



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109689028 A

(43)申请公布日 2019.04.26

(21)申请号 201780056037.8

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

(22)申请日 2017.07.12

72001

(30)优先权数据

代理人 徐晶 万雪松

62/361351 2016.07.12 US

(51)Int.Cl.

62/513800 2017.06.01 US

A61K 9/127(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 31/7048(2006.01)

2019.03.12

A61K 31/00(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/041750 2017.07.12

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/013711 EN 2018.01.18

(71)申请人 马丁尼斯生物制药纳米技术公司

权利要求书2页 说明书20页 附图8页

地址 美国新泽西州

(72)发明人 R.J.曼尼诺 R.卢 D.F.克林

(54)发明名称

用于中枢神经系统递送和治疗隐球菌感染
的脂质卷包封的抗真菌化合物

(57)摘要

本申请涉及一种脂质卷组合物，包含一种或
多种脂质卷和至少两种抗真菌化合物，所述抗真
菌化合物选自两性霉素B、5-氟胞嘧啶、氟康唑、
酮康唑、雷夫康唑、阿巴康唑、伊曲康唑、泊沙康
唑、艾沙康唑和/或伏立康唑。还公开了使用该抗
真菌脂质卷制剂的方法。

1. 一种脂质卷组合物,包含:一种或多种脂质卷和治疗有效量的至少两种选自以下的抗真菌化合物:两性霉素B、5-氟胞嘧啶、氟康唑、酮康唑、雷夫康唑、阿巴康唑、伊曲康唑、泊沙康唑、艾沙康唑和/或伏立康唑。

2. 根据权利要求1所述的脂质卷组合物,其中所述至少两种抗真菌化合物是两性霉素B和5-氟胞嘧啶。

3. 根据权利要求1或权利要求2所述的脂质卷组合物,其中所述一种或多种脂质卷配制用于口服施用或鼻内施用。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的脂质卷组合物,其中所述一种或多种脂质卷配制用于静脉内施用。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的脂质卷组合物,其中所述一种或多种脂质卷配制用于鞘内施用。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的脂质卷组合物,其中仅一种抗真菌化合物配制成脂质卷。

7. 根据权利要求1-5中任一项所述的脂质卷组合物,其中至少两种抗真菌化合物配制成脂质卷。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的脂质卷组合物,其中一种或多种脂质卷是晶洞脂质卷。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的脂质卷组合物,其中一种或多种脂质卷包含脂质组分,所述脂质组分包含大豆磷脂酰丝氨酸,其量为约30%至70%重量,更优选40%至70%重量,更优选40%至60%重量,更优选45%至55%重量,更优选45%至60%重量,最优选45%至55%重量。

10. 一种治疗或预防由于隐球菌属(*Cryptococcus* spp.)引起的感染的方法,所述方法包括:向有此需要的受试者口服施用包含脂质卷的制剂,其中所述脂质卷包含两性霉素B。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中每天施用所述制剂历时至少7天,至少14天,至少21天,或至少28天。

12. 根据权利要求10或11所述的方法,还包括向受试者施用5-氟胞嘧啶。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中口服施用5-氟胞嘧啶。

14. 根据权利要求12或13所述的方法,其中每天施用5-氟胞嘧啶,历时至少7天,至少14天,至少21天,或至少28天。

15. 一种治疗或预防由于隐球菌属(*Cryptococcus* spp.)引起的感染的方法,所述方法包括:向有此需要的受试者施用包含脂质卷组合物的制剂,其中所述脂质卷组合物包含至少两种抗真菌化合物,其中所述至少两种抗真菌化合物选自两性霉素B、5-氟胞嘧啶、氟康唑、酮康唑、雷夫康唑、阿巴康唑、伊曲康唑、泊沙康唑、艾沙康唑和/或伏立康唑,其中所述至少两种抗真菌化合物中的至少一种配制成脂质卷。

16. 根据权利要求10-15中任一项所述的方法,其中所述感染涉及皮肤、肺、前列腺和/或中枢神经系统。

17. 根据权利要求10-16中任一项所述的方法,其中所述感染是隐球菌性脑膜脑炎。

18. 根据权利要求10-16中任一项所述的方法,其中所述感染是隐球菌性脑膜炎。

19. 根据权利要求10-18中任一项所述的方法,其中所述隐球菌属(*Cryptococcus* spp.)是新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)。

20. 根据权利要求10-18中任一项所述的方法,其中所述隐球菌属(*Cryptococcus* spp.)是加蒂隐球菌(*Cryptococcus gattii*)。

21.根据权利要求15-20中任一项所述的方法,其中所述施用是口服、鼻内、鞘内或静脉内施用。

22.根据权利要求15-21中任一项所述的方法,其中所述至少两种抗真菌化合物是两性霉素B和5-氟胞嘧啶。

23.根据权利要求10-22中任一项所述的方法,其中所述受试者是人。

24.根据权利要求10-23中任一项所述的方法,其中所述受试者患有HIV/AIDS、淋巴瘤、肝硬化或已接受器官移植。

25.根据权利要求10-24中任一项所述的方法,其中将抗真菌化合物递送至脑。

26.根据权利要求15-24中任一项所述的方法,其中所述脂质卷制剂口服施用并且其中将所述抗真菌化合物递送至脑。

27.一种治疗或预防由于隐球菌属(*Cryptococcus* spp.)引起的感染的方法,所述方法包括:向有此需要的受试者施用包含脂质卷的制剂,其中所述脂质卷包含抗真菌化合物,其中所述抗真菌化合物选自5-氟胞嘧啶、氟康唑、酮康唑、雷夫康唑、阿巴康唑、伊曲康唑、泊沙康唑、艾沙康唑和/或伏立康唑中的至少一种。

28.根据权利要求10-27中任一项所述的方法,其中预防由于隐球菌属(*Cryptococcus* spp.)引起的感染包括预防感染复发。

29.根据权利要求10-28中任一项所述的方法,其中预防由于隐球菌属(*Cryptococcus* spp.)引起的感染包括治疗哺乳动物或人,其中所述哺乳动物或人对隐球菌性物质抗原呈阳性(使用例如IMMY Inc. (Norman,OK)的隐球菌抗原试验)。

30.根据权利要求15-29中任一项所述的方法,其中至少两种抗真菌化合物配制在相同的脂质卷中。

用于中枢神经系统递送和治疗隐球菌感染的脂质卷包封的抗真菌化合物

[0001] 相关申请的交叉引用

本申请要求于2016年7月12日提交的美国临时申请No. 62/361,351和2017年6月1日提交的美国临时申请No. 62/513,800的权益并依赖于这些专利的申请日；每个申请的全部公开内容通过引用结合到本文中。

[0002] 领域

概括而言，本申请涉及包含抗真菌剂的脂质卷组合物和施用该组合物来治疗真菌感染、特别是由隐球菌属(*Cryptococcus* spp.)引起的真菌感染的方法。

[0003] 背景

隐球菌病是一种机会性真菌感染，在全世界人类免疫缺陷病毒患者中由于中枢神经系统(CNS)疾病每年导致估计约100万例病例和625,000例死亡。与地理上更受限制的加蒂隐球菌(*Cryptococcus gattii*)相比，全球大多数病例由新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)引起。尽管隐球菌病最常与HIV感染有关，但在许多地区，特别是在较发达国家，大多数病例发生在非HIV感染个体中，包括移植受者；接受免疫抑制剂的患者，免疫抑制剂诸如糖皮质激素、细胞毒性化疗、TNF- α 抑制剂和其他疾病调节剂；和还患有潜在疾病的不同种类患者，潜在疾病诸如器官衰竭综合征、先天性免疫学问题、常见变异性免疫缺陷和血液学疾病。此外，在许多地区，多达20%的隐球菌病病例发生在表型“正常”或临幊上非免疫受损的患者中。

[0004] 认为隐球菌病病例如始于从环境中吸入真菌细胞。在肺内，隐球菌属可在免疫抑制患者中引起肺炎，但在免疫活性宿主中，真菌细胞通常被免疫系统清除或建立无症状的潜在感染。在随后的免疫抑制中，这种潜在感染可随后传播到其他组织，最明显的是中枢神经系统(CNS)。一旦在CNS中确立，隐球菌病就会引起脑膜和脑组织的势不可挡的感染，这通常伴有颅内压升高。如果没有快速有效的治疗，CNS感染总是致命的。

[0005] 治疗隐球菌性脑膜脑炎的基础是20世纪50年代开发的两性霉素B脱氧胆酸盐(AmBd)，其通过在细胞膜中产生孔并通过氧化损伤诱导细胞死亡而发挥其杀真菌作用。与单独使用AmBd治疗相比，AmBd有时与5-氟胞嘧啶(5-FC)组合以提供组合疗法，可以改善患者的10周存活。这种组合仍然是推荐的“黄金标准”引导治疗，但由于AmBd具有显著的毒性并且其IV制剂需要复杂的电解质监测和静脉内导管(这阻止了在资源贫乏的环境中使用该药物)，因此存在实质性挑战。

[0006] 为了避免与AmBd和5-FC组合疗法相关的问题，考虑了氟康唑与5-FC的组合。氟康唑具有良好的口服生物利用度并且可以穿透脑脊液，这也使其成为初始治疗后的维持疗法的良好候选者。然而，氟康唑是一种抑制真菌的化合物(而不是杀真菌化合物)，因此它在病原体清除方面效果较差，因此不推荐用于初始治疗。因此，仍然清楚且持续地需要提供可口服利用、有效并且可以降低成本提供的隐球菌病治疗。

[0007] 概述

本发明人已意外地发现，脂质卷包封的两性霉素B(在本文中也称为AmB，其为可口服利

用的并且具有低毒性)与口服施用的5-氟胞嘧啶组合在小鼠中清除隐球菌属方面与全身性施用两性霉素B脱氧胆酸盐和口服施用5-氟胞嘧啶一样有效。

[0008] 此外,本发明人已经表明,将脂质卷包封的两性霉素B递送至隐球菌属感染发生最严重的脑部。因此,本发明组合物,其可方便地口服施用,具有开辟发展中世界的巨大地区的基于两性霉素的治疗剂的有效杀真菌活性来治疗隐球菌病的潜力。本文进一步描述了本发明的抗真菌脂质卷的这些和其他益处。

[0009] 本公开涉及一种脂质卷组合物,包含:一种或多种脂质卷和治疗有效量的至少两种例如选自以下的抗真菌化合物:两性霉素B、5-氟胞嘧啶(也称作5-FC和氟胞嘧啶)、氟康唑、酮康唑、雷夫康唑、阿巴康唑、伊曲康唑、泊沙康唑、艾沙康唑和/或伏立康唑。在一些实施方案中,所述至少两种抗真菌化合物是两性霉素B和5-氟胞嘧啶。本文描述了另外的抗真菌化合物。

[0010] 在一些实施方案中,将脂质卷配制用于粘膜施用,诸如口服施用或鼻内施用。在其他实施方式中,将脂质卷配制用于静脉内施用。在一些实施方式中,将脂质卷配制用于鞘内施用。

[0011] 在一些实施方案中,将所述至少两种抗真菌化合物中的仅一种配制成脂质卷。在其他实施方式中,将至少两种抗真菌化合物配制成脂质卷。在一些实施方式中,将所述至少两种抗真菌化合物配制在相同的脂质卷内。在其他实施方案中,将所述至少两种抗真菌化合物各自配制在不同的脂质卷中。

[0012] 在一些实施方案中,本文所述的一种或多种脂质卷是也如本文所述的晶洞脂质卷。

[0013] 在一些实施方案中,本文所述的一种或多种脂质卷包含脂质组分,所述脂质组分包括大豆磷脂酰丝氨酸,其量为约30%至70%重量,更典型地40%至70重量%,更典型地40%至60%重量,更典型地45%至55%重量,更典型地45%至60%重量且最典型地45%至约55%重量。

[0014] 本公开还涉及治疗或预防由于隐球菌属引起的感染的方法,所述方法包括:向有需要的受试者口服施用包含脂质卷的制剂,其中所述脂质卷包含两性霉素B。在一些实施方案中,每天施用所述制剂历时至少7天,至少14天,至少21天,或至少28天。在一些实施方案中,所述方法还包括向受试者施用5-氟胞嘧啶。在一些实施方案中,口服施用5-氟胞嘧啶。在一些实施方案中,每天施用5-氟胞嘧啶历时至少7天,至少14天,至少21天,或至少28天。

[0015] 本公开还涉及治疗或预防由于隐球菌属引起的感染的方法,所述方法包括:向有需要的受试者施用包含脂质卷组合物的制剂,其中所述脂质卷组合物包含至少两种抗真菌化合物,其中所述至少两种抗真菌化合物选自两性霉素B、5-氟胞嘧啶、氟康唑、酮康唑、雷夫康唑、阿巴康唑、伊曲康唑、泊沙康唑、艾沙康唑和/或伏立康唑,其中将所述至少两种抗真菌化合物中的至少一种配制成脂质卷。在一些实施方案中,所述至少两种抗真菌化合物是两性霉素B和5-氟胞嘧啶。本文描述了另外的抗真菌化合物。在一些实施方案中,将抗真菌化合物递送至脑。

[0016] 在一些实施方案中,感染涉及皮肤、肺、前列腺和/或中枢神经系统。在一些实施方案中,感染是隐球菌性脑膜脑炎。在一些实施方案中,感染是隐球菌性脑膜炎。

[0017] 在一些实施方案中,隐球菌属是新型隐球菌。在一些实施方案中,隐球菌属是加蒂

隐球菌。

[0018] 在一些实施方案中,施用是口服、鼻内、鞘内或静脉内施用。在一些实施方案中,口服施用所述脂质卷制剂并将抗真菌化合物递送至脑。

[0019] 在一些实施方案中,受试者是人。在一些实施方案中,受试者患有HIV/AIDS、淋巴瘤、肝硬化或已接受器官移植。

[0020] 本文还提供了治疗或预防由于隐球菌属引起的感染的方法,所述方法包括:向有需要的受试者施用包含脂质卷的制剂,其中所述脂质卷包含抗真菌化合物,其中所述抗真菌化合物选自5-氟胞嘧啶、氟康唑、酮康唑、雷夫康唑、阿巴康唑、伊曲康唑、泊沙康唑、艾沙康唑和/或伏立康唑中的至少一种。本文描述了另外的抗真菌化合物。

[0021] 在一些实施方案中,预防由于隐球菌属引起的感染包括预防感染复发。在一些实施方案中,预防由于隐球菌属引起的感染包括治疗哺乳动物或人,其中所述哺乳动物或人对隐球菌性物质抗原呈阳性(使用例如IMMY Inc. (Norman, OK)的隐球菌抗原试验)。

[0022] 附图简述

结合在本说明书中并构成本说明书一部分的附图说明了某些实施方案,并与书面描述一起用于解释本文公开的组合物和方法的某些原理。

[0023] 图1是脂质卷的示意图。插图描绘了脂质卷的脂质多层(strata),其包含磷脂双层(圆圈和尾部)、多价阳离子(无阴影圆圈)和保护在脂质卷内的示例性负载(cargo)部分(有阴影圆圈)。

[0024] 图2描绘了吞噬脂质卷及其负载的巨噬细胞的示意图。插图描述了脂质卷的开口和负载在巨噬细胞内部的释放,如详细描述中所述。

[0025] 图3描绘了两性霉素B的结构图。

[0026] 图4是制备两性霉素B-脂质卷(本文也称为CAMB)的方案的示意图。

[0027] 图5描绘了如详细描述中所述的晶洞脂质卷的示例性制备。

[0028] 图6描绘了如实施例2中所述用CAMB或FUNGIZONE®处理的感染新型隐球菌小鼠的体内功效结果。

[0029] 图7描绘了如实施例2中所述用CAMB、FUNGIZONE®和/或5-氟胞嘧啶处理的感染新型隐球菌小鼠的体内功效结果。

[0030] 图8描绘了如实施例2中所述用CAMB、FUNGIZONE®、5-FC和/或氟康唑处理的感染新型隐球菌小鼠的体内功效结果。

[0031] 图9描绘了如实施例2中所述用CAMB、FUNGIZONE®、5-FC、氟康唑及其组合处理的小鼠观察到的每克脑组织的菌落形成单位(CFU)的数目。

[0032] 图10描绘了研究设计,其用于证明如实施例3中所述在口服施用后脂质卷包封的两性霉素B局限于脑。

[0033] 图11描绘了如实施例3中所述荧光标记的CAMB颗粒向感染新型隐球菌小鼠脑中的递送。

[0034] 详细描述

现在将详细参考各种示例性实施方案,这些实施方案的实例在附图中示出并在随后的详细描述中讨论。应当理解的是,下面的详细描述为读者提供对本发明的某些实施方案、特征和各方面细节的更全面理解,并且不应该解释为限制本发明的范围。

[0035] 隐球菌属和抗真菌化合物

本公开涉及一种脂质卷组合物，包含：一种或多种脂质卷和至少两种抗真菌化合物，所述抗真菌化合物有效对抗由隐球菌属引起的感染。如本文所用，术语“隐球菌属(*Cryptococcus spp.*)”是指属于隐球菌(*Cryptococcus*)属的真菌种，其是担子菌包封的酵母。这种感染例如可以通过确定受试者对隐球菌类抗原是否呈阳性来检测。用于进行这种测试的试剂盒可商购获得，例如，来自IMMY Inc. (Norman, OK)。

[0036] 典型地，本公开的抗真菌脂质卷有效对抗新型隐球菌。新型隐球菌最初基于片状凝集反应分类为血清型A,B,C,D和AD。最近，新型隐球菌已分为两个变种：*C. neoformans* var. *grubii* (以前的A类) 和 *C. neoformans* var. *neoformans* (以前的D类)。新型隐球菌是世界上大多数温带地区发现的普遍存在的病原体，但通常存在于腐烂的有机物和许多土壤类型中，特别是已经富集动物和鸟类粪便的土壤中。

[0037] 在一些实施方案中，本公开的抗真菌脂质卷有效对抗加蒂隐球菌(以前的B和C类)。加蒂隐球菌可以分为四个分子类型，包括VG I、VG II、VG III和VG IV。VG II型可以进一步分为VG IIa、VG IIb和VG IIc亚型。加蒂隐球菌可以通过将分离物铺板在刀豆氨酸-甘氨酸-溴百里酚(CGB)琼脂上来容易地分化。在这种生物体存在下，CGB琼脂变成蓝色。加蒂隐球菌通常发现于热带和亚热带地理区域。

[0038] 在一些实施方案中，本公开的隐球菌属，诸如加蒂隐球菌或新型隐球菌，更典型地加蒂隐球菌，例如加蒂隐球菌的VG II谱系，诸如VG IIa，能够感染免疫活性受试者。如本文所用，免疫活性受试者是在暴露于抗原后能够产生正常免疫反应的受试者，通常是哺乳动物受试者诸如人受试者。然而，更典型地，本公开的隐球菌属能够感染免疫受损的受试者。免疫受损的受试者包括患有HIV/AIDS、淋巴瘤、肝硬化或者是器官移植受者的受试者，正在接受免疫抑制剂诸如糖皮质激素、细胞毒性化疗和/或TNF- α 抑制剂的受试者(通常是哺乳动物受试者诸如人受试者)。

[0039] 在一些实施方案中，隐球菌属可导致受试者的隐球菌性肺病。隐球菌性肺病的症状从无症状呼吸道定植到急性呼吸窘迫综合征。患有肺隐球菌病的受试者可能出现轻度至中度症状，包括发烧、不适、咳嗽痰少和/或胸膜疼痛。在一些实施方案中，患有肺隐球菌病的受试者可能出现肺炎。在一些实施方案中，肺病可在不存在肺外疾病的情况下发生。

[0040] 在一些实施方案中，隐球菌属可以从肺部浸染以感染受试者的皮肤、前列腺、骨髓腔和/或中枢神经系统(CNS)。典型地，隐球菌属感染CNS。在一些实施方案中，隐球菌属导致CNS隐球菌病，诸如脑膜炎和/或脑膜脑炎。如果没有适当的治疗，这些感染形式总是致命的；症状出现后2周至数年可能发生死亡。隐球菌性脑膜炎和脑膜脑炎的最常见症状是头痛和精神状态改变，包括性格改变、精神错乱、嗜睡和昏迷。

[0041] 本公开的所述一种或多种脂质卷与一种或多种抗真菌化合物结合或加载有一种或多种抗真菌化合物，诸如至少两种抗真菌化合物，诸如至少三种抗真菌化合物或诸如至少四种抗真菌化合物。在一些实施方案中，所述一种或多种抗真菌化合物是杀真菌化合物，诸如两性霉素B或抑制真菌化合物，诸如氟康唑和/或5-氟胞嘧啶。如本文所用，“杀真菌”化合物是杀死真菌而不是简单地防止其生长的抗真菌化合物。相比之下，如本文所用的“抑制真菌”化合物是防止真菌生长、但不杀死真菌的抗真菌化合物。

[0042] 典型地，本公开的脂质卷与一种或多种多烯、唑和/或嘧啶类似物结合或加载有一

种或多种多烯、唑和/或嘧啶类似物。典型地，多烯是两性霉素B。在一些实施方案中，唑是氟康唑、酮康唑、雷夫康唑、阿巴康唑、伊曲康唑、泊沙康唑、艾沙康唑和/或伏立康唑。更典型地，唑是氟康唑。典型地，嘧啶类似物是5-氟胞嘧啶。

[0043] 在一些实施方案中，考虑其他抗真菌化合物用于配制成本发明的脂质卷组合物。这样的其他抗真菌化合物包括能够抑制细胞壁组分合成的那些，诸如糖基磷脂酰肌醇(GPI)-锚接的甘露糖蛋白，例如E1210，一种口服活性分子，其具有抗隐球菌属的体外活性。在其他实施方案中，抗真菌化合物是麦角甾醇合成抑制剂，诸如VT-1129，其可口服利用，显示出良好的CNS渗透并且在感染隐球菌属的小鼠模型中是杀真菌的。

[0044] 在其他实施方案中，抗真菌化合物是口服利用的化合物，已知其与氟康唑对隐球菌属表现出加和或协同活性。这样的抗真菌化合物包括胺碘达隆(心脏抗心律失常药物)、吩噻嗪(抗精神病药)和他莫昔芬(雌激素拮抗剂)。

[0045] 在一些实施方案中，本发明的脂质卷组合物的所述至少两种抗真菌化合物中的每一种在单独的脂质卷中。在其他实施方案中，所述至少两种抗真菌化合物中的每一种在相同的脂质卷中。然而，更典型地，所述至少两种抗真菌化合物中的仅一种是脂质卷包封的。甚至更典型地，所述脂质卷包封的抗真菌化合物是多烯，诸如两性霉素B，第二、第三或第更多种抗真菌化合物是未经脂质卷包封的。

[0046] 在典型的实施方案中，本发明的脂质卷组合物包含脂质卷包封的两性霉素B和未经脂质卷包封的唑和/或未经脂质卷包封的嘧啶类似物。典型地，未经脂质卷包封的唑是氟康唑，未经脂质卷包封的嘧啶类似物是5-氟胞嘧啶。甚至更典型地，本发明的脂质卷组合物包含脂质卷包封的两性霉素B和未经脂质卷包封的5-氟胞嘧啶。

[0047] 在一些实施方案中，将本发明的脂质卷组合物配制用于粘膜施用，典型地是口服和/或鼻内施用，更典型地是口服施用。然而，也考虑配制所述脂质卷组合物用于静脉内、皮下、腹膜内和鞘内施用。

[0048] 脂质卷及其制备方法

脂质卷是无水、稳定、多层的脂质晶体，其在带负电荷的脂质(诸如磷脂酰丝氨酸)和二价阳离子(诸如钙)的相互作用后自发形成(参见，例如，美国专利号4,078,052;5,643,574;5,840,707;5,994,318;6,153,217;6,592,894，以及PCT公开号WO 2004/091572;WO 2004/091578;WO 2005/110361，WO 2012/151517和WO2014/022414，美国专利公开号2014/220108和专利公开号2010/0178325；其中每个在此通过全文引用并入本文)。典型地，这些称为晶体脂质卷。

[0049] 晶体脂质卷具有独特的多层结构，该结构由以螺旋卷起的或作为堆叠片的大的、连续的、固体磷脂双层片或多层组成，没有内部含水空间(图1)。这种独特的结构为缔合的“脂质卷包封的”分子提供保护以防止降解。由于整个脂质卷结构是一系列固体层，因此脂质卷结构内部的组分保持完好无损，即使脂质卷的外层可能暴露于苛刻的环境条件或酶。血清和粘膜分泌物中的体内二价阳离子浓度使得脂质卷结构得到保持。因此，大多数脂质卷缔合的分子存在于固态、稳定的、不可渗透结构的内层中。然而，一旦在细胞的内部中，低钙浓度导致脂质卷晶体打开并释放已经配制到脂质卷中的分子(图2)。因此，脂质卷制剂在生理流体(包括粘膜分泌物、血浆和胃肠液)中保持完好无损，由此通过许多施用途径(包括粘膜例如口服和鼻内施用)介导生物活性化合物的递送。

[0050] 典型的脂质卷结构包含脂质多层，所述脂质多层包含交替的二价阳离子和磷脂双层，所述磷脂双层包括至少一种带负电荷的磷脂。典型地，负载部分（诸如抗真菌剂，例如两性霉素B）（图3）被隔离在脂质卷的脂质多层内。

[0051] 可以使用已知方法制备脂质卷。在一个典型的实施方式中，美国专利公开号2014/220108中描述的方法用于制备本公开的脂质卷，其通过引用整体并入本文。该过程的概述示于图4。在该方法中，将疏水性抗真菌化合物（诸如两性霉素B）溶解在溶剂（例如，二甲基亚砜）中并通过例如0.22μm过滤器过滤，并与例如在200毫升无菌水中的2000毫克50%大豆磷脂酰丝氨酸（PS）脂质体组合（PS脂质体首先通过例如5、0.8和0.45μm过滤器过滤）以形成包含抗真菌剂诸如AmB的脂质体。可向所得混合物中加入阳离子诸如多价或二价阳离子。多价或二价阳离子的添加导致脂质体的坍塌，并形成阳离子螯合的磷脂双层片，其卷起或堆叠以形成包含抗真菌剂诸如AmB的脂质卷。含抗真菌剂的脂质卷诸如含AmB的脂质卷可以在冻干下干燥。可以将无菌水加入干燥的粉末状抗真菌脂质卷中以制备悬浮液。悬浮液可以在4°C下避光储存。

[0052] 制备包含抗真菌剂的脂质卷的其他方法包括捕集-高pH（trapping-high pH）方法、捕集-膜（trapping-film）方法和水凝胶方法。在捕集-高pH方法中，脂质粉末和抗真菌化合物（例如AmB）在例如无菌聚丙烯管中以例如10:1的脂质/抗真菌剂摩尔比混合。加入缓冲液，例如TES [N-三(羟甲基)-甲基-2-氨基甲磺酸]（pH7.4）。涡旋后形成多层脂质体。然后通过添加例如1N NaOH将pH增加至例如11.5，以溶解抗真菌化合物例如AmB。可以通过使用相对照和偏振光学显微镜来监测AmB晶体的缺乏和脂质体的存在。将多价或二价阳离子（诸如氯化钙）以例如2:1的脂质/阳离子摩尔比缓慢加入抗真菌脂质体悬浮液中，以形成脂质卷。然后可以将外部pH调节至pH 7。

[0053] 在捕集膜方法中，将抗真菌化合物（例如AmB）溶解在溶剂（例如甲醇）中，同时进行短暂声处理，并将溶液加入到氯仿中的脂质中。抗真菌剂例如AmB易溶于氯仿/甲醇混合物中。然后可以使用旋转蒸发器将混合物干燥成膜，并在例如35°C-40°C、减压（1巴）下温和加热。然后可以用去离子水使干燥的脂质膜水合并且声处理。抗真菌-脂质体大小应为约50纳米。为了形成脂质卷，将多价或二价阳离子溶液（例如溶液中的氯化钙）缓慢加入到脂质体悬浮液中以形成脂质卷。

[0054] 为了使用水凝胶方法制备抗真菌脂质卷，将抗真菌化合物诸如AmB溶解在甲醇中，并加入到氯仿中的脂质中，例如以10:1的摩尔比，然后使用旋转蒸发器将混合物干燥成药物-脂质膜。然后可以用去离子水使膜水合，并且将该药物-脂质悬浮液声处理，直到获得包含抗真菌化合物的小脂质体。然后可以将抗真菌剂-脂质体悬浮液与例如40% w/w的葡聚糖-500,000在例如2/1 v/v葡聚糖/脂质体的悬浮液中混合。然后在磁力搅拌（800-1000rpm）下使用注射器将该混合物注入例如15% w/w PEG-8000中。获得分散在PEG连续相中的抗真菌脂质体/葡聚糖液滴的水-水乳液。然后将多价或二价阳离子溶液（例如在溶液中的氯化钙）加入到乳液中。继续搅拌以允许缓慢形成小尺寸的抗真菌脂质卷，其被隔离在葡聚糖液滴中。然后通过加入包含例如1 mM CaCl₂和150 mM NaCl的洗涤缓冲液洗涤聚合物。

[0055] 如普通技术人员所知晓，许多参数，包括pH、盐浓度、搅拌方法和速率、阳离子类型、浓度和添加速率、脂质组成、浓度以及脂质与其他材料的比率等影响制剂，并且可以对

此进行改变以优化特定材料的脂质卷包封。

[0056] 在一些实施方案中,亲水性抗真菌化合物诸如5-FC或包含亲水性结构域的抗真菌化合物诸如氟康唑也可以配制成脂质卷。将这些化合物结合到脂质卷中的方法是本领域熟知的,并且描述于例如美国专利公开号2014/220108中。不希望束缚于任何特定理论,据信,亲水性分子或具有亲水结构域的大分子诸如感兴趣的活性药物成分(API)(包括本公开的抗真菌化合物)可以以增强的方式通过将API与起到“筏”作用的脂质结构域缔合配制成脂质卷,并且其保持完整并包埋在脂质卷晶体基质内。这样的脂质包括本领域已知并在本文中所述的“中性脂质”。

[0057] 在一个典型的实施方式中,可用于将脂质体塌缩成脂质卷的本文所述的多价阳离子是二价金属阳离子,诸如钙、锌、镁和钡。在一个更典型的实施方式中,二价金属阳离子是钙。

[0058] 在一些实施方式中,抗真菌剂与脂质的比率(wt/wt)为1:1至1:50,或其间的任何范围,诸如1:2、1:3、1:4、1:6、1:8、1:10、1:12、1:15、1:20和1:25,典型地为1:1至1-1:20,诸如1:2.5至1:10,典型地为1:10。

[0059] 在形成脂质卷期间使用的脂质体可以是多层(MLV)或单层(ULV)的,包括小单层囊泡(SUV)。这些脂质体溶液中的脂质浓度可为约0.1mg/ml至500mg/ml。典型地,脂质浓度为约0.5mg/ml至约50mg/ml,更典型地为约1mg/ml至约25mg/ml。

[0060] 可以在制备脂质卷的方法中引入尺寸调节剂。如本文所用,尺寸调节剂是指降低脂质卷的粒度的试剂。如本文所用,术语“粒度”是指颗粒直径,或者在颗粒不是球形的情况下,是指在颗粒的一个方向上的最大延伸。可以使用常规方法测量脂质卷的粒度,诸如亚微米粒度分析仪。在某些实施方案中,尺寸调节剂是脂质的锚定多核苷酸、脂质锚定的糖(糖脂)或脂质锚定多肽。在其他实施方案中,尺寸调节剂是胆汁盐,例如氧胆酸盐(oxycholate)、胆酸盐、鹅脱氧胆酸盐、牛磺胆酸盐、甘氨胆酸盐、牛磺鹅脱氧胆酸盐、甘氨鹅脱氧胆酸盐、脱氧胆酸盐或石胆酸盐。胆汁盐是与阳离子(通常为钠)化合的胆汁酸。胆汁酸是主要存在于哺乳动物胆汁中的类固醇酸,可商购获得。

[0061] 在某些实施方案中,在形成沉淀的脂质卷之前,将尺寸调节剂加入脂质或脂质体中。例如,在一个实施方案中,将尺寸调节剂引入脂质体悬浮液中,随后将由该悬浮液形成脂质卷(例如,通过添加阳离子或渗析)。或者,可以在添加药理活性剂之前或之后将尺寸调节剂引入脂质溶液中。

[0062] 在一些实施方案中,本发明的脂质卷可任选地包含一种或多种聚集抑制剂。如本文所用,术语“聚集抑制剂”是指抑制脂质卷聚集的试剂。聚集抑制剂通常至少存在于脂质卷表面上,并且可以仅存在于脂质卷表面上(例如,当脂质卷形成后引入聚集抑制剂时)。可以在脂质卷形成之前、之后或期间添加聚集抑制剂。本领域普通技术人员仅仅通过常规实验即能够容易地确定形成所需尺寸的脂质卷所需的聚集抑制剂的量。

[0063] 根据本公开可以使用的合适的聚集抑制剂包括但不限于下列中的至少一种:酪蛋白、κ-酪蛋白、乳、白蛋白、血清白蛋白、牛血清白蛋白、兔血清白蛋白、甲基纤维素、乙基纤维素、丙基纤维素、羟基纤维素、羟甲基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、羧甲基纤维素、羧乙基纤维素、支链淀粉、聚乙烯醇、海藻酸钠、聚乙二醇、聚环氧乙烷、黄原胶、黄蓍胶、瓜尔胶、金合欢胶、阿拉伯树胶、聚丙烯酸、甲基丙烯

酸甲酯共聚物、羧基聚合物、直链淀粉、高直链淀粉、羟丙基化高直链淀粉、糊精、果胶、甲壳素、壳聚糖、果聚糖、爱生兰(elsinan)、胶原蛋白、明胶、玉米醇溶蛋白、谷蛋白、角叉菜胶、巴西棕榈蜡、虫胶、乳胶聚合物、乳蛋白分离物、大豆蛋白分离物、乳清蛋白分离物及其混合物。

[0064] 任何合适的脂质可用于制备脂质卷。在一个实施方案中，脂质包括一种或多种带负电荷的脂质。如本文所用，术语“带负电荷的脂质”包括在酸性、碱性或生理pH下在水溶液中具有带形式负电荷的头基的脂质，并且还包括具有两性离子头基的脂质。在一个实施方案中，带负电荷的脂质是磷脂。

[0065] 脂质卷还可以包括不带负电荷的脂质(例如，带正电荷和/或中性的脂质)。典型地，脂质卷包含显著量的带负电荷的脂质。在某些实施方案中，大多数脂质带负电荷。在一个实施方案中，脂质是脂质的混合物，其包含至少50%的带负电荷的脂质，诸如磷脂。在另一个实施方案中，脂质包括至少75%的带负电荷的脂质，诸如磷脂。在其他实施方案中，脂质包括至少85%、90%、95%或98%的带负电荷的脂质，诸如磷脂。在其他实施方案中，带负电荷的脂质(例如，磷脂)占脂质卷中总脂质的30%至70%，35%至70%，40%至70%，45%至65%，45%至70%，40%至60%，50%至60%，45%至55%，45%至65%或45%至50%。在某些实施方案中，带负电荷的脂质(例如，磷脂)占脂质卷中总脂质的40%至60%或45%至55%。在一些实施方案中，带负电荷的脂质(例如，磷脂)占脂质卷的非疏水结构域组分中的总脂质的30%至70%，35%至70%，40%至70%，45%至65%，45%至70%，40%至60%，50%至60%，45%至55%，45%至65%或45%至50%。在某些实施方案中，带负电荷的脂质(例如，磷脂)占脂质卷的非疏水结构域组分中的总脂质的40%至60%或45%至55%。在一些实施方案中，带负电荷的脂质是磷脂并且占脂质卷中或脂质卷的非疏水结构域组分中的总磷脂的30%至70%，35%至70%，40%至70%，45%至65%，45%至70%，40%至60%，50%至60%，45%至55%，45%至65%或45%至50%。在一些实施方案中，带负电荷的脂质是磷脂并且占脂质卷中或脂质卷的非疏水结构域组分中的总磷脂的40%至60%或45%至55%。

[0066] 带负电荷的脂质可以包括基于蛋的脂质、基于牛的脂质、基于猪的脂质、基于植物的脂质或衍生自其他来源的类似脂质，包括合成产生的脂质。带负电荷的脂质可包括磷脂酰丝氨酸(PS)、二油酰磷脂酰丝氨酸(DOPS)、磷脂酸(PA)、磷脂酰肌醇(PI)和/或磷脂酰甘油(PG)和/或这些脂质中的一种或多种与其他脂质的混合物。另外地或另选地，脂质可包括磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)、二磷脂酰甘油(DPG)、二油酰磷脂酸(DOPA)、二硬脂酰磷脂酰丝氨酸(DSPS)、二肉豆蔻酰磷脂酰丝氨酸(DMPS)、二棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG)等。在另一个实施方案中，磷脂酰丝氨酸是衍生自卵或牛的磷脂酰丝氨酸。

[0067] 包含大豆脂质的脂质卷

在一些典型的实施方案中，脂质卷(包括晶洞脂质卷，如下文所述)使用基于豆类的磷脂、更典型地基于大豆的脂质制备。这种基于大豆的脂质可以是天然的或合成的。甚至更典型地，基于大豆的脂质是大豆磷脂，诸如大豆磷脂酰丝氨酸的量为脂质卷的脂质组分重量的40%至74%。或者，大豆磷脂酰丝氨酸可以是脂质卷的脂质组分重量的约40%、45%、50%、55%、60%、65%或70%或其任何增量值。应理解，本公开旨在涵盖这些值和范围之间的所有值和范围。在一个典型的实施方案中，磷脂包含45-70%的大豆磷脂酰丝氨酸。在一

个更典型的实施方案中，磷脂包含45–55%的大豆磷脂酰丝氨酸。

[0068] 大豆磷脂酰丝氨酸是可商购的，例如，来自Avanti Polar Lipids, Inc. Alabaster, AL。或者，根据众所周知的标准纯化技术，可以从大豆磷脂组合物中纯化大豆磷脂酰丝氨酸，所述大豆磷脂组合物是数种大豆磷脂的混合物。

[0069] 在一些实施方案中，中性脂质与大豆磷脂酰丝氨酸组合使用以制备本发明的脂质卷。如本文所用，术语“中性脂质”包括许多脂质物质中的任何一种，其在生理pH下以不带电或中性两性离子形式存在，并因此包括在无阴离子功能的脂质类型中。这样的脂质包括例如二酰基磷脂酰胆碱、二酰基磷脂酰乙醇胺、神经酰胺、鞘磷脂、二氢鞘磷脂、脑磷脂和脑苷脂。用于本文所述的脂质卷组合物中的中性脂质的选择通常通过考虑例如脂质卷大小和稳定性来指导。具有不同链长和饱和度的各种酰基链基团的脂质是可获得的，或者可以通过众所周知的技术分离或合成。在一组实施方案中，可以使用包含碳链长度在C₁₄至C₂₂范围内的饱和脂肪酸的脂质。在另一组实施方案中，可以使用具有碳链长度在C₁₄至C₂₂范围内的单或二-不饱和脂肪酸的脂质。在另一组实施方案中，可以使用具有碳链长度在C₈至C₁₂范围内的单或二-不饱和脂肪酸的脂质。另外，可以使用具有饱和和不饱和脂肪酸链的混合物的脂质。

[0070] 在一些实施方案中，在本公开中使用的中性脂质是DOPE、DSPC、DPPC、POPC，或者任何相关的磷脂酰胆碱。可用于本公开的中性脂质也可以由鞘磷脂、二氢鞘磷脂或具有其他头基诸如丝氨酸和肌醇的磷脂构成。

[0071] 在一个典型的实施方式中，使用99.9%纯的二油酰磷脂酰丝氨酸、99.9%纯的大豆磷脂酰丝氨酸、75%的大豆磷脂酰丝氨酸和50%的大豆磷脂酰丝氨酸来制造脂质卷。通常通过添加中性脂质来改性99.9%纯的磷脂酰丝氨酸的脂质组合物，所述中性脂质包括但不限于鞘磷脂和/或磷脂酰胆碱。当使用较低纯度的磷脂酰丝氨酸（例如，50%大豆磷脂酰丝氨酸）作为起始材料时，可以对较低纯度的磷脂酰丝氨酸进行提取步骤以除去不需要的杂质诸如核酸酶。

[0072] 晶洞脂质卷

在一些实施方式中，本公开的脂质卷是晶洞脂质卷或晶洞状物（geodate），如例如美国专利公开2013/0224284中所描述，其全部公开内容通过引用并入本文。晶洞脂质卷进一步包含含有带负电荷的磷脂的脂质单层，其中脂质单层包围疏水结构域（诸如油）和分散在疏水结构域内的负载部分（诸如本文所述的抗真菌化合物）。脂质单层隔离在晶洞脂质卷的脂质多层内。

[0073] 如本文所使用，“疏水结构域”是在性质上有足够的疏水性以允许围绕其周边形成脂质单层的组合物。疏水结构域通常包括与负载部分（诸如本公开的抗真菌化合物，诸如AmB）缔合的疏水性组合物（诸如油或脂肪）。在某些实施方案中，疏水结构域（HD）与晶洞脂质卷的磷脂组分（PPLGD）之间的比率HD:PPLGD或蓖麻油结构域（COD）与晶洞脂质卷的磷脂组分（PPLGD）之间的比率COD:PPLGD是1:20或更少，1:15或更少，1:10或更少，1:8或更少，1:6或更少，1:5或更少，1:4或更少，1:3.5或更少，1:3或更少，1:2.75或更少，1:2.5或更少，1:2.25或更少，1:2或更少，1:1.75或更少，1:1.5或更少，1:1.25或更少，1:1或更少。

[0074] 图5示出了可以如何制造晶洞脂质卷的示例性示意图。在该示例性方法中，将磷脂（表示为开环）与疏水结构域（带阴影圆圈）（诸如油）组合，并混合以形成包含脂质体和围绕

疏水结构域的脂质单层的稳定乳液。负载部分(诸如抗真菌化合物等)可以分散在疏水结构域内。疏水结构域将磷脂包埋在其表面中。不旨在受任何理论的束缚,据信磷脂的疏水酰基链在疏水结构域内,导致疏水结构域具有亲水表面(由于磷脂头基的涂覆)并形成稳定的乳液。如果磷脂是带负电荷的,诸如磷脂酰丝氨酸,则加入二价阳离子诸如钙会引起包含交替的二价阳离子和磷脂双层的结晶结构(或脂质多层)的形成。脂质多层用阴影表示。在晶洞脂质卷中,围绕疏水结构域的脂质单层被“包壳”或“包埋”在结晶基质内,类似于“晶洞”。

[0075] 药物组合物

可将如本文所述的脂质卷组合物作为药物组合物制备。用于本文所公开的药物组合物的合适的制剂形式包括例如片剂、胶囊剂、软胶囊剂、颗粒剂、散剂、混悬剂、乳剂、微乳剂、纳米乳剂、单位剂型、环、膜、栓剂、溶液剂、乳膏剂、糖浆剂、透皮贴剂、软膏剂和凝胶剂。然而,典型地,脂质卷制备用于粘膜(例如口服或鼻内,典型地是口服)施用。

[0076] 药物组合物可包括其他药学上可接受的赋形剂,诸如各种pH和离子强度的缓冲剂(例如Tris-HCl、乙酸盐、磷酸盐);添加剂,诸如白蛋白或明胶,以防止吸附于表面;蛋白酶抑制剂;渗透促进剂;增溶剂(例如甘油、聚乙烯甘油(polyethylene glycerol));抗氧化剂(例如抗坏血酸、焦亚硫酸钠、丁基化羟基苯甲醚);稳定剂(例如羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素);增粘剂(例如卡波姆、胶体二氧化硅、乙基纤维素、瓜尔胶);甜味剂(例如阿斯巴特、柠檬酸);防腐剂(例如硫柳汞、苯醇、对羟基苯甲酸酯类);流动助剂(例如胶体二氧化硅)、增塑剂(例如邻苯二甲酸二乙酯、柠檬酸三乙酯);乳化剂(例如卡波姆、羟丙基纤维素、月桂基硫酸钠);聚合物包衣(例如泊洛沙姆或泊洛沙胺、乙酸琥珀酸羟丙甲纤维素);包衣和成膜剂(例如乙基纤维素、丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯、乙酸琥珀酸羟丙甲纤维素);佐剂;用于液体制剂的药学上可接受的载体,诸如水性(水、醇性/水性溶液、乳液或混悬液,包括盐水和缓冲介质)或非水性(例如丙二醇、聚乙二醇和可注射有机酯例如油酸乙酯)溶液、混悬液、乳液或油;以及胃肠外溶媒(用于皮下、静脉内、动脉内、鞘内或肌内注射),包括但不限于氯化钠溶液、林格氏葡萄糖、葡萄糖和氯化钠、乳酸化林格氏液和非挥发性油。

[0077] 在某些实施方案中,药物组合物包含盐,诸如NaCl或胆汁盐,诸如氧胆酸盐、胆酸盐、鹅脱氧胆酸盐、牛磺胆酸盐、甘氨胆酸盐、牛磺鹅脱氧胆酸盐、甘氨鹅脱氧胆酸盐、脱氧胆酸盐或石胆酸盐。胆汁盐是与阳离子(通常为钠)化合的胆汁酸。胆汁酸是主要存在于哺乳动物胆汁中的类固醇酸,可商购获得。在一个实施方案中,胆汁盐包括胆酸盐。在另一个实施方案中,胆汁盐包括脱氧胆酸盐。在另一个实施方案中,胆汁盐包括胆酸盐和脱氧胆酸盐。在另一个实施方案中,胆汁盐由胆酸盐和脱氧胆酸盐组成。

[0078] 在某些实施方案中,NaCl的浓度是1 mM至1M、1mM至0.5M、1mM至0.1M、1mM至50mM、10mM至100mM、10mM至50mM、0.1M至1M、0.1M至0.5M或0.5M至1M。在某些实施方案中,胆汁盐的浓度是1mM至100mM、1mM至50mM、1mM至25mM、1mM至10mM、1mM至5mM、0.1mM至5mM、0.1mM至1mM或0.1mM至0.5mM胆汁盐。

[0079] 通过实例提供这些赋形剂,且本领域技术人员将知晓存在可提供与本文所列举的那些相同的化学特征的其他或不同的赋形剂。

[0080] 剂量和施用

将如本文所公开的包含脂质卷组合物的药物组合物配制为与其预期的施用途径相容。实现该施用的方法对于本领域普通技术人员是已知的。这包括例如通过胃肠外途径(诸如

鞘内、静脉内、血管内、动脉内、皮下、肌内、腹膜内、心室内、硬膜内或其他)注射以及经口、经鼻、经眼、经直肠或局部施用。典型地，鼻内施用脂质卷，例如通过施用悬浮液，或口服施用，例如通过施用悬浮液、片剂、胶囊、软凝胶或其他口服剂型。

[0081] 在某些实施方案中，抗真菌剂(例如，脂质卷包封的两性霉素B、未经脂质卷包封的5-FC和/或未经脂质卷包封的氟康唑)以0.1-20 mg/kg, 5-10 mg/kg, 5-15 mg/kg, 10-15 mg/kg, 10-13 mg/kg, 10-20 mg/kg, 5-25 mg/kg, 1-30 mg/kg之间或2.5 mg/kg的剂量施用。例如，脂质卷包封的两性霉素B可以0.1mg/kg至10mg/kg，诸如1mg/kg的量施用。或者，可以下列固定剂量施用抗真菌剂：约200-1000 mg/天、400-1000 mg/天、200-800 mg/天、300-800 mg/天、400-800 mg/天、500-700 mg/天、200-2000 mg/天、100-4000 mg/天、100-600 mg/天、200-600 mg/天、400-600 mg/天或300-700 mg/天，包括但不限于约400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500或4000mg。例如，脂质卷包封的两性霉素B可以0.1mg/kg/天至4mg/kg/天，诸如0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、2、3、4 mg/kg/天的量施用两周。由于较低的毒性，可更频繁地施用脂质卷包封的抗真菌剂或持续比静脉内施用的抗真菌剂更长的时间。在某些实施方案中，可每天一次、每天两次、每天三次或每天四次施用脂质卷包封的抗真菌剂。在另一个实施方案中，每周一次、每周两次、每周三次或每周四次施用脂质卷包封的制剂。在一个实施方案中，可每周施用脂质卷包封的抗真菌剂2-3次。在其他实施方案中，每天施用脂质卷制剂，历时至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12周。在另一个实施方案中，每天施用脂质卷制剂，历时至少3个月、至少4个月，或至少6个月。典型地，施用脂质卷组合物历时两周。

[0082] 治疗方法

本发明的一个方面涉及一种治疗或预防由于隐球菌属引起的受试者的感染的方法，所述方法包括：向有此需要的受试者施用包含脂质卷组合物的制剂，其中所述脂质卷组合物包含至少两种抗真菌化合物，其中所述至少两种抗真菌化合物选自两性霉素B、5-氟胞嘧啶、氟康唑、酮康唑、雷夫康唑、阿巴康唑、伊曲康唑、泊沙康唑、艾沙康唑和/或伏立康唑，其中所述至少两种抗真菌化合物中的至少一种配制成脂质卷。

[0083] 在本发明方法中所用的脂质卷可使用脂质和如本文所述的方法来制备。在一些实施方案中，将所述至少两种抗真菌化合物配制在相同的脂质卷中。在其他实施方案中，将所述至少两种抗真菌化合物配制在不同的脂质卷中。典型地，所述至少两种抗真菌化合物是两性霉素B和5-氟胞嘧啶，并且两性霉素B配制成脂质卷。

[0084] 在一些实施方案中，感染涉及皮肤、肺、前列腺、骨和/或中枢神经系统(CNS)。典型地，感染涉及CNS，诸如脑膜。在一些实施方案中，感染是隐球菌性脑膜脑炎或隐球菌性脑膜炎。在一些实施方案中，由隐球菌属引起的感染是由*Cryptococcus neoformans*引起的。在其他实施方案中，感染是由加蒂隐球菌引起的。

[0085] 施用可以是口服、鼻内、鞘内或静脉内施用。然而，最典型的是，施用是口服施用。在一些实施方案中，每天施用脂质卷组合物历时至少7天，至少14天，至少21天，或至少28天。

[0086] 在一些实施方案中，将脂质卷组合物的抗真菌化合物递送至脑。在一些实施方案中，在口服施用后将脂质卷组合物的抗真菌化合物递送至脑。在一些实施方案中，本公开的脂质卷组合物具有将真菌菌落形成单位(CFU)减少至少5%，诸如至少8%的能力。更优选

地,AmB脂质卷可以将脑中的CFU减少例如至少10%,诸如至少25%,甚至更优选地50%、75%、85%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%或100%。落在这些范围和值之间的所有单个值和范围都在本发明的范围内。菌落形成单位的减少可以是体内或体外的。

[0087] 本文所用的术语“受试者”是指任何动物,包括但不限于人、小鼠、大鼠、兔、非人灵长类动物或任何其他哺乳动物。在一个实施方案中,受试者是灵长类动物。在另一个实施方案中,受试者是人。

[0088] 在一些实施方案中,受试者是免疫受损的受试者。例如,受试者可能患有HIV/AIDS、淋巴瘤、肝硬化或受试者可能已接受器官移植。在其他实施方案中,受试者是免疫活性个体。

[0089] 本公开还提供了一种治疗或预防由于隐球菌属引起的感染的方法,如本文所述,所述方法包括:向有此需要的受试者施用包含脂质卷的制剂,如本文所述,其中所述脂质卷包含抗真菌化合物,其中所述抗真菌化合物选自5-氟胞嘧啶、氟康唑、酮康唑、雷夫康唑、阿巴康唑、伊曲康唑、泊沙康唑、艾沙康唑和/或伏立康唑中的至少一种。

[0090] 其他考虑的用于本发明方法的抗真菌化合物包括能够抑制细胞壁组分合成的那些,诸如糖基磷脂酰肌醇(GPI)-锚定甘露糖蛋白,例如E1210。在其他实施方案中,用于该方法的抗真菌化合物是麦角甾醇合成抑制剂,诸如VT-1129,其口服可用,显示出良好的CNS渗透并且在感染隐球菌属的小鼠模型中是杀真菌的。

[0091] 在其他实施方案中,抗真菌化合物是口服可用的化合物,已知其与氟康唑对隐球菌属具有加和或协同活性。这样的抗真菌化合物包括胺碘达隆(心脏抗心律失常药物)、吩噻嗪(抗精神病药)和他莫昔芬(雌激素拮抗剂)。

[0092] 如本文使用,“预防”由于隐球菌属引起的感染包括防止感染复发。在用于防止感染复发的一些实施方案中,本发明的脂质卷组合物不含AmB。在一些实施方案中,预防由于隐球菌属引起的感染包括治疗对隐球菌属抗原呈阳性的哺乳动物或人(使用例如IMMY Inc. (Norman, OK) 隐球菌抗原试验)。

[0093] 毒性

与胃肠外施用未经脂质卷包封的抗真菌剂相比,口服给予脂质卷包封的抗真菌剂诸如AmB显示出降低的毒性。由于与其使用相关的潜在的例如肾毒性,用胃肠外、未经脂质卷包封的抗真菌剂诸如AmB治疗的受试者必须处于紧密的临床观察下。

[0094] 施用作为脂质卷制剂的一部分的抗真菌剂诸如AmB,降低了与该抗真菌剂相关的毒性并允许施用较高剂量的AmB。脂质卷包封的抗真菌剂如两性霉素B的较低毒性允许在较低剂量下以改善的功效和降低的毒性口服递送这样的抗真菌剂。或者,由于较低的毒性,包封的抗真菌剂可以更频繁地施用和/或以更高的剂量施用,而不良后果的风险更少。

实施例

[0095] 实施例1. 材料和方法

抗真菌剂

对脂质卷包封的两性霉素B(CAMB)(单独或与5-氟胞嘧啶或氟康唑组合)的制剂和施用途径进行评价并与FUNGIZONE®进行比较以评估哪个处理对清除小鼠中的新型隐球菌最有效,通过隐球菌接种后的存活来测定。评价的制剂、剂量和施用途径描述于下表1-3中。

[0096] CAMB使用良好生产规范 (GMP) 如美国公开号2014/0220108和图4所述制备。评估了另外的CAMB制剂,这些制剂也根据GMP制造,包括在脂质体形成后进行声波处理以进一步减少如上所述的脂质卷大小的那些,以及在脂质卷制备期间被修饰以包括聚集抑制剂(牛血清白蛋白或淡奶油和牛奶)或大小选择剂(例如,脱氧胆酸盐)的制剂。其他评估的CAMB GMP制剂包括使用2.5:1而不是10:1的脂质与两性霉素B比率制备的包含脂质卷的那些。参见表2和表3。

[0097] 5-氟胞嘧啶 (5-FC), $C_4H_4FN_3O$, (Sigma Aldrich, Inc. St. Louis, MO) 和 FUNGIZONE® (两性霉素B去氧胆酸盐,由National Institutes of Health Department of Veterinary Resources, Bethesda, MD提供) 根据制造商的说明书重构并在无菌水中稀释。在研究期间,FUNGIZONE® 每周用新的重构小瓶更换并在每次使用后冷藏。氟康唑 (99%), $C_{13}H_{12}F_2N_6O$, 得自Alfa Aesar, Thermo-Fisher Scientific, Inc., Ward Hill, MA。

[0098] 传染性菌株和培养条件

将小鼠用*C. neoformans*, 菌株H99/ATCC 208821, (American Type Culture Collection, Rockville, MD) 接种,制备如下。将来自新型隐球菌悬浮液的细胞划线到酵母提取粉胨葡萄糖 (YPD) 琼脂板上,然后将其在37°C下温育48小时。将分离良好的菌落重新悬浮于包含氯霉素的25毫升YPD肉汤中,并在振荡培养箱上的烧瓶中于37°C下温育过夜。通过以4,000rpm离心5分钟回收细胞,并通过重悬浮和离心在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中洗涤两次。通过血细胞计数法定量挑战生物体,并用PBS稀释至终浓度为 10^5 个生物体/毫升。通过连续稀释新型隐球菌悬浮液并将接种物铺板在YPD琼脂板上来确认活菌数。

[0099] 新型隐球菌感染通过在记录初始体重之后经由侧尾静脉注射在0.1毫升PBS中的 10^4 个H99细胞来诱导。产生全身感染,在14至24天内导致未治疗的对照组完全死亡。在整个实验中使用雌性Hsd:ND4 Swiss Webster Outbred小鼠(年龄:9至10周;体重:20至29克) (Harlan Laboratories, Frederick, MD (Now Envigo, Inc.))。小鼠已允许在感染前适应环境一周并保持在微隔离笼中。

[0100] 进行了三个不同的处理试验。在第一个试验中,通过口服管饲法 (PO) 用50毫克/千克/天 (mg/kg/天) 的CAMB或通过腹膜内 (IP) 注射用5 mg/kg/天的FUNGIZONE® 处理感染小鼠 (表1)。每个处理组使用5只小鼠。在感染后24小时开始药剂施用,并且在测量体重后每天继续一次,连续历时28天。5只感染的未处理小鼠组用作对照。

[0101] 在第二个试验中,感染的小鼠通过PO、IP或皮下注射 (SQ) 用10mg/kg/天、25mg/kg/天或50mg/kg/天的CAMB处理。CAMB单独施用或与5-氟胞嘧啶联合施用。另外,用单独的5-氟胞嘧啶或单独的5mg/kg/天的FUNGIZONE® 处理感染的小鼠,每次通过IP注射施用 (表2)。如在第一次试验中,每个治疗组也使用5只小鼠,并且将5只感染的未治疗小鼠组用作对照。对于所示各组,每三天制备250 mg 5-氟胞嘧啶/250毫升无菌水,等分到干净的高压灭菌水瓶中并置于两组小鼠的笼中。在感染后72小时开始药剂施用,并且在测量体重后每天继续一次,连续历时28天。

[0102] 在第三个试验中,感染的小鼠通过PO或IP注射用5mg/kg/剂量、25mg/kg/剂量或50mg/kg/剂量的CAMB处理,单独施用或与5-氟胞嘧啶或氟康唑联合施用。小鼠也给予单独的5-氟胞嘧啶、单独的氟康唑或5 mg/kg/剂量的FUNGIZONE® (通过IP注射,单独或与5-氟

胞嘧啶组合) (表3)。在每日体重测量后,如表3中所述,动物每天给药一次或两次。每个处理组使用5只小鼠,5只感染的未处理小鼠组用作对照。对于所示各组,每三天制备250mg 5-氟胞嘧啶/250ml无菌水,等分到干净的高压灭菌水瓶中并置于四组小鼠的笼中。如所示,氟康唑通过口服管饲法以25mg/kg/天分两个剂量单独或组合施用。在感染后72小时开始药剂施用,并且每天继续一次,连续历时28天。

[0103] 三个试验中的每一个的存活和脑研究用于确定抗真菌效力。记录三个试验的每一个的死亡率。在死亡时对动物进行尸体剖检,在无菌条件下取出脑,称重,并在1毫升无菌水中匀浆。通过脑组织中新型隐球菌的浓度(单位为CFU/g)评价对抗真菌处理的微生物反应。将使用无菌PBS的系列稀释的经匀浆的脑一式两份铺板到YPD琼脂板上。将培养板在37°C下温育48小时,然后对CFU计数并计算每克脑组织的CFU数。该方法对 ≥ 10 CFU/g的检测敏感。培养阴性板的计数为0 CFU/g。

[0104] 实施例2. 结果

试验1

小鼠通过静脉内方式感染新型隐球菌菌株H99 (1×10^4 CFU), 1天后开始每日治疗, 历时28天, 如上所述并如图6所示, 然后跟踪60天。图6示出了在所指定时间每组的存活百分比。从图6中可以明显看出, 在1天的感染潜伏期后单独使用的CAMB导致80%的小鼠存活了60天, 这相当于注射两性霉素B去氧胆酸盐(FUNGIZONE®)并优于未处理的对照组(第20天显示100%死亡)。

[0105] 试验2

小鼠通过静脉内方式感染新型隐球菌菌株H99 (1×10^4 CFU)。3天后开始每日治疗, 历时28天, 如上所述并如表4和图7所示。跟踪小鼠直至垂死, 然后处死。实验在第188天终止, 其中第1组有1只小鼠存活。表4显示第1-11组的存活百分比。图7仅描绘了第1、2和4-6组的存活百分比。如表4所示, 未治疗小鼠的中位生存期为13天, 通过用FUNGIZONE® IP 5 mg/kg/天延长(61天, $p = 0.004$), 或通过P0、SQ或IP途径中的任何一种施用CAMB延长(33, 50, 84天, $p = 0.004$)。然而, 使用CAMB的存活通过使用IP途径来改进(84天, $p = 0.022$), 或者通过在饮用水中添加口服5-FC来改进(75天, $p < 0.05$)。

[0106] 通过在死亡时存在头部肿大和通过培养小鼠尸体的经匀浆脑部并随后从YPD板获得菌落来验证新型隐球菌相关的脑死亡(见表5)。培养的第1组中存活的一只小鼠包含225 CFU的新型隐球菌, 表明通过FUNGIZONE® IP进行了部分处理。

[0107] 基于11组测试化合物的存活率分析, 第1、2和6组中的小鼠存活时间最长, 在处理结束后超过了60天。可以得出结论, 第1组(FUNGIZONE® IP注射)、第2组(CAMB IP注射)和第6组(CAMB P0 + 在饮用水中的5-氟胞嘧啶)为小鼠提供了比其他治疗组更好的抗新型隐球菌存活率。对于口服处理, 添加5-FC比用单独的脂质卷包封的两性霉素B显著延长了存活率, 并且大致相当于FUNGIZONE® IP。

[0108] 试验3

小鼠通过静脉内方式感染新型隐球菌菌株H99 (1×10^4 CFU)。3天后开始每日治疗, 历时28天, 如上所述并如表6和图8所示。跟踪小鼠直至垂死, 然后处死。表6显示第1-11组的存活百分比。图8仅描绘了第1、2、6、8和9组的存活百分比。如表6所示, 未治疗小鼠的中位生存期为19天, 通过用FUNGIZONE® IP 5 mg/kg/天 + 5-FC 延长(80天, $p = 0.003$), 或通过

PO或IP途径每天给予CAMB延长(分别为35或49天; $p = 0.003$)。每日两次给药导致更短存活的趋势,这可能是由于重复的损伤,导致减少的PO摄取或CAMB胃肠毒性(31 天 vs. 35 天, $p =$ 无统计学显著性 (NS))。口服CAMB制剂的存活通过添加在饮用水中的5-FC来提高(102天, $p = 0.002$ vs. 单独口服CAMB)或者通过添加口服氟康唑来提高(尽管未大到一定的程度) (56天, $p = 0.002$)。

[0109] 实验在第151天终止,第6组(CAMB + 5-FC组)有一只小鼠存活。新型隐球菌相关的脑死亡通过在死亡时存在头部肿大和通过培养小鼠尸体的经匀浆脑部并随后从YPD板获得菌落来验证。参见表7和图9中的CFU数/g脑组织。

[0110] 实施例3. 口服施用后荧光脂质卷的脑局域化

为了确定CAMB是否真正递送到脑组织,三只小鼠通过尾静脉感染 10^4 新型隐球菌, 菌株H99且三只保持未感染的。5天后,来自每组的两只小鼠以10 mg/kg/天通过口服管饲法用罗丹明标记的CAMB (Rod-AmpB) 等同物每天处理一次,历时3天。(参见图10,研究设计的示意图)。在第7天处死小鼠并回收脑物质,匀浆并使用差分干涉对比 (DIC) 进行显微镜检查并观察荧光 (RFP)。

[0111] 图11描绘了该研究的结果。如图11所示,荧光成像表明用CAMB口服制剂治疗的小鼠的脑中大量的荧光颗粒。与在未感染小鼠中相比,在感染小鼠的大脑中递送增加明显。见图11。黑色箭头描绘了新型隐球菌包封的生物体,白色箭头描绘了脂质卷荧光(条=10毫米)。因此,该研究表明,CAMB被递送到感染新型隐球菌小鼠中的大脑,并且可以与5-FC组合用作有效的口服抗真菌剂,其相当于全身性的FUNGIZONE® + 5-FC,以治疗*C. neoformans* 感染。

[0112] 表1. 试验1给药组和施用途径

组号	处理	施用途径	剂量/mg/kg/天
	未处理	未施用	未施用
1	FUNGIZONE® (两性霉素B脱氧 胆酸盐)	IP	5
2	CAMB	PO	50

表2. 试验2给药组和施用途径

组号	处理	施用途径	剂量/mg/kg/天
	未处理	未施用	未施用
1	FUNGIZONE®	IP	5
2	CAMB	IP	10
3	CAMB	SQ	10
4	5-氟胞嘧啶 (5-FC)	口服	250 在饮用水中
5	CAMB	PO	25
6	CAMB + 5-FC	PO, 口服	25 + 250 在饮用水中
7	CAMB-S	PO	25
8	CAMB-S-脱氧胆酸盐	PO	25
9	CAMB-S-BSA	PO	25
10	CAMB-S-FAT	PO	25
11	CAMB 2.5:1-S	PO	25

S = 声波处理, BSA = 牛血清白蛋白, FAT = 50/50 淡奶油和牛奶,

IP=腹膜内, SQ = 皮下, PO=口服管饲

S = 声波处理, BSA = 牛血清白蛋白, FAT = 50/50 淡奶油和牛奶,

IP=腹膜内, SQ = 皮下, PO=口服管饲

表3. 试验3 给药组和施用途径

组号	处理	施用途径	CAMB 剂量 (mg/kg)	CAMB 方案	CAMB 每日剂 量 (mg/kg)	其他方案	其他每 日剂量 (mg/kg)
	未处理	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
1	FUNGIZONE® + 5-FC	IP	N/A	N/A	N/A	QD ² ; 水	5; 250
2	CAMB	IP	5	QD	5	N/A	N/A
3	CAMB USPS ¹	PO	25	BID ³	50	N/A	N/A
4	CAMB	PO	25	QD	25	N/A	N/A
5	CAMB	PO	25	BID	50	N/A	N/A
6	CAMB + 5-FC	PO	25	QD	25	水	250
7	CAMB + 5-FC	PO	25	BID	50	水	250
8	5-FC	PO	N/A	N/A	N/A	水	250
9	CAMB + 氟康唑	PO	25	QD	25	PO; BID	25
10	CAMB + 氟康唑	PO	25	BID	50	PO; BID	25
11	氟康唑	PO	N/A	N/A	N/A	PO; BID	25

¹ 超小粒径

² 每日一次

³ 每天两次

表4 来自表2的各组的中位生存期

组号和处理	mg/kg/天	中位生存期	vs. 对照*	vs. FUNGIZONE®*	vs. CAMB PO*
未处理对照	N/A	13			
1. FUNGIZONE® IP	5	61	0.004		
2. CAMB IP	10	84	0.004	NS**	0.022
3. CAMB SQ	10	50	0.004	NS**	NS**
4. 5-氟胞嘧啶 (5-FC) 口服	250	34	0.004	0.002	
5. CAMB PO	25	33	0.004	NS**	
6. CAMB PO + 5-FC 口服	25, 250	75	0.004	NS**	0.049
7. CAMB-S PO	25	34			
8. CAMB S-脱氧胆酸盐 PO	25	34			
9. CAMB-S-BSA PO	25	33			
10. CAMB-S-FAT PO	25	34			
11. CAMB 2.5:1-S PO	25	38			

*N = 每组5只小鼠; log 等级 (Mantel-Cox, 单变量)

**NS=无统计学显著性

表5 脑部的CFU/g数(来自表2的各组)

组号和处理	小鼠 1	小鼠 2	小鼠 3	小鼠 4	小鼠 5
未处理对照	3,600,000	3,000,000	8,700,000	7,900,000	6,700,000
1. FUNGIZONE® IP	4,100,000	4,200,000	12,000,000	6,700,000	0
2. CAMB IP	3,700,000	8,700,000	1,500,000	1,000,000	10,000,000
3. CAMB SQ	12,500,000	8,700,000	8,200,000	2,100,000	2,500,000
4. 5-氟胞嘧啶 (5-FC) 口服	1,700,000	5,100,000	17,400,000	8,300,000	3,200,000
5. CAMB PO	5,900,000	10,700,000	5,100,000	2,600,000	6,700,000
6. CAMB PO + 5-FC 口服	6,000,000	4,300,000	7,300,000	720,000	14,000,000
7. CAMB-S PO	4,100,000	5,100,000	9,400,000	2,900,000	10,300,000
8. CAMB S-脱氧胆酸盐 PO	3,000,000	18,400,000	9,000,000	3,100,000	2,700,000
9. CAMB-S-BSA PO	18,200,000	11,500,000	11,100,000	4,400,000	10,700,000
10. CAMB-S-FAT PO	25,200,000	8,600,000	2,000,000	72,000,000	5,000,000
11. CAMB 2.5:1-S PO	19,200,000	7,000,000	3,800,000	3,000,000	5,000,000

表6. 来自表3各组的中位生存期

组, 处理, 频率和施用途径	剂 量 (mg/kg/ 天)	中位生 存 期 (天)	vs. 对 照*	vs. FUNGIZONE® + 5-FC*	vs. CAMB PO 每天*
未处理	N/A	19	N/A		
1. FUNGIZONE® IP + 5-FC 口服	5	80	0.003		
2. CAMB IP QD	5	49	0.003	0.002	0.01
3. CAMB USPS ¹ PO BID	50	42	0.003	0.003	NS**
4. CAMB PO, QD	25	35	0.003	0.002	
5. CAMB PO, BID	50	31	0.025	0.002	
6. CAMB PO, QD+ 5-FC 口服	25, 250	102	0.003	NS**	0.002
7. CAMB PO BID + 5-FC 口服	50, 250	62	0.043	0.016	
8. 5-FC 口服	250	47	0.003	0.002	
9. CAMB PO QD + 氟康唑 PO BID	25, 25	56	0.003	0.002	0.002
10. CAMB PO BID + 氟康唑 PO BID	50, 25	67	0.003	NS**	
11. 氟康唑 PO BID	25	53	0.003	0.002	

¹超小粒径

*N = 每组5只小鼠; log 等级 (Mantel-Cox, 单变量)

**NS=无统计学显著性

表7. CFU/g脑组织数(来自表3的各组)

组号和处理	小鼠 1	小鼠 2	小鼠 3	小鼠 4	小鼠 5
未处理	15,400,000	7,300,000	17,800,000	9,800,000	6,000,000
1. FUNGIZONE® IP + 5-FC 口服	3,500,000	15,400,000	9,000,000	73,000,000	12,700,000
2. CAMB IP QD	4,800,000	4,600,000	6,900,000	2,600,000	11,900,000
3. CAMB USPS ¹ PO BID	18,300,000	9,400,000	9,100,000	30,000,000	1,830,000
4. CAMB PO, QD	14000	142,000	9,300,000	12,900,000	6,400,000
5. CAMB PO, BID	14,000,000	21000	249,000	1,310,000	8,300,000
6. CAMB PO, QD+ 5-FC 口服	5,200,000	9,200,000	8,600,000	3,900,000	3,400,000
7. CAMB PO BID + 5-FC 口服	20000	6,300,000	8,100,000	9,900,000	6,800,000
8. 5-FC 口服	10,800,000	8,500,000	7,300,000	15,000,000	5,800,000
9. CAMB PO QD + 氟康唑 PO BID	8,200,000	2,100,000	18,000,000	9,700,000	5,800,000
10. CAMB PO BID + 氟康唑 PO BID	16,200,000	11,700,000	7,500,000	5,700,000	31,000,000
11. 氟康唑 PO BID	4,200,000	4,300,000	3,900,000	6,800,000	11,300,000

¹超小粒径

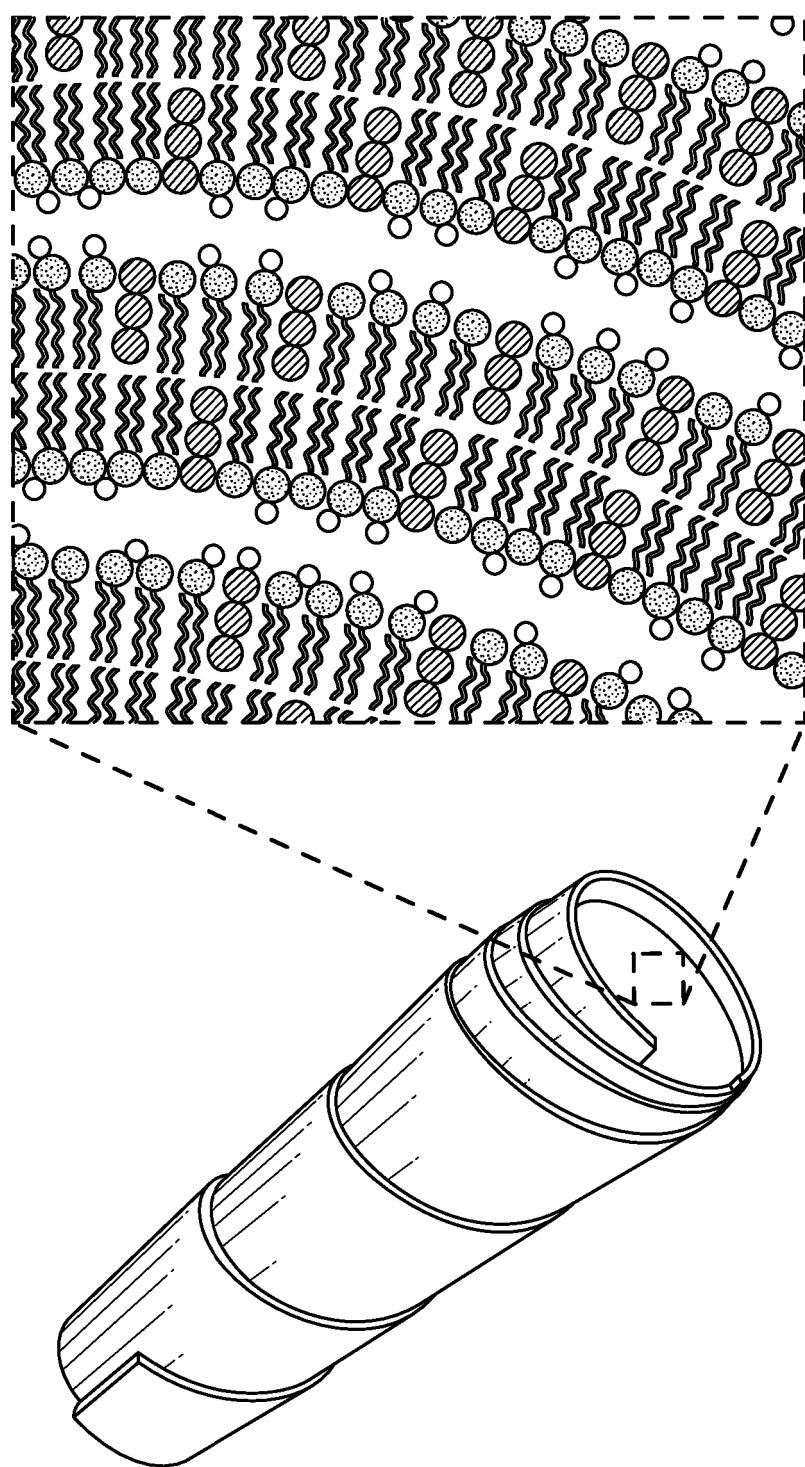


图 1

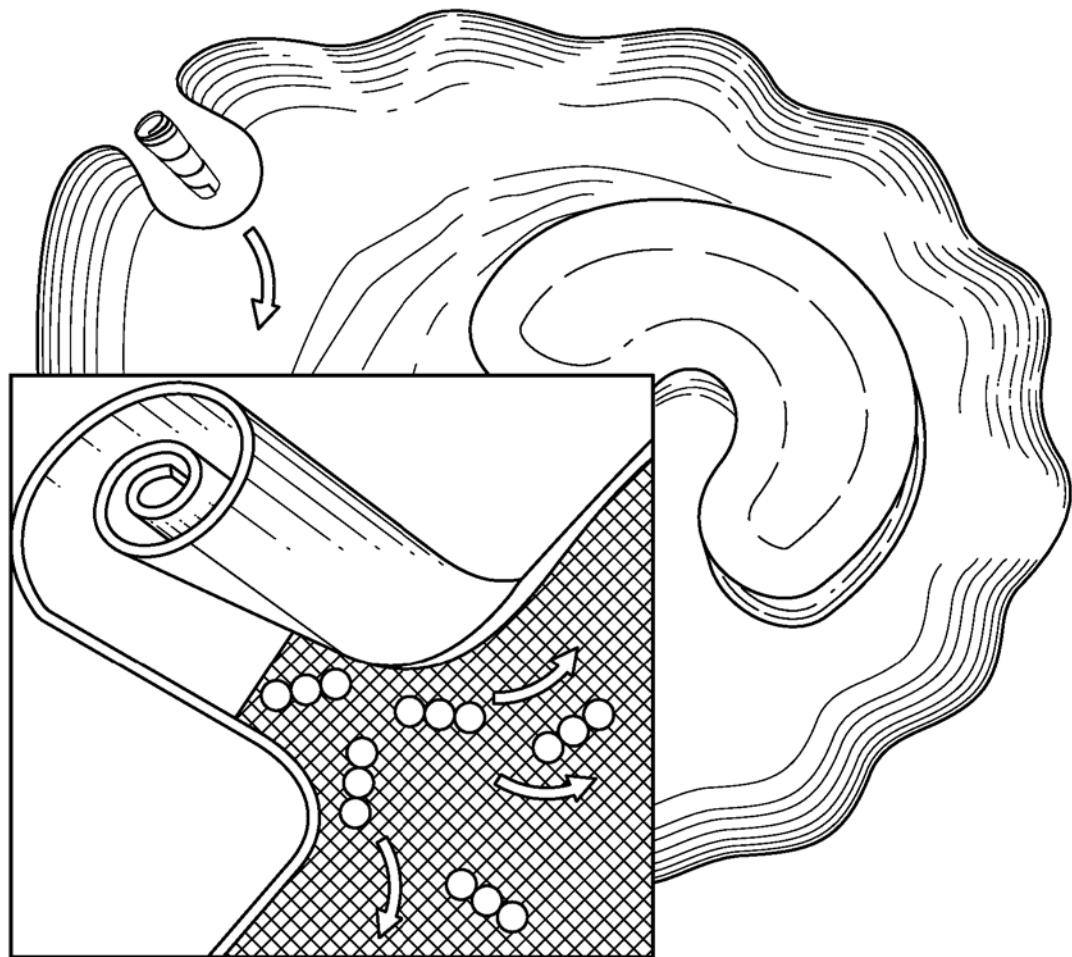


图 2

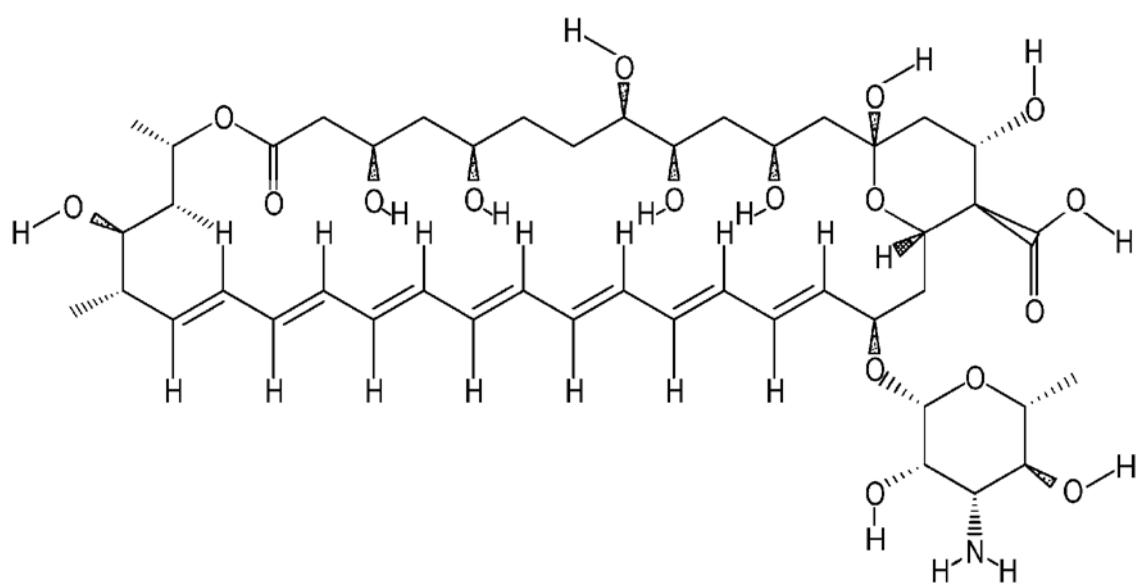


图 3

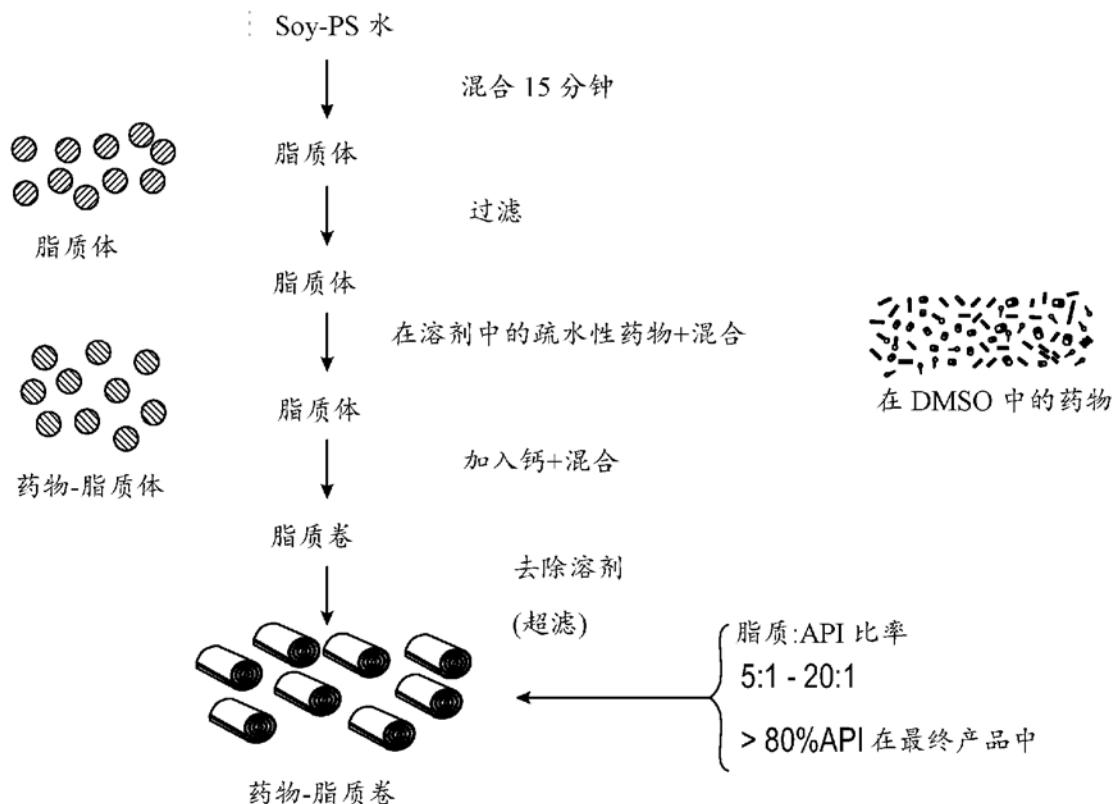


图 4

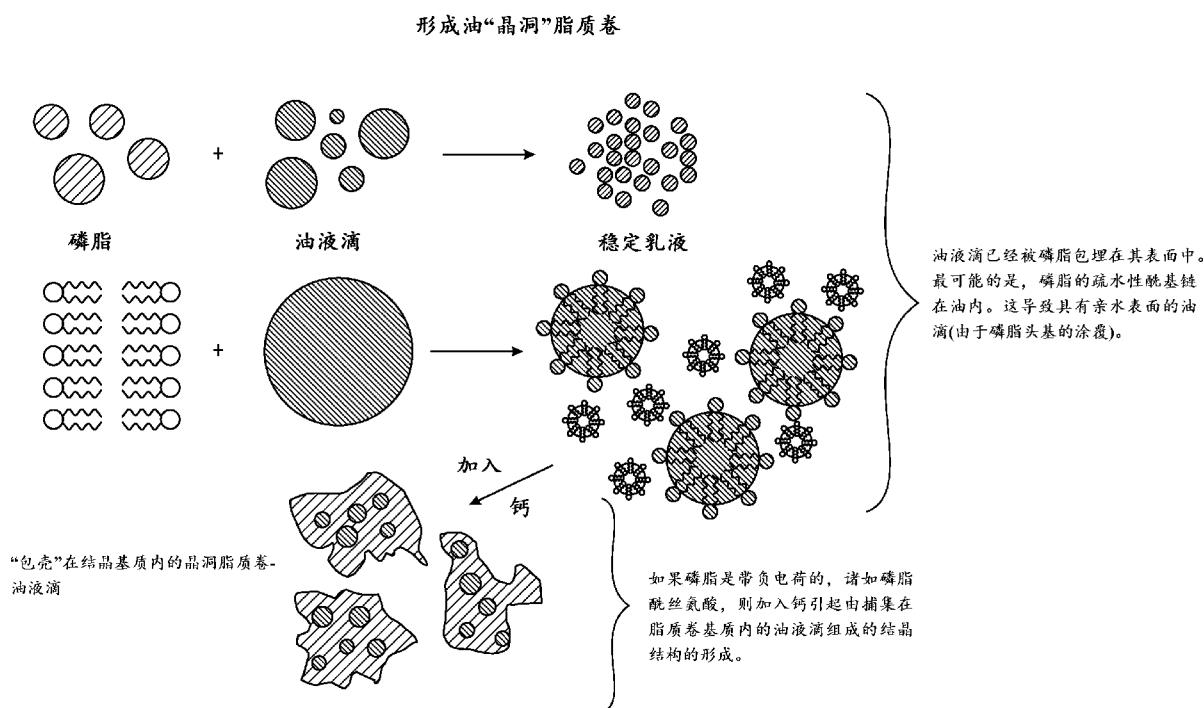


图 5

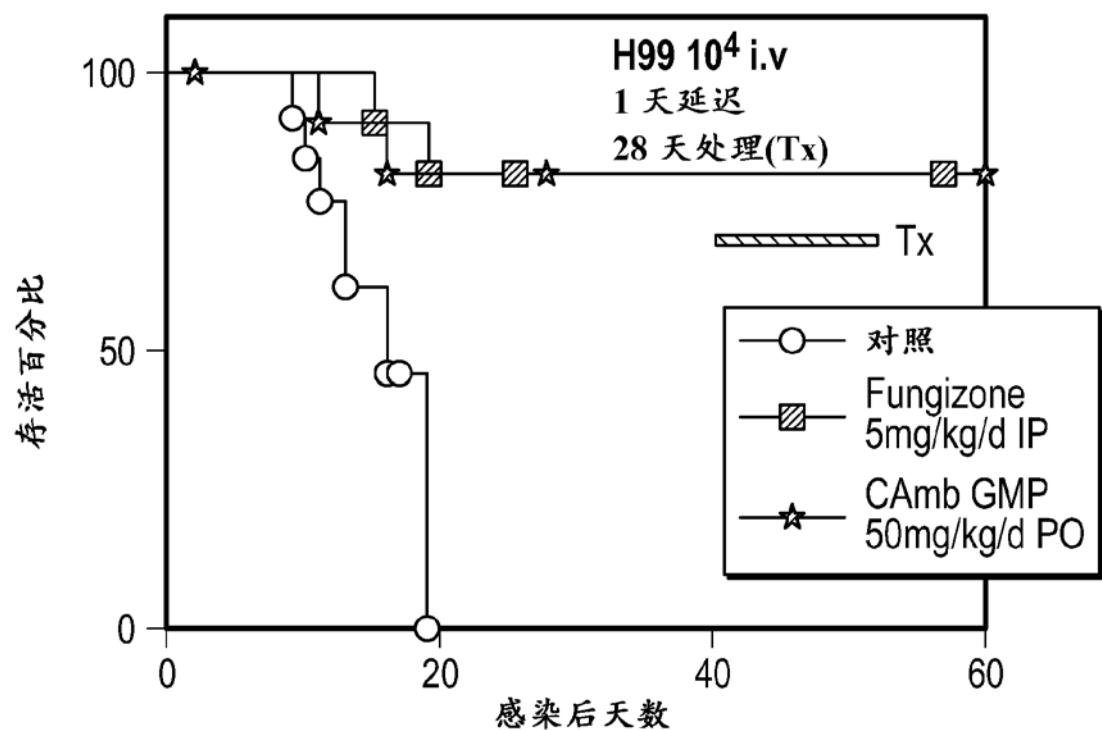


图 6

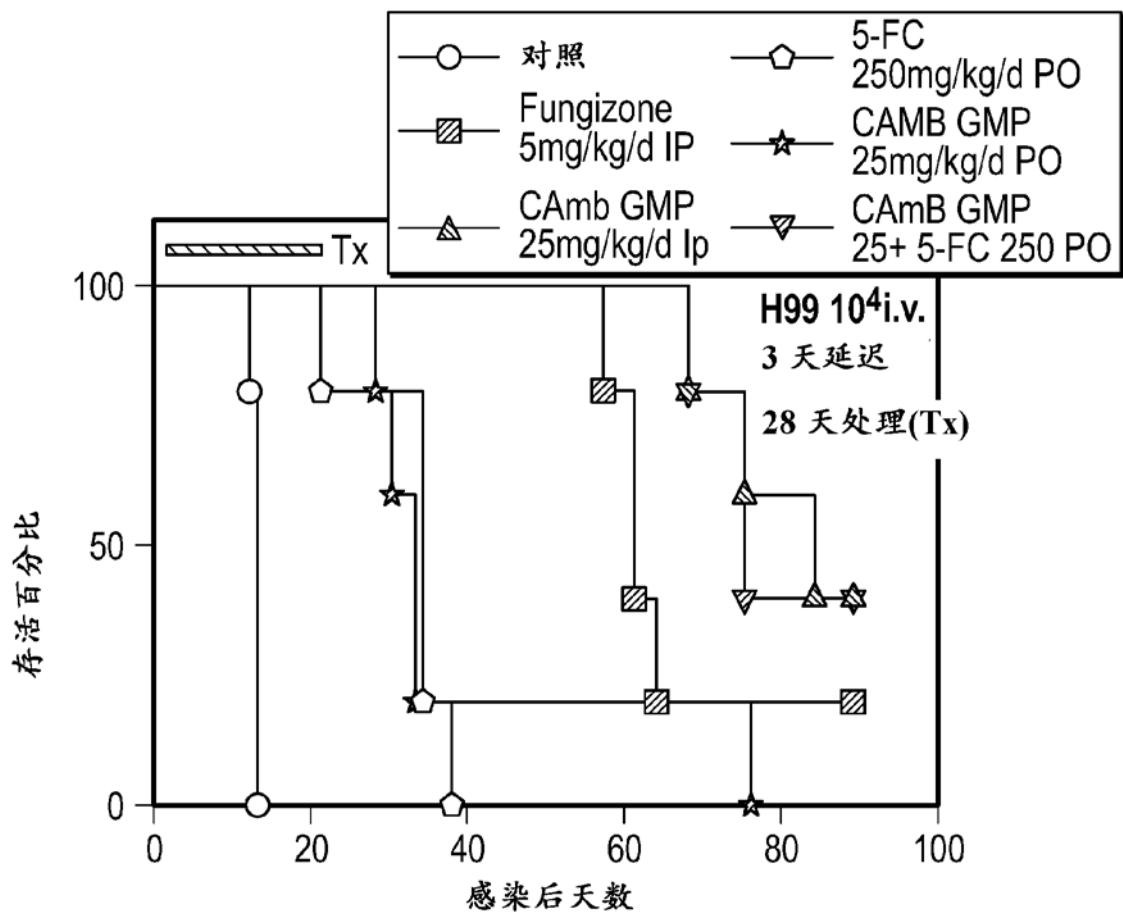


图 7

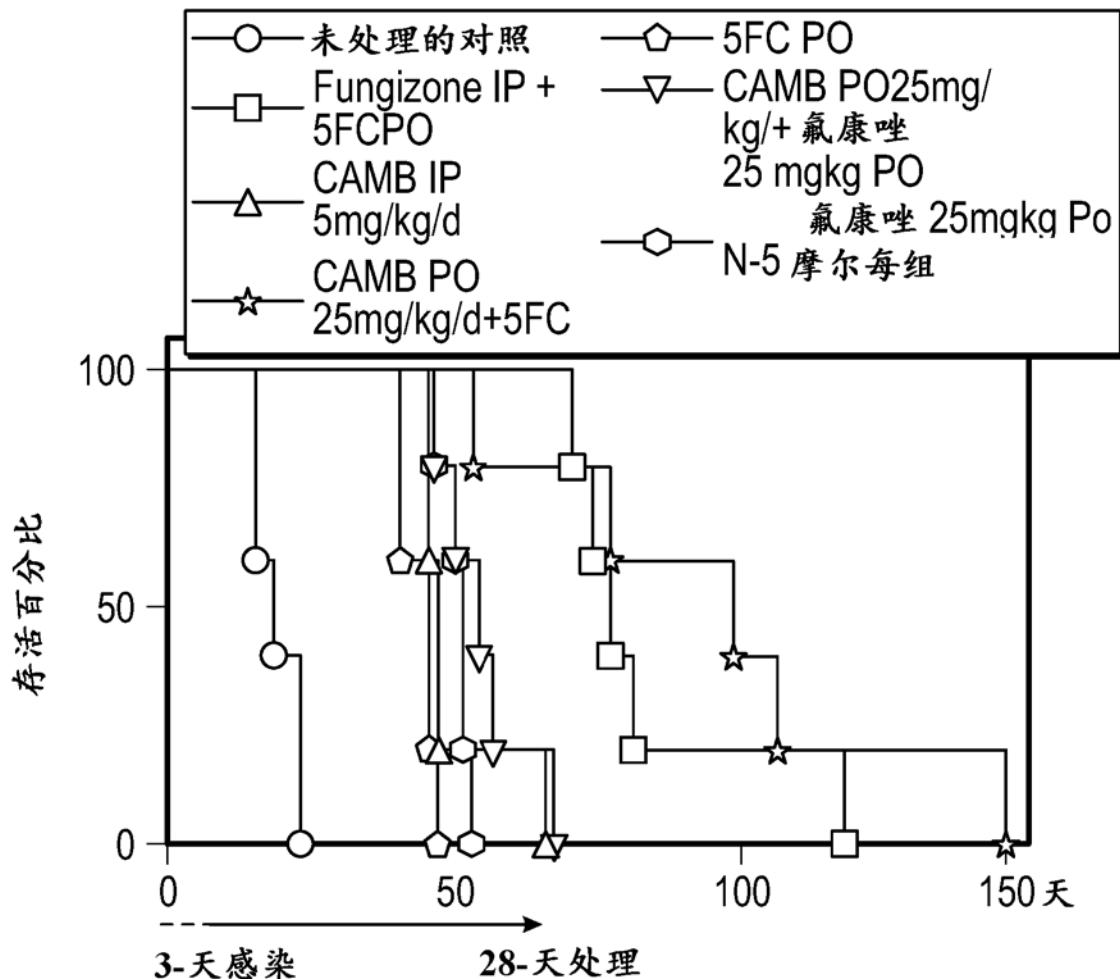


图 8

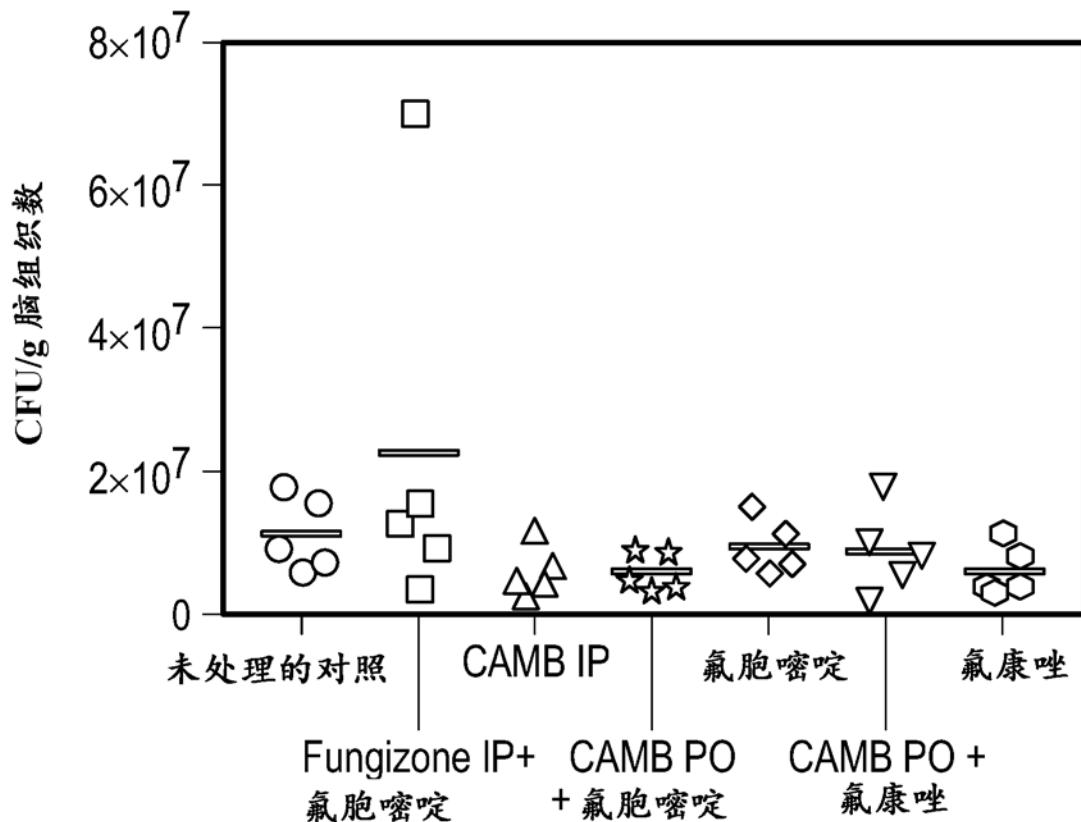


图 9

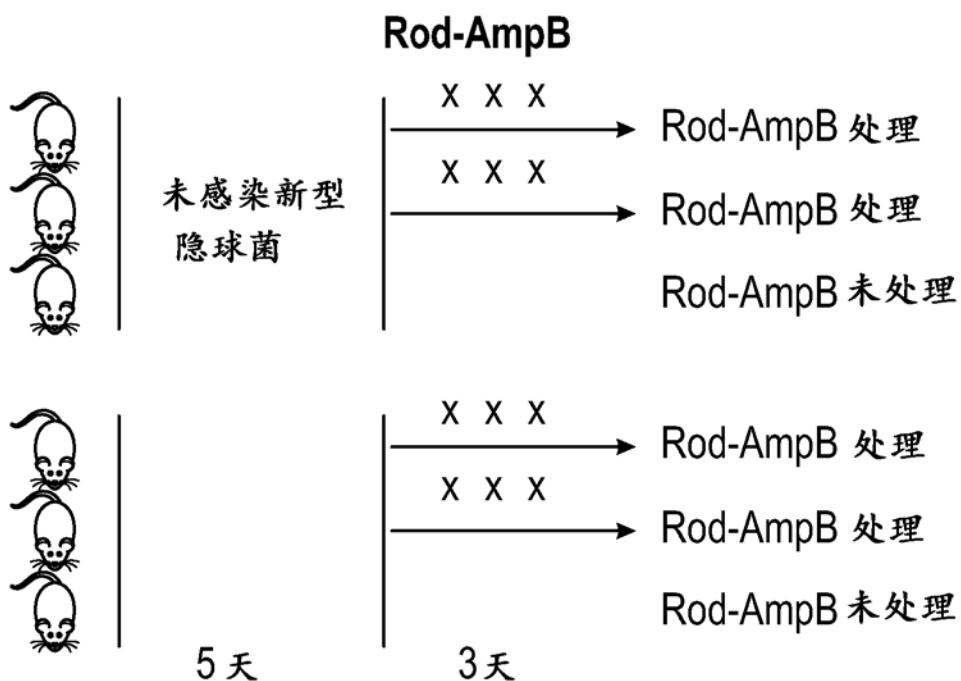


图 10

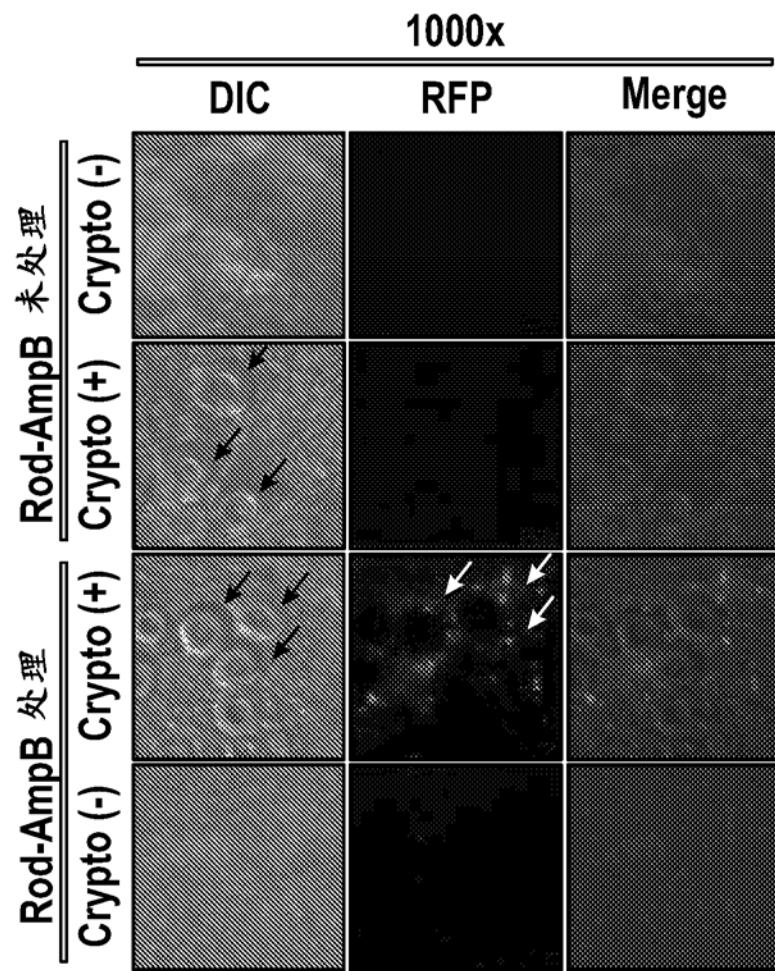


图 11