



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109562077 A

(43)申请公布日 2019.04.02

(21)申请号 201780019759.6

(22)申请日 2017.03.24

(30)优先权数据

1605127.8 2016.03.25 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.09.25

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2017/050852 2017.03.24

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/163091 EN 2017.09.28

(71)申请人 蓝莓疗法有限公司

地址 英国柴郡

(72)发明人 约翰·瑞登

克里斯廷·卡罗琳·瑞登

大卫·库克

(74)专利代理机构 广州华进联合专利商标代理有限公司 44224

代理人 刘培培 黄爱娇

(51)Int.Cl.

A61K 9/51(2006.01)

A61K 31/137(2006.01)

A61K 31/785(2006.01)

A61P 31/10(2006.01)

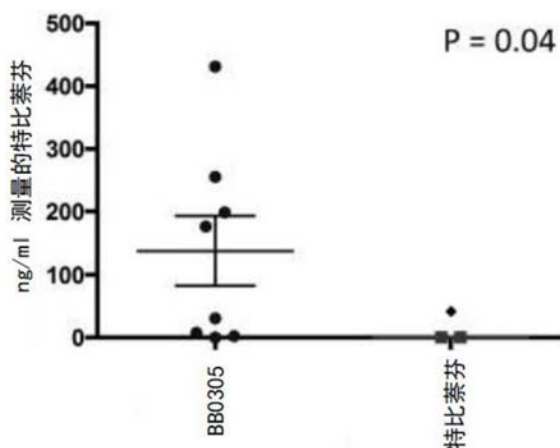
权利要求书4页 说明书23页 附图12页

(54)发明名称

组合物和治疗方法

(57)摘要

本发明涉及一种用于治疗真菌感染的组合物,该组合物包括能够形成纳米颗粒的聚合物和特比萘芬或其衍生物或盐,其中与特比萘芬或其衍生物或盐一起和/或在特比萘芬或其衍生物或盐的存在下形成所述纳米颗粒,并且其中该组合物包括:a)约1:2至约1:4的特比萘芬或其衍生物或盐与聚合物的比例;和b)高达约30%(v/v)的醇。该组合物特别适合作为指甲或皮肤真菌感染的局部治疗。本发明还涉及制备这种组合物的方法和可用于制备所述组合物的组合。



1. 一种用于治疗真菌感染的组合物,所述组合物包括能够形成纳米颗粒的聚合物和特比萘芬或其衍生物或盐,其中与特比萘芬或其衍生物或盐一起和/或在特比萘芬或其衍生物或盐的存在下形成所述纳米颗粒,并且其中所述组合物包括:

- a) 约1:2至约1:4的特比萘芬或其衍生物或盐与聚合物的比例;和
- b) 高达约30% (v/v) 的醇。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,所述聚合物包括线性和/或支化或环状的聚单胍/聚胍、聚双胍、其类似物或衍生物。

3. 根据权利要求1或2所述的组合物,其特征在于,所述聚合物包括聚六亚甲基双胍(PHMB)。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其特征在于,所述醇包括乙醇。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其特征在于,所述组合物还包括水。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其特征在于,所述组合物是局部用组合物。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其特征在于,特比萘芬或其衍生物或盐以约5 $\mu$ g/ml至约600 $\mu$ g/ml的量存在。

8. 根据权利要求7所述的组合物,其特征在于,特比萘芬或其衍生物或盐以约25 $\mu$ g/ml至约200 $\mu$ g/ml的量存在。

9. 根据权利要求7或8所述的组合物,其特征在于,特比萘芬或其衍生物或盐以约50 $\mu$ g/ml至约150 $\mu$ g/ml的量存在。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其特征在于,所述组合物包括约5% (v/v) 至约30% (v/v) 的量包括的醇。

11. 根据权利要求10所述的组合物,其特征在于,所述组合物包括约20% (v/v) 至约30% (v/v) 的量包括的醇。

12. 根据权利要求1至9中任一项所述的组合物,其特征在于,所述醇高达约23% (v/v)。

13. 根据权利要求12所述的组合物,其特征在于,所述醇高达约20% (v/v)。

14. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其特征在于,所述聚合物的量为约150 $\mu$ g/ml至约450 $\mu$ g/ml。

15. 根据权利要求14所述的组合物,其特征在于,所述聚合物的量高达约300 $\mu$ g/ml。

16. 根据权利要求5至15中任一项所述的组合物,其特征在于,所述水的量为约70% (v/v) 至约90% (v/v)。

17. 根据权利要求16所述的组合物,其特征在于,所述水的量高达约80% (v/v)。

18. 一种用于治疗真菌感染的组合物,包括:

(a) 特比萘芬或其衍生物或盐,其以约0.005%w/w至约1%w/w的量存在;

(b) 聚合物,其能够和特比萘芬或其衍生物或盐形成纳米颗粒,其中与特比萘芬或其衍生物或盐一起和/或在特比萘芬或其衍生物或盐的存在下形成所述纳米颗粒,并且其中所述聚合物以约0.015%w/w至约3%w/w的量存在;

(c) 低于约30%w/w的醇;和

(d) 高达约90%w/w的水。

19. 根据权利要求18所述的组合物,包括:

- (a) 约0.1%w/w的特比萘芬或其衍生物或盐；
- (b) 约0.3%w/w的聚合物；
- (c) 约20%w/w的醇；和
- (d) 高达约79.6%w/w的水。

20. 根据权利要求18或19所述的组合物，其特征在于，所述聚合物包括线性和/或支化或环状的聚单胍/聚胍、聚双胍、其类似物或衍生物，和/或所述醇包括乙醇。

21. 根据权利要求1至17中任一项所述的组合物，其特征在于，特比萘芬或其衍生物或盐与聚合物的比例为约1:3。

22. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物，其特征在于，所述纳米颗粒包括两个截然不同的种类的颗粒。

23. 根据权利要求22所述的组合物，其特征在于，所述种类包括0.5nm至5nm的第一类和50nm至350nm的第二类。

24. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物，其特征在于，所述真菌感染包括指甲或皮肤真菌感染。

25. 根据权利要求24所述的组合物，其特征在于，所述指甲或皮肤真菌感染包括甲癣和/或脚癣、或皮肤癣菌和/或酵母菌感染。

26. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物，其特征在于，所述组合物还包括一种或多种以下组分：缓冲剂、赋形剂、粘合剂、油、水、乳化剂、甘油、抗氧化剂、防腐剂和香料和尿素。

27. 根据权利要求1至25中任一项所述的组合物，其特征在于，所述组合物基本上不含其他组分。

28. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物，其特征在于，所述组合物是乳膏、软膏、喷雾剂或粉末的形式。

29. 一种制备用于治疗真菌感染的组合物的方法，包括：以约1:2至约1:4的比例，将能够形成纳米颗粒的聚合物和特比萘芬或其盐或衍生物在适于允许形成纳米颗粒的条件下混合，并加入到高达约30% (v/v) 的醇中。

30. 根据权利要求29所述的方法，其特征在于，所述聚合物包括线性和/或支化或环状的聚单胍/聚胍、聚双胍、其类似物或衍生物。

31. 根据权利要求30所述的方法，其特征在于，所述聚合物包括聚六亚甲基双胍 (PHMB)。

32. 根据权利要求29至31中任一项所述的方法，其特征在于，所述方法用于制备局部用组合物。

33. 根据权利要求29至32中任一项所述的方法，其特征在于，特比萘芬或其衍生物或盐以约5μg/ml至约600μg/ml的量存在。

34. 根据权利要求29至33中任一项所述的方法，其特征在于，特比萘芬或其衍生物或盐以约5μg/ml至约600μg/ml的量存在。

35. 根据权利要求29至32中任一项所述的方法，其特征在于，特比萘芬或其衍生物或盐以约25μg/ml至约200μg/ml的量存在。

36. 根据权利要求35所述的方法，其特征在于，特比萘芬或其衍生物或盐以约50μg/ml

至约150 $\mu$ g/ml的量存在。

37. 根据权利要求29至36中任一项所述的方法,其特征在于,所述乙醇的量为约5% (v/v) 至约30% (v/v)。

38. 根据权利要求37所述的方法,其特征在于,所述乙醇的量为约20% (v/v) 至约30% (v/v)。

39. 根据权利要求29至36中任一项所述的方法,其特征在于,所述醇高达约23% (v/v)。

40. 根据权利要求39所述的方法,其特征在于,所述醇高达约20% (v/v)。

41. 根据权利要求29到40中任一项所述的方法,其特征在于,所述醇包括乙醇。

42. 根据权利要求29至41中任一项所述的方法,其特征在于,所述聚合物为约150 $\mu$ g/ml 至约450 $\mu$ g/ml。

43. 根据权利要求42所述的方法,其特征在于,所述聚合物高达约300 $\mu$ g/ml。

44. 根据权利要求29至43中任一项所述的方法,其特征在于,所述水的量为约70% (v/v) 至约90% (v/v)。

45. 根据权利要求44所述的方法,其特征在于,所述水的量高达约80% (v/v)。

46. 根据权利要求29至45中任一项所述的方法,其特征在于,特比萘芬或其衍生物或盐与所述聚合物以约1:3的比例混合。

47. 根据权利要求29至46中任一项所述的方法,其特征在于,所述纳米颗粒形成于两个截然不同的种类的颗粒。

48. 根据权利要求47所述的方法,其特征在于,所述种类包括0.5nm至5nm的第一类和50nm至350nm的第二类。

49. 根据权利要求29至48中任一项所述的方法,其特征在于,所述真菌感染包括指甲或皮肤真菌感染。

50. 根据权利要求49所述的方法,其特征在于,所述指甲或皮肤真菌感染包括运动员脚病、或皮肤癣菌和/或酵母菌感染。

51. 根据权利要求29至50中任一项所述的方法,其特征在于,所述方法用于制备局部用组合物。

52. 根据权利要求29至51中任一项所述的方法,其特征在于,所述组合物还包括一种或多种以下组分:缓冲剂、赋形剂、粘合剂、油、水、乳化剂、甘油、抗氧化剂、防腐剂和香料和尿素。

53. 根据权利要求29至51中任一项所述的方法,其特征在于,所述组合物基本上不含其他组分。

54. 根据权利要求29至53中任一项所述的方法,其特征在于,随后将所述局部用组合物形成乳膏、软膏、喷雾剂或粉末。

55. 一种以下述物质的组合:

a) 能够与特比萘芬或其衍生物或盐形成纳米颗粒的聚合物;

b) 特比萘芬或其衍生物或盐;和

c) 醇;

其中特比萘芬或其衍生物或盐提供为与聚合物的比例为约1:2至1:4;并且醇提供为量高达约30% (v/v)。

56. 根据权利要求55所述的组合,其特征在于,所述组合用于制备根据权利要求1至28中任一项所述的组合物或用于根据权利要求29至54中任一项所述的方法。

## 组合物和治疗方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及包括由聚合物和特比萘芬形成的纳米颗粒的组合物(和制备该组合物的方法)。所述组合物特别适于,但不限于治疗指甲和/或皮肤真菌感染。

### 背景技术

[0002] 真菌感染在人类和动物中越来越普遍,但是由于抗真菌组合物的毒性、这些组合物的不良溶解性以及某些感染位置偏远(这可以从使用传统药物制剂难以达到来证明),这些感染的治疗仍然存在问题。

[0003] 20世纪60年代发现了广谱抗真菌药,如两性霉素B(amphotericin B)、哈霉素(hamycin)、菲律宾菌素(filipin)和制霉菌素(nystatin)。但由于毒性,只有哈霉素和制霉菌素能局部使用,而两性霉素B则是全身使用。唑类尤其是酮康唑(ketoconazole)的引入是抗真菌治疗的一个突破。目前使用的主要类型的抗真菌药为多烯,唑烯丙基胺,脂肽和嘧啶。然而,多烯对哺乳动物细胞是有毒的。唑类局部耐受性良好,但全身给药时有副作用,且已有一些对唑类抗性的报道。氟胞嘧啶是最常用的嘧啶。虽然其具有优异的组织穿透性,但对氟胞嘧啶的抗性可迅速发展并产生胃肠副作用。脂肽显示低毒性且仍在进行若干试验以测试疗效。

[0004] 由于真菌是真核的,如果破坏细胞靶标,也会破坏宿主细胞,因而新抗真菌药的开发受到限制。真菌感染的增加和抗真菌药的使用增加已导致真菌中出现抗性。由于真菌疾病导致免疫功能低下患者的发病率和死亡率增加,抗真菌抗性具有较大的临床影响。

[0005] 据估计,因水溶性问题,约40%新发现的药物由于缺乏适当的递送而失败。在局部递送药物的情况下,皮肤的屏障特性通常需要渗透促进剂来获得所需剂量的药物。

[0006] 甲癣(通常称为指甲真菌感染)导致指甲变厚、变色、变丑和开裂。如果不治疗,指甲会变得很厚,以至于会压迫鞋子内部,造成压力、刺激和疼痛。尤其是糖尿病患者、外周血管疾病患者和免疫功能低下患者有进一步引发并发症的风险。指甲真菌感染可能会导致心理和社会问题。指甲真菌感染的发病率随着年龄的增加而增加,60多岁时患病率约为30%,欧洲发病率较高,亚洲甚至更高。指甲真菌感染可能会影响一个或多个脚趾甲和/或手指甲,并且如果不治疗,可能会完全破坏指甲。

[0007] 目前治疗指甲真菌感染的方法是局部甲搽剂/涂剂(如阿莫罗芬)每周1-2次,持续6-12个月,和/或口服抗真菌药(如特比萘芬或伊曲康唑)。口服抗真菌药可能有严重的副作用,如肠胃不适,甚至可能导致肝功能衰竭。通常有25-50%的病例报道复发,许多患者由于预期的副作用和治疗时长而不会投入治疗过程中,并且通常只有当疾病变得更有侵略性时才开始治疗。目前的口服或局部治疗可能要耗费6-12个月才起作用。口服治疗必须使全身循环饱和以达到脚趾,并且增加的剂量提高了胃肠和肝并发症的风险。局部治疗在穿透增厚的指甲时是无效的,并且也需要高剂量。

[0008] 运动员脚病(即“Athlete's Foot”,也称为足癣、脚癣或平底靴足癣)是通常由毛癣菌(*Trichophyton*)属(最常见的是红色毛癣菌(*T. rubrum*)或须癣毛癣菌

(*T. mentagrophytes*)) 中的真菌引起的皮肤真菌感染。引起运动员脚病的各种寄生真菌也可以引起其他皮肤感染,如甲癣和股癣。虽然不同于指甲真菌感染,但是运动员脚病也有用药依从性和持续时间问题。

[0009] 真菌性角膜炎是由真菌感染引起的角膜炎症。纳他霉素眼用悬浮液经常用于丝状真菌感染,而氟康唑眼用溶液被推荐用于念珠菌(*Candida*)感染。两性霉素B滴眼液用于难治疗的病例,然而,这些滴眼液对个体可能是有毒的。

[0010] 口腔念珠菌病是念珠菌物种引起的口腔黏膜真菌感染。在免疫缺陷患者中,通常难以成功治疗,这可能是特别有问题的。

[0011] W02015044669公开了用于治疗真菌感染的、包括能够形成纳米颗粒的聚合物和抗真菌剂的局部用组合物(和制备该组合物的方法)。W02017/006112公开了包括由聚合物和特比萘芬形成的纳米颗粒的抗真菌组合物,其中所述纳米颗粒包括0.5至5nm和/或150至250nm的颗粒。

[0012] 本发明的一个目的是解决与目前的抗真菌治疗相关的上述问题中的一个或多个问题。本发明的另一个目的是提供局部抗真菌治疗。另外,本发明的一个目的是提供一种允许抗真菌剂更好地穿透若干身体组织(如指甲和/或真皮、黏膜、角膜和/或巩膜)的治疗。希望本发明可以用作治疗甲癣和脚癣的单一治疗方法,并且也易于使用,产生高治疗依从性并且具有低的再发生率。

## 发明内容

[0013] 根据本发明的第一方面,提供一种用于治疗真菌感染的组合物,该组合物包括能够形成纳米颗粒的聚合物和特比萘芬或其衍生物或盐,其中与特比萘芬或其衍生物或盐一起和/或在特比萘芬或其衍生物或盐的存在下形成所述纳米颗粒,并且其中所述组合物包括:

[0014] a) 约1:2至约1:4的特比萘芬或其衍生物或盐与聚合物的比例;和

[0015] b) 高达约30% (v/v) 的醇。

[0016] 根据本发明的一个可选的第一方面,提供一种用作药物的组合物,该组合物包括能够形成纳米颗粒的聚合物和特比萘芬或其衍生物或盐,其中与特比萘芬或其衍生物或盐一起和/或在特比萘芬或其衍生物或盐的存在下形成所述纳米颗粒,并且其中所述组合物包括:

[0017] a) 约1:2至约1:4的特比萘芬或其衍生物或盐与聚合物的比例;和

[0018] b) 高达约30% (v/v) 的醇。

[0019] 根据本发明的又一个可选的第一方面,提供了组合物在用于治疗真菌感染中的用途,所述组合物包括能够形成纳米颗粒的聚合物和特比萘芬或其衍生物或盐,其中与特比萘芬或其衍生物或盐一起和/或在特比萘芬或其衍生物或盐的存在下形成所述纳米颗粒,并且其中所述组合物包括:

[0020] a) 约1:2至约1:4的特比萘芬或其衍生物或盐与聚合物的比例;和

[0021] b) 高达约30% (v/v) 的醇。

[0022] 根据本发明的再一个可选的第一方面,提供了组合物在制造用于治疗真菌感染的药物中的用途,所述组合物包括能够形成纳米颗粒的聚合物和特比萘芬或其衍生物或盐,

其中与特比萘芬或其衍生物或盐一起和/或在特比萘芬或其衍生物或盐的存在下形成所述纳米颗粒,并且其中所述组合物包括:

[0023] a) 约1:2至约1:4的特比萘芬或其衍生物或盐与聚合物的比例;和

[0024] b) 高达约30% (v/v) 的醇。

[0025] 根据本发明的第二方面,提供了一种用于治疗真菌感染的组合物,该组合物包括:

[0026] (a) 特比萘芬或其衍生物或盐,其以约0.005%w/w至约1%w/w的量存在;

[0027] (b) 聚合物,其能够和特比萘芬或其衍生物或盐形成纳米颗粒,其中与特比萘芬或其衍生物或盐一起和/或在特比萘芬或其衍生物或盐的存在下形成所述纳米颗粒,并且其中所述聚合物以约0.015%w/w至约3%w/w的量存在;

[0028] (c) 低于约30%w/w的醇;和

[0029] (d) 高达约90%w/w的水。

[0030] 根据本发明的一个可选的第二方面,提供了一种用作药物的组合物,该组合物包括:

[0031] (a) 特比萘芬或其衍生物或盐,其以约0.005%w/w至约1%w/w的量存在;

[0032] (b) 聚合物,其能够和特比萘芬或其衍生物或盐形成纳米颗粒,其中与特比萘芬或其衍生物或盐一起和/或在特比萘芬或其衍生物或盐的存在下形成所述纳米颗粒,并且其中所述聚合物以约0.015%w/w至约3%w/w的量存在;

[0033] (c) 低于约30%w/w的醇;和

[0034] (d) 高达约90%w/w的水。

[0035] 根据本发明的又一个可选的第二方面,提供组合物在治疗真菌感染中的用途,所述组合物包括:

[0036] (a) 特比萘芬或其衍生物或盐,其以约0.005%w/w至约1%w/w的量存在;

[0037] (b) 聚合物,其能够和特比萘芬或其衍生物或盐形成纳米颗粒,其中与特比萘芬或其衍生物或盐一起和/或在特比萘芬或其衍生物或盐的存在下形成所述纳米颗粒,并且其中所述聚合物以约0.015%w/w至约3%w/w的量存在;

[0038] (c) 低于约30%w/w的醇;和

[0039] (d) 高达约90%w/w的水。

[0040] 根据本发明的再一个可选的第二方面,提供了组合物在制造用于治疗真菌感染的药物中的用途,该组合物包括:

[0041] (a) 特比萘芬或其衍生物或盐,其以约0.005%w/w至约1%w/w的量存在;

[0042] (b) 聚合物,其能够和特比萘芬或其衍生物或盐形成纳米颗粒,其中与特比萘芬或其衍生物或盐一起和/或在特比萘芬或其衍生物或盐的存在下形成所述纳米颗粒,并且其中所述聚合物以约0.015%w/w至约3%w/w的量存在;

[0043] (c) 低于约30%w/w的醇;和

[0044] (d) 高达约90%w/w的水。

[0045] 第二方面的这种组合物可以优选包括:

[0046] (a) 约0.1%w/w的特比萘芬或其衍生物或盐;

[0047] (b) 约0.3%w/w的聚合物;

[0048] (c) 约20%w/w的醇;和

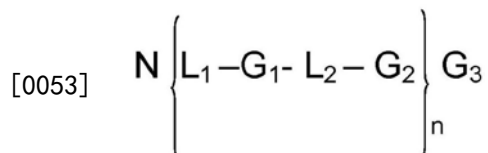


[0049] (d) 高达约79.6%w/w的水。

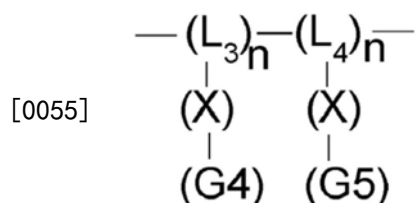
[0050] 本发明的第一和第二方面的特征可包括如下所述的组分和那些组分的数量,它们在适当时可彼此互换。

[0051] 优选地,聚合物优选包括线性和/或支化或环状的聚单胍(polymonoguanide)/聚胍、聚双胍、其类似物或衍生物。线性和/或支化或环状的聚单胍/聚胍、聚双胍、其类似物或衍生物可以根据下式1a或式1b,其中下表A和B中提供了例子:

[0052] 式1a



[0054] 式1b

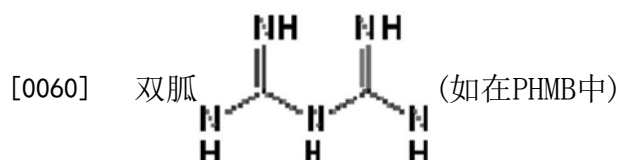


[0056] 其中:

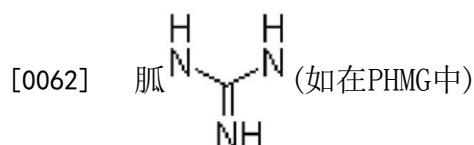
[0057] “n”是指聚合物重复单元个数,并且n可以为2至1000不等,例如为2或5至10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800或900;

[0058]  $\text{G}_1$ 和 $\text{G}_2$ 独立地表示包括双胍或胍的阳离子基团,其中 $\text{L}_1$ 和 $\text{L}_2$ 直接连接至胍的氮原子。因此,双胍或胍基团是聚合物骨架的组成部分。双胍或胍基团在式1a中不是侧链部分。

[0059] 阳离子基团的例子:



[0061] 或



[0063] 在本发明中, $\text{L}_1$ 和 $\text{L}_2$ 是聚合物中 $\text{G}_1$ 和 $\text{G}_2$ 阳离子基团之间的连接基团。 $\text{L}_1$ 和 $\text{L}_2$ 可以独立地表示包括 $\text{C}_1$ - $\text{C}_{140}$ 碳原子的脂族基团,例如烷基如亚甲基、亚乙基、亚丙基、 $\text{C}_4$ 、 $\text{C}_5$ 、 $\text{C}_6$ 、 $\text{C}_7$ 、 $\text{C}_8$ 、 $\text{C}_9$ 或 $\text{C}_{10}$ ;  $\text{C}_{11}$ - $\text{C}_{10}$ 、 $-\text{C}_{20}$ 、 $-\text{C}_{30}$ 、 $-\text{C}_{40}$ 、 $-\text{C}_{50}$ - $\text{C}_{60}$ 、 $-\text{C}_{70}$ 、 $-\text{C}_{80}$ 、 $-\text{C}_{90}$ 、 $-\text{C}_{100}$ 、 $-\text{C}_{110}$ 、 $-\text{C}_{120}$ 、 $-\text{C}_{130}$ 或 $-\text{C}_{140}$ 、烷基;或 $\text{L}_1$ 和 $\text{L}_2$ 可以(独立地)为 $\text{C}_1$ - $\text{C}_{140}$ (例如 $\text{C}_1$ 、 $\text{C}_2$ 、 $\text{C}_3$ 、 $\text{C}_4$ 、 $\text{C}_5$ 、 $\text{C}_6$ 、 $\text{C}_7$ 、 $\text{C}_8$ 、 $\text{C}_9$ 或 $\text{C}_{10}$ ;  $\text{C}_{11}$ - $\text{C}_{10}$ 、 $-\text{C}_{20}$ 、 $-\text{C}_{30}$ 、 $-\text{C}_{40}$ 、 $-\text{C}_{50}$ 、 $-\text{C}_{60}$ 、 $-\text{C}_{70}$ 、 $-\text{C}_{80}$ 、 $-\text{C}_{90}$ 、 $-\text{C}_{100}$ 、 $-\text{C}_{110}$ 、 $-\text{C}_{120}$ 、 $-\text{C}_{130}$ 或 $-\text{C}_{140}$ )、脂环基、杂环基、芳族基、芳基、烷基芳基、芳基烷基、氧化烯基团,或 $\text{L}_1$ 和 $\text{L}_2$ 可以(独立地)为任选地掺杂一个或多个(优选一个)氧、氮或硫原子、官能团以及饱和或不饱和的环状部分的聚亚烷基团。表A列出了合适的 $\text{L}_1$ 和 $\text{L}_2$ 的例子。

[0064]  $\text{L}_1$ 、 $\text{L}_2$ 、 $\text{G}_1$ 和 $\text{G}_2$ 可以使用脂族基、脂环族基、杂环基、芳基、烷基芳基和氧化烯基进行

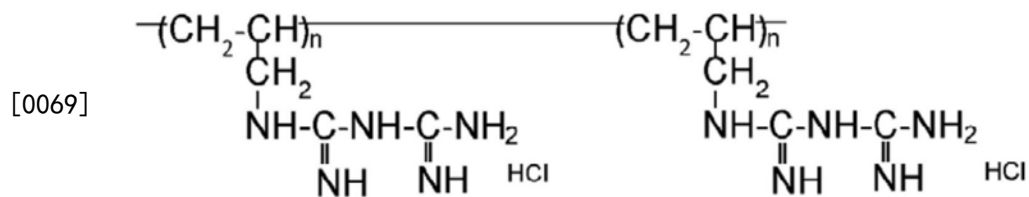
改性。

[0065] N和G<sub>3</sub>优选为端基。典型地,用于本发明的聚合物具有末端氨基(N)和氰基胍(G<sub>3</sub>)或胍(G<sub>3</sub>)端基。这种端基可以通过与脂族基、脂环族杂环基、杂环基、芳基、烷基芳基、芳基烷基、氧化烯基连接而改性(例如用1,6-己二胺、1,6-二(氰基胍基)己烷、1,6-二胍基己烷、4-胍基丁酸)。另外,端基可以通过与受体配体、葡聚糖、环糊精、脂肪酸或脂肪酸衍生物、胆固醇或胆固醇衍生物或聚乙二醇(PEG)连接而改性。任选地,所述聚合物的末端可以是在N和G<sub>3</sub>位上为胍或双胍或氰基胍或胺或氰基胍,或者在N处为氰基胍且在G<sub>3</sub>位上为氰基胍,或者在N处为胍且在G<sub>3</sub>位为氰基胍,或在G<sub>3</sub>处为L<sub>1</sub>胺且在N处为氰基胍。G<sub>3</sub>可以是L<sub>1</sub>-胺、L<sub>2</sub>-氰基胍或L<sub>2</sub>-胍。取决于合成期间的聚合数字(n)或聚合物链断裂和副反应,可以如上所述产生端基的非匀质混合物作为例子。因此,如上所述,N和G<sub>3</sub>基团可以作为非匀质混合物互换/存在。可选地,N和G<sub>3</sub>可以不存在,并且聚合物可以是环状的,在这种情况下,相应的末端L<sub>1</sub>和G<sub>2</sub>基团彼此直接连接。

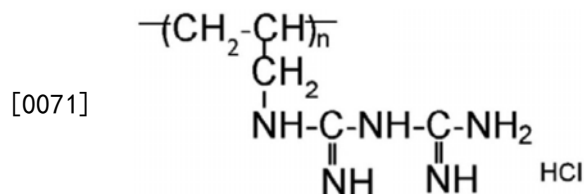
[0066] 在式1b中,X可以存在或不存在。L<sub>3</sub>、L<sub>4</sub>和X如上针对“L<sub>1</sub>或L<sub>2</sub>”所述。因此,L<sub>3</sub>和L<sub>4</sub>以及X是聚合物中G<sub>4</sub>和G<sub>5</sub>阳离子基团之间的连接基团。L<sub>3</sub>和L<sub>4</sub>以及X可以独立地表示包括C<sub>1</sub>-C<sub>140</sub>碳原子的脂族基团,例如烷基如亚甲基、亚乙基、亚丙基、C<sub>4</sub>、C<sub>5</sub>、C<sub>6</sub>、C<sub>7</sub>、C<sub>8</sub>、C<sub>9</sub>或C<sub>10</sub>;C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>、-C<sub>20</sub>、-C<sub>30</sub>、-C<sub>40</sub>、-C<sub>50</sub>-C<sub>60</sub>、-C<sub>70</sub>、-C<sub>80</sub>、-C<sub>90</sub>、-C<sub>100</sub>、-C<sub>110</sub>、-C<sub>120</sub>、-C<sub>130</sub>或-C<sub>140</sub>、烷基;或L<sub>3</sub>和L<sub>4</sub>以及X可以独立地为C<sub>1</sub>-C<sub>140</sub>(例如C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>、C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub>、C<sub>5</sub>、C<sub>6</sub>、C<sub>7</sub>、C<sub>8</sub>、C<sub>9</sub>或C<sub>10</sub>;C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>、-C<sub>20</sub>、-C<sub>30</sub>、-C<sub>40</sub>、-C<sub>50</sub>、-C<sub>60</sub>、-C<sub>70</sub>、-C<sub>80</sub>、-C<sub>90</sub>、-C<sub>100</sub>、-C<sub>110</sub>、-C<sub>120</sub>、-C<sub>130</sub>或-C<sub>140</sub>)、脂环基、杂环基、芳族基、芳基、烷基芳基、芳基烷基、氧化烯基团,或L<sub>3</sub>和L<sub>4</sub>以及X可以独立地为任选地掺杂一个或多个(优选一个)氧、氮或硫原子、官能团以及饱和或不饱和的环状部分的聚亚烷基团。表B列出了合适的L<sub>3</sub>和L<sub>4</sub>以及X的例子。

[0067] “G<sub>4</sub>”和“G<sub>5</sub>”是阳离子部分,可以相同或不同。其中的至少一个是双胍部分或氨基甲酰基胍,而其他部分可以如上所述(双胍或氨基甲酰基胍)或胺。为了避免疑问,在式1b中,阳离子部分G<sub>4</sub>和G<sub>5</sub>不包括单个胍基。例如,G<sub>4</sub>和G<sub>5</sub>通常不含单个胍基。这样的化合物的实施例如是如表B中所列的聚烯丙基双胍、聚(烯丙基双胍-共-烯丙胺)(poly(allylbiguanidnion-co-allylamine))、聚(烯丙基氨基甲酰基胍-共-烯丙胺)(poly(allylcarbamoylguanidino-co-allylamine))、聚乙烯双胍。

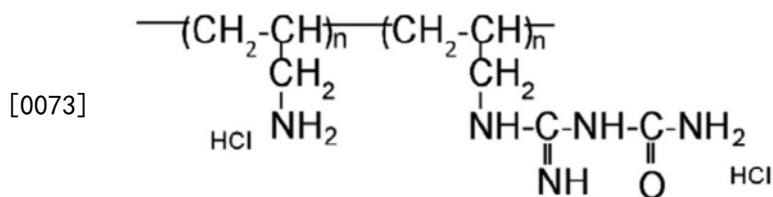
[0068] 聚烯丙基双胍的例子如下所示:



[0070] 在聚烯丙基双胍的情况下,L<sub>3</sub>和L<sub>4</sub>相同,G<sub>4</sub>和G<sub>5</sub>是相似的,因此聚烯丙基双胍可简化如下。



[0072] 聚(烯丙基氨基甲酰基胍-共-烯丙胺)的例子如下所示



[0074] 用于本发明的聚合物通常会具有与其相关的反离子。合适的反离子包括但不限于：卤化物(例如氯化物)、磷酸盐、乳酸盐、膦酸盐、磺酸盐、氨基羧酸盐、羧酸盐、羟基羧酸盐、有机磷酸盐、有机膦酸盐、有机磺酸盐和有机硫酸盐。

[0075] 用于本发明的聚合物可以是不同数字“n”的聚合物的非匀质混合物,或者是通过标准纯化方法纯化的包括特定数字“n”的匀质部分。如上所述,聚合物也可以是环状的并且另外可以是支化的。

[0076] 优选的数字“n”包括2-250、2-100、2-80和2-50。

[0077] 表A.由式1a产生的聚合物类似物的例子。

[0078]

名称	L <sub>1</sub>	G <sub>1</sub>	L <sub>2</sub>	G <sub>2</sub>
聚六亚甲基双胍 (PHMB)	(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	双胍	(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	双胍
聚亚乙基双胍 (PEB)	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	双胍	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	双胍
聚亚乙基四亚甲基双胍	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	双胍	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	双胍
聚亚乙基六亚甲基双胍 (PEHMB)	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	双胍	(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	双胍
聚亚丙基双胍, 聚氨基丙基双胍 (PAPB)	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	双胍	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	双胍
聚[2-(2-乙氧基)-乙氧乙基]-双胍 -氯化物] (PEEG)	(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> )	双胍	(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OC H <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> )	双胍
聚亚丙基六亚甲基双胍	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	双胍	(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	双胍
聚亚乙基亚辛基双胍	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	双胍	(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub>	双胍
聚亚乙基十亚甲基双胍	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	双胍	(CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub>	双胍
聚亚乙基十二亚甲基双胍	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	双胍	(CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub>	双胍
聚四亚甲基六亚甲基双胍	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	双胍	(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	双胍
聚四亚甲基双胍	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	双胍	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	双胍
聚亚丙基亚辛基双胍	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	双胍	(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub>	双胍
聚四亚甲基亚辛基 双胍	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	双胍	(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub>	双胍
聚六亚甲基二亚乙基三胺双胍	(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	双胍	CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH	双胍

[0079]

			-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	
聚六亚甲基胍 (PHMG)	(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	胍	(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	胍
聚亚乙基胍	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	胍	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	胍
聚亚乙基四亚甲基胍	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	胍	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	胍
聚亚乙基六亚甲基胍	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	胍	(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	胍
聚亚丙基胍, 聚氨基丙基胍 (PAPB)	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	胍	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	胍
聚[2-(2-乙氧基)-乙氧基乙基]-胍	(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> )	胍	(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OC H <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> )	胍
聚亚丙基六亚甲基胍	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	胍	(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	胍
聚亚乙基亚辛基胍基胍	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	胍	(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub>	胍
聚亚乙基十亚甲基胍	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	胍	(CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub>	胍
聚亚乙基十二亚甲基胍	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	胍	(CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub>	胍
聚四亚甲基六亚甲基胍	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	胍	(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	胍
聚亚丙基亚辛基胍	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	胍	(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub>	胍
聚四亚甲基胍	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	胍	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	胍
聚六亚甲基二亚乙基三胺胍	(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	胍	CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	胍

[0080] 例如,由式1a产生的化合物的CAS号

[0081]	聚合物	CAS 号
	盐酸聚六亚甲基双胍 (PHMB)	27083-27-8 32289-58-0
	盐酸聚六亚甲基胍 (PHMG)	57028-96-3
	聚[2-(2-乙氧基)-乙氧基乙基]-氯化胍] (PEEG)	374572-91-5 10

[0082] 表B由式1b产生的聚合物类似物的例子。

[0083]

名称	L <sub>3</sub>	G <sub>4</sub>	L <sub>4</sub>	G <sub>5</sub>	x
聚烯丙基双胍	(CH <sub>2</sub> -CH)	双胍	(CH <sub>2</sub> -CH)	双胍	CH <sub>2</sub>
聚(烯丙基双胍-共-烯丙胺)	(CH <sub>2</sub> -CH)	胺	(CH <sub>2</sub> -CH)	双胍	CH <sub>2</sub>

[0084]

聚(烯丙基氨基甲酰基双胍-共-烯丙胺)	(CH <sub>2</sub> -CH)	胺	(CH <sub>2</sub> -CH)	氨基甲酰基	CH <sub>2</sub>
聚乙烯基双胍	(CH <sub>2</sub> -CH)	双胍	(CH <sub>2</sub> -CH)	双胍	不存在

[0085] 所使用的聚合物可以包括线性、支化或树枝状分子。该聚合物可以包括线性、支化或树枝状分子的组合。所述聚合物可以包括式1a或式1b的分子中的一种或任意组合，例如如上所述。

[0086] 例如，所述聚合物可以包括聚六亚甲基双胍 (PHMB)、聚六亚甲基单胍 (PHMG)、聚亚乙基双胍 (PEB)、聚四亚甲基双胍 (PTMB) 或聚亚乙基六亚甲基双胍 (PEHMB) 中的一种或多种。表A和表B列出了一些例子。

[0087] 因此，所述聚合物可以包括聚六亚甲基双胍 (PHMB)、聚六亚甲基单胍 (PHMG)、聚亚乙基双胍 (PEB)、聚四亚甲基双胍 (PTMB)、聚亚乙基六亚甲基双胍 (PEHMB)、聚亚甲基双胍 (PMB)、聚(烯丙基双胍-共-烯丙基胺)、聚(N-乙烯基双胍)、聚烯丙基双胍中的一种或多种的匀质或非匀质混合物。最优选的聚合物包括聚六亚甲基双胍 (PHMB)。

[0088] 术语“特比萘芬”或其衍生物或盐旨在表示与盐酸特比萘芬有关的药用活性物质，盐酸特比萘芬为最初以商品名 Lamisil® 销售的合成的烯丙胺抗真菌药。该术语还旨在包括药学上可接受的形式盐酸特比萘芬的药用变体、衍生物、替代盐，例如无毒有机或无机酸或碱、加成盐。

[0089] 特比萘芬或其衍生物或盐可以以约5至约1000μg/ml的量存在。优选地，特比萘芬或其衍生物或盐可以为约5至约600μg/ml。更优选地，特比萘芬或其衍生物或盐将为约25至约200μg/ml。甚至更优选地，特比萘芬或其衍生物或盐将为约50至约150μg/ml。最优选地，特比萘芬或其衍生物或盐为约100μg/ml。

[0090] 聚合物可以以约15至约3000μg/ml的量存在。优选地，聚合物可以为约15至约1800μg/ml。更优选地，聚合物可以为约75至约600μg/ml。甚至更优选地，聚合物可以为约150至约450μg/ml。最优选地，聚合物将为约300μg/ml。聚合物将优选包括PHMB。

[0091] 醇可以以约5%至约29%或约30% (v/v) 的量存在。优选地，醇将以约10%至约29%或约30% (v/v) 的量存在。更优选地，醇将以约20%至约29%或约30% (v/v) 的量存在。仍然更优选地，醇将以高达约25%或23% (v/v) 的量存在。最优选地，醇的量高达约20% (v/v)。

[0092] 醇优选包括乙醇，尽管它可以包括(无论是单独地还是结合地)其他醇，如甲醇或丙醇。

[0093] 组合物也可以包括水。水优选为蒸馏水。水可以以约70%至约95% (v/v) 的量存在。优选地，水将以约70%至约90% (v/v) 的量存在。更优选地，水将以约70%至约80% (v/v) 的量存在。仍然更优选地，水的量超过约77% (v/v)。最优选地，水的量高达约90% (v/v)、高达约80% (v/v) 或高达约79.6% (v/v)。

[0094] 特比萘芬或其衍生物或盐可以以约0.005%w/w至约1.0%w/w的量存在。优选地，

特比萘芬或其衍生物或盐可以为约0.005%w/w至约0.6%w/w。更优选地,特比萘芬或其衍生物或盐可以为约0.025%w/w至约0.2%w/w。甚至更优选地,特比萘芬或其衍生物或盐可以为约0.05%w/w至约0.15%w/w存在。最优选地,特比萘芬或其衍生物或盐将为约0.1w/w。

[0095] 聚合物可以以约0.15%w/w至约3%w/w的量存在。优选地,聚合物可以为约0.15%w/w至约1.8%w/w。更优选地,聚合物将为约0.75%w/w至约0.6%w/w。甚至更优选地,聚合物将为约0.15%w/w至约0.45%w/w。最优选地,聚合物为约0.3%w/w。聚合物将优选包括PHMB。

[0096] 醇可以以约5%w/w至约29%w/w的量存在。优选地,醇将以约10%w/w至约29%w/w的量存在。更优选地,醇将以约20%w/w至约29%w/w的量存在。仍然更优选地,醇将以约29%w/w,更优选地,高达约25%,甚至更优选地,高达约23%w/w的量存在,最优选地,醇的量高达约20%w/w。

[0097] 醇优选包括乙醇,尽管它可以包括(无论是单独地还是结合地)其他醇,如甲醇或丙醇。

[0098] 组合物也可以包括水。水优选为蒸馏水。水可以以约70%w/w至约95%w/w的量存在。优选地,水将以约70%w/w至约90%w/w的量存在。更优选地,水将以约70%w/w至约80%w/w的量存在。仍然更优选地,水的量将高达约70%w/w,更优选地,高达约77%w/w。最优选地,醇的量高达约90%w/w、高达约80%w/w或高达约79.6%w/w。

[0099] 优选地,该组合物仅包括特比萘芬、聚合物、醇和水。即,组合物中不包括另外的赋形剂或溶剂。

[0100] 特比萘芬或其衍生物或盐与聚合物的比例可以为约1:3±0.75。优选地,特比萘芬或其衍生物或盐与聚合物的比例为约1:3±0.5。更优选地,特比萘芬或其衍生物或盐与聚合物的比例为约1:3±0.25。甚至更优选地,特比萘芬或其衍生物或盐与聚合物的比例为约1:3±0.1。最优选地,特比萘芬或其衍生物或盐与聚合物的比例为约1:3。

[0101] 纳米颗粒可包括形成于两个截然不同的种类的颗粒。这可以包括0.5至5nm的第一类和50至350nm的第二类。

[0102] 第一类相对于第二类的相对量通常可以彼此相等,或在组合物中,其中一类可以是主类。

[0103] 优选地,第一类颗粒为0.5至3nm。更优选地,第一类颗粒为0.5至2.5nm。最优选地,第一类颗粒为0.5至2nm。优选地,第二类颗粒为75至325nm。更优选地,第二类颗粒为100至300nm。最优选地,第二类颗粒为150至200nm或215nm。

[0104] 优选地,第一类颗粒的平均尺寸将为0.5至1.5nm。更优选地,第一类颗粒的平均尺寸将为0.6至1.4nm。甚至更优选地,第一类颗粒的平均尺寸将为0.7至1.2nm。最优选地,第一类颗粒的平均尺寸将为约0.9nm左右。

[0105] 优选地,第二类颗粒的平均尺寸将为50至350nm。更优选地,第二类颗粒的平均尺寸将为100至300nm。甚至更优选地,第二类颗粒的平均尺寸将为150至200nm。最优选地,所述第二类颗粒的平均尺寸将为约160至约176nm左右。

[0106] 优选地,所述第二类颗粒的平均模态尺寸将为150至225nm。更优选地,第二类颗粒的平均模态尺寸将为155至220nm。甚至更优选地,所述第二类颗粒的平均模态尺寸将为160至215nm。最优选地,所述第二类颗粒的平均模态尺寸将为约164至约211nm左右。

[0107] 该组合物可以包括局部应用的组合物。

[0108] 对于技术人员来说,显而易见的是,所述组合物可以进一步包括一种或多种以下组分:缓冲剂、赋形剂、粘合剂、油、溶剂、水、乳化剂、甘油、抗氧化剂、防腐剂和香料或通常见于药物(特别是局部用乳膏和软膏)的其他额外组分。此外,该组合物可以有若干形式,例如糊剂或悬浮液。该组合物可配制成与喷雾装置一起使用或与微针阵列递送系统一起使用。如果使用微针阵列,则可将其结合至粘合贴片中。

[0109] 对于某些应用,该组合物可另外包括渗透剂,以允许将特比萘芬剂递送至感染区域。例如,可以使用尿素,从而使纳米颗粒突破感染位于指甲底下或者位于指甲本身的指甲真菌感染的个体的指甲。另外,可以使用某些溶剂,以使组合物的一种或多种组分(例如特比萘芬)能够溶解于溶液中。

[0110] 本发明的组合物还可以经鼻或通过吸入给药,并且可以便利地以干粉吸入器或使用合适的推进剂从加压容器、泵、喷雾器或雾化器进行气溶胶喷雾穿透的形式递送,所述推进剂如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、氢氟烷烃如1,1,1,2-四氟乙烷(HFA 134A或1,1,1,2,3,3,3-七氟丙烷(HFA 227EA3))、二氧化碳或其它合适的气体。在加压气溶胶的情况下,剂量单位可以通过提供递送计量数的阀来确定。加压的容器、泵、喷雾器或雾化器可以含有组合物的溶液或悬浮液,如,使用乙醇和推进剂的混合物作为溶剂,其可以另外含有润滑剂,例如脱水山梨糖醇三油酸酯。用于吸入器或吹入器的胶囊和药筒(例如由明胶制成)可以配制成含有本发明组合物和合适的粉末基质(如乳糖或淀粉)的粉末混合物。

[0111] 气溶胶或干粉制剂优选设置成使得每个计量的剂量或“粉扑(puff)”含有至少1 $\mu$ g的组合物用于递送给患者。可以理解的是,气溶胶的总日剂量将因患者而异,并且可以在一天内以单次剂量或更通常地以分剂量给药。

[0112] 可替换地,本发明的组合物可以以栓剂或阴道栓的形式给药,或者它们可以以洗剂、溶液、乳膏、软膏或扑粉的形式局部施用。本发明的组合物也可以经皮给药,例如通过使用皮肤贴片。本发明的组合物也可以通过经眼途径给药,特别是用于治疗眼部疾病。

[0113] 对于眼科用途,本发明的组合物可以使用纳米颗粒系统配制,或者配制为等渗的、pH调节过的无菌盐水中的微粒化悬浮液,或者优选地配制成等渗的、pH调节过的无菌盐水中的溶液,任选地与防腐剂如苯扎氯铵组合。可替换地,本发明的组合物可以配制成软膏如凡士林。

[0114] 为了局部应用于皮肤,本发明的组合物可以配制成合适的软膏,其含有活性化合物,该活性化合物悬浮或溶解于例如有以下一种或多种物质的混合物中:矿物油、液体凡士林、白凡士林、丙二醇、聚氧乙烯聚氧丙烯化合物、乳化蜡和水。可替换地,本发明的组合物可以配制成合适的洗剂或乳膏,其悬浮或溶解于例如以下一种或多种物质的混合物中:矿物油、脱水山梨糖醇单硬脂酸酯、聚乙二醇、液体石蜡、聚山梨酸酯60、十六烷基酯蜡、鲸蜡硬脂醇、2-辛基十二烷醇、苯甲醇和水。

[0115] 如上所述的组合物可用于治疗若干真菌感染。但是,特别适合治疗指甲真菌感染、运动员脚病或其他类型的皮肤真菌感染/皮肤癣菌感染(例如腹股沟癣(股癣),身体癣(体癣),头皮癣(头癣),其他“癣”类感染)。本发明也适用于治疗酵母菌感染,例如但不限于间擦疹、花斑癣、鹅口疮(白色念珠菌)。真菌感染可以包括皮肤癣菌感染。然而,本发明也可以用于治疗或调节酵母菌感染和/或定殖。如上所述的组合物可以用于治疗或控制真菌感染。

治疗可以是局部治疗。

[0116] 此外,如上所述的组合物可用于治疗若干真菌疾病,例如治疗指甲真菌感染和运动员脚病。

[0117] 根据本发明的另一方面,提供了一种制备用于治疗指甲或皮肤真菌感染的组合物的方法,包括:以约1:2至约1:4的比例,将能够形成纳米颗粒的聚合物和特比萘芬或其盐或衍生物在适于允许形成纳米颗粒的条件下混合,并加入到高达约30% (v/v) 的醇中。

[0118] 优选地,该方法用于制备根据本发明的第一方面所述的组合物。

[0119] 可以使用各种方法来形成纳米颗粒,并且设想该纳米颗粒将形成聚合物和特比萘芬复合物。然而,聚合物纳米颗粒可以独立形成,然后与特比萘芬一起孵育或以任何顺序单独孵育。可以以保持抗真菌剂对真菌的疗效和纳米颗粒的穿透增强作用的方式将特比萘芬吸收或附着至纳米颗粒。

[0120] 本发明的另一方面中,提供了一种以下述物质的组合:

[0121] a) 能够与特比萘芬或其衍生物或盐形成纳米颗粒的聚合物;

[0122] b) 特比萘芬或其衍生物或盐;和

[0123] c) 醇;

[0124] 其中特比萘芬或其衍生物或盐提供为与聚合物的比例为约1:2至1:4;并且醇提供为量高达约30% (v/v)。

[0125] 优选地,该组合用于制备本文根据第一和第二方面所述的组合物或者本文根据其他方面所述的方法。

[0126] 可采用若干技术来进一步处理所述混合物以选择所需尺寸范围的纳米颗粒,例如离心、电泳、色谱或过滤方法。纳米颗粒的尺寸/直径的测量优选使用动态光散射分析进行。

[0127] 所述方法可以进一步包括将该组合物配制成局部用药物。

[0128] 同样显而易见的是,所述方法将用于制备本文上述的组合物。

[0129] 在本发明的又一个方面中,提供了一种本文上述的组合物和用于治疗指甲真菌感染的微针阵列的组合。所述微针阵列可结合至粘合贴片中。所述微针的长度可以小于2mm。更优选地,所述微针的长度小于1.5mm。最优选地,所述微针的长度小于1mm。优选地,将小于500 $\mu$ m的微针插入到皮肤中。更优选地,将小于400 $\mu$ m的微针插入到皮肤中。最优选地,将约300至200 $\mu$ m的微针插入到皮肤中。优选地,所述微针将所述组合物施用至真皮和/或表皮。

## 附图说明

[0130] 现在将参照下面的实验和附图,仅以举例的方式来描述本发明的实施例,其中:

[0131] 图1A是显示通过将0.1mg/ml特比萘芬混合于30%乙醇中且在室温下孵育至少24小时而形成的颗粒的尺寸分布的直方图。使用Malvern Instruments Nanosight LM10(粒径范围=50-800nm,颗粒数=0.5x10<sup>8</sup>个颗粒/ml)测量粒径分布;

[0132] 图1B是通过将0.1mg/ml特比萘芬混合于30%乙醇中且在室温下孵育至少24小时而形成的颗粒的视频帧图像。使用Malvern Instruments Nanosight LM10来显现颗粒;

[0133] 图2A是显示通过将0.1mg/ml特比萘芬和0.3mg/ml PHMB混合于30%乙醇中且在室温下孵育至少24小时而形成的颗粒的尺寸分布的直方图。使用Malvern Instruments Nanosight LM10(粒径范围=100-300nm,模式尺寸=195nm,颗粒数=12x10<sup>8</sup>个颗粒/ml)测



量粒径分布；

[0134] 图2B是通过将0.1mg/ml特比萘芬和0.3mg/ml PHMB混合于30%乙醇中且在室温下孵育至少24小时而形成的颗粒的视频帧图像。使用Malvern Instruments Nanosight LM10来显现颗粒；

[0135] 图3是显示Malvern Instruments Zetasizer上测量的由0.3mg/ml PHMB/0.1mg/ml特比萘芬纳米颗粒形成的纳米颗粒的强度的尺寸分布的图；

[0136] 图4A是显示每ml的特比萘芬和PHMB纳米颗粒的数量随时间变化的图，其中评估纳米颗粒的稳定性170天，和在环境温度和光照条件下，将0.1mg/ml特比萘芬的当量浓度的BB0305在30% (v/v) 乙醇中的溶液储存在透明塑料螺旋盖管中。在指定的天数，取出样品并分析纳米颗粒总数/ml；

[0137] 图4B是显示特比萘芬和PHMB纳米颗粒的模式粒径随时间变化的图，其中评估纳米颗粒的稳定性170天，和在环境温度和光照条件下，将0.1mg/ml特比萘芬的当量浓度的BB0305在30% (v/v) 乙醇中的溶液储存在透明塑料螺旋盖管中。在指定的天数，取出样品并分析纳米颗粒总数/ml；

[0138] 图5是显示用BB0305 (特比萘芬和PHMB纳米颗粒) 和单独用特比萘芬进行指甲浸泡实验的结果的图，其中将来自健康指甲剪切段的3mm人指甲盘悬浮于当量浓度的活性成分(0.1、1和10mg/ml) 下的BB0305和特比萘芬溶液中。将洗过并干燥的指甲溶解在5M NaOH中，通过定量LC-MS/MS测定特比萘芬的水平；

[0139] 图6A是来自健康人志愿者的指甲剪切段的冷冻切片组织学样品的照片，该指甲剪切段在32℃下在0.25mg/ml PHMB、0.05mg/ml FITC标记的PHMB (荧光标记PHMB有五分之一的尖峰) 和0.1mg/ml特比萘芬的溶液中浸泡24小时 (比例尺约为100μm)；

[0140] 图6B是来自健康人志愿者的指甲剪切段的冷冻切片组织学样品的照片，该指甲剪切段以与图6A类似的方式浸泡。展示出整个指甲部分 (左手边比例尺约为100μm) 和仅指甲的中心区域 (右手边比例尺约为20μm) 的两个图像。在指甲的边缘清楚地看到着色，该着色至少穿透到指甲结构本身内20μm；

[0141] 图7是显示特比萘芬穿透用BB0305 (特比萘芬和PHMB纳米颗粒) 或特比萘芬溶液处理的健康人指甲样品的散点图。特比萘芬的浓度通过LC-MS/MS在来自用BB0305或0.1mg/ml特比萘芬溶液处理的健康人指甲的乙醇洗液中测定。绘制单个样品。(菱形标志) 所有特比萘芬样品 (n=4) 均低于检测限 (<0.1ng/ml)。通过假设特比萘芬穿透用特比萘芬溶液处理的指甲的浓度为0.1ng/ml (LC-MS/MS检测限)，使用非配对参数学生T-检验比较两个样品组。该检验的p值为0.04；

[0142] 图8是显示与用BB0305 (特比萘芬和PHMB纳米颗粒) 或特比萘芬溶液处理的指甲结合的特比萘芬水平的散点图。特比萘芬的浓度通过LC-MS在来自用BB0305或0.1mg/ml特比萘芬溶液处理的健康人指甲的溶解指甲样品中测定。绘制单个样品。使用非配对参数学生T-检验比较两个样本组。该检验的p值为0.02；

[0143] 图9A是显示了来自多次剂量添加BB0305 (特比萘芬和PHMB纳米颗粒) 到人指甲的Franz细胞数据的总结的散点图，其中研究了来自用多次小剂量BB0305处理的健康人指甲的乙醇洗液中的特比萘芬浓度 (通过LC-MS/MS测定)；

[0144] 图9B是显示了来自多次剂量添加BB0305 (特比萘芬和PHMB纳米颗粒) 到人指甲的

Franz细胞数据的总结的散点图,其中研究了来自用多种小剂量BB0305处理的健康人指甲的溶解指甲样品中的特比萘芬浓度(通过LC-MS/MS测定);

[0145] 图10A-10E是在30℃下孵育4天后带有须癣毛癣菌(*Trichophyton mentagrophytes*)的酵母提取物蛋白胨右旋糖(YEPD)琼脂平板的照片图像。每个板都有10毫米的无菌纸盘置于须癣毛癣菌苔的中心。在每个纸盘上点上40μl的双蒸水或不同浓度的特比萘芬溶液。所用的特比萘芬溶液的浓度是:0μg/ml(对照,图7A)、0.06μg/ml(图7B)、0.6μg/ml(图7C)、6.00μg/ml(图7D)和60.0μg/ml。图8是带有被用于递送本发明组合物的微针贴片处理的指甲的手指平面图;

[0146] 图11A和11B是评估BB0305(特比萘芬和PHMB纳米颗粒)和特比萘芬样品对抗须癣毛癣菌穿过健康人指甲的疗效的YEPD板的照片图像,将须癣毛癣菌苔涂布在补充有50μg/ml氯霉素的YEPD琼脂平板上。在用0.1mg/ml特比萘芬(图11A)或BB0305(图11B)处理健康人指甲7天后,将Franz细胞收集室的含水样品点在10mm纸盘上。将盘置于毛癣菌板的中间,然后使其在30℃下孵育5天以使真菌生长。将来自BB0305处理的指甲的特比萘芬的抗真菌活性视为盘周围的空隙区域;

[0147] 图12是显示了来自用多次剂量BB0305(特比萘芬和PHMB纳米颗粒)处理的指甲的乙醇洗液中的特比萘芬浓度的散点图。该浓度为用多次小剂量的20%(v/v)乙醇(左手边)或30%(v/v)乙醇(右手边)中的BB0305处理的健康人指甲的乙醇洗液中的特比萘芬浓度(通过LC-MS/MS测定);

[0148] 图13是显示了来自用多次剂量BB0305(特比萘芬和PHMB纳米颗粒)处理的指甲的溶解的指甲中的特比萘芬浓度的散点图。该浓度为用多次小剂量的20%(v/v)乙醇(左手边)或30%(v/v)乙醇(右手边)的BB0305处理的健康人指甲的溶解指甲中的特比萘芬浓度(通过LC-MS/MS测定);

[0149] 图14是带有被用于递送本发明组合物的微针贴片处理的指甲的手指平面图;

[0150] 图15是图14所示的手指的横截面视图;以及

[0151] 图16是微针贴片的横截面视图。

## 具体实施方式

[0152] 以下实验的目的是研究使用具有阳离子聚合物聚六亚甲基双胍(PHMB)的基于纳米技术的递送系统是否可以增强抗真菌药(特别是用于治疗甲癣)的细胞递送。PHMB是一种廉价易得的消毒剂和抗菌剂,常用于敷料、游泳池和隐形眼镜溶液。据信其抗菌作用通过破坏生物体的细胞膜从而引起细胞内容物的泄漏而起作用。实验还评估了抗真菌剂的不同浓度和制剂对真菌种类的影响,从而能够确定合适的剂量水平和制剂。

### [0153] 特比萘芬和PHMB的纳米颗粒的形成

[0154] 首先进行实验以形成特比萘芬和PHMB的纳米颗粒。在整个实验中,将这些特比萘芬和PHMB的纳米颗粒表示为BB0305。

[0155] 首先通过特比萘芬·HCl与PHMB在30%(v/v)乙醇中的组合形成BB0305纳米颗粒,最终特比萘芬浓度相当于0.1mg/ml、1mg/ml或10mg/ml。在Nanosight LM10仪器(Malvern Instruments)上按常规确认纳米颗粒的形成。使用Zetasizer(Malvern Instruments)进行另外的纳米颗粒分析。通过将特比萘芬·HCl溶解在30%(v/v)乙醇中至最终浓度为0.1mg/

ml、1mg/ml或10mg/ml来制备对照特比萘芬溶液。

[0156] 30%乙醇中的特比萘芬与PHMB的初始制剂显示所形成的纳米颗粒的显著增加的数量,并导致形成比单独用特比萘芬在30%乙醇中形成的颗粒更多的单分散纳米颗粒。结果表明,PHMB可用于与抗真菌剂形成单分散纳米颗粒,单分散纳米颗粒可接着用于制备用于随后治疗一系列潜在的真菌感染的局部用药物。

#### [0157] 纳米颗粒的分析

[0158] BB0305的溶液显示出在室温下稳定超过5个月的纳米颗粒的清晰形成。

[0159] 初步分析使用Nanosight LM10 nanosizer (Malvern Instruments) 检测溶液中的纳米颗粒。在该分析中,特比萘芬溶液含有可检测的颗粒(如图1A所示)。然而,溶液的颗粒数量/ml相对较低(对于0.1mg/ml特比萘芬在30% (v/v) 乙醇中的溶液, $<0.5 \times 10^8$ /ml),粒径是非匀质的并且是多分散的。认为这些颗粒的存在至少部分是由于化合物的疏水性质,这意味着它没有完全溶解并因此在水溶液中含有一系列药物聚集体。

[0160] 相反,在0.1mg/ml特比萘芬的当量浓度的BB0305溶液中,观察到大量(通常为 $5-10 \times 10^8$ 纳米颗粒/ml)直径在170-210nm范围内(如图1B所示))的单分散颗粒。还制备了更高浓度的BB0305(分别为1和10mg/ml的特比萘芬的当量浓度)用于初始指甲浸泡实验(如下所述),但这些更高浓度的BB0305显示单分散性丧失,这被认为是由于更高的聚合物浓度允许形成较大的纳米颗粒聚集体(数据未显示)。

[0161] LM10通过用摄像机跟踪颗粒的显微镜直接观察颗粒,并使用将溶液中的颗粒速度与其直径相关联的爱因斯坦-斯托克斯(Einstein-Stokes)方程计算其尺寸。该视频采集还允许在分析期间对不同制剂进行定性评估。但是,该仪器具有约20nm直径的较低的界限范围用于分析。因此,还在Zetasizer (Malvern Instruments) 上分析了BB0305的纳米颗粒,Zetasizer使用动态光散射来计算粒径并且能够检测尺寸低至0.3nm的颗粒。该分析(如图3所示)鉴定了BB0305中直径在0.3-2nm范围内的第二群纳米颗粒,该第二群纳米颗粒无法被LM10检测到。

[0162] 最后,通过在170天的期间内测量溶液中的纳米颗粒来评估BB0305在30% (v/v) 乙醇中的溶液的长期稳定性(如图4A和4B所示)。使用Nanosight LM10进行分析,因此仅考虑较大直径的BB0305纳米颗粒群。该分析表明,尽管最初溶液中的颗粒数适度减少并且颗粒的模式尺寸有一些变化,但BB0305纳米颗粒在室温下在环境光条件下基本上稳定至少5个月。

#### [0163] 指甲浸泡实验

[0164] 将健康人指甲的样品在30℃下在ddH<sub>2</sub>O中预孵育2小时。然后使用3mm活检穿孔器从剪切段切下3mm盘。将指甲盘置于1.5ml管中的250μl测试溶液中,并在32℃下在0.5% (v/v) CO<sub>2</sub>的潮湿孵育箱中孵育24小时。取出指甲样品并在大量ddH<sub>2</sub>O中洗涤以除去指甲上的任何药物溶液。使用干净的纸巾擦干指甲,然后称重。将称重后的指甲在37℃下溶解于200μl的5M NaOH中1小时。溶解后,向样品中加入200μl甲醇以确保样品中的所有特比萘芬留在溶液中。使用定量LC-MS/MS质谱法分析溶解的指甲样品溶液中特比萘芬的量。

[0165] 定量质谱(MS)用于检测和定量样品中的特比萘芬。在提交分析之前,样品鉴定者是不知情的。分析使用液相色谱串联质谱检测法(LC-MS/MS),其使用Waters Acquity I-Class UPLC色谱系统与Waters Xevo TQ-S质谱仪结合。针对0.1-10ng/ml特比萘芬的标准

曲线上的药物标准对特比萘芬的水平进行定量。适当稀释样品以确保它们落在标准曲线内。低于0.1ng/ml特比萘芬的样品低于该分析的检测限。将指甲样品中特比萘芬的浓度标准化到指甲的总量,并表示为ng特比萘芬/mg指甲。

[0166] 最初的研究专注于使用简单的指甲“浸泡”实验,其中在不同的制剂和测试溶液中孵育3mm的人指甲盘。这些实验只能检测特比萘芬是否与指甲结合,并没有给出指甲穿透的直接证据。然而,它们在技术上操作简单,相对高通量并且能够评估一系列不同的制剂。

[0167] 如图5所示,特比萘芬的简单溶液中的特比萘芬与人指甲样品结合。与指甲结合的特比萘芬的量在0.1mg与1mg/ml之间是浓度相关的,但在10mg/ml的较高浓度下未显示任何进一步的增强。这表明,1mg/ml以上时,则指甲盘已达到可与之结合的特比萘芬量的上限。

[0168] 图5还说明了BB0305与人指甲样品结合。在0.1mg/ml特比萘芬的当量浓度下,观察到BB0305与特比萘芬溶液之间没有显著差异,并且两者都在溶解的指甲样品中产生了相等浓度的药物。如已对特比萘芬所观察到的,在特比萘芬浓度相当于0.1和1mg/ml的BB0305之间的药物结合也增加,但在10mg/ml时没有进一步增加。这再次表明,1mg/ml以上时,则BB0305已达到可在24小时内浸入指甲盘中的药物量的极限。然而,与用特比萘芬处理的指甲相比,能够与用BB0305处理的指甲结合的最大药物量要高得多(1.3-2.5倍)。这种增加并不是由于可进入的指甲表面或整个指甲材料的差异,因为所有测试均在具有基本相同的表面积并且样品之间的重量仅变化<10%的3mm指甲盘上进行的。因此,这些实验表明BB0305增加了可与人指甲结合的特比萘芬的最大量,这表明该制剂增强了药物向组织中的递送。

[0169] 尽管指甲浸泡实验表明BB0305增强了药物向指甲的递送,但它们不能区分渗透到指甲中而增加的药物和与指甲结合而增加的药物。因此决定将0.1mg/ml BB0305制剂推进到组织学研究中,以尝试获得纳米颗粒渗透到组织中的直接证据。选择该浓度是因为它产生了最稳固和一致的纳米颗粒制剂,并且如前所讨论的,更高浓度的BB0305在形成纳米颗粒时是更加多变的。

#### [0170] 组织学研究

[0171] 以0.1mg/ml特比萘芬的当量浓度制备BB0305的制剂,其包括1% (w/w) “尖峰(spike)”的FITC共轭的Nanocin<sup>TM</sup>(基于纳米颗粒的递送平台,由PHMB组成,由Tecrea Ltd, The London Bioscience Innovation Center, 2 Royal College Street, London, NW1 0NH, UK销售)。标记的BB0305用于如上所述的指甲浸泡实验。然后将洗过和干燥的指甲送去进行组织学分析。在指甲的冷冻切片上进行组织学和荧光显微镜检查。

[0172] 将FITC标记的BB0305的组织学研究的示例图像显示在图6A和6B中。在指甲边缘周围观察到强荧光,这与结合到指甲表面的BB0305一致。此外,我们还观察到从表面渗透到指甲中的染色。染色水平不同,但我们能够检测到指甲结构本身深处的荧光(特别如图6A所示)。

[0173] 尽管该数据高度暗示了BB0305纳米颗粒渗透到人指甲中,但需要消除一种可能性,即观察到的染色仅是由于游离FITC-Nanocin<sup>TM</sup>而引起的。因此决定从这些组织学实验发展到使用Franz细胞并直接测量穿过人类指甲样品的药物。

#### [0174] Franz细胞指甲穿透研究

[0175] 将指甲剪切段在30℃水中浸泡过夜并简单干燥。使用直径3mm的穿孔器取出指甲剪切段进行盘活组织检查(disc biopsies)。将每个指甲盘添加到Franz细胞和细胞黏着的

上室。向上室中添加40 $\mu$ l的以下制剂:0.3mg/ml PHMB+0.1mg/ml特比萘芬;或10mg/ml特比萘芬。Franz细胞的下收集室充满水(约600 $\mu$ l),样品室底部的孔也充满ddH<sub>2</sub>O,以防止在指甲下形成气泡。将上样品室小心地放入收集室中,并确保不引入任何气泡。此时,从收集室排出过量液体,在下室中留下最终体积为500 $\mu$ l的液体。Parafilm®用于包裹上室和下室之间的连接处,以防止液体蒸发。

[0176] 对于单次剂量(连续暴露)实验,使用精细移液管尖端将40 $\mu$ l相关测试样品(BB0305或特比萘芬对照)添加到上样品室中,确保不在指甲/液体界面处引入任何气泡。密封上室以限制蒸发。对于多次剂量实验,使用精细移液管尖端每天将5 $\mu$ l样品加入上样品室并直接加到指甲上,持续7天,确保在指甲/液体界面处没有引入气泡。将室保持敞开以使样品蒸发。在32℃下在0.5% (v/v) CO<sub>2</sub>的潮湿孵育箱中孵育Franz细胞。

[0177] 在孵育Franz细胞后,小心地取出样品室和套环组件,并且从下收集室和套环底部的孔中取出所有液体。将样品室和套环组件倒置,然后用5 $\times$ 20 $\mu$ l乙醇轻轻洗涤指甲的下侧,以除去与指甲下侧结合的任何药物。保留合并的乙醇洗液用于分析(总体积100 $\mu$ l)。该洗液旨在捕获可能已经穿过指甲的所有特比萘芬。在下收集室或指甲下侧的乙醇洗液中发现的特比萘芬代表已穿过指甲的药物。

[0178] 还分析了如下来自Franz细胞的指甲盘中特比萘芬的存在:将剩余的测试样品从上样品室中取出并丢弃,用100 $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O洗涤样品室5次,丢弃每次使用的洗液,以去除留在样品室中的所有残留测试溶液。然后拆开样品室和套环并取出指甲样品。通过浸入大量ddH<sub>2</sub>O中洗涤指甲,使用干净的纸巾擦干并称重。然后将称重后的指甲在37℃下溶于200 $\mu$ l的5M NaOH中1小时。溶解后,向样品中加入200 $\mu$ l甲醇以确保样品中的所有特比萘芬留在溶液中。

[0179] 图7-9B总结了来自穿过人指甲样品的药物的Franz细胞分析的数据。仅提供了来自溶解的指甲样品和指甲下侧的乙醇洗液的数据,因为这些观察结果被证明是样品之间最稳固的。然而,在用BB0305处理的指甲的下室中总能检测到特比萘芬,有时达到非常高的水平(>0.6 $\mu$ g/ml)。据信该分析代表了在经BB0305处理的样品中穿过指甲的特比萘芬的量的保守观点。

#### [0180] 单次剂量(恒定暴露)实验

[0181] 将40 $\mu$ l的BB0305(相当于0.1mg/ml特比萘芬)或特比萘芬(0.1mg/ml)在30% (v/v)乙醇中的溶液加入含有健康人指甲样品的Franz细胞样品室中。然后将细胞在32℃下孵育7天。在每次实验的持续时间内,样品保持与上指甲表面接触。7天后,收集来自指甲下侧的样品(乙醇洗液),并通过LC-MS/MS分析。如前所述,洗涤并使用5M NaOH溶解第7天的指甲样品。使用液相色谱串联质谱检测法(LC-MS/MS)分析所有收集的样品的特比萘芬的存在,液相色谱串联质谱检测法使用与Waters Xevo TQ-S质谱仪结合的Waters Acquity I-Class UPLC色谱系统。针对药物标准对特比萘芬的水平进行定量。这些分析中的检测限为0.1ng/ml。

[0182] 如图7和图8所示,用BB0305处理的样品始终证明特比萘芬穿过了健康人指甲样品。早在孵育1天时,就可以在收集室溶液和指甲下侧的乙醇洗液中检测到特比萘芬。来自用BB0305处理7天的指甲下侧的乙醇洗液的分析证明了药物通过BB0305穿过指甲的稳固递送(如图7所示)。样品之间的递送量不同,可能是由于指甲样品的自然变化,但预测所有情

况下都会大于实现真菌杀灭剂量所需的量。

[0183] 相反,特比萘芬溶液没有穿透指甲,并且在使用与BB0305相当的药物浓度(0.1mg/ml)的所有实验中,穿过指甲的特比萘芬的量低于LC-MS/MS中检测限(<0.1ng/ml)(如图7所示)。通过假设特比萘芬已经穿透了0.1ng/ml的浓度,可以对数据进行统计测试以证明BB0305结果与简单的特比萘芬溶液的结果显著不同。在该分析中计算的p值0.04低估了显著性,因为经简单特比萘芬处理的样品中特比萘芬的最高的可能浓度是假设的。

[0184] 来自Franz细胞的溶解的指甲样品中的特比萘芬的量也在第7天测定(如图8所示)。这表示结合到指甲顶面的药物(在用5M NaOH溶解之前没有被洗掉)和在指甲本身内的所有药物一起的量,即穿透指甲但未到达另一侧的药物。与我们的指甲浸泡实验类似(图5),与单独用特比萘芬相比,我们发现与用BB0305处理的指甲结合的特比萘芬的量显著更高(约2倍的中值差异, $p=0.02$ )。这再次与BB0305增强特比萘芬递送进(和穿过)指甲的观念一致。

#### [0185] 多次剂量实验

[0186] 在单次剂量实验中,在整个孵育期间,测试溶液与指甲的上表面始终保持接触。这不一定反映将药物每天应用于受感染的指甲然后使其干燥的患者应用的实际情况。因此,为了尝试和复制这种情况,进行每天向Franz细胞中的指甲添加5 $\mu$ l BB0305的实验。这个小体积足以覆盖指甲盘表面但在下一次添加之前蒸发,更接近地模仿了应用BB0305作为每天局部治疗的患者。如前所述,收集来自指甲下侧的乙醇洗液的样品和指甲本身的样品,并通过如前所述的LC-MS/MS分析特比萘芬的存在。

[0187] 在多次剂量实验中,检测到大量与指甲本身结合的特比萘芬(如图9A和9B所示)。这与用BB0305的单次剂量(恒定暴露)实验中观察到的水平(如图8所示)并没有太大差异,并且再次高于单次剂量实验的特比萘芬对照。还在指甲下侧的乙醇洗液中检测到大量特比萘芬,表明该实验中药物也已穿过指甲。与单次剂量(恒定暴露)实验相比,在多次剂量实验中递送穿过指甲的药物水平低得多。这与用BB0305处理越长时间,递送穿过指甲的特比萘芬越多的观念一致。

#### [0188] 须癣毛癣菌抗真菌试验

[0189] 早期的实验已经清楚地表明BB0305递送特比萘芬穿过指甲,但必须确定药物穿过指甲不会引起导致疗效丧失的化学修饰。因此,使用须癣毛癣菌苔进行抗真菌试验。

[0190] 须癣毛癣菌是与甲癣相关的主要病原体有关的实验室真菌物种(参见例如Wade Foster et al, J.American Acad.Dermatology.2004.50 (5) .pp748-752),因此针对该物种的疗效将被预期转化为针对致病性毛癣菌物种(如红色毛癣菌T.rubum)的疗效(下表1)。

[0191]

真菌	测试的菌株的编号	MIC 范围 ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )
絮状表皮癣菌	42	0.0001-0.047
小孢子菌物种	25	0.002-0.07
犬小孢子菌	49	0.006-0.08
毛癣菌物种	27	$\leq 0.06$
红色毛癣菌	72	0.001-0.038
疣状癣菌	17	0.001-0.006
须癣毛癣菌	32	0.001-0.006
指间毛癣菌	11	0.002-0.028
土生毛癣菌	1	0.002

[0192] 表1:特比萘芬的体外活性(取自Leyden, J. Am. Acad. Dermatol. 1998. 38: S42-7)。

[0193] 从原料(stock)板中挑取单个菌落的须癣毛癣菌,并在30℃的5ml YEPD(酵母提取物、蛋白胨、右旋糖)培养基中生长48小时。将无菌拭子浸入所得培养物中,然后用于将须癣毛癣菌苔涂布到补充有氯霉素(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )的YEPD琼脂平板上。包括氯霉素是因为来自Franz细胞的样品并不是无菌的并且显示在常规YEPD平板上的细菌生长。将10mm无菌纸盘浸泡在测试溶液中,除去过量的液体并将盘置于须癣毛癣菌苔上。将板倒置并在30℃下孵育5天。

[0194] 进行的第一个实验是在纸盘试验中确定特比萘芬对须癣毛癣菌的近似MIC(最小抑制剂浓度)。为此,形成从60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至0.06 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的特比萘芬.HCl在ddH<sub>2</sub>O中的1:10稀释系列。然后将10mm无菌纸盘浸泡在各种稀释液中,并将它们置于须癣毛癣菌苔上。孵育5天后,在特比萘芬的浓度对该物种具有抗真菌活性(如图10所示)的盘周围观察到空隙区域。该试验中特比萘芬的MIC为0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,低于该浓度则未观察到清晰空隙区域。注意到,对于针对须癣毛癣菌的特比萘芬,该试验中的MIC比先前报道的(6ng/ml)高超过100倍(参见上表1)。该报道的数据肯定来自已知更敏感的液体MIC试验,因此该纸盘试验代表了实质更严格的药物疗效的测试。

[0195] 该试验还用于解决在经BB0305处理的样品中穿过指甲的特比萘芬是否仍然保持其抗真菌疗效的问题。为此,使用来自Franz细胞实验之一的水相样品进行须癣毛癣菌苔试验,定量LC-MS/MS分析证明其含有>0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 特比萘芬(图11A-11B)。对于该样品,与MIC实验和的定量MS结果一致,用BB0305的可以看到的清晰空隙区域,但用特比萘芬对照样品的则没有影响。因此,穿过用BB0305处理的健康人指甲的特比萘芬保持其疗效并且仍然能够杀灭须癣毛癣菌。

[0196] BB0305在甲癣中的潜在疗效

[0197] 用BB0305的目的是与口服特比萘芬的性能相匹配,局部用药物制剂将不具有与全身性药物暴露相关的安全性问题。与特比萘芬溶液相比,BB0305显示出显著增强的药物穿过健康人指甲的递送。关键问题是通过BB0305给药所实现的量是否被预计为在治疗甲癣时是有效的。为了解决这个问题,将Franz细胞实验中观察到的特比萘芬浓度与所报道的口服特比萘芬治疗的患者的指甲中的特比萘芬浓度进行了比较(Leyden, J. Am. Acad. Dermatol. 1998. 38: S42-7)。

[0198] 口服给药后,在治疗7天后,特比萘芬在指甲中达到 $0.1\mu\text{g/g}$ 的浓度,3周后升至约 $0.25\mu\text{g/g}$ ,18个月后升至 $0.55\mu\text{g/g}$  (Leyden,1998)。所有这些水平都高于与甲癣相关的一系列关键真菌物种的MICs (表1),因此解释了在治疗这些患者的指甲真菌感染中的药效。

[0199] 在溶解的指甲中,BB0305似乎大大超过该水平 (图8和图9A-9B),在7天后达到相当于约 $1\text{mg/g}$ 的指甲中药物的中值浓度 (比口服给药高10000倍)。然而,虽然较低,但单独的特比萘芬也显示出与溶解的指甲结合的药物显著水平 (约 $0.5\text{mg/g}$ 的中值浓度),但使用局部用特比萘芬 (比在这些实验中使用的剂量高得多) 的试验未能显示在治疗甲癣中的疗效 (Elewski et al., Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology. 2013, 27 (3), pp287-294)。

[0200] 尽管发现大量药物与用特比萘芬溶液处理的指甲结合,但在我们的任何样品中都没有测量到大量的特比萘芬穿过指甲 (图7)。因此,对于这些样品,我们推断绝大多数药物与指甲的上表面结合或没有穿透到组织深处。

[0201] 与特比萘芬处理的样品相比,在用BB0305处理的指甲的下侧不断检测到特比萘芬,表明药物必定已经进入并穿过指甲。因此,从来自用BB0305处理的样品的溶解的指甲中的特比萘芬的测量不仅表示与上表面相关的药物,而且表示在整个组织深处存在的药物。

[0202] 很可能在BB0305处理的指甲中,建立了药物的不对称分布,在上部 (处理过的) 表面具有较大浓度并且在指甲底部发现最低浓度的药物。因此,指甲下部的特比萘芬浓度是估计的,因为这是我们样品中最低的药物浓度。为此,假设在指甲下侧 (乙醇洗液) 发现的药物水平与指甲盘中指甲正上方的浓度相当。尽管在Franz细胞实验中使用直径3mm的指甲盘,但只有直径1.5mm的指甲环与上室和下室中的溶液接触 (指甲的其余部分与室本身形成密封)。这意味着指甲底部的乙醇洗液中的特比萘芬来自表面积为约 $1.8\text{mm}^2$ 的指甲。为了计算指甲下部中的近似浓度,假设指甲的该部分具有0.1mm的深度。总的来说,指甲厚约0.5mm,所以该指甲下部代表整个指甲盘的约五分之一。因此,指甲盘下部的体积为 $0.18\text{mm}^3$ ,相当于 $0.18\mu\text{l}$ 。为了计算指甲下部中特比萘芬的浓度,假设该体积的指甲含有与在乙醇洗液中发现的特比萘芬相当的量的特比萘芬。

[0203] 在多次剂量实验中,在指甲下侧发现的特比萘芬的中值浓度为 $0.4\text{ng/ml}$  (图9A-9B),其相当于样品中 $0.04\text{ng}$ 的总的特比萘芬。据此,因此估计指甲最下部中的特比萘芬浓度为 $220\text{ng/ml}$  ( $0.04\text{ng}/0.18\mu\text{l}$ )。最后,健康人指甲的密度为 $1.34\text{g/ml}$  (Baraldi et al. 2015, Pharm. Res. 32 (5), 1626-33),所以指甲最下部中的特比萘芬的浓度约相当于 $0.165\mu\text{g/g}$  ( $0.22\mu\text{g/ml}/1.34\text{g/ml}$ )。

[0204] 从该计算可以看出,多次剂量实验中BB0305递送了一定量的特比萘芬到指甲的最下部,该量大于通过7天口服给药后达到的特比萘芬浓度 ( $0.165\mu\text{g/g}$ 与 $0.1\mu\text{g/g}$ 相比)。该药物水平比杀灭与甲癣相关的最低敏感性真菌物种所需的药物水平高2-3倍 ( $>0.06\mu\text{g/ml}$ , 参见表1)。对于更接近治疗表面的指甲部分,我们预期浓度会高得多。这些数据基于多次剂量实验中最保守的数据。对于单次剂量实验,在乙醇洗液中发现的特比萘芬的中值浓度为 $185\text{ng/ml}$  (图7),并且等效预测的指甲下部中的药物浓度为 $8\mu\text{g/ml}$ ,远远超过口服给药所达到的浓度以及用于抗真菌疗效所需的浓度。

[0205] 总之,与简单的特比萘芬溶液相比,7天局部应用BB0305促进特比萘芬与健康人指甲的更多结合。此外,BB0305使特比萘芬能够一直穿透指甲,这表明药物指甲水平的这种增



加至少部分是由于药物穿透组织的增强。甚至预测距离BB0305应用最远端的指甲的部分达到了一药物浓度,该药物浓度超过通过等效口服给药产生的药物浓度。该水平高于相关真菌物种的MICs,因此可能在治疗甲癣中是有效的。

[0206] 口服特比萘芬目前是治疗甲癣的“黄金标准”,并且具有最高的治愈率以及最短的治疗时间(给药后3-6个月治愈>80%)。然而,其在疾病治疗中的用途受到其安全性以及特比萘芬具有显著的药物-药物相互作用的事实的限制。大量的这些问题几乎确定是由于口服给药(例如肝脏毒理学、CNS作用)和随后的高全身性药物暴露而引起的。其他局部甲癣治疗需要长期的治疗方案(长达18个月的治疗),治愈率低(20-40%)并且疾病复发率高(>50%) (Halmy, K. J. Am. Acad. Dermatol, 2005. 52 (3) :126-126, Scher et al. J Am Ac Dermatol. 2007; 56 (6) :939-944)。制备特比萘芬的有效局部用制剂是对治疗甲癣极具吸引力的方法,因为它使用具有被最佳证实的临床疗效的药物并消除了与全身性暴露相关的安全性问题。实现这一目标已被证实是具有挑战性的,并且许多先前使用局部用特比萘芬溶液的试验未能证明在甲癣治疗中具有任何显著疗效。

[0207] 如上所述,局部应用的BB0305中存在的特比萘芬的量远低于目前口服剂量所需的量。目前的全身性治疗通常采用在7天内每天口服250mg剂量的特比萘芬。在每天局部应用少量BB0305至指甲样品7天后(模仿每天的患者应用),实现了比所报道的口服剂量中更高水平的指甲中的特比萘芬。在指甲中发现的药物水平远远高于针对与甲癣相关的所有相关真菌物种显示疗效所需的水平(表1)。为了给出背景知识,从这些实验中,治疗普通指甲(100mm<sup>2</sup>)所需的BB0305剂量为一周约200μg,而口服治疗的特比萘芬为1.75g,即剂量低8750倍。

[0208] 最后,健康的人指甲是药物穿透的更严格的测试。Baraldi等人最近的一篇出版物(Baraldi et al. 2015)证明,尽管在患甲癣时的指甲较厚,但它们的完整性显著缺失,这意味着它们对于水溶液的透过性增强(强3-4倍)。因此,我们可以认为BB0305在患病组织中显示出更好的药物穿透性质。

#### [0209] BB0305在20% (v/v) 乙醇与30% (v/v) 乙醇中的比较

[0210] 采用BB0305的所有上述实验均在30% (v/v) 乙醇的溶液中进行。初始制剂研究表明,30% (v/v) 乙醇产生最高数量的BB0305纳米颗粒,而在10% (v/v) 乙醇或更低的溶液中的实验显示颗粒数量显著下降。尽管30% (v/v) 乙醇是用于治疗局部真菌感染的可接受的溶液,但评估不同% (v/v) 乙醇以观察较低的乙醇含量是否仍将保持疗效。因此决定考虑BB0305在20% (v/v) 乙醇中的制剂。

[0211] 如上所述制备BB0305的制剂,但使用20% (v/v) 乙醇代替30% (v/v) 乙醇。NanoSight LM10的分析显示,与30% (v/v) 乙醇的情况相比,20% (v/v) 制剂中的BB0305的颗粒数或颗粒分布没有检测到差异。因此,用20% (v/v) 乙醇中的BB0305制剂进行若干多次剂量Franz细胞实验,因为它们最好地模拟了患者使用的每天局部给药的类型,因此在模仿治疗甲癣的药物疗效方面最有意义。

[0212] 如正文中的描述,通过LC-MS/Ms分析在每天添加5μl的20% (v/v) 乙醇中的BB0305(持续一星期)进行处理的指甲下侧的乙醇洗液中发现的特比萘芬的量(如图12所示)。这些证明了穿过指甲的特比萘芬的一致水平,洗液中平均值为0.5ng/ml。该数据显示特比萘芬穿过用20% (v/v) 乙醇中的BB0305处理的指甲的量略高,表明20% (v/v) 中的BB0305在递送

药物穿过指甲上更有效。与此一致的,用20% (v/v) 乙醇中的BB0305处理的溶解的指甲中的特比萘芬的量比用30% (v/v) 乙醇中的BB0305处理的那些高3倍(如图13所示)。

[0213] 综合起来,这些结果表明,在Franz细胞多次剂量(每天添加)实验中,使用20% (v/v) 乙醇中的BB0305的制剂进一步增强了特比萘芬进入并穿过人指甲中的递送。发现与指甲结合的药物量显著更高,并且穿过指甲的特比萘芬的量也更高。计算表明,用这种BB0305制剂处理的指甲下部的药物中值数量为0.21 $\mu$ g/g,这是在口服给药7天后在指甲中获得的中值数量的两倍,远高于杀灭甲癣中相关真菌物种所需的量。该结果与Baraldi等人的观察结果一致(Baraldi et al.2015),与50% (v/v) 乙醇溶液中的化合物相比,水溶液中的化合物进入健康和患病指甲的穿透性水平更高。

[0214] 总之,将BB0305溶液中的乙醇浓度从30%降低至20% (v/v) 对纳米颗粒的形成没有可检测的影响,但有趣的是,在模仿治疗甲癣中药物的每天应用的Franz细胞实验中,20% (v/v) 乙醇中的BB0305的制剂显示出特比萘芬进入和通过健康的人指甲的改善的递送性能。

[0215] 甲癣药物的制剂

[0216] 设想根据上述实验,以下制剂作为甲癣的局部用药物是有效的:

[0217]

成分	量
特比萘芬.HCl	100 $\mu$ g/ml
PHMB	300 $\mu$ g/ml
乙醇	20% (v/v)
蒸馏水	$\geq$ 80% (v/v)

[0218] 式A:

[0219] 其他制剂也可提供有效的局部用药物:

[0220]

成分	量
特比萘芬.HCl	100 $\mu$ g/ml
PHMB	300 $\mu$ g/ml
乙醇	30% (v/v)
蒸馏水	$\geq$ 70% (v/v)

[0221] 式B:

[0222]

成分	量
特比萘芬.HCl	50 $\mu$ g/ml
PHMB	150 $\mu$ g/ml
乙醇	20% (v/v)
蒸馏水	$\geq$ 80% (v/v)

[0223] 式C:

[0224]

成分	量
----	---

特比萘芬.HCl	200μg/ml
PHMB	600μg/ml
乙醇	20% (v/v)
蒸馏水	≥80% (v/v)

[0225] 式D:

[0226]

成分	量
特比萘芬.HCl	150μg/ml
PHMB	450μg/ml
乙醇	30% (v/v)
蒸馏水	≥70% (v/v)

[0227] 式E:

[0228] 对于技术人员来说显而易见的是,通常使用的药物组分可以与上述式A至E结合使用,包括:缓冲剂、赋形剂、粘合剂、油、水、乳化剂、甘油、抗氧化剂、防腐剂和香料、和尿素。这些组分可以部分用于替代水含量并使药物能够配制成合适的局部用的形式,例如乳膏、软膏或喷雾剂。

[0229] 根据以下式F制备根据本发明的制剂并表示为BB2603。

[0230]

成分	量(%w/w)
特比萘芬.HCl	0.1
PHMB	0.3
乙醇	20
蒸馏水	79.6

[0231] 式F:

[0232] 将式F的制剂置于喷雾瓶中。然后通过1-2周的期间内定期喷洒制剂到患有甲癣(以及在一些情况下还有脚癣)的患者的脚趾上进行试验。治疗证明是成功的,成功并快速治疗患有甲癣(和脚癣)的患者,而随后不会复发。

[0233] 微针贴片

[0234] 经皮贴片长期以来用于小分子亲脂性药物的给药,其可以通过皮肤轻易地吸收。这种非侵入性递送途径对于与口服递送不相容的许多药物的给药是有利的,因为其允许将药物直接吸收到全身循环中,绕过显著降低许多药物的生物利用度的消化道和肝门系统。经皮递送还通过大大减少患者的不适、针头焦虑、对管理者的意外针刺伤害的风险和围绕锐器处理的问题,克服了许多与皮下注射相关的挑战。

[0235] 尽管有这些许多优点,药物的经皮递送限于与通过皮肤吸收相容的分子种类。小分子盐和治疗性蛋白质的递送通常不能通过传统的经皮递送来实现,因为即使在增强吸收的赋形剂的存在下,皮肤也对这些分子提供了有效的保护屏障。然而,可以使用微针技术将含有抗真菌剂的纳米颗粒直接递送至表皮、真皮和指甲基质(指甲和皮肤在指甲上皮处汇合)。通过以这种方式递送本发明的组合物,纳米颗粒将进入指甲基质和毛细管系统,并将抗真菌纳米颗粒组合物递送至甲床,在硬甲板下,并进入真菌中。通过这种方式,有效的抗

真菌剂可以直接递送至作用部位,从而减少治疗时间并提高效力。

[0236] 图14和图15显示了手指10的图,可以在虚线所示的治疗区域12内将微针贴片(图16所示)应用到手指上。治疗区域12由在指甲14后面和在指甲和皮肤汇合的指甲基质(指甲上皮)16处的真皮形成。甲根18位于指甲后面真皮下的区域,因此可以通过施加用于递送本发明组合物的微针贴片来有效地治疗。当然,除了手指甲之外,微针贴片还可用于脚指甲。

[0237] 图16显示了微针贴片的图,该微针贴片可用于将本发明的组合物应用至患有指甲真菌感染的个体。微针贴片20由柔性材料网22形成,该柔性材料网22具有施加到其下侧的粘合剂24。位于柔性网下侧的中心的是一系列向下延伸的具有多个点30的微针26。该点可以形成具有导管的针,所述导管连接到含有组合物的储存器28,或者简单地将其点涂覆在组合物中。在一个可替换的配置中,储存器28可以通过设置在微针阵列周围的孔排出组合物,使得组合物可以在预定的时间范围内连续涂覆阵列的点。对于技术人员显而易见的是,目前有若干不同的微针贴片可供使用,并且本发明的组合物可适用于一系列这些贴片。

[0238] 将微针(长度可以小于2mm,优选大约250 $\mu$ m)插入到皮肤中,使患者的不适感最低,并且产生小孔,使注射后感染、出血或用于皮内施用的无意静脉注射的风险最小。此外,微针可以降低注射管理者的风险,因为这些小的突出物几乎不可能意外刺破皮肤。

[0239] 可以设想的是,微针贴片可以用于单次治疗,其中患者必须做的是将贴片从包裹材料上取下并将其施加至手指或脚趾的适当部分保持给定的时间段。可替换地,可以将微针贴片与组合物一起销售,患者将一定量的组合物涂覆到微针的表面上,并以规定的方式将贴片施加至身体上。贴片可以在其外部带有标记,以帮助患者或医生将微针正确地排列在待治疗的手指或脚趾上的正确位置。

[0240] 前面的实施例并不非旨在限制权利要求赋予的保护范围,而是描述如何将本发明付诸实践的例子。

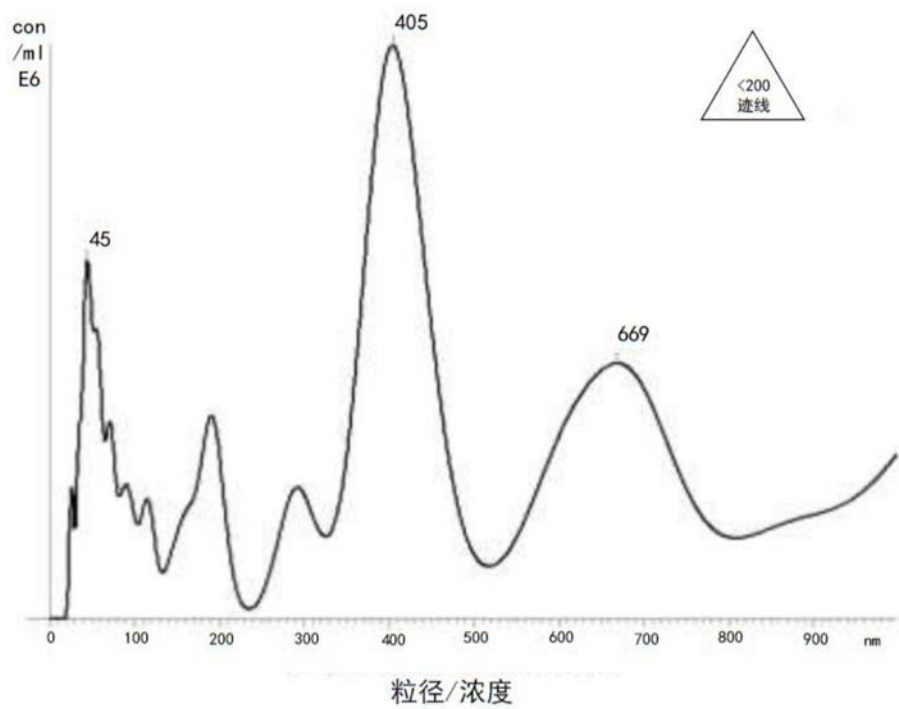
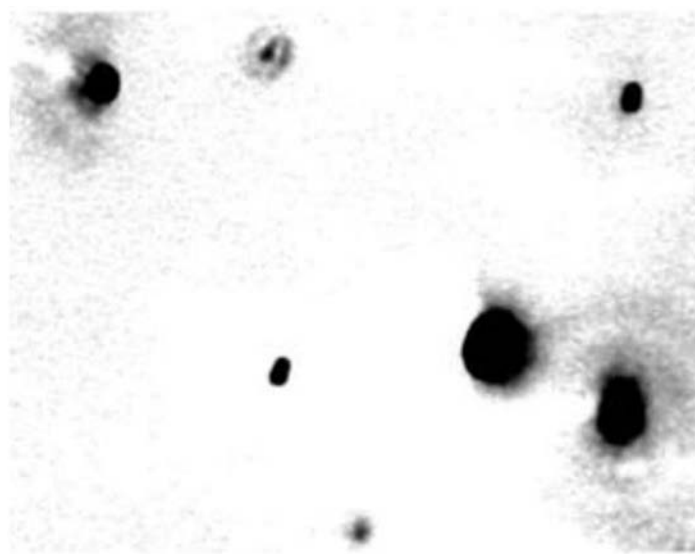


图1A



样品视频帧

图1B

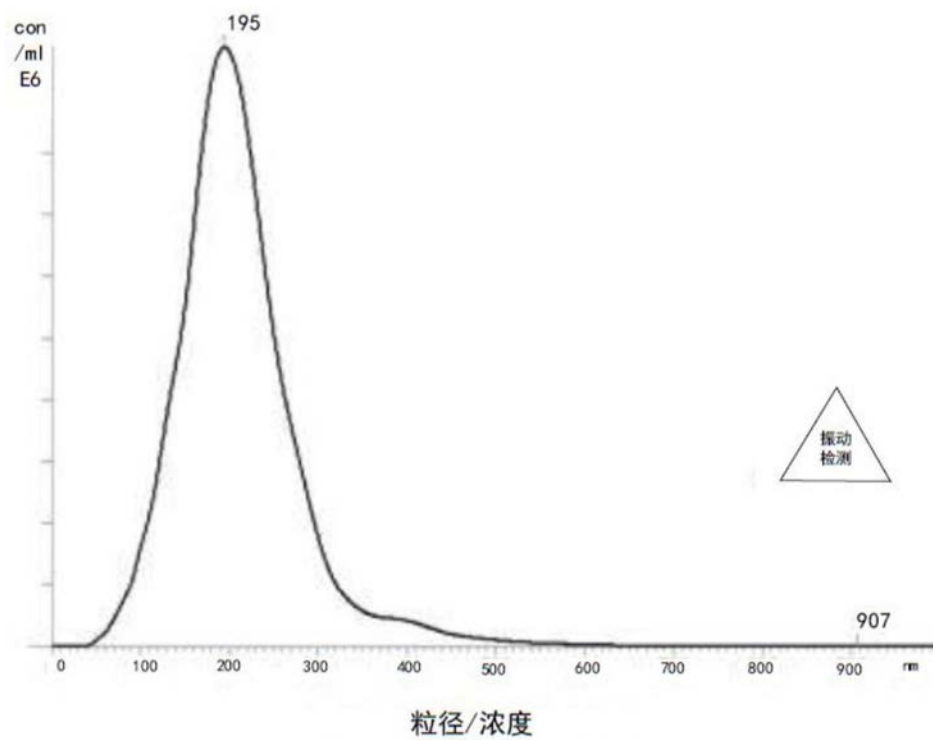
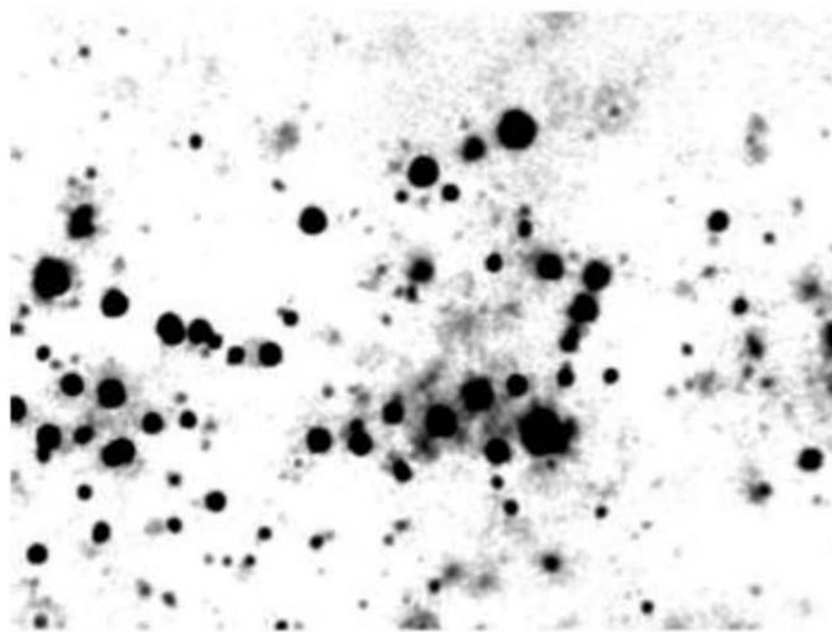


图2A



样品视频帧

图2B

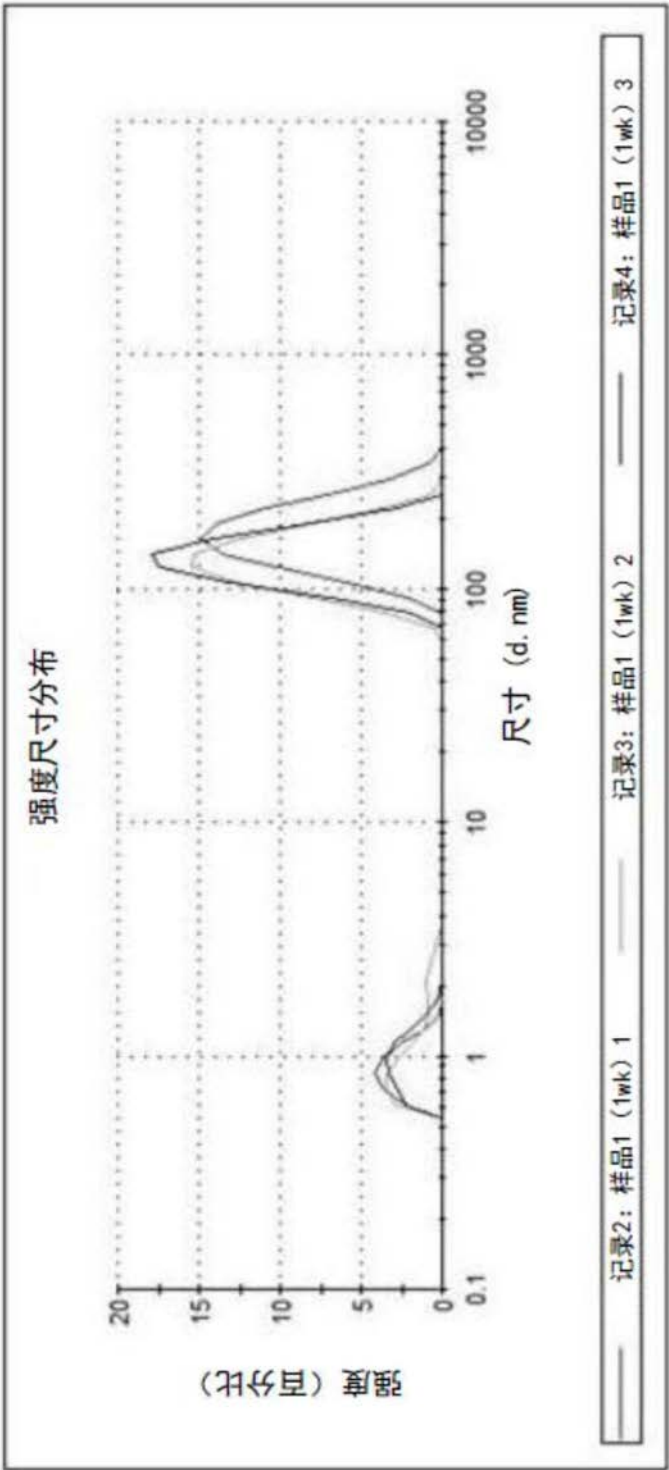


图3

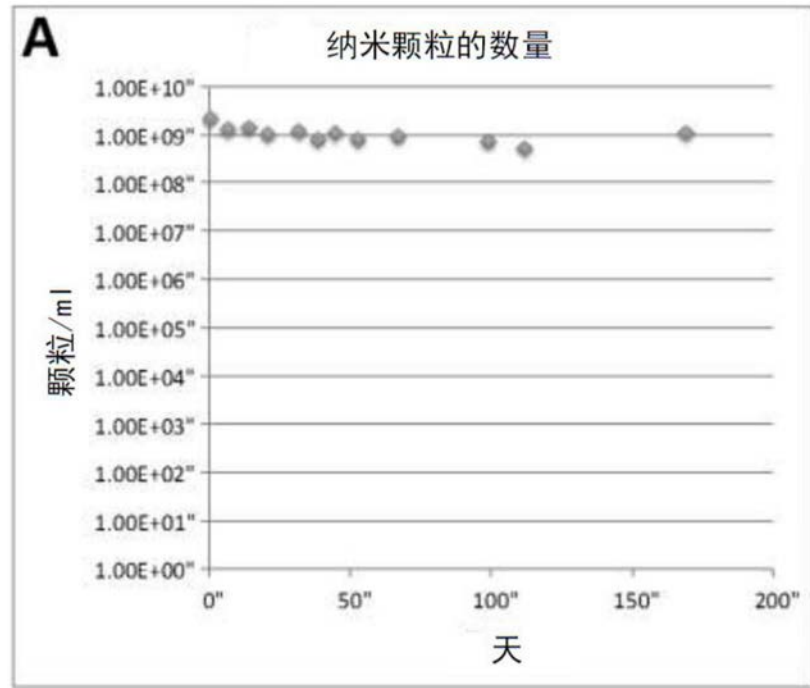


图4A

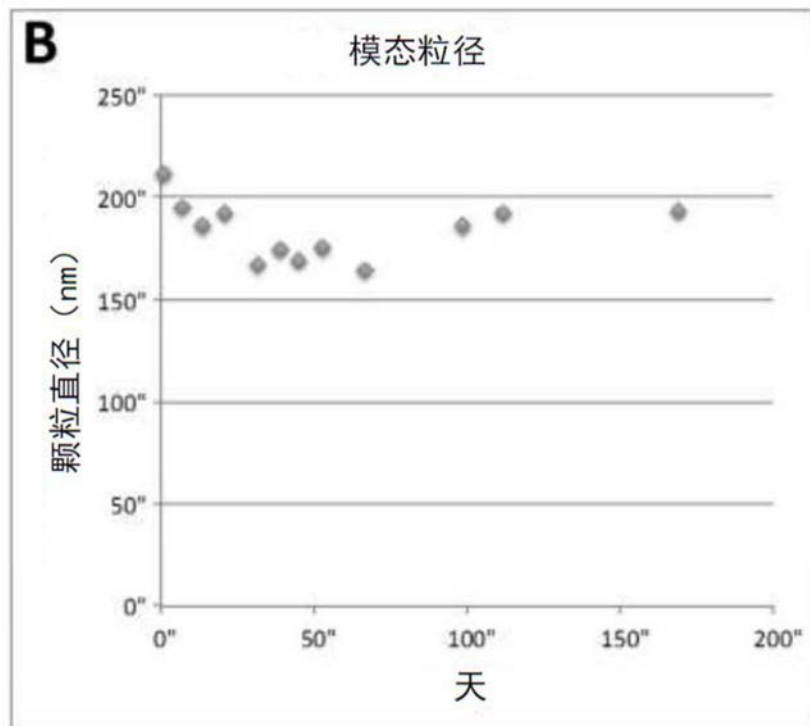


图4B



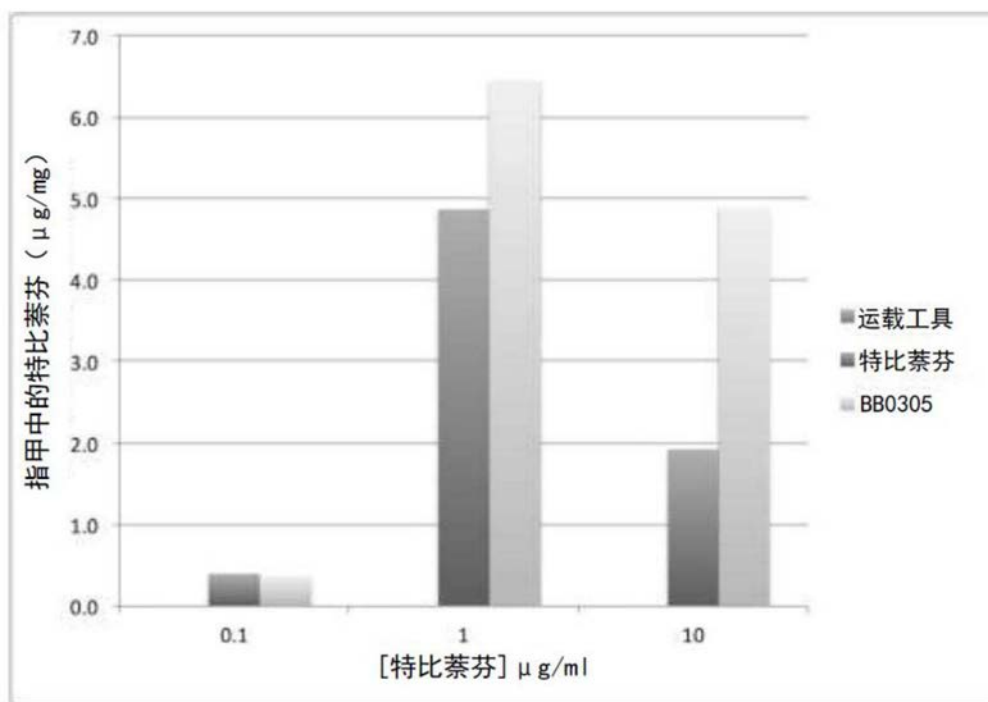


图5

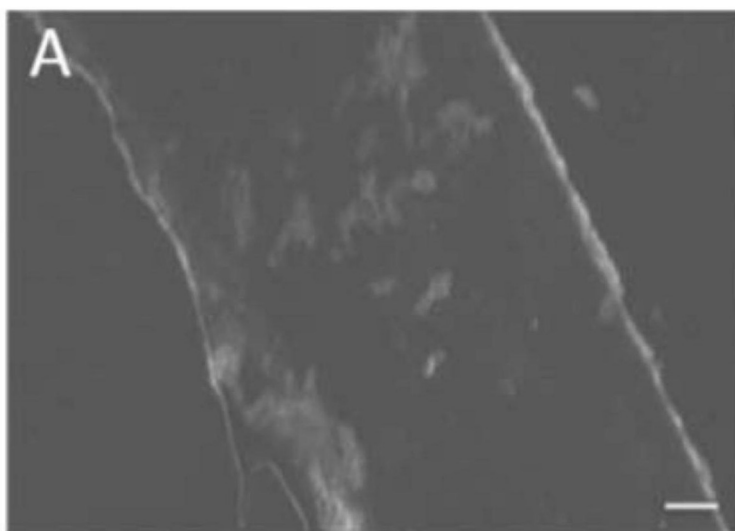


图6A

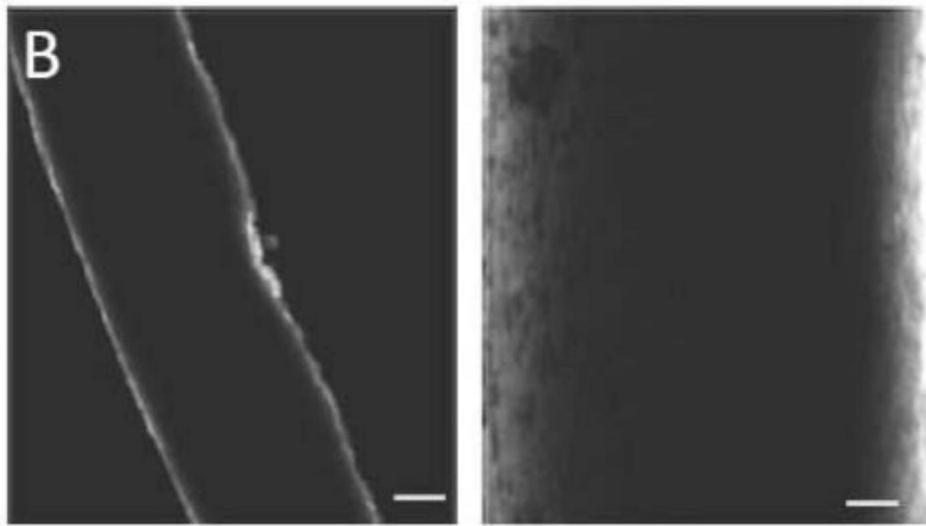


图6B

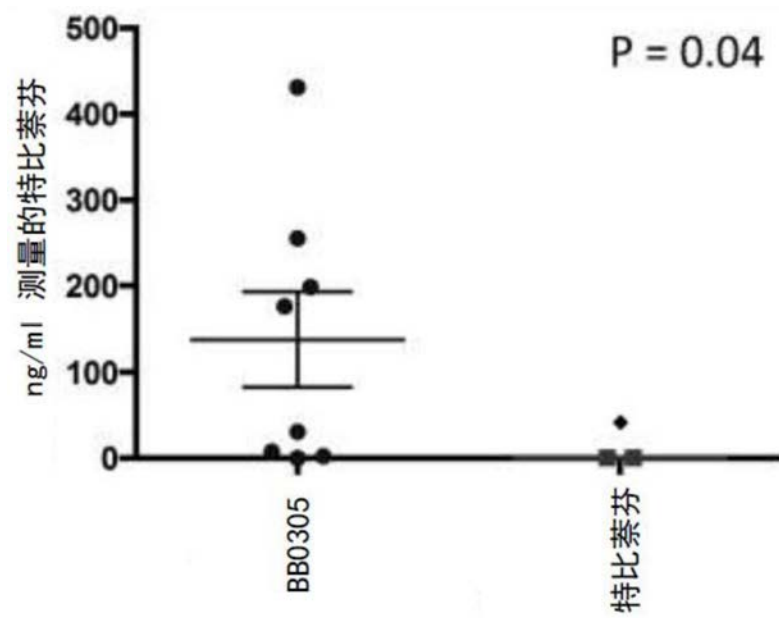


图7

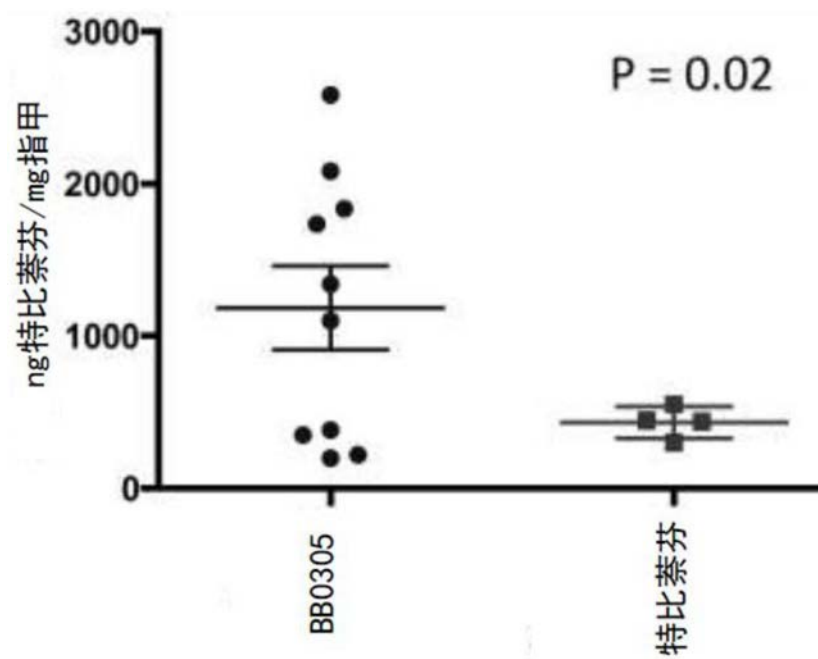


图8

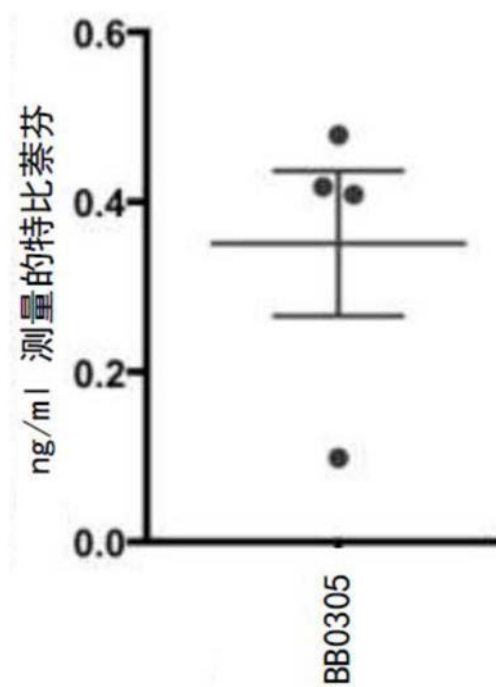


图9A

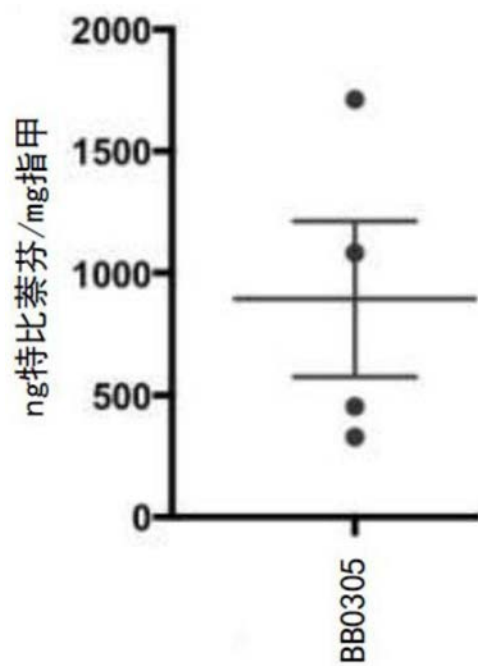


图9B

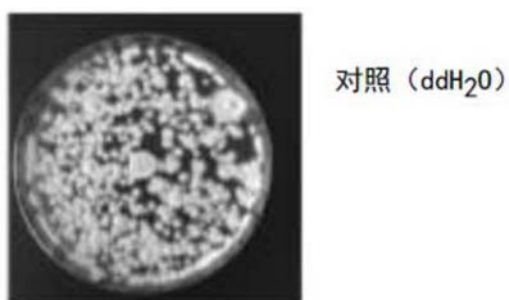


图10A

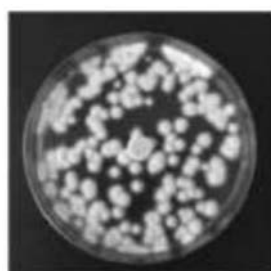
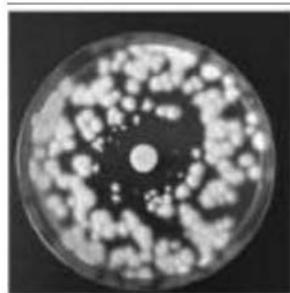
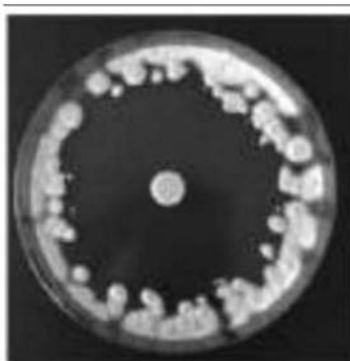


图10B



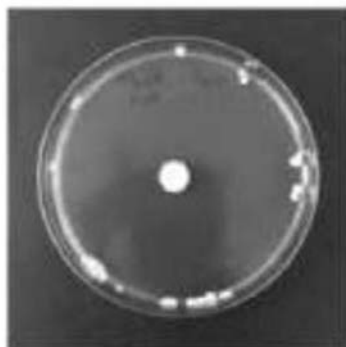
0.60  $\mu\text{g/ml}$   
特比萘芬

图10C



6.00  $\mu\text{g/ml}$   
特比萘芬

图10D



60.0  $\mu\text{g/ml}$   
特比萘芬

图10E

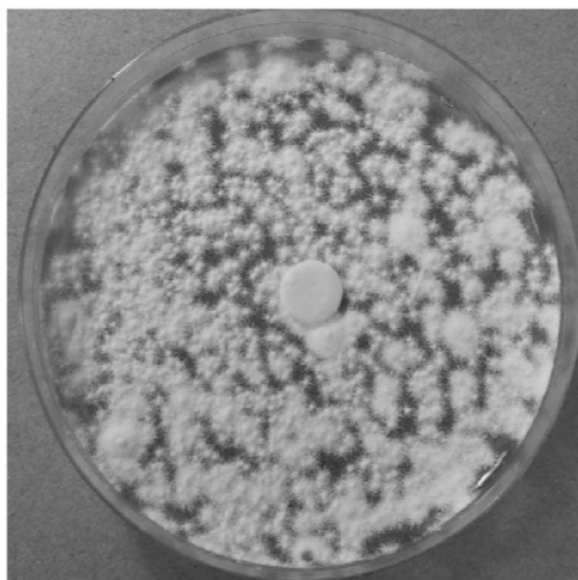


图11A

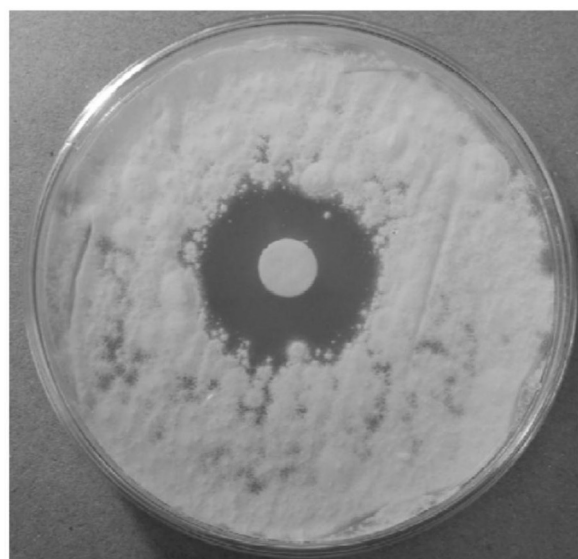


图11B

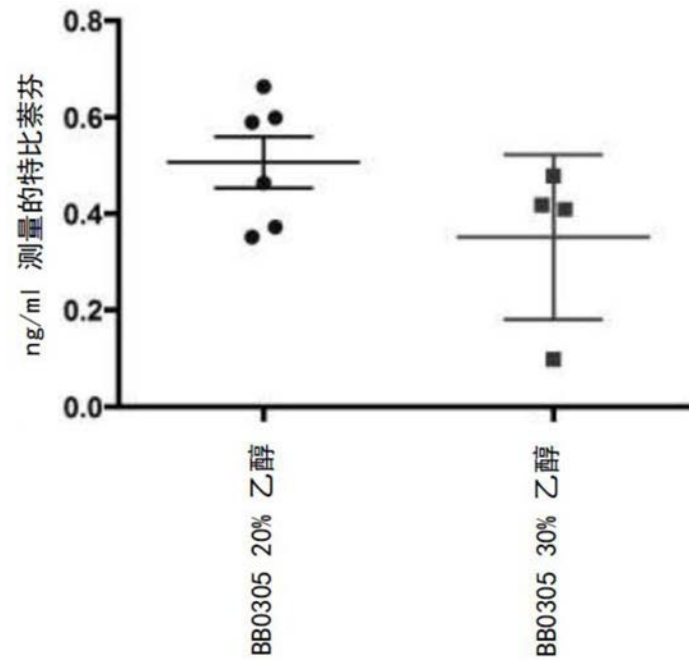


图12

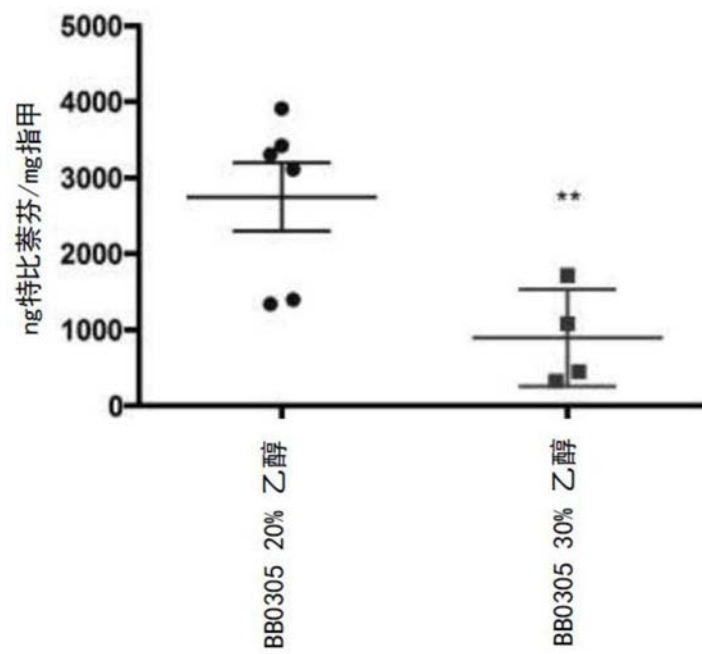


图13

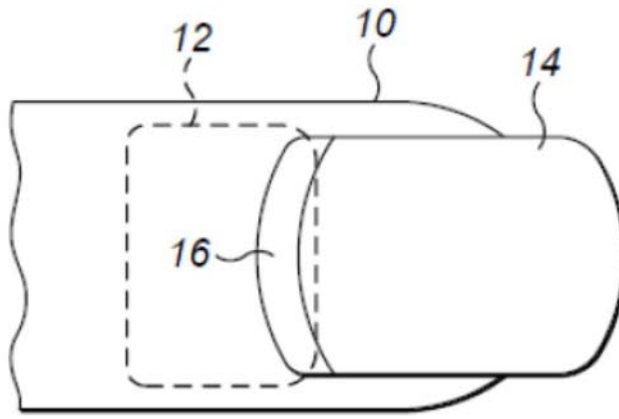


图14

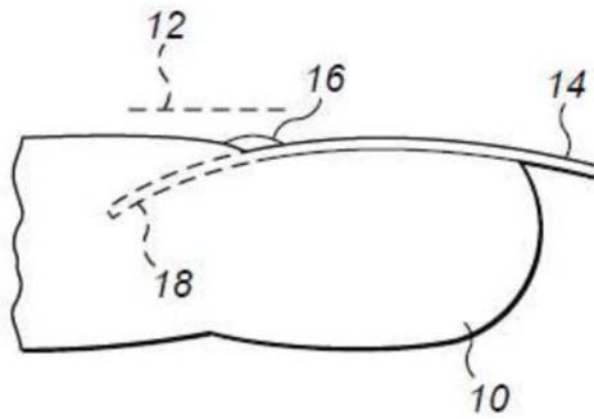


图15

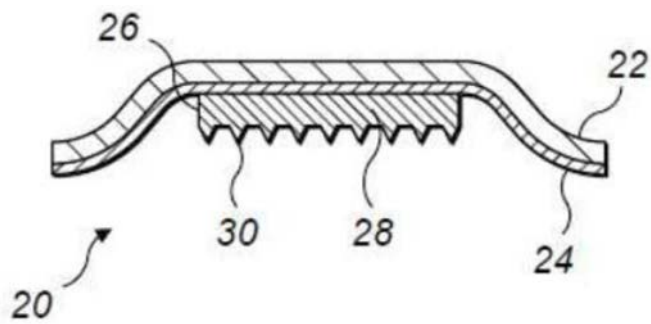


图16