



(10) 申请公布号 CN 119365218 A

(43) 申请公布日 2025. 01. 24

(21) 申请号 202380041480.3

T·塔拉拉 D·P·米勒

(22) 申请日 2023.03.21

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

(30) 优先权数据

63/321965 2022.03.21 US

专利代理师 马蔚钧 林毅斌

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.11.19

(51) Int. Cl.

A61K 47/28 (2006.01)

A61K 31/575 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2023/015762 2023.03.21

A61K 47/02 (2006.01)

A61K 51/04 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/183297 EN 2023.09.28

A61K 31/56 (2006.01)

A61K 31/7048 (2006.01)

(71) 申请人 伊利诺伊大学评议会

地址 美国伊利诺伊州

申请人 赛斯泰特医药公司

(72) 发明人 M·D·伯克 A·莱万多夫斯卡

C·苏塔 J·G·威尔斯

权利要求书4页 说明书50页 附图10页

(54) 发明名称

包含脂质包覆的两性霉素B晶体的离子通道
假体组合物

(57) 摘要

公开了药物组合物,其包含:(i)两性霉素B或其可药用盐或水合物;(ii)胆固醇;(iii)磷脂,其包含氢化大豆磷脂酰胆碱和二硬脂酰磷脂酰甘油;和(iv)氯化钙(CaCl₂)。还公开了使用所述药物组合物治疗疾病或障碍(例如囊性纤维化)、提高气道表面液体的pH、增加到气道表面液体中的碳酸氢根分泌和增加受试者的一秒用力呼气量的方法。

1. 一种药物组合物,其包含:
 - (i) 两性霉素B(AmB) 或其可药用盐或水合物;
 - (ii) 胆固醇(Chol);
 - (iii) 磷脂,其包含氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)和二硬脂酰磷脂酰甘油(DSPG);和
 - (iv) 氯化钙(CaCl_2)。
2. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中AmB的量为约0.5%至约25%w/w。
3. 根据权利要求2所述的药物组合物,其中AmB的量为约3%至约16%w/w。
4. 根据权利要求3所述的药物组合物,其中AmB的量为约14%w/w。
5. 根据权利要求1-4中任一项所述的药物组合物,其中Chol的量为约0.1%至约8%w/w。
6. 根据权利要求5所述的药物组合物,其中Chol的量为约0.3%至约6%w/w。
7. 根据权利要求6所述的药物组合物,其中Chol的量为约0.5%至约3%w/w。
8. 根据权利要求1-7中任一项所述的药物组合物,其中 CaCl_2 的量为约1%至约10%w/w。
9. 根据权利要求8所述的药物组合物,其中 CaCl_2 的量为约4%至约7%w/w。
10. 根据权利要求1-9中任一项所述的药物组合物,其中磷脂的量为约60%至约95%w/w。
11. 根据权利要求10所述的药物组合物,其中磷脂的量为约70%至约90%w/w。
12. 根据权利要求1-11中任一项所述的药物组合物,其中Chol与磷脂的重量比为约0.001:1至约0.1:1。
13. 根据权利要求1-11中任一项所述的药物组合物,其中Chol与磷脂的重量比为约0.005:1至约0.05:1。
14. 根据权利要求1-13中任一项所述的药物组合物,其中大豆磷脂酰胆碱(HSPC)与二硬脂酰磷脂酰甘油(DSPG)的重量比为约2:1至约19:1。
15. 根据权利要求14所述的药物组合物,其中大豆磷脂酰胆碱(HSPC)与二硬脂酰磷脂酰甘油(DSPG)的重量比为约7:1至约12:1。
16. 根据权利要求1-15中任一项所述的药物组合物,其中Chol与AmB的摩尔比为约0.05:1至约1.2:1。
17. 根据权利要求16所述的药物组合物,其中Chol与AmB的摩尔比为约0.4:1至约1.2:1。
18. 根据权利要求16所述的药物组合物,其中Chol与AmB的摩尔比为约0.05:1至约0.4:1。
19. 根据权利要求16所述的药物组合物,其中Chol与AmB的摩尔比为约0.4:1。
20. 根据权利要求1-19中任一项所述的药物组合物,其中磷脂与 CaCl_2 的摩尔比为约4:1至约2:1。
21. 根据权利要求20所述的药物组合物,其中磷脂与 CaCl_2 的摩尔比为约2:1。
22. 根据权利要求1-21中任一项所述的药物组合物,其中AmB的结晶度大于约75%。
23. 根据权利要求22所述的药物组合物,其中AmB的结晶度大于约85%。
24. 根据权利要求23所述的药物组合物,其中AmB的结晶度大于约95%。
25. 根据权利要求1所述的药物组合物,其包含以下组分、基本由以下组分组成或由以

下组分组成：

- (i) 约14.0%w/w两性霉素B(AmB)；
- (ii) 约2.3%w/w胆固醇(Chol)；
- (iii-a) 约70.3%w/w氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)；
- (iii-b) 约7.8%w/w二硬脂酰磷脂酰甘油(DSPG)；和
- (iv) 约5.52%w/w氯化钙(CaCl_2)。

26. 根据权利要求1所述的药物组合物，其包含以下组分、基本由以下组分组成或由以下组分组成：

- (i) 约14.0%w/w两性霉素B(AmB)；
- (ii) 约6.81%w/w胆固醇(Chol)；
- (iii-a) 约51.2%w/w氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)；
- (iii-b) 约22.8%w/w二硬脂酰磷脂酰甘油(DSPG)；和
- (iv) 约5.2%w/w氯化钙(CaCl_2)。

27. 根据权利要求1所述的药物组合物，其包含以下组分、基本由以下组分组成或由以下组分组成：

- (i) 约3.4%w/w两性霉素B(AmB)；
- (ii) 约0.57%w/w胆固醇(Chol)；
- (iii-a) 约80.72%w/w氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)；
- (iii-b) 约8.97%w/w二硬脂酰磷脂酰甘油(DSPG)；和
- (iv) 约6.34%w/w氯化钙(CaCl_2)。

28. 根据权利要求1所述的药物组合物，其包含：

- (i) 约0.4至1.2mol/mol的Chol/AmB比；
- (ii) 小于约0.05w/w的Chol/PL比；
- (iii) 约2.3至约9.0w/w的HSPC/DSPG比；和
- (iv) 约2:1mol/mol的PL/ Ca^{2+} 比。

29. 根据权利要求1-28中任一项所述的药物组合物，其中AmB和Chol没有复合；并且AmB没有包封在脂质体中。

30. 根据权利要求1-29中任一项所述的药物组合物，其中AmB被磷脂和Chol的多孔壳包覆。

31. 根据权利要求1-30中任一项所述的药物组合物，其中所述药物组合物配制为干粉。

32. 根据权利要求31所述的药物组合物，其中所述粉末粒子的质量中值直径 X_{50} 为约1.0至约4.0 μm 。

33. 根据权利要求32所述的药物组合物，其中所述粉末粒子的质量中值直径 X_{50} 为约1.5至约3.5 μm 。

34. 根据权利要求33所述的药物组合物，其中所述粉末粒子的振实密度为约0.03至约0.4g/mL。

35. 根据权利要求34所述的药物组合物，其中所述粉末粒子的振实密度为约0.06至约0.2g/mL。

36. 根据权利要求31-35中任一项所述的药物组合物，其中所述粉末粒子的卡尔指数为

约20至约32。

37. 根据权利要求31-36中任一项所述的药物组合物,其中所述壳的主转变温度(T_m)为至少80°C。

38. 根据权利要求31-37中任一项所述的药物组合物,其中所述粉末的水含量为约1.5至约6%w/w。

39. 根据权利要求1-38中任一项所述的药物组合物,其中所述组合物配制为肺部施用或气道施用。

40. 根据权利要求39所述的药物组合物,其中所述组合物配制为气雾剂施用。

41. 根据权利要求31-40中任一项所述的药物组合物,其中所述粉末粒子的质量中值空气动力学直径为约1.5 μm 至约4.0 μm 。

42. 根据权利要求41所述的药物组合物,其中所述粉末粒子的质量中值空气动力学直径为约2.0 μm 至约3.5 μm 。

43. 一种治疗疾病或障碍的方法,其包括向有需要的受试者施用治疗有效量的根据权利要求1-42中任一项所述的药物组合物;其中所述施用是肺部施用。

44. 根据权利要求43所述的方法,其中所述疾病或障碍是囊性纤维化、非囊性纤维化支气管扩张或慢性阻塞性肺病。

45. 根据权利要求44所述的方法,其中所述疾病或障碍是囊性纤维化。

46. 一种提高气道表面液体的pH的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的根据权利要求1-42中任一项所述的药物组合物,由此提高受试者的气道表面液体的pH;其中所述施用是肺部施用。

47. 一种增加到气道表面液体中的碳酸氢根分泌的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的根据权利要求1-42中任一项所述的药物组合物,由此增加到受试者的气道表面液体中的碳酸氢根分泌;其中所述施用是肺部施用。

48. 一种增加一秒用力呼气量(FEV1)的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的根据权利要求1-42中任一项所述的药物组合物,由此增加受试者的FEV1;其中所述施用是肺部施用。

49. 根据权利要求48所述的方法,其中所述受试者的FEV1增加约3%至约20%。

50. 根据权利要求43-49中任一项所述的方法,其中所述受试者患有囊性纤维化、非囊性纤维化支气管扩张或慢性阻塞性肺病。

51. 根据权利要求50所述的方法,其中所述受试者患有囊性纤维化。

52. 根据权利要求43-51中任一项所述的方法,其中将所述组合物施用于受试者的气道。

53. 根据权利要求43-52中任一项所述的方法,其中所述组合物作为气雾剂施用。

54. 根据权利要求43-53中任一项所述的方法,其中所述受试者是小于12岁的人。

55. 根据权利要求43-53中任一项所述的方法,其中所述受试者是至少12岁的人。

56. 根据权利要求43-55中任一项所述的方法,其中所述囊性纤维化是用依伐卡托难治的。

57. 根据权利要求43-56中任一项所述的方法,其中所述囊性纤维化是用elexacaftor、tezacaftor和依伐卡托的组合难治的。

58. 根据权利要求43-57中任一项所述的方法,其中所述药物组合物的标称剂量或计量剂量为0.01mg至10mg。

59. 根据权利要求58所述的方法,其中所述药物组合物的标称剂量或计量剂量为0.1mg、0.5mg、1.0mg、2.0mg或4.0mg。

60. 根据权利要求43-59中任一项所述的方法,其中所述组合物每天施用一次。

61. 根据权利要求43-60中任一项所述的方法,其中所述施用包括最初递送负荷剂量的所述药物组合物;随后递送维持剂量的所述药物组合物;其中所述负荷剂量与所述维持剂量的质量比为约2:1至约5:1。

62. 根据权利要求61所述的方法,其中所述负荷剂量与所述维持剂量的质量比为约2.5:1至约3:1。

63. 根据权利要求43-62中任一项所述的方法,其中AmB的绝对生物利用度为约0.1%至约5%。

包含脂质包覆的两性霉素B晶体的离子通道假体组合物

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2022年3月21日提交的美国临时申请号63/321,965的优先权利益;其内容经此引用并入本文。

[0003] 背景

[0004] 囊性纤维化(CF)是一种进行性遗传疾病,其引起持续性肺部感染并随时间推移限制呼吸能力。CF的症状是由一种被称为囊性纤维化跨膜传导调节子(CFTR)蛋白的缺陷蛋白引起的。研究人员正在研究潜在疗法以恢复CFTR蛋白的正常功能或校正其生产过程以产生正常的蛋白质。尽管当前的CFTR调节剂和校正剂改善了约90%的CF患者的肺功能,但约10%的患者具有I类突变或其它突变,对其还没有有效的治疗。

[0005] Burke及其同事最近提出了一种替代策略:开发用于CFTR蛋白的小分子假体(small molecule prosthetics)。为此,他们改换抗真菌药物两性霉素B(AmB)的用途,其与胆固醇(Chol)自组装以形成一价离子通道。通过由在有机溶剂中的溶液在水中快速纳米沉淀而制造AmB和Chol的复合物(US 2019/0083517;US 2020/0352970)。随后将所得纳米粒子冻干。Burke等人声称,由Chol和AmB(Chol/AmB=1.0至50.0mol/mol)形成的离子通道能够独立于基因突变而恢复碳酸氢根分泌,提高气道表面液体(ASL)pH,并改善CF细胞系(例如,来自U.Iowa的CuFi-1、CuFi-4细胞系)中的宿主防御。他们还证明,如果AmB与胆固醇预复合,则能够增大AmB有效恢复ASL pH时浓度的范围。也就是说,纯AmB仅在低AmB浓度下有效,而AmB:Chol复合物在宽范围的AmB浓度下保持活性。

[0006] 在来自具有不同CFTR突变(其中一些不产生CFTR)的CF患者的人气道上皮的分化原代培养物中进一步确立了AmB的益处。在CFTR无效(CFTR-null)猪模型中也观察到ASL pH的提高。

[0007] 最后,Fungizone[®](AmB的一种商业肠胃外组合物)的鼻内施用能够改变患有CF的人(包括用当前疗法无法治疗的那些人)的鼻电位差。观察到的鼻电位差的改善与用调节剂,如依伐卡托所见的相当。

[0008] 在CF患者中建立AmB/Chol离子通道需要将这些材料递送至气道上皮细胞的顶端侧,即通过口腔吸入施用。在患有非囊性纤维化支气管扩张(NCFBE)和慢性阻塞性肺病(COPD)的受试者中观察到类似的挑战。

[0009] 概述

[0010] 在某些方面,本文提供了一种药物组合物,其包含:(i)两性霉素B(AmB)或其可药用盐或水合物;(ii)胆固醇(Chol);(iii)磷脂(PL),包含氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)和二硬脂酰磷脂酰甘油(DSPG);和(iv)氯化钙(CaCl₂)。

[0011] 在进一步的方面,本文提供了一种治疗疾病或障碍的方法,其包括向有需要的受试者施用治疗有效量的所述药物组合物;其中所述施用是肺部施用。

[0012] 在进一步的方面,本文提供了一种提高气道表面液体的pH的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的所述药物组合物,由此提高受试者的气道表面液体的pH;其中所述施用是肺部施用。

[0013] 在进一步的方面,本文提供了一种增加碳酸氢根到气道表面液体中的分泌的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的所述药物组合物,由此增加碳酸氢根到受试者的气道表面液体中的分泌;其中所述施用是肺部施用。

[0014] 在进一步的方面,本文提供了一种增加受试者的一秒用力呼气量(FEV1)的方法,其包括向受试者施用有效量的所述药物组合物,由此增加受试者的FEV1;其中所述施用是肺部施用。

[0015] 附图简述

[0016] 图1显示完全水合的二棕榈酰磷脂酰胆碱-胆固醇混合物的相图。

[0017] 图2呈现了显示各种AmB/脂质组合物的三元相图。阴影三角形代表优化的脂质包覆的两性霉素B晶体组合物。

[0018] 图3显示两性霉素B吸入粉末(ABIP)、ABCI-001、ABCI-002和ABCI-003的差示扫描量热法热谱图。

[0019] 图4显示X射线粉末衍射(XRPD)图,其显示了PLCI-001和PLCI-002中的胆固醇结晶的证据。

[0020] 图5呈现了表明富Chol相的焓与Chol含量成比例的图。

[0021] 图6显示各种两性霉素B(AmB)和安慰剂组合物的吸湿等温线(25°C)。

[0022] 图7A呈现了显示对于包含在0.4至1.2mol/mol之间的Chol/AmB比和在PL的70%至90%w/w之间的HSPC的各种组合物,CuFi-1细胞中的气道表面液体(ASL)pH提高的图。

[0023] 图7B呈现了显示对于包含在0至0.4mol/mol之间的Chol/AmB比的各种组合物和不含Chol或DSPG的组合物,CuFi-1细胞中的ASL pH提高的图。

[0024] 图7C呈现了显示Chol/AmB比的变化对CuFi-1细胞中的ASL pH改善的影响的图。

[0025] 图8呈现了显示在对来自患有CF的个体(包括具有无义突变的那些)的原代培养的气道上皮细胞施用ABCI-003后的ASLpH提高的图。

[0026] 图9呈现了显示在ABCI-003的情况下CuFi-1细胞中的ASL pH提高vs.悬浮在全氟己烷(FC-72)载体中的AmB浓度的增加的图。

[0027] 图10呈现了显示在对来自患有CF的个体(包括具有无义突变的那些)的原代培养的气道上皮细胞施用ABCI-003后的ASL粘度降低的图。

[0028] 图11呈现了显示在对来自患有CF的个体(包括具有无义突变的那些)的原代培养的气道上皮细胞施用ABCI-003后的ASL抗微生物活性增加的图。

[0029] 图12A呈现了显示喷雾干燥的粉末组合物的标称和振实密度对标称剂量范围为0至10mg的散装粉末的计算药物载量的影响的图。

[0030] 图12B呈现了显示喷雾干燥的粉末组合物的标称和振实密度对标称剂量范围为0至3mg的散装粉末的计算药物载量的影响的图。

[0031] 图13显示ABCI-003、ABCI-004和PLCI-002的GMP和GLP批次的X射线粉末衍射图的叠加。

[0032] 图14显示ABCI-003、ABCI-004和PLCI-002的GMP和GLP批次的DSC热谱图的叠加。

[0033] 图15显示ABCI-003的空气动力学粒度分布(APSD)。

[0034] 详述

[0035] 令人惊讶地发现,AmB和Chol不需要复合来实现上文概述的益处。实际上,这两种

组分可以相分离为核-壳粒子中的单独域。

[0036] 还令人惊讶地发现,远小于1.0mol/mol的Chol/AmB比能够维持宿主防御的改善,包括碳酸氢根分泌、ASLpH、ASL粘度和/或ASL抗微生物活性的改善。

[0037] 组合物

[0038] 在一些方面,提供了一种药物组合物,其包含:

[0039] (i) 两性霉素B(AmB)或其可药用盐或水合物;

[0040] (ii) 胆固醇(Chol);

[0041] (iii) 磷脂;和

[0042] (iv) 氯化钙(CaCl_2)。

[0043] 在进一步的方面,提供了一种药物组合物,其包含:

[0044] (i) 两性霉素B(AmB)或其可药用盐或水合物;

[0045] (ii) 胆固醇(Chol);

[0046] (iii) 磷脂,其包含氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)或二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC);和二硬脂酰磷脂酰甘油(DSPG);和

[0047] (iv) 氯化钙(CaCl_2)。

[0048] 在进一步的方面,提供了一种药物组合物,其包含:

[0049] (i) 两性霉素B(AmB)或其可药用盐或水合物;

[0050] (ii) 胆固醇(Chol);

[0051] (iii) 磷脂,其包含氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)和二硬脂酰磷脂酰甘油(DSPG);和

[0052] (iv) 氯化钙(CaCl_2)。

[0053] 在某些实施方案中,该药物组合物包含约0.5%至约25%w/w AmB。

[0054] 在某些实施方案中,该药物组合物包含约1%至约22%w/w AmB。

[0055] 在某些实施方案中,该药物组合物包含约2%至约16%w/w AmB。

[0056] 在某些实施方案中,该药物组合物包含约14%w/w AmB。

[0057] 在某些实施方案中,该药物组合物包含约0.1%至约8%w/w Chol。

[0058] 在某些实施方案中,该药物组合物包含约0.5%至约3%w/w Chol。

[0059] 在某些实施方案中,该药物组合物包含约0.3%至约6%w/w Chol。

[0060] 在某些实施方案中,该药物组合物包含约0.5%至约3%w/w Chol。

[0061] 在某些实施方案中,该药物组合物包含约1%至约10%w/w CaCl_2 。

[0062] 在某些实施方案中,该药物组合物包含约4%至约7%w/w CaCl_2 。

[0063] 在某些实施方案中,该药物组合物包含约60%至约95%w/w磷脂。

[0064] 在某些实施方案中,该药物组合物包含约70%至约90%w/w磷脂。

[0065] 在某些实施方案中,该药物组合物包含约75%至约90%w/w磷脂。

[0066] 在某些实施方案中,Chol与磷脂的重量比为约0.001:1至约0.1:1。

[0067] 在某些实施方案中,Chol与磷脂的重量比为约0.005:1至约0.05:1。

[0068] 在某些实施方案中,大豆磷脂酰胆碱(HSPC)与二硬脂酰磷脂酰甘油(DSPG)的重量比为约2:1至约19:1。

[0069] 在某些实施方案中,大豆磷脂酰胆碱(HSPC)与二硬脂酰磷脂酰甘油(DSPG)的重量比为约7:1至约12:1。

[0070] 在某些实施方案中,大豆磷脂酰胆碱(HSPC)与二硬脂酰磷脂酰甘油(DSPG)的重量比为约1:1至约3:1。

[0071] 在某些实施方案中,Chol与AmB的摩尔比为约0.05:1至约1.2:1。

[0072] 在某些实施方案中,Chol与AmB的摩尔比为约0.4:1至约1.2:1。

[0073] 在某些实施方案中,Chol与AmB的摩尔比为约0.05:1至约0.4:1。

[0074] 在某些实施方案中,Chol与AmB的摩尔比为约0.4:1。

[0075] 在某些实施方案中,磷脂与CaCl₂的摩尔比为约4:1至约2:1。

[0076] 在某些实施方案中,磷脂与CaCl₂的摩尔比为约2:1。

[0077] 在某些实施方案中,AmB的结晶度大于约75%。

[0078] 在某些实施方案中,AmB的结晶度大于约85%。

[0079] 在某些实施方案中,AmB的结晶度大于约95%。

[0080] 在某些实施方案中,该药物组合物包含以下组分、基本由以下组分组成或由以下组分组成:

[0081] (i) 约14.0%w/w两性霉素B(AmB);

[0082] (ii) 约2.3%w/w胆固醇(Chol);

[0083] (iii-a) 约70.3%w/w氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC);

[0084] (iii-b) 约7.8%w/w二硬脂酰磷脂酰甘油(DSPG);和

[0085] (iv) 约5.52%w/w氯化钙(CaCl₂)。

[0086] 在某些实施方案中,该药物组合物包含以下组分、基本由以下组分组成或由以下组分组成:

[0087] (i) 约14.0%w/w两性霉素B(AmB);

[0088] (ii) 约6.81%w/w胆固醇(Chol);

[0089] (iii-a) 约51.2%w/w氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC);

[0090] (iii-b) 约22.8%w/w二硬脂酰磷脂酰甘油(DSPG);和

[0091] (iv) 约5.2%w/w氯化钙(CaCl₂)。

[0092] 在某些实施方案中,该药物组合物包含以下组分、基本由以下组分组成或由以下组分组成:

[0093] (i) 约3.4%w/w两性霉素B(AmB);

[0094] (ii) 约0.57%w/w胆固醇(Chol);

[0095] (iii-a) 约80.72%w/w氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC);

[0096] (iii-b) 约8.97%w/w二硬脂酰磷脂酰甘油(DSPG);和

[0097] (iv) 约6.34%w/w氯化钙(CaCl₂)。

[0098] 在某些实施方案中,该药物组合物包含:

[0099] (i) 约0.4至1.2mol/mol的Chol/AmB比;

[0100] (ii) 小于约0.05w/w的Chol/PL比;

[0101] (iii) 约2.3至约9.0w/w的HSPC/DSPG比;和

[0102] (iv) 约2:1mol/mol的PL/Ca²⁺比。

[0103] 在某些实施方案中,AmB和Chol没有复合;并且AmB没有包封在脂质体中。

[0104] 在某些实施方案中,AmB被磷脂和Chol的多孔壳包覆。

- [0105] 在某些实施方案中,该药物组合物配制为干粉。
- [0106] 在某些实施方案中,粉末粒子的振实密度为约0.03至约0.4g/mL。
- [0107] 在某些实施方案中,粉末粒子的振实密度为约0.06至约0.2g/mL。
- [0108] 在某些实施方案中,粉末粒子的卡尔指数为约20至约32。
- [0109] 在某些实施方案中,壳的主转变温度(T_m)为至少70°C、至少80°C或至少90°C。在某些实施方案中,壳的主转变温度(T_m)为约50°C至约100°C、约70°C至约100°C、约80°C至约100°C、或约85°C至约95°C。
- [0110] 在某些实施方案中,该粉末的水含量为约1.5至约6%w/w。
- [0111] 在某些实施方案中,该组合物配制为用于肺部施用或气道施用。
- [0112] 在某些实施方案中,该组合物配制为用于气雾剂施用。
- [0113] 在某些实施方案中,该组合物配制为作为干粉用于气雾剂施用。
- [0114] 在某些实施方案中,提供工程化粒子的干粉组合物,其包括被磷脂(PL)和Chol的多孔壳包覆的多个AmB药物粒子,其中AmB的结晶度为至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%。
- [0115] 在某些实施方案中,该粉末粒子的质量中值直径 X_{50} 为约0.5 μm 至约5.0 μm 、约1.0 μm 至约4.0 μm 、或约1.5 μm 至约3.5 μm 。
- [0116] 在某些实施方案中,该粉末粒子的 X_{90} 为约1.5 μm 至约10.0 μm ,如约2.0 μm 至约8.0 μm 。
- [0117] 在某些实施方案中,该粉末粒子的质量中值空气动力学直径(MMAD)为约1.5 μm 至约4.0 μm 。
- [0118] 在某些实施方案中,该粉末粒子的质量中值空气动力学直径(MMAD)为约2.0 μm 至约3.5 μm 。
- [0119] 在某些实施方案中,提供AmB、Chol和PL的无载体干粉组合物,其中AmB没有包封在脂质中,并且AmB和脂质在其自身的域中相分离。
- [0120] 在某些实施方案中,提供工程化粒子的干粉组合物,其包括被PL和Chol的多孔壳包覆的多个AmB药物粒子,其中Chol/AmB比为约0.05至约1.2mol/mol,如约0.2至约0.6mol/mol。
- [0121] 在某些实施方案中,提供工程化粒子的干粉组合物,其包括被PL和Chol的多孔壳包覆的多个AmB药物粒子,其中Chol/PL小于0.10w/w或小于0.05w/w。
- [0122] 在某些实施方案中,提供工程化粒子的干粉组合物,其包括被包含PL和Chol的多孔壳包覆的多个AmB药物粒子。在一些实施方案中,PL包含氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二硬脂酰磷脂酰甘油(DSPG)或其组合。
- [0123] 在某些实施方案中,提供工程化粒子的干粉组合物,其包括被PL和Chol的多孔壳包覆的多个AmB药物粒子,其中PL包含(1)HSPC或DSPC,和(2)DSPG以约2.3w/w(即7/3w/w)和约19.0w/w(即95/5w/w),如约8w/w至约18w/w的w/w比率的混合物。
- [0124] 在某些实施方案中,提供工程化粒子的干粉组合物,其包括被PL、Chol和氯化钙(CaCl_2)的多孔壳包覆的多个AmB药物粒子,其中PL/Ca比为约2.0mol/mol至约4.0mol/mol、约2.0mol/mol至约3.0mol/mol、或约2.0mol/mol。PL/Ca比不应该降低到低于约2.0mol/mol。

mol。

[0125] 在某些实施方案中,提供工程化粒子的干粉组合物,其包括被PL、Chol和氯化钙(CaCl_2)的多孔壳包覆的多个AmB药物粒子,其中该组合物中的AmB百分比小于60%w/w,如小于30%或小于20%w/w。在一些实施方案中,药物载量为约0.5%至约25%w/w,并且标称Chol/AmB比为约0.05至约1.2mol/mol。

[0126] 在某些实施方案中,提供工程化粒子的干粉组合物(ABCI-003),其包括被PL和Chol的多孔壳包覆的细结晶AmB粒子(约14.0%w/w)的喷雾干燥核-壳粒子,其中Chol/AmB比为约0.4mol/mol,Chol/PL比为约0.03w/w,PL/Ca比为约2mol/mol,并且PL中的PC/PG比为约9.0w/w。

[0127] 在某些实施方案中,提供工程化粒子的干粉组合物(ABCI-004),其包括被PL和Chol的多孔壳包覆的细结晶AmB粒子(约3.4%w/w)的喷雾干燥核-壳粒子,其中Chol/AmB比为约0.4mol/mol,Chol/PL比为约0.006w/w,PL/Ca比为约2mol/mol,并且PL中的PC/PG比为约9.0w/w。

[0128] 在某些实施方案中,提供工程化粒子的干粉组合物(图2),其包括被PL和Chol的多孔壳包覆的细结晶AmB粒子(14.0%w/w)的喷雾干燥核-壳粒子,其中Chol/AmB比为约0.4至约1.2mol/mol,Chol/PL比为小于0.05w/w,PL/Ca比为约2mol/mol,并且PL中的PC/PG比在约2.3至约9.0w/w之间。

[0129] 在某些实施方案中,最大Chol/AmB比为约1.2mol/mol,但这种高比率仅对于较低的药物载量(例如,不大于10.0%w/w)可以是可接受的,其中脂质保持在高度有序的S0相中。将Chol/AmB降低至0.4mol/mol可以允许so相内的更高药物载量(例如,不大于22%w/w)。

[0130] 在一些实施方案中,本文所述的组合物占据图2中的阴影三角形。该三角形的两条边代表标称Chol/AmB比为0.4和1.2mol/mol的线,而第三条边代表可能导致DSC热谱图中的富Chol相消除的Chol/PL比($\text{Chol/PL}=0.05\text{w/w}$) (实施例4)。

[0131] 在某些实施方案中,本文所述的组合物包括约2.3至约9.0w/w的HSPC/DSPG比,和约2.0mol/mol的PL/ Ca^{2+} 比。

[0132] 在某些实施方案中,本文所述的组合物的选择取决于将脂质维持在单相(即, T_m 比40°C的加速储存温度高大于50°C的凝胶相(so) (实施例4))中。在一些实施方案中,本文所述的组合物的选择取决于在宽范围的AmB浓度下维持的ASLpH的最大提高(实施例11)。在某些实施方案中,本文所述的组合物的选择取决于相对于HSPC/DSPG<9.0的组合物降低的吸湿性(实施例5)。在一些实施方案中,本文所述的组合物的选择取决于增加的生产收率(实施例9)。在某些实施方案中,本文所述的组合物的选择取决于改善的粉末流动性(实施例9)。在一些实施方案中,本文所述的组合物的选择取决于相对于含有1o相的粉末改善的气雾剂性能(实施例9)。在某些实施方案中,本文所述的组合物的选择取决于在CuFi-1细胞和来自CF患者(甚至具有无义突变的那些)的原代培养物中在基于细胞的测定中恢复宿主防御的优异性能(实施例10)。在一些实施方案中,本文所述的组合物的选择取决于即使在低Chol/AmB摩尔比下也没有红细胞溶血(实施例15)。

[0133] 在某些实施方案中,提供工程化粒子的干粉组合物,其包括被PL、Chol和氯化钙(CaCl_2)的多孔壳包覆的多个AmB药物粒子,其中标称剂量为约0.01mg至约50mg、约0.1mg至

约10.0mg、约0.5mg、约1.0mg、约2.0mg、约4.0mg或约6.0mg。

[0134] 在某些实施方案中,提供工程化粒子的干粉组合物,其包括被PL、Chol和氯化钙(CaCl_2)的多孔壳包覆的多个AmB药物粒子,其中粒子的质量中值直径(X_{50})为约1.0至约5.0 μm ,如约1.5至约4.0 μm 。

[0135] 在某些实施方案中,提供工程化粒子的干粉组合物,其包括被PL、Chol和氯化钙(CaCl_2)的多孔壳包覆的多个AmB药物粒子,其中粒子的 X_{90} 为约3 μm 至约10 μm ,如约3.5 μm 至约7 μm 。

[0136] 在某些实施方案中,提供工程化粒子的干粉组合物,其包括被PL、Chol和氯化钙(CaCl_2)的多孔壳包覆的多个AmB药物粒子,其中粒子的振实密度为约0.03至约0.40g/mL,如约0.06至约0.20g/mL。

[0137] 在某些实施方案中,提供工程化粒子的干粉组合物,其包括被PL、Chol和氯化钙(CaCl_2)的多孔壳包覆的多个AmB药物粒子,其中粉末中的水含量为约1.0%至约10.0%,优选约2.0%至约5.0%。

[0138] 在某些实施方案中,提供工程化粒子的干粉组合物,其包括被PL、Chol和氯化钙(CaCl_2)的多孔壳包覆的多个AmB药物粒子,其中当从便携式干粉吸入器施用,质量中值空气动力学直径(MMAD)为约1.0 μm 至约6.0 μm ,如约2.0 μm 至约4.0 μm 。

[0139] 在某些实施方案中,提供工程化粒子的干粉组合物,其包括被PL、Chol和氯化钙(CaCl_2)的多孔壳包覆的多个AmB药物粒子,其中当用便携式干粉吸入器施用,表示为标称剂量的百分比的小于5 μm 的细粒分数为至少30%w/w、至少50%或至少60%w/w。

[0140] 在某些实施方案中,提供工程化粒子的干粉组合物,其包括被PL、Chol和氯化钙(CaCl_2)的多孔壳包覆的多个结晶AmB药物粒子,其中该粉末通过包含悬浮在由本文所述的脂质混合物的单层稳定化的水包油乳状液中的细AmB晶体的液体原料的喷雾干燥生产。

[0141] 在某些实施方案中,提供工程化粒子的干粉组合物,其包括被PL、Chol和氯化钙(CaCl_2)的多孔壳包覆的多个结晶AmB药物粒子,其中该脂质具有至少80 $^{\circ}\text{C}$,如至少90 $^{\circ}\text{C}$ 的主转变温度(T_m)。

[0142] 在某些实施方案中,提供工程化粒子的干粉组合物,其包括被PL、Chol和氯化钙(CaCl_2)的多孔壳包覆的多个结晶AmB药物粒子,其中该粉末通过液体原料在低于脂质的最低 T_m 的出口温度下的喷雾干燥生产。在一些实施方案中,出口温度为至少50 $^{\circ}\text{C}$ 、至少60 $^{\circ}\text{C}$ 或至少70 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0143] 在某些实施方案中,提供工程化粒子的干粉组合物,其包括被PL、Chol和氯化钙(CaCl_2)的多孔壳包覆的多个结晶AmB药物粒子,其中该粉末通过液体原料在低于脂质的最低 T_m 的出口温度下的喷雾干燥生产。在一些实施方案中,出口温度为至少60 $^{\circ}\text{C}$ 或至少70 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0144] 在某些实施方案中,提供工程化粒子的干粉组合物,其包括被PL、Chol和氯化钙(CaCl_2)的多孔壳包覆的多个结晶AmB药物粒子,其中该粉末通过液体原料在约70至约100scfm的在PSD-1规模喷雾干燥器上的总气体流量下的喷雾干燥生产。

[0145] 在某些实施方案中,用鼓式装填机填充包含被PL、Chol和氯化钙(CaCl_2)的多孔壳包覆的AmB药物粒子的工程化粒子的干粉组合物。

[0146] 在某些实施方案中,粉末填充质量在3号或2号胶囊中为约1.0mg至约40mg,如约3mg至约20mg、或约10mg至约15mg。

[0147] 在某些实施方案中,粉末填充质量对于目标填充质量具有良好的精度(例如,RSD<3%)和准确度。

[0148] 方法

[0149] 在某些方面,提供了一种治疗疾病或障碍的方法,其包括向有需要的受试者施用治疗有效量的根据本文所述的任一实施方案的药物组合物;其中所述施用是肺部施用。在某些实施方案中,该疾病或障碍包含囊性纤维化、非囊性纤维化支气管扩张(NCFBE)或慢性阻塞性肺病(COPD)。在某些实施方案中,该疾病或障碍是囊性纤维化。

[0150] 提供了一种恢复ASL的宿主防御特征(例如,碳酸氢根分泌、pH、抗微生物活性的增加和/或粘度的降低)的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的根据本文所述的任一实施方案的药物组合物,由此改善肺功能和生活质量。

[0151] 还提供了一种提高气道表面液体的pH的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的根据本文所述的任一实施方案的药物组合物,由此提高受试者的气道表面液体的pH;其中所述施用是肺部施用。

[0152] 还提供了一种增加到气道表面液体中的碳酸氢根分泌的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的根据本文所述的任一实施方案的药物组合物,由此增加到受试者的气道表面液体中的碳酸氢根分泌;其中所述施用是肺部施用。

[0153] 还提供了一种增加一秒用力呼气量(FEV1)的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的根据本文所述的任一实施方案的药物组合物,由此增加受试者的FEV1;其中所述施用是肺部施用。

[0154] 在一些实施方案中,当受试者的FEV1可测量地大于在根据本公开的方法治疗之前或在时间上远离该治疗时测量的相同受试者的FEV1时,将受试者的FEV1称为增加。

[0155] 在某些实施方案中,受试者的FEV1增加约3%至约20%、约5%至约15%、或约6%至约10%。

[0156] 在某些实施方案中,受试者患有CF。

[0157] 在某些实施方案中,将药物组合物施用于受试者的气道。

[0158] 在某些实施方案中,将药物组合物施用于受试者的支气管气道。

[0159] 在某些实施方案中,该药物组合物作为气雾剂施用。

[0160] 在某些实施方案中,该药物组合物作为干粉气雾剂施用。

[0161] 在某些实施方案中,受试者是人。

[0162] 在某些实施方案中,受试者是成年人。

[0163] 在某些实施方案中,受试者是小于12岁的人。

[0164] 在某些实施方案中,受试者是至少12岁的人。

[0165] 在某些实施方案中,受试者是至少4岁的人。

[0166] 在某些实施方案中,CF是用依伐卡托;或elexacaftor、tezacaftor和依伐卡托的组合难治的。

[0167] 在某些实施方案中,患有CF的受试者具有无法用电流调节剂(包括联合疗法)有效治疗的1类或其它突变。这包括无义突变或其中不产生功能性CFTR蛋白的其它突变。

[0168] 在某些实施方案中,受试者在CF跨膜传导调节子(CFTR)阴离子通道中具有两个突变;并且这两个突变各自独立地选自表1中所列的突变。

[0169] 表1. 示例性CFTR突变

R75X	663delT	1525-1G->A	1924del7
CFTRdele1	G178R	1525-2A->G	2055del9->A
M1V	675del4	S466X	2105- 2117del13insAGAAA
Q2X	E193X	L467P	2118del4
S4X	711+1G->T	1548delG	2143delT
182delT	711+3A->G	S489X	G673X
CFTRdele2	711+5G->A	S492F	2183AA->G 或 2183delAA->G
CFTRdele2-4	712-1G->T	1609delCA	2184insA
185+1G->T	H199Y	Q493X	2184delA
CFTRdele2,3	P205S	W496X	2185insC
W19X	L206W	I507del	Q685X
R75X	W216X	F508del	R709X
Q39X	Q220X	1677delTA	K710X
A46D	L227R	V520F	Q715X
296+1G->A	849delG	C524X	2307insA
296+1G->T	852del22	Q525X	L732X
CFTRdele3-10,14b-16	CFTRdup6b-10	CFTRdele11	2347delG
297-1G->A	935delA	1717-1G->A	2372del8
E56K	Y275X	1717-8G->A	R764X
W57X	C276X	G542X	R785X
306insA	991del5	S549R	R792X

[0170]

[0171]

306delTAGA	1078delT	S549N	2556insAT
E60X	1119delA	G550X	2585delT
P67L	G330X	1782delA	2594delGT
R75X	R334W	G551S	E822X
365-366insT	1138insG	G551D	2622+1G->A
G85E	I336K	Q552X	E831X
394delTT	T338I	R553X	W846X
L88X	S341P	A559T	Y849X
CFTRdele4-7	1154insTC	1811+1634A->G 或 1811+1.6kbA->G	R851X
CFTRdele4-11	1161delC	1811+1G->C	2711delT
CFTR50kdel	R347H	R560K	2721del11
405+1G->A	R347P	R560T	2732insA
405+3A->C	R352Q	1811+1G->A	CFTRdele14b-17b
406-1G->A	1213delT	1811+1643G->T	W882X
E92K	1248+1G->A	1812-1G->A	2789+5G->A
E92X	1249-1G->A	R560S	2790-1G->C
Q98X	1259insA	A561E	Q890X
442delA	1288insTA	V562I	S912X
444delA	W401X	1824delA	2869insG
457TAT->G	1341+1G->A	1833delT	Y913X
D110H	1343delG	Y569D	2896insAG
R117C	Q414X	E585X	L927P
R117H; 5T	D443Y	1898+1G->A	2942insT
541delC	1461ins4	1898+1G->C	2957delT
574delA	1471delA	CFTRdele13,14a	S945L
602del14	A455E	1898+3A->G	2991del32
621+1G->T	1497delGG	1898+5G->T	3007delG
3120G->A	3132delTG	H1054D	3028delA
CFTRdele17a,17b	3171delC	G1061R	G970R
CFTRdele17a-18	3171insC	L1065P	CFTRdele16-17b
3120+1G->A	Q1042X	R1066C	L1077P
3121-1G->A	3271delGG	R1066H	W1089X
3121-2A->G	3272-26A->G	3600G->A	Y1092X
3121- 977_3499+248del2 515	3600G->A	CFTRdele19	W1098X
3349insT	CFTRdele19	CFTRdele19-21	M1101K
3659delC	CFTRdele19-21	3600+2insT	R1102X
3667ins4	3600+2insT	3600+5G->A	E1104X
S1196X	3600+5G->A	R1158X	3500-2A->G
3737delA	R1158X	R1162X	W1145X

	W1204X	R1162X	W1282X	CFTRdele22-24
	3791delC	3849G->A	4005+1G->A	CFTRdele22,23
	Y122X	3849+4A->G	CFTRdele21	Q1330X
	3821delT	3849+40A->G	4005+2T->C	G1349D
	I1234V	3849+10kbC->T	4010del4	4209TGTT->AA
	4326delTC	3850-1G->A	4015delA	4218insT
[0172]	Q1411X	3850-3T->G	4016insT	E1371X
	Q1412X	G1244E	4022insT	4259del5
	4374+1G->T	3876delA	4021dupT	Q1382X
	4374+1G->A	3878delG	4040delA	4279insA
	4382delA	S1251N	N1303K	S1255P
	4428insGA	L1254X	Q1313X	S1255X
	3905insT	D259G		

[0173] 在某些实施方案中,这两个突变各自独立地选自2184delA、F508del、V520F、1717-1G->A、E60X、G551D、R553X和D259G。

[0174] 在某些实施方案中,这两个突变是选自F508del/F508del、G551D/F508del、R553X/E60X、F508del/1717-1G->A、F508del/2184delA和D259G/V520F的一对CFTR突变。

[0175] 在某些实施方案中,这两个突变是选自F508del/F508del、R553X/E60X、F508del/1717-1G->A、F508del/2184delA和D259G/V520F的一对CFTR突变。

[0176] 在某些实施方案中,该药物组合物的标称剂量或计量剂量为0.01mg至10mg。

[0177] 在某些实施方案中,该药物组合物的标称剂量或计量剂量为约0.1mg、约0.5mg、约1.0mg、约2.0mg或约4.0mg。

[0178] 在某些实施方案中,该组合物每天至少一次、每天至少两次或每天至少三次施用。

[0179] 在某些实施方案中,该组合物每天一次施用。

[0180] 在某些实施方案中,该组合物每周至少一次、每周至少两次或每周至少三次施用。

[0181] 在某些实施方案中,施用包括最初递送负荷剂量的药物组合物;随后递送维持剂量的药物组合物;其中负荷剂量与维持剂量的质量比为约2:1至约5:1。在某些实施方案中,负荷剂量与维持剂量的质量比为约2.5:1至约3:1。在某些实施方案中,负荷剂量为约1.0mg至约20mg、约3mg至约15mg、或约6mg至约10mg。在某些实施方案中,维持剂量为约0.1mg至约5mg、约0.5mg至约5mg、约1mg至约4mg、或约2mg。在某些实施方案中,负荷剂量为约1.5mg,且维持剂量为约0.5mg。在某些实施方案中,负荷剂量为约6mg,且维持剂量为约2mg。在某些实施方案中,负荷剂量为约10mg,且维持剂量为约4mg。

[0182] 上文对于负荷剂量和维持剂量描述的所有质量是指药物组合物的标称剂量或计量剂量(即,不是喷射剂量(emitted dose))的质量。

[0183] 在某些实施方案中,一种治疗患有CF、NCFBE或COPD的受试者的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的如本公开中提供的包含AmB和Cho1的脂质包覆的晶体组合物,

[0184] 其中所述脂质包覆的晶体组合物通过口腔吸入至肺中的支气管气道而向受试者施用。

[0185] 在某些实施方案中,一种治疗患有CF、NCFBE或COPD的受试者的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的如本公开中提供的包含AmB和Cho1的脂质包覆的晶体组合物,

其中所述组合物提供约0.2至约1.0pH单位的ASL pH提高。

[0186] 在某些实施方案中,一种治疗患有CF、NCFBE或COPD的受试者的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的如本公开中提供的包含AmB和Chol的脂质包覆的晶体组合物,

[0187] 其中所述组合物相对于安慰剂提供肺功能(FEV₁)的临床上显著的改善。

[0188] 在一些实施方案中,本文提供一种降低患有CF、NCFBE或COPD的个体的气道表面液体粘度的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的根据本文所述的任一实施方案的药物组合物,由此增加气道表面液体的水合和高度,同时降低受试者的气道表面液体的粘度;其中所述施用是肺部施用。

[0189] 在一些实施方案中,本文提供一种提高患有CF、NCFBE或COPD的个体的气道表面液体的抗菌活性的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的根据本文所述的任一实施方案的药物组合物,由此提高受试者的气道表面液体的抗菌活性;其中所述施用是肺部施用。

[0190] 在一些实施方案中,本文提供一种提高患有CF、NCFBE或COPD的个体的粘膜纤毛清除功能的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的根据本文所述的任一实施方案的药物组合物,由此提高受试者的粘膜纤毛清除功能;其中所述施用是肺部施用。

[0191] 在一些实施方案中,本文提供一种增强患有CF、NCFBE或COPD的个体的肺功能的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的根据本文所述的任一实施方案的药物组合物,由此增强受试者的肺功能;其中所述施用是肺部施用。

[0192] 在一些实施方案中,本文提供一种提高患有CF、NCFBE或COPD的个体的健康相关生活质量(HRQoL)的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的根据本文所述的任一实施方案的药物组合物,由此提高受试者的HRQoL;其中所述施用是肺部施用。

[0193] 在某些实施方案中,本文提供一种治疗患有CF、NCFBE或COPD的受试者的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的如本公开中提供的包含AmB和Chol的脂质包覆的晶体组合物,

[0194] 其中所述脂质包覆的晶体组合物相对于安慰剂提供健康相关生活质量的临床上显著的提高。

[0195] 在某些实施方案中,本文提供一种改善肺功能的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的本公开的药物组合物,由此改善受试者的肺功能;其中所述施用是肺部施用。

[0196] 在某些实施方案中,受试者患有CF、NCFBE或COPD。

[0197] 在某些实施方案中,受试者患有CF。

[0198] 在某些实施方案中,该药物组合物是干粉。

[0199] 在某些实施方案中,该干粉用便携式干粉吸入器施用。

[0200] 在某些实施方案中,干粉吸入器利用受试者的吸气流来流化和分散粉末(即,该装置是被动式干粉吸入器)。

[0201] 在某些实施方案中,干粉吸入器优选具有中等至高的气流阻力(即约0.10至0.30cm H₂O^{0.5} L⁻¹min)。

[0202] 在某些实施方案中,便携式干粉吸入器包括基于胶囊的单位剂量DPI、单次使用的一次性DPI或基于泡罩的多剂量干粉吸入器。

[0203] 在CF患者中发现超过1900种不同的CFTR突变,其中数百种被证实是通过至少五种不同的功能性丧失机制致病的。在与CFTR的某些突变形式结合并由此增加其活性的基因型

特异性小分子药物的开发中已经取得重要的最新进展。但是,约10%的CF患者具有对当前的小分子治疗无反应的CFTR基因型。这些包括产生完全缺失功能性CFTR蛋白的主要截断(major truncations)和其功能性缺陷的机制基础不明的非常罕见的突变。

[0204] 在一些实施方案中,本文公开的任何方法治疗选自I、II、III、IV、V、VI、U及其组合的CF突变类别。在一些实施方案中,突变类别选自I/I、II/II、II/U和U/III。

[0205] 无意受制于理论,本文所述的组合物不调节、校正或改变CFTR通道的活性。相信包含脂质包覆的AmB晶体的分子假体创建新的离子通道,其活性与CFTR和受试者的特定基因突变无关。

[0206] 在一些实施方案中,本文公开的任何方法是非基因型依赖性治疗。

[0207] 如本文所用,短语“非基因型依赖性”或“基因型无关性(genotype-agnostic)”是指不依赖于导致CF中的CFTR表达降低或CFTR功能降低的基因突变的确切性质的任何治疗。

[0208] 在某些实施方案中,本文所述的方法可用于治疗通常对常规CF疗法的治疗无反应或反应极小的各种CF基因型。例如,具有D259G/V520F CFTR突变对的患者中的V520F等位基因是用依伐卡托;或elexacaftor、tezacaftor和依伐卡托的组合难治的。

[0209] 因此,在某些实施方案中,本文所述的治疗CF的方法与CF基因型无关。

[0210] 在某些实施方案中,本文公开的任何方法治疗难治性或抵抗性CF。在某些实施方案中,该CF对一种或多种CF治疗是难治性或抵抗性的。

[0211] 可以使用本领域技术人员已知的任何技术测量受试者的气道表面液体(ASL)的pH。例如,可以通过将平面pH敏感探针放置在气管表面上来测量气道pH。Pezzullo AA等人(2012)Nature 487:109-113。

[0212] 当受试者的ASL的pH可测量地大于未治疗受试者的ASL的pH时,将受试者的ASL的pH称为提高。在一个实施方案中,当受试者的ASL的pH可测量地大于在根据本公开的方法治疗之前或在时间上远离该治疗时测量的相同受试者的ASL的pH时,将受试者的ASL的pH称为提高。

[0213] 在实施例1中描述了提高气道表面液体的pH的这种方法。值得注意的是,在宽范围的AmB:甾醇浓度下观察到ASL pH的恢复。因此,本文所述的提高ASL pH的方法对临床应用具有重大意义。

[0214] 在某些实施方案中,pH的提高可为0.1pH单位至2.0pH单位。在某些实施方案中,pH的提高可为0.1pH单位至1.0pH单位。在某些实施方案中,pH的提高可为0.3pH单位至1.0pH单位。在某些实施方案中,pH的提高可为0.3pH单位至1.0pH单位。在某些实施方案中,pH的提高可为0.5pH单位至0.9pH单位。在某些实施方案中,pH的提高可为0.5pH单位至0.8pH单位。在某些实施方案中,pH的提高可为0.6pH单位至0.8pH单位。在某些实施方案中,pH的提高可为约0.7pH单位。在某些实施方案中,pH的提高可为0.1pH单位至0.5pH单位。在某些实施方案中,pH的提高可为0.1pH单位至0.4pH单位。在某些实施方案中,pH的提高可为0.2pH单位至0.4pH单位。在某些实施方案中,pH的提高可为0.1pH单位至0.3pH单位。在某些实施方案中,pH的提高可为0.2pH单位至0.3pH单位。在某些实施方案中,pH的提高可为0.1pH单位至0.2pH单位。

[0215] 在某些实施方案中,pH的提高是通过顶端添加本文公开的任一组合物。

[0216] 在某些实施方案中,本文所述的方法可用于提高患者的气道表面液体的pH,而无

论其基因型如何,包括具有通常对常规CF调节剂/校正剂疗法的治疗无反应或反应极小的各种CF基因型的任一种的患者。

[0217] 因此,在某些实施方案中,本文所述是提高ASLpH的方法与患者的CF基因型无关。

[0218] 在某些实施方案中,本文公开的任何方法提高患有难治性或抵抗性CF的患者的ASLpH。在一些实施方案中,该CF对一种或多种CF治疗,如依伐卡托;或elexacaftor、tezacaftor和依伐卡托的组合是难治性或抵抗性的。

[0219] 在某些方面,本文提供一种恢复阴离子转运、提高气道表面液体水合和高度,由此降低CF患者的气道表面液体的粘度的方法,其包括向CF患者施用治疗有效量的本公开的药物组合物。

[0220] 在一些实施方案中,阴离子分泌(例如碳酸氢根分泌)的恢复导致气道表面液体pH提高、气道水合增加、气道表面液体高度增加、气道表面液体的抗微生物活性提高或其组合。气道表面液体的性质的这些改善可导致粘膜纤毛清除功能、肺功能量度(例如FEV1)、患者健康相关生活质量(HRQoL)或其组合的临床改善。

[0221] 在某些实施方案中,使用囊性纤维化问卷(Cystic Fibrosis Questionnaire)(CFQ)测量HRQoL。Henry, B.等人,QualLifeRes.2003年2月;12(1):63-76。在一些实施方案中,使用修订的囊性纤维化问卷(Cystic Fibrosis Questionnaire Revised)(CFQ-R)测量HRQoL。Wenninger, K.等人,Qual Life Res.2003NIAN 2YUE;12(1):77-85。在某些实施方案中,向患者施用本组合物提供了如通过CFQ或CFQ-R测得的至少0.5、至少0.8、至少1或至少2的HRQoL域分数的提高。在一些实施方案中,当受试者的HRQoL域分数可测量地大于在根据本公开的方法治疗之前或在时间上远离该治疗时测量的相同受试者的HRQoL域分数时,将受试者的HRQoL域分数称为提高。在某些实施方案中,当受试者的HRQoL域分数可测量地大于未治疗的受试者的HRQoL域分数时,将受试者的HRQoL域分数称为提高。

[0222] 与健康受试者相比,患有CF的受试者可具有降低的ASL高度。Muraglia, Katrina A.等人,Nature 2019年3月;567(7748):405-408。在某些实施方案中,患有CF的受试者具有约3 μ m至约4 μ m的ASL高度。在一些实施方案中,本文所述的方法将患有CF的受试者的ASL高度提高至健康受试者的ASL高度(例如,提高至约9 μ m至约10 μ m的ASL高度)。

[0223] 在某些实施方案中,本文所述的方法将受试者的ASL高度提高约1 μ m至约8 μ m、约1 μ m至约5 μ m、约1 μ m至约3 μ m、约2 μ m至约8 μ m、约2 μ m至约5 μ m、约3 μ m至约8 μ m、约3 μ m至约5 μ m、约5 μ m至约7 μ m、或约6 μ m。在一些实施方案中,当受试者的ASL高度可测量地大于在根据本公开的方法治疗之前或在时间上远离该治疗时测量的相同受试者的ASL高度时,将受试者的ASL高度称为提高。在某些实施方案中,当受试者的ASL高度可测量地大于未治疗的受试者的ASL高度时,将受试者的ASL高度称为提高。

[0224] 在某些方面,本文提供一种降低气道表面液体的粘度的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的本公开的药物组合物,由此降低受试者的气道表面液体的粘度;其中所述施用是肺部施用。

[0225] 在某些实施方案中,受试者患有CF、NCFBE或COPD。

[0226] 在某些实施方案中,受试者患有CF。

[0227] 在某些实施方案中,将药物组合物通过干粉气雾剂施用于受试者的气道。

[0228] 在某些实施方案中,将药物组合物通过干粉气雾剂施用于受试者的支气管气道。

[0229] 在某些实施方案中,受试者的气道是指所谓的传导或支气管气道,即以下肺结构中的任一种或全部:下呼吸道中的气管、支气管和细支气管。

[0230] 在某些实施方案中,本文所述的方法可用于降低具有通常对常规CF疗法的治疗无反应或反应极小的各种CF基因型的任一种的患者的气道表面液体的粘度。

[0231] 因此,在某些实施方案中,本文所述的降低ASL粘度的方法与患者的CF基因型无关。

[0232] 在一些实施方案中,本文公开的任何方法降低难治性或抵抗性CF患者的ASL粘度。在一些实施方案中,该CF对一种或多种CF治疗,如依伐卡托;或elexacaftor、tezacaftor和依伐卡托的组合是难治性或抵抗性的。

[0233] 根据每个前述实施方案,在某些实施方案中,患者是人。

[0234] 在某些实施方案中,适于用本文所述的组合物治疗的年龄范围取决于有效利用被动式干粉吸入器(DPI)的能力。6岁以下的受试者可能不具有正确执行被动式DPI的使用中涉及的步骤的认知能力。此外,他们可能缺乏产生所需吸气压力所需的呼吸肌力量。尽管如此,一些被动式DPI已被批准用于低至4岁的受试者。类似地,一些老年患者也可能具有阻碍正确使用被动式DPI的认知或萎缩的肌肉。吸气压力倾向于随年龄增加,在约25岁时达到最大,直到约40岁时趋于平稳,此后它们稳步下降。男性倾向于达到比女性高的吸气压力。气道疾病的增加也可能不利地影响受试者实现有效操作被动式DPI所需的压降($\sim 1.0\text{kPa}$)的能力。可以用In-Check dial基于其实现 1.0kPa 吸气压力的能力鉴别吸气肌力量差的受试者。根据每个前述实施方案,在某些实施方案中,患者的年龄在4至80岁之间。

[0235] 在某些实施方案中,患者至少4岁。在某些实施方案中,患者为至少6至约18岁。在一些实施方案中,患者在约80岁以下,具有可接受的吸气肌力量。在某些实施方案中,患者为约60至约70岁。在一些实施方案中,患者为约70至约80岁。

[0236] 在某些实施方案中,本文公开的任何方法使顶膜通透。在某些实施方案中,本文公开的任何方法使顶膜对质子通透。在某些实施方案中,本文公开的任何方法使顶膜对碳酸氢根阴离子通透。

[0237] 原料药

[0238] 本文所述的组合物可称为Amphotericin B Cystetic for Inhalation(ABCI),其可用作CF患者中的离子通道假体以恢复阴离子转运和宿主防御,由此改善肺功能和生活质量。

[0239] 在某些实施方案中,本文所述的组合物包含被包括胆固醇的脂质的多孔层包覆的两性霉素B的高度结晶的微粉化粒子。

[0240] AmB是一种七烯大环内酯,其含有在反式位置的七个共轭双键和通过糖苷键连接到主环的3-氨基-3,6-二脱氧甘露糖(海藻糖胺)。

[0241] AmB由结节链霉菌(*Streptomyces nodosus*)菌株作为发酵产物产生。静脉内AmB是目前用于治疗全身性真菌感染的唯一批准的杀真菌化合物。尽管未批准通过吸入施用,但吸入型AmB已被广泛研究用于治疗侵入性肺曲霉病。

[0242] 实际上,已经施用超过500,000个剂量的吸入型AmB,没有报告严重或重度的副作用。大多数研究出版物已经将吸入型AmB描述为耐受良好的。报告的不良事件(AE)主要与呼吸道刺激(例如咳嗽、支气管痉挛、呼吸困难、喘鸣)有关。另一些AE包括不愉快的味道(味觉

障碍)、恶心和呕吐。药物从肺缓慢吸收导致非常低的全身药物水平,其通常接近或低于定量限。血清肌酸酐(肾功能的一个生物标志物)的浓度通常不随气雾剂AmB施用而变化。因此,AmB靶向呼吸道显著改善AmB的全身耐受性。

[0243] 在中性pH下,AmB是两性离子型的,其中羧酸根基团($pK_a=5.7$)被去质子化,而海藻糖胺环上的氨基($pK_a=10.0$)被质子化。AmB的高度结晶的两性离子形式几乎不溶于水溶液,在37°C下在水、Gamble溶液和稀释Alveofact®中的溶解度分别为0.5、0.2和0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0244] 剂量数(Do)是用于基于其在预期临床剂量下的溶解度来预测化合物是否将合理地肺吸收的简单度量。

$$[0245] \quad Do = \frac{M_o(\mu\text{g})/V_{ASL}(\text{mL})}{S_{ASL} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right)}$$

[0246] 在此 M_o 是ASL中的AmB剂量, V_{ASL} 是ASL液的体积,且 S_{ASL} 是AmB在ASL液中的溶解度。大于1.0的Do的值与溶出限制的从肺吸收一致。在 $S_{ASL}=0.2\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $V_{ASL}=25\text{mL}$ 下,在 $M_o>5\mu\text{g}$ 下发生溶出限制的吸收。AmB的治疗剂量预期大于约1.0mg。在这种情况下,AmB的吸收将是溶出限制的。

[0247] 通过AmB在血浆中的缓慢出现(例如, $t_{\text{max}}=4$ 至8hr)和总体全身暴露相对于AmB的静脉内组合物显著减少证明本公开的组合物的缓慢溶出。在一些实施方案中,本文所述的吸入型组合物的全身暴露为静脉内施用相当的AmB剂量后测得的全身暴露的1/100-1/1,000倍。

[0248] 在某些实施方案中,本文所述方法中AmB的绝对生物利用度为约0.1%至约20%、约0.1%至约10%、约0.1%至约5%、约0.1%至约2%、或约0.1%至约1%。在一些实施方案中,AmB从血浆的清除是两相的,其中溶解在ASL中的AmB的初始半衰期为约5-20小时,然后由药物从肺组织的再分布引起非常缓慢的终末清除($t_{1/2} \sim 20$ 天)。对于AmB在静脉内施用微粒后观察到类似的两相清除过程,其最初被网状内皮系统的细胞清除,稍后再分布回血浆中。

[0249] AmB的标称剂量、粒度和物理形式可能对大鼠口服吸入后的AmB毒性有影响(US 2012/0128728 A1)。接受在包含50%AmB和50%的2:1摩尔比的DSPC/氯化钙的脂质包覆晶体中配制的高度无定形AmB(即,ABIP,Nektar Therapeutics)的大鼠(US 7,326,691;US 8,404,217;US 2012/0128728)表现出呼吸窘迫、气管和支气管肥大、气管炎症、支气管粘膜细胞浸润以及气管和支气管管腔渗出物迹象的临床症状。对于接受具有较小粒度的高度结晶AmB(在ABIP中 $\geq 76\%$ 的结晶度)的大鼠,这些效应的发生率显著降低。

[0250] 包含高度结晶AmB并以适当剂量和方案施用的ABIP组合物在非临床毒性研究中耐受良好。它们在健康志愿者中的单剂量和多剂量研究中也耐受良好(Kugler等人:两性霉素B吸入性粉末(ABIP)实现显著的肺部两性霉素B浓度和低全身两性霉素B浓度.16th Congress of the International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM), Paris, France, Abstract 0-0011, 2006年6月26日); lee J.D.等人:两性霉素B吸入性粉末(ABIP)在健康受试者中耐受良好,具有低全身两性霉素B暴露.In: Program and Abstracts of the 2nd Meeting of Advances Against Aspergillosis (AAA), Abstract P-118, 第214-215页, Athens, Greece, 2006)。

[0251] 无定形含量的增加也可导致原料药的可研磨性降低,这可导致粒度增加。对于实

施例3中的湿磨法例证了这一观察结果。晶体粒度的这些增加有可能不利地影响与空气动力学粒度分布相关的关键品质属性。

[0252] AmB的结晶度从96%降低到75%导致在水中湿磨后 X_{50} 从1.06增加到2.16 μm ,且 X_{90} 从2.14增加到5.99 μm (实施例3)。AmB晶体粒度的增加对配制的ABCI-002药物产品的物理化学性质和气雾剂性能没有有意的影响。MMAD从2.9增加到3.1 μm ,而 $\text{FPF}_{<5\mu\text{m}}$ 从61%增加到63%。

[0253] 在一些实施方案中,该原料药的结晶度为至少75%、至少90%或至少95%。

[0254] 在某些实施方案中,微粉化药物粒子的小初级粒度分布可以提供药物产品向肺的高效递送。AmB晶体具有如通过激光衍射测定的约0.5 μm 至约4 μm ,如约1 μm 至约3 μm 的 X_{50} 。在一些实施方案中,AmB晶体具有约1.5 μm 至约10 μm ,如约2.0 μm 至约8.0 μm 的 X_{90} 。

[0255] 赋形剂

[0256] 在某些实施方案中,本文所述的组合物包含被包含两种磷脂(HSPC和DSPG)、胆固醇和氯化钙的多孔层包覆的高度结晶的AmB粒子。这些材料可表现出直接影响该组合物的物理化学和气雾剂性质的复相行为。这又可能对配制的药物产品的功效、安全性和耐受性产生影响。

[0257] 磷脂是一类包含甘油或鞘氨醇主链并在其上连接一个或多个脂肪酸和具有与其相连的醇的磷酸酯基团的脂质。该磷酸酯基团可以用简单的有机分子如胆碱、乙醇胺或丝氨酸修饰。磷脂是两亲分子,其中两个脂肪酸酰基链是亲脂性的,而经修饰的磷酸酯基团是亲水性的。磷脂在水中自组装以形成膜结构。它们在哺乳动物细胞膜中普遍存在。

[0258] 水合磷脂双层表现出热致相行为。随着温度升高,酰基链经历从“凝胶相”(so)(其中酰基链以高度有序的固体样全反式构型存在)到无序“液晶相”(ld)(其中酰基链中的偏转构象异构体(gauche conformer)含量的增加导致无序的液体样堆砌)的相转变。凝胶到液晶的相变温度有时被称为主转变温度,或 T_m 。

[0259] 磷脂的 T_m 关键取决于酰基链的长度和饱和度,并且在较小程度上取决于首基的性质。表2提供各种水合磷脂的 T_m 值的比较。

[0260] 表2. 各种磷脂的水合凝胶到液晶的主转变温度

磷脂首字母缩略词	通用名	酰基链	T _m (°C)
DLPC	二月桂酰磷脂酰胆碱	12:0/12:0	-2
DMPC	二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱	14:0/14:0	24
DPPC	二棕榈酰磷脂酰胆碱	16:0/16:0	41
DSPC	二硬脂酰磷脂酰胆碱	18:0/18:0	55
[0261] HSPC	氢化大豆磷脂酰胆碱	~89% 18:0/18:0; 11% 16:0/16:0	53.6
DOPC	二油酰磷脂酰胆碱	18:1/18:1	-19
DLPC	二亚油酰磷脂酰胆碱	18:2/18:2	-57
DSPG	二硬脂酰磷脂酰甘油	18:0/18:0	55
DSPS	二硬脂酰磷脂酰丝氨酸	18:0/18:0	68
DSPE	二硬脂酰磷脂酰乙醇胺	18:0/18:0	74

[0262] 磷脂酰胆碱的酰基链的长度从12增加至18导致水合T_m从-2增加至55°C。在酰基链中引入不饱和导致T_m显著降低至小于0°C的值。首基性质的变化也导致T_m的差异,其中T_m为磷脂酰乙醇胺(PE) > 磷脂酰丝氨酸(PS) > 磷脂酰甘油(PG) ~ 磷脂酰胆碱(PC)。HSPC和DSPG的水合T_m值分别为53.6和55°C。

[0263] 细胞膜是包含各种类别的脂质和蛋白质的固有多组分系统。细胞膜的物理性质和生物学功能与磷脂双层内的脂质的排列和分布紧密相关。实际上,脂质可能根据其组成在双层内相分离为不同的域。Chol大量存在于细胞膜中,在维持结构完整性和调节膜流动性方面起到关键作用。

[0264] 在某些实施方案中,本文所述的组合物包含Chol。Chol可有助于配制的药物产品的安全性和离子通道活性。Chol添加到饱和PL中可对细胞膜和喷雾干燥粒子中的PL相行为具有显著影响。

[0265] 图1呈现水合DPPC-Chol混合物的相图(Ipsen JH, *Karlström*G, Mouritsen OG等人, Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. *Biochim Biophys Acta*.1987;905:162-172)。

[0266] 如图1中描绘,Chol的加入导致形成被称为有序液相(1o)的新相。低于~6摩尔%的Chol并入so中导致DSC热谱图中的T_m相变的增宽和酰基链堆砌中的无序度的增加。相反,在T_m以上存在于无序1d相中的磷脂酰基链在加入Chol的情况下具有提高的有序度。在约6至20摩尔%之间的Chol浓度下,两个相共存。在T_m以上,无序液相和有序液相共存(1d-1o)。在T_m以下,固体有序相与有序液相共存(so-1o)。在高Chol浓度(20-25摩尔%)下,失去了协同T_m相变,仅存在1o相。对于HSPC(较长的酰基链),预期类似的图,其中图1中的纵坐标上的温度上移约13°C。

[0267] 与上述完全水合的PL相比,根据本文所述的实施方案的组合物包含部分脱水的PL。对于所提出的作为离子通道假体的用途,可以将本文所述的组合物中的脂质喷雾干燥以形成具有低水含量的可吸入干粉。

[0268] 在不存在水的情况下,磷脂首基之间的间距减小,由此提高脂质酰基链之间的范

德华相互作用并提高 T_m 。例如,在冻干后,DPPC的 T_m 值从约41°C(完全水合)提高到105°C(Ohtake S, Schebor C, Palacek SP, de Pablo JJ: Phase behavior of freeze-dried phospholipid-cholesterol mixtures stabilized with trehalose. *Biochim Biophys Acta*. 2005, 1713:57-64)。

[0269] 对于喷雾干燥的DSPC粉末, T_m 从55°C(完全水合)提高到在75%RH下的71°C,在11%RH下的85°C,在<3%RH下的102°C(Pikal-Cleland KA, Zhang J, Lechuga-Ballesteros D, Tarara TE, Weers JG: The impact of Ca^{2+} binding on the packing structure of dry phospholipids. Presented at CRS Annual Meeting, Seoul, Korea, 2002)

[0270] 对于当前市售的包含PL的喷雾干燥组合物(例如,TOBI[®]Podhaler[™]、Bevespi[®] Aerosphere、Breztri[®] Aerosphere和Inbrija[®]),目标是在粒子形成过程中、在喷雾干燥过程中的收集器中和在产品的保质期内储存时将PL保持在so相。因此,这些产品利用长链饱和和磷脂酰胆碱,如DPPC和DSPC作为主要的成壳赋形剂。

[0271] 在水性原料的喷雾干燥过程中,雾化液滴的蒸发冷却将液滴温度保持在刚好高于室温,并且远低于PL的水合 T_m (41至55°C)。即使当喷雾干燥器上的入口温度超过 T_m 时也是如此。在粒子形成后,将喷雾干燥器中的出口温度和收集器夹套温度保持低于在脱水状态下的 T_m 。因此,酰基链在整个制造过程中和在储存期间保持在so相。

[0272] 对于包含DPPC或DSPC的液体原料,so相的喷雾干燥能够形成离散的喷雾干燥粒子,其中粒子的表面组成、表面形态、尺寸、密度、孔隙率都可以有效地控制。此外,由于它们存在于内源性肺表面活性物质中以及从肺中的天然快速清除途径,长链饱和PL被认为在肺中是生物相容的。

[0273] 相比之下, T_m 值<0°C的不饱和PL的水性原料的喷雾干燥带来重大挑战。在喷雾干燥过程中的水蒸发可能需要显著高于 T_m 的出口温度。在这种情形中,PL酰基链在粒子形成过程中存在于1d相中,并且干燥过程因此可能导致熔结粒子的大附聚物。这可能导致不适合作为干粉气雾剂吸入的低生产收率和空气动力学粒度分布。

[0274] 在某些实施方案中,本文所述的组合物包含具有较长酰基链(例如16:0/16:0或18:0/18:0)的饱和磷脂。在一些实施方案中,本文所述的组合物包含DPPC、DSPC、HSPC、DSPG或其组合。

[0275] 钙离子可以与磷脂中的磷酸酯基团结合,以置换水分子并压缩PL分子之间的堆砌。对于喷雾干燥的DSPC粉末,添加Ca离子可改善脱水粉末的环境鲁棒性(T、RH),特别是在通常导致毛细力显著提高的RH值(例如,75%RH)下。在一些实施方案中,PL/Ca比小于4.0mol/mol、小于3.0mol/mol或约2.0mol/mol(US 8,709,484;US 7,442,388;经此引用并入)。在一些实施方案中,可能不希望将PL/Ca比降低到低于化学计量比2.0mol/mol,因为低于这一比率的过量氯化钙可能提高粉末的吸湿性。

[0276] 在1d或1o相的 T_m 以上,喷雾干燥的粉末可变成“粘着的”粘性液体。这些内聚粉末(cohesive powders)倾向于负面影响粉末流动性和气雾剂性能。这一观察结果可能类似于高度无序的无定形固体在高于其玻璃化转变温度 T_g 时发生的情况。具有相分离的so和1o域的喷雾干燥粉末往往具有差的粉末性质。因此,可能希望将脂质保持在so相。

[0277] 对添加的Chol对于干粉制剂中的PL的相行为的影响知之甚少。根据本文所述的实施方案的组合物差示扫描量热法热谱图表明,1o相在低于约0.05w/w(≤ 9.4 摩尔%Chol)的

Chol/PL比下完全溶解到so相中(实施例4)。因此,在脱水状态下,so相可以溶解比水合DPPC-Chol混合物观察到的更大百分比的Chol(图1)。so相的维持导致 T_m 值 $>90^\circ\text{C}$ 。

[0278] ABCI粉末中的DSPG含量从如**AmBisome®**和一些肺表面活性物质制剂中使用的2.3mol/mol($\sim 7/3\text{mol/mol}$)的HSPC/DSPG比降低到9.0w/w或更高的HSPC/DSPG比也可以改善喷雾干燥的AmB/Chol粉末的物理化学性质和气雾剂性质(实施例12)。

[0279] 在一些实施方案中,HSPC/DSPG比的提高降低了本文所述的组合物在高相对湿度(RH)下的吸湿性(实施例5)。DSPG是可作为钠盐提供的阴离子磷脂。钙离子的添加可以置换钠离子,钠离子然后可以与来自氯化钙的氯离子组合以在喷雾干燥粉末中形成吸湿性氯化钠域。在高RH下,NaCl潮解(即,从空气中吸收水分并溶解在其中)。这可能促成根据本文所述的实施方案的组合物在高RH下的粘性。

[0280] 另一些PL可以提供ASL pH的改善和可接受的粉末和气雾剂性质。可以通过使用实施例部分中描述的特征方法测定它们的效用。在某些实施方案中,本文所述的组合物包含鞘磷脂、磷脂酰丝氨酸(PS)或其组合。在一些实施方案中,本文所述的组合物包含具有较长饱和酰基链(例如, $n \geq 16$)的磷脂。

[0281] 药物产品组合物

[0282] 在一些实施方案中,本文所述的组合物包含与脂质赋形剂相分离在其自身的结晶域中的药物粒子。也就是说,AmB和Chol不像US 2019/0083517、US 2020/0352970的情况那样复合在无定形纳米粒子中。AmB也不像**AmBisome®**中的情况那样包封在脂质体内(US 5,965,156)。

[0283] Chol在本文所述的组合物中的存在可从功效和安全性角度看都是至关重要的。

[0284] 从功效的角度看,Chol的存在可以在低和高AmB浓度下都保持离子通道活性。尽管机制尚未清楚理解,但在不存在Chol的情况下,在较高AmB浓度下离子通道活性倾向于下降(实施例10)。对于不含Chol的纯AmB和ABIP都观察到这一趋势。

[0285] 在US 2019/0083517中,Burke等人公开了用于恢复CF肺上皮中的气道表面生理学的AmB和Chol的组合物,其中声称Chol/AmB的摩尔比在2.6至50mol/mol的范围内。在US 2020/0352970中,Burke等人公开了用小分子碳酸氢根通道治疗CF的方法。在这种情况下,Chol/AmB比在1.0至12.0mol/mol之间。在本公开中,已经令人惊讶地发现,在显著低于1.0mol/mol的Chol/AmB比下保持离子通道活性(实施例10)。在一些实施方案中,Chol/AmB比的标称比率在0.4至1.2mol/mol之间。在一些实施方案中,由于在喷雾干燥过程中的原料药富集,最终喷雾干燥粉末中的Chol/AmB比的实际范围为约0.33至约1.0mol/mol。在某些实施方案中,与用AmB:Chol复合物所实现的相当的ASL pH的显著改善(即, $>0.1\text{pH}$ 单位)保持到低至0.05mol/mol的标称Chol/AmB比。

[0286] 在包含PL的喷雾干燥粉末中在较低Chol/AmB比下维持离子通道活性可以使富含Chol的lo相的相分离最小化,这是由于其对粉末性质的负面影响。

[0287] US 2019/0083517和US 2020/0352970中公开的AmB:Chol复合物实现CuFi-1和CuFi-4上皮细胞中的ASL pH的 ~ 0.1 至 0.2 个pH单位的改善。ASL pH保持微酸性($\text{pH} \sim 6.90$ - 6.95)。在CuFi-4细胞中,CFTR调节剂依伐卡托实现与AmB:Chol复合物相当的ASL pH改善。相比之下,用根据本文所述的实施方案的组合物观察到的CuFi-1细胞中的ASL pH改善为约0.4至0.5个pH单位,即,用AmB:Chol复合物和依伐卡托观察到的约2倍至5倍。在一些实施方

案中,ASLpH从使用AmB:Chol复合物时的微酸性提高到使用本文所述的组合物时的微碱性(pH~7.2)。实现微碱性pH可以改善参与宿主防御的许多阳离子肽(例如防御素)的活性。

[0288] 从安全性的角度看,已知Chol在根据本文所述的实施方案的组合物中的存在防止甾醇从哺乳动物细胞膜提取到膜外甾醇海绵相中。这已被证明是AmB的无Chol组合物中的毒性的主要机制。在US 2019/0083517、US 2020/0352970中已经提出在低至1.0mol/mol的Chol/AmB比下保持这种保护效应。已经令人惊讶地发现,在低至0.4mol/mol以下的Chol/AmB比下保持对于红细胞膜的这种保护效应(实施例15)。

[0289] 图2是详述各种AmB/脂质组合物的组成的三元相图。在某些实施方案中,本文所述的组合物由阴影三角形限定。该三角形的两条边由Chol/AmB摩尔比的范围限定(例如1.2mol/mol和0.4mol/mol)。该三角形的第三条边由消除1 α 相的相分离的Chol/PL比(0.05w/w)限定。在实施例1中更详细讨论了相图和各种组成。

[0290] 在一些实施方案中,用于恢复CF患者的ASL pH的AmB的标称日剂量为约0.1至约10mg、或约0.2mg至约6mg。

[0291] 在一些实施方案中,在实施例16中给出基于粉末的标称剂量和振实密度的药物载量的估算值。在某些实施方案中,药物载量为约0.1%至约50%w/w,如约0.5%至约20%w/w。

[0292] 物理化学性质

[0293] 本文所述的组合物的物理化学性质可取决于原料组成(例如固含量、PFOB含量)和喷雾干燥器中的干燥条件。下面描述的范围基于实施例中给出的组合物批次的结果。

[0294] 在一些实施方案中,小多孔粒子具有相对较低的密度,尽管不如由溶液基液体原料喷雾干燥的组合物低。在一些实施方案中,倾倒堆积密度为约0.04至约0.12g/cm³,并且振实密度为约0.08至约0.20g/cm³。

[0295] 卡尔指数提供散装粉末的流动性质的量度(表3)。几何尺寸小于5 μ m的细粒子,如根据本文所述的实施方案的那些,是高度内聚的,具有非常差的粉末流动性质。

[0296] 表3. 卡尔指数与散装粉末流动性质之间的关系

卡尔指数	粉末流动的描述
≤ 10	优异的自由流动粉末
11-15	良好的自由流动粉末
[0297] 16-20	适度的粉末流动
21-25	可通行的粉末流动 (Passable powder flow)
26-31	内聚, 差的粉末流动
32-37	非常内聚, 非常差的粉末流动
[0298] >38	几乎没有粉末流动

[0299] 尽管如此,可以用鼓式装填机(例如,来自Harro Höfliger的机器)准确且精确地填充细的内聚粉末,以对低至约1.0mg的填充质量实现小于约3%的相对标准偏差。

[0300] 在一些实施方案中,本文所述的粉末具有约20至约50,如约24至约30的卡尔指数。

具有较低卡尔指数值的粉末可具有显著改善的粉末流动性质、减小的尺寸和密度测量的可变性以及增加的生产收率。在喷雾干燥粉末中具有10域的组合物具有约40的卡尔指数,这倾向于导致低收率和难以处理(例如,填充和流化)粉末。

[0301] 在某些实施方案中,观察到的相对较高的卡尔指数值(表明差的内聚流动,即20-32的卡尔指数值)不会负面影响对便携式干粉吸入器的开发而言重要的流动性质。

[0302] 初级粒度分布可通过激光衍射测定(参见例如下文的表征方法)。在某些实施方案中,本文所述的粉末具有约0.40至约1.2 μm 的 X_{10} ,约1.5至约3.5 μm 的 X_{50} 和约4.0至约8.0 μm 的 X_{90} 。

[0303] 可以通过库仑KarlFischer滴定法测定水含量。在某些实施方案中,本文描述的粉末的水含量为约1.5%至约6%w/w。

[0304] 在某些实施方案中,可以通过制造工艺参数的变化在所描述的整个范围内调节粉末的物理化学性质。

[0305] 气雾剂性能

[0306] 在某些实施方案中,本文所述的组合物靶向支气管气道。在这方面,往往有益的是,使口腔和咽喉以及肺泡中的胸腔外药物沉积最小化,同时使肺内的大气道和小气道中的沉积最大化。

[0307] 在体外气雾剂性能指标的背景下,根据本文所述的实施方案的组合物具有至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的在4kPa压降和4L吸入体积下来自便携式干粉吸入器的喷射剂量。在一些实施方案中,将本文所述的组合物配制为通过如FDA关于“Metered Dose Inhaler (MDI) and Dry Powder Inhaler (DPI) Products-Quality Considerations (2018年4月)”的指导草案中描述的递送剂量均匀性(DDU)监管要求,其中平均ED值的标准偏差为6%或更小。

[0308] 在某些实施方案中,在4kPa压降和4L吸入体积下运行的Next Generation Impactor (NGI)中,本文所述的组合物的质量中值空气动力学直径(MMAD)为约1.5至约4.0 μm ,如约2.0至约3.5 μm 。

[0309] NGI内的沉积模式可能是重要的。根据上文详述的区域沉积的所需模式,有益的是使在USP喉部和撞击器(impactor)1和2级(被称为“粗级分”)中的沉积最小化,以及在至滤器的级6上“超细级分”中的沉积最小化,同时使在级3、4和5(被称为“气道级分”)上的沉积最大化。在某些实施方案中,在粗级分中的沉积为标称剂量的小于30%、小于20%或小于10%w/w。在一些实施方案中,在超细级分中的沉积为标称剂量的小于16%、小于12%或小于8%。在某些实施方案中,在气道级分中的沉积为标称剂量的至少40%、至少50%、至少60%或至少70%。

[0310] 在某些实施方案中,表示为喷射剂量的百分比的小于5 μm 的细粒分数($\text{FPF}_{<5\mu\text{m}}$)为至少40%、至少50%、至少70%或至少90%w/w。

[0311] 在某些实施方案中,在1.0至6.0kPa的压降之间的Alberta Idealized Throat (AIT)模型中总肺剂量(TLD)的流速依赖性小于40%或小于15%。

[0312] 在某些实施方案中,目标填充质量为约5至约40mg,如约10至约20mg。在一些实施方案中,本文所述的组合物用便携式胶囊型干粉吸入器(DPI)施用于受试者。在某些实施方案中,DPI具有体积为约0.30 cm^3 (3号胶囊)至约0.37 cm^3 (2号胶囊)的容器。

[0313] 在某些实施方案中,DPI是RS01 DPI(Plastiapae,Osnago,Italy)的一种变体。RS01的变体的不同在于它们容纳的胶囊的尺寸(3号至0号)以及它们对气流的阻力($R=0.06$ 至 $0.16\text{cm H}_2\text{O}^{0.5}\text{L}^{-1}\text{min}$)。在一些实施方案中,DPI是中至高阻力的(例如, R 为约 0.10 至约 $0.30\text{cm H}_2\text{O}^{0.5}\text{L}^{-1}\text{min}$)。在某些实施方案中,DPI是具有约 $0.14\text{cm H}_2\text{O}^{0.5}\text{L}^{-1}\text{min}$ 的阻力的RS01 DPI的一种变体。在某些实施方案中,中至高阻力DPI限制胸腔外沉积,同时也限制吸入后咳嗽的可能性。

[0314] 在一些实施方案中,本文所述的组合物用Handihaler(Boehringer Ingelheim)、RS00(Plastiapae)或Aerolizer®(Novartis)(美国专利3,991,761;经此引用并入)、Breezhaler®(US 2007/0295332;经此引用并入)(Novartis)施用。在某些实施方案中,本文所述的组合物用Turbospin(PH&T)或其变体,如美国专利8,069,851和7,559,325(都经此引用并入)中所述的T-326(Podhaler™)(Novartis)或AIR吸入器(Acorda Therapeutics)施用。

[0315] 在某些实施方案中,本文所述的组合物用单次使用的一次性吸入器施用。在一些实施方案中,单次使用的一次性吸入器是TwinCaps(Hovione)、Dose1®(Micro Engineering Solutions)、ICOne™(Iconovo)或Cyclops®(Pure IMS)。

[0316] 在一些实施方案中,本公开的干粉组合物鼻内施用以提高鼻中的ASL pH并提高鼻电位差。考虑的装置包括Aptar的Unidose系统。

[0317] 制造

[0318] 可以通过溶解在有机溶剂中来制备胆固醇和磷脂的混合物。在某些实施方案中,制备包含54/24/22w/w/w比率的HSPC/DSPG/Chol的脂质混合物。根据所需组成,该脂质混合物可以补充有额外的PL和氯化钙。

[0319] 在一些实施方案中,制备本文所述的组合物的方法包括将脂质混合物分散在水中以形成多层脂质体。在某些实施方案中,这一步骤涉及将脂质添加到温度高于脂质的水合 T_m 的热水中。在一些实施方案中,水的温度为 65°C 至 90°C 。在一些实施方案中,用高剪切混合器,如UltraTurrax®T-50实现分散。

[0320] 在一些实施方案中,该方法进一步包括在混合的同时加入氟化(FC)发泡剂(例如,全氟辛基溴(PFOB,Perflubron)、全氟辛基乙烷(PFOE)或全氟萘烷(PFD))以形成包含微米级乳液液滴的粗水包FC乳液(FC-in-water emulsion)。在某些实施方案中,该粗乳液用MicroFluidizer®或活塞间隙均质器(piston-gap homogenizer)(例如Avestin Emulsiflex®)在高压下均质化以形成亚微乳液。在一些实施方案中,均质化过程中的压力为约10,000至约20,000psi,并且均质化进行设定的时间(取决于批次大小)或指定数量的独立道次(pass)。在一些实施方案中,在设定的周期过程结束时进行单个独立道次,以确保所有液滴通过均质器至少一次。

[0321] 在一些实施方案中,该方法进一步包括在混合下将原料药添加到亚微乳液中。在某些实施方案中,该添加在一锅法中进行。在一些实施方案中,将乳液液滴和悬浮的药物粒子的所得复杂分散体用高剪切混合器混合或通过均质器。

[0322] 在一些实施方案中,乳液制备和药物的湿磨在两锅法中在分开的罐中进行。在某些实施方案中,这使得能够通过激光衍射或动态光散射对微粉化药物粒子进行进程内分级(in-process sizing)。在一些实施方案中,然后将两锅合并成一个,同时混合。

[0323] 在某些实施方案中,乳液制备和湿磨步骤用浓缩乳液/悬浮液进行,以限制通过均质器加工的液体量。在一些实施方案中,在最终步骤中加入水以实现最终液体原料中的目标固含量和PFOB体积分数。

[0324] 在一些实施方案中,将原料喷雾到温热的过滤空气流中,以蒸发溶剂并将干燥的产物输送到旋风分离器或袋滤室。在某些实施方案中,然后将废气与蒸发的溶剂一起排出。在一些实施方案中,可以调节喷雾干燥器的运行条件如入口和出口温度、进料速率、雾化压力、干燥空气的流速和喷嘴配置以产生所得干粒子的所需粒度、湿含量和生产收率。在某些实施方案中,该方法进一步包括将Niro PSD-1规模喷雾干燥器设置为具有在80°C至200°C之间的入口空气温度、在约40°C至120°C之间的空气出口温度、在30g/min至120g/min之间的液体进料速率、在50scfm至230scfm之间的总空气流量和在30至90scfm之间的雾化气流。喷雾干燥原料中的固含量将通常在0.5%w/v至10%w/v之间,并且发泡剂浓度将通常在3%至30%v/v之间。在一些实施方案中,所需设置至少部分取决于所用设备的规模和类型。

[0325] 随着雾化液滴中的水蒸发,水性雾化液滴的直径减小,并且缓慢扩散的乳液液滴和AmB晶体在空气/水界面处浓缩,形成中空液滴芯。当较高沸点的油相蒸发时,其在喷雾干燥粒子中留下孔隙。最终的粒子形态包括具有包埋的药物粒子的多孔脂质粒子。

[0326] 在某些实施方案中,出口温度和收集器夹套温度(如果用于控制收集器中的RH)必须低于最低脂质主转变温度。在其中Chol/PL比<0.05w/w的某些实施方案中,最低脂质主转变温度大于80°C,以提供70°C或更高的出口和收集器夹套温度。Chol/PL比的降低和HSPC/DSPG比的提高(实施例9和12)可能消除富Chol相,由此提供更高的出口温度、生产速率的提高和喷雾干燥粉末中的残余溶剂的减少。

[0327] 如果雾化液滴干燥得太快,可能失去细乳液液滴的益处。因此,控制干燥速率可以是有益的。

[0328] 定义

[0329] 如本文所用的术语“治疗(“treat”和“treating”)”是指进行干预以导致(a)预防病况或疾病在可能有发展该病况或疾病的风险或易患该病况或疾病但尚未被诊断为患有该病况或疾病的受试者中发生;(b)抑制病况或疾病,例如减缓或阻止其发展;或(c)缓解或改善病况或疾病,例如引起病况或疾病消退。在一个实施方案中,术语“治疗”是指进行干预以导致(a)抑制病况或疾病,例如减缓或阻止其发展;或(b)缓解或改善病况或疾病,例如引起病况或疾病消退。

[0330] 如本文所用的“受试者”或“患者”是指活哺乳动物。在各种实施方案中,患者是非人哺乳动物,包括但不限于小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠、兔、绵羊、山羊、猫、狗、猪、马、牛或非人灵长类动物。在某些实施方案中,患者是人。

[0331] 如本文所用,“有效量”是指足以实现所需生物效应的任何量。

[0332] 如本文所用的“治疗有效量”是指足以实现所需治疗效果,例如治疗CF的任何量。

[0333] 如本文所用的“活性成分”、“治疗活性成分”、“活性剂”、“药物”或“原料药”是指药物的活性成分,也称为活性药物成分(API)。

[0334] 如本文所用的“无定形”是指材料在分子层面缺乏长程有序的状态,并且根据温度可以表现出固体或液体的物理性质。通常,这样的材料没有给出特征性的X射线衍射图,并且尽管表现出固体的性质,但更正式地被描述为液体。在加热时,在“玻璃化转变”下发生从

固体到液体状性质的变化,其通常被定义为二级相变。

[0335] 如本文所用的“结晶”是指其中材料在分子层面具有规则有序的内部结构并给出具有限定峰的特征性X射线衍射图的固相。这样的材料在充分加热时也将表现出液体的性质,但是从固体到液体的变化以相变为特征,通常是一级相变(“熔点”)。在本公开的上下文中,结晶活性成分是指结晶度大于75%的活性成分。在某些实施方案中,结晶度合适地大于90%。在另一些实施方案中,结晶度大于95%。在另一些实施方案中,结晶度小于10%或小于5%。

[0336] 如本文所用的“药物载量”是指基于质量计(一种或多种)活性成分在组合物总质量中的百分比。

[0337] 如本文所用的“质量中值直径”或“MMD”或“ X_{50} ”是指通常在多分散粒子群中,即由一定范围的粒度组成的多个粒子的中值直径。除非上下文另有说明,如本文报道的 X_{50} 值通过激光衍射(Sympatec Helos, Clausthal-Zellerfeld, Germany)测定。

[0338] 如本文所用的“振实密度”或 ρ_{tapped} 以类似于如USP<616> Bulk Density and Tapped Density of Powders中所述的方法I的方式测量。振实密度代表了比倾倒堆积密度更接近于粒子密度,测量值比实际粒子密度小约20%。

[0339] 如本文所用的“质量中值空气动力学直径”或“MMAD”是指通常在多分散群体中的多个粒子的中值空气动力学尺寸。“空气动力学直径”是通常在空气中具有与粉末相同的沉降速度的单位密度球体的直径,因此是在其沉降行为方面表征雾化粉末或其它分散粒子或粒子组合物的有用方式。空气动力学粒度分布(APSD)和MMAD在本文中通过使用NEXT GENERATION IMPACTOR™(Copley Scientific)的级联撞击测定。一般而言,如果粒子在空气动力学上太大,则较少的粒子将到达肺的特定区域。如果粒子太小,则更大百分比的粒子可能被呼出。相比之下, d_a 表示单个粒子的空气动力学直径。

[0340] 如本文所用的“标称剂量”或“ND”是指装载到非储库型(non-reservoir based)干粉吸入器中的容器(例如胶囊或泡罩)中的药物的质量。ND有时也称为计量剂量。

[0341] 如本文所用的“喷射剂量”或“ED”是指在来自粉末单元的致动或分散事件后从吸入器装置递送干粉的指示。ED被定义为由吸入器装置递送的剂量与标称或计量剂量的比率。ED是实验测定的参数,并且可以使用模拟患者给药的体外装置设置来测定。ED有时也称为递送剂量(DD)。

[0342] 如本文所用的“细粒分数”(FPF)是指喷射剂量中的空气动力学尺寸小于 $5\mu\text{m}$ 的活性成分的百分比。空气动力学粒度分布(APSD)在本文中通过使用NEXT GENERATION IMPACTOR™的级联撞击测定。

[0343] 如本文所用的“固含量”是指溶解或分散在待喷雾干燥的液体溶液或分散体中的(一种或多种)活性成分和赋形剂的浓度。

[0344] 如本文所用,“受试者的气道”是指以下肺结构的任一种或全部:气管、支气管和细支气管。

[0345] 术语“约”是指可吸入组合物领域的技术人员通常遇到的数量值变化,包括本文所述数量值加或减0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或10%的变化。

[0346] 在整个说明书和随后的权利要求书中,除非上下文另有要求,词语“包含(comprise)”或变型如“包括”或“含有”应理解为意味着包括指定的整数或步骤,或整数或

步骤的组,但不排除任何其它整数或步骤,或整数或步骤的组。

[0347] 除非另有说明或从上下文中清楚可见,数值范围包括端点和其间的任何值。

实施例

[0348] 参考以下实施例进一步澄清本公开的各种方面和实施方案。这些实施例本质上是示例性的,并且不应被理解为限制本公开的主题。

[0349] 表征方法

[0350] 两性霉素B (AmB) 含量和纯度. 通过在383nm处检测的反相高效液相色谱法 (RP-HPLC) 测定配制的散装粉末或空气动力学粒度分布 (APSD) 样品中的AmB含量和纯度。用Agilent 1260 InfinityII HPLC系统 (Wilmington, DE, USA) 分析样品。用Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3.0x150mm, (2.7 μ m) 柱使用梯度方法 (溶剂A=10mM 乙酸盐缓冲液, pH4.2; 溶剂B=乙腈/甲醇, 1.0v/v) 实现分离。使用USP认证的参考标准, 使用单点校准量化AmB。

[0351] 胆固醇含量. 通过在210nm处检测的RP-HPLC测定胆固醇含量。用Agilent 1260 Infinity II HPLC系统 (Wilmington, DE, USA) 分析样品。用Haisil ClipeusTMC18柱 (5 μ m) 使用等度法 (乙腈/异丙醇, 1.0v/v) 实现分离。使用Cholesterol HP, Ph.Eur/USP-NF原料 (Carbogen Amcis, Beuvry-la-Forêt, France), 使用单点校准量化胆固醇。

[0352] 初级粒度分布. 通过激光衍射 (Sympatec GmbH, Clausthal-Zellerfeld, Germany) 测定初级粒度分布。Sympatec H3296单元配备R2透镜、ASPIROS微计量单元和RODOS/M干粉分散单元。将约2mg至5mg粉末填充到ASPIROS管中, 并以5mm/s供入以4巴分散压力和65毫巴真空操作的RODOS中。以约1%至5%的光学浓度引入粉末, 并在长达15秒的测量持续时间内收集数据。通过仪器软件使用Fraunhofer模型计算粒度分布。报告的值表示每个收集器的三次独立测量的平均值。

[0353] 振实密度. 使用已知体积 (0.593cm³) 的圆柱形空腔测定振实密度 (ρ_{tapped})。使用微型刮刀将粉末填充到该样品容器 (holder) 中。然后在台面上轻轻敲击样品池。随着样品体积减少, 将更多粉末添加到池中。重复敲击和粉末添加步骤, 直至空腔填满, 并且粉末床不再随着进一步敲击而固结。振实密度被定义为该粉末振实床的质量除以空腔的体积。

[0354] 堆积密度. 堆积密度 (ρ_{bulk}) 代表在没有振实的情况下装载到样品容器中至所需体积的粉末的质量。

[0355] 卡尔指数. 卡尔指数C提供粉末可压缩性的指示。其由下式给出:

$$[0356] \quad C = \frac{\rho_{\text{tapped}} - \rho_{\text{bulk}}}{\rho_{\text{tapped}}} \times 100$$

[0357] 随着卡尔指数提高, 认为粉末的流动性降低。<10%的值表示优异的自由流动粉末, 11-15%之间的值与良好的自由流动粉末相关, 16-20%之间的值与适度的粉末流动相关, 21-25%之间的值与可通行的粉末流动 (passable powder flow) 相关, 26-31%之间的值与差流动内聚相关, 32-37%之间的值与非常差的流动相关, 并且 \geq 38%与几乎没有流动相关。

[0358] 水含量. 使用具有无烧结阴极 (fritless cathode) 和汽化器型号VA-300的Nittoseiko Analytech Moisture Meter CA-310通过Karl Fischer滴定法测定水含量。

[0359] 动态蒸气吸附.使用由Surface Measurement Systems,UK制造的动态蒸气吸附(DVS)仪器测量在25℃下的吸湿等温线.该仪器通过重量分析测量材料对水蒸气的吸收和损失.该DVS系统配备分辨率为 $\pm 0.1\mu\text{g}$ 且每日漂移为约 $\pm 1\mu\text{g}$ 的记录微量天平.在实验运行的第一步骤中,将样品在25℃和0%RH下干燥24小时以使样品达到恒定质量.然后,将仪器编程为从0至2%RH、至5%RH,然后将RH以5%RH的步长增加至90%RH并以5%RH的步长从90%降低至0%RH.为该系统选择 $\text{dm}/\text{dt}=0.005\%/ \text{min}$ 的平衡标准,以在自动进行到下一个RH步骤之前实现每个RH步骤.在这一研究中使用10至15mg之间的样品质量。

[0360] 差示扫描量热法.使用配备制冷冷却系统(New Castle,Delaware)的TA Instruments型号Q2000差示扫描量热计测量给定样品的DSC热谱图.用干燥氮气以 $50\text{cm}^3/\text{min}$ 的流量吹扫样品池;制冷控制系统(RCS)使用流量为 $110\text{cm}^3/\text{分钟}$ 的氮气.使用样品包封压机将含有约5至10mg粉末的Tzero铝盘气密密封.将样品在-40℃下平衡,然后以 $5^\circ\text{C}/\text{min}$ 加热至200℃。

[0361] 空气动力学粒度分布.使用RS01干粉吸入器(Mod.7Ultra High Resistance 2型号)、USP induction port(IP)和Next Generation Impactor™或NGI™测定空气动力学粒度分布(APSD),并符合USP<601>和Ph.Eur.2.9.18.调节流量控制装置以在4kPa压降下和通过吸入器的4L总体积下运行.使用的RS01 DPI变体具有 $0.143\text{cmH}_2\text{O}^{0.5} \text{L}^{-1}\text{min}$ ($0.045\text{kPa}^{0.5} \text{L}^{-1}\text{min}$)的阻力.这对应于在4kPa压降下 44.2L min^{-1} 的流量.将约10mg手动填充到#3号尺寸吸入级HPLC胶囊(Vcaps,Qualicaps)中.从吸入器喷出的气雾剂粉末通过USPIP抽吸并在NGI中分级.在NGI的每个级,用包含甲醇的样品溶解溶液提取排空的胶囊和装置.进行进一步稀释以降低AmB浓度在检测范围的线性度内.使用上述HPLC方法测定每级的AmB质量,并计算小于 $5\mu\text{m}$ 的细粒剂量($\text{FPD}_{<5\mu\text{m}}$)和质量中值空气动力学直径(MMAD)。

[0362] 细胞系和生长条件.在Thermo Scientific BioLite Cell Culture处理过的 75cm^2 烧瓶上由冻存液(cryostock)生长NuLi、CuFi-1和CuFi-4细胞(Welsh Laboratory, University of Iowa).这些烧瓶预先用4mL $60\mu\text{g}/\text{mL}$ 人胎盘胶原IV型(Sigma-Aldrich)在37℃下涂覆最少1小时,用PBS冲洗两次,然后干燥,然后接种.该细胞用12mL支气管上皮细胞生长培养基(BEGM) BulletKit (Lonza CC-3170)培养,该培养基包括基础培养基和8个SingleQuots的补充剂(牛垂体提取物(BPE) 2mL;氢化可的松0.5mL;hEGF 0.5mL;肾上腺素0.5mL;转铁蛋白0.5mL;胰岛素0.5mL;视黄酸0.5mL;三碘甲状腺原氨酸0.5mL)。弃置庆大霉素-AmB等分试样,并且培养基替代地补充 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ 青霉素-链霉素(Corning Cellgro)、 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ 庆大霉素(Sigma-Aldrich G1397)和 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 氟康唑(Sigma-Aldrich)。通过Integrated Genetics对原始CF移植供体进行基因分型.通过ATCC库二次确认细胞系具有正确的基因型并且没有支原体污染.MycAlert支原体检测试剂盒(Lonza LT07-418)用于检测广谱支原体共有的任何RNA转录体.证实细胞系不含支原体.使细胞在5%CO₂中在37℃下生长至>90%融合(confluence),每2-3天更换培养基,然后用含有1mM EDTA(Gibco 25200-056)的4mL 0.25%胰蛋白酶进行胰蛋白酶化.胰蛋白酶用含有1%胎牛血清的10mL HEPES缓冲盐水溶液(Lonza CC-5024)灭活.将细胞在Eppendorf离心机5430R中在室温下以1,500rpm旋转5分钟,并重悬在BEGM培养基中以用于传代.为了在膜载体上培养以分化,在离心后将细胞重悬在Ultrosor G培养基中.这包含1:1DMEM:Ham's F-12,补充有4%v/v Ultrosor G (Crescent Chemical)以及 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ 青霉素-链霉素(Corning Cellgro)、 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ 庆大霉素

(Sigma-Aldrich G1397) 和 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 氟康唑 (Sigma-Aldrich)。对于所有研究,使用的膜载体是 Corning Costar 0.4- μm 24孔板 Transwell 透明聚酯膜插件 (0.33cm^2) (Corning 3470)。以与上文详述的烧瓶相同的方式用胶原蛋白涂覆这些膜,只是使用 100mL 胶原蛋白并且仅用 PBS 冲洗一次。插件各接种 $115,000$ 个细胞。使这些膜在气-液界面处成熟最少 14 天以达到完全分化,其中 Ultroser G 培养基根据需要每周更换一次或多次。在成熟后,每 7 天更换培养基。对于协变量控制,实验中使用的膜在龄期和成熟方面尽可能接近。

[0363] 对于原代培养的气道上皮细胞,从经历肺移植或器官捐赠的患有 CF 的个体获得肺组织。将组织解离,并将解离的细胞直接接种到 transwell 过滤器上并在气-液界面处培养。培养物在接种后大于三周时使用,此时上皮细胞分化成气道的典型细胞类型并且细胞的电性质反映离体的组织。

[0364] 用于测量气道表面液体 pH 的荧光显微测定法。对于每个实验,通过将约 2mg 的 ABCI 分散在约 $100\mu\text{L}$ 的全氟己烷 PFH (FC-72, Sigma-Aldrich) 中以达到约 1mM AmB 的最终浓度而制备 ABCI 的新鲜悬液。在甲醇中溶解后,通过吸收光谱学一式三份测量储备悬液中的 AmB 浓度。使用比尔定律由在 406nm 处的吸光度 ($\epsilon_{406} = 164,000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 计算浓度。接下来,储备悬液用 PFH 稀释以实现 ~ 0.5 至 $50\mu\text{M}$ 的悬液 AmB 浓度。

[0365] 小直径 NuLi 和 CuFi 细胞用于 ASL pH 的测量。比率式 pH 指示剂 SNARF 偶联葡聚糖 (Molecular Probes) 用于测量 ASL pH。通过超声处理将 SNARF 粉末悬浮在 PFH 中并分布到细胞的顶端表面上。在 2 小时后测量 ASL pH。在 514nm 下激发 SNARF,并使用配备用于细胞系培养物的水浸透镜的 Zeiss LSM 800 显微镜在 $40\times$ 放大倍数下在 580nm 和 640nm 下记录喷射。为了生成用于 pH 测定的标准曲线,将 SNARF 溶解在无色 pH 标准品中,并将荧光比率转换为 pH。将在该测定中测试的粉末悬浮在适当体积的 PFH 中,将其超声处理 1 分钟以帮助悬浮。通过在 PFH 中涡旋而悬浮 AmBisome。随后,将 $20\mu\text{L}$ 悬液以 0.5 至 $50\mu\text{M}$ 的浓度施用到培养的气道上皮细胞 ($A = 0.33\text{cm}^2$) 的表面上。在所有实验中,测量化合物处理过的上皮细胞的 ASL pH 并与来自媒介物处理过的上皮细胞的结果进行比较。对于顶端化合物施用,在测量 ASL pH 之前将培养的气道上皮细胞在 37°C 下温育约 22 小时。

[0366] 红细胞储备悬液的制备。将 1mL 人全血 (肝素钠制剂; BioIVT, Westbury, NY) 在室温下以 $10,000\times g$ 离心 2 分钟。除去上清液,并将团块通过轻轻倒置而重悬在 1mL 0.9% (m/v) 盐水中 (红细胞将通过移液和涡旋而裂解)。将所得悬液以 $10,000\times g$ 离心 2 分钟。然后除去上清液,且盐水洗涤再重复两次。在最后一次洗涤后,除去上清液,将红细胞团块重悬在 1mL 重悬缓冲液 (10mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 10mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、 150mM NaCl 、 1mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、pH 7.4) 中以制造红细胞储备悬液。

[0367] 最低溶血浓度测定 (MHC)。在 DMSO ($D6-99.9\%$; Cambridge Isotope Laboratories) 溶液中以稀释系列制备待测试的化合物,每个浓度为 $25.63\times$ 最终浓度。在 0.2mL 微量离心管中将化合物稀释系列在重悬缓冲液中 $1:25$ 稀释至总共 $100\mu\text{L}$,并涡旋以混合该溶液。阴性对照 (0% 裂解) 含有仅在重悬缓冲液中的 DMSO,而阳性对照 (100% 裂解) 含有仅在水中的 DMSO,因为这导致红细胞由于渗透压而完全裂解。将 $2.52\mu\text{L}$ 体积的红细胞悬液添加到每个管 (包括对照) 中,通过轻轻倒置而混合每个管,并在 37°C 下静态温育 2 小时。在温育后,通过轻轻倒置再次混合每个样品,并以 $3,214\times g$ 离心 6 分钟。在离心后,取出 $60\mu\text{L}$ 上清液,添加到 96 孔板中,并在 540nm 下读取吸光度。将数据归一化为阴性对照,并处理为相

对于阳性对照的%总溶血。

[0368] 实施例1:脂质包覆的AmB(ABCI-001、ABCI-002、ABCI-003、ABCI-004)的组成

[0369] 脂质包覆的AmB的四种组合物(ABCI-001、ABCI-002、ABCI-003、ABCI-004)的标称无水组成显示在表4中。还显示了三种对照:AmBisome[®](即脂质体两性霉素B,L-AmB);Burke等人(US 2019/0083517;US 2020/0352970)制备的冻干AmB/Chol复合物;和两性霉素B吸入粉末(ABIP),这是由Nektar Therapeutics开发的用于治疗侵入性肺曲霉病的AmB的干粉组合物(US 7,326,691;US 8,404,217;US 2012/0128728)。

[0370] 表4.理论无水吸入型AmB组合物

组合物	AmB (%w/w)	Chol (%w/w)	HSPC (%w/w)	DSPG (%w/w)	CaCl ₂ (%w/w)	Chol/AmB (mol/mol)	HSPC/ DSPG (w/w)	Chol/PL (w/w)
ABCI-001	30.0	14.6	35.8	15.9	3.70	1.16	2.3	0.29
ABCI-002	14.0	6.81	51.2	22.8	5.20	1.16	2.3	0.09
[0371] ABCI-003	14.0	2.36	70.3	7.8	5.52	0.40	9.0	0.03
ABCI-004	3.4	0.57	80.72	8.97	6.34	0.40	9.0	0.006
AmBisome ^a (L-AMB)	3.8	3.9	16.1	6.3	---	2.45	2.6	0.18
AmB/Chol 复合物	32.3	67.7	---	---	---	5.00	---	---
ABIP	50.0	0.0	47.0 ^b	0.0	3.0	0.0	n.a.	0.0

[0372] ^a除了脂质和AmB之外,AmBisome还含有67.8%蔗糖、2.0%六水合琥珀酸二钠和0.2%生育酚

[0373] ^bABIP利用合成DSPC代替HSPC

[0374] 将表4中详述的AmB/脂质组合物绘制在图2中的伪三元相图中。该三元图的顶点处的PL组分代表各种PL组分(例如HSPC、DSPC、DSPG)的质量总和。

[0375] 尽管商业L-AMB含有与ABCI组合物相同的脂质组分(即HSPC、DSPG、Chol),但它们以不同的比例存在。此外,与ABCI组合物相比,L-AMB中的药物和脂质的组织不同。L-AMB中的原料药包封在小单层囊泡(脂质体)中。该组合物具有2.5mol/mol的Chol/AmB比和2.3的HSPC/DSPG比(即7/3w/w)。将脂质粒子在大百分比的蔗糖存在下冻干成干粉,所述蔗糖充当冷冻保护剂以在冻干过程中维持脂质体完整性。60mg重构的L-AMB通过四个CFTR^{-/-}猪中的1cm²气管窗施用到气道上皮细胞的顶侧使得ASL pH提高~0.2pH单位,从pH 6.8至7.0(US 2020/0352970)。

[0376] Burke等人(US 2019/0083517;US 2020/0352970)研究的冻干AmB:Chol复合物具有5.0mol/mol的甚至更高的Chol/AmB比,但不含添加的PL。通过在快速注入非溶剂(水)中时从该材料在二甲亚砜/氯仿中的溶液中快速纳米沉淀而形成AmB:Chol复合物。将所得悬浮液冻干以形成干粉。AmB:Chol复合物在CuFi-1细胞中表现出碳酸氢根分泌和ASL pH(~0.1-0.2pH单位)的显著增加。

[0377] ABIP是包含用2:1摩尔比的DSPC/氯化钙包覆的湿磨AmB晶体的喷雾干燥组合物。这种组合物不含胆固醇(即Chol/AmB=0mol/mol)。其还仅含有饱和磷脂酰胆碱(DSPC),没有添加DSPG。尽管ABIP在低剂量(在FC-70中2μM)下在CuFi-1细胞中表现出ASL pH的改善,

但其在高剂量 (50 μ M) 下没有 (实施例10和12)。这一结果与先前使用纯AmB的研究一致,并且表明一定量的Chol对于在宽范围的AmB浓度下维持离子通道活性是必需的。包含高度结晶的原料药的ABIP组合物在早期临床开发中已经证明良好的耐受性。

[0378] 还呈现已用于非临床毒理学研究的三种ABCI组合物 (ABCI-001、ABCI-002和ABCI-003) 的组成。这些粉末具有0.4至1.2mol/mol的Chol/AmB比。无意受制于理论,但L-AMB和AmB:Chol复合物中使用的高Chol/AmB比可能不适合于包含PL的干粉组合物,因为大量Chol的存在可能导致PL酰基链的堆砌的无序,以导致粒子间内聚力的不可接受的提高和“粘性”粉末。ABCI-003和ABCI-004都包含在图2的阴影三角形内,而ABCI-001和ABCI-002不在。

[0379] 如所述,ABCI-001和ABCI-002在图2的阴影三角形之外,因为这些组合物中的脂质在so+lo两相区内。相比之下,ABCI-003和ABCI-004在so相内。迄今研究的其它吸入型AmB组合物(即,ABIP、L-AMB (AmBisome) 和AmB:Chol复合物) 的组成完全在图2的阴影三角形之外。

[0380] ABCI-001 (30%w/w AmB、Chol/AmB=1.2mol/mol) 的DSC温谱图含有显著比例的富含Chol的lo相(实施例4)。对于ABCI-002,将药物含量降低至14%w/w,同时保持Chol/AmB摩尔比恒定,这导致胆固醇/PL比从0.29降低至0.09w/w。尽管如此,仍然保留小比例的富含Chol的lo相。具有相分离的lo相的干粉可以表现出强的粒子间内聚力以及在高相对湿度下提高的吸湿性和潮解(实施例5)。这些特征可能对喷雾干燥过程中的粉末收率具有负面影响,并且可能导致相对较大的质量中值空气动力学直径 (MMAD ~ 4 μ m) (实施例9)。

[0381] ABCI-003保持ABCI-002中的14%w/w药物载量,但具有0.4mol/mol的降低的标称Chol/AmB比。总体而言,Chol含量从ABCI-001中的14.6%降低至ABCI-003中的2.4%,而Chol/PL比降低至0.03w/w。在这种Chol/PL比下,lo相溶解在so相中(实施例4)。在ABCI-003中,HSPC/DSPG比也从2.3w/w提高到9.0w/w,以致Chol在PL相中的溶解度改善、NaCl形成减少和粉末吸湿性降低(实施例5)。

[0382] 与ABIP不同,含有添加的Chol的所有ABCI组合物在低和高AmB浓度下都表现出ASL pH的显著改善(实施例10)。此外,已经显示DSPG的存在加强所观察到的ASL pH改善的量级(实施例12)。

[0383] 关于Chol/AMB、Chol/PL和HSPC/DSPG比的许多限制可能专门针对用于吸入的干粉组合物的开发,并且可能不适用于液体基气雾剂,如吸入型L-AMB。它们也无法直接适用于不含PL的组合物。

[0384] 实施例2:通过喷雾干燥制造ABCI-001

[0385] 原料制备. 首先用高剪切混合器 (UltraTurraxT-50) 将脂质和氯化钙分散在热水中以形成多层囊泡 (MLV)。水相必须高于脂质的主转变温度 (T_m) 以促进MLV形成 ($T > 65^\circ\text{C}$)。将MLV分散体冷却 ($T < 30^\circ\text{C}$), 并使用Watson-Marlow蠕动泵过滤和加入全氟辛基溴 (PFOB), 同时混合以形成由脂质的单层稳定化的粗水包PFOB (PFOB-in-water) 乳液液滴。乳液液滴充当成孔剂以在结晶药物粒子上形成脂质的多孔包衣。粗乳液然后用M-100型微流化器在高压下在单个独立道次中均质化以形成纳米乳液液滴 (直径 ~ 200-500nm)。接下来,将原料药在高剪切混合下添加到该纳米乳液中。使包含悬浮药物和纳米乳液液滴的复合分散体通过均质器另外两个独立道次。均质化过程将AmB粒子湿磨至适合肺部递送的尺寸。在数量基础上,大多数湿磨AmB晶体具有小于1000nm的直径。在一个实施方案中,最终原料组合物具有3.0%w/w的固含量、20%v/v的PFOB含量和318g (9升原料) 或424.2g (12升原料) 的理论批

次大小。

[0386] 通过喷雾干燥生产干粉。用配备Schlick 970/0双流体雾化器(0.8mm i.d.)、DorrClone旋风分离器以及包括直管和Brewer阀的下端几何结构的中试规模喷雾干燥器(Niro Mobile Minor, Copenhagen, Denmark)进行喷雾干燥。附接在Brewer阀下方的1L Eagle收集器配备夹套并保持在50℃。

[0387] 用Watson-Marlow蠕动泵将液体进料泵入喷雾干燥器。雾化器在 7.0 ± 0.6 scfm的气体流量和 104 ± 5 ℃的入口温度下运行。调节液体进料速率以保持 55 ± 3 ℃的干燥器出口温度。总气体流量为约 $140 \text{ N m}^3/\text{h}$ (~85scfm)。

[0388] 在基于悬浮液的进料中,每个雾化液滴(质量中值直径~10 μm)含有分散的药物晶体和约1000个亚微米乳液液滴。在干燥过程的初始时刻,较易挥发的水相开始蒸发。快速减退的雾化液滴界面驱动缓慢扩散的药物和乳液粒子富集在界面处。这导致在干燥液滴的中心形成空隙空间。随着干燥过程继续,乳液液滴中挥发性较低的油相蒸发,以致在其位置形成中空孔隙。总体而言,所得中空喷雾干燥复合粒子含有包埋多孔脂质基质的界面层中的药物晶体。

[0389] 使用相同的通用方法制造ABCI-002、ABCI-003和ABCI-004,尽管液体进料的组成不同。

[0390] 实施例3: AmB的湿磨和对ABCI-002的性质的影响

[0391] AmB的物理形式(结晶vs.无定形)可对其湿磨行为具有影响。对于这一研究,从North China Pharmaceutical Group Corp. (Hebei, China)获得两批AmB。这两个批次的结晶度不同,批次‘202和‘203的结晶度分别为77%和96%(通过定量XRPD测定)。

[0392] 实际上,批次‘202的降低的结晶度对湿磨过程具有负面影响,以显著提高如用Malvern Mastersizer通过激光衍射对药物悬浮液测定的湿磨药物的 X_{50} 和 X_{90} (表5)。

[0393] 表5. AmB结晶度对湿磨过程中的初级粒度分布的影响

AmB 批次	结晶度	方法	初级粒度	
			X_{50} (μm)	X_{90} (μm)
[0394] ‘202	77	1 个道次(15 kpsi)	3.01	6.93
		3 个道次(15,15,20 kpsi)	2.16	5.99
‘203	96	1 个道次(15 kpsi)	1.14	2.46
		3 个道次(15,15,20 kpsi)	1.06	2.14

[0395] 使用实施例2中描述的方法,在Niro Mobile Mino上用AmB批次‘202(ABCI-002批次FP21060)和‘203(ABCI-002批次FP21059)造ABCI-002批次。液体原料中的总固含量和% PFOB分别为2% w/w和10% v/v。液体进料速率为约44.5g/min。雾化器在 $11.5 \pm 1.0 \text{ Nm}^3/\text{h}$ (7.0scfm)的气体流量和 104 ± 5 ℃的入口温度下运行。这等于约44.5g/min。总气体流量为约 $140 \text{ N m}^3/\text{h}$ (~85scfm)。目标批次大小为40g。

[0396] 两个批次的物理化学性质和气雾剂性能详述在表6中。没有观察到粉末性质和气雾剂性能的显著差异,表明低至77%的结晶度仍然适用于制备ABCI-002组合物。

[0397] 表6. 由具有不同结晶度的AmB批次制备的ABCI-002批次的物理化学性质和气雾剂性能的比较

批次	AmB 结晶度 (%)	收率 (%)	Chol 测定 (mg/g)	AmB 测定 (mg/g)
FP21059	96	81	66	162
FP21060	77	80	66	152

[0398]

批次	堆积密度 (g/cm ³)	振实密度 (g/cm ³)	卡尔指数 (%)	初级粒度		
				X ₁₀ (μm)	X ₅₀ (μm)	X ₉₀ (μm)
FP21059	0.078	0.130	39.7	0.63 ± 0.02	2.61 ± 0.15	5.70 ± 0.27
FP21060	0.063	0.096	34.5	0.64 ± 0.03	2.60 ± 0.07	5.62 ± 0.06

批次	ED (%)	FPF _{<5μm} (% ND)	MMAD (μm)
FP21059	85	61	2.9
FP21060	89	63	3.1

[0399] 实施例4: 脂质对脂质包覆的AmB晶体组合物的相行为的影响

[0400] ABCI-001、ABCI-002、ABCI-003和ABIP的DSC热谱图的比较呈现在图3中。

[0401] ABIP具有简单热谱图, 带有单个尖锐的协作 T_m , 外推起始温度为96.2°C。在ABCI组合物中加入Chol和DSPG带来更复杂的热谱图, 其中转变增宽并且存在多个峰。

[0402] 在0.29w/w的Chol/PL比(ABCI-001)下, 观察到两个相分离的域, 起始温度为62.5°C的富含Chol的l_o相和起始温度为83.9°C的宽的富含PL的s_o相。如对于水合DPPC双层所证明(图1), 将Chol添加到s_o相导致提高的无序度和共存的l_o相的最终相分离。

[0403] 富Chol相转变非常宽并且含有重叠特征。通过X射线粉末衍射(XRPD)图证实l_o相中的Chol结晶的存在, 其显示ABCI变体在约5.2° 2θ处的衍射峰。胆固醇结晶的相分离在PLCI-001(图4)中更容易区分(即, 在相同区域中更少的衍射峰和没有来自两性霉素B峰的干扰)。PLCI组合物是不包含AmB但包含ABCI组合物的其它组分的安慰剂组合物。

[0404] 随着粉末组合物中的Chol含量的增加, 观察到富Chol相转变的焓的线性增加(图5)。对Chol/(Chol+PL) > 10% w/w的数据点进行线性回归。在约4.9% w/w的Chol/(Chol+PL)重量比下将数据外推至x轴。这相当于0.05w/w的Chol/PL比或~9.4摩尔% Chol。因此, 具有小于约9.4摩尔% Chol的组合物可预计具有无法检测的低温峰。

[0405] 在脱水状态下, s_o-l_o两相区的开始往往在高得多的Chol浓度下发生(即, 相对于图1中的水合状态)。因此, 在高得多的Chol含量下(~9.4摩尔% vs. 水合DPPC双层的6摩尔%) 保持ABCI组合物中的有序s_o相。同样地, 尽管在高于约20摩尔% Chol的水合DPPC/Chol混合物中消除了s_o相(图1), 但在脱水ABCI-001中s_o-l_o两相区延伸超过36.5摩尔% Chol。因此, 相对于图1中的水合DPPC-Chol混合物相图, ABCI-001的相图上移到更高的 T_m 值和向右移动到更高的胆固醇含量。

[0406] ABCI-001中的高- T_m 峰也非常宽并且包含多个重叠特征。高 T_m 峰的焓倾向于随PL含量的增加而增加, 并且倾向于随Chol含量的增加而降低, 表明低于 T_m 的该峰与s_o相有关。

[0407] 在20% AmB组成(无Chol)中的HSPC/DSPG的二元混合物表现出类似的重叠特征, 这表明共存的不混溶s_o相。在钙离子存在下PC和PG域的相分离与其它研究中的观察结果一

致。ABCI-001中的高- T_m 峰的起始温度和焓分别为83.9°C和19.74J/g。

[0408] 从ABCI-001到ABCI-002的转变将药物载量从30%w/w降低至14%w/w,同时保持1.2mol/mol的Chol/AmB比。AmB和Chol的减少导致PL含量增加以及Chol/PL比从0.28w/w降低至0.092w/w。尽管少量的低 T_m 峰在ABCI-002中仍然可见,但富Chol域的 T_m 从62.5°C提高到64.6°C,而 ΔH 从7.73J/g降低到1.93J/g(图3)。高 T_m 峰保持宽,具有重叠特征。相对于ABCI-001,起始温度从83.9°C提高到88.5°C,表明酰基链随着Chol含量降低而具有更高的有序性。

[0409] 在ABCI-003中,药物载量保持14%w/w,但Chol/AmB比从1.2降低至0.4mol/mol。这使得Chol/PL比能够相对于ABCI-002从0.092降低至0.030w/w。ABCI-003热谱图的低- T_m 峰区域的增大(图3)表明富Chol的峰已被消除。高 T_m 峰也尖锐得多,起始温度相对于ABCI-001提高7.2°C,达到91.1°C。

[0410] 对于无定形固体的长期稳定性,玻璃化转变温度 T_g 超过储存温度 T_s 至少50°C可以是有益的。以此类推,PL中的 T_m 代表有序-无序转变。ABCI-003的 T_m 为91.1°C意味着 T_m 超过40°C的加速 T_s 50°C。

[0411] 如前所述,Chol/PL比的降低对粉末性质具有重大影响,将生产收率从74.5%提高到82.4%,将卡尔指数从41.4降低到27.0,并且如MMAD的接近两倍降低所证明,显著降低粒子间内聚力。

[0412] 随着粉末组合物中的Chol含量增加,观察到 l_0 相转变的焓的线性降低(图5)。回归到这些点表明x截距(即,在此焓为零)发生在0.05w/w的Chol/PL比处。这一比率用于限定图2的阴影区域。

[0413] 实施例5:脂质组成对AmB组合物在高相对湿度下的吸湿性的影响

[0414] 图6显示各种组合物的动态蒸气吸附特性。相对于ABIP,观察到含有Chol和DSPG的组合物的吸湿的显著增加。无意受制于理论,但相信吸湿的增加是由于组合物中NaCl的存在,这是由DSPG和氯化钙的相互作用引起的。二价钙离子可以与阴离子DSPG Na强结合,以致置换钠离子,然后钠离子可以与来自CaCl₂的氯离子相互作用以形成NaCl。在高RH下,包含DSPG/CaCl₂的组合物潮解,吸湿和潮解的量级与形成的NaCl的量成正比。

[0415] 与其中HSPC/DSPG比为2.3(即7/3)w/w的ABCI-001和ABCI-002相比,其中PL组分含有9.0w/w的HSPC/DSPG比的ABCI-003表现出显著降低的吸湿性。

[0416] 实施例6:ABCI-001的物理化学性质

[0417] 在如实施例2中所述的Niro Mobile Minor喷雾干燥器上制造ABCI-001的喷雾干燥粉末。小多孔粒子的物理化学性质(例如,AmB含量、AmB纯度、Chol含量、初级粒度分布、堆积密度、振实密度、卡尔指数和水含量)详述在表7中。

[0418] 作为由药物悬浮液喷雾干燥的粉末的特征,ABCI-001粉末富集AmB为标称药物含量的约10%。该富集导致Chol/AmB摩尔比降低至1.0mol/mol。尽管富集,AmB和Chol测定值在五个批次中一致,相对标准偏差(RSD)分别为5%和1%。引入的AmB原料药的纯度为96.7%。AmB的纯度在整个制造过程中得以保持,其中五个ABCI-001批号的平均纯度为97.2±0.5%。此外,在RP-HPLC色谱图中没有观察到新的降解峰。

[0419] 表7. ABCI-001散装粉末批次的物理化学性质

批号	收率(%)	Chol 测定 (mg/g)	AmB 测定 (mg/g)	AmB 纯度 (%)	水含量 (% w/w)
FP21040	82	141 ± 1	338 ± 0	97.7 ± 0.2	3.09 ± 0.14
FP21041	74	142 ± 1	338 ± 1	97.7 ± 0.1	3.48 ± 0.09
FP21045	74	144 ± 0	334 ± 2	96.7 ± 0.2	3.44 ± 0.10
FP21046	74	144 ± 1	356 ± 2	97.6 ± 0.2	2.94 ± 0.08
FP21047	68	144 ± 1	360 ± 5	97.2 ± 0.2	3.14 ± 0.14
平均值 ± SD	74.5 ± 4.9	143 ± 1	345 ± 12	97.2 ± 0.5	3.22 ± 0.23
RSD (%)	6.6	1.0	3.4	0.5	7.2

批号	堆积密度 (g/cm ³)	振实密度 (g/cm ³)	卡尔指数 (%)	初级粒度		
				X ₁₀ (μm)	X ₅₀ (μm)	X ₉₀ (μm)
FP21040	0.066 ± 0.006	0.114 ± 0.008	42.3 ± 2.2	0.63 ± 0.02	2.11 ± 0.07	5.25 ± 0.28
FP21041	0.081 ± 0.007	0.143 ± 0.007	43.3 ± 4.2	0.49 ± 0.05	1.90 ± 0.09	5.21 ± 0.15
FP21045	0.077 ± 0.007	0.126 ± 0.009	39.3 ± 1.8	0.63 ± 0.06	1.90 ± 0.04	4.51 ± 0.18

[0420]

[0421]

FP21046	0.061 ± 0.006	0.101 ± 0.007	39.3 ± 4.0	0.57 ± 0.02	1.84 ± 0.11	4.13 ± 0.42
FP21047	0.069 ± 0.006	0.121 ± 0.011	43.1 ± 3.7	0.61 ± 0.04	1.85 ± 0.07	4.53 ± 0.33
平均值 ± SD	0.071 ± 0.008	0.121 ± 0.015	41.4 ± 2.0	0.59 ± 0.06	1.92 ± 0.11	4.73 ± 0.48
RSD (%)	11.2	12.6	4.8	10.0	5.8	10.2

[0422] 通过激光衍射获得的初级粒度分布是典型的来自乳液基原料的喷雾干燥粒子,其中五个批次的平均X₅₀值为1.9 ± 0.1 μm,并且平均X₉₀为4.7 ± 0.5 μm。在批次内,X₅₀的RSD在4.7%至9.6%之间变化,其中大部分变异性来自在喷雾干燥器中建立平衡之前的第一收集器。

[0423] 观察到的低堆积密度(0.071 ± 0.008 g/cm³)和振实密度(0.121 ± 0.015 g/cm³)也是由乳液基液体原料制成的粉末特有的(表7)。通过41.5 ± 2.0%的平均卡尔指数值证明细的低密度粒子的高压缩性。该值表明ABCI-001粉末几乎没有流动性。粉末中的平均残余水含量为3.2 ± 0.2%。

[0424] 实施例7: ABCI-002的物理化学性质

[0425] ABCI-002的物理化学性质显示在表7中。结果与对ABCI-001呈现的结果有些相似。这并不令人惊讶,因为ABCI-002(14% w/w AmB)代表用另外的PL稀释的ABCI-001(30% w/w AmB),同时保持1.16 mol/mol的恒定Chol/AmB比。

[0426] 表8. ABCI-002散装粉末批次的物理化学性质

[0427]

批号	收率(%)	Chol 测定 (mg/g)	AmB 测定 (mg/g)	AmB 纯度 (%)
FP21062	79	67	149 ± 3	97.7 ± 0.2
FP21063	75	67	154 ± 1	97.7 ± 0.1
FP21064	76	67	158 ± 0	96.6 ± 0.1
平均值 ± SD	76.7 ± 1.7	67 ± 0	154 ± 4	97.3 ± 0.3
RSD (%)	2.2	0.0	2.6	0.3

批号	堆积密度 (g/cm ³)	振实密度 (g/cm ³)	卡尔指数 (%)	初级粒度		
				X ₁₀ (μm)	X ₅₀ (μm)	X ₉₀ (μm)
FP21062	0.069 ± 0.004	0.108 ± 0.005	36.4 ± 2.1	0.57 ± 0.00	2.07 ± 0.03	5.20 ± 0.10
FP21063	0.062 ± 0.005	0.097 ± 0.007	35.5 ± 3.9	0.59 ± 0.01	2.21 ± 0.10	5.39 ± 0.21
FP21064	0.077 ± 0.005	0.128 ± 0.007	39.7 ± 4.0	0.60 ± 0.01	2.12 ± 0.03	5.58 ± 0.26
平均值 ± SD	0.069 ± 0.006	0.111 ± 0.013	37.2 ± 1.8	0.59 ± 0.01	2.13 ± 0.06	5.39 ± 0.16

[0428]

RSD	8.7%	11.7%	4.8%	1.7%	2.8%	1.3%
-----	------	-------	------	------	------	------

[0429] 实施例8: ABCI-003的物理化学性质

[0430] ABCI-003的物理化学性质详述在表9中。相对于ABCI-001, 药物载量已经从30%w/w降低至14%w/w, 并且标称Chol/AmB比已经从1.2mol/mol降低至0.4mol/mol。

[0431] 表9. ABCI-003散装粉末批次的物理化学性质

批号	收率(%)	Chol 测定 (mg/g)	AmB 测定 (mg/g)	AmB 纯度 (%)	水含量(%)
FP22002	79.3	22 ± 0	163 ± 1	97.9 ± 0.0	3.82 ± 0.30
FP22003	82.7	22 ± 0	168 ± 2	98.2 ± 0.5	3.71 ± 0.17
FP22005	85.1	22 ± 0	168 ± 2	99.1 ± 0.0	3.72 ± 0.11
平均值 ± SD	82.4 ± 2.9	22 ± 0	166 ± 3	98.4 ± 0.6	3.75 ± 0.06
RSD (%)	3.5	0.0	1.7	0.7	1.6

[0432]

批号	堆积密度 (g/cm ³)	振实密度 (g/cm ³)	卡尔指数 (%)	初级粒度		
				X ₁₀ (μm)	X ₅₀ (μm)	X ₉₀ (μm)
FP22002	0.071 ± 0.004	0.098 ± 0.003	28.0 ± 2.5	0.99 ± 0.21	2.73 ± 0.11	5.97 ± 0.20
FP22003	0.078 ± 0.005	0.110 ± 0.010	28.8 ± 4.5	1.02 ± 0.20	2.70 ± 0.14	5.99 ± 0.36
FP20005	0.069 ± 0.004	0.091 ± 0.006	24.2 ± 2.5	0.92 ± 0.01	3.11 ± 0.05	6.91 ± 0.15
平均值 ± SD	0.073 ± 0.004	0.100 ± 0.008	27.0 ± 2.0	0.98 ± 0.05	2.85 ± 0.23	6.29 ± 0.54
RSD (%)	5.5	8.0	7.4	5.3	8.0	8.5

[0433] 实施例9: 三种ABCI组合物的比较

[0434] 三种ABCI组合物的物理化学性质和气雾剂性能的比较显示在表10中。

[0435] 表10. ABCI-001、ABCI-002和ABCI-003的物理化学性质和气雾剂性能的比较

组合物	收率(%)	Chol 测定 (mg/g)	AmB 测定 (mg/g)	Chol/AmB (mol/mol)	AmB 纯度 (%)
ABCI-001	74.5 ± 4.9	143 ± 1	345 ± 12	1.0	97.2 ± 0.5
ABCI-002	76.7 ± 1.7	67 ± 0	154 ± 4	1.0	97.3 ± 0.3
ABCI-003	82.4 ± 2.9	22 ± 0	166 ± 3	0.32	98.7 ± 0.6

[0436]

组合物	堆积密度 (g/cm ³)	振实密度 (g/cm ³)	卡尔指数 (%)	初级粒度		
				X ₁₀ (μm)	X ₅₀ (μm)	X ₉₀ (μm)
ABCI-001	0.071 ± 0.008	0.121 ± 0.015	41.4 ± 2.0	0.59 ± 0.06	1.92 ± 0.11	4.73 ± 0.48
ABCI-002	0.069 ± 0.006	0.111 ± 0.013	37.2 ± 1.8	0.59 ± 0.01	2.13 ± 0.06	5.39 ± 0.16
ABCI-003	0.073 ± 0.004	0.100 ± 0.008	27.0 ± 2.0	0.98 ± 0.05	2.85 ± 0.23	6.29 ± 0.54

[0437]

组合物	ED (%)	粗级分 [T-S2] (%)	气道级分 [S3-S5] (%)	超细级分 [S6-F] (%)	FPF _{<5μm} (% ND)	FPF _{<5μm} (% ED)	MMAD (μm)
ABCI-001	89	36.0	49.3	3.4	50	56	3.9
ABCI-002	92	21.0	60.3	10.5	70	76	2.6
ABCI-003 (R21058)	88	6.1	71.8	10.6	81	92	2.1

[0438] 随着PL/Chol从3.5提高至10.9再提高至33.1w/w (ABCI-001至ABCI-003), 存在几个明显趋势。首先, 收率从74.5%提高至82.4% (+10.6%)。其次, 卡尔指数从41.4降低至27.0, 表明粉末流动性显著改善。

[0439] 气雾剂性能也存在显著变化。这可能反映了随着Chol含量降低, 粒子间内聚力显著降低和粉末分散性提高。粗级分中的药物百分比从36.0%降低至6.1%, 而气道级分中的

百分比从49.3%增加至71.8%。FPF_{<5μm}从ED的56%增加至92%，而MMAD从3.9μm降低至2.1μm。MMAD的大幅降低还可以减少在仅鼻部气雾剂递送过程中在啮齿动物鼻中的沉积。

[0440] 实施例10: AmB的各种组合物在顶端施用于培养的气道上皮细胞后的ASL pH的改善

[0441] 使用基于细胞的测定来研究各种脂质包覆的AmB晶体组合物的效力。对于正常肺上皮细胞(NuLi)观察到的ASLpH为约7.6。相比之下,在CuFi-1细胞(ΔF508/ΔF508 CF突变)中观察到的ASLpH为约6.85。ASLpH的降低对CF肺中的宿主防御具有重大影响。大于7.0的ASLpH值导致防御素(在肺中具有抗微生物活性的在宿主防御中至关重要的肽)的有效性改善。因此,ASLpH的测量是用于评价不同的吸入型AmB组合物的有效性的有用代表。

[0442] 表11比较在各种AmB组合物的情况下对于永生化和原代培养的气道上皮细胞观察到的ASL pH的改善。对University of Iowa开发的正常永生化的气道上皮细胞系(NuLi)观察到的ASLpH为约pH 7.5。研究两种永生化的CF气道上皮细胞系:具有纯合ΔF508/ΔF508突变的CuFi-1和具有杂合G551D/ΔF508突变的CuFi-4细胞。在各种研究中,在这些细胞中测得的ASL pH在约pH 6.7至pH 7.0之间变化。还研究衍生自患有CF的个体(包括具有无义突变的那些)的气道上皮细胞的原代细胞培养物。在衍生自没有CF的对照受试者的原代气道上皮细胞中测得的ASL pH具有约6.9的pH(Shah等人Airway acidification initiates host defense abnormalities in cystic fibrosis mice.Science 2016,351:503-507)。

[0443] 来自这些研究的发现包括:未添加Chol的AmB组合物(例如,纯AmB、ABIP)在全氟己烷媒介物中在2μM浓度下有效,但在50μM AmB浓度下无效(图7b);AmB/Chol复合物在2μM和50μM AmB浓度下表现出相对于媒介物对照~0.1pH单位的改善(表11);在向来自患有CF的受试者的原代培养的气道上皮细胞顶端施用2μM AmB后,观察到0.1至0.2pH单位的ASL pH改善,与CFTR基因型无关(表11);含有添加的PL(HSPC/DSPG=7/3w/w)的L-AMB表现出~0.4pH单位的ASL pH改善,这在2μM和50μM AmB浓度下得以保持(表11);依伐卡托在CuFi-4细胞中将ASLpH提高约0.2个pH单位,但如预期,在具有纯合ΔF508突变的CuFi-1细胞中具有ASL pH的最小增加(表11);Trikafta在CuFi-1细胞中带来与ABCI-003相似的ASL pH增加(表11);包含Chol/AmB比≥0.4mol/mol的ABCI组合物在2μM和50μM AmB浓度下都表现出约0.4至0.5pH单位的在CuFi-1细胞中的ASL pH的最大改善,但在小于0.4mol/mol的Chol/AmB比下ASL pH的改善幅度降低(图7a;图7c);对于低至0.05mol/mol的Chol/AmB比观察到≥0.2pH单位的改善(图7b;图7c);在与单独HSPC的比较中,DSPG在该组合物中的存在增强ASL pH的改善(图7b;图7c);在施用ABCI-001、ABCI-002和ABCI-003后没有观察到ASLpH的显著差异(图7a);来自患有CF的个体的原代培养的气道上皮细胞中ASL pH的平均改善为~0.7pH单位,从pH6.3至pH 7.0;并且在来自患有CF的个体的七个原代培养的气道上皮样品中的六个达到6.9或更高的pH(即,相对于健康志愿者,ASLpH完全恢复),包括衍生自具有无义突变的个体的两个细胞培养物(图8)。基于这些结果,ABCI组合物的最佳Chol/AmB比可以在0.4至1.2mol/mol之间(图2)。

[0444] 表11. 在施用AmB组合物后来自CF患者的CuFi-1、CuFi-4和原代上皮细胞中的ASL pH的改善

[0445]

批次	描述	细胞	[AmB] (μM)	pH	ΔpH	Ref.
	媒介物对照	NuLi	---	7.51	n.a.	[1]
	媒介物对照	CuFi-1	---	6.88	n.a.	[1]
	AmB	CuFi-1	2	7.06	+0.18	[1]
	AmB	CuFi-1	50	6.80	+0.02	[1]
	媒介物对照	CuFi-1	---	6.75	n.a.	[1]
	AmB:Chol (1:5)复合物	CuFi-1	2	6.84	+0.09	[1]
	AmB:Chol (1:5)复合物	CuFi-1	50	6.86	+0.11	[1]
	L-AMB	CuFi-1	2	7.18	+0.43	[1]
	L-AMB	CuFi-1	50	7.15	+0.40	[1]
	依伐卡托	CuFi-1	2	6.82	+0.07	[1]
	媒介物对照	CuFi-4	---	6.75	n.a.	[1]
	依伐卡托	CuFi-4	2	6.92	+0.17	[1]
	AmB:Chol (1:5)复合物	CuFi-4	2	6.98	+0.23	[1]
	媒介物对照	原代人 CF	---	6.76	n.a.	[1]
	AmB	原代人 CF	2	6.97	+0.21	[1]
	媒介物对照	CuFi-1	---	6.95	n.a.	[2]
R20047	ABIP	CuFi-1	50	7.01	+0.06	[2]
FP22001	PLCI-002 (ABCI-003 的匹配安慰剂)	CuFi-1	50	6.85	-0.10	[2]
FP20002	ABCI-003	CuFi-1	50	7.26	+0.31	[2]
	媒介物对照	CuFi-1	---	6.82	n.a.	[2]
R21058	ABCI-003	CuFi-1	2	7.29	+0.47	[2]
R21058	ABCI-003	CuFi-1	50	7.25	+0.42	[2]
R21052	ABCI-001	CuFi-1	50	7.19	+0.37	[2]
R21061	ABCI-002	CuFi-1	50	7.25	+0.43	[2]
R21057	ABCI (Chol/AmB = 0.4、 % HSPC = 70%)	CuFi-1	50	7.32	+0.50	[2]
	媒介物对照	CuFi-1	---	6.72	n.a.	[2]
CM22001	ABCI (Chol/AmB = 0.2、 DSPG = 10%)	CuFi-1	50	7.09	+0.37	[2]
CM22002	ABCI (Chol/AmB =	CuFi-1	50	7.04	+0.32	[2]

	0.1、 DSPG = 10%)					
	CM22003 ABCI (Chol/AmB = 0.05、 DSPG = 10%)	CuFi-1	50	6.95	+0.23	[2]
	CM22004 ABCI (Chol/AmB = 0、 DSPG = 10%)	CuFi-1	50	6.70	-0.02	[2]
	CM22005 ABCI (Chol/AmB = 0.4、 DSPG = 0%)	CuFi-1	50	7.12	+0.40	[2]
[0446]	CM22006 ABCI (Chol/AmB = 0、 DSPG = 0%)	CuFi-1	50	6.71	-0.01	[2]
	媒介物对照	CuFi-1	---	6.92	n.a.	[2]
	Trikafta (ETI)	CuFi-1	E (1) T (1) I (0.33)	7.38	+0.46	[2]
	FP22005 ABCI-003	CuFi-1	2	7.38	+0.46	[2]
	媒介物对照	原代人 CF	---	6.30	n.a.	[2]
	媒介物对照	原代人 HV	---	6.90	+0.60	[3]
	FP22005 ABCI-003	原代人 CF	2	6.98	+0.68	[2]
	FP22005 ABCI-003	原代人 CF	50	7.00	+0.70	[2]

[0447] ¹US 2019/0083517;US 2020/0352970;²本公开;³Shah,2016

[0448] 实施例11:用ABCI-001观察到的剂量反应

[0449] 在ABCI-003的情况下ASL pH改善的剂量依赖性呈现在图9中。横坐标上的浓度代表悬浮在全氟己烷媒介物中以施加于CuFi-1细胞的AmB浓度,而不是真实的ASL浓度。基于全氟己烷浓度的EC₅₀和EC₉₀分别为约0.5μM和2.0μM。

[0450] 实施例12:包含各种Chol/AmB比和DSPG含量的ABCI组合物

[0451] Burke等人证明,在全氟己烷中2μM至50μM的悬浮液浓度范围内,具有5.0mol/mol的Chol/AmB比的AmB:Chol复合物保持CuFi-1细胞中的ASL pH的改善(US 2019/0083517;US 2020/0352970;两者都经此引用并入)。

[0452] 用本公开的脂质包覆的AmB组合物观察到类似的结果,条件是它们含有添加的Chol。在50μM AmB浓度下,ABIP(其不含添加的Chol)没有表现出ASL pH的改善。

[0453] 相比之下,具有~1.2的理论Chol/AmB比的ABCI组合物(例如,ABCI-001、ABCI-002)在50μM下表现出ASLpH的显著改善(例如,0.35至0.45pH单位)。

[0454] 先前的研究已经表明,在低于1.0mol/mol的Chol/AmB比下可能丧失通过添加Chol实现的益处(US 2019/0083517;US 2020/0352970)。已经令人惊讶地发现,对于理论Chol/AmB比为0.4mol/mol(粉末中的标称测量比率=0.32mol/mol)的ABCI组合物,在50μM AmB浓度下可以维持ASL pH的改善。

[0455] 因此,尽管Chol可能是在广泛的递送剂量范围内维持ASL pH的有效改善所必需的,但低至0.4mol/mol的Chol/AmB比仍然有效。在小实验设计(DoE)研究中确立了对较低Chol/AmB比观察到的功效(图7A)。该研究还探索了降低组合物中的DSPG百分比的影响。在

Buchi B-191喷雾干燥器上制造的喷雾干燥粉末的理论无水组成详述在表12中。ABCI变体的物理化学性质呈现在表13中。所选ABCI变体的气雾剂性能呈现在表14中。

[0456] 表12. 包含较低Chol/AmB比和降低的DSPG含量的ABCI变体的标称无水组成

批号	AmB (%w/w)	Chol (%w/w)	HSPC (%w/w)	CaCl ₂ ^b (%w/w)	DSPG (%w/w)	Chol/AmB (mol/mol)	HSPC/ DSPG (w/w)	PL/Chol (w/w)
R21057	14.0	2.34	54.1	5.51	24.1	0.40	2.2	32.6
R21058 (ABCI-003)	14.0	2.36	70.3	5.52	7.8	0.40	9.0	33.1
[0457] R21059	14.0	4.58	60.5	5.37	15.5	0.78	3.9	16.6
R21060	14.0	6.81	66.5	5.22	7.4	1.16	9.0	10.9
R21061 (ABCI-002)	14.0	6.81	51.2	5.20	22.8	1.16	2.3	10.9
R21062 (ABCI-002)	14.0 ^a	6.81	51.2	5.22	22.8	1.16	2.3	10.9
ABCI-001	30.0	14.6	35.8	3.70	15.9	1.16	2.3	3.5

[0458] ^a批次R21062含有无定形AmB粒子

[0459] ^bPL/CaCl₂比为2.0mol/mol

[0460] 表13. 含有各种Chol/AmB比和DSPG百分比的14%w/w ABCI变体的物理化学性质

批次	堆积密度 (g/cm ³)	振实密度 (g/cm ³)	卡尔指数 (%)	初级粒度分布		
				X ₁₀ (μm)	X ₅₀ (μm)	X ₉₀ (μm)
R21057	0.085	0.125	32.0	0.64 ± 0.01	1.86 ± 0.01	3.71 ± 0.02
R21058 (ABCI-003)	0.060	0.081	26.0	0.77 ± 0.02	2.01 ± 0.02	3.77 ± 0.07
R21059	0.059	0.089	33.3	0.76 ± 0.01	2.03 ± 0.03	4.02 ± 0.17
R21060	0.049	0.070	29.9	0.79 ± 0.01	2.16 ± 0.02	4.10 ± 0.08
R21061	0.048	0.065	26.1	0.71 ± 0.00	2.00 ± 0.01	3.91 ± 0.01
R21062	0.051	0.078	34.3	0.70 ± 0.03	2.07 ± 0.02	4.06 ± 0.09
ABCI-002	0.069 ± 0.006	0.111 ± 0.013	37.2 ± 1.8	0.59 ± 0.01	2.13 ± 0.06	5.39 ± 0.16
ABCI-001	0.071 ± 0.008	0.121 ± 0.015	41.4 ± 2.0	0.59 ± 0.06	1.92 ± 0.11	4.73 ± 0.48

[0461]

批次	理论			标称			
	Chol/AmB (mol/mol)	HSPC/DSPG (mol/mol)	PC/Chol (w/w)	收率 (%)	Chol 测定 (mg/g)	AmB 测定 (mg/g)	Chol/AmB (mol/mol)
R21057	0.40	2.2	32.6	70	22	163	0.33
R21058 (ABCI-003)	0.40	9.0	33.1	67	23	167	0.33
R21059	0.78	3.9	16.6	69	43	163	0.64
R21060	1.16	9.0	10.9	71	65	151	1.04
R21061	1.16	2.3	10.9	64	65	161	0.98
R21062	1.16	2.3	10.9	70	66	83	1.93
ABCI-002	1.16	2.3	10.9	77	67	154	1.06
ABCI-001	1.16	2.3	3.5	75	143	345	1.01

[0462] 表14. 关于ABCI变体的气雾剂性能的指标

批次	Chol/AmB (mol/mol)	HSPC/ DSPG (w/w)	ED (%)	粗级分 [T-S2] (%)	气道级分 [S3-S5] (%)	超细级分 [S6-F] (%)	FPF _{<5μm} (% ND)	MMAD (μm)
[0463] R21058 (ABCI-003)	0.40	9.0	88	6.1	71.8	10.6	81	2.1
R21059	0.78	3.9	89	11.8	64.2	13.0	75	2.1
R21061 (ABCI-002)	1.16	2.3	86	10.3	70.6	5.2	73	2.7
FP21062 (ABCI-002)	1.16	2.3	92	21.0	60.3	10.5	70	2.6
FP21040 (ABCI-001)	1.16	2.3	89	36.0	49.3	3.4	50	3.9

[0464] 粒子间内聚力倾向于随着粉末中的Chol和DSPG含量降低而降低。这体现在如在撞击器中的USP喉部以及级1和级2上的沉积所示的粗粒子分数的显著降低中。粗粒子分数从ABCI-001的35.9%降低至ABCI-002的21.1-21.8%，再至批次R21058 (ABCI-003) 的仅6.2%。这进一步体现为级沉积(stage deposition)模式的偏移。ABCI-001的APSD以级2和3为中心,MMAD为3.9μm。ABCI-002在级3和4上表现出主要沉积,MMAD向下移动到2.6至2.7μm。最后,对于批次R21058,将Chol/AmB比降低至0.4mol/mol,并将PL中的HSPC含量增加至90% w/w,主要沉积现在在撞击器的级4和5上达到峰值,MMAD为2.1μm。

[0465] 当批次R21058的数据表示为喷射剂量的百分比时,FPF_{<5μm}为93%。考虑到批次R21058的喷射剂量的98%沉积在撞击器级上(即,仅2%沉积在进气口或USP喉部上),可以计算整个单峰粒度分布的撞击参数(即, $d_a^2 Q$)。195μm²L/min的值可用于预测上呼吸道(URT)中的粒子沉积以及总肺剂量(TLD)。撞击参数结果表明,预计喷射剂量的约90%沉积在肺内,且只有约10%沉积在URT中。如很大百分比的剂量在级3至5上的气道级分中沉积并且相对较低百分比的粒子在级6至过滤器上的超细级分中沉积所证明,很大百分比的TLD可以沉积在肺内的大气道和小气道中。

[0466] MMAD的显著降低不仅可以减少人体的URT沉积,而且在非临床研究中还可以减少大鼠的鼻咽沉积。用各种ABCI变体实现的ASL pH的改善绘制在图7中。在碳氟化合物媒介物中50μM AmB浓度下在温育22小时后收集数据(每种组合物N=12个重复)。对于批次R21058还在2μM下收集数据(N=6个重复)。具有CuFi-1细胞的ABCI变体的ASL pH在约7.25至7.35之间(ΔpH~0.4至0.5)。因此,所有批次都表现出ASL pH的显著提高(相对于CuFi-1对照,p<0.0001)。用脂质包覆的晶体组合物观察到的ΔpH的改善幅度显著大于用Burke等人(US 2019/0083517;US 2020/0352970)采用的AmB:Chol复合物观察到的~0.15-0.2pH单位的改善。

[0467] 实施例13:在施用ABCI-003后来自患有CF的人的原代培养的上皮细胞中的ASL液的相对粘度的评价

[0468] CFTR蛋白的缺失或功能障碍导致有缺陷的离子转运-造成ASL耗尽(即,ASL厚度增加)、ASL粘度增加和粘膜纤毛清除受损的潜在缺陷。

[0469] 评价ABCI相对于单独的FC-72递送媒介物降低CF气道上皮细胞的原代培养物中的ASL液的粘度的能力。向CF气道上皮的原代培养物中顶端添加ABCI使得平均ASL粘度(τ_{ASL}/τ_{saline})值从盐水的3.3倍降低至约1.9至2.2倍;与CFTR基因型无关地观察到类似的活性(图

10)。

[0470] 非CF气道上皮的ASL的相对粘度是盐水的2.5倍。因此,这些数据证明ABCI可以将CF气道上皮中的ASL的相对粘度降低到与在来自没有CF的个体的气道上皮细胞中观察到的水平类似的水平。由于ASL的粘度增加与患有CF的受试者的粘膜纤毛清除受损和感染/炎症风险增加相关,这些数据表明根据本文所述的实施方案的组合物减轻气道中最严重的CF后遗症之一的潜力。

[0471] 实施例14:在施用ABCI后来自患有CF的人的原代培养的上皮细胞中的ASL液的抗微生物杀灭活性

[0472] 气道的先天宿主防御系统的许多方面是pH敏感的,包括分泌的粘蛋白的流变性质、粘膜纤毛清除、蛋白酶的活性和抗微生物肽(例如防御素)的活性。在衍生自没有CF的受试者的原代气道上皮中,ASL对镀金网格中的金黄色葡萄球菌的抗微生物活性降低了约50%。

[0473] 在衍生自具有不同CFTR突变的患有CF的六名受试者的原代培养的气道上皮细胞中评价相对于单独的FC-72递送媒介物,ABCI-003的顶端施用对ASL抗菌活性的效应。CF衍生的气道上皮细胞暴露于ABCI-003使得金黄色葡萄球菌的杀灭百分比从媒介物对照中的约22%提高至高剂量ABCI-003组中的约40%(即,ASL的抗微生物活性几乎翻倍至与在非CF细胞中测得的水平相似的水平)(图11)。

[0474] 作为细胞来源的患有CF的受试者的CFTR突变状态显示在图11中。值得注意的是,来自具有两个无义突变的两名个体(调节剂药物对其无效)的细胞中的反应与具有更常见的 $\Delta F508$ 突变的那些(他们是调节剂疗法的候选者)至少一样高。此外,在 $50\mu\text{M}$ ABCI-003剂量下ASL的改善的细菌杀灭与非CF对照相似。

[0475] 实施例15:脂质组成和AmB结晶度对溶血的影响

[0476] AmB的毒性.静脉内施用两性霉素B(Fungizone)引起许多急性全身性反应,包括发烧、发抖、发冷、低血压、高血压、厌食、恶心、呕吐、头痛和呼吸急促,以致其昵称为“amphoterrible”。其主要的慢性副作用是肾毒性。基于脂质的组合物(例如,L-AMB)减少急性全身效应,但肾毒性仍然是剂量限制性毒性。

[0477] Burke实验室的最近研究表明,AmB在哺乳动物细胞中的毒性作用不是如已经假定的离子通道形成的结果,而是由于将胆固醇从细胞膜提取到膜外甾醇海绵相中(Anderson等人,Nature Chem Biol.2014;10:400-406;Gray等人,PNAS.2012;109:2234-2239)。Chol1提取引起的毒性被认为仅在甾醇:AmB的比率小于 $\sim 1.0\text{mol/mol}$ 时发生。

[0478] API的物理形式(即,无定形vs.结晶)和粒子的尺寸可能影响AmB在水中的“表观”溶解度。这又可能影响药物在肠胃外施用后(Ghielmetti等人,J Pharm Sci.1976;65:905-907;Bennett等人,Antimicrob Agents Chemother.1963;161:745-752)和在经口吸入后(US 2012/0128728)的安全性状况。在本公开的上下文中,溶血测定用于评价API的物理形式和组成属性对从红细胞膜提取Chol1的影响。

[0479] 表15比较了施用包含AmB的各种组合物后的溶血。Fungizone[®],一种不含Chol1的溶解在脱氧胆酸钠胶束中的AMB的胶束组合物,充当阳性对照,而L-AMB充当阴性对照。ABCI-001、ABCI-002和ABCI-003(都包含高度结晶的AmB和Chol1)表现出类似于阴性对照的溶血。令人惊讶的是,即使Chol1/AmB比显著小于1.0也是如此。例如,理论Chol1/AmB比仅为

0.4mol/mol (实际=0.33mol/mol) 的ABCI-003具有与L-AMB相当的溶血。

[0480] 表15. 包含AmB的组合物的溶血

批次	描述	在 100 mM AmB 浓度下的溶血(%)	
	Fungizone; (阳性对照)	90	
[0481]	AmBisome (L-AMB); (阴性对照)	< 5	
	AmB (100%结晶)	<5	
	AmB (100%无定形)	100	
R20047	ABIP (结晶 AmB); 无 Chol	< 5	
R20048	ABIP (无定形 AmB); 无 Chol	40	
[0482]	R21052	ABCI-001	< 5
	R21061	ABCI-002	< 5
	R21058	ABCI-003	< 5

[0483] ABIP组合物的情况是有指导意义的。用完全无定形AmB配制的ABIP是高度溶血的，而用结晶药物配制的ABIP不是高度溶血的，表明无定形相的物理形式或“表观溶解度”可以增强效果。

[0484] 实施例16: 干粉组合物中的药物载量和目标密度

[0485] 标称剂量 (ND)、振实密度 (ρ_{tapped}) 和干粉吸入器的容器体积 (V_r) 可用于根据以下方程计算药物载量:

$$[0486] \quad \%AmB = \frac{0.2 \times ND(mg)}{V_r(mL) \times \rho_{\text{tapped}} \left(\frac{g}{cm^3}\right)}$$

[0487] 该方程假设填充50%的容器体积。胶囊的最佳性能可能在胶囊体积的25%至75%之间的填充体积下出现，尽管可以使用低至约10%和高达90%的填充体积。由于在气雾剂施用过程中胶囊和装置中的固定损失，太低的填充体积可能导致喷射剂量 (ED) 值降低。

[0488] 对于振实密度为0.1g/mL的粉末的2mg标称剂量 (ND) (3号胶囊)，%AmB在半满胶囊的情况下为~13.4%w/w，在25%至75%的填充体积的情况下为6.7%至20.1%w/w。因此，振实密度为0.11g/mL的ABCI-003粉末可以很好地设计用于实现目标2mg剂量。

[0489] 对于振实密度为0.1g/mL的0.67mgNd，%AmB为4.5%，在填充3号胶囊体积的25%至75%的情况下为2.25-6.75%w/w。

[0490] 对于0.1mg标称剂量，达到50%填充体积所需的药物载量为约0.7% (振实密度=0.1g/mL)。

[0491] 图12提供基于粉末的标称剂量和振实密度的药物载量要求的估算。

[0492] 总体而言，对于小于约10mg的标称剂量，%AmB从0.1%至50%，如0.5%至20%变化。对于约10mg的标称剂量，可能有利的是将振实密度调节至约0.2g/cm³，而对于小于3mg的较低剂量，有利的是采用约0.1g/cm³的较低振实密度。在组合物中可以通过改变喷雾干燥条件、固含量和通过改变成孔加工助剂PFOB的浓度来控制喷雾干燥粉末内的振实密度。

[0493] 实施例17: 从气道表面液体中清除组合物

[0494] 通过口服吸入施用根据本公开的组合物将AmB沉积在气道上皮细胞的顶侧的ASL中,在此发生上皮细胞膜中的离子通道形成。考虑到只有溶解在ASL中的药物可能有助于离子通道形成,希望选择维持ASL谷浓度远高于AmB在ASL中的平衡溶解度(即, $>0.2\mu\text{g}/\text{mL}$)的剂量和方案。

[0495] 在吸入(IH)施用后沉积在气道腔中的药物粒子通过多种清除途径从ASL分布到其它隔室中。这些包括:(1)溶解的AmB从ASL吸收到体循环中;(2)粘膜纤毛扶梯(mucociliary escalator)上的微粒清除或通过咳嗽清除;(3)通过循环和组织驻留肺泡巨噬细胞吞噬粒子,和(4)AmB与肺组织的结合或缔合。

[0496] 由于AmB的低溶解度,全身吸收是溶解受限的,并且大多数未在粘膜纤毛扶梯上清除的药物将分布到肺组织中,在此由于其清除缓慢而随时间积聚。类似于静脉内给药,由于药物从肺组织缓慢再分布,AmB的IH施用导致从ASL和血浆的双相消除动力学。

[0497] 在IT(研究FY21-211A)和IH(研究FY21-211B)施用后获自Sprague-Dawley大鼠的支气管肺泡灌洗液(BALF)样品中评价ABCI-001从ASL的清除。FY21-211A和FY21-211B都是非GLP单剂量研究。研究FY21-211A评价在5mg/kg递送剂量下ABCI-001和ABIP的IT施用。研究FY21-211B评价通过仅鼻吸入的三种递送剂量的ABCI-001(6.8、13.6和23mg/kg)。在这两项研究中都在六个时间点(给药后0.5、1、2、4、8和16小时)评价BALF收集。支气管肺泡灌洗程序显著稀释ASL中的AmB浓度。尿素可用作ASL稀释的内源性标志物,因为尿素通过身体的快速扩散导致血浆和ASL中的浓度相同。这使得能够由简单稀释原理计算BALF样品中的ASL体积。使用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)方法定量ASL中的AmB浓度,而使用比色血尿素氮测定法定量ASL和血浆中的尿素浓度。

[0498] 将在FY21-211B中施用的三种递送剂量的ABCI-001(6.8、13.6和23.0mg/kg)的ASL AmB浓度vs.时间曲线组合在单个图上,在研究FY21-211A中气管内施用5mg/kg剂量的ABCI-001和ABIP后获得结果。为此,将ASL浓度归一化为12mg/kg剂量水平。由于这5种治疗每一种的剂量归一化ASL浓度vs.时间曲线显著重叠并且似乎共同拥有类似的下降速率,汇总的数据用单指数下降方程拟合以估算大鼠中的ASL清除的这一初始速率。结果表明,ASL中AmB的暴露和起始处置基本不依赖于施用的ABCI-001剂量,并且与ABIP相当。此外,在本研究中向大鼠施用ABCI-001和ABIP后ASL中的AmB的初始下降的半衰期为~16小时。AmB从ASL的这种清除率可以支持根据本文所述的实施方案的组合物的每日一次给药。

[0499] 实施例18: IH施用组合物后在大鼠和犬中AmB的肺组织分布和清除

[0500] 在IH施用后,ASL中存在的显著比例的AmB分布到肺组织中。在28天GLP毒理学研究中用ABCI-001在Sprague-Dawley大鼠中(研究FY21-235)并且用ABCI-003在大鼠中(研究FY22-071)和用ABCI-003在比格犬中(研究FY21-234)测量肺组织浓度。也在非GLP研究中在施用单剂量的ABCI-001(研究FY21-211B)和多剂量的ABCI-003(研究FY22-070)后在大鼠中测量肺组织浓度。尸检时的平均肺组织浓度详述在表16中。

[0501] 表16. IH施用组合物后在大鼠和犬中AmB的肺组织浓度

研究	物种	组合物	DD (mg/kg)	频率	天	肺负荷 (mg/g)	巨噬细胞反应
FY21-211B	大鼠	ABCI-001	6.8	QD	1	0.010 ± 0.005	适应性
			13.6	QD	1	0.014 ± 0.006	适应性
			23.0	QD	1	0.016 ± 0.006	适应性
FY21-235	大鼠	ABCI-001	4.7	QD	28	1.42 ± 0.29	不良
			9.3	QD	28	1.93 ± 0.27	不良
			17.3	QD	28	2.94 ± 0.52	不良
FY22-070	大鼠	ABCI-003	4.8	QD	14	1.70 ± 0.44	不良
FY22-071	大鼠	ABCI-003	1.1/0.2	QW	29	0.019 ± 0.004	适应性
			2.6/0.4	QW	29	0.050 ± 0.014	适应性
			5.7/1.1	QW	29	0.088 ± 0.031	适应性
FY21-234	犬	ABCI-003	0.5	QD	28	0.25 ± 0.08	适应性
			1.8	QD	28	1.38 ± 0.61	适应性
			4.9	QD	28	3.54 ± 0.65	适应性
1 期	人类	ABCI-003	10/4	QD	28	0.08 (估算)	

[0504] SD=标准偏差;QW=每周一次

[0505] ¹除了第42天和第57天测量之外,所有肺组织浓度在最后一个剂量施用后24小时定量

[0506] ²在研究FY22-071中以负荷/维持剂量每周一次(QW)给药

[0507] 在14或28天内重复递送剂量 $\geq 1.8\text{mg/kg/天}$ 后,在大鼠和犬中AmB的平均肺浓度通常都超过 1.0mg/g 。这两个物种中的肺浓度都随剂量的增加而增加,但以不成比例的方式。在重复给药结束时这两个物种中来自ABCI-001和ABCI-003的AmB的平均肺组织浓度为重复IV施用脂质体AmB后肺组织中的AmB的报道浓度的约80至100倍。用ABCI-001和ABCI-003观察到的肺组织浓度与IV施用后在肝和脾中对L-AMB测得的浓度($1-10\text{mg/g}$)相当。用ABCI-001和ABCI-003($>1.0\text{mg/g}$)重复给药观察到的肺组织浓度显著大于在施用单剂量的ABCI-001和ABCI-003($<0.1\text{mg/g}$)后测定的肺组织浓度,即使在高达 23.0mg/kg 的单剂量下(研究FY21-211B)。随着重复给药肺组织水平的大幅增加是由于几乎不溶性原料药在肺中的累积。累积比AR表示给药间隔与在稳态下的药物消除速率之间的关系,即: $AR=1/1-e^{-k\tau}$,其中k是终末消除速率常数,且 τ 是给药间隔。

[0508] 在犬中的FY21-234中在肺组织中测得的ABCI-003的 $t_{1/2}$ 为约10天。在中剂量组和

高剂量组中,在大鼠中的ABCI-003洗脱期间测得的肺组织 $t_{1/2}$ (研究FY22-071)为20-25天。在犬的14天GLP研究中还对ABIP观察到在肺组织中的显著累积。在停止给药后,AmB从肺组织再分布的 $t_{1/2}$ 为19天。在大鼠中的相应14天GLP研究中,对于1.1和12.4mg/kg的递送剂量,从肺组织再分布的 $t_{1/2}$ 分别为22和34天。这些结果与对于IV施用后从肝清除AmB测得的1至4周 $t_{1/2}$ 一致。由于翻转PK(其中药物进入ASL或血浆隔室的速率慢于其吸收或消除速率),药物从肺组织的缓慢再分布导致药物从ASL和血浆的双相清除。

[0509] 如果假设AmB的终末 $t_{1/2}$ 为~20天,则 $k \sim 0.035 \text{天}^{-1}$ 。对于每日一次施用,AR等于29.4,这表明每日AmB剂量将在稳态下在肺组织中累积高达30倍。这种累积程度体现为在大鼠和犬中对ABCI-IP、ABCI-001和ABCI-003测得的高肺组织浓度。

[0510] 在FY22-071研究中观察到的肺组织中的较低AmB暴露归因于较低的递送剂量和每周一次的给药方案。对于ABCI-003的每周一次给药,AR等于4.6。可以使用维持剂量的5倍之高的负荷剂量以在给药期间维持恒定的肺组织浓度。考虑到我们的治疗靶点是ASL,在肺组织中快速达到AmB的平衡浓度不如在ASL中那样重要。

[0511] 维持ASL中的谷浓度 $>0.2 \mu\text{g/mL}$ 对于本文所述的组合物的功效可能是重要的。如所讨论,ASL中的AmB的测得 $t_{1/2}$ 为~16小时。这导致在稳态下约2的AR。因此,维持剂量的2.5至3倍的负荷剂量可以在本文所述的组合物的给药期间实现一致的ASL峰和谷AmB浓度。

[0512] 实施例19: IH施用后在大鼠和犬中AmB的血浆毒代动力学

[0513] 在28天GLP毒理学研究(研究FY21-235)中在吸入单剂量或重复剂量的ABCI-001后评价雄性和雌性Sprague-Dawley大鼠的血浆AmB消除。该研究包括三个治疗组,组平均达到的递送剂量为:4.7mg/kg(低剂量)、9.3mg/kg(中剂量)和17.3mg/kg(高剂量)。在给药前、给药后0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0和24.0小时收集血浆样品,并用具有1ng/mL定量下限的验证LC-MS/MS方法定量血浆AmB浓度。使用Phoenix WinNonlin 8.3版软件测定毒代动力学参数。

[0514] 尽管雌性始终表现出比雄性更高的暴露,但性别之间差异的证据有限。因此,在表17中呈现雄性和雌性的综合平均值。由于AmB的低溶解度,AmB的全身吸收在单次或重复吸入后缓慢,通常在4至8小时之间观察到达到最大浓度的中值时间(t_{max})值,与剂量、动物性别和施用日无关。在28天给药期内观察到血浆中AmB的最小累积,其中剂量归一化的时间浓度曲线下面积与最后可测量浓度(AUC_{last})和最大浓度(C_{max})的平均累积比为0.699至1.51。在第1天,低、中和高剂量的雄性通过报告标准,以使它们的血浆ABCI-001消除 $t_{1/2}$ 可以估算为5.28至8.55小时的值。在第28天,低剂量和中剂量雌性的消除 $t_{1/2}$ 在7.16至9.33小时之间。这些值与以24小时采样期在大鼠中对4mg/kg IV剂量的AmBisome报告的8小时 $t_{1/2}$ 值一致。

[0515] 表17. 对于低剂量、中剂量和高剂量,在ABCI-001给药后第1天或在28天连续每日剂量后第28天大鼠血浆中的平均TK参数的概要(研究FY21-235)

指标	低剂量(4.7 mg/kg)		中剂量(9.3 mg/kg)		高剂量(17.3 mg/kg)	
	天 1	天 28	天 1	天 28	天 1	天 28
[0516] C_{max} (ng/mL)	52.7 ± 15.0	36.9 ± 10.6	48.7 ± 9.7	46.1 ± 20.0	53.6 ± 8.4	54.5 ± 21.3
$\text{AUC}_{0-24 \text{ h}}$ (hr ng/mL)	701 ± 200	557 ± 130	747 ± 245	682 ± 230	794 ± 68	1010 ± 364
$t_{1/2}$ (h)	5.56	7.16	5.28	9.33	8.55	N.A.

[0517] AUC_{0-24hr} = 从0至24小时的时间浓度曲线下面积; C_{max} = 最大浓度; $t_{1/2}$ = 半衰期

[0518] 在相当的剂量下,大鼠中的平均血浆 C_{max} 值在IV脂质体AmB(AmBisome)的情况下比IHABCI-001高约两个数量级(表18),而肺组织 C_{max} 值为1/83倍。假设大鼠中的肺沉积分数为0.1,在第1天全身吸收24小时的ABCI的绝对生物利用度为约3%。这是药物高度分布到组织中的额外证据。

[0519] IH施用提供了药物对肺的显著靶向,肺组织浓度比IV施用后达到的浓度高近两个数量级,并且血浆浓度低两个数量级。

[0520] 表18. 在Sprague-Dawley大鼠中在相当剂量下IHABCI-001与IV AmBisome的血浆和肺组织暴露的比较

产品	途径	剂量 (mg/kg)	天	血浆 C_{max} (ng/mL)	C_{max} (IV) / C_{max} (IH) (血浆)	肺 C_{max} (mg/g)	C_{max} IH / C_{max} (IV) (肺)
[0521] AmBisome	IV	4	1	14200 ± 2450	269	14.5	
ABCI-001	IH	4.7	1	52.7 ± 15.0		1200	83

[0522] 也在28天GLP毒理学研究(研究FY21-234)中在吸入单剂量或重复剂量的ABCI-003后评价雄性和雌性比格犬的血浆TK。该研究包括三个剂量组,其中平均递送剂量为:0.51mg/kg(低剂量)、1.8mg/kg(中剂量)和4.9mg/kg(高剂量)。以与上文对大鼠所述相同的方式进行样品收集时间、AmB定量和非隔室数据分析。

[0523] 显性性别差异的证据有限,因此在表19中呈现雄性和雌性的综合平均值。如在大鼠中,血浆暴露在第1天和第28天以小于剂量比例的方式(less than dose proportional manner)增加,AmB浓度在 C_{max} 水平或接近 C_{max} 水平下保持升高直至24小时时间点,尤其是对于中剂量组和高剂量组。在第28天尸检时和在第42天从吸入恢复14天后,浓度在所有动物中仍然是可量化的。

[0524] 表19. 在单剂量后第1天或第28天犬血浆中的ABCI平均TK参数(±SD)的概要(研究FY21-234)

指标	低剂量(0.51 mg/kg)		中剂量(1.8 mg/kg)		高剂量(4.9 mg/kg)	
	第1天	第28天	第1天	第28天	第1天	第28天
[0525] C_{max} (ng/mL)	3.02 ± 0.79	9.56 ± 4.25	6.44 ± 2.43	13.9 ± 4.4	15.0 ± 5.1	33.8 ± 9.2
AUC_{0-24h} (hr ng/mL)	53.6 ± 10.3	166 ± 52	115 ± 42	265 ± 71	263 ± 86	655 ± 183

[0526] 与大鼠相比,在28天给药期内犬的血浆AmB累积存在一致的证据,其中剂量归一化的从0至24小时的时间浓度曲线下面积(AUC_{0-24hr})和 C_{max} 值的平均累积比为1.54至3.58。药物处置的这种差异可能反映了这两个物种之间肺解剖学和生理学的差异。用ABCI-003观察到的测量血浆浓度和累积的量级与先前用ABIP的研究一致。

[0527] 血浆ABCI-003消除 $t_{1/2}$ 只能够对恢复研究中的两只高剂量雌性动物估算并且通过报告标准,值为103和105小时。如对IV组合物所讨论,由于从组织中再分布引起的AmB从血浆中的缓慢清除,使用非隔室方法测量的 $t_{1/2}$ 受到取样时间的严重影响。相对于大鼠在犬中观察到的更长的 $t_{1/2}$ (~100小时vs.5-10小时)仅仅是更长取样期的反映(即,对于恢

复动物,到第42天)。

[0528] 在相当的剂量下,与IH ABCI-003相比,犬中的平均血浆 C_{max} 值在IVAmB脱氧胆酸盐(Fungizone®)的情况下高约两个数量级,并在IV脂质体AmB(AmBisome®)的情况下高约三个数量级(表20)。对于ABCI-003,肺组织浓度高19至100倍。假设犬中的沉积分数为0.25,24小时的绝对生物利用度为0.6%。在大鼠和犬中观察到的低生物利用度与在Fungizone®和AmBisome®的IH施用下观察到的以及对根据本文所述的实施方案的组合物的IH预期的低全身毒性一致。

[0529] 表20.在比格犬中在相当剂量下IH ABCI与IV Fungizone和AmBisome的血浆和肺组织暴露的比较

产品	途径	剂量 (mg/kg)	天	血浆 C_{max} (ng/mL)	C_{max} (IV) / C_{max} (IH) (血浆)	肺 C_{max} (mg/g)	C_{max} IH / C_{max} (IV) (肺)
Fungizone	IV	0.6	1	232	77		
			14	1323	138	15.4	
ABCI-003	IH	0.5	1	3			
			28	9.6		300	19
AmBisome	IV	4	1	20000	1333		
			30	100000	2954	31	
ABCI-003	IH	4.9	1	15			
			28	33.8		3100	100

[0531] 实施例20:在大鼠和犬中的毒理学研究

[0532] 在研究FY21-211B(大鼠中的单剂量研究)中观察到的毒性.在研究FY21-211B中,在非GLP研究中通过仅鼻吸入向54只Sprague-Dawley大鼠施用6.8、13.6和23.0mg/kg的单剂量的ABCI-001。ABCI-001组合物包含30%w/w的AmB和1.2mol/mol的Chol/AmB比。ABCI-001耐受良好,在尸检时没有异常的临床观察或宏观观察。血浆、ASL和肺组织中的AmB暴露倾向于随剂量增加而增加,尽管以小于剂量比例的方式。测得的肺组织浓度分别为0.010、0.014和0.016mg/g。尽管观察到肺泡巨噬细胞的剂量依赖性增加,但在组织病理学中没有注意到不良变化(例如,炎性细胞的增加)。巨噬细胞的增加归因于吸入的干粉的正常微粒清除率。尽管是非GLP研究,但23.0mg/kg剂量支持~46mg的ABCI的单人剂量,具有10倍安全裕度。

[0533] 在研究FY21-235(大鼠中的28-dGLP研究)中观察到的毒性.在成功的单剂量研究后,在大鼠中用ABCI-001进行具有14天恢复的28天GLP重复剂量毒理学研究(研究FY21-235)。几乎不溶性AmB原料药的缓慢清除导致在4.7、9.3、17.3mg/kg/天的每日剂量后AmB在肺组织中的显著累积。低剂量组、中剂量组和高剂量组中AmB的肺组织浓度分别为1.2、2.0和2.9mg/g。

[0534] 峰值血浆药物浓度保持小于55ng/mL,比静脉内施用相当浓度的AmB后观察到的低2至3个数量级,并且远低于1000ng/mL的全身毒性阈值。

[0535] 在低、中和高剂量组中,分别在4/38、3/38和13/47只动物中发生早期死亡。推测这是由粘液物质分泌过多引起的大气道阻塞所致。ABCI-001治疗组中的一些动物在给药阶段期间歇性地具有呼吸相关症状(喘鸣、可触知的罗音、呼吸急促)。在高剂量组中首发症状

在第4天出现,并且随着持续暴露而出现得更频繁。但是,临床体征和死亡率之间的相关性差。

[0536] 没有观察到体重、食物消耗、血液学、临床化学和凝血的重要差异。

[0537] 组织病理学评价揭示了所有剂量组中雄性和雌性的喉、气管和肺中的病变。发现包括黄色/金色色素沉着的巨噬细胞的最小至中度增加,喉、气管和肺中的最小至中度混合细胞炎症,粘液物质的最小至中度积聚,以及呼吸道上皮细胞增生的最小至中度增加。由于在研究FY 21-235中观察到显著的发病率和死亡率,不能确定未观察到有害作用的剂量(no observable adverse effect level) (NOAEL)。有害作用的最低剂量(lowest adverse effect level) (LOAEL)是所研究的最低剂量(4.7mg/kg)。

[0538] 研究FY22-071(大鼠中的28-dGLP研究)。在Sprague-Dawley大鼠中进行具有14天恢复的第二个28天GLP研究(研究FY22-071)。这一研究利用ABCI-003并在肺组织中实现低得多的AmB负荷。ABCI-003组合物包含14%w/w的AmB和0.4mol/mol的Chol/AmB比。与ABCI-001相比,由于脂质保持在高度有序的so相中,ABCI-003可能具有降低的粒子间内聚力。三个剂量组采用负荷剂量,然后每周维持剂量。低剂量、中剂量和高剂量分别为:1.08/0.17mg/kg、2.54/0.41mg/kg和5.74/1.06mg/kg。对于低剂量、中剂量和高剂量组,肺组织浓度分别为0.019、0.050和0.088mg/g。

[0539] 与研究FY21-235相比,研究FY22-071的生命部分(in-lifeportion)没有显示发病率或死亡率的证据。大体病理学结果也不显著。尽管观察到巨噬细胞的微小增加,但这些发现没有伴随在研究FY21-235中注意到的不良发现(粘液物质、上皮增生或炎症)。没有观察到体重、食物消耗、血液学、临床化学和凝血的重要差异。NOAEL是最高施用剂量,即5.74/1.06mg/kg。

[0540] 研究FY21-234(犬中的28-d GLP研究)。研究FY21-234以0.5、1.8和4.9mg/kg的日剂量向比格犬施用ABCI-003。犬中的高剂量与在大鼠中的研究FY21-235中(其中没有确立NOAEL)的低剂量相当。此外,类似于大鼠,肺组织中的暴露高(0.25、1.38和3.54mg/g)。但是,与大鼠研究相比,在犬中在任何剂量下都没有观察到发病率或死亡率。临床体征、体重、食物消耗、临床病理学(血液学、凝血、尿分析)、眼科学、ECG参数都不受用ABCI-003治疗的影响。在低剂量下第29天的临床病理学结果表明没有效果。遗憾的是,由于临床化学分析仪故障,第29天的中剂量组和高剂量组以及恢复组(空气、安慰剂对照和高剂量)的数据不可评价。考虑到在更大量级的血浆暴露下全身AmB施用对临床化学的影响的已知临床概况以及在该组合物和AmB相关组合物(例如ABIP)的任何其它吸入毒理学研究中没有观察到临床化学发现的事实,可能遗漏临床病理学发现的担忧是不太可能的。

[0541] 此外,尽管观察到色素沉着的巨噬细胞的数量增加,但没有炎症增加、粘液分泌过多或上皮细胞增生的迹象。组织病理学发现被认为并非不良,并且与肺的正常微粒清除一致。NOAEL是高剂量组,即4.9mg/kg/天。

[0542] 概要.无意受制于理论,但相信,AmB从肺组织中缓慢清除导致随着每日给药的药物显著累积。肺内任何种类的大量未溶解颗粒材料可导致适应性的和最终不良的肺变化,其简单地与呼吸道中存在的外来物质的物理负荷相关。这些变化可与药物的任何基于化学的或药理学介导的毒性无关。

[0543] 随着不溶性物质的量增加,巨噬细胞的数量增加,并且过度的巨噬细胞刺激引起

其它炎性细胞的募集,并且最终可产生继发性组织损伤。这种反应通常被称为“肺超负荷”。重要的是将其与由低毒性粒子(来自可以杀死巨噬细胞或损害其功能的化合物如结晶石英的直接巨噬细胞毒性)的容量过载引起的巨噬细胞肺清除率的降低区分开。

[0544] 当肺组织中的难溶性粒子(例如二氧化钛、炭黑)的浓度超过~1mg/g时,在大鼠中发生与肺超负荷相关的不良观察结果。在低于~0.1mg/g的浓度下通常观察到适应性反应(即,没有炎症反应的巨噬细胞的增加)。

[0545] 在研究FY21-235中,低剂量、中剂量和高剂量组中AmB的肺浓度分别为1.2、2.0和2.9mg/g,超过大鼠肺超负荷的阈值浓度。与肺超负荷现象一致,这些肺负荷在所有剂量组中引起显著的发病率和死亡率。这与证明大鼠巨噬细胞对超负荷特别敏感的其它研究一致。

[0546] 在研究FY22-071中,调整剂量和方案以保持AmB肺组织浓度小于0.1mg/g阈值,在该阈值以下预计只有适应性巨噬细胞反应。实际上,仅观察到巨噬细胞的微小增加,没有与肺超负荷相关的毒性的证据。

[0547] 还值得注意的是,高达23mg/kg的单剂量的ABCI-001(研究FY21-211B)在大鼠中也导致低肺负荷(0.016mg/g)和适应性巨噬细胞反应。这表明不良反应可能不是对给药后肺上皮上的高AmB浓度的急性反应,而是可能由药物随时间在肺组织中的累积引起。

[0548] 在大鼠中用组合物在大于1.0mg/g和低于0.1mg/g的浓度下观察到的适应性反应和不良反应与对不溶性化合物如二氧化钛和炭黑报道的一致。这些观察结果支持以下断言:在研究FY21-235中用ABCI-001观察到的毒性不是化学或药理学介导的药物效应,而是由于与几乎不溶性粒子的肺超负荷相关的巨噬细胞反应。

[0549] 一般而言,在类似的给药条件下,大鼠对肺超负荷效应比其它物种敏感得多。ABCI-003的情况明显如此,其中在犬中在1.23mg/kg的沉积剂量下建立NOAEL,而在大鼠中在约1/3倍(0.47mg/kg)的沉积剂量下仍然观察到肺超负荷。Forbes及其同事总结了与巨噬细胞超负荷相关的物种差异,报道了大鼠对这种现象比小鼠或仓鼠更敏感(Forbes等人*Adv Drug Deliv Rev.*2014,71,15-33)。尽管具有难溶性粒子(例如二氧化钛、煤尘、二氧化硅)的更高的级分沉积和更慢的清除速率,但肺超负荷在人类中并不常见。降低的敏感性似乎与解剖差异(即,大鼠没有呼吸细支气管)和生理差异(即,间质巨噬细胞摄取更多的粒子并转运到淋巴管)有关。因此,在大鼠中观察到的毒性可能无法预测在人类中的毒性,并且犬被认为是用于评价人类风险的最合适的物种。

[0550] 尽管大鼠是敏感的物种,但相信犬是用于评价人类风险的更相关的物种。相对于健康志愿者中的1期单递增剂量临床研究中的最大建议标称剂量(即10mg),犬中的NOAEL(4.9mg/kg)提供12.6倍安全裕度。在健康志愿者的1期多剂量递增研究中,最大建议日剂量的裕度增加至31.5倍。

[0551] 下面基于肺组织中的AmB暴露详细描述估计安全裕度的替代方式。在人类中10mg负荷剂量然后4mg每日维持剂量的给药28天后,人类受试者中的预期肺组织浓度为0.08mg/g。这是已知引起肺超负荷的大鼠肺组织浓度的1/12.5倍。此外,其小于0.1mg/g肺组织浓度,在该浓度以下在大鼠中仅观察到适应性反应。

[0552] 实施例21:PLCI-002、ABCI-003和ABCI-004的开发批次与用于早期临床开发的GMP批次的固态性质的比较

[0553] 对用于GLP毒理学研究的开发批次和用于早期临床开发的GMP批次观察到相当的XRPD衍射图(图13)和如通过差示扫描量热法测定的主转变温度(图14)。结果表明,湿磨两性霉素B晶体在包埋在包含磷脂和胆固醇的混合物的壳内时保持其结晶度,所述壳在脱水粉末的情况下具有超过90℃的主转变温度(即,凝胶到液晶的相变温度)。

[0554] 实施例22: ABCI-003的GMP批次的气雾剂性能

[0555] 用鼓式填充法(Harro **Höfliger**)将喷雾干燥的ABCI-003粉末以良好的精度(RSD <3%)和准确度(2mg剂量)填充到3号HPMC胶囊中。

[0556] 在4kPa的压降和4L的吸入体积下测定胶囊滞留、装置滞留和来自RS01干粉吸入器的AmB的递送剂量。平均递送剂量为 $83.1 \pm 2.4\%$, 胶囊和装置滞留分别为 $6.3 \pm 0.27\%$ 和 $7.0 \pm 2.0\%$ (N=5)。用RP-HPLC方法定量药物浓度。

[0557] 在与上文详述的相同条件下运行的Next Generation Impactor上测定ABCI-003的空气动力学粒度分布(APSD)(图15)。批次MSV-ENG-129代表使用旨在用于1期的GMP喷雾干燥批次运行的填充开发。将该批次的结果与在冷藏条件下1个月稳定性后的开发批次进行比较。

[0558] APSD的关键特征包括:在USP喉部和撞击器中的级1上的沉积小于5%。单峰尺寸分布在级4上达到峰值,在级3和5上具有显著沉积。开发批次的MMAD为 $2.5\mu\text{m}$, 而使用临床材料的两个运行产生 $2.8\mu\text{m}$ 的MMAD。小于 $5\mu\text{m}$ 的细粒剂量对于开发批次为标称剂量的69.6%, 对于临床批次为66.8%。在级3至过滤器上的细粒剂量(总肺剂量的替代物)对于开发批次为标称剂量的71.4%, 对于临床批次为70.6%。开发批次在装置和胶囊中具有更大的沉积。总体而言,可以预期临床批次达到标称剂量的60-70%和递送剂量的75-85%以上的总肺剂量。

[0559] 经此引用并入

[0560] 上述说明书中提到的所有专利和公开专利申请全文经此引用并入本文。

[0561] 等同物

[0562] 为了便于理解,已经通过说明和示例相当详细地充分描述了本发明,但本领域普通技术人员显而易见的是,可以通过在宽且等同的条件、制剂和其它参数的范围内修改或改变本发明来实施本发明,而不影响本发明或其任何具体实施方案的范围,并且这样的修改或改变意图包括在所附权利要求书的范围内。

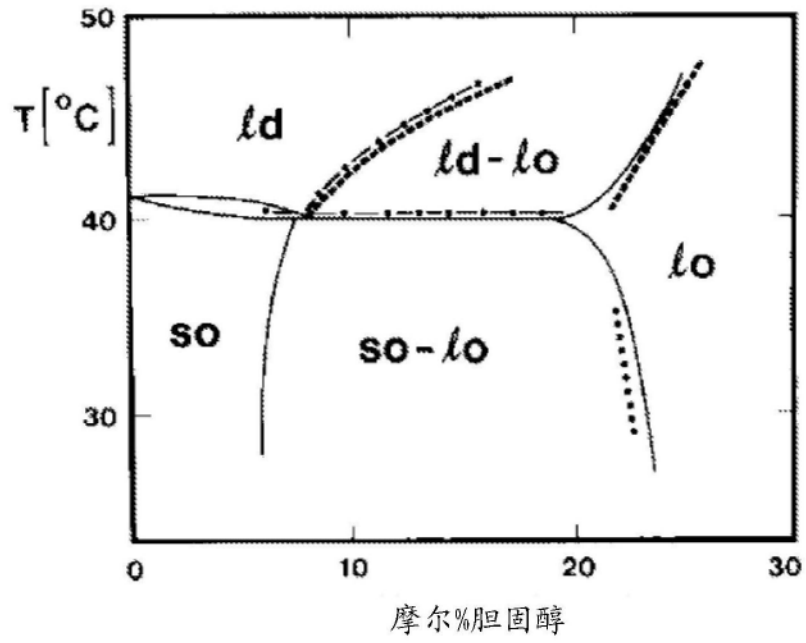


图1

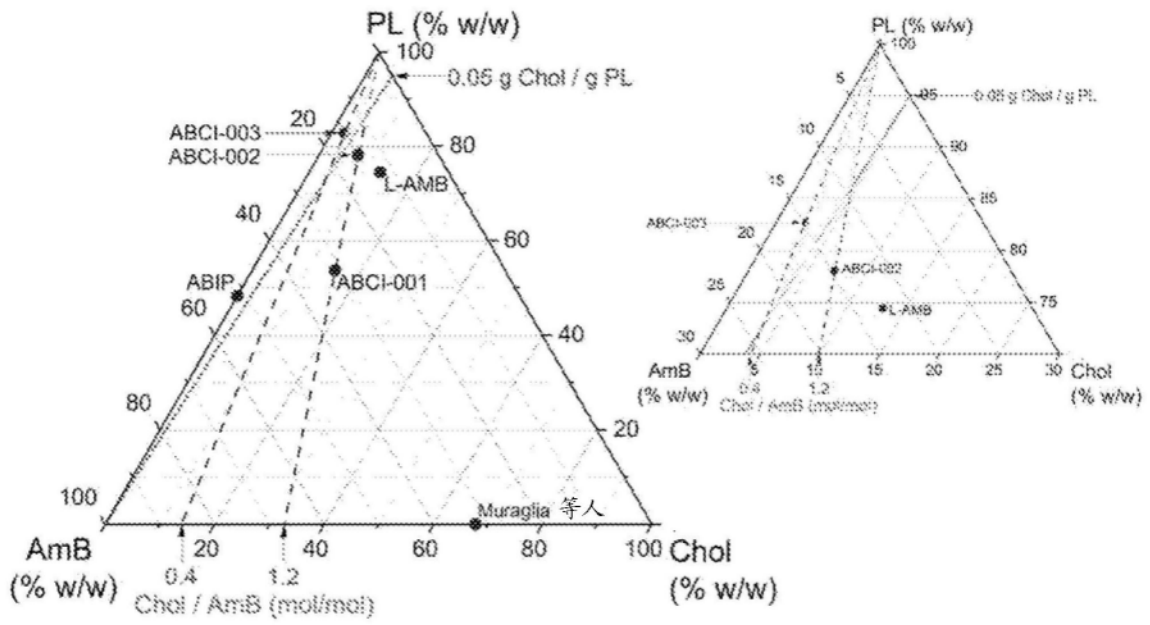


图2

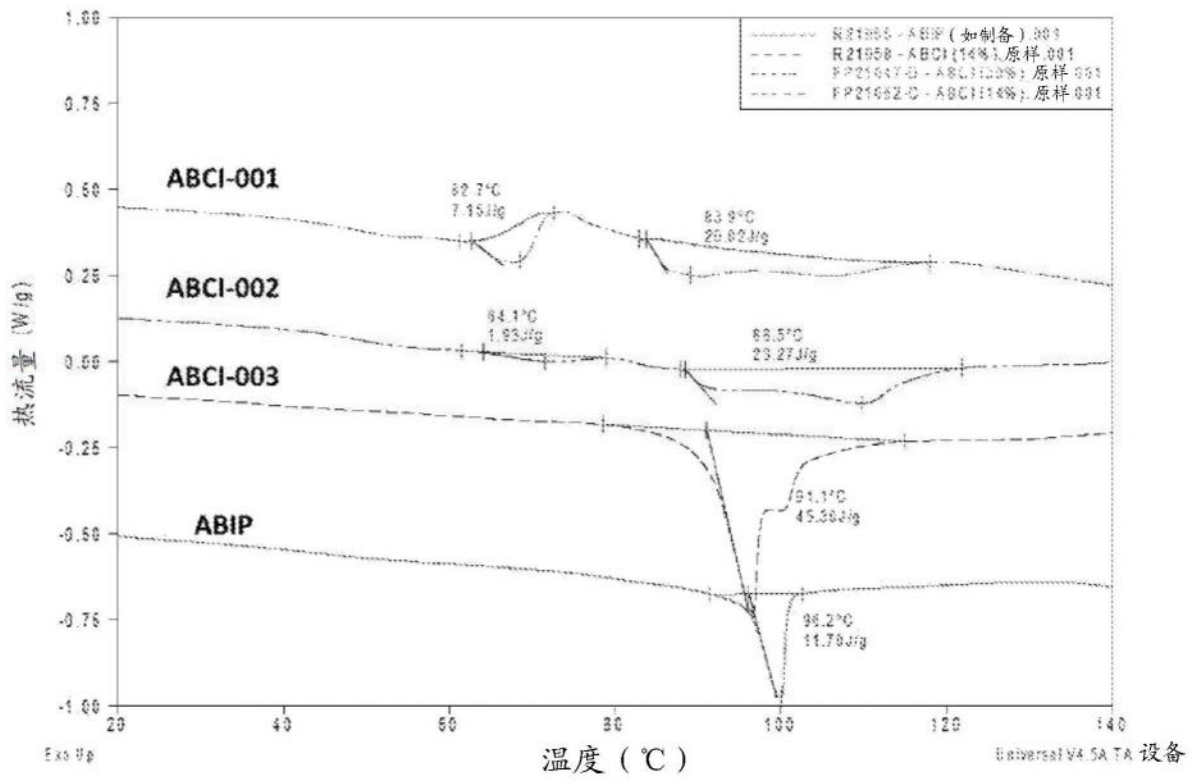


图3

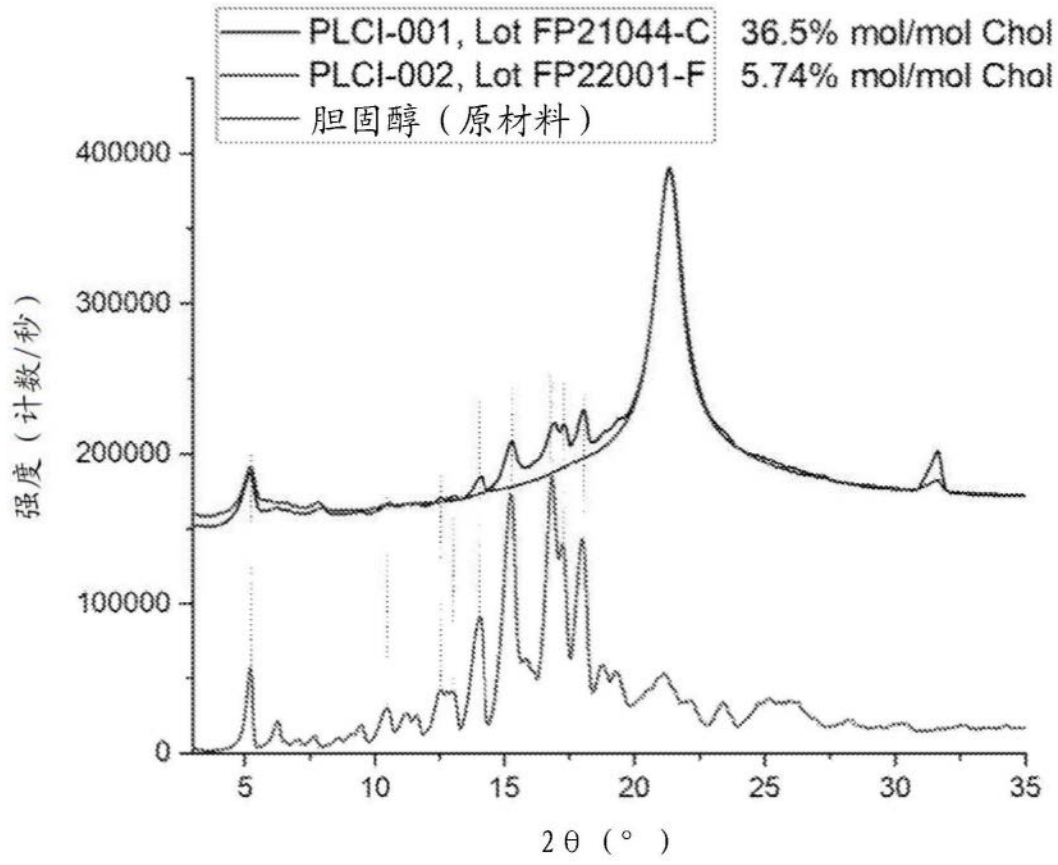


图4

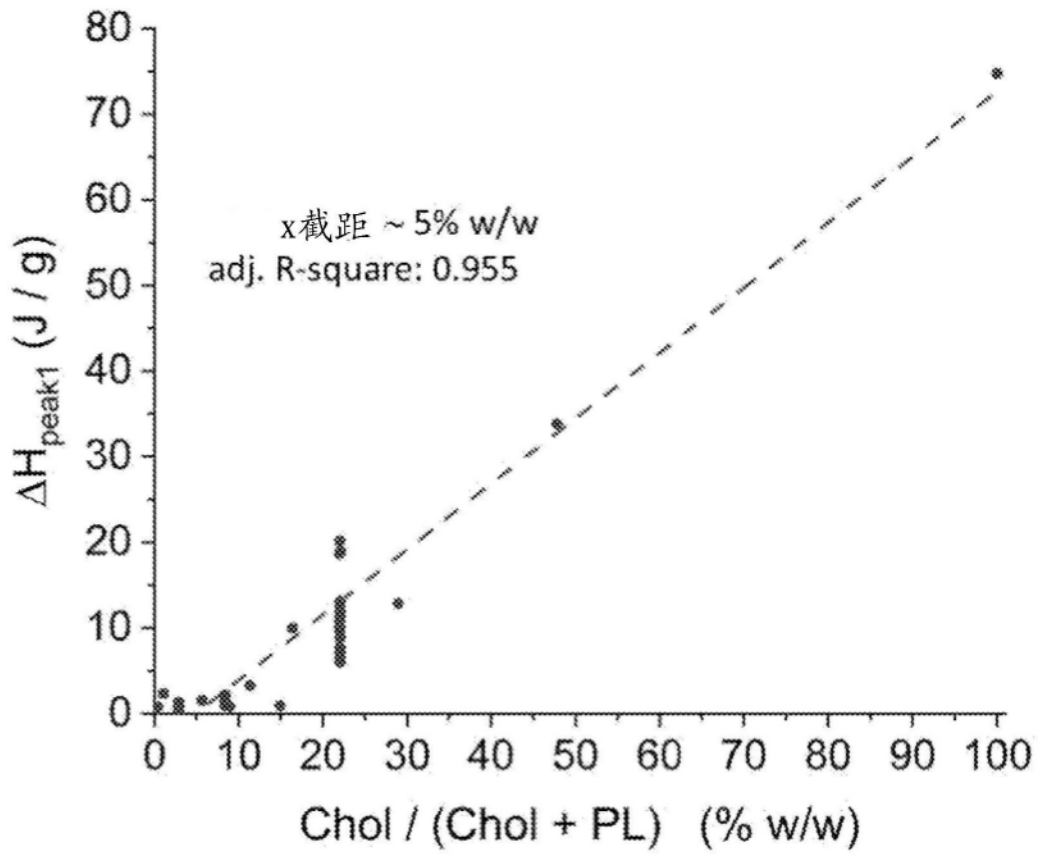


图5

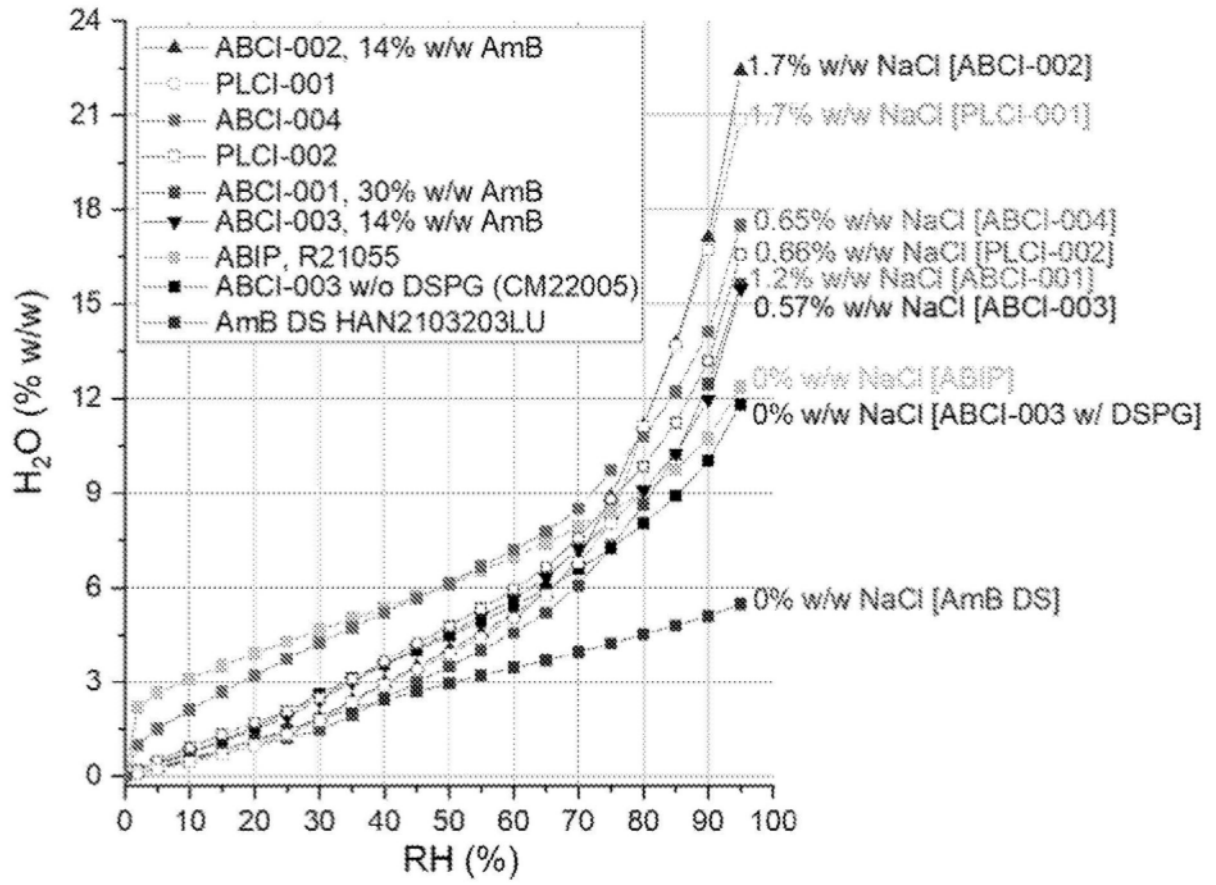


图6

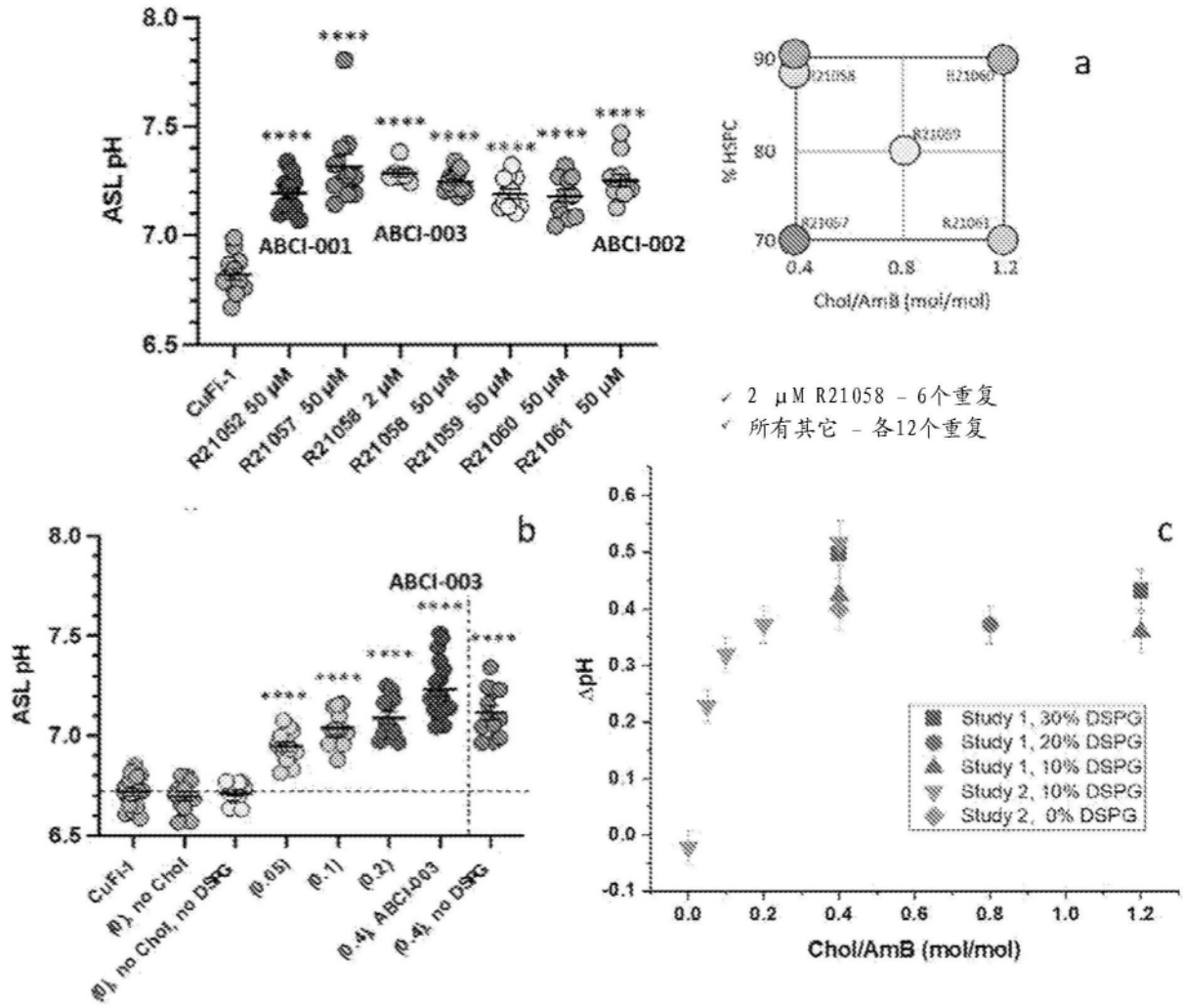


图7A, 7B, 7C

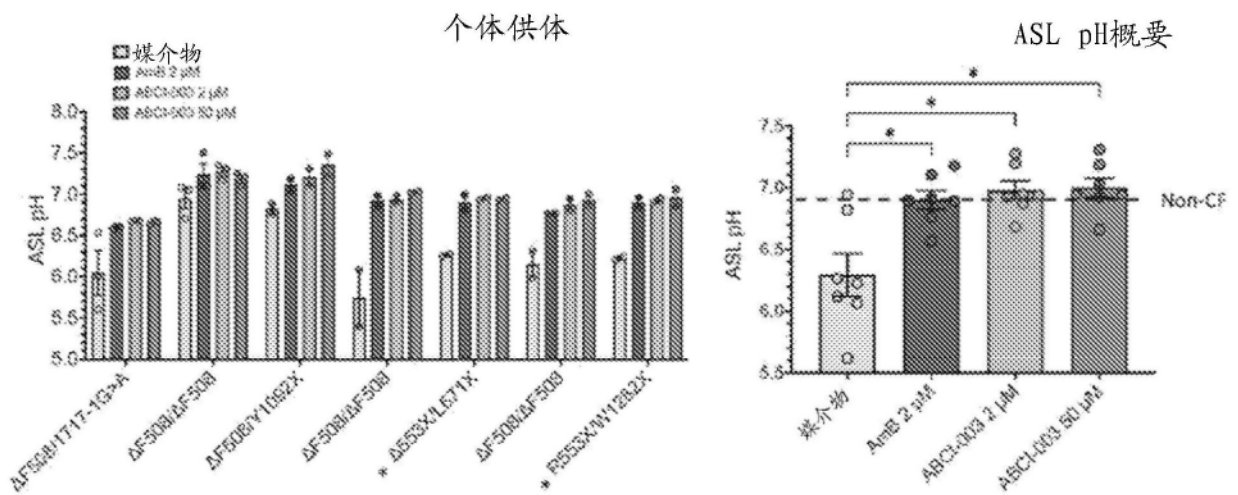


图8

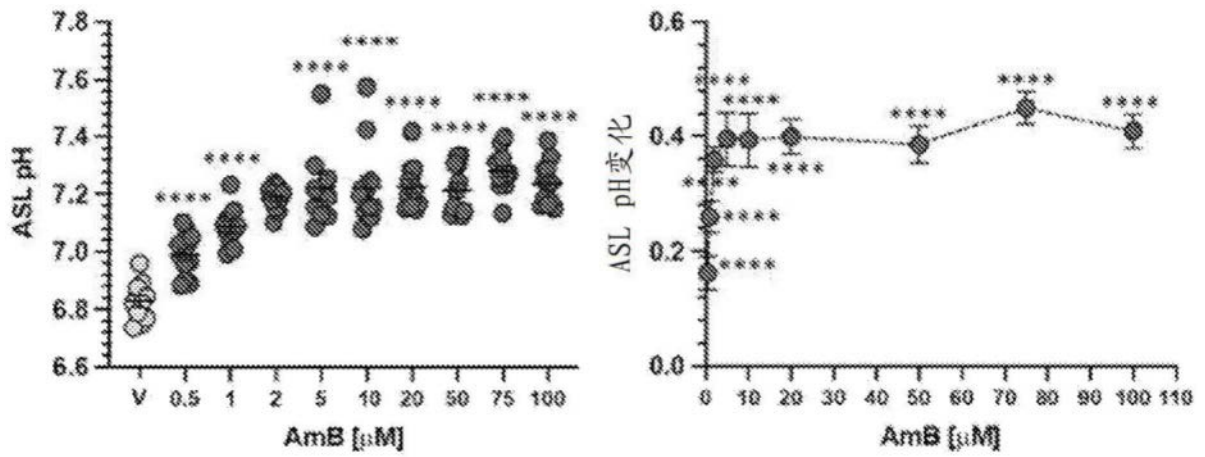
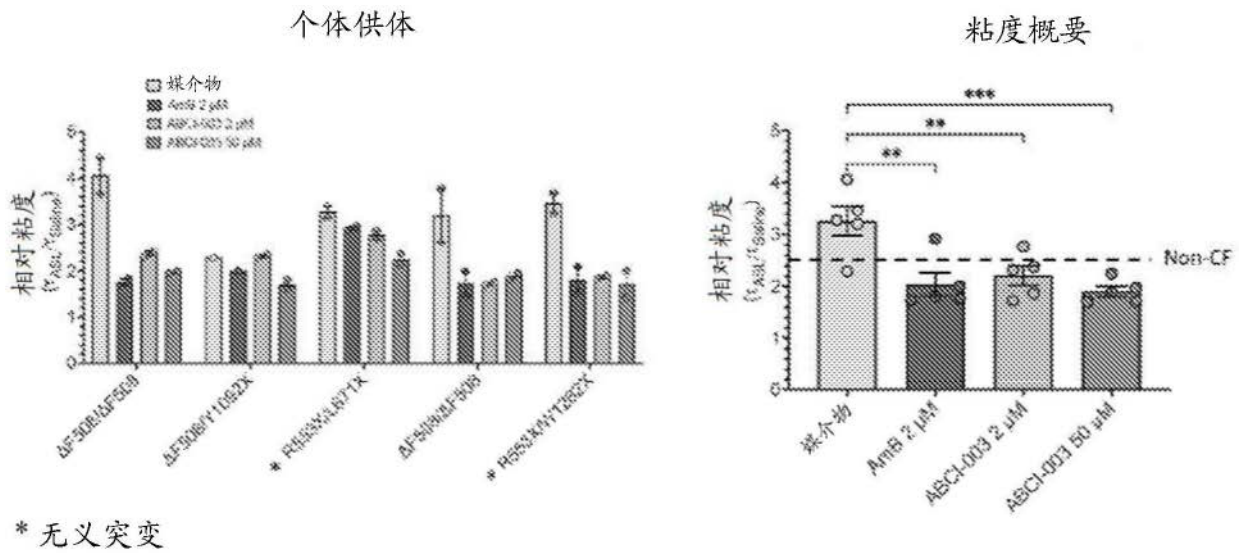


图9



* 无义突变

图10

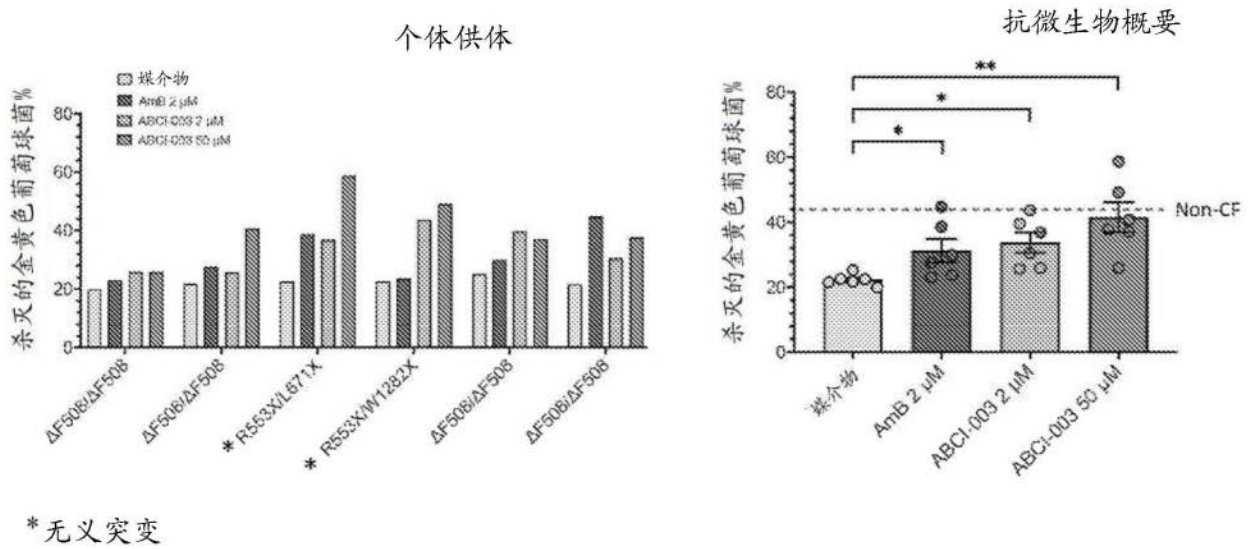


图11

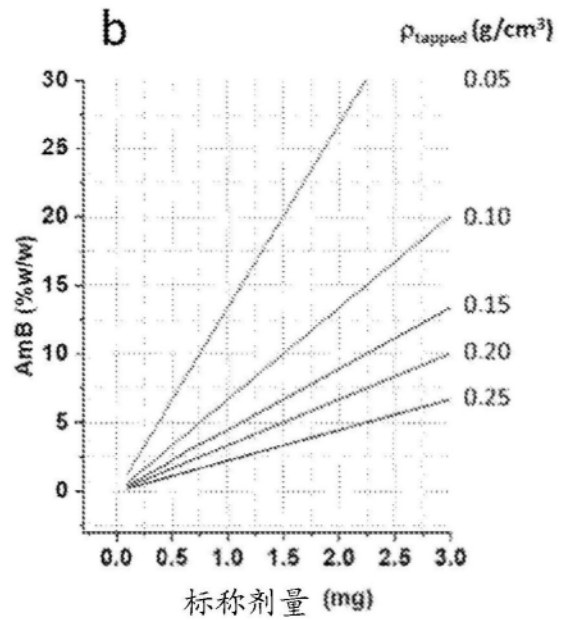
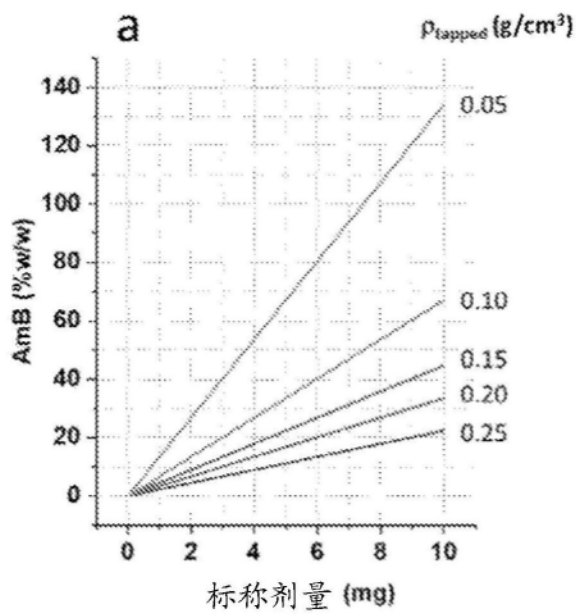


图12A和12B

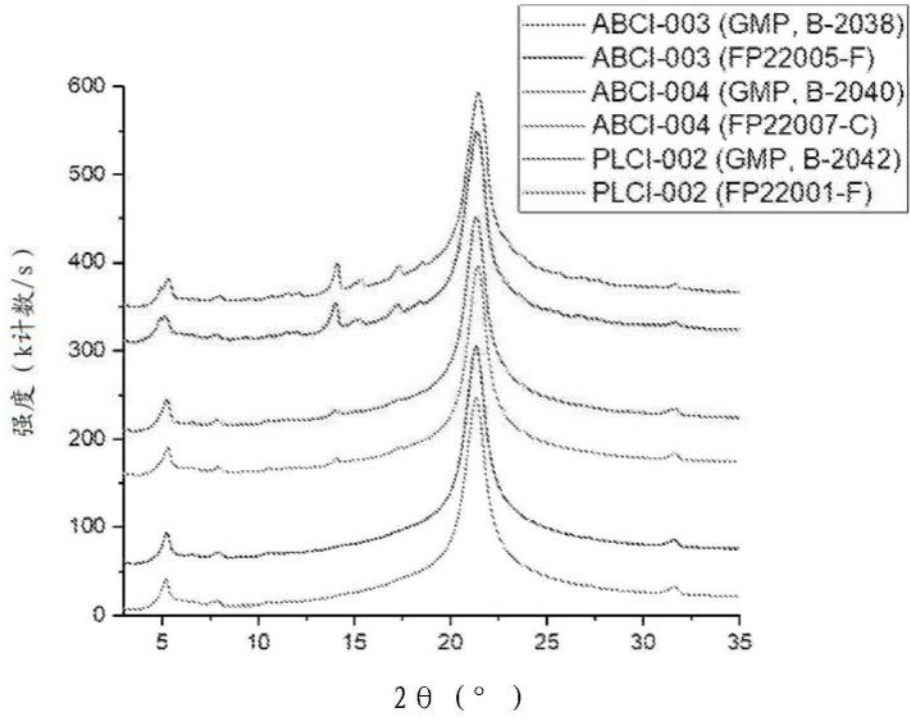


图13

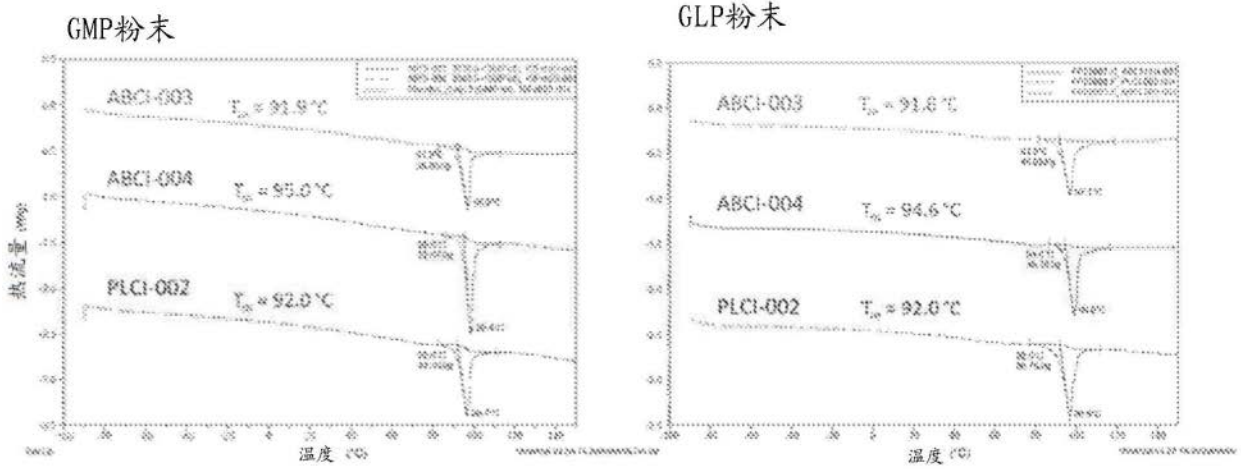


图14

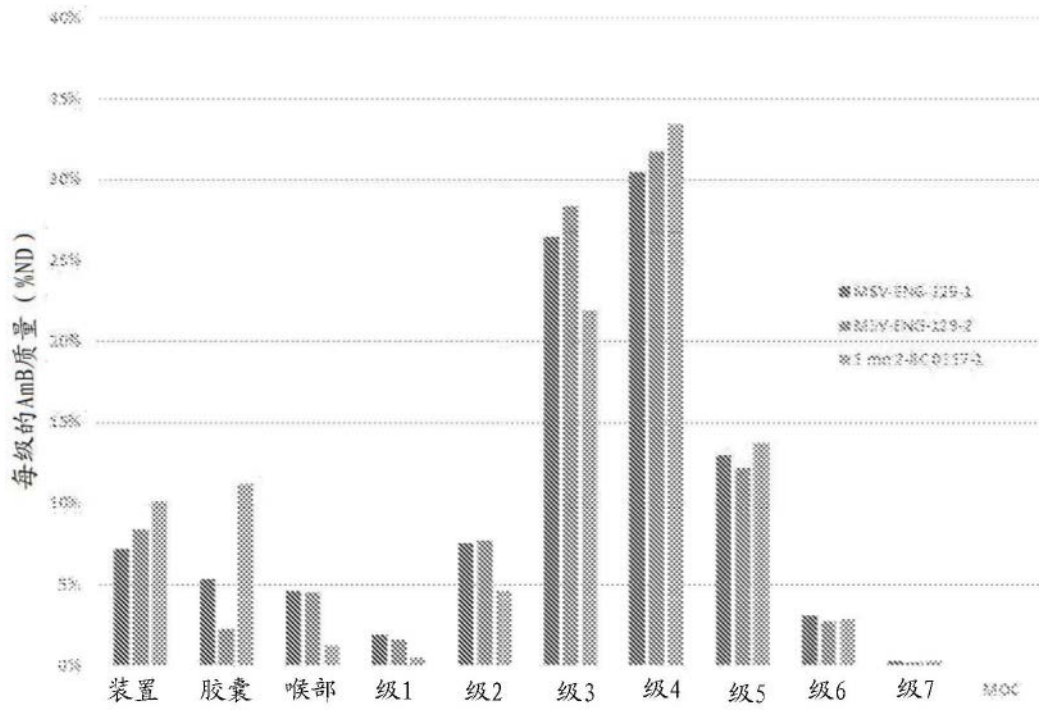


图15