

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 31/7048 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580023366.X

[43] 公开日 2007 年 8 月 8 日

[11] 公开号 CN 101014322A

[22] 申请日 2005.6.13

[21] 申请号 200580023366.X

[30] 优先权

[32] 2004.6.11 [33] IN [31] 1113/Del/2004

[86] 国际申请 PCT/IN2005/000193 2005.6.13

[87] 国际公布 WO2005/120460 英 2005.12.22

[85] 进入国家阶段日期 2007.1.11

[71] 申请人 吉藤德拉·纳提·维玛

地址 印度哈里亚纳邦

共同申请人 莉莉·维玛

库里山·库马尔·特里帕提

[72] 发明人 吉藤德拉·纳提·维玛 莉莉·维玛

库里山·库马尔·特里帕提

[74] 专利代理机构 北京德琦知识产权代理有限公司

代理人 王 琦 王珍仙

权利要求书 1 页 说明书 7 页

[54] 发明名称

盐水中富含固醇的添加两性霉素的混合层状
脂质体及其制备方法

[57] 摘要

本发明涉及用于治疗主要是寄生虫感染，特别是由细胞内原生动物寄生虫引起的那些感染的盐水中富含固醇的添加两性霉素的混合层状脂质体。本发明进一步涉及通过在给药前声波处理该脂质体药物以增加包埋在脂质体中的药物在血液中的循环时间。

1、水性悬浮液中富含固醇的添加两性霉素的混合层状脂质体，其中用于感染治疗的两性霉素 B 的浓度为 1~15mg/ml。

2、水性悬浮液中富含固醇的添加两性霉素的混合层状脂质体，其中所述水性悬浮液含有或不含有 0.9% 的盐水。

3、根据权利要求 1 所要求的富含固醇的添加两性霉素的混合层状脂质体，其中所述固醇是含有或不含胆固醇的麦角固醇。

4、根据权利要求 2 所要求的富含固醇的添加两性霉素的混合层状脂质体，其中所述固醇与磷脂相结合。

5、根据权利要求 4 所要求的富含固醇的添加两性霉素的混合层状脂质体，其中所述磷脂是卵磷脂。

6、根据权利要求 2 所要求的富含固醇的添加两性霉素的混合层状脂质体，其中麦角固醇构成脂质体总脂类的 50%。

7、根据权利要求 1~5 任意一项所要求的富含固醇的添加两性霉素的混合层状脂质体，其中卵磷脂、麦角固醇和两性霉素 B 的比例为 5:2:1。

8、根据权利要求 1 所要求的富含固醇的添加两性霉素的混合层状脂质体，其中所述感染由包括利什曼原虫的细胞内原生动植物寄生虫引起。

9、根据权利要求 1 所要求的富含固醇的添加两性霉素的混合层状脂质体，其中在制造过程中和在给药前对所述组合物进行声波处理以增加血浆半衰期和更好的生物分布。

盐水中富含固醇的添加两性毒素的混合层状脂质体 及其制备方法

技术领域

本发明涉及盐水中富含固醇的添加两性毒素的混合层状脂质体及其制备方法。

背景技术

利什曼病由寄生在巨噬细胞中的细胞内的原生动物寄生虫杜氏利什曼原虫、婴儿利什曼原虫和恰加斯利什曼原虫引起。寄生虫传播通过被感染的雌性白蛉亚科昆虫的叮咬而产生。当白蛉从携带有寄生虫的寄主那里吸了血后便获得了感染的血液。人类可患具有不同临床表现的四种形式的利什曼病。在这些不同的形式中，内脏利什曼病（VL），也就是所说的黑热病，是最严重的，如果不治疗其死亡率几乎为 100%。发烧的频繁发作、体重减轻、伴随贫血的肝脾肥大是内脏利什曼病的典型病征和症状。

两性霉素 B 是一种由土壤菌、链霉菌产生的多烯类抗生素。两性霉素 B 是自二十世纪五十年代发现以来被认为是最有潜力的抗真菌药。随后还发现它能够有效治疗黑热病（Trans Royal Soc. Trop. Med. Hyg, 1963; 57: 266-268）。

与通常所用的最优良的药物，即：锍酰葡萄糖酸钠和戊烷脒惊人的耐性事件不同，两性霉素 B 没有耐药性的问题（CP Thakur *et.al*, 1993, The National Medical Journal of India: 6: 57-60 和 CP Thakur *et.al*, 1993, Indian Journal of Medical Research; 97: 170-175）。两性霉素 B 除了是一种有效的抗利什曼原虫药物外，由于其注射相关的不良影响和毒性，主要是肾毒性、心脏毒性和神经毒性，因此仅被谨慎地用作二线药物。因为没有其它药物可以替代两性霉素 B 的广普性和效力，因此可以理解，各种方案已进行了实验，并且甚至

进行了取得有限成功的实践以克服两性霉素 B 的药剂相关的毒性。

因为是最不科学的、不清楚的和不可接受的不一致，因此极少实践来克服两性霉素 B 相关的毒性的方法是加热、冷却，然后服用传统的两性霉素 B。已经进行临床试验来评价将英脱利匹特（Intralipid，静脉注射脂类悬浮液）与传统的两性霉素 B 相结合作为两性霉素 B 真正脂类配方的替代品的优点（Dupont B. 2002, *J. Antimicrobial Chemotherapy*; 49, Suppl. S1, 31-36）。

在对 82 名儿童单独使用两性霉素 B 脱氧胆酸悬浮液和使用其与英脱利匹特的混合物的这样的对比研究中，没有发现混合物在提高两性霉素 B 的安全性或耐受性上有好处（Nath, CE *et. al.* 1999, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 43: 1417-1423）。在另一个对成人患者的研究中，两性霉素 B 的两种形式被对比评价，观察揭示在肾毒性方面在给予有或没有英脱利匹特的两性霉素 B 的各组中没有显著的不同（Nucci, M *et. al.* 1999, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 43: 1445-1448）。

英脱利匹特混合物除了缺乏优点外，与两性霉素 B - 英脱利匹特混合物的给药相关的方面还存在显著问题。这些问题是：较低的治疗活性、肝功能异常、胆汁淤积和肺毒性（Deray, G. 2002, *J. Antimicrobial Chemotherapy*; 49, Suppl. S1, 37-41）。

另外，另一种通常考虑减少两性霉素 B 的毒性作用的替代方法是以较慢的速率注射。虽然预期的研究推断，较慢的注射速率不能降低两性霉素 B 的毒性（Ellis, M.E. 1992, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 36: 172-179），但在肾机能不全的患者中，建议避免快速注射以克服严重的高血钾病和潜在的致命的心率失常（Bell, N.H. *et. al.* 1962, *American Journal of Medicine*; 340:64-69 和 Craven P.C. 1985, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 27:868-871）。两性霉素 B 的毒性如此关键以至于虽有十分有限的和增长的优点，缓慢注射两性霉素 B 的所有配方也已成为标准的作法。

然而，两性霉素 B 的不良影响已经通过两性霉素 B 的脂类配方被成功克服（Sunder S and Murray HW, 1996; 173: 762-765 和 Seaman *et. al.* 1995; 21:

188-193)。脂质体两性霉素 B 是目前确定的最有效和安全的药物, 该药物也没有耐药性的问题。

用来治疗心脏利什曼病的两性霉素 B 的脂质体制剂的关键的适用性源自若干因素, 这些因素包括例如利什曼原虫存在于诸如巨噬细胞的清除细胞中, 脂质体快速地被巨噬细胞吸收, 两性霉素 B 是有效的抗利什曼病的药物和两性霉素 B 可配制成脂质体制剂。所有这些因素都促进脂质体两性霉素 B 靶向输送到理想的抗寄生虫的作用位点, 并降低两性霉素 B 的毒性。另外, 脂质体通过将含大量药物分子的包裹聚集到输送到作用位点的每个脂质体颗粒中而提供放大作用 (Gregoriadis G, 1995. Engineering liposomes for drug delivery: Progress and Problems. TIBTECH; 13: 527-537)。通过在脂质体中包埋两性霉素 B 对毒性的阻止使脂质体的两性霉素 B 成为治疗心脏利什曼病的最佳选择。

使治疗全身性真菌病配方的两性霉素 B 的毒性最小化的关键脂类成份是固醇。在可用于配方的固醇中, 胆固醇、胆固醇琥珀酸盐、胆固醇硫酸盐已用于试验和/或商品化的两性霉素 B 脂类制剂中。已报道, 包括含有特定磷脂的麦角固醇的两性霉素 B 的配方引起体外红细胞的溶胞, 因而认为是不适合的 (Mehta, R. *et. al.* 1984, Biochimica et Biophysica Acta; 770:230-234)。

有限数量的磷脂结合物和麦角固醇的不成功的尝试阻止了开发含麦角固醇的两性霉素 B 配方的进一步努力 (New, P.R.C. *et. al.* 1981, J. Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 8: 371-381 和 Graybill, J.R. *et. al.* 1982, J. Infectious Diseases; 145: 748-752)。

两性霉素 B 的细胞溶解作用通过两性霉素 B 与细胞中固醇的相互作用完成。与胆固醇, 一种存在于哺乳动物细胞膜中的固醇相比, 该药物与引起寄生虫利什曼原虫的黑热病中的麦角固醇和麦角固醇的前体 (Meyerhoff, A. 1999, Clinical Infectious Diseases; 28: 42-48) 有更强的亲合力, 其中麦角固醇是一种真菌细胞膜的主要成份 (Szoka, F.C. and Tang, M. 1993, J. Liposome Research; 3: 363-375)。在细胞膜中两性霉素 B 与固醇的结合导致孔洞的形

成,从而引起该药物的细胞溶解作用。治疗的抗微生物的作用和对哺乳动物细胞的毒性作用均由该相同的机制引起。

为了通过以病原体为目标和对哺乳动物宿主的回避而获得对宿主细胞毒性的降低,含胆固醇的脂质体作为以甚至高至 15 毫克/公斤体重/天的剂量的攻击性治疗来治疗全身性真菌病的惟一策略出现。对于这样的攻击性治疗,似乎更好的方法是给予更高浓度两性霉素 B 的配方。对浓缩的两性霉素 B 制剂预期毒性的明显考虑已将全部两性霉素 B 制剂限制为 1mg/ml,并建议缓慢注射。

对于以脂质体的两性霉素 B 治疗由寄生在巨噬细胞中的细胞内寄生虫引起的利什曼病来说,对两性霉素 B 的这种考虑应该更重要。已知脂质体可被快速吞噬到巨噬细胞中,并将显著导致被脂质体包埋的两性霉素 B 在巨噬细胞中聚集。配制具有较高浓度的两性霉素 B 的脂质体而不引起毒性需要对策,目前为止这样的对策还没有报道。

理解固醇的合成对于合理设计用脂质体两性霉素 B 快速、有效和特异的治疗利什曼病是重要的。脂类占利什曼原虫细胞干重的 15% (Meyer and Ilolz, 1966, J. Biol. Chem. 24: 5000-5007)。脂类的代谢对于若干极重要的生理过程是至关重要的,并影响到寄生虫的生存。麦角固醇或其前体(episterol)是由乙酰辅酶 A 到 E (evalonate)到 S (Squalene)到羊毛固醇随后通过另外四个步骤最终得到麦角固醇 (Coppens and Courtoy. 1995, Mol. Biochem. Parasitol. 73, 179-188 和美国专利 No. 6,403,576B1)。

应适当注意,利什曼原虫需要胆固醇为其给养,并通过从其宿主巨噬细胞中废物利用胆固醇来满足其需要。有效的药物设计应谨慎地涉及通过不满足利什曼原虫的胆固醇需求而使其不能生存。

网状内皮组织细胞的吞噬细胞作用对含胆固醇的脂质体的输送在一定程度上消除了利什曼原虫寄居的巨噬细胞中两性霉素 B 靶向输送的益处。

在较短的期间服用 20~21mg 的两性霉素 B 也导致在糖尿病患者中不期望的蔗糖摄入。已知含有 0.9%氯化钠的传统两性霉素 B 的混合物导致两性

霉素 B 的沉淀 (Martindale, 315 页)。此外, 也报道单糖和二糖, 例如葡萄糖、甘露醇、海藻糖、蔗糖和乳糖, 能使脂质体的配方稳定 (美国专利 No. 5,180,713)。这些观察反驳了用氯化钠溶液作为脂质体两性霉素 B 的悬浮液的做法, 并且用法说明建议不使用盐水 (AmBisome 产品信息)。

发明内容

本发明的主要目的是提供一种盐水中富含固醇的添加两性霉素的混合层状脂质体, 通过脂质体两性霉素 B 的靶向输送从而降低两性霉素 B 的毒性而用于感染的治疗。

本发明的另一个目的是制备胆固醇被适当替代的脂质体两性霉素 B。胆固醇通常用于防止脂质体的药物/疫苗的泄漏, 对于两性霉素 B 配方的情况, 胆固醇用于导向目标和使药物毒性最小化。然而, 胆固醇在宿主体内支持利什曼原虫的生存, 因此不应该作为配方的组份。

本发明的再一个目的是将更高浓度的两性霉素 B 输送到靶区域而不引起毒性。

本发明的另一个目的是在给药前对脂质体的药物进行声波处理, 以增加脂质体药物血浆半衰期来促进在体内更好的生物分布。

本发明的再一个目的是提供一种含有脂质体两性霉素 B 的无糖组合物, 因此能自由地用于糖尿病人。

为实现上述目的, 本发明提供在 0.9% 的盐水中富含固醇的添加两性霉素的混合层状脂质体, 其中用于感染治疗的两性霉素 B 的浓度是 1~15mg/ml。在脂质体中两性霉素 B 的浓度是高的。

所述固醇是含有或不含胆固醇的麦角固醇。所述固醇与磷脂结合。所述磷脂是卵磷脂。所述麦角固醇构成脂质体总脂类的 50%。一个实施例的卵磷脂、麦角固醇和两性霉素 B 的优选比例是 5:2:1。

给药前的声波处理增加血浆半衰期并提供更好的生物分布。

具体实施方式

脂质体，特别是固醇的脂类成份的选择是挑剔的，以谨慎设计十分有效的和安全的抗利什曼病的药物。包含合适的固醇必须能够防止脂质体两性霉素 B 结合到哺乳动物宿主细胞。通过吞噬细胞对含胆固醇的脂质体两性霉素 B 的摄取，胆固醇在利什曼原虫寄居的巨噬细胞中的输送消除了两性霉素 B 靶向输送的最优的益处。而在脂质体中麦角固醇与特定脂类结合的其它固醇的选择，如上所述已显示引起体外红细胞毒性。本发明旨在设计不含胆固醇，含有合适固醇的脂质体两性霉素 B。

发现麦角固醇适于配制能安全并十分有效地抗诸如利什曼原虫之类感染的脂质体两性霉素 B，其中所述麦角固醇可以含有胆固醇也可以不含，并在一定比率范围内与诸如卵磷脂之类的磷脂结合而不管磷脂的脂肪酸成份是合成的或是天然来源，如来源于大豆。所用两性霉素 B 的浓度范围在最终制剂中为 1~15mg/ml。脂类，即磷脂，优选为卵磷脂和麦角固醇，其所用的比率为麦角固醇构成脂质体配方的总脂类的 50 摩尔 %。例如，一个优选的配方为在水介质中 PC（卵磷脂）：麦角固醇：两性霉素 B 的摩尔比为 5:2:1。

文献很好地证明两性霉素 B 在盐水中沉淀。两性霉素 B 在以上所述的磷脂的脂质体组合物中是稳定的，并且即使经过长期贮存也没有沉淀发生。本发明允许以右旋糖替代盐水，其中可以有缓冲液也可以没有。一个优选的实施例是用 0.9% 的氯化钠作为脂质体两性霉素 B 的悬浮液。这样的脂质体配方在悬浮液中或在冻干后贮存时都是稳定的。

或者，冻干的脂质体两性霉素 B 可以在诸如 0.9% 氯化钠的水溶液中重新配制。

说明制备脂质体两性霉素 B 的过程，但不限于以下的实施例。

脂质体可以通过多种方法来生产，这些方法可以单独使用也可结合使用（Szoka, F. Jr. 和 Papahadjopoulos, D., 1980. Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9: 467-508）。

实施例 1. 蒸发脂质体组份的甲醇溶液获得该组份的膜。这个膜用水溶液水合，并通过把所述膜相互避开（sheering）而获得多层状的脂质体。

实施例 2. 脂质体组份的甲醇溶液进行喷雾干燥，然后水合，并在选择的水介质中重新配制以获得混合的层状的脂质体制剂。

实施 3. 蒸发脂质体组份的甲醇溶液获得该组份的膜，加入选择的水介质，然后进行声波处理得到主要为单层状的脂质体制剂。

生物治疗的性质

具有较高脂质体浓度的麦角固醇-PC 脂质体可被很好地耐受，并发现在慢性和急性毒性方面都是安全的。这些具有高至 15mg/ml 两性霉素 B 的脂质体配方的制剂可以被服用而没有任何与注射有关的不良影响。这些配方的 LD₅₀ 高于已报道的胆固醇-PC 脂质体两性霉素 B。

中毒性肾损害通过在服用该药物后的不同时间段测量血清中肌酸酐的值而被检测。血清肌酸酐的值在高至利什曼病完全治疗所需的完全剂量，即每公斤体重 21mg 下给药明显保持不变。

在此报告，采用任何浓缩的包埋的两性霉素 B 麦角固醇-PC 脂质体以脂质体中含 21mg 的两性霉素 B 给药后，利什曼原虫完全被清除。仅在各别情况下，需要给予额外剂量的脂质体两性霉素 B 以完全清除寄生虫。

为支持该发现，采用本文描述的方法制备本发明的固醇组合物，对小鼠进行了耐受性研究。高至 10mg/ml 的更高浓度的两性霉素 B 被服用。耐受性研究显示，在该用于脂质体配方的麦角固醇中以 100mg 两性霉素 B/kg 为单剂量可被很好的耐受。

参考文献

Nath, CE et. al. 1999, Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 43: 1417-1423

Ellis, M.E. 1992, Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 36: 172-179

Bell, N.H. et. al. 1962, American Journal of Medicine; 340: 64-69

Craven P.C. 1985, Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 27: 868-871