(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101048138 B
(45)授权公告日 2010.12.08

(21)申请号 200580035974.2

(22)申请日 2005.09.11

(30)优先权数据
60/608,140 2004.09.09 US

(85)PCT申请进入国家阶段日
2007.04.20

(86)PCT申请的申请数据
PCT/IL2005/000962 2005.09.11

(87)PCT申请的公布数据
WO2006/027786 EN 2006.03.16

(73)专利权人 耶路撒冷希伯来大学伊萨姆研发公司
地址 以色列耶路撒冷
专利权人 哈达斯特医学研究服务与开发有限公司

(72)发明人 叶切科尔·巴伦霍茨
雅各布·纳帕斯塔克
尤瓦尔·阿夫尼埃尔
里娜·乌尔曼斯基

(74)专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127
代理人 丁香兰 赵晓梅

(51)Int.Cl.
A61K 9/127(2006.01)
A61K 31/573(2006.01)

(56)对比文件
DE 19607722 A1,1997.09.04, 全文.
WO 02/45688 A2,2002.06.13, 说明书实施例1,第1页第6行至第2页第21行,第4页第8-14行,第5页第11-17行.
WO 90/06775 A1,1990.06.28, 全文.
DE 10255106 A1,2004.06.09, 全文.
WO 03/032947 A2,2003.04.24, 全文.
Schmidt Jens等.Drug targeting by long-circulating liposomalglucocorticosteroids increases therapeutic efficacy in a modelof multiple sclerosis.Brain1268.2003,126(8),1895-1904.

审查员 王海鹏

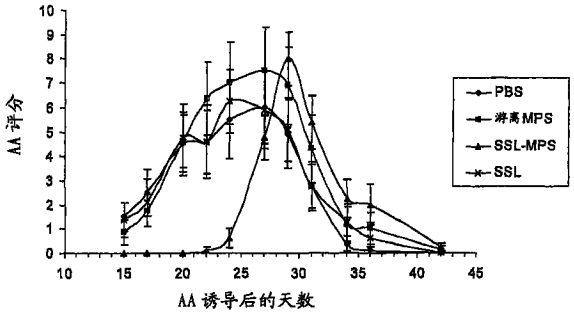
权利要求书 1 页 说明书 21 页 附图 7 页

(54)发明名称

脂质体糖皮质激素用于治疗炎性状态的用途

(57)摘要

本发明涉及脂质体糖皮质激素用于治疗炎性状态的用途。具体地说,本发明提供了包封在脂质体中的糖皮质激素(GC)或GC衍生物在制备药物组合物中的用途,所述药物组合物用于治疗受试对象中炎性相关症状,条件是所述症状与神经变性疾病或失调不相关。具体的应用涉及用于治疗类风湿性关节炎的包含甲泼尼龙半琥珀酸钠(MPS)的脂质体制剂。



CN 101048138 B

1. 包封在脂质体中的糖皮质激素或从所述脂质体释放进入体液后转变为活性糖皮质激素的药物前体在制备药物组合物中的应用，所述脂质体包含 (i) 聚乙二醇二硬脂酰磷脂酰乙醇胺的脂聚合物、(ii) 胆固醇；和 (iii) 磷脂，所述磷脂选自磷脂酰胆碱、蛋黄磷脂酰胆碱、1- 棕榈酰 -2- 油酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰胆碱、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱、氢化大豆磷脂酰胆碱和具有 12 ～ 24 个碳原子酰基链或烷基链的鞘磷脂；

所述药物组合物用于治疗受试对象中的自体免疫失调，其中至少 80％的所述糖皮质激素或所述药物前体在 4℃保存条件下保留在所述脂质体中 6 个月，所述糖皮质激素或所述药物前体选自：

具有 pKa 等于或低于 11 且在 pH 7 时 logD 为 -1.5 ～ 1.0 的两亲弱碱性糖皮质激素或药物前体；或具有 pKa 大于 3.5 且在 pH 7 时 logD 为 -1.5 ～约 1.0 的两亲弱酸性糖皮质激素或药物前体。

2. 如权利要求 1 所述的应用，其中所述糖皮质激素或所述药物前体与所述脂质间的摩尔比为 0.01 ～ 2.0。

3. 如权利要求 1 所述的应用，其中所述糖皮质激素或所述药物前体是酸性糖皮质激素或药物前体。

4. 如权利要求 3 所述的应用，其中所述酸性糖皮质激素选自甲泼尼龙半琥珀酸钠、氢化可的松半琥珀酸钠、半琥珀酸地塞米松、半琥珀酸泼尼松龙。

5. 如权利要求 1 所述的应用，其中所述脂质体包含氢化大豆磷脂酰胆碱、聚乙二醇包覆的二硬脂酰磷脂酰乙醇胺和胆固醇的组合。

6. 如权利要求 1 所述的应用，其中所述脂质体是空间稳定的脂质体。

7. 如权利要求 2 所述的应用，其中所述糖皮质激素或所述药物前体与所述形成脂质体的脂质之间的摩尔比为 0.04 ～ 0.25。

8. 如权利要求 1 所述的应用，其中所述自体免疫失调是类风湿性关节炎。

脂质体糖皮质激素用于治疗炎性状态的用途

技术领域

[0001] 本发明通常涉及脂质体技术，具体地说，涉及该技术用于输送糖皮质激素的用途。

背景技术

[0002] 糖皮质激素（糖皮质类固醇）是一类特征在于能与在几乎所有脊椎动物组织细胞内发现的皮质醇受体结合并引发相似效果的类固醇激素。糖皮质激素通过特定受体、靶细胞和效果等与诸如性类固醇等其他类固醇区分开。皮质醇（或氢化可的松）是天然的最重要的人糖皮质激素。

[0003] 糖皮质激素具有潜在的抗炎和免疫抑制性质。这在以药理剂量施用糖皮质激素时是非常明显的，而且在正常免疫应答中也是重要的。结果，糖皮质激素广泛用作用于治疗诸如关节炎或皮炎等炎性症状的药物，以及用作诸如自体免疫疾病等症状的附加疗法。另一方面，由作为药物施用导致的过量糖皮质激素水平或肾上腺皮质功能亢进对许多系统都有影响，一些实例包括抑制骨骼形成、抑制钙吸收以及延缓伤口愈合等。

[0004] 已开发多种合成的糖皮质激素用于治疗用途，其中一些比皮质醇有效得多。它们具有不同的药物代谢动力学（吸收因素、半衰期、分布体积、清除率）和药物效应动力学（例如盐皮质激素活性的能力：钠（Na^+）和水的保持）。因为可很好地通过小肠吸收，它们主要通过口服（经口）施用，但也可通过诸如在皮肤上局部施用等其他途径施用。

[0005] 甲泼尼龙（孕甾-1,4-二烯-3,20-二酮,11,17,21-三羟基-6-甲基-,(6α,11β)。$C_{22}H_{30}O_5$,MW 374.48）是治疗上有效的合成糖皮质激素药物的一个实例，由于其具有疏水特性，因此通常口服服用。类似于大多数肾上腺皮质类固醇，甲泼尼龙通常用于抗炎目的。然而，糖皮质激素具有广泛的作用，包括对代谢和免疫应答的改变。类似于其他皮质类固醇，甲泼尼龙对之有效的疾病或病理症状的列表是相当长的。常见用途包括关节炎治疗，以及由于各种呼吸道疾病导致的支气管炎症的短期治疗。虽然非常有效，但由于频发尤其是与长期治疗有关的严重不良作用，它们的全身应用受到限制。

[0006] 糖皮质激素的全身施用的有效性和安全性研究揭示了除所述药物在不同组织中的深奥活性外，这些药物被从血浆中快速清除，因此需要大而频繁的剂量以获得靶位点处的有效量。

[0007] 因此，研究了作为另外一种选择的用于肠胃外施用的方法。例如，开发糖皮质激素的损伤内施用（例如通过在哮喘中使用吸入器和在关节炎中使用关节内注射）使得能使用较低剂量的类固醇而在损伤处获得足够药物水平，同时具有最小的副作用。

[0008] 另外的方法包括通过使用诸如脂质体等合适的载体将药物靶向靶组织。

[0009] Fildes FJ等，[J Pharm.Pharmacol.30(6):337-42(1978)]首次尝试将皮质类固醇包封在脂质体中，其中包括在脂质体的脂双层中包封胆固醇。该方法基于皮质类固醇实际上是疏水性的理解。然而，这样的脂质体制剂变得不适合临床应用。

[0010] 同样也努力开发“可溶性”糖皮质激素。实例包括琥珀酸（succinate）衍生的类固醇，例如氢化可的松半琥珀酸钠盐和甲泼尼龙半琥珀酸钠盐。另一类可溶性糖皮质激素

包括类固醇的磷酸衍生物。当赋予类固醇水溶性使得能使用注射用酸性类固醇时，显示出这些“药物前体”在注射后少于 6 小时内从血浆中完全清除。[Mishina EV 等，Pharm Res 13(1) :141-5(1996)]。

[0011] 还研究了酸性类固醇与脂质体的组合。Schmidt 等，[Schmidt J 等，Brain 126(8) : 1895-1904(2003)] 描述了聚乙二醇 (PEG) 包覆的长期循环空间稳定的脂质体包封有磷酸泼尼松龙（水溶性类固醇药物前体中的一种）的制剂以及其在治疗多发性硬化中与游离形式的类固醇相比的有利效果。然而，类似包封半琥珀酸甲泼尼龙（一种弱酸）的尝试失败了，原因在于其导致产生不稳定的制剂。

[0012] 另 外，[Gonzalez-Rothi，Ricardo J 等，Pharmaceutical Research13(11) : 1699-1703(1996)] 描述了将磷酸曲安奈德（曲安西龙的水溶性强酸衍生物 (pKa 小于 2)) 包封在脂质体中。所述脂质体制剂通过将酸性皮质类固醇被动装载入脂质体中进行制备并用作用于治疗肺部症状的可注射剂型（静脉内的或气管内的）。另外，离体 (ex vivo) 稳定性研究中显示出在 24 小时后所述脂质体保留有超过 75％的酸性皮质类固醇。

发明内容

[0013] 本发明基于以下发现 :化学修饰的糖皮质激素 (GC) 对于改善佐剂关节炎 (AA) 诱导的动物中的类风湿性关节炎的症状是有效的，其中所述化学修饰的糖皮质激素的两亲弱酸形式被稳定地装载入脂质体，即在 4℃保存甚至 14 个月以后大部分所述物质以完整的酸性 GC 的形式保留在脂质体内。

[0014] 因此，根据本发明的第一方面，本发明提供了 GC 或 GC 衍生物在制备药物组合物中的应用，所述药物组合物用于治疗受试对象中的炎性相关症状，条件是所述症状与神经变性疾病或失调不相关，所述 GC 或 GC 衍生物包封在脂质体中并可基本上保留在所述脂质体中 6 个月，所述 GC/GC 衍生物选自 :

[0015] i) 具有 pKa 等于或低于 11 且在 pH7 时 logD 为约 -2.5 ～约 1.5，优选为约 -1.5 ～约 1.0 的两亲弱碱性 GC 或 GC 衍生物 ;

[0016] ii) 具有 pKa 大于 3.5 且在 pH 7 时 logD 为约 -2.5 ～约 1.5，优选为约 -1.5 ～约 1.0 的两亲弱酸性 GC 或 GC 衍生物。

[0017] 所述 GC 或 GC 衍生物优选为酸性 GC 或 GC 衍生物。当指 GC 衍生物时，优选的是在从脂质体释放至体液后转化为非酸性形式的 GC 的两亲弱酸性衍生物。更具体地说，所述酸性 GC 是甲泼尼龙半琥珀酸钠 (MPS)。

[0018] 优选的本发明的 MPS 制剂含有由氢化大豆磷脂酰胆碱 (HSPC)、聚乙二醇包覆的二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 (PEG-DSPE) 和胆固醇以 55 ： 40 ： 5 的摩尔比组合形成的空间稳定的脂质体（具有约 80nm 平均直径的均匀尺寸）。

[0019] 所述药物组合物优选用于炎症和自体免疫失调的治疗或预防，优选用于自体免疫失调（优选为类风湿性关节炎 (RA)) 的治疗。

[0020] 优选的是排除在本发明范围之外的神经变性疾病为多发性硬化。

[0021] 炎症和免疫反应

[0022] 免疫过程极可能是进行性的并在大多数情况下导致抗原的消除而不产生临床上可检测的炎症。临床上显现的炎症的发展指出免疫系统可能已遇到不寻常大量的抗原，处

于不寻常位置的抗原，或者难以消化或者以导致炎症或自体免疫疾病的方式处理的抗原。在一些疾病中，例如类风湿性关节炎中，引发物质是未知的或者可能是正常主体组织成分。在其他疾病（例如全身性红斑狼疮）中，先天性或获得性免疫调节异常可促成炎症过程的持续性质。

[0023] 由免疫系统介导的炎性反应和免疫诱导病变可分为四类：I、II、III 和 IV，其代表四种不同的免疫机制。

[0024] I. 速发型超敏反应（过敏的或反应素的急性炎症）。

[0025] II. 细胞毒性（细胞毒性抗体介导的炎症）。

[0026] III. 免疫复合物（免疫复合物介导的炎症）。

[0027] IV. 迟发型超敏反应（淋巴细胞和巨噬细胞介导的慢性炎症）。

[0028] 上述机制中的每一种均可导致与免疫系统相关的医学症状的发展并可使用本发明的脂质体 GC 或 GC 衍生物进行治疗。

[0029] 因此，本发明还提供了一种治疗炎性相关的医学症状的方法，条件是所述症状不与神经变性疾病或失调相关，所述方法包括向需要的受试对象施用一定量的包封在脂质体中并在所述脂质体中基本上保留 6 个月的 GC 或 GC 衍生物，所述量对治疗所述症状有效，其中所述 GC 或 GC 衍生物选自：

[0030] i) 具有 pKa 等于或低于 11 且在 pH7 时 logD 为约 -2.5 ～约 1.5，优选为约 -1.5 ～约 1.0 的两亲弱碱性 GC 或 GC 衍生物；

[0031] ii) 具有 pKa 大于 3.5 且在 pH 7 时 logD 为约 -2.5 ～约 1.5，优选为约 -1.5 ～约 1.0 的两亲弱酸性 GC 或 GC 衍生物。

[0032] 再进一步，本发明提供了一种用于治疗炎性相关症状的药物组合物，该药物组合物含有一定量的包封在脂质体中并在所述脂质体中保留 6 个月的 GC 或 GC 衍生物，其中所述 GC 或 GC 衍生物选自：

[0033] i) 具有 pKa 等于或低于 11 且在 pH 7 时 logD 为约 -2.5 ～约 1.5，优选为约 -1.5 ～约 1.0 的两亲弱碱性 GC 或 GC 衍生物；

[0034] ii) 具有 pKa 大于约 3.5 且在 pH7 时 logD 为约 -2.5 ～约 1.5，优选为约 -1.5 ～约 1.0 的两亲弱酸性 GC 或 GC 衍生物。

[0035] 可根据本发明被治疗的优选症状是影响除中枢神经系统以外的关节或其他器官的炎性状态，和 / 或除 CNS 疾病以外对 GC 治疗响应或敏感的炎性状态。具体的一组炎性状态是自体免疫症状，具体为关节炎，更具体为类风湿性关节炎 (RA)。

附图说明

[0036] 为理解本发明并领会如何实际实施本发明，现将仅通过非限制性实施例的方式，参考如下附图描述优选实施方案，在所述附图中：

[0037] 图 1A-1C 是显示甲泼尼龙半琥珀酸钠 (MPS) 化学特性的示图，所述化学特性包括作为 pH 函数的 MPS 的浊度（图 1A）；MPS 在不同 pH 点的分配系数（图 1B）；以及作为 GC 浓度函数的半琥珀酸甲泼尼龙 (MP- 半琥珀酸）和磷酸地塞米松 (DEX- 磷酸）的表面张力（图 1C)。

[0038] 图 2A-2B 是在主动装载 MPS 前（图 2A) 和后（图 2B) 脂质体的 Cryo-TEM（透射电

子显微镜）图像。

[0039] 图 3A-3B 是在 4℃保存 14 个月后 SSL-MPS 的尺寸排阻色谱图，显示了包封的 MPS(enc-MPS)、游离 MPS(free-MPS) 和游离甲泼尼龙 (free-MP)，而图 3B 是描述图 3A 的级分 8 ～ 17 的这部分的放大图，显示存在极少量的游离 MPS 和 (MP)。

[0040] 图 4A-4B 是于 37℃在血浆（图 4A) 中或在发炎的滑液（图 4B) 中温育时，MPS 和 Ca^{+2} 从 SSL-MPS 中的释放曲线。

[0041] 图 5 是显示不同时间点 SSL-MPS 在躯体中，包括在血浆、脾（除以 5 以后的值）、肾、肺、肝和皮肤等中的生物分布的柱状图。

[0042] 图 6 是显示 SSL-MPS 进入大鼠爪的非关节（●）和关节（○）中的分布的曲线图。

[0043] 图 7A-7B 是显示在如下所述的两次不同治疗方案后游离 MPS(10mg/kg 体重和 50mg/kg 体重，分别为“Ster.10”或“Ster.50”)、SSL-MPS(10mg/kg 体重、2mg/kg 体重和 0.4mg/kg 体重，分别为“Lip.10”、“Lip.2”、“Lip.0.4”）对佐剂关节炎 (AA) 诱导的动物的效果的曲线图。

[0044] 图 8 是显示在疾病峰值期 SSL-MPS 对 AA 的治疗效果的曲线图。

具体实施方式

[0045] 糖皮质激素 (GC) 是主要影响碳水化合物（和在更小范围里的脂肪和蛋白）的代谢（并具有其他作用）的一类激素。糖皮质激素是在肾上腺的外侧部分（皮质）中产生并在化学上分类为类固醇。皮质醇是主要的天然糖皮质激素。虽然如此，术语“糖皮质激素”也用于指实验室中合成的等价激素。

[0046] 在互联网站点 http://www.steraloids.com/ 可以找到糖皮质激素的非限制性列表，在此以参考的方式全文引入。实例包括半琥珀酸泼尼松龙、半琥珀酸甲泼尼龙、半琥珀酸地塞米松、半琥珀酸别孕烷醇酮、倍氯米松 21- 半琥珀酸、倍他米松 21- 半琥珀酸、半琥珀酸勃地酮、半琥珀酸泼尼松龙（钠盐）、泼尼松龙 21- 半琥珀酸、半琥珀酸诺龙、19- 去甲睾酮半琥珀酸酯、脱氧皮质酮 21- 半琥珀酸、半琥珀酸地塞米松、半琥珀酸地塞米松 :精胺、半琥珀酸皮质酮、11- 脱氧皮甾醇半琥珀酸酯 (cortexolonehemisuccinate)。

[0047] 类似许多其他药物，施用游离形式的 GC 可具有一些缺点，例如使受治疗个体受到已知与 GC 治疗伴生的副作用影响的风险，类固醇从血浆中被迅速清除等。

[0048] 本发明目的在于提供其中 GC 由适宜的载体携带和保护的制剂。在寻求如此的解决方案中，本发明人已设想，尽管难以将所述疏水性 GC 有效地和稳定地装载入载体中，但通过对 GC 进行相当简单的化学修饰（包括将所述类固醇转化为水溶性衍生物）可以将所述衍生物装载入脂质体中并且所得脂质体 GC 或 GC 衍生物对改善炎症症状是有效的。

[0049] 因此，本发明提供了 GC 或 GC 衍生物在制备用于治疗炎性相关症状的药物组合物中的应用，条件是所述症状与神经变性疾病或失调不相关，其中所述 GC 或 GC 衍生物是包封在脂质体中并可基本上保留在所述脂质体中 6 个月，所述 GC 或 GC 衍生物选自 :

[0050] i) 具有 pKa 等于或低于 11 且在 pH7 时 logD 为约 -2.5 ～约 1.5，优选为约 -1.5 ～约 1.0 的两亲弱碱性 GC 或 GC 衍生物 ;

[0051] ii) 具有 pKa 大于 3.5 且在 pH 7 时 logD 为约 -2.5 ～约 1.5，优选为约 -1.5 ～约 1.0 的两亲弱酸性 GC 或 GC 衍生物。

[0052] 此处使用的术语“GC 衍生物”指或者通过插入化学基团或者通过从 GC 分子上移除化学基团进行化学修饰过的 GC 分子，所述修饰导致所述分子根据所用修饰的类型转化为两亲弱碱或两亲弱酸。正如精通类固醇化学的技术人员能很好地理解的那样，这些天然亲水分子具有至少一个可与弱酸或弱碱结合而形成相应的两亲弱酸或两亲弱碱分子的化学反应性基团。正如精通化学的技术人员公知的那样，通常包含在类固醇基本结构中的化学反应性基团的非限制性实例有羟基、羧基等。应当注意的是在本发明的上下文中，GC 衍生物也包括活性的、非修饰的、两亲的和弱酸性的 GC。

[0053] 一方面，GC 衍生物是药物前体，即当其为存在于脂质体中的形式时不具有药物活性。随着从脂质体中释放，所述 GC 药物前体通过例如酯酶等酶转化为其具有药物活性的疏水形式。

[0054] 根据另一方面，包封在脂质体中的 GC 已经是其药物活性形式，和不需要进行任何酶促过程使之变得有活性。根据第二方面，GC 本身是弱两亲酸或碱。

[0055] 此处使用的术语“两亲弱酸”指既具有疏水基团又具有亲水基团的分子，GC 的类固醇骨架基本构成所述疏水基团，而由于上述修饰而连接在 GC 上的弱酸部分基本构成所述亲水基团。所述 GC 两亲弱酸或 GC 衍生物的特征在于下列物理特性：

[0056] -pKa：其具有大于 3.0，优选为大于 3.5，更优选为约 3.5 ～约 6.5 的 pKa；

[0057] - 分配系数：在 pH 为 7.0 的正辛醇 / 缓冲液（水相）体系中，其具有约 -2.5 ～约 1.5，更优选为约 -1.5 ～约 1.0 的 logD。

[0058] 可通过本领域技术人员已知的技术将 GC 与二羧酸或三羧酸反应，或者将 GC 连接到氨基酸的氨基上而得到上述 GC 的两亲弱酸性衍生物。

[0059] GC 衍生物的具体实例包括，但不限制于，倍他米松 21- 半琥珀酸泼尼松龙半琥珀酸钠盐、泼尼松龙 21- 半琥珀酸、半琥珀酸地塞米松、半琥珀酸地塞米松：精胺、半琥珀酸皮质酮半琥珀酸泼尼松龙、半琥珀酸甲泼尼龙、半琥珀酸地塞米松。

[0060] 此处使用的术语“两亲弱碱”指既具有疏水基团又具有亲水基团的分子，GC 的类固醇骨架基本构成所述疏水基团，而由于上述修饰而连接在 GC 上的弱碱部分基本构成所述亲水基团。所述 GC 两亲弱碱性衍生物的特征在于下列物理特性：

[0061] -pKa：其具有小于 11.0，更优选为约 11.0 ～约 7.5 的 pKa；

[0062] - 分配系数：在 pH 为 7.0 的正辛醇 / 缓冲液（水相）体系中，其具有约 -2.5 ～约 1.5，优选为 -1.5 ～约 1.0 的 logD。

[0063] 可通过以下方法得到上述 GC 的两亲弱碱性衍生物：将 GC 与诸如精氨酸或赖氨酸等碱性氨基酸反应，或使 GC 通过其羧基与任何氨基酸反应而使氨基自由，或将 GC 与诸如亚精胺或精胺等多胺反应。

[0064] 此处使用的术语“脂质体”指基于脂质的双层泡囊。脂质体广泛用作药物、肽、蛋白质、原生质 DNA(plasmic DNA)、反义寡核苷酸或核酶的生物相容性载体，而用于药物、化妆和生化目的。所述脂质在颗粒尺寸和物理参数上极其丰富的多样性提供了有吸引力的潜力，以用于为广泛的应用而构建特制载体。对于不同的应用（例如胃肠外、经皮、肺部、鼻内和口服施用）的各种脂质制剂（脂质体、脂复合物、立方相、乳液、微胶粒和固体脂质纳米颗粒）的不同性质（尺寸、胶体行为、相转移、电荷和多形性）对于本领域技术人员是可用的和已知的。这些性质影响所述脂质体的相关性质，例如脂质体在保存时和在血清中的稳定

性，生物分布和货物的被动或主动（特异性）靶向，以及如何触发药物释放和膜解体和/或融合。

[0065] 本发明可用于大量脂质体组合物而本领域技术人员知道如何根据不同的考虑来选择所述脂质体的组成，所述考虑包括活性成分（在本具体案例申请中，为特定GC或GC衍生物）的选择、最终脂质体组合物的施用模式等。

[0066] 所述脂质体是主要由形成脂质体的脂质所组成的脂质体，所述脂质是两亲分子，该两亲分子的基本特征在于包装参数为0.74～1.0或者在于加和包装参数（脂质体每种成分的包装参数乘以每种成分的摩尔分数的总和）为0.74～1的脂质混合物。

[0067] 形成脂质体的脂质，此处可举出磷脂，其在水中形成双层泡囊。所述脂质体也可以包括加入到所述脂质双层中的其他脂质，例如磷脂酰乙醇胺(PE)和甾醇，这些其他的脂质的疏水部分与双层膜的内侧疏水区域相接触，而其头部基团部分朝向双层膜的外侧极性表面。这些附加的非形成脂质体的脂质成分的类型和水平取决于所述脂质双层的所有组分的加和包装参数保持为0.74～1.0。

[0068] 所述形成脂质体的脂质优选为具有丙三醇骨架的脂质，在丙三醇骨架中头部基团的至少一个优选两个羟基优选被酰基链取代（以形成酰基或二酰基衍生物），然而也可以被烷基链或烯基链、磷酸基团或它们的组合或衍生物取代，并且在所述头部基团中可含有化学反应性基团（例如胺、酸、酯、醛或醇），因此提供了极性头部基团。诸如鞘磷脂等鞘脂是甘油磷酸酯的优秀替代物。

[0069] 通常，所述取代链，例如酰基链、烷基链或烯基链的长度为14～约24个碳原子，并具有为完全氢化、部分氢化或非氢化脂质等不同的饱和度。此外，所述脂质可以是天然来源的、半合成的或者全合成的脂质，并且可以是中性的、带负电的或带正电的。存在大量形成泡囊的合成脂质和形成泡囊的天然脂质，包括诸如磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰肌醇(PI)、磷脂酰甘油(PG)、二肉豆蔻酰磷脂酰甘油(DMPG)、蛋黄磷脂酰胆碱(EPC)、1-棕榈酰-2-油酰磷脂酰胆碱(POPC)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)等磷脂；磷脂酸(PA)、磷脂酰丝氨酸(PS)1-棕榈酰-2-油酰磷脂酰胆碱(POPC)，以及诸如具有12～24个碳原子酰基链或烷基链的鞘磷脂(SM)等鞘磷脂。上述具有不同饱和度的烃链（酰基/烷基/烯基链）的脂质和磷脂可以商购或根据公开的方法制备。其他合适的包含在脂质体中的脂质有甘油糖脂和鞘糖脂和甾醇（例如胆固醇或植物甾醇）。

[0070] 优选为所述磷脂是蛋磷脂酰胆碱(EPC)、1-棕榈酰-2-油酰磷脂酰胆碱(POPC)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)或氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)。

[0071] 阳离子脂质（单阳离子和多阳离子）也适合用于本发明的脂质体中，其中所述阳离子脂质可作为所述脂质组合物的次要成分或作为主要或单独组分被包含于其中。所述阳离子脂质通常具有亲脂部分，诸如甾醇、酰基链或二酰基链，并且其中所述脂质具有整体上的净正电荷。优选为所述脂质载体的头部基团带正电。单正电荷脂质可包括例如，1,2-二肉豆蔻酰-3-三甲基铵丙烷(DMTAP)、1,2-二油酰氧-3-(三甲基氨基)丙烷(DOTAP)、N-[1-(2,3-二(十四烷氧基))丙基]-N,N-二甲基-N-羟乙基溴化铵(DMRIE)、N-[1-(2,3-二油酰氧)丙基]-N,N-二甲基-N-羟乙基-溴化铵(DORIE)、N-[1-(2,3-二油酰氧)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)、3β[N-(N′,N′-二甲基氨基乙烷)氨基甲酰基]胆固醇(DC-Chol)和二甲基-二(十八烷基)铵(DDAB)。

[0072] 多阳离子脂质的实例包括与单阳离子脂质相似的亲脂性部分，多阳离子部分与所述亲脂性部分相连。示例性多阳离子部分包括精胺或亚精胺（可举出DOSPA和DOSPER），或者诸如聚赖氨酸等肽或其他多胺脂质。例如，中性脂质(DOPE)能与聚赖氨酸衍生形成阳离子脂质。多阳离子脂质包括但不局限于N-[2-[[2,5-双(3-氨丙基）氨基]-1-氧戊基]氨基]乙基]-N,N-二甲基-2,3-双[(1-氧-9-十八碳烯基）氧基]-1-丙铵(DOSPA)和神经酰胺氨基甲酰基精胺(CCS)。

[0073] 所述形成脂质体的脂质混合物可经选择后实现特定程度的流动性或刚性，以控制所述脂质体在血清中的稳定性以及控制被包封在脂质体中的试剂的释放速率。

[0074] 此外，所述脂质体也可以包括脂质与亲水聚合物衍生形成的称为脂聚合物的新的实体。脂聚合物优选包括在其头部基团处使用分子量等于或大于750 Da的聚合物进行修饰的脂质。所述头部基团可以是极性的或非极性的，然而，优选连接有较大（＞750Da）高度水化（每个头部基团水化至少60个分子水）的柔性聚合物的极性头部基团。所述亲水聚合物头部基团与脂质区域的连接可以是共价的或者非共价的连接，然而，优选通过共价键的形成（可选地通过接头）。亲水聚合物链的最外层有效地使得脂质体在体内具有较长的血液循环寿命。所述脂聚合物可以通过两种不同方式导入脂质体：(a)或者通过将所述脂聚合物加入到形成脂质体的脂质混合物中。所述脂聚合物将被合并以及暴露在脂质体双层的内小叶和外小叶[Uster P.S.等,FEBBS Letters 386:243(1996)]；(b)或者通过首先制备脂质体然后或者通过在高于脂质体和形成脂质体的脂质的Tm的温度温育，或者通过短时间微波照射将脂聚合物并入预先形成的脂质体的外小叶。

[0075] 以下文献中已经描述了包含形成脂质体的脂质的泡囊的制备和亲水聚合物对所述脂质的衍生（因此形成脂聚合物），例如Tirosh等，[Tirosh等，Biopys.J.,74(3):1371-1379，(1998)]和在美国专利第5,013,556号、第5,395,619号、第5,817,856号、第6,043,094号、第6,165,501号中，在此通过参考的方式整体引入，以及在WO 98/07409中。所述脂聚合物可以是非离子脂聚合物（有时也称为中性脂聚合物或不带电荷的脂聚合物）或具有净负电荷或净正电荷的脂聚合物。

[0076] 存在可以连接到脂质上的大量聚合物。通常用作脂质修饰物的聚合物包括但不局限于：聚乙二醇(PEG)、聚唾液酸、聚乳酸（也称为聚丙交酯）、聚羟基乙酸（也称为聚乙交酯）、聚乳酸-聚羟基乙酸(apolylactic-polyglycolic acid)、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚甲基噁唑啉、聚乙基噁唑啉、聚羟乙基噁唑啉、聚羟丙基噁唑啉、聚天冬酰胺(polyaspartmide)、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、聚乙烯基甲基醚、聚丙烯酸羟乙基酯、诸如羟甲基纤维素或羟乙基纤维素等衍生纤维素。这些聚合物可以以均聚物或嵌段共聚物或无规共聚物的形式使用。

[0077] 尽管衍生为脂聚合物的脂质可以是中性、带负电荷以及带正电荷的，但是对带特定电荷（或者不带电荷）没有限制，最常使用并可市售购得的衍生为脂聚合物的脂质是基于磷脂酰乙醇胺(PE)，通常为二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE)的那些脂质。

[0078] 本发明采用的一类具体的脂聚合物包括连接至DSPE的单甲基化PEG(具有不同长度的PEG链，所述甲基化PEG在本文简称为PEG)，其中所述PEG聚合物通过氨基甲酸酯连接与脂质相连而形成带负电荷的脂聚合物。其他脂聚合物是中性甲基聚乙二醇二硬脂酰甘油(mPEG-DSG)和中性甲基聚乙二醇羟羰基-3-氨基-1,2-丙二醇二硬脂酰酯(mPEG-DS)

[Garbuzenko O. 等,Langmuir.21 :2560-2568(2005)]。所述 PEG 部分优选具有分子量为约 750Da ～约 20,000Da 的头部基团。更优选为所述分子量为约 750Da ～约 12,000Da 以及最优选为约 1,000Da ～约 5,000Da。本文采用的一种具体的 PEG-DSPE 是其中 PEG 具有 2000Da 分子量的 PEG-DSPE,在本文称为 ^{2000}PEG-DSPE 或者 ^{2k}PEG-DSPE。

[0079] 已描述包括所述衍生脂质的脂质体的制备,其中通常为 1 摩尔%～ 20 摩尔%的所述衍生脂质包括在所述脂质体制剂中。

[0080] 已很好地确定 :脂质体制剂的制备涉及除水相成分成分以外选择合适的脂质组合物,所述水相成分例如缓冲剂、抗氧化剂、金属螯合剂和低温保护剂等。诸如磷脂酰甘油等电荷诱导脂质可加入到脂质体双层中以降低泡囊 - 泡囊融合并增强与细胞的相互作用,同时胆固醇和鞘磷脂可包含在制剂中以降低包封药物的可透过性和泄漏。在中性 pH 的缓冲剂能减低水解。加入诸如抗坏血酸钠等抗氧化剂能降低氧化等。

[0081] 这些脂质体成分间比例的变化控制所述脂质体的药物性质,包括脂质体的稳定性,这是多种类型的泡囊应用的主要考虑因素。显然,脂质体的稳定性应当满足与传统药物相同的标准。化学稳定性涉及防止磷脂双层中的酯键水解和脂质链中不饱和位点的氧化。化学不稳定性可导致物理不稳定性或者包封药物从双层中的泄漏以及泡囊的融合和聚集。化学不稳定性也可导致脂质体的血液循环时间短,这将影响有效接近靶目标和与靶目标的相互作用。

[0082] 本发明的优选制剂是含有诸如蛋 PC(EPC) 或氢化大豆 PC(HSPC) 等磷脂酰胆碱 (PC)(作为形成脂质体的脂质)、PEG 化 (2000Da) 的二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 (PEG-DSPE) 和胆固醇的制剂。明显地是,也可以以相同、相近或者不同摩尔比采用其他脂质混合物,条件是脂质体的不同成分的最终加和包装参数为约 0.74 ～ 1.0。

[0083] 已证明本发明的药物制剂是高度稳定的。在本发明的一个示意性实施方案中,GC 衍生物、半琥珀酸甲泼尼龙 (用琥珀酸修饰的甲泼尼龙) 被包封在含有上述三种成分的脂质体中,该实施方案显示在 4℃保存 14 个月后 GC 衍生物仅有少量的减少 (从起始浓度算少于 20%)(图 3A-3B)。

[0084] 因此,在本发明的上下文中,术语“稳定性”指制剂在传统保存条件 (4℃) 在脂质体中保留大部分 (超过 80%,优选超过 90%)GC/GC 衍生物长达 6 个月、优选为 10 个月并更优选为 14 个月。因此,此处使用的术语“基本上保留”指 80%,优选 90%的 GC/GC 衍生物在保存条件下保留在脂质体中长达约 6 个月,优选为 10 个月并更优选为 14 个月。根据一个优选实施方案,通过使用立体稳定脂质体 (SSL),即包覆有亲水成分的脂质体来保持脂质体的稳定性。根据一个优选实施方案,所述 SSL 包含摩尔比为 55 ： 40 ： 5 的氢化大豆磷脂酰胆碱 (HSPC)、^{2000}PEG-DSPE 和胆固醇的组合。

[0085] 通常,可获得多种药物装载方法以制备含有俘获药物的脂质体,包括被动俘获和主动远程装载。所述被动俘获法最适合将亲脂性药物俘获入脂质体膜中以及最适合俘获高水溶解性的药物。在可离子化亲水性或两亲药物的情况下,通过将药物逆膜离子梯度装载入脂质体甚至能实现更高的药物装载效率 [Nichols, J.W,等, Biochim.Biophys.Acta455 : 269-271(1976) ;Cramer,J.,等,Biochemical and Biophysical ResearchCommunications 75(2) :295-301(1977)]。通常称为远程装载的这种装载方法通常涉及天然为两亲并具有可离子化基团的药物,通过将所述药物加入到具有内侧较高 / 外侧较低的 H^+ 和 / 或离子梯度

的脂质体悬浮液中进行装载。

[0086] 在本发明的上下文中采用的脂质体优选通过远程装载原理进行装载。所得制剂表现出显著高的 GC/GC 衍生物 :脂质比例。优选为 GC/GC 衍生物与脂质的摩尔比为 0.01 ～ 2.0,更优选为 0.04 ～ 0.25。对于两亲弱碱 / 碱的高装载,有时候优选其在脂质体中的浓度为使其在预先俘获的反离子存在下沉淀。

[0087] 可以通过多种技术制备用于远程装载中具有跨脂质体双层的 H^+ 和 / 或离子梯度的脂质体。典型的方法包括将具有形成稳定脂质体的比例的脂质混合物溶解在合适的有机溶剂中并在容器中蒸发形成脂质薄膜。随后使用将在脂质体内部空间中形成水相的含有溶质物质的水性介质覆盖在薄膜上。在脂质体形成后,根据已知方法可以调节泡囊的尺寸以实现在所选范围内的脂质体尺寸分布。在本发明中使用的脂质体优选为均匀调整至选定的尺寸范围 70nm ～ 100nm,优选为约 80nm。

[0088] 在调整尺寸后,脂质体的外部介质经处理形成跨脂质体膜的离子梯度 (通常使用与形成脂质体相同的缓冲液),其通常为内侧较高 / 外侧较低的离子浓度梯度。这可以通过多种方式完成,例如通过 (i) 稀释外部介质,(ii) 对所需的最终介质透析,(iii) 凝胶排阻色谱,例如使用 Sephadex G-50,在用于洗脱的所需介质中平衡,或者 (iv) 重复进行高速离心和将沉淀脂质体在所需最终介质中重悬浮。外部介质的选择取决于梯度的类型、梯度形成的机制、外部溶质和所需的 pH,现将进行描述。

[0089] 在产生离子和 / 或 H^+ 梯度的最简单的方法中,脂质在具有选定的内部介质 pH 的介质中进行水合和调整大小。脂质体的悬浮液经过滴定直到外部脂质体混合物达到所需最终 pH,或者经过如上处理使外部相缓冲液与具有所需外部 pH 的缓冲液交换。例如,在选定的缓冲液,例如谷氨酸盐、柠檬酸盐、琥珀酸盐、富马酸盐缓冲液中的起始水合介质可具有 5.5 的 pH,而最终外部介质可具有在相同或不同缓冲液中的 8.5 的 pH。这些缓冲液的共同特性是它们形成自脂质体基本不能穿过的酸。优选选择内部和外部介质使之含有相同的重量克分子渗透浓度,例如通过合适地调节缓冲液、盐或诸如葡萄糖或蔗糖等低分子非电解质溶质的浓度。

[0090] 在另外一种通用方法中,通过在脂质体中包括选定的离子载体来生成梯度。为了进行示例,在钾缓冲液中制备用于制备在脂质体双层中包含缬氨霉素的脂质体,调整尺寸,然后外部介质与钠缓冲液交换,而产生内侧钾 / 外侧钠的梯度。钾离子由内向外方向的移动接着产生内侧较低 / 外侧较高的 pH 梯度,大概是由于质子响应跨脂质体膜的净电负性从而进入脂质体的移动 [Deamer, D.W. ,等, Biochim.et Biophys.Acta 274 :323(1972)]。

[0091] 相似的方法是水合所述脂质和在高浓度硫酸镁中调整所形成的多层脂质体的尺寸。通过对蔗糖中的 20mM HEPPES, pH 7.4 的缓冲液透析产生所述硫酸镁梯度。然后,加入 A23187 离子载体,而引起镁离子的向外转运以每个镁离子交换两个质子,还建立脂质体内侧高 / 脂质体外侧低的质子梯度 [Senske DB 等 (Biochim.Biophys.Acta 1414 : 188-204(1998)]。

[0092] 在另一个更优选的方法中,用于药物装载的质子梯度是通过建立跨脂质体膜的铵离子梯度产生的,如同在例如美国专利第 5,192,549 号和第 5,316,771 号中所描述,在此以参考的方式引入。所述脂质体在含有诸如硫酸铵、磷酸铵和柠檬酸铵等铵盐的水性缓冲液中制备,所述铵盐通常为在诸如 5.5 ～ 7.5 的合适 pH 的 0.1M ～ 0.3M 铵盐。所述梯度也可

以通过在水合介质中包括硫酸化聚合物产生，所述硫酸化聚合物例如葡萄糖硫酸酯铵盐、肝素硫酸酯铵盐或硫糖铝。在脂质体形成和尺寸调整以后，外部介质与不含铵离子的介质交换。在该方法中，在装载过程中两亲弱碱与铵离子进行交换。

[0093] 还有，在美国专利第 5,939,096 号中描述了另一种方法，在此以参考的方式引入。简言之，所述方法采用包括诸如乙酸等弱酸的盐的质子穿梭机制，所述弱酸盐的质子化形式跨过脂质体膜进行位置转移而形成内侧高 / 外侧低的 pH 梯度。然后将两亲弱酸化合物加入到预先形成的脂质体的介质中。所述两亲弱酸响应该梯度在脂质体内聚集，并通过阳离子（例如钙离子）促进的沉淀或跨脂质体膜低穿透性保留在脂质体中，即，所述两亲弱酸与乙酸交换。

[0094] 因此形成的装载有 GC 或 GC 衍生物的脂质体可以随后用于治疗具有或倾向发展与免疫系统相关的医学症状的患者。

[0095] 术语“炎性相关的症状”可以与术语“炎性状态”相互交换使用，是指其中之一显示炎症存在的任何疾病和病理症状。所述炎症可以是所述疾病或病理症状的潜在原因，或者可以是所述症状下隐藏的结果或其他生理过程。该术语指活性或亚临床性炎症的任何状态，包括免疫诱导的病理（例如自体免疫失调）。所述炎症可以是由于炎性疾病所致，或者也可以由于一些其他类型疾病或失调的副作用所致。

[0096] 炎性状态和其他由免疫系统介导的免疫诱导病理可以分为四类：

[0097] I. 速发型超敏反应（过敏的或反应素的急性炎症）：包括 I 型超敏反应，其特征在于在与抗原（过敏原）接触后立即发生的过敏反应。在一些个体中某些过敏原倾向于刺激 IgE 抗体的产生。IgE 抗体通过其高亲和性 Fc 受体非特异性地结合柱状细胞和嗜碱细胞。抗原与细胞结合 IgE 抗体的 Fab 部分的随后结合导致细胞质颗粒内容物从柱状细胞和嗜碱细胞中释放（例如组胺），以及导致花生四烯酸的生物活性产物的合成和分泌（例如白三烯）。

[0098] 过敏反应包括但不限于荨麻疹、季节性鼻炎、哮喘和其中大量抗原（过敏原）进入宿主循环情况中的全身性过敏症。

[0099] I 型超敏反应的另一个非限制性实例是脓毒性休克。

[0100] II. 细胞毒性（细胞毒性抗体介导的炎症）：指 II 型或抗体依赖性细胞毒性超敏反应并在当抗体在细胞上与其自身抗原或外来抗原结合时发生，并导致吞噬作用、杀伤细胞活性或补体介导的胞溶。

[0101] 在 II 型超敏反应中，通过上述术语也可知，针对细胞表面抗原或组织抗原的抗体形成与补体和大量效应细胞相互作用的免疫复合物以带来对靶细胞的损伤。抗体通过效应细胞上的 Fc 受体的方式将靶细胞与诸如巨噬细胞、嗜中性细胞、嗜伊红细胞以及通常的 K 细胞等这些效应细胞相连。

[0102] 补体片段和 IgG 都能用作与宿主组织或与微生物结合的调理素，而吞噬细胞吞噬所述受调理的微粒。

[0103] 细胞毒性超敏反应有三类主要亚型：

[0104] (a) 由同种免疫引起的相同物种的不同成员间的 II 型反应，包括 ABO 系统中不相容的输血后的输血反应，由于 Rh 因子不相容引起的新生儿溶血症和 / 或接受者体内针对移植体上表面移植抗原的抗体所引起的移植反应。

[0105] (b) 宿主体内针对其自身细胞或者组织抗原的抗体（自体抗体）所引起的自体免疫 II 型超敏反应。可举出抗患者自身红细胞的自体抗体所引起的自体免疫溶血性贫血；抗甲状腺过氧化物酶表面抗原的自体抗体所引起的桥本甲状腺炎；表现为抗血小板抗体引起的血小板破裂的特发性血小板减少性紫癜；其中观察到由特定自体抗体引起的补体介导的基底膜损伤的古德帕斯彻病综合征。

[0106] 下列是可根据本发明治疗的自体免疫疾病的非限制性列表：热带痉挛性下肢轻瘫、急性坏死性出血性白质脑炎、副肿瘤、桥本甲状腺炎、产后甲状腺炎、灶性甲状腺炎、青少年甲状腺炎、特发性甲状腺功能减退、I 型（胰岛素依赖性）糖尿病、阿狄森氏病、垂体炎、自体免疫尿崩症、甲状旁腺功能减退、寻常性天庖疮、落叶型天庖疮、大水疱性类天庖疮 / 妊娠性类天庖疮、疤痕性类天庖疮、疱疹样皮炎、获得性表皮大疱 (Epidermal bullosa acquisita)、多形红斑、妊娠性疱疹 (Herpes gestatonis)、白癜风、慢性荨麻疹、盘状狼疮、普秃 / 斑秃、牛皮癣、自身免疫性肝炎、原发性胆汁性硬化、慢性活动性肝炎、慢性活动性肝炎 / 原发性胆汁性硬化重叠综合征、原发性硬化性胆管炎、自体免疫性溶血性贫血、特发性血小板减少性紫癜、伊凡伊综合征、肝素诱导的血小板减少、原发性自体免疫嗜中性白细胞减少症、幼儿自体免疫性（原发性）嗜中性白细胞减少症、骨髓移植后自体免疫性嗜中性白细胞减少症、获得性自体免疫性血友病、自体免疫性胃炎和恶性贫血、腹部疾病、克罗恩病、溃疡性结肠炎、炎性肠病 (IBD)、涎腺炎、自体免疫性卵巢早衰、精子缺乏 (Azzospermia)、性腺机能减退、与精子自体抗体相关的男性不育、自体免疫性睾丸炎、卵巢早衰、自体免疫性卵巢炎、色素层炎、视网膜炎、交感性眼炎、鸟枪弹样视网膜脉络膜病变、Vogt-Koyanagi-Harada 肉芽肿性色素层炎、晶体诱发性色素层炎、自体免疫性心肌炎、先天性心脏传导阻滞（新生儿狼疮）、恰加斯病、阿霉素心脏毒性、德雷丝勒心肌炎综合征、支气管哮喘、间质性纤维性肺病、迅速进行性肾小球肾炎、自体免疫性肾小管间质性肾炎、全身性红斑狼疮 (SLE)、抗磷脂抗体综合征、类风湿性关节炎、青少年性类风湿性关节炎、费尔提综合征、大颗粒淋巴细胞增多症 (LGL)、斯耶格伦综合征、全身性硬化症（硬皮病）、crest 综合征、混合结缔组织病、多肌炎 / 皮肌炎、古德帕斯彻病、韦格纳肉芽肿病、丘 - 施综合征、过敏性紫癜、显微镜下型多脉管炎 (Microscopicpolyangiatis)、结节性动脉周围炎、黑奇特综合征、动脉粥样硬化、颞（巨）细胞性动脉炎、高安动脉炎、顺崎病、强硬性脊椎炎、莱特氏症、Sneddons 病、自体免疫性多内分泌腺症、念珠菌病 - 外胚层营养不良、特发性冷球蛋血症性血管炎、皮肤白细胞分裂性脉管炎、莱姆病、风湿热和心脏病、嗜酸细胞性筋膜炎、阵发性冷血红蛋白尿、风湿性多肌痛、纤维肌痛、POEMS 综合征（多神经病、脏器巨大症、内分泌病、M 点和皮肤改变）、复发性多软骨炎、自体免疫性淋巴增生综合征、TINU 症（急性肾小管间质性肾炎和色素层炎）、普通可变免疫缺陷症、TAP（与抗原呈递相关的转运蛋白）缺乏症、欧门综合征 (Omenn syndrome)、高 IgM 综合征、BTK 无丙种球蛋白血症、人类免疫缺陷病毒和骨髓移植后 (Postbone-marrow-transplant)。

[0107] (c) II 型药物反应，其中药物可与身体成分结合并因此经历从半抗原到可使某些个体过敏的全抗原的转化。如果在此反应中产生 IgE 抗体，可导致过敏性反应。在一些情况下，可诱导细胞介导的超敏反应。在其他情况下，当发生与血清蛋白的结合时，III 型免疫复合体介导的反应发生的可能性会增加。最后，与宿主细胞表面的分子结合的药物抗原复合物可导致对细胞 - 药物复合物有细胞毒性的抗体的产生。该机制的实例已在以下情况中观

察到：有时与连续施用氯丙嗪或非那西丁相关的溶血性贫血中、与服用氨基比林或奎尼丁相关的粒细胞缺乏症中以及可能由镇痛剂 edormid 产生的血小板减少性紫癜的典型症状。当停用药物后，所述超敏反应不再明显。

[0108] III. 免疫复合物（免疫复合物介导的炎症）可广泛地划分为三类：

[0109] (a) 低级持续感染与微弱抗体响应的联合效果，导致慢性免疫复合物形成并且复合物在组织中最终沉积。

[0110] (b) 作为自体免疫疾病并发症的免疫复合物疾病，在所述自体免疫疾病中持续产生针对自身抗原的抗体导致长期免疫复合物的形成。单核吞噬细胞、红血球和补体系统（负责移除复合物）变得超负荷且所述复合物在组织中沉积，正如在全身性红斑狼疮中发生的。

[0111] (c) 在躯体表面形成的免疫复合物，特别是在重复吸入来自霉菌、植物或动物的抗原材料后的肺中。实例可举出农民肺和鸽子爱好者肺，其中存在针对发霉干草中发现的放线菌真菌或鸽子抗原的循环抗体。两种疾病均是外源性变应性肺泡炎的形式，并且仅在反复暴露于所述抗原后发生。

[0112] IV. 迟发性超敏反应（淋巴细胞和巨噬细胞介导的慢性炎症，DTH）- 当抗原（例如结核杆菌的抗原）被俘获在巨噬细胞中而不能被清除时表现出来。然后 T 细胞被刺激以加工淋巴因子（介导一系列的炎症响应）。DTH 反应的其他方面可在移植排异和过敏性接触性皮炎中见到。DTH 用作描述所有那些需要经过超过 12 小时的发展并涉及细胞介导免疫反应而不是体液免疫反应的超敏反应的大致类别。然而过敏反应在数秒、数分钟内发生，免疫复合物反应在数小时至一天内发生，DTH 反应在 2 ～ 3 天达到峰值。

[0113] 公认三种类型的迟发性超敏反应：接触性超敏反应和结核菌素型超敏反应两者均在抗原攻击后 72 小时内发生，而肉芽肿性反应的发展超过数周的时间。肉芽肿由巨噬细胞的聚集和增殖形成并可持续数周。

[0114] 根据优选实施方案，所述炎性相关的症状与选自类风湿性关节炎、克罗恩病 & 结肠炎（共同称为 IBD- 炎性肠病）以及糖尿病等自体免疫应答相关。

[0115] 本发明特别地排除任何可认为与神经变性疾病或失调相关的症状。在本发明的上下文中的术语“与神经变性疾病或失调相关”或简称为“神经变性症状”指任何导致神经系统机能障碍的神经系统的异常退化。此外，其还指一类症状，其中存在由如下任何与神经元功能降低相关的参数表现出来的神经系统结构元件的渐进的通常是非常残酷的进行性衰弱，所述参数例如活动性的降低、发声降低、认知功能（尤其是学习和记忆）降低、异常的肢体紧握性反射、视网膜萎缩以致不能成功完成悬挂测试、MMP-2 水平的提高、神经纤维缠结水平的提高、τ 磷酸化的增加、τ 丝形成、异常的神经元形态、溶酶体异常、神经元退化、神经胶质瘤病和脱髓鞘作用。

[0116] 并不局限于此，神经变性症状可按如下组分类：

[0117] - 脱髓鞘和神经自体免疫疾病，包括但不局限于急性、慢性进行性和复发缓解型多发性硬化 (MS)、德维克氏病、视神经炎、急性播散性脑脊髓炎、格 - 巴综合征、慢性炎性脱髓鞘性多神经根神经瘤、脉管炎、全身性红斑狼疮的神经作用、神经类肉瘤病。

[0118] - 感染性疾病，包括但不局限于脑疟疾、病毒感染后脑炎 (post viralinfectious encephatitis) 和 Bell 麻痹。

[0119] -神经变性失调，包括但不局限于阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、老年性痴呆、朊病毒病、海绵状脑病、克－雅病、艾滋病性痴呆、tau 蛋白病（tauopathies）和肌萎缩性脊髓侧索硬化症。

[0120] -大脑损伤，包括但不局限于中风、闭合性头部外伤、辐射损伤和脊髓损伤。

[0121] 考虑到上述内容，本发明也提供了一种用于炎性相关症状 I 的治疗方法（排除了也与分类为诸如多发性硬化等神经变性症状相关的症状），所述方法包括向所述受试对象施用有效量的脂质体 GC 或 GC 衍生物。

[0122] 此外，本发明提供了一种含有所定义的脂质体 GC 或 GC 衍生物的用于上述限定的治疗的药物组合物。所述脂质体 GC/GC 衍生物可与本领域内已知的生理上可接受的赋形剂联合配制。根据本发明采用的可药用赋形剂通常指优选不与脂质体反应的惰性无毒物质。所述赋形剂可以是任何通常使用的赋形剂并只受限于化学－物理考虑（例如溶解度和不具有与脂质体的反应性）和施用途径。载体有时还可以具有提高所述脂质体制剂输送或渗到靶组织、提高所述脂质体制剂的稳定性、减缓清除速度、赋予缓释特性和减少不希望的副反应等作用。所述赋形剂也可以是稳定制剂的物质（例如防腐剂），为制剂提供可食用香味等。所述载体可以包括添加剂、着色剂、稀释剂、缓冲剂、崩解剂、湿润剂、防腐剂、香味剂等。

[0123] 所述药物组合物也可以包括熟知免疫系统疾病的技术人员所知的其他活性成分，例如免疫抑制剂。

[0124] 术语“治疗”、“进行治疗”和“治疗方法”指施用治疗上有效的抗炎性量的脂质体包封的 GC/GC 衍生物或者含有该 GC/GC 衍生物的药物组合物，其对改善与免疫系统的疾病或失调相关的不希望的症状（炎症或免疫诱导病状）有效，以在症状出现前防止所述症状的显现，减缓医学病状的进程、减缓与所述病症相关的症状的恶化、减缓所述病症的慢性期导致的不可逆损伤、缓解严重性或治愈所述病症、提高存活率或从如此病症中更快的恢复。

[0125] 应当理解在本发明的上下文中，术语“治疗”也指“预防性治疗”，即防止与炎性相关症状的发展，或防止在慢性患病个体中所述症状的急性期的反复发生。至此，包封 GC/GC 衍生物的脂质体可施用给没有炎症或自体免疫失调的个体，特别是具有发展与免疫系统相关的医学症状的高风险（例如外伤的结果、暴露于感染剂或过敏原）的个体以延缓疾病的发作。在此情况中，脂质体包封的GC/GC衍生物通常以每日一剂（例如为产生累计有效量）、每日多剂或多日一剂等在较长时期内施用以防止炎症或自体免疫反应的显现。

[0126] 此处目的性的“抗炎有效量”通过本领域内可已知的那些考虑因素决定。所述量必须在患有上述炎性状态或自体免疫状态的受试个体中有效地实现所期望的抗炎作用。

[0127] 有效量取决于需要治疗的疾病的类型和严重性以及治疗策略以及其他因素。通常在恰当设计的临床试验（剂量范围研究）中确定有效量并且本领域技术人员知道如何正确地进行这样的试验以确定有效量。正如通常已知，有效量取决于各种因素，包括分子与相应受体的亲合性、在体内的分布概况、诸如在体内的半衰期等各种药物参数，取决于（如果有的话）不期望的副作用，取决于诸如年龄和性别等因素。

[0128] 此处使用的“施用”用以指通过任何合适的用于输送脂质体制剂到体内所期望的部位的途径向患者接触或分散、输送或应用所述脂质体制剂，所述途径包括口服、胃肠外（包括皮下、肌肉内和静脉内、动脉内、腹膜内）和鼻内施用以及通过鞘内或输注技术。

[0129] 根据一个实施方案，根据本发明使用的脂质体制剂是适用于注射的形式。用于注

射制剂的有效药物载体的要求对于本领域的普通技术人员是公知的。参见 Pharmaceutics and Pharmacy Practice, J.B.Lippincott Co., Philadelphia, Pa., Banker 和 Chalmers, 编辑, 第 238-250 页 (1982), 和 ASHPHandbook on Injectable Drugs, Toissel, 第四版, 第 622-630 页 (1986)。有效量可以是在较长时间里提供给受试对象的单剂或者是以多剂提供给受试个体的累积量（例如以每日单剂）或者是一日多剂。

[0130] 应当注意的是对人类的治疗通常长于在此处举例的实验动物, 所述治疗的时间长短与疾病过程和活性剂效率成比例。所述剂量可以是在几天的时间里单剂或多剂的形式。

[0131] 虽然下列公开内容提供了使用动物模型的实验数据, 但有多种用于将动物模型的剂量换算为人类用的剂量的可接受方法。例如, 近似体表面积 (BSA) 方法的计算利用基于体重 (BW) 的简单异速生长关系, 从而 BSA 等于体重 (BW) 的 0.67 次方 [Freireich E.J. 等, Cancer Chemother.Reports 1966,50(4)219-244 ; 和 Mordenti, J 在如 Dosage RegimenDesign for Pharmaceutical Studies Conducted in Animals 中所分析的, J.Pharm.Sci.,75 :852-57,1986]。此外, 也已建立 BSA 数据的异速生长和表格 [Extrapolation of Toxicological and Pharmacological Data from Animals toHumans, Chappell W&Mordenti J,Advances in Drug Research, 卷 20,1-116,1991(Academic Press Ltd 出版)]。

[0132] 另一个换算剂量的方法是使用浓度时间曲线下面积 (AUC) 的基于药物代谢动力学的方法或者是以下所描述的基于生理学的药物代谢动力学 (PBPK) 方法 [Voisin E.M. 等 Regul Toxicol Pharmacol.12(2) :107-116.(1990)]。

[0133] 实施例

[0134] 概况

[0135] 材料

[0136] 氢化大豆磷脂酰胆碱 (HSPC) 获自 Lipoid KG(Ludwigshafen, 德国)。N- 氨基甲酰基 - 聚 -(乙二醇甲基醚)-1,2- 二硬脂酰 -sn- 甘油基 -3- 磷酸乙醇胺三乙基铵盐 (PEG-DSPE)(该磷脂的聚乙烯部分具有 2000Da 的分子量) 获自 Genzyme Liestale, 瑞士。

[0137] 胆固醇 (＞ 99％纯度) 获自 Sigma(St.Louis, MO, USA)。

[0138] [^{3}H] 胆固醇基十六烷基醚 (每 mmol 45Ci) 来自 NEN Life ScienceProducts(Boston, MA, USA)。叔丁醇 (99％纯) 购自 BDH, Poole, UK。

[0139] 弱酸性类固醇、药物前体甲泼尼龙半琥珀酸钠 (MPS) 和氢化可的松半琥珀酸钠 (HYD) 获自 Pfeizer, Belgium。

[0140] 所有其他化学试剂, 包括缓冲剂都是分析级以上, 并获自 Sigma。纯化水获自 WaterPro PS HPLC/Ultrafilter Hybrid 型, (Labconco, KansasCity, Mo., USA)。

[0141] 方法

[0142] 脂质体的制备

[0143] 将摩尔比为 55 ： 40 ： 5 的 HSPC/ 胆固醇 /PEG-DSPE-2000 储备溶液溶解在 70℃乙醇中至 62.5％ (w/v) 的最终凝胶脂质浓度。然后将所述溶液在 70℃温育直到所有脂质溶解为清澈溶液。随后将所述储备溶液加入到 70℃的 200mM 乙酸钙溶液中以得到 10％脂质浓度 (w/v) 并因此达到 16％ (w/v) 的最终乙醇浓度。将混合物在 70℃持续搅拌得到奶状分散液, 在此阶段脂质水合形成多层脂质体 (MLV) 分散液。

[0144] 通过具有开始于400nm并结束于50nm孔径滤孔的特定孔径的聚碳酸酯过滤器挤出已形成的泡囊而使之尺寸变小，最后的挤出步骤在低压至中压下进行。该过程形成80±15nm的脂质体。在整个过程中将所述挤出装置(Northern Lipids，加拿大）保持在70℃恒温。

[0145] 通过在4℃对5％蔗糖或0.9的生理盐水进行透析(4次交换×每次100体积，最后一次过夜）获得脂质体外(extraliposomal)乙酸钙的移除以产生乙酸钙梯度｛脂质体中［乙酸钙］>>介质中［乙酸钙］｝。

[0146] 通过改进的Bartlet程序[Shmeeda，H.，等，在Methods in Enzymology“Liposomes”中，(Düzgünes，N.，编辑），367：272-292(2003)]由有机磷浓度确定脂质体磷脂浓度。在所得脂质体储备溶液中的脂质浓度为约40mM。

[0147] 通过使用原子吸收光谱法(AAS)测定脂质体内部的钙量。

[0148] 放射性SSL的制备和表征

[0149] 如上所述制备由HSPC：Chol：^{2000}PEG-DSPE(55：40：5摩尔比）和痕量的[^{3}H]胆固醇基十六烷基醚(0.125μCi/μmol PL)构成的[^{3}H]胆固醇醚标记的空间稳定脂质体(SSL)。所述脂质体尺寸由动态光散射(DLS)测量为87±15nm。

[0150] 将MPS装载入脂质体

[0151] 将甲泼尼龙半琥珀酸钠盐(MPS，所述GC衍生物）的储备溶液溶解在5％葡萄糖(pH7.2)中得到约9mg/ml的浓度并在建立乙酸钙梯度后加入到预形成的SSL分散液中。MPS浓度为约9mg/ml而磷脂浓度为约32mM磷酸酯。

[0152] 通过将上述成分在62℃（高于基质脂质T_m）温育所需时间实现所述装载。然后将脂质体冷却至4℃和在4℃对5％葡萄糖透析以去除装载时释放的乙酸盐和去除未装载的药物，或者作为另外一种选择通过离子交换器Dowex 1×400目(Cl-形式）去除未装载的药物。

[0153] MPS的聚集态、分配系数和表面张力

[0154] 1.MPS的聚集态

[0155] 使用分光荧光计在MPS没有吸收的条件下（激发和发射在相同波长Ex＝600nm，Em＝600nm)以与激发光束成90°时的光散射的强度作为所测定的浊度，通过浊度变化来判定MPS的聚集。由于聚集的形成，MPS溶液/分散液的光散射有很大提高。

[0156] 散射光的强度（与激发成90°）也定义为浊度，与聚集体的浓度和尺寸成比例[Zuidam，N.J.和Barenholz，Y.，Biochim.Biophys.Acta1368：115-128(1998)]。按照如下方式测试MPS的聚集态：向石英比色杯中加入MPS浓度为约6.5mg/ml的MPS(2ml)。然后用HCl(1.756M)滴定所述溶液并使用都在600nm具有1％衰减的激发光和发射光散射并监测溶液的pH。

[0157] 2.分配系数

[0158] 通过如[Samuni，A.M.和Barenholz，Y.，Free Radicals Biol.Med.22：1165-1174(1997)]描述的“摇晃烧瓶(shake flask)”测定一些GC衍生物（两亲弱酸）的分配系数(logD)。

[0159] 3.表面张力

[0160] 通过使用μtrouge S(Kibron Inc.，Helsinki，芬兰）测量表面张力。将含有GC

衍生物的溶液（300μl）在使用纯水和空气将传感器校准和归零后放置在井中。在26℃进行测量。

[0161] SSL内MPS的沉淀

[0162] 如[Lasic，D.D.，Frederik，P.M.，Stuart，M.C.A.，Barenholz，Y.和McIntosh，T.J.，Gelation of liposome interior.A novel method for drugencapsulation. FEBS Lett.3 12,255-258(1992)；Lasic，D.D.，等 Biochim.Biophys.Acta 1239，145-156(1995)]所述使用Cryo TEM使泡囊的脂质体内水相中的MPS沉淀可视化。

[0163] 沉淀研究

[0164] 在63℃，在不同pH点下向600mOsm的乙酸钙溶液中加入MPS使最终浓度为5mg/ml，然后将所得混合溶液温育40分钟，然后离心所述溶液并使用HPLC分析上清液。

[0165] 装载效率

[0166] 装载效率是装载后和装载前的MPS/磷脂浓度间的比例。如Anderson，和Taphouse 1981[Anderson B.D.和Taphouse.V.J Pharm Sci,70：181-6(1981)]所描述在HPLC装置中完成MPS的定量，通过改进的Bartlet程序[Shmeeda，H.，等在Methods in Enzymology“Liposomes”中，(Düzgünes，N.编辑)，367：272-292(2003)]完成磷脂的定量。

[0167] 稳定性测定

[0168] MPS从脂质体中释放的测定

[0169] 通过使用凝胶排阻色谱法在琼脂糖交联CL-4B柱上首先从游离MPS中分离出脂质体来测定从SSL-MPS释放的MPS的水平。脂质体在外水体积中洗脱而游离MPS在随后的洗脱级分中（图3A-3B）。

[0170] 保存在4℃的稳定性和在37℃的80％血浆中的释放动力学通过上述的凝胶排阻色谱法测定。然后如上所述对不同的柱级分进行分析以确定在外水体积级分中的MPS、磷脂和Ca。

[0171] 另外，在37℃，SSL-MPS与80％的人发炎滑液在80％血浆的比例下温育。然后在不同的时间点将样品与阴离子交换树脂(DOOWEX，1×400目(Cl-形式))混合，所述树脂只与游离MPS结合。分析所述样品以确定脂质体包封的MPS和脂质体磷脂含量。

[0172] 结果

[0173] 下列表1提供了所测试的GC衍生物的logD和pKa，其使用AdvancedChemistry Development(ACD/Labs)[Software Solaris V4.67(&#61651；1994-2005ACD/Labs) SciFinder SCHOLAR Version 2004.2 © AmericanChemical Society 2004]进行计算。

[0174] 表1：一些酸化GC的logD和pKa

[0175]

pKa	pH 7时的logD	修饰的GC
1.67±0.10	-4.25	磷酸泼尼松龙
4.29±0.17	-0.64	半琥珀酸泼尼松龙
1.67±0.10	-3.76	磷酸甲泼尼龙

4.29±0.17	-0.15	半琥珀酸甲泼尼龙
1.67±0.10	-3.88	磷酸地塞米松
4.29±0.17	-0.27	半琥珀酸地塞米松

[0176] MPS 的浊度、分配系数和表面张力

[0177] 测定 MPS 的浊度（指示聚集度）。图 1A 中显示的结果指出在 pH 7.2 所述两亲弱酸衍生物（药物前体）是非聚集水溶性的，而在酸性 pH 其则聚集，因此表现出浊度的增加。在很低的 pH 观察到浊度的降低，这是由于形成非常大的沉淀的聚集体。点状线箭头指出从使用 HCl（μmol H^+，箭头左侧）滴定到使用 NaOH（μmol OH^-，箭头右侧）滴定的转换点。

[0178] 在不同 pH 点测定 MPS 的分配系数。如图 1B 所示，MPS 实际是两亲物质。

[0179] 另外，测定了 MPS 的表面张力并在图 3C 中明显示出，MPS 在使用的所有浓度 (0.785mM ～ 30mM) 具有表面活性并在约 5mM 具有 CAC（临界离解 / 聚集浓度）点，而诸如磷酸地塞米松等具有磷酸酯基团（强酸性基团）的 GC 在至少高至 50mM 的浓度下没有表面活性且并不自离解形成胶束和 / 或其他有规装配体。

[0180] 通过钙离子的 MPS 的沉淀

[0181] 如上所述测定了在存在乙酸钙溶液时 MPS 的沉淀。表 2 显示了存在钙离子时，即在不同 pH 时沉淀的 MPS 的百分比。如所示，在 pH 6.8 时已发生沉淀。在 pH 位于 GC 的 pKa 附近时沉淀增加到极大程度 (97％的 MPS)。

[0182] 表 2 :MPS 的沉淀

[0183]

％（已沉淀的 MPS)	pH
44.1	6.8
42.8	6.2
96.6	4.5

[0184] 不同脂质体制剂的普通装载效率

[0185] 1. 脂质体装载效率

[0186] 使用三个单独批次（由日期进行区别）以测定药物装载入脂质体的效率 (HSPC ： Chol ： ^{2000}PEG-DSPE(54 ： 41 ： 5 摩尔比))，总结在表 3 中。

[0187] 表 3 :装载入脂质体的效率

[0188]

包封％	MPS/ 脂质 (mg/μmole)	mM 磷酸酯	mg/ml MPS	04 年 7 月 18 日
	0.188	39.80	7.46	透析前 [(a)]
99.1	0.186	40.70	7.56	透析后 [(b)]

包封％	MPS/ 脂质 (mg/μmole)	mM 磷酸酯	mg/ml MPS	05 年 4 月 6 日
	0.19	33.20	6.22	透析前 [a]
96.6	0.18	27.60	4.99	透析后 [b]
包封％	MPS/ 脂质 (mg/μmole)	mM 磷酸酯	mg/ml MPS	05 年 5 月 4 日
	0.21	45.73	9.68	透析前 [a]
93.2	0.20	32.19	6.35	透析后 [b]

[0189] [a] 脂质体中的 MPS+ 脂质体外介质中的 MPS

[0190] [b] 仅在脂质体中的 MPS

[0191] 2. 不同脂质体制剂的 MPS 装载效率

[0192] 已确定用于有效装载的最佳条件包括约 600mOsm 的乙酸钙。在使用初始药物前体浓度为 5mg/ml ～ 10mg/ml，优选为 9mg/ml 时，获得 MPS 在 HSPC ： Chol ： ^{2000}PEG-DSPE(55 ： 40 ： 5 摩尔比）的脂质体中具有该 MPS/ 磷脂比例的装载效率。药物前体在最终制剂中的浓度为约 6.5mg/ml，其用于后续实验（下文中称为 SSL-MPS 制剂或简称为 SSL-MPS)。

[0193] 图 2A-2B 是在装载前（图 2A) 和装载后（图 2B) 脂质体的 Cryo-TEM 图像，清晰地显示出沉淀在脂质体内部水相空间中的位置。

[0194] 脂质体制剂的稳定性

[0195] 如上所述测定 14 个月以后在 SSL-MPS（即完整的脂质体制剂）中 MPS 的浓度。图 3A 显示在 14 个月以后约 80％的 MPS 保留在脂质体中。部分游离 MPS 水解为其活性形式：甲泼尼龙 (MP)。图 3B 提供了在 4℃保存 14 个月以后的脂质体制剂的琼脂糖 4B 尺寸排阻色谱图，以及该色谱图在级分 8 ～ 17 处的放大图（图 3C)，显示出游离 MPS 以及游离 MP 的存在。

[0196] 此外，测定了在临床相关环境中 SSL-MPS 的稳定性。图 4A ～ 4B 显示了脂质体制剂在人类血浆和发炎滑液中的稳定性。在 MPS 被释放（在脂质体中的半衰期为 50 小时）的条件下 100％的包封钙保留在包封脂质体中，这说明所述脂质体可以在血浆中完整保留至少 66 个小时。这表明 MPS 的释放是由于其两亲性。MPS 释放的半衰期是与 SSL 经 i.v.（静脉内）注射后在血浆中的半衰期相似的值。

[0197] 风湿性关节炎（以佐剂关节炎为模型）

[0198] 佐剂关节炎 (AA) 诱导

[0199] 雌性近交六周龄的 Lewis 大鼠 (Harlan labs. 以色列）在尾巴根部 s.c.（皮下）注射 1mg 在 CFA 中的结核分枝杆菌 H37Ra(MT)。每隔一天按如下评估关节炎的严重性 (AA 评分）：0 ＝无关节炎；1 ＝关节发红；2 ＝关节红肿。每只爪上的踝关节和跗骨－跖骨关节均被评分。

[0200] 组织分布

[0201] 为估计 SSL 选择性外渗到发炎组织中的能力，测定了在健康和患关节炎大鼠中

SSL-MPS 从血浆和组织中的清除。具体地说，在注射 FCA 后 22 天（最肿大）以磷脂浓度为 42mg/kg(56μmol/kg) 的剂量将 SSL-MPS 注射入健康大鼠和患关节炎大鼠。在注射后的 4 个时间点：4 小时、24 小时、48 小时和 72 小时，将大鼠杀死，使用 Sample Oxidiser(307 型，Packard Instrument Co.，Meriden，CT) 通过 Sample Oxidizer 中的放射性测量测试所述大鼠的血浆、肝、肾、脾和肺的脂质体标记 [^{3}H] 胆固醇基十六烷基醚（在整个组织中）。所有组织均按现状氧化而不均化。该方法的局限在于每份样品的重量不应当超过 0.5g，因此皮肤和关节被分解为小块（≤ 0.5 g）然后通过所述 Sample Oxidizer 测定其 [^{3}H] 胆固醇醚水平。

[0202] 在健康大鼠和患关节炎大鼠中均观察到缓慢的 SSL 清除速率，如使用 WinNolin 分析软件计算的那样，在健康大鼠中为 23 小时的 $t_{1/2}$ 和在患关节炎大鼠中为与之近似的 25 小时的 $t_{1/2}$。注射后 4 小时分别有 79％和 81％的注射 SSL-MPS 剂量保留在患关节炎大鼠和健康大鼠的血浆中。表 4A ～ 4B 和图 5A ～ 5B 示出量化的生物分布数据，显示在从健康大鼠（表 2A，图 5A）和患关节炎大鼠（表 2B，图 5B）中分离的组织中发现相似量的脂质体。

[0203] 表 4A：在健康大鼠中的生物分布

[0204] 注射剂量百分比（％ ID）

[0205] 24 小时后的 SSL　4 小时后的 SSL　器官

[0206] 54　79　血浆

[0207] 10　2.4　肝

[0208] 1.7　0.43　肺

[0209] 5　0.7　脾

[0210] 2.5　1　肾

[0211] 73.2　83.5　总量

[0212] 表 4B：在 AA 大鼠中的生物分布

[0213] 注射剂量百分比（％ ID）

[0214] 24 小时后的 SSL　4 小时后的 SSL　器官

[0215] 58　81　浆

[0216] 9.50　2.35　肝

[0217] 0.80　0.67　肺

[0218] 2.80　0.75　脾

[0219] 1.25　0.7　肾

[0220] 72.35　85.54　总量

[0221] 对比患关节炎大鼠和健康大鼠，显示出：观察到在所有时间点，与健康大鼠的非发炎爪相比，明显更大量（2 ～ 4 倍）的 SSL-MPS 外渗到患关节炎大鼠的发炎爪中（图 6）。从 24 小时到至少 72 小时，SSL-MPS 在所述发炎爪中的浓度基本保持不变（≈ 220μg 脂质 / g 组织；293μmole 脂质 /g 组织；7％ ID/ 爪）。SSL-MPS 在健康大鼠的爪中的浓度在 48 小时达到最大（100μg/g 组织或者仅 2％ ID/ 爪）。与健康爪 3000(h×μg/g 组织）的近似 AUC 值相比与 4600(h×μg/g 组织）相比，在发炎爪中获得 16 倍高的近似 AUC 值（使用 WinNonlin 分析软件计算；使用近似值是因为在注射后 72 小时没有观察到 SSL 浓度的降低）。

[0222] 使用脂质体靶向的甲泼尼龙琥珀酸钠盐 (SSL-MPS) 治疗 AA

[0223] 在两个连续的化验中测定评估 SSL-MPS 对 AA 的效果 :

[0224] (1) 使用 2 次静脉内注射 (在 AA 诱导后的第 10 天和第 14 天) 游离 MPS 和 SSL-MPS 治疗 Lewis 大鼠。两种制剂的首次注射为 5mg/kg 体重 (BW) 而第二次注射为 10mg/kg BW。对照大鼠使用空白 SSL 或 PBS 治疗。

[0225] (2) 使用 2 次注射游离 MPS(10mg/kg 体重和 50mg/kg 体重), 或者 SSL-MPS(0.4mg/kg BW、2mg/kg BW 和 10mg/kg BW) 治疗 Lewis 大鼠。对照大鼠使用 PBS 治疗。另外一组大鼠接受 3 次静脉内注射 (在 AA 诱导后的第 10 天、第 14 天和第 18 天) 的 10mg/kg BW SSL-MPS。

[0226] (3) 在作为选择的另外一种化验中, 为测定 SSL-MPS 在疾病峰值阶段的效果, 使用如下之一治疗 Lewis 大鼠 :葡萄糖 5% (在第 19 天、第 23 天);游离 MPS 10mg/kg BW(在第 19 天、第 23 天);SSL-MPS 10mg/kgBW(在第 19 天、第 23 天) 以及使用英夫利昔单抗 (Remicade)5mg/kg(在第 19 天) 作为阳性对照。

[0227] SSL-MPS 治疗对 AA 的调整

[0228] 如上所述, 通过在疾病诱导后第 10 天和第 14 天使用 2 次静脉内注射治疗 AA 诱导大鼠而测试 SSL-MPS 对 AA 的治疗效果。第一次注射为 5mg/kg BW 和第二次注射为 10mg/kg BW。对照大鼠使用游离 MPS、空白脂质体或 PBS 治疗。

[0229] 从图 7A 中可以看到, 无论游离 MPS 还是空白脂质体对 AA 都没有任何效果。然而, 在使用 SSL-MPS 治疗的大鼠中发现显著的疾病发作延迟。仅在第二次注射 (第 24 天)10 天后疾病的第一征兆变明显, 而甚至在第 26 天时, 与游离 MPS 或 PBS 治疗的大鼠的疾病状态相比仍有明显较轻的严重性。

[0230] 为进一步评估该治疗的效果, 使用 2 次静脉内注射 (如上所述的第 10 天和第 14 天) 的 10mg/kg BW 以及 5 倍更高浓度的类固醇 (即 50mg/kg BW) 以及 5 倍更低浓度的 SSL-MPS(即 10mg/kg BW、2mg/kg BW 和 0.4mg/kgBW) 来治疗大鼠。对照大鼠接受 PBS。另一组大鼠接受第三次注射 (在第 18 天) 剂量为 10mg/kg BW 的 SSL-MPS。

[0231] 图 7B 显示 2 次注射的 SSL-MPS(10mg/kg BW) 延迟疾病的发作超过 10 天并与 PBS 治疗的大鼠相比降低了脂质体治疗大鼠的峰值关节炎评分。第三次注射导致 AA 发作的进一步的超过 10 ～ 11 天的延迟。在这些大鼠中, 疾病在 PBS 治疗的大鼠已经处于恢复期时达到高峰。两个较低剂量的 SSL-MPS(0.4mg/kg BW) 具有较小的效果而 2mg/kg 仅显示微弱效果。即, 该实验显示 SSL-MPS 的剂量响应曲线。

[0232] SSL-MPS 对疾病峰值的效果

[0233] 如上所述治疗 AA 诱导大鼠。在 SSL-MPS 注射后立即观察到 SSL-MPS 处理组的临床评分的急剧降低, 而其他组 (葡萄糖 5%、游离 MPS、空白 SSL 和英夫利昔单抗) 显示出非常缓慢的降低, 与对照组 (葡萄糖) 组中所观察的相似。

[0234] 在第 23 天的第二次注射引起 AA 评分的进一步降低, 而其他组 (葡萄糖 5%、游离 MPS、空白 SSL 和英夫利昔单抗) 显示出极微的降低, 再次与对照组 (葡萄糖) 组中所观察的相似。

[0235] 然而, 在第 30 天 SSL-MPS 组的评分开始升高, 并在第 47 天与其他组一致观察到疾病的降低。

[0236] 也在图 8 中所示的结果表明 :SSL-MPS 在炎性状态的峰值期具有比英夫利昔单抗和游离 MPS 更好的有利治疗效果。

[0237] 现有技术列表

[0238] 以下列出了被认为与描述本发明领域内技术状况相关的现有技术列表。

[0239] Gonzalez-Rothi, Ricardo J 等, Pharmaceutical Research 13(11) : 1699-1703(1996) ;

[0240] Schmidt J 等, Brain 126(8) :1895-1904(2003) ;

[0241] Fildes FJ 等, J Pharm.Pharmacol.30(6) :337-42(1978) ;

[0242] MishinaEV 等, Pharm Res 13(1) :141-5(1996) ;

[0243] Gonzalez-Rothi, Ricardo J 等, Pharmaceutical Research 13(11) : 1699-1703(1996) ;

[0244] Metselaar JM, 等, Ann Rheum Dis.63(4) :348-53(2004) ;

[0245] Metselaar JM, 等, Arthritis Rheum.48(7) :2059-66(2003) ;

[0246] Metselaar JM, 等, Cell Mol Biol Lett.7(2) :291-2(2002) ;

[0247] Lopez-Garcia F, 等, J Pharm Pharmacol.45(6) :576-8(1993) ;

[0248] Love WG, 等, Ann Rheum Dis.49(8) :611-4(1990) ;

[0249] Josbert M.Metselaar, Liposomal targeting of glucocorticoids.A noveltreatment approach for inflammatory disorders(糖皮质激素的脂质体靶向 : 一种新的用于炎性病症的治疗方法), 第 7 章, 第 107-122 页, 2003, 博士论文, Utrecht Universlty, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Faculty ofVeterinary Medicine ISBN 90-393-3285-1。

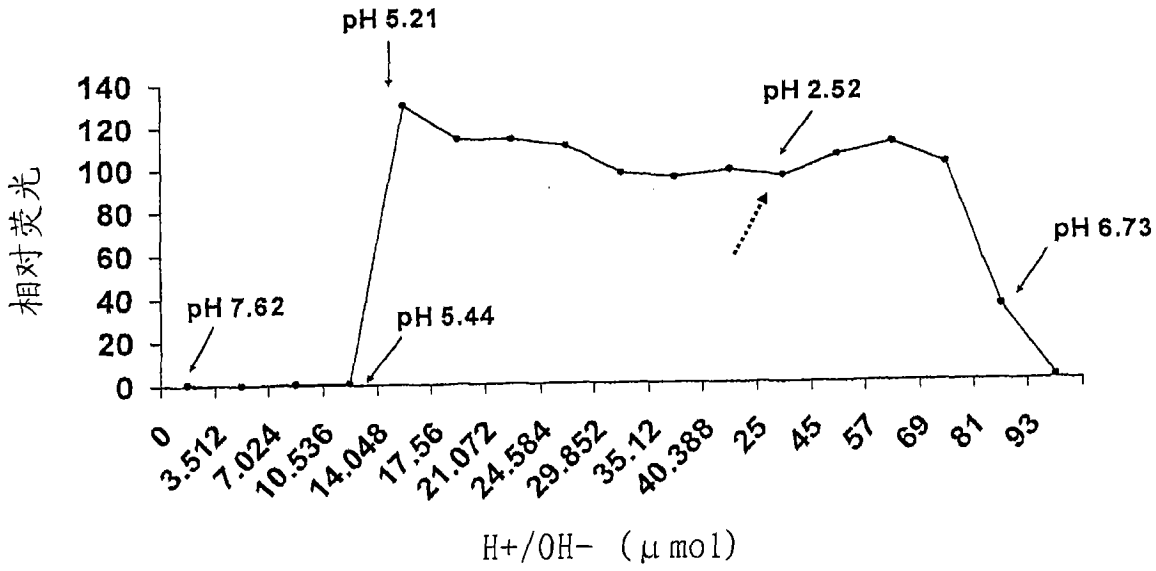

pH 5.21
pH 2.52
pH 6.73
pH 7.62
pH 5.44
相对荧光
140
120
100
80
60
40
20
0
0
3.512
7.024
10.536
14.048
17.56
21.072
24.584
29.852
35.12
40.388
25
45
57
69
81
93
H+/OH- (μmol)

图 1A

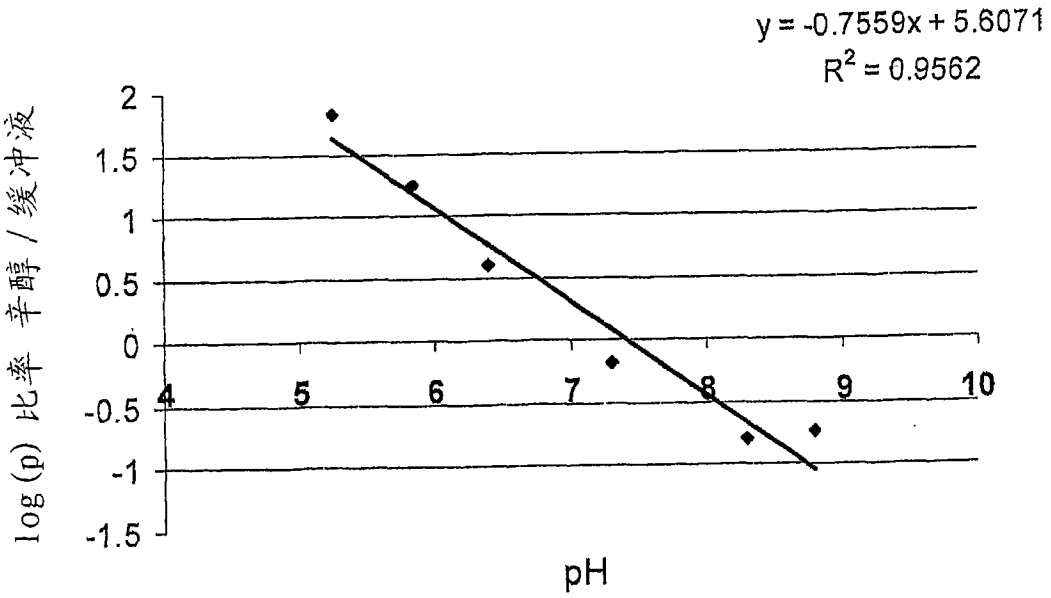

y = -0.7559x + 5.6071
R2 = 0.9562
log(p) 比率 辛醇 / 缓冲液
2
1.5
1
0.5
0
-0.5
-1
-1.5
4
5
6
7
8
9
10
pH

图 1B

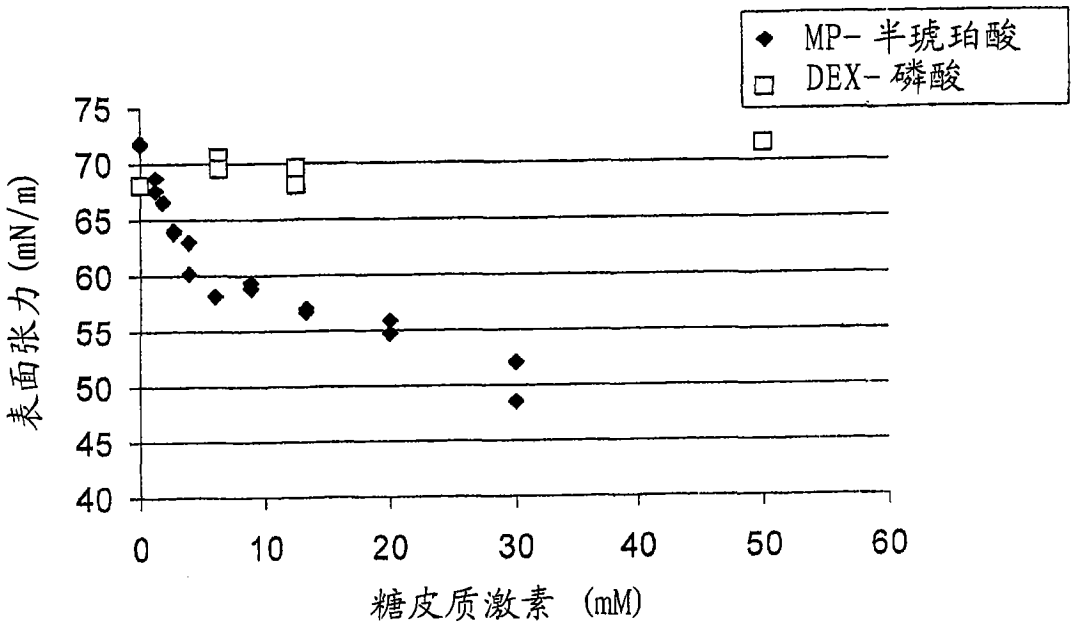

MP- 半琥珀酸
DEX- 磷酸
表面张力 (mN/m)
75
70
65
60
55
50
45
40
0
10
20
30
40
50
60
糖皮质激素 (mM)

图 1C

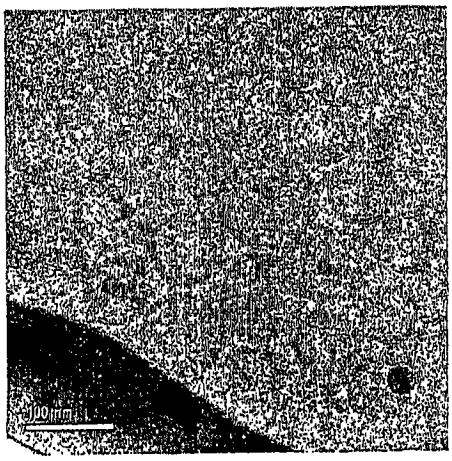


图 2A

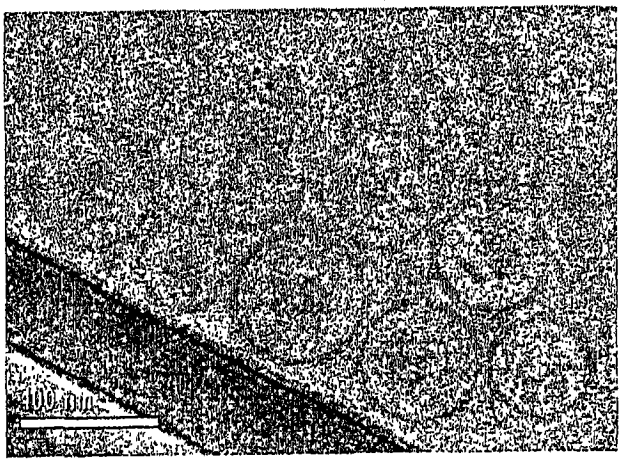


图 2B

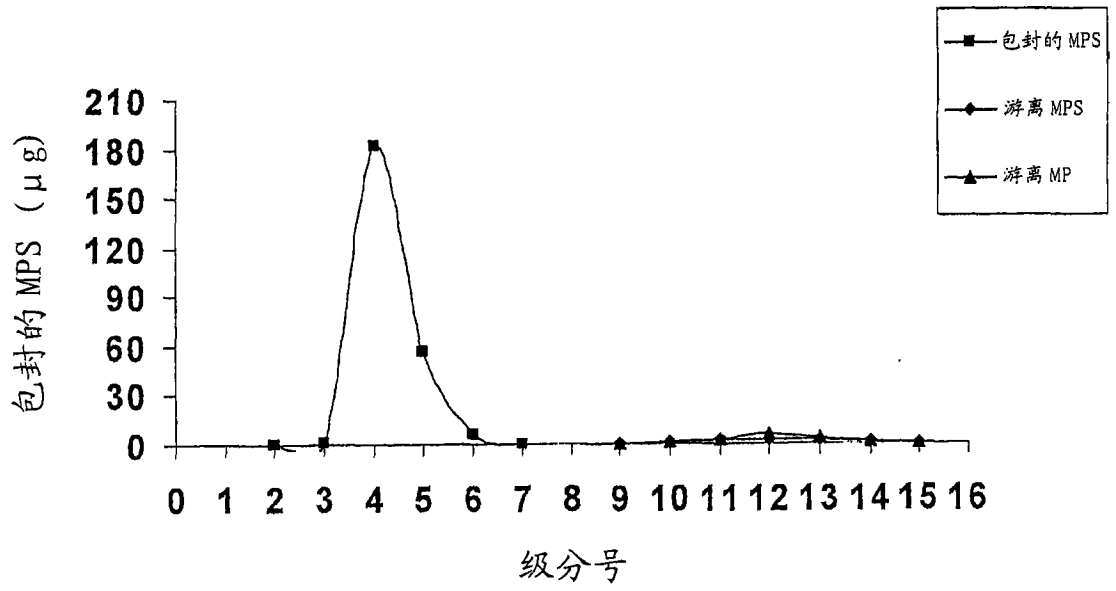

包封的 MPS
游离 MPS
游离 MP
包封的 MPS（μg）
210
180
150
120
90
60
30
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16
级分号

图 3A

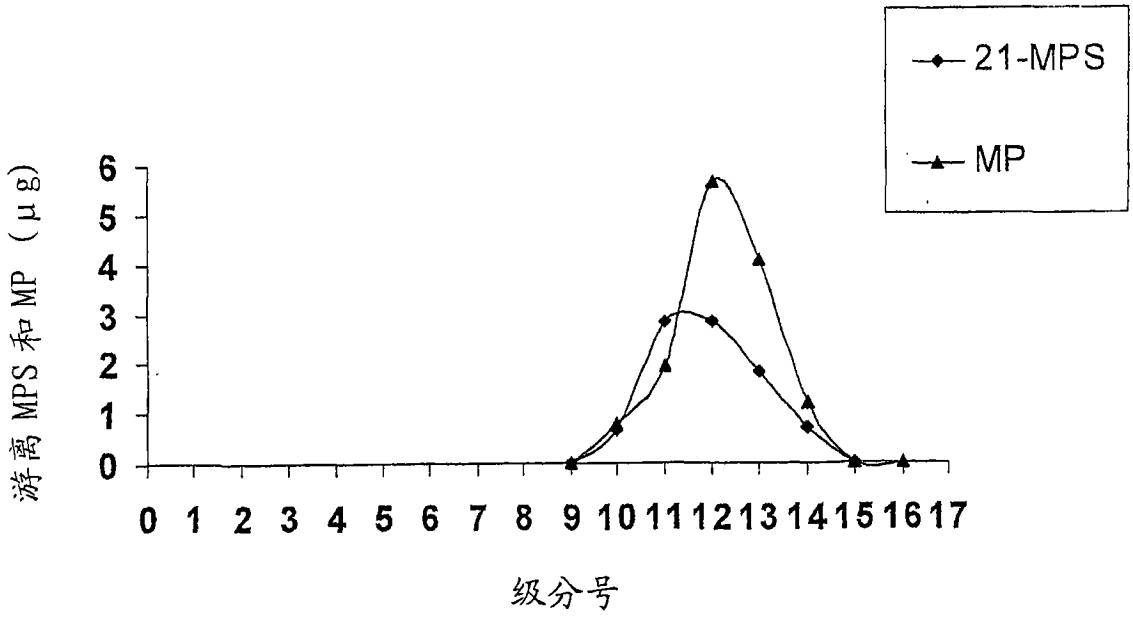

21-MPS
MP
游离 MPS 和 MP（μg）
6
5
4
3
2
1
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
级分号

图 3B

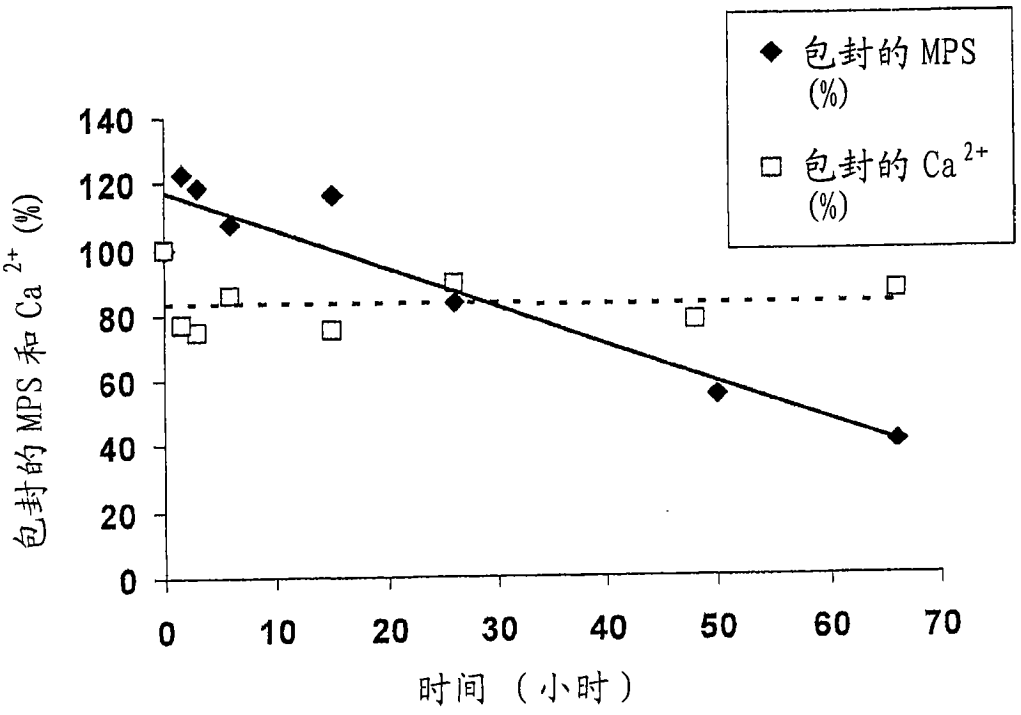

包封的 MPS (%)
包封的 Ca 2+ (%)
包封的 MPS 和 Ca 2+ (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
60
70
时间 （小时）

图 4A

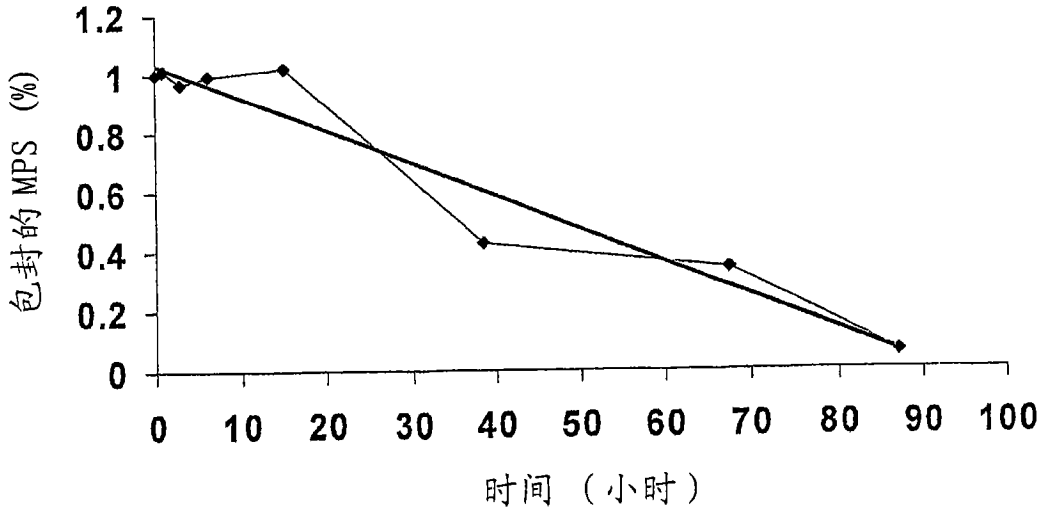

包封的 MPS (%)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
时间 （小时）

图 4B

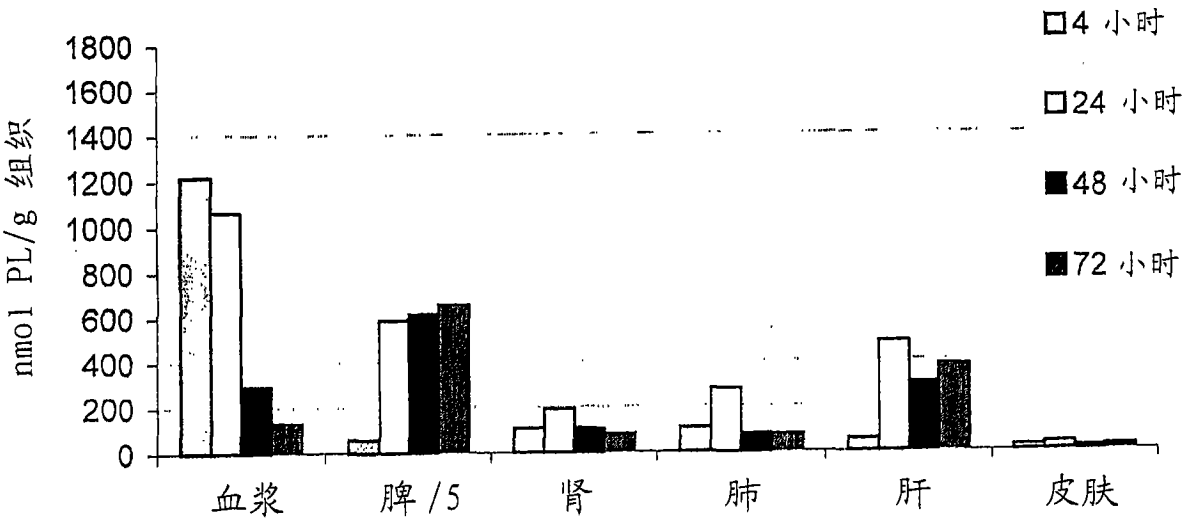

4 小时
24 小时
48 小时
72 小时
nmol PL/g 组织
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
血浆
脾/5
肾
肺
肝
皮肤

图 5

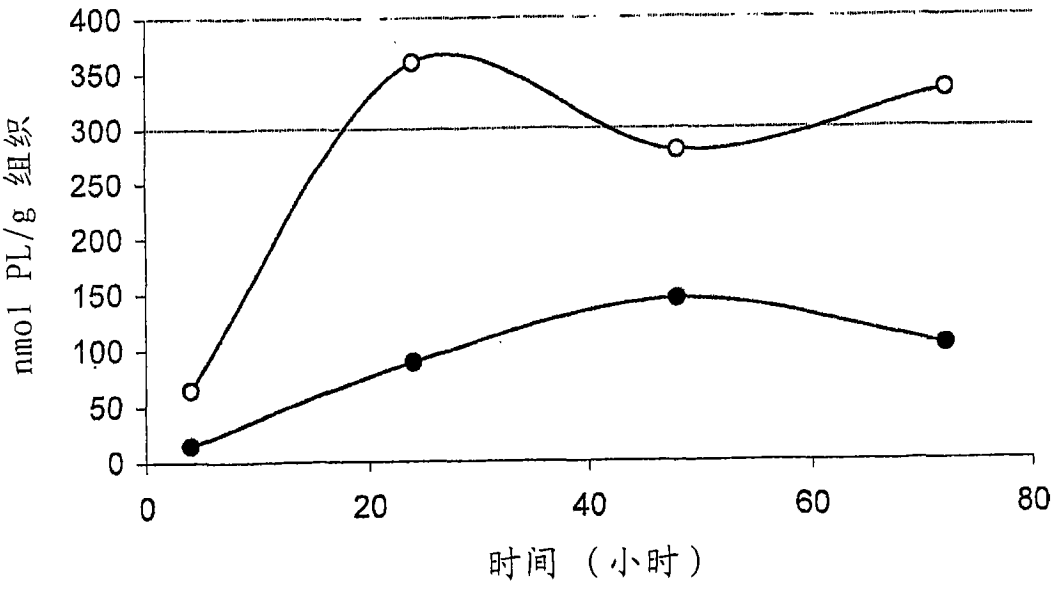

nmol PL/g 组织
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0
20
40
60
80
时间（小时）

图 6

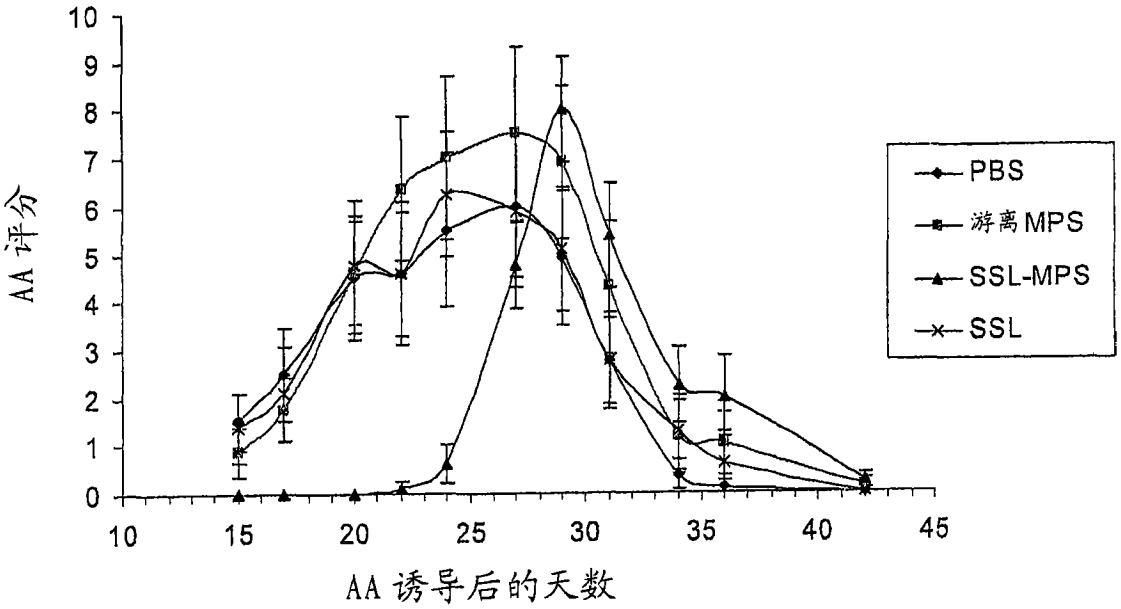

AA 评分
AA 诱导后的天数
PBS
游离 MPS
SSL-MPS
SSL

图 7A

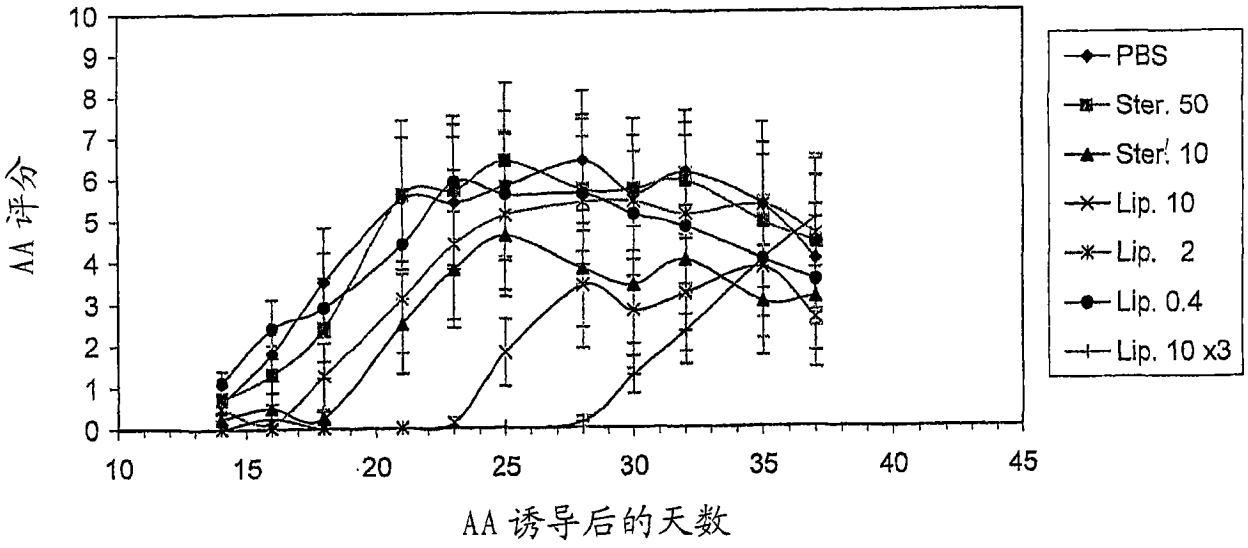

AA 评分
AA 诱导后的天数
PBS
Ster. 50
Ster. 10
Lip. 10
Lip. 2
Lip. 0.4
Lip. 10 x3

图 7B

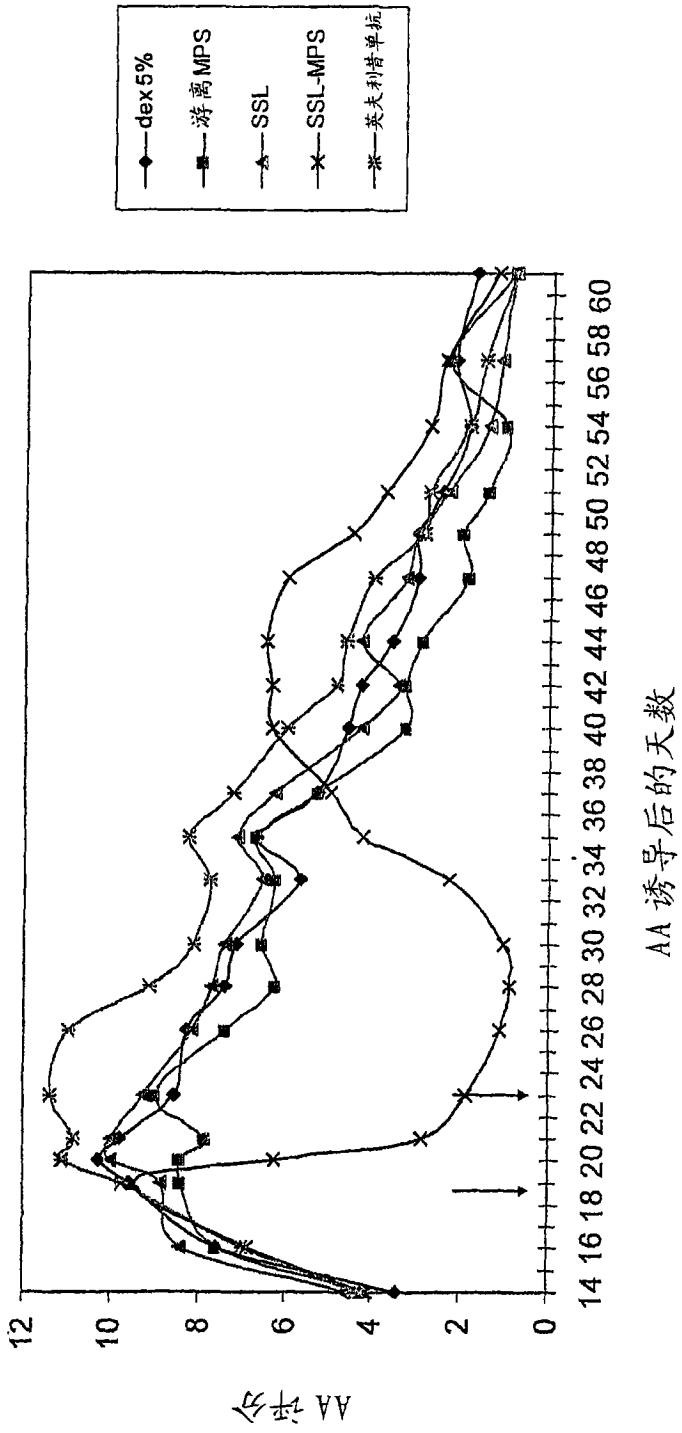

dex5%
游离MPS
SSL
SSL-MPS
英夫利昔单抗
AA 评分
0
2
4
6
8
10
12
14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40 42 44 46 48 50 52 54 56 58 60
AA 诱导后的天数

图 8