

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 31/765



[12] 发明专利说明书

A61K 9/127 A61K 47/32

/(A61K31/765,31:00)

[21] ZL 专利号 97194489.X

[45] 授权公告日 2004 年 12 月 1 日

[11] 授权公告号 CN 1177594C

[22] 申请日 1997.5.9 [21] 申请号 97194489.X

[30] 优先权

[32] 1996. 5. 9 [33] US [31] 60/017,106

[86] 国际申请 PCT/CA1997/000319 1997.5.9

[87] 国际公布 WO1997/042962 英 1997.11.20

[85] 进入国家阶段日期 1998.11.9

[71] 专利权人 传染病研究股份有限公司

地址 加拿大魁北克

[72] 发明人 米歇尔·G·伯杰龙

安德勒·狄索缪克斯

米歇尔·全姆伯累

审查员 周 静

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 章鸣玉

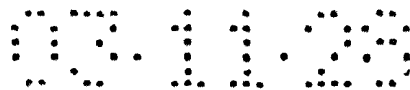
权利要求书 3 页 说明书 11 页 附图 9 页

[54] 发明名称 预防治疗粘膜皮肤各种感染 (特别是包括人类免疫缺陷病毒的性传播性疾病)、炎症、赘生物或其他类型疾病的方法和制剂

[57] 摘要

本发明涉及含有本身能对病原体形成物理屏障的“成膜”成份的若干制剂。诸如泊洛沙姆之类热可逆凝胶对于该应用特别有用。成膜制剂可进一步包含杀微生物剂、杀精子剂或其它药物,其选择根据欲灭活或治疗的病原体、微生物或疾病而定。因此,本发明的制剂作为物理屏障,及任选地作为化学或药理屏障,以及用作在给药部位的缓释系统,都是有效的。部分药物还可包裹在脂质体或其它药物载体中。这些制剂用来预防性传播疾病及治疗感染、癌症、炎症或需要药理治疗的任何疾病或状态。例如,制剂可施用于粘膜、皮肤和眼睛。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4



权 利 要 求 书

1. 一种凝胶化合物的应用，其特征在于，用于制备形成屏障的组合物，该
- 5 组合物被施用于人的皮肤或粘膜，并且在接触后固化形成保护性的半固体层，该半固体层有效地提供防止病原体通过皮肤或粘膜的物理屏障。
2. 如权利要求 1 所述的应用，其中所述的形成屏障的组合物还包含杀微生物剂、抗生素、化学治疗剂、抗炎剂、抗毒素、免疫治疗剂、抗组胺药、杀精子剂、抗患者组织成分或抗所述病原体的疫苗，每一种药物单独或合并使用。
- 10 3. 如权利要求 2 所述的应用，其中所述的杀微生物剂或杀精子剂有效地抵御病原体。
4. 如权利要求 3 所述的应用，其中，该组合物形成抵御病原体的物理屏障，以及原位的化学或药理屏障。
5. 如权利要求 1-4 中任一项权利要求所述的应用，其中该个体的粘膜是阴
- 15 道的或肛门一直肠的粘膜。
6. 如权利要求 2 所述的应用，其中所述组合物含有杀精子剂。
7. 如权利要求 6 所述的应用，其中所述的杀精子剂是壬苯醇醚-9。
8. 如权利要求 7 所述的应用，其中壬苯醇醚-9 的量为每剂量单位 125 毫克。
9. 如权利要求 3 所述的应用，其中该组合物还保护个体的皮肤或粘膜免受
- 20 该杀微生物剂或杀精子剂造成的局部毒性。
10. 如权利要求 5 所述的应用，其中该组合物还保护个体的皮肤或粘膜免受该杀微生物剂或杀精子剂造成的局部毒性。
11. 如权利要求 7 所述的应用，其中该组合物还保护个体的皮肤或粘膜免受壬苯醇醚-9 造成的局部毒性。
- 25 12. 如权利要求 1-4 和 6-11 中任一项权利要求 所述的应用，其中该病原体是病毒。
13. 如权利要求 5 所述的应用，其中该病原体是病毒。
14. 如权利要求 10 或 13 所述的应用，其中杀微生物剂或杀精子剂选自硫酸右旋糖酐、沙奎那韦、印地那韦、利托那韦、叠氮胸苷、双脱氧胞苷、双脱
- 30 氧肌苷、3-硫胞苷、膦甲酸、利巴韦林、阿昔洛韦、更昔洛韦、壬苯醇醚-9、苯扎氯铵和孟苯醇醚。
15. 如权利要求 12 所述的应用，其中杀微生物剂或杀精子剂选自硫酸右旋

糖酐、沙奎那韦、印地那韦、利托那韦、叠氮胸苷、双脱氧胞苷、双脱氧肌苷、3-硫胞苷、膦甲酸、利巴韦林、阿昔洛韦、更昔洛韦、壬苯醇醚-9、苯扎氯铵和孟苯醇醚。

16. 如权利要求 2 所述的应用, 其中至少部分所述杀微生物剂或其它药物包
裹在脂质体、超微颗粒或环糊精中。

17. 如权利要求 16 所述的应用，其中脂质体由二酰基磷脂酰胆碱：联十六烷基磷酸酯：胆固醇的混合物组成，其中酰基链是饱和或不饱和的，长度为 14-18 个碳原子。

18. 如权利要求 17 所述的应用, 其中脂质体由二棕榈酰磷脂酰胆碱: 磷酸
10 联十六烷酯: 胆固醇以 4: 1: 5 的摩尔比组成, 并且包裹的药物为双脱氧胞苷。

19. 如权利要求 16 所述的应用, 其中脂质体由摩尔比在 10: 1 和 1: 1 之间的二酰基磷脂酰胆碱和二酰基磷脂酰甘油的混合物组成, 其中酰基链是饱和或不饱和的, 长度为 14-18 个碳原子。

20. 如权利要求 19 所述的应用, 其中脂质体还包含二酰基磷脂酰乙醇胺的
15 聚乙二醇衍生物。

21. 如权利要求 19 所述的应用, 其中脂质体由 10: 3 摩尔比的二硬脂酰磷脂酰胆碱: 二硬脂酰磷脂酰甘油组成, 并且包裹的药物为双脱氧肌苷。

22. 如权利要求 20 所述的应用，其中脂质体由二硬脂酰磷脂酰胆碱：二硬脂酰磷脂酰甘油：二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇以 10 : 3 : 1.45 的摩尔比组成，并且包裹的药物为双脱氧肌苷。

23. 如权利要求 19 所述的应用, 其中脂质体由二棕榈酰磷脂酰胆碱: 二棕榈酰磷脂酰甘油以 10: 3 的摩尔比组成, 并且包裹的药物为膦甲酸。

24. 如权利要求 1-4、6-11 和 16-23 中任一权利要求所述的应用, 其中所述组合物施用于包括阴道、宫颈、肛门-直肠、眼睛、嘴、鼻粘膜的不同类型的
25 粘膜或皮肤, 或注射到眼中用于眼科治疗。

25. 如权利要求 5 所述的应用, 其中所述组合物施用于包括阴道、宫颈、肛门-直肠、眼睛、嘴、鼻粘膜的不同类型的粘膜或皮肤, 或注射到眼中用于眼科治疗。

26. 如权利要求 12 所述的应用, 其中所述组合物施用于包括阴道、宫颈、
30 肛门-直肠、眼睛、嘴、鼻粘膜的不同类型的粘膜或皮肤, 或注射到眼中用于眼
科治疗。

27. 如权利要求 14 所述的应用, 其中所述组合物施用于包括阴道、宫颈、

肛门-直肠、眼睛、嘴、鼻粘膜的不同类型的粘膜或皮肤，或注射到眼中用于眼科治疗。

28. 如权利要求 1-4、6-11 和 16-23 中任一权利要求所述的应用，其中所述凝胶包括泊洛沙姆。

5 29. 如权利要求 5 所述的应用，其中所述凝胶包括泊洛沙姆。

30. 如权利要求 12 所述的应用，其中所述凝胶包括泊洛沙姆。

31. 如权利要求 14 所述的应用，其中所述凝胶包括泊洛沙姆。

32. 如权利要求 24 所述的应用，其中所述凝胶包括泊洛沙姆。

33. 如权利要求 28 所述的应用，其中泊洛沙姆是泊洛沙姆 407。

10 34. 如权利要求 29 所述的应用，其中泊洛沙姆是泊洛沙姆 407。

35. 如权利要求 33 所述的应用，其中所述泊洛沙姆 407 的重量百分比浓度为 10-50 %。

36. 如权利要求 34 所述的应用，其中所述泊洛沙姆 407 的重量百分比浓度为 10-50 %。

15 37. 如权利要求 33 所述的应用，其中所述泊洛沙姆 407 的重量百分比浓度为 18-19.5 %。

38. 如权利要求 34 所述的应用，其中所述泊洛沙姆 407 的重量百分比浓度为 18-19.5 %。

说明书

预防治疗粘膜皮肤各种感染

(特别是包括人类免疫缺陷病毒的性传播性疾病)、

5 炎症、赘生物或其他类型疾病的方法和制剂

发明所属领域

本发明涉及一些含有成膜成份的制剂，特别是局部制剂，更具体讲是以下局部制剂： I) 预防病原体经粘膜和/或皮肤传播，更具体讲是用于预防人类免疫缺陷病毒和其他性传播性疾病的性传播的制剂， ii) 治疗病原体或其他疾病引起的
10 粘膜和/或皮肤损伤的制剂， iii) 预防和/或治疗包括引起粘膜皮肤感染、癌症、炎症反应或任何其他疾病的任何其他病原体的制剂。

发明的背景

15 由于对 AIDS 尚没有真正有效的治疗药物或疫苗，预防措施仅仅是靠实行一些目前可减少人类免疫缺陷病毒(HIV)传播的方法。坚持和小心地使用合适的避孕套提供了预防 HIV 传播的有效屏障。但是，避孕套必须在几乎所有性交时使用方能显著降低获得感染的可能性。在非洲，最强有力的预防计划只能使妓女在所有性交中的避孕套使用率增加至 70 % 左右。因此，对于宣传避孕套可控制高危
20 人群中 AIDS 流行的可能性产生了疑问。在 HIV 异性传播为主的情况下，依靠约束女性行为的预防措施对控制流行将增加一种方法。因为对实行性传播疾病(STD)预防性干预措施，妇女的顺从性优于男性，有规则地使用这种预防措施是可能的。在发展中国家，使用导入阴道的各种产品是常见的事，这个事实强化了上述观点。这种保护工具在男性同性恋关系上也可能有用，因为在接受方控制之下它
25 可提供额外的保护。

在 HIV 预防领域中，预防 HIV 在人群中性传播的杀微生物剂的开发实际上是最重要的研究领域之一。这一方法的主要困难在于用作控制 HIV 传播的药物(包括杀精子剂，如壬苯醇醚-9)已被证明可引起有利于 HIV 进入的局部炎症和溃疡。在全世界范围内感染 HIV 的人数迅速增长，迫切需要开发可减少 HIV 传播且粘
30 膜刺激极小、对阴道菌群和 pH 的影响极少的活性产品。使用可局部施用于人阴道、宫颈、肛门直肠粘膜的杀微生物药物或其他药物的凝胶制剂提出了达到这一目标的合适策略。可将杀微生物剂或其他药物包埋于凝胶制剂中，这些药物可以

是游离的或包裹在脂质体、超微颗粒或环糊精中。这样的杀微生物剂凝胶可延长所掺入活性剂的局部杀微生物活性、消除其局部刺激和降低其全身副作用。

II 型单纯疱疹病毒(HSV-2)是最常见的 STD 之一。一种阴道 HSV-2 感染的动物模型提出了评估我们的凝胶制剂预防 HSV-2 性传播效能的一种有趣方法。另一种重要的疱疹病毒感染是 I 型单纯疱疹病毒(HSV-1)，它是一种嗜神经性病毒，主要感染神经外胚层组织，包括皮肤、外周神经系统和中枢神经系统。复发的 HSV-1 皮肤感染常见于免疫受损的病人。带状疱疹的临床特征是出现因外周神经受累而产生的单侧皮疹和神经痛。虽然这是一种轻度的疾病，但特别对于经常生病的病人来说，皮肤 HSV 感染可能是麻烦的。膦甲酸钠和阿昔洛韦都是对各型疱疹病毒有活性的抗病毒剂。但是，目前可用的治疗剂(无论局部或全身)只有有限的效能，特别对于症状复发的疱疹的治疗更是如此。因此，需要开发可改善药物效能的新的抗病毒剂局部用制剂。

脂质体是由被水性分隔空间分开的一个或几个脂质双层组成的微囊泡，其中可掺入各种药物。大量研究表明，脂质体中包裹的药物其治疗指数改善、毒性降低。我们早已证明，抗 HIV 剂包裹在脂质体中可获得高细胞渗透、良好的体外抗 HIV 病毒活性、有效地靶向富含巨噬细胞的组织和明显地改善药物的药代动力学(Desomeaux et al., 1994, AIDS 8: 1545-1553; Makabi-Panzu et al., 1994, AIDS Res. Hum. Retroviruses 10: 1463-1470; Dusserre et al., 1995, AIDS 9: 833-841; Harvie et al., 1995, AIDS 9: 701-707; Harvie et al., 1996, Antimicrob. Agents Chemother. 40: 225-229)。根据我们的了解，脂质体包裹的药物从未见用于预防感染因子的粘膜传播。脂质体局部施用于粘膜或皮肤时，常被单核细胞、巨噬细胞、也被朗罕细胞摄取，这些细胞可捕集和隐藏 HIV。结果，与游离的药物相反(它们倾向于快速扩散通过粘膜到达循环系统)，使用包裹在脂质体中和掺入凝胶制剂中的药物应能将活性药物浓集于受感染的细胞及对 HIV 感染敏感的细胞。这样的药物输送系统更引人注目，因为已知脂质体局部给药时能为机体极好地耐受(parnham and Wetzig, 1993, Chem. Phys. Lipids 64: 263-174)。

美国专利 No. 5,292,516 描述了用作给药系统的含泊洛沙姆(poloxamers)的凝胶制剂。但是，该文献中并未提到此凝胶本身是阻止病原体渗透的物理屏障。

国际专利出版物 WO 95/10268 描述了防止 HIV 感染的包含半胱胺的泊洛沙姆 407 凝胶的组合物。该文献确实说过泊洛沙姆 407 凝胶可用作阴道凝胶，但它并未提出泊洛沙姆本身可用作防止病原体传播及渗透通过粘膜的物理屏障。而且，该文献并未说凝胶制剂可起防止宿主细胞感染的药理屏障的作用。此外，该

文献并未给出任何体外和体内试验的证据表明凝胶制剂对防止病原体传播可能是有效的。

发明的概述

- 5 本发明的目的在于提供一种方法，此法用于 i) 预防病原体经粘膜皮肤的传播，更具体地说是用于预防人类免疫缺陷病毒和其他性传播性疾病的性传播， ii) 治疗病原体和其他疾病所引起的粘膜皮肤损伤， iii) 预防治疗引起粘膜皮肤感染、癌症、炎症反应或其他疾病的其他病原体。

- 10 本发明的目的还在于提供预防病原体经粘膜皮肤传播、特别是预防人类免疫缺陷病毒和其他性传播性疾病的性传播的制剂。本发明的另一个目的是提供治疗粘膜皮肤损伤的制剂。本发明的再一个目的是提供预防治疗引起粘膜皮肤感染、癌症、炎症反应或其他疾病的其他病原体的制剂。

- 在较佳的实施方案中，上述方法和制剂作为物理、化学和/或药理屏障，对预防 STD (特别是 HIV) 的传播有效。物理屏障包括施用于粘膜或皮肤表面的“成膜”成份，以凝胶、乳剂或软膏的形式为佳。更可取的是，当热可逆凝胶以液体形式使用时，当其达到体表温度后能在该表面扩散并形成半固体涂层。在更佳的实施方案中，热可逆凝胶由泊洛沙姆 407 组成。也可使用象 poloxamine 一样的聚合物。半固体凝胶单独起机械(物理)屏障作用，它阻断游离的或细胞内的病原体接近粘膜或皮肤。化学和/或药理屏障包括杀微生物剂、杀精子剂和/或其他药物。对本发明来说，术语“杀微生物剂”意指包括对病原体有效的任何药物。化学屏障包含游离的杀微生物剂、杀精子剂和/或包裹在凝胶中的其他药物，它们对与粘膜或皮肤接触的病原体进行化学性破坏，并降低或消除杀微生物剂、杀精子剂和/或其他药物对上皮细胞的毒性。杀微生物剂、杀精子剂和/或其他药物可从凝胶中释放出来或可原位进入病原体或受感染的细胞。在一个更佳的实施方案中，化学屏障
- 25 意指用于阴道、宫颈和/或肛门-直肠粘膜的凝胶中的物质，它是一种化合物，如壬苯醇(nonoxynol)-9。药理屏障可包括杀微生物剂、杀精子剂和/或对病原体有效的任何药物，如阻止病原体进入靶细胞的吸收抑制剂，病原体复制所必需的酶的抑制剂或对病原体有毒的代谢毒素。在更佳的实施方案中，药理屏障是指用于阴道、宫颈和/或肛门-直肠粘膜的凝胶中阻止 HIV 性传播的物质，它包括 HIV 蛋白酶和逆转录酶的抑制剂(单用或合用)。这些抑制剂以包裹在药物载体如脂质体、超微颗粒或环糊精中为佳，这样的包裹导致抑制剂在 HIV 靶细胞中浓集，阻止感染性病毒颗粒的产生或未感染细胞的感染。如果精液中的感染细胞可到达粘膜，
- 30

抗 HIV 药物的凝胶制剂可阻止宿主细胞如巨噬细胞、淋巴细胞、朗罕细胞和 M 细胞感染 HIV。

在一个较佳的实施方案中，凝胶制剂由泊洛沙姆 407 组成。在一个更佳的实施方案中，泊洛沙姆 407 的浓度为 19.5% (w/w)。在另一个较佳的实施方案中，

- 5 凝胶制剂由泊洛沙姆 407(19.5% w/w)组成，并含壬苯醇-9 作为杀微生物剂。在另一个较佳的实施方案中，凝胶制剂由泊洛沙姆 407(19.5% w/w)组成，并含由摩尔比为 10：3 的二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)和二硬脂酰磷脂酰甘油(DSPG)组成的脂质体，其中包裹了 2',3'-二脱氧肌苷酸(ddI)作为抗病毒药物。在另一个较佳的实施方案中，凝胶制剂由泊洛沙姆 407(19.5% w/w)组成，并含由 DSPC：
- 10 DSPG：二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇(DSPE-PEG)以 10：3：1.45 摩尔比组成的脂质体，其中包裹了 ddI 作为抗病毒药物。在另一个较佳的实施方案中，凝胶制剂由泊洛沙姆 407(19.5% w/w)组成，并含由二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)：磷酸联十六烷酯(DP)：胆固醇(CHOL)以 4：1：5 摩尔比组成的脂质体，其中包裹了 2',3'-二脱氧胞苷(ddC)作为抗病毒药物。在另一个较佳的实施方案中，凝胶
- 15 制剂由泊洛沙姆 407(19.5% w/w)组成，并含由 DPPC：二棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG)以 10：3 摩尔比组成的脂质体，其中包裹了膦甲酸作为抗病毒药物。

在另一个更佳的实施方案中，凝胶制剂包含泊洛沙姆 407(18 % w/w)。在另一个较佳的实施方案中，凝胶制剂由泊洛沙姆 407(18 % w/w)组成，并含有膦甲酸作为杀微生物剂。在另一个较佳的实施方案中，凝胶制剂由泊洛沙姆 407(18

- 20 % w/w)组成，并含有阿昔洛韦(acyclovir)作为杀微生物剂。在另一个较佳的实施方案中，凝胶制剂由泊洛沙姆 407(18 % w/w)组成，并包含由 10：3 摩尔比的 DPPC：DPPG 组成的脂质体，其中包裹了膦甲酸作为抗病毒药物。在另一个较佳的实施方案中，凝胶制剂由泊洛沙姆 407(18 % w/w)组成，并包含由 10：3 摩尔比的 DPPC：DPPG 组成的脂质体，其中包裹了阿昔洛韦作为抗病毒药物。

- 25 泊洛沙姆的浓度可根据情况而有所变化，如依据液体/凝胶转化温度、所用的凝胶的物理性质和生产制剂时所用的 pH 值而变化。

凝胶制剂系用来涂覆不同类型的粘膜(如阴道、宫颈、肛门-直肠、眼睛、嘴、鼻)或皮肤，以阻止病原体(如病毒、细菌、真菌、寄生虫、外寄生物和支原体)的渗透。此外，凝胶制剂在眼科应用中可注入眼中。凝胶制剂可与杀微生物剂、抗

30 微生物剂、化学治疗剂、抗炎药物、任何其他药物、杀精子剂和/或脂质体(或其他药物载体)合并使用。此外，杀微生物剂和/或杀精子剂可与脂质体(或其他药物载体)合用以预防或治疗任何粘膜皮肤疾病。另外，我们的凝胶和/或脂质体(或其

他药物载体)制剂还可用作对抗病原体所致感染或其他疾病的疫苗的载体。

附图的简单说明

图 1 显示泊洛沙姆 407(19.5% w/w)凝胶施用于人宫颈(ME-180)和结肠(HT-29)

5 上皮细胞时的细胞毒性。

图 2 表示接种不同浓度壬苯醇醚-9[(游离的或掺入泊洛沙姆凝胶(19.5% w/w)]后人宫颈细胞的存活率。

图 3 表示泊洛沙姆 407 凝胶(19.5% w/w)作为抗 HIV 的物理屏障的效能。

图 4 表示泊洛沙姆 407 凝胶(19.5% w/w)预防 Sup-T1 细胞感染 HIV 的效能。

10 图 5 表示家兔每日阴道内施用泊洛沙姆 407 凝胶(19.5% w/w)和/或壬苯醇醚-9 共两周的效能。

图 6 表示家兔每日阴道内施用泊洛沙姆 407 凝胶(19.5% w/w)和/或壬苯醇醚-9 两周后相应的宫颈组织病理学。

15 图 7 表示泊洛沙姆 407 凝胶(19.5% w/w)预防小鼠 II 型单纯疱疹病毒生殖道传染的效能。

图 8 表示泊洛沙姆 407 凝胶(18% w/w)单独使用和含 3 % 膦甲酸的凝胶治疗 HSV-1 皮肤损伤的效能。

图 9 表示不作任何治疗或单用泊洛沙姆 407 凝胶(18% w/w)或使用含 3 % 膦甲酸的凝胶治疗后, HSV-1 感染小鼠的平均损伤计分的时间演变情况。

20

发明的详细描述

下面借助具体的实施例和附图对本发明进行描述,其目的是阐述本发明而不是限制其范围。

25 凝胶制剂

泊洛沙姆 407 是聚氧乙烯和聚氧丙烯以 7: 3 重量比形成的嵌段共聚物,其平均分子量为 12500。该嵌段共聚物的一个重要特征是能够形成热至可逆凝胶,从低温时的液态向体温时的凝胶状态的转变(相变温度部分取决于凝胶的浓度和离子强度)使很多有意义的医学应用(包括局部使用)成为可能。这种特性是最重要的,因为在以其液体状态局部施用于粘膜时,凝胶制剂将形成可抵御生物体液的人工屏障。我们的凝胶制剂因其毒性和刺激性极低,故提供了局部给药系统的一个引入注目的方法。该凝胶制剂的详细制备方法在实施例 1 中提供。本发明覆盖

30

了任何合适浓度(w/w)，特别是在约 10 % 和 50 % 之间浓度的泊洛沙姆 407 凝胶制剂。本发明还覆盖包括其他泊洛沙姆、poloxamines 或其他化学品的任何其他成膜成份、凝胶、乳剂、软膏或热可逆物质。

5 杀微生物剂、杀精子剂和其它药物

对病原体(病毒、细菌、真菌、寄生虫、外寄生物和支原体)有效的任何杀微生物剂均在本发明的范围内。特别是对 HIV、HSV 或其它微生物疾病(特别是性传播性疾病)有效的那些杀微生物剂则更佳。这一类中包括杀精子剂(如壬苯醇醚-9、苯扎氯铵和孟苯醇醚(menfegol))、HIV 吸收抑制剂(如硫酸右旋糖酐)、HIV 蛋白酶抑制剂(如沙奎那韦(saquinavir)、印地那韦(indinavir)和利托那韦(ritonavir))、HIV 逆转录酶抑制剂(如叠氮胸苷(AZT)、双脱氧胞苷(ddC)、双脱氧肌苷(ddI)、3-硫胞苷(3TC)和磷甲酸)和其他抗病毒剂(如利巴韦林、阿昔洛韦和更昔洛韦)，和包括抗生素、抗真菌剂、抗病毒剂、抗寄生虫药在内的任何抗微生物剂，以及控制粘膜皮肤疾病的化学治疗剂、抗炎剂、抗毒素、免疫治疗剂。重要的是要提到杀微生物剂和/或杀精子剂可单独使用或与任何其他药物合并使用。本发明还覆盖凝胶、杀微生物剂、杀精子剂的各种联合应用。

脂质体

在脂质体类产物中，我们早已证明，为了靶向 HIV 感染组织，必须利用脂质体双层的特性，该特性使药物能被高效包裹，并减少被包裹药物的泄漏，继而借助脂质体的能力将高浓度药物输送到细胞中。在本实验室以前进行的研究基础上，使用由以下物质组成的脂质体可达到这些要求：i) 二酰基磷脂酰胆碱和二酰基磷脂酰甘油(摩尔比在 10:1 和 1:1 之间)的混合物，其中酰基链是饱和或不饱和的，长度为 14-18 个碳原子；或 ii) 二酰基磷脂酰胆碱、联十六烷基磷酸酯和胆固醇的混合物，其中磷脂酰胆碱的酰基链是饱和或不饱和的，长度为 14-18 个碳原子。但是，据认为，可容易地从中获得一族脂质体制剂而不影响其有价值的性能。因此，这一族化合物包含已在实践中得到验证的上述磷脂制剂的其他酰基链。

本发明的脂质体还包括空间稳定性脂质体，如本文所定义的，是指通过掺入聚合物(如泊洛沙姆和 poloxamines)或掺入聚合物衍生的两性类脂[(如 DSPE-PEG 或二油酰磷脂酰乙醇胺-PEG(DOPE-PEG))]或掺入延长脂质体循环时间的任何分子进行修饰的脂质体。本发明的脂质体还包括免疫脂质体，如本文所定义的是指，与能增强对特定细胞靶向的抗体分子交联而成的脂质体。本发明的脂质体还

包括 pH 敏感脂质体、热敏感脂质体、靶敏感脂质体及可用于此目的的任何其他类型的脂质体。本发明还覆盖了凝胶、杀微生物剂、杀精子剂、其他药物、脂质体和疫苗的各种联合使用。

本发明的脂质体的制备可用文献中描述的各种技术来进行(如 Szoka And Papahadjopoulos, 1980, Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467-508; Nassander et al., 1990, Liposomes in biodegradable polymers as drug delivery systems. p. 261-338). 本发明的脂质体制剂包括药物/类脂以任何摩尔比制得的各种大小平均粒径的脂质体。用文献中描述的一种或几种主动和/或被动负载方法(如 Mayer et al., 1986, Chem. Phys. Lipids 40:333-345)可成功地将药物掺入脂质体。

下面的实施例是为了证明对 HIV 性传播的预防和疱疹病毒感染所致皮损的治疗非常有效的凝胶制剂的制备, 而决不能理解为限制本发明的范围。我们的凝胶制剂可用于预防几种其他性传播疾病的传染, 例如由病毒(单纯疱疹病毒、人乳头状病毒、人免疫缺陷病毒、触染性软疣、巨细胞病毒、 Epstein-Barr 病毒、甲型、乙型、丙型肝炎病毒)、细菌(淋病双球菌、梅毒螺旋菌、 *Chlamydia trachomatis*, *Gardnerella vaginalis*、肉芽肿荚膜杆菌、杜克雷氏嗜血杆菌、化脓性链球菌、空肠弯曲菌, *Prevotella bivirus*, 肠球菌, 消化球菌, 拟杆菌, *Mobiluncus*)、肠杆菌科细菌(如志贺氏菌, 沙门氏菌和绿脓杆菌)、支原体(人支原体, 尿道支原体 *urealyticum*, 生殖道支原体)、寄生虫(阴道毛滴虫、溶组织阿米巴、 *Cryptosporidium*, 蛲虫、兰伯氏贾第虫、 *Mobiluncus*)、真菌(白色念珠菌、隐球菌, 光滑隐球菌、皮真菌)和外寄生物(阴虱、人虱、头虱、疥螨)等引起的传染。此外, 杀微生物剂凝胶也可用于意外接触 HIV 或其它病原体的专业卫生人员的皮肤。除了预防感染的传播外, 它们可用于治疗这些感染, 并防范或治愈包括癌症、炎症过程或其他疾病过程引起的粘膜皮肤的病理变化。

即使本发明的描述仅限于一些具体情况, 但任何成膜成份、杀微生物剂、杀精子剂、其他药物和/或脂质体(或其他药物载体), 或上述物质的任何组合都被认为是开发这些局部用药的潜在候选材料, 均属本发明范围之内。本发明的制剂还包括各种成膜成份、杀微生物剂、杀精子剂、其它药物、脂质体(或其它药物载体)或它们以适当浓度的任何组合。

实施例 1

杀微生物剂凝胶的制备

将适当体积的蒸馏水、乙酸盐缓冲液(0.2M, pH 4.6)、磷酸盐缓冲液(0.2M, pH

6)、 HEPES 缓冲液(0.02M, pH 7.2)或其他合适的水溶液加到泊洛沙姆 407 中, 达到所需的比例(w/w), 制备热可逆凝胶。将此溶液于 4 °C 下搅拌, 确保完全溶解, 使其静置以稳定凝胶基质。然后, 向冷的聚合物溶液中加入适量游离的或包裹在药物载体中的杀微生物剂。

5 涉及我们的凝胶制剂的实施例

为了测试我们的凝胶制剂对细胞株的体外毒性, 制备 pH 近中性的溶液, 该溶液与细胞株存活的条件相适应。可调节 pH 以符合将用本制剂涂覆的各种靶组织的需要。例如, 如果制剂是用于涂覆阴道粘膜, 则可用轻度酸性 pH。为获得液态向固态转变的合适温度, 聚合物的百分率可作相应的调整。

10

药物释放实验

泊洛沙姆凝胶可用作延长所掺入活性剂的局部杀微生物活性的药物缓释系统。我们用放射标记药物和由透析膜隔开的两个空间组成的扩散室, 研究了抗病毒剂(AZT、 ddC、 ddI、 膦甲酸、 阿昔洛韦)从我们的泊洛沙姆凝胶制剂中的释放。结果表明, 与 4 °C 相比, 在体温下尽管凝胶的粘度增加(数据未显示), 但药物的释放增加了。其解释是温度升高时凝胶的胶束间网状结构形成了许多大孔, 继而增加了所掺入活性剂的释放。

体外毒性试验

20 在人宫颈(ME-180)和结肠(HT-29)上皮细胞上评价泊洛沙姆 407 凝胶制剂(19.5% w/w)的细胞毒性。简言之, 将半融合单层细胞放在含有 McCoy 5a 培养液的 24 孔板的“细胞培养插入物”上, 再将凝胶放在细胞上面。培养 24 小时后, 用 PBS 洗涤细胞以除去凝胶, 在每个孔中加入含有 50 微升 MTS 溶液(用 PBS 配, 2mg/ml)的 500 μ l 新鲜培养液。然后将板于 37 °C、 CO₂ 培养箱中培养 1 小时。
25 再将培养液转入 96 孔板, 于 420nm 处读出光密度。结果表明, 我们的凝胶制剂施用于细胞株时无细胞毒性(图 1)。

图 2 表示接种不同浓度壬苯醇醚-9[(游离的或掺入泊洛沙姆凝胶(19.5% w/w)]后人宫颈细胞的存活率。如预期的那样, 壬苯醇醚-9 对人宫颈细胞有剂量依赖方式的高度毒性, 毒性起始于 150 μ g/ml。最感兴趣的是, 在同样的实验条件下,
30 我们证明了杀精子剂掺入到我们的凝胶制剂中却无毒性。

凝胶作为抵御 HIV 的物理屏障的效能

我们还检测了泊洛沙姆凝胶阻止 HIV-1 通过的能力。简言之, 将“细胞培养

插入物”(0.4 μ m 膜孔大小)放在 24 孔板中.然后在膜上加 100 μ l 凝胶(19.5% w/w, 以 pH7.2 的 HEPES 缓冲液配),再加 HIV-1_{IIIB}(p24 5000pg).用市售酶试剂(Organon Teknika, Durham, NC)监测 p24 水平以评价病毒颗粒随时间推移通过凝胶和膜的扩散情况.这一系列试验的结果表明,凝胶起了物理屏障作用,通过大大减少通过凝胶和膜的病毒颗粒量,阻止了 HIV-1 颗粒的通过(图 3).

凝胶防止 T 细胞感染 HIV 的效能

在每个孔的底部加上已知对 HIV 感染高度敏感的指示细胞株,进行类似的研究.用于实验的是 CD4 阳性的人 T 淋巴细胞 Sup-T1 株.简言之,先将 Sup-T1 细胞接种在 24 孔板(1.25×10^5 个细胞/孔)上.其次,将细胞培养插入物放入各孔中,在膜上加上 100 μ l 凝胶(19.5% w/w,以 pH7.2 的 HEPES 缓冲液配),再加 HIV-1_{IIIB}(感染倍数 0.01; 每个靶细胞感染的病毒颗粒). 37 $^{\circ}$ C 培养 48 小时后,取出插入物,洗涤细胞以除去未内化的病毒.将细胞保持于完全培养液中,测定无细胞培养上清液中的逆转录酶活性.如图 4 所示,由于凝胶的存在而消除了病毒复制.上述实验结果从而提示凝胶的效应或系物理性阻断 HIV 颗粒和/或系对病毒传染力起负面影响.本试验重复数次,均得到同样的结果.

体内毒性试验

泊洛沙姆 407 凝胶(19.5% w/w)局部施用于新西兰家兔的阴道和宫颈粘膜,每天一次,共二周,进行研究以评价其耐受性和毒性.凝胶以液体状态使用时能很好地渗透到不规则形状的粘膜表面.在第 0、4、7 和 14 天进行阴道和宫颈粘膜组织活检,作组织学检测.图 5 表示在家兔阴道和宫颈粘膜上进行阴道施用凝胶和/或壬苯醇醚-9 的效果.结果表明,与对照组相比(图 5a),单用凝胶处理的动物并未出现阴道和宫颈粘膜的毒性症状(图 5b).相反,壬苯醇醚-9 剂量为 125mg 时毒性很大,其证据为存在上皮破裂、刺激、坏死和出血(图 5c).壬苯醇醚-9 引起的这种毒性可能有利于病原体的进入.但是,将壬苯醇醚-9 掺入凝胶中则完全解除了该杀精子剂的毒性(图 5d).

图 6 表示每天一次阴道内施用泊洛沙姆凝胶(19.5 % w/w)和/或壬苯醇醚-9 两周后相应的宫颈组织学变化.与对照组(图 6a)相比,单独施用凝胶(图 6b)后家兔宫颈粘膜未见大的组织学改变.相反,用壬苯醇醚-9 处理的宫颈粘膜的光学显微镜检查显示粘膜下大量噬酸性细胞堆积,并导致上皮细胞完整性的严重丧失(图 6c).另一方面,施用掺入凝胶中的同样量的该杀精子剂未显示毒性症状(图 6d),

与单用凝胶所观察到的相类似。

体内效能试验

在小鼠上评价泊洛沙姆凝胶(19.5 % w/w)预防 HSV-2 生殖道传播的效能。简言之，将 4 周龄雌性 Balb/c 小鼠用于本研究。为了提高小鼠对疱疹的敏感性，在接种 HSV-2 前 7 天和接种当天，每只小鼠皮下给予 2.5mg 黄体酮(Depo-Provera)。用培养液预湿润的藻酸钙细头拭子拭擦麻醉小鼠的阴道后，接种 10 μ l 含 2.4×10^7 pfu/ml 的 HSV-2 333 株。为了测定泊洛沙姆凝胶(19.5 % w/w)阻断疱疹感染的效能，在接种前数分钟用移液管头将 10 μ l 凝胶送到阴道中。将移液管头进出移动 4 次以模拟性交的搅动作用，但需小心不要引起出血。感染后 4 天，对照感染动物会阴出现红肿，6-9 天，大都死于脑炎(图 7)。相反，用凝胶预处理的小鼠感染后 9 天无一死亡(即 100 % 存活)。此结果清楚地表明，我们的凝胶制剂的使用可能提供了一种降低 STD(包括 HIV)传播的新颖预防方法。

对单用泊洛沙姆凝胶(19.5 % w/w)和含 3 % 膦甲酸的凝胶治疗小鼠 HSV 皮损的效能也进行了研究。简言之，腹腔注射氯胺酮(70mg/kg)/赛拉嗪(11.5mg/kg)溶液使无毛小鼠(SKH1, 35-42 日龄)麻醉。将病毒(从人面部水疱分离出来的 HSV-1, F 株; ATCC VR-733)接种到腰部皮肤区体侧。垂直握住 27 号针头以交叉画线方式将皮肤刮擦 6 次。然后将 50 μ l 病毒悬液(1.5×10^7 pfu/ml)施加于刮擦过的皮肤区。用饱蘸悬浮病毒培养液的棉签将病毒悬液擦在皮肤上。将刮擦过的皮肤区域用玉米垫子(Schering Plough)保护起来，该玉米垫子用外科绷带固定在小鼠身体上。小鼠发生泡状皮疹，迅速融合，形成 4-5mm 宽的区带，从脊柱延伸到受感染皮区的腹中线，类似于腰带状感染。病毒最后扩散到中枢神经系统，引起脑炎，小鼠最终死亡。

感染后 24 小时，单用凝胶或用含 3 % 膦甲酸的凝胶对小鼠进行处理，每天 3 次，共 4 天。简言之，去除封闭玉米垫孔的外科绷带，用饱蘸了冷水的棉签清洗该刮擦过的皮区。将含有或不含有膦甲酸的 15 μ l 凝胶施加在该刮擦过的皮肤上。然后再用外科绷带封闭玉米垫的孔。每天两次观察小鼠存活情况及按表 1 给出的标准作损伤评分。

表 1 疱疹皮损的评分标准

计分	临床表现
0	无感染症状
1	仅在接种部位可见感染
2	在接种部位可见感染，伴有肿胀、结痂和红斑
3	在接种部位可见感染，伴有接种部位以外形成的损伤、约半身出现红斑
4	约半身出现疱疹但尚未融合
5	疱疹完全融合但尚未坏死或溃疡
6	疱疹完全融合而且有坏死或溃疡，后肢麻痹，肿胀和死亡

图 8 表示皮肤感染了 HSV-1 的小鼠未经任何治疗、单用泊洛沙姆凝胶(18 % w/w)或用含 3 % 膦甲酸的凝胶进行治疗的存活率。未治疗的小鼠，感染的致死率为 33 %。对单用凝胶治疗的小鼠，观察到的死亡率为 50 %，提示对此疱疹模型凝胶本身并无治疗效果，但是，用含 3 % 膦甲酸的泊洛沙姆凝胶治疗的小鼠全部存活，表明药物掺入凝胶中的良好效能。

图 9 表示经皮感染 HSV-1 的小鼠，不经任何治疗、单用泊洛沙姆凝胶(18 % w/w)或用含 3 % 膦甲酸的凝胶进行治疗的损伤计分的时间演变。未治疗小鼠，感染后的最初 4 天未见皮肤感染的病理表现。第 5 天，某些小鼠开始出现疱疹损伤，其形式为远离接种部位的小泡。第 6 天，几乎所有未治疗的小鼠发生了疱疹性皮肤损伤。最高平均损伤计分见于第 8 天。一些小鼠由于皮损自发性消退，而在第 12-16 天平均损伤计分降低。单用凝胶治疗的小鼠，观察到形式大致类似于未治疗小鼠所见的情况，提示单用凝胶对疱疹性皮肤损伤的发生无治疗作用。最重要的是，观察到用含 3 % 膦甲酸的凝胶治疗的小鼠的平均损伤计分比未治疗小鼠明显降低，证明掺入凝胶的药物效能良好。因此，本发明制剂恰当地实现了药物输送。因为还证明它们抑制了病原体从感染环境向非感染环境的渗透(前面关于 HSV-2 的实施例)，因此本发明的制剂具有双重目的，即起药物输送系统作用和阻止外部病原体传染或阻止感染者传染未感染者的屏障作用，。任何佐剂药物均可加到本制剂中。例如，想用来治疗疱疹病毒感染时，可将抗组胺药加到含有泊洛沙姆和阿昔洛韦的制剂中，这样能令人满意地抑制瘙痒和抓挠，使患者更舒适并避免感染扩散。

上面对本发明进行了描述，对于专业读者来说，对所描述的实施方案可作若干变动而不会背离上述教导，这将是容易明白的。如所附权利要求所限定的，这些变动都落在本发明的范围内。

说明书附图

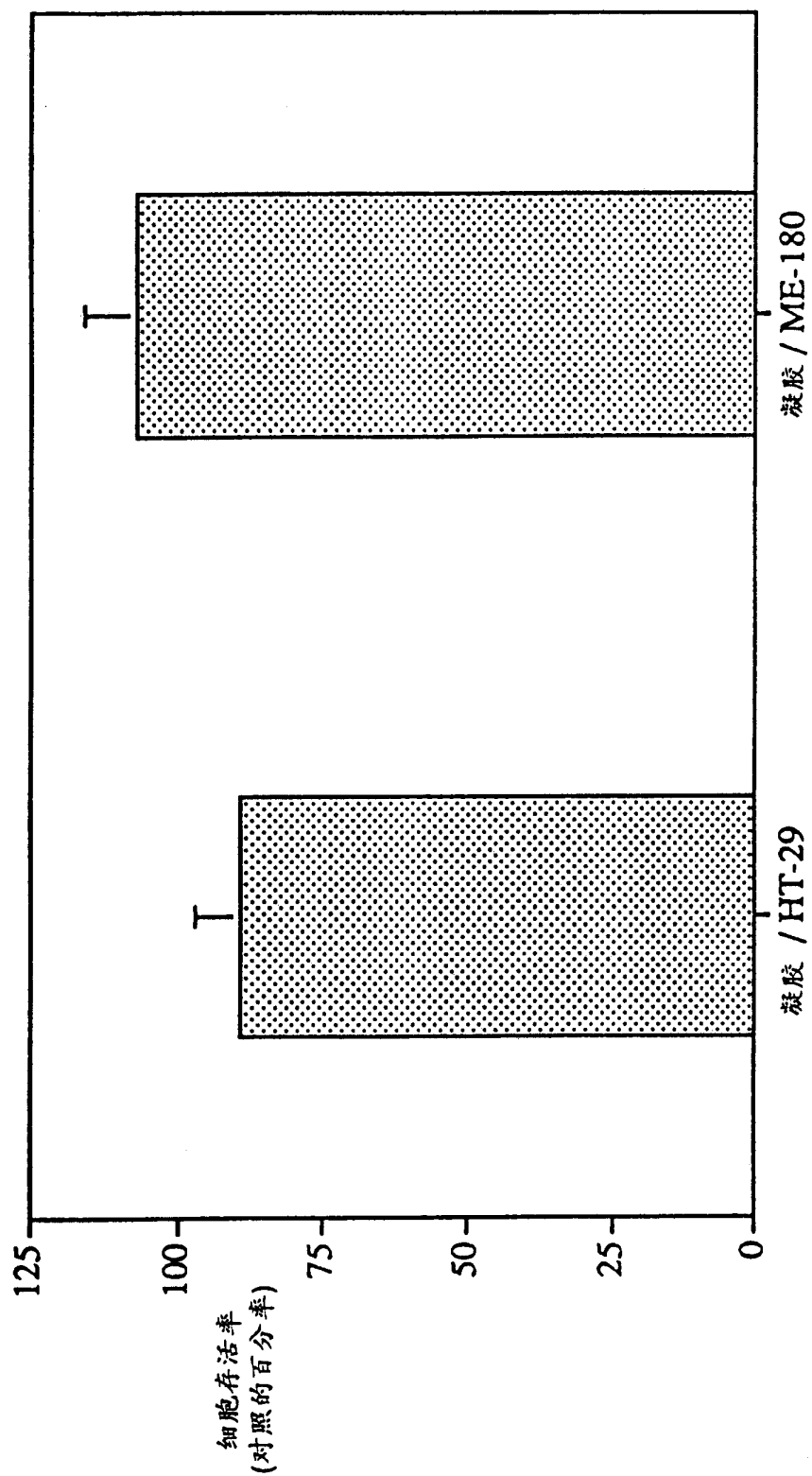


图 1

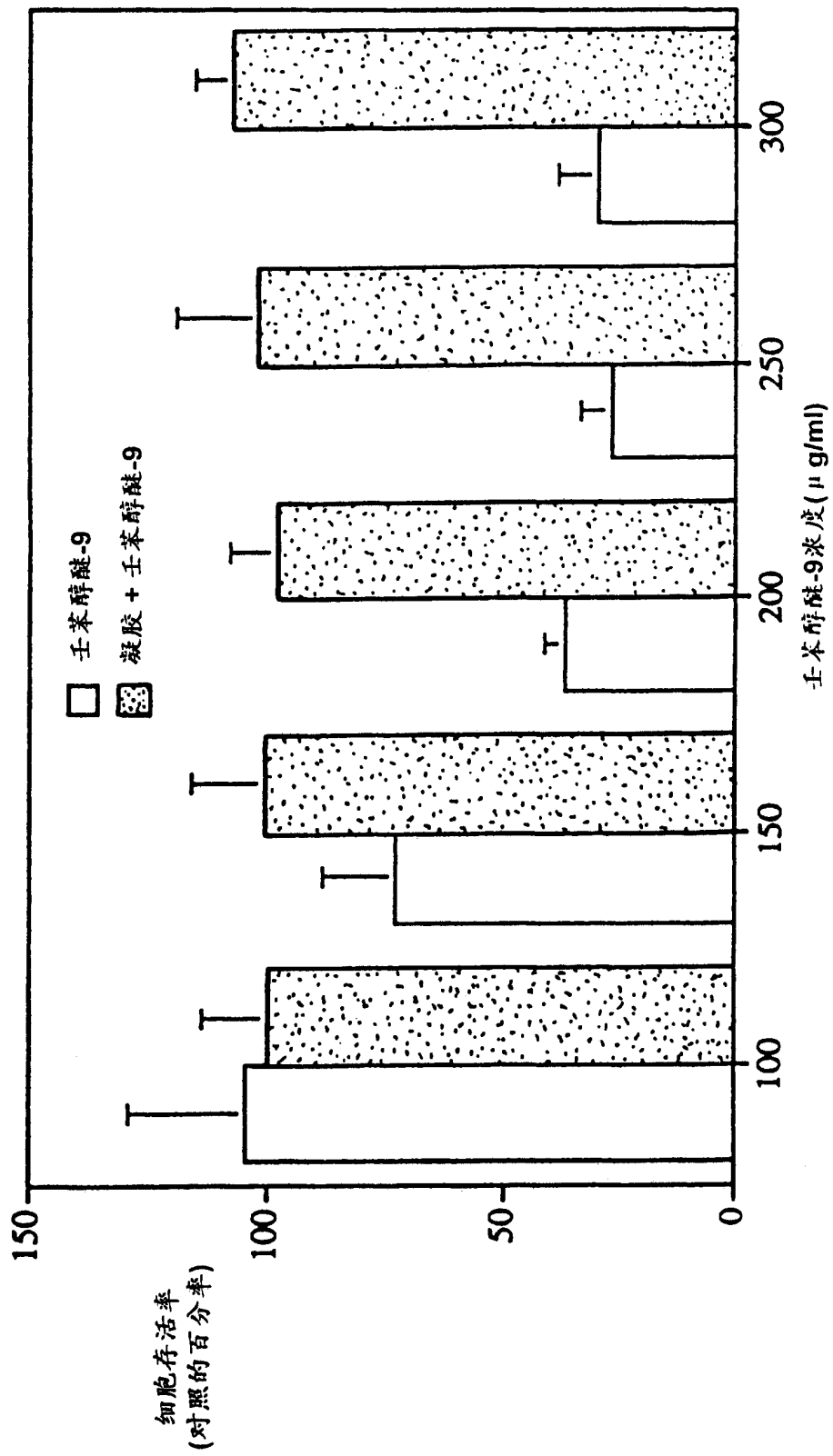


图 2

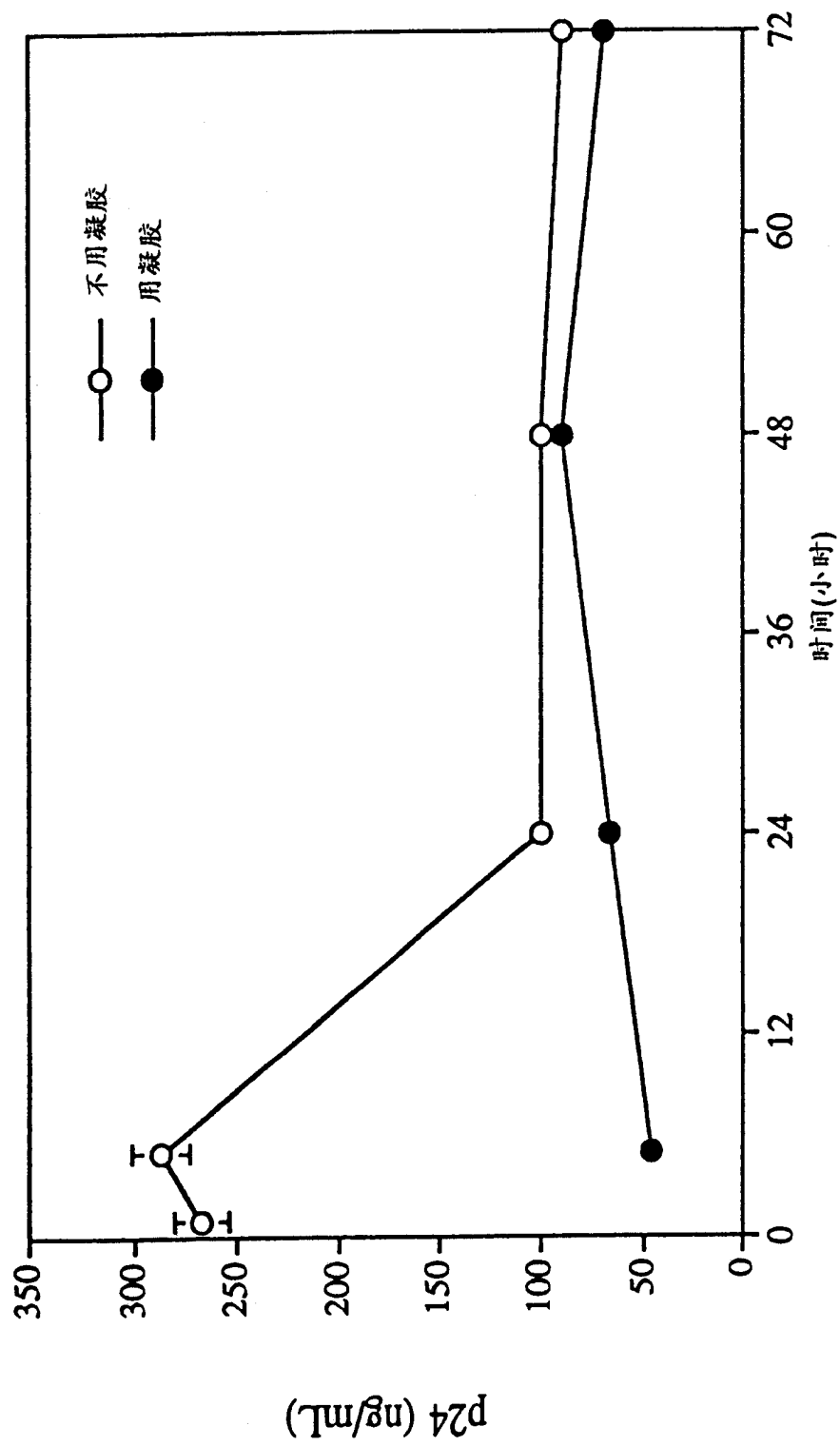


图 3

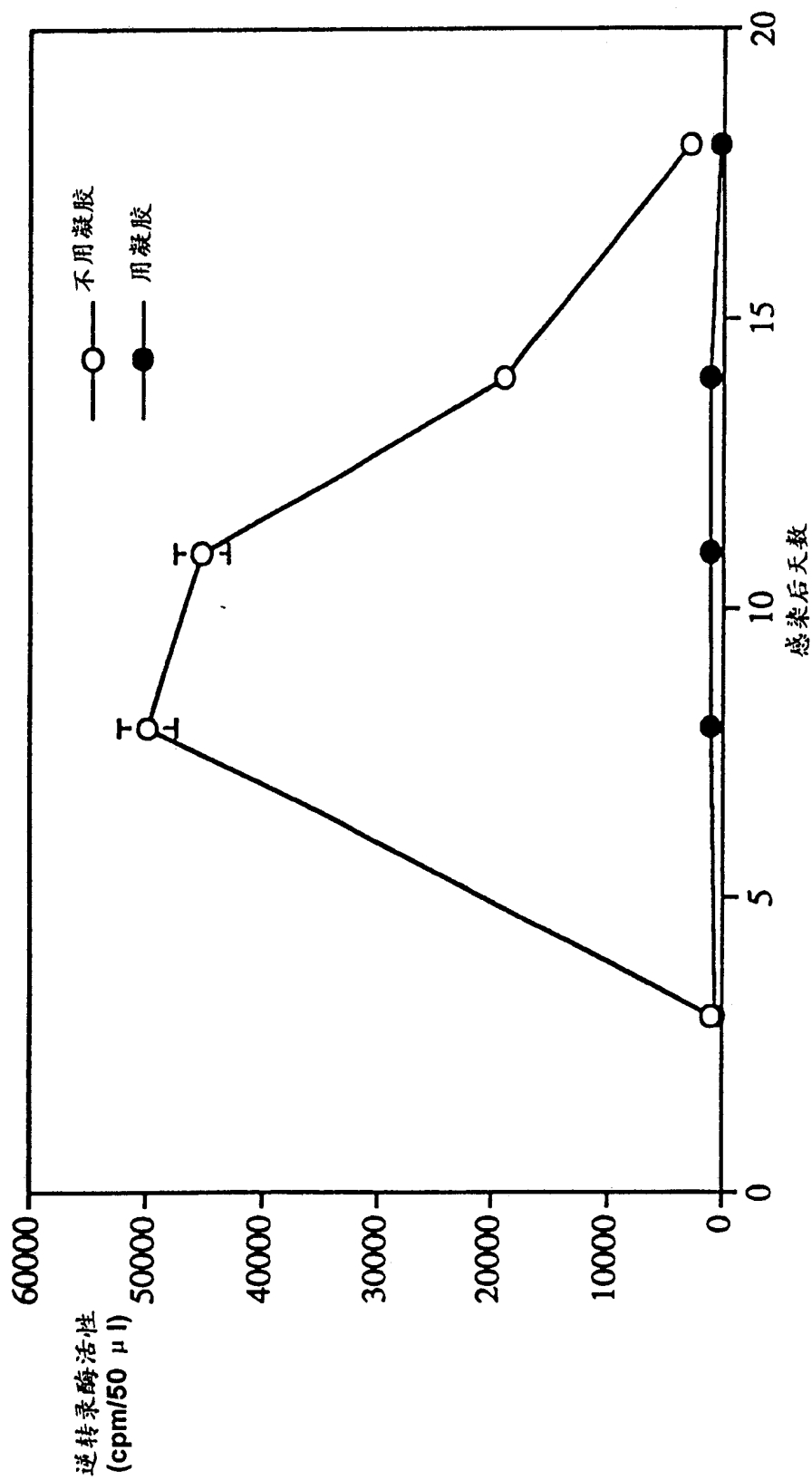


图 4



图 5A



图 5B



图 5C



图 5D



图 6A

图 6B



图 6C

图 6D

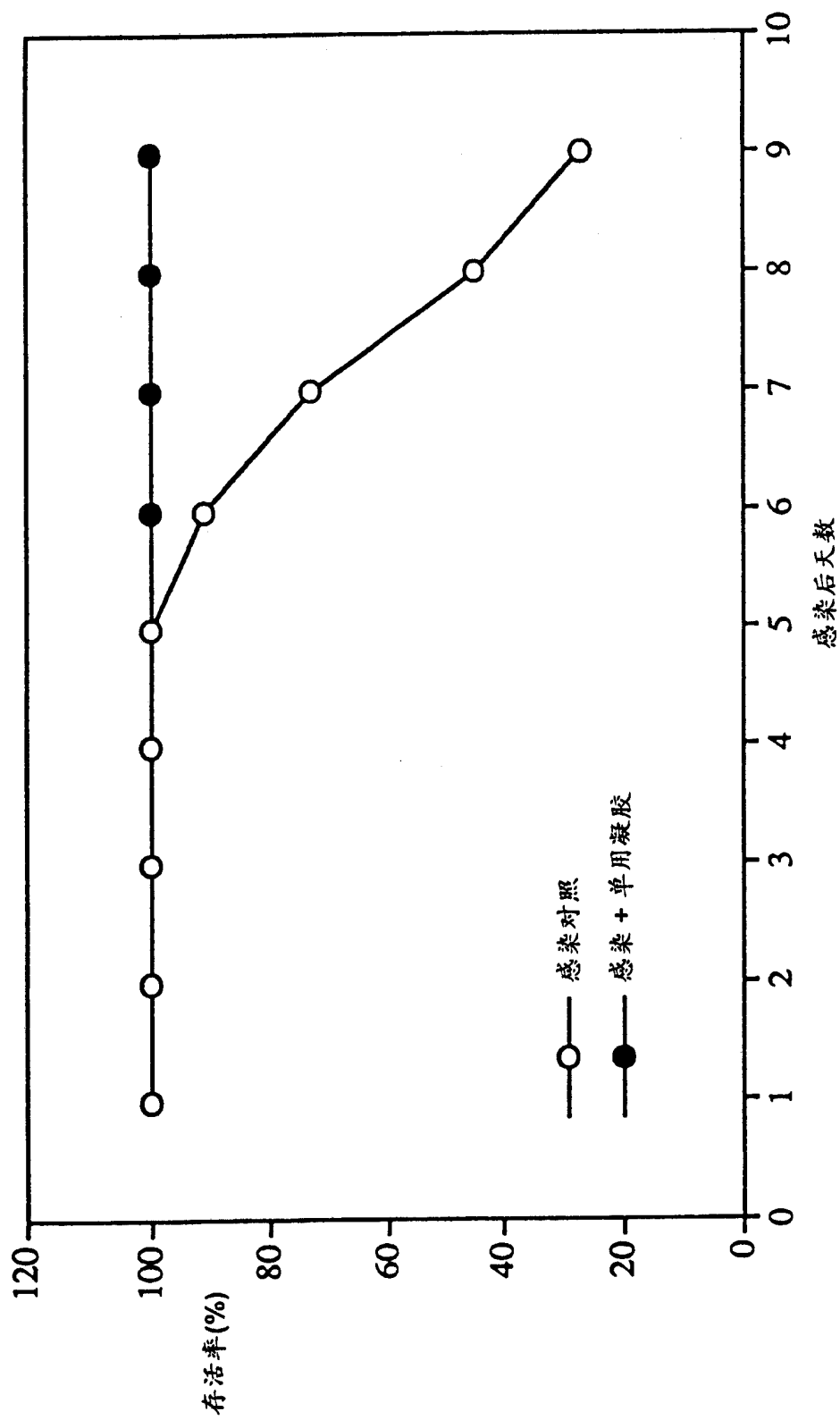


图 7

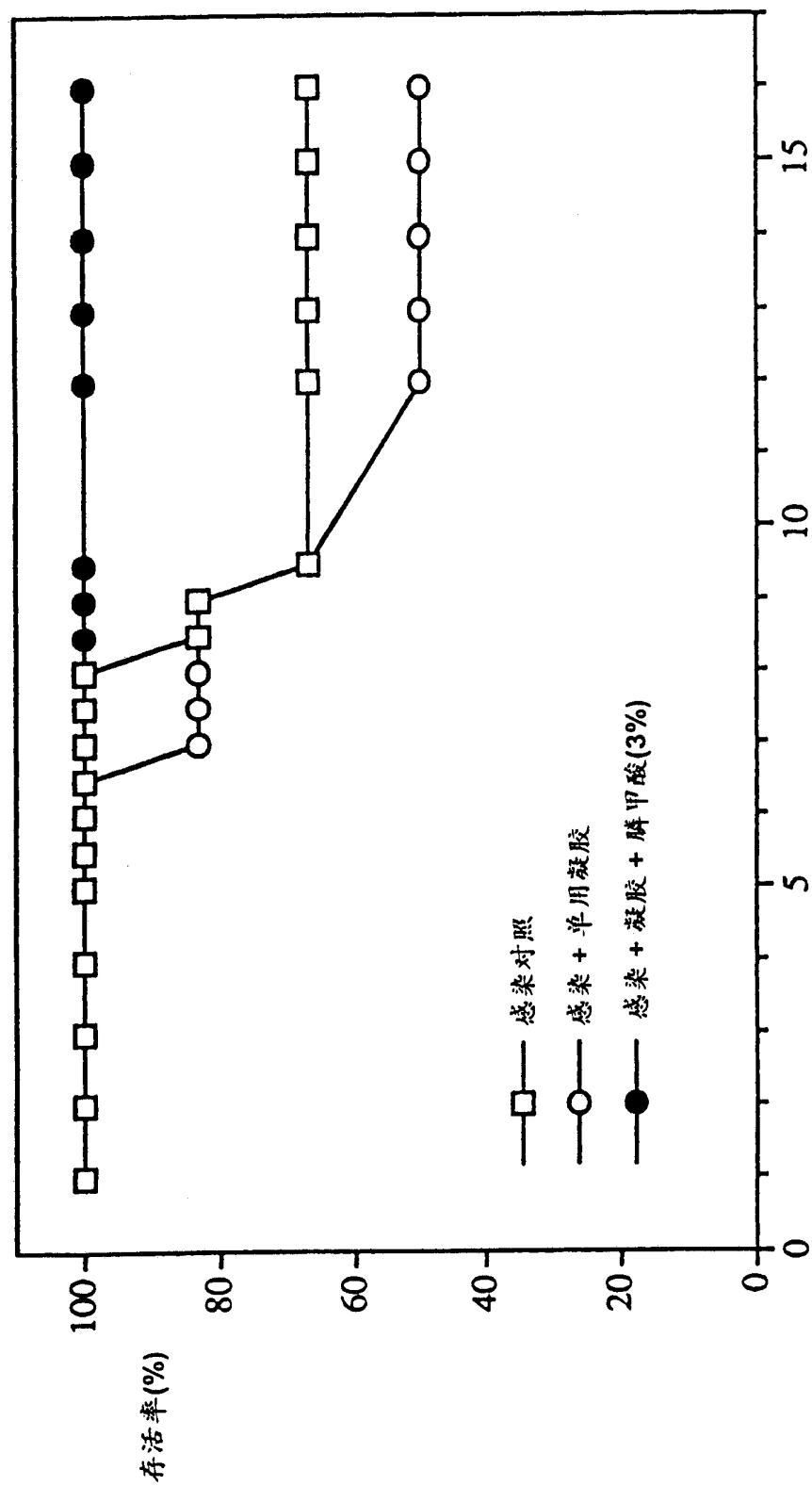


图 8

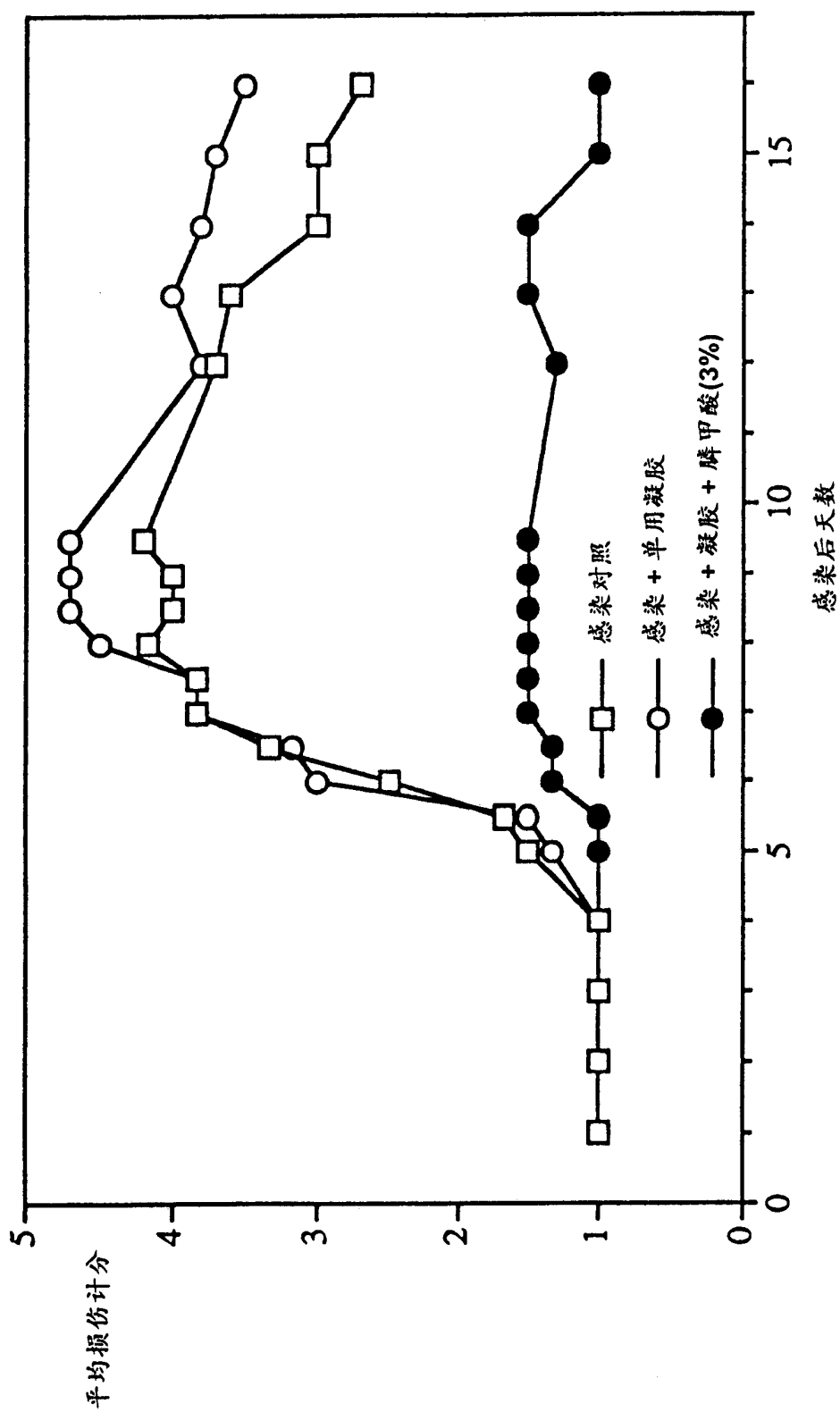


图 9