

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 31/70



[12] 发 明 专 利 说 明 书

A61K 31/28 A61K 31/57

A61K 31/58 A61P 17/06

[21] ZL 专利号 97199438.2

[45] 授权公告日 2003 年 12 月 10 日

[11] 授权公告号 CN 1130201C

[22] 申请日 1997. 11. 4 [21] 申请号 97199438.2

[30] 优先权

[32] 1996. 11. 4 [33] AU [31] P03473

[86] 国际申请 PCT/AU97/00747 1997. 11. 4

[87] 国际公布 WO98/19683 英 1998. 5. 14

[85] 进入国家阶段日期 1999. 5. 4

[71] 专利权人 医学创新有限公司

地址 澳大利亚新南威尔士州

[72] 发明人 R·E·托马斯

[56] 参考文献

WO8909054A 1989. 10. 05 A61K31/28

审查员 刘 锋

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

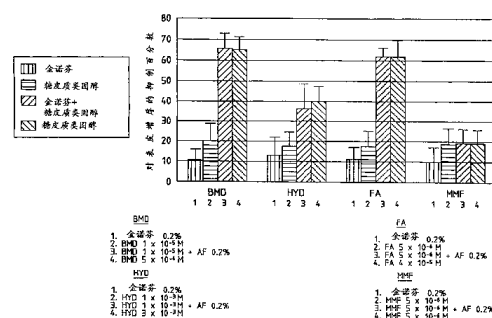
代理人 陈文青

权利要求书 2 页 说明书 17 页 附图 2 页

[54] 发明名称 协同作用的含金组合物

[57] 摘要

本发明涉及治疗有一种或多种表征的免疫一介导疾病的方法，该方法包括对需要这类治疗的病人给予金化合物和至少一种皮质类固醇，其中至少一种皮质类固醇选自与金化合物有相互的协同作用，显示对所述疾病的表征之一有优选的作用，或对所述疾病的每个表征有相等的作用。本发明也涉及适用于本方法的药物组合物。



1. 一种治疗有效量的金诺芬和莫米松糠酸酯在制备治疗与免疫介导疾病有关的炎症的药物中的应用。
- 5 2. 根据权利要求1所述的应用, 其中金诺芬和莫米松糠酸酯为同时给药的形式。
3. 根据权利要求1所述的应用, 其中金诺芬和莫米松糠酸酯为按序给药的形式。
4. 根据权利要求1所述的应用, 其中莫米松糠酸酯在金化合物后给药。
- 10 5. 根据权利要求1所述的应用, 其中疾病是免疫-介导的皮肤疾病。
6. 根据权利要求5所述的应用, 其中皮肤疾病是牛皮癣。
7. 根据权利要求5所述的应用, 其中皮肤疾病是皮炎。
8. 根据权利要求1所述的应用, 其中疾病是类风湿性关节炎。
9. 根据权利要求1-8任一所述的应用, 其中金诺芬为全身性给药形式。
- 15 10. 根据权利要求1-8任一所述的应用, 其中金诺芬为口服给药形式。
11. 根据权利要求1-8任一所述的应用, 其中金诺芬为局部给药形式。
12. 根据权利要求1-8任一所述的应用, 其中金诺芬为局部外用给药形式。
13. 根据权利要求1-8任一所述的应用, 其中金诺芬为经关节内注射给药形式。
- 20 14. 根据权利要求1-8任一所述的应用, 其中莫米松糠酸酯为全身给药形式。
15. 根据权利要求1-8任一所述的应用, 其中莫米松糠酸酯为经口服给药形式。
16. 根据权利要求1-8任一所述的应用, 其中莫米松糠酸酯为局部给药形式。
- 25 17. 根据权利要求1-8任一所述的应用, 其中莫米松糠酸酯为局部外用给药形式。
18. 根据权利要求1-8任一所述的应用, 其中莫米松糠酸酯为经关节内注射给药形式。
19. 一种药物组合物, 包括治疗有效量的金诺芬和莫米松糠酸酯。
- 30 20. 根据权利要求19所述的药物组合物, 其中组合物为全身给药的制剂。
21. 根据权利要求19所述的药物组合物, 其中组合物为口服给药的制剂。
22. 根据权利要求19所述的药物组合物, 其中组合物为局部给药的制剂。

23. 根据权利要求 19 所述的药物组合物，其中组合物为局部外用给药的制剂。

24. 根据权利要求 19 所述的药物组合物，其中组合物为关节内注射给药的制剂。

5

协同作用的含金组合物

5

技术领域

本发明涉及一种药物组合物及其它们在治疗皮肤疾病上的用途，所述的药物组合物包括与皮质类固醇组合的金化合物。

背景技术

10

自 1960 年代以来人们已经知道金化合物在治疗类风湿性关节炎中的有效性。最近，金复合物已被用于治疗类风湿性关节炎的治疗剂，但它们的真正机制仍然是未知的。最常用的复合物是水溶的，非胃肠道给药的硫羟酸金(Au(I))，如硫羟酸金盐(Mycrisin[®])和金硫代葡萄糖(Solganol[®])。结果，当口服给予辅助的关节炎大鼠时，许多烷基膦金复合物显示出抗关节炎活性。金诺芬(1-硫代- β -D-吡喃型葡萄糖 2, 3, 4, 6-四乙酰基-S)-(三已膦)-Au(I))是其中最有效的试验化合物，现被用于治疗人体的风湿性关节炎。

15

金化合物也通过静脉和口服途径给药以治疗哮喘、肺结核、普通天疱疮、各种关节炎、癌症和炎症。但是，用金化合物治疗也通常有不可接受的情况，偶然有严重的副作用。

20

皮质类固醇也被发现有相似的治疗用途。自皮质类固醇首次局部给药以来，局部给予皮质类固醇在治疗皮肤炎症和增生疾病上的成功导致人们积极地开发新的皮质类固醇。通过化学修饰天然皮质类固醇、氢可的松能增强效果，但尚未准确地了解皮质类固醇的作用机理。开发更有效的皮质类固醇已扩展到它们在各个皮肤疾病里的应用，但是，特别是长期使用也带来不利的作用。已知全身使用皮质类固醇具有诸如下丘脑脑垂体肾上腺轴抑制的全身作用。局部使用后仅在用更强力的合成的类固醇时才观察到局部副作用。

25

局部使用皮质类固醇的最常见的严重副作用是皮肤变薄，出现条纹和毛细血管扩张。长期用极有效的皮质类固醇治疗期间，炎症细胞受到影响，角质化细胞的繁殖和成纤维细胞的活性也受到抑制。

30

成纤维细胞合成了皮肤的重要结构和功能组分，即胶原质、弹力素和葡糖胺聚糖。抑制了角质化细胞繁殖导致表皮变薄。虽然对表皮的影响通常是可逆的，但真皮会被不可逆地损伤。

最近已发现在治疗诸如牛皮癣的皮肤疾病中使用金有机复合物。这样，澳大利亚专利 616,755 揭示了使用金诺芬和皮质类固醇组合的局部制剂治疗诸如与牛皮癣有关的局部炎症。特别是，用含金诺芬和倍他米松二丙酸酯的制剂治疗与相同浓度的单个活性组分比较显示了明显的协同作用。金化合物对皮质类固醇有协同作用的发现使金化合物和皮质类固醇在制剂里能以较低水平使用，这样能更有效，同时避免与单独使用金化合物或皮质类固醇有关的公知副作用。

皮肤疾病除了发炎外还伴有明显的表征。例如，牛皮癣也含细胞过度增殖(增生)的部分，其机理完全不同于发炎，因此不一定会被金/皮质类固醇制剂所影响。此外，不同皮肤病的发炎组成范围从极温和到极严重，这需要制剂改变，特别是改变皮质类固醇的选择，所选择的皮质类固醇不仅对治疗发炎症状的有效合适，且对诸如细胞增殖的另外症状的皮肤疾病也有特异的作用。

其它免疫、自体免疫和感染疾病也有多种表征，其中有效治疗可根据被治疗的疾病和对病人的评定，依赖于针对疾病表征中的一个表征，或多个表征。

本发明基于皮质类固醇与金化合物结合使用时就作用的加强程度和加强作用的类型方面存在着重要不同的发现。就是说，不同的皮质类固醇与金化合物组合时不都对炎症产生预期的相似的协同作用，对炎症和增生也有不同的协同作用。在本发明组合物中，某些皮质类固醇与金化合物协同，对诸如牛皮癣的发炎疾病有更大的效果，而其它的皮质类固醇则优选地提高组合物对细胞增殖的作用。预期本发明的组合物也可有效地用来治疗各种全身性，组织特异或局部化的免疫、自体免疫和炎症疾病。

发明内容

本发明的第一方面是治疗有炎症和/或细胞增殖症状的免疫介导疾病的方法，包括对需要这类治疗的病人给予金化合物和至少一种皮质类固醇的步骤，其中至少一种皮质类固醇选自与金化合物相互协同，对所述疾病的症状之一有优先作用，或对所述疾病的每个症状显示相同作用。

本发明优选的技术方案是治疗第一方面所述的免疫介导的疾病的方法，包括给予至少两种皮质类固醇的步骤，所选择的至少一种皮质类固醇与金化合物相互作用，对炎症有优先的协同作用，所选择的另外的至少一种皮质类固醇与金化合物相互作用，对所述疾病的细胞增殖症状有优先的协同作用。

本发明的另一个优选技术方案是治疗有多个症状的免疫介导的疾病的方法，所述的方法包括对需要这类治疗的病人给予一种或多种组合物的步骤，所述的组合物包含一种金化合物和一种或多种皮质类固醇，其中所选择的皮质类固醇提供了一种对所述疾病的症状有相等协同作用的组合物。

- 5 本发明的另一个优选的技术方案是治疗有一个或多个症状的免疫介导的疾病的方法，所述的方法包括对需要这类治疗的病人给予一种含金化合物的组合物和一种或多种含一种或多种皮质类固醇的组合物的步骤，其中所选择的皮质类固醇提供了一种组合物，它对所述疾病的症状之一有优先的协同活性，其中含金化合物的组合物被口服给药，含一种或多种的皮质类固醇的一种或多种组合物被局
10 部外用给药，其用量是有效地提供金和皮质类固醇组合物对所述症状有优先协同作用的量。

优选的是，免疫介导疾病的症状是炎症和/或细胞增殖症状，组合物包括至少两种皮质类固醇，选择其中一种以提供对炎症有优先协同作用的组合物，选择第二种皮质类固醇以提供对所述疾病的细胞增殖症状有优先协同作用的组合物。

- 15 优选的是，被治疗的疾病是免疫介导的皮肤疾病，它有一种以上的表征。免疫介导的皮肤疾病包括牛皮癣或皮炎，如接触性皮炎、特异反应性皮炎或脂溢性皮炎。其它疾病包括类风湿性关节炎。典型的症状包括发炎和/或细胞增殖。细胞增殖症状由细胞增生所表现。可选择皮质类固醇，以提供对细胞增殖的协同活性优先于炎症的组合物，反之亦然。这类皮质类固醇可选自，如倍他米松二丙酸盐、氟轻松或氢可的松。对于对炎症作用优先于对细胞繁殖作用的情况，皮质类
20 固醇优选地选自倍他米松二丙酸盐、氟轻松或莫米松糠酸盐。

组合物适合配制成局部给药的制剂。

- 当免疫介导的疾病特征在于许多不同症状时，优选的治疗方法是使用一种或多种组合物，所述的组合物包含金化合物和一种或多种皮质类固醇，其中皮质
25 类固醇被选择来提供仅对所述疾病的一个症状有优先活性的组合物。这样，每个单个症状通过使用含一种或多种选定的皮质类固醇的组合物来治疗，它们可以两种或多种分开的组合物形式或含两种或多种皮质类固醇的单组合物形式施加。

优选的是，用于本发明的金化合物是脂溶性的。更优选的是，使用的金化合

物被配制成局部外用给予的制剂。但是，应当明白，全身或局部给予的组合物，包括通过注射，优选的是关节内注射的组合物也在本发明的范围里。就此而言，皮质类固醇可配制成供口服、局部外用、全身或局部给药的制剂。

5 本发明的另一个方面是包含金化合物和一种或多种皮质类固醇，并结合了药理学上可接受的载体、赋形剂、佐剂或溶剂的药物组合物，选择皮质类固醇以提供对免疫介导的疾病的特定表征有特异作用的协同组合物。

优选的是，金化合物是金诺芬，皮质类固醇选自氢可的松乙酸酯、氢可的松、倍他米松、地塞米松、氟可龙 21-新戊酸酯、曲安奈德、倍他米松戊酸酯、阿氯米松二丙酸盐、哈西奈德、倍他米松二丙酸盐、莫米松糠酸盐或氟轻松。更好的
10 皮质类固醇选自氢可的松、倍他米松二丙酸盐、莫米松糠酸盐或氟轻松。

附图说明

图 1：显示金诺芬和糖皮质激素单独使用或组合使用对 TPA-诱导的上皮增生的作用的柱状图。BMD：倍他米松二丙酸盐；HYD：氢可的松；FA：氟轻松；MMF：莫米松糠酸盐；AF：金诺芬。纵线表示平均标准差(SEM)。
15

图 2：显示金诺芬和糖皮质激素单独使用或组合使用对 TPA-诱导的炎症细胞渗透作用的柱状图。BMD：倍他米松二丙酸盐；HYD：氢可的松；FA：氟轻松；MMF：莫米松糠酸盐；AF：金诺芬。纵线表示平均标准差(SEM)。

具体实施方式

20

常规来说，TPA(12-O-四癸基佛波醇 13-乙酸酯)，牛皮癣的模式，作为有炎症和细胞增殖的免疫介导疾病的例子，可用来显示不同皮质类固醇的特异作用及金化合物和皮质类固醇不同制剂的特异作用。

虽然除人体外的动物不发生牛皮癣，但研究显示，使用 TPA 产生了许多方面类似于牛皮癣的具有上皮增厚的炎症反应。它产生了上皮增生，发炎细胞渗入真皮。两者特征都是牛皮癣的特征。
25

TPA 增加了磷酸酯酶 C/肌醇三磷酸酯/二酰基甘油系统的活性。该系统活化了蛋白质激酶 C 和花生四烯酸途径。这些系统都隐含了牛皮癣致病病理。以 TPA 处理的小鼠被认为是牛皮癣的适宜的模型。该动物模式可被用来显示不同皮质类固醇的不同作用和含金化合物和皮质类固醇组合物的协同效果。
30

测量三种参数：皮肤交迭厚度、上皮增生和发炎细胞渗入真皮。这些特征，特别是最后两个特征是牛皮癣的证明。但是，值得注意的是，目前的发现已清楚

地涉及到超出仅对皮肤治疗的范围。用本发明组合物治疗对全身或组织发炎和增生病情也是有利。

局部外用的皮质类固醇

根据它们的强度可将局部外用的皮质类固醇分组：弱，中等，强和极强。血管收缩分析被认为是评价各种制剂强度的最好方法。尚未知测量血管收缩是否能预报抗炎活性。可得到的其它分析方法包括临床试验、真皮厚度放射线照片、上皮厚度的解剖评估和有丝分裂抑制分析。

表 1 显示了对局部外用皮质类固醇制剂相对效力的有用的临床指南，对于软膏剂和霜剂有相同的等级划分。每组制剂大致等效。

10

表 1 局部外用皮质类固醇临床效果指南

弱	中等	强	极强
地塞米松 0.01%	阿氯米松二丙酸酯 0.05%	安西奈德 0.1%	倍氯米松二丙酸酯 0.5%
氟轻松 0.0025%	倍他米松戊酸酯 0.025%	倍氯米松二丙酸酯 0.025%	丙酸氯倍他素 0.05%
氢可的松 0.5%和 0.1%	氟倍他松丁酸酯 0.05%	倍他米松苯甲酸酯 0.025%	二氟可龙戊酸酯 0.3%
氢可的松乙酸酯 1 %	倍他米松 0.05%	倍他米松二丙酸酯 0.05 %	氟轻松 0.2%
甲基泼尼松龙 0.25%	氟米松新戊酸酯 0.02%	倍他米松戊酸酯 0.1%	
	氟轻松 0.01%	布地奈德 0.025%	
	氟可丁丁酯 0.75%	地奈德 0.05%	
	氟可龙 0.2%	地塞米松 0.25%	
	氟氢缩松 0.0125%-0.025%	双醋二氟拉松 0.05%	
	氢可的松 1 % ,具有脲	二氟可龙戊酸酯 0.1%	
		氟氯奈德 0.025%	
		氟轻松 0.025%	
		醋酸氟轻松 0.05%	
		氟可龙 0.5%	
		醋酸氟泼尼定 0.1%	
		氟氢缩松 0.05%	
		哈西奈德 0.1%	
		氢可的松丁酸酯 0.1%	
		莫米松糠酸酯 0.1%	
		曲安奈德 0.1%	

本发明将参照特定的技术方案通过非限定性实施例作更特定的揭示。

实施例 1：动物处理和测量方法

材料

5 金诺芬由 Smith Kline 和 Beecham Pharmaceuticals(美国费城)捐献。

阿氯米松二丙酸酯、倍他米松二丙酸酯、倍他米松戊酸酯、倍他米松(游离醇)和莫米松糠酸酯由 Schering-Plough Pty. Ltd.(澳大利亚, NSW)捐献。

哈西奈德、氢可的松和曲安奈德由 Bristol-Myers Squibb Pharmaceuticals Pty. Ltd.捐献。

10 地塞米松由 Roussel Uclaf(法国巴黎)捐献。

氟可龙 21-新戊酸盐由 Schering AG.(德国柏林)捐献。

从 Sigma Chemical Company(澳大利亚 NSW)得到 12-O-四癸基佛波醇 13-乙
酸酯、氟轻松、硫酸钾铝、碳酸氢钠、碘酸钠、硫酸镁、曙红 Y、焰红染料、碳
酸钙、甲醛乙酸(17M)、百里酚、二甲苯、苏木精和“Paraplast”组织埋入介质。

15 从 Wille 实验室(澳大利亚昆士兰)得到 Sorbolene 霜 A.P.F..

金诺芬 0.2%溶液的制备

将金诺芬(20 毫克)溶于 10 毫升丙酮, 得到浓度为 0.2%。每个实验新鲜制备
金诺芬溶液。

金诺芬软膏的制备

20 根据下列配方制备各种浓度的金诺芬软膏:

<u>浓度(% 重量/重量)</u>	<u>金诺芬</u>	<u>丙二醇(10%)</u>	<u>白色软石蜡</u>
0.20	40mg	2 克	加到 20 克
0.50	100mg	2 克	加到 20 克

动物的处理方法

从悉尼大学得到 6-8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠, 根据悉尼大学动物照料和道德规范委员会许可的方案进行处理。

25 将小鼠喂养在不锈钢的笼子里, 在实验前于正常的实验条件(约 22 °C 的室温)
下每个笼子放置 6 个小鼠达至少 7 天以顺应环境。在实验阶段随意给予食物和
水。在每个处理前两天, 用电剪刀刮去小鼠背上的毛, 只使用没有鼠毛再生长
的小鼠(即选择处于毛发生长周期中的休息相的小鼠)。在处理期间, 举起小鼠尾巴,
放在笼子的顶部使它们能拉住笼子, 并在其上休息。通过用“Pipetman”将溶液
施加到已刮去毛背部的面积约 2cm × 2cm 上。若施加金诺芬软膏或软膏基, 则通

- 过使用一端卷曲的微量药刀使用量标准化,然后将软膏放入隆起部,通过另一个微量药刀除去过量的物质,节制地每天施加两次。在固定的时间后,在上午9点到11点之间通过颈部转位来常规地杀死小鼠以避免由于昼夜节律改变引起的变化,用手术刀和剪刀从处理部位的中央割下(1厘米×1厘米)的区域。剩余的组织
- 5 通过焚烧除去。然后使组织固定、嵌入、切片和染色。

皮肤切片的制备方法

悉尼大学病理学系开发的方法适合于皮肤切片的制备,并得以成功。

固定、嵌入、切片和染色

- 使用标准的制备方法。简言之,将组织在10%缓冲的福尔马林里固定24小
- 10 时,用自来水冲洗10分钟,然后在自动组织处理器(Tissue-Tek VIP 200)里处理。在自动组织处理器里,组织在梯度系列的醇和二甲苯里于室温下脱水,然后在60℃下4次更换石蜡进行渗透(“Paraplast”组织标本介质)。最后嵌入了新鲜的石蜡里。

- 在 American Optical Spencer “820”显微镜用薄片切片机上切割5微米厚的
- 15 切片。然后用木胶水(“Selleys”等分物,用水1:100稀释)作为粘合剂将切片放置在洁净的显微镜片上,在45℃的烘箱里干燥至少2小时(通常过夜)。

当切片在 Scott 蓝色溶液里染蓝后,在显微镜下检查,以确定核被清楚地染色,细胞质未被染色。

皮肤交迭厚度的测量

- 20 使刮毛小鼠的背部皮肤交迭并用“Etalon”微米螺旋计量器测量。每个小鼠进行一次测量。

测量上皮厚度

- 通过成像分析来测定上皮厚度。该成像分析系统是一个与光显微镜(Zeiss Axioplan)和摄像机-录像机组合装置(Sony DXC-3000P)连接的小型计算机(Tracor
- 25 Northern TN8500)。从每个组织段上取出切片,每个切片以固定的间隔进行20次测量。得到20次测量的平均值作为每个小鼠的一个值。计算每个处理组里的6个小鼠的平均值和SEM。

测量炎症细胞的渗透

- 通过相同的成像分析系统,用埋入石蜡或 Spurr 树脂的来自小鼠块的切片,
- 30 并依次用苏木柴和曙红或甲苯胺蓝染色来测定炎症细胞的渗透。对于每个切片,除非另外指出,任意选择10个区域,并测定选定区域每 mm^2 的细胞密度。得到10个区域的平均值,作为每个小鼠的一个值。计算每个处理组里6个小鼠的平均

值和 SEM 值。

测定炎症细胞的渗透包括在真皮里的其它材料以相同的方法染色的基底值。但是，增长值反映了炎症细胞的迁移。

数据处理

- 5 用下式计算出药物对 TPA-诱导的皮肤反应(即上皮增生、炎症细胞渗透和皮肤交迭厚度)的抑制百分数:

$$\text{抑制百分数} = \frac{\text{归于TPA的总反应} - \text{归于药物的总反应}}{\text{归于TPA的总反应} - \text{归于丙酮的总反应}} \times 100\%$$

通常发现，剂量(或浓度)和反应之间的关系可用 Michaelis Menton 等式或其变体，如 Hill 等式来阐述。这使得人们能评估(a)效力，(b)效应或最大作用($E_{\text{最大}}$)

- 10 和通过使用 Hill 系数(γ)评估对数浓度-反应曲线的斜率。Hill 等式如下所示:

$$E = \frac{E_{\text{最大}} \times C^{\gamma}}{IC_{50}^{\gamma} + C^{\gamma}}$$

- 其中 IC_{50} 是产生最大反应的 50 % 时药物的浓度， $E_{\text{最大}}$ 指由药物产生的最大作用，也称为效应。效应是测量药物在其占据受体位点后引发反应的固有能
15 力。在比较相似药物的活性时测定 $E_{\text{最大}}$ 和 IC_{50} (效力)是很关键的。Hill 系数(γ)测量了剂量-作用曲线的斜率，它明显地被揭示药物与受体结合的曲线的形状所影响。对于许多药物， γ 在 0.6 和 1.5 之间。使用 Hill 系数不仅改进了数据的固定性，而且也指出了剂量或浓度对反应影响的改变：例如当 γ 大于 1 时，斜率很陡，表示与药物剂量或浓度有小的改变时药物作用即有很明显的改变。另一方面，当 γ 小于 1，具有浅的双曲线浓度效应关系时，在很宽的药物水平范围里有活性。因此， γ
20 的不同值会戏剧性地影响药物的临床应用。

在本研究里，对于一系列的皮质类固醇观察得到的浓度-反应曲线。在这些实验中，用称为“科学家”(MicroMath Scientific Software, 美国犹他州，盐湖城)的计算机程序制出曲线，其中通过使用非线性回归和最小平方配合(least square fits)对每个类固醇的参数、 $E_{\text{最大}}$ 、 IC_{50} 和 Hill 系数(γ)进行评估。

- 25 处理之间的总的不同处通过变体单向分析来测定，同时用 Tukey HSD 试验来检查特定差别的重要性水平。使用 Windows 程序的 Systat (Systat Inc., 美国伊利诺斯)。

实施例 2：TPA 对小鼠皮肤的作用

进行该研究以测定对小鼠施加 TPA 产生作用的时间进程和在 1、2、3、5

和 8 天时的杀死率。测定上皮增生、真皮发炎和皮肤交迭厚度的峰值时间。该研究的目的是测定杀死 TPA-处理过小鼠的最佳时间以得到对 TPA 最大的反应。文献表明，TPA-诱导的上皮增生和真皮发炎的峰值发生在不同的时间。这样预计可选择折衷的时间。

- 5 将 42 只雌性 BALB/c 小鼠划分成各处理组，用 TPA(0.01%丙酮中)(100 微升)单剂处理，在 1、2、3、5 和 8 天宰杀，按实施例 1 所述测量 TPA 对上皮增生、真皮发炎细胞渗透和皮肤交迭厚度的时间进程。

皮肤对 TPA 的反应综述如下：

	1 天	2 天	3 天	5 天	8 天
上皮厚度的增加	326 %	382 %	393 %	270 %	130 %
真皮炎症细胞密度的增加	397 %	296 %	272 %	280 %	225 %
皮肤交迭厚度的增加	193 %	142 %	124 %	116 %	107 %

- 10 该实验显示，单剂给予 TPA 导致的上皮增厚、真皮发炎和皮肤交迭增加持续至少 8 天。在 72 小时观察到上皮增生的峰值效应，在 24 小时观察到真皮发炎和皮肤交迭增厚的峰值作用。

- 15 基于这些结果，现决定了大多数实验的折衷的时间是单剂给予 TPA 后的 24 小时杀死动物。这是由于对于发炎和皮肤交迭增厚达到了最大作用，对于上皮增生几乎是最大作用(是峰值作用的 80 %)。除非另作阐述，在给予 TPA 后 24 小时杀死小鼠。

实施例 3：不同皮质类固醇的作用

首先研究单独的皮质类固醇对 TPA 损害的抑制。对下列皮质类固醇组进行实验(对皮质类固醇效力的分类依据所用的浓度、赋形剂的组成和被研究的作用)(表 1)。

- 20 低效力：倍他米松、地塞米松、氢可的松、醋酸氢可的松

中等效力：阿氯米松二丙酸酯、氟可龙 21-新戊酸酯、

高效力：倍他米松二丙酸酯、倍他米松戊酸酯、氟轻松、哈西奈德、莫米松糠酸酯、曲安奈德

- 25 将小鼠划分成各处理组。将 TPA 和皮质类固醇预先混合成所需的浓度，并立即施加到小鼠的背部。对于不易溶于丙酮的类固醇(即，倍他米松、地塞米松、氢可的松和氢可的松乙酸酯)，在用丙酮稀释前溶于 100 微升的二甲基甲酰胺。如前所述来评定皮质类固醇对抑制上皮增生、发炎细胞渗透和皮肤交迭增厚的效应。在计算机固定数据后测定浓度-反应曲线。通过所谓的“科学家”计算机程序

产生曲线固定技术, 其中产生了 Hill 等式里的参数。这些包括每个类固醇的 $E_{\text{最大}}$ 、 IC_{50} 和 Hill 系数(γ)。作出每个类固醇的浓度-反应曲线, 从 IC_{50} 值测定相对的效力。比较每个被试验的皮质类固醇的 IC_{50} 比率的变化。这些数据与文献进行比较, 它反映了类固醇的相对固有效力。

5

表 2 通过各种类固醇显示的关于 Hill 等式里的 $E_{\text{最大}}$ 、 IC_{50} 和 γ 来综述抑制 TPA-诱导的上皮增生的浓度-反应曲线

皮质类固醇	$E_{\text{最大}}$ (抑制%)	$IC_{50}(M \times 10^{-4})$	γ
阿氯米松二丙酸酯	96.59±7.90 (76.28-116.90)	0.89±0.30 (0.16-1.67)	0.67±0.12 (0.36-0.97)
倍他米松	94.19±7.33 (75.35-113.04)	13.81±3.73 (4.22-23.39)	0.81±0.11 (0.51-1.10)
倍他米松二丙酸酯	95.59±6.55 (82.14-109.04)	0.81±0.36 (0.49-1.13)	0.54±0.06 (0.37-0.71)
倍他米松戊酸酯	82.24±2.84 (75.69-88.78)	0.15±0.02 (0.10-0.20)	0.94±0.12 (0.66-1.21)
地塞米松	90.70±5.72 (76.72-104.69)	1.26±0.44 (0.85-1.67)	0.50±0.08 (0.31-0.69)
氟轻松	89.60±6.93 (70.36±108.85)	0.39±0.14 (0.043-0.78)	0.75±0.23 (0.12-1.38)
氟新诺隆 21-新戊酸酯	85.18±9.51 (58.79-111.58)	0.40±0.15 (0.12-0.68)	0.97±0.30 (0.13-1.82)
哈西奈德	92.55±2.98 (85.25-99.85)	0.97±0.13 (0.66-1.27)	0.78±0.06 (0.62-0.94)
氢可的松	99.04±9.54 (72.56-125.51)	46.18±13.22 (9.47-82.90)	0.96±0.17 (0.49-1.44)
氢可的松乙酸酯	79.63±7.62 (60.04-99.23)	36.67±12.01 (5.80-67.56)	0.79±0.13 (0.46-1.13)
莫米松糠酸酯	83.31±3.04 (76.11-90.51)	0.23±0.04 (0.14-0.33)	0.79±0.11 (0.53-1.04)
曲安奈德	89.80±6.40 (74.14-105.46)	1.13±0.35 (0.28-1.98)	0.75±0.15 (0.39-1.11)

以平均值±SD 表示结果。括弧里的数据是置信区间

表 3 通过各种类固醇显示的关于 Hill 等式里的 $E_{\text{最大}}$ 、 IC_{50} 和 γ 来综述抑制 TPA-诱导的发炎细胞渗透的浓度-反应曲线

皮质类固醇	$E_{\text{最大}}$ (抑制 %)	$IC_{50}(M \times 10^{-4})$	γ
阿氯米松二丙酸酯	82.12±5.65 (67.58-96.66)	0.32±0.09 (0.10-0.54)	0.97±0.26 (0.31-1.63)
倍他米松	74.5±3.29 (66.09-83.01)	13.12±1.65 (8.87-17.37)	1.28±0.17 (0.85-1.71)
倍他米松二丙酸酯	90.77±3.71 (83.18-98.37)	0.29±0.06 (0.16-0.41)	0.52±0.06 (0.39-0.65)
倍他米松戊酸酯	73.52±1.76 (69.46-77.57)	0.29±0.03 (0.22-0.34)	0.93±0.07 (0.77-1.09)
地塞米松	99.05±10.98 (72.18-125.93)	4.44±1.02 (3.19-5.69)	0.73±0.19 (0.25-1.20)
氟轻松	79.60±2.41 (74.05±85.15)	0.16±0.02 (0.11-0.21)	1.05±0.14 (0.72-1.38)
氟新诺隆 21-新戊酸酯	97.19±12.16 (64.15-131.67)	1.10±0.40 (0.55-1.65)	0.94±0.21 (0.36-1.54)
哈西奈德	90.34±6.29 (74.94-105.74)	0.31±0.05 (0.14-0.48)	0.60±0.11 (0.32-0.88)
氢可的松	100.29±9.36 (71.35-129.23)	61.48±9.66 (39.13-83.83)	0.57±0.26 (0.25-0.89)
氢可的松乙酸酯	79.36±11.49 (59.39-99.33)	77.33±13.85 (60.28-94.58)	1.11±0.27 (0.42-1.80)
莫米松糠酸酯	89.98±4.88 (78.45-101.51)	0.20±0.05 (0.08-0.33)	0.69±0.14 (0.37-1.01)
曲安奈德	77.24±1.26 (74.15-80.33)	0.39±0.03 (0.33-0.46)	1.42±0.11 (1.14-1.70)

5 以平均值±SD 表示结果。括弧里的数据是置信区间。

表 2 和 3 对该研究中研究的 12 个皮质类固醇的效应($E_{\text{最大}}$)、效力(IC_{50})和浓度-反应曲线(γ)进行了评估。这些数值来自改进 Michaelis-Menton 等式的 Hill

等式得到。

IC₅₀ 值之间明显优良的相关性表明对炎症和上皮增生的抑制由相同机制调节，或在产生两种效应里的限制因子是甾族化合物渗透到皮肤里去的能力。两种效应的最大效应(E_{最大})和浓度-反应曲线的斜率(γ)相关性差的事实提示，在甾族化合物抑制炎症和上皮增生时涉及不同的机理。另外，当某些局外药物的作用除去时，不会给人留下 IC₅₀ 值之间有相关性的印象。除去局外物的作用如表 4 所示：

表 4： IC₅₀ 值(炎症对表皮增生)

IC ₅₀ 值的图 (炎症对表皮增生)	r (来自 Hill 等式)	r (当 IC ₅₀ =对 TPA 作用抑制一半时从图上读取)
包括所有的药物	0.961(p<0.0005)	0.909(p<0.0005)
氢可的松， 不包括氢可的松乙酸酯	0.959(p<0.0005)	0.988(p<0.0005)
氢可的松、 氢可的松乙酸酯、 倍他米松二丙酸酯、 地塞米松 不包括氟可龙 21-新戊酸酯	0.741(p=0.057)	0.637(p=0.072)

从上述结果可见，甾族化合物通过不同的机理，或是诱导不同的生化反应或在不同细胞系里产生相同的反应来抑制 TPA 的炎症和增生作用。该结论与金诺芬可能的协同作用极为相关。

从 Hill 等式测定 E_{最大}值由于在浓度-反应曲线的顶部进行的测量有些不确定，故可能会发生错误。因此，通过两种方法测定 IC₅₀ 值：(a)用 Hill 等式产生的 E_{最大}值(表 5 和 6)，(b)直接来自浓度-反应曲线，读取使 TPA-诱发的增生和炎症的抑制达 50 % 的浓度的 IC₅₀ 值(表 7 和 8)。由两种方法测定的 IC₅₀，及相应的效力之间的差异不是很大。但是，直接从浓度-反应曲线上读取更为可信，这些读数可用来计算表 9 和 10 里的“协同因子”。

表 5 局部用的皮质类固醇抑制 TPA-诱导的表皮增生的真正效力和相对效力 [Hill 等式产生的值, 其中 IC_{50} 是产生最大抑制作用($E_{最大}$)的 50 % 时的浓度]

皮质类固醇	抑制表皮增厚的 $IC_{50}(M \times 10^{-4})$	相对效力
氢可的松乙酸酯	36.67	1.0
氢可的松	46.18	0.79
倍他米松	27.25	1.35
地塞米松	1.26	29.10
曲安奈德	1.13	32.45
氟氯松	0.97	37.80
阿氯米松二丙酸酯	0.89	41.20
倍他米松二丙酸酯	0.81	45.27
氟可龙 21-新戊酸酯	0.4	91.68
氟轻松	0.39	94.03
莫米松糠酸酯	0.23	159.43
倍他米松戊酸酯	0.15	244.47

表 6 局部用的皮质类固醇抑制 TPA-诱导的发炎细胞渗透到真皮的真正效力和相对效力 [Hill 等式产生的值, 其中 IC_{50} 是产生最大抑制作用($E_{最大}$)的 50 % 时的浓度]

皮质类固醇	抑制发炎细胞渗入真皮的 $IC_{50}(M \times 10^{-4})$	相对效力
氢可的松乙酸酯	77.33	1.0
氢可的松	61.48	1.26
倍他米松	13.12	5.89
地塞米松	4.44	17.42
氟可龙 21-新戊酸酯	1.10	70.30
曲安奈德	0.39	198.28
阿氯米松二丙酸酯	0.32	241.66
氟氯松	0.31	249.45
倍他米松二丙酸酯	0.29	26.66
倍他米松戊酸酯	0.29	266.66
莫米松糠酸酯	0.20	386.65
氟轻松	0.16	483.31

表 7 局部用的皮质类固醇抑制 TPA-诱导的表皮增生的真正效力和相对效力 [从浓度-反应曲线中读取的值, 其中 IC_{50} 是抑制 TPA 作用 50 % 时的浓度]

皮质类固醇	抑制表皮增厚的 $IC_{50}(M \times 10^{-4})$	相对效力
氢可的松乙酸酯	70.00	1.0
氢可的松	45.10	1.55
倍他米松	50.00	1.40
地塞米松	2.00	35.0
曲安奈德	1.40	50.0
倍他米松二丙酸酯	1.40	50.0
氟氯松	1.10	63.64
阿氯米松二丙酸酯	1.00	70.0
氟可龙 21-新戊酸酯	0.60	116.67
莫米松糠酸酯	0.40	175.0
倍他米松戊酸酯	0.22	318.18
氟轻松	0.21	333.33

表 8 局部用的皮质类固醇抑制 TPA-诱导的发炎细胞渗透到真皮的真正效力和相对效力 [从浓度-反应曲线中读取的值, 其中 IC_{50} 抑制 TPA 作用的 50 % 时的浓度]

皮质类固醇	抑制发炎细胞渗入真皮的 $IC_{50}(M \times 10^{-4})$	相对效力
氢可的松乙酸酯	110.0	1.0
氢可的松	60.0	1.83
倍他米松	21.0	5.23
地塞米松	4.10	26.83
氟可龙 21-新戊酸酯	1.10	100.0
曲安奈德	0.70	157.14
倍他米松戊酸酯	0.65	169.23
阿氯米松二丙酸酯	0.60	183.33
氟氯松	0.60	183.33
倍他米松二丙酸酯	0.40	275.0
莫米松糠酸酯	0.30	366.67
氟轻松	0.25	440.0

在本研究中，氢可的松、氢可的松乙酸酯、倍他米松和地塞米松对于抑制 TPA-诱导的表皮增生和 TPA-诱导的炎症细胞渗透具有低到中等的效力。这个级别与表 1 小时的临床设定的相应效力是相符的。

哈西奈德、曲安奈德、阿氯米松二丙酸酯、倍他米松二丙酸酯、氟可龙 21-新戊酸酯在抑制 TPA-诱导的表皮增生和炎症系统渗透中具有中等到强大的效力，这些值与临床效力相符。

最后，莫米松糠酸酯、倍他米松戊酸酯、倍他米松二丙酸酯和氟轻松对于 TPA-诱导的表皮增生有强到极强的效力。在它们之中，倍他米松戊酸酯显示出最强的效力。在研究抑制 TPA-诱导的炎症细胞渗透时，它们也显示出强到极强的抗炎作用。氟轻松是最强效的药物，相对效力为 483(表 6)或 440(表 8)。

当对该研究里试验的甾族化合物的相对效力和它们各自的临床效力进行比较时，效力的次序一般是相同的。

可以预期，特定的皮质类固醇会有相同的抗增生和抗炎作用。我们的结果显示这些反应不一定很密切地相关。对于抑制甾族化合物的增生作用的相对效力对抑制炎症的相对效力进行线性回归在表 5 和 6 里的数据得到 $r=0.573(p=0.51)$ ，对于表 7 和 8 的值为 $r=0.658(p<0.02)$ 。这样，两个作用之间约 65 % 的差异似乎是由于一些普通的性质(可为脂溶性)引起的，但这些作用明显的组成抑制增生和炎症来说是明显不同的。这也可通过比较表 7 和 8 的效力级别来显示。12 个甾族化合物中只有 6 个具有同样级别的作用，4 个具有四个最小效力。

实施例 2：金诺芬和具有不同临床效力的皮质类固醇的协同作用

最初研究的结果表明，在某些条件下，金诺芬对 TPA 某些作用有抑制，但没有特定的效力。

本研究测定了金诺芬和皮质类固醇的组合是否在抑制 TPA 损伤上有协同作用。

选择 4 种具有不同临床效力的、级别从弱到强的皮质类固醇，即氢可的松、氟轻松、倍他米松二丙酸酯和莫米松糠酸酯。使 TPA 与皮质类固醇在有固定浓度的金诺芬(0.2%)或没有金诺芬的存在下进行预混合，以得到所需的浓度，并马上施加到小鼠的背部。用最小平方适配通过非线性回归测定浓度-反应曲线。通过从相应于 TPA 产生的 50 % 作用处的图上读取数据来测定 IC_{50} (表 9 和 10)。

术语“表观 IC_{50} ”是指甾族化合物和金诺芬的组合值。

表 9 计算机匹配图上得到的有或没有金诺芬(0.2%)存在下四种皮质类固醇对 TPA-诱导的表皮增生作用的表观 IC_{50}

	表观 IC ₅₀ (M × 10 ⁻⁴)		
皮质类固醇	没有金诺芬	有醋硫葡萄金	协同因子
倍他米松二丙酸酯	1.40±0.36	0.025±0.003	56.0
氢可的松	45.00±13.22	22.00±11.23	2.05
氟轻松	0.21±0.14	0.016±0.002	13.13
莫米松糠酸酯	0.40±0.04	0.31±0.05	1.29

结果表示为平均值±SD。

表 10 计算机匹配图上得到的有或没有金诺芬(0.2%)存在下四种皮质类固醇对 TPA-诱导的真皮发炎细胞渗透作用的表观 IC₅₀

	表观 IC ₅₀ (M × 10 ⁻⁴)		
皮质类固醇	没有金诺芬	有醋硫葡萄金	协同因子
倍他米松二丙酸酯	0.40±0.06	0.090±0.016	4.44
氢可的松	60.00±9.66	31.00±4.12	1.94
氟轻松	0.25±0.002	0.116±0.013	2.27
莫米松糠酸酯	0.30±0.05	0.008±0.001	37.50

5 结果表示为平均值±SD。

“协同因子”值被定义为没有金诺芬存在下测得的甾族化合物的 IC₅₀除以有金诺芬(0.2%)存在下相同甾族化合物的 IC₅₀。

协同作用指两种药物的组合产生的作用明显大于每个药物相同的剂量或浓度在相同的试验系统里分别观察到的作用的代数和的情况。协同导致一种药物或
10 两种药物的作用数倍地加强，或它可产生单独使用时药物产生的性质上不同的作用。

关于对表皮增生的作用，只有四种甾族化合物中只有两种与金诺芬产生协同反应，即倍他米松二丙酸酯和氟轻松。从表 9 和 10 显示的结果来看，对于倍他米松二丙酸酯和氟轻松，表观效力的百分增长各自为 5,600%和 1,300 %。但是，
15 对于四种甾族化合物中最小效力的化合物，即氢可的松，表观效力增长为 100 %。显示真实的协同作用的更有效的方法是分开比较下列情况：

- 1)单独使用金诺芬(0.2%)，
- 2)单独使用低浓度甾族化合物(足以抑制约 20 % 的 TPA 作用-该值可从甾族化合物单独研究时的浓度-反应曲线上读取)，
- 20 3)在(2)中的甾族化合物的相同浓度与金诺芬(0.2%)组合使用-该值可从在金

诺芬存在下的甾族化合物的剂量-反应曲线里读取, 和

4)在(2)中使用的相同甾族化合物, 但其浓度是足以产生(3)相同作用的浓度。

若(3)的作用是(1)和(2)的总和, 该结果没有协同作用。若(3)的作用大大超过(1)和(2)算术上的和, 根据我们的定义, 该结果是有协同作用的。

5 图 1 显示了表皮增生的结果。在所有四个研究中, 单独使用的金诺芬抑制了约 10 % 的 TPA-诱导的表皮增生。单独使用倍他米松二丙酸酯 $1 \times 10^{-5}\text{M}$ 对 TPA 作用抑制达 20 %。倍他米松二丙酸酯($1 \times 10^{-5}\text{M}$)和金诺芬(0.2%)对 TPA 作用产生了约 65 % 的抑制。为了估计当金诺芬加到倍他米松二丙酸酯中时得到的增长作用的明显性, 应当比较没有金诺芬时产生相同作用的倍他米松二丙酸酯浓度。

10 该值是 $5 \times 10^{-4}\text{M}$ 或产生有金诺芬存在下相同作用的浓度的 50 倍。

关于表皮增生, 研究显示: (a)当金诺芬加到倍他米松二丙酸酯和氟轻松里时, 有很大的协同结果; (b)氢可的松和金诺芬的组合得到轻微的协同作用; 和(c)当金诺芬与莫米松糠酸酯共同给药时没有协同作用, 甚至没有加成作用。

对于发炎细胞渗入真皮, 表 10 的结果表示, 金诺芬(0.2%)和莫米松糠酸酯的
15 组合作用是协同作用的结果, 因为表观 IC_{50} 增加到约 3, 800 %。在 0.2%金诺芬存在下倍他米松二丙酸酯的抗炎作用也有较小程度的协同作用。这里表观 IC_{50} 的增长是 400-500 % 级别(表 10)。

图 2 的结果显示莫米松糠酸酯($5 \times 10^{-6}\text{M}$)和金诺芬(0.2%)之间有很大的协同作用。该组合产生的作用相当于没有金诺芬存在下由 $1 \times 10^{-3}\text{M}$ 产生的作用。图
20 2 也表示金诺芬与倍他米松二丙酸酯和氟轻松组合有协同作用, 但与氢可的松组合没有协同作用。

这些研究的结果表示, 金诺芬与某些皮质类固醇, 如与倍他米松二丙酸酯和氟轻松组合在减少表皮增生上, 和与莫米松糠酸酯的组合对减少炎症有很强的协同作用。在金诺芬与其它甾族化合物之间的协同作用较小。

25 在澳大利亚专利 616 755 已经详细讨论了适用于本发明的金化合物和皮质类固醇, 及其它们的配方, 该专利掺入本文供参考。

