



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105050409 B

(45)授权公告日 2018.05.25

(21)申请号 201380051033.2

(22)申请日 2013.07.30

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105050409 A

(43)申请公布日 2015.11.11

(30)优先权数据
61/677414 2012.07.30 US
61/835825 2013.06.17 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.03.30

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2013/052756 2013.07.30

(87)PCT国际申请的公布数据
W02014/022414 EN 2014.02.06

(73)专利权人 马丁尼斯生物制药纳米技术公司
地址 美国新泽西州
专利权人 新泽西州州立大学(拉特格斯)

(72)发明人 R.曼尼诺 R.卢

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 赵胜宝 吕彩霞

(51)Int.Cl.
A61K 31/12(2006.01)
A61K 9/19(2006.01)
A61K 47/24(2006.01)
A61K 33/06(2006.01)
A61K 45/06(2006.01)

(56)对比文件
US 2005008686 A1, 2005.01.13,
US 2005008686 A1, 2005.01.13,
US 2003219473 A1, 2003.11.27,
US 4663161 A, 1987.05.05,
WO 2004037271 A1, 2004.05.06,
WO 2004064805 A1, 2004.08.05,
US 2005013855 A1, 2005.01.20,
WO 2004041247 A2, 2004.05.21,

审查员 赵雪

权利要求书2页 说明书15页 附图11页

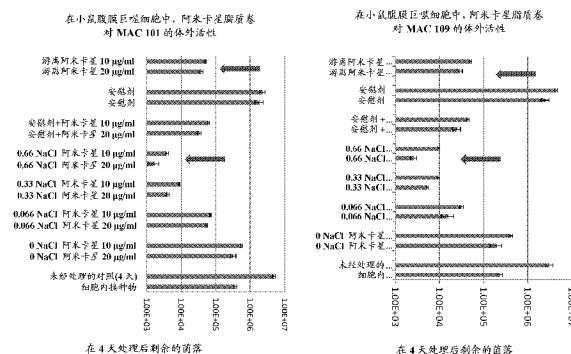
(54)发明名称

使用大豆磷脂酰丝氨酸制备的脂质卷

(57)摘要

未纯化的或低纯的大豆磷脂酰丝氨酸用于制备脂质卷。所述脂质卷含有约40-74%大豆磷脂酰丝氨酸、多价阳离子和生物活性剂。一种优选的脂质卷含有抗真菌药物两性霉素B。

阿米卡星脂质卷体外活性



1. 一种脂质卷,所述脂质卷包含:
基于大豆的磷脂,该磷脂含量为所述脂质卷的脂肪组分的45-55重量%的大豆磷脂酰丝氨酸,
多价阳离子,和
生物活性剂,其中所述生物活性剂选自两性霉素B、姜黄素、阿米卡星、庆大霉素和巴龙霉素。
2. 权利要求1的脂质卷,其还包含磷脂酸。
3. 权利要求2的脂质卷,其中所述生物活性剂为阿米卡星。
4. 权利要求1-3中任一项的脂质卷,其中所述多价阳离子为Ca⁺⁺、Zn⁺⁺、Ba⁺⁺或Mg⁺⁺。
5. 权利要求1-3中任一项的脂质卷,其中所述多价阳离子为Ca⁺⁺。
6. 权利要求1的脂质卷,其中所述生物活性剂为两性霉素B。
7. 权利要求1的脂质卷,其中所述生物活性剂为姜黄素。
8. 权利要求1-3中任一项的脂质卷,其中所述脂质卷还包含胆汁盐。
9. 权利要求8的脂质卷,其中基于大豆的磷脂与胆汁盐的重量比为20:1-0.5:1。
10. 权利要求9的脂质卷,其中基于大豆的磷脂与胆汁盐的重量比为10:1-3:1。
11. 一种用于制备包括基于大豆的磷脂酰丝氨酸和生物活性剂的脂质卷的方法,所述方法包括以下步骤:
 - a. 在含水介质中制备脂质体,其中所述脂质体具有(i) 脂质双层,其含量为脂质双层的45-55重量%的大豆磷脂酰丝氨酸和(ii) 生物活性剂的载荷,所述生物活性剂选自两性霉素B、姜黄素、阿米卡星、庆大霉素和巴龙霉素;
 - b. 向(a)的脂质体的悬浮液中加入多价阳离子,以形成包括大豆磷脂酰丝氨酸和生物活性剂的脂质卷;和
 - c. 收集包括基于大豆的磷脂酰丝氨酸和生物活性剂的脂质卷。
12. 权利要求11的方法,其中步骤(a)得到的含水介质为pH为6.5-7.5的缓冲的环境,并且在加入到脂质体之前,所述生物活性剂的载荷在pH 10或更高。
13. 权利要求12的方法,其中所述脂质体的悬浮液被磷酸盐缓冲。
14. 权利要求11-13中任一项的方法,其中所述多价阳离子为Ca⁺⁺、Zn⁺⁺、Ba⁺⁺或Mg⁺⁺。
15. 权利要求11-13中任一项的方法,其中所述多价阳离子为Ca⁺⁺。
16. 权利要求11-13中任一项的方法,其中所述生物活性剂为两性霉素B。
17. 权利要求11-13中任一项的方法,其中所述生物活性剂为姜黄素。
18. 权利要求11-13中任一项的方法,其中所述生物活性剂为阿米卡星。
19. 权利要求11-13中任一项的方法,其中所述脂质双层与所述生物活性剂的重量比为3:1-20:1。
20. 权利要求11-13中任一项的方法,其中所述方法还包括在步骤(b)之前将胆汁盐加入到(a)的脂质体的悬浮液或在步骤(b)之后将胆汁盐加入到包括基于大豆的磷脂酰丝氨酸和生物活性剂的脂质卷的步骤,其中所述脂质双层与所述胆汁盐的重量比为20:1-0.5:1。
21. 权利要求20的方法,其中所述脂质双层与所述胆汁盐的重量比为10:1-3:1。
22. 杀真菌有效量的脂质卷在制备用于治疗患有真菌感染的患者的药物中的用途,所

述脂质卷包含(i)含量为所述脂质卷的脂肪组分的45-55重量%的大豆磷脂酰丝氨酸的基于大豆的磷脂、(ii)多价阳离子和(iii)抗真菌药物,其中所述抗真菌药物为两性霉素B。

23. 杀细菌有效量的脂质卷在制备用于治疗患有细菌感染的患者的药物中的用途,所述脂质卷包含(i)含量为所述脂质卷的脂肪组分的45-55重量%的大豆磷脂酰丝氨酸的基于大豆的磷脂、(ii)多价阳离子和(iii)抗生素药物,其中所述抗生素药物为阿米卡星。

24. 权利要求1-3、6、和7中任一项的脂质卷,其中所述基于大豆的磷脂含量为所述脂质卷的脂肪组分的50重量%的大豆磷脂酰丝氨酸。

25. 权利要求11-13中任一项的方法,其中所述基于大豆的磷脂含量为所述脂质卷的脂肪组分的50重量%的大豆磷脂酰丝氨酸。

26. 权利要求22-23中任一项的用途,其中所述基于大豆的磷脂含量为所述脂质卷的脂肪组分的50重量%的大豆磷脂酰丝氨酸。

27. 权利要求1的脂质卷,其中所述生物活性剂在含水介质中为亲水的。

28. 权利要求11的方法,其中所述生物活性剂在含水介质中为亲水的。

使用大豆磷脂酰丝氨酸制备的脂质卷

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2012年7月30日提交的美国临时申请号61/677,414和2013年6月17日提交的美国临时申请号61/835,825的优先权,每一个前面提及的申请通过引用而全文结合到本文中。

发明领域

[0003] 本发明涉及未纯化的或低纯度(40-74重量%)基于大豆的磷脂酰丝氨酸(PS)制备脂质卷(cochleates)的能力、由基于大豆的PS制备药物-脂质卷的方法和该药物-负载的脂质卷作为药物治疗的用途。

[0004] 发明背景

[0005] 脂质卷递送媒介物为用于递送宽范围的生物活性治疗产品的基于广阔的技术。脂质卷递送媒介物为包含简单的天然存在的材料(例如,磷脂酰丝氨酸和钙)的稳定的磷脂-阳离子沉淀物。

[0006] 脂质卷的双层结构提供保护免于缔合的或“卷成螺旋形的(encochleated)”分子的降解。由于整个脂质卷结构为一系列固体层,脂质卷结构内部中的组分保持基本上完整,即使脂质卷的外层可能暴露于苛刻的环境条件或酶。这包括保护免于在胃中消化。

[0007] 利用这些独特的性质,脂质卷已用于调节和增强广谱的重要但是难以配制生物药物的口服生物利用度,包括水溶解度差的化合物、蛋白质和肽药物和大的亲水分子。例如已实现两性霉素B、DNA疫苗和基因疗法的大的DNA构造/质粒、肽制剂和抗生素(例如氯法齐明)的脂质卷-介导的口服递送。

[0008] 脂质卷可在含有阳离子的缓冲液中储存,或者冻干为粉末,在室温下储存,以及在给予前用液体重新组成。冻干对脂质卷形态学或功能不具有不利地影响。脂质卷制剂已显示在含有阳离子的缓冲液中在4°C下稳定多于两年,在室温下作为冻干的粉末稳定至少一年。

[0009] 脂质卷可通过若干方法制备,例如捕集或水凝胶方法(国际申请公布号WO 03/082209,其通过引用而全文结合到本文中)。

[0010] 大豆PS在健康食物储存中作为营养补充剂而销售。未纯化的(40%) PS已作为营养补充剂使用和研究并且作为在老年人中对增强脑功能具有有益效果的组分(Villardita C等人,*Clin. Trials J.* 24,1987,84-93)。

[0011] 虽然未纯化的大豆PS(NSPS)已销售并且对患者进行研究,但是NSPS(或低纯度PS)从未用于制备脂质卷和使用这些脂质卷来递送药物。如在WO 03/082209中先前公开的,NSPS不形成脂质卷,并且需要纯化过程来增强在PS的内含物中的NSPS,直至达到至少约75重量%的PS,这种百分数允许形成脂质卷。

[0012] 发明概述

[0013] 已经意外地发现,NSPS或低纯度基于大豆的PS(40-74重量%)仍可形成脂质卷。

[0014] 简要地,根据本发明,改进的基于脂质的脂质卷通过使用未纯化的或低纯度大豆

磷脂酰丝氨酸作为脂质来源而制备。改进的脂质卷含有其量为脂质的约40%–74%（优选45–70%，更优选45–55%）重量的大豆磷脂酰丝氨酸。改进的脂质卷可为空的或负载的脂质卷。负载的脂质卷可含有任何生物活性剂或生物活性剂的组合，例如，蛋白质、小的肽、多核苷酸、氨基糖苷类药物、抗病毒药物、麻醉剂、抗生素、抗真菌药物、抗癌药物、免疫抑制剂、甾体抗炎药、非甾体抗炎药、镇静剂、营养补充剂、草本植物产物、维生素或血管扩张药物。在实践本发明中特别关注的是，抗真菌药物或抗生素药物在本发明的基于大豆的磷脂酰丝氨酸脂质卷中负载，以提供具有降低的毒性的成本有效的和改进的抗真菌药物/抗生素药物。优选的抗真菌药物包括两性霉素-B和制霉菌素。优选的抗生素药物包括氨基糖苷类药物和阿米卡星。

[0015] 本发明的改进的基于脂质的脂质卷可通过以下方法制备：该方法包括以下步骤：

(a) 在含水介质中制备脂质体，其中所述脂质体具有 (i) 包含其量为脂质双层的约40%–74%（优选45–70%，更优选45–55%）重量的基于大豆的磷脂酰丝氨酸的脂质双层和 (ii) 生物活性剂的载荷；(b) 向 (a) 的脂质体的悬浮液中加入多价阳离子，以形成大豆磷脂酰丝氨酸/生物活性剂脂质卷；和 (c) 收集基于大豆的磷脂酰丝氨酸/生物活性剂脂质卷。

[0016] 本发明还教导大豆磷脂酰丝氨酸/生物活性剂脂质卷可给予患有真菌感染或患有细菌感染的患者。本发明的大豆磷脂酰丝氨酸/生物活性剂脂质卷方便地口服给予，甚至在治疗免疫危及的患者的全身真菌感染时。本发明的磷脂酰丝氨酸/生物活性剂脂质卷还通过肠胃外或通过其它给予方式而给予。优选的生物活性剂为两性霉素-B、姜黄素和阿米卡星。

[0017] 附图简述

[0018] 图1显示在小鼠腹膜巨噬细胞中，阿米卡星脂质卷对MAC 101和MAC 109的体外研究。

[0019] 图2显示在MAC 101感染的小鼠模型中，IP-递送阿米卡星脂质卷的体内效力。

[0020] 图3显示在MAC 101感染的小鼠模型中，口服递送阿米卡星脂质卷的体内效力。

[0021] 图4显示庆大霉素卷成螺旋形，与PS性质相关。

[0022] 图5显示阿米卡星胆汁盐的卷成螺旋形功效，与PS性质相关。

[0023] 图6显示阿米卡星胆汁盐的卷成螺旋形功效，与PS性质相关。

[0024] 图7显示庆大霉素胆汁盐的卷成螺旋形功效，与PS性质相关。

[0025] 图8显示庆大霉素胆汁盐的卷成螺旋形功效，与PS性质相关。

[0026] 图9显示巴龙霉素胆汁盐的卷成螺旋形功效，与PS性质相关。

[0027] 图10显示巴龙霉素胆汁盐的卷成螺旋形功效，与PS性质相关。

[0028] 图11显示巴龙霉素胆汁盐的卷成螺旋形功效，与PS性质相关。

[0029] 发明详述

[0030] 当在本文中使用时，以下术语具有以下给出的定义。

[0031] “脂质卷”为可为空的或负载的稳定的磷脂-阳离子沉淀物。

[0032] “空的脂质卷”为仅包含磷脂和阳离子的脂质卷。

[0033] “负载的脂质卷”为在磷脂-阳离子结构内具有一种或多种生物活性化合物的脂质卷。

[0034] “大豆磷脂酰丝氨酸”或“基于大豆的磷脂酰丝氨酸”为衍生自基于大豆的组合物

的磷脂酰丝氨酸。

[0035] 在实践本发明中,通过使用其量为脂质卷的脂质组分的40%-74重量%的大豆磷脂酰丝氨酸,制备改进的基于磷脂的脂质卷。或者,大豆磷脂酰丝氨酸可为脂质卷的脂质组分重量的约40%、45%、50%、55%、60%、65%或70%,或其任何增加的值。应理解的是,在这些值和范围之间的所有值和范围打算包括在本发明中。在一个优选的实施方案中,磷脂包含45-70%大豆磷脂酰丝氨酸。在一个更优选的实施方案中,磷脂包含45-55%大豆磷脂酰丝氨酸。

[0036] 当在目前改进的脂质卷中除了磷脂酰丝氨酸以外还存在另外的磷脂时,磷脂酸为一种优选的磷脂。除了磷脂酸以外,可用于目前改进的脂质卷的其它磷脂包括磷脂酰胆碱、磷脂酰肌醇和磷脂酰甘油。另外的磷脂的混合物也可与大豆磷脂酰丝氨酸组合使用。

[0037] 大豆磷脂酰丝氨酸原料为市售可得的,或者根据公知的和标准的纯化技术,可由若干大豆磷脂的混合物的大豆磷脂组合物纯化。

[0038] 任何多价化合物可用于从脂质体原料沉淀脂质卷。优选多价化合物为二价阳离子,例如 Ca^{++} 、 Zn^{++} 、 Ba^{++} 和 Mg^{++} 。这些阳离子的优选的来源包括钙、锌、钡和镁的氯化物盐。 CaCl_2 为二价阳离子的特别优选的来源。

[0039] 在一个实施方案中,本发明的大豆磷脂酰丝氨酸脂质卷还可包含胆汁盐。基于大豆的磷脂与胆汁盐的重量比为20:1-0.5:1,优选10:1-3:1。

[0040] 胆汁盐为与阳离子(通常为钠)化合的胆汁酸。胆汁酸为主要在哺乳动物的胆汁中发现的甾体酸。胆汁盐为市售可得的(例如,Sigma -Aldrich目录#48305 Fluka胆汁酸钠盐,~50%脱氧胆汁酸钠盐,~50%)。

[0041] 已经意外地发现,加入胆汁盐增强大豆磷脂酰丝氨酸脂质卷的卷成螺旋形功效。例如,包括胆汁盐,比起含有至少约75%大豆磷脂酰丝氨酸的脂质卷,本发明的大豆磷脂酰丝氨酸脂质卷(例如,使用50%大豆PS)在卷成螺旋形方面更有效。

[0042] 在一个实施方案中,本发明的大豆磷脂酰丝氨酸脂质卷通过以下方法制备,该方法包括以下步骤:

[0043] a. 在含水介质中制备脂质体,其中所述脂质体具有(i) 包含其量为脂质双层的约40%-74% (优选45-70%,更优选45-55%)重量的基于大豆的磷脂酰丝氨酸的脂质双层和(ii) 生物活性剂的载荷;

[0044] b. 向(a)的脂质体的悬浮液中加入多价阳离子,以形成大豆磷脂酰丝氨酸/生物活性剂脂质卷;和

[0045] c. 收集基于大豆的磷脂酰丝氨酸/生物活性剂脂质卷。

[0046] 在一个实施方案中,所述含有脂质体的悬浮液的含水介质为pH为6.5-7.5的缓冲的环境,并且在加入到脂质体之前,所述生物活性剂的载荷在pH 10或更高。在一个优选的实施方案中,脂质体的悬浮液被磷酸盐缓冲。

[0047] 在另一实施方案中,所述方法还包括在步骤(b)之前将胆汁盐加入到(a)的脂质体的悬浮液或在步骤(b)之后将胆汁盐加入到基于大豆的磷脂酰丝氨酸/生物活性剂脂质卷的步骤,其中所述脂质双层与所述胆汁盐的重量比为20:1-0.5:1,优选10:1-3:1。

[0048] 本发明提供一种晶洞状(geodate)组合物,所述组合物含有(1) 围绕疏水结构域布置的包括包含约40%-74% (优选45-70%,更优选45-55%)重量大豆磷脂酰丝氨酸的基于大豆的磷脂的脂质单层;和(2) 围绕脂质单层布置的脂质层,其中所述脂质层包含包含二价

阳离子的阳离子层和带负电荷的脂质片材-样层的交替结构;和与疏水结构域相关的货物部分。

[0049] 国际专利申请公布号WO 2004/041247已公开一种制备晶洞状组合物的方法,其通过引用而全文结合到本文中。

[0050] 生物活性成分/药物(称为“负载”或药物)在含水介质中可为疏水、亲水或两性的。药物可为但不限于蛋白质、小的肽、生物活性多核苷酸、抗真菌药物、抗病毒药物、麻醉剂、抗感染药物、抗真菌药物、抗癌药物、免疫抑制剂、甾体抗炎药、营养补充剂、草本植物产物、维生素、非甾体抗炎药、镇静剂或血管扩张药物。实例包括两性霉素B、无环鸟苷、多柔比星、维生素 A、卡马西平(cabamazepine)、美法仑、硝苯地平、消炎痛、萘普生、雌激素、睾酮、类固醇、苯妥英、麦角胺、大麻素、雷帕霉素、丙泮尼地、丙泊酚、阿尔法双酮、棘霉素、硝酸咪康唑、替尼泊苷、紫杉烷、紫杉醇和泰索帝。

[0051] 药物可为多肽,例如环孢菌素、血管紧张素I、II和III、脑啡肽和它们的类似物、ACTH、抗炎肽I、II、III、血管舒缓激肽、降钙素、b-内啡肽、强啡肽(dinorphin)、白细胞激肽、促黄体激素释放激素(LHRH)、胰岛素、神经激肽、抑生长素、物质P、甲状腺释放激素(TRH)和加压素。

[0052] 药物可为抗原,但不限于蛋白质抗原。抗原还可为碳水化合物或DNA。抗原蛋白质的实例包括来自流感或仙台(Sendai)病毒的包膜糖蛋白、动物细胞膜蛋白质、植物细胞膜蛋白质、细菌膜蛋白质和寄生虫膜蛋白质。

[0053] 抗原通过已知的方法由来源颗粒、细胞、组织或有机体提取。不需要维持抗原的生物活性。然而,在一些情况下(例如,当蛋白质具有免疫系统识别的膜融合或配体结合活性或复合物构造时),期望保持生物活性。在这些情况下,使用不会破坏膜蛋白质的生物活性的含有洗涤剂的提取缓冲液。合适的洗涤剂包括离子洗涤剂(例如胆酸盐、脱氧胆酸盐等)或多相聚氧乙烯洗涤剂(例如吐温、BRIG或Triton)。

[0054] 利用该方法允许抗原(更尤其是蛋白质)再组成为脂质体,其中保留生物活性,并且最终与脂质卷有效缔合。这样避免有机溶剂、超声处理或极端pH、温度或压力,在生物活性形式中,所有这些对抗原的有效再组成均可具有不利的影

[0055] 适当地,目前改进的脂质卷可包括具有多个抗原分子、生物学相关的分子或药物处方的负载。

[0056] 为了分离脂质卷结构和除去聚合物溶液,脂质卷沉淀物使用含有带正电荷的分子(更优选二价阳离子)的缓冲液反复洗涤。向洗涤缓冲液中加入带正电荷的分子确保在整个洗涤步骤期间保持脂质卷结构,并且它们保持为沉淀物。

[0057] 其中悬浮脂质卷的介质可含有盐,例如氯化钠、硫酸钠、硫酸钾、硫酸铵、硫酸镁、碳酸钠。介质可含有聚合物,例如吐温80或BRIG或Triton。药物-脂质卷通过在适当的药理学上可接受的载体(例如,含有二价阳离子的缓冲液)中稀释而制备。

[0058] 脂质卷颗粒可为肠溶的。可将脂质卷颗粒放置在明胶胶囊内,并且胶囊可包肠溶衣。

[0059] 专业技术人员可确定最有效和治疗性手段来实施实践本发明的治疗。还可参考任何众多权威和参考文献,包括,例如,“Goodman & Gillman's, The Pharmaceutical Basis for Therapeutics (用于治疗药物基础)”,(第6版,Goodman等人编辑,MacMillan Publ.

Co., 纽约, 1980)。

[0060] 含有生物活性剂的本发明的改进的大豆磷脂酰丝氨酸脂质卷方便地口服给予患者, 从而脂质卷在血流中吸收, 并且生物活性载荷全身递送。这对于水不溶性药物 (例如两性霉素-B和紫杉醇) 特别有利。此外, 许多疏水药物的毒性显著降低, 由含有两性霉素-B作为载荷的大豆磷脂酰丝氨酸脂质卷可见。

[0061] 以下实施例说明本发明的实践, 但是不应看作是限制其范围。

[0062] 实施例1 两性霉素B结晶脂质卷制剂

[0063] 两性霉素B结晶制剂的按试验台尺寸的程序:

[0064] #1.1 实验制剂:

[0065] 将43 mg (实际上40 mg两性霉素B, 基于0.932mg/mg浓度的效力测定) 的两性霉素B在1.33mL 0.1N NaOH中与200 mg二油酰基磷脂酰丝氨酸 (DOPS, 得自Avanti或NOF Corporation) 在6.6mL 50mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 中 (脂质体通过5 μ m过滤器过滤) 混合, 以形成含有两性霉素B的脂质体。随后将29.3mg氯化钙加入到所得到的混合物中, 以形成结晶脂质卷。为了制备良好的结晶脂质卷, 脂质:两性霉素B重量比设定为约5:1。

[0066] #1.2 实验制剂:

[0067] 然后, 将18mg两性霉素B在0.6mL 0.1N NaOH中与90mg DOPS (得自Avanti或NOF Corporation) 在3.0mL 50 mM磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 中 (脂质体通过5 μ m、8 μ m和4.5 μ m过滤器过滤) 混合, 以形成含有两性霉素B的脂质体。随后将0.33mL 0.5M氯化钙溶液加入到所得到的混合物中, 以形成结晶两性霉素B脂质卷。为了制备良好的结晶脂质卷, 脂质:两性霉素B重量比为约5:1。

[0068] 小规模尺寸的两性霉素B (两性霉素B) 结晶脂质卷的程序:

[0069] #1.3 实验制剂:

[0070] 将399mg (实际上372mg, 基于0.932mg/mg浓度的效力测定) 两性霉素B在12.4mL 0.1N NaOH溶液中与1.86g 50%大豆PS (American Lecithin Company或Lipoid LLC) 在62mL 50 mM磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 中 (脂质体通过5 μ m过滤器过滤) 合并, 以形成含有两性霉素B的脂质体。为了加入抗氧化剂, 随后将372mg维生素E在3.72mL乙醇中的悬浮液加入到脂质体的混合物中。随后将520mg氯化钙粉末加入到所得到的混合物中, 以形成两性霉素B结晶脂质卷。为了制备两性霉素B的良好的结晶脂质卷, 脂质:两性霉素B重量比为约5:1。

[0071] 规模最多4.5L的两性霉素B结晶制剂的程序:

[0072] #1.4 实验制剂:

[0073] 随后将22.75g两性霉素B (实际上21.2g两性霉素B, 基于0.932mg/mg浓度的效力测定) 在707mL 0.1N NaOH溶液中与106g 50%大豆PS在3.533L 50 mM磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 中 (脂质体通过10 μ m过滤器过滤) 混合, 以形成含有两性霉素B的脂质体。为了制备脂质卷的稳定的悬浮液, 随后将372mg维生素E在3.72mL乙醇中的溶液加入到混合物中。随后将194.8mL 1M氯化钙加入到所得到的混合物中, 以形成结晶脂质卷。将脂质卷的最终产物使用制冷机干燥器冻干几天。为了制备两性霉素B的良好的结晶脂质卷, 脂质:药物重量比设定为约5:1。

[0074] 实施例2姜黄素 (颗粒) 晶洞 (Geode) 脂质卷制剂

[0075] 小规模尺寸的姜黄素 (颗粒) 晶洞脂质卷的程序:

[0076] #2.1 实验制剂:

[0077] 首先将50mg姜黄素在1g蓖麻油和4.0mL乙醇中溶解,随后与19.75%大豆PS (American Lecithin Company或Lipoid LLC) 在100mL无菌水中(脂质体通过5 μ m过滤器过滤)合并,以形成含有姜黄素的脂质体。为了降低悬浮液的粘着性和糊状物扩散,随后将500mg牛血清白蛋白(“BSA”或酪蛋白)加入到脂质体的混合物中。随后将16.9mL 0.1M氯化钙加入到所得到的混合物中,以形成姜黄素晶洞脂质卷。将晶洞脂质卷的最终产物使用制冷机干燥器冻干几天。为了制备姜黄素的良好晶洞脂质卷,脂质:药物重量比设定为约20:1。

[0078] #2.2 实验制剂:

[0079] 将100mg 75%大豆PS在100mg无菌水中(脂质体通过5 μ m过滤器过滤)与500mg 酪蛋白(或BSA)混合,随后与50mg姜黄素在2.0g蓖麻油和4.0mL乙醇中混合,以形成含有姜黄素的脂质体。随后将16.9mL 0.1M氯化钙加入到所得到的混合物中,以形成晶洞脂质卷。将晶洞脂质卷的最终产物使用制冷机干燥器冻干几天。为了制备姜黄素的良好晶洞脂质卷,脂质:药物重量比设定为约20:1。

[0080] 小规模尺寸的姜黄素(颗粒)结晶制剂的程序:

[0081] #2.3 实验制剂:

[0082] 将1000mg 75%大豆PS在100mL无菌水中(脂质体通过5 μ m过滤器过滤)与20mg姜黄素在4.0mL乙醇中合并,以形成含有姜黄素的脂质体。为了帮助药物在脂质双层中稳定,随后将500mg 酪蛋白(或BSA)加入到脂质体的悬浮液中。随后将16.9mL 0.1M氯化钙加入到所得到的混合物中,以形成结晶脂质卷。结晶脂质卷的最终产物使用制冷机干燥器冻干几天。为了制备良好的结晶脂质卷,脂质:姜黄素重量比设定为约50:1。

[0083] #2.4 实验制剂:

[0084] 将1000mg 75%大豆PS在100mL无菌水中(脂质体通过5 μ m过滤器过滤)与20mg姜黄素在4.0mL乙醇中合并,以形成含有姜黄素的脂质体。随后将16.9mL 0.1M氯化钙加入到所得到的混合物中,以形成结晶脂质卷。为了帮助药物在脂质双层中稳定,随后将500mg 酪蛋白(或BSA)加入到脂质卷的悬浮液中。结晶脂质卷的最终产物使用制冷机干燥器冻干几天。为了制备良好的结晶脂质卷,脂质:姜黄素重量比设定为约50:1。

[0085] 实施例3两性霉素B(两性霉素B)晶洞制剂

[0086] 按试验台尺寸的两性霉素B(两性霉素B)晶洞制剂的程序:

[0087] #3.1 实验制剂:

[0088] 将7.5mg两性霉素B(实际上7mg,基于0.932mg/mg浓度的效力测定)在0.2mL 0.1N NaOH溶液中与50mg蓖麻油混合,随后与35mg 50%大豆PS在1.75mL无菌水中(脂质体通过5 μ m过滤器过滤)合并,以形成含有两性霉素B的晶洞脂质体。为了防止两性霉素B晶洞制剂的粘着性,随后将21mg BSA或酪蛋白加入到两性霉素B晶洞脂质体的混合物中。为了提高两性霉素B晶洞制剂的稳定性,随后将7mg维生素E在70 μ L乙醇中的溶液加入到晶洞脂质体的混合物中。随后向所得到的混合物中加入127 μ L 0.5M氯化钙,以形成两性霉素B晶洞脂质卷。为了制备两性霉素B的良好晶洞脂质卷,脂质:两性霉素B重量比为约5:1。

[0089] 规模最多150mL的两性霉素B晶洞制剂的程序:

[0090] #3.2 实验制剂:

[0091] 随后将536mg两性霉素B (实际上500 mg,基于0.932mg/mg浓度的效力测定)在14.3mL 0.1N NaOH溶液中与3.57g蓖麻油混合,随后与2.5g 50%大豆PS在125mL无菌水中(脂质体通过5 μ m过滤器过滤)合并,以形成含有两性霉素B的晶洞脂质体。为了防止晶洞制剂的粘着性,随后将1.5g BSA或酪蛋白加入到晶洞脂质体的混合物中。为了提高两性霉素B晶洞制剂的稳定性,随后将250mg维生素E在2.5mL乙醇中的加入到晶洞脂质体的混合物中。随后向所得到的混合物中加入8.88mL 0.5M氯化钙,以形成晶洞脂质卷。使用0.3mL 1N HCl将最终混合物的pH调节至中性。为了制备两性霉素B的良好的晶洞脂质卷,脂质:两性霉素B重量比为约5:1。

[0092] #3.3 实验制剂:

[0093] 将2.5g 50%大豆PS在125mL无菌水中(脂质体通过5 μ m过滤器过滤)与1.5g BSA或酪蛋白混合,随后与536mg两性霉素B (实际上500 mg,基于0.932mg/mg浓度的效力测定)在含有3.57g蓖麻油的14.3mL 0.1N NaOH溶液中合并,以形成含有两性霉素B的脂质体。为了制备稳定的晶洞制剂,随后将250mg维生素E在2.5mL乙醇中的溶液加入到晶洞脂质体的混合物中。使用0.3mL 1N HCl将最终混合物的pH调节至中性。随后将8.88mL 0.5M氯化钙加入到所得到的混合物中,以形成晶洞脂质卷。晶洞脂质卷随后使用冻干浓缩,以提供任何浓度的含有无菌水的晶洞脂质卷(基于实验需要),其中脂质:两性霉素B的重量比约5:1。

[0094] 实施例4用于体外研究的阿米卡星结晶脂质卷制剂

[0095] 阿米卡星制剂的用于体外研究的程序:

[0096] #4.1 实验制剂:

[0097] 将2mg阿米卡星在1.0mL蒸馏的去离子(D.D)水中通过0.22 μ m过滤器过滤,并且与20mg 50%大豆PS在2.0mL无菌水中(脂质体通过5、0.8和0.45 μ m过滤器过滤)合并,以形成含有阿米卡星的脂质体。随后向所得到的混合物中加入0.206mL 0.1M氯化钙,以形成脂质卷。随后用无菌水将混合物中的阿米卡星的药物浓度调节为0.5mg/mL。为了制备阿米卡星的良好结晶脂质卷,其中脂质:药物比率为约10:1。

[0098] #4.2 实验制剂:

[0099] 将2mg阿米卡星在1.0mL D.D水中通过0.22 μ m过滤器过滤,并且与20mg 50%大豆PS在2.0mL无菌水中(脂质体通过5、0.8和0.45 μ m过滤器过滤)合并,以形成含有阿米卡星的脂质体。随后向所得到的混合物中加入0.206mL 0.1M氯化钙,以形成脂质卷。为了降低结晶脂质卷的聚集尺寸,随后将15mg氯化钠在52 μ l无菌水中的溶液加入到脂质卷的混合物中。随后用无菌水将混合物中的阿米卡星的浓度调节为0.5mg/mL。另外,最终产品含有0.066M 氯化钠。为了制备阿米卡星的良好结晶脂质卷,其中脂质:药物比率为约10:1。

[0100] #4.3 实验制剂:

[0101] 将2mg阿米卡星在1.0mL D.D水中通过0.22 μ m过滤器过滤,并且与20mg 50%大豆PS在2.0mL无菌水中(脂质体通过5、0.8和0.45 μ m过滤器过滤)合并,以形成含有阿米卡星的脂质体。随后向所得到的混合物中加入0.206mL 0.1M氯化钙,以形成脂质卷。为了降低结晶脂质卷的聚集尺寸,随后将76mg氯化钠在264 μ l无菌水中的溶液加入到脂质卷的混合物中。随后用无菌水将混合物中的阿米卡星的浓度调节为0.5mg/mL。另外,最终产品含有0.33M氯化钠。为了制备阿米卡星的良好结晶脂质卷,其中脂质:药物比率为约10:1。

[0102] #4.4 实验制剂:

[0103] 将2mg阿米卡星在1.0mL D.D水中通过0.22 μ m过滤器过滤,并且与20mg 50%大豆PS在2.0mL无菌水中(脂质体通过5、0.8和0.45 μ m过滤器过滤)合并,以形成含有阿米卡星的脂质体。随后向所得到的混合物中加入0.206mL 0.1M氯化钙,以形成脂质卷。为了降低结晶脂质卷的聚集尺寸,随后将152mg氯化钠在524 μ l无菌水中的溶液加入到脂质卷的混合物中。随后用无菌水将混合物中的阿米卡星的浓度调节为0.5mg/mL。另外,最终产品含有0.66M氯化钠。为了制备阿米卡星的良好结晶脂质卷,其中脂质:药物比率为约10:1。

[0104] 实施例5用于体内研究的阿米卡星结晶脂质卷制剂

[0105] 阿米卡星制剂的用于体内研究的程序:

[0106] #5.1 实验制剂:

[0107] 将200mg阿米卡星在20mL D.D水中通过0.22 μ m过滤器过滤,并且与2000mg 50%大豆PS在200mL无菌水中(脂质体通过5、0.8和0.45 μ m过滤器过滤)合并,以形成含有阿米卡星的脂质体。随后向所得到的混合物中加入17mL 0.1M氯化钙,以形成脂质卷。脂质卷随后在冻干下浓缩,以提供结晶脂质卷(约6.7mg/mL),其中脂质:阿米卡星比率为约10:1。

[0108] #5.2 实验制剂:

[0109] 将200mg阿米卡星在20mL D.D水中通过0.22 μ m过滤器过滤,并且与2000mg 50%大豆PS在200mL无菌水中(脂质体通过5、0.8和0.45 μ m过滤器过滤)合并,以形成含有阿米卡星的脂质体。随后向所得到的混合物中加入17mL 0.1M氯化钙,以形成脂质卷。为了降低结晶脂质卷的聚集尺寸,随后将1125.2mg氯化钠在3.88mL无菌水中的溶液加入到脂质卷的混合物中。脂质卷随后在冻干下浓缩,以提供结晶脂质卷(约6.7mg/mL和0.66M氯化钠),其中脂质:阿米卡星比率为约10:1。

[0110] 实施例6氨基糖苷类药物结晶脂质卷制剂的体外研究

[0111] 巨噬细胞和感染

[0112] 细胞系:小鼠腹膜巨噬细胞细胞系(Raw 246.7)和/或THP-1(人巨噬细胞细胞系)。将细胞分别在补充5%热-失活的胎牛血清的DMEM和RPMI-1640中培养。通过向24-孔组织培养板中加入 10^5 个巨噬细胞,建立巨噬细胞单层。24小时后,单层受感染,并且让感染发生1小时,随后通过洗涤除去细胞外细菌。将一些孔内含物裂解,并且平板接种在Middlebrook 7H10琼脂板上,以测定细菌的细胞内接种物。其余的孔每天用根据要求保护的方法制备的不同的氨基糖苷类药物(即,阿米卡星、庆大霉素和巴龙霉素)脂质卷处理。处理后,使细胞单层裂解,将裂解产物平板接种在7H10琼脂中,以定量细胞内负荷。

[0113] 表1 卷成螺旋形的氨基糖苷类药物制剂和游离氨基糖苷类药物之间的效力比较

结果	相对于游离的药物增强的效力
阿米卡星	<ul style="list-style-type: none"> ● 鸟结核分支杆菌(<i>Mycobacterium avium</i>)(10[×]-20[×]) ● 结核分支杆菌(<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)(7[×]) ● 土拉热弗朗西斯氏菌 LVS (<i>Francisella tularensis</i> LVS)(3[×])
[0114] 庆大霉素	<ul style="list-style-type: none"> ● 鸟结核分支杆菌(<i>Mycobacterium avium</i>)(10[×]) ● 淋病分支杆菌(<i>Mycobacterium smegmatis</i>)(50[×]) ● 结核分支杆菌(<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)(2[×]) ● 土拉热弗朗西斯氏菌 LVS(<i>Francisella tularensis</i> LVS)(2[×]) ● 土拉热弗朗西斯氏菌 A 型(<i>Francisella tularensis</i> type A)(4[×])
巴龙霉素	<ul style="list-style-type: none"> ● 土拉热弗朗西斯氏菌 A 型(<i>Francisella tularensis</i> type A)(4[×]) ● 皮肤利什曼原虫(3[×])

[0115] 如表1中指示的,与相应的非卷成螺旋形的游离药物相比,氨基糖苷类药物脂质卷对不同的细菌具有增强的效力。

[0116] 实施例7阿米卡星结晶脂质卷制剂的体外研究

[0117] 方法:如在实施例4中显示的,通过改变使用的PS的类型、PS:生物活性剂比率、PS:Ca⁺⁺比率和NaCl浓度,阿米卡星脂质卷(Amkcch)制剂优化阿米卡星卷成螺旋形功效和粒径。使用被鸟结核分支杆菌菌株MAC 101或MAC 109感染的小鼠腹膜巨噬细胞体外评价Amkcch对细胞内Ma感染的效力。以10⁵个细胞/孔接种小鼠腹膜巨噬细胞(Mo) Raw 264.7细胞。以1:10的比率将Mo单层感染1小时,除去细胞外细菌。单层用游离阿米卡星和/或脂质卷制剂处理4天,并且测定细胞内细菌的数量。测定重复三次。

[0118] 结果:未经处理的对照Ma菌株在Mo内从3.8×10⁵生长为4.9×10⁶。用游离阿米卡星(10和20 mg/mL)处理的在Mo内的Ma分别被杀灭至6.1和3.4×10⁴个细菌。优化的Amkcch(10和20 mg/mL)证明大于10倍的增强的效力,在Mo内降低细菌计数至3.9和1.7×10³个细菌(p<0.05,与游离阿米卡星相比)。

[0119] 结论:如图1中指示的,在巨噬细胞中,对鸟结核分支杆菌感染,阿米卡星脂质卷制剂比游离阿米卡星更具活性,为10-50倍。阿米卡星的脂质卷制剂对巨噬细胞中的Ma菌株显示显著的和增强的活性,表明脂质卷比游离阿米卡星实现更高的细胞内浓度,保持更长的时间。

[0120] 实施例8阿米卡星结晶脂质卷制剂的体内研究

[0121] 已开发形成阿米卡星脂质卷。使用C57BL/6黑色小鼠评价阿米卡星脂质卷对鸟结核分支杆菌复合物(MAC)的体内效力。

[0122] ●小鼠(12个/组)通过尾静脉注射感染鸟结核分支杆菌101(8.1×10⁷个细菌/小鼠)。

[0123] ●7天后,收获6只小鼠,定量在脾中MAC的数量,以建立基线细菌负荷(时间0)。

[0124] ●如在图2和3中指示的,小鼠用各种阿米卡星脂质卷处理。

[0125] ●以1.0 mg阿米卡星/天,保持2周。

[0126] ●在第3周和2天后(2周处理后)收获小鼠,使脾均质化,并且平板接种在7H10琼脂

上。

[0127] ●计数在板上的菌落,并且分析数据。

[0128] 如在图2和3中证明的,I.P或口服给予的阿米卡星脂质卷为活性的,降低在脾中细菌负载的数量。具有高盐浓度的阿米卡星脂质卷制剂口服进行

[0129] 结论:口服递送阿米卡星脂质卷制剂证明具有与I.P游离阿米卡星类似的体内效力。

[0130] 实施例9氨基糖苷类药物制剂的用于体外研究的高盐程序

[0131] #9.1 实验制剂:

[0132] 将2mg氨基糖苷类药物在1.0ml D.D水中通过0.22 μ m过滤器过滤,并且与20mg 50%大豆PS在2.0mL无菌水中(脂质体通过5、0.8和0.45 μ m过滤器过滤)合并,以形成含有氨基糖苷类药物的脂质体。随后向所得到的混合物中加入0.206mL 0.1M氯化钙,以形成脂质卷。随后用无菌水将混合物中的氨基糖苷类药物的药物浓度调节为0.5mg/ml。为了制备氨基糖苷类药物的良好的结晶脂质卷,其中脂质:药物比率为约10:1。

[0133] #9.2 实验制剂:

[0134] 将2mg氨基糖苷类药物在1.0ml D.D水中通过0.22 μ m过滤器过滤,并且与20mg 50%大豆PS在2.0mL无菌水中(脂质体通过5、0.8和0.45 μ m过滤器过滤)合并,以形成含有氨基糖苷类药物的脂质体。随后向所得到的混合物中加入0.206mL 0.1M氯化钙,以形成脂质卷。为了降低结晶脂质卷的聚集尺寸,随后将15mg氯化钠在52 μ l无菌水中的溶液加入到脂质卷的混合物中。随后用无菌水将混合物中的氨基糖苷类药物的浓度调节为0.5mg/ml。另外,最终产品含有0.066M氯化钠。为了制备氨基糖苷类药物的良好的结晶脂质卷,其中脂质:药物比率为约10:1。

[0135] #9.3 实验制剂:

[0136] 将2mg氨基糖苷类药物在1.0ml D.D水中通过0.22 μ m过滤器过滤,并且与20mg 50%大豆PS在2.0mL无菌水中(脂质体通过5、0.8和0.45 μ m过滤器过滤)合并,以形成含有氨基糖苷类药物的脂质体。随后向所得到的混合物中加入0.206mL 0.1M氯化钙,以形成脂质卷。为了降低结晶脂质卷的聚集尺寸,随后将76mg氯化钠在264 μ l无菌水中的溶液加入到脂质卷的混合物中。随后用无菌水将混合物中的氨基糖苷类药物的浓度调节为0.5mg/ml。另外,最终产品含有0.33M氯化钠。为了制备氨基糖苷类药物的良好的结晶脂质卷,其中脂质:药物比率为约10:1。

[0137] #9.4 实验制剂:

[0138] 将2mg氨基糖苷类药物在1.0ml D.D水中通过0.22 μ m过滤器过滤,并且与20mg 50%大豆PS在2.0mL无菌水中(脂质体通过5、0.8和0.45 μ m过滤器过滤)合并,以形成含有氨基糖苷类药物的脂质体。随后向所得到的混合物中加入0.206mL 0.1M氯化钙,以形成脂质卷。为了降低结晶脂质卷的聚集尺寸,随后将152mg氯化钠在524 μ l无菌水中的溶液加入到脂质卷的混合物中。随后用无菌水将混合物中的氨基糖苷类药物的浓度调节为0.5mg/ml。另外,最终产品含有0.66M氯化钠。为了制备氨基糖苷类药物的良好的结晶脂质卷,其中脂质:药物比率为约10:1。

[0139] 表2由阿米卡星-脂质卷上清液得到的内部研究的阿米卡星卷成螺旋形的结果(Degussa 85%相对类脂50%大豆PS,在冻干前后)

[0140]

通过使用... 测量	脂质: 药物的 比率	Degussa 85% ^{ab} 大豆 PS 在冻干前	Degussa 85% ^{ab} 大豆 PS 在冻干后	美膳 50% 大豆 PS 在冻干前	美膳 50% 大豆 PS 在冻干后
缓冲液	20:1	34% 在上清液中	39.5% 在上清液中	34.5% 在上清液中	33.8% 在上清液中
缓冲液	10:1	69.1% 在上清液中	72.6% 在上清液中	50% 在上清液中	48.3% 在上清液中
缓冲液	5:1	74.7% 在上清液中	83.5% 在上清液中	61.3% 在上清液中	58.1% 在上清液中
Degussa 85% 大豆 PS 普通上清液	20:1	25.3% 在上清液中	30.2% 在上清液中	25.7% 在上清液中	25% 在上清液中
Degussa 85% 大豆 PS 普通上清液	10:1	55.4% 在上清液中	58.4% 在上清液中	38.4% 在上清液中	36.8% 在上清液中
Degussa 85% 大豆 PS 普通上清液	5:1	61.6% 在上清液中	69.5% 在上清液中	49.5% 在上清液中	47% 在上清液中
美膳 50% 大豆 PS 普通上清液	20:1	29.6% 在上清液中	34.3% 在上清液中	30% 在上清液中	29.5% 在上清液中
美膳 50% 大豆 PS 普通上清液	10:1	59.8% 在上清液中	62.9% 在上清液中	43.6% 在上清液中	42.4% 在上清液中
美膳 50% 大豆 PS 普通上清液	5:1	64.3% 在上清液中	72.2% 在上清液中	52.8% 在上清液中	50.8% 在上清液中

[0141] 在形成脂质卷并且随后离心后,通过测量在上清液中阿米卡星的量(水合茚三酮测定),测定卷成螺旋形百分数。随后从在卷成螺旋形过程期间的总量减去在上清液中的量。这作为在上清液中的百分数报道。在上清液中的百分数越低,则卷成螺旋形功效越高。在表2中列举的结果清楚地证明50%大豆PS比85% PS在卷成螺旋形方面更有效。

[0142] 表3由在400nm下的吸光度得到的阿米卡星制剂的结果

[0143]

通过使用... 测量	50% 大豆 PS 与药物 的比率 (10:1)	85% 大豆 PS 与药物 的比率 (10:1)	50% 大豆 PS 与药物 的比率 (20:1)	85% 大豆 PS 与药物 的比率 (20:1)	50% 大豆 PS 与药物 的比率 (5:1)	85% 大豆 PS 与药物 的比率 (5:1)
50mM 磷酸 盐缓冲液+阿 米卡星	30.6%在 上清液中	94.4%在 上清液中	34.8%在 上清液中	54.9%在 上清液中	53.5%在 上清液中	76.4%在 上清液中
50%大豆 PS 普通上清液+ 阿米卡星	41%在 上清液中	79%在 上清液中	27.9%在 上清液中	45.2%在 上清液中	44.3%在 上清液中	63.8%在 上清液中
85%大豆 PS 普通上清液+ 阿米卡星	44%在 上清液中	82.8%在 上清液中	30%在 上清液中	47.8%在 上清液中	46.8%在 上清液中	66.9%在 上清液中

[0144] 在形成脂质卷并且随后离心后,通过测量在上清液中阿米卡星的量(水合茚三酮测定),测定卷成螺旋形百分数。随后从在卷成螺旋形过程期间的总量减去在上清液中的量。这作为在上清液中的百分数报道。在上清液中的百分数越低,则卷成螺旋形功效越高。在表3中列举的结果清楚地证明50%大豆PS比85% PS在卷成螺旋形方面更有效。

[0145] 表4由在400nm下的吸光度得到的阿米卡星制剂的结果

[0146]

通过使用... 测量	DOPS 与阿 米卡星的比 率	类似 50% 大豆 PS	Avanti DOPS	Avanti 99% 大豆 PS	NOF DOPS
50mM 磷酸盐 缓冲液	10:1	47.3% 在上清液中	87.7% 在上清液中	84.3% 在上清液中	86.4% 在上清液中
类似 50%大 豆 PS 普通脂质卷 上清液	10:1	37.1% 在上清液中	77% 在上清液中	73.5% 在上清液中	64% 在上清液中
Avanti DOPS 普通上清液	10:1	43.6% 在上清液中	83%在上清 液中	80% 在上清液中	81.7% 在上清液中
Avanti 99%大 豆 PS 普通上清液	10:1	41.9% 在上清液中	84.6%在上 清液中	81% 在上清液中	83% 在上清液中

[0147] 在形成脂质卷并且随后离心后,通过测量在上清液中阿米卡星的量(水合茚三酮测定),测定卷成螺旋形百分数。随后从在卷成螺旋形过程期间的总量减去在上清液中的量。这作为在上清液中的百分数报道。在上清液中的百分数越低,则卷成螺旋形功效越高。在表4中列举的结果清楚地证明50%大豆PS比99.99% PS在卷成螺旋形方面更有效。

[0148] 图4显示庆大霉素卷成螺旋形,与PS性质相关。与表1-3类似,在表4中列举的结果清楚地证明50%大豆PS在较低胆汁盐浓度下比85% PS或99.99% PS在卷成螺旋形庆大霉素方面更有效。

[0149] 实施例10阿米卡星、庆大霉素和巴龙霉素胆汁盐脂质卷的卷成螺旋形功效

[0150] #10.1具有胆汁盐(在钙之后)的氨基糖苷类药物制剂的用于体外研究的程序。

[0151] 具有不同量的胆汁盐(Sigma -Aldrich目录#48305 Fluka胆汁酸钠盐,~50%脱氧胆汁酸钠盐,~50%)的氨基糖苷类药物制剂的结晶脂质卷:

[0152] 将2mg氨基糖苷类药物在0.2ml无菌水中通过0.22 μ m过滤器过滤,并且与20mg 50%大豆PS脂质体在2.0ml无菌水中(大豆PS脂质体首先通过5、0.8和0.45 μ m过滤器过滤)合并,以形成含有氨基糖苷类药物的脂质体。随后剧烈搅拌下向所得到的混合物中加入0.159mL 0.1M氯化钙,以形成氨基糖苷类药物脂质卷。为了使得氨基糖苷类药物脂质卷结晶的粒径较小,随后将20.4mg胆汁盐加入到氨基糖苷类药物脂质卷的混合物中。随后使用作为悬浮液的缓冲液将混合物调节至氨基糖苷类药物的药物浓度为0.5mg/ml。最终氨基糖苷类药物脂质卷制剂含有11.3mM。

[0153] 将2mg氨基糖苷类药物在0.2ml无菌水中通过0.22 μ m过滤器过滤,并且与20mg 50%大豆PS脂质体在2.0ml无菌水中(大豆PS脂质体首先通过5、0.8和0.45 μ m过滤器过滤)合并,以形成含有氨基糖苷类药物的脂质体。随后剧烈搅拌下向所得到的混合物中加入0.159mL 0.1M氯化钙,以形成氨基糖苷类药物脂质卷。为了使得氨基糖苷类药物脂质卷结晶的粒径较小,随后将13.6mg胆汁盐加入到氨基糖苷类药物脂质卷的混合物中。随后使用作为悬浮液的缓冲液将混合物调节至氨基糖苷类药物的药物浓度为0.5mg/ml。最终氨基糖苷类药物脂质卷制剂含有7.8mM。

[0154] 将2mg氨基糖苷类药物在0.2ml无菌水中通过0.22 μ m过滤器过滤,并且与20mg 50%大豆PS脂质体在2.0ml无菌水中(大豆PS脂质体首先通过5、0.8和0.45 μ m过滤器过滤)合并,以形成含有氨基糖苷类药物的脂质体。随后剧烈搅拌下向所得到的混合物中加入0.159mL 0.1M氯化钙,以形成氨基糖苷类药物脂质卷。为了使得氨基糖苷类药物脂质卷结晶的粒径较小,随后将6.8mg胆汁盐加入到氨基糖苷类药物脂质卷的混合物中。随后使用作为悬浮液的缓冲液将混合物调节至氨基糖苷类药物的药物浓度为0.5mg/ml。最终氨基糖苷类药物脂质卷制剂含有3.9mM。

[0155] 将2mg氨基糖苷类药物在0.2ml无菌水中通过0.22 μ m过滤器过滤,并且与20mg 50%大豆PS脂质体在2.0ml无菌水中(大豆PS脂质体首先通过5、0.8和0.45 μ m过滤器过滤)合并,以形成含有氨基糖苷类药物的脂质体。随后剧烈搅拌下向所得到的混合物中加入0.159mL 0.1M氯化钙,以形成氨基糖苷类药物脂质卷。为了使得氨基糖苷类药物脂质卷结晶的粒径较小,随后将3.4mg胆汁盐加入到氨基糖苷类药物脂质卷的混合物中。随后使用作为悬浮液的缓冲液将混合物调节至氨基糖苷类药物的药物浓度为0.5mg/ml。最终氨基糖苷类药物脂质卷制剂含有1.95mM。

[0156] 将2mg氨基糖苷类药物在0.2ml无菌水中通过0.22 μ m过滤器过滤,并且与20mg 50%大豆PS脂质体在2.0ml无菌水中(大豆PS脂质体首先通过5、0.8和0.45 μ m过滤器过滤)合并,以形成含有氨基糖苷类药物的脂质体。随后剧烈搅拌下向所得到的混合物中加入0.159mL 0.1M氯化钙,以形成氨基糖苷类药物脂质卷。为了使得氨基糖苷类药物脂质卷结晶的粒径较小,随后将1.7mg胆汁盐加入到氨基糖苷类药物脂质卷的混合物中。随后使用作为悬浮液的缓冲液将混合物调节至氨基糖苷类药物的药物浓度为0.5mg/ml。最终氨基糖苷类药物脂质卷制剂含有0.97mM。

[0157] #10.2具有胆汁盐(在钙之前)的氨基糖苷类药物制剂的用于体外研究的程序。

[0158] 将2mg氨基糖苷类药物在0.2ml无菌水中通过0.22 μ m过滤器过滤,并且与20mg 50%大豆PS脂质体在2.0ml无菌水中(大豆PS脂质体首先通过5、0.8和0.45 μ m过滤器过滤)合并,以形成含有氨基糖苷类药物的脂质体。为了使得氨基糖苷类药物脂质卷结晶的粒径较小,随后将20.4mg胆汁盐加入到氨基糖苷类药物脂质体的混合物中。随后剧烈搅拌下向所得到的混合物中加入0.159mL 0.1M氯化钙,以形成氨基糖苷类药物脂质卷。随后使用作为悬浮液的相同的缓冲液将混合物调节至氨基糖苷类药物的药物浓度为0.5mg/ml。最终氨基糖苷类药物脂质卷制剂含有11.3mM。

[0159] 将2mg氨基糖苷类药物在0.2ml无菌水中通过0.22 μ m过滤器过滤,并且与20mg 50%大豆PS脂质体在2.0ml无菌水中(大豆PS脂质体首先通过5、0.8和0.45 μ m过滤器过滤)合并,以形成含有氨基糖苷类药物的脂质体。为了使得氨基糖苷类药物脂质卷结晶的粒径较小,随后将13.6mg胆汁盐加入到氨基糖苷类药物脂质体的混合物中。随后剧烈混合下向所得到的混合物中加入0.159mL 0.1M氯化钙,以形成氨基糖苷类药物脂质卷。随后使用作为悬浮液的缓冲液将混合物调节至氨基糖苷类药物的药物浓度为0.5mg/ml。最终氨基糖苷类药物脂质卷制剂含有7.8mM。

[0160] 将2mg氨基糖苷类药物在0.2ml无菌水中通过0.22 μ m过滤器过滤,并且与20mg 50%大豆PS脂质体在2.0ml无菌水中(大豆PS脂质体首先通过5、0.8和0.45 μ m过滤器过滤)合并,以形成含有氨基糖苷类药物的脂质体。为了使得氨基糖苷类药物脂质卷结晶的粒径较小,随后将6.8mg胆汁盐加入到氨基糖苷类药物脂质体的混合物中。随后剧烈混合下向所得到的混合物中加入0.159mL 0.1M氯化钙,以形成氨基糖苷类药物脂质卷。随后使用作为悬浮液的缓冲液将混合物调节至氨基糖苷类药物的药物浓度为0.5mg/ml。最终氨基糖苷类药物脂质卷制剂含有3.9mM。

[0161] 将2mg氨基糖苷类药物在0.2ml无菌水中通过0.22 μ m过滤器过滤,并且与20mg 50%大豆PS脂质体在2.0ml无菌水中(大豆PS脂质体首先通过5、0.8和0.45 μ m过滤器过滤)合并,以形成含有氨基糖苷类药物的脂质体。为了使得氨基糖苷类药物脂质卷结晶的粒径较小,随后将3.4mg胆汁盐加入到氨基糖苷类药物脂质体的混合物中。随后剧烈混合下向所得到的混合物中加入0.159mL 0.1M氯化钙,以形成氨基糖苷类药物脂质卷。随后使用作为悬浮液的缓冲液将混合物调节至氨基糖苷类药物的药物浓度为0.5mg/ml。最终氨基糖苷类药物脂质卷制剂含有1.95mM。

[0162] 将2mg氨基糖苷类药物在0.2ml无菌水中通过0.22 μ m过滤器过滤,并且与20mg 50%大豆PS脂质体在2.0ml无菌水中(大豆PS脂质体首先通过5、0.8和0.45 μ m过滤器过滤)合并,以形成含有氨基糖苷类药物的脂质体。为了使得氨基糖苷类药物脂质卷结晶的粒径较小,随后将1.7mg胆汁盐加入到氨基糖苷类药物脂质体的混合物中。随后剧烈混合下向所得到的混合物中加入0.159mL 0.1M氯化钙,以形成氨基糖苷类药物脂质卷。随后使用作为悬浮液的缓冲液将混合物调节至氨基糖苷类药物的药物浓度为0.5mg/ml。最终氨基糖苷类药物脂质卷制剂含有0.97mM。

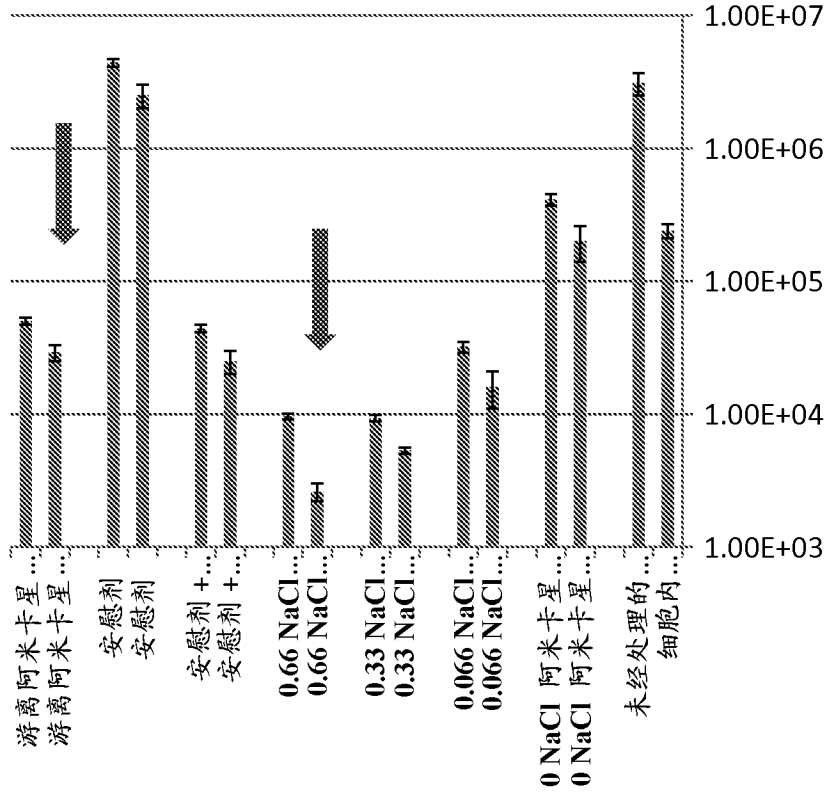
[0163] 图5-11显示氨基糖苷类药物胆汁盐(包括阿米卡星胆汁盐、庆大霉素胆汁盐和巴龙霉素胆汁盐)的卷成螺旋形功效。

[0164] 在形成脂质卷并且随后离心后,通过测量在上清液中氨基糖苷类药物胆汁盐的量

(水合茛三酮测定),测定卷成螺旋形百分数。随后从在卷成螺旋形过程期间的总量减去在上清液中的量。这些结果清楚地证明在较低胆汁盐浓度下50%大豆PS比75% PS或99.99% PS在卷成螺旋形方面更有效。A为在卷成螺旋形之后加入的胆汁盐。B为在卷成螺旋形之前加入的胆汁盐。

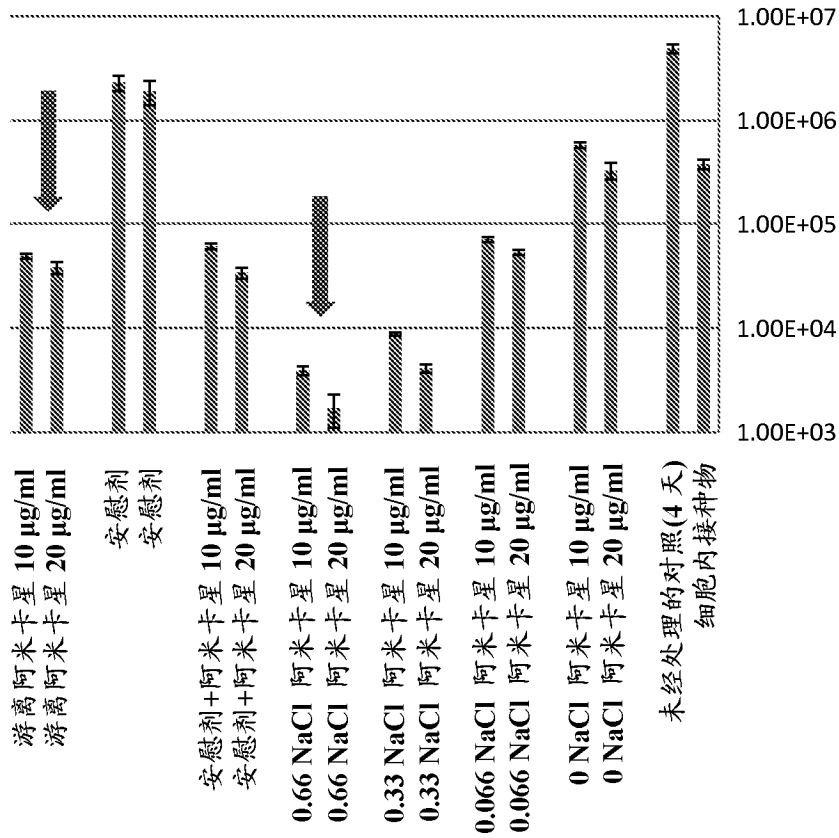
阿米卡星脂质卷体外活性

在小鼠腹膜巨噬细胞中，阿米卡星脂质卷对 MAC 109 的体外活性



在 4 天处理后剩余的菌落

在小鼠腹膜巨噬细胞中，阿米卡星脂质卷对 MAC 101 的体外活性



在 4 天处理后剩余的菌落

图 1

**在 MAC 101 感染的小鼠模型中，阿米卡星脂质卷
的体内效力—IP 递送**

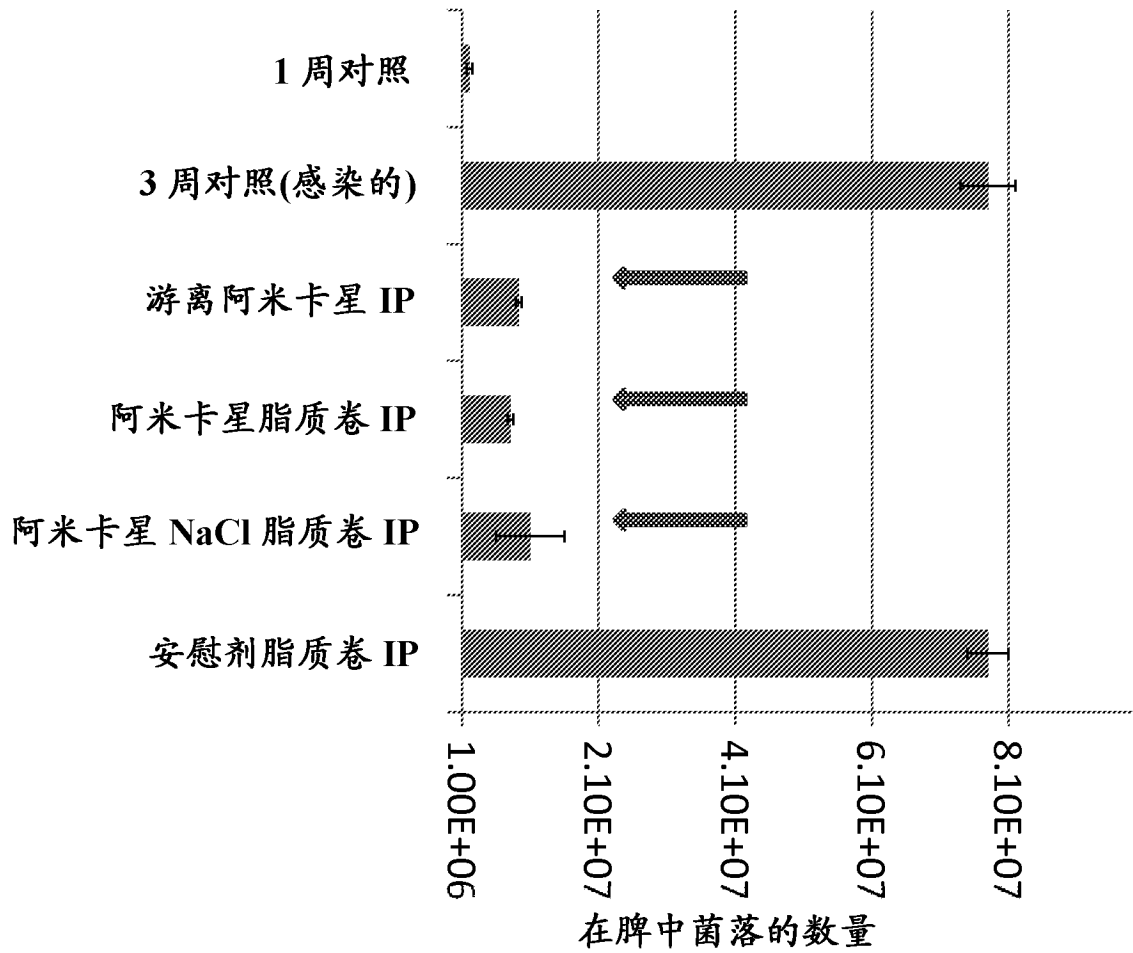


图 2

在 MAC 101 感染的小鼠模型中，阿米卡星脂质卷的体内效力—口服递送

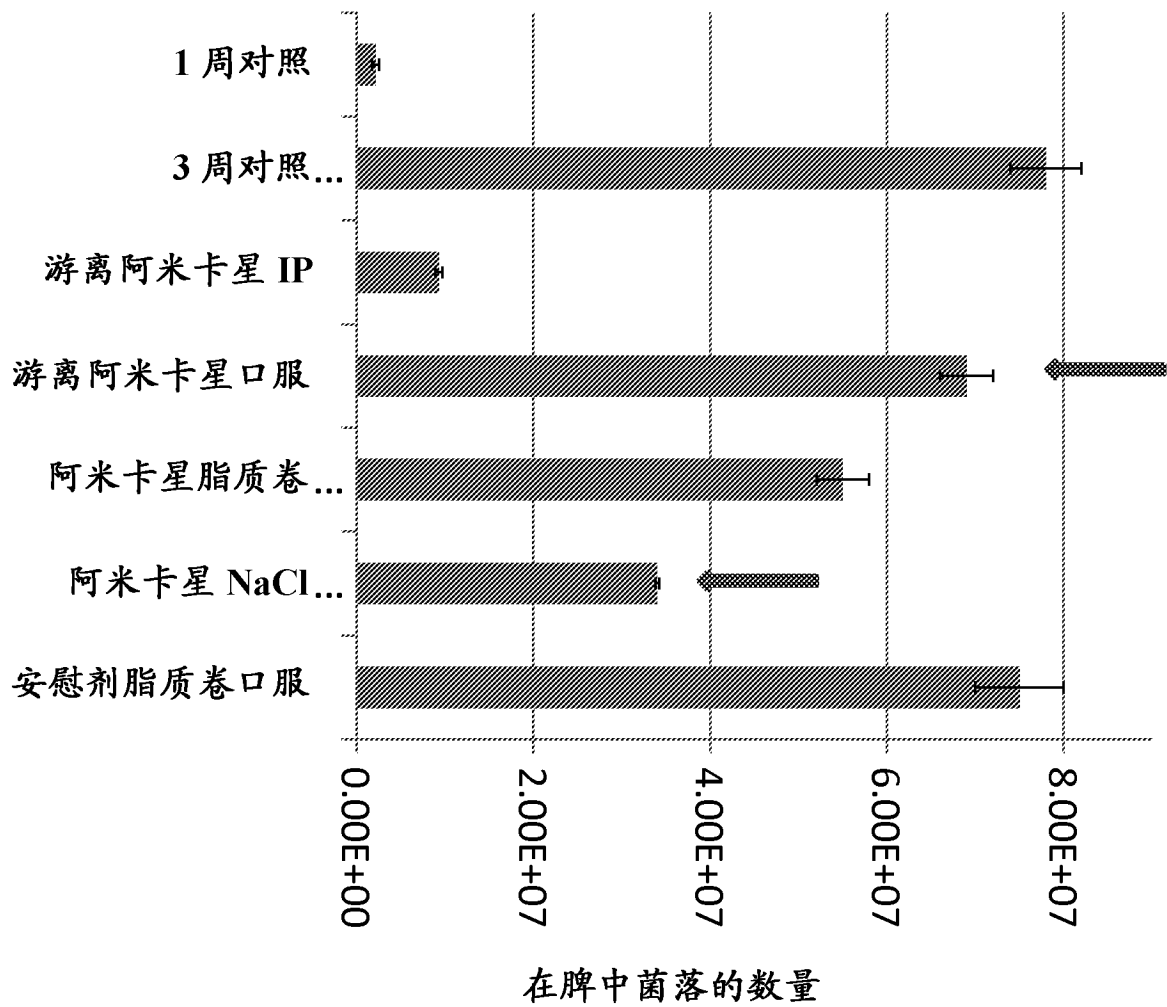


图 3

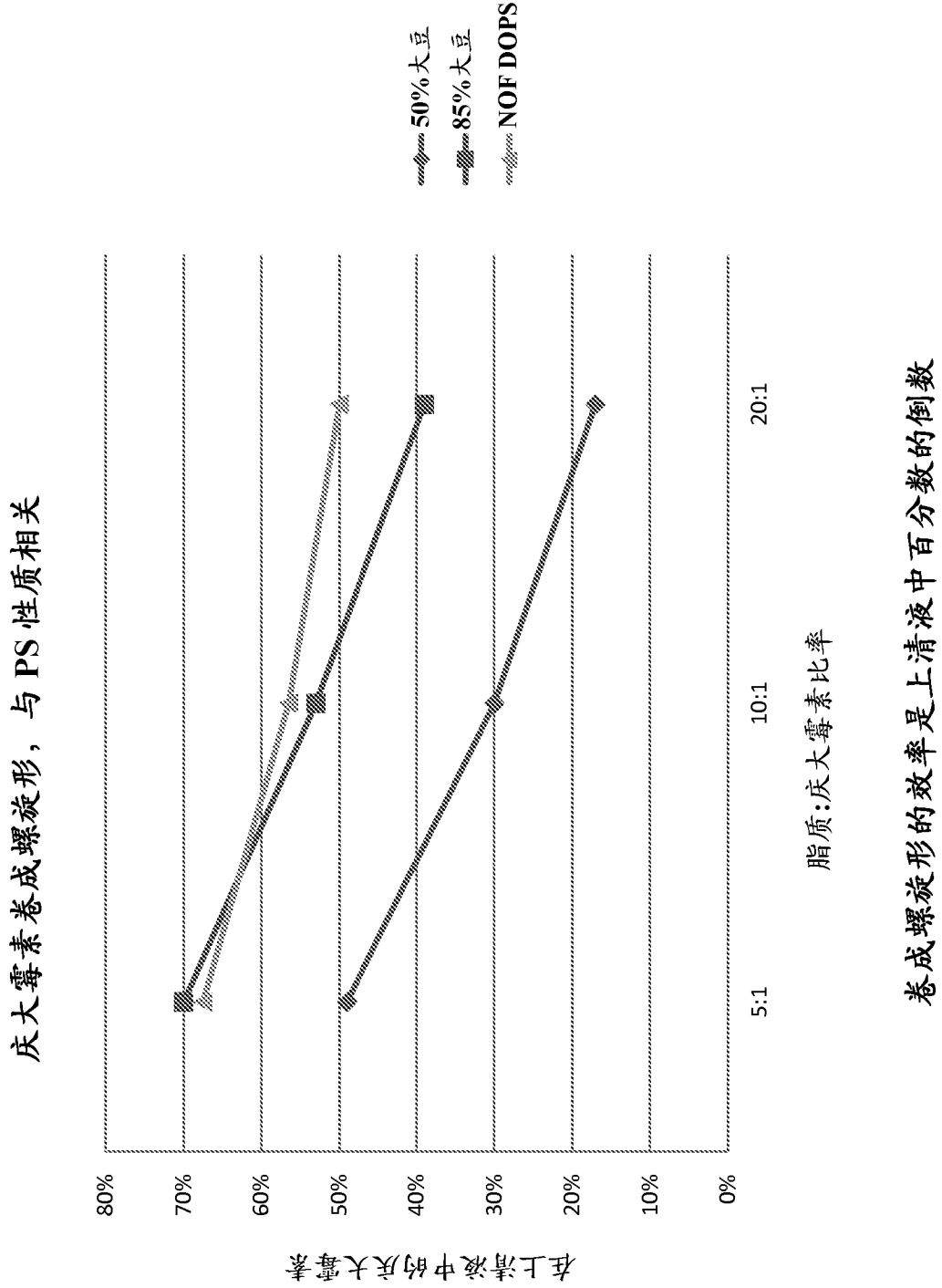
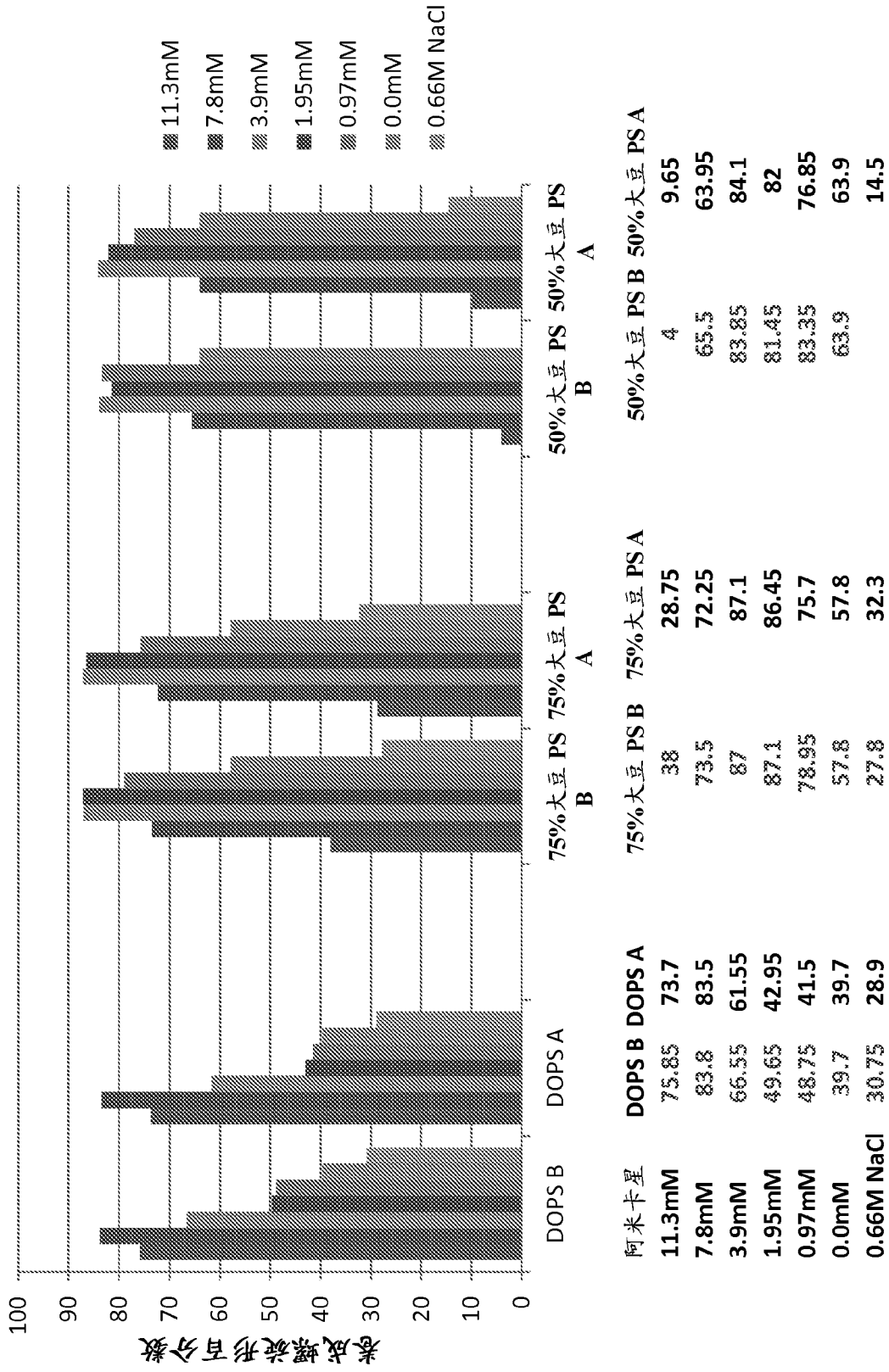


图 4

阿米卡星胆汁盐



A 为在卷成螺旋形之后加入的胆汁盐。 B 为在卷成螺旋形之前加入的胆汁盐。

图 5

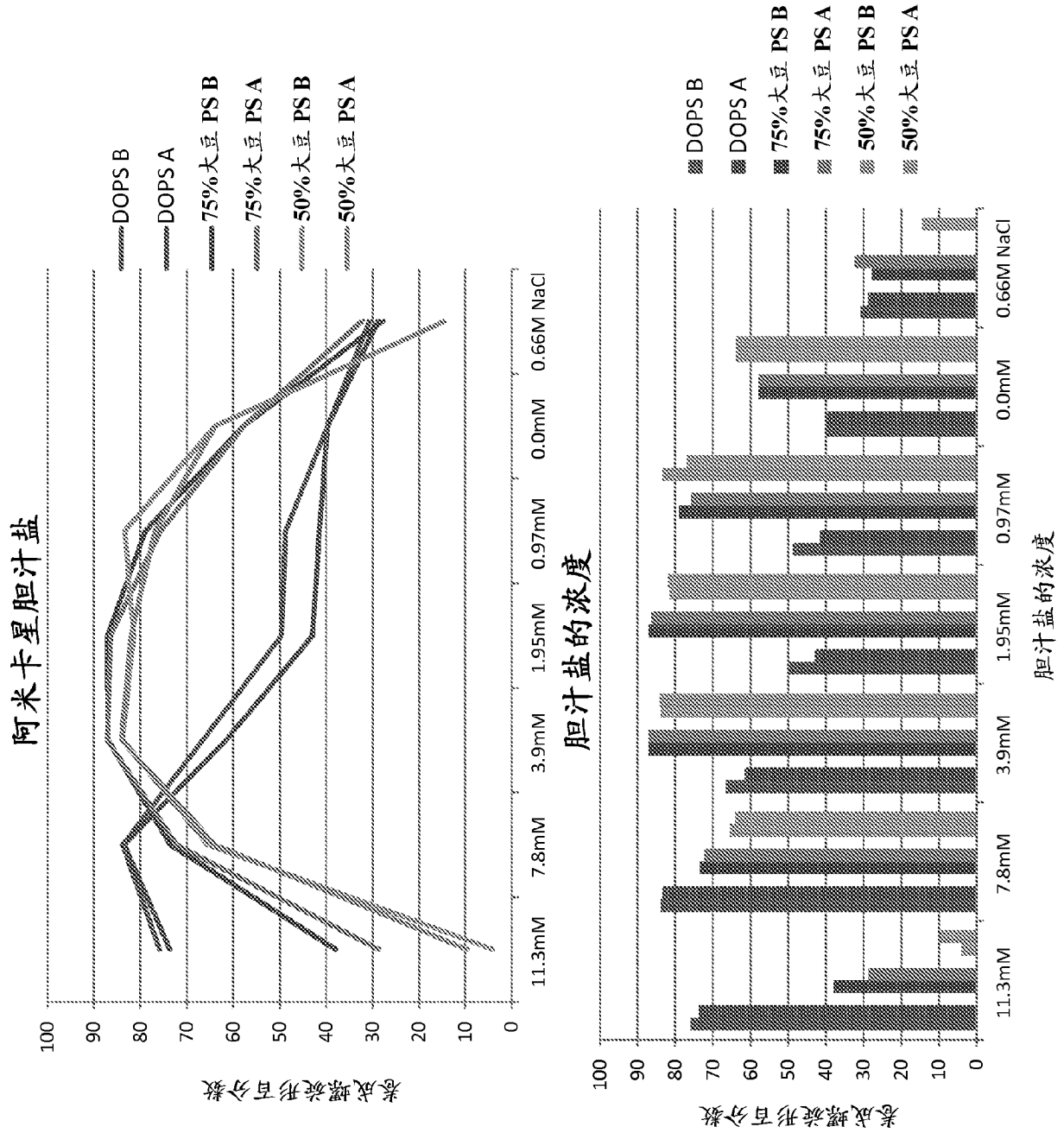


图 6

庆大霉素胆盐

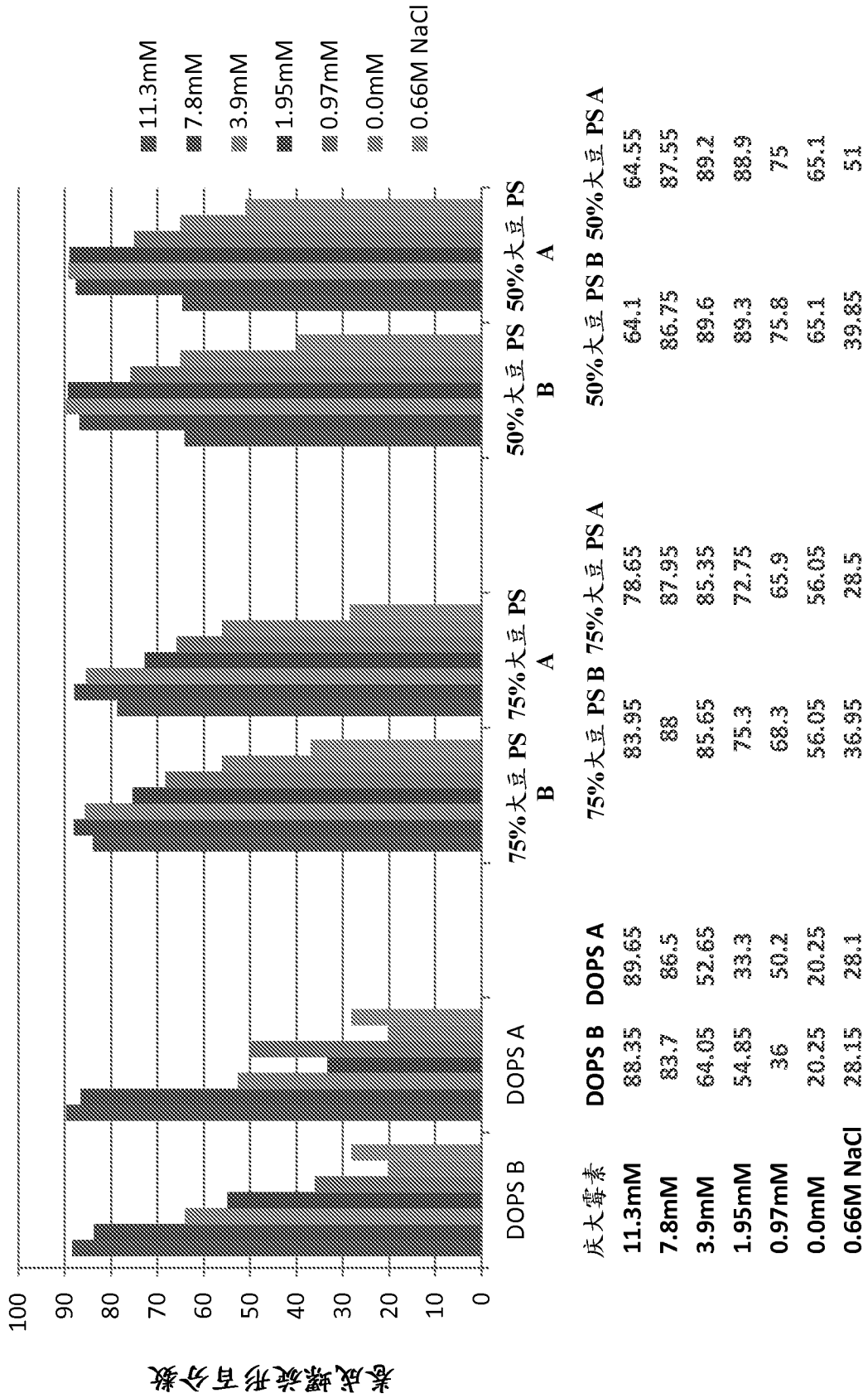
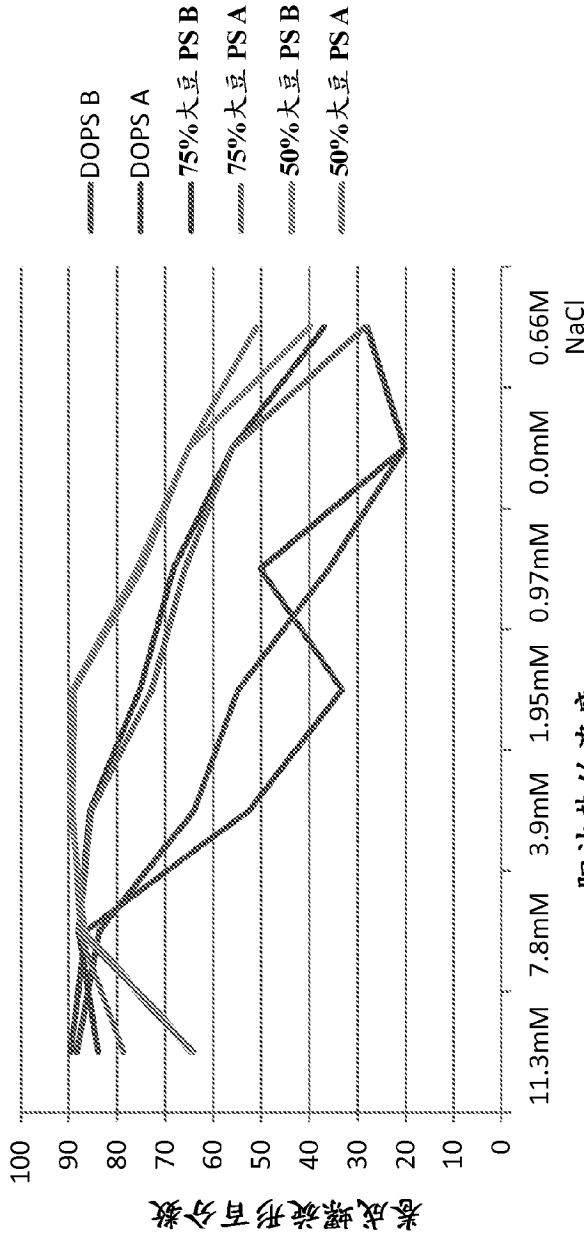


图 7

庆大霉素胆汁盐



胆汁盐的浓度

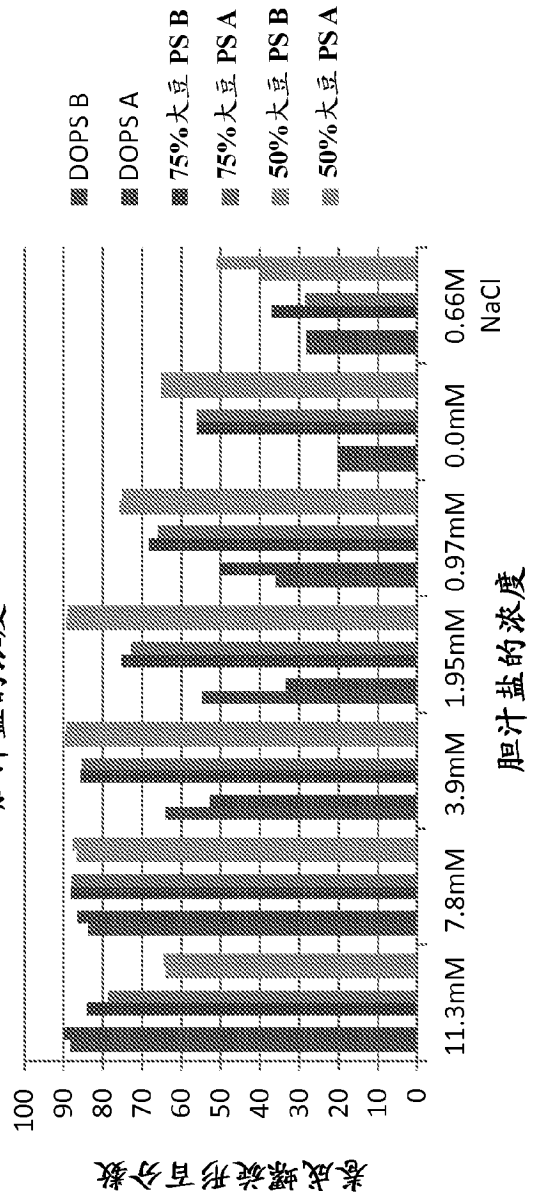


图 8

巴龙霉素胆汁盐

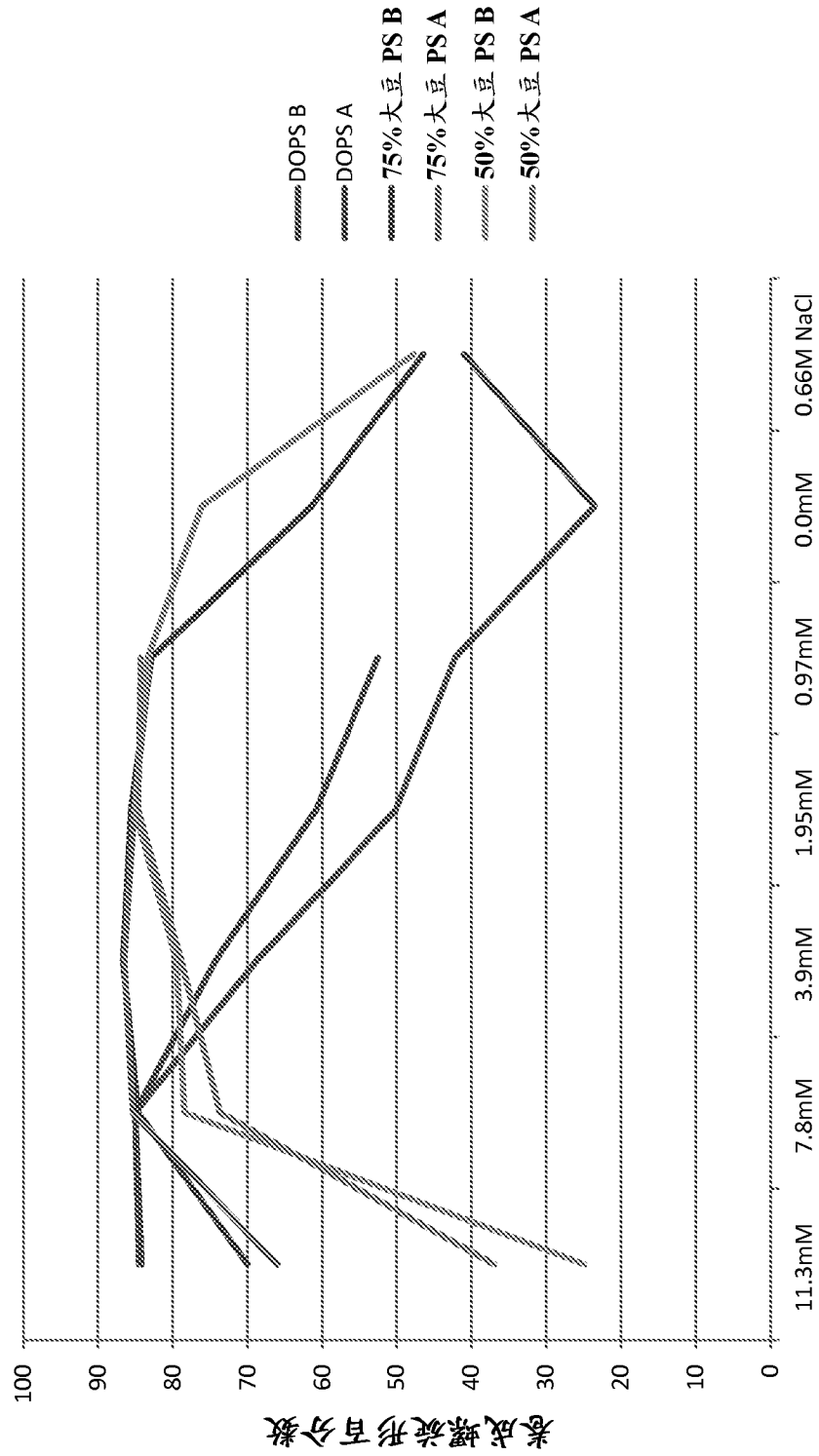
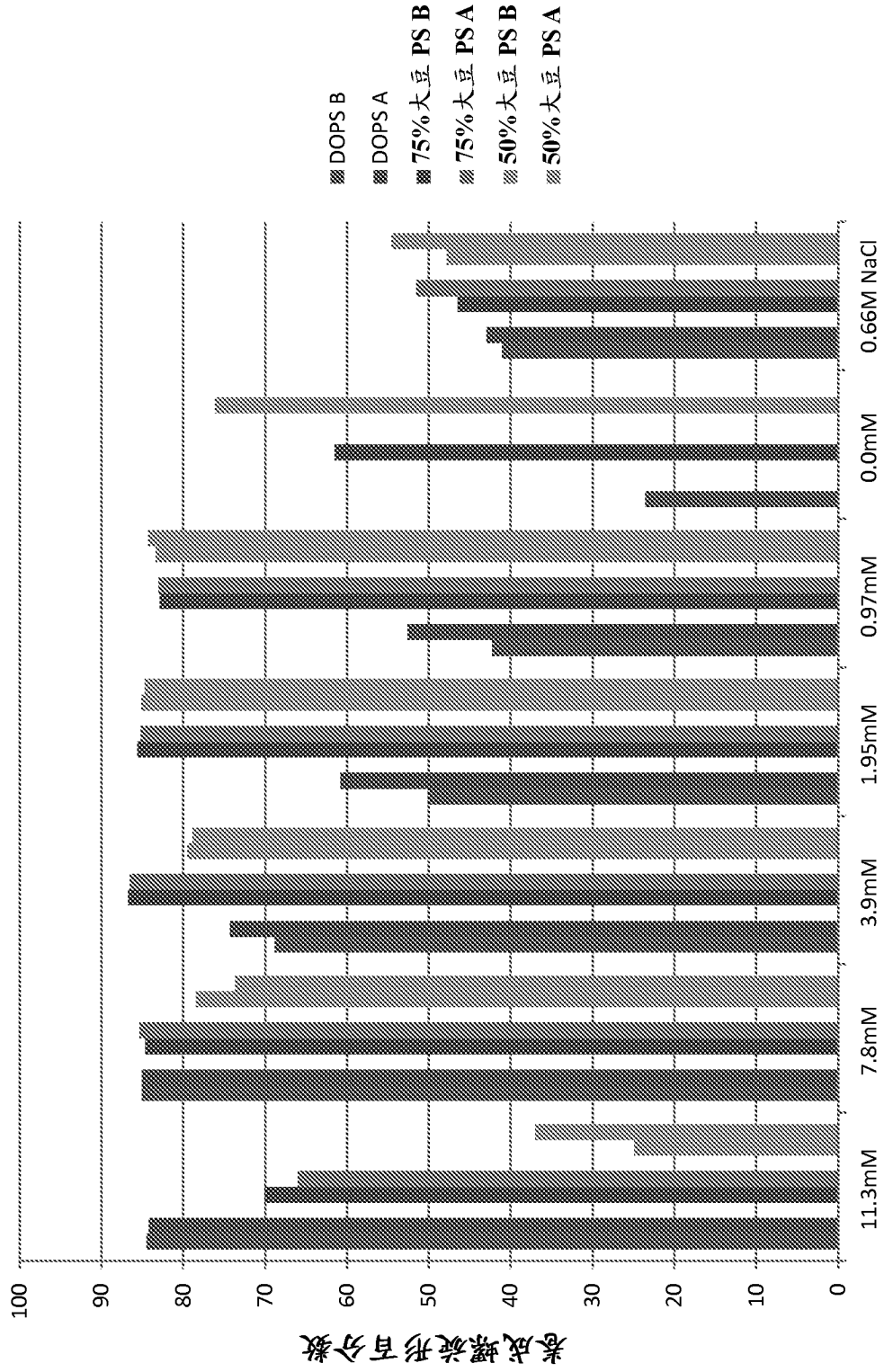


图 9

巴龙霉素胆盐



胆汁盐的浓度

图 10

巴龙霉素胆汁盐

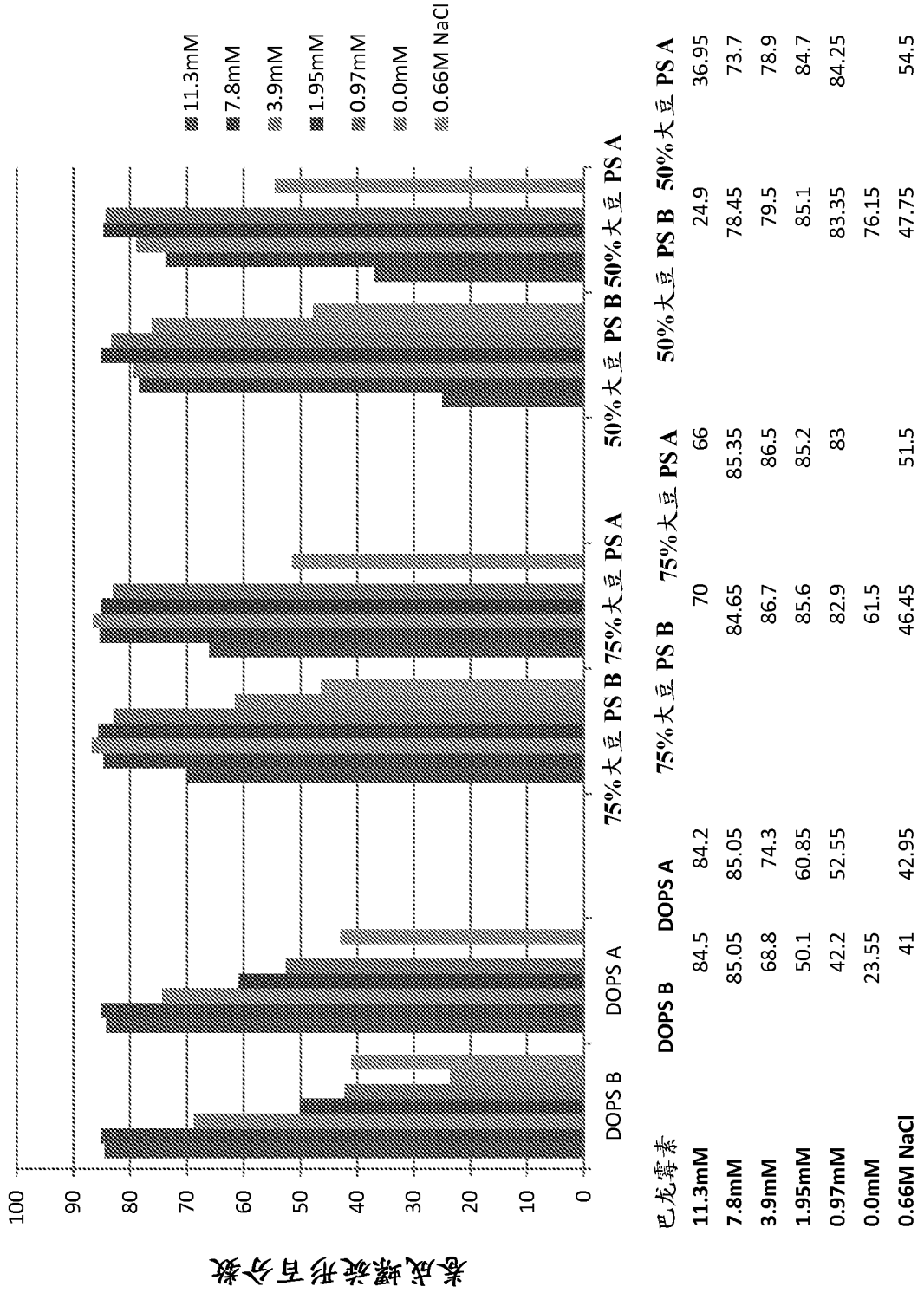


图 11