PEG-DSPE 和 10mol. % PEG-DSPE 的制剂 (在这里 PEG-DSPE 的量,用脂质体磷脂的 mol. % (摩尔百分数) 表示)。结果 (图 37,表 31) 证明:所有阿霉素治疗对延缓肿瘤生长是有效的。根据接种后第 53 天的肿瘤大小,在所有三个非定向脂质体组中的肿瘤生长抑制上的差异,并没有产生统计学上的显著性 (ANOVA<sub>p</sub> = 0.081);但是免疫脂质体型阿霉素比非定向脂质体型阿霉素明显更有效 (ANOVA<sub>p</sub> = 5.5  $\times$  10<sup>-10</sup>),“10% PEG-DSPE”制剂比



“0.5% PEG-DSPE”制剂更有效(学生 t- 试验,  $p = 0.027$ )。在“10% PEG-DSPE”F5-ILs 组中,在 67%的动物中,肿瘤退化到  $1\text{mm}^3$  或更小;而在“0.5% PEG-DSPE”组中,仅 9%。在对照组(盐水治疗)中,在第 38-43 天,肿瘤超过可接受大小的极限:体重的 15%。

[0430] 表 31. 脂质体型阿霉素体内抗肿瘤功效研究:脂质体特征和治疗结果。

[0431]

脂类组成	脂质体大小, nm (平均值 $\pm$ SD)	药物/磷脂比率, mg/mmol,(平均值 $\pm$ SD)	在第 58 天时的平 均肿瘤大小, $\text{mm}^3$ , (平均值 $\pm$ SEM)
DSPC/Chol/PEG-DSPE (3: 2: 0.015)	83.4 $\pm$ 23.3	136.7 $\pm$ 6.7	490 $\pm$ 74
DSPC/Chol (3: 2)	80.5 $\pm$ 26.6	151.2 $\pm$ 1.9	587 $\pm$ 61
DSPC/Chol/PEG-DSPE	81.0 $\pm$ 24.7	140.1 $\pm$ 4.2	365 $\pm$ 60

[0432]

(2.7: 2: 0.3)			
DSPC/Chol/PEG-DSPE (3: 2: 0.015) + F5 scFv-PEG-DSPE	未测量	140.7 $\pm$ 2.8	119 $\pm$ 39
DSPC/Chol/PEG-DSPE (2.7: 2: 0.3) + F5 scFv-PEG-DSPE	未测量	132.9 $\pm$ 2.2	15.5 $\pm$ 7.6

[0433] 实施例 58. 脂质体型长春碱的制备和脂质体型长春碱在大鼠中的血液药理学

[0434] 利用 2 次挤压通过二叠层  $0.2\ \mu\text{m}$  聚碳酸酯膜和 10 次挤压通过二叠层  $0.08\ \mu\text{m}$  聚碳酸酯膜,通过实施例 11 的方法,制备含有包载有 TEA-SOS 水溶液 ( $0.65\text{M TEA}$ ,  $\text{pH}6.4$ , 同渗重摩  $502\text{mmol/kg}$ ) 和大小  $99.5\pm 10.2\text{nm}$  (平均值  $\pm$ SD, 经 QELS 测定) 的脂质体。以  $150\text{mg/mmol}$  的药物 - 与 - 磷脂比率,加入硫酸长春碱 USP (美国药典) 形式的长春碱 (vinblastine (VBL))。使用  $1\text{N NaOH}$ , 将药物 - 脂质体混合物的 pH 调节到 6.5, 随后将混合物在  $60^\circ\text{C}$  下温育 30 分钟。然后,反应在冰上冷却 15 分钟;使用 Sephadex G-75 凝胶过滤层析,用  $5\text{mM HEPES-Na}$ 、 $135\text{mM NaCl}$ 、 $\text{pH}6.5$  洗脱,去除未包封药物。然后如实施例 70 和实施例 71 那样,通过分光光度法分析纯化的脂质体中的 VBL,通过 Bartlett 方法分析磷脂。以  $1.5\text{mCi/mmol}$  磷脂的比率,将  $[^3\text{H}]\text{-CHE}$  引入到制剂中。脂质体型长春碱具有  $152.4\pm 12.0\text{mgVBL/mmol}$  磷脂 (定量包封)。

[0435] 如实施例 9 所述,以  $5\text{mg VBL/kg}$  剂量,研究脂质体型长春碱在雌性 Albino 大鼠 (8-9 周龄;  $200\text{g}$ ) 中的血液药理学。如实施例 41 中所述,在血浆样品中,对长春碱定量 (使用长春瑞滨作为内标)。长春碱型脂质体显示出良好的循环寿命 (脂类组分的血浆半衰期为  $12.8\pm 0.04$  小时) (图 38) 以及对抗药物从脂质体渗漏的良好稳定性,在 24 小时后,超过 70% 的初始长春碱加载量保持在被包囊状态中 (图 39)。发现:注射后达到包封药

物之 50% 释放的时间为  $40.6 \pm 1.2$  小时。

[0436] 实施例 59. 使用 TEA-SOS 方法制备采用长春新碱进行装载的脂质体, 以及 pH 对装载效率的影响。

[0437] 利用 15 次通过二叠层  $0.08 \mu\text{m}$  孔径聚碳酸酯膜的挤出步骤, 通过实施例 11 的方法, 制备大小为  $86.6 \pm 12.9\text{nm}$  (经 QELS)、含有摩尔比 3 : 2 : 0.015 的 DSPC/Chol/PEG-DSPE 脂类组成的、以及含有包载的含水 TEA-SOS 溶液 ( $0.65\text{MTEA}$ , pH5.4, 同渗重摩  $521\text{mmol/kg}$ ) 的脂质体。向处于  $5\text{mM}$  HEPES-Na、 $5\%$  葡萄糖含水缓冲液、pH6.5 中的脂质体中, 以  $350 \mu\text{g}$  长春新碱 /  $\mu\text{mol}$  磷脂的药物 - 对 - 磷脂比率, 将长春新碱 (VCR) 以硫酸长春新碱加入; 用  $1\text{N}$  NaOH 将 pH 调节到指示比率; 混合物在  $60^\circ\text{C}$  下温育 30 分钟, 冰上冷却 15 分钟; 并且使用 SephadexG-75 凝胶过滤层析, 用 HBS-6.5 ( $20\text{mM}$  HEPES,  $135\text{mM}$  NaCl, pH6.5) 洗脱, 将脂质体与未包封药物分离开来。然后, 分析纯化的脂质体, 其中在溶解在酸性异丙醇之后, 通过分光光度法使用  $265\text{nm}$  处的吸光率分析长春新碱; 并使用 Bartlett 的磷酸盐测试 (1959) 分析磷脂含量。

[0438] 结果显示在表 32 中。在 pH4.5-7.5 范围内, 药物装载超过 90%; 并且在 pH5.0-7.5, 几乎是定量的。在 pH3.5 下——该 pH 值是加入药物后、在脂质体混合物中所观察到的 pH, 但不进行 pH 调整, 装载水平相当低。

[0439] 表 32. 长春新碱装载入携带有包载的 TEA-SOS 的脂质体中的 pH- 依赖性

pH	药物/磷脂比率, $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$	装载效率(%)
3.5	$39.7 \pm 4.9$	$11.3 \pm 0.2$
4.5	$327.2 \pm 20.6$	$93.5 \pm 5.4$
5.0	$360.6 \pm 5.8$	$103.0 \pm 1.7$
[0440] 5.5	$371.2 \pm 30.2$	$106.1 \pm 9.1$
6.0	$347.7 \pm 20.4$	$99.3 \pm 5.8$
6.5	$347.7 \pm 20.9$	$99.4 \pm 5.9$
7.0	$377.3 \pm 22.2$	$107.8 \pm 6.8$
7.5	$371.5 \pm 24.9$	$106.1 \pm 7.6$

[0441] 实施例 60. 使用 TEA-SOS 方法制备装载有长春新碱的脂质体; 药物 / 脂类比率对装载效率的影响。

[0442] 根据实施例 59, 制备含 SOS-TEA 的脂质体; 根据实施例 59 的程序, 在 pH6.5 下, 以  $150-550 \mu\text{g}$  长春新碱 /  $\mu\text{mol}$  磷脂的药物 - 与 - 磷脂比率, 装载硫酸长春新碱。然后, 分析从未包封药物纯化而来的脂质体, 其中通过分光光度法分析 VCR; 并使用 Bartlett 的分析方法 (1959) 分析脂质体磷脂。在整个被研究的药物 / 脂类比率的范围内, 药物装载效率是超过 90% 的; 并且在  $150-450 \mu\text{g}$  长春新碱 /  $\mu\text{gmol}$  磷脂之间, 几乎是定量的 (表 33)。

[0443] 表 33. 以不同的药物 - 与 - 脂类比率, 将长春新碱装载入含 TEA-SOS 的脂质体

	输入的药物-比-磷脂 ( $\mu\text{g} / \mu\text{mol}$ )	包封的药物-比-磷脂 ( $\mu\text{g} / \mu\text{mol}$ )	装载效率(%)
	150	163.6 $\pm$ 6.6	109.0 $\pm$ 4.8
[0444]	250	251.1 $\pm$ 17.0	100.5 $\pm$ 6.8
	350	347.7 $\pm$ 20.9	99.4 $\pm$ 5.9
	450	452.0 $\pm$ 18.8	100.4 $\pm$ 4.2
	550	521.6 $\pm$ 24.9	94.8 $\pm$ 4.3

[0445] 实施例 61. 制备免疫脂质体型长春新碱以及脂质体型长春新碱和免疫脂质体型长春新碱对体外癌细胞的细胞毒性

[0446] 采用 350mg/mmol 的药物 / 磷脂比率, 如实施例 59 所述地那样, 制备脂质体型长春新碱 (liposomal vincristine (Ls-VCR))。如实施例 19 所述, 通过与抗-HER2scFv F5-PEG-DSPE 偶联物共温育, 由脂质体型长春新碱制备 HER2-特异性的 F5-免疫脂质体型长春新碱 (F5-immunoliposomal vincristine (F5-ILs-VCR))。通过将硫酸长春新碱 USP (美国药典) 溶解在水中, 制备“游离的”长春新碱 (VCR) 溶液; 然后无菌过滤。通过使用实施例 27 的程序, 进行 MTT- 基的细胞存活力分析, 测定 VCR、Ls-VCR 和 F5-ILs-VCR 对 HER2- 过量表达的人乳腺癌细胞 SKBr-3 (ATCC) 的细胞毒性, 其中细胞以 5,000 个细胞 / 孔被接种到 96- 孔微量滴定板中, 驯化过夜; 并与含药物的培养基温育 4 小时; 然后, 在温育后, 在无药物培养基中, 放置 3 天。结果显示在图 40 中。游离 VCR 的  $IC_{50}$  是 75ng/ml, F5-ILs-VCR 的  $IC_{50}$  是 11ng/ml, Ls-VCR 的  $IC_{50}$  是 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。根据本发明制备的定向脂质体长春新碱活性比游离药物高 6.8 倍, 并且比非定向脂质体药物活性高 273 倍; 这表明: 作为细胞特异性药物输送的一个作用, 在抗癌活性上存在实质性增加。

[0447] 实施例 62. Ls-VCR 在大鼠中的血液药物动力学

[0448] 使用 10 次通过孔径 80nm 或 100nm 的二叠层聚碳酸酯膜的挤压步骤, 通过实施例 11 的方法, 制备脂质体; 该脂质体含有包载的 SOS-TEA 溶液 (0.65MTEA, pH5.8, 同渗重摩 530mmol/kg), 并且脂类组成为 DSPC/Chol/PEG-DSPE (摩尔比 3 : 2 : 0.015), 也以 1.5mCi/mmol 磷脂含有 [ $^3\text{H}$ ]-CHE。如实施例 59 所述, 脂质体在 H6.5 下、以 350mg/mmol 的药物 / 磷脂比率装载 VCR。装载有 VCR 的脂质体, 以 5mgVCR/kg 的剂量, 经静脉给予雌性 albino 大鼠 (180-220g); 并且, 如实施例 9 中所述地, 研究药物和脂质体脂类的血液药物动力学。除了移动相中的含水的醋酸三乙铵 (pH5.5) 和乙腈的体积比为 65 : 35 之外, 如实施例 41 所述通过 HPLC 对血液样品中的 VCR 量进行定量。VCR 典型的保留时间为 8.8min (分钟)。结果显示在图 41 和表 34 中。两种制剂都具有延长的循环寿命 (血液半衰期 12-17 小时)。在两种制剂中, 就药物渗漏而言, 脂质体型长春新碱是非常稳定的 (半释放期超过 120 小时) (图 42)。

[0449] 表 34. 使用 TEA-SOS 方法, 以 350mg/mmol 磷脂装载了长春新碱的脂质体的特征

	挤压孔径, nm	脂质体大 小, nm(平 均值±SD)	药物装载, mg/mmol 磷 脂	$t_{1/2\beta}$ 脂类, 小时	$t_{1/2\beta}$ VCR, 小时	$t_{1/2\beta}$ VCR 释 放, 小时
[0450]	80	101.2±20.2	347.7±20.93	17.5±1.5	16.0±2.0	>120
	100	125.6±32.0	366.8±18.11	12.1±0.7	12.0±0.8	不可检测到

[0451] 实施例 63. 不同药物 / 脂类比率的 Ls-VCR 在大鼠中的血液药物动力学

[0452] 使用 10 次通过孔径 50nm 或 80nm 的二叠层聚碳酸酯膜的挤压步骤, 通过实施例 11 的方法, 制备脂质体; 该脂质体含有包载的 SOS-TEA 溶液 (0.65M TEA, pH6.4, 同渗重摩 485mmol/kg), 脂类组成为 DSPC/Chol/PEG-DSPE (摩尔比 3 : 2 : 0.0151, 也以 1.5mCi/mmol 磷脂含有 [<sup>3</sup>H]-CHE。通过以计算出的药物 / 脂类比率 100mg/mmol、200mg/mmol 或 350mg/mmol 磷脂, 加入含水硫酸 VCR 溶液的 20 $\mu$ g/mL 储液, 从而如实施例 59 所述在 pH6.5 下使脂质体装载上 VCR。对于所有制备方法, 药物装载效率超过 96%。以 5mg VCR/kg 的剂量, 经静脉, 将装载了 VCR 的脂质体给予雌性 albino 大鼠 (8-9 周龄, 180-220g); 并且如实施例 62 中所述地那样, 研究药物和脂质体脂类的血液药物动力学。结果显示在表 35 中。脂质体型长春新碱具有良好的循环寿命 (药物的血液半衰期为 20-30 小时); 并且, 在所有被研究的尺寸和药物一与 . 脂类比率下, 是异常稳定的 (药物释放半衰期超过 93 小时)。

[0453] 表 35. 使用 TEA-SOS 方法, 以不同药物 / 脂类比率装载长春新碱的脂质体的特征

	挤压孔 径, nm	脂质体大 小, nm(平 均值±SD)	VCR, mg/mmol 磷 脂	加入的 包封的	$t_{1/2}$ 脂类, 小时	$t_{1/2}$ VCR, 小时	$t_{1/2}$ 药物 释放, 小 时
[0454]	50	76.8±27.2	100	96.1±3.0	35.6±2.7	30.3 ±4.0	227±96
			200	193.3 ±3.9	20.8 ±2.2	18.4 ±0.7	244±130
			350	375.2±10.0	24.8 ±0.9	19.6±0.9	93.2±6.7
	80	101.6±25.3	100	104.5 ±2.1	33.0±7.6	26.8±4.8	153±10

[0455] 实施例 64. HER2-定向脂质体型长春新碱的制备, 以及非定向型和 HER2-定向型脂质体长春新碱在小鼠中对过量表达 HER2 的人乳腺癌异种移植物的抗肿瘤功效。[0277] 使用 50nm 孔径的膜挤压和以 100mg/mmol 的药物 / 磷脂比率装载药物, 根据实施例 63 (省去 [<sup>3</sup>H]-CHE 组分), 通过 TEA-SOS 方法制备装载有长春新碱的脂质体 (vincristine-loaded liposomes (Ls-VCR-SOS))。如实施例 43 所述, 通过将 Ls-VCR-SOS 与抗-HER2 scFv F5-PEG-DSPE 偶联物 (实施例 19) 温育, 形成 F5 免疫脂质体长春新碱 (F5-ILs-VCR)。利用 TEA-柠檬酸的装载有长春新碱的脂质体 (Ls-VCR-Cit), 是按与 Ls-VCR-SOS 脂质体相似的方法制备的; 除了用柠檬酸三乙胺溶液 (通过用纯三乙胺将含水柠檬酸滴定至 pH5.1, 并将浓度调整到 0.65M 三乙胺制备而得) 替代 TEA-SOS 溶液之外。治疗研究设计遵照实施例 10 的方法。在裸鼠上培养 BT-474 人乳腺癌的皮下异种移植肿瘤, 且当肿瘤大小达到 250mm<sup>3</sup> (144-309mm<sup>3</sup> 范围) 时, 将由 8 到 9 只小鼠组成的组别中的小鼠, 经静脉、以 2mgVCR/kg 的剂量, 用游离 VCR、Ls-VCR 或 F5-ILs-VCR 治疗, 每周一次, 总共三周, 是在肿瘤接种后第 19 天开始进行。如实施例 10 所述, 对肿瘤大小和动物体重进行监控。对于对照组, 小鼠

用等体积的盐水处理。在肿瘤接种后第 63 天,利用 Mann-Whitney 试验,用统计学方法评价处理组之间、在肿瘤大小上的差异。各组中平均肿瘤大小的动态变化,显示在图 43 中。当与 Ls-VCR 或游离 VCR 相比时, F5-ILs-VCR 表现出最大的效率,导致:在第 63 天时,8 只动物中的 6 只 (75%) 的肿瘤完全消退。Ls-VCR-Cit 也是具有效力的,导致:在 63 天时,也观察到 9 只动物中的 2 只 (22%) 的肿瘤完全消退;然而其比 F5-ILs-VCR 效力低 ( $p < 0.005$ )。Ls-VCR-SOS 和游离 VCR 具有相同的功效 ( $p > 0.2$ ),但效力比 F5-ILs-VCR 或 Ls-VCR-Cit 低。因此,令人惊讶的是,借助细胞-定向输送,使用本发明的多价阴离子所包封的脂质体型药物,被证明比通过非结合性阴离子所包封的脂质体药物功效更大。动物体重动力学显示:所有脂质体型 VCR 制剂的毒性低于游离型 CVR 的毒性,导致治疗期间体重减轻较少 (图 44)。

[0456] 实施例 65. EGFR-定向脂质体型长春新碱的制备,非定向和 EGFR-定向脂质体型长春新碱在小鼠中对 EGFR-过量表达的人脑癌异种移植物的抗肿瘤功效。

[0457] 如实施例 64,使用 TEA-SOS 方法制备装载长春新碱的脂质体 (Ls-VCR)。如实施例 36 所述,通过将脂质体与抗-HER2 Fab' C225Fab-PEG-DSPE 偶联物共温育,制备 EGFR-定向免疫脂质体长春新碱。

[0458] 在雄性 NCR nu/nu 小鼠 (5-6 周龄,称重 17-20g) 的胁区,皮下注射 0.15ml 的细胞生长培养基,该培养基中含有  $1 \pm 10^7$  个的稳定表达表皮生长因子受体 (HER1) 突变体 EGFRvIII 的 U87 人成胶质细胞瘤细胞。在第 11 天,当平均肿瘤大小达到 300-400 mm<sup>3</sup> 时,将小鼠随机分成 10-12 动物/组的四个组。在肿瘤接种后第 11、18 和 25 天,以 1.5mg/kg 的剂量,静脉内给予游离 VCR (硫酸长春新碱 1mg/mL,于盐水中)、Ls-VCR 或 C225Fab-ILs-VCR,进行治疗。对照组中的小鼠类似地注射等体积的生理盐水。如实施例 10 所述,监控肿瘤大小和小鼠体重。结果显示在图 45 中。与对照动物相比,所有用 VCR 制剂治疗的动物显示出肿瘤生长的延迟。在用游离 VCR 和 Ls-VCR 治疗的组之间,没有显著性差异。EGFR-定向型 C225Fab-ILs-VCR,比游离型或非定向型脂质体 VCR 效率高。

[0459] 实施例 66. 含有包载的三乙铵肌醇六磷酸 (triethylammonium inositolhexaphosphate (TEA-IHP)) 溶液的脂质体的制备。

[0460] 聚阴离子化的多元醇、肌醇六磷酸 (IHP) 十二烷基钠盐,获自 Sigma (St. Louis, MO)。根据实施例 4 的程序,通过在 Dowex 50W×8-200 交联磺化聚苯乙烯树脂上进行离子交换制备水溶液,该溶液含有 0.65M 三乙铵和 0.681M 磷酸基团, pH6.5,且同渗重摩为 718mmol/kg;然后用纯 TEA 滴定,并用水稀释。残留的钠含量,是在阳离子数量的 1% 以下。在 60°C 下,将干的脂类 (150 μmol DSPC、100 μmol Chol、0.75 μmol PEG-DSPE) 溶解在 0.5ml 的 100% 乙醇 USP (美国药典) 中,与 4.5ml 的、预加热到相同温度的三乙铵肌醇六磷酸溶液混合。在 30-40mm Hg 以及 40-45°C 下,通过旋转蒸发,部分地除去乙醇,直到混合物显示出不起泡。然后,在 60-65°C 下,将脂类悬浮液 15 次挤压通过二叠层 0.1 μm 孔径聚碳酸酯膜。经 QELS 测定,所得的脂质体大小为 104.3 ± 39.0nm。通过在 Sepharose 4B 柱上进行凝胶层析,用 5mM HEPES-Na、5% 葡萄糖, pH6.5 缓冲液洗脱,去除未包封的三乙铵 IHP。根据实施例 70 提取,使用 Bartlett 方法,由磷脂浓度定量脂质体。

[0461] 实施例 67. 将药物装载入含包载的 TEA-IHP 溶液的脂质体中

[0462] 用 CPT11 或长春瑞滨装载实施例 67 的脂质体。长春瑞滨以 175 或 350g/mol 的药物-与-磷脂比率装载, CPT11 以 250 或 500g/mol 的比率装载。以下面示出的输入药物/

磷脂比率（参见表 36），将药物施加给处于 HEPES-葡萄糖缓冲液（实施例 67）中的脂质体。如果需要，使用 1N NaOH 将 pH 调整到 6.5-6.8。混合物在 60°C 下温育 30 分钟，冰上冷却 15 分钟，并且在 Sephadex G-25 凝胶过滤柱上层析，用 5mM HEPES-Na、145mM NaCl, pH6.5 洗脱。将纯化的脂质体之等分试样增溶在酸化甲醇中，并通过分光光度法分析（实施例 71）。通过（实施例 70）提取，使用 Bartlett 方法（1959），对磷脂定量。如下面的表 36 所示，两种药物定量（即，几乎 100%）装载入脂质体中。

[0463] 表 36. 被装载入含包载的肌醇六磷酸的脂质体中的药物的特性

	药物	输入的药物/脂类 比率, g/mol 磷脂	包封的药物/脂类 比率, g/mol 磷脂	装载效率, %
[0464]	长春瑞滨	175	175.3±8.0	100.2±4.5
	长春瑞滨	350	352.3±11.8	100.6±3.3
	CPT-11	250	265.1±11.2	106.1±4.7
	CPT-11	500	518.7±27.8	103.7±5.8

[0465] 实施例 68. 在体外的小鼠血浆存在下，游离型 CPT-11 或脂质体型 CPT-11 的化学稳定性

[0466] 在体内，前药 CPT-11 进行化学转化，形成活性药物代谢物，称为 SN-38。SN-38 和 CPT-11 都从它们的活性内酯形式转化为无活性的前药，称为 SN-38 或 CPT-11 羧酸盐。在该实施例中，研究了根据本发明的 CPT-11 脂质体化作用，对在血浆存在下 CPT-11 化学转化为这些前药的影响。利用 10 次挤压通过二叠层 0.08 μm 聚碳酸酯过滤器，根据实施例 11 制备脂质体；该脂质体含有包载的蔗糖八硫酸酯三乙基铵 (triethylammonium sucroseoctasulfate) (0.65M TEA, pH6.4, 同渗重摩 485mmol/kg)，和摩尔比为 3 : 2 : 0.015 的 DSPC、胆固醇和 PEG-DSPE 的脂类组成。经 QELS 测定，脂质体的大小为 87.4±19.2nm。通过以约 500mg CPT-11 基本成分 /mmol 脂质体磷脂的比率；在含水的 5mM HEPES-Na、5% 葡萄糖，pH6.5 中，在 60°C 下，温育 30 分钟；然后在冰上维持 15 分钟终止，从而装载 CPT-11。然后在 Sephadex G-75 柱上纯化装载了 CPT-11 的脂质体，采用 HEPES 缓冲盐水 (5mMHEPES, 145mM NaCl, pH6.5) 洗脱。所得的 CPT-11 脂质体具有 536.5±20.1mgCPT-11/mmol 磷脂的比率。通过以 1mg/ml，将盐酸伊立替康 USP (美国药典) 溶解在 144mM 的水溶液 NaCl 中，新鲜制备游离型 CPT-11 溶液，用稀 HCl 酸化到 pH3。将 10 μl 脂质体型 CPT-11 或游离型 CPT-11 的等分试样，与 90 μl 的肝素 - 稳定的小鼠血浆 (Harlan Bioproducts, USA) 混合，并于 37°C、在振荡水浴中温育。在给定时间点时，一式三份将脂质体样品在 Sepharose CL-4B 尺寸排阻柱 (2ml 床体积) 上进行层析，用 HBS-6.5 洗脱；并且经荧光检测含药物的级分。收集第一（空体积）和第二（拖尾 (trailing)) 含药物峰，并认为是脂质体包封的和释放的药物级分。通过旋涡 10 秒钟，然后在 14, 100×g 离心 5 分钟，用 400 μl 冰冷的甲醇提取样品。分析上清液中的 CPT-11，并利用对 Warner and Burke, J Chromatogr., Ser. B Biomed. Sci. Appl. 1997, vol. 691, p. 161-71 方法予以修改的方法，通过 HPLC 分析其转化产物。由 3% 醋酸三乙铵 pH5.5 (溶液 A) 和乙腈 (溶液 B) 组成的移动相，以 1.0ml/min 的速度，在 20vol% B 至 50vol. % B 的线性梯度中，输送 14min。以 375nm 的激发光和 500nm 的发射光，通过荧光检测洗脱的产物。保留时间为 5.3min (CPT-11

羧酸酯)、6.8min(SN-38 羧酸酯)、9.3min(CPT-11) 和 11.0min(SN-38)。结果表明:当游离 CPT-11 和从脂质体释放的 CPT-11 经历转化时,脂质体内的 CPT-11 是相当稳定的。

[0467] 表 37. 在小鼠血浆中,游离型 CPT-11 和脂质体型 CPT-11 体外转化为 SN-38 和羧酸酯形式。

[0468]

样品	时间, 小时	CPT-11, %		SN-38, %	
		内酯	羧酸酯	内酯	羧酸酯
游离 CPT-11	2	1.9 ± 0.4	35.2±1.9	4.4±0.1	58.4± 2.1
	12	<0.1	11.5±0.9	9.9±0.8	78.6±1.3
	24	<0.1	<0.1	22.5±9.8	77.5±9.8
Ls-CPT-11 (包封的)	12	97.7±0.1	<0.1	2.3±0.1	<0.1
	24	97.7 ±0.1	<0.1	2.3±0.1	<0.1
Ls-CPT-11 (释放的)	12	60.5 ±10.4	25.0±7.1	5.0±0.3	9.5 ±3.0
	24	78.3±6.7	14.0±5.2	6.5±0.5	1.2±1.7

[0469] 实施例 69. 游离型 CPT-11 或脂质体型 CPT-11 在大鼠中的体内化学稳定性

[0470] 如实施例 68 所述,使用三乙基铵蔗糖八硫酸酯制备脂质体 CPT-11,该三乙基铵蔗糖八硫酸酯具有 0.65M TEA, pH6.4,同渗重摩 502mmol/kg。脂质体大小为 98.5±18.4nm, CPT-11 封装为 510.1±16.5mg CPT-11/mmol 磷脂。脂质体型 CPT-11 和游离型 CPT-11, 以 25mg/kg 的剂量,通过静脉内,给予具有留置的中心静脉插管的雌性 Albino 大鼠 (180-220g);并且,在 48 小时的时间里,间隔地抽取血液样品。将血液样品与含有 0.04% EDTA 的冰冷 PBS 混合,并迅速离心去除血细胞。如上面实施例 68 所述,通过 HPLC 分析上清液流体的等分试样中的 CPT-11、SN-38 和它们羧酸酯形式。结果显示在图 46 和 47 中。尽管游离 CPT-11 被迅速清除,在 30 分钟之后不可检测到,然而脂质体 CPT-11 仍然保留在循环中 ( $t_{1/2}$ 15.2 小时),在 24 小时时有 37.8% 的药物保留在循环中,在 48 小时后有近似 10% 的药物依然保留在循环中。没有检测到脂质体形式的 CPT-11 转化为 SN-38 或羧酸盐形式的 CPT-11。游离 CPT-11,即作为溶液给予的 CPT-11,相当快地从循环中去除(半衰期约 16min),且可以测量到转化为羧酸盐形式的药物。

[0471] 实施例 70. 脂质体磷脂的定量

[0472] 改良型酸消化——蓝色磷钼酸盐方法 I。该方法是从 Bartlett(1959) 修改而来。将 10-20ml 脂质体等分试样置于耐热的玻璃杯,用 0.5ml10N 硫酸在 110-130℃ 下加热 2 小时进行消化,通过加入 50ml 的 9% 过氧化氢进行矿化;再加热 30min,直到用指示纸条不能检测到过氧化氢。在环境温度中,将消化的样品用 1ml0.2% 含水钼酸铵稀释;与 0.1ml5% 含水抗坏血酸混合;并且,在沸水浴中温育 10min。在 800nm 下,测量还原的磷钼酸盐复合物的吸光率,并与使用无机磷酸盐标准溶液所同时产生的标准曲线比较。

[0473] 改良型酸消化——蓝色磷钼酸盐方法 II。该方法是 Morrison(1964) 的方法的改良型。将 5  $\mu$ l 含 1-10mM 磷脂的脂质体等分试样与 60  $\mu$ l 浓硫酸和 10  $\mu$ l 30% 过氧化氢,在耐热玻璃管中混合。将混合物在 200-220℃ 下加热 10min,用 0.7  $\mu$ l 去离子水稀释,与 10  $\mu$ l 10% 含水亚硫酸钠混合,在沸水浴中温育 5 分钟,并冷却至环境温度。加入 200  $\mu$ l 12%

含水钼酸铵和 10  $\mu$ l 10% 含水抗坏血酸, 并将样品在沸水浴中 10min。将样品迅速冷却至环境温度; 针对空样品, 在 825nm 下, 测量还原的磷钼酸盐复合物的吸光率。由使用具有 2、4、6、8 和 10nM 磷酸二氢钾的标准溶液在同一操作中获得的标准曲线, 确定磷脂的数量。

[0474] 提取方法。用 200  $\mu$ l 份额的甲醇-氯仿混合物 (体积比 1 : 2), 对脂质体的 25-100  $\mu$ l 等分试样提取 3 次。将有机相合并并在耐热玻璃管中, 真空中去除溶剂。残留物用 10N 硫酸处理, 根据上面的方法 I 进一步分析磷。

[0475] 除非另外指出, 分析数据用平均值  $\pm$  三次操作的标准误差表示。

[0476] 实施例 71. 脂质体中药物的定量

[0477] 分光光度法定量。将脂质体等分试样 (10-50  $\mu$ l) 与 1mL 70vol. % 含 0.075-0.1N HCL 的含水异丙醇混合; 并且针对空白样品, 在下列波长处测量吸光率: 阿霉素, 485nm; CPT-11 和托泊特坎, 372nm; 玫瑰树碱, 306nm; 长春瑞滨, 270nm; 长春新碱和长春碱, 265nm。通过与同时操作的标准曲线比较, 测定药物的数量。

[0478] 荧光定量。将含脂质体的样品 (例如血浆) 的等分试样稀释, 稀释用酸化的异丙醇 (0.02-0.1 等分试样: 1mL 70% 异丙醇 -0.075N HCl; >0.1ml 等分试样: 90% 异丙醇 -0.1N HCl 至 1mL)。如果出现蛋白质沉淀, 将样品在冰上温育 1-2 小时, 并通过在 12, 100  $\times$  g 离心 10 分钟澄清。在下列波长下, 测量上清液的荧光: CPT-11, 激发光 370nm, 发射光 423-425nm; 托泊特坎, 激发光 380-385nm, 激发光 520-525nm; 玫瑰树碱, 激发光 306nm, 发射光 520nm。在减去空白荧光之后, 由同时操作的标准曲线计算药物数量。

[0479] 实施例 72. 脂聚合物对长春瑞滨包囊入脂质体的包囊效率的影响。

[0480] 利用 80nm 孔径膜的挤压步骤, 根据实施例 11 的方法, 制备含有包囊的 0.65MTEA-SOS 溶液、由 DSPC200 摩尔份、胆固醇 133 摩尔份和聚 (乙二醇) (分子量 2,000) 衍生脂类 PEG-DSPE (1-20 摩尔份或 PEG-DSG (20 摩尔份) 组成的脂质体。脂质体以 350mg/mmol 的药物 / 磷脂比率装载长春瑞滨, 并根据实施例 40 的方法从未包囊的药物纯化出来。如实施例 70 所述, 分析脂质体中的药物和脂类含量, 并使用体积重量高斯近似方法 (volume-weighted Gaussian approximation) 经 QELS 分析脂质体大小。结果 (表 38) 表明: 当数量为脂质体磷脂的 1 摩尔% 以上 (总脂类的 0.3 摩尔%) 的阴离子 PEG 衍生物 PEG-DSPE 对药物装载效率具有负影响时, 中性衍生物 PEG-DSG 却令人惊奇地并不影响包囊效率, 甚至在脂质体磷脂的 9.1 摩尔% (总脂类的 5.7 摩尔%) 时也不影响。

[0481] 表 38. 以不同的 PEG- 脂类衍生物数量通过 TEA-SOS 方法制备的长春瑞滨脂质体的特性

[0482]	PEG-脂类	PEG-脂类数	脂质体大小,	药物装载,	装载效率, %
[0483]		量, 总脂类的	nm (平均 SD)	mg/mmol 磷脂	包囊
[0484]		mol. %			
[0485]	PEG-DSPE	0.3	108 $\pm$ 32	359.5 $\pm$ 17.8	102.7 $\pm$ 5.2
[0486]	PEG-DSPE	0.6	110 $\pm$ 18	346.6 $\pm$ 14.5	99.0 $\pm$ 4.1
[0487]	PEG-DSPE	1.8	104 $\pm$ 35	332.0 $\pm$ 14.0	94.9 $\pm$ 3.8
[0488]	PEG-DSPE	2.9	94 $\pm$ 33	259.8 $\pm$ 9.5	74.2 $\pm$ 2.0
[0489]	PEG-DSPE	4.0	100 $\pm$ 36	155.4 $\pm$ 7.0	44.4 $\pm$ 0.9
[0490]	PEG-DSPE	5.7	103 $\pm$ 31	61.2 $\pm$ 5.2	17.5 $\pm$ 0.3



[0491] PEG-DSG 5.7 97±36 362.7±14.2 103.6±4.2

[0492] 实施例 73. 脂质体内药物包载剂对 CPT-11 在小鼠中血液寿命的影响

[0493] 遵照实施例 66 的一般程序,制备含有 0.65N 的六磷酸肌醇 (IHP, 植酸) 或八硫酸蔗糖的三乙铵 (TEA) 或三乙醇铵 (TEOA) 盐溶液的脂质体,并以 500g/mol 磷脂装载 CPT-11。以 5mg CPT-11/kg 体重的剂量,将脂质体静脉内给予 Swiss-Webster 小鼠。24 小时之后,麻醉小鼠,经开口心脏穿刺放血。收集血液,如实施例 68 所述通过 HPLC 分析血液血浆中的 CPT-11 含量,药物数量用保留在血液中的注射剂量的百分比表示 (% ID)。TEOA-IHP 在改进药物血液寿命中的有效性比 TEA-IHP、TEOA-SOAS 和 TEA-SOS 低 (表 39)。

[0494] 表 39. 在小鼠静脉内给予 CPT-11 脂质体后 24 小时 CPT-11 在血液中的保留水平

[0495] 脂质体内药物包载剂 保留在血液中的 % ID

[0496] TEOA-IHP 2.74±0.54

[0497] TEA-IHP 5.86±0.20

[0498] TEOA-SOS 7.03±0.17

[0499] TEA-SOS 11.32±0.46

[0500] 实施例 74. 药物装载入含有 1.05N 二乙铵八硫酸蔗糖的脂质体

[0501] 使用纯二乙胺 (99.5% 纯度),利用实施例 6 的离子-交换/滴定方法,制备 1.05N 二乙铵八硫酸蔗糖 (DEA-SOS) 的含水溶液, pH6.0, 同渗重摩 727mmol/kg。使用实施例 11 的方法,将 3 摩尔份 DSPC、2 摩尔份胆固醇和 0.015 摩尔份 PEG2000-DSPE 的脂类基质在 DEA-SOS 溶液存在下配制入脂质体 (体积权重平均大小 92.4nm),并将 CPT-11 以不同的药物/脂类输入比率装载在脂质体中。通过凝胶层析去除未包囊的药物,测定每单位脂类包囊的药物的数量 (药物/脂类输入比)。以药物/脂类输入比与输入比的百分比计算包囊效率。结果显示在表 40 中。该装载获得其最大的水平:每摩尔磷脂约 1.76 摩尔药物 (1.67-1.70mol 药物/g 总脂类),其与基于脂质体中的二乙铵含量的量 (1.78mol 二乙铵/mol 磷脂) 非常一致,假设对于药物分子发生脂质体内二乙铵离子的化学计量交换,以及估算的脂质体内包载的体积约 1.71/mol 磷脂。

[0502] 表 40. CPT-11 装载在含有 1.05N DEA-SOS 的 DSPC/Chol/PEG-DSPE 脂质体中。

[0503] 药物/脂类输入比率, 药物/脂类输出比率, 包囊效率, %

[0504] mol/g mol/g

[0505] 1.25 1.247±0.038 99.8±3.0

[0506] 1.50 1.534±0.052 102.3±3.5

[0507] 1.80 1.669±0.043 92.7±2.4

[0508] 2.06 1.690±0.054 82.0±2.6

[0509] 2.20 1.704±0.062 77.5±2.8

[0510] 2.42 1.685±0.103 69.6±4.3

[0511] 除非另外指出,分析数据以三次运算的平均值 ± 标准误差表示。大鼠血浆药物动力学数据以两次运算的平均值 ± 标准误差表示。

[0512] 尽管本发明已参考目前优选的实施方案进行描述,应该理解可以在不脱离本发明精神的情况下进行各种修改。因此,本发明的范围由随附的权利要求书决定,并包括这些权利要求有权获得的等同的全部范围。所有引用的文章和参考文献,包括专利申请和公布的

公开内容通过参考并入本文,用于所有目的。