



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101056626 B

(45) 授权公告日 2011. 12. 14

(21) 申请号 200580038446. 2

(22) 申请日 2005. 11. 04

(30) 优先权数据

0424833. 2 2004. 11. 10 GB

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007. 05. 10

(86) PCT申请的申请数据

PCT/GB2005/004253 2005. 11. 04

(87) PCT申请的公布数据

W02006/051269 EN 2006. 05. 18

(73) 专利权人 弗托库尔公司

地址 挪威奥斯陆

(72) 发明人 阿斯莱克·戈戴尔 乔·克拉维内斯

希尔德·莫里斯

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 陈桢

(51) Int. Cl.

A61K 31/197(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1533271 A, 2004. 09. 29, 说明书第 5 页第 5 段至第 11 页第 5 段.

CN 1460099 A, 2003. 12. 03, 说明书第 8 页 4 段, 第 9 页第 1 段, 第 11 页第 6 段至第 12 页第 7 段, 第 13 页第 5 段, 第 14 页第 2 段, 第 32 页第 1 段至 36 页.

W0 9628412 A1, 1996. 09. 19, 说明书第 1 页第 2 段, 第 15 页第 3 段, 第 25 页第 2 段.

US 20040048842 A1, 2004. 03. 11, 说明书第 2 段, 第 12 段.

CN 1243445 A, 2000. 02. 02, 说明书第 7 页第 4 段至第 11 页第 4 段, 第 21 页实施例 5.

W0 0213788 A1, 2002. 02. 21, 说明书第 2 页第 3 段至 4 页第 1 段, 第 6 页第 5 段.

武洁. 痤疮药物治疗的现状与进展. 右江民族医学院学报 3. 2001, (3), 464-466.

B. POLLOCK et al.. Topical aminolaevulinic acid-photodynamic therapy for the treatment of acne vulgaris: a study of clinical efficacy and mechanism of action. British Journal of Dermatology 151 3. 2004, 151(3), 616-622.

Y. ITOH et al.. Photodynamic therapy of acne vulgaris with topical δ -aminolaevulinic acid and incoherent light in Japanese patients. British Journal of Dermatology 144. 2001, 144: 575-579.

审查员 吴斌

权利要求书 1 页 说明书 15 页 附图 11 页

(54) 发明名称

利用 5-氨基乙酰丙酸衍生物治疗痤疮

(57) 摘要

本发明披露一种光敏剂或其药学上可接受的盐在制备用于预防或治疗痤疮的药物中的用途, 所述光敏剂为 5-氨基乙酰丙酸 (5-ALA) 的衍生物 (例如酯)。

1. 一种光敏剂或其药学上可接受的盐在制备用于预防或治疗与痤疮丙酸杆菌、贪婪丙酸杆菌或颗粒丙酸杆菌有关痤疮的药物中的用途,所述光敏剂选自甲基 ALA 酯、苄基 ALA 酯、2- 甲基苄基 ALA 酯、4- 氯苄基 ALA 酯、4- 硝基苄基 ALA 酯、4- 异丙基苄基 ALA 酯和 4- 甲基苄基 ALA 酯。

2. 根据权利要求 1 的用途,其中所述光敏剂是甲基 ALA 酯。

3. 根据权利要求 1 的用途,其中所述光敏剂是苄基 ALA 酯。

4. 根据权利要求 1 的用途,其中所述光敏剂选自 2- 甲基苄基 ALA 酯、4- 氯苄基 ALA 酯、4- 硝基苄基 ALA 酯、4- 异丙基苄基 ALA 酯和 4- 甲基苄基 ALA 酯。

5. 根据权利要求 1 至 4 中任一项的用途,其中所述痤疮选自寻常痤疮、红斑痤疮、聚合性痤疮、丘疹性痤疮、月经前痤疮。

6. 根据权利要求 5 的用途,其中痤疮为寻常痤疮

7. 根据权利要求 1 至 4 中任一项的光敏剂或其药学上可接受的盐与第二光敏剂一起在制备用于预防或治疗痤疮的药物中的用途,其中所述第二光敏剂选自血卟啉衍生物 HpD ; 血卟啉 ;Photosan III ;二氢卟酚 ;菌绿素 ;苯并卟啉 ;purpurines ;酞菁 ;卟啉 ;竹红菌素 ;原卟啉 IX ;血卟啉二醚 ;尿卟啉 ;粪卟啉 ;次卟啉 ;聚血卟啉 ;和四环素。

8. 根据权利要求 1 至 4 中任一项的光敏剂或其药学上可接受的盐与至少一种表面渗透助剂,以及任选一种或多种螯合剂一起在制备用于治疗或预防痤疮的一种或多种药物中的用途。

9. 根据权利要求 1 至 4 中任一项的光敏剂或其药学上可接受的盐与非光敏化痤疮治疗剂一起在制备用于预防或治疗痤疮的药物中的用途。

利用 5- 氨基乙酰丙酸衍生物治疗痤疮

[0001] 本发明涉及痤疮的治疗；具体地，涉及 5- 氨基乙酰丙酸 (5-aminolevulinic acid, 5-ALA) 的衍生物在治疗痤疮（例如寻常痤疮）的方法中的用途。最具体地，本发明涉及 5-ALA 酯用于治疗这些症状的用途。

[0002] 痤疮是全世界最普遍的皮肤病症之一。尽管在青春期期间尤为普遍，但其可持续数年。在英国，痤疮影响了几乎 85-95% 的 16 岁男女，约 20% 的患者寻求临床医生的帮助。某些情况下，痤疮可导致永久疤痕，并常常是大多情绪忧伤的来源。

[0003] 在其较温和的形式中，痤疮是一种表面病症 (superficial disorder)，伴有轻微、斑点刺激。然而，在更多炎性类型的痤疮中，出现细菌入侵毛皮脂腺囊或其周围，导致形成脓疱 (pustules)，受感染的囊肿 (cyst) 等。这些损害可能扩大，并常常留下永久的、损伤外表的疤痕。

[0004] 尽管毛囊皮脂腺管 (pilosebaceous canal) 的阻塞被认为是首要因素，但仍未能完全认识痤疮的确切成因。痤疮可能由皮脂生成过多、上皮细胞更新增加和 / 或细菌（例如，痤疮丙酸杆菌 (propionibacterium acnes)）的增殖引起。例如，可认为皮脂生成过多和上皮细胞更新增加可能导致毛孔的闭合或堵塞，并导致黑头粉刺 (blackhead) 和闭合性粉刺 (whitehead) 的形成。若某种细菌与这些因素同时存在，则可能形成诸如丘疹、脓疱、囊肿的炎性损害 (inflammatory lesions)。

[0005] 黑头粉刺、闭合性粉刺、丘疹、脓疱和囊肿一般指作“斑点”。在任何痤疮患者中，各种类型的斑点可能以不同的程度存在，最普遍的是，发现多种不同类型。斑点通常出现在脸上和背上，特别是面部皮肤区域（例如，颞、鼻子及前额上），在这些区域中皮脂腺最大、最普遍且最活跃。

[0006] 已确立的痤疮治疗被设计为防止新损害的形成以及促进现有损害的康复。常规治疗包括，例如全身和局部施用抗生素，抗生素的目的在于减少毛皮脂腺囊的细菌繁殖；以及局部施用既具有抗菌作用又具有黑头粉刺溶解性的 (comedolytic) 的过氧化物，例如过氧化苯甲酰。诸如类视黄醇的维生素 A 类似物具有黑头粉刺溶解性 (comedolytic)，并且已经用于局部痤疮治疗组合中，获得一定程度上的成功。

[0007] 然而，这些常规治疗存在一些问题。例如，过氧化物如过氧化苯甲酰通常不稳定，因而其保质期有限。它们的功效随着时间的推移趋于降低。痤疮丙酸杆菌的抗生素抗性也将提高，这严重降低功效。类视黄醇药物（例如，异维甲酸），尽管有效，但常会造成令人厌恶且有时严重的副作用，禁忌征常限制其可接受性和使用。因而存在开发替代痤疮治疗方法的需要。

[0008] 近期提出的治疗痤疮方法之一是利用光敏剂的光动力疗法 (photodynamic therapy, PDT)。光动力疗法 (PDT) 是一种相对较新的技术，该技术已应用于治疗皮肤或其他上皮器官或黏膜的各种异常或病症，特别是治疗癌症或癌前期损害，以及某些非恶性损害，例如牛皮癣。PDT 包括施用光敏剂，接着暴露在光敏化光 (photoactivating light)，以激活光敏剂，并将光敏剂转化为细胞毒素形式，这导致细胞破坏，从而治疗疾病。一些光敏剂是已知的并且描述于文献中，例如各种卟啉补骨脂素、二氢卟酚、酞菁、5- 氨基乙酰丙酸

(5-ALA) 及其某些衍生物,例如 5-ALA 酯。

[0009] 尽管 PDT 主要集中在癌症和癌前期阶段的治疗,但仍有利用 PDT 治疗痤疮的一些相关报道。然而,这些方法仅享有有限的成功。例如, Itoh, Y. 等 (Brit. J. Dermatology, 2001, 144, 575-579) 和 Hongcharau, W. 等 (J. Invest. Dermatology, 2000, 115, 183-192) 都对有关采用 5-ALA 作为光敏剂对痤疮进行 PDT 治疗的试验进行了说明。这两项研究均推断 ALA-PDT 可有效治疗痤疮,但指出伴随治疗会有严重的副作用。这些副作用包括照射过程中的不适、烧伤、痒和刺痛,进行 PDT 之后很快出现的水肿红斑和表皮脱落,以及治疗后对物理刺激的长期刺激和超敏性持续至 10 天。在许多案例中还报导了色素沉着,且患者的皮肤历时一个月才恢复正常。

[0010] 治疗中使用 5-ALA 带来的另一问题在于其极不稳定,并有进行过多分解反应的趋势。5-ALA 不稳定的结果是,其通常作为酸性成分存在(其在低于 pH5 最为稳定),但这将进而进一步降低其作为治疗物质的可接受性。5-ALA 还具有相对较低的生物利用度,这意味着其不得不以高剂量使用,因而加剧了许多 5-ALA 成分的酸性相关的问题。

[0011] 因而,仍存在对于治疗和 / 或预防痤疮替代方法的需求。尽管文献中已经突出了有关利用 5-ALA 进行 PDT 治疗痤疮的各种问题,但是我们目前惊奇地发现 5-ALA 衍生物(例如,5-ALA 酯、特别是任选取代的苯甲基 ALA 酯)可有效应用于痤疮的光动力疗法中。

[0012] 因而,从一方面看出,本发明提供了一种光敏剂或其药学上可接受的盐在制备用于预防或治疗痤疮的药物中的用途,所述光敏剂为 5-氨基乙酰丙酸(5-ALA)的衍生物(例如酯)。

[0013] 另一方面,本发明提供了一种治疗或预防痤疮的方法,该方法包括将光敏剂或其药学上可接受的盐施用于(例如,局部施用)身体上的皮肤区域(例如受感染的皮肤区域),所述光敏剂为 5-氨基乙酰丙酸(5-ALA)的衍生物(例如酯);以及对所述光敏剂进行光敏化(photoactivate)。

[0014] 特别是,本发明提供了一种治疗或预防痤疮的方法,该方法包括以下步骤:

[0015] (a) 将光敏剂或其药学上可接受的盐施用于(例如,局部施用)身体上的皮肤区域(例如受感染的皮肤区域),所述光敏剂为 5-氨基乙酰丙酸(5-ALA)的衍生物(例如酯);

[0016] (b) 任选等待光敏剂在预期部位(例如,受感染的部位)获得有效组织浓度所需的时间;以及

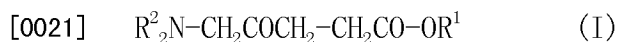
[0017] (c) 对预期部位(例如,受感染的部位)处的光敏剂进行光敏化。

[0018] 5-ALA(5-氨基-4-氧代-戊酸,也称为 5-氨基乙酰丙酸)衍生物在 PDT 中的应用在科学和专利文献中是众所周知的(例如,参见 J. C. Kennedy 等, J. Clin. Laser Med. Surg. (1996) 14 :289-304, US-A-5, 079, 262、US-A-5, 211, 938、US-A-5, 234, 940、US-A-5, 422, 093、US-A-6, 034, 267、W091/01727 和 W096/28412,在此引入它们的内容作为参考)。所有这些 5-ALA 衍生物和它们的药学上可接受的盐适合应用于在此说明的方法。

[0019] 根据本发明可用的 5-ALA 可为能够在体内形成原卟啉 IX(PpIX) 或任何其他光敏剂(例如 PpIX 衍生物)的任何 5-ALA 衍生物。典型地,这些衍生物在血红素生物合成通道中作为 PpIX 的前体或 PpIX 衍生物(例如, PpIX 酯)的前体,因而施用后,其能够在体内于痤疮部位处产生 PpIX 积累。PpIX 或 PpIX 衍生物的前体包括 5-ALA 前体药物,其可以能够在体内形成 5-ALA 作为 PpIX 生物合成中的中间体,或其可被转化(例如酶转化)为卟

啉而不形成中间体 5-ALA。5-ALA 酯为用于此处描述的方法的优选化合物。

[0020] 5-氨基乙酰丙酸的酯及其 N-取代衍生物为用于本发明的优选光敏剂。特别优选为 5-氨基未被取代的那些化合物（即 ALA 酯）。这些化合物是公知的，并且描述于文献中（例如，参见 PhotoCure ASA 的 W096/28412 和 W002/10120，在此引入这些文献的内容，作为参考）。5-氨基乙酰丙酸与取代或未取代的，优选取代的烷醇的酯，即烷基酯，或者更优选为取代的烷基酯是用于本发明的特别优选光敏剂。这些化合物的实例包括通式 I 那些及其药学上可接受的盐：



[0022] 其中

[0023] R^1 表示取代的或未取代的，优选取代的，直链、支链或环状烷基（例如，取代的直链烷基）；以及 R^2 各自独立表示氢原子或任选取代的烷基（例如基团 R^1 ）。

[0024] 如此处所用的，术语“烷基”，除非另作说明，包括任何长链或短链、环状、直链或支链脂肪族饱和或不饱和烃基。不饱和烷基可为单不饱和的或多不饱和的，并且，既包括链烯基又包括炔基。除非另作说明，这些基团可包含最多 40 个原子。然而，最多含 30 个、优选最多含 10 个、特别优选最多含 8 个、尤为优选最多含 6 个，例如最多含 4 个碳原子的烷基是优选的。

[0025] 取代的烷基 R^1 和 R^2 基团可为单取代的或多取代的。合适的取代基可选自羟基、烷氧基、酰氧基、烷氧羰氧基、氨基、芳基、硝基、氧基（oxo）、氟基、 $-SR_3$ 、 $-NR_3^2$ 和 $-PR_3^3$ 基团，各烷基可任选被一个或多个 $-O-$ 、 $-NR_3-$ 、 $-S-$ 或 $-PR_3-$ 基团间隔，其中 R^3 为氢原子或 C_{1-6} 烷基。

[0026] 优选的取代的烷基 R^1 基团包括带一个或多个氧基的那些基团、优选为被一个、两个或三个（优选两个或三个）氧基取代的直链 C_{4-12} 烷基（例如 C_{8-10} 烷基）。这些基团的实例包括 3,6-二氧杂-1-辛基和 3,6,9-三氧杂-1-癸烷基团。

[0027] 特别优选用于本发明的是通式 I 的那些化合物，其中至少一个 R^2 表示氢原子。在特别优选的化合物中，各 R^2 都表示氢原子。

[0028] 还优选的是，通式 I 所示的化合物，其中 R^1 表示未取代的烷基（优选 C_{1-8} 烷基，例如 C_{1-6} 烷基）或更优选被如上所定义的取代基（例如，被芳基，如苯基；或烷氧基，如甲氧基）取代的烷基（例如， C_{1-2} 烷基，特别是 C_1 烷基）。

[0029] 可用于本发明的未取代的烷基既包括支链烃基，又包括直链烃基。优选为通式 I 所示的化合物，其中 R^1 为被一个或多个 C_{1-6} 烷基（例如， C_{1-2} 烷基）支援的 C_{4-8} 直链烷基，特别是 C_{5-8} 直链烷基。合适的未取代支链烷基的典型实例包括 2-甲基戊基、4-甲基戊基、1-乙基丁基、3,3-二甲基-1-丁基。特别优选为 4-甲基戊基。

[0030] 还优选的是通式 I 所示的化合物，其中 R^1 为 C_{1-10} 直链烷基。合适的未取代的烷基的典型实例包括甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基和辛基（例如，正丙基、正丁基、正戊基、正己基和正辛基）。特别优选为己基，特别是正己基。甲基也是特别优选的。

[0031] 特别优选用于本发明的是通式 I 的那些化合物，其中， R^1 表示任选被芳基取代的 C_{1-2} 烷基（优选 C_1 烷基）。

[0032] 此外还优选用于本发明的是通式 I 的那些化合物，其中， R^1 表示被芳基（例如苯基）取代的烷基（例如， C_{1-2} 烷基，特别是 C_1 烷基）。可在通式 I 化合物中存在的优选的取代的烷基 R^1 包括 C_{1-6} 烷基，优选 C_{1-4} 烷基，特别优选为被任选取代的芳基所取代（优选末端

取代)的 C_1 或 C_2 烷基(例如 C_1 烷基)。

[0033] “芳基”是指芳族基团。优选的芳基包括最多 20 个碳原子,更优选最多 12 个碳原子,例如 10 或 6 个碳原子。

[0034] 可存在于本发明化合物中的芳基可为杂芳族(例如,5-7 元杂芳族),但优选非杂芳族的(non-heteroaromatic)。“非杂芳族的”是指具有这样芳族体系的芳基,所述芳族体系包含仅源自碳原子的电子。优选的芳基包括苯基和萘基,特别是苯基。在用于本发明的优选化合物中,可存在一个或两个芳基,优选存在一个芳基。

[0035] 在本发明优选的方面,提供一种光敏剂或其药学上可接受的盐在制备用于预防或治疗痤疮的药物中的用途,其中所述光敏剂为通式 I 所示的化合物,其中 R^1 表示被芳基取代的 C_{1-4} 烷基(优选 C_{1-2} 烷基,例如 C_1 烷基),优选其中所述芳基包括最多 20 个碳原子(例如,最多 12 个碳原子,特别是 6 个碳原子),并且其本身任选被取代,各 R^2 如上所定义(例如,各 R^2 为氢)。

[0036] 可存在于本发明化合物中的芳基可任选被一个或多个(例如 1 至 5)基团取代,更优选被一或两个基团取代(例如,被一个基团取代)。优选的是,芳基在间位或对位被取代,更优选在对位被取代。合适的取代基团可包括卤代烷基(例如,三氟甲基)、烷氧基(即 -OR 基团,其中 R 优选为 C_{1-6} 烷基)、卤素(例如碘、溴、更特别是氯或氟)、硝基以及 C_{1-6} 烷基(优选 C_{1-4} 烷基)。优选的 C_{1-6} 烷基包括甲基、异丙基和叔丁基,特别是甲基。特别优选的取代基包括氯和硝基。此外更优选的是,芳基是未取代的。

[0037] 用于本发明的优选化合物包括甲基 ALA 酯、乙基 ALA 酯、丙基 ALA 酯、丁基 ALA 酯、戊基 ALA 酯、己基 ALA 酯、辛基 ALA 酯、2-甲氧基乙基 ALA 酯、2-甲基戊基 ALA 酯、4-甲基戊基 ALA 酯、1-乙基丁基 ALA 酯、3,3-二甲基-1-丁基 ALA 酯、苄基 ALA 酯、4-异丙基苄基 ALA 酯、4-甲基苄基 ALA 酯、2-甲基苄基 ALA 酯、3-甲基苄基 ALA 酯、4-[叔丁基]苄基 ALA 酯、4-[三氟甲基]苄基 ALA 酯、4-甲氧基苄基 ALA 酯、3,4-[二氟]苄基 ALA 酯、4-氯苄基 ALA 酯、4-氟苄基 ALA 酯、2-氟苄基 ALA 酯、3-氟苄基 ALA 酯、2,3,4,5,6-五氟苄基 ALA 酯、3-硝基苄基 ALA 酯、4-硝基苄基 ALA 酯、2-苯基乙基 ALA 酯、4-苯基丁基 ALA 酯、3-吡啶-甲基 ALA 酯、4-二苯基-甲基 ALA 酯、以及苄基-5-[(1-乙酰氧基乙氧基)-羰基]氨基乙酰丙酸酯。

[0038] 此外用于本发明的优选化合物包括甲基 ALA 酯、乙基 ALA 酯、2-甲氧基乙基 ALA 酯、苄基 ALA 酯、4-异丙基苄基 ALA 酯、4-甲基苄基 ALA 酯、2-甲基苄基 ALA 酯、3-甲基苄基 ALA 酯、4-[叔丁基]苄基 ALA 酯、4-[三氟甲基]苄基 ALA 酯、4-甲氧基苄基 ALA 酯、3,4-[二氯]苄基 ALA 酯、4-氯苄基 ALA 酯、4-氟苄基 ALA 酯、2-氟苄基 ALA 酯、3-氟苄基 ALA 酯、2,3,4,5,6-五氟苄基 ALA 酯、3-硝基苄基 ALA 酯、4-硝基苄基 ALA 酯、2-苯基乙基 ALA 酯、4-苯基丁基 ALA 酯、3-吡啶-甲基 ALA 酯、4-二苯基-甲基 ALA 酯以及苄基-5-[(1-乙酰氧基乙氧基)-羰基]氨基乙酰丙酸酯。

[0039] 用于本发明的特别优选化合物包括苄基 ALA 酯、4-异丙基苄基 ALA 酯、4-甲基苄基 ALA 酯、2-甲基苄基 ALA 酯、3-甲基苄基 ALA 酯、4-[叔丁基]苄基 ALA 酯、4-[三氟甲基]苄基 ALA 酯、4-甲氧基苄基 ALA 酯、3,4-[二氯]苄基 ALA 酯、4-氯苄基 ALA 酯、4-氟苄基 ALA 酯、2-氟苄基 ALA 酯、3-氟苄基 ALA 酯、2,3,4,5,6-五氟苄基 ALA 酯、3-硝基苄基 ALA 酯、4-硝基苄基 ALA 酯、2-苯基乙基 ALA 酯、4-苯基丁基 ALA 酯、3-吡啶-甲基 ALA 酯、

4-二苄基-甲基 ALA 酯以及苄基-5-[(1-乙酰氧基乙氧基)-羰基]氨基乙酰丙酸酯。

[0040] 此处说明的方法中所用的特别优选化合物包括苄基 ALA 酯、4-异丙基苄基 ALA 酯以及 4-甲基苄基 ALA 酯,特别是苄基 ALA 酯。特别优选为 4-硝基苄基 ALA 酯、4-氯苄基 ALA 酯和苄基 ALA 酯。

[0041] 可利用本领域获得的任何常规过程(例如,如 PhotoCure ASA 的 W002/10120 中所述)制备用于本发明的化合物。例如,可在碱的存在下,使 5-ALA 与适当的醇反应制得 5-ALA 酯。用于本发明的替代化合物可商购(例如从 PhotoCure ASA,挪威)。

[0042] 根据本发明方法所用的化合物可为游离胺的形式(例如 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHR}^2$ 或 $-\text{NR}^2\text{R}^2$)或优选为生理上可接受的盐的形式。这些盐优选为与生理上可接受的有机酸或无机酸的酸加成盐。适合的酸包括,例如盐酸、硝酸、氢溴酸、磷酸、硫酸、磺酸以及磺酸衍生物。特别优选的盐为与磺酸或磺酸衍生物的酸加成盐,如 PhotoCure ASA 的 W02005/092838 中所述,在此引入其全部内容,作为参考。盐的形成属于本领域中的常规过程。

[0043] 在本发明方法中,可单独使用单一的光敏剂(即 5-ALA 的衍生物)治疗或预防痤疮。可供选择地,可采用两种或多种(优选两种光敏剂)的组合,其中所述光敏剂中的至少一种是 5-ALA 的衍生物或其药学上可接受的盐。

[0044] 根据本发明,可与 5-ALA 衍生物(例如 5-ALA 的酯)配制或者一起施用的其它光敏剂包括:

[0045] 血卟啉衍生物(HpD);

[0046] 血卟啉,例如 **Photofrin**[®] (Quadra Logic Technologies Inc., Vancouver, Canada),以及血卟啉 IX(HpIX);

[0047] Photosan III (Seehof Laboratorium GmbH, Seehof, Wesselburenerkoog, Germany);

[0048] 二氢卟酚,例如四(间羟苯基)二氢卟酚(m-THPC)及其菌绿素(Scotia Pharmaceuticals Ltd, Surrey, UK)、单-L-天冬氨酰二氢卟酚 e6(NPe6) (Nippon Petrochemical Co., CA, USA)、二氢卟酚 e6(Porphyrin Products Inc.)、苯并卟啉(Quadra Logic Technologies Inc., Vancouver, Canada)(例如苯并卟啉衍生物单酸环 A, BPD-MA)以及 purpurines(PDT Pharmaceuticals Inc., CA, USA)(例如本紫红素乙酯锡(tin-ethyl etiopurpurin), SnET₂);

[0049] 酞菁(例如锌酞菁(Quadra Logic Technologies Inc., Vancouver, Canada)、一些铝酞菁或硅酞菁,特别是磺化酞菁,例如二磺化酞菁铝(AlPcS_{2a})或四磺化酞菁铝(AlPcS_{4a}));

[0050] 卟啉(Porphycenes);

[0051] 竹红菌素;

[0052] 原卟啉 IX(PpIX);

[0053] 血卟啉二醚;

[0054] 尿卟啉;

[0055] 粪卟啉;

[0056] 次卟啉;

[0057] 聚血卟啉(PHP),以及其前体和衍生物;和诸如四环素的抗生素(例如

Topicycline®, Shire)。

[0058] 优选的第二光敏剂为血卟啉（例如Photofrin®），二氢卟吩（特别是 m-THPC 或二氢卟吩 e6）或磺化酞菁（特别是二磺化酞菁铝或四磺化酞菁铝）。

[0059] 因此，另一方面本发明提供了第一光敏剂或其药学上可接受的盐与第二光敏剂一起在制备用于预防或治疗痤疮的药物中的用途，所述第一光敏剂为如上所定义的 5-ALA 衍生物。

[0060] 还一方面，本发明提供了第一光敏剂或其药学上可接受的盐与第二光敏剂一起在制备在预防或治疗痤疮的方法中同时、单独或相继使用的药物中的用途，所述第一光敏剂为如上所定义的 5-ALA 衍生物。

[0061] 还一方面，本发明提供了试剂盒 (kit) 或包 (pack)，其包括第一光敏剂，该光敏剂为如上所定义的 5-ALA 衍生物或其药学上可接受的盐，以及单独的第二光敏剂，它们同时、单独或相继用于治疗或预防痤疮的方法中。

[0062] 如此处所用，痤疮的“预防”是指痤疮的预防性治疗。因而根据本发明此处说明的化合物可用于皮肤区域的治疗，皮肤在治疗时不需已生出痤疮，但有生出痤疮的倾向。优选地，根据本发明所用化合物用于治疗确曾生出的痤疮，特别是治疗炎性痤疮 (inflammatory acne)。

[0063] 如此处所用，术语“痤疮”即包括毛囊皮脂腺单位的炎性病症，也包括其非炎性病症。然而，主要地，此处说明的方法将用于治疗更多炎性类型的痤疮，其中出现了毛囊皮脂腺单位或毛皮脂腺囊的细菌侵入。如先前所提到的，痤疮的确切成因是未知的，尽管痤疮通常与皮脂生成过多（由雄激素敏感皮脂腺分泌的油脂）、诸如丙酸杆菌属的细菌（例如痤疮丙酸杆菌、颗粒丙酸杆菌 (*Propionibacterium granulosum*) 和贪婪丙酸杆菌 (*propionibacterium avidum*)）的增殖、上皮细胞更新增加和 / 或炎症发展（例如，红、肿和 / 或脓）相关。在此说明的化合物优选用于治疗或预防（优选用于治疗）与痤疮丙酸杆菌相关的痤疮。

[0064] 痤疮本身可以多种不同形式出现（如附图 1 所示）。痤疮的共性包括黑头粉刺和闭合性粉刺。这些由毛孔阻塞造成（例如被皮脂和 / 或死细胞阻塞）。若毛孔张开，则造成黑头粉刺（图 1(i)），而毛孔闭合并膨胀，则产生闭合性粉刺（图 1(ii)）。若毛孔壁被破坏并且细菌感染毛孔，则认为将产生丘疹、脓疱和囊肿。在丘疹中，脓 (pus) 十分接近皮肤表面（图 1(iii)），而在脓疱中，脓处于毛孔深处（图 1(iv)）。囊肿通常比脓疱更大更深，并含大量脓。在此说明的化合物可用于治疗或预防以下一种或多种：黑头粉刺、闭合性粉刺、丘疹、脓疱以及囊肿。

[0065] 根据例如黑头粉刺、闭合性粉刺、丘疹、脓疱和 / 或囊肿的性质、严重程度和 / 或部位，将痤疮分为不同形式。根据本发明可进行治疗的痤疮的典型类型包括寻常痤疮 (vulgaris)、红斑痤疮 (acne rosacea)、聚合性痤疮、丘疹性痤疮 (acne papulosa) 和月经前痤疮 (premenstrual acne)，特别是寻常痤疮，它是毛囊皮脂腺器官的慢性炎性病症。痤疮可出现在背部、胸部、上臂和 / 或面部；在此说明的化合物可用于治疗任何这些身体部位，特别是面部。

[0066] 痤疮的某些温和形式（例如黑头粉刺和 / 或闭合性粉刺）通常可不认为是“疾病”，可能单纯出于美容的原因对其进行处理。这可能是这样一种情况，例如，当痤疮相对稀

少和 / 或没有大面积出现时 (即出现很少的斑点)。

[0067] 因而,进一步来看,本发明提供了一种美容处理痤疮 (例如,脸部痤疮) 的方法,该方法包括在受感染的部位施用 (例如局部施用) 光敏剂或其药学上可接受的盐,此光敏剂为如上所定义的 5- 氨基乙酰丙酸 (5-ALA) 衍生物 (例如酯),以及在受感染处对该光敏剂进行光敏化。

[0068] 可根据本领域已知技术,以任何常规方式,对本发明所用化合物与一种或多种生理上可接受的载体或赋形剂进行配制。

[0069] 组合物可在受感染部位处或附近全身施用 (例如口服给药或胃肠外给药) 或更优选局部施用 (例如通过注射给药或更优选表面给药 (topical))。施用路径将取决于所治疗痤疮的严重程度和性质、痤疮的部位、以及所用光敏剂 (或光敏剂组合)。然而,通常优选局部施用 (local administration),更优选表面施用 (topical administration)。

[0070] 优选的制剂包括凝胶剂、乳膏、软膏、喷雾剂、洗剂、油膏剂、贴剂、皂、粉剂、气雾剂、滴剂、溶液剂以及本领域任意其他常规药用形式。通常优选凝胶剂、乳膏以及软膏。

[0071] 软膏、凝胶剂和乳膏,例如可采用水性基质 (aqueous base) 或油性基质 (oily base) 以及添加有合适的增稠剂和 / 或胶凝剂来配制。洗剂可采用水性基质或油性基质来配制,洗液通常还将包含一种或多种乳化剂、分散剂、悬浮剂、增稠剂或着色剂。粉剂可借助于任何合适的粉末基质 (powder base) 来形成。滴剂和溶液剂可采用还含有一种或多种分散剂、增溶剂或悬浮剂的水性基质或非水性基质 (nonaqueous base) 来配制。喷雾剂利用合适的推进剂,可便利地从充压部件中释放。

[0072] 组合物可额外包括润滑剂、润湿剂、乳化剂、悬浮剂、防腐剂、调味剂、增味剂 (odour enhancers) 和 / 或吸附增强剂 (adsorption enhancer),例如如下所述的表面渗透剂,等等。可配制用于本发明方法的组合物,从而利用本领域众所周知的操作施用于患者后,得以快速释放、持续释放或延释活性成分。还可使用增溶剂和 / 或稳定剂,例如环糊精 (CD) α 、 β 、 γ 以及 HP- 环糊精。组合物可为任何适当的剂型,例如乳液或脂质体、囊泡 (niosome)、微球、纳米颗粒等中。之后本发明所用化合物可吸附于、溶入或结合于这些剂型中。

[0073] 典型地,用于 PDT 治疗粉刺的组合物将为即用型制剂形式,例如乳膏或由二组分体系 (例如包含两种光敏剂) 组成的试剂盒 (kit)。

[0074] 成品制剂中 pH 值优选处于 2.5 至 7.4 范围内。若制剂为即用型,则优选为弱酸性 pH 值,例如 pH5-7。

[0075] 在治疗粉刺的成品制剂中,此处说明的 5-ALA 化合物的浓度将随几个因素发生改变,这些因素包括化合物的化学性质、化学组成、用药方式以及所治疗痤疮的性质。然而,通常浓度范围在 0.01 至 30% (w/w) 之间是合适的。局部施用治疗痤疮的最优选浓度在 0.02 至 25% 范围内 (w/w),例如约 5% (w/w)。

[0076] 施用含一种或多种光敏剂的制剂后,将所治疗的部位暴露在光照下,以获得预想的光敏化效果。在施用后,曝光时间的长短将取决于组合物性质、治疗条件、用药形式。通常,在光敏化之前,有必要使光敏剂在痤疮部位达到有效的组织浓度。一般这将历时 0.5 至 24 小时 (例如 1 至 3 小时)。

[0077] 在优选的治疗过程中,光敏剂用于患处,之后进行照射 (例如约 3 小时后)。必要

的话,可重复此过程,例如至多再进行 3 次,每次间隔可达 14 天(例如 7-14 天)。在此过程未能令人满意的减少或完全治愈痤疮的情况下,可在几个月后再进行治疗。

[0078] 在本领域中,照射不同人体部位的方法已众所周知,例如利用灯或激光(例如,参见 Van den Bergh, Chemistry in Britain, May 1986 p. 430-439)。通常以 40 至 200 焦耳/cm² 的剂量,例如 100 焦耳/cm² 的剂量进行照射。

[0079] 可选择用于照射的光波长度以获取更有效的光敏化效果。最有效的光波长在 300-800nm 范围内,特别是 400-700nm。

[0080] 因而本发明另一方面提供了一种治疗人体痤疮的方法,该方法包括在受感染部位施用光敏剂,此光敏剂为 5-ALA 衍生物或如上所定义的组合物,并将所述表面暴露在光下,优选暴露在波长在 300-800nm 范围内,例如 400-700nm 范围内的光下。

[0081] 如此前说明的,本发明所用化合物可与其他光敏剂一起进行配制和/或施用,其他光敏剂例如 5-ALA 或其他 5-ALA 衍生物、或诸如 **Photofrin**[®] 的卟啉衍生物。或者,根据本发明所用化合物可与其他活性成分一起进行配制和/或施用,这些活性成分可提高光敏化效果,从而增强对痤疮的治疗。例如可有利地包含和/或同时使用螯合剂,以增加 Pp 的累积;通过螯合剂,铁的螯合作用可防止其在亚铁螯合酶的作用下结合至 Pp 中,形成血红素,从而造成 Pp 的堆积。因而增强了光敏化效果。

[0082] 合适的螯合剂包括氨基多羧酸(amino polycarboxylic acid),包括文献中所述的用于金属脱毒或者用于螯合磁共振成像造影剂中顺磁金属离子的任何螯合剂。特别提及的可由 EDTA、CDTA(环己胺二胺四乙酸)、DTPA 和 DOTA、及其已知的衍生物/类似物。特别优选为 EDTA 和 DTPA。为获得铁螯合效应,还可以将去铁胺和铁载体(siderophores)与例如,诸如 EDTA 的氨基多羧酸螯合剂结合使用。

[0083] 如果存在螯合剂,则其可以便利地以 0.05 至 20%,例如 0.1 至 10% (w/w) 的浓度使用。

[0084] 增渗剂(penetration enhancer)对提高本发明所用化合物的光敏效果也可具有有益的影响。因而在本发明所用组合物中还可包括和/或一同施用表面渗透助剂(surface-penetration assisting agent),特别是诸如二甲基亚砜(DMSO)的二烷基亚砜。表面渗透助剂可为药学文献中描述的任何皮肤渗透助剂(skin-penetration assisting agent),例如螯合剂(例如 EDTA)、表面活性剂(例如十二烷基硫酸钠)、非表面活性剂、胆汁盐(例如脱氧胆酸钠)以及脂肪酸(例如油酸)。合适的表面渗透助剂的实例包括异丙醇、HPE-101(购自 Hisamitsu)、DMSO、以及其他二烷基亚砜,特别是正癸甲基亚砜(NDMS)、二甲基磺胺醋酐(dimethylsulphacetamide)、二甲基甲酰胺(DMFA)、二甲基乙酰胺、二醇、各种吡咯烷酮衍生物(Woodford 等, J. Toxicol. Cut. & Ocular Toxicology, 1986, 5: 167-177)、以及 **Azone**[®] (Stoughton 等, Drug Dpv. Ind. Pharm. 1983, 9: 725-744)、或以上各实例的混合物。

[0085] 可以 0.2 至 50% (w/w) 的浓度范围,例如约 10% (w/w) 的浓度方便地提供表面渗透剂。

[0086] 从另一方面来看,本发明从而提供了光敏剂或其药学上可接受的盐与至少一种表面渗透助剂,以及任选一种或多种螯合剂一起在制备用于治疗或预防痤疮的一种或多种药

物中的用途,所述光敏剂为 5-ALA 的衍生物(例如,5-ALA 酯)。

[0087] 本发明所用化合物可附加地与其它非光敏化剂(non-photosensitizing agent)结合使用,以改善痤疮的治疗或预防。这些非光敏剂包括一种或多种常规痤疮治疗剂。这些非光敏剂的代表性实例包括:

[0088] 类视黄醇,例如阿昔曲丁、异维甲酸(例如**Isotrex®**, Steifel 以及**Roaccutane®**, Roche)、维甲酸(例如**Retin-A®**, Janssen-Cilag)和他佐罗汀;

[0089] 过氧化物,例如过氧化苯甲酰(例如**PanOxyl®**, Stiefel);

[0090] 抗生素,例如四环素(例如**Topicycline®**, Shire)、氯洁霉素(例如**Dalacin T®**, Pharmacia)、红霉素(**Stiemycin®**, Stiefel)、多西环素、地霉素、米诺环素、甲氧苄氨嘧啶以及甲硝哒唑;

[0091] 激素,例如 co-cyprindiol(醋酸环丙氯地孕酮和乙炔雌二醇),例如**Dianette®**, Schering Health;

[0092] 壬二酸(例如**Skinoren®**, Schering Health)及其衍生物,例如 PhotoCureASA 的 W003/045893 中所述;

[0093] 阿达帕林(Adapalene)(例如**Differin®**, Galderma);

[0094] 烟酰胺(例如**Nican®**, Dermal);以及

[0095] 水杨酸(例如**Acnival®**, DermaPharm)。

[0096] 尽管这些痤疮治疗剂可作为制剂的一部分存在,但典型地将这些痤疮治疗剂用作独立治疗剂同时、单独或相继使用。根据辅助剂的已知使用方法,应根据方式、浓度和制剂使用任何这些辅助剂。根据附加剂的功能,可在 PDT 之前、期间或之后使用这些附加剂。

[0097] 从另一方面来看,本发明从而提供了治疗或预防痤疮的方法中所用的产品或试剂盒,其包括:

[0098] (a) 第一容器,其含有光敏剂,或其药学上可接受的盐,所述光敏剂为 5-ALA 衍生物(例如酯);以及

[0099] (b) 第二容器,其含有非光敏化痤疮治疗剂。

[0100] 也可以提供试剂盒的附加组分,例如此处所述的第二光敏剂、表面渗透剂或螯合剂。

[0101] 因此,另一方面,本发明提供了光敏剂或其药学上可接受的盐与非光敏化痤疮治疗剂一起在制备用于预防或治疗痤疮的药物中的用途,所述光敏剂为 5-ALA 衍生物(例如酯)。

[0102] 另一方面,本发明提供了光敏剂或其药学上可接受的盐与非光敏化痤疮治疗剂一起在制备在预防或治疗痤疮的方法中同时、单独或相继使用的药物中的用途,所述光敏剂为 5-ALA 衍生物(例如酯)。

[0103] 依据待处理的痤疮的性质,以及本发明方法中使用的任何一种或多种附加活性剂的性质,附加活性剂可与 5-ALA 衍生物一同使用,例如在单一组合中,或可相继或单独使用。典型地,在使用表面渗透助剂的那些情况下,在使用本发明所用化合物之前,在单独步骤中施用附加活性剂。当预处理中使用表面渗透助剂时,可以高浓度使用,例如高达 100% (w/w)。若采用这种预处理步骤,可在预处理几小时后使用光敏剂,例如预处理后间隔 5-60

分钟。

[0104] 现通过以下非限定实施例并参考附图对本发明进行更详细地说明,其中:

[0105] 图 1 显示痤疮的不同阶段;

[0106] 图 2 显示 ALA 甲酯、ALA 己酯和 ALA 苄酯的避光毒性 (dark toxicity) 结果;

[0107] 图 3 显示 ALA 甲酯、ALA 己酯和 ALA 苄酯培养的痤疮丙酸杆菌中的光动力效应;

[0108] 图 4 显示 ALA 己酯和 ALA 苄酯培养的细菌中的光动力效应;

[0109] 图 5 显示各种浓度的 ALA 酯培养后,痤疮丙酸杆菌中卟啉的形成;

[0110] 图 6 显示 ALA 己酯和 ALA 苄酯的避光毒性 (相对未处理的对照物 (即未在培养缓冲液中进行 4 小时培养的对照物) 给出存活率);

[0111] 图 7 显示 ALA 己酯和 ALA 苄酯培养的颗粒丙酸杆菌以及贪婪丙酸杆菌中的光动力效应;

[0112] 图 8 显示 ALA 己酯和 ALA 苄酯培养后,用 cureLight LED 灯 (PhotoCureASA 以商品名 Aktelite 128 出售) 光照的颗粒丙酸杆菌以及贪婪丙酸杆菌中的光动力效应;

[0113] 图 9 显示 1mM ALA 苄酯 (B)、ALA 己酯 (H)、ALA3,6- 二氧杂 -1- 辛基酯 (3,6-D)、ALA4- 苄基酯 (M-B) 以及 ALA4- 异丙基苄酯 (L-B) 培养后,贪婪丙酸杆菌和颗粒丙酸杆菌中卟啉的形成。

[0114] 图 10 显示 1mM ALA 苄酯 (B)、ALA 己酯 (H)、ALA3,6- 二氧杂 -1- 辛基酯 (3,6-D)、4- 苄基酯 (M-B) 以及 ALA4- 异丙基苄酯 (L-B) 培养后,痤疮丙酸杆菌中的光动力效应;

[0115] 图 11 显示采用 **Metvix[®]** 和 PDT 或空白对照乳膏和 PDT 治疗后的 6 周和 12 周,炎性损害的减少。

[0116] 常规方法

[0117] 细菌培养:

[0118] 痤疮丙酸杆菌 (*P. acnes*) 获自 American Type Culture Collection (ATCC No. 6919), 在 37°C 于血液琼脂平皿上避光对细菌厌氧培养。

[0119] 参考文献:Skerman VB 等, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30:225-420,1980;Goodsell ME 等, *Curr. Microbiol.* 22:225-230,1991;Zierdt CH 等, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 18:33-47,1968;Douglas HD 和 Gunter SE, *J. Bacteriol.* 52:15-23,1946;Johnson JL 和 Cummins CS, *J. Bacteriol.* 109:1047-1066,1972;Wang RF 等, *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1242-1247,1996。

[0120] 颗粒丙酸杆菌 (*P. granulosum*) 获自 American Type Culture Collection (ATCC No. 25564)。

[0121] 参考文献:Johnson JL 等, *J. Bacteriol.* 109(3):1047-1066,1972;SkermanVB 等, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30:225-420,1980。

[0122] 贪婪丙酸杆菌 (*P. avidum*) 获自 ATCC (ATCC No. 25577)。

[0123] 参考文献:Goodsell ME 等, *Curr. Microbiol.* 22(4):225-230,1991;Skerman VB, 等, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30:225-420,1980。

[0124] 用 ALA 酯培养

[0125] 向各个血琼脂陪替氏平皿中加入 PIPES 缓冲液 (约 1ml), 并利用无菌玻璃棒和巴斯德移液管 (Pasteur pipette) 将细菌溶液移至 20ml 的试管中。然后利用 PIPES 缓冲液

稀释悬浮液,直至分光光度计测得 550nm 的光学密度 (OD) 达到 1.00 ± 0.01 。在此 OD 时,细菌密度为约 5×10^8 个细胞 /ml。

[0126] 收集细菌样品 (100 μ l 悬浮液,每 ml 悬浮液含约 5×10^8 个细菌),并用作 $t = 0$ 对照物。将细菌悬浮液的等分样品与合适容积的 5-ALA 酯储备液 (含 100mM ALA 酯) 混合以获得合适的浓度,并在 37°C 避光培养 4 小时。若不进行光照,如下测定存活率 (survival)。

[0127] 光照

[0128] 在某些情况下,对 ALA 酯处理过的细菌悬浮液进行光照。在以下实施例中对确切的条件进行说明。照射后,如下测定存活率。

[0129] 存活率测定

[0130] 经 ALA 酯处理后 (光射或未光射),收集处理过的细菌样品 (以及未处理的对照物),并用 PIPES 缓冲液将其进一步稀释到浓度为 1×10^4 个细菌 /ml。然后,将 20ml 这种悬浮液的等分样品移至细菌琼脂陪替氏培养皿 (Bactoagar Petri-dishes) 中 (Futsaether 等, Can. J. Microbiol., 39 (2):180-186 1993),并在 37°C 避光培养 3-5 天。利用菌落计数器计算细菌琼脂陪替氏平皿上形成的菌落。用不同浓度的 5-ALA 酯培养后,细胞存活率相对于对照样品 (即在 $t = 0$ 小时收集的样品和不用 5-ALA 酯培养 4 小时后收集的样品),并表示为存活百分比:

[0131] 存活率 = $[C_{\text{经处理}} / C_{\text{对照物}}] \times 100\%$

[0132] 其中 C = 菌落数。

[0133] 实施例 1— 避光毒性 (dark toxicity)

[0134] 为找到合适的条件研究 ALA 酯培养后痤疮丙酸杆菌中的光动力效应,进行一项研究以测定所述酯的毒性。该研究避光进行,以避免被杂散光引起的任何 PDT 效应。如以上常规部分中所述,对培养和存活率进行测定,其结果在附图 2 所示中给出。

[0135] 从图 2 可以看出,对于高达 20mM 的浓度,ALA 甲酯本质上无毒,然而 ALA 己酯毒性很大。ALA 苄酯显现中等毒性。

[0136] 实施例 2— 利用 Curelight BroadBand 灯进行 PDT

[0137] 如以上常规部分中所述,用 4mM ALA 甲酯、4mM ALA 苄酯和 1mM ALA 己酯 (鉴于该酯的高避光毒性结果) 处理细菌悬浮液 (痤疮丙酸杆菌),对该细菌悬浮液进行稀释,并在受控温度条件下 (例如在环境温度下) 利用 Curelight BroadBand 灯 (购自 PhotoCure ASA, Norway, 580-740nm 的红光,小于或等于 $840\text{W}/\text{m}^2$ 的注量率 (fluence rate)) 对该细菌悬浮液进行光照。在光照过程中,在共十分钟内每两分钟收集 $2 \times 20 \mu$ l 等分样品,并如以上常规部分中所述对其进行存活率测定。相对于未进行红光照射的对照样品,计算光照后的相对存活率。其结果如图 3 所示。

[0138] 从图 3 中可看出,ALA 苄酯对于杀灭细菌最为有效,而 ALA 甲酯效果最差。利用 4mM ALA 苄酯,约 $10\text{J}/\text{cm}^2$ 剂量的光足以 100% 的杀灭细菌。ALA 己酯也十分有效,但由于其高避光毒性,所以这种酯以较低浓度使用 (1mM)。

[0139] 实施例 3— 利用 Curelight LED 灯进行 PDT (PhotoCure ASA 以商品名 Aktilite 出售)

[0140] 为比较相同浓度 (1mM) 的 ALA 己酯和 ALA 苄酯,以及测试另一光源,进行了另一实验,该实验包括使用窄带红光 (Photocure ASA, Norway 以商品名 Aktilite 出售的

CureLight LED 128 灯)。此灯由 128 个发光二极管(LED) 组成,峰波长为 $634 \pm 3\text{nm}$ 。此灯发射谱的半高宽(FWHM) 为 18nm 。距离 50mm 处的注量率为约 $50\text{mW}/\text{cm}^2$ (目标区域的最大注量率变化为 $\pm 10\%$)。

[0141] ALA 酯培养后,在 5.5cm 的塑料陪替氏培养皿中对 10ml 细菌悬浮液进行照射(见以上常规部分)。将陪替氏培养皿放在的支座上,此支座处于环境温度下的大水储器中,以避免温度的影响。光照过程中,共十分钟内每两分钟收集 $2 \times 20 \mu\text{l}$ 等分样品,并将其移至细菌琼脂陪替氏培养皿。

[0142] 培养 3-5 天后(37°C 避光),如常规部分中所述确定存活率,并相对未光照对照样品给出存活率。其结果如图 4 所示。

[0143] 从图 4 可看出,与 1mM ALA 己酯相比, 1mM ALA 苄酯具有更好的光动力效应。事实上,26 分钟的光照(对应 $78\text{J}/\text{cm}^2$ 的光注量)杀灭了用 1mM ALA 苄酯培养的全部细菌,但仅杀灭 40% 用 1mM ALA 己酯培养的细菌。

[0144] 实施例 4— 细胞内卟啉的形成

[0145] 为研究 ALA 酯培养后细胞内卟啉的形成,在 37°C ,用 ALA 酯对细菌(5×10^8 个细胞/ ml , 10ml) 避光进行 4 小时培养。形成卟啉后研究荧光发射谱(卟啉显现特征峰)。其过程如下:

[0146] 为评定内生性残留卟啉的量,向塑料试管中加 8ml 5-ALA 酯培养的细菌,并在冰箱中 $2-3^\circ\text{C}$ 下进行培养,以停止 5-ALA 酯的进一步摄取和 / 或卟啉的形成。然后通过离心(5000g , 5min , $2-3^\circ\text{C}$) 使细胞沉积,丢去上清液,使细胞重新悬浮在新鲜的缓冲液中(8ml) 并混合均匀。将 2ml 细菌悬浮液等分样品移至标准的一次性塑料比色杯中,利用设定如下的 Perkin Elmer LS50B 荧光分光光度计测定细胞悬浮液的荧光发射谱:

[0147] 激发波长, λ_x : 405nm

[0148] 发射波长, λ_e : $550-700\text{nm}$

[0149] 激发和发射狭缝: 5nm

[0150] 荧光单色器速度: $300\text{nm}/\text{min}$

[0151] 对相当宽的波长范围进行测量是出于掌控细菌自发荧光的需要,其自发荧光最易于在较低或较高波长处被识别。

[0152] 其结果如图 5 所示,从中证实可能由于 ALA 己酯的高避光毒性,其引发痤疮丙酸杆菌中卟啉形成的效果最差。ALA 甲酯提供了稍高的卟啉水平,而 ALA 苄酯是细菌卟啉生物合成最为有效的诱导物。

[0153] 实施例 5— 避光毒性

[0154] 为找到合适的条件研究“痤疮相关细菌”的其它两种菌株中的光动力效应,进行一项研究以测定颗粒丙酸杆菌和贪婪丙酸杆菌中 ALA 己酯和 ALA 苄酯的毒性。如实施例 1 所述进行该研究,在图 6 中给出其结果。

[0155] 从图 6 证实 ALA 己酯的毒性远大于 ALA 苄酯, 4mM ALA 己酯杀灭了 100% 的两种菌株。还可看出颗粒丙酸杆菌菌株不能很好地耐受培养条件。

[0156] 实施例 6— 利用 Curelight BroadBand 灯进行 PDT

[0157] 如以上常规部分中所述,用 4mM ALA 甲酯、 4mM ALA 苄酯和 1mM ALA 己酯(鉴于该酯的高避光毒性结果)处理细菌悬浮液(颗粒丙酸杆菌和贪婪丙酸杆菌)进行处理,对细

菌悬浮液进行稀释,并在控温条件下(例如在环境温度下),利用 Curelight BroadBand 灯(购自 PhotoCure ASA, Norway--580-740nm 的红光,小于或等于 840W/m² 的注量率)进行光照。

[0158] 采用实施例 2 所述的方法,用 ALA 己酯和 ALA 苄酯进行培养后,在控温条件下(例如在环境温度下),利用 Curelight BroadBand 灯(购自 PhotoCure ASA, Norway--580-740nm 的红光,小于或等于 840W/m² 的注量率)观察颗粒丙酸杆菌和贪婪丙酸杆菌中的 PDT 效应。其结果如图 7 所示。

[0159] 实施例 7--利用 LED 灯进行 PDT

[0160] 如实施例 3 所述,用 ALA 己酯和 ALA 苄酯(1mM)进行培养后,利用 Curelight LED 128 灯(PhotoCure ASA, Norway 以商品名 Aktelite 出售)观察颗粒丙酸杆菌和贪婪丙酸杆菌中的 PDT 效应。如实施例 3 所述进行该实验,其结果如图 8 所示。

[0161] 实施例 8--卟啉形成

[0162] 该实验在颗粒丙酸杆菌和贪婪丙酸杆菌以及所含以下 ALA 酯中进行:5-氨基乙酰丙酸己酯、5-氨基乙酰丙酸苄酯、3,6-二氧杂-1-辛基 5-氨基乙酰丙酸酯、5-氨基乙酰丙酸 4-异丙基苄基酯以及 5-氨基乙酰丙酸 4-甲基苄基酯。

[0163] 由于己酯在 4mM 显现高避光毒性(见实施例 5),因而本实验选取 1mM 的浓度。如实施例 4 所述进行该实验,利用荧光分光光度计,确定内生性残留卟啉的量以及外生性卟啉的量。

[0164] 其结果如图 9 所示,其中 620nm 的荧光用于量化。尽管两菌株对卟啉形成存在相当大的差异,但从图中证实苄酯引起卟啉形成的能力最强,其次为己酯和 3,6-二氧杂-1-辛基酯。

[0165] 实施例 9--避光毒性

[0166] 为找到研究 5-氨基乙酰丙酸苄酯、5-氨基乙酰丙酸 4-氯苄酯、5-氨基乙酰丙酸 4-硝基苄酯、5-氨基乙酰丙酸 2-甲基苄酯、5-氨基乙酰丙酸 4-甲基戊酯和 5-氨基乙酰丙酸 2-甲氧基乙酯培养后痤疮丙酸杆菌中的光动力效应,进行一项研究,测定这些化合物的毒性。该研究避光进行,如实施例 1 所述,以避免被杂散光引起的任何 PDT 效应。

[0167] 如以上常规部分所述,对培养和存活率进行化验,其结果示于下表 1 中。

[0168] 表 1 归纳了避光毒性实验结果。利用下列 ALA 酯,在 37℃ 避光培养 4 小时。基于琼脂平皿上菌落形成能力,确定细胞存活率。示出了基于 5-8 次独立实验的平均归一菌落形成单位(colony-forming units, CFU)以及平均值的标准误差(SE)。

[0169]

5-ALA 酯 (侧链)	实验次数	浓度 (mM)	%CFU	SE
空白 t=0 小时	n=4	0	100.0	-
空白 t=4 小时	n=4	0	82.9	6.6
苄基	n=5	0.4	78.3	8.4
	n=5	4	62.9	16.8
	n=5	20	15.0	6.9
4-氯苄基	n=5	0.4	81.6	10.4
	n=5	4	3.7	1.7
	n=5	20	0.0	-
4-硝基苄基	n=8	0.4	63.5	11.9
	n=8	4	61.8	12.1
	n=8	20	53.2	13.4
2-甲基苄基	n=5	0.4	66.0	17.6
	n=5	4	1.2	0.8
	n=5	20	0.0	-
4-甲基戊基	n=5	0.4	86.5	20.3
	n=5	4	37.3	10.9
	n=5	20	0.5	0.4
2-甲氧基乙基	n=8	0.4	75.5	13.9
	n=8	4	60.8	18.4
	n=8	20	54.0	11.4

[0170] 各物质显现出差异很大的毒性。在浓度高达 20mM 时,4-硝基苄基 ALA 酯和 2-甲氧基乙基 ALA 酯表现出几乎没有毒性;而在 4mM 的浓度,4-氯苄基 ALA 酯和 2-甲基苄基 ALA 酯显示出相当大的毒性。当在 0.4mM 浓度进行测试时,所有物质都显示低毒性,因而对于之后的 PDT 实验选择该浓度。

[0171] 实施例 10-- 利用 LED 灯进行 PDT

[0172] 用 Akti-lite® 128 灯光照后,研究用实施例 9 所列的 5-ALA 酯培养后,痤疮丙酸杆菌的光动力灭活作用。所用的灯和实验细节描述于实施例 3 中,其结果如图 10 所示。

[0173] 从图 10 可看出,4-氯苄基 ALA 酯和 4-硝基苄基 ALA 酯最为有效。实际上,用 0.4mM 这些酯培养后,仅需 10 分钟光照,就获得实际上 100% 的杀灭。在该浓度下,苄基 ALA 酯和 2-甲基苄基 ALA 酯显示出良好的灭菌能力(10 分钟光照杀灭约 50%)。利用 4-甲基戊基 ALA 酯和 2-甲氧基乙基 ALA 酯取得了较弱的 PDT 效应。

[0174] 实施例 11-- 凝胶形成

[0175] 将羟乙基纤维素(HEC)(150mg, mw720,000)加到水(10ml)中,对此混合物进行搅拌,并加热到 70℃。HEC 溶解并形成凝胶。将该混合物冷却至 50℃,一边搅拌一边将 5-ALA 苄酯 HCl(300mg)和苄醇(150mg)加到此凝胶中。搅拌此混合物 5 分钟,装入 10ml 的试管中。

[0176] 该凝胶含 3% 的 5-ALA 苄酯 HCl,并可使用。

[0177] 实施例 12-- 乳膏的形成

[0178] 利用研钵和研棒,将 5-ALA 异丙基苄酯 HCl (500mg) 混到 Ung. Merck 中。将所得乳膏装到小瓶中。

[0179] 该乳膏含 5% 的 5-ALA 异丙基苄酯 HCl,并可使用。

[0180] 实施例 13-- 甲基 ALA 酯的临床应用

[0181] 此临床应用的目的在于研究局部施用甲基 ALA 酯治疗中度炎性面部痤疮后,光动力疗法 (PDT) 的功效和耐受力。

[0182] 在盲目、预期、随机、空白对照的多中心研究中,包括三十位年龄在 15-28 岁的患中度或严重痤疮的患者。对每个患者面部两侧随机采用含 160mg/g 氨基乙酰丙酸甲基酯盐酸盐 (PhotoCure ASA, Norway 以商品名 Metvix[®] 出售) 的乳膏或空白对比乳膏进行治疗,并覆以粘性封闭敷料 (Tegaderm[®]、3M 或 Opsite[®]、Smith and Nephew)。利用套管 (1-2mm) 准备结节性损害或囊肿损害,以便乳膏渗透。3 小时后,在用 Aktilite[®] CL 128 灯 (PhotoCure ASA, 平均波长 635nm, 光剂量 37Jcm⁻²) 的非相干红光照射前,立即轻轻抹去面部两侧的乳膏。然后在面部另一侧重复进行光照。当对另一侧进行光照时,遮盖面部不接受光照的一侧。

[0183] 两周后进行第二次处理。每次,使用 10cm 可视模拟标尺 (visual analogue scale) 评定患者的疼痛强度。在初期 (即开始处理前)、最后一次 PDT 治疗后 4 周和 10 周时,对炎性和非炎性痤疮损害进行统计。采用 6 点等级分划,研究者对初期 (七位患者至少一侧面部上有严重的痤疮) 和各研究阶段痤疮的整体严重性 (见表 2) 进行评定。以处理目的 (intention-to-treat) 为基础,对数据进行分析,包括全部 30 位患者。

[0184] 表 2 研究者整体严重性评价

[0185]

等级	定义
0 洁净	可能存在残余的过度色素沉着和红斑
1 基本洁净	几个散落的粉刺和几个(小于五)小丘疹
2 轻度	易辨识; 波及不足面部一半。许多粉刺、丘疹和脓疱
3 中度	波及超过面部一半。大量粉刺、丘疹和脓疱
4 严重	波及整个面部。布满粉刺、大量丘疹和脓疱, 没有硬结和囊肿
5 非常严重	严重的炎性痤疮布满面部; 有硬结和囊肿出现

[0186] 研究结果如图 11 所示,其中各组结果以中值 (框符) 和所有观察结果的 50% 百分比 (线) 显示。这表明,对于各组,观察结果的 25% 在线以下,25% 在线以上。

[0187] 在 12 周时,与空白对比 PDT 相比,采用 Metvix[®] PDT 时,整个炎性损害数统计上显著大大降低 (中值降低 54% [95% CI 35% -64%] 相对 20% [95% CI 8% -50%], $p = 0.0006$)。尽管 Metvix[®] PDT 的强度经过中心发生改变并随重复处理而降低,但与空白对比 PDT 相比, Metvix[®] PDT 伴随更大的疼痛。因此,可断定在中度至严重炎性面部痤疮的治疗中 Metvix[®] PDT 是有效的。

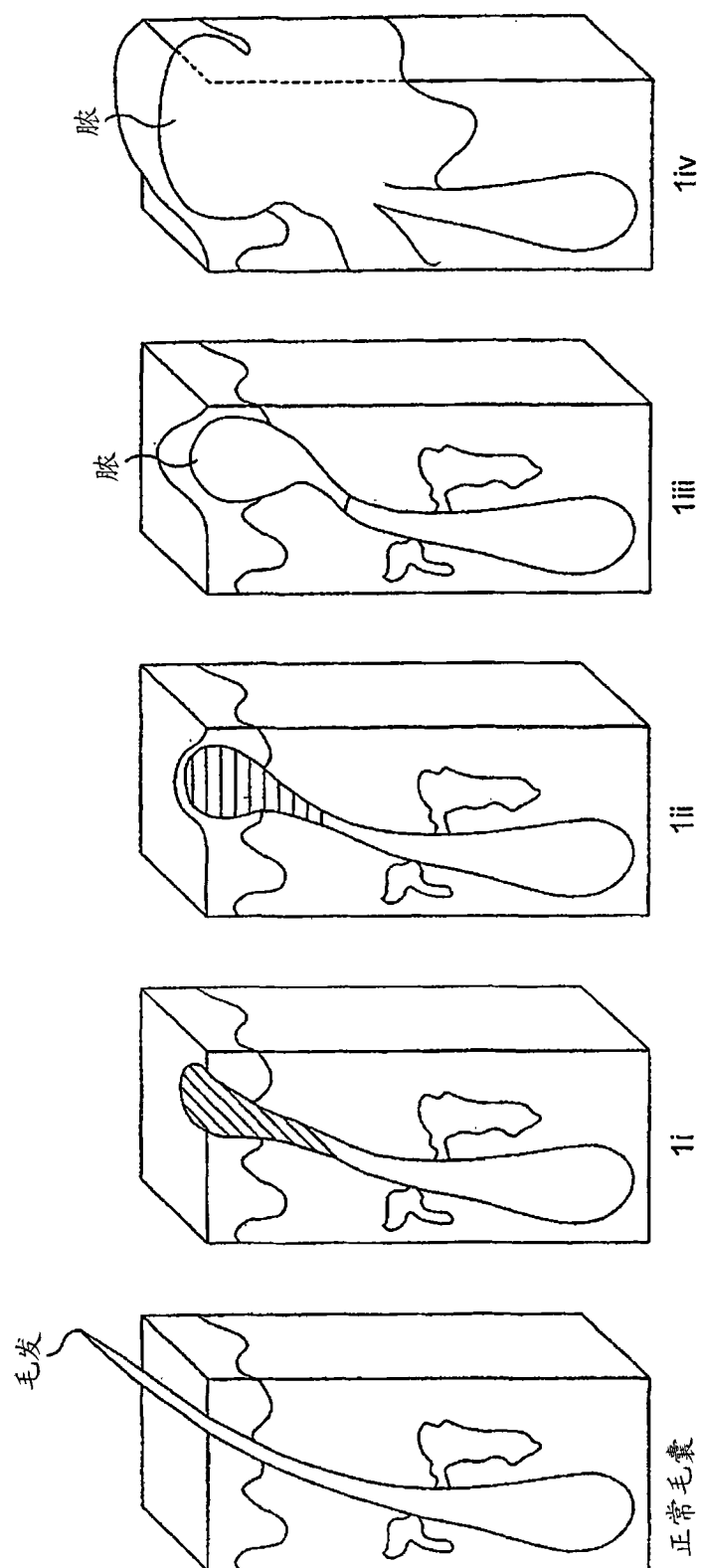


图 1

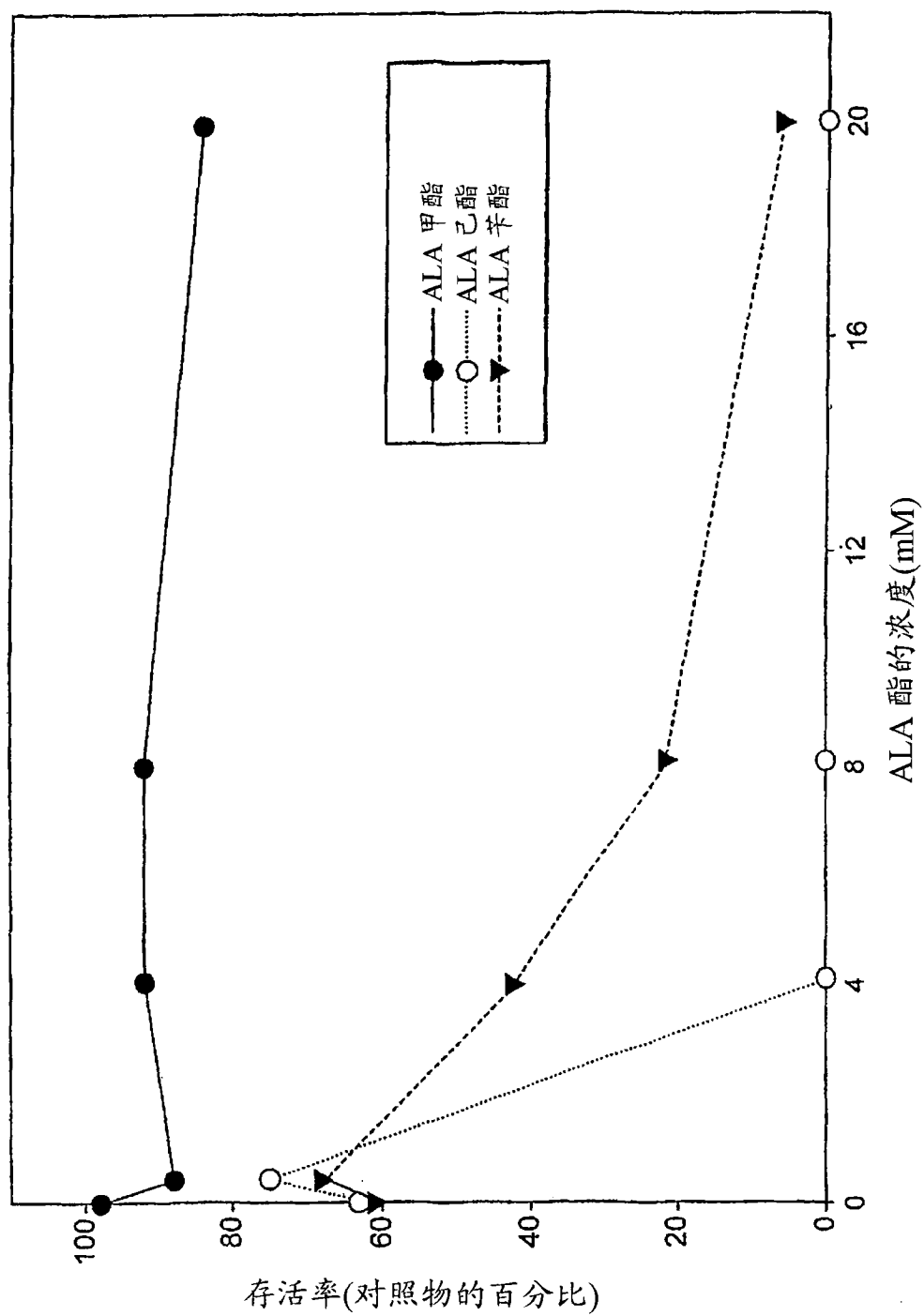


图 2

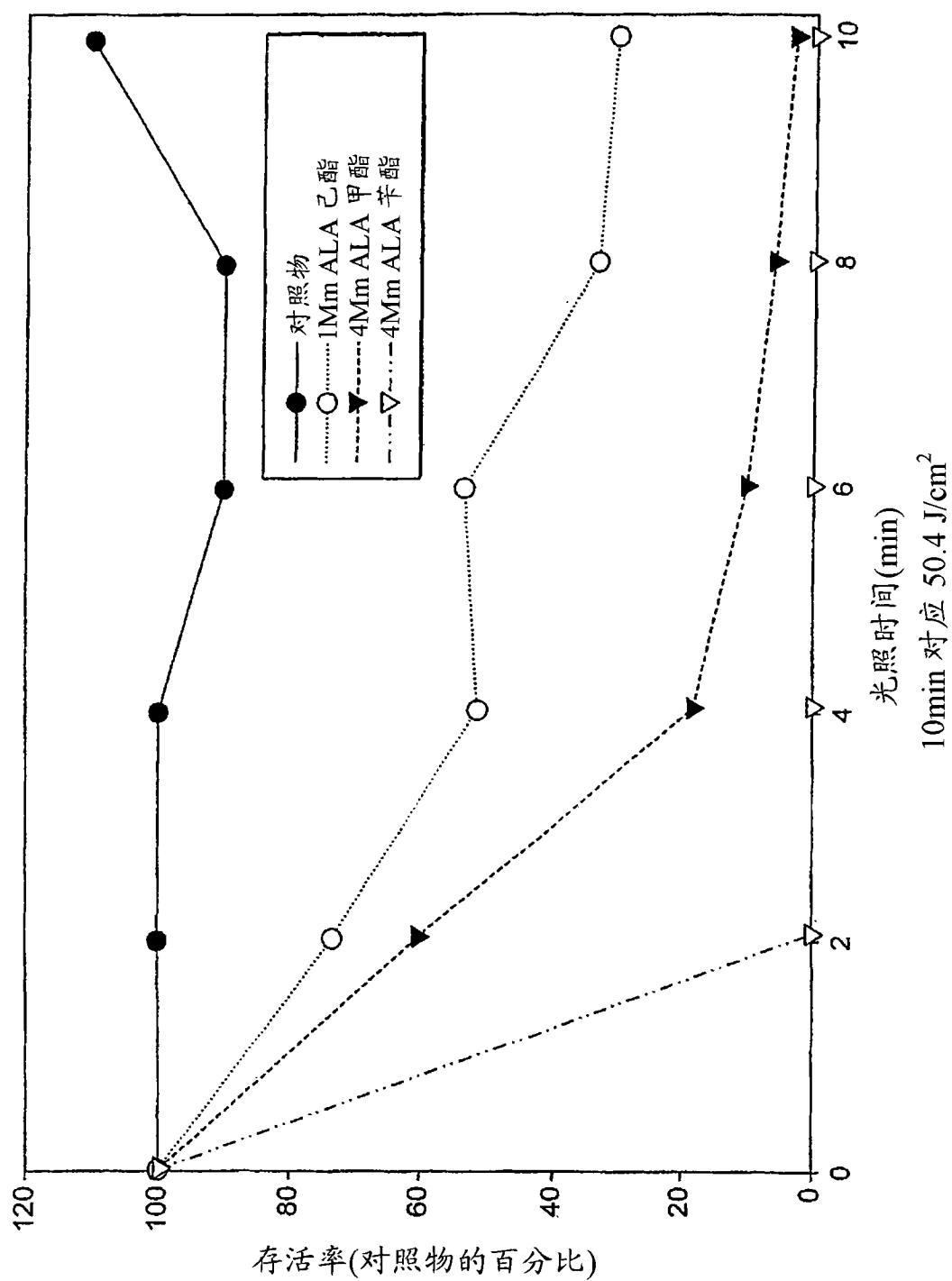


图 3

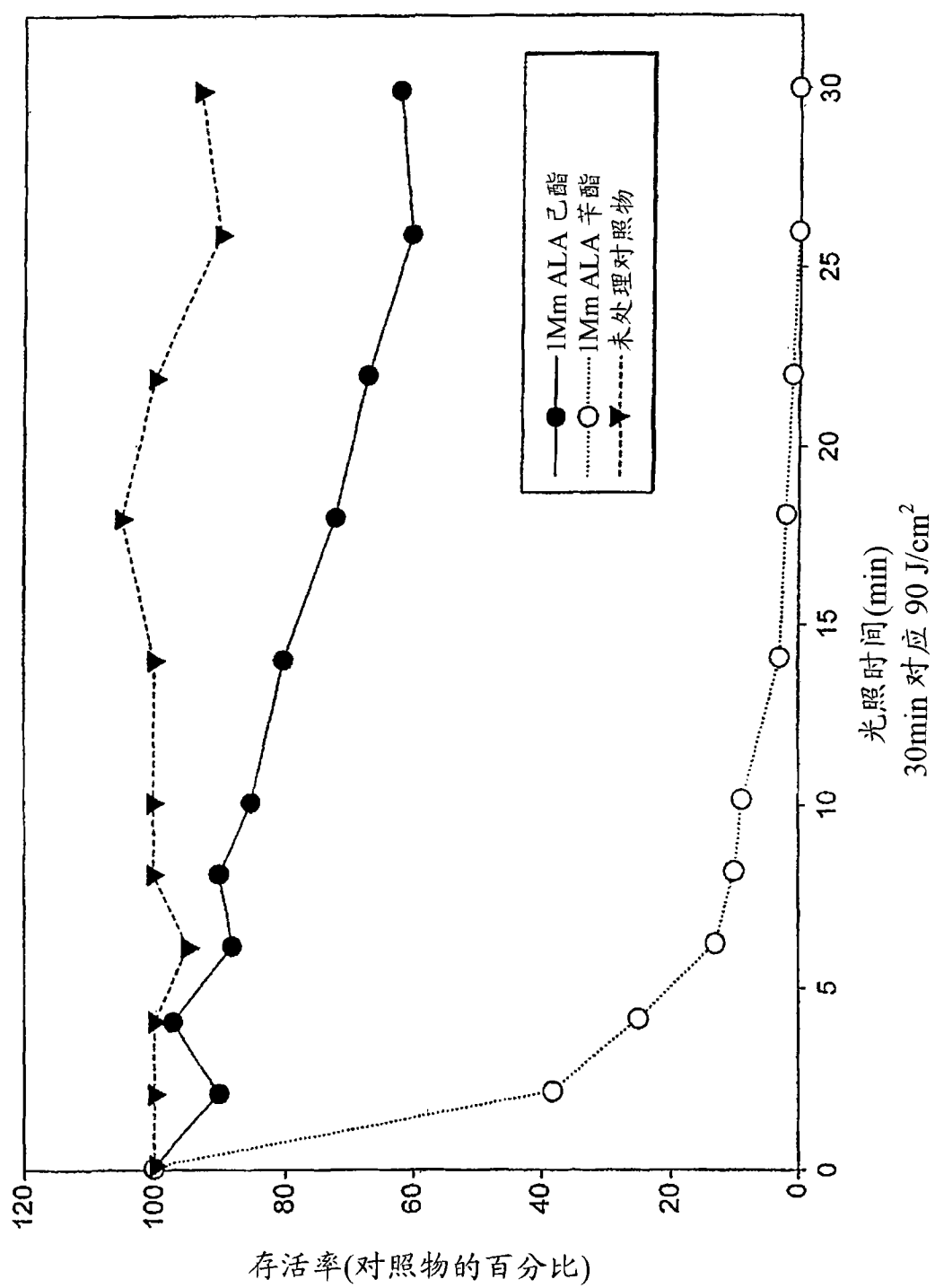


图 4

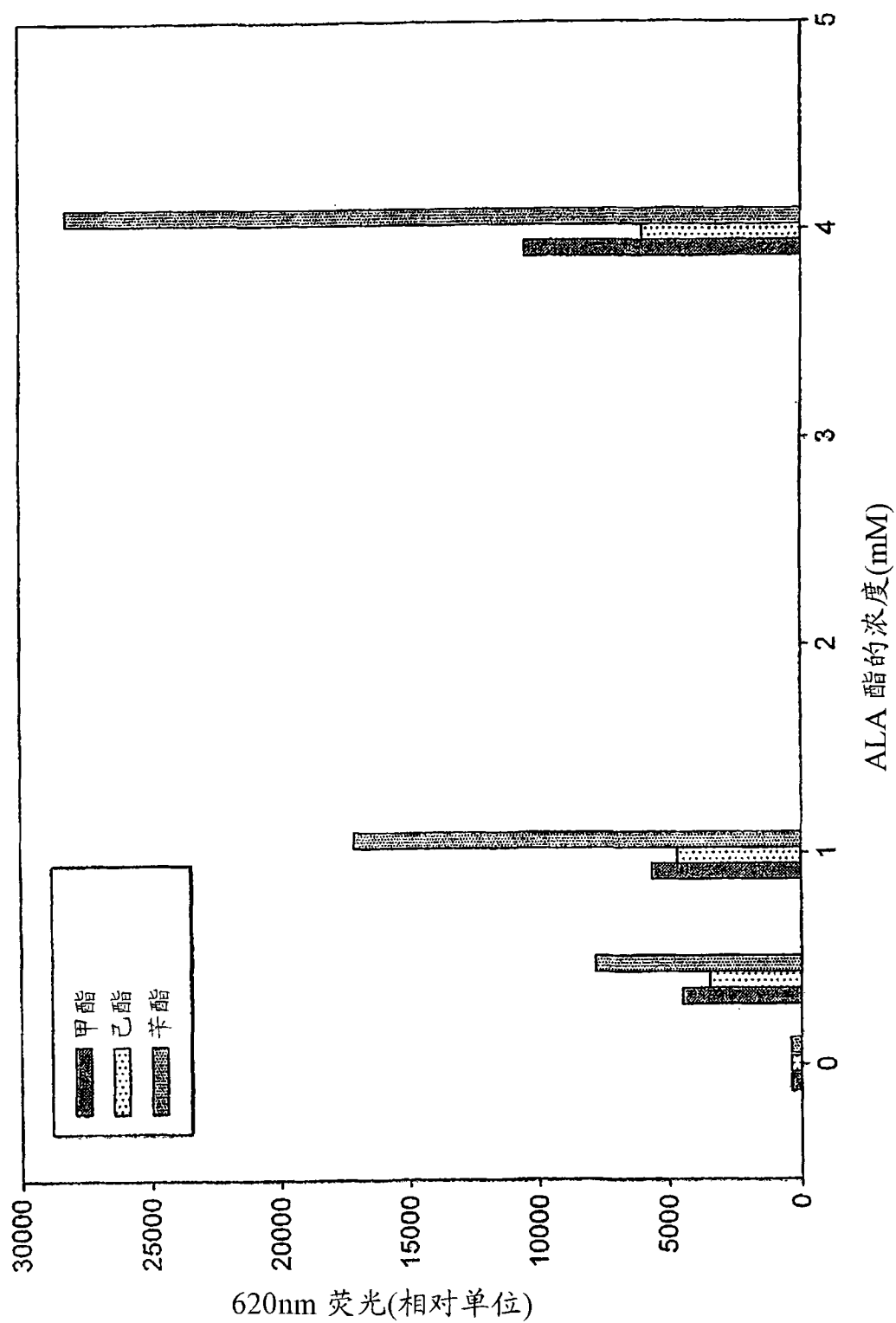


图 5

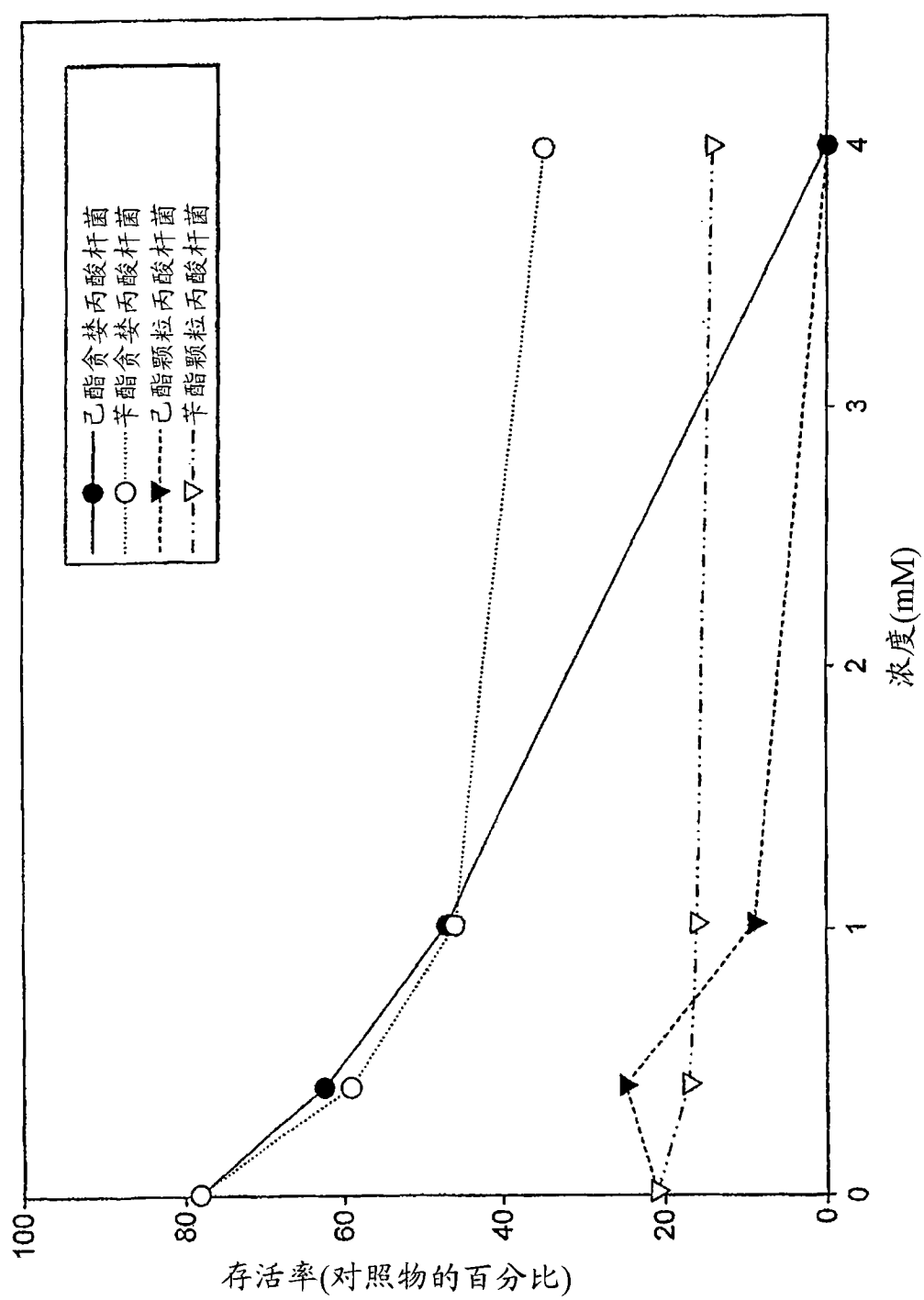


图 6

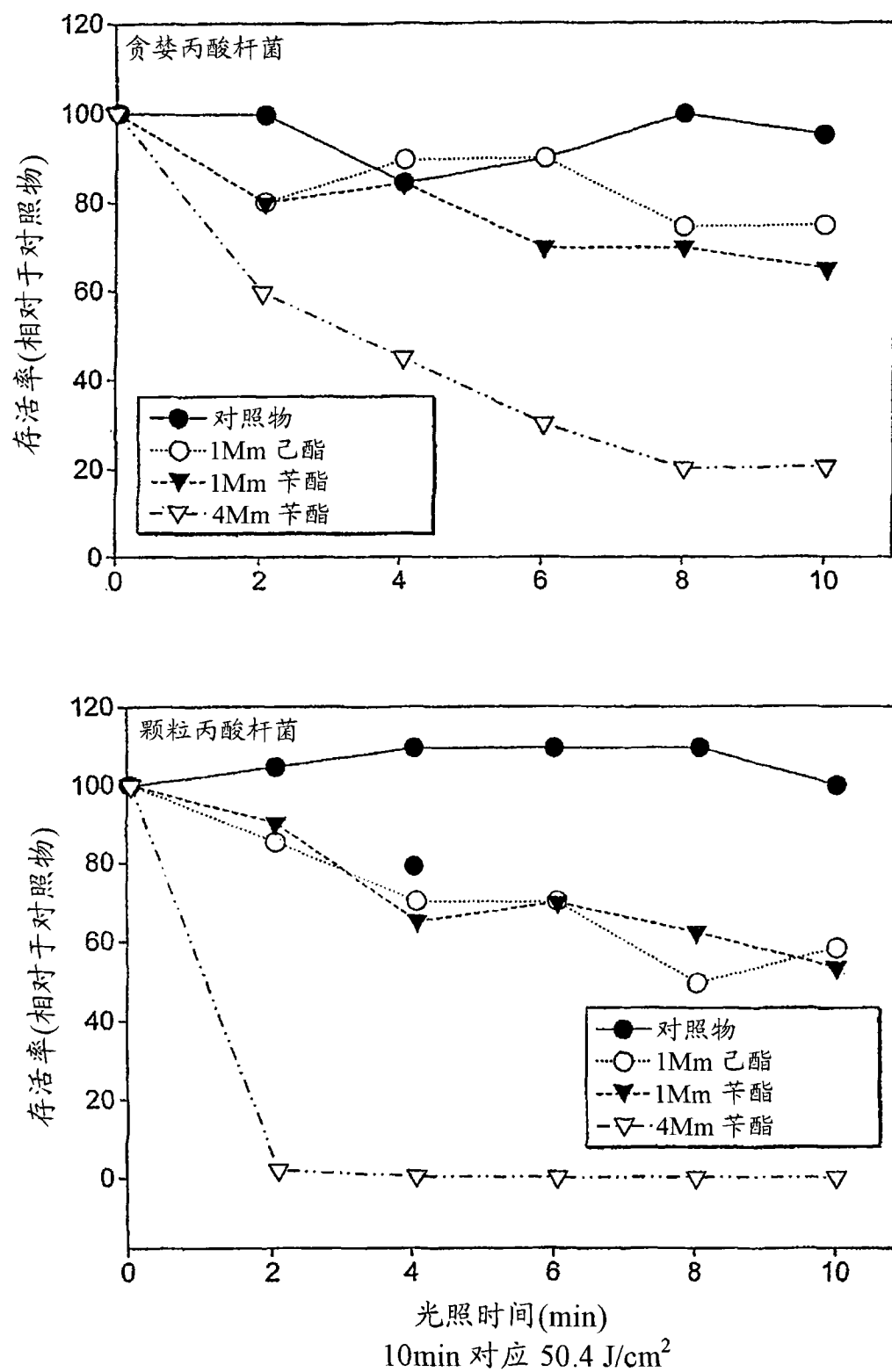


图 7

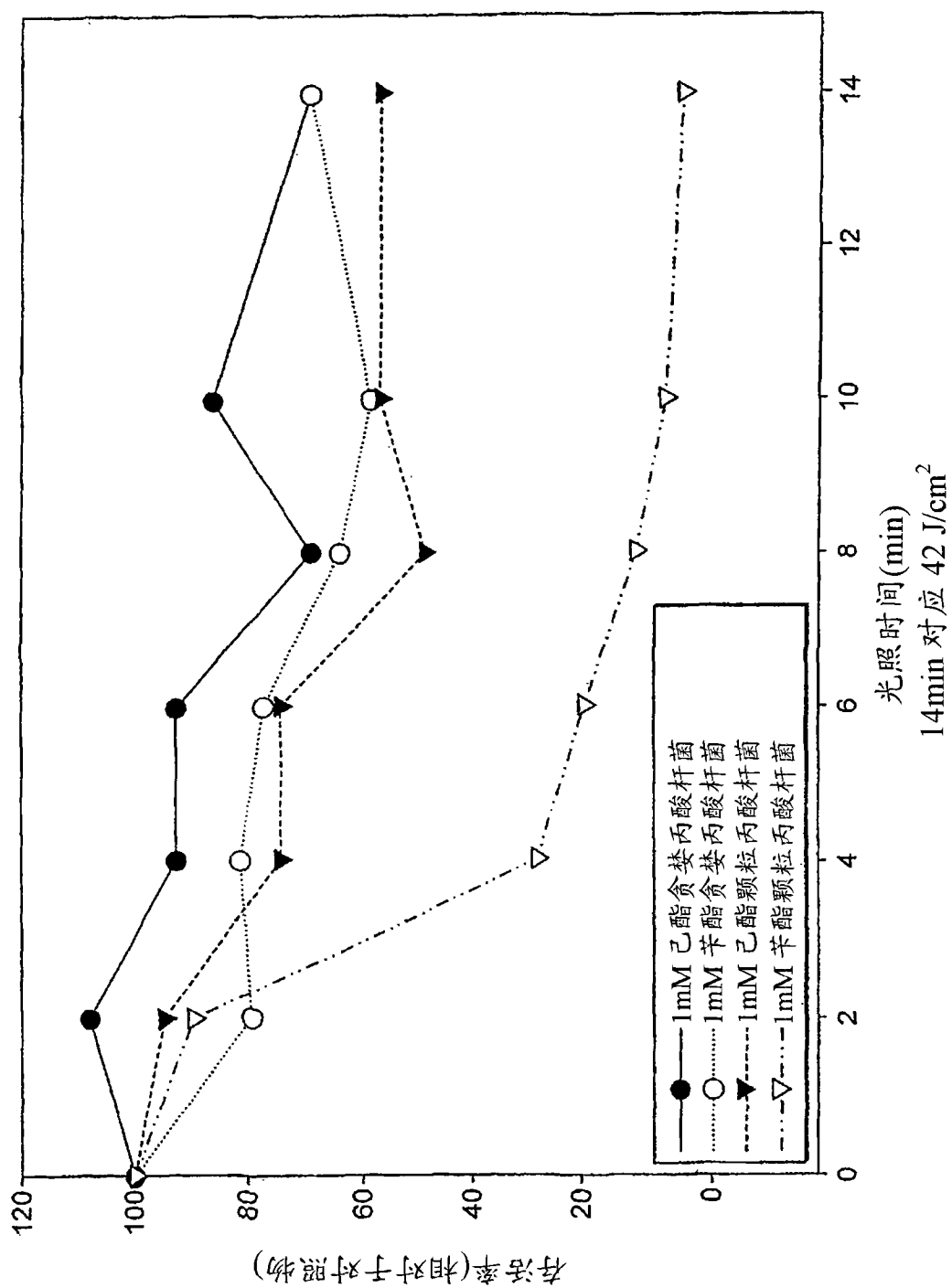


图 8

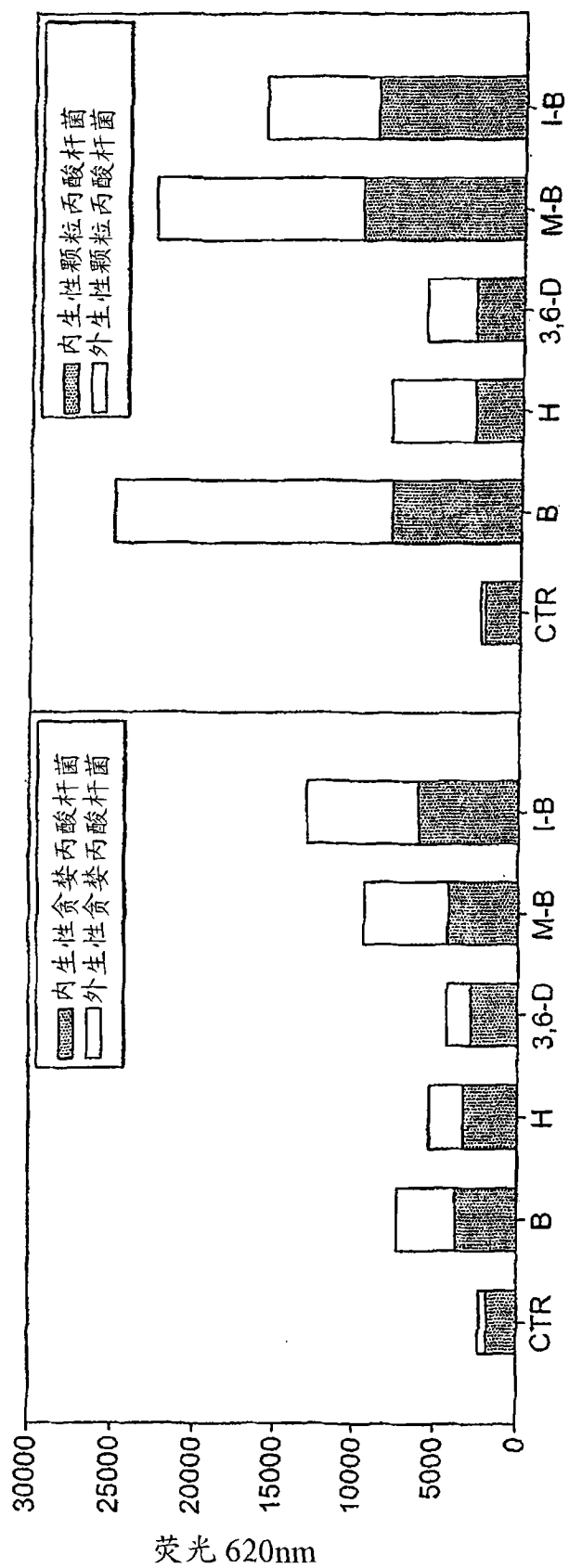


图 9

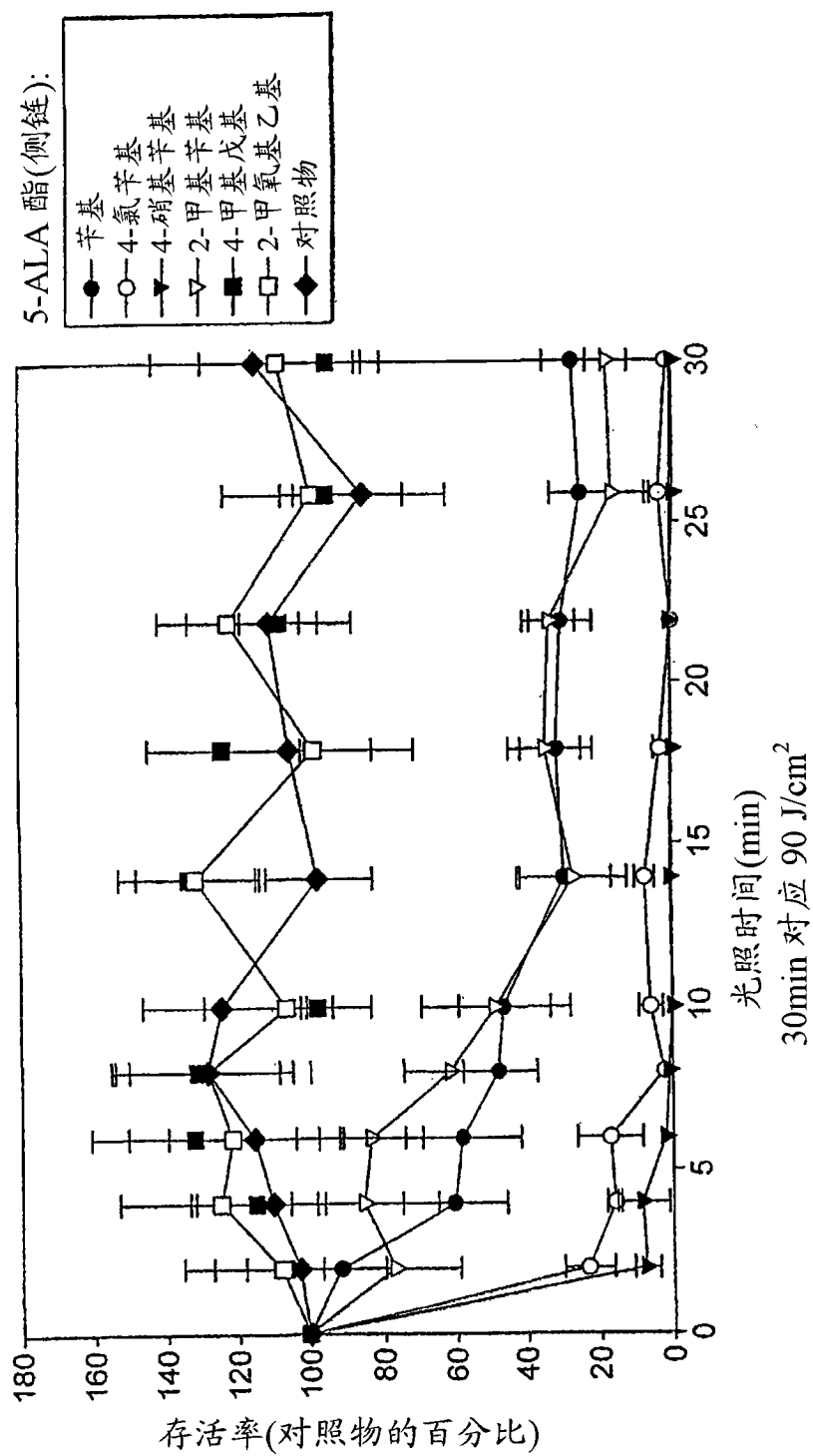


图 10

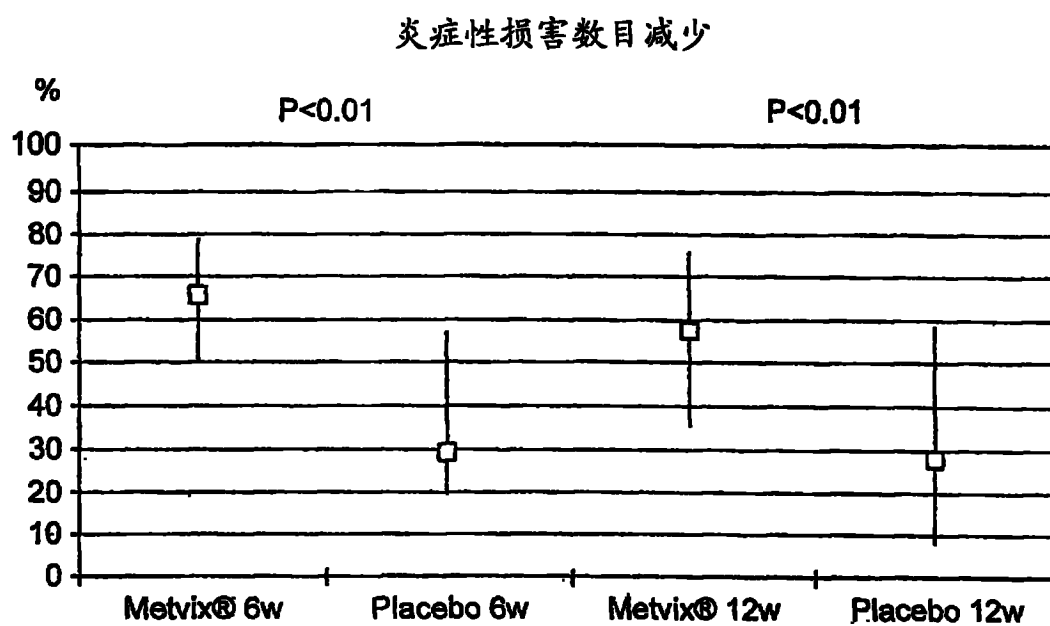


图 11