



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02812195.3

[43] 公开日 2005 年 3 月 16 日

[11] 公开号 CN 1596129A

[22] 申请日 2002. 6. 19 [21] 申请号 02812195. 3
[30] 优先权
[32] 2001. 6. 21 [33] DE [31] 10129369. 0
[86] 国际申请 PCT/EP2002/006764 2002. 6. 19
[87] 国际公布 WO2003/000738 德 2003. 1. 3
[85] 进入国家阶段日期 2003. 12. 18
[71] 申请人 费森尤斯卡比德国有限公司
地址 德国巴特洪堡
[72] 发明人 K·佐默迈尔

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
代理人 黄革生 林柏楠

权利要求书 6 页 说明书 14 页

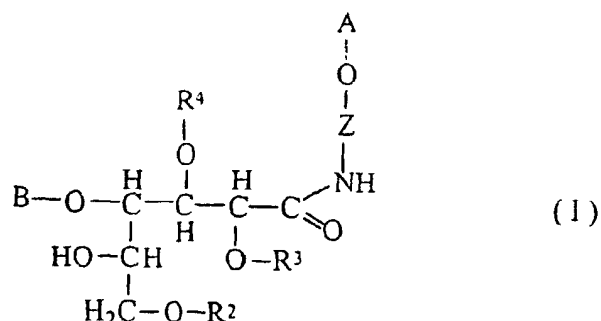
[54] 发明名称 多糖结合物形式的含有氨基糖的水溶性抗生素

[57] 摘要

本发明涉及含氨基糖的抗生素，两性霉素 B、柔毛霉素和阿霉素的新的药物形式，在这些药物形式中已知的副作用降低，因此它们可以以简单的方式使用。抗真菌剂两性霉素 B 具有肾毒性。细胞抑制剂柔毛霉素和阿霉素都具有显著的心脏毒性。这些新的药物形式是抗生素-淀粉结合物，其中抗生素与多糖的还原端以肽键结合。按照本发明，实现所述键合的方法是在碱性水溶液中对淀粉衍生物的还原端进行 I₂ 氧化，并使氧化后的淀粉衍生物与抗生素在有机溶剂中偶联。所得结合物的毒性降低。多糖部分可以被血清 α-淀粉酶降解，所述肽键能够受到酶的进攻。

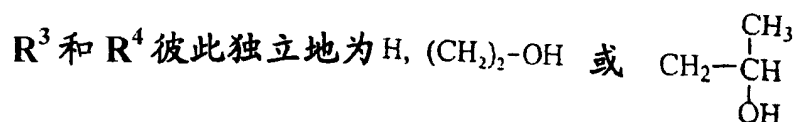
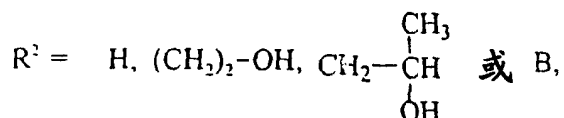
ISSN 1008-4274

1. 含有氨基糖的水溶性抗生素衍生物，其为通式(I)的多糖结合物形式：



其中

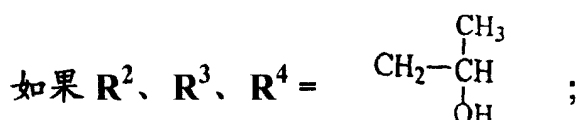
B = 以 1,4 键结合的聚合物，选自羟乙基淀粉、羟丙基淀粉、可溶性直链淀粉、羟乙基化和/或羟丙基化形式的可溶性直链淀粉、可溶性支链淀粉、以及羟乙基化和/或羟丙基化形式的可溶性支链淀粉；



条件是

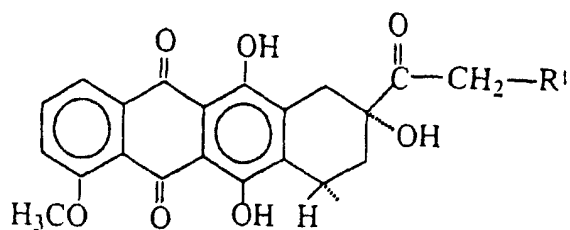
如果 $\text{R}^2 = \text{R}^3 = \text{R}^4 = \text{H}$ ，则 B = 直链淀粉或支链淀粉；

如果 $\text{R}^2, \text{R}^3, \text{R}^4 = (\text{CH}_2)_2-\text{OH}$ ，则 B = 羟乙基淀粉、羟乙基化支链淀粉或羟乙基化直链淀粉；



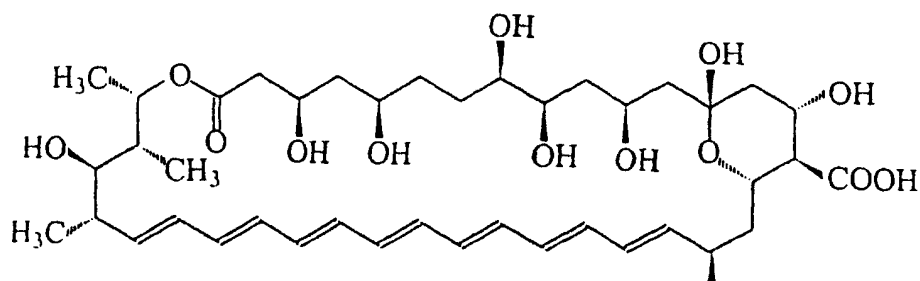
则 B = 羟丙基淀粉、羟丙基化支链淀粉或羟丙基化直链淀粉;

A 为

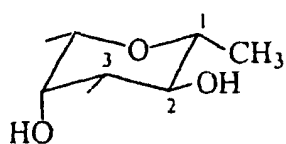


其中 $R^1 = H$ 或 OH

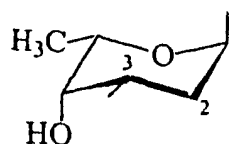
或是



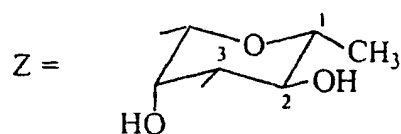
且 Z 是



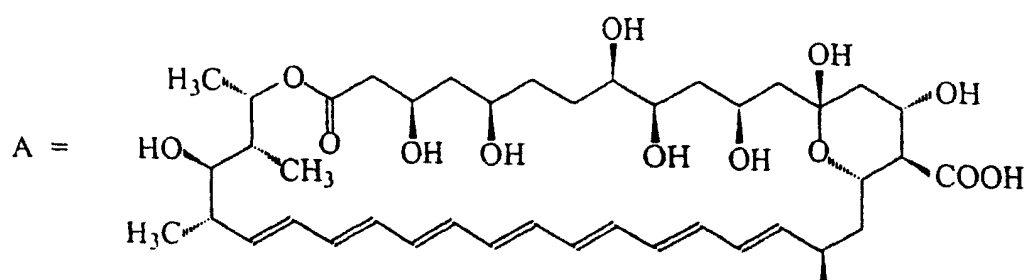
或



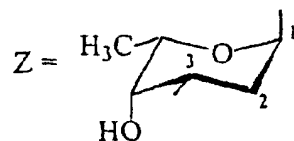
条件是, 如果



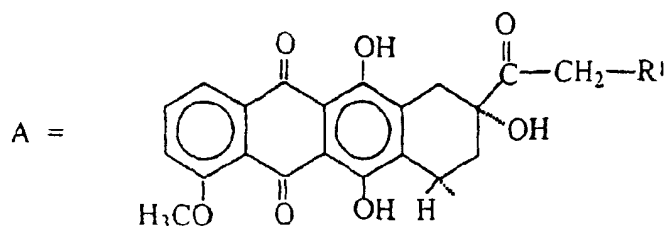
则



且如果



则



其中 $R^1 = H$ 或 OH ;

该结合物的多糖部分与抗生素的氨基糖的 C_3 位氨基结合而形成肽键。

2. 权利要求 1 的抗生素衍生物, 其特征在于抗生素与多糖部分的摩尔比为 1:1。

3. 权利要求 1 或 2 的抗生素衍生物, 其特征在于多糖部分由羟乙基淀粉组成。

4. 权利要求 1 至 3 的抗生素衍生物, 其特征在于羟乙基淀粉的平均分子量在 2000 至 2×10^6 道尔顿之间的范围。

5. 权利要求 3 或 4 的抗生素衍生物, 其特征在于羟乙基淀粉的平均聚合度至少为 15。

6. 权利要求 3 至 5 的抗生素衍生物, 其特征在于羟乙基淀粉的平均分子量大于 70000 道尔顿。

7. 权利要求 3 至 6 的抗生素衍生物, 其特征在于羟乙基淀粉的规格为 130/, 且取代级 MS 在 0.1-0.8 范围内。

8. 权利要求 7 的抗生素衍生物, 其特征在于羟乙基淀粉的取代级 MS 在 0.3-0.5 范围。

9. 权利要求 3 至 8 中任一项的抗生素衍生物, 其特征在于羟乙基淀粉的 C_2/C_6 取代比例在 2-12 范围。

10. 权利要求 9 的抗生素衍生物, 其特征在于羟乙基淀粉的 C_2/C_6 取代比例在 5-11 范围。

11. 权利要求 3 至 10 中任一项的抗生素衍生物, 其特征在于羟乙基淀粉是以 α -1,4-糖苷键连接的非分支形式。

12. 权利要求 3 至 10 中任一项的抗生素衍生物, 其特征在于羟乙基淀粉是具有 α -1,4-糖苷键和 α -1,6-糖苷键的分支形式。

13. 权利要求 1 至 12 中任一项的抗生素衍生物, 其特征在于抗生素为两性霉素 B。

14. 权利要求 1 至 12 中任一项的抗生素衍生物, 其特征在于抗生素为柔毛霉素。

15. 权利要求 1 至 12 中任一项的抗生素衍生物, 其特征在于抗生素为阿霉素。

16. 制备权利要求 1 至 15 中任一项的抗生素-多糖结合物的方法, 其特征在于, 在碱性水溶液中使多糖的还原端氧化, 形成内酯环, 所得产物与含有氨基糖的抗生素在有机溶剂中一起反应, 形成抗生素-多糖结合物。

17. 权利要求 16 的方法, 其特征在于, 用 I_2 使多糖的还原端氧化。

18. 权利要求 16 或 17 的方法, 其特征在于, 氧化后的多糖与抗生素的偶联反应在有机溶剂中进行。

19. 权利要求 18 的方法, 其特征在于, 用二甲亚砜作为有机溶剂。

20. 权利要求 16 至 19 中任一项的方法, 其特征在于, 用淀粉或淀粉衍生物作为多糖。

21. 权利要求 20 的方法, 其特征在于使用羟乙基淀粉。

22. 权利要求 21 的方法, 其特征在于, 所使用的羟乙基淀粉的平均分子量在 2000 至 2×10^6 道尔顿之间。

23. 权利要求 21 或 22 的方法, 其特征在于, 所使用的羟乙基淀粉的平均聚合度至少为 15。

24. 权利要求 21 至 23 的方法, 其特征在于, 所使用的羟乙基淀粉的平均分子量大于 70000 道尔顿。

25. 权利要求 21 至 24 的方法, 其特征在于, 所使用的羟乙基淀粉的规格为 130/, 取代级 MS 在 0.1-0.8 范围内。

26. 权利要求 25 的方法, 其特征在于, 所使用的羟乙基淀粉的取代级 MS 在 0.3-0.5 范围。

27. 权利要求 21 至 26 中任一项的方法, 其特征在于, 所使用的羟乙基淀粉的 C_2/C_6 取代比例在 2-12 范围内。

28. 权利要求 27 的方法, 其特征在于, 所使用的羟乙基淀粉的 C_2/C_6 取代比例在 5-11 范围内。

29. 权利要求 21 至 28 中任一项的方法, 其特征在于, 使用具有 α -1,4-糖苷键的非分支羟乙基淀粉。

30. 权利要求 21 至 28 中任一项的方法, 其特征在于, 使用具有 α -1,4-糖苷键和 α -1,6-糖苷键的分支羟乙基淀粉。

31. 权利要求 21 至 30 中任一项的方法, 其特征在于, 使用羟丙基淀粉代替羟乙基淀粉。

32. 权利要求 16 至 31 中任一项的方法, 其特征在于所使用的抗生素为两性霉素 B。

33. 权利要求 16 至 32 中任一项的方法, 其特征在于所使用的抗生素为两性霉素 B。

34. 权利要求 16 至 32 中任一项的方法, 其特征在于, 所使用的抗生素为柔毛霉素。

35. 权利要求 16 至 32 中任一项的方法, 其特征在于, 所使用的抗生素为阿霉素。

36. 淀粉衍生物在制备用于对真菌感染进行全身性治疗的两性霉素 B 结合物中的用途。

37. 权利要求 36 的用途, 其特征在于淀粉衍生物为羟乙基淀粉。

38. 权利要求 36 的用途, 其特征在于淀粉衍生物为羟丙基淀粉。

39. 淀粉衍生物在制备用于癌症治疗的柔毛霉素结合物中的用途。

40. 权利要求 39 的用途, 其特征在于淀粉衍生物为羟乙基淀粉。

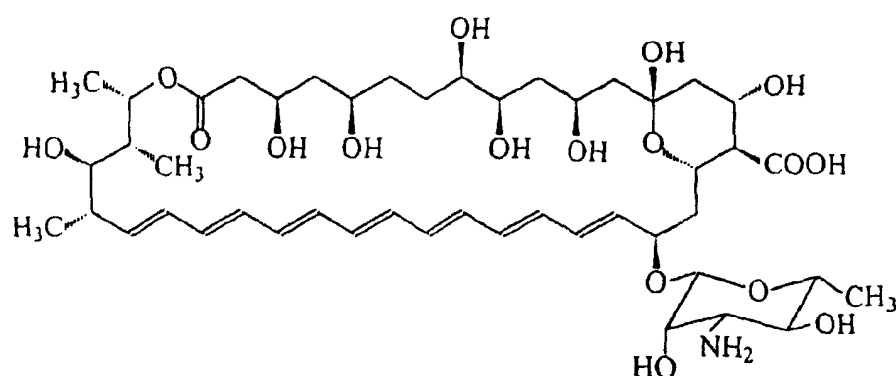
41. 权利要求 39 的用途，其特征在于淀粉衍生物为羟丙基淀粉。
42. 淀粉衍生物在制备用于癌症治疗的阿霉素结合物中的用途。
43. 权利要求 42 的用途，其特征在于淀粉衍生物为羟乙基淀粉。
44. 权利要求 45 的用途，其特征在于淀粉衍生物为羟丙基淀粉。

多糖结合物形式的含有氨基糖的水溶性抗生素

本发明涉及水溶性的、可口服或肠胃外给予的含氨基糖的抗生素制剂及其高产率低成本制备方法，其中所述制剂为与多糖形成的结合物形式，所述多糖是以淀粉或淀粉衍生物、特别是羟乙基淀粉和羟乙基淀粉为基础的。特别优选的多糖是羟乙基淀粉。两性霉素 B、柔毛霉素和阿霉素被特别认为是含有氨基糖的抗生素，因为它们都在氨基酸部分的 C₃ 位置含有氨基基团。

含有氨基糖的抗生素，两性霉素 B、柔毛霉素和阿霉素，在治疗上被广泛应用，而且常常是首选药物，但在某些情况中有严重的副反应。两性霉素 B 主要是肠胃外给予，而柔毛霉素和阿霉素则必须静脉给予。

两性霉素 B 是从结节链霉菌 (*Streptomyces nodosus*) 中分离的一种多烯抗生素。它在化学上为大环内酯 (macrolide)，在其 38 元内酯环内有 7 个均为反式构型的共轭双键，而该内酯环又通过 O-糖苷键与氨基糖 D-海藻糖胺键接。两性霉素 B 是兼性的，在分子内具有亲脂区和亲水区，这使得它能够与存在于真菌细胞质膜内的甾醇形成复合物，从而导致细胞通透性受损。由于细菌细胞膜不含甾醇，所以两性霉素 B 的抗生素作用选择性地针对真菌。



两性霉素 B

由于两性霉素 B 具有广谱的作用，该作用包括实际上所有致人疾病的真菌，所以它是用于全身性治疗人的真菌感染的首选药物。特别是在免疫系统受损的患者如 HIV 或癌症患者中，相关侵入性真菌感染的治疗近年来急剧增加。

另一方面，使用两性霉素 B 伴随有副作用，且这种副作用有时相对严重。在全身性真菌病和器官真菌病中，通常以 0.5-0.7mg/kg 体重的日剂量静脉给予两性霉素 B。然而，由于不同患者对两性霉素 B 的耐受性不同，所以必须对剂量进行个体调整或改变。此外，免疫系统受损的患者一般要求的剂量高于常量，例如 1mg/kg 体重的日剂量，这一剂量在重型疾病中（如果耐受性好）可以提高到 1.5mg/kg。在这一点上肠胃外给药的持续时间可以从数周延长至数月。

在肠胃外治疗的过程中，通常会发生典型的输液反应，例如发热、呕吐和颤抖的发作，对这些反应通常只是做对症治疗，不必中断输液治疗。但更为严重的是常常发生的肝功能障碍，特别是肾功能障碍。因此，例如，在治疗开始时，肾小球滤过率总是下降 40% 左右。所治疗的多数患者在整个治疗过程中都维持这种低肾小球滤过率。因此血清中的肌酸酐和血液中的尿素升高。偶尔甚至可在治疗期过后观察到不可逆损伤。治疗二至三周后，还常出现贫血，这会使血细胞比容水平降至 25-30%。但血细胞计数的变化一般在治疗结束后完全可以逆转。

由于两性霉素 B 具有毒性和副作用，因此应当只在有生命危险的情况下给药。另一方面，在由免疫系统失调（如艾滋病或器官移植后）引起的真菌病中，它又经常是唯一有效的药物。

尽管两性霉素在分子内有亲水域，但在整体上仍呈现出显著的疏水性质，因此在生理 pH 下几乎不溶于水，即便在有机溶剂中也只是微溶。因此，现有的市售制剂是结构较为复杂的药物形式，被一些额外的缺点所阻碍。用适宜的增溶剂如脱氧胆酸钠能提高水溶性。因此，例如，由 BRISTOL-MYERS SQUIBB 生产的用于输注的原初制剂（在德国可以以商品名“Amphotericin B”得到）是以干物质形式存在的，其必须在水中

重构而呈两性霉素 B 和脱氧胆酸钠在水中的胶束分散体形式。为获得立即可用的输注溶液，可以仅用无电解质载体溶液如 5% 葡萄糖溶液将所获得的原液稀释至所需的终浓度。

此外，该制剂仅显示出很有限的治疗指数，即有效剂量和有毒剂量之间的间隔很窄。此外，尽管两性霉素 B 具有较为广谱的作用，该制剂在某些临床情况下仍然效果较差，因为活性物质不能到达真菌感染部位或到达真菌感染部位的浓度不够，致使两性霉素 B 在该部位不能呈现其特有的抗真菌作用或作用不足。

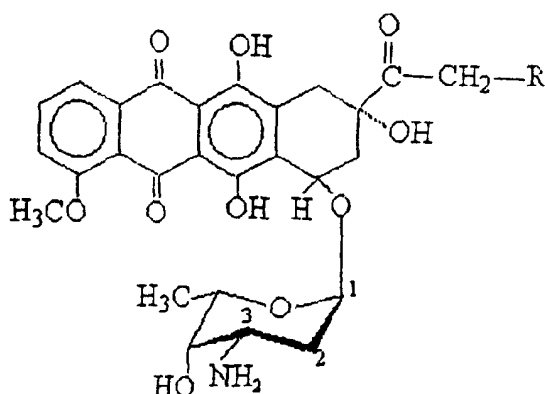
为克服此原初制剂的这些缺点，已研制出了一系列属于脂类制剂的两性霉素 B 制剂，例如类脂与两性霉素 B 的脂类复合物、胆固醇硫酸酯与两性霉素 B 的胶体分散体、以及包裹在脂质体中的两性霉素 B。所用这些药物形式都具有较大的治疗指数和较高的耐受性，特别是相对于常规两性霉素 B 脱氧胆酸盐制剂具有较低的肾毒性，因此这些药物形式也可以以较高的剂量给药，但是在高剂量下上述副作用仍不能完全避免。

然而，这些两性霉素 B 脂类制剂的一个严重不足是生产成本很高，因此售价也很高。此外，这些复杂药物形式仍必须费事地进行重构以得到其可直接给药的形式。尽管两性霉素 B 脂类制剂的治疗范围得到了改善，但由于有上述不足和其他不足，这些制剂在市场上并没有被广泛接受。

作为将两性霉素 B 转化为用于注射的水溶性形式的另一种方法，文献中介绍了形成两性霉素 B-阿拉伯半乳聚糖结合物的方法 (Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol. 43 No. 8, 1999, 1975-1981)。阿拉伯半乳聚糖是得自落叶松属植物的水溶性多糖，是由阿拉伯糖和半乳糖单元以 1:6 的比例组成的。两性霉素 B 和阿拉伯半乳聚糖的键合分 4 步进行。首先，对阿拉伯半乳聚糖进行高碘酸氧化使糖单元上的相邻羟基由于开环而转化为二醛。反应产物经阴离子交换柱纯化后，使两性霉素 B 的海藻糖胺上的氨基与醛基偶联而形成亚胺（席夫碱），最后，借助氢硼化钠进行还原使该亚氨基转化为氨基，未反应的醛基则转化为羟基。该偶联反应在 pH 11 下进行。该 pH 值是在生成结合物的产率和结合物毒性之间的折衷。在 pH

10 以下，两性霉素 B 不溶于水，产率低。pH 升至 12 以上时两性霉素 B 的水溶性较高，允许高产率，但所得产物具毒性。如果去掉最后一步的氢硼化钠还原则也会观察到毒性。

抗生素柔毛霉素和阿霉素属于蒽环类，其区别仅在于一个羟基基团。它们溶于水。阿霉素是从真菌波赛链霉菌青灰变种 (*Streptomyces peuceticus* var. *caesius*) 的培养物获得的，而柔毛霉素则是从真菌波赛链霉菌 (*Streptomyces peuceticus*) 或淡蓝浅红链霉菌 (*Streptomyces coeruleorubidus*) 的培养物获得的。



柔毛霉素: $R=H$

阿霉素: $R=OH$

由于其四环基团，柔毛霉素和阿霉素能够抑制 DNA 和 RNA 合成，形成高度稳定的 DNA 嵌入复合物，该复合物具有较长时间的抗性。此外，柔毛霉素和阿霉素在细胞内代谢中借助细胞色素 P-450 还原酶和 NADPH 形成半醌基团，这些半醌基团本身又触发进一步的自由基反应（超氧化物阴离子和羟基）。这些抗生素因此而具有显著的细胞抑制作用，使其能够在癌症治疗中作为细胞抑制剂使用。

由于这些抗生素口服后吸收不好，必须（严格地）以多次 10-15 分钟的短时间静脉输注方式给药。这些抗生素在体内迅速分布，最高浓度见于心脏、肺、脾和肾。

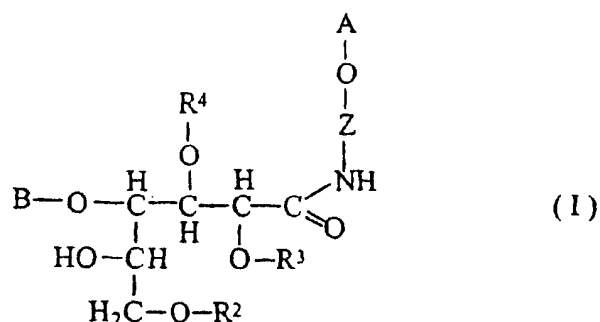
这些抗生素在体内的迅速分布以及由于代谢而形成的活泼自由基似乎

是其显著的毒副作用的原因之一，结果是尤其使心脏受到损害。

阿霉素和柔毛霉素都具有显著的心脏毒性，特别是迟发型心脏毒性是一种剂量依赖性累积器官毒性，一般来说是不可逆的，而且常常危及生命。如果超过最大累积总剂量(在成人为 550 mg/m^3 体表面积)，则蒽环诱导的心肌病的发病率迅速提高。总剂量升至 550 mg/m^3 体表面积以上时，就会有大约 5% 的危险出现严重心功能不全。如果达到了这个累积总剂量，则必须中断治疗。

因此，本发明的目的是获得这种含氨基糖的抗生素药物形式，该药物形式具有降低的特定毒副作用，并确保了在体内的分布更均一旦受到控制，因此可以使用更高的剂量，此外该药物形式还易于使用。本发明的另一个目的是获得以高产率生产这一药物形式的低成本方法。

出人意料地发现，上述目的可以用淀粉或淀粉衍生物与这些抗生素的结合物来实现。本发明的药物形式是通式 (I) 的多糖结合物形式的含有氨基糖的水溶性抗生素衍生物：



其中

B = 以 1,4 键连接的聚合物，选自羟乙基淀粉、羟丙基淀粉、可溶性直链淀粉、羟乙基化和/或羟丙基化形式的可溶性直链淀粉、可溶性支链淀粉、羟乙基化和/或羟丙基化形式的可溶性支链淀粉；

R^2 是 H、 $(\text{CH}_2)_2\text{-OH}$ 、 $\text{CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$ 或 B；

R^3 和 R^4 彼此独立地是 H、 $(\text{CH}_2)_2\text{-OH}$ 或 $\text{CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$ ；

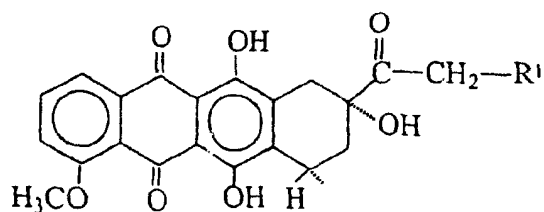
条件是

如果 $\text{R}^2 = \text{R}^3 = \text{R}^4 = \text{H}$ ，则 B = 直链淀粉或支链淀粉；

如果 $R^2, R^3, R^4 = (CH_2)_2-OH$, 则 $B =$ 羟乙基淀粉、羟乙基化支链淀粉或羟乙基化直链淀粉;

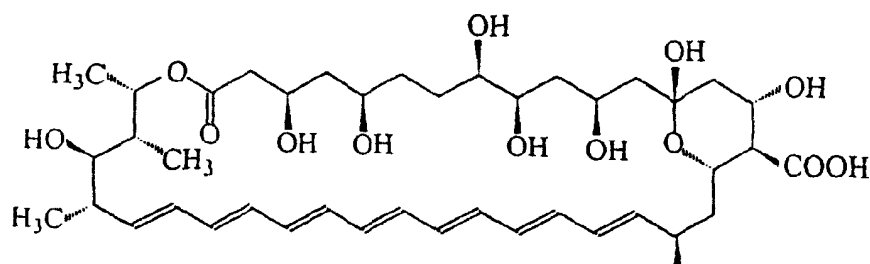
如果 $R^2, R^3, R^4 = CH_2-CH(CH_3)OH$, 则 $B =$ 羟丙基淀粉、羟丙基化支链淀粉或羟丙基化直链淀粉;

A 是

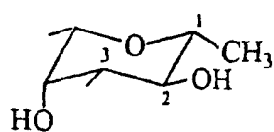


其中 $R^1 = H$ 或 OH

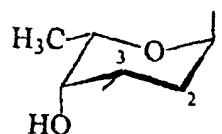
或



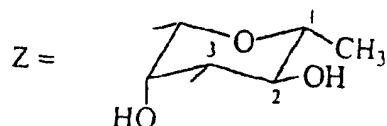
且 Z 是



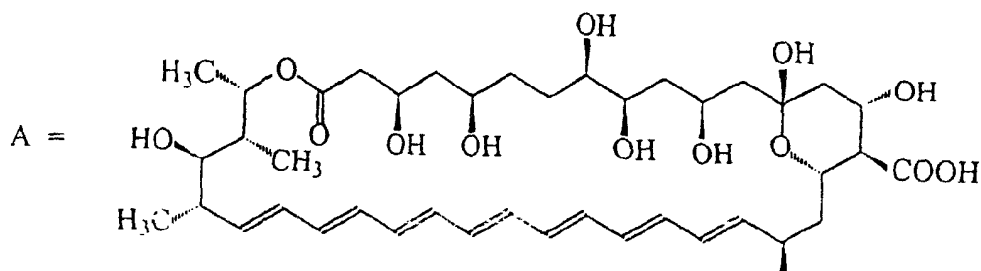
或



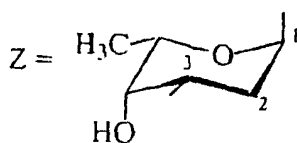
条件是, 如果



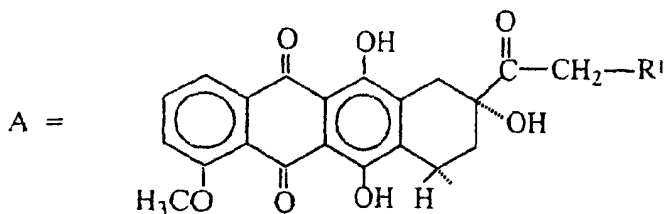
则



如果



则



其中 $R^1 = H$ 或 OH ;

该结合物的多糖部分与抗生素的氨基糖的 C_3 位氨基结合而形成肽键。

直链淀粉（非分支的，只有 α -1,4-糖苷键）和/或支链淀粉（分支的，除 α -1,4-糖苷键外还有 α -1,6-糖苷键），特别是羟烷基化淀粉，被认为是淀粉或淀粉衍生物。如果使用直链淀粉或支链淀粉，则使用市售的“可溶性”淀粉。后者也可以以羟乙基化和羟丙基化形式存在。

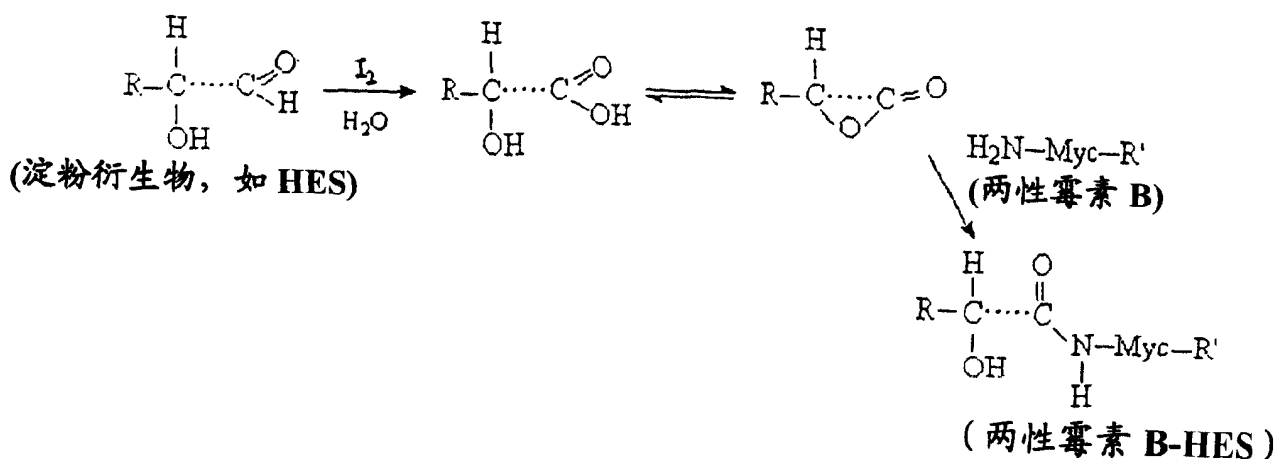
本发明优选使用羟烷基化淀粉，即羟乙基淀粉和羟丙基淀粉，就此而言，平均分子量（重均分子量 M_w ）可以在 2000 至 2×10^5 道尔顿之间的范围。但平均聚合度应至少为 15，在一个优选实施方案中延至 3000 左右（相当于平均分子量在 5×10^5 左右）。特别优选的是使用羟乙基淀粉。

以下就作为特别优选实施方案的羟乙基淀粉所作的陈述同样适用于羟丙基淀粉。

在本发明的抗生素-HES（羟乙基淀粉）结合物中，HES 的分子量应

优选在 HES 的肾阈以上,即 70000 道尔顿以上。特别优选的是规格为 130/、平均分子量为 130000 道尔顿的 HES。克分子取代级 MS 优选在 0.1-0.8 范围。在一个优选实施方案中,取代级在 0.3-0.5 范围。优选的 C_2/C_6 比例在 2-12 范围,而在一个特别优选的实施方案中是在 5-11 范围内。就此而言, HES 既可以以主要具有 α -1,4-糖苷键的仅非支形式存在,也可以以既有 α -1,4-糖苷键又有 α -1,6-糖苷键的分支形式存在。

在本发明的结合物中,多糖是根据本发明方法与抗生素的氨基糖的氨基实现键接,方式是优选用 I_2 使多糖分子末端的游离还原性醛基氧化成醛糖酸基团,该基团本身又与末端糖单元上的游离羟基(优选在末端糖单元的 C_4 原子处)形成内酯环,而后该内酯环可以与抗生素的氨基糖上的氨基形成肽键。与阿拉伯半乳聚糖由于高碘酸氧化而生成的醛基与氨基糖上的氨基形成席夫碱不同,在 HES 还原端的氧化产物可以,与氨基糖(例如,对两性霉素 B 而言,海藻糖胺)上的氨基,在有机溶剂(例如 DMSO),例如可溶解抗生素两性霉素 B 的有机溶剂中以高产率进行本发明的偶联反应。



该偶联反应被证实具有极强的选择性,并以高产率生成抗生素-淀粉结合物,与高碘酸氧化反应不同,该结合物的抗生素与多糖的摩尔比为 1:1。

所得的结合物还被证实出人意料地没有毒性,因此还可以口服给药。

此多糖载体，特别是 HES 与抗生素的偶联，即便在本身就不溶于水的两性霉素 B 的情况下，也生成整体上具有足够水溶性的结合物。这意味着还可以用含电解质的溶剂或混合物（例如等渗盐溶液与葡萄糖溶液的混合物）将结合物溶解或将其稀释至所需的可用于给药的终浓度。此外，由于所得的结合物不再具有毒性，故可以给予更高的剂量，例如两性霉素 B 结合物的日剂量最高可达 15mg 两性霉素 B 级分。

由于羟乙基淀粉作为血浆增容剂总是可以以高剂量静脉给予，所以就 HES 与两性霉素 B 的偶联而言，未反应的 HES 部分在生理上是安全的，所以无需专门从反应产物中分离，这在合成上有相当大的经济利益。就两性霉素 B 而言，也无须进行最终的水化以降低所形成的结合物的毒性。此外，出人意料地发现，未结合的羟乙基淀粉本身甚至会对两性霉素 B 产生增溶作用，结果是过量的 HES 能够对此抗真菌活性物质产生额外的稳定作用。

本发明抗生素-HES 结合物的另一个优点在于多糖部分可以被血清 α -淀粉酶降解。这种降解作用在有关 HES 用作血浆增容剂的药代动力学的相关文献中有详细的介绍。此外，多糖部分和抗生素之间的肽键在体内原则上可以受到酶攻击。

白色念珠菌 (*Candida albicans*) 被称为可能真菌感染病原谱中的指示微生物。对该真菌的研究表明，本发明的两性霉素 B 结合物具有与脂类制剂相若的活性。在绵羊红细胞溶血试验中，能够证明两性霉素 B-HES 结合物的体外毒性显著低于市售的两性霉素 B 脱氧胆酸盐制剂。

本发明抗生素-HES 结合物的决定性优点可以从以下事实看出：对所用 HES 的分子量、取代级、取代形式和分支程度进行适当的选择，就可以实质上地改变所得结合物的药代动力学性质，使其适应特定患者的需要。

在以下实施例中更详细地阐明了优选抗生素-HES 结合物的生产方法和溶血作用。

实施例 1

HES 130kD 的氧化:

将 10g HES (130kD)置于反应容器中, 并使其在尽可能少量的水中溶解。在该溶液中加入 2 ml 0.1N 碘溶液和约 3 ml 0.1N NaOH 溶液, 同时加以搅拌(磁力搅拌器)。将该混合物搅拌至其颜色表明 I_2 已消失。反复加入碘溶液和/或 NaOH 溶液若干次, 直至总共加入 10 ml 0.1N 碘溶液和 20 ml 0.1N NaOH 溶液。然后将所得溶液加载通过 H^+ 离子交换柱(Amberlite IR120), 然后在排阻限为 4-6kD 的透析管中相对于蒸馏水进行透析 20 小时。将透析产物冻干, 用 SOMOGYI 方法测定氧化程度。

氧化程度的测定:

为测定所生成的氧化 HES(ox-HES), 采用 SOMOGYI 方法(Meth. Carbohydrate Chem., I, 384-386, 1962)。该方法的基础是通过将 Cu^{2+} 还原为 Cu^+ 测定游离醛基。借助由碘化物和碘酸盐形成的碘将 Cu^+ 再氧化为 Cu^{2+} 。然后利用硫代硫酸盐滴定过量的碘。

实施例 2

两性霉素 B-HES 结合物的合成:

在反应容器中, 在室温和氮气氛下, 将 650mg(1.5×10^{-5} 摩尔)干燥的 ox-HES(130kD, 氧化程度约为 100%)和 2.8mg(3.0×10^{-6} 摩尔)两性霉素 B 溶解于约 4ml 无水 DMSO 中, 同时加以搅拌。在 70℃ 下使混合物避光反应 24 小时。加入 10 倍体积的 H_2O 后, 通过在 4℃ 下以水避光透析 48 小时对反应产物进行处理, 其间更换水四次。然后对产物进干, 得到微黄色粉末。

用另 3 批反应物重复该偶联方法, 所得到的偶联反应的可重复产率大于 90%。结果示于表 1。(该表的最后一栏所示的产量是按偶联产物加未反应的 HES 来计算的。)

表 1

	ox-HES	两性霉素 B	无水 DMSO	反应时 间和温 度	反应条件	透析后两性 霉素 B-HES 的产量
第 1 批	650mg (1.5×10^{-5} 摩尔)	2.8mg (3.0×10^{-6} 摩尔)	约 4ml	24h 70℃	暗处 氮气下	460mg
第 2 批	10.0g (2.4×10^{-4} 摩尔)	44.0mg (4.7×10^{-5} 摩尔)	约 40ml	24h 70℃	暗处 氮气下	7.0g
第 3 批	12.0g (2.8×10^{-4} 摩尔)	52.0mg (5.6×10^{-5} 摩尔)	约 30ml	24h 70℃	暗处 氮气下	8.4g
第 4 批	7.2g (1.7×10^{-4} 摩尔)	31.2mg (3.4×10^{-5} 摩尔)	约 20ml	24h 70℃	暗处 氮气下	5.1g

所得的两性霉素 B-HES 结合物通过其紫外光谱 (0.5g/5ml 蒸馏水) 进行表征, 在 300-400nm 范围显示出两性霉素 B 的聚合或胶束相互作用的典型条带。与几乎不溶于水的游离两性霉素 B 不同, 所得的两性霉素 B-HES 结合物的水溶解度大于 0.1g/5ml 水。

借助 LALLS-GPC (小角度激光散射与凝胶渗透色谱联用), 测得以下 GPC 特性:

重均分子量 Mw: 102,700

数均分子量: 36,050

峰部分(10%): 24,050

基线 (base 级分) (90%): 13,800

这些特性与所用的 HES 的特性基本相符。

实施例 3

两性霉素 B-HES 结合物的溶血比较试验:

本发明的两性霉素 B-HES 制剂的溶血作用通过与市售两性霉素 B-脱氧胆酸盐制剂（由 BRISTOL-MEYERS SQUIBB 生产的“Amphotericin B”，批号为 A068）的比较来测定，后者的活性物质预期在 $8\mu\text{g/ml}$ 以上的浓度下具有溶血作用（R. Falk 等，Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1999, 1975-1981）。

本发明制剂的原液：将 11.61g 两性霉素 B-HES（按重量百分比计算相当于 50mg 两性霉素 B）溶解于 50ml 5%葡萄糖溶液（批号为 9233A4，由 Braun Melsungen 公司生产）中。所制得的原液的活性物质含量为每毫升 1mg 两性霉素 B。按表 2 所示，由该原液制备三个稀释液，并研究其溶血作用。

市售参比制剂（两性霉素 B-脱氧胆酸盐制剂）：将一瓶 50mg 制剂用 10ml 注射用水（A.a.injectabilia）（批号为 0514A63，由 Braun Melsungen 公司生产）溶解，并用 5%葡萄糖溶液稀释至 0.12mg/ml 两性霉素 B。

红细胞悬浮液的制备：将新鲜采集的人血用大约 5 倍体积的无菌 0.9% NaCl 溶液（批号为 9055A64，由 Braun Melsungen 公司生产）稀释，并在 2000 相对离心加速度下离心 5 分钟。然后吸出上清液，沉淀的红细胞用相同方法再处理两次。

如此洗涤过的红细胞在 Neubauer 计数室中进行计数，必要时再用无菌 0.9% NaCl 溶液稀释至每毫升约 5×10^8 红细胞的终浓度。按照 DIN 标准，该悬浮液可在室温下使用不超过 6 小时。

溶血对比试验：将 5ml 待测溶液与 1ml 上述红细胞悬浮液混合，转移至洁净离心管中，并在 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 水浴中温育 20 分钟。然后在 2000 相对离心加速度下离心 5 分钟。

测定上清液的消光。将 5ml 0.9% NaCl 溶液和 5%葡萄糖溶液与 1ml 红细胞悬浮液混合后，也在 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 温育 20 分钟，然后如上进行离心，将其用作阴性对照。

为测试溶血作用,在光度计中用 10mm 厚的比色池在 576nm 波长下相对于阴性对照测定各上清液的消光。由于溶液的染色各不相同,还为比较不含红细胞悬浮液的溶液的目的测定了消光。

各批测试的结果概括于表 2。

表 2

测试溶液	溶液中两性霉素 B 的浓度 (mg/ml)	各批测试中两性霉素 B 的浓度 (mg/ml)	576nm 处的消光	不含红细胞时 576nm 处的消光
0.9% NaCl	-	-	0.015	0.000
5% 葡萄糖	-	-	0.016	0.000
市售制剂	0.12	0.1	2.271*)	0.008
两性霉素 B - HES	0.12	0.1	0.027	0.033
两性霉素 B - HES	0.24	0.2	0.061	0.076
两性霉素 B - HES	0.48	0.4	0.274*)	0.151
两性霉素 B - HES(原液)	1.00	0.83	2.452*)**)	0.288

*)红色上清液中的溶液

**)由于离心后粘度增加,红细胞仍是完整的,在上清液中可用显微镜检测到。

如表 2 所示,在上述试验条件下,在测试批次中所测试的市售两性霉素 B-脱氧胆酸盐制剂在仅仅 0.1mg/ml 的浓度下就显示出很强的溶血作用。该上清液在 576nm 处的消光为 2.271,呈很强的红色。

相比之下,本发明的两性霉素 B-HES 制剂在高达每毫升 0.2mg 两性霉素 B 的浓度下仍观察不到任何溶血作用。只是在 0.4mg/ml 的浓度下才能

在测试批次的上清液中检测到相对于阴性对照的轻微红色染色，这也可从消化值上看出。因此，在测试批次中在这一两性霉素 B 浓度下存在轻微的溶血作用。在 0.83mg/ml 的浓度下可以检测到测试制剂所致的强溶血作用，此时上清液呈很强的红色。此外，在上清液中用显微镜几乎检测不到完整红细胞，这些细胞由于过程中的高粘度是不能沉降到沉淀物中的。

实施例 4

柔毛霉素 - HES 结合物的合成：

在与实施例 2 相同的工艺条件下，在反应容器中使 650mg(1.5×10^{-5} 摩尔)干燥的 ox-HES(130kD, 氧化程度约为 100%)和 0.8mg(3.0×10^{-6} 摩尔)柔毛霉素反应，并如实施例 2 进行进一步处理。这里也获得约 72%的可重复产率。

实施例 5

阿霉素 - HES 结合物的合成：

在与实施例 2 相同的工艺条件下，在反应容器中使 650mg(1.5×10^{-5} 摩尔)干燥的 ox-HES(130kD, 氧化程度约为 100%)和 0.8mg(3.0×10^{-6} 摩尔)阿霉素反应，并如实施例 2 进行进一步处理。所获得的产率也约为 70%。