

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

A61K 9/127

A61K 31/47 A61K 31/495

A61P 31/04



# [12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 99804655.8

[45] 授权公告日 2004 年 5 月 19 日

[11] 授权公告号 CN 1149978C

[22] 申请日 1999.3.24 [21] 申请号 99804655.8

[30] 优先权

[32] 1998.4.2 [33] US [31] 09/054,857

[86] 国际申请 PCT/US1999/006500 1999.3.24

[87] 国际公布 WO99/051202 英 1999.10.14

[85] 进入国家阶段日期 2000.9.29

[71] 专利权人 阿尔扎有限公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 L·S·S·郭 J·吉特勒曼

S·扎利普斯基 F·J·马丁

审查员 张珍丽

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 陈文青

权利要求书 1 页 说明书 17 页 附图 6 页

[54] 发明名称 含喹诺酮的脂质体组合物和它们的制备方法

[57] 摘要

本发明揭示了一种用于治疗细菌感染的脂质体组合物。该组合物包括有亲水聚合物链表面包衣的脂质体和由与氨基酸结合的喹诺酮化合物组成的被包封的药物-结合物。

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

1. 一种用于治疗细菌感染的脂质体组合物，包括  
由形成囊泡的类脂和 1-20 摩尔%用亲水聚合物衍生的类脂构成的脂质体，  
5 将药物-结合物包封于脂质体里，所述的药物-结合物由与氨基酸共价连接的  
喹诺酮化合物组成，相对于脂质体里喹诺酮化合物的留存，所述的氨基酸有效地  
增加药物-结合物在脂质体里的留存。
2. 根据权利要求 1 所述的组合物，其中喹诺酮化合物是氟代喹诺酮。
3. 根据权利要求 1 所述的组合物，其中喹诺酮化合物是 6-氟喹诺酮。
- 10 4. 根据权利要求 3 所述的组合物，其中 6-氟喹诺酮选自环丙沙星、诺氟沙  
星、氧氟沙星、斯巴沙星、洛美沙星、氟罗沙星、培氟沙星和氨氟沙星。
5. 根据权利要求 1 所述的组合物，其中所述的氨基酸选自丙氨酸、缬氨酸、  
亮氨酸、异亮氨酸、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸。
6. 根据权利要求 1 所述的组合物，其中喹诺酮化合物是环丙沙星。
- 15 7. 根据权利要求 6 所述的组合物，其中所述的氨基酸被共价连接到环丙沙  
星的哌嗪环。
8. 根据权利要求 1 所述的组合物，其中所述的亲水聚合物是聚乙二醇，其  
分子量为 1,000-5,000 道尔顿。
9. 一种制备如权利要求 1 所述的脂质体组合物方法，包括  
20 制备具有第一离子浓度的内部水相的脂质体；和  
在有比所述第一浓度高的第二离子浓度整体相介质里培养脂质体，所述的整  
体相介质包括所述的药物-结合物。
10. 根据权利要求 9 所述的方法，其中所述的第一较低离子浓度和所述的第  
二较高离子浓度是氢离子浓度，它限定了第一 pH 值和第二 pH 值，其中第一 pH  
25 为 4.5-7.5，比外部整体相介质的第二 pH 低至少 2 个 pH 单位。
11. 根据权利要求 9 所述的方法，其中脂质体是主要形成囊泡的类脂，其相  
转变温度高于 37°C，所述的培养在高于形成囊泡的类脂的相转变温度下进行。
12. 根据权利要求 10 所述的方法，其中所述的第一和第二 pH 值限定了 pH  
梯度，它是由于较高的内部/较低的外部铵离子梯度产生的。
- 30 13. 根据权利要求 12 所述的方法，其中所述的梯度通过有相反离子的铵盐  
产生，相反离子能有效地降低内部水相中药物-结合物的溶解度。

## 含喹诺酮的脂质体组合物和它们的制备方法

## 5 发明领域

本发明涉及供给予用于治疗细菌感染的喹诺酮的组合物，更具体的是本发明涉及供给予与氨基酸共价连接的喹诺酮的药物-结合物的脂质体组合物和它们的制备方法。

## 参考文献

- 10 Chakrabarti, A. 等, 美国专利 5,380,532, 1995, 1, 10 颁布。  
Cramer, J. 等, 生物化学和生物物理研究通讯 (Biochemical and Biophysical Research Communications) 75(2):295-301(1977)。  
Culbertson, T.P. 等, 药物化学杂志 (J. Med. Chem.) 33:2270-2275(1990)。  
Deamer, D.W. 等, Biochim. et Biophys Acta 274:323(1972)。
- 15 Domagala, J.M. 等, 药物化学杂志 29: 448-453(1986)。  
Greene, T.W. 等, 有机合成中的保护基团, 第 2 版, John Wiley & Sons, 美国纽约(1991)。  
Hagen, S.E. 等, 药物化学杂志 33: 849-845(1990)。  
Hagen, S.E. 等, 药物化学杂志 34: 1155-1161(1991)。
- 20 Hope, M. 等, WO 96/26715, “装载类脂赋形剂的方法 (METHOD FOR LOADING LIPID VESICLES)”, 1996, 9, 6 公开。  
Klopman, G. 等, 抗微生物剂和化疗 (Antimicrobial Agents and Chemotherapy), 9 月: 1807-1815(1993)。  
Lehninger, A.L., 生物化学原理, Worth Publishers, 1982.
- 25 Madden, T.D. 等, 类脂的化学和物理学 53: 37-46(1990)。  
Martin, F.J., 特异性药物释放系统-制备和生产技术 (SPECIALIZED DRUG DELIVERY SYSTEMS-MANUFACTURING AND PRODUCTION TECHNOLOGY(P. Tyle 编辑) Marcel Dekker, 美国纽约 267-316 页(1990)。  
Nichols, J.W. 等, Biochim. Biophys. Acta 455:269-271(1976)。
- 30 Paphadjopoulos, D. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88:11460-11464(1991)。

Ryan, J. 等, WO 91/09616, “封于类脂赋形剂里的喹诺酮抗生素” 1991, 7, 11 公开。

Sanchez, J. P. 等, J. Med. Chem. 31:983-991(1988)。

Salyers, A. A. 和 Whitt, D. D., 细菌的致病机理, 分子途径 (BACTERIAL PATHOGENESIS, A MOLECULAR APPROACH), ASM Press, 美国华盛顿 D. C. 1994, 101-102 页。

Szoka, F., Jr. 等, Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467(1980)。

Wong, J. P. 等, 欧洲专利申请 0 652 008, 名称为“环丙沙星胶囊化的脂质体”, 1995 年 5 月 10 日公开。

Zalipsky, S., 隐秘的脂质体 (STEALTH LIPOSOMES), D. Lasic 和 F. Martin 编辑, CRC Press, 第 9 章(1995)。

#### 发明背景

人们已提出将脂质体作为许多治疗剂的载体。使用脂质体的药物释放系统提供了有效的改善释放性质, 包括增加血液循环时间、减少细胞毒性, 延缓药物的释放, 对选定的组织靶向释放。

在应用脂质体供药物释放中, 通常需要将脂质体负载到高胶囊化的药物浓度上。药物从脂质体的泄漏速率也是低的, 以保存包封在脂质体里的药物释放优点。

对于制备具有包封药物的脂质体有许多负载药物的方法。对于许多亲脂药物, 这样得到有效的药物包封: 制备形成囊泡的类脂和药物混合物, 如, 为干燥膜形式, 水化混合物形成脂质体, 药物主要包封在其囊泡的类脂双层相里。假定药物的分配系数更利于类脂相, 可得到高承载效率和稳定的药物保留力。

也可使用相同类型的被动承载以制备具有包封的亲水化合物的脂质体。在此情况下, 药物通常溶于用来使形成囊泡的类脂的类脂膜水合的水介质。根据水合条件和药物的性质, 典型地可得到在约 5-20% 之间的胶囊化效率, 剩余的药物在大量的水相里。通常也需要另外的加工步骤以除去未胶囊化的药物。

业已报道了用于使亲水性药物胶囊化更有效的方法, 涉及从有机溶剂中反相蒸发 (Szoka 等, 1980)。在此方法中, 亲水药物和形成囊泡的类脂的混合物在油包水的乳剂里乳化, 然后除去溶剂, 形成不稳定的类脂-单层凝胶。搅动凝胶时, 典型的是在加入的水相存在下搅拌时, 凝胶崩溃, 形成了具有高的药物胶囊化 (可达 50%) 的少薄片 (oligolamellar) 的脂质体。

对于可离子化的亲水或两性药物，通过将药物反跨膜离子梯度地负载到脂质体里可得到更大的药物承载效率(Nichols 等, 1976; Cramer 等, 1977)。该负载方法通常地称为远程负载，典型地涉及具有可离子化的胺基团的药物，通过将它加入脂质体的悬浮液进行负载，所述的脂质体悬浮液具有较低的内部/较高的外部离子梯度，通常是 pH 梯度。

但是，远程负载值得注意的一个问题是并非所有的离子化药物对离子梯度反应聚集在脂质体上(Chakrabarti 等, 1995; Madden 等, 1990)。另一个问题是一些聚集在脂质体里的试剂聚集后马上释放。再一个问题是在体外成功地负载并保留在脂质体里的一些试剂从在体内的脂质体里泄漏出来的泄漏率很高，这消除了包封形式的脂质体试剂给药的优点。

### 发明概述

本发明的一个方面包括一种用于治疗细菌感染的组合物。该组合物包括由形成囊泡的类脂和 1-20 摩尔%用亲水聚合物衍生的类脂组成的脂质体，和包封在脂质体里的药物-结合物，所述的药物-结合物具有抗菌活性，由与氨基酸共价连接的喹诺酮化合物组成。该氨基酸相对于脂质体里只有喹诺酮化合物的保留能力而言，能有效地增加脂质体里药物-结合物的保留能力。

本发明还提供了制备上述脂质体组合物的方法，包括制备具有第一离子浓度的内部水相的脂质体；和在有比所述第一浓度高的第二离子浓度整体相介质里培养脂质体，所述的整体相介质包括所述的药物-结合物。

在一个实施方案里，喹诺酮化合物是氟喹诺酮，在另一个实施方案里，喹诺酮化合物是 6-氟喹诺酮。在另一个实施方案里，6-氟喹诺酮选自环丙沙星、诺氟沙星、氧氟沙星、斯巴沙星(sparfloxacin)、洛美沙星(lomefloxacin)、氟罗沙星、培氟沙星和氨氟沙星(amifloxacin)。

在一个实施方案中，氨基酸选自丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸。

在优选的实施方案里，喹诺酮是环丙沙星，氨基酸与环丙沙星的哌嗪环共价连接。

在另一个实施方案中，在脂质体组合物中的亲水性聚合物是分子量在 1,000-5,000 道尔顿的聚乙二醇。

在另一个方面，本发明包括制备上述脂质体组合物的方法。该方法包括制备脂质体，使其包含具有第一种离子浓度的内部水相，在有比第一种离子浓度高的第二种离子浓度的整体相介质里培养脂质体，整体相介质包括药物-结合物。

在一个实施方案里，第一种较低离子浓度和所述的第二种较高离子浓度是氢

离子浓度，它们依次限定了第一和第二 pH 值，其中第一 pH 为约 4.5-7.5，比外部的整体相介质的第二 pH 低至少 2 个 pH 单位。

在另一个实施方案里，主要形成的脂质体的类脂的相转变温度在约 37°C 以上，在明显高于形成脂质体的类脂的相转变温度下对脂质体进行培养。

- 5 在另一个实施方案里，第一和第二 pH 值限定了 pH 梯度，它是由于较高的内部/较低的外部铵离子梯度产生的。

在另一个实施方案里，通过有相反离子的铵盐产生梯度，它能有效地降低药物-结合物在内部的水相里的溶解度。

- 10 当本发明下列详述结合附图来阅读时能更完全地理解本发明的这些和其它目的和特征。

#### 附图简述

图 1A 显示喹诺酮抗生素化合物的一般结构；

图 1B 显示 6-氟-喹诺酮化合物的一般结构；

- 15 图 1C 显示 6-氟-喹诺酮环丙沙星的结构；

图 2A-2D 显示适用于本发明的其它 6-氟-喹诺酮类；

图 3 是制备环丙沙星氨基酸酰胺的一般反应流程；

- 20 图 4A-4D 显示在本发明基础上例举性的环丙沙星-氨基酸结合物，包括环丙沙星-甘氨酸(图 4A)、环丙沙星-赖氨酸(图 4B)、环丙沙星-苏氨酸(图 4C)和环丙沙星-亮氨酸(图 4D)；

图 5A-5B 显示 $\alpha$ -氨基己酰基环丙沙星(图 5A)和 $\epsilon$ -氨基己酰基环丙沙星(图 5B)；

图 6 显示环丙沙星-氨基酸结合物相反离子梯度负载到脂质体上的离子化结果；和

- 25 图 7 显示大鼠用脂质体包封的甘氨酰基-环丙沙星(■)、脂质体包封的环丙沙星(■)和游离的甘氨酰基-环丙沙星(◇)和游离的环丙沙星(▲)给药后血浆中剩余的药物的百分数。

#### 发明详述

- 30 如上所述，本发明提供了一种有环丙沙星-氨基酸结合物包封于其中的脂质体组合物。下面第 I 节阐述了例举性的结合物和它们的制备，第 II 节阐述了脂

质体的制备和结合物负载入脂质体。第 III 节里，体外和体内的含有两个例举的结合物的脂质体。

### I. 喹诺酮-氨基酸结合物

5 喹诺酮是一类如图 1A 所示的 4-吡啶酮-3-羧酸一般结构的合成的抗微生物剂。在附图显示的一般结构里，X 是 N 或 C， $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_5$ 、 $R_6$ 、 $R_7$  和  $R_8$  可为任何基团。一些喹诺酮类药物，如萘啶酸是多年来已知的。近来的结构活性相关性导致了人们合成了许多有抗菌活性的喹诺酮 (Culbertson 等, 1990; Domagala 等, 1986; Hagen 等, 1990, 1991; Klopman 等, 1993; Sanchez 等, 1998)，本技术  
10 领域的人员能很容易地合成这类化合物。

作为这些结构-活性相关性的部分，业已介绍了氟代-喹诺酮类，这些衍生物在早期喹诺酮类物质的基础上提供了治疗益处，如氟代剂具有宽的抗微生物活性，口服后能有效地治疗各种感染疾病。该类化合物的副作用也相对少，不会迅速形成微生物对它们作用的耐药性。6-氟代-喹诺酮的一般结构见图 1B。

15 已广泛地研究了 6-氟代-喹诺酮，已知许多结构变化，它们中的许多适用于本发明。继续参见图 1B，6-氟-喹诺酮类典型的是其中  $R_1$  是  $C_1$  到  $C_3$  烷基，如甲基、乙基、丙基或环丙基，它在一个或多个位置被 F、Cl 或 Br 取代； $R_7$  是直链、支链或环状的含氮烷烃，优选地含有一个可离子化的氨基；例举性的  $R_7$  取代基  
20 包括环结构，如 1-氮杂环丁烷基 (azetidyl)、1-哌嗪基、4-甲基-1-哌嗪基、4-乙基-1-哌嗪基、2-哌嗪基、1-吡咯烷基，每个基团可被  $NH_2$ 、 $NHCH_3$ 、 $N(CH_3)_2$ 、2-氨基乙基、乙基氨基甲基、1-吡咯烷基或氨基乙基氨基甲基所取代，其它例举性的饱和和不饱和氮杂环包括单环杂环，如咪唑、咪唑啉、二氢吡咯、1, 2, 3, 6-四氢吡啶、1, 4, 5, 6-四氢嘧啶、吡咯烷、吗啉、哌啶、哌嗪、1, 3, 5-三嗪和双环杂环，如全  
25 氢化吲哚、全氢化喹啉、全氢化异喹啉、全氢化-7-氮杂吲哚、全氢化-4-氮杂苯并咪唑、1, 5-二氮杂双环 [4. 3. 0] 壬烯 (DBN)、1, 8-二氮杂双环 [5. 5. 0] 十一烯 (DBU)、1, 5-二氮杂双环 [4. 3. 0] 壬烷、1, 8-二氮杂双环 [5. 5. 0] 十一碳烷、1, 4-二氮杂双环 [2. 2. 2] 辛烷 (三亚乙基二胺)、3-氮杂双环 [3. 2. 2] 壬烷、3-氮杂双环 [4. 3. 0] 壬烷、3-氮杂双环 [3. 3. 0] 辛烷、2, 8-二氮杂双环 [4. 3. 0] 壬烷、5-二氮杂双环 [4. 3. 0] 壬烷、1, 5, 7-三氮杂双环 [4. 4. 0] 十二-5-烯、2, 7-二氮杂螺 [4. 4]  
30 壬烷；X 是 N 或 C，结果当 X 是 N 时，没有  $R_8$ ，当 X 是 C 时， $R_8$  是 H、F、Cl 或  $CF_3$ 、 $OCH_3$  或  $OCH_2CH_3$ ，或  $R_1$  和  $R_8$  都是 2 个或 3 个原子的烷基或烷氧基，与在喹诺酮环

里 1-8 个环中原子桥键连接，依次形成 5 或 6 元环。预期可能存在顺-和反-立体异构体，当不对称手性中心存在时，化合物可包括单个立体异构体或混合物，典型的是立体异构体的外消旋混合物。图 5A-5D 显示了本发明里使用的一些例举性的 6-氟-喹诺酮。

5 一些更加公知的 6-氟-喹诺酮类包括环丙沙星、诺氟沙星、氧氟沙星、斯巴沙星(sparfloxacin)、洛美沙星(lomefloxacin)、氟罗沙星、培氟沙星和氨氟沙星(amifloxacin)。在这之中，环丙沙星(1-环丙基-6-氟-1,4-二氢-4-氧基-7-(1-哌嗪基)-3-喹啉羧酸)是最有效的一个，其结构如图 1C 所示。像其它喹诺酮一样，环丙沙星通过抑制细菌的 DNA 复制来作用。药物与 DNA 促旋酶的 $\beta$ -亚单位结合，  
10 并有效地抑制其活性，所述的 DNA 促旋酶是让超螺旋释放并重构的 DNA 复制中必不可少的酶(Salyers 等，1994)。环丙沙星包括在 R1 处的环丙基环和在 R7 处的哌嗪环，它包括可离子化的胺，其 pKa 约 8.7。药物对大多数革兰氏阴性菌和一些革兰氏阳性菌的致病细菌有效。但是，抗菌的和许多其它喹诺酮化合物的治疗有效性被其消除半衰期短至 4 小时所限制，这使它难以在血液中维持治疗浓度。

15 如上所述，药物包封于脂质体是改进药物治疗有效性的一个途径，已揭示了将环丙沙星包封(Ryan 等，1991; Wong 等，1995, Hope 等，1996)。但是，脂质体包封的环丙沙星在脂质体里的保留时间不足以使有亲水聚合物链的表面包衣的、长-循环的脂质体达到体内生物分布的程度。这在对比实施例 1 显示，对比实施例 1 揭示了通过远程负载来制备有聚乙二醇链表面包衣的脂质体，并将环丙  
20 沙星包封入脂质体。体外测量含环丙沙星的脂质体中从脂质体释放到血浆里的环丙沙星量(对比实施例 1B)。发现在 37°C 下在血浆里培养 24 小时后 85% 药物从脂质体里泄漏出来，40% 的药物在 1 小时里释放。

长-循环的脂质体在血流中保留最长达 24 小时。本文使用的“长-循环”脂质体指有亲水聚合物链表面包衣的脂质体，如美国专利 5,013,556 揭示的聚乙  
25 醇包衣的脂质体。在注射后 24 小时，最长达 10% 注射剂量的长-循环的脂质体保留在血流中，这与常规的脂质体，如没有聚合物链包衣的脂质体相反，常规的脂质体在数小时后即从血流里廓清。因此，长-循环脂质体在体内包括器官和组织，进行生物分布，而不同于常规脂质体在给药后迅速积聚于那些单核噬菌细胞系统或网状内皮细胞系统(Paphadjopoulos 等，1991)。很清楚，在数小时里由  
30 于药物跨越脂质体的双层而泄漏使超过半数负载的环丙沙星释放的环丙沙星脂质体组合物不具有长-循环脂质体的长循环寿命和良好生物分布的优点。

申请人业已发现，环丙沙星与氨基酸结合时可被负载进入脂质体，并在脂质体里逗留比环丙沙星的逗留时间长。这样，本发明提供了包括环丙沙星结合物的脂质体组合物，它具有长时间血循环寿命，以得到良好的生物分布和使包封的化合物缓释的优点。

5 图 3 显示了制备以环丙沙星-氨基酸结合物为例的喹诺酮-氨基酸结合物的合成反应流程，并在实施例 2 里进行揭示。一般来说，喹诺酮的 3-羧酸基团能被本技术领域已知的任何羧基保护基团所保护(Greene 等, 1991)，图 3 显示的是叔丁基酯。被保护的喹诺酮然后与 N-保护的碱性氨基酸在缩合剂存在下反应，以通过酰胺连接使喹诺酮里的伯氨基或仲氨基，如环丙沙星哌嗪环的仲氨基与碱性氨基酸的 $\alpha$ -羧基结合。所得的保护酰胺结合物然后在负载入脂质体前去保护。酰胺连接是化学稳定的，脂质体被巨噬细胞摄入后可在体内通过溶菌酶裂解。

10 在研究中，环丙沙星根据图 3 的流程，与下列氨基酸结合：甘氨酸、赖氨酸、苏氨酸和亮氨酸。这些环丙沙星-氨基酸结合物的结构如图 4A-4D 所示，其中图 4A 显示了环丙沙星-甘氨酸，图 4B 显示了环丙沙星-赖氨酸，图 4C 显示了环丙沙星-苏氨酸，图 4D 显示了环丙沙星-亮氨酸。如下所述，甘氨酰基-环丙沙星和赖氨酰基-环丙沙星被包封入脂质体，测试其体外血浆里的泄漏和体内血液循环寿命。

20 如上所述，本发明设想使用任何氨基酸与任何喹诺酮化合物组合，只要结合物以脂质体包封形式给药时能保留一定量的适合治疗的抗菌活性量即可。在一个实施方案里，优选的氨基酸是有直链和支链 R 基团的氨基酸，如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸和精氨酸。在另一个实施方案里，优选的是 pKa 在 9.0 以上的氨基酸。例如，与甘氨酸、丙氨酸和亮氨酸相关的 pKa 值依次是 9.6, 9.7 和 9.6。赖氨酸和精氨酸是三元的，在 R 基团里有第二个氨基。赖氨酸里的氨基的 pKa 是 8.95 和 10.53，精氨酸的是 9.04 和 12.48(Lehninger)。

25 应当了解，本发明总的概念是提供稳定地包封于脂质体的喹诺酮，并根据脂质体的生物分布保留足以进行生物分布的时间，对任何喹诺酮化合物都是可用的，如上述以环丙沙星为例的研究，任何 pKa 值大于约 9.0 的喹诺酮或 6-氟-喹诺酮是适合使用的，应当了解喹诺酮可包括 pKa 大于 9.0 的部分，或如上所述，30 用氨基酸或其它化合物对现存的化合物进行修饰，以包括 pKa 大于 9.0 的部分。

也应当知道，喹诺酮化合物可用氨基酸以外的配位体修饰，得到所需的增加

的脂质体保持力。例如，环丙沙星可用 $\alpha$ -氨基己酸(pKa9.6)和 $\epsilon$ -氨基己酸(pKa10.5)修饰得到 $\alpha$ -氨基己酰基-环丙沙星(图5A)和 $\epsilon$ -氨基己酰基-环丙沙星(图5B)。

## II. 脂质体组合物

- 5 上述的环丙沙星-氨基酸结合物被包封于脂质体，其中“包封”指化合物被隔绝在脂质体的中央水层，它在脂质体类脂双层之间的水空间或在其双层里。该部分揭示了通过远程负载用于将药物结合物包封的脂质体的制备。

### A. 脂质体组分

- 10 本发明的脂质体由形成囊泡的类脂组成，通常包括有疏水尾部基团和极性头部基团的两性类脂。形成囊泡的类脂的特征是它能(a)在水里同时形成双层囊泡，如磷脂的例子，或(b)能稳定地掺入类脂双层，疏水部分与内部的双层膜的疏水区域接触，极性头部基团向外界，膜的极性表面定向。用于本发明的形成囊泡的类脂是具有上述特征之一的任何常规的类脂。

- 15 该类型形成囊泡的类脂优选的是有两个烃尾部或链，典型的是酰基，和一个极性头部基团的类脂。包括在该类里的类脂是磷脂，如磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酸(PA)、磷脂酰甘油(PG)和磷脂酰肌醇(PI)，其中两个烃链典型的长度在约14-22个碳原子之间，有多种不饱和的程度。优选的磷脂包括PE和PC。例举性的PC是氢化的大豆磷脂酰胆碱(HSPC)。也可使用单链类脂，如鞘
- 20 磷脂(SM)。

可以市售得到，或根据公开的方法制备上述类脂和磷脂中酰基链具有各种饱和程度的类脂和磷脂。其它可包含于本发明的类脂是糖脂。本文的术语“糖脂”包括有两个烃链的类脂和一个或多个的糖残基，烃链中的一个为鞘氨醇的烃链。

- 25 用于本发明的类脂可为相对“液体”类脂，表示类脂相有相对低的类脂熔融温度，如在室温或低于室温下熔融，或者为相对“刚硬”的类脂，表示类脂的熔点相对较高，如在直至50°C熔融。作为一个通则，越刚硬，即越饱和的类脂使类脂的双层结构膜的坚硬程度越大，因此使活性药物负载后药物的保持力更稳定。该类型优选的类脂的相转变温度在约37°C以上。

- 脂质体可进一步包括能稳定囊泡的类脂或主要由磷脂构成的脂质体。最常用的
- 30 类脂是胆甾醇，其含量水平为25-45摩尔%。

用于本发明的脂质体，以摩尔百分数为基表达，优选地含30-75%磷脂，优

选的是磷脂酰胆碱(PC)、25-45%胆甾醇和1-20%聚合物衍生的类脂。一个例举性的脂质体制剂含有50摩尔%磷脂酰胆碱和45摩尔%胆甾醇和5摩尔%聚合物衍生的类脂, mPEG-DSPE。

5 本发明的脂质体包括亲水聚合物链的表面包衣。“表面包衣”指在脂质体表面上的任何亲水聚合物包衣。这样将亲水聚合物包含于脂质体:将一种或多种用亲水聚合物链衍生的、形成囊泡的类脂包含于脂质体组合物。可被使用的形成囊泡的类脂是上述第一种形成囊泡类脂的任一,但是,优选的是具有二酰基链的形成囊泡的类脂,如磷脂。一个优选的磷脂是磷脂酰乙醇胺(PE),它含有反应性氨基供与活化的聚合物偶合。PE的一个例子是二硬脂酰基 PE(DSPE)。

10 用于与形成囊泡类脂偶合的优选的亲水聚合物是聚乙二醇(PEG),优选的是分子量为1,000-10,000道尔顿,更优选是1,000-5,000道尔顿的PEG链。

其它合适的亲水聚合物包括聚乳酸、聚乙醇酸(polyglycolic acid)、聚乙炔吡咯烷酮、聚甲基噁唑啉、聚乙基噁唑啉、聚羟丙基甲基丙烯酰胺、聚甲基丙烯酰胺、聚二甲基丙烯酰胺和衍生的纤维素,如羟甲基纤维素或羟乙基纤维素。

15 业已阐述了含这些聚合物的类脂-聚合物结合物与合适的类脂,如PE,连接,例如参见美国专利5,395619,和Zalipsky, STEALTH LIPOSOMES(1995),在此并入供参考。典型的是,在脂质体形成期间,约1-20摩尔%聚合物衍生的类脂包含于形成脂质体的组分中。

20 亲水聚合物链提供了亲水链的表面包衣,它能延长没有这类包衣的脂质体的血液循环时间。血液循环时间的增加程度是没有聚合物包衣时的数倍,这在共同拥有的美国专利5,013,556中已加以揭示,在此并入供参考。

25 进一步的是,可制备含有表面基团的脂质体,所述的表面基团可为如抗体或抗体片段、用于与细胞表面受体相互作用的小效应体分子、抗原和其它用于得到对特定细胞群有所需靶向连接性质的化合物。这里,在脂质体里的类脂组分包括衍生自靶分子的类脂,或有极性头部化学基团、可根据已知的方法用靶分子衍生的类脂。

#### B. 制备离子梯度脂质体

30 如上所讨论的,具有高内部浓度药物的脂质体可通过远程负载进行制备。在该技术中,药物针对离子梯度(典型的是跨越脂质体双层的pH梯度)的反应,在脂质体中心室里积聚。本节讨论有pH梯度脂质体的制备和药物的负载。

具有所需离子梯度的脂质体可通过各种技术制备。在一个典型的方法中，形成脂质体的类脂混合物溶于合适的有机溶剂，在烧瓶里蒸发，形成薄膜。在最后的脂质体制备中，如上所讨论的，然后用含在脂质体内部形成水相的溶质的水介质覆盖膜。脂质体膜水合，形成多薄层状的囊泡 (MLV)，典型的多种尺寸为约  
5 0.1-10 微米。

脂质体形成后，根据已知方法筛分囊泡，使脂质体的大小分布在选定的范围里。脂质体优选的是大小均匀，其范围 0.04-0.25 微米，小的单层囊泡 (SUV) 典型地在 0.04-0.08 微米之间，它们可通过对脂质体进行广泛的声波处理或均质化来制备 (Martin 等, 1990)。

10 可通过聚碳酸酯膜或其它限定孔径为 0.03-0.5 微米，典型的是 0.05, 0.08, 0.1 或 0.2 微米的膜挤出，产生直径在约 0.08-0.4 微米的均匀的脂质体。膜的孔径大致相当于通过膜挤出产生的脂质体的最大粒径，特别是在通过相同的膜挤出两次或多次的场合里更是这样。

15 优选地在开始的类脂-水合缓冲液里进行筛分，结果在开始脂质体加工步骤的整个过程中该介质都在脂质体内部空间里。

筛分后，处理脂质体的外部介质以产生跨越脂质体膜的离子梯度，典型的是较低的内部/较高的外部浓度梯度。这可由各种方式进行，如 (i) 稀释外部介质，(ii) 对所需的最终介质进行渗析，(iii) 对所需的介质进行分子筛层析，如用 Sephadex G-50, 或 (iv) 高速离心并将已成小球的脂质体再悬浮于所需的最终介质  
20 里。

外部介质的选择根据梯度形成机构和所需的外部 pH 而定。

在最简单的产生 pH 梯度方法里，水合筛分的脂质体有选定的内部介质 pH。滴定脂质体的悬浮液，直至达到所需最终的 pH，或如上述处理，用一种有所需外部 pH 的物质交换外界相缓冲液。例如，在选定的缓冲液里，如在谷氨酸盐或  
25 磷酸盐缓冲液里，原始介质的 pH 可为 5.5，在相同或不同的缓冲液里，最终外部介质的 pH 可为 8.5。如，通过适当地调节缓冲液、盐或低分子量溶质 (如蔗糖) 的浓度，使内部和外部介质优选地含有大致相同的克分子渗透浓度。

在另一个一般方法中，在脂质体里包含选定的离子载体来产生梯度。为了阐述，在钾盐缓冲液里制备将真菌霉素包含于脂质体双层里的脂质体，筛分，然后  
30 用钠缓冲液交换，产生钾盐内部/钠盐外部梯度。钾离子在内-到-外方向的移动中产生了低的内/高的外部 pH 梯度，推定为由于质子移动进入脂质体作为对跨越

脂质体膜净负电荷的反应。(Deamer 等, 1972)。

在另一个更优选的方法里, 用于药物负载的质子梯度通过制造跨越脂质体膜的铵离子梯度来产生, 例如参见美国专利 5,192,549。在此脂质体在含铵盐, 典型的是 0.1-0.3M 铵盐, 如硫酸铵的水性缓冲液里, 在合适的 pH, 如 5.5-7.5  
5 下制备。脂质体形成和筛分后, 对于缺乏铵离子的外部介质进行交换, 如相同的缓冲液, 但一种缓冲液中的硫酸铵被使脂质体内部和外部的克分子渗透浓度相同的 NaCl 或糖替代。

脂质体形成后, 用氨和质子平衡脂质体内部的铵离子。氨能渗透进入脂质体  
10 双层, 并从脂质体内部逃逸。氨的连续逸出使脂质体里的平衡向右移动, 产生了质子。

铵离子梯度在上述另两个途径的活性药物负载里有许多优点。它们是:

i. 该系统能产生质子作为对药物负载的反应, 结果负载药物的能力不被质子  
或开始的 pH 梯度所限制。即, 由于非质子形式的药物分子被摄入脂质体, 并在  
其中质子化, 质子在脂质体里的缺失使铵/氨平衡向氨移动, 并产生质子, 使质  
15 子的浓度保持相对恒定的水平, 不受药物负载量的约束。唯一的要求是在脂质体  
里原始的铵离子浓度的摩尔数超过最终负载的药物浓度。

ii. 在脂质体贮存期间该系统能像电池那样作用, 扩散出膜的所损失的质子被  
新产生的质子替代, 这与铵/氨平衡向产生氨移动一样。

iii. 铵盐的相反离子, 如硫酸盐相反离子, 可通过与被负载的药物形成沉淀  
20 或不溶络合物而进一步增加药物负载。

### C. 脂质体负载

上述形成的脂质体被用于负载本发明的环丙沙星-氨基酸化合物。在该方法  
里, 化合物被加到 pH 梯度脂质体的悬浮液里, 在足以让化合物从外部介质进入  
脂质体的条件下处理悬浮液。适合药物负载的培养条件是: (i) 让衍生的化合物  
25 以不带电荷的形式扩散入脂质体, 和 (ii) 优选地产生高的药物负载浓度, 如 50-  
200mM 药物被胶囊化。

优选地在脂质体类脂的相转变温度以上进行负载。因此, 对于主要形成饱和  
磷脂的脂质体来说, 负载温度可高达 60°C 或更高。负载时间典型地为 15-120 分  
钟, 根据衍生的药物向脂质体双层膜的渗透性、温度和脂质体类脂与药物的相对  
30 浓度而定。

图 6 显示了药物负载进入有离子梯度的脂质体的机理。该图显示, 脂质体 10



表 1: 环丙沙星和甘氨酸基-环丙沙星的活性

药物	最小的抑制浓度(微克/毫升)				
	<i>S. pyrogenes</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
环丙沙星	<0.5	1.0	1.0	<0.5	<0.5
甘氨酸- 环丙沙星	4	32	32	8	>512

用甘氨酸衍生的环丙沙星使药物失去了一些效力，其证据是甘氨酸基-环丙沙星的 MIC 较高。但是，失去的效力通过长循环脂质体提供的较好的生物分布加以弥补，因此，较低剂量药物产生了等价的效率。

- 5 实施例 2D 测定了脂质体包封的甘氨酸-环丙沙星和赖氨酸基-环丙沙星在体外血浆里的泄漏。简单来说，在 37°C 下使含甘氨酸-环丙沙星和赖氨酸-环丙沙星的脂质体在大鼠血浆里培养 24 小时。在 24 小时培养末，分析血浆中游离药物的存在。对于脂质体包封的赖氨酸-环丙沙星或脂质体包封的甘氨酸-环丙沙星来说，血浆里没有检测到游离药物。药物从脂质体组分里的回收百分数对于脂质体包封的赖氨酸-环丙沙星为 93%，对于脂质体包封的甘氨酸-环丙沙星来说为 100%。

相反的是，如对比实施例 1 所述，在 24 小时培养后，纯净的环丙沙星从脂质体里泄漏，血浆里 85% 的药物得以回收。很显然，对环丙沙星的氨基酸修饰能有效地增加药物在脂质体里的留存。

- 15 对大鼠测定脂质体包封的甘氨酸-环丙基沙星的体内血液循环寿命，并与脂质体包封的环丙沙星和游离的甘氨酸-环丙沙星和游离的环丙沙星比较。如实施例 2E 所述，16 个大鼠分成 4 个试验组，对每组 4 个动物静脉注射含 30 $\mu$ M/kg 药物的前述制剂之一。测定血浆中的药物浓度，时间对测定结果的函数如图 7 所示。

从图中可见，给予脂质体包封的甘氨酸-环丙沙星后在血浆里剩余的药物百分数(■)明显大于脂质体包封的环丙沙星给药后血浆里药物的百分数(■)。给予脂质体包封的甘氨酸-环丙沙星 24 小时后，大于 30% 的药物剂量残留在血浆里。相反的是，对于脂质体包封的环丙沙星，4 小时后，几乎所有的药物从血液里廓清。游离的甘氨酸-环丙沙星(◇)和游离的环丙沙星(▲)从血液里廓清的时间少于 1 小时。

- 25 测定包封在有表面 PEG 包衣的脂质体里的甘氨酸-环丙沙星的血浆半衰期为约 24 小时。这大致与脂质体本身相等，这表明药物在体内保留在脂质体里。它进

一步被这样的事实支持：游离的甘氨酸-环丙沙星在约 30 分钟后从血液里廓清。相反的是，包封在有 PEG 表面包衣的脂质体里的环丙沙星的血液循环半衰期约为 1 小时。游离的环丙沙星在约 30 分钟后廓清。在此情况下，当脂质体能保留在循环里长达 24 小时时，环丙沙星廓清得更迅速，表明药物在体内从脂质体里泄  
5 漏出来。

这些观察表明，通过合适地修饰喹诺酮，如通过用氨基酸衍生化或通过仔细选择有所需 pKa 值的喹诺酮来增加喹诺酮的胺强度，或通过合成新的喹诺酮药物或类似物，可以改进药物在脂质体里的留存。

进一步应当知道的是，喹诺酮的 pKa 值可与选定的喹诺酮的其它特征，如化  
10 合物的溶解度和扩散系数，配合，以增加在脂质体的留存。

本发明的脂质体组合物可用于治疗各种细菌感染，包括治疗分支杆菌属感染，特别是结核分支杆菌、堪萨斯分支杆菌 (*M. kansasii*)、蟾分支杆菌 (*M. Xenopi*)、偶发分支杆菌 (*M. fortuitum*) 和鸟分支杆菌 (*M. avium*)-*M. 胞内* (intracellular) 复合物。

15 其它可用脂质体包封的喹诺酮化合物治疗的疾病包括慢性皮肤感染，如褥疮溃疡、或褥疮。给予脂质体包封形式的优点在于脂质体的循环时间长使携带药物的脂质体积聚在感染和发炎部位。

多药物耐药性的结核杆菌是另一个用喹诺酮制剂治疗的疾病，它可从给予脂质体包封形式中得到好处。这是由于结核杆菌常常存在于活性地摄入 PEG-包衣  
20 的脂质体的巨噬细胞里，引起感染部位药物浓集。

其它疾病包括由革兰氏阴性假单孢菌属 (*Pseudomonas*) 引起的肺部感染、慢性骨感染和涉及寄居了分支杆菌的巨噬细胞的疾病。

#### IV. 实施例

25 下列对比实施例和实施例揭示了脂质体的制备、环丙沙星-氨基酸结合物的制备和结合物进入脂质体的负载。实施例并非用来限定范围。

##### 对比实施例 1

含环丙沙星脂质体的制备和特征

30 A. 脂质体制备和负载

在 250 毫升圆底烧瓶里，通过将 661.1 毫克氢化大豆磷脂酰胆碱 (HSPC)、220.5

毫克胆甾醇和 220.5 毫克聚乙二醇衍生的二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(PEG-DSPE)溶于 10 毫升氯仿来制备有聚乙二醇包衣表面的脂质体。在减压下用闪蒸蒸发器除去氯仿直至干燥。向在烧瓶表面上的类脂薄层加入 15 毫升 250mM 硫酸铵溶液(pH5.5),通过在 60℃下剧烈振摇约 30 分钟,使类脂分散在溶液里。在 200-400psig 压力下,用不锈钢挤出室使所得的多层囊泡通过 0.4 微米孔径的 Nucleopore 的聚碳酸酯滤膜挤出 6 次,通过 0.1 微米的聚碳酸酯滤膜达 6 次,通过 0.05 微米聚碳酸酯滤膜达 3 次。挤出过程在 60℃下进行。挤出过程后的脂质体的平均直径为 100±30nm。然后在 4℃下,脂质体对 4 升 10%蔗糖渗析过夜,以除去外部的硫酸铵。

- 5  
10  
15
- 通过将环丙沙星 HCl 粉末溶于 10%蔗糖水溶液制备 40 毫克/毫升的环丙沙星贮存溶液。通过使等体积上述制备的脂质体以总类脂浓度 80 毫克/毫升与 40、20、10 或 5 毫克/毫升的环丙沙星溶液混合使活性药物负载。使混合物在 60℃下培育 30 分钟。培育后,使混合物马上在冰浴里冷却。取出等分的样品,用 Sephadex G-50 柱(1.0×19 厘米)测定药物负载的百分数。类脂/药物比为 2、4、8 和 16 的脂质体制剂中药物负载的百分数分别为 49%、75%、90%和 91%。

#### B. 体外释放环丙沙星进入血浆

- 20
- 用大鼠血浆将类脂/药物比为 8、环丙沙星负载 75% (脂质体里约 75 毫克/毫升)的脂质体制剂稀释 1/50,在 37℃下培育 24 小时。在培育结束时,0.5 毫升血浆负载到 Sepharose CL-4B 柱上。收集约 45 1-ml 组分,汇集脂质体和游离药物组分。汇集的组分用甲醇和 1N HCl 溶剂(9:1v/v)以 1:4 稀释度进行萃取。接着离心,沉淀下血浆蛋白,通过反相 HPLC,用 C-19 柱分析上清液。HPLC 流动相是 85%25mM 磷酸钠缓冲液, pH2.3 和 15%乙腈。

在 24 小时内泄漏出脂质体的环丙沙星百分数为 85%。

#### 实施例 2

- 25
- 制备甘氨酸-环丙沙星和赖氨酸-环丙沙星

#### A. 合成甘氨酸-环丙沙星和赖氨酸-环丙沙星

N-TBOC 保护的氨基酸是市售的。使化合物与等摩尔量 N-羟基琥珀酰胺和 10%过量二环己基碳化二亚胺(DCC)在二氯甲烷里反应,形成 N-羟基琥珀酰胺酯。

- 30
- 酯与 2 摩尔三乙胺和 1 摩尔无水羧基-保护的环丙沙星 HCl 在无水溶剂里反应,形成 TBOC 保护的氨基酸的环丙沙星酰胺。

环丙沙星-酰胺用三氟乙酸去保护,然后用适合于产物的物理和化学性质的方

法进行分离。例如，通过将水悬浮液的 pH 调节到 7 使结晶的结合物分离来回收 L-苏氨酸-环丙沙星。通过用 1-丁醇萃取 pH7-8 水溶液，然后用甲醇重结晶，回收 L-亮氨酸-环丙沙星结合物。通过用磷钨酸和氢氧化钡处理 L-赖氨酸-环丙沙星衍生物转化为磷钨酸盐，然后用稀硫酸处理而转化为它的硫酸盐。

5 回收的产物用质子 NMR 光谱识别证实。

#### B. 脂质体制备和负载。

如对比实施例 1 所述，通过使 585 毫克氢化的大豆磷脂酰胆碱 (HSPC)、261 毫克胆甾醇和 210 毫克 PEG-DSPE (如 Zalipsky (1995) 里揭示的那样制备) 溶解，  
10 形成具有下列组成的脂质体：50% HSPC、45% 胆甾醇和 5% mPEG-DSPE。

环丙沙星-甘氨酸和环丙沙星-赖氨酸药物结合物通过上述的远程负载以下列浓度负载入脂质体。

药物结合物	药物:类脂比 (mg/ml/mM)	类脂浓度 36mg/ml 的药物浓度	负载 %	内部脂质体药物浓度 (mg/ml)
赖氨酸-环丙沙星	2.5:50	1.825	73	13.1
甘氨酸-环丙沙星	5:50	5	75	37.5

#### C. 抗微生物活性

15 测定环丙沙星、甘氨酸-环丙沙星和赖氨酸-环丙沙星对 *S. pyrogenes*、*E. faecalis*、*S. aureus*、*E. coli* 和 *P. aeruginosa* 的抗微生物活性。通过按照国家委员会的临床实验室标准指南 (NCCLS 文件 M7-A, National Committee for Laboratory Standards, 美国宾夕法尼亚, 作为“用于需氧生长细菌的抗微生物易感性试验的稀释方法”的 1994 许可的标准) 的肉汤微稀释技术测定最小抑制浓度，其起始接种为  $5 \times 10^5$  CFU/ml。环丙沙星和甘氨酸-环丙沙星的结果如表 1 所示。  
20

#### D. 体外的血浆泄漏率

25 用大鼠血浆将含赖氨酸-环丙沙星和甘氨酸-环丙沙星的脂质体各自稀释 1/10 和 1/100, 在 37°C 下培养 24 小时。用上述对比实施例 1B 的方法测量药物-结合物

的泄漏，在培养 24 小时末，在血浆中没有检测到脂质体包封的赖氨酰-环丙沙星或脂质体包封的甘氨酰-环丙沙星的游离药物。药物从脂质体组分的回收百分数对于脂质体包封的赖氨酰-环丙沙星为 93%，对于脂质体包封的甘氨酰-环丙沙星为 100%。

5

#### E. 体内血液循环寿命

测定大鼠血浆内脂质体包封的甘氨酰-环丙沙星和脂质体-包封的环丙沙星的留存时间，16 个大鼠划分成四组，对每组 4 个动物静脉注射含 30 $\mu$ M/kg 药物的脂质体包封的甘氨酰-环丙沙星或脂质体包封的环丙沙星或游离的甘氨酰-环丙沙星或游离的环丙沙星。

从尾部静脉取出血样，通过甲醇萃取，然后 HPLC 分析测量药物在血浆里的浓度。结果如图 7 所示。

虽然本发明已根据特定的技术方案作了阐述，应当明白本技术领域的技术人员能作出各种改变和修饰而不背离本发明。

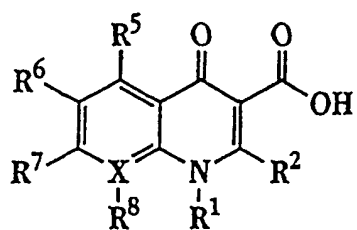


图 1A

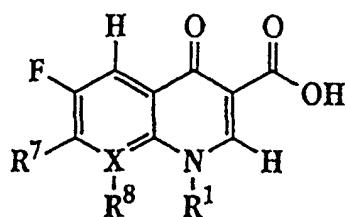


图 1B

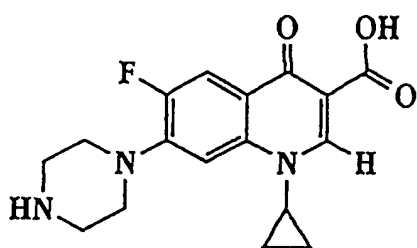


图 1C

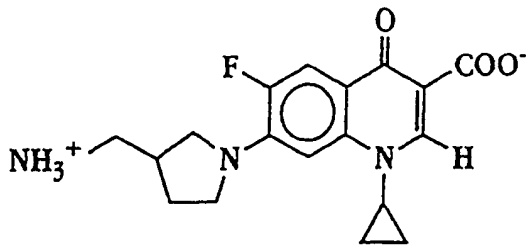


图 2A

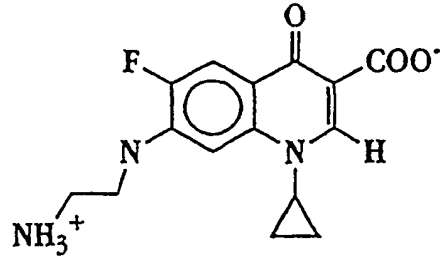


图 2B

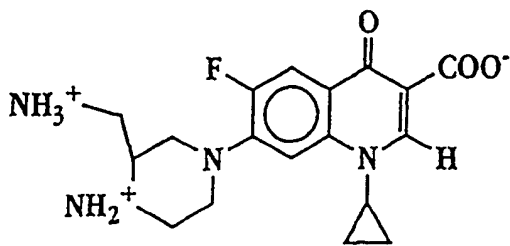


图 2C

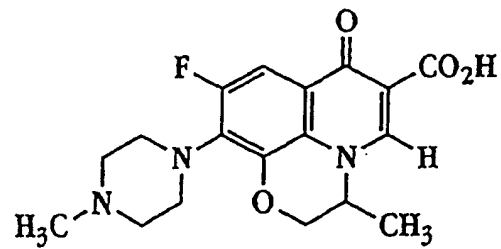


图 2D

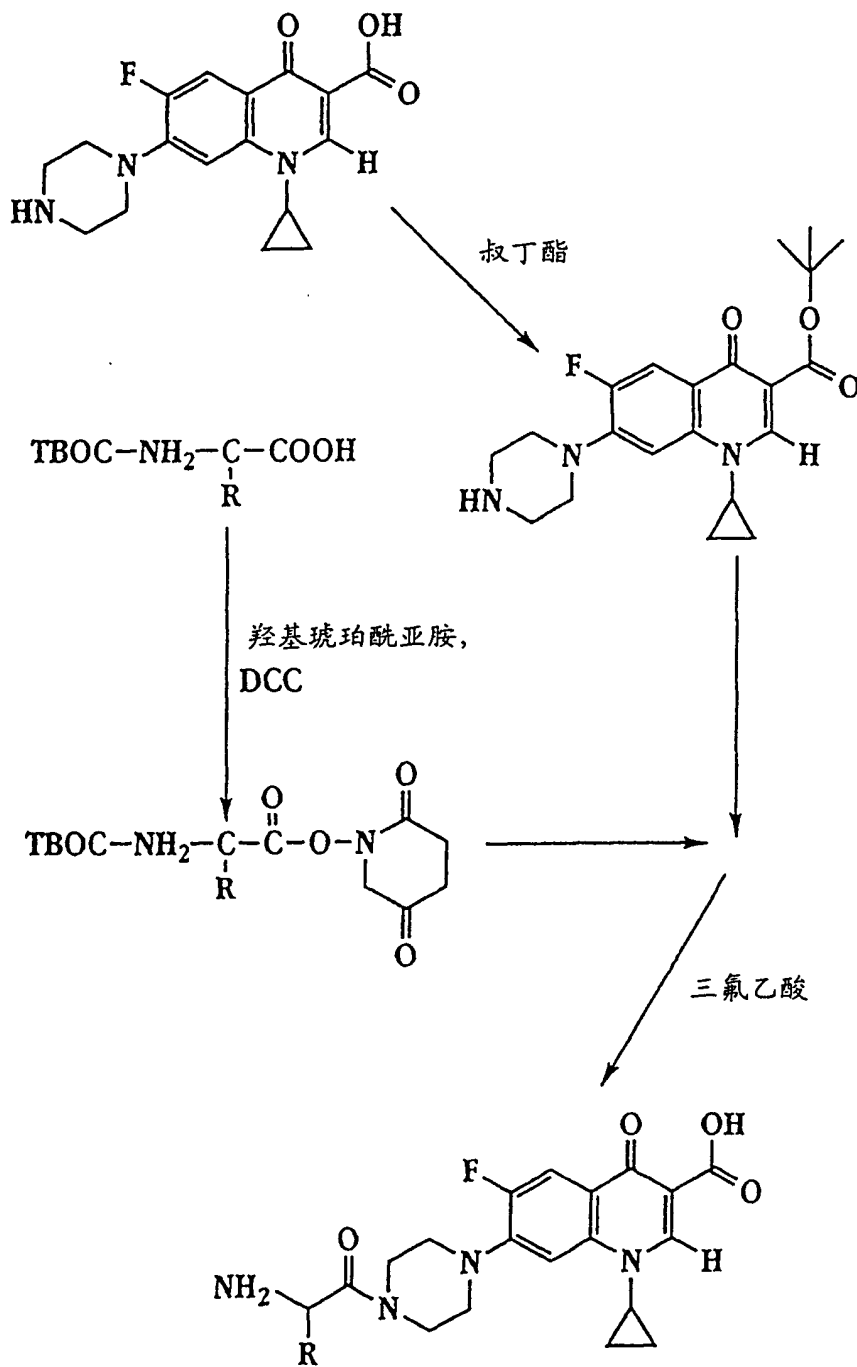


图 3

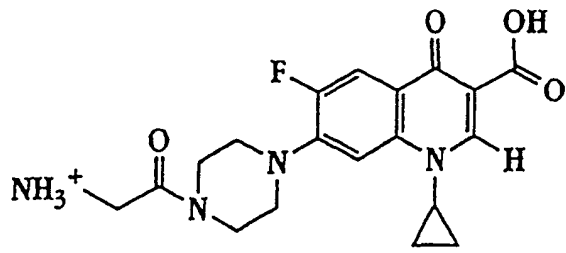


图 4A

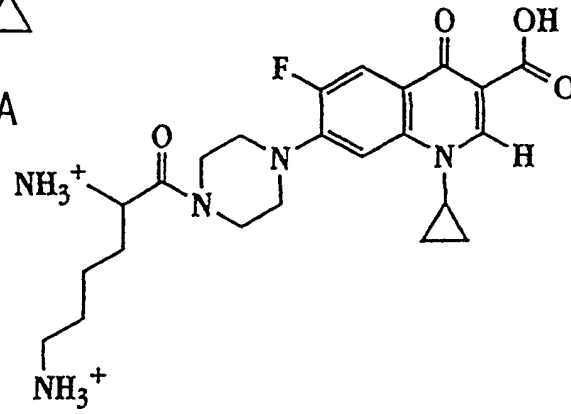


图 4B

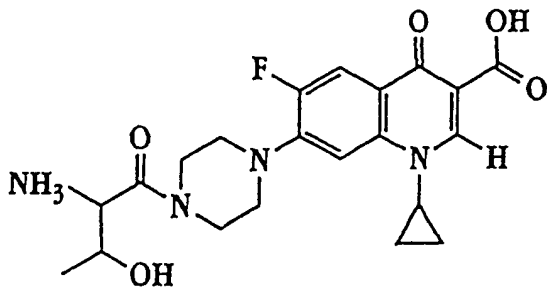


图 4C

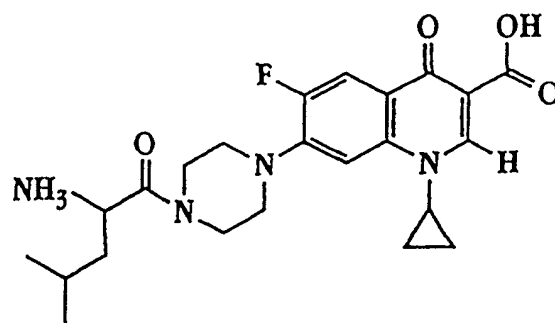


图 4D

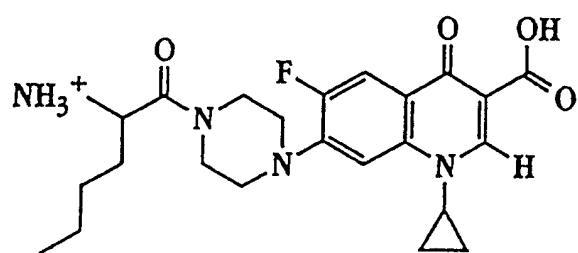


图 5A

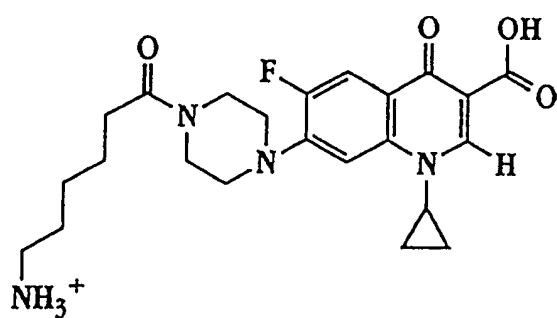


图 5B

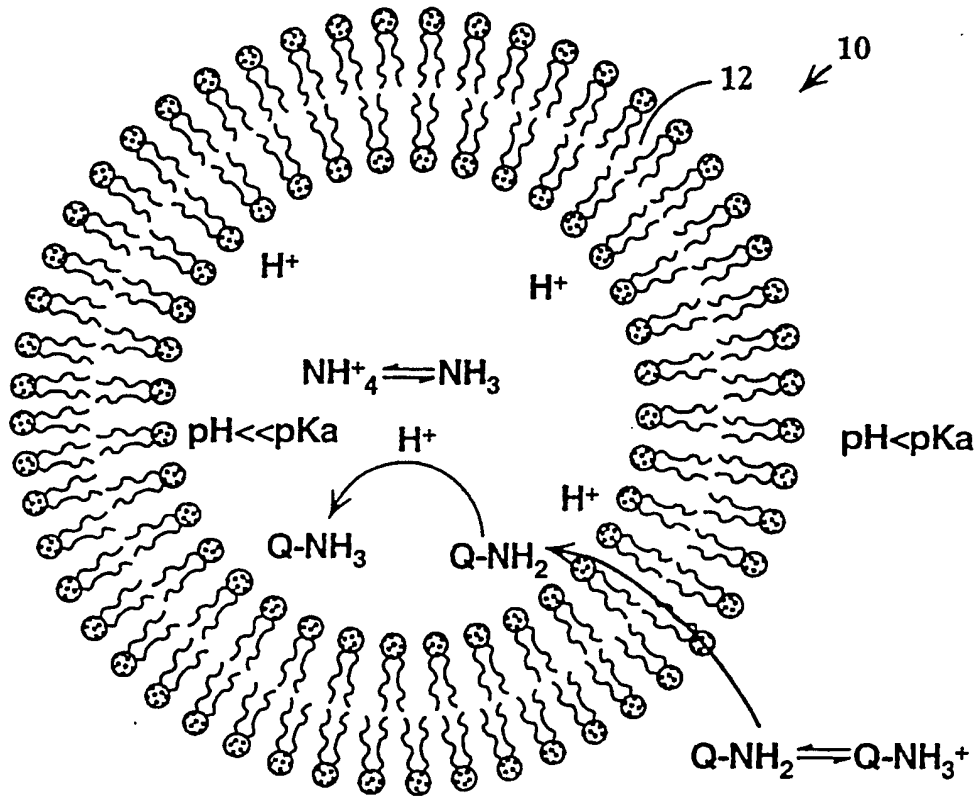


图 6

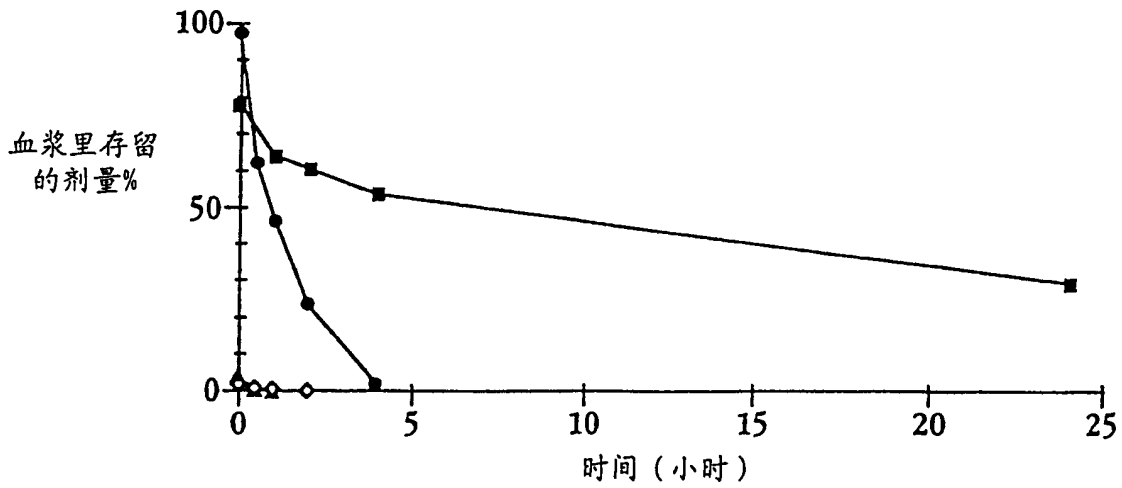


图 7